

骨シアロタンパク質の転写に対する成長因子の効果と 歯周組織再生治療への応用の可能性

小方 頼 昌

日本大学松戸歯学部歯周病学講座

Effects of Growth Factors on Bone Sialoprotein (BSP) Transcription and Search for the Possibility of Clinical Use of Growth Factors for Periodontal Tissue Regeneration

Yorimasa Ogata

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

1. 緒 言

骨は、形態維持と生体内でのカルシウム貯蔵庫としての役割をになう器官であり、常に形成と吸収をバランスよく繰り返す（骨のリモデリング）、その機能と構造を保っている。近年、食生活の変化や、高齢化に伴い、骨粗鬆症や歯周病などの骨疾患の増加が顕著であり、QOL（クオリティーオブライフ）の維持をおびやかしつつある。骨シアロタンパク質（BSP）は、石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現し、試験管内でハイドロキシアパタイト結晶形成能を有することから、初期の石灰化部位における結晶形成に関与すると考えられる¹⁾。このことから、BSPの転写調節機構を明らかにし、その遺伝子およびタンパク質発現を調節する因子（成長因子、ホルモン等）を臨床応用することで、骨粗鬆症や歯周病の骨吸収を抑制し、歯周組織再生に応用できる可能性があると考えられる。

BSPは、リン酸化および硫酸化を受けた糖タンパク質で、その配列中にRGD（アルギニン-グリシン

—アスパラギン酸）細胞接着配列およびグルタミン酸連続配列を有し、RGD配列で細胞に接着し、グルタミン酸連続配列で、カルシウムおよびアパタイト結晶に結合する^{2,3)}（図1）。さらに最近では、骨に転移を生ずる乳がん、前立腺がん、肺がん病巣でBSPの発現が認められることから、BSPはがんの骨転移に関与することが示唆されている^{3,4)}。

2. BSP 遺伝子プロモーター領域の 塩基配列と転写因子結合配列

構造遺伝子の upstream をプロモーター遺伝子と呼ぶ。プロモーターは調節遺伝子の一種で、RNAポリメラーゼや転写因子が結合し、転写の調節に関わる領域である。BSP 遺伝子プロモーター領域には、成長因子およびホルモンに応答する塩基配列（レスポンスエレメント；応答配列）が多数存在し、転写を調節していると考えられる。ラット、マウスおよびヒト BSP のプロモーター遺伝子配列は、転写開始点から 370 塩基対上流までは約 75% の相同性を示す^{5,6)}。その配列中

連絡先：小方頼昌

〒271-8587 千葉県松戸市栄町 2-870-1 日本大学松戸歯学部歯周病学講座

Yorimasa Ogata

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

870-1, Sakaecho, Nishi-2, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

E-mail ogata@mascad.nihon-u.ac.jp

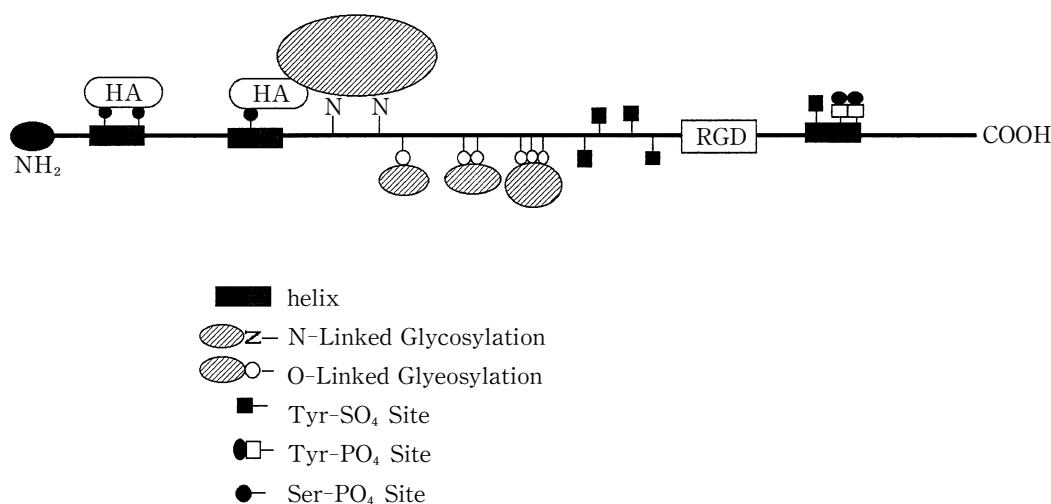


図1 BSPの構造の模式図

N末端付近にhelix構造が存在し、同部分のグルタミン酸連続配列を介してアパタイト(HA)に結合する。RGD細胞接着配列はC末端近くに存在する。その他、糖結合部位、リン酸化、硫酸化部位を示す。

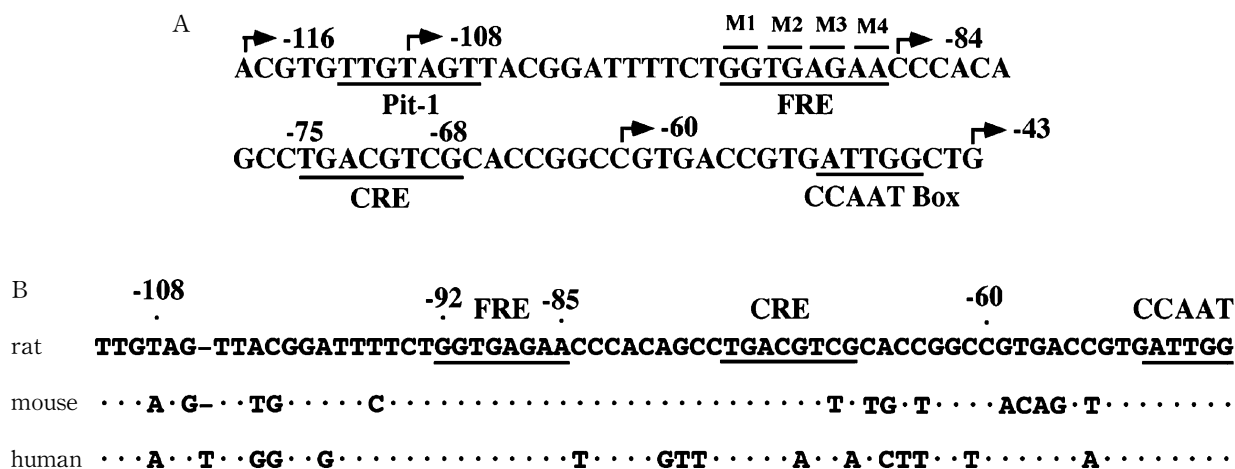


図2 A: ラット BSP プロモーター遺伝子配列(-116~-43)を示す。同配列内には、Pit-1 配列, FRE 配列, CRE 配列および逆方向の CCAAT 配列が存在する。FRE の上には、ミューテーションを挿入した部位(M1~M4)を示した。詳細は文献12)を参照のこと。B: ラット, マウスおよびヒト BSP プロモーター配列の比較。相同性が高く、特に FRE および CCAAT 配列は完全に保存されている。

には、逆方向の TATA 配列(-20 塩基対上流)⁷⁾と重複したビタミン D 受容体結合配列 (VDRE)⁸⁾, 逆方向の CCAAT 配列(-50 塩基対上流)⁹⁾, cAMP 応答配列 (CRE; -70 塩基対上流)^{10,11)}, 塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF 2) 応答配列 (FRE; -90 塩基対上流)^{11~13)}, 下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit 1; -108 塩基対上流)^{13,14)}, TGF- β 応答配列(-500 塩基対上流)^{15,16)}, グルココルチコイド応答配列 (GRE; -930 塩基対上流)¹⁷⁾ および同配列に重複したアクチベータープロテイン 1 (AP 1) 結合配列¹⁸⁾

等が存在する(図2)。マウス BSP 遺伝子プロモーターの転写開始点から約-190 塩基対上流に存在するホメオボックス (HOX) 応答配列に Dlx 5 転写因子が結合し、BSP の石灰化組織特異的発現が調節されていることが報告されたが¹⁹⁾, その内容を否定する論文が最近報告された^{6,20)}。BSP 遺伝子発現における HOX 応答配列の意義については、今後の研究結果を待たなければならない。

3. BSP の転写に対する FGF 2 の効果

ホルモンや成長因子、メカニカルストレス等が骨のリモデリングを調節し、骨量を常に一定に保っている。FGF 2 は、胎生期より形態形成、骨成長や創傷治癒に重要な役割を果たすヘパリン結合型成長因子であり、骨芽細胞においても合成分泌され、細胞外マトリックス中に活性型として貯蔵されている²¹⁻²⁴)。FGF ファミリーの細胞内情報伝達系は膜貫通型の受容体 (FGFR 1~4) によりチロシンのリン酸化を介する²⁵⁻²⁹)。FGF 2 は FGFR 1 と FGFR 2 に結合する。FGFR 1 遺伝子変異により、常染色体優性遺伝に起因する Pfeiffer 症候群が発症する。同疾患は、頭蓋冠の変形、手の親指、足の指が大きいことを特徴とする²⁶)。FGFR 2 と FGFR 3 の遺伝子異常により骨成長に異常が生じ、常染色体遺伝疾患である Jackson-Weiss, Crouzon 症候群は FGFR 2 遺伝子の変異で発症する。両症候群は変異遺伝子の位置が異なり、頭蓋冠の変形、手足の指および爪の変形が認められる^{27,28})。また、thanatophoric dysplasia や軟骨形成不全症は FGFR 3 遺伝子異常が原因である²⁹)。FGFR 3 ノックアウトマウスでは長幹骨が長くなることから、FGFR 3 は骨成長を抑制していると考えられる³⁰)。

ラット骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞である ROS 17/2.8 細胞を FGF 2 で刺激しノーザンブロット法で解析すると、濃度依存的 (1, 10, 50 ng/ml, 6 時間刺激; 図 3 A), 経時的 (10 ng/ml 刺激, 3, 6, 12, 24 時間; 結果は示していない) に BSP の mRNA 量は増加した。転写阻害剤を用いたノーザンブロットの結果, BSP mRNA の半減期は FGF 2 刺激前後で変化はなかった。FGF 2 による BSP の転写調節を調べる目的で, ラット BSP プロモーターを含むルシフェラーゼコンストラクト (pLUC 1~pLUC 5) を作成し, ROS 17/2.8 細胞に導入後, FGF 2 (10 ng/ml) で 6 時間刺激し, ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果, pLUC 3 (-116~+60 塩基対) と pLUC 3 よりも長いプロモーター配列を含むコンストラクトで, FGF 2 により約 3 倍の転写活性の上昇が認められた (図 4 A)。pLUC 3 に含まれるプロモーター配列である -116 から -43 塩基対までのプロモーター配列をさらに短く切断したコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行ったところ, -108 塩基対上流までのプロモーター配列では, FGF 2 による転写活性の上昇が認められ, -84 塩基対上流までのプロモーター配列を含むコンストラクトでは転写活性の上昇は認められなかった。以上のことから, -108 か

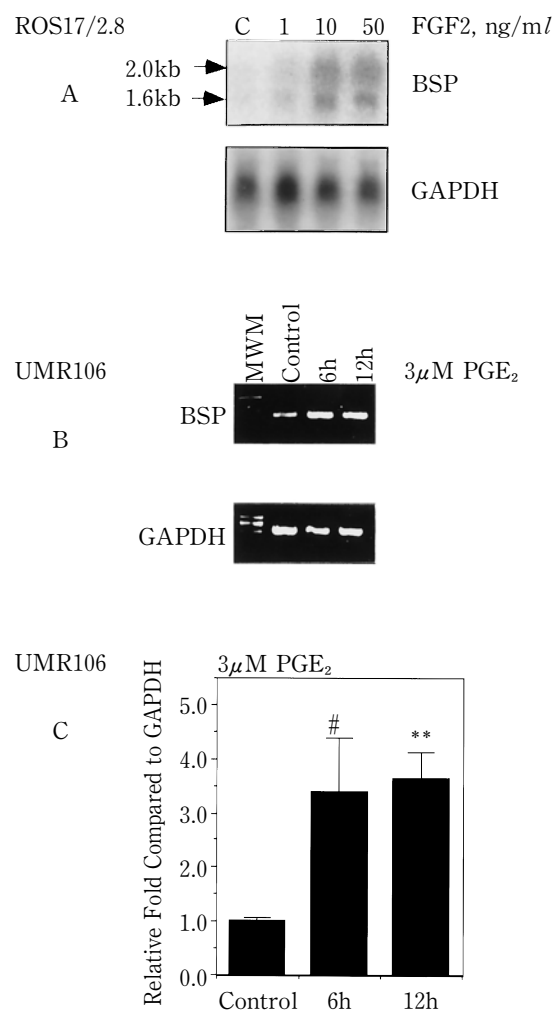


図 3 A: ROS 17/2.8 細胞に対する FGF 2 (6 時間刺激) の効果 (ノーザンブロット法)。B: UMR 106 細胞に対する PGE₂ (3 μM) の効果 (RT-PCR)。C: UMR 106 細胞に対する PGE₂ (3 μM) の効果 (Real-time PCR)。

ら -84 塩基上流までの BSP プロモーター中に FGF 2 応答配列が存在すると考えられた。次に, -92 から -85 塩基対上流の間に存在する塩基配列を 2 塩基対ずつ変化させたミューテイションルシフェラーゼコンストラクト pLUC 3 M 1~4 を作製した (図 2 A)。FGF 2 刺激前のミューテイションプラスミドの basal 活性は pLUC 3 に比べて全てのコンストラクトで低く, その中でも pLUC 3 M 2 が最も低値を示した。次に FGF 2 刺激を行うと, FGF 2 による転写活性の上昇はすべてのミューテイションコンストラクトで抑制されたが, その中でも pLUC 3 M 2 が最も抑制された。以上のことからラット BSP プロモーター中の -92 から -85 塩基対の間の配列を FGF 2 応答配列

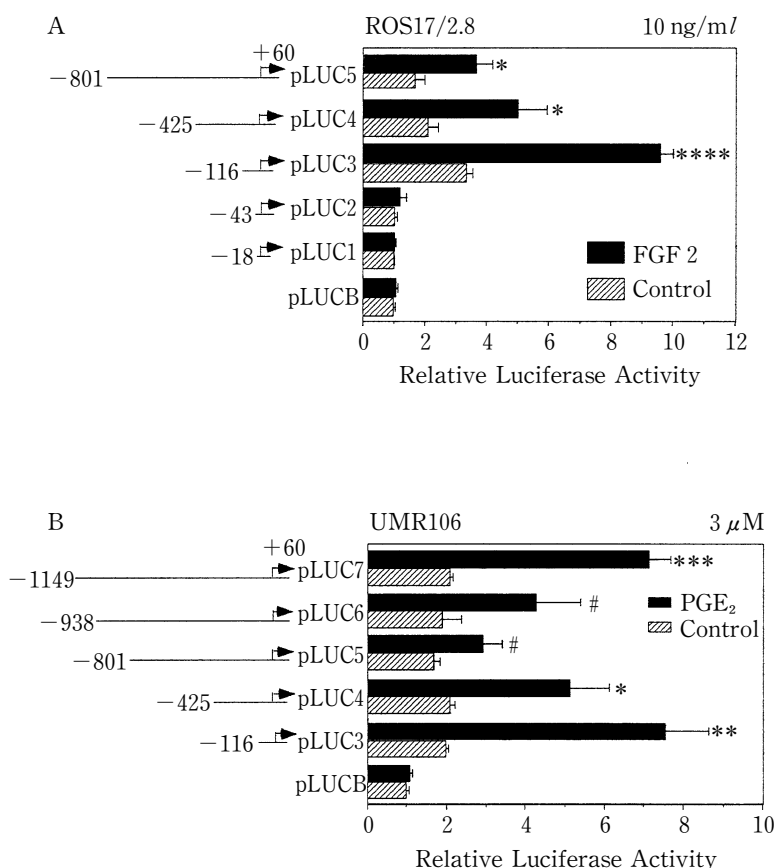


図4 A: ラット BSP プロモーターを含むルシフェラーゼコンストラクト (pLUC 1~pLUC 5) を作成し, ROS 17/2.8 細胞に導入後, FGF 2 (10 ng/ml) で6時間刺激し, ルシフェラーゼアッセイを行った結果。B: ルシフェラーゼプラスミド (pLUC 3~pLUC 7) を UMR 106 細胞に導入し, PGE₂ (3 μM) にて12時間刺激後ルシフェラーゼアッセイを行った結果。

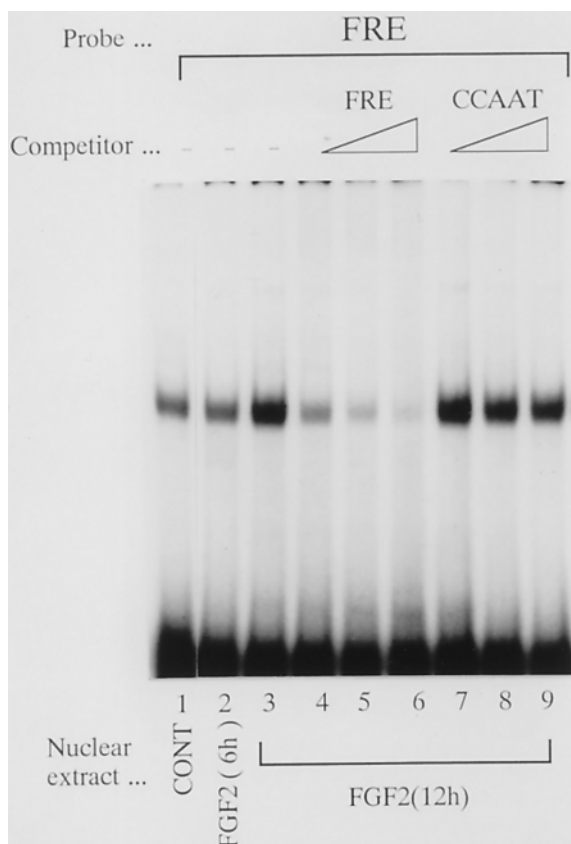
(FRE) と同定した¹²⁾。FRE 配列はラット, マウス, およびヒトで完全に保存されていることから, BSP の発現および FGF 2 による転写調節に重要な塩基配列であると考えられる (図2B)。FGF 2 による細胞内情報伝達系を検索する目的で, 各種リン酸化阻害剤を用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果, Src チロシンキナーゼ阻害剤である PP 1, チロシンキナーゼ阻害剤のハービマイシン A そして MAP キナーゼ阻害剤の U 0126 で FGF 2 による転写活性の上昇が抑制された。以上のことから, FGF 2 は Src チロシンキナーゼおよび MAP キナーゼ系を介して作用すると考えられた。FRE 配列と核内タンパク質 (転写因子) との結合をゲルシフトアッセイで検索したところ, ROS 17/2.8 細胞から抽出した核内タンパク質とアイソトープ標識した FRE との結合は, FGF 2 (10 ng/ml) 刺激後, 経時的に増加した。さらに, 非標識の FRE では競合され, CCAAT では競

合されないことから, その結合は特異的であると考えられた (図5A)¹²⁾。最近, プロスタグランジン E₂ (PGE₂) および静磁場 (メカニカルストレス) による BSP の転写調節に, FRE が関与することが報告された^{11,13)}。

4. BSP の転写に対するプロスタグランジン E₂ (PGE₂) の効果

PGE₂ は骨芽細胞により産生され, 骨吸収を促進し, さらに骨髓細胞培養系で破骨細胞形成を促進する³¹⁻³⁴⁾。PGE₂ の破骨細胞分化に対する効果は, 骨芽細胞を介する。骨芽細胞は, マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)³⁵⁾ や Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand (RANKL) を発現し, 破骨細胞形成を促進する³⁶⁾。osteoprotegerin (OPG) は RANKL のおとり受容体として働き, 破骨細胞形

A ROS 17/2.8



B UMR 106

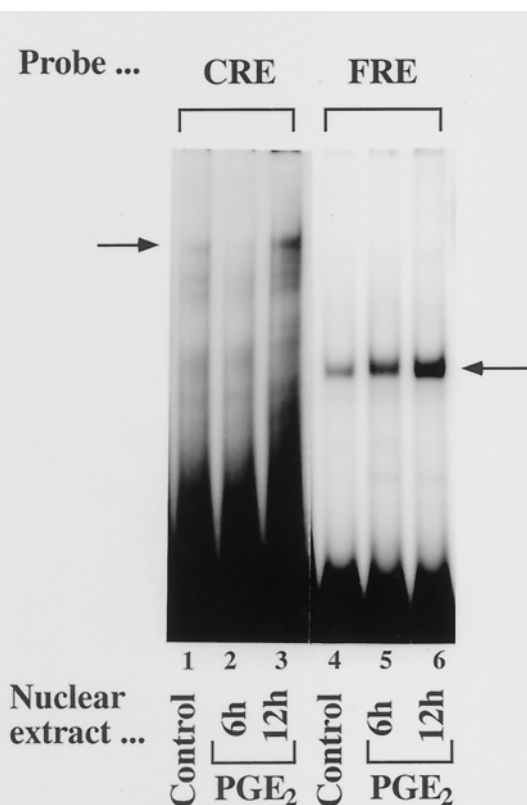


図5 A: FRE 配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイで検索した結果。ROS 17/2.8 細胞から抽出した核内タンパク質とアイソトープ標識した FRE との結合は、FGF 2 (10 ng/ml) 刺激後、経時的に増加した。さらに、非標識の FRE では競合され、CCAAT では競合されなかった。B: CRE および FRE 配列と核内タンパク質との結合は、PGE₂ 刺激後に経時的に増加を示した。

成を抑制する³⁷⁾。PGE₂ は RANKL および IL-6 の発現を促進し、OPG の発現を抑制することにより骨吸収を促進するが、その一方で、骨形成も促進する^{31,36,38-42)}。PGE₂ は、*in vivo* での骨量増加作用を有し、頭蓋骨の器官培養系で、コラーゲンおよび DNA 合成を促進する⁴³⁻⁴⁶⁾。PGE₂ はその濃度や投与方法により骨芽細胞の成長と分化を促進または抑制する。PGE₂ 受容体 (EP) は EP 1~4 の 4 種類のサブタイプが存在し、G タンパク質と共役してシグナルを伝達する^{32,42)}。EP 1 は細胞内カルシウム動態と関連し、EP 2 および EP 4 はアデニル酸シクラーゼの活性化、EP 3 はアデニル酸シクラーゼを抑制する⁴⁷⁻⁴⁹⁾。MC 3 T 3-E 1 骨芽細胞様細胞において、EP 1 アゴニストは細胞増殖を促進し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を抑制する。一方、EP 4 アゴニストは細胞増殖を抑制し、ALP 活性を促進する⁵⁰⁾。EP 4 受容体刺激は骨形成を促進し、骨吸収を

抑制することから、EP 4 ノックアウトマウスではリポポリサッカライド (LPS) による骨吸収は誘導されない^{51,52)}。以上のことから、PGE₂ は骨代謝において重要な役割を担うと考えられる。

PGE₂ (3 μM) にて、6 および 12 時間刺激した UMR 106 骨芽細胞様細胞から全 RNA を抽出し、BSP mRNA 量の変化を RT-PCR (図 3 B) および real-time PCR (図 3 C) にて検索した結果、BSP mRNA の発現は、6 および 12 時間で優位に上昇した。ルシフェラーゼプラスミド (pLUC 1~pLUC 7) を UMR 106 細胞に導入し、PGE₂ (3 μM) にて 12 時間刺激後ルシフェラーゼアッセイを行った結果、pLUC 3 (-116~+60 塩基対) およびそれよりも長いプロモーター配列を含むルシフェラーゼコンストラクトで転写活性の上昇が認められ (図 4 B)、短いプロモーター配列を含むコンストラクト (pLUC 2; -43~+60 塩基対) では転写活性に変化はなかった

(結果は示していない)。以上の結果から、ラット BSP 遺伝子プロモーターの-116塩基対上流までの配列中に、PGE₂ 応答配列が存在すると考えられた。PGE₂ による BSP の転写調節に関わる細胞内情報伝達系を検索するために、pLUC 3 ルシフェラーゼプラスミドを UMR 106 細胞に導入し、リン酸化阻害剤を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。A キナーゼ阻害剤である H 89, チロシンキナーゼ阻害剤の HA, Src チロシンキナーゼ阻害剤である PP1 および MAP キナーゼキナーゼ (MEK) 阻害剤の U 0126 で、PGE₂ による転写活性の上昇が抑制されたが、C キナーゼ阻害剤 (H 7) では効果が認められなかった。以上の結果から、PGE₂ は、A キナーゼ、チロシンキナーゼおよび MAP キナーゼ系を介して BSP の転写を調節すると考えられた。

PGE₂ に応答すると考えられる-116~-43 塩基対上流までの配列を、さらに短く調節したコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、PGE₂ に応答する BSP プロモーター配列は-108~-84 塩基対上流の間に存在すると考えられた。次に、pLUC 3 に存在する応答配列に変異を導入したミューテーションコンストラクトを用い、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、PGE₂ 刺激による転写活性の上昇は、CRE および FRE ミューテーションコンストラクトで抑制され、CRE と FRE のダブルミューテーションコンストラクトでは、BSP の転写活性の上昇は完全に抑制された。以上のことから、PGE₂ の作用は CRE および FRE 配列を介すると考えられた。CRE および FRE 配列と核内タンパク質との結合は、PGE₂ 刺激後に経時的に増加した (図 5 B)。さらに、CRE に結合する転写因子はリン酸化 CREB であることが判明した¹¹⁾。

プロスタグランジン合成酵素である cyclooxygenase-2 (COX-2) のノックアウトマウスでは、骨折治癒が遅延する。同ノックアウトマウスの骨髄細胞では、Cbfa 1 と osterix の発現が減少し、試験管内での骨結節の形成量がワイルドタイプの約 50% に減少するが、PGE₂ または BMP-2 を添加すると、ワイルドタイプと同等の骨結節の形成を示し、Cbfa 1 と osterix の発現も上昇する。以上の結果から、骨折治癒における間葉系細胞の分化において、PGE₂ は BMP-2 の上流に位置し、BMP-2 の下流に Cbfa 1 と osterix が存在すると考えられる^{53,54)}。以上の結果は、PGE₂ が、骨折治癒、骨形成に非常に重要な因子であることを示している。

5. ガン細胞での BSP の発現

BSP は、石灰化結合組織特異的に発現するタンパク質であるが、乳ガン、肺ガン、甲状腺ガンおよび前立腺ガン細胞で発現し、ガン細胞の骨転移に関与することが報告されている⁵⁵⁻⁵⁸⁾。さらに、原発ガン病巣で BSP の発現が認められる場合は予後が悪く、骨転移が予測できる⁵⁵⁾。BSP の他の機能としては、補体 H 因子と結合することにより、補体の攻撃から細胞を守ることが報告された⁵⁹⁾。BSP を発現するガン細胞は、まず細胞膜に存在する $\alpha v \beta 3$ インテグリンに RGD 配列部分で結合し、その後 H 因子と結合して補体の攻撃から逃れることが出来ると考えられる⁵⁹⁾。さらに、血管内皮細胞の付着と移動に関与し、骨形成や腫瘍の転移における血管形成を促進すると考えられる⁶⁰⁾。

6. おわりに

我々のグループは、BSP の転写調節に関わる細胞内情報伝達系を検索する過程で、チロシンリン酸化を抑制する薬剤である genistein が BSP の転写を促進することを見いだした。Genistein はイソフラボン構造を持つことから、チロシンのリン酸化阻害作用ではなく、フラボノイド構造が BSP の転写を促進すると考えられたが、その細胞内情報伝達系は不明である⁶¹⁾。BSP の遺伝子発現は、チロシンリン酸化 (FGF 2 および PGE₂) および cAMP (PGE₂) により調節を受けることから、その発現を調節することにより、将来、歯周組織再生に応用出来る可能性が期待される。

謝 辞

本総説には、共同研究者のデーターを引用させていただきました。共同研究者各位に深く感謝に意を表します。

文 献

- 1) Hunter GK, Goldberg HA: Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 8562-8565, 1993.
- 2) Oldberg Å, Franzén A, Heinegård: The primary structure of a cell-binding bone sialoprotein. J Biol Chem, 263: 19430-19432, 1988.
- 3) Ganss B, Kim RH, Sodek J: Bone Sialoprotein. Crit Revs Oral Biol Med, 10: 79-98, 1999.
- 4) Bellahcène A, Merville MP, Castronovo V:

- Expression of bone sialoprotein, a bone matrix protein, in human breast cancer. *Cancer Res*, 54 : 2823-2826, 1994.
- 5) Sodek J, Li JJ, Kim RH, Ogata Y, Yamauchi M : Characterization of bone sialoprotein (BSP) gene promoter. *Connect Tissue Res*, 35(1-4) : 23-31, 1996.
 - 6) Kiyoshima T, Yamauchi M, Wong C, Jheon A, Ganss B, Sodek J : An L1 element disrupts human bone sialoprotein promoter : Lack of tissue-specific regulation by distalless (Dlx 5) and runt homeodomain protein 2 (Runx 2)/core binding factor a 1 (Cbfa 1) elements. *Gene*, 299 : 205-217, 2002.
 - 7) Li JJ, Kim RH, Sodek J : An inverted TATA box directs downstream transcription of the bone sialoprotein gene. *Biochem J*, 310 : 30-40, 1995.
 - 8) Kim RH, Li JJ, Ogata Y, Yamauchi M, Freedman LP, Sodek J : Identification of a vitamin D 3-response element that overlaps a unique inverted TATA box in the rat bone sialoprotein gene. *Biochem J*, 318 : 219-226, 1996.
 - 9) 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.
 - 10) Samoto H, Shimizu E, Matsuda-Honjyo Y, Saito R, Yamazaki M, Kasai K, Furuyama S, Sugiyama 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.
 - 11) Samoto H, Shimizu E, Matsuda-Honjyo Y, Saito R, Nakao S, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiyama H, Sodek J, Ogata Y : Prostaglandin E₂ stimulates bone sialoprotein (BSP) expression through cAMP and FGF 2 response elements in the proximal promoter of the rat BSP gene. *J Biol Chem*, 278 : 28659-28667, 2003.
 - 12) Shimizu-Sasaki E, Yamazaki M, Furuyama S, Sugiyama 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.
 - 13) 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 FGF 2 response element and pituitary-specific transcription factor-1 motif. *J Cell Biochem*, 91 : 1183-1196, 2004.
 - 14) Ogata Y, Nakao S, Kim RH, Li JJ, Furuyama S, Sugiyama 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.
 - 15) Ogata Y, Niisato N, Furuyama S, Cheifetz S, Kim RH, Sugiyama 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.
 - 16) 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, 2004.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) Barnes GL, Torre TD, Sommer B, Young MF, Gerstenfeld LC : Transcriptional regulation restricting bone sialoprotein gene expression to both hypertrophic chondrocytes and osteoblasts. *J Cell Biochem*, 87 : 458-469, 2002.
 - 21) Mason IJ : The ins and outs of fibroblast growth factors. *Cell*, 78 : 547-552, 1994.
 - 22) Yamasaki M, Miyake A, Tagashira S, Itho N : Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*, 271 : 15918-15921, 1996.
 - 23) Hurley MM, Abreu C, Harrison JR, Lichtler AC, Raisz LG, Kream B : Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC 3 T 3-E 1 cells. *J Biol Chem*, 268 : 5588-5593, 1993.

- 24) Nakamura T, Hanada K, Tamura M, Shibunushi T, Nigi H, Tagawa M, Fukumoto S, Matsumoto T, Ogata Y : Stimulation of endosteal bone formation by systemic injection of recombinant basic fibroblast growth factor in rat. *Endocrinol*, 136 : 1276-1284, 1995.
- 25) Debais F, Hott M, Graulet AM, Marie PJ : The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific. *J Bone Miner Res*, 13 : 645-654, 1998.
- 26) Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin NH, Losken HW, Schinzel A, Pulleyn LJ, Rutland P, Reardon W, Malcolm S, Winter RM : A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nature Genet*, 8 : 269-274, 1994.
- 27) Jabs EW, Li X, Scott AF, Meyers G, Chen W, Eccles M, Mao J, Charnas LR, Jackson CE, Jaye M : Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblasts growth factor receptor 2. *Nature Genet*, 8 : 275-279, 1994.
- 28) Reardon W, Winter RM, Rutland P, Pulleyn LJ, Jones BM, Malcolm S : Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome. *Nature Genet*, 8 : 98-103, 1994.
- 29) Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Wilkin DJ, Lachman RS, Wilcox WR, Rimoin DL, Cohn DH, Wasmuth JJ : Thanatophoric dysplasia (type I and II) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet*, 9 : 321-328, 1995.
- 30) Den C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P : Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*, 84 : 911-921, 1996.
- 31) Kaneki H, Takasugi I, Fujieda M, Kiriu M, Mizuochi S, Ide H : Prostaglandin E_2 stimulates the formation of mineralized bone nodules by a cAMP-independent mechanism in the culture of adult rat calvarial osteoblasts. *J Cell Biochem*, 73 : 36-48, 1999.
- 32) Suzawa T, Miyaura C, Inada M, Maruyama T, Sugimoto Y, Ushikubi F, Ichikawa A, Narumiya S, Suda T : The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP 1, EP 2, EP 3, and EP 4) in bone resorption : An analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinol*, 141 : 1554-1559, 2000.
- 33) Akatsu T, Takahashi N, Debari K, Morita I, Murota S, Nagata N, Takatani O, Suda T : Prostaglandins promote osteoclastlike cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J Bone Miner Res*, 4 : 29-35, 1989.
- 34) Li X, Okada Y, Pilbeam CC, Lorenzo JA, Kennedy CRJ, Breyer RM, Raisz LG : Knockout of the murine prostaglandin EP 2 receptor impairs osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinol*, 141 : 2054-2061, 2000.
- 35) Hattersley G, Owens J, Flanagan AM, Chambers TJ : Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 177 : 526-531, 1991.
- 36) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinisaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad USA*, 95 : 3597-3602, 1998.
- 37) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R : Osteoprotegerin : A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89 : 309-319, 1997.
- 38) Kanematsu M, Sato T, Takai H, Watanabe K, Ikeda K, Yamada Y : Prostaglandin E_2 induces expression of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand/osteoprotegrin ligand on pre-B cells : Implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J Bone Miner Res*, 15 : 1321-1329, 2000.
- 39) Kozawa O, Suzuki A, Tokuda H, Kaida T, Uematsu : Interleukin-6 synthesis induced by prostaglandin E_2 : Cross-talk regulation by protein kinase C. *Bone*, 22 : 355-360, 1998.
- 40) Millet I, McCarthy TL, Vignery A : Regulation of interleukin-6 production by prostaglandin E_2 in fetal rat osteoblasts : Role of protein kinase A signaling pathway. *J Bone Miner Res*, 13 : 1092-1100, 1998.
- 41) Gruber R, Nothegger G, Ho G, Willheim M, Peterlik M : Differential stimulation by PGE_2 and calcemic hormones of IL-6 in stromal/osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 270 : 1080-1085, 2000.

- 42) Weinreb M, Machwate M, Shir N, Abramovitz M, Rodan GA, Harada S : Expression of the prostaglandin E_2 (PGE_2) receptor subtype EP_4 and its regulation by PGE_2 in osteoblastic cell lines and adult rat bone tissue. *Bone*, 28 : 275-281, 2001.
- 43) Opas EE, Gentile MA, Rossert JA, de Crombrughe B, Rodan GA, Schmidt A : Parathyroid hormone and prostaglandin E_2 preferentially increase luciferase levels in bone of mice harboring a luciferase transgene controlled by elements of the pro- α 1 (I) collagen promoter. *Bone*, 26 : 27-32, 2000.
- 44) Raisz LG, Fall PM : Biphasic effects of prostaglandin E_2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae : Interaction with cortisol. *Endocrinol*, 126 : 1654-1659, 1990.
- 45) Flanagan AM, Chambers TJ : Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostaglandin E_1 and E_2 . *Endocrinol*, 130 : 443-448, 1992.
- 46) Nagata T, Kaho K, Nishikawa S, Shinohara H, Wakano Y, Ishida H : Effect of prostaglandin E_2 on mineralization of bone nodule formed by fetal rat calvarial cells. *Calcif Tissue Int*, 55 : 451-457, 1994.
- 47) Watabe A, Sugimoto Y, Honda A, Irie A, Namba T, Negishi M, Ito S, Narumiya S, Ichikawa A : Cloning and expression of cDNA for a mouse EP_1 subtype of prostaglandin E receptor. *J Biol Chem*, 268 : 20175-20178, 1993.
- 48) Katsuyama M, Nishigaki N, Sugimoto Y, Morimoto K, Negishi M, Narumiya S, Ichikawa A : The mouse prostaglandin E receptor EP_2 subtype : cloning, expression, and Northern blot analysis. *FEBS Lett*, 372 : 151-156, 1995.
- 49) Sugimoto Y, Namba T, Honda A, Hayashi Y, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S : Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP_3 subtype. *J Biol Chem*, 267 : 6463-6466, 1992.
- 50) Suda M, Tanaka K, Natsui K, Usui T, Tanaka I, Fukushima M, Shigeno C, Konishi J, Narumiya S, Chikawa A, Nakao K : Prostaglandin E receptor subtypes in mouse osteoblastic cell line. *Endocrinol*, 137 : 1698-1705, 1996.
- 51) Yoshida K, Oida H, Kobayashi T, Maruyama T, Tanaka M, Katayama T, Yamaguchi K, Segi E, Tsuboyama T, Matsushita M, Ito K, Ito Y, Sugimoto Y, Ushikubo F, Ohchida S, Kondo K, Nakamura T, Narumiya S : Stimulation of bone formation and prevention of bone loss by prostaglandin E EP_4 receptor activation. *Proc Natl Acad USA*, 99 : 4580-4585, 2002.
- 52) Sakuma Y, Tanaka K, Suda M, Komatsu Y, Yasoda A, Miura M, Ozawa A, Narumiya S, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ushikubi F, Nakao K : Impaired bone resorption by lipopolysaccharide in vivo in mice deficient in the prostaglandin E receptor EP_4 subtype. *Infect Immun*, 68 : 6819-6825, 2000.
- 53) Simon AM, Manigrasso MB, O'Connor JP : Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res*, 17 : 963-976, 2002.
- 54) Zhang X, Schwarz EM, Young DA, J. Puzas E, Rosier RN, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest*, 109 : 1405-1415, 2002.
- 55) Bellahcène A, Menard S, Bufalino R, Moreau L, Castronovo V : Expression of bone sialoprotein in primary human breast cancer is associated with poor survival. *Int J Cancer*, 69 : 350-353, 1996.
- 56) Bellahcène A, Maloujahmoum N, Fisher LW, Pastorino H, Tagliabue E, Ménard S, Castronovo V : Expression of bone sialoprotein in human lung cancer. *Calcif Tissue Int*, 61 : 183-188, 1997.
- 57) Bellahcène A, Albert V, Pollina L, Basolo FN, Fisher LW, Castronovo V : Ectopic expression of bone sialoprotein in human thyroid cancer. *Thyroid*, 8 : 637-645, 1998.
- 58) Walthregny D, Bellahcène A, Van RI, Fisher LW, Young M, Fernandez P, Dewe W, deLeval J, Castronovo V : Prognostic value of bone sialoprotein expression in clinically localized human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90 : 1000-1008, 1998.
- 59) Fedarko NS, Fohr B, Robey PG, Young M, Fisher LW : Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem*, 275 : 16666-16672, 2000.
- 60) Bellahcène A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young M, Fisher LW, Castronovo V : Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Cir Res*, 85 : 885-891, 2000.
- 61) 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.