

〔原 著〕

正常ヒト骨芽細胞におけるBMP産生に 及ぼすフェニトインの効果

小山 宏樹*, 中出 修*, 斎藤 隆史**, 賀来 亨*

*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

**北海道医療大学歯学部歯科保存学第二講座

*(主任: 賀来 亨教授)

** (主任: 松田 浩一教授)

Effects of phenytoin on synthesis of bone morphogenetic proteins (BMPs) in normal human bone cells in vitro

Hiroki KOYAMA*, Osamu NAKADE*, Takashi SAITO** and Tohru KAKU*

*Department of Oral Pathology,

**Department of Operative Dentistry and Endodontology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

*(Chief: Prof. Tohru KAKU)

** (Chief: Prof. Koichi MATSUDA)

Abstract

The present study was undertaken to examine the effect of phenytoin on the synthesis of bone morphogenetic proteins (BMPs). The effects of phenytoin on the gene expression of BMP-1-7 in normal human mandible-derived bone cells (HOB-M cells) were evaluated by the semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). While phenytoin increased the mRNA levels of BMP-2 in HOB-M cells, it failed to significantly affect the mRNA levels of other BMPs. The effects of phenytoin treatment on intracellular BMP-2 synthesis in HOB-M were assessed by immunocytochemistry and the effects on the secretion of BMP-2 were evaluated by dot blotting. Phenytoin significantly increased the intensity of immunocytological staining of BMP-2 and the secretion of BMP-2. Interestingly, the stimulatory effects of phenytoin on osteocalcin secretion were completely blocked by anti-human BMP-2 monoclonal antibody.

In conclusion, the present study indicates that the stimulatory effects of phenytoin on osteocalcin secretion in human bone cells are, at least, in part mediated by BMP-2.

Key words : phenytoin, bone morphogenetic proteins (BMPs), normal human bone cells, osteocalcin, RT-PCR.

緒 言

フェニトイン(phenytoin=5,5-diphenyl-2,4-imidazolidinedione),別名ジフェニルヒダントインあるいはダイランチン®は1938年MerrittとPutnam¹⁾によって抗てんかん薬として最初に報告されて以来,フェノバルビタールと並び最も広く使用されている薬剤である。フェニトインの副作用として歯肉増殖症^{2,3)},催奇形性⁴⁻⁶⁾および骨軟化症⁷⁾などが報告されている。一方,フェニトインの骨形成に対する有益な効果,すなわちosteogenicな作用を示唆する報告もいくつか報告されている⁸⁻¹⁰⁾。すなわちフェニトインを投与されている患者の頭蓋顔面骨においてその厚みやX線不透過性の増加が認められる⁸⁾。フェニトインを投与されている患者は,年齢を一致させたフェニトイン非投与群に比べ,歯槽骨の吸収の抑制が認められる⁹⁾。フェニトインはウサギの下顎骨骨折の治癒を促進させる¹⁰⁾などの報告である。近年,Nakadeら¹¹⁾は,フェニトインがin vitroにおいて正常ヒト骨芽細胞の細胞増殖および細胞分化の指標であるアルカリホスファターゼ活性,オステオカルシン産生およびtypeI collagen産生を増加させることを明らかにし,フェニトインのosteogenicな作用をin vitroにおいて裏付ける報告を行った。またOhtaら¹²⁾は成熟雄性ラットに0-150mg/kg/dayのフェニトインを毎日,腹腔内投与した結果,フェニトインがin vivoにおいて骨形成を刺激する作用があることを実験的に証明した。最近,Nakadeら¹³⁾により,その作用機序としてフェニトインのTGF- β のup-regulationを介した作用が示されたが,TGF- β は一般に骨芽細胞のオステオカルシンの産生を抑制する増殖因子¹⁴⁻¹⁶⁾であるのに対しフェニトインはオステ

オカルシンの産生を刺激することからTGF- β のup-regulationのみで説明されない点が残されている。本研究では,オステオカルシンの強力な産生因子として知られており,TGF- β スーパーファミリーに属すBone morphogenetic proteins(BMPs)が,フェニトインのosteogenicな作用における関わりが,あるか否かを明らかにすることを目的に計画された。

材料と方法

1. 材料

細胞培養器具はIwaki Glass (Funabashi, Japan) あるいはFalcon (Oxnard, CA, U.S.A)製のものを使用した。[³H]thymidineはNew England Nuclear (Danvers, MA, U.S.A)から購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (以下,DMEM),0.5% trypsin-5.3 mM EDTA溶液およびcollagenase, Oligo(dT) oligonucleotide, dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)はGIBCO/BRL Life Technologies (Grand Island, NY, U.S.A)製のものを使用した。Super Script II RNase H-reverse transcriptase および GAPDH, TGF- β_1 の primerはClone Tech Laboratories Inc. (Palo Alto, CA, U.S.A)から購入した。Iron supplemented bovine calf serum (以下,BCS)はJRH Biosciences社 (Lenexa, KS, U.S.A)から購入した。Penicillin GはMeiji-Seika Kaisha-Ltd (Tokyo, Japan)製のものをを用いた。Fungizoneは(Bristol-Myers Squibb KK., Tokyo, Japan)から購入した。Gentamicin, bovine serum albumin (以下,BSA), Triton-X100およびp-nitrophenyl phosphate (pNPP)はSigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A.)製のものを使用した。mouse anti-human

BMP-2 monoclonal antibodyはGenetic Institute(Boston, MA, U.S.A.)から供与された。ECL Western blotting analysis system, Nitrocellulose membraneはAmersham Life Science (Buckinghamshire, England) から購入した。Animal Injectible Grade rRNasinはPromega Biotech Co. (Madison, WI, U.S.A.)から購入した。horseradish peroxidase(以下, HRP) 標識anti-mouse IgG antibodyおよびdot blotting装置 (Bio Dot) はCosmo Bio (Tokyo, Japan) から購入した。Taq DNA polymerase, PICP-EIA assay kit, Osteocalcin-EIA assay kitはTakara (Ohtsu, Japan) から購入した。その他の実験材料はSigma Chemical Co.あるいはKanto Chemical Co. (Tokyo, Japan) から購入した。

2. 細胞培養

細胞は、交通事故による下顎骨骨折の修復手術の際に生じた余剰骨から、コラゲナーゼ消化法により分離され、骨芽細胞としての特性を備えたヒト下顎骨由来正常骨芽細胞(以下, HOB-M)で、継代3-6代のもを用いた^{13,17)}。培養液は10%BCS含有DMEMに抗生剤Penicillin G (100IU/ml), Gentamicin (50 μ g/ml) Fungizone (3 μ g/ml)を添加したものをを用い、100mm tissue culture dish内で培養した。培養条件は温度37°C, 湿度100%, 5%CO₂-95%空気的环境下で行い、細胞の継代には0.5%trypsin-5.3mM EDTA solutionをPBSで10倍希釈したものをを用い、confluentに達した時点で1:4の希釈率で継代培養した。

3. BMP-1-7のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響

フェニトインが HOB-M の BMP-1~7 の mRNA の遺伝子発現に与える影響をOgoseら¹⁸⁾の方法に準じた半定量的reverse transcrip-

Table 1 PCR primer sequence

Primer	Sequence(5'to 3'orientation)	Product size(bp)
Human BMP-1(3')	TCACAGCTGCACTTGTAGCTGCC	286
Human BMP-1(5')	TTGAGATTGAGCGCCACGACAGC	
Human BMP-2(3')	GCTGTACTAGCGACACCCAC	671
Human BMP-2(5')	TCATAAAACCTGCAACAGCCAACTGG	
Human BMP-3(3')	TCAAATGAGTTCTTTGCCAGGTTATC	330
Human BMP-3(5')	CGCCAGGAGATACTCAAGGTAGA	
Human BMP-4(3')	GCTGAAGTCCACATAGAGCGAGTG	346
Human BMP-4(5')	ACTGGTCCACCACAATGTGACAGC	
Human BMP-5(3')	CGGAGATAACTGTATGGGACGGAG	305
Human BMP-5(5')	GGAGACAATCATGTTCACTCCAG	
Human BMP-6(3')	CTGGGTAATAAGGCACTGGCATG	528
Human BMP-6(5')	GTGGTAATGGCTCTACCCAGTCC	
Human BMP-7(3')	AGGCCGTCTTCAGTACCCAGG	277
Human BMP-7(5')	TCCGATTCCCTGCCCAAGTG	
Human GAPDH(3')	TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT	983
Human GAPDH(5')	CATGTGGGCATGAGGTCCACCAC	
Human TGF- β 1(3')	GCCCTGGACACCACTATTGCT	161
Human TGF- β 1(5')	AGGCTCCAAATGTAGGGGCGAG	

tion polymerase chain reaction (以下, RT-PCR) 法により、短時間作用 (30分) から長時間作用 (24時間) について調べた。すなわち HOB-M を直径100mm の dish に sub-confluent になるまで培養し上記抗生剤添加0.01%BSA含有DMEM (0.01%BSA-DMEM) に交換、さらに24時間培養後、再度、新鮮な0.01%BSA-DMEMに交換し、直ちにフェニトインを0-50 μ M添加、さらに0.5, 1, 12, 24時間培養した。培養終了時にHOB-MをPBSにて洗浄後acid-guanidium-thiocyanate-phenol-chloroform (以下, AGTPC)法¹⁹⁾によりtotal RNAの抽出を行いRNAを逆転写酵素でcDNAに転換した後、PCRを行った。使用したBMP-1~7のPCR primerはOgoseら¹⁸⁾の方法に従い作製した。また内部標準として用いたGAPDHのプライマーおよび各々の sequence および PCR-product sizeはTable 1に示す。

4. BMP-2の免疫細胞化学的染色性に及ぼす影響

RT-PCR法によりコントロールにくらべ明

らかな違いが出たものはBMP-2のみであったため、抗ヒトBMP-2単クローン抗体(以下、抗ヒトBMP-2抗体)を用いた免疫細胞化学法によりフェニトインがHOB-MのBMP-2の免疫染色性に及ぼす影響をHatakeyamaら²⁰⁾の方法に従い検索した。すなわち滅菌cover glass上でHOB-Mを上記抗生剤血清添加培養液を用い24時間培養後、0.01%BSA-DMEMに交換した。さらに24時間培養後、フェニトインを0-50 μ M添加、さらに12, 24時間培養した。培養終了後95%エタノールにて30分間固定を行い、PBSにて3分間3回洗浄後、室温で10%ウサギ正常血清を用いて15分ブロッキングを行い、0.2%Tween 20添加PBSにて洗浄した後40倍希釈の抗ヒトBMP-2抗体を添加し4°Cで一晩incubateした。次に二次抗体のbiotin標識ウサギ抗マウスIgG抗体による反応を室温で30分間行いHRP標識ストレプトアビジンで5分間処理し、洗浄後DAB buffer tabletsを添加し、発色反応を行いヘマトキシリンにて核染し封入後、顕微鏡下で観察した。

5. BMP-2の培地中への分泌に及ぼす影響

フェニトインがHOB-MのBMP-2の培地中への分泌に及ぼす影響をドットブロッキング装置BIO DOTを用いたドットプロット法により検討した²¹⁾。まず抗体の特異性を確認するために、tris buffered saline(pH7.5)(以下、TBS)にて段階希釈したrhBMP-2(30, 15, 7.5, 0ng/ml)をドットプロットし抗原抗体反応を行った。HOB-Mをsub-confluentになるまで培養後、0.01%BSA-DMEMに交換、さらに24時間培養後、再度、新鮮な0.01%BSA-DMEMに交換した。直ちにフェニトインを0-50 μ M添加し48時間作用させた。ドットプロットする液量は各々細胞の蛋白量当たりで補正後、各々TBSにて段階希釈後ニトロセルロース膜に添加した。試料添加後、ニトロセルロース膜を1%BSA

-0.05% Tween 20添加TBS(以下、TTBS)によってブロッキング後、400倍希釈した抗ヒトBMP-2抗体を添加、室温にて2時間反応させた。その後TTBSにて3回洗浄し、10,000倍希釈二次抗体HRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体を室温で2時間反応させた。再びTTBSにて洗浄しECL法²²⁾によりBMP-2の抗原量をX線フィルム上に感光させた。

6. 抗BMP-2抗体存在下におけるフェニトインのオステオカルシン産生

フェニトインのオステオカルシン産生刺激作用におけるBMP-2の役割を明らかにする目的で抗ヒトBMP-2抗体存在下あるいは非存在下におけるフェニトインのオステオカルシン産生に及ぼす影響をオステオカルシン-EIA assay kitを用いて調べた。作用時間は48時間とした。すなわち48well-plateにHOB-Mを各well細胞数 3×10^4 の割合で播種、上記抗生剤血清添加培養液にて24時間培養した後、0.01%BSA-DMEMに交換、さらに24時間培養後、 10^{-8} M Vit. D₃含有0.01%BSA-DMEMに交換した。直ちに2 μ g/mlの抗ヒトBMP-2抗体あるいは、同濃度の正常マウス血清IgGを添加しフェニトインを濃度依存性に添加48時間培養した。なお、オステオカルシンの濃度は細胞蛋白量当りの値として算出し、細胞蛋白量はWieche-lmanら²³⁾の方法に準じ計測した。

7. 統計処理

コントロール群と実験群の有意差検定は、Student's-t検定により評価した。なお、危険率が0.05以下の場合を有意差ありとした。

結 果

1. BMP-1-7のmRNAの遺伝子発現に及ぼす影響

Table 2に示すようにHOB-Mはフェニトイ

ンを添加しない状態で、BMP-1,2,4,5のmRNAの発現がみられたが、BMP-3,6,7の発現は観察されなかった。Figure 1のように10~50 μM のフェニトインは30分作用でBMP-2のmRNAの発現を明瞭に増加させた。同様な作用は1時間作用においても観察された。しかしながら、BMP-2以外のBMPに対してはこのようなmRNAの発現を刺激する作用は認められなかった。同様に12時間、24時間と長時間作用させた場合においても、10~50 μM の範囲で、BMP-2の発現を非常に明瞭に増加させた (Figure 2, Table 3)。

Table 2 Summary of short term effect of phenytoin on gene expression of BMP-1~7 in HOB-M

(μM)	0	5	10	50	
BMP-1	+	+	+	+	0.5 or 1h
BMP-2	+	+	+++	++	0.5 h
BMP-2	+	++	++	+++	1h
BMP-3	-	-	-	-	0.5 or 1h
BMP-4	++	++	++	++	0.5 or 1h
BMP-5	+	+	+	+	0.5 or 1h
BMP-6	-	-	-	-	0.5 or 1h
BMP-7	-	-	-	-	0.5 or 1h

+: products were detected by 35 cycles of PCR
 ++: products were detected by 30 cycles of PCR
 +++: products were detected by 25 cycles of PCR

Table 3 Summary of long term effect of phenytoin on gene expression of BMP-1~7 in HOB-M

(μM)	0	5	10	50	
BMP-1	+	+	+	+	12 or 24h
BMP-2	+	+	++	++	12 or 24h
BMP-3	-	-	-	-	12 or 24h
BMP-4	++	++	++	++	12 or 24h
BMP-5	+	+	+	+	12 or 24h
BMP-6	-	-	-	-	12 or 24h
BMP-7	-	-	-	-	12 or 24h

+: products were detected by 35 cycles of PCR
 ++: products were detected by 30 cycles of PCR
 +++: products were detected by 25 cycles of PCR

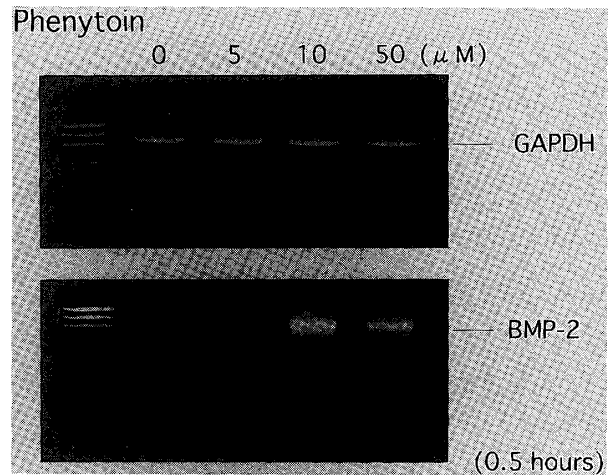


Figure 1 Mitogenic concentrations of phenytoin increased mRNA levels of BMP-2 in HOB-M in vitro (0.5 h-treatment). Figure shows detection of BMP-2 expression by 35 cycles of PCR.

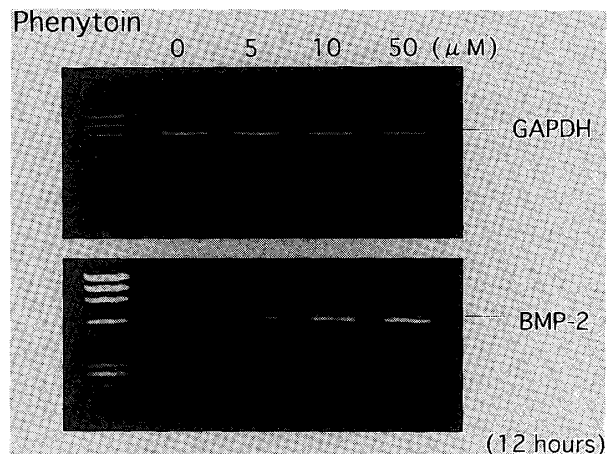


Figure 2 Phenytoin increased mRNA levels of BMP-2 in HOB-M in vitro (12 h-treatment). Figure shows detection of BMP-2 expression by 35 cycles of PCR.

2. BMP-2の免疫細胞化学的染色性に及ぼす影響

今回用いたBMP-2抗体は、ELISA法にて他のBMP3~7と交叉性のないこと、およびウエスタンブロット法にて明瞭なバンドの検出されることが報告されている²⁰⁾。24時間作用の10-50 μM のフェニトイン処置はHOB-MにおいてBMP-2の免疫細胞化学的局在を弱陽性 (0 μM) から強陽性へと増強させた (Figure 3)。

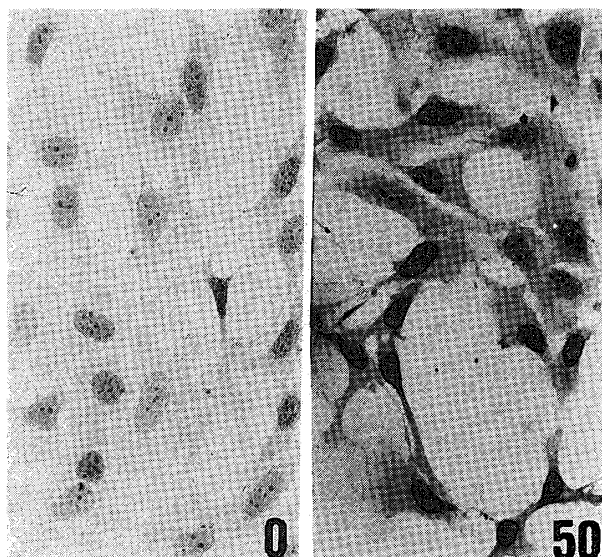


Figure 3 Phenytoin increased Immunocytochemical localization of BMP-2 in HOB-M (24 h-treatment).

しかしながら、5 μM のフェニトイン処置には0 μM との明らかな差は観察されなかった。同様の結果が12時間作用においても観察された。

3. BMP-2の培地中への分泌に及ぼす影響

段階希釈したrhBMP-2に比例してドットの

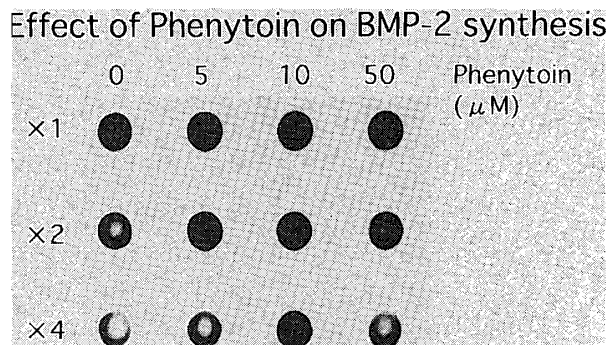


Figure 4 Dot blotting analysis indicated that phenytoin enhanced the BMP-2 secretion into the media in HOB (48 h-treatment).

濃淡は変化しており、抗体の特異性が認められた。48時間作用のフェニトイン無処置のメディア原液とフェニトイン10 μM のメディアを4倍希釈したものが、ほぼ同じBMP-2の濃度であった。ドットの濃淡をNIHイメージにて定量した結果、5および50 μM のフェニトインで約2倍、10 μM のフェニトインで約4倍のBMP-2の分泌の増加が観察された (Figure 4)。

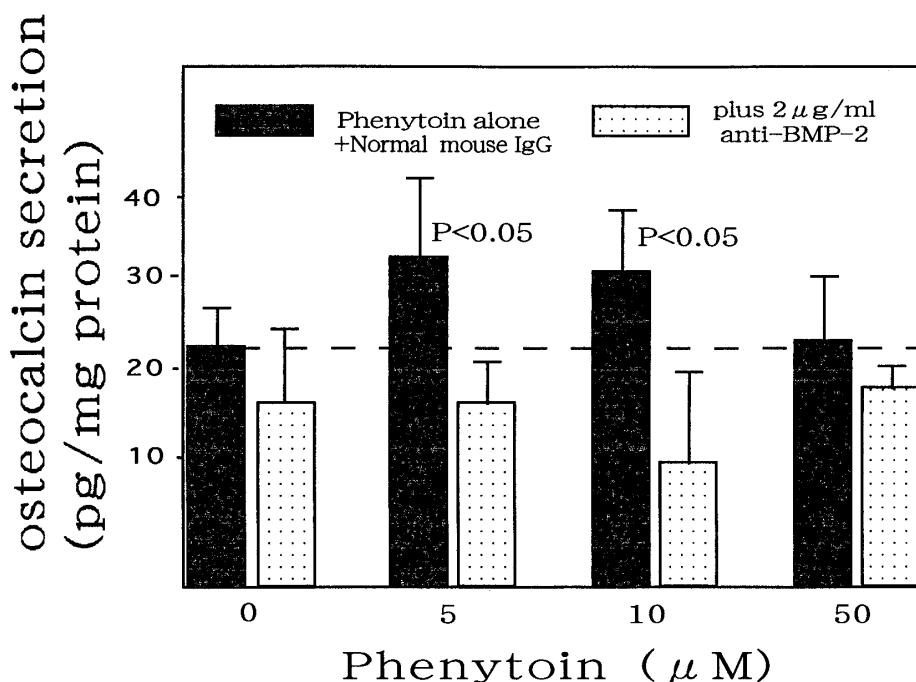


Figure 5 Anti-human BMP-2 antibody completely blocked the stimulated osteocalcin secretion by phenytoin in HOB-M.

4. BMP-2 産生上昇を介したフェニトインのオステオカルシン産生刺激効果

抗ヒトBMP-2抗体非存在下において48時間作用の5-50 μ Mフェニトイン処置は、オステオカルシン分泌を有意に約1.5倍まで増加させた。しかしながら、フェニトインが刺激したオステオカルシン分泌は抗ヒトBMP-2抗体存在下においてはほぼ完全にブロックされた (Figure 5)。

考 察

1. フェニトインの正常ヒト骨芽細胞におけるBMP-1~7のmRNAの遺伝子発現および蛋白合成に及ぼす影響

Nakadeら¹¹⁾は正常ヒト骨芽細胞においてフェニトインが種々の増殖因子のmRNAの発現に及ぼす影響を調べ、5-50 μ Mのフェニトインの短時間 (0.5h) から長時間 (24h) 投与によりTGF- β_1 のmRNAの発現が刺激されることを報告した。さらにNakadeら¹¹⁾はフェニトインがTGF- β の産生を蛋白レベルにおいても刺激し、さらにフェニトインによる正常ヒト骨芽細胞の細胞増殖およびALP活性の上昇は抗TGF- β 抗体存在下で完全にブロックされたことから、フェニトインのosteogenicな作用の少なく

とも一部は、TGF- β_1 のup-regulationを介したものであることを結論付けている。しかしながら、TGF- β_1 は一般に骨芽細胞のオステオカルシンの産生を抑制する増殖因子であること¹³⁻¹⁵⁾が知られているのに対し、フェニトインはオステオカルシンの産生を刺激することから、TGF- β_1 以外の因子の関与も考えられる。そこで本研究では、骨芽細胞の強力な分化促進因子であり、オステオカルシンの産生を刺激するBMPsに着目し、フェニトインがBMPsの産生を刺激するとの仮説を立て実験を行った。その結果、本研究ではフェニトインがBMPsのうちBMP-2のmRNAの発現および蛋白産生を刺激することを明らかにした。すなわちフェニトインが、正常ヒト骨芽細胞においてBMP-2のmRNAの発現を増加させること、免疫染色においてBMP-2の細胞内の発現増加させること、さらにドットプロット法において、BMP-2の培地中への分泌を促進することを明らかにした。そして本研究では抗BMP-2抗体存在下でフェニトインが増加させたオステオカルシン産生をブロックさせたことから、フェニトインによるオステオカルシン産生作用の少なくとも一部に、BMP-2のup-regulationが関与している可能性が示された。すなわちフェニトインの

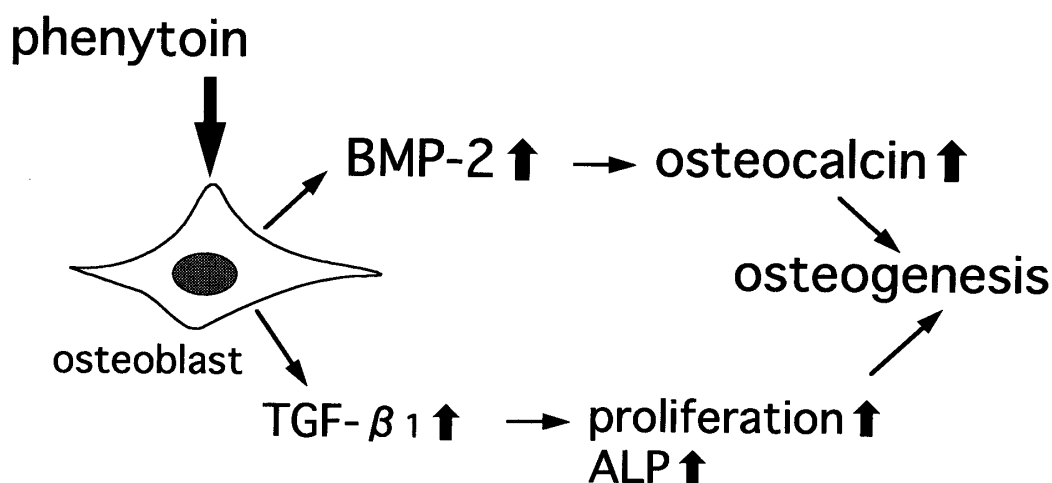


Figure 6 The proposed model of the osteogenic effects of phenytoin in normal human bone cells.

osteogenicな作用にはTGF- β_1 以外にBMP-2が関与している可能性を示した。

本研究では、フェニトインの骨芽細胞における作用について、Figure 6のような仮説の提唱を試みた。すなわち骨芽細胞はフェニトインを投与されると細胞増殖、ALP活性が刺激され、それはTGF- β_1 の産生上昇に関与していること、また同様にフェニトインを投与されると、オステオカルシンの産生が増加し、それはBMP-2の産生上昇によるということが示されたが、これら2種類の増殖因子の産生増加を介して骨形成に働くというものである。BMP-2はBMP-4, 7と並んでin vivoにおける骨形成促進作用²⁷⁻³⁰⁾が明らかにされている増殖因子であることから、本研究の結果はフェニトインの骨形成促進剤としての有用性をさらに裏付ける結果と考えられる。脳³¹⁾と同様に骨芽細胞にフェニトインのレセプターが存在するかどうかについては未だ明らかにされていないが、フェニトインのosteogenicな作用が骨芽細胞のレセプターを介した作用であるか否かについては今後、検討を要する課題と考えられる。

結 論

1. HOB-Mはフェニトインを添加しない状態で、BMP-1, 2, 4, 5のm-RNAの発現がみられたが、BMP-3, 6, 7の発現は、観察されなかった。
2. フェニトインは濃度依存性に短時間および長時間作用で、BMP-2のm-RNAの発現を増加させたが、それ以外のBMPに関しては明確な影響は認められなかった。
3. 10-50 μ MのフェニトインはHOB-MのBMP-2の免疫細胞化学的染色性を増加させた。
4. ドットプロット法による検索においても5-50 μ MのフェニトインはHOB-MのBMP-2の分泌を2~4倍に増加させた。
5. フェニトインによるオステオカルシンの産

生増加作用は抗BMP-2抗体存在下で、ほぼ完全にブロックされた。

謝 辞

本稿を終わるにあたり研究遂行に対して御理解、御協力下さいました北海道医療大学歯学部口腔病理学講座教室員の皆様に心より感謝致します。

文 献

1. Merritt HH, Putnam TJ: Sodium diphenyl hydantoinate in treatment of convulsive disorders. *JAMA* **111**: 1068-1073, 1938.
2. Klar LA: Gingival hyperplasia during Dilantin therapy. A survey of 321 patients. *J Public Health Dent* **33**: 180-185, 1973.
3. Hassell TM, Page RC, Narayanan AS, et al.: Diphenylhydantoin (Dilantin) gingival hyperplasia: drug-induced abnormality of connective tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* **73**: 2909-2912, 1976.
4. Bell RD, Pak CY, Zerwerkh J, et al.: Effect of phenytoin on bone and vitamin D metabolism. *Ann Neurol* **5**: 374-378, 1979.
5. Martz F, Failing C, Blake DA: Phenytoin teratogenesis: correlation between embryopathic effect and covalent binding of putative arene oxide metabolite in gestational tissue. *J Pharmacol Exp Ther* **203**: 231-239, 1977.
6. Schardelin JL, Dresner AJ, Hentz DL, et al.: The modifying effect of folic acid on diphenylhydantoin induced teratogenicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **24**: 150-158, 1973.
7. Hanson JW, Marianthopoulos NC, Harvey MA, Smith DW: Risks to the offspring of women treated with hydantoin anticonvulsants, with emphasis on the fetal hydantoin syndrome. *J Pediatr* **89**: 662-668, 1976.
8. Kattan KR: Calvarial thickening after dilantin medication. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* **110**: 102-106, 1970.
9. Seymour RA, Smith DG, Smith DG, et al.: The effects of phenytoin and sodium valproate on periodontal health of adult epileptic patients. *J*

- Clin Periodontol* **12** : 413-419, 1985.
10. Sklans S, Taylor RG, Shklar G : Effect of diphenylhydantoin sodium on healing of experimentally induced fractures in rabbit mandibles. *J Oral Surg* **25** : 310-319, 1967.
 11. Nakade O, Baylink DJ, Lau K-HW : Phenytoin at micromolar concentrations is an osteogenic agent for human mandible-derived bone cells in vitro. *J Dent Res* **74** : 331-337, 1995.
 12. Ohta T, Wergedal JE, Gruber HE, et al. : Low dose phenytoin is osteogenic agent in the rat. *Calcif Tissue Int* **56** : 42-48, 1995.
 13. Nakade O, Baylink DJ, Lau K-HW : Osteogenic actions of phenytoin in human bone cells are mediated in part by TGF- β 1. *J Bone Miner Res* **11** : 1880-1888, 1996.
 14. Breen EC, Ignatz RA, McCabe L, et al. : TGF- β alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype. *J Cell Physiol* **160** : 323-335, 1994.
 15. Pirskanen A, Jaaskelainen T, Maenpaa PH : Effect of transforming growth factor β 1 on the regulation of osteocalcin synthesis in human MG-63 osteosarcoma cells. *J Bone Miner Res* **9** : 1635-1642, 1994.
 16. Noda M : Transcriptional regulation of osteocalcin production by transforming growth factor-beta in rat osteoblast-like cells. *Endocrinol* **124** : 612-617, 1989.
 17. Wergedal JE, Baylink DJ : Characterization of cells isolated and cultured from human bone. *Proc Soc Exp Biol Med* **176** : 60-69, 1984.
 18. Ogose A, Motoyama T, Hotta T, Watanabe H : Expression of bone morphogenetic proteins in human osteogenic and epithelial tumor cells. *Pathol Int* **46** : 9-14, 1996.
 19. Chomczynski P, Sacchi N : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162** : 156-159, 1987.
 20. Hatakeyama S, Y Ohara-Nemoto, Kyakumoto S, Satoh M : Expression of morphogenetic protein in human adenocarcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Com* **190** : 695-701, 1993.
 21. Nakamura K, Tanaka T, Kuwahara A, et al. : Microassay for proteins on nitrocellulose filter using protein dye-staining procedure. *Anal Biochem* **148** : 311-319, 1985.
 22. Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, et al. : Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* **25** : 1531-1546, 1979.
 23. Wiechelman K, Braun R, Fitzpatrick J : Investigation of bicinchonin acid protein assay : identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* **175** : 231-237, 1988.
 24. Roem NW, Rodgers GH, Hatfield SM, et al. : An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* **142** : 257-265, 1991.
 25. Farley JR, Jorch UM : Differential effects of phospholipids on skeletal alkaline phosphatase activity in extracts, in situ, and circulation. *Arch Biochem Acta* **840** : 56-68, 1983.
 26. Suzuki R, Kobayashi M, Takiguchi T, et al. : Bone morphogenetic protein-2 enhances the expression of the osteoblast phenotypes in human periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts (abstract). *J Bone Miner Res* **10** (suppl 1) : T216, 1995.
 27. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA : Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242** : 1528-1533, 1988.
 28. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, et al. : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* **113** : 681-687, 1991.
 29. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, et al. : Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* **161** : 218-228, 1994.
 30. Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, et al. : Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Miner Res* **6** : 1373-1385, 1991.

31. Spero L : In situ molecular weight determination of rat brain (³H-phenytoin binding sites. *Can J Physiol Pharmacol* **63** : 515-516, 1985.
32. Hassell TM, Page RC : The major metabolite of phenytoin (Dilantin) induces gingival overgrowth in cats. *J Periodont Res* **13** : 280-282, 1978.
33. Lau K-HW, Nakade O, Baylink DJ : Phenytoin increase markers of osteogenesis for the human species in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metabol* **80** : 2347-2353, 1995.