



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102526706 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201210032026. 5

(22) 申请日 2004. 09. 08

(30) 优先权数据

2003-316719 2003. 09. 09 JP

(62) 分案原申请数据

200480031194. 6 2004. 09. 08

(73) 专利权人 智再如股份有限公司

地址 日本广岛

专利权人 栗原英见

(72) 发明人 栗原英见 河口浩之 武田克浩

柴秀树 水野智仁 吉野宏

长谷川直彦 筱原弘明

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 于巧玲

(51) Int. Cl.

A61K 38/18 (2006. 01)

A61P 1/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

KEIJO LUUKKO et al. Neurotrophin

mRNA Expression in the Developing Tooth

权利要求书1页 说明书18页 附图30页

(54) 发明名称

牙周病和牙髓疾病的治疗剂以及治疗方法

(57) 摘要

本发明的目的在于提供牙周病和牙髓疾病的治疗剂和治疗方法、牙周组织再生用移植材料、牙周组织的再生方法。通过本发明可以提供以神经营养因子作为有效成分的牙周病和牙髓疾病的治疗剂。

1. 神经营养素 4/5 在制备用于治疗牙周病的治疗剂中的用途。
2. 权利要求 1 所述的用途,其中所述治疗剂使牙周组织再生。
3. 权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述治疗剂使牙骨质再生。
4. 权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述治疗剂使牙周韧带再生。
5. 权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述治疗剂使牙槽骨再生。
6. 权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述治疗剂防止牙肉上皮沿着牙根面根尖方向侵入。
7. 权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述治疗剂使牙髓再生。
8. 权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述治疗剂促进牙髓腔中修复象牙质的产生。

牙周病和牙髓疾病的治疗剂以及治疗方法

[0001] 本申请是中国专利申请号 200480031194.6, 申请日 2004 年 9 月 8 日, 发明名称为“牙周病和牙髓疾病的治疗剂以及治疗方法”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及到牙周病和牙髓疾病的治疗剂以及治疗方法、牙周组织再生用移植材料、牙周组织的再生方法。

背景技术

[0003] 由牙肉、牙槽骨、牙周韧带(牙根膜)、牙骨质、牙髓等构成的牙周组织是用于使牙直立, 维持咀嚼和咬合等功能的重要组织, 它的损伤或破坏与牙的丧失相关。例如, 据称日本国内约 3000 万人患有牙周病, 在牙病发展的同时牙周组织的损伤或破坏也随之发展, 成为丧失牙的很大的一个原因。在被损伤或破坏的包括牙髓在内的牙周组织的治疗中, 虽然尝试了给药或外科手术等各种各样的方法, 但任一种药剂或治疗方法使被损伤或破坏的包括牙髓在内的牙周组织再生的效果可以说都不理想。

[0004] 神经营养因子中有来自脑的神经营养因子(Brain-derived neurotrophic factor、BDNF)、神经生长因子(Nerve growth factor、NGF)、神经营养素 3(Neurotrophin 3、NT-3) 以及神经营养素 4/5(Neurotrophin4/5、NT-4/5), 参与促进神经细胞的分化或维持生存、促进再生、维持功能。BDNF 和 NT-4/5 特异结合称为 TrkB(tropomyosin receptor kinase B) 的高亲和性受体、NGF 特异结合称为 TrkA 的高亲和性受体、NT-3 特异结合称为 TrkC 的高亲和性受体。

[0005] BDNF、NGF、NT-3 是主要存在于脑内的神经营养因子, BDNF 和 NGF 通过使用运动神经障碍模型、帕金森病模型、阿尔茨海默病模型等各种疾病模型动物的实验已证明其有效性。人们正期盼其中 BDNF 可作为以下各种疾病的治疗剂的开发, 运动・末梢神经疾病 - 肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、糖尿病和由化疗制剂导致的末梢神经障碍等, 以及中枢神经系疾病 - 阿尔茨海默病、帕金森病、视网膜关联疾病等。

[0006] 可以说这些神经营养因子不仅在中枢神经系, 而且在末梢神经系也起着重要的作用。有报道称在鼠肋骨骨折的治愈过程中, BDNF、NGF、NT-3、TrkC、TrkA 的表达增加(K. Asaumi 等人、Bone Vol26, No. 6, 625-633, 2000), BDNF、NGF、NT-3 促进小鼠牙周韧带细胞的增殖(Y. Tsuboi 等人、J Dent Res 80, (3), 881-886, 2001) 等。然而, 有关这些神经营养因子在牙周组织或牙髓组织中的作用的详细报道还没有。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供牙周病和牙髓疾病的治疗剂以及治疗方法、牙周组织再生用移植材料、牙周组织的再生方法。

[0008] 本发明人为了解决上述课题进行了不断研究, 结果了解到神经营养因子促进来自人牙周韧带的成纤维细胞的增殖, 促进骨关联蛋白质的 mRNA 表达, 狗的牙根分叉部病变模

型中促进牙周组织的再生,直至完成本发明。

[0009] 即,利用本发明,可提供以神经营养因子作为有效成分的牙周病治疗剂。

[0010] 本发明的治疗剂优选使牙周组织再生。

[0011] 本发明的治疗剂优选使牙骨质、牙周韧带、牙槽骨或牙髓再生。

[0012] 本发明的治疗剂优选防止牙周上皮沿着牙根面根尖方向侵入。

[0013] 本发明的治疗剂优选促进牙髓腔中修复象牙质的产生。另外优选促进修复象牙质向牙髓腔内壁的添加。

[0014] 在本发明的治疗剂中,神经营养因子优选是来自脑的神经营养因子、神经生长因子、神经营养素 3 或神经营养素 4/5。

[0015] 根据本发明的另一个方面可提供含有神经营养因子的牙周组织再生用移植材料。

[0016] 本发明的移植材料优选使牙周组织再生。

[0017] 本发明的移植材料优选使牙骨质、牙周韧带、牙槽骨或牙髓再生。

[0018] 本发明的移植材料优选防止牙周上皮沿着牙根面根尖方向。

[0019] 本发明的移植材料优选促进牙髓腔中的修复象牙质的产生。另外,优选向牙髓腔内壁添加修复象牙质。

[0020] 在本发明的移植材料中,神经营养因子优选是来自脑的神经营养因子、神经生长因子、神经营养素 3 或神经营养素 4/5。

[0021] 根据本发明的另一个方面可以提供使用神经营养因子的牙周组织的再生方法。

[0022] 本发明的再生方法优选使牙周组织再生。

[0023] 本发明的再生方法优选使牙骨质、牙周韧带、牙槽骨或牙髓再生。

[0024] 本发明的再生方法优选防止牙周上皮沿着牙根面根尖方向侵入。

[0025] 在本发明的再生方法中,神经营养因子优选是来自脑的神经营养因子、神经生长因子、神经营养素 3 或神经营养素 4/5。

[0026] 根据本发明的另一方面可以提供牙周病的治疗方法,作为牙周病的治疗方法包括向患有或容易患有这样疾病状态的对象给予治疗有效量的神经营养因子。

[0027] 本发明的治疗方法优选使牙周组织再生。

[0028] 本发明的治疗方法优选使牙骨质、牙周韧带、牙槽骨或牙髓再生。

[0029] 本发明的治疗方法优选防止牙周上皮向牙根面根尖方向进入。

[0030] 本发明的治疗方法优选促进牙髓腔中修复象牙质的产生。另外优选修复象牙质向牙髓腔内壁的添加。

[0031] 在本发明的治疗方法中,神经营养因子优选是来自脑的神经营养因子、神经生长因子、神经营养素 3 或神经营养素 4/5。

[0032] 根据本发明的另一方面可以提供用于制造牙周病治疗中使用的药剂的神经营养因子的使用。

[0033] 该药剂优选使牙周组织再生,优选使牙骨质、牙周韧带、牙槽骨或牙髓再生。该药剂优选防止牙周上皮向牙根面根尖方向进入。该药剂优选促进牙髓腔中修复象牙质的产生。另外优选促进修复象牙质向牙髓腔内壁的添加。神经营养因子优选是来自脑的神经营养因子、神经生长因子、神经营养素 3 或神经营养素 4/5。

[0034] 根据本发明的另一方面可以提供以神经营养因子作为有效成分的修复象牙质的

形成促进剂。神经营养因子优选是来自脑的神经营养因子、神经生长因子、神经营养素 3 或神经营养素 4/5。优选修复象牙质添加到牙髓腔的内壁。

[0035] 根据本发明的另一方面可以提供牙髓疾病的治疗法,作为牙髓疾病的治疗方法,包括为了促进修复象牙质的形成向患有或容易患有这样疾病的对象给予治疗有效量的神经营养因子。其中神经营养因子优选是来自脑的神经营养因子、神经生长因子、神经营养素 3 或神经营养素 4/5。优选修复象牙质被添加到牙髓腔的内壁。

[0036] 本发明的另一个方面可以提供为了制造在促进修复象牙质的形成中使用的药剂的神经营养因子的使用。其中神经营养因子优选是来自脑的神经营养因子、神经生长因子、神经营养素 3 或神经营养素 4/5。优选修复象牙质被添加到牙髓腔的内壁。

[0037] 附图的简单说明

[0038] [图 1] 是在 HPL 细胞以及人牙周韧带中显示 BDNF 和 TrkB 的 mRNA 表达的电泳图。各个电泳图左端带为标记。(A) 表示甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的 mRNA (613bp) 在人牙周韧带和 HPL 细胞中的表达。(B) 表示 BDNF 的 mRNA (438bp) 和 TrkB 的 mRNA (434bp) 在人牙周韧带中的表达。(C) 表示 BDNF 和 TrkB 的 mRNA 在 HPL 细胞中的表达。

[0039] [图 2A] 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的作用时间与 ALPase 的 mRNA (381bp) 的表达量的关系的电泳图和图。HPL 细胞都用最终浓度 50ng/ml 的 BDNF 处理。电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 1 时各个作用时间中的 mRNA 表达量的比例。横轴表示 BDNF 作用时间。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。**表示 $p < 0.01$ 的统计学的有意义差 (t-test)。

[0040] [图 2B] 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的作用时间与 OPN 的 mRNA (532bp) 的表达量的关系的电泳图和图。HPL 细胞都用最终浓度 50ng/ml 的 BDNF 处理。电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 1 时各个作用时间中的 mRNA 表达量的比例。横轴表示 BDNF 作用时间。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。**表示 $p < 0.01$ 的统计学的有意义差 (t-test)。

[0041] [图 2C] 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的作用时间与 BMP-2 的 mRNA (440bp) 的表达量的关系的电泳图和图。HPL 细胞都用最终浓度 50ng/ml 的 BDNF 处理。电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 1 时各个作用时间中的 mRNA 表达量的比例。横轴表示 BDNF 作用时间。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。**表示 $p < 0.01$ 的统计学的有意义差 (t-test)。

[0042] [图 2D] 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的作用时间与 GAPDH 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图。HPL 细胞都用最终浓度 50ng/ml 的 BDNF 处理。电泳图左端带为标记。

[0043] [图 3A] 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的作用时间与 BMP-4 的 mRNA (339bp) 的表达量的关系的电泳图和图。HPL 细胞都用最终浓度 50ng/ml 的 BDNF 处理。电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100 时各个作用时间中的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 BDNF 作用时间。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。

[0044] [图 3B] 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的作用时间与 OPG 的 mRNA (736bp) 的表达量的关系的电泳图和图。HPL 细胞都用最终浓度 50ng/ml 的 BDNF 处理。电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100 时各个作用时间中的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 BDNF 作用时间。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。

[0045] [图 4A] 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的给予量与 ALPase 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。使各个浓度的 BDNF 作用于 HPL 细胞 24 小时。电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 的给予量为 0 的 mRNA 表达量作为 1 时在各个给予量下的 mRNA 表达量的比例。横轴表示 BDNF 的浓度 (ng/ml)。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。** 表示 $p < 0.01$ 的统计学的有意义差 (t-test)。

[0046] [图 4B] 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的给予量与 OPN 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。使各个浓度的 BDNF 作用于 HPL 细胞 12 小时。电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 的给予量为 0 的 mRNA 表达量作为 1 时于各个给予量下的 mRNA 表达量的比例。横轴表示 BDNF 的浓度 (ng/ml)。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。** 表示 $p < 0.01$ 的统计学的有意义差 (t-test)。

[0047] [图 4C] 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的给予量与 BMP-2 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。使各个浓度的 BDNF 作用于 HPL 细胞 24 小时。电泳图左端带为标记。图纵轴表示 BDNF 的给予量为 0 的 mRNA 表达量作为 1 时于各个给予量下的 mRNA 表达量的比例。横轴表示 BDNF 的浓度 (ng/ml)。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ 的统计学的有意义差 (t-test)。

[0048] [图 4D] 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的给予量与 GAPDH 的 mRNA (613bp) 的表达量关系的电泳图。

[0049] [图 5] (A) 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的给予量与 OPN 的分泌量关系的图。使各个浓度的 BDNF 作用于 HPL 细胞 12 小时。纵轴表示 OPN 的分泌量 (ng/ml), 横轴表示 BDNF 的浓度 (ng/ml)。(B) 表示在 HPL 细胞中 BDNF 的给予量与 BMP-2 分泌量关系的图。使各个浓度的 BDNF 作用于 HPL 细胞 24 小时。纵轴表示表示 BMP-2 分泌量 (pg/ml), 横轴表示 BDNF 的浓度 (ng/ml)。(C) 是表示在 HPL 细胞中 BDNF 的作用时间与 BMP-2 的分泌量关系的图。细胞用最终浓度 50ng/ml 的 BDNF 处理。纵轴表示表示 BMP-2 分泌量 (pg/ml), 横轴表示 BDNF 的作用时间。(A) ~ (C) 的各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。** 表示 $p < 0.01$ 的统计学的有意义差 (t-test)。

[0050] [图 6] 是表示 BDNF 的给予量与 HPL 细胞和 HGK 的 DNA 合成能力关系的图。使各个浓度的 BDNF 作用于 HPL 细胞和 HGK 24 小时。各个图的纵轴以没有给予 BDNF 或 bFGF (即 BDNF 浓度为 0 或 bFGF 浓度为 0) 时的 DNA 合成能力作为 100 时的各个给予量下的 DNA 合成能力的比例。横轴表示 BDNF 或 bFGF 的浓度 (ng/ml)。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ 的统计学的有意义差 (t-test)。(A) 表示 HPL 细胞中的 DNA 合成能力, (B) 表示 HGK 细胞中的 DNA 合成能力。

[0051] [图 7] (A) 是表示 HPL 细胞中 BDNF 的给予量与 I 型胶原的合成量关系的图。使各个浓度的 BDNF 作用于 HPL 细胞 24 小时。纵轴表示 I 型胶原的合成量 (μ g/ml), 横轴表示 BDNF 的浓度 (ng/ml)。(B) 是表示 HPL 细胞中 BDNF 的作用时间与 I 型胶原的合成量关系的图。细胞用最终浓度 50ng/ml 的 BDNF 处理。纵轴表示 I 型胶原的合成量 (μ g/ml), 横轴表示 BDNF 的作用时间。(A)、(B) 的各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ 的统计学的有意义差 (t-test)。

[0052] [图 8] 是表示狗的 3 级牙根分叉部病变模型中 BDNF 的给予量与牙骨质和牙槽骨再生的关系的图。纵轴表示牙骨质再生率 (%) 或骨再生率 (%), 横轴表示 BDNF 的浓

度 ($\mu\text{g/ml}$)。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ 的统计学的有意义差 (t-test)。(A) 表示与牙骨质再生率的关系, (B) 表示与骨再生率的关系。

[0053] [图 9A] 是填塞了实施例 2 做成的不含 BDNF 的 TERUPLUG R 的牙根分叉部骨缺损部位 (对照组) 的苏木精·曙红染色标本的光学显微镜像 (倍率 20 倍)。

[0054] [图 9B] 是填塞了实施例 2 做成的含有 BDNF ($5\mu\text{g/ml}$) 的移植材料的分叉部骨缺损部位的显微镜像 (倍率 20 倍)。

[0055] [图 10] 是图 9B 的牙根分叉部正下方的部分放大像 (倍率 200 倍)。在牙根分叉部正下方, 在裸露的牙根面的几乎所有部分中埋入了胶原纤维的牙骨质已再生, 也没有看到上皮的侵入。

[0056] [图 11A] 是表示 HPL 细胞中 NGF 的 mRNA 表达量的放射活性的带和图。图纵轴表示 NGF 的 mRNA 表达量对 GAPDH 的 mRNA 表达量的比例。图中, HGF 表示牙肉成纤维细胞、HPC 表示牙髓细胞、HSF 表示来自包皮的成纤维细胞、HNB 表示人成神经细胞瘤细胞。

[0057] [图 11B] 是表示 HPL 细胞中 TrkA 的 mRNA 表达量的放射活性的带和图。图纵轴表示 TrkA 的 mRNA 表达量对 GAPDH 的 mRNA 表达量的比例。图中, HGF 表示牙肉成纤维细胞、HPC 表示牙髓细胞, HSF 表示来自包皮的成纤维细胞、HNB 表示人成神经细胞瘤细胞。

[0058] [图 12] 是 NGF 影响 HPL 细胞中 OPN 的 mRNA 表达量的图。(A) 是表示 NGF 的经时效果的测定结果的图, 图纵轴表示以 NGF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 1 时各个作用时间中的 OPN 的 mRNA 表达量的比例。图横轴表示 NGF 的作用时间。全部用最终浓度 100ng/ml 的 NGF 进行处理。(B) 是表示浓度效果的测定结果的图。图纵轴表示以在 NGF 浓度 0 时 mRNA 表达量作为 1 时, 各个浓度下 OPN 的 mRNA 表达量的比例。横轴表示 NGF 的浓度 (ng/ml)。NGF 都作用 24 小时。

[0059] [图 13] 是表示 NGF 影响 HPL 细胞中 ALPase 的 mRNA 表达量的图。(A) 是表示 NGF 的经时效果的测定结果的图, 图纵轴表示以 NGF 作用时间 0 的 ALPase 的 mRNA 表达量作为 1 时各个作用时间中的 ALPase 的 mRNA 表达量的比例。图横轴表示 NGF 的作用时间。(B) 是表示浓度效果的测定结果的图。图纵轴表示以在 NGF 浓度 0 时 ALPase 的 mRNA 表达量作为 1 时, 各个浓度下 ALPase 的 mRNA 表达量的比例。横轴表示 NGF 的浓度 (ng/ml)。

[0060] [图 14] 是表示 NGF 影响 HPL 细胞中 BMP-2 的 mRNA 表达量的图。(A) 是表示 NGF 的经时效果的测定结果的图, 图纵轴表示以 NGF 作用时间 0 的 BMP-2 的 mRNA 表达量作为 1 时各个作用时间中的 BMP-2 的 mRNA 表达量的比例。图横轴表示 NGF 的作用时间。(B) 是表示浓度效果的测定结果的图。图纵轴表示以在 NGF 浓度 0 时 BMP-2 的 mRNA 表达量作为 1 时, 在各个浓度下 BMP-2 的 mRNA 表达量的比例。横轴表示 NGF 的浓度 (ng/ml)。

[0061] [图 15] 是表示 NGF 的给予量与 HPL 细胞和 HGK 的 DNA 合成能力关系的图。使各个浓度的 NGF 作用于 HPL 细胞和 HGK 24 小时。各个图的纵轴以 NGF 浓度 0 时的 DNA 合成能力作为 100 时的各个 NGF 给予量下的 DNA 合成能力的比例。横轴表示 NGF 的浓度 (ng/ml)。(A) 表示在 HPL 细胞中的 DNA 合成能力, (B) 表示在 HGK 中的 DNA 合成能力。

[0062] [图 16A] 是表示在 HPL 细胞中 NT-3 的 mRNA 表达量的放射活性的带和图。图纵轴表示 GAPDH 的 mRNA 表达量作为 1 时的 NT-3 的 mRNA 表达量的比例。图中, HGF 表示牙肉成纤维细胞、HPC 表示牙髓细胞、HSF 表示来自包皮的成纤维细胞、HNB 表示人成神经细胞瘤细

胞。

[0063] [图 16B] 是表示 HPL 细胞中 TrkC 的 mRNA 表达量的放射活性的带和图。图纵轴表示 GAPDH 的 mRNA 表达量作为 1 时的 TrkC 的 mRNA 表达量的比例。图中, HGF 表示骨肉成纤维细胞、HPC 表示牙髓细胞, HSF 表示来自包皮的成纤维细胞、HNB 表示人成神经细胞瘤细胞。

[0064] [图 17] 是 HPL 细胞中的表示 NT-3 的给予量与 ALPase 活性的关系的图。图纵轴表示 ALPase 活性 (nmol/孔), 横轴表示 NT-3 浓度 (ng/ml)。

[0065] [图 18] 是表示在 HPL 细胞中的 NT-3 的给予量与 HPL 细胞的 DNA 合成能力的关系的图。图纵轴表示通过吸光度比较在 NT-3 各浓度下的 HPL 细胞的 DNA 合成能力, 横轴表示 NT-3 浓度 (ng/ml)。

[0066] [图 19A] 是表示在 HPL 细胞中 NT-4/5 的作用时间与 OPN、OCN 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。NT-4/5 最终浓度调整到 50ng/ml。电泳图左端带为标记。各个图纵轴表示以 NT-4/5 作用时间 0 的各 mRNA 表达量作为 100 时各个作用时间中的各 mRNA 表达量的比例。横轴表示 NT-4/5 作用时间。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。各图中, * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ (统计学的鉴定用 t-test)。

[0067] [图 19B] 是表示在 HPL 细胞中 NT-4/5 的作用时间与 BMP-2、BMP-7 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。NT-4/5 最终浓度调整到 50ng/ml。电泳图左端带为标记。各个图纵轴表示以 NT-4/5 作用时间 0 的各 mRNA 表达量作为 100 时各个作用时间中的各 mRNA 表达量的比例。横轴表示 NT-4/5 作用时间。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。各图中, * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ (统计学的鉴定用 t-test)。

[0068] [图 19C] 是表示在 HPL 细胞中 NT-4/5 的作用时间与 ALPase 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图, 以及 NT-4/5 的作用时间与 GAPDH 的表达量的关系的电泳图。NT-4/5 最终浓度调整到 50ng/ml。电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NT-4/5 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100 时各个作用时间中的各 mRNA 表达量的比例。横轴表示 NT-4/5 作用时间。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。* 表示 $p < 0.05$ (统计学的鉴定用 t-test)。

[0069] [图 20] 是表示对于 HP 细胞的各个骨关联蛋白质 (ALPase、BMP-2、DSPP、OPN、OCN) 的 mRNA 表达的 NGF 浓度效果的测定结果的图。NGF 作用时间是 24 小时。各图纵轴表示以在 NGF 浓度 0 时 mRNA 表达量作为 1 时, 在各个浓度下 mRNA 表达量的比例。横轴表示 NGF 的浓度 (ng/ml)。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。

[0070] [图 21] 是表示对于 HP 细胞的各个骨关联蛋白质 (ALPase、BMP-2、DSPP、I 型胶原、OPN、OCN) 的 mRNA 表达的 BDNF 浓度效果的测定结果的图。各图纵轴表示以在 BDNF 浓度 0 时各 mRNA 表达量作为 1 时, 在各个浓度下 mRNA 表达量的比例。横轴表示 BDNF 的浓度 (ng/ml)。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。

[0071] [图 22] 是表示 NT-3 浓度对于 HP 细胞的各个骨关联蛋白质 (ALPase、BMP-2、DSPP、OPN、OCN) 的 mRNA 表达的效果的测定结果的图。各图纵轴表示以在 NT-3 浓度 0 时 mRNA 表达量作为 1 时, 在各个浓度下 mRNA 表达量的比例。横轴表示 NT-3 的浓度 (ng/ml)。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。

[0072] [图 23] 是表示 NT-4/5 浓度对 HP 细胞的各个骨关联蛋白质 (ALPase、BMP-2、DSPP、I 型胶原、OPN、OCN) 的 mRNA 表达的效果的测定结果的图。各图纵轴表示以在 NT-4/5 浓度 0

时 mRNA 表达量作为 1 时,在各个浓度下 mRNA 表达量的比例。横轴表示 NT-4/5 的浓度 (ng/ml)。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。

[0073] [图 24] 是表示各种神经营养因子 (NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5) 的给予量与 HP 细胞的 DNA 合成能力关系的图。使各浓度神经营养因子作用于 HP 细胞 24 小时。各个图的纵轴以没有给予神经营养因子 (即神经营养因子的浓度 0) 时的吸光度作为 100 时的各个给予量下的吸光度的比例。横轴表示各神经营养因子的浓度 (ng/ml)。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。

[0074] [图 25A] 是表示在 HMS 细胞中 NGF 的作用时间与 ALPase 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。也显示出表示与作为对照的 GAPDH 的 mRNA 表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 NGF 处理。电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NGF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 NGF 作用时间。

[0075] [图 25B] 是表示在 HMS 细胞中 NGF 的作用时间与 OCN 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。也显示出表示与 GAPDH 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 NGF 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NGF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 NGF 作用时间。

[0076] [图 25C] 是表示在 HMS 细胞中 NGF 的作用时间与 OPN 的 mRNA 表达量的关系的电泳图和图。也给出了与 GAPDH 的 mRNA 表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 NGF 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NGF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 NGF 作用时间。

[0077] [图 25D] 是表示在 HMS 细胞中 NGF 的作用时间与 BSP 的 mRNA 表达量的关系的电泳图和图。也显示出也给出了与 GAPDH 的 mRNA 表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 NGF 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NGF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 NGF 作用时间。

[0078] [图 25E] 是表示在 HMS 细胞中 NGF 的作用时间与 I 型胶原的 mRNA 表达量的关系的电泳图和图。也显示出表示与 GAPDH 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 NGF 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NGF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 NGF 作用时间。

[0079] [图 26A] 是表示在 HMS 细胞中 BDNF 的作用时间与 ALPase 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。也给出了与 GAPDH 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 BDNF 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 BDNF 作用时间。

[0080] [图 26B] 是表示在 HMS 细胞中 BDNF 的作用时间与 OCN 的 mRNA 表达量的关系的电泳图和图。也给出了与 GAPDH 的 mRNA 表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 BDNF 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 作用时间 0 的 mRNA

表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 BDNF 作用时间。

[0081] [图 26C] 是表示在 HMS 细胞中 BDNF 的作用时间与 OPN 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。也给出了与 GAPDH 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 BDNF 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 BDNF 作用时间。

[0082] [图 26D] 是表示在 HMS 细胞中 BDNF 的作用时间与 BSP 的 mRNA 表达量的关系的电泳图和图。也给出了与 GAPDH 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 BDNF 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 BDNF 作用时间。

[0083] [图 26E] 是表示在 HMS 细胞中 BDNF 的作用时间与 I 型胶原的 mRNA 表达量的关系的电泳图和图。也给出了表示与 GAPDH 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 BDNF 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 BDNF 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 BDNF 作用时间。

[0084] [图 27A] 是表示在 HMS 细胞中 NT-3 的作用时间与 ALPase 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。也给出了与 GAPDH 的 mRNA 表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 NT-3 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NT-3 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 NT-3 作用时间。

[0085] [图 27B] 是表示在 HMS 细胞中 NT-3 的作用时间与 OCN 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图和图。也给出了与 GAPDH 的 mRNA 的表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 NT-3 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NT-3 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 NT-3 作用时间。

[0086] [图 27C] 是表示在 HMS 细胞中 NT-3 的作用时间与 OPN 的 mRNA 表达量的关系的电泳图和图。也给出了与 GAPDH 的 mRNA 表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 NT-3 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NT-3 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 NT-3 作用时间。

[0087] [图 27D] 是表示在 HMS 细胞中 NT-3 的作用时间与 BSP 的 mRNA 表达量的关系的电泳图和图。也给出了表示与 GAPDH 的 mRNA 表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 NT-3 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NT-3 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 NT-3 作用时间。

[0088] [图 27E] 是表示在 HMS 细胞中 NT-3 的作用时间与 I 型胶原的 mRNA 表达量的关系的电泳图和图。也给出了与 GAPDH 的 mRNA 表达量的关系的电泳图。HMS 细胞都用最终浓度 100ng/ml 的 NT-3 处理。各电泳图左端带为标记。图纵轴表示以 NT-3 作用时间 0 的 mRNA 表达量作为 100% 时各个作用时间下的 mRNA 表达量的百分率。横轴表示 NT-3 作用时间。

[0089] [图 28] 是表示抗坏血酸 (Aa)、NGF、BDNF、NT-3 对 HMS 细胞的增殖影响的效果的图。图纵轴表示试验组相对于对照组的吸光度的百分率。各个棒图的杆表示平均值 $\pm$ 标准偏差的范围。* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ (统计学的鉴定用 t-test)。

[0090] [图 29A] 是填塞了实施例 8 做成的含 NGF (100 μ g/ml) 的移植材料的牙根分叉部

骨缺损部位的光学显微镜像（倍率 20 倍）。

[0091] [图 29B] 是填塞了实施例 8 做成的含 NT-3 (100 μ g/ml) 的移植材料的牙根分叉部骨缺损部位的光学显微镜像（倍率 20 倍）。

具体实施方式

[0092] 以下就本发明的更具体的方式、以及用于实施本发明的方法进行说明。

[0093] 在本说明书中,所谓“牙周组织”指的是由牙肉、牙槽骨、牙周韧带（牙根膜）、牙骨质构成的组织。

[0094] 所谓“牙肉”指的是被覆牙颈部和牙槽骨一部分的软组织,由牙肉上皮和牙肉固有层构成。

[0095] 所谓“牙周韧带”是介于牙槽骨和牙骨质之间的结缔组织,也称为牙根膜。

[0096] “牙槽骨”分为相当于包围牙根的牙槽壁的致密质部分的固有牙槽骨、以及由处于它的外侧的海绵质和致密质的部分构成的支持牙槽骨。

[0097] “牙骨质”是牙根的最表层的硬组织,分为含有牙骨质细胞的有细胞性牙骨质和不含有牙骨质细胞的无细胞性牙骨质。

[0098] “牙髓”是负责牙的生活反应的组织,对生理、病的刺激反应,形成牙质。由牙髓细胞、神经纤维、细胞外基质、血管等构成。

[0099] 所谓“再生 (regeneration)”是丧失组织、被破坏的组织 and 损伤组织的再构成 (reconstruction) 以及再构建 (reproduction),“牙周组织的再生”是使牙周组织恢复到原来状态的功能。

[0100] 所谓“修复 (repair)”指的是创伤部的结构和功能现在不能以完全的状态恢复的组织的治愈,在“牙周组织的修复”中,包括对牙根表面的上皮性附着等。

[0101] 所谓“防止牙肉上皮沿着牙根面根尖方向侵入”指的是防止牙肉上皮细胞沿着牙根面向牙根尖侧增殖。

[0102] 所谓“牙周组织再生用移植材料”是促进牙周组织再生的材料。为了使 BDNF 等神经营养因子以一定的浓度作用于所定的生物体部位（牙槽骨的缺损部位等）,需要某种支架材料 (scaffold)。组合了可成为这样支架材料的材料与 BDNF 等神经营养因子的材料是本申请的移植材料。

[0103] 所谓“牙周病”指的是局部的细菌等为起因引起的牙周组织的发炎性疾病。

[0104] 所谓“修复象牙质”指的是受到外来刺激的结果形成的象牙质。

[0105] 所谓“牙髓疾病”指的是牙髓的发炎性疾病、退行变性等。

[0106] 本发明在人等温血动物中,特别优选的是适用于人。

[0107] 本发明中使用的神经营养因子、BDNF、NGF、NT-3、NT-4/5 等无论是通过基因重组或化学合成等人工制造的,还是天然型 (native) 的都可以。

[0108] 本发明的牙周病治疗剂优选是通过外用剂等局部给药。也可以充填到注射器等,注入到牙周袋内。另外当进行牙周外科治疗时,也可以向牙周组织的缺损部给药。此时,为了能以一定浓度长时间作用,优选是使本发明的治疗剂吸收到片材或海绵等后使用。优选将感染的牙周组织除去之后给药。本发明的治疗剂可以通过注射局部给药。例如,可以注射到牙周袋部的牙肉,也可以注射到牙槽骨顶部附近的牙根膜腔。也可以注射到牙根尖部

附近。

[0109] 本发明的修复象牙质形成促进剂优选是通过外用剂等局部给药。例如,可以将液状、膏状、糊状等修复象牙质形成促进剂运用于露髓部,也可以运用于断髓(amputation)或拔髓(extirpation of the pulp)。也可以运用吸收活性成分的片材或海绵,进行一定期间暂封。或当对由于外伤等脱落的牙进行再植时,也可以运用于牙根尖部等。

[0110] 作为本发明的牙周病治疗剂和修复象牙质形成促进剂的剂型,如通过通常的制剂方法使用制剂中容许的载体或稀释剂等制造的膏剂、软膏剂、洗剂等外用剂以及例如以水系的溶剂为主要成分的注射剂等。作为粉末状剂型,也可以在使用之前溶解于精制水等后使用。

[0111] 本发明的牙周病治疗剂和修复象牙质形成促进剂的给药量因给予对象的年龄、性别、症状等不同而有所差异,在局部给药时,通常每一颗牙作为神经营养因子为 $1 \times 10^{-12} \text{g} \sim 1 \times 10^{-3} \text{g}$ 、特优选 $1 \times 10^{-11} \text{g} \sim 1 \times 10^{-7} \text{g}$ 、更优选 $1 \times 10^{-10} \text{g} \sim 1 \times 10^{-8} \text{g}$ 。一般来说,当通过注射局部给药时,比外用药少的给药量就可以。

[0112] 本发明的移植材料每一个牙根分叉部缺损中使用的每份量,优选含有 $1 \times 10^{-12} \text{g} \sim 1 \times 10^{-3} \text{g}$ 、特别优选 $1 \times 10^{-11} \text{g} \sim 1 \times 10^{-8} \text{g}$ 、更特别优选 $1 \times 10^{-10} \text{g} \sim 1 \times 10^{-9} \text{g}$ 的神经营养因子。

[0113] 本发明的牙周病治疗剂、修复象牙质形成促进剂和移植材料只要是不妨碍其有效性,可以与其它药剂组合使用。也可以将BDNF、NGF、NT-3、NT-4/5相互组合后使用。也可以与来自骨髓的间叶系干细胞(MSC)、来自牙周韧带的成纤维细胞、牙肉成纤维细胞、血管内皮细胞等组合使用。也可以与氢氧化钙制剂、抗菌剂等并用。

[0114] 在本发明的移植材料中作为可与神经营养因子组合的材料只要是能在给药局部保持神经营养因子的对生物体没有危害性的材料就可以,例如优选多孔性的片材或海绵等。如果是生物体分解性蛋白质材料(胶原、明胶、白蛋白、富有血小板的血浆(PRP))或组织吸收性材料(聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸(PLA)、乳酸乙醇酸共聚物(PLGA)、透明质酸(HA)、三磷酸钙(TPC)),由于以后不用取出所以更优选。例如,TERUPLUG R(商品名)(TERUMO株式会社)、GC膜(商品名)(株式会社GC)、Osferion(商品名)(OLYMPUS株式会社)等。

[0115] 实施例

[0116] 以下通过实施例对本发明进行更详细说明。

[0117] (实施例1)BDNF对来自人牙周韧带成纤维细胞(human periodontal ligament cell、HPL细胞)和人牙肉上皮细胞(human gingival keratinocyte、HGK)影响的研究。

[0118] (1)使用细胞

[0119] (i)来自牙周韧带的成纤维细胞(HPL细胞)

[0120] 从为矫正治疗而方便拔出的健全的人小白齿的牙周韧带分离HPL细胞。为了防止来自牙周韧带周围的其它结缔组织的细胞混入,用手术刀将除去人小白齿的齿颈部、除去牙根部的牙根中央部的健康牙周韧带剥离,切碎。将切碎的组织贴附在直径60mm的细胞培养皿(CORNING、NY),于 37°C 、5% CO_2 气相条件下进行培养。培养基使用添加了10% FBS(GIBCO、Buffalo、NY)、盘尼西林(100单位/ml)(明治制果、东京)、链霉素(100 $\mu\text{g/ml}$)(明治制果)、以及两性霉素B(1 $\mu\text{g/ml}$)(GIBCO)的Dulbecco改进培养基(DMEM、日水制药、东京)(这里使用的培养基表记为“培养基A”)。将进行了4~8代继代的HPL细胞供以下

实验用。

[0121] (ii) 人牙肉上皮细胞 (HGK)

[0122] 要将使用人培养细胞的实验的必要性以及牙肉的使用目的等对患者充分说明, 征得患者同意后, 接受牙肉的提供。以智齿牙周炎患者当在拔掉成为病因的智齿时, 可以从剩余的牙肉边 (gingival flap) 获得牙肉片。将得到的牙肉片于 4℃ 下用含有 0.01% 乙二胺四乙酸 (EDTA) 和 0.025% 胰蛋白酶的 Dulbecco PBS(-) (PBS(-)、日水制果) 处理一昼夜, 分离 HGK。用含有牛胰岛素 (10 μg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA)、人转运铁蛋白 (5 μg/ml) (Sigma)、2- 巯基乙醇 (10 μM)、2- 氨基乙醇 (10 μM)、亚硒酸钠 (10 μM)、牛下垂体提取液 (50 μg/ml)、盘尼西林 (100 单位/ml)、链霉素 (100 μg/ml) 以及两性霉素 B (50ng/ml) 的 MCDB153 培养基 (Sigma) 进行初代培养 (将这里使用的培养基标记为“培养基 C”)。培养使用牛 I 型胶原被覆的直径 60mm 培养皿 (SUMILON CELTITE C-1、住友 BAKELIGHT、东京), 于 37℃、5% CO₂ 气相条件下进行。将进行了 3 ~ 4 代继代培养的 HGK 供以下实验用。

[0123] (2) BDNF 和它的受体在 HPL 细胞中的表达

[0124] 对于 BDNF 和 TrkB 的 mRNA 在 HPL 细胞以及人牙周韧带中的表达使用用于 RT-PCR 的第 1 条链 cDNA 合成试剂盒 (Roche、Indianapolis), 通过逆转录 PCR 法进行研究。

[0125] 当上述 (1) (i) 中得到的 HPL 细胞达到铺满时, 回收细胞, 通过 ISOGEN (Nippon Gene, 东京) 使细胞溶解后, 加氯仿进行离心分离, 向得到的水相中加异丙醇, 提取总 RNA。

[0126] 将上述 (1) (i) 中得到的人牙周韧带在 ISOGEN 中均匀化后, 加入氯仿进行离心分离, 在得到的水相中加入异丙醇, 提取总 RNA。

[0127] 对于纯化的总 RNA 中的 1 μg 的各个 RNA 使用寡 dT 引物进行逆转录, 通过 PCR 反应 30 个循环使得到的 cDNA 扩增后, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。作为对照使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)。

[0128] 结果如图 1 所示。作为对照使用甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)。就像图表明的那样, 在人牙周韧带中看到 BDNF 和 TrkB 的 mRNA 的表达, 在从该人牙周韧带分离、培养的 HPL 细胞中也确认 BDNF 和 TrkB 的 mRNA 表达。

[0129] (3) 细胞用 BDNF 处理

[0130] (i) HPL 细胞

[0131] 将上述 (1) (i) 中得到的 HPL 细胞在用牛 I 型胶原被覆的直径 60mm 培养皿 (SUMILON CELTITE C-1), 每一个皿 3.5×10^5 个, 使用含有 50 μg/ml 的 L- 抗坏血酸的培养基 A, 于 37℃、5% CO₂ 气相条件下培养 13 天 (将这里使用的培养基记为“培养基 B”)。培养基每 2 天交换一次。在第 14 天培养结束前 0、3、6、12 或 24 小时, 用 DMEM 将细胞洗 2 次, 换成含有最终浓度 0、1、10、50 或 100ng/ml 的 BDNF (Recombinant Human BDNF、R&D system、Minneapolis、USA) 的无血清培养基 (添加了盘尼西林 (100 单位/ml)、链霉素 (100 μg/ml) 以及两性霉素 B (1 μg/ml) (GIBCO) 以及 L- 抗坏血酸 (50 μg/ml) 的 DMEM) (将这里使用的培养基记为“培养基 D”)。

[0132] (ii) HGK

[0133] 将上述 (1) (ii) 中得到的 HGK 按照 2×10^3 个 / 孔接种到用牛 I 型胶原被覆的 96 孔板 (SUMILON CELTITE C-1 板 96F、住友 BEKELIGHT), 于 37℃、5% CO₂ 气相条件下, 使用培养基 C 进行培养。培养基每 2 天交换一次。当处于细胞增殖期的培养第 4 ~ 5 天, 将板的

细胞用 MCDB153 培养基洗 2 次,换成含有最终浓度 0、1、10、25、50 或 100ng/ml 的 BDNF 的培养基(除了不含牛下垂体提取液以外,其它与培养基 C 同一组成的培养基)培养 24 小时。

[0134] (4) 骨相关蛋白在 HPL 细胞中的表达

[0135] (i)mRNA 的表达

[0136] 与上述 (3) (i) 所述方法同样操作,使用 ISOGEN 从用最终浓度 0、1、10、50 或 100ng/ml 的 BDNF 处理的 HPL 细胞提取、纯化总 RNA。碱性磷酸酶 (ALPase)、骨形成蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)、骨形成蛋白-4(bone morphogenetic protein-4, BMP-4)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)、护骨蛋白 (osteoprotegerin, OPG) 的 mRNA 表达量使用 ABI PRISM7700 (Applied Biosystems、东京),通过实时监测 PCR 产物生成过程进行定量解析 (Real-time PCR 法)。作为对照使用 GAPDH。

[0137] 对于各个骨相关蛋白的 mRNA 表达的 BDNF 的经时效果测定的结果如图 2A ~ 2C、3A、3B 所示,浓度效果测定的结果如图 4A ~ 4C 所示。在各个图中 * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ (统计学的鉴定通过 t-test)。

[0138] 就像这些图所表明的那样, BDNF 不影响 OPG、BMP-4 的 mRNA 表达,但 ALPase、BMP-2、OPN 的 mRNA 表达量依赖于浓度和时间,随着它们增加而增加。

[0139] (ii) 蛋白质的表达

[0140] 将上述 (1) (i) 中得到的 HPL 细胞按照 1×10^4 个 / 孔接种到用牛 I 型胶原被覆的 48 孔板 (SUMILON CELTITE C-1 板 48F、住友 BEKELIGHT),使用培养基 B 培养 13 天。培养基每 2 天交换一次。在第 14 天培养结束前 24 小时,将板的细胞用 DMEM 培养基洗 2 次,换成含有最终浓度 0、1、10、25、50 或 100ng/ml 的 BDNF 的无血清培养基 D。培养结束后,回收上清,通过 ELISA 法测定上清中的分泌 OPN 量、分泌 BMP-2 量。在分泌 OPN 量的测定中使用夹心 ELISA 试剂盒 (IBL、群马),在分泌 BMP-2 量的测定中使用夹心 ELISA 试剂盒 (R&Dsystem)。

[0141] 图 5 中给出了 BDNF 对于 HPL 细胞的分泌 OPN 量和分泌 BMP-2 量的经时效果测定以及浓度效果测定的结果。在各个图中, * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ (统计学的鉴定通过 t-test)。就像图 5 所表明的那样, BDNF 促进 OPN 和 BMP-2 在 HPL 细胞中的分泌。

[0142] (5) HPL 细胞和 HGK 的增殖

[0143] 对于 BDNF 对 HPL 细胞和 HGK 的 DNA 合成能力的影响使用 Cell Proliferation ELISA system, version 2 (Amersham Pharmacia Biotech) 通过 ELISA 法进行测定。

[0144] 将上述 (1) (i) 中得到的 HPL 细胞按照 5×10^3 个 / 孔接种到用牛 I 型胶原被覆的 96 孔板 (SUMILON CELTITE C-1 板 96F、住友 BEKELIGHT),使用培养基 B 培养 10 天。将细胞用 DMBM 洗 2 次,替代 10% FBS 用添加了 0.3% FBS 的培养基 B 培养 24 小时后,与向同一培养基按照最终浓度为 0、1、10、25、50 或 100ng/ml 添加了 BDNF 制备的培养基交换,再培养 24 小时。培养结束的前 2 小时 (即 BDNF 添加 22 小时后),以 10ng/ml 的浓度向各个孔添加溴脱氧尿苷 (BrdU),整合到细胞。培养在 37°C 、5% CO_2 气相条件下进行。

[0145] 将上述 (1) (ii) 中得到的 HGK 用与上述 (3) (ii) 同一方法进行培养,用 BDNF 处理。培养结束的前 2 小时 (即 BDNF 添加 22 小时后),以 10ng/ml 的浓度向各个孔添加溴脱氧尿苷 (BrdU),整合到细胞。

[0146] 培养结束后,将 HPL 细胞和 HGK 固定后,进行封闭,使过氧化物酶标记抗 BrdU 抗体于室温下作用 2 小时,加 TMB (3,3',5,5' - 四甲基联苯胺) 底物,用吸光度计 (MICRO

PLATE READER、TOSOH) 测定波长 450nm 的吸光度。作为对照,对使碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在最终浓度 0、0.3、1、3、5、10ng/ml 下作用 24 小时的细胞进行同样处理,测定 DNA 合成能力。

[0147] 结果如图 6 所示。(A) 表示对 HPL 细胞的效果的图,(B) 表示对 HGK 的效果的图。在各个图中 * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ (统计学的鉴定通过 t-test)。

[0148] 就像图 6 所表明的那样, BDNF 促进 HPL 细胞的 DNA 合成能力,而对 HGK 的 DNA 合成能力没有影响。

[0149] (6)HPL 细胞的胶原合成

[0150] 将上述 (1) (i) 中得到的 HPL 细胞接种到用牛 I 型胶原被覆的 48 孔板,使用培养基 B 培养 13 天。培养基每 2 天换一次。在第 14 日的培养结束的前 0、3、6、12 或 24 小时,将板中细胞用 DMEM 洗 2 次,换成含有最终浓度 0、1、10、25、50 或 100ng/ml 的 BDNF 的无血清培养基 D。

[0151] 使用 I 型原胶原 C-肽 (Procollagen type IC-peptide) (PIP) EIA 试剂盒 (TAKARA),通过 ELISA 法测定 HPL 细胞的胶原合成量。使用对 I 型胶原 C 末端前肽 (PIP) 特异的单克隆抗体 (过氧化物酶标记) 通过吸光度计 (MICRO PLATE READER) 测定波长 450nm 的吸光度来测定 HPL 细胞培养上清中的胶原合成量。

[0152] 结果如图 7 所示。(A) 表示 BDNF 对 I 型胶原合成的浓度效果测定的结果,(B) 表示经时效果测定的结果。就像图 7 表明的那样, BDNF 可使 HPL 细胞的 I 型胶原合成量增加。

[0153] (实施例 2)

[0154] BDNF 在 Beagle 犬的 3 级牙根分叉部病变模型中的效果的研究。

[0155] 使浓度 5、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 的 BDNF 溶液 (灭菌生理盐水液中) 的 25 μl 浸透直径 8mm $\times$ 5mm 的 TERUPLUG R (商品名) (TERUMO),作为移植材料。

[0156] 将 7 只雌 beagle 犬 (12 ~ 20 个月龄、体重 10 ~ 14kg) 通过 DOMITOR (明治制果) 肌肉注射镇静下来,用手动刮牙器 (scaler) 进行全颌刮牙。以后按照每 2 天一次的比例进行刷牙和用以聚维酮碘为有效成分的漱口水 ISOJIN (商品名) (明治制果) 进行口腔清扫一个月,确立临床上健康牙周组织的状态。

[0157] 对这些 Beagle 犬通过戊巴比妥系麻醉剂的静脉内注射实施全身麻醉,对左右两侧下颞侧牙肉进行浸润麻醉,由第一小白齿远心 (distal part) 至第一大白齿近心 (mesial part) 的牙肉切开一个沟,剥离牙肉,形成粘膜骨膜瓣。然后,用圆头锉 (bur) 和骨凿消除左右两侧第二、第三、第四小白齿的牙根分叉部牙槽骨,做成牙根分叉部 3 级 (按照 Lindhe & Nyman 的分类) 的骨缺损。骨缺损的大小从未处置的牙根分叉部正下方至约 4mm 靠近牙根尖侧。

[0158] 将露出的牙根面的残存牙骨质用手动刮牙器除去后,将牙根分叉部骨缺损内用生理盐水充分清洗,冲去碎片,每一处填塞直径 8mm $\times$ 5mm 的 TERUPLUG R 移植材料。作为对照填塞渗透了不含 BDNF,而只含灭菌生理盐水 25 μl 的 8mm $\times$ 5mm 的 TERUPLUG R 移植材料。

[0159] 手术 6 周后,在通过戊巴比妥系麻醉剂的静脉内注射实施全身麻醉下,用 4% 多聚甲醛对全身进行灌流固定。灌流固定后,切断下颞,将处理的牙和牙周组织一块摘出。将得到的标本于 4% 聚多甲醛中浸渍固定 1 天后,用 10% EDTA 除去石灰质,根据通用做法进行乙醇脱水,包埋在石蜡中。从该标本制作在近远心方向 (mesial-distal plane) 与牙轴平

行的切片（厚度约 5 μ m）实施苏木精曙红染色。

[0160] 在做成的组织标本中，选择与近远心方向牙轴平行，而且在牙根中央附近被切得很薄的标本，用光学显微镜（ECLIPSE E600、NIKON）进行组织观察和计测。骨再生率以再生牙槽骨的面积与裸露的牙根分叉部缺损的面积的比例（百分率）表示。牙骨质再生率以再生牙骨质的长度与裸露的牙根面的长度的比例（百分率）表示。

[0161] 结果如图 8、9A、9B、10 所示。图 8 的 (A) 表示 BDNF 对牙骨质再生的效果的测定结果，图 8 的 (B) 表示 BDNF 对牙槽骨再生的效果的测定结果。图 9A 是没有给予 BDNF（对照）的牙根分叉部骨缺损部的苏木精曙红染色标本，图 9B 是给予 BDNF（填充含有 BDNF (5 μ g/ml) 的移植材料）的牙根分叉部骨缺损部的光学显微镜像（倍率 20 倍）。图 10 是图 9B 的牙根分叉部正下方的部分放大像（倍率 200 倍）。

[0162] 就像图 8 表明的那样，通过给予 BDNF，在狗的 3 级牙根分叉部病变模型中证实牙骨质的再生和牙槽骨的再生。

[0163] 在图 9A 的对照标本中，虽然牙骨质、牙槽骨、牙周韧带的再生可观察到少许，但停留在从骨缺损底部到牙冠侧方向大约 1/2 处。在牙根分叉部正下方的缺损部没有看到牙骨质再生、牙槽骨再生，但看到上皮的进入，被以成纤维细胞、胶原纤维、血管为主体的结缔组织占据。

[0164] 在图 9B 和图 10 的给予 BDNF 的牙根分叉部骨缺损部的标本中，在裸露的牙根面的几乎所有部分牙骨质再生，没有看到上皮的侵入。另外，在再生牙骨质和再生牙槽骨之间还观察到维持一定宽度的牙周韧带。

[0165] （实施例 3）

[0166] NGF 对 HPL 细胞和 HGK 的影响的研究。

[0167] (1) NGF 和它的受体在 HPL 细胞中的表达

[0168] 用与上述实施例 1 (2) 同一的方法从 HPL 细胞回收、纯化总 RNA。将得到的总 RNA 作为样品，通过 Northern blot 法测定 NGF 和 TrkA 的 mRNA 表达。作为对照使用 GAPDH。

[0169] 结果如图 11A、11B 所示。图 11A 表示 NGF 的 mRNA 的表达，图 11B 表示 TrkA 的 mRNA 表达。就像图所表明的那样，确认 NGF 的 mRNA 和 TrkA 的 mRNA 在 HPL 细胞中都表达。

[0170] (2) 骨相关蛋白在 HPL 细胞中的表达

[0171] NGF 对 HPL 细胞中的骨相关蛋白的 mRNA 表达的影响的测定。

[0172] 除了使用最终浓度 0、5、10、25、50 或 100ng/ml 的 NGF (Recombinant Human NGF、R&D system、Minneapolis、USA) 取代 BDNF 以外，用与实施例 1 (4) (i) 同一的方法对 HPL 细胞进行处理。用与实施例 1 (4) (i) 同一的方法对 NGF 处理的 HPL 细胞的 ALPase、BMP-2、OPN 的各个 mRNA 表达量进行测定。

[0173] 图 12、13、14 分别给出了 NGF 对于 OPN、ALPase、BMP-2 的各个 mRNA 表达的经时效果测定和浓度效果测定的结果。在各个图中，* 表示 $p < 0.05$ ，** 表示 $p < 0.01$ 。检验通过 t-test。

[0174] 就像图 12、13、14 所表明的那样，NGF 依赖于浓度和时间使 ALPase、BMP-2、OPN 的 mRNA 表达量增加。

[0175] (3) HPL 细胞和 HGK 的增殖

[0176] NGF 对 HPL 细胞和 HGK 的 DNA 合成能力影响的测定。

[0177] 除了使用最终浓度 0、5、10、25、50 或 100ng/ml 的 NGF 取代 BDNF 以外,用与实施例 1(5) 同一的方法对 HPL 细胞和 HGK 的 DNA 合成能力进行处理。用与实施例 1(5) 同一的方法对 NGF 处理的 HPL 细胞和 HGK 进行测定。

[0178] 图 15 给出了测定结果。NGF 作用时间都是 24 小时。(A) 表示对 HPL 细胞的效果,(B) 表示对 HGK 的效果。在各个图中,* 表示 $p < 0.05$,** 表示 $p < 0.01$ 。鉴定通过 t-test。

[0179] 就像图 15 所表明的那样,NGF 促进 HPL 细胞的 DNA 合成能力,而使 HGK 的 DNA 合成能力降低。

[0180] (实施例 4)

[0181] NT-3 对 HPL 细胞和 HGK 影响的研究。

[0182] (1)NT-3 和它的受体在 HPL 细胞中的表达

[0183] 用与上述实施例 1(2) 同一的方法从 HPL 细胞回收、纯化总 RNA。将得到的总 RNA 作为样品,通过 Northern blot 法测定 NT-3 和 TrkC 的 mRNA 表达。作为对照使用 GAPDH。

[0184] 结果如图 16A、16B 所示。图 16A 表示 NT-3 的 mRNA 的表达,图 16B 表示 TrkC 的 mRNA 表达。就像这些图所表明的那样,确认 NT-3 的 mRNA 和 TrkC 的 mRNA 在 HPL 细胞中都表达。

[0185] (2) 骨相关蛋白在 HPL 细胞中的表达

[0186] NT-3 对 HPL 细胞的 ALPase 活性影响的测定。

[0187] 除了使用最终浓度 0、1、10 或 50ng/ml 的 NT-3(Recombinant Human NT-3、R&D system、Minneapolis、USA) 取代 BDNF 以外,用与实施例 1(3)(i) 同一的方法对 HPL 细胞进行处理,该 ALPase 活性按照 Bessey-Lowry 法进行定量。即用磷酸缓冲液将 NT-3 处理的 HPL 细胞洗 3 次,加 10mM Tris 盐酸缓冲液后,在冰冷下进行超声波处理,制备样品。使用对硝基苯磷酸作为底物的 ALPase 测定试剂盒(和光纯药),测定样品中的 ALPase 活性。

[0188] 图 17 给出了对于 ALPase 活性的 NT-3 浓度效果测定的结果。NT-3 作用时间都是 24 小时。就像图表明的那样,几乎没有看到 NT-3 对 ALPase 活性有什么影响。

[0189] (3)HPL 细胞的增殖

[0190] 除了使用最终浓度 0、1、5、10、50 或 100ng/ml 的 NT-3 取代 BDNF 以外,用与实施例 1(5) 同一的方法对用实施例 1(1) 同一方法分离的 HPL 细胞进行处理。用与实施例 1(5) 同一的方法对它的 DNA 合成能力进行测定。

[0191] 图 18 给出了测定结果。NT-3 作用时间都是 24 小时。在各个图中,* 表示 $p < 0.05$,** 表示 $p < 0.01$ 。鉴定通过 t-test。就像图表明的那样,NT-3 促进 HPL 细胞的 DNA 合成能力。

[0192] (实施例 5)

[0193] 对在来自人牙周韧带成纤维细胞(human periodontal ligament cell、HPL 细胞)中 NT-4/5 导致骨相关蛋白的 mRNA 表达进行研究。

[0194] (1) 用 NT-4/5 处理 HPL 细胞

[0195] 将上述实施例 1(1)(i) 中得到的 HPL 细胞按照每皿 3.5×10^5 个接种到用牛 I 型胶原被覆的直径 60mm 的培养皿(SUMILON CELTITE C-1),使用 50 μ g/ml 的培养基 B 在 37℃、5% CO₂ 气相条件下培养 13 天。培养基每 2 天交换一次。在第 14 天培养结束前 0、3、6、12 或 24 小时,将细胞用 DMEM 洗 2 次,换成含有最终浓度 50ng/ml 的 NT-4/5(R&D) 的培养基 D。

[0196] (2)mRNA 在 HPL 细胞中的表达

[0197] 与上述 (3) (i) 所述方法同样操作,使用 ISOGEN 从用最终浓度 50ng/ml 的 NT-4/5 处理的 HPL 细胞提取、纯化总 RNA。ALPase、BMP-2、OPN、骨钙蛋白 (OCN)、BMP-7、BMP-4、OPG 的 mRNA 表达量使用 ABI PRISM7700 (Applied Biosystems、东京),通过实时监测 PCR 产物生成过程进行定量解析 (Real-time PCR 法)。作为对照使用 GAPDH。

[0198] 对于各个骨相关蛋白的 mRNA 表达的 NT-4/5 的经时效果测定的结果如图 19A、19B、19C 所示。在各个图中 * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ (统计学的鉴定通过 t-test)。就像图所表明的那样,在 HPL 细胞中 NT-4/5 促进 OPN、BMP-2、ALPase、OCN、BMP-7 的 mRNA 表达。然而,对 BMP-4、OPG 的表达没有影响。

[0199] (实施例 6)

[0200] NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 对人牙髓细胞 (human pulp cell, HP 细胞) 的影响的研究。

[0201] (1) 使用细胞

[0202] 将在方便除去牙髓时得到的健全牙髓切碎。将切碎的组织贴附在直径 60mm 的细胞培养皿 (CORNING、NY),于 37℃、5% CO₂ 气相条件下用培养基 A 进行培养。将进行了 4 ~ 8 代继代的 HP 细胞供以下实验用。

[0203] (2) 细胞用 NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 处理

[0204] 将 NGF、BDNF、NT-3 或 NT-4/5 按照最终浓度 0、5、10、25、50 或 100ng/ml 加到培养基 D 中,制备含有各种浓度的神经营养因子的培养基。将上述 (2) 得到的 HP 细胞在用牛 I 型胶原被覆的直径 60mm 培养皿 (SUMILON CELTITE C-1),每一个皿 3.5×10^5 个,使用培养基 B,于 37℃、5% CO₂ 气相条件下培养 13 天。培养基每 2 天交换一次。在第 14 天培养结束前 24 小时,用 DMEM 将细胞洗 2 次,换成含有任一个神经营养因子的培养基。

[0205] (3)mRNA 在 HP 细胞中的表达

[0206] 使用 ISOGEN 从在上述 (1) 用各种浓度 NGF、BDNF、NT-3 或 NT-4/5 处理 24 小时的 HP 细胞提取、纯化总 RNA。ALPase、BMP-2、牙质唾液酸磷酸蛋白 (DSPP)、I 型胶原 (collagen)、OPN、OCN 的 mRNA 表达量使用 ABI PRISM7700 (Applied Biosystems、东京),通过实时监测 PCR 产物生成过程进行定量解析 (Real-time PCR 法)。作为对照使用 GAPDH。

[0207] 对于 NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 对于各个骨相关蛋白的 mRNA 表达的浓度效果测定的结果分别如图 20、21、22、23 所示。就像图所表明的那样,NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 在 HP 细胞中促进 ALPase、BMP-2、DSPP、OPN、OCN 的 mRNA 表达。BDNF 和 NT-4/5 也促进 I 型胶原 mRNA 的表达。

[0208] (4) HP 细胞的增殖

[0209] NGF、BDNF、NT-3、NT-4/5 对于对 HP 细胞的 DNA 合成能力的影响使用 Cell Proliferation ELISA system, version 2 (Amersham Pharmacia Biotech) 通过 ELISA 法进行测定。

[0210] 取代 10% 的 FBS,向添加了 0.3% FBS 的培养基 B 按照最终浓度为 0、5、10、25、50 或 100ng/ml 分别添加 NGF、BDNF、NT-3 或 NT-4/5,制备含有各种神经营养因子的培养基。

[0211] 将上述 (1) 中得到的 HP 细胞按照 5×10^3 个 / 孔接种到用牛 I 型胶原被覆的 96 孔板 (SUMILON CELTITE C-1 板 96F),使用培养基 B 培养 10 天。将细胞用 DMEM 洗 2 次,取代

10%的FBS,用添加了0.3%FBS的培养基B培养24小时后,换成上述的含有各种神经营养因子的培养基,再培养24小时。培养结束的前2小时(即神经营养因子添加22小时后),以10ng/ml的浓度向各个孔添加溴脱氧尿苷(BrdU),整合到细胞。培养在37℃、5%CO₂气相条件下进行。

[0212] 培养结束后,对HP细胞进行固定后,进行封闭,使过氧化物酶标记抗BrdU抗体于室温下作用2小时,加TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)底物,用吸光度计(MICRO PLATE READER、TOSOH)测定波长450nm的吸光度。

[0213] 结果如图24所示。就像图表明的那样,NGF、BDNF、NT-3或NT-4/5促进HP细胞的DNA合成能力。

[0214] (实施例7)

[0215] NGF、BDNF、NT-3、抗坏血酸对人间叶系干细胞(human mesenchymal stem cell、HMS细胞)影响的研究。

[0216] (1) 使用细胞

[0217] HMS细胞的分离按照堤等人(S. Tsutsumi;BBRC,26,288(2),2001)方法进行。即,在取得完全告知同意的患者的智齿拔去时,向下颚骨髓腔进行穿刺,得到骨髓液。将得到的骨髓液与含有肝磷脂钠(heparin sodium)(200U/ml, Sigma,美国)的Dulbecco改进的Eagle培养基(DMEM、Sigma、美国)迅速混合,进行离心分离(150g,5分钟)。离心分离后除去上清,将得到的细胞成分悬浮于含有10%的胎牛血清(FCS, Biological Industries, Israel)、100单位/ml的盘尼西林(明治制果、东京)、100μg/ml的链霉素(明治制果、东京)、1μg/ml的两性霉素B(GIBCO,美国)的DMEM,按照骨髓液为200~500μl/dish、培养基为10ml/dish那样接种于直径100mm的细胞培养用培养皿(Corning、美国)。培养在37℃、5%CO₂气相条件下进行。以后每隔4天进行培养基交换。在增殖的细胞刚达到铺满时,用含有0.05%胰蛋白酶(GIBCO,美国)、0.02%EDTA(片山化学,大阪)、100单位/ml的盘尼西林、100μg/ml的链霉素的磷酸缓冲生理盐水(PBS, 日水制药, 东京)使细胞分散。分散的细胞按照最终细胞密度为 1.0×10^6 细胞/ml那样悬浮于含有20%的FCS、10%二甲基亚砷(DMSO,片山化学,大阪)、100单位/ml的盘尼西林、100μg/ml的链霉素的DMEM中,按照每管1ml分装于血清管(住友BAKELITE,东京)后,于-20℃下冷冻2小时,-80℃下冷冻过夜后,保存在液氮中。

[0218] (2) 骨相关蛋白的mRNA在HMS细胞中的表达

[0219] (i) 将细胞用NGF、BDNF、NT-3处理

[0220] 将上述(1)得到的HMS细胞悬浮于含有10%的FCS的DMEM(含有100单位/ml的盘尼西林(明治制果,东京)、100μg/ml的链霉素(明治制果,东京)、1μg/ml的两性霉素B(GIBCO,美国))中,按照 1.0×10^5 细胞/孔的密度接种在6孔细胞培养板上。将细胞培养一周,在细胞要达到铺满前的时点,换成不含有FCS的DMEM(含有100单位/ml的盘尼西林(明治制果,东京)、100μg/ml的链霉素(明治制果,东京)、1μg/ml的两性霉素B(GIBCO,美国)),使NGF、BDNF、NT-3中的任一个都以100ng/ml浓度作用12小时和24小时。培养结束后使用ISOGEN(商品名)进行总RNA的提取。

[0221] (ii)mRNA的表达

[0222] 使用对ALPase、OCN、OPN、骨唾液酸蛋白(BSP)、I型胶原特异的引物进行PCR。PCR

反应在进行 94℃、2 分钟变性后,按照每一循环为 94℃ 15 秒、退火 30 秒、72℃ 50 秒反复进行 30 循环(只有 BSP 进行 35 循环),最后 72℃ 进行 7 分钟的延伸。得到的 PCR 产物使用含有 0.002% 溴化 -3,8- 二氨基 -5- 乙基 -6- 苯基菲啶鎓的 2% 琼脂糖凝胶进行电泳。电泳后的带浓度用 NIHimage 进行测定。

[0223] 结果如图 25A ~ E、26A ~ E27 以及 27A ~ E 所示。就像图表明的那样,没有看到 NGF 对 HMS 细胞的 ALPase、OCN、OPN、BSP、I 型胶原的任一个 mRNA 表达有显著作用。BDNF 明显促进 ALPase、OPN、BSP、BMP-2 的 mRNA 表达,也对 OCN 的基因表达有些促进。NT-3 促进 ALPase 和 I 型胶原的 mRNA 表达。

[0224] (3) 抗坏血酸、NGF、BDNF、NT-3 对 HMS 细胞增殖的影响

[0225] 将上述 (1) 得到的 HMS 细胞悬浮于含有 10% FCS 的 DMEM(日水制药制)(含有 100 单位 /ml 的盘尼西林 (明治制果、东京)、100g/ml 的链霉素 (明治制果、东京)、1 μ g/ml 的两性霉素 B(GIBCO, 美国)), 按照 5.0×10^3 细胞 / 孔的密度接种在 96 孔细胞培养板 (Corning、美国)。试验组在培养开始 24 小时后分别单独向培养基中 50 μ g/ml 的抗坏血酸 (Sigma、美国)、100ng/ml 的 NGF (FUNAKOSHI, 东京)、100ng/ml 的 BDNF (FUNAKOSHI, 东京)、或 100ng/ml 的 NT-3 (FUNAKOSHI, 东京),再培养 7 天。培养基交换在第 4 天进行。对照组为用含有 10% FCS 的 DMEM(日水制药制)(含有 100 单位 /ml 的盘尼西林 (明治制果、东京)、100 μ g/ml 的链霉素 (明治制果、东京)、1 μ g/ml 的两性霉素 B(GIBCO, 美国)) 培养的细胞。培养 7 天后,培养基全部换成含有 10% FCS 的 DMEM(含有 100 单位 /ml 的盘尼西林 (明治制果、东京)、100 μ g/ml 的链霉素 (明治制果、东京)、1 μ g/ml 的两性霉素 B(GIBCO, 美国)), 使用 CellTiter96(商品名) Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega、美国),通过测定 490nm 的吸光度计测活细胞数。

[0226] 结果如图 28 所示。图的纵轴表示试验组相对于对照组的吸光度的百分率。* 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$ (统计学的鉴定通过 t-test)。就像图所表明的那样,添加了抗坏血酸、NGF、BDNF、NT-3 中任一个的培养基培养的 HMS 细胞与对照相比表现出有意义的很高的细胞增殖。特别是抗坏血酸、BDNF、NT-3 的增殖促进作用比 NGF 强。

[0227] (实施例 8)

[0228] 在 Beagle 犬的 3 级牙根分叉部病变模型中 NGF 和 NT-3 的效果的研究。

[0229] 除了取代浓度 5、25、50 μ g/ml 的 BDNF 溶液 (灭菌生理盐水液中) 的 25 μ l, 使浓度 100 μ g/ml 的 NGF 溶液 (灭菌生理盐水液中) 的 25 μ l 浸透直径 8mm × 5mm 的 TERUPLUG R 后的材料和使浓度 100 μ g/ml 的 NT-3 溶液 (灭菌生理盐水液中) 的 25 μ l 浸透的材料作为移植材料以外,其它与实施例 2 同样进行实验。从做成的组织标本 (苏木精曙红染色) 选择与近远心方向牙轴平行,而且在牙根中央附近被切得很薄的标本,用光学显微镜 (ECLIPSE E600、NIKON) 进行观察。

[0230] 图 29A 是填塞含有 NGF 的移植材料的牙根分叉部骨缺损部的光学显微镜像,图 29B 是填塞含有 NT-3 的移植材料的牙根分叉部骨缺损部的光学显微镜像 (倍率 20 倍)。就像图表明的那样,通过给予 NGF 或 NT-3,在狗的 3 级牙根分叉部病变模型中观察到再生骨。

[0231] 产业上利用的可能性

[0232] 本发明的牙周病治疗剂、修复象牙质形成促进剂、治疗方法、牙周组织再生用移植材料、牙周组织的再生方法在牙周病治疗和牙内疗法中都具有能成为有效治疗的可能性。

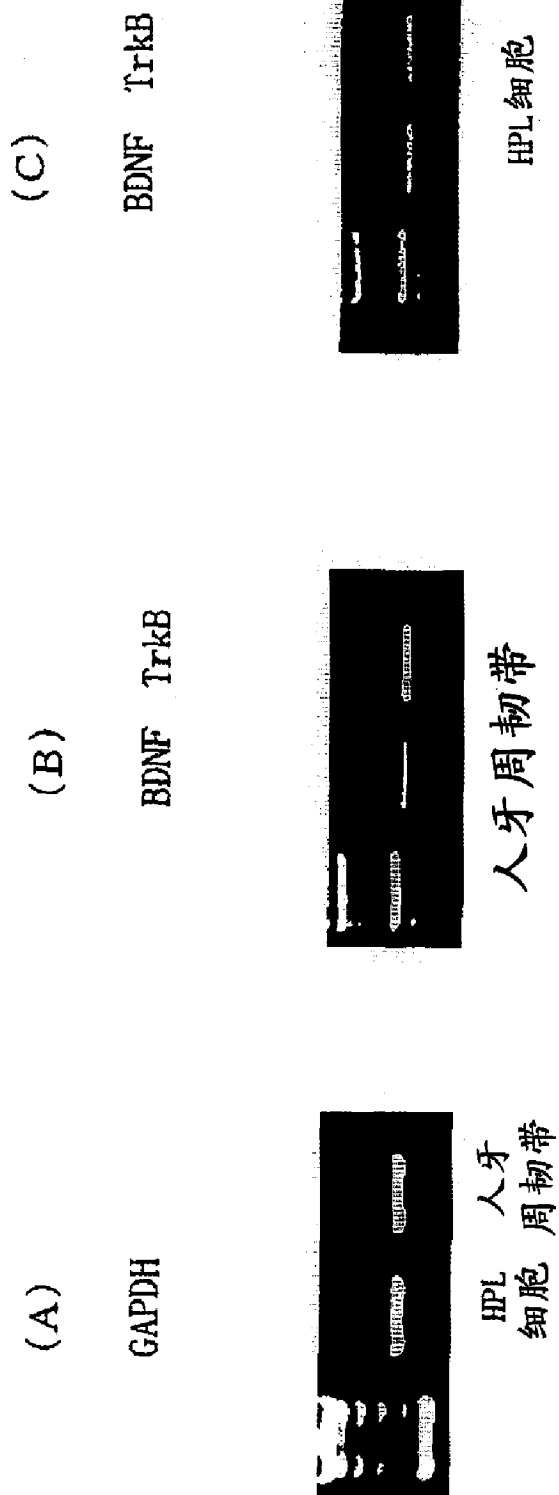


图 1

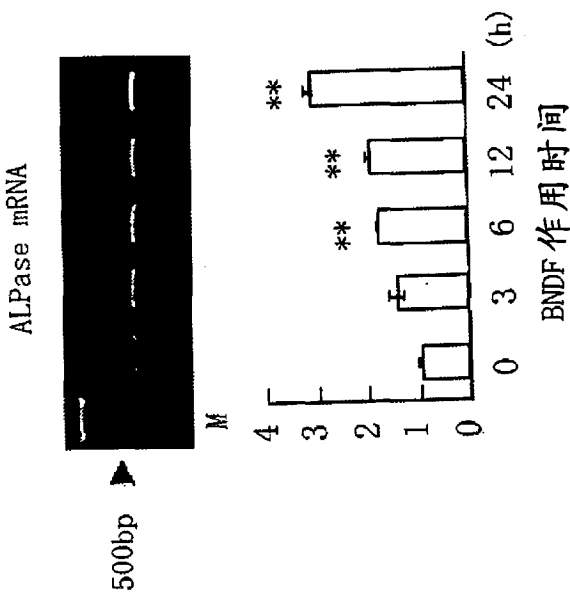


图 2A

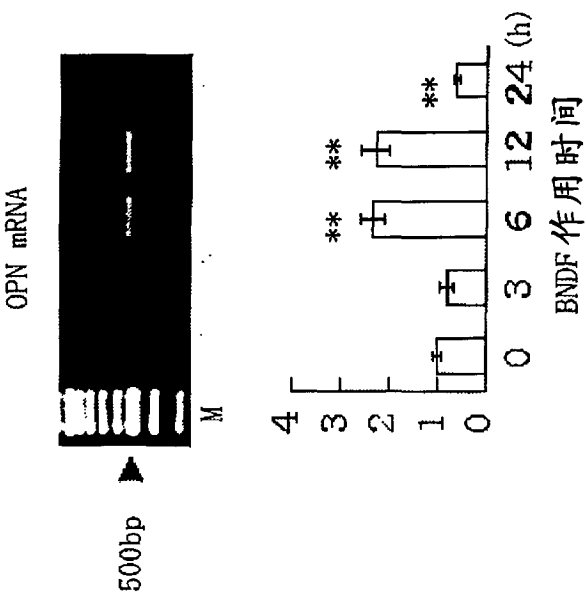


图 2B

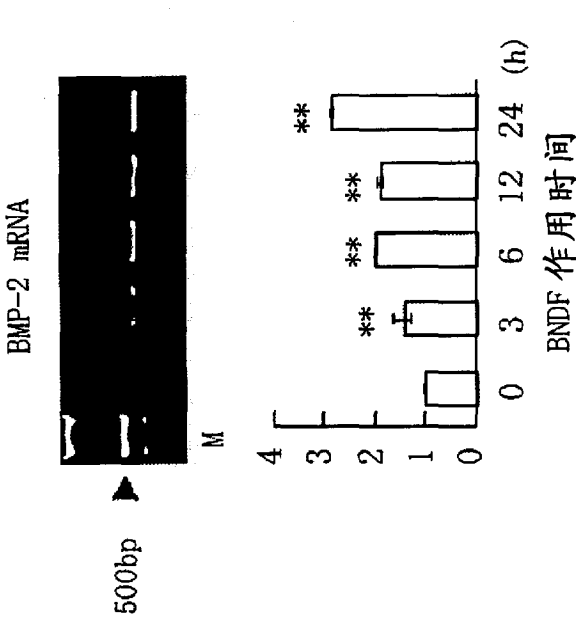


图 2C

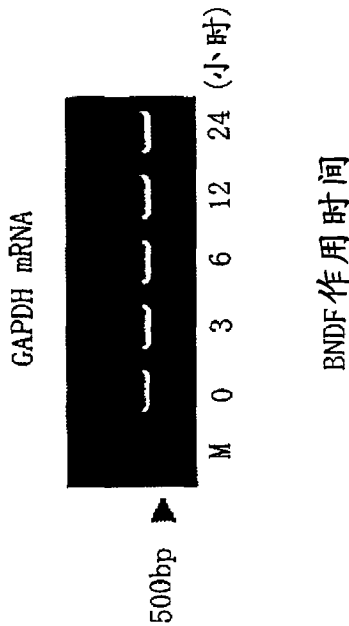


图 2D

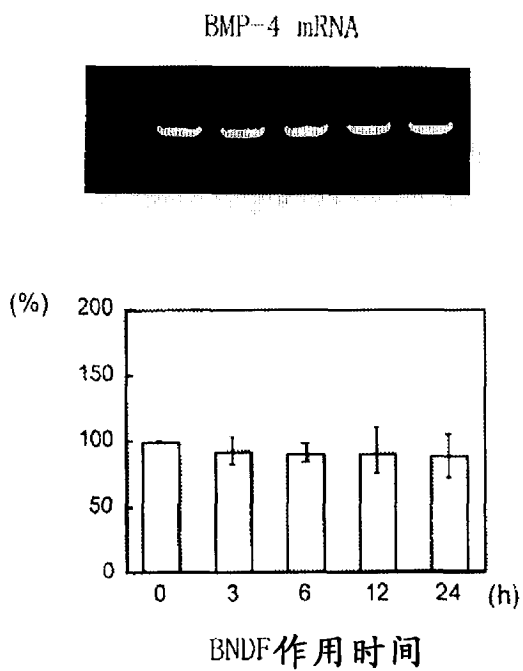


图 3A

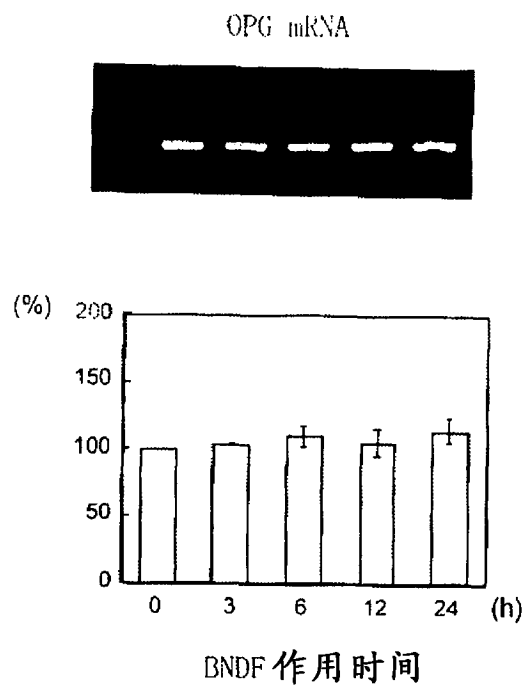


图 3B

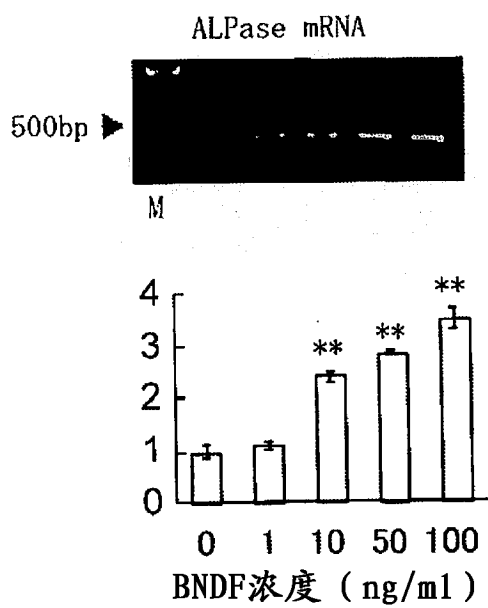


图 4A

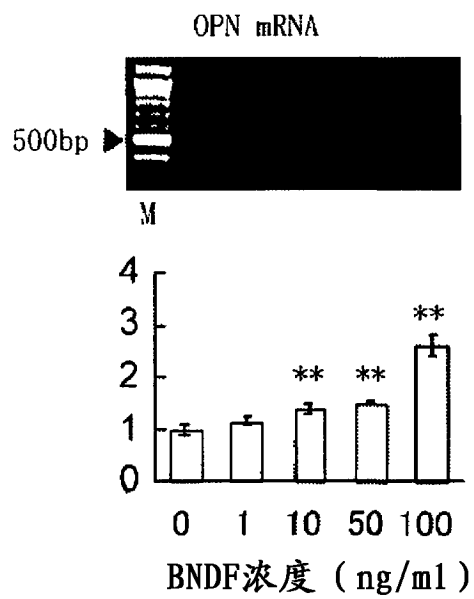


图 4B

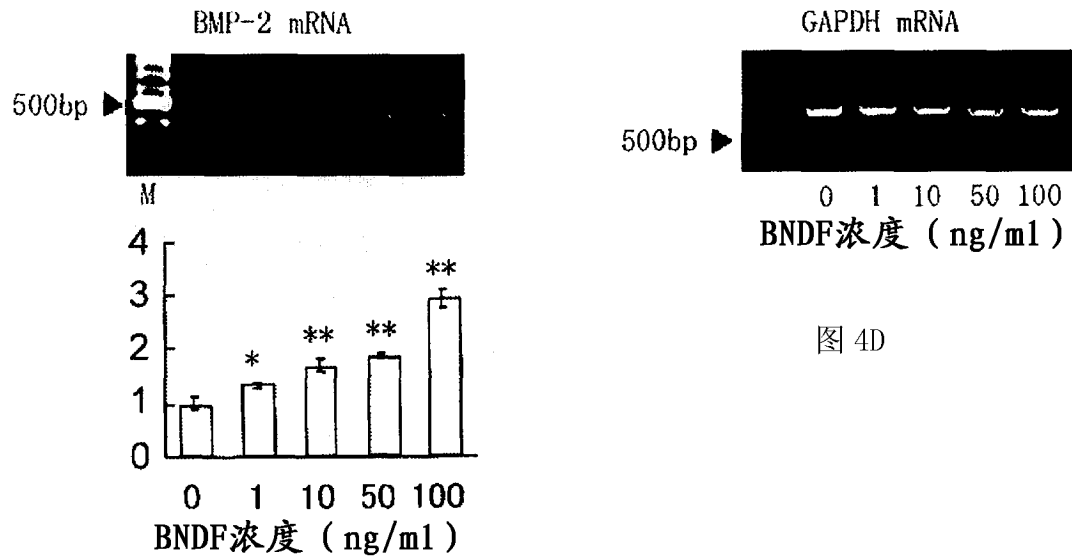


图 4D

图 4C

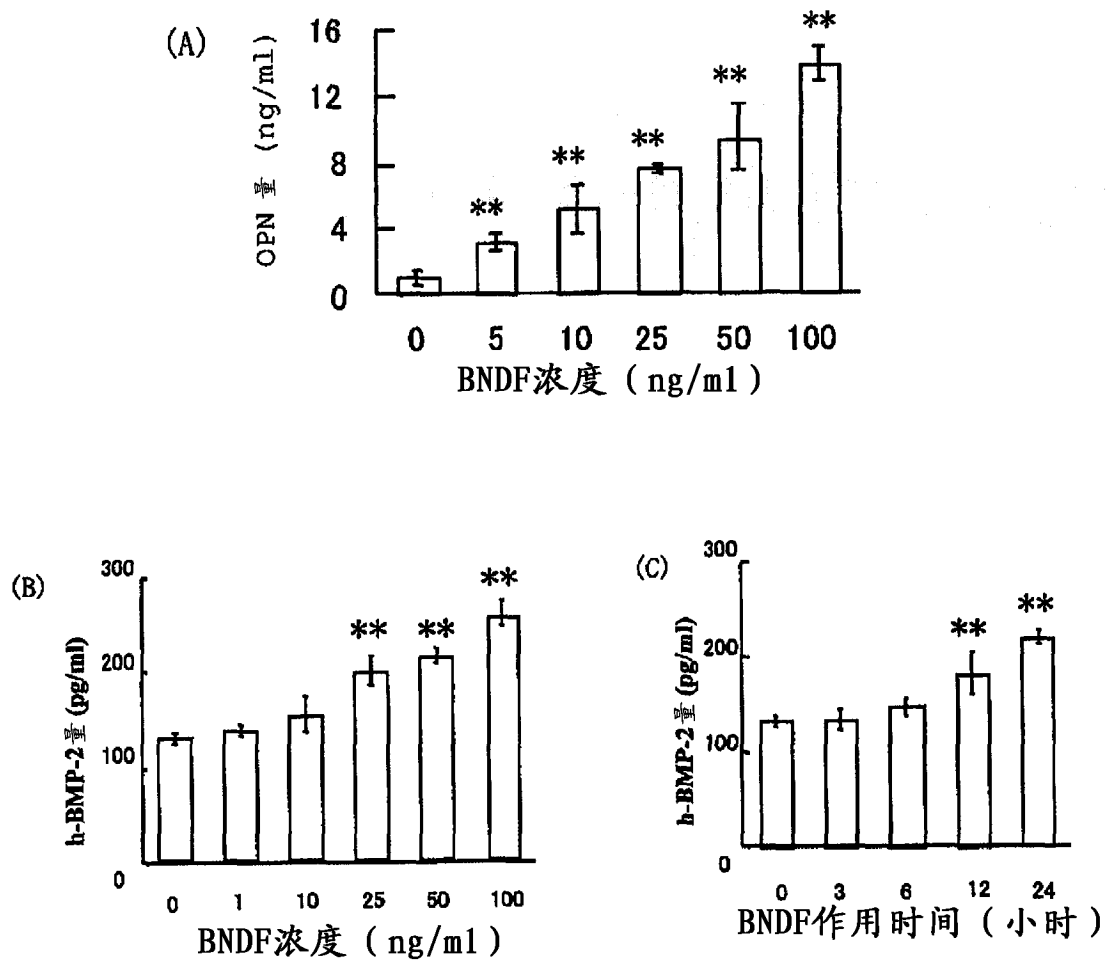


图 5

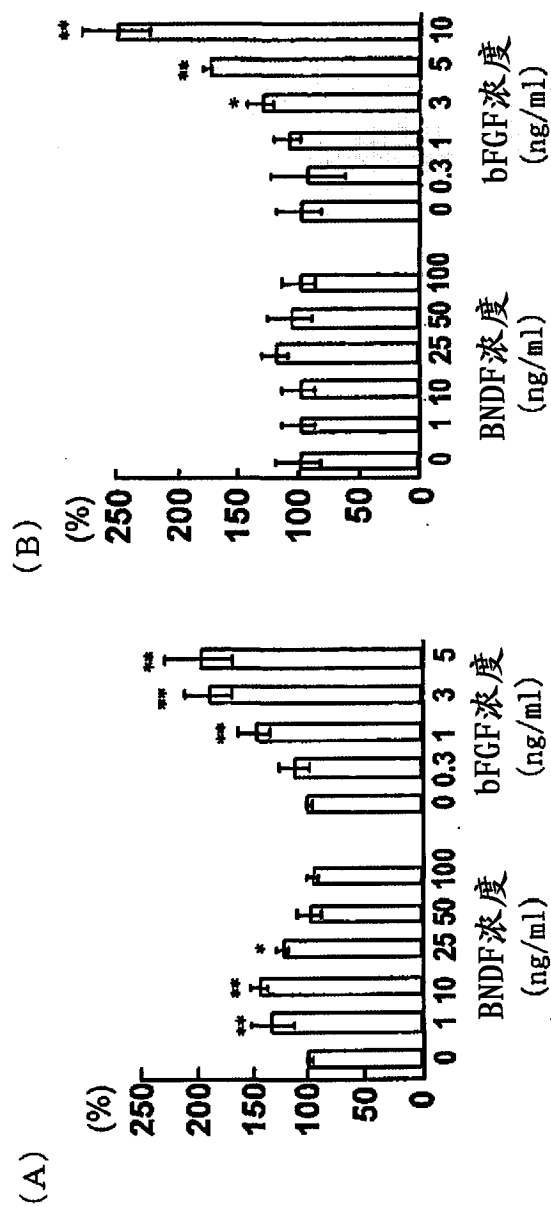


图 6

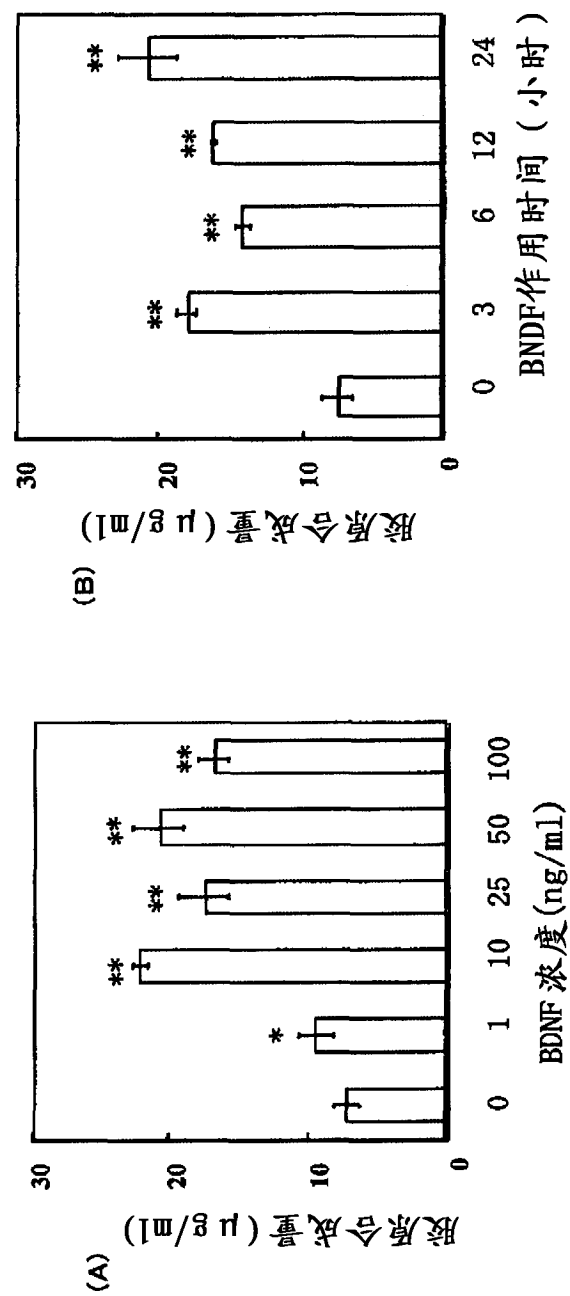


图 7

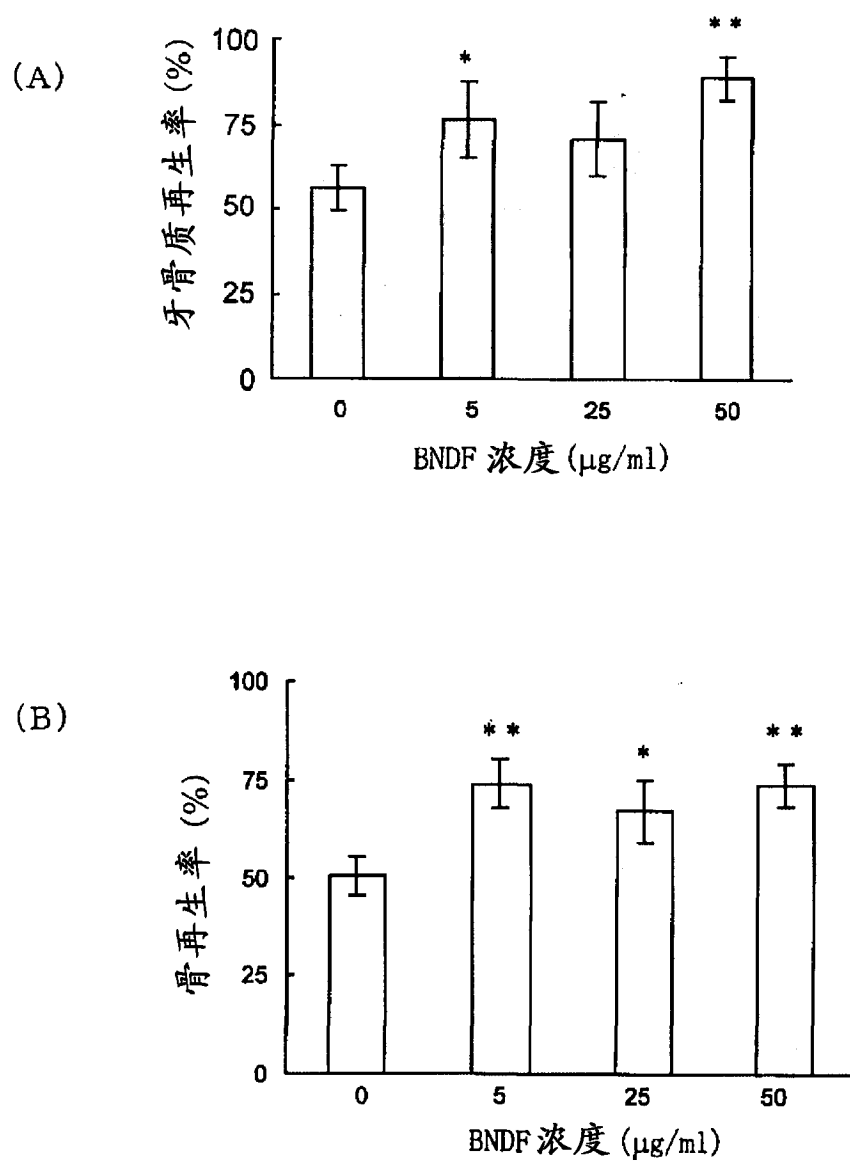


图 8



图 9A



图 9B

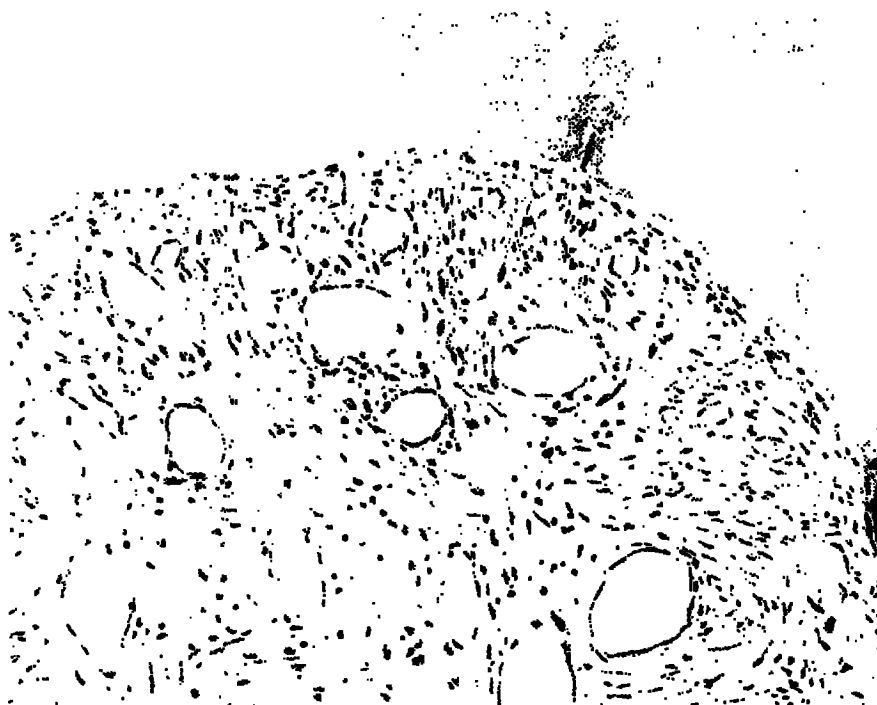


图 10

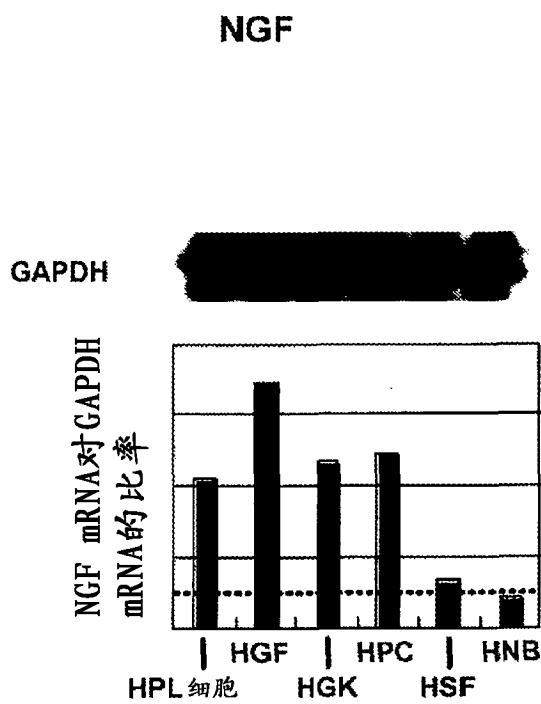


图 11A

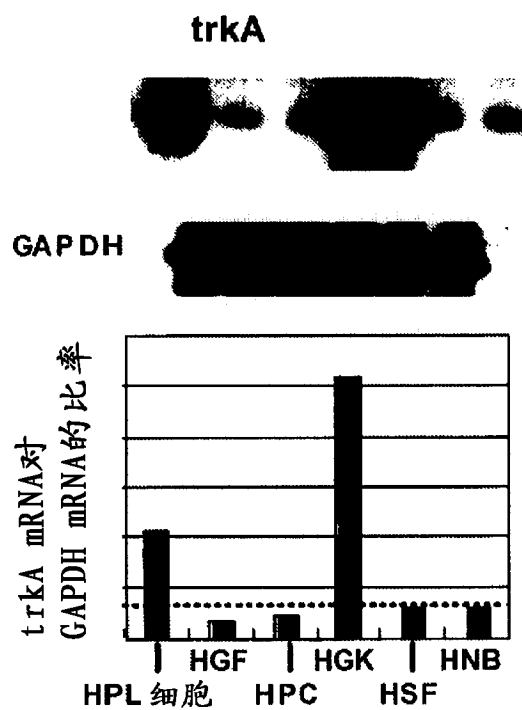
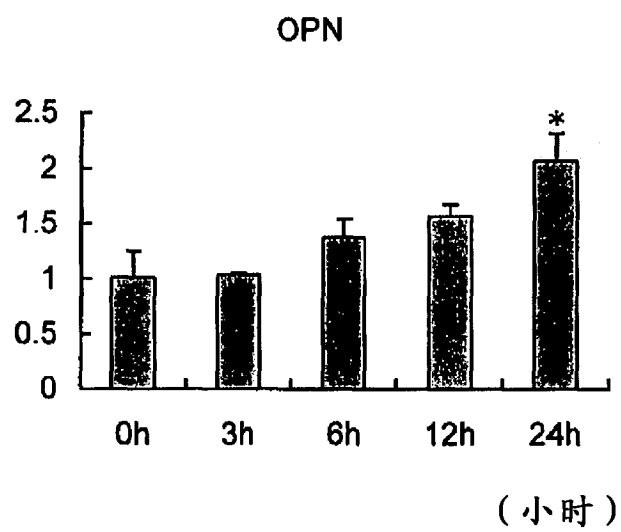


图 11B

(A)



(B)

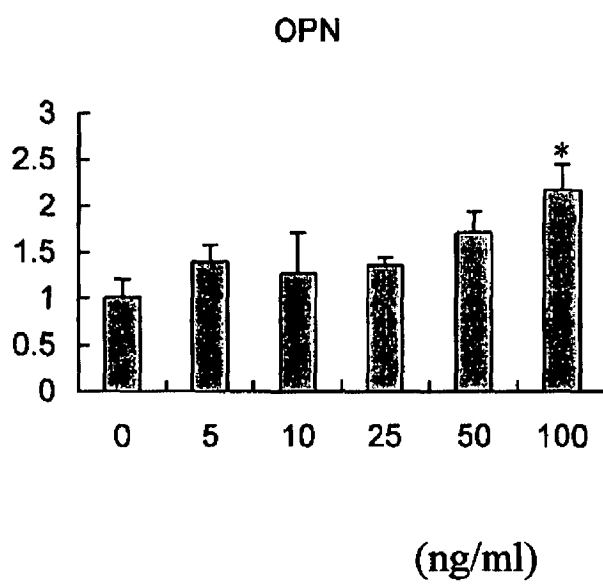
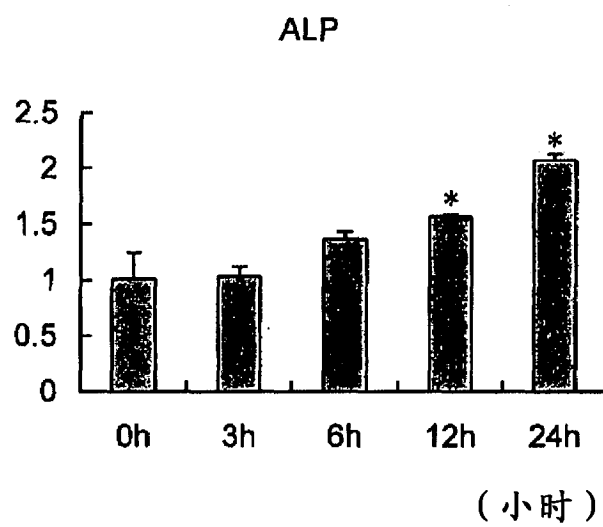


图 12

(A)



(B)

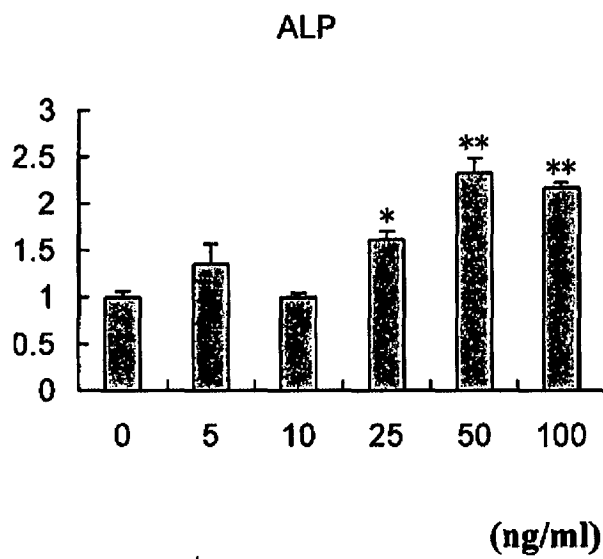
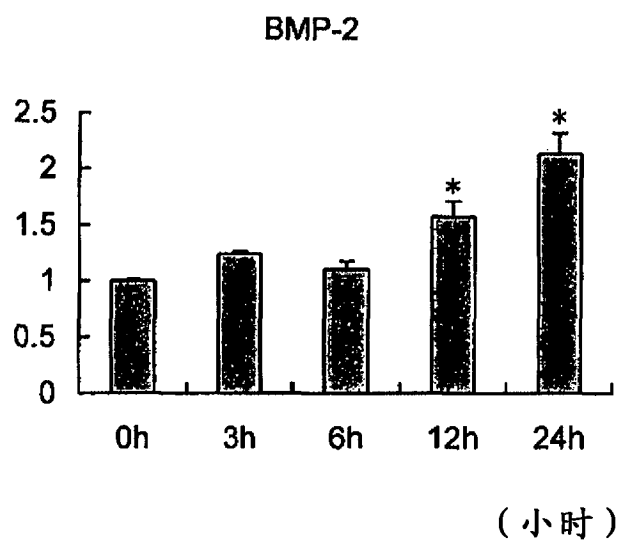


图 13

(A)



(B)

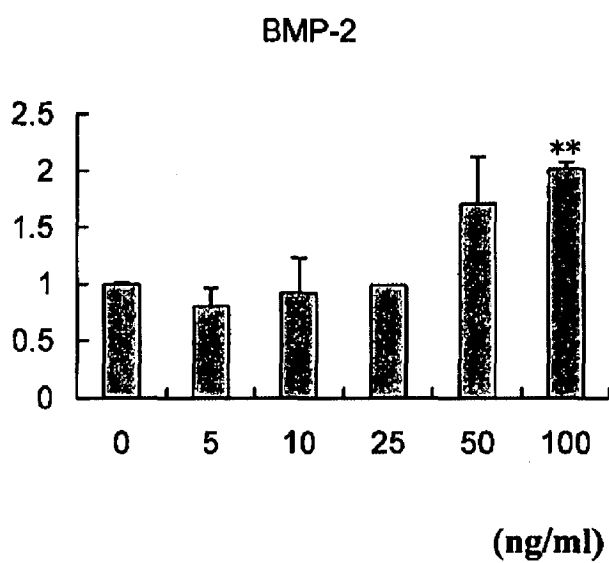
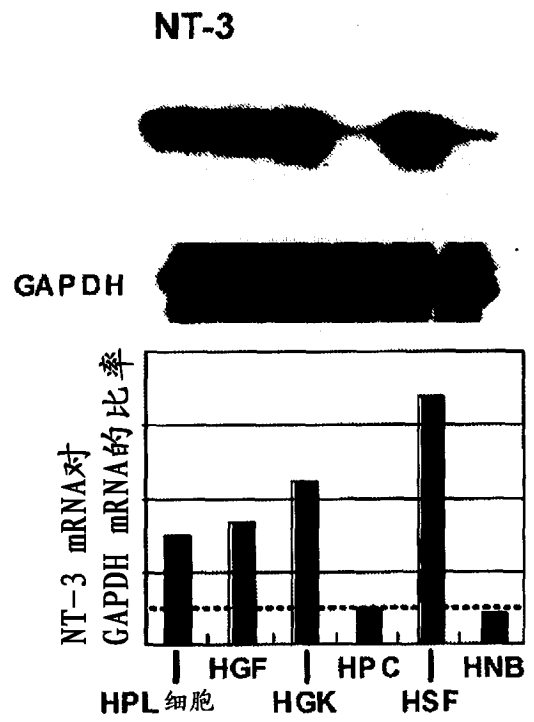
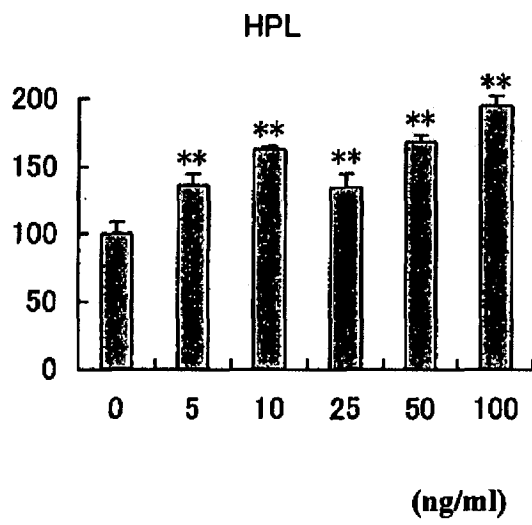


图 14

(A)



(B)

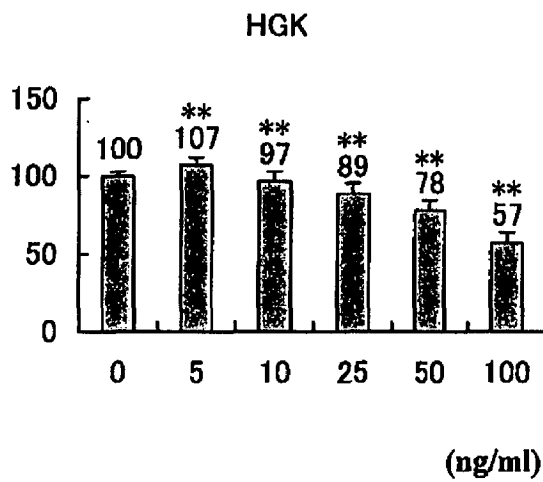


图 16A

图 15

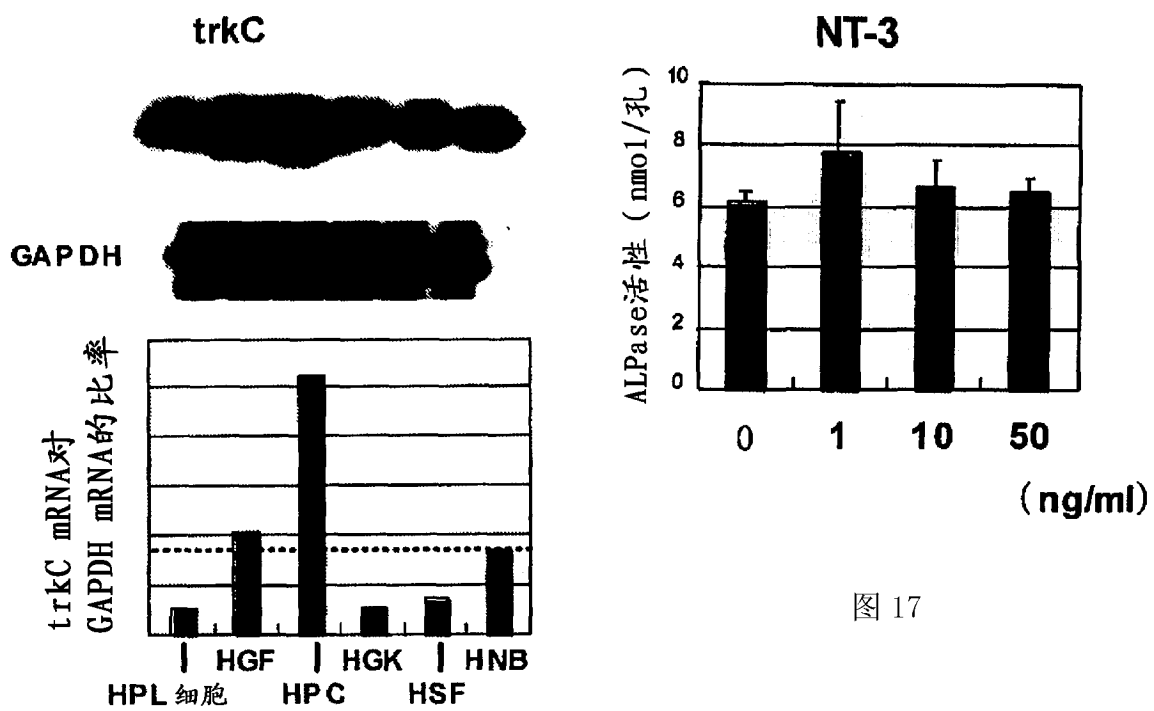


图 17

图 16B

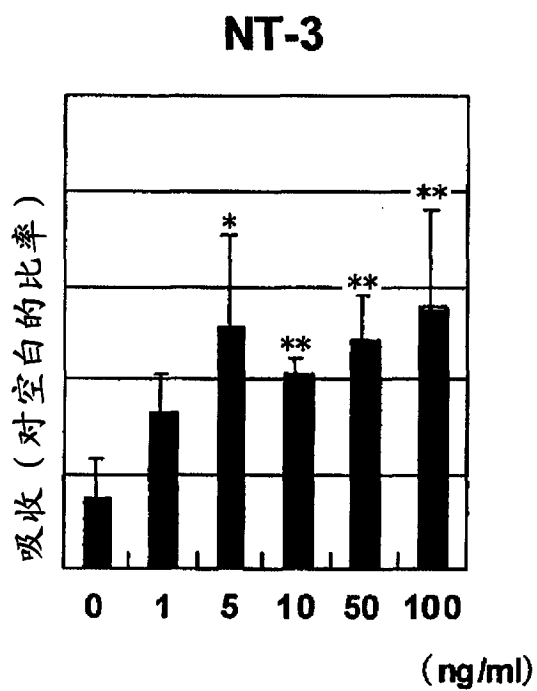


图 18

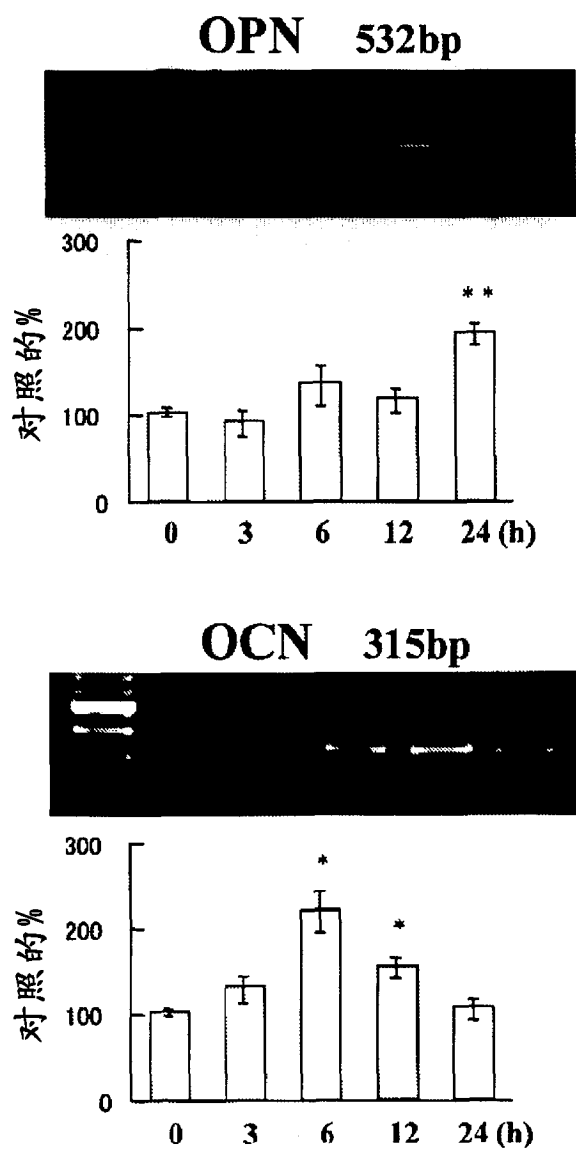


图 19A

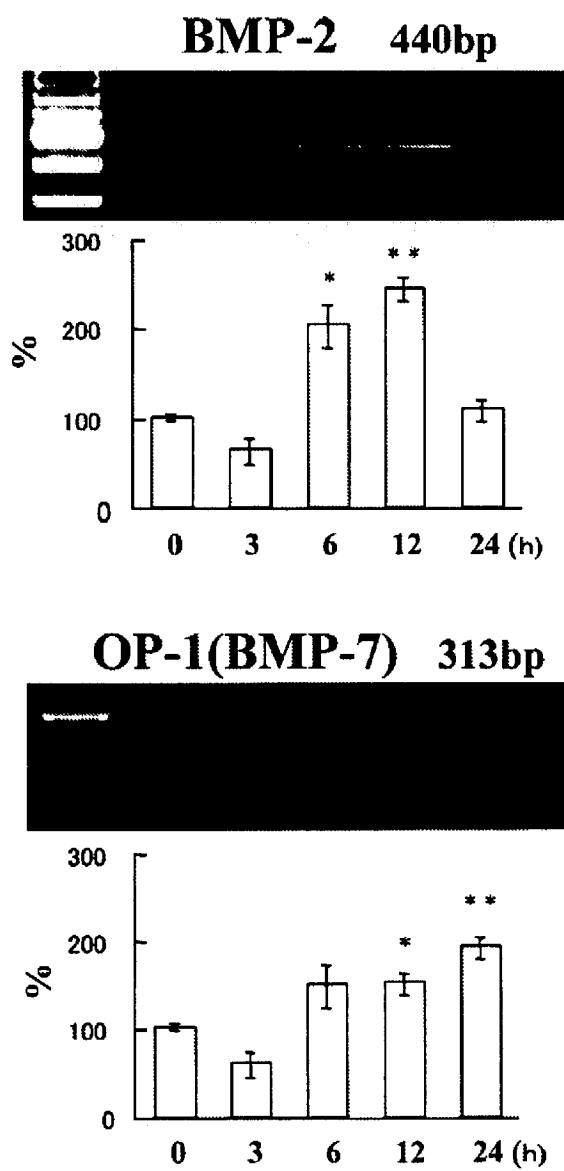


图 19B

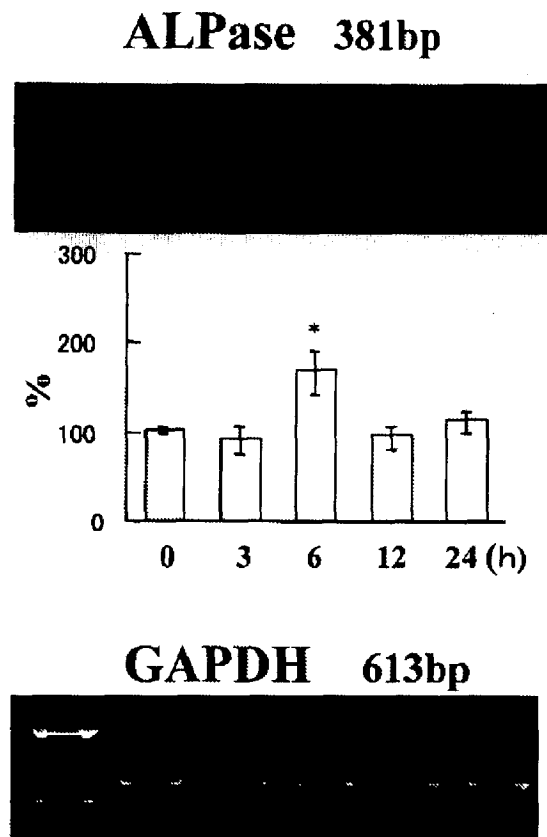


图 19C

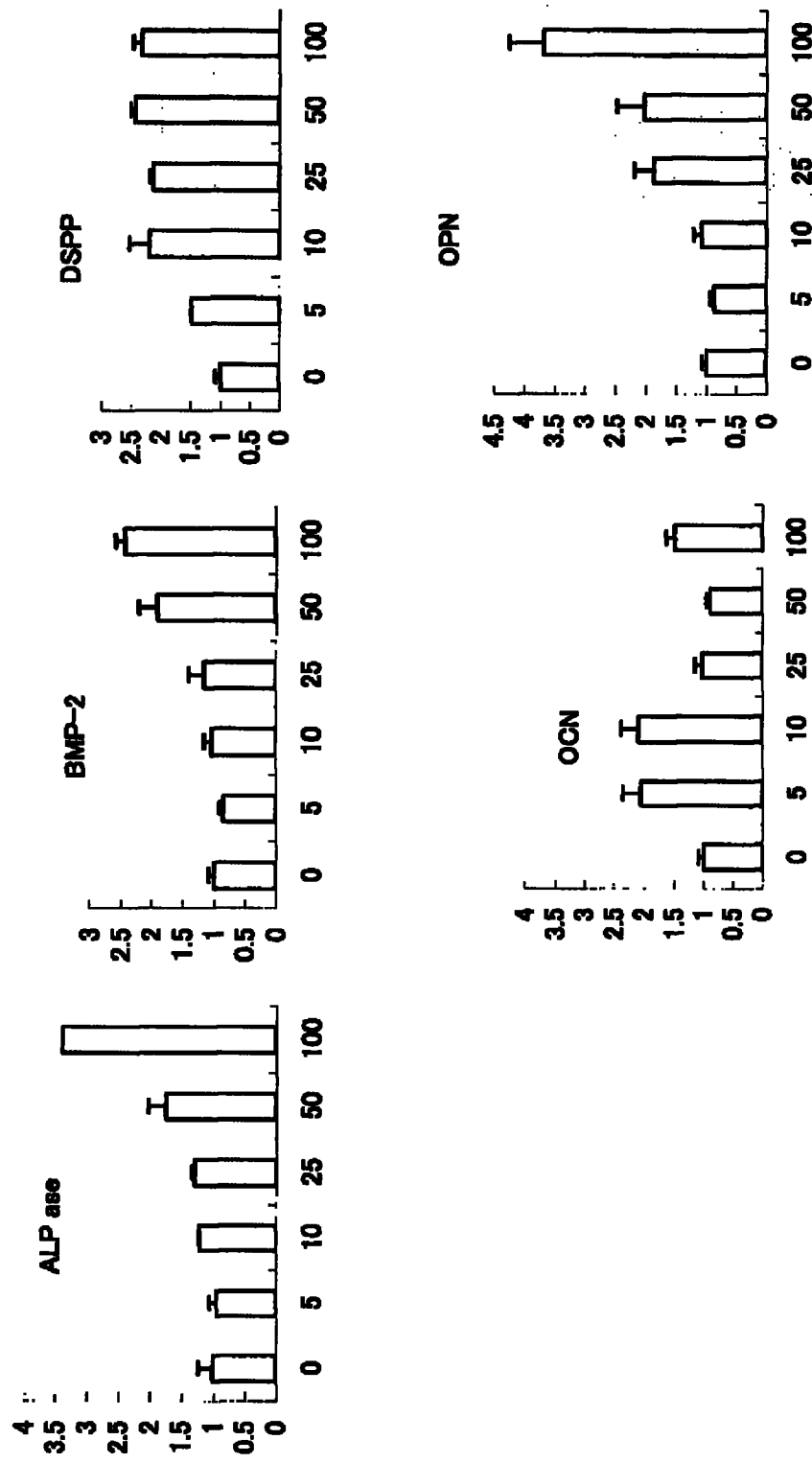


图 20

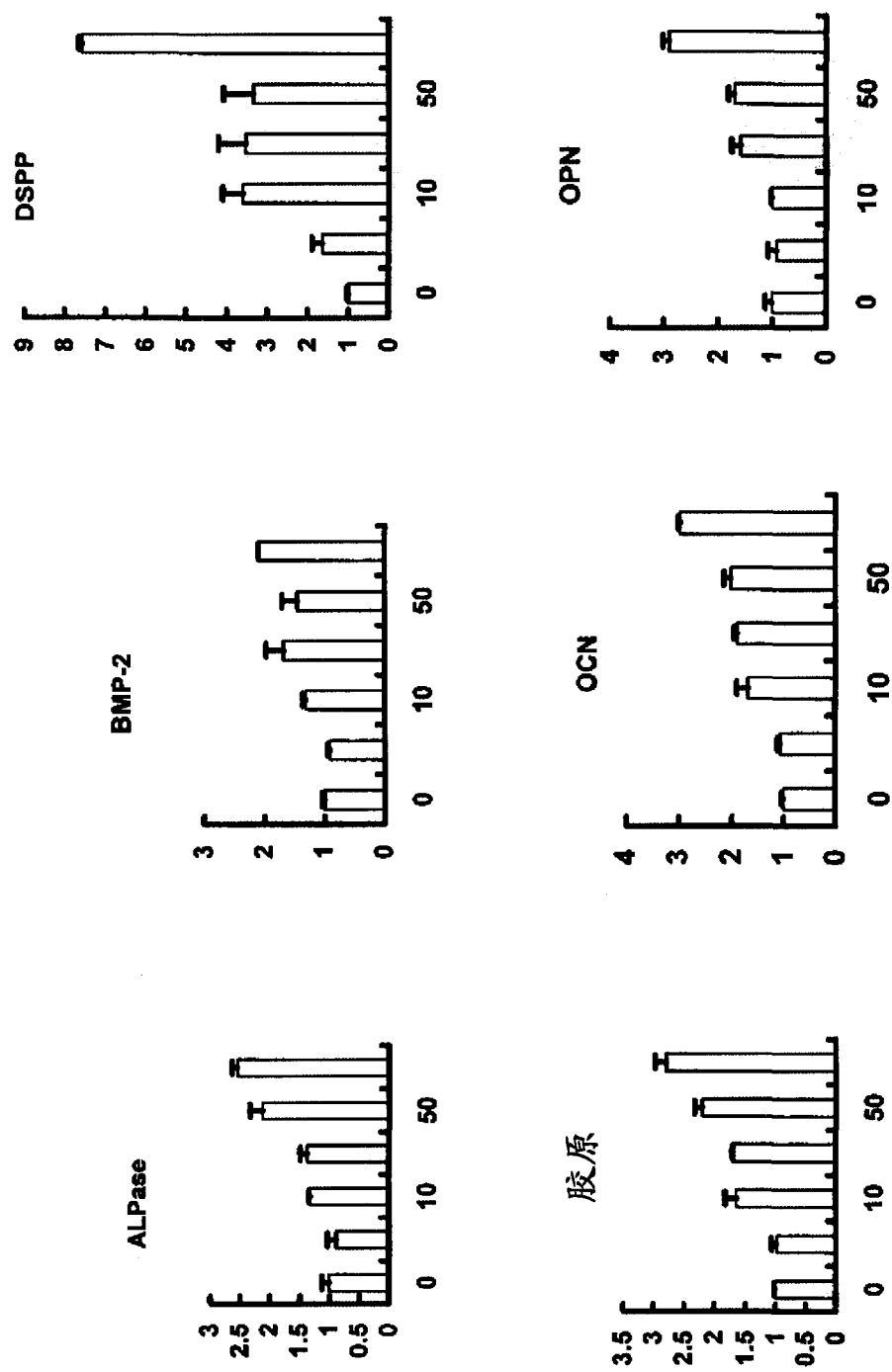


图 21

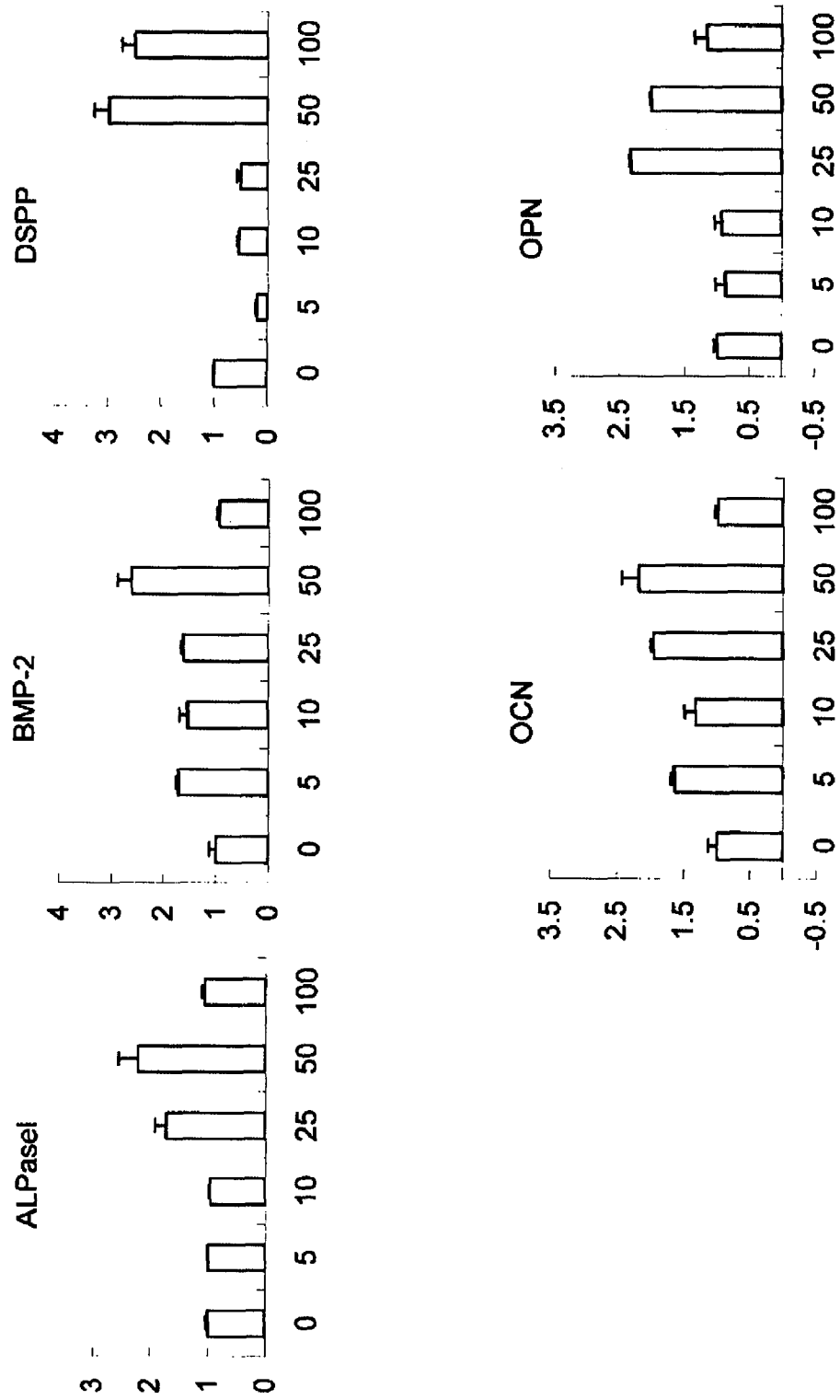


图 22

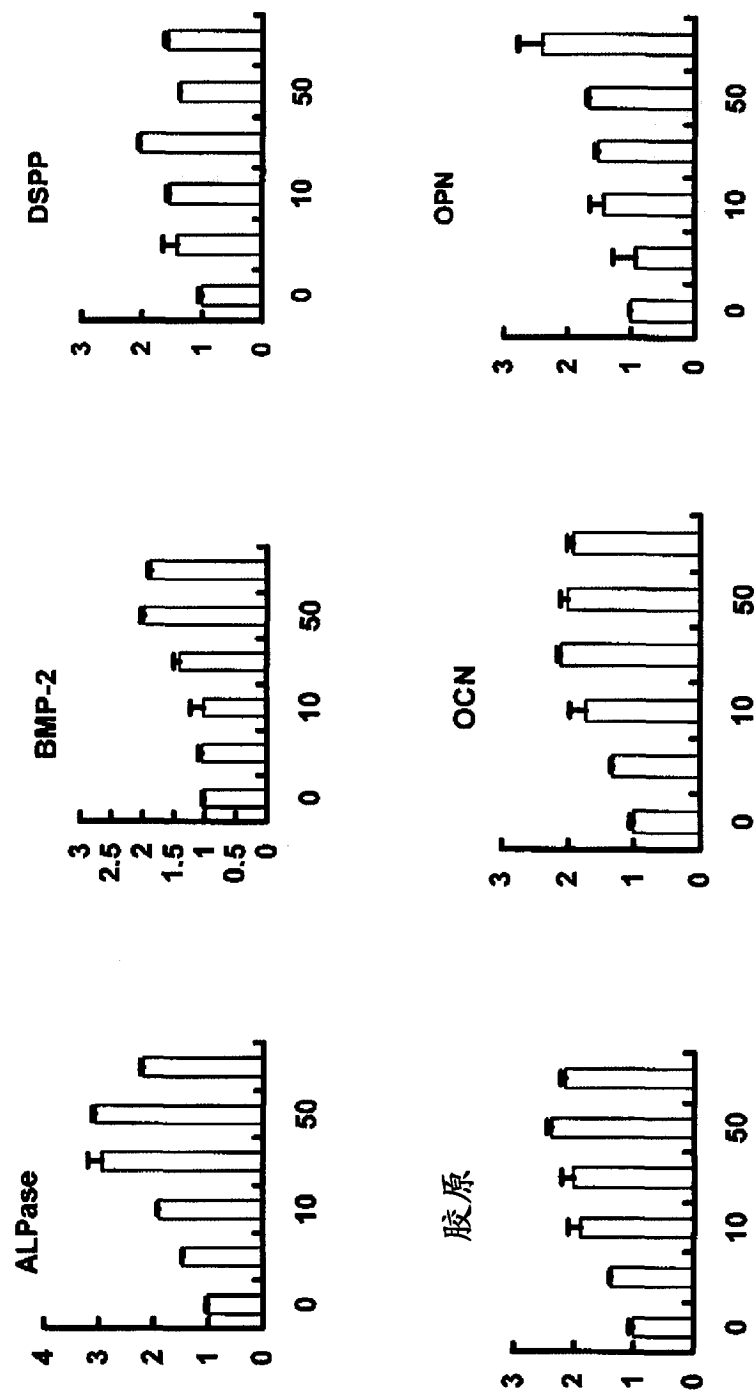


图 23

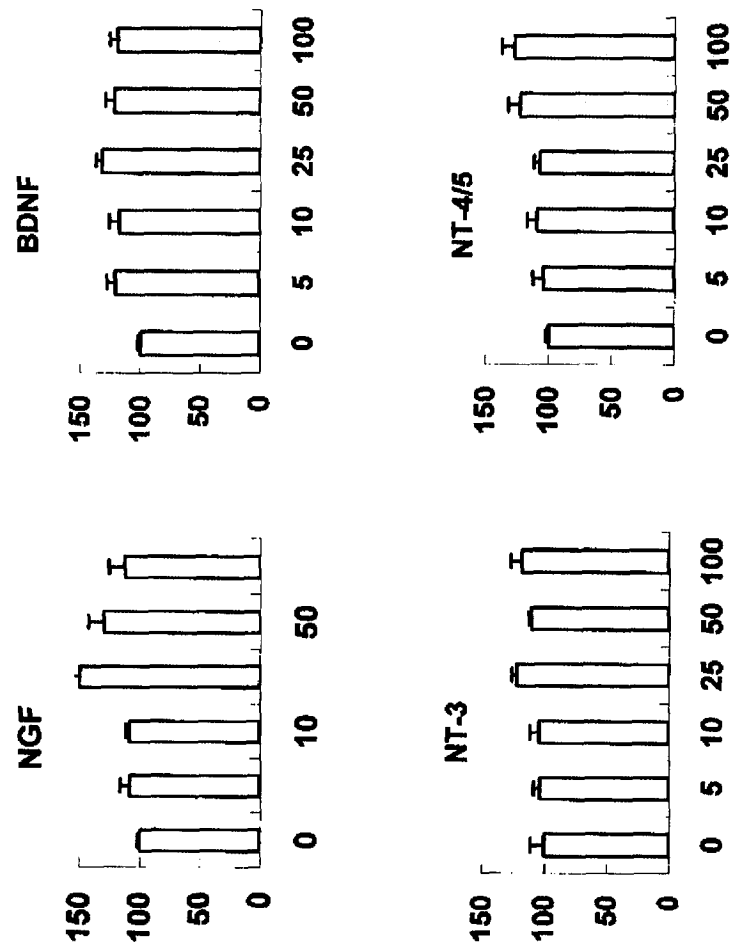


图 24

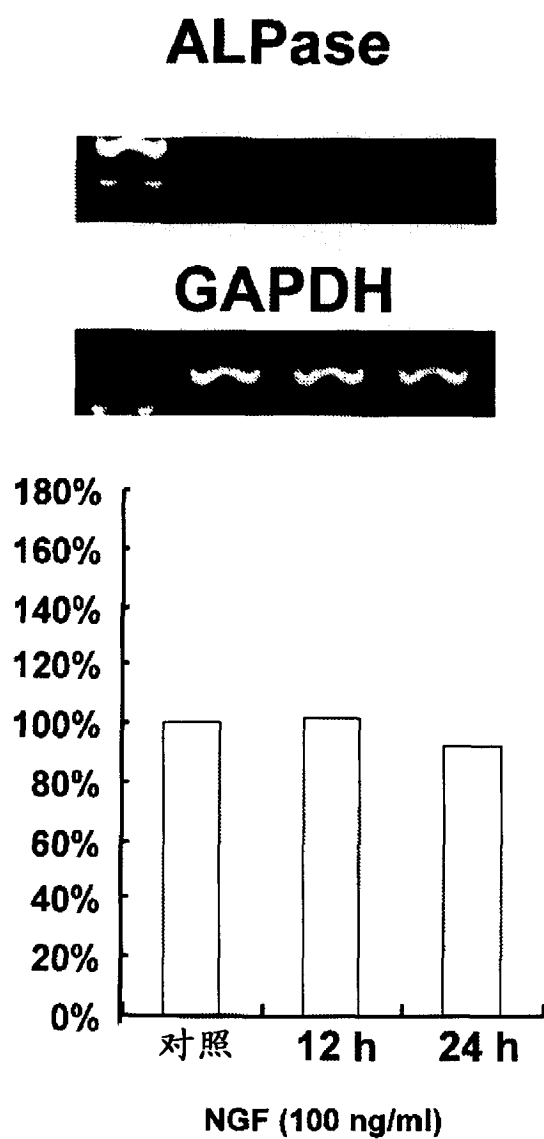


图 25A

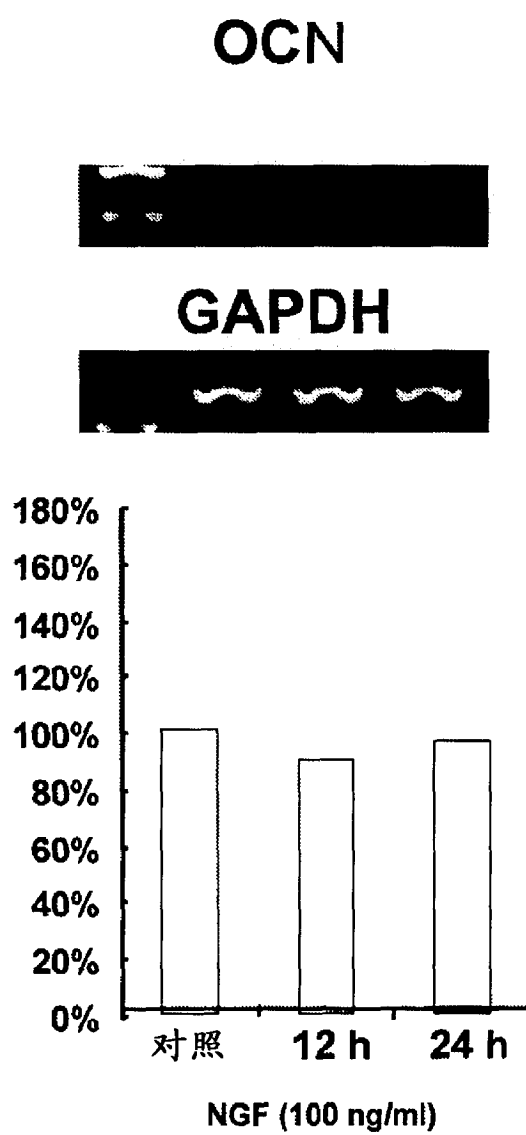


图 25B

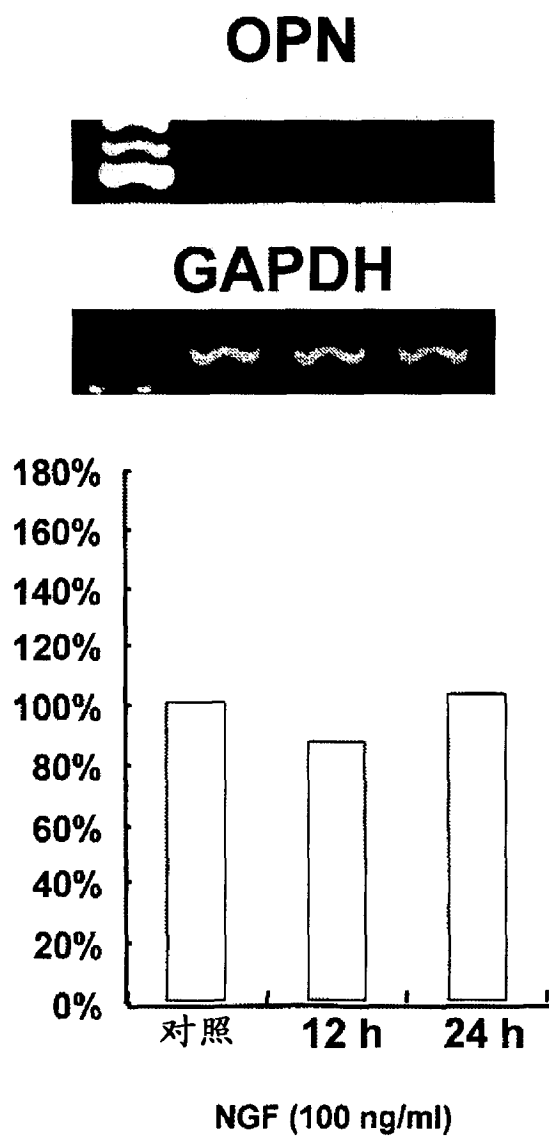


图 25C

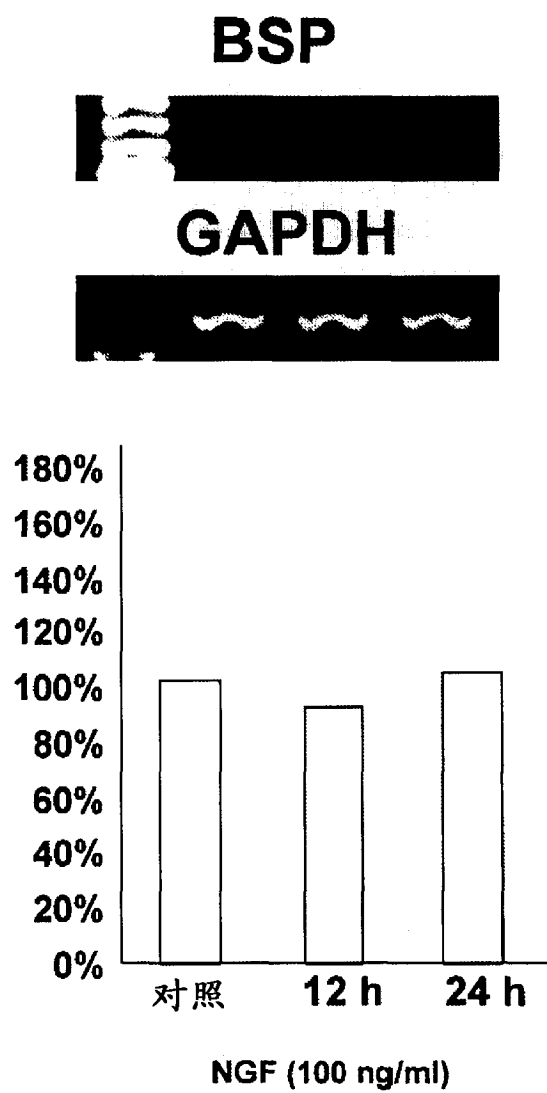


图 25D

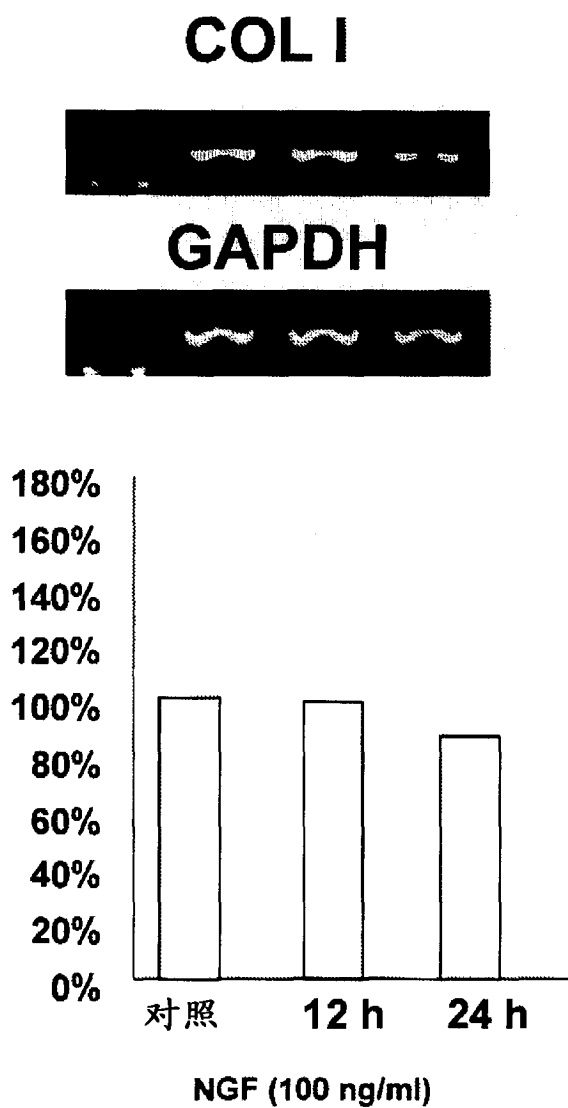


图 25E

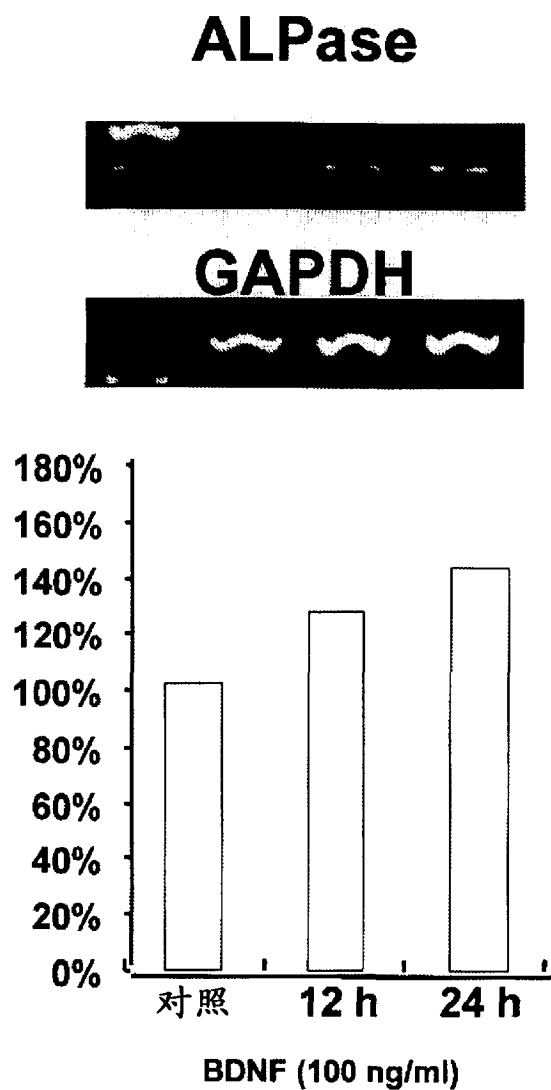


图 26A

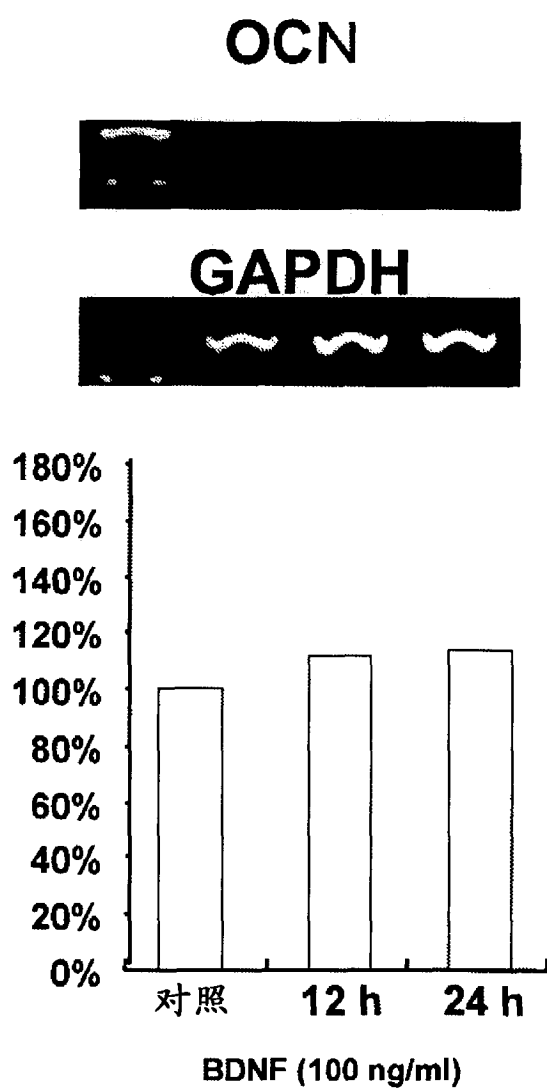


图 26B

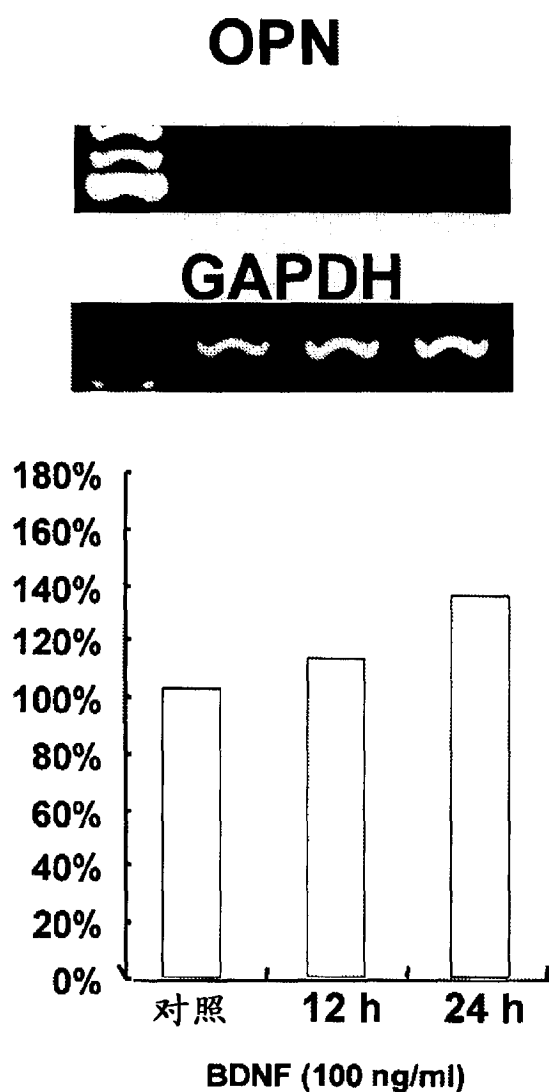


图 26C

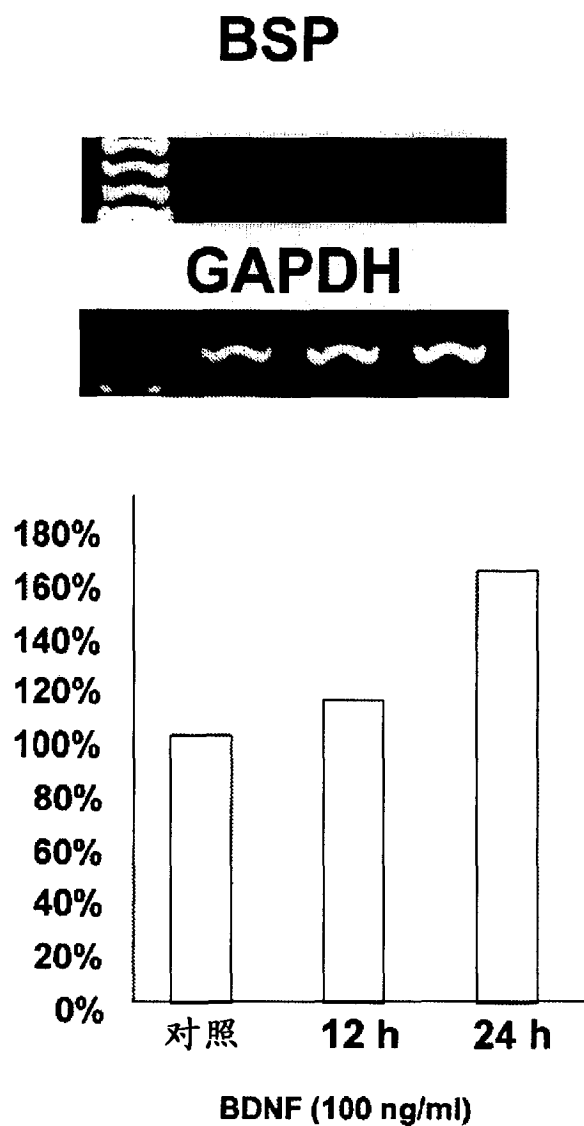


图 26D

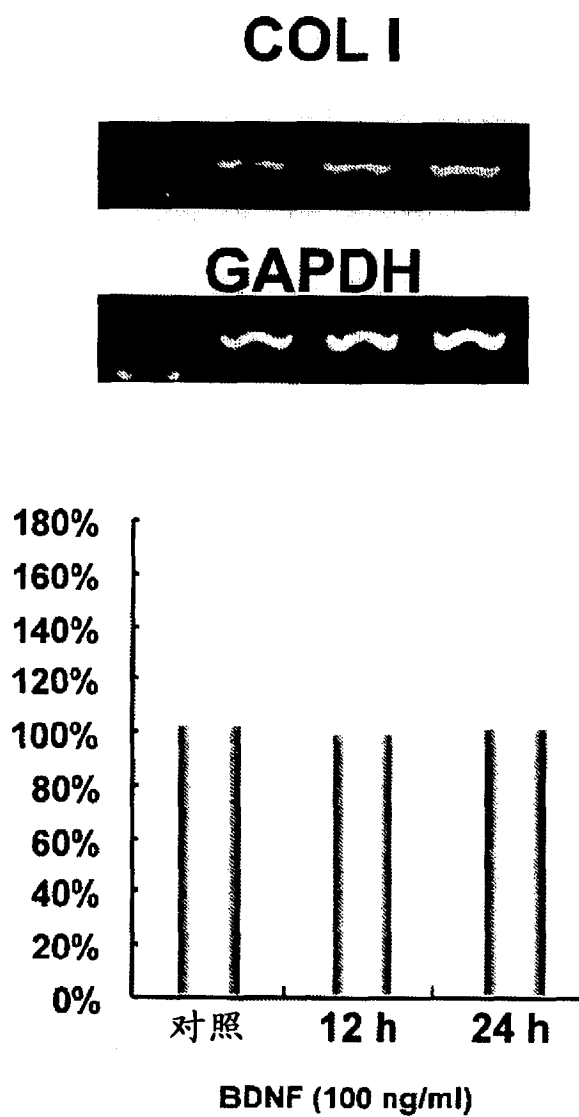


图 26E

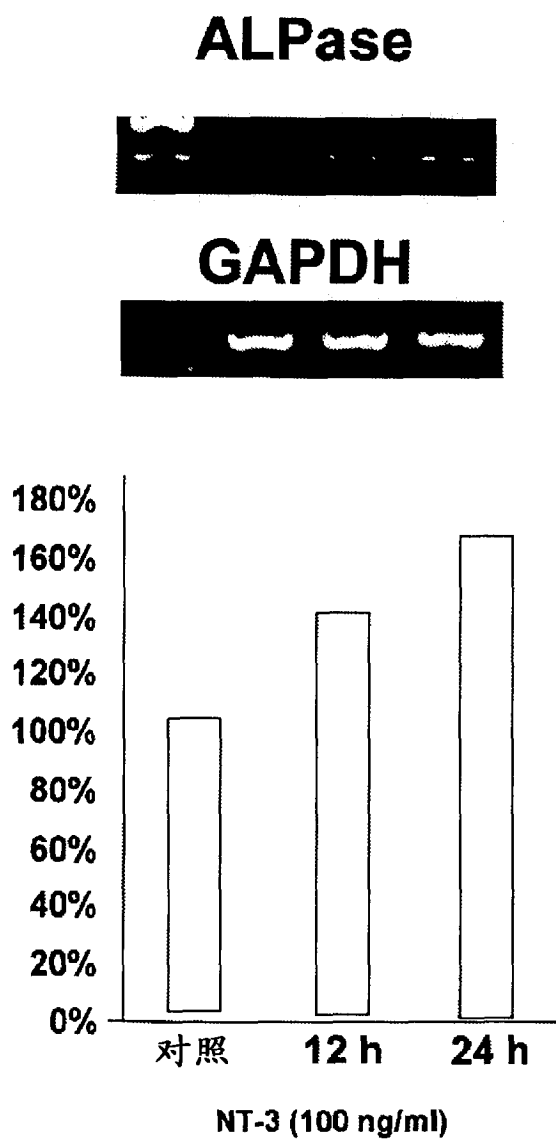


图 27A

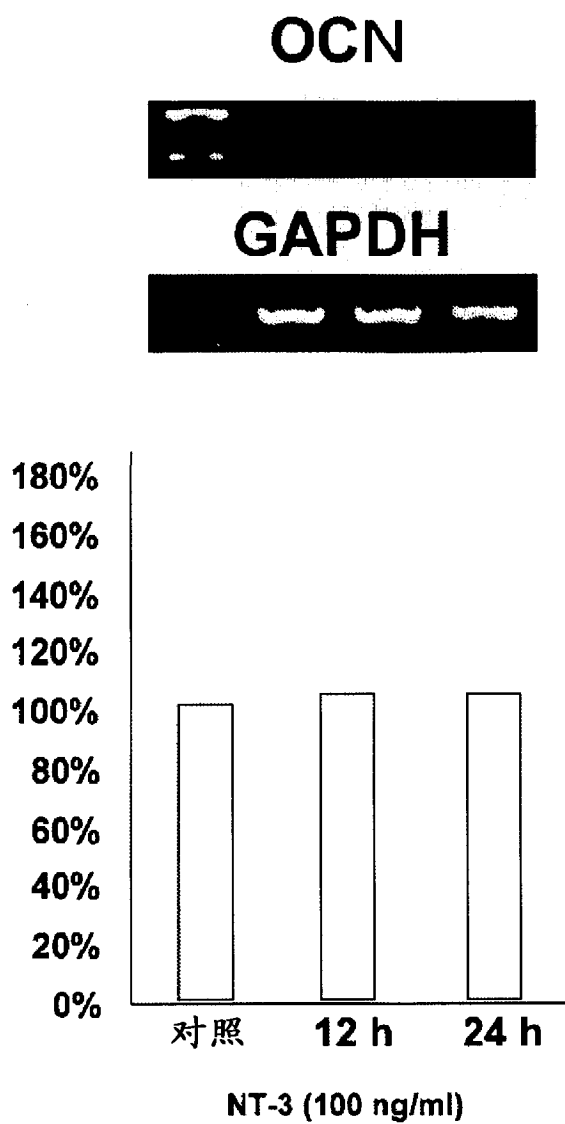


图 27B

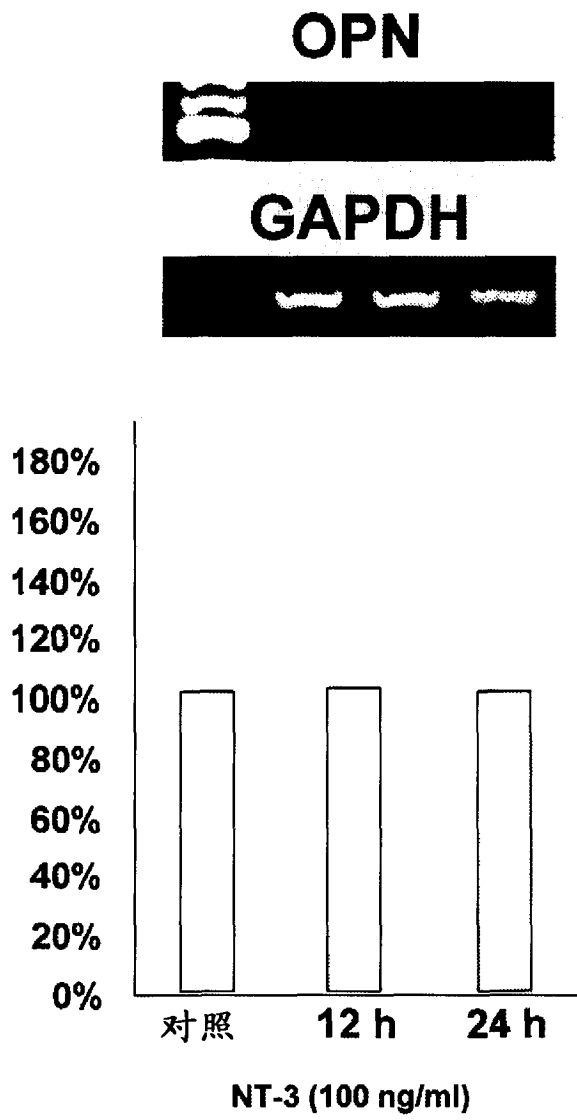


图 27C

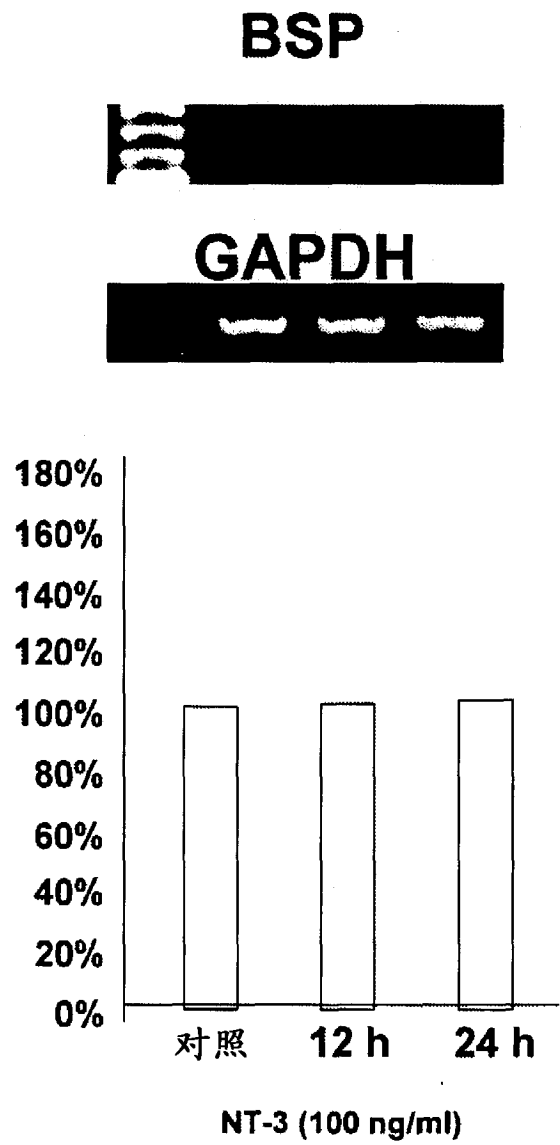


图 27D

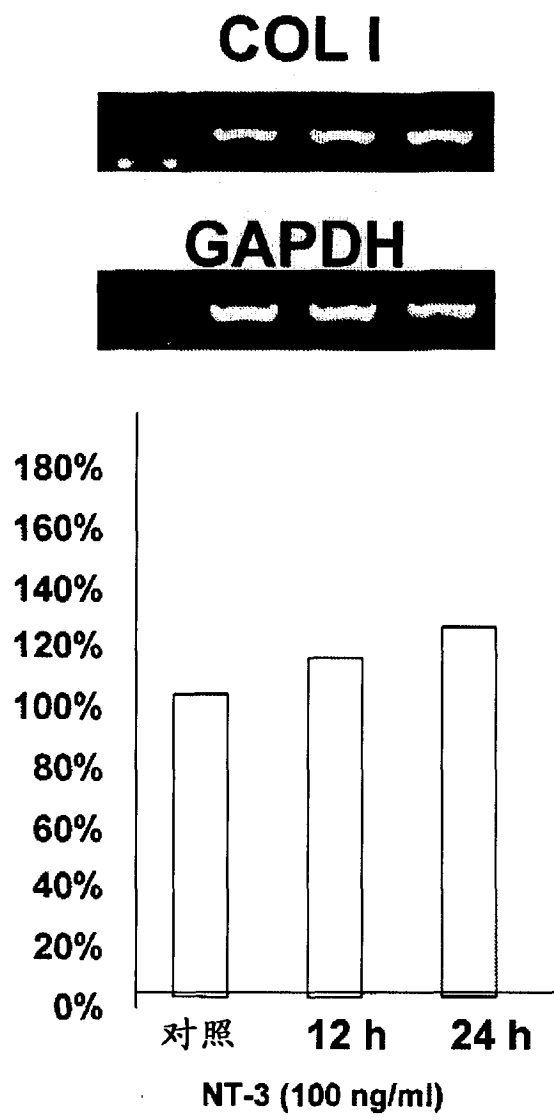


图 27E

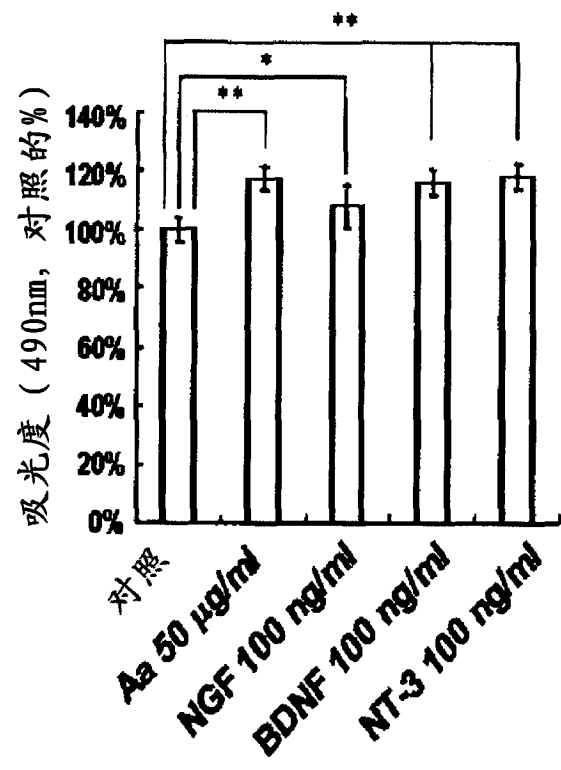


图 28



NGF 100 μ g/ml

图 29A



NT-3 100 μ g/ml

图 29B