



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
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
学位論文名	歯学研究科分子病態口腔科学専攻 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、骨シクロタンパク質(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、A₁AdoR、A₂AdoR 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