The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	CD73 (ecto-5'-nucleotidase)による骨芽細胞分化制御機構
Author(s)	大原, 廣之
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58425
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

った後にAdo刺激を行った際，細胞内cAMP濃度の上昇を認めた．さらにこの濃度上昇は，A_{2A}AdoRまたはA_{2B}AdoR選択的アンタゴニスト処理により有意に抑制された．このことからA_{2A}AdoR，A_{2B}AdoRの機能的な発現が認められた．MC/CD73はControlと比して同等の増殖能を示す一方で，有意に高いALP活性，*Ocn*，*Bsp* mRNA発現および石灰化ノジュール形成の亢進を認めた．また，MC/CD73で認められた高い*Ocn*，*Bsp* mRNA発現は，A_{2A}AdoR選択的アンタゴニスト処理によっては影響を受けなかった一方で，A_{2B}AdoR選択的アンタゴニスト存在下では有意に抑制された．

【結論および考察】

CD73KOでは骨量減少を認め，そのメカニズムの一端に骨芽細胞の細胞機能低下が関与していることが明らかとなった．さらに*in vitro*における検証の結果，CD73は骨芽細胞分化に伴い発現が上昇し，分化を促進的に制御する分子であることが明らかとなった．またCD73による骨芽細胞分化促進作用には，A_{2B}AdoRを介したシグナルが関与する可能性が示唆された．

本研究により，今まで全く報告のなかったCD73および同分子により産生されるAdoによる骨芽細胞分化調節機構を見出した．今後さらなる詳細な機序の解明を行うことで，骨粗鬆症などの代謝性骨疾患のみならず，慢性関節リウマチや歯周病といった炎症性骨疾患をも対象とした，抗炎症作用と骨形成促進作用を兼ね備える新規のAdo関連の骨疾患治療薬の開発がなされるものと期待される．

論文審査の結果の要旨

本研究は，CD73（ecto-5'-nucleotidase）および同分子により産生される内因性アデノシンによる骨代謝制御機構の解明を目的としたものである．

その結果，骨芽細胞において，CD73は骨芽細胞分化に伴い発現が上昇し，分化を促進的に制御する分子であることが明らかとなった．またCD73による骨芽細胞分化促進作用には，A_{2B}アデノシンレセプターを介したシグナルが関与する可能性が示唆された．

以上の研究成果は，CD73および内因性アデノシンによる骨芽細胞分化調節機構の一端を明らかにし，骨代謝調節機序を解明する上で重要な知見を与えるものであり，博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める．

明らかとなった。さらに、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化過程をアディポネクチンは正に制御する作用を有することが明らかとなった。以上の所見は、肥満と歯周病の相互作用のメカニズム解明の一端として有益な知見を提供するものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。

【43】

氏　　名	大原廣之（おおはらひろゆき）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２４５００　号
学位授与年月日	平成 23 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	CD73（ecto-5'-nucleotidase）による骨芽細胞分化制御機構
論文審査委員	（主査） 教　授　村上　伸也 （副査） 教　授　豊澤　　悟　　准教授　西村　理行　　講　師　上松　節子

論文内容の要旨

【研究目的】

ヒトの骨格は，破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の繰り返しにより，絶えず古い骨が新しい骨へ remodeling することで，その形態と機能を維持している．骨の remodeling は，種々の生理活性物質や力学的負荷因子などにより均衡が保たれており，その異常は，骨粗鬆症などの代謝性骨疾患の原因になるばかりか，関節リウマチや歯周病などの炎症性骨疾患の増悪をもたらすと考えられている．アデノシン三リン酸（ATP）が細胞膜上の P2 受容体を介して種々の生物学的機能を制御することが知られているが，近年，その一つとして，骨芽細胞，破骨細胞の細胞機能を制御し，骨代謝調節に関与することが明らかとなりつつある．一般に，細胞外 ATP はヌクレオチド代謝関連酵素群により速やかにアデノシン（Ado）へと代謝されるが，代謝産物である Ado は，その特異的受容体であるアデノシンレセプター（AdoR）を介して，神経系や脈管系の調節，炎症および免疫機構の制御，創傷治癒の促進など，様々な生物学的機能を調節していることが明らかとされている．しかしながら，Ado の骨代謝調節における役割については，未だに十分な検討はなされていない．そこで本研究では，細胞外 Ado 産生に積極的に関与するヌクレオチド代謝関連酵素の一つである CD73 に着目し，CD73 および同分子により産生される Ado による骨代謝制御機構について解明することを目的とした．

【材料および方法】

1）CD73 欠損マウス（CD73KO）の骨における表現型の解析

①長管骨における骨構造，骨量解析：Thompson 博士（Oklahoma Medical Research Foundation）より供与された CD73KO を実験に供した．CD73KO および野生型マウス（WT）の 12 週齢オスより脛骨および大腿骨を採取し，ヘマトキシリン･エオシン（H&E）染色にて組織学的に解析した．さらに pQCT 法にて骨体積密度を，μCT にて骨構造をそれぞれ定量解析した．②血清中の骨代謝マーカー発現量解析：CD73KO および WT の 12 週齢オスより末梢血を採取し，骨形成マーカーであるオステオカルシン（OCN），および骨吸収マーカーである tartrate-resistant acid phosphatase 5b（TRAP5b）と C-terminal telopeptide の濃度を，ELISA 法にて測定した．③大腿骨および頭蓋骨における骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現解析：CD73KO および WT の 12 週齢オスより採取した大腿骨および頭蓋骨より RNA を抽出し，*Runx2*，アルカリホスファターゼ（*Alp*），*Ocn*，骨シアロタンパク質（*Bsp*）mRNA 発現を Real-time PCR 法により解析した．

2）骨芽細胞における CD73 の発現および機能解析

①骨組織における CD73 発現解析：3 日齢の CD73KO および WT より頭蓋骨を採取，薄切標本を作製し，抗-CD73 抗体による免疫染色法にて検討した．②骨芽細胞における CD73 および AdoR の発現解析：マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 を石灰化誘導培地（ウシ胎仔血清，β-glycerophosphate，ascorbic acid 含有 α-MEM）にて長期培養を行い，CD73 および各 AdoR サブタイプの mRNA 発現を Real-time PCR 法にて経時的に解析した．また同時に CD73 のタンパク発現をフローサイトメトリーにて解析した．さらに，A_{2A}AdoR，および A_{2B}AdoR の機能的な発現を，両 AdoR のセカンドメッセンジャーである cAMP を指標として解析した．すなわち，MC3T3-E1 を石灰化誘導培地にて 2 週間長期培養を行った後，A_{2A}AdoR 選択的アンタゴニスト（ZM241385）もしくは A_{2B}AdoR 選択的アンタゴニスト（MRS1754）存在下で Ado を添加し，細胞内 cAMP 濃度を ELISA 法にて測定した．③骨芽細胞における CD73 の機能解析：MC3T3-E1 にリポフェクション法にて CD73 発現プラスミドベクターを導入し，ジェネティシン含有選択培地にて培養することにより CD73 強発現 MC3T3-E1（MC/CD73）を樹立した．コントロール細胞（Control）は，前述と同様の方法にて MC3T3-E1 にコントロールプラスミドベクターを導入することにより樹立した．MC/CD73 の増殖能は WST-1 細胞増殖アッセイにて検討を行った．また分化能については石灰化誘導培地にて長期培養を行い，ALP 活性を経時的に測定するとともに，Real-time PCR 法にて *Ocn*，*Bsp* mRNA の発現解析を行い検討した．さらに石灰化ノジュール形成能についてはアリザリンレッド染色にて解析を行った．④CD73 による骨芽細胞機能制御への A_{2A}AdoR，A_{2B}AdoR シグナルの関与についての検討：A_{2A}AdoR または A_{2B}AdoR 選択的アンタゴニスト存在下にて MC/CD73 を 3 日間培養した後に RNA を回収し，Real-time PCR 法にて *Ocn*，*Bsp* mRNA の発現解析を行った．

【結果】

1）H&E 染色による解析の結果，CD73KO では WT に比して，海綿骨の疎な構造と皮質骨の菲薄化を認めた．さらに pQCT 法にて解析したところ，海綿骨および皮質骨の有意な骨体積密度の減少を認め，μCT による詳細な骨構造解析の結果，海綿骨における有意な骨量減少を認めた．CD73KO 血清中の骨吸収マーカー（TRAP5b，C-terminal telopeptide）は正常値である一方で，骨形成マーカーである OCN 濃度は WT に比して有意に減少していた．CD73KO では WT に比して，大腿骨，頭蓋骨いずれにおいても骨芽細胞分化マーカーである *Runx2*，*Alp*，*Ocn*，*Bsp* mRNA の有意な発現低下を認めた．

2）抗-CD73 抗体による免疫染色の結果，WT 由来頭蓋骨骨膜に CD73 の発現を認めた．MC3T3-E1 において骨芽細胞分化に伴う *CD73* mRNA の発現上昇，および細胞膜上の CD73 の発現上昇を認めた．また，AdoR サブタイプのうち，A_1*AdoR*，A_3*AdoR* mRNA 発現は認めなかった一方で，A_{2A}*AdoR*，A_{2B}*AdoR* mRNA 発現および分化に伴う発現上昇を認めた．MC3T3-E1 を石灰化誘導培地にて 2 週間長期培養を行