

Title	歯肉線維芽細胞の機能発現に及ぼすアデノシンの影響の解析
Author(s)	橋川, 智子
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3143891">https://doi.org/10.11501/3143891</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

①

歯肉線維芽細胞の機能発現に及ぼすアデノシンの影響の解析

大阪大学大学院歯学研究科  
歯学臨床系専攻（口腔治療学）  
（指導教官：岡田 宏教授）

橋川 智子

学会発表

本論文の要旨は、第38回秋季日本歯周病学会総会（平成7年10月、小倉）、第105回秋季日本歯科保存学会総会（平成8年11月、広島）、第40回春季日本歯周病学会総会（平成9年4月、郡山）、第40回秋季日本歯周病学会総会（平成9年10月、広島）、第18回日本炎症学会（平成9年11月、東京）において発表した。

## 緒言

歯周病はデンタルプラークにより歯周組織に惹起される慢性炎症疾患である。炎症歯周組織においては、歯周病原性細菌による直接的な影響に加えて、種々の宿主細胞が慢性的に加えられるデンタルプラークからの細菌刺激に対して過剰な応答を持続する結果、同組織の破壊が進行していくものと考えられる。このような生体内で繰り返される応答は、サイトカインをはじめとする種々の炎症メディエーターや細胞間の直接の相互作用による制御を受けると今日では考えられている。歯周組織の主要な構成細胞の1つである歯肉線維芽細胞は、細胞外基質の産生制御等を介して同組織の恒常性維持のみならず炎症反応の制御・創傷治癒において重要な役割を演じていると考えられるが、近年の研究結果から歯肉線維芽細胞は歯周病原性細菌由来の菌体成分や各種炎症性サイトカインの刺激を受けることにより IL-1, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  等のサイトカインを産生し、このことにより同組織での炎症反応の消長や免疫反応の制御にも積極的に関与している可能性が示唆されている<sup>1-7)</sup>。さらに当研究室における研究結果より、Very Late Antigen インテグリン、Lymphocyte Function Associated Antigen-1/ Intercellular Adhesion Molecule-1、CD44 分子といった複数の細胞接着分子を介して歯肉線維芽細胞とリンパ球が細胞間接着することによりリンパ球の炎症歯周組織への定着・集積を歯肉線維芽細胞が介助し得る可能性や、このような異種細胞間相互作用を通じて歯肉線維芽細胞自身が炎症性サイトカインの産生や細胞外基質の産生を亢進し、その結果歯周組織の恒常性を破綻させる可能性が明らかにされている<sup>8-13)</sup>。

一方、アデノシンはプリン代謝産物のひとつとして従来位置づけられ、生化学的には細胞内外のアデノシン一リン酸 (AMP) より ect-5'-nucleotidase を触媒にして脱リン酸化されることにより生成され、その一部はアデノシンキナーゼによりリン酸化され AMP へリサイクルされたり、あるいはアデノシンデアミナーゼにより脱アミノ化されイノシンへ、そして最終的には尿酸にまで分解されることが知られている<sup>14)</sup>。しかしながら、最近の研究結果からアデノシンは単なる代謝産物として留まるばかりでなく多彩な生物学的活性を有し<sup>15)</sup>、抗炎症的なメディエーターの1つとしても重要な役割を果たしていることが *in vivo*, *in vitro* の実験を通じて報告されている<sup>14-21)</sup>。たとえば慢性炎症疾患モデルとして起炎物質である *Mycobacterium butyricum* を皮内投与することにより実験的にアジュバント関節炎をおこしたラットにアデノシンやアデノシンレセプターアゴニストを投与することにより同関節炎の症状が軽減すること<sup>16)</sup>、またリウマチの治療薬として用

いられている抗炎症薬のスルファサラジンやメトトレキサートを背中に air pouch を形成されたマウスに投与すると同 air pouch 中の炎症性細胞数が減少し、その際にアデノシンデアミナーゼやアデノシンレセプターアンタゴニストを投薬すると同上薬剤の効果が抑制されることから、その作用機序にアデノシンが関与していること<sup>14,17-21)</sup>などが報告されている。さらに *in vitro* の解析結果より、*E.Coli* 由来リポ多糖刺激により誘導される単球、マクロファージからの TNF $\alpha$  産生をアデノシンあるいはアデノシンレセプターアゴニストが阻害することも明らかにされている<sup>22-26)</sup>。また、アデノシンが血管内皮細胞と好中球との細胞間接着に影響を及ぼすとの報告もなされており<sup>15, 17, 27, 28)</sup>、免疫担当細胞と異種細胞との接着性細胞間相互作用の制御にもアデノシンが関与している可能性が示唆されている。しかしながら、歯周病炎症局所においてアデノシンが如何なる炎症反応制御機能を担っているかに関してはいまだ検討されては無い。上述のごとく歯肉線維芽細胞が歯周病の病態形成においても重要な役割を担っている可能性があることを考え合わせると、このような歯肉線維芽細胞の細胞機能に対してアデノシンが如何なる影響をおよぼすかを解明することは、歯周病に対してアデノシンが抗炎症効果を発揮する可能性を明らかにする上で極めて有益な情報を提供するものと期待される。そこで本研究では、歯肉線維芽細胞による炎症性サイトカイン、各種細胞外基質の mRNA 発現、細胞接着分子発現および歯肉線維芽細胞とリンパ球との異種細胞間相互作用にアデノシンがいかなる影響を及ぼすかについて検討を加えた。さらに、歯肉線維芽細胞におけるアデノシンレセプターの発現をサブタイプ別に mRNA レベルで検討した。

## 実験材料及び方法

### 1. 実験試薬

リコンビナントヒト IL-1 $\beta$  (Genzyme Corporation, Cambridge, MA)、アデノシン (Research Biochemicals International (RBI), Natick, MA)、アデノシンレセプターアゴニストである 2-CHLOROADENOSINE (RBI, 以下 2CADO と略す)、アデノシンレセプターアンタゴニストである XANTHINE AMINE CONGENER (RBI, 以下 XAC と略す)、*Escherichia coli* (以下 *E.coli* と略す) 由来リポ多糖 (lipopolysaccharide; 以下 LPS と略す) (Sigma Chemical Co., St.Louis, Mo, USA) は市販品を購入し実験に供した。*Porphyromonas gingivalis* 381 (以下 *P.g.* と略す) 菌体からの LPS の抽出ならびに精製は Westphal らの記載<sup>29)</sup>に従い、温フェノール/水法により行った。

### 2. 歯肉線維芽細胞

実験目的を承知し、組織提供を応諾した健常人ボランティアより採取した健康歯肉組織を、50U/ml ペニシリン G 及び 50 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (Bioproducts Inc., Walkersville, MD) を加えた  $\alpha$ -modification of Eagle's medium (Flow Laboratories, Irvine, UK, 以下  $\alpha$ -MEM と略す) 中で細切し、3回洗浄した後、スライドガラス上に移し、レイトンチューブを用いて、10% ウシ胎児血清 (Hazleton Biologics Inc., Lenexa, KS, 以下 FCS と略す) を加えた  $\alpha$ -MEM 培地にて培養した。培養は、5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ Cにて湿度 95%の条件下で行った。細切組織片より増殖してきた細胞を 0.05%トリプシン加 0.02% EDTA (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) を加えたリン酸緩衝液 (以下 PBS と略す) で処理し、付着細胞を遊離させ、Hanks' balanced salt solution (Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, 以下 HBSS と略す) にて洗浄後、フラスコ (Corning Laboratory Sciences Company, Corning, NY) 中で継代培養し、継代 4代から 13代目までの細胞をヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts; 以下 HGF と略す) として実験に供した。

### 3. ヒト末梢血単核球及び T細胞の分離

実験目的を承知し、血液の提供を応諾した健常人ボランティアより末梢血を採取し、HISTOPAQUE-1077 (Sigma Diagnostic, St. Louis, MO) を用いた比重遠心法により単核球を分離した。また単核球を分離し回収した後、HBSS にて洗浄後、ノイラミニダーゼ (Behringwerke AG,

Marburg, Germany) 処理した羊赤血球 (SRBC) とロゼット形成させた。そしてさらに、比重遠心法によりロゼット形成細胞を回収し、トリス塩化アンモニウム緩衝液 (0.75% 塩化アンモニウム, 17mM トリスアミノメタン (pH7.2)) を用いて溶血し、Tリンパ球を分離した。これら細胞の CD3 陽性率は 95% 以上であった。

#### 4. モノクローナル抗体 (mAb)

84H10 (抗- Intercellular Adhesion Molecule-1 (以下 ICAM-1 と略す) mAb) は米国国立衛生研究所 (NIH)、S. Shaw 博士より恵与を受け、TS1/22 (抗- Lymphocyte Function Associated Antigen-1 (以下 LFA-1 と略す) mAb) は ATCC (Rockville, MD) より購入し、実験に供した。4-145<sup>23)</sup> (抗- Very Late Antigen (以下 VLA と略す)  $\beta$ 1 mAb) 及び OS/37<sup>27)</sup> (抗-CD44 mAb) は大阪大学歯学部口腔治療学講座にて樹立された。これら mAb 産生ハイブリドーマをプリスタン (Sigma Chemical Co.) 投与 (0.5ml / マウス) BALB/c マウス (雌 5 週齢以上) の腹腔内に接種し、得られた腹水から各々の mAb をプロテイン G 結合セファロース 4B (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA) カラムを用いて精製したものを実験に使用した。

#### 5. 間接蛍光抗体法によるフローサイトメトリーを用いた細胞表面分子発現状況の解析

直径 100mm 培養用ディッシュ (No.25020-100, Corning Glass Works, Corning, NY)にてコンフルエントにした HGF 単層上に IL-1 $\beta$  (25U/ml) 存在、非存在下に 10mM のアデノシンを 15 時間作用させ、培養終了後、回収された細胞  $1 \times 10^6$  個当り、あらかじめ至適濃度に調製しておいた種々のヒト細胞接着分子に特異的なマウス mAb と 4°C で 30 分間反応させた。1% BSA、0.1% アジ化ナトリウムを加えた PBS にて洗浄後、FITC 標識-ヤギ抗-マウス IgG(H&L) Fab フラグメント (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN) を加え、4°C で 30 分間反応させ、反応終了後、再び洗浄し、同緩衝液にて細胞を浮遊させた後、フローサイトメーター (FCS-1, 日本分光工業、東京) を用いて発色した蛍光強度を測定した。

#### 6. 細胞接着実験

末梢血 Tリンパ球を、Murakami らの方法<sup>30)</sup>に従い、 $1 \times 10^7$  細胞当り 200 $\mu$ Ci (7.4Bq) の <sup>51</sup>Cr (DU

PONT, Boston, MA) を加えて 37°C で 1 時間培養することにより細胞を標識し、洗浄後、10% FCS-RPMI 1640 培地に浮遊させた。そして、24 穴培養用プレート (Corning Glass Works, Corning, NY) 中でコンフルエントにした HGF 上に、Phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma Chemical Co., 以下 PMA と略す) にて 15 時間刺激後  $^{51}\text{Cr}$  で標識した T リンパ球を  $3 \times 10^5$  個ずつ加え、5%  $\text{CO}_2$ 、37°C にて湿度 95% の条件下で 30 分間培養した。培養後、HGF と接着しなかった細胞を PLATE MIXER (PM-1、東洋科学産業株式会社、東京) にて 10 秒間振盪し、10% FCS-RPMI 1640 培地にて洗い流した後、プレートに 5% Triton X-100 を加えて接着した細胞を溶解させ、遊離してきた  $^{51}\text{Cr}$  量をガンマカウンターにて測定した。HGF に接着した細胞の割合は %Binding として下記の式により算出した。

$$\% \text{Binding} = \frac{\text{HGF に接着した細胞からの } ^{51}\text{Cr 量}}{\text{全投入細胞中の } ^{51}\text{Cr 量} - \text{自然遊出 } ^{51}\text{Cr 量}} \times 100$$

また、HGF に IL-1 $\beta$  (25U/ml) 存在、非存在下にて 10mM アデノシンを 15 時間作用させ、アデノシンによる接着阻害効果の有無をアデノシン無添加の場合の接着率 (%) と比較することにより検討した。また、この細胞接着実験系に 4 で記載した mAb を  $^{51}\text{Cr}$  で標識された細胞と同時に添加し、mAb による接着阻害効果の有無を mAb 無添加の場合の接着率 (%) と比較することにより検討した。

## 7. 全 RNA の抽出

全 RNA の分離は RNA zol<sup>TM</sup> (Cinna/Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX) を用いて行った。すなわち培養後回収された細胞に RNA zol<sup>TM</sup> を加えホモジナイズし、1/10 容量のクロロホルムを添加後、12,000 $\times$ g、15 分間遠心分離した。分離された水層から RNA をイソプロパノールの添加によって沈殿させ、75% エタノールによる洗浄の後、得られた全 RNA 沈殿を 10 $\mu$ l のジエチルピロカルボン酸 (以下 DEPC と略す) 処理水に溶解し、全 RNA 量を波長 260nm の吸光度測定値より算定した。

## 8. 相補鎖 DNA (Complementary DNA, 以下 cDNA と略す) の作成

全 RNA をもとに逆転写を行い cDNA を作成した。すなわち 65°C で熱処理された各 RNA 検体

1 $\mu$ g に、以下に示す最終濃度、52.5mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.3)、3mM MgCl<sub>2</sub>、75.5mM KCl、1mM Dithiothreitol (Life Technologies, Gaithersburg, MD)、1.1U/ $\mu$ l リボヌクレアーゼ阻害剤 (宝酒造, 大津)、0.5mM dNTP 混合液 (宝酒造)、5U/ $\mu$ l Moloney-Mouse Leukemia Virus 逆転写酵素 (Life Technologies)、55ng/ $\mu$ l Random Hexamers (pd(N)<sub>6</sub>; Pharmacia Biotech, Milwaukee, WI) となるように各試薬を加え DEPC 処理水で全量 40 $\mu$ l の反応液を調合した。反応液は 37 $^{\circ}$ C にて 60 分間保温後、99 $^{\circ}$ C にて 5 分間処理し残留酵素を失活させ、cDNA を調製した。

#### 9. Polymerase Chain Reaction 法 (以下 PCR 法と略す) による cDNA の増幅及び検出

合成された cDNA を鋳型として陽性コントロールである Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (以下 GAPDH と略す)、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ヒアルロン酸 (以下 HA と略す) 合成酵素 mRNA、コラーゲンタイプ I・タイプ III、フィブロネクチン、ラミニン及びアデノシン A1・A2a・A2b・A3 レセプターサブタイプ mRNA の PCR 法による増幅を行った。すなわち以下に示す最終濃度、10mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.3)、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、0.15mM dNTP 混合液、1.25U AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> (Perkin Elmer, Foster City, CA) となるように各試薬を加え、cDNA 溶液を 5 $\mu$ l、そして検出する mRNA に特異的な アンチセンスプライマー、センスプライマー (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) を最終濃度各 0.2 $\mu$ M ずつ加え、DEPC 処理水で全量 50 $\mu$ l の反応液を調合した。反応液面にミネラルオイル (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI) を添加し、94 $^{\circ}$ C、9 分間の熱処理後 94 $^{\circ}$ C、45 秒間の熱変性、60 $^{\circ}$ C、45 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C、2 分間の伸張反応を 1 サイクルとし、DNA thermal cycler 480 (Perkin Elmer Cetus Company, Emeryville, CA) を用いて cDNA 増幅を行った。尚、GAPDH は 21、24 サイクル、IL-1 $\beta$  は 30、33 サイクル、IL-1 $\alpha$  は 33、36 サイクル、IL-6 は 21、24 サイクル、HA 合成酵素は 30、33 サイクル、コラーゲンタイプ I は 18、21 サイクル、コラーゲンタイプ III は 30、33 サイクル、フィブロネクチンは 27、30 サイクル、ラミニンは 33、36 サイクル、アデノシン A1 レセプターサブタイプは 39、42 サイクル、A2a レセプターサブタイプは 30、33、36 サイクル、A2b レセプターサブタイプは 30、33、36 サイクル、A3 レセプターサブタイプは 36、39 サイクル反応時に検体 8 $\mu$ l を分取し、1.5% アガロースゲル (Nippon Gene Company, 東京) に電気泳動後、エチジウムブロマイド (Nippon Gene Company) DNA 染色を行った。表に実験に供した各々のプライマーの塩基配列を示す。

表 PCRプライマーの塩基配列

増幅cDNAの分子量

GAPDH	5'プライマー	5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3'	983bp
	3'プライマー	5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'	
IL-1 $\alpha$	5'プライマー	5'-CAA GGA GAG CAT GGT GGT AGT AGC AAC CAA CG-3'	491bp
	3'プライマー	5'-TAG TGC CGT GAG TTT CCC AGA AGA AGA GGA GG-3'	
IL-1 $\beta$	5'プライマー	5'-ATG GCA GAA GTA CCT AAG CTC GC-3'	802bp
	3'プライマー	5'-A CAC AAA TTG CAT GGT GAA GTC AGT T-3'	
IL-6	5'プライマー	5'-ATG AAC TCC TTC TCC ACA AGC GC-3'	628bp
	3'プライマー	5'-G AAG AGC CCT CAG GCT GGA CTG-3'	
TNF $\alpha$	5'プライマー	5'-GAG TGA CAA GCC TGT AGC CCA TGT TGT AGC A-3'	446bp
	3'プライマー	5'-GCA ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA GAC T-3'	
HA合成酵素	5'プライマー	5'-TGC GAT ACT GGG TAG CCT TCA ATG-3'	324bp
	3'プライマー	5'-CGT TGT ACA GCC ACT CAC GGA AGT A-3'	
TypeI collagen	5'プライマー	5'-CTG GCA AAG AAG GCG GCA AA-3'	503bp
	3'プライマー	5'-CTC ACC ACG ATC ACC ACT CT-3'	
TypeIII collagen	5'プライマー	5'-GAT ATT GCA CCC TAT GAC ATT G-3'	341bp
	3'プライマー	5'-GTT GAA GTT TAT TTA TTA TAG CAC C-3'	
Laminin	5'プライマー	5'-GAA TCA GAA TGG CTG GTA ACA TTT G-3'	321bp
	3'プライマー	5'-CTA ATG TGC CCA ACT TCA TTT CC-3'	
Fibronectin	5'プライマー	5'-GCC TGG TAC AGA ATA TGT AGT G-3'	423bp
	3'プライマー	5'-ATC CCA GCT GAT CAG TAG GCT GGT G-3'	
A1	5'プライマー	5'-AGT ACT ATG GGA AGG AGC TGA AGA T-3'	489bp
	3'プライマー	5'-GGT AGT TAA CTC CTA GTG GAG GGA C-3'	
A2a	5'プライマー	5'-ACG CCC CTC TCT CTG GCT CAT GTA CCT-3'	454bp
	3'プライマー	5'-TCA TCA GGA CAC TCC TGC TCC ATC C-3'	
A2b	5'プライマー	5'-GTG CCA CCA ACA ACT GCA CAG AAC-3'	520bp
	3'プライマー	5'-CTG ACC ATT CCC ACT CTT GAC ATC-3'	
A3	5'プライマー	5'-CAC CAC CTT CTA TTT CAT TGT CTC T-3'	340bp
	3'プライマー	5'-GGT ACT CTG AGG TCA GTT TCA TGT T-3'	
nestedプライマー	5'-AAG TCA TAA AAA GGC AGC TGT AGA A-3'	130bp	

### 10. nested PCR 法によるアデノシン A3 レセプターサブタイプの検出

アデノシン A3 レセプターサブタイプ mRNA の 40 サイクル増幅後の cDNA 産物 5 $\mu$ l に最終濃度、10mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.3)、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、50mM KCl、0.15mM dNTP 混合液、1.25U AmpliTaq Gold™ となるように各試薬を加え、上記のアデノシン A3 レセプターサブタイププライマー対の内側に設計した nested プライマーと上記の PCR で用いた A3 センスプライマーを最終濃度各 0.2 $\mu$ M ずつ加え、DEPC 処理水で全量 50 $\mu$ l の反応液を調合した。反応液面にミネラルオイル (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI) を添加し、94 $^{\circ}$ C、9 分間の熱処理後 94 $^{\circ}$ C、45 秒間の熱変性、60 $^{\circ}$ C、45 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C、2 分間の伸張反応を 1 サイクルとし、DNA thermal cycler 480 (Perkin Elmer Cetus Co., Emeryville, CA) を用いて cDNA 増幅を行った。



## 結果

### 1. *P.g.*由来 LPS 刺激により HGF に誘導される TNF $\alpha$ mRNA 発現に対するアデノシンレセプターアゴニストおよびアデノシンの抑制効果

HGF に 0.1 $\mu$ g/ml の *P.g.*由来 LPS を添加して 2.5 時間培養した場合、HGF 中に TNF $\alpha$  mRNA の発現増強が惹起される (図 1)。そこでこの条件下にアデノシンレセプターアゴニストである 2CADO (100 $\mu$ M) を同時に添加した際に HGF 中の TNF $\alpha$  mRNA 発現がいかなる影響を受けるかを検討した。その結果、LPS 刺激により誘導される HGF 中の TNF $\alpha$  mRNA 発現は 2CADO の添加により抑制されることが明らかとなった。さらに、このアデノシンレセプターアゴニストによる効果の特異性を検討するために同培養系にアデノシンレセプターアンタゴニストである XAC (10 $\mu$ M) を添加した。その結果、2CADO の添加による TNF $\alpha$  mRNA 発現の抑制効果が XAC 添加により消失することが確認された (図 1)。

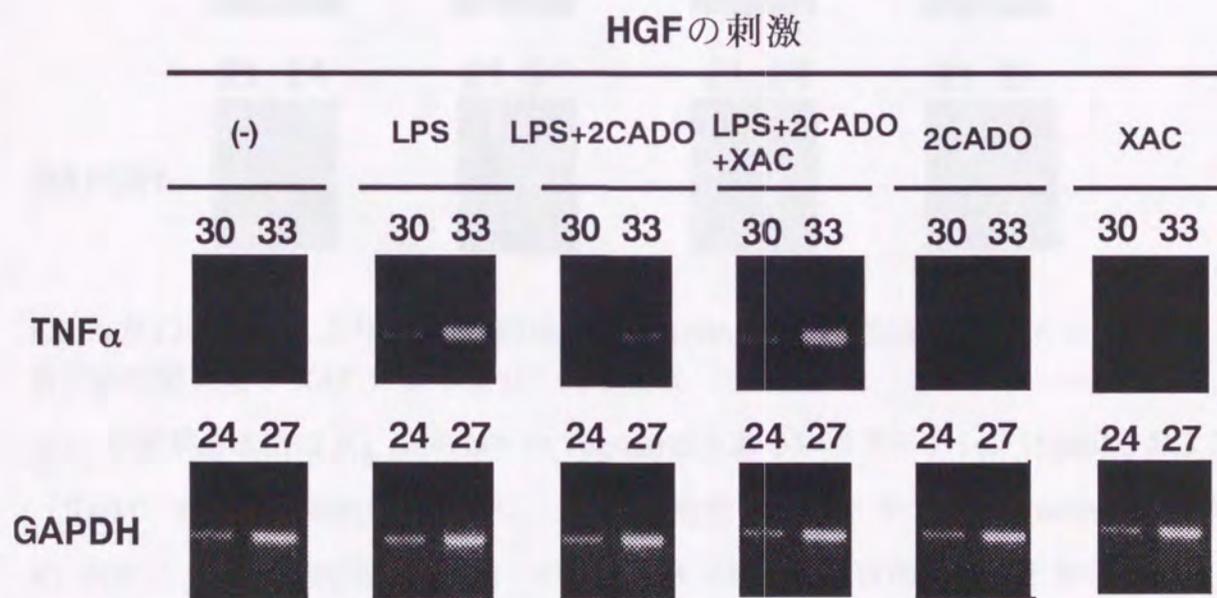


図 1 *P.g.*由来 LPS 刺激により HGF に誘導される TNF $\alpha$  mRNA 発現と 2CADO によるその発現の抑制効果及び XAC による競合的抑制効果

HGF を無刺激または *P.g.*由来 LPS (0.1 $\mu$ g/ml) のみあるいは 2CADO (100 $\mu$ M) および XAC (10 $\mu$ M) を同時に添加して、37 $^{\circ}$ C、2.5 時間培養後、HGF 中の TNF $\alpha$  mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて検出した。同一の実験を 5 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

またアデノシン(100 $\mu$ M)をアデノシンレセプターアゴニストのかわりに添加し同様の検討を行った結果、LPS 刺激による TNF $\alpha$  mRNA 発現の誘導はアデノシン添加により抑制される傾向にあることが確認された(図2)。また結果には示していないが、無刺激の HGF に対しアデノシンのみ、アデノシンレセプターアゴニストのみ、アデノシンレセプターアンタゴニストのみ、およびアデノシンレセプターアゴニストとアデノシンレセプターアンタゴニストの両方を添加しても、無刺激 HGF と比較して TNF $\alpha$  mRNA の発現量に変化は認められなかった。

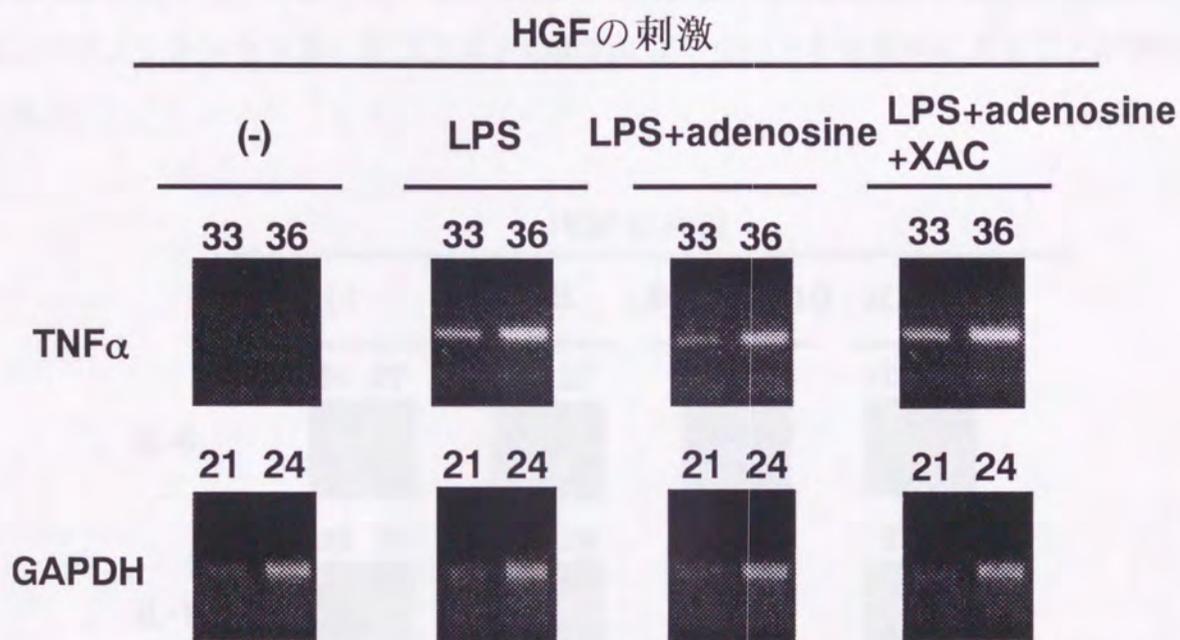


図2 *P.g.* 由来 LPS 刺激により HGF に誘導される TNF $\alpha$  mRNA 発現とアデノシンによるその発現の抑制効果及び XAC による競合的抑制効果

HGF を無刺激または *P.g.* 由来 LPS (0.1 $\mu$ g/ml)のみあるいはアデノシン(100 $\mu$ M)および XAC (10 $\mu$ M) を同時に添加して、37 $^{\circ}$ C、2.5 時間培養後、HGF 中の TNF $\alpha$  mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて検出した。同一の実験を 3 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

2.P.g.由来 LPS 刺激により HGF 中に誘導される IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 発現に対する アデノシンレセプターアゴニストの抑制効果

HGF に LPS を添加して 2.5 時間培養した場合、HGF 中には TNF $\alpha$  mRNA 以外の炎症性サイトカインとして IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA の発現が誘導される (図 3)。そこで先の実験と同様に、LPS により誘導されるこれらの炎症性サイトカイン mRNA 発現に対するアデノシンレセプターアゴニストの影響を検討した。その結果、IL-1 $\alpha$ , IL-6 mRNA 発現はアデノシンレセプターアゴニスト添加によりほとんど影響を受けなかった。一方 IL-1 $\beta$  mRNA 発現は、TNF $\alpha$  mRNA の場合と同様に、アデノシンレセプターアゴニストの添加により抑制される傾向にあることが明らかにされた (図 3)。

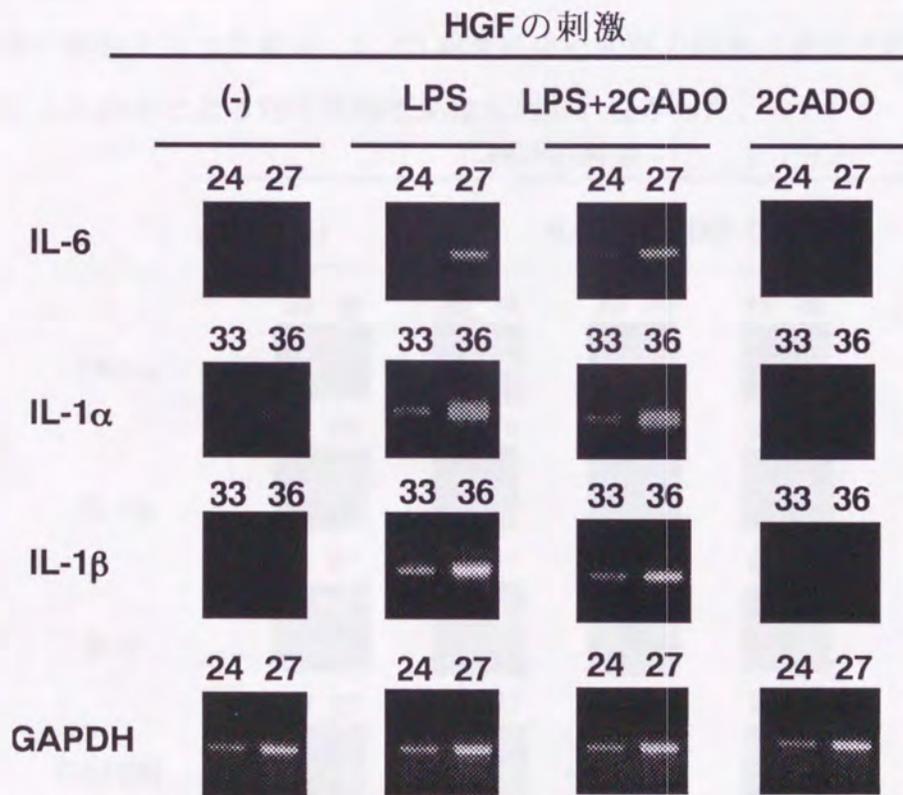


図 3 P.g.由来 LPS 刺激により HGF に誘導される IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 発現と 2CADO によるその発現の抑制効果及び XAC による競合的抑制効果

HGF を無刺激または P.g.由来 LPS (0.1 $\mu$ g/ml)のみあるいは 2CADO (100 $\mu$ M)および XAC (10 $\mu$ M)を同時に添加して、37 $^{\circ}$ C、2.5 時間培養後、HGF 中の IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて検出した。同一の実験を 3 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

### 3. IL-1 $\beta$ 刺激により HGF 中に誘導される TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 発現に対するアデノシンレセプターアゴニストの抑制効果

炎症歯周組織においては、HGF は LPS のみならず同組織で産生される種々のサイトカインの影響を受け、その結果さらに炎症反応が修飾され複雑な炎症応答を構築するものと考えられる。そこで、サイトカイン刺激により誘導される HGF 中の炎症性サイトカイン mRNA 発現に対してもアデノシンレセプターアゴニストが如何なる影響を及ぼすのかについて検討を加えた。HGF を 25U/ml の IL-1 $\beta$  にて 2.5 時間刺激すると HGF 中に TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  および IL-6 mRNA 発現が誘導される (図 4)。この条件下にアデノシンレセプターアゴニスト 2CADO を添加すると TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  mRNA 発現が著明に抑制された。一方、IL-6 mRNA 発現はアデノシンレセプターアゴニスト添加により抑制されなかった (図 4)。また結果には示していないが、HGF 中の IL-1 $\alpha$  mRNA についても同様の検討を行った結果、IL-1 $\beta$  刺激による発現の誘導は確認されたがアデノシンレセプターアゴニスト添加による発現抑制効果は認められなかった。

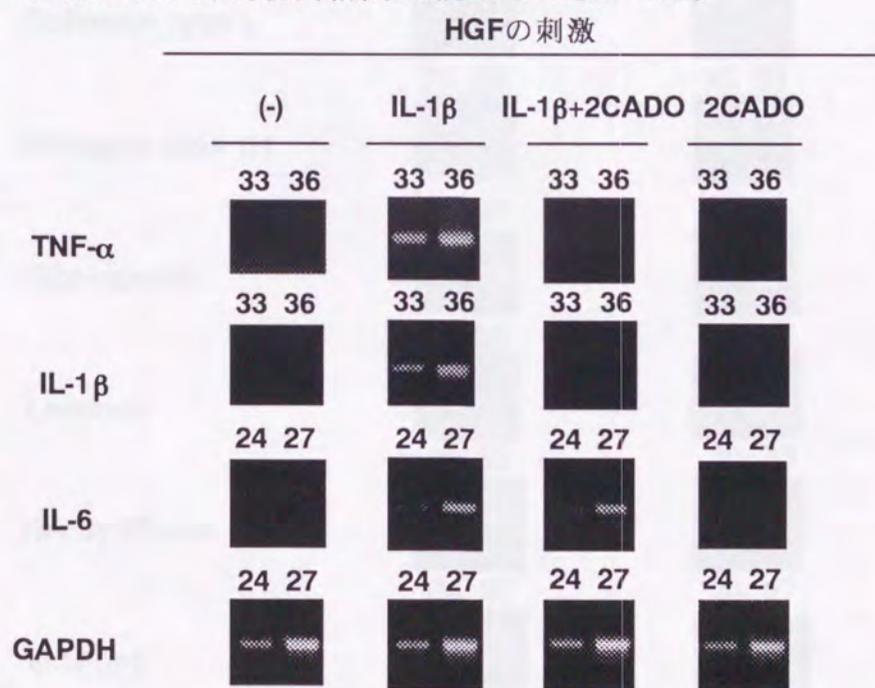


図 4 IL-1 $\beta$  刺激により HGF に誘導される TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA 発現と 2CADO によるその発現の抑制効果及び XAC による競合的抑制効果

HGF を無刺激または IL-1 $\beta$  (25U/ml)のみあるいは 2CADO (100 $\mu$ M)および XAC (10 $\mu$ M)を同時に添加して、37 $^{\circ}$ C、2.5 時間培養後、HGF 中の TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて検出した。同一の実験を 3 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

#### 4. アデノシンレセプターアゴニストおよびアデノシン添加による HGF 中の HA 合成酵素 mRNA 発現の増強

次にアデノシン刺激が HGF 中の各種細胞外基質 mRNA の恒常的発現に及ぼす影響を検討した。すなわち、HGF にアデノシンレセプターアゴニストである 2CADO を 100 $\mu$ M 添加して 2.5 時間培養後、HGF 中の各種細胞外基質および HA 合成酵素 mRNA 発現を RT-PCR 法により検出した。その結果、2CADO を添加した HGF においては無刺激 HGF と比較してコラーゲンタイプ I・タイプ III、ラミニン、フィブロネクチン mRNA の発現に著明な変化は認められなかった (図 5)。一方、HA 合成酵素 mRNA 発現は 2CADO の添加のみにより著明な増強が認められた (図 5)。

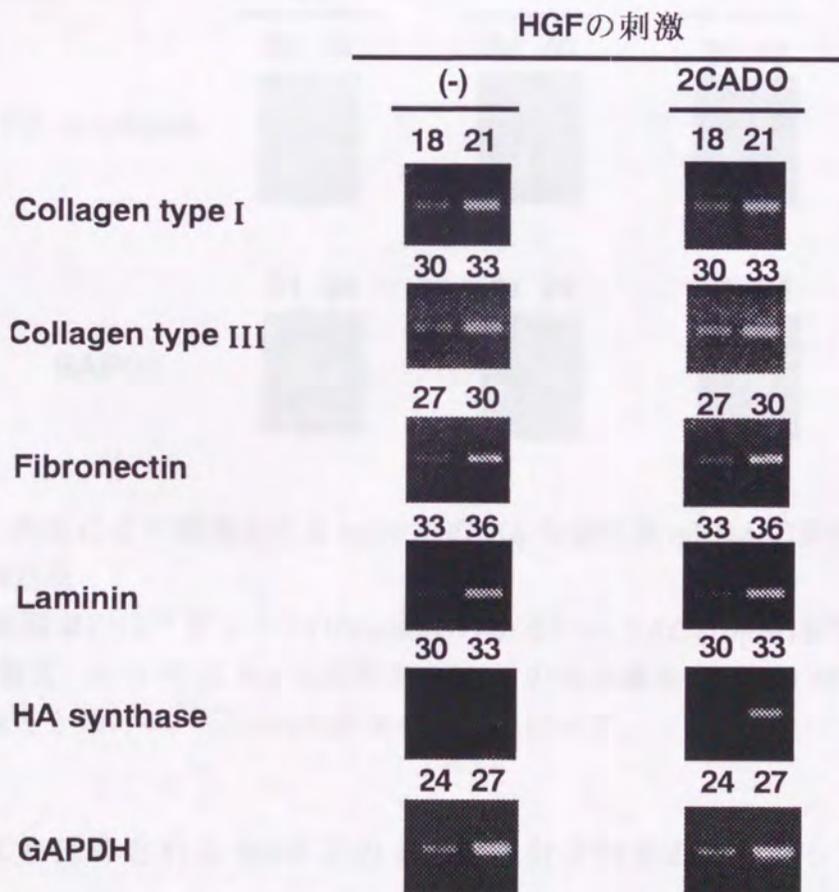


図 5 2CADO 刺激による HGF 中の各種細胞外基質および HA 合成酵素 mRNA の発現量  
HGF を無刺激または 2CADO(100 $\mu$ M)を添加して、37 $^{\circ}$ C、2.5 時間培養後、HGF 中のコラーゲンタイプ I・タイプ III、フィブロネクチン、ラミニン、HA 合成酵素 mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて検出した。同一の実験を 3 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

さらに結果には示していないが、同条件下にアデノシンレセプターアンタゴニストである XAC を 10 $\mu$ M 添加した場合、2CADO の添加による HA 合成酵素 mRNA 発現の増強は完全に抑制されることが確認された。同様の実験をアデノシンを用いて行ったところ、アデノシン 100 $\mu$ M を添加することによっても HGF 中の HA 合成酵素 mRNA 発現は著明な増強が認められた。さらに同条件下にアデノシンレセプターアンタゴニストである XAC を 10 $\mu$ M 添加した場合、アデノシンの添加による HGF 中の HA 合成酵素 mRNA 発現の増強は完全に抑制されることが確認された (図 6)。

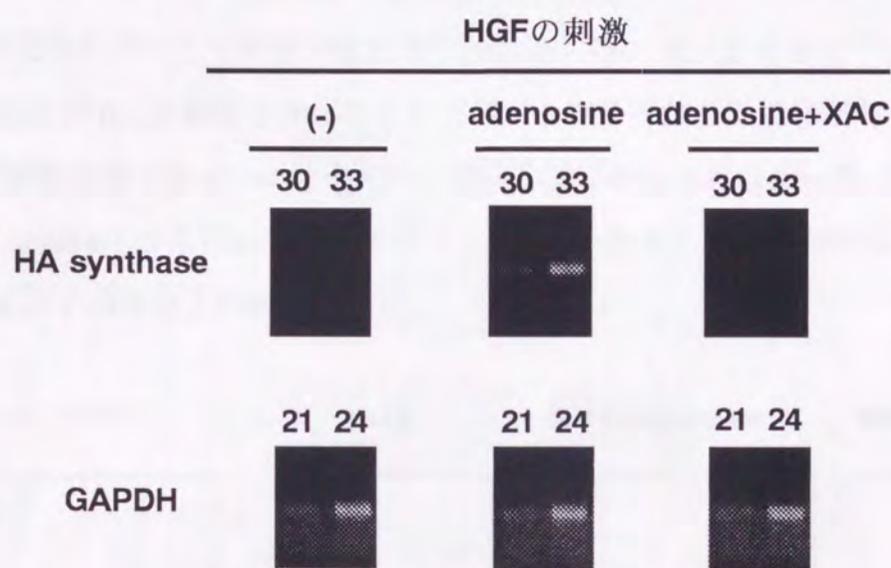


図 6 アデノシン刺激により誘導される HGF 中の HA 合成酵素 mRNA の発現と XAC によるその発現の抑制効果  
HGF を無刺激またはアデノシン(100 $\mu$ M)のみあるいは XAC (10 $\mu$ M)を同時に添加して、37 $^{\circ}$ C、2.5 時間培養後、HGF 中の HA 合成酵素 mRNA の発現量を RT-PCR 法を用いて検出した。同一の実験を 3 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

### 5. IL-1 $\beta$ 刺激により誘導される HGF 上の ICAM-1 分子発現のアデノシンによる抑制

血管外へ遊走したリンパ球が炎症歯周組織へ定着、集積する際には、歯肉結合組織の主要な構成細胞である HGF とリンパ球との細胞接着分子を介した接着性相互作用が重要な役割を果たしていると考えられている。さらにこの異種細胞間接着を通じて HGF が活性化され、炎症性サイトカインや HA などの産生を亢進する可能性が示唆されている。そこで、上記細胞間接着を媒介

する HGF 上の細胞接着分子の発現に対するアデノシンの作用を次に検討した。HGF に IL-1 $\beta$  存在、非存在下にアデノシン 10mM を添加し 15 時間培養後、HGF 上の細胞接着分子の発現をフローサイトメトリーにより解析した (図 7)。その結果、これまでに報告されているように無刺激の状態ではわずかに発現している ICAM-1 分子は HGF を IL-1 $\beta$  にて刺激するとその発現が著明に増加することが確認された。この条件下にアデノシンを同時添加した場合、IL-1 $\beta$  刺激による ICAM-1 分子の発現増加はほぼ完全に抑制された。また IL-1 $\beta$  非存在下にアデノシンのみを添加した HGF においては無刺激 HGF と比較して著明な ICAM-1 分子発現の差は認められなかった。一方、CD44 分子の発現についても同様の検討を行ったところ、IL-1 $\beta$  非存在下にアデノシンのみを添加した場合および IL-1 $\beta$  刺激を加えた上にアデノシンを添加した場合どちらの場合も無刺激 HGF と比較して細胞表面上の CD44 分子発現に著明な差は認められなかった (図 7)。結果には示していないが、mAb 4-145 を用いてインテグリン  $\beta$ 1 分子発現についても同様の解析を行ったが、その結果は CD44 分子の場合と同様であった。

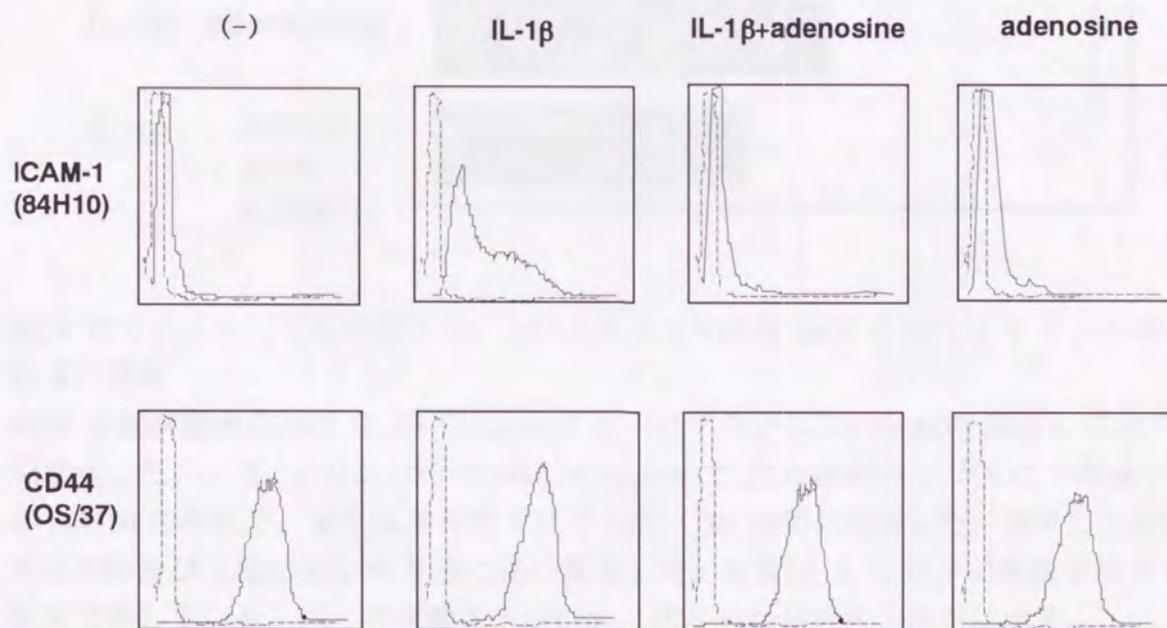


図 7 IL-1 $\beta$  刺激により誘導される HGF 上の ICAM-1 分子発現に対するアデノシンの抑制効果  
HGF を無刺激あるいは IL-1 $\beta$  (25U/ml) 存在下にアデノシン(10mM)を添加して 37 $^{\circ}$ C、15 時間培養後、回収した HGF を 84H10 あるいは OS/37 と 4 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、洗浄後、FITC 標識一ヤギ抗マウス IgG を加え、4 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、フローサイトメトリー解析を行った (-)。抗体を加えず FITC 標識一ヤギ抗マウス IgG のみを加えたものをネガティブコントロール (...) として用いた。

## 6. アデノシンによる IL-1 $\beta$ 刺激 HGF と活性化 T リンパ球の細胞間接着の抑制

HGF を IL-1 $\beta$  刺激することにより ICAM-1 分子の発現が亢進し、その結果 HGF と活性化 T リンパ球の接着は ICAM-1/LFA-1 接着経路を介して増強される<sup>26)</sup>。そこでこの接着にアデノシンがいかなる影響を及ぼし得るのかを検討するために、HGF をアデノシンで前処理した後、細胞接着実験を行った。その結果、HGF を IL-1 $\beta$  刺激する際に同時にアデノシン 10mM を添加した場合、IL-1 $\beta$  刺激された HGF と活性化 T リンパ球との接着は抑制された (図 8)。

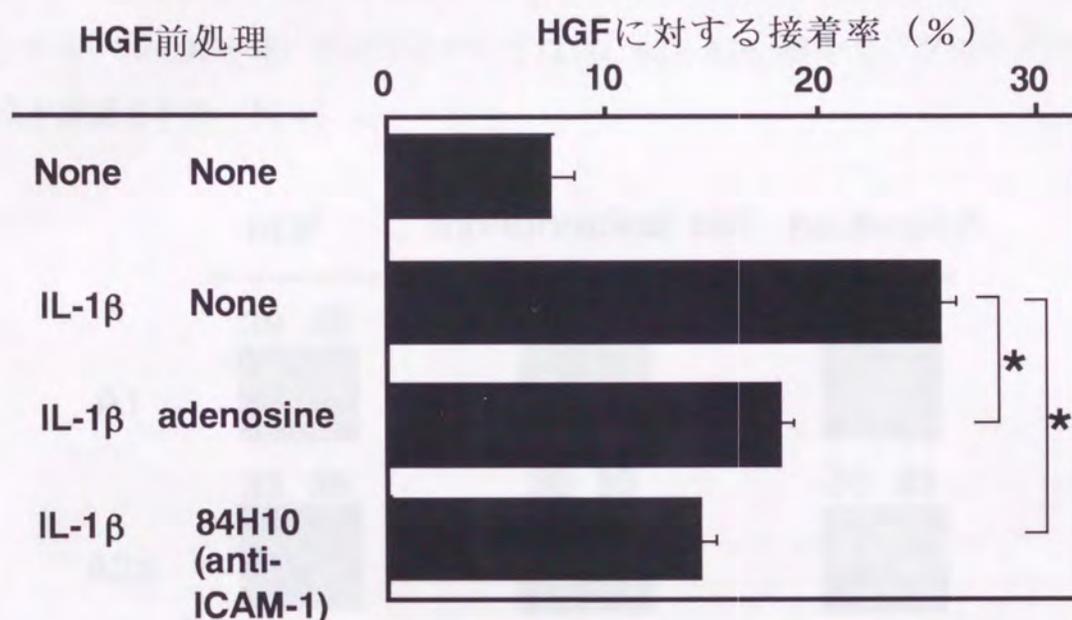


図 8 HGF をアデノシンで前処理することによる IL-1 $\beta$  刺激 HGF と活性化 T リンパ球の細胞間接着の抑制

HGF を無刺激あるいは IL-1 $\beta$  (25U/ml)存在下にアデノシン(10mM)を添加して 37 $^{\circ}$ C、15 時間培養した。一方、T リンパ球は PMA (0.5 $\mu$ g/ml)で 15 時間刺激し  $^{51}$ Cr にて標識し、5 $\mu$ g/ml の 84H10 の存在下、または非存在下にて 37 $^{\circ}$ C、30 分間共培養した。接着した細胞の接着率は材料及び方法に記した方法に従い算出した。結果は 2 ウェルの算術平均%と標準誤差%で表している。同一の実験を 5 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

\*は t-検定により  $p < 0.05$  にて有意差があることを示す。

### 7.HGF 中のアデノシンレセプター各サブタイプの mRNA 発現

アデノシンは各種細胞表面のアデノシンレセプターを介して細胞内にシグナルを伝達し、そのアデノシンレセプターには少なくとも A1, A2a, A2b, A3 の4種類のサブタイプの存在がこれまでに報告されている。そこで、HGF に発現するアデノシンレセプターサブタイプを検討するために HGF 中に検出されるアデノシンレセプターサブタイプ mRNA 発現を RT-PCR により解析した。その結果、A1, A2a, A2b レセプターサブタイプ mRNA の発現が確認された (図9)。しかしながら A3 レセプターサブタイプ mRNA 発現は 40 サイクル増幅後では検出されなかった。一方、ポジティブコントロールの好中球、単核球においては A1, A2a, A2b, A3 レセプターサブタイプの mRNA 発現が確認された (図9)。

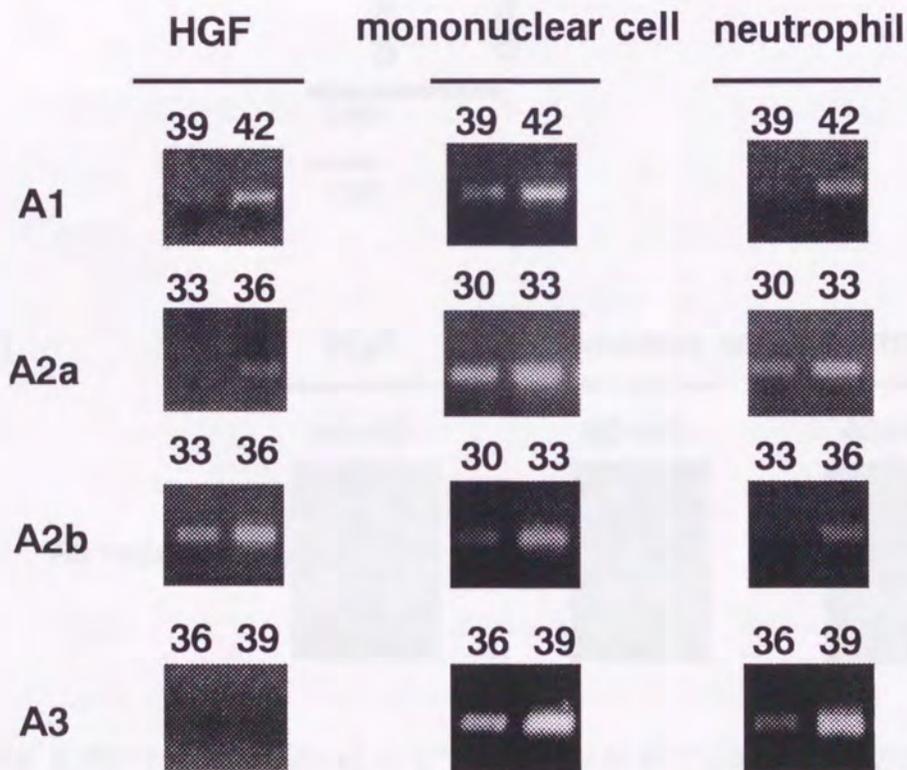


図9 HGF 中のアデノシンレセプター各サブタイプの mRNA 発現量  
HGF、単核球、好中球中のアデノシンレセプターA1, A2a, A2b, A3 サブタイプの mRNA 発現量を RT-PCR 法を用いて検出した。同一の実験を 3 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

A3 レセプターサブタイプの発現が検出されなかったため、その有無をさらに詳細に検討するために、nested PCR を行った。その結果、上記 7 の条件にて A3 レセプターサブタイプ特異的プライマーにて 40 サイクルの増幅後、さらに nested PCR で 40 サイクルの増幅を行ったが、A3 レセプターサブタイプ mRNA 発現は HGF 中に認められなかった。一方、同条件下で好中球および単核球においては A3 レセプターサブタイプ発現が確認された (図 10)。

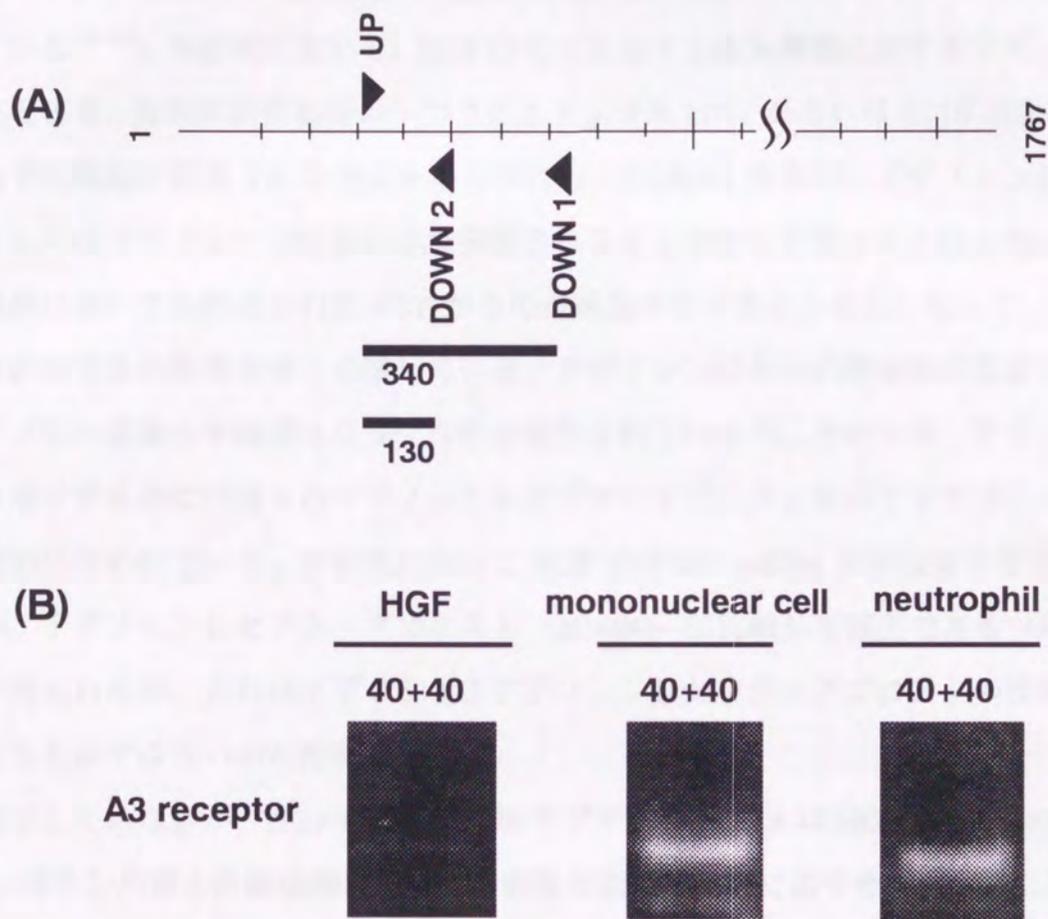


図 10 nested PCR を用いた HGF 中の A3 レセプターサブタイプ mRNA 発現の検討

(A) アデノシン A3 レセプターサブタイププライマー対の内側に nested プライマーを設計した。

(B) HGF、単核球、好中球中のアデノシンレセプター A3 サブタイプの mRNA 発現量を RT-PCR 法を用いて 40 サイクルの増幅後、さらに nested PCR 法を用いて検出した。同一の実験を 3 回行い、代表的な結果を本図中に示す。

## 考察

アデノシンは恒常的に各種細胞より産生されている生理活性物質である。ヒト血中のアデノシン濃度は通常 300nM 以下であるが炎症巣においては 500-600nM に亢進することが報告されており<sup>2)</sup>、歯周病炎症局所においても、アデノシンが局所炎症反応の制御に関与していることが推察される。一方、これまでの研究結果より、HGF は歯周組織での恒常性維持に重要な役割を演じているのみならず、同組織での炎症反応の消長や免疫反応の制御に積極的に関与している可能性が示唆されている<sup>16-22)</sup>。本研究において、HGF のサイトカイン産生機能に対するアデノシンの影響を解析したところ、歯周病原性細菌の一つである *P.g.*由来 LPS、あるいは IL-1 $\beta$  により HGF を刺激することで同細胞に誘導される TNF $\alpha$  ならびに IL-1 $\beta$  mRNA 発現が、アデノシンレセプターアゴニストもしくはアデノシンの添加により抑制されることが初めて明らかとなった。このことは炎症歯周組織において活性化された HGF からの炎症性サイトカイン産生に対して、アデノシンが抑制的に作用する可能性を強く示唆している。アデノシンはその代謝速度が急速であり、ヒト血中のアデノシン濃度の半減期は 0.6-1.5 秒と報告されている<sup>31)</sup>。そのため、アデノシンの生物学的活性を解析するには種々のアデノシンレセプターアゴニスト及びアンタゴニストを用いる研究が一般的に行われている。本研究において HGF の TNF $\alpha$  mRNA 発現に対するアデノシンの阻害効果が、アデノシンレセプターアゴニスト (2CADO) に比較して軽度である (図 1、2) という結果が得られたが、これはアデノシンとアデノシンレセプターアゴニストの代謝速度の差異の影響によるものではないかと推察される。

結果には示していないが、HGF 中の A1, A2b サブタイプ mRNA は HGF に LPS, PMA, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  あるいはリンパ球との細胞間接着による刺激を加えることによりその発現量に著明な影響を認めなかった。一方、A2a サブタイプ mRNA は LPS, PMA, IL-1 $\beta$  刺激を加えることによりその発現量が増加することが確認されている。さらに LPS, PMA, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$  による刺激やリンパ球との細胞間接着による刺激を HGF に与えても A3 レセプター mRNA 発現が検出できなかった。これらのことは、細胞の種類によりアデノシンレセプターサブタイプの発現パターンが異なる可能性を示唆しており、このことによりアデノシンの作用がその標的となる細胞により異なるという現象が一部説明されるかもしれない。

本研究において、HGF を *P.g.*由来 LPS にて刺激することにより誘導される TNF $\alpha$  ならびに

IL-1 $\beta$  mRNA 発現がアデノシンレセプターアゴニスト添加により抑制され、IL-1 $\alpha$  ならびに IL-6 mRNA 発現に関してはアデノシンレセプターアゴニスト添加の影響を受けないことが示された (図 1、3)。現在、アデノシンレセプターに関しては、A1, A2a, A2b, A3 の 4 種類のサブタイプの存在が知られており<sup>2)</sup>、今回の研究結果から HGF においては、A1, A2a, A2b の mRNA 発現が確認されたが、A3 の mRNA に関しては nested PCR によっても発現が検出されなかった (図 9、10)。この HGF における TNF $\alpha$  ならびに IL-1 $\beta$  mRNA の発現抑制は 2CADO に加え他の 2 種類のアデノシンレセプターアゴニスト (5'-N-ethylcarboxamidoadenosine; NECA, N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine; CPA) を用いても検討され同じ結果が再現されている。残念ながら、これらのアゴニストは特定のレセプターサブタイプにのみ作用するというものではなく、解離定数の差はあるとはいえ複数種のレセプターに同時に作用することが知られているため HGF 上のどのレセプターサブタイプが HGF におけるサイトカイン発現制御の中心的役割を果たしているのかに関しては結論が得られていない。今後各レセプターサブタイプに特異的なアゴニスト、アンタゴニストおよび mAb を用いることにより、解析が進められることが期待される。

興味深いことにヒト単球においては *E. coli* 由来 LPS 刺激により誘導される TNF $\alpha$  mRNA 発現のみが<sup>9-13)</sup>、またヒト内皮細胞においては同刺激により誘導される IL-6, IL-8 産生が<sup>32)</sup> アデノシンもしくはアデノシンレセプターアゴニストにより抑制されることが報告されており、LPS 刺激の結果誘導されるサイトカイン発現に対するアデノシンの影響が細胞種によって異なることが示されている。この差異は LPS の刺激が細胞内に伝達されていく経路が細胞の種類により異なるために生じているとの可能性が 1 つ考えられる。一方、ヒト単球、内皮細胞中には、A1, A2a, A2b, A3 の 4 種類すべてのサブタイプ mRNA が発現していることが報告されているのに対して<sup>2, 33-37)</sup> HGF においては A1, A2a, A2b の 3 種類のみが発現が確認されており、細胞種間において発現されているアデノシンレセプターサブタイプが異なる可能性が示されている。さらに特定のレセプターサブタイプの発現の有無に加え、各細胞種間において個々のアデノシンレセプターサブタイプの発現比率に差異がある可能性も示唆されている (図 9)。従って、このようなアデノシンレセプターサブタイプの発現の差異がその一因となって、上記細胞種間における炎症性サイトカイン mRNA 発現に対するアデノシンの作用の差異が生じているのかもしれない。

LPS 刺激のみならず IL-1 $\beta$  刺激において HGF 中に誘導される TNF $\alpha$  および IL-1 $\beta$  mRNA 発現が

アデノシンレセプターアゴニスト添加により阻害されることも今回の研究で初めて明らかにされた事実である(図4)。HGFをLPSにて刺激することによりいかなるシグナルが細胞内に伝達されるかは現在に至るまで十分に解明されていないが、IL-1 $\beta$ 刺激に関しては、IL-1がレセプターに結合するとジアシルグリセロールの産生やcAMP濃度の上昇とプロテインキナーゼCの活性化、あるいはG蛋白の活性化とGTPaseの活性化がみられるなどそのシグナル伝達機構が複数存在する可能性が考えられている。一方、アデノシンのアデノシンレセプターを介した細胞内シグナル伝達の過程で細胞内のcAMP濃度が変動するという報告<sup>2)</sup>があることから、IL-1 $\beta$ 刺激によるHGF中のcAMP濃度の上昇をアデノシンが阻害することにより同サイトカインmRNA発現の抑制効果を表す可能性も考えられる。

細胞外基質産生はHGFの重要な機能の一つである。現在では細胞外基質は単に細胞間隙を埋めるだけでなく、細胞の増殖、分化および炎症反応、創傷治癒過程において重要な役割を演じていると考えられている。今回の研究ではHGFにおけるコラーゲンタイプI・タイプIII、ラミニン、フィブロネクチンの恒常的mRNA発現に関してはアデノシン刺激が特に影響を及ぼさないことが明らかにされた(図5)。一方、細胞外基質成分の一つであるグリコサミノグリカンも生体内で重要な役割を果たし、前述した機能に加え、ヘパリン結合性増殖因子等のreservoirとしての機能も注目を集めている。その中で、HAはグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの繰り返し構造からなる分子量数万から百万を越える巨大分子であり、間充組織、硝子体液、関節液、軟骨、基底膜、血管周囲など生体内に広範に分布している。歯周組織においても、水分調節機能、細胞間接着、細胞の増殖・分化・遊走において重要な役割を演じていると考えられている<sup>38-45)</sup>。また当研究室の研究結果より、HGFより産生されたHAがHGFと活性化リンパ球との細胞間接着に関与していることが明らかにされている<sup>25)</sup>。さらに炎症部位や創傷治癒過程にある部位においてHAの産生量が亢進することも報告されおり<sup>46-49)</sup>、種々の生体反応におけるHAの重要性が示唆されている。興味深いことに、今回の研究結果ではアデノシン刺激がHGF中のHA合成酵素mRNA発現を著明に増強することが明らかにされた(図6)。HGF中のHA合成酵素mRNAの発現量の増加はHA産生量の増加と相関して変動することがすでに確認されており、HGFをIL-1 $\beta$ やLPSを用いて刺激するとHGF中のHA合成酵素mRNAの発現が増強されること(未公表結果)、さらにHGFをヒアルロニダーゼ処理することによりHGF中のHA合成酵素mRNA発現が

増強されること(未公表結果)を考え合わせると、歯周病原性細菌由来のヒアルロニダーゼや LPS、炎症歯周組織で産生される炎症性サイトカイン、さらに同部位にて産生が亢進されるであろうアデノシンの作用により、同炎症巣の HGF による HA 産生量が亢進するものと考えられる。

当研究室のこれまでの研究成果から、炎症歯周組織におけるリンパ球の定着及び集積を考える上で HGF とリンパ球との接着性細胞間相互作用は極めて重要な役割を演じていることが示唆されている<sup>23-28)</sup>。さらにこの異種細胞間接着により HGF が活性化され、炎症性サイトカインの産生が誘導されるのみならず、外因性の IL-1 $\beta$  刺激に対する HGF の感受性が高まることが示されている<sup>26, 28)</sup>。この異種細胞間接着には VLA インテグリン、LFA-1/ICAM-1、CD44 分子といった複数の細胞接着分子が関与していることが *in vitro* の研究によりすでに明らかにされている<sup>23-26)</sup>。とりわけ、LFA-1/ICAM-1 を介した接着経路は、HGF が炎症性サイトカインの影響を受けることによりその重要性を高めることが示唆されている<sup>26)</sup>。アデノシンによる刺激が IL-1 $\beta$  刺激を受けた HGF 上の ICAM-1 分子の発現を抑制し(図7)、かつ ICAM-1 分子を介した HGF と活性化 T リンパ球の接着をアデノシンが部分的に阻害する(図8)という今回の結果は、歯周病炎症局所で産生されたアデノシンが同部位におけるリンパ球の定着及び集積を制御し、抗炎症的なメディエーターとして作用し得る可能性を強く示唆している。一方、CD44 分子・インテグリン  $\beta$ 1 分子は無刺激の状態でも恒常的に HGF 上に発現しており、その発現にアデノシンは影響を及ぼさなかった(図7)。このことはアデノシンがすべての細胞接着分子発現を抑制するのではなく IL-1 $\beta$  刺激により亢進する細胞接着分子の発現のみを抑制することを示唆している。しかしながら細胞接着分子としての機能はその発現量にのみ比例するものではないことから、CD44 分子とそのリガンドである HA、およびインテグリン  $\beta$ 1 分子とそのリガンドである各種細胞外基質との接着能に対するアデノシンの影響は今後さらに検討することが求められる重要な課題であろう。また結果には示していないが、IL-1 $\beta$  刺激した HGF と活性化 T リンパ球を細胞間接着させる際に抗 ICAM-1 抗体を添加した場合に比較して、IL-1 $\beta$  とアデノシンで前処理した HGF と T リンパ球を細胞間接着させる際に抗 ICAM-1 抗体を添加した場合、後者で細胞接着率(%)がより減少する傾向が認められている。このことは、アデノシンが ICAM-1/LFA-1 を介した接着経路以外の接着経路にも影響を及ぼし得る可能性を示唆しているものであり、このアデノシンにより制御がなされると考えられる新たな接着経路の解明も今後の研究課題として残されている。

アデノシンが細胞表面上のアデノシンレセプターに結合した際の細胞内の変化については好中球を用いた解析が進められている。これまでの研究からアデノシンレセプターの構造は7つの膜貫通部位を持つG蛋白結合型レセプターであり、アデノシンとアデノシンレセプターが結合することにより、Gi蛋白に結合しているA1レセプターについてはアデニル酸シクラーゼの活性が抑制されセカンドメッセンジャーであるcyclic-AMP(cAMP)が減少すること、またGs蛋白に結合しているA2a, A2bレセプターについてはアデニル酸シクラーゼの活性が増強されcAMPが増加することが報告されている<sup>2, 37)</sup>。興味深いことにアデノシンA1レセプターを介したシグナルにより、好中球の走化性、貪食能、接着能が増強され、A2レセプターを介したシグナルによりその貪食能や接着能およびH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>やO<sup>2-</sup>の生成が減少することが報告されている<sup>2, 4, 14, 15, 50-54)</sup>。しかしながら、細胞内のcAMPの増減とアデノシン刺激により惹起される細胞の機能の変化が直接関係するのかが否かに関してはまだ見解の一致をみていないのが実状である。さらに、現在までのところ線維芽細胞上のアデノシンレセプターにアデノシンが結合した際の細胞内変化に関する報告は皆無であり、アデノシンがHGF内にいかなる種類のシグナル伝達を行い得るのかを明らかにすることは今後の重要な課題であろう。

今回の研究からアデノシンはアデノシンレセプターを介して、歯周病原性細菌やIL-1βによる刺激でHGF中に誘導される炎症性サイトカイン産生を抑制するのみならず、炎症巣や創傷治癒の初期過程に産生が亢進することが報告されているHAの産生亢進にも関与していることが示唆された。またアデノシンはHGF上のICAM-1分子の発現を阻害し、さらにその結果、炎症歯周組織へのリンパ球の定着・集積を抑制し得ることが示唆された。このような機構を通じて炎症歯周組織における炎症反応の制御にアデノシンが深く関与し得る可能性が示唆された。

今後さらに、HGF上のアデノシンレセプターサブタイプの違いによるHGFへの作用の違い、アデノシンが関与するHGFと活性化リンパ球との新たな接着経路、およびHGF中へのアデノシンのシグナル伝達機構を解明することにより、歯周病炎症局所におけるアデノシンの意義がさらに解明されるものと期待される。

## 結論

HGF の炎症性サイトカインおよび細胞外基質産生、細胞接着分子発現、リンパ球との異種細胞間接着性相互作用に対してアデノシンがいかなる影響を及ぼすか、さらに HGF のアデノシンレセプターサブタイプの発現についても検討し、以下の結果を得た。

1、*P.g.* 由来 LPS および IL-1 $\beta$  の刺激により HGF 中の TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  mRNA の発現量が著明に増加し、その発現量の増加はアデノシンおよびアデノシンレセプターアゴニストにより抑制されることが確認された。さらにそのアデノシンおよびアデノシンレセプターアゴニストによる抑制効果はアデノシンレセプターアンタゴニストにより競合的に阻害されることが確認された。一方 HGF 中の IL-1 $\alpha$ , IL-6 mRNA は、*P.g.* 由来 LPS および IL-1 $\beta$  の刺激により著明に発現量が増加したが、その発現量の増加はアデノシンおよびアデノシンレセプターアゴニストにより抑制されないことが確認された。

2、アデノシンは HGF 中のコラーゲンタイプ I・タイプ III、ラミニン、フィブロネクチンの恒常的 mRNA 発現に影響は及ぼさなかったが、HA 合成酵素 mRNA 発現を増強させ、その発現増強はアデノシンレセプターアンタゴニストにより阻害されることが確認された。

3、IL-1 $\beta$  刺激により誘導される HGF 上の ICAM-1 分子の発現増強は、アデノシンの添加により抑制された。一方、IL-1 $\beta$  非存在下にアデノシンのみを添加した場合および IL-1 $\beta$  刺激を加えた上にアデノシンを添加した場合の両方において、CD44 およびインテグリン  $\beta$ 1 分子の発現はアデノシンによる影響を受けなかった。さらに IL-1 $\beta$  刺激された HGF と活性化 T リンパ球との細胞間接着は HGF をアデノシンにて前処理することにより阻害されることが確認された。

4、HGF 中には、アデノシンレセプター A1, A2a, A2b タイプの mRNA の発現が認められた。

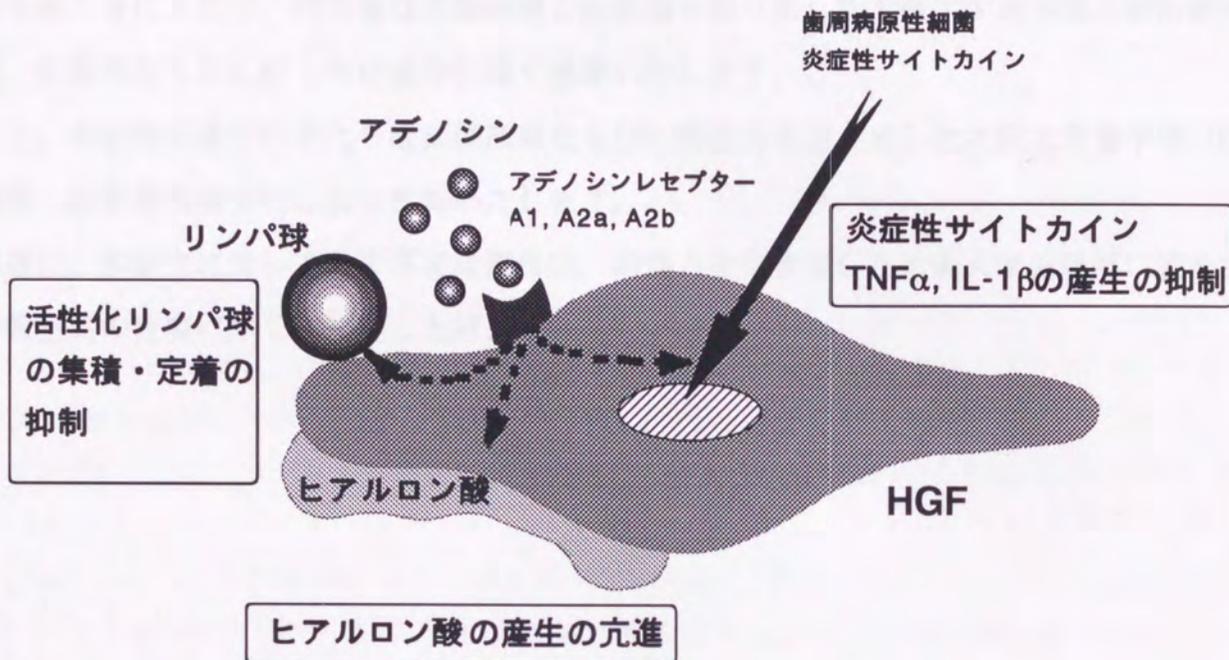


図 11 HGF 上のアデノシンレセプターを介したアデノシンの作用  
 アデノシンは HGF 上のアデノシンレセプターを介して、HGF 中の炎症性サイトカイン mRNA 発現を抑制し、また HA 合成酵素 mRNA 発現を亢進させた。さらに活性化リンパ球と HGF の接着を抑制することが明らかになった。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学歯学部口腔治療学講座  
岡田 宏教授ならびに村上伸也講師に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学歯学部口腔治療  
学講座 島袋善夫博士に心より感謝いたします。

最後に、本研究に対してさまざまな御援助、御協力を頂きました大阪大学歯学部口腔治療学講  
座の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Huleihel, M., Douvdevani, A., Segal, S., and Apte, R. N.(1990): Regulation of interleukin 1 generation in immune-activated fibroblasts. *Eur. J. Immunol.*, 20, 731-738
- 2) Le, J. M., Weinstein, D., Gubler, U., and Vilcek, J.(1987): Induction of membrane-associated interleukin 1 by tumor necrosis factor in human fibroblasts. *J. Immunol.*, 138, 2137-2142
- 3) Dalton, B. J., Connor, J. R., and Johnson, W. J.(1989): Interleukin-1 induces interleukin-1  $\alpha$  and interleukin-1  $\beta$  gene expression in synovial fibroblasts and peripheral blood monocytes. *Arthritis Rheum.*, 32, 279-287
- 4) Hassell, T. M.(1993): Tissues and cells of the periodontium. *Periodontology 2000*, 3, 9-38
- 5) Rios, M., and Williams, D.A.(1990): Systematic analysis of the ability of stromal cell lines derived from different murine adult tissues to support maintenance of hematopoietic stem cells *in vitro*. *J. Cell Physiol.*, 145, 434-443
- 6) Bucala, R., Ritchlin, C., Winchester, R., and Cerami, A.(1991): Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 173, 569-574
- 7) Elias, J. A., Reynolds, M. M., Kotloff, R. M., and Kern, J. A.(1989): Fibroblast interleukin 1  $\beta$ : synergistic stimulation by recombinant interleukin 1 and tumor necrosis factor and posttranscriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6171-6175
- 8) Murakami, S., Saho, T., Shimabukuro, Y., Isoda, R., Miki, Y., and Okada, H.(1993): Very late antigen integrins are involved in the adhesive interaction of lymphoid cells to human gingival fibroblasts. *Immunology*, 79, 425-433
- 9) Murakami, S., Shimabukuro, Y., Saho, T., Isoda, R., Kameyama, K., Yamashita, K., and Okada, H.(1993): Evidence for a role of VLA integrins in lymphocyte-human gingival fibroblast adherence. *J. Periodontal. Res.*, 28, 494-496
- 10) Murakami, S., Saho, T., Asari, A., Hino, E., Kasai, D., Shimabukuro, Y., and Okada, H.(1996): CD44-hyaluronate interaction participates in the adherence of T-lymphocytes to gingival fibroblasts. *J. Dent. Res.*, 75, 1545-1552
- 11) Murakami, S., Shimabukuro, Y., Saho, T., Hino, E., Kasai, D., Hashikawa, T., Hirano,

- H., and Okada, H.(1997): Immunoregulatory roles of adhesive interactions between lymphocytes and gingival fibroblasts. *J. Periodontal. Res.*, 32, 110-114
- 12) Murakami, S., Shimabukuro, Y., Miki, Y., Saho, T., Hino, E., Kasai, D., Nozaki, T., Kusumoto, Y. and Okada, H. (1994): Inducible binding of human lymphocytes to hyaluronate via CD44 does not require cytoskeleton but does require new protein synthesis. *J. Immunol.*, 152, 467-477
- 13) Murakami, S., and Okada, H. (1997): Lymphocyte-Fibroblast Interactions *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 8, 40-50
- 14) Cronstein, B. N., Naime, D., and Firestein, G.(1995): The antiinflammatory effects of an adenosine kinase inhibitor are mediated by adenosine. *Arthritis Rheum.*, 38, 1040-1045
- 15) Cronstein, B. N.(1994): Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J. Appl. Physiol.*, 76, 5-13
- 16) Green, P. G., Basbaum, A. I., Helms, C., and Levine., J. D.(1991): Purinergic regulation of bradykinin-induced plasma extravasation and adjuvant-induced arthritis in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 4162-4165
- 17) Cronstein, B. N., Eberle, M. A., Gruber, H. E., and Levin, R. I.(1991): Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2441-2445
- 18) Cronstein, B. N., Naime, D., and Ostad, E.(1993): The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an *in vivo* model of inflammation. *J. Clin. Invest.*, 92, 2675-2682
- 19) Cronstein, B. N., Naime, D., and Ostad, E.(1994): The antiinflammatory effects of methotrexate are mediated by adenosine. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 370, 411-416
- 20) Cronstein, B. N.(1995): The antirheumatic agents sulphasalazine and methotrexate share an anti-inflammatory mechanism. *Br. J. Rheumatol.*, 2, 30-32
- 21) Gadangi, P., Longaker, M., Naime, D., Levin, R. I., Recht, P. A., Montesinos, M. C., Buckley, M. T., Carlin, G., and Cronstein, B. N.(1996): The anti-inflammatory mechanism of sulfasalazine is related to adenosine release at inflamed sites. *J. Immunol.*, 156, 1937-1941
- 22) Parmely, M. J., Zhou, W. W., Edwards, C. K. d., Borcharding, D. R., Silverstein, R., and Morrison, D. C.(1993): Adenosine and a related carbocyclic nucleoside analogue

- selectively inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$  production and protect mice against endotoxin challenge. *J. Immunol.*, 151, 389-396
- 23) Bouma, M. G., Stad, R. K., van den Wildenberg, F. A., and Buurman, W. A.(1994): Differential regulatory effects of adenosine on cytokine release by activated human monocytes. *J. Immunol.*, 153, 4159-4168
- 24) Sajjadi, F. G., Takabayashi, K., Foster, A. C., Domingo, R. C., and Firestein, G. S.(1996): Inhibition of TNF- $\alpha$  expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J. Immunol.*, 156, 3435-3442
- 25) Hasko, G., Szabo, C., Nemeth, Z. H., Kvetan, V., Pastores, S. M., and Vizi, E. S.(1996): Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- $\alpha$ , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. *J. Immunol.*, 157, 4634-4640
- 26) Le Moine, O., Stordeur, P., Schandene, L., Marchant, A., de Groote, D., Goldman, M., and Deviere, J.(1996): Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes. *J. Immunol.*, 156, 4408-4414
- 27) Cronstein, B. N., Levin, R. I., Philips, M., Hirschhorn, R., Abramson, S. B., and Weissmann, G.(1992): Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J. Immunol.*, 148, 2201-2206
- 28) Firestein, G. S., Bullough, D. A., Erion, M. D., Jimenez, R., Ramirez Weinhouse, M., Barankiewicz, J., Smith, C. W., Gruber, H. E., and Mullane, K. M.(1995): Inhibition of neutrophil adhesion by adenosine and an adenosine kinase inhibitor. The role of selectins. *J. Immunol.*, 154, 326-334
- 29) Westphal, O., and Jann., K.(1965): Bacterial lipopolysaccharides.Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods Carbohydr. Chem.*, 5, 83-91
- 30) Murakami, S., Miyake, K., June, C. H., Kincade, P. W., and Hodes, R. J.(1990): IL-5 induces a Pgp-1 (CD44) bright B cell subpopulation that is highly enriched in proliferative and Ig secretory activity and binds to hyaluronate. *J. Immunol.*, 145, 3618-3627
- 31) Moser, G. H., Schrader, J., and Deussen, A.(1989): Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am. J. Physiol.*, 256, C799-806
- 32) Bouma, M. G., van den Wildenberg, F. A., and Buurman, W. A.(1996): Adenosine

inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, 270, C522-529

- 33) Stone, T. W.(1991): Receptors for adenosine and adenine nucleotides. *Gen. Pharmacol.*, 22, 25-31
- 34) Linden, J.(1994): Cloned adenosine A3 receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends Pharmacol. Sci.*, 15, 298-306
- 35) Boyle, D. L., Sajjadi, F. G., and Firestein, G. S.(1996): Inhibition of synoviocyte collagenase gene expression by adenosine receptor stimulation. *Arthritis Rheum.*, 39, 923-930
- 36) Murrison, E. M., Goodson, S. J., Edbrooke, M. R., and Harris, C. A.(1996): Cloning and characterisation of the human adenosine A3 receptor gene. *FEBS Lett.*, 384, 243-246
- 37) Resta, R., and Thompson, L. F.(1997): SCID: the role of adenosine deaminase deficiency. *Immunol. Today*, 18, 371-374
- 38) Weigel, P. H., Frost, S. J., McGary, C. T., and LeBoeuf, R. D.(1988): The role of hyaluronic acid in inflammation and wound healing. *Int. J. Tissue React.*, 10, 355-365
- 39) King, S. R., Hickerson, W. L., and Proctor, K. G.(1991): Beneficial actions of exogenous hyaluronic acid on wound healing. *Surgery*, 109, 76-84
- 40) Mast, B. A., Flood, L. C., Haynes, J. H., DePalma, R. L., Cohen, I. K., Diegelmann, R. F., and Krummel, T. M.(1991): Hyaluronic acid is a major component of the matrix of fetal rabbit skin and wounds: implications for healing by regeneration. *Matrix*, 11, 63-68
- 41) Mast, B. A., Haynes, J. H., Krummel, T. M., Diegelmann, R. F., and Cohen, I. K.(1992): *In vivo* degradation of fetal wound hyaluronic acid results in increased fibroplasia, collagen deposition, and neovascularization. *Plast. Reconstr. Surg.*, 89, 503-509
- 42) Mast, B. A., Diegelmann, R. F., Krummel, T. M., and Cohen, I. K.(1993): Hyaluronic acid modulates proliferation, collagen and protein synthesis of cultured fetal fibroblasts. *Matrix*, 13, 441-446
- 43) Suzuki, Y., and Yamaguchi, T.(1993): Effects of hyaluronic acid on macrophage phagocytosis and active oxygen release. *Agents Actions*, 38, 32-37
- 44) Ialenti, A., and Di Rosa, M.(1994): Hyaluronic acid modulates acute and chronic inflammation. *Agents Actions*, 43, 44-47

- 45) Dillon, P. W., Keefer, K., Blackburn, J. H., Houghton, P. E., and Krummel, T. M.(1994): The extracellular matrix of the fetal wound: hyaluronic acid controls lymphocyte adhesion. *J. Surg. Res.*, 57, 170-173
- 46) Vuorio, E., Einola, S., Hakkarainen, S., and Penttinen, R.(1982): Synthesis of underpolymerized hyaluronic acid by fibroblasts cultured from rheumatoid and non-rheumatoid synovitis. *Rheumatol. Int.*, 2, 97-102
- 47) Bartold, P. M., and Page, R. C.(1986): The effect of chronic inflammation on gingival connective tissue proteoglycans and hyaluronic acid. *J. Oral Pathol.*, 15, 367-374
- 48) Bjermer, L., Lundgren, R., and Hallgren, R.(1989): Hyaluronan and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*, 44, 126-131
- 49) Suresh, R., Puvanakrishnan, R., and Dhar, S. C.(1992): Alterations in human gingival glycosaminoglycan pattern in inflammation and in phenytoin induced overgrowth. *Mol. Cell Biochem.*, 115, 149-154
- 50) Salmon, J. E., Brogle, N., Brownlie, C., Edberg, J. C., Kimberly, R. P., Chen, B. X., and Erlanger, B. F.(1993): Human mononuclear phagocytes express adenosine A1 receptors. A novel mechanism for differential regulation of Fc gamma receptor function. *J. Immunol.*, 151, 2775-2785
- 51) Firestein, G. S., Boyle, D., Bullough, D. A., Gruber, H. E., Sajjadi, F. G., Montag, A., Sambol, B., and Mullane, K. M.(1994): Protective effect of an adenosine kinase inhibitor in septic shock. *J. Immunol.*, 152, 5853-5859
- 52) Felsch, A., Stocker, K., and Borchard, U.(1995): Phorbol ester-stimulated adherence of neutrophils to endothelial cells is reduced by adenosine A2 receptor agonists. *J. Immunol.*, 155, 333-338
- 53) Walker, B. A., Rocchini, C., Boone, R. H., Ip, S., and Jacobson, M. A.(1997): Adenosine A2a receptor activation delays apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.*, 158, 2926-2931
- 54) Bouma, M. G., Jeunhomme, T. M., Boyle, D. L., Dentener, M. A., Voitenok, N. N., van den Wildenberg, F. A., and Buurman, W. A.(1997): Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J. Immunol.*, 158, 5400-5408

