

Mini Review

炎症歯周組織における内因性アデノシンの抗炎症作用の解析—歯肉線維芽細胞におけるアデノシンレセプター活性化の制御機構—

橋川智子, 島袋善夫, 竹立匡秀, 寺倉まみ, 村上伸也

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学

Regulation of adenosine receptor engagement by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and ecto-adenosine deaminase by human gingival fibroblasts

Adenosine(Ado) has various biological effects on human gingival fibroblasts(HGF) and epithelial cells, that are closely associated with inflammation. However, little is known regarding mechanisms by which Ado action is regulated. In this study we examined the involvement of CD73 and ecto-adenosine deaminase(ADA) in metabolizing Ado and thus regulating AdoR activation in HGF. Adenosine production was observed following the addition of 5'-AMP, a substrate of CD73-associated ecto-5'-nucleotidase. Moreover, addition of 5'-AMP to HGF resulted in the elevation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Flow cytometric analysis revealed that ecto-ADA expression on HGF could be increased by pretreatment with exogenous ADA. However, this maximum expression of ecto-ADA did not lead to a significant increase in metabolism of exogenously added extracellular Ado. Interestingly, however, the cAMP response to Ado generated from 5'-AMP via CD73 was significantly decreased by the pretreatment of HGF with exogenous ADA and this inhibitory effect was reversed by the specific ADA inhibitor 2'-deoxycoformycin. These results suggest that ecto-ADA, which can be anchored to CD26 on HGF, has the potential to metabolize CD73-generated Ado in the microenvironmental milieu and that this plays a critical role in the regulation of AdoR activation.

Rec.11/8/2004, Acc.12/15/2004, pp181-185

Tomoko Hashikawa, Yoshio Shimabukuro, Masahide Takedachi, Mami Terakura and Shinya Murakami

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

Key words adenosine, adenosine receptor, adenosine deaminase, CD73, CD26

はじめに

プリン代謝産物の一つであるアデノシン(adenosine; Ado)は, 細胞内外のアデノシンモノリン酸(adenosine 5'-monophosphate; AMP)より 5'-nucleotidase を触媒と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, また一方では, アデノシンデアミナーゼ(ADA)によりイノシンへ, 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¹⁾. しかしながら, 最近の報告から, Ado は単な

る代謝産物として存在するだけでなく, 細胞膜上に発現するアデノシンレセプター(AdoR)を介して虚血性疾患, 低酸素症, 炎症性疾患並びに創傷治癒の制御等, 様々な生物学的活性を有することが明らかにされつつある²⁾. とりわけ Ado は, 抗炎症メディエーターの一つとして重要な機能を果していることが *in vitro*, *in vivo* の実験結果から報告されている. AdoR には A1, A2a, A2b, A3 の 4 つのサブタイプの存在が報告されているが, その中でも A2a レセプターは炎症性サイトカイン刺激により, その発現

が上昇すること³⁾, さらにA2aレセプターノックアウトマウスでは, 野生型に比べ各種炎症疾患モデルにおいて, より重篤な炎症反応が惹起されるばかりか, 創傷治癒過程において細胞外基質の産生が抑制され, さらに新生血管数が減少することから, 同レセプターの活性化が炎症反応や創傷治癒過程に積極的に関与していることが示唆されている^{4,5)}.

歯周病はデンタルプラークからの慢性的な細菌刺激により宿主に持続的な炎症反応が惹起された結果, 歯周組織の破壊が進行していくものと考えられている. われわれの研究室では歯周病の病巣局所においてAdoが如何なる炎症反応制御機能を担っているかを解明することを目的とし, 歯周組織の主な構成細胞の一つである歯肉線維芽細胞(HGF)に対するAdoの作用を検討してきた. その結果, AdoR活性化が, HGFの細胞内cAMP産生を亢進すること, IL-6, IL-8といった炎症性サイトカインの産生を亢進する一方で, LPS刺激によって誘導されるTNF α 発現を抑制すること, またICAM-1の発現を抑制することによりリンパ球との異種細胞間接着を阻害すること, さらに創傷治癒促進に関与すると報告されているヒアルロン酸の合成酵素(hyaluronan synthesis; HAS)の発現を上昇させることなどを明らかにしてきた⁶⁻⁸⁾.

Adoは生体内でその代謝が極めて速いこと⁹⁾から, AdoR活性化を介した細胞機能の解析には, AdoRアゴニストおよびアンタゴニストを用いた手法が従来から多く用いられている. しかしながら, *in vivo*におけるAdoR活性化を介した細胞機能制御機構を解析するためには, 内因性Adoの代謝機構についての情報が不可欠であると考えられるが, その情報は未だ十分に得られておらず, 歯周組織における情報は皆無である. Adoはその産生に関与する分子としてCD73分子, 分解に関与する分子としてADAの存在が知られている. CD73分子は同分子の有する5'-nucleotidase活性によってAMPを脱リン酸化することによりAdo産生に関与¹⁰⁾し, ADAはAdoからアンモニアを遊離することによりイノシンに分解する細胞内酵素として知られていたが, 近年ヒトリンパ球においてCD26分子の細胞外ドメインにADAが結合し得ること¹¹⁾が示され, 細胞外にもecto-ADAとして存在し得ることが示唆されている.

そこで本稿では, HGFを用いて, 細胞外Ado産生に関与するCD73分子および分解に関与するecto-ADAの両酵素に着目し, 細胞外Ado濃度調節機構について検討し, さら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も検討を加えたので, その結果を紹介する.

CD73によるAdoRの活性化制御¹²⁾

HGF上のCD73分子発現状況についてはフローサイトメトリーおよび免疫染色法によって同発現が確認された. 次にHGF上のCD73分子が細胞外Ado産生に関与しているか否かを検討するために, 5'-nucleotidaseの阻害剤である α , β -methylene adenosine 5'-diphosphate(AOPCP)の存在, 非存在下にてHGFにAMPを添加し, 培養上清中のAdo濃度を測定した. その結果, HGFにAMPを添加することにより培養上清中のAdo濃度は上昇し, その上昇はAOPCPの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分子を介してAdoが産生される可能性が強く示唆された. そこでCD73分子を介して産生されたAdoがAdoRを活性化するか否かを検討するために, HGF培養上清中にAMPを添加することにより, 細胞内cAMP濃度とHAS mRNA発現に変化が誘導されるか否かを検討した. その結果, AMP添加によってHGFの細胞内cAMPの濃度上昇が認められ, その上昇はAOPCP添加によって濃度依存的に抑制された. また, AMP添加によるHGF内cAMP産生誘導はAdoRアンタゴニストであるXAC存在下ではほぼ完全に阻害された. さらにHGF中のHAS mRNA発現はAdo添加の際と同様にAMP添加によっても上昇したが, その上昇はXACを同時に添加することにより抑制された. これらの結果から, HGF上のCD73分子を介してAMPより産生された細胞外AdoがAdoR活性化に関与している可能性が強く示唆された.

CD26遺伝子導入株を用いたecto-ADAによるAdoRの活性化制御

細胞外AdoによるAdoRの活性化がCD26分子に結合したecto-ADAにより抑制されるか否かを検討するために, ヒトCD26遺伝子導入Molt4(ヒト急性リンパ芽球性白血病細胞株)を作製した¹³⁾. CD26とecto-ADAの局在を抗CD26抗体および抗ADA抗体を用いて二重染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡にて解析した結果, 同細胞上において, CD26分子の発現を確認することができたが, ecto-ADA発現はほとんど確認することができなかった. しかしながら, 外来性のADAとしてJurkat(ヒト急性T細胞性白血病細胞株)のcell lysate(Jurkat lysate)あるいはヒトトリコンビナントADAを添加したところ, 同細胞上にADAが検出され, さらにその局在はCD26分子の位置と一致した(図1). これらのことから, CD26分子にADAが結合しうることが確認され, さらに外来性ADAとしてJurkat lysateを添加することにより, ecto-ADA量が増加することも明らかとなった. CD26遺伝子導入Molt4中の細胞内cAMP濃度はAdo添加により上昇することをあらかじめ確認し

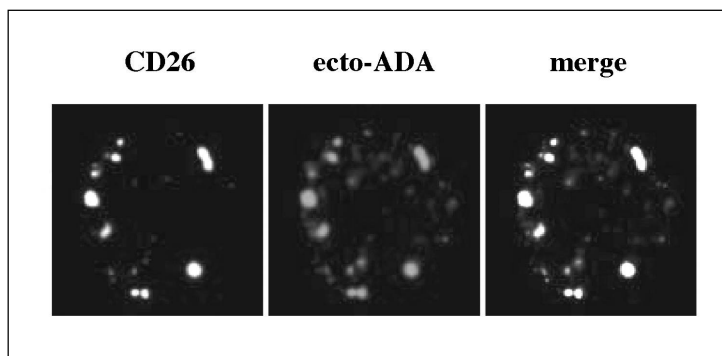


図1 CD26とecto-ADAの局在の一致(文献13より引用)
ヒト CD26 遺伝子導入 Molt4 上の CD26 と ecto-ADA の局在を抗 CD26 抗体および抗 ADA 抗体を用いて二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて解析した。

ている。そこで、もしも ecto-ADA が細胞外 Ado をイノシンへ分解することにより Ado による AdoR 活性化を抑制するならば、Ado 添加による細胞内 cAMP 濃度の上昇は、同細胞を Jurkat lysate にて処理し、ecto-ADA 量を増加させることにより抑制されるのではないかと作業仮説を立てて実験を行った。その結果、同細胞を Jurkat lysate にて処理後 Ado を添加することにより、未処理時に比べ細胞内 cAMP 濃度は減少したが、その減少は ADA 阻害剤存在下では認められなかった。このことから、CD26 分子に結合した ecto-ADA が細胞外 Ado による AdoR 活性化を抑制する可能性が示唆された。

HGF における ecto-ADA による AdoR の活性化制御

上記モデルシステムを用い、HGF における ecto-ADA による AdoR 活性化制御機構について同様の検討を加えた。HGF 上における CD26 分子の発現は認めることができたが、ecto-ADA の発現はほとんど確認することができなかった。しかしながら、この ecto-ADA の発現量は、外来性 ADA として Jurkat lysate を添加することにより増加を認めた。CD26 と ecto-ADA 両分子の局在は、フローサイトメトリーにて二重染色を行うことにより一致することを確認した。Ado 添加による HGF 中の cAMP 濃度の上昇は ecto-ADA の発現量を増加させることにより減少し、またこの減少は ADA 阻害剤を同時に添加することにより阻害された。さらに HGF 中の HAS mRNA の発現も Ado 添加により増強され、その増強は ecto-ADA の発現量を増加させることにより抑制された。このことより HGF 上の ecto-ADA が AdoR 活性化を抑制する可能性が強く示唆された。興味深いことに、Ado を添加し 5 分後の HGF 培養上清中の Ado 濃度は、HGF 上の ecto-ADA 量を増加させることにより、わずかに減少する傾向は認められたものの、統計学的に

有意な差は認められなかった。このことから、ecto-ADA は AdoR 近傍の Ado 濃度のみを調節し、AdoR 活性化の制御に関与しているのではないかと考察される。

HGF における CD73 および ecto-ADA による AdoR 活性化制御

AMP 添加により CD73 分子を介して産生される Ado による AdoR 活性化が ecto-ADA によって抑制されるか否かについて検討を加えた。その結果、AMP 添加による HGF の細胞内 cAMP 濃度上昇は、Ado 添加の場合と同様に、HGF 上の ecto-ADA 量を増加させることにより抑制された。さらに、ADA 特異的阻害剤存在下では、この抑制効果は阻害された。同様に、HGF 中の HAS mRNA 発現も AMP 添加によりその発現が増加し、この発現増加は HGF 上の ecto-ADA 量を増加させることにより抑制された。さらに、ADA 特異的阻害剤存在下では、この抑制効果は阻害された(図2)。以上のことから、CD73 分子、AdoR、ecto-ADA が一つの機能単位として Ado 刺激による HGF の生物学的機能発現を制御している可能性が明らかとなった(図3)。

Ado の抗炎症効果を期待した host modulating drug 開発への期待

Ado が抗炎症作用を有するとの知見は集積されつつあるが、Ado 自体の臨床応用は限定されている。その理由としては、Ado の代謝が極めて急速であるため、その作用が短時間で消失すること⁹⁾や、薬理作用を発揮するほどの大量の Ado あるいは AdoR アゴニストの投与は全身的な副作用を引き起こすことが危惧されるためである。そこで近年、Ado の細胞内への取り込みを阻害することにより¹⁴⁾、あるいは ADA 阻害剤を用いて Ado の分解を抑制することにより¹⁵⁾、局所の Ado 濃度を上昇させ、AdoR 活性化を促進し抗炎症効果を得ようとする試みがなされつつある。現在の歯周治療ではスケーリング・ルートプレーニングといっ

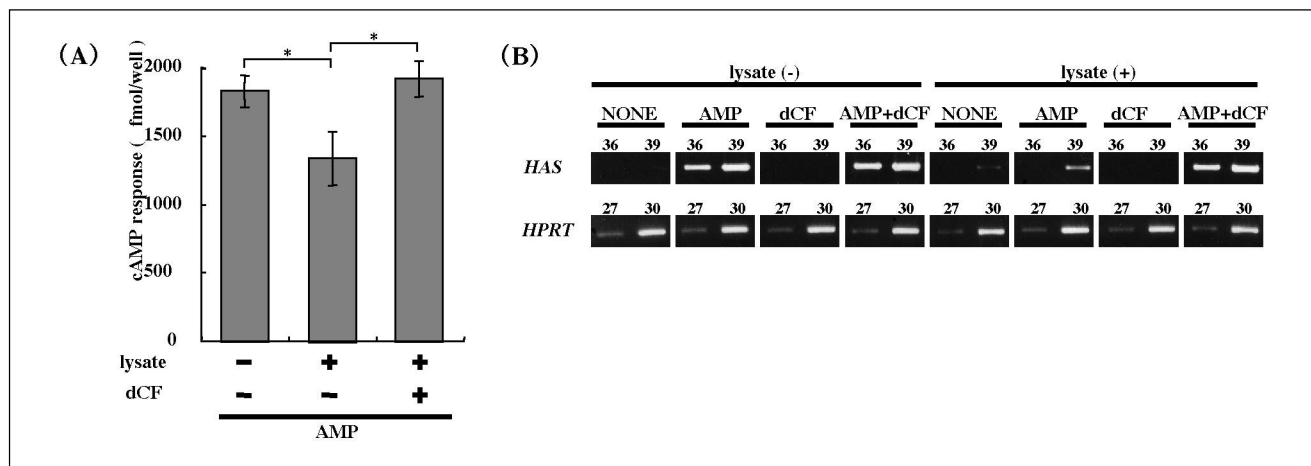


図2 HGF上のCD73分子およびecto-ADAによるAdoR活性化制御

(A) HGFをJurkat lysateにて処理あるいは未処理後, ADA阻害剤の存在または非存在下にてAMPを添加し, 細胞内cAMP濃度を測定した。*は $p < 0.05$ にて有意差があることを示す。

(B) HGFをJurkat lysateにて処理あるいは未処理後, ADA阻害剤の存在または非存在下にてAMPを添加し, HGF中のHAS mRNAの発現をRT-PCR法を用いて検出した。図中の数字は, それぞれのPCRサイクル数を表す。

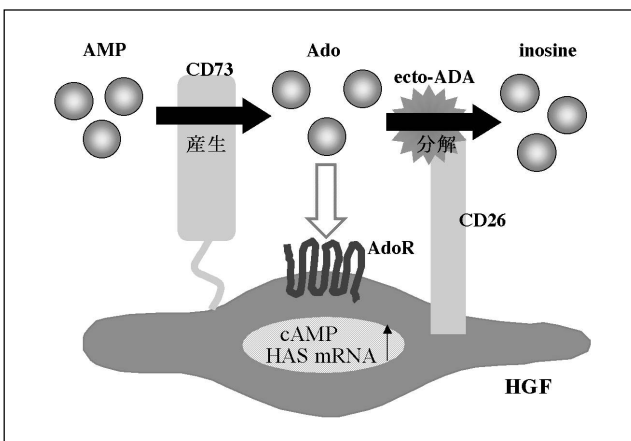


図3 HGFの細胞外Ado代謝メカニズムとAdoR活性化制御機構

HGFのAdoRはCD73分子を介したAdo産生系により活性化されるが, 一方でCD26分子に結合したecto-ADAによる細胞外Adoの分解により活性化が抑制されている可能性が明らかとなった。

たmechanical debridementがその中心をなしているのが実状であり, 生体反応を制御することを目的とした歯周病治療薬は未だ開発されていない。今後, 実験的歯周病モデルなどを用いることにより, 炎症歯周組織におけるAdoの炎症反応制御機構について, さらにAdoの抗炎症効果を期待した歯周病治療薬の開発の可能性について詳細な検討がなされることが期待される。

文献

- 1) Cronstein BN, Naime D, Firestein G: The anti-inflammatory effects of an adenosine kinase inhibitor are mediated by adenosine. *Arthritis Rheum*, 38: 1040-1045, 1995.
- 2) Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50: 413-492, 1998.
- 3) Khoa ND, Montesinos MC, Reiss AB, Delano D, Awadallah N, Cronstein BN: Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A_{2A} receptors in human monocytic THP-1 cells. *J Immunol*, 167: 4026-4032, 2001.
- 4) Montesinos MC, Desai A, Chen JF, Yee H, Schwarzschild MA, Fink JS, Cronstein BN: Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A_{2A} receptors. *Am J Pathol*, 160: 2009-2018, 2002.
- 5) Ohta A, Sitkovsky M: Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, 414: 916-920, 2001.
- 6) Murakami S, Terakura M, Kamatani T, Hashikawa T, Saho T, Shimabukuro Y, Okada H: Adenosine regulates the production of interleukin-6 by human gingival fibroblasts via cyclic AMP/protein kinase A pathway. *J Periodontal Res*, 35: 93-101, 2000.
- 7) 橋川智子, 村上伸也, 野崎剛徳, 佐保輝之, 島袋善夫, 岡田 宏: 歯肉線維芽細胞のヒアルロン酸合成酵素発現に及ぼすアデノシンの影響. *日本炎症学会雑誌*, 20 (3): 231-235, 2000.

- 8) Murakami S, Hashikawa T, Saho T, Takedachi M, Nozaki T, Shimabukuro Y, Okada H: Adenosine regulates the IL-1beta-induced cellular functions of human gingival fibroblasts. *Int Immunol*, 13: 1533-1540, 2002.
- 9) Moser GH, Schrader J, Deussen A: Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol*, 256: C799-C806, 1989.
- 10) Zimmermann H: 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J*, 285: 345-365, 1992.
- 11) Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C: Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science*, 261: 466-469, 1993.
- 12) Hashikawa T, Takadachi M, Terakura M, Saho T, Yamada S, Thompson LF, Shimabukuro Y, Murakami S: Involvement of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in adenosine generation by human gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 82: 888-892, 2003.
- 13) Hashikawa T, Hooker SW, Maj JG, Knott-Craig CJ, Takedachi M, Murakami S, Thomson LF: Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *FASEB J*, 18: 131-133, 2004.
- 14) 野地 徹, 唐沢 啓, 日下英昭: 炎症に対する新規アデノシン取り込み阻害薬 KF24345 の有効性に関する薬理学的研究. *日本薬理学雑誌*, 122: 121-134, 2003.
- 15) Adanin S, Yalovetskiy IV, Nardulli BA, Sam AD, Jonjev ZS, Law WR: Inhibiting adenosine deaminase modulates the systemic inflammatory response syndrome in endotoxemia and sepsis. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 282: R1324-R1332, 2001.