

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：11401
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2018～2021
課題番号：18H02925
研究課題名(和文) 抗老化因子 133p53による軟骨細胞への分化誘導と増殖の分子機構解明とその応用

研究課題名(英文) Mechanism of chondrogenic differentiation from aged mesenchymal stem cells by overexpression of delta133p53

研究代表者
藤田 香里 (Fujita, Kaori)

秋田大学・理工学研究科・講師

研究者番号：10633092
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：抗老化因子 133p53 の過剰発現系を用いた老化制御の分子機構を解明し、高齢患者の老化間葉系幹細胞からの移植用軟骨細胞分化誘導法の確立に向けた基礎研究として、老化間葉系幹細胞に 133p53を過剰発現させ、軟骨分化誘導を経時的にサンプリングし、RNA シーケンスにより特徴的な発現変動遺伝子群を得た。さらにその経時的に発現変動する遺伝子群が4つのクラスターに分けられることが判明した。また、同様のサンプルを用いて、133p53の標的遺伝子を見出すため、Cut & Runシーケンスを行い、ピーク近傍の特徴的な遺伝子を多数得た。今後は、老化間葉系幹細胞を若返らせ軟骨細胞に誘導する全機序を解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義
変形性関節症をはじめとする軟骨の加齢性疾患に対する根本的な治療は現在はない。軟骨には血管も神経も通っておらず、自然治癒も期待できない。変形性関節症の罹患率の高い高齢患者からの間葉系幹細胞を用いた再生医療を考える場合、高齢患者の細胞は老化しており、軟骨細胞に分化誘導させることは若年の患者の細胞に比べて非常に困難である。一方、自分の細胞を用いるという点では、拒絶反応の問題がクリアできる。以上より、既に見出した抗老化作用を持つ 133p53を用いて老化間葉系幹細胞を若返らせ、軟骨細胞に分化誘導する詳細な分子機序を解明するために上記研究を行った。さらに詳細な解析により、誘導法の確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：For therapeutic applications against defects of adult articular cartilage increase with aging, development of regenerative medicine and cartilage tissue engineering are important. However, autologous bone marrow mesenchymal stromal cell (MSC) implantation for elderly individuals is more difficult than young individuals, because capability of cell proliferation and differentiation of the cells decreases in elderly individuals. Cellular senescence contributes to organismal aging and age-related diseases. The p53 signaling network plays a critical role in the induction of cellular senescence. The human TP53 gene encodes twelve natural isoforms. Overexpressing 133p53, an anti-senescence p53 isoform, in near-senescent hMSCs and their differentiated chondrocytes showed characteristic differential expression genes in RNA-sequencing. We also obtained many 133p53-transcriptional target genes during the chondrogenic differentiation from 133p53-overexpressing hMSCs, by Cut & Run-sequencing.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：133p53 p53 isoform aging mesenchymal stem cells differentiation chondrocytes

1. 研究開始当初の背景

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することは若年患者と比較して困難である。また、高齢者に多い離断性骨軟骨炎では軟骨自家移植が行われるが、この場合も正常軟骨細胞を採取後、細胞を培養し移植に賄える細胞数を確保することは、若年患者に比べ、細胞老化の影響を強く受けるため難しくなる。そもそも間葉系幹細胞や軟骨細胞の老化を積極的に制御して移植可能な軟骨細胞を得るための分子機構はあるのかという問題に対し、これまでに海外の幾つかのグループが老化間葉系幹細胞の増殖亢進を目的に研究しているが答えを得るに至っていない。例えば、テロメラーゼの過剰発現は間葉系幹細胞の老化を遅延するが、細胞の形質転換が起こりガン化しやすく、主に骨形成方向のみに分化すること (J. Bone Miner. Res., 2003; Nat. Biotechnol., 2002)、また、RB (retinoblastoma protein) の発現抑制は形質転換なしに増殖促進するが、骨・軟骨・脂肪への分化能も失われること (Cell. Mol. Life Sci., 2013)、などの報告があるが何れにしても老化を積極的に制御して移植可能な軟骨細胞得るところまでは至っておらず、軟骨細胞自体の老化制御に関しては報告が少ない。

一方これまで申請者は、様々なヒト正常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てきた (Nat. Cell Biol., 2009; Nat. Cell Biol., 2010; Aging, 2011; Oncogene, 2012; J. Clin. Invest., 2013; Nat. Commun., 2014)。また最近では、iPS 細胞作製時に p53 をノックダウンするよりも競合的 isoform の Δ 133p53 を過剰発現させる方がゲノム安定性を確保し、効率よく iPS 細胞を作製できることを明らかにした (Cell Death Differ., 2017)。すでに予備実験として軟骨細胞に分化誘導できないほど老化した間葉系幹細胞に Δ 133p53 を過剰発現させると細胞が若返り、軟骨細胞に誘導できることを見出している。以上より、単に老化間葉系幹細胞の表現型や分化誘導能低下の分子機構、老化軟骨細胞表現型を調べるのではなく、本研究では抗老化因子である Δ 133p53 を用いて、老化を制御(克服)して高齢患者の老化間葉系幹細胞からでも効率よく移植用軟骨細胞を得る方法、また、高齢患者の老化軟骨細胞増殖促進の方法確立へと展開するための基盤となる研究を行う。

2. 研究の目的

抗老化因子 Δ 133p53 の過剰発現系を用いた老化制御の分子機構を解明し、高齢患者の老化間葉系幹細胞からの移植用軟骨細胞分化誘導法の確立に繋げる。

3. 研究の方法

(1) 老化ヒト間葉系幹細胞に $\Delta 133p53$ を過剰発現させると細胞が若返り、軟骨細胞分化誘導能が上昇することは既に見出している。そこで、 $\Delta 133p53$ 過剰発現がどのような分子機構に影響を与えるかを、 $\Delta 133p53$ を過剰発現させた老化間葉系幹細胞とベクターコントロール細胞から軟骨細胞に分化誘導させ 7 日毎にサンプリング後、軟骨マーカー遺伝子発現のチェックと同時に RNA シーケンス (RNA-Seq) を行った。同時に、 $\Delta 133p53$ は p53 の isoform であり転写因子の側面もあるため、軟骨細胞分化における $\Delta 133p53$ 特異的なクロマチン結合領域を同定するため、Cut & Run シーケンス (Cut & Run-Seq) を行った。

(2) $\Delta 133p53$ の発現上昇を遺伝子導入で行うことは実際の臨床応用を考えた場合、様々な問題が生じやすい。そこで、内在性 $\Delta 133p53$ の転写発現やタンパク質発現の安定性を上昇させる低分子化合物等を見つけることでこれを回避したい。そのためのスクリーニングに使用する細胞系の構築に際し、細胞に導入するコンストラクトを作製した。一つは内在性 $\Delta 133p53$ の転写を指標とするもので、CRISPR/Cas9 システムにより、ヒト *TP53* 遺伝子エクソン4の $\Delta 133p53$ の開始コドン直前に tdTomato 遺伝子を挿入した。もう一つは、 $\Delta 133p53$ のタンパク質安定性を指標としたスクリーニングのため、RFP (Red Fluorescent Protein) との融合タンパク質発現コンストラクトを作製した。

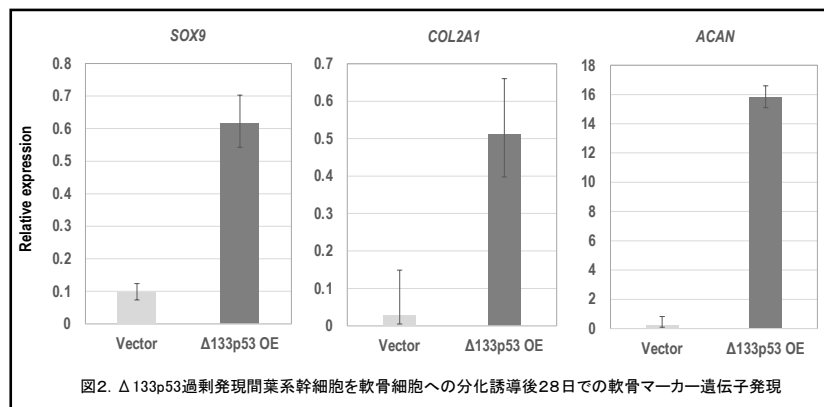
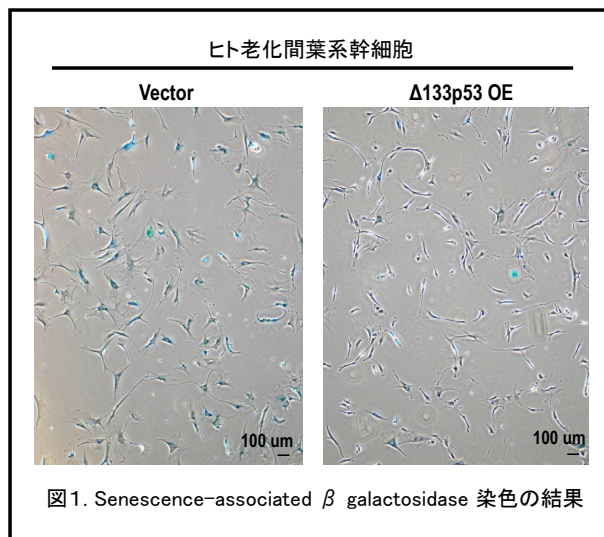
4. 研究成果

(1)-1. $\Delta 133p53$ 過剰発現老化ヒト間葉系幹細胞とその軟骨分化誘導における RNA-seq

まず、 $\Delta 133p53$ 過剰発現、あるいはベ

クターコントロールを導入した老化ヒト間葉系幹細胞の細胞増殖、老化マーカーの1つである senescence-associated β -galactosidase 染色を行い、 $\Delta 133p53$ 過剰発現細胞が老化を改善することを確認した(図1)。次に、前述の2つの細胞をそれぞれ軟骨細胞に分化誘導し、軟骨

マーカー遺伝子である *SOX9*、*COL2A1*、*ACAN* 遺伝子の発現を qRT-PCR で確認した(図2)。その結果、 $\Delta 133p53$ 過剰発現細胞の *SOX9*、*COL2A1*、*ACAN* は



分化誘導後28日において有意に発現が上昇していた。さらに、これらの2つの間葉系幹細胞を軟骨細胞に分化誘導させ7日毎にサンプリング後、RNAシーケンス (RNA-Seq) を行ったところ、 $\Delta 133p53$ 過剰

発現に特徴的な発現変動遺伝子が多数認められた。それらを、分化誘導時間ごとにプロットすると、時間変動に伴い発現変動する特徴的な4種にクラスタリングできることがわかった(図3)。現在、これら発現変動遺伝子の個々、及び分化誘導時間毎の変化の詳細な解析を行っており、抗老化 p53 isoform の $\Delta 133p53$ による老化ヒト間葉系幹

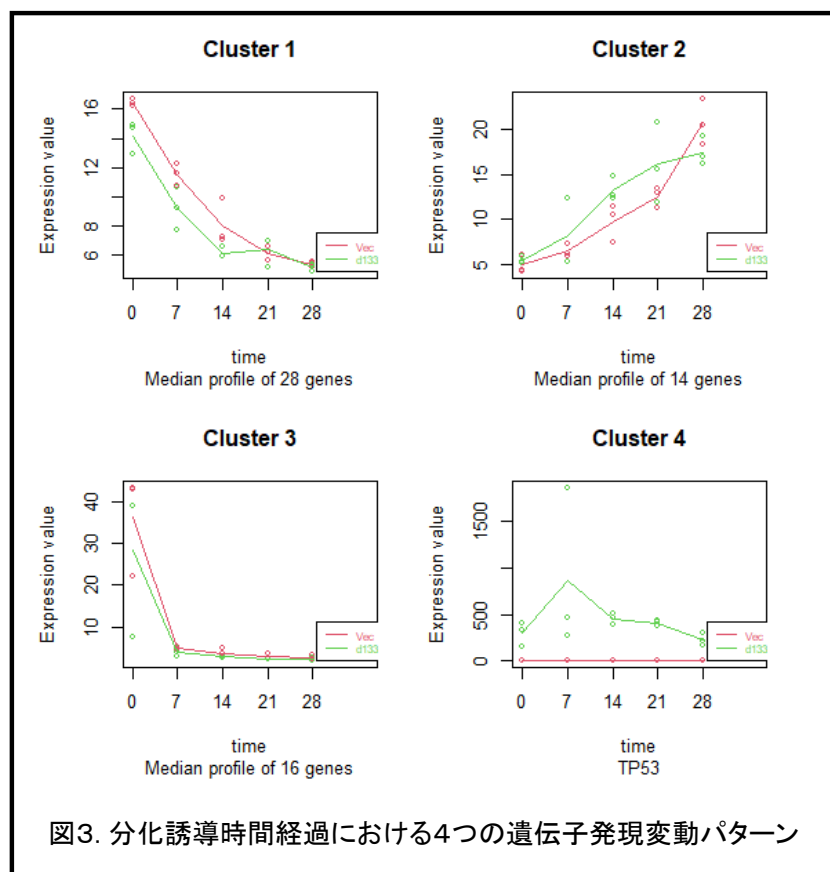


図3. 分化誘導時間経過における4つの遺伝子発現変動パターン

細胞の老化制御機序と軟骨分化誘導機序の全容を明らかにしていく。

(1)-2. $\Delta 133p53$ 過剰発現老化ヒト間葉系幹細胞から分化誘導させた軟骨の Cut & Run-Seq DYKDDDDK タグ付き $\Delta 133p53$ 過剰発現老化ヒト間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化誘導を行い、(1)において、軟骨マーカー遺伝子発現の違いが認められた誘導後14、21、28日の軟骨パーティクルを用いて、抗 DYKDDDDK 抗体により Cut & Run 反応を行なった。これにより、ネイティブなクロマチン上の DYKDDDDK タグ付き $\Delta 133p53$ - DNA 複合体を分離した。その後、複合体より DNA を抽出し、ライブラリーを作製後、次世代シーケンス解析を行なった。その結果、分化誘導時間が経過するに従い、 $\Delta 133p53$ が結合しているプロモーター領域のピークおよび転写開始点近傍のピークが減少することがわかった。また、アノテーションによりピーク近傍に位置する非常にユニークな遺伝子情報リストを得ている。さらなる解析により、老化間葉系幹細胞から $\Delta 133p53$ により効率よく軟骨細胞分化誘導させる際の、 $\Delta 133p53$ の転写標的遺伝子を同定する予定である。

(2) 内在性 $\Delta 133p53$ の転写やタンパク質の安定性を指標としたスクリーニングのためのコンストラクト作製

1. 内在性 $\Delta 133p53$ の転写を指標としたコンストラクト

図4のように、ヒト TP53 遺伝子内エクソン4の非コーディング領域にある $\Delta 133p53$ の転写に必要な alternative promoter の活性を蛍光可視化するため、 $\Delta 133p53$ の開始コドンの下流に、tdTomato - 2A - blasticidin resistance gene - poly A を挿入するためのドナーベクターの設計を行なった。

但し、 $\Delta 133p53$ の開始コドンは全長 p53 と in frame であることから、これらの挿入カセットを単純に開始コドン直下に挿入すると、融合タンパク質の発現が懸念される。そこで、Cas9 で切断される塩基より

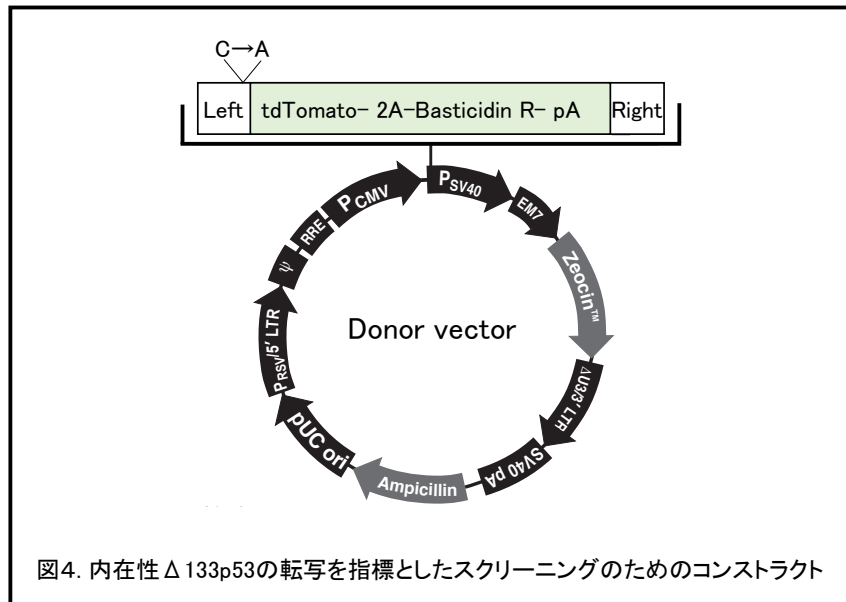


図4. 内在性 $\Delta 133p53$ の転写を指標としたスクリーニングのためのコンストラクト

上流のレフトアーム部分の1塩基を C→A に置換した。最終的に、pLenti4/V5-DEST ベクターの CMV プロモーター直下をレフトアーム(1 kbp) - tdTomato - 2A - blasticidin resistance gene - poly A-ライトアーム(1kbp)に入れ替えたドナーベクターを構築した。一方、ガイド RNA を2種設計し、それぞれ pLenti6-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro ベクターの sgRNA 部分に挿入した。

2. 内在性 $\Delta 133p53$ のタンパク質発現安定性を指標としたコンストラクト

pLenti- III- RFP- N の RFP (Red Fluorescent Protein) に in frame になるように $\Delta 133p53$ cDNA を挿入した。RFP- $\Delta 133p53$ 融合タンパク質の蛍光消失の有無を指標としてスクリーニングを行う。

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 1件）

1. 著者名 Kaori Fujita	4. 巻 20
2. 論文標題 p53 Isoforms in Cellular Senescence- and Ageing-Associated Biological and Physiological Functions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E6023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20236023.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 Kaori Fujita
2. 発表標題 p53 isoforms in cellular senescence, aging, cancer, and reprogramming
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会ワークショップ
4. 発表年 2019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
---------	---------