

角化嚢胞性歯原性腫瘍線維芽細胞におけるCa²⁺刺激によるBMP-2発現について

永田, 佳枝
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/21981>

出版情報：九州大学，2011，博士（歯学），課程博士
バージョン：
権利関係：



角化嚢胞性歯原性腫瘍線維芽細胞における Ca^{2+} 刺激による BMP-2 発現について

2011 年

九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座

口腔顎顔面外科学分野

永田（矢原）佳枝

指導教員

九州大学大学院歯学府 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

森 悦秀 教授

本研究の内容は下記の学術雑誌に投稿中である。

Ca²⁺ stimulates the expression of BMP-2 in KCOT fibroblasts

Y. Yahara, Y. Kubota*, Y. Mori

Journal of Dental Research

目次

略語表	3
要旨	5
緒言	7
材料と方法	10
結果	17
角化嚢胞性歯原性腫瘍における高濃度 Ca^{2+} 刺激と BMP-2 mRNA 発現について	
KCOTFs における Ca^{2+} 誘発 BMP-2 mRNA 発現の細胞内シグナル伝達について	
KCOTFs における Ca^{2+} 誘発 BMP-2 mRNA 発現に対する PGE_2 の影響	
歯肉由来線維芽細胞に対する高濃度カルシウム刺激の影響	
考察	32
謝辞	38
References	39

略語表

BMP	bone morphogenetic protein
$[\text{Ca}^{2+}]_o$	細胞外 Ca^{2+}
CaSR	calcium-sensing receptor
COX-2	cyclooxygenase-2
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FCS	fetal calf serum
IL-1 α	interleukin 1-alpha
Ins (1,4,5) P ₃	inositol 1,4,5-trisphosphate
JNK	c-jun N-terminal kinase
KCOT	keratocystic odontogenic tumor (角化嚢胞性齒原性腫瘍)
KCOTFs	keratocystic odontogenic tumor fibroblasts (角化嚢胞性齒原性腫瘍由来線維芽細胞)
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
PBS	phosphate buffered saline

PGE ₂	prostaglandin E ₂ (プロスタグランジン E ₂)
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
RANKL	receptor activator of nuclear factor κB ligand
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean (標準誤差)
TNF	tumor necrosis factor

要旨

当分野ではこれまでに角化嚢胞性歯原性腫瘍（keratocystic odontogenic tumors , KCOTs ）より分離された線維芽細胞（KCOT 由来線維芽細胞：KCOTFs ）がカルシウム感知受容体（calcium-sensing receptor , CaSR ）を発現し、細胞外 Ca^{2+} （ $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ）濃度の上昇によってシクロオキシゲナーゼ 2（cyclooxygenase-2, COX-2 mRNA）の発現が増強し、その結果プロスタグランジン E_2 （prostaglandin E_2 , PGE_2 ）の分泌が増加することを明らかにしてきた。最近、結腸筋上皮線維芽細胞において、 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ 濃度依存性に CaSR を介して bone morphogenetic protein-2（BMP-2）の分泌増加が起こることが報告された。そこで、本研究では $[\text{Ca}^{2+}]_o$ が KCOTFs の BMP-2 mRNA 発現にどのような影響を及ぼすかについて、real-time PCR、ELISA 法、western blotting を用いて検討を行った。その結果、下記のような知見を得た。

- 1) 高濃度 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ と CaSR agonist である neomycin は KCOTFs の BMP-2 mRNA およびそのタンパクの発現を増大させた。
- 2) PLC 阻害剤である U-73122 と PKC 阻害剤である staurosporin は Ca^{2+} による BMP-2 mRNA 発現を減弱させたが、KT5720 はこの発現に影響を及ぼさなかった。

3) 高濃度 $[Ca^{2+}]_o$ は KCOTFs の ERK1/2、 p38 MAPK、 JNK のリン酸化を増加させ、また NF- κ B p65 の核内移行を促進させた。

4) ERK1/2、 p38 MAPK、 JNK および NF- κ B それぞれの阻害剤である PD98059、 SB203580、 SP600125 および PDTC は、全て Ca^{2+} による BMP-2 mRNA 発現を阻害した。

5) PGE_2 は KCOTFs の BMP-2 mRNA 発現を増大させたが、 indomethacin は Ca^{2+} による BMP-2 mRNA 発現に対して有意な影響を与えなかった。

以上より、で高濃度 $[Ca^{2+}]_o$ は KCOTFs の CaSR を刺激し、 ERK1/2、 p38 MAPK、 JNK および NF- κ B の活性化を介して、高濃度 $[Ca^{2+}]_o$ によって発現される PGE_2 とは関係なく、 BMP-2 の発現を増大させると推測された。よって、KCOT 周囲の骨近傍に存在する KCOTFs は BMP-2 を介して KCOT 周囲での骨代謝制御に関与している可能性が示唆された。

緒言

角化嚢胞性歯原性腫瘍（keratocystic odontogenic tumor , KCOT）は、過去においては歯原性嚢胞として分類されていた疾患であるが、他の歯原性嚢胞に比して、より骨基質を破壊して顎骨内で増大し、また再発傾向も高いため、2005 年の WHO 分類より良性腫瘍に分類されている。過去に当分野では、KCOT の裏層上皮細胞は陽圧刺激によって炎症性サイトカインである interleukin (IL) - 1 α を分泌し、これが KCOT 由来線維芽細胞（KCOTFs）を刺激して matrix metalloproteinases-2（MMP-2）の発現を増加させるとともに prostaglandin E₂（PGE₂）の産生を促進し、その結果、骨基質の破壊と破骨細胞の分化に影響を与えることによって腫瘍周囲の骨破壊に関与している可能性があることを報告してきた（Kubota 2002, Ninomiya 2002, Oka, 2005; Ogata, 2007）。しかし、この腫瘍の発育増大機構に関しては未だ不明な点が多く、十分には解明されていない。

bone morphogenetic proteins（BMPs）は transforming growth factor β スーパーファミリーに属するタンパク質の 1 つで、胎生期の骨形成、軟骨成長、骨のリモデリング及び骨修復といった様々な機能に関与することが知られている。BMP-2 は BMP ファミリーの中で最も幅広く研究されているタンパクの一つで、骨芽細胞系列の細胞の分化や成熟を促進することが示されている

(Hanada, 1997; Noth, 2003)。他方、 BMP-2 は破骨細胞前駆細胞の分化を直接的に促進することや (Jansen, 2010)、骨芽細胞の成熟を促進することにより、間接的に破骨細胞分化誘導を促進することも示されている (Tachi, 2010)。よって、BMP-2 は骨形成あるいは骨融解を制御することによって骨の病理学および生理学的な制御において重要な役割を担っていると考えられる。

カルシウム感知受容体 (CaSR) は、牛の副甲状腺ホルモンとしてクローニングされた 7 回膜貫通型 GTP-結合蛋白受容体であり、ヒトにおいても副甲状腺や腎臓など多数の器官においてその存在が知られている。細胞外 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) によって CaSR が刺激された場合、CaSR は phospholipase C (PLC) を活性化し、inositol 1,4,5-trisphosphate ($\text{Ins} (1,4,5) \text{P}_3$) を産生して protein kinase C (PKC) を活性化する (Brown, 1993; Tfelt-Hansen, 2005)。CaSR の病理学的あるいは生理学的機能については、甲状腺ホルモンの合成や分泌の調節 (Tfelt-Hansen, 2005) や腎臓の遠位尿管でのカルシウム再吸収の調節 (Riccardi, 1998) などに関与していることが過去に報告されている。当分野では以前、KCOTFs は CaSR を発現しており、CaSR を介して高濃度の細胞外 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) 刺激により IL-1 α とは関係なく PGE₂ の分泌を促進することを報告した (Ogata, 2006)。PGE₂ は破骨細胞形成

(Chikazu, 2002; Tsutsumi, 2009; Take, 2005) や骨芽細胞分化 (Chikazu, 2002; Minamizaki, 2009) などに影響を及ぼすため、 KCOT では腫瘍周辺の線維芽細胞にける CaSR を介した骨代謝制御機構が存在する可能性が考えられる。

現在、 BMP-2 と PGE₂ の間には密接な関係があることが示唆されているが、その関係は非常に複雑で十分には解明されていない。間葉系幹細胞では PGE₂ によって BMP-2 の発現が増強されるとする報告がある一方(Arikawa, 2004)、ヒト骨肉腫 cell line やラット頭蓋冠の細胞においては、 PGE₂ 刺激によって BMP-2 発現が抑制されるとの報告もある(Viridi, 1998; Minamizaki, 2009)。最近、ヒト結腸筋上皮線維芽細胞において [Ca²⁺]_o 濃度依存性に CaSR を介して BMP-2 が分泌されることが報告された (Peiris, 2007)。これらの報告から、骨から遊離した Ca²⁺ が KCOTFs の CaSR を刺激し、 KCOTFs が PGE₂ だけでなく BMP-2 も分泌することで骨代謝に影響を及ぼすのではないかと仮説を立てた。

そこで、本研究ではこの仮説を証明するために、 Ca²⁺ 刺激によって、 KCOTFs が CaSR を介して BMP-2 発現を増強させるか否かを組織生検の際に得られた組織の一部を用いて検討した。

材料と方法

試薬

ウサギ抗ヒト polyclonal p-38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、ウサギ抗ヒト monoclonal phospho-p38 MAPK、ウサギ抗ヒト monoclonal c-jun N-terminal kinase (JNK)、ウサギ抗ヒト monoclonal nuclear factor-kappa B (NF- κ B) p65 の抗体は、Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) より購入した。ウサギ抗ヒト polyclonal phospho-JNK、ウサギ抗ヒト polyclonal extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2、マウス抗ヒト monoclonal phospho-ERK1/2 は Millipore Co. (Temecula, CA, USA) より購入した。ウサギ抗ヒト polyclonal CaSR 抗体は Thermo Fisher Scientific. (Waltham, USA) より購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、neomycin、KT5720、PDTC は Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) より購入した。U-73122、staurosporin、PD98059、SB203580、SP600125 は Biomol Research Laboratories Inc. (Plymouth Meeting, PA, USA) より購入した。

細胞培養

KCOT 及びヒト正常歯肉より分離された線維芽細胞は、当分野の過去の研究

と同様に、九州大学病院倫理審査委員会で承認されたプロトコールに従い、同意を得た患者の生検組織より採取した(Kubota, 2002; Oka, 2005; Ogata, 2006)。 約 1 mm³ に細割した組織片を 10% 非働化仔牛血清及び抗菌薬 (100 IU/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin) 含有 DMEM 中にて 95% 空気、5% CO₂、37°C の条件の下に、プラスチック培養皿 (Becton, Dickinson and company, Franklin Lakes, NJ USA) 上で培養した。この培養法により上皮細胞と線維芽細胞が 1 週間以内に組織片周囲に現れ、上皮細胞の混在は 2~3 回の継代操作によってほぼ消滅した。線維芽細胞はコンフルエントになるまで培養した後、血清非含有の DMEM (1.8 mM Ca²⁺) 中で 37°C、12 時間予備培養して実験に用いた。

免疫細胞化学的染色

カバーガラス上に播種した培養細胞を 10% FCS 含有 DMEM で 24 時間培養後、2% パラホルムアルデヒド溶液で室温にて 15 分間固定した。続いて、0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) 含有 PBS にて 20 分間前処理し、その後ヤギ正常血清でブロッキングを行った。これにウサギ抗ヒトポリクローナル CaSR 抗体 (Thermo Fisher Scientific., Waltham, USA) を加えて室温で 1 時間反応させた。二次抗体として ENVISION+ (Dako, Glostrup,

Denmark) を加えて室温で 1 時間処理し、FUSION SUBSTRATE CHROMOGEN (Dako, Glostrup, Denmark) にて発色させた。

Quantitative Real-time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

径 100 mm 培養皿内の細胞を phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄後、TRIZOL® 1mL を加えて室温で 5 分間放置した。その後、クロロホルム 200 μ l を加えて 15 秒間激しく攪拌し、室温で 3 分間放置後、4°C、14,500 rpm で 15 分間遠心し、RNA を含む水層約 500 μ l を採取した。この水溶液にイソプロピルアルコール 500 μ l を加えて混合し、室温で 10 分間静置して RNA を沈殿させた。その後、4°C、14,500 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した後、75%エタノール 1 ml で沈殿物を洗浄した。次に、4°C、11,500 rpm で 5 分間遠心し、沈殿物を回収した。この沈殿物を室温で約 8 分間乾燥させ、超純水 20 μ l に溶解した。さらに、60°Cで 10 分間加温し、3 分間氷冷した。cDNA を合成するため、total RNA 3 μ g 、 40U / μ l Recombinant RNasin®Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, USA) 1 μ l 、 pd (T)₁₂₋₁₈ 0.5 μ g、250 mM トリス塩酸塩 (pH8.3) 、375 mM KCl および 15 mM MgCl₂ を含む 5×反応緩衝液 4 μ l、100 mM dithiothreitol を 2 μ l、200 U/ μ l の SUSPERSRIPT™

II Rnase H-Reverse Transcriptase (Life Technologies, Rockville, USA) 0.5 μ l 加えて合計 20 μ l とし、42°Cで 1 時間インキュベートした。その後、95°Cで 5 分間加温して酵素を失活させ、直ちに氷冷した。これを 50 ~ 100 倍に希釈し、mRNA の解析に用いた。

リアルタイム PCR は、LightCycler FastStart DNA Master SYBER Green 1kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて行った。プライマーは、BMP-2 が 5'-CAACCATGTCCTGATAGTTCT-3' 及び 5'-GGACACGCCAACCATCCATT-3' (NIHON GENE RESEARCH LABORATORIES Inc. , Sendai, Japan) β -actin が 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', 及び 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3' (Oka, 2005; Ogata, 2006) であった。反応条件は、熱変性は95°C で、1サイクル目は10 分間、2サイクル目以降は10 秒間行った。アニーリング／伸長反応は BMP-2 は 63°C、 β -actin は 62°C で10 秒、72°C で10 秒間とし、蛍光測定は伸長反応毎に行った。すべて 45 サイクルの増幅を行い、定量化には LightCycler Software Version 3.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いた。また、BMP-2 mRNA の発現量は、 β -actin mRNA の発現量との相対比で表した。

Western Blotting

各実験後、培養皿から培養液を吸引除去し、ただちに液体窒素上で細胞を凍結した後、sodium dodecyl sulfate (SDS) 4 g / 100 ml を含む、0.5 M Tris (pH 6.8) 25%、Glycerol 20%、2-mercaptoethanol 5% の×2 SDS sample buffer によって細胞を融解し、4℃、15,500 rpm で 30 分間遠心した後、その上清をサンプルとして用いた。

サンプルを 12% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、20% メタノール / 20 mM トリス / 150 mM グリシン (PH 8.8) 溶液内で、ニトロセルロース紙に 80 V で 5 時間転写した。抗体のニトロセルロース紙への非特異的結合を避けるため、まずニトロセルロース紙を 5% 牛血清アルブミンを含む Tris buffered saline with Tween-20 (TBST) [150 mM 塩化ナトリウム / 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) / 0.1 % Tween-20] で 1 時間、前処理した。その後 ウサギ抗ヒト p-38 MAPK (1:500)、ウサギ抗ヒト phospho-p38 MAPK 抗体 (1:500)、ウサギ抗ヒト JNK 抗体 (1:500)、ウサギ抗ヒト phospho-JNK 抗体 (1:50)、ウサギ抗ヒト ERK1/2 抗体 (2 µg / ml)、マウス抗ヒト phospho-ERK1/2 抗体 (1 µg / ml)、ウサギ抗ヒト NF-κB p-65 抗体 (1:1000) で 4℃、12 時間反応させた後、HRP 標識二次抗体で室温 1 時間反応させた。各反応終了後は TBST で 5 分間 × 2 回ずつ洗浄した。その

後、ECL ウェスタンブロッティング検出システム（Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA）で発光させ、化学発光検出システム（ChemiDoc XRS-J, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA）を用いて検出後、Quantity One software（Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA）を用いて解析を行った。

BMP-2 タンパク濃度の測定

KCOTFs を 1.8 mM Ca^{2+} あるいは 5 mM Ca^{2+} を含む血清非含有 DMEM 中で 48 時間培養した後、培養皿より細胞を剥離し、2 分間超音波ソニケーターにて破碎した。細胞は 4°C、10 分間、3,000 rpm で遠心分離し、その上清を ELISA 法で測定した。上清中の BMP-2 の濃度は、enzyme immunoassay kit を使用し、プロトコールに従い行った(Assay Designs Inc., Ann Arbor, USA)。

BMP-2 の standard sample を段階的に希釈し、検量線を作成した。このシステムでは最小 7.81 pg/ml から 最大 1,000 pg / ml まで計測可能であった。マイクロプレートリーダー（Bio-Rad Model 680, Hercules, USA）を用い、波長 450 nm で吸光度を測定した。

細胞核および細胞質分離

細胞質と細胞核の分離は、NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo scientific, Rockford, USA) を用いて行った。Cytoplasmic Extraction Reagent に融解し遠心分離し、上清を細胞質分画として、また、沈殿物を Nuclear Extraction Reagent に融解し遠心分離した上清を核抽出分画として用いた。

統計処理

データは平均値 $\pm$ 標準誤差 (SEM) で表し、検定法は Mann-Whitney U-test を用いた。統計処理は SPSS software for windows Version 19 (SPSS Inc., Chicago, USA) を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果 1

角化嚢胞性歯原性腫瘍における

高濃度 Ca^{2+} 刺激と BMP-2 mRNA 発現について

1. KCOTFs における CaSR の発現

KCOTFs を抗 CaSR 抗体で免疫細胞化学的染色したところ、KCOTFs の細胞膜、細胞質ともに強く染色された。これにより KCOTFs 上に CaSR が発現していることが示された（図 1A）。

2. KCOTFs における Ca^{2+} 刺激の BMP-2 mRNA 発現への影響

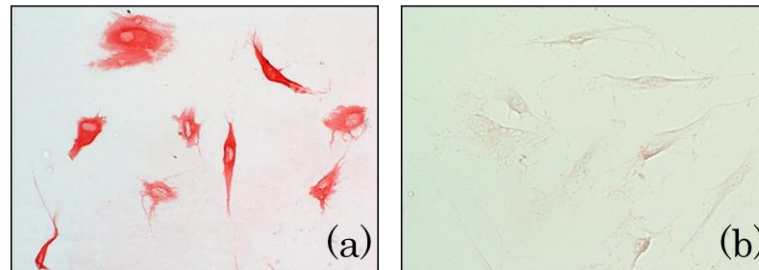
KCOTFs にて BMP-2 mRNA の発現に対する細胞外 Ca^{2+} の影響を real-time PCR にて調べた。KCOTFs を 1.8 mM Ca^{2+} 含有 DMEM 中で培養したところ、BMP-2 mRNA の弱い発現を認めた。しかし、KCOTFs を 5 mM Ca^{2+} で刺激したところ、BMP-2 mRNA の発現は経時的に増大し、7 時間の Ca^{2+} 刺激後では、無刺激の KCOTFs と比してその発現量は 7.6 ± 2.1 倍（ $n=5$ ）と有意に増加した。また、BMP-2 mRNA の発現は CaSR のアゴニストである Neomycin（0.3 mM）によっても同様に有意な増大が認められた（ 4.3 ± 2.1 倍（ $n=4$ ））（図 1B）。

3. KCOTFs における Ca^{2+} 刺激の 細胞内 BMP-2 タンパク濃度への影響

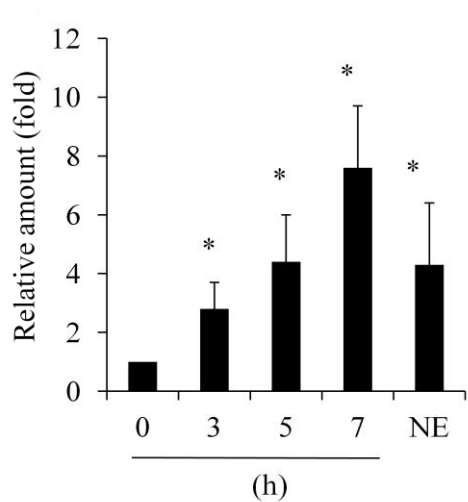
KCOTFs における細胞内 BMP-2 タンパク濃度に対する細胞外 Ca^{2+} の影響を ELISA 法にて調べた。KCOTFs を 1.8 mM Ca^{2+} 含有 DMEM 中で 48 時間培養したところ、細胞内の BMP-2 タンパク濃度は $31.6 \pm 2.9 \text{ pg/ml}$ ($n=3$) であった。一方、5 mM Ca^{2+} 含有 DMEM 中で培養したところ、その BMP-2 濃度は $57.1 \pm 16.4 \text{ pg/ml}$ ($n=3$) に上昇した。しかし、両者の値の間に統計学的な有意差は認められなかった (図 1C)。

図. 1

(A)



(B)



(C)

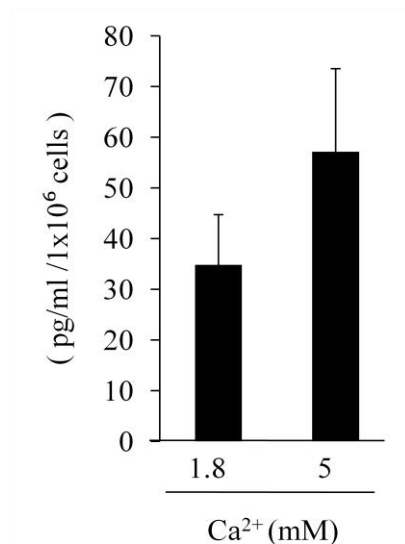


図.1 BMP-2 mRNAとタンパクの発現における[Ca²⁺]_oの影響

A: 抗 CaSR 抗体によって免疫細胞学的に KCOTFs を染色し、細胞上の CaSR 発現を確認した(a)。

ネガティブコントロールとして同種の正常IgGを使用した(b)。

B: KCOTFs を 5 mM Ca²⁺ にて3, 5, 7時間、及び neomycine (NE) で7時間刺激し、BMP-2 mRNA の発現を real-time PCR で測定した。BMP-2 mRNA の発現量は、Ca²⁺ 刺激されていない細胞の発現量で標準化した。線は標準誤差を示す (n=5)。

C: KCOTFs におけるBMP-2 の濃度を調べた。1.8 mM Ca²⁺ あるいは 5 mM Ca²⁺ を含む無血清 DMEM 中で48時間培養した後、培養皿より細胞を剥離し、細胞数を計測した。その後、細胞をソニケーターで破碎し、4℃, 10分間, 3,000 rpm で遠心分離し、その上清中 BMP-2 濃度を ELISA 法にて計測した (n=3)。

P<0.05を有意差ありとした。

結果 2

KCOTFs における Ca^{2+} による BMP-2 mRNA 発現の
細胞内シグナル伝達について

1. KCOTFs における Ca^{2+} 刺激時の PLC 及び PKC 活性化について

Ca^{2+} 刺激による KCOTFs の BMP-2 mRNA 発現において、PLC および PKC の関与の有無を明らかにするため、PLC 阻害剤である U-73122 と PKC 阻害剤である staurosporin の影響を real-time PCR にてそれぞれ観察した。5 mM Ca^{2+} 刺激による BMP-2 mRNA 発現は、5 mM Ca^{2+} 刺激前に U-73122 (10 μM) または staurosporin (2 μM) で 1 時間前処理すると、前処理しなかった場合と比較して、それぞれ 0.13 ± 0.03 倍 (n=3) と 0.02 ± 0.01 倍 (n=3) に有意に阻害された。一方、protein kinase A (PKA) の阻害剤である KT5720 (10 μM) での前処理は Ca^{2+} 刺激による BMP-2 mRNA 発現に影響を与えなかった (図 2)。

図2.

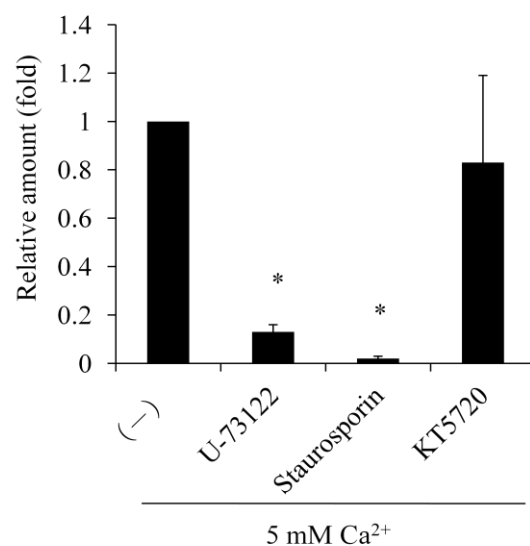


図.2 [Ca²⁺]_o による BMP-2 mRNA発現におけるPLC、PKC、PKA 阻害剤の影響

KCOTFs を10 μ M U-73122、2 μ M staurosporin、10 μ M KT5720 の存在下 (+)あるいは存在しない (-) 1.8 mM Ca²⁺ 含有 DMEM 中で1時間事前に培養したのち、7時間 5 mM Ca²⁺ で刺激した。BMP-2 mRNA は real-time PCR で計測した。結果は、阻害剤 なしで Ca²⁺ 刺激した細胞の結果を 1 として比較した (n=3) 。
P<0.05を有意差ありとした。

2. KCOTFs における Ca^{2+} 刺激時の細胞内シグナル伝達について

KCOTFs における CaSR を介した Ca^{2+} 刺激による BMP-2 mRNA 発現での細胞内シグナル伝達経路を明らかにするために、ERK1/2、p38 MAPK および JNK のリン酸化を western blotting 法にて検討した。KCOTFs を 5 mM Ca^{2+} によって刺激すると、刺激後 15 分で最大となる ERK1/2、p38 MAPK および JNK のリン酸化がみられた (図 3A)。次に、NF- κ B p65 の核内移行を調べたところ、刺激前の細胞質分画には p65 が認められ、5 mM Ca^{2+} 刺激後もその量には大きな変化は認められなかった。一方、核抽出分画では、刺激前では p65 は認められなかったが、刺激後 30 分後には核抽出分画に認められた (図 3B)。KCOTFs を ERK kinase、p38 MAPK、JNK、および NF- κ B それぞれの特異的阻害剤である PD98059 (20 μ M)、SB203580 (20 μ M)、SP600125 (40 μ M)、PDTC (20 μ M) で 1 時間前処理することにより 5 mM Ca^{2+} 刺激による BMP-2 mRNA の発現は前処理しなかった場合と比較して、 0.35 ± 0.23 、 0.20 ± 0.05 倍 (n=3)、 0.45 ± 0.12 倍 (n=3)、及び 0.40 ± 0.08 倍 (n=3) と、それぞれ有意に阻害された (図 3C)。

図3.

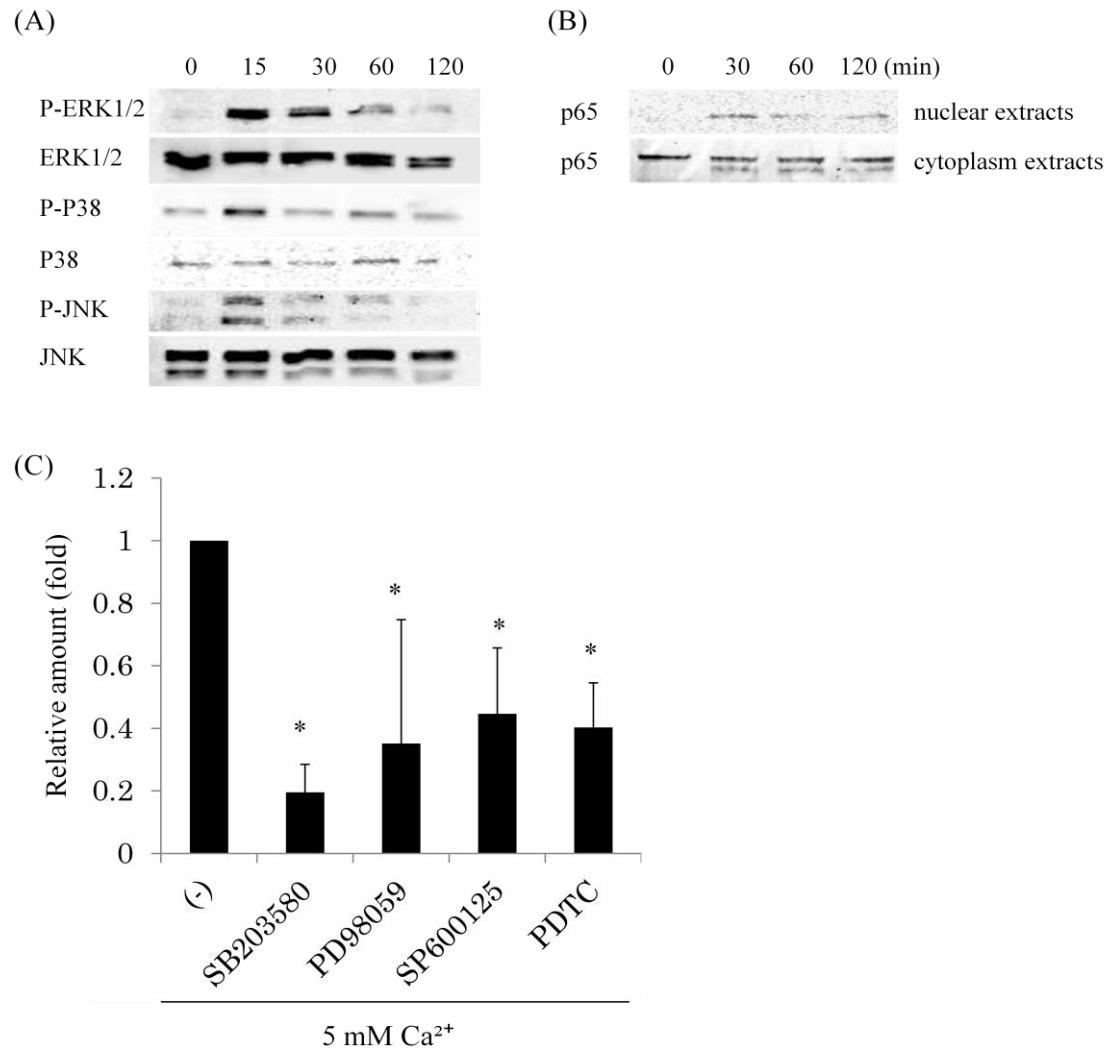


図3 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ による BMP-2 mRNA 発現における ERK1/2、p38MAPK、JNK、NF- κ B の役割

A: KCOTFs における ERK1/2、p38 MAPK、JNK のリン酸化を western blotting にて確認した。5 mM Ca^{2+} にて15分、30分、60分、120分それぞれ刺激した。

B: KCOTFs における p65 の核内移行を計測した。5 mM Ca^{2+} で30分、60分、120分それぞれ刺激し、KCOTFs の全細胞および核内抽出物をそれぞれ p65 抗体によって western blotting した。

C: 1.8 mM Ca^{2+} を含む無血清 DMEM 中で 20 μM PD98059、20 μM SB203580、40 μM SP600125、20 μM PDTC をそれぞれ含むものと含まないものとで KCOTFs を1時間事前に培養し、5 mM Ca^{2+} で7時間刺激した後、BMP-2 mRNA の発現を real time-PCR で計測した。阻害剤を作用させなかった細胞の結果をコントロールとし比較した (n=3)。P<0.05を有意差ありとした。

結果 3

KCOTFs における Ca^{2+} による

BMP-2 mRNA 発現に対する PGE_2 の影響

KCOTFs の BMP-2 mRNA 発現における PGE₂ と indomethacine の影響

KCOTFs において PGE₂ の BMP-2 mRNA 発現に対する影響と、Ca²⁺ によって発現誘導される PGE₂ の BMP-2 mRNA 発現に対する影響について real-time PCR にて検討した。KCOTFs を 10 μM PGE₂ によって 7 時間刺激すると、BMP-2 mRNA の発現は、1.8 mM Ca²⁺ 含有無血清 DMEM によるコントロールに比べて 5.6 ± 0.9 倍（n=4）と有意に増大した。しかし、1 μM indomethacin による 10 分間の前処理を行い、Ca²⁺ による PGE₂ 発現を阻害しても、KCOTFs における 5 mM Ca²⁺ による BMP-2 mRNA の発現は有意な影響を受けなかった（図 4）。

図4.

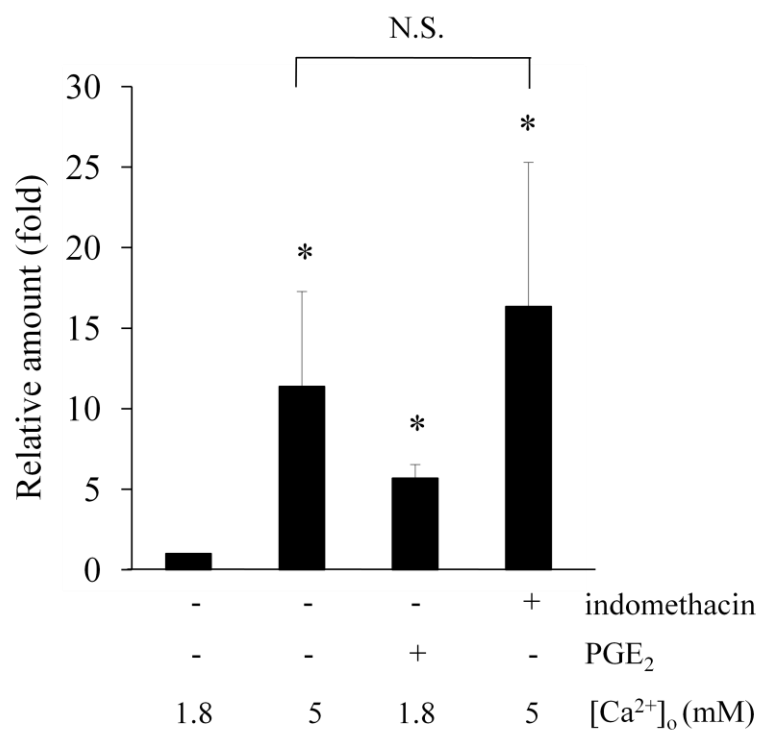


図.4 KCOTFsのBMP-2 mRNA 発現におけるPGE₂ とindomethacine の影響

KCOTFs は1 μ M indometacine の存在下 (+)あるいは存在しない (-) 1.8 mM Ca²⁺ 含有 DMEM 中で10 分間事前に培養したのち、7 時間 5 mM Ca²⁺ で刺激した。BMP-2 mRNA は real-time PCR で計測した。結果は、indometacine なしでCa²⁺ 刺激をうけた細胞の結果と比較した (n=3) 。

P<0.05を有意差ありとした。

結果 4

歯肉由来線維芽細胞に対する
高濃度カルシウム刺激の影響

歯肉由来線維芽細胞における Ca^{2+} 刺激による BMP-2 mRNA 発現

Ca^{2+} による BMP-2 mRNA 発現誘導が KCOTFs に特異性であるか否かを検討するため、KCOTFs と同様にヒト歯肉より線維芽細胞を分離し、BMP-2 mRNA 発現に対する細胞外 Ca^{2+} の影響を real-time PCR にて調べた。その結果、歯肉由来線維芽細胞を 1.8 mM Ca^{2+} 含有 DMEM 中で培養したところ、BMP-2 mRNA の弱い発現を認め、5 mM Ca^{2+} で 7 時間刺激すると、その発現量は 15.1 ± 11.42 倍 ($n=3$) と有意に増大した (図 5)。

図5.

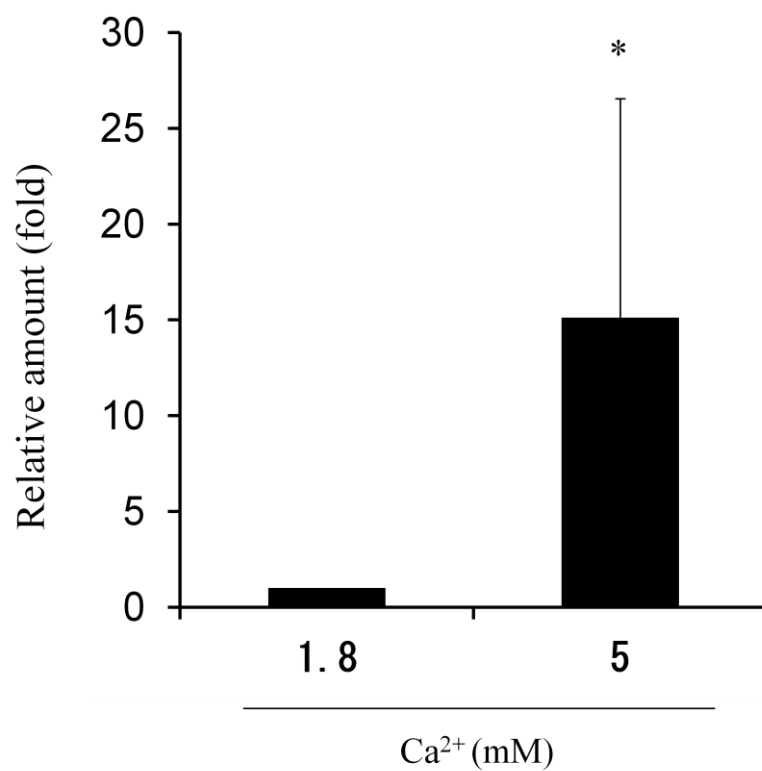


図.5 ヒト正常歯肉由来線維芽細胞におけるBMP-2 mRNA発現における[Ca²⁺]_oの影響

B:ヒト正常歯肉線維芽細胞を5 mM Ca²⁺にて7時間刺激し、BMP-2 mRNAの発現を real-time PCRで測定した。BMP-2 mRNAの発現量は、Ca²⁺刺激されていない細胞の発現量を1として比較した。線は標準誤差を示す (n=3)
P<0.05を有意差ありとした。

考察

線維芽細胞における BMP-2 発現に関する過去の報告では、歯周靱帯、歯肉及び滑膜より分離された線維芽細胞において、成長ホルモン、IL-1 β 、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、血小板由来増殖因子、インシュリン由来増殖因子などによって BMP-2 が発現増大することが報告されている (Haase, 2003, Ivanovski, 2001, Lories, 2003)。また、免疫組織学的研究においても歯胚、歯原性腫瘍、関節炎患者滑膜などの組織中に BMP-2 が発現していることが明らかにされている (Haase, 2003, Ivanovski, 2001, Lories, 2003)。このことから、様々な組織における線維芽細胞は BMP-2 を発現させているのではないかと考えられる。本研究では、KCOTFs を高濃度 $[Ca^{2+}]_o$ で刺激すると、結腸筋上皮線維芽細胞での報告と同様に、BMP-2 mRNA および細胞内 BMP-2 濃度が増加することが明らかになった。最近の研究結果では、 Ca^{2+} 刺激による BMP-2 mRNA の発現誘導は、ヒトの歯髄細胞では CaSR を介してではなく Ca^{2+} チャンネルを介して起こるとの報告がある (Tada, 2010)。しかし当分野では、KCOTFs は CaSR を発現しており、 Ca^{2+} 刺激によって PLC と PKC の活性化が起こることをすでに報告している (Ogata, 2006)。本研究では、1) KCOTFs が CaSR を発現していることを再確認し、さらに、2) CaSR agonist である neomycin も BMP-2 mRNA の発現を増大させること、3) PLC 阻

害剤である U-73122 と PKC 阻害剤である staurosporin によって $[Ca^{2+}]_o$ による BMP-2 mRNA 発現が有意に阻害されるが、PKA 阻害剤である KT5720 では阻害されないことを示した。これらの結果から、KCOTFs では高濃度 $[Ca^{2+}]_o$ は細胞膜上の CaSR を刺激して PLC を活性化し、続いて PKC を活性化させて BMP-2 mRNA を発現増強しているのではないかと推測された。

次に、この KCOTFs における CaSR を介した BMP-2 mRNA 発現における細胞内シグナル伝達について検討した。線維芽細胞における BMP-2 発現のシグナル伝達に関しては十分解明されていない。最近、軟骨細胞における TNF- α による BMP-2 mRNA の発現に関する研究では、p38 MAPK (SB203580 , SB202190) と NF- κ B (PDTC) の各阻害剤によっては抑制されたが、ERK1/2 (PD98059) 、 JNK (SP600125) 、 PKC (GF109203X) の阻害剤では抑制されなかったことから、p38 MAPK や NF- κ B が関与している可能性が示唆されている (Fukui, 2006) 。また、骨芽細胞では、Adiponectin による BMP-2 mRNA 発現に p38 MAPK、NF- κ B、5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) が関与するとの報告もある (Huang, 2010) 。本研究では、 $[Ca^{2+}]_o$ の濃度上昇によって p38 MAPK だけでなく ERK1/2 及び JNK のリン酸化が亢進し、これらキナーゼの阻害剤である PD-98059、SB-203580、SP600125 が、KCOTFs における Ca^{2+} による BMP-2 mRNA 発現を有意に

阻害することを示した。さらに本研究では、KCOTFsにおいて高濃度の $[Ca^{2+}]_o$ 刺激によってp65の核内移行が起こることも示した。NF- κ B複合体はp65とp50により構成されるheterodimerで、未刺激の細胞ではinhibitor kappa B alpha (I κ B α)がNF- κ Bに結合し、NF- κ Bを細胞質内に保持している。NF- κ Bの活性化因子が作用すると、I κ B α はリン酸化され、リン酸化されたI κ B α はNF- κ Bを遊離する。そして、その遊離されたNF- κ Bは核内に移行し、目標遺伝子の発現を調節することが明らかにされている(Chen, 2004)。よって、p65の核内移行は間接的にNF- κ Bの活性化を意味している。従って、本研究の結果からはKCOTFsでは Ca^{2+} 刺激によるBMP-2発現はERK1/2、p38 MAPK、JNK及びNF- κ Bの活性化によって調整されていると推察された。これらのMAPKやNF- κ Bのシグナル伝達経路は相互に影響し合っているとの報告もあるため(Berghe, 1998; Schwenger, 1998)、KCOTFsにおける Ca^{2+} 刺激によるBMP-2発現における調節機序を明確にするためにはさらなる解析を進める必要がある。

当分野では以前、KCOTFsでは高濃度 $[Ca^{2+}]_o$ がCaSRを介してPGE₂の分泌を促進することを報告した(Ogata, 2006)。BMP-2とPGE₂は相互に作用しあうとの報告があるが、その関係については十分解明がなされていない。つまり、BMP-2の発現がPGE₂によって増大するとの報告もあるが

(Arikawa, 2004)、一方 BMP-2 の発現を PGE₂ が抑制するとの報告もある (Viridi, 1998; Minamizaki, 2009)。そこで、本研究では PGE₂ の BMP-2 mRNA に対する影響について検討を行った。その結果、 KCOTFs において PGE₂ は BMP-2 mRNA の発現を増加させた。そこで、 Ca²⁺ によって誘導される PGE₂ の影響を排除するためインドメタシンによる前処理を行ったが、 Ca²⁺ による BMP-2 mRNA 発現はインドメタシンでは有意な影響を受けなかった。これらの結果より、 KCOTFs における Ca²⁺ による BMP-2 mRNA 発現は Ca²⁺ によって同じく誘導される PGE₂ には影響を及ぼされていないことが示唆された。ただ、 PGE₂ 以外の因子が Ca²⁺ によって誘導されないのか否かについては未だ検討を行っておらず、そのため本当に BMP-2 mRNA 発現が CaSR の活性化によって直接誘導されたのかについては明らかではなく、今後の課題と思われる。

KCOTFs では CaSR を高濃度 [Ca²⁺]_o で刺激すると BMP-2 mRNA および細胞内 BMP-2 濃度が増加したが、この現象が KCOTFs 特有のものであるか否かを検討するため、正常ヒト歯肉より分離した線維芽細胞に対しても 5 mM Ca²⁺ 刺激を加え、 BMP-2 mRNA の発現を調べた。その結果、ヒト歯肉由来線維芽細胞においても Ca²⁺ 刺激によって KCOTFs と同様に BMP-2 mRNA の発現増大を認めた。歯周組織に BMP-2 が発現していることは、過去にも報

告されているが（Ivanovski, 2001）、この歯肉由来線維芽細胞に CaSR が発現しているか否かについては確認できておらず、BMP-2 mRNA の発現増加が KCOTFs と同じ機序によるものかは未確認で、今後の検討課題である。

過去の研究において、当分野では開窓術前の KCOT の上皮細胞では他の歯原性嚢胞と比較して IL-1 α が強く発現しており、この IL-1 α の発現は腔内の圧刺激によって誘導され、開窓療法によって著しく減弱することを報告している（Ninomiya, 2002; Oka, 2005; Suyama, 2008）。また、IL-1 α は KCOTFs での MMP-2 の発現を増強させるとともに COX-2 mRNA の発現を増強して PGE₂ 産生を促進する。そして、分泌された PGE₂ は KCOTFs での receptor activator of nuclear factor κ B ligand（RANKL）の発現を誘導することも示した（Kubota, 2002; Ogata, 2007）。さらに、KCOT の腔内圧はその腫瘍の大きさに反比例し、大きさが小さなときにより高いため（Kubota, 2004）、腫瘍形成の初期の段階では KCOT の内圧が IL-1 α の発現を増加させ、その IL-1 α を介して発現した MMP-2 や PGE₂ が周囲の骨組織の代謝に影響を及ぼすと考えられる。そして、この結果、破壊された骨によって遊離された Ca²⁺によって局所的な Ca²⁺ 濃度が上昇し、腫瘍増大によって IL-1 α の発現が減弱した後も CaSR を介して周囲の骨組織の代謝に影響を及ぼすのではないかと推測された（図 6）。

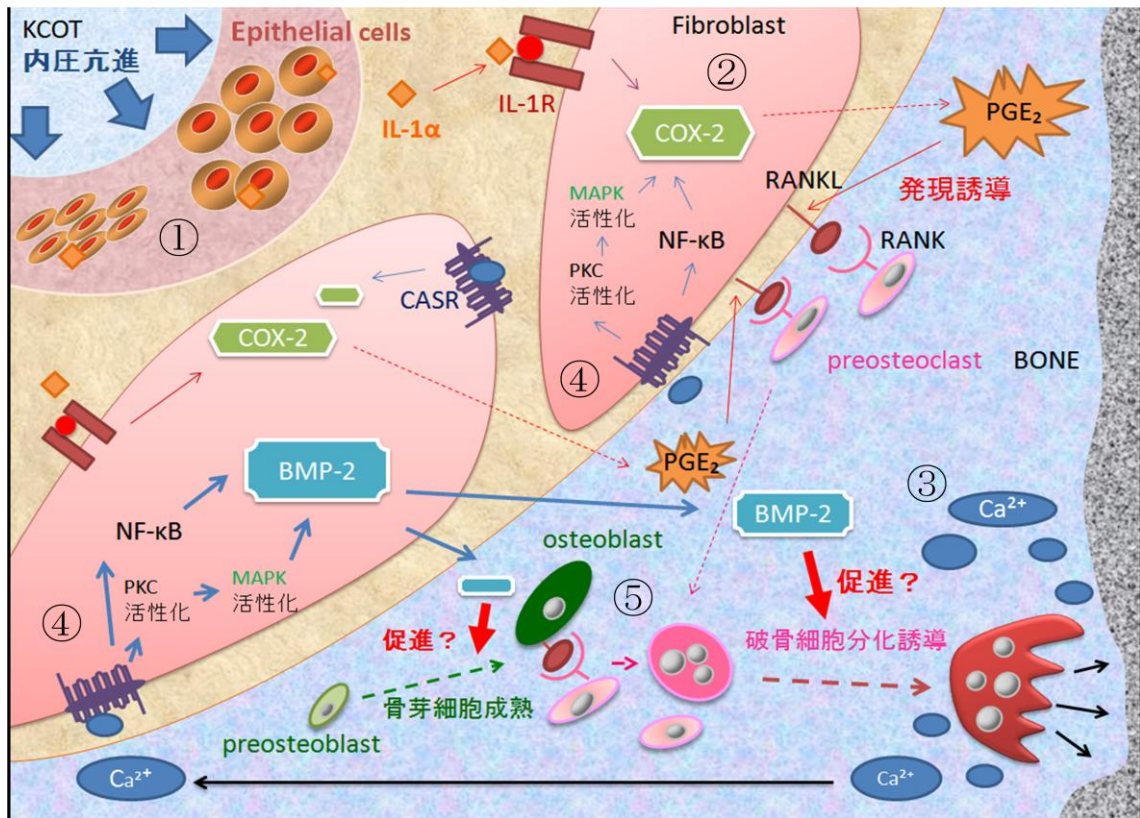


図6 本研究より推察される角化嚢胞性歯原性腫瘍の骨吸収の図説

①KCOT の内圧により、IL-1 α の発現を増加させ、②そのIL-1 α を介して発現した PGE₂ やCOX-2 が周囲の骨組織の代謝に影響を及ぼし、③破壊された骨によって遊離されたCa²⁺によって局所的な Ca²⁺ 濃度が上昇する。④この Ca²⁺ が KCOTFs に発現した CaSR を介して PGE₂や BMP-2 の発現を増大させる。PGE₂はRANKLの発現誘導を介し破骨細胞前駆細胞の分化誘導を促進する。⑤また、BMP-2 は骨芽細胞成熟や破骨細胞分化誘導を促進し直接及び間接的に破骨細胞成熟に影響を与えていると推測される。

こうした働きにより、IL-1 α の発現が減弱した後も KCOT は周囲の骨組織の代謝に影響を及ぼし増大を続けるのではないかと推測される。

謝辞

稿を終えるにあたり、御校閲を頂きました森 悦秀 教授に謝意を表します。

また、本研究の課題を与え、実験方法や研究に対する姿勢など、直接指導頂きました 窪田 泰孝 講師に深謝致します。また、本研究を遂行するにあたり、実験手技等の御指導、御助言頂きました 陶山 曜子 先生、山城 崇裕 先生、永田 幸恵 先生、岡 正司 先生、二宮 史浩 先生に深く感謝致します。そして、様々な御助言や励ましのお言葉を頂いた、九州大学大学院 歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野の教官各位、研究室の皆様、研究生活を支えてくださった全ての皆様方に、心から深く感謝致します。

References

- Arikawa T, Omura K, Morita I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 200; 400-406, 2004.
- Berghe WV, Plaisance S, Boone E, Bosscher K, Schmitz ML, Fiers W, Haegeman G. p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor-kappaB p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J Biol Chem* 273; 3285-3290, 1998.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press; WHO classification of tumours series. 2005.
- Blackwell KA, Hortschansky P, Sanovic S, Choudhary S, Raisz LG, Pilbeam CC. Bone morphogenetic protein 2 enhances PGE(2)-stimulated osteoclast formation in murine bone marrow cultures. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 90: 76-80, 2009.
- Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC. Cloning and characterization of an

- extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid, *Nature* 366: 575-580, 1993.
- Chang W, Tu C, Chen TH, Komuves L, Oda Y, Pratt SA, Miller S, Shoback D. Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinol.* 140: 5883-93, 1999.
- Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF- κ B. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 392-401, 2004.
- Chikazu D, Li X, Kawaguchi H, Sakuma Y, Voznesensky OS, Adams DJ, Xu M, Hoshio K, Katavic V, Herschman HR, Raisz LG, Pilbeam CC. Bone morphogenetic protein 2 induces cyclo-oxygenase 2 in osteoblasts via a Cbfa1 binding site: role in effects of bone morphogenetic protein 2 in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 17: 1430-1440, 2002.
- Fukui N, Ikeda Y, Ohnuki T, Hikita A, Tanaka S, Yamane S, Suzuki R, Sandell LJ, Ochi T. Pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α induces bone morphogenetic protein-2 in chondrocytes via mRNA stabilization and transcriptional up-regulation. *J Biol Chem* 281: 27229-27241, 2006.
- Groeneveld EHJ, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone

- regeneration. Eur J Endocr 142: 9-21, 2000.
- Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Reynolds PR, Rosier RN, O'Keefe RJ. BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. J Bone Miner Res 14: 475-482, 1999.
- Haase HR, Ivanovski S, Waters MJ, Bartold PM. Growth hormone regulates osteogenic marker mRNA expression in human periodontal fibroblasts and alveolar bone-derived cells. J Periodont Res 38: 366-374, 2003.
- Hanada K, Dennis JE, Caplan AJ. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells. J Bone Miner Res 12: 1606-1614, 1997.
- Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. Genes Dev 10: 1580-1594, 1996.
- House MG, Kohlmeier L, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Leboff MS, Glowacki J, Brown EM. Expression of an Extracellular Calcium-Sensing Receptor in Human and Mouse Bone Marrow Cells. J Bone Miner Res 12:1959-70, 1997.

- Ivanovski S, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone matrix protein mRNAs by primary and cloned cultures of the regenerative phenotype of human periodontal fibroblasts. *J Dent Res* 80: 1665-1671, 2001.
- Jensen ED, Pham L, Billington CJ Jr, Espe K, Carlson AE, Westendorf JJ, Petryk A, Gopalakrishnan R, Mansky K. Bone morphogenic protein 2 directly enhances differentiation of murine osteoclast precursors. *J Cell Biochem* 109: 672-682, 2010.
- Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Tanaka H, Omura S, Suda T. The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 295-299, 1990.
- Kifor O, Macleod RJ, Diaz R, Bai M, Yamaguchi T, Yao T, Kifor I, Brown EM. Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CasR-transfected HEK293 cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280: F291-302, 2001.
- Kubota Y, Oka S, Nakagawa S, Shirasuna K. Interleukin-1 α enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic

- keratocyst fibroblasts. *J Dent Res* 81: 23-27, 2002.
- Kubota Y, Yamashiro T, Oka S, Ninomiya T, Ogata Y, Shirasuna K. Relation between size of odontogenic jaw cysts and the pressure of fluid within. *Br J Oral Maxillofac Surg* 42: 391-395, 2004.
- Kumamoto H, Ooya K. Expression of bone morphogenetic proteins and their associated molecules in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Oral Disease* 12: 163-170, 2006.
- Lories RJU, Derese I, Ceuppens JL, Luyten FP. Bone morphogenetic protein 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Arthritis Rheum* 48: 2807-2818, 2003.
- Minamizaki T, Yoshiko Y, Kozai K, Aubin JE, Maeda N. EP2 and EP4 receptors differentially mediate MAPK pathways underlying anabolic actions of prostaglandin E2 on bone formation in rat calvaria cell cultures. *Bone* 44: 1177-1185, 2009.
- Ninomiya T, Kubota Y, Koji T, Shirasuna K. Marsupialization inhibits interleukin-1 α expression and epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 31: 526-533, 2002.

- Ogata S, Kubota Y, Satoh S, Ito S, Takeuchi H, Ashizuka M, Shirasuna K.
Ca²⁺ stimulates COX-2 expression through calcium-sensing receptor in
fibroblasts. *Biochem Biophys Res Comm* 351: 808-814, 2006.
- Ogata S, Kubota Y, Yamashiro T, Takeuchi H, Ninomiya T, Suyama Y,
Shirasuna K. Signaling pathways regulating IL-1 α -induced COX-2
expression. *J Dent Res* 86: 186-191, 2007.
- Oka S, Kubota Y, Yamashiro T, Ogata S, Ninomiya T, Ito S, Shirasuna K.
Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 84:
913-918, 2005.
- Pacheco II, MacLeod RJ. CaSR stimulates secretion of Wnt5a from colonic
myofibroblasts to stimulate CDX2 and sucrase-isomaltase using Ror2 on
intestinal epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295:
G748-G759, 2008.
- Peiris D, Pacheco I, Spencer C, MacLeod RJ. The extracellular
calcium-sensing receptor reciprocally regulates the secretion of BMP-2
and the BMP antagonist Noggin in colonic myofibroblasts. *Am J Physiol
Gastrointest Liver Physiol* 292: G753-G766, 2007.
- Riccardi D, Hall AE, Chattopadhyay N, Xu JZ, Brown EM, Hebert SG.

- Localization of the extracellular Ca^{2+} /polyvalent cation-sensing protein in rat kidney, *Am. J. Physiol.* 274: F611-F622, 1998.
- Ripamonte V, Duneas N. Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plast Reconstr Surg* 101: 227-239, 1998.
- Sato MM, Nakashima A, Nashimoto M, Yawaka Y, Tamura M. Bone morphogenetic protein-2 enhances Wnt/beta-catenin signaling-induced osteoprotegerin expression. *Genes Cells* 14: 141-153, 2009.
- Schmidt M, Schler G, Gruensfelder P, oppe F. Expression of bone morphogenetic protein-2 messenger ribonucleic acid in cholesteatoma fibroblasts. *Otol Neurotol* 23: 267-270, 2002.
- Schwenger P, Alpert D, Skolnik EY, Vilcek J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ phosphorylation and degradation, *Mol. Cell Biol.* 18: 78-84, 1998.
- Su JL, Yang CY, Zhao M, Kuo ML, Yan ML. Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol. *J Biol Chem* 282: 19385-19398, 2007.
- Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H. Elevated

- extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394: 1093-1097, 2010.
- Tachi K, Takami M, Zhao B, Mochizuki A, Yamada A, Miyamoto Y, Inoue T, Baba K, Kamijo R. Bone morphogenetic protein 2 enhances mouse osteoclast differentiation via increased levels of receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblasts. *Cell Tissue Res* 342: 213-220, 2010.
- Take I, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Tsuboi H, Ochi T, Uematsu S, Okafuji N, Kurihara S, Udagawa N, Takahashi N. Prostaglandin E2 strongly inhibits human osteoclast formation. *Endocrinology* 146: 5204-5214, 2005.
- Tfelt-Hansen J, Brown EM. The calcium-sensing receptor in normal physiology and pathophysiology: a review, *Crit Rev Clin Lab Sci* 42: 35-70, 2005.
- Tsutsumi R, Xie C, Wei X, Zhang M, Zhang X, Flick LM, Schwarz EM, O'Keefe RJ. PGE2 signaling through the EP4 receptor on fibroblasts upregulates RANKL and stimulates osteolysis. *J Bone Miner Res* 24: 1753-1762, 2009.

Urist MR, Mikulski A, Lietze A. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1828-32, 1979.

Virdi AS, Cook LJ, Oreffo RO, Triffitt JT. Modulation of bone morphogenetic protein-2 and bone morphogenetic protein-4 gene expression in osteoblastic cell lines. *Cell Mol Biol* 44: 1237-1246, 1998.

Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, Rosen V, Yoshiki S. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 220: 366-371, 1996.

Zhou S, Turgeman G, Harris SE, Leitman DC, Komm BS, Bodine PN, Gazit D. Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells. *Mol Endocrinol* 17: 56-66, 2003.