

原 著

骨シアロタンパク質(BSP)の転写調節に対するCO₂レーザーの効果

佐々木庸子¹, 荒木正大¹, 目澤 優¹
 Zhitao Wang¹, 金子博寿¹, 小方頼昌^{1,2}

¹日本大学松戸歯学部歯周治療学講座

²口腔科学研究所

(受付日: 2008年6月29日 受理日: 2008年7月24日)

Effects of CO₂ Laser Irradiation on Bone Sialoprotein Transcription

Yoko Sasaki¹, Shouta Araki¹, Masaru Mezawa¹,
 Zhitao Wang¹, Hirotohi Kaneko¹ and Yorimasa Ogata^{1,2}

Departments of Periodontology¹ and Research Institute of Oral Science²,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

(Received : June 29, 2008 Accepted : July 24, 2008)

Abstract : Laser irradiation at low photon intensities has a stimulating effect on cell and tissues. Although the carbon dioxide (CO₂) laser is a surgical rather than a therapeutic laser, we have attempted to use the CO₂ laser at low energy densities to obtain biological alterations. Bone sialoprotein (BSP) is a noncollagenous protein of the extracellular matrix in the mineralized connective tissues that has been implicated in the nucleation of hydroxyapatite crystals. The present study investigated the regulation of BSP transcription in a rat osteoblast-like cell line, UMR106 cells, following CO₂ laser irradiation. CO₂ laser irradiation (3 W, 20 sec) increased the BSP mRNA levels at 12 h in UMR106 cells. From transient transfection assays using various sized rat BSP promoter-luciferase constructs, the same level of CO₂ laser irradiation increased the luciferase activity of the construct (pLUC4), including the promoter sequence nucleotides -425 to +60. Transcriptional stimulations following CO₂ laser irradiation were almost completely abrogated in the constructs that included 2 bp mutations in the fibroblast growth factor 2 response element (FRE) and homeodomain protein-binding site (HOX). On the other hand, the CCAAT-protein complex did not change after stimulation by CO₂ laser according to gel shift assays. Low-intensity CO₂ laser irradiation decreased the nuclear protein binding to the 3'-FRE and HOX. These data suggest that CO₂ laser irradiation increased the BSP mRNA expression, and that the FRE and HOX elements in the promoter of the rat BSP gene are required for CO₂ laser induced BSP transcription.

Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 50(3) : 176-184, 2008.

Key words : CO₂ laser, bone sialoprotein, osteoblasts, transcriptional regulation

要旨 : 低出力レーザーに細胞や組織の修復促進効果があることが知られている。CO₂レーザーは、治療用レー

連絡先: 佐々木庸子

〒271-8587 千葉県松戸市栄町西2-870-1

日本大学松戸歯学部歯周治療学講座

Yoko Sasaki

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, 271-8587, Japan

E-mail : mayo07008@g.nihon-u.ac.jp

ザーと言うよりもむしろ外科用レーザーであるが、低エネルギー密度で照射することにより、何らかの生物学的効果が得られると考えられる。骨シアロタンパク質(BSP)は、アパタイト結晶形成能を有し、石灰化結合組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質である。本研究では、低出力のCO₂レーザー照射がBSPの転写に与える影響を、骨芽細胞様細胞であるUMR106細胞を使用して検索した。UMR106細胞をCO₂レーザー(3 W, 20sec)で刺激すると、12時間後にBSP mRNA量の増加が認められた。ラットBSP遺伝子プロモーター配列を挿入したルシフェラーゼ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、同エネルギーのCO₂レーザー刺激により、12時間後にpLUC4(-425 ~ +60)の転写活性が増加した。CO₂レーザー照射による、pLUC4ルシフェラーゼコンストラクトの転写の上昇は、FGF2応答配列とHOX配列に2塩基対の変異を導入すると抑制された。ゲルシフトアッセイの結果、CO₂レーザー照射後に経時的に抽出した核内タンパク質と、逆方向のCCAAT配列との結合に変化は認められなかったが、3'-FREとHOX配列と核内タンパク質との結合は、経時的に減少した。以上の結果から、CO₂レーザー照射による骨芽細胞でのBSPの転写調節は、ラットBSPプロモーターに存在するFREとHOX配列を介すると考えられた。

日本歯周病学会誌(日歯周誌)50(3):176-184, 2008

キーワード: CO₂レーザー, 骨シアロタンパク質, 骨芽細胞, 転写調節

緒 言

レーザーには、ネオジウムヤグ(Nd:YAG)レーザー、エルビウムヤグ(Er:YAG)レーザー、炭酸ガス(CO₂)レーザー等のハードレーザーと、ヘリウムネオン(He-Ne)レーザーや半導体レーザー等のソフトレーザーがあり、歯科領域全般で広く臨床応用されている。根管内や歯周ポケット内の殺菌作用を目的として使用される場合、疼痛緩和効果、創傷治癒促進効果、線維芽細胞の増殖、マクロファージの貪食能亢進等様々な効果が報告されている¹⁻⁸⁾。

Nd:YAGおよびEr:YAGレーザーは近赤外領域のレーザーで、Nd:YAGレーザーの発振波長は1.064 μmであり、蒸散能が高く、黒色素に良く吸収され、照射部位から数cm組織内に浸透する性質を持つ。Er:YAGレーザーの発振波長は2.940 μmで、水によく吸収され、作用が照射部位に局限することから内部組織への有害性が少ない。CO₂レーザーの発振波長は10.6 μmで、エネルギーはほとんど熱に変換される。水に吸収されやすく、止血や口内炎治療、切開、メラニン除去などに用いられる。高出力の照射では組織の蒸散や切開などが主な作用であるが、低出力では、消炎、血流増加、疼痛緩和および創傷治癒促進等を有する⁹⁾。さらに、低出力の照射により、骨修復促進効果が報告されている¹⁰⁾。He-Neレーザーの照射により、骨芽細胞様細胞の増殖が認められ¹⁰⁾、CO₂レーザーにおいても低出力で同様の効果が得られるとの報告がある⁷⁾。

骨シアロタンパク質(BSP)は、Small Integrin Binding Ligand, N-linked Glycoprotein(SIBLING)ファミリー

のメンバーで、Arg-Gly-Asp(RGD)細胞接着配列で細胞に接着し、グルタミン酸連続配列でヒドロキシアパタイトに結合する¹²⁻¹⁴⁾。BSPは石灰化初期に発現し、生理的なカルシウム、リン濃度の準安定溶液中でアパタイト結晶の誘導能を持ち、初期の石灰化に関与すると考えられる¹³⁻¹⁶⁾。さらに、骨に転移を生じる乳ガン、肺ガンおよび前立腺ガン病巣でBSPの発現が認められる事から、BSPはガン局所での石灰化および骨転移に関与すると考えられる¹⁷⁾。マウス、ラットおよびヒトBSPのプロモーター領域は非常に相同性が高く、転写開始位置より370塩基対上流までは約75%の相同性を示す^{14,18-21)}。BSP遺伝子の上流域(プロモーター領域)には、ホルモン、サイトカインおよび成長因子に应答する遺伝子配列が存在し、その配列中には逆配列のTATA配列²²⁾と重複したビタミンD応答配列(VDRE)²³⁾、逆方向のCCAAT配列(-50 ~ -46塩基対上流)^{24,25)}、cAMP応答配列(CRE;-75 ~ -68塩基対上流)²⁶⁻²⁸⁾、FGF2応答配列(FRE;-92 ~ -85塩基対上流)²⁷⁻³²⁾、下垂体特異的転写因子結合配列(Pit-1;-111 ~ -105塩基対上流)^{30,33)}、ホメオボックス応答配列(HOX;-199 ~ -192塩基対上流)^{32,34,35)}、TGF-β₁応答配列(TAE;-499 ~ -485塩基対上流)^{31,35,36)}およびグルココルチコイド応答配列(GRE;-920 ~ -906塩基対上流)³⁷⁾と重複したアクチベータープロテイン1結合配列(AP-1;-921 ~ -915塩基対上流)^{38,39)}などが報告されている。本研究では、低出力のCO₂レーザー照射が、骨代謝を促進する分子生物学的メカニズムを検討するために、石灰化組織特異的に発現するBSPを骨代謝のマーカーとして使用し、BSPの転写調節に対するCO₂レーザーの影響を解析した。

材料および方法

1. 材料および器具

Alpha minimal essential 培地 (α -MEM), ペニシリン・ストレプトマイシン, Tryple Express, ウシ胎児血清 (FCS), β -ガラクトシダーゼプラスミド (pSV- β -Galactosidase Control Vector; β -Gal), アガロース, アクリルアミド, リポフェクタミンは Invitrogen 社製, Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene), 細胞培養シャーレーおよびフラスコ (Corning), ルシフェラーゼアッセイ基質 (東洋インキ), ルミノメーター (Acuu FLEX Lumi 400; ALOKA), [γ - 32 P] ATP および [α - 32 P] dCTP (パーキンエルマー・ジャパン), Hybond-N plus ナイロンメンブレン (GEヘルスケアバイオサイエンス), グアニンチオシアネート (和光純薬工業), CO₂レーザー (ジーシーナノレーザー GL-III) を使用した。

2. 細胞培養と CO₂レーザーによる刺激

ラット骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞は, カナダトロント大学 Dr. Jaro Sodek より供与された。同細胞は BSP を多量に発現し, DNA を導入するトランスフェクション効率が高いことから本実験に使用した。UMR106 細胞を 10% FCS および抗生物質 (100 unit/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシン) を含む α -MEM 培地を使用し, コンフルエントになるまで 37°C, 5%CO₂ インキュベーター内で培養し, CO₂レーザー照射 12 時間前に無血清の α -MEM 培地に交換した。CO₂レーザー照射は, 培養シャーレー (ノーザンプロットでは直径 60 mm, ルシフェラーゼアッセイでは直径 35mm) 中の培地を除去後, レーザー照射口を培養シャーレーから 30 cm 離し, 垂直にレーザー照射を行った。CO₂レーザーはスーパーパルスモードを使用し, 出力は 4 段階 (1 W, 2 W, 3 W および 4 W) に変化させて細胞を 20 秒間照射し, 12 時間後に細胞を回収した。次に, 細胞を 3 W, 20 秒間照射後, 経時的 (0, 3, 6, 12, 24 時間) に細胞を回収した。CO₂レーザー照射の総エネルギー量は, 1 W, 20 秒刺激で 0.715 J/cm², 2 W, 20 秒刺激; 1.429 J/cm², 3 W, 20 秒刺激; 2.144 J/cm², 4 W, 20 秒刺激; 2.858 J/cm² である。

3. ノーザンハイブリダイゼーション

UMR106 細胞からグアニンチオシアネート法で全 RNA を抽出し, 20 μ g を 1.2% アガロースゲルで電気泳動後, ナイロン膜に転写した²⁹⁾。次に紫外線照射により RNA を膜上に固定し, [α - 32 P] dCTP で標識 (ランダムプライム法) した BSP および glycerol-

dehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーション後, メンブレンを 0.1%SDS を含む 2 \times SSC (30 mM 酢酸ナトリウム, 0.3 M 塩化ナトリウム, pH7.0) で 25°C, 30 分間 2 回洗浄し, さらに 55°C で 30 分間洗浄した。次に, 0.1%SDS を含む 0.1 \times SSC で 55°C, 30 分間 2 回洗浄した後, フジ BAS2500 イメージングプレートに約 12 時間コンタクトさせた。ハイブリダイゼーションの結果は, フジ BAS2500 イメージングアナライザーにて解析した。

4. プラスミドの作製

ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだルシフェラーゼプラスミドを, 制限酵素 Hind III および Sal I で切断し, 種々の長さに調節したラット BSP 遺伝子プロモーター遺伝子を挿入した³⁷⁾。作製したコンストラクトは, pLUC1 (-18 ~ +60 塩基対), pLUC2 (-43 ~ +60 塩基対), pLUC3 (-116 ~ +60 塩基対), pLUC4 (-425 ~ +60 塩基対), pLUC5 (-801 ~ +60 塩基対) および pLUC6 (-938 ~ +60 塩基対) であり, pLUCB は BSP プロモーターを含まないルシフェラーゼプラスミドである³⁷⁾。また, Quickchange Site-directed Mutagenesis Kit を用いて, pLUC4 コンストラクト中のプロモーター配列に 2 塩基ずつ変異を挿入したミューテーションルシフェラーゼプラスミドを作製した。全てのミューテーションプラスミドは, 作製後に塩基配列の確認を行った。

5. ルシフェラーゼアッセイ

ルシフェラーゼプラスミドを細胞に導入する 24 時間前に UMR106 細胞を 35 mm シャーレーに播種し, 細胞が 40 ~ 70% コンフルエントの状態に達し, ルシフェラーゼプラスミド (1 μ g) とコントロールとして β -Gal プラスミド (2 μ g) を, リポフェクタミンを用いて細胞に導入した。プラスミドを導入した UMR106 細胞は, 10% FCS を含む α -MEM 培地で 36 時間培養し, 無血清の α -MEM 培地で 12 時間培養後, CO₂レーザー (3W, 20 秒) にて刺激し, 12 時間後細胞を回収した。細胞は PBS で 2 回洗浄し, 細胞溶解液 (125 μ l) にて溶解後, 12,000 \times g で 1 分間遠心し, 上清を活性の測定に用いた。20 μ l の上清と 100 μ l のルシフェラーゼ基質を混合し, ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性の測定を行った。プラスミドの導入効率を補正する目的で, 60 μ l の上清と 66 μ l の β -Gal 基質を混合し, 37°C で 12 時間インキュベート後, 420 nm で吸光度を測定して活性値の補正に用いた。

6. ゲルシフトアッセイ

核内タンパク質と BSP 遺伝子プロモーター配列との結合を検索する目的で, ゲルシフトアッセイを行っ

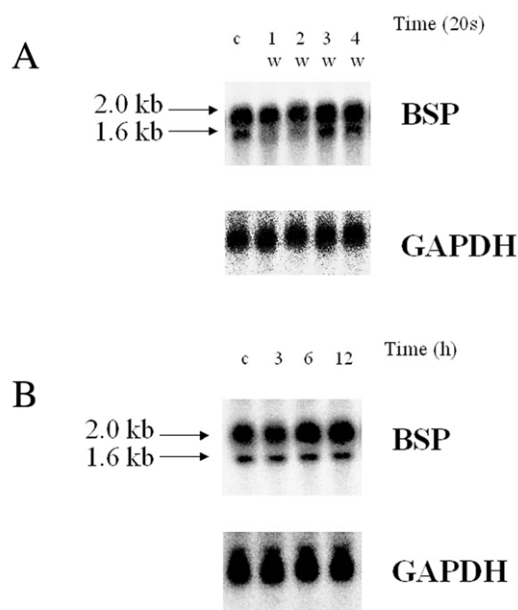


Fig.1 CO₂レーザー刺激による BSPmRNA 発現の変化

A; UMR106 骨芽細胞様細胞を CO₂レーザーの出力(1 W, 2 W, 3 W および 4 W)を変化させて 20 秒間刺激し, 12 時間後に全 RNA を抽出して BSP および GAPDH mRNA 量の変化をノーザンハイブリダイゼーションで解析を行った結果。B; UMR106 細胞を CO₂レーザーにて 3 W, 20 秒間刺激後, 経時的に細胞を回収して全 RNA を抽出し, BSP および GAPDH mRNA 量の変化をノーザンハイブリダイゼーションで検索した結果。

た。ルシフェラーゼアッセイの結果から, pLUC4 に含まれる BSP プロモーター配列中の転写因子結合配列を合成した。合成オリゴヌクレオチドは相補鎖同士がそれぞれ終濃度 10 pmol になるように調整し, 100°C で 5 分間煮沸後, 室温に放置して 2 本鎖にするためのハイブリダイズを行った。合成したオリゴヌクレオチドの配列は CCAAT 配列 (nts, -61 ~ -37 5'-CCGTGACCGTGATTGGCTGCTGAGA-3'), 3'-FRE 配列 (nts, -92 ~ -73 5'-TCTGGTGAGAACCCACAGCCTGA-3'), HOX 配列 (nts, -204 ~ -179 5'- TCCTCAGCCTTCAATTAAATCCCACA -3') である。2 本鎖オリゴヌクレオチドは 2 pmol に希釈し, T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いて [γ -³²P] ATP で標識を行った。UMR106 細胞を CO₂レーザー (3W, 20 秒) で刺激し, 核内タンパク質を抽出した。核内タンパク質 (3 μ g) に, 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.04% Nonidet P-40, 5% glycerol, 0.5 mM EDTA, pH 8.0) と polydI-dC (1 μ g) を加え, アイソトープ標識したオリゴヌクレオチドを添加し, 20 分間室温でインキュベート後, 5% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行った。ゲルを乾燥後, イメージングプレートに 12 時間コンタクトし, イメー

ジングアナライザー (Fuji BAS 2500 富士写真フィルム) にて解析を行った³⁶⁾。

7. 検定

ルシフェラーゼアッセイの結果は, サンプルを 3 回採取後それぞれ測定し, Student's *t*-test を用いて有意差の検定を行った。

結 果

1. BSP mRNA 量の変化

BSP の転写に対する CO₂レーザーの影響を検索するために, CO₂レーザー (スーパーパルスモード使用) の出力を 1 W, 2 W, 3 W および 4 W に変化させ, 培地を除去した UMR106 細胞に 20 秒間照射し, 培地を再添加して 12 時間後に細胞を回収した。その結果, BSP mRNA 量は 3 W, 20 秒間照射で最大となった (Fig. 1A)。次に, UMR106 細胞を CO₂レーザーで 3 W, 20 秒間照射後, 経時的に細胞を回収した結果, BSP mRNA 量は CO₂レーザー刺激 12 時間後に最大となった (Fig. 1B)。

2. BSP の転写活性に対する CO₂レーザーの影響

ラット BSP 遺伝子プロモーター配列の長さを変化させたルシフェラーゼプラスミド (pLUC1 ~ pLUC6)

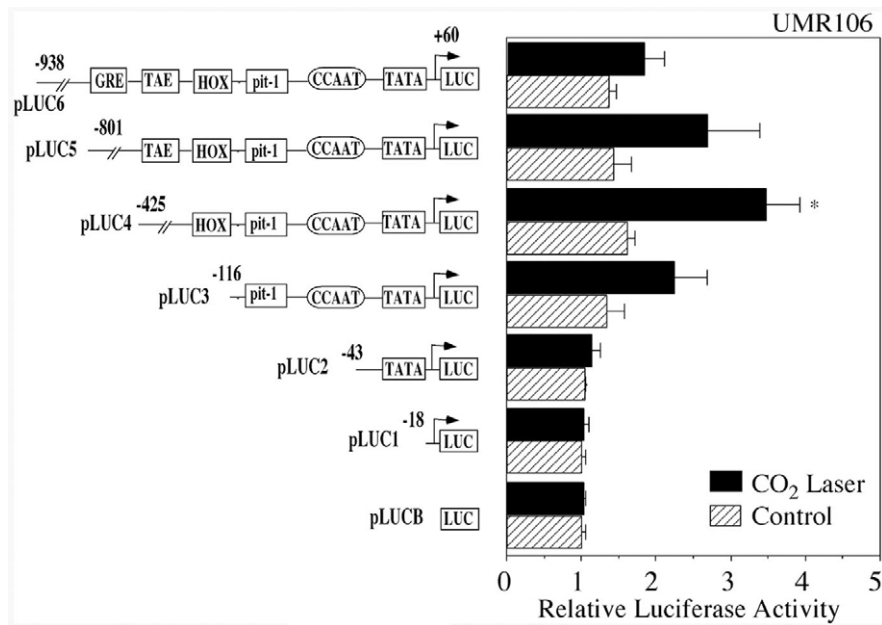


Fig. 2 ラット BSP プロモーターの転写活性に対する CO₂レーザーの効果

pLUCB(BSP プロモーターを含まないルシフェラーゼプラスミド), pLUC1(-18 ~ +60 塩基対), pLUC2(-43 ~ +60 塩基対), pLUC3(-116 ~ +60 塩基対), pLUC4(-425 ~ +60 塩基対), pLUC5(-801 ~ +60 塩基対)および pLUC6(-936 ~ +60 塩基対)の 6 種類のルシフェラーゼプラスミドを UMR106 細胞に導入し, CO₂レーザーで刺激(3 W, 20 秒間)し, 12 時間後の転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて検索した結果。

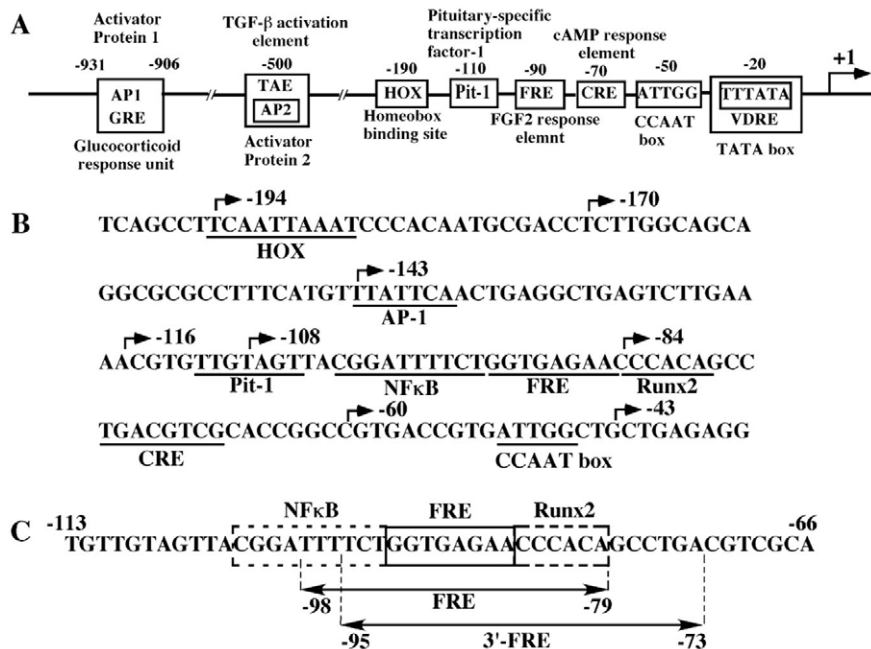


Fig. 3 ラット BSP 遺伝子プロモーターの模式図

A: ラット BSP 遺伝子プロモーターの転写開始点から -931 塩基対上流までの転写因子結合配列の模式図。B: ラット BSP 遺伝子プロモーターの -35 ~ 201 塩基対上流までの塩基配列。下線は, 逆方向の CCAAT 配列(-50 ~ -46 塩基対), cAMP 応答配列 (CRE; -75 ~ -68 塩基対), Runx2 応答配列(Runx2; -84 ~ -79 塩基対), FGF2 応答配列 (FRE; -92 ~ -85 塩基対), 下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit-1; -111 ~ -105 塩基対), ホメオボックス応答配列 (HOX; -199 ~ -192 塩基対)。C: BSP 遺伝子プロモーターの -113 から -66 塩基対上流までの配列と, FRE と 3'-FRE 配列の詳細。

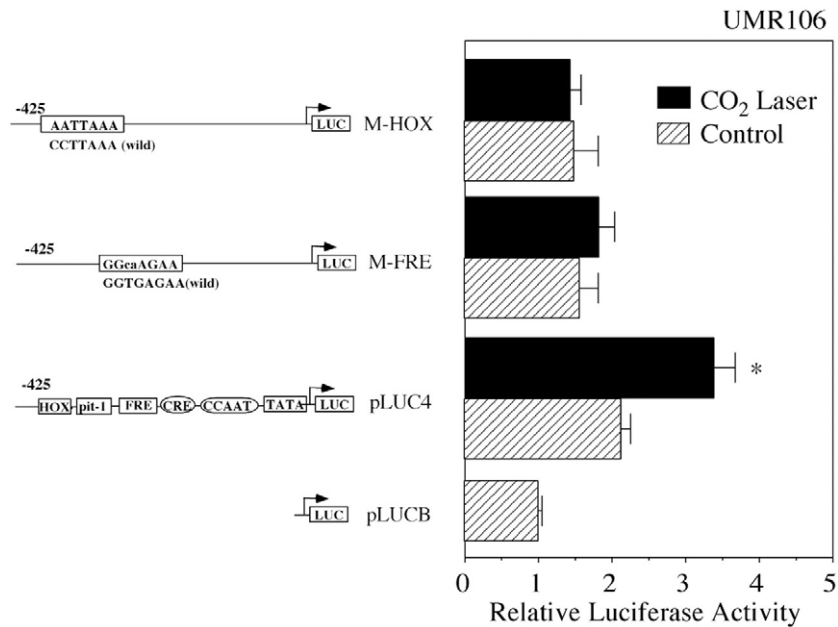


Fig. 4 ミューテーションルシフェラーゼコンストラクトに対する CO₂レーザーの効果

ラット BSP 遺伝子プロモーター中の転写因子結合配列 (FRE および HOX) に 2 塩基対のミューテーションを挿入したルシフェラーゼコンストラクト (M-FRE および M-HOX) を UMR106 細胞に導入し、CO₂レーザーにて 3 W, 20 秒間刺激後、12 時間後に細胞を回収して転写活性の影響をルシフェラーゼアッセイにて検索を行った結果。

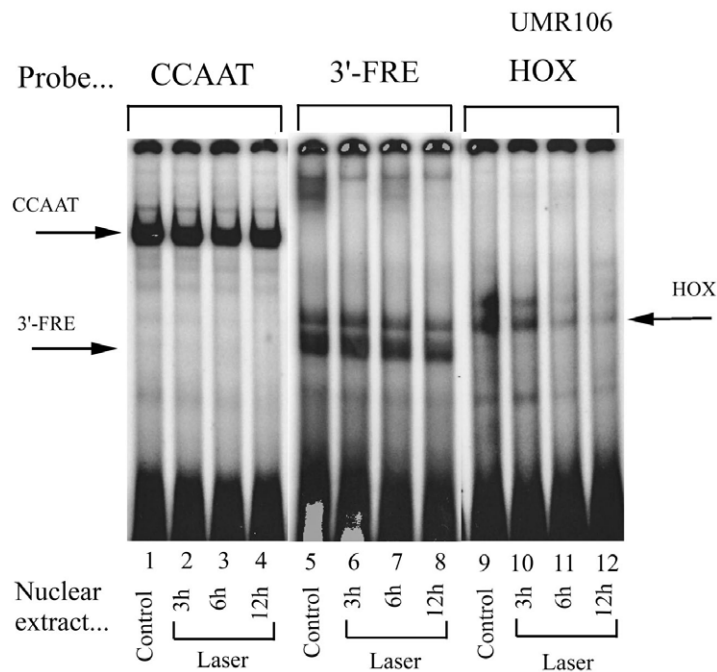


Fig. 5 CO₂レーザーが核内タンパク質と転写因子結合配列との結合に与える影響

逆方向の CCAAT, 3'-FRE および HOX 配列をアイソトープ標識し、CO₂レーザーにて 3 W, 20 秒間刺激後、経時的に細胞を回収し抽出した核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した結果。

を UMR106 細胞に導入した。CO₂レーザーにて 3 W, 20 秒間刺激し, 12 時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した結果, pLUC3(-116 ~ +60 塩基対), pLUC4(-425 ~ +60 塩基対), pLUC5(-801 ~ +60 塩基対)および pLUC6(-938 ~ +60 塩基対)の活性が上昇したが, pLUC4 にのみ有意差 ($p < 0.1$) が認められた (Fig. 2)。以上の結果から, BSP の転写活性は CO₂レーザーにより促進され, BSP 遺伝子プロモーターの転写開始点から -425 塩基対上流までの配列中に転写調節配列が存在すると考えられた。

ラット BSP 遺伝子プロモーター中(-425 ~ -43 塩基対上流)には, 逆方向の CCAAT 配列(-50 ~ -46 塩基対上流), cAMP 応答配列 (CRE; -75 ~ -68 塩基対上流), FGF2 応答配列 (FRE; -92 ~ -85 塩基対上流), 下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit-1; -111 ~ -105 塩基対上流), ホメオボックス応答配列 (HOX; -194 ~ -185 塩基対)等が存在する (Fig. 3)。

CO₂レーザーに反応すると考えられる BSP プロモーター中の転写因子結合配列 (FRE および HOX 配列) に 2 塩基ずつのミューテーションを導入した pLUC4 のミューテーションプラスミドを作製した。FRE および HOX 配列にミューテーションを挿入すると, CO₂レーザーによる転写活性の上昇が抑制された。以上のことから, FRE および HOX 配列は CO₂レーザーに反応する配列であると考えられた (Fig. 4)。

3. ゲルシフトアッセイ

ルシフェラーゼアッセイの結果から, FRE および HOX 配列は CO₂レーザーによる転写調節に関与するプロモーター配列であると考えられた。そこで, 両配列と UMR106 細胞から抽出した核内タンパク質の結合をゲルシフトアッセイにて検索した。3'-FRE および HOX 配列と UMR106 細胞から抽出した核内タンパク質の結合をゲルシフトアッセイにて検索したところ, 3'-FRE および HOX 配列への核内タンパク質の結合は, コントロールに比べて経時的に減少した (Fig. 5)。

考 察

レーザーからの放射エネルギーが組織に吸収されるとエネルギーは熱に変換される。そのため, レーザーの治療的応用については, レーザーの生体刺激により組織を賦活化し, 消炎鎮痛, 除痛, 創傷治癒促進および骨再生促進などの効果が期待されている¹⁻⁸⁾。今回使用した CO₂レーザーは, 歯科領域で広く使用されており, 水に吸収されやすいことから, 深部組織に影響

を与えることが少ない。低出力レーザーの照射による骨再生の促進効果が報告されているが, CO₂レーザーの様な高出力レーザーであっても, 照射エネルギーを低くすることで低出力レーザーと同様の効果が得られる可能性が考えられる^{9,10)}。そこで, 本研究では, CO₂レーザーの照射エネルギーを低く設定し, 初期の石灰化に重要な役割を果たしていると考えられる BSP の転写調節に対する影響を検索した。

骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞を, CO₂レーザーで 3 W, 20 秒間刺激し, 経時的に細胞を回収して BSP mRNA の発現量の変化を検索した結果, BSP mRNA 量は刺激 12 時間後に最大となった (Fig. 1)。以上の結果は, CO₂レーザーの照射 (20 秒間) の効果が, BSP mRNA 量の変化として現れるのに 12 時間必要であることを示している。CO₂レーザー刺激後のシグナル伝達系およびタンパク質合成の関与等は今後の検討課題であると思われる。

ルシフェラーゼアッセイの結果, pLUC4(-425 ~ +60 塩基対)で転写活性の上昇が有意に認められ, pLUC1(-18 ~ +60 塩基対)および pLUC2(-43 ~ +60 塩基対)では, 活性に変化が認められなかったことから, CO₂レーザーに反応する配列は BSP 遺伝子プロモーターの -43 から -425 塩基対上流までの間に存在すると考えられた (Fig. 2)。さらに, ミューテーションプラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイの結果, FRE および HOX 配列が CO₂レーザー刺激に反応する配列である可能性が考えられた (Fig. 4)。CO₂レーザー刺激後に, 3'-FRE および HOX 配列と核内タンパク質の結合が経時的に減少したことから, 3'-FRE および HOX 配列に結合する核内転写因子の結合量の減少が, CO₂レーザーによる BSP の転写調節に関係していると考えられた (Fig. 5)。これまでの研究の結果, FRE および HOX 配列に近接して Runx2 結合配列 (CCCACA) が存在するが (Fig. 3), FRE 配列に近接した Runx2 結合配列にのみ Runx2 が結合する結果を得ている³²⁾。また, FRE および HOX 配列には Dlx5, Smad1 等の転写因子が結合し, BSP の転写を調節していると考えられる³²⁾。FRE および HOX 両配列への転写因子の結合の減少が, どの様に CO₂レーザーによる BSP の転写調節に関わるかは, 今後の研究課題である。

以上の結果から, CO₂レーザーは BSP プロモーターの転写開始点から -85 ~ -92 塩基対上流に存在する FRE 配列および -194 ~ -185 塩基対上流に存在する HOX 配列に結合する転写因子を介して BSP の転写を調節していると考えられた。

今後, CO₂レーザーが BSP プロモーター配列に結合

するどのような転写因子の活性を調節し、BSPの転写に関与するかを検索する予定である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対してご協力と励ましをいただいた歯周治療学講座の皆様は厚く御礼申し上げますとともに、本研究を実施するにあたり、ご協力いただきました株式会社ミワテック、株式会社ジーシーの各位に御礼申し上げます。本研究の一部は基盤研究(B)課題番号18390563および萌芽研究課題番号18659625の補助を受けて行った。

文 献

- 葛西眞一, 山本康弘, 小谷裕美, 安藤修敏, 神谷和則, 河野 透: 損傷・潰瘍の治療. 日本レーザー医学会誌, 18: 27-34, 1997.
- 鈴木浩之, 田中英俊, 橋本賢二: 培養骨芽細胞に対する半導体レーザー照射の影響に関する実験的研究. 日本レーザー歯学会誌, 5: 41-46, 1994.
- 中嶋正人, 平田健一, 篠田公敬, 渡邊 好, 寺野竹彦, 保地富夫, 関根一郎, 木村健一, 向山嘉幸: 低出力レーザーの疼痛抑制効果第一報ラット開口反射に及ぼす影響. 日歯保存誌, 34: 329-334, 1991.
- Walsh LJ: The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. Aust Dent J, 42: 247-254, 1997.
- Bednarska K, Rozga B, Kolodziejczyk K, Szosland D, Leyko W, Bryszewska M: Effect of low-power red light laser irradiation on the viability of human skin fibroblast. Radiat Environ Biophys, 37: 215-217, 1998.
- De Long HP, Schakenraad JM, Busscher HJ: Spreading of human fibroblasts on pretreated human root dentine. J Biol Buccale, 16: 31-34, 1998.
- 堅田尚生: レーザー照射が線維芽細胞のPGE₂産生に及ぼす影響. 愛院大歯誌, 32: 159-167, 1994.
- Yu Hs, Wu HS, Yu CL, Kao YH, Chiou MH: Helium-Neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. J Invest Dermatol, 120: 56-64, 2003.
- 石川 烈, 渡邊 久: レーザー治療 臨床歯周病学第3編, 第6章, 294-301, 第1版, 医歯薬出版, 東京, 2007.
- 長澤明範, 浅井 浩, 山本 肇, 加藤一: レーザーの骨組織修復促進効果に関する試験的研究. 日本レーザー医学会誌, 7: 73-74, 1987.
- 宮島邦彰, 吉田光志, 神谷一有, 堅田尚生, 千田 彰, 原 学郎: He-Ne レーザーの培養細胞に対する照射効果に関する研究・第1報 骨芽細胞様細胞に対する効果. 日歯保存誌, 35: 911-915, 1992.
- Oldberg Å, Franzén A, Heinegård D: The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. J Biol Chem, 263: 19430-19432, 1988.
- Ganss B, Kim RH, Sodek J: Bone sialoprotein. Crit Rev Oral Biol Med, 10: 79-98, 1999.
- Ogata Y: Bone Sialoprotein (BSP) and its transcriptional regulatory mechanism. J Perio Res, 43, 127-135, 2008.
- Chen J, Shapiro HS, Sodek J: Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. J Bone Miner Res, 7: 987-997, 1992.
- Hunter GK, Goldberg HA: Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 8562-8565, 1993.
- Waltregny D, Bellahcène A, Leval X. D, Florkin B, Weidle U, Castronovo V: Increased expression of bone sialoprotein in bone metastases compared with visceral metastases in human breast and prostate cancers. J Bone Miner Res, 15: 834-843, 2000.
- Li JJ, Sodek J: Cloning and characterization of the rat bone sialoprotein gene promoter. Biochem J, 289: 625-629, 1993.
- Kerr JM, Fisher LW, Termine JD, Wang MG, McBride OW, Young MF: The human bone sialoprotein gene (IBSP): Genomic localization and characterization. Genomics, 17: 408-415, 1993.
- Kim RH, Shapiro HS, Li JJ, Wrana JL, Sodek J: Characterization of the human bone sialoprotein (BSP) gene and its promoter sequence. Matrix Biol, 14: 31-40, 1994.
- Benson MD, Aubin JE, Xiao G, Thomas PE, Franceschi RT: Cloning of a 2.5kb murine bone sialoprotein promoter fragment and functional analysis of putative Osf2 binding sites. J Bone Miner Res, 14: 396-405, 1999.
- Li JJ, Kim RH, Sodek J: An inverted TATA box directs downstream transcription of the bone sialoprotein gene. Biochem J, 310: 33-40, 1995.
- Kim RH, Li JJ, Ogata Y, Yamauchi M, Freedman LP, Sodek J: Identification of a Vitamin D3-response element that overlaps a unique inverted TATA box in the rat bone sialoprotein gene. Biochem J, 318: 219-226, 1996.
- Kim RH, Sodek J: Transcription of the bone sialoprotein gene is stimulated by v-Src acting through an inverted CCAAT box. Cancer Res, 59: 565-571, 1999.
- Shimizu E, Ogata Y: Activation of bone sialoprotein

- gene transcription by flavonoids is mediated through an inverted CCAAT box in ROS 17/2.8 cells. *J Cell Biochem*, 86: 35–44, 2002.
- 26) Samoto H, Shimizu E, Matsuda-Honjyo Y, Saito R, Yamazaki M, Kasai K, Furuyama S, Sugiya H, Sodek J, Ogata Y: TNF- α suppresses bone sialoprotein (BSP) expression in ROS 17/2.8 cells. *J Cell Biochem*, 87: 313–323, 2002.
- 27) Samoto H, Shimizu E, Matsuda-Honjyo Y, Saito R, Nakao S, Yamazaki M, Furuyama S, Suguya H, Sodek J, Ogata Y: Prostaglandin E2 stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through cAMP and FGF2 response elements in the proximal promoter of the rat BSP gene. *J Biol Chem*, 278: 28659–28667, 2003.
- 28) Shimizu E, Nakayama Y, Nakajima Y, Kato N, Takai H, Kim D, Arai M, Saito R, Sodek J, Ogata Y: Fibroblast growth factor 2 and cyclic AMP synergistically regulate bone sialoprotein gene expression. *Bone*, 39:42–52, 2006.
- 29) Shimizu-Sasaki E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiya H, Sodek J, Ogata Y: Identification of a novel response element in the rat bone sialoprotein (BSP) gene promoter that mediates constitutive and fibroblast growth factor 2-induced expression of BSP. *J Biol Chem*, 276: 5459–5466, 2001.
- 30) Shimizu E, Matsuda-Honjyo Y, Samoto H, Saito R, Nakajima Y, Nakayama Y, Kato N, Yamazaki M, Ogata Y: Static magnetic fields-induced bone sialoprotein (BSP) expression is mediated through FGF2 response element and pituitary-specific transcription factor-1 motif. *J Cell Biochem*, 91: 1183–1196, 2004a.
- 31) Shimizu E, Saito R, Nakayama Y, Nakajima Y, Kato N, Takai H, Kim D, Arai M, Simmer J, Ogata Y: Amelogenin stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through FGF2 response element and TGF- β_1 activation element in the promoter of the BSP gene. *J Periodontol*, 76: 1482–1489, 2005.
- 32) Nakayama Y, Nakajima Y, Kato N, Takai H, Kim D, Arai M, Mezawa M, Araki S, Sodek J, Ogata Y: Insulin-like growth factor-I increases bone sialoprotein (BSP) expression through fibroblast growth factor-2 response element and homeodomain protein-binding site in the proximal promoter of the BSP gene. *J Cell Physiol*, 208: 326–335, 2006.
- 33) Ogata Y, Nakao S, Kim RH, Li JJ, Furuyama S, Sugiya H, Sodek J: Parathyroid hormone regulation of bone sialoprotein (BSP) gene transcription is mediated through a pituitary specific transcription factor-1 (Pit-1) motif in the rat BSP gene promoter. *Matrix Biol*, 19: 395–407, 2000.
- 34) Benson MD, Bargeon JL, Xiao G, Thomas PE, Kim A, Cui Y, Franceschi RT: Identification of a homeodomain binding element in the bone sialoprotein gene promoter that is required for its osteoblast-selective expression. *J Biol Chem*, 275: 13907–13917, 2000.
- 35) Shimizu E, Nakajima Y, Kato N, Nakayama Y, Saito R, Samoto H, Ogata Y: Regulation of rat bone sialoprotein (BSP) gene transcription by enamel matrix derivative. *J Periodontol*, 75: 260–267, 2004b.
- 36) Ogata Y, Niisato N, Furuyama S, Cheifetz S, Kim RH, Sugiya H, Sodek J: Transforming growth factor- β_1 regulation of bone sialoprotein gene transcription: identification of a TGF- β activation element in the rat BSP gene promoter. *J Cell Biochem*, 65: 501–512, 1997.
- 37) Ogata Y, Yamauchi M, Kim RH, Li JJ, Freedman LP, Sodek J: Glucocorticoid regulation of bone sialoprotein (BSP) gene expression: identification of a glucocorticoid response element in the bone sialoprotein gene promoter. *Eur J Biochem*, 230: 183–192, 1995.
- 38) Yamauchi M, Ogata Y, Kim RH, Li JJ, Freedman LP, Sodek J: AP-1 regulation of the rat bone sialoprotein gene transcription is mediated through a TPA response element within a glucocorticoid response unit in the gene promoter. *Matrix Biol*, 15: 119–130, 1996.
- 39) Takai H, Araki S, Mezawa M, Kim D, Li X, Yang L, Li Z, Wang Z, Nakayama Y and Ogata Y: AP1 Binding Site is Another Target of FGF2 Regulation of Bone Sialoprotein Gene Transcription. *Gene*, 410: 97–104, 2008.