

日本歯科産業学会春期講演会, 東京・東京医科歯科大学, 2011年2月20日

**辻 孝**, 歯の再生研究の現状と将来, 東京歯科大学講義, 東京・東京歯科大学, 2011年1月24日

**辻 孝**, 未来の歯科治療としての歯科再生医療の実現を目指して, 九州大学歯学研究院講義, 福岡・九州大学, 2010年12月3日

**辻 孝**, 未来の歯科治療を創造する歯科再生医療—研究の現状と将来展望—, 愛知学院大学歯学部創立50年記念講演会, 愛知・名古屋観光ホテル, 2010年11月27日

**辻 孝**, 次世代再生医療である臓器置換再生医療の実現に向けた先端基盤技術の開発, 特許庁先端技術研修, 東京・経済産業省別館1階, 2010年11月19日

**辻 孝**, 臓器・器官を再生する医療システムの実現を目指して, 第10回山梨再生・移植研究会, 山梨・山梨大学, 2010年11月10日

**辻 孝**, 臓器置換再生医療としての歯の再生治療の実現を目指して, 慶應義塾大学医学部眼科学教室講演会, 東京・慶應義塾大学医学部, 2010年11月4日

**辻 孝**, 臓器を再生する医療の実現を目指して, 理科大フォーラム講演, 東京・秋葉原コンベンションホール, 2010年11月2日

**辻 孝**, 生体内環境と調和・機能する歯科再生治療の実現を目指して, 福岡歯科大学「生体内環境を調和する硬組織再建システム」キックオフシンポジウム, 福岡・福岡歯科大学, 2010年10月15日

**辻 孝**, 臓器・器官を再生する医療システムの実現を目指して, 自治医科大学大学院特別講義, 栃木・自治医科大学, 2010年10月6日

**辻 孝**, 未来の歯科治療としての歯科再生医療, 栃木歯学研究会, 栃木・ホテルサンルート栃木, 2010年9月7日

**辻 孝**, 歯科再生医療の実現に向けた研究戦略と進展, 第2回リガク in vivo microCT フォーラム, 東京・日本大学駿河台キャンパス, 2010年8月27日

**辻 孝**, 未来の歯科医療としての歯科再生医療, 2010年日本自家歯牙移植・外傷歯学研究講演会, 愛知・ナディアパーク・デザインセンター, 2010年8月1日

**辻 孝**, 臓器置換再生医療の実現を目指して—歯や毛髪再生からアプローチした研究戦略と展開—, 第186回生命科学フォーラム, 東京・日本記者クラブ, 2010年7月28日

**辻 孝**, 歯科再生治療の実現を目指した「歯の再生」研究の戦略と展開, 第30回昭和歯学会総会, 東京・昭和大学歯科病院, 2010年7月3日

**辻 孝**, 次世代歯科治療としての歯の再生, 鶴見大学大学院・研究者セミナー, 神奈川・鶴見大学, 2010年6月29日

**辻 孝**, 歯の機能的な再生を目指した基盤技術の開発, 第64回日本口腔科学会学術集会, 札幌・札幌プリンスホテル国際館パミール, 2010年6月24日

**辻 孝**, 歯科再生治療の実現に向けた研究戦略と展開, 第11回九州臨床再生歯科研究会講演会, 福岡・福岡県歯科医師会館, 2010年6月20日

**辻 孝**, 未来の歯科治療としての歯科再生医療, 日本歯科企業協議会第39回年次総会, 東京・ホテルグランドパレス, 2010年6月15日

中尾一久, **辻 孝**, 臓器置換再生医療に向けた歯の再生の現状と課題, 日本組織培養学会第83回大会, 岡山, 岡山大学創立50周年記念館, 2010年5月21日

**辻 孝**, 歯の再生に向けた研究の現状とその未来像, 東京都中央区京橋歯科医師会学術講演会, 東京, 京橋プラザ, 2010年5月19日

**辻 孝**, 未来の歯科医療としての歯科再生医療,

東京歯科大学創立 120 周年記念学術講演会, 東京, 東京国際フォーラム, 2010 年 5 月 8 日

辻 孝, 再生歯胚移植による歯の機能的な再生, 第 8 回日本歯科骨粗鬆症研究会－歯科再生医療と骨粗鬆症－, 東京, 東京医科歯科大学, 2010 年 4 月 4 日

### 3) 学会発表 (国際学会)

該当なし

### 4) 学会発表 (国内学会)

水野光政、大島正充、小川美帆、山崎大道、中尾一久、山本照子、齋藤正寛、辻 孝, 再生歯による移植システムの開発 (I) –再生歯ユニットの作製と成体顎骨への生着の解析–, 第 10 回 日本再生医療学会総会, 東京・京王プラザホテル, 2011 年 3 月 2 日

大島正充、水野光政、今村 彩、森田梨津子、小川美帆、山崎大道、山本照子、齋藤正寛、辻 孝, 再生歯による移植システムの開発 (II) –再生歯ユニットによる歯槽骨と歯の生理機能の回復–, 第 10 回 日本再生医療学会総会, 東京・京王プラザホテル, 2011 年 3 月 2 日

大島正充、水野光政、今村 彩、小川美帆、山崎大道、中尾一久、山本照子、齋藤正寛、辻 孝, 歯の機能的な再生 (I) : 再生歯ユニットの作製と成体顎骨への生着の解析: 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸・神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 10 日

今村彩、大島正充、水野光政、森田梨津子、小川美帆、山崎大道、山本照子、齋藤正寛、辻 孝, 歯の機能的な再生 (II) : 再生歯ユニット移植による歯の生理的機能の再生: 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸・神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 10 日

中村友美、石田研太郎、花岡麻伊、弓削洋平、小川美帆、齋藤正寛、辻 孝, 器官原基法を応用した器官発生における遺伝子機能解析システムの

構築: 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸・神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 7 日

花岡麻伊、石田研太郎、弓削洋平、中村友美、安川真人、齋藤正寛、辻 孝, SMAD6 は歯胚発生過程において歯原性上皮の発生を抑制的に制御する: 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸・神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 7 日

野本洋平、森田梨津子、紀平望帆、小川美帆、齋藤正寛、辻 孝, 器官原基の形態形成と細胞動態の解析: 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸・神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 7 日

石田研太郎、室伏真由美、中尾一久、森田梨津子、小川美帆、齋藤正寛、辻 孝, 歯胚発生における細胞増殖による歯冠幅制御機構の解析: 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸・神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 7 日

森田梨津子、野本 洋平、小川美帆、大橋一正、水野健作、辻 孝, 細胞骨格再編成を介した器官形態の制御メカニズムの解析: 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸・神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 7 日

水野光政、大島正充、今村彩、小川美帆、中尾一久、山崎大道、山本照子、齋藤正寛、辻 孝, 機能的な歯の再生 (I) : 機能的な歯の構造体: 再生歯ユニットの作製技術の開発, 第 8 回日本再生歯科医学会学術大会・総会, 名古屋・愛知学院大学, 2010 年 10 月 30 日

大島正充、水野光政、今村彩、小川美帆、山崎大道、中尾一久、山本照子、齋藤正寛、辻 孝, 機能的な歯の再生 (II) : 再生歯ユニット移植による生体顎骨への生着と歯槽骨再生, 第 8 回日本再生歯科医学会学術大会・総会, 名古屋・愛知学院大学, 2010 年 10 月 30 日

山崎大道、大島正充、水野光政、今村彩、小川美帆、山本照子、齋藤正寛、辻 孝, 機能的な歯の再生 (III) : 再生歯ユニット移植による歯の生理的機能の再生, 第 8 回日本再生歯科医学会学術大会・総会, 名古屋・愛知学院大学, 2010 年 10 月 30 日

### 3. その他（報道発表）

#### 1) 国内報道

##### ① 新聞（主要新聞、地方新聞）

該当なし

##### ② WEB

歯科会員制ポータルサイト DentWave、2011年2月24日

##### ③ テレビ・ラジオ報道

該当なし

##### ④ 雑誌

辻 孝、歯科雑誌「日本歯科評論」4月号、2011年3月23日

辻 孝、歯科専門誌 Quintessence「クイント 494号」、2011年2月24日

辻 孝、阪急コミュニケーションズ「Pen with new attitude」2010年11月15日

辻 孝、独立行政法人 日本学術振興会「2010 VOL.2 科研費 NEWS」2010年11月

辻 孝、朝日新聞社・メディカル朝日 2010年4月1日

#### 2) 国外報道

##### ① WEB

該当なし

##### ② テレビ報道

該当なし

##### ③ 雑誌

該当なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

#### 1. 特許取得

辻 孝、中尾一久、大島正充（出願人：オーガンテクノロジーズ）：再生歯ユニットの製造方法：特願 2010-196009、平成 22 年 9 月 1 日

辻 孝、中尾一久、大島正充（出願人：オーガンテクノロジーズ）：再生歯ユニットの移植による歯槽骨の回復方法：特願 2010-196016、平成 22 年 9 月 1 日

辻 孝、池田悦子、朝井洋明（出願人：オーガンテクノロジーズ）：歯欠損部の修復方法及び修復材料の製造方法：特願 2010-525698、平成 22 年 12 月 28 日

#### 2. 実用新案登録

該当なし

#### 3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

イヌでの移植歯胚の発生・萌出モデルの作成に関する研究

研究分担者 窪木 拓男 岡山大学医歯薬学総合研究科 教授

研究要旨：本研究は、マウスにおいて確立されている器官原基法による再構成歯胚の移植ならびに機能回復を、大型動物であるビーグル犬にも適応できる移植モデルを作成するために計画された。つまり、ビーグル犬胎仔ならびに仔犬から硬組織の形成直前のステージである歯胚を摘出し、顎骨への他家移植および自家移植を行って、継続的な発生・萌出が達成される手技・条件を確立することを目的としている。

A. 研究目的

歯の欠損は、摂食障害、発音障害、審美障害などを引き起こし、患者のQOLを低下させる。現在の歯科治療は、義歯やインプラントなどの人工材料を用いて喪失した歯の機能回復を図っている。しかし、これらの治療法では口腔機能を十分に回復することが困難な場合が多い。本研究では、実験的再生歯の臨床応用の基盤技術開発を目的に、マウスにおいて確立されている器官原基法による再構成歯胚の移植・機能回復を、大型動物であるビーグル犬にも適応できるモデル作成を試みた。すなわち、再構成歯胚の移植・萌出モデルの確立を目指し、ビーグル犬胎仔ならびに仔犬から発生期にある歯胚を摘出し、顎骨への他家移植および自家移植を行って、継続的な発生・萌出が達成される手技・条件を確立することを目的とした。

B. 研究方法

本報告書に記載の実験は、すべて本学動物実験管理委員会の許可を受けて行った。

1. 他家歯胚移植モデルの確立

前年度から、胎生55日齢の胎仔第二小白歯歯胚が硬組織の形成直前のステージであり、萌出モデルの検討に適した歯胚であることを確認し、サイクロスポリン投与による免疫抑制状態において、他家歯胚移植を行い、歯胚発生の有無を、マイクロCTにて評価してきた。しかし、歯胚発生は認められず、その原因として、1) サイクロスポリンによる免疫抑制効果が不十分である可能性、2) 移植窩洞形成による移植時の強い急性炎症反応による負の作用の可能性、3) 移植歯胚の継続的な発生・発達よりも、顎骨内移植窩内の骨再生が早く、移植歯胚の発生スペースが確保できなかった可能性を考えた。そこで、1) に関して、免疫抑制剤の有効血中濃度を保つためには、一日二回投与が望ましい

が、これまでは手技的な問題から筋肉注射による一日一回投与を行ってきた。この問題を解決するため、FK506とプレドニゾロンの併用による経口投与に変更し、一日二回食事と混合し投与することとした。2)の問題を解決するため、移植3日前に前もって移植窩洞を形成し、急性炎症反応の軽減を図ることとした。3)の問題を解決するため、移植窩洞への骨再生を一定期間抑制することを目的に、歯科用吸収性遮断膜 (GTRメンブレン) を用い発生スペースを一定期間確保できるようにしたうえで、移植を行った。またこれから実験には免疫抑制剤なしのコントロール群を設定した。

## 2. 自家歯胚移植モデルの確立

免疫反応による負の因子を排除するため、自家歯胚移植による歯胚の発生の有無を検討した。つまり、これまでの文献的情報から、萌出モデルの検討に適した胎生30日齢の下顎第3, 4小臼歯 (P3, P4)の歯胚に注目し、30日齢の子犬の下顎第3, 第4乳臼歯を抜歯後、顎骨からP3, P4の歯胚を摘出し、抜歯窩へ自家歯胚移植を行った。移植2ヶ月後に下顎骨ごと摘出し、マイクロCTにて解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. 他家歯胚移植モデルの確立

免疫抑制対策として、FK506とプレドニゾロンの併用による一日二回投与下にて、急性炎症反応の軽減を目的とし移植窩洞の前形成し、移植時にその移植窩洞をGTRメンブレンにて覆うことで移植歯胚の発生スペースの確保を行った窩洞に、胎生55日齢の胎仔第二小臼歯歯胚を他家移植した。約2ヶ月後に顎骨を摘出し、マイクロCTにて解析を行った結果、FK506/プレドニゾロン一日二回投与群において、顎骨内での天然歯胚の発生が認め

られた。しかし、顎骨内での発生頻度は1/6と低く、免疫抑制剤の投与量、投与方法のさらなる検討が必要である。

### 2. 自家歯胚移植モデルの確立

免疫反応を回避するため、自家歯胚移植を行った。つまり、30日齢の子犬の下顎第3, 第4乳臼歯を抜歯し、顎骨から下顎第3, 4小臼歯 (P3, P4)の歯胚を摘出し、抜歯窩へ自家歯胚移植を行った。2ヶ月後に摘出し、マイクロCTにて解析を行ったが歯胚発生は認められなかった。発生しなかった理由として、歯胚摘出の際、歯胚周囲に傷を付けている可能性が考えられた。そこで、次の実験では、歯胚を傷つけないように、歯胚周囲の骨ごと歯胚を摘出し、抜歯窩へ自家移植を行った。移植一ヶ月後にレントゲンにて確認した結果、歯胚発生がおこっていることを確認した。現在レントゲンにて経過を追っている。

## D. 考察

### 1. 他家歯胚移植モデルの確立

FK506とプレドニゾロンの併用による免疫抑制、急性炎症反応の軽減、GTRメンブレンによる移植歯胚の発生スペースの確保等を行ってきたが、歯胚の発生頻度はかなり低かった。この原因としてやはり、免疫抑制の問題が考えられる。我々が使用してきた免疫抑制剤の濃度は心臓移植、肺移植時に使用される濃度である。しかし我々は顎骨骨髓内に発生途中の歯胚を移植しており明らかに条件が異なる。免疫細胞の多くは骨髓内で産生されるため、異物に対する免疫反応は明らかに他の臓器と比べ敏感であろう。また、移植体も発生途中の組織であり、成熟した臓器と比べ周囲の刺激に対し敏感であり、今回のケースでは綿密な免疫、炎症のコントロールが必要不可欠と考えられる。

## 2. 自家歯胚移植モデルの確立

免疫反応を回避するため、自家歯胚移植を行ってきたが、歯胚発生は認められなかった。しかし、歯胚周囲の組織ごと摘出した自家歯胚移植においては顎骨内で歯胚の発生が確認された。このことは、歯胚周囲の組織が歯胚発生のスペースメイキングなど重要な役割を果たしていることを示している。しかし、現在歯胚移植に使用している歯胚は永久歯歯胚であり、歯胚の発生スピードは乳歯歯胚と比べ明らかに遅く、歯胚が発生し萌出するまでにはかなりの時間を要するであろう。

## E. 結論

発生スピードの問題から、乳歯歯胚を用いた他家歯胚移植モデルの確立を試みたが、骨髄内の免疫反応のコントロールが難しく、なかなかうまくいかない。一方、自家歯胚移植モデルにおいて、周囲組織を温存した状態で歯胚を摘出、移植することで歯胚発生が進むことから、今後は自家歯胚移植の系で実験を進めることとする。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Mine A, De Munck J, Van Ende A, Cardoso MV, Kuboki T, Yoshida Y, Van Meerbeek B. TEM characterization of a silorane composite bonded to enamel/dentin. *Dental Materials*; 26(6): 524-532, 2010.

2) Takiguchi S, Maekawa K, Ono T, Sasai N, Kaji M, Clark GT, Kuboki T. Relationship between a chronically painful trapezius muscle and its metabolic state analyzed with PET/CT. *Oral Surg*

*Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*; 110(1): 54-61, 2010.

3) Kawahara D, Mine A, De Munck J, Kuboki T, Yoshida Y, Suzuki K, Van Meerbeek B, Yatani H. The quasi-three-dimensional marginal leakage of full-coverage crowns: resin coating versus sodium hypochlorite treatment. *International Journal of Prosthodontics*; 23(5): 406-409, 2010.

4) Ueda M, Mine A, De Munck J, Hakogi T, VAN Meerbeek B, Kuboki T. The effect of clinical experience on dentine bonding effectiveness: students versus trained dentists. *Journal of Oral Rehabilitation*; 37(9): 653-657, 2010.

5) De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *European Journal of Oral Sciences*; 118(5): 494-501, 2010.

6) Mine A, De Munck J, Cardoso MV, Van Landuyt KL, Poitevin A, Kuboki T, Yoshida Y, Suzuki K, Van Meerbeek B. Enamel-smear compromises bonding by mild self-etch adhesives. *Journal of Dental Research*; 89(12): 1505-1509, 2010.

7) Hikasa T, Matsuka Y, Mine A, Minakuchi H, Hara ES, Van Meerbeek B, Yatani H, Kuboki T. A 15-year clinical comparative study of the cumulative survival rate of cast metal post-and-core and resin core restorations luted with adhesive resin cement. *International Journal of Prosthodontics*; 23(5): 397-405, 2010.

8) Nagamatsu-Sakaguchi C, Maekawa K, Ono T, Yanagi Y, Minakuchi H, Miyawaki S, Asami J, Takano-Yamamoto T, Clark GT, Kuboki T. Test-retest reliability of MRI-based disk position diagnosis of the temporomandibular joint. *Clinical Oral Investigations*; 2010.

9) Shimono K, Oshima M, Arakawa H, Kimura A, Nawachi K, Kuboki T. The effect of growth factors for bone augmentation to enable dental implant placement. A systematic review. Japanese Dental Science Review; 46(1): 43-53, 2010.

## 2. 学会発表

- ・園山 亘, 窪木拓男. Functional Regeneration of Oral Tissue -Transfer of in vitro Results with Cultured Stem/Progenitor Cells to in vivo-. 日本組織培養学会 第83回大会. 岡山, 日本. 発表日 2010. 5. 21.
- ・新川重彦, 園山 亘, 大野充昭, 窪木拓男. ヒト歯胚関連組織から分離した上皮細胞の分化を制御する因子の検索. 歯の発生・再生に関する研究セミナー. 岡山, 日本. 発表日 2010. 8. 24.
- ・Sonoyama W, Ono M, Kuboki T. Biological Researches for Regenerative Dentistry in our Department. Kotsanos seminar. Okayama, Japan. 発表日 2010. 10. 26.
- ・窪木拓男. 生物学的配慮と臨床事実に基づいた口腔リハビリテーション医学を構築

するために一臨床疫学, バイオメカニクス, そしてバイオロジーへ. 昭和大学歯学部大学院セミナー. 東京, 日本, 発表日 2011. 02. 04.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

- ・窪木拓男, エミリオ サトシ ハラ, 大野充昭, 園山 亘, 滝川正春: 特許の名称「軟骨再生促進剤」特願2011-037932.
- ・窪木拓男, 大野充昭, 園山 亘, 中島 隆, 笈田育尚: 特許の名称「新規間葉系幹細胞」特願2011-111873.

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

再生歯作成のための新たな細胞シーズの探索と歯の形態制御機構の解析

研究分担者 福本 敏 東北大学大学院歯学研究科教授

研究要旨：再生歯作成の為に細胞シーズとして、iPS 細胞から歯原性上皮および間葉組織の誘導法の開発と、分化誘導メカニズムの解明を行う。また、既に分化した細胞集団から、組織幹細胞を人為的に誘導できるケミカルコンパウンドのスクリーニングを行い、単一薬剤による簡便な幹細胞大量調整法の開発を行う。

A. 研究の目的

歯の再生には、器官原基法などを用いた再生技術の開発や、再生歯を作成する為の細胞シーズの探索が必要である。そこで本研究では、iPS 細胞や歯髄中に存在する歯髄幹細胞の利用を考え、これら細胞から歯の構築に必要な細胞群の分化誘導システムの構築を目的とする。

B. 研究方法

昨年の研究成果により、iPS 細胞からエナメル上皮細胞への誘導が可能となり、またケミカルコンパウンドを利用し、分化した歯髄細胞から、歯髄幹細胞を大量に調整する方法を見いだした。そこで、iPS 細胞から歯関連細胞への分化誘導に必要な分子の同定を試みた。また、ケミカルコンパウンドで誘導した歯髄幹細胞の細胞分化能について検討を行った。さらに、新たな FDA 認可ケミカルコンパウンドライブラリーと天然コンパウ

ンドライブラリーを使用し、幹細胞を人為的に誘導する薬剤同定を試みた。

C. 研究結果

iPS 細胞からエナメル上皮への誘導には、ラット由来の歯原性上皮を用いたとも培養系を用いて行った。この共培養法では、iPS 分化に関わる要素として、細胞同士の直接的な相互作用、細胞増殖因子などの液性因子による採用、細胞外マトリックスの関与などが示唆された。そこで、ラット由来の歯原性上皮細胞を、4% パラホルムアルデヒド処理したもの、アンモニア処理により細胞外マトリックスだけにしたものなどを作製し、これらとの相互作用により iPS の分化について検討した。その結果、マトリックス単独や、液性因子の分泌作用を有しない細胞では、エナメル上皮への分化誘導が認められなかった。また、ラット由来歯原性上皮細胞の培養上清を iPS 細胞に添加すること



で、エナメル上皮への分化が誘導された。この結果から、何らかの液性因子が、エナメル上皮への分化に重要であることが示唆された。そこで、エナメル上皮分化に必須の分子であるアメロブラスチンの発現の高いラット由来上皮細胞と、iPS細胞を共培養すると、iPS細胞からエナメル上皮への分化が促進され、逆にアメロブラスチン低発現細胞を用いた実験では、分化誘導が抑制された。このことから、アメロブラスチンが、直性iPS細胞からエナメル上皮への分化に重要であることが示唆された。一方、分化した歯髄細胞から、歯髄幹細胞の人工的な誘導に関しては、新たに5種類のコンパウンドのスクリーニングに成功した。これらの成果から、歯の再生に必要な歯原性上皮はiPS細胞から、間葉細胞は分化した歯髄細胞から調整できるようになった。

#### D. 考察

これまで、再構成歯胚の作成には、胎児由来の細胞を大量に使用する以外に方法はなかったが、iPS細胞を利用することで、成人から得られた細胞を利用することができるようになった。これにより、胎児を使用する倫理的問題を回避できたと考えられる。また、分化した歯髄細胞から歯髄幹細胞を、単一のコンパウンドを用いることで、短時間に作製する手法は、歯の再生のみならず、全身のすべての組織再生に応用できる技術と考えられる。

#### E. 結論

本研究の成果から、iPS細胞および分化した歯髄細胞から、歯の再生に必要な細胞集団の作成が可能となった。

#### F. 健康危機情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ishikawa M, Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Fukumoto S, Yamada Y.: Pannexin3 promotes osteoblast differentiation through its function as an endoplasmic reticulum(ER)Ca2+ channel, a hemichannel and a gap junction. J Cell Biol. 2011 in press.

2) Iwamoto T, Yamada A, Arakaki M, Sugawara Y, Ono M, Futaki M, Yoshizaki K, Fukumoto E, Nakamura T, Fukumoto S: Expression and functions of neurotrophic factors in tooth development. J Oral Biosci. 2011;53(1):13-21

3) Nakamura T, Yamada Y, Fukumoto S.: Divers function of epiprofin in tooth development. J Oral Biosci. 2011;53(1):22-30

4) Iwamoto T, Nakamura T, Doyle A, Ishikawa M, de Vega S, Fukumoto S, Yamada Y.: Pannexin3 regulates intracellular ATO/camp levels and promotes chondrocyte differentiation. J Biol Chem. 2010;285(24):18948-84

5) Wu N, Iwamoto T, Sugawara Y, Futaki M, Yoshizaki K, Yamamoto S,

Yamada A, Nakamura T, Nonaka K, Fukumoto S.: PDGFs regulate tooth germ proliferation and ameloblast differentiation. Arch Oral Biol. 2010;55(6):426-34.

## 2. 学会発表

1) 福本敏、歯髄細胞から歯髄幹細胞への誘導と上皮相互作用(シンポジウム)、第10回日本再生医療学会総会、東京、2011年3月

2) 福本敏、GSK-3bを用いた歯髄細胞の未分化誘導法の確立(シンポジウム)、第3回口腔先端医学会議、東京、2011年1月

3) 福本敏、Extracellular signaling regulates tooth morphogenesis、Harverd-Forsyth Research Workshop

(シンポジウム)、ボストン、2011年1月

4) 福本敏、歯の形態形成の分子機構(シンポジウム)、第42回日本臨床分子形態学会、三島市、2010年9月

5) 福本敏、エナメル上皮分化における分子制御メカニズム(シンポジウム)、第52回歯科基礎医学会総会、東京、2010年9月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

イヌモデル組織工学的人工再生歯根技術の開発に関する研究

研究分担者 園山 亘 岡山大学病院 助教

研究要旨：本研究は、前臨床モデルとしての基礎研究において汎用性の高いビーグル犬を用いて、組織工学的な人工再生歯根技術を開発・確立するために計画された。つまり、ハイドロキシアパタイトなどのスキャフォールドと組織幹細胞である歯髄組織由来間葉系幹細胞および歯根膜組織由来間葉系幹細胞を応用することで、歯根膜の機能を有した人工歯根を、大型動物であるビーグル犬で再生することを目的としている。

A. 研究目的

歯の欠損は、摂食障害、発音障害、審美障害などを引き起こし、患者のQOLを低下させる。現在の歯科治療は、義歯やインプラントなどの人工材料を用いて喪失した歯の機能回復を図っている。しかし、これらの治療法では口腔機能を十分に回復することが困難な場合が多い。本研究では、ミニブタモデルでの報告がある組織幹細胞を用いた組織工学的人工再生歯根技術を、前臨床モデルとしての基礎研究において汎用性の高いビーグル犬において実施し、その技術を開発・確立することを目的とした。

B. 研究方法

本報告書に記載の実験は、すべて本学動物実験管理委員会の許可を受けて行った。

1. イヌ歯髄細胞、歯根膜細胞の幹細胞マーカー発現の解析ならびに多分化能の検討

前年度、イヌ歯髄組織から歯髄細胞、歯

周組織から歯根膜細胞の単離に成功し、これらの細胞が硬組織形成能を有していることを確認した。今年度は、まずこれらの細胞が幹細胞マーカーを発現しているかを確認するため、CD34, CD45, CD29, CD44, CD90, CD271の細胞表面マーカーの発現について、フローサイトメトリーを用い、骨髓由来幹細胞と比較検討した。また、多分化能を有しているか確認するため、脂肪分化誘導培地で長期間培養し、オイルレッドO染色にて脂肪分化の有無を確認した。

2. 歯髄細胞、歯根膜細胞評価

歯髄細胞の象牙質形成能、歯根膜細胞の歯周組織形成能を確認するため、多孔性ハイドロキシアパタイト(HA:ネオボーン、エム・エム・ティー)に歯髄細胞を浸透させ、歯根膜細胞シートで被覆して、SCIDマウス背部皮下に移植し、8週後に回収し、組織学的に評価した。

### 3. 人工歯根に適したキャリアの選定

前年度から歯根膜細胞シートを多層に被覆した、歯髓細胞を含む歯根型多孔性HAおよび多孔性β-TCP（オスフェリオン，オリンパステルモバイオマテリアル株式会社）を、細胞分離のために下顎小白歯抜歯を行ったビーグル犬の抜歯後3ヶ月の治癒を待った顎骨に埋入窩を形成し、移植した。移植12週後に灌流固定のうえ屠殺し、研磨切片を作製し、組織学的検討を行った。

### 4. 再生歯根膜の機能的評価

歯根膜細胞シートにより正常な歯根膜組織が再生されれば、挺出方向の矯正力に対して、周囲骨は歯根膜の付着レベルを維持したまま垂直方向に増生されると推測される。この仮説を検証するため、挺出装置付きの再生人工歯根を顎骨へ埋植し、2-3ヶ月後に矯正力を加え、人工歯根並びに周囲組織の移動量をX線学的、肉眼的に評価した。

また、歯根膜組織の成熟には機能力の負荷が必要であると考えられるため、歯髓細胞を含浸させ、歯根膜細胞シートで被覆したHAに歯冠補綴物装着のためのポスト（維持孔）を形成した。その後、歯冠補綴物作製のための印象採得を行い、歯冠補綴装置の作製、装着を行い、負荷をかけた。

なお、本移植実験は免疫学的な拒絶の可能性を排除するため、細胞はイヌの個体別に培養し、細胞を分離した個体と同一の個体に細胞を移植する自家細胞移植とした。

## C. 研究結果

### 1. イヌ歯髓細胞、歯根膜細胞の幹細胞マーカー発現の解析ならびに多分化能の検討

歯髓細胞、歯根膜細胞の表面抗原発現動態の評価を行った結果、CD29（歯髓細胞：28.6%、歯根膜細胞：22.8%）、CD44（100%、

100%）、CD90（41.9%、15.9%）、CD271（17.4%、8.18%）陽性、CD34、CD45陰性な細胞群であり、骨髄由来間葉系幹細胞と同様の表面抗原発現動態を示した。また、これらの細胞を脂肪細胞誘導培地で長期間培養し、オイルレッドO染色を行った結果、脂肪滴の貯留が確認された。

### 2. 歯髓細胞、歯根膜細胞評価

歯根型多孔性HAに歯髓細胞を含浸させ、歯根膜細胞シートで被覆して、SCIDマウス背部皮下に移植し、8週後に回収し、H.E.染色にて評価した。

歯髓細胞を使用しなければHA内部に硬組織形成は認められないこと、歯根膜細胞シートを使用しない場合は周囲のマウス由来と考えられる脂肪細胞と直接接しているが、歯根膜細胞シートを使用すれば脂肪組織との間には線維性の組織が介在することを確認した。

### 3. 人工歯根に適したキャリアの選定

前年度に摘出した再生歯根サンプルの非脱灰切片の作製し、組織学的な検討を行った結果、キャリアにHAを用いたサンプルにおいては、その中心部においても硬組織の形成が確認された。一方、β-TCPを用いたサンプルにおいては、HAと比べ硬組織形成が低調であり、キャリア中心部では硬組織の形成が確認されなかった。この原因の一つとして、二つのポーラスサイズの違いが考えられる。すなわち、今回キャリアに用いたβ-TCPはHAと比べてポーラスサイズが明らかに小さく、内部まで十分な細胞の拡散が行われなかった事、また十分な栄養供給がされなかったため、硬組織が形成されなかったものと考えられる。これらの結果から、今後の研究にはキャリアとしてHAを使

用する予定とした。

#### 4. 再生歯根膜の機能的評価

初めに、歯根膜細胞シートでの被覆の効果を検討するため、歯髓細胞を含浸させ、歯根膜細胞シートで被覆した多孔性HA、被覆しなかった多孔性HAを、イヌ下顎骨に埋入窩を形成し、移植した。8週後に下顎骨ごと回収し、マイクロCT撮影を行い、骨と多孔性HAとの関係を3次元的に評価した。その結果、細胞シートあり群と比べ、細胞シートなし群では骨とHAとの間の空間が狭く、細胞シートなし群においてのみ移植先の骨が多孔性HAの内部に進展し、骨癒着している像が一部観察された。また、組織切片を作製し評価したところ、歯根膜シートあり群では、歯根膜様組織像が観察され、一部で既存骨とキャリアの間をつなぐ線維の配列が確認されたが、正常歯根膜のような均一な線維の配列は認められなかった。

そこで次に、歯根膜組織や線維の成熟には機能力に負荷が必要であると考え、歯冠補綴装置を作製し、咬合力を付与するモデルを作製し、検討した。つまり、歯髓細胞を含浸させ、歯根膜細胞シートで被覆した多孔性HAをイヌ顎骨に埋植し、3ヶ月の治療期間の後、歯冠補綴装置を装着した。装着後レントゲンにて経過を追っていたが、装着7日目に脱離したため、組織を回収し組織切片を作製した。その結果、歯根膜シートなし群は骨との癒着がみられたが、歯根膜シートあり群ではHA周囲は歯根膜様組織で覆われていた。

現在、長期間人工歯根を口腔内で機能させるため、これまでの方法でHAをイヌ顎骨に埋入した。埋入3ヶ月後に再度補綴物を装着し、経過を追う予定である。

挺出方向の矯正力に対して、周囲骨は歯根

膜の付着レベルを維持したまま垂直的に増生できるという仮説のもと、挺出装置付きの再生人工歯根を顎骨へ埋植し、3ヶ月後に矯正力（挺出力）を加えたが、HAに接着させた矯正用のワイヤーの脱離、またHAの矯正力による破折が認められ、継続的な挺出力を加えることが出来なかった。これらの失敗を改善するため、HAに接着させるワイヤーの形態および接着方法を改良し埋植を行った。現在経時的に矯正力を加え、X線学的、肉眼的に検討を行なっている。

#### D. 考察

##### 1. イヌ歯髓細胞、歯根膜細胞の幹細胞マーカー発現の解析ならびに多分化能の検討

イヌ抜去歯から単離した歯髓細胞、歯根膜細胞はin vivoにおいて硬組織形成能を有していること、in vitroにおいて脂肪分化能を有していることが明らかとなった。また、幹細胞マーカーをフローサイトメトリーで確認したところ、骨髄由来間葉系幹細胞と類似した表現型を有していた。これらの結果から、これら単離した細胞群は間葉系の幹細胞を含む細胞群であることが明らかとなった。

##### 2. 歯髓細胞、歯根膜細胞評価

SCIDマウス背部皮下移植実験の結果から、歯髓細胞がないとHA内部に硬組織形成は認められないこと、また、歯根膜細胞シートの使用が移植体と周囲組織との癒合を防止する役割を果たしていることが明らかとなった。

##### 3. 人工歯根に適したキャリアの選定

SCIDマウス背部皮下移植実験においてはβ-TCPはHAと比べてポーラス内部に硬組織形成が誘導されていたが、イヌ顎骨移植モデルにおいては明らかにβ-TCP内部に硬組

織は形成されていなかった。これはSCIDマウス移植実験とイヌ顎骨移植実験に用いたキャリアの形状が異なったためと考えられる。つまり、SCIDマウス移植実験には多孔質形状を有した顆粒状のスキヤフォードを使用したのに対し、イヌ移植実験には歯根形態の多孔質形状を有したブロックを使用したため、ポーラスサイズの小さなβ-TCPブロックにおいて、内部まで細胞の進展、栄養供給がなされなかったためと考えられる。

#### 4. 再生歯根膜の機能的評価

歯根膜の機能評価を行うため、歯冠補綴装置を装着し咬合機能させる事による評価、矯正力を負荷する事による評価をこれまで行ってきたが、補綴物脱離、矯正装置の脱離などのトラブルによりなかなか前進していないのが現状である。現在、補綴物の作製、接着方法の変更を行い、再度試みている。

#### E. 結論

ビーグル成犬抜去歯から得た歯髄組織ならびに歯根膜組織より、幹細胞を含む細胞群が採取可能であることを確認した。

また、歯髄細胞は歯根型スキヤホードのポーラス内部に象牙質様硬組織を再生させるのに有用であること、歯根膜細胞シートは歯根型スキヤホードの周囲に歯根膜様組織の形成を促し、周囲組織との癒合を防止する役割を果たすことを確認した。

今後は、再生歯根膜の機能評価を引き続き行っていく。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

・ 園山 亘, 窪木拓男. Functional Regeneration of Oral Tissue -Transfer of in vitro Results with Cultured Stem/Progenitor Cells to in vivo-. 日本組織培養学会 第83回大会. 岡山, 日本. 発表日 2010. 5. 21.

・ 園山 亘. 組織再生による口腔機能の再生へ向けて. 第11回 九州再生歯科研究会. 博多, 日本. 発表日 2010. 6. 20.

・ Ono M, Inkson CA, Kilts TM, Sonoyama W, Kuboki T, Young MF. WISP-1/CCN4 Regulates Osteogenic Differentiation by Controlling BMP-2 Function. 88th International Association for Dental Research. Barcelona, Spain. 2010. 7. 14-17. 発表日 2010. 7. 15. 東京, 日本. 2010.

・ 新川重彦, 園山 亘, 大野充昭, 窪木拓男. ヒト歯胚関連組織から分離した上皮細胞の分化を制御する因子の検索. 歯の発生・再生に関する研究セミナー. 岡山, 日本. 発表日 2010. 8. 24.

・ Sonoyama W, Ono M, Kuboki T. Biological Researches for Regenerative Dentistry in our Department. Kotsanos seminar. Okayama, Japan. 発表日 2010. 10. 26.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

##### 1. 特許取得

・ 窪木拓男, エミリオ サトシ ハラ, 大野充昭, 園山 亘, 滝川正春: 特許の名称「軟骨再生促進剤」特願2011-037932.

・ 窪木拓男, 大野充昭, 園山 亘, 中島 隆, 笈田育尚: 特許の名称「新規間葉系幹細胞」特願2011-111873.

##### 2. 実用新案登録

該当なし

該当なし

3. その他

### Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

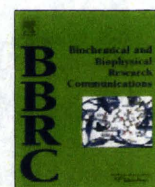
—





Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbrc](http://www.elsevier.com/locate/ybbrc)

## Acerogenin A, a natural compound isolated from *Acer nikoense* Maxim, stimulates osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein action

Tasuku Kihara<sup>a,b,c</sup>, Saki Ichikawa<sup>a</sup>, Takayuki Yonezawa<sup>d</sup>, Ji-Won Lee<sup>d</sup>, Toshihiro Akihisa<sup>e</sup>, Je Tae Woo<sup>d</sup>, Yasuyuki Michi<sup>b</sup>, Teruo Amagasa<sup>b</sup>, Akira Yamaguchi<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Section of Oral Pathology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

<sup>b</sup> Section of Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

<sup>c</sup> Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

<sup>d</sup> Research Institute for Biological Functions, Chubu University, Kasugai, Aichi, Japan

<sup>e</sup> College of Science and Technology, Nihon University, Tokyo, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 February 2011

Available online 15 February 2011

#### Keywords:

Acerogenin A  
Natural compound  
Osteoblast  
BMP  
Runx2  
Noggin

### ABSTRACT

We investigated the effects of acerogenin A, a natural compound isolated from *Acer nikoense* Maxim, on osteoblast differentiation by using osteoblastic cells. Acerogenin A stimulated the cell proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells and RD-C6 osteoblastic cells (Runx2-deficient cell line). It also increased alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 and RD-C6 cells and calvarial osteoblastic cells isolated from the calvariae of newborn mice. Acerogenin A also increased the expression of mRNAs related to osteoblast differentiation, including *Osteocalcin*, *Osterix* and *Runx2* in MC3T3-E1 cells and primary osteoblasts: it also stimulated *Osteocalcin* and *Osterix* mRNA expression in RD-C6 cells. The acerogenin A treatment for 3 days increased *Bmp-2*, *Bmp-4*, and *Bmp-7* mRNA expression levels in MC3T3-E1 cells. Adding noggin, a BMP specific-antagonist, inhibited the acerogenin A-induced increase in the *Osteocalcin*, *Osterix* and *Runx2* mRNA expression levels. These results indicated that acerogenin A stimulates osteoblast differentiation through BMP action, which is mediated by Runx2-dependent and Runx2-independent pathways.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Osteoblasts play a crucial role in bone formation. They derive from the mesenchymal stem cells and differentiate into mature and functional osteoblasts, which process is regulated by many factors. Among these factors, bone morphogenetic proteins (BMPs) are the strongest inducers of osteoblast differentiation and bone formation [1,2]. In this process, BMPs activate runt-related gene 2 (*Runx2*) [3], which is an essential transcription factor for osteoblast differentiation and bone formation; *Runx2*-deficient mice lacked bone formation because of the maturation arrest of osteoblasts [4–6]. *Osterix*, another transcription factor, is also essential for osteoblast differentiation and bone formation since *osterix*-deficient mice also lack bone formation because of the maturation arrest of osteoblasts [7]. These two transcription factors govern the critical regulation of osteoblast differentiation and bone formation. *Runx2* is more upstream factor than *osterix* during osteoblast differentiation and bone formation because *Runx2*-deficient mice do not exhibit *osterix* expression but *osterix*-deficient mice retain-

*Runx2* expression in their skeletal tissue [7]. Thus, osteoblast differentiation and bone formation are critically regulated by BMPs and the transcription factors, *Runx2* and *osterix*, which regulate the expression of the osteoblast-related genes encoding alkaline phosphatase (ALP), type I collagen and *osteocalcin* [2].

BMPs were originally identified as proteins that induced ectopic bone formation when implanted into muscular tissue, and these play important roles in bone regeneration [1,8]. Several lines of evidence have shown that the BMP expression levels are upregulated during bone regeneration, and that BMPs stimulate osteoblast differentiation and bone regeneration [9–13]. Therefore, BMPs are suitable for therapeutic use in bone repair and BMPs have been used for human bone regeneration therapy [14–16]. In addition, chemicals or drugs that upregulate BMP expression will be useful for developing therapeutic drugs for bone regeneration [17–20].

Some natural compounds exert anabolic effects on bone metabolism [21]. We performed extensive screening for identifying new natural compounds that stimulate osteoblast differentiation and identified several such candidates. In the present study, we have investigated the effects of one of these compounds, acerogenin A (ACE), on osteoblast differentiation. ACE was isolated from *Acer nikoense* Maxim, which is indigenous to Japan and its stem bark has been used in folk medicine as a remedy for hepatic disorders

\* Corresponding author at: Section of Oral Pathology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan. Fax: +81 3 5803 0188.

E-mail address: [akira.mpa@tmd.ac.jp](mailto:akira.mpa@tmd.ac.jp) (A. Yamaguchi).

and eyewash [22]. Many new diarylheptanoids and their glycosides named acerogenin and aceroside were isolated from the stem bark of *A. nikoense*. Nagai et al. first isolated ACE from the stem bark of *A. nikoense* in 1976 [23], and many structurally related products have been identified. These compounds exert several biological actions including the inhibitory effects of degranulation in basophilic leukemia cells [24], the protective effects against hepatic injury [25], the inhibitory effects on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages [26] and the inhibitory effect of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter [27], which is a specific activity of ACE. However, its beneficial effects on osteoblast differentiation have not been evaluated.

To investigate the effects of ACE, we used three kinds of osteoblastic cells, MC3T3-E1 cells, RD-C6 cells and calvarial osteoblastic cells. The MC3T3-E1 cell line is a typical osteoblastic cell lines isolated from mouse calvariae. RD-C6 cells are isolated from Runx2-deficient mouse embryos [28]. We have previously reported that RD-C6 cells are capable of differentiating into certain stages of osteoblasts by stimulation with BMP-2, indicating the usefulness of this cell line for identifying the molecular events underlying osteoblast differentiation through the Runx2-independent pathway [28]. Calvarial osteoblastic cells retain osteoblastic characteristics well and these cells are used as primary osteoblastic cells [29].

In this study, we found that ACE stimulates osteoblast differentiation through BMP action, which is mediated by both Runx2-dependent and Runx2-independent pathways. These results indicate that ACE is a potent compound that stimulates osteoblast differentiation and suggest that ACE is a potential candidate for therapeutic use in bone regeneration as an agent for stimulating bone formation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Acerogenin A (ACE) was provided from Dr. Toshihiro Akihisa. Recombinant mouse noggin was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN). Specific PCR primers for mouse *Alp*, *Osteocalcin* (*Ocn*), *Osterix*, *Runx2*, *Bmp-2*, *Bmp-4*, *Bmp-7* and *18s* RNA were synthesized by BEX Co., Ltd. (Tokyo, Japan). All other chemicals and reagents were of analytical grade.

### 2.2. Cell culture

MC3T3-E1 osteoblastic cells were purchased from Cell Bank, RIKEN BioResource Center (Tsukuba, Japan). The Runx2-deficient cell line, RD-C6, was isolated from Runx2-deficient mouse embryos as described previously [28]. Primary osteoblastic cells (calvarial cells) were isolated from the calvariae of newborn C57B/6J mice. The cells were inoculated into 24-well plates at a density of  $2.5 \times 10^4$  cells/well, except for cell proliferation assay. These cells were cultured using  $\alpha$ -modified minimum essential medium containing 10% fetal bovine serum (Sigma, St. Louis, MO), 50 units/ml penicillin G and 50 mg/ml streptomycin.

### 2.3. Cell proliferation assay

MC3T3-E1 cells and RD-C6 cells were inoculated into 24-well plates at a cell density of 250 cells/well and 500 cells/well, respectively, and cultured with or without 30  $\mu$ M of ACE up to day 6. The cell number for each cell type was assessed on days 2, 4, and 6 after cell inoculation. The cell number was counted on removing the cells after incubation with calcium and magnesium free-phosphate buffered saline containing 0.25% trypsin and 0.04% ethylenediaminetetraacetic acid. The doubling time for each cell type was estimated using cell counts obtained during the culture.

### 2.4. Measurement of alkaline phosphatase activity and histochemical staining

Cultured cells were sonicated in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer to obtain cell lysate. ALP activity was determined using *p*-nitrophenylphosphate solution (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) as the substrate [9]. For histochemical detection of ALP activity, the cultured cells were fixed in 10% phosphate-buffered formalin for 5 min, washed twice with 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), and then stained with ALP [10].

### 2.5. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis

For the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis, total RNA was extracted from the cultured cells by using NucleoSpin (Macherey-Nagel, Duren, Germany). RNA aliquots were reverse transcribed to complementary DNAs by using an oligo (dT) primer (Roche), deoxynucleotide triphosphate (dNTP; Promega), and Moloney murine leukemia virus (M-MuLV) reverse transcriptase (Fermentas, Hanover, MD). The complementary DNA products were subjected to PCR amplification with gene-specific primers for mouse *Osteocalcin*, *Runx2*, *Osterix*, *Alp*, *Bmp-2*, *Bmp-4*, and *Bmp-7* (Table 1). Real-time RT-PCR amplification was performed using a LightCycler System (Roche) with a Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). The relative amount of each mRNA in each sample was normalized to the 18S rRNA level.

### 2.6. Statistical analyses

We used analysis of variance with an F-test, followed by a t-test. *P* values less than 0.05 were considered significant. The data are presented as mean  $\pm$  standard deviation values of independent replicates.

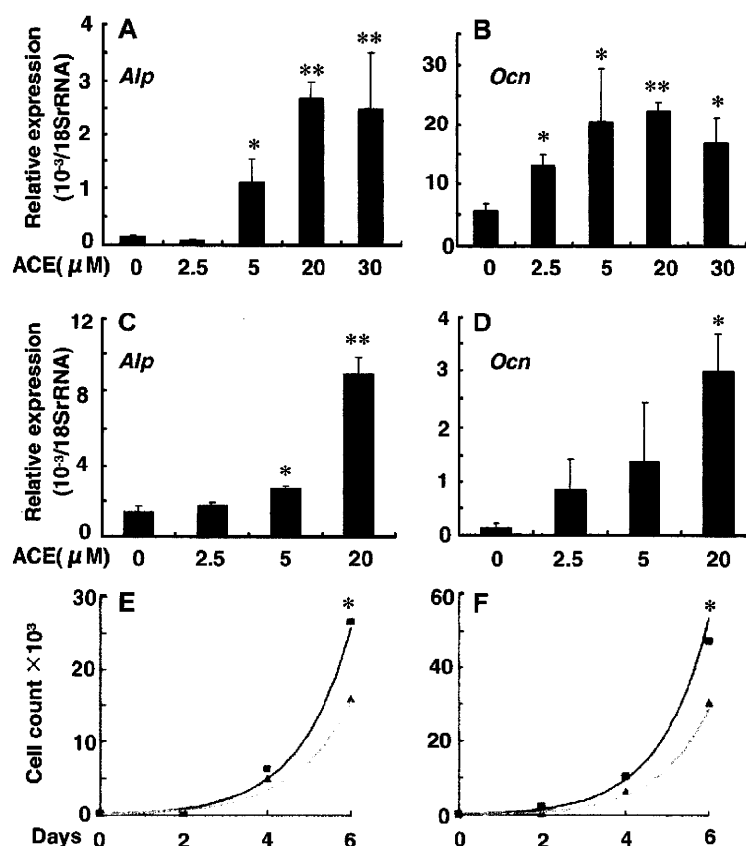
## 3. Results

### 3.1. Effective doses of ACE for osteoblast differentiation

Because ALP is an early-stage marker and osteocalcin is a late-stage marker for osteoblast differentiation, we first tested the dose–response effects of ACE on *Alp* and *Osteocalcin* mRNA expres-

**Table 1**  
Primer sequences of RT-PCR.

Gene	Forward	Reverse
Alkaline phosphatase	5'-TGAGCGACACGGACAAGA	3'-GGCCTGGTAGTTGTTGTGAG
Osteocalcin	5'-CCAAGCAGGAGGGCAATA	3'-AGGGCAGCACAGGTCCTAA
Osterix	5'-TATGCTCCGACCTCCTCAACT	3'-TCCTATTGGCCCTTTCCCGA
Runx2	5'-ATCCATCCAACCTCCACCACG	3'-AGAGGAAGGCCAGAGGCA
BMP-2	5'-CCCCAAGACACAGTTCCTA	3'-GAGACCCGAGTCCGTCTAAG
BMP-4	5'-TGAGCCTTTCCAGCAAGTTT	3'-CTTCCCGGTCTCAGGTATCA
BMP-7	5'-GAAAACAGCAGCAGTGACCA	3'-GGTGGCTTCATGTAGGAGT
18S rRNA	5'-GTAACCCGTTGAACCCCAAT	3'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG



**Fig. 1.** Dose-dependent effects of ACE on *Alp* and *Osteocalcin* (*Ocn*) mRNA expression in MC3T3-E1 (A, B) and RD-C6 cells (C, D). These cells were treated with various concentrations of ACE for 3 days (A, B, C) or 9 days (D). Effects of ACE on the cell proliferation of MC3T3-E1 (E) and RD-C6 cells (F). Vehicle (triangle) and ACE treatment (square). The cells were cultured for 2, 4, and 6 days in the presence or absence of ACE (30 μM), and the cells numbers were assessed as described in Materials and Methods. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

sion levels by using MC3T3-E1 and RD-C6 cells. In MC3T3-E1 cells, 3-day treatment with ACE significantly stimulated the *Alp* mRNA expression levels at 5 μM and its stimulatory effects plateaued at concentrations greater than 20 μM (Fig. 1A). *Osteocalcin* mRNA expression was significantly increased when doses greater than 2.5 μM of ACE were used (Fig. 1B). In RD-C6 cells, the *Alp* mRNA expression level significantly increased on day 3 by treatment with ACE at concentrations greater than 5 μM (Fig. 1C). Treatment with 20 μM of ACE failed to stimulate *Osteocalcin* mRNA expression during the 3-day treatment (data not shown), but when the cells were treated with the same dose, i.e., 20 μM of ACE for 9 days, the *Osteocalcin* mRNA expression level significantly increased (Fig. 1D). On the basis of these results, we performed the following experiments on the cell proliferation and differentiation of osteoblastic cells by using 30 μM of ACE.

### 3.2. ACE stimulated the cell proliferation of osteoblastic cells

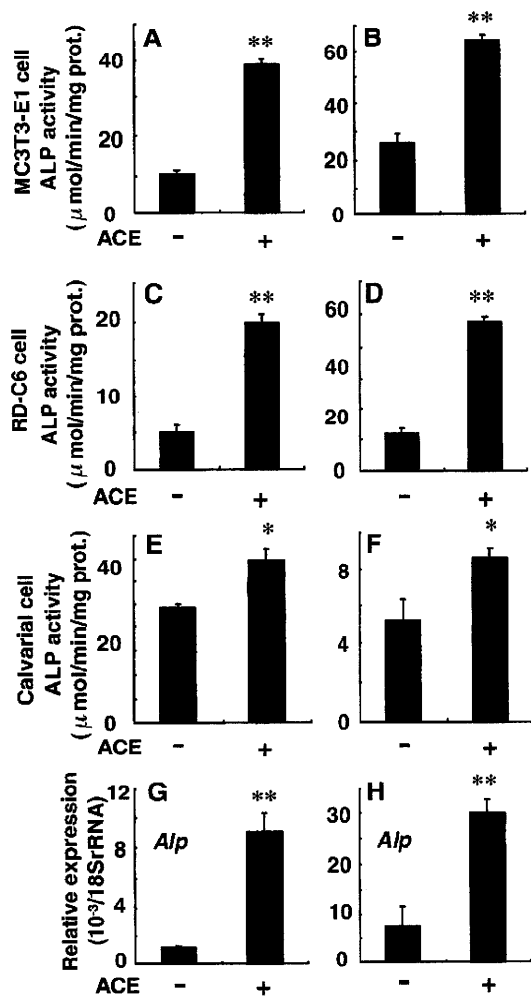
Treatment with ACE (30 μM) did not induce any significant changes in the number of MC3T3-E1 and RD-C6 cells on days 2 and 4; however, on day 6, the number of both types of cells was significantly greater than that were not treated with ACE (Fig. 1E and F). After ACE treatment, the cell doubling times for both cell lines were lower than those for the control cultures (MC3T3-E1: control cells, 24.9 h versus ACE treated cells, 21.9 h; RD-C6: control cells, 21.4 h versus ACE treated cells, 18.4 h). These results suggest that ACE stimulates the cell proliferation of osteoblastic cells.

### 3.3. ACE stimulated ALP activity

Treatment with ACE for 6 days significantly increased the ALP activity in MC3T3-E1 (Fig. 2A), RD-C6 (Fig. 2C), and calvarial cells (Fig. 2E), and these stimulatory effects were also observed on ACE treatment for 21 days (Fig. 2B, D and F). The histochemical detection of ALP activity in MC3T3-E1 cells, RD-C6 cells, and calvarial cells after treatment with ACE for 6 days also indicated the stimulatory effects of ACE in these cells (data not shown).

### 3.4. ACE stimulated the expression of mRNAs related to osteoblast differentiation

Next, we investigated the effects of ACE on the expression of mRNAs related to osteoblast differentiation. ACE treatment for 6 days greatly increased *Alp* mRNA expression in MC3T3-E1 and RD-C6 cells (Fig. 2G and H). The 6-day ACE treatment (30 μM) significantly increased the mRNA expression level of *Osteocalcin*, which is a marker for differentiated osteoblasts, in MC3T3-E1, calvarial cells and RD-C6 cells (Fig. 3A, D and G). It also significantly enhanced the expression of *Osterix* mRNA, which encodes an essential transcription factor for osteoblast differentiation, in MC3T3-E1 cells, calvarial cells, and RD-C6 cells (Fig. 3B, E and H). ACE treatment also significantly increased the mRNA expression of *Runx2*, which encodes another essential transcription factor for osteoblast differentiation, in MC3T3-E1 and calvarial cells (Fig. 3C and F). RD-C6 cells did not express *Runx2* mRNA because these cells were isolated from *Runx2*-deficient mice.



**Fig. 2.** Effects of ACE on ALP activity in MC3T3-E1 cells (A, B), RD-C6 cells (C, D) and calvarial cells (E, F). The cells were treated with ACE (30 μM) for 6 days (A, C, E) or 21 days (B, D, F). Effects of ACE on *Alp* mRNA expression in MC3T3-E1 (G) and RD-C6 cells (H). The cells were treated with ACE (30 μM) for 6 days, and mRNA expression was determined as described in Materials and Methods. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01.

### 3.5. Noggin inhibited ACE-induced osteoblast differentiation

Because BMPs are the most potent inducers of osteoblast differentiation [2,9–12], we investigated the effects of noggin, a BMP specific antagonist [2,30], on ACE-induced expression of osteoblast-related mRNAs. We added noggin (500 ng/ml) to ACE-treated cultures. Noggin significantly inhibited the ACE-induced expression of *Osteocalcin* in MC3T3-E1 cells, calvarial cells, and RD-C6 cells (Fig. 3A, D and G). It also attenuated the *Osterix* mRNA expression levels in all of these cell types, but its inhibitory effects were significant in MC3T3-E1 and RD-C6 cells (Fig. 3B, E and H). This treatment also significantly inhibited the *Runx2* mRNA expression level to the control levels in MC3T3-E1 cells and calvarial cells (Fig. 3C and F). Furthermore, histochemical analysis revealed that noggin treatment inhibited ACE-induced ALP activity in MC3T3-E1, RD-C6, and calvarial cells (Fig. 3I).

### 3.6. ACE stimulated the expression of BMPs in osteoblastic cells

To further confirm what kinds of BMPs are involved in ACE-induced osteoblast differentiation, we evaluated *Bmp-2*, *Bmp-4* and

*Bmp-7* mRNA expression after ACE treatment. After ACE (30 μM) treatment for 3 days, *Bmp-2*, *Bmp-4* and *Bmp-7* mRNA expression levels in MC3T3-E1 cells were considerably higher than those in the control culture (Fig. 4A–C). Although this treatment failed to induce significant increases in the mRNA expression of these BMPs in RD-C6 cells (data not shown), ACE treatment for 6 days stimulated *Bmp-2* and *Bmp-7* mRNA expression in RD-C6 cells to levels that were significantly higher than those in control cultures (Fig. 4D and F). This treatment induced no significant increase in the *Bmp-4* mRNA level in RD-C6 cells (Fig. 4E). Treatment with ACE for 9 days significantly upregulated *Bmp4* mRNA expression in RD-C6 cells (data not shown).

### 3.7. ACE stimulated osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells in the postconfluent state

In the present study, ACE stimulated the cell proliferation of MC3T3-E1 and RD-C6 cells (Fig. 1E and F). Because the increase in cell number accelerates osteoblast differentiation *in vitro*, the effects of ACE on osteoblast differentiation may be related to the stimulated cell proliferation. To explore this possibility, we treated MC3T3-E1 cells in the postconfluent state with ACE (30 μM) for 3 days, and determined the *Alp*, *Osteocalcin*, *Osterix* and *Runx2* mRNA expression. As a result, ACE significantly increased the mRNA expression levels for *Osteocalcin*, *Osterix* and *Runx2* but not for *Alp* (Fig. 4G–J). Interestingly, the same treatment did not induce significant increases in the *Bmp2*, *Bmp4* and *Bmp7* mRNA expression levels (data not shown).

## 4. Discussion

In the present study, we have shown that ACE stimulated osteoblast differentiation by using MC3T3-E1 cells, RD-C6 cells, and calvarial osteoblastic cells isolated from the calvariae of newborn mice (so-called primary osteoblastic cells). We first determined the ACE doses that affected the expression of osteoblast-related genes such as *Alp* and *Osteocalcin* by using MC3T3-E1 and RD-C6 cells (Fig. 1). The results of these experiments suggested that MC3T3-E1 cells are more sensitive to ACE stimulation than are RD-C6 cells. We have also shown that ACE induces ALP activity (Fig. 2) and *Osterix*, *Runx2*, and *Osteocalcin* mRNA expression in MC3T3-E1 and calvarial cells (Fig. 4). Because *Runx2* is a critical transcription factor that regulates *Osteocalcin* mRNA expression [4,6], ACE-induced increase in the *Runx2* mRNA expression level may be involved in the ACE-induced stimulatory effects on osteoblast differentiation in MC3T3-E1 and calvarial osteoblastic cells. ACE also stimulated osteoblast differentiation in RD-C6 cells, which lack *Runx2* [28], by increasing the *Alp*, *Osteocalcin* and *Osterix* expression levels. These results indicate that ACE stimulates osteoblast differentiation through *Runx2*-dependent and *Runx2*-independent pathways.

To determine the mechanism underlying the stimulatory effects of ACE on osteoblast differentiation, we first investigated whether BMPs are involved in ACE-induced osteoblast differentiation, because BMPs are the most potent inducers of osteoblast differentiation; this was done using the BMP-specific antagonist, noggin. Noggin treatment significantly inhibited the ACE-induced upregulation of osteoblast-related mRNAs as well as ALP activity (Fig. 3). These results indicated that ACE-induced osteoblast differentiation is mediated by BMP action.

To explore what kinds of BMPs participated in ACE-induced osteoblast differentiation, we assessed *Bmp-2*, *Bmp-4* and *Bmp-7* mRNA expression in MC3T3-E1 and RD-C6 cells with or without ACE treatment. As expected, ACE stimulated the *Bmp-2*, *Bmp-4* and *Bmp-7* mRNA expression as early as day 3 after treatment. Be-