

## 論文の内容の要旨

氏名：松 村 浩 禎

専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Transcriptional Regulation of Bone Sialoprotein Gene by Melatonin and Interleukin-11

（メラトニンとインターロイキン 11 による骨シアロタンパク質の転写の調節）

骨シアロタンパク質(BSP)は、リン酸化および硫酸化を受けた非コラーゲン性タンパク質で、その配列中の Arg-Gly-Asp (RGD)配列で細胞に接着し、グルタミン酸連続配列でハイドキシアパタイトに結合する。石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現し、アパタイト結晶形成能を有することから、BSP は初期の石灰化において重要な役割を果たすと考えられる。

インターロイキン 11 (IL-11)は、インターロイキン 6 (IL-6)ファミリーに属する間質細胞由来のサイトカインであり、同ファミリーには、カルジオトロフィン 1、白血球遊走阻止因子、オンコスタチン M などが含まれる。IL-11 には、造血、免疫応答、神経系、骨代謝などの様々な機能があり、骨吸収を誘導する因子に応答して、骨芽細胞から分泌される。IL-11 は、破骨細胞形成を促進することで、骨吸収を誘導し、骨芽細胞でのアルカリホスファターゼ活性を上昇させることから、骨形成にも関与すると考えられる。

メラトニンは、血液脳関門の外側、脳を中心にある小さな内分泌腺である松果体によって合成される。視交叉上核および明/暗サイクルの制御下にあり、松果体以外に、骨髄、胃腸管、精巣およびリンパ球で局所的に合成される。メラトニンは、体温調節、性的発達、炎症、免疫系および細胞増殖を含む生理学および病態生理学のプロセスを調節し、骨リモデリング、骨粗鬆症予防、歯科用インプラントの骨結合や象牙質形成を誘導することが報告されている。

本研究では、ラット骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞、ラット骨髄由来未分化間葉細胞である RBMC 細胞、および、ヒト骨芽細胞様細胞である Saos2 細胞を使用した。ROS17/2.8 細胞および Saos2 細胞から全 RNA を抽出し、BSP mRNA 量をノーザンハイブリダイゼーション法および real-time PCR 法で検索した。また、Saos2 細胞からタンパク質を抽出し、BSP タンパク質発現量をウェスタンブロット法にて検索した。ラット BSP 遺伝子プロモーターおよびヒト BSP 遺伝子プロモーターの長さを変化させたルシフェラーゼコンストラクトを ROS17/2.8 細胞、RBMC 細胞または Saos2 細胞に導入し、BSP の転写に対する IL-11 またはメラトニンの影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。BSP の転写調節に関与するプロモーター配列中の応答配列を検索するために、ゲルシフトアッセイを行った。さらに、BSP の転写調節に係る応答配列に特異的に結合する転写因子を検索するために、転写因子に対する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降法を行った。

IL-11 (20 ng/ml)は、ROS17/2.8 細胞における BSP mRNA およびタンパク質量を、刺激 12 時間後に増加させた。ラット BSP 遺伝子プロモーターを挿入したルシフェラーゼコンストラクトを ROS17/2.8 細胞または RBMC 細胞に導入したルシフェラーゼアッセイの結果、IL-11 (20 ng/ml)は、ラット BSP 遺伝子の転写開始点から -116 塩基対上流から +60 塩基対下流までを挿入したコンストラクト (-116 ~ +60) のルシフェラーゼ活性を上昇させた。ゲルシフトアッセイの結果、IL-11 (20 ng/ml)は、cAMP 応答配列 (CRE)、塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF2) 応答配列 (FRE) およびホメオドメインタンパク質結合配列 (HOX) への核内タンパク質の結合を増加させた。

Saos2 細胞を、100 nM メラトニンで刺激すると、BSP mRNA の発現量は、刺激 3 時間後から増加し、12 および 24 時間後に最大となった。Runx2 mRNA 量は、刺激 6 時間後、Osterix mRNA 量は、刺激 12 および 24 時間に増加した。BSP タンパク質の発現量は、メラトニン (100 nM) 刺激 3 時間後に増加し、刺激 6 および 12 時間に最大となり、24 時間後に減少した。ヒト BSP 遺伝子プロモーターを導入したルシフェラーゼコンストラクトを Saos2 細胞に導入し、メラトニン (100 nM) で 12 時間刺激した結果、-84 ~ -868 LUC の全てのルシフェラーゼコンストラクトの転写活性が上昇した。2 つの cAMP 応答配列 (CRE1 と CRE2) に 2 塩基対の変異を挿入したルシフェラーゼコンストラクトを Saos2 細胞に導入すると、メラトニンによる転写活性の上昇は抑制された。メラトニン刺激によるルシフェラーゼ活性の増加は、プロテインキナーゼ A 阻害薬 KT5720、チロシンキナーゼ阻害薬ハービマイシン A、ERK1/2 阻害薬 U0126、PI3 キナーゼ阻害薬 LY294002 で抑制された。Saos2 細胞を、メラトニン (100 nM) で刺激すると、CRE1、CRE2 配列への核内タンパク質の結合が無刺激と比べて増加した。CRE1 および CRE2 への核内タンパク質の結合は、CRE 結合タンパク質 1 (CREB1)、

リン酸化 CREB1, c-Fos, c-Jun, JunD および Fra2 に対する抗体で阻害された。

以上の結果から, IL-11 は, ラット BSP 遺伝子プロモーター中の CRE, FRE および HOX 配列を介して BSP の転写を促進すると考えられた。一方, メラトニンは, ヒト BSP 遺伝子プロモーターに存在する CRE1 および CRE2 配列を介して BSP の転写を調節し, 両応答配列には, CREB1, リン酸化 CREB1, c-Fos, c-Jun, JunD および Fra2 等の転写因子が結合し, メラトニンによる BSP の転写を調節すると考えられた。IL-11 およびメラトニンは, 骨芽細胞様細胞および骨髄由来未分化間葉細胞の分化を誘導し, ラットおよびヒト BSP の転写を促進することが明らかとなった。以上の結果から, IL-11 およびメラトニンは, 骨形成を促進し, 将来の歯周治療への応用の可能性が示唆された。