

審査の結果の要旨

氏名 大森 徳貴

本論文は6章からなる。第1章は、イントロダクションである。本研究の対象である老化細胞について、その誘導機構や特徴について記載されている。また、老化細胞と老化研究について、最新の知見や老化細胞に着目する理由、研究目的について述べられている。これまで多くの老化細胞の研究は主に *in vitro* で行われていたが、近年老化細胞のマーカー遺伝子である $p16^{Ink4a}$ に着目した老化細胞のレポーターマウスモデルの樹立が試みられてきた。しかしながら $p16^{Ink4a}$ の発現量の低さから様々な組織において一細胞レベルで標識することが難しいという問題点があった。その為、生体内の老化細胞がどの細胞種から誘導されるのか、*in vitro* で明らかとなっている性質と同じ性質を持つのか、代謝されるのかなどといった、老化細胞の生体内での特性などについてほとんどわかっていなかった。そこで本研究では新規に $p16^{Ink4a}$ に着目した老化細胞のレポーターマウスモデル($p16\text{-Cre}^{ERT2}\text{-tdTomato}$ マウス)を樹立し、シングルセル RNA-seq などを用いてその性質に迫っていくものである。

第2章は方法と材料であり、本研究で樹立された $p16\text{-Cre}^{ERT2}\text{-tdTomato}$ マウスの作成方法やコンストラクトの詳細や飼育方法、細胞培養法、FACS 解析、シングルセル RNA-seq の手技と解析手法、切片を用いた病理解析、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)誘導手法など、必要な情報がそれぞれ適切に記載されている。

第3章は結果である。まず $p16$ 陽性細胞で Cre^{ERT2} を発現するマウスモデル $p16\text{-Cre}^{ERT2}$ マウスを作製し、このマウスと Cre^{ERT2} リコンビナーゼ活性依存的に tdTomato を発現するマウスを交配し、タモキシフェン依存的に $p16$ 陽性細胞を赤色蛍光で標識可能な $p16\text{-Cre}^{ERT2}\text{-tdTomato}$ マウスを樹立している。このマウスにタモキシフェンを投与して $p16$ 陽性細胞を標識し、全身の様々な組織で $p16$ 陽性細胞が存在することを示した。また、 $p16$ 陽性細胞は加齢に伴い蓄積すること、不可逆的に増殖停止していること、ターンオーバーされていることを示した。次に、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 解析を実施している。肝臓の $p16$ 陽性のクッパー細胞では、クッパー細胞と肝類洞内皮細胞(LSECs)の両者の性質を持血、細胞のアイデンティティの変化を示した。 $p16$ 陽性のマクロファージは、アポトーシス抵抗性や炎症性サイトカイン産生に関わる遺伝子群が発現上昇することを示した。さらに、 $p16$ 陽性細胞が NASH における炎症場形成に影響を及ぼしていることを示した。腎臓については、 $p16$ 陽性の近位尿細管上皮細胞ではエピジェネティックな変化、遠位尿細管上皮細胞では RNA 合成の活性化、集合管上皮細胞では $p53$ 経路の活性化や細胞内 pH のホメオスタシスに変化が生じていることを示した。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の変化・性質が認められることを示した。最後に、 $p16\text{-Cre}^{ERT2}$ マウスと Cre^{ERT2} リコンビナーゼ活性依存的にジフテリア毒素受容体を発現するマウス

を交配し、ジフテリア毒素依存的に標識された p16 陽性細胞を除去可能な p16-Cre^{ERT2}-DTR-tdTomato マウスを樹立している。このマウスに対して NASH を誘導し老化細胞の除去を行ったところ脂肪化や炎症が抑制され、p16 陽性細胞の除去により NASH の進行を抑制できることを示した。

第 4 章は結論と考察である。これまでの p16 に着目したレポーターマウスと p16-Cre^{ERT2}-tdTomato を比較し、老化細胞が生じる時期やターンオーバーの期間などについて議論している。また、シングルセル RNA-seq により明らかになった in vivo の老化細胞の性質と、これまでの in vitro の研究で明らかになった老化細胞の性質との関連性について議論している。

第 5 章は図、表、およびこれらの説明であり、必要な情報がそれぞれ適切に記載されている。

第 6 章は引用文献であり、本文中に適切な場所に適切に引用されている。

本論文は、老化細胞を一細胞レベルで可視化できるマウスモデルを樹立し、これまでに未知であった in vivo の老化細胞の性質などが明らかにし、老化研究を加速させる成果である。これまでは老化細胞のマーカーとして主に p16^{Ink4a} が用いられてきたが、本論文で樹立したマウスモデルを用いることで、老化細胞固有の膜表面マーカーなど、新しいマーカーが見つかることも期待される。

なお、本論文は、王徳瑋、城村由和、金井友美、横手貴匠、隈本宗一郎、西山敦哉、中西真、中野泰博、木戸丈友、宮島篤、洲崎悦生、上田泰己、山口貴世志、畠山晴良、古川洋一、清水英悟、片山琴絵、井元清哉、中島拓弥、七野成之、上羽悟史、松島綱治、岩崎加奈子、三好千香、船戸弘正、柳沢正史、山崎聡、坂本毅治、小沢学、山田泰広、吉田進昭、上野博夫との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。