

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 μ g/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- κ B 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。