Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

P21 deficiency exhibits delayed endochondral ossification during fracture healing

菊池, 健一

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2023-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8501号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482249

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

P21 deficiency exhibits delayed endochondral ossification during fracture healing

p21 欠損では骨癒合過程の内軟骨性骨化が遅延する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
（指導教員：黒田　良祐教授）

菊池　健一

【目的】

骨折の治癒過程は様々な要因や細胞が関与する複雑な生物学的現象である。内軟骨性骨化の過程では、間葉系細胞はまず休止期軟骨細胞に分化する。その後、SRY-box transcription factor 9 (Sox9)の制御下で前肥大軟骨細胞へと分化、更に runt-related transcription factor 2 (Runx2)の制御を受けて肥大軟骨細胞へと分化するが、これら Sox9 や Runx2 は Indian hedgehog (Ihh)の制御を受けている。その後、肥大軟骨細胞はアポトーシスし、その結果できた間隙には血管新生がおこる。

サイクリン依存性キナーゼインヒビター1 (p21) は、外部ストレスの影響を受け、サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) 複合体に結合しその働きを阻害する事で細胞周期の進行を阻害する。我々は以前に胎生期の内軟骨性骨化が内因性の p21 欠乏の影響を受けないことを報告したが、外部ストレスの影響を受ける骨折治癒過程での内軟骨性骨化に対する p21 発現の影響は不明である。

そこで本研究の目的は、p21 ノックアウト (p21KO) マウスの脛骨横骨折モデルにおいて、p21 欠損が骨癒合過程における内軟骨性骨化に影響するか調査する事とした。

【方法】

p21KO マウス・genotyping

Jackson 社より購入した p21 欠損マウス(B6.129S6 (Cg)-Cdkn1atm1Led/J)を、野生型マウス（C57BL/6）と 10 継代以上戻し交配して得た新生マウスの尾部から DNA を抽出して genotyping を行い、遺伝子型を同定し、$p21^{-/-}$を p21KO マウス、$p21^{+/+}$を WT マウスとして実験に使用した。

脛骨横骨折モデルマウス

脛骨横骨折モデルマウスは、生後 10 週齢のマウスの脛骨中央に横骨折を作成し、脛骨高原部より髄内に順行性に刺入した 27G 針で固定して作成した。

骨折周囲の放射線学的評価・組織学的評価・免疫組織化学染色

術直後、7、10 日後の各マウスの脛骨を回収し、μCT を撮像した。骨折部を中心とする関心領域を設定し、骨密度により未成熟な仮骨、高度に石灰化した仮骨を判別し、それぞれの体積を BVL、BVH と定義した。更に、仮骨全体に占める未成熟な仮骨の割合を%BVL と定義した。

骨折周囲の組織学的評価・免疫組織化学染色

術直後、7、10、14、21 日後の各マウスの脛骨を回収し、サフラニン O 染色を行い、Allen score を用いて骨癒合を評価した。更に、サフラニンで染色される仮骨の面積を評価した。免疫組織化学瀬職として、Cdk1、Ihh、Sox9、Runx2、Osterix の肥大軟骨細胞における陽性細胞率を計測した。また、仮骨における単位面積当たりの cathepsin K 陽性細胞の数も計測した。TUNEL 染色でアポトーシスも評価した。

ATDC5 細胞培養・Alizarin Red 染色・Alcian blue 染色・Real-time PCR

ATDC5 を培養し、経時的に Alizarin Red 染色および Alcian blue 染色を行った。Alizarin Red 染色では 405nm における吸光度も計測した。また、Real-time PCR にて *Col2a1*、*Col10a1* の mRNA の発現量の推移を確認した。更に、ATDC5 が肥大軟骨細胞に分化した段階で p21 siRNA を導入した。対照群として非介入群(vehicle)および非特異的 control siRNA 導入群を作成した。Real-time PCR にて *p21*、*Cdk1*、*Ihh*、*Sox9*、*Runx2*、*Osterix* の mRNA の発現量を比較した。Western blotting にて p21、cleaved caspase 3、β-Actin の蛋白量を比較した。

統計解析

2 群間の比較は t 検定で解析し、3 群間以上の比較は one-way ANOVA 検定を行い、各群間の比較は Tukey's post hoc test を用いた。

【結果】

p21KO マウスにおける骨癒合

骨折モデル作成後、p21KO マウスおよび WT マウス共に、経時的に骨折部周囲に仮骨量が増大し、内軟骨性骨化が進行していった。術直後、7、10 日の時点では 2 群間に有意差はみられなかったが、術後 14 日の段階で Allen スコアは p21KO マウスの方が有意に低く、内軟骨性骨化が遅延していた。μCT では、BVL、BVH、%BVL は術後 7、10 日の時点では 2 群間に有意差は見られなかったが、術後 14 日の段階で p21KO マウスの方が有意に BVL 高値、BVH 低値、%BVL 高値であった。

p21KO マウスでは Ihh-Runx2-Osterix 経路抑制を介して内軟骨性骨化が遅延した

免疫組織化学的解析の結果、術後 7、10 日後において p21KO マウスでは WT マウスと比較して Cdk1 陽性軟骨細胞の割合は有意に高値、Ihh 陽性軟骨細胞の割合は有意に低値であった。Sox9 陽性軟骨細胞の割合には群間差が見られなかった。また、術後 7、10 日後において p21KO マウスで WT マウスと比較して Runx2、Osterix 陽性肥大軟骨細胞の割合は有意に低値であった。

p21 siRNA 導入により ATDC5 細胞における内軟骨性骨化が遅延した

ATDC5 の Alizarin red 染色、Alcian blue 染色の結果、経時的に濃度上昇が見られた。Alizarin red 染色の吸光度は day 16 から 18 にかけて有意な上昇が見られた。Real-time PCR 解析では、*Col2a1* の mRNA 発現量は day8 から 10 にかけて有意に上昇、day 14 から 16 にかけて有意に低下していた。*Col10a1* の mRNA 発現量は day 12 から 14、day 14 から 16 にかけて有意に上昇していた。day 14 で ATDC5 に p21 siRNA を導入した群では、control siRNA と比較して p21 mRNA 発現量は有意に低下し、Cdk1 mRNA 発現量は有意に上昇、Ihh、Runx2、Osterix の mRNA 発現量も有意に低下していた。Sox9 の mRNA 発現量は変化しなかった。

p21 発現低下により軟骨細胞のアポトーシスが抑制された

p21KO マウスでは WT マウスと比較して TUNEL 染色陽性の軟骨細胞の割合が有意に低値であった。ATDC5 の Western blotting では、control siRNA 群と比較して p21 siRNA 群で有意な p21 蛋白量の低下、cleaved caspase 3 蛋白量の低下が見られた。

p21KO マウスでは骨折部周囲の破骨細胞数が増加した

p21KO マウスでは WT マウスと比較して単位面積あたりの cathepsin K 陽性細胞数が有意に高値であった。

【考察】

本研究により、マウス骨折モデルにおいて、p21KO マウスでは WT マウスと比較して、肥大軟骨細胞の分化が阻害された事により内軟骨性骨化が遅延することが分かった。p21KO マウスでは WT マウスと比較し Ihh、Runx2、Osterix 陽性軟骨細胞が減少したが、Sox9 陽性軟骨細胞に変化は見られなかった。同様に、ATDC5 への p21 siRNA 導入により control siRNA 群と比較して Ihh-Runx2-Osterix 経路の抑制が見られた。

過去には Cdk1 が PTHrP の Ihh 抑制を仲介し、軟骨細胞の後期分化の抑制に繋がると報告がある。これを踏まえると、p21 欠損により Cdk1 の発現量が増加し、その結果 PTHrP の Ihh 抑制が増強し、その下流の Runx2、Osterix の発現抑制につながったと示唆される。

今回、Ihh の下流にある Sox9 の発現には変化がなかった。これは Sox9 に影響する物は Ihh 以外にも hypoxia-inducible factor 1、epidermal growth factor、bone morphogenetic protein、tumor necrosis factor α などがあり、Ihh 発現抑制による Sox9 発現抑制が他の要素により補填されたためと考えた。実際、過去の研究でも、in vitro において p21 発現抑制によって Sox9 発現レベルは抑制されていなかった。

肥大軟骨細胞からの内軟骨性骨化の後期分化において、軟骨はアポトーシスを起こし、破骨細胞が cathepsin K を分泌しコラーゲンや細胞マトリックス蛋白の変性をもたらす。p21 がアポトーシスを阻害し、p21KO マウスで cathepsin K 発現が増加していたことを踏まえると、p21KO マウスで WT マウスと比較して軟骨細胞のアポトーシスや、コラーゲンや細胞マトリックス蛋白の変性が促進すると思われたが、実際には p21KO マウスでは WT マウスと比較して TUNEL 染色陽性細胞の割合は有意に低値で、アポトーシスが阻害されていた。p21KO マウスでは、Runx2 の発現が抑制された結果、軟骨細胞が肥大軟骨細胞へと分化する以前の段階で内軟骨性骨化が遅延し、その後のアポトーシスが見られなかった可能性が考えられた。実際に、過去には Runx2 ノックアウトマウスで軟骨分化が前肥大期の前で阻害されたという報告や、軟骨特異的 Runx2 欠損により軟骨細胞の後期分化が阻害され、内軟骨性骨化が遅延したという報告もあり、本研究の結果と矛盾しない。

【結語】

本研究の結果より、p21KO マウスでは Ihh-Runx2-Osterix 発現減弱を介して内軟骨性骨化が遅延し、肥大軟骨細胞における p21 発現抑制により肥大軟骨細胞の後期分化が阻害された。p21 発現の制御が骨癒合治療の新たな治療に繋がる可能性が示された。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3245 号	氏　名	菊池 健一
論文題目 Title of Dissertation	P21 deficiency exhibits delayed endochondral ossification during fracture healing p21 欠損では骨癒合過程の内軟骨性骨化が遅延する		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	明石量也 伊藤智雄 溝渕知司	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

骨折の治癒過程は様々な要因や細胞が関与する複雑な生物学的現象である。内軟骨性骨化の過程では、間葉系細胞はまず休止期軟骨細胞に分化する。その後、SRY-box transcription factor 9 (Sox9)の制御下で前肥大軟骨細胞へと分化、更に runt-related transcription factor 2 (Runx2)の制御を受けて肥大軟骨細胞へと分化するが、これら Sox9 や Runx2 は Indian hedgehog (Ihh)の制御を受けている。その後、肥大軟骨細胞はアポトーシスし、その結果できた間隙には血管新生がおこる。サイクリン依存性キナーゼインヒビター1 (p21) は、外部ストレスの影響を受け、サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) 複合体に結合しその働きを阻害する事で細胞周期の進行を阻害する。本研究の目的は、p21 ノックアウト (p21KO) マウスの脛骨横骨折モデルにおいて、p21 欠損が骨癒合過程における内軟骨性骨化に影響するか調査する事とした。

【方法】

Jackson 社より購入した p21 欠損マウス(B6.129S6 (Cg)-Cdkn1atm1Led/J)を、野生型マウス（C57BL/6）と 10 継代以上戻し交配して得た新生マウスの尾部から DNA を抽出して genotyping を行い、遺伝子型を同定し、$p21^{-/-}$を p21KO マウス、$p21^{+/+}$を WT マウスとして実験に使用した。脛骨横骨折モデルマウスは、生後 10 週齢のマウスの脛骨中央に横骨折を作成し、脛骨高原部より髄内に順行性に刺入した 27G 針で固定して作成した。術直後、7、10 日後の各マウスの脛骨を回収し、μCT を撮像した。骨折部を中心とする関心領域を設定し、骨密度により未成熟な仮骨、高度に石灰化した仮骨を判別し、それぞれの体積を BVL、BVH と定義した。更に、仮骨全体に占める未成熟な仮骨の割合を%BVL と定義した。

術直後、7、10、14、21 日後の各マウスの脛骨を回収し、サフラニン O 染色を行い、Allen score を用いて骨癒合を評価した。更に、サフラニンで染色される仮骨の面積を評価した。免疫組織化学瀬職として、Cdk1、Ihh、Sox9、Runx2、Osterix の肥大軟骨細胞における陽性細胞率を計測した。また、仮骨における単位面積当たりの cathepsin K 陽性細胞の数も計測した。TUNEL 染色でアポトーシスも評価した。

ATDC5 を培養し、経時的に Alizarin Red 染色および Alcian blue 染色を行った。Alizarin Red 染色では 405nm における吸光度も計測した。また、Real-time PCR にて *Col2a1*、*Col10a1* の mRNA の発現量の推移を確認した。更に、ATDC5 が肥大軟骨細胞に分化した段階で p21 siRNA を導入した。対照群として非介入群(vehicle)および非特異的 control siRNA 導入群を作成した。Real-time PCR にて *p21*、*Cdk1*、*Ihh*、*Sox9*、*Runx2*、*Osterix* の mRNA の発現量を比較した。Western blotting にて p21、cleaved caspase 3、β-Actin の蛋白量を比較した。2 群間の比較は t 検定で解析し、3 群間以上の比較は one-way ANOVA 検定を行い、各群間の比較は Tukey's post hoc test を用いた。

【結果】

骨折モデル作成後、p21KO マウスおよび WT マウス共に、経時的に骨折部周囲に仮骨量が増大し、内軟骨性骨化が進行していった。術直後、7、10 日の時点では 2 群間に有意差

はみられなかったが、術後 14 日の段階で Allen スコアは p21KO マウスの方が有意に低く、内軟骨性骨化が遅延していた。μCT では、BVL、BVH、%BVL は術後 7、10 日の時点では 2 群間に有意差は見られなかったが、術後 14 日の段階で p21KO マウスの方が有意に BVL 高値、BVH 低値、%BVL 高値であった。免疫組織化学的解析の結果、術後 7、10 日後において p21KO マウスでは WT マウスと比較して Cdk1 陽性軟骨細胞の割合は有意に高値、Ihh 陽性軟骨細胞の割合は有意に低値であった。Sox9 陽性軟骨細胞の割合には群間差が見られなかった。また、術後 7、10 日後において p21KO マウスで WT マウスと比較して Runx2、Osterix 陽性肥大軟骨細胞の割合は有意に低値であった。

ATDC5 の Alizarin red 染色、Alcian blue 染色の結果、経時的に濃度上昇が見られた。Alizarin red 染色の吸光度は day 16 から 18 にかけて有意な上昇が見られた。Real-time PCR 解析では、*Col2a1* の mRNA 発現量は day8 から 10 にかけて有意に上昇、day 14 から 16 にかけて有意に低下していた。*Col10a1* の mRNA 発現量は day 12 から 14、day 14 から 16 にかけて有意に上昇していた。day 14 で ATDC5 に p21 siRNA を導入した群では、control siRNA と比較して p21 mRNA 発現量は有意に低下し、Cdk1 mRNA 発現量は有意に上昇、Ihh、Runx2、Osterix の mRNA 発現量も有意に低下していた。Sox9 の mRNA 発現量は変化しなかった。p21KO マウスでは WT マウスと比較して TUNEL 染色陽性の軟骨細胞の割合が有意に低値であった。ATDC5 の Western blotting では、control siRNA 群と比較して p21 siRNA 群で有意な p21 蛋白量の低下、cleaved caspase 3 蛋白量の低下が見られた。p21KO マウスでは WT マウスと比較して単位面積あたりの cathepsin K 陽性細胞数が有意に高値であった。

【考察および結論】

本研究により、マウス骨折モデルにおいて、p21KO マウスでは WT マウスと比較して、肥大軟骨細胞の分化が阻害された事により内軟骨性骨化が遅延することが分かった。p21KO マウスでは、Runx2 の発現が抑制された結果、軟骨細胞が肥大軟骨細胞へと分化する以前の段階で内軟骨性骨化が遅延し、その後のアポトーシスが見られなかった可能性が考えられた。実際に、過去には Runx2 ノックアウトマウスで軟骨分化が前肥大期の前で阻害されたという報告や、軟骨特異的 Runx2 欠損により軟骨細胞の後期分化が阻害され、内軟骨性骨化が遅延したという報告もあり、本研究の結果と矛盾しない。p21KO マウスでは Ihh-Runx2-Osterix 発現減弱を介して内軟骨性骨化が遅延し、肥大軟骨細胞における p21 発現抑制により肥大軟骨細胞の後期分化が阻害された。

本研究は、p21 発現の制御が骨癒合治療の新たな治療に繋がる可能性が示された価値のある業績であると認める。よって本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。