

## 論文の内容の要旨

### Generation of a p16 Reporter Mouse and Its Use to Characterize and Target p16<sup>high</sup> Cells *In Vivo*

(新規 p16 レポーターマウスを用いた生体内における p16 陽性細胞の一細胞解析)

氏名 大森 徳貴

#### 〈背景〉

細胞は DNA 損傷、テロメアの短小化、がん遺伝子の活性化、酸化ストレスなどの様々なゲノムストレスを受けると細胞老化が誘導されることが知られている(図 1)。

細胞老化によって生じる『老化細胞』

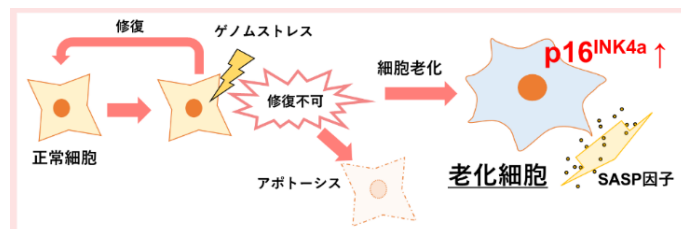


図 1 老化細胞の誘導機構

細胞』の特徴として、細胞周期停止因子 p16<sup>Ink4a</sup> が発現することで不可逆的な増殖停止を示すことや、SASP(Senescence-associated secretory phenotype)と呼ばれる表現型をとり炎症性サイトカインなどを分泌することが知られている。このような老化細胞に特有の表現型は *in vitro* の培養システムを用いて解析されてきた。近年、マウスを用いた研究から、老化細胞の除去を行うと様々な加齢性疾患が改善し健康寿命が延伸されることが示され、細胞老化は加齢変化に重要な役割を担っていることが明らかとなった。そのため、老化細胞の除去は様々な疾患を治癒できる可能性を秘めており注目を集めている。また、老化細胞は加齢への関与だけでなく、皮膚創傷治癒や肝臓の繊維化などの組織の損傷・再生時ににおいて一時的に誘導され、速やかに消失すると考えられている。しかし、生体内の老化細胞

を同定・分離するための適切なツールがなかったため、生体内の老化細胞がどのような細胞種から誘導されるのか、さらには生体内における性質は未知であった。そこで本研究では、老化細胞を生体内で可視化できるマウスモデルを新規に樹立しその多様な性質を明らかにするとともに、老化細胞と疾患の関連性について明らかにしていく。

## 〈研究内容〉

### 1. マウスモデルの樹立

これまで生体内の老化細胞を可視化するために、老化細胞のマーカ遺伝子 *p16<sup>Ink4a</sup>* に着目したマウスモデルの樹立は試みられていたが、検出感度の低さと時期特異性が問題であった。

そこで、生体内の老化細胞

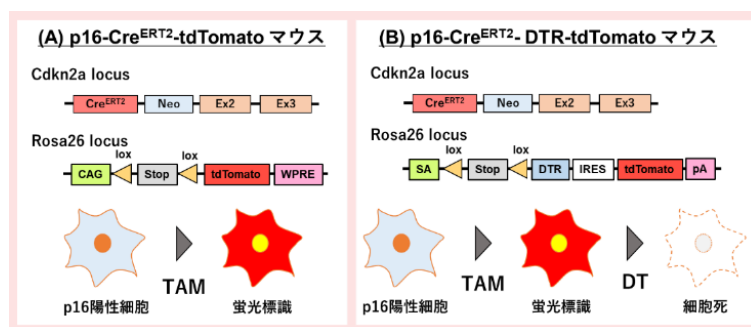


図2 新規に樹立したマウスモデル

を時期特異的に1細胞レベルで蛍光標識可能なシステムの構築を目指した。時期特異性での標識を可能とするため、タモキシフェン(TAM)により遺伝子の発現調節が可能となる Cre<sup>ERT2</sup> システムを用いることにした。また、十分な Cre リコンビナーゼ活性を可能にするため、組み換え遺伝子の発現量を上昇させると報告されていたネオマイシン遺伝子カセットも同時に組み込むことにした。まず、この Cre<sup>ERT2</sup> リコンビナーゼ・ネオマイシン遺伝子カセットを内在性の *p16<sup>Ink4a</sup>* 遺伝子の1番目のエクソンに組み込み、p16 陽性細胞で Cre<sup>ERT2</sup> が発現するマウスモデルである p16-Cre<sup>ERT2</sup> マウスを作製した。このマウスと Cre<sup>ERT2</sup> リコンビナーゼ活性依存的に tdTomato を発現する Rosa26-CAG-lsl-tdTomato マウスを交配し、TAM 依存的に p16 陽性細胞を赤色蛍光で標識可能なマウスモデル(p16-Cre<sup>ERT2</sup>-tdTomato)を樹立した(図2A)。

### 2. 生体内の p16 陽性細胞の性質

まず、p16-Cre<sup>ERT2</sup>-tdTomato マウスに TAM を投与して p16 陽性細胞を標識した切片を作製したところ、脳・肺・肝臓・腎臓・心臓・脾臓・小腸・大腸・皮膚・脂肪といった全身の様々な臓器・組織にて p16 陽性細胞が確認された。次に、3・6・9・12・15・18・21・24 カ月齢のマウスの肺・腎臓・皮膚に対して FACS 解析を行ったところ、p16 陽性細胞の数が加齢に伴い増加することが分かった。肺では加齢に伴い徐々に p16 陽性細胞数が増加するのに対し、腎臓では9カ月齢、皮膚では12カ月齢から p16 陽性細胞数が増加するような、臓器による蓄積の違いが明らかになった。さらに、3カ月齢のマウスに TAM

を投与した後に、3・6 カ月後の臓器・組織内の p16 陽性細胞のクラスター形成の割合や数の変化を解析した。その結果、p16 陽性細胞のクラスター形成は認められず、老化細胞のもっとも重要な性質の一つである不可逆的な増殖停止機能を持つことが示唆された。また、この実験による細胞数の変化から推測される半減期は肝臓では 2.6 カ月、腎臓では 2.9 カ月、肺では 4.2 カ月であることが明らかとなり、p16 陽性細胞は生体内においてターンオーバーされていることが示唆された。(図 3)。



図 3 生体内の p16 陽性細胞の特性

次に、7-10 カ月齢の p16-Cre<sup>ERT2</sup>-tdTomato マウスを用い、肝臓と腎臓において p16 陽性細胞を単離し、シングルセル RNA-seq (scRNA-seq)解析を行った。その結果、ほぼすべての細胞種において p16 陽性細胞が検出された。肝臓では、特に肝類洞内皮細胞(LSECs)において多く認められた。一方、クッパー細胞では p16 陽性細胞が多く存在する細胞集団はクッパー細胞と LSECs の両者の性質を持っていることが明らかになった。これは、p16 陽性になることにより細胞のアイデンティティが変化していることが推察される。また、コリン欠乏高脂肪食を用いた長期間飼育により非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を誘導した肝臓において、p16 陽性細胞数は増加していた(図 3)。p16 陽性細胞と陰性細胞の遺伝子発現変化の違いを解析したところ、マクロファージにおいて、アポトーシス抵抗性に関わる遺伝子群や炎症性サイトカイン産生に関わる遺伝子群の発現上昇が認められた。また正常肝と NASH における p16 陽性細胞の LSECs を比較したところ、p16 陽性細胞が NASH における炎症場形成に大きな影響を及ぼしていることが明らかになった。腎臓においては近位尿細管上皮細胞と遠位尿細管細胞に多く認められた。特に、p16 陽性の近位尿細管上皮細胞においては、エピジェネティックな変化が生じていることが明らかになった。一方、p16 陽性の遠位尿細管上皮細胞においては、RNA 合成が活発に行われていた。また集合管上皮細胞では p53 経路の活性化や細胞内 pH のホメオスタシスの変化が起きていた。これらの結果から、生体内の老化細胞は多様な細胞から誘導され、細胞種ごとに様々な機能変化・性質が認められることが示唆された(図 4)。



図 4 scRNA-seq により明らかになった性質

### 3.p16 陽性細胞と疾患モデル

これまでに老化細胞は様々な疾患に関与していることが疑われているが、除去した際の影響は分かっていないことが多い。

そこで、p16-Cre<sup>ERT2</sup> マウスと Cre<sup>ERT2</sup> リコンビナーゼ活性依存的にジフテリア毒素受容体 (DTR) を発現する Rosa26-SA-lsl-DTR-IRES-tdTomato マウスを交配し、

ジフテリア毒素 (DT) 依存的に tdTomato 標識された p16 陽性細胞

を除去可能なマウスモデル(p16-Cre<sup>ERT2</sup>-DTR-tdTomato)を樹立した(図 2B)。このマウスに、コリン欠乏・低メチオニン高脂肪食飼料(CDA-HFD)を与え NASH を誘導し、老化細胞の除去による影響を検証した。6 週間 CDA-HFD を与え、後半の 3 週間で p16 陽性細胞を除去したところ、除去を行っていないマウスに比べ、脂肪化や炎症が抑制されていた。この結果から、p16 陽性細胞の除去により NASH の進行を抑制できることが示唆された(図 5)。

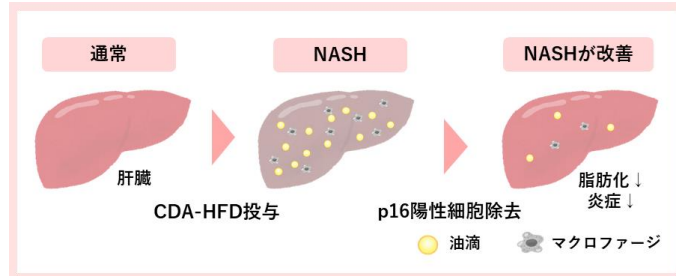


図 5 NASH と p16 陽性細胞の関係

#### 〈まとめ・展望〉

本研究で樹立された新規マウスモデルにより、生体内の p16 陽性細胞は様々な臓器・組織に存在し増殖せず加齢に伴い蓄積していることが明らかになった。また、scRNA-seq 解析から、p16 陽性細胞は臓器や細胞種により多様な性質を持っていることが明らかとなった。さらに、p16 陽性細胞を除去することにより NASH の病態の進行を抑制できることが明らかになり、NASH 病態と深く関与していることが明らかとなった。今後はこれらのマウスモデルを用い、老化細胞と様々な加齢性疾病の関連性や新たな機能を明らかにしていく。