



Title	歯肉線維芽細胞におけるアデノシンレセプター活性化制御機構の解析
Author(s)	竹立, 匡秀
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45152">https://hdl.handle.net/11094/45152</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	竹 立 匡 秀
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 18614 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	歯肉線維芽細胞におけるアデノシンレセプター活性化制御機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 村上 伸也 (副査) 教授 天野 敦雄 講師 田中 宗雄 講師 中川 一路

### 論文内容の要旨

#### 【研究目的】

近年、プリン代謝産物の一つであるアデノシン（以下 Ado と略す）が細胞膜上に発現するアデノシンレセプター (AdoR) を介して様々な生物学的作用発現を誘導し、抗炎症メディエーターの一つとしても重要な役割を演じていることが報告されている。これまでに我々の研究室では慢性炎症疾患の一つである歯周病の病巣局所において、歯肉線維芽細胞 (HGF) がリンパ球との相互作用や炎症性サイトカイン・細胞外基質の産生調節を通じて同部の炎症反応に積極的に関与すること、さらに HGF のアデノシンレセプター活性化が HGF の諸機能を制御し得ることを報告してきた。しかしながら歯周組織における細胞外 Ado の代謝及び AdoR 活性化を介した生物学的作用発現がいかに制御されているかについてはいまだ十分に検討されていない。そこで本研究では、adenosine 5'-monophosphate (AMP) の脱リン酸化による Ado 産生に関与する酵素である CD73 分子 (ecto-5'-nucleotidase) と Ado のイノシンへの分解に関与する酵素である細胞外アデノシンデアミナーゼ (ecto-ADA, CD26-binding protein) に着目し、HGF の細胞外 Ado 濃度調節機構について検討するとともに、そのメカニズムと AdoR 活性化制御機構との関与について検討した。

#### 【材料および方法】

1. HGF の調製：実験目的を理解し、実験に参加することを応諾した健康人ボランティアからの健康歯肉片を細断し培養を行い、outgrowth してきた細胞を HGF とした。実験には 5-11 代継代した細胞を供した。2. 試薬：Ado、AMP、5'-nucleotidase 阻害薬として  $\alpha, \beta$ -methylene adenosine 5'-diphosphate (AOPCP)、AdoR アンタゴニストとして xanthine amine congener (XAC)、ADA 阻害薬として 2'-deoxycoformycin (dCF) を使用した。3. 細胞表面上の CD73 分子、CD26 分子並びに ecto-ADA の検出：AD2 (マウス抗ヒト-CD73 単クローン抗体)、M-A261 (マウス抗ヒト-CD26 単クローン抗体) 並びにヤギ抗ヒト-ADA ポリクローナル抗体を用いてフローサイトメトリー及び免疫染色法にて解析した。4. 外因性 ADA の調整：細胞内 ADA を豊富に含有する急性 T 細胞性白血病細胞株 (Jurkat) を、凍結・解凍を 3 回繰り返すことにより溶解させ、遠心後、上清を回収し (Jurkat lysate)、外因性 ADA として使用した。5. 細胞外 Ado 濃度測定：HGF 培養上清中に Jurkat lysate を添加し 30 分間前処理あるいは無処理後、AOPCP あるいは dCF 存在、非存在下において Ado あるいは AMP を添加し 5 分間培養を行ったのち、培養上清中の Ado 濃度を [ $^{125}$ I]-Ado を用いた Radioimmunoassay キットにより測定した。6. 細胞内 cAMP 濃度測定：HGF 培養上清中に Jurkat lysate を添加し 30 分間前処理あるいは無処理後、AOPCP、XAC あるいは dCF 存在、非存在下に

において Ado あるいは AMP を添加し、5 分後の細胞内 cAMP 濃度を cAMP EIA キットを用いて測定した。7. ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) mRNA の検出: HGF 培養上清中に Jurkat lysate を添加し 30 分間前処理あるいは無処理後、XAC あるいは dCF 存在、非存在下において Ado あるいは AMP を添加し、2.5 時間の培養後、全 RNA を精製し Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction 法により検出した。

#### 【結果】

(1) HGF における CD73 分子による AdoR の活性化制御を検討した。その結果、HGF 上に CD73 分子の発現が認められ、AMP 添加によって培養上清中の Ado 濃度は上昇し、その濃度上昇は AOPCP 添加により濃度依存的に抑制された。このことから HGF 上の CD73 分子が細胞外 Ado 産生に関与していることが明らかとなった。次に CD73 分子を介して産生される Ado が AdoR を活性化するか否かを HGF 中の cAMP 産生及び HAS mRNA 発現を指標として解析した。その結果、HGF 中の細胞内 cAMP 産生は、Ado だけでなく AMP の添加によっても亢進が認められ、その亢進は AOPCP によって濃度依存的に抑制され、また XAC によって阻害された。さらに、HGF 中の HAS mRNA 発現も Ado だけでなく AMP 添加によっても増加し、その増加は XAC によって阻害された。以上のことから HGF 上の CD73 分子が AdoR 活性化に関与していることが明らかとなった。(2) 次に ecto-ADA が HGF の AdoR 活性化制御に関与しているか否かについて検討を加えた。HGF 上には CD26 分子の発現が認められたが、ecto-ADA の発現はわずかに検出されるのみであった。しかしながら外因性 ADA として、細胞質内に ADA を豊富に含有する Jurkat lysate にて HGF を前処理することにより、HGF 上にアンカリングされた ecto-ADA の発現上昇を認めることが明らかとなった。そこで ecto-ADA による細胞外 Ado 分解能について検討するために、Jurkat lysate にて HGF を前処理あるいは未処理後、培養上清中に Ado を添加し 5 分後の培養上清中の Ado 濃度を測定することによりその分解能を解析したが、有意な差は認められなかった。一方、Ado 添加による HGF 中の cAMP 産生亢進及び HAS mRNA 発現増加は、HGF を Jurkat lysate にて前処理し ecto-ADA の発現を増加させることにより抑制され、その抑制効果は dCF を添加することにより回復することが明らかとなった。このことより、ecto-ADA は、AdoR 近傍に存在する細胞外 Ado を分解することにより AdoR 活性化を抑制している可能性が示唆された。さらに、Ado だけでなく AMP 添加による HGF 中の cAMP 産生亢進及び HAS mRNA 発現増加も Jurkat lysate 前処理により抑制され dCF 添加により回復することから、HGF 上の CD73 分子及び ecto-ADA の両酵素が AdoR 活性化の制御に関与していることが明らかとなった。

#### 【結論と考察】

今回の研究結果から、HGF 上の CD73 分子及び CD26 分子上にアンカリングされた ecto-ADA により AdoR 近傍での細胞外 Ado 濃度が調節され AdoR の活性化が制御される機構が存在する可能性が明らかとなった。このことは、AdoR を介した HGF の生物学的作用発現を、[CD73・ecto-ADA・AdoR] が一つの機能単位として制御していることを強く示唆している。今回の研究結果は、アデノシンの抗炎症効果を期待した host modulating drug の開発につながる有益な基礎的情報を提供してくれたものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、歯肉線維芽細胞 (HGF) による細胞外アデノシンの濃度調節機構について検討するとともに、同機構とアデノシンレセプター (AdoR) 活性化制御機構との関連について解析を試みたものである。その結果、HGF 上の CD73 分子及び CD26 分子に結合したアデノシンデアミナーゼの両酵素の作用により HGF の AdoR 近傍での細胞外アデノシン濃度が調節され、AdoR の活性化が制御される機構が明らかとなった。本知見は、HGF の AdoR を介した細胞機能制御機構の一端を明らかにすると共に、アデノシンの抗炎症効果を期待した host modulating drug の開発につながる有益な基礎的情報を提供したものであり、本研究は博士 (歯学) の学位を得るに値するものと認める。