

第45回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 (第2報)

メインテーマ：健康維持と口腔インプラント治療 —口腔インプラント治療のメリットを再考する—

大 会 長：窪木 拓男（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科インプラント再生補綴学分野）
実行委員長：前川 賢治（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科インプラント再生補綴学分野）
準備委員長：秋山謙太郎（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科インプラント再生補綴学分野）

■会期：平成27年（2015年）9月21日（月・祝）、22日（火・祝）、23日（水・祝）

■開催概要：（予定）

20日（日）：ケースプレゼンテーション試験
21日（月・祝）：開会式、専門医教育講座 等
22日（火・祝）、23日（水・祝）：
教育講演、特別講演、シンポジウム、海外招待講演、優秀研究発表、
一般口演、ポスター発表、ランチョンセミナー、衛生士セッション、
専門歯科衛生士教育講座、専門歯科技工士教育講座、懇親会、企業展示 等

■会場：ホテルグランヴィア岡山 （〒700-8515 岡山県岡山市北区駅元町1番5）

岡山コンベンションセンター（〒700-0024 岡山県岡山市北区駅元町14-1）

岡山シティフォーラムホール（〒700-0822 岡山県岡山市北区表町1-5-1）

岡山シティミュージアム（〒700-0024 岡山県岡山市北区駅元町15-1）

■演題募集期間：2015年（平成27年）2月2日（月）～5月7日（木）

■大会事務局：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科インプラント再生補綴学分野

■運営事務局：株式会社日本旅行 中四国コンベンショングループ

〒700-0023 岡山県岡山市北区駅前町2-1-7

JR西日本岡山支社ビル1階

TEL：086-225-9281/FAX：086-225-9305

E-mail：jsoi45@kyodo-mice.jp

■大会ホームページ：<http://www.convention-w.jp/45jsoi/index.html>

<原 著>

β-TCPによるイヌ顎骨のデコリン発現の促進

水上 哲也¹⁾ 今宮 克明¹⁾ 押谷 敏之¹⁾
渡辺 孝夫²⁾ 安孫子宜光¹⁾

Stimulation of Decorin Expression in Dog Mandible by β-TCP

MIZUKAMI Tetsuya¹⁾, IMAMIYA Katsuaki¹⁾, OSHITANI Toshiyuki¹⁾,
WATANABE Takao²⁾ and ABIKO Yoshimitsu¹⁾

β-TCP can stimulate bone formation; however, its molecular mechanism is unclear. In this study, an implant drill was used to make bone defects in Beagle dog mandible, and β-TCP was filled into the bone defects. After isolation of mRNA, gene expression levels were monitored by dog DNA microarray. The gene expression of decorin was enhanced by β-TCP, and decorin gene expression was increased through TGF-β by β-TCP. An im-

munohistochemical study demonstrated that the decorin protein was also increased by β-TCP, since decorin binds with TGF-β and plays a role in osteoblast maturation. Taken together, the stimulation of decorin expression by β-TCP might be a part of the mechanism in accelerating bone formation.

Key words : dog mandible, β-TCP, decorin

緒 言

口腔インプラント治療が歯の喪失による咀嚼機能の回復に貢献している。その普及につれ、従来は禁忌とされていた高度に骨吸収した顎堤に対しても、骨再生誘導術や上顎洞底骨造成術などが行われている。インプラント治療の過程で顎骨や上顎洞内に骨の補填を必要とする症例があり^{1,2)}、骨の補填材としてハイドロキシアパタイトが用いられていたが、生体に吸収され難く、骨内に長期間残存することから、近年では、骨親和性、骨誘導性に優れ³⁾、吸収されやすく骨に置換されるβ-TCPが汎用されている⁴⁾。しかしながら、

β-TCPの骨形成促進能の詳細な分子機序については不明な点が多く、その分子機序を解明することによって新規骨補填材料の開発に貢献できると考えられる。

近年、機能ゲノム科学の飛躍的な発展に伴って、バイオインフォマティクス研究技術が開発され、DNAマイクロアレイを応用して膨大な数の遺伝子のDNAプローブに試料中のmRNAをハイブリダイズさせて遺伝子の発現を解析することが可能になっている^{5,6)}。さらに、ゲノムプロジェクトによってバイオインフォマティクス研究が進展し、膨大な情報データベースを駆使して新規性の高い遺伝子が発見できるようになっている。

本研究では、ビーグル犬の下顎骨にインプラント

¹⁾日本大学松戸歯学部生化学・分子生物学講座

²⁾神奈川歯科大学口腔解剖学講座

¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

²⁾Department of Oral Anatomy, Kanagawa Dental University

平成26年4月25日受付

ホール様の骨欠損を作成して β -TCPを填入後、頸骨組織からmRNAを回収し、DNAマイクロアレイを用いて半網羅的な遺伝子発現のモニターを試みた。最初に骨形成マーカーの遺伝子発現を解析し試料として有用であるかを調べた。最近、骨形成に重要な働きをもつ分子としてデコリン⁷⁾が注目されている。DNAマイクロアレイの解析結果から情報伝達系を基盤とするIngenuity Pathways Analysis (IPA) システム⁸⁾を応用してデコリンの遺伝子ネットワークを検索し、 β -TCPによる骨形成促進作用の分子機序の解明を試みた。

材料および方法

1. 動物実験

実験動物は、ビーグル犬（体重、約13kg、6頭）を静岡実験動物研究会より購入して使用した。 β -TCPのイヌ頸骨への填入はZhaoら⁹⁾の論文に従って行った。抜歯窩の骨の修復過程は部位によって異なるので、遺伝子発現の一様化を図るために下顎臼歯を抜歯後、約3カ月の骨治癒後に、改めてトレフィンバー(4.5×8.0mm)を用いてホールを作製し、無填入のコントロール群および β -TCP填入群の2群に分けて実験を行った。 β -TCP粉末(β -TCP-100, >99% pure, 500~800μm, 大平化学(株), 日本)を1,100°C×2時間の条件で焼成後粉碎、粒子径φ50~150μmの範囲に調整し、ガンマ線滅菌して1ホール200mg用いた。

1) 第1回手術：抜歯

麻酔は、塩酸メデトメジン(ドミトールTM, Orion Pharma Inc., フィンランド)0.05mL/kgを筋肉注射、生理的食塩水の点滴下でペントバルビタールナトリウム(ネンブタールTM, 大日本製薬, 日本)0.5mL/kgの静脈内注射による全身麻酔を施した。次いで、口腔内、下顎左側前臼歯部歯肉および歯槽粘膜に2%塩酸リドカイン(キシロカインTM, 藤沢薬品株式会社, 日本)で骨膜下浸潤麻酔し、第一前臼歯から第四前臼歯を鉗子にて抜歯、縫合した。同様の処置を右側下顎にも行った。

2) 第2回手術：実験材料の填塞

術後3カ月、術部の創傷治癒を確認した。実験では、抜歯時と同様の麻酔操作を行った後、左側下顎骨について歯槽頂部粘膜を前後方向に切開、剥離し、左右歯肉弁の間からインプラント用トレフィンバーを挿入、歯槽骨に幅4.5mm、深さ8mmの骨穴を1頭当たり4個形成した。次いで、各骨穴に β -TCP顆粒0.2gを填塞し、歯肉弁を縫合、閉鎖して手術を終了した。右側下顎については、左側と同様に穴を形成した後、補填材を填塞せずに歯肉弁を縫合、閉鎖した。左側を実験側、右側を対照側とした。

次いで、各骨穴に β -TCP顆粒0.2gを填塞し、歯肉弁を縫合、閉鎖して手術を終了した。右側下顎については、左側と同様に4個の骨穴を形成した後、補填材を填塞せずに、歯肉弁を縫合、閉鎖した。左側を実験側、右側を対照側とした。

3) 試料の採取

埋植期間終了後、前2回の手術と同様の麻酔処置を施し、手術後創傷治癒過程の痕跡を目安に骨穴相当部にインプラント用中空ドリル(幅4.5mm)にて円柱状に骨溝(幅4mm、深さ8mm)を形成した。中空ドリルを引き上げ、その内部に確保された組織片についてはピンセットにて把持して摘出した。円柱状に残留した組織片については銳匙状の小器具にて周囲組織より分離し、ピンセットにて把持して摘出した。

β -TCPを填入し、1週および2週後に同じドリルを用いて骨組織を採取し、両者からmRNA画分を回収した。本実験は神奈川歯科大学実験動物倫理委員会の承認(承認番号08.12.TTH号)を得て、実験動物指針に基づいて行った。

2. RNA試料の作製

イヌ頸骨組織を採取後、ただちにRNAの変成分解を防ぐRNA later溶液(Applied Biosystems, Ambion, USA)に浸漬して冷蔵庫(4°C)で一夜温置してから冷凍庫(-20°C)に保存した。組織ホモジナイザー(FastPrep[®] System, MP Biomedicals, Tokyo, Japan)を用いて破碎し、RNA画分の抽出は、RNeasyTM Fibrous Tissue Midi Kit Isolation System(Qiagen, CA, USA)を用いて行った。RNAの定量と質の検定はAgilent RNA 6000 nano kits(Agilent,

Santa Clara, CA, USA) を用いた。さらに GeneChipTM 3' IVT express kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いて蛍光標識相補 RNA を合成した。

3. DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の遺伝子チップ (GeneChipTM Canine Genome 2.0 Array : Affymetrix ; イヌ 38,000 遺伝子) を用いた。蛍光標識相補 RNA を DNA マイクロアレイとハイブリダイズし、GeneChip 蛍光スキャナー (Affymetrix GeneChip[®] Scanner 3000) を用いて蛍光シグナルインテンシティをスキャンした。遺伝子発現解析は、Agilent Feature Extract software および GeneSpring GX software (Agilent Technologies, CA, USA) を用いて行った。遺伝子発現の検定はマイクロアレイデータのシグナルインテンシティから GeneSpring の Flag 判定法に従った。すなわち, Presence (P) を有意な発現とし, Absent (A) を発現がきわめて低レベルあるいは発現なしとした。さらにコントロールとテストの発現比較で 2 倍以上あるものを有意な違いと判定した。また、マイクロアレイデータのノーマライズは Affymetrix GeneChip[®] のプロトコールにしたがって Median normalization array の分析データを用いた。

4. 逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR)

RT-PCR は DNA thermal analyzer (RFN-GeneTM 6000 ; Corbett Life Science, Sidney, Australia) を用いて行った。PCR の增幅 DNA を 1.5% アガロースゲル電気泳動で分離した後、Ethidium bromide 染色して紫外線照射下で観察した。DNA 増幅用 PCR DNA プライマーは、イヌデコリン遺伝子（上流 5'-TCAGGGATTGAAAATGGAGC-3'；下流 5'-CCTTGG-TGATTTGTTGCCT-3'，(合成サイズ 142 bp)；glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子（上流 5'-GGTCACCAGGGCTGCTTTA-3'；下流 5'-GGTCACCAGGGCTGCTTTA-3'，合成サイズ 190 bp）を用いた。

5. IPA ネットワークサーチ

IPA システム (IPA ; Ingenuity Systems Ver. 4, Mountain View, CA, USA)⁵⁾ はマイクロアレイの解

析データから生物学的な機能の解釈や情報伝達系のパスウェイ解析を行うことができるデータベース化ソフトウェアである。医学・生物学のエキスパートにより論文を全文読んで抽出された知見に対し、厳しいクオリティコントロールを行って作製されており、遺伝子、遺伝子産物の相互作用情報や分子情報が得られる遺伝子ネットワーク解析が可能である。

6. 組織化学実験

イヌ顎骨組織を採取後、ただちに 10% 中性ホルマリン溶液に 48 時間浸漬し固定して、骨ブロックを急速脱灰液に 2~3 日間浸漬して脱灰し、24 時間の水洗後にエタノールによる脱水処理、キシレンへの置換、パラフィン浸漬の工程を経て、パラフィン包埋を実施した。各パラフィンブロックから円形の骨孔（材料埋植部）全体を含む面で組織切片を切り出し、キシレン浸漬によるパラフィンの溶解、エタノール置換、蒸留水への浸漬を経て、ヘマトキシリソ・エオジン (H-E) 染色を実施した。HE 染色標本を光学顕微鏡 (E800, ニコン, 日本) にて観察した。石灰化部位をアトランダムにイメージアナライザ (Image software ; NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて半定量した。

免疫組織化学染色は同切片の内在性パーオキシダーゼ活性を 3% hydrogen peroxide-methanol を用いてブロッキングし、PBS で洗浄した。ついで一次抗体としてマウス抗デコリン抗体を作用させ、パーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を作用させ、内在性パーオキシダーゼ活性は、ブロッキング溶液 (Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution ; S2023, Carpinteria, CA, USA) を用いた。二次抗体を作用後、PBS で洗浄し 0.06% diaminobenzidine (Walter, Kiel, Germany) と 0.01 vol% H₂O₂ diaminobenzidine で発色させて観察した。

結 果

β -TCP による骨形成促進について、イヌ顎骨の β -TCP 埋入実験の結果の H-E 染色を図 1 (上図) に示す。石灰化部位をイメージアナライザで半定量した結果 (下図)、コントロール群に比べて β -TCP 群では骨形成が有意に促進していることが判明した。このことからマイクロアレイによる遺伝子発現解析の試料

表1 β -TCPのイヌ頸骨の遺伝子発現のDNAマイクロアレイの分析結果

Gene symbol	Gene name	7-day		14-day	
		Control	β -TCP	Control	β -TCP
ALP	Alkaline phosphatase	29.8 (P)	120.7 (P)	22.8 (A)	157.9 (P)
Colla1	Collagen alpha 1	684.0 (P)	1563.9 (P)	1563.9 (P)	7047.8 (P)
Colla2	Collagen alpha 2	582.4 (P)	1648.8 (P)	568.3	2716.6 (P)
BMP2	Bone morphogenic protein 2	ND	ND	445.2	482.8 (P)
BMP4	Bone morphogenic protein 4	ND	ND	13.3 (A)	96.4 (P)
OPN	Osteopontin	ND	ND	2393.1 (P)	2735.0 (P)
BGN	Biglycan	360.8 (P)	877.2 (P)	22.2 (P)	93.0 (P)
DCN	Decorin	1986.1 (P)	6072.6 (P)	5654.9 (P)	10342.1 (P)

(P), Presence : (A), Absence ; ND, Not Detectable

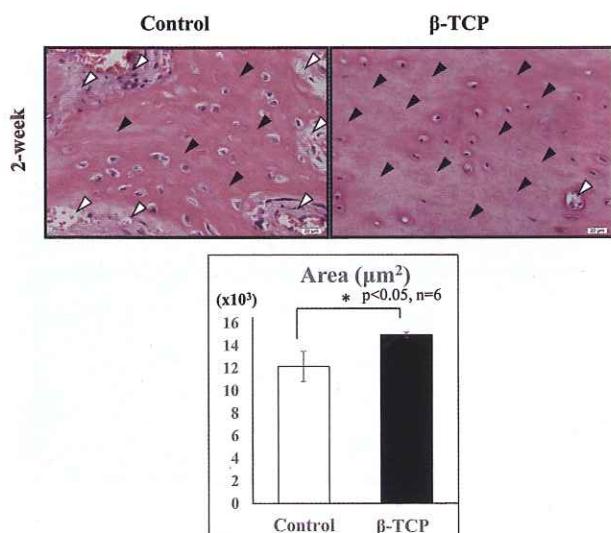
コントロール, β -TCPのDNAマイクロアレイのシグナルインテンシティ

図1 β -TCPのイヌ頸骨への骨形成の影響
白矢頭, 未石灰化部分; 黒矢頭, 石灰化部分, H-E染色によりコントロールに比べて β -TCPによる骨形成が促進している。

として有用であった。

β -TCPによる遺伝子発現の影響について、コントロールと β -TCP群の頸骨組織から回収したmRNAを用いてDNAマイクロアレイ遺伝子発現解析を行った。解析結果から骨の関連遺伝子群としてアルカリホスファターゼ, I型コラーゲン, BMP2, 4, オステオポンチンを選び、そのシグナルインテンシティを表1に示した。いずれの遺伝子も発現の判定はPresent(P)で有意に発現しており、 β -TCP群ではコントロールに比べて発現が増大していた。

次にDNAマイクロアレイ測定データからデコリンをランドマークにして、IPAシステムでネットワー

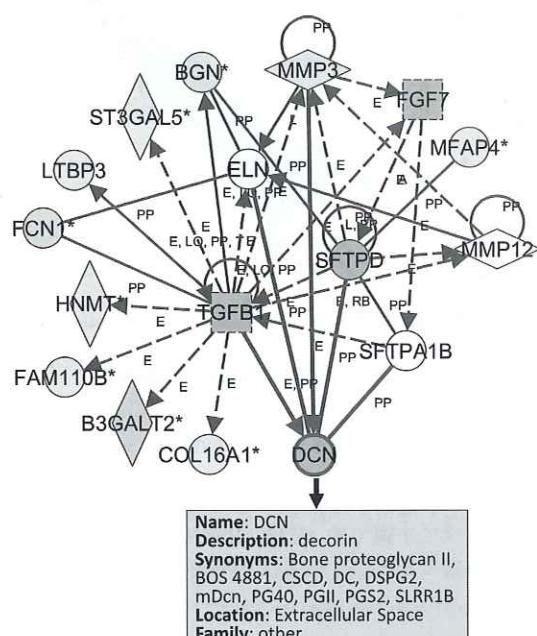


図2 IPAシステムによる遺伝子ネットワーク検索
TGFB1 : transforming growth factor, beta 1 ; BGN : biglycan ; ST3GAL5 : ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5 ; LTBP3 : latent transforming growth factor beta binding protein 3 ; FCN : ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1 ; HNMT : histamine N-methyltransferase ; FAM110B : family with sequence similarity 110, member B ; B3GALT2 : UDP-Gal : betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2 ; COL16A1 : collagen, type XVI, alpha 1 ; DCN : decorin ; SFTPA1B : N/A ; MMP12 : matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) ; SFTPD : surfactant protein D ; MFAP4 : microfibrillar-associated protein 4 ; FGF7 : fibroblast growth factor 7 ; MMP3 : matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase) ; ELN : elastin.
相互作用：実線, 直接作用；点線, 間接作用
E, Expression : PP, Protein-Protein binding ; LO, Localization : L, ProteoLysis : A, Activation : RB, Regulation of Binding : Solid line, Direct Interaction.

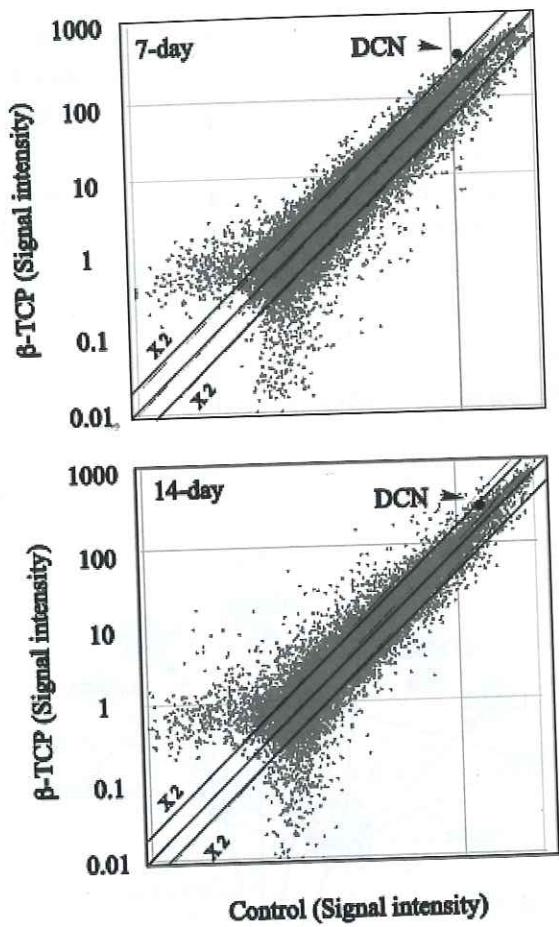


図3 β -TCPによるデコリンのタンパク発現のノーマライズ後のスキャタープロット分析

デコリン遺伝子は β -TCP よりてコントロールに比べて1週で約4.2倍、2週で約2.1倍の発現増大とともに2倍以上の有意に増大している。

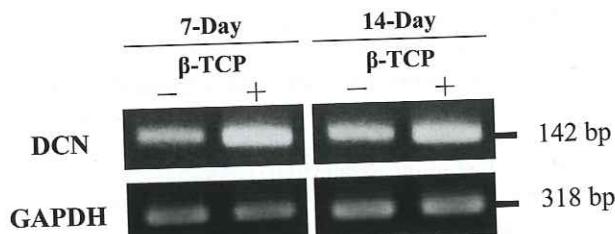


図4 デコリン mRNA レベルの RT-PCR 法分析
デコリン遺伝子の増幅 DNA バンドは、増幅理論値の 142 bp であり、コントロール群に比べて β -TCP 群の増幅 DNA バンドは増大している。インターナルコントロールであるハウスキーピング遺伝子の DNA バンドはコントロール、 β -TCP 群に変化はなかった。

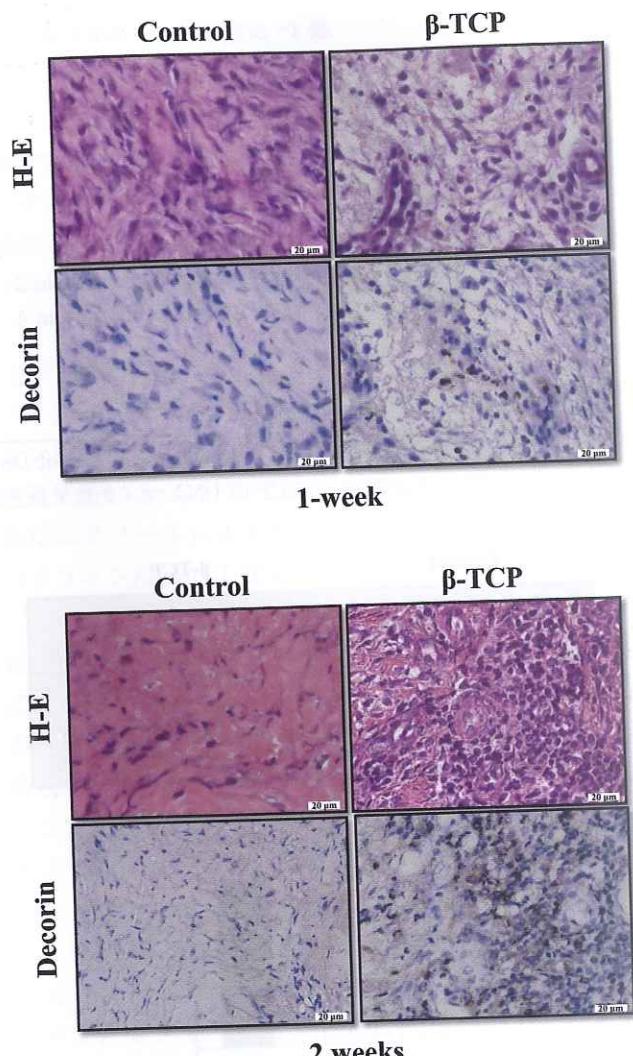


図5 β -TCPによるデコリンのタンパク発現の免疫組織化学的観察
デコリン抗体による免疫組織化学の染色度は、矢頭に示すように β -TCP 群で増大している。

ク解析を行った。その結果、図2に示したネットワーク関連遺伝子が明らかになった。デコリン(DCN)およびバイグリカン(BGN)の発現にTGFB、MMP3が直接作用していることやELNとSFTPДに結合することがみられる。また、TGF- β がFGF7、COL16A1などの遺伝子発現に関与することが見いだされた。

DNAマイクロアレイ測定データのシグナルインテンシティは測定した直接の蛍光シグナル値であり、遺伝子発現レベルの発現度の検定にはGeneSpring解析ソフトでノーマライズが必要である。バイグリカンの発現は低く、本研究では高い発現のデコリンを取り上げてノーマライズを行い、スキャタープロット分析を

行って2倍以上の発現の有意差があるかを検証した。その結果、 β -TCP 填入後1, 2週後のコントロール群と β -TCP 群間のスキャタープロットを図3に示す。スキャタープロット分析から明らかのように、 β -TCP によって多数の遺伝子の発現が変動しており、デコリンは1週で約4.2倍、2週で約2.1倍となり、ともに2倍以上の有意な発現増大が認められた。

マイクロアレイ解析の結果から β -TCP はイヌ顎骨組織のデコリン遺伝子の発現を促進することが示唆されたことから、RT-PCR 法によってデコリン mRNA レベルの確認を行った。その結果、図4に示すように、発現は変化しないハウスキーピング遺伝子である GAPDH の增幅 DNA バンドはコントロール、 β -TCP 群に変化はなかった。これに対してデコリン遺伝子の增幅 DNA バンドは、増幅理論値の 142 bp に正しく増幅されており、そしてコントロール群に比べて β -TCP 群の増幅 DNA バンドは増大していた。

最後にデコリン抗体を用いた免疫組織化学実験を行って、デコリンタンパクの産生に対する β -TCP の影響について調べた。その結果、図5に示すようにイヌ顎骨組織のデコリン量は β -TCP の填入によって増大していることが明らかになった。

考 察

これまでに、 β -TCP のイヌ顎骨組織への填入によって発現増大する遺伝子の探索がDNAマイクロアレイ法で行われ、骨芽細胞の細胞ギャップ結合に関与し、骨芽細胞の分化のマーカーであるオステオカルシンや骨シアロタンパクの発現を促進するコネキシン遺伝子の発現が促進することが報告されている¹⁰⁾。

本研究でも同様の実験を行い、 β -TCP による骨形成能の促進機序の解明を試み、特にプロテオグリカン関連分子の探索を試みた。プロテオグリカンは、コアタンパクにグリコサミノグリカンが結合した糖タンパク質である。プロテオグリカンは、アグリカンやバーシカンなどの比較的大きい分子種とデコリン、バイグリカン、フィプロモジュリン、ルミカンなどのスマルロイシンリッチプロテオグリカン種に大別される¹¹⁾。なかでもデコリンは細胞外基質を形成して細胞増殖や骨芽細胞系の分化に関与することが知られており、コラーゲン分子の特異的な結合部位と反応して機

能発現することが知られている。また、デコリンのコアタンパク部分は TGF- β と高いアフィニティをもって結合することが報告されている^{12, 13)}。

IPA ネットワーク検索結果から、 β -TCP が TGF- β の発現を促進し、TGF- β がデコリン、バイグリカンの発現を促進するネットワークが明らかとなった。デコリンは TGF- β と結合して TGF- β とその受容体の情報伝達を提示し、TGF- β の生理作用を高めることが報告されている^{13, 14)}。

マイクロアレイの解析結果から、 β -TCP によるデコリンの遺伝子発現の促進が証明され、免疫組織化学によって β -TCP は顎骨組織のデコリンタンパクの合成を促進することが確かめられた。したがって顎骨組織でも β -TCP によるデコリン発現促進が骨形成促進の分子機序の一つであると考えられる。IPA ネットワーク検索の結果から、 β -TCP は TGF- β の発現を促進しオートクラインあるいはパラクラインに TGF- β 情報伝達系に働いてデコリンの発現を促進させることができた。また、TGF- β 中心に FGF7, CO-L16A1 などの遺伝子発現に関与することが見いだされたことから、これらの遺伝子産物の発現増大と、 β -TCP による骨形成促進の機序解明に役立てられると思われる。

興味深いことに、デコリン遺伝子を欠損したマウスでは骨粗鬆症を発症し、異常なコラーゲン線維の形成がみられると報告されている¹⁵⁾。最近、創傷治癒治療を目的に、損傷した組織の血管を認識する合成ペプチドと遺伝子組換えデコリンの融合分子を応用してデコリンを供給することが成功したと報告されている¹⁶⁾。本研究の結果、デコリンは TGF- β の骨基質における成分自身、あるいは調節因子として骨形成の維持に関与する可能性が考えられることから、組換えデコリンの修飾分子を応用してデコリンを供給することでインプラント治療への応用が期待される。

結 論

ビーグル犬下顎臼歯を抜歯し、骨治癒後にトレフィンバーを用いてホールを作製して β -TCP 填入後の骨組織の遺伝子発現の変動をDNAマイクロアレイで解析した。その結果、デコリン遺伝子のmRNAレベルが増大していることを見いだした。デコリン遺伝子の

発現増大は RT-PCR 法で確かめられた。さらに、デコリン抗体を用いた免疫組織化学実験の結果、顎骨組織のデコリンタンパク量は β -TCP の填入によって増大していることが明らかになった。デコリンは細胞外基質を形成して細胞増殖や骨芽細胞系の分化に関与することが知られていることから、 β -TCP によるデコリンの発現は骨形成促進の機序の一つであると考えられる。

謝 辞

組織化学実験でご協力いただいた Bhawal UK 博士に感謝いたします。

文 献

- 1) Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J Oral Surg* 1980; 38: 613-616.
- 2) Moy PK, Lundgren S, Holmes RE. Maxillary sinus augmentation : Histomorphometric analysis of graft materials for maxillary sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg* 1993; 51: 857-862.
- 3) Ozawa M. Experimental study on bone conductivity and absorbability of the pure β -TCP. *J Jpn Soc Biomater* 1995; 13: 167-175.
- 4) Matsushita N, Terai H, Okada T, et al. A new bone-inducing biodegradable porous beta-tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res A* 2004; 70: 450-458.
- 5) Shai RM. Microarray tools for deciphering complex diseases. *Front Biosci* 2006; 11: 1414-1424
- 6) Leung YF, Cavalieri D. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet* 2003; 19: 649-659.
- 7) Igwe JC1, Gao Q, Kizivat T, et al. Keratocan is expressed by osteoblasts and can modulate osteogenic differentiation. *Connect Tissue Res* 2011; 52: 401-407.
- 8) van Someren EP, Wessels LF, Backer E, et al. Genetic network modeling. *Pharmacogenomics* 2002; 3: 507-525.
- 9) Zhao J, Watanabe T, Bhawal UK, et al. Transcriptome analysis of β -TCP implanted in dog mandible. *Bone* 2011; 48: 864-877.
- 10) Hayashi M, Takahashi T, Kawaguchi K, et al. Connexin 43 expression at an early stage in dog mandibles by β -TCP. *Dent Mater J* 2011; 30: 58-65.
- 11) Hocking AM, Shinomura T, McQuillan DJ. Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix. *Matrix Biol* 1998; 17: 1-19.
- 12) Takeuchi Y, Kodama Y, Matsumoto T. Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity. *J Biol Chem* 1994; 269: 32634-32638.
- 13) Schonherr E, Witsch-Prehm P, Harrach B, et al. Interaction of biglycan with type I collagen. *Biol Chem* 1995; 270: 2776-2783.
- 14) Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen L, et al. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor. *Biochemistry* 1994; 302: 527-534.
- 15) Ameye L, Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans : novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 2002; 12: 107R-116R.
- 16) Järvinen TA, Ruoslahti E. Targeted antiscarring therapy for tissue injuries. *Adv Wound Care* 2013; 2: 50-54.