

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293321

研究課題名(和文)細胞老化を克服した軟骨細胞分化誘導/維持メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism for chondrocyte differentiation and maintenance that overcome cell aging

研究代表者

藤田 香里 (FUJITA, Kaori)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：10633092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：主要細胞老化因子の1つのp53の2つの isoform (p53 と 133p53) の間葉系幹細胞老化と軟骨細胞への分化制御機構を解明する目的で、ヒト間葉系幹細胞老化での isoform 発現パターンと軟骨細胞への分化誘導能の違い、若い幹細胞に p53 を過剰発現または老化幹細胞に 133p53 を過剰発現させ老化の誘導と阻害を引き起こすか、さらに軟骨細胞分化誘導能の分子機構を解析した結果、133p53 の発現は若い幹細胞で発現が高く老化すると発現減少が認められ、老化細胞に 133p53 を過剰発現させると細胞寿命延長と軟骨細胞分化誘導能の亢進を認め、また特徴的な分子機構の存在を確認した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed that (1) the expression pattern of two isoforms (co-operative p53 and competitive 133p53) of p53, a major regulator for cellular senescence, in senescence of human mesenchymal stem cells (MSCs) and their ability of differentiation into chondrocytes, and (2) whether overexpression of p53 in young MSCs induces senescence or overexpression of 133p53 in old (pre-senescent) MSCs inhibits senescence and extends cellular lifespan, and molecular mechanism of their differentiation into chondrocytes. Expression of 133p53, similar results with our previous reports in normal human fibroblasts and normal human CD8 positive T lymphocytes, extended MSC's lifespan and up regulated the ability of differentiation into chondrocytes. We also found the unique molecular mechanism of 133p53 by metabolome analysis and RNA-sequence, and have studied the detail mechanism.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞老化 p53 p53 isoform 軟骨細胞分化 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢と共に関節軟骨の変性が進行し、高齢化社会の進行に伴い変形性関節症の患者数は急増している。しかし軟骨細胞は分化度が高い細胞で、損傷部位の自然修復は期待出来ず、根本的な治療方法が無い。変性した軟骨を回復させて関節機能の改善を目指すためには、細胞老化を克服した軟骨細胞の誘導、分化制御のメカニズムを分子レベルで解明することが必要である。なぜなら、以下の3つの理由からである。1) 間葉系幹細胞から軟骨細胞を分化誘導する方法では、幹細胞を提供する donor age が高いと幹細胞の分化誘導能が低くなる傾向にあること (Nat Rev Mol Cell Biol, 2007:8:703-713)、2) この幹細胞も含め培養系に移した場合、継代により細胞老化の影響を受け分化誘導、形質維持が難しくなる (Science, 1996:273:63-67)、3) 元々の donor age が高い細胞は細胞老化に至りやすい (Proc Natl Acad Sci USA, 1998:95:10614-10619)。現状では、変形性関節症に罹患しているのは高齢者に多く、その患者から間葉系幹細胞を採取し軟骨に分化誘導させ、さらに硝子軟骨細胞の状態を維持するのは、上述の細胞老化の影響を強く受けるため課題が多い。

(2) 研究代表者は、ヒト正常線維芽細胞の細胞老化において、細胞老化マスター因子の1つである p53 の2つの isoform が p53 に対し一方 (p53 β) は協調的に、もう一方 (Δ 133p53) は競合的に働いて p53 の細胞老化に関連する標的遺伝子の発現調節を担っていることを明らかにした (Nat Cell Biol, 2009; Oncogene, 2012) (申請者が、2重下線は first author、下線は co-author であるもの (以下同))。また一般に細胞老化では、テロメア末端保護に寄与するタンパク質が老化に伴い不安定化することでテロメア長の短縮が促進される。我々は、p53 が標的

遺伝子の1つのユビキチン E3 リガーゼ Siah1 の転写発現を上昇させ、さらに Siah1 がテロメア末端の維持に必須のタンパク質 TRF2 にユビキチンを付加させプロテアソームにより分解されることで細胞老化を促進すること、この p53 の機能も前述の isoform が寄与していることを明らかにした (Nat Cell Biol, 2010; Aging, 2011)。また、2つの p53 isoform の発現変化はヒト正常線維芽細胞の細胞老化に見られるだけでなく、健康人 (若年期、老年期の2群) から採取した T 細胞においても観察されることを見いだした (J Clin Invest, 2013)。以上から、p53 とその isoform が加齢自体、さらに加齢に伴う疾患にも関連していることが考えられる。本当に臨床に使用出来る硝子軟骨細胞を誘導するためには、この課題を克服しなければならない。そのためにも、本申請研究において、細胞老化を制御する p53 とその isoform の軟骨細胞の分化誘導における役割を分子レベルで解明し、得られる知見を元に細胞老化を克服した軟骨細胞の誘導方法の開発につなげたい。

2. 研究の目的

上記の背景と我々の p53 とその isoform の加齢、細胞老化での研究成果を元に、p53 とその isoform の間葉系幹細胞老化と軟骨誘導能さらに軟骨細胞分化成熟過程での役割解明という基礎的研究を行い、donor age と培養で生じる細胞老化を克服した軟骨細胞誘導法を開発し、再生医療で高齢の患者からでも効率よく移植用軟骨細胞を得る方法の確立へと展開するための基盤となる研究を行う。

1) p53 と isoform の間葉系幹細胞老化と軟骨細胞への分化誘導能に対する分子メカニズムを解明する、2) 軟骨細胞の分化成熟過程各段階での p53 と isoform の機能と細胞老化との関係性を明らかにする、3) 細胞老化を克服するため、細胞内の p53 と isoform の

発現調節出来るベクターシステムを開発し、至適培養条件を探索する、の3つである。

3. 研究の方法

(1) ヒト間葉系幹細胞の細胞老化における p53 活性化、p53 isoform の発現プロファイルの解析と老化・非老化幹細胞の軟骨細胞分化誘導能の比較

申請者らはヒト正常線維芽細胞と in vivo の老化細胞を多く含む前癌病変である colon adenoma において、細胞老化マスター因子 p53 の isoform のうち2つの isoform が p53 に対して一方 (p53 β) は協調的に、もう一方 (Δ 133p53) は競合的に働いて p53 の細胞老化に関連する標的遺伝子の発現調節を担っていることを明らかにした。まず、この p53 isoform の発現プロファイルがヒト間葉系幹細胞の老化でも見られるか確認した。間葉系幹細胞の老化誘導は、①継代を繰り返して細胞老化を起こす、②元々の細胞提供者の年齢の違いによるもの (若年期・老年期健康人の間葉系幹細胞) の比較で行った。各 p53 isoform の発現プロファイルは isoform 特異的抗体を用いたウェスタンブロットを行った。また一般に、老化間葉系幹細胞は分化誘導しにくいことが報告されているが、実際の軟骨細胞分化誘導能を老化または非老化間葉系幹細胞で、軟骨細胞初期分化マーカーである II 型コラーゲン遺伝子、アグリカン遺伝子の発現を指標に確認した。

(2) ヒト間葉系幹細胞での p53 β と Δ 133p53 の過剰発現による細胞老化誘導・遅延の効果と軟骨細胞分化誘導能に対する分子メカニズムの解析

我々のこれまでの研究で、老化直前のヒト正常線維芽細胞に Δ 133p53 を過剰発現すると老化を遅らせること、逆に若い細胞に p53 β を過剰発現すると急速に老化を引き起こすことを報告している。そこで継代を繰り返

老化に近づいたヒト間葉系幹細胞に Δ 133p53 を過剰発現して細胞老化を遅延するか、継代回数が少ないヒト間葉系幹細胞に p53 β を過剰発現して急速に老化を誘導するかを確認した。さらに、これらの細胞を用いて軟骨細胞分化誘導を行い、(1) で見られた差異と比較した。また p53 isoform の細胞老化と軟骨細胞分化誘導能の分子メカニズムを明らかにするために、(1) (2) のサンプル共に RNA-Seq、メタボローム解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト間葉系幹細胞の細胞老化における p53 活性化、p53 isoform の発現プロファイルの解析と老化・非老化幹細胞の軟骨細胞分化誘導能の比較

ドナー年齢の異なるヒト間葉系幹細胞で細胞老化マーカーを染色 (senescence associated β -galactosidase assay ; SA- β -gal assay) した (図1)。

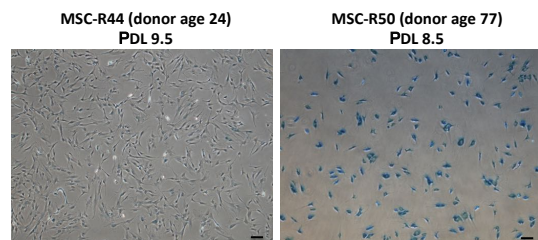


図1. 細胞老化マーカーの染色

ドナー年齢の高い細胞で老化マーカーの染色を確認した。またこれらの細胞の細胞寿命を計測したところ、ドナー年齢が若い細胞では約 250 日間で 24 継代出来たが、ドナー年齢が高い細胞では 200 日未満で 10 継代に留まった (図2)。

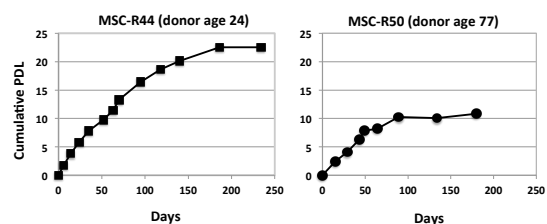


図2. Lifespan assay

さらに p53 isoform の発現プロファイルを確認したところ、p53 の発現はドナー年齢が高い細胞で高い傾向があったが、同じ細胞での増殖期と細胞老化に到達した時期との比較では予想に反して増殖期の方が高かった。さらに p53 β の発現は確認できなかったが、 Δ 133p53 はこれまでの報告どおり、ドナー年齢が若い細胞で発現が高く、さらに細胞が老化状態になると発現が減少した。また、これらの細胞を軟骨細胞に分化誘導させ、10日後のサンプルにおける軟骨細胞誘導状況を軟骨細胞マーカー遺伝子である Acan、Col2a1、Col11a2、Sox9 の発現を qRT-PCR で解析したところ、予想どおりドナー年齢が若い細胞で

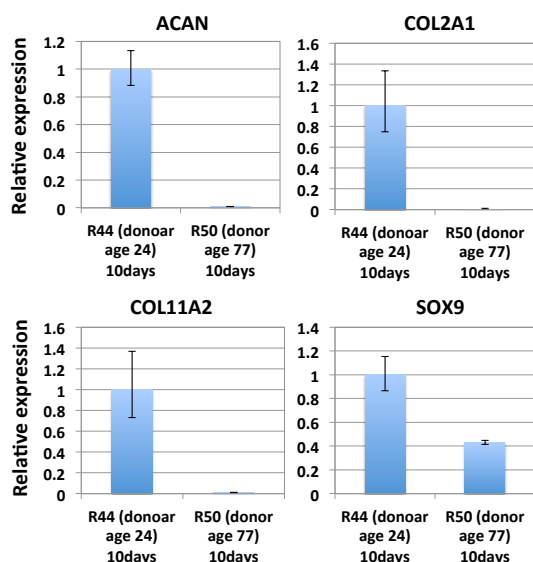


図3. 軟骨細胞マーカー遺伝子の発現

発現が高く、軟骨細胞誘導はドナー年齢が高い細胞に比較してスムーズに行われていた

(図3)。同様に、継代を繰り返して細胞老化に至った細胞と継代回数の少ない同一細胞間での比較においても同様に、p53 isoform の発現プロファイルを確認したところ、p53 の発現は予想に反して継代回数の少ない細胞の方が高かった。さらに p53 β の発現は確認できなかったが、 Δ 133p53 はこれまでの報告どおり、継代回数の少ない細胞で発現が高く、さらに細胞が老化状態になると発現が減少した。また、これらの細胞を軟骨細胞に分化誘導させ、7日毎にサンプリングし、軟骨

細胞誘導状況を軟骨細胞マーカー遺伝子である Acan、Col2a1、Col11a2、Sox9 の発現を qRT-PCR で解析したところ、継代回数の少ない細胞では日にちが経つにつれて軟骨細胞マーカー遺伝子発現が上昇するのに対し、細胞老化に至った細胞では上手く軟骨細胞に分化できなかった。以上より、ヒト間葉系幹細胞の老化はドナー年齢が高い場合及び継代を繰り返して細胞老化に至った場合に p53 β の発現の上昇は認められないが Δ 133p53 の発現減少が認められ、このことがこれまでの体細胞での状況と異なる場所と推測された。

(2) ヒト間葉系幹細胞での p53 β と Δ 133p53 の過剰発現による細胞老化誘導・遅延の効果と軟骨細胞分化誘導能に対する分子メカニズムの解析

(1) においてヒト間葉系幹細胞の老化過程ではヒト正常体細胞と異なり、p53 β 発現上昇よりも Δ 133p53 発現減少が鍵になっていると推測された。そこで、継代を繰り返し老化に近づいたヒト間葉系幹細胞に Δ 133p53 を過剰発現して細胞老化を遅延するか、またヒト正常体細胞同様に継代回数の少ない細胞に p53 β を過剰発現させると老化を誘導するかを解析した。老化に近づいた細胞に Δ 133p53 を過剰発現すると、予想どおりコントロールベクターを導入した細胞と比較して細胞寿命が亢進した。また、継代回数の少ない細胞に p53 β を過剰発現すると多くの細胞は死滅するが、その中で発現がマイルドに維持された細胞は老化マーカー染色 (SA- β -gal) がポジティブであった。これらのことから、 Δ 133p53 の発現は間葉系幹細胞の寿命維持に関わっていること、p53 β の大過剰な発現は間葉系幹細胞にアポトーシスを起こすが、通常よりもマイルドな過剰発現は老化を誘導することが分かった。これらの細胞を軟骨細胞に分化誘導させると、老化に近づい

た細胞に $\Delta 133p53$ を過剰発現させた場合は、コントロールではほとんど軟骨細胞に分化できなかったが、軟骨細胞マーカー遺伝子の発現を確認でき、継代回数の少ない細胞と同レベルに軟骨細胞に分化誘導できていた。また、継代回数の少ない細胞に $p53\beta$ を過剰発現し、発現がマイルドに維持された細胞を軟骨細胞に分化誘導させたが、ほとんどマーカー遺伝子の確認はできず軟骨細胞には分化誘導できなかった。以上から、 $p53$ isoforms の発現が間葉系幹細胞の軟骨細胞分化誘導能にも影響を与えることがわかった。さらにこれらの細胞と通常に継代を繰り返して細胞老化に至ったもの、継代回数の少ない細胞との間に代謝の違いや遺伝子発現の違いがあるかを見るため、メタボローム解析と RNA-Seq 解析を行った。その結果、 $p53$ isoforms の発現に連動した特徴的な遺伝子発現や代謝物が見つかった。現在、それらの分子を含めた詳細な解析を続行中である。また特に、 $\Delta 133p53$ の間葉系幹細胞、あるいは軟骨細胞誘導過程での標的遺伝子はあるかなどを ChIP-Seq を用いて解析予定でいる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Horikawa I, Park KY, Isogaya K, Hiyoshi Y, Li H, Anami K, Robles AI, Mondal AM, Fujita K, Serrano M, Harris CC. $\Delta 133p53$ represses $p53$ -inducible senescence genes and enhances the generation of human induced pluripotent stem cells. *Cell Death Differ.* 2017. 24. 1017-1028. doi: 10.1038/cdd.2017.48. 査読有
- ② Yahara Y, Takemori H, Okada M, Kosai A, Yamashita A, Kobayashi T, Fujita K, Itoh Y, Nakamura M, Fuchino H, Kawahara N, Fukui N, Watanabe A, Kimura T, Tsumaki N.

Corrigendum: Pterostatin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting *Sik3*. *Nat Commun.* 2016. 24. 7. 10959. doi: 10.1038/ncomms10959. 査読有

- ③ Horikawa I, Fujita K, Jenkins LM, Hiyoshi Y, Mondal AM, Vojtesek B, Lane DP, Appella E, Harris CC. Autophagic degradation of the inhibitory $p53$ isoform $\Delta 133p53\alpha$ as a regulatory mechanism for $p53$ -mediated senescence. *Nat Commun.* 2014. 5. 4706. doi: 10.1038/ncomms5706. 査読有

- ④ Yamashita A, Morioka M, Kishi H, Kimura T, Yahara Y, Okada M, Fujita K, Sawai H, Ikegawa S, Tsumaki N. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* 2014. 25. 507-511. doi: 10.1038/nature13775. 査読有

- ⑤ Fujita K and Tsumaki N. Stem cell aging and the implications for stem cell-based therapies for aging-related diseases and aged tissues. *Clin Calcium.* 2013. 23. 65-73. doi: CliCa13016573 査読無

- ⑥ Mondal AM, Horikawa I, Pine SR, Fujita K, Morgan KM, Vera E, Mazur SJ, Appella E, Vojtesek B, Blasco MA, Lane DP, Harris CC. $p53$ isoforms regulate aging- and tumor-associated replicative senescence in T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2013. 123. 5247-5257. doi: 10.1172/JCI70355. 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）研究代表者のみ
藤田 香里. p53 isoforms regulate aging-
and tumor-associated replicative
senescence. BMB2015（第 3 8 回日本分子生
物学会年会、第 8 8 回日本生化学会大
会）. 2015. 12. 2. 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 香里 (Kaori FUJITA)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員

研究者番号：10633092

(2) 研究分担者

妻木 範行 (Noriyuki TSUMAKI)

京都大学・iPS 細胞研究所・教授

研究者番号：50303938