

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18682

研究課題名（和文）炎症と骨形成のクロストーク機構の解明による顎骨癒合誘導法の開発

研究課題名（英文）Development of jawbone fusion induction method by elucidating the crosstalk mechanism of inflammation and bone formation

研究代表者

青木 淳也（AOKI, Junya）

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：20867030

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、p53K0マウスを用いて、骨形成に対するp53の役割を検討した。その結果、野生型マウスと比べて、p53K0マウスの骨芽細胞増殖能は高く、骨欠損修復は早かった。p53K0マウスでは、runx2やosterixの発現が高く、一方、骨芽細胞の機能を抑制するsclerostinの発現が抑制されていた。また、p53K0マウス由来のマクロファージは、破骨細胞形成能が低かった。これらが起因して、p53K0マウスの骨欠損は、早期に修復したと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はp53欠損が骨芽細胞の増殖を促進することに加え、骨細胞のスクレロスチン発現を一時的に阻害することで、骨欠損部に骨形成が促される環境になることを明らかにした。この得られた結果は、これまで知られていた腫瘍抑制作用だけでなく、骨形成促進に働くというp53の新たな役割を示したことは学術的意義がある。さらに、これらの結果は、今後の口腔外科学ならびに関連歯科医学の発展に寄与するところが大きいため、社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the role of p53 in bone regeneration using p53K0 mice. As a result, the osteoblast proliferation ability of the p53K0 mouse was higher and the bone defect repair was faster than that of the wild-type mouse. In p53K0 mice, the expression of runx2 and osterix was high, while the expression level of sclerostin, which suppresses the function of osteoblasts, was low. In addition, p53K0 mice-derived macrophages had a low ability of osteoclast differentiation. These effects of p53 deficiency induced that the bone defect in p53K0 mice is considered to have been repaired at an early stage.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨欠損修復 p53 骨芽細胞 骨細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、顎変形症に対する治療は、上顎では Le Fort I 型骨切り術や上顎骨延長法など、下顎では下顎枝矢状分割術やオトガイ形成術などの骨切りを行う外科的手術が適用されている。これらの手法は、術後約 1 週間の入院に加えて、6 か月ほどの通院期間、さらに骨癒合のためのチタンプレート装置を外すまで長期間を要する。その間、咬合および咀嚼に不自由が生じるため、QOL (Quality Of Life) の低下が予想される。したがって、QOL の向上に繋がる正常な口腔機能を獲得するために、効率的に顎骨癒合を誘導する手法の確立が急務となっている。

外科的手術後の治癒は、出血凝固期、炎症期、肉芽組織形成期、成熟期、治癒の過程を辿る。この過程が円滑に進行するためには、炎症を最小限に抑えること、成熟期において、効率的な骨癒合を誘導することが重要である。これまで、炎症性サイトカインが単球マクロファージの破骨細胞分化を誘導するため、炎症抑制により骨吸収が抑制されること、T 細胞の活性化に關与する NFAT を標的とした免疫抑制剤サイクロスポリン A や FK506 は、T 細胞による炎症性サイトカイン産生を抑制するが、骨形成も抑制すること、そして、遺伝子転写を制御する Histone deacetylase が IL-1 や INF- γ 分泌および骨吸収を抑制するが、骨形成には關与しないことが報告されている。以上のように、術後の炎症抑制および骨形成促進による短期治癒に適した薬剤はないため、骨癒合を制御する因子の解明と新たな薬剤の開発が切望されている。

2. 研究の目的

これまでに、p53 遺伝子の不活性化が骨形成を増強することが報告されている。しかしながら、骨欠損修復と p53 の相互關係に関しては、不明な点が多く残されている。そこで、本研究では、炎症と骨形成のクロストークを解明するために、p53 の欠損が骨損傷の修復に与える作用を詳細に検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には、理化学研究所バイオリソースセンターから供与された p53 ヘテロマウスの交配によって得られた 6 ~ 8 週齢雄性 p53KO マウスおよび野生型 (WT) マウスを用いた。本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認を得て、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に従って、動物の処置を行った。

(2) 間葉系細胞 (MSCs) および骨芽細胞の分離

マウスの大腿骨および脛骨から骨髓細胞を回収し、培養シャーレに播種した。播種 16 時間後に、培養シャーレを PBS で洗浄して MSCs のみを分離した。同様に、マウスの頭蓋骨を細切し、酵素液で骨芽細胞を採取した。採取した MSCs および骨芽細胞は、10% fetal bovine serum (FBS) と 1% antibiotic-antimycotic (Invitrogen) を含む α -MEM (10% FBS α -MEM) を用いて、37°C、5% 炭酸ガス存在下で培養した。

(3) MSCs の細胞遊走能

細胞遊走能評価には、CytoSelect24-well cell migration assay kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。無血清 α -MEM による MSCs の細胞浮遊液 (1×10^5 cells/300 μ L) を 8 μ m の

孔を有するトランスウェルチャンバーに加え、10%FBS α -MEM 500 μ Lを満たした24-well plateにトランスウェルチャンバーを設置した。37 $^{\circ}$ C、6時間および12時間インキュベートした後、細胞を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、ギムザ染色液で染色した。

(4) MSCsおよび骨芽細胞の細胞増殖能

MSCs および骨芽細胞 (5×10^3 cells/well) をそれぞれ 48-well plate に播種し、4 時間後に細胞接着を確認して、0 時間、24 時間および 48 時間のインキュベーションし、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、0.05%トルイジンブルー溶液で染色した。さらに、Cell proliferation kit (Biological Industries、) を用いて、細胞増殖を測定した。各細胞 (4×10^3 cells/well) を 96-well plate に播種して 4 時間後から 0 時間、24 時間、および 48 時間のインキュベーション後、反応溶液を添加した。添加して 2 時間後、マイクロプレート吸光分光光度計 (SpectraMax ABS Plus、 Molecular Devices、 Tokyo Japan) を利用して、波長 452 nm の吸光度を計測した。なお、波長 630nm に吸光度で測定値を補正した。

(5) RNA抽出と定量的real-time PCR

MSCsおよび骨芽細胞 (1×10^5 cells/well) をそれぞれ6-well plateに播種し、24時間後に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) と反応させ、cDNAを合成した。定量的real-time PCRは、TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ) とCFX connect system (Bio-Rad Laboratories) を使用した。

(6) MSCsの骨芽細胞分化能

MSCs (2×10^5 cells/well) を6-well plateに播種し、16時間後に100 ng/ml BMP-2 (R&D systems、Minneapolis、MN、USA) を添加し、7日目にRNAを抽出した。抽出したRNAはcDNAの合成後、*alkaline phosphatase (alp)*、*osterix (osx)*、*osteocalcin (ocn)* の遺伝子発現について検討した。

(7) 創傷治癒能

骨芽細胞の創傷治癒能の検討には、CytoSelect24-well wound healing assay kit (Cell Biolabs Inc.) を使用した。24-well plateにWound field insert (Cell Biolabs Inc.) をウェルに設置し、骨芽細胞 (1×10^5 cells/well) を播種して6時間後に、wound field insertをウェルから取り出して、1 mm幅の細胞欠損部を作製した。0.1 μ g/mlマイトマイシンCを含む10%FBS α -MEMに交換し、24時間および48時間後に10%中性緩衝ホルマリンで細胞を固定し、ギムザ染色液で染色した。

(8) 骨欠損の作製

三種混合麻酔薬を6週齢雄性KOマウスおよびWTマウスの腹腔内投与によって深麻酔し、歯科用エンジンを用いて、大腿骨中心部に直径1 mm の骨欠損を作製した。なお、ドリルによる掘削の際は、熱の影響を最小限に抑えるために、生理食塩水を注入した。

(9) マイクロCT撮影

骨欠損作製後、経時的に大腿骨中心の骨欠損部をマイクロCT (R_mCT、 Rigaku Corp.、東京) で撮影した。撮影データの解析は、画像解析システム (TRI/3D-BON、Ratoc System Engineering Co.、 Ltd.、東京) を使用した。骨量測定では、骨欠損部を含む1 mmの骨幹部を抽出した後、その部位に含まれる骨量を測定し、実験開始時との差分を取ることで再生された骨量を算出した。

(10) 組織染色および免疫組織染色

骨欠損作製3、5、および7日目に摘出した大腿骨を4%パラホルムアルデヒドに浸漬し、10% EDTA溶液で脱灰後、パラフィン切片を作製した。パラフィン切片は、ヘマトキシリン溶液（武藤化学、東京）およびエオシンY溶液（武藤化学）で染色した。免疫組織染色では、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）、ヤギ抗マウスsclerostin抗体（100倍希釈、R&D systems）、およびマウス抗Runx2モノクロナール抗体（100倍希釈、MBL）を用いた。

(11) 骨欠損部位からのRNA抽出

骨欠損作製3、5、および7日目に骨欠損部の両端をメス刃で切除し、歯科用探針を用いて、骨欠損部の新生骨を含む骨髓組織を採取した。採取した組織をlysis buffer（Takara Bio Inc）に浸漬して、組織破碎装置（TissueLyser II、Qiagen）で破碎した後、NucleroSpin RNA Plus（Takara Bio Inc）を用いてRNAを抽出した。RNAからcDNAを合成した後、real-time PCRによって、osterix、Runx2、およびsclerostinの遺伝子発現を調べた。

(12) 統計学的解析

統計分析は、GraphPad Prism 8（GraphPad Software Inc.）を用いて実施した。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。

4. 研究成果

(1) p53欠損によるMSCsの細胞遊走能への影響

MSCs動員に与える影響を調べるために、トランスウェルを用いて細胞遊走能を評価した。培養12時間後、KOマウス由来MSCs（KO MSCs）では、多くの細胞が膜を通過しており、WTマウス由来MSCs（WT MSCs）よりも高い細胞遊走能が示された。培養6時間および12時間後の細胞遊走能を計測すると、12時間後では、KO MSCsは、WT MSCsの約1.8倍の細胞遊走能であった。

(2) 細胞増殖に対するp53欠損の影響

KO MSCsおよびKOマウス由来骨芽細胞（KO骨芽細胞）の増殖活性は、48時間後でWT MSCsおよびWTマウス由来骨芽細胞（WT骨芽細胞）よりも高く、48時間後で、KO MSCsはWT MSCsよりも約1.5倍、KO骨芽細胞はWT骨芽細胞の約2.3倍の増殖能を示した。また、KO MSCsおよびKO骨芽細胞は、WT MSCsおよびWT骨芽細胞と比較して、cyclin a2、cyclin b1、およびcyclin e1の高い発現レベルであった。

(3) MSCsの骨芽細胞分化および骨芽細胞の創傷治癒能に対するp53欠損の影響

BMP2刺激によって、WT MSCsおよびKO MSCsは、いずれもalp、osterix、およびosteocalcinの発現が高くなり、特に、KO MSCsの発現増加は著しく、WT MSCsと比較して、alpが約7.0倍、osterixが約2.0倍、そしてosteocalcinが約4.2倍の高値を示した。また、骨芽細胞の欠損治癒能について、実験開始24時間後にWT骨芽細胞の約1.3倍の領域を修復したが、48時間後には両者間には差は認められなかった。

(4) 骨欠損修復に対するp53欠損の影響

マイクロCT解析によって、骨欠損作製後7日目にKOマウスおよびWTマウスの骨欠損部位内縁に骨組織の形成が認められた。さらに、14日目になると、KOマウスの欠損部位の大部分が新生骨によって修復されたが、WTマウスでは、KOマウスの半分程度であった。そして、21日目になると、KOマウスの欠損部位は、ほぼ完全に骨組織で覆われたが、WTマウスでは小さな欠損部位が残っていた。欠損部位に形成された骨量を定量すると、KOマウスの骨量は徐々に増加し、術後21日目において、WTマウスの約2.2倍の骨量増加が認められた。

(5) 組織化学的解析

HE染色では、術後3日目に、MSCsが骨欠損部位に集積したが、KOマウスおよびWTマウスに差は見られなかった。5日目になると、WTマウスでは、MSCsの凝集が多くみられたのに対し、KOマウスでは、すでに骨基質の形成が開始されていた。そして、7日目では、KOマウスおよびWTマウスの骨損傷部位の全体に、骨細胞を含む骨基質が形成された。

免疫組織化学的解析では、術後3日目の骨欠損では、KOマウスとWTマウスの凝集したMSCsにosterix発現はみられなかったが、5日目になると、KOマウスでのosterix陽性細胞が顕著に増加し、WTマウスの約2.1倍の陽性細胞数を示した。7日目には、KOマウスとWTマウスのosterix陽性細胞数に差は認められなかった。KOマウスにおける骨欠損部位のosterix遺伝子は、術後5日目でWTマウスの約5.5倍で、術後7日目では約2.0倍の発現レベルを示した。一方、Runx2の発現は、術後3日目でKOマウスおよびWTマウスの凝集したMSCsにみられた。その後、WTマウスにおけるRunx2陽性細胞は、徐々に増加したが、KOマウスでは、術後5日目で急激に陽性細胞が増加し、その陽性細胞数は、術後7日目まで維持された。KOマウスのRunx2陽性細胞数は、術後5日目で、WTマウスの約1.4倍であり、有意に高い値を示した。Runx2の遺伝子発現においても、KOマウスは、術後5日目で、WTマウスの約1.9倍、術後7日目で、WTマウスの約1.7倍となり、有意に高い発現レベルであった。p53欠損は、骨細胞のsclerostinの発現にも影響を与えた。WTマウスは、術後5日目ではMSCsの凝集が観察されるが骨基質の形成がみられないため、sclerostin陽性細胞は存在しなかったが、7日目になって骨基質が形成すると、骨細胞にsclerostinの発現が認められた。一方、KOマウスでは、術後5日目で骨基質が形成するのだが、sclerostin陽性細胞はみられず、術後7日目で骨損傷部位全体に骨基質が形成されたが、sclerostin陽性細胞は極めて少なく、WTマウスの約0.1倍であった。また、遺伝子発現においても、同様に、KOマウスの発現レベルは、WTマウスの約0.5倍であり、有意に抑制されていた。

本研究によって、p53欠損マウスは骨芽細胞の骨形成が促進することで骨細胞が増強されることが明らかになり、p53が骨欠損修復を制御する因子である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagashima Toshimichi, Ninomiya Tadashi, Nakamura Yoshiki, Nishimura Shirabe, Ohashi Akiko, Aoki Junya, Mizoguchi Toshihide, Tonogi Morio, Takahashi Tomihisa	4. 巻 40
2. 論文標題 p53 deficiency promotes bone regeneration by functional regulation of mesenchymal stromal cells and osteoblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 434 ~ 447
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-022-01314-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永島利通、二宮 禎、青木淳也、桐原祐喜、上道一輝、三宅悠介、三宅希和、中島諄也、篠塚啓二、外木守雄
2. 発表標題 間葉系幹細胞が発現するp53の骨欠損修復に対する役割
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------