The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	化合物ライブラリーを用いた骨形成促進作用を有する小分子化合物の探索
Author(s)	福安, 翔
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/55539
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

学　位　論　文

化合物ライブラリーを用いた
骨形成促進作用を有する小分子化合物の探索

大阪大学大学院歯学研究科
顎口腔機能再建学講座
クラウンブリッジ補綴学分野

福安　翔

化合物ライブラリーを用いた
骨形成促進作用を有する小分子化合物の探索

大阪大学大学院歯学研究科

顎口腔機能再建学講座

クラウンブリッジ補綴学分野

福安　翔

緒言

歯槽骨の吸収は，歯周病の進行[1]，重度の齲蝕，歯根破折あるいは外傷等を原因とした歯の喪失に継続して惹起される。歯を喪失した後の高度な顎堤吸収はインプラント治療や補綴歯科治療による審美回復あるいは機能回復を困難にするため[2]，歯槽骨の吸収を予防する技術や，失われてしまった歯槽骨を再生する技術の確立は歯科補綴学にとって重要な課題である[3,4]。

今日，歯槽骨を再生する術式としてGBR（Guided Bone Regeneration：骨誘導再生）法が多く用いられるようになったが[5,6]，骨組織の欠損が広範囲に及ぶ症例では，十分な治療効果が得られない場合も多い[7]。そのため，より確実な骨造成を可能にしようとする試みとして，GBR法に加えて多血小板血漿（PRP）[8]，エナメル基質由来蛋白（Emdogain®）[9]，bone morphogenetic protein-2（BMP-2）[10]，plate derived growth factor-BB（PDGF-BB）[11]，fibroblast growth factor（FGF）-2[12]などの生理活性因子を利用した骨造成の術式が報告されており，一定の効果が報告されている[13]。しかし，これらの成長因子は多数のアミノ酸からなる分子量の大きなタンパク質であり，またいずれの成長因子も動物由来物質であること，リコンビナント技術により大腸菌を用いて作製されていること，生体内での活性が不安定[14]であること，高価であること等の欠点を有している[15]。

これに対して，小分子化合物（small molecule compound）は，分子量が小さく単純な構造であるため，効率的な合成法および検定法が確立されており，大量かつ安価に提供できるという利点を有する[16]。また，小分子化合物は複数の特異的な分子標的に対して迅速に作用するという利点を有しており，生体高分子を標的とした分子標的薬もすでに実用化が進んできている。

小分子化合物を骨形成治療薬に応用しようとする試みはこれまでに多く行われており，試験管内で骨芽細胞分化を促進する小分子化合物として isoflavone derivatives[17, 18]，TAK-778[19]，TH[15]，Phenamil[20]，Harmine[21]，Statin[22]，Resveratrol[23]等が報告されているが，生体内でも骨形成作用を示す化合物は少ない[22-24]。したがって，新規に骨形成促進作用を有する小分子化合物を発見することによって，新たな骨形成治療薬を開発しようとする研究に期待が集まっている[16]。

一方，ポストゲノム時代の幕が開け，近年では化学的観点から生命現象を解明するケミカルバイオロジーという，化学と生命科学を融合した学問分野が発展している。ケミカルバイオロジーは，多数の化合物を集めたライブラリーを用いて細胞内の分子機構を標的としたスクリーニングを行い，得られたヒット化合物をプローブとして用いて，DNA，RNA，タンパク質といった生体高分子と特異的に作用させることで，生体内の機能を解明していくアプローチである

[25]。また，この分子機構を解明する過程で，ヒット化合物は創薬に繋がる新たな手法や分子標的をもたらす可能性がある。

生体内分子の機能や反応を標的とした化合物の探索には，培養細胞を基盤とした化合物ライブラリーのスクリーニングが有用な方法であり，これまでに様々な種類の細胞を用いたスクリーニングシステムが報告されている[26]。また，骨代謝研究の分野では骨粗鬆症に対する創薬の観点から，骨吸収を司る破骨細胞を基盤とした化合物ライブラリースクリーニングによって骨吸収抑制化合物を探索する試みが数多く報告されている[27-29]。一方で，骨形成の主役である骨芽細胞を基盤とした化合物ライブラリースクリーニングの報告は少ない[30, 31]。

以上を背景に，本研究では，骨芽細胞分化促進作用および骨形成促進作用を有する新規の化合物を検出することを目的とし，骨芽細胞分化促進作用を有する化合物を簡便かつ高い信頼度で検出するためのスクリーニングシステムの構築，ならびに骨芽細胞分化促進作用および骨形成促進作用を有する化合物の探索を試みた。

材料と方法

1. 培養細胞

1）I 型コラーゲンレポーター骨芽細胞

東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センターの鄭雄一教授より，ラットI型コラーゲンプロモーターの配列断片(2.3 kb)によって制御されるgreen fluorescent protein（GFP）レポーター遺伝子を導入した MC3T3-E1 骨芽細胞株（Col1a1GFP-MC3T3E1）[30] の供与を受けた。この細胞株の培養維持には，増殖培地〔10% FBS（equitech-bio，Kerrville，TX，USA，Lot #.SFBM30-2215），100 U/ml 100 units/ml ペニシリン，100 μg/ml ストレプトマイシン，250 ng/ml アンホテリシン B（Invitrogen，Carlsbad，USA，Cat.# 15240）含有 Minimum Essential Medium Eagle，Alpha Modification（α-MEM）培地：ナカライテスク，京都，Cat.# 21444-05）培地〕を用い，培地交換を 2 日に 1 度，継代培養を 3 日に 1 度行い，37℃，5% CO_2 気層下で培養した。

骨芽細胞への分化誘導では，細胞を 96 well プレートに播種（5×10^4 cells/cm^2）した翌日に，骨芽細胞分化誘導を目的に誘導培地〔10% FBS（equitech-bio，Lot #.SFBM30-2215），0.1 μM デキサメタゾン（Sigma，St. Louis，Mo，USA，Cat.# D2915），10 mM β-グリセロリン酸（Sigma，Cat.# G9422）および 50 μg/ml

アスコルビン酸-2-リン酸（Sigma，Cat.# A8920），100 units/ml ペニシリン，100 μg/ml ストレプトマイシン，250 ng/ml アンホテリシン B 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose（DMEM: Sigma，Cat.# D6429）〕に交換し，2～3 日ごとに培地交換を行った。

2）マウス骨芽細胞株（MC3T3-E1）

MC3T3-E1 は RIKEN BRC CELL BANK 社（茨城, Cat.# RCB1126）より購入し，培養維持には増殖培地〔10% FBS（Invitrogen, Lot #.586690），100 U/ml 100 units/ml ペニシリン，100 μg/ml ストレプトマイシン，250 ng/ml アンホテリシン B 含有 α-MEM 培地〕を用い，培地交換を 3 日に 1 度，継代培養を週 1 回行い，37℃，5% CO_2 気層下で培養した。

骨芽細胞に分化誘導するため，細胞を 12 well 細胞培養プレート（Iwaki, 千葉, Cat.# 3815-012）に播種し（2×10^4 cells/cm^2），約 80%のコンフルエント状態に達した時点で，骨芽細胞分化誘導培地〔10% FBS（Invitrogen，Lot #.586690），0.1 μM デキサメタゾン，10 mM β-グリセロリン酸，50 μg/ml アスコルビン酸-2-リン酸，100 units/ml ペニシリン，100 μg/ml ストレプトマイシン，250 ng/ml アンホテリシン B 含有 α-MEM 培地〕に交換し，2～3 日ごとに培地交換を行った[32, 33]。

3) マウスおよびラット骨髄由来間葉系幹細胞（Mouse/Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell：mBMSC/rBMSC）

マウスおよびラット BMSC の分離培養実験は，大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会より承認された研究計画（承認番号 19-054-1）に基づいて行った。

3-1） mBMSC

雄性 10 週齢 C57BL/6 マウス（日本動物，大阪）の大腿骨から骨髄を採取し，15% FBS 含有α-MEM 培地中にて mBMSC を分離培養した [33]。さらに，30 回以上の継代培養を約 6 か月間にわたり行うことで細胞の自然不死化を誘導した。不死化された mBMSC から，シリンダー法および限界希釈法 [33] を用いて樹立した mBMSC クローン株のうち，骨芽細胞，軟骨細胞，脂肪細胞，骨格筋細胞への分化能を有する細胞株（mBMSC-4）[34] を実験に用いた。

mBMSC の培養維持には増殖培地〔15% FBS（Invitrogen，Lot #586690），100 U/ml 100 units/ml ペニシリン，100 μg/ml ストレプトマイシン，250 ng/ml アンホテリシン B 含有α-MEM 培地〕を用い，培地交換を 3 日に 1 度，継代培養を週 1 回行った。骨芽細胞に分化誘導するため，細胞を 12 well 細胞培養プレートに播種し（9.8×10^5 cells/cm^2），約 80％のコンフルエント状態に達した時点で，骨芽細胞分化誘導培地に交換し，2～3 日ごとに培地交換を行った [32]。

3-2） rBMSC

雄性 8 週齢 Spague-Dawley 系ラット（日本動物）の大腿骨より骨髄を採取し，Hamada らの方法[35]に従い rBMSC を分離，培養した。骨芽細胞への分化誘導では，継代培養 4 回目の rBMSC を用いて 12 well 培養プレートへ播種（9.8×10^5 cells/cm^2）し，80%のコンフルエントに達した時点で骨芽細胞分化誘導培地に交換し，2～3 日ごとに培地交換を行った。

4）マウス iPS 細胞

マウス iPS 細胞の骨芽細胞への分化誘導実験には，Egusa らの報告[3]で樹立したマウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞株（mGF-iPS-3F-3）を用いた。6 well 細胞培養プレート（0.1% ゼラチンコート処理）に用意した MitomycinC 処理した SNLP76.7-4 フィーダー細胞上にマウス iPS 細胞（18～20 回継代培養）を播種し，ES 培地〔15% FBS（Invitrogen，Lot #.10437），2 mM L-Glutamine（Invitrogen, Cat.# 25030-081），1×10^{-4} M nonessential amino acids（Invitrogen, Cat.# 11140-050），1×10^{-4} M 2-mercaptoethanol（Invitrogen, Cat.# 21985-023），50 U penicillin，50 μg/ml streptomycin（Invitrogen）含有 DMEM 培地（sodium pyruvate 非含有：ナカライテスク，京都，Cat.# 08459-35）〕を用いて培養した。マウス iPS 細胞が 80% のコンフルエントに達した時点で細胞を 0.25% トリプシン処理によって回収した。この細胞懸濁液を，低接着性 10 cm 培養皿（Sterilin，Caerphilly，UK，Cat.#

101VR20）に移し，ES 培地を用いた浮遊培養により iPS 細胞の胚様体の形成を誘導した[36]。浮遊培養を 2 日間行った後に，300 rpm，2 分間の遠心操作を行って iPS 細胞胚様体を回収し，1 μM レチノイン酸（all-trans retinoic acid：Sigma, Cat.# R2625）含有 ES 培地を用いてあらたな低接着性培養皿上に播種した[37]。さらに 2 日間の浮遊培養後，同様の遠心操作にて回収した。

回収した 4×10^6 個の iPS 細胞胚様体を凝集体のまま 1 μM レチノイン酸含有の ES 培地に懸濁し，6 well 細胞培養プレート（0.1% ゼラチンコート処理）上に播種した。翌日に培地を骨芽細胞分化誘導培地に交換し，2～3 日ごとに培地交換を行った。

2. 骨芽細胞分化の誘導促進に用いた生理活性因子

各種細胞の骨芽細胞分化誘導促進実験には，ヒト組換え BMP-2（rhBMP-2）（Peprotech, London, UK Cat.# 120-02），Harmine（Biomol，Plymouth Meeting, PA，USA，Cat.# AC-1053），Phenamil（Sigma，Cat.# P203），Resveratrol（Sigma, Cat.# S6196），Leflunomide，（Sigma，Cat.# L5025），LFM-A13（Calbiochem, Nottingham, UK，Cat.# 435300）および 1-(5-isoquinolinylsulfonil)-3-metylpiperazine dihydrochloride（1-5：Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, Cat.# 213278）を用いた。

3. GFP 蛍光値および alkaline phosphatase（ALP）検出による I 型コラーゲンレポーター骨芽細胞の分化評価

増殖培地を用いて Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞を 96 well 蛍光測定用黒色細胞培養プレート（Thermo，Waltham，MA，USA，Cat.# 4940）に 5×10^4cells/cm^2 で播種し，翌日に小分子化合物（Phenamil，Resveratrol，Harmine：1～10 μM）あるいは rhBMP-2（100 ng/ml）を添加した骨芽細胞分化誘導培地に交換して培養し，2～3 日ごとに培地交換を行った（**図 1A**）。

分化誘導 7 日目に蛍光マイクロプレートリーダー（GloMax®-Multi Detection System: Promega，Madison，WI，USA）にて GFP 蛍光値を測定した（**図 1B**）。また，実際の細胞の GFP 発現を，蛍光顕微鏡（TE2000，Nikon，東京）を用いて観察した。

その後さらに 7 日間の分化誘導を行い，分化誘導 14 日目の細胞の ALP 活性を染色により確認した（**図 1C**）。ALP 染色では，10% 中性緩衝ホルマリン溶液（Wako，Cat.# 062-01661）で固定した細胞に，1.8 mM Fast red TR salt（Sigma），0.9 mM Naphthol AS-MX phosphate（Sigma）を添加した 120 mM tris (hydroxymethyl) aminomethane 緩衝液（pH8.4：Wako）溶液を加えて，37℃で 30 分間反応させた[33]。

4. I 型コラーゲンレポーター骨芽細胞を用いた LOPAC^{1280} ライブラリーのスクリーニング

Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞の GFP 蛍光値および ALP 活性を指標とした骨芽細胞分化評価システムを用いて，1,280 種類の小分子化合物を含むライブラリーである LOPAC^{1280}（Sigma，Cat.# LO1280）のスクリーニングを行った。スクリーニングにあたり，ライブラリーに含まれる各小分子化合物を骨芽細胞分化誘導培地中で最終濃度が 10 μM となるように添加した。実験は 3 回行い，GFP 蛍光は各試薬につき三つの GFP 蛍光測定値の平均を求めて評価した。ALP 活性は染色した 3 回の実験分の 96 well プレートを各試薬のウェルが重なるように合わせ，各ウェルにおける染色（赤色）強度を肉眼的に評価した。

5. 細胞増殖・細胞生存試験

ライブラリースクリーニングによって得られた候補化合物の細胞増殖および細胞死に及ぼす影響を確認するため，WST-1 細胞増殖および細胞生存試験を行った。

MC3T3-E1 細胞を 96 well 細胞培養プレートの各ウェルに 1×10^3 cells/cm^2 で播種し，各化合物〔Leflunomide（Sigma，Cat.# L5025），LFM-A13（Sigma，Cat.#

L8789），1-5（Sigma，Cat.# I6391）〕を 1～50 μM の最終濃度となるよう増殖培地に添加して 6 日間培養した。培養 2，4 および 6 日目に WST-1 細胞増殖試験キット（Cell Counting Kit-8：同仁化学研究所，熊本，Cat.# 341-07621）を用いて細胞増殖試験を行った[32]。各試料における吸光度の測定（検査波長 450 nm，対照波長 630 nm）にはマイクロプレートリーダー（Model 680：Bio-Rad，東京）を用い，得られた値から細胞数を換算した。

また，同条件で MC3T3-E1 細胞を 5 日間培養し，Cyto Tox-Glo™ Cytotoxicity Assay キット（Promega，Cat.# G9290）を用いて死細胞由来プロテアーゼ活性に起因するルシフェラーゼ発光を測定した[38,39]。細胞培養容器には 96 well 発光測定用白色細胞培養プレート（Thermo，Cat.# 4938）を，測定には発光プレートリーダー（GloMax®-Multi Detection System：Promega）を用いた。各ウェル中の死細胞数を計測した後にキットに添付の細胞溶解剤を加えて全細胞数を計測し，細胞死率（死細胞数/全細胞数）を算出した。

6. 骨芽細胞分化の評価

1）Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction（RT-PCR）解析

培養した細胞を，リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄後，セルスクレーパー（Iwaki，Cat.# 9000-220）を用いて回収し，各細胞試料から TRIZOL（Invitrogen,

Cat.# 15596-020）および RNeasy Mini Kit（QIAGEN, Hilden, Germany, Cat.#74106）を用いてトータル RNA を抽出した。抽出したトータル RNA 1 μg から Oligo dt プライマー（Promega, Medison, USA, Cat.# C1101）および逆転写酵素（Super ScriptⅢ；Invitrogen, Cat.# 18080-085）を用いて逆転写反応を行い，cDNA を合成した。

次に，各細胞の cDNA を鋳型として表 **1** に示すプライマーのペアを使用して PCR 反応を行った。PCR 反応はサーマルサイクラー（Program Temp Control System : ASTEC, 福岡）を用いて，95℃で 5 分間の熱処理後，PCR サイクルを，熱変性 95℃で 60 秒間，アニーリング反応を表 **1** に示した温度条件で 60 秒間，伸長反応を 72℃で 60 秒間行った。得られた PCR 産物を 1.5% アガロースゲル（Wako, Cat.# 312-01193）にて泳動し，エチジウムブロマイド（Invitrogen, Cat.# 15585-011）染色の後，CCD カメラ仕様ゲル撮影装置 Dolphin-View Image System（Wealtec, Sparks, NV, USA）を用いて撮影を行った。

2）リアルタイム RT-PCR 解析

リアルタイム RT-PCR 解析には，THUNDERBIRD® SYBR® qPCRMix（Toyobo, 大阪，Cat.# TMMFS-001）および表 **2** に示すプライマーのペアおよびリアルタイム PCR 装置（ABI PRISM 7900 Sequence Detection System：Applied Biosystems,

Foster City，CA，USA）を用いた。遺伝子発現における内在性コントロールには glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）を用いた。検出した遺伝子発現の結果を ABI PRISM 7900 ソフトウェア（Applied Biosystems）を用いて解析し，試料間の遺伝子発現量を GAPDH の発現量で補正したうえで目的遺伝子の相対発現量を$\Delta\Delta$Ct 法[40]で算出した。

3）カルシウム濃度測定

マウス iPS 細胞を 12 well 細胞培養プレートに 7×10^4 cells/cm^2 で播種して 14～21 日間分化誘導した後，PBS で 2 回洗浄し，3 ml の 0.5 M 酢酸（Sigma，Cat.# 01-0270-5）に室温下で一晩浸漬した。その後，セルスクレーパーを用いて細胞を回収し，2,300 g で 10 分間の遠心操作後の上清溶液中のカルシウム濃度を，MXB 法（カルシウム E-テストワコー，Wako，Cat.# 437-58201）に従い吸光度（検査波長 595 nm）を測定した[41]。また，遠心後の沈殿した細胞試料に含まれる DNA 量を，Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA reagent（Invitrogen，Cat.#P7581）を用いて蛍光マイクロプレートリーダーで測定し，DNA 量あたりのカルシウム濃度を算出した[42]。

4）ALP 活性の測定（酵素免疫測定法）

MC3T3-E1 細胞を 96 well 培養プレートの各ウェルに 4×10^4 cells/cm^2 で播種し，各小分子化合物（1～25 μM）を添加した骨芽細胞分化誘導培地で 14 日間培養した。各細胞試料を 0.9% NaCl 溶液（Wako, 198-01675）で洗浄後，1% IGEPAL® CA-630（Sigma, Cat# I8896）を加えて溶解した。この細胞溶解液に 1 mg/mL p-Nitrophenyl phosphate 含有 0.2 M Tris バッファー溶液（Sigmafast™ Tablets：Sigma, cat.# N1891）を加え，遮光状態にて 15 分間反応させた後，マイクロプレートリーダーを用いて各 well の吸光度（検査波長 405 nm）を測定した[43, 44]。

5）von Kossa 染色

培養した細胞試料を PBS にて洗浄し，10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した後に 5% $AgNO_3$（Sigma, Cat.# S6506）溶液を添加し，20 分間紫外線照射を行った。その後，蒸留水にて 2 回洗浄し，5% $Na_2S_2O_3$（Wako, Cat.# 197-03605）溶液を加えて 5 分間反応させた[33]。試料の培養プレートをスキャナー（GT-9800F, EPSON, 東京）にてスキャンした後，石灰化によって黒く染色された細胞の面積を Photoshop CS（Adobe Systems, San Jose, CA, USA）および画像解析ソフト Image J 1.33u（NIH, USA）を用いて計測した。

7. 頭蓋骨欠損ラット実験モデルを用いた骨組織再生の評価

1）頭蓋骨欠損ラット実験モデル

頭蓋骨欠損ラット実験モデルを用いた実験は，大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会より承認された研究計画（承認番号 24-018-0）に基づいて行った。

雄性 Spague-Dawley 系ラット（8 週齢；日本動物）に 5% ネンブタール注射液（大日本住友製薬株式会社，大阪，日本）を体重 100 g に対して 0.1 ml 腹腔内注射し，全身麻酔を施した後，2% キシロカイン（デンツプライ三金株式会社，東京，Cat.#87271）を用いて頭蓋部の局所麻酔を行い，頭皮を剥離して骨膜弁を形成し，頭蓋骨矢状縫合の左右に直径 5 mm の欠損を形成した[45]（図 **2A**）。頭蓋骨欠損の形成には，動物手術用エンジンおよびトレフィンバー（インプラテックス，東京，Cat.#04949202）を用い，注水下にて行った。生検トレパン（カイインダストリーズ株式会社，岐阜，Cat.# BP-50F）を用いて直径 5 mm に切り出したコラーゲンスポンジ（テルダーミス；テルモ，東京，Cat.# TD-A006N）に 0.5 または 5 μg の Leflunomide 溶液（0.013 μM Dimethyl sulfoxide：DMSO に溶解）を含浸させ，これを頭蓋骨欠損部に埋入し，骨膜で被覆し頭皮を縫合した。埋入後，Leflunomide の投与量の合計が 3 または 30 μg になるように，3 週間にわたり 3，4 日毎に 5 回に分けて Leflunomide 溶液を局所注射した（図 **2B**）。対照群には，同様の術式を用いて 0.013 μM DMSO を含浸させたコラーゲンスポンジの埋入および 0.013 μM DMSO の局所注射を行った。

2）組織染色および組織形態学的分析

術後3週にてジエチルエーテルで吸入麻酔を施した後，頸椎脱臼にて屠殺し，頭蓋骨を摘出した（図 **2C**）。摘出した頭蓋骨を，実験動物用三次元マイクロ X 線 CT 装置（リガク社，R_mCT2，東京）にて撮影後，骨構造解析ソフト（TRI/3D-BON：ラトックシステムエンジニアリング株式会社，東京）を用いて骨塩量，骨体積，骨密度を測定した。

マイクロ CT 撮影後，試料を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定し，0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid（EDTA）で 3 日間浸漬脱灰した後，組織包埋用パラフィンで包埋した。この試料から 3 μm 薄切の切片を作製し，マイヤー・ヘマトキシリン溶液を用いてヘマトキシリン－エオジン（HE）染色を行った。染色された切片を，生物顕微鏡（BX51；Olympus，東京）下で観察し，顕微鏡デジタルカメラ（DP71；Olympus）で撮影した。撮影した画像から，形成した骨欠損部に相当する面積中（5 mm × 1 mm）に存在する新生骨の面積を Photoshop CS および画像解析ソフト Image J 1.33u を用いて計測した。

また，薄切切片試料中の破骨細胞を識別するために Tartrate Resistant Acid Phosphatase（TRAP）染色を施した。切片を脱パラフィン，水洗後，TRAP 反応液（0.1 M 酢酸緩衝液 pH 5.0，5% 塩酸パラローズアニリン，20% 塩酸，4% 亜

硝酸ナトリウム，1% ナフトール AS-B1-リン酸塩・N`N－ジメチルホルムアミド溶液）を用いて 40 分間反応後，マイヤー・ヘマトキシリン溶液を 5 秒間反応させて核の染色を行った。この切片試料を生物顕微鏡下でデジタルカメラにて撮影し，画像中の TRAP 陽性細胞数を数えた。

8. 統計分析

実験結果は平均値±標準偏差で表し，各試料群における有意差検定を，一元配置の分散分析（ANOVA）後に Dunnett 法を用いて行った。分析ソフトには Graph Pad InStat（Graph pad Software inc，San Diego，USA）用い，有意水準は $\alpha=0.05$ に設定した。

結　　果

1. 既知の骨芽細胞分化促進因子を用いたスクリーニングシステムの評価

1）ALP 活性

スクリーニングシステムにおける 14 日目の Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞の ALP 活性を，ALP 染色を用いて評価した（図 **3A**）。非誘導の Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞では，ALP 活性を認めなかったが（図 **3B**），骨芽細胞分化誘導培地で培養した細胞はわずかな ALP 活性を示した（図 **3C**）。また，この ALP 活性は，Harmine, Phenamil，Resveratrol の添加により増強し（図 **3A**，**D**），rhBMP-2 の添加により強い ALP 活性を示した（図 **3E**）。

2）Ⅰ型コラーゲンの発現（GFP 蛍光値）

スクリーニングシステムにおける 7 日目の Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞の GFP 蛍光を観察した結果，非誘導の細胞（図 **4A**）と比較して，分化誘導を行った細胞（図 **4B**）は強い GFP の緑色蛍光を示した。また，細胞の緑色蛍光は，Phenamil あるいは rhBMP-2 を添加することでさらに増強された（図 **4C**，**D**）。

蛍光量測定の結果（図 **4E**），骨芽細胞分化誘導培地で分化誘導した細胞の GFP 蛍光値は，非誘導の細胞と比較して有意に上昇した（$P<0.01$）。また，骨芽細胞分化誘導培地中に 1 あるいは 10 μM の Harmine，Phenamil，Resveratrol あるいは

100 ng/ml の rhBMP-2 を添加した細胞の蛍光値は，非添加の場合と比較して 1.22 倍以上有意に高い蛍光値を示した（$P<0.01$）。

2. LOPACK^{1280} ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング

1）ALP 活性の評価

LOPAC^{1280} を用いたハイスループットスクリーニングの結果，ライブラリーに含まれる 1,280 種類の化合物の中で，11 種類の化合物が Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞の ALP 活性を促進した（**表 3**）。そのうち，6 種類の化合物が肉眼所見にて強い ALP 活性を，残りの 5 種類の化合物が弱い ALP 活性化作用を示した（**図 5A**）。

これら 11 種類の小分子化合物を MC3T3-E1 細胞に添加し，培養 14 日目の細胞の ALP 活性を，酵素免疫測定法を用いて定量的に評価した。その結果，これらすべての化合物は非添加の場合と比較して高い ALP 活性化促進作用を示し，スクリーニングで特に強い ALP 活性作用を示した 6 種類の化合物の中の 5 種類が，統計学的に有意な促進作用を示した（$P<0.05$）（**図 5B**）。

2）GFP 蛍光値の評価

GFP 蛍光値を指標としたスクリーニングの結果，ライブラリーに含まれる 1,280 種類の化合物の中で，1,030 種類の化合物がレポーター骨芽細胞の GFP 蛍

光値を増強した（図 **6A**）。また，スクリーニングで ALP 活性の促進作用を示した 11 種類の化合物の GFP 蛍光値を比較検討した結果（図 **6B**），これらすべての化合物が GFP 蛍光値の増強作用を示し，中でも 3 種類の化合物（Leflunomide, LFM-A13，1-5）が非添加の場合と比較して 1.16 倍以上の有意に高い GFP 蛍光値を示した（$P<0.01$）。また，LOPAC[1280] ライブラリーに含まれる化合物のなかで，レポーター骨芽細胞の GFP 蛍光値を非添加の場合と比較して 1.16 倍以上増強したものは 152 種類であった。

以上の結果から，本研究のスクリーニングシステムにおいて，ALP 活性および GFP 蛍光値の両方を有意に促進した 3 種類の化合物，Leflunomide, LFM-A13, 1-5 を，骨芽細胞分化を促進する候補化合物とした（図 **7**）。

3. 候補化合物が骨芽細胞の増殖および細胞死に及ぼす影響

WST-1 細胞増殖試験の結果，スクリーニングで得た候補化合物 Leflunomide, LFM-A13 および 1-5 は，25 μM 以上の高濃度では MC3T3-E1 細胞の増殖を抑制したが，10 μM 以下の濃度では細胞の増殖に有意な影響を及ぼさなかった（図 **8A**）。

細胞生存試験の結果，1～50 μM の Leflunomide，LFM-A13 あるいは 1-5 の存在下で 5 日間培養した MC3T3-E1 細胞は，化合物を添加していない場合と同様

の生存率を示したことから（図 **8B**），これらの候補化合物は，50 μM 以下の濃度では細胞死に有意な影響を及ぼさないことが示された。

4. 候補化合物が骨芽細胞分化に及ぼす影響

1）MC3T3-E1 骨芽細胞の分化に及ぼす影響

リアルタイム RT-PCR 解析の結果，Leflunomide，LFM-A13，1-5 は，分化誘導 10 日目の MC3T3-E1 骨芽細胞における骨芽細胞分化マーカー遺伝子（*Osterix*, *Type I collagen*，*Runx2*，*Osteocalcin*）の発現を促進した（図 **9A**）。特に，25 μM の Leflnomide，10 μM の LFM-A13，10-25 μM の 1-5 は，*Osterix*，*Type I collagen* あるいは *Osteocalcin* 遺伝子の発現を有意に促進した（$P<0.05$）。

また，Leflunomide，LFM-A13，1-5 が，MC3T3-E1 骨芽細胞における ALP 活性に及ぼす影響を酵素免疫測定法で検討した結果，これらすべての化合物は，分化誘導 14 日目の MC3T3-E1 細胞の ALP 活性を，濃度依存的に有意に促進した（$P<0.05$）（図 **9B**）。

2）mBMSC/rBMSC の骨芽細胞分化に及ぼす影響

RT-PCR 解析の結果，1 μM の Leflunomide，LFM-A13，1-5 は，骨芽細胞分化誘導 10 日目の mBMSC における骨芽細胞分化マーカー遺伝子（*Runx2*，*Type I*

collagen, *ALP*, *Osteopontin*, *Osteocalcin*）の発現を促進した（図 **10A**）。ALP/von Kossa 二重染色の結果，10 μM の Leflunomide，LFM-A13，1-5 は，分化誘導 14 日目の mBMSC における ALP 活性を著明に促進し（図 **10B**），21 日目の細胞外基質に著明な石灰化を誘導した。

また，rBMSC の骨芽細胞分化誘導系においても，10 μM の Leflunomid は分化誘導 14 日目に細胞の ALP 活性を促進し（図 **10C**），21 日目における細胞外基質の石灰化を著明に促進した（図 **10D**）。

3）iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

リアルタイム RT-PCR 解析の結果，Leflunomide，LFM-A13，1-5 は，骨芽細胞分化誘導 14 日目のマウス iPS 細胞における骨芽細胞分化マーカー遺伝子（*Osterix*, *Type I collagen*, *Runx2*, *Osteocalcin*）の発現を促進した（図 **11A**）。特に，25 μM の Leflnomide は *Type I collagen* を，10 μM の LFM-A13 は *Osterix* を，25 μM の 1-5 はこれらすべてのマーカー遺伝子の発現を有意に促進した（$P<0.05$）。

また，25 μM の Leflunomide，LFM-A13，1-5 存在下で 21 日間骨芽細胞に分化誘導したマウス iPS 細胞は，非添加の場合と比較して強い von Kossa 染色像を示した（図 **11B**）。von Kossa 染色陽性面積を解析した結果，Leflunomide, LFM-A13, 1-5 は，マウス iPS 細胞の細胞外基質の石灰化を有意に促進した（$P<0.05$）（図

11C）。さらに，25 μM の Leflunomide，LFM-A13 あるいは 1-5 の添加により，骨芽細胞分化誘導 21 日目におけるマウス iPS 細胞のカルシウム産生量は有意に増加した（$P<0.01$）（図 **11D**）。

5. Leflinomide がラット頭蓋骨欠損部の骨再生に及ぼす影響

1）組織切片標本を用いた評価

頭蓋骨欠損ラット実験モデルにおいて，術後 3 週目に摘出した頭蓋骨の組織切片を HE 染色で観察した。Leflunomide 投与群および非投与群ともに頭蓋骨欠損部位に新生骨の形成を認めたが，Leflunomide を投与した場合には，非投与の場合と比較して，成熟した皮質骨を示すセメントラインの存在が著明となり，より成熟した骨組織の再生が示唆された（図 **12A**）。また，組織切片標本の HE 染色像を用いて解析（図 **12B**）した新生骨の面積は，3 あるいは 30 μg の Leflunomide を投与することで，非投与の場合よりも有意に増加した（$P<0.001$）（図 **12C**）。

同じ頭蓋骨試料より作製した組織切片の TRAP 染色像（図 **13A, B**）を用いて，新生骨部位における TRAP 陽性細胞の数を計測した結果，破骨細胞数は 3 あるいは 30 μg の Leflunomide 投与群と非投与群で有意な差を認めなかった（図 **13C**）。

3）マイクロ CT 解析を用いた評価

摘出した頭蓋骨のマイクロ CT 撮影像（図 **14A**）を用いた骨構造解析の結果，頭蓋骨欠損部における新生骨の成熟度を表す CT 値は，3 あるいは 30 μg の Leflunomide 投与群において著明に上昇した（図 **14B**）。また，Leflunomide 投与群における頭蓋骨欠損部の骨塩量，骨体積および骨密度は，非投与群と比較して濃度依存的に増加し，投与量 30 μg で有意な骨形成促進作用を示した（$P<0.05$）（図 **14C-E**）。

考察

近年，有機化学的な手法を推進力として広範な小分子化合物ライブラリーと革新的スクリーニングシステムを活用することで，分子レベルで生命現象を解明しようとするケミカルバイオロジーという概念が提唱された。この概念は，生体物質の相互作用とその制御機能を解明する手がかりになると同時に，創薬のための新たな手法をもたらしている。これまでに，培養細胞を用いた様々な化合物ライブラリーのスクリーニングシステムが報告されており[26]，スクリーニングに用いる指標（細胞応答）には，細胞増殖[46]，細胞毒性[47]，細胞死[48]，細胞分化[49]等がある。

これまでの骨芽細胞を用いたライブラリースクリーニングシステムの多くは，間葉系幹細胞あるいは骨芽細胞前駆細胞のALP活性を指標に用いている[31, 50-52]。ALP は骨芽細胞分化の初期マーカー分子であり[53, 54]，染色等により容易に検出が可能である。しかしながら，ALP 染色には細胞の固定が必要であり，同じ培養細胞を用いて，他の骨芽細胞分化マーカーの発現を評価することは困難である。したがって，分化作用とは直接関係のない細胞増殖能を二次スクリーニングの指標に用いている報告が多く見受けられる[31, 50, 52]。

骨芽細胞の分化に影響を及ぼす化合物をより確実に検出するためには，単一の分化マーカーを指標としたスクリーニングではなく，複数の分化マーカーを指標としたスクリーニングシステムを構築することが有用である[55]。また，ハイスループットなスクリーニングを行うためには，指標となる細胞応答を検出する方法をできるだけ簡略化し，検出されるデータは定量的であることが重要である。そこで，本研究では骨芽細胞の分化マーカーである Collagen type 1 alpha 1 [56]遺伝子のプロモーターによって制御される GFP レポーター遺伝子を導入した骨芽細胞を用いて，GFP 蛍光値をマイクロプレートリーダーで簡便かつ定量的に検出した後に ALP 染色を行う方法を着想した。

本研究でスクリーニングシステムを構築するにあたり，最初の課題はレポーター細胞の発する微弱な GFP 蛍光値を蛍光マイクロプレートリーダーで検出可能な条件を検討することであった。条件検討の結果，rhBMP-2 および既知の骨芽細胞分化促進化合物によって増強される細胞の GFP 蛍光を，分化誘導 7 日目に非添加の場合と有意な差をもって検出可能であることが確認された。しかしながら，I 型コラーゲン遺伝子の発現亢進に伴う GFP 蛍光の増強は，必ずしも骨芽細胞分化の亢進を反映しているとは限らない。たとえば，プロテアソーム阻害剤は GFP の分解を阻害するため，レポーター細胞の I 型コラーゲン遺伝子の発現亢進とは関係なく GFP 蛍光値を上昇させてしまう可能性が報告されている

[57]。また，骨芽細胞分化においてI型コラーゲンの発現は必要条件であるが十分条件ではない。実際に，本研究で LOPAC[1280] を用いたスクリーニングを行った際，最も高い GFP 蛍光値を示した化合物〔AC-93253（レチノイン酸受容体アゴニスト [58]，the class III histone deacetylases, Sirtuin-2 (SIRT2)阻害剤 [59]）：非添加の細胞と比較して 18.8 倍の蛍光値）は，骨芽細胞の ALP 活性亢進作用を示さなかった。本研究で構築したスクリーニングシステムは，GFP 蛍光値の測定が終了したレポーター細胞に対して簡便な ALP 染色を行うことで，より確実な骨芽細胞分化を捉えることが可能である。また，このシステムは，ALP 活性と GFP 蛍光値の二つの分化指標のスクリーニングを，同一の培養系で同時に行うことが可能である（一次，二次スクリーニングに分けて行う必要がない）という利点を有している。

ただし，本研究で構築したスクリーニングシステムにおいて検出された GFP 蛍光値は決して高いとは言えず，骨形成因子として強力な骨芽細胞分化誘導作用を有する BMP-2（100 ng/ml）であっても，非添加の細胞と比較して 1.46 倍であった。本研究に用いたレポーター細胞は，既に骨芽細胞への分化系が決定されている MC3T3-E1 細胞株を用いて作製されており，分化を誘導していない培養環境においても，すでにある程度のI型コラーゲンを発現している。したがって，分化を誘導した場合にもI型コラーゲン発現における変化が小さかったため，

これに伴う GFP 蛍光値の増加も少なかった可能性が考えられる。今後，MC3T3-E1 細胞よりも未分化な細胞をレポーター細胞源に用いたり，あるいは蛍光マイクロプレートリーダーの検出力を向上したりすることで，この課題が改善されていくことが期待される。

本研究で用いた LOPAC[1280] 小分子化合物ライブラリーは，薬理活性を有することが既知である化合物を集めているため，創薬や分子機構解明の手がかりになり得るツールとして注目されつつある。Alves ら [31] は，ヒト間葉系幹細胞の ALP 活性および細胞増殖を指標とした LOPAC[1280] ライブラリー（化合物濃度 4.5 μM）のスクリーニングを行い，骨芽細胞分化促進作用を有する化合物として 5 種類の化合物（H-8，GW 5074，propentofylline，pinacidil，SQ 22536）を検出している。興味深いことに，同じ化合物ライブラリーを用いたにもかかわらず，これら化合物は本研究のスクリーニングで得た骨芽細胞分化促進化合物（Leflunomide，LFM-A13，1-5）とは異なっている。これは，スクリーニングに用いる細胞，検出する指標とその検出時期，あるいは化合物の濃度等が，スクリーニングの結果を大きく左右する可能性を示唆している。したがって，化合物の新規作用の発見には，スクリーニング目的に合った細胞を選び，スクリーニング指標の検出を最適化する条件を探るとともに，異なるスクリーニングシ

ステムを用いて同じ化合物ライブラリーを探索することも有用であると思われる。

本研究のライブラリースクリーニングの結果，骨芽細胞分化促進作用を有する化合物として，1-5，Leflunomide，LFM-A13 が検出された。1-5 は，プロテインキナーゼ C（PKC）の阻害剤として知られている[60]。PKC は 10 種類以上のアイソフォームから構成されるタンパク質ファミリーであり[61]，細胞の分化や増殖を調節する[62-65]。PKC ファミリーは骨芽細胞の分化促進作用を有することが報告されており[66]，PKCα は p44/42MAPK のシグナル伝達経路を介して，骨芽細胞の分化促進作用を示す[67]。

一方，Leflunomide および LFM-A13 が骨芽細胞の分化に及ぼす影響を検討した報告はなく，現時点ではこれら化合物がどのような機序で幹細胞および骨芽細胞の分化誘導を促進しているのかは不明である。Leflunomide はマロノニトリル誘導体であり[68]，dihydroorotate dehydrogenase およびチロシンキナーゼを阻害することにより新規 primidin 合成を抑制する作用をもつ[69]。Leflunomide は，この作用により細胞性免疫を司る T リンパ球の産制を抑制し，免疫抑制作用を示すため，抗リウマチ薬（商品名：アラバ）として臨床応用されている[70]。経口投与された Leflunomide は，血中で A771726 化合物に代謝されてその薬理活性を示す[71, 72]。A771726 は生体内でアラキドン酸カスケードにおける cyclo-oxygenase-2

抑制作用による消炎作用を示す[73]。また，A771726 は関節炎患者の滑膜由来細胞の炎症性サイトカイン（prostaglandin E(2)，matrix metalloproteinase 1 および interleukin 6）産生を抑制する[74]。さらに近年，Leflunomide は破骨細胞において，Recepter activator of NF-κB ligand（RANKL）誘導性のカルシウム経路の阻害を介して nuclear factor of activated T cells c1（NFATc1）発現を抑制することから，細胞分化を強く抑制することが報告されている[75]。骨芽細胞分化促進機序を考察する上で，Leflunomide は JAK/STAT 経路との関連が示唆されており[76]，JAK/STAT 経路を介した骨芽細胞分化促進機構が報告されていることから[77]，Leflunomide は JAK/STAT 経路を介して骨芽細胞分化を促進している可能性が推察される。

LFM-A13 は Leflunomide のアナログ化合物であり[78]，ブルトン型チロシンキナーゼ（BTK）の選択的阻害剤として知られている[79, 80]。BTK は，ヒト B 細胞における Wnt シグナル伝達経路を阻害する[81]。一方，Wnt シグナルは骨芽細胞分化の促進に重要な役割を果たすことから[82-84]，LFM-A13 の骨芽細胞分化促進作用には Wnt シグナルが関与している可能性が推察される。

Malviya ら[85]は，患者の大腿骨頭から分離培養した骨芽細胞を用いて細胞増殖試験を行い，Leflunomide（15 μM）が骨芽細胞の増殖を抑制することを報告している。本研究において，Leflunomide，LFM-A13 および 1-5 は，25 μM 以上の濃度でマウス骨芽細胞株の増殖抑制作用を示した。また，これらの化合物は 50 μM

以下の濃度では細胞毒性を示さなかった。さらに，10～25 μM の Leflunomide, LFM-A13 および 1-5 は，MC3T3-E1 骨芽細胞，mBMSC，iPS 細胞の骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現，ALP 活性あるいは細胞外基質の石灰化を有意に促進したことから，骨芽細胞だけでなく幹細胞に対しても骨芽細胞分化促進作用を有することが明らかとなった。

生体内における骨組織の形成・再生には，骨芽細胞だけでなく破骨細胞や免疫細胞等が重要な役割を担っているため，試験管内で骨芽細胞の分化を促進する化合物が必ずしも生体内で骨形成・再生促進作用を示すとは限らない。本研究では，候補化合物の骨再生促進作用の検討に頭蓋骨欠損ラット実験モデルを用いた。また，ラット由来 BMSC を用いた実験で Leflunomide は LFM-A13 および 1-5 と比較して強い骨芽細胞分化促進作用を示したため（data not shown），Leflunomide に着目して動物実験を進めた。

組織切片標本の HE 染色像を観察した結果，Leflunomide を作用させた群における新生骨の面積は非投与群と比較して増加し，投与群では破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨添加により形成されるセメントライン [86] の存在が著明であった。また，マイクロ CT 解析を用いて定量的に再生骨を評価した結果，Lefulunomide を頭蓋骨欠損部に 3 μg あるいは，30 μg 投与すると，新生骨の骨量，

骨密度および骨組織の体積は有意に増加しており，Leflunomide の投与はより成熟した骨組織の再生を促すことが明らかとなった。

骨のリモデリングでは，炎症から惹起される免疫反応や破骨細胞の活性亢進が骨吸収を引き起こすことが知られている[87-89]。また，Leflunomide は骨芽細胞だけでなく，破骨細胞あるいは炎症細胞である T 細胞も分子標的とする化合物である。したがって，生体内の骨再生において Leflunomide は骨芽細胞分化促進作用だけでなく，破骨細胞や炎症細胞に対しても制御作用を示す可能性がある。そこで，組織切片標本の TRAP 染色像を観察した結果，Leflunomide の投与による破骨細胞数の有意な変化は認めなかった。また，Leflunomide を投与した群の HE 染色像には，活発な骨代謝を示すセメントラインが存在することから，実験に用いた濃度の Leflunomide は骨組織再生において明らかな破骨細胞抑制作用は示さなかったと思われる。また，組織切片中の炎症細胞の浸潤は，Leflunomide 投与群と非投与群で明らかな相違を認めなかった。したがって，Leflnomide の骨組織再生促進作用には，欠損部周辺に存在する幹細胞および骨芽細胞に対する Leflnomide の作用が重要な役割を担っているのではないかと推察する。

骨形成因子である BMP-2 は，高い骨芽細胞分化促進作用を示すが，生体内で骨形成を促進するためには，細胞培養時の 15,000 倍の濃度が必要とされる（1.5 mg/ml）[90-93]。これに対して，Leflunomide は 3～30 μg（約 28～280 μg/ml）で骨

形成促進作用を示している。本研究における Leflunomide 投与の骨再生促進効果は, 現時点では臨床応用するために十分であるとは言い難いが, 今後 Leflunomide の薬理活性を化学的修飾によって増強したアナログ化合物が，骨再生治療薬として発展する可能性がある。また，本研究では，頭蓋骨欠損ラット実験モデルを用いて，Lefulnomid 溶液を数回に分けて欠損部に投与したが，この手法では投与した試薬が作用するまでの間に欠損部から排出されてしまう可能性や，早期の代謝により不活性化されてしまう可能性がある[94]。今後は，生体内における吸収に伴い生理活性因子の濃度を一定に徐放するゼラチンゲル[95]や小分子化合物徐放性 PLGA[96]等の drug delivaly system（DDS）の手法[95]を用いて，Lefulnomid の確実な薬理作用を引き出すことが必要である。また，本研究のスクリーニングで得た Leflunomide，LFM-A13 あるいは 1-5 を組み合わせて投与することで，相加・相乗効果による高い骨再生促進効果が得られる可能性がある。今後，本研究成果を基に，Leflunomide，LFM-A13 あるいは 1-5 が標的とする骨芽細胞内の分子機能や反応を解明することにより骨代謝機構への理解を深め，強力な骨芽細胞分化促進作用や，骨形成促進作用を有する新規の小分子化合物を用いた骨造成術が可能となることを期待する。

結論

本研究により以下のことが明らかとなった。

1. I 型コラーゲンレポーター骨芽細胞を用いて GFP 蛍光値および ALP 活性を二重指標とするスクリーニングシステムは，骨芽細胞分化促進因子の検出を簡便かつ高い信頼度で可能とする。
2. このスクリーニングシステムによって検出された化合物，Leflunomide, LFM-A13 および 1-5 はマウス骨芽細胞，間葉系幹細胞および iPS 細胞の骨芽細胞分化促進作用を示す。
3. Leflunomide は，骨欠損部において骨形成促進作用を示す。

謝　　辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて戴き，御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔機能再建学講座（クラウンブリッジ補綴学分野）矢谷博文教授に深甚なる謝意を表します。そして，本研究の遂行にあたり，終始御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔機能再建学講座（クラウンブリッジ補綴学分野）江草 宏助教に心より感謝申し上げます。

最後に，この研究に対して多大なる御協力と御助言を頂いた大阪大学大学院歯学研究科 薬理学教室　佐伯万騎男講師，ならびに歯科補綴学第一教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Kirkwood KL. Periodontal Diseases and Oral Bone Loss. In: Rosen CJ, ed. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Seventh Edition ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2008: 510-13.

2. Darby I, Chen S, De Poi R. Ridge preservation: what is it and when should it be considered. *Aust Dent J* 2008; **53**(1): 11-21.

3. Egusa H. [iPS cells in dentistry]. *Clinical calcium* 2012; **22**(1): 67-73.

4. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry- Part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res* 2012; **56**(3): 151-65.

5. Izumi Y, Aoki A, Yamada Y, et al. Current and future periodontal tissue engineering. *Periodontology 2000* 2011; **56**(1): 166-87.

6. Buser DA, Tonetti M. Clinical trials on implants in regenerated bone. *Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology* 1997; **2**(1): 329-42.

7. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry- Part II: Clinical application. *J Prosthodont Res* 2012; **56**(4): 229-48.

8. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* 2006; **26**(4): 363-9.

9. Rathe F, Junker R, Chesnutt BM, Jansen JA. The effect of enamel matrix derivative (Emdogain) on bone formation: a systematic review. *Tissue engineering Part B, Reviews* 2009; **15**(3): 215-24.

10. Wikesjo UM, Polimeni G, Qahash M. Tissue engineering with recombinant human bone morphogenetic protein-2 for alveolar augmentation and oral implant osseointegration: experimental observations and clinical perspectives. *Clin Implant Dent Relat Res* 2005; **7**(2): 112-9.

11. Filho Cerruti H, Kerkis I, Kerkis A, et al. Allogenous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. *Artif Organs* 2007; **31**(4): 268-73.

12. Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, et al. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. *Journal of dental research* 2011; **90**(1): 35-40.

13. Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, et al. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. *PloS one* 2008; **3**(7): e2611.

14. Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, Rutherford RB. Gene therapy for bone formation: in vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7. *J Cell Biochem* 2000; **78**(3): 476-86.

15. Ohba S, Nakajima K, Komiyama Y, et al. A novel osteogenic helioxanthin-derivative acts in a BMP-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **357**(4): 854-60.

16. Egusa H, Saeki M, Doi M, et al. A small-molecule approach to bone regenerative medicine in dentistry. *J Oral Biosci* 2010; **52**(2): 107-18.

17. Notoya K, Yoshida K, Tsukuda R, Taketomi S. Effect of ipriflavone on expression of markers characteristic of the osteoblast phenotype in rat bone marrow stromal cell culture. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1994; **9**(3): 395-400.

18. Civitelli R. In vitro and in vivo effects of ipriflavone on bone formation and bone biomechanics. *Calcified tissue international* 1997; **61 Suppl 1**: S12-4.

19. Notoya K, Nagai H, Oda T, et al. Enhancement of osteogenesis in vitro and in vivo by a novel osteoblast differentiation promoting compound, TAK-778. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1999; **290**(3): 1054-64.

20. Park KW, Waki H, Kim WK, et al. The small molecule phenamil induces osteoblast differentiation and mineralization. *Mol Cell Biol* 2009; **29**(14): 3905-14.

21. Yonezawa T, Lee JW, Hibino A, et al. Harmine promotes osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **409**(2): 260-5.

22. Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999; **286**(5446): 1946-9.

23. Zhou H, Shang L, Li X, et al. Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells. *Exp Cell Res* 2009; **315**(17): 2953-62.

24. Nakajima K, Komiyama Y, Hojo H, et al. Enhancement of bone formation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **395**(4): 502-8.

25. Bayliss PE, Bellavance KL, Whitehead GG, et al. Chemical modulation of receptor signaling inhibits regenerative angiogenesis in adult zebrafish. *Nature chemical biology* 2006; **2**(5): 265-73.

26. Chanda SK, Caldwell JS. Fulfilling the promise: drug discovery in the post-genomic era. *Drug discovery today* 2003; **8**(4): 168-74.

27. Chen T, Knapp AC, Wu Y, et al. High throughput screening identified a substituted imidazole as a novel RANK pathway-selective osteoclastogenesis inhibitor. *Assay and drug development technologies* 2006; **4**(4): 387-96.

28. Wu YW, Chen SC, Lai WF, Chen YC, Tsai YH. Screening of flavonoids for effective osteoclastogenesis suppression. *Analytical biochemistry* 2013; **433**(1): 48-55.

29. Egusa H, Doi M, Saeki M, et al. The small molecule harmine regulates NFATc1 and Id2 expression in osteoclast progenitor cells. *Bone* 2011; **49**(2): 264-74.

30. Hojo H, Igawa K, Ohba S, et al. Development of high-throughput screening system for osteogenic drugs using a cell-based sensor. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **376**(2): 375-9.

31. Alves H, Dechering K, Van Blitterswijk C, De Boer J. High-throughput assay for the identification of compounds regulating osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells. PloS one; 2011. p. e26678.

32. Egusa H, Kaneda Y, Akashi Y, et al. Enhanced bone regeneration via multimodal actions of synthetic peptide SVVYGLR on osteoprogenitors and osteoclasts. *Biomaterials* 2009; **30**(27): 4676-86.

33. Egusa H, Schweizer FE, Wang CC, Matsuka Y, Nishimura I. Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing. *The Journal of biological chemistry* 2005; **280**(25): 23691-7.

34. Egusa H, Kobayashi M, Matsumoto T, Sasaki JI, Uraguchi S, Yatani H. Application of Cyclic Strain for Accelerated Skeletal Myogenic Differentiation of Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells with Cell Alignment. *Tissue engineering Part A* 2012.

35. Hamada Y, Egusa H, Kaneda Y, et al. Synthetic osteopontin-derived peptide SVVYGLR can induce neovascularization in artificial bone marrow scaffold biomaterials. *Dental materials journal* 2007; **26**(4): 487-92.

36. Egusa H, Okita K, Kayashima H, et al. Gingival fibroblasts as a promising source of induced pluripotent stem cells. *PloS one* 2010; **5**(9): e12743.

37. Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* 2005; **36**(5): 758-69.

38. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of biomolecular screening* 1999; **4**(2): 67-73.

39. Niles AL, Moravec RA, Eric Hesselberth P, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical biochemistry* 2007; **366**(2): 197-206.

40. Egusa H, Nikawa H, Makihira S, Yatani H, Hamada T. In vitro mechanisms of interleukin-8-mediated responses of human gingival epithelial cells to Candida albicans infection. *International journal of medical microbiology : IJMM* 2006; **296**(4-5): 301-11.

41. Tashiro K, Kondo A, Kawabata K, et al. Efficient osteoblast differentiation from mouse bone marrow stromal cells with polylysin-modified adenovirus vectors. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **379**(1): 127-32.

42. Arakaki A, Shibusawa M, Hosokawa M, Matsunaga T. Preparation of genomic DNA from a single species of uncultured magnetotactic bacterium by multiple-displacement amplification. *Applied and environmental microbiology* 2010; **76**(5): 1480-5.

43. Voller A, Bidwell DE, Bartlett A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization* 1976; **53**(1): 55-65.

44. Jones JV, Mansour M, James H, Sadi D, Carr RI. A substrate amplification system for enzyme-linked immunoassays. II. Demonstration of its applicability for measuring anti-DNA antibodies. *Journal of immunological methods* 1989; **118**(1): 79-84.

45. Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of alpha-tricalcium phosphate, beta-tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *Journal of biomedical materials research Part A* 2011; **98**(4): 488-98.

46. Zhang JD, Koerner C, Bechtel S, et al. Time-resolved human kinome RNAi screen identifies a network regulating mitotic-events as early regulators of cell proliferation. *PloS one* 2011; **6**(7): e22176.

47. Kolniak TA, Sullivan JM. Rapid, cell-based toxicity screen of potentially therapeutic post-transcriptional gene silencing agents. *Experimental eye research* 2011; **92**(5): 328-37.

48. Kwon CH, Wheeldon I, Kachouie NN, et al. Drug-eluting microarrays for cell-based screening of chemical-induced apoptosis. *Analytical chemistry* 2011; **83**(11): 4118-25.

49. Desbordes SC, Placantonakis DG, Ciro A, et al. High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Cell stem cell* 2008; **2**(6): 602-12.

50. Darcy A, Meltzer M, Miller J, et al. A novel library screen identifies immunosuppressors that promote osteoblast differentiation. *Bone* 2012; **50**(6): 1294-303.

51. Zhao Y, Ding S. A high-throughput siRNA library screen identifies osteogenic suppressors in human mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; **104**(23): 9673-8.

52. Brey DM, Motlekar NA, Diamond SL, Mauck RL, Garino JP, Burdick JA. High-throughput screening of a small molecule library for promoters and inhibitors of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biotechnol Bioeng*; **108**(1): 163-74.

53. Fei Y, Xiao L, Doetschman T, Coffin DJ, Hurley MM. Fibroblast growth factor 2 stimulation of osteoblast differentiation and bone formation is mediated by modulation of the Wnt signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 2011; **286**(47): 40575-83.

54. Yu S, Geng Q, Sun F, Yu Y, Pan Q, Hong A. Osteogenic differentiation of C2C12 myogenic progenitor cells requires the Fos-related antigen Fra-1 - A novel target of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun* 2012.

55. Jang K, Sato K, Igawa K, Chung UI, Kitamori T. Development of an osteoblast-based 3D continuous-perfusion microfluidic system for drug screening. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2008; **390**(3): 825-32.

56. Tural S, Kara N, Alayli G, Tomak L. Association between osteoporosis and polymorphisms of the bone Gla protein, estrogen receptor 1, collagen 1-A1 and calcitonin receptor genes in Turkish postmenopausal women. *Gene* 2012.

57. Zhang YJ, Gendron TF, Xu YF, Ko LW, Yen SH, Petrucelli L. Phosphorylation regulates proteasomal-mediated degradation and solubility of TAR DNA binding protein-43 C-terminal fragments. *Molecular neurodegeneration* 2010; **5**: 33.

58. Piu F, Gauthier NK, Olsson R, et al. Identification of novel subtype selective RAR agonists. *Biochem Pharmacol* 2005; **71**(1-2): 156-62.

59. Zhang Y, Au Q, Zhang M, Barber JR, Ng SC, Zhang B. Identification of a small molecule SIRT2 inhibitor with selective tumor cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **386**(4): 729-33.

60. Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S, Sasaki Y. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 1984; **23**(21): 5036-41.

61. Silva RD, Saraiva L, Coutinho I, Goncalves J, Corte-Real M. Yeast as a powerful model system for the study of apoptosis regulation by protein kinase C isoforms. *Current pharmaceutical design* 2012; **18**(17): 2492-500.

62. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984; **308**(5961): 693-8.

63. Nishizuka Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* 1984; **225**(4668): 1365-70.

64. Keenan C, Kelleher D. Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cellular signalling* 1998; **10**(4): 225-32.

65. Lampasso JD, Chen W, Marzec N. The expression profile of PKC isoforms during MC3T3-E1 differentiation. *International journal of molecular medicine* 2006; **17**(6): 1125-31.

66. Liu J, Someren E, Mentink A, et al. The effect of PKC activation and inhibition on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2010; **4**(5): 329-39.

67. Nakura A, Higuchi C, Yoshida K, Yoshikawa H. PKCalpha suppresses osteoblastic differentiation. *Bone* 2011; **48**(3): 476-84.

68. Xu X, Blinder L, Shen J, et al. In vivo mechanism by which leflunomide controls lymphoproliferative and autoimmune disease in MRL/MpJ-lpr/lpr mice. *J Immunol* 1997; **159**(1): 167-74.

69. Xu X, Williams JW, Gong H, Finnegan A, Chong AS. Two activities of the immunosuppressive metabolite of leflunomide, A77 1726. Inhibition of pyrimidine nucleotide synthesis and protein tyrosine phosphorylation. *Biochem Pharmacol* 1996; **52**(4): 527-34.

70. Wiacek R, Kolossa K, Jankowski T, et al. The efficacy and safety of leflunomide in patients with active rheumatoid arthritis. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University* 2012; **21**(3): 337-42.

71. van Roon EN, Jansen TL, van de Laar MA, et al. Therapeutic drug monitoring of A77 1726, the active metabolite of leflunomide: serum concentrations predict response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2005; **64**(4): 569-74.

72. Rozman B. Clinical pharmacokinetics of leflunomide. *Clinical pharmacokinetics* 2002; **41**(6): 421-30.

73. Hamilton LC, Vojnovic I, Warner TD. A771726, the active metabolite of leflunomide, directly inhibits the activity of cyclo-oxygenase-2 in vitro and in vivo in a substrate-sensitive manner. *British journal of pharmacology* 1999; **127**(7): 1589-96.

74. Burger D, Begue-Pastor N, Benavent S, et al. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, inhibits the production of prostaglandin E(2), matrix metalloproteinase 1 and interleukin 6 in human fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology* 2003; **42**(1): 89-96.

75. Urushibara M, Takayanagi H, Koga T, et al. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF-kappa B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. *Arthritis and rheumatism* 2004; **50**(3): 794-804.

76. Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Dominguez-Jimenez C, Aragon-Bodi A, Diaz Sanchez B, Sanchez-Madrid F. Inhibition of tumour necrosis factor and IL-17 production by leflunomide involves the JAK/STAT pathway. *Annals of the rheumatic diseases* 2009; **68**(10): 1644-50.

77. Joung YH, Lim EJ, Darvin P, et al. MSM enhances GH signaling via the Jak2/STAT5b pathway in osteoblast-like cells and osteoblast differentiation through the activation of STAT5b in MSCs. *PloS one* 2012; **7**(10): e47477.

78. Uckun FM. Chemosensitizing anti-cancer activity of LFM-A13, a leflunomide metabolite analog targeting polo-like kinases. *Cell cycle* 2007; **6**(24): 3021-6.

79. Mahajan S, Ghosh S, Sudbeck EA, et al. Rational design and synthesis of a novel anti-leukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase (BTK), LFM-A13 [alpha-cyano-beta-hydroxy-beta-methyl-N-(2, 5-dibromophenyl)propenamide]. *The Journal of biological chemistry* 1999; **274**(14): 9587-99.

80. Uckun FM. Clinical potential of targeting Bruton's tyrosine kinase. *International reviews of immunology* 2008; **27**(1-2): 43-69.

81. James RG, Biechele TL, Conrad WH, et al. Bruton's tyrosine kinase revealed as a negative regulator of Wnt-beta-catenin signaling. *Sci Signal* 2009; **2**(72): ra25.

82. Johnson ML, Harnish K, Nusse R, Van Hul W. LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2004; **19**(11): 1749-57.

83. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004; **341**: 19-39.

84. Baron R, Rawadi G, Roman-Roman S. Wnt signaling: a key regulator of bone mass. *Current topics in developmental biology* 2006; **76**: 103-27.

85. Malviya A, Kuiper JH, Makwana N, Laing P, Ashton B. The effect of newer anti-rheumatic drugs on osteogenic cell proliferation: an in-vitro study. *J Orthop Surg Res* 2009; **4**: 17.

86. Rozman B, Praprotnik S, Logar D, et al. Leflunomide and hypertension. *Annals of the rheumatic diseases* 2002; **61**(6): 567-9.

87. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *Journal of periodontal research* 2005; **40**(4): 287-93.

88. Takayanagi H, Oda H, Yamamoto S, et al. A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; **240**(2): 279-86.

89. Arron JR, Choi Y. Bone versus immune system. *Nature* 2000; **408**(6812): 535-6.

90. Polly DW, Jr., Ackerman SJ, Shaffrey CI, et al. A cost analysis of bone morphogenetic protein versus autogenous iliac crest bone graft in single-level anterior lumbar fusion. *Orthopedics* 2003; **26**(10): 1027-37.

91. Ackerman SJ, Mafilios MS, Polly DW, Jr. Economic evaluation of bone morphogenetic protein versus autogenous iliac crest bone graft in single-level anterior lumbar fusion: an evidence-based modeling approach. *Spine* 2002; **27**(16 Suppl 1): S94-9.

92. Boden SD, Kang J, Sandhu H, Heller JG. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. *Spine* 2002; **27**(23): 2662-73.

93. Kusumoto K, Bessho K, Fujimura K, et al. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in muscles of non-human primates. *The Journal of international medical research* 2002; **30**(3): 251-9.

94. Kohara H, Tabata Y. Enhancement of ectopic osteoid formation following the dual release of bone morphogenetic protein 2 and Wnt1 inducible signaling pathway protein 1 from gelatin sponges. *Biomaterials* 2011; **32**(24): 5726-32.

95. Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* 2003; **24**(24): 4375-83.

96. Nath SD, Son S, Sadiasa A, Min YK, Lee BT. Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration. *International journal of pharmaceutics* 2013.

表1　RT-PCRに用いたプライマー

Gene	Primers (Fw, forward; Rv, reverse)	Ann Temp* (Cycles)	Product size (bp)
Runx2	Fw: 5'-ACT GCC CCT CAT CAG ACT GCT ACT-3'	65℃	289
	Rv: 5'-CGC TCC GGC CCA CAA ATC TC-3'	(35)	
ALP	Fw: 5'-GCC CTC TCC AAG ACA TAT A-3'	55℃	372
	Rv: 5'-CCA TGA TCA CGT CGA TAT CC-3'	(30)	
collagen 1a2	Fw: 5'-GCA ATC GGG ATC AGT ACG AA-3'	57℃	485
	Rv: 5'-CTT TCA CGC CTT TGA AGC CA-3'	(34)	
osteopontin	Fw: 5'-TCA CCA TTC GGA TGA GTC TG-3'	45℃	287
	Rv: 5'-ACT TGT GGC TCT GAT GTT CC-3'	(19)	
osteocalcin	Fw: 5'-AAG CAG GAG GGC AAT AAG GT-3'	61℃	380
	Rv: 5'-AGC TGC TGT GAC ATC CAT AC-3'	(25)	
GAPDH	Fw: 5'-CAC CAT GGA GAA GGC CGG GG-3'	67℃	418
	Rv: 5'-GAC GGA CAC ATT GGG GGT AG-3'	(26)	

* Ann Tmp：annealing temperature

表2　リアルタイムRT-PCRに用いたTHUNDERBIRD® SYBR®プライマー

Gene	Primers	Ann. Tem.	product size (bp)
GAPDH	Fw: 5'- TGCACCACCAACTGCTTAG -3'	60℃	177
	Rv: 5'- GGATGCAGGGATGATGTTC -3'		
Runx2	Fw: 5'-CGGGCTACCTGCCATCAC-3'	60℃	78
	Rv: 5'-GGCCAGAGGCAGAAGTCAGA-3'		
Osterix	Fw: 5'-CTCGTCTGACTGCCTGCCTAG-3'	60℃	84
	Rv: 5'-GCGTGGATGCCTGCCTTGTA-3'		
Osteocalcin	Fw: 5'-CCGGGAGCAGTGTGAGCTTA-3'	60℃	68
	Rv: 5'-AGGCGGTCTTCAAGCCATACT-3'		
COL1A1	Fw: 5'-TGTCCCAACCCCCAAAGAC-3'	60℃	92
	Rv: 5'-CCCTCGACTCCTACATCTTCTGA-3'		

表3　LOPAC[1280]ライブラリーのスクリーニングにおいてCol1a1GFP-MC3T3E1細胞のALP活性を促進した小分子化合物

Rack No	Rack Pos	分子量	試薬名	Description
09	C03	364.30	1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)-3-methylpiperazine dihydrochloride	Protein kinase C (PKC) inhibitor
13	B03	161.08	Putrescine dihydrochloride	Binds to the polyamine modulatory site of the NMDA glutamate receptor and potentiates NMDA-induced currents; precursor of spermidine
09	A10	270.21	Leflunomide	Immunosuppressive; its metabolite, a malononitrile derivative, inhibits dihydroorotate dehydrogenase (in the de novo pyrimidine synthesis pathway) and several protein tyrosine kinases
09	A11	360.01	LFM-A13	Potent and selective inhibitor of Bruton's tyrosine kinase (BTK)
11	C03	338.26	H-8 dihydrochloride	Potent inhibitor of cAMP- and cGMP-dependent protein kinase
14	A05	277.21	Ro 41-0960	Specific, reversible, orally-active COMT-inhibitor
10	D07	459.30	MRS 2179	Competitive P2Y1 receptor antagonist
11	B02	195.22	L-alpha-Methyl-p-tyrosine	Tyrosine hydroxylase inhibitor
14	C08	398.73	SKF 83959 hydrobromide	Atypical D1 dopamine receptor agonist; displays antagonist activity in vitro and agonist activity in vivo
14	A08	254.63	Spermidine trihydrochloride	Binds to the polyamine modulatory site of the NMDA glutamate receptor
08	F08	402.45	L-165,041	Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma agonist.

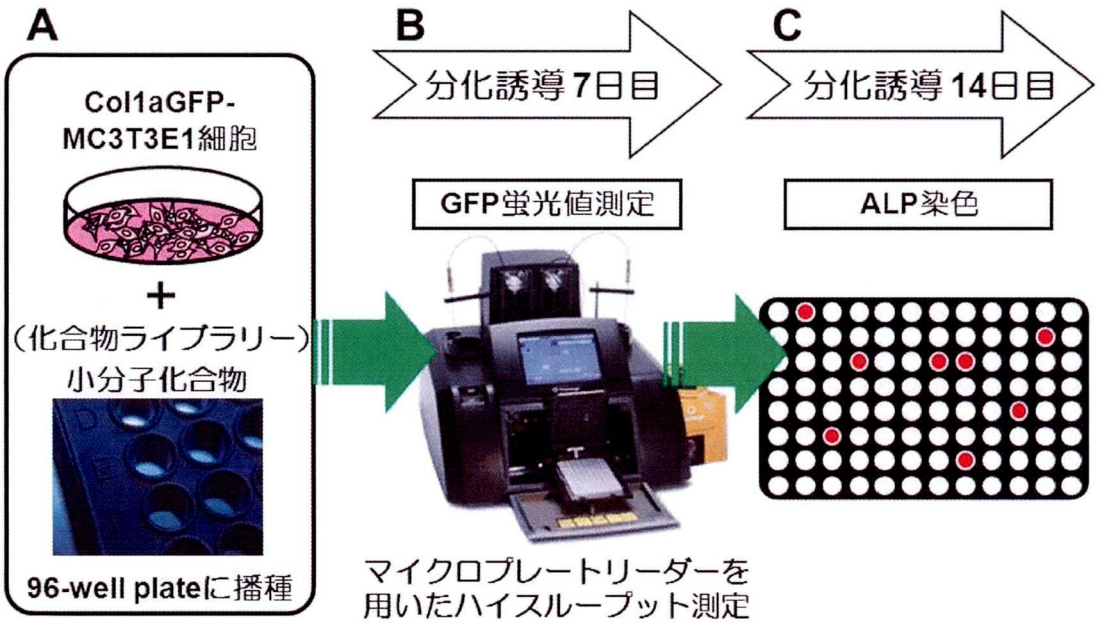

図 1： **Col1a1GFP-MC3T3E1** 細胞を用いたⅠ型コラーゲン発現/**ALP** 活性の二重評価法

（**A**）Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞を 96 well 培養プレートへ播種し，各小分子化合物（10 μM）を添加した骨芽細胞分化誘導培地で培養した。（**B**）培養 7 日後に，各ウェルの GFP 蛍光値をマイクロプレートリーダーにて測定し，細胞のⅠ型コラーゲンの発現を評価した。（**C**）さらに 7 日間の培養を行い，分化誘導 14 日目の細胞の ALP 活性を染色で確認した。このシステムによって，二つの異なる骨芽細胞分化マーカー（Ⅰ型コラーゲン/ALP）の検出を一つの培養系で行うことが可能である。

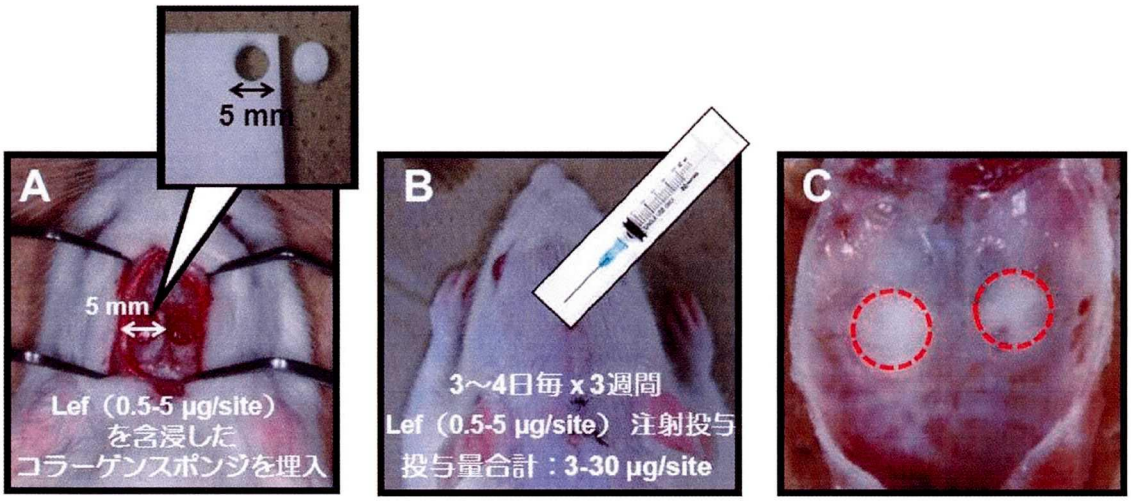

図 **2**：頭蓋骨欠損ラット実験モデルを用いた骨組織再生の評価

（**A**）頭蓋骨欠損ラット実験モデル。Spague-Dawley 系ラット（8 週齢，雄性）の頭蓋骨矢状縫合の左右に直径 5 mm の欠損を形成した。直径 5 mm に切り出したコラーゲンスポンジに 0.5 または 5 μg の Leflunomide 溶液を含浸させ，これを頭蓋骨欠損部に埋入し，骨膜で被覆し頭皮を縫合した。（**B**）埋入後，Leflunomide の投与量の合計が 3 または 30 μg になるように，3 週間にわたり 3，4 日毎に 5 回に分けて Leflunomide 溶液を局所注射した。（**C**）埋入 3 週間後に摘出した頭蓋骨（破線は骨欠損部）を用いて，動物用マイクロ CT 撮影および組織切片（HE 染色）観察により骨組織再生を評価した。

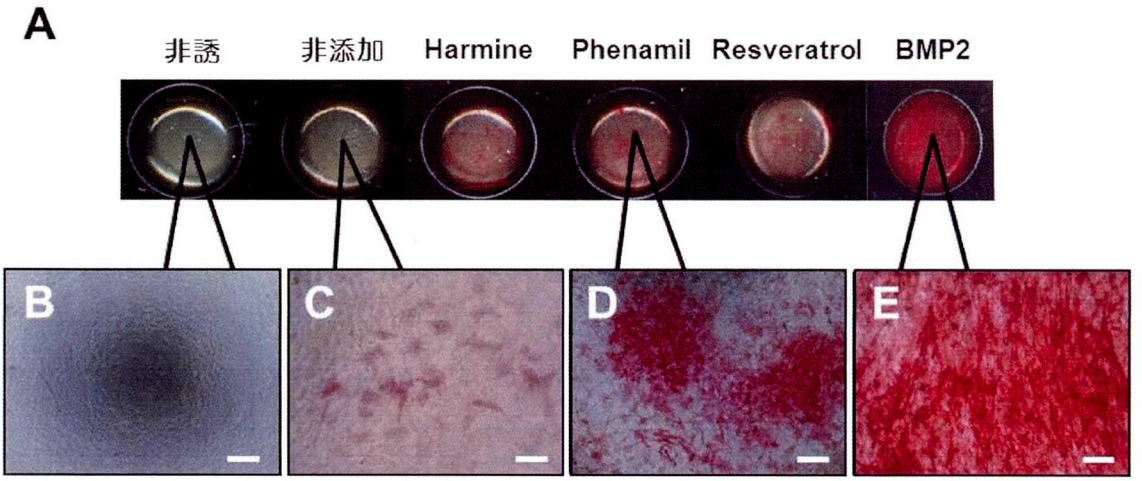

図 **3 : Col1a1GFP-MC3T3E1** 細胞を用いたスクリーニングシステムにおける **ALP** 活性の評価

（**A**）培養 14 日後の Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞の ALP 染色像。非誘導の Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞では，ALP 活性を認めなかったが（**B**），骨芽細胞分化誘導培地で培養した細胞はわずかな ALP 活性を示した（**C**）。また，この ALP 活性は，既知の骨芽細胞分化促進化合物（Harmine，Phenamil，Resveratrol）1 μM の添加により増強し（**A, D**），骨形成因子（rhBMP-2）100 ng/ml の添加により強い ALP 活性を示した（**E**）（Bar; 200 μm ）。

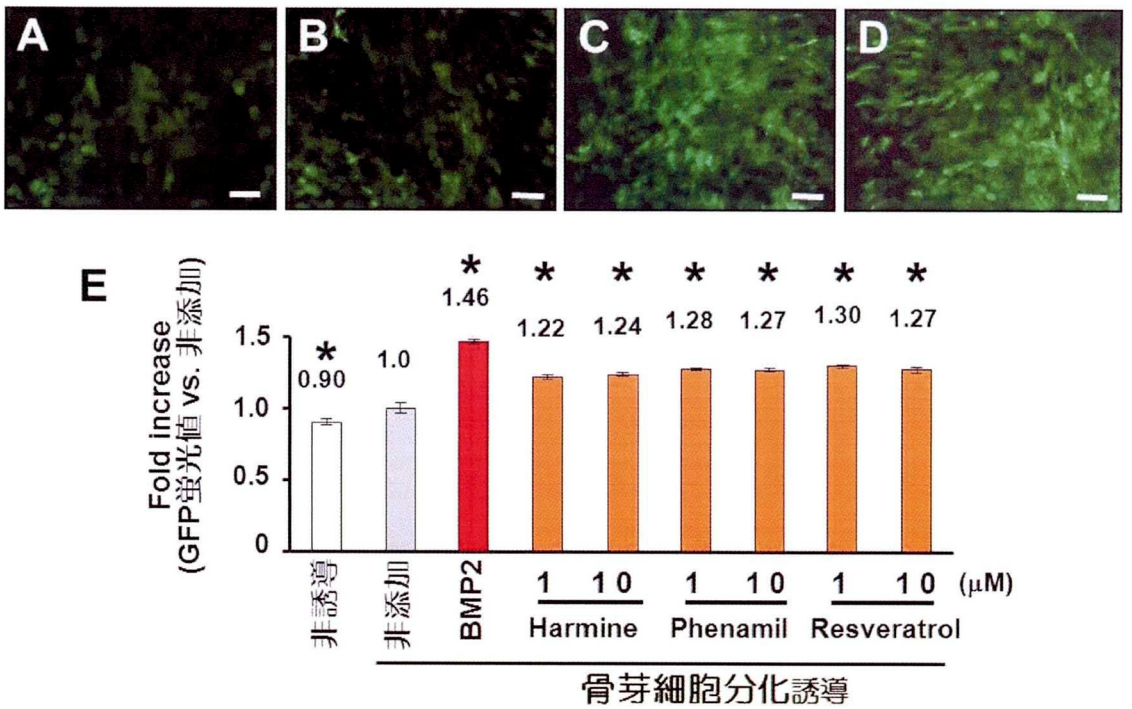

図 4 : Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞を用いたスクリーニングシステムにおける GFP 蛍光（Ⅰ型コラーゲン発現）の評価

Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞を用いたスクリーニングシステムにおける 7 日後の GFP 蛍光を評価した。(**A-D**) 蛍光顕微鏡観察像 (Bar; 200 μm)。非誘導の細胞 (**A**) と比較して，分化誘導を行った細胞 (**B**) は強い GFP の緑色蛍光を示した。また，細胞の緑色蛍光は，Phenamil (10 μM) あるいは rhBMP-2 (100 ng/ml) を添加することでさらに増強された (**C**, **D**)。(**E**) マイクロプレートリーダーを用いた蛍光量測定の結果，骨芽細胞分化誘導培地で分化誘導した細胞（非添加）の GFP 蛍光値は非誘導の細胞と比較して有意に上昇した ($P<0.01$) 。また，1 あるいは 10 μM の既知の骨芽細胞分化促進化合物 (Harmine, Phenamil, Resveratrol) あるいは 100 ng/ml の骨形成因子 (rhBMP-2) を添加した細胞の蛍光値は，非添加の場合と比較して 1.22 倍以上有意に高い蛍光値を示した ($P<0.01$)。値は平均値および標準偏差 (n=3), * : $P<0.01$ (ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非添加)。

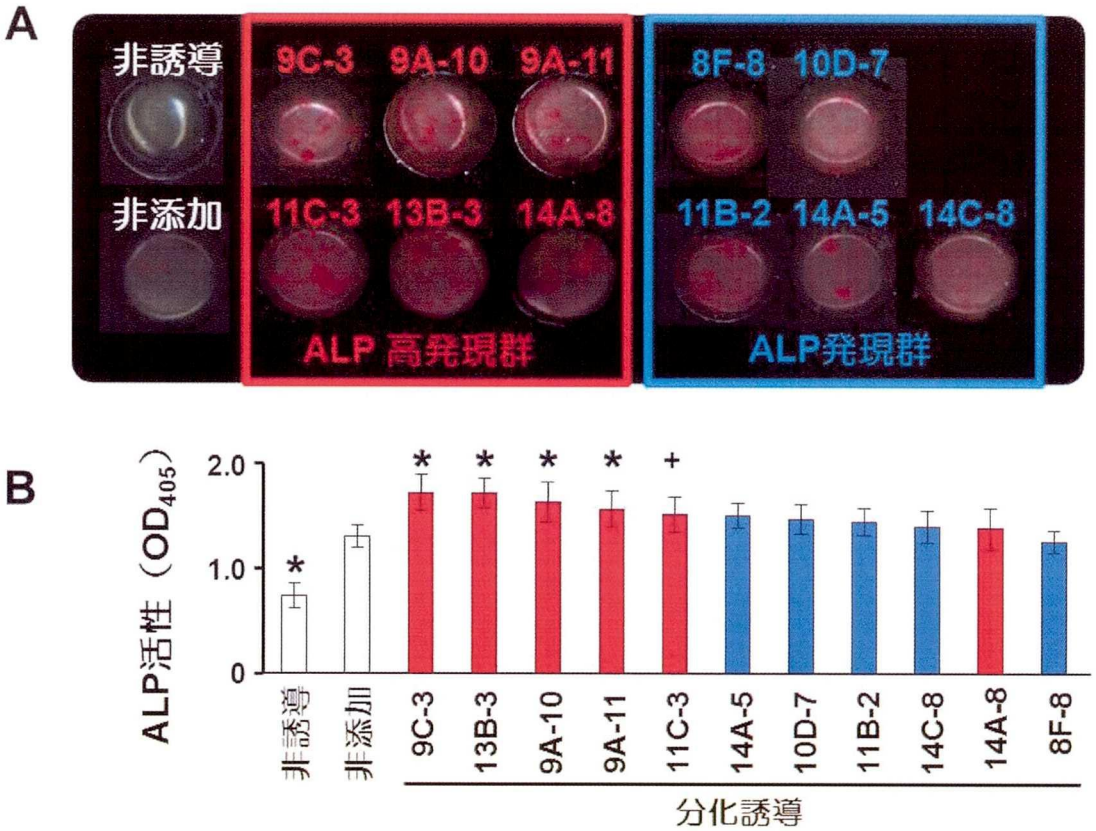

図 5：**LOPAC**[1280] のスクリーニングにおける **ALP** 活性の評価

（**A**）LOPAC[1280] を用いたスクリーニングにおける ALP 染色像。11 種類の化合物（10 μM）が Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞の ALP 活性を促進した。各ウェル上の記号は，LOPAC[1280] 中の小分子化合物のコード（表 3 参照）を示す。赤線で囲まれた 6 種類の化合物が肉眼所見にて強い ALP 活性を，青線で囲まれた 5 種類の化合物が弱い ALP 活性化作用を示した。（**B**）スクリーニングで ALP 活性の促進作用を示した 11 種類の小分子化合物（10 μM）を MC3T3-E1 細胞に添加し，培養 14 日目の細胞の ALP 活性を，酵素免疫測定法を用いて定量的に評価した。すべての化合物は非添加の場合と比較して高い ALP 活性化促進作用を示し，スクリーニングで特に強い ALP 活性作用を示した 6 種類の化合物（赤色バー）の中の 5 種類が，統計学的に有意な促進作用を示した。値は平均値および標準偏差 (n=10)，+: $P<0.05$，*: $P<0.01$（ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非添加）。

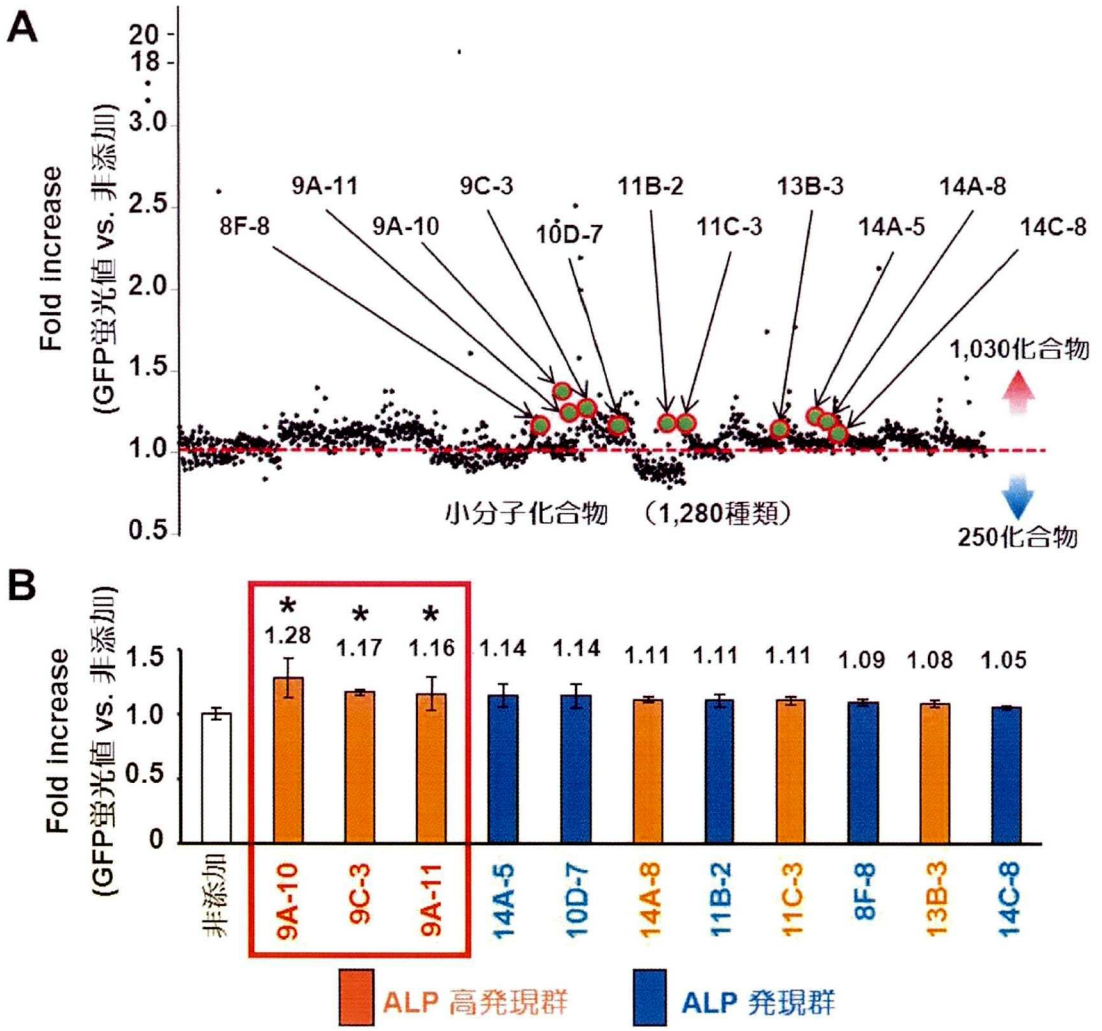

図 6：**LOPAC**[1280] のスクリーニングにおける **GFP** 蛍光値の評価

（**A**）GFP 蛍光値を指標とした LOPAC[1280] のスクリーニング結果。ライブラリーに含まれる 1,280 種類の化合物の中で，1,030 種類の化合物がレポーター骨芽細胞の GFP 蛍光値を増強した（赤破線より上の化合物）。（**B**）スクリーニングで ALP 活性の促進作用を示した 11 種類の化合物における GFP 蛍光値。11 種類すべての化合物が GFP 蛍光値の増強作用を示し，中でも 3 種類の化合物（赤線囲み：Leflunomide，LFM-A13，1-5）が非添加の場合と比較して 1.16 倍以上の有意に高い GFP 蛍光値を示した（$P<0.01$）。値は平均値および標準偏差 (n=3)，*: $P<0.01$（ANOVA, Dunnett, multiple-comparison test . vs. 非添加）。

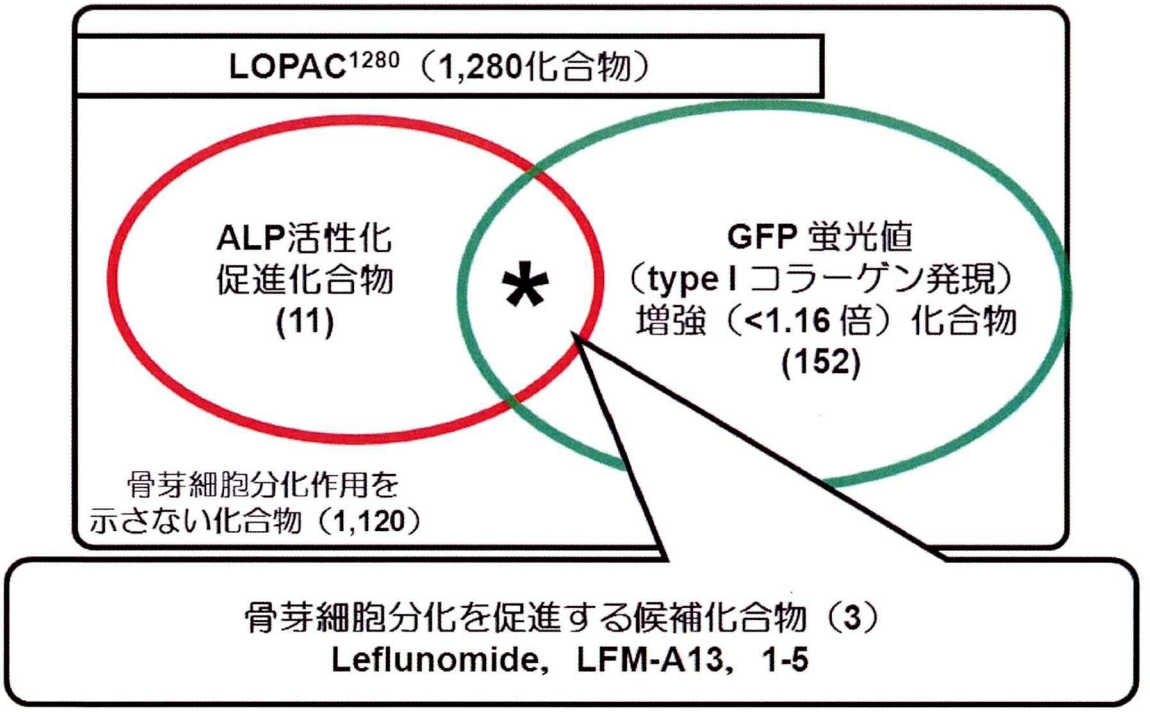

図 7： **Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞を用いた LOPAC^{1280} のスクリーニングの結果**

LOPAC^{1280} ライブラリーに Col1a1GFP-MC3T3E1 細胞を用いて ALP 活性および GFP 蛍光値を指標としたスクリーニングを行った結果，1,280 種類の化合物のうち，ALP 活性化の促進作用をもつ化合物が 11 種類検出され，Ⅰ型コラーゲンの発現を反映する GFP 蛍光値を増強する化合物（非添加の場合と比較して 1.16 倍以上の増強作用）が 152 種類検出された。また，これらの指標に対して 3 種類の候補化合物（Leflunomide，LFM-A13，1-5）が重複して検出された。

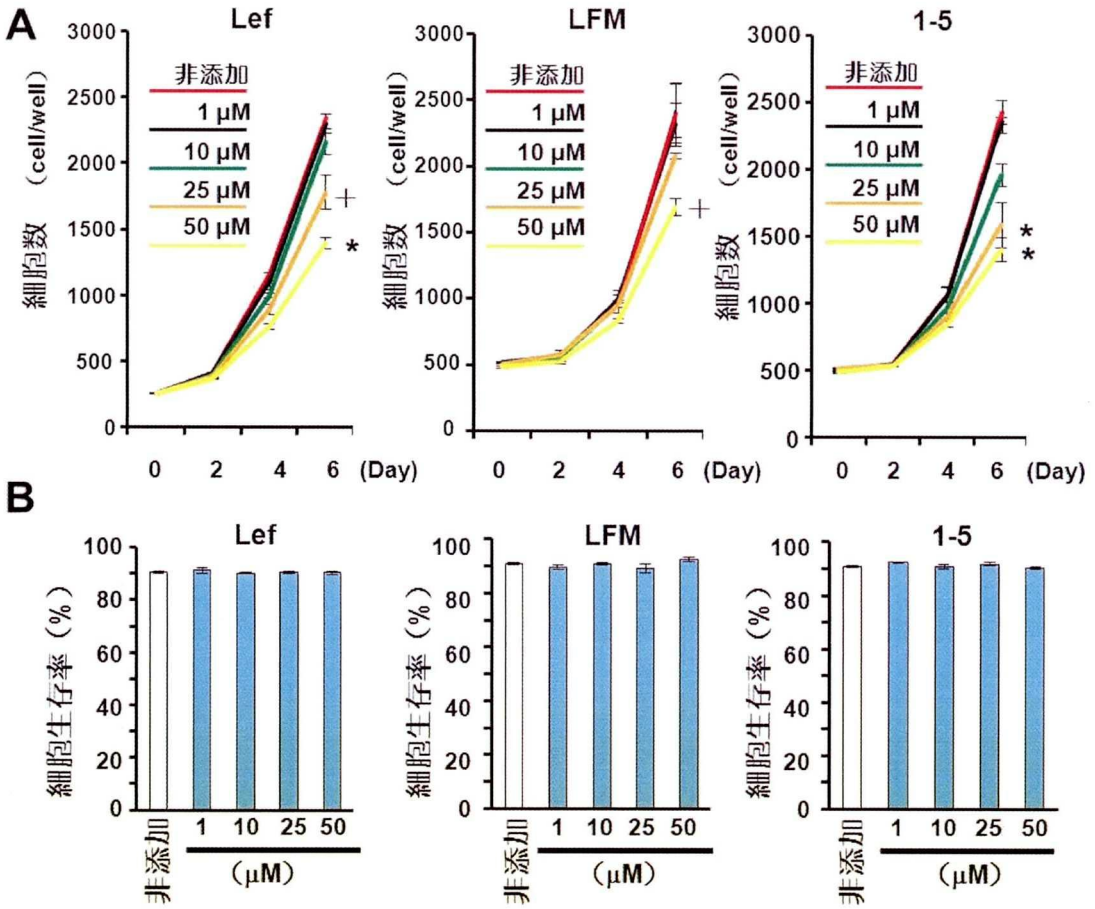

図 8：候補化合物が骨芽細胞の増殖および細胞死に及ぼす影響

MC3T3-E1 細胞に 1~50 μM の Leflunomide（Lef），LFM-A13（LFM），1-5 を添加し，WST-1 細胞増殖試験（**A**）および細胞生存試験（**B**）を行った。（**A**）Lef，LFM および 1-5 は，25 μM 以上の高濃度では細胞増殖を抑制したが，10 μM 以下の濃度では細胞の増殖に有意な影響を与えなかった。値は平均値および標準偏差 (n=10)，+: $P<0.05$，*: $P<0.01$（ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非添加）。（**B**）生存細胞率は，Cyto Tox-Glo™ Cytotoxicity Assay キットを用い，（全細胞数-死細胞数)/全細胞数を算出して求めた。1-50 μM の Lef，LFM あるいは 1-5 の存在下で 5 日間培養した MC3T3-E1 細胞の生存率は，化合物を添加していない場合と有意な差を認めなかった。値は平均値および標準偏差 (n=3)（ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非添加）。

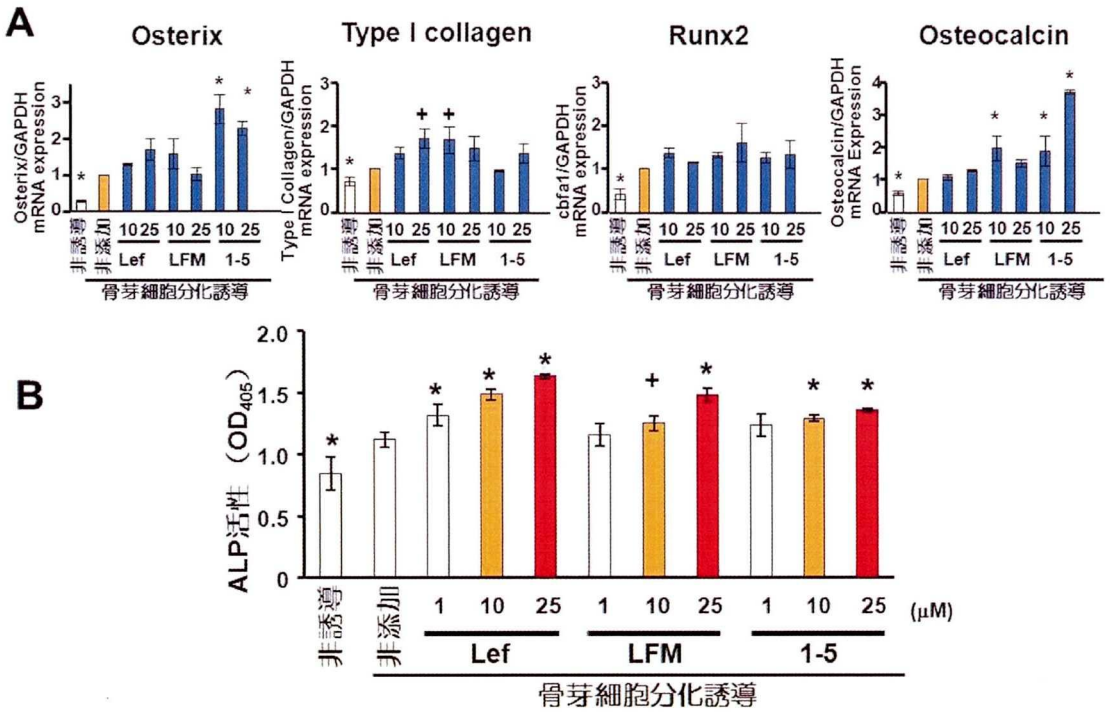

図 9：候補化合物が **MC3T3-E1** 骨芽細胞の分化に及ぼす影響

MC3T3-E1 細胞に 1~25 μM の Leflunomide（Lef），LFM-A13（LFM），1-5 を添加し，骨芽細胞分化誘導 10 日目に骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析し（**A**），14 日目に ALP 活性を酵素免疫測定法で定量した（**B**）。(**A**) Lef, LFM, 1-5 は，細胞における骨芽細胞分化マーカー遺伝子（*Osterix*, *Type I collagen*, *Runx2*, *Osteocalcin*）の発現を促進した。内部標準には GAPDH を用いた。値は平均値および標準偏差 (n=3), +: $P<0.05$, *: $P<0.01$ (ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非添加)。(**B**) Lef, LFM, 1-5 は，細胞の ALP 活性を濃度依存的に有意に促進した。値は平均値および標準偏差 (n=4), +: $P<0.05$, *: $P<0.01$（ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非添加）。

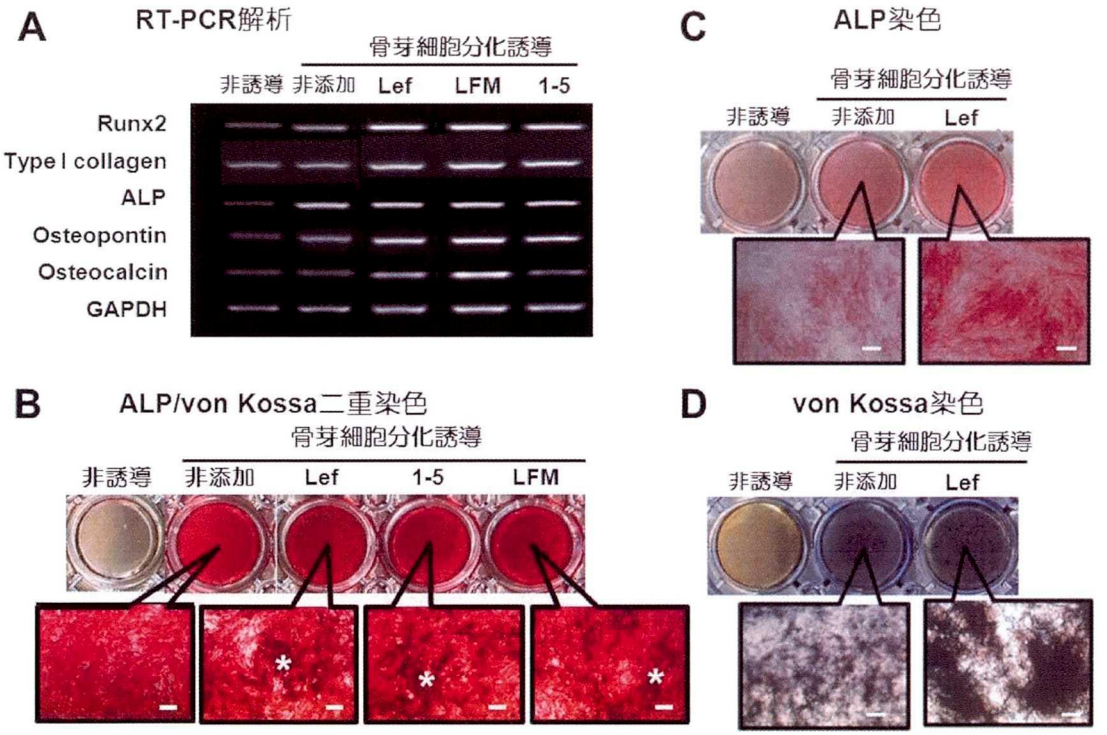

図 10：候補化合物が BMSC の骨芽細胞分化に及ぼす影響

mBMSC に 1 あるいは 10 μM の Leflunomide（Lef），LFM-A13（LFM），1-5 を添加し，骨芽細胞分化誘導 10 日目に骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を RT-PCR 法で評価し（**A**），14 日目に ALP/von Kossa 二重染色を行った（**B**）。（**A**）1 μM の Lef，LFM，1-5 は，mBMSC における骨芽細胞分化マーカー遺伝子（*Runx2*，*Type I collagen*, *ALP*, *Osteopontin*, *Osteocalcin*）の発現を促進した。内部標準には GAPDH を用いた。（**B**）ALP/von Kossa 二重染色像（Bar; 200 μm ）。10 μM の Lef，LFM，1-5 は，細胞の ALP 活性を著明に促進した。また，これらの化合物を添加した場合には，非添加の場合には見られなかった細胞外基質の石灰化（*）を認めた。（**C**，**D**）rBMSC の骨芽細胞分化誘導系においても，10 μM の Lef は分化誘導 14 日目に細胞の ALP 活性を促進し（**C**：ALP 染色像），21 日目における細胞外基質の石灰化を著明に促進した（D：von Kossa 染色像）（Bar; 200 μm）。

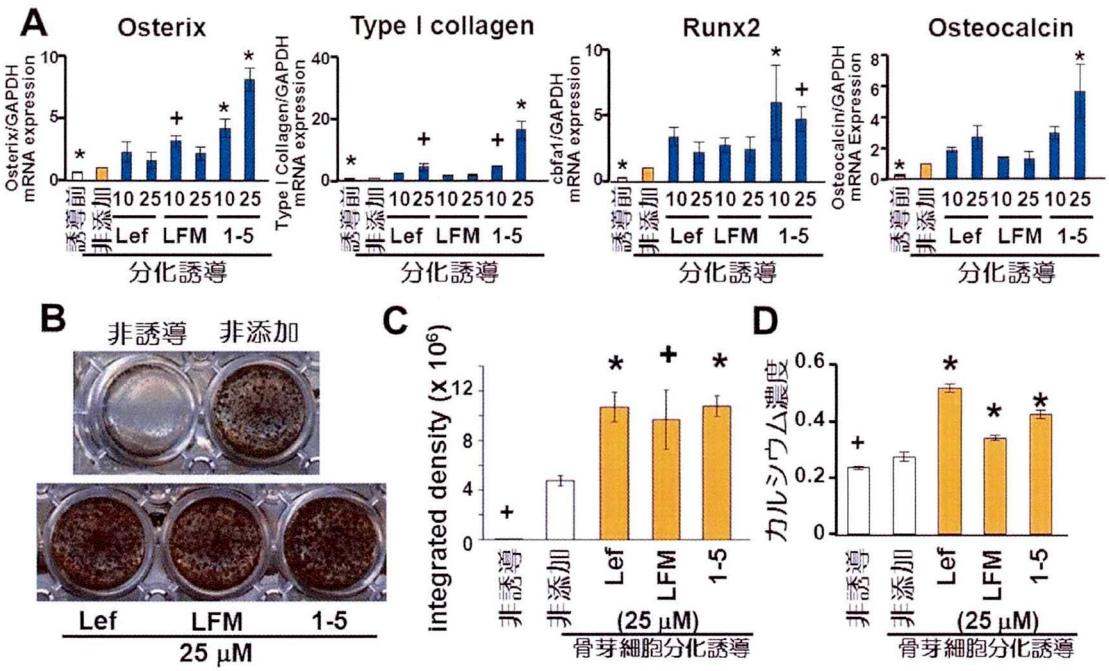

図 11：候補化合物が iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

マウス iPS 細胞に 10 あるいは 25 μM の Leflunomide（Lef），LFM-A13（LFM），1-5 を添加し，骨芽細胞分化誘導 14 日目に骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法で解析し（**A**），21 日目に von Kossa 染色（**B**，**C**）およびカルシウム定量を行った（**D**）。（**A**）Lef，LFM，1-5 は，iPS 細胞における骨芽細胞分化マーカー遺伝子（*Osterix*，*Type I collagen*，*Runx2*，*Osteocalcin*）の発現を促進した。内部標準には GAPDH を用いた。値は平均値および標準偏差 (n=3)，+: $P<0.05$，*: $P<0.01$（ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非添加）。（**B**）Lef，LFM，1-5 は，細胞外基質の石灰化を著明に促進した。（**C**）von Kossa 染色陽性面積を解析した結果，Lef，LFM，1-5 は，細胞外基質の石灰化を有意に促進していた。値は平均値および標準偏差 (n=4)，+: $P<0.05$，*: $P<0.01$（ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非添加）。（**D**）Lef，LFM，1-5（25 μM）は，マウス iPS 細胞のカルシウム産生量を有意に促進した。値は細胞の DNA 量あたりのカルシウム濃度の平均値および標準偏差 (n=3)，+: $P<0.05$，*: $P<0.01$（ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非添加）。

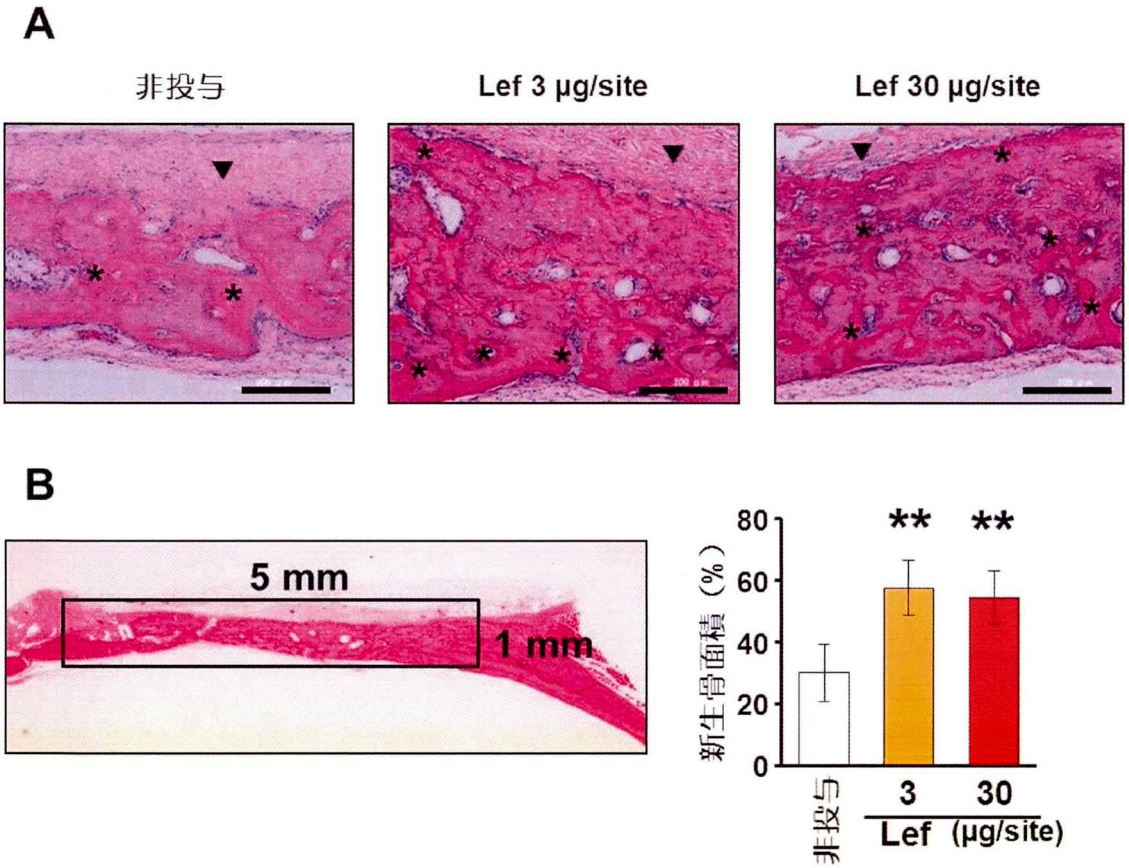

図 12：**Leflunomide** がラット頭蓋骨欠損における骨形成に及ぼす影響（組織切片標本）

頭蓋骨欠損ラット実験モデルにおける術後 3 週の組織切片 HE 染色像を用いて，Leflunomide（Lef）投与が欠損部の骨形成に及ぼす影響を評価した。（**A**）HE 染色像（Bar; 200 μm）。Lef（3 あるいは 30 μg）を投与した場合には，非投与の場合と比較して，形成された新生骨部に成熟した皮質骨を示すセメントライン（*）の存在が著明である。▼：残存しているコラーゲンスポンジ。（**B**）HE 染色像を用いて，骨欠損サイズに対応した面積（黒線の囲み）における新生骨の面積の割合を画像解析ソフトを用いて計測した（左図）。新生骨面積は，Lef（3 あるいは 30 μg）を投与することで，非添加の場合よりも有意に増加した。値は平均値および標準偏差 (n=10)，**: $P<0.001$（ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非投与）。

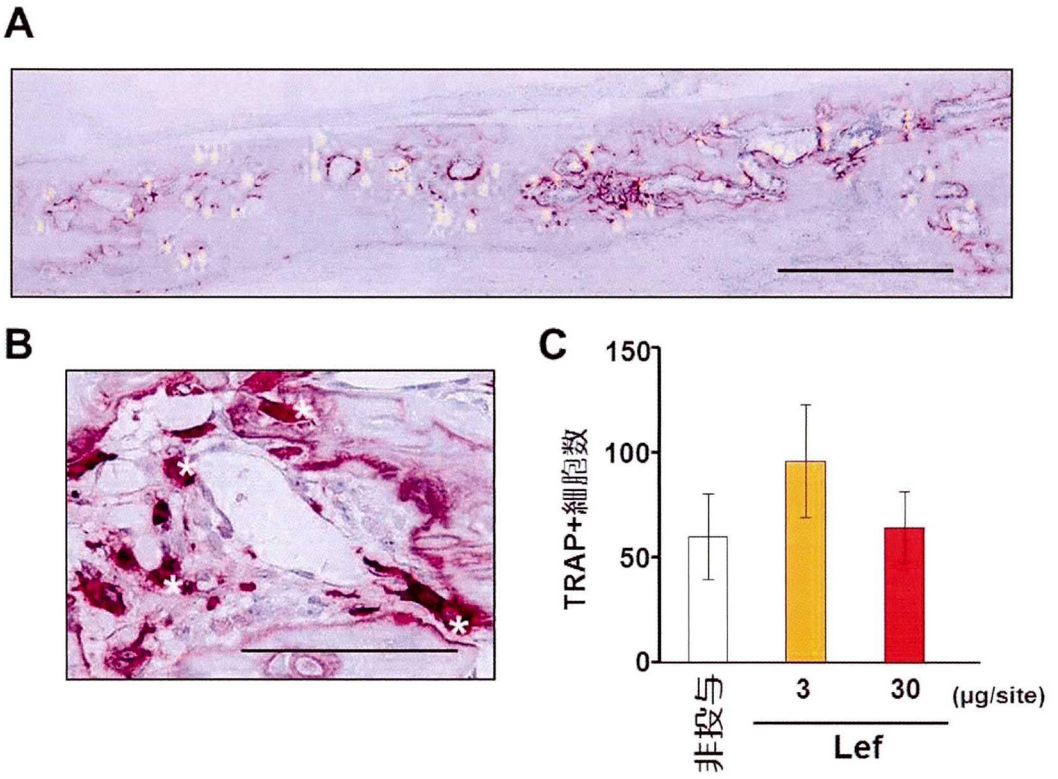

図 **13 : Leflunomide** がラット頭蓋骨欠損の新生骨部位における破骨細胞に及ぼす影響

頭蓋骨欠損ラット実験モデルにおける術後 3 週の組織切片 TRAP 染色像を用いて，Leflunomide（Lef）投与が欠損部の骨形成における破骨細胞に及ぼす影響を評価した。（**A**）形成した骨欠損部に相当する範囲の TRAP 染色像（Bar; 1 mm）。赤色の TRAP 陽性多核細胞（*）の数を計測した。（**B**）A の拡大像（Bar; 100 μm）。多核の破骨細胞が TRAP により染まっている（*）。（**C**）破骨細胞数は Lef（3 あるいは 30 μg）投与群と非投与群で有意な差を認めなかった。値は平均値および標準偏差 (n=3) （ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非投与）。

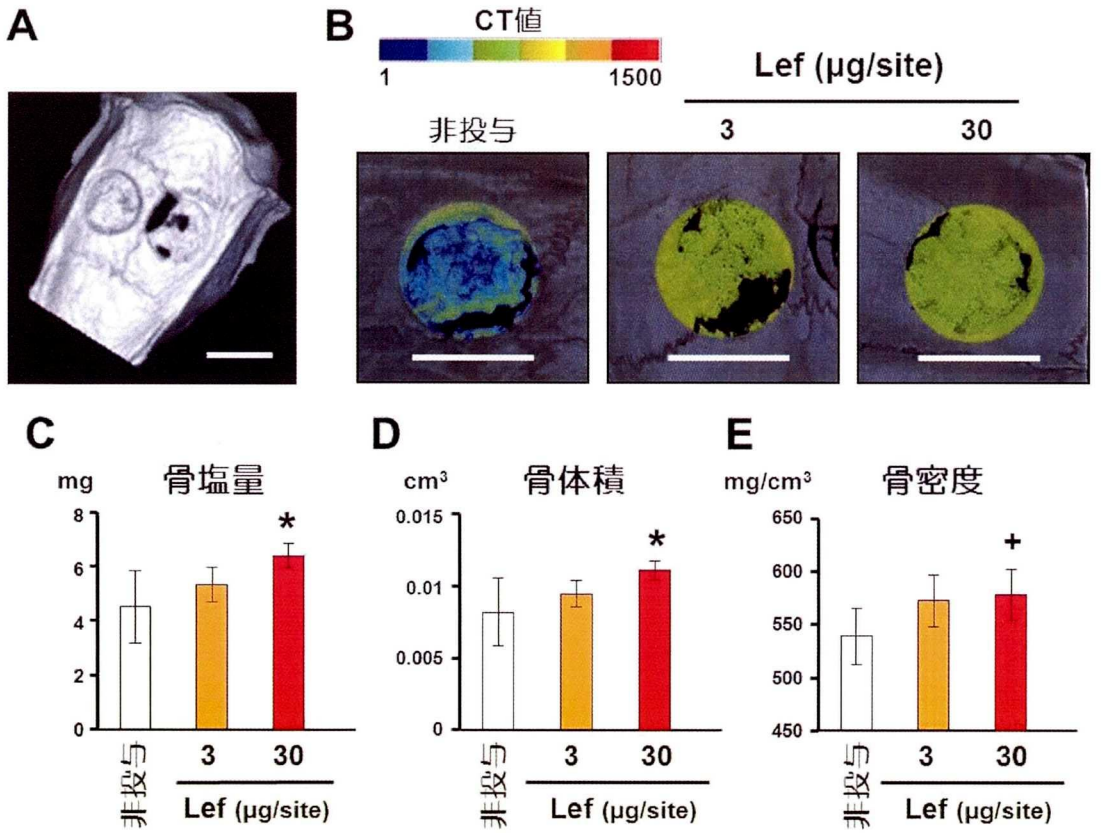

図 14：**Leflunomide** がラット頭蓋骨欠損における骨形成に及ぼす影響（マイクロ CT 解析）

頭蓋骨欠損ラット実験モデルにおける術後 3 週の頭蓋骨試料を用いてマイクロ CT 撮影を行い骨構造解析を行った。（**A**）摘出した頭蓋骨のマイクロ CT 撮影像（Bar; 5 mm）。（**B**）CT 値の階調スケール（上図）および頭蓋骨欠損部における CT 画像（下図：Bar; 5 mm）。Leflunomide（Lef：3 あるいは 30 μg）投与群は非投与群と比較して著明に高い CT 値を示している。（**C-E**）撮影した CT 画像に骨構造解析ソフトを用いて，骨塩量（**C**），骨体積（**D**），骨密度（**E**）を解析した。Lef（3 あるいは 30 μg）投与群における頭蓋骨欠損部の骨塩量，骨体積および骨密度は，非投与群と比較して濃度依存的に増加し，投与量 30 μg で有意な骨形成促進作用を示した。値は平均値および標準偏差 (n=7)，+: $P<0.05$，*: $P<0.01$（ANOVA, Dunnett multiple-comparison test vs. 非投与）。