



図4 1型糖尿病患者(26歳)にみられた重度歯周病(文献⁹⁾より引用改変)



図5 2型糖尿病患者(52歳)にみられた重度歯周炎(文献⁹⁾より引用改変)

糖代謝異常に起因して生体防御機構の破綻が生じる糖尿病と歯周病との関連性が以前から強く指摘されている⁵⁾⁶⁾。たとえば1型糖尿病患者は、同年代の健常者に比べ歯周炎の罹患率が高いとする報告⁷⁾や歯周治療後の再発が生じやすいとの報告⁸⁾がある。図4は、26歳の重度歯周炎に罹患した1型糖尿病患者の口腔内およびX線写真である。1型糖尿病の罹患に加え、口腔清掃などのプラークコントロールが十分行われなかったため、このような著しい炎症所見を示す重度の歯周炎に罹患し、高度の歯槽骨吸収を生じて多数歯の抜去に至ったものと考えられる⁹⁾。また、2型糖尿病と歯周病の発症率との関係については、2型糖尿病を高い頻度で発症する米国アリゾナ州の原住民であるピマインディアンを対象にした研究¹⁰⁾で、2型糖尿病患者の歯周病発症率が非糖尿病患者に比べ2.6倍高いことが示されている。このように、糖尿病患者は1型、2型にかかわらず、健常者と比較して有意に歯周病を発症する頻度が高いといえる。

また、糖尿病における血糖コントロールの状態と歯周病との関連性についても多くの報告がなされている。たとえば、血糖コントロールの悪い1型糖尿病患者は、血糖コントロールの良

好な患者に比べ、歯槽骨吸収が大きいことが示されている¹¹⁾¹²⁾。また2型糖尿病患者でも同様に、血糖コントロールが不良な患者は、非糖尿病患者や血糖コントロールの良好な患者と比較して、歯周組織破壊や歯周炎の罹患率が高いことが示されている¹³⁾¹⁴⁾。また、2型糖尿病患者を対象に歯肉溝浸出液中の炎症性サイトカインであるinterleukin-1 β (IL-1 β)レベルを測定したところ、血糖コントロール不良患者では血糖コントロール良好患者の約2倍のIL-1 β 濃度が検出され¹⁵⁾、糖尿病における血糖コントロールが歯周病の炎症状態に影響を与えている可能性が示唆されている。さらに、糖尿病の罹患期間の歯周病への影響についても、糖尿病の1型、2型にかかわらず、糖尿病の罹患期間が長くなるに従い歯周組織破壊が進行し、歯周病が悪化することが示されている¹⁶⁾¹⁷⁾。そして近年、糖尿病は歯周病に対するリスク因子であることを示すメタアナリシスの結果が報告¹⁸⁾されていることから、糖尿病は歯周病の進行に明らかに関与していると考えられる。図5は52歳の歯周炎患者の口腔内写真である。初診から長期間経過後に重度の2型糖尿病であることが判明し糖尿病の治療を開始したが、長期にわたり血糖のコントロールが十

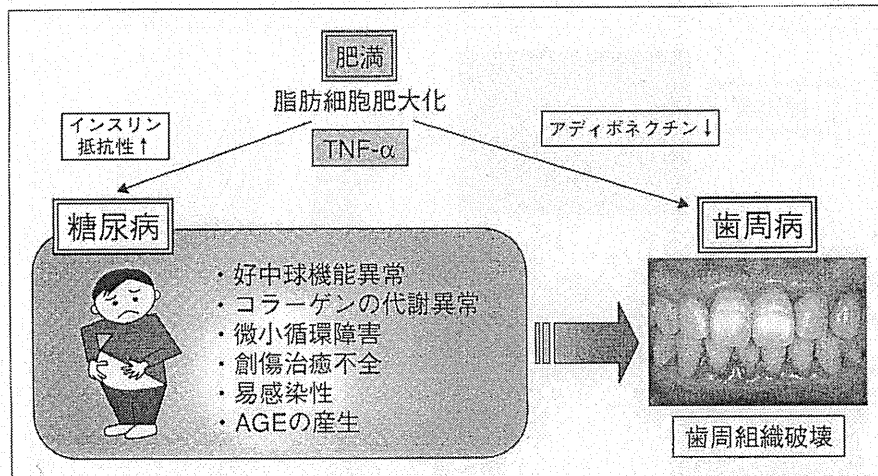


図6 糖尿病が歯周病の病態に影響を与えるメカニズム(想定図)

分行われていなかったため、歯周治療により炎症の軽減は認められたものの、約2年後には多くの歯を喪失することとなったと考えられる⁹⁾。

2. 糖尿病が歯周病の病態に影響を与えるメカニズム

糖尿病患者には、好中球機能異常、コラーゲンの代謝異常、微小循環障害による創傷治癒不全や易感染性などが認められることが多く、糖尿病に併発した宿主の免疫応答の低下や結合組織の代謝異常が、歯周病の重症化をもたらすものと考えられる。近年、糖尿病に伴う高血糖状態に伴いコラーゲンなどの蛋白質が非酵素的に糖化・修飾されて産生される最終糖化産物(advanced glycation end product; AGE)の歯周病局所病変形成への関与が注目されている。すなわち、歯周組織において結合組織のコラーゲンがAGE化されると、歯肉組織中の微小血管や結合組織の劣化に加え歯根膜線維の脆弱化が生じる。さらに、AGE化され変性したコラーゲンはマクロファージなどの食細胞に貪食され、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor- α ; TNF- α)やinterleukin-6(IL-6)などの炎症性サイトカインや活性酸素が産生される。そして、これらの炎症性サイトカインがコラーゲナーゼ活性の亢進や破骨細胞の活性化を誘導したり、活性酸素が直接歯周組織に為害作用を発揮することにより歯周組織破壊が進行するのではないかと考えられている。前記の図4に示した1型糖尿病患者にも、好中球遊走能や貪食能に著しい低下が認められ、糖尿病に併発した免疫応答の低下が著明な歯周組織破壊に関与したものと考えられる。また近年、

肥満の程度が大きい人ほど歯周病に罹患しやすいことが報告され、内臓脂肪の蓄積により生じるメタボリックシンドロームが歯周病の発症に関与するのではないかと考えられるようになってきた¹⁰⁾。糖尿病、特に2型糖尿病患者は肥満を伴っているケースが多く、肥満により脂肪細胞が肥大化しTNF- α の産生量が増加して、直接的に歯槽骨吸収を惹起し歯周病を増悪させたり、TNF- α が誘導するインスリン抵抗性の亢進による糖尿病の増悪を介して、間接的に歯周病のリスクを増大させている可能性が示唆されている。さらに近年、肥満が脂肪細胞からのアディポネクチンの分泌を抑制し、結果として歯周組織の炎症が亢進することも、肥満を伴う糖尿病患者における歯周病発症のメカニズムとして注目されている(図6)。

歯周病の糖尿病への影響

1. 全身的な細菌感染源や慢性炎症巣としての歯周病

歯周病による炎症やその原因となる細菌感染は、局所に限局した小規模なものと考えがちであるが、実際にはかなり大きな炎症巣や細菌感染源が存在する。このことは、歯周病の実際のモデルを想定すると理解しやすい。通常成人は智歯(親知らず)を除くと28本の歯を有している。その28本の歯の周囲に5mmの歯周ポケットが形成された状態を想定してみると、ポケットに面する歯肉上皮の面積を合計すると大人の手のひらに相当する約72cm²にも及ぶ(図7)。そして、そのポケット上皮に接するポケット内には、プ

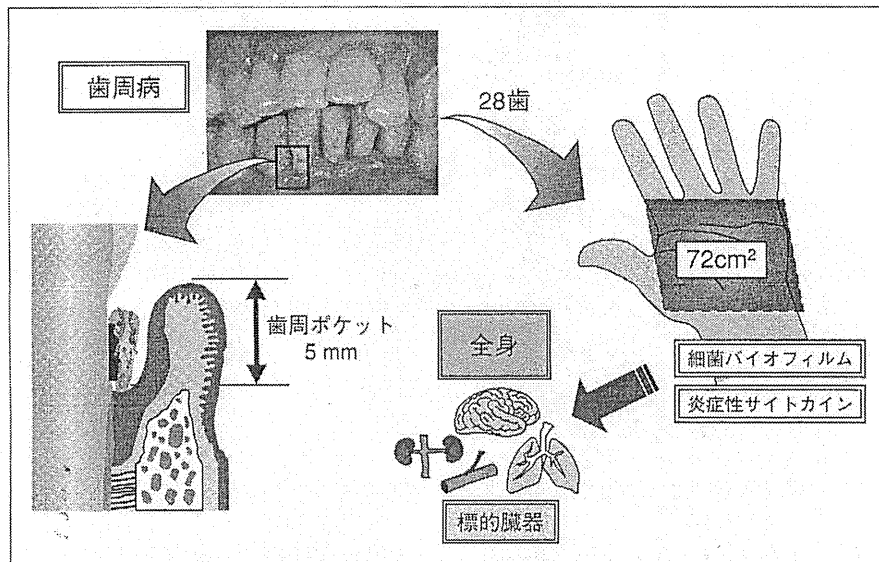


図7 慢性炎症巣や細菌感染源としての歯周病(文献²⁰⁾より引用改変)

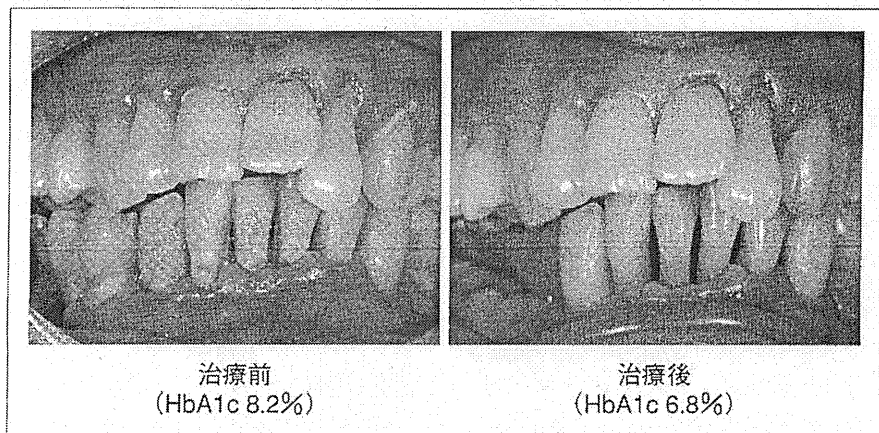


図8 2型糖尿病患者(56歳)にみられた重度歯周炎

ラーク 1 mgあたり $10^8 \sim 10^9$ 個もの高密度の歯周病細菌がバイオフィルムを形成して生息し炎症を惹起しているのであるから、歯の周囲に限局した疾患である歯周病のイメージより、はるかに大きな慢性炎症巣と細菌感染源が恒常的に存在していることになる²⁰⁾。その結果、歯周病原菌やその菌体成分、そしてそれに対する免疫・炎症反応により歯周病局所の産生されるTNF- α などのサイトカインが血行性に遠隔の標的臓器に到達し影響を及ぼす可能性が示唆されている。

2. 糖尿病のリスク因子としての歯周病

近年、糖尿病から歯周病へ方向とは逆に、糖尿病に対する歯周病の影響を検討するため、糖尿病患者に歯周治療を行い糖尿病の病状の変化を検討しようとする研究が盛んに行われている。その結果、それらの研究の多くで、ヘモグ

ロビンA1c(HbA1c)が歯周治療を行うことにより低下することが報告され、歯周病が糖尿病のリスクファクターの一つとなる可能性が示唆されている²¹⁾。この「歯周病の治療は糖尿病の病態を改善するのか?」という臨床上の疑問に対して、2型糖尿病患者を対象にメタ解析を用いて検討したシステマティックレビューが2010年に報告されている²²⁾。このシステマティックレビューでは、歯周治療を受けた糖尿病患者(介入群)と歯周治療を受けない糖尿病患者(対照群)のHbA1cなどの糖尿病の臨床指標を3か月以上観察し比較した5つの臨床研究が取り上げられている。そして、5つの研究すべての研究で歯周治療を受けた介入群のほうが対照群に比べてHbA1c値の減少量(Δ HbA1c: 0.05~1.17%)が大きく、そのうち2つの研究では歯周治療を受けた群が対照

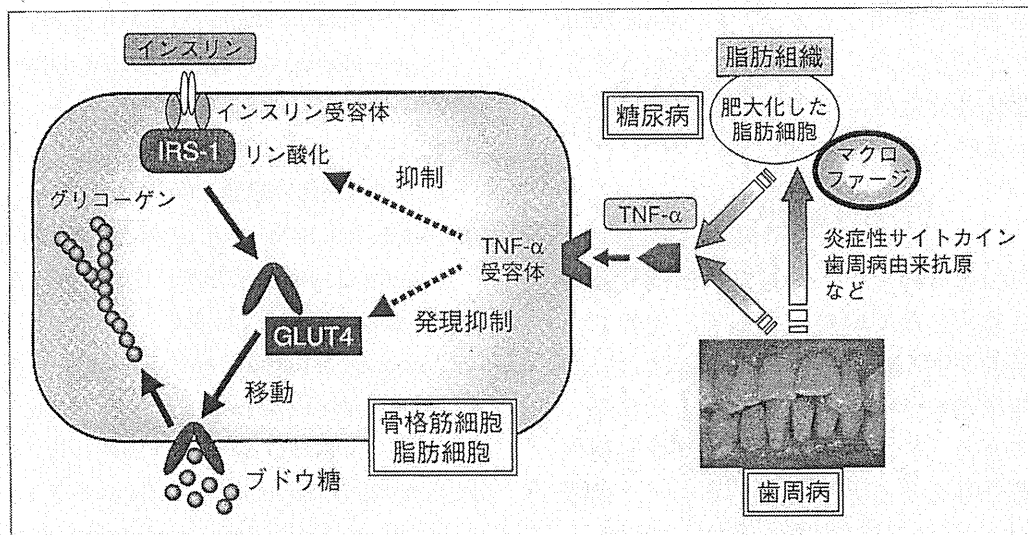


図9 歯周病が糖尿病の病態に影響を与えるメカニズム(想定図)

群に比べて有意にHbA1c値が減少した。またメタ解析を行った結果、歯周治療を受けた介入群のほうが未治療の対照群に比べて平均0.4%のHbA1c値(95%信頼区間: 0.04~0.77%)の減少が認められることが示されている。図8は、コントロールが不良であった2型糖尿病患者の歯周治療前後の口腔内写真である。治療前のHbA1c値は8.2%であったが、糖尿病の教育入院と保存不可能な歯の抜歯を含めて歯周治療を行ったところ、歯周組織の炎症状態が改善し、HbA1c値も6.8%に低下した。前記のシステマティックレビューの結果をはじめ、これまでのエビデンスから現段階では、歯周治療を行うことにより糖尿病の病態が改善されると考えられる。しかしながら、研究間の結果にばらつきが大きく、このことをより明確にするためには、さらに大規模なランダム化比較試験が必要である。

3. 歯周病が糖尿病の病態に影響を与えるメカニズム(図9)

現在、2型糖尿病患者において肥満が病態の悪化を助長することから、脂肪組織が産生するTNF- α がインスリン抵抗性を誘導する原因の一つではないかと推察されている²³⁾。すなわち、インスリンは筋肉、脂肪組織および肝臓の糖代謝に大きな影響を与える。特に骨格筋や脂肪組織では、インスリンが筋肉細胞や脂肪細胞のインスリン受容体に結合すると、受容体の下流にあるインスリン受容体基質-1 (insulin receptor substrate-1 ;

IRS-1)のチロシン残基がリン酸化されインスリンシグナルが細胞内へと伝達され、glucose transporter 4 (GLUT4)と呼ばれるブドウ糖輸送担体が細胞質から細胞膜上に移動(トランスロケーション)し、細胞外のブドウ糖を細胞内に取り込み血糖を低下させる。しかしながら脂肪組織が産生するTNF- α は、骨格筋の筋肉細胞や脂肪組織の脂肪細胞で、その受容体を介してIRS-1のセリン残基をリン酸化することでIRS-1のチロシン残基のリン酸化を阻害し、インスリンのシグナル伝達を抑制する。その結果、GLUT4の細胞膜上へのトランスロケーションが阻害され、細胞外のブドウ糖の細胞内への取り込みが低下する。またTNF- α は、直接GLUT4の発現を抑制し、ブドウ糖の細胞内への取り込みを抑制してインスリン抵抗性を亢進させると考えられている。

同様に歯周病においても、歯周病に罹患した歯周組織でTNF- α が産生されることから、そのTNF- α が骨格筋や脂肪組織における糖代謝に影響を与え、インスリン抵抗性を亢進させ糖尿病を悪化させることが、歯周病が糖尿病に影響を与えるメカニズムの一つと考えられている。しかしながら、歯周組織で産生されるTNF- α だけで歯周病の糖尿病に対する影響を説明することは困難である。そのため肥満と歯周病、糖尿病との関連性を考慮し、歯周病細菌由来抗原や歯周病局所で産生される炎症性サイトカインが血行性に脂肪細胞やマクロファージを刺激しTNF- α をは

はじめとするさまざまなサイトカインの放出を誘導し、結果としてインスリン抵抗性を亢進させて糖尿病を悪化させたのではないかとする説が提唱されている²³⁾。

おわりに

以前から歯周病の発症や進行は糖尿病の影響を受けると考えられていた。そして、そのメカニズムの詳細が明らかになるに従い、最近では歯周病が糖尿病の合併症の一つに数えられるようになってきた。一方近年、歯周病が糖尿病の病態に影響を与えることが明らかとなり、糖尿病と歯周病が双方向的に影響を及ぼしていることを示唆するエビデンスが蓄積されている。今後さらに、歯周病と糖尿病との相互関係に関する双方向的知見を集積・理解することにより、歯周病と糖尿病双方の病態改善が期待される。

謝辞：図表の作成に協力していただいた小笹国雄博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 村上伸也, 山崎和久, 大石慶二, ほか. Q1: 糖尿病になると歯周病になりやすいか? 日本歯科医学会・監修. 糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン. 東京: 日本歯周病学会; 2009. p. 12.
- 2) Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 1997; 14: 9.
- 3) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318.
- 4) Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol* 1999; 4: 54.
- 5) Benveniste R, Bixler D, Conneally PM. Periodontal disease in diabetics. *J Periodontol* 1967; 38: 271.
- 6) Finestone AJ, Boorujy SR. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Diabetes* 1967; 16: 336.
- 7) Nishimura F, Kono T, Fujimoto C, et al. Negative effects of chronic inflammatory periodontal disease on diabetes mellitus. *J Int Acad Periodontol* 2000; 2: 49.
- 8) Tervonen T, Karjalainen K. Periodontal disease related to diabetic status. A pilot study of the response to periodontal therapy in type 1 diabetes. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 505.
- 9) 北村正博. 全身から歯周へ, 歯周から全身へ. 大阪府歯科医師会雑誌 2001; 610: 12.
- 10) Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, et al. Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care* 1990; 13: 836.
- 11) Tervonen T, Karjalainen K, Knuutila M, Huuonen SJ. Alveolar bone loss in type 1 diabetic subjects. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 567.
- 12) Seppälä B, Seppälä M, Ainamo J. A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1993; 20: 161.
- 13) Taylor GW, Burt BA, Becker MP, et al. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol* 1998; 3: 30.
- 14) Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol* 2002; 30: 182.
- 15) Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 β and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol* 2004; 75: 1203.
- 16) Al-Shammari KF, Al-Ansari JM, Moussa NM, et al. Association of periodontal disease severity with diabetes duration and diabetic complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *J Int Acad Periodontol* 2006; 8: 109.
- 17) Cerda J, Vázquez de la Torre C, Malacara JM, Nava LE. Periodontal disease in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). The effect of age and time since diagnosis. *J Periodontol* 1994; 65: 991.
- 18) Khader YS, Dauod AS, El-Qaderi SS, et al. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications* 2006; 20: 59.
- 19) 村上伸也, 北村正博. 歯周病とメタボリックシンドローム. 鴨井久一, 花田信弘, 佐藤 勉, 野村義明・編. *Preventive Periodontology 臨床を支え*

- るサイエンスを知る・唾液検査を活用する・生活習慣病を予防する。東京：医歯薬出版；2007。p. 123.
- 20) 北村正博，村上伸也。総論一歯周病と全身疾患。医学のあゆみ 2010；232：161.
- 21) 村上伸也，山崎和久，大石慶二，ほか。Q1：歯周病の治療をすると糖尿病の状態が改善するか？日本歯科医学会・監修。糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン。東京：日本歯周病学会；2009。p. 25.
- 22) Teeuw WJ, Gerdes VE, Loos BG. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients : a systematic review and meta-analysis. Diabetes Care 2010 ; 33 : 421.
- 23) 西村英紀，曾我賢彦。歯周病と糖尿病。医学のあゆみ 2010；232：167.

* * *

II. 歯

1. 歯周病の病態と成因

The pathogenesis of periodontal diseases

北村 正博・村上 伸也

Masahiro Kitamura(准教授), Shinya Murakami(教授)/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歯周病診断制御学

key words

歯周病
歯周病細菌
細菌バイオフィーム
炎症反応
免疫応答

歯周病は、歯周病細菌が原因となり生じる慢性炎症性疾患である。歯の周囲の特殊な局所環境(歯周ポケット内)に細菌バイオフィームが形成されることにより、免疫排除機能を十分受けない状態が構築され、歯周組織に持続的感染をもたらす。その結果、歯周病細菌の産生する毒素や酵素などが慢性的に歯周組織に作用することにより、歯周組織を構成する細胞が刺激され免疫応答や炎症反応が惹起される。そして、これらの反応が慢性化することにより、本来生体にとって防衛的に働くべき生体応答が歯周病では歯周組織破壊の誘因となっている。

歯と歯周組織の特徴

歯は、その歯冠部が歯肉(歯ぐき)から口腔内に萌出した状態で存在している。身体の組織の中で最も固い硬組織により形成される歯がこのような軟組織から突出した解剖学的構造は、身体他の部位ではみられない非常に特徴的なものといえる。また、組織学的にみても歯とその周囲の歯周組織は独特の構造を有している。すなわち、歯は軟組織である歯髄(いわゆる歯の神経)を硬組織である象牙質とエナメル質が取り囲む構造を有している。一方、歯周組織は硬組織であるセメント質と歯槽骨、軟組織である歯根膜と歯肉の4つの組織から構成され、歯の歯根部分をセメント質、歯根膜、歯槽骨が順に

積層し、歯肉がそれらを被覆し歯を支えている(図1)。このように、歯と歯周組織は、体表面近傍で硬組織と軟組織が隣接して存在する身体の中でも特にユニークな解剖学および組織学的特徴をもっていることから、そこに生じる歯周病も独特の発症メカニズムと臨床症状を有している。

歯周病の定義と分類

歯周病は歯周疾患とも呼ばれ、広義には、歯髄の感染により生じる根尖性歯周炎(いわゆる歯の根の病気)、口内炎などの粘膜疾患、歯周組織に発生した新生物(腫瘍など)を除く歯周組織に生じるすべての疾患を意味する。しかしながら、一般的には歯と歯肉の境界

部に存在するプラーク(歯周病細菌により形成された細菌バイオフィーム¹⁾)が原因となり歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患が歯周病として広く認識されている²⁾。

表1に日本歯周病学会による歯周病の分類(2006年)³⁾を示す。このなかで、ウイルス感染・アレルギー反応・類天疱瘡などの粘膜疾患などに伴い現れる非プラーク性歯肉病変、カルシウム拮抗薬・抗てんかん薬(フェニトイン)・免疫抑制薬(サイクロスポリン)などの副作用として主に発症する歯肉増殖、そして、主に過大な咬合力などの外力が歯周組織に加わり生じる咬合性外傷は歯周病細菌が直接原因となり発症することはないが、これら以外の歯周病細菌が原因となり発症する歯周病と合

II. 歯 1. 歯周病の病態と成因

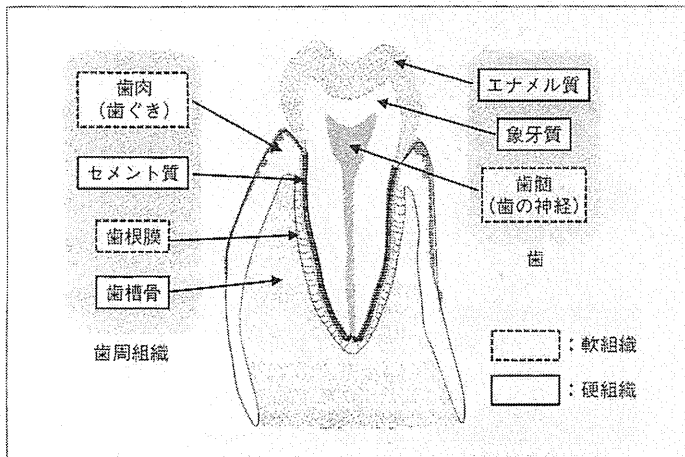


図1 健康な歯と歯周組織の構造

併した場合、重症化して重篤な臨床症状を示すことがある。歯周病細菌が原因となり発症する歯周病では、プラーク性歯肉炎と35歳以上で好発する慢性歯周炎の2つの疾患の罹患率が圧倒的に高く、軽症の人や他の歯周病を併発した人まで含めるとわが国の成人の80%以上がこの2つの疾患に罹患しているといえる⁹⁾。一方、侵襲性歯周炎は35歳以下で発症する歯周病であり、慢性歯周炎に比べると罹患率ははるかに低いが発病の進行が速く早期に重症化しやすいという特徴を有している。そして、さらに全体に占める割合は低いものの、表2に示した遺伝性疾患においても、合併症として歯周病が高頻度に発症する。これらの疾患において歯周病が発症するメカニズムに関しては不明な点が多いが、それぞれの遺伝性疾患に伴う免疫・代謝異常が歯周組織に影響を与えていると考えられる。そして、これらの疾患では永久歯だけではなく、小児の乳歯列期においても

歯周炎を発症する場合があることが報告されている⁹⁾。また、壊死性歯周疾患は歯周組織破壊の程度により壊死性潰瘍性歯肉炎と壊死性潰瘍性歯周炎に分類されるが、AIDSや白血病などの重度の免疫不全を伴う疾患に随伴したり、強いストレスや著しい栄養障害などにより誘発される急性炎症所見の著しい歯周病であり、歯肉に広範な潰瘍形成を認める。歯肉膿瘍と歯周膿瘍はそれぞれ、歯肉あるいは歯肉以外の深部歯周組織内に生じた膿瘍で、歯周病細菌により生じた歯周病が急性化したものである。歯周一歯内病変は、根尖性歯周炎とプラーク由来の歯周炎が同じ歯に発症し、互いの領域に波及した状態をいう。そのため、歯周組織破壊の進行したケースが多く予後不良の頻度が高い。また、歯根の口腔内への露出を招く歯肉退縮は加齢によるものや誤った口腔清掃法による外傷性的ものがあるが、歯根が露出すると、う蝕や知覚過敏が生じて口腔清掃が困難とな

表1 日本歯周病学会による歯周病分類(2006年)

| | |
|---|---|
| I 歯肉病変 1. プラーク性歯肉炎 2. 非プラーク性歯肉病変 3. 歯肉増殖 | IV 歯周組織の膿瘍 1. 歯肉膿瘍 2. 歯周膿瘍 |
| II 歯周炎 1. 慢性歯周炎 2. 侵襲性歯周炎 3. 遺伝疾患に伴う歯周炎 | V 歯周一歯内病変 |
| III 壊死性歯周疾患 1. 壊死性潰瘍性歯肉炎 2. 壊死性潰瘍性歯周炎 | VI 歯肉退縮 |
| | VII 咬合性外傷 1. 一次性咬合性外傷 2. 二次性咬合性外傷 |

表2 歯周炎を随伴する遺伝疾患

| |
|------------------------------|
| 1. 家族制周期性好中球減少症 |
| 2. Down 症候群 |
| 3. 白血球接着能不全症候群 |
| 4. Papillon-Lefevre 症候群 |
| 5. Chediak-Higashi 症候群 |
| 6. 組織球症候群 |
| 7. 小児遺伝性無顆粒球症 |
| 8. グリコーゲン代謝疾患 |
| 9. Cohen 症候群 |
| 10. Ehlers-Danlos 症候群(Ⅲ, Ⅷ型) |
| 11. 低アルカリフォスファターゼ血症 |
| 12. その他 |

(文献2)より引用)

り、プラークの堆積を招いて歯周病の悪化をきたすことも少なくない。

このように歯周病には、プラークに起因しない疾患も含まれるが、一般の認識も加味し、以下ではプラーク性歯肉炎や慢性歯周炎に代表されるプラークが原因となり発症する“狭義の歯周病”を取り上げ解説する。

歯周病の発症と進行

歯周病に罹患していない健康な状態

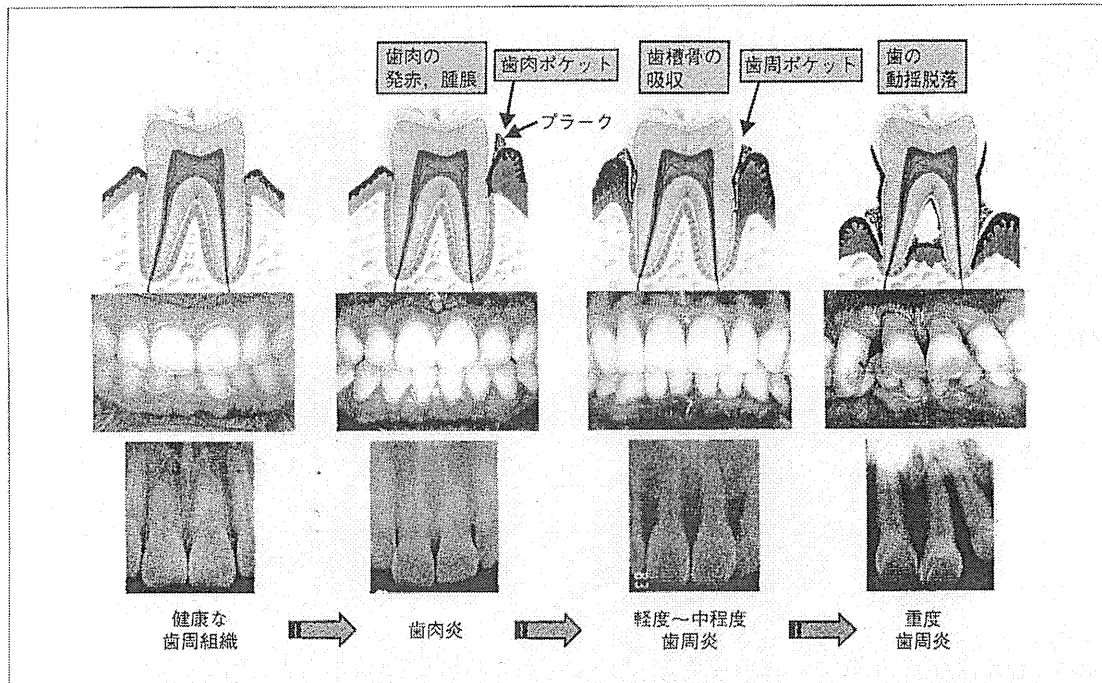


図2 歯周病の進行

では、歯と歯肉の接合部には1~2mmの歯肉溝と呼ばれる陥凹が存在する。口腔清掃不良によりこの歯肉溝付近にプラークが付着した状態が持続すると、プラーク由来の起炎物質によりまず歯肉の発赤・腫脹が生じ、歯肉溝が病的に深くなりポケット(歯肉ポケット)が形成される。このような状態を歯周病の初期段階である歯肉炎と呼ぶ。歯肉炎が未治療のまま長期間放置されると、歯と歯肉の接合部が傷害され、接合部が根の先端(根尖)方向へ移動し、歯の周囲にさらに深いポケット(歯周ポケット)が形成される。このような状態になると、歯肉だけではなくそれ以外の深部歯周組織にも炎症が波及し歯槽骨も破壊され、歯周炎と呼ばれるようになる。そして、歯周炎がさらに進

行し重症化すると、歯槽骨の吸収が進行し歯が動揺するようになり、最終的には歯が脱落することとなる(図2)。

歯周病の感染症としての特徴

歯周病は、口腔内の細菌が原因となり発症する細菌感染症である。しかしながら、原因菌の多様性や感染様式などの点で単一の病原菌が生体内に侵入することにより生じる通常の感染症とは異なっている。すなわち、歯周病では特定の細菌が単独で感染源となるのではなく、歯周炎の発症や進行に関与する可能性が特に高いレッドコンプレックスと称される *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* といった細菌種をはじめ、侵

襲性歯周炎と密接に関連すると考えられている *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* など10数種類以上の嫌気性グラム陰性菌が有力な歯周病原菌として歯周病の発症・進行に関与している。そして、歯周病ではその原因となる原因菌(歯周病細菌)が厳密には生体外と考えられる歯や歯肉の表面に付着したり、あるいはポケット内に浮遊して存在することから、原因菌が生体の免疫系の働きによる排除機構を十分受けない。そのため、多くの細菌感染症と異なり歯周病が重症化し歯が脱落することを除いて、感染源を人為的に除去しない限り歯周病は自然治癒することはない。また、これらの歯周病細菌の多くは口腔内の常在菌であり、細菌自らが産生した菌体外多糖(glycocalyx)に

II. 歯 1. 歯周病の病態と成因

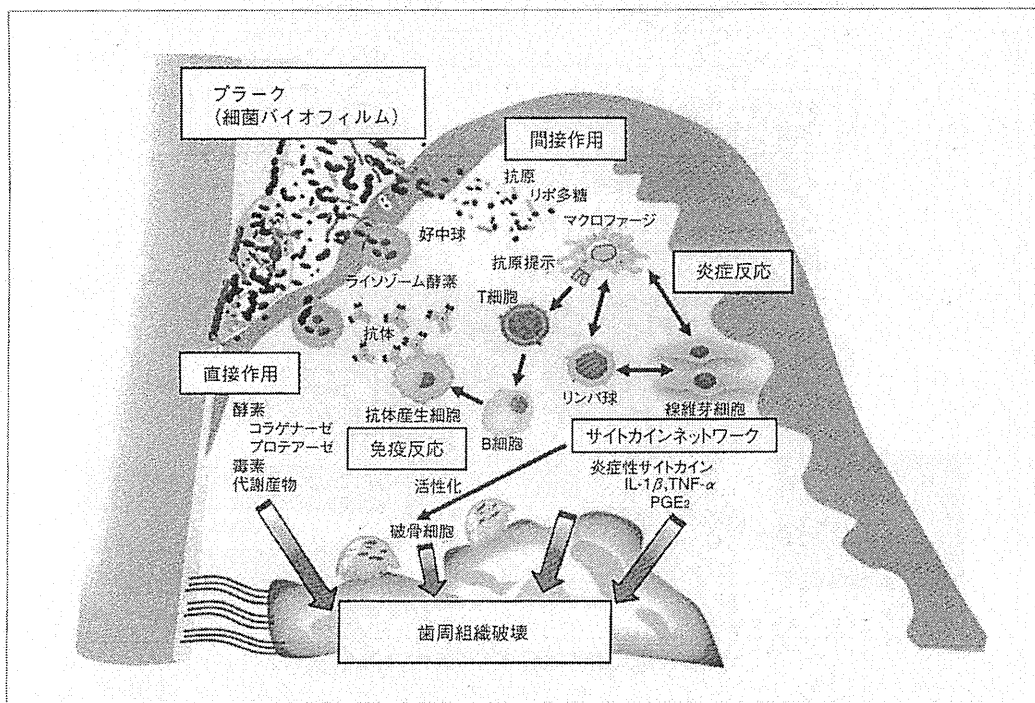


図3 歯周病の病態形成

被覆され共生・集合した細菌バイオフィルム¹⁾を形成している。この細菌バイオフィルムは生体の細菌排除機構に対するバリアとして機能するだけでなく、内部の細菌の細胞壁の肥厚や代謝活性の低下をもたらし、生体の免疫系の排除機能(抗体や食細胞など)や抗菌薬に対する抵抗性の獲得による歯周病の難治化の要因になっている。そしてさらに、歯周病はその感染源を除去しても歯と歯周組織に十分な組織の修復・再生機序が機能しないため、歯周病の進行を食い止めることができても、歯周病により失われた歯周組織が罹患前の健康な状態に回復することは通常期待できない。

歯周病の病態形成

歯周病は、歯周病細菌の持続的感染により直接的あるいは間接的に歯周組織が障害され発症・進行する(図3)。すなわち、歯周病細菌の歯周組織への直接作用は、ポケット近傍に存在する歯周病細菌の産生する酵素(コラーゲナーゼ、プロテアーゼなど)、毒素および代謝産物が直接近傍の歯周組織に作用して障害を与えるものである。一方、歯周病細菌に対する宿主の感染防御機構として免疫反応や炎症反応が生じ、それらの一連の生体応答が結果として歯周組織に障害的に働いてしまうことが歯周病細菌の歯周組織への間接作用としてあげられる。たとえば、好

中球はポケット上皮直下で、あるいは歯肉溝滲出液とともにポケット内に遊走して歯周病細菌を貪食・融解し、ライゾゾーム酵素を放出し歯周組織のコラーゲン線維の分解を亢進させ結合組織の脆弱化を招く。また、歯周病細菌を貪食・処理するために歯周組織に集積したマクロファージや好中球などの食細胞は、貪食後、インターロイキン- 1β (IL- 1β)や腫瘍壊死因子- α (TNF- α)などのさまざまなサイトカインやプロスタグランジン E_2 (PGE $_2$)などの生理活性物質を放出し、サイトカインネットワークを形成し、線維芽細胞などの歯周組織構成細胞を障害したり破骨細胞を活性化させ、歯槽骨吸収をはじめとする歯周組織破壊を惹起する。

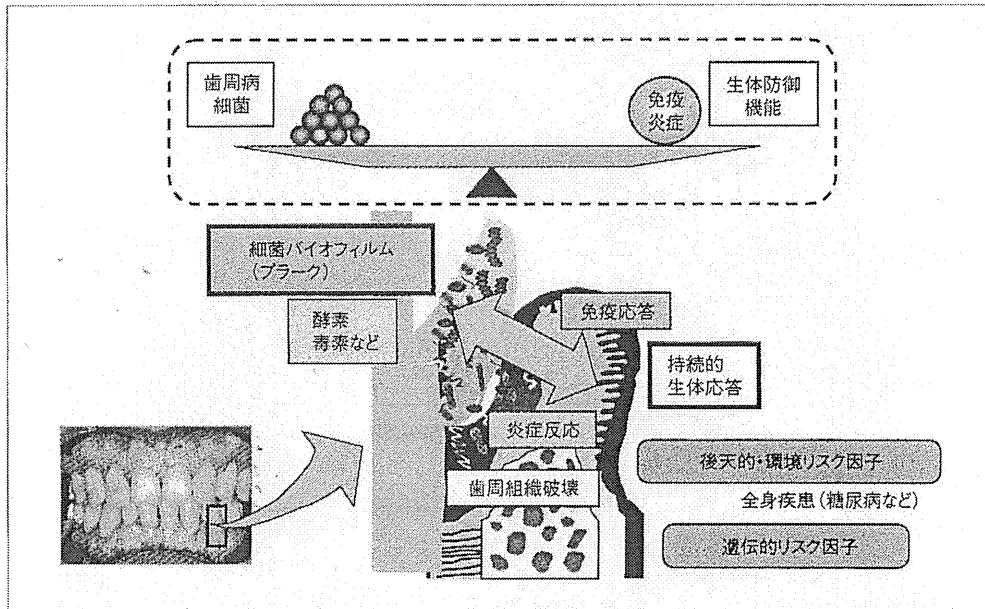


図4 歯周病の病態決定のメカニズム

(文献9)を改変)

一方、リポ多糖などの歯周病細菌由来の抗原を貪食・処理したマクロファージは、ヘルパー T 細胞にその情報を伝え、抗原特異的抗体を産生する抗体産生細胞(形質細胞)へ B 細胞を分化させて、歯周病細菌の排除を図る。しかしながら、この歯周病細菌由来抗原に対する特異的抗体の産生過程で、歯周病細菌由来抗原と自己との相同性などから自己抗体が産生され、自らの歯周組織を構成する細胞や成分との抗原抗体反応が生じて歯周組織破壊を助長していると考えられている。

歯周病の病態決定のメカニズム

歯周病では、前記のようにその原因菌が生体外で細菌バイオフィルムを形成し生体の免疫系の排除機構を十分受

けないため、慢性的に歯周組織を刺激し続けることになる。その結果、歯周病細菌の産生する毒素や酵素などが持続的に歯周組織に直接障害を与えるだけでなく、慢性的に歯周組織の宿主細胞に作用し、持続的な免疫応答や炎症反応を惹起し、本来生体にとって防御的に働くべき生体応答が、歯周病では逆に歯周組織の破壊に関与することになる。このように、歯周病は歯周病細菌を生体が十分排除できず長期間感染が持続することにより発症するため、その病態は原因因子である細菌と宿主の生体防御機能とのバランスに影響される。そのため、歯周病原菌に対する生体防御機能を減弱させるような糖尿病⁹⁾などの全身疾患を有する患者では、歯周病の発症や進行のリスクが高くなると考えられる²⁷⁾(図4)。

歯周病のリスクファクター

歯周病は細菌感染症であり、その発症や進行のリスクを考えると、細菌—宿主間の相互関係を中心に考えるべき疾患である。しかしながら、歯周病は喫煙やストレスなどの生活習慣や糖尿病などの全身疾患に影響を受けることが疫学調査や臨床研究で明らかにされている。すなわち、現在では細菌因子だけではなく、年齢、免疫能、遺伝的要因、全身疾患、薬物、人種などの宿主因子、そして喫煙、ストレス、口腔環境への関心度、生活習慣などの環境因子が複雑に絡み合い、歯周病が発症したり進行したりすると考えられている⁸⁾⁹⁾(図5)。

II. 歯 1. 歯周病の病態と成因

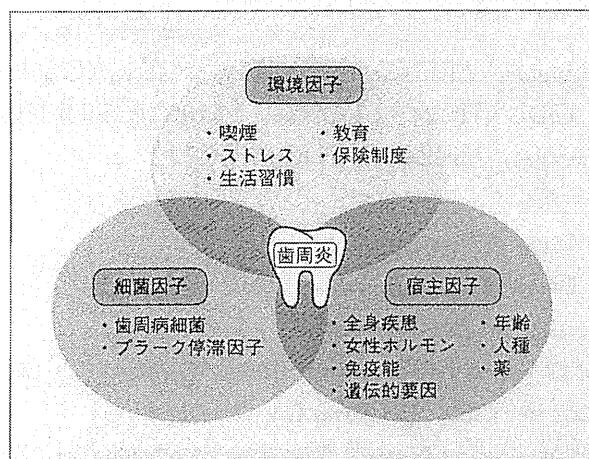


図5 歯周病のリスクファクター
(Credentials 29(2) : 5-12, 2011より改変)

文献

- 1) Costerton WJ, Stewart PS, Greenberg EP : Bacterial biofilm ; a common cause of persistent infections. *Science* 284 (5418) : 1318-1322, 1999
- 2) Page RC, Kornman KS : The patho-

- genesis of human periodontitis ; an introduction. *Periodontol* 2000 14 : 9-11, 1997
- 3) 伊藤公一, 池田雅彦, 小方頼昌, 他 : 歯周病の分類. 特定非営利活動法人日本歯周病学会 編, 歯周病の診断と治療指針. 東京, 医歯薬出版, 2-5,

- 2007
- 4) 平成17年歯科疾患実態調査, 歯科疾患実態調査報告解析検討委員会 編, 東京, 口腔保健協会, 2007
 - 5) 大嶋 隆 : 小児の歯科治療 シンプルなベストを求めて. 大阪, 大阪大学出版会, 163-175, 2009
 - 6) 村上伸也, 山崎和久, 大石慶二, 他 : 糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン Q1 : 糖尿病になると歯周病になりやすいか?. 特定非営利活動法人日本歯周病学会 編, 東京, 特定非営利活動法人日本歯周病学会, 12-15, 2009
 - 7) Kinane DF : Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol* 4 : 54-63, 1999
 - 8) 北村正博 : 全身から歯周へ歯周から全身へ. 大阪府歯科医師会雑誌 610 : 12-23, 2001
 - 9) 北村正博, 村上伸也 : 総論—歯周病と全身疾患. *医学のあゆみ* 232 : 161-166, 2010

北村 正博 (Masahiro Kitamura)

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 歯周病診断制御学 准教授
歯学博士

日本歯周病学会 歯周病専門医・指導医
日本歯科保存学会 認定医・指導医
主要研究テーマ : 歯周組織再生療法の開発,
歯周病の病態解析



村上 伸也 (Shinya Murakami)

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 歯周病診断制御学 教授

大阪大学歯学部附属病院 副院長
日本歯周病学会 歯周病専門医・指導医
日本歯科保存学会 認定医・指導医
JADR 会長

主要研究テーマ : 歯周組織再生療法の開発,
歯周病の病態解析, 予測歯周病学



CD73-Generated Adenosine Promotes Osteoblast Differentiation

MASAHIDE TAKEDACHI,^{1,2} HIROYUKI OOHARA,¹ BRENDA J. SMITH,³ MITSUYOSHI IYAMA,¹ MARIKO KOBASHI,¹ KENICHIRO MAEDA,¹ COURTNEY L. LONG,⁴ MARY B. HUMPHREY,⁵ BARBARA J. STOECKER,³ SATORU TOYOSAWA,² LINDA F. THOMPSON,⁶ AND SHINYA MURAKAMI^{1*}

¹Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan

²Department of Oral Pathology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan

³Department of Nutritional Sciences, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma

⁴Department of Microbiology and Immunology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma

⁵Department of Medicine, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, Oklahoma

⁶Department of Immunobiology and Cancer Program, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, Oklahoma

CD73 is a GPI-anchored cell surface protein with ecto-5'-nucleotidase enzyme activity that plays a crucial role in adenosine production. While the roles of adenosine receptors (AR) on osteoblasts and osteoclasts have been unveiled to some extent, the roles of CD73 and CD73-generated adenosine in bone tissue are largely unknown. To address this issue, we first analyzed the bone phenotype of CD73-deficient (*cd73*^{-/-}) mice. The mutant male mice showed osteopenia, with significant decreases of osteoblastic markers. Levels of osteoclastic markers were, however, comparable to those of wild-type mice. A series of *in vitro* studies revealed that CD73 deficiency resulted in impairment in osteoblast differentiation but not in the number of osteoblast progenitors. In addition, over expression of CD73 on MC3T3-E1 cells resulted in enhanced osteoblastic differentiation. Moreover, MC3T3-E1 cells expressed adenosine A_{2A} receptors (A_{2A}AR) and A_{2B} receptors (A_{2B}AR) and expression of these receptors increased with osteoblastic differentiation. Enhanced expression of osteocalcin (OC) and bone sialoprotein (BSP) observed in MC3T3-E1 cells over expressing CD73 were suppressed by treatment with an A_{2B}AR antagonist but not with an A_{2A}AR antagonist. Collectively, our results indicate that CD73 generated adenosine positively regulates osteoblast differentiation via A_{2B}AR signaling.

J. Cell. Physiol. 227: 2622–2631, 2012. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

A balanced relationship between bone resorption by osteoclasts and bone formation by osteoblasts is essential for bone remodeling which maintains bone integrity. The extracellular nucleotide ATP can be one of the key mediators in bone metabolism, not only as a phosphate source, but also as a signaling molecule via P2 receptors. In fact, osteoblasts have been reported to release ATP into the extracellular environment constitutively followed by engagement of P2 receptors (Buckley et al., 2003). The release of ATP by osteoblasts could be facilitated by mechanical stress (Romanello et al., 2001) and released ATP serves as an autocrine or paracrine regulator of both osteoblast and osteoclast function (Grol et al., 2009; Orriss et al., 2010). Meanwhile, it has been reported that P2 receptor signal transduction is rapidly inactivated by the extracellular breakdown of ATP to adenosine by the sequential actions of enzymes including members of the ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase families, ecto-5'-nucleotidase (CD73) and alkaline phosphatases (ALPase; Yegutkin, 2008). Although the role of ATP in bone metabolism has been revealed to some extent, functions of its metabolite adenosine are not fully elucidated.

The biological actions of adenosine are mediated via A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃ adenosine receptors (AR) that are ubiquitously expressed seven transmembrane spanning G-protein-coupled receptors. A₁AR and A₃AR mediate an inhibitory effect on adenylyl cyclase via Gi/Go, resulting in decreasing cAMP levels, whereas, A_{2A} receptors (A_{2A}AR)

and A_{2B} receptors (A_{2B}AR) stimulate adenylyl cyclase via activation of Gs with a consequent increase of cAMP (Ralevic and Burnstock, 1998). Recent reports suggested that adenosine supports osteoclast formation and bone resorption. It was shown that A₁AR signaling was required for osteoclastogenesis *in vitro* (Kara et al., 2010b) and lack of A₁AR resulted in increased bone mass in mice (Kara et al., 2010a). In addition, Evans et al. (2006) demonstrated that AR activation inhibited osteoprotegerin expression but did not affect receptor activator of NF-κB ligand expression in human osteoblasts. On the other hand, several *in vitro* studies demonstrated the role of

Conflict of Interest: All authors have no conflicts of interest.

Contract grant sponsor: Ministry of Education, Science Technology, Sports and Culture of Japan;

Contract grant number: 2110452, 23249086.

Contract grant sponsor: NIH;

Contract grant numbers: AI18220, DE19398.

*Correspondence to: Shinya Murakami, Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

E-mail: ipshinya@dent.osaka-u.ac.jp

Received 11 January 2011; Accepted 19 August 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com), 31 August 2011.

DOI: 10.1002/jcp.23001

adenosine in osteoblasts. Engagement of AR on murine osteoblasts induced mitogenesis (Shimegi, 1998; Fatokun et al., 2006) and protected them from cell death (Fatokun et al., 2006). In addition, selective agonists specific for each AR subtype modulated proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells (Costa et al., 2010, 2011). Although these reports strongly suggest that AR signaling may play a critical role in osteoblasts, no report provides *in vivo* evidence.

AR activation is believed to be regulated by the extracellular adenosine level which is controlled by the coordinated action of an equilibrative nucleoside transporter and ecto-nucleotidases. CD73 is a major enzyme involved in the generation of extracellular adenosine by the dephosphorylation of adenosine 5'-monophosphate (Thomson et al., 1990). Although cytoplasmic nucleotidases also make a contribution to adenosine production, recent studies utilizing *cd73*^{-/-} mice clearly demonstrated that CD73 plays a major role in the generation of extracellular adenosine *in vivo* in a number of physiologically relevant experimental models (Thompson et al., 2004; Volmer et al., 2006; Eckle et al., 2007; Takedachi et al., 2008). Interestingly, CD73 expression is regulated by Wnt- β -catenin signaling (Spychala and Kitajewski, 2004), a known critical pathway in bone metabolism (Baron et al., 2006; Piters et al., 2008; Williams and Insogna, 2009). It is also noteworthy that hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), a transcription factor reported to be important for bone regeneration and skeletal development (Wang et al., 2007; Wan et al., 2008), also regulates CD73 expression (Synnestvedt et al., 2002). Therefore, we hypothesized that CD73 may be involved in regulating osteoblast function through modulating nucleotide metabolism and generating extracellular adenosine that can activate AR.

To address this hypothesis, we asked whether CD73 functionally regulates bone metabolism *in vivo* by characterizing the bone phenotype of *cd73*^{-/-} mice. In addition, we investigated the involvement of CD73 and AR signaling in osteoblast differentiation *in vitro*.

Materials and Methods

Mice

cd73^{-/-} mice were developed as described (Thompson et al., 2004) and backcrossed onto the C57BL/6J background for 14 generations. Genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) using DNA extracted from toes and primers that differentiate between the wild-type *cd73* allele and the mutated *cd73* allele containing a neomycin resistance cassette (Thompson et al., 2004). All mice were bred and maintained in our animal facilities under specific pathogen-free (SPF) conditions. All protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees of the Oklahoma Medical Research Foundation and Osaka University Graduate School of Dentistry.

Peripheral quantitative computed tomography (pQCT) and micro-computed tomography (μ CT)

In pQCT analyses, femurs were harvested from *cd73*^{+/+} and *cd73*^{-/-} male and female mice at 13 weeks of age and were fixed with 10% buffered formalin for 24 h and analyzed using an XCT Research SA+ instrument (Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim, Germany). Voxel size was 0.08 mm \times 0.08 mm \times 0.46 mm. The contour of the total bone was determined automatically by the pQCT software algorithm. The parameters were obtained at 1.2 mm from the distal growth plate using threshold values of 690 mg/cm³ for the cortical region and 395 mg/cm³ for the trabecular region.

In μ CT analyses, tibias from 13-week-old *cd73*^{+/+} and *cd73*^{-/-} male mice were scanned using μ CT (μ CT40, SCANCO Medical, Bruttisellen, Switzerland) to assess trabecular bone

microarchitecture at the proximal tibia metaphysis. Scans of the proximal tibia metaphysis were performed at a resolution of 2,048 pixels \times 2,048 pixels. Analyses of the proximal tibia were accomplished by placing semiautomated contours beginning 0.03 mm distal to the growth plate and including a 0.6 mm volume of interest (VOI) of only secondary spongiosa for trabecular analyses. All samples were evaluated at a global threshold of 300 in the per mille unit to segment mineralized from soft tissue. Trabecular parameters evaluated included bone volume expressed per unit of total volume (BV/TV; %), trabecular number (TbN; 1/mm), trabecular thickness (TbTh; μ m), and trabecular separation (TbSp; μ m).

Histology and immunohistochemistry

For histological analysis, tibias were dissected from 13-week-old *cd73*^{+/+} and *cd73*^{-/-} male mice and fixed overnight at 4°C in 10% formalin in PBS, decalcified in 10% EDTA at 4°C for 10 days, and embedded in paraffin. Sections (4 μ m) were prepared and stained with hematoxylin and eosin (H&E). For immunohistochemistry, calvaria were collected from 3-day-old *cd73*^{+/+} and *cd73*^{-/-} male mice and fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde in PBS, decalcified in 7.5% EDTA at 4°C for 14 days, and embedded in OCT compound (Sakura Finetek Co., Ltd., Tokyo, Japan). Then 7 μ m frozen sections were prepared and treated with 2.5% hyaluronidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in PBS at 37°C for 1 h, followed by inactivation of endogenous peroxidase with 0.3% H₂O₂ in PBS containing 0.3% FBS (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan). After blocking with 3% BSA in PBS overnight at 4°C, sections were reacted with 5 μ g/ml rat anti-mouse CD73 antibody (TY/23; Yamashita et al., 1998; BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ). After washing, they were then incubated with biotin-conjugated anti-rat IgG, treated with the ABC reagents (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), developed with DAB (Dojindo, Kumamoto, Japan) and counterstained with hematoxylin.

Serum measurements

OC, tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRAP5b), C-terminal telopeptide of type I collagen, and phosphate were measured in mouse sera collected from 13-week-old *cd73*^{+/+} and *cd73*^{-/-} male mice after an overnight fast. OC was determined by sandwich ELISA using the mouse osteocalcin (OC) EIA kit (Biomedical Technologies Inc., Stoughton, MA). TRAP5b level was determined by a solid phase immunofixed enzyme activity assay using the MouseTRAP Assay kit (IDS Ltd., Boldon, UK). C-terminal telopeptide of type I collagen was measured by RatLaps ELISA kit (Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Denmark) using a rabbit polyclonal antibody raised against a synthetic peptide having a sequence specific for a part of the C-terminal telopeptide α 1 chain of rat type I collagen. Serum inorganic phosphate was determined by the improved Malachite Green method utilizing the malachite green dye and molybdate provided by the Phosphate assay kit (BioChain, Hayward, CA).

Reverse transcription (RT)-PCR

Total RNA was extracted from calvarial or femoral bones of 13-week-old *cd73*^{-/-} male mice and wild-type control mice by TissueLyser II (Retch, Haan D, Germany) or from *in vitro* cultured cells using RNA-Bee (TEL-TEST, Inc., Friendwood, TX) in accordance with the manufacturer's instructions. Purified total RNA was reverse-transcribed using M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA) reverse transcriptase with random hexamers. For semiquantitative analysis, PCR was carried out using AmpliTaq Gold DNA polymerase (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). The primer sequences used for semiquantitative PCR are previously described (Van De Wiele et al., 2002). Real-time PCR analysis was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix and a 7300 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster

City, CA). The primer sequences used for Real-Time PCR are listed in Table 1.

Cell culture and transfection

Primary osteoblasts were isolated from 3-day-old pups by digesting calvarial bones in PBS containing 0.1% collagenase (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) and 0.2% dispase (Roche Applied Science) for 20 min at 37°C. The digestion was sequentially performed three times and cells isolated from last two digestion were cultured in α -MEM supplemented with 10% FBS as primary osteoblasts. MC3T3-E1 cells were obtained from the Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan). Cells were maintained in α -MEM (Nikken Biomedical Laboratory, Kyoto, Japan) supplemented with 10% FBS and 60 μ g/ml kanamycin. To induce differentiation, cells were cultured in a 24-well plates until they reached confluence and then switched to mineralization medium (α -MEM supplemented with 10% FBS, 10 mM β -glycerophosphate, and 50 μ g/ml ascorbic acid) which was replaced every 3 days.

To produce stable transfectants, 2×10^4 MC3T3-E1 cells/well were plated in a 24-well plates and after 24 h, were transfected with the pH β Apr-I-neo-cd73 expression vector (Resta et al., 1994) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's protocol. After 24 h, the culture medium was supplemented with 600 μ g/ml geneticin (Invitrogen) to initiate drug selection. After selection, we then established the stable transfectant over expressing CD73 (MC/CD73). Cells used in this study had been passaged 3–5 times.

Colony forming assay

Bone marrow cells were flushed with PBS from femurs and tibias of 13-week-old *cd73^{+/+}* and *cd73^{-/-}* mice. One million bone marrow cells/well were plated in a 6-well plates and cultured in α -MEM supplemented with 10% FBS for 14 days. The cells were fixed with methanol and stained with Giemsa (Wako Pure Chemical Industries). Colonies with >20 cells were counted as fibroblast colony forming units (CFU-F). To enumerate osteoblast colony forming units (CFU-OB), bone marrow cells were cultured in mineralization media for 10 days and fixed with ethanol. Formation of osteoblast progenitors were detected using an ALPase staining kit (Sigma-Aldrich) and ALPase positive colonies with >20 cells were counted. Then Giemsa staining was performed and total colonies were counted. CFU-OB was calculated as a ratio of ALPase positive colonies/total colonies.

Flow cytometry analysis

Single cell suspensions of MC/CD73 or control transfectants were prepared by trypsinization and reacted with 10 μ g/ml PE-conjugated rat anti-CD73 antibody TY/23 (BD Pharmingen) or an isotype-matched control antibody. Data were collected with a

FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA) and analyzed with CellQuest software.

Proliferation assay

Proliferation of MC/CD73 and control transfectants was measured using the nonradioactive colorimetric WST-1 Cell Proliferation Assay (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. This assay is based on the cleavage of a tetrazolium salt by mitochondrial dehydrogenases to form formazan in viable cells. Briefly, 1×10^4 cells were plated in 24-well plates and cultured in α -MEM supplemented with 10% FBS. The number of viable cells was determined by adding WST-1 reagent and colorimetric evaluation of OD450/630 by a microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA) after 30 min incubation.

ALPase activity

After washing twice with PBS, the cells were sonicated in 0.01 M Tris/HCl (pH 7.4) and then centrifuged for 5 min at $12,000 \times g$. Subsequently the supernatant was mixed with 0.5 M Tris-HCl buffer (pH 9.0) containing 0.5 mM *p*-nitrophenyl phosphate as substrate, 0.5 mM $MgCl_2$, and 0.006% Triton X-100. Then the samples were incubated at room temperature for 60 min, and the reaction was stopped by addition of 0.2 M NaOH. The hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate was monitored as a change in OD410. ALPase from bovine intestinal mucosa was used as a standard and one unit of activity was defined as the enzyme activity hydrolyzing 1 μ mol of *p*-nitrophenyl phosphate per min at pH 9.8 at 37°C. Protein concentration was determined by Lowry method and the results were expressed as mU/ μ g protein.

Mineralization assay

Histochemical staining of calcified nodules was performed with alizarin red S. Cell monolayers were washed twice with PBS, and then fixed with dehydrated ethanol. After fixation, the cell layers were stained with 1% alizarin red S in 0.1% NH_4OH (pH 6.5) for 5 min, then washed with H_2O .

cAMP measurement

Cells were washed with serum-free α -MEM and treated with 0.1% DMSO (as carrier) or 10 nM to 1 μ M of the $A_{2A}AR$ antagonist ZM241385 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO) or 10 nM to 1 μ M of the $A_{2B}AR$ antagonist MRS1754 (Sigma-Aldrich). After 10 min incubation, cells were stimulated with 100 μ M adenosine (Sigma-Aldrich) for 5 min. Intracellular cAMP was determined by competition between cAMP of cells and cAMP conjugated to ALPase detected by rabbit polyclonal antibody to cAMP using a cyclic AMP complete EIA kit (Assay Designs, Ann Arbor, MI). Protein concentration was determined by the Lowry method and the cAMP results were expressed in pmol/mg protein.

TABLE 1. Nucleotide sequences of primers used for PCR

| Gene | Product size (bp) | | Primer sequence |
|-------------------------------------|-------------------|---|---------------------------------|
| Beta actin | 171 | F | 5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3' |
| | | R | 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3' |
| Runt related transcription factor 2 | 144 | F | 5'-CACTGGCGGTGCAACAAGA-3' |
| | | R | 5'-TTTCATAACAGCGGAGGCATTTC-3' |
| Bone sialoprotein | 153 | F | 5'-ATGGAGACTGCGATAGTTCGGAAG-3' |
| | | R | 5'-CGTAGCTAGCTGTTACACCCGAGAG-3' |
| Osteocalcin | 178 | F | 5'-AGCAGCTTGGCCACACCTA-3' |
| | | R | 5'-TAGCGCCGGAGTCTGTCTACTAC-3' |
| Alkaline phosphatase | 159 | F | 5'-ACACCTTGACTGTGGTTACTGCTGA-3' |
| | | R | 5'-CCTTGTAGCCAGGCCCGTTA-3' |
| CD73 (5'-nucleotidase, ecto) | 118 | F | 5'-AGTTCGAGGTGTGGACATCGTG-3' |
| | | R | 5'-ATCATCTGCGGTGACTATGAATGG-3' |
| Adenosine A2a receptor | 172 | F | 5'-ATTCGCCATCACCATCAGCA-3' |
| | | R | 5'-ACCCGTCACCAAGCCATTGTA-3' |
| Adenosine A2b receptor | 157 | F | 5'-GTCCGACCGATATCTGGCCATTTC-3' |
| | | R | 5'-TGCTGGTGGCACTGTCTTACTG-3' |

Statistical analysis

Data were expressed as the mean \pm SE. Statistical analyses were performed by Student's *t*-test. In some experiments, statistical analyses were performed by one-way ANOVA and specific differences were identified by the Bonferroni test: $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

CD73 is expressed in periosteal osteoblasts

To determine where CD73 is expressed in bone tissue, frozen sections of calvaria specimens from 3-day-old *cd73*^{+/+} mice were examined. Incubation with anti-CD73 antibody (TY/23) demonstrated that periosteum containing osteoblast and osteoblast precursors expressed CD73 (Fig. 1A). In contrast, no CD73 expression was observed in the periosteum of *cd73*^{-/-} mice.

cd73^{-/-} mice exhibit osteopenia

To examine the skeletal phenotype of 13-week-old *cd73*^{-/-} mice, we first evaluated the bone mineral density by pQCT. Compared to control littermates, male *cd73*^{-/-} mice had significantly lower bone mineral content in the trabecular bone of the femur metaphysis (Table 2). No differences were observed in the trabecular bone of female *cd73*^{-/-} or cortical bone of either male or female mice at the femur diaphysis. Histological evaluation of the proximal tibias showed that *cd73*^{-/-} male mice exhibited small and scattered bone spicules in the proximal metaphysis area compared with sex-matched wild-type mice (Fig. 1B).

Quantitative analyses of trabecular bone were accomplished using μ CT. Representative three-dimensional images reconstructed from μ CT scans of trabecular bone at the proximal tibia metaphysis further demonstrated osteopenia in male *cd73*^{-/-} mice (Fig. 1C). These changes were characterized by reduced trabecular bone volume, decreased trabecular number and thickness (Fig. 1D), and increased trabecular separation (data not shown) in *cd73*^{-/-} mice.

cd73^{-/-} mice exhibit decreased bone formation and osteoblast differentiation in vivo

We then investigated whether osteopenia in male *cd73*^{-/-} mice was the result of impaired bone formation or activated bone resorption. To address this question, we measured biochemical markers of in vivo bone turnover. As shown in Figure 2A, a significant decrease in serum OC, a metabolic marker of in vivo bone formation (Hauschka et al., 1989), was observed in *cd73*^{-/-} mice. In contrast, levels of the osteoclast marker TRAP5b (Alatalo et al., 2003) and fragments of type I collagen (C-terminal telopeptide), the products of bone resorption (Garnero et al., 2003), were comparable in the two strains of mice.

To further substantiate the involvement of impaired osteoblasts in the phenotype of *cd73*^{-/-} mice, we investigated the gene expression of osteoblast markers in calvarial and femoral bones. Real-time PCR analysis demonstrated significantly decreased expression of Runx2, ALPase, OC, and bone sialoprotein (BSP) in calvarial and femoral bones of *cd73*^{-/-} mice (Fig. 2B,C). These results suggested that the involvement of CD73 in bone homeostasis was directed to the osteoblast.

Inorganic phosphate required for osteoblast differentiation and mineralization (Beck, 2003) is produced when CD73 catalyzes the conversion of adenosine monophosphate to adenosine. To examine if decreased inorganic phosphate contributed to the reduction in trabecular bone volume in *cd73*^{-/-} mice, serum phosphate was determined. As shown in Figure 2A, serum phosphate in *cd73*^{-/-} mice was similar to that

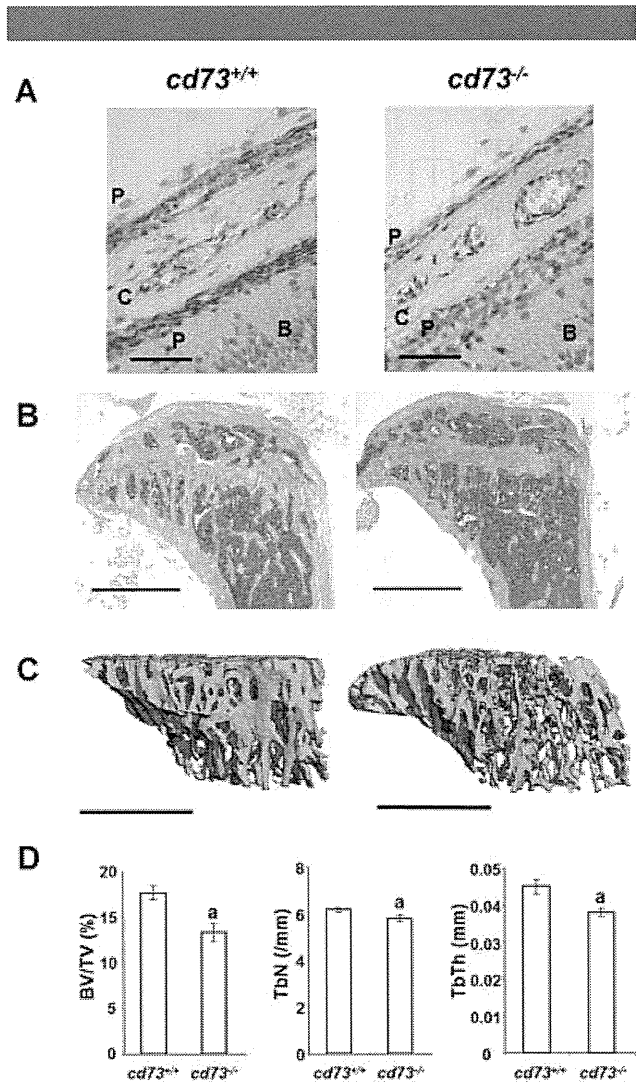


Fig. 1. Bone phenotype of *cd73*^{-/-} mice. **A:** CD73 expression on periosteum. Frozen sections of calvarial bones from *cd73*^{+/+} and *cd73*^{-/-} mice at 3 days of age were incubated with anti-CD73 monoclonal antibody (TY/23) and developed with DAB, as described in the Materials and Methods Section. P, periosteum; C, calvarial bone; B, brain. Scale bar, 50 μ m. Representative images of **(B)** H&E-stained medial, longitudinal sections of proximal tibias and **(C)** μ CT reconstruction of the proximal tibial metaphysis of *cd73*^{+/+} and *cd73*^{-/-} mice at 13 weeks of age. Scale bar **(B)** and **(C)**, 1 mm. **D:** Histomorphometric analysis of trabecular bone volume per tissue volume (BV/TV), trabecular number (TbN), and trabecular thickness (TbTh) of secondary spongiosa in *cd73*^{+/+} and *cd73*^{-/-} mice ($n = 7-8$ /each group). Data are expressed as mean \pm SE. ^a $P < 0.05$ compared with *cd73*^{+/+} mice.

TABLE 2. Cortical and trabecular bone mineral density at the distal femur metaphysis and body weights of *cd73*^{-/-} and *cd73*^{+/+} male and female mice

| | Genotype | Bone mineral density (mg/cm ³) | | |
|--------|----------------------------|--|---------------------|------------------|
| | | Trabecular bone | Cortical bone | Body weight (g) |
| Male | <i>CD73</i> ^{+/+} | 271.15 \pm 23.09 | 1081.48 \pm 18.77 | 27.32 \pm 1.57 |
| | <i>CD73</i> ^{-/-} | 246.13 \pm 13.78 ^a | 1070.55 \pm 25.78 | 27.52 \pm 1.48 |
| Female | <i>CD73</i> ^{+/+} | 206.23 \pm 23.03 | 1051.62 \pm 18.13 | 19.23 \pm 2.14 |
| | <i>CD73</i> ^{-/-} | 207.39 \pm 21.65 | 1055.03 \pm 20.64 | 19.43 \pm 0.64 |

^a $P < 0.05$ compared with *cd73*^{+/+} mice.

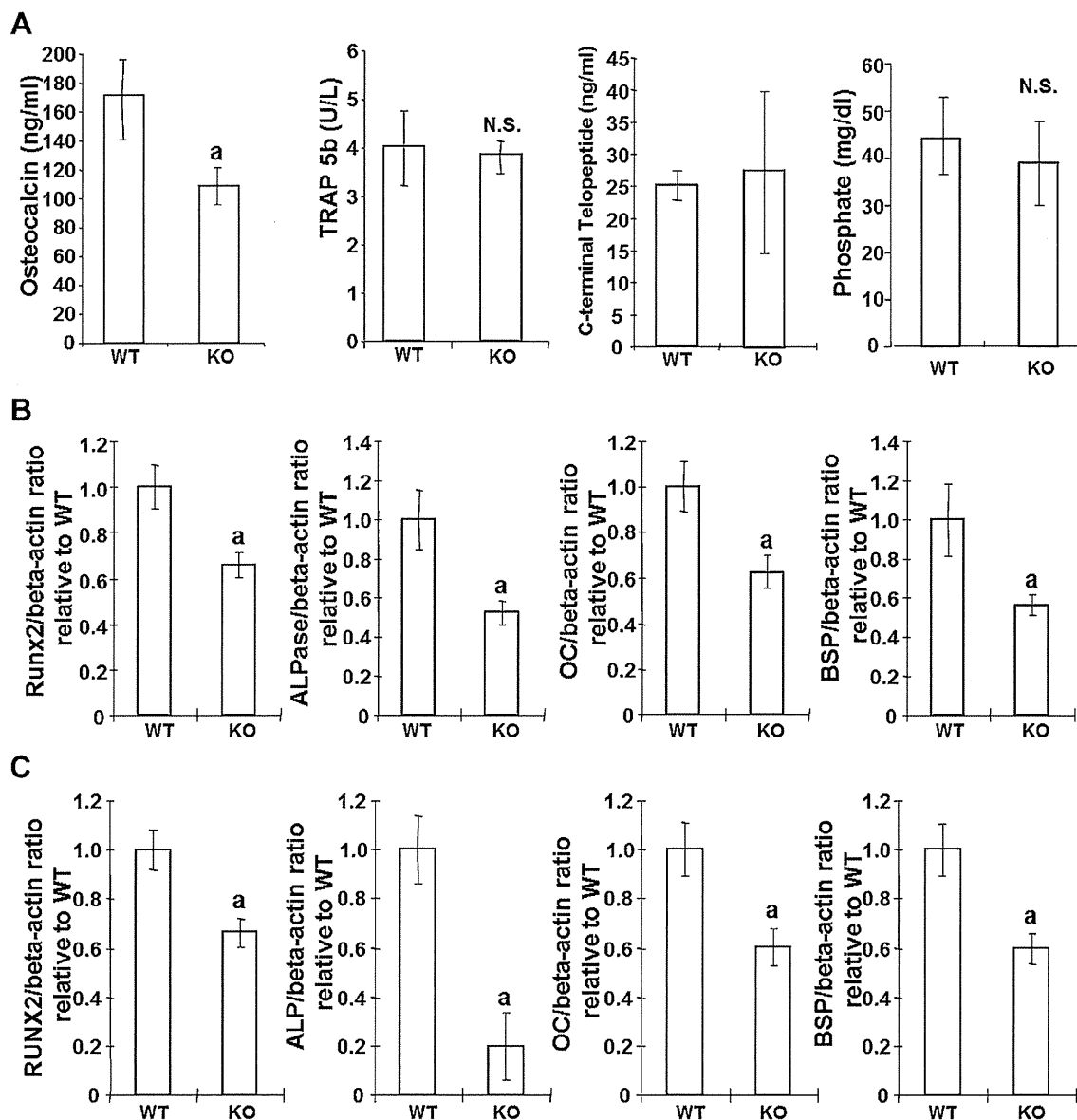


Fig. 2. Decreased osteoblast markers in $cd73^{-/-}$ mice. **A:** Serum OC, TRAP5b, C-terminal telopeptides, and inorganic phosphate in $cd73^{+/+}$ and $cd73^{-/-}$ mice at 13 weeks of age. Gene expression of Runx2, ALPase, OC, and BSP mRNA in femoral (**B**) and calvarial (**C**) bone samples from $cd73^{+/+}$ and $cd73^{-/-}$ mice as determined by real-time PCR ($n = 6-13$ in each group). Results were normalized to β -actin mRNA levels in the same samples. Data are expressed as mean \pm SE. ^a $P < 0.05$ compared with $cd73^{+/+}$ mice.

in $cd73^{+/+}$ mice, suggesting that CD73 has a minor role in production of phosphates.

CD73 deficiency impairs osteoblast differentiation in vitro

Ex vivo studies were performed to identify the role of CD73 in osteoblast differentiation and mineralization. Primary osteoblasts were isolated from calvarial bones of $cd73^{+/+}$ mice and $cd73^{-/-}$ mice and cultured in mineralization medium to examine the role of CD73 in osteoblast differentiation. As shown in Figure 3A, ALPase mRNA expression and activity were significantly decreased in CD73-deficient osteoblasts

compared to wild-type osteoblasts at 6 days of culture. Moreover, calcified nodule formation was delayed in cultures from $cd73^{-/-}$ mice, suggestive of reduced mineralization (Fig. 3B).

Because $A_{2A}AR$ is reported to play a role in bone marrow-derived mesenchymal stem cell development (Katebi et al., 2009), we assessed the number of bone marrow stem cells and osteoblast progenitors in bone marrow of $cd73^{-/-}$ mice. Colony forming assays revealed that bone marrow cells cultured from $cd73^{-/-}$ mice formed similar numbers of fibroblast colonies and ALPase positive osteoblast colonies compared to cultures from $cd73^{+/+}$ mice (Fig. 3C). Taken together, our results suggested that CD73 plays a role in

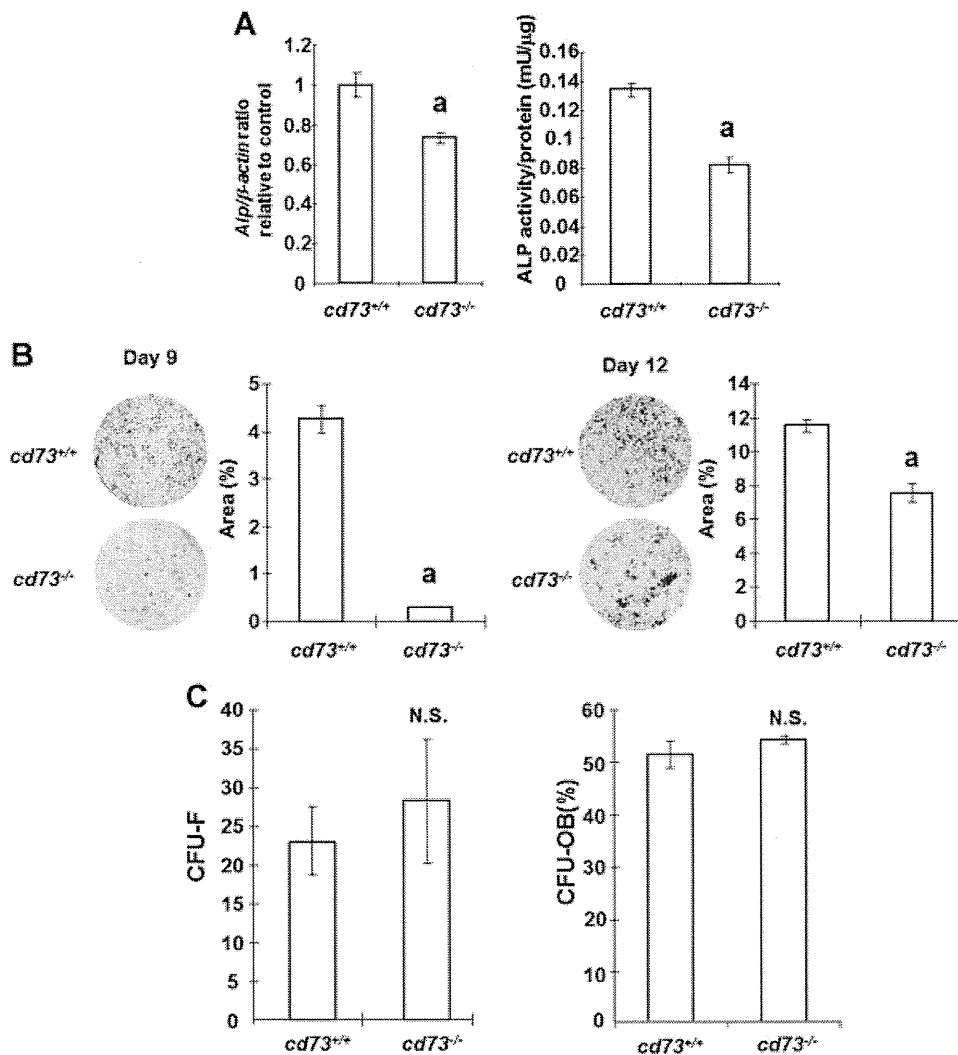


Fig. 3. Impaired differentiation in CD73 deficient osteoblasts. **A:** ALPase mRNA expression and activity of primary osteoblasts isolated from *cd73*^{-/-} mice. Primary osteoblasts were isolated and cultured in mineralization medium for 6 days. ALPase mRNA expression and ALPase activity was determined as described in Materials and Methods Section. **B:** Mineral deposition by osteoblasts isolated from *cd73*^{+/+} and *cd73*^{-/-} mice. On days 9 and 12 of culture in mineralization medium, cells were fixed and stained with alizarin red S. The area of mineralization was measured photographically. Data are expressed as mean of area \pm SE. * $P < 0.05$ compared with *cd73*^{+/+} mice. **C:** The number of CFU-F and the percentage of CFU-OB in bone marrow cultures derived from *cd73*^{+/+} and *cd73*^{-/-} mice. CFU-F and CFU-OB assays were performed as described in Materials and Methods Section. Representative results from three experiments are shown. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/jcp>]

osteoblast differentiation but not in the development of osteoblast progenitors.

Osteoblast differentiation is accelerated in MC3T3-E1 cells over expressing CD73

To investigate the mechanism by which CD73 promotes osteoblast differentiation, we established MC3T3-E1 cells over expressing CD73 (MC/CD73) by transfecting with pH β Apr-I-neo-cd73. Increased expression of CD73 in MC/CD73 is shown in Figure 4A. MC/CD73 cells exhibited normal cell shape (data not shown) and comparable proliferative ability (Fig. 4B). To examine the effects of CD73 over expression on differentiation, we cultured MC/CD73 cells in mineralization medium and assessed ALPase activity at weekly intervals. ALPase activity was significantly higher at days 7 and 14 compared with control transfectants (Fig. 4C). However, after

reaching peak activity on day 14, the ALPase activity of the MC/CD73 cells decreased more rapidly in the late stages of culture.

We next examined the expression of BSP and OC in MC/CD73 cells as differentiation markers of mature osteoblasts. As shown in Figure 4D, mRNA expression of BSP and OC was significantly higher in MC/CD73 cells compared with control transfectants, even when cells were cultured in normal culture medium, suggesting that over expression of CD73 promoted osteogenic potential. Elevated BSP and OC gene expression was further enhanced by cultivation in mineralization medium. Moreover, alizarin red S staining showed increased calcified nodule formation in MC/CD73 cells after 28 days of culture (Fig. 4E). These observations support the findings from primary osteoblast cultures that CD73 has a positive role in osteoblast differentiation and function.

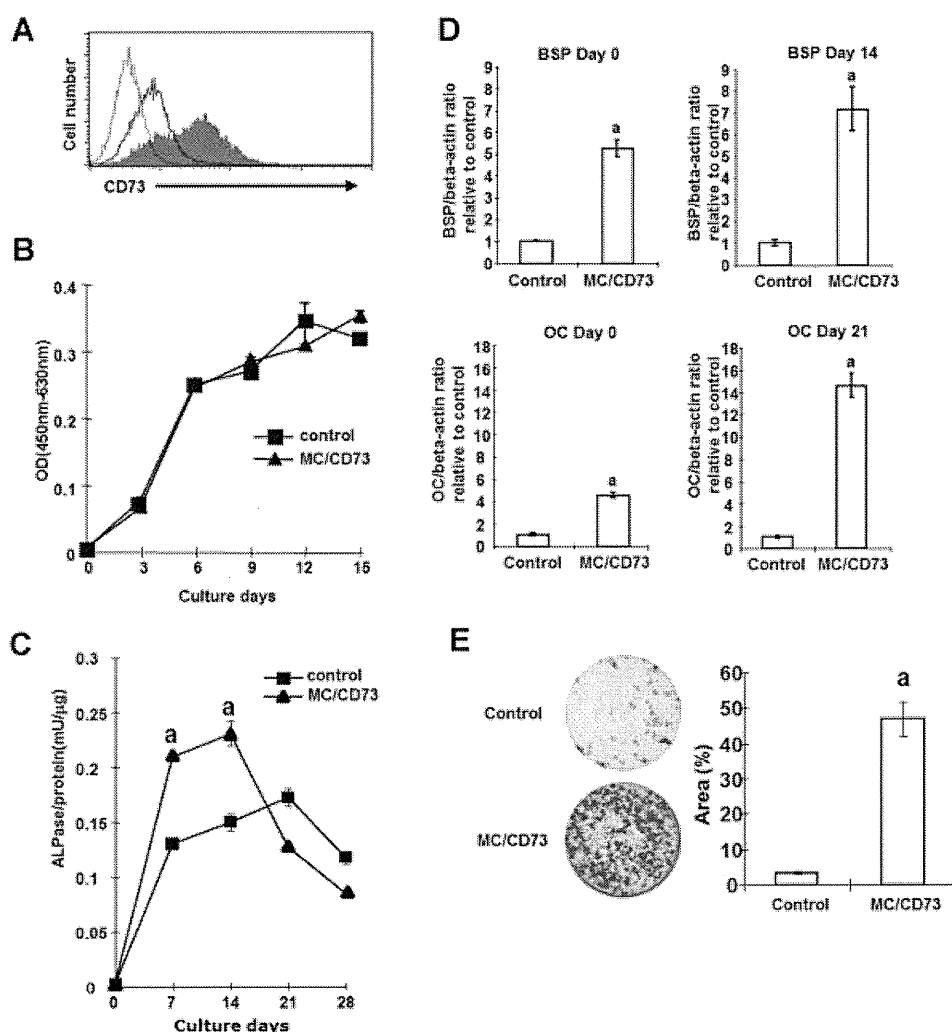


Fig. 4. Accelerated osteoblast differentiation in cd73-transfected MC3T3-E1 cells (MC/CD73). **A:** CD73 expression on MC/CD73 cells. CD73 expression on control cells is shown with the black line, and that on MC/CD73 cells is shown with the shaded histogram. Staining with an isotype control mAb is shown with the grey line. **B:** Proliferation of MC/CD73 and control cells. Cells were cultured in α -MEM supplemented with 10% FBS and OD450/630 was measured after reaction with WST-1 for 30 min on the indicated days. **C:** ALPase activities during differentiation in MC/CD73 and control cells. Cells were cultured with mineralization medium and ALPase activities were determined on the indicated days as described in the Materials and Methods Section. **D:** BSP and OC mRNA expression in MC/CD73 and control cells. Cells were cultured with or without mineralization medium for 14 or 21 days and BSP and OC mRNA levels were determined, respectively, by real-time PCR as described in Materials and Methods Section. **E:** Mineral deposition by MC/CD73 and control cells. On day 28 of culture in mineralization medium, cells were fixed and stained with alizarin red S. The area of mineralization was measured photographically. Data are expressed as mean \pm SE. Representative results from more than three experiments are shown. $^*P < 0.05$ compared with control cells. [Color figure can be seen in the online version of this article, available at <http://wileyonlinelibrary.com/journal/jcp>]

Adenosine receptor expression increases during osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells

As CD73 is a major enzyme generating extracellular adenosine, we next evaluated AR expression on MC3T3-E1 cells. We performed RT-PCR analysis of each subtype of AR using RNAs isolated from the MC3T3-E1 cells cultured with mineralization medium. As shown in Figure 5A, expression of A_{2A} AR and A_{2B} AR were increased during culture in mineralization medium, and strong expression was observed in the later stages of osteoblast differentiation. Real-time PCR analysis confirmed the increase of A_{2A} AR and A_{2B} AR mRNA expression (Fig. 5B,C). In contrast, A_{1A} AR and A_{3A} AR mRNA were not detected throughout the culture by RT-PCR. To confirm the functional expression of A_{2A} AR and A_{2B} AR on MC3T3-E1 cells, cells were stimulated with exogenous adenosine in the presence or absence

of A_{2A} AR and A_{2B} AR antagonists (ZM241385 and MRS1754, respectively), and cAMP, the second messenger of both receptors, was measured. Significant increases of cAMP were observed by adding 100 μ M adenosine to cells that had been cultured for 2 weeks in mineralization medium. This response to adenosine was suppressed in a dose-dependent manner by an A_{2A} AR or A_{2B} AR antagonist (Fig. 5D). These results demonstrated that differentiating osteoblasts express functional A_{2A} AR and A_{2B} AR and that their expression increases with differentiation.

CD73-generated adenosine stimulates osteoblasts via A_{2B} AR signaling

Having demonstrated functional A_{2A} AR and A_{2B} AR on MC3T3-E1 cells, we next utilized ZM241385 and MRS1754 to determine if one or both of these receptors is involved in the

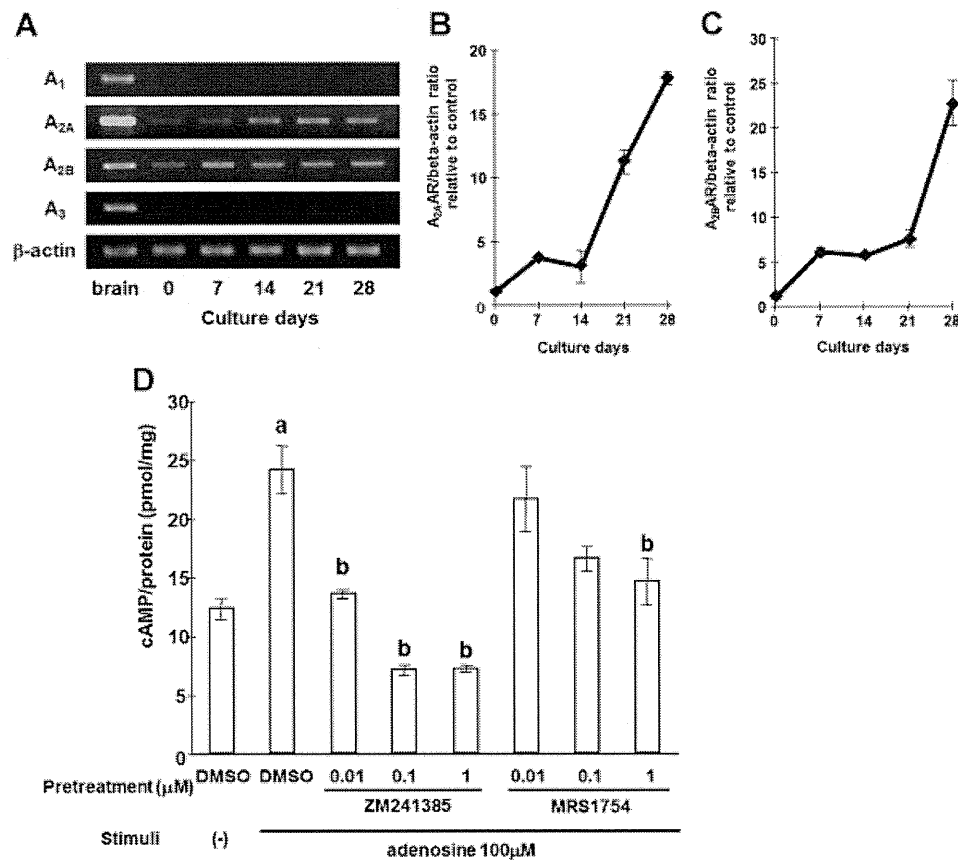


Fig. 5. Expression and function of A_{2A}AR and A_{2B}AR on MC3T3-E1 cells. **A:** AR mRNA expression during differentiation. MC3T3-E1 cells were cultured in mineralization medium and total RNA was extracted on the indicated days. Expression of AR mRNA was detected by RT-PCR. Mouse brain was used as a positive control for all AR subtypes. **B,C:** Quantification of A_{2A}AR and A_{2B}AR mRNA expression during osteoblast differentiation by real-time RT-PCR. **D:** Functional expression of A_{2A}AR and A_{2B}AR. MC3T3-E1 cells were cultured with mineralization medium for 14 days. Cells were then stimulated with exogenous adenosine (100 μM) with or without 5 min pretreatment with the indicated concentrations of ZM241385 (A_{2A}AR antagonist) or MRS1754 (A_{2B}AR antagonist) or DMSO. The DMSO concentration in each well was 0.1%. After 5 min incubation, cells were homogenized and cAMP was measured. ^aP < 0.05 compared with DMSO only. ^bP < 0.05 compared with DMSO and adenosine. Representative results from more than three experiments are shown.

CD73-induced alterations in osteoblast differentiation. As shown in Figure 6A,B, enhanced gene expression of BSP and OC in MC/CD73 was significantly suppressed by treatment with an A_{2B}AR antagonist. Surprisingly, an A_{2A}AR antagonist had no effects on the BSP and OC gene expression of MC/CD73. It is important to note that A_{2A}AR and A_{2B}AR mRNA expression on MC3T3-E1 was not changed by over expression of CD73 (data not shown). These data suggest that CD73-generated adenosine modulates osteoblast differentiation and function via activation of A_{2B}AR.

Discussion

Adenosine has a plethora of biological actions on a large variety of cells and modulates their function. Cells responsible for bone remodeling are no exception. In vitro and in vivo studies demonstrated that formation and function of osteoclasts responsible for bone resorption require A₁AR signaling (Kara et al., 2010a,b). In vitro studies showed proliferation and differentiation of osteoblasts responsible for bone formation could be modulated by AR signaling (Shimegi, 1998; Fatokun et al., 2006; Costa et al., 2010, 2011). Extracellular adenosine which activates AR is generated, at least in part, by ecto-5'

nucleotidase: CD73. The expression of this molecule is regulated by the canonical Wnt and HIF-1α pathways, crucial signaling cascades in bone forming cells (Synnestvedt et al., 2002; Sychala and Kitajewski, 2004). Thus, the possibility that CD73 could impact osteoblast function by modulating nucleotide metabolism and adenosine concentrations prompted us to examine the role of this molecule in bone metabolism.

Significantly decreased serum OC and suppressed osteoblastic gene expression in bone of male *cd73*^{-/-} mice suggest that their reduced bone volume is due to, at least in part, to a defect of osteoblast function (Fig. 2). As CD73 plays a major role in extracellular adenosine generation, this is the first report indicating the involvement of endogenous adenosine in osteoblast function in vivo. A better understanding of the specific role of adenosine can be gained by a detailed analysis of the phenotype observed in *cd73*^{-/-} mice. Unlike cortical bone, trabecular bone volume, and trabecular thickness were significantly reduced (29.5% and 17.9% reduction, respectively), in *cd73*^{-/-} mice as compared to wild-type mice. Likewise, bone mineral density was significantly reduced in the trabecular rich metaphysis but was not statistically reduced in cortical bone. These findings suggest bone microenvironment-specific