

Shikonin による歯髄幹細胞の分化誘導

かじうら　くにひろ
梶浦　久仁洋

本論文の要旨は，第247回朝日大学歯学研究科発表会（2021年5月21日，瑞穂）において発表した．本論文の一部は，第62回歯科基礎医学会学術大会（2020年9月11日，鹿児島）において発表した．

緒 言

ヒト歯髄からコラゲナーゼ処理し分離した歯髄幹細胞と造血幹細胞を比較した場合，歯髄幹細胞は細胞増殖能が速く，幹細胞として多分化能も造血幹細胞と同程度有すると報告されている^{1, 2)}．これ以降，さまざまな研究者により歯髄幹細胞の可能性が報告されており，*in vitro* において歯髄幹細胞から歯性分化誘導 (odontogenic differentiation) できるとの報告³⁻⁵⁾や，ヒト歯髄幹細胞 (hDPSC) が肝細胞への分化能を有すること⁶⁾，さらには培養条件によって膵臓のβ細胞への分化誘導⁷⁾などの報告がある．また，*in vivo* において，歯髄幹細胞 (DPSC) の移植で角膜上皮の再生可能との報告⁸⁾や，心筋の欠損したラットに hDPSC の移植による心筋の再生⁹⁾，や hDPSC によるラットの脊髄損傷再生^{10, 11)}，およびラット筋ジストロフィーモデルでの筋肉の再生報告¹²⁾，頭蓋顔面骨 (craniofacial bone) においてはコラーゲンを足場にしたラット歯髄幹細胞で修復できる¹³⁾など，さまざまな可能性を有することが報告されている．

一方，歯髄幹細胞のマーカーの1つである CD44 陽性細胞は歯髄組織内において，歯冠部よりの象牙芽細胞の一部と根未完成歯の根尖部に存在し石灰化に参与しているとの報告がある^{14, 15)}．また，歯髄幹細胞は CD44 を高発現し，CD44 のリガンドであるヒアル

ロン酸により骨分化に関連する bone morphogenic protein-2 (BMP-2), BMP-4 の mRNA に変化を示さない。一方, 象牙芽細胞のマーカである象牙質シアロリンタンパク質 (dentin sialophosphoprotein: 以下, DSPP) と dentin matrix protein-1 (DMP-1) が mRNA だけでなく, タンパク質レベルで発現を上昇させることが判っている¹⁶⁾。これらのことから, 歯髄幹細胞を含む歯髄細胞は CD44 を介して象牙芽細胞へ分化することにより, 石灰化に関与していることが予測できると考えられた。

しかしながら, ヒアルロン酸による CD44 を介した歯髄幹細胞の細胞内シグナルは MAPK, Akt などさまざまなシグナルを活性化するものの, 歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化とそれらの活性化されたシグナルとの因果関係は明らかにされていない。また, ヒアルロン酸以外に歯髄幹細胞や象牙芽細胞様分化に効率的に誘導する試薬などの因子の報告は少なく, 歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導に CD44 が普遍的に関与しているのかは明らかになっていない。

Vitamin K は脂溶性ビタミンの 1 つで様々な血液凝固因子に関連するタンパク質の翻訳後修飾の役割が知られている¹⁷⁾。また, オステオカルシンなど Vitamin K 依存性骨基質タンパク質の生成に関与していることが知られている¹⁸⁾。その中で, Vitamin K2 同族体の 1 つであるメナテトレノン (menatetrenone) は, 骨粗鬆症

治療薬や止血薬として臨床で用いられ¹⁹⁾、骨の形成、組織の石灰化や血液凝固に関与することが知られている^{20, 21)}。しかしながら、歯科領域における臨床的意義については十分な検討をされておらず不明な点が多い。

Vitamin Kの基本骨格であるナフトキノン誘導体の一つであるShikoninは生薬の紫根に含まれる天然赤色色素成分であり、古くより咽頭炎、火傷、切傷などの治療や漢方薬として用いられてきたものの、その基本的分子メカニズムは解明されていない。

そこで、今回、このShikoninに着目し、歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導能の有無を検証し、歯髄幹細胞を象牙芽細胞様分化誘導する新たな化合物を探索した。そして、その歯髄幹細胞を象牙芽細胞様分化誘導する新たな化合物の細胞内シグナルがヒアルロン酸と同じくCD44を介したシグナルが重要であるのかどうかの検証を行った。

材料および方法

1. ヒト歯髄幹細胞の培養

ヒト歯髄幹細胞株 (Lonza, Walkersville, MD, USA) の細胞培養にはヒト歯髄幹細胞用培養液 (Lonza, Walkersville, MD, USA) を用い, 37°C, 5% CO₂ 含有混合気インキュベーター内で培養した。

2. 試薬

Vitamin K1, Vitamin K3, vitamin K4, 1, 4-Benzoquinone, Emodin, Aloe emodin (東京化成工業, 東京), Vitamin K2, Shikonin (富士フィルム和光純薬, 大阪), Alkannin (長良サイエンス, 岐阜) を使用した。これらの試薬を DMSO で 100mM になるように溶かし, 遮光して -20°C で保管した。なお, Shikonin と Alkannin は光学異性体の関係である (図 1)。

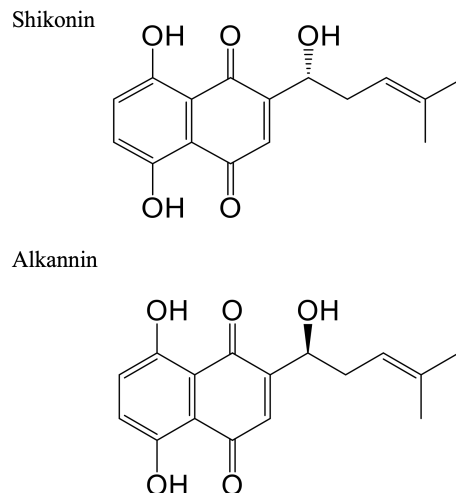


図 1 Shikonin と Alkannin の化学構造

3. MTT assay による細胞増殖の測定

1×10^4 個に調整したヒト歯髄幹細胞を 96 穴マイクロタイタープレート (Falcon, Franklin, NJ, USA) に播種したのち, 24 時間後に Shikonin もしくは Alkannin を濃度勾配つけて培養液に添加した. 48 時間後, $5 \mu\text{L}$ の MTT(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)(富士フィルム和光純薬, 大阪)を添加し, Cell Proliferation Kit I(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)によるホルマザン色素の発色を吸光度 595nm で TECAN Spectra Flour plus XFluor4 software(テカンジャパン, 神奈川)にて検出した. Shikonin と Alkannin の DPSC での 50% 抑制濃度 (half maximal inhibitory concentration: IC_{50}) を計算するために, 細胞増殖曲線を作成し, 細胞増殖を 50% 抑制する濃度を求めた.

4. ウェスタンブロット法

ヒト歯髄幹細胞を 6 穴プレート (Falcon, Franklin, NJ, USA) に 1×10^6 cells/well の細胞数で播種し, 24 時間培養した. その後, 培養液を除去し, 氷上にて $100 \mu\text{L}$ の RIPA lysis buffer (Cell Signaling Technology, Beverly, USA) に, 1mM PMSF と 1 倍希釈 protease inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を加えて, 細胞を剥離し, 遠心分離後 cell lysate を回収した. 回収し

たサンプルはアルブミン 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を基準にしてタンパク質定量を行った。一定のタンパク質に調整するため 2 倍希釈 sample buffer [125 mM Tris-HCl (PH6.8), 4 % SDS, 10 % β -mercaptoethanol, 10 % sucrose, 1 % bromo phenol blue (BPB)] を添加し, 100 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加熱処理後, 8 % polyacrylamide gel 濃度の条件で 160 V, 60 分間 SDS-polyacrylamide gel にて電気泳動を行った。その後, 水中で polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (Milipore, Bedford, USA) に 80 V, 60 分間転写した。転写終了後, 5 % Difco skim milk(富士フィルム和光純薬, 大阪)をブロッキング溶液として用い, 室温にて 1 時間ブロッキング処理を行った。一次抗体は, ブロッキング溶液で希釈して室温で 1 時間振盪させた。一次抗体として, anti CD44 mouse mAb, anti Phospho-Akt rabbit mAb, anti Akt rabbit mAb, anti Phospho-GSK-3 β rabbit mAb, anti Phospho-mTOR(Ser2448) rabbit mAb, anti mTOR rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti DSPP mouse mAb, (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti beta-actin(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を使用した。一次抗体反応後, PVDF 膜は 1 倍希釈 TBST(10 倍希釈 TBST; 富士フィルム和光純薬, 大阪)で 10 分間 3 回洗浄した後, 二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) を標識した goat

anti-rabbit IgG もしくは goat anti-mouse IgG antibody(Santa Cruz Biothechnology, Dallas, TX, USA)を 1/10, 000 の濃度に希釈して室温で反応させた後, 1 倍希釈 TBST で再度 10 分間 3 回洗浄し, Western BLoT Chemiluminescence Luminol / Enhancer Solution, Western BLoT Chemiluminescence Peroxide Reagent (タカラバイオ, 東京) を 1 ml 添加し, 1 分間振盪させ, その後ブロット画像の取得には ImageQuantTM LAS500 Imaging System (GE Healthcare Bio-Science, Uppsala, Sweden)を用いた. 半定量法として, ウエスタンブロット法にて得られたバンド画像密度を Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, USA) を用いて数値化した. 標的タンパクの発現は beta-action の発現との比率で表示した.

5. シグナルブロッキング解析

細胞内シグナルの抑制のために LY2090314 (Phosphoinositide 3-kinase inhibitor), GSK690693 (Akt inhibitor), Rapamycin (mTOR inhibitor) (Selleck chem, 東京)を使用した. ヒト歯髄幹細胞は 0. 5uM Shikoninにて処理する前に, これらの抑制剤を 30 分間曝露した. Shikoninにて 30 分間刺激後, シグナル伝達の抑制の確認のために細胞を回収した. また, 24 時間後に象牙芽細胞の分化マーカーである

DSPP の発現を確認するため，細胞を回収しウエスタンブロット法を実施した．

6. siRNA transfection による CD44 ノックダウン

ヒト歯髄幹細胞を 6 穴プレートに 1×10^5 個播種し，ヒト CD44 を標的とした Small interfering RNA (siRNA) (#1: siRNA ID s2681, #2: siRNA ID s2682) (life technologiesTM, Carlsbad, USA) を siRNA Lipofectamine RNAiMAX と OPTI-MEM I reduced serum medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて導入し 24 時間反応させた．遺伝子導入 24 時間後，その細胞を実験に用いた．

7. 統計処理

各実験群の測定値は平均 \pm 標準偏差で表記した．2 群間の検定には Student's *t*-test を行い． $P < 0.05$ を有意差有りとした．ウエスタンブロットの半定量解析においては，独立した 3 回の実験から得られた数値を一元配置分散分析のあと Dunnett の多重比較を行い， $P < 0.05$ を有意差有りとした．

結 果

1. Vitamin K 群中の Shikonin による歯髄幹細胞の DSPP 発現誘導

Vitamin K の基本骨格であるナフトキノン誘導体を中心に，歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導能を検証した結果，Shikonin において象牙芽細胞の分化マーカーである DSPP の発現を誘導した（図 2）。

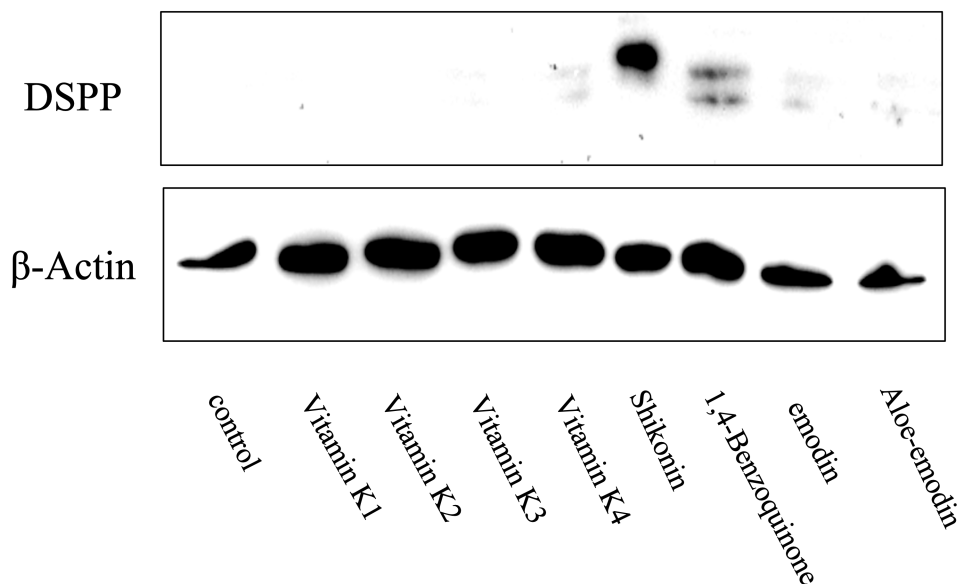


図 2 Vitamin K 群による歯髄幹細胞の DSPP 発現誘導確認

2. Shikonin とその光学異性体 Alkannin の歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導の比較

Shikonin とその光学異性体である Alkannin の歯髄幹細胞に対する 50% 阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration: IC50) を調べた結果, IC50 はそれぞれ, $4.48\mu\text{M} \pm 0.51$ と $5.08\mu\text{M} \pm 1.21$ となり, 有意な差はなかった (図 3). さらに DSPP の発現誘導を検証した結果, ヒアルロン酸 (HA) と同様に Shikonin $0.4\mu\text{M}$ で DSPP が発現した (図 4A, B). その一方, Alkannin には DSPP の発現誘導は見られなかった (図 5). これらのことから, Shikonin の光学異性体の Alkannin には歯髄幹細胞を象牙芽細胞様に分化誘導する能力がないが, Shikonin は歯髄幹細胞を象牙芽細胞様に分化誘導する能力があることが示された.

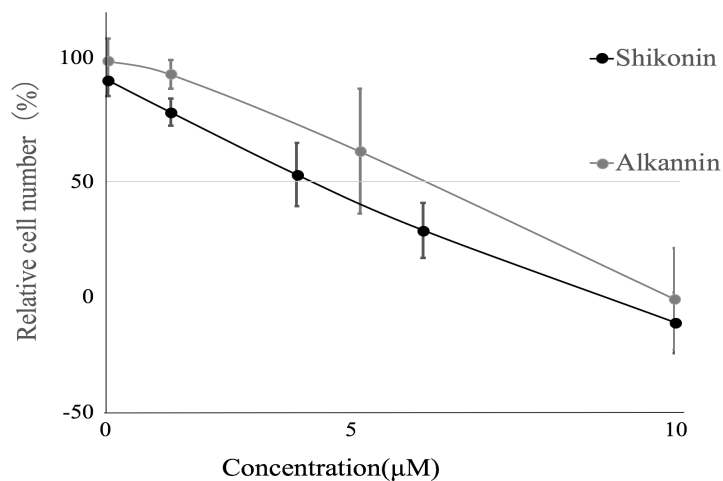


図 3 Shikonin と Alkannin の歯髄幹細胞増殖に対する影響

非処理細胞に対する細胞数 (%) を縦軸に示す.

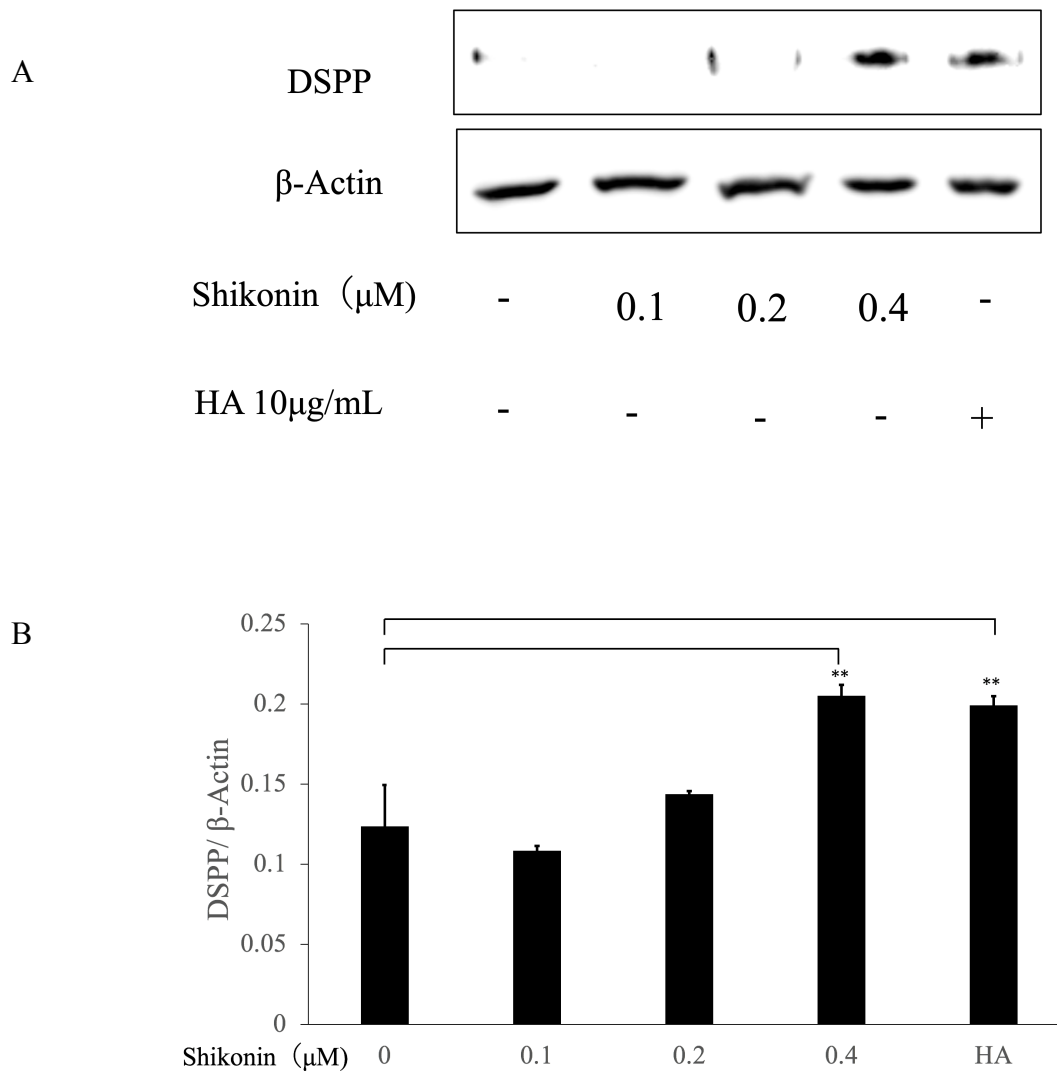


図 4 Shikonin とヒアルロン酸の歯髓幹細胞の DSPP 発現誘導の比較

A. Shikonin とヒアルロン酸の歯髓幹細胞に対する DSPP 発現誘導確認

B. Shikonin とヒアルロン酸処理した歯髓幹細胞の DSPP 発現量の比較

縦軸に β -Actin に対する相対的発現量 (%) を示す。

HA, ヒアルロン酸. **: $p < 0.01$

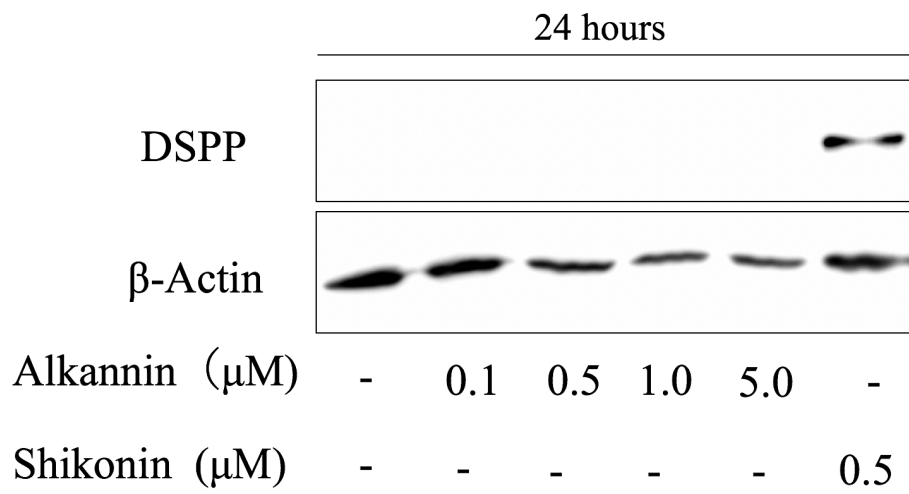


図 5 Alkannin と Shikonin の 歯 髓 幹 細 胞 に 対 す る
DSPP 発 現 誘 導 確 認

3. Shikonin による歯髄幹細胞の象牙芽細胞への細胞内シグナル

Shikonin はどのような細胞内シグナル伝達で歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導しているのかを検証した結果、Shikonin は 30 分をピークに Akt タンパク質のリン酸化を示し (図 6A), また mTOR タンパク質のリン酸化も 30 分から 90 分の間に見られた (図 6B). これらの結果より, Shikonin による歯髄幹細胞の象牙芽細胞様への分化誘導には Akt タンパク質と mTOR タンパク質が深く関与していると考え, それぞれの抑制剤でその細胞内シグナルを抑制した場合, DSPP の発現誘導が抑制されるのかを検証した. その結果, p- Akt の抑制剤 Ly294002 で Akt タンパク質のリン酸化を抑制すると, DSPP の発現は認めなかった (図 7A, B). また Akt タンパク質の抑制剤 GSK690693 で Akt タンパク質を抑制すると, DSPP の発現が抑えられた (図 8A, B). mTOR タンパク質の抑制剤 Rapamycin で DSPP の発現が抑えられた (図 9A, B).

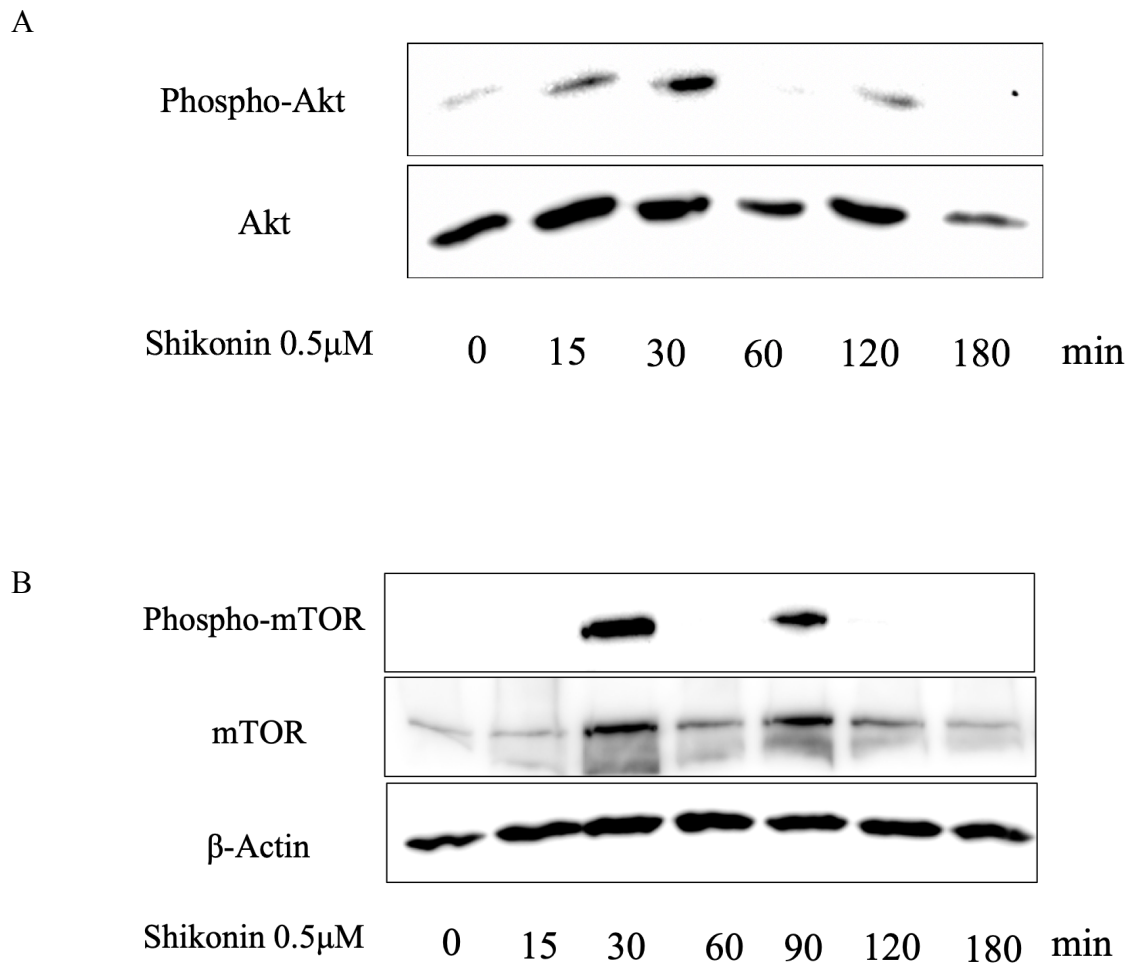


図 6 Akt タンパク質と mTOR タンパク質のリン酸化の比較

A. Shikonin 0.5 μ M 添加による歯髄幹細胞の Akt タンパク質リン酸化の経時変化

B. Shikonin 0.5 μ M 添加による歯髄幹細胞の mTOR タンパク質リン酸化の経時変化

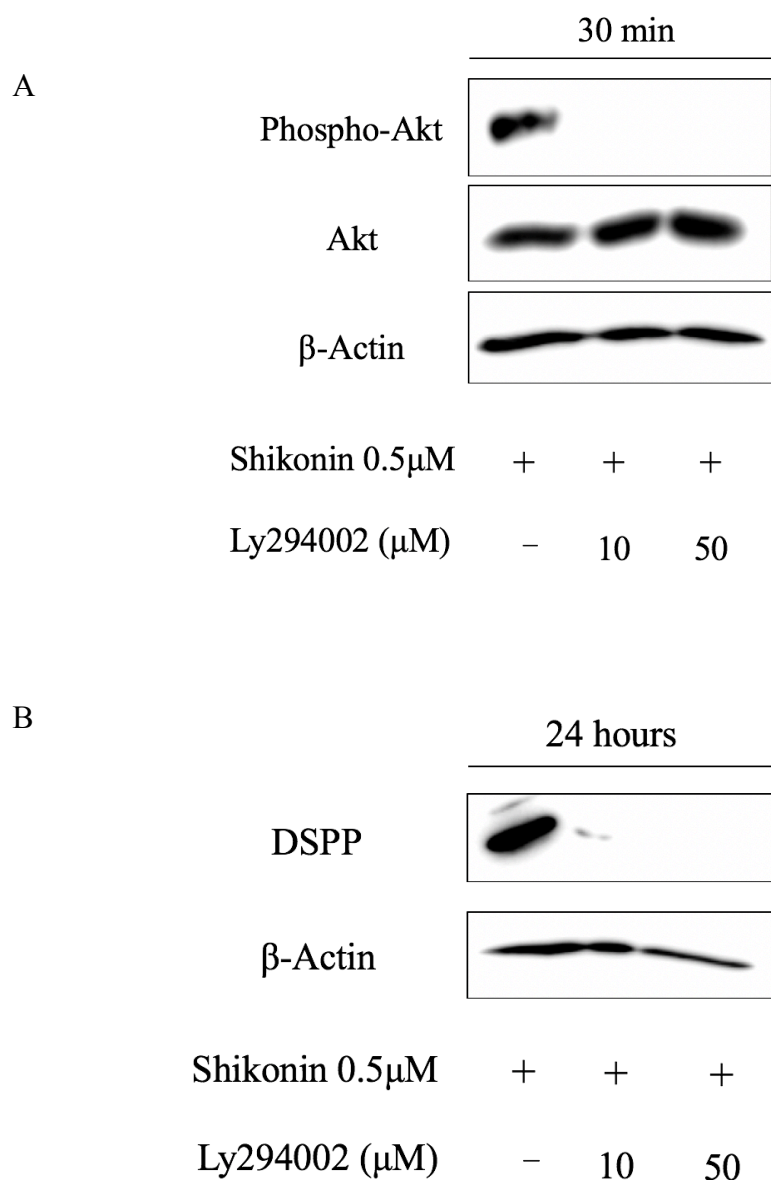


図 7 Ly294002 の Akt タンパク質リン酸化と DSPP 発現への影響

A. Shikonin による歯髄幹細胞の Akt タンパク質リン酸化と Ly294002 添加による抑制作用

B. Shikonin による歯髄幹細胞の DSPP 発現誘導と Ly294002 添加による抑制作用

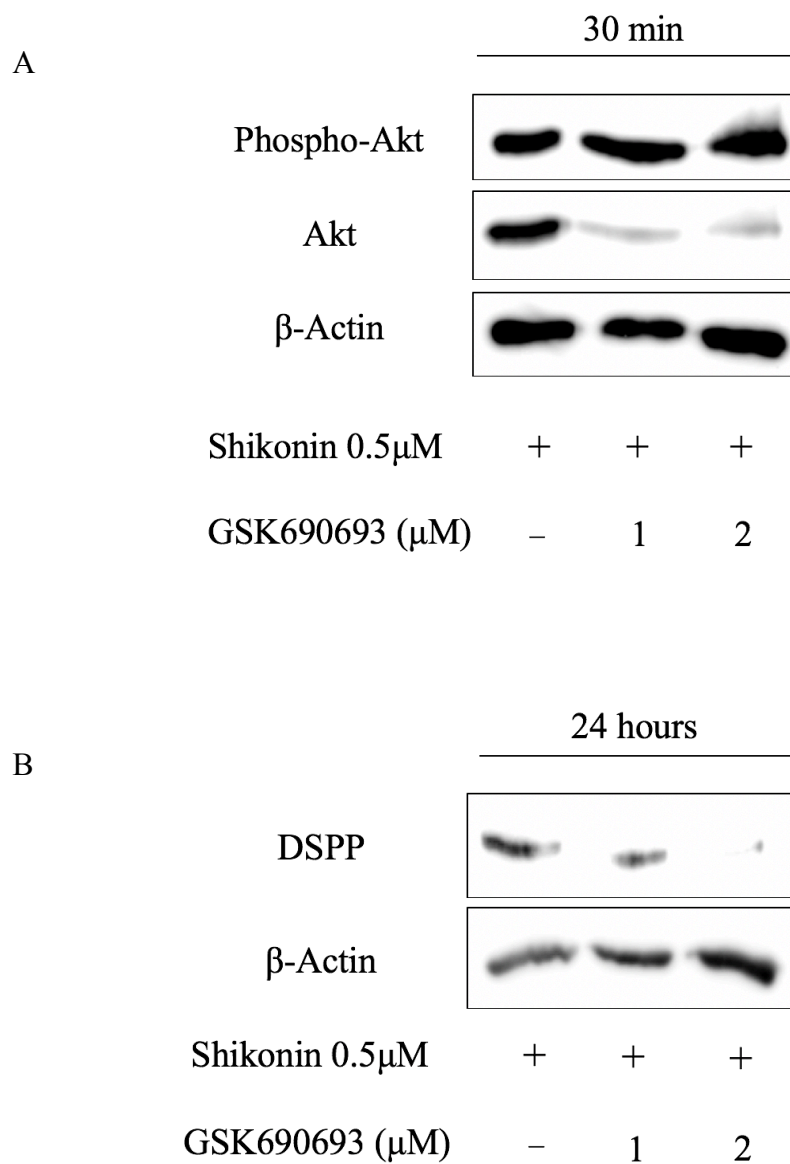


図 8 GSK690693 の Akt タンパク質リン酸化と DSPP 発現への影響

A. Shikonin による歯髄幹細胞の Akt タンパク質リン酸化と GSK690693 添加による抑制作用

B. Shikonin による歯髄幹細胞の DSPP 発現誘導と GSK690693 添加による抑制作用

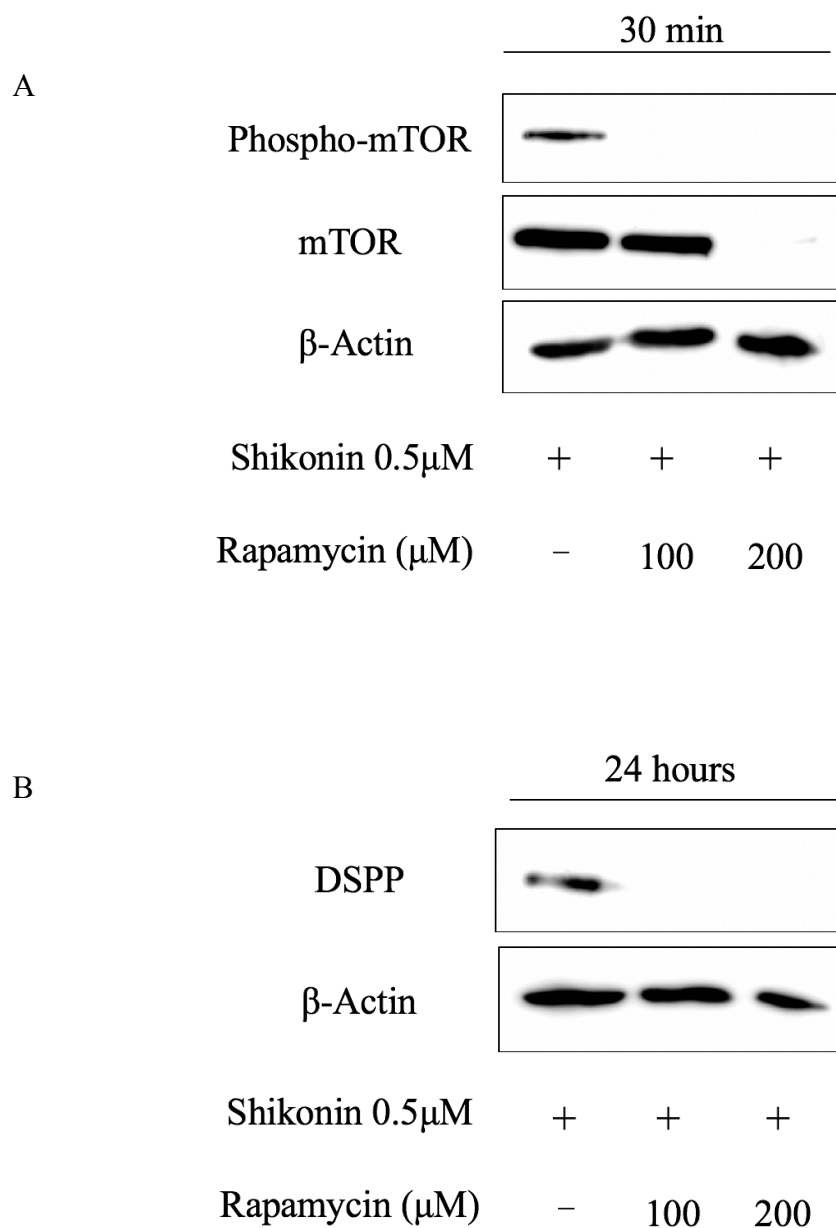


図 9 Rapamycin の m-TOR タンパク質リン酸化と DSPP 発現への影響

A. Shikonin による歯髄幹細胞の m-TOR タンパク質リン酸化と Rapamycin 添加による抑制作用

B. Shikonin による歯髄幹細胞の DSPP 発現誘導と Rapamycin 添加による抑制作用

4. Shikonin による歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導と CD44 の影響

Shikonin が CD44 を介して、歯髄幹細胞を象牙芽細胞様に分化誘導するかの検証の結果、CD44 をノックダウンすると、Shikonin による歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導は抑制された (図 10A)。そこで、先に解明した Shikonin は Akt-mTOR を介して歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を誘導することと、CD44 の発現が象牙芽細胞分化誘導にどのように関連しているか調べる目的で、CD44 をノックダウンした状態で Shikonin を作用させた場合、CD44 を抑制すると Shikonin による Akt タンパク質と mTOR タンパク質の活性化は抑制されなかった (図 10B)。

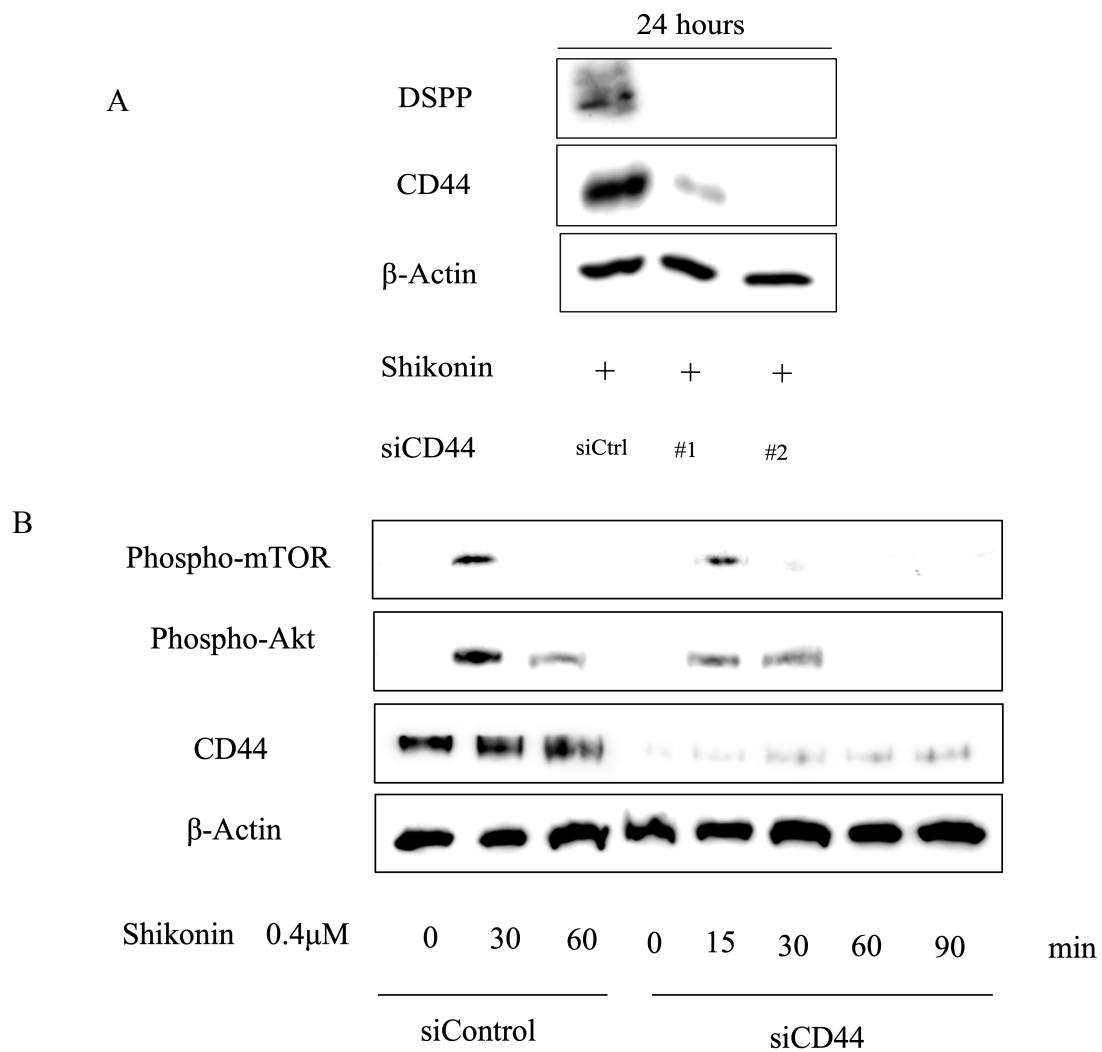


図 10 CD44 抑制による Shikonin 処理した DSPP の発現変化と Akt タンパク質, m-TOR タンパク質のリン酸化の比較

A. CD44siRNA による Shikonin 存在下歯髄幹細胞の CD44 および DSPP 発現の変化

siCtr, Negative control siRNA. #1, siRNA IDs2681. #2, siRNA IDs2682

B. CD44 抑制下での Shikonin による Akt タンパク質と mTOR タンパク質リン酸化の時間変化

考 察

先行研究において歯髄幹細胞の CD44 が象牙芽細胞への分化には重要であることが示唆されている¹⁶⁾。そのため、本研究では、CD44 の関連性が報告されていない化合物を探索し、まず歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導する化合物を探索した。

新たに歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導する可能性のあるものを探索するきっかけとして VitaminK 群を中心としたナフトキノン誘導体関連の化合物について検証した結果、Shikonin にその能力があることが示唆された。Shikonin は生薬の紫根に含まれる天然赤色色素成分である。紫根 (*Lithospermum erythrorhizon*) は草原に自生する多年草で根は太く、紫色である。生薬として根を使用し、Shikonin の主成分 (0.5~1.5% 含有) となっている。2 世紀の古代中国の薬物書「神農本草経」には薬草の言明が収載されており、古くからその薬効は様々な疾患 (咽頭炎, 火傷, 切傷, 麻疹, 皮膚の化膿性炎など) の治療に使用されてきた。漢方薬として清熱涼血・解毒・透疹の効能があり, 紫斑, 黄疸, 吐血, 鼻血, 血尿, 腫れ物などの治療に用いられる²²⁾。また Shikonin には様々ながん細胞の増殖を抑制し, アポトーシス誘導や, 血管新生を抑制するとの報告がある²³⁾。しかしながら, Shikonin の基本的な分子メカニズムは不明である。本研究から Shikonin は歯

髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導に働くことが示唆されたことより，さらにそのシグナル伝達の詳細を検証し，CD44とAkt-mTORの細胞内シグナルを介することが明らかとなった．また，CD44を抑制してもAkt-mTORのシグナルに変化がないにもかかわらず象牙芽細胞分化誘導が抑制された．Akt-mTOR経路を介さないCD44に依存した経路もまた，Shikoninによる髄幹細胞の象牙芽細胞分化誘導に重要であることが示された．すなわち，ShikoninはCD44存在下やAkt-mTORシグナルを介して象牙芽細胞分化誘導すると考えられた．

多能性幹細胞（ES細胞，iPS細胞）は，体のあらゆる組織や細胞に分化可能な多様性を持つことが広く知られ，近年，目的となる細胞や組織へと迅速かつ効率的に分化誘導する方法が多くの研究者により報告されている．例えば，様々な細胞増殖因子，細胞分化因子，または小分子薬などの組合せが入っている細胞培養液にて分化誘導し，順次異なる培養液に触れさせる方法が報告されている²⁴⁾．多くの研究は目的とする細胞，組織へと分化誘導するための方法を開発するものが多い．PI3K/Akt pathwayは様々な細胞のpro-proliferation signaling pathway（前増殖促進シグナル伝達経路）として知られている²⁵⁾．またAktはmTOR complexのpositive regulator（正の調節因子）と知られている^{26, 27)}．分化誘導に関するAkt/mTORシグナル伝達は

Human mesenchymal stem cell において骨形成誘導に関与しているとの報告もあれば²⁸⁾, Stem cells from the apical papilla(SCAPs)における歯性分化誘導を抑制するとの報告もあり²⁹⁾, 意見が分かれている.

一方, 今回の研究から, 新たに Shikonin に歯髄幹細胞を象牙芽細胞へと分化誘導する能力が示された. その細胞内メカニズムとして Akt/mTOR シグナル伝達に関与し, CD44 が象牙芽細胞への分化誘導には重要であることが示された. しかしながら, Shikonin による歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導に, Akt-mTOR シグナル伝達と CD44 がどのように関連しているのかは明らかになっていない. また, *in vivo* において Shikonin に象牙芽細胞への分化誘導能が発揮されるかも不明のままである.

先行研究から, ヒアルロン酸による歯髄幹細胞の象牙芽細胞への分化誘導には CD44 を介することが明らかになっている¹⁶⁾. そして今回の結果から, ヒアルロン酸は CD44 の刺激の有無ではなく, CD44 の発現自体が歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化誘導に重要であることが明らかになった. また Shikonin が歯髄幹細胞を Akt-mTOR シグナル伝達を介して象牙芽細胞様分化誘導することから Shikonin は象牙芽細胞への分化誘導剤として有用であるとともに, 歯内治療においては適切な材料との組合せにより, 直接覆髄薬や生活歯髄切断治療薬としての可能性があることが示唆された.

結 論

歯髄幹細胞を象牙芽細胞様へ分化誘導する化合物の探索およびその化合物の細胞内シグナルを検証した結果、以下の知見が得られた。

1. 歯髄幹細胞を Shikonin で処置すると、DSPP の発現が誘導された。
2. Shikonin の DSPP 発現には、Akt-mTOR シグナル伝達に関与していた。
3. Shikonin の DSPP 発現には、CD44 の関与が重要であった。

引用文献

- 1) Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG and Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002; 81: 531-535.
- 2) Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG and Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 13625-13630.
- 3) Zhang W, Liu W, Ling J, Lin Z, Gao Y, Mao X and Jian Y. Odontogenic differentiation of vascular endothelial growth factor-transfected human dental pulp stem cells in vitro. *Mol Med Rep.* 2014; 10: 1899-1906.
- 4) Nam S, Won JE, Kim CH and Kim HW. Odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells stimulated by the calcium phosphate porous granules. *J Tissue Eng.* 2011; 2011: 812547.
- 5) Lee JH, Lee DS, Choung HW, Shon WJ, Seo BM, Lee EH, Cho JY and Park JC. Odontogenic differentiation of human dental pulp

- stem cells induced by preameloblast-derived factors. *Biomaterials*. 2011; 32: 9696-9706.
- 6) Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Tanaka T, Nakahara T, Ishikawa H, Mitev V and Haapasalo M. High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. *J Endod*. 2012; 38: 475-480.
- 7) Carnevale G, Riccio M, Pisciotta A, Beretti F, Maraldi T, Zavatti M, Cavallini GM, La Sala GB, Ferrari A and De Pol A. In vitro differentiation into insulin-producing beta-cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Dig Liver Dis*. 2013; 45: 669-676.
- 8) Syed-Picard FN, Du Y, Lathrop KL, Mann MM, Funderburgh ML and Funderburgh JL. Dental pulp stem cells: a new cellular resource for corneal stromal regeneration. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4: 276-285.
- 9) Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Ruiz A, Minana MD, Sanchez-Torrijos J, Paya R, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Llop M, Montero JA and Sepulveda P. Human dental pulp stem cells improve left

ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*. 2008; 26: 638-645.

- 10) Nicola FDC, Marques MR, Odorcyk F, Arcego DM, Petenuzzo L, Aristimunha D, Vizquete A, Sanches EF, Pereira DP, Maurmann N, Dalmaç C, Pranke P and Netto CA.

Neuroprotector effect of stem cells from human exfoliated deciduous teeth transplanted after traumatic spinal cord injury involves inhibition of early neuronal apoptosis. *Brain Res*. 2017; 1663: 95-105.

- 11) Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M, Sakamoto K, Tauchi R, Wakao N, Imagama S, Hibi H, Kadomatsu K, Ishiguro N and Ueda M. Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest*. 2012; 122: 80-90.

- 12) Pisciotta A, Riccio M, Carnevale G, Lu A, De Biasi S, Gibellini L, La Sala GB, Bruzzesi G, Ferrari A, Huard J and De Pol A. Stem cells isolated from human dental pulp and

- amniotic fluid improve skeletal muscle histopathology in mdx/SCID mice. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6: 156.
- 13) Chamieh F, Collignon AM, Coyac BR, Lesieur J, Ribes S, Sadoine J, Llorens A, Nicoletti A, Letourneur D, Colombier ML, Nazhat SN, Bouchard P, Chaussain C and Rochefort GY. Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. *Sci Rep.* 2016; 6: 38814.
- 14) Chen KL, Huang YY, Lung J, Yeh YY and Yuan K. CD44 is involved in mineralization of dental pulp cells. *J Endod.* 2013; 39: 351-356.
- 15) Chen KL, Yeh YY, Lung J, Yang YC and Yuan K. Mineralization effect of hyaluronan on dental pulp cells via CD44. *J Endod.* 2016; 42: 711-716.
- 16) Umemura N, Ohkoshi E, Tajima M, Kikuchi H, Katayama T and Sakagami H. Hyaluronan induces odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells via CD44. *Stem Cell Res Ther.* 2016; 7: 135.

- 17) Dahlbäck B. Blood coagulation. *The Lancet*. 2000; 355: 1627-1632.
- 18) Palermo A, Tuccinardi D, D'Onofrio L, Watanabe M, Maggi D, Maurizi AR, Greto V, Buzzetti R, Napoli N, Pozzilli P and Manfrini S. Vitamin K and osteoporosis: Myth or reality? . *Metabolism*. 2017; 70: 57-71.
- 19) Iwamoto J. Vitamin K(2) therapy for postmenopausal osteoporosis. *Nutrients*. 2014; 6: 1971-1980.
- 20) Guralp O and Erel CT. Effects of vitamin K in postmenopausal women: mini review. *Maturitas*. 2014; 77: 294-299.
- 21) Iwamoto J, Seki A, Sato Y, Matsumoto H, Takeda T and Yeh JK. Effect of vitamin K2 on cortical and cancellous bone mass and hepatic lipids in rats with combined methionine-choline deficiency. *Bone*. 2011; 48: 1015-1021.
- 22) Chen X, Yang L, Zhang N, Turpin JA, Buckheit RW, Osterling C, Oppenheim JJ and Howard OM. Shikonin, a component of chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 2810-2816.

- 23) Komi Y, Suzuki Y, Shimamura M, Kajimoto S, Nakajo S, Masuda M, Shibuya M, Itabe H, Shimokado K, Oettgen P, Nakaya K and Kojima S. Mechanism of inhibition of tumor angiogenesis by beta-hydroxyisovalerylshikonin. *Cancer Sci.* 2009; 100: 269-277.
- 24) Hatou S and Shimmura S. Review: corneal endothelial cell derivation methods from ES/iPS cells. *Inflamm Regen.* 2019; 39:19.
- 25) Fruman DA and Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 13: 140-156.
- 26) Pantovic A, Krstic A, Janjetovic K, Kocic J, Harhaji-Trajkovic L, Bugarski D and Trajkovic V. Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone.* 2013; 52: 524-531.
- 27) Tsai TL, Wang B, Squire MW, Guo LW and Li WJ. Endothelial cells direct human mesenchymal stem cells for osteo- and chondro-lineage differentiation through endothelin-1 and AKT signaling. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6: 88.

- 28) Tanaka Y, Sonoda S, Yamaza H, Murata S, Nishida K, Kyumoto-Nakamura Y, Uehara N, Nonaka K, Kukita T and Yamaza T. Acetylsalicylic acid treatment and suppressive regulation of AKT accelerate odontogenic differentiation of stem cells from the apical papilla. *J Endod.* 2019; 45: 591-598 e596.
- 29) Tanaka Y, Sonoda S, Yamaza H, Murata S, Nishida K, Hama S, Kyumoto-Nakamura Y, Uehara N, Nonaka K, Kukita T and Yamaza T. Suppression of AKT-mTOR signal pathway enhances osteogenic/dentinogenic capacity of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9: 334.