

## 論文審査の結果の要旨

氏名：金子 博 寿

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Fibroblast Growth Factor 2 and Forskolin Regulate Mineralization-associated Genes in Osteoblast-like Cells and Breast Cancer Cells

（塩基性線維芽細胞成長因子とフォルスコリンによる骨芽細胞様細胞および乳ガン細胞における石灰化関連遺伝子の調節）

審査委員：（主査）教授 吉垣 純子

（副査）教授 松島 潔

（副査）教授 小方 頼昌

骨シアロタンパク質（BSP）は、石灰化結合組織（骨、象牙質、セメント質）で発現する非コラーゲン性タンパク質である。近年、乳ガン、前立腺ガン細胞等で発現し、ガンの骨転移に関与することが報告された。塩基性線維芽細胞成長因子（FGF2）とサイクリック AMP（cAMP）は、骨芽細胞の分化および骨の石灰化を調節する役割を有しており、FGF2 とフォルスコリン（FSK）は、単独で ROS17/2.8 骨芽細胞様細胞における骨シアロタンパク質（BSP）の転写を増加させるが、FGF2 と FSK で同時刺激（FGF2/FSK）すると BSP の転写は相乗的に増加することが報告された。しかしながら、FGF2、FSK および FGF2/FSK 刺激による BSP 以外の遺伝子発現に関する検索は行われていない。そこで、本研究では、ラットおよびヒト由来の2種類の骨芽細胞様細胞に対する FGF2、FSK または FGF2/FSK 刺激後の石灰化関連遺伝子の発現変化を DNA マイクロアレイにて検索した。また、MCF7 ヒト乳ガン細胞における BSP の発現が、FSK 刺激でどの様に誘導されるかを、RT-PCR、ルシフェラーゼアッセイおよびゲルシフトアッセイで検索を行った。

ラット骨芽細胞様細胞 ROS17/2.8 細胞において、FGF2 および FSK は c-FOS 遺伝子の発現を 7.2 および 10.7 倍増加させたが、FGF/FSK 刺激では、c-FOS 遺伝子の発現は変化しなかった。FGF2 は dentin matrix protein 1（DMP1）遺伝子の発現を 129.8 倍増加させた。一方 FGF/FSK は、amphiregulin（AREG）遺伝子発現を 73 倍増加させた。

ヒト骨芽細胞様細胞 Saos2 細胞において、FGF2 は osteopontin（SPP1）遺伝子の発現を 16.7 倍に、Interleukin-8（IL8）を 6.4 倍、IL11 遺伝子発現を 4.8 倍増加させた。FSK は、IL6 遺伝子発現を 2.6 倍、IL11 を 4.0 倍、Chemokine ligand 13（CXCL13）を 2.8 倍、Bone morphogenetic protein 2（BMP2）遺伝子発現を 2.5 倍増加させた。

ヒト乳ガン由来 MCF7 細胞において、FSK（1  $\mu$ M）は、BSP、Runt homeodomain protein 2（Runx2）および Osterix の mRNA 発現を刺激 12 時間後に増加させた。種々の長さのラット BSP 遺伝子プロモーターをルシフェラーゼプラスミドに挿入し、ルシフェラーゼアッセイを行った結果、cAMP 応答配列（CRE）、Runx2 応答配列および FGF2 応答配列（FRE）が FSK による転写調節の標的であると考えられた。ゲルシフトアッセイの結果、FSK は CRE と FRE に結合する核内タンパク質の量を増加させた。

以上の結果から、ヒト乳ガン細胞での FSK による BSP の転写の調節は、BSP 遺伝子プロモーター中の CRE、Runx2 および FRE 応答配列を介すると考えられた。FGF2 と FSK は、骨形成と石灰化を促進することから、歯周組織再生治療に応用できる可能性を示唆しており、歯周治療の発展に大きく寄与するものである。

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4月24日