

ヒト歯嚢由来細胞の骨形成能および骨芽細胞分化における PRGF の影響

日本大学大学院松戸歯学部研究科歯学専攻

岡田 仁恵

(指導：近藤 壽郎 教授)

Bone formation ability and effect of PRGF on osteogenic differentiation

of human dental follicle cells

Hitoe Okada

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo,

Department of Oral and Maxillofacial Surgery

## **ABSTRACT**

The dental follicle, which is an ectomesenchymal tissue surrounding developing tooth germ, contains stem cells and osteoblastic-lineage-committed progenitor cells. First, the capacity of human dental follicle cells (hDFCs) for bone formation was investigated *in vivo*. hDFCs were obtained from wisdom teeth extracted from patients aged 14 years. hDFCs obtained from the 5th to 8th passages were used in the experiments. Gelatin sponges containing  $\beta$ -tricalcium phosphate were used for three-dimensional (3D) culture. Then, hDFCs subjected to 3D culture osteogenic induced medium (OIM) without dexamethasone (DEX) or growth medium (GM) were transplanted onto the calvarias of F344/NJcl-rnu/rnu male rats (immunodeficient rats). Hematoxylin-eosin (H-E) staining showed newly formed bone. Result of immunohistochemistry showed BMP-2, Runx2 and Osterix positive cells in areas with newly formed bone. Furthermore, micro-CT showed that, in comparison to controls, transplanted hDFC promoted better bone quality and bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC) and bone

volume (BV). This suggests that human dental follicles are potentially useful for regenerative therapy.

Plasma Rich in Growth Factors (PRGF), which was prepared from autologous blood from the patient, had been reported in bone regeneration for dental implant. The aim of this study is to evaluate the effects of PRGF for osteogenic differentiation in human dental follicle cells (hDFCs). PRGF was prepared from whole blood centrifuging at 460 x g for 8 min. The platelet concentration in PRGF F2 was 2.14-fold higher than in whole blood. White blood cells were not detected in PRGF. Transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) levels were higher than insulin-like growth factor-1, platelet-derived growth factors-AB and -BB, and vascular endothelial growth factors in PRGF F2. hDFCs were cultured with GM or OIM containing PRGF or fetal bovine serum (FBS). Proliferation and migration of hDFCs increased in OIM supplemented with PRGF in a dose-dependent manner and were higher in hDFCs cultured in OIM with 10% PRGF compared with OIM with 10% FBS. PRGF up-regulated gene expression of type I collagen, osteomodulin, alkaline phosphatase, bone morphogenic protein-4, and TGF- $\beta$  in hDFCs. PRGF may promote bone regeneration. It may affect that PRGF include the high levels of growth factors.

In conclusion, these data suggest that the dental follicle is a potential cellular resource for basic research of osteogenic differentiation and bone regeneration therapy. PRGF included the high levels of growth factors, which may be the reason why PRGF promote bone regeneration.

## 緒言

歯嚢は、神経堤の外胚葉性間葉由来の結合組織であり、未分化間葉系幹細胞が存在し、ヒト歯嚢から分離したヒト歯嚢由来細胞 (human dental follicle cells: hDFCs) は、骨芽細胞分化誘導培地で培養すると石灰化することが報告されている<sup>1)</sup>。hDFCs は、骨芽細胞 / セメント芽細胞以外にも脂肪細胞や神経細胞にも分化すること、また、幹細胞マーカーである Notch-1, STRO-1 や間葉系細胞マーカーである CD29, CD44 などを発現していることから、骨髄由来のヒト未分化間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells from bone marrow; hMSCs) と類似した性質を有していると考えられる<sup>2)</sup>。従来、未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導する際には、骨芽細胞分化誘導培地中に dexamethasone (DEX) の添加が必要とされるが、hDFCs は in vitro にて DEX を含まない培地で培養しても石灰化することが報告されている<sup>3)</sup>。DEX は多様な作用を有するステロイドであり、再生医療では副作用、基礎研究では非特異的な作用の影響が出ることが心配される。また、hDFCs は、hMSCs と比べ、細胞増殖能が優れていると報告されている<sup>4)</sup>。さらに、歯嚢は歯科治療の過程で破棄される組織であるため、新たに生体侵襲を加えることなく採取することが可能である。そのため、歯

囊細胞は再生医療および基礎的研究用の体性幹細胞として有用ではないかと示唆されている。

近年、感染や宿主反応などの合併症の懸念が少ないことから、自己血から分離した血漿を再生医療に用いられるようになった。血小板を濃縮した血漿（濃縮血小板血漿）は血小板に含まれる様々な増殖因子を高濃度に含み、足場となるフィブリンを含むことから、軟組織や神経の損傷治癒促進に用いられるようになった<sup>1, 5, 6)</sup>。また、歯科領域では骨形成の促進や骨増生を図る目的で、インプラント周囲に埋入する臨床的試みがなされている<sup>7, 8)</sup>。濃縮血小板血漿には、Platelet-rich plasma (PRP), Plasma rich in growth factors (PRGF) などが存在する。臨床応用が進んでいる PRP においても、作製プロトコールが均一化されていないため<sup>9, 10)</sup>、骨形成能についての過去の報告の信頼性は必ずしも高いとは言えない。また、PRP には白血球が含まれているため、生体内で炎症性サイトカインが放出される可能性も否定できない<sup>11)</sup>。一方、PRGF は血小板の濃縮を調整するための方法や遠心分離機が規格・統一化されており<sup>12)</sup>、一回の遠心分離で血漿ならびに血小板成分のみを抽出することが可能で、白血球を含まない特徴を有している。PRGF は、骨形成や骨芽細胞分化促進に関与する TGF- $\beta$  及び VEGF のような増殖因子を高濃度に含むことが報告され、臨床的にも骨形成促進能が報告されている<sup>6)</sup>。しかし PRGF の骨形成に及ぼす影響を検討した基礎研究は少ない<sup>12)</sup>。

本研究では、まず hDFCs の体性幹細胞としての有用性を明らかにするために、DEX を含まない骨芽細胞分化誘導培地で3次元培養した hDFCs を、ラット頭頂骨上に移植し、骨形成

の様相を組織学的および免疫組織化学的に観察した。次に、PRGF の骨形成能を検討することを目的に、hDFCs の石灰化過程ならびに、骨芽細胞分化における PRGF の影響を検討した。

## 材料および方法

### I. hDFCs の骨形成能

#### 1. hDFCs の分離および培養

十分なインフォームドコンセントの得られた 14 才の患者から下顎埋伏智歯を抜去し、その歯冠に付着する歯嚢を分離採取した。歯嚢を PBS で洗浄し、血液成分を取り除いた後、メスを用いて細切し、0.1 U/ml collagenase type 1 と 1 U/ml dispase (Roche) を用いて 37°C で 1 時間酵素処理をして hDFCs を分離した。分離した歯嚢は増殖培地 (GM: Mesenchymal stem cell growth medium, Lonza) を用い、37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air 条件下で初代および継代培養を行った。GM の組成は、Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (Lonza) に MSCGM SingleQuots<sup>®</sup> (10% FBS: fetal bovine serum, L-glutamine, penicillin/streptomycin, Lonza) を加えたものとした。培地は 3 日ごとに交換した。本実験は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (承認番号: EC05-025, EC10-036) の指針に従って行った。

#### 2. hDFCs の三次元培養

β-TCP 強化型ゼラチンスポンジ (直径 3.0 mm×高さ 2.0 mm, pore size: 100-300 μm, MedGel) をスキャホールドとして用いた。5.0×10<sup>5</sup> cells/ml に調整した hDFCs 混濁液 25 μl を 96 well plate 内でスキャホールドに滴下、CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air 条件下) 内で 1 時間静置し、スキャホールドに hDFCs を定着させた。その後、GM または骨芽細胞分化誘導培地 (OIM: Mesenchymal stem cell osteogenic induced medium, Lonza) を 0.2 ml/well 加え、CO<sub>2</sub>

incubator 中で 4 日間培養した。OIM は Osteogenic Basal Medium (Lonza) に DEX を除いた Osteogenic SingleQuots<sup>®</sup> (FBS 10%, Ascorbate,  $\beta$ -glycerophosphate, L-glutamine, penicillin/streptomycin, Lonza) 加えたものとした [OIM (D-)]。121°C で 20 分間の高圧蒸気滅菌を行った内径 3.0 mm, 外径 4.0 mm, 高さ 2.0 mm の PTFE チューブに GM または OIM で 3 次元培養した hDFCs を, PTFE チューブ内に挿入した。

### 3. hDFCs のラット頭頂骨上への移植

hDFCs 移植実験には生後 9 週齢 F344/NJcl-rnu/rnu 雄性ラット(215±15 g, 日本クレア株式会社) 計 6 匹を用いた。GM 群 (GM で 3 次元培養した hDFCs を移植した群) と OIM (D-) 群 [OIM (D-) で 3 次元培養した hDFCs を移植した群] の 2 群 (各群 3 匹) に分けた。全ての工程はペントバルビタールナトリウム (25 mg/kg) を腹腔内投与し, 全身麻酔下で施工した。hDFCs を移植するラットの頭頂部を剃毛し, 頭頂骨側縁に沿って皮膚切開を行い, 皮下組織は解剖鉗を用いて剥離・挙上した。上皮・皮下組織および骨膜を挙上した。頭頂骨面と骨膜の間に hDFCs を含むスキャホールドが内部に挿入された PTFE チューブを埋入し, 骨膜をナイロン糸で縫合し, 続いて創部皮膚を縫合閉鎖した (Fig. 1)。観察期間は, 各群いずれも 28 日間とした。本実験は日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認 (承認番号: AP10-MD001) に従って行った。





Figure 1. hDFCs were cultured with 3D in vitro, then the cells transplanted onto the rat calvarial bone. Then, skin flap was closed.

#### 4. Micro-CT による解析

ラット頭頂骨上に PTFE チューブを設置した各群における新生骨量を Micro-CT を用いて定量的に骨梁構造計測をした。ラットをペントバルビタールによる全身麻酔後、頭頂骨上の PTFE チューブ埋入部を Micro-CT (R-mCT<sup>®</sup>, Rigaku Corporation) を用い撮影した。hDFCs 移植実験の撮影条件は、管電圧 90 kv, 管電流 88  $\mu$ A, 撮影倍率 10 倍, 撮影時間 17 秒で 360 度回転し撮影した。撮影は移植後 28 日目で行った。画像のボクセル解像度は  $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$  で、三次元骨梁構造計測ソフト TRI/3D-Bon (Ratoc System engineering) を用いて処理し、骨の微小構造を観察した。

形成された新生骨を定量的に評価するために、骨量 (BV,  $\text{cm}^3$ ) および骨塩量 (BMC, mg) を計測した。骨梁体積率 (BV/TV, %), BMC/TV と骨密度 (BMD=BMC/BV,  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) は BV, BMC およびチューブ内部の総体積 (TV,  $\text{cm}^3$ ) から算出した。

## 5. 組織学的観察

ラットの安楽死は、各群とも移植時と同様の手法で全身麻酔後、心臓よりヘパリン含有生理食塩水を灌流、脱血させた後 10%中性ホルマリン水溶液にて灌流固定を行い、PTFE チューブを含む頭頂骨を一塊に摘出した。10%中性ホルマリン水溶液に 3 日間室温下で浸漬した後、10%EDTA で 2 週間脱灰、その後矢状断に切断しパラフィン包埋を行い、厚さ 4  $\mu\text{m}$  で薄切した。切片は通法に従い hematoxylin-eosin (H-E) 染色を施し観察した。

## 6. 免疫組織化学的観察

全群の頭頂骨切片に対して免疫組織化学染色を行った。一次抗体は骨芽細胞分化について検索する目的で、マウス monoclonal 抗 BMP-2 抗体 (65529.111; 1:500; Abcam), ラビット polyclonal 抗 RUNX2 抗体 (1: 500; Abcam), ラビット polyclonal 抗 Osterix 抗体 (1: 500; Abcam) およびラビット polyclonal 抗 VEGF-A20 (1: 50; Santa Cruz) を用いた。各切片は、脱パラフィン後、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を用い、温浴法で 95°C, 40 分間加熱処理し賦活化させ、室温下で一次抗体を 12 時間反応させた。一次抗体反応後、内因性ペルオキシターゼ反応防止のため、3%過酸化水素エタノールに 15 分間反応させた。さらに PBS で洗淨後、二次抗体として ChemMate ENVISION kit/HRP (Dako) を使用し、プロトコールに従って処理した。各切片は PBS で洗淨し、diaminobenzidine (DAB) (Merck) にて 3 分間発色後、マイヤーヘマトキシリン水溶液で対比染色を行い観察した。各抗原に対する陽性対照として、正常な骨の組織切片を用いた。陰性対照として 1 次抗体を用いずに二次抗体を作用させた。

## II. hDFCs に対する PRGF の影響

### 1. PRGF の作製方法

十分なインフォームドコンセントの得られた健常ボランティアから、抗凝固剤 3.8%クエン酸ナトリウム入りの真空採血管を用いて静脈より血液を 5 ml 採取した。採取した血液は、BTI System IV遠心分離™ (BTI Biotechnology Institute) を用いて、室温下に 8 分間、 $460\times g$  で遠心分離を行い PRGF を採取した。分離した血液成分のうち、白血球層より約 1.0 ml 上方の血漿成分を PRGF F2 とし、PRGF F2 より上方の層を PRGF F1 として分画した。分画した PRGF F2 1000  $\mu$ l に対し、10%塩化カルシウム (PRGF-Endoret™ Activator, BTI Biotechnology Institute) を 50  $\mu$ l を加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートし、ゲル状のフィブリンクロットを作製した。作製したクロットを  $4^{\circ}\text{C}$ 、10 分間、 $4500\times g$  で遠心分離を行い、上清を採取した。本実験は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (承認番号: EC14-13-029-1) の指針に従って行った。

### 2. 血清の作製方法

健常ボランティアから、真空採血管を用いて静脈より血液を 5 ml 採取した。採取した血液を室温下に 30 分間放置し、 $1000\times g$  で 15 分間遠心分離を行い血清を分離した。

### 3. 血球数測定

血小板および白血球数は多項目自動血球分析装置 XE-2100 (Sysmex, Hyogo, Japan) を用いて測定した。

#### 4. ELISA

血清, PRGF F1, PRGF F2, PRGF F2 上清の PDGF, TGF- $\beta$ , IGF-1 量は Quantikine™ ELISA kit (R&D System) を用いて測定した.

#### 5. PRGF の hDFCs への影響

hDFCs を播種し, 24 時間後に Osteogenic Basal Medium (Lonza) に FBS, DEX を除いた Osteogenic Single Quots<sup>®</sup> (Ascorbate,  $\beta$ -glycerophosphate, L-glutamine, penicillin/streptomycin, Lonza) を加えたものに, PRGF F2 上清を添加した培地 [OIM (D-) -PRGF] に交換した. PRGF F2 上清は4名のボランティアの物を等量混和したものを使用した. 変更した日を培養 0 日目とし, 翌日を培養 1 日目とした. 対照として Osteogenic Basal Medium (Lonza) に DEX を除いた Osteogenic Single Quots<sup>®</sup> (FBS 10%, Ascorbate,  $\beta$ -glycerophosphate, L-glutamine, penicillin/streptomycin, Lonza) を加えた培地 [OIM (D-) -FBS] とした.

#### 6. 細胞数測定

24 well plate に hDFCs を  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し, GM, OIM (D-) -FBS または OIM (D-) -PRGF で 2, 3 日間培養した. 細胞数は Z1 Counter Particle Counter (Beckman) を用いて測定した.

#### 7. 細胞遊走

24 well plate に hDFCs を  $1 \times 10^4$  cells/well で播種し, GM で 80%コンフルエントまで CO<sub>2</sub> Incubator (5% CO<sub>2</sub> in air, 37°C) で培養した. その後, CELL Scratcher™ でスクラッチし, GM,

OIM (D-) -FBS (10%) または OIM (D-) -PRGF (1, 5, 10, 20%)で 72 時間培養後、細胞遊走能を観察した。遊走した細胞は、Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて画像を二値化し、任意に 3 箇所 1 mm×1 mm サイズで測定した。全体の面積に対する細胞の面積の割合を測定した。

## 8. Total RNA の抽出

hDFCs を 60 mm dish に  $1.2 \times 10^5$  cells/dish で播種した。OIM (D-) -FBS (10%) または OIM (D-) -PRGF (10%) で培養した培養 0, 3, 7 日目の hDFCs から miRNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。

## 9. Real-time PCR

GeneAmp RNA PCR kit (Life Technologies) の付属である MnLV RT を用いて、total RNA から cDNA を作製した。cDNA 溶液 2  $\mu$ l, 上流および下流の Primer (20  $\mu$ M) を各 0.4  $\mu$ l, DyNAmo SYBR Green qPCR Master mix (Thermo Fisher Scientific) を 10  $\mu$ l, 滅菌精製水を 7.2  $\mu$ l を加えて全量を 20  $\mu$ l とし、PCR 反応溶液を作製した。DNA Engine Opticon 1 (Bio Rad) にて、95°C で 5 分間加熱後、95°C 15 秒、55°C 30 秒、70°C 30 秒を 40 サイクル行い DNA を増幅し、SYBR Green による蛍光強度をモニターした。GAPDH をコントロールとして  $\Delta\Delta$ CT 法を用いて計算した。PCR 法にて使用した primer は Table.1 に示す。

Table 1 Primers used in Real – time PCR

Gene	Primers	bp
Coll $\alpha$ 1	F: 5'- ggc caa gag gaa ggc caa gt- 3' R: 5'- tgg tcg gtg ggt gac tct ga- 3'	251
OMD	F: 5'- cat ctt ctt ctg ctt ccc tca- 3' R: 5'- gtc aaa gtg ccc ttc tgc tc- 3'	123
ALP	F: 5'- gtc atc atg ttc ctg gga ga- 3' R: 5'- gaa ggg gaa ctt gtc cat ct- 3'	123
BMP-2	F: 5'- cat gtg gac gct ctt tca at - 3' R: 5'- gaa gca gca acg cta gaa ga - 3'	113
BMP-4	F: 5'- gct agg agc cat tcc gta gt - 3' R: 5'- cct agc agg act tgg cat aa - 3'	193
GAPDH	F: 5'- atc acc atc ttc cag gag- 3' R: 5'- atg gac tgt ggt cat gag- 3'	315

## 10. 統計的解析

統計解析は、*t*-検定を用いて行った。

## 結果

### I. hDFCs の骨形成能

#### 1. Micro-CT による解析

hDFCs 移植後 28 日目において Micro-CT 画像分析から、BMD 値を疑似カラー3D 画像表示した。GM 群および OIM (D-) 群ともに頭頂骨側から新生骨形成を認めた(Fig. 3A, B)。GM 群と比較して、OIM (D-) 群はより多くの新生骨形成を認めた (Fig. 3B)。骨梁構造計測において OIM (D-) 群は GM 群と比較して、BMD、BMC および BV など全てにおいて高値を示した (Fig. 4)。

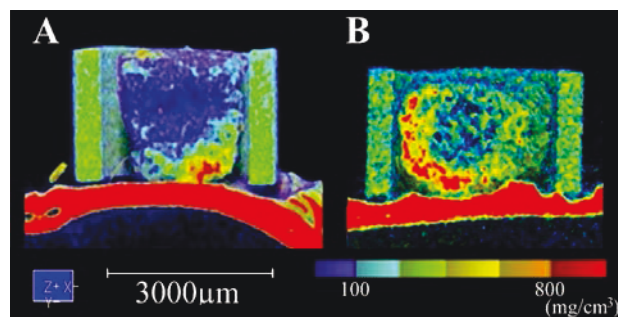


Figure 3. Color images showing bone mineral density by TRI/3D-BON; A small amount of newly formed bone was seen on the inner side of the PTFE tube in the GM group at 28 days after surgery (A). New bone formation had progressed into the PTFE tube in the OIM (D-) group (B). Bar =3000 μm

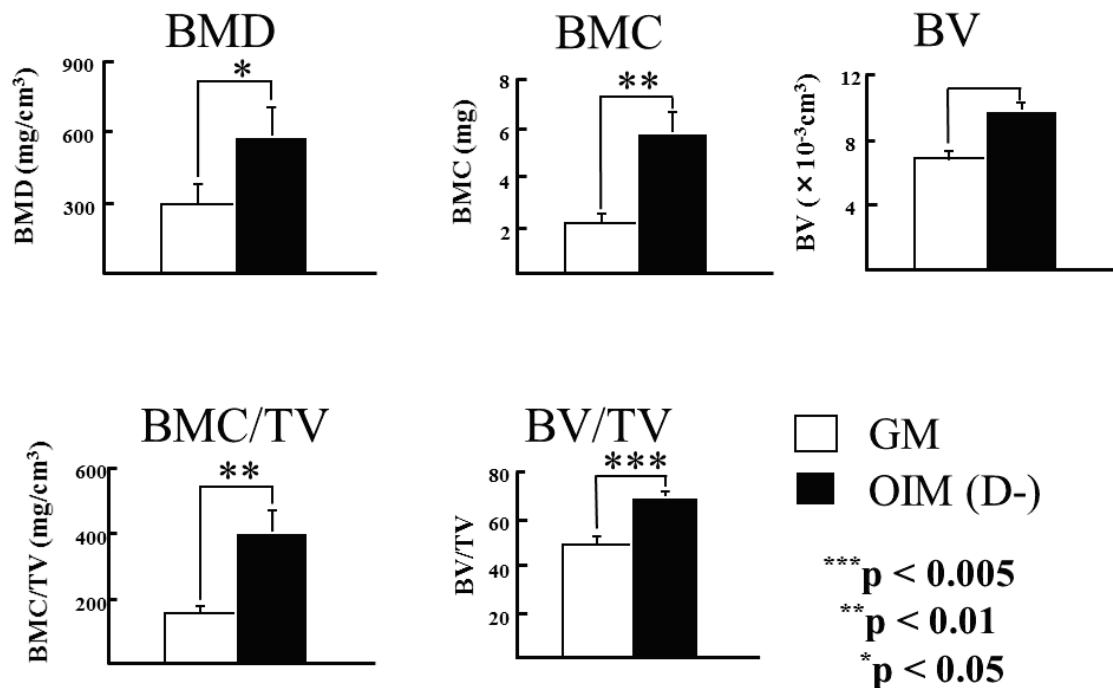


Figure 4. Micro-CT analysis; Quantitative measurement of bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC), bone volume (BV), BMC/total volume (BMC/TV), and BV/TV. Columns represent means  $\pm$  standard deviation. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.005.

## 2. 組織学的所見

スキャホールドを用いて三次元培養したhDFCsをPTFEチューブに挿入し、頭頂骨上に移植した。移植後28日目に両群ともに新生骨が観察された。OIM (D-) 群は、GM群と比較して、スキャホールド内に広範囲の新生骨が形成された。新生骨周囲の結合組織には多数の紡錘形の細胞が認められ、新生骨辺縁には骨芽細胞の配列が観察された (Fig. 2)。



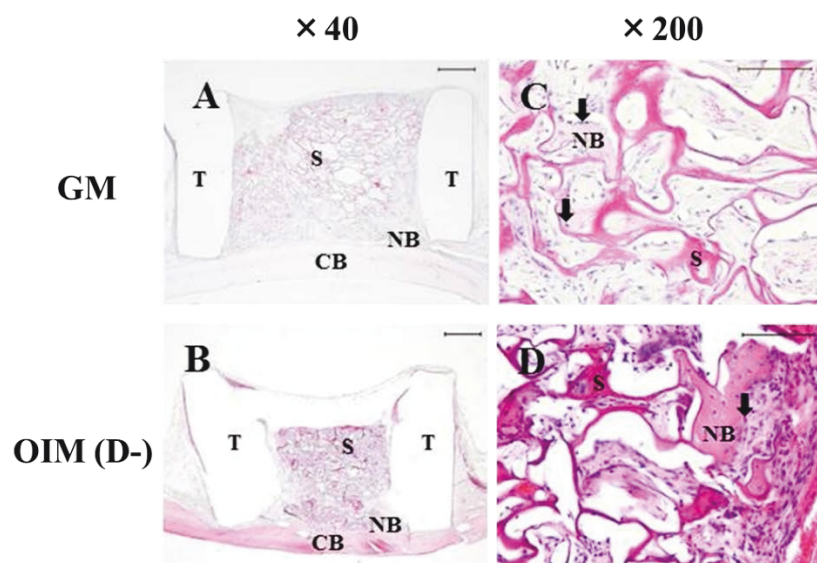


Figure2. Histological findings with H-E staining; New bone formation was observed at 28 days after surgery.

Higher magnification images of A, B ( $\times 40$ ) are shown in C, D ( $\times 200$ ), respectively.

(A, B): Bars =500  $\mu\text{m}$ , (C, D): Bars = 100 $\mu\text{m}$  (NB: new bone; CB: calvarias bone; S: scaffold; T: tube; black arrows: osteoblast).

### 3. 免疫組織化学的所見

hDFCs 移植後 28 日目の免疫組織化学染色において、BMP-2, Runx2, および Osterix は両群ともに、結合組織内の新生骨辺縁に配列した骨芽細胞で陽性反応が観察された。両群ともに、VEGF は血管内皮細胞および新生骨の辺縁に配列した骨芽細胞において陽性所見を認めた (Fig. 5).

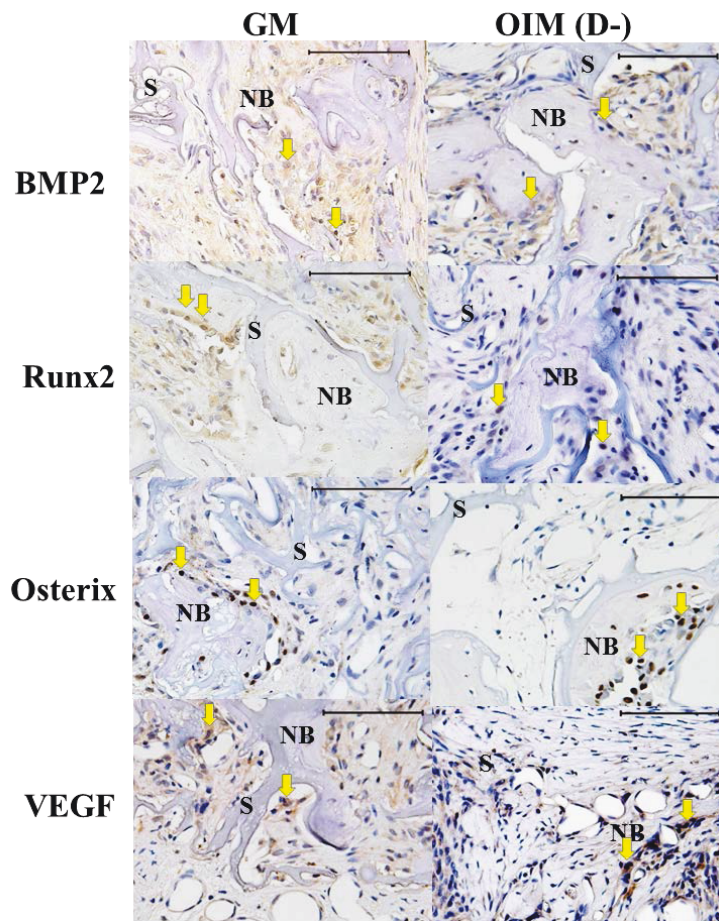


Figure 5. Immunohistochemical staining; BMP2, Runx2, Osterix and VEGF at 28 days after surgery ( $\times 400$ ). Bars = 100  $\mu\text{m}$ , (NB: new bone; S: scaffold). Arrowa indicate to positive reactions.

## II. PRGF の効果

### 1. PRGF の特徴

まず初めに、4名のボランティアから採血を行った。一部を全血とし分取後、残りの全血から PRGF を作製した。PRGF の特徴またはボランティア間による差の検討を行った。

#### 1) PRGF の血球数

4名のボランティアから得た全血、血清および PRGF 中の血小板および白血球数を測定した。血小板数は全血と比べ、PRGF F2 は  $2.14 \pm 0.10$  倍、PRGF F1 は  $0.59 \pm 0.19$  倍含んでいた。PRGF、血清は白血球を含んでいなかった。全血および PRGF の血小板数は、ボランティアによって個体差を認めた (Table. 2)。

Table 2 Numbers of blood cells

	Platelets ( $\times 10^4$ cells / $\mu$ l)				WBCs (cells / $\mu$ l)			
	WB	Serum	F1 (Fold)	F2 (Fold)	WB	Serum	F1	F2
Volunteer1	19.7	0.0	16.2 (0.8)	39.9 (2.0)	3870.0	0.0	0.0	0.0
Volunteer2	25.1	0.0	12.3 (0.5)	55.8 (2.2)	3410.0	0.0	0.0	0.0
Volunteer3	14.4	0.0	10.6 (0.7)	32.4 (2.3)	3850.0	0.0	0.0	0.0
Volunteer4	26.2	0.0	8.7 (0.3)	54.0 (2.1)	5510.0	0.0	0.0	0.0

WB; Whole blood, F1; PRGF F1 fraction, F2; PRGF F2 fraction, Fold; Number of F1 or F2 / number of WB, WBCs; White blood cells,

#### 2) PRGF の増殖因子濃度

血清、PRGF F1、PRGF F2 中の増殖因子濃度を測定した。今回は骨形成に関与すると示唆されている IGF-1, TGF- $\beta$ , PDGF-AB, -BB, VEGF の 5 種類について測定した。

IGF-1 濃度は、血清、PRGF F1、PRGF F2 で大きな差は認められなかった。TGF- $\beta$  濃度は PRGF F1、血清と比べて PRGF F2 は高値を示した。PDGF-AB、-BB、VEGF 濃度は、PRGF F2 および血清に比べ PRGF F1 は低い値であった。PRGF、血清の増殖因子濃度は、ボランティアによって個体差を認めた (Fig. 6)。血小板数の多いボランティアは、増殖因子濃度が高い傾向を認めた。

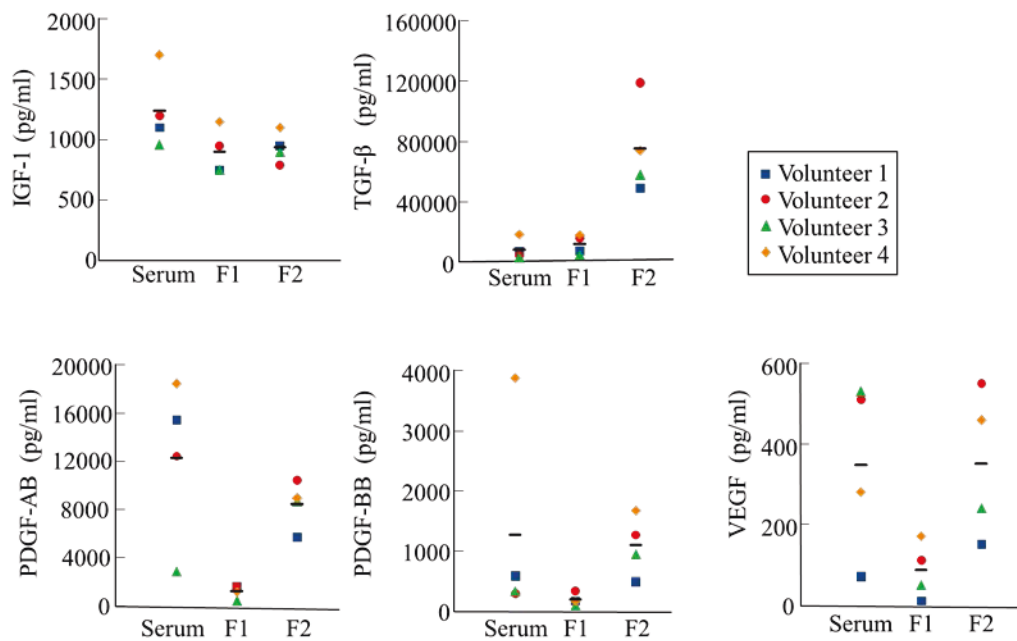


Figure 6. The concentration of growth factors in serum and PRGF fractions. Serum and PRGF were prepared from four healthy volunteers. Growth factor concentrations are expressed as the means  $\pm$  SD. F1, PRGF F1 fraction; F2, PR fraction. Bar indicates the mean value.

## 2. hDFCs に対する PRGF の効果

hDFCs に対する PRGF の液性因子の影響を調べるため、PRGF F2 に塩化カルシウムを加えて、PRGF クロットを作製後、遠心分離を行い PRGF F2 上清を作製した。OIM に添加する FBS [OIM (D-) -FBS] の代わりに、PRGF F2 上清 [OIM (D-) -PRGF] を添加した。

## 1) 細胞増殖に対する PRGF の影響

GM, OIM (D-) -FBS (10%) または OIM (D-) -PRGF (1, 5, 10, 20%) で 2, 3 日間培養し, 細胞数を測定した. hDFCs の細胞数は, PRGF の濃度依存的に増加した. 培養 3 日目において OIM (D-) -PRGF (10, 20%) は, OIM (D-) -FBS (10%) と比較し細胞数が有意に増加していた. また, OIM (D-) -PRGF (5%) と OIM (D-) -FBS (10%) では細胞数は同程度であった (Fig. 7).

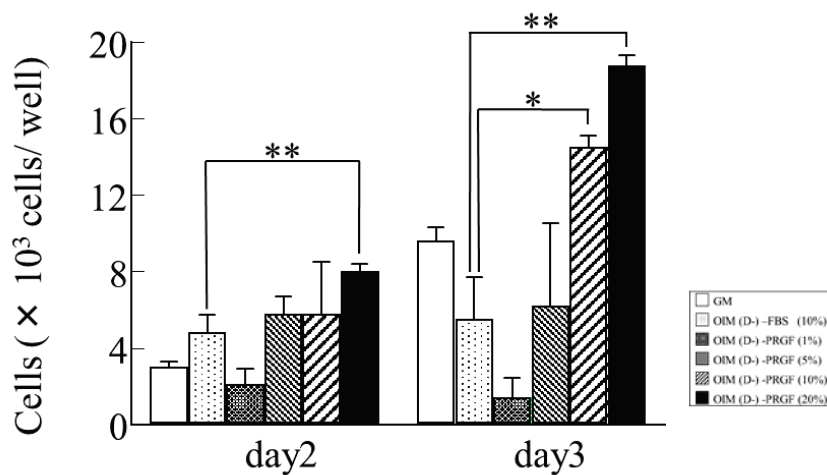
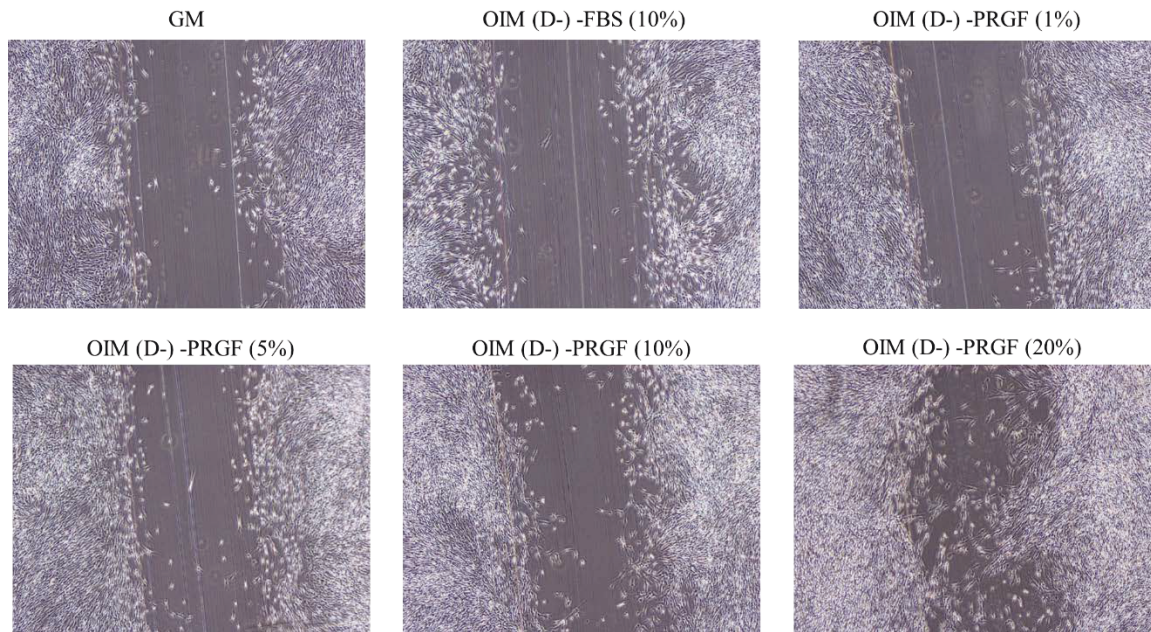


Figure 7. Effect of PRGF on hDFCs proliferation. hDFCs were cultured in GM, OIM (D-) supplemented with 10% FBS, or OIM (D-) supplemented with the indicated PRGF concentrations for 2 or 3 days. Values represent the means  $\pm$  SD. \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$ .

## 2) 細胞遊走に対する PRGF の影響

hDFCs を GM, OIM (D-) -FBS (10%) または OIM (D-) -PRGF (1, 5, 10, 20%) を用いて, 72 時間培養したところ, OIM (D-) -PRGF (20%) は他と比較し, 遊走している細胞を多く認めた. また OIM (D-) -PRGF (10%) は OIM (D-) -FBS (10%) と比較すると, 遊走している細胞を多く認めた (Fig. 8A, B).

A



B

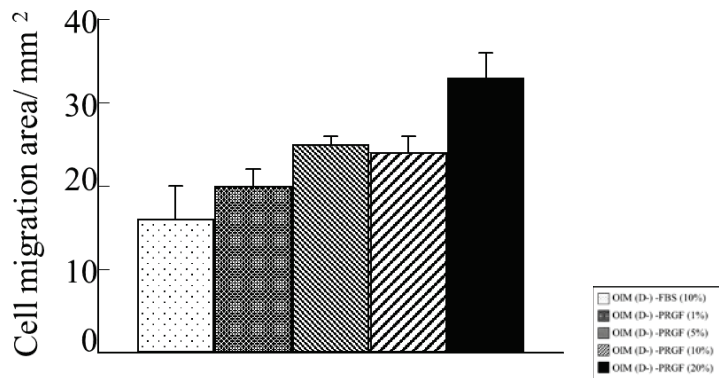


Figure 8. Effect of PRGF on migration of hDFCs. hDFCs were cultured in GM, OIM (D-) supplemented with 10% FBS, or OIM (D-) supplemented with the indicated PRGF concentrations for 3 days. A) Phase-contrast microscopy shows hDFCs migration. B) Quantitation of cell migration using Image J Software. Values represent the means  $\pm$  SD.

### 3) 骨形成関連の遺伝子発現に対する PRGF の影響

hDFCs を OIM (D-) -FBS (10%) または OIM (D-) -PRGF (10%) で培養し、骨形成関連遺伝子の経時的遺伝子発現量を検討した。BMP4 は培養 3 日目に、TGF- $\beta$  は培養 7 日目で

OIM (D-) -PRGF による培養で上昇を認めた。BMP2 は上昇傾向を示したが、有意差は認められなかった。OMD, Col1a1, ALP の遺伝子発現量は、培養 3, 7 日目において OIM (D-) -FBS で培養した時に比べ、OIM (D-) -PRGF で培養した hDFCs で上昇を認めた (Fig. 9).

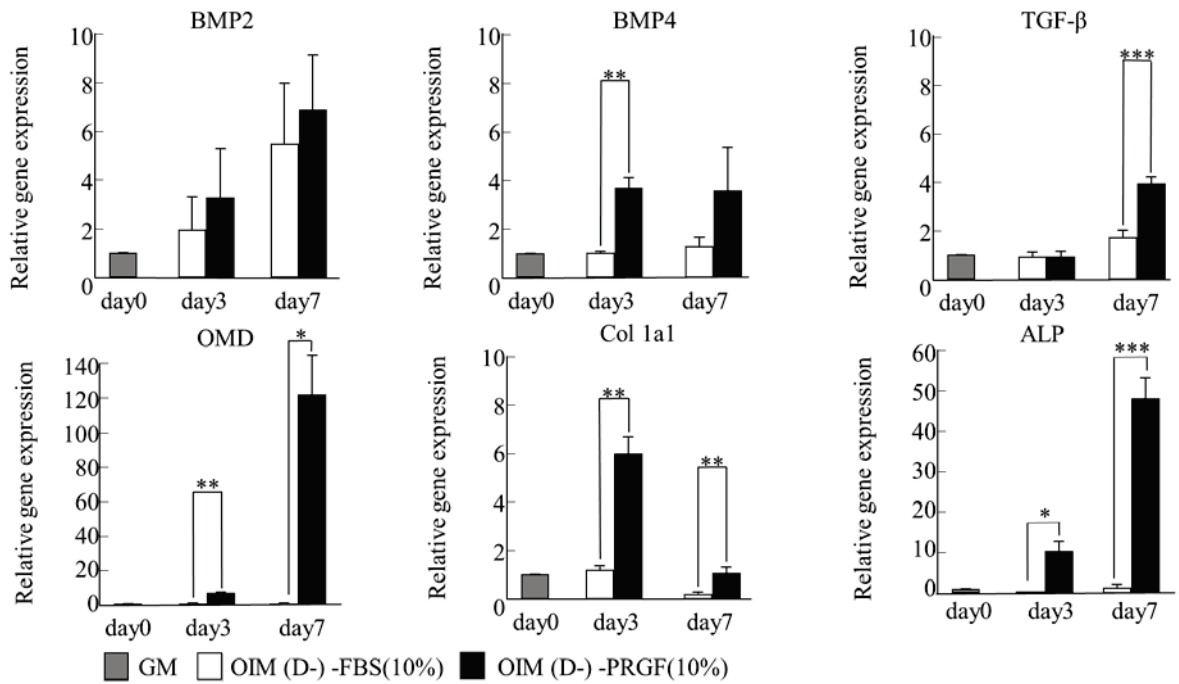


Figure 9. Gene expression of , BMPs, TGF-β, OMD, Col 1a1, and ALP in hDFCs. hDFCs were cultured in GM. OIM (D-) supplemented with 10% FBS, or OIM (D-) supplemented with the indicated PRGF concentrations for 3 or 7 days. The gene expression was examined by real time PCR. Value represent the means ± SD of the result from three independent experiment. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.005 compared to culture day .

### 3. PRGF F2 と PRGF F2 上清の増殖因子濃度

PRGF F2 と PRGF F2 上清の増殖因子濃度を比較した。PRGF F2 上清は PRGF F2 と比較し、PDGF-AB, PDGF-BB, VEGF は約 1/2 の濃度, TGF-β は約 1/10 の濃度であった。IGF-1 は PRGF F2 上清が 1.2 倍であった (Table. 3).

Table 3 Levels of growth factors

Growth factors (pg/ml)	F2	F2 supernatant	Average F2 supernatant / Average F2 (Fold)
IGF-1	935.0±128.7	1087.5±209.0	1.2
TGF-β	75000.0±31102.0	10850.0±2820.8	0.1
PDGF-AB	8000.0±1990.0	5050.0±1497.8	0.6
PDGF-BB	1025.0±499.4	397.5±233.9	0.4
VEGF	340.0±186.4	142.5±110.3	0.4

IGF; insulin like growth factor, TGF; transforming growth factor, PDGF; platelet derived growth factor, VEGF; vascular endothelial growth factor, F2; PRGF F2 fraction, F2 supernatant; property of F2 supernatant was described in material and methods.



## 考察

本研究では、まず hDFCs の骨再生医療応用への可能性を検討することを目的に、OIM (D-) で培養した hDFCs をラット頭頂骨上へ移植した。通常、未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導する場合、DEX を培地中へ添加する。しかし、DEX は、I 型コラーゲンの発現を低下させ骨基質形成を抑制することが報告され<sup>13)</sup>、さらに DEX が長期投与されることにより、骨粗鬆症発症が増加することが報告されている<sup>14)</sup>。加えて DEX は、骨芽細胞の増殖抑制、骨芽細胞のアポトーシスの誘導、および破骨細胞数の増加により骨吸収を促進するとされている<sup>15)</sup>。それらのことから、骨再生医療において DEX の添加は避けることが望ましいと考えられる。hDFCs は *in vitro* において、OIM (D-) で培養しても石灰化することが確認されている<sup>3)</sup>。前骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞は、DEX を含まない培地で培養しても骨芽細胞へ分化すると報告されていることから<sup>16)</sup>、hDFCs には、未分化間葉系幹細胞のみならず、前骨芽細胞様細胞も存在する可能性が示唆されている<sup>3)</sup>。

本研究では、ラット頭頂骨に 3 次元培養した hDFCs を移植し、骨形成について検討を行った。Micro-CT による骨梁構造計測の結果から、OIM (D-) 群は GM 群と比較して、BMC、BMD、BV、BMC/TV および BV/TV のいずれにおいても高値を示していた。臨床的に骨粗鬆症患者の健康状態を評価する基準である BMD および BV が高値を示したことから<sup>17)</sup>、OIM (D-) で培養した hDFCs を移植すると、骨量も多く、より成熟した新生骨が形成されることが示唆された。

また、組織学的検討を行った結果、hDFCs 移植後 28 日目に OIM (D-) 群は GM 群と比較し

て、より多くの新生骨形成を認めた。また新生骨周囲には、多数の紡錘形の細胞および骨芽細胞の配列が観察された。よって、GM で培養した hDFCs よりも OIM (D-) で培養した hDFCs の方が、新生骨形成能が優れている可能性が示唆された。

免疫組織化学的観察では、新生骨辺縁部の骨芽細胞に BMP2, Runx2 および Osterix 陽性所見を認めた。BMP2 は未分化間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促すことが報告されている<sup>18)</sup>。Runx2 と Osterix は骨芽細胞の分化に必須の転写因子として知られている<sup>19,20)</sup>。VEGF は血管新生を促進することで、骨形成および骨修復に関与すること<sup>21)</sup>、また、内因性 VEGF の作用を遮断すると骨形成を阻害されることが報告されている<sup>22)</sup>。hDFCs は OIM (D-) で培養しても石灰化することが報告されており<sup>3)</sup>、さらに本研究の結果から、生体内に移植すると新生骨形成を促進することが明らかとなった。よって歯嚢細胞は骨再生医療用細胞として有用であると考えられた。

次に、本研究では、hDFCs を用いて濃縮血小板血漿である PRGF について骨芽細胞分化への影響を検討した。濃縮血小板血漿は自己血から精製される自家移植材料であり、免疫反応を生じる可能性が低く、再生医療で注目されている<sup>23)</sup>。

まず、4 人のボランティアから分離した PRGF の性質の検討を目的に、PRGF 中の血小板数および白血球数を測定した。血小板数では個体差が認められた。全血中の血小板数の多いボランティアは PRGF F2 中の血小板数も多い傾向を示した。また全血と比較して PRGF F2 では  $2.14 \pm 0.10$  倍、PRGF F1 では  $0.59 \pm 0.19$  倍の血小板を含んでいた。従来の報告と同様に

PRGF F1, PRGF F2ともに白血球を含んでいなかった<sup>12)</sup>. PRGFは白血球を含まないことから、代表的な濃縮血小板血漿である PRP に比べ炎症反応や細胞障害を起こしにくいと考えられている<sup>24)</sup>.

骨形成や骨芽細胞分化促進に関与すると言われていた増殖因子、IGF-1, TGF- $\beta$ , PDGF-AB, PDGF-BB および VEGF について PRGF 中の濃度を測定した. 各増殖因子濃度も、4人のボランティア間で個体差が認められ、血小板数の多いボランティアでは増殖因子濃度も高い傾向が認められた. TGF- $\beta$  は PRGF F2 で、血清および PRGF F1 と比較して高値を示した. TGF- $\beta$  は hMSCs から軟骨細胞や骨芽細胞への分化を促進することによって骨修復を促進するといわれている<sup>25)</sup>. PDGF-AB, -BB および VEGF は PRGF F1 に比べ PRGF F2 で高い値を示した. また IGF-1 は血清が最も高く、PRGF F1 と PRGF F2 で同様の値であった. PDGF は hMSCs の分裂や遊走能を亢進させることによって仮骨形成を促進すること<sup>26)</sup>, IGF は骨基質中に存在する増殖因子で、細胞増殖や軟骨細胞への分化を促進することが報告されている<sup>27)</sup>. VEGF は血管新生因子で、軟骨内骨化において重要である<sup>22)</sup>. これらの増殖因子を含む PRGF は骨芽細胞分化促進や骨形成に有用ではないかと示唆された. そこで、hDFCs の骨芽細胞分化への PRGF F2 の影響を調べることにした.

PRGF F2 中に増殖因子等の液性因子の他、スキャホールドとして働くフィブリンも含まれている. 実験では PRGF F2 のフィブリンを除いた増殖因子等を含む液性因子についての影響を調べることにした. そこで、PRGF F2 クロットを遠心分離し上清を採取し、OIM の

FBSの代わりにPRGF F2上清を添加し、OIM (D-) -FBSとOIM (D-) -PRGFの間で細胞増殖および遊走について測定した。その結果PRGFの液性因子は、hDFCsの細胞増殖および遊走能を亢進させることが明らかになった。

さらに、hDFCsをOIM (D-) -PRGF (10%) または、OIM (D-) -FBS (10%) で培養した時の、骨形成関連遺伝子であるBMP2, BMP4, TGF- $\beta$ , OMD, Colla1  $\alpha$ 1 鎖, およびALPの遺伝子発現を調べた。BMPとTGF- $\beta$ は骨基質中に存在し、BMP2, BMP4は幹細胞の骨芽細胞分化に関与し<sup>28,29)</sup>、TGF- $\beta$ は骨芽細胞前駆細胞の増殖を促進することによって骨のモデリング、リモデリングに重要な因子である<sup>30)</sup>。本研究において、OIM (D-) -FBS培養に比べOIM (D-) -PRGFで培養すると、培養3日でBMP4、培養7日目でTGF- $\beta$ の遺伝子発現量が上昇していた。また、BMP2は有意差を認めないが上昇傾向を認めた。骨芽細胞様細胞や歯根膜細胞はエナメルマトリックスと培養すると、TGF- $\beta$ が上昇すると言われている<sup>31)</sup>。よって、TGF- $\beta$ の発現が培養7日目に上昇したのはhDFCsのType I collagenやOMD発現上昇と関連があるのかもしれない。OMDおよびColla1の遺伝子発現は培養3,7日ともOIM (D-) -PRGFで上昇を認めた。OMDは別名をosteoaderinといい、small leucine rich proteoglycan familyに属する小分子の細胞外基質で、特に骨基質や象牙質といった硬組織中で大量に検出され、ミネラル沈着に関与しているのではないかと示唆されている<sup>32)</sup>。Colla1はType I collagenの $\alpha$ 1鎖であり、前骨芽細胞から成熟骨芽細胞に分化する際に発現する。Type I collagenは骨の主要な細胞外基質であり、TGF- $\beta$ によって発現上昇する。PRGFはType I collagen, OMDといった

骨基質を上昇させることにより、骨治癒を促進する可能性が示唆された。

ALP は前骨芽細胞から成熟骨芽細胞に分化する時の初期マーカーと言われている。本研究では培養 3, 7 日ともに OIM-PRGF は OIM-FBS に比べ発現上昇した。通常, hDFCs を OIM (D-) -FBS で培養を行うと培養 7 日目程度から ALP の、発現量が上昇する。今回も OIM (D-) -FBS で培養では 7 日目から ALP 発現の上昇が認められた。一方 OIM (D-) -PRGF で培養を行ったところ、培養 3 日目から ALP 発現の上昇を認めた。これは PRGF により hDFCs が早期に骨芽細胞分化したことが示唆された。PRGF は、骨基質や骨形成因子を上昇させることにより骨再生を促進される可能性が示唆された。

また, OIM (D-) -FBS に比べ OIM (D-) -PRGF に hDFCs の骨芽細胞分化を促進させたが、実験に用いたのは PRGF F2 の上清である。そこで PRGF F2 とその上清では増殖因子濃度で差があるか調べた。PRGF F2 と PRGF F2 上清について増殖因子を調べた。その結果, IGF-1 濃度は PRGF F2 とその上清で差は認められ無かったが、他の増殖因子の濃度は, PRGF F2 上清で低下した。これはフィブリンに増殖因子が接着する為と考えられた。以前の研究で, IGF-1 はフィブリンに結合しないと報告されている<sup>33)</sup>。また TGF- $\beta$  はフィブリンとの親和性が高く、PDGF はフィブリンと結合はするものの、親和性が弱くすぐに放出されると報告されている。本研究の結果はこれらの報告を反映していると示唆される。今後は、PRGF の液性因子についてだけでなく、スキャホールドとしてフィブリンを含んだ PRGF による hDFCs の 3 次元培養系を確立して、骨芽細胞分化への影響を調べる必要があると考える。

PRGF は患者の血液から作製可能であり, PRGF に含まれる増殖因子により hDFCs の細胞増殖が促進したことにより骨芽細胞分化が促進されたと示唆された.

最後に, hDFCs は DEX 非依存下でも石灰化し, 骨形成促進作用を有すること, 顎顔面領域や歯胚の発生に関与するといわれている LIM homeobox 8 を高発現していることから<sup>3)</sup>, 顎骨等の顎顔面領域における骨再生医療応用に, また骨芽細胞分化機序研究に有用と考えられる. また PRGF は, 骨再生医療において増殖因子を含む材料として有用であることが示唆された.

## 結語

本研究では、hDFCs の骨再生医療応用を視野に入れ、OIM (D-) で三次元培養した hDFCs をラット生体内へ移植した時の新生骨形成能の検討を行うとともに、患者から採取可能な濃縮血小板血漿の PRGF の hDFCs への骨芽細胞分化への影響の検討を行った。結果は次の通りである。

1. hDFCs をラット頭頂骨上へ移植すると、組織学的所見にて移植後 28 日目において両群ともに新生骨を認めたが、OIM (D-) 群は GM 群と比較して、広範囲に新生骨の形成が観察された。

2. hDFCs 移植後 28 日目において、Micro-CT 画像分析から BMD 値を疑似カラーで 3D 画像表示したところ、OIM (D-) 群は GM 群と比較して、より広範囲に新生骨の形成が観察された。また骨梁構造計測を行ったところ、BMD、BMC および BV など全てにおいて高値を示した。

3. hDFCs 移植後 28 日目において、OIM (D-) 群、GM 群ともに BMP2、Runx2、Osterix および VEGF の陽性所見を認めた。

4. PRGF F2 は全血と比べ、血小板を約 2 倍含んでいた。PRGF、血清は白血球を含んでいなかった。

5. TGF- $\beta$  量は、PRGF F2 で F1、血清と比べて高値を示した。また増殖因子の濃度は、4 人のボランティアによって個体差を認めた。

6. OIM (D-) -PRGF で hDFCs の培養を行うと、OIM (D-) -FBS に比べ細胞数の増加を認めた。

7. OIM (D-) -PRGF で培養した hDFCs は OIM (D-) -FBS (10%) と比べ、遊走している細胞を多く認めた.

8. OIM (D-) -PRGF で培養した hDFCs は OIM (D-) -FBS に比べ, BMP2, BMP4, TGF- $\beta$ , OMD, Type I collagen, ALP の遺伝子発現量が多くみられた.

以上の結果から hDFCs は DEX を添加することなく新生骨を形成し, PRGF 存在下では, hDFCs の骨芽細胞分化が促進されることが明らかとなった. 以上より, hDFCs は骨再生医療の細胞供給源として有用であることが示唆された. また hDFCs の細胞増殖および細胞遊走の亢進, 骨形成関連遺伝子の発現上昇は, PRGF の増殖因子の影響による可能性が示唆された.



本論文は、参考論文1「Applicability of human dental follicle cells to bone regeneration without dexamethasone: an in vivo pilot study」 International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery, 2015 および、参考論文2「Plasma rich in growth factors stimulates proliferation, migration, and gene expression associated with bone formation in human dental follicle cells」 Journal of Dental Sciences [連載予定] をまとめたものである。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました日本大学松戸歯学部顎顔面外科学講座の近藤壽郎教授に謹んで感謝の意を表すとともに、ご指導、ご校閲の労を賜りました生理学講座 吉垣純子教授、口腔病理学講座 久山佳代教授に深く御礼申し上げます。

また本研究に際し、適切なご指導ならびに助言をいただきました顎顔面外科学講座 小倉直美講師に感謝いたします。さらに、本研究を進めるにあたり終始ご協力いただいた顎顔面外科学講座の諸先生方に感謝いたします。

## 引用文献

1. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005; 24: 155-65.
2. Aonuma H, Ogura N, Takahashi K, Fujimoto Y, Iwai S, Hashimoto H, Ito K, Kamino Y, Kondoh T. Characteristics and osteogenic differentiation of stem/progenitor cells in the human dental follicle analyzed by gene expression profiling. *Cell Tissue Res.* 2012; 350: 317-31.
3. Takahashi K, Ogura N, Aonuma H, Ito K, Ishigami D, Kamino Y, Kondoh T. Bone morphogenetic protein 6 stimulates mineralization in human dental follicle cells without dexamethasone. *Arch Oral Biol.* 2013; 58: 690-8.
4. Tamaki Y, Nakahara T, Ishikawa H, Sato S. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology.* 2013; 101: 121-32.
5. Sánchez M, Yoshioka T, Ortega M, Delgado D, Anitua E. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injections for the treatment of common peroneal nerve palsy associated with multiple ligament injuries of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2014; 22: 1084-9.
6. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999; 14: 529-35.
7. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich

plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85: 638-46.

8. Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo AM, Inchingolo AD, Dipalma G, Flace P, Girolamo F, Tarullo A, Laino L, Sabatini R, Abbinante A, Cagiano R. Regenerative surgery performed with platelet-rich plasma used in sinus lift elevation before dental implant surgery: an useful aid in healing and regeneration of bone tissue. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012; 16: 1222-6.

9. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33: 56-9.

10. Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 64: 443-51.

11. Fréchette JP, Martineau I, Gagnon G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res.* 2005; 84: 434-9.

12. Anitua E, Tejero R, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration, and autocrine secretion in primary human osteoblasts. *J Periodontol.* 2013; 84: 1180-90.

13. Porter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* 2003; 90: 13-22.

14. McIlwain HH. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis, diagnosis, and management.

Prev Med. 2003; 36: 243-9.

15. Wang FS, Ko JY, Yeh DW, Ke HC, Wu HL. Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology*. 2008; 149: 1793-801.

16. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol*. 1983; 96: 191-8.

17. Burghardt AJ, Link TM, Majumdar S. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. *Clin Orthop Relat Res*. 2011; 469: 2179-93.

18. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2001; 83: 1-6.

19. Ryoo HM, Hoffmann HM, Beumer T, Frenkel B, Towler DA, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ, Lian JB. Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol*. 1997; 11: 1681-94.

20. Shirakabe K, Terasawa K, Miyama K, Shibuya H, Nishida E. Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells*. 2001; 6: 851-6.

21. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular

endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 9656-61.

22. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*. 1999; 5: 623-8.

23. Mariani E, Filardo G, Canella V, Berlingeri A, Bielli A, Cattini L, Landini MP, Kon E, Marcacci M, Facchini A. Platelet-rich plasma affects bacterial growth in vitro. *Cytherapy*. 2014; 16: 1294-304.

24. Anitua E, Zalduendo M, Troya M, Padilla S, Orive G. Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PLoS One*. 2015; 10

25. Mimura S, Kimura N, Hirata M, Tateyama D, Hayashida M, Umezawa A, Kohara A, Nikawa H, Okamoto T, Furue MK. Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol*. 2011; 55: 181-7.

26. Ng F, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmipathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde V. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic

lineages. *Blood*. 2008; 112: 295-307.

27. Fisher MC, Meyer C, Garber G, Dealy CN. Role of IGFBP2, IGF-I and IGF-II in regulating long bone growth. *Bone*. 2005; 37: 741-50.

28. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Expression of bone morphogenetic protein in the course of osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Oral Implants Res*. 2002; 13: 80-5.

29. Pereira RC, Rydziel S, Canalis E. Bone morphogenetic protein-4 regulates its own expression in cultured osteoblasts. *J Cell Physiol*. 2000; 182: 239-46.

30. Trasatti C, Spears R, Gutmann JL, Opperman LA. Increased Tgf-beta1 production by rat osteoblasts in the presence of PepGen P-15 in vitro. *J Endod*. 2004; 30: 213-7.

31. Okubo K, Kobayashi M, Takiguchi T, Takada T, Ohazama A, Okamatsu Y, Hasegawa K. Participation of endogenous IGF-I and TGF-beta 1 with enamel matrix derivative-stimulated cell growth in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2003; 38: 1-9.

32. Couble ML, Bleicher F, Farges JC, Peyrol S, Lucchini M, Magloire H, Staquet MJ. Immunodetection of osteoadherin in murine tooth extracellular matrices. *Histochem Cell Biol*. 2004; 121: 47-53.

33. Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic

matrix. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110: 4563-8.