

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

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

永島 利通

(指導：外木 守雄 教授，二宮 禎 准教授)

概要

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などにおいて多くの機能を演じている。また，最近の研究から p53 が骨芽細胞の増殖と分化を制御している因子であることも明らかにされている。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減少を伴うのに対して，p53 ノックアウト (p53KO) マウスでは間葉系幹細胞 (MSCs) から骨芽細胞への分化を促進して骨量の増加が認められる。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，本研究では 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。

本実験では，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 マウスと WT マウスの頭蓋冠から，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。それぞれの細胞の増殖能は，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 に播種し，0，24，48 時間の培養後，トルイジンブルーで染色した。また，proliferation assay は 96-well plate に播種した細胞を 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。Wound field insert を設置した 24-well plate に細胞を播種し, 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を形成し, 0, 24, 48 時間培養後にギムザ染色を施し, 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, PrimeScript reverse transcriptase によって cDNA を合成した。TB Green Premix Ex Taq II を含む反応液に cDNA を混合し, CFX connect system を利用して遺伝子を増幅し, CFX maestro software で相対的な発現レベルを算出した。次に, 骨再生能を評価するために, 6 週齢雄性の p53KO マウスと WT マウスを三種混合麻酔薬によって麻酔し, 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 日の欠損部をマイクロ CT で撮影した。また, 欠損形成後 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 μ 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, 脛骨の骨髄から分離した単球/マクロ

ファージを 48-well plate に播種し、50 ng/ml macrophage-colony stimulation factor (M-CSF) を含んだ培地で 2 日間培養した。その後、50 ng/ml M-CSF と 100 ng/ml receptor activator of nuclear factor κ 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 で透過処理し、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 は非被覆面が見られた。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。次に、マイクロ CT によって大腿骨欠損部の骨再生を観察した結果、p53KO マウスと WT マウスともに 5 日まで再生骨はほとんど確認できなかったが、7 日になると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増え、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 マウスの約 2.2 倍であった。さらに、HE 染色で欠損部の骨再生過程を調べた結果、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 マウスでは、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多くの骨芽細胞が存在し、WT マウスでは p53KO マウスと異なり破骨細胞

が観察できた。免疫組織化学染色によって 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 WT マウスよりも 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 Runx2 の発現が認められた。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 WT マウスよりも p53KO マウスの方が高かった。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発現が見られたが、p53KO マウスでは少なかった。7 日の欠損部における sclerostin の遺伝子発現も p53KO マウスは、WT マウスよりも低いレベルだった。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、単核の破骨細胞または多核であるが小型の破骨細胞しか形成されず、その数も WT マウスの 1/3 ほどだった。

以上の結果から、p53KO マウスの骨欠損部では骨芽細胞の増殖が高まり、Runx2 と osterix の強い発現とともに骨芽細胞分化が促進し、逆に単球/マクロファージからの破骨細胞形成の阻害によって、骨再生が早まると考えられた。

本論文は、Journal of Bone and Mineral Metabolism に掲載予定の論文（p53 deficiency promotes bone regeneration by functional regulation of mesenchymal stromal cells and osteoblasts）を基幹論文とし、p53 欠損と破骨細胞形成の関係を示すデータ（図 9）を加えて総括したものである。

緒言

骨欠損の治癒過程は、炎症期、骨形成期、そしてリモデリング期に分類できる¹⁻³⁾。例えば外傷などの機械的な要因によって骨欠損が生じると、はじめに血腫が生じ、その後、炎症期になると肉芽組織の形成に続き、骨髄から欠損部へ間葉系幹細胞 (MSCs) が移動して増殖する。骨形成期では、MSCs から分化した前駆骨芽細胞は骨芽細胞へと成熟し、リン酸カルシウムが沈着するための骨の有機性基質を分泌しながら増殖する。その後、骨芽細胞は骨組織に封入されて骨細胞になり、骨組織の恒常性を維持するために働く。リモデリング期になると、骨の改造現象が起きる。すなわち破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が繰り返されることで、欠損部が完全に再生骨によって修復される。このうち骨形成期でみられる骨芽細胞の増殖と分化は、その後の骨基質の産生と石灰化の進行に影響を及ぼす重要な過程の一つとして考えられている³⁾。

現在まで、transforming growth factor (TGF), bone morphogenetic protein (BMP), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), そして vascular endothelial growth factor (VEGF) などが、骨芽細胞の増殖を促進させる因子として知られている²⁾。また、転写因子の runt-related transcription factor 2 (Runx2) と osterix は、MSCs から骨芽細胞への分化を促進し、骨芽細胞による骨基質の産生を増加させる³⁾。逆に Wnt/ β -catenin アンタゴニストの sclerostin は骨芽細胞の

増殖や骨基質の産生を抑制する⁴⁾。さらに、cyclin も骨芽細胞の増殖を早めることが報告されている⁵⁾。このように多くの研究によって骨芽細胞の増殖と分化を制御しているメカニズムは解明されつつあるが、骨欠損の修復過程において、骨芽細胞の増殖と骨再生を調節する全ての因子が同定された訳ではない。

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などにおいて重要な機能を演じている⁶⁾。また、最近の研究から p53 が骨芽細胞の増殖と分化を制御している因子であることも明らかにされている。例えば、p53 のトランスジェニックマウスは大腿骨や椎骨の骨量減少を伴うのに対して、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^{7,8)}。また、p53KO マウスでは、MSCs から骨芽細胞への分化と骨芽細胞の増殖が促進し、脛骨と椎骨の骨量が著しく増加する^{7,9)}。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 マウスから採取した骨芽細胞の増殖能と骨欠損修復能について野生型 (WT) マウスと比較検討した。

材料および方法

1. 実験動物

p53 ヘテロマウス¹⁰⁾は、理化学研究所バイオリソースセンターから供与された。雌雄の交配によって得られた p53KO マウスは、12 時間の明暗サイクル、恒温 (23°C) の環境下で飼育した。なお、同週齢の WT マウスと比較して p53KO マウスの骨格形態や行動に違いは認められなかった。飼育期間中は、ラット・マウス MF 固形飼料 (オリエンタル酵母工業, 東京) と水を自由に摂取させた。本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認 (承認番号: AP19DEN004-3, AP19DEN005-3) を得て、米国国立予防衛生研究所および国際疼痛学会のガイドライン¹¹⁾に従って、動物を処置した。また、全ての実験において、実験動物の苦痛軽減と使用動物数の低減に努めた。

2. 細胞の採取

三種混合麻酔薬 [4 mg/kg midazolam (サンド, 東京), 0.3 mg/kg medetomidine hydrochloride (日本全薬工業, 郡山), 5 mg/kg butorphanol tartrate (Meiji Seika ファルマ, 東京)] による過麻酔で安楽死させた 6~8 週齢雄性 p53KO マウスと WT マウスの頭蓋冠を採取し、細切後、2 mg/ml collagenase (富士フィルム和光純薬, 大阪) と 0.25% trypsin (Invitrogen, Waltham, MA, USA) を含んだ α minimal

essential medium (α MEM, 富士フィルム和光純薬) で, 37°C, 30 分間の処理をした。その後, 37°C, 20 分間の酵素処理を 4 回繰り返すことで, 細胞を採取した¹²⁾。細胞は, 10% fetal bovine serum (FBS, PAN Biotech, Aidenbach, Germany) と 1% antibiotic-antimycotic (Invitrogen) を含む α MEM (10%FBS- α MEM) で, 37°C, 5%炭酸ガス存在下で培養し, それぞれ p53KO マウス骨芽細胞 (p53KO-OBs) と WT マウス骨芽細胞 (WT-OBs) とした。培地交換は 2~3 日ごとに実施し, コンフルエントに達する前に実験に供した^{12,13)}。一方, MSC 様細胞は両マウスの大腿骨と脛骨の骨髓細胞から採取した。骨の両端を切除した後, α MEM を充填した注射シリンジを使用して, 切断面から骨髓細胞を押し流した。採取した骨髓細胞は培養シャーレに播種し, 10%FBS- α MEM で, 37°C, 5%炭酸ガス存在下で培養した。16 時間後に, 浮遊細胞を除去し, MSC 様細胞を含む付着細胞を p53KO マウス MSC 様細胞 (p53KO-MSCs) と WT マウス MSC 様細胞 (WT-MSCs) とした。また, これらの細胞に 100 ng/ml BMP-2 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を添加して培養し, 7 日目に RNA を抽出した。

3. 増殖能の評価

- 1) 形態学評価 : p53KO-OBs と WT-OBs, さらに p53KO-MSCs と WT-MSCs を 24-well plate に 5×10^3 個/well の細胞密度でそれぞれ播種し, 細胞が well に接

着しているのを確認できた時点を 0 時間とし、24 および 48 時間の培養後、10%中性緩衝ホルマリン（富士フィルム和光純薬）で固定し、0.05%トルイジンブルー溶液（富士フィルム和光純薬）で染色した。

- 2) Proliferation assay による評価：p53KO-OBs と WT-OBs, さらに p53KO-MSCs と WT-MSCs を 96-well plate に 4×10^3 個/well の細胞密度でそれぞれ播種し、細胞が well に接着しているのを確認できた時点を 0 時間とし、24 および 48 時間の培養後、20 μ l の反応溶液（cell proliferation kit, Biological Industries, Kibbutz, Israel）を加えた。2 時間、室温に静置した後、マイクロプレート吸光分光光度計（SpectraMax ABS Plus, モレキュラーデバイスジャパン, 東京）を使用して、波長 450 nm の吸光度を計測した。なお、波長 630 nm の吸光度で測定値を補正した。
- 3) Scratch test による評価：CytoSelect 24-well wound healing assay kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) を使用した。Wound field insert (Cell Biolabs) を設置した 24-well plate に、p53KO-OBs と WT-OBs を 1×10^5 個/well の細胞密度で播種し、培養 6 時間後に insert を取りはずし、欠損面（長さ 15 mm, 幅 1 mm）を形成した。培地を交換し、24 および 48 時間後に 10%中性緩衝ホルマリンで細胞を固定し、ギムザ染色を施し、p53KO-OBs と WT-OBs の欠損面の被覆能について比較した。

4) p53KO-MSCs と WT-MSCs の増殖能の評価 : CytoSelect 24-well cell migration assay kit (Cell Biolabs) を使用し 300 μ l の細胞浮遊液 (1×10^5 個) をトランスウェルチャンバー (孔径 : 8 μ m) に加え, 500 μ l の 10%FBS- α MEM を満たした 24-well plate に浸した。37°C で, 6, 12 時間のインキュベート後, 膜下面の細胞を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し, ギムザ染色を行ない, 細胞数を顕微鏡下で計数した。

4. 骨欠損の形成

6 週齢雄性 p53KO マウスおよび 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, メス (フェザー安全剃刃, 大阪) で大腿部の皮膚と筋を切開後, 骨膜を剥離して骨表面を露出させた。円形ドリルを付けたマイクロモーター (Tas-35LX, 松風, 京都) を使用して, 大腿骨骨幹中央部の後面から直径 1 mm, 深さ 0.7 mm の円筒状の骨欠損を形成した。なお, 切削の際は, 熱の影響を最小限に抑えるために, 生理的食塩液を注入した。骨欠損形成後は筋と皮膚をそれぞれ縫合した。

5. マイクロ CT 撮影

骨欠損形成後のマウスは 0, 5, 7, 14, 21 日目に, 三種混合麻酔薬の腹腔内投

与によって麻酔し，大腿骨の骨欠損部をマイクロ CT (R_mCT, リガク, 東京) で撮影した。撮影条件は，管電圧 100 kV, 管電流 $160 \mu\text{A}$, 撮影時間 2 分, および撮影倍率 10 倍とした。撮影データは，画像解析システム (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング, 東京) で分析した。欠損部を含む 1 mm 長の骨幹部の画像を抽出し，その部位に含まれる骨量を測定し，欠損形成直後 (0 日) の骨量との差によって再生骨量を算出した。また，欠損形成前的大腿骨の長さ，および骨幹中央部横断面の長径と短径もマイクロ CT によって測定した。

6. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と免疫組織化学染色

- 1) HE 染色 : p53KO マウスと WT マウスの大腿骨に骨欠損を形成後，3, 5, 7 日に大腿骨を摘出し， 4°C ，16 時間，4%パラホルムアルデヒドで固定した。10% EDTA 溶液に 2 週間浸漬して脱灰後，パラフィン包埋し，厚さ約 $4 \mu\text{m}$ の切片を作成した。パラフィン切片は，キシレンで脱パラフィン後，下降エタノールに浸漬させて親水性にした。切片をヘマトキシリン溶液 (武藤化学, 東京) とエオシン Y 溶液 (武藤化学) で染色した後，上昇エタノールで脱水，キシレンで透徹し，標本用封入剤 (MGK-S, 松浪硝子工業, 東京) で封入した。
- 2) 免疫組織化学染色 : 脱パラフィンした切片は 0.3%過酸化水素水によって，内因性ペルオキシターゼを失活させた。Phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後，

3% bovine serum albumin（富士フィルム和光純薬）によって室温で 60 分間、ブロッキングし、一次抗体のウサギ抗ヒト p53 ポリクロナール抗体（100 倍希釈, Abcam, Cambridge, UK）、ウサギ抗マウス osterix モノクロナール抗体（100 倍希釈, Abcam）、またはヤギ抗マウス sclerostin 抗体（100 倍希釈, R&D systems, Minneapolis, MN, USA）と 4°C で 16 時間、反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体として horseradish peroxidase（HRP）標識抗ウサギ IgG（ヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO, ニチレイバイオサイエンス, 東京）、または HRP 標識抗ヤギ IgG（200 倍希釈, Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Germany）と室温で 1 時間、反応させた。なお、一次抗体のマウス抗 Runx2 モノクロナール抗体（100 倍希釈, MBL, 東京）に対する二次抗体は、HRP 標識抗マウス IgG（ヒストファインマウスステインキット, ニチレイバイオサイエンス）を使用した。二次抗体と反応させた切片は洗浄後、ヒストファイン DAB 基質キット（ニチレイバイオサイエンス）によって、抗体結合部との反応性を可視化し、ヘマトキシリン溶液で対比染色を施した。切片は水洗後、上昇エタノールに浸漬させることで脱水し、キシレンで透徹後、標本用封入剤で封入した。

7. RNA 抽出と cDNA の合成

細胞からの RNA 抽出は、NucleoSpin RNA Plus (タカラバイオ, 草津) を使用した。一方, 骨欠損部位からの RNA 抽出は次のように行なった。欠損部の両端をメスで切除し, 歯科用探針 (ジーシーデンタルプロダクツ, 愛知) で, 再生骨を含む組織を欠損部から採取した。採取した組織は, lysis buffer (タカラバイオ) に浸漬して組織破碎装置 (TissueLyser II, キアゲン, 東京) によって粉碎後, NucleoSpin RNA Plus (タカラバイオ) を利用して RNA を抽出した。10 μ g の RNA を鋳型にして, PrimeScript reverse transcriptase (タカラバイオ) によって cDNA を合成した。

8. Standard RT-PCR (RT-PCR) と quantitative RT-PCR (qPCR)

RT-PCR では Thermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ) を使用し, GoTaq Green Master Mix (Promega, WI, USA) と混合した cDNA から次の条件で遺伝子を増幅した。p53 は, 94°C で 2 分間の反応後, 94°C, 30 秒, 60°C, 30 秒, 72°C, 60 秒を 35 回, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は 94°C で 5 分の反応後, 94°C, 30 秒, 58°C, 45 秒, 72°C, 60 秒を 23 回, それぞれ繰り返した。使用した p53 と GAPDH のプライマー配列を表 1 に示す。反応産物は, 臭化エチジウム含有 2%アガロースゲルで電気泳動後, UV トランスイルミネーター (BioDoc-It, UVP, Jena, Germany) で可視化した。

qPCR では p53, cyclin A2, cyclin B1, cyclin E1, alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN), osterix, Runx2, および sclerostin 遺伝子の相対的な発現レベルを検出した。TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ) を含む反応液に cDNA を混合し, CFX connect system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を利用して, それぞれの遺伝子を増幅した。反応条件は, 95°C で 180 秒の反応後, 95°C, 10 秒, 60°C, 30 秒を 40 回繰り返した。測定データは, CFX maestro software (Bio-Rad Laboratories) を使用して, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法によって数値化した¹⁴⁾。qPCR で使用したプライマーの塩基配列を表 2 に示す。

9. 破骨細胞形成能の検討

p53KO マウスと WT マウスから脛骨を採取し, 2. で述べた同様の方法で骨髓細胞を採取した。骨髓細胞は 50 ng/ml macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, 協和発酵, 東京) を加えた 10%FBS- α MEM で十分に懸濁した後, 培養プレートに播種し, 16 時間培養した。その後, 単球/マクロファージを含む非接着細胞を回収し, 1.5×10^5 個/well の細胞密度で 48-well plate へ播種し, 50 ng/ml M-CSF を加えた 10%FBS- α MEM で 2 日間の培養後, 50 ng/ml M-CSF と 100 ng/ml receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) (PeproTech, Cranbury, NJ, USA) を含む培地に交換した。培地交換は 2 日ごとに行ない, 5 日後に 10%中性緩衝

ホルマリンで細胞を固定して、0.2% triton-X を含む PBS で 2 分間、室温での透過処理後、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色キット（コスモバイオ，東京）を使用して破骨細胞を同定した。

10. 統計学的解析

統計分析は、GraphPad Prism 8（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を使用した。データ解析には、2つのグループ間の比較に、unpaired Student *t*-test を使用し、複数のグループ間の比較に、一次配置分散分析とチューキー検定を使用した。実験は、少なくとも3回繰り返し、結果を平均値と標準偏差で示し、有意差水準を $\alpha = 0.05$ とした。

結果

1. p53 の発現

p53KO-OBs と WT-OBs の p53 遺伝子とタンパク発現について調べた。図 1A, B に示すように、WT-OBs は p53 の遺伝子発現がみられたが、p53KO-OBs には認められなかった。同様に、WT-MSCs にも p53 が発現したが、p53KO-MSCs では検出できなかった。免疫組織化学染色によって、多くの WT-OBs の核に p53 が発現していたが、p53KO-OBs では観察できなかった (図 1C)。

2. p53 欠損が増殖能に与える影響

トルイジンブルー染色によって p53KO-OBs と WT-OBs の増殖能を比較した。その結果、培養 48 時間で p53KO-OBs は WT-OBs よりも多くの細胞が増殖し、培養面を埋めた (図 2A)。Proliferation assay によって増殖能を OD450 nm の吸光度として測定すると、培養 48 時間での p53KO-OBs は WT-OBs と比較して増殖能が約 2.3 倍高かった (図 2B)。また、WT-OBs に比べて p53KO-OBs の高い増殖能を scratch test によって確認した。すなわち、培養 24 時間では、p53KO-OBs は細胞欠損面の大部分を被覆したが、WT-OBs は欠損面が広く残っていた。培養 48 時間でも WT-OBs による欠損面の被覆は不完全であったが、p53KO-OBs は完全に被覆した (図 2C)。さらに、細胞周期に関連する cyclin 遺伝子の発現レベル

を両細胞で比較した結果、培養 24 時間で、p53KO-OBs の cyclin A2, B1, E1 の発現レベルが WT-OBs よりも高かった (図 3)。

3. マイクロ CT による欠損部での骨再生の評価

骨欠損形成前の p53KO マウスと WT マウスの大腿骨の長さ、骨幹中央部横断像における長径と短径には、大きな違いは認められなかった (表 3, 図 4A)。大腿骨に欠損形成後 0, 5, 7, 14, 21 日の骨再生過程を比較したマイクロ CT 画像を図 4B に示す。両マウスともに 5 日まで、ほとんど再生骨の形成は観察できなかったが、7 日から欠損部の内側縁に沿って、再生骨が確認できた。14 日には、p53KO マウスの欠損部の大部分が再生骨によって埋められたが、WT マウスは p53KO マウスの半分程だった。21 日の p53KO マウスの欠損部は完全に再生骨で埋められたが、WT マウスは未だ不完全であり、欠損領域が残っていた。両マウスの再生骨量を計測した結果、7 日以降、p53KO マウスの骨量は徐々に増加し、21 日では、WT マウスよりも約 2.2 倍高い値を示した (図 4C)。

4. HE 染色による骨再生についての組織学的検討

大腿骨欠損部での骨再生の形態学的違いを HE 染色によって調べた (図 5A, B)。p53KO マウスと WT マウスともに欠損形成後 3 日に、細長い細胞質と類円

形の核を有した MSC 様細胞が肉芽組織の内部に散見できた。5 日には、WT マウスの MSC 様細胞の増加が見られたが、p53KO マウスでは、すでに骨芽細胞による骨梁形成が生じており、その内部には骨細胞が確認できた。7 日になると、両マウスの欠損部には、明瞭な骨梁形成が見られ、その辺縁に骨芽細胞と骨小腔内に骨細胞が多数確認できた。一方、p53KO マウスではほとんど見られなかった破骨細胞が WT マウスでは一部に観察できた (図 5A)。

5. 免疫組織化学染色と qPCR による検討

p53KO マウスと WT マウスの大腿骨欠損部における Runx2 と osterix の発現について比較した (図 6A, B)。3 日の欠損部を見ると、Runx2 の発現は両マウスとも MSC 様細胞に確認できたが、5 日になると p53KO マウスの骨芽細胞に認められた。7 日においても WT マウスに比べて p53KO マウスの骨梁周辺に分布する多くの骨芽細胞と骨細胞に Runx2 が認められた (図 6A)。Osterix は 5 日の WT マウスの骨芽細胞で少なかったが、p53KO マウスの方が多く、骨を形成している骨芽細胞にその発現が認められた。7 日での osterix の発現は p53KO マウスの方が多く、骨梁周辺の骨芽細胞と骨小腔内の骨細胞に発現が確認できた (図 6B)。

欠損部から採取した組織の 5 日と 7 日における Runx2 と osterix の遺伝子発現は、WT マウスに比べて p53KO マウスで高いレベルを示し、Runx2 は 5 日で約

1.7 倍, 7 日では約 1.5 倍, *osterix* は 5 日で約 5.0 倍, 7 日では約 2.1 倍増加した (図 6C)。また, MSC 様細胞と骨芽細胞に見られる Runx2 陽性細胞と *osterix* 陽性細胞の割合を比較した結果, どちらも 5 日で p53KO マウスは WT マウスよりも高い値を示した (図 6D)。

増殖した骨芽細胞は最終分化を遂げて骨細胞になる¹⁵⁾。骨細胞は *sclerostin* を産生することで骨芽細胞の増殖を抑制することから¹⁶⁾, *sclerostin* の発現を p53KO マウスと WT マウスで比較検討した。欠損形成後 7 日で, WT マウスの骨梁内の骨細胞に *sclerostin* の発現がみられたが, p53KO マウスではその発現は極めて弱かった (図 7A)。両マウスの欠損部から採取した組織における *sclerostin* の遺伝子レベルを比較すると, 5 日では差はなかったが, 7 日になると WT マウスよりも p53KO マウスの方が有意に低かった (図 7B)。同様に p53KO マウスの骨細胞に含まれる *sclerostin* 陽性細胞数は WT マウスよりも少なかった (図 7C)。

6. p53 が *in vitro* の MSC 様細胞の細胞機能に与える影響

p53KO-MSCs と WT-MSCs の運動能を比較した。培養 12 時間で, p53KO-MSCs は WT-MSCs よりも多くの細胞がチャンバー内に設置した膜を通過したことが確認できた (図 8A)。この時の細胞数を比較すると KO-MSCs は WT-MSCs よりも約 1.8 倍高い値を示した (図 8B)。また, 48 時間の細胞増殖能は, WT-MSCs

より p53KO-MSCs の方が高く、cyclin A2, B1, E1 の遺伝子発現も増加した (図 8C~E)。BMP-2 を添加すると、7 日で p53KO-MSCs は WT-MSCs よりも ALP が約 5.0 倍、osterix が約 2.1 倍、OCN が約 4.5 倍増加した (図 8F)。

7. p53 が破骨細胞形成に与える影響

HE 染色によって、p53KO マウスで観察できなかった破骨細胞が WT マウスで出現したことから (図 5A)、両マウスの破骨細胞形成能について比較した。WT マウスの単球/マクロファージから TRAP 陽性の破骨細胞が多く形成されたが、p53KO マウスでは少なかった (図 9A)。WT マウスの破骨細胞は多核の大型細胞が大部分を占めていたが、p53KO マウスは単核または多核の小型細胞だった (図 9B)。破骨細胞の数を比較すると、p53KO マウスは WT マウスの約 1/3 し
か形成されなかった (図 9C)。

考察

p53KO-OBs が WT-OBs よりも高い増殖能を示したことから、p53KO-OBs の細胞周期の進行が促進している可能性が考えられた。そこで、cyclin A2, B1, E1 の発現レベルを調べた。細胞周期の進行は cyclin-dependent kinases (CDKs) が cyclin と相互作用することで速まり、細胞の増殖能を高める⁵⁾。例えば、CDK1 は cyclin

B1 と結合することによって M 期の有糸分裂を活性化する¹⁷⁾。また、CDK2 は cyclin A2 と cyclin E1 に結合し、S 期の DNA 複製と G1 期から S 期の移行をそれぞれ促進する^{18,19)}。p53KO-OBs は、WT-OBs と比べて、特に cyclin A2 の発現レベルが高いことから、p53 欠損が骨芽細胞の S 期での DNA 複製を速め、培養 24 時間以降の増殖能の増加に繋がったと考える。

今回、p53KO-OBs と WT-OBs の *in vitro* の細胞増殖能を scratch test によって検討した。その結果、WT-OBs よりも p53KO-OBs が早期に欠損面を被覆したことは、p53KO-OBs のもつ高い増殖能によると考えられる。ただし、p53KO-OBs の増殖能は、単に細胞周期の亢進だけでなく、PI3K-Akt シグナルの活性化が関わっている可能性がある。例えば、ヒト骨肉腫由来株化細胞の MG63 に p53 を過剰発現させると、PI3K と Akt のリン酸化抑制と増殖能が低下する^{20,21)}。これらの報告は、p53 が PI3K-Akt シグナル経路を阻害し、細胞増殖を抑制することを意味するもので、p53KO-OBs についても p53 欠損が PI3K のリン酸化を促進し、PI3K-Akt シグナルを活性化することによって、細胞増殖が促進した可能性がある。また、scratch test は増殖能に加え、細胞の移動能も同時に評価できる²²⁾。骨芽細胞の移動能が阻害されると、骨形成能は低下するため²³⁾、p53KO-OBs が示した WT-OBs よりも高い移動能は、欠損面での骨形成の促進と関係すると考えられる。この移動能も PI3K-Akt シグナルの進行によって活性化されるため²⁴⁾、

p53 欠損と PI3K のリン酸化について今後検討する必要がある。

マイクロ CT 撮影によって WT マウスよりも p53KO マウスの欠損部に多くの再生骨が確認できたことから、p53KO-OBs の高い増殖能と欠損部の骨再生能には相関があることが示された。なお、骨欠損形成後 5 日に注目した場合、今回用いた撮影条件でのマイクロ CT 画像では再生骨は検出できなかったが、HE 染色では p53KO マウスに明瞭な骨梁形成が観察できた。

HE 染色によって p53KO マウスと WT マウスの骨欠損形成後 3 日に肉芽組織の増殖と、その内部に MSCs に類似した形態をもつ MSC 様細胞の存在が確認できた。骨髄中には、血球系細胞やストローマ細胞が存在しており、ストローマ細胞の約 20%が MSCs であるという報告がある^{25,26)}。今回、観察された MSC 様細胞が MSCs であることを証明するには、幹細胞マーカーの発現と骨芽細胞や脂肪細胞などへの multipotential な分化能を持つことを証明しなければならない。骨髄 MSCs の本来の特性を知るためにも、p53KO マウスの骨髄細胞から MSCs を分離し、欠損部における骨芽細胞分化について詳細な検討を加える必要がある。

免疫組織化学染色によって、p53KO マウスの骨欠損作成後 5, 7 日に Runx2 と osterix の強い発現が確認できた。Runx2 は MSCs から骨芽細胞への分化段階で発現し、また osterix は骨芽細胞から骨細胞への分化段階で強い発現を示す^{4,27)}。

今回、欠損部の骨再生過程で見られた Runx2 と osterix の発現は、MSCs から骨芽細胞、さらに骨細胞へ分化する際の発現パターンにほぼ合致しており、Runx2 は MSC 様細胞と骨芽細胞に、また osterix は骨芽細胞と骨細胞に強い発現が認められた。しかし、p53 欠損がどのような機構で Runx2 と osterix の発現に影響を及ぼしているのかは明らかにされていない。p53 欠損が Runx2 を介した MSCs の骨芽細胞分化を促進し²⁸⁾、OCN などの骨基質タンパクの産生を増加させることが知られている⁹⁾。また、Runx2 は osterix のプロモーター活性も促進させる²⁷⁾ことから、p53KO マウスの骨欠損修復では、肉芽組織内の MSC 様細胞に Runx2 の発現が誘導され、前駆骨芽細胞を経て、osterix の発現増加を示す骨芽細胞へ分化したと考える。このことは、Runx2 を発現している MSC 様細胞が骨髄由来 MSCs であることを強く支持するものである。

p53KO マウスの欠損部の骨再生過程で、骨細胞に sclerostin の発現低下が確認できた。Sclerostin を欠失したマウスは骨硬化症に似た特徴をもち、高い骨密度の骨を形成する²⁹⁾。p53KO マウスは WT マウスよりも約 1.3 倍高い骨密度を示すことから²⁷⁾、p53 欠損が直接あるいは間接的に sclerostin の発現を抑制している可能性がある。実際に sclerostin は骨芽細胞の機能を促す Wnt/ β -catenin シグナルのアンタゴニストとして働くため³⁰⁾、p53KO マウスの骨細胞に見られた sclerostin の発現減少が骨芽細胞の Wnt/ β -catenin シグナルを活性化することで

骨形成を促し、骨量の増加に繋がったと考える。

WT マウスに比べて、p53KO からの単球/マクロファージは破骨細胞形成能が低かった。RANKL 刺激によって単球/マクロファージが破骨細胞に分化するためには、細胞周期が停止していなければならない³¹⁾。つまり、WT マウスに比べて単球/マクロファージの細胞周期の進行が促進している p53KO マウスでは、破骨細胞の形成能が低下していると考えられる。また、骨細胞の sclerostin の発現減少は、骨芽細胞における RANKL のおとり受容体である osteoprotegerin の発現を増加させるため^{4,32)}、このことが p53KO マウスの破骨細胞形成が阻害された原因の一つであると言える。p53KO マウスで観察された破骨細胞は WT マウスよりも小型だったことから、骨吸収活性も WT マウスの破骨細胞よりも低いことが示唆される³³⁾。

本研究では、p53KO マウスの大腿骨に形成した骨欠損において、骨芽細胞の増殖能が高まり、骨再生が促進することを示した。p53 は腫瘍細胞の増殖や浸潤を抑制する機能を持ち、また p53 の欠損は骨硬化症との関係もあることから、p53 を抑制することに焦点を当てた骨疾患の治療法の開発は難しいとされる。しかし、近年、siRNA の導入による標的遺伝子の mRNA を一過性に抑制する技術が広まっている³⁴⁾。局所的な骨損傷で、p53 siRNA の適用が可能になれば、早期回復も期待できるであろう。

結論

p53KO マウスの骨芽細胞の増殖能を調べるとともに、大腿骨骨幹中央部に円形の骨欠損を形成し、骨再生について検討した結果、以下の結論を得た。

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。

以上のことから、p53KO マウスの骨欠損部では骨芽細胞の増殖が高まり、Runx2 と osterix の発現増加とともに骨芽細胞分化が促進し、逆に単球/マクロファージからの破骨細胞形成の阻害によって、骨再生が早まると考えられた。

本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

謝辞

画像解析システムを使用するにあたり御協力いただいた東京歯科大学口腔科学
学研究センター 溝口利英准教授に謹んで深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Shapiro F (2008) Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cells Mater* 15, 53-76.
- 2) Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, Rodriguez EK, Nazarian A (2017) Bone fracture healing in mechanobiological modeling: a review of principles and methods. *Bone Reports* 6, 87-100.
- 3) Pérez-Campo FM, Santurtún A, García-Ibarbia C, Pascual MA, Valero C, Garcés C, Sañudo C, Zarrabeitia MT, Riancho JA (2016) Osterix and Runx2 are transcriptional regulators of sclerostin in human bone. *Calcif Tissue Int* 99, 302-309.
- 4) Weivoda MM, Youssef SJ, Oursler MJ (2017) Sclerostin expression and functions beyond the osteocyte. *Bone* 96, 45-50.
- 5) Bertoli C, Skotheim JM, De Bruin RAM (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 518-528.
- 6) Hafner A, Bulyk ML, Jambhekar A, Lahav G (2019) The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 199-210.
- 7) Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Sang HP, Thompson T, Karsenty G, Bradley A,

- Donehower LA (2002) p53 mutant mice that display early aging-associated phenotypes. *Nature* 415, 45-53.
- 8) Velletri T, Huang Y, Wang Y, Li Q, Hu M, Xie N, Yang Q, Chen X, Chen Q, Shou P, Gan Y, Candi E, Margherita AP, Agostini M, Yang H, Melino G, Shi Y, Wang Y (2021) Loss of p53 in mesenchymal stem cells promotes alteration of bone remodeling through negative regulation of osteoprotegerin. *Cell Death Differ* 28, 156-169.
- 9) Artigas N, Gámez B, Cubillos-Rojas M, Sánchez-de Diego C, Valer JA, Pons G, Rosa JL, Ventura F (2017) p53 inhibits sp7/osterix activity in the transcriptional program of osteoblast differentiation. *Cell Death Differ* 24, 2022-2031.
- 10) Tsukada T, Tomooka Y, Takai S, Ueda Y, Nishikawa S, Yagi T, Tokunaga T, Takeda N, Suda Y, Abe S, Matsuo I, Ikawa Y, Aizawa S (1993) Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. *Oncogene* 8, 3313-3322.
- 11) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 12) Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Takahashi M, Nakamura H (2009) Formation of bone-like mineralized matrix by periodontal ligament cells *in vivo*: a

- morphological study in rats. *J Bone Miner Metab* 27, 149-157.
- 13) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
 - 14) Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408.
 - 15) Bonewald LF, Johnson ML (2008) Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 42, 606-615.
 - 16) Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T (2017) Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone* 96, 29-37.
 - 17) Yang Y, Xue K, Li Z, Zheng W, Dong W, Song J, Sun S, Ma T, Li W (2018) c-Myc regulates the CDK1/cyclin B1 dependent-G2/M cell cycle progression by histone H4 acetylation in Raji cells. *Int J Mol Med* 41, 3366-3378.
 - 18) Cascales HS, Burdova K, Middleton A, Kuzin V, Müllers E, Stoy H, Baranello L, Macurek L, Lindqvist A (2021) Cyclin A2 localises in the cytoplasm at the S/G2 transition to activate PLK1. *Life Sci Alliance* 4, 1-15.
 - 19) Chen R, Chen Y, Yuan Y, Zou X, Sun Q, Lin H, Chen X, Liu M, Deng Z, Yao Y,

- Guo D, Zhang Y (2020) Cx43 and AKAP95 regulate G1/S conversion by competitively binding to cyclin E1/E2 in lung cancer cells. *Thorac Cancer* 11, 1594-1602.
- 20) Liu X, Xiao M, Zhang L, Li L, Zhu G, Shen E, Lv M, Lu X, Sun Z (2021) The m6A methyltransferase METTL14 inhibits the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *J Clin Lab Anal* 35, 1-10.
- 21) Song R, Tian K, Wang W, Wang L (2015) p53 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of osteosarcoma through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Int J Surg* 20, 80-87.
- 22) Martinotti S, Ranzato E (2020) Scratch wound healing assay. *Methods Mol Biol* 2109, 225-229.
- 23) Smriti Aryal AC, Miyai K, Izu Y, Hayata T, Notomi T, Noda M, Ezura Y (2015) Nck influences preosteoblastic/osteoblastic migration and bone mass. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 15432-15437.
- 24) Johnson HE, King SJ, Asokan SB, Rotty JD, Bear JE, Haugh JM (2015) F-actin bundles direct the initiation and orientation of lamellipodia through adhesion-based signaling. *J Cell Biol* 208, 443-455.

- 25) Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834.
- 26) Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ (2014) Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 15, 154-168.
- 27) Komori T (2006) Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99, 1233-1239.
- 28) Lengner CJ, Steinman HA, Gagnon J, Smith TW, Henderson JE, Kream BE, Stein GS, Lian JB, Jones SN (2006) Osteoblast differentiation and skeletal development are regulated by Mdm2-p53 signaling. *J Cell Biol* 172, 909-921.
- 29) Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C (2008) Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 23, 860-869.
- 30) Tanaka S, Matsumoto T (2021) Sclerostin: from bench to bedside. *J Bone Miner*

- Metab 39, 332-340.
- 31) Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N (2009) Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors *in vivo*. J Cell Biol 184, 541-554.
- 32) Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, Kobayashi Y, Furuya Y, Yasuda H, Fukuda C, Tsuda E (2021) Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. J Bone Miner Metab 39, 19-26.
- 33) Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T (2005) DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. J Exp Med 202, 345-351.
- 34) Sardh E, Harper P, Balwani M, Stein P, Rees D, Bissell DM, Desnick R, Parker C, Phillips J, Bonkovsky HL, Vassiliou D, Penz C, Chan-Daniels A, He Q, Querbes W, Fitzgerald K, Kim JB, Garg P, Vaishnav A, Simon AR, Anderson KE (2019) Phase 1 trial of an RNA interference therapy for acute intermittent porphyria. N

Engl J Med 380, 549-558.

図の説明

図 1 p53 の遺伝子およびタンパク発現

A : p53KO-OBs, WT-OBs, p53KO-MSCs, WT-MSCs の p53 発現を RT-PCR で調べた。B : p53KO-OBs, WT-OBs, p53KO-MSCs, WT-MSCs の p53 発現を qPCR で比較した。C : p53KO マウスと WT マウスの免疫組織化学染色による p53 の発現, 矢印は骨芽細胞, 矢頭は骨細胞を示す (スケールバー : $30 \mu\text{m}$)。* $p < 0.01$ (versus WT-OBs), 統計学解析は, unpaired Student *t*-test を使用した ($n = 5$)。

図 2 増殖能の比較

A : p53KO-OBs と WT-OBs のトルイジンブルー染色 (スケールバー : $300 \mu\text{m}$),
B : proliferation assay による p53KO-OBs と WT-OBs の増殖能の比較, * $p < 0.01$ (versus WT 細胞), 統計学解析は, unpaired Student *t*-test を使用した ($n = 5$),
C : scratch test による p53KO-OBs と WT-OBs の増殖能の比較, 骨芽細胞の培養面に欠損 (長さ 15 mm, 幅 1 mm) を作成し, 欠損面局所における骨芽細胞の増殖能を比較した (スケールバー : 1 mm)。

図 3 Cyclin の遺伝子発現レベルの比較

培養 24 時間での p53KO-OBs と WT-OBs の cyclin の遺伝子発現レベルを比較し

た。* $p < 0.01$ (versus WT-OBs), 統計学解析は, unpaired Student t -test を使用した (n = 5)。

図4 マイクロCTによる骨再生の評価

A : 欠損形成前的大腿骨骨幹部の断面像 (スケールバー : 1 mm), B : p53KO マウスと WT マウスの欠損部における再生骨 (スケールバー : 1 mm), C : p53KO マウスと WT マウスの欠損部における骨再生の経日的変化, * $p < 0.05$ (versus WT マウス), 統計学解析は, unpaired Student t -test を使用した (n = 5)。

図5 HE染色による大腿骨欠損部の骨再生過程の形態学的検討

A : WT マウスの骨欠損修復過程, B : p53KO マウスの骨欠損修復過程, それぞれ右列は, 左列に示す矩形の拡大像, スケールバーは $300 \mu\text{m}$ (左列), $100 \mu\text{m}$ (右列), 矢印は MSC 様細胞, 矢頭は骨細胞, 青矢印は骨芽細胞, 青矢頭は破骨細胞, また BN は骨梁を示す。

図6 大腿骨欠損部の骨再生過程における Runx2 と osterix の発現

A : p53KO マウスと WT マウスの骨再生と Runx2 の発現, B : p53KO マウスと WT マウスの骨再生と osterix の発現, スケールバーは $100 \mu\text{m}$, 矢印は MSC 様

細胞，矢頭は骨細胞，青矢印は骨芽細胞，また BN は骨梁を示す。C : p53KO マウスと WT マウスの大腿骨欠損部の Runx2 (上段) と osterix (下段) の遺伝子発現レベルの比較, WT マウスと p53KO マウスの大腿骨欠損部から組織を採取し, 3, 5, 7 日の Runx2 と osterix の発現レベルを qPCR で調べた。D : p53KO マウスと WT マウスの再生骨における Runx2 (上段) と osterix (下段) の陽性細胞の割合, 異なる 4 視野 (倍率×200, 横 360 μ m, 縦 200 μ m) を観察し, 骨芽細胞と MSC 様細胞の両方に発現している Runx2 と osterix の陽性細胞数の割合を算出した。* $p < 0.05$, # $p < 0.01$ (versus WT マウス), 統計学解析は, unpaired Student t -test を使用した (n = 5)。

図 7 再生骨における sclerostin の発現

A : p53KO マウスと WT マウスの sclerostin の発現 (スケールバー : 100 μ m), p53KO マウスと WT マウスの大腿骨に欠損を形成し, 5, 7 日の再生骨の sclerostin の発現を調べた。下段は, day 7 (中段) に示す矩形の拡大像 (スケールバー : 30 μ m) で, 矢印は骨細胞を示す。B : p53KO マウスと WT マウスの欠損部における sclerostin の遺伝子発現, p53KO マウスと WT マウスの欠損部から組織を採取し, 5, 7 日の sclerostin の発現を qPCR によって調べた。C : p53KO マウスと WT マウスの再生骨における sclerostin 陽性細胞の割合, 異なる 4 視野 (倍率×200,

横 $360\ \mu\text{m}$, 縦 $200\ \mu\text{m}$) の骨細胞に見られる sclerostin 陽性細胞の割合を算出した。* $p < 0.05$, # $p < 0.01$ (versus WT マウス), 統計学解析は, unpaired Student t -test を使用した ($n = 5$)。

図 8 MSCs 様細胞の細胞機能に与える p53 欠損の影響

A : p53KO-MSCs と WT-MSCs の細胞運動能, トランスウェルチャンバーに設置した膜を通過した細胞のギムザ染色, B : トランスウェルチャンバーの膜を通過した細胞数, C : p53KO-MSCs と WT-MSCs のトルイジンブルー染色 (スケールバー : $300\ \mu\text{m}$), D : proliferation assay による p53KO-MSCs と WT-MSCs の増殖能の比較, E : cyclin の遺伝子発現レベルの比較, 培養 24 時間の p53KO-MSCs と WT-MSCs の cyclin の発現レベルを qPCR によって調べた。F : ALP, osterix, OCN の遺伝子発現レベルを比較, BMP-2 を添加して 7 日後の p53KO-MSCs と WT-MSCs における発現レベルを qPCR によって調べた。* $p < 0.01$ (B, D~F : versus WT), 統計学解析は, unpaired Student t -test (B, D, E), または一次配置分散分析とチューキー検定 (F) を使用した ($n = 5$)。

図 9 破骨細胞形成

A : RANKL 刺激による破骨細胞形成, p53KO マウスと WT マウスの骨髄に含ま

れる単球/マクロファージによる破骨細胞の形成能を TRAP 染色によって調べた。

B : A の拡大像 (スケールバー : 1 mm) C : TRAP 染色後の 1 well あたりの破骨

細胞数, $*p < 0.01$ (versus WT 単球/マクロファージ), 統計学解析は, unpaired

Student *t*-test を使用した (n = 3)。

表および図

表 1 RT-PCR に使用したプライマーの塩基配列

Gene	Primer sequence		Size (bp)
gapdh	Forward	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	223
	Reverse	5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'	
p53	Forward	5'-CTCCCCCGCAAAGAAAA-3'	146
	Reverse	5'-CCTGCTGTCTCCAGACTCCT-3'	

表 2 qPCR に使用したプライマーの塩基配列

Gene	Primer sequence	
actin	Forward	5'-TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'
	Reverse	5'-AAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3'
p53	Forward	5'-CTCCCCCGCAAAGAAAA-3'
	Reverse	5'-CCTGCTGTCTCCAGACTCCT-3'
cyclin A2	Forward	5'-CTTGGCTGCACCAACAGTAA-3'
	Reverse	5'-CAAACCTCAGTTCTCCAAAAACA-3'
cyclin B1	Forward	5'-GCGCTGAAAATTCTTGACAAC-3'
	Reverse	5'-TTCTTAGCCAGGTGCTGCAT-3'
cyclin E1	Forward	5'-TTCTGCAGCGTCATCCTCT-3'
	Reverse	5'-TGGAGCTTATAGACTTCGCACA-3'
alp	Forward	5'-CGGATCCTGACCAAAAACC-3'
	Reverse	5'-TCATGATGTCCGTGGTCAAT-3'
osx	Forward	5'-AGAGATCTGAGCTGGGTAGAGG-3'
	Reverse	5'-AAGAGAGCCTGGCAAGAGG-3'
ocn	Forward	5'-AGACTCCGGCGCTACCTT-3'
	Reverse	5'-CTCGTCACAAGCAGGGTTAAG-3'
Runx2	Forward	5'-CCAGCCACCGAGACCAACC-3'
	Reverse	5'-GTTTGACGCCATAGTCCCTCC-3'
sclerostin	Forward	5'-TCCTGAGAAGAACCAGACCA-3'
	Reverse	5'-GCAGCTGTACTCGGACACATC-3'

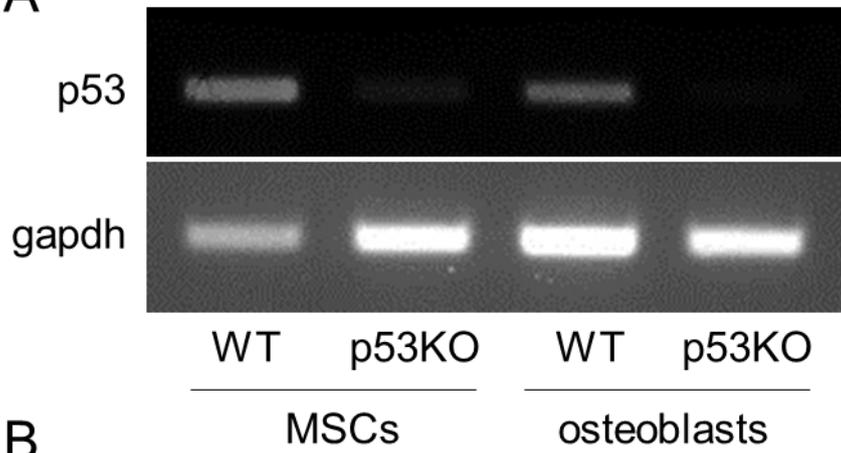
表 3 大腿骨のサイズ

Parameter	WT マウス (n = 6)	p53KO マウス (n = 6)	<i>p</i> value
長さ (mm)	14.45 ± 0.31	14.92 ± 0.41	0.06
長径 (mm) [#]	1.84 ± 0.06	1.89 ± 0.03	0.10
短径 (mm) [#]	1.33 ± 0.01	1.33 ± 0.01	0.68

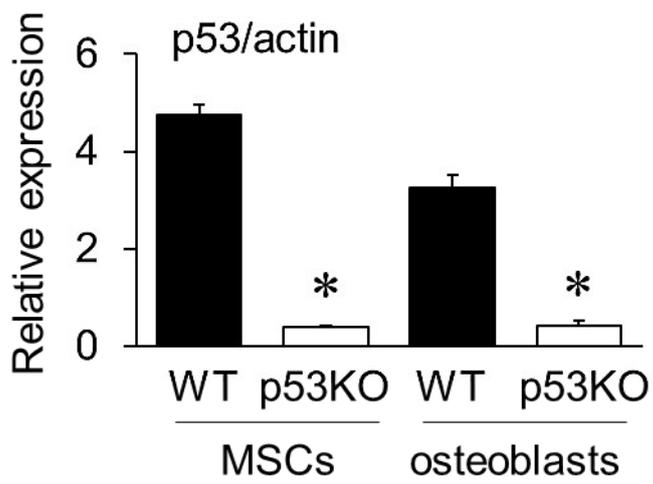
骨幹中央部横断面の長径または短径

☒ 1

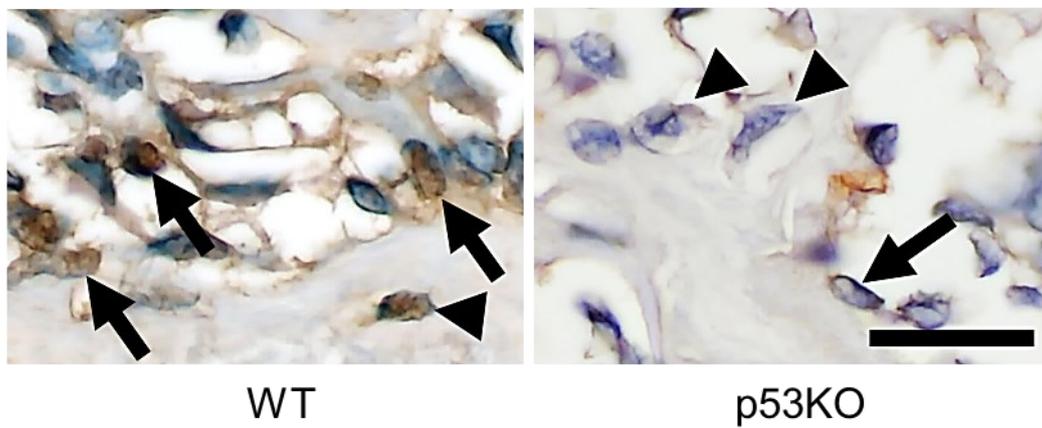
A



B

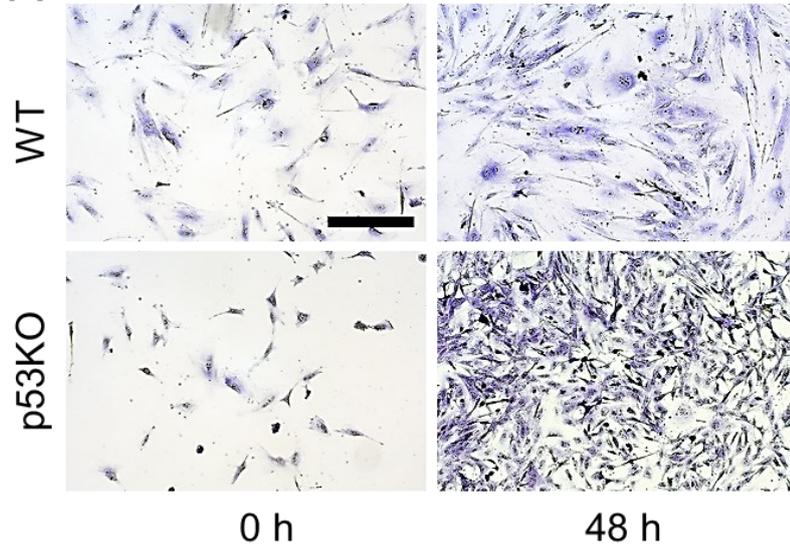


C

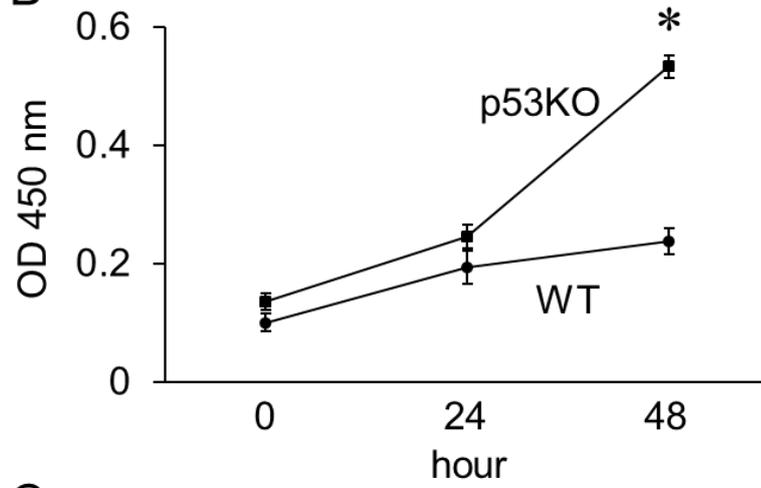


2

A



B



C

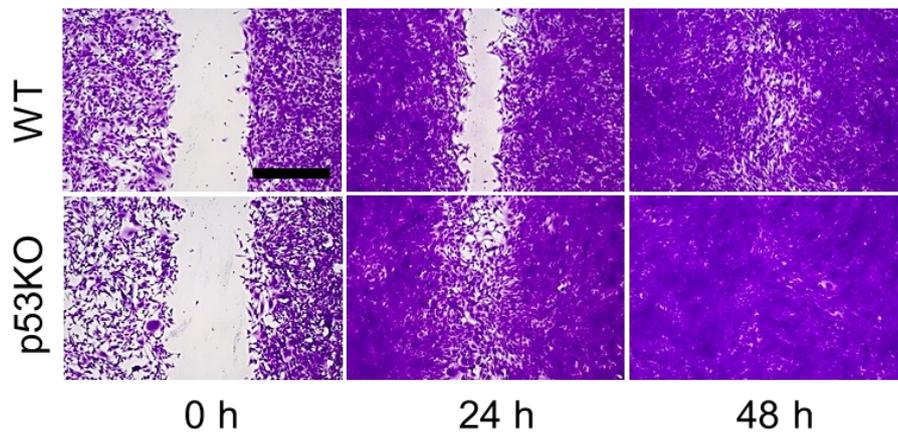
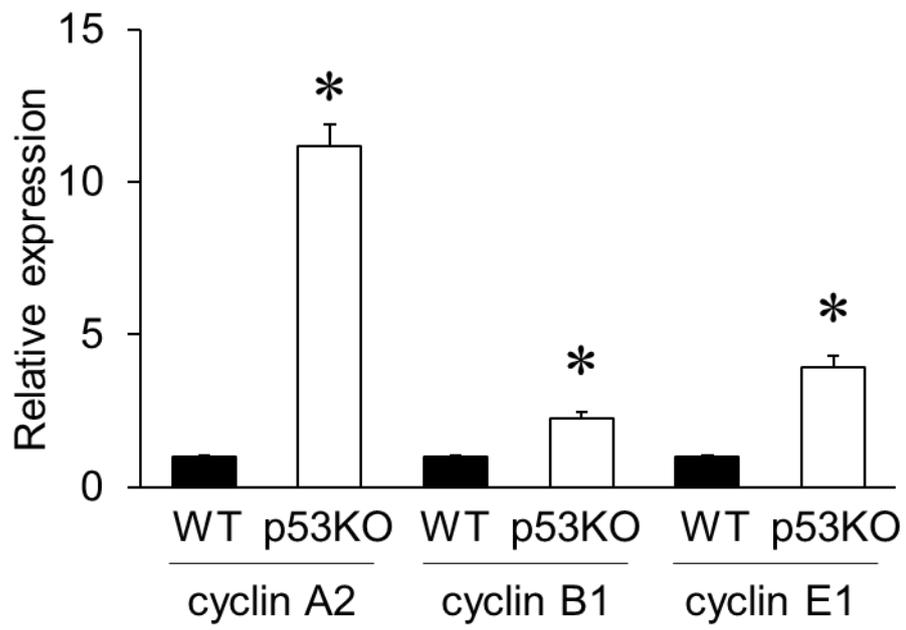
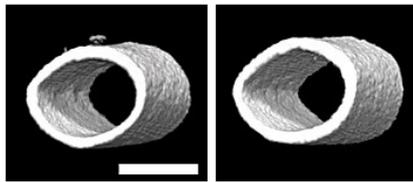


Figure 3



4

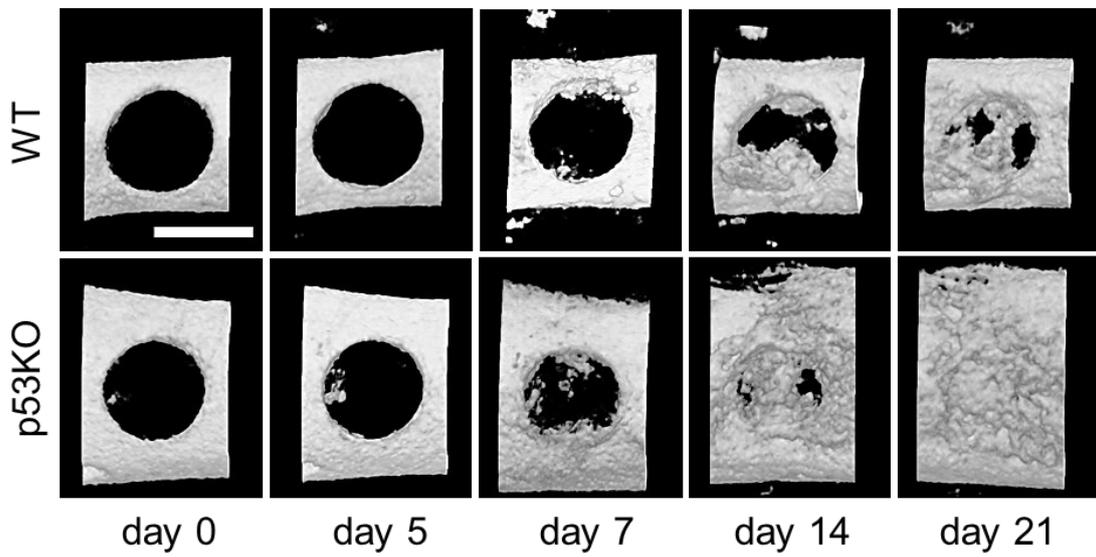
A



WT

p53KO

B



WT

p53KO

day 0

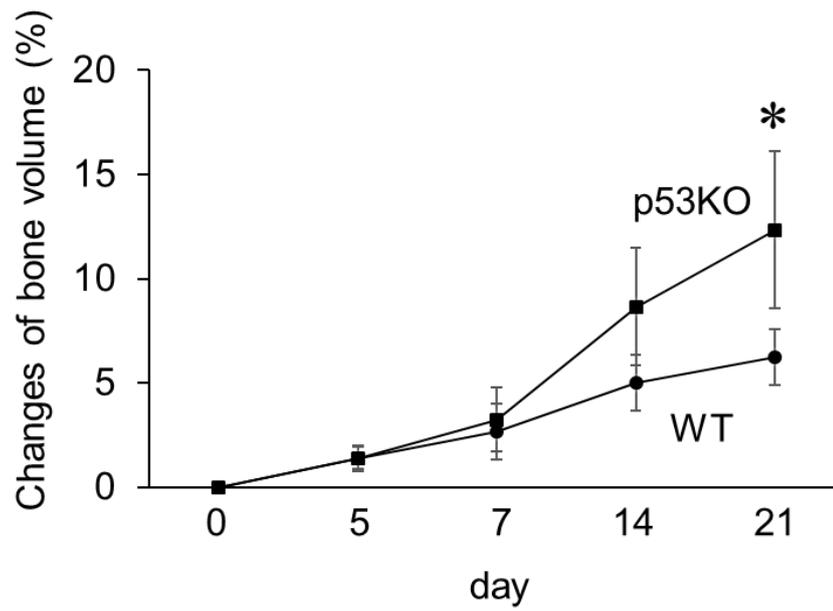
day 5

day 7

day 14

day 21

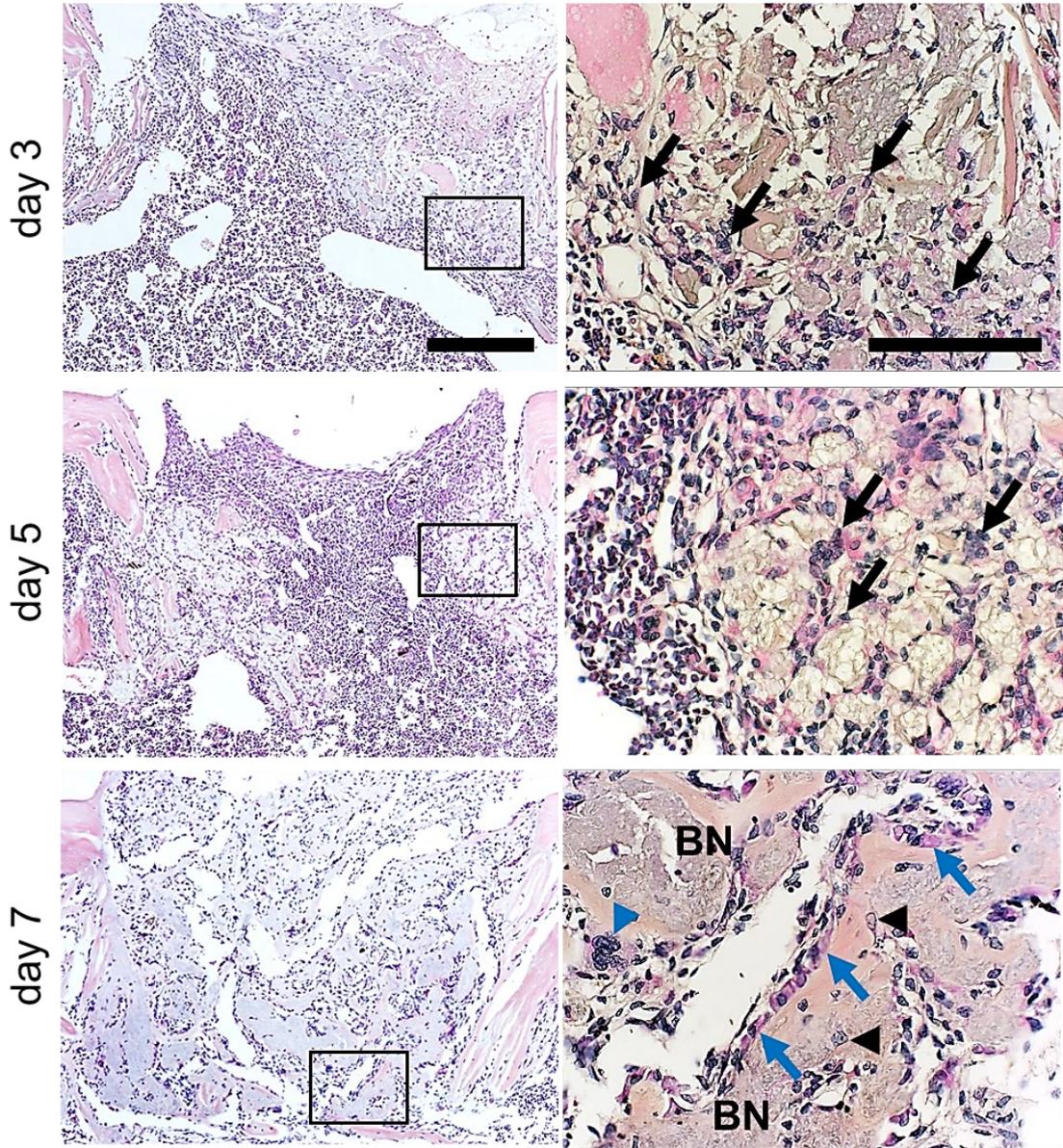
C



5

A

WT

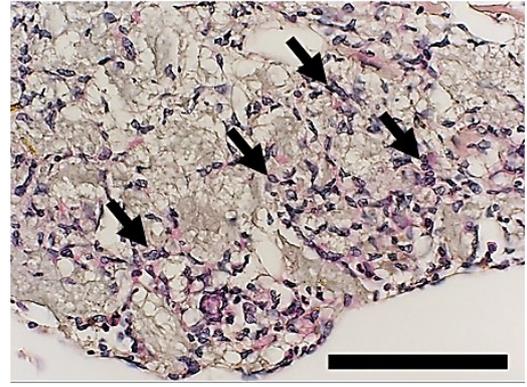
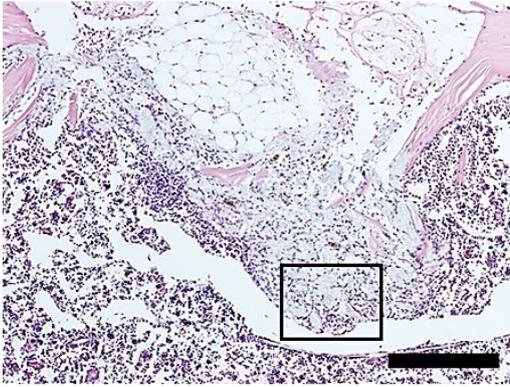


5

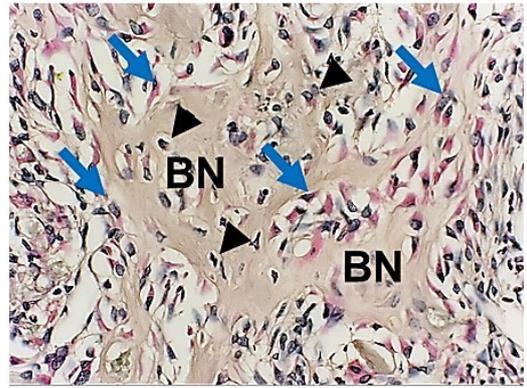
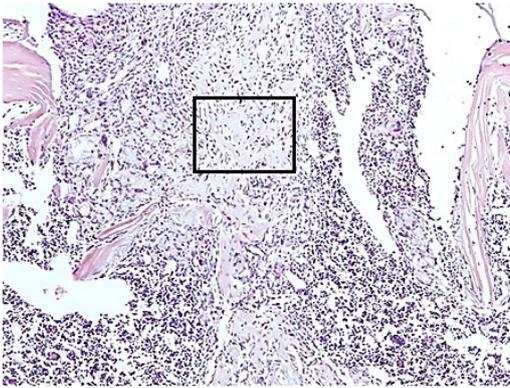
B

p53KO

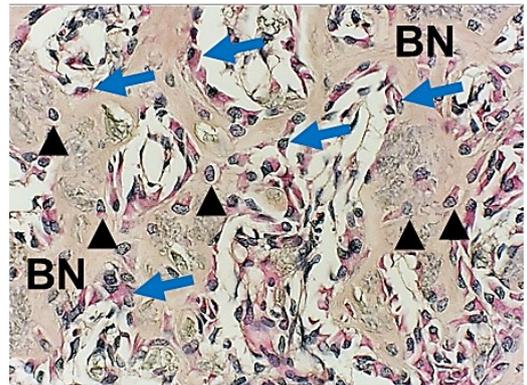
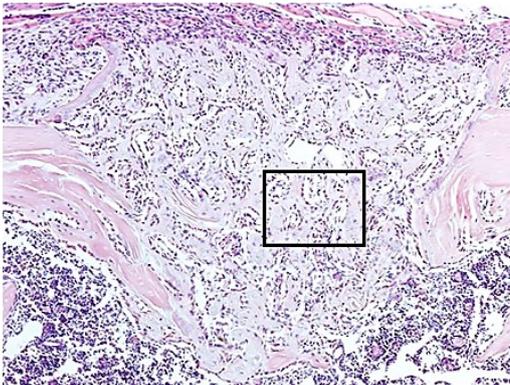
day 3



day 5

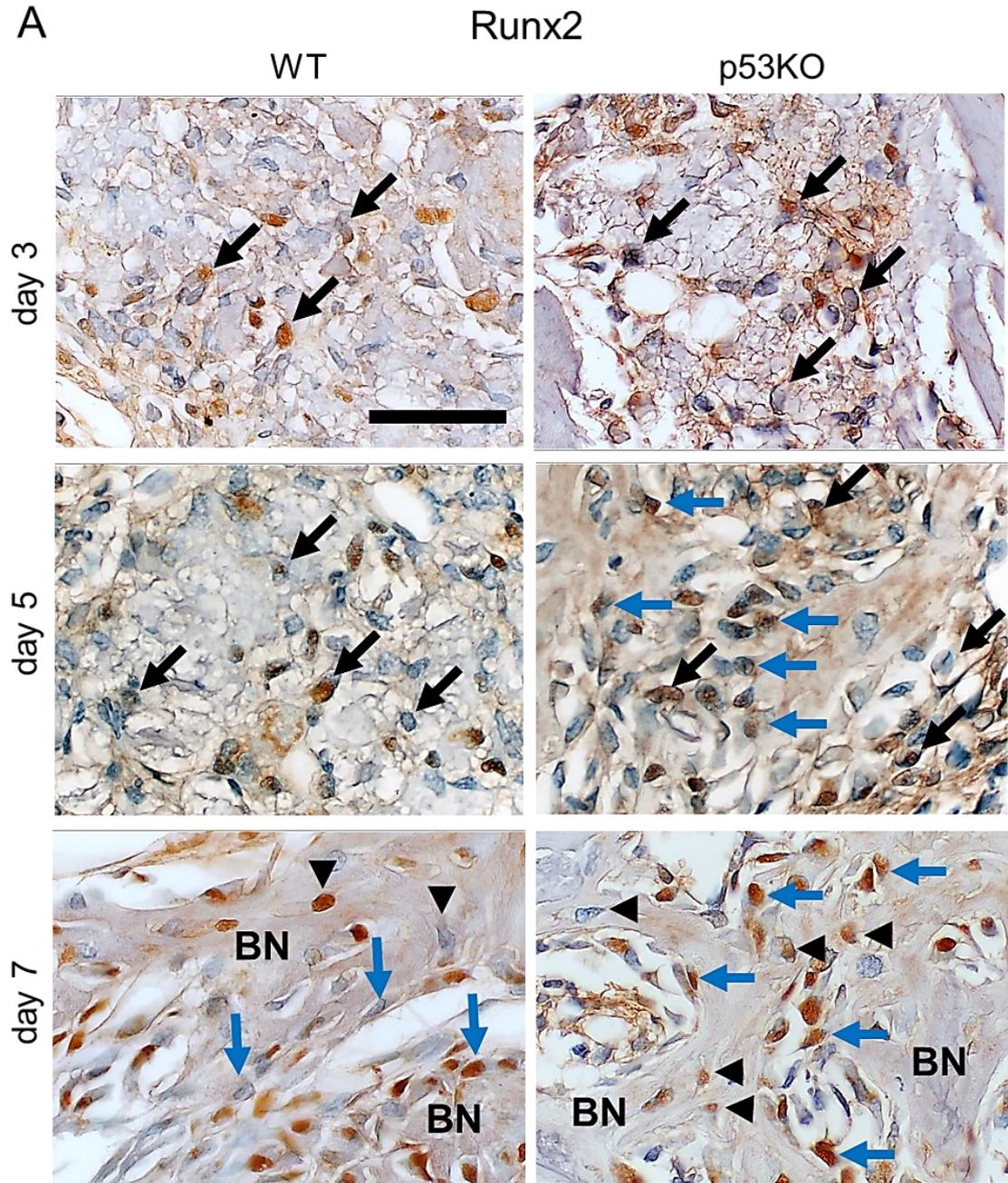


day 7



6

A



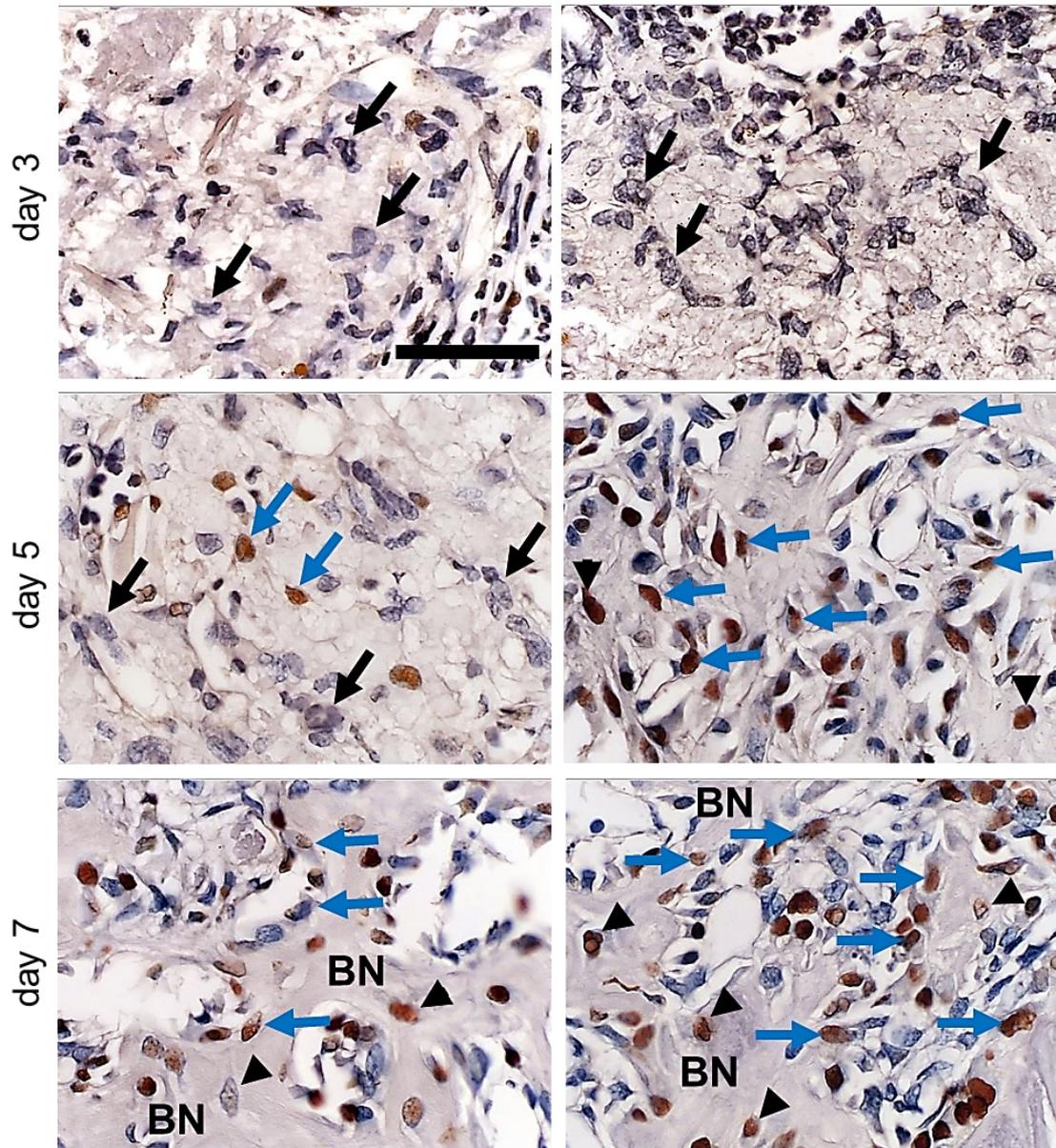
6

B

osterix

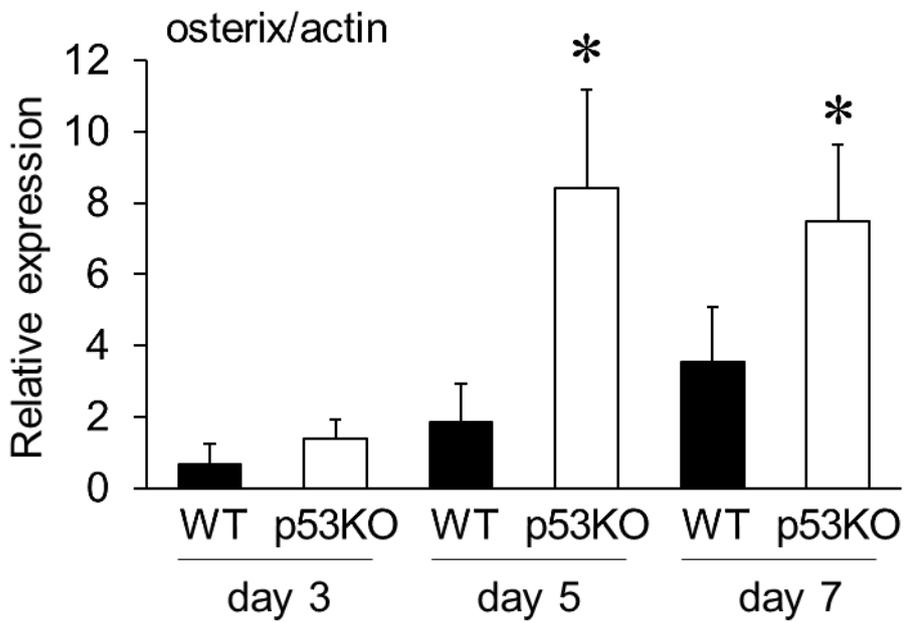
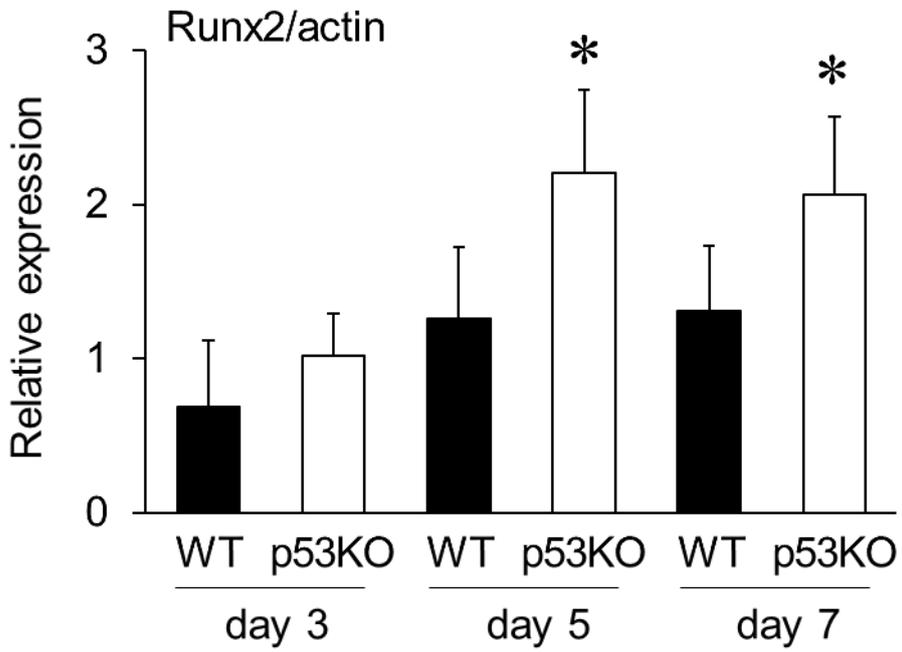
WT

p53KO



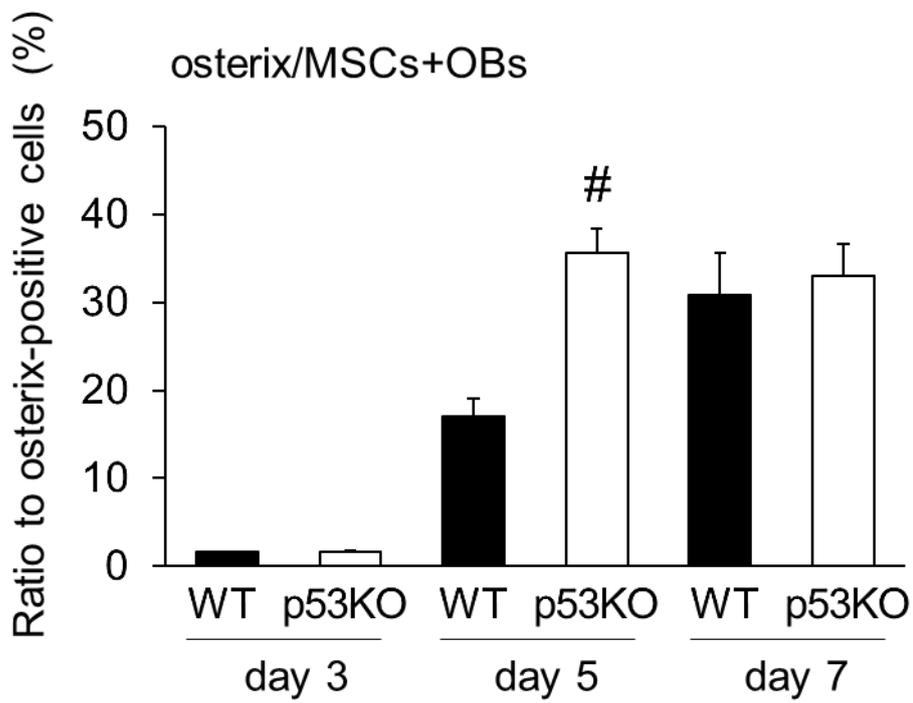
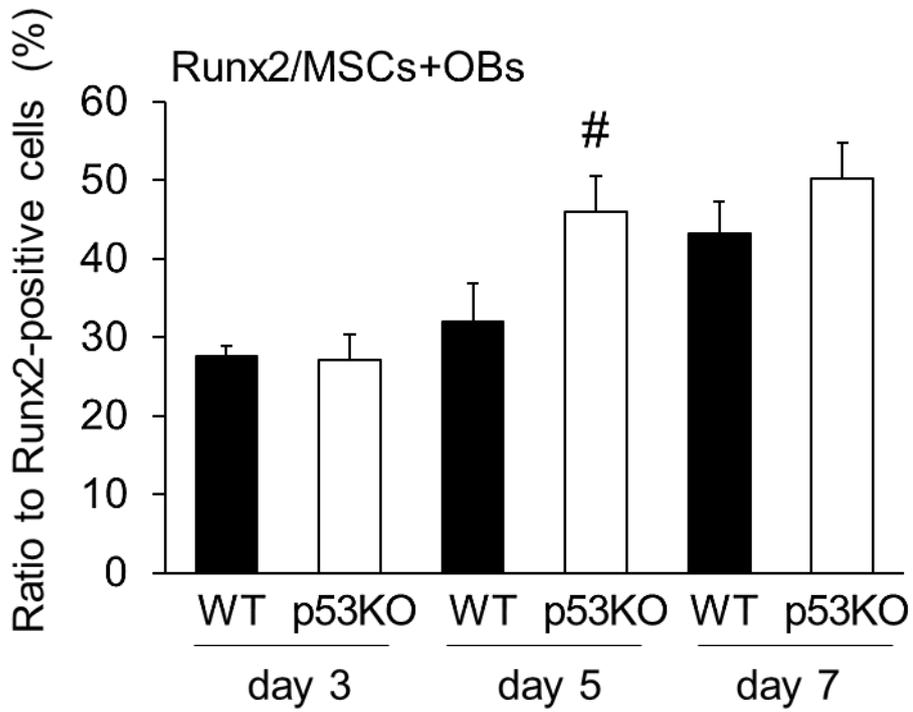
6

C



☒ 6

D



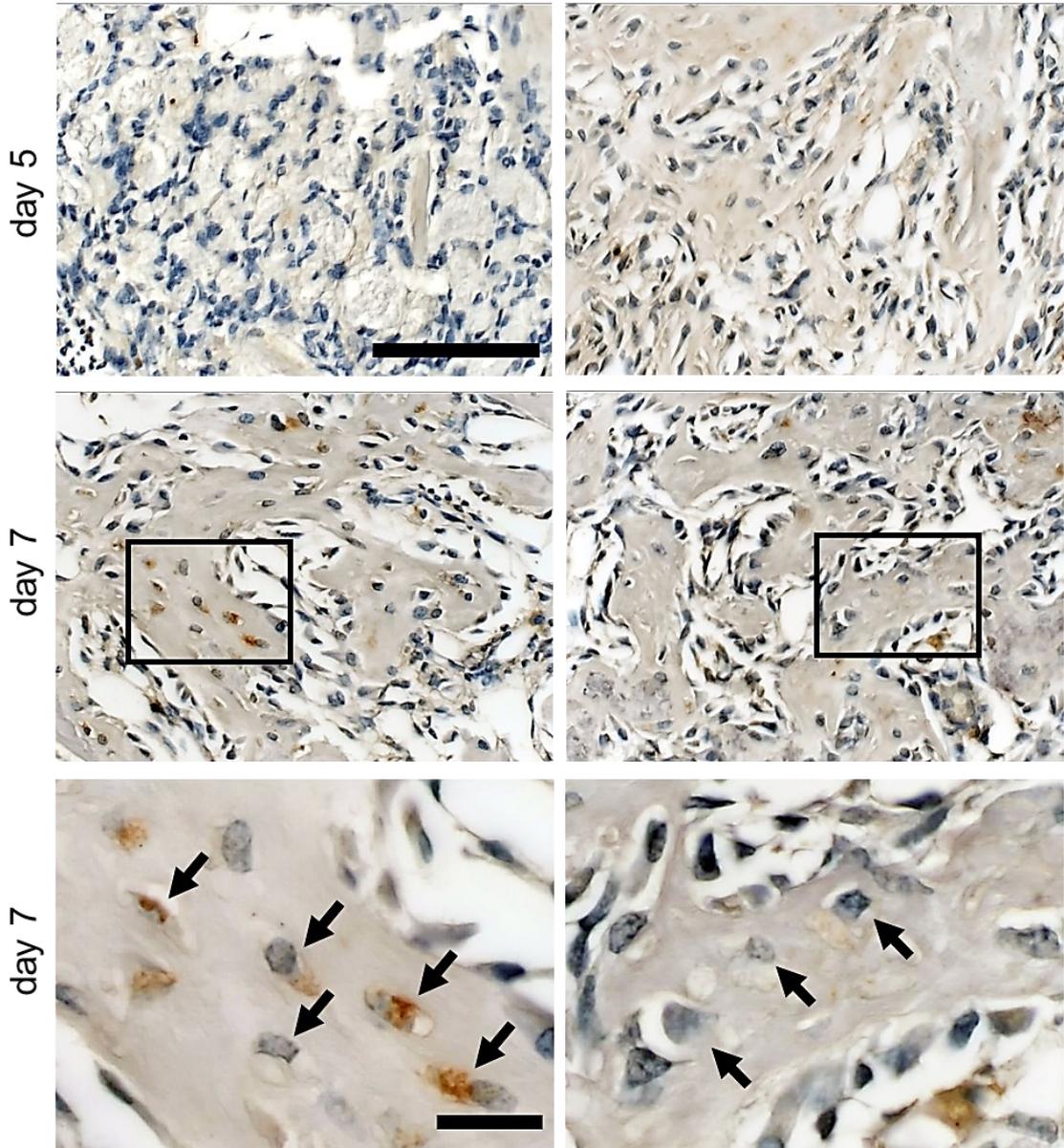
7

A

sclerostin

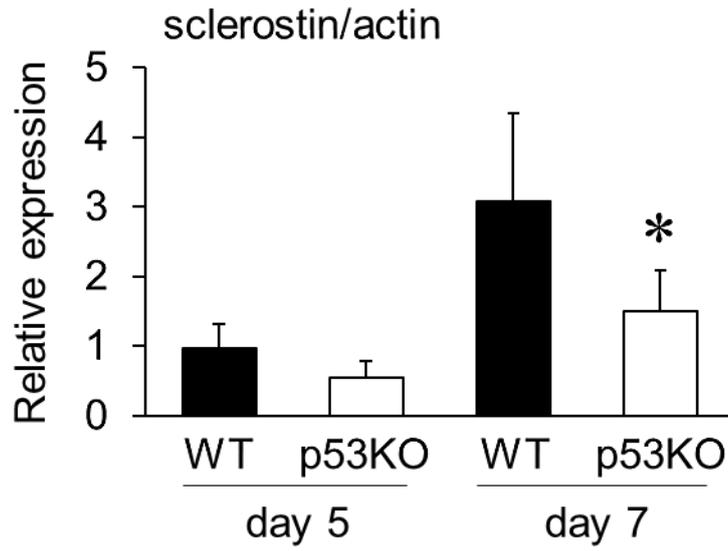
WT

p53KO

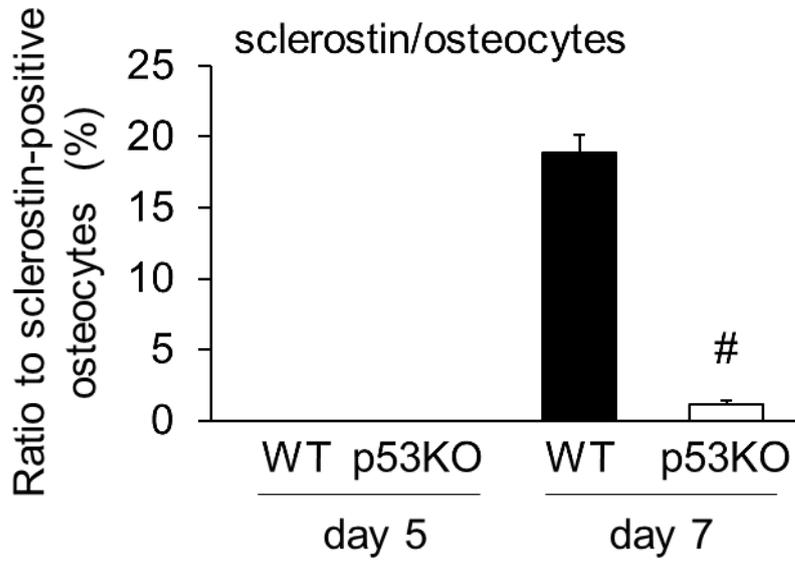


☒ 7

B

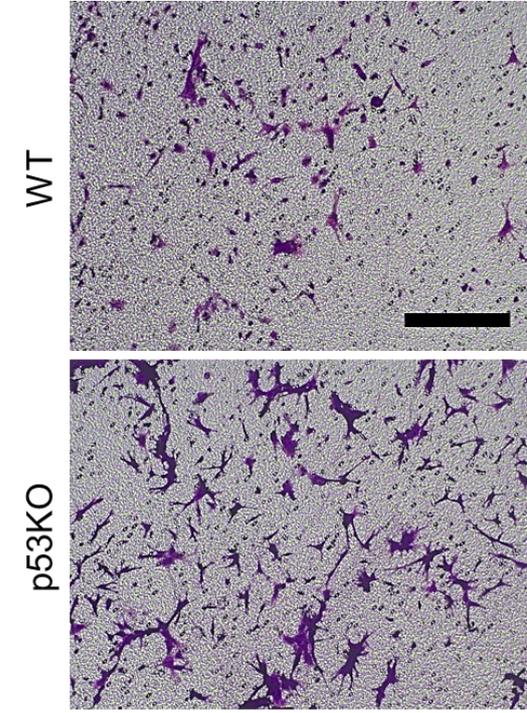


C



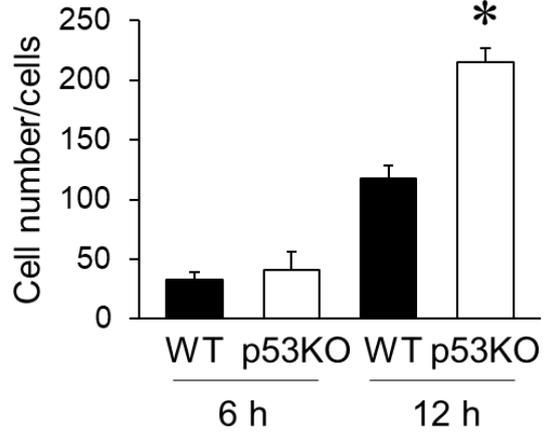
8

A

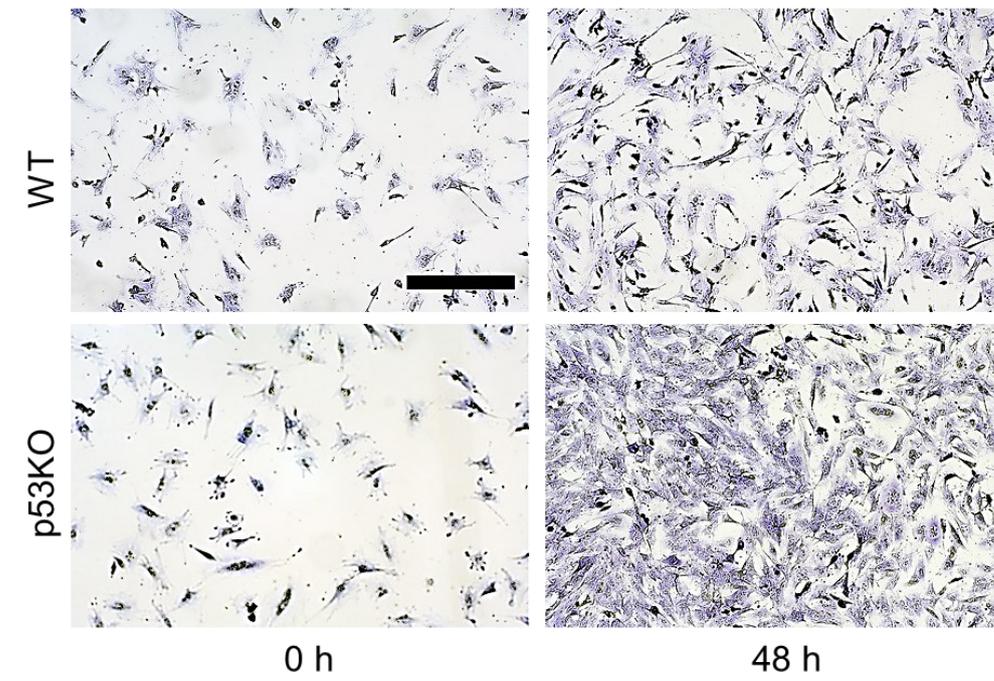


12 h

B



C

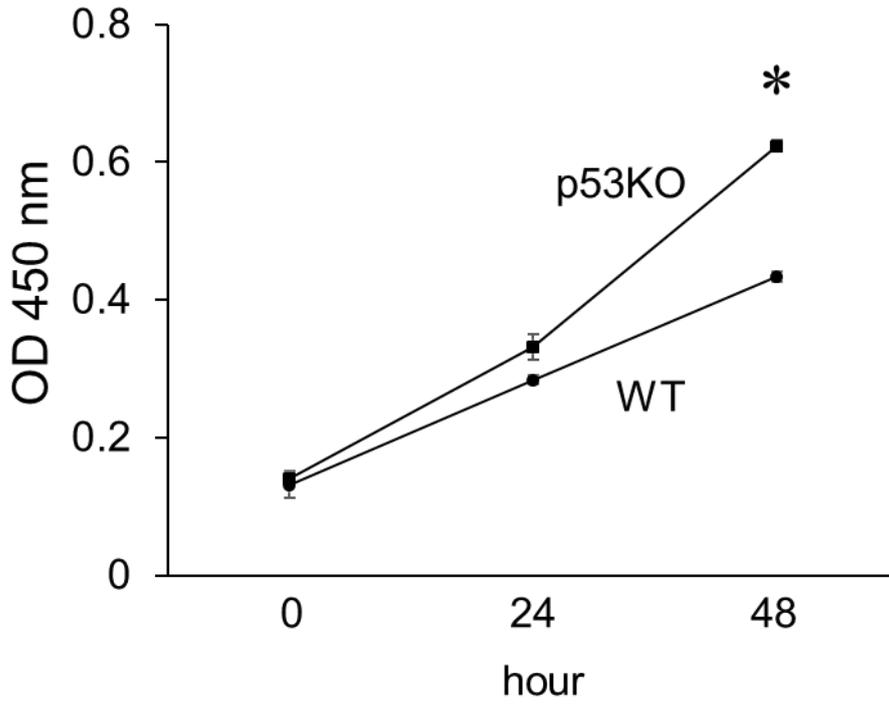


0 h

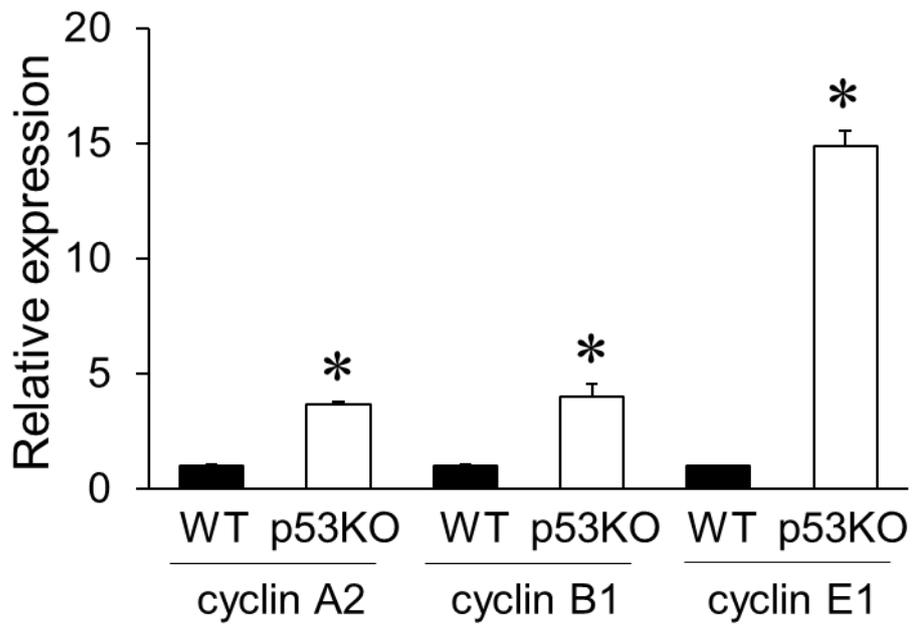
48 h

8

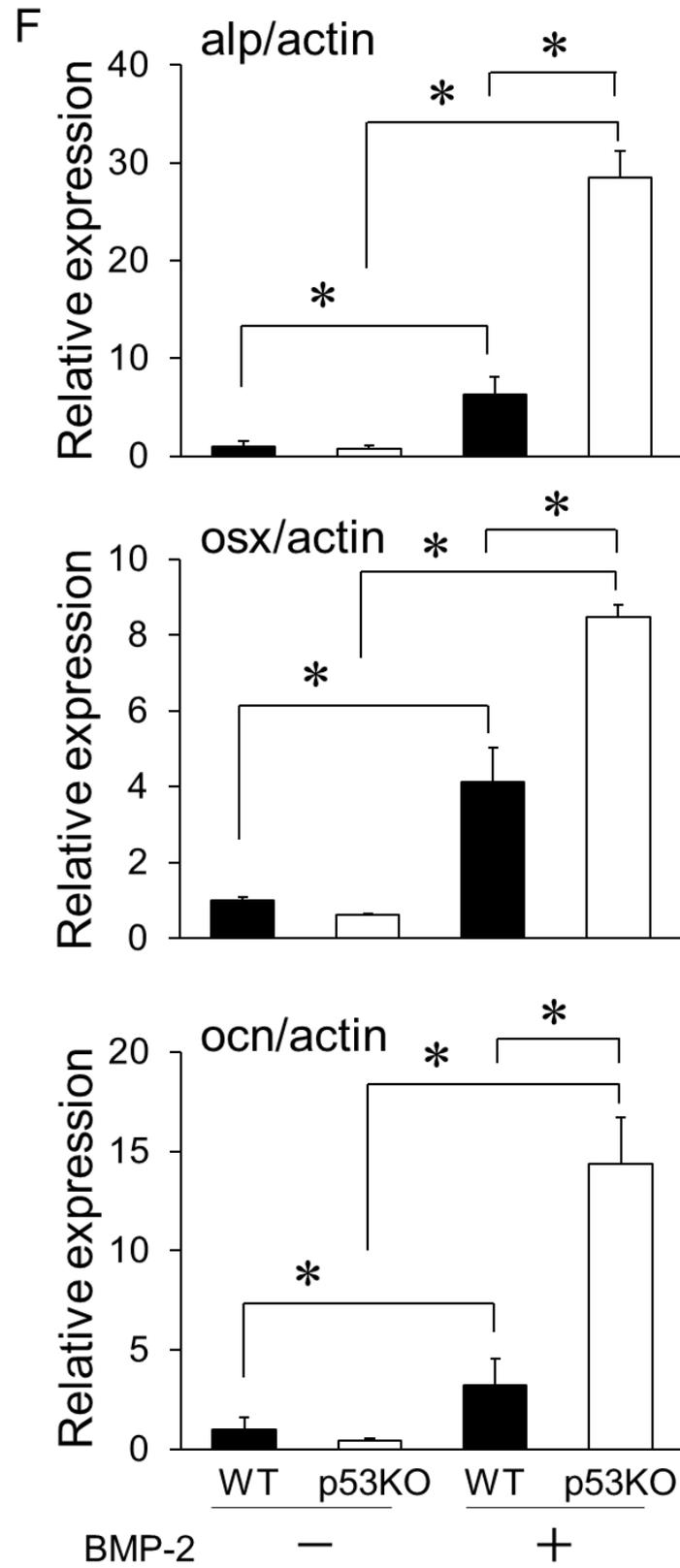
D



E



☒ ∞



9

