

学 位 論 文

歯肉上皮細胞と歯周靱帯細胞の増殖に
及ぼす脳由来神経栄養因子の相反作用

学位申請者 柏井 桂

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

創生医科学専攻

(主任指導教員：栗原 英見教授)

2014 年度

目 次

第一章	緒 論	8
-----	-----	---

第二章	BDNF による歯肉上皮細胞と歯周靭帯細胞の細胞増殖と アポトーシスに及ぼす影響	
-----	---------------------------------------------	--

第一節	概 要	10
-----	-----	----

第二節	材料と方法	10
-----	-------	----

1. 供試細胞

2. 培養法

3. 細胞増殖能の評価

4. アポトーシス細胞の評価

1) TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling)染色

2) Western blotting 法

5. 統計解析

第三節	結 果	12
-----	-----	----

1. 細胞増殖の検討

2. アポトーシス細胞の検討

第四節	考 察	16
-----	-----	----

第三章	BDNF の受容体の発現と	
-----	---------------	--

BDNF が ERK と JNK のリン酸化に及ぼす影響

第一節	概 要	17
第二節	材料と方法	17
	1. TrkB、p75 の発現	
	2. BDNF が ERK、JNK のリン酸化に及ぼす影響	
第三節	結 果	18
	1. TrkB、p75 の発現の確認	
	2. BDNF が ERK、JNK のリン酸化に及ぼす影響	
第四節	考 察	19

第四章 アポトーシスに関わるシグナル伝達経路の検討

第一節	概 要	20
第二節	材料と方法	20
	1. 歯肉上皮細胞	
	1) RNAi による TrkB、p75 の発現抑制が及ぼす影響	
	2) JNK 阻害剤、ERK 阻害剤による影響	
	2. 歯周靭帯細胞への p75 の強制発現ベクター導入が及ぼす影響	
第三節	結 果	21
	1. BDNF が誘導する歯肉上皮細胞のアポトーシスに及ぼす影響	
	1) TrkB、p75 受容体発現抑制による影響	
	2) JNK、ERK 阻害剤の前処理による影響	
	2. 歯周靭帯細胞への p75 強制発現ベクター導入による影響	

第四節	考 察	29
第五章 細胞増殖に関わるシグナル伝達経路の検討		
第一節	概 要	30
第二節	材料と方法	30
1.	歯周靭帯細胞の増殖	
1)	TrkB の発現抑制、また ERK 阻害剤による影響	
2)	p75 の強制発現による影響	
2.	歯肉上皮細胞の増殖	
1)	TrkB、p75 の発現抑制による影響	
2)	JNK 阻害剤、ERK 阻害剤による影響	
第三節	結 果	31
1.	歯周靭帯細胞の細胞増殖に与える影響	
2.	歯肉上皮細胞の細胞増殖に与える影響	
第四節	考 察	37
第六章 総 括		
第六節	総 括	40
参考文献		41

第一章 緒論

歯周炎は、細菌感染に対する宿主の免疫応答の結果生じる組織破壊性疾患である。失われた組織を取り戻す歯周組織再生療法は咀嚼機能・審美性を回復させる理想的な歯周治療である。

歯周組織再生療法として、現在応用されているものは、Guided Tissue Regeneration(GTR)法(1~5)、あるいはエナメルタンパクを根面に塗布するエムドゲイン(6)が挙げられる。GTR法あるいはエムドゲインは臨床的に有効であるとされているが、GTR法は歯周靭帯細胞の遊走・増殖を受動的に待つ方法であるので、広範囲な骨欠損には応用できない。またGTRの術式は煩雑であり、熟練の歯周病専門医でなければ、正確な施術は困難である。一方、エムドゲインは、ブタ由来のエナメルタンパクが主成分とされる種々の因子を含んだ抽出物のヒトへの応用であり、未知な微生物等の感染や免疫学的な観点から現代の医療材料としては安全性に疑問が残る。また、エムドゲインは多種多様なタンパクを含有していると考えられ、作用メカニズムにおける科学的根拠が乏しいまま臨床応用されている。したがって、多様な歯周組織病変に対応するために、細胞機能を積極的に制御し、術式が簡単で、安全性が高く、効率的な新たな再生療法の開発が望まれている。

近年、歯周組織再生治療の分野では、幹細胞を用いた歯周組織再生療法やサイトカイン療法の開発がさかんに進められている。サイトカイン療法は内在性の細胞の機能制御を行うことによって歯周組織再生を促す方法で、GTR法と比較し、術式が容易でプロトコール主導の治療法である。ヒト型リコンビナントタンパク質を使用することによって、再生のメカニズムも明らかとなり、高い安全性を確保でき、大量生産も可能である。

脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)は、神経栄養因子関連タンパク質の一つで、その受容体として TrkB(7~10)と p75(11~16)がある。BDNFはこの二つの受容体を介して、中枢および末梢の神経細胞の増殖や細胞死、分化等の機能制御に関わっている。一方、BDNFは骨、軟骨、歯胚などの非神経系の組織にも発現しており、細胞レベルにおいても、骨芽細胞、歯周靭帯細胞、免疫細胞、血管内皮細胞においても確認されている(17~27)。また、BDNFは、骨折の治癒過程に発現し、その過程で骨の再生に関与していることや(18)、歯胚の発生時期に歯小嚢に強く発現し、歯周組織の発生過程において重要な役割を担っていると考えられている(22)。*in vitro*ではBDNFが歯周靭帯細胞の増殖や骨関連タンパク質の遺伝子の発現を促進することや、セメント芽細胞の骨関連タンパク質の発現を促進すること、さらに、血管内皮細胞の vascular endothelial growth factor (VEGF)の遺伝子の発現を促進し、細胞遊走

を促進する(28、29)。さらに、*in vivo* では、BDNF がビーグル犬のⅢ級根分岐部病変の歯槽骨、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(20、21)。これらのことから BDNF の局所投与は歯周組織再生のサイトカイン療法として有用であると考えられる。しかしながら BDNF を歯周組織再生に臨床応用するためには、BDNF の歯周組織再生メカニズムをより詳細に解明しておく必要がある。

これまでの研究結果において、BDNF を用いた歯周組織再生動物実験モデルの組織再生過程に、歯肉上皮の侵入や、深部増殖は観察されなかった(20)。歯肉上皮の侵入は長い上皮性付着を形成し間葉系の組織の再生を阻害するだけでなく、機械的な強度と安定性を欠いた治癒形態に陥ってしまう(30、31)。この歯肉上皮の侵入は、歯肉上皮細胞の遊走、増殖、細胞死が関与していると考えられるが、BDNF は歯肉上皮細胞の遊走には影響を及ぼさないことが明らかとなっている(結果非表示)。BDNF は受容体である p75 を介し、アポトーシスを誘導することや、細胞周期を停止し細胞増殖の休止を促すことが知られている(32、33)。また、p75 受容体が介する細胞死に関わるシグナル伝達経路として、c-Jun N-terminal kinase (JNK)が知られている(34、35)。さらに、BDNF による細胞増殖促進のシグナル伝達経路としては、TrkB を介した Extracellular signal-regulated kinase(ERK)が知られている(36、37)。

BDNF を安全で確実性の高い歯周組織再生療法として確立するために、BDNF による歯肉上皮の侵入抑制のメカニズムを解明する必要がある。そこで、本研究では、BDNF の歯肉上皮細胞の細胞増殖・アポトーシスに及ぼす影響を、歯周靭帯細胞と比較しながら検討することとした。

第二章 BDNF による歯肉上皮細胞と歯周靭帯細胞の細胞増殖とアポトーシスに及ぼす影響

第一節 概要

歯肉上皮の侵入を制御するメカニズムを理解する上で、BDNF が細胞増殖に与える影響、またそれに相反するアポトーシスによる細胞死に与える影響を解明することは重要である。そこで、BDNF による細胞増殖に及ぼす影響については BrdU incorporation による DNA 合成能を、アポトーシスに及ぼす影響については TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色法によるアポトーシス細胞の検出と、Western blotting 法による caspase3 の活性化を検討した。

第二節 材料と方法

1. 供試細胞

歯肉上皮細胞は、大阪大学村上伸也教授から供与して頂いた不死化ヒト歯肉上皮細胞(OBA9)を、歯周靭帯細胞は、広島大学高田隆教授から供与して頂いた不死化ヒト歯周靭帯細胞(HPL cells)を用いた。

2. 培養法

OBA9 の培養には insulin (10 µg/ml)、hEGF (0.1 ng/ml)、Hydrocortisone Hemisuccinale (0.67 µg/ml)、Gentamycin (50 µg/ml)、amphotericin B (50 ng/ml)、BPE (0.4%)を添加した Humedia-KG2 (KURABO, Osaka, Japan) を用いた。HPL cells の培養には penicillin G/streptomycin (1%)、amphotericin B (50 ng/ml)、FBS (10%)を添加した DMEM (SIGMA, St. Louis, Missouri)を用いた。

3. 細胞増殖能の評価

HPL cells と OBA9 を Type I コラーゲンでコーティングしてある 96 穴プレートに 5.0×10^4 /ml となるように播種し、サブコンフルエントになるまで培養した後、PBS (phosphate buffered saline)で2回洗浄し、BDNF (0, 10, 25, 50, 100, 200 ng/ml)(R&D Systems, Minneapolis, MN)を、BPE を除いた KG2 培地もしくは FBS を除いた DMEM 培地に添加し、21 時間培養後、BrdU (10 µM) (Roche, Basel, Switzerland ; Cell proliferation ELISA, BrdU)を添加し更に3時間培養した。培養終了後、細胞の固定と DNA の変性を行い、抗 BrdU 抗体を加え、発色基質液を作用させ、370 nm の波長の吸光度を測定することで、DNA 合成量を定量化した。

4. アポトーシス細胞の評価

1) TUNEL 染色

HPL cells と OBA9 を Type I コラーゲンでコーティングしたガラスベースディッシュに 5.0×10^4 /ml となるように播種し、コンフルエントになるまで培養した後、PBS で二回洗浄し、BDNF (0, 100, 200 ng/ml)を、BPE を除いた KG2 培地もしくは FBS を除いた DMEM 培地に添加し、24 時間培養した。培養終了後、4%パラホルムアルデヒドを用いて 4°C で 25 分細胞を固定し、TUNEL 染色 (Promega、DeadEnd Fluorometric TUNEL System)した。核は Anti-Fade Dapi Fluoromount-G (Southern Biotech)で染色した。DNA の断片化を起こした細胞をアポトーシス細胞として蛍光顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan)下で、任意の 4 視野について全細胞数と TUNEL 染色陽性細胞数を計測した。

2) Western blotting 法

Western blotting 法によって、アポトーシス伝達因子である caspase3 の活性化を解析した。HPL cells と OBA9 を 5.0×10^4 /ml になるように 6 穴プレートに播種し、サブコンフルエントになるまで培養した後、BDNF 100 ng/ml を添加し、0, 15, 24, 48 時間後に細胞を PBS で 2 回洗浄した。その後、RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay)buffer (Pierce, Waltham, Massachusetts)を添加して細胞溶解液をサンプルとして回収し、さらにホモジナイザーで細胞を粉砕した後(28khz,5 秒)、2-メルカプトエタノールと LDS sample buffer (Invitrogen, Buffalo, NY)を加え、95°C で 4 分間加熱処理を行った。その後、15% polyacrylamide gel を用いて電気泳動を行い、ゲルに展開したタンパク質をニトロセルロースメンブレン(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)に転写した。転写後ニトロセルロースメンブレンを 5%スキムミルク含有 Tris-buffered saline (TBS)-Tween (TBS-t)で常温、1 時間ブロッキングした。次に can get signal solution1 (TOYOBO, Osaka, Japan)で希釈した rabbit anti-human cleaved-caspase3 antibody (1:500, Cell signaling, Beverly, MA)、mouse anti-human β -actin antibody (1:10000, SIGMA)を一昼夜反応させた。その後メンブレンを TBS-t で洗浄し、horse-radish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody)含有 can get signal solution2 (TOYOBO)を加え常温で 1 時間反応させた。反応後、メンブレンを TBS-t で洗浄し、ECL (Bio-Rad Laboratories)を用いて化学発光させ、フィルムを感光させた。

5. 統計解析

Student の t 検定を用いて対照群との比較検定を行った。

第三節 結果

1. 細胞増殖の検討

BrdU の取り込みにおいて、HPL cells は BDNF (10, 25, 50, 100 ng/ml) 投与群で統計学的に有意に細胞増殖が促進したが、OBA9 は BDNF を作用させても細胞増殖に影響を与えなかった(図 1)。

2. アポトーシス細胞の検討

TUNEL 染色では、HPL cells に BDNF を作用させても TUNEL 染色陽性のアポトーシス細胞はほぼ観察されなかったが、OBA9 は BDNF 投与群でアポトーシス細胞が数多く観察され、TUNEL 染色陽性細胞数の割合は統計学的に有意に増加した(図 2)。また、HPL cells の caspase3 の活性化は BDNF を作用させても影響がなかったが、OBA9 の caspase3 の活性化は BDNF を 15 時間作用させた時に最大になった(図 3)。

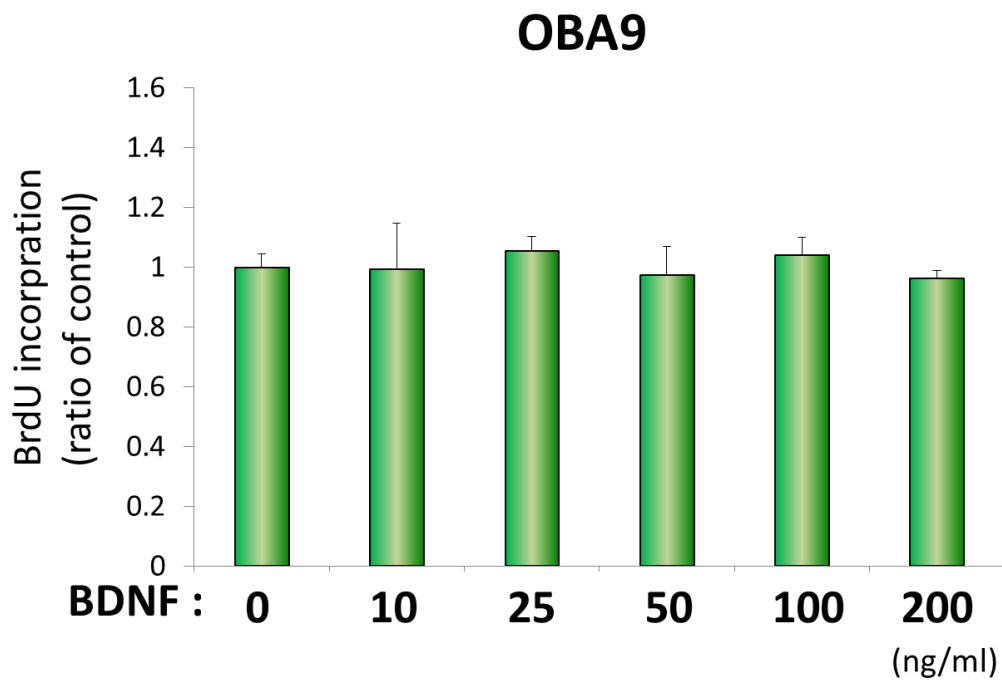
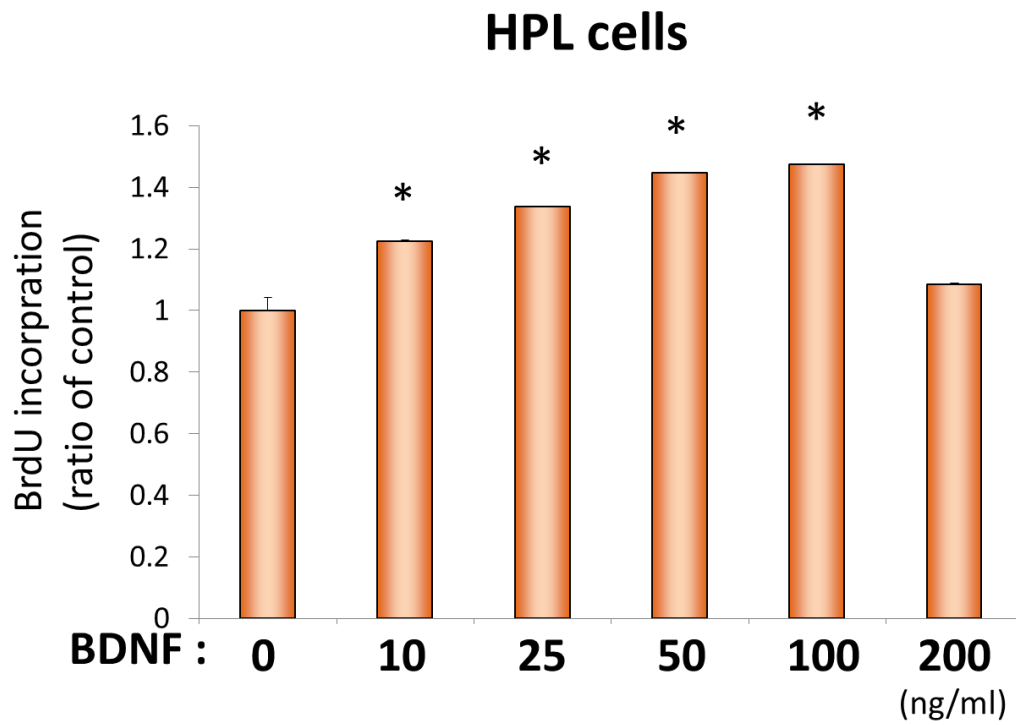


図 1. BDNF が HPL cells と OBA9 の細胞増殖に及ぼす影響 (BrdU assay)
 それぞれの細胞をサブコンフルエントまで培養した後、BDNF (0, 10, 25, 50, 100, 200 ng/ml)を作用させ、21 時間後に BrdU を添加し、さらに 3 時間培養した後に、DNA 合成を行った細胞の吸光度を測定した。*: $p < 0.05$ (vs control)

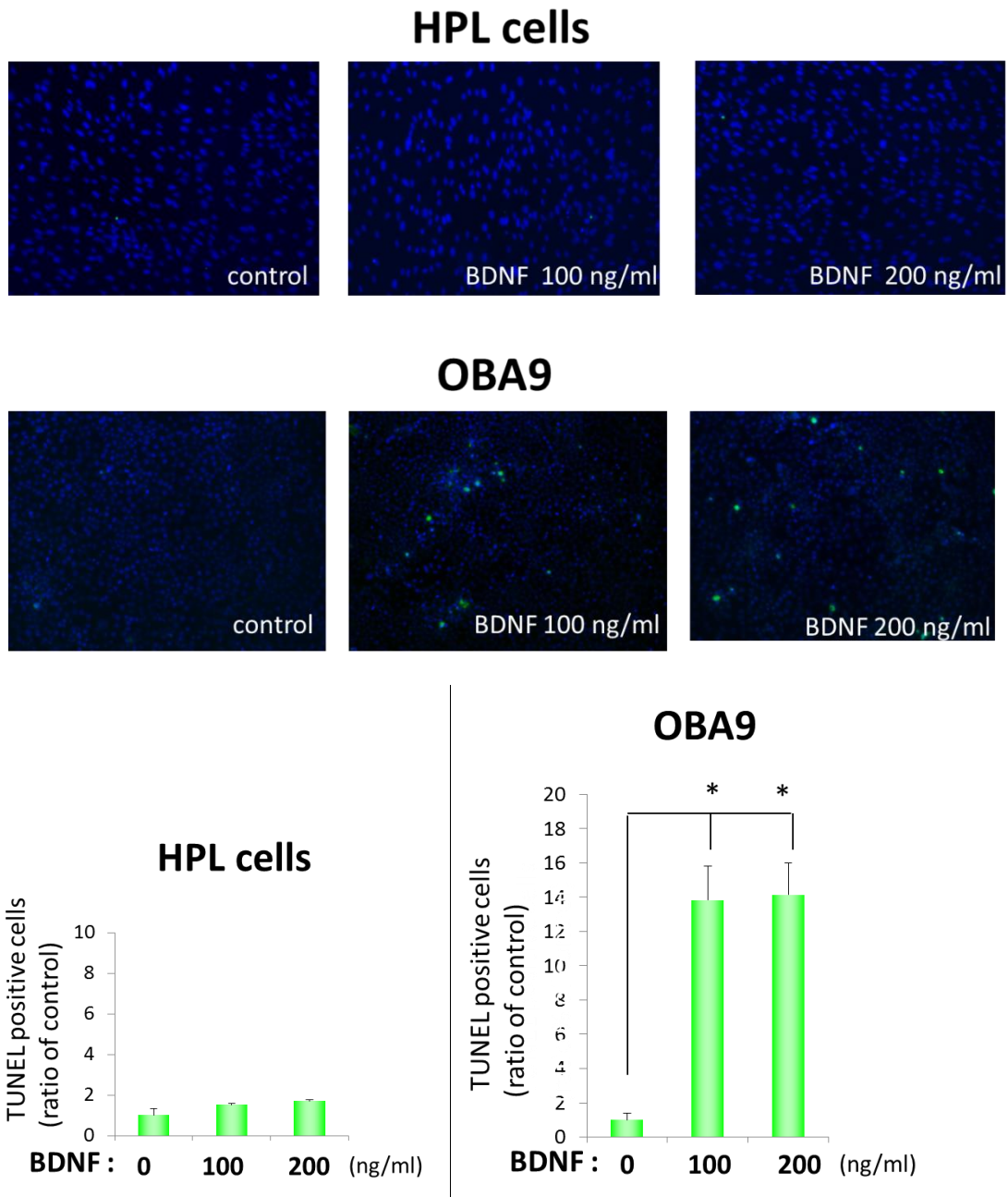


図 2. BDNF が HPL cells と OBA9 のアポトーシスに及ぼす影響 (TUNEL 染色)
 Type 1 コラーゲンでコーティングしたガラスベースディッシュにてそれぞれの細胞をコンフルエントになるまで培養、BDNF (0, 100, 200 ng/ml)を添加し 24 時間培養した後、細胞を固定、TUNEL 染色し、青色の核の有核細胞と緑色の切断された DNA の断片を有する細胞を蛍光顕微鏡で観察し、細胞数の計測を行った。*: $p < 0.01$

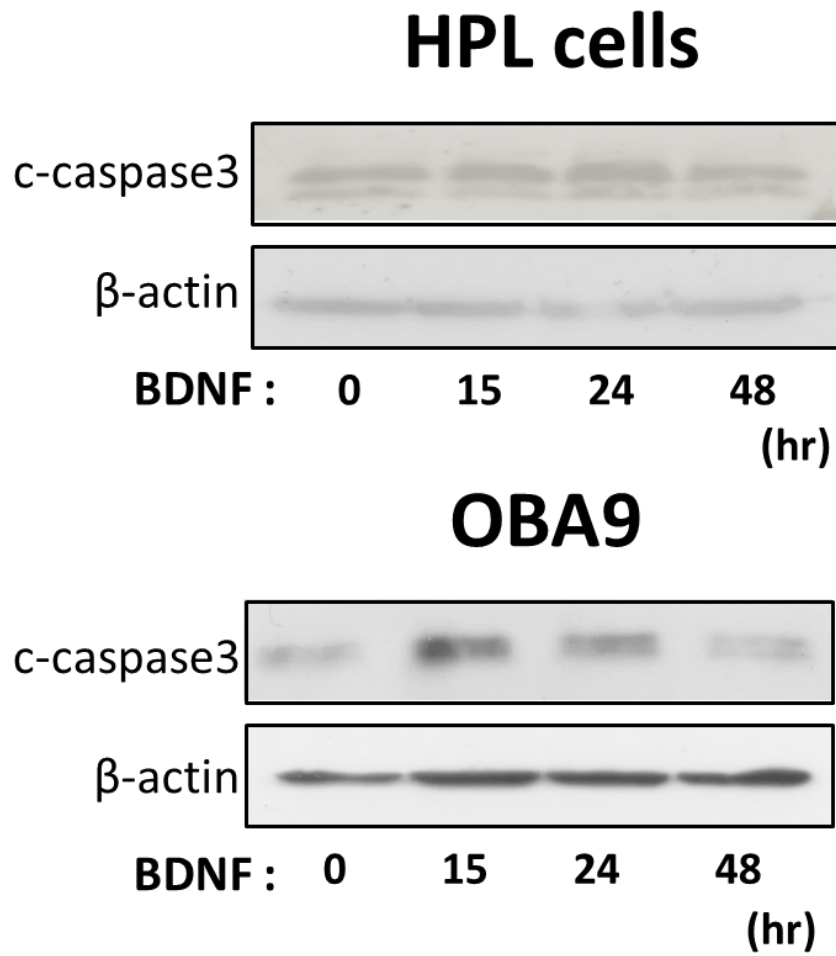


図 3. BDNF が caspase3 の活性化に及ぼす影響

BDNF (100 ng/ml)の添加 0、15、24、48 時間後に細胞溶解液を回収し、Western blotting 法によって caspase3 の活性化に及ぼす BDNF の影響を検討した。

第四節 考 察

BDNF が歯周靱帯細胞の細胞増殖とアポトーシスに与える影響を評価したところ、アポトーシスには影響を与えない一方で、BDNF 100 ng/ml の濃度を最大にして細胞増殖を促進した。歯周靱帯細胞は歯周組織再生を担う主たる細胞であり、歯周靱帯細胞の増殖は歯周組織再生において重要な役割を果たしている(38~40)。BDNF は歯周靱帯細胞を増殖させることによって、歯周組織の再生を促進することが示唆された。

一方、BDNF は歯肉上皮細胞の細胞増殖には影響を与えず、BDNF 100, 200 ng/ml の濃度においてアポトーシスを促進した。BDNF は、その受容体である p75 を介して、種々の細胞でアポトーシスを誘導することや細胞増殖を休止させることが知られている(32, 33)。歯肉上皮細胞の歯根面に沿った下方増殖は歯周組織再生時の新付着の形成を妨げることから、本実験で得られた結果は歯周組織再生過程において重要である。

歯周組織再生を阻害する歯肉上皮の侵入は、歯肉上皮細胞の増殖が歯周靱帯細胞等の間葉系の組織の細胞の増殖を上回ることが一因と考えられるが、本実験の結果は、BDNF が歯肉上皮の侵入を制御する機構の解明の一助となり得ると考えられる。

本実験の結果から、BDNF の歯周靱帯細胞、歯肉上皮細胞に与えるいずれの作用も歯周組織再生に有利に働き、BDNF による歯周組織再生メカニズムの一部が明らかになった。

第三章 BDNF の受容体の発現と BDNF が ERK と JNK のリン酸化に及ぼす影響

第一節 概要

第二章で BDNF が歯周靭帯細胞の細胞増殖を促進し、歯肉上皮細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。そのメカニズムを解明するため、細胞増殖、細胞死の過程におけるシグナル経路の解析は重要である。これまでの研究から、BDNF の受容体である TrkB は ERK のリン酸化を介し細胞増殖に関与すること(36、37)、一方の受容体である p75 は JNK のリン酸化を介し細胞死を司ることが知られている(34、35)。そこで、BDNF の受容体である TrkB と p75 の発現と、その下流のシグナル経路として ERK、JNK のリン酸化を検討した。

第二節 材料および方法

1. TrkB および p75 の発現

TrkB と p75 の発現は、HPL cells、OBA9 をコンフルエントになるまで培養し、細胞溶解液を回収し、Western blotting 法で解析した(第二章、第二節参照)。一次抗体として rabbit anti-TrkB antibody (1:1000, Millipore, Darmstadt, Germany)と rabbit anti-NGF Receptor(p75)antibody (1:1000, EPITOMICS, Burlingame, CA)、及び mouse anti-human β -actin antibody(SIGMA, 1:10000)を用いた。

2. BDNF が ERK および JNK のリン酸化に及ぼす影響

6 穴プレートに HPL cells、OBA9 を 5.0×10^4 /ml の細胞密度で播種し、サブコンフルエントになるまで培養した後、PBS で 2 回洗浄した後に、BDNF (0, 10, 25, 50, 100, 200 ng/ml)を 30 分間作用させた。細胞溶解液を回収した後、Western blotting 法で解析した(第二章、第二節参照)。一次抗体として、rabbit anti-human phospho-p44/42 MAPK antibody (Cell signaling, 1:1000)と rabbit anti-human p44/42 MAPK antibody (Cell signaling, 1:1000)、rabbit anti-human phospho-SAPK/JNK antibody (Cell signaling, 1:500)、rabbit anti-human SAPK/JNK antibody (Cell signaling, 1:1000)を用いた。

第三節 結果

1. TrkB および p75 の発現

HPL cells、OBA9 ともに TrkB を発現していることが確認できた(図 4)。しかし、p75 の発現に関しては、OBA9 に比べて HPL cells ではその発現が極めて少なく、Western blotting の長時間感光によってわずかに検出できる程度であった。

2. BDNF が ERK および JNK のリン酸化に及ぼす影響

BDNF は HPL cells の ERK のリン酸化を濃度依存的に促進したが、JNK のリン酸化を促進しなかった。一方の OBA9 では BDNF の作用によって微弱ながら ERK のリン酸化を促進したのに対し、JNK のリン酸化を明らかに促進した(図 5)。

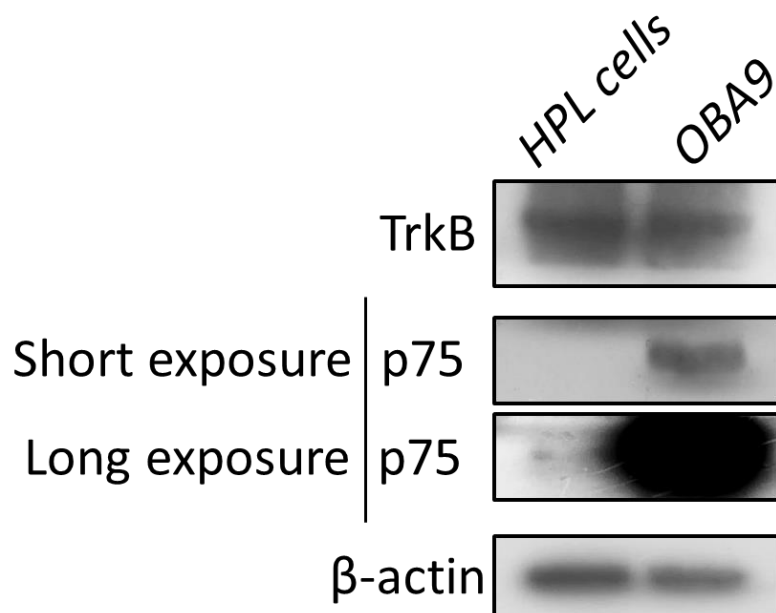


図 4. BDNF の受容体である TrkB と p75 の発現の検討

それぞれの細胞をコンフルエントになるまで培養した後に、Western blotting 法にて TrkB と p75 の発現を検討した。

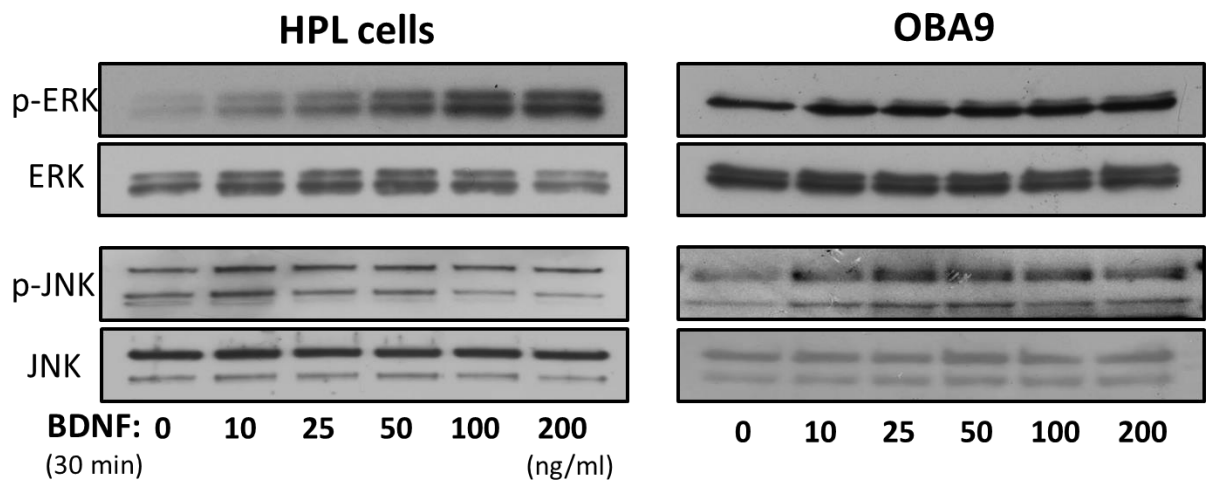


図 5. BDNF が ERK と JNK のリン酸化に及ぼす影響

BDNF (0, 10, 25, 50, 100, 200)ng/ml 刺激 30 分後に細胞を回収し、HPL cells と OBA9 において、ERK と JNK のリン酸化を検討した。リン酸化の評価は Western blotting 法によって行った。

第四節 考察

歯周靭帯細胞と歯肉上皮細胞ともに **TrkB** を発現していることを確認した。また、**p75** の発現が著しく低かった歯周靭帯細胞では、**BDNF** の作用によって **ERK** のリン酸化が促進することが明らかとなった。神経系の細胞の生存に **TrkB** を介した **ERK** シグナルが関与していることが知られている(36, 37)ことから、**BDNF** の投与によって細胞増殖の促進がみられた歯周靭帯細胞では、**TrkB** が優位に働き、**ERK** カスケードが活性化していることが示唆された。

BDNF の作用は歯肉上皮細胞の **JNK** のリン酸化を促進した。神経系のみならず種々の細胞において、**p75** が下流のシグナル伝達経路として **JNK** のリン酸化と関連していることが報告されている(34, 35)。歯肉上皮細胞においても、**BDNF** の作用が **p75** 受容体を介し、**JNK** カスケードを活性化していると推察される。

以上のことから、歯周靭帯細胞と歯肉上皮細胞における **BDNF** の受容体の発現量の差が、下流のシグナル伝達経路の活性化の違いとなり、その結果、細胞増殖とアポトーシスというそれぞれの細胞の機能発現の違いとして表れていることが示唆された。

第四章 アポトーシスに関わるシグナル伝達経路の検討

第一節 概要

BDNF の作用による細胞のアポトーシスには、p75 受容体、JNK のリン酸化、及び caspase3 の活性が関与していると考えられる。本章では、BDNF によるアポトーシスにおけるこれらの刺激伝達経路について検討した。

第二節 材料と方法

1. 歯肉上皮細胞

1) RNAi による TrkB、p75 の発現抑制の影響

TrkB と p75 のタンパク発現を RNAi によって抑制するために、siRNA (small interference RNA)を用いた。24 穴プレートに 2.5×10^4 /ml の細胞密度で播種し、50%コンフルエントになった時点で、抗菌薬を除いた培地に変え、細胞内への導入は lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)を用いて行った。10 nM の siRNA と lipofectamine を KG2 培地で希釈した siRNA buffer (DHRAMACON, Little Chalfont, UK)に溶解し混合した後、各 well に添加し、48 時間培養した。その後、PBS で 2 回洗浄した。BDNF (100 ng/ml) 添加 30 分後に回収した細胞溶解液は JNK のリン酸化を、15 時間後に回収した細胞溶解液は caspase3 の活性化をそれぞれ Western blotting 法(第二章 第二節参照)で検討した。また、BDNF で 24 時間刺激した後に細胞を固定し TUNEL 染色(第二章 第二節参照)によってアポトーシスについても検討を行った。

2) JNK 阻害剤、ERK 阻害剤が与える影響

SP600125 (JNK inhibitor 5 μ M ; Cell signaling)、U0126 (ERK inhibitor 5 μ M ; Cell signaling)を、いずれも DMSO に溶解して使用した。6 穴プレートに 5.0×10^4 /ml の密度で細胞を播種し、サブコンフルエントになるまで培養し、PBS で 2 回洗浄した後、BDNF を作用させる 30 分前にそれぞれの阻害剤を前投与し、BDNF 添加後、上述通り細胞溶解液を回収、もしくは細胞を固定し、JNK のリン酸化と caspase3 の活性化を Western blotting 法によって、アポトーシスについて TUNEL 染色を行い検討した。

2. 歯周靱帯細胞への p75 強制発現ベクター導入の影響

哺乳動物細胞の発現ベクター pCMV/hygro に、Ampicillin 耐性遺伝子である Amp (R) を含む DNA 断片と、p75 をコードする cDNA を挿入した p75 強制発現ベクターと、p75 をコードしない cDNA を挿入したネガティブコントロールベクターを得た (Sino Biological, Beijing, China)。p75 の発現が著しく低かった HPL cells にこのベクターを導入した。細胞内への導入は lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いた。24 穴プレートに細胞密度が 2.5×10^4 /ml で播種し、70%コンフルエントになるまで培養し、500 ng の DNA ベクターと lipofectamine LTX を opti-MEM (GIBCO, Buffalo, NY) 中に溶解し混合した後、各 well に添加し 48 時間培養した。BDNF 添加後上述通り細胞溶解液を回収、もしくは細胞を固定し、JNK のリン酸化と caspase3 の活性化を Western blotting 法によって、アポトーシスについては TUNEL 染色を行い検討した。

第三節 結果

1. BDNF が誘導する歯肉上皮細胞のアポトーシスに及ぼす影響

1) TrkB、p75 受容体発現抑制による影響

各種デザインされた配列の、TrkB、p75 の siRNA 導入によってそれぞれのタンパク発現が抑制された(図 6)。BDNF (100 ng/ml) による JNK のリン酸化の促進は、p75 siRNA の導入によって抑制されたが、TrkB siRNA の導入では抑制されなかった(図 7A)。また、BDNF (100 ng/ml) によって促進した caspase3 の活性化は、p75 siRNA の導入によって抑制されたが、TrkB siRNA の導入では抑制されなかった(図 7B)。同様に、BDNF (100 ng/ml) の投与によって誘導されたアポトーシス陽性細胞数の増加は、p75 siRNA の導入によって抑制されたが、TrkB siRNA の導入では抑制されなかった(図 8)。

2) JNK、ERK 阻害剤の前処理による影響

JNK 阻害剤 SP600125、ERK 阻害剤 U0126 が、BDNF によって促進する JNK のリン酸化、ERK のリン酸化をそれぞれ抑制していることが確認された(図 9A)。BDNF (100 ng/ml) によって促進した caspase3 の活性化は、SP600125 前処理によって抑制されたが、U0126 前処理では抑制されなかった(図 9B)。また、BDNF (100 ng/ml) の作用によって誘導されたアポトーシス陽性細胞数の増加は、SP600125 の前処理によって抑制されたが、U0126 の前処理では抑制されなかった(図 10)。

2. 歯周靱帯細胞への p75 強制発現ベクター導入による影響

p75 強制発現ベクターを導入することによって、HPL cells でも p75 受容体が発現することを確認した(図 11A)。p75 発現ベクターを導入した HPL cells では、BDNF (100 ng/ml)を作用させると、JNK のリン酸化が促進し、caspase3 の活性化も促進し(図 11B)、さらにアポトーシス陽性細胞数も有意に増加した(図 12)。

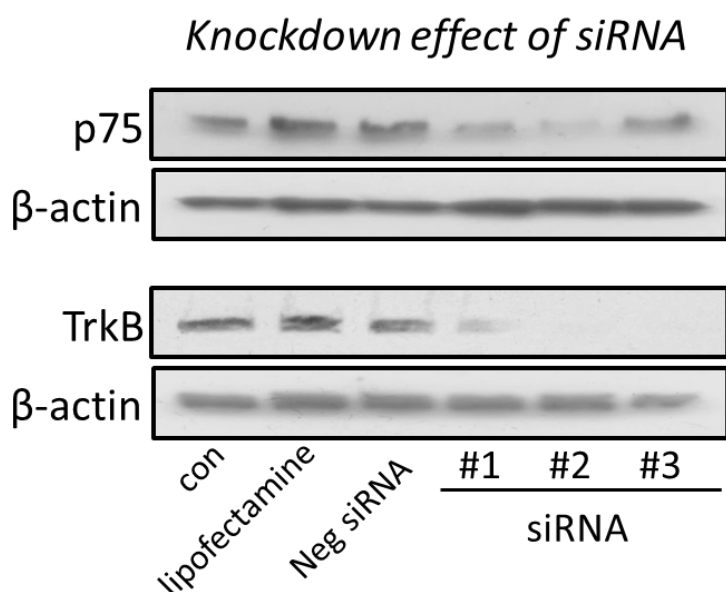
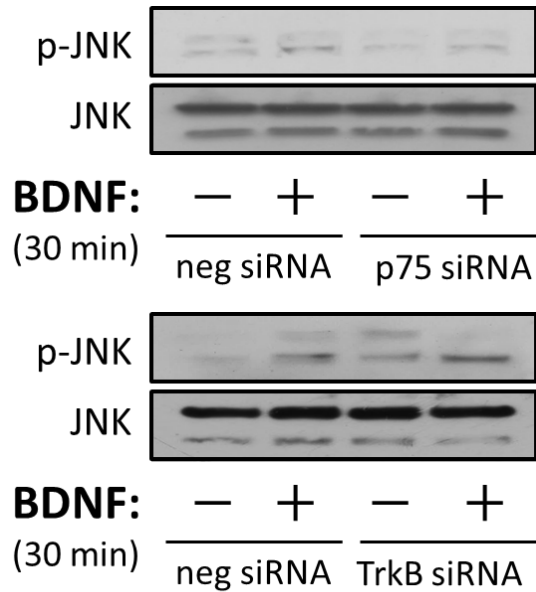


図 6. OBA9 への p75 および TrkB の siRNA の導入がそれぞれのタンパクの発現に及ぼす効果の検討

OBA9 に 3 種類デザインされた配列の TrkB と p75、及び negative コントロールの siRNA の導入を行い、48 時間培養した後に細胞を回収し、Western blotting 法によって、TrkB と p75 の発現の抑制を確認した。

A.



B.

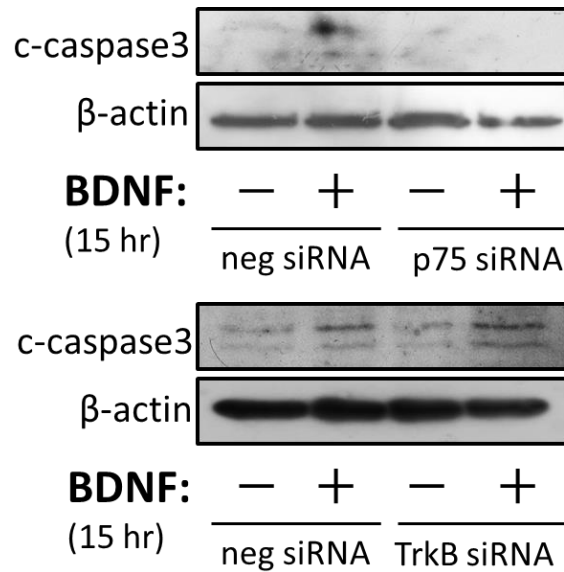


図 7. OBA9 への p75 および TrkB の siRNA の導入が BDNF による JNK のリン酸化と caspase3 の活性化に及ぼす影響

OBA9 に TrkB 及び p75 の siRNA の導入 48 時間後に、BDNF (100 ng/ml) を添加し、30 分後に細胞を回収し、rabbit anti-human phospho-SAPK/JNK antibody を(図 A)、また 15 時間後に細胞を回収し、rabbit anti-human cleaved-caspase3 antibody を(図 B)一昼夜 4°C で反応させた。評価は Western blotting 法で行った。

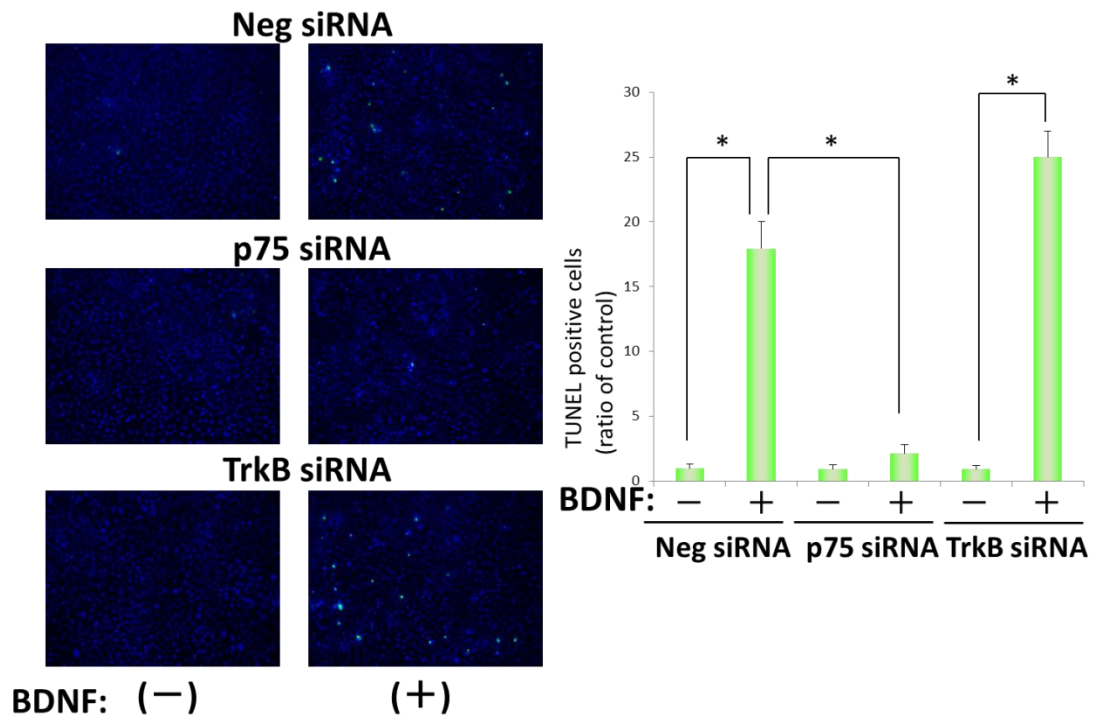
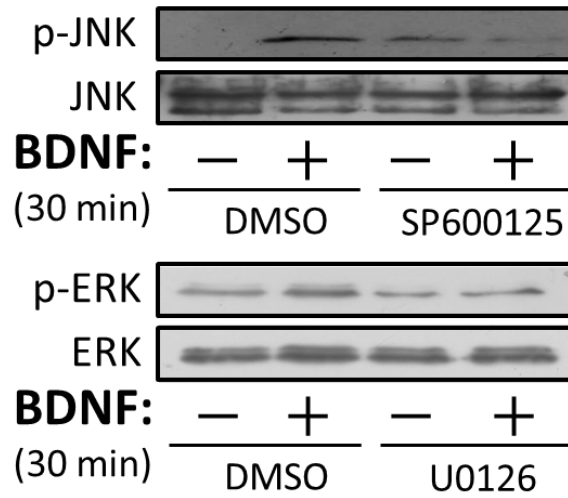


図 8. OBA9 への p75 および TrkB の siRNA の導入が BDNF による OBA9 のアポトーシスに及ぼす影響

ガラスベースディッシュ上に OBA9 を播種し、negative、p75、及び TrkB の siRNA を導入し、48 時間培養を行った。その後、BDNF (100 ng/ml) を添加し 24 時間培養後に細胞を固定し、TUNEL 染色を行い、蛍光顕微鏡で観察し、陽性細胞数の割合を定量化した。*: $p < 0.01$

A.



B.

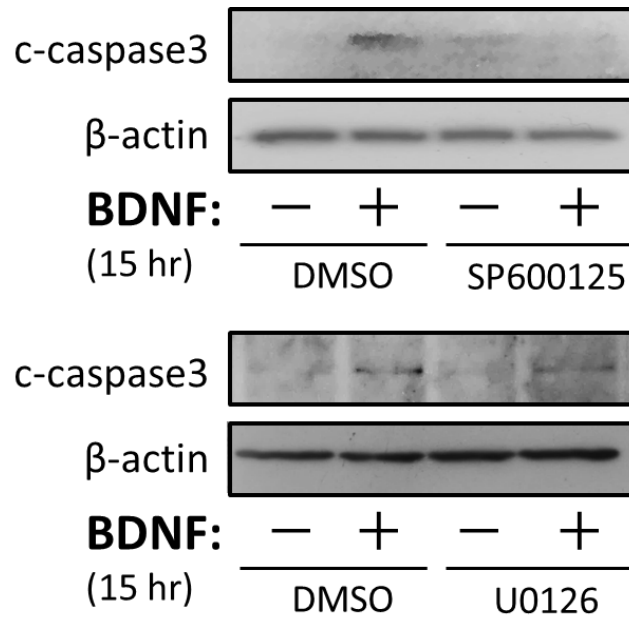


図 9. JNK 及び ERK の阻害剤が BDNF による OBA9 の caspase3 の活性化に及ぼす影響
OBA9 に SP600125 (JNK inhibitor) と U0126 (ERK inhibitor) の前処理を 30 分間行った。
その後、BDNF (100 ng/ml) の添加 30 分後に細胞を回収し、rabbit anti-human
phospho-SAPK/JNK antibody と rabbit anti-human phospho-p44/42 MAPK antibody を
(図 A)、また 15 時間後に細胞を回収し、rabbit anti-human cleaved-caspase3 antibody を
(図 B) 一昼夜 4°C で反応させた。評価は Western blotting 法で行った。

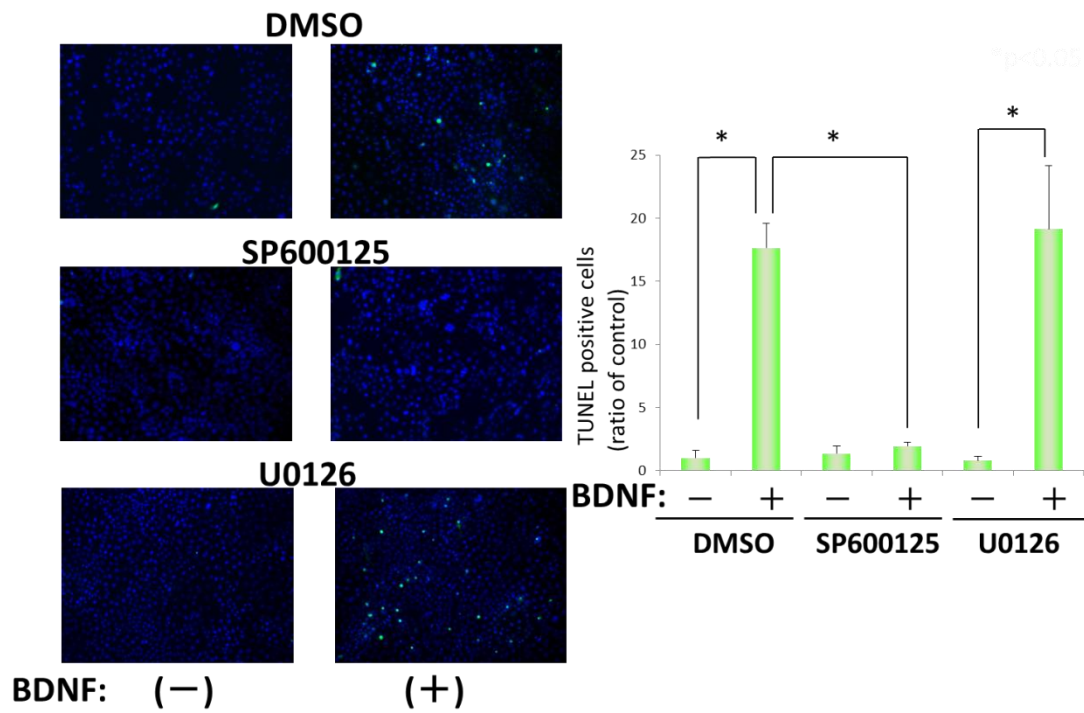


図 10. JNK 及び ERK の阻害剤が BDNF による OBA9 のアポトーシスに及ぼす影響
 ガラスベースディッシュ上に OBA9 を播種し、SP600125 (JNK inhibitor)と U0126 (ERK inhibitor)の前処理を 30 分間行った。その後、BDNF (100 ng/ml)を添加し 24 時間培養後に細胞を固定し、TUNEL 染色を行い、蛍光顕微鏡で観察し、陽性細胞数の割合を定量化した。

*: $p < 0.01$

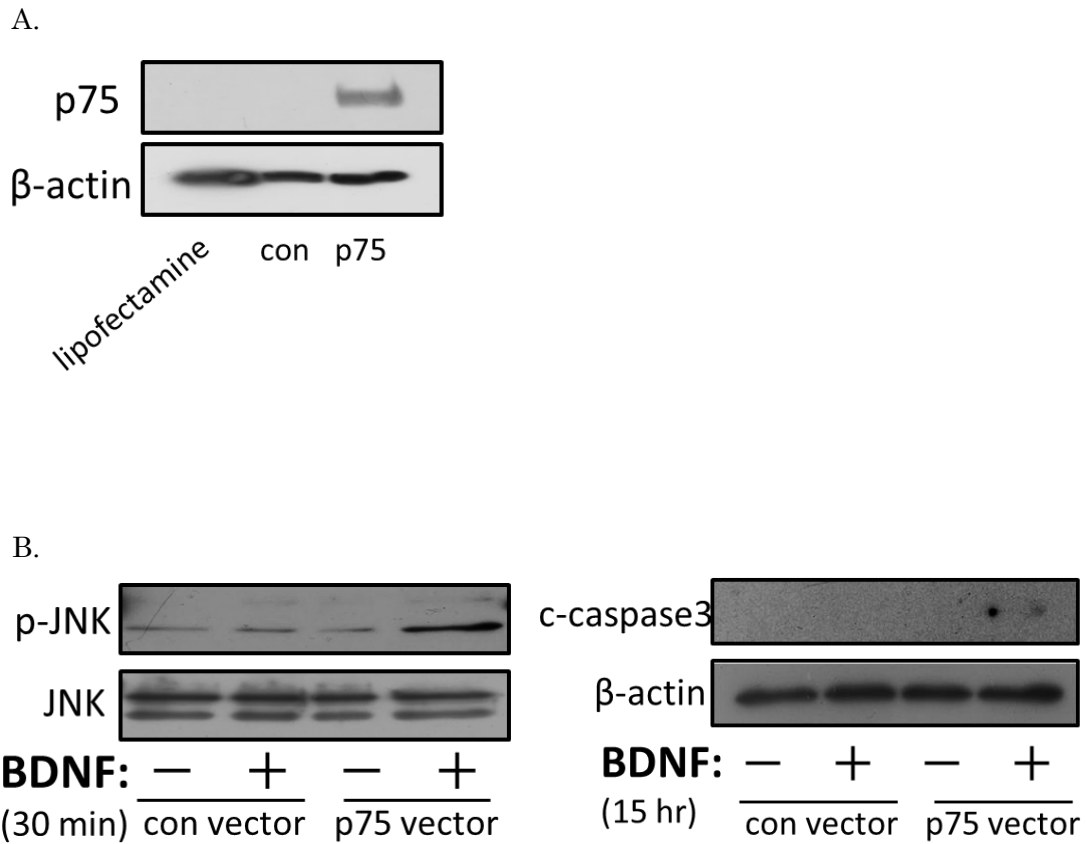


図 11. HPL cells への p75 発現ベクターの導入が BDNF による JNK のリン酸化、caspase3 の活性化に及ぼす影響

HPL cells にコントロールベクターと p75 強制発現ベクターを導入した 48 時間後、細胞を回収し、rabbit anti-NGF Receptor(p75)antibody (EPITOMICS, 1:1000)を一昼夜作用させた(図 A)。また、ベクター導入後、BDNF (100 ng/ml)を添加し、30 分後に細胞を回収し、rabbit anti-human phospho-SAPK/JNK antibody を、また 15 時間後に細胞を回収し、rabbit anti-human cleaved-caspase3 antibody を一昼夜 4°C で反応させた(図 B)。評価は Western blotting 法で行った。

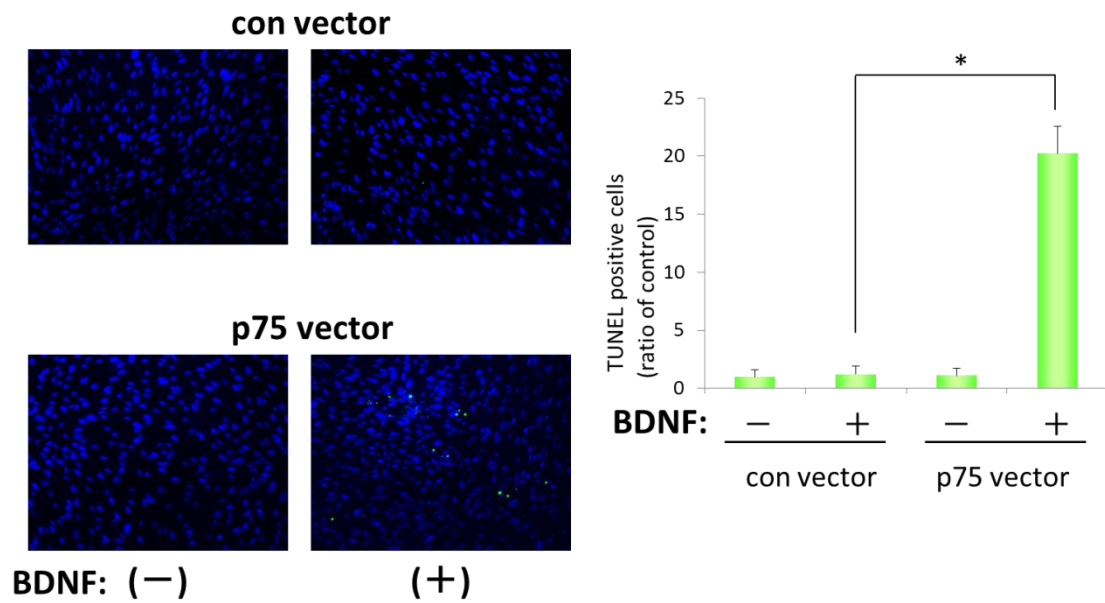


図 12. HPL cells への p75 発現ベクターの導入が BDNF によるアポトーシスに及ぼす影響
 ガラスベースディッシュ上に HPL cells を播種し、コントロールベクターと p75 強制発現
 ベクターの導入を 48 時間行った。その後、BDNF (100 ng/ml) を添加し 24 時間培養後に細
 胞を固定し、TUNEL 染色を行い、蛍光顕微鏡で観察し、陽性細胞数の割合を定量化した。

*: $p < 0.01$

第四節 考察

本実験で、BDNFが誘導する歯肉上皮細胞のアポトーシスは、p75 siRNAの導入によるp75タンパクの発現の減少によって抑制され、さらに、アポトーシスに関わるシグナル伝達経路であるJNKのリン酸化とcaspase3の活性化も同様に抑制されることが確認された。また、JNKのリン酸化を阻害することで、BDNFの作用によって促進するcaspase3の活性化、アポトーシス細胞数の増加が抑制されることも確認できた。したがって、BDNFを歯肉上皮細胞に作用させると、BDNFがp75受容体に結合し、JNKのリン酸化を促進し、caspase3の活性化を促進した結果、アポトーシスを誘導するという伝達経路が示唆された。

歯肉上皮細胞と比べ、p75受容体の発現が著しく低く、BDNFを作用させてもアポトーシスをほぼ認めなかった歯周靭帯細胞に、p75受容体を強制発現させ、BDNFを作用させることで、JNKがリン酸化し、caspase3が活性化し、アポトーシスを誘導することが確認できた。この事実からも、BDNFの作用によるアポトーシスはp75受容体が司っており、p75にBDNFが結合した後に、JNKのリン酸化を促進し、caspase3の活性化を促進し、アポトーシスを誘導するという一連のシグナルカスケードが働くということを裏付ける結果となった。

また、近年、皮膚の角化上皮細胞において、p75受容体がJNKのリン酸化を介し、caspase3を活性化させ、アポトーシスを誘導することも報告されている(41)。

以上のことから、p75-JNK-caspase3カスケードの活性化がBDNFを用いた歯周組織再生過程において歯肉上皮の侵入が抑制された要因の一つと考えられる。

第五章 細胞増殖に関わるシグナル伝達経路の検討

第一節 概要

BDNF の作用による細胞増殖促進には TrkB 受容体、ERK のリン酸化が関与していると考えられている。また、p75 受容体を介した JNK のリン酸化が細胞周期停止と関連している報告がある。そこで、本章では、BDNF による、歯周靭帯細胞と歯肉上皮細胞の細胞増殖とこれらの刺激伝達系について検討した。

第二節 材料と方法

1. 歯周靭帯細胞

1) TrkB の発現抑制、および ERK 阻害剤が細胞増殖に及ぼす影響

TrkB の発現抑制を行うため、TrkB siRNA を用いた。24 穴プレートに細胞密度 2.5×10^4 /ml で播種、50%コンフルエントになった時点で抗菌薬を除いた培地に変え、10 nM の siRNA と lipofectamine RNAiMAX を opti-MEM で溶解、混合した後、各 well に添加し、48 時間培養した。その後、PBS で 2 回洗浄し、BDNF (100 ng/ml) を添加し、21 時間後に BrdU を加え、細胞増殖を検討した(第二章 第二節参照)。また、BDNF (100 ng/ml) 添加後、30 分後に細胞溶解液を回収し、Western blotting 法によって ERK のリン酸化を検討した(第二章 第二節)。

次に、HPL cells をサブコンフルエントになるまで培養し、PBS で 2 回洗浄した後、BDNF (100 ng/ml) 添加 30 分前に U0126 (5 μ M) を作用させた。BDNF 添加の 21 時間後に BrdU を加え、細胞増殖を検討した(第二章 第二節参照)。また、BDNF (100 ng/ml) 添加の 30 分後に細胞溶解液を回収し、Western blotting 法によって ERK のリン酸化を検討した(第二章 第二節参照)。

2) p75 の強制発現が細胞増殖に及ぼす影響

HPL cells に p75 強制発現ベクターを導入し、48 時間培養した(第四章 第二節参照)。その後、PBS で 2 回洗浄し、BDNF (100 ng/ml) を添加し、21 時間後に BrdU を加え、細胞増殖を検討した(第二章 第二節参照)。また、BDNF (100 ng/ml) 添加後、30 分後に細胞溶解液を回収し、Western blotting 法によって ERK のリン酸化を検討した(第二章 第二節参照)。

2. 歯肉上皮細胞

1) TrkB および p75 の発現抑制が細胞増殖に及ぼす影響

TrkB と p75 のタンパク発現を抑制するために、それぞれの siRNA と lipofectamine を用いた(第四章 第二節参照)。siRNA 導入の 48 時間後、PBS で 2 回洗浄し、BDNF (100 ng/ml)を添加し、21 時間後に BrdU を加え、細胞増殖を検討した(第二章 第二節参照)。また、BDNF (100 ng/ml)添加後、30 分後に細胞溶解液を回収し、Western blotting 法によって ERK のリン酸化を検討した(第二章 第二節参照)。

2) JNK 阻害剤および ERK 阻害剤が細胞増殖に与える影響

OBA9 をサブコンフルエントになるまで培養し、PBS で 2 回洗浄した後、BDNF (100 ng/ml)添加 30 分前に SP600125 と U0126 (5 μ M)を作用させた。BDNF 添加の 21 時間後に BrdU を加え、細胞増殖を検討した(第二章 第二節参照)。

第三節 結果

1. 歯周靭帯細胞

1) TrkB の siRNA の導入が、TrkB の発現を抑制していることを確認した(図 13A)。BDNF (100 ng/ml)による ERK のリン酸化の促進は、TrkB siRNA の導入によって抑制された(図 13B)。また、BDNF による細胞増殖の亢進は、TrkB siRNA の導入によって抑制された(図 13C)。ERK 阻害剤、U0126 の前処理は BDNF によって促進する ERK のリン酸化を抑制し(図 14A)、同様に細胞増殖の促進も抑制した(図 14B)。

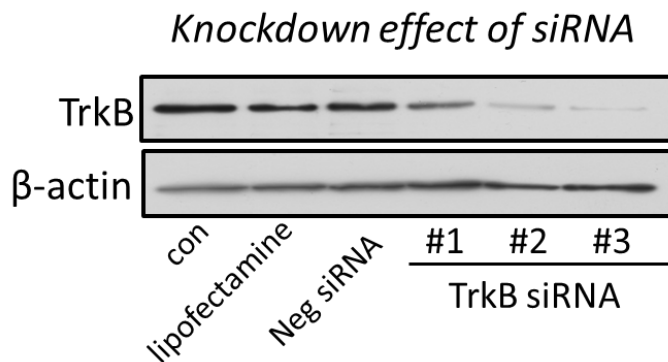
2) BDNF (100 ng/ml)による ERK のリン酸化の促進は、p75 強制発現ベクター導入群でも変化がなく、影響を受けていなかったが(図 15A)、BDNF による細胞増殖の促進は、p75 強制発現によって抑制された(図 15B)。

2. 歯肉上皮細胞

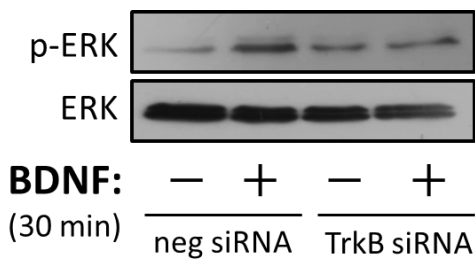
1) BDNF (100 ng/ml)による ERK のリン酸化は、TrkB siRNA 導入によって抑制されたが、p75 siRNA 導入では抑制されなかった(図 16A)。細胞増殖を検討したところ、BDNF を作用させても影響がなかった細胞増殖は、TrkB siRNA 導入後に BDNF を作用させると細胞増殖が抑制されたが、p75 siRNA 導入群では細胞増殖が促進した(図 16B)。

2) BDNF (100 ng/ml)を作用させても細胞増殖は影響を受けなかったが、U0126 前処理後に BDNF を作用させると細胞増殖が抑制されたが、一方 SP600125 群では細胞増殖が促進した(図 17)。

A.



B.



C.

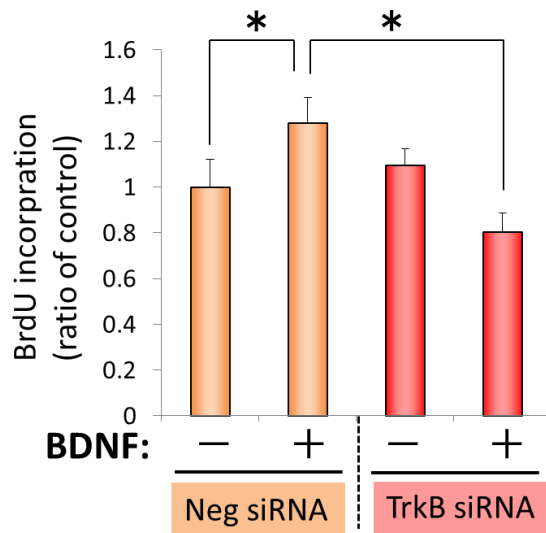


図 13. HPL cells への TrkB の siRNA の導入が BDNF による細胞増殖に及ぼす影響

HPL cells に 3 種類デザインされた配列の TrkB と negative コントロールの siRNA の導入を行い、48 時間培養した後に細胞を回収し、Western blotting 法によって、TrkB の発現の抑制を確認した(図 A)。siRNA 導入後に、BDNF (100 ng/ml)を作用させ、30 分後に細胞を回収し、rabbit anti-human phospho-p44/42 MAPK antibody を 4°C で一昼夜作用させ、Western blotting 法にて検討した(図 B)。また、siRNA 導入後に、BDNF (100 ng/ml)を作用させ 21 時間後に BrdU を添加し、さらに 3 時間培養した後に、DNA 合成を行った細胞の吸光度を測定した(図 C)。

*: $p < 0.05$

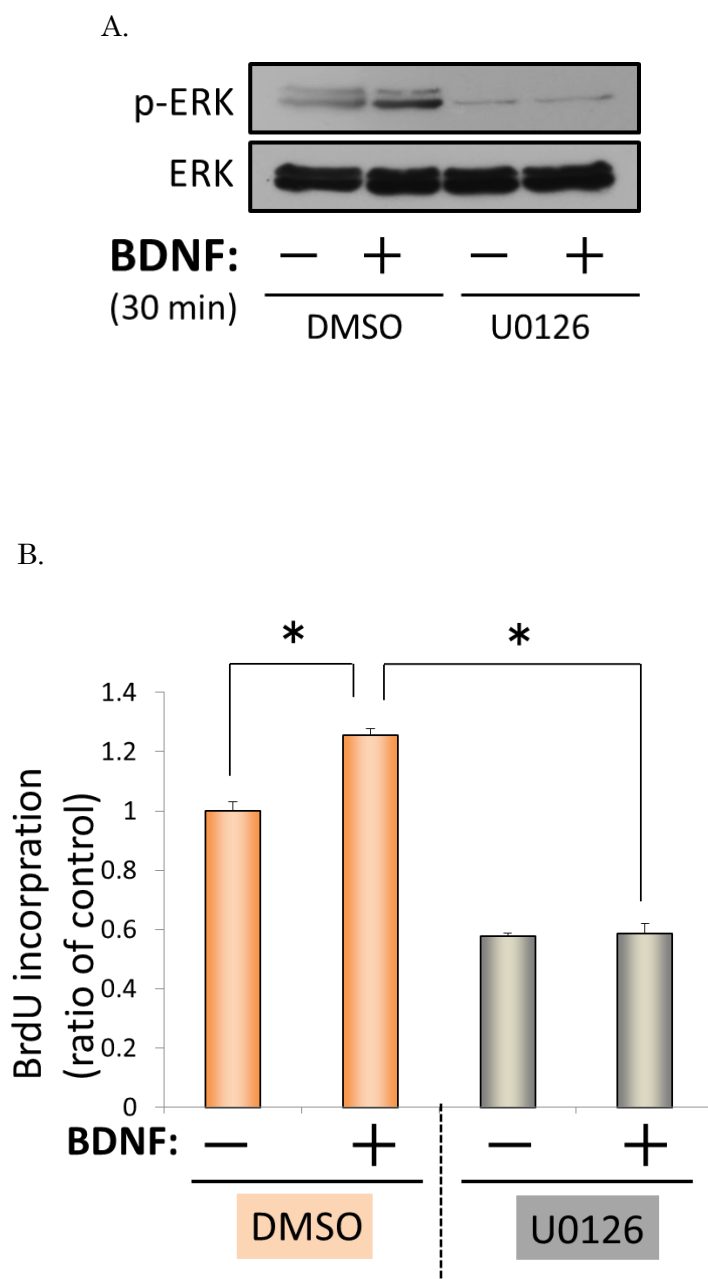


図 14. ERK 阻害剤が BDNF による HPL cells の細胞増殖に及ぼす影響

HPL cells に U0126 の前処理を行った 30 分後に、BDNF (100 ng/ml) を作用させ、30 分後に細胞を回収し、rabbit anti-human phospho-p44/42 MAPK antibody を 4°C で一昼夜作用させ、Western blotting 法にて検討した(図 A)。また、U0126 前処理後に、BDNF (100 ng/ml) を作用させ 21 時間後に BrdU を添加し、さらに 3 時間培養した後に、DNA 合成を行った細胞の吸光度を測定した(図 B)。*: $p < 0.05$

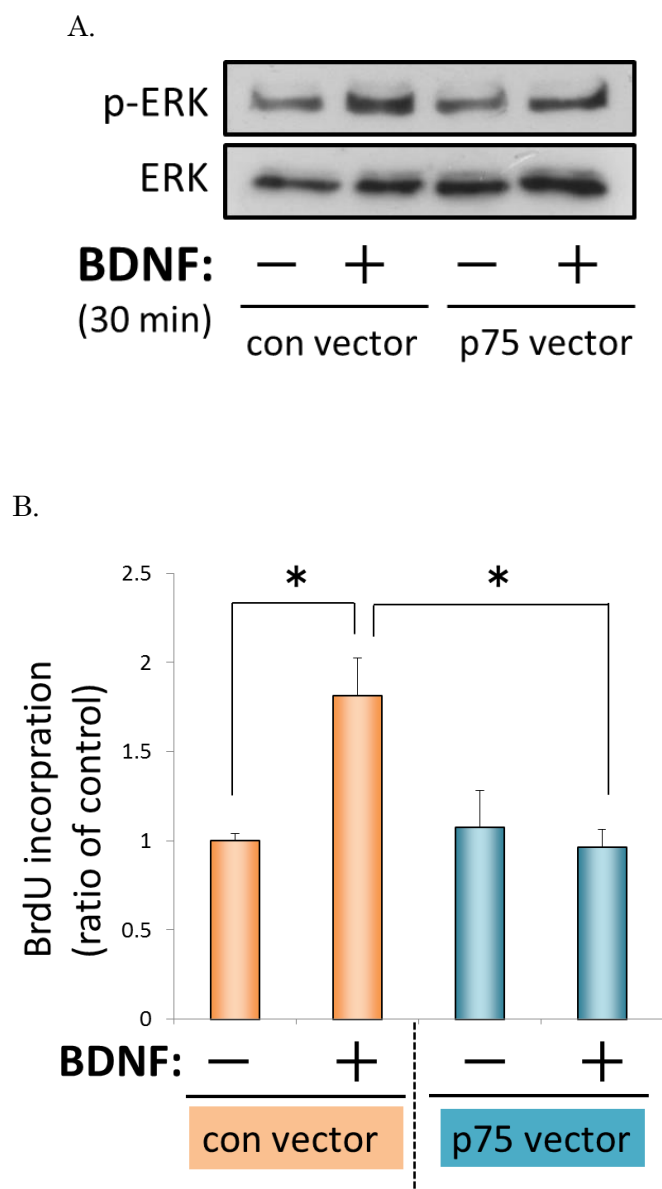


図 15. HPL cells への p75 発現ベクターの導入が BDNF による細胞増殖に及ぼす影響
 HPL cells にコントロールベクターと p75 強制発現ベクターの導入を 48 時間行った。その後、BDNF (100 ng/ml) を作用させ、30 分後に細胞を回収し、rabbit anti-human phospho-p44/42 MAPK antibody を 4°C で一昼夜作用させ、Western blotting 法によって検討した(図 A)。また、ベクター導入後に、BDNF (100 ng/ml) を作用させ 21 時間後に BrdU を添加し、さらに 3 時間培養した後に、DNA 合成を行った細胞の吸光度を測定した(図 B)。
 *: p<0.05

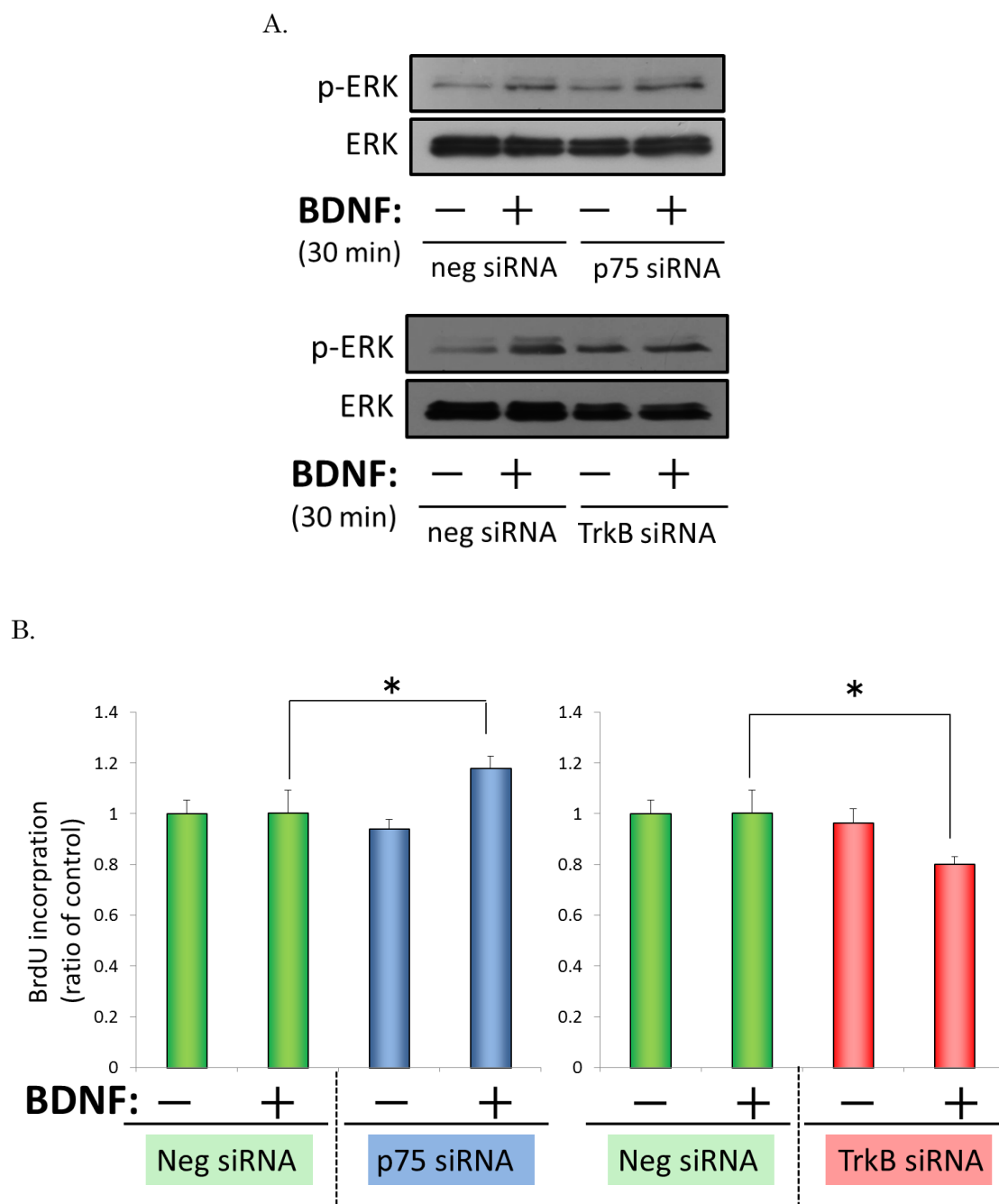


図 16. OBA9 への p75 及び TrkB の siRNA の導入が BDNF による細胞増殖に及ぼす影響
 OBA9 に、negative、p75、及び TrkB の siRNA 導入を行い、48 時間培養した。その後、
 BDNF (100 ng/ml) を作用させ、30 分後に細胞を回収し、rabbit anti-human
 phospho-p44/42 MAPK antibody を 4°C で一昼夜作用させ、Western blotting 法にて検討し
 た(図 A)。また、siRNA 導入後に、BDNF (100 ng/ml) を作用させ 21 時間後に BrdU を添
 加し、さらに 3 時間培養した後に、DNA 合成を行った細胞の吸光度を測定した(図 B)。*:
 $p < 0.05$

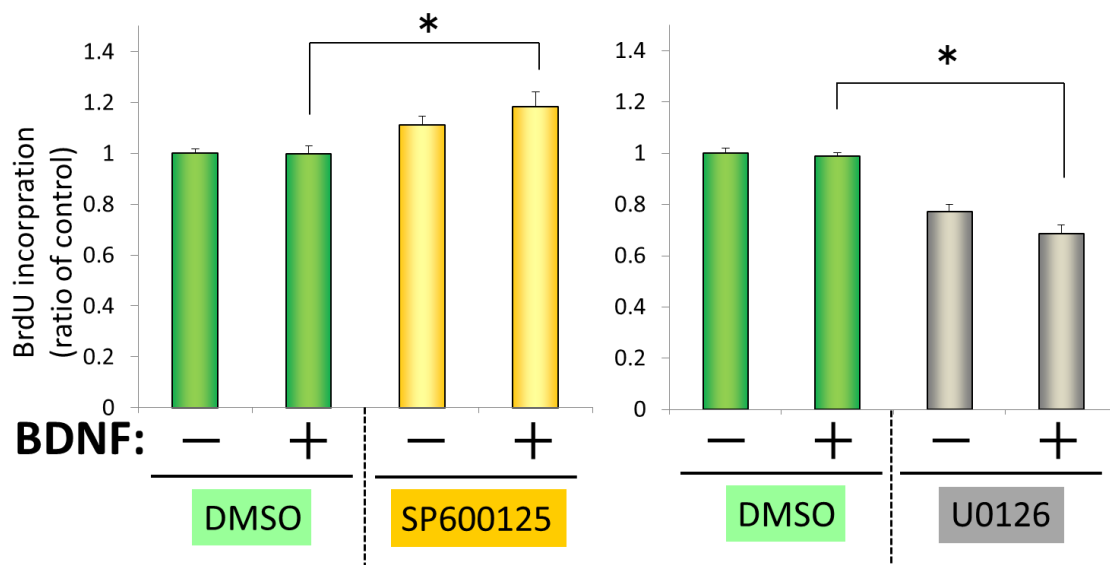


図 17. JNK 及び ERK の阻害剤が BDNF による OBA9 の細胞増殖に及ぼす影響
 OBA9 に、SP600125 (JNK inhibitor) と U0126 (ERK inhibitor) の前処理を 30 分行った後、
 BDNF (100 ng/ml) を作用させ 21 時間後に BrdU を添加し、さらに 3 時間培養した後に、
 DNA 合成を行った細胞の吸光度を測定した。*: $p < 0.05$

第四節 考 察

本実験で、**BDNF** による歯周靭帯細胞の細胞増殖促進が、**TrkB** 受容体タンパクの発現の減少と、**ERK** 阻害剤によって抑制された。また、**ERK** のリン酸化の促進が **TrkB** 受容体タンパクの発現の減少によって抑制された。**BDNF** が歯周靭帯細胞の細胞増殖を促進すること(20)や、**BDNF** は **TrkB-ERK** シグナル伝達経路を介して、セメント芽細胞の分化の促進(28)、また血管内皮細胞の遊走を促進する(29)ことが報告されている。これらのことから、**BDNF** の作用による細胞増殖の促進には、**TrkB** 受容体を介した **ERK** のリン酸化が関与していることが明らかとなった。

歯肉上皮細胞においても、**TrkB** タンパクの発現減少、**ERK** 阻害剤によって、**BDNF** 投与が細胞増殖を減弱させた。このことから、歯肉上皮細胞においても **TrkB** 受容体、**ERK** を介した細胞増殖促進のシグナルが働いていることが示唆された。一方で、**p75** 受容体タンパクの減少、また **JNK** のリン酸化を阻害することで、**BDNF** 投与が細胞増殖を促進することが明らかとなった。神経細胞において、**JNK** のリン酸化が **p21** の発現を上昇させ、細胞周期を停止させること(42)や、**p75** 受容体が **p21** の発現の上昇を介した神経細胞の増殖停止に関与している(44)ことが報告されている。さらに、胃癌細胞では、**p75** 受容体が **p27** や **Rb** の発現を制御し、細胞増殖停止に関わっていることも報告されている(43)。すなわち、歯肉上皮細胞において、**p75-JNK** シグナルが細胞増殖停止シグナルを司る可能性が示唆された。これらの事実から、歯肉上皮細胞では、**TrkB-ERK** カスケードが細胞増殖促進シグナルとして働くものの、**p75-JNK** カスケードが細胞増殖停止シグナルを生じ、細胞増殖促進に関わるカスケードを打ち消していると考えられる。

歯肉上皮細胞に **p75 siRNA** の導入を行うことで、**BDNF** が誘導する **JNK** のリン酸化は抑制されるが、**ERK** のリン酸化は抑制されなかった。また、**TrkB siRNA** の導入を行うと、**BDNF** が誘導する **ERK** のリン酸化は抑制されるが、**JNK** のリン酸化は抑制されなかった。さらに歯周靭帯細胞に **p75** 受容体を強制発現させても、**BDNF** が誘導する **ERK** のリン酸化には影響がなかった。これらのことから、**BDNF** が制御する **TrkB** と **p75** のシグナル伝達は、歯肉上皮細胞と歯周靭帯細胞で、それぞれ相互作用を与えることなく独立して働いていると考えられる。これまでに、**p75** 受容体が **Trk** 受容体への **NGF** 等の神経栄養因子の親和性を高めること(45)や、**p75** 受容体が **Trk** 受容体とヘテロ二量体を形成すること(46)、またその二量体の形成が、下流のシグナル経路や付随タンパクを通じて相互作用を可能にすること(47)や、反対に **p75** が **TrkB** のシグナルを抑制

すること(48)が報告されている。また、骨芽細胞に p75 を強制発現させた研究において、p75 は MC3T3-E1 細胞株では Trk 受容体のシグナルを増強させ、細胞増殖を促進させる(49)が、MG63 細胞株では反対に、神経細胞の増殖抑制に関わることで知られる Nogo 受容体との相互作用によって細胞増殖を抑制させること(50)が報告されている。このように、p75 と Trk やその他の受容体との相互作用については不明な点も多く、未だに議論の余地がある問題ではあるが、今回の実験からは、歯肉上皮細胞と歯周靭帯細胞において、p75 と TrkB はそれぞれ独立したシグナルを下流に伝えていることが示唆された。

現在、他のサイトカイン療法として、transforming growth factor- β (TGF- β) (51)、bone morphogenetic protein (BMPs) (52)、insulin like growth factor (IGF) (53、54)などの報告があり、platelet-derived growth factor (PDGF)は GEM21S® (Osteohealth, New York, U.S.A)として商品化されている。また、basic fibroblast growth factor (b-FGF)は、現在、臨床治験中でもある代表的な歯周組織再生療法に有効なサイトカインの一つである(55、56)。in vitro の実験において、b-FGF はその強力な細胞増殖促進作用から、歯周靭帯細胞のみならず歯肉上皮細胞の細胞増殖も促進させることが報告されている(57、58)。

本研究の結果から、BDNF は TrkB-ERK を介し歯周靭帯細胞の増殖を促進することが明らかとなった。一方でまた、BDNF は歯肉上皮細胞の p75-JNK シグナルカスケードを介し、caspase3 を活性化させアポトーシスを誘導するとともに、細胞周期停止のシグナルを伝達させ細胞増殖を休止させる作用機構を明らかにした。

以上の事から、BDNF による歯周組織再生において、BDNF は歯周靭帯細胞の TrkB-ERK カスケードを介し細胞増殖を促進しながら、歯肉上皮細胞の p75-JNK カスケードを介しアポトーシスを誘導するとともに増殖を休止させることが明らかとなった。この、歯周組織を構成する2つの異なる細胞に対する、BDNF の相反する作用が歯周組織再生を有意に促進することが示唆された。

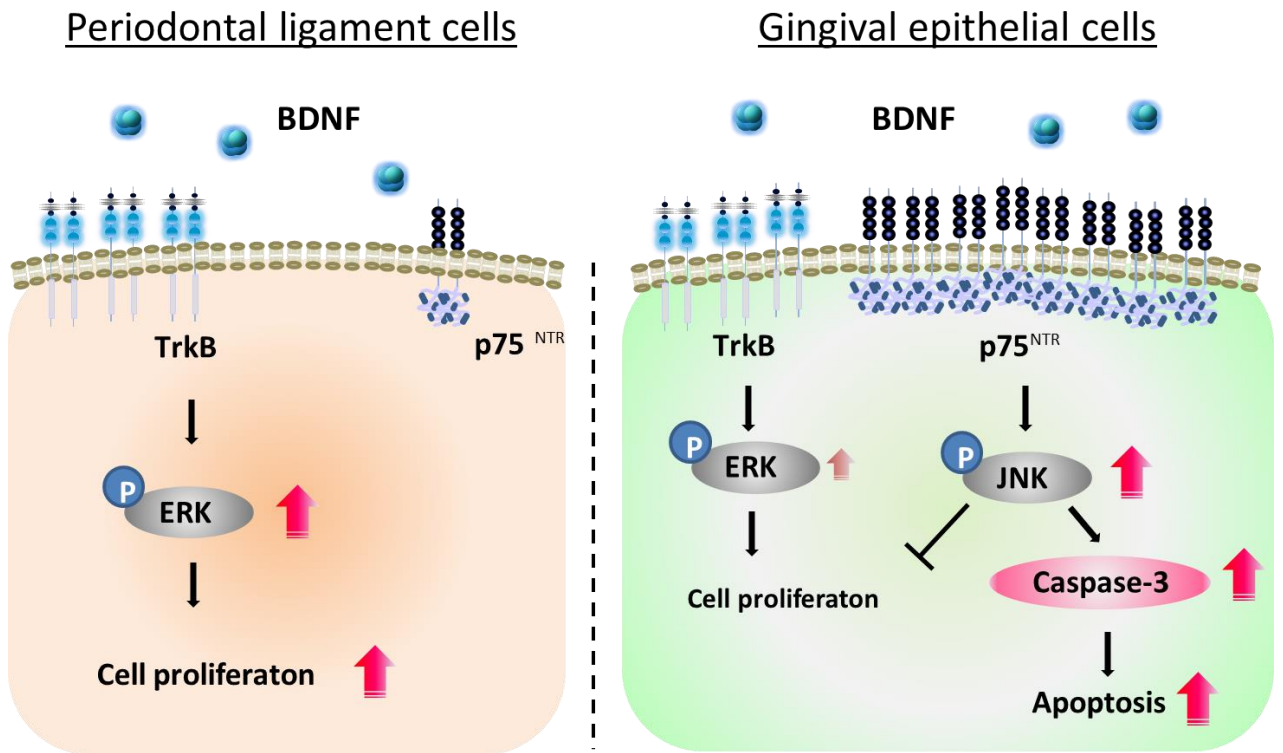


図 18. BDNF が司る歯周靱帯細胞と歯肉上皮細胞のシグナル伝達経路の模式図

第六章 総括

BDNFによる歯周組織再生過程における歯肉上皮の侵入抑制のメカニズムを解明するため、BDNFの歯周靭帯細胞の増殖に及ぼす影響とそのメカニズム、また歯肉上皮細胞のアポトーシス、細胞増殖に与える影響とそのメカニズムについて検討を行い以下に結果を示す。

1. BDNFは歯周靭帯細胞の細胞増殖を促進したが、アポトーシスには影響がなかった。
2. BDNFは歯肉上皮細胞の細胞増殖には影響を与えず、アポトーシスを誘導した。
3. 歯肉上皮細胞、歯周靭帯細胞ともにTrkB受容体を発現していた。
4. 歯周靭帯細胞は歯肉上皮細胞に比べ、p75受容体の発現が著しく低かった。
5. BDNFは歯周靭帯細胞のERKのリン酸化を促進したがJNKのリン酸化を促進はしなかった。
6. BDNFは歯肉上皮細胞のERKのリン酸化を微弱ながら促進したのに対し、JNKのリン酸化を明らかに促進した。
7. BDNFによる歯肉上皮細胞のJNKのリン酸化、caspase3の活性化、アポトーシスの誘導は、TrkB siRNAの導入では抑制されず、p75 siRNAの導入で抑制された。
8. BDNFによる歯肉上皮細胞のcaspase3の活性化、アポトーシスの誘導は、ERKの阻害剤では抑制されず、JNKの阻害剤で抑制された。
9. 歯周靭帯細胞にp75を強制発現させ、BDNFを作用させると、JNKのリン酸化、caspase3の活性化、アポトーシスの誘導を促進した。
10. BDNFによる歯周靭帯細胞のERKのリン酸化はTrkB siRNAの導入で抑制され、また細胞増殖は、TrkB siRNAの導入とERKの阻害剤で抑制された。
11. BDNFによる歯肉上皮細胞のERKのリン酸化はTrkB siRNAの導入で抑制されたが、p75 siRNAの導入では抑制されなかった。
12. BDNFを作用させても影響がなかった歯肉上皮細胞の細胞増殖は、TrkB siRNAの導入とERK阻害剤によって抑制されたが、p75 siRNAの導入とJNK阻害剤によって促進された。

参考文献

1. Christgeu M, Bader N, Felden A, Gradl J, Wenzel A, Schmalz G. 2002. Guided tissue regeneration in intrabony defects using an experimental bioresorbable polydioxanon (PDS) membrane. A 24-month spilit-mouth study. *J. Clin. Periodontol.* 29(8): 710-23.
2. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. 1993. Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. *Periodontol 2000.* 1:26-35.
3. Cortellini P, Tonetti MS. 2000. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *Periodontol.* 2000. 22:104-132.
4. Sanz M, Giovannoli JL. 2000. Focus on furcation defects: guided tissue regeneration. *Periodontol.* 2000. 22:169-189.
5. Lindhe J, Pontoriero R, Berglundh T, Araujo M. 1995. The effent of flap management and bioresorbable occlusive devices in GTR treatment of degree furcation defects. An experimental study in dogs. *J. Clin. Periodontol.* 22:276-283.

6. Kalpidis CD, Ruben MP. 2002. Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: A literature review. *J. Periodontol.* 73:1360-1376.
7. Johnson D, Lanahan A, Buck CR, Sehgal A, Morgan C, Mercer E, Bothwell M Chao M. 1986. Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545-554
8. Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. 1987. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature* 325, 593-597.
9. Ebendal T. 1992. Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J. Neurosci. Res.* 32, 461-470.
10. Barbacid M. 1994. The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* 25, 1386-1403. Barbacid, M. *J. Neurobiol.* 25, 1386–1403.
11. Bibel M, Barde YA. 2000. Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* 14, 2919-2937.
12. Hempstead BL. 2002. The many face of p75^{NTR}. (2002) *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 260-267.
13. Philippe PR, Philip AB. 2002. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin

receptor. *Progress in Neurobiology*. 67, 203-233.

14. Yamashita T, Fujitani M, Hata K, Mimura F, Yamagishi S. 2005. Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. *Anatomical Sci Int*. 80, 37-41.
15. Carlos FI, Anastasia S. 2012. p75 neurotrophin receptor signaling in nervous system injury and degeneration: paradox and opportunity. *Trends in Neurosci*. 35, 7.
16. Ioannis C, Annalisa V, Iosif P, Achille G, Anastasia S, Carlos FI. 2012. Genetic dissection of neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Cell Reports* 2, 1563-1570.
17. Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B. 2000. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett*. 470, 113-117.
18. Nakanishi T, Takahashi K, Aoki C, Nishikawa K, Hattori T, Taniguchi S. 1994. Expression of nerve growth factor family neurotrophins in a mouse osteoblastic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 198, 891-897.
19. Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I. 1999. 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, 865-870.
20. Takeda K, Shiba H, Mizuno N, Hasegawa N, Mouri Y, Hirachi A, Yoshino H, Kawaguchi H, Kurihara H. 2005. Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng.* 11, 1618-1629.
 21. Takeda K, Sakai N, Shiba H, Nagahara T, Fujita T, Kajiya M, Iwata T, Matsuda S, Kawahara K, Kawaguchi H, Kurihara H. 2010. Characteristics of High Molecular Weight Hyaluronic Acid as a BDNF Scaffold in Periodontal Tissue Regeneration. *Tissue Eng.* 17 (7-8), 955-967.
 22. Kurihara H, Shinohara H, Yoshino H, Takeda K, Shiba H. 2003. Neurotrophins in cultured cells from periodontal tissue. *J. Periodontol.* 74, 76-84.
 23. Nosrat CA, Fried K, Lindskog S, Olson L. 1997. Cellular expression of neurotrophin mRNAs during tooth development. *Cell Tissue Res.* 290, 569-580.
 24. Furukawa Y, Furukawa S, Satoyoshi E, Hayashi K. 1984. Nerve growth factor secreted by mouse heart cells in culture. *J. Biol. Chem.* 259, 1259-1264.
 25. Otten U, Ehrhard P, Peck R. 1989. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 10059-10063.

26. MacGrogan D, Saint-Andre JP, Dicou E. 1992. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor genes in human tissues and in prostatic adenocarcinoma cell lines. *J. Neurochem.* 59, 1381-1391.
27. Yamashiro T, Fukunaga T, Yamashita K, Kobashi N, Yamamoto T. 2001. Gene and protein expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in bone and cartilage. *Bone* 28, 404-409.
28. Kajiya M, Shiba H, Fujita T, Ouhara K, Takeda K, Mizuno N, Kawaguchi H, Kitagawa M, Takata T, Tsuji K, Kurihara H. 2008. Brain-derived neurotrophic factor stimulates bone/cementum-related protein gene expression in cementoblasts. *J. Biol. Chem.* 283, 16259-16267.
29. Matsuda S, Fujita T, Kajiya M, Takeda K, Shiba H, Kawaguchi H, Kurihara H. 2011. Brain-derived neurotrophic factor induces migration of endothelial cells through a TrkB-ERK-Integrin α v β 3-FAK cascade. *J. Cell. Physiol.* 9999, 1-7.
30. Cho MI, Garant PR. 2000. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol.* 24, 9-27.
31. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjo UM. 2006. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000.* 41, 30-47.
32. Schor NF. 2005. The p75 neurotrophin receptor in human development and disease.

Prog neurobiol. 77, 201-214.

33. Khwaja F, Djakew D. 2003. Inhibition of cell-cycle effectors of proliferation in bladder tumor epithelial cells by the p75NTR tumor suppressor. *Mol Carcinog.* 36, 153-160.
34. Reichardt LF. 2006. Neurotrophin-regulated signaling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 361, 1545-1564.
35. Blochl A, Blochl R. 2007. A cell-biological model of p75NTR signaling. *J Neurochem.* 102, 289-305.
36. Barnabe-Heider F, Miller FD. 2003. Endogenously produced neurotrophins regulate survival and differentiation of cortical progenitors via distinct signaling pathways. *J Neurosci.* 23, 5149-5160.
37. Kawamura N, Kawamura K, Manabe M, Tanaka T. 2010. Inhibition of brain-derived neurotrophic factor/tyrosine kinase B signaling suppresses choriocarcinoma cell growth. *Endocrinology.* 151, 3006-3014.
38. Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okada H. 1997. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J periodontal Res.* 32, 667-675.

39. Takayama S, Murakami S, Shimabukuro Y, Kitamura M, Okada H. 2001. Periodontal regeneration by FGF-2 in primate models. *J Dent Res.* 80, 2075-2079.
40. Yanagita M, Kojima Y, Kubota M, Mori K, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. 2014. Cooperative effects of FGF-2 and VEGF-A in periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 93, 89-95.
41. Truzzi F, Marconi A, Atzei P, Panza MC, Lotti R, Dallaglio K, Tiberio R, Palazzo E, Vaschieri C, Pincelli C. 2011. p75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. *Cell Death Differ.* 18, 948-958.
42. Haeusgen W, Herdegen T, Waetzig V. 2011. MKK7gamma1 reverses nerve growth factor signals: proliferation and cell death instead of neuritogenesis and protection. *Cellular signaling.* 23, 1281-1290.
43. Jin H, Pan Y, Zhao L, Zhai H, Li X, Sun L, He L, Chen Y, Hong L, Du Y, Fan D. 2007. p75 neurotrophin receptor suppresses the proliferation of human gastric cancer cells. *Neoplasia.* 9, 471-478.
44. Do H, Park HJ, Sohn EH, Kim BO, Um SH, Kwak JH, Moon EY, Rhee DK, Pyo S. 2013. Ethanol induces cell cycle arrest and triggers apoptosis via Sp1-dependent p75NTR expression in human neuroblastoma cells. *Cell Biol Toxicol.* 29, 365-380.

45. Zaccaro MC, Ivanisevic L, Perez P, Meakin SO, Saragovi HU. 2001. p75 Co-receptors regulate ligand-dependent and ligand-independent Trk receptor activation, in part by altering Trk docking subdomains. *J Biol Chem.* 276, 31023-31029.
46. He XL, Garcia KC. 2004. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science.* 304, 870-875.
47. Wehrman T, He X, Raab B, Dukipatti A, Blau H, Garcia KC. 2007. Structural and mechanistic insights into nerve growth factor interactions with the TrkA and p75 receptors. *Neuron.* 53, 25-38.
48. Vesa J, Kruttgen A, Shooter EM. 2000. p75 reduces TrkB tyrosine autophosphorylation in response to brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 4/5. *J Biol Chem.* 275, 24414-24420.
49. Mikami Y, Suzuki S, Ishii Y, Watanabe N, Takahashi T, Isokawa K, Honda MJ. 2012. The p75 neurotrophin receptor regulates MC3T3-E1 osteoblastic differentiation. *Differentiation.* 84, 392-399.
50. Akiyama Y, Mikami Y, Watanabe E, Watanabe N, Toriumi T, Takahashi T, Komiyama K, Isokawa K, Shimizu N, Honda MJ. 2014. The p75 neurotrophin receptor regulates proliferation of the human MG63 osteoblast cell line. *Differentiation.* 87, 111-118.

51. Teare JA, Ramoshebi LN, Ripamonti U. 2008. Periodontal tissue regeneration by recombinant human transforming growth factor-beta 3 in *Pepio ursinus*. *J. Periodontal Res.* 43(1): 1-8.
52. Ripamonti U, Teare J, Petit JC. 2006. Pleiotropism of bone morphogenetic proteins: from bone induction to cementogenesis and periodontal ligament regeneration. *J. Int. Acad. Periodontal.* 8(1): 23-32.
53. Dereka Xe, Markopoulo CE, Vrotsos IA. 2006. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors.* 24(4): 260-267.
54. Sant'Ana AC, Marques MM, Barroso TE, Passanezi E, Rezende ML. 2007. Effects of TGF-beta 1, PDGF-BB, and IGF-1 on the rate of proliferation and adhesion of a periodontal ligament cell lineage in vitro. *J. periodontal.* 78(10): 2007-2017.
55. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H. 2003. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class 2 furcation defects created in beagle dogs. *J periodontal Res.* 38, 97-103.
56. Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, Fujii T, Shimauchi H, Sasano T, Furuuchi T, Fukuda M, Noguchi T, Shibutani T, Iwayama Y, Takashiba S, Kurihara H, Ninomiya M, Kido J, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Hara Y, Izumi Y, Hirofuji T, Imai E, Omae M, Watanuki M, Murakami S. 2008. Periodontal tissue regeneration

using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase 2 clinical trial. *PloS ONE*. 3, e2611.

57. Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okada H. 1997. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J periodontal Res*. 32, 667-675.

58. Takayama S, Yoshida J, Hirano H, Okada H, Murakami S. 2002. Effects of basic fibroblast growth factor on human gingival epithelial cells. *J Periodontal*. 73, 1467-1473.