

【要約】

Role of tumor suppressor p53 in the functional anterior pituitary differentiation from human embryonic stem cells

(ヒト ES 細胞からの機能的下垂体前葉細胞誘導におけるプラコード分化を介した癌抑制遺伝子 p53 の役割)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：横手 幸太郎教授)

河野 貴史

## 【緒言】

ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療研究の進展と内分泌細胞誘導への応用に伴い、ヒト(h)ES細胞からの機能的下垂体細胞誘導や $\beta$ 細胞の作製法が樹立され、注目を集めている。しかしながら、その分化誘導プロセスの詳細な分子基盤は十分に明らかにされておらず、誘導効率やiPS細胞のquality control・腫瘍化リスクなど、未だ多くの課題が残されている。本研究は、腫瘍抑制シグナルと幹細胞機能制御の接点で作用する転写因子p53に着目し、*in vitro*におけるhES細胞からの機能的下垂体細胞作製モデルを樹立し、CRISPR/Cas9を組み合わせて、その分化プロセスにおけるp53の役割を検討した。

## 【結果・考察】

細胞株はkES1細胞を使用し、feeder free条件で培養し、matrigel coating dish上で分化誘導を行った。ES細胞から胚様体形成過程を介さない機能的下垂体分化誘導モデルにおいて、NogginとSB431543を用いたdual SMAD阻害によるhES分化誘導刺激を行った後、sonic hedgehogとpurmorphamineによる下垂体プラコード分化を経て $\beta$ -secretase阻害の有無によりadrenocorticotrophic hormone(ACTH)産生系譜とgrowth hormone(GH)産生系譜の機能的下垂体内分泌細胞への分化誘導を行った。ACTH産生系譜細胞では、*TBX19/NEURO D1/POMC*の時間依存的発現誘導を認め、*PIT1*の一過性に軽度発現上昇を認めた。一方、GH産生系譜細胞では、*PIT1/GH1*の発現誘導を認め、ACTH系譜の*TBX19/POMC*遺伝子発現は認めなかった。また、分化誘導後day30で蛍光免疫染色を行った結果、ACTHおよびGH分泌顆粒を認めた。培養メディアウムにACTH分泌を確認し、hES細胞から機能的ACTH産生細胞とGH産生細胞を樹立した。

次に、機能的下垂体分化誘導の分子メカニズムを明らかにする目的でRNAシーケンスを用いたゲノムワイド解析を行った。幹細胞状態から下垂体内分泌細胞期と分化段階の進展に伴ってダイナミックな遺伝子変動を認め、発現変動遺伝子数の増加を認めた。Ingenuity pathway analysis (IPA)を用いた活性化経路解析では、下垂体分化制御に必須なsonic hedgehogやWNT、notch、TGF $\beta$ シグナルなどの転写ネットワーク、ACTH産生経路であるcorticotrophin releasing hormone signalを認め、樹立した分化誘導システムの妥当性が確認された。さらに、がん抑制遺伝子p53経路の活性化が明らかとなった。タンパク発現解析ではp53の経時的発現誘導および蛍光免疫染色での核内集積を認めた。RNA-seqの遺伝子発現解析からp53下流遺伝子群は遺伝子ごとに異なる時間依存的・時相特異的発現誘導プロファイルを認め、RT-qPCRによる遺伝子発現解析においてもp53下流遺伝子*CDKN1A*の時間依存的発現誘導を認めた。

機能的下垂体分化制御におけるp53の役割を検討するため、CRISPR/Cas9を用いて樹立したp53欠失hES細胞(p53KO-hES)を用い、ACTH産生系譜細胞への分化誘導を行い、機能解析を行った。その結果、p53KO-hES細胞では、*TBX19*、*NEURO D1*、*POMC*遺伝子の発現誘導効果の増強を認め、蛍光免疫染色ではp53WT ES細胞に比較して

NEURO D1、POMC の発現増加を認めた。p53KO-hES 細胞では ACTH 系譜への分化が促進していることが明らかとなった。

そこで ACTH 産生系譜細胞分化における p53 の分子機構を検討するため、RNA シーケンスによるゲノムワイド解析を行った。発現変動遺伝子解析ではプラコード期から機能的下垂体内分泌細胞期にかけて分化に重要で p53 依存的遺伝子群の著明な増加を認め、活性化経路解析を行った。分化誘導 day7 において、ILK や RhoA など細胞増殖関連経路に加え、幹細胞関連経路の活性化が上位に認められた。また、分化誘導 day30 では、下垂体分化に必須な WNT、TGF、notch シグナルの活性化を認め、p53 依存的に制御を受ける可能性が示唆された。

機能的下垂体内分泌細胞は多種多様な転写因子の時期特異的な制御によって分化誘導が起こる。p53 は分化後期である下垂体内分泌細胞への分化制御に加え、幹細胞関連遺伝子群の制御により早期プラコード分化と p53 依存的制御の接点で機能することが明らかとなった。

p53 の発現制御機構として RNA-seq の解析からさまざまな non-coding RNA の機能的制御作用が示唆され、さらなる分子メカニズムの解析が重要であると考えられた。

#### 【結語】

幹細胞における p53 機能として、Nanog 抑制を介した核リプログラミングへの負の作用だけでなく、レチノイン酸刺激による 3 胚葉分化の制御が報告されている。今回の結果から、p53 シグナルの新たな機能として、*in vitro* での ES 細胞からの下垂体分化における制御因子として作用する可能性が示された。腫瘍抑制シグナルと下垂体分化制御メカニズムの違いを明らかにすることにより、安全で効率的な誘導方法開発への応用が期待できると考えられた。