

論文審査の結果の要旨

氏名：金 鏡美

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Effects of estrogen receptor and thalidomide on bone sialoprotein gene expression

（骨シアロタンパク質の遺伝子発現に対するエストロゲン受容体とサリドマイドの効果）

審査委員：（主査）日本大学教授 博士（理学） 吉垣 純子

（副査）日本大学教授 歯学博士 松島 潔

（副査）日本大学教授 歯学博士 小方 頼昌

骨シアロタンパク質（BSP）は、石灰化組織特異的に発現し、初期の石灰化を誘導すると考えられる糖タンパク質である。エストロゲンは、骨格成長に必須なステロイドホルモンである。エストロゲン受容体（ER）は、ステロイド受容体スーパーファミリーに属し、転写因子として働く。ER α とER β の異なる遺伝子にコードされた2種類の受容体が、多くの細胞で共発現し、ステロイドホルモンで活性化されると2量体を形成する。サリドマイドは、免疫調節薬であるが、当初は鎮痛薬および睡眠薬として処方され、妊婦が服用した場合にサリドマイド胎芽症の原因となった。また、骨芽細胞の成長抑制作用を有する薬物である。エストロゲン、ERおよびサリドマイドによるBSPの転写調節機構を検索する目的で、 β -エストラジオール、ER α およびサリドマイドのBSP遺伝子発現に対する効果を検索した。

ラット骨芽細胞様細胞 ROS17/2.8 細胞において、BSPの mRNA 量は ER α の過剰発現で増加した。一方、無刺激および過剰発現後に増加した BSP mRNA 量は、 10^{-8} M の β -エストラジオール刺激で変化しなかった。種々の長さのラット 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（pLUC3~pLUC6）の活性は、ER α の過剰発現で増加した。一方、 β -エストラジオールで刺激してもルシフェラーゼ活性は変化しなかった。ER α の過剰発現の効果は、ラット BSP 遺伝子プロモーター中の cAMP 応答配列（CRE）または AP1 とグルココルチコイド応答配列（GRE）が重複した AP1/GRE 配列に2塩基の変異を導入すると消失した。ゲルシフトアッセイの結果、ROS17/2.8 細胞の核内タンパク質と CRE および AP1/GRE 配列との結合バンド量は ER α の過剰発現で増加した。CRE 結合バンドは、ER α 、CRE 結合タンパク質（CREB）およびリン酸化 CREB 抗体で消失し、AP1/GRE 結合タンパク質は、c-Fos 抗体で高分子量領域にスーパーシフトした。

サリドマイド（10 μ g/ml）は、ROS17/2.8 細胞での BSP mRNA 量を12時間後に抑制し、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（pLUC3~pLUC6）の活性を抑制した。さらに、BSP プロモーターの長さを短く調節したルシフェラーゼアッセイの結果、サリドマイドに応答するプロモーター領域は、転写開始点から-43 から-84 塩基対上流までの間に存在すると考えられた。逆方向の CCAAT、CRE、FGF2 応答配列（FRE）および下垂体特異的転写因子応答配列1（Pit-1）に2塩基対の変異を導入したコンストラクトを使用したルシフェラーゼアッセイの結果、逆方向の CCAAT と CRE 配列の両者がサリドマイドによる転写調節のターゲットであると考えられた。ゲルシフトアッセイの結果、サリドマイドは CRE 結合タンパク質量を増加させたが、逆方向の CCAAT 配列への核内タンパク質の結合量は変化しなかった。CRE 結合タンパク質は、CREB1、リン酸化 CREB1、c-Fos、c-Jun、JunD および CREB2 抗体で消失した。

以上の結果から、ER α はラット BSP 遺伝子プロモーター中の CRE および AP1/GRE 配列を介してリ

ガンドなしに BSP の転写を増加させた。サリドマイドは、ラット BSP 遺伝子プロモーター中の CRE と逆方向の CCAAT 配列を介して BSP の転写を抑制した。

ER α とサリドマイドは、石灰化組織特異的に発現する BSP の転写を正および負に調節することから、両因子の作用メカニズムの解明は、骨形成と石灰化の制御機構の解明に役立つと考えられ、歯周治療の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文の著者は、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 27 年 9 月 17 日