

学位論文

脳由来神経栄養因子（BDNF）のヒト歯髄細胞
に対する細胞機能制御能の検討

学位申請者 徳永 尚子

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

応用生命科学部門 歯周病態学研究室

（主任：栗原 英見 教授）

2016年度

謝 辞

本研究の御指導および御高覧を賜りました本学応用生命科学部門
歯周病態学研究室 栗原 英見教授に対して、謹んで感謝の意を表
します。また、研究の遂行ならびに本論文の作製において、御指導、
御鞭撻を頂きました基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学 高田
隆教授ならびに基礎生命科学部門生体材料学 加藤 功一教授に深
厚なる謝意を表します。さらに、本研究の遂行、および本論文の作
製を終始御指導ならびに御高覧を賜りました本学応用生命科学部門
歯周病態学研究室 武田 克浩博士に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行上および本論文の作製上、御助言と御鞭撻な
らびに御協力頂きました本学応用生命科学部門歯周病態学の皆様に
厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、常に私を支えてくれ
た両親の彰、智子、伯母の美枝子に心から感謝致します。

2016年1月

広島大学大学院医歯薬学総合研究科
応用生命科学部門 歯周病態学研究室

徳永 尚子

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 35 回 日本歯内療法学会

(2014 年 7 月 新潟)

第 36 回 日本歯内療法学会

(2015 年 7 月 神奈川)

第 97 回 広島大学歯学会

(2015 年 11 月 広島)

目 次

第一章	序 章	6
第二章	ヒト歯髄細胞 (HP cells) の炎症性・抗炎症性サイトカイン発現に及ぼす脳由来神経栄養因子 (BDNF) の影響	9
第一節	概 要	9
第二節	材料および方法	9
第一項	HP cells における BDNF と Peptidoglycan (PGN) のレセプター発現	
	1. HP cells の培養法	
	2. Western blot 法	
第二項	HP cells の炎症性サイトカイン発現に及ぼす PGN の影響	
	1. 総 RNA の抽出法	
	2. mRNA 発現の解析法	
	3. シグナル伝達経路の解析	
第三項	PGN 刺激した HP cells の炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響	
	1. 総 RNA の抽出法	
	2. mRNA 発現の解析法	
	3. 蛋白質発現の解析法	
	4. リン酸化 p38 のキナーゼ活性の解析	
第四項	HP cells の抗炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響	
	1. 総 RNA の抽出	
	2. mRNA 発現の解析法	
	3. シグナル伝達経路の解析	
第三節	結 果	15
	1. HP cells における BDNF と PGN のレセプター発現	
	2. HP cells の炎症性サイトカイン発現に及ぼす PGN の影響	
	3. PGN 刺激した HP cells の炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響	
	4. HP cells の抗炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響	

第四節	考 察	28
第三章	HP cells のコラーゲン代謝に及ぼす BDNF の影響	30
第一節	概 要	30
第二節	材料および方法	30
第一項	HP cells のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -1 と I 型コラーゲン発現に及ぼす BDNF 及び PGN の影響	
1.	総 RNA の抽出法	
2.	mRNA 発現の解析法	
3.	蛋白質発現の解析法	
第二項	PGN 刺激した HP cells の MMP-1 と I 型コラーゲン発現に及ぼす BDNF の影響	
1.	総 RNA の抽出法	
2.	蛋白質発現の解析法	
第三節	結 果	32
1.	HP cells における MMP-1 と I 型コラーゲン発現に及ぼす BDNF と PGN の影響	
2.	PGN 刺激した HP cells の MMP-1 と I 型コラーゲン発現に及ぼす BDNF の影響	
第四節	考 察	38
第四章	HP cells の骨・象牙質関連蛋白質発現に及ぼす BDNF の影響	40
第一節	概 要	40
第二節	材料及び方法	40
1.	HP cells の培養法	
2.	BDNF の作用	
3.	総 RNA の抽出法	
4.	mRNA 発現の解析法	

第三節 結果	42
1. HP cells への骨分化誘導培地 (OM) の影響	
2. 骨・象牙質関連蛋白質 mRNA 発現に及ぼす BDNF の影響	
第四節 考察	45
第五章 総括	46
参考文献	47

第一章 序 章

歯髄炎は、細菌感染による生物学的要因、外傷・歯ぎしりなどの物理的要因、歯科材料による化学的要因などによって生じる歯髄の炎症である。細菌感染においては、歯髄細胞やマクロファージ、好中球、リンパ球などの免疫担当細胞が炎症性サイトカインや抗炎症性サイトカインを産生し[1]、I型コラーゲンなどの細胞外基質の分解が亢進する。炎症性サイトカインとしては、Interleukin (IL) -1、2、6、8、Tumor Necrosis factor (TNF) - α 、Interferon (IFN) - γ 、抗炎症性サイトカインとしてはIL-4、10、13が関与しているとの報告がある[2、3]。

歯髄は、疎性結合組織で、線維芽細胞、免疫系細胞、未分化間葉系細胞、象牙芽細胞などの構成細胞と共に、脈管、神経、リンパ管などで構成されており、歯の知覚、象牙質への栄養補給、刺激に対する防御反応といった役割を担っている[4]。歯髄を失うと、破折しやすい、知覚を失い齲蝕の発見が遅れるなどの問題が生じる。また根管は形態が極めて複雑なため、根管治療が必ずしも成功するとは限らない。そのため歯髄の保存は、歯の長期保存に非常に有用である[5]。

歯科治療において、齲蝕除去時や窩洞形成時に露髄した場合、露髄面に水酸化カルシウムやMineral Trioxide aggregate (MTA)セメントなどを直接覆髄し、修復象牙質形成を期待する[6、7]。MTAセメントは、封鎖性・生体親和性・親水性・X線造影性に優れているなど様々な長所を持つが、除去の困難さ、患歯の変色といった短所も持ち、抗炎症性作用などの細胞機能を積極的に誘導するという報告はない[8、9、10、11、12]。カルシウム製剤は、カルシウムイオンによって硬組織形成を誘導し、強アルカリ性によって抗菌性を示すが、選択毒性が

無いため、組織に壊死層を形成する。今後、歯の長期保存を目的として歯髄再生・保護治療を進展させるためには、歯髄構成細胞の機能を積極的に制御することが必要と考える。

神経栄養因子 (neurotrophin) は、中枢神経系のみでなく末梢神経系においても、ニューロンの一生を通じて、未分化な神経芽細胞の増殖と分化、および成熟神経細胞の生存と機能の維持などの様々な機能を有している[13]。Nerve growth factor、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin-3、neurotrophin-4/5 は哺乳類で存在が確認されている神経栄養因子である。各々の神経栄養因子は特異的な膜受容体、いわゆる proto-oncogene 産物として発見された高親和性受容体 (Trk family: TrkA、TrkB、TrkC) あるいは低親和性受容体 (p75) に結合することによって細胞機能を制御している[14、15、16、17]。また神経栄養因子は、中枢神経系においては海馬の long-term potentiation を調節し[18]、学習機能にも関わる[19]。このような機能を有する神経栄養因子は神経細胞が変性する神経難病 (アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症など) の治療薬、神経再生促進薬、神経細胞死抑制薬として臨床応用の可能性が期待されている。

脳由来神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) は、神経栄養因子の一つで、高親和性受容体 TrkB と低親和性受容体 p75 に結合する[13、20、21、22、23]。BDNF はそれらの受容体を介して、中枢及び末梢の神経細胞の機能制御に関わっている。一方、BDNF は骨、軟骨、腎臓、歯胚などの非神経系の組織にも発現しており[24、25]、細胞レベルでも、骨芽細胞、歯周靭帯細胞、免疫細胞、血管内皮細胞が産生するとの報告がある[26、27、28、29、30、31、32]。また、BDNF はマウスの第8肋骨の骨折治癒過程において、骨芽細胞様細胞によって産生されるとの報告があり[33]、さらに、歯の形成初期において、未

分化な上皮系・間葉系細胞の増殖、そして象牙芽細胞やエナメル芽細胞への分化に関与している可能性が示唆されている[34]。

歯周組織においては、BDNF がヒト歯周靭帯細胞、セメント芽細胞、血管内皮細胞の増殖や分化といった細胞機能を制御することがこれまでに明らかにされている[35、36、37]。一方で、BDNF は歯周組織の再生を阻害する歯肉上皮細胞の増殖には影響を及ぼさなかった[35、38]。また、ビーグル犬の実験的根分岐部Ⅲ級歯周組織欠損モデルにおいて、BDNF は歯槽骨、セメント質、歯周靭帯の再生を促進することが報告されている[35]。

歯髄・象牙質複合体を再生させ、歯髄を保存するためには、感染細菌の除去、炎症の制御、血管新生および歯髄細胞の増殖や象牙芽細胞への分化が必要である。本研究では、BDNF の新規直接覆髄剤としての臨床応用を最終的な目的として、BDNF が歯髄細胞に及ぼす影響を検討することとした。

第二章 ヒト歯髄細胞 (HP cells) の炎症性・抗炎症性サイトカイン発現に及ぼす脳由来神経栄養因子 (BDNF) の影響

第一節 概要

一般に歯髄炎は齶蝕に起因することが多い。多くは滲出性炎（漿液性、化膿性）としてみられる。歯髄炎では炎症の徴候である発赤、腫脹、発熱を知ることができず、疼痛のみが臨床症状として表現される。またそれによって、歯痛のため物が噛めないなどの機能障害が示される。病理組織像としては、障害を受けた象牙細管の領域下には、象牙芽細胞の破壊像、血管の拡張、炎症性水腫、リンパ球や形質細胞の限局性浸潤、マクロファージなどが観察される。歯髄の保存のためには、これらの炎症を速やかに鎮静化することが必要である。本章では細菌刺激として Peptidoglycan (PGN) を用い、HP cells の炎症性・抗炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響を検討した。

第二節 材料および方法

第一項 HP cells における BDNF と Peptidoglycan (PGN) のレセプター発現

1. HP cells の培養法

HP cells として正常ヒト歯髄幹細胞を Lonza (Walkersville, MD) から購入し、3-4 代継代したものを本研究で使用した。HP cells を 6 穴プレート (Corning Incorporated-Life Science, Durham, NC) に 1.0×10^5 cells/well となるように播種し、10%ウシ胎児血清 (FBS, GIBCO, Buffalo, NY)、100 units/ml のペニシリン (明治製菓)、100 μ g/ml のストレプトマイシン (明治製菓) を含む培地 (培地 A) で培養した。培養 7 日目、DMEM のみで細胞を 2 回洗浄した後、10%FBS を含

まない培地A（培地B）に変更し、BDNF（50 ng/ml）（R&D、Minneapolis、MN）、PGN（10 µg/ml）（Sigma、Saint Louis、MO）をそれぞれ培養終了前の3、6、12、24時間、HP cellsに作用した。また、同様の培養条件でPGN（10 µg/ml）を24時間、HP cellsに作用した。

2. Western blot 法

培養終了後、HP cellsをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、1 × SDS（sodium dodecyl sulfate）（片山化学、大阪）で細胞の回収を行った。回収したサンプルは、ホモジナイザー（トミー精工、東京）で攪拌（28 kHz、5秒間）した後、100°Cで5分間加熱した。その後、10% polyacrylamide gelを用いて電気泳動（120 V、90分間）を行い、ゲルに展開したタンパク質をpolyvinylidene fluoride（PVDF）メンブレン（Bio-Rad、Carlsbad、CA）に転写した。転写後PVDFメンブレンを5%スキムミルク（和光純薬工業、大阪）含有TBS-Tween（TBS-t）で常温、1時間ブロッキングした。次に5%スキムミルク含有TBS-tで希釈したrabbit TrkB抗体（1:1000、Millipore、Billerica、MA）、rabbit p75抗体（1:1000、EPITOMICS、Burlingame、CA）、Toll-like receptor（TLR）2抗体（1:1000、Biolegend、San Diego、CA）を4°Cで一晩反応させた。その後メンブレンをTBS-tで洗浄し、5%スキムミルク含有TBS-tでHRP標識抗rabbit IgG抗体（1:5000、R&D）を希釈し、常温で1時間反応させた。反応後、メンブレンをTBS-tで洗浄し、Clarity™ Western ECL substrate（Bio Rad）を用いて化学発光させ、フィルムを感光させた。

第二項 HP cellsの炎症性サイトカイン発現に及ぼすPGNの影響

1. 総 RNA の抽出法

HP cells を培養 7 日目、DMEM のみで細胞を 2 回洗浄した後、培地 B に変更した。PGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を培養終了 3、6、12、24 時間前から作用させた。また TLR2 の中和抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Biolegend) を 30 分間前処理し、PGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 24 時間作用させた。培養終了後、PBS で細胞を 2 回洗浄後、RNA iso plus (Takara、大津) を用いて総 RNA を抽出した。RNA 濃度は分光光度計 (260 nm、280 nm) で測定し、算出した。

2. mRNA 発現の解析法

cDNA は Rever Tra Ace (東洋紡、大阪) を用いて 1.0 μg の総 RNA から逆転写・合成し、Real-time PCR システム STEP ONE PLUS-D 式 (アプライドバイオシステム、Foster City、CA) を用いて、リアルタイムでモニタリングし、mRNA 発現を解析した。IL-6、IL-8 の mRNA 発現は、ハウスキーピング遺伝子 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現に対する比で表した。反応には表 1 に示すプライマーを用いて、94°C、20 秒間、62°C で 1 分間の反応を 40 サイクル (PCR) で行った。

3. シグナル伝達経路の解析

HP cells を培養 7 日目、DMEM のみで 2 回洗浄した後、培地 B に変更した。ERK 1/2 inhibitor である PD98059 (50 μM) (EMD Millipore、Billerica、MA)、JNK inhibitor である SP600125 (10 μM) (EMD Millipore) を p38 inhibitor である SB203580 (10 μM) (EMD Millipore)、NF- κ B inhibitor である PDTC (10 μM) (EMD Millipore) を 30 分間前処理後、PGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を作用し 24 時間培養後、PBS で洗浄し、RNA iso plus を用いて総 RNA を抽出した。RNA 濃度は上述の方法で

測定した。cDNA 精製後、Real-time PCR 法によってサイトカイン mRNA 発現を解析した。

第三項 PGN 刺激した HP cells の炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響

1. 総 RNA の抽出法

HP cells を培養 7 日目、DMEM のみで細胞を 2 回洗浄した後培地 B に変更した。PGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 3 時間前処理した後、BDNF (50 ng/ml)、ポジティブコントロールとして Indomethacin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma) をそれぞれ作用し、24 時間培養した。また BDNF (50 ng/ml) (R&D) を培養終了 3、6、12、24 時間前から作用させた。培養終了後、PBS で細胞を洗浄し、RNA iso plus を用いて総 RNA を抽出した。RNA 濃度は上述の方法で測定した。

2. mRNA 発現の解析法

第二章第二節第二項 2. と同様の方法で行った。

3. 蛋白質発現の解析法

HP cells を培養 7 日目、DMEM のみで 2 回洗浄した後、培地 B に変更した。PGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 3 時間前処理した後、BDNF (50 ng/ml) を作用し、24 時間培養した。培養上清中の IL-6 と IL-8 の発現量は Quantikine[®] ELISA (R&D) を用いて測定した。

4. リン酸化 p38 のキナーゼ活性の解析

HP cellsを培養 7 日目、DMEMのみで 2 回洗浄した後、培地Bに変更した。PGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を 5、10、15、30 分間作用させたHP cells、またはPGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) とBDNF (50 ng/ml) を同時に 5 分間作用させたHP cellsをPBSで洗浄し、1×Cell lysis buffer (Cell Signaling、#9803、Danvers、MA) で細胞を回収した。回収したサンプルは、氷冷下でホモジナイザーにて 5 秒間攪拌した後、4 °C、14,000 rpm、10 分間遠心後、上清 200 μl を回収した。回収したサンプルにImmobilize Phospho-p44/42 MAPK (Thr180/Tyr182) Mouse mAb (Cell Signaling、#9219) を 10 μl 加え、4°Cにて一晩反応させた。その後、14,000 rpm、30 秒間遠心後、1×Cell Lysis Buffer (Cell Signaling、#9803) でサンプルを 2 回洗浄した。その後、1×Kinase Buffer (Cell Signaling、#9802) を加え、4 °C、14,000 rpm、30 秒間遠心した。この操作を 2 回繰り返した後、新たに1×Kinase Buffer を 50 μl 加え、10 mM ATP (1 μl) と、ATF-2-Fusion Protein (1 μl) (Cell Signaling、#9224) を加え 30°Cで 30 分間保温した。さらに 3×SDS (片山化学) を 25 μl ずつ加え、100°Cで 5 分間加熱した。このサンプルを 10% polyacrylamide gelを用いて電気泳動(80V、90 分間)を行い、ゲルに展開したタンパク質をPVDF メンブレン(Bio-Rad) に転写した。転写後PVDFメンブレン を 5%スキムミルク (和光純薬工業) 含有 TBS-tで常温、1 時間ブロッキングした。次に 5%スキムミルクにて Phospho-ATF-2 (Thr71) Antibody (10 μl) (Cell Signaling、#9221) を加え、4°Cで一晩反応させた。その後メンブレンをTBS-tで洗浄し、5%スキムミルクにて 2000 倍希釈した。Anti-rabbit IgG、HRP-linked Antibody (Cell Signaling、#7074) とAnti-biotin、HRP-linked Antibody (Cell Signaling、#7075) を加え、常温で 1 時間反応させた。反応後、メンブレンをTBS-tween で洗浄し、20×LumiGLO[®] Reagent and 20×peroxide (Cell Signaling、#7003)

を用いて化学発光させ、フィルムを感光させ、解析した。

第四項 HP cells の抗炎症性サイトカインに発現を及ぼす BDNF の影響

1. 総 RNA の抽出法

HP cells を培養 7 日目、DMEM のみで 2 回洗浄した後培地 B に変更した。BDNF (50 ng/ml) (R&D) を培養終了 3、6、12、24 時間前から作用させた。HP cells 培養終了後、PBS で洗浄し、総 RNA の抽出、測定は前述と同様の方法で行った。

2. mRNA 発現の解析法

第二章第二節第二項 2. と同様の方法で、IL-4 と IL-10 の mRNA 発現を解析した。

3. シグナル伝達経路の解析

HP cells を培養 7 日目、DMEM のみで 2 回洗浄した後、培地 B に変更した。ERK 1/2 inhibitor である PD98059 (50 mM) (EMD Millipore)、JNK inhibitor である SP600125 (10 mM) (EMD Millipore) を 30 分間前処理後、BDNF (50 ng/ml) を作用し 24 時間培養した。MAP kinase phosphatase (MKP) -1 inhibitor である Ro-318220 (10 μ M) (和光純薬工業) は 1 時間前処理した。培養終了後、HP cells を PBS で洗浄し、総 RNA の抽出、測定は前述の方法と同様に行った。cDNA 精製後、Real-time PCR 法によって IL-4 と IL-10 の mRNA 発現を解析した。

第三節 結 果

1. HP cells における BDNF と PGN のレセプター発現

HP cells は、BDNF レセプターである TrkB と p75 を発現していた。その発現量は BDNF (50 ng/ml) および PGN (10 µg/ml) の 3、6、12、24 時間作用で変化は認められなかった (図 1)。PGN レセプターである TLR2 は PGN (10 µg/ml) の 24 時間作用で発現量が統計学的に有意に増加した (図 1)。

2. HP cells の炎症性サイトカイン発現に及ぼす PGN の影響

HP cells において、PGN (10 µg/ml) 作用 3 時間後から、炎症性サイトカインである IL-6、IL-8 の mRNA 発現は促進した (図 2)。TLR2 の中和抗体を PGN 刺激の 30 分前に作用しておく、PGN 刺激で誘導された IL-6 と IL-8 の mRNA 発現量は統計学的に有意に抑制された (図 3)。PGN 誘導によって誘導された IL-6 の mRNA 発現は、p38 の阻害剤である SB203580 (10 mM) によって (図 4A)、IL-8 の mRNA 発現は SB203580 (10 mM) と JNK の阻害剤である SP600125 (10 mM) によって統計学的に有意に抑制された (図 4B)。

3. PGN 刺激した HP cells の炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響

PGN (10 µg/ml) 刺激で誘導された IL-6 mRNA 発現は、BDNF (50 ng/ml) によって、Indomethacin (10 µg/ml) と同程度まで (図 5A)、IL-8 mRNA 発現は Indomethacin (10 µg/ml) には及ばなかったが統計学的に有意

に抑制された (図 5B)。また BDNF 単独作用によっては、IL-6 と IL-8 の mRNA 発現は促進しなかった (図 5C、D)。蛋白質レベルにおいても、BDNF は PGN 刺激で誘導される IL-6 と IL-8 の産生を抑制した (図 6)。PGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) によってリン酸化 p38 のキナーゼ活性の指標である Phospho-ATF-2 の発現が、作用 5 分をピークに亢進された (図 7A)。さらに PGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) によって促進したリン酸化 p38 によるキナーゼ活性が、BDNF (50 ng/ml) によって統計学的に有意に抑制された (図 7B)。

4. HP cells の抗炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響

BDNF は、50 ng/ml の濃度で、抗炎症性サイトカインである IL-4 と IL-10 の mRNA 発現がピークを示した (図 8A)。そこで BDNF (50 ng/ml) を時間作用させたところ、12 時間をピークに IL-4 と IL-10 の mRNA 発現が促進された (図 8B)。ERK1/2 inhibitor である PD98059 (50 μM)、JNK inhibitor である SP600125 (10 μM) を 30 分間前処理すると、BDNF によって誘導された IL-4 と IL-10 の mRNA 発現量は統計学的に有意に抑制された (図 9A-D)。さらに MKP-1 inhibitor である Ro-318220 (10 μM) を 1 時間前処理すると、BDNF (50 ng/ml) によって誘導された IL-4 と IL-10 の mRNA 発現は統計学的に有意に抑制された (図 10A、B)。BDNF (50 ng/ml) は、MKP-1 mRNA 発現は作用時間依存的に促進した (図 10C)。PGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を時間作用させたところ、12 時間をピークに増加傾向を示したが、BDNF と比較して IL-4 と IL-10 の mRNA 発現は 2 割程度であった (data not shown)。

表 1 Primer sets for Real Time-PCR

	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	5'- AACGTGTCAGTGGTG GACCTG -3'	5'- AGTGGGTGTCGCTGTTGAAGT -3'
ALPase	5'-G GCGGTGAACGAGAGAATG -3'	5'- CGTAGTTCTGCTC GTGGAC -3'
BMP-2	5'- CTGTATCGCAGGCACTCA -3'	5'- CTCCGTG GGGATAGAACTT -3'
OCN	5'- GCAGCGAGG TAGTGAAGAGAC -3'	5'- GGTCAGCCAACTCGTCACAG -3'
OPN	5'- GATGGCCGAGGTGATAGTGT -3'	5'- CCATTCAACTCCTCGCTTTC -3'
DSPP	5'-AGTGACAGCCAGAGCAAG-3'	5'-CCTATCCCATTACCAAAC-3'
DMP-1	5'-CACCTTGGCAAATGAAGAC-3'	5'-CTCCTTTTCCTGTGCTCCTG-3'
Runx2	5'-GTGGACGAGGCAAGAGTTTCA-3'	5'-CATCAAGCTTCTGTCTGTGCC-3'
Nanog	5'-GCAAGAACTCTCCAACATCCTGA-3'	5'-CATTGCTATTCTTCGGCCAGTT-3'
Nestin	5'-AGCCCTGACCACTCCAGTTTAG-3'	5'-CCCTCTATGGCTGTTTCTTTCTCT-3'
IL-6	5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3'	5'- GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3'
IL-8	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGCT-3'	5'-TCTCAGCCCTTCAAAAACCTCTC-3'
IL-4	5'-TCATTTCCCTCGGTTTCAG-3'	5'-AGAACAGAGGGGAAGCAGT-3'
IL-10	5'-TCAAACACTCATGGCTTTGT-3'	5'-GCTGTCATCGATTTCTTCCC-3'
MKP-1	5'-GCTGTGCAGCAAACAGTCGA-3'	5'-CGATTAGTCCTCATAAGGTA-3'

Reference

[39、40、41]

Suzuki S、Department of Biological Endodontics Integrated Health Sciences Institute of Biomedical & Health Sciences、Hiroshima university

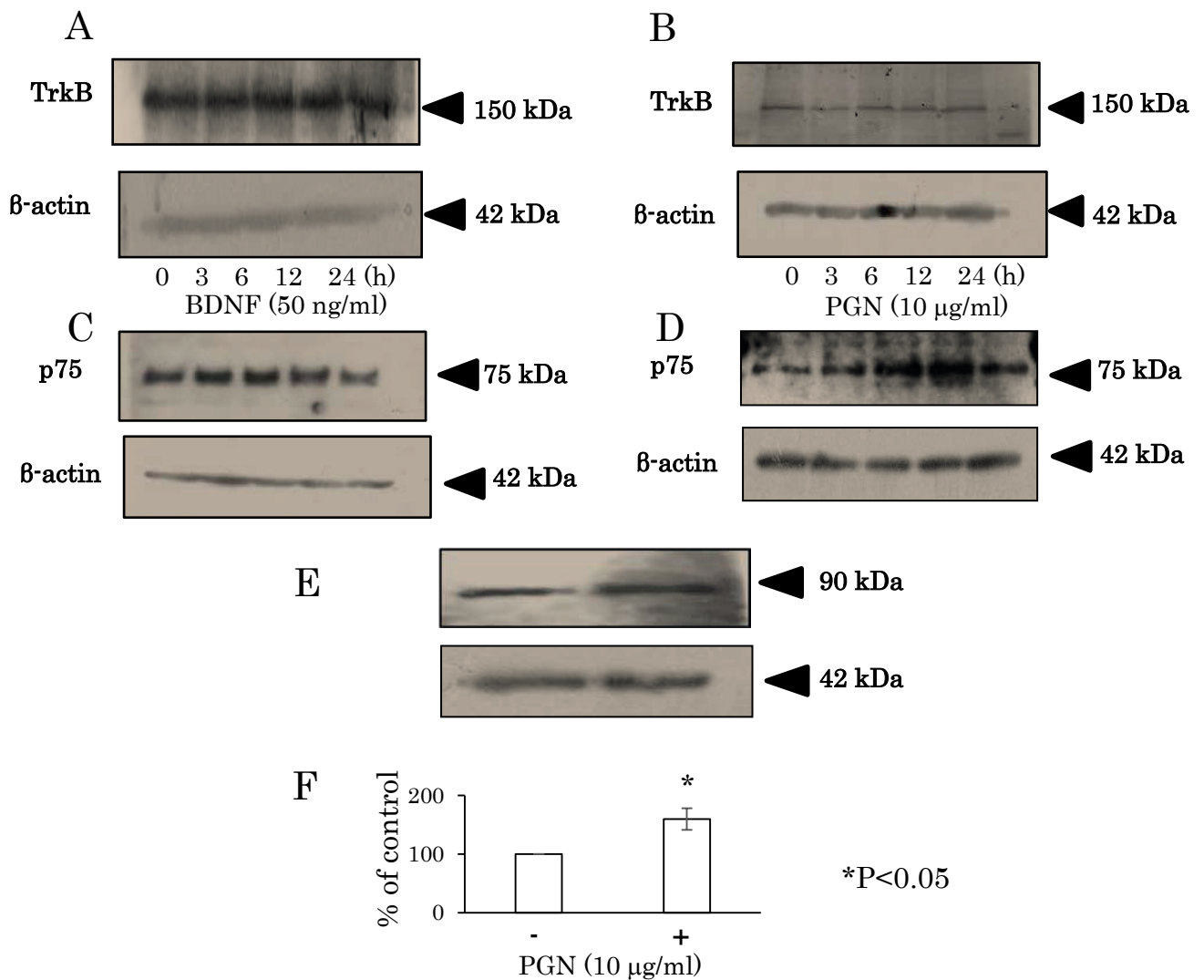


図1. HP cells における BDNF と PGN のレセプター発現

培養終了3、6、12、24時間前に BDNF (50 ng/ml)、PGN (10 μ g/ml) を HP cells に作用させた。SDS サンプルバッファーを用いて細胞を回収後、western blot を行った (TrkB、p75、TLR2 : 10 μ g/lane、 β -actin: 5 μ g/lane)。A、B: 上段に TrkB、下段に β -actin のバンドを、C、D: 上段に p75、下段に β -actin のバンドをそれぞれ示す。E: PGN (10 μ g/ml) を 24 時間作用させた。SDS サンプルバッファーを用いて細胞を回収した。Western blot 法によって TLR2 発現を解析した。上段に TLR2、下段に β -actin のバンドをそれぞれ示す。F: Western blot 法の画像をコンピュータに取り込み Image J (NIH、USA) によって画像解析したグラフを示す。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student' s t-test *: p<0.01)。

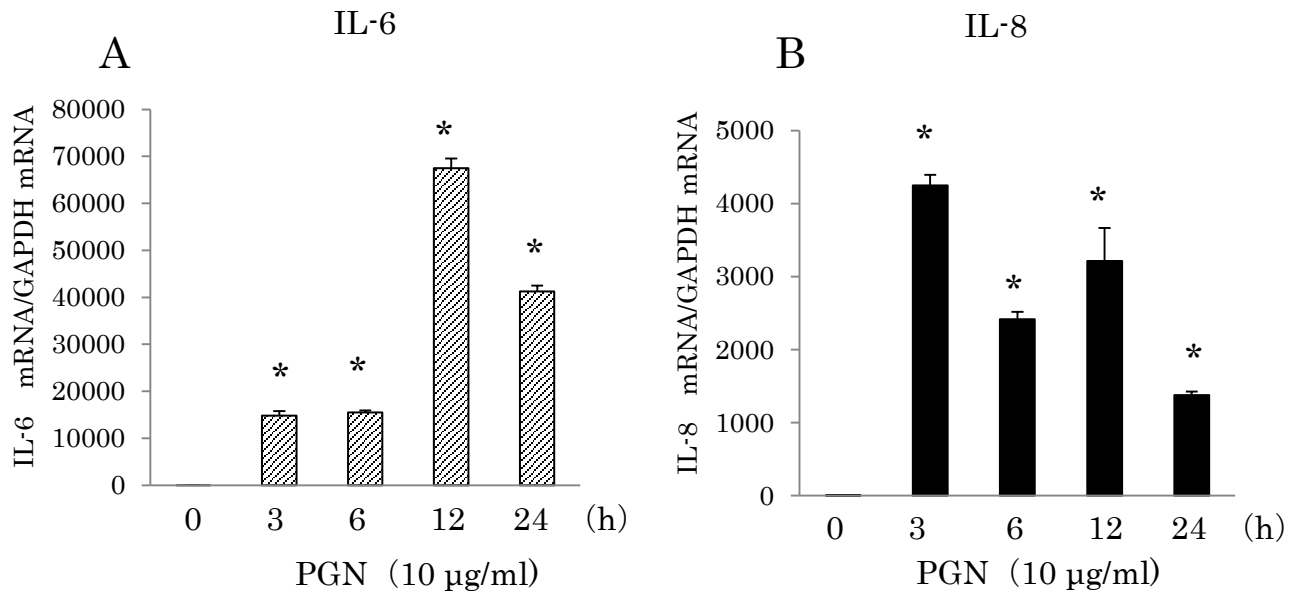


図2 . HP cells における PGN 刺激時の炎症性サイトカイン発現

培養終了 3、6、12、24 時間前に PGN (10 µg/ml) を作用させ、IL-6、IL-8 の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。IL-6 (A)、IL-8 (B) の mRNA 発現は、GAPDH mRNA 発現に対するサイトカインの mRNA 発現の比で表した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student' s t-test *: p<0.01)。

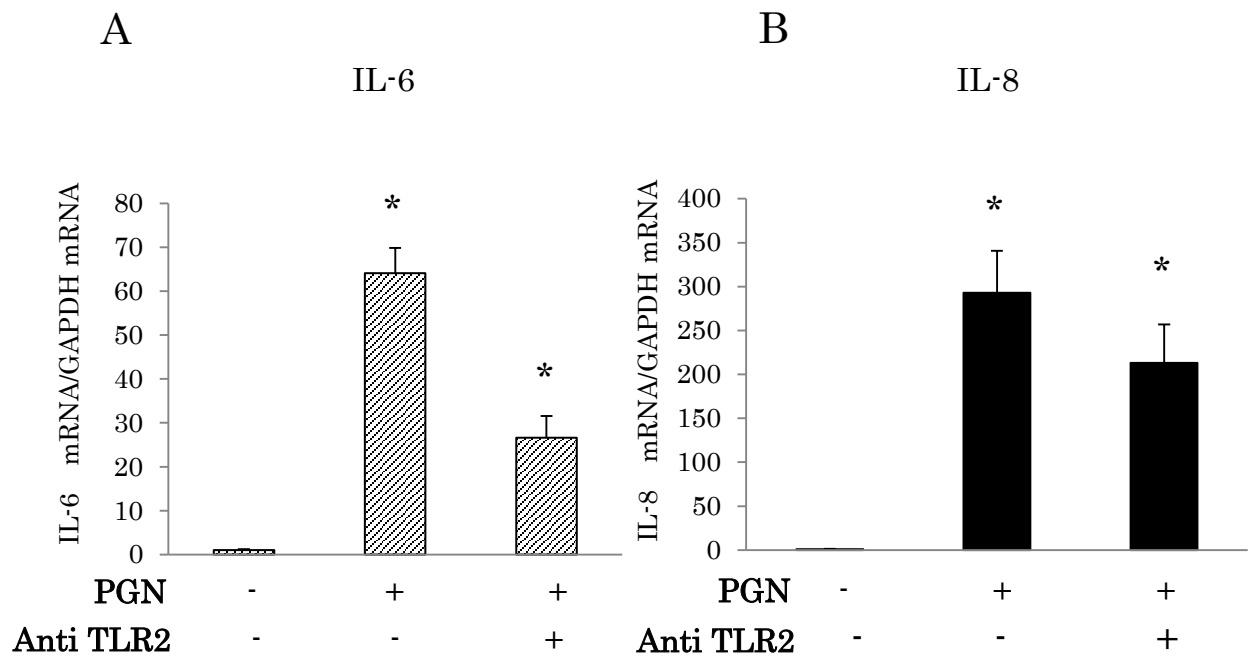


図 3. PGN によって誘導される IL-6 と IL-8 の mRNA 発現に及ぼす TLR2 中和抗体の影響

TLR2 の中和抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) を 30 分間前処理後に、PGN (10 $\mu\text{g/ml}$) を 24 時間作用させた時の、IL-6 (A)、IL-8 (B) の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (ANOVA *: $p < 0.01$)。

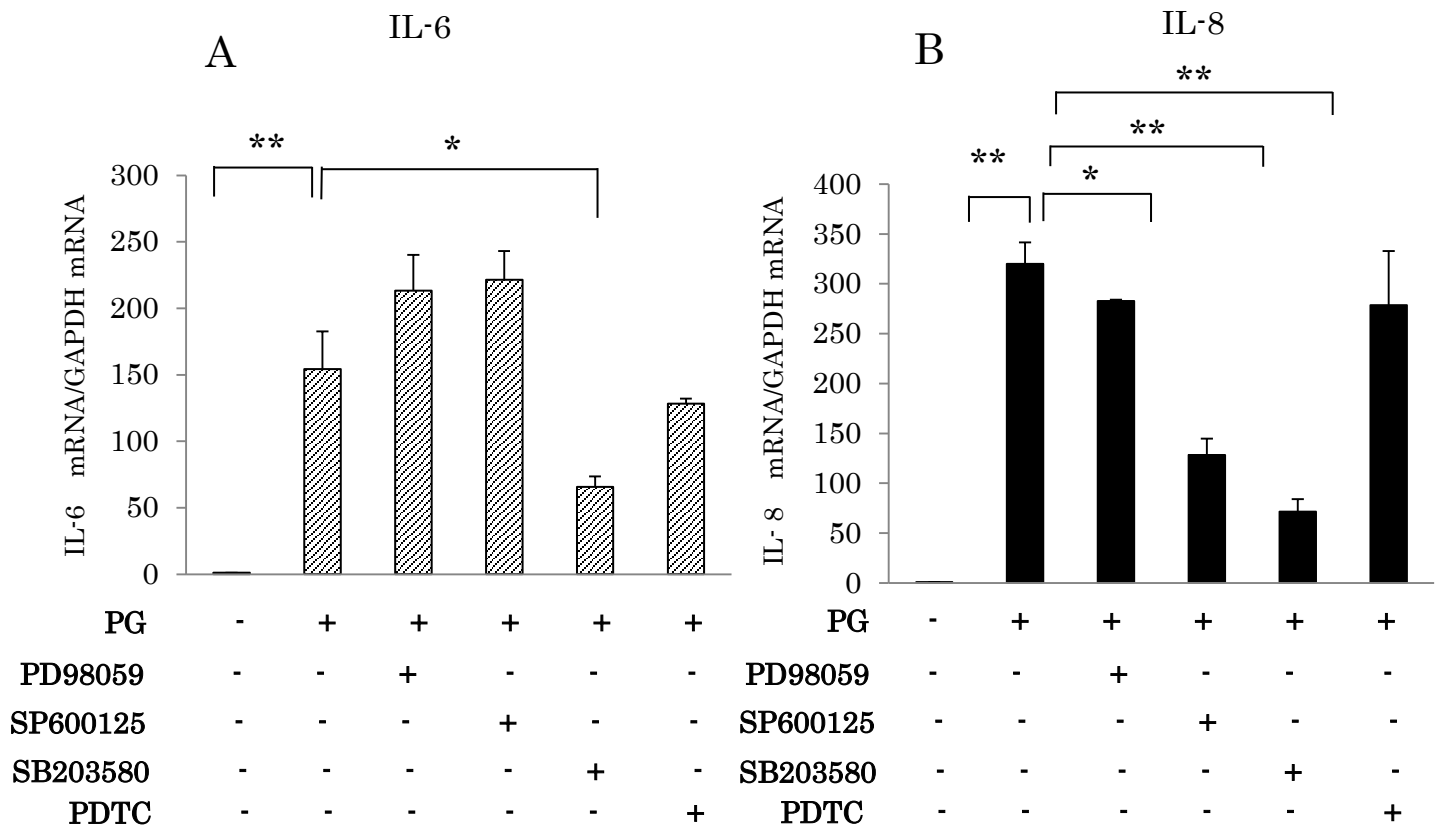


図 4. PGN によって誘導される炎症性サイトカイン発現におけるシグナル経路阻害の影響

PD98059 (50 mM、ERK 阻害剤)、 SP600125 (10 mM、JNK 阻害剤)、 SB203580 (10 mM、p38 阻害剤)、 PDTC (10 mM、NF- κ B 阻害剤) を 30 分前処理後に、PGN (10 μ g/ml) を作用させた時の、IL-6 (A)、IL-8 (B) の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (ANOVA *: $p < 0.05$ 、 **: $p < 0.01$)。

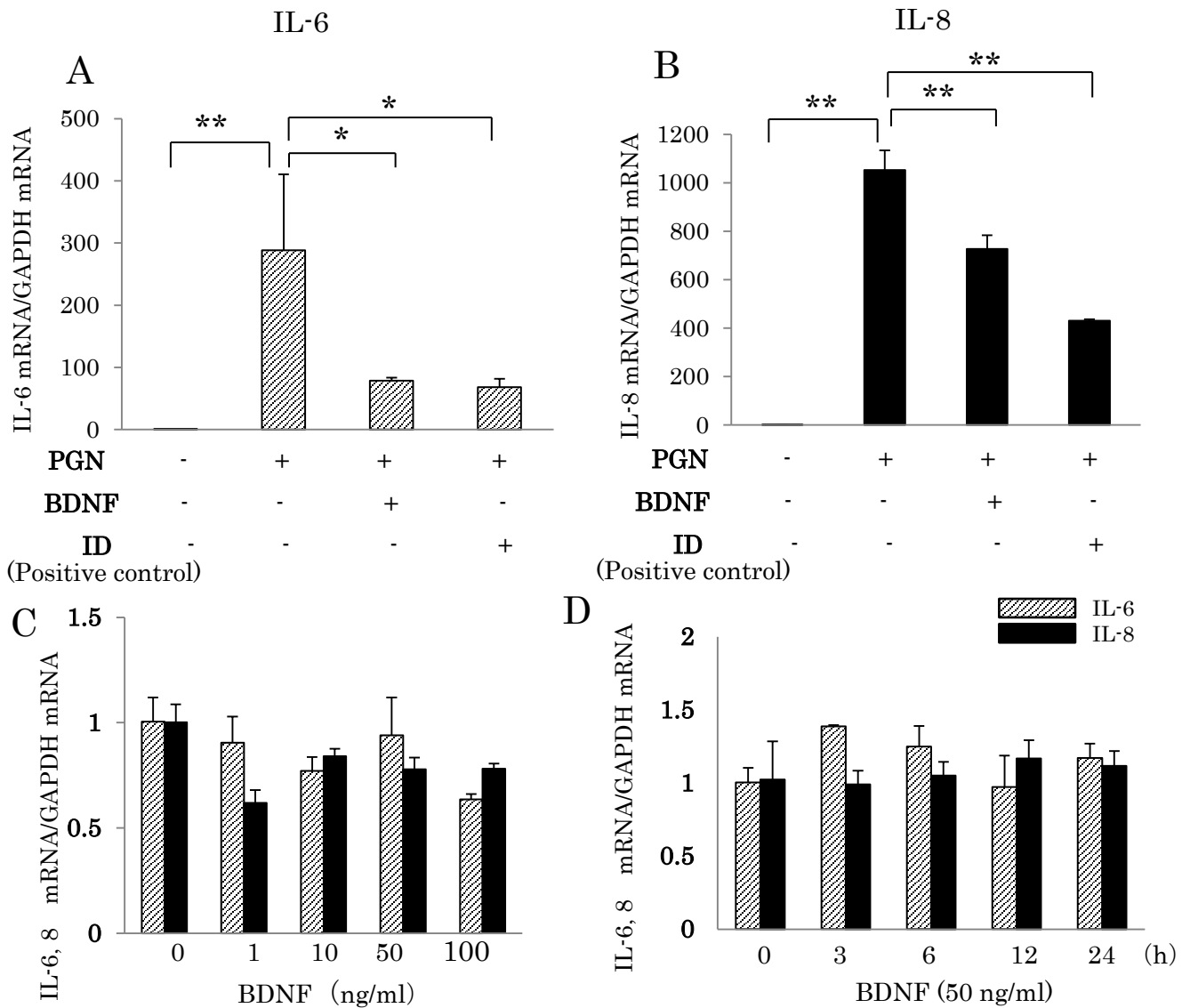


図 5. PGN 刺激された HP cells の炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響

PGN (10 $\mu\text{g/ml}$) を 3 時間前処理し、BDNF (50 ng/ml) を 24 時間作用させ、IL-6 (A)、IL-8 (B) の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。ポジティブコントロールとして、indomethacin (ID、10 $\mu\text{g/ml}$) を用いた。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (ANOVA *: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)。

BDNF (1、10、50、100 ng/ml) を 24 時間作用した HP cells (C)、及び BDNF (50 ng/ml) を 3、6、12、24 時間前に作用した HP cells (D) の、IL-6、IL-8 mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。A、B 共に非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す。

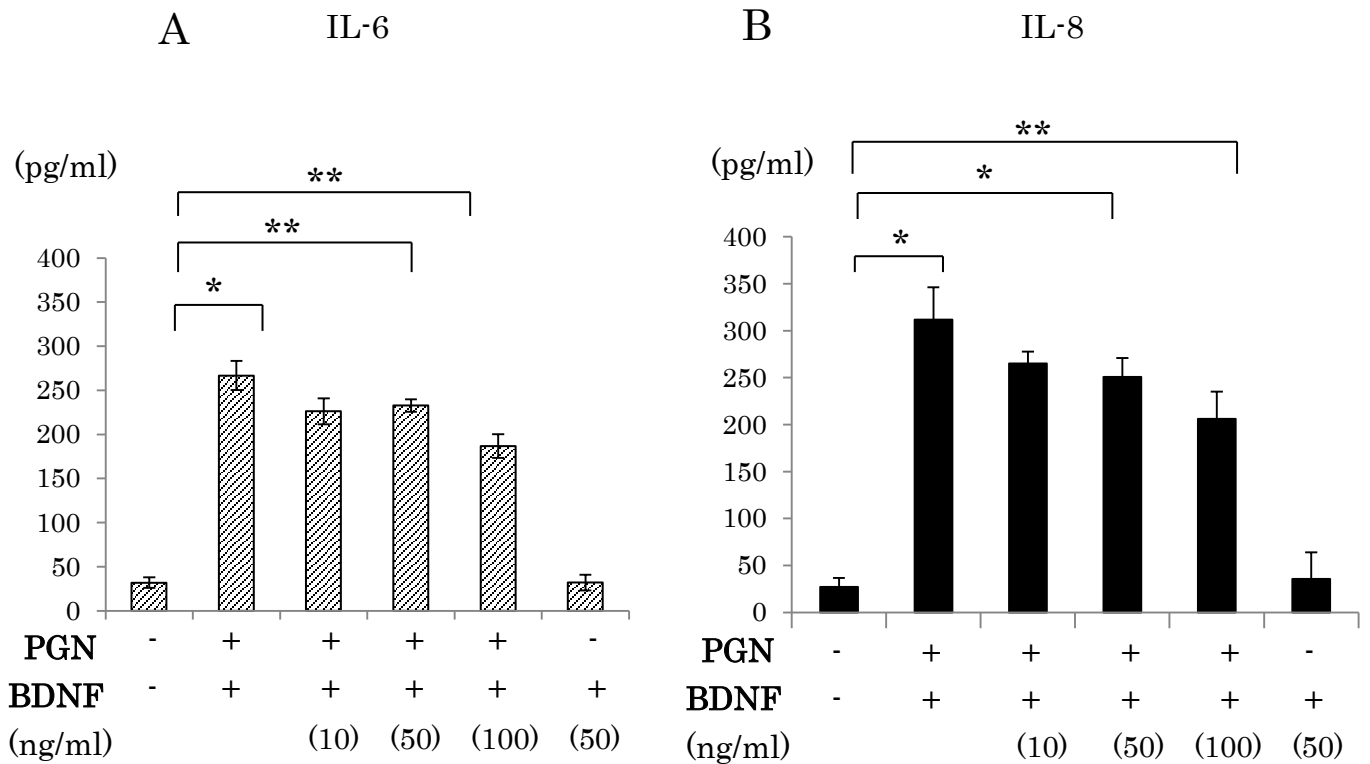


図 6. PGN 前処理した HP cells の炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響

PGN (10 µg/ml) を 3 時間前処理後に、BDNF (50 ng/ml) を 24 時間作用させ、IL-6 (A)、IL-8 (B) の蛋白質発現を ELISA 法によって解析した。値は 3 つの培養系における平均値±標準偏差を示す(ANOVA *: p<0.05、**: p<0.01)。

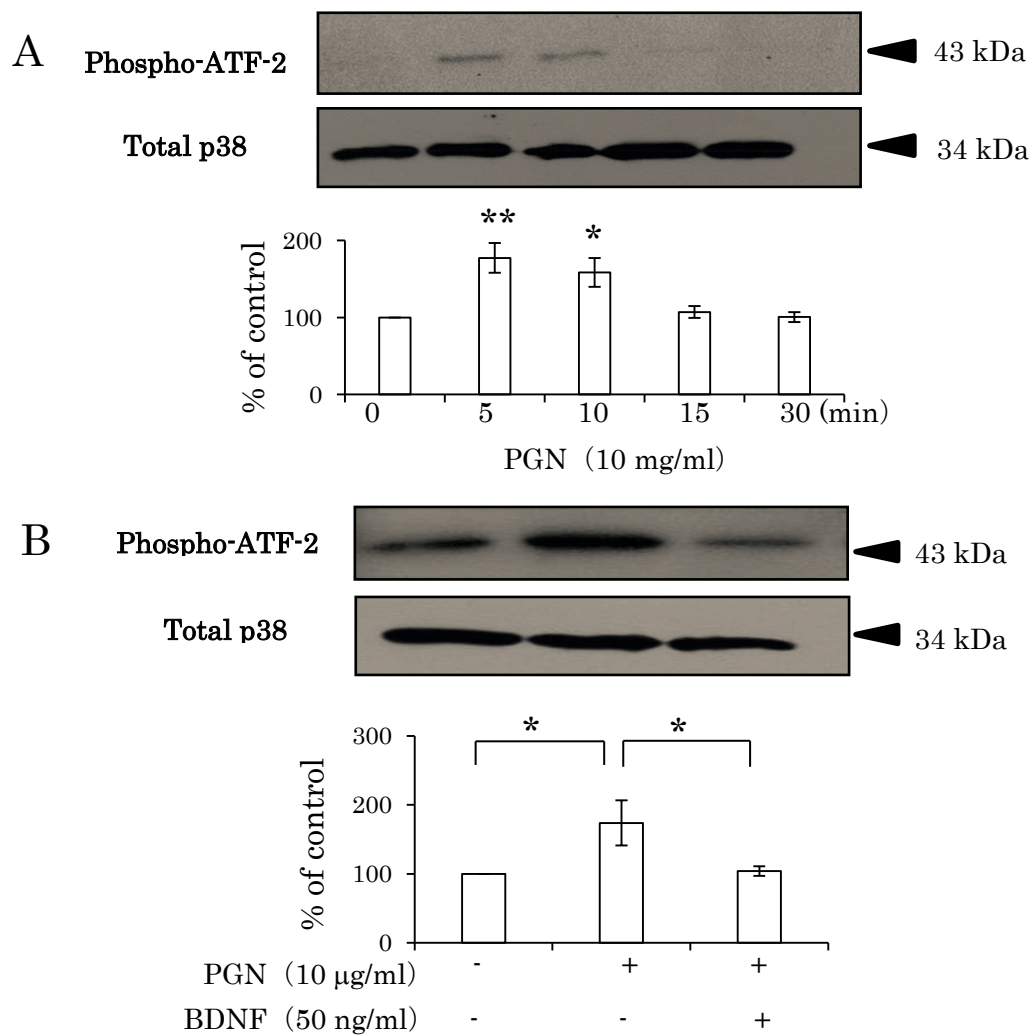


図7. HP cells における PGN によるリン酸化 p38 のキナーゼ活性

A: 培養終了後、HP cells に PGN (10 µg/ml) を 5、10、15、30 分間作用させた。SDS サンプルバッファーを用いて細胞を回収後、western blot 法を行った。上段に Phospho-ATF-2、下段に Total p38 のバンドをそれぞれ示す。下のグラフは、western blot 法の画像をコンピュータに取り込み Image J (NIH) によって画像解析し、グラフ化したものである。各値は 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student's t-test *: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)。

B: PGN (10 µg/ml) 単独作用及び PGN 刺激 5 分後に BDNF (50 ng/ml) を作用した。HP cells を SDS サンプルバッファーを用いて細胞を回収後、Western blot 法を行った。上段に Phospho-ATF-2、下段に Total p38 のバンドをそれぞれ示す。下のグラフは、western blot 法の画像をコンピュータに取り込み Image J (NIH) によって画像解析し、グラフ化したものである。各値は 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (ANOVA *: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)。

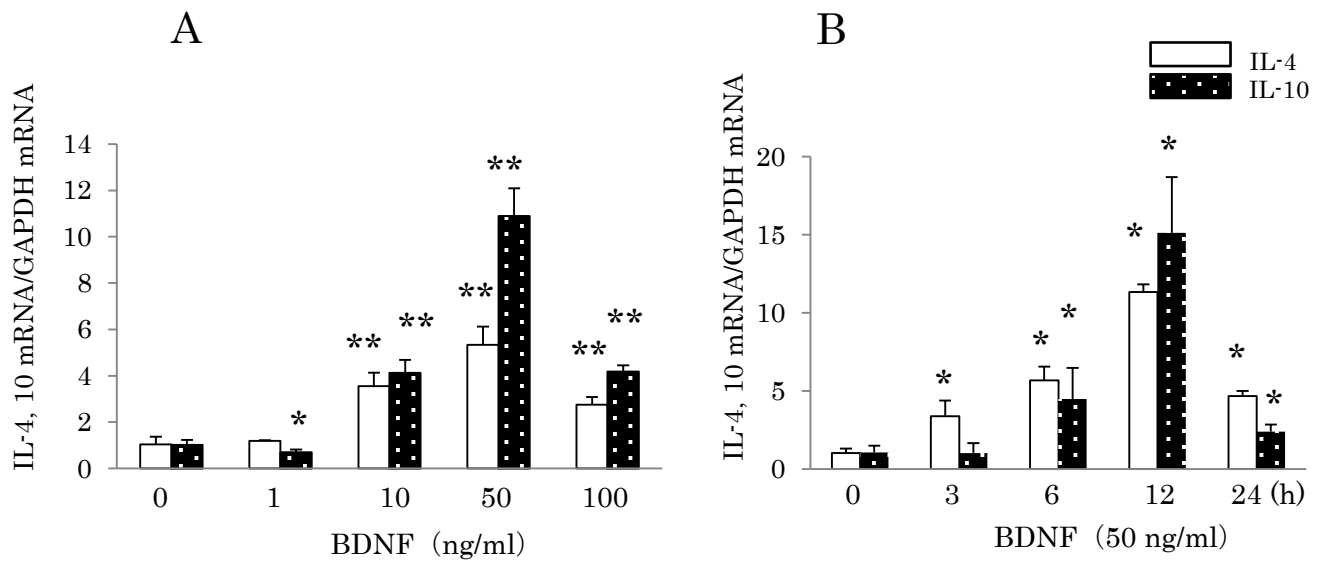


図8. HP cells における BDNF 刺激時の抗炎症性サイトカイン発現

A: BDNF (1、10、50、100 ng/ml) を 24 時間作用させ、IL-4、IL-10 の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。

B: 培養終了 3、6、12、24 時間前に BDNF (50 ng/ml) を作用させ、IL-4、IL-10 の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。

A, B 共に非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student's t-test *: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

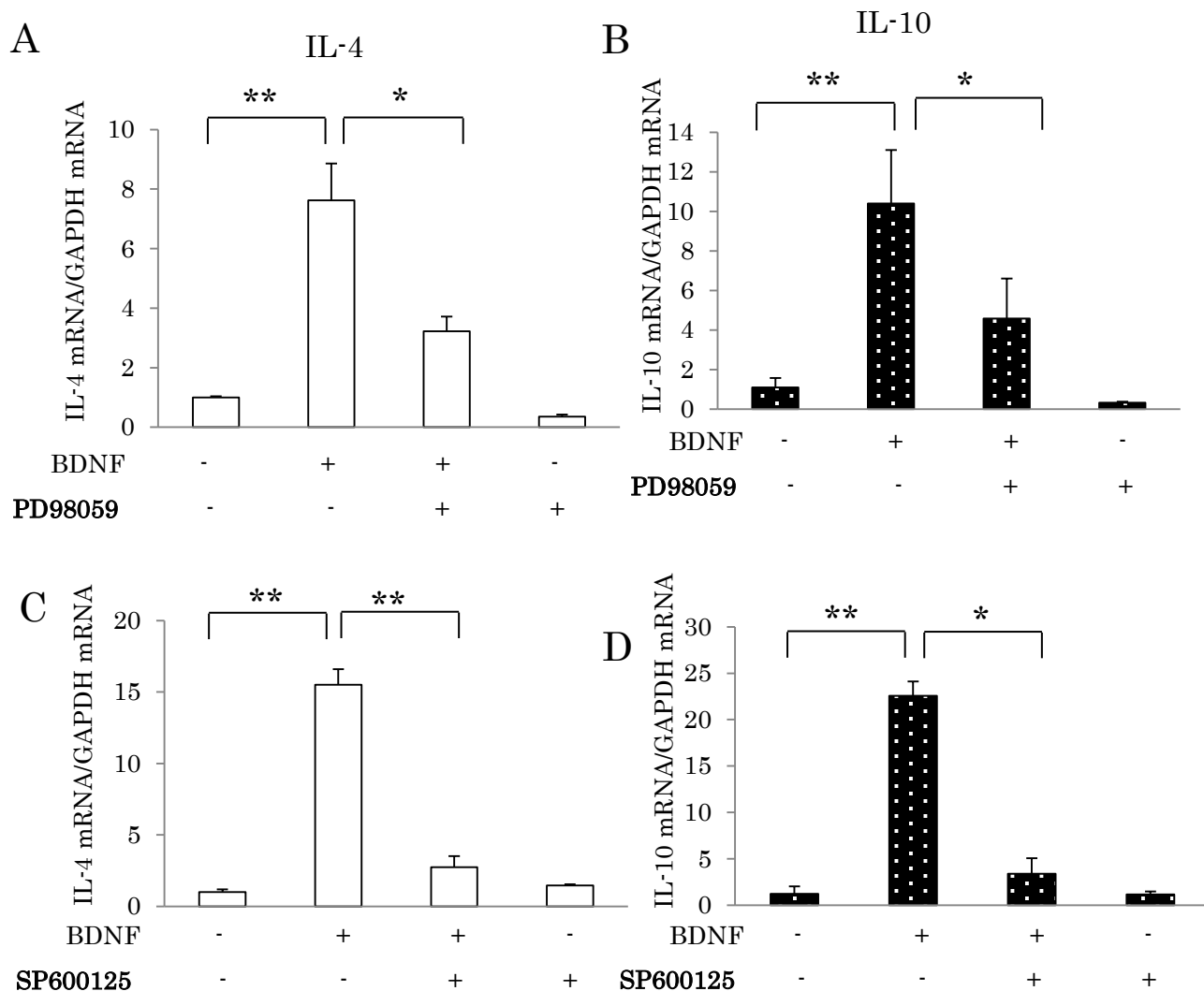


図 9. BDNF によって誘導される抗炎症性サイトカイン発現におけるシグナル経路阻害の影響

A-D: PD98059 (50 mM、ERK1/2 阻害剤)、SP600125 (10 mM、JNK 阻害剤) を 30 分間前処理し、BDNF (50 ng/ml) を作用させた時の、IL-4、IL-10 の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (ANOVA *: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

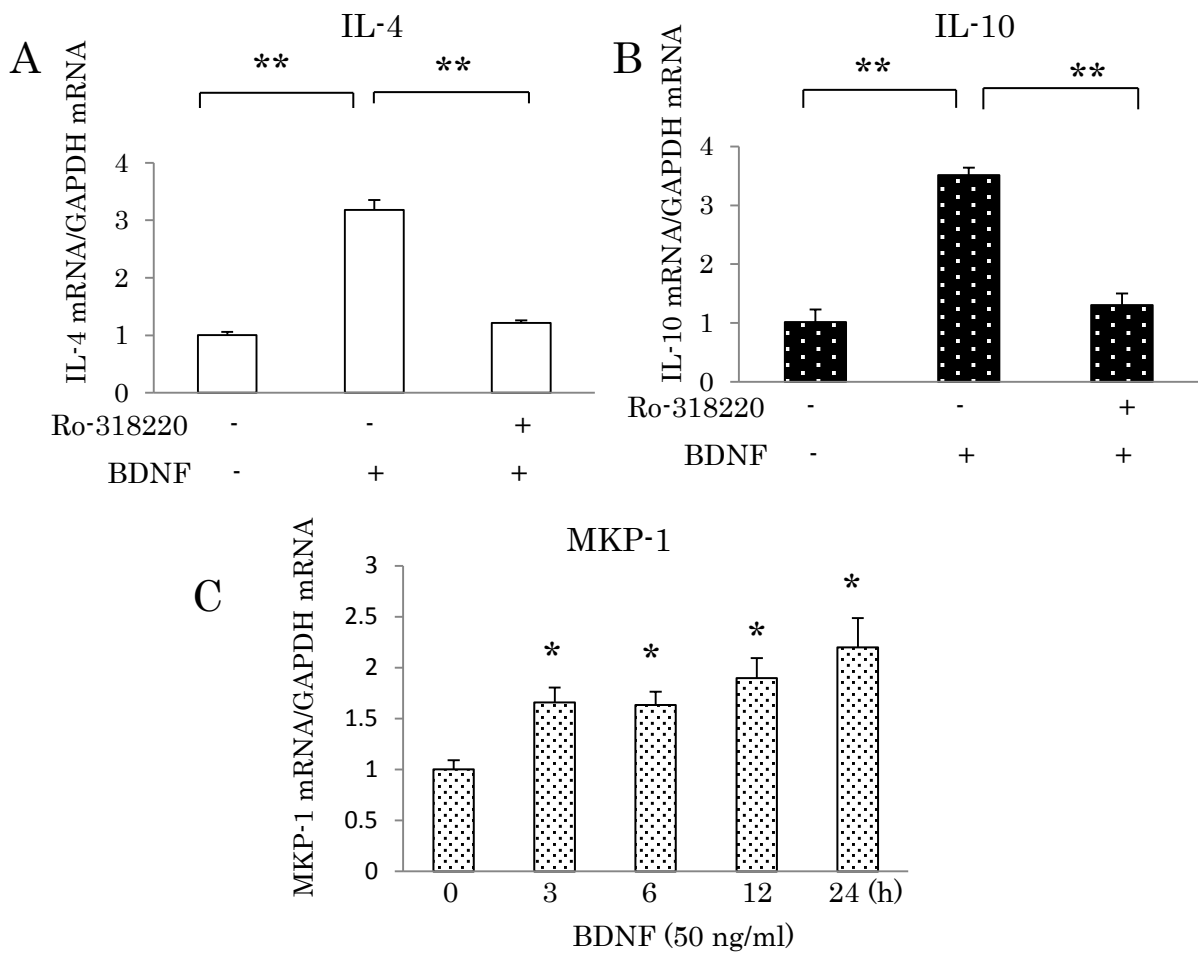


図 10. BDNF によって誘導される抗炎症性サイトカイン発現における MKP-1 阻害剤の影響

Ro-318220 (10 μ M、MKP-1 阻害剤) を 1 時間前処理し、BDNF (50 ng/ml) を作用させた時の IL-4 (A)、IL-10 (B) の mRNA 発現、培養終了 3、6、12、24 時間前に BDNF (50 ng/ml) を作用させた時の MKP-1 (C) の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (ANOVA (A、B)、Student's t-test (C) *: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

第四節 考 察

細菌刺激として用いた PGN は、細菌の細胞壁の主成分である糖ペプチドである。深在性齶蝕に存在するとされる *Staphylococcus aureus* を始めとするグラム陽性菌では 20-80 nm と厚い PGN 層が認められる[42、43]。PGN は Raw264.7 Macrophages において、TLR2-ERK/p38-NF- κ B-COX2 経路を介し、IL-6 を誘導するという報告がある[44、45、46]。本研究においても PGN は、HP cells の IL-6、IL-8 産生を促進し、TLR2-p38 経路を介していることが示唆された。また BDNF のポジティブコントロールとして用いた Indomethacin は COX 阻害剤であり[47]、PGN によって誘導された IL-6、IL-8 発現を抑制したことから、COX 経路も関与していることが推察され、今後の検討課題である。

BDNF と炎症の関連についてはいくつかの報告がある。BDNF がラット脳神経での炎症を抑制する[48]という報告の一方で、BDNF が気管支炎を助長するとの報告もある[49]。炎症性サイトカインに関しても、BDNF はヒト骨髄間質細胞の IL-6 発現を促進する[50]という報告の一方で、ヒト肥満細胞の IL-8 発現を抑制するとの報告がある[51]。本研究では、BDNF は HP cells の炎症性サイトカインである IL-6、IL-8 の産生を促進しないことを示した。また BDNF は、PGN によって誘導された IL-6、IL-8 発現を抑制し、そのメカニズムは PGN に誘導されるリン酸化 p38 のキナーゼ活性の抑制によることを示唆した。BDNF の p38 リン酸化抑制に関しては、p38、JNK のリン酸化を抑制し、神経細胞の生存率を高めるとの報告がある[52]。

抗炎症性サイトカイン IL-4 に関しては、網膜細胞に IL-4 を作用させると BDNF の発現が上昇するとの報告がある[53]。IL-10 に関しては、ヒト樹状細胞に BDNF を作用させると IL-10 の発現が上昇するとの報告がある[51、54]。以上のように、

BDNFは抗炎症性サイトカイン発現にも関連している。本研究において、BDNFはHP cellsの抗炎症性サイトカインであるIL-4、IL-10 のmRNA発現を統計学的に有意に促進し、そのシグナル経路としてERK1/2、JNKを介することを示唆した。これまでBDNFのシグナル経路に関しては、セメント芽細胞においてTrkB-c-Raf-ERK1/2-ELK-1 経路を介して骨・セメント質関連蛋白質発現促進[36]や血管内皮細胞においてTrkB/ERK/integrin $\alpha v\beta_3$ /FAK経路を介して細胞の遊走を促進するとの報告がある[37]。さらに本研究において、MAP kinaseを抑制するMKP-1 の阻害剤を前処理しBDNFを作用したところIL-4、IL-10 mRNA発現が抑制される結果となった。またBDNFは作用時間依存的に、歯髄細胞のMKP-1 mRNA発現を促進した。以上の結果から、BDNFの歯髄細胞におけるIL-4、IL-10 mRNA発現の促進には、MKP-1 を介したMAP kinaseのネガティブフィードバック[55]が関与している可能性が考えられる。BDNFの抗炎症メカニズムに関しては今後より詳細な検討が必要である。

第三章 HP cells のコラーゲン代謝に及ぼす BDNF の影響

第一節 概要

歯髄細胞はヘテロな細胞集団で、線維芽細胞を豊富に含み、歯髄の細胞外基質である collagen、elastin、oxytalan、eluanin を産生する。そしてこの細胞外基質を分解する酵素マトリックスプロテアーゼは、線維芽細胞や免疫担当細胞などによって分泌される。歯髄細胞のコラーゲン代謝能は、結合組織の構造の調節に重要であり、歯髄炎で破壊された組織修復の生理学的過程において必要不可欠である [56、57]。本研究では、HP cells における I 型コラーゲン発現と MMP-1 発現に及ぼす BDNF と PGN の影響について検討した。

第二節 材料および方法

第一項 HP cells のマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-1) と I 型コラーゲン発現に及ぼす BDNF 及び PGN の影響

1. 総 RNA 抽出法

HP cells を培養 7 日目、DMEM のみで細胞を 2 回洗浄した後培地 B に変更した。BDNF (50 ng/ml) または PGN (10 µg/ml) を培養終了前の 3、6、12、24 時間作用させた。培養終了後、HP cells を PBS で洗浄し、総 RNA の抽出、測定は前述と同様の方法で行った。

2. mRNA 発現の解析法

第二章第二節第二項 2. と同様の方法で、I 型コラーゲンと MMP-1 の mRNA 発現

を解析した。

3. 蛋白質発現の影響の解析法

HP cells を培養 7 日目、DMEM のみで細胞を 2 回洗浄した後培地 B に変更した。BDNF (50 ng/ml) または PGN (10 µg/ml) を培養終了前の 3、6、12、24 時間作用し、培養上清を獲得した。解析は MMP-1 Human ELISA kit (abcam、Cambridge、UK)、Procollagen type I C-peptide EIA kit (Takara) を用いて行った。

m

第二項 PGN 刺激した HP cells の MMP-1 と I 型コラーゲン発現に及ぼす BDNF の影響

1. 総 RNA の抽出法

HP cells を培養 7 日目、DMEM のみで細胞を 2 回洗浄した後培地 B に変更した。PGN (10 µg/ml) を 3 時間前処理した後、BDNF (50 ng/ml) を 24 時間作用させた。培養終了後、HP cells を PBS で洗浄し、総 RNA の抽出、測定は前述と同様の方法で行った。

2. 蛋白質発現の解析法

HP cells を培養 7 日目、DMEM のみで細胞を 2 回洗浄した後培地 B に変更した。PGN (10 µg/ml) を 3 時間前処理した後、BDNF (50 ng/ml) を 24 時間作用し、培養上清を獲得した。解析は MMP-1 Human ELISA kit (abcam®、Cambridge、UK) を用いて行った。

第三節 結 果

1. HP cells における MMP-1 と I 型コラーゲン発現に及ぼす BDNF と PGN の影響

PGN (10 $\mu\text{g/ml}$) は作用時間 12 時間をピークに、MMP-1 の mRNA 発現を促進した (図 11A)。I 型コラーゲンの mRNA 発現は 3~24 時間作用で統計学的に有意に減少した (図 11B)。BDNF (1、10、50、100 ng/ml) の 24 時間作用は、MMP-1 の mRNA 発現を減少させる傾向を示した (図 12A)。その一方で、I 型コラーゲンの mRNA 発現は約 1.5 倍促進した (図 12B)。また BDNF (50 ng/ml) の作用時間の影響では、24 時間作用で MMP-1 の mRNA 発現は減少し、I 型コラーゲンの mRNA 発現は 12 時間作用で促進した (図 12C、D)。さらに蛋白質レベルにおいても、BDNF (50、100 ng/ml) は MMP-1 発現を有意に減少させた (図 13A)。I 型コラーゲン発現は BDNF (1、10、50、100 ng/ml) でコントロールと比較し、産生量が有意に促進され、10 及び 50 ng/ml で約 1.7 倍であった (図 13B)。

2. PGN 刺激した HP cells の MMP-1 と I 型コラーゲン発現に及ぼす BDNF の影響

HP cells において、PGN (10 $\mu\text{g/ml}$) によって誘導された MMP-1 の mRNA 発現を、BDNF (50 ng/ml) は統計学的に有意に抑制した (図 14A)。PGN (10 $\mu\text{g/ml}$) によって減少した I 型コラーゲン mRNA 発現を、BDNF (50 ng/ml) はコントロールレベルまで回復させた (図

14B)。さらに蛋白質レベルでは、PGN (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) によって誘導された MMP-1 を BDNF (50、100 ng/ml) は抑制する傾向を示した (図 14C)。

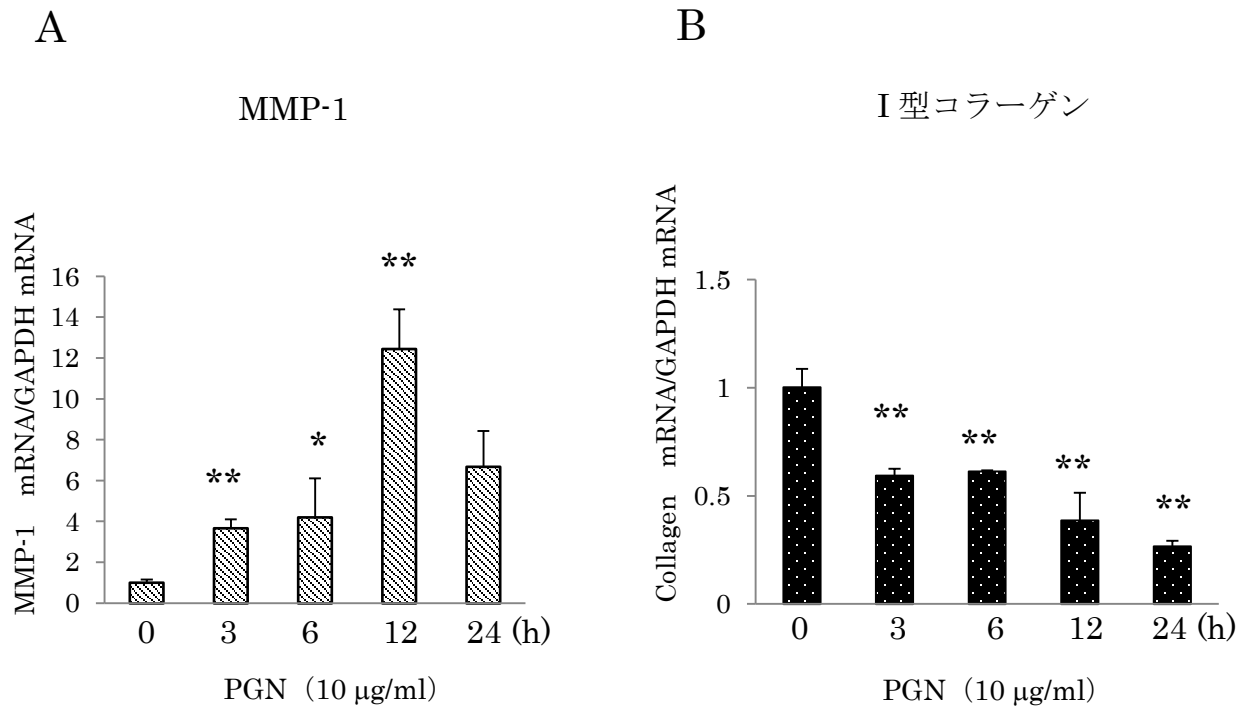


図 11. HP cells における PGN 刺激時の MMP-1 と I 型コラーゲン発現

PGN(10 µg/ml) を時間作用させた時の、MMP-1 (A)、I 型コラーゲン (B) の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student' s t-test *: $p < 0.05$ 、 **: $p < 0.01$)。

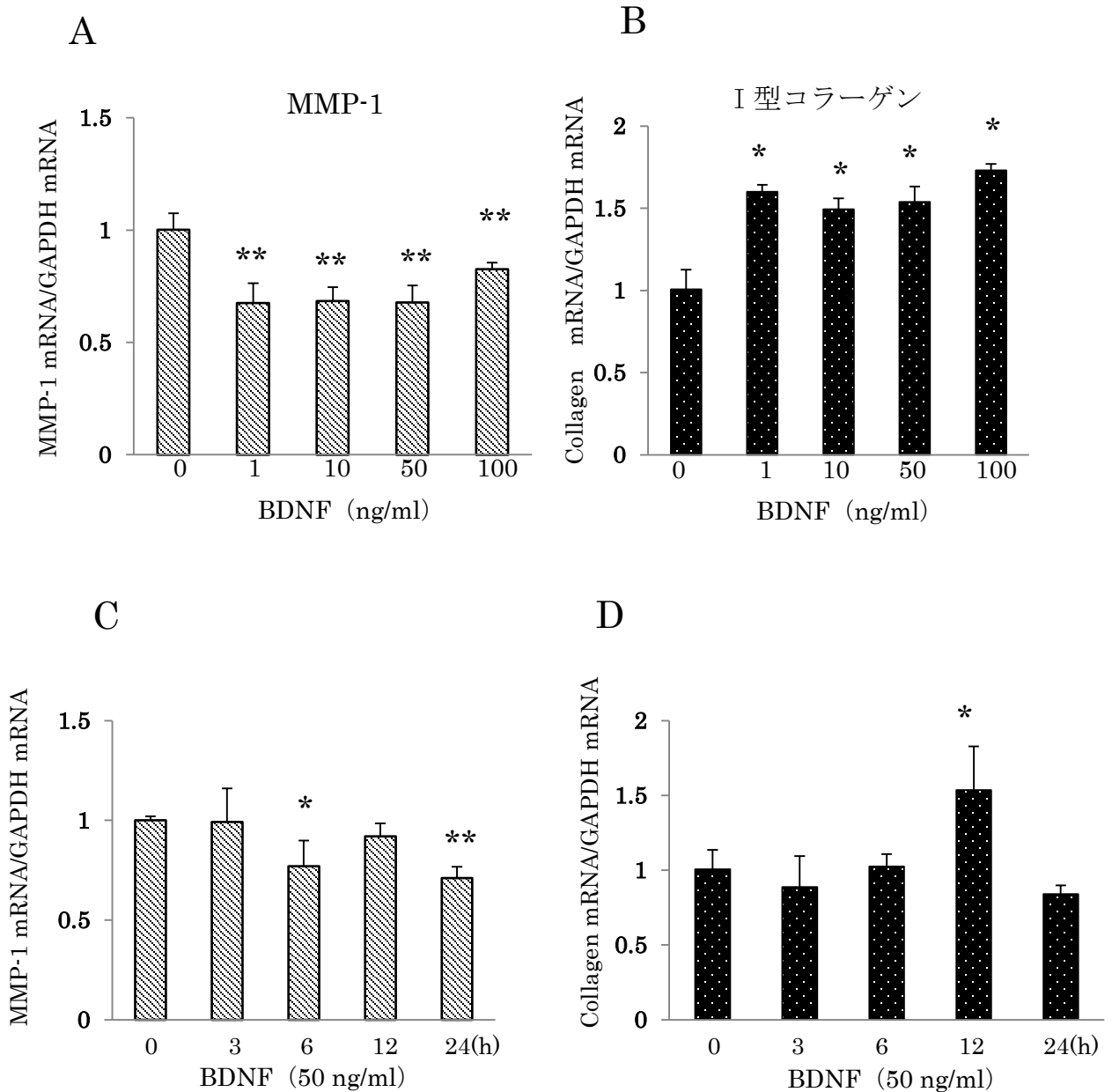


図 12. HP cells における BDNF 刺激時の MMP-1 と I 型コラーゲン発現

BDNF (1、10、50、100 ng/ml) を 24 時間作用させた時の MMP-1 (A)、I 型コラーゲン (B) の mRNA 発現、BDNF (50 ng/ml) を時間作用させた時の MMP-1 (C)、I 型コラーゲン (D) の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (ANOVA (A、B) Student's t-test (C、D) *: $p < 0.05$ 、**: $p < 0.01$)。

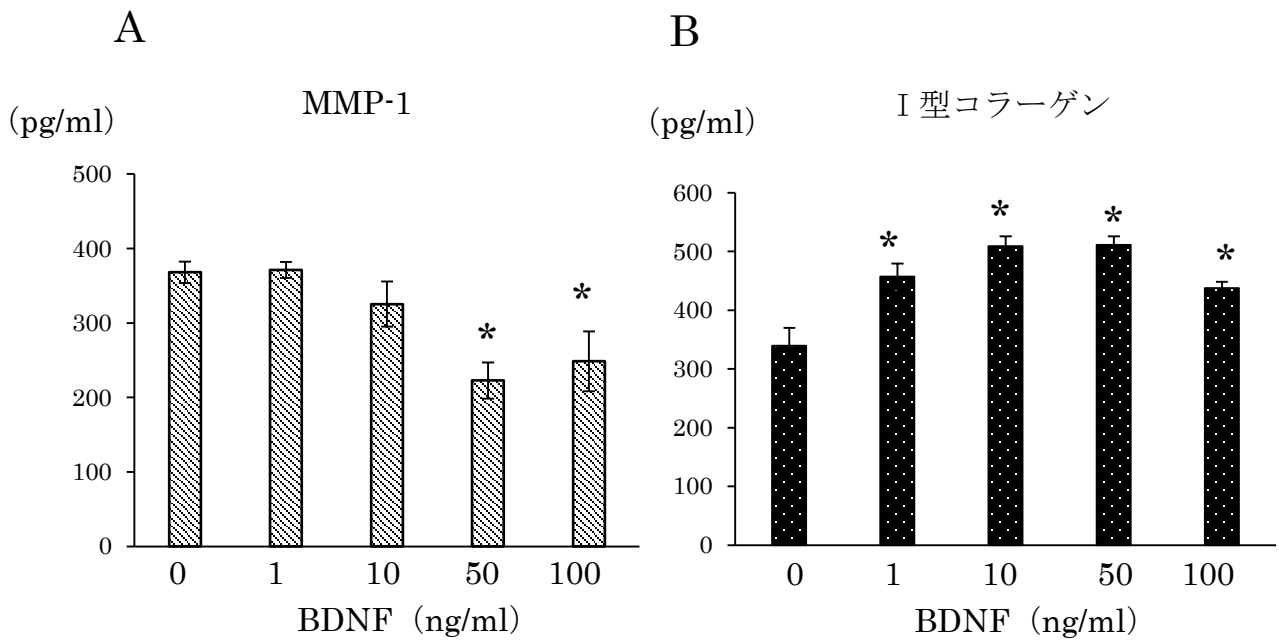


図 13. HP cells における BDNF 刺激時の MMP-1 と I 型コラーゲンの蛋白質発現

BDNF (50 ng/ml) を時間作用させた時の、MMP-1 (A)、I 型コラーゲン (B) の蛋白質発現を ELISA 法によって解析した。値は 3 つの培養系における平均値 ± 標準偏差を示す (ANOVA *: $p < 0.01$)。

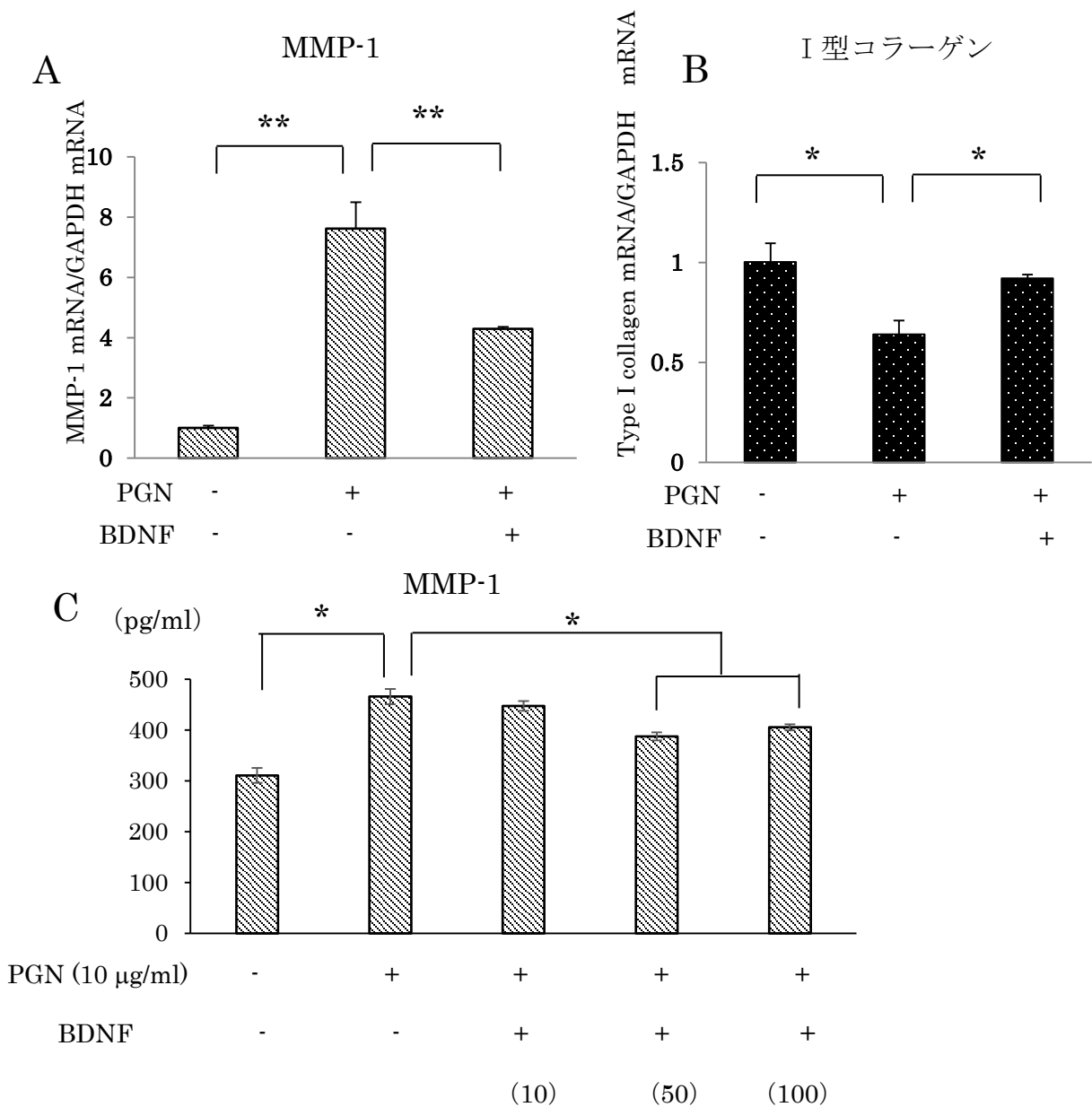


図 14. PGN 刺激された HP cells の MMP-1 と I 型コラーゲン発現に及ぼす BDNF の影響

PGN (10 μg/ml) を 3 時間前処理し、BDNF (50 ng/ml) を 24 時間作用させた時の、MMP-1 (A)、I 型コラーゲン (B) の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student's t-test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。 (C) MMP-1 の蛋白質発現を ELISA 法によって解析した。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (ANOVA *: $p < 0.01$)。

第四節 考 察

歯髄を構成する細胞（歯髄細胞）は多くが線維芽細胞であるが、未分化間葉系細胞、免疫系の細胞なども存在している。細胞外基質として I 型コラーゲンが最も豊富に存在しており [58]、この細胞外基質を分解する酵素として、線維芽細胞を含むいくつかの細胞によって分泌されるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）があり、現在では 25 種類確認されている [2、59]。特に MMP-1 は歯髄において多く存在しており、I 型コラーゲンを分解する。MMP は、炎症や腫瘍の進行などの病的過程に関与するだけでなく、組織修復、骨リモデリングなどの生理現象にも重要である。歯髄炎に関連する報告としては、リポ多糖（LPS）は Raw264.7 Cells に作用して MMP-9 を産生する [60]、マクロファージが産生する IL-1 と TNF- α はマクロファージと線維芽細胞の MMP-1、MMP-3 産生を誘導する [61] などがある。実際、歯髄炎に罹患した歯髄は MMP の発現が健康歯髄と比較し高いと言われている [2、3、59、62]。本研究で細菌刺激として用いた PGN に関しては、単球における MMP-9 発現を促進するとの報告 [63、64] や、ラットの皮膚損傷モデルにおいて MMP 経路を介し、コラーゲン産生を減少させるとの報告がある [65]。本研究でも、PGN は HP cells において、MMP-1 産生を促進し、I 型コラーゲン発現を減少させたことから、歯髄におけるコラーゲン破壊を促進すると思われる。

BDNF は、軟骨肉腫細胞において細胞の遊走能や MMP-1 など含む代謝能に関与する [66]、中枢神経系において TrkB 活性が MMP 活性に影響を与える [67]、MMP によって前駆体 BDNF を成熟 BDNF に切断し、神経細胞の長期増強（LTP）や神経可塑性に関与するなどの報告がある [66、68、69、70]。コラーゲン産生に関しては、BDNF は歯周靱帯細胞（HPL cells）の I 型コラーゲン産生を促進する [35]

との報告がある。本研究において、BDNFはHP cellsにおけるMMP-1の産生を減少させる一方で、BDNFはI型コラーゲン発現を促進した。さらにBDNFは、PGNによって減少したI型コラーゲン発現を統計学的に有意に回復させ、PGNによって増加したMMP-1発現を統計学的に有意に抑制したことから、PGNによって破壊された細胞外基質を回復する作用があることが推察される。

第四章 HP cells の骨・象牙質関連タンパク質発現に及ぼす BDNF の影響

第一節 概要

修復象牙質は、齲蝕や咬耗などの物理的・化学的刺激に対応して原生象牙質や二次象牙質のさらに歯髄側に付加的に形成される象牙質である。露髄面の封鎖において、歯髄細胞の増殖や分化を誘導し、修復象牙質形成を促進することは非常に有用であると考えられる。本章では、以下の条件にて培養した HP cells の骨・象牙質関連蛋白質発現に及ぼす BDNF の影響を検討した。

第二節 材料および方法

1. HP cells の培養法

HP cells は培養系あたり 1.0×10^5 個の細胞をタイプ I コラーゲンコートした直径 35 mm シャーレ (住友ベークライト) に播種し、培地 A (GM 培地) に ascorbic acid (50 mg/ml)、dexamethazone (0.1 mM)、 β -glycerophosphate (10 mM) を加え骨分化誘導培地 (OM 培地) で 1 週間および 2 週間培養した。

2. BDNF の作用

HP cells を OM 培地にて 13 日間培養した。14 日目は血清を含まない培地 B で培養した。BDNF (50 ng/ml) を 14 日目の培養終了前の 3、6、12、24 時間作用させた。

3. 総 RNA の抽出法

第二章第二節第二項 1. と同様の方法で行った。

4. mRNA 発現の解析法

第二章第二節第二項 2. と同様の方法で行った。プライマーは、骨・象牙質関連蛋白質である alkaline phosphatase (ALP)、osteopontin (OPN)、osteocalcin (OC)、bone morphogenetic protein (BMP-2)、象牙芽細胞マーカーである dentin matrix protein-1 (DMP-1)、runt-related transcription factor 2 (RUNX2)、dentin sialophosphoprotein (DSPP)、未分化マーカーである Nanog、Nestin を用いた。

第三節 結 果

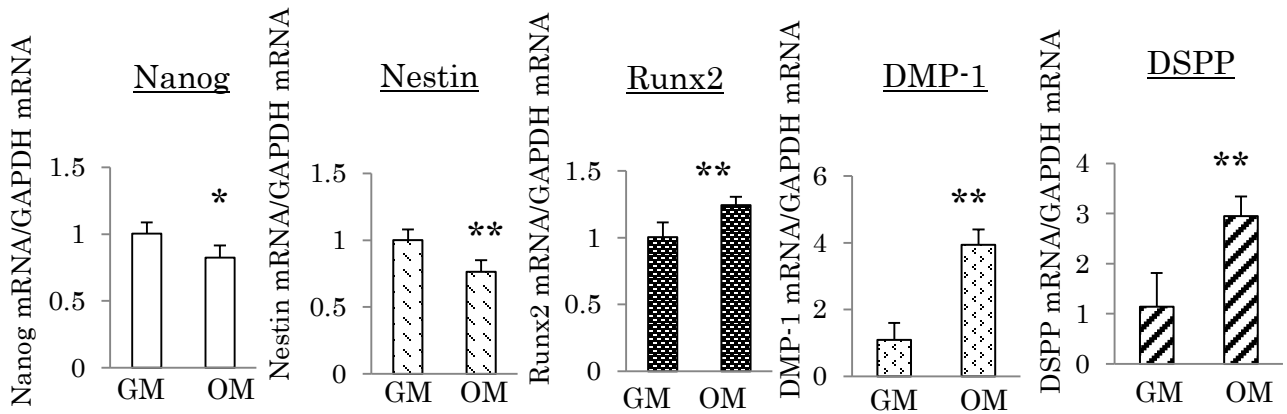
1. HP cells の分化に及ぼす OM 培地の影響

OM 培地で HP cells を 1 週間培養すると、未分化マーカー (Nanog、Nestin) の mRNA 発現量が統計学的に有意に減少し、象牙芽細胞マーカー (Runx2、DMP-1、DSPP) の mRNA 発現は有意に促進した。2 週間培養では、その発現がより顕著となった (図 15)。

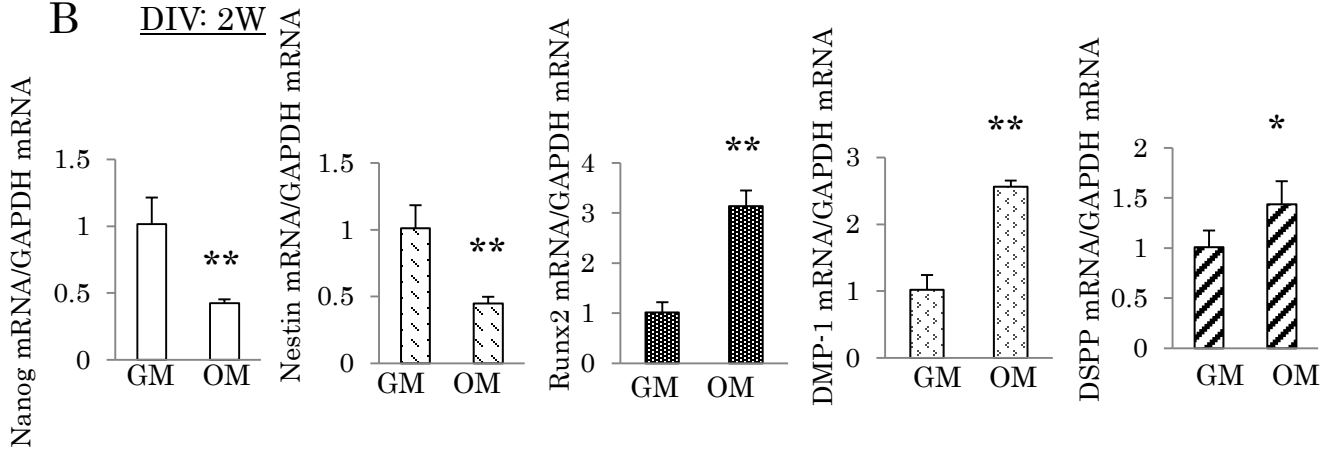
2. 骨・象牙質関連蛋白質 mRNA 発現に及ぼす BDNF の影響

OM 培地で培養した HP cells に、BDNF (50 ng/ml) を 3、6、12、24 時間させたとき、ALP、OPN、OC の mRNA 発現は作用 6 時間でピークを示し、BMP-2、DMP-1 は作用 3 時間以降から mRNA 発現の促進傾向が見られた (図 16)。

A DIV: 1W



B DIV: 2W



GM: Growth medium

OM: Osteo-inductive medium

図 15. HP cells の象牙芽細胞様細胞への分化

HP cells を GM 培地、OM 培地にて 1 週間 (A)、2 週間 (B) それぞれ培養し、未分化マーカー (Nanog、Nestin)、象牙芽細胞マーカー Runx2、DMP-1、DSPP の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (ANOVA *: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)。

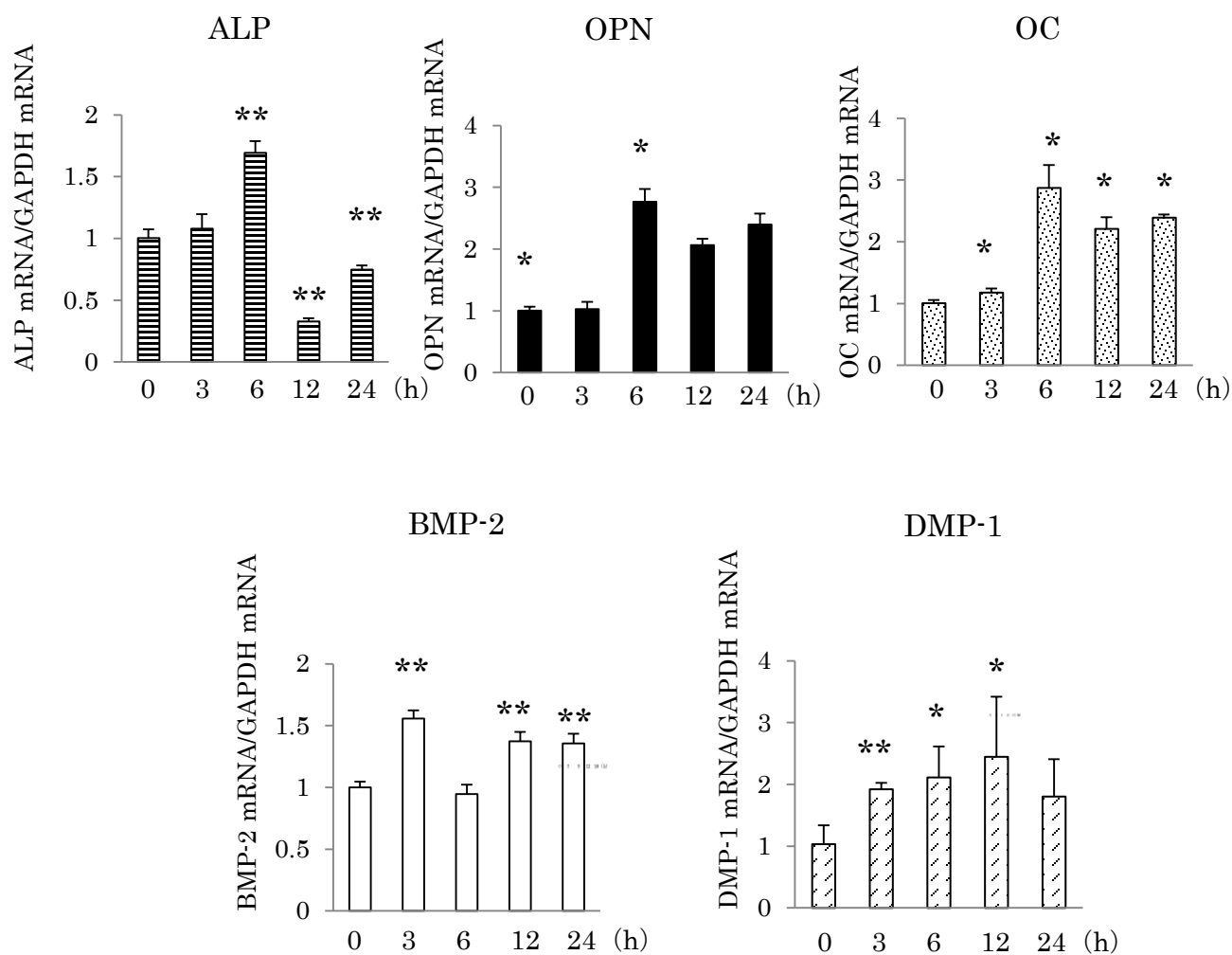


図 16. 骨・象牙質関連蛋白質 mRNA 発現に及ぼす BDNF の影響

HP cells を OM 培地にて 2 週間培養した後、BDNF (50 ng/ml) を無血清下で 3、6、12、24 時間作用させた。骨・象牙質関連蛋白質 (ALP、OPN、OC、BMP-2、DMP-1) の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって解析した。非刺激時の発現量を 1 としている。各バーは 3 つの培養系の平均値と標準偏差 (SD) を示す (Student's t-test *: $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$)。

第四節 考 察

Nanog、Nestin は未分化マーカー、Runx2、DMP-1、DSPP は象牙芽細胞マーカーとして知られている[71、72、73、74]。本研究において、OM 培地で 1 及び 2 週間培養することで、未分化マーカーの mRNA 発現量が減少し、分化マーカーの発現量が増加したことから、HP cells は象牙芽細胞様細胞に分化した可能性が示唆された。

BDNF はヒト歯周靭帯細胞 (HPL cells) やセメント芽細胞の骨・セメント質関連蛋白質発現を促進するとの報告がある[35、36]。本研究では、BDNF が象牙芽細胞様細胞に分化したと推察される HP cells の骨・象牙質関連蛋白質発現の mRNA 発現を促進することを明らかにし、BDNF が修復象牙質形成において有用であることを示唆した。今後蛋白質レベルでの検討が必要である。

ポルトランドセメントを主成分とした MTA セメントの修復象牙質形成機構は、まず覆髄直後に露髄部直下で壊死層形成と炎症性細胞浸潤が生じる。その後、下層の歯髄内での活発な細胞増殖に引き続き、露髄部に線維性基質の形成と新生象牙質細胞様細胞の配列が生じ、最終的に細管構造を有する象牙質様基質が形成される[75、76、77]。この形成機構から考えると、これまで本研究の *in vitro* で明らかにした BDNF の炎症制御能やコラーゲン代謝制御能は、MTA セメントよりも修復象牙質形成に有利であると考えられる。今後、適切な担体を選択し、*in vivo* で BDNF の象牙質-歯髄複合体における再生能・保護能を検討する必要がある。

第五章 総括

歯の長期保存を目的として、歯髄再生・保護治療を発展させるためには、歯髄構成細胞の機能を積極的に制御する治療法が有用と考える。本研究は BDNF の新規歯髄覆髄剤としての臨床応用を最終的な目的として、BDNF の歯髄細胞に及ぼす影響を検討し、以下の結果を得た。

1. HP cells は TrkB、p75、TLR2 を発現していた。
2. PGN は HP cells の IL-6、IL-8 mRNA 発現を促進し、そのシグナル伝達には p38 を介していることが示唆された。
3. BDNF は PGN 刺激で誘導された HP cells の IL-6 と IL-8 の mRNA 発現および蛋白質発現を抑制した。そのメカニズムとして、BDNF が PGN によるリン酸化 p38 のキナーゼ活性を抑制することが示唆された。
4. BDNF は HP cells の IL-4、IL-10 mRNA 発現を促進した。そのシグナル伝達には ERK1/2、JNK を介していることが示唆された。さらに MAPK 脱リン酸化酵素である MAP Kinase phosphatase (MKP-1) によるネガティブフィードバックが関与する可能性が示唆された。
5. BDNF は PGN 刺激による MMP-1 産生を抑制し、PGN 刺激によって減弱した I 型コラーゲンの mRNA 発現を回復した。
6. BDNF は HP cells において、骨・象牙質関連蛋白質である OPN、OC、BMP-2、ALP、DMP-1 の mRNA 発現を促進した。

本研究結果から、ヒト歯髄細胞は BDNF レセプター (TrkB、p75) を有しており、BDNF によって生理的な細胞機能を制御出来ると考えられる。また BDNF は歯髄細胞において炎症制御、コラーゲン代謝、骨・象牙質関連蛋白質発現に関与し、新規歯髄覆髄剤として有用であることが示唆された。

参考文献

- [1] M. Elsalhy, F. Azizieh, R. Raghupathy, Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation, *Int Endod J* 46 (2013) 573-580.
- [2] H. Gusman, R.B. Santana, M. Zehnder, Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps, *Eur J Oral Sci* 110 (2002) 353-357.
- [3] S.J. Shin, J.I. Lee, S.H. Baek, S.S. Lim, Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions, *J Endod* 28 (2002) 313-315.
- [4] M. Aurrekoetxea, P. Garcia-Gallastegui, I. Irastorza, J. Luzuriaga, V. Uribe-Etxebarria, F. Unda, G. Ibarretxe, Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues, *Front Physiol* 6 (2015) 289.
- [5] M. Raedel, A. Hartmann, S. Bohm, I. Konstantinidis, H.W. Priess, M.H. Walter, Outcomes of direct pulp capping: interrogating an insurance database, *Int Endod J* (2015).
- [6] G. Guven, Z.C. Cehreli, A. Ural, M.A. Serdar, F. Basak, Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts in vitro, *J Endod* 33 (2007) 447-450.
- [7] P.L. Tomson, L.M. Grover, P.J. Lumley, A.J. Sloan, A.J. Smith, P.R. Cooper, Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate, *J Dent* 35 (2007) 636-642.
- [8] E.T. Koh, F. McDonald, T.R. Pitt Ford, M. Torabinejad, Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate, *J Endod* 24 (1998) 543-547.
- [9] T.J. Hilton, J.L. Ferracane, L. Mancl, Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial, *J Dent Res* 92 (2013) 16s-22s.
- [10] C. Krupp, C. Bargholz, M. Brusehaber, M. Hulsmann, Treatment outcome after repair of root perforations with mineral trioxide aggregate: a retrospective evaluation of 90 teeth, *J Endod* 39 (2013) 1364-1368.
- [11] S.H. Baek, W.C. Lee, F.C. Setzer, S. Kim, Periapical bone regeneration after endodontic microsurgery with three different root-end filling materials: amalgam, SuperEBA, and mineral trioxide aggregate, *J Endod* 36 (2010) 1323-1325.
- [12] J. Mente, M. Leo, D. Panagidis, M. Ohle, S. Schneider, J. Lorenzo Bermejo, T. Pfefferle, Treatment outcome of mineral trioxide aggregate in open apex teeth, *J Endod* 39 (2013) 20-26.
- [13] D. Johnson, A. Lanahan, C.R. Buck, A. Sehgal, C. Morgan, E. Mercer, M. Bothwell, M.

- Chao, Expression and structure of the human NGF receptor, *Cell* 47 (1986) 545-554.
- [14] G.L. Barrett, The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis, *Prog Neurobiol* 61 (2000) 205-229.
- [15] B.D. Carter, G. Dechant, J.M. Frade, C. Kaltschmidt, Y.A. Barde, Neurotrophins and their p75 receptor, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 61 (1996) 407-415.
- [16] R. Klein, D. Martin-Zanca, M. Barbacid, L.F. Parada, Expression of the tyrosine kinase receptor gene *trkB* is confined to the murine embryonic and adult nervous system, *Development* 109 (1990) 845-850.
- [17] D.S. Middlemas, R.A. Lindberg, T. Hunter, *trkB*, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors, *Mol Cell Biol* 11 (1991) 143-153.
- [18] A. Figurov, L.D. Pozzo-Miller, P. Olafsson, T. Wang, B. Lu, Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus, *Nature* 381 (1996) 706-709.
- [19] Y.T. Ma, T. Hsieh, M.E. Forbes, J.E. Johnson, D.O. Frost, BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death, *J Neurosci* 18 (1998) 2097-2107.
- [20] T. Ebendal, Function and evolution in the NGF family and its receptors, *J Neurosci Res* 32 (1992) 461-470.
- [21] M.J. Radeke, T.P. Misko, C. Hsu, L.A. Herzenberg, E.M. Shooter, Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor, *Nature* 325 (1987) 593-597.
- [22] M. Bibel, Y.A. Barde, Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system, *Genes Dev* 14 (2000) 2919-2937.
- [23] H. Kurihara, H. Shinohara, H. Yoshino, K. Takeda, H. Shiba, Neurotrophins in cultured cells from periodontal tissues, *J Periodontol* 74 (2003) 76-84.
- [24] I. Nosrat, A. Seiger, L. Olson, C.A. Nosrat, Expression patterns of neurotrophic factor mRNAs in developing human teeth, *Cell Tissue Res* 310 (2002) 177-187.
- [25] A.F. Bray, R.R. Cevallos, K. Gazarian, M. Lamas, Human dental pulp stem cells respond to cues from the rat retina and differentiate to express the retinal neuronal marker rhodopsin, *Neuroscience* 280 (2014) 142-155.
- [26] Y. Furukawa, S. Furukawa, E. Satoyoshi, K. Hayashi, Nerve growth factor secreted by mouse heart cells in culture, *J Biol Chem* 259 (1984) 1259-1264.
- [27] U. Otten, P. Ehrhard, R. Peck, Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 10059-10063.
- [28] D. MacGrogan, J.P. Saint-Andre, E. Dicou, Expression of nerve growth factor and nerve

- growth factor receptor genes in human tissues and in prostatic adenocarcinoma cell lines, *J Neurochem* 59 (1992) 1381-1391.
- [29] T. Yamashiro, T. Fukunaga, K. Yamashita, N. Kobashi, T. Takano-Yamamoto, Gene and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage, *Bone* 28 (2001) 404-409.
- [30] T. Nakanishi, K. Takahashi, C. Aoki, K. Nishikawa, T. Hattori, S. Taniguchi, Expression of nerve growth factor family neurotrophins in a mouse osteoblastic cell line, *Biochem Biophys Res Commun* 198 (1994) 891-897.
- [31] T. Nakahashi, H. Fujimura, C.A. Altar, J. Li, J. Kambayashi, N.N. Tandon, B. Sun, Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor, *FEBS Lett* 470 (2000) 113-117.
- [32] M. Kerschensteiner, E. Gallmeier, L. Behrens, V.V. Leal, T. Misgeld, W.E. Klinkert, R. Kolbeck, E. Hoppe, R.L. Oropenza-Wekerle, I. Bartke, C. Stadelmann, H. Lassmann, H. Wekerle, R. Hohlfeld, Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation?, *J Exp Med* 189 (1999) 865-870.
- [33] K. Asaumi, T. Nakanishi, H. Asahara, H. Inoue, M. Takigawa, Expression of neurotrophins and their receptors (TRK) during fracture healing, *Bone* 26 (2000) 625-633.
- [34] C.A. Nosrat, K. Fried, S. Lindskog, L. Olson, Cellular expression of neurotrophin mRNAs during tooth development, *Cell Tissue Res* 290 (1997) 569-580.
- [35] K. Takeda, H. Shiba, N. Mizuno, N. Hasegawa, Y. Mouri, A. Hirachi, H. Yoshino, H. Kawaguchi, H. Kurihara, Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration, *Tissue Eng* 11 (2005) 1618-1629.
- [36] M. Kajiya, H. Shiba, T. Fujita, K. Ouhara, K. Takeda, N. Mizuno, H. Kawaguchi, M. Kitagawa, T. Takata, K. Tsuji, H. Kurihara, Brain-derived neurotrophic factor stimulates bone/cementum-related protein gene expression in cementoblasts, *J Biol Chem* 283 (2008) 16259-16267.
- [37] S. Matsuda, T. Fujita, M. Kajiya, K. Takeda, H. Shiba, H. Kawaguchi, H. Kurihara, Brain-derived neurotrophic factor induces migration of endothelial cells through a TrkB-ERK-integrin α V β 3-FAK cascade, *J Cell Physiol* 227 (2012) 2123-2129.
- [38] K. Kashiwai, M. Kajiya, S. Matsuda, K. Ouhara, K. Takeda, T. Takata, M. Kitagawa, T. Fujita, H. Shiba, H. Kurihara, Distinction Between Cell Proliferation and Apoptosis Signals Regulated by Brain-Derived Neurotrophic Factor in Human Periodontal Ligament Cells and Gingival Epithelial Cells, *J Cell Biochem* (2015).
- [39] K. Takeda, N. Sakai, H. Shiba, T. Nagahara, T. Fujita, M. Kajiya, T. Iwata, S. Matsuda,

- K. Kawahara, H. Kawaguchi, H. Kurihara, Characteristics of high-molecular-weight hyaluronic acid as a brain-derived neurotrophic factor scaffold in periodontal tissue regeneration, *Tissue Eng Part A* 17 (2011) 955-967.
- [40] B. Bahrami, S. Macfarlane, G.T. Macfarlane, Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines, *J Appl Microbiol* 110 (2011) 353-363.
- [41] F.A. Roberts, K.A. McCaffery, S.M. Michalek, Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis, *J Dent Res* 76 (1997) 1833-1839.
- [42] B. Kouidhi, T. Zmantar, H. Hentati, A. Bakhrouf, Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in *Staphylococcus aureus* associated to dental caries, *Microb Pathog* 49 (2010) 14-22.
- [43] K. Matsushima, E. Ohbayashi, H. Takeuchi, S. Hosoya, Y. Abiko, M. Yamazaki, Stimulation of interleukin-6 production in human dental pulp cells by peptidoglycans from *Lactobacillus casei*, *J Endod* 24 (1998) 252-255.
- [44] B.C. Chen, H.M. Chang, M.J. Hsu, C.M. Shih, Y.H. Chiu, W.T. Chiu, C.H. Lin, Peptidoglycan induces cyclooxygenase-2 expression in macrophages by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway, *J Biol Chem* 284 (2009) 20562-20573.
- [45] B.C. Chen, C.C. Liao, M.J. Hsu, Y.T. Liao, C.C. Lin, J.R. Sheu, C.H. Lin, Peptidoglycan-induced IL-6 production in RAW 264.7 macrophages is mediated by cyclooxygenase-2, PGE2/PGE4 receptors, protein kinase A, I kappa B kinase, and NF-kappa B, *J Immunol* 177 (2006) 681-693.
- [46] B.C. Chen, Y.S. Chang, J.C. Kang, M.J. Hsu, J.R. Sheu, T.L. Chen, C.M. Teng, C.H. Lin, Peptidoglycan induces nuclear factor-kappaB activation and cyclooxygenase-2 expression via Ras, Raf-1, and ERK in RAW 264.7 macrophages, *J Biol Chem* 279 (2004) 20889-20897.
- [47] M. Kawashima, N. Ogura, M. Akutsu, K. Ito, T. Kondoh, The anti-inflammatory effect of cyclooxygenase inhibitors in fibroblast-like synoviocytes from the human temporomandibular joint results from the suppression of PGE2 production, *J Oral Pathol Med* 42 (2013) 499-506.
- [48] R. Bovolenta, S. Zucchini, B. Paradiso, D. Rodi, F. Merigo, G. Navarro Mora, F. Osculati, E. Berto, P. Marconi, A. Marzola, P.F. Fabene, M. Simonato, Hippocampal FGF-2 and BDNF overexpression attenuates epileptogenesis-associated neuroinflammation and reduces spontaneous recurrent seizures, *J Neuroinflammation* 7 (2010) 81.
- [49] L. Benedich Kahn, L.E. Gustafsson, C. Olgart Höglund, Brain-derived neurotrophic factor enhances histamine-induced airway responses and changes levels of exhaled nitric oxide in guinea pigs in vivo, *Eur J Pharmacol* 595 (2008) 78-83.

- [50] F. Rezaee, S.L. Rellick, G. Piedimonte, S.M. Akers, H.A. O'Leary, K. Martin, M.D. Craig, L.F. Gibson, Neurotrophins regulate bone marrow stromal cell IL-6 expression through the MAPK pathway, *PLoS One* 5 (2010) e9690.
- [51] D.A. Groneberg, T.C. Fischer, N. Peckenschneider, O. Noga, Q.T. Dinh, T. Welte, P. Welker, Cell type-specific regulation of brain-derived neurotrophic factor in states of allergic inflammation, *Clin Exp Allergy* 37 (2007) 1386-1391.
- [52] N. Vakili Zahir, M. Abkhezr, Z. Khaje Piri, S.N. Ostad, A. Kebriaezade, M.H. Ghahremani, The Time Course of JNK and P38 Activation in Cerebellar Granule Neurons Following Glucose Deprivation and BDNF Treatment, *Iran J Pharm Res* 11 (2012) 315-323.
- [53] L. de Araujo-Martins, R.M. de Oliveira, G.V. dos Santos, R.C. dos Santos, A.A. dos Santos, E. Giestal de Araujo, Treatment in vitro of retinal cells with IL-4 increases the survival of retinal ganglion cells: the involvement of BDNF, *Neurochem Res* 38 (2013) 162-173.
- [54] O. Noga, M. Peiser, M. Altenahr, H. Knieling, R. Wanner, G. Hanf, R. Grosse, N. Suttorp, Differential activation of dendritic cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor, *Clin Exp Allergy* 37 (2007) 1701-1708.
- [55] J. Kim, J. Shim, S. Lee, S.S. Lim, K.W. Lee, H.J. Lee, Licorice-derived dehydroglyasperin C increases MKP-1 expression and suppresses inflammation-mediated neurodegeneration, *Neurochem Int* 63 (2013) 732-740.
- [56] K. Wisithphrom, L.J. Windsor, The effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6, and transforming growth factor-beta1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation, *J Endod* 32 (2006) 853-861.
- [57] A. Jain, R. Bahuguna, Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: An overview, *J Oral Biol Craniofac Res* 5 (2015) 212-218.
- [58] W.J. Bae, K.S. Min, J.J. Kim, H.W. Kim, E.C. Kim, Odontogenic responses of human dental pulp cells to collagen/nanobioactive glass nanocomposites, *Dent Mater* 28 (2012) 1271-1279.
- [59] B. Evrosimovska, C. Dimova, I. Kovacevska, S. Panov, Concentration of collagenases (MMP-1, -8, -13) in patients with chronically inflamed dental pulp tissue, *Prilozi* 33 (2012) 191-204.
- [60] C.H. Woo, J.H. Lim, J.H. Kim, Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells, *J Immunol* 173 (2004) 6973-6980.
- [61] A. Beklen, M. Ainola, M. Hukkanen, C. Gurgan, T. Sorsa, Y.T. Konttinen, MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis, *J Dent Res* 86 (2007) 347-351.

- [62] V.J. Uitto, K. Airola, M. Vaalamo, N. Johansson, E.E. Putnins, J.D. Firth, J. Salonen, C. Lopez-Otin, U. Saarialho-Kere, V.M. Kahari, Collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression is induced in oral mucosal epithelium during chronic inflammation, *Am J Pathol* 152 (1998) 1489-1499.
- [63] J.E. Wang, S. Pettersen, J.F. Stuestol, Y.Y. Wang, S.J. Foster, C. Thiemermann, A.O. Aasen, K. Bjornland, Peptidoglycan of *S. aureus* causes increased levels of matrix metalloproteinases in the rat, *Shock* 22 (2004) 376-379.
- [64] P. Gaibani, F. Caroli, C. Nucci, V. Sambri, Major surface protein complex of *Treponema denticola* induces the production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6 and matrix metalloproteinase 9 by primary human peripheral blood monocytes, *J Periodontal Res* 45 (2010) 361-366.
- [65] K. Stuart, J. Paderi, P.W. Snyder, L. Freeman, A. Panitch, Collagen-binding peptidoglycans inhibit MMP mediated collagen degradation and reduce dermal scarring, *PLoS One* 6 (2011) e22139.
- [66] C.Y. Lin, S.L. Chang, Y.C. Fong, C.J. Hsu, C.H. Tang, Apoptosis signal-regulating kinase 1 is involved in brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-enhanced cell motility and matrix metalloproteinase 1 expression in human chondrosarcoma cells, *Int J Mol Sci* 14 (2013) 15459-15478.
- [67] J.J. Hwang, M.H. Park, S.Y. Choi, J.Y. Koh, Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases, *J Biol Chem* 280 (2005) 11995-12001.
- [68] M. Feng, Y. Shu, Y. Yang, X. Zheng, R. Li, Y. Wang, Y. Dai, W. Qiu, Z. Lu, X. Hu, Ulinastatin attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis by enhancing anti-inflammatory responses, *Neurochem Int* 64 (2014) 64-72.
- [69] I.Y. Hwang, E.S. Sun, J.H. An, H. Im, S.H. Lee, J.Y. Lee, P.L. Han, J.Y. Koh, Y.H. Kim, Zinc-triggered induction of tissue plasminogen activator by brain-derived neurotrophic factor and metalloproteinases, *J Neurochem* 118 (2011) 855-863.
- [70] L. Tapia-Arancibia, E. Aliaga, M. Silhol, S. Arancibia, New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease, *Brain Res Rev* 59 (2008) 201-220.
- [71] J. Neradil, R. Veselska, Nestin as a marker of cancer stem cells, *Cancer Sci* 106 (2015) 803-811.
- [72] D. Trivanovic, A. Jaukovic, B. Popovic, J. Krstic, S. Mojsilovic, I. Okic-Djordjevic, T. Kukolj, H. Obradovic, J.F. Santibanez, D. Bugarski, Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression, *Life Sci* 141 (2015) 61-73.
- [73] T. Miyazaki, T.T. Baba, M. Mori, T. Moriishi, T. Komori, Microtubule-associated protein tau (Mapt) is expressed in terminally differentiated odontoblasts and severely

- down-regulated in morphologically disturbed odontoblasts of Runx2 transgenic mice, *Cell Tissue Res* 361 (2015) 457-466.
- [74] Z. Chen, W. Li, H. Wang, C. Wan, D. Luo, S. Deng, H. Chen, S. Chen, Klf10 regulates odontoblast differentiation and mineralization via promoting expression of dentin matrix protein 1 and dentin sialophosphoprotein genes, *Cell Tissue Res* (2015).
- [75] E. Takei, Y. Shigetani, K. Yoshiba, G. Hinata, N. Yoshiba, T. Okiji, Initial transient accumulation of M2 macrophage-associated molecule-expressing cells after pulpotomy with mineral trioxide aggregate in rat molars, *J Endod* 40 (2014) 1983-1988.
- [76] M. Kuratate, K. Yoshiba, Y. Shigetani, N. Yoshiba, H. Ohshima, T. Okiji, Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate, *J Endod* 34 (2008) 970-974.
- [77] N. Yoshiba, K. Yoshiba, N. Ohkura, Y. Shigetani, E. Takei, A. Hosoya, H. Nakamura, T. Okiji, Immunohistochemical analysis of two stem cell markers of alpha-smooth muscle actin and STRO-1 during wound healing of human dental pulp, *Histochem Cell Biol* 138 (2012) 583-592.