

## 論文の内容の要旨

氏名：永 島 利 通

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名： p53 ノックアウトマウスにおける骨芽細胞の増殖能と骨再生能について

癌抑制遺伝子産物の p53 は細胞周期の停止、DNA の修復、代謝の阻害、老化の誘導およびアポトーシスの促進の他に、骨芽細胞の増殖と分化に影響を及ぼすことが知られている。例えば、p53 トランスジェニックマウスは大腿骨や椎骨の骨量が減少するのに対して、p53 ノックアウト (p53KO) マウスでは骨量が増加し、その結果、どちらのマウスも骨格形成に異常が生じる。また、p53KO マウスでは、間葉系幹細胞 (MSC) から骨芽細胞への分化が促進し、脛骨と椎骨の骨量が著しく増加する。これらの知見は p53 欠損が骨形成を促進させることを示すものであるが、p53 欠損が骨芽細胞の増殖と骨欠損の再生過程に如何なる影響を及ぼしているのかは、十分に解明されていない。そこで、本研究は p53KO マウスの骨芽細胞の増殖能と骨欠損部での骨再生能について野生型 (WT) マウスと比較検討した。

雌雄の p53 ヘテロマウスを交配することで p53KO マウスを得た。三種混合麻酔薬の深麻酔によって安楽死させた 6~8 週齢雄性 p53KO マウスの頭蓋冠を採取して、2 mg/ml collagenase と 0.25% trypsin の酵素処理によって、p53KO マウス骨芽細胞 (p53KO-OBs) と WT マウス骨芽細胞 (WT-OBs) を採取した。p53KO-OBs と WT-OBs をそれぞれ培養シャーレへ播種し、10% fetal bovine serum を含む  $\alpha$  MEM (10%FBS- $\alpha$  MEM) で 7 日間培養してから実験に供した。骨芽細胞の増殖能は、組織染色、proliferation assay, scratch test によって評価した。組織染色は細胞を 24-well plate に  $5 \times 10^3$  個/well の密度で播種し、0, 24, 48 時間の培養後、0.05% トルイジンブルーで染色した。また、proliferation assay は 96-well plate に  $4 \times 10^3$  個/well の密度で播種した細胞を 0, 24, 48 時間培養した後、cell proliferation kit を使用して計測した。Scratch test は CytoSelect 24-well wound healing assay kit を使用した。24-well plate に wound field insert を設置し、その上から細胞を  $1 \times 10^5$  個/well の密度で播種し、培養 6 時間後に insert を取りはずし、細胞の存在しない欠損面 (長さ 15 mm, 幅 1 mm) を形成した。培地交換後、0, 24, 48 時間培養し、ギムザ染色を施し、細胞による欠損被覆能を評価した。さらに、quantitative real-time RT-PCR (qPCR) によって cyclin A2, B1, E1 の遺伝子発現を調べた。RNA は NucleoSpin RNA Plus を利用して細胞から抽出した。10  $\mu$ g の RNA を鋳型にして PrimeScript reverse transcriptase によって cDNA を合成し、TB Green Premix Ex Taq II を含む反応液に加え、CFX connect system を利用して遺伝子を増幅後、CFX maestro software で相対的な発現レベルを算出した。一方、骨再生能を評価するために、6 週齢雄性 p53KO マウスと WT マウスを三種混合麻酔薬の腹腔内投与によって麻酔し、円形ドリルを付けたマイクロモーターで、大腿骨骨幹中央部に直径 1 mm, 深さ 0.7 mm の骨欠損を形成した。皮膚と筋を縫合後、0, 5, 7, 14, 21 日の大腿骨をマイクロ CT で撮影した。また、3, 5, 7 日に大腿骨を摘出し、固定・脱灰後、パラフィン包埋し、厚さ約 4  $\mu$ m の切片を作成した。脱パラフィンした切片は HE 染色と Runx2, osterix, sclerostin の一次抗体を使用して免疫組織化学染色を施した。さらに、3, 5, 7 日の欠損部から再生骨を含む組織を採取し、qPCR によって Runx2, osterix, sclerostin の発現レベルを調べた。破骨細胞の形成能を知るため、脛骨の骨髓から分離した単球/マクロファージを  $1.5 \times 10^5$  個/well の密度で 48-well plate に播種し、50 ng/ml macrophage-colony stimulation factor (M-CSF) を含んだ 10%FBS- $\alpha$  MEM で 2 日間培養した。その後、50 ng/ml M-CSF と 100 ng/ml receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand を含む培地に交換し、5 日間培養を続け、固定後、0.2% triton-X を含む phosphate buffer saline で 2 分間の透過処理を施し、tartrate-resistant acid phosphatase 染色キットによって破骨細胞を同定した。

トルイジンブルー染色および proliferation assay によって、p53KO-OBs は培養 48 時間で WT-OBs よりも約 2.3 倍高い増殖能を示した。また、scratch test では、培養 48 時間で p53KO-OBs は欠損面を完全に被覆したが、WT-OBs は非被覆面が存在していた。さらに、qPCR によって p53KO-OBs は WT-OBs よりも cyclin A2, B1, E1 の発現レベルが高いことが示された。マウス大腿骨欠損部の骨再生をマイクロ CT によって観察した結果、p53KO マウスと WT マウスともに 5 日まで再生骨の形成は確認できなかったが、7 日から欠損部の内側縁に沿って、再生骨が認められた。14 日以降、p53KO マウスの再生

骨量は多くなり、21日には欠損部のほとんどを覆った。この時の p53KO マウスの再生骨量は、WT マウスと比べて約 2.2 倍増加した。p53KO マウスと WT マウスの欠損部の骨再生過程を HE 染色で調べた結果、欠損形成 5 日で、WT マウスに MSC 様細胞の増加が見られたが、p53KO マウスはすでに骨芽細胞が形成した骨梁が観察できた。7 日になると、両マウスの再生骨の周囲には多くの骨芽細胞が存在したが、WT マウスでは p53KO マウスと異なり破骨細胞が観察できた。Runx2 と osterix の発現を比較した結果、欠損形成後 3 日で、両マウスの MSC 様細胞に Runx2 の発現が確認できた。5 日になると、Runx2 の発現は p53KO マウスの骨芽細胞に多く見られ、7 日になると p53KO マウスのほとんどの骨芽細胞に認められた。Osterix の発現は、5 日の p53KO マウスの骨芽細胞と骨細胞に多く認められ、7 日もほぼ同様な発現パターンを示した。欠損部から採取した組織における Runx2 と osterix の遺伝子発現レベルを比較すると、5 および 7 日で p53KO マウスは WT マウスよりも高かった。また、欠損形成後 7 日の sclerostin の発現を調べた結果、WT マウスでは再生骨の多くの骨細胞にその発現が見られたが、p53KO マウスでは少なかった。同じく 7 日の sclerostin の遺伝子発現も p53KO マウスは、WT マウスより低いレベルだった。両マウスの破骨細胞形成能について比較すると、WT マウスの単球/マクロファージからは多核で大型の破骨細胞が形成されたが、p53KO マウスの単球/マクロファージからは、単核または多核であるが小型の破骨細胞しか認められず、破骨細胞数も WT マウスの 1/3 ほどだった。以上の結果から次の結論を得た。

1. p53KO マウスの骨芽細胞増殖能は、WT マウスの骨芽細胞よりも高かった。
2. 骨再生による欠損部の閉鎖は、WT マウスと比較して p53KO マウスの方が早かった。
3. p53KO マウスの骨芽細胞には Runx2 と osterix の強い発現がみられた。
4. p53KO マウスの骨細胞は sclerostin の発現が極めて弱かった。
5. p53KO マウスの単球/マクロファージの破骨細胞形成能は低かった。