

# 論文内容要旨

脳由来神経栄養因子 (BDNF) のヒト歯髄に対する  
細胞機能制御能の検討

主指導教員：栗原 英見 教授

(応用生命科学部門歯周病態学)

副指導教員：柴 秀樹 教授

(統合健康科学部門歯髄生物学)

副指導教員：加藤 功一 教授

(応用生命科学部門生体材料学)

徳永 尚子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 論文内容要旨

論文題目 脳由来神経栄養因子 (BDNF) のヒト歯髄に対する細胞機能  
制御能の検討

学位申請者 徳永 尚子

### 【背景および目的】

歯の機能を長期的に維持するうえで、歯髄の保存は非常に重要である。現在、深在性齲蝕の除去時や窩洞形成中に露髄した場合、MTA セメントや水酸化カルシウム製材を直接覆髄材として用いて、歯髄を保存する。これらの治療法は、歯髄の感染がないこと、露髄面が小さいことなどの適用制限がある。今後、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。

ニューロトロフィンの一つである脳由来神経栄養因子(以下 BDNF)は、神経系において神経細胞の分化、成熟、生存・維持に関与している。また、BDNF は骨、軟骨、腎臓などの非神経系組織にも発現しており、骨芽細胞、歯周靭帯細胞、免疫細胞、そして血管内皮細胞等の細胞で発現している。これまでに、BDNF が歯周靭帯細胞、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で、歯周組織再生を促進することを *in vitro*、*in vivo* の研究で明らかにされている。

本研究は、BDNF の新規直接覆髄材としての臨床応用を目的として、BDNF の歯髄細胞に及ぼす影響を検討することとした。

### 【材料および方法】

- 1 供試細胞：ヒト歯髄細胞 (HP cells) を Lonza から購入し、10%牛胎児血清を添加した DMEM (培地 A) で培養した。3~4 代継代した HP cells を以下の実験に供した。
2. BDNF のレセプター：高親和性レセプターである TrkB、低親和性レセプターである p75 の発現を Western blot 法によって調べた。
3. Peptidoglycan (PGN) のレセプター：Toll-like receptor (TLR) 2 の発現を、Western blot 法によって調べた。
4. 炎症性サイトカイン発現：培地 A で 11 日間培養した HP cells を DMEM で 2 回洗浄した後、無血清下で 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。HP cells から総 RNA を回収、精製した。また細胞培養上清を回収した。Interleukin (IL) -6、-8 の発現を Real-time PCR 法、ELISA 法によって解析した。そのシグナル伝達を PD98059 (ERK1/2 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤)、SB203580 (p38 阻害剤) 及び PDTC (NF-κB 阻害剤) を用いて調べた。
5. 抗炎症性サイトカイン発現：培地 A で 11 日間培養した HP cells を DMEM で 2 回洗浄した後、無血清下で BDNF (50 ng/ml) を 0、3、6、12、24 時間作用させ、IL-4、-10 の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって調べた。さらにそのシグナル伝達を PD98059 (ERK1/2 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤)、Ro-318220 (PKC 阻害剤) を用いて調べた。
6. コラーゲン代謝関連蛋白質発現：培地 A で 11 日間培養した HP cells を DMEM で

2回洗浄した後、BDNF (50 ng/ml) を 0、3、6、12、24 時間無血清下で作用させ、I 型コラーゲン、Matrix metalloproteinase (MMP) -1 の発現を Real-time PCR 法、および ELISA 法によって調べた。

7. 骨・象牙質関連蛋白質発現: 培地 A に Ascorbic acid (50 µg/ml)、β-glycerophosphate (10 mM)、Dexamethasone (0.1 µM) を加えた培地で HP cells を 11 日間培養後、DMEM で 2 回洗浄した後、BDNF (50 ng/ml) を 0、3、6、12、24 時間無血清下で作用させた。HP cells から総 RNA を回収、精製後、Dentin Matrix Protein (DMP) -1、Osteopontin (OPN)、Osteocalcin (OC)、Bone morphogenetic protein (BMP-2)、Alkaline phosphatase (ALP) の mRNA 発現を Real-time PCR 法によって調べた。

#### 【結果】

1. HP cells は TrkB、p75、TLR2 を発現していた。
2. PGN は HP cells の IL-6、-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、IL-8 の mRNA 発現およびタンパク質発現を抑制した。そのメカニズムとして、BDNF が PGN による p38 のリン酸化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、象牙質関連蛋白質である DMP-1、OPN、OC、BMP-2、ALP の mRNA 発現を促進した。

#### 【結論】

ヒト歯髄細胞は BDNF レセプター (TrkB、p75) を有していたことから、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。本研究から BDNF は歯髄細胞において炎症制御、コラーゲン代謝、象牙質関連蛋白質発現に関与し、新規歯髄覆髓材として有用である可能性が示唆された。