

## 論文審査の結果の要旨

氏名：松 村 浩 禎

博士の専攻分野の名称：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）

審査委員：（主査）教授 吉 垣 純 子

（副査）教授 松 島 潔

教授 小 方 頼 昌

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、そのアミノ酸配列中に存在するArg-Gly-Asp (RGD)配列で細胞に接着し、グルタミン酸連続配列でカルシウムおよびハイドキシアパタイトに結合する。そのため、癌局所での異所性石灰化についても報告されており、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、アルカリホスファターゼ活性を上昇させることで骨髄細胞の分化に関わることから、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、BSPmRNA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と特異的に結合する転写因子を検索するために、ゲルシフトアッセイを行った。さらに、細胞内での転写因子とBSP遺伝子プロモーター配列中の応答配列との特異的な結合を検索するために、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BSPmRNA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、BSPmRNA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。Runx2mRNA量は、刺激6時間後、OsterixmRNA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 ~ -868LUC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。また細胞内、転写因子と応答配列との結合はクロマチン免疫沈降法にて、CREB1, リン酸化CREB1, c-Fos, c-Jun, JunDおよびFra2のメラトニン刺激後、結合量の増加を認めた。

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。

本研究は、骨芽細胞様細胞をIL-6ファミリーに属するIL-11と松果体から放出されるメラトニンで刺激すると、各種リン酸化経路を介して、BSP遺伝子プロモーター配列中の応答配列に転写因子の結合量が増加することで、BSPの転写を促進することが明らかとなった。このことから、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。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成26年1月23日