

造血幹細胞とそのニッチの加齢変化の分子機構解明

Molecular Mechanisms of Age-Related Changes in  
Hematopoietic Stem Cells and Their Niches

2024年2月

反町 優理子  
Yuriko SORIMACHI

造血幹細胞とそのニッチの加齢変化の分子機構解明

Molecular Mechanisms of Age-Related Changes in  
Hematopoietic Stem Cells and Their Niches

2024年2月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
生命医科学専攻 分子病態医化学研究

反町 優理子  
Yuriko SORIMACHI

## 目次

第1章 : ストレス応答因子 p38MAPK は加齢早期および後期過程においてそれぞれ異なるメカニズムで造血幹細胞エイジングを制御する .....	1
1.1 研究背景 .....	1
1.1.1 造血幹細胞を起点とした造血システム .....	1
1.1.2 ストレス造血が誘導する2種類の幹細胞エイジングとその特徴 .....	2
1.1.3 HSC エイジングを誘導する既存のメカニズム .....	3
1.1.4 HSC エイジングとストレス応答因子 p38MAPK .....	4
1.1.5 本研究の目的 .....	7
1.2 実験方法 .....	7
1.2.0 使用した試薬および抗体 .....	7
1.2.1 実験動物 .....	10
1.2.2 マウス遺伝子型同定 .....	12
1.2.3 マウス骨髄細胞の採取 .....	14
1.2.4 マウス脾臓細胞, 胸腺細胞の採取 .....	16
1.2.5 マウス末梢血細胞の採取 .....	17
1.2.6 fluorescence-activated cell sorting (FACS) を用いた造血幹/前駆細胞の解析・単離 .....	17
1.2.7 骨髄移植実験 .....	18
1.2.8 骨髄移植後の末梢血・骨髄キメリズム解析 .....	18
1.2.9 コロニーアッセイ (CFU-C/HPP-CFC アッセイ) .....	19
1.2.10 細胞周期解析 (Ki67 染色) .....	19
1.2.11 p38MAPK のリン酸化状態解析 .....	20
1.2.12 ミトコンドリア活性酸素 (ROS) 解析 .....	21
1.2.13 アポトーシス解析 .....	22
1.2.14 細胞からの mRNA の単離と cDNA 合成 (RNeasy mini Kit; QIAGEN, 74104) .....	23
1.2.15 リアルタイム PCR .....	24
1.2.16 移植後の造血幹細胞の免疫細胞染色 .....	25
1.2.17 RNA 抽出とマイクロアレイ .....	26
1.2.18 データベースからの若齢・1 年齢・2 年齢マウス造血幹細胞の RNA-seq データ取得およびデータ解析 .....	27
1.2.19 GSEA .....	27
1.2.20 統計解析 .....	29
1.3 実験結果 .....	29
1.3.1 加齢初期段階において p38 $\alpha$ は HSC をエイジング形質から保護する .....	29
1.3.2 加齢後期過程において p38 $\alpha$ は HSC エイジングを促進する .....	34

1.3.3	加齢後期過程における p38 $\alpha$ 欠損は HSC の炎症を抑制しエイジング形質を抑制する	39
1.3.4	早老症モデルマウス( <i>Atm</i> $\Delta/\Delta$ マウス)において p38 $\alpha$ は HSC をエイジング形質から保護する	46
1.3.5	誘導性 <i>Atm</i> 欠損は造血幹細胞移植後に p38MAPK の活性化を誘導する	50
1.3.6	<i>Atm</i> $\Delta/\Delta$ マウスにおいて p38 $\alpha$ 欠損は HSC の炎症応答活性化と幹細胞機能低下を誘導する	51
<b>1.4</b>	<b>考察</b>	<b>55</b>
1.4.1	HSC エイジング進行初期過程における p38MAPK の役割	55
1.4.2	HSC エイジング進行後期過程における p38MAPK の役割	56
1.4.3	早老症モデルにおける p38MAPK の役割	58
<b>1.5</b>	<b>Data availability</b>	<b>59</b>

## 第 2 章：ストレス応答因子 p53 は間葉系幹細胞(MSC)の幹細胞性維持および癌化抑制に働く

<b>2.1</b>	<b>研究背景</b>	<b>60</b>
2.1.1	骨髄間葉系幹細胞の造血ニッチとしての機能	60
2.1.2	MSC エイジングの特徴と既存のメカニズム	61
2.1.3	腫瘍の起源細胞としての間葉系幹細胞	62
2.1.4	ストレス応答因子 p53 について	63
2.1.5	本研究の目的	64
<b>2.2</b>	<b>実験方法</b>	<b>64</b>
2.2.0	使用した試薬および抗体	64
2.2.1	実験動物	66
2.2.2	マウス遺伝子型同定	67
2.2.3	マウス骨髄細胞の採取	68
2.2.4	マウス脾臓細胞, 胸腺細胞の採取	68
2.2.5	マウス末梢血細胞の採取	68
2.2.6	マウス骨髄間葉系幹細胞の採取	68
2.2.7	fluorescence-activated cell sorting(FACS)を用いた造血幹/前駆細胞および間葉系幹細胞の解析・単離	69
2.2.8	骨髄移植実験および移植後の末梢血キメラリズムの解析	70
2.1.9	マウス骨髄間葉系幹細胞の培養	70
2.2.10	マウス骨髄間葉系幹細胞の分化アッセイ	71
2.2.11	細胞周期解析(Ki67 染色)	71
2.2.12	Seahorse 細胞外フラックスアナライザー解析	72

2.2.13	μCTによる骨密度測定.....	73
2.2.14	放射線照射後の造血の回復評価の解析.....	73
2.2.15	腫瘍凍結切片の免疫組織学染色.....	73
2.2.16	腫瘍パラフィン切片の HE 染色.....	74
2.2.17	p53 タンパク質発現量の解析.....	75
2.2.18	細胞からの mRNA の単離と cDNA 合成(RNeasy mini Kit; QIAGEN, 74104).....	76
2.2.19	リアルタイム PCR.....	77
2.2.20	マウス間葉系幹細胞および腫瘍細胞からの DNA 抽出 (DNeasy Blood & Tissue Kit (50), Qiagen#69504).....	78
2.2.21	ライブラリー調製とエクソームシーケンス.....	79
2.2.22	ヒト軟部肉腫の遺伝子変異解析.....	79
2.2.23	データベースからのヒト臨床データ取得.....	79
2.2.24	腫瘍細胞からの total RNA の抽出 (NucleoSpin® Blood; Takara, 740951).....	79
2.2.25	マウス間葉系幹細胞および腫瘍細胞から抽出した RNA のライブラリー調製, 遺伝子発現解析.....	80
2.2.26	若齢および加齢マウスから採取した間葉系幹細胞の Single-cell RNA-seq.....	80
2.2.27	R ソフトウェアを使用した single-cell RNA-seq データの解析.....	82
2.2.28	ヒト軟部肉腫の遺伝子発現解析.....	82
2.1.29	GSEA.....	82
2.2.30	統計解析.....	83
<b>2.3</b>	<b>実験結果.....</b>	<b>83</b>
2.3.1	若齢マウスと比較して加齢マウス MSC では p53 下流経路の発現が低下する...83	83
2.3.2	若齢マウスにおける MSC 特異的 p53 欠損はニッチ機能を変化させない.....87	87
2.3.3	MSC 特異的 p53 欠損はストレス負荷後のニッチ機能を変化させない.....90	90
2.3.4	MSC 特異的 p53 欠損は MSC 由来の未分化軟部腫瘍(USTS)の発症を誘導する.95	95
2.3.5	p53 欠損 MSC は細胞周期と代謝活性が亢進する.....98	98
2.3.6	p53 欠損 MSC は脂肪細胞への分化が抑制され, 幹細胞性の低下を示す.....99	99
2.3.7	p53 <sup>ΔMSC</sup> マウス由来 USTS はヒトの軟部腫瘍(STS)と類似した遺伝子発現プロファイルを示す.....104	104
2.3.8	p53 <sup>ΔMSC</sup> マウス由来 USTS ではヒトの軟部腫瘍(STS)と類似した遺伝子変異が見られる.....109	109
2.3.9	遺伝子発現に基づくヒト STS の新規分類方法の提示.....114	114
<b>2.4</b>	<b>考察.....</b>	<b>119</b>
2.4.1	若齢およびストレス負荷後の p53 <sup>ΔMSC</sup> マウスのニッチ機能の検討.....119	119
2.4.2	MSC の腫瘍化抑制および幹細胞機能の維持における p53 の役割の検討.....120	120
2.4.3	p53 <sup>ΔMSC</sup> マウス由来の腫瘍・p53 <sup>ΔΔ</sup> USTS のヒト STS モデルとしての有用性の	

検討 .....	122
<b>2.5 Limitation of study.....</b>	<b>123</b>
<b>2.6 Data availability .....</b>	<b>124</b>
<b>3. 謝辞 .....</b>	<b>125</b>
<b>4. 参考文献 .....</b>	<b>126</b>

# 第1章 : ストレス応答因子 p38MAPK は加齢早期および後期過程においてそれぞれ異なるメカニズムで造血幹細胞エイジングを制御する

## 1.1 研究背景

### 1.1.1 造血幹細胞を起点とした造血システム

哺乳類を構成する全細胞の約三分の二は血液細胞が占めている。血液は呼吸(O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>の運搬), 凝固・線溶, 感染や外傷に対する防御, 体温調節, 栄養素の運搬など様々な機能を担い私たちの生命活動を支えている。出生後, これら多数の血液細胞は骨の中・骨髄に存在する造血幹細胞(hematopoietic stem cell; HSC)から継続的に産生される(造血; hematopoiesis) [\(1\)](#)。HSCは自己複製能と多分化能を有し, 血液細胞の分化ヒエラルキーの頂点に位置する組織幹細胞である [\(2\)](#)。HSCの中で最も未分化な集団は長期造血幹細胞(Long-term HSC; LT-HSC)と呼ばれ, 自己複製能が高く移植後長期間にわたって骨髄再構築能を示す。LT-HSCは分化して1か月程度の短期間のみ血液を生成する能力を有する短期造血幹細胞(Short-term HSC; ST-HSC)を産生する [\(3, 4\)](#) (本論文内では便宜上, 前者のLT-HSCのみを指してHSCと表記する)。ST-HSCはより活発に分化・分裂する多能性前駆細胞(multipotent progenitor; MPP)へ分化し, MPPはさらに特定の系統へコミットメントした前駆細胞への分化を経て最終的に白血球や赤血球, 血小板などの終末分化した血球細胞を産生する(図 1.1.1) [\(5\)](#)。ST-HSCやMPPなどの集団は合わせて造血前駆細胞(hematopoietic stem and progenitor cell; HPC)と呼ばれ, 感染炎症や薬剤投与, 時には放射線照射などの急激に血液が失われる状況下で, 活発に分化・増殖を行い短期間の血液細胞の産生を維持する [\(6, 7\)](#)。

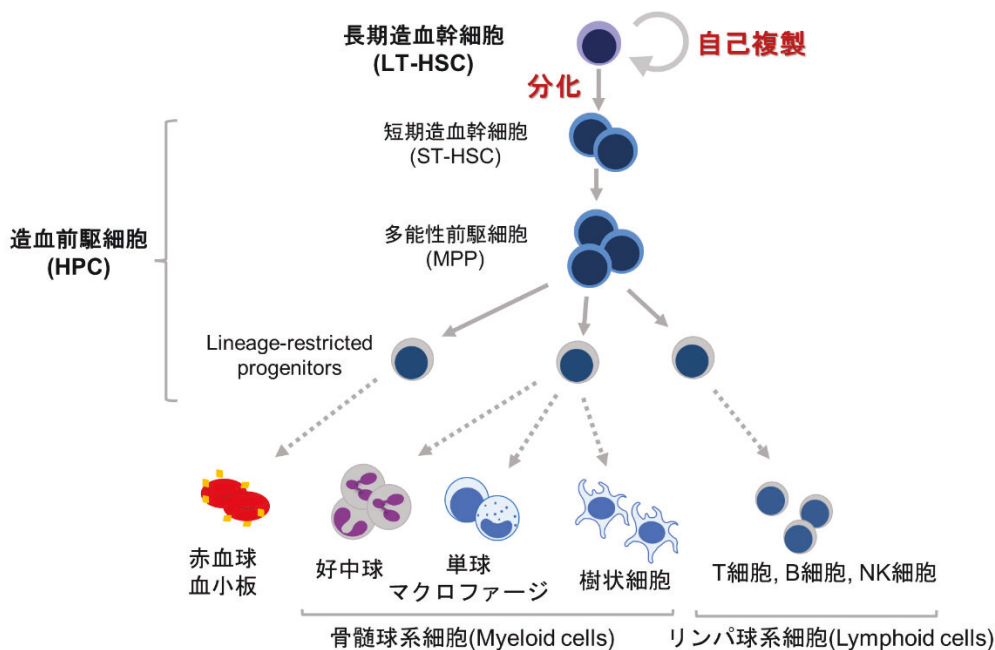


図 1.1.1 造血幹細胞の分化系統樹

出生後, HSC の生存や未分化性は骨髄の「ニッチ」と呼ばれる微小環境により維持されている。間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; MSC)や血管内皮細胞(Endothelial cell; EC)、骨芽細胞 (Osteoblast; OB)などは主要なニッチ構成細胞であり、「ニッチ因子」と総称されるサイトカイン・ケモカインの産生を介して HSC の生存・未分化性を制御している(8-14)。中でも MSC は, 自身が骨や脂肪細胞への分化能を持つとともに HSC の「ニッチ細胞」として骨髄造血を支える極めて重要な細胞集団である(8, 9, 15-20) (図 1.1.2)。

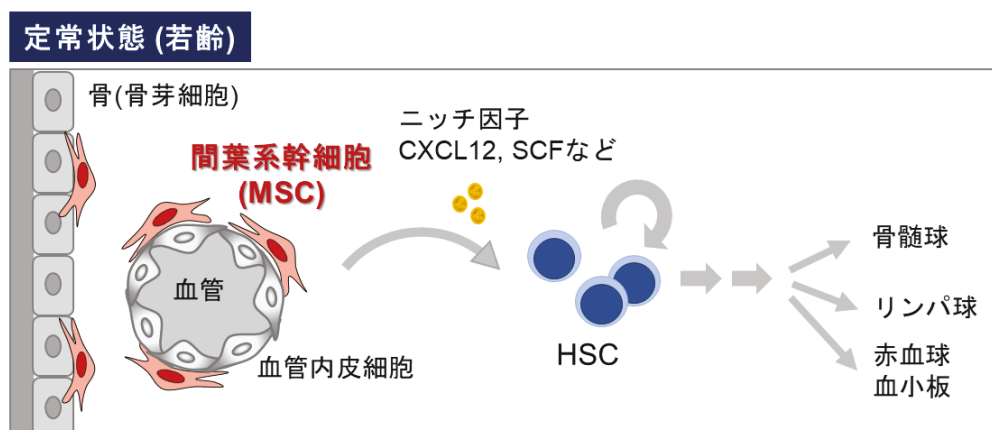


図 1.1.2 骨髄ニッチ細胞による骨髄造血の支持

### 1.1.2 ストレス造血が誘導する 2 種類の幹細胞エイジングとその特徴

造血は胎生期から老年期まで必須の生命活動であるが、個体は生涯を通じて感染炎症や薬剤投与、放射線照射などの急性ストレスを受け、あるいは加齢による慢性ストレスの影響を受けて、HSC やニッチの質的・量的変化(それぞれ HSC エイジング、MSC エイジングと呼ぶ)に起因する造血機能の低下が認められる(ストレス造血)。HSC エイジングでは、表面マーカー上の HSC の数は増加する一方で、移植生着率は低下し、分化の偏りやクローン性造血が生じる(21-25) (図 1.1.3)。HSC エイジングに起因するリンパ球や赤血球・血小板の産生低下は高齢者に最も多い血液疾患である貧血の原因となるのみならず、免疫機能低下と感染症への罹患率増加の原因となる(26-29)。また、HSC や MSC のエイジングは白血病、悪性リンパ腫といった造血器腫瘍や、肉腫などの MSC 由来の腫瘍の発症リスクを増大させる(18, 30-35)。このような観点から、HSC や MSC のエイジングの制御機構の解明およびその理解に基づく細胞機能の改善や若返り手法の探索は、上記の造血器疾患や間葉系組織由来の病態解明と治療法確立に貢献する重要な課題である。





図 1.1.3. ストレスが引き起こす MSC および HSC の質的・機能的変容

### 1.1.3 HSC エイジングを誘導する既存のメカニズム

多くの体細胞では、増殖回数が上限に達すると p16<sup>INK4a</sup>-RB 経路あるいは p53 経路の活性化により細胞周期の不可逆的停止(細胞老化)が生じる。しかし造血システムの加齢変化ではこれと対照的に、骨髄の HSC は増加する一方、移植生着率や多分化能といった幹細胞機能のみが低下する。このユニークな HSC エイジングを誘導する分子基盤について、これまでの研究から細胞内因性の要因と細胞外因性の要因の 2 種類が報告されている。

細胞内因性の要因としては、DNA 損傷の蓄積、テロメアの短縮、エピジェネティックな変化、代謝変容、細胞内極性の変化などがあげられる。HSC は生涯にわたって骨髄に存在する長寿命の幹細胞であり、内因性(複製ストレス、活性酸素、テロメア短縮など)や外因性(紫外線、電離放射線、化学物質など)の遺伝毒性へ絶えず暴露されることで DNA 損傷を蓄積し HSC の機能低下を引き起こす(36-39)。また、HSC は静止期性の高い細胞でありその大部分が G0 期にあるため、DNA 損傷修復には相同組み換え(Homologous recombination; HR)ではなく非同末端結合(Non-homologous end joining; NHEJ)を用いることが報告されており、DNA 損傷修復後に遺伝子変異の蓄積が起こりやすくなる(36, 40)。実際に加齢した HSC では DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha (DNMT3A), Ten-Eleven Translocation 2 (TET2), Additional sex combs like 1 (ASXL1), enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)などの遺伝子に”clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP)”と呼ばれる変異が高頻度で認められる(31, 32, 36, 41)。これらの遺伝子はいずれもエピジェネティック修飾因子であり、HSC において分化関連遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現を変化させることで、HSC のクローン性の増殖や悪性造血器腫瘍の発症を引き起こすと考えられている(42, 43)。

HSC の代謝変容も HSC エイジングに伴う機能低下に深く関わっている。定常状態(若齢の健常人の骨髄)において、HSC は解糖系活性を高く維持する一方でミトコンドリアによる酸化的リン酸化は抑制されており、これにより活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)の産生を抑え、酸化ストレスから細胞を保護している(44, 45)。これは HSC の存在

する環境が生理的な低酸素であることに起因している。これまでの報告で骨髄は他の組織と比べて比較的低酸素であり、動脈血での酸素濃度が 75~100mmHg であるのに対して、骨髄内部の酸素濃度は 10~20mmHg と極めて低い範囲に維持されることが報告されている(46, 47)。HSCは骨髄の中でも最も低酸素な微小環境に局在すると考えられており(6, 48, 49), このような環境下で低酸素応答性転写因子(hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$ ; HIF-1  $\alpha$ )を安定化させることで解糖系活性を高く保っている(44, 45) (図 1.1.4)。しかしながら加齢 HSC では微小環境の変化・エピジェネティック修飾の変化・ミトコンドリア遺伝子の変異の蓄積などにより酸化的リン酸化が亢進し細胞内 ROS レベルが上昇する(50-53)。ROS の異常発生は HSC の生存, 静止期性の維持, 多分化能などを損なうため(39, 50, 54, 55), HSC の代謝状態の維持は幹細胞機能に重要である。

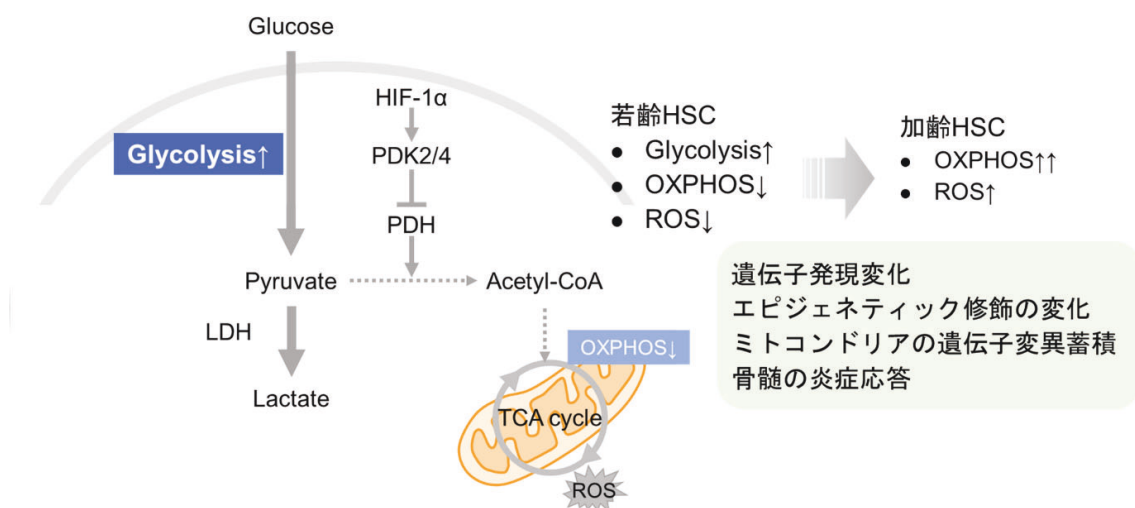


図 1.1.4. Hif1- $\alpha$  を介した造血幹細胞の代謝制御

HSCエイジングを誘導する細胞外因性の要因には、ニッチの老化によるニッチ構造のリモデリング(血管構造の退縮, 交換神経支配の減少など)の変化(56-59), MSC や血管内皮細胞からのニッチ因子の産生量低下(57, 58, 60, 61), SASP 分泌による骨髄環境における炎症惹起(59, 60, 62-65)などが考えられている。特に主要なニッチ細胞の一つである MSC は HSC と同様加齢に伴う機能変容(MSC エイジング)を起こし, これが HSC エイジングを誘導すると考えられている(MSC エイジングの詳細については第 2 章で述べる)。

#### 1.1.4 HSC エイジングとストレス応答因子 p38MAPK

HSC エイジングに関連するストレス応答因子として, MAPK スーパーファミリーの一つである p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)が知られている。MAPK シグナルは 3 種類のリン酸化酵素 MAPKKK-MAPKK-MAPK が順にリン酸化を行い細胞内の情報伝達を担うシグナルカスケードである。活性化された MAPK は転写因子を含む様々な標的分子を

リン酸化により活性化して下流遺伝子の発現や活性を制御する。MAPK経路にはERK経路, p38経路, JNK経路の3つの経路が存在する(図 1.1.5)。中でも p38MAPK はストレス応答性 MAP キナーゼと呼ばれ, 4 つの主要アイソザイム p38  $\alpha$  (MAPK14), p38  $\beta$  (MAPK11), p38  $\gamma$  (MAPK12/ERK6), p38  $\delta$  (MAPK13/SAPK4)から構成される。p38MAPK は DNA 損傷, 酸化ストレス(ROS 産生), サイトカイン刺激など様々な細胞内ストレスにより活性化され, 活性化された p38MAPK は p53, STAT1 や ATF-2 などの転写因子のリン酸化を介してアポトーシスや細胞周期の停止, 炎症性サイトカインの産生といったストレス応答を促す役割を担っている(66, 67)。また, 線維芽細胞においてはテロメア短縮, Ras-Raf経路の活性化, 酸化ストレスなど加齢様のストレスを負荷した際に活性化することも報告され, 細胞老化の実行因子であると考えられてきた(68)。

HSC においても p38MAPK がストレス応答を担うことが知られている。HSC では骨髄移植(Bone marrow transplantation; BMT)などの急性造血ストレス, および常染色体劣性遺伝性早老症・毛細血管拡張性小脳失調症の原因遺伝子である *Atm* 遺伝子の欠損や, テロメア伸長酵素である telomerase (TERT)の欠損などの加齢を模した介入によって p38MAPK が活性化され, HSC の幹細胞機能の低下を引き起こすことが報告されている(44, 67, 69)。メカニズムとしては, 細胞内に蓄積した ROS が p38MAPK-p16<sup>INK4a</sup>/19<sup>Arf</sup>-Rb 経路を活性化することで HSC の細胞数や移植生着率の低下などにつながることを示されており, 抗酸化剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC)や, p38MAPK の阻害剤である SB203580 の処理, shRNA による p38  $\alpha$  のノックダウンなどによって HSC の数や機能が回復することも示された(12, 67, 69-71)。こうした報告から p38MAPK はストレス負荷後に活性化され HSC の機能を低下させると考えられてきた(図 1.1.6)。

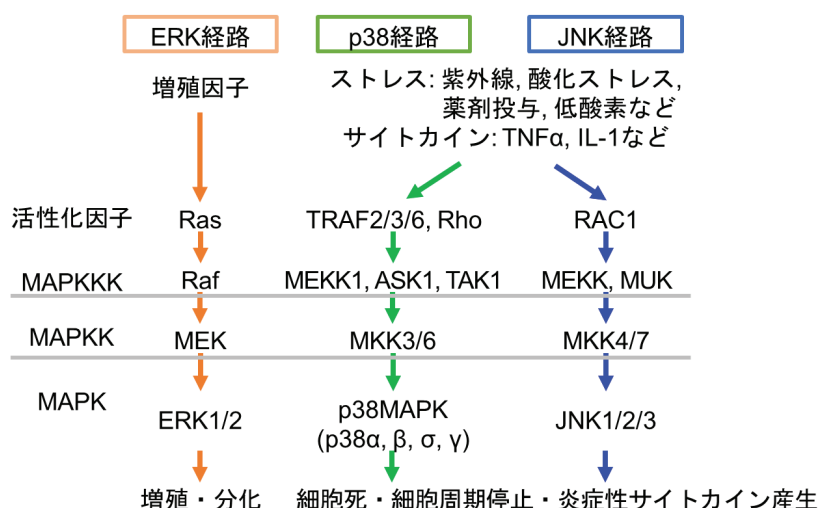


図 1.1.5. MAP キナーゼカスケードによる細胞内情報伝達システム

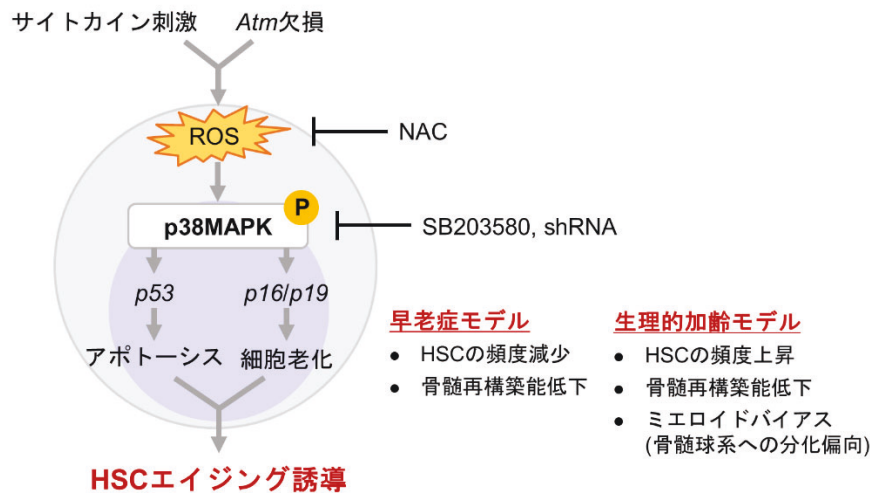


図 1.1.6. ストレス造血で p38MAPK が HSC に果たすと考えられてきた役割  
本研究ではこれらを遺伝学的手法を用いて検討した。

一方, 当研究室では p38MAPK が必ずしも HSC の機能を低下させるわけではなく, 状況に応じて HSC 機能に重要な役割を果たすことを報告している(72)。ここでは, 骨髄移植や薬剤投与などの急性造血ストレス負荷直後に HSC で p38 $\alpha$  が活性化し, microphthalmia-associated transcription factor (Mitf)/inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2 (Impdh2)シグナルの亢進を介してプリン代謝を誘導し, 細胞増殖および移植後の骨髄再構築能を維持することをコンディショナルノックアウトマウスを用いて明らかにした(図 1.1.7)。このように, 以前の阻害剤を用いた *in vitro* の実験系では HSC エイジングを促進する”悪玉分子”として考えられてきた p38MAPK だが, 生体内では逆に幹細胞機能を維持する”善玉分子”としての働きを持つことが明らかとなっている。

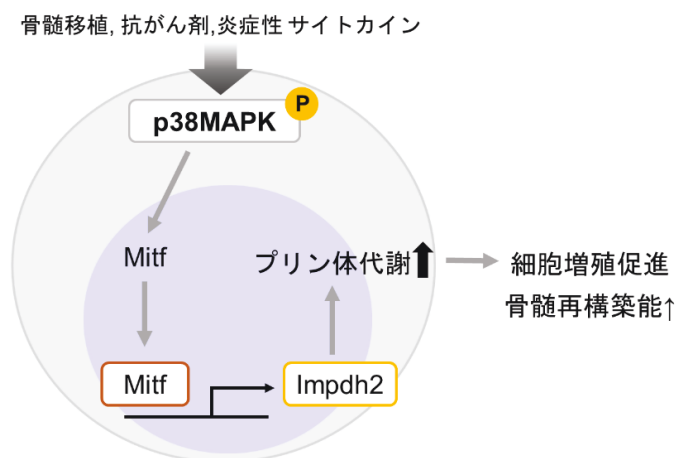


図 1.1.7. 当研究室が報告した p38 $\alpha$  の新しい機能  
急性造血ストレス負荷後に HSC で Mitf/Impdh2 経路を介して細胞増殖が促進される

### 1.1.5 本研究の目的

個体の老化に伴う2種類の幹細胞の老化、“HSCエイジング”と”MSCエイジング”は造血機能の低下のみならず様々な疾患の原因となる。HSCエイジングの分子機構の解明とその理解に基づき細胞機能の回復を図ることは、ライフコースを通じて頑健な造血機能を維持し、上記の様々な疾患を予防するうえで極めて重要である。そこで本研究では第1章と第2章のそれぞれで、HSCエイジングとMSCエイジングという2つの幹細胞エイジングの分子機構の解明を目的として研究を開始した。

第1章では、個体老化に伴って起こるHSCエイジングにおける、p38MAPKの機能解析を目的とした。上述のようにp38MAPKの機能には2面性がある可能性があり、さらにこれまで*in vitro*で証明されてきた知見と生体内で実際に起こる現象は異なる可能性がある。また、HSCエイジングが単一の分子機序によって制御される過程なのかという点は不明である。そこで本研究ではp38MAPKの中でもHSCにおけるメジャーアイソザイムであるp38 $\alpha$ の誘導性のコンディショナルノックアウトマウスを用いて、個体老化の異なる時期でp38 $\alpha$ を欠損させるモデルを作成し、生体内でのHSCエイジングにおけるp38 $\alpha$ の意義を遺伝学的に検討した。また、本モデルと遺伝的早老症の原因遺伝子であるAtm欠損マウスを交配することで、生理学的老化モデルに加えて早老症モデルにおけるp38 $\alpha$ の機能の検討も行った。

第2章では細胞老化のマスターレギュレーターとして知られるもう一つのストレス応答因子、p53のMSCエイジングにおける意義について検討を行う。本研究を通して骨髄HSCおよびニッチの加齢変化を理解することで加齢関連疾患の病態理解・予防・診断・治療法確立に資する知見を得ることを目指す。

## 1.2 実験方法

### 1.2.0 使用した試薬および抗体

本研究で使用した試薬および抗体を表1.2.0に示す。

表 1.2.0 本研究で使用した試薬および抗体一覧

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-mouse CD4-PerCP-Cy5.5 (clone: RM4-5)	TONBO biosciences	Cat# 65-0042-U100; RRID: AB_2621876
Anti-mouse CD4-FITC (clone: RM4-5)	TONBO biosciences	Cat# 35-0042-U100
Anti-mouse CD4-biotin (clone: RM4-5)	BioLegend	Cat# 100508; RRID: AB_312711
Anti-mouse CD8a-PerCP-Cy5.5 (clone: 53-6.7)	TONBO biosciences	Cat# 65-0081-U100; RRID: AB_2621882
Anti-mouse CD8a-PE (clone: 53-6.7)	BD biosciences	Cat# 553033; RRID: AB_394571
Anti-mouse CD8a-PE-Cy7 (clone: 53-6.7)	TONBO biosciences	Cat# 60-0081-U100
Anti-mouse CD8a-biotin (clone: 53-6.7)	BD biosciences	Cat# 553029; RRID: AB_394566
Anti-mouse B220-PerCP-Cy5.5 (clone: RA3-6B2)	TONBO biosciences	Cat# 65-0452-U100; RRID: AB_2621892

Anti-mouse B220-APC (clone: RA3-6B2)	BioLegend	Cat# 103212; RRID: AB_312997
Anti-mouse B220-biotin (clone: RA3-6B2)	BD biosciences	Cat# 553086; RRID: AB_394615
Anti-mouse Ter-119-PerCP-Cy5.5 (clone: TER-119)	TONBO biosciences	Cat# 65-5921-U100
Anti-mouse Ter-119-biotin (clone: TER-119)	BioLegend	Cat# 116204; RRID: AB_313705
Anti-mouse Gr1-PerCP-Cy5.5 (clone: RB6-8C5)	BioLegend	Cat# 108428; RRID: AB_893558
Anti-mouse Gr1-PE-Cy7 (clone: RB6-8C5)	TONBO biosciences	Cat# 60-5931-U100; RRID: AB_2621870
Anti-mouse Gr1-biotin (clone: RB6-8C5)	BioLegend	Cat# 108404; RRID: AB_313369
Anti-mouse Mac1 (CD11b)-PerCP-Cy5.5 (clone: M1/70)	TONBO biosciences	Cat# 65-0112-U100; RRID: AB_2621885
Anti-mouse Mac1-PE-Cy7 (clone: M1/70)	TONBO biosciences	Cat# 60-0112-U100; RRID: AB_2621836
Anti-mouse Mac1-APC-Cy7 (clone: M1/70)	BioLegend	Cat# 101226; RRID: AB_830642
Anti-mouse Mac1-biotin (clone: M1/70)	BioLegend	Cat# 101204; RRID: AB_312787
Anti-mouse CD45.1-PE (clone: A20)	BD biosciences	Cat# 553776; RRID: AB_395044
Anti-mouse CD45.1-Alexa700 (clone: A20)	BioLegend	Cat# 110724; RRID: AB_493733
Anti-mouse CD45.2-FITC (clone: 104)	BD biosciences	Cat# 553772; RRID: AB_395041
Anti-mouse CD45.2-APC (clone: 104)	BD biosciences	Cat# 558702
Anti-mouse CD45-FITC (clone: 30-F11)	BD biosciences	Cat# 553080; RRID: AB_394609
Anti-mouse CD45-PE (clone: 30-F11)	BD biosciences	Cat# 553081; RRID: AB_394611
Anti-mouse CD45-PerCP-Cy5.5 (clone: 30-F11)	BD biosciences	Cat# 550994; RRID: AB_394003
Anti-mouse CD45-APC (clone: 30-F11)	BD biosciences	Cat# 559864; RRID: AB_398672
Anti-mouse CD45-APC-Cy7 (clone: 30-F11)	Invitrogen	Cat# 47-0451-82; RRID: AB_1548781
Anti-mouse CD45-PE-Cy7 (clone: 30-F11)	BD biosciences	Cat# 552848; RRID: AB_394489
Anti-mouse Sca-1 (Ly-6A/E)-PE-Cy7 (clone: E13-161.7)	BioLegend	Cat# 122514; RRID: AB_756199
Anti-mouse Sca-1 (Ly-6A/E)-APC (clone: E13-161.7)	eBiosciences	Cat# 17-5981-83; RRID: AB_469487
Anti-mouse c-Kit (CD117)-APC-Cy7 (clone: 2B8)	eBiosciences	Cat# 105826; RRID: AB_1626278
CD117 MicroBeads Mouse	Miltenyi Biotec	Cat# 130-091-224
Anti-mouse CD48-FITC (clone: HM48-1)	BioLegend	Cat# 103404; RRID: AB_313019
Anti-mouse CD150-PE (clone: TC15-12F12.2)	BioLegend	Cat# 115904; RRID: AB_313683
Anti-mouse CD150-APC (clone: TC15-12F12.2)	BioLegend	Cat# 115910; RRID: AB_493460
Anti-Flt3 (CD135)-APC (clone: A2F10)	BioLegend	Cat# 135310; RRID: AB_2107050
Anti-Flt3 (CD135)-PE (clone: A2F10)	BioLegend	Cat# 135306; RRID: AB_1877217
Anti-mouse CD34-AlexaFluor700 (clone: RAM34)	BD biosciences	Cat# 560518; RRID: AB_1727471
Anti-mouse CD34-FITC (clone: RAM34)	Invitrogen	Cat# 11-0341-85
Anti-mouse IL7Ra-PE (clone: SB/199)	BioLegend	Cat# 121112; RRID: AB_493509
Anti-mouse CD44-PE (clone: Im7)	TONBO biosciences	50-0441-U100
Anti-mouse CD25-AlexaFluor647 (clone: PC61)	BioLegend	Cat# 102020; RRID: 102020
Anti-Human Ki-67-AlexaFluor555 (clone: B56)	BD biosciences	Cat# 558617
Anti-mouse p38MAPK (pT180/pY182)-PE (clone: 36/p38)	BD biosciences	Cat# 612565; RRID: AB_399856
Anti-Human IgG1-PE (clone: G18-145)	BD biosciences	Cat# 555787; RRID: AB_396122
Anti-mouse H2AX (pS139)-AlexaFluor488 (clone: N1-431)	BD biosciences	Cat# 560443; RRID: AB_1645592

rabbit Anti-mouse 53BP1	Novus Biologicals	Cat# NB100-304
Anti-rabbit IgG-AlexaFluor555 (clone: A-21428)	Invitrogen	Cat# A-21428; RRID: AB_2535849
StreptAvidin-PE-Cy7	BD biosciences	Cat# 557598; RRID: AB_10049577
StreptAvidin-AlexaFluor700	Thermo Fisher Scientific	Cat# S21383
Fc-block (anti-mouse CD16/32) (clone: 2.4-G2)	BD biosciences	Cat# 553142; RRID: AB_394657

#### Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins

D-PBS (-)(1×)	Nacalai Tesque	Cat# 14249-24
Fetal bovine serum	Thermo Fisher Scientific	Cat# 10270-106
MethoCult®培地	StemCell technologies	Cat# 03434
NH <sub>4</sub> Cl	Wako	Cat# 017-02995
NaHCO <sub>3</sub>	Wako	Cat# 191-01305
EDTA-2Na	DOJINDO	Cat# 345-01865
ノボ・ヘパリン注	持田製薬株式会社	Cat# B108
デキストラン	Nacalai Tesque	Cat# 10927-54
Propidium iodide	Invitrogen	Cat# P3566
DirectPCR Lysis Reagent (Tail)	Viagen Biotech	Cat# 101-T
Proteinase K	Takara Bio	Cat# 9034
TaKaRa Ex Taq (Mg <sup>2+</sup> plus Buffer)	Takara Bio	Cat# RR001A
アガロース	Nacalai Tesque	Cat# 02468-95
Tris	Nacalai Tesque	Cat# 35434-21
酢酸	Nacalai Tesque	Cat# 00212-85
EtBr	WAKO	Cat# 315-90051
10× Loading buffer	Takara Bio	Cat# SD0012
Tamoxifen	Sigma Aldrich	Cat# T5648
Hoechst	Invitrogen	Cat# H3570
Mito Tracker stock solution	Life Technologies	Cat# M7511
DMSO	Sigma Aldrich	Cat# D8418
2-mercapto ethanol (2-ME) 1000x	Life Technologies	Cat# 21985-023
SYBR Premix ExTaq	Takara Bio	Cat# RR820
Rox II dye	Takara Bio	Cat# SD0384
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	Applied Biosystems	Cat# 4353042
TaqMan Gene Expression Assays	Applied Biosystems	Cat# 4351370
4%-Paraformaldehyde	Nacalai Tesque	Cat# 09154-85
TritonX	Nacalai Tesque	Cat#35501-15
37% formalin	東京化成	Cat# F0622
Aqueous Mounting Medium, PermaFluor	Thermo Fisher Scientific	Cat# TA-030-FM
4',6-diamidino-2-phenylindole staining (DAPI)	Invitrogen	Cat# D1306

#### Critical Commercial Assays

BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit	BD biosciences	Cat# 554714; RRID: AB_2869008
---	----------------	-------------------------------

BD Pharmingen™ PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD biosciences	Cat# 559763; RRID: AB_2869265
RNeasy Mini Kit	QIAGEN	Cat# 74104
SuperScript® VILOTM cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# 11754-050
Deposited Data		
Raw and analyzed microarray data	This paper	GEO: GSE168057
Raw and analyzed microarray data	This paper	GEO: GSE168085
Raw and analyzed microarray data	GEO website( <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/</a> )	GEO: GSE151333
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6JmsSlc	Japan SLC, Inc.	<a href="http://www.jslc.co.jp/english/index2.htm">http://www.jslc.co.jp/english/index2.htm</a>
Mouse: C57BL/6J-Ly5.1	CLEA Japan, Inc	N/A
Mouse: CAG-CreERT	Hayashi S et al., <i>Dev Biol</i> (2002)	<a href="#">(73)</a>
Mouse: p38 $\alpha^{fl/fl}$	Nishida K et al., <i>Mol Cell Biol.</i> (2004)	<a href="#">(74)</a>
Mouse: Atm $^{fl/fl}$	Zha S et al., <i>PNAS</i> (2011)	<a href="#">(75)</a>
Software and Algorithms		
R v3.6.1		<a href="http://www.r-project.org">http://www.r-project.org</a>
clusterProfiler		<a href="https://www.rdocumentation.org/packages/clusterProfiler/versions/3.0.4">https://www.rdocumentation.org/packages/clusterProfiler/versions/3.0.4</a>
DOSE		<a href="https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DOSE.html">https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DOSE.html</a>
ggplot2		<a href="https://www.rdocumentation.org/packages/ggplot2/versions/3.4.3">https://www.rdocumentation.org/packages/ggplot2/versions/3.4.3</a>
gplots		<a href="https://www.rdocumentation.org/packages/ggplot2/versions/3.4.3/topics/ggplot">https://www.rdocumentation.org/packages/ggplot2/versions/3.4.3/topics/ggplot</a>
heatmap		<a href="https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.2/topics/heatmap">https://www.rdocumentation.org/packages/stats/versions/3.6.2/topics/heatmap</a>
GSEA software	Broad Institute	<a href="http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp">http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp</a>
FlowJo version 10.9.0	Tree Star	<a href="https://www.flowjo.com/solutions/flowjo">https://www.flowjo.com/solutions/flowjo</a>

### 1.2.1 実験動物

全身で誘導性に各遺伝子を欠損するマウスを作製するため、CAG-CreERT2 マウスと  $p38\alpha^{lox/lox}$  マウス、 $Atm^{lox/lox}$  マウス ([73](#), [74](#), [76](#))を交配し、CAG-CreERT2- $p38\alpha^{fl/fl}$ 、 $Atm^{fl/fl}$  または  $Atm^{fl/fl}p38\alpha^{fl/fl}$  マウスを作成した。

生理的加齢モデルとして、CAG-Cre ERT2 (-) $p38\alpha^{lox/lox}$  マウス (コントロール群)と CAG-Cre (+) ERT2; $p38\alpha^{lox/lox}$  マウス (ノックアウト群)を各実験に用いた。Cre リコンビナーゼを誘導するために、2 mg の Tamoxifen (TAM) (表 1.2.1)を 5 日間連続でマウス腹腔内に投与し、標的遺伝子を TAM 誘導的に欠損させた (図 1.2.1)。加齢早期過程(HSC エイジング形質の出現過程)における  $p38\alpha$  の機能解析に使用したマウスは 4-6 週齢で TAM を投与し、1 年齢まで加齢させた後に解析に用いた。加齢後期過程(HSC エイジング形質の進行や維持過程)における



*p38α* の機能解析に使用したマウスは 1 年齢で TAM を投与し, 2 年齢まで加齢させた後に解析に用いた。早老症モデルとして, 6-20 週齢に TAM を投与した CAG-Cre ERT2 (-) *Atm*<sup>flx/flx</sup>*p38α*<sup>flx/flx</sup> マウス (コントロール群), CAG-Cre ERT2 (+) *Atm*<sup>flx/flx</sup> マウス, CAG-Cre ERT2 (+) *Atm*<sup>flx/flx</sup>*p38α*<sup>flx/flx</sup> マウス (ノックアウト群) を各実験に用いた(図 1.2.2)。

これらのマウスは交配によって繁殖し, 遺伝子型はマウス尾由来の DNA サンプルを用いた PCR 法によって同定した。TAM を投与してから 4 週間経過した後に, TaqMan qPCR 法で *Atm* の欠損を確認し, Genomic qPCR 法で *p38α* が欠損していることを確認した (*p38α*<sup>+/+</sup> or *p38α*<sup>Δ/Δ</sup>, *Atm*<sup>+/+</sup>*p38α*<sup>+/+</sup> or *Atm*<sup>Δ/Δ</sup> or *Atm*<sup>Δ/Δ</sup>*p38α*<sup>Δ/Δ</sup>)。C57BL/6-Ly5.1 マウス (Ly5.1) は日本クレアから購入し, 移植実験のレシピエントマウスとして用いた。これらのマウスは, 飲料水, 餌ともに自由摂取のもと, 明 12 時間, 暗 12 時間サイクルの SPF 環境下で飼育を行った。すべての動物実験は, 国立国際医療研究センターの動物実験委員会の承認を受け, 国立国際医療研究センターのガイドラインに従い行った。

表 1.2.1. TAM 組成 (1 投与分)

試薬	使用量
Tamoxifen	2 mg
食用なたね油	100 μl

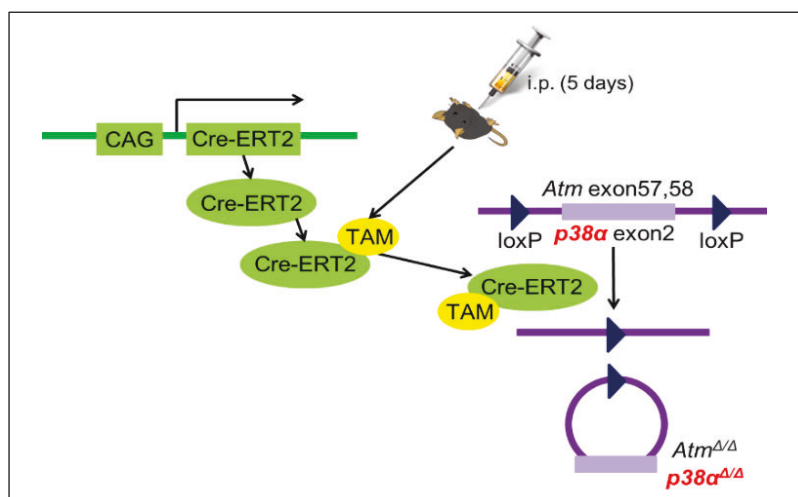


図 1.2.1 CAG-CreERT2 *Atm/p38α* cKO マウス

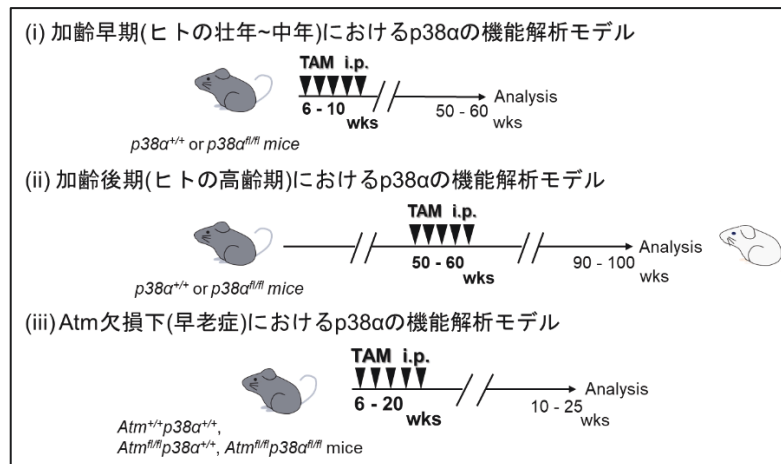


図 1.2.2 解析に用いたマウスモデル

### 1.2.2 マウス遺伝子型同定

- 1) マウスの尾 5 mm 程度を鋏で切り取り, 1.5 ml チューブへ採取する。
- 2) Direct PCR 250 $\mu$ l と Proteinase K 3.75  $\mu$ l を加え, 55 $^{\circ}$ C で振盪しながら一晩おく。
- 3) サンプルを 85 $^{\circ}$ C で 45 分間加熱する。
- 4) サンプルを 15000 rpm (17400 xg) で 5 分間遠心する。
- 5) 表 1.2.2 (*Atm*), 表 1.2.3 (*p38 $\alpha$* ), 表 1.2.4 (*Cre*) に示す組成の Mixture を作成する。
- 6) 8 連チューブに 5) で作成した Mixture を 20  $\mu$ l ずつ添加する。
- 7) サーマルサイクラーに 8 連チューブを設置し, 図 1.2.3 (*Atm*), 図 1.2.4 (*p38 $\alpha$* , *Cre*) に示す条件に従い PCR 反応を行う。(使用したプライマーは表 1.2.5 に示す。)
- 8) 2%アガロースゲル(表 1.2.6)を作製し, PCR 反応後のサンプルに 10  $\times$  Loading buffer 2  $\mu$ l を加え, 100 V で 15 分間電気泳動をする。
- 9) UV ランプでゲルを照射し, PCR で増幅されたバンドを確認・撮影し, 遺伝子型の判別を行う。

表 1.2.2. *Atm* 遺伝子型同定 PCR 反応 Mixture 組成

試薬	使用量 ( $\mu$ l)
10 $\times$ ExTaq Buffer	2
2.5 mM dNTP Mix	2
50 $\mu$ M primer ( <i>Atm</i> Forward)	0.2
50 $\mu$ M primer ( <i>Atm</i> Reverse)	0.2
Template DNA	1
5U/ $\mu$ l ExTaq	0.2
DW	14.4
Total	20

表 1.2.3. *p38α* 遺伝子型同定 PCR 反応 Mixture 組成

試薬	使用量 (μl)
10×ExTaq Buffer	2
2.5 mM dNTP Mix	1.6
50 μM primer ( <i>p38α</i> Forward)	0.08
50 μM primer ( <i>p38α</i> Reverse)	0.08
Template DNA	0.5
5U/μl ExTaq	0.1
DW	15.64
Total	20

表 1.2.4. Cre 遺伝子型同定 PCR 反応 Mixture 組成

試薬	使用量 (μl)
10×ExTaq Buffer	2
2.5 mM dNTP Mix	1.6
50 μM primer (Cre Forward)	0.08
50 μM primer (Cre Reverse)	0.08
50 μM primer (Ctrl Forward)	0.08
50 μM primer (Ctrl Forward)	0.08
Template DNA	0.5
5U/μl ExTaq	0.1
DW	15.48
Total	20

表 1.2.5. ジェノタイピングプライマー配列

対象配列	プライマー名	配列 (5'→3')
<i>Atm</i>	<i>ATM</i> BAC7	GCCCATCCCGTCCACAATATCTCTGC
	<i>ATM</i> BAC13	CATCCTTTAATGTGCCTCCCTTCGCC
<i>p38α</i>	p38 A3	ATGAGATGCAGTACCCTTGGAGACCAGAAG
	P38 A4	AGCCAGGGCTATACAGAGAAAAACCCTGTG
Cre	CREi 22S	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGC
	CRE 775AS	GAGTTGATAGCTGGCTGGTGGCAGATG
	oIMR7338	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
	oIMR7339	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

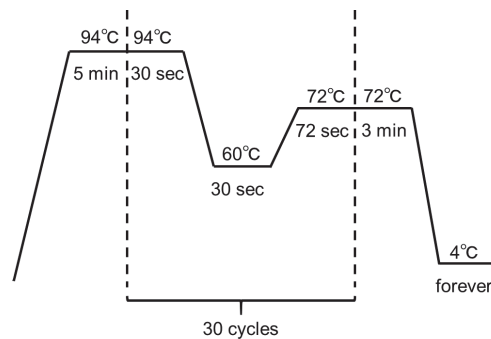


図 1.2.3. PCR 条件 (*Atm*)

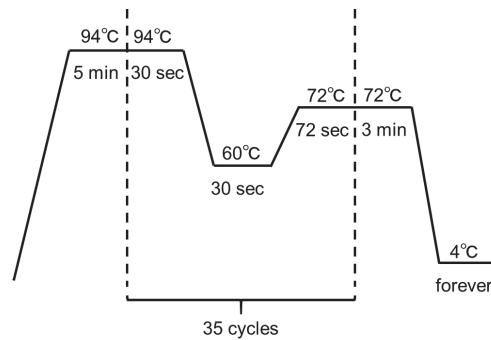


図 1.2.4. PCR 条件 (*p38α*, Cre)

表 1.2.6. アガロースゲル組成 (300 ml)

試薬	使用量 (μl)
アガロース	6 g
Tris	1.452 g
EDTA-2Na	0.1395 g
酢酸	0.3426 ml
MilliQ	299.7 ml
EtBr	15 μl

### 1.2.3 マウス骨髄細胞の採取

- 1) 4°Cに冷却した 0.45 μl フィルター滅菌済みの Fetal Bovine Serum (FBS)を 2%加えた血液細胞分取用バッファー (2% FBS-PBS ;表 1.2.7)を 10 cm petri dish に 20 ml 分注する。
- 2) マウスから大腿骨と脛骨を採取し, 21 ゲージ注射針と 10 ml シリンジを用いて FBS-PBS 内でフラッシュアウトし, 50 ml ファルコンチューブに回収する。
- 3) 1800 rpm (680 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 4) 上清をデカンテーションで捨て, Lysis buffer (表 1.2.8)を 5 ml 加え, よく懸濁し溶血を 5 分間行う。
- 5) FBS-PBS を 10 ml 加え, 1800 rpm (680 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 6) 上清をデカンテーションで捨て, FBS-PBS を 10 ml 加え, 40 μm フィルターを通して新しいファルコンチューブに移す。
- 7) 1800 rpm (680 xg), 4°C, で 5 分間遠心分離する。
- 8) 上清をアスピレーターで除き, ペレットをエッペンチューブに移す。
- 9) 細胞表面の Fc 受容体による非特異的な染色を防ぐため, Fc-block (anti-mouse CD16/32) 2 μl/匹を加え, 4°Cで 5 分間静置する。
- 10) 必要に応じ, Anti-CD117 micro beads 20 μl/匹を加え, 遮光をして 4°Cで 15 分間静置する (この作業を行った場合, 11) - 14)の手順も行う)。
- 11) 1 ml の FBS-PBS を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。

- 12) 11)の作業を繰り返す。
- 13) 2 ml の FBS-PBS に懸濁し, autoMACS Pro Separator (Miltenyi Biotec)の posseld2 プログラムで CD117 positive fraction を分離する。
- 14) Positive fraction の細胞を 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 15) 各種抗体(表 1.2.9-1.2.12)を 2 µl/匹加え, 遮光をし, 4°Cで 30 分間静置する。
- 16) 1 ml の FBS-PBS を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 17) 16)の作業を繰り返す。
- 18) 1/1000 量の Propidium iodide を加えた FBS-PBS (PI 入り FCS-PBS) 350 µl に細胞を懸濁し, 0.45 µm フィルター付きチューブへ移す。
- 19) SORP BDFACS Aria (3 laser) (BD, 657590)で解析またはソーティングする。

表 1.2.7. 2% FBS-PBS 組成

試薬	使用量 (µl)
D-PBS (-)(1×)	500 ml
FBS	10 ml

表 1.2.8. Lysis buffer 組成 (500 ml)

試薬	使用量 (µl)
NH <sub>4</sub> Cl	4 g
NaHCO <sub>3</sub>	420.05 mg
EDTA-2Na	186.12 mg
DW	500 ml

表 1.2.9. 造血幹細胞解析用抗体-1

抗体	使用量 (µl)
Lineage(CD4/CD8/Mac-1/B220/Ter119/Gr-1 計 6 種類)-PerCP-Cy5.5	各抗体 1ul ずつ
Sca-1- PE-Cy7	1 µl
c-Kit-APC-Cy7	1 µl
Flt3-APC	1 µl
CD48-FITC	1 µl
CD150-PE	1 µl

表 1.2.10. 造血幹細胞解析用抗体-2

抗体	使用量 (µl)
Lineage(CD4/CD8/Mac-1/B220/Ter119/Gr-1 計 6 種類)-PerCP-Cy5.5	各抗体 1ul ずつ
Sca-1- PE-Cy7	1 µl
c-Kit-APC-Cy7	1 µl
Flt3-APC	1 µl
CD34-FITC	1 µl

表 1.2.11. 造血幹前駆細胞解析用抗体

抗体	使用量 (μl)
Lineage(CD4/CD8/Mac-1/B220/Ter119/Gr-1 計 6 種類)-PerCP-Cy5.5	各抗体 1ul ずつ
Sca-1- PE-Cy7	1 μl
c-Kit-APC-Cy7	1 μl
CD34-FITC	1 μl
Flt3-APC	1 μl
IL7Rα-PE	1 μl

表 1.2.12. 分化血球細胞解析用抗体

抗体	使用量 (μl)
CD4-PerCP-Cy5.5	各抗体 1ul ずつ
CD8-PE	1 μl
B220-APC	1 μl
Gr-1-PE-Cy7	1 μl
Mac-1-APC-Cy7	1 μl

#### 1.2.4 マウス脾臓細胞, 胸腺細胞の採取

- 1) マウスから脾臓, 胸腺を採取する。
- 2) 40 μm のフィルター上で脾臓をすりつぶして 5 ml の FBS-PBS に懸濁し, 50 ml ファルコンチューブに移す。
- 3) 上清をデカンテーションで捨て, Lysis buffer 5 ml を加えよく懸濁し溶血を 5 分間行う。
- 4) FBS-PBS を 10 ml 加え, 1800 rpm (680 xg), 4°C で 5 分間遠心分離する。
- 5) 上清をデカンテーションで捨て, FBS-PBS を 10 ml 加え, 40 μm フィルターを通して新しいファルコンチューブに移す。
- 6) 1800 rpm (680 xg), 4°C, で 5 分間遠心分離する。
- 7) 上清をアスピレーターで除き, ペレットをエッペンチューブに移す。
- 8) Fc-block (anti-mouse CD16/32) 2 μl/匹を加え, 4°C で 5 分間静置する。
- 9) 各種抗体(表 1.2.9-1.2.13)を 2 μl/匹加え, 遮光をし, 4°C で 30 分間静置する。
- 10) 1 ml の FBS-PBS を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°C で 5 分間遠心分離する。
- 11) 10)の作業を繰り返す。
- 12) PI 入り FBS-PBS 350 μl に細胞を懸濁し, 0.45 μm フィルター付きチューブへ移す。
- 13) SORP BDFACS Aria で解析またはソーティングする。

表 1.2.13. 胸腺解析用抗体

抗体	使用量 (μl)
CD4-FITC	各抗体 1ul ずつ
CD8-PE-Cy7	1 μl
CD44-PE	1 μl
CD25-AlexaFluor647	1 μl

### 1.2.5 マウス末梢血細胞の採取

- 1) マウス眼窩静脈叢からヘパリンコートされた採血管を用いて末梢血を 40-60  $\mu$ l 採取し、20  $\mu$ l の末梢血を 180  $\mu$ l の 0.1%ヘパリン-PBS (表 1.2.14)に懸濁する。
- 2) 全自動血球計数器 (日本光電, MEK-6558)で解析をする。
- 3) (1)で残った末梢血を 1 ml の 0.1%ヘパリン-PBS に懸濁する。
- 4) 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 3 分間遠心分離する。
- 5) 上清をピペットマンで除去し、デキストラン溶液(表 1.2.15) 1 ml を加えて 45 分間静置する。
- 6) 上清を新しいエッペンチューブに移し、2000 rpm (340 xg), 4°Cで 3 分間遠心分離する。
- 7) 上清をピペットマンで除去し、NH<sub>4</sub>Cl 溶液 (表 1.2.16)を 1 ml 加えて懸濁し、懸濁液が透明になるまで 5-10 分間静置する。
- 8) 2000 rpm (340 xg), 4°C, で 5 分間遠心分離する。
- 9) 上清をピペットマンで除去し、Fc-block (anti-mouse CD16/32) 0.3  $\mu$ l/匹を加え、4°Cで 5 分間静置する。
- 10) 各種抗体(表 1.2.12)を 0.3  $\mu$ l/匹加え、遮光をし、4°Cで 15 分間静置する。
- 11) 1 ml の FBS-PBS を加え、2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 12) PI 入り FBS-PBS 250  $\mu$ l に細胞を懸濁し、0.45  $\mu$ m フィルター付きチューブへ移す。
- 13) SORP BDFACS Aria で解析またはソーティングする。
- 14) PI 入り FBS-PBS 350  $\mu$ l に細胞を懸濁し、0.45  $\mu$ m のフィルター付きチューブへと懸濁液を移し、MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec)で解析する。

表 1.2.14. 0.1% ヘパリン-PBS 組成 (10 ml)

試薬	使用量 ( $\mu$ l)
D-PBS (-)(1 $\times$ )	10 ml
ノボ・ヘパリン注	10 $\mu$ l

表 1.2.15. デキストラン溶液組成

試薬	使用量 ( $\mu$ l)
D-PBS (-)(1 $\times$ )	500 ml
デキストラン	6 g

表 1.2.16. NH<sub>4</sub>Cl 溶液組成

試薬	使用量	メーカー	型番
NH <sub>4</sub> Cl	4.55 g	Wako	017-02995
DW	500 ml	-	-

### 1.2.6 fluorescence-activated cell sorting(FACS)を用いた造血幹/前駆細胞の解析・単離

CD4 (Clone: RM4-5), CD8a (Clone: 53-6.72), B220 (Clone: RA3-6B2), TER-119 (Clone: TER119), Gr-1 (Clone: RB6-8C5), Mac-1 (Clone: M1/70)に対する mAb の混合物を lineage

marker (Lin)として用いた。

造血幹細胞分画は以下のように定義した: LSKs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>; LT-HSCs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>Flt3<sup>-</sup>または Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>; ST-HSCs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>または Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>; MPPs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>; MPP2 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>; MPP3 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>-</sup>; MPP4 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>; Common lymphoid progenitors (CLPs), Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>c-Kit<sup>low</sup>IL-7R<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>; Megakaryocyte/erythroid progenitors (MEPs), Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>c-Kit<sup>low</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>; Granulocyte/macrophage progenitors (GMPs), Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>c-Kit<sup>low</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>; Common myeloid progenitors (CMPs), Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>c-Kit<sup>low</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>。分化血球細胞分画は以下のように定義した: CD4 T cells, CD4<sup>+</sup>; CD8 T cells, CD8<sup>+</sup>; DN cells, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>; DP cells, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; B cells, B220<sup>+</sup>; Granulocytes, Gr-1<sup>high</sup>Mac-1<sup>high</sup>; Macrophages, Gr-1<sup>dim</sup>Mac-1<sup>high</sup>。

解析および細胞の単離は SORP FACS Aria IIu または FACS Aria IIIu 装置 (BD Biosciences)を用いた。データは FlowJo ソフトウェア (TreeStar) を用いて解析した。

### 1.2.7 骨髄移植実験

- 1) 各マウス(C57BL/6-Ly5.2 マウス)より 500 個の LT-HSC (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup> cell)を FACS により分取する (1.2.6 参照)。
- 2) C57BL/6-Ly5.1 マウスから 4×10<sup>5</sup> 個の骨髄単核球 (Bone marrow mononuclear cells; BMMNCs)を採取する。
- 3) SF-O3 medium (エーディア, 410043352) 200 μl に 1), 2)の細胞を合わせて懸濁する(500 個 LT-HSC s+ 4×10<sup>5</sup> 個 BMMNCs/ SF-O3 medium/匹ずつ移植)。
- 4) レシピエント(C57BL/6-Ly5.1 マウス)に 9.5 Gy の放射線を照射する。
- 5) 4)のマウスの尾静脈から 27 ゲージの針を用いて, 3)で調製した細胞懸濁液を移植する (一次移植)。
- 6) 骨髄移植後, 1 か月ごとに 4 か月目までマウス眼窩静脈叢から末梢血を採取し, レシピエント内での生着率 (末梢血キメリズム)を解析する。(解析手順は 1.2.8 に示す。)
- 7) 4 か月後, レシピエントマウスの骨髄を採取し, 骨髄キメリズムを解析する。(解析手順は 1.2.8 に示す。)
- 8) 各レシピエントマウスから BMMNCs を分取し, 1×10<sup>6</sup> 個/200 μl になるように SF-O3 に懸濁する。
- 9) 4), 5)と同様に新たなレシピエントマウスに 8)の細胞懸濁液を移植する (二次移植)。
- 10) 二次移植後, 一次移植と同様に末梢血と骨髄のキメリズムを解析する。

### 1.2.8 骨髄移植後の末梢血・骨髄キメリズム解析

- 1) 1.2.7 に従って骨髄移植を行う。



- 2) 骨髄解析は 1.2.3 の 9)まで, 末梢血解析は 1.2.5 の 9)までの作業を行う。
- 3) 各種抗体(骨髄は表 1.2.17, 末梢血は表 1.2.18 の抗体を用いる)を 2  $\mu$ l/匹加えて遮光をし, 4°Cで 30 分間静置する。
- 4) 1 ml の FBS-PBS を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 5) 1/1000 量の Propidium iodide を加えた FBS-PBS (PI 入り FCS-PBS) 350  $\mu$ l に細胞を懸濁し, 0.45  $\mu$ m フィルター付きチューブへ移す。
- 6) SORP BDFACS Aria (3 laser) (BD, 657590)で解析またはソーティングする。

表 1.2.17. 骨髄キメリズム解析用抗体

抗体	使用量 ( $\mu$ l)
Lineage(CD4/CD8/Mac-1/B220/Ter119/Gr-1 計 6 種類)-PerCP-Cy5.5	各抗体 1 $\mu$ l ずつ
Ly5.1- AlexaFluor700	1 $\mu$ l
Ly5.2-APC	1 $\mu$ l
Sca-1- PE-Cy7	1 $\mu$ l
c-Kit-APC-Cy7	1 $\mu$ l
Flt3-APC	1 $\mu$ l
CD48-FITC	1 $\mu$ l
CD150-PE	1 $\mu$ l

表 1.2.18. 末梢血キメリズム解析用抗体

抗体	使用量 ( $\mu$ l)
Ly5.1-PE	1 $\mu$ l
Ly5.2-FITC	1 $\mu$ l
CD4-PerCP-Cy5.5	1 $\mu$ l
CD8- PerCP-Cy5.5	1 $\mu$ l
B220-APC	1 $\mu$ l
Gr-1-PE-Cy7	1 $\mu$ l
Mac-1-PE-Cy7	1 $\mu$ l

### 1.2.9 コロニーアッセイ(CFU-C/HPP-CFC アッセイ)

- 1) 各マウスより 500 個の LSK (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> cell)を FACS により分取する(1.2.6 参照)。
- 2) MethoCult<sup>®</sup>培地 (StemCell technologies, 03434)3 ml に 1)で分取した LSK を加え, 20 回程度転倒混和する。
- 3) 35 mm 培養皿に 1 ml ずつ播種し(150 cell/dish), 37°Cインキュベーターで培養する。
- 4) 培養 7 日後, 14 日後に顕微鏡で観察しながら形成されたコロニーを分類し, 数を数える。

### 1.2.10 細胞周期解析(Ki67 染色)

- 1) 1.2.3 の 6)までの作業を行う。
- 2)  $1.4 \times 10^7$  個の細胞をコンペンセーション用にとりわけける。
- 3) コンペンセーション用サンプルを 7 等分し, それぞれ 6 色の anti-CD45 抗体(表 1.2.19)を 1  $\mu$ l ずつ加える(コンペンセーションは 8)へ)。

- 4) 2)の残りの細胞を, 1800 rpm (680 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 5) 上清をアスピレーターで除き, ペレットをエッペンチューブに移す。
- 6) Fc-block (anti-mouse CD16/32) 1 µl/匹を加え, 氷上で 10 分間静置する
- 7) 各種抗体(表 1.2.20)を 1 µl/匹加え, 遮光をし, 4°Cで 30 分間静置する。
- 8) 1 ml の FBS-PBS を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 9) 8)の作業を繰り返す。
- 10) BD Cytotfix/Cytoperm を 250 µl 加え, 氷上で 20 分間静置する。
- 11) MilliQ で 10 倍に希釈した BD Wash buffer を 1 ml 加え, 2000 rpm (340 xg), 4°C, で 5 分間遠心分離する。
- 12) 11)の作業を繰り返す (コンペンセーションは 16)へ)。
- 13) Anti-Ki67 Alexa555 10 µl/匹加え, 遮光をし, 室温で 30 分間静置する。
- 14) 13)の作業を 2 回繰り返す。
- 15) 1/1000 量の Hoechst33342 を加えた PBS (1000×Hoechst-PBS)350 µl に懸濁し, FACS で解析する。
- 16) コンペンセーションは PBS 350 µl に懸濁し FACS で解析する。

表 1.2.19. コンペンセーション用抗体

抗体	使用量 (µl)
(1) No staining	-
(2) CD45-FITC	1 µl
(3) CD45-PE	1 µl
(4) CD45-PerCP-Cy5.5	1 µl
(5) CD45-APC	1 µl
(6) CD45-APC-Cy7	1 µl
(7) Cd45-PE-Cy7	1 µl

表 1.2.20. Ki-67 染色用抗体

抗体	使用量 (µl)
Lineage(CD4/CD8/Mac-1/B220/Ter119/Gr-1 計 6 種類)-PerCP-Cy5.5	各抗体 1µl ずつ
Sca-1- PE-Cy7	1 µl
c-Kit-APC-Cy7	1 µl
Flt3-APC	1 µl
CD150-APC	1 µl
CD48-FITC	1 µl

### 1.2.11 p38MAPK のリン酸化状態解析

- 1) 1.2.3 の 6)までの作業を行う。
- 2)  $8 \times 10^6$  個の細胞をコンペンセーション用にとりわけける。
- 3) コンペンセーション用サンプルを 7 等分し, それぞれ 6 色の anti-CD45 抗体(表 1.2.11) を 1 µl ずつ加える(コンペンセーションは 14)へ)。
- 4) 2)の残りの細胞を, 1800 rpm (680 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。

- 5) 上清をアスピレーターで除き、ペレットをエッペンチューブに移す。
- 6) Fc-block (anti-mouse CD16/32) 1  $\mu$ l/匹を加え、氷上で 10 分間静置する。
- 7) 1  $\mu$ l/匹の 1 次抗体染色用抗体 (表 1.2.21)を加え、遮光をし、4°Cで 15 分間静置する。
- 8) 1 ml の FBS-PBS を加え、2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 9) 8)の作業を繰り返す。
- 10) 1  $\mu$ l/匹の 2 次抗体染色用抗体 (表 1.2.21)を加え、遮光をし、4°Cで 30 分間静置する。
- 11) 1 ml の FBS-PBS を加え、2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 12) 上清を除去し、500 $\mu$ l の PBS に懸濁する。
- 13) 遮光をし、37°Cのヒートブロックで 10 分間静置する。
- 14) 500 $\mu$ l の 4% PFA (nacalai tesque, 0915485)を加え、遮光をして 37°Cのヒートブロックで 10 分間静置する。
- 15) 1500 rpm (190 xg), 室温で 5 分間遠心分離する。
- 16) 1 ml の 90%メタノール (表 1.2.22)を加え、遮光をして氷上で 30 分間静置する。
- 17) 1500 rpm, 室温で 5 分間遠心分離する。
- 18) 上清を除去し、1ml の PBS を加え、1500 rpm (190 xg), 室温で 5 分間遠心分離する (コンペンセーションは 21)へ)。
- 19) サンプルを 2 等分し、100 $\mu$ l の PBS に懸濁する。
- 20) 2 等分したうちの 1 つに IgG1-PE(Isotype control)抗体, もう 1 つに anti-p38MAPK (pT180/pY182)-PE 抗体を 10 $\mu$ l ずつ加え、遮光をして室温で 30 分間静置する。
- 21) 1ml の PBS を加え、1500 rpm (190 xg), 室温で 5 分間遠心分離する。
- 22) PI 入り FBS-PBS 350  $\mu$ l に細胞を懸濁し FACS で解析する。ただし、コンペンセーションは PBS(PI なし) 350  $\mu$ l に懸濁し FACS で解析する。anti-p38MAPK (pT180/pY182)-PE の平均蛍光強度(Mean fluorescence intensity; MFI)を、IgG1-PE(Isotype control)の MFI で補正した値を用いた。

表 1.2.21. リン酸化 p38MAPK 染色用抗体

一次抗体	使用量 ( $\mu$ l)
Lineage(CD4/CD8/Mac-1/B220/Ter119/Gr-1 計 6 種類)-biotin	各抗体 1 $\mu$ l ずつ
二次抗体	1 $\mu$ l
Sca-1-PE-Cy7	1 $\mu$ l
c-Kit-APC-Cy7	1 $\mu$ l
CD34-FITC	1 $\mu$ l
Flt3-APC	1 $\mu$ l
SA-AlexaFluor700	1 $\mu$ l

表 1.2.22. 90%メタノール組成

試薬	使用量 (ml)
MtOH	45
MilliQ	5

### 1.2.12 ミトコンドリア活性酸素(ROS)解析

- 1) 1.2.3 の 9)までの作業を行う。
- 2) 各種抗体(表 1.2.23)を 1  $\mu$ l/匹加え, 遮光をし, 4°Cで 30 分間静置する。
- 3) 1 ml の FBS-PBS を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 4) 3)の作業を繰り返す。
- 5) 1 ml の 2% FBS-DMEM(表 1.2.24)に懸濁する。
- 6) 遮光をし, 37°Cの水浴で, 10 分間インキュベートする。
- 7) Mito Tracker stock solution 1  $\mu$ l + DMSO 1250  $\mu$ l を加え, 遮光をして 37°Cの水浴で 30 分間インキュベートする。
- 8) 1 ml の FBS-PBS を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 9) 8)の作業を繰り返す。
- 10) PI入り FBS-PBS 350  $\mu$ l に細胞を懸濁し FACS で解析する。

表 1.2.23. ミトコンドリア ROS 染色用抗体

抗体	使用量 ( $\mu$ l)
Lineage(CD4/CD8/Mac-1/B220/Ter119/Gr-1 計 6 種類)-PerCP-Cy5.5	各抗体 1 $\mu$ l ずつ
Sca-1-PE-Cy7	1 $\mu$ l
c-Kit-APC-Cy7	1 $\mu$ l
CD34-FITC	1 $\mu$ l
FIt3-APC	1 $\mu$ l

表 1.2.24. 2% FBS-DMEM 組成

試薬	使用量 ( $\mu$ l)
DMEM	500 ml
FBS	10 ml

### 1.2.13 アポトーシス解析

- 1) 1.2.3 の 9)までの作業を行う。
- 2) 各種抗体(表 1.2.25)を 1  $\mu$ l/匹加え, 遮光をし, 4°Cで 30 分間静置する。
- 3) 1 ml の FBS-PBS を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 4) 3)の作業を繰り返す。
- 5) 200  $\mu$ l の Binding buffer に懸濁し, AnnexineV-PE を 10  $\mu$ l 加え, 遮光をして室温で 15 分間静置する。
- 6) 700 $\mu$ l の Binding buffer を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- 7) 上清を除去し, 1/500 量の Propidium iodide を加えた Binding buffer 500  $\mu$ l に細胞を懸濁し FACS で解析する。

表 1.2.25. AnnexinV 染色用抗体

抗体	使用量 (μl)
Lineage(CD4/CD8/Mac-1/B220/Ter119/Gr-1 計 6 種類)-PerCP-Cy5.5	各抗体 1ul ずつ
Sca-1-PE-Cy7	1 μl
c-Kit-APC-Cy7	1 μl
CD48-FITC	1 μl
CD150-APC	1 μl

#### 1.2.14 細胞からの mRNA の単離と cDNA 合成

RNeasy mini Kit (QIAGEN)を使用して manufacture's protocol に従って行う。手順を以下に示す。

- 1) FACS により分取した細胞を 2000 rpm (340 xg), 4°C で 5 分間遠心分離する。
- 2) 上清を除去し, 2-mercaptoethanol 3.5 μl + RLT buffer 350μl に懸濁する。
- 3) 70%エタノール 350μl を加えよく懸濁する。
- 4) RNeasy カラムに全量をアプライする。
- 5) 10000rpm (7700 xg), 室温, 1 分間遠心分離する。
- 6) 700μl の RW1 buffer を加え, 10000rpm (7700 xg), 室温, 1 分間遠心分離する。
- 7) カラムを新しいコレクションチューブに装着する。
- 8) 500μl の RPE buffer を加え, 10000rpm (7700 xg), 室温, 1 分間遠心分離する。
- 9) コレクションチューブに溜まった溶液を捨て, もう一度 500μl の RPE buffer を加え, 10000rpm (7700 xg), 室温, 2 分間遠心分離する。
- 10) カラムを 1.5ml チューブに装着し, 14.5μl の RNase free water をカラムにしみ込ませ, 1 分以上静置する。
- 11) 10000rpm (7700 xg), 室温, 2 分間遠心分離する。
- 12) 得られた 14μl の RNA 溶液と, SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit の 5× VILO Reaction Mix 4 μl + 10×SuperScript Enzyme Mix 2 μl を 8 連チューブで混合する。
- 13) サーマルサイクラーに 8 連チューブを設置し, 図 1.2.5 に示す条件で逆転写反応を行う。
- 14) PCR 反応後の産物を cDNA として使用する。

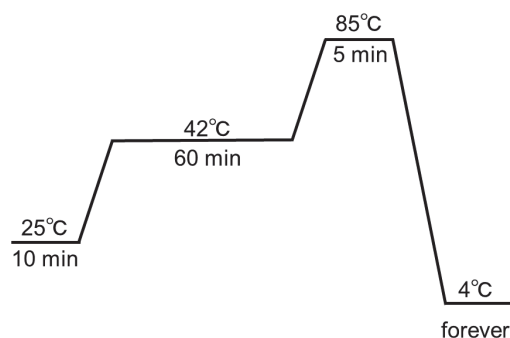


図 1.2.5. 逆転写反応プロトコル

### 1.2.15 リアルタイム PCR

- 1) *p38α*, *p16<sup>Ink4a</sup>*, *p19<sup>Arf</sup>* のプライマーに対して SYBR Green 反応溶液 mixture (表 1.2.26), *Atm* のプライマーに対して Taqman 反応溶液 mixture (表 1.2.27) を作製する(プライマー配列は表 1.2.28-1.2.29 を参照)。
- 2) cDNA を 1 μl 加え, よく懸濁する。
- 3) 96 well プレートに, 20 μl×4 well ずつ加える。
- 4) 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, 4362143) で PCR 反応を行う (図 1.2.6)。

表 1.2.26. SYBR Green PCR 反応 mixture 組成

試薬	使用量 (μl)
SYBR Premix ExTaq	45
Forward primer	0.36
Reverse primer	0.36
Rox II dye	1.8
D <sub>2</sub> W	41.48

表 1.2.27. Taqman PCR 反応 mixture 組成

試薬	使用量 (μl)
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x)	45
TaqMan Gene Expression Assays	4.5
D <sub>2</sub> W	39.5
Rox II dye	1.8

表 1.2.28. SYBR Green PCR プライマー配列

対象配列		配列 (5'→3')
β-actin	Forward	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC
	Reverse	ATGGAGCCACCGATCCACA
<i>p38α exon2</i>	Forward	GGTCAGCAGCCTCGATGCAC
	Reverse	GACTGCCCCTCCAACCGTTC
<i>p38α exon12</i>	Forward	GCCCTCCCTCACTTCAGGAG
	Reverse	TGTGCTCGGCACTGGAGACC
<i>p16<sup>Ink4a</sup></i>	Forward	GCCCAACGCCCGAACTCTTTC
	Reverse	GCGACGTTCCCAGCGGTACACA
<i>p19<sup>Arf</sup></i>	Forward	TGGGTCGCAGGTTCTTGGTCAC
	Reverse	CGACGTTCCCAGCGGTACAAA

表 1.2.29. TaqMan Gene Expression Assays リスト

対象配列	メーカー	型番
β-actin	Applied Biosystems	18996809
<i>Atm</i> -T	Applied Biosystems	G84309

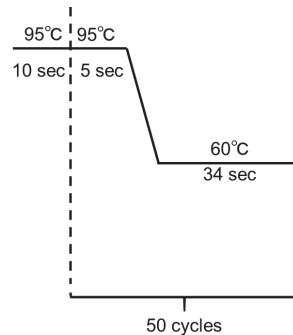


図 1.2.6. リアルタイム PCR プロトコル

### 1.2.16 移植後の造血幹細胞の免疫細胞染色

- 1) 1.2.7 に従って  $Atm^{A/A}$ ,  $Atm^{A/A}p38\alpha^{A/A}$  および  $Atm^{+/+}p38\alpha^{+/+}$  マウスの BMMNCs  $5 \times 10^5$  個を致死量(9.5Gy)の放射線を照射した C57BL/6-Ly5.1 マウスへ移植する。
- 2) 骨髄移植の 1 週間後, 1.2.8 に従ってドナー由来の造血幹細胞を FACS で SF-O3 medium へソートする。
- 3) 細胞を 2000 rpm (340 xg), 4°C で 10 分間遠心分離する。
- 4) 上清を捨て, PBS 50 $\mu$ l に懸濁する。
- 5) FBS 50 $\mu$ l と合わせて Thermo Scientific Cytospin4(Thermo Scientific, A78300003)を用いてサイトスピンを行う。
- 6) スライドガラス上の細胞を含むように撥水性ペンで囲み, よく乾かす。
- 7) 4%-Paraformaldehyde (PFA) 100 $\mu$ l を加えて室温で 5 分間静置する。
- 8) ピペットマンで 4%-PFA を除去し, PBS 200 $\mu$ l を加えて室温で 5 分間静置する。
- 9) 8)を繰り返す。
- 10) 0.3% TritonX-PBS (表 1.2.30) 100 $\mu$ l を加えて室温で 5 分間静置する。
- 11) ピペットマンで 0.3% TritonX-PBS を除去し, PBS 200 $\mu$ l を加えて室温で 5 分間静置する。
- 12) 11)を繰り返す。
- 13) 1% BSA-PBS (表 1.2.31) 100 $\mu$ l を加えて室温で 30 分間静置する。
- 14) 1 次抗体(表 1.2.32) を加えて 4°C で一晩静置する。
- 15) ピペットマンで抗体溶液を除去し, PBS 200 $\mu$ l を加えて室温で 5 分間静置する。
- 16) 15)を繰り返す。
- 17) 2 次抗体(表 1.2.32)を加えて 4°C で一晩静置する。
- 18) ピペットマンで抗体溶液を除去し, PBS 200 $\mu$ l を加えて室温で 5 分間静置する。
- 19) 18)を繰り返す。
- 20) 3.7% formalin (表 1.2.33)を加えて室温で 5 分間静置する。
- 21) ピペットマンで 3.7% formalin を除去し, PBS 200 $\mu$ l を加えて室温で 5 分間静置する。
- 22) 21)を繰り返す。

- 23) Aqueous Mounting Medium, PermaFluor (MPF)を 8~10 $\mu$ l 程加えてカバーガラスを被せる。  
 24) サンプルはレーザー走査型共焦点顕微鏡 (FV-1000 ; Olympus) を用いて観察した。

表 1.2.30. 0.3% TritonX-PBS 組成 (10 ml)

試薬	使用量 ( $\mu$ l)
D-PBS (-)(1 $\times$ )	10 ml
TritonX	300 $\mu$ l

表 1.2.31. 1% BSA-PBS 組成 (10 ml)

試薬	使用量 ( $\mu$ l)
D-PBS (-)(1 $\times$ )	10 ml
BSA	100 mg

表 1.2.32. サイトスピン用抗体

一次抗体	使用量 ( $\mu$ l)
0.1% BSA-PBS	200 $\mu$ l
Anti-mouse H2AX (pS139)-AlexaFluor488	10 $\mu$ l
rabbit Anti-mouse 53BP1	1 $\mu$ l
二次抗体	使用量 ( $\mu$ l)
0.1% BSA-PBS	200 $\mu$ l
Anti-rabbit IgG-AlexaFluor555 (clone: A-21428)	1 $\mu$ l
4',6-diamidino-2-phenylindole staining (DAPI)	0.2 $\mu$ l

表 1.2.33. 3.7% formalin 組成 (10 ml)

試薬	使用量 ( $\mu$ l)
D <sub>2</sub> W	9 ml
37% formalin	1 ml

### 1.2.17 RNA 抽出とマイクロアレイ

- 1) 1.2.3, 1.2.6 に従って, 2 年齢の  $p38\alpha^{A/A}$  および  $p38\alpha^{+/+}$  マウス, または 10-25 週齢の  $Atm^{A/A}$ ,  $Atm^{A/A}p38\alpha^{A/A}$  および  $Atm^{+/+}p38\alpha^{+/+}$  マウスから HSC を分取し, SF-O3 培地 (Iwai; 1303) にソートする。
- 2) 細胞を 2000 rpm (340 xg), 4°C で 5 分間遠心分離する。
- 3) 上清を除去し, 2-mercaptoethanol 0.75 $\mu$ l + RLT buffer 75 $\mu$ l に懸濁する。
- 4) cDNA 合成, マイクロアレイ解析, データ正規化は DNA Chip Research, Inc. に委託し, アジレント社のマウス様マイクロアレイ 8 $\times$ 60K フォーマットでマイクロアレイを作製, 遺伝子発現解析を行う。
- 5) 正規化された遺伝子発現データは GSEA v2.0.13 software (Broad Institute) を用いて解析した。



### 1.2.18 データベースからの若齢・1年齢・2年齢マウス造血幹細胞の RNA-seq データ取得およびデータ解析

若齢(10週齢), 中年齢(1年齢), 老齢(2年齢)マウスの HSC の RNA-sequence data を Gene Expression Omnibus のデータベース(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)からダウンロードした(GSE151333)。遺伝子発現データは GSEA v2.0.13 software もしくは R software で解析を行った。PCA 解析, ヒートマップ解析で使用した解析ソフトおよびアルゴリズムは表 1.2.0 に示す。

### 1.2.19 GSEA

正規化されたマイクロアレイデータを, GSEA v2.0.13 software (Broad Institute)で解析した。遺伝子セットは, GSEA のウェブサイト(<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)で配布されている Molecular Signatures Database v4.0 (MSigDB)から入手した遺伝子セット (表 1.2.34 参照), または既報([An epigenetic component of hematopoietic stem cell aging amenable to reprogramming into a young state - PubMed \(nih.gov\)](#))を参考に作成した遺伝子セット (表 1.2.35 参照)を使用した。

GSEA の結果は Normalized Enrichment Score (NES), Normalized p value および False Discovery Rate (FDR) の 3 つの値を踏まえて決定し, p value 0.05 以下かつ FDR 0.25 以下を統計学的に有意とした。Enrichment score (ES) とは, 各遺伝子を発現変動順にランク付けしたときに, 特定のシグナル経路(gene set)に含まれる遺伝子群の中で, 発現変動が大きい遺伝子がどのくらい存在するかを示す指標である。特定の gene set に関する GSEA を行った結果の見方について図 1.2.7 に示す。横軸に発現変動が大きい順に全遺伝子を並べ, gene set に関連する遺伝子があった場合にその発現変動の大きさに応じて ES が加算され, なければ減算される。そのようにして得られた曲線のピークがその gene set における ES として算出される。ES が正の値の場合は gene set が発現変動リストの上位で濃縮する(該当する gene set を高く発現すること)を示し, 負の値をとる場合はリストの下位で濃縮する(該当する gene set を低く発現すること)を意味する。

表 1.2.34. 本論文文中で使用する遺伝子セット名と MSigDB 上の遺伝子セット名の対応表

Gene set name	MSigDB gene set name
p38 $\alpha$ / $\beta$ pathway	PID_P38ALPHABETAPATHWAY
TNF $\alpha$ signaling via p38 partial	PHONG_TNF_RESPONSE_VIA_P38_PARTIAL
TNF $\alpha$ signaling via p38 complete	PHONG_TNF_RESPONSE_VIA_P38_COMPLETE
IFN $\gamma$ response	HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE
TNF $\alpha$ signaling via NF $\kappa$ B	HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB
p38MAPK pathway	BIOCARTA_P38MAPK_PATHWAY
Inflammatory response	HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE
HSC marker	GEORGANTAS_HSC_MARKES
lineage marker	KEGG_HEMATOPOIETIC_CELL_LINEAGE
PI3K/Akt/mTOR pathway	HALLMARK_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING

表 1.2.35. 加齢および若齢 HSC で発現の高い遺伝子セット

Aged HSC marker								
LPL	PFN2	AK1	ETL4	CD38	CCBE1	PLCL1	DOCK9	SYNM
NPDC1	IRF6	EPHX1	NUDT10	FAT1	CLU	MM.173892.1	TM4SF1	CCNJ
SCD1	HOXB5	ITGA6	PAWR	JAG1	ALCAM	PRKD1	NDRG1	TBC1D8
SGK1	MATN4	MT1	MARVELD2	1810010M01RIK	ALCAM	PBX3	XDH	MM.23733.1
PERP	ASPA	AMPD3	RDH10	YPEL2	IL22RA2	NEO1	NT5C3	PGR
TNFAIP2	RIPK4	CTSW	PLK2	D330050I23RIK	CLU	MAF	STXBP4	RORB
LAMP2	OXR1	GDA	CDCP1	GALNT6	MM.100454.1	MM.29940.1	CYTIP	SOCS3
LAMP2	OXR1	BMP4	4833442J19RIK	VLDLR	MM.178542.1	WWP2	LSR	MAF
GSTM2	CLU	PTPRK	RPS6KA3	ABCA5	FAM63A	PRNP	RBM19	NDRG1
ALDH1A1	OSMR	PTPRK	MYOF	TMEM56	TNFAIP2	MMP14	GHR	SOCS3
LUZP1	FADS3	TACSTD2	SULT1A1	C53008M17RIK	D14ERTD668E	DHRS3	MEF2C	DDR1
EPCAM	ABCB1B	UHRF1BP1L	CBR3	NTF3	FHDC1	THBD	PK3R1	HOXB3
SDPR	RHOJ	ISCA1	COL16A1	EXOC6B	KLHL4		FYB	CLEC1A
SDPR	MAB21L2	TMEM49	TMEM158	NEO1	DSG2	CXCR4	ETS1	GM106
TBC1D8	ST3GAL1	ZFP503	2310043N10RIK	MM.26478.1	PGR	PLEK	PRCP	PDGFD
H2-EB1	CAMKK1	RBPMS2	SFRP1	MM.80474.1	TNFSF10	PLEK	LOC100048391	EYA4
CABC1	CASP12	PTGER4	DHX40	ID2	MM.44969.1	OCLN	NCKAP1	NRG4
PIM2	CTSE	GCA	1810010M01RIK	KCNK6	MM.59574.1	CD302	CITED2	GM106
EHD3	PCLO	CALML4	2610305D13RIK	VWF	GPR64	PLSCR2	AMOTL2	GPR183
SLC7A7	RGNEF	2310001H12RIK	LDHD	EPAS1	CYP11A1	EZH1	IL6ST	GPR4
TGM2	NUPR1	FFAR2	P2RY5	CTTNBP2NL	SELP	ST3GAL6	ALDH5A1	PLSCR1
CYB561	PRTN3	FFAR2	LOC676870	LOC664787	MM.183314.1	ART4	PLSCR1	MM.96562.1
FAP	ABCB1A	LOC100044677	D14ERTD449E	CYTIP	MM.17891.1	MUC1	TDRD9	MM.218392.1
SDC4	SAT1	BMPR1A	SNX24	MM.170971.1	CAPS2	MAPK12	MLLT3	SEMA7A
ARHGAP6	SELP	MYLK	DUSP4	GDA	ACPP	CASP12	GADD45G	TNFSF10
WWTR1	MYOM1	PIK3R1	EXOC3L2	GDA	PCDHB16	KDR	6430527G18RIK	CYP26B1
CLDN5	CLEC7A	SLAMF1	MT2	FAM169A	VLDLR	JAM2	GPR146	CLEC1A
CLCA1	NDRG1	ENPP5	4930506M07RIK	EG665317	MM.38121.1	CARD10	ARHGAP29	CD55
CLCA1	PTGER4	TGM2	C030044C12RIK	VLDLR	MM.216619.1	KLRB1C	CLU	CLCA1
FHL1	TRPC1	GEM	NXNL2	ENSMUSG0000007269	EYA4	ABCA4	YPEL2	B3GALT1
VLDLR	PBX3	PROS1	EVC2	RAB40B	SBF2	DSG2	RARB	MM.22185.1
GHR	JUB	ALCAM	PLSCR1	JAM2	SDPR	PKP2	CPD	
C4B	S100A6	ALCAM	TMTC2	AGTR1A	MM.151150.1	SELP	KIF21A	
BHLHE40	CYSLTR2	FAM63A	1810073008RIK	NAV1	CYTIP	SERPINB6A	PPP1R16B	
GPLD1	NRG4	SLC6A15	CPNE8	MMRN1	TC2N	PTGER3	PAK6	
ADCY6	BCL6	ETS1	1700112E06RIK	A730089K16RIK	GPRIN2	EPDR1	ITGB3	
BCL3	PIP5K1B	TRIM47	CPNE8	GPR183	DOCK9	PIP5K1B	DENN5B	
RAMP2	CSPRS	OBF2A	MM.41243.1	HOMER1	RUNX1T1	ARHGAP5	A230083H22RIK	
Young HSC marker								
MGST1	NCF4	4933411K20RIK	LOC632297	LHFPL2	SH2D5	EBI3	RBM5	MM.196322.1
MCM5	SOCS2	CEP110	TRP53	FAM105A	SGOL1	GATA1	CFP	CERKL
MPO	KLF1	NEDD4	ANTXR2	KNTC1	RASSF4	PLXDC2	CENPN	NCF1
SATB1	MS4A6B	CCNE2	HNF4A	ARHGAP15	MM.123404.1	CHEK1	MM.220934.1	A030001D16RIK
CD34	PLXDC2	CTR9	EIF4G1	SH2D5	RNF220	BAZ1B	PPIL5	PANK1
MELK	EPB4.1L3	SYNCRIP	POLE2	ARHGAP30	E330016A19RIK	NRK	CEP350	CREBBP
LIG1	ANXA2	HMG2	ARMCX4	MLEC	JAKMIP1	MS4A6C	HBA-A1	UBTF
CDC45	2810417H13RIK	DNMT3A	MM.214467.1	MCM5	MM.150139.1	RP23-357I141	ATIC	KIF23
CDC6	CD37	RAD54L	TPX2	COTL1	MTAP7	CHEK1	DSCC1	MM.196322.1
TIMELESS	MTHFD2	PNN	HBA-A1	CDCA8	RHOBTB3	SYNCRIP	4933439C20RIK	CERKL
PTGR1	TNFRSF13C	COL4A2	CDCA8	RG57BP	AP1S2	HMG2	PHLDB2	
RAD51AP1	SELL	CDT1	NCAPG	CDCA2	VCAM1	RNPEP	LGALS1	
KPNA4	CDKN1B	TM6SF1	SYCE2	ZFP800	HIF1A	PLAC8	KCTD14	
IL15	ECT2	TXNRD1	4933439C20RIK	FAM46A	CDCA5	EFCAB7	CSF2RB	
SYK	LGALS1	P2RY14	RNASE6	CASC5	DNMT3B	COL4A1	MM.157900.2	
CENPK	BMPR2	MAP2K7	LOC433762	CHEK1	PRIM1	CAMK1D	MM.220934.3	
DNMT3B	SLC22A3	LST1	ESPL1	MMP2	SOCS2	PLK4	KIF23	

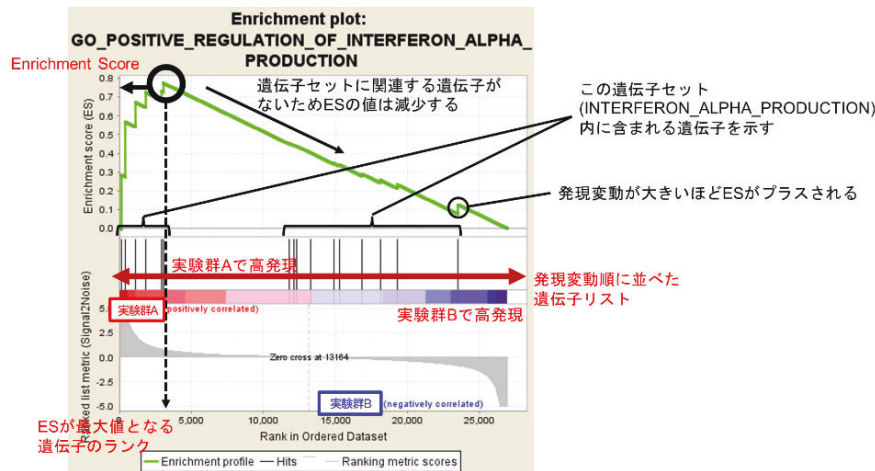


図 1.2.7. GSEA の結果の見方

### 1.2.20 統計解析

特に他に断りのない限り、データは平均値±SD (標準偏差)で示す。統計学的に有意かどうかの判定は、2群実験の比較には two-tailed Student's t test を、多群間の比較は Tukey's multiple comparison test. を用いた(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  と表記し、ns は  $p$  値が 0.05 以上の場合に用いた)。

## 1.3 実験結果

### 1.3.1 加齢早期過程において p38 $\alpha$ は HSC をエイジング形質から保護する

はじめに p38 $\alpha$  が HSC エイジングへどのように寄与するか検討するため、HSC のエイジング形質がどの段階で生じるのか調べた。本実験で用いた C57BL6J 系統のマウスの寿命は約 2 年(23-24 ヶ月)であるため、ヒトでいうと若齢, 壮年~中年齢, 高齢に相当する 8 週齢, 1 年齢, 2 年齢のマウスから HSC を採取し、HSC エイジングの指標の一つである細胞数および老化マーカー (CD41, P-selectin) ([77, 78](#))の発現を調べた。その結果、HSC の細胞数および CD41, P-selectin の発現量は 8 週齢と比べて 1 年齢マウスで有意に上昇し、1 年齢から 2 年齢にかけてさらに上昇する傾向が見られた (補助図 1.3.1 A-C)。この結果から、HSC はエイジング形質を特定の時期に獲得するのではなく、一生を通して徐々に獲得していくことが示唆された。そこで HSC エイジングの進行初期(若齢~1 年齢)および後期(1 年齢~2 年齢)の各過程において p38 $\alpha$  が果たす機能を検討すべく、CAG-CreERT2: p38 $\alpha^{\text{flox/flox}}$  (p38 $\alpha^{\text{fl/fl}}$ )マウスを用いて異なる時期に誘導的に p38 $\alpha$  を欠損させたモデルを作製した。

最初に、HSC エイジングの進行初期過程における p38 $\alpha$  の機能を調べるため、6 週齢前後で Tamoxifen (TAM)を腹腔内投与(i.p.)して p38 $\alpha$  を欠損させ、1 年齢まで加齢させた p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ マウスを使用した (図 1.3.1 A)。まずフローサイトメーター (FACS)を用い

て定常状態の造血を解析したところ、 $p38\alpha^{\Delta/\Delta}$ マウスは  $p38\alpha^{+/+}$ マウスに比べ末梢血中の B 細胞の割合が有意に減少し、顆粒球の割合は上昇していた (図 1.3.1 B)。骨髄、脾臓、胸腺における分化血球細胞の割合は  $p38\alpha^{+/+}$ および  $p38\alpha^{\Delta/\Delta}$ マウスで有意差は認められなかった (図 1.3.1 C および補助図 1.3.1 D-E)。次に  $p38\alpha^{\Delta/\Delta}$ HSC の骨髄再構築能を評価するため、骨髄移植実験を行った。その結果、一次移植後の末梢血キメリズム(レシピエント内におけるドナー細胞の割合)および分化細胞の割合は両群間で有意な差を認めなかったが (図 1.3.1 D および E)、移植後 4 ヶ月目の骨髄キメリズムは  $p38\alpha^{\Delta/\Delta}$ HSC を移植した群で有意に減少した (図 1.3.1 F)。また二次移植後には、 $p38\alpha^{\Delta/\Delta}$ HSC を移植した群ではコントロール群と比べて末梢血キメリズムおよび骨髄キメリズムが有意に低下し、末梢血中の分化血球細胞の T 細胞の割合が上昇した (図 1.3.1 G-I)。さらに三次移植後、 $p38\alpha^{\Delta/\Delta}$ HSC 移植群ではドナー由来の細胞はほとんど検出されなかった (図 1.3.1 J)。以上の結果より、 $p38\alpha$  は HSC エイジングの進行初期過程において、HSC の分化能および骨髄再構築能の維持に重要であることが示唆された。

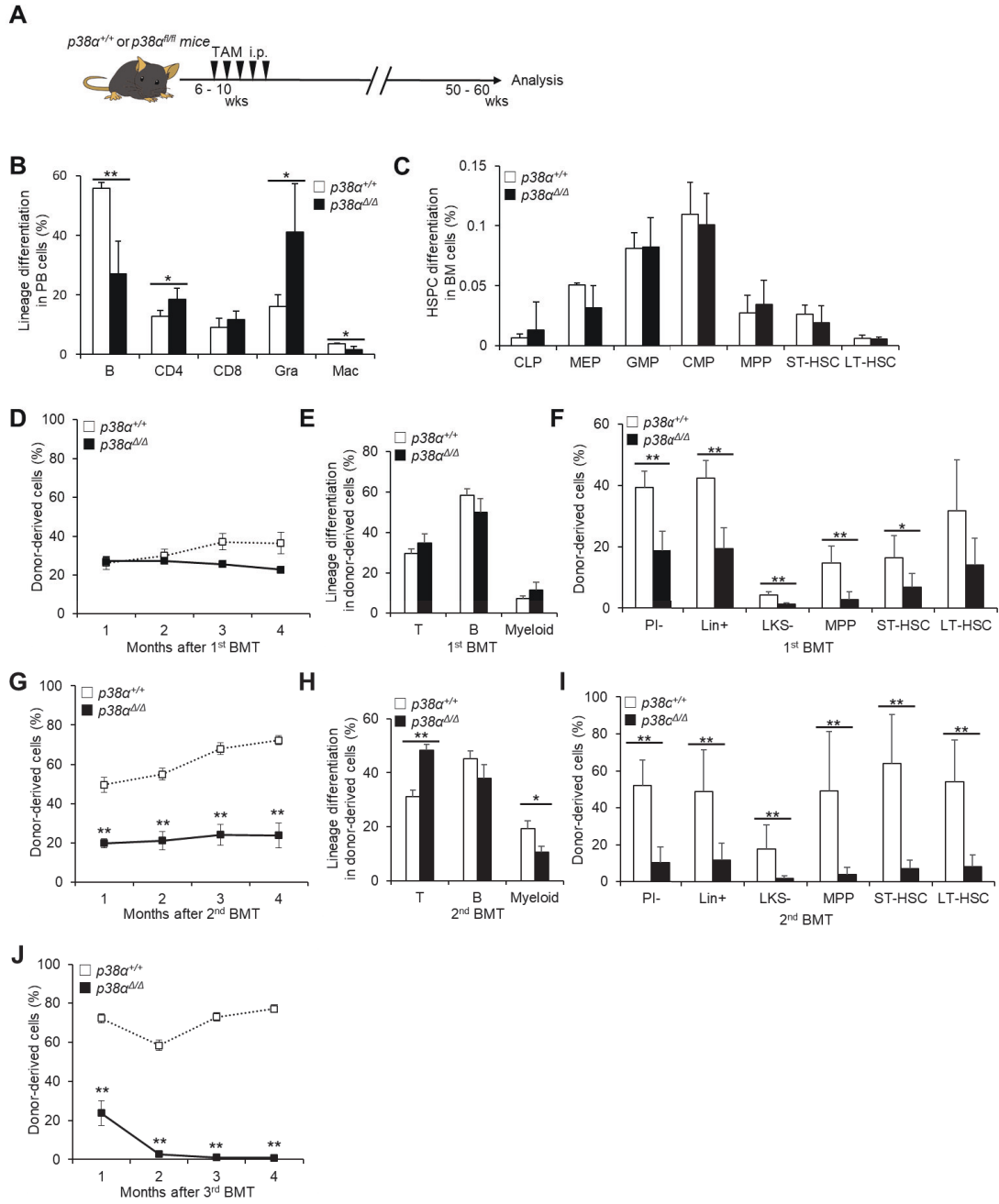


図 1.3.1. 1 年齢マウスにおいて、p38 $\alpha$  の欠損は HSC のエイジング形質を改善しない

(A) 1 年齢マウスにおける p38 $\alpha$  機能解析のための実験デザイン。

(B-C) 1 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスの末梢血(PB)中の分化血球細胞(B)および骨髄(BM)中の造血幹前駆細胞(C)の割合(B, B220<sup>+</sup> B cells; CD4, CD4<sup>+</sup> T cells; CD8, CD8<sup>+</sup> T cells; Gra, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>hi</sup> Granulocytes; Mac, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>lo</sup> Macrophages; CLP, common lymphoid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>Sca-1/c-Kit<sup>lo</sup>); MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); GMPs, granulocyte-monocyte progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); CMPs, common myeloid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs) (means  $\pm$  SD, n = 5)。

(D-E) 1 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスから採取した HSC の一次移植後の PB キメリズム(D)および分化血球細胞の割合(E) (means  $\pm$  SD, n = 6)。

(F) 1 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスから採取した HSC の一次移植後 4 ヶ月目の骨髄キメリズム (PI<sup>-</sup>, propidium iodide negative live cells; Lin<sup>+</sup>, lineage marker positive cells; LKS<sup>-</sup>, Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> cells; MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs) (means  $\pm$  SD, n = 5-6)。

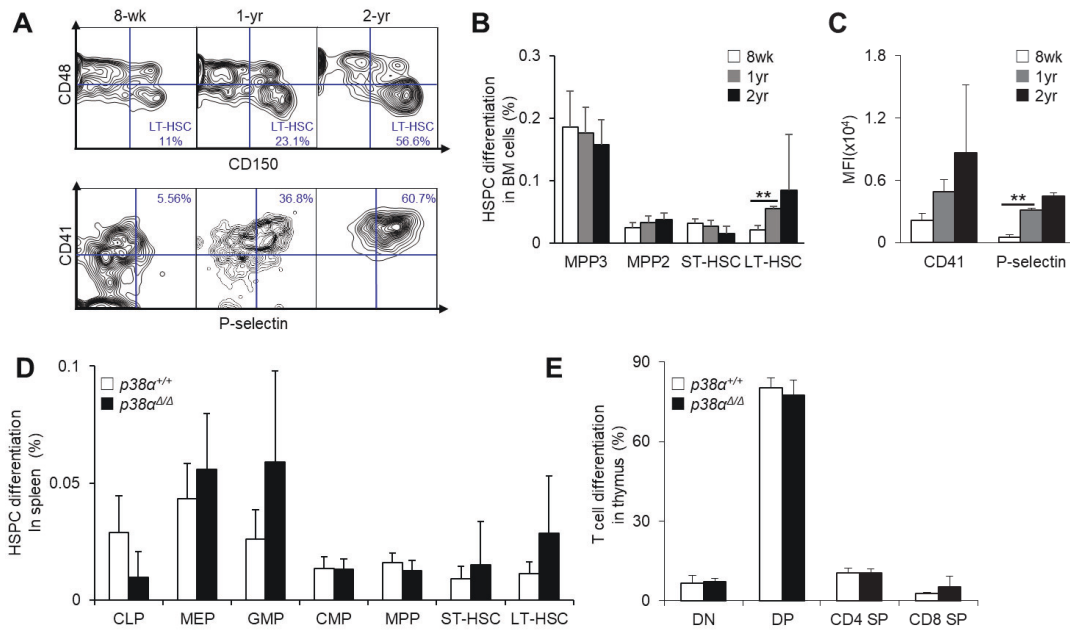
(G-H) 1 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスから採取した HSC の二次移植後の PB キメリズム(G)および分化血球細胞の割合(H) (means  $\pm$  SD, n = 4-6)。

(I) 1 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスから採取した HSC の二次移植後 4 ヶ月目の骨髄キメリズム (means  $\pm$  SD, n = 5-6)。

(J) 1 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスから採取した HSC の三次移植後の PB キメリズム (means  $\pm$  SD, n = 4-6)。

データは全て 1 回の実験から得られた結果である。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01。

(Sorimachi et al., *J Biol Chem.* 2021 の図から引用。)



補助図 1.3.1.

(A) 若齢(8週齢), 1年齢および2年齢マウスにおける LT-HSCs (CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSKs) (上段)と LT-HSC における CD41, P-selectin の発現(下段)の代表的な FACS plot.

(B-C) 若齢(8週齢), 1年齢および2年齢マウスにおける骨髄造血幹細胞分画の割合 (MPP3, CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK; MPP2, CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK; ST-HSCs, CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK; LT-HSCs, CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK) (B)および LT-HSC における CD41, P-selectin の発現量(C)。Mean fluorescence Intensity (MFI)は FACS で解析した (mean±SD, n=2-8)。

(D-E) 1年齢 p38α<sup>+/+</sup>および p38α<sup>Δ/Δ</sup>マウスの脾臓中の造血幹前駆細胞(D)および胸腺中の分化血球細胞(E)の割合(CLP, common lymphoid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>Sca-1/c-Kit<sup>lo</sup>); MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); GMPs, granulocyte-monocyte progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); CMPs, common myeloid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs; DN, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> cells; DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells; CD4 SP, CD4<sup>+</sup> cells; CD8 SP, CD8<sup>+</sup> cells) (means ± SD, n = 5)。

データは全て 1 回の実験から得られた結果である。\*\*p < 0.01。

(Sorimachi et al., *J Biol Chem.* 2021 の図から引用。)

### 1.3.2 加齢後期過程において p38 $\alpha$ は HSC エイジングを促進する

次に, HSC エイジングの進行後期過程における p38 $\alpha$  の機能を調べるため, 若齢 (10 週齢付近) の p38 $\alpha^{\text{fl/fl}}$  マウスへ TAM を投与し, 2 年齢まで加齢させた後の解析を試みたが, このマウスは 2 年齢まで生存しなかった (補助図 1.3.2 A)。そこで, 1 年齢 (50-60 週齢) で TAM を投与し, 2 年齢まで加齢させた p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$  マウスを使用して解析を行った (図 1.3.2 A)。ゲノム DNA の qPCR によって, 2 年齢の p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$  マウスでは p38 $\alpha$  の発現量が約 70% 程度低下することを確認した (補助図 1.3.2 B)。2 年齢の p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$  マウスにおける定常状態の造血を解析したところ, 末梢血, 骨髄, 脾臓, 胸腺における分化細胞の割合および造血幹/前駆細胞の割合は同等であった (図 1.3.2 B-C および補助図 1.3.2 C-I)。次に両マウス HSC の骨髄再構築能を評価するために骨髄移植実験を行ったところ, 一次移植後の末梢血キメリズムや分化細胞の割合, および骨髄キメリズムに有意な差は認められなかった (図 1.3.2 D-F および補助図 1.3.2 J)。一方, 2 次移植後においては, 末梢血中の分化血球細胞の割合は同等であったが, p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$  HSC を移植した群で末梢血キメリズムの有意な上昇が認められた (図 1.3.2 G-H および補助図 1.3.2 K)。また, p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$  HSC を移植した群では MPP や LKS などの画分で骨髄キメリズムも有意に上昇しており, HSC エイジング後期では, p38 $\alpha$  欠損によって移植後の再構築能が改善することが示された (図 1.3.2 I)。また, ストレス負荷後の HSC で活性化すると報告されているサイクリン依存性キナーゼ (CDK) 阻害因子である p16<sup>Ink4a</sup> および p19<sup>Arf</sup> の発現量を qPCR で確認した結果 (67), 定常状態, 二次移植後いずれにおいても p38 $\alpha$  の有無によって発現量に差は認められなかった (補助図 1.3.2 L および M)。これらの結果から, HSC エイジングの進行後期過程において, p38 $\alpha$  が HSC の移植後再構築能を低下させることが示された。



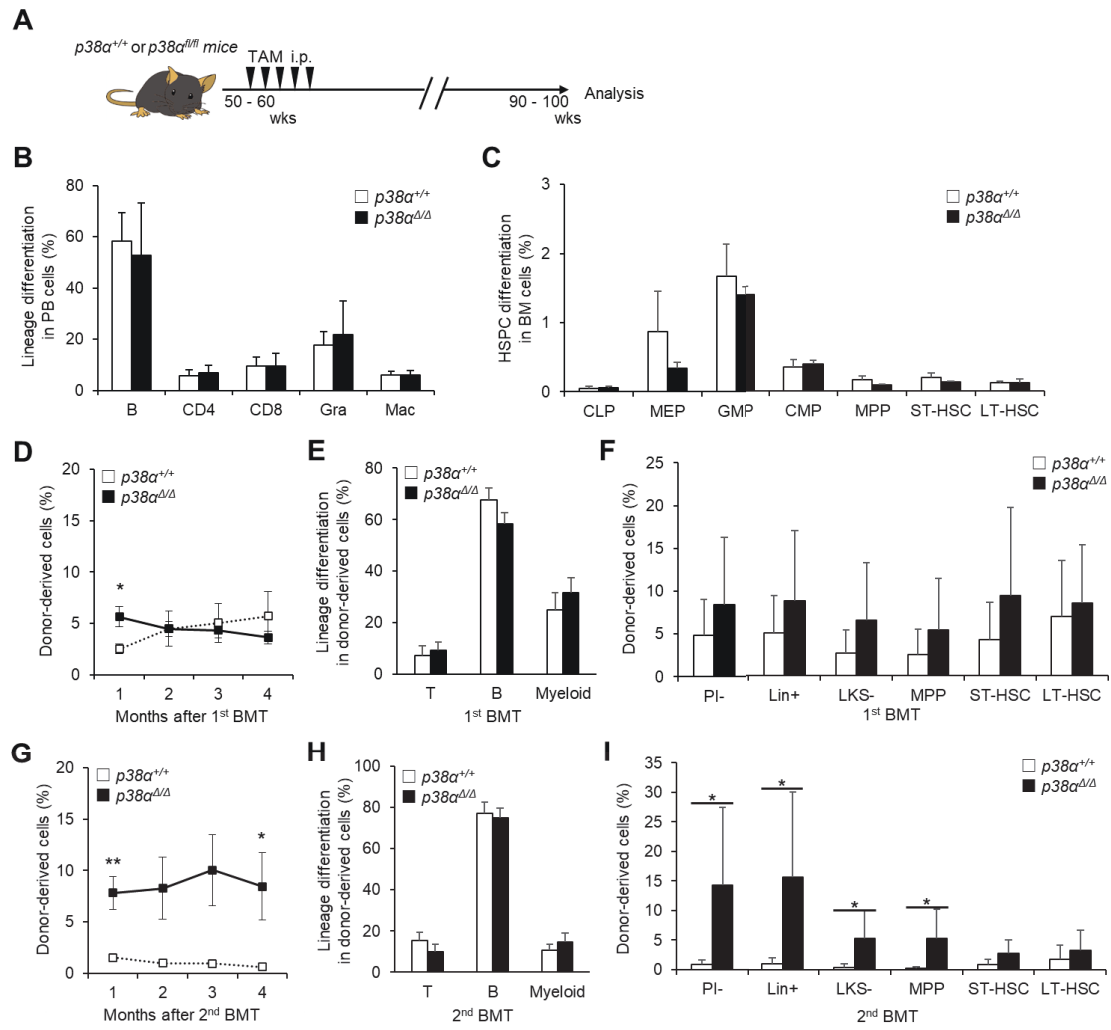


図 1.3.2. 2 年齢マウスにおける p38 $\alpha$  の欠損は HSC のエイジング形質を部分的に改善する

(A) 2 年齢マウスにおける p38 $\alpha$  機能解析のための実験デザイン。

(B-C) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスの末梢血(PB)中の分化血球細胞(B)および骨髄(BM)中の造血幹前駆細胞(C)の割合(B, B220<sup>+</sup> B cells; CD4, CD4<sup>+</sup> T cells; CD8, CD8<sup>+</sup> T cells; Gra, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>hi</sup> Granulocytes; Mac, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>lo</sup> Macrophages; CLP, common lymphoid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>Sca-1/c-Kit<sup>lo</sup>); MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); GMPs, granulocyte-monocyte progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); CMPs, common myeloid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs) (means  $\pm$  SD, n = 3-5)。

(D-E) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスから採取した HSC の一次移植後の PB キメリズム(D)および分化血球細胞の割合(E) (means  $\pm$  SD, n = 7-8)。

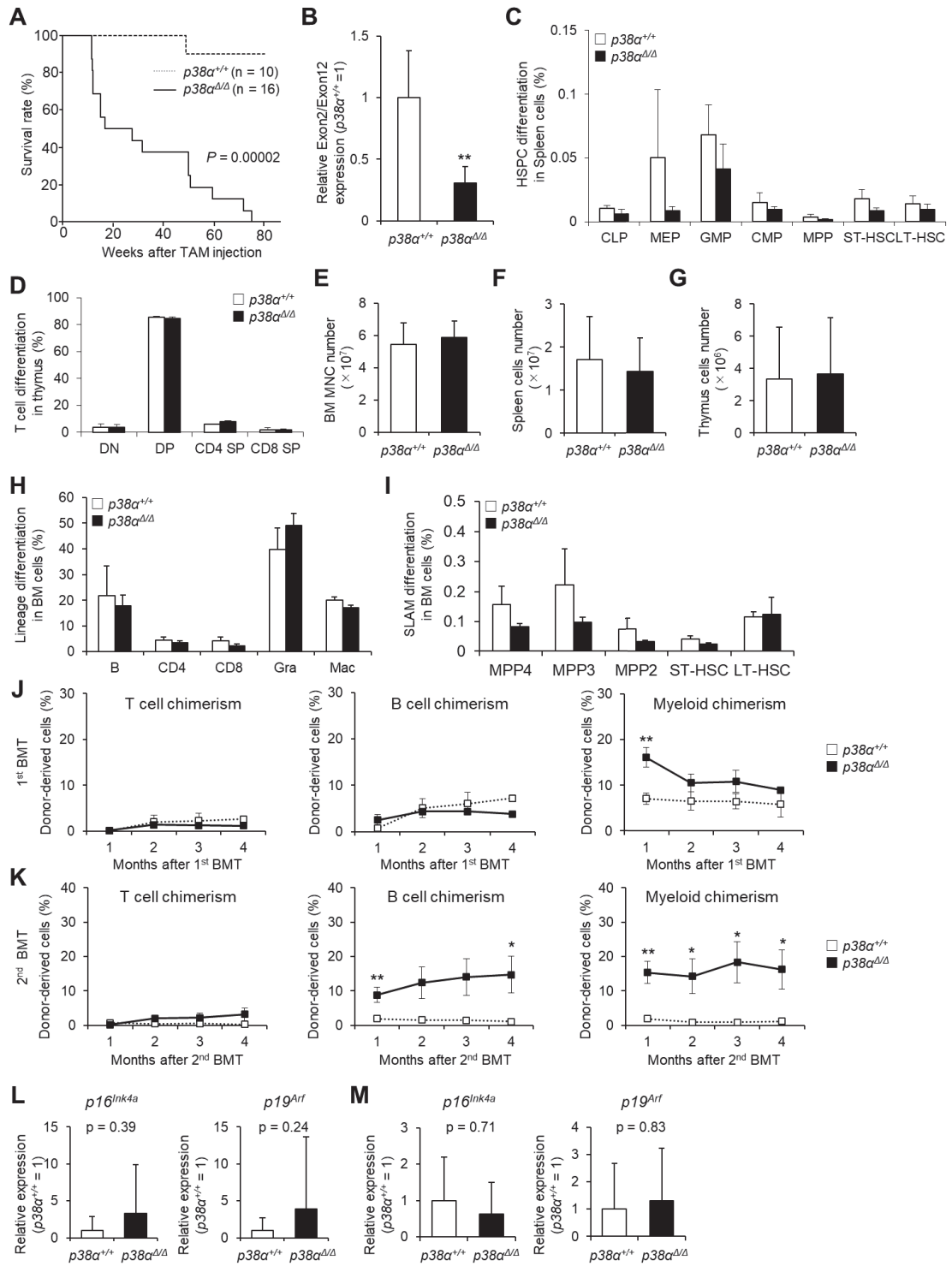
(F) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスから採取した HSC の一次移植後 4 ヶ月目の骨髄キメリズム (PI<sup>-</sup>, propidium iodide negative live cells; Lin<sup>+</sup>, lineage marker positive cells; LKS<sup>-</sup>, Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> cells; MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs) (means  $\pm$  SD, n = 7-8)。

(G-H) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスから採取した HSC の二次移植後の PB キメリズム(G)および分化血球細胞の割合(H) (means  $\pm$  SD, n = 4-6)。

(I) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  マウスから採取した HSC の二次移植後 4 ヶ月目の骨髄キメリズム (means  $\pm$  SD, n = 7-8)。

データは全て 1 回の実験から得られた結果である。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01。

(Sorimachi et al., *J Biol Chem.* 2021 の図から引用。)



### 補助図 1.3.2.

(A) Tamoxifen (TAM)投与後の p38 $\alpha^{+/+}$ または p38 $\alpha^{Δ/Δ}$ マウスの生存曲線 (n = 10-16)。TAMは 10-25 週齢時点で投与した。

(B) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$ および p38 $\alpha^{Δ/Δ}$ マウスの末梢血細胞の p38 $\alpha$  の発現量 (mean $\pm$ SD, n=2-9)。

(C) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$ および p38 $\alpha^{Δ/Δ}$ マウスの脾臓(SP)中の造血幹前駆細胞の割合 (CLP, common lymphoid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>Sca-1/c-Kit<sup>lo</sup>); MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); GMPs, granulocyte-monocyte progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); CMPs, common myeloid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>-</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs) (means  $\pm$  SD, n = 3-5)。

(D) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$ および p38 $\alpha^{Δ/Δ}$ マウスの胸腺中の T 細胞の割合 (DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T cells; DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells; CD4 SP, CD4<sup>+</sup> T cells; CD8 SP, CD8<sup>+</sup> T cells) (means  $\pm$  SD, n = 2-3)。

(E-G) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$ または p38 $\alpha^{Δ/Δ}$ マウスの骨髄(BM) (E), 脾臓(SP) (F), および胸腺 (G)における骨髄単核球数 (means  $\pm$  SD, n = 2-3)。

(H-I) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$ または p38 $\alpha^{Δ/Δ}$ マウスの骨髄中の分化血球細胞の割合 (H) (means  $\pm$  SD, n = 7-9)および造血幹前駆細胞の割合 (I) (means  $\pm$  SD, n = 3-5) (B, B220<sup>+</sup> B cells; CD4, CD4<sup>+</sup> T cells; CD8, CD8<sup>+</sup> T cells; Gra, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>hi</sup> Granulocytes; Mac, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>lo</sup> Macrophages; LT-HSCs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>; ST-HSCs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>-</sup>; MPP2 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>; MPP3 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>-</sup>; MPP4 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>)。

(J-K) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$ および p38 $\alpha^{Δ/Δ}$ マウスから採取した HSC の一次移植(J)または二次移植(K)後の末梢血中の分化細胞(CD4/8<sup>+</sup> T 細胞、B220<sup>+</sup> B 細胞、および Gr-1/Mac-1<sup>+</sup> Myeloid 細胞)のキメリズム (means  $\pm$  SD, n = 7-8)。

(L-M) 定常状態(L)または二次移植後(M)の p38 $\alpha^{+/+}$ および p38 $\alpha^{Δ/Δ}$  HSC (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSK)における p16<sup>Ink4a</sup> および p19<sup>Arf</sup> の発現量 (mean $\pm$ SD, n=4-19)。

データは全て 1 回の実験から得られた結果である。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01。

(Sorimachi et al., *J Biol Chem.* 2021 の図から引用。)

### 1.3.3 加齢後期過程における p38 $\alpha$ 欠損は HSC の炎症を抑制しエイジング形質を抑制する

HSC エイジング過程における p38 $\alpha$  の役割についてさらに知見を得るため、HSC における p38 $\alpha$  および p38 $\alpha$  下流経路の加齢に伴う発現変化を調べた。まず 10 週齢, 1 年齢, 2 年齢のマウスから採取した HSC の qPCR を行い p38MAPK の各アイソザイムの発現量を調べたところ、p38 $\alpha$  の発現量は加齢によって変化しなかった (図 1.3.3 A および補助図 1.3.3 A)。p38 $\gamma$ (MAPK12)および p38 $\delta$ (MAPK13)の発現量は加齢に伴い上昇していたが、p38 $\alpha/\beta$  と比較すると相対的な発現量(内在性コントロールに対する発現量)は低かった(補助図 1.3.3 A)。次に、Gene expression Omnibus (GEO)データベースから取得した RNA-sequence data (GSE151333)を用いて若齢(10 週齢), 1 年齢, 2 年齢の HSC の Gene set enrichment analysis (GSEA)を行ったところ、p38 $\alpha/\beta$  下流経路関連遺伝子群の発現が 2 年齢の HSC で発現が上昇傾向にあった(図 1.3.3 B)。一方で、1 年齢の HSC では変化は見られず、p38 $\gamma/\delta$  下流経路の発現は 1 年齢・2 年齢ともに変化は見られなかった(data not shown)。これらの結果は HSC エイジングの進行過程において、p38 $\alpha$  下流のシグナルが特に加齢後期(1 年齢から 2 年齢)にかけて増強されることを示唆している。

加齢に伴う HSC の遺伝子発現変化をさらに調べるため、ヒートマップ解析および主成分解析(Principal component analysis; PCA)を行ったところ、各週齢で発現の高い Differential expression gene (DEG)が同定され、HSC は各週齢で異なる遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなった(図 1.3.3 C, 補助図 1.3.3 B-C および表 1.3.1, 1.3.2)。PCA から若齢, 1 年齢, 2 年齢 HSC の遺伝子発現は PC1 によって特徴づけられ、この PC1 を構成する遺伝子の Gene ontology (GO)解析から、炎症反応やサイトカイン産生に関連する遺伝子群が多く含まれることが分かった (図 1.3.3 C および D)。また、GSEA から p38MAPK 経路や炎症応答に関連する遺伝子群が 1 年齢と比較して 2 年齢 HSC で発現上昇していた (補助図 1.3.3 D)。特に NF $\kappa$ B - TNF $\alpha$  signaling や Interferon (IFN) response などの遺伝子群は 1 年齢から 2 年齢にかけて発現が上昇傾向にある、もしくは有意に上昇したが、若齢から 1 年齢の間では変化はなかった (図 1.3.3 E-F および補助図 1.3.3 E)。つまり、HSC エイジングは単一に進行する過程ではなく、特に後期過程では早期過程よりも炎症応答が強く活性化されることが示唆される。

既報より、p38MAPK は炎症刺激やサイトカイン刺激などのストレスを受けると TNF $\alpha$ , Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6)などの炎症性サイトカインの産生を誘導することが知られている(79, 80)。そこで私たちは、2 年齢マウスにおいて p38MAPK の中でも特に p38 $\alpha$  が HSC の炎症応答を増強して機能を低下させる可能性を考えた。そこで 2 年齢の p38 $\alpha^{+/+}$  および p38 $\alpha^{d/d}$  HSC (図 1.3.2 A に示すマウスモデルを使用した)の遺伝子発現解析を行い、炎症応答に対する p38 $\alpha$  の寄与を調べた。その結果、p38 $\alpha^{d/d}$  HSC は p38 $\alpha^{+/+}$  HSC に比べて p38MAPK 下流経路関連遺伝子群の発現が有意に低下することが確認でき、さらに TNF $\alpha$  signaling, IFN response などの炎症経路関連の遺伝子群の発現が有意に低下することが分かった(図 1.3.3 G-H および補助図 1.3.3 F-H)。さらに、p38 $\alpha^{+/+}$  HSC に比べて p38 $\alpha^{d/d}$  HSC では、

加齢 HSC に特徴的な遺伝子群(aged HSC marker)の発現は低下し, 若齢 HSC に特徴的な遺伝子群(young HSC marker) の発現が上昇したことから, p38 欠損によって HSC は遺伝子発現上若返ることが明らかとなった(図 1.3.3 I および表 1.2.34, 1.2.35) [\(81\)](#)。これらの結果より, p38 $\alpha$  は HSC エイジングの特に後期過程において炎症関連の遺伝子発現の増強および加齢促進を担うことが示唆された。

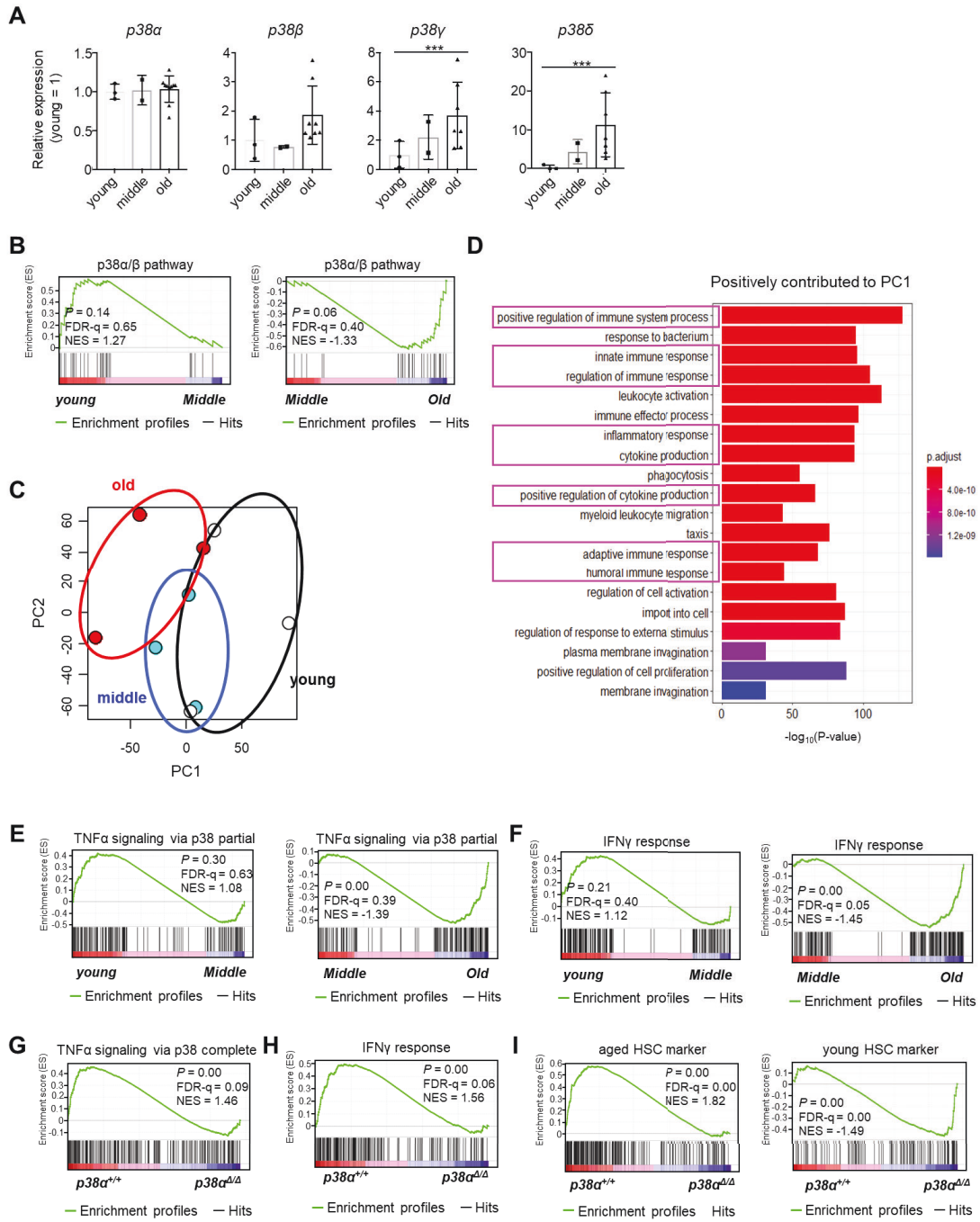


図 1.3.3. p38 $\alpha$  は 1 年齢から 2 年齢にかけて HSC の炎症応答を増強し HSC エイジングを促進する

(A) 若齢(10 週齢), 1 年齢, および 2 年齢 HSC (CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK)における p38 $\alpha$  (MAPK14), p38 $\beta$  (MAPK11), p38 $\gamma$ (MAPK12), p38 $\delta$ (MAPK13)の発現量。若齢 HSC の発現量に対する相対値で示す (mean $\pm$ SD, n=2-10)。

(B) 若齢(10 週齢), 1 年齢, および 2 年齢 HSC (CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK)における p38 $\alpha/\beta$  下流経路の GSEA plot。

(C) 若齢(10 週齢), 1 年齢, および 2 年齢 HSC (CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK)の主成分分析。

(D) (C)の主成分分析の結果, PC1 に正に寄与する遺伝子の Gene ontology (GO)解析。

(E-F) 若齢(10 週齢), 1 年齢, および 2 年齢 HSC (CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK)における TNF $\alpha$  signaling via p38 (E)および IFN $\gamma$  response (F)に関連する遺伝群の GSEA plot。

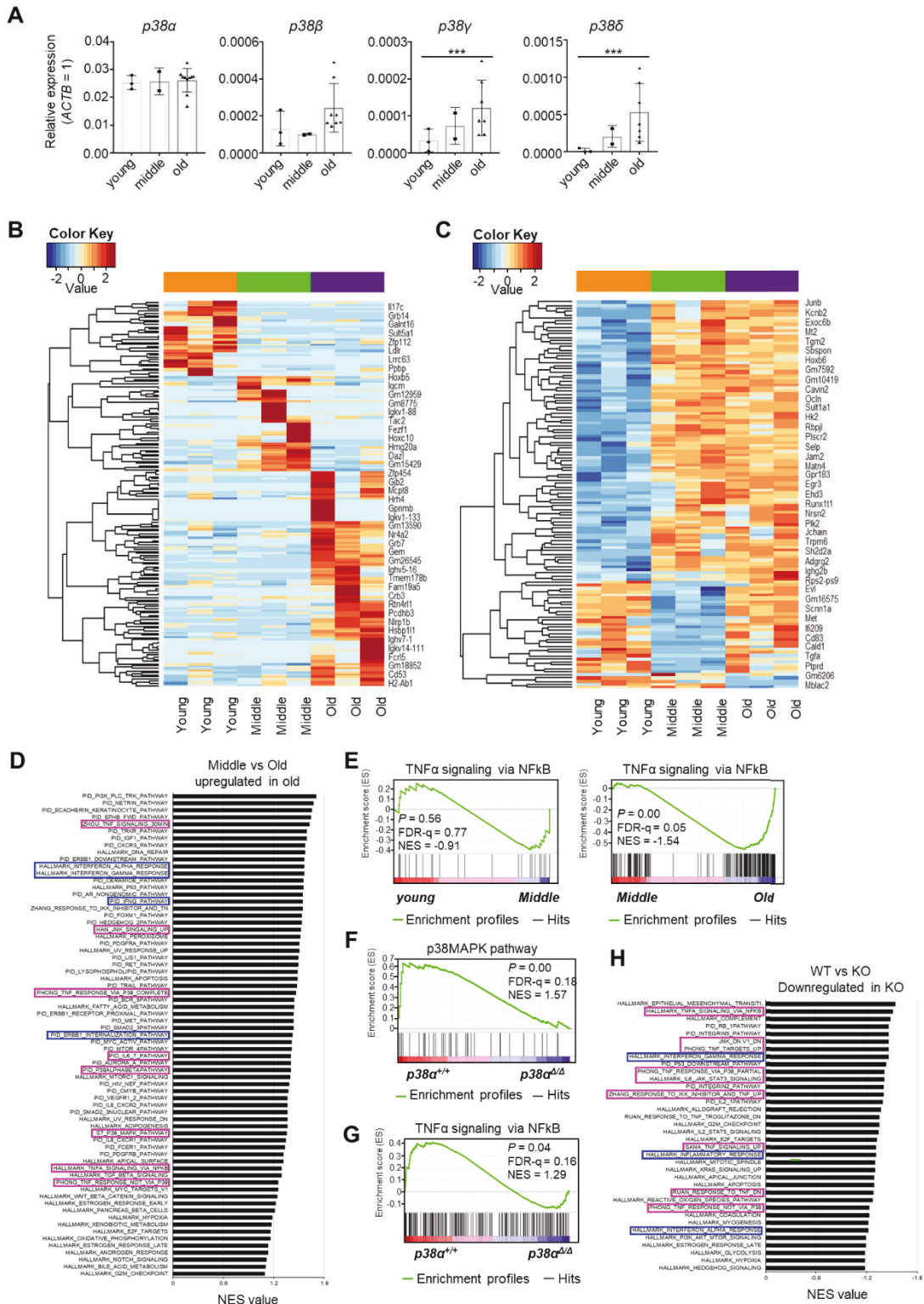
(G-H) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$ または p38 $\alpha^{d/d}$  HSC の TNF $\alpha$  signaling via p38 (G)および IFN $\gamma$  response (H)に関連する遺伝群の GSEA plot。

(I) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$ または p38 $\alpha^{d/d}$  HSC の aged HSC marker および young HSC marker に含まれる遺伝群の GSEA plot。

\*\*\*P < 0.001.

(Sorimachi et al., *J Biol Chem.* 2021 の図から引用。)





### 補助図 1.3.3.

(A) 若齢(10 週齢), 1 年齢, および 2 年齢 HSC (CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK)における p38 $\alpha$  (MAPK14), p38 $\beta$  (MAPK11), p38 $\gamma$ (MAPK12), p38 $\delta$ (MAPK13)の発現量。内在性コントロール( $\beta$ -actin; ACTB)の発現量に対する相対値で示す(mean  $\pm$  SD, n=2-10)。

(B-C) 若齢(10 週齢, オレンジ), 1 年齢(緑), および 2 年齢(紫)HSC (CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK)で特異的に発現が上昇(B)または減少(C)する遺伝子とその発現量をヒートマップで示す。ヒートマップは各サンプルの z-normalized score を表す。遺伝子は BH p-value < 0.0015, FDR q-value < 0.25 に基づき選択し, 代表的な遺伝子のみ表示した(全遺伝子リストは表 1.3.1 および 1.3.2 参照)。Color key は各週齢の HSC における遺伝子発現の増加または減少を示す。

(D) 1 年齢 HSC と比較して 2 年齢 HSC で発現上昇した遺伝子群。グラフの横軸は負の Normalized Enrichment Score (NES) を示す。

(E) 若齢(10 週齢), 1 年齢, および 2 年齢 HSC (CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>LSK)における TNF $\alpha$  signaling via NF $\kappa$ B に関連する遺伝子群の GSEA plot。

(F-G) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$ または p38 $\alpha^{d/d}$  HSC の p38MAPK 下流経路(F)および TNF $\alpha$  signaling via NF $\kappa$ B (G)に関連する遺伝子群の GSEA plot。

(H) 2 年齢 p38 $\alpha^{+/+}$ と比較して, p38 $\alpha^{d/d}$  HSC で発現が低下した遺伝子群。グラフの横軸は負の Normalized Enrichment Score (NES) を示す。

\*\*\*P < 0.001.

(Sorimachi et al., *J Biol Chem.* 2021 の図から引用。)

表 1.3.1. 若齢, 1 年齢, 2 年齢 HSC で発現の高い遺伝子と発現量  
(補助図 1.3.3 B のヒートマップより)

gene	Young	Young	Young	Middle	Middle	Middle	Old	Old	Old	gene	Young	Young	Young	Middle	Middle	Middle	Old	Old	Old	gene	Young	Young	Young	Middle	Middle	Middle	Old	Old	Old	
Rgs5	-0.333	-0.333	2.667	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	Tac2	-0.487	-0.487	-0.487	-0.487	1.199	2.213	-0.487	-0.487	-0.487	Zfp454	-0.484	-0.484	-0.484	-0.484	-0.484	-0.484	-0.484	-0.484	1.135	2.252
Galnt16	-0.333	2.667	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	Gm5937	-0.616	-0.616	-0.616	1.222	2.000	0.470	-0.616	-0.616	-0.616	Pdgfra	-0.549	-0.549	0.049	-0.549	-0.549	-0.549	-0.549	0.940	2.304	
My9	-0.396	-0.396	2.623	-0.396	-0.396	-0.396	-0.396	-0.396	-0.396	Dact3	-0.330	-0.843	-0.843	0.091	1.897	1.415	-0.843	-0.238	-0.306	Ighv14-1	-0.549	-0.549	-0.147	-0.549	-0.549	-0.549	-0.549	1.361	2.079	
Acvr1c	-0.225	1.861	1.642	-0.546	-0.546	-0.546	-0.546	-0.546	-0.546	Gm10399	-0.239	-0.639	-0.639	1.050	0.639	2.253	-0.639	-0.292	-0.218	I700041G16RKA	-0.612	-0.612	-0.612	-0.612	-0.612	-0.612	1.172	2.040	4.788	
Ccdc162	-0.545	2.202	1.186	-0.545	-0.545	-0.545	-0.545	-0.545	-0.545	Ranbp2-ps1	-0.845	-0.464	0.101	1.213	2.222	1.401	-0.845	-0.845	-0.845	Kcnk11	-0.565	0.059	-0.565	-0.565	-0.565	-0.565	2.178	0.565	1.155	
Caivi1	2.053	0.488	1.451	-0.498	-0.498	-0.498	-0.498	-0.498	-0.498	Dazl	-0.500	-0.922	-0.334	0.226	1.369	0.269	-0.269	-0.564	Fam83c	-0.557	-0.557	-0.132	-0.557	-0.557	-0.557	1.945	-0.557	0.360		
Uhhp1	1.727	0.504	1.800	-0.504	-0.504	-0.504	-0.504	-0.504	-0.504	Gm15429	-0.200	-0.939	0.014	0.776	1.807	1.055	-0.939	-0.863	-0.863	Dusp14	-0.530	0.105	-0.530	-0.530	-0.530	-0.530	1.530	0.245	0.851	
Bmp2	1.244	0.490	2.185	-0.490	-0.490	-0.490	-0.490	-0.490	-0.490	Fil1-ps1	0.033	-0.899	-0.899	1.511	1.495	0.491	-0.899	-0.899	0.068	Gm10916	-0.663	-0.663	-0.663	-0.663	-0.663	-0.663	1.500	1.104	1.376	
Gm13298	1.965	1.613	-0.503	-0.503	-0.503	-0.503	-0.503	-0.503	-0.503	Gm16135	-0.780	-0.780	-0.001	0.007	2.055	1.154	-0.780	-0.093	-0.780	Sbx1a	-0.748	-0.748	-0.058	-0.748	-0.748	-0.748	1.684	0.809	1.306	
Fam205a3	1.905	1.613	-0.503	-0.503	-0.503	-0.503	-0.503	-0.503	-0.503	Mirg	-0.911	-0.024	-0.911	0.742	1.781	0.962	-0.911	0.182	-0.911	Tnnt1	-0.788	-0.788	0.155	-0.788	-0.788	-0.788	1.498	1.049	1.237	
Klh129	-0.460	2.575	0.295	-0.460	-0.460	-0.460	-0.460	-0.460	-0.460	Sei13	0.044	-1.491	-1.492	0.467	0.849	1.599	0.055	0.139	-0.170	G7b7	-0.763	-0.763	-0.358	-0.763	-0.763	-0.763	0.384	0.742	0.627	2.274
Plyk	2.335	-0.474	0.985	-0.474	-0.474	-0.474	-0.474	-0.474	-0.474	Creb5	0.414	-0.818	-0.968	1.673	0.842	0.615	-0.968	-0.302	0.471	I700012C14RKA	-0.711	0.156	-0.711	-0.711	-0.711	-0.711	2.008	0.220	1.169	
Ifi7e	-0.501	1.545	1.984	-0.501	-0.501	-0.501	-0.501	-0.501	-0.501	Cask	-0.512	-0.997	-0.750	0.778	2.038	2.510	-0.146	-0.062	-0.406	Hnr93	-0.752	0.200	-0.316	-0.752	-0.752	-0.752	1.916	1.057	0.587	
Sulf5a1	2.340	0.570	0.452	-0.621	-0.621	-0.621	-0.621	-0.621	-0.621	Hoxb5	-1.139	-1.179	-0.552	1.294	1.230	0.867	-0.918	-0.069	0.466	Hmt2b2b	0.025	-0.773	-0.169	-0.773	-0.429	-0.773	2.411	0.422	0.068	
Lamb3	0.660	2.065	0.995	-0.620	-0.620	-0.620	-0.620	-0.620	-0.620	Appb2	-1.272	-0.314	-0.919	0.347	1.437	1.332	-1.022	0.624	-0.214	Mcp1b	-0.663	-0.663	-0.129	-0.663	-0.663	-0.663	0.663	1.795	1.600	
Lro63	2.049	0.046	0.757	-0.520	-0.520	-0.520	-0.520	-0.520	-0.520	Mblac2	0.281	0.284	0.132	0.179	1.225	1.396	-1.504	-1.212	-0.781	Gm26545	-0.210	-0.207	-0.842	-0.842	-0.842	-0.842	1.626	0.588	1.302	
Vstm5	0.953	1.164	1.724	-0.741	-0.741	-0.741	-0.741	-0.741	-0.741	Fads2	0.080	-0.568	-0.333	0.640	1.649	1.196	-1.070	-0.255	-1.338	Naalad1	-0.807	-0.113	-0.402	-0.807	-0.807	-0.807	1.404	0.662	1.677	
Rtn2	-0.528	2.331	0.940	-0.528	-0.528	-0.528	-0.528	-0.528	-0.528	Hmg20a	-0.304	-0.315	-0.573	0.291	1.250	1.556	-0.546	0.368	-1.726	Tbhs2	-0.650	-0.650	-0.650	-0.650	-0.650	-0.650	1.421	1.965	0.650	
Prss40	2.019	1.273	0.333	-0.604	-0.604	-0.604	-0.604	-0.604	-0.604	Ighg2b	-0.633	-0.633	-0.633	-0.633	-0.633	-0.633	-0.633	-0.633	-0.633	Spag16	-0.733	-0.733	-0.261	-0.733	-0.275	-0.733	1.848	1.510	2.110	
Grl4	0.730	1.006	2.024	-0.627	-0.627	-0.627	-0.627	-0.627	-0.627	Ighv3-2	-0.416	-0.416	-0.416	-0.416	-0.416	-0.416	-0.416	0.325	2.585	Gm3629	-0.024	0.140	-0.833	-0.833	-0.833	-0.833	0.702	0.379	2.137	
Pdp3	0.392	0.392	0.392	-0.468	-0.468	-0.468	-0.468	-0.468	-0.468	Ighg2c	-0.374	-0.374	-0.374	-0.374	-0.374	-0.374	-0.374	2.650	0.504	Rhtd11	-0.315	-0.759	-0.759	-0.759	-0.759	-0.759	0.019	0.759	1.500	
Gm15813	2.119	1.164	0.122	-0.330	-0.330	-0.330	-0.330	-0.330	-0.330	Ighv1-47	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	2.687	Wisp1	-0.876	-0.402	-0.404	-0.399	-0.876	-0.876	0.876	1.290	1.667
BC043934	1.542	-0.595	1.930	-0.595	-0.595	-0.595	-0.595	-0.595	-0.595	Gpm16	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	2.687	Asb2	-0.849	-0.849	0.094	-0.849	-0.849	-0.849	0.941	1.544	1.276
Gm16068	0.934	2.452	0.189	-0.128	-0.128	-0.128	-0.128	-0.128	-0.128	Ighv5-91	-0.024	-0.375	-0.375	-0.375	-0.375	-0.375	-0.375	-0.375	-0.375	Foxc1	-0.070	-0.880	-0.880	-0.880	-0.880	-0.880	1.777	1.780	0.386	
Atp2c2	2.022	1.128	0.337	0.064	-0.710	-0.710	-0.710	-0.710	-0.710	Ighv15-103	-0.366	-0.366	-0.366	-0.366	-0.366	-0.366	-0.366	-0.366	-0.366	C1s1	-0.850	0.154	-0.406	-0.850	-0.850	-0.850	1.252	1.645	3.763	
I700110K19RKA	0.505	2.056	1.023	-0.702	-0.702	-0.702	-0.702	-0.702	-0.702	Ighv1-135	-0.611	-0.611	-0.047	-0.611	-0.611	-0.257	-0.611	1.220	2.139	Gm14005	-0.262	-0.929	0.128	-0.929	-0.929	-0.929	0.568	1.379	1.054	
Fndc11	0.358	2.387	-0.059	-0.156	-0.300	-0.300	-0.300	-0.300	-0.300	Ighv1-136	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	2.667	Crb3	-0.996	-0.153	-0.126	-0.458	-0.603	-0.178	2.259	0.916	0.382
Fxyd1	1.128	0.245	1.072	-0.249	-0.249	-0.249	-0.249	-0.249	-0.249	Sowahc	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	2.667	Spn11	-1.242	-0.483	-0.438	-0.372	-0.226	-1.242	0.713	0.596	0.659
Fxyd2	0.554	1.501	1.670	-0.787	-0.787	-0.787	-0.787	-0.787	-0.787	Ighv14-100	-0.474	-0.474	-0.474	-0.474	-0.474	-0.474	-0.474	0.074	1.285	Pde5	-1.150	-0.862	-0.265	-0.258	-1.150	-0.349	1.169	0.521	1.648	
Zfp112	1.020	2.035	0.059	-1.059	-1.059	-1.059	-1.059	-1.059	-1.059	Ighv5-16	-0.481	-0.481	-0.481	-0.481	-0.481	-0.481	-0.481	2.278	-0.481	Tmem82	-0.376	-0.154	-0.157	-0.508	-0.178	-0.175	1.857	1.445	1.214	
Ap2a1	1.024	0.578	2.505	-0.710	-0.386	-0.620	-0.365	0.255	-0.325	Ighv7-1	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	2.667	-0.333	Gm13590	-0.459	-1.187	0.299	-1.187	-0.333	-0.667	1.504	0.999	1.032	
Shisa8	1.664	0.880	0.725	-1.224	-0.592	-0.320	-0.147	0.171	-0.796	Gm9889	-0.637	-0.637	-0.637	-0.637	-0.637	-0.637	-0.637	1.791	1.402	Nirp1b	-0.026	-0.211	-0.424	-0.545	-1.474	-0.745	1.866	1.100	0.498	
Gm6206	1.565	0.865	0.876	0.019	-0.021	-0.045	-0.618	-1.034	-1.607	Ighv12-44	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	2.667	-0.333	Slpi	-0.205	-1.694	0.578	-0.616	-0.224	-0.228	-0.633	0.759	1.186	
Ldlr	1.200	1.572	0.645	-0.279	-0.590	-0.044	-1.109	-1.328	-0.236	Tox2	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	2.667	-0.333	AJU04972	-1.132	-0.540	0.033	0.039	0.127	-1.415	1.715	-0.027	2.015	
Igha	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	2.667	-0.333	-0.333	-0.333	Gp2b	-0.456	-0.456	-0.456	-0.456	-0.456	-0.456	-0.456	0.741	2.449	Nra1	-0.891	-1.305	-0.430	-0.680	0.119	0.039	0.726	0.379	2.042	
Ighv1-86	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	-0.333	2.667	-0.333	-0.333	-0.333	Bmp10	-0.440	-0.440	-0.440	-0.440	-0.440	-0.440	-0.440	2.613	0.094	1.025	-0.600	-0.220	-0.570	-0.125						

### 1.3.4 早老症モデルマウス( $Atm^{\Delta/\Delta}$ マウス)において p38 $\alpha$ は HSC をエイジング形質から保護する

次に私たちは p38 $\alpha$  欠損が早老症のような病態下で HSC にどのような影響を与えるか調べることにした。ヒトにおいて、早老症の一種である毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia-telangiectasia; AT)の原因遺伝子として Ataxia-telangiectasia mutated ( $Atm$ )という遺伝子が知られており、 $Atm$  欠損マウスは生存率の低下、一部の臓器における p16<sup>Ink4a</sup>や p19<sup>Arf</sup>の発現増加など、早老症に似た表現型を示すことが報告されている(44)。 $Atm$ は DNA 損傷修復を担うセリン/スレオニンキナーゼであり、 $Atm$  欠損は DNA 損傷が蓄積して細胞老化を引き起こす(12, 82)。 $Atm$ を TAM 誘導性に欠損させることができるマウス CAG-CreERT2:: $Atm^{flox/flox}$  ( $Atm^{f/f}$ )マウスに TAM を投与後、単離した HSC の免疫細胞染色によって H2A histone family member X (H2AX)のリン酸化および tumor suppressor p53-binding protein 1 (53BP1)の集積レベルを解析したところ、 $Atm^{\Delta/\Delta}$  HSC では phosphorylated H2AX ( $\gamma$ H2AX)および 53BP1 の発現量が有意に増加したことから、HSC でも DNA 損傷の蓄積が確認された (図 1.3.4 A-C)。

ここで、 $Atm$  欠損マウスにおける p38MAPK の機能を評価するため、CAG-CreERT2:: $Atm^{+/+}$  p38 $\alpha^{+/+}$ マウス、CAG-CreERT2:: $Atm^{flox/flox}$  ( $Atm^{f/f}$ )マウス、CAG-CreERT2:: $Atm^{flox/flox}$  p38 $\alpha^{flox/flox}$  ( $Atm^{f/f}$  p38 $\alpha^{f/f}$ )マウスを用意し、6~20 週齢の各マウスへ TAM を投与し、10~25 週齢で造血を解析した(以下  $Atm^{+/+}$  p38 $\alpha^{+/+}$ マウス、 $Atm^{\Delta/\Delta}$ マウス、 $Atm^{\Delta/\Delta}$  p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ マウスと呼ぶ) (図 1.3.4 D)。まず、定常状態の造血を解析したところ、末梢血および骨髄の細胞数に変化はなかった(図 1.3.4 E および補助図 1.3.4 A)が、 $Atm^{\Delta/\Delta}$ および  $Atm^{\Delta/\Delta}$  p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ マウスの両方で、コントロールマウスと比較して HSC の割合が有意に減少した (図 1.3.4 F および補助図 1.3.4 B)。また、コントロールと比較して MPP や ST-HSC などの造血前駆細胞画分の割合は  $Atm^{\Delta/\Delta}$ マウスでは変化がない一方、 $Atm^{\Delta/\Delta}$  p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ マウスでは有意に減少した (図 1.3.4 F および補助図 1.3.4 B)。次にこれらのマウスの HSC の骨髄再構築能を評価するため骨髄移植実験を行った。その結果、一次移植後の末梢血の分化状態は全ての群で有意差を認めなかったが、末梢血キメリズムは  $Atm^{\Delta/\Delta}$ および  $Atm^{\Delta/\Delta}$  p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$  HSC を移植した群の両方でコントロールより有意に低下し、これは一次移植、二次移植、三次移植後ともすべて同様だった (図 1.3.4 G-I および補助図 1.3.4 C)。骨髄キメリズムも末梢血と同様の傾向を示し、一次移植後には有意差はつかなかったが、二次移植後は  $Atm^{\Delta/\Delta}$ および  $Atm^{\Delta/\Delta}$  p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$  HSC を移植した群のキメリズムは有意に低下した (図 1.3.4 J-K)。さらに、 $Atm^{\Delta/\Delta}$  p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$  HSC を移植した群は、 $Atm^{\Delta/\Delta}$  HSC を移植した群よりも末梢血および骨髄キメリズムがさらに低下することが確認された (図 1.3.4 G-K および補助図 1.3.4 D)。

これらの結果より、 $Atm$  欠損は HSC の数と機能を低下させること、さらに p38 $\alpha$  は  $Atm$  欠損下において HSC の機能に保護的に作用しており、 $Atm^{\Delta/\Delta}$  p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$  HSC では  $Atm^{\Delta/\Delta}$  HSC よりも HSC の機能がより低下することが明らかとなった。

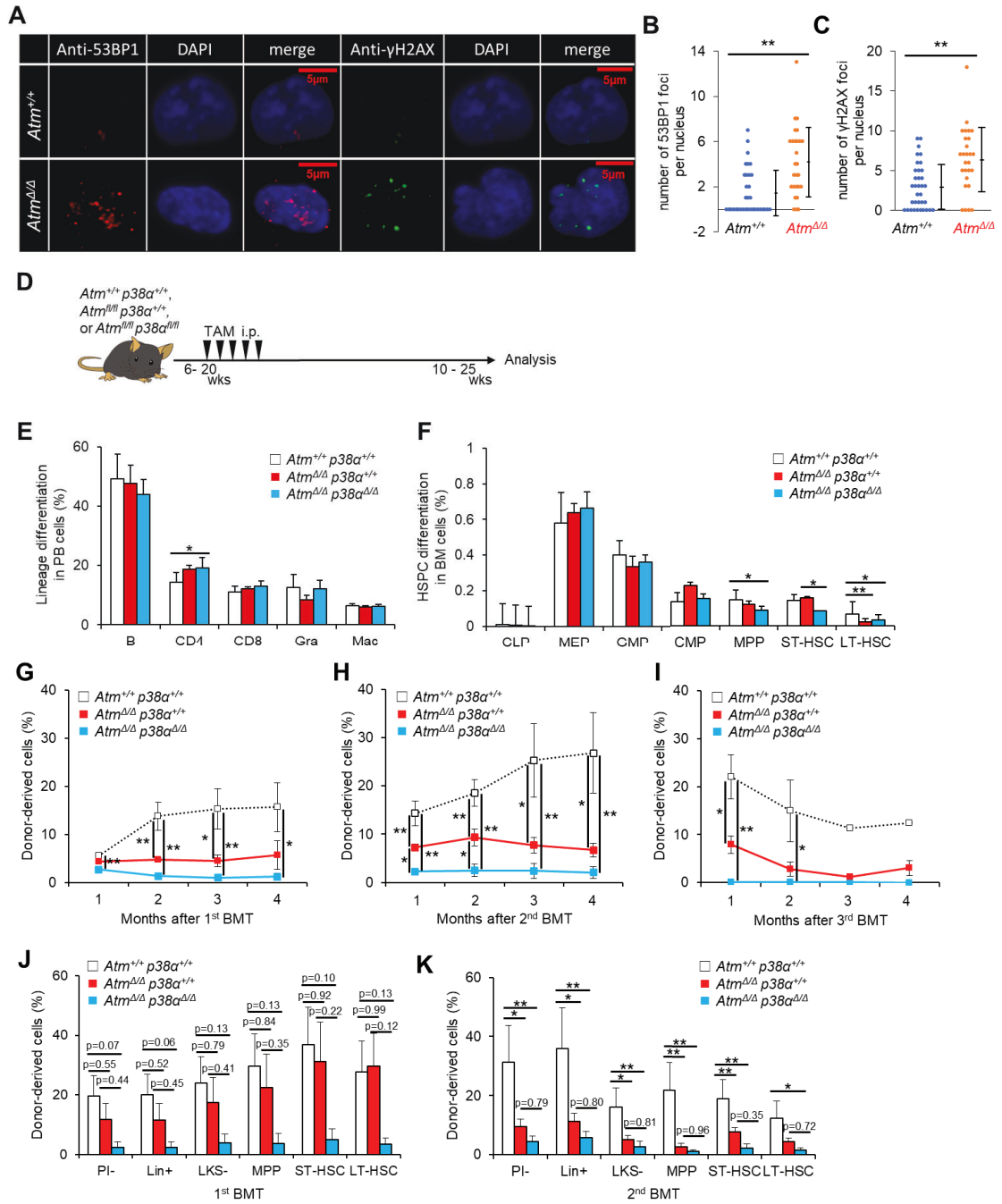


図 1.3.4. Atm と p38α の両欠損は HSC の細胞数の減少と骨髄生着率の低下を引き起こす

(A-C) 移植後 1 週間後の Atm<sup>+/+</sup> p38α<sup>+/+</sup> または Atm<sup>ΔΔ</sup> HSC における 53BP1 および γH2AX の免疫細胞染色。53BP1 (赤), γH2AX (緑), DAPI (青) で染色した代表的な免疫染色画像(A)および 53BP1 (B), γH2AX(C) の foci の数を定量したグラフ (means ± SD, n = 27-35)。

(D) Atm 欠損下における p38α 機能解析のための実験デザイン。

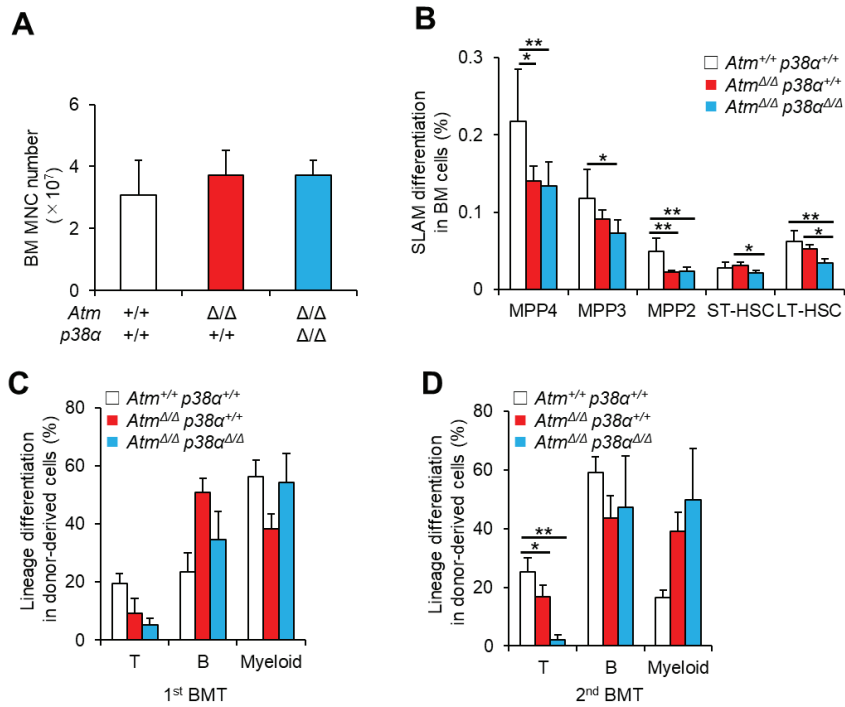
(E-F) Atm<sup>+/+</sup> p38α<sup>+/+</sup>, Atm<sup>ΔΔ</sup>, Atm<sup>ΔΔ</sup>p38α<sup>ΔΔ</sup> マウスの末梢血(PB)中の分化血球細胞(E)および骨髄(BM)中の造血幹前駆細胞(F)の割合(B, B220<sup>+</sup> B cells; CD4, CD4<sup>+</sup> T cells; CD8, CD8<sup>+</sup> T cells; Gra, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>hi</sup> Granulocytes; Mac, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>lo</sup> Macrophages; CLP, common lymphoid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>Sca-1/c-Kit<sup>lo</sup>); MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); GMPs, granulocyte-monocyte progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); CMPs, common myeloid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7Rα<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs) (means ± SD, n = 5)。

(G-I) Atm<sup>+/+</sup> p38α<sup>+/+</sup>, Atm<sup>ΔΔ</sup>, Atm<sup>ΔΔ</sup>p38α<sup>ΔΔ</sup> マウスから採取した HSC の一次(G), 二次(H), 三次(I)移植後の PB キメリズム (means ± SD, n = 6)。

(J-K) Atm<sup>+/+</sup> p38α<sup>+/+</sup>, Atm<sup>ΔΔ</sup>, Atm<sup>ΔΔ</sup>p38α<sup>ΔΔ</sup> マウスから採取した HSC の一次(J)および二次(K)移植後 4 ヶ月目の骨髄キメリズム (PI, propidium iodide negative live cells; Lin<sup>+</sup>, lineage marker positive cells; LKS<sup>-</sup>, Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> cells; MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs) (means ± SD, n = 5-6)。

データは全て 1 回の実験から得られた結果である。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01。

(Sorimachi et al., *J Biol Chem.* 2021 の図から引用。)



補助図 1.3.4.

(A)  $Atm^{+/+} p38\alpha^{+/+}$ ,  $Atm^{\Delta/\Delta}$ ,  $Atm^{\Delta/\Delta} p38\alpha^{\Delta/\Delta}$  マウス骨髄(BM)における骨髄単核球数 (means  $\pm$  SD, n = 5)。

(B)  $Atm^{+/+} p38\alpha^{+/+}$ ,  $Atm^{\Delta/\Delta}$ ,  $Atm^{\Delta/\Delta} p38\alpha^{\Delta/\Delta}$  マウス骨髄(BM)中の造血幹前駆細胞の割合 (means  $\pm$  SD, n = 5) (LT-HSCs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>; ST-HSCs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>; MPP2 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>; MPP3 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>; MPP4 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>)。

(C-D)  $Atm^{+/+} p38\alpha^{+/+}$ ,  $Atm^{\Delta/\Delta}$ ,  $Atm^{\Delta/\Delta} p38\alpha^{\Delta/\Delta}$  マウスから採取した HSC の一次(C)および二次(D)移植後 4 ヶ月目の末梢血中の分化細胞(CD4/8+ T 細胞、B220+ B 細胞、および Gr-1/Mac-1+ Myeloid 細胞)のキメリズム (means  $\pm$  SD, n = 7-8)。

データは全て 1 回の実験から得られた結果である。\*p < 0.05, \*\*p < 0.01。

(Sorimachi et al., *J Biol Chem.* 2021 の図から引用。)

### 1.3.5 誘導性 Atm 欠損は造血幹細胞移植後に p38MAPK の活性化を誘導する

既報より, Atm<sup>ΔΔ</sup>HSC において p38MAPK の活性化が活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)の産生を増加させ, p16<sup>Ink4a</sup> と p19<sup>Arf</sup> の発現を上昇することで HSC の機能を低下させることが *in vitro* 系を用いて証明されている (67)。そこで, Atm<sup>+/+</sup> p38α<sup>+/+</sup> マウス, Atm<sup>ΔΔ</sup>マウスおよび Atm<sup>ΔΔ</sup>p38α<sup>ΔΔ</sup>マウスそれぞれから採取した HSC で ROS 産生および p16<sup>Ink4a</sup> と p19<sup>Arf</sup> の発現上昇が起こるかどうか調べた(67)。FACS と qPCR 解析により, Atm<sup>ΔΔ</sup>および Atm<sup>ΔΔ</sup>p38α<sup>ΔΔ</sup> HSC はコントロールと比較して ROS 産生量や p16<sup>Ink4a</sup>/p19<sup>Arf</sup> の発現レベルに変化はないことが示された(図 1.3.5 A-B および補助図 1.3.5 A-B)。また, ROS- p16<sup>Ink4a</sup>/p19<sup>Arf</sup> 経路の活性化は HSC の細胞周期を活性化することで, HSC の最も重要な性質の一つである静止期性の喪失につながるということが報告されている(76)。そこで細胞内 Ki67 染色を用いて細胞周期の状態を解析したところ, Atm<sup>ΔΔ</sup> HSC ではコントロールと比較して静止期(G0)の割合は変わらず, Atm<sup>ΔΔ</sup>p38α<sup>ΔΔ</sup> HSC では有意に低下していた (図 1.3.5 C-D)。これらの結果は Atm 欠損下で ROS- p16<sup>Ink4a</sup>/p19<sup>Arf</sup> 経路の活性化は起こらないことを示唆している。

次に, Atm 欠損下で p38MAPK の活性化が誘導されるかどうかを調べるため, Atm<sup>+/+</sup>および Atm<sup>ΔΔ</sup> HSC における p38MAPK のリン酸化レベルを FACS を用いて測定した。その結果, 定常状態では両者の p38MAPK リン酸化レベルに差はなかった (図 1.3.5 E)。既報より p38MAPK は移植などの造血ストレス負荷直後に一時的に活性化し, 短期間で正常レベルまで戻ることが報告されている(72)ため, 骨髄移植後 3 日目および 7 日目においても同様に p38MAPK リン酸化レベルを調べた。その結果, 移植後 3 日目において, Atm<sup>ΔΔ</sup> HSC の p38MAPK リン酸化レベルが有意に上昇し, これは移植後 7 日目には正常レベルまで戻ることが分かった(図 1.3.5 F および補助図 1.3.5 C-D)。

以上の結果より, Atm 欠損下において, 定常状態では p38MAPK やその下流の ROS- p16<sup>Ink4a</sup>/p19<sup>Arf</sup> 経路の活性化は起こらないが, 移植直後一時的に p38MAPK が活性化されることが示された。



### 1.3.6 Atm<sup>Δ/Δ</sup>マウスにおいて p38α 欠損は幹細胞機能を低下させる

最後に, Atm 欠損下での p38α の機能を調べるため, 11 週齢のコントロールマウス (Atm<sup>+/+</sup>マウス), Atm<sup>Δ/Δ</sup>マウスおよび Atm<sup>Δ/Δ</sup>p38α<sup>Δ/Δ</sup>マウスから採取した HSC の RNA-seq を行い, 各遺伝子型のマウスで発現が上昇または低下している遺伝子をそれぞれ同定した(図 1.3.5 G)。Atm<sup>Δ/Δ</sup>マウス HSC で, 生理学的に老化した HSC(2 年齢 HSC)で見られたような炎症応答関連遺伝子群の発現上昇は認められなかった(図 1.3.3 D-F and data not shown)。むしろ, p38α 欠損は WT, Atm<sup>Δ/Δ</sup>HSC の両方で TNFα signaling などの炎症応答関連遺伝子の発現を低下させた(図 1.3.5 H-I)。しかしながら, WT や Atm<sup>Δ/Δ</sup>HSC と比較して Atm<sup>Δ/Δ</sup>p38α<sup>Δ/Δ</sup> HSC では, 造血幹細胞特異的遺伝子群(HSC marker)の発現低下と分化血球細胞に特徴的な遺伝子群(Lineage marker)の発現上昇が認められ, p38α 欠損によって HSC の幹細胞性が低下することが分かった(図 1.3.5 J および K)。炎症応答が改善されるにも関わらず p38α 欠損によって移植生着率の低下や幹細胞マーカーの発現が低下する機序を調べたところ, WT や Atm<sup>Δ/Δ</sup>HSC において p38α の欠損は PI3K/Akt/mTOR 経路関連遺伝子群の発現を上昇させることが分かった(図 1.3.5 L)。PI3K/Akt/mTOR 経路は移植後に一過性に活性化することで HSC の増殖を促す一方で, 恒常的に活性化すると HSC は静止期を維持できなくなり, 最終的には枯渇することが報告されている(83-85)。以上の結果から, Atm 欠損下においては, p38α は生理学的老化とは異なる経路を標的に HSC の幹細胞機能の維持に関与することが示唆された。

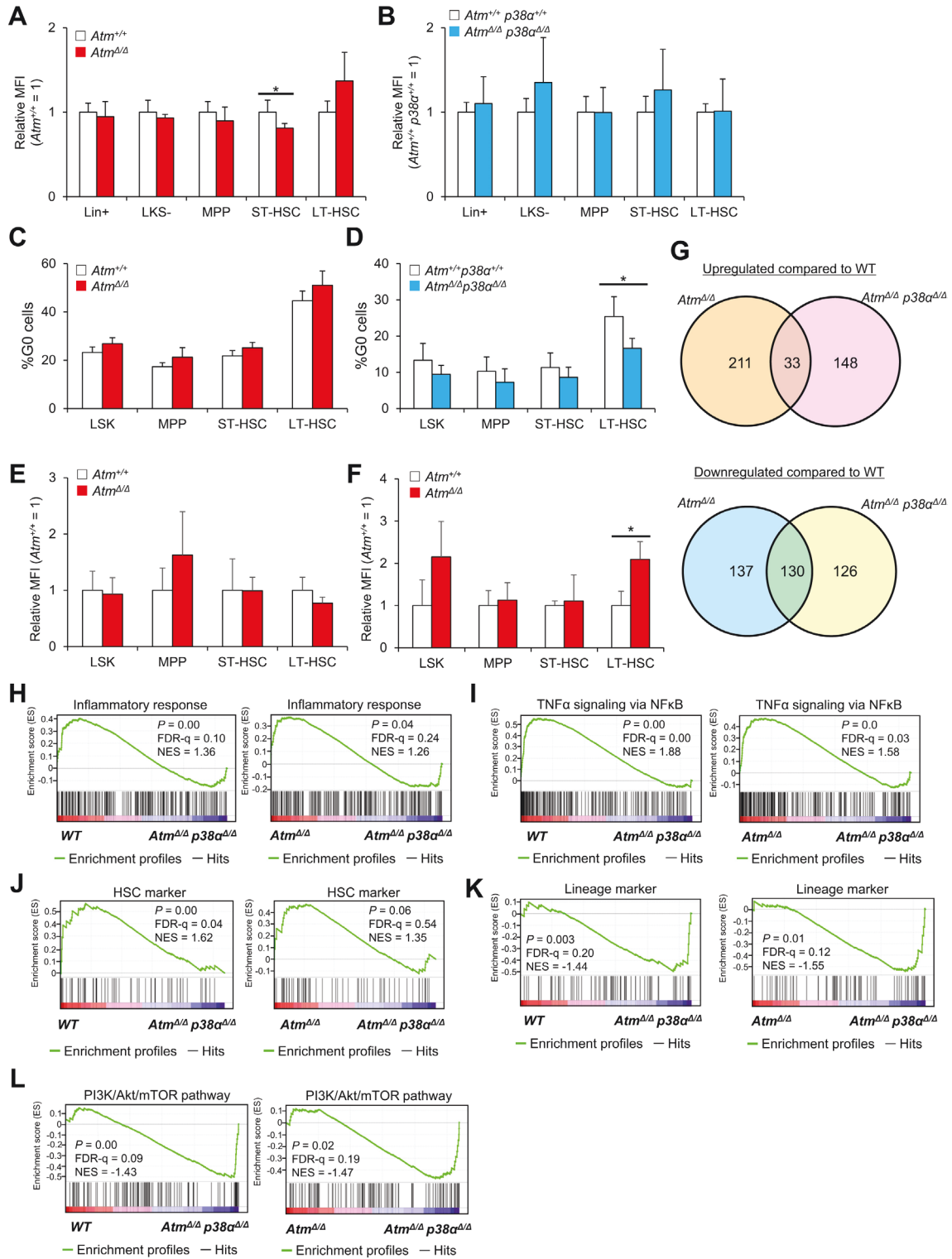


図 1.3.5. Atm 欠損は HSC の ROS 産生量や細胞周期の状態を変化させない

(A-B)  $Atm^{+/+}$  または  $Atm^{\Delta\Delta}$  マウス(A)および  $Atm^{+/+}p38\alpha^{+/+}$  または  $Atm^{\Delta\Delta}p38\alpha^{\Delta\Delta}$  マウス(B)の造血幹前駆細胞における MitoTracker Orange CMH2TMROS の蛍光量 (Lin<sup>+</sup>, lineage marker positive cells; LKS<sup>-</sup>, Lin<sup>c</sup>-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> cells; MPPs, Multipotent progenitors, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs; ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs) (mean±SD, n = 4)。

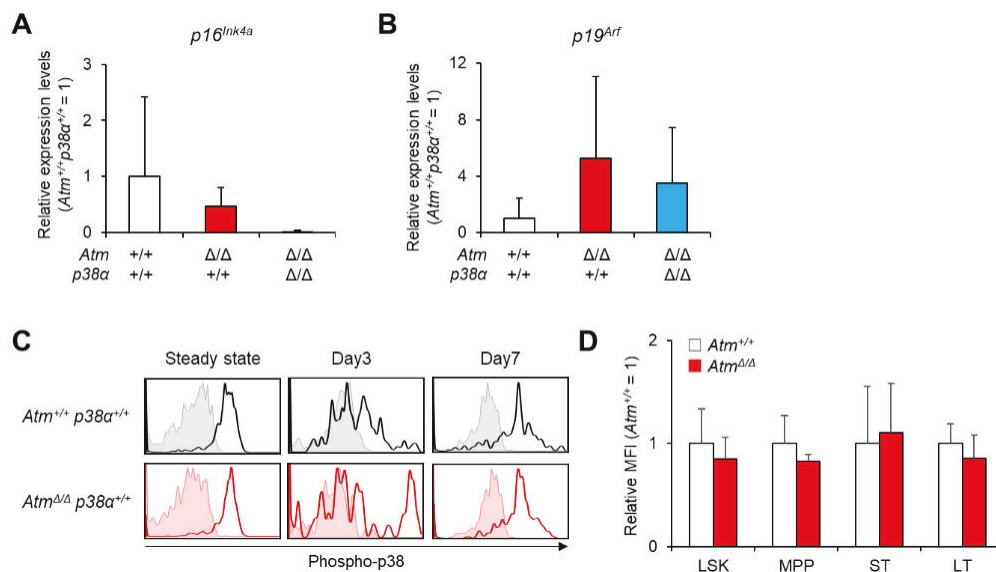
(C-D)  $Atm^{+/+}$  または  $Atm^{\Delta\Delta}$  マウス(C)および  $Atm^{+/+}p38\alpha^{+/+}$  または  $Atm^{\Delta\Delta}p38\alpha^{\Delta\Delta}$  マウス(D)の造血幹前駆細胞における Ki67 を用いた細胞周期解析 (Lin<sup>+</sup>, lineage marker positive cells; LKS<sup>-</sup>, Lin<sup>c</sup>-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> cells; MPPs, Multipotent progenitors, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs; ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs)。静止期(G0期)の割合を示す (mean±SD, n = 4)。

(E-F)  $Atm^{+/+}$  または  $Atm^{\Delta\Delta}$  マウスの定常状態(E)および放射線(4Gy)照射後 3 日目(F)の造血幹前駆細胞における p38MAPK リン酸化レベルの解析 (Lin<sup>+</sup>, lineage marker positive cells; LKS<sup>-</sup>, Lin<sup>c</sup>-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> cells; MPPs, Multipotent progenitors, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs; ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs)。Mean fluorescence intensity (MFI)は FACS で解析した (mean±SD, n = 4)。

(G) コントロールと比較して  $Atm^{\Delta\Delta}$  HSC または  $Atm^{\Delta\Delta}p38\alpha^{\Delta\Delta}$  HSC で発現が上昇または減少する遺伝子のまとめ。ベン図には発現量が 8 倍以上変動した遺伝子の数を示す。

(H-L) WT ( $Atm^{+/+}$ ),  $Atm^{\Delta\Delta}$  または  $Atm^{\Delta\Delta}p38\alpha^{\Delta\Delta}$  HSC の inflammatory response (H), TNF $\alpha$  signaling via NF $\kappa$ B (I), HSC marker (J), Lineage marker (K), PI3K/Akt/mTOR pathway (L)に関連する遺伝群の GSEA plot。データは全て 1 回の実験から得られた結果である。\*p < 0.05。

(Sorimachi et al., *J Biol Chem.* 2021 の図から引用。)



#### 補助図 1.3.5.

(A-B) *Atm*<sup>+/+</sup>*p38α*<sup>+/+</sup>, *Atm*<sup>Δ/Δ</sup>または *Atm*<sup>Δ/Δ</sup>*p38α*<sup>Δ/Δ</sup> HSC (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSK)における *p16<sup>Ink4a</sup>* (A)および *p19<sup>Arf</sup>* (B)の発現量 (mean±SD, n = 4)。

(C) 定常状態, および放射線(4Gy)照射後3日と7日目の *Atm*<sup>+/+</sup>*p38α*<sup>+/+</sup>, *Atm*<sup>Δ/Δ</sup>または *Atm*<sup>Δ/Δ</sup>*p38α*<sup>Δ/Δ</sup> マウスの造血幹前駆細胞における p38MAPK リン酸化レベルの解析。放射線照射後3日目と7日目の代表的なヒストグラム(C)および放射線照射後7日目の MFI を定量化したグラフ(D)を示す(LSK, Lin<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> cells; MPPs, Multipotent progenitors, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs; ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs)。Mean fluorescence intensity (MFI)はFACSで解析した (mean±SD, n = 4)。

データは全て1回の実験から得られた結果である。

(Sorimachi et al., *J Biol Chem.* 2021 の図から引用。)

## 1.4 考察

加齢による様々な変化は、部分的には組織幹細胞の老化によって媒介される多面的なプロセスである。造血系において、HSCの老化は細胞数の増加、移植生着率の低下、分化の偏り、クローン性増殖などの表現型に特徴付けられる(23, 37, 86-88)。HSCエイジングに伴うこれらの変化の分子基盤は近年多数報告されている。細胞自律的なメカニズムとしてDNA損傷の蓄積、テロメアの短縮、ミトコンドリアの機能障害、オートファジーの障害、エピジェネティックな制御機構の破綻、細胞極性の喪失などが造血幹細胞の老化に関与すると言われている(86, 88, 89)。また、HSCエイジングを誘導する細胞非自律的なメカニズムとしてニッチ由来の因子の存在も報告されている(57-59)。これらの変化を抑制することで部分的にHSC機能は回復するが、老化したHSCがどのようにエイジング形質を獲得するのか、また、これらの性質が徐々に獲得されるのか、それとも多段階の過程を経て獲得されるのかは分かっていない。

これまでp38MAPK阻害剤でHSCやマウスを処理することでHSCの加齢に関連する表現型が改善することから、生体内においてHSCエイジングを誘導するシグナル候補としてp38MAPKが同定されていた(90)。これらの既報はp38MAPKがHSCの機能を低下させ、HSCエイジングを促進する分子であることを示唆している(44, 67)が、実際に生体内におけるp38MAPKの役割を遺伝学的に検討した仕事はこれまでに存在していなかった。

ここでは生理的に加齢させたマウスモデルを用いて加齢の早期または後期のいずれかの時点でp38 $\alpha$ を欠損させ、各過程におけるp38MAPKのHSCエイジングへの寄与を検討した。さらにTAM誘導性にAtmをコンディショナルノックアウトした早老症モデルマウスを用い、病的な加齢モデルにおいてp38MAPKがどのように作用するかについても調べた。(1)生理的な加齢に伴って起こるHSCエイジングの進行初期過程、(2)HSCエイジングの進行後期過程、さらに(3)早老少モデルにおけるHSCエイジング、の3つの異なる状況において、p38MAPKのHSCエイジング制御機構を明らかにした。

### 1.4.1 HSCエイジング進行初期過程におけるp38MAPKの役割

まずHSCエイジング進行初期過程におけるp38MAPKの機能を解析するため、6週齢前後のCAG-CreERT2:p38 $\alpha^{\text{lox/lox}}$ (p38 $\alpha^{\text{fl/fl}}$ )マウスへTAMを投与し、1年齢まで加齢させたp38 $\alpha^{+/+}$ マウスとp38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ マウスの解析を行った。1年齢のp38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ マウスはコントロールと比べて定常状態における骨髄の造血幹細胞/前駆細胞(Hematopoietic stem/progenitor cell; HSPC)の割合に変化は見られなかったが、末梢血中の分化血球細胞の割合が変化し、B細胞の割合が減少して骨髄球系細胞の割合が増加した(図 1.3.1 B-C)。HSCエイジングの促進が示唆されたため、次にp38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ HSCの機能を直接評価するため骨髄移植実験を行った(定常状態の造血解析ではニッチ細胞や前駆細胞の影響を含めた結果を見ているため、p38 $\alpha^{\Delta/\Delta}$ HSCを野生型マウスへ移植することでこれらの影響を除外することが出来る)。

その結果, 1 年齢の  $p38\alpha^{d/d}$  HSC を移植した群では移植生着率が低下し, 分化傾向にも偏りが生じていた(図 1.3.1 D-J)。1 次移植後の末梢血キメリズムでは有意差がつかず, 2 次移植後以降に有意差が見られた原因としては, 1 次移植後の造血再構築は短期造血幹細胞が補うが, 2 次移植後はより長期の造血幹細胞が造血を担っており, HSC サブセットの中でもより長期間生存する HSC サブセットのアウトプットを評価している可能性が考えられる (HSC の中にも移植後の潜伏期が長く幹細胞プールの維持に寄与する分画と比較的迅速に分化・増殖して造血系の再構築に寄与する分画の両方存在することがヒトとマウスで報告されている(91, 92))。

以上の結果より,  $p38\alpha$  が HSC のエイジング形質の獲得に一部寄与しており, HSC エイジングの進行初期過程において  $p38\alpha$  は HSC の機能を維持する分子であることが示された。ただし,  $p38\alpha$  欠損による移植生着率の低下は HSC エイジングのフェノタイプと一致するが, 移植後の分化バイアスについては必ずしも一致しない(HSC エイジングでは移植後の骨髄球系への分化が亢進するのに対して,  $p38\alpha$  欠損 HSC では B 細胞の割合が増加し骨髄球系細胞の割合が低下していた)ことから,  $p38\alpha$  以外の HSC エイジングの制御分子が関与する可能性が考えられる。

以前私たちのグループでは, 移植や抗がん剤投与などのストレスが負荷後の HSC において,  $p38\alpha$  がプリン代謝を活性化し, 細胞増殖を促進することを報告した(72)。今回の 1 年齢の  $p38\alpha^{d/d}$  HSC の骨髄再構築能の低下は, 以前報告したような,  $p38\alpha$  による増殖制御が関与しているかもしれない。この点について検討するためには移植後の  $p38\alpha^{d/d}$  HSC の代謝フラックス解析や遺伝子発現解析等の更なる検討が必要である。

#### 1.4.2 HSC エイジング進行後期過程における $p38\text{MAPK}$ の役割

HSC エイジング進行後期過程における  $p38\text{MAPK}$  の機能を解析するため, 1 年齢の CAG-CreERT2:  $p38\alpha^{\text{lox/lox}}$ ( $p38\alpha^{\text{fl/fl}}$ )マウスへ TAM を投与し, 2 年齢まで加齢させた  $p38\alpha^{+/+}$  マウスと  $p38\alpha^{d/d}$  マウスを用いて解析を行った。1 年齢の  $p38\alpha^{d/d}$  マウスの解析結果とは対照的に, 2 年齢の  $p38\alpha^{d/d}$  マウスではコントロールと比べて定常状態において造血系のフェノタイプに変化は認められなかった(図 1.3.2 B-C および補助図 1.3.2 C-I)。一方, 移植後の生着率は  $p38\alpha^{d/d}$  HSC を移植した群で上昇した(図 1.3.2 D-I および補助図 1.3.2 J-K)。すなわち,  $p38\alpha$  は HSC エイジング進行初期過程と後期過程で全く反対の機能を持つことが示唆される。

$p38\alpha$  が加齢の各ステージにおいて, どのような機序で HSC エイジングを制御するのかを明らかにするため, まず若齢(10 週齢), 1 年齢, 2 年齢 HSC のトランスクリプトーム解析を行い, 加齢の各段階における遺伝子発現変化を調べた。すると, 加齢後期(1 年齢から 2 年齢)において,  $p38\alpha/\beta$  下流経路の発現上昇と IFN や TNF $\alpha$  response を含む炎症関連遺伝子の発現上昇が認められた(図 1.3.3 B, D-F および補助図 1.3.3 D-E)。加齢早期(若齢から 1 年齢)ではこれらの遺伝子発現に変化は見られなかった(図 1.3.3 D-F および補助図 1.3.3

D-E)。既報より、p38 $\alpha$ がストレス負荷後にNF $\kappa$ Bを介したIL-1/IL-6やTNF $\alpha$ などの炎症性サイトカインの産生を増強させること、TNF $\alpha$ やIL-1などの炎症性サイトカインがHSC機能を低下させることが報告されているため、HSCにおいてもp38 $\alpha$ が炎症応答の活性化を介してHSCエイジングを促進する可能性が考えられた(59, 93)。実際、2年齢のp38 $\alpha^{A/A}$ HSCではTNF $\alpha$  signaling via NF $\kappa$ BやTNF $\alpha$  signaling via p38など、炎症応答関連の遺伝子発現が有意に低下した(図 1.3.3 G-H および補助図 1.3.3 G-H)。さらに、2年齢のp38 $\alpha^{A/A}$ HSCは若齢HSCと似た遺伝子発現パターンをとるようになり、それに伴い骨髄移植後の生着率も上昇していた(図 1.3.2 G-I および図 1.3.3 I)。

これらの結果から、p38 $\alpha$ が加齢の各時期に、HSCエイジングにおいて異なる役割を持つこと、すなわち、加齢早期ではp38 $\alpha$ はHSCの移植後の生着や分化血球細胞の産生に重要であり、老化抑制的に作用するのに対して、加齢後期ではHSCの炎症応答を促進することで老化促進的に作用することが分かった(図 1.3.6)。p38 $\alpha$ が時期によって下流シグナルを変化させるメカニズムについては今後の課題であるが、上流の刺激の違いによって、p38 $\alpha$ がプリン代謝や炎症応答を促進する際に標的とするタンパク質の発現量が異なる可能性や、p38 $\alpha$ が活性化される場所(細胞膜表面やエンドソーム膜など)によってリクルートされてくる分子が異なる可能性が考えられる。p38 $\alpha$ の有無による、HSCのp38 $\alpha$ 標的タンパク質の発現量やリン酸化レベルの違いを調べる必要がある。

以上の知見は、*in vitro*の阻害剤を用いた実験系を用いた先行研究より信じられてきた、「p38MAPKはHSCエイジングを誘導する必須シグナルである」という既存のドグマの反例を与えるもので、HSCエイジングがp38MAPKの働きで区別される複数のステップで構成されることを示すものである。

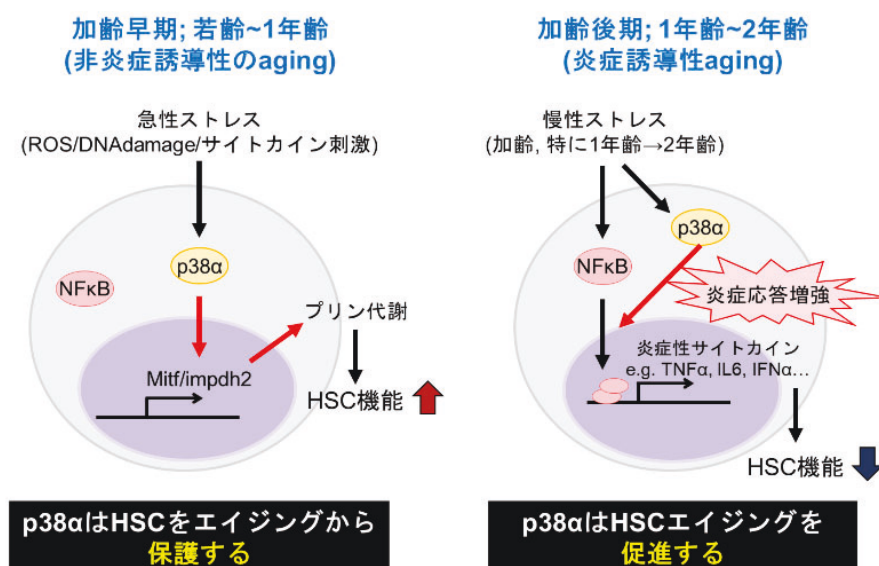


図 1.3.6. p38 $\alpha$ を介した加齢早期および後期過程におけるHSCエイジングの制御機構

### 1.4.3 早老症モデルにおける p38MAPK の役割

ヒト早老症の一つである毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia-telangiectasia; AT)の原因遺伝子である *Atm* の欠損は HSC の細胞数の減少や骨髄再構築能の低下など、幹細胞機能の低下を誘導する。先行研究より, *Atm*<sup>ΔΔ</sup> HSC において, ROS-p38MAPK-p16<sup>Ink4</sup>/p19<sup>Arf</sup> 経路が活性化して HSC の幹細胞機能を損なうことが示されていた(12, 44)。本研究では CAG-CreERT2::*Atm*<sup>+/+</sup>p38α<sup>+/+</sup>マウス, CAG-CreERT2::*Atm*<sup>flox/flox</sup> (*Atm*<sup>f/f</sup>)マウス, CAG-CreERT2::*Atm*<sup>flox/flox</sup>p38α<sup>flox/flox</sup> (*Atm*<sup>f/f</sup>p38α<sup>f/f</sup>)マウスを用いて, *Atm*<sup>ΔΔ</sup> HSC における p38α の機能を遺伝学的に検討した。既報通り, *Atm*<sup>ΔΔ</sup> マウスでは骨髄 HSC の割合の減少や移植生着率の低下が認められたが, これは p38α 欠損によって回復しなかった(図 1.3.4 G-K および補助図 1.3.4)。むしろ移植後の骨髄再構築能や分化能の偏りは, p38α の欠損により増悪傾向にあった(図 1.3.4 および補助図 1.3.4 B-D)。また, *Atm* の誘導性欠損の下流では ROS-p38MAPK-p16<sup>Ink4</sup>/p19<sup>Arf</sup> 経路の活性化は認められなかったことから, 本研究で用いたモデルにおいて, 既報の経路の活性化は見られないことが明らかとなった(図 1.3.5 A-D)。既報と異なる結果となった要因として, 本研究では TAM 誘導性のコンディショナルノックアウトマウスを用いているが, 先行研究では生殖細胞系列の *Atm* ノックアウトマウスを使用していること, p38α の機能解析にはノックアウトマウスではなく阻害剤を使用した *in vitro* の系を用いていたため, 実験系が異なっていたためだと考えられる (12, 44)。今回 *Atm*<sup>ΔΔ</sup> マウスの HSC は, 生理学的に老化させた(2 年齢)マウスの HSC とは対照的に, 炎症関連遺伝子の発現増強は認めなかった(data not shown)。加えて, p38α 欠損は *Atm*<sup>ΔΔ</sup> HSC の幹細胞機能を改善しなかった。これらの結果は, 早老症モデルとしての *Atm* 欠損と生理学的老化は同じ「老化」という単語で表記されるものの, 全く異なる HSC の応答を生じていることを示唆している。すなわち, これまで老化は DNA 損傷の蓄積によって誘導されると考えられてきたが, HSC エイジングにおいては DNA 損傷の蓄積だけでなく, 他の要因(ニッチの炎症応答の活性化や骨髄酸素分圧の変化など)が関与すると考えられる。生理学的老化(早期・後期)および *Atm* 欠損下において, それぞれ HSC の機能変容を誘導する上流因子については今後明らかにしていく必要がある。

以上の結果から, 本研究では p38α の多面的な機能を明らかにすることができた(図 1.3.7)。特に, 個体の加齢に伴って HSC エイジングは連続的に進行するにも関わらず, 加齢の早期と後期では炎症応答の活性化の度合いや p38α の機能が異なり, HSC エイジングの制御が複数のステージで行われることを初めて実験的に証明した。さらに早期老化モデルである *Atm* 欠損マウスにおいても p38α が異なる経路を標的として HSC の機能を制御する可能性が示唆された。以上のように, 異なるストレス負荷によって惹起される HSC のストレス応答機構を理解し, 制御する手法を明らかにすることで, 造血器疾患を含む様々な病気の病態理解や治療法開発の一助になることが期待される。



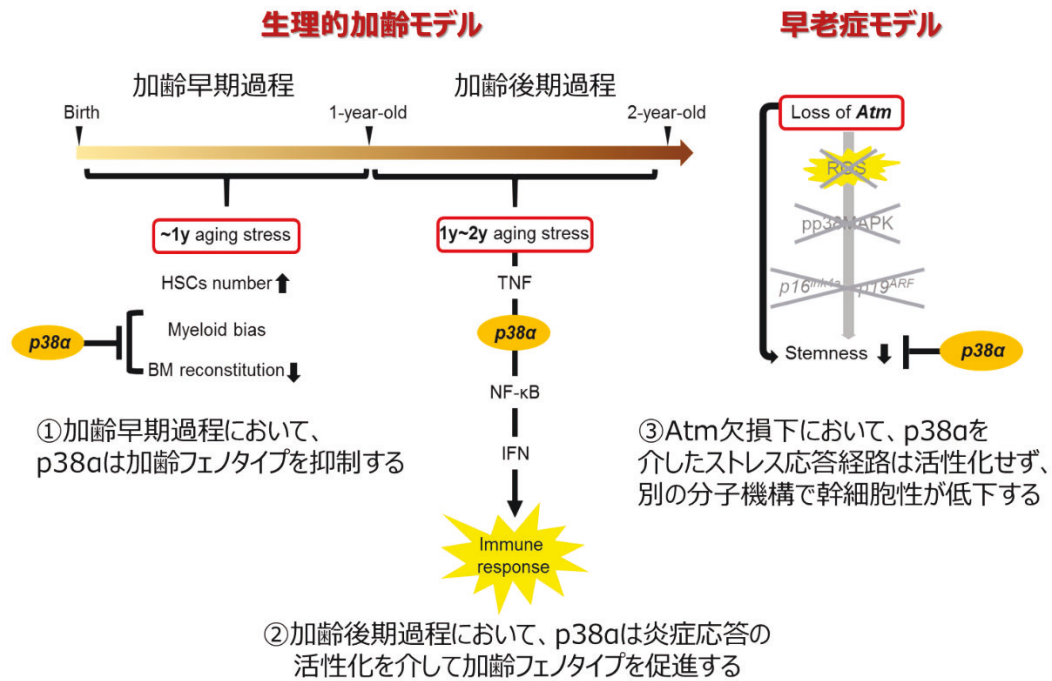


図 1.3.7. 本研究のまとめ

## 1.5 Data availability

本研究で使用した若齢(10週齢), 1年齢, 2年齢マウスのHSCのRNA-sequence dataはNCBIのGene Expression Omnibus (GEO)データベース(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)からダウンロード可能である(GSE151333)。

また, 本研究で取得した  $p38\alpha^{+/+}$  または  $p38\alpha^{\Delta/\Delta}$  HSC の RNA-sequence data および  $Atm^{+/+}p38\alpha^{+/+}$ ,  $Atm^{\Delta/\Delta}$  または  $Atm^{\Delta/\Delta}p38\alpha^{\Delta/\Delta}$  HSC の RNA-sequence data はそれぞれ GEO データベースから Accession number: GSE168057 および GSE168085 から入手できる。

## 第2章 : ストレス応答因子 p53 は間葉系幹細胞(MSC)の幹細胞性維持および癌化抑制に働く

### 2.1 研究背景

#### 2.1.1 骨髄間葉系幹細胞の造血ニッチとしての機能

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; MSC)は全身の組織に存在する中胚葉由来の組織幹細胞であり、自己複製能と多分化能を持ち、組織の発生過程や損傷修復過程において骨、軟骨、脂肪細胞、線維芽細胞などの様々な間質系細胞を供給する(20, 94-96)。MSCは1970年にFriedensteinらによって発見され、骨髄から採取した細胞を低密度で播種した際に、ゲイッシュに接着しコロニーを形成する細胞集団、colony-forming unit-fibroblast(UFC-F)として同定された(97)。その後この集団が骨・軟骨・脂肪の3系統を含む分化細胞への多分化能を有することが報告され、1991年にCaplanによって間葉系幹細胞(MSC)と名付けられた(98)。MSCは高い再生能力を有することから脊髄損傷、変形性関節症、脳血管障害などの様々な疾患の再生医療に用いられるほか、近年ではMSC自身やMSC由来のエクソソームに免疫寛容作用があることも報告されており、移植片対宿主病(graft versus host disease; GVHD)の治療および予防に使用されている(99-102)。

組織幹細胞としてのMSCは①プラスチック接着性で②骨・軟骨・脂肪の3系統への分化能を有し、③細胞表面マーカーとして、血球系マーカーであるCD11b, CD19, CD45, CD34, HLA-DRが陰性で、CD49a(Integrin  $\alpha$ 1), CD105, CD200, Stro-1, CD73, CD90などが陽性(103-106)などの特徴が報告されているが、この方法で単離された細胞集団の中にはMSCの他に前駆細胞や脂肪細胞、マクロファージ、内皮細胞なども混在し非常にheterogeneityに富む細胞集団である。また、組織によって表面マーカーや機能が異なるため(21, 107-109)、各組織に存在するMSCの特異的表面マーカーの特定は今後の課題であると考えられる。

全身のMSCの中で、骨髄MSCは分化細胞を供給するほか、骨髄微小環境(ニッチ)の構成細胞として働く。MSCのニッチ機能としては、C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12), Kit ligand (KITL), Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)といったケモカイン・サイトカインの産生を介したHSCの生存・未分化性の維持が主要であるが(8-14)、他にも細胞外マトリクスや接着因子、細胞外小胞の分泌などを介した直接的・間接的なものを含む相互作用によっても造血系を制御すると考えられている(110-117) (図 2.1.1)。

骨髄MSCは、マウスではPlatelet-derived growth factor (Pdgfr  $\alpha$ ), Leptin receptor (LepR), Nestinなどが陽性で、血球マーカーのCD45, Ter119などが陰性であるが(118-120)、骨髄MSCの中でも血管内皮細胞近傍に存在する集団と骨膜直下に存在する集団では発現するマーカーや性質が異なることや、HSCのニッチ因子を高く発現する集団とそうでない集団が存在することなども報告されており、現在single-cell RNA-seqを用いた骨髄MSCのサブポピュレーションの同定が複数のグループから報告されている(121-125)。これまで、最も造血支持能の高い細胞集団、すなわちニッチ因子であるCXCL12を高発現する細

胞集団である CXCL12-abundant reticular (CAR)細胞が同定され、この集団は Pdgfr $\alpha$ <sup>+</sup>LepR<sup>+</sup>の MSC 集団であることが分かってきた(16, 118, 119)。Pdgfr $\alpha$ <sup>+</sup>LepR<sup>+</sup> MSC 特異的なニッチ因子の欠損は HSC を骨髄内へ保持できず、自己複製能・多分化能も失われることが示されており(13, 15), MSC のニッチとしての重要性が示されている。

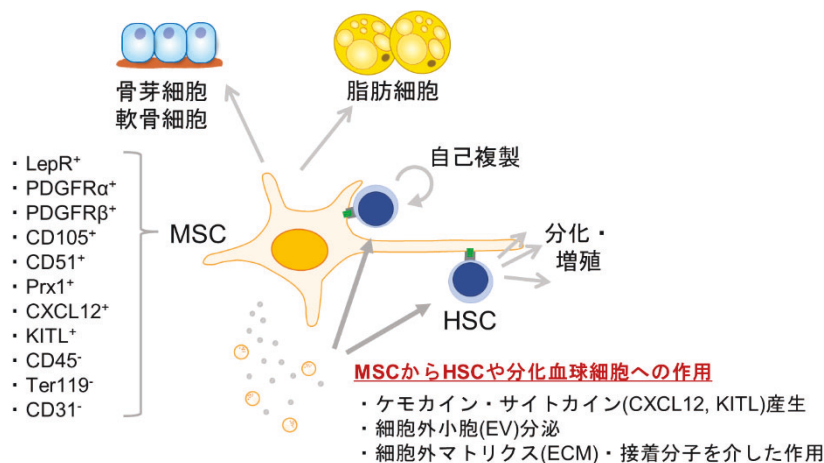


図 2.1.1. 骨髄 MSC の機能

## 2.1.2 MSC エイジングの特徴と既存のメカニズム

MSC も HSC と同様、個体の老化に伴い数や機能に変化をきたす(ここでは MSC エイジングとよぶ)。MSC エイジングは HSC エイジングほど明確に定義された特徴はないが、これまでの報告から細胞数の増加、細胞の肥大化・老化様の形態変化、Senescence-associated secretory phenotype (SASP)による炎症応答の活性化、Senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ -gal)活性の上昇など、一般的な細胞老化と同様のフェノタイプが見られることが *in vitro* の系で示されてきた(126-128)。それに加えて増殖能の低下、骨形成能の低下と脂肪分化能の亢進、ホーミング能力の低下といった幹細胞機能の低下と(128, 129)、骨髄ニッチ機能の低下も報告されている(57, 58) (図 2.2.2)。

MSC エイジングのメカニズムとしては、DNA 損傷の蓄積、テロメア短縮、ROS 産生などによって p16<sup>Ink4a</sup>/Rb 経路や p53/p21 経路が活性化し増殖停止が起こることが *in vitro* の系で示されており(130-135)、抗酸化作用を持つ酵素(Super Oxide Dismutase(SOD), catalase)などの処理により ROS を消去することで骨分化能が復活する(136)。しかし、生体内で起こる MSC エイジングの実態や制御機構はほとんどわかっていない。

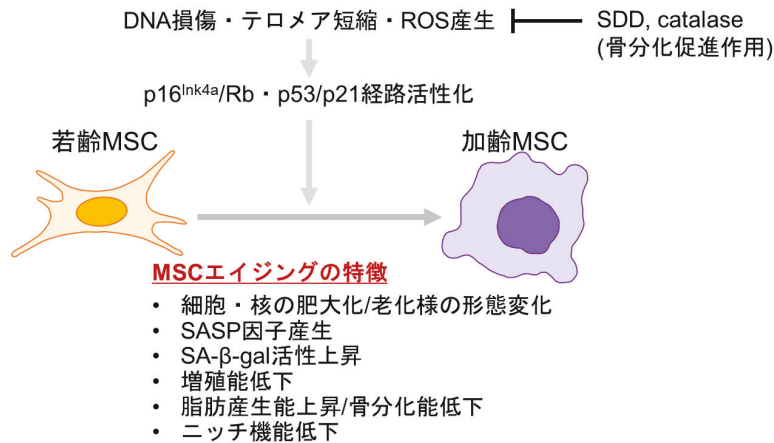


図 2.1.2. MSC エイジングに伴う機能変化

### 2.1.3 腫瘍の起源細胞としての間葉系幹細胞

MSCは分化細胞の供給源や造血ニッチとしての機能とは別に、腫瘍の起源細胞であるとも考えられている。間葉系細胞由来の悪性腫瘍である軟部肉腫(Soft tissue sarcoma; STS)は発生部位も病理組織も多岐にわたり、罹患率1%の典型的な希少がんである(137)。中でも線維肉腫など STS のうちのいくつかのタイプの肉腫は侵襲性が高く、高い抗がん剤耐性を持つため術後の再発率が50%と高く、極めて予後不良である(18, 35, 138)。STSは初発部位と病理組織学的特徴に基づいて分類されるが、病理診断に临床上頻用される腫瘍マーカーが無く定義上除外診断となるため確定診断が難しく、これが肉腫の病態理解および治療法確立を妨げる一因となっている。従って STS の病態を理解し、診断に有用なバイオマーカーや治療法を開発することが強く求められている。

ヒトの病態を忠実に再現する動物モデルは STS の生物学的特徴を解明するうえでも有用である(35)。P53, Rb 遺伝子はヒト STS 患者で最も高頻度に変異が見られる遺伝子であり(51, 139, 140)、これまで間葉系細胞における p53 および Rb 変異によって誘導される STS のマウスモデルが報告されている(141-143)が、STS マウスモデルで発症する肉腫がヒト STS をどの程度模倣しているかはいまだ不明であることに加え、マウスモデル由来の肉腫が多岐にわたるヒト STS のサブクラスターのどれに該当するのか詳細な検討は行われていない。

脂肪肉腫, 平滑筋肉腫, 線維肉腫などの一部の肉腫では加齢とともに肉腫の発症率は上昇する(144, 145)。先行研究より、連続的に継代した MSC によって誘導される未分化 STS や、加齢マウス MSC において p53 変異が観察されている(146)が、p53 欠損や加齢によって MSC の特性がどのように変化して腫瘍形成が促進されるのか、STS の発症機序の理解は今後の課題である。

### 2.1.4 ストレス応答因子 p53 について

P53 は DNA 損傷応答を伴う様々なゲノムストレスによって活性化されるがん抑制遺伝子であり、細胞周期の停止・細胞老化・DNA 修復・アポトーシスなどに関わる様々な経路を活性化するストレス応答因子である(図 2.1.3)。p53 は骨肉腫、白血病、リンパ腫といった様々ながんで高頻度に遺伝子変異が見られ、発癌における役割が注目されてきた一方で、初期発生過程、代謝、幹細胞性の制御においても重要な機能を持つことが報告されている。HSC において、p53 は静止期性の維持と造血ストレス負荷後の細胞増殖の制御を担い、p53 の欠損は白血病や悪性リンパ腫の発症を誘導することが示されている(147-152) (図 2.1.4)。

MSC においても *in vitro* のアッセイ系を用いて p53 が幹細胞活性を制御することが示されている。先行研究より、エイジング、複製老化、酸化ストレス、ROS、炎症などの様々なストレスによって MSC で p53 が活性化され、脂肪分化の上昇、増殖能の低下といった MSC エイジング様の形質を誘導する(153, 154)。逆に、MSC で p53 を欠損すると骨分化が誘導され骨量が増加することがマウスモデルで示されており(155)、p53 は MSC の幹細胞機能を制御することが明らかとなってきた(図 2.1.4)。しかしながら生体内でおこる MSC エイジングにおける p53 の寄与は不明である。

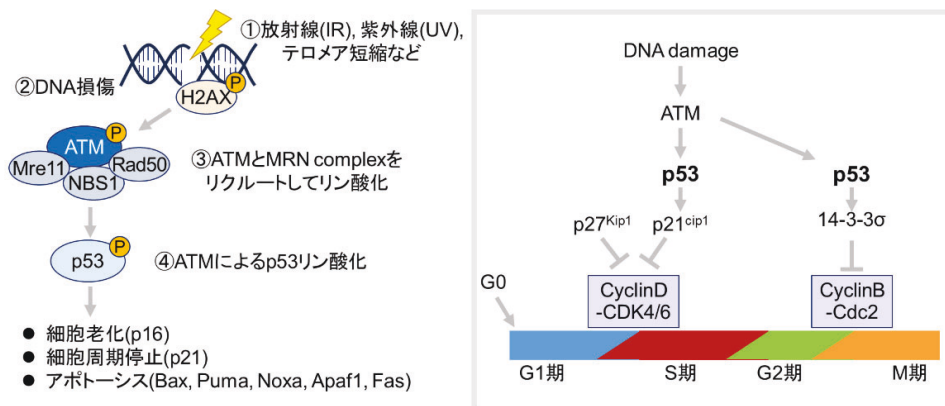


図 2.1.3. p53 を介した DNA 損傷応答

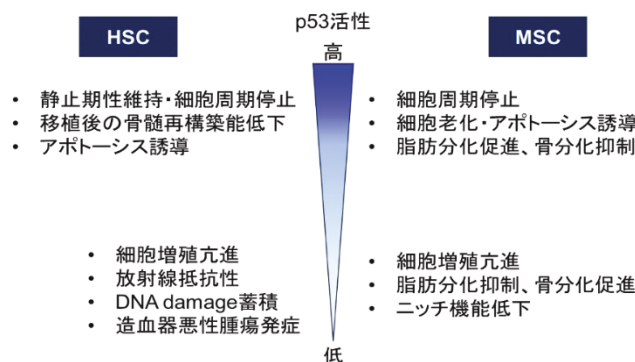


図 2.1.4. MSC エイジングにおける p53 の機能

## 2.1.5 本研究の目的

第2章ではMSCエイジングにおけるp53の機能解析を目的とした。上述のように生体内でおこるMSCエイジングの分子機序はほとんど分かっておらず、また、複数あるMSCの機能が同じ仕組みで制御されるのかも不明である。そこでMSC特異的にp53を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを用いて、MSCの①造血ニッチとしての機能、②幹細胞機能(分化・増殖能)、③腫瘍形成における機能の3つに分けて検討を行った。また、その過程でMSC特異的p53欠損マウスは高頻度にMSC由来の腫瘍・未分化軟部肉腫を発症することが明らかとなったため、ヒトの肉腫とその特性を比較することでヒト軟部肉腫のモデルとしての妥当性を検証し、最後に上述した肉腫治療における臨床の課題(臨床上頻用される腫瘍マーカーが少なく病態が多様なことから適切な分類や診断が困難であるという点)に対して新規のアプローチを提案することを試みた。

## 2.2 実験方法

### 2.2.0 使用した試薬および抗体

本研究で使用した試薬および抗体を表2.2.0に示す。(第1章でも記載した試薬は省略)

表 2.2.0 本研究で使用した試薬および抗体一覧

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Anti mouse Leptin R-biotin	R&D systems	Cat# BAF497
Anti-mouse CD45-PerCP-Cy5.5 (clone: 30-F11)	BD bioscience	Cat# 550994; RRID: AB_394003
Anti-mouse Ter119-PerCP-Cy5.5 (clone: TER-119)	Tonbo biosciences	Cat# 560512; RRID: AB_10561844
Anti-mouse CD31-PE (clone: MEC 13.3)	BD bioscience	Cat#553373; RRID: AB_394819
Anti-mouse CD140a-APC (clone: APAS)	Invitrogen	Cat# 17-1401-81; RRID: AB_529482
Anti-CD45 micro beads	Miltenyi Biotec	Cat# 130--52-301
Streptavidin-Alexa488	BioLegend	Cat# 405235
Streptavidin-APC-Cy7	Biolegend	Cat# 405208; RRID: AB_529482
Rat anti-CD31 (clone: MEC13.3)	BD biosciences	Cat#550274
Mouse IgG2 $\alpha$ anti-Vimentin	Abcam	Cat# ab137321
Goat anti-Mouse IgG2 $\alpha$ -Alexa555	Invitrogen	Cat# A21137
Donkey anti-Rat IgG-DyLight650	Invitrogen	Cat# SA5-10029
Anti-p53(1C12)-Alexa647	BD Cell Signaling	Cat# 2533S
Anti-IgG1-Alexa647	BioLegend	Cat# 406617
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
collagenase type I	Gibco	Cat# 17100-017
Dnase I	Sigma Aldrich	Cat# D5025-150KU

DMEM	Sigma Aldrich	Cat# D5796
Accutase	Innovative Cell Technologies, Inc.	Cat#AT-104
OCT compound	Tissue-Tek	Cat# 4583
Protein Block	Dako	Cat# X0909
Mountant, Perma Fluor	Thermo Fisher Scientific	Cat# TA-030-FM
EDTA・2NA	Dojindo	Cat# N001
XF 用 DMEM	Agilent	Cat# 103575-100
10mM Glucose	Agilent	Cat# 103577-100
1mM Pyruvate	Agilent	Cat# 103578-100
2mM L-Glutamine	Agilent	Cat# 103579-100
fibronectin	Corning	Cat# 354008
Recombinant Murine IGF-I	PeproTech	Cat# 250-19
Recombinant Murine PDGF-AA	PeproTech	Cat# 315-17
Recombinant Murine FGF-basic	PeproTech	Cat# 450-33
oligomycin	Sigma Aldrich	Cat# 495455
FCCP	Sigma Aldrich	Cat# C2920
antimycin A	Sigma Aldrich	Cat# A8674
rotenon	東京化成	Cat# R0090
2-deoxy-D-glucose	東京化成	Cat# D0051
Oil Red O	コスモ・バイオ株式会社	Cat# ORG125
Alizarin Red S	Fuj Film	Cat# 011-01192
5%ぎ酸	Fuj Film	Cat# 64-18-6
カラッチヘマトキシリン液(x2)	Fuj Film	Cat# 039-17705
ピュア・エオジン	Muto Pure Chemicals	Cat# 32042
キシレン	東京化成	Cat# X0012
TRIZOL	Thermo Fisher Scientific	Cat# 15596-026
クロロホルム	Nacalai Tesque	Cat# 08402-55
イソプロピルアルコール	Wako	Cat# 166-04836

#### Critical Commercial Assays

MesenCult™ Expansion Kit (Mouse)	Veritas	Cat# ST-05513
Mesenchymal Stem Cell (hMSC) Osteogenic Differentiation Medium BulletKit™	Lonza	Cat# PT-3002
Mesenchymal Stem Cell (hMSC) Adipogenic Differentiation Medium BulletKit™	Lonza	Cat# PT-3004
FluxPak Mini-XFe96/XF Pro assay pack	Agilent	Cat# 103793-100
DNeasy Blood & Tissue Kit (50)	QIAGEN	Cat#69504
C1 Single-Cell AutoPrep Reagent Kit	Fluidigm	Cat# 100-5319

SMARTer Ultra Low RNA Kit	Clontech	Cat# 634888
C1 IFC for PreAmp	Fluidigm	Cat# 100-5757
Ambion Single Cell-to-CT Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# 4458237
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific	Cat# 4352042
GE 96.96 Dynamic Array Sample & Loading Reagent Kit	Fluidigm	Cat# 85000802
GE 96.96 Dynamic Array IFC	Fluidigm	Cat# BMK-M-96.96
Nextera XT DNA Sample Preparation Kit	Illumina	Cat# TG-131-1096
Nextera XT DNA Sample Preparation Index Kit (96 index)	Illumina	
Deposited Data		
Raw and analyzed bulk RNA-seq data	This paper	GEO: GSE226843
Raw and analyzed single-cell RNA-seq data	This paper	GEO: GSE226845
Raw and analyzed exome sequencing data	This paper	Bio Project: PRJNA935829
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6JmsSlc	Japan SLC, Inc.	<a href="http://www.jslc.co.jp/english/index2.htm">http://www.jslc.co.jp/english/index2.htm</a>
Mouse: C57BL/6J-Ly5.1	CLEA Japan, Inc	N/A
Mouse: Prrx1-Cre	The Jackson Laboratory	JAX stock #005584
Mouse: p53 <sup>fl/fl</sup>	Logan M et al., <i>Genesis</i> (2002)	<a href="#">(156)</a>
Software and Algorithms		
Ubuntu v20.04LTS		<a href="https://releases.ubuntu.com/20.04/">https://releases.ubuntu.com/20.04/</a>
Seurat	Satija Lab	<a href="https://satijalab.org/">Tools for Single Cell Genomics • Seurat (satijalab.org)</a>
GSVA Bioconductor package	Bioconductor	<a href="#">Bioconductor - GSVA</a>
maftools Bioconductor package	Bioconductor	<a href="#">Bioconductor - maftools</a>

### 2.2.1 実験動物

MSC 特異的に p53 を欠損させるため、Prrx1-Cre(-)-Trp53<sup>flx/flx</sup> (p53<sup>+/+</sup>) マウス (コントロール群) と Prrx1-Cre(+)-Trp53<sup>flx/flx</sup> (p53<sup>Δ/Δ</sup>) マウス (ノックアウト群) を実験に用いた ([153](#), [156](#), [157](#))。なお、今回使用したプロモーターは MSC の中でも最も広範に発現するプロモーターであり、特定のクラスターではなく MSC 全体で p53 を欠損し、その結果 MSC に由来する間葉系細胞でも p53 が欠損しているモデルを使用した。定常状態の造血動態の解析には 10-15 週齢のマウスを用い、加齢マウスの造血動態の解析には 47-59 週齢の 1 年齢付近のマウスを使用した。これらのマウスは交配によって繁殖し、遺伝子型はマウス尾由来の DNA サンプルを用いた PCR 法によって同定した。

C57BL/6-Ly5.1 マウス (Ly5.1) は日本クレアから購入し、移植実験のレシピエントマウスとして用いた。これらのマウスは、飲料水、餌ともに自由摂取のもと、明 12 時間、暗 12 時間サイクルの SPF 環境下で飼育を行った。



## 2.2.2 マウス遺伝子型同定

マウスの遺伝子型同定は 1.2.2 で述べた方法で行った。表 2.2.1(p53), 表 2.2.2(Cre)に示す Mixture を作成し, 図 2.2.1(p53, Cre)に示す条件に従い PCR 反応を行う。(使用プライマーは表 2.2.3 に示す。)

表 2.2.1. p53 遺伝子型同定 PCR 反応 Mixture 組成

試薬	使用量 (μl)	メーカー	型番
10×ExTaq Buffer	2	TaKaRa	RR001A
2.5 mM dNTP Mix	1.6	TaKaRa	RR001A
50 μM primer (1)	0.08	SIGMA	ATM BAC7
50 μM primer (2)	0.08	SIGMA	ATM BAC13
Template DNA	0.5	-	-
5U/μl ExTaq	0.1	TaKaRa	RR001A
DW	1	-	-
Total	20	-	-

表 2.2.2. Cre 遺伝子型同定 PCR 反応 Mixture 組成

試薬	使用量 (μl)	メーカー	型番
10×ExTaq Buffer	2	TaKaRa	RR001A
2.5 mM dNTP Mix	1.6	TaKaRa	RR001A
50 μM primer (5)	0.08	SIGMA	CREi 22S
50 μM primer (6)	0.08	SIGMA	CRE 775AS
50 μM primer (7)	0.08	SIGMA	oIMR7338
50 μM primer (8)	0.08	SIGMA	oIMR7339
Template DNA	0.5	-	-
5U/μl ExTaq	0.1	TaKaRa	RR001A
DW	15.48	-	-
Total	20	-	-

表 2.2.3. ジェノタイピングプライマー配列

対象配列	プライマー名	配列 (5'→3')
p53	P53 1F	CACAAAAACAGGTTAAACCCAG
	P53 1R	AGCACATAGGAGGCAGAGAC
Cre	CREi 22S	CCTGGAAAATGCTTCTGTCCGTTTGC
	CRE 775AS	GAGTTGATAGCTGGCTGGTGGCAGATG
	oIMR7338	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
	oIMR7339	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC

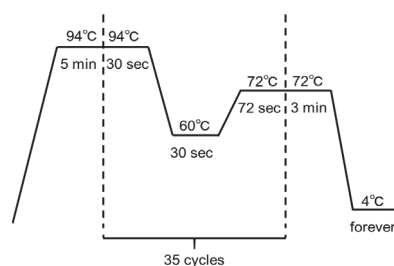


図 2.2.1 PCR 条件 (p53, Cre)

### 2.2.3 マウス骨髄細胞の採取

マウス骨髄細胞の採取は 1.2.3 で述べた方法で行った。

### 2.2.4 マウス脾臓細胞, 胸腺細胞の採取

マウス脾臓細胞, 胸腺細胞の採取は 1.2.4 で述べた方法で行った。

### 2.2.5 マウス末梢血細胞の採取

マウス末梢血細胞の採取は 1.2.5 で述べた方法で行った。

### 2.2.6 マウス骨髄間葉系幹細胞の採取

- (1) 3.5cm petri dish に Collagenase 溶液(表 2.2.4)を 1 匹あたり 1mL 分注する。
- (2) マウスから大腿骨と脛骨を採取し, 21 ゲージの注射針と 1mL シリンジを用いて Collagenase 溶液内で骨髄組織をフラッシュする。
- (3) 37°Cインキュベーターで 20min 放置する。
- (4) 骨髄の塊が見えなくなるまでピペティングしシングルセル化し 50mL チューブへ移す。
- (5) 600 xg, 4°C, 5min で遠心分離する。
- (6) 上清をアスピレーターで捨て, Lysis buffer (表 1.2.8)を 5 ml 加えてよく懸濁し溶血を 5 分間行う。
- (7) FBS-PBS を 10 ml 加え, 600 xg, 4°C, 5min で遠心分離する。
- (8) 上清をアスピレーターで除去し, 10mL の FBS-PBS に懸濁して 70µm のセルストレイナーに通して新しい 50mL チューブに移す。
- (9) 上清をアスピレーターで除去し, ペレットを 1.5mL エッペンチューブに移す。
- (10) 細胞表面の Fc 受容体による非特異的な染色を防ぐため, 1 匹あたり 1µL の Anti-mouse CD16/CD32 を加え, 4°Cで 10min 静置する。
- (11) 必要に応じ, 10 µl/2x10<sup>7</sup>cells の Anti-CD45 micro beads を加え, 遮光をし, 4°Cで 15 分間静置する (この作業を行った場合, (11)-(14)の手順も行う)。
- (12) 1 ml の FBS-PBS を加え, 600 xg, 4°C, で 5 分間遠心分離する。
- (13) (11)の作業を繰り返す。
- (14) 3 ml の FBS-PBS に懸濁し, autoMACS Pro Separator の Deplete\_s プログラムにかける。
- (15) negative fraction の細胞を 600 xg, 4°C, で 5 分間遠心分離する。
- (16) 各種抗体 (表 2.2.5)を加え, 遮光をし, 4°Cで 30 分間静置する。
- (17) 1 ml の FBS-PBS を加え, 600 xg, 4°C, で 5 分間遠心分離する。
- (18) 各種抗体 (表 2.2.6)を加え, 遮光をし, 4°Cで 30 分間静置する。
- (19) (16)の作業を繰り返す。
- (20) 1/1000 量の Propidium iodide を加えた FBS-PBS (PI-PBS) 350 µl に細胞を懸濁し, 0.45 µm

のフィルター付きチューブへと懸濁液を移し, SORP BDFACS Aria (3 laser) (BD, 657590) を用い, 100 $\mu$ m のノズルで解析またはソーティングする。

表 2.2.4.collagenase 溶液組成 (1 ml)

試薬	使用量
Collagenase type I	7 mg
DNase I	1 mg
FBS	20 $\mu$ l
Penicillin-Streptomycin Solution ( $\times$ 500)	2 $\mu$ l
DMEM	1 ml

表 2.2.5.一次抗体

抗体	使用量
Leptin Receptor-biotin	1 $\mu$ L
CD45-PerCP-Cy5.5	2 $\mu$ L
Ter119-PerCP-Cy5.5	2 $\mu$ L
CD31-PE	1 $\mu$ L
CD140a-APC	1 $\mu$ L

表 2.2.6.二次抗体

抗体	使用量
Streptavidin-Alexa488	0.3 $\mu$ L
FBS-PBS	150 $\mu$ L

## 2.2.7 fluorescence-activated cell sorting(FACS)を用いた造血幹/前駆細胞および間葉系幹細胞の解析・単離

造血幹細胞分画の単離では CD4 (Clone: RM4-5), CD8a (Clone: 53-6.72)、B220 (Clone: RA3-6B2), TER-119 (Clone: TER119), Gr-1 (Clone: RB6-8C5), Mac-1 (Clone: M1/70) に対する mAb の混合物を lineage marker (Lin) として用い, 以下のように定義した: LSKs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>; LT-HSCs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>; ST-HSCs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>-</sup>; MPPs, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>; MPP2 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>; MPP3 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>-</sup>; MPP4 cells, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>; Common lymphoid progenitors (CLPs), Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>c-Kit<sup>low</sup>IL-7R<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>; Megakaryocyte/erythroid progenitors (MEPs), Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>c-Kit<sup>low</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>; Granulocyte/macrophage progenitors (GMPs), Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>c-Kit<sup>low</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>; Common myeloid progenitors (CMPs), Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>c-Kit<sup>low</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>。分化血球細胞分画は以下のように定義した: CD4 T cells, CD4<sup>+</sup>; CD8 T cells, CD8<sup>+</sup>; DN cells, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>; DP cells, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>; B cells, B220<sup>+</sup>; Granulocytes, Gr-1<sup>high</sup>Mac-1<sup>high</sup>; Macrophages, Gr-1<sup>dim</sup>Mac-1<sup>high</sup>。

間葉系幹細胞および血管内皮細胞は以下のように定義した: MSC, CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>LepR<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>; EC, CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>VE-cadherin<sup>+</sup>。

解析および細胞の単離は SORP FACS Aria IIu または FACS Aria IIIu 装置 (BD

Biosciences)を用いた。データはFlowJo ソフトウェア (TreeStar) を用いて解析した。

## 2.2.8 骨髄移植実験および移植後の末梢血キメリズムの解析

骨髄移植実験および移植後の末梢血キメリズムの解析は 1.2.7 と 1.2.8 で述べた方法で行った。

## 2.2.9 マウス間葉系幹細胞の培養

- (1) 2.2.6, 2.2.7 に従って MSC を FACS を用いて 2%FBS-DMEM (表 1.2.24 参照) 500 $\mu$ L を入れた collection tube へ sorting する。
- (2) Sorting した細胞を 2000 rpm (340 xg), 4°C で 10 分間遠心分離する。
- (3) 上清を除去し, 1x10<sup>4</sup>cells/100 $\mu$ L となるように MSC 用の culture medium (MesenCult™ Expansion Kit (Mouse), Veritas (Cat# ST-05513)) を使用, 表 2.2.7 参照) に懸濁し, 100 $\mu$ g/mL の fibronectin コートした 96well culture plate へ 100 $\mu$ L ずつ細胞を播種する。
- (4) 96well culture plate を 400 xg, 4°C で 5 分間遠心する。
- (5) 遠心後, 追加で MSC culture medium 100 $\mu$ L ずつ加え 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 8 日間培養する。
- (6) 8 日後に継代を行う。96-well culture plate の上清をアスピレーターで除去し, accutase を 40 $\mu$ L/well ずつ加え, 室温で 10-20 分静置する。
- (7) 2%FBS-PBS 100 $\mu$ L を加えて反応を停止させ, 細胞を回収する。2000 rpm (340 xg), 4°C で 5 分間遠心分離する。
- (8) 上清を除去し, 2-3x10<sup>5</sup>cells/2mL となるように MSC 用 culture medium (表 2.2.7) に懸濁し, 50 $\mu$ g/mL の fibronectin コートした 35mm dish へ 2mL ずつ細胞を播種する。
- (9) 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで 4 日間培養する。
- (10) 4 日後, 再び継代を行う。(6)-(8) を繰り返す。(sorting 直後は MSC の増殖が悪いため fibronectin 100 $\mu$ g/mL と高濃度で使用したが, 継代を繰り返すうちに増殖能が上がるため 3 回目以降は 25 $\mu$ g/mL でも十分増殖する。培養 dish も必要な細胞数に応じて 96-well plate → 35mm dish → 6well plate → 10cm dish を使用した。ただし若齢マウス由来の MSC と比べて, 加齢マウスから採取した MSC は増殖能が非常に低いため, 実験に応じて fibronectin を高濃度で使用した。)
- (11) 3 回ほど継代しコロニーを拡大したあと, Passage 3-4 (P3-4) を解析に用いた。

表 2.2.7. MSC culture medium 組成

抗体	使用量
MesenCult Basal Medium	0.9mL
MesenCult 10X Supplement (Mouse)	0.1mL
200mM L-Glutamin	10 $\mu$ L
Penicilin/Streptomycin (500x)	2 $\mu$ L
1000x MesenPure	1 $\mu$ L

100µg/mL IGF-I	1µL
100µg/mL PDGF-AA	1µL
100µg/mL FGF-basic	1µL

### 2.2.10 マウス間葉系幹細胞の分化アッセイ

- (1) 2.2.9に従って MSC を用意し, 96-well culture plate に  $2 \times 10^5$  cells/well (脂肪分化誘導用) または  $2 \times 10^3$  cells/well (骨分化誘導用)の培養密度で播種し, 一晚 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。
- (2) 翌日, 脂肪分化誘導のために, 培地を脂肪分化誘導培地(Lonza, #PT-3004)に交換し, 3日間培養する。骨分化誘導を行う際は(9)以降の操作を行う。
- (3) その後, 培地を脂肪分化維持培地(Lonza, #PT-3004)に交換しさらに3日間培養する。
- (4) (2)-(3)の操作を2~3サイクル繰り返す。
- (5) 顕微鏡で観察して脂肪への分化が確認されたら, 上清を除去し4%PFAを加えて室温で1時間静置し, 細胞を固定する。
- (6) 4%PFAをアスピレーターで除去し, 60%イソプロピルアルコールで一回洗浄した後, Oil Red Oを加えて30分間染色を行う。
- (7) その後60%イソプロピルアルコールで1回洗浄し, 顕微鏡で観察を行った。
- (8) Oil Red O染色の定量化には, 100%イソプロピルアルコールを加え, 色素が十分溶出したことを確認した後, 溶液をよく混合し, 500nmの吸光度(OD値)を測定した。
- (9) 骨分化のためには, (1)の操作の翌日, 培地を骨分化誘導培地(Lonza, #PT-3002)に交換し, 3日ごとに培地交換をしながら2-3週間培養する。
- (10) 骨への分化が確認されたら, 上清を除去し4%PFAを加えて室温で1時間静置し, 細胞を固定する。
- (11)4%PFAをアスピレーターで除去し, MilliQ水で一回洗浄した後, Alizarin Redを加えて染色を行う。
- (12)その後, 洗浄は行わずそのまま顕微鏡で観察を行った。
- (13) Alizarin Red染色の定量化には, 10%ギ酸を加えることで色素を溶出させ, 450nmの吸光度(OD値)を測定した。

### 2.2.11 細胞周期解析(Ki67染色)

- (1) 2.2.6の(8)までの作業を行う。
- (2)  $1.4 \times 10^7$ 個の細胞をコンペンセーション用にとりわけける。
- (3) コンペンセーション用サンプルを7等分し, それぞれ6色の anti-CD45抗体(表2.2.8)を1µlずつ加える(コンペンセーションは8)へ)。
- (4) 2)の残りの細胞を, 1800 rpm (680 xg), 4°Cで5分間遠心分離する。
- (5) 上清をアスピレーターで除き, ペレットをエッペンチューブに移す。
- (6) Fc-block (anti-mouse CD16/32) 1 µl/匹を加え, 氷上で10分間静置する

- (7) 一次抗体(表 2.2.9)を加え、遮光をし、4°Cで 30 分間静置する。
- (8) 1 ml の FBS-PBS を加え、2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- (9) 8)の作業を繰り返す。
- (10) 二次抗体(表 2.2.10)を加え、遮光をし、4°Cで 30 分間静置する。
- (11) 1 ml の FBS-PBS を加え、2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- (12) 11)の作業を繰り返す。
- (13) BD Cytotfix/Cytoperm を 250  $\mu$ l 加え、氷上で 20 分間静置する。
- (14) MilliQ で 10 倍に希釈した BD Wash buffer を 1 ml 加え、2000 rpm (340 xg), 4°C, で 5 分間遠心分離する。
- (15) 14)の作業を繰り返す (コンペンセーションは 19)へ)。
- (16) Anti-Ki67 Alexa555 10  $\mu$ l/匹加え、遮光をし、室温で 30 分間静置する。
- (17) 14)の作業を 2 回繰り返す。
- (18) 1/1000 量の Hoechst33342 を加えた PBS (1000×Hoechst-PBS) 350  $\mu$ l に懸濁し、FACS で解析する。
- (19)コンペンセーションは PBS 350  $\mu$ l に懸濁し FACS で解析する。

表 2.2.8. コンペンセーション用抗体

抗体	使用量 ( $\mu$ l)
(1) No staining	-
(2) CD45-FITC	1 $\mu$ l
(3) CD45-PE	1 $\mu$ l
(4) CD45-PerCP-Cy5.5	1 $\mu$ l
(5) CD45-APC	1 $\mu$ l
(6) CD45-APC-Cy7	1 $\mu$ l
(7) Cd45-PE-Cy7	1 $\mu$ l

表 2.2.9. Ki-67 染色用一次抗体

抗体	使用量 ( $\mu$ l)
CD45-PerCP-Cy5.5	1 $\mu$ l
Ter119-PerCP-Cy5.5	1 $\mu$ l
CD31-PE-Cy7	1 $\mu$ l
LepR-biotin	1 $\mu$ l
CD140a-APC	1 $\mu$ l

表 2.2.10. Ki-67 染色用二次抗体

抗体	使用量 ( $\mu$ l)
SA-APC-Cy7	1 $\mu$ l

## 2.2.12 Seahorse 細胞外フラックスアナライザー解析

- (1) 2.2.9 に従って MSC を用意し、25 $\mu$ g/mL の fibronectin coat した 96-well culture plate に 5x10<sup>4</sup> cells/well の密度で細胞を播種し、一晩 37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。

- (2) 培地を seahorse 用の培地(Seahorse, #103680-100 を使用, 表 2.2.11 参照)に交換した後, 細胞を 37°C, 0%CO<sub>2</sub> インキュベーターに 30 分間入れて培地の pH を平衡化させる。
- (3) Seahorse XF Pro で OCR と ECAR を測定する。Mitostress test については, oligomycin (1μM), FCCP (2μM), Antimycin A (0.5μM) + rotenone (0.5μM), 2-deoxy-D-glucose (50mM) に対する OCR の変化を測定した。

表 2.2.11. seahorse 測定用培地

試薬	使用量
XF 用 DMEM	29.7mL
10mM Glucose	300 μl
1mM Pyruvate	300 μl
2mM L-Glutamine	300 μl

### 2.2.13 μCT による骨密度測定

$p53^{+/+}$  マウスおよび  $p53^{\Delta MSC}$  マウスに麻酔をかけ, μCT(CosmoScan FX; Rigaku)を用いて大腿骨頭部をスキャンした。スキャン画像を元に 3 次元画像を再構成し, BMD Analysis software (Rigaku)を用いて骨量を測定した。海綿骨骨量測定の際には, 大腿骨頭の成長板から近位 0.5mm の位置の厚さ 1mm の骨量を測定した。

### 2.2.14 放射線照射後の造血の回復評価の解析

- (1) 10-15 週齢の  $p53^{+/+}$  又は  $p53^{\Delta MSC}$  マウスを放射線用ラウンドゲージに入れ, MBR-1520R (Hitachi Power Solutions)を用いて, 125kV 10mA, 0.5mm Al, 0.2mm Cu filter, 4Gy に設定して放射線を照射する。
- (2) 0, 3, 7, 10, 14, 21, 30, 40, 50, 60, 70 日後に各マウスから末梢血を採取し, 3.5 と同様の手順でキメリズムを測定する。
- (3) 70 日後, 再び(1)の手順で 4Gy の放射線を照射し, 0, 3, 7, 10, 14, 21, 30, 40, 50, 60, 70 日後に末梢血キメリズムを測定する。

### 2.2.15 腫瘍凍結切片の免疫組織学染色

- (1) 腫瘍を発症した  $p53^{\Delta MSC}$  マウスから腫瘍を切り出す。
- (2) 4%PFA (表 2.2.12)に一晩つけて固定する。
- (3) 骨由来の腫瘍の場合は, 0.5M EDTA に一晩つけて脱灰した後, 10%→15%→20% Sucrose にそれぞれ 4h 以上ずつ置換する。
- (4) OCT compound に検体を浸し, 氷上で 10min 冷やす。
- (5) 液体窒素上に置き, 10min 冷やす。
- (6) クライオスタット (HM550, OMVP)を用いて切片を切り出し, プレパラートにのせる。
- (7) ドライヤーを用いて組織をよく乾かす。
- (8) 0.1%TritonX-PBS (表 2.2.13)で切片を浸し 5min 洗う。

- (9) 残りを取り除いたあともう一度 0.1%TritonX-PBS に浸して 5min 置き, 残った OCT compound を洗い流す。
- (10) 0.1%TritonX-Protein Block (表 2.2.14)につけて 1h 置き, ブロッキングを行う。
- (11) 1次抗体 (表 2.2.15)につけて 4°Cで一晩静置する。
- (12) 0.1%TritonX-Protein Block につけて 10min x3 回洗う。
- (13) 2次抗体 (表 2.2.16)につけて 30min-1h 置く。
- (14) (11)の作業を繰り返す。
- (15) Mountant, Perma Fluor を一滴たらしカバーガラスをかけてサンプルを封入する。
- (16) サンプルの観察は LSM800 Confocal microscopy (Zeiss)で観察した。

表 2.2.12. 4%PFA 溶液

試薬	使用量
D-PBS (-)(1×)	10 mL
PFA	0.4g

表 2.2.13. 0.1%TritonX-Protein Block

試薬	使用量
D-PBS (-)(1×)	500 mL
TritonX	500μL

表 2.2.14. 0.1%TritonX-Protein Block

試薬	使用量
Protein Block	500 mL
TritonX	500μL

表 2.2.15. 一次抗体

抗体	使用量
Mouse IgG2α anti-Vimentin	1 μL
Rat anti-CD31	1 μL
0.1%TritonX-Protein Block	100 μL

表 2.2.16. 二次抗体

抗体	使用量
Goat anti-Mouse IgG2α-Alexa555	0.5 μL
Donkey anti-Rat IgG-DyLight650	0.5 μL
DAPI	0.1 μL
0.1%TritonX-Protein Block	100 μL

## 2.2.16 腫瘍パラフィン切片の HE 染色

- (1) 腫瘍を発症した  $p53^{d/d}$  マウスから腫瘍を切り出す。
- (2) 4%PFA (表 2.2.12)に一晩つけて固定する。
- (3) 70%エタノールに 1h 以上つける。



- (4) 100%エタノールに 7h つける。
- (5) キシレンに 3h つける。
- (6) パラフィンで包埋する。
- (7) ミクロトームで 2-3 $\mu$ m の厚さに切り、プレパラートにのせる。
- (8) キシレンに 5-10min つける。2 回繰り返す。
- (9) 100%エタノールに 5-10min つける。2 回繰り返す。
- (10) 70%エタノールに 5-10min つける。
- (11) MilliQ 水に 5-10min つける。
- (12) カラッチヘマトキシリン液 (x2)につけて 5min 置く。
- (13) ピュア・エオジンにつけて 5min 置く。
- (14) 100%エタノールにさっとつける。3 回繰り返す。
- (15) キシレンに 5-10min つける。3 回繰り返す。
- (16) マルチマウント 220 (松浪ガラス, 68300234)で封入する。

#### 2.2.17 p53 タンパク質発現量の解析

- (1) 2.2.6 の (8)までの作業を行う。
- (2) コンペンセーション用サンプルを 8 等分し, 各種抗体を 1 $\mu$ l 加える (コンペンセーションは (14)へ)。
- (3) (2)の残りの細胞を 600 xg, 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- (4) 上清をアスピレーターで除き, ペレットをエッペンチューブに移す。
- (5) 1  $\mu$ l/匹の Anti-mouse CD16/CD32 を加え, 4°Cで 10 分間静置する。
- (6) 1 次抗体 (表 2.2.17)を 1  $\mu$ l/匹加え, 遮光をし, 4°Cで 30 分間静置する。
- (7) 1 ml の FBS-PBS を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°C, で 5 分間遠心分離する。
- (8) 2 次抗体 (表 2.2.18)を 1  $\mu$ l/匹加え, 遮光をし, 4°Cで 30 分間静置する。
- (9) 1 ml の FBS-PBS を加え, 2000 rpm (340 xg), 4°C, で 5 分間遠心分離する。
- (10) 上清を除去し, 50 $\mu$ l の PBS に懸濁する。
- (11) 1mL の 1x lyse/fix buffer (BD Biosciences, 558049)を加え, すぐによくピペッティングする。
- (12) 遮光をし, 37°Cのヒートブロックで 10 分間静置する。
- (13) 2000 rpm (340 xg), 4°Cで 5 分間遠心分離する。
- (14) 上清を除去し, 500  $\mu$ l の Perm buffer II (BD Biosciences, 558052)を加え, 遮光をし, 4°Cで 30 分間静置する。
- (15) 1500 rpm (190 xg), 室温で 5 分間遠心分離する。
- (16) 上清を除去し, 1ml の Perm buffer II を加え, 1500 rpm (190 xg), 室温で 5 分間遠心分離する (コンペンセーションは (26)へ)。
- (17) サンプルを 50 $\mu$ L ずつ 2 等分し, 2 等分したうちの 1 つに anti-p53-Alexa647 抗体を 5 $\mu$ L

ずつ, もう 1 つに anti-IgG1-Alexa647 抗体を 1 $\mu$ L ずつ加え, 遮光をし, 室温で 30 分間静置する。

- (18) 1ml の FBS-PBS を加え, 1500 rpm (190 xg), 室温で 5 分間遠心分離する
- (19) 上清を除去し, 350 $\mu$ l の FBS-PBS に懸濁し, フローサイトメーターで解析をする。
- (20) コンペンセーションは FBS-PBS 500  $\mu$ l に懸濁し, フローサイトメーターで解析する。

表 2.2.17. 一次抗体

抗体	使用量	メーカー	クローン名
Leptin Receptor-biotin	1 $\mu$ L	R&D systems	-
CD45-PerCP-Cy5.5	2 $\mu$ L	BD Biosciences	30-F11
Ter119-PerCP-Cy5.5	2 $\mu$ L	Tonbo Biosciences	TER-119
CD31-PE	1 $\mu$ L	BD Pharmingen	MEC 13.3
CD140a-APC	1 $\mu$ L	eBioscience	APAS

表 2.2.18. 二次抗体

抗体	使用量	メーカー	クローン名
Streptavidin-Alexa488	0.3 $\mu$ L	Biolegend	-
FBS-PBS	150 $\mu$ L	-	-

## 2.2.18 細胞からの mRNA の単離と cDNA 合成 (RNeasy mini Kit; QIAGEN, 74104)

- (1) フローサイトメーターで分取した細胞を 3.5  $\mu$ l の 2-mercaptoethanol (SIGMA, M6250) と, 350 $\mu$ l の RLT buffer (QIAGEN, 1015750) に懸濁する。
- (2) 350 $\mu$ l の 70% エタノールを加え, よく懸濁する。
- (3) RNeasy カラムに全量をアプライする。
- (4) 10000rpm (7700 xg), 室温, 1 分間遠心分離する。
- (5) 700 $\mu$ l の RW1 buffer を加え, 10000rpm (7700 xg), 室温, 1 分間遠心分離する。
- (6) カラムを新しいコレクションチューブに装着する。
- (7) 500 $\mu$ l の RPE buffer を加え, 10000rpm (7700 xg), 室温, 1 分間遠心分離する。
- (8) コレクションチューブに溜まった溶液を捨て, もう一度 500 $\mu$ l の RPE buffer を加え, 10000rpm (7700 xg), 室温, 2 分間遠心分離する。
- (9) カラムを 1.5ml チューブに装着し, 14.5 $\mu$ l の RNase free water をカラムにしみ込ませ, 1 分以上静置する。
- (10) 10000rpm (7700 xg), 室温, 2 分間遠心分離する。
- (11) 得られた 14 $\mu$ l の RNA 溶液と, SuperScript<sup>®</sup> VILO<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, 11754050) の 5 $\times$  VILO Reaction Mix 4  $\mu$ l, 10 $\times$  SuperScript Enzyme Mix 2  $\mu$ l を 8 連チューブで混合する。
- (12) サーマルサイクラーに 8 連チューブを設置し, 図 2.2.2 に示す条件に従って逆転写反応を行う。
- (13) PCR 反応後の産物を cDNA として使用する。

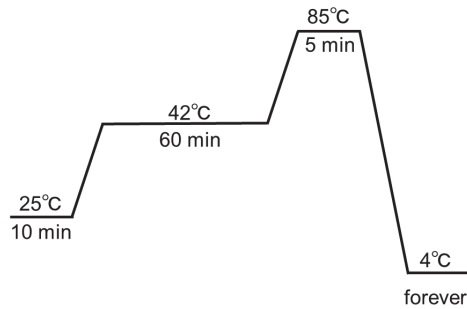


図 2.2.2. 逆転写反応プロトコル

### 2.2.19 リアルタイム PCR

- (1) SYBR Green 反応溶液 mixture (表 2.2.19) を作製する (プライマー配列は表 2.2.20)。
- (2) SYBR Green 反応溶液 mixture 89 $\mu$ L に cDNA を 1  $\mu$ L 加え, よく懸濁する。
- (3) 96 well プレートに, 20  $\mu$ L $\times$ 4 well ずつ加える。
- (4) 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, 4362143) で PCR 反応を行う (図 2.2.3)。

表 2.2.19. SYBR Green PCR 反応 mixture 組成

試薬	使用量 ( $\mu$ l)
SYBR Premix ExTaq	45
Forward primer	0.36
Reverse primer	0.36
Rox II dye	1.8
D <sub>2</sub> W	41.48

表 2.2.20. SYBR Green PCR プライマー配列

対象配列		配列 (5'→3')
$\beta$ -actin	Forward	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC
	Reverse	ATGGAGCCACCGATCCACA
<i>p53</i>	Forward	AAGATCCGCGGGCGTAA
	Reverse	CATCCTTTAACTCTAAGGCCTCATTC
<i>Leptin Receptor</i>	Forward	AAGGATTTGCAGCGGTGAG
	Reverse	TGGATATGCCAGGTTAAGTGCAG
<i>Cxcl12</i>	Forward	CAGAGCCAACGTCAAGCATC
	Reverse	TTAATTTCTGGGTCAATGCACAC
<i>Kit ligand</i>	Forward	AGATCTGCGGGAATCCTGTGA
	Reverse	CATCCCGGCGACATAGTTGA
<i>Vcam1</i>	Forward	TTCCGGCATTATGTGTGTGAAG
	Reverse	GGCACATTTCCACAAGTGCAG

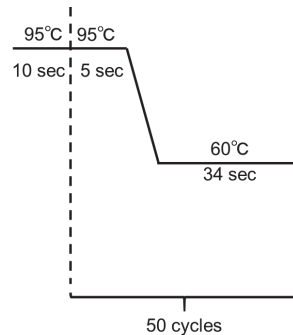


図 2.2.3. リアルタイム PCR プロトコル

### 2.2.20 マウス間葉系幹細胞および腫瘍組織からの DNA 抽出 (DNeasy Blood & Tissue Kit (50), Qiagen#69504)

- (1) マウス間葉系幹細胞からの DNA 抽出では、まず 2.2.6, 2.2.7 に従って p53<sup>+/+</sup>および p53<sup>ΔΔ</sup>MSC を FACS を用いて 2%FBS-DMEM (表 1.2.24 参照) 500μL を入れた collection tube へ分取する。
- (2) Sorting した細胞を 2000 rpm (340 xg), 4°C で 10 分間遠心分離する。
- (3) 上清を除去し, Buffer ATL 180μL + ProK 20μL へ懸濁し, 56°C で一晩インキュベートを行う。
- (4) マウスの正常組織および腫瘍組織からの DNA 抽出では, p53<sup>+/+</sup>マウスの肝臓および p53<sup>ΔΔ</sup>マウスの腫瘍 20~30mg ずつを液体窒素につけ-80°C に凍結して stock しておき, サンプルが集まったら Buffer ATL 180μL + ProK 20μL をいれてホモジェナイズし, 56°C で一晩インキュベートを行う。
- (5) 15 秒間ボルテックスを行い, Buffer AL 200μL を加えてよく懸濁する。
- (6) 100%エタノール 200μL を加え, よく懸濁する。
- (7) DNeasy Mini spin column を 2 ml コレクションチューブにセットし, その中に(6)全量をアプライする。
- (8) 8000rpm (6000 xg), 室温, 1 分間遠心分離する。
- (9) コレクションチューブを捨て, カラムを新しいコレクションチューブに装着する。
- (10) Buffer AW1 500μL を加え, 8000rpm (6000 xg), 室温, 1 分間遠心分離する。
- (11) コレクションチューブに溜まった溶液を捨て, Buffer AW2 500μL を加え, 14000rpm (20000 xg), 室温, 3 分間遠心分離する。
- (14) カラムを新しい 1.5ml チューブに装着し, 200μl の Buffer AE を加え, 1 分以上室温に静置する。
- (12) 8000rpm (6000 xg), 室温, 1 分間遠心分離する。
- (13) 得られた溶液から 1μL を用いて NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) で DNA 濃度を測定し, 濃度が 50μg/mL を超えるサンプルを DNA 抽出液として使用する。

### 2.2.21 ライブラリー調製とエクソームシーケンス

DNA のシーケンス, 配列のアラインメント, variant calling などは全て Macrogen Japan に委託した。Quality check を通ったサンプルをすべて使用し, ライブラリーの調製とシーケンスは SureSelect キット(Agilent)と NovaSeq6000 システムを用いて行った。シーケンス後, reference 配列に Genome Reference Consortium から提供されている Genome assembly GRCm38 を用いてアラインメントを行った。Paired End 法を用い Read length: 150bp, average target coverage depth: 140x に設定した。

### 2.2.22 ヒト軟部肉腫の遺伝子変異解析

Mutation Annotation Format (MAF)ファイルは vcf2maf package を使用して variant calling format (VCF)ファイルから作成した。MAF ファイルは maftools Bioconductor package (158)を用いて解析やグラフ作成などを行った。Total mutation burden (TMB)に関しては maftools が提供する tcgaCompare 関数(159)を用いて解析した。全解析は、Ubuntu (Ubuntu 20.04 LTS)と R software (version 3.6.1)用いて行った。

### 2.2.23 データベースからのヒト臨床データ取得

ヒト肉腫の RNA-seq データは NCI の GDC Data Portal から入手した (<https://portal.gdc.cancer.gov/>)。ヒト肉腫のゲノム変異の解析と可視化には、cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>) からダウンロードした TCGA データセット“Adult Soft Tissue Sarcomas (Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas, 2017)”を使用した。

### 2.2.24 腫瘍組織からの total RNA の抽出 (NucleoSpin® Blood; Takara, 740951)

- (1) 腫瘍を発症した  $p53^{+/Δ}$  マウスから腫瘍を切り出す。
- (2) サンプルを液体窒素につけ, 瞬時に凍らせる。使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存しておく。
- (3) 腫瘍サンプルをホモジェナイザーを用いて 50-100mg に碎き, 1mL の TRIZOL を加え, 5min 静置する。
- (4) 0.2mL のクロロホルムを加え, 15 秒間激しく懸濁する。
- (5) 2-3min 静置する。
- (6) 12000 xg,  $4^{\circ}\text{C}$  で 15 分間遠心分離する。
- (7) 水層を 500 $\mu\text{L}$  別の 1.5mL エッペンチューブに取り分け, イソプロピルアルコールをゆっくり加える。
- (8) 泡立ないように転倒混和し, 室温で 10 分間静置する。
- (9) 12000 xg,  $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心分離する。
- (10) 上清を除去し, 1mL の 70%エタノールを加えて攪拌する。

- (11) 7500 xg, 4°Cで5分間遠心分離する。
- (12) 上清を除去し, ペレットを乾燥させる。
- (13) 200μL の RNase free water (Qiagen, 129112)を加えピペッティングする。
- (14) RNA 量を紫外・可視分光光度計 Ultrospec 3300 pro を用いて測定し, total RNA として使用する。

#### 2.2.25 マウス間葉系幹細胞および腫瘍細胞から抽出した RNA のライブラリー調製 遺伝子発現解析

- (1) 2.2.24 に従って腫瘍細胞の total RNA 溶液を調製する。
- (2) 2.2.18(10)までを行い, p53<sup>+/+</sup>MSC および p53<sup>ΔΔ</sup>MSC から RNA を抽出し, RNA 量を紫外・可視分光光度計 Ultrospec 3300 pro を用いて測定して RNA 溶液を調製する。
- (3) 調製した RNA 溶液を DNA チップ研究所に受託し, アジレント社のマウス様マイクロアレイ 8×60K フォーマットでマイクロアレイを作製, 遺伝子発現解析を行う。

#### 2.2.26 若齢および加齢マウスから採取した間葉系幹細胞の single-cell RNA-seq

- (1) 若齢(10 週齢)および加齢(2 年齢)マウスの MSC (CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD140a<sup>+</sup>LepR<sup>+</sup>)を, それぞれ 2.2.6, 2.2.7 に示す方法で FACS Aria II セルソーターを用いて単離する。
- (2) Single-cell cDNA 合成は, C1 Single-Cell Auto Prep System (Fluidigm)を用いて行う。
- (3) 逆転写および増幅は, Fluidigm C1 System 用の SMARTer Ultra Low RNA Kit (Clontech)および mRNA Seq 用の C1 Single-Cell Auto Prep Reagent Kit (Fluidigm)を用い, 製造元のプロトコルに従う。
- (4) RNA control 用に, ArrayControl RNA Spikes (Thermo Fisher Scientific)の#1, #4, #7 の tube を 100:10:1 の割合で混合し, RNA Spikes mixture を C1 Loading Reagent (Fluidigm)で 1:10000 に希釈する。
- (5) Sorting した MSC は, Suspension Reagent で希釈して~1000cells/μL とし, mRNA-seq 用の C1-Single-Cell Auto Prep IFC にロードする (5~10μm)。
- (6) 細胞をロードした後, IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare) を用いて integrated fluidic circuit (IFC)を観察し, 各ウェルで単一細胞がきちんと捕捉されていることを確認した。細胞がない, または 2 個以上存在していたり, shrink しているようなウェルは除外する (若齢 MSC では 96 ウェル中 83 ウェル, 加齢 MSC では 96 ウェル中 79 ウェルを使用)。
- (7) 細胞溶解、逆転写、前増幅のための PCR 反応条件は図 2.2.4, 2.2.5 に示す。
- (8) 各ウェルの増幅した cDNA (約 3.5μL)を 10μL の C1 DNA Dilution Reagent (Fluidigm)で希釈し, 使用するまで-30°Cで凍結保存する。
- (9) 各ウェルのサンプルを C1 Harvest Reagent で 1:2 に希釈し, Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina)と Nextera XT DNA Sample Preparation Index Kit (96 index, Illumina)を用いてタグメンテーションとイルミナシーケンスライブラリー調製を行う。

- (10) 2.5 $\mu$ L の Tagment DNA Buffer、1.25 $\mu$ L の Amplification Tagment Mix, および 1.25 $\mu$ L の希釈した cDNA サンプルを混合し、サーマルサイクラーで 55°C, 10 分間インキュベートする。
- (11) 10 分後, 1.25 $\mu$ L の neutralizing buffer (NT buffer)を加えて反応を停止する。
- (12) サンプルを PCR でさらに増幅する。各ウェルから 6.25 $\mu$ L ずつを NPM buffer と混合し, index primer 1 と index primer 2 をそれぞれ 1.25 $\mu$ L 添加する。
- (13) 図 2.2.6 に示す条件に従って PCR 反応を行う。
- (14) 増幅反応後, 各ウェルから 1 $\mu$ L ずつを, AMPure XP beads (Beckman Coulter)で 2 回混ぜて洗い,最後に 144 $\mu$ L の DNA suspension buffer で溶出する。
- (15) Illumina HiSeq2000 を用いてシーケンスを行う。シーケンスリードは, RNA-seq Unified Mapper (RUM) version 2.0.4 を用いて mouse genome mm9 にアライメントし, 転写産物は Cufflinks version 2.1.1 を用いてアセンブルした。

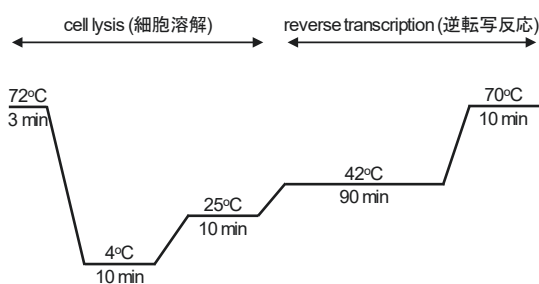


図 2.2.4. 細胞溶解・逆転写反応プロトコル

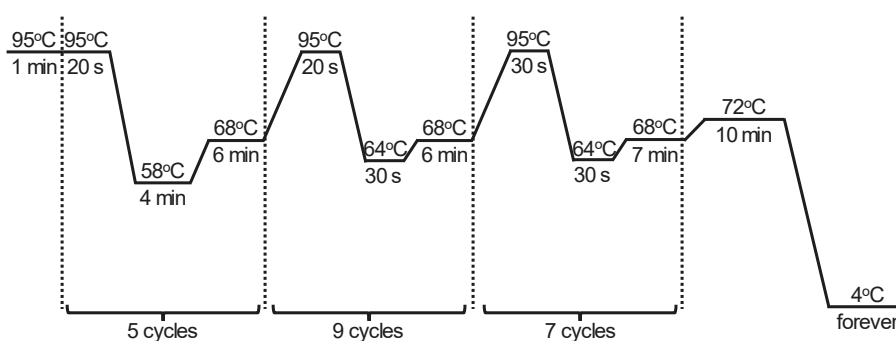


図 2.2.5. 前増幅反応プロトコル

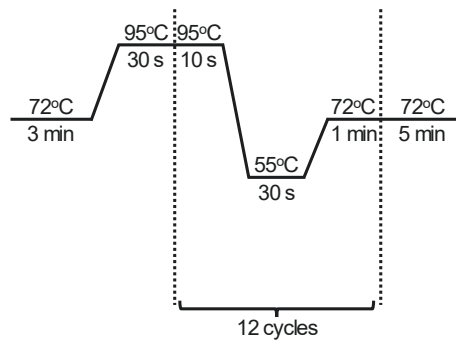


図 2.2.6. 増幅反応プロトコル

### 2.2.27 R ソフトウェアを使用した single-cell RNA-seq データの解析

PCA, Gene ontology (GO)解析, GSVA を含むすべての解析に R software (version 3.6.1)を使用した。最初に、 $\beta$ actin 遺伝子(Actb)の FPKM 値が 300 未満のサンプルを解析から除外した。フィルタリング処理後、GSVA package [\(160\)](#)を用いて GSVA を行った。GSVA の結果は gplots package の heatmap.2 関数を用いて可視化した。また、cluster Profiler package [\(113\)](#)を用いて GO enrichment 解析を行った。マウスのゲノムアノテーションの取得の際は org.Mm.eg.db を用いた。

### 2.2.28 ヒト軟部肉腫の遺伝子発現解析

117 個のヒト肉腫サンプルの RNA-seq データは、National Cancer Institute (NCI)の Genomic Data Commons (GDC) data portal から入手した。サンプルのクラスタリングと可視化には、R package の Seurat [\(161\)](#)を用いた。最初に、 $nFeature\_RNA > 10000$  および  $nCount\_RNA > 200000$  でフィルタリングを行い、その後 Seurat のデフォルトワークフローに従ってデータを正規化・スケーリングした後、Principal component analysis (PCA)を用いてサンプルの線形次元削減を行った。データセットの可視化のため、UMAP により非線形次元削減を行った(解像度パラメーターを 1.2、次元パラメーターを 10 に設定した)。クラスタリング後の各クラスターのマーカーは FindAllMarkers を用いて同定し、violin plot と Feature plot で可視化した。ヒトとマウスのデータ統合には、Seurat が提供する FindIntegrationAnchors 関数と IntegrateData 関数を使用した[\(161\)](#)。

### 2.2.29 GSEA

正規化されたマイクロアレイデータを、GSEA v4.0.3 software (Broad Institute)で解析した。遺伝子セットは、Molecular Signatures Database v4.0 から入手した(<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>)。permutation の回数は 1000 とし、 $p$  値 0.05 以下かつ擬陽性 FDR 0.25 以下を有意とした。



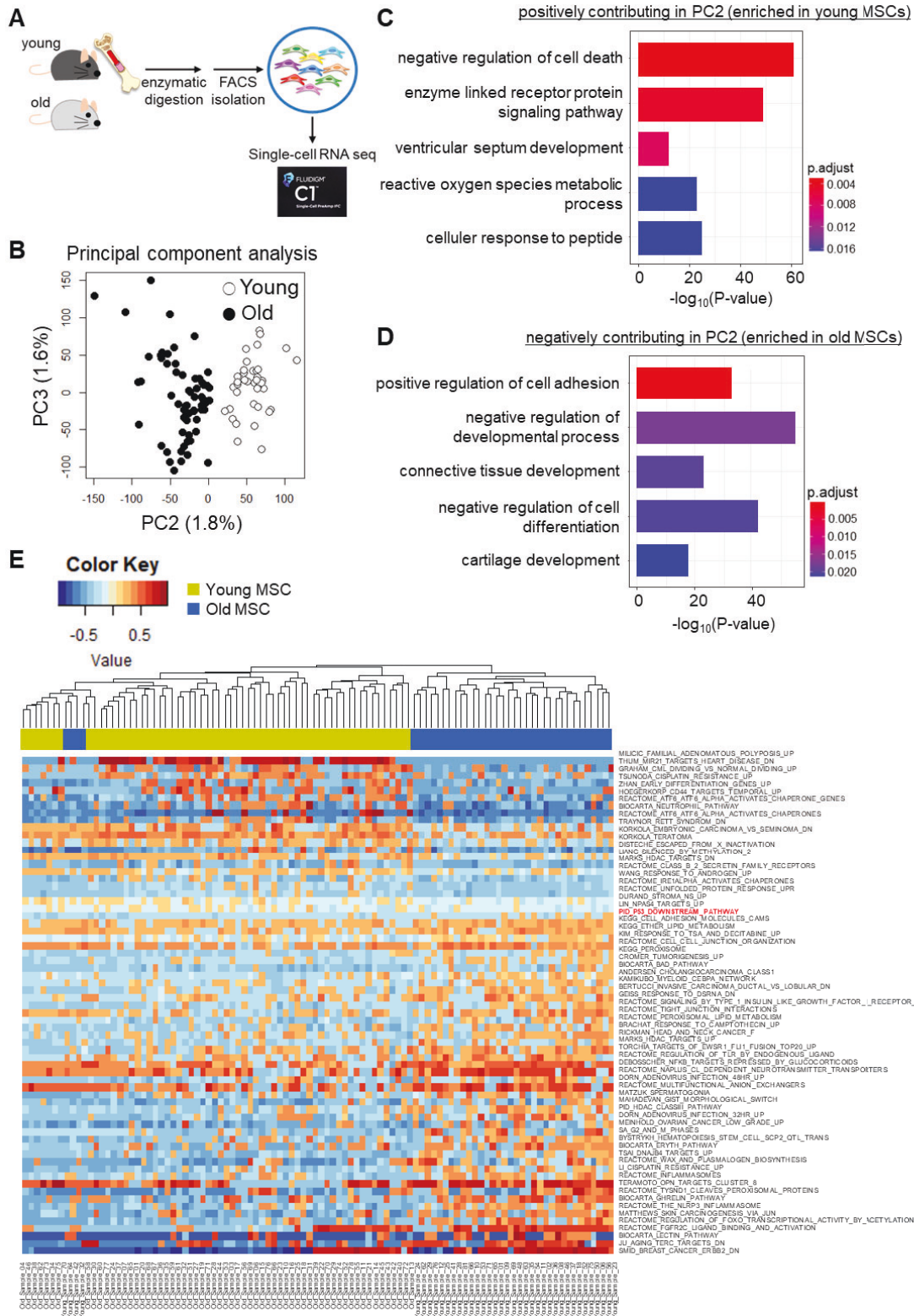
### 2.2.30 統計解析

特に他に断りのない限り, データは平均値±SD (標準偏差)で示す。2群実験の比較には two-tailed Student's t test を, 多群間の比較は Tukey's multiple comparison test. を用いた (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  と表記し,  $p$  値が 0.05 以上の場合は ns と表記した)。統計検定は、GraphPad PRISM 9J または BellCurve for Excel を用いて、独立反復で行った。

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 若齢マウスと比較して加齢マウス MSC では p53 下流経路の発現が低下する

最初に, 加齢に伴って p53 下流シグナルを含む MSC の遺伝子発現がどのように変化するかを調べるため, 若齢および加齢 MSC の single-cell RNA sequence (scRNA-seq) を行った (図 2.3.1 A)。scRNA-seq データの主成分分析 (Principal component analysis; PCA) より, 加齢 MSC は若齢 MSC とは異なるクラスターを形成し, 異なる遺伝子発現プロファイルを示すことが分かった (図 2.3.1 B)。特に Principal component 2 (PC2) によって, 若齢および加齢 MSC の遺伝子発現が分類された (図 2.3.1 B)。PC2 に正に寄与する遺伝子の Gene ontology (GO) 解析より, 細胞死の negative regulation や活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) の代謝プロセスに関連する遺伝子群がプラスに寄与している一方で, 細胞接着, 発生過程, 細胞分化に関連する遺伝子群は PC2 にマイナスに寄与していた (図 2.3.1 C および D)。若齢 MSC と加齢 MSC の遺伝子発現の違いをさらに解析するため, Molecular Signatures Database (MSigDB) に登録されている遺伝子セットを用いて, Gene set variation analysis (GSVA) を行った。加齢 MSC では 68 個の遺伝子セットが有意に発現変動していた (図 2.3.1 E)。これら遺伝子セットの中には p53 下流経路も含まれ, 若齢 MSC と比較して加齢 MSC で有意に発現が低下していた (図 2.3.1 E)。同様に, Gene enrichment analysis (GSEA) によって, p53 下流経路に関連する遺伝子セットの発現は若齢と比較して加齢 MSC で低下しており, PTEN や CDKN1A などの典型的な p53 下流遺伝子の発現が加齢 MSC で有意に低下していることが示された (補助図 2.3.1 A-C) ([162](#), [163](#))。これらの結果は, 加齢 MSC において p53 経路が減弱することを示唆している。



### 図 2.3.1. 加齢 MSC では p53 下流シグナルの発現が低下する

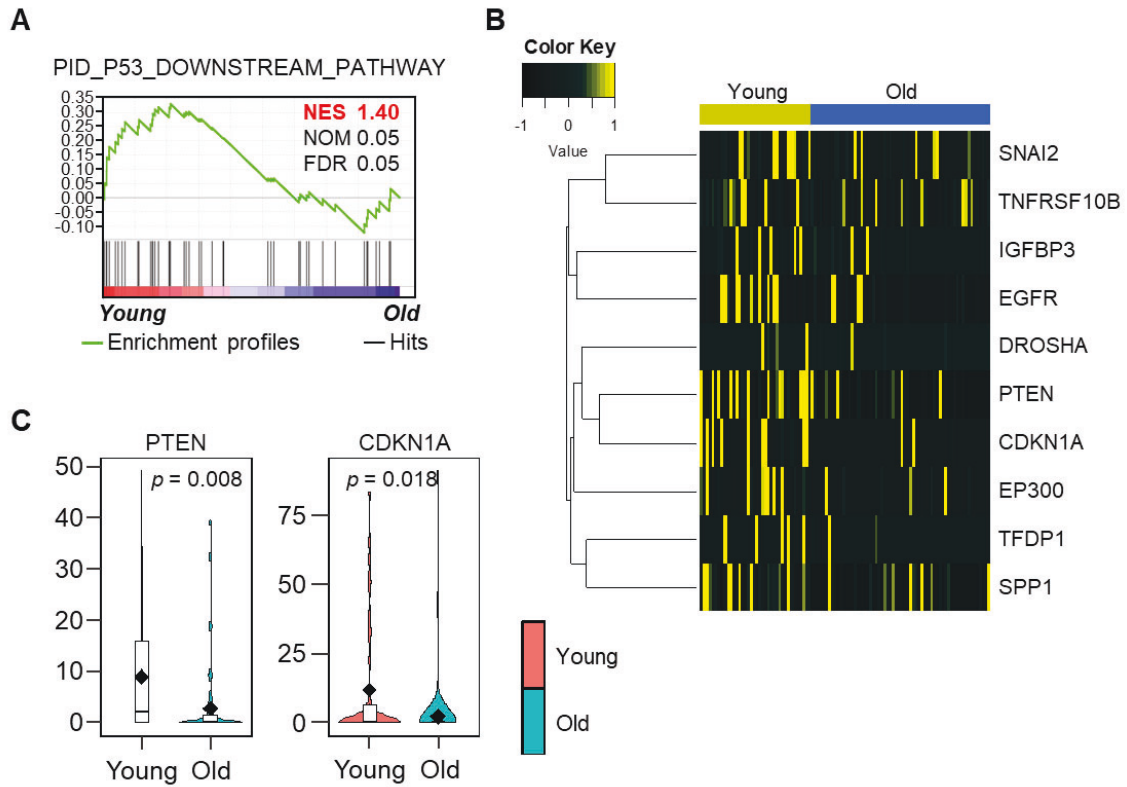
(A) 若齢 (9 週齢) および加齢 (2 年齢) マウスの scRNA-seq 用サンプル調製の手順。

(B) 若齢 (9 週齢) および加齢 (2 年齢) マウス MSC の PCA plot。

(C-D) (B) に示す, PC2 に正に寄与する遺伝子(C)と負に寄与する遺伝子(D)の GO 解析。

(E) 若齢 (9 週齢) および加齢 (2 年齢) マウス MSC の GSVA から得られた 67 個の遺伝子セットのクラスタリングとヒートマップ。X 軸: 若齢マウスと加齢マウスから得られた MSC (それぞれ青色と黄色で示す)。Y 軸: GSVA によって同定した有意に発現変動する遺伝子セット。ヒートマップの色は各細胞における各遺伝子セットの enrichment score を Z-score normalization した値を表し, 年齢によって MSC における遺伝子セットの発現が増加(または減少)することを示している。

(Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用。)



補助図 2.3.1.

(A) 若齢 (9 週齢) および加齢 (2 年齢) マウス MSC における p53 下流経路に関連する遺伝子セットの GSEA plot。

(B) (A) に示す, p53 下流経路に含まれる遺伝子のヒートマップ。X 軸: 若齢マウスと加齢マウスから得られた MSC (それぞれ青色と黄色で示す)。Y 軸: Molecular Signatures Database (MSigDB) から取得した, “PID\_P53 DOWNSTREAM\_PATHWAY” に含まれる遺伝子群の中で, 若齢および加齢 MSC 間で発現変動遺伝子の上位 10 個を示す。ヒートマップの色は各細胞における各遺伝子発現量を Z-score normalization した値を表し, 遺伝子発現の増加(または減少)を示している。

(C) PTEN と CDKN1A の発現量を示す dot plot。scRNA-seq のデータを用いた。

(Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用。)

### 2.3.2 若齢マウスにおける MSC 特異的 p53 欠損はニッチ機能を変化させない

加齢 MSC で p53 シグナルの減弱が確認されたことから, MSC エイジングにおける p53 機能を明らかにするため, MSC 特異的に p53 を欠損するマウス(*Prrx1-Cre(+)::Trp53<sup>fl/fl</sup>; p53<sup>ΔMSC</sup>* マウス) (156)を用いて, MSC の機能解析を行うことにした。まず, p53 欠損によって若齢 MSC のニッチ機能がどのように変化するか調べるため, *Prrx1-Cre(-)::Trp53<sup>fl/fl</sup>; p53<sup>+/+</sup>* マウスおよび *p53<sup>ΔMSC</sup>* マウスにおける MSC の数とニッチ因子の発現を比較した。FACS を用いた解析から, *p53<sup>+/+</sup>* および *p53<sup>ΔMSC</sup>* マウスの MSC の plot や数に変化はなかった(図 2.3.2 A および B)。また, qPCR より, *p53<sup>ΔMSC</sup>* マウスの MSC で p53 の遺伝子発現が低下していることを確認したが, MSC のマーカーの一つである *LepR* や, 代表的なニッチ因子である *CXCL12*, *SCF*, *Vcam1* の発現に大きな差は認められなかった(図 2.3.2 C)。また, FACS を用いて *p53<sup>ΔMSC</sup>* マウスの造血を調べたところ, 骨髄, 脾臓, 胸腺の単核球数, 造血幹/前駆細胞数, 分化血球細胞数や末梢血中の分化血球の割合は *p53<sup>+/+</sup>* マウスと変わらなかった(図 2.3.2 D-H)。さらに, *p53<sup>+/+</sup>* および *p53<sup>ΔMSC</sup>* マウスから採取した HSC の移植後の骨髄再構築能を調べるため骨髄移植実験も行ったが, 末梢血キメリズムに変化はなく, MSC で p53 を欠損していても, HSC は正常な機能を持つことが分かった(図 2.3.2 I および J)。以上の結果より, 若齢 MSC において p53 を欠損しても, ニッチ機能(すなわち HSC 支持能)は変化しないことが明らかとなった。

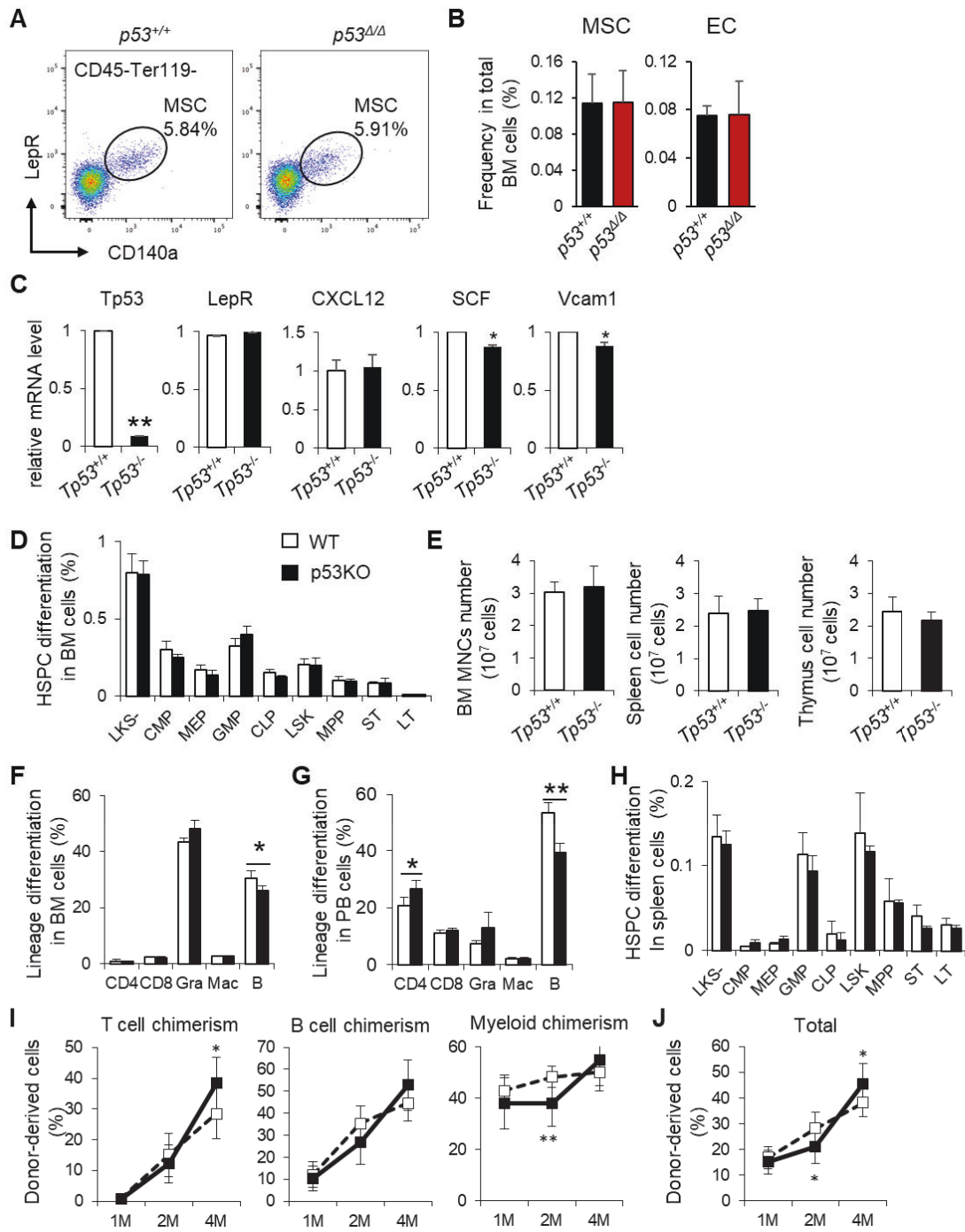


図 2.3.2. 若齢 MSC において p53 を欠損しても正常な造血支持能を維持する

- (A) 若齢  $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウス MSC (CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>LepR<sup>+</sup>CD140a<sup>+</sup>) の FACS plot。
- (B) 若齢  $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウスの MSC および血管内皮細胞 (Endothelial cell; EC, CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>) の割合。
- (C) 若齢  $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウス MSC における, p53, LepR, CXCL12, Vcam1 の発現量。データは  $p53^{+/+}$  MSC に対する相対値で示す (mean  $\pm$  SD, n=4 technical replicates, 10-15w)。
- (D) 若齢  $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウス骨髄における造血幹前駆細胞 (Hematopoietic stem/progenitor cells; HSPCs) の割合 (LKS<sup>-</sup>, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>; CMPs, common myeloid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); GMPs, granulocyte-monocyte progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); CLP, common lymphoid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>Sca-1/c-Kit<sup>lo</sup>); LSK (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>); MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>-</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs) (means  $\pm$  SD, n = 4, 10-15w)。
- (E) 若齢  $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウスの骨髄 (BM), 脾臓 (SP), 胸腺における骨髄単核球数 (means  $\pm$  SD, n = 4, 10-15w)。
- (F-G) 若齢  $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウスの骨髄 (F) と末梢血 (G) 中の分化血球細胞の割合 (B, B220<sup>+</sup> B cells; CD4, CD4<sup>+</sup> T cells; CD8, CD8<sup>+</sup> T cells; Gra, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>hi</sup> Granulocytes; Mac, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>lo</sup> Macrophages) (means  $\pm$  SD, n = 4, 10-15w)。
- (H) 若齢  $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウス脾臓 (SP) 中の造血幹前駆細胞の割合 (LKS<sup>-</sup>, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>; CMPs, common myeloid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>); GMPs, granulocyte-monocyte progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); CLP, common lymphoid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>Sca-1/c-Kit<sup>lo</sup>); LSK (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>); MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>LSKs) (means  $\pm$  SD, n = 9-10, 9w)。
- (I-J) 若齢  $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウスから採取した LT-HSC (Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>LSKs) を移植したレシピエントにおけるドナー由来の末梢血キメリズム (ドナー由来の細胞の割合)。T 細胞, B 細胞, および骨髄球 (Myeloid) のキメリズム (I) と全体のキメリズム (J) を示す (means  $\pm$  SD, n = 9-10, 9w)。
- データは全て 1 回の実験から得られた結果である。\*p < 0.05, \*\*p < 0.01。

### 2.3.3 MSC 特異的 p53 欠損はストレス負荷後のニッチ機能を変化させない

次に p53 を欠損した MSC にストレスを負荷してニッチ機能が変わるかどうか調べた。ストレス負荷モデルとして、亜致死量(4Gy)の放射線を照射したマウスモデル、または中年齢(1 年齢)まで加齢させたマウスモデルを用いて、 $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウスの MSC のニッチ機能の解析を行った。まず FACS を用いた解析から、人工的にストレスを負荷した放射線照射モデルにおいて、 $p53^{+/+}$  マウスでは MSC や血球細胞(Blood cell; BC), 血管内皮細胞(Endothelial cell; EC)などの細胞で一過性に p53 の発現量が上昇すること、 $p53^{AMSC}$  マウスでは MSC でのみ p53 の発現量は低下することが確認された(図 2.3.3 A-C)。この時の MSC のニッチ機能を評価するため、qPCR により *LepR*, *CXCL12*, *Vcam1* の発現を調べたが、p53 の有無によってこれらの発現は変わらなかった(図 2.3.3 D)。また、造血への影響を調べるため、放射線照射後の末梢血中の白血球(WBC), 血小板(PLT), 赤血球(RBC)数や、T 細胞, B 細胞, 骨髄球(Myeloid)数の経時変化を追ったが、コントロールと比較して  $p53^{AMSC}$  マウスで変化はなく、さらに 2 回目の照射(4Gy)後でも造血の回復に  $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウス間で変化は認められなかった(図 2.3.3 E および F)。

次に中年齢まで加齢させたモデルのニッチ機能を調べるため 1 年齢の  $p53^{+/+}$  および  $p53^{AMSC}$  マウスの造血フェノタイプおよび、これらマウスから採取した HSC の骨髄移植後の生着率を解析したが、これも両者の間で変化は認められなかった(補助図 2.3.2)。以上の結果より、ストレス負荷後の MSC のニッチ機能の維持には p53 は関与していないことが明らかとなった。



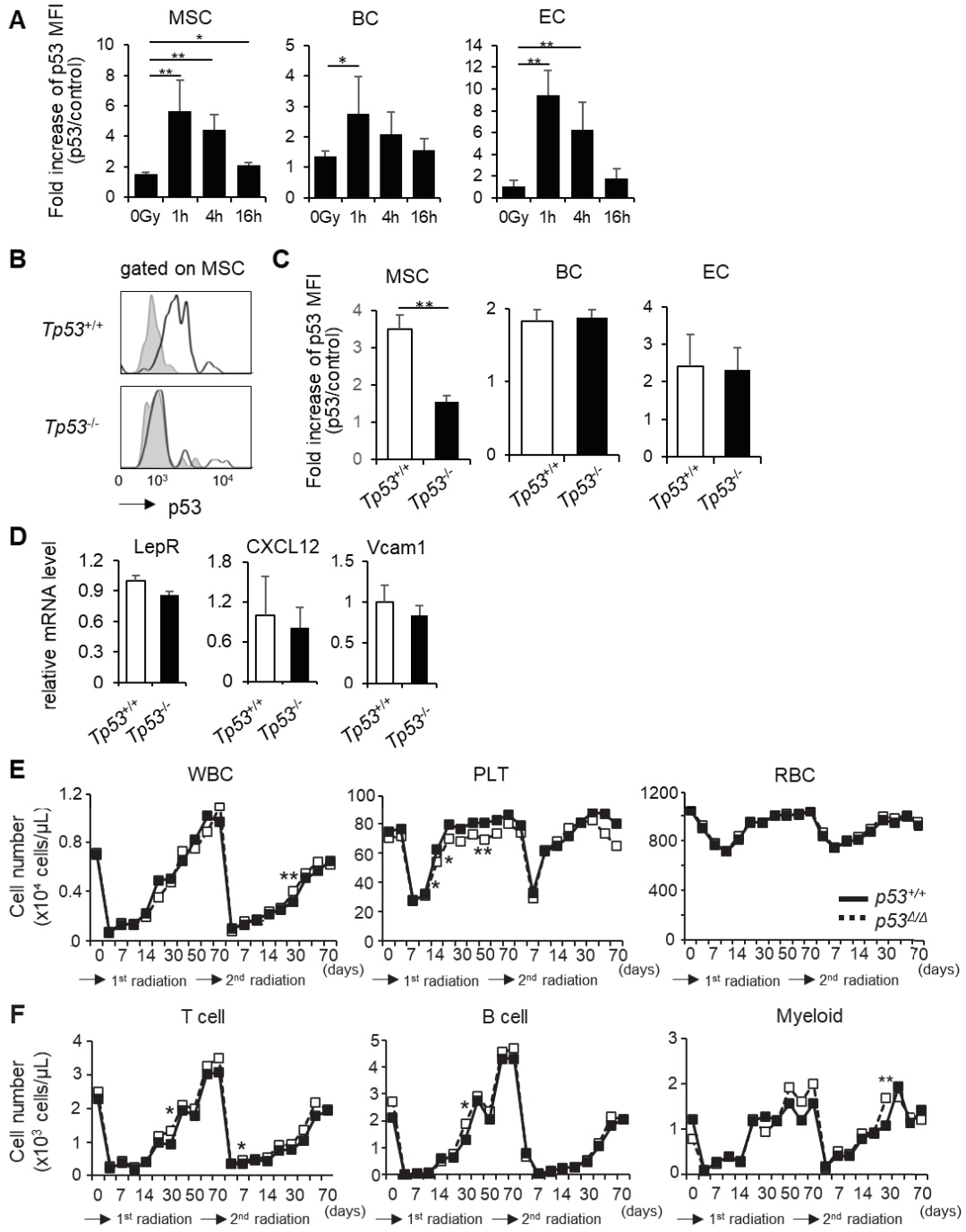


図 2.3.3. p53 欠損 MSC はストレス負荷後も正常なニッチ機能を維持する

(A) C57BL6 マウスへ亜致死量(4Gy)の放射線を照射した後, 1, 4, 16 時間後の MSC (CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD140a<sup>+</sup>LepR<sup>+</sup> MSC), BC (CD45<sup>+</sup> blood cell), EC (CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup> EC)における p53 のタンパク質量。グラフはコントロール(anti-mouse IgG)に対する相対値で示す (mean ± SD, n=5-8 each, 13w)。

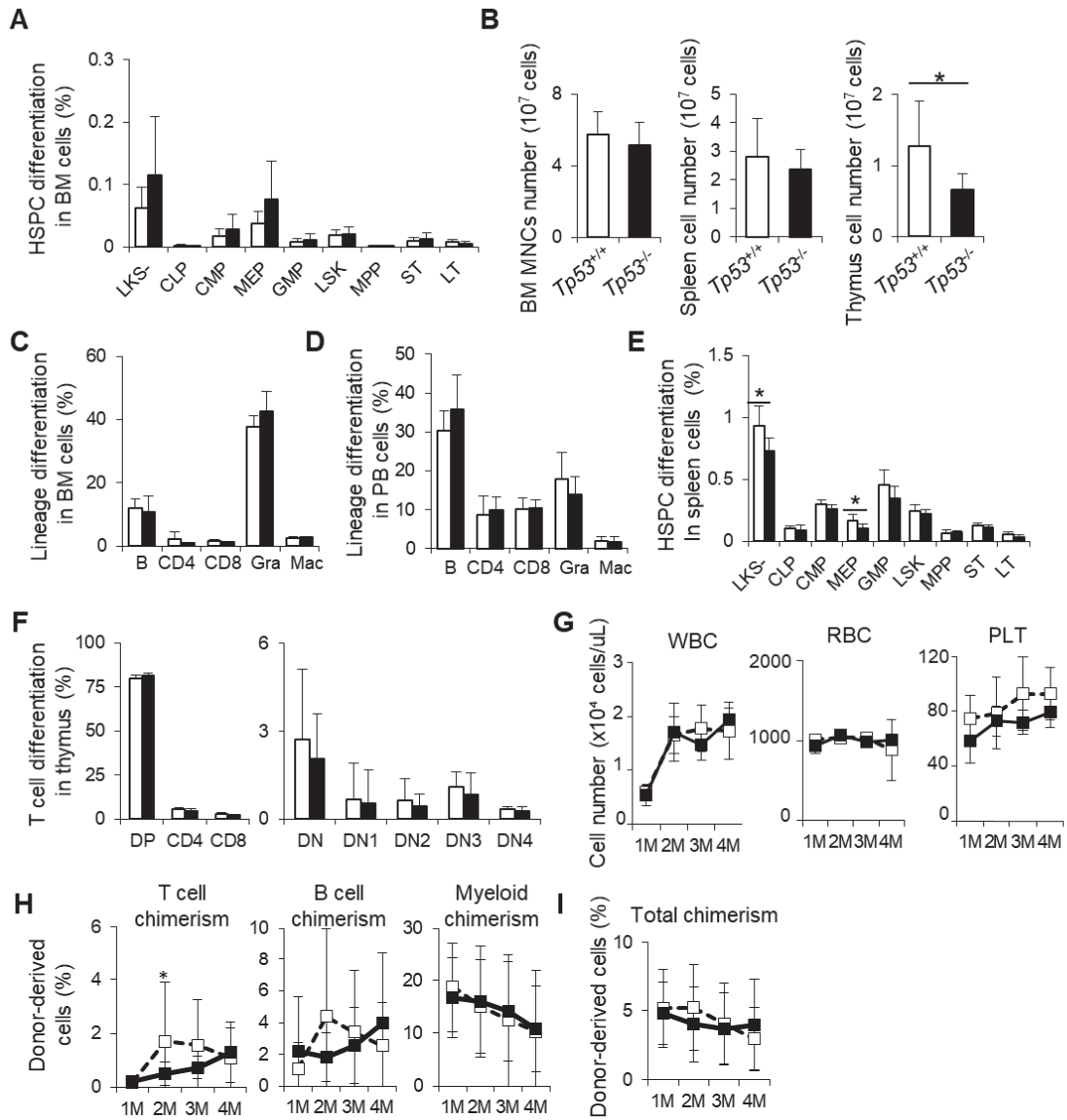
(B-C) 亜致死量(4Gy)の放射線照射後 1 時間の p53<sup>+/+</sup>および p53<sup>ΔMSC</sup> マウスから採取した MSC, BC, EC における p53 のタンパク質量をヒストグラム(B)および棒グラフ(C)で示す。

(D) 亜致死量(4Gy)の放射線照射後 4 時間の p53<sup>+/+</sup>および p53<sup>ΔMSC</sup> マウスの MSC における, LepR, CXCL12, Vcam1 の発現量。データは p53<sup>+/+</sup> MSC に対する相対値で示す (mean ± SD, n = 4 technical replicates, 11w)。

(E) 亜致死量(4Gy)の放射線照射後, p53<sup>+/+</sup>および p53<sup>ΔMSC</sup> マウスから末梢血を経時的に採取し, 白血球 (WBC), 赤血球(RBC), 血小板数(PLT)を測定した。1 度目の放射線照射かた 70 日目に再度放射線(4Gy)を照射し, 同様に末梢血中の白血球, 赤血球, 血小板数を測定した。(n = 9-13, 10-15w)

(F) 亜致死量(4Gy)の放射線照射後, p53<sup>+/+</sup>及び p53<sup>ΔMSC</sup> マウスのから末梢血を経時的に採取し, T 細胞, B 細胞, 骨髄球(Myeloid)の数を測定した。1 度目の放射線照射から 70 日目に再度放射線(4Gy)を照射し, 同様に末梢血中の T 細胞, B 細胞, 骨髄球数を測定した。(n = 9-13, 10-15w)

データは全て 1 回の実験から得られた結果である。\*p < 0.05、\*\*p < 0.01。



### 補助図 2.3.2.

(A) 1 年齢の  $p53^{+/+}$  および  $p53^{4MSC}$  マウス骨髄における造血幹前駆細胞 (Hematopoietic stem/progenitor cells; HSPCs) の割合 (LKS<sup>-</sup>, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>; CMPs, common myeloid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); GMPs, granulocyte-monocyte progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); CLP, common lymphoid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>lo</sup>); LSK (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>); MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, CD34<sup>-</sup>Flt3<sup>-</sup>LSKs) (means  $\pm$  SD, n = 4, 47-59w)。

(B) 1 年齢の  $p53^{+/+}$  および  $p53^{4MSC}$  マウスの骨髄(BM), 脾臓(SP), 胸腺における骨髄単核球数(means  $\pm$  SD, n = 4, 47-59w)。

(C-D) 1 年齢の  $p53^{+/+}$  および  $p53^{4MSC}$  マウスの骨髄 (C) と末梢血 (D) 中の分化血球細胞の割合(B, B220<sup>+</sup> B cells; CD4, CD4<sup>+</sup> T cells; CD8, CD8<sup>+</sup> T cells; Gra, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>hi</sup> Granulocytes; Mac, Mac-1<sup>+</sup>Gr-1<sup>lo</sup> Macrophages) (means  $\pm$  SD, n = 4, 47-59w)。

(E) 1 年齢の  $p53^{+/+}$  および  $p53^{4MSC}$  マウス脾臓(SP)中の造血幹前駆細胞の割合(LKS<sup>-</sup>, Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>; CMPs, common myeloid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); GMPs, granulocyte-monocyte progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>); CLP, common lymphoid progenitors (Lin<sup>-</sup>IL7R $\alpha$ <sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup>c-Kit<sup>lo</sup>); LSK (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>); MPPs, Multipotent progenitors (CD34<sup>+</sup>Flt3<sup>+</sup>LSKs); ST-HSCs, Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>-</sup>LSKs; LT-HSCs, Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>LSKs) (means  $\pm$  SD, n = 4, 47-59w)。

(F) 1 年齢の  $p53^{+/+}$  および  $p53^{4MSC}$  マウス胸腺における分化血球細胞の割合 (DN, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double negative cells; DP, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> double positive cells; CD4, CD4<sup>+</sup> T cells; CD8, CD8<sup>+</sup> T cells; DN1, CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> DN cells; DN2, CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> DN cells; DN3, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> DN cells; DN4, CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> DN cells) (means  $\pm$  SD, n = 4, 47-59w)。

(G) 1 年齢の  $p53^{+/+}$  および  $p53^{4MSC}$  マウスから採取した LT-HSC (Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>LSKs) を移植したレシピエントにおける白血球(WBC), 赤血球(RBC), 血小板(PLT)の細胞数(means  $\pm$  SD, n = 7-21)。

(H-I) 1 年齢の  $p53^{+/+}$  および  $p53^{4/4}$  マウスから採取した LT-HSC (Flt3<sup>-</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>LSKs) を移植したレシピエントにおけるドナー由来の末梢血キメリズム(ドナー由来の細胞の割合)。T 細胞, B 細胞, および骨髄球(Myeloid)のキメリズム(H)と全体のキメリズム (I)を示す (means  $\pm$  SD, n = 7-21)。

データは全て 1 回の実験から得られた結果である。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

### 2.3.4 MSC 特異的 p53 欠損は MSC 由来の未分化軟部腫瘍(USTS)の発症を誘導する

MSC 特異的に p53 を欠損したマウスは正常な HSC ニッチ機能を維持していたため、次にニッチ機能以外の(組織幹細胞としての)MSC の機能を調べることにした。組織幹細胞は腫瘍の起源細胞としても責任を担うことがあり、MSC における p53 の欠損は悪性の骨肉腫の発症を誘導することが報告されている(142, 143)。以前の報告とも一致して、本研究で用いた  $p53^{MSC}$  マウスも高い死亡率を示し、加齢とともに腫瘍の自然発症を認めた(図 2.3.4 A)。発症した腫瘍の大部分は主に四肢に発生し、多発性および結節性の固形腫瘍であった(図 2.3.4 B)。組織学的な観察結果より、腫瘍は楕円形または異型の巨大核を持つ紡錘形および多角形の細胞から構成されており(図 2.3.4 C-F)、腫瘍組織全体に融資分裂中の細胞が高頻度に存在し、壊死巣も観察された(図 2.3.4 C-E)。腫瘍細胞は筋線維、真皮、潰瘍化を伴う表皮、脂肪組織、神経などの正常組織や静脈に浸潤していた(図 2.3.4 G-H)。さらに免疫組織学的解析より、本マウスモデルで発症した腫瘍は間葉系細胞マーカーである Vimentin がびまん性に陽性である、内皮細胞マーカーである CD31 や alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA), S100 calcium-binding protein A4 (S100A4)などの組織マーカー陰性であった(図 2.3.4 I および data not shown) (164-167)。以上の病理組織学的および免疫組織学的所見から、 $p53^{MSC}$  マウスに発症した腫瘍の大部分(8割)は未熟な間葉系細胞から構成される未分化多形肉腫(Undifferentiated soft tissue sarcoma; USTS)であると診断された(図 2.3.4 J)。残りの 20%の腫瘍には骨肉腫を含む他のタイプの腫瘍も確認できた(図 2.3.4 J-M)。以上より、p53 は USTS などの MSC を起源とする肉腫発症の抑制に重要であることが示された。

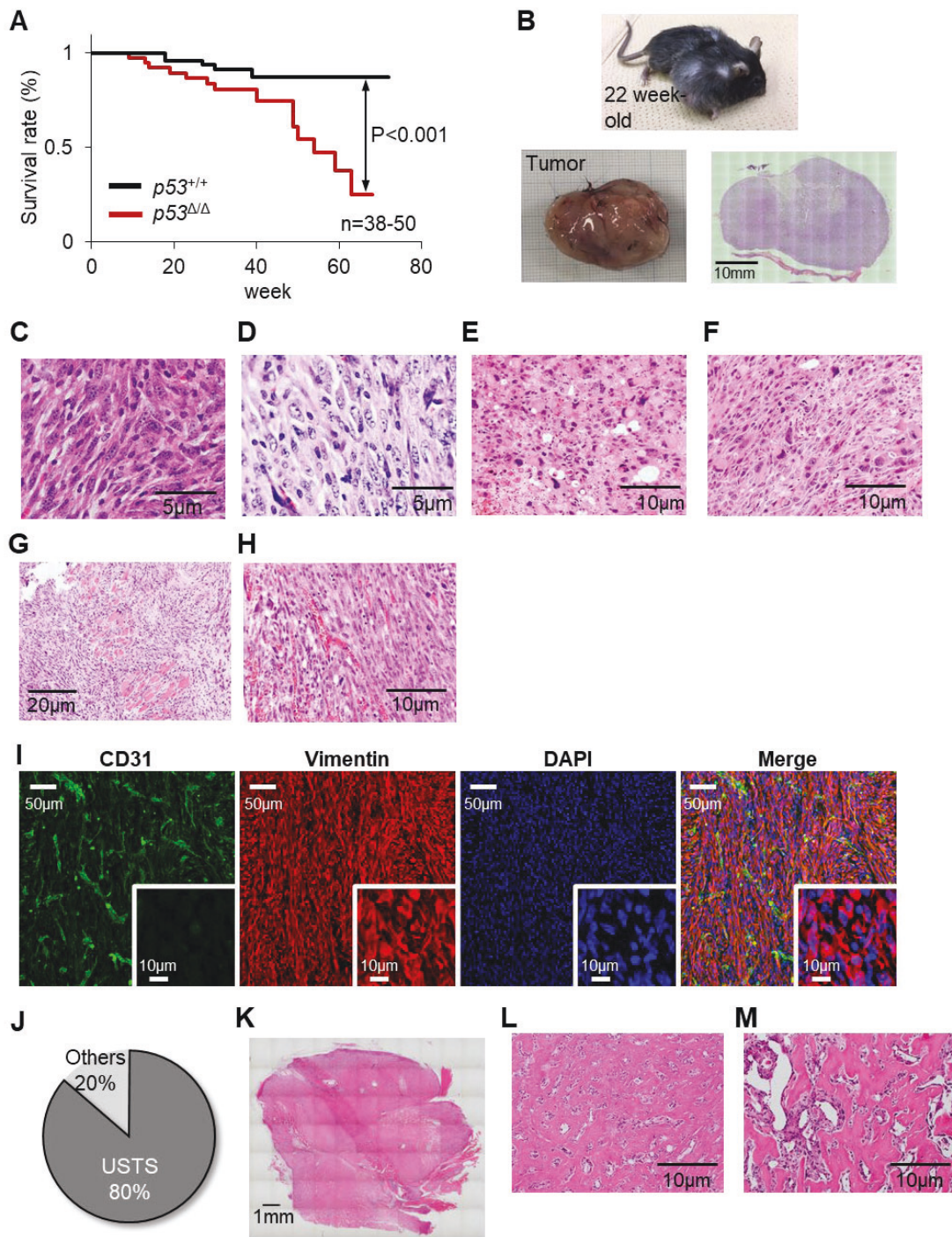


図 2.3.4. MSC 特異的 p53 欠損マウスは高頻度に未分化多形肉腫(USTS)を発症する

(A)  $p53^{+/+}$ および  $p53^{ΔMSC}$  マウスの生存曲線 (n = 38-50)。

(B) 右側前肢に USTS を発症した  $p53^{ΔMSC}$  マウス(22w) (上段)および切り出した  $p53^{ΔΔ}$  USTS の写真と HE 染色画像(下段)。

(C-H)  $p53^{ΔMSC}$  マウスに発症した USTS の組織学的解析画像。

(I)  $p53^{ΔΔ}$  USTS の凍結切片の免疫組織学的解析画像。抗 CD31 抗体(緑)および抗 Vimentin 抗体(赤)で染色した組織切片を示す。核は DAPI(青)で染色した。

(J)  $p53^{ΔMSC}$  マウスに発症した腫瘍の割合 (n=10)。

(K-M)  $p53^{ΔMSC}$  マウスに発症した骨肉腫の組織学的解析画像。

(Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用。)

### 2.3.5 p53 欠損 MSC は細胞周期と代謝活性が亢進する

組織幹細胞の腫瘍化には分化能や増殖能の変化, 代謝状態, 遺伝子発現変化など様々な腫瘍化前段階の細胞の性質変化が知られている。そこで p53 欠損が MSC の組織幹細胞としての機能をどのように制御するのかを明らかにするため,  $p53^{+/+}$  および  $p53^{\Delta MSC}$  マウス MSC のこれらの機能や遺伝子発現を調べた。増殖マーカーである Ki67 と Hoechst33342 を用いた FACS 解析より,  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC ではコントロールに比較して G0 期(静止期)に存在する細胞の割合が低く, SG2M 期(分裂期)に存在する割合が多く, 細胞周期が亢進していることが確認された(図 2.3.5 A-B および補助図 2.3.3 A)。また, p53 を欠損していない血管内皮細胞 (CD31<sup>+</sup> EC) や血球細胞(CD45<sup>+</sup> BC) といったその他の細胞分画では細胞周期の亢進は見られず, MSC 特異的な現象であることを確認した(補助図 2.3.3 B および C)。次に,  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC の増殖能を調べるため,  $p53^{+/+}$  および  $p53^{\Delta MSC}$  マウスから採取した MSC を *in vitro* で培養して増殖アッセイを行ったところ,  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC は  $p53^{+/+}$  MSC と比べて顕著に増殖能が亢進していた(図 2.3.5 C)。幹細胞では代謝の変化が増殖能と関連することが知られているため, seahorse XF analyzer を用いてミトコンドリア呼吸能と解糖系活性を調べた。その結果, ミトコンドリア呼吸能を反映する酸素消費速度(Oxygen consumption rate; OCR)および解糖系活性を反映する細胞外酸性化速度(Extracellular acidification rate; ECAR)の値はどちらもコントロールと比べて  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC で有意に上昇していた(図 2.3.5 D-F)。

次に, p53 欠損が MSC の遺伝子発現に及ぼす影響を調べるため  $p53^{+/+}$  MSC,  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC, および  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC 由来 USTS 細胞の bulk の RNA sequence (RNA-seq)を行った。PCA の結果,  $p53^{\Delta/\Delta}$  USTS は  $p53^{+/+}$  または  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC とは明らかに異なる遺伝子発現プロファイルを示した(補助図 2.3.3 D)。これらの集団を最も明確に分離する PC1 を構成する遺伝子群の GO 解析の結果, 走化性シグナルやケモカインシグナルに関連する遺伝子群が PC1 に正に寄与し, 免疫応答や脂質輸送に関連する遺伝子群が負に寄与していた(補助図 2.3.3 E-F)。また, GSVA を行い  $p53^{+/+}$  MSC,  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC, および  $p53^{\Delta/\Delta}$  USTS の 3 群間で有意に発現変動する遺伝子を同定した(補助図 2.3.3 G-L)。DNA 修復関連の遺伝子発現は  $p53^{+/+}$  MSC と比較して  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC で有意に低下しており, p53 が MSC における DNA 損傷修復やゲノム安定性に機能的に重要であることが示唆された(補助図 2.3.3 G および J)。  $p53^{\Delta/\Delta}$  USTS では KRAS シグナルや MYC シグナルなどの増殖シグナルが  $p53^{+/+}$  MSC や  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC と比較して発現上昇していた(補助図 2.3.3 H-I および K-L)。さらに, GSEA の結果から酸化的リン酸化および細胞周期に関連する遺伝子セットの発現が  $p53^{+/+}$  MSC と比較して  $p53^{\Delta/\Delta}$  MSC で有意に上昇していることも示された(補助図 2.3.3 M および N)。以上より, MSC において, p53 が代謝活性化, 細胞周期の亢進, および腫瘍形成を抑制して MSC の幹細胞性や静止期性を維持することが明らかとなった。



### 2.3.6 p53 欠損 MSC は脂肪細胞への分化が抑制され、幹細胞性の低下を示す

幹細胞における代謝プログラミングは、細胞周期の状態だけでなく、分化能や未分化性にも影響を及ぼす(168, 169)。そこで、 $p53^{ΔΔ}$  MSC の分化能を調べるため、*in vitro* で分化アッセイを行った。その結果、 $p53^{+/+}$ MSC と比べて  $p53^{ΔΔ}$  MSC では脂肪分化の抑制および骨分化の亢進が認められた(図 2.3.5 G-H)。また、 $\mu$ CT を用いて  $p53^{+/+}$ および  $p53^{\Delta MSC}$  マウスの大腿骨の骨量を測定したところ、若齢では両者の間に違いは見られない一方で、中年齢(31-45 週齢)マウスでは  $p53^{+/+}$ マウスに比べて  $p53^{\Delta MSC}$  マウスで骨量が有意に増加していた(図 2.3.5 I-K)。さらに既報(9, 15)を参考に、 $CXCL12^{\text{high}}SCF^{\text{high}}$  MSC で高発現する遺伝子から”COMMON MSC markers”を作成し GSEA を行ったところ、これら遺伝子セットの発現は  $p53^{+/+}$ MSC と比べて  $p53^{\Delta Δ}$  MSC で有意に低下し、 $p53^{\Delta Δ}$  USTS ではさらに発現低下することが示された(図 2.3.5 L-N)。これらの結果より、p53 は代謝や増殖能だけでなく、MSC の分化能と幹細胞性の維持にも重要であることが示唆された。

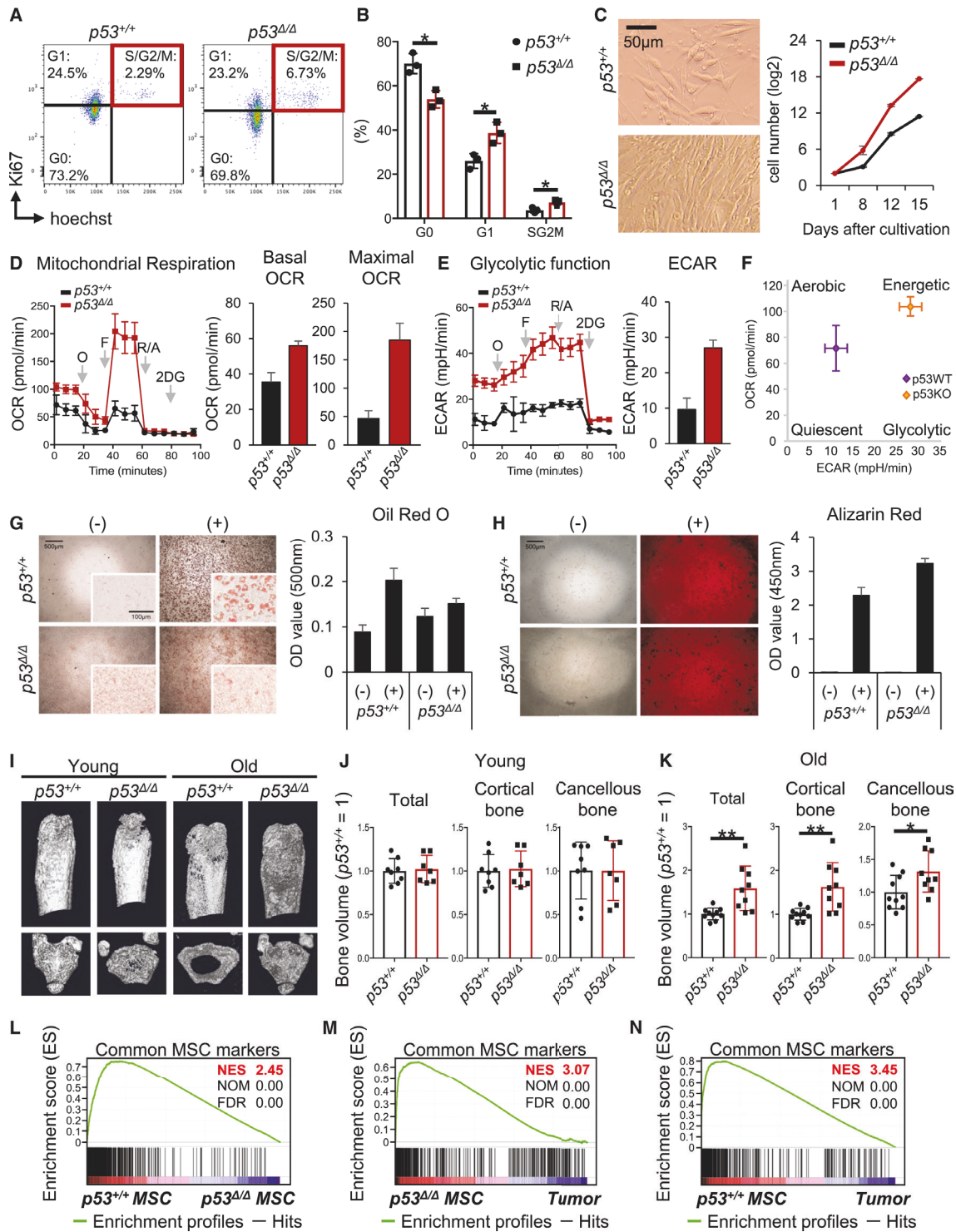


図 2.3.5. p53 欠損 MSC は細胞周期の亢進, 脂肪分化抑制, 幹細胞マーカーの発現低下を示す

(A-B)  $p53^{+/+}$  および  $p53^{ΔMSC}$  マウスの MSC(CD45<sup>+</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD140a<sup>+</sup>LepR<sup>+</sup>)における Ki67 と Hoechst33342 を用いた細胞周期解析。代表的な FACS plot (A) および細胞周期の各段階にある MSC の割合 (B) を示す (mean±SD, n = 3, 36w; データは 1 回の実験から得られた結果を示す)。

(C)  $p53^{+/+}$  および  $p53^{ΔMSC}$  マウスから採取した MSC の *in vitro* 増殖アッセイ。培養後 8 日目の  $p53^{+/+}$  および  $p53^{ΔΔ}$  MSC の代表的な画像 (左) および増殖曲線 (右)。データは 1 日目の細胞数に対する倍数で示す (n = 1; データは 3 回の独立した実験から得られた結果のうち, 代表的なものを示す)。

(D-F)  $p53^{+/+}$  および  $p53^{ΔMSC}$  マウスから採取した MSC の Seahorse XF mitochondria stress test。OCR (D) および ECAR (E) を測定した。Basal OCR と maximal OCR は Seahorse に記載されている計算方法にしたがって算出した。Energy map を (F) に示す (mean±SD, n = 4-5, technical replicate; データは 2 回の独立した実験から得られた結果のうち, 代表的なものを示す)。

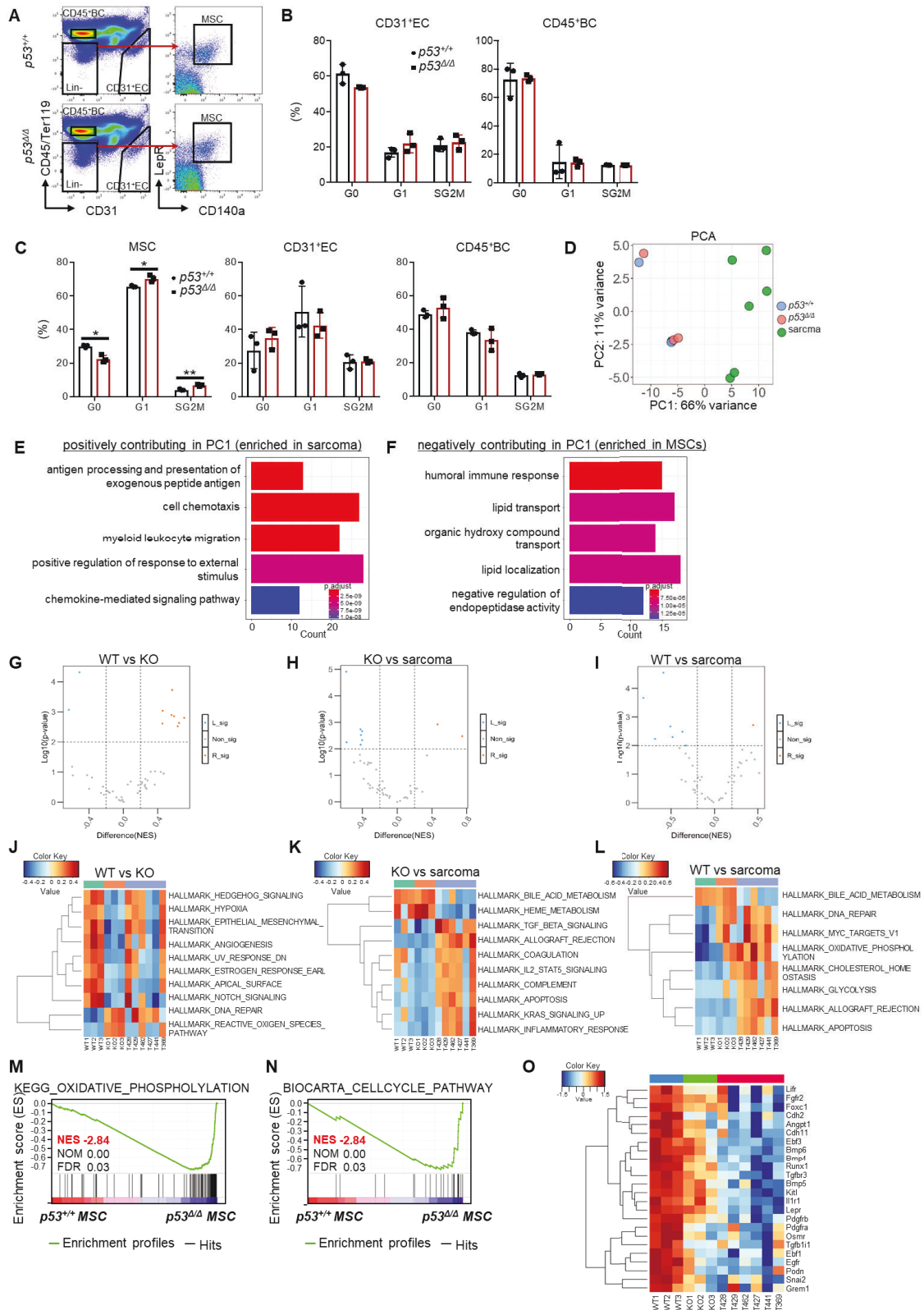
(G)  $p53^{+/+}$  および  $p53^{ΔMSC}$  マウスから採取した MSC の脂肪分化アッセイ。Oil red O 染色 (左) と吸光度測定により定量化したグラフ (右) を示す (mean±SD, n = 3, technical replicate)。

(H)  $p53^{+/+}$  および  $p53^{ΔMSC}$  マウスから採取した MSC の骨分化アッセイ。Alizarin red 染色 (左) と吸光度測定により定量化したグラフ (右) を示す (mean±SD, n = 3, technical replicate)。

(I-K) 若齢 (8-13w) および中年齢 (31-45w) の  $p53^{+/+}$  および  $p53^{ΔMSC}$  マウスの大腿骨頭部の 3 次元再構成  $\mu$ CT 画像 (上: 縦断面図, 下: 軸方向断面図) (I)。若齢 (J) および高齢 (K) の骨量は, 成長板から 0.5mm 近位の位置にある厚さ 1mm の骨量を計測して算出した (mean±SD, n = 7-8; データは 2 回の独立した実験結果をまとめて示す)。

(L-N)  $p53^{+/+}$  MSC vs  $p53^{ΔΔ}$  MSC (L),  $p53^{ΔΔ}$  MSC vs  $p53^{ΔΔ}$  USTS (M),  $p53^{+/+}$  MSC vs  $p53^{ΔΔ}$  USTS (N) における MSC マーカー遺伝子セットの GSEA plot。

(Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用。)



### 補助図 2.3.3.

(A)  $p53^{+/+}$ および  $p53^{AMSC}$  マウスの MSC(CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD140a<sup>+</sup>LepR<sup>+</sup>)および EC(CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>)の FACS plot。

(B)  $p53^{+/+}$ および  $p53^{AMSC}$  マウスの blood cell (BC, CD45<sup>+</sup>)および EC(CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>)における Ki67 と Hoechst33342 を用いた細胞周期解析 (mean±SD, n = 3, 36w; データは3回の独立した実験から得られた結果のうち、代表的なものを示す)。

(C) 若齢  $p53^{+/+}$ および  $p53^{AMSC}$  マウスの MSC(CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD140a<sup>+</sup>LepR<sup>+</sup>), blood cell (BC, CD45<sup>+</sup>)および EC(CD45<sup>-</sup>Ter119<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>)における Ki67 と hoechst33342 を用いた細胞周期解析 (mean±SD, n = 3, 8w; データは1回の実験から得られた結果を示す)。

(D)  $p53^{+/+}$  MSC,  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC, および  $p53^{\Delta\Delta}$  USTS の PCA plot。

(E-F) (D)に示す, PC1 に正に寄与する遺伝子(E)と負に寄与する遺伝子(F)の GO 解析。

(G-I)  $p53^{+/+}$  MSC,  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC, および  $p53^{\Delta\Delta}$  USTS の GSVA の結果を表す volcano plot。オレンジおよび青のドットは  $p53^{+/+}$  MSC vs  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC (G),  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC vs  $p53^{\Delta\Delta}$  USTS (H),  $p53^{+/+}$  MSC vs  $p53^{\Delta\Delta}$  USTS (I) においてそれぞれ有意に発現が上昇または低下した遺伝子セットを示す。

(J-L) (G-I)に示す,  $p53^{+/+}$  MSC vs  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC (J),  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC vs  $p53^{\Delta\Delta}$  USTS (K),  $p53^{+/+}$  MSC vs  $p53^{\Delta\Delta}$  USTS (L)で発現が有意に変動する遺伝子セットをヒートマップで示す。X軸:  $p53^{+/+}$  MSC,  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC, および  $p53^{\Delta\Delta}$  USTS の各細胞 (それぞれ緑色, 赤色, 青色で示す)。Y軸: GSVA によって同定した有意に発現変動する遺伝子セット。ヒートマップの色は各細胞における各遺伝子セットの enrichment score を Z-score normalization した値を表し, 各細胞において遺伝子セットの発現が増加(または減少)することを示している。

(M-N)  $p53^{+/+}$  MSC および  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC における酸化的リン酸化(O)または細胞周期経路に関連する遺伝子セットの GSEA plot。

(O)  $p53^{+/+}$  MSC,  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC, および  $p53^{\Delta\Delta}$  USTS における MSC マーカー遺伝子の発現(図 2.3.5 に対応)をヒートマップで示す。X軸:  $p53^{+/+}$  MSC,  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC, および  $p53^{\Delta\Delta}$  USTS の各細胞 (それぞれ青色, 緑色, 赤色で示す)。Y軸: 図 2.3.5 に示す, “COMMON MSC markers”に含まれる遺伝子群の中で,  $p53^{+/+}$  MSC,  $p53^{\Delta\Delta}$  MSC,  $p53^{\Delta\Delta}$  USTS の順で発現が低下する代表的な遺伝子を示す。ヒートマップの色は各細胞における各遺伝子発現量を Z-score normalization した値を表し, 遺伝子発現の増加(または減少)を示している。

(Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用。)

### 2.3.7 p53<sup>ΔMSC</sup> マウス由来 USTS はヒトの軟部腫瘍(STS)と類似した遺伝子発現プロファイルを示す

p53<sup>ΔMSC</sup> マウスは高頻度に USTS を発症することが分かったため、これがヒトの軟部腫瘍 (Soft tissue sarcoma; STS) のモデルとして有用かどうか検証することにした。そのため、腫瘍細胞の遺伝子発現および遺伝子変異の類似性という 2 つの観点から本マウスモデル由来の USTS とヒト STS で比較を行った。

まず遺伝子発現の類似性を調べるため、National Cancer Institute (NCI) の Genomic Data Commons (GDC) data portal から 117 検体のヒト肉腫サンプルの RNA-seq data を入手した。この遺伝子発現データは病理組織学的に分類された 6 種類の STS サンプルから構成されていた: 線維腫性新生物 (fibromatous neoplasm; Fib), 筋腫性新生物 (Myomatous neoplasm; Myo), 脂肪腫性新生物 (Lipomatous neoplasm; Lipo), 滑膜性新生物 (Synovial neoplasm; Syn), 神経鞘腫瘍 (Nerve sheath tumor; Nerve), その他特定の組織形に分類されない軟部組織腫瘍 (soft tissue tumor not otherwise specified; NOS)。これらのヒトのデータを用いて、遺伝子発現プロファイルと p53 の遺伝子変異の有無という 2 つの観点から各肉腫サブタイプの特徴を調べた(図 2.3.6 A)。その結果, NOS, Fib, Lipo は組織学的には異なる肉腫サブタイプに分類されているが, 他 3 つのサブタイプと比較すると遺伝子発現プロファイルが類似していることが分かった(図 2.3.6 A)。p53 は Fib, Myo, NOS のサンプルで高頻度に変異していた(図 2.3.6 A および B)が, p53 変異の有無によって肉腫の遺伝子発現プロファイル进行分类することはできなかった(補助図 2.3.4 A-D)。ここで, ヒト肉腫で高く発現する遺伝子が, 本マウスモデル由来の p53<sup>ΔΔ</sup> USTS でも発現するのかを調べるために, ヒトの各肉腫のサブタイプで高発現する遺伝子について, p53<sup>+/+</sup> MSC, p53<sup>ΔΔ</sup> MSC, および p53<sup>ΔΔ</sup> USTS の 3 群間で GSEA を行った。その結果, ヒトの Fib もしくは NOS で高発現する遺伝子群は p53<sup>+/+</sup> MSC と比較して p53<sup>ΔΔ</sup> USTS でも有意に発現が上昇していることが分かった(図 2.3.6 C)。一方で, Myo や Syn で発現上昇する遺伝子は得に p53<sup>ΔΔ</sup> USTS での発現上昇を認めなかった(data not shown)。p53<sup>+/+</sup> MSC と比べて, p53<sup>ΔΔ</sup> MSC では NOS で高発現する遺伝子の発現が有意に上昇することもわかった(補助図 2.3.4 E-H)。個別の遺伝子について調べたところ, integrin alpha M (ITGAM) や S100 calcium binding protein A10 (S100A10) などの遺伝子は, p53<sup>+/+</sup> MSC と比べて p53<sup>ΔΔ</sup> MSC で発現が上昇傾向にあった(図 2.3.6 D および E)。p53<sup>ΔΔ</sup> MSC は MSC に特徴的な遺伝子発現が低下する(図 2.3.5 L-N)ことから, p53<sup>ΔΔ</sup> MSC は遺伝子発現プロファイル上, MSC の性質を喪失し, 腫瘍特性の一部を獲得していると考えられる。以上より, 本マウスモデル由来の p53<sup>ΔΔ</sup> USTS とヒトの一部の肉腫サブタイプは類似した遺伝子発現プロファイルを示し, さらに腫瘍化前段階にある p53<sup>ΔΔ</sup> MSC が既にこれらの腫瘍特性の一部を獲得していることが示唆された。

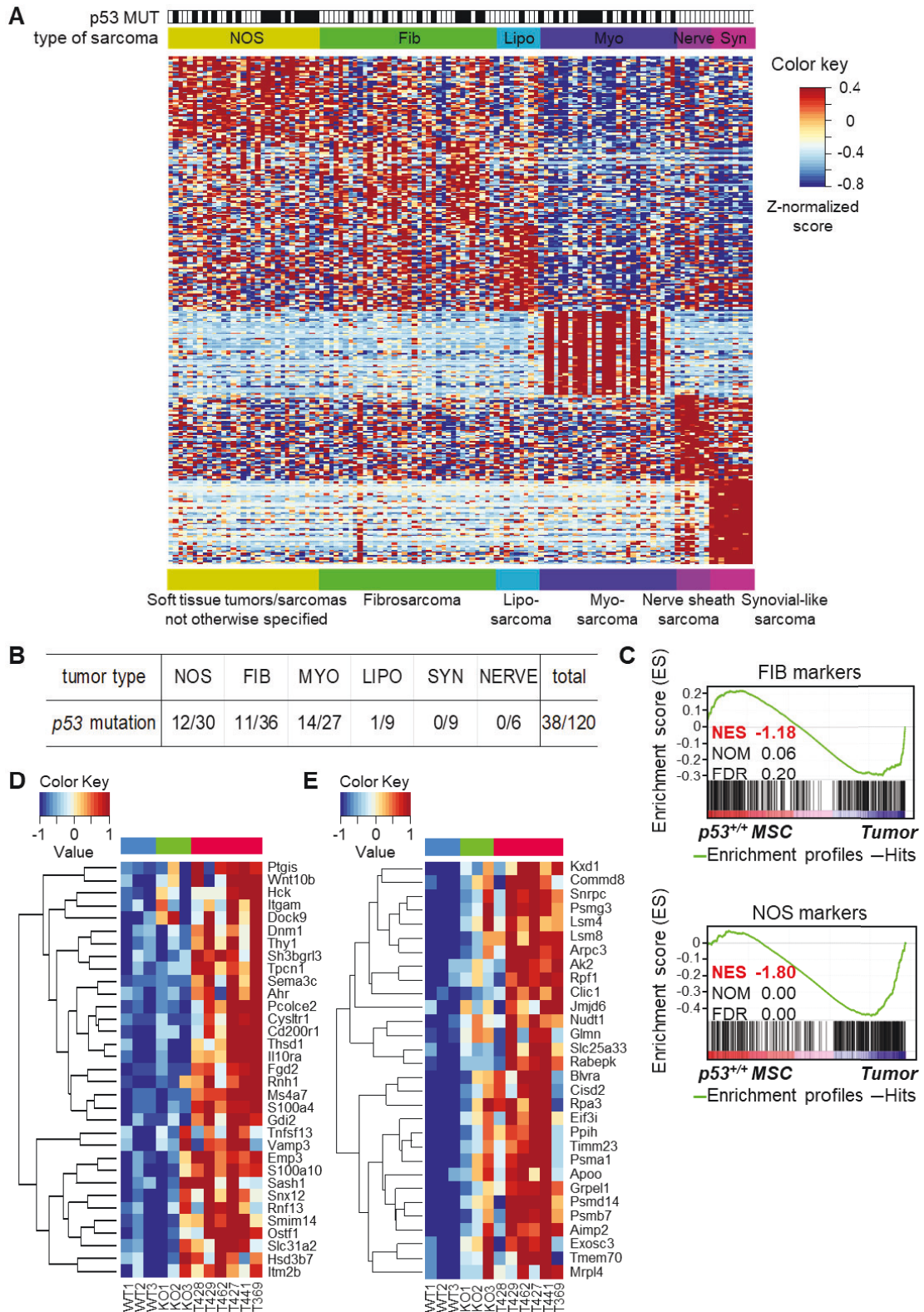


図 2.3.6. p53<sup>ΔΔ</sup> USTS はヒト STS に類似した遺伝子発現プロファイルを示す

(A) 組織学的に分類されたヒトの 6 種類の肉腫でそれぞれ発現の高い遺伝子上位 100 個ずつをヒートマップに示す。データは National Cancer Institute of Health (NIH) の Genomic Data Commons (GDC) data portal から取得したものをを使用した。X 軸: NCI の GDC Data Portal から得られた肉腫サンプルを示す。各サンプルの組織学的分類と p53 変異の有無(白:野生型, 黒:p53 変異型)も示す。Y 軸: 各肉腫で有意に発現上昇する遺伝子 top50 を示す。ヒートマップの色は各細胞における各遺伝子発現量を Z-score normalization した値を表し, 遺伝子発現の増加(または減少)を示している。

(B) 肉腫のサブタイプごとの p53 変異の含有率。

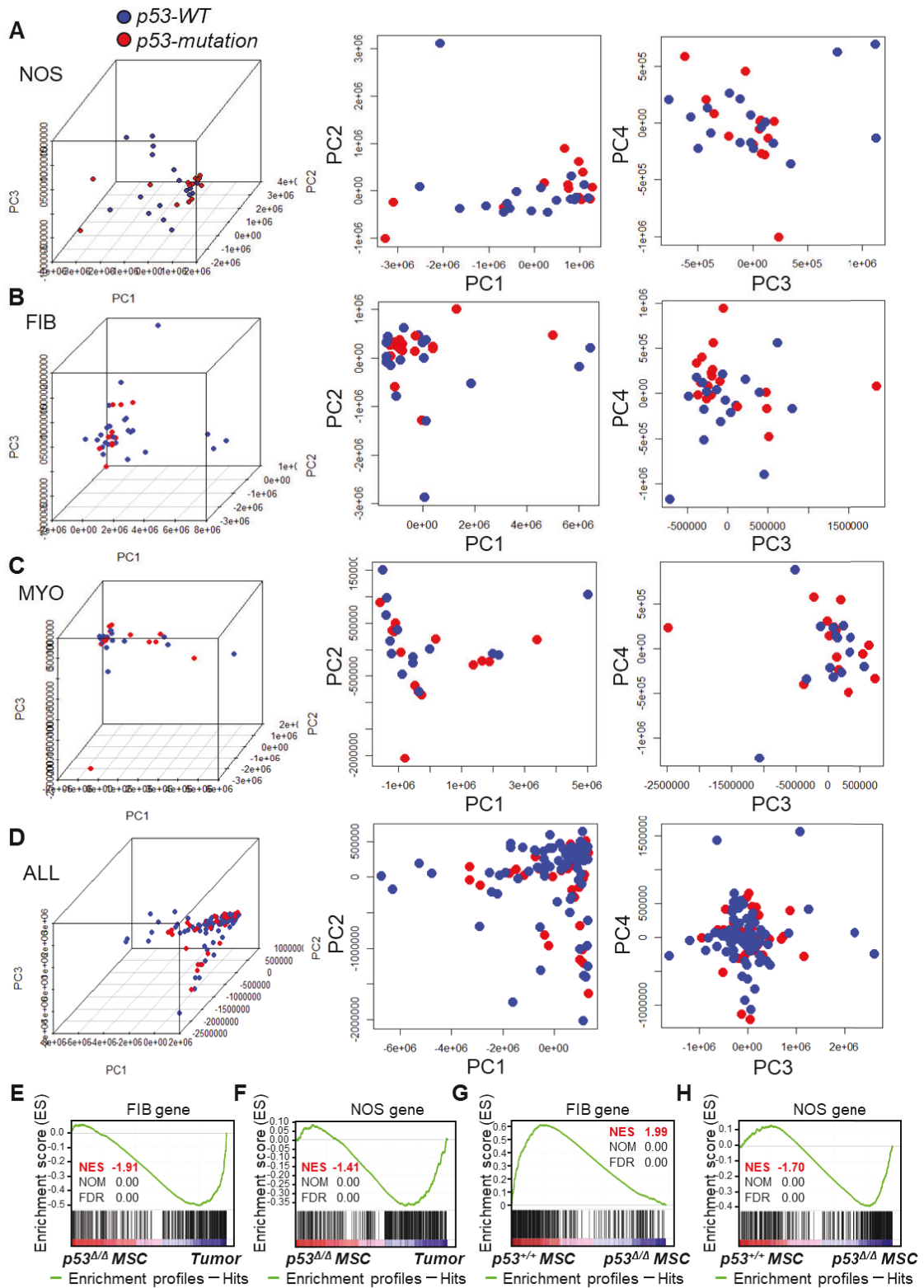
(C) p53<sup>+/+</sup> MSC, p53<sup>ΔΔ</sup> MSC, および p53<sup>ΔΔ</sup> USTS における, 肉腫のサブタイプのうち Fib および NOS に特徴的な遺伝子セットの GSEA plot。

(D-E) p53<sup>+/+</sup> MSC, p53<sup>ΔΔ</sup> MSC, および p53<sup>ΔΔ</sup> USTS における, 肉腫のサブタイプのうち Fib (D) および NOS (E) に特徴的な遺伝子セットの発現をヒートマップで示す。

p53<sup>+/+</sup> MSC, p53<sup>ΔΔ</sup> MSC, および p53<sup>ΔΔ</sup> USTS の各細胞 (それぞれ青色, 緑色, 赤色で示す)。Y 軸: Fib および NOS に特徴的な遺伝子の発現量を Z-score normalization した値を表し, 遺伝子発現の増加(または減少)を示している。

(Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用。)





補助図 2.3.4.

(A-D) p53 野生型および変異型のヒト STS の遺伝子発現プロファイルを 3 次元(左)または 2 次元(真ん中, 右)の PCA plot で示す。NOS, soft tissue tumor not otherwise specified (A); Fib, Fibromatous neoplasm (B), Myo, Myomatous neoplasm (C); All, NOS, Fib, Lipo, Myo 全サンプルを統合したもの (D)を示す。

(E-H) p53<sup>+/+</sup> MSC, p53<sup>ΔΔ</sup> MSC, および p53<sup>ΔΔ</sup> USTS における Fib または NOS に特徴的な遺伝子セットの GSEA plot。

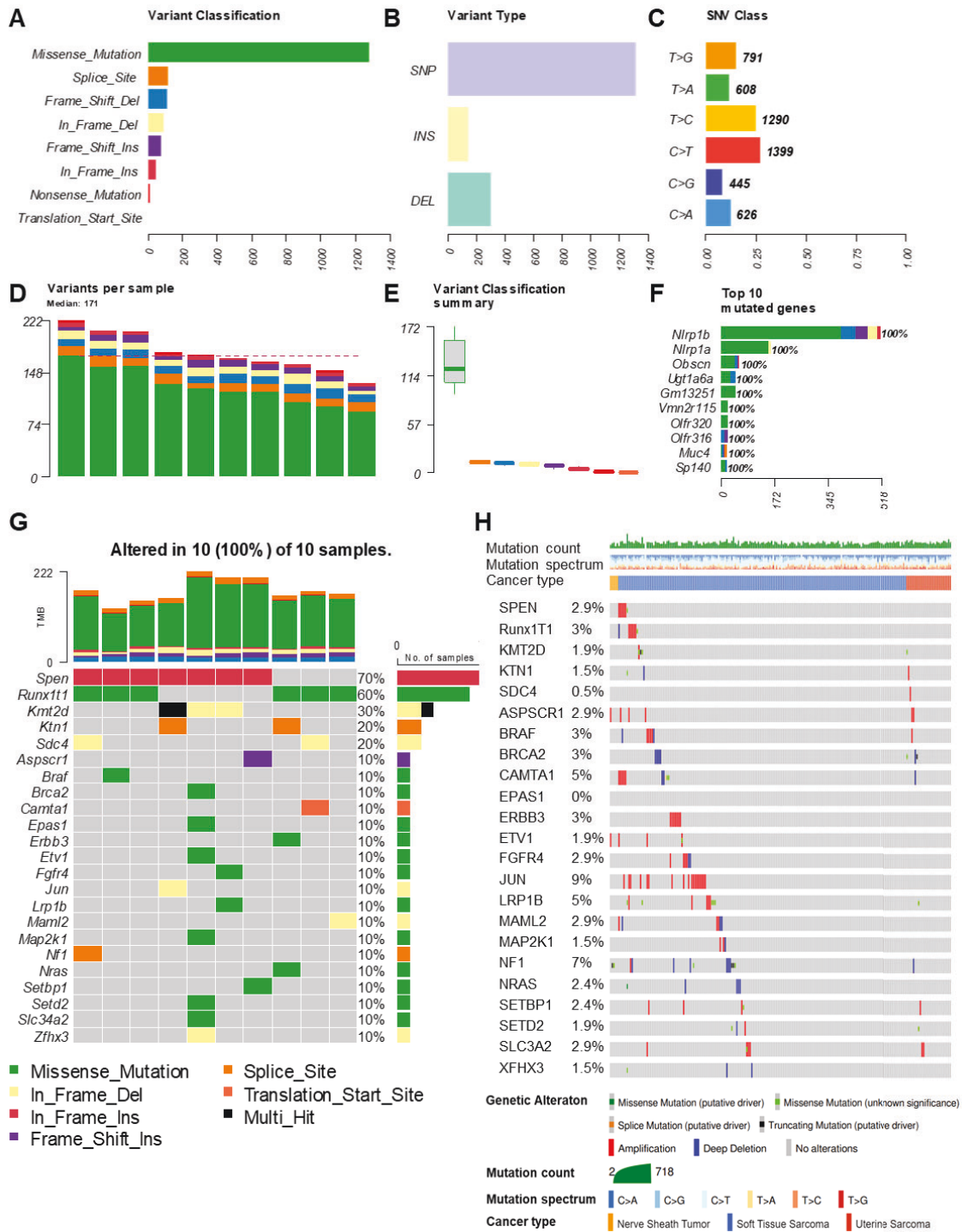
(Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用。)

### 2.3.8 p53<sup>ΔMSC</sup> マウス由来 USTS ではヒトの軟部腫瘍(STS)と類似した遺伝子変異が見られる

次にマウスとヒトの肉腫の遺伝子変異の類似性について検討を行った。まず p53<sup>ΔΔ</sup> USTS サンプルを用いて全ゲノムシーケンスを行い、野生型組織と比較して腫瘍組織でどのような遺伝子変異が見られるか調べた。10 個の p53<sup>ΔΔ</sup> USTS サンプルから合計 1760 個の遺伝子変異を検出した。ミスセンス変異と一塩基多型(SNP)が最も高頻度に見られた変異型で、フレームシフト欠失がそれに続いた(図 2.3.7 A および B)。SNP の中で最も多くみられた変異は C>T と T>C であった(図 2.3.7 C)。サンプルあたりの平均バリエーション数は 171 個であり、そのうち最も高頻度に変異した 10 個の遺伝子は Nlrp1b, Nlrp1a, Obscn, Ugt1a6a, Gm13251, Vmn2r115, Olfir320, Olfir316, Muc4, および Sp140 であった(図 2.3.7 D-F)。解析した 10 サンプルのうち、5 サンプル以上(全サンプルの 50%)で共通して変異が見られた遺伝子が 40 個あった(補助図 2.3.5 A)。そこでこれらの遺伝子がヒトの STS でも見られるか調べるため、cBioPortal から提供されている TCGA data set “Adult Soft Tissue Sarcomas (Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas, 2017)”を取得して調べた。すると、TTN, MUC4, OBSCN, PRKDC, SCN9A などいくつかの遺伝子は、p53<sup>ΔΔ</sup> USTS とヒト STS の両方で変異していることが確認された(補助図 2.3.5 A および B)。次に p53<sup>ΔΔ</sup> USTS が COSMIC database より提供される腫瘍化のドライバーとなるがん原遺伝子の変異を含んでいるかどうかを調べた。その結果、p53<sup>ΔΔ</sup> USTS では 25 個のがん原遺伝子に変異しており、BRCA2、ERBB3、BRAF、NRAS といった典型的ながんのドライバー遺伝子に変異を有していることが確認された(図 2.3.7 G)。これらの遺伝子変異の一部(BRAF および NRAS)は、メラノーマや多発性骨髄腫と比較すると割合は低いが、ヒト STS でも同様の変異を有していた(図 2.3.7 H および補助図 2.3.5 C-D) (170)。

ヒト STS における遺伝子変異量(Total mutation burden; TMB)は他の腫瘍型と比較すると低いことが知られている(171)。そこでヒト STS および p53<sup>ΔΔ</sup> USTS の TMB をその他の腫瘍型と比較した(172)。その結果、ヒト STS は既報通り肺腺がん(LUAC)や皮膚黒色腫(SKMC)といった他の種類の腫瘍よりも TMB が低いことが確認された(補助図 2.3.5 E)。また p53<sup>ΔΔ</sup> USTS はヒトと比較すると TMB が大きくなったが、これは生殖細胞系列に p53 欠失が導入されたことが原因として考えられる(補助図 2.3.5 E)。

以上の結果より、p53<sup>ΔΔ</sup> USTS がヒト STS と類似した遺伝子変異を持つことが明らかとなった。また、BRCA2, ERBB2, NRAS, BRAF などの癌遺伝子で同定された変異は、p53 欠損 MSC の腫瘍形成に機能的に重要な役割を果たしている可能性がある。



### 図 2.3.7. p53<sup>ΔΔ</sup> USTS はヒト STS と同様の遺伝子変異を有する

(A-C) エクソームシーケンスによって p53<sup>ΔΔ</sup> USTS サンプルで検出されたバリエーションの分類。Variant class (A), variant type (B), SNV class (C)を示す。DEL: 欠失, INS: 挿入, SNP: 一塩基多型, SNV: 一塩基バリエーション。

(D-E) p53<sup>ΔΔ</sup> USTS のサンプルあたりのバリエーション数(D)および各分類内のバリエーション数(E)。グラフの色分けは(A)と同様。

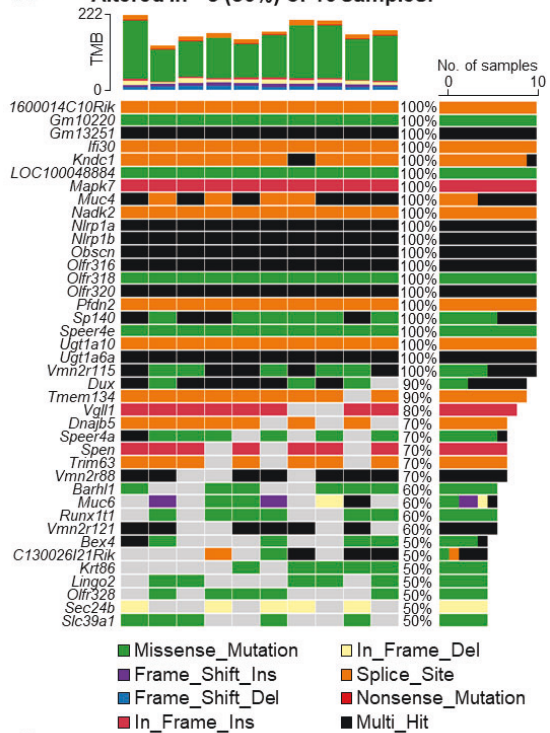
(F) p53<sup>ΔΔ</sup> USTS のサンプル内で最も多く変異が入っている遺伝子 top10。グラフの色分けは(A)と同様。

(G) p53<sup>ΔΔ</sup> USTS のサンプルで変異が見られる遺伝子のうち, COSMIC database 上でがん遺伝子として登録されている遺伝子の変異の種類と頻度を示す Oncoplot。各列は 1 つの p53<sup>ΔΔ</sup> USTS のサンプルを表し, 各行は 1 つのがん関連遺伝子を表す。上部の棒グラフは, 各サンプルが有する変異遺伝子数を示す。右側の棒グラフは, 各遺伝子の変異を持つサンプル数を示す。プロットの下に示すように, 色は変異のタイプを示す。

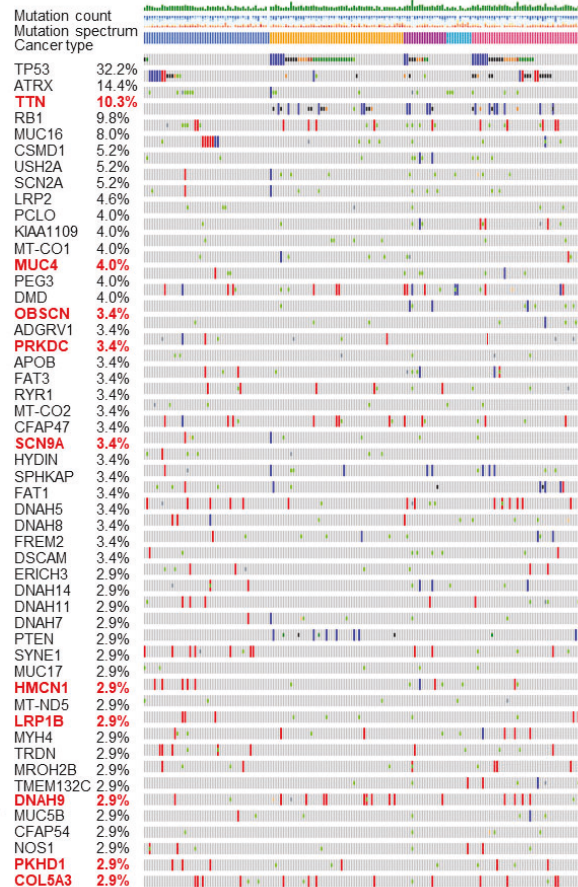
(H) ヒト STS で変異が見られる遺伝子のうち, (G)に示した代表的な癌遺伝子とその変異頻度を示す oncoplot。cBioPortal database 由来の変異データを使用した。各患者の変異数をプロットの上部に示す。プロットの下部に示すように, 色は変異のタイプを表す。

(Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用。)

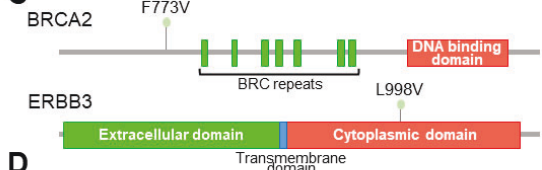
**A** Altered in ~5 (50%) of 10 samples.



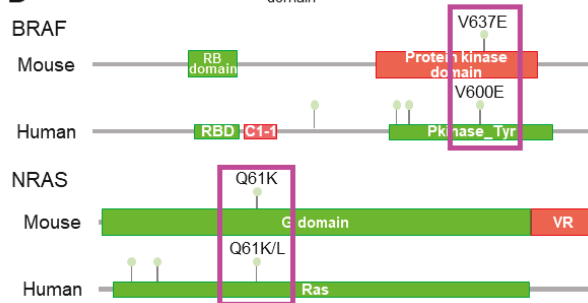
**B**



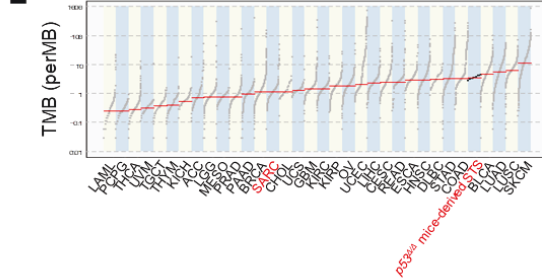
**C**



**D**



**E**



### 補助図 2.3.5

(A-C) p53<sup>ΔΔ</sup> USTS サンプルにおいて、すべてのサンプルのうち 50%以上(10 サンプル中 5 サンプル以上)で変異が見られる遺伝子の Oncoplot。上部の棒グラフは、各サンプルにおける変異遺伝子の数を示す。右側の棒グラフは、各遺伝子の変異を持つサンプル数を示す。プロットの下部に示すように、色は変異のタイプを表す。

(B) ヒト STS で高頻度に変異が見られる遺伝子と変異の割合を示す Oncoplot。cBioPortal database 由来の変異データを使用した。各患者の変異数をプロットの上部に示す。プロットの下部に示すように、色は変異のタイプを表している。

(C) p53<sup>ΔΔ</sup> USTS で見られる BRCA2 と ERBB3 の変異の位置を示す lollipop plot。

(D) p53<sup>ΔΔ</sup> USTS とヒト STS における BRAF と KRAS の変異の位置を示す lollipop plot。

(E) TCGA database から提供された 33 の異なるヒト腫瘍タイプの TMB。 LAML, Acute myeloid leukemia (急性骨髄性白血病); PCPG, Pheochromocytoma and paraganglioma (褐色細胞腫および傍神経節腫); THCA, Thyroid carcinoma (甲状腺がん); UVM, Uveal melanoma (ブドウ膜黒色腫); TGCT, Testicular germ cell tumors (精巣胚細胞腫瘍); THYM, Thymoma (胸腺腫); KICH, Kidney chromophobe (腎臓色素斑); ACC, Adrenocortical carcinoma (副腎皮質がん); LGG, Brain lower grade glioma (脳低悪性度神経膠腫); MESO, Mesothelioma (中皮腫); PRAD, Prostate adenocarcinoma (前立腺腺がん); PAAD, Pancreatic adenocarcinoma (膵臓腺がん); BRCA, Breast invasive carcinoma (乳房浸潤がん); SARC, Sarcoma (肉腫); CHOL, Cholangiocarcinoma (胆管がん); UCS, Uterine carcinosarcoma (子宮がん肉腫); GBM, Glioblastoma multiforme (多形膠芽腫); KIRC, Kidney renal clear cell carcinoma (腎明細胞がん); KIRP, Kidney renal papillary cell carcinoma (腎乳頭細胞がん); OV, Ovarian serous cystadenocarcinoma (卵巣漿液性嚢胞腺がん); UCEC, Uterine corpus endometrial carcinoma (子宮体部内膜がん); LIHC, Liver hepatocellular carcinoma (肝細胞がん); CESC, Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma (子宮頸部扁平上皮がんおよび子宮頸部内膜腺がん); READ, Rectum adenocarcinoma (直腸腺がん); ESCA, Esophageal carcinoma (食道がん); HNSC, Head and neck squamous cell carcinoma (頭頸部扁平上皮がん); DLBC, Lymphoid neoplasm diffuse large B-cell lymphoma (リンパ性新生物びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫); STAD, Stomach adenocarcinoma (胃腺がん); COAD, Colon adenocarcinoma (結腸腺がん); BLCA, Bladder urothelial carcinoma (膀胱尿路上皮がん); LUAD, Lung adenocarcinoma (肺腺がん); LUSC, Lung squamous cell carcinoma (肺扁平上皮がん); SKCM, Skin cutaneous melanoma (皮膚黒色腫); TMB, Tumor mutational burden. (Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用。)

### 2.3.9 遺伝子発現に基づくヒト STS の新規分類方法の提示

これまでの解析から, MSC 特異的 p53 欠損マウス由来の USTS およびヒト STS の遺伝子発現, 遺伝子変異を比較し, 本マウスがヒト STS と類似した性質を有しており, モデルとして妥当であることを確認してきた。その過程で, 病理学組織学的な分類と遺伝子発現に基づく分類は必ずしも一致しないことに気が付いた(図 2.3.6 A)。これまでも肉腫の診断はその病態, 発症部位, 形態学的な特徴が様々であり, 有用なマーカーの欠如から困難とされてきた。そこで, 病理組織学的な分類に加えてヒトの肉腫の遺伝子発現に基づく分類が可能かどうかを検討した。ヒト肉腫サンプルを Seurat を用いて遺伝子発現プロファイルによりクラスタリングし, Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)を用いた次元削減アプローチにより可視化した(図 2.3.8 A および B)。サンプルは 6 つのグループ(cluster 0-5)に分類され, Myo および Syn のサンプルのほとんどは, それぞれ他の肉腫とは異なる別のグループ(それぞれ cluster 4 と 5)に分類された(図 2.3.8 A-C)。対照的に, Fib, NOS, Lipo のサンプルは, 遺伝子発現プロファイルで分類しても別のクラスターには分けられず, クラスター0 から 3 の間に分布していた(図 2.3.8 A-D)。次に, それぞれのグループに特異的に発現し, マーカーとして使用できる候補遺伝子を探索した。Cluster 0 では, 未分化 MSC で高発現している TGF $\beta$ 3, EBF1 および EBF3 の高発現を認めた(図 2.3.8 E および補助図 2.3.6 A) ([173-175](#))。Cluster 1 は骨形成に関連する遺伝子, COL1A1, COL16A1, MMP13, COL1A2, RUNX2 が高発現しており, 一方 cluster 4 は平滑筋関連の遺伝子, LMO1, MYLK, CNN1 が高発現していた(図 2.3.8 E および補助図 2.3.6 A)。また, cluster2 では転写因子 FOSL1 とセリンプロテアーゼ阻害因子(SERPINE1 と SERPINB7)が高発現し, cluster 3 では小胞輸送に関与する SNX20 と免疫調節遺伝子(CD48, UNC13D, CORO1A)が高発現していた(図 2.3.8 E および補助図 2.3.6 A)。次に, 上記の遺伝子発現に基づく分類が, 患者の予後と関連しているかどうか調べた。Cluster 0 と比較して, cluster 1 と 2 はより予後不良の経過を辿ることが分かった (cluster 1 vs. cluster 0:  $p < 0.025$ , HR=3.52 (95%CI, 1.119-11.07); cluster 2 vs. cluster 0:  $p < 0.026$ , HR=2.96 (95%CI, 1.165-12.37)) (図 2.3.8 F)。これらのデータは, 遺伝子発現に基づく肉腫の分類が患者の予後予測に役立つ可能性を示唆している。

最後に, 本マウスモデル由来の p53 $\Delta\Delta$  USTS でヒト肉腫の各 cluster marker の発現を調べた。GSEA の結果, p53 $^{+/+}$  MSC と比較して p53 $\Delta\Delta$  USTS では cluster 0, 3, 5 のマーカー遺伝子の発現が上昇していた(図 2.3.8 G-I)。さらに, ヒト STS および p53 $\Delta\Delta$  USTS の遺伝子発現データを統合し, Seurat を用いて UMAP に展開したところ, p53 $\Delta\Delta$  USTS は単一の cluster というより, 様々な cluster 内に位置することが分かった(補助図 2.3.6 B-D)。これらのデータは p53 $\Delta\Delta$  USTS がヒト STS と類似した不均一性を持ち, このモデルはヒト STS のいくつかの特徴を忠実に再現していることを示している。

以上の解析から, ヒト STS は遺伝子発現によって現在の病理組織学的分類とは異なる分類が可能であり, p53 $\Delta$ MSC マウスのヒト STS モデルとしての有用性も示された。



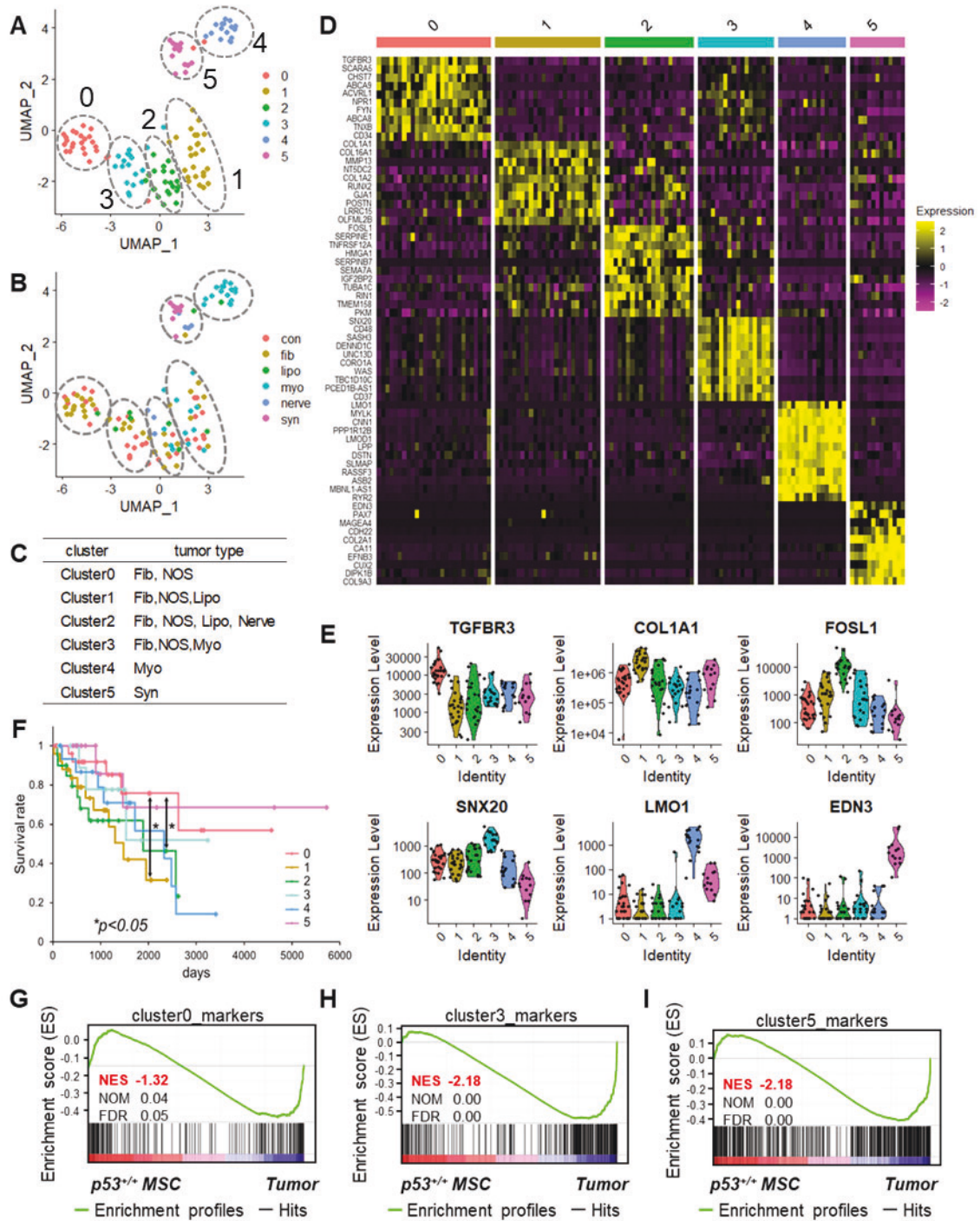


図 2.3.8. ヒト STS の遺伝子発現に基づく分類は予後予測に役立つ

(A-B) ヒト STS の遺伝子発現に基づく UMAP plot。Cluster ごとに色分けした plot (A) とヒト STS の病理学的分類によって色分けした plot (B)。

(C) (A) で定義した各クラスターに含まれる病理組織学的な肉腫のタイプ。

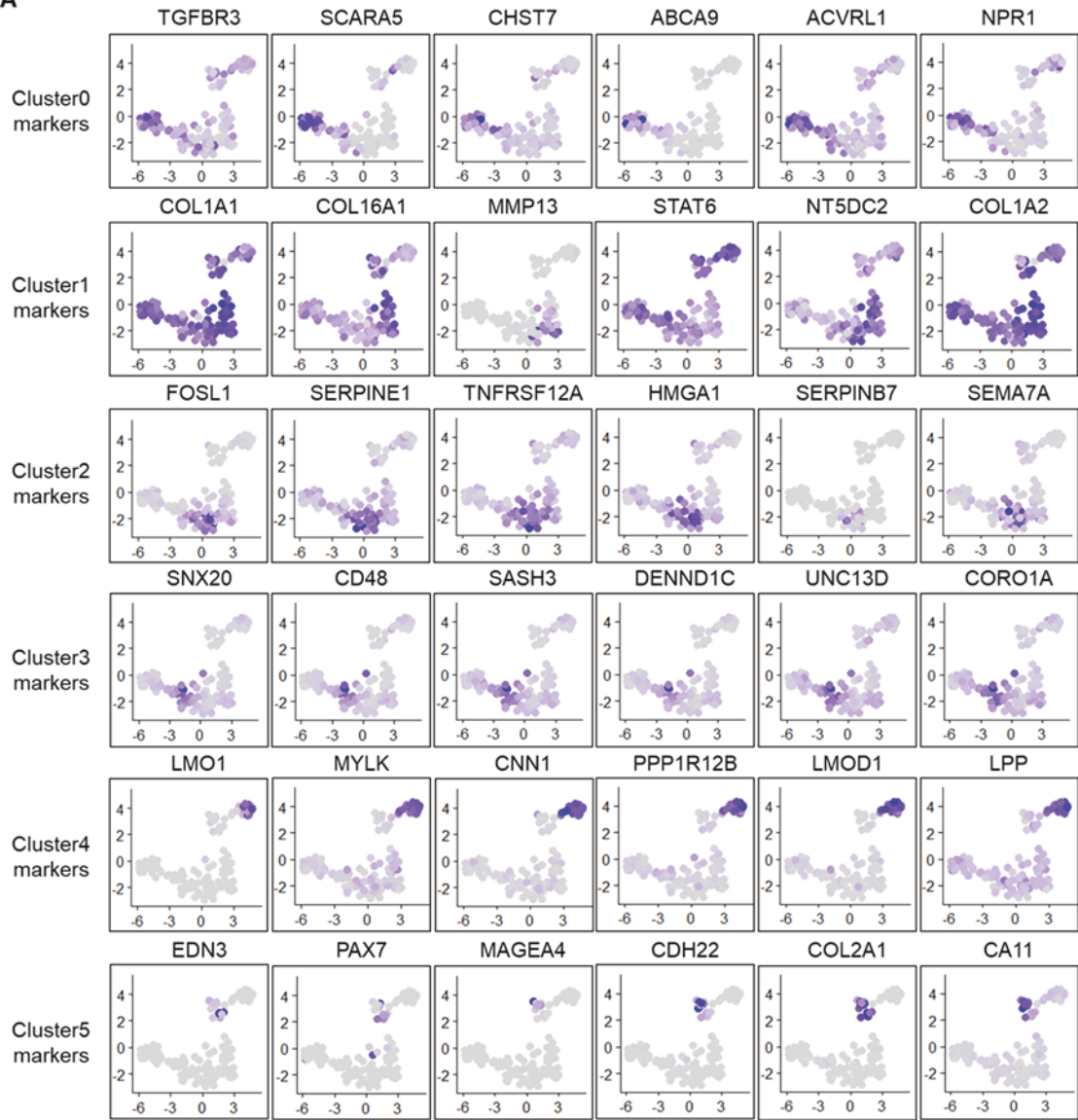
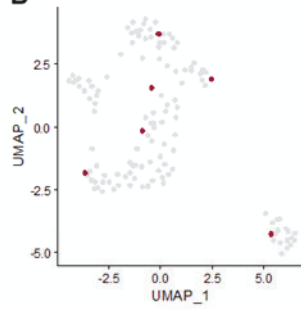
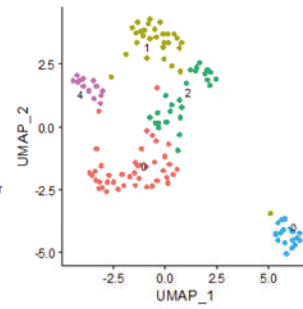
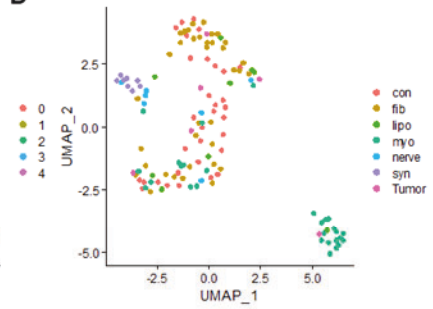
(D) (A) で定義した各クラスターで特異的に発現している遺伝子のヒートマップ。X 軸: ヒト STS サンプルを示す。Y 軸: Seurat によって決定された発現変動が大きい上位の遺伝子を示す。ヒートマップは各遺伝子の発現量を Z-score normalization した値を表し、遺伝子発現の増加(または減少)を示している。

(E) ヒト STS の各クラスターに発現の高い代表的な遺伝子の発現を示す violin plot。

(F) (A) で定義した各クラスターごとの生存曲線 (cluster 0~5, n=27, 25, 21, 17, 16, 13)。

(G-I) p53<sup>+/+</sup> MSC および p53<sup>Δ/Δ</sup> USTS における, cluster 0,3,5 で発現の高い遺伝子セットの GSEA plot。

(Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用し一部改変。)

**A****B****C****D**

### 補助図 2.3.6

(A-B) 各クラスターのマーカー遺伝子の発現を示す UMAP plot。

(B-D) ヒト STS および p53<sup>ΔΔ</sup>USTS の遺伝子発現データを統合した UMAP plot。サンプルは Seurat を用いて遺伝子発現に基づいて 5 つのクラスター(cluster 0-4)に分類した。パネル(B)では、マウスの p53<sup>ΔΔ</sup>USTS サンプルを赤で示した。他のパネルでは、サンプルをクラスター別 (C)または腫瘍タイプ別 (D)に色分けした。

(Sorimachi et al., *Stem Cell Reports*. 2023 の図から引用し一部改変。)

## 2.4 考察

MSC は脂肪細胞・骨細胞・軟骨細胞への分化能を持つ組織幹細胞であり、特に骨髄では HSC からの造血を支持するニッチ細胞としても重要な働きを担う。これまで個体老化に伴って MSC エイジングが誘導され、増殖能や多分化能、ニッチ機能などが低下することが知られてきたが、このような加齢変化がどういった分子機序によって誘導されるのかは全く分かっていなかった。本研究では、はじめに若齢および加齢 MSC の single-cell RNA-seq を行い、個体の老化に伴って MSC で p53 下流経路の発現が減弱することを明らかにした(図 2.3.1 および補助図 2.3.1)。

p53 は多くの体細胞において、老化、酸化ストレス、放射線、化学物質など、DNA damage を伴うストレス下において、ATM の下流で活性化され、p21 経路や Bax, Puma などアポトーシスの経路を介して細胞分裂と細胞の生存を制御する重要なストレス応答分子である。先行研究から、p53 は幹細胞においても重要なストレス応答を担っており、定常状態とストレス下の両方で細胞周期、自己複製能、多分化能を厳密に調整し、時にはアポトーシスを起こすことで幹細胞の恒常性維持を担うことが報告されている(82, 176-178)。MSC においても p53 が増殖・分化を制御することが知られてきたが、これらは cell line を用いた検討のみで、個体の老化に伴って誘導される MSC エイジングへの寄与は不明であった。

そこで、本研究では p53 を MSC 特異的に欠損するマウス(Prrx1-Cre(+)::Trp53<sup>fl/f</sup>; p53<sup>ΔMSC</sup> マウス)を用いて、MSC エイジングにおける p53 の寄与を検討した。最初に若齢およびストレス下における p53 欠損 MSC のニッチ機能への影響を調べた。その後、分化・増殖能などの幹細胞機能およびがん化における p53 シグナルの寄与を検討した。

### 2.4.1 若齢およびストレス負荷後の p53<sup>ΔMSC</sup> マウスのニッチ機能の検討

若齢と比較して加齢 MSC で p53 下流経路の発現が低下するという結果から、p53 シグナルの減弱が MSC エイジングを誘導する可能性が考えられた。すなわち p53 を欠損した MSC では通常よりも早く MSC エイジングが誘導されニッチ機能が低下する可能性がある。

しかしながら、若齢 p53<sup>ΔMSC</sup> マウスの MSC の数やニッチ因子の産生能を解析したところ、野生型マウスとの差は認められなかった(図 2.3.2A-C)。また、ニッチ因子の産生以外の造血支持能に変化があるかどうかを調べるために、p53<sup>ΔMSC</sup> マウスの造血解析も行ったが、骨髄・脾臓・末梢血中の造血幹前駆細胞 (Hematopoietic stem/progenitor cell; HSPC) や分化血球細胞の数と割合は全て正常であった(図 2.3.2 D-J)ことから、p53 シグナルは MSC のニッチ機能の維持には重要でない可能性が示唆された。

ここで次の可能性として、若齢時点では p53 を欠損する期間が十分ではない、すなわち、p53 を欠損していてもストレスの蓄積が十分ではなく、エイジングフェノタイプが見られなかったせいだと考えた。そこでさらにストレスを負荷することで p53 を欠損した MSC で MSC エイジングが誘導されるかどうか、2 つのモデルを用いて検討した。まず一つ目のモデルとして、亜致死量(4Gy)の放射線照射するモデルを作成し、その後の MSC のニッチ因子の産生

能とその他の造血支持能を解析した。その結果、放射線照射後の  $p53^{d/d}$  MSC のニッチ因子の発現は野生型と変わらず、造血回復の速度も正常であった(図 2.3.3)。次に中年齢(1 年齢)まで加齢させた  $p53^{+/+}$  および  $p53^{dMSC}$  マウスの MSC の造血支持能を解析したが、予想に反して両者間に差は見られなかった(補助図 2.3.2)。

これらの結果から、少なくとも私たちが検討したモデルにおいて、 $p53$  は MSC のニッチ機能には関与しないことが強く示唆された。しかしながら 2 年齢の完全に加齢した  $p53^{dMSC}$  マウスを解析することは腫瘍発生による寿命短縮のため不可能であったため、 $p53$  シグナルの減弱が 1 年齢以降から 2 年齢にかけて(個体老化の進行後期過程)で MSC エイジングを誘導する可能性については検討の余地が残された。

## 2.4.2 MSC の腫瘍化抑制および幹細胞機能の維持における $p53$ の役割の検討

$p53$  が MSC のニッチ機能の維持に関わらないことが示唆されたため、次に MSC のがん化および幹細胞機能に果たす役割について検討した。既報より MSC 特異的に  $p53$  を欠損したマウスでは高頻度で骨肉腫を発症することが知られていた(51, 142, 143)。しかしながら本研究で用いた  $p53^{dMSC}$  マウスでは主に線維腫性の特徴を有する軟部肉腫が観察され、病理学的診断に基づき未分化多形肉腫(USTS)と診断された。骨肉腫の頻度は低かった(図 2.3.4)。この既報との相違は使用している Cre マウスの遺伝的およびエピジェネティックな背景の違いにあるのかもしれない。私たちは腫瘍のエクソームシーケンシングを行った際に、本マウスが細胞増殖、細胞接着、生存やアポトーシスなどの生命現象を制御する CDH11 (別名: “osteoblast” (OB)-cadherin)に生殖細胞系列の変異が入っていることを確認している(179, 180) (図 2.4.1)。このことも本研究で見られた  $p53^{dMSC}$  マウスのフェノタイプと既報のフェノタイプの差異を説明する可能性がある。いずれにせよ、私たちのモデルは高頻度に USTS を発症することが明らかとなった。

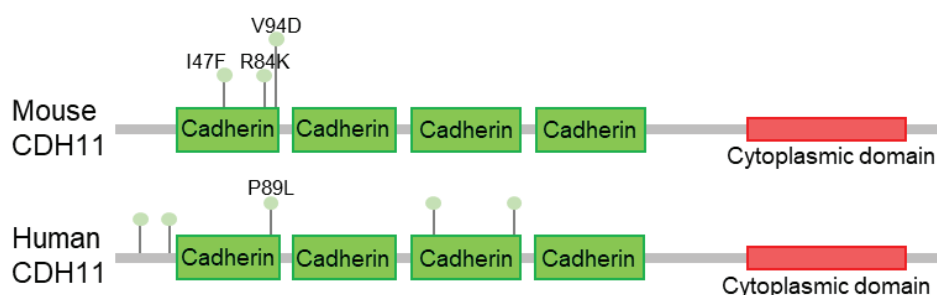


図 2.4.1. 本研究で用いたマウスの生殖細胞系列で確認された CDH11 の変異箇所(上段)  
(下段はヒト STS で見られる変異の箇所を示す)

線維肉腫を含むいくつかのタイプの肉腫は未分化間葉系腫瘍であり、その由来となる細胞が MSC であると考えられている(34, 138)。以上の観察結果より、 $p53$  は MSC のがん化抑制に重要であることが明らかとなった。

また、分化・増殖アッセイおよび  $\mu$ CT を使った分化能と増殖能の解析から、 $p53^{4/4}$  MSC は増殖能が亢進し、脂肪分化が低下、骨分化が亢進することが分かった (図 2.3.5 A-C および G-K)。p53 欠損 MSC で分化異常が起こるメカニズムについては今後の検討課題であるが、既報より、p53 が TWIST2 の発現調節を介して MSC の多分化能を維持するという報告があるため、そのような分化関連遺伝子の発現調節を介して分化能を制御している可能性が考えられる(153, 181, 182)。幹細胞の子孫細胞への分化障害は幹細胞性の喪失と腫瘍形成を促すことが知られている。実際、 $p53^{4/4}$  MSC は静止期性を失い細胞周期の亢進が認められ、MSC マーカーである Foxc1, Ebf3, Runx2 といった遺伝子発現の低下を示した(175, 183) (図 2.3.5 L-N および補助図 2.3.3 O)。さらに、増殖能・分化能の変化に加えて  $p53^{4/4}$  MSC はミトコンドリア代謝および解糖能の亢進も示した。これも MSC やその他の幹細胞で報告されている p53 の代謝活性化における先行研究(153, 184-186)と合致しており、こういった代謝活性の変化が MSC の増殖能・分化能の変化に影響する可能性がある。

以上の結果より、p53 は MSC の静止期性・多分化能といった幹細胞機能の維持に重要であり、p53 欠損によってこれらの機能が喪失することが明らかとなった。

研究開始時に、“p53 シグナルの減弱が MSC エイジングを促進する”という仮説を元にスタートしたが、p53 を欠損してもニッチ機能は変化しなかった一方で、MSC の増殖能は亢進し脂肪分化抑制と骨分化促進が確認された。この結果より、確かに p53 が MSC の幹細胞性を制御していることは分かったが、ここで見られる変化はどちらかといえば MSC エイジングで見られるフェノタイプ(増殖能の低下、脂肪分化亢進および骨分化抑制)とは反対であり、必ずしも p53 シグナルの減弱が MSC エイジングを促進するというわけではないのかもしれない。p53 シグナルの減弱は MSC エイジングの原因ではなく結果的に見られる現象かもしれない。また、今回 p53 を遺伝学的にノックアウトしたマウスモデルを用いたが、実際の個体老化の過程では完全に p53 がなくなるわけではないため、p53 シグナルの強弱が MSC エイジングに重要な可能性も残されている。いずれにせよ、本研究から MSC における p53 の意義について以下の 5 つのことが明らかとなった。

- (1) 若齢 MSC と比較して加齢 MSC では p53 下流経路の遺伝子発現が低下する。
- (2) p53 は(少なくとも今回試したモデルにおいて)、若齢およびストレス負荷後の MSC のニッチ機能の維持には関与しない。
- (3) p53 は MSC の腫瘍化抑制に重要であり、p53 を欠損した MSC は未分化多形肉腫 (USTS) を高頻度に発症する。
- (4) p53 は MSC の静止期性と多分化能の維持に重要である。P53 を欠損した MSC では代謝が亢進し、細胞周期の活性化、脂肪分化の低下、骨分化の亢進、およびトランスクリプトーム上の”MSCらしさ”を喪失する。
- (5) MSC エイジングにおける p53 の寄与 (p53 シグナルの減弱がエイジングの原因なの

か結果なのか)は今回明らかにはならなかったが、今後は p53 の発現量だけでなくリン酸化による制御にも着目しながら MSC エイジングを引き起こす分子実態を明らかにしていく必要がある。

#### 2.4.3 $p53^{AMSC}$ マウス由来の腫瘍・ $p53^{4/4}$ USTS のヒト STS モデルとしての有用性の検討

本研究の後半は、本研究で用いた  $p53^{AMSC}$  マウスで自然発症する USTS ( $p53^{4/4}$  USTS)がヒト STS モデルとして有用であるかどうかの検討を行った。動物モデルで発症した腫瘍がヒトの腫瘍とどの程度類似しているかは、そのモデルの有用性を表す指標である。本研究では  $p53^{4/4}$  USTS とヒト STS の遺伝子発現および遺伝子変異を比較することで類似性を検討した。まず遺伝子発現を調べた結果、ヒト STS、中でも線維性腫瘍である fibromatous neoplasm (Fib) および soft tissue tumor not otherwise specified (NOS) で高発現する遺伝子のうちの一部が  $p53^{4/4}$  USTS でも高く発現することが分かった(図 2.3.6 C-E)。腫瘍特異的遺伝子のうち、ITGAM や S100A10 のような遺伝子は腫瘍細胞だけでなく  $p53^{4/4}$  MSC にも発現していたことから、前癌病変マーカーとして使用できる可能性もある(図 2.3.6 D および E)。さらに NOS 関連遺伝子セットは  $p53^{+/+}$  MSC と比較して  $p53^{4/4}$  MSC で既に発現が有意に上昇しており、 $p53^{4/4}$  MSC が既に部分的に腫瘍様特性を示すことを裏付けている(補助図 2.3.4 H)。しかしながら Fib 関連遺伝子セットの発現は  $p53^{+/+}$  MSC と比べると  $p53^{4/4}$  MSC でむしろ低下したことから、p53 の欠失のみで腫瘍形成には不十分であり、腫瘍形質の獲得には更なる変化が必要である可能性がある。すなわち、図 2.3.7 および補助図 2.3.5 に示すようながん遺伝子が second hit として機能して腫瘍形成を促すことが示唆される。また、今回  $p53^{AMSC}$  マウスで発症した腫瘍を USTS と診断したが、これはヒト STS のサブタイプではないことも注意が必要である。今回はヒト STS をデータベース上で提供された分類型に基づいて分類したが、このヒト STS と本マウスモデルの USTS は全く同じサブタイプではない(139)。これは  $p53^{4/4}$  USTS において、ヒト STS のサブタイプの中で一つのグループというよりむしろ複数のグループの遺伝子セットの発現が enrich されている理由かもしれない(図 2.3.6 C-E)。

次に  $p53^{4/4}$  USTS とヒト STS の遺伝子変異を比較した。 $p53^{4/4}$  USTS のサンプル全てにおいて BRCA2, ERBB3, BRAF, KRAS など異なるがん遺伝子に一つ以上の変異が認められ、さらにこれらの遺伝子変異はヒト STS でも一定の割合で認められた(図 2.3.7 G-H, 補助図 2.3.5 C-D)。つまりこれらのドライバーがん遺伝子の変異が MSC の腫瘍形成に重要である可能性がある。また、 $p53^{4/4}$  USTS サンプルの 5 割以上で変異が認められる TTN, MUC4, OBSCN, PRKDC, SCN9A などの遺伝子変異が、ヒト STS でも一定の割合で確認された(補助図 2.3.5 A および B)。このことは  $p53^{4/4}$  USTS がヒト STS の特徴の一部を再現することを示している。以上の RNA-seq やエクソームシーケンスを用いた遺伝子発現および遺伝子変異解析から、 $p53^{4/4}$  USTS とヒト STS の類似性が示され、 $p53^{AMSC}$  マウスのヒト STS のモデルとしての有用性が示された。

最後に、ヒト STS は病理組織学的な分類に加えて、遺伝子発現に基づく分類が可能である



ことが明らかとなった。STS は起源となる細胞や病態, 形態学的な特徴が多様であり, 臨床において特異度の高い腫瘍マーカーがないため確定診断が困難であり, 病態理解や治療法開発の妨げの一つとなっている。そこで私たちは, 117 検体のヒト STS サンプルの RNA-seq data を UMAP を用いてクラスタリングし, 遺伝子発現に基づいて 6 つのクラスターに分類できることを提示した (図 2.3.8 A-D)。各クラスターはそれぞれ, 骨芽細胞(COL1A1 など)や平滑筋細胞(MYLK など)を含む間葉系細胞の特異的マーカーを発現しており, 腫瘍発生の起源細胞のタイプを示している可能性がある(図 2.3.8 E)。さらにこれらの分類法によって分類された肉腫のサブタイプは, クラスターによって患者の予後にも有意差が認められることが明らかとなり, 本分類法は予後の予測にも役立つ可能性が示唆された(図 2.3.8 F)。加えて,  $p53^{ΔΔ}$  USTS とヒト STS の RNA-seq データを統合して UMAP で展開したところ,  $p53^{ΔΔ}$  USTS がヒト STS の複数のクラスター上に収まることも確認され, ヒト STS と  $p53^{ΔΔ}$  USTS の類似性がさらに裏付けられた(補助図 2.3.6 B-D)。

要約すると, 本研究は, 骨髄 MSC におけるニッチ機能や幹細胞機能の維持における p53 の役割を明らかにし, ヒト STS のモデルとして  $p53^{ΔΔ}$  USTS モデルを検証した(図 2.4.2)。このマウスモデルの詳細な解析は, ヒトの病理学的データおよび臨床データと組み合わせられ, STS の病態解明と新たな治療法および診断法の開発に役立つと考えられる。

### (1) $p53^{ΔMSC}$ の機能解析

- ・ p53はMSCのニッチ機能の制御には関与しない
- ・ p53はMSCの代謝の活性化を抑え, 細胞の静止期性・多分化能・幹細胞性を維持する

### (2) ヒト STS モデルとしての検証

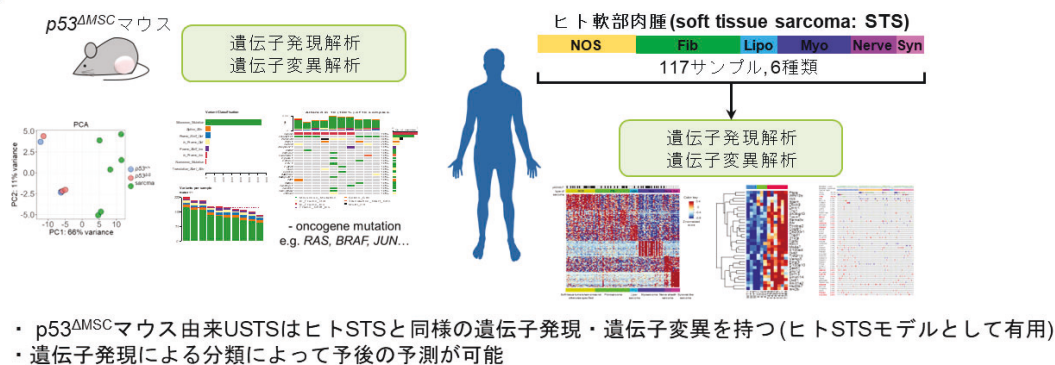


図 2.4.2. 本研究のまとめ

## 2.5 Limitation of study

本研究はヒトとマウスの RNA-seq データを統合し解析を行っているが, これは Seurat に記載されている FindIntegrationAnchors (<https://satijalab.org/seurat/reference/findintegrationanchors>) という関数を用いて行った。この際, ヒトとマウスで同じ遺伝子名の遺伝子のみ抽出して解析に用いたため, 同一の機能を持つが名前が違う遺伝子の存在は考慮できていない。

## 2.6 Data availability

本研究で用いた RNA-seq および single-cell RNA-seq データは全て, NCBI の Gene Expression Omnibus (GEO) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) から入手可能である。Bulk RNA-seq は GSE226843, single-cell RNA-seq は GSE226845 に登録されている。RNA-seq と exome sequence を含む全ての生データは NCBI の Bio Project (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>) から入手可能である(PRJNA935829)。本論文の解析に使用した全てのコードと software は, GitHub ([https://github.com/takubo-lab/p53\\_MSC](https://github.com/takubo-lab/p53_MSC))に記載予定である。

### 3. 謝辞

本研究の遂行, 展開にあたり, 指導教官の早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻合田亘人教授からは丁寧なご指導と適切なご助言を賜りました。心より感謝申し上げます。また, 実験を最後まで暖かく見守り, 適切な指導と研究環境を与えて下さった国立国際医療研究センター研究所生体恒常性プロジェクトの田久保圭誉プロジェクト長に心より御礼申し上げます。研究の要所で適切な助言を与えて下さり, 本研究の遂行に大きな割合を占めているトランスクリプトーム解析の手法を一から教えて下さった小林央先生にも厚く御礼申し上げます。外部性である私を受け入れて下さった国立国際医療研究センター研究所生体恒常性プロジェクトの皆様にも心より御礼申し上げます。加えて, 外部生として日ごろ研究室にいないにも関わらず, 研究室を訪ねた際に快く迎え入れてくれ, 研究や実験手法の相談に乗って下さった田中昌子先生, 丸山剛先生をはじめ, 早稲田大学先進理工学研究科生命医科学専攻合田研究室の皆様にも心より御礼申し上げ, 感謝の意を表します。

最後に, 日々身近で私の研究と成長とを温かく見守って頂き, 研究に関する助言のみならず手厚い精神的・経済的な支援を頂いた東京大学医科学研究所国際ワクチンデザインセンターヒト免疫学分野の反町典子博士および東京都医学総合研究所生体分子先端研究分野(現基礎医科学研究分野)カルパインプロジェクトの反町洋之博士に心より感謝の意を申し上げます。

令和5年12月  
反町 優理子

#### 4. 参考文献

1. E. Dzierzak, A. Bigas, Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell* **22**, 639-651 (2018).
2. L. E. Purton, D. T. Scadden, Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell Stem Cell* **1**, 263-270 (2007).
3. E. Laurenti *et al.*, CDK6 levels regulate quiescence exit in human hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **16**, 302-313 (2015).
4. F. Notta *et al.*, Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* **333**, 218-221 (2011).
5. S. H. Orkin, L. I. Zon, Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631-644 (2008).
6. K. Busch *et al.*, Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. *Nature* **518**, 542-546 (2015).
7. J. Sun *et al.*, Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature* **514**, 322-327 (2014).
8. S. Méndez-Ferrer *et al.*, Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829-834 (2010).
9. L. Ding, T. L. Saunders, G. Enikolopov, S. J. Morrison, Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* **481**, 457-462 (2012).
10. J. Zhu *et al.*, Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood* **109**, 3706-3712 (2007).
11. L. M. Calvi *et al.*, Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* **425**, 841-846 (2003).
12. F. Arai *et al.*, Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149-161 (2004).
13. L. Ding, S. J. Morrison, Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* **495**, 231-235 (2013).
14. J. Zhang *et al.*, Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* **425**, 836-841 (2003).
15. A. Greenbaum *et al.*, CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227-230 (2013).
16. T. Sugiyama, H. Kohara, M. Noda, T. Nagasawa, Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* **25**, 977-988 (2006).
17. N. Asada *et al.*, Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. *Nat Cell Biol* **19**, 214-223 (2017).

18. J. Yang, Z. Ren, X. Du, M. Hao, W. Zhou, The role of mesenchymal stem/progenitor cells in sarcoma: update and dispute. *Stem Cell Investig* **1**, 18 (2014).
19. D. Park *et al.*, Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell* **10**, 259-272 (2012).
20. M. F. Pittenger *et al.*, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
21. Y. T. Ho *et al.*, Chromatin accessibility identifies diversity in mesenchymal stem cells from different tissue origins. *Sci Rep* **8**, 17765 (2018).
22. K. Sudo, H. Ema, Y. Morita, H. Nakauchi, Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **192**, 1273-1280 (2000).
23. D. J. Rossi *et al.*, Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9194-9199 (2005).
24. W. W. Pang *et al.*, Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20012-20017 (2011).
25. B. Dykstra, S. Olthof, J. Schreuder, M. Ritsema, G. de Haan, Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **208**, 2691-2703 (2011).
26. P. J. Linton, K. Dorshkind, Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* **5**, 133-139 (2004).
27. R. Stauder, P. Valent, I. Theurl, Anemia at older age: etiologies, clinical implications, and management. *Blood* **131**, 505-514 (2018).
28. R. Ceccaldi *et al.*, Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* **11**, 36-49 (2012).
29. R. M. Brosh, Jr., M. Bellani, Y. Liu, M. M. Seidman, Fanconi Anemia: A DNA repair disorder characterized by accelerated decline of the hematopoietic stem cell compartment and other features of aging. *Ageing Res Rev* **33**, 67-75 (2017).
30. T. McKerrell *et al.*, Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep* **10**, 1239-1245 (2015).
31. G. Genovese *et al.*, Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* **371**, 2477-2487 (2014).
32. M. Xie *et al.*, Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* **20**, 1472-1478 (2014).
33. P. A. Colom Díaz, J. J. Mistry, J. J. Trowbridge, Hematopoietic stem cell aging and leukemia transformation. *Blood* **142**, 533-542 (2023).

34. K. L. Lye, N. Nordin, S. Vidyadaran, K. Thilakavathy, Mesenchymal stem cells: From stem cells to sarcomas. *Cell Biol Int* **40**, 610-618 (2016).
35. R. Rodriguez, R. Rubio, P. Menendez, Modeling sarcomagenesis using multipotent mesenchymal stem cells. *Cell Res* **22**, 62-77 (2012).
36. I. Beerman, J. Seita, M. A. Inlay, I. L. Weissman, D. J. Rossi, Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell* **15**, 37-50 (2014).
37. D. J. Rossi *et al.*, Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* **447**, 725-729 (2007).
38. C. E. Rube *et al.*, Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. *PLoS One* **6**, e17487 (2011).
39. T. Yahata *et al.*, Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* **118**, 2941-2950 (2011).
40. M. Mohrin *et al.*, Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* **7**, 174-185 (2010).
41. S. Jaiswal *et al.*, Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* **371**, 2488-2498 (2014).
42. Y. J. Dai *et al.*, Conditional knockin of Dnmt3a R878H initiates acute myeloid leukemia with mTOR pathway involvement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 5237-5242 (2017).
43. J. Xu *et al.*, DNMT3A Arg882 mutation drives chronic myelomonocytic leukemia through disturbing gene expression/DNA methylation in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2620-2625 (2014).
44. E. Nitta *et al.*, Telomerase reverse transcriptase protects ATM-deficient hematopoietic stem cells from ROS-induced apoptosis through a telomere-independent mechanism. *Blood* **117**, 4169-4180 (2011).
45. K. Takubo *et al.*, Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 49-61 (2013).
46. K. Parmar, P. Mauch, J. A. Vergilio, R. Sackstein, J. D. Down, Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5431-5436 (2007).
47. J. A. Spencer *et al.*, Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* **508**, 269-273 (2014).
48. Y. Liang, G. Van Zant, S. J. Szilvassy, Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **106**, 1479-1487 (2005).
49. S. J. Morrison, A. C. Spradling, Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132**, 598-611 (2008).

50. Y. Y. Jang, S. J. Sharkis, A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* **110**, 3056-3063 (2007).
51. T. Velletri *et al.*, P53 functional abnormality in mesenchymal stem cells promotes osteosarcoma development. *Cell Death Dis* **7**, e2015 (2016).
52. G. L. Norddahl *et al.*, Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes distinct from physiological stem cell aging. *Cell Stem Cell* **8**, 499-510 (2011).
53. M. A. Reid, Z. Dai, J. W. Locasale, The impact of cellular metabolism on chromatin dynamics and epigenetics. *Nat Cell Biol* **19**, 1298-1306 (2017).
54. C. I. Kobayashi, T. Suda, Regulation of reactive oxygen species in stem cells and cancer stem cells. *J Cell Physiol* **227**, 421-430 (2012).
55. K. Miyamoto *et al.*, Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* **1**, 101-112 (2007).
56. M. Saçma *et al.*, Haematopoietic stem cells in perisinusoidal niches are protected from ageing. *Nat Cell Biol* **21**, 1309-1320 (2019).
57. M. Maryanovich *et al.*, Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche. *Nat Med* **24**, 782-791 (2018).
58. A. P. Kusumbe *et al.*, Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells. *Nature* **532**, 380-384 (2016).
59. Z. Chen *et al.*, Cohesin-mediated NF- $\kappa$ B signaling limits hematopoietic stem cell self-renewal in aging and inflammation. *J Exp Med* **216**, 152-175 (2019).
60. D. Gnani *et al.*, An early-senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program. *Aging Cell* **18**, e12933 (2019).
61. X. Fu, S. Wu, B. Li, Y. Xu, J. Liu, Functions of p53 in pluripotent stem cells. *Protein Cell* **11**, 71-78 (2020).
62. S. Valletta *et al.*, Micro-environmental sensing by bone marrow stroma identifies IL-6 and TGF $\beta$ 1 as regulators of hematopoietic ageing. *Nat Commun* **11**, 4075 (2020).
63. A. V. Ergen, N. C. Boles, M. A. Goodell, Rantes/Ccl5 influences hematopoietic stem cell subtypes and causes myeloid skewing. *Blood* **119**, 2500-2509 (2012).
64. M. Yamashita, E. Passequé, TNF- $\alpha$  Coordinates Hematopoietic Stem Cell Survival and Myeloid Regeneration. *Cell Stem Cell* **25**, 357-372.e357 (2019).
65. C. M. Schürch, C. Riether, A. F. Ochsenbein, Cytotoxic CD8+ T cells stimulate hematopoietic progenitors by promoting cytokine release from bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell* **14**, 460-472 (2014).

66. J. S. Arthur, S. C. Ley, Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 679-692 (2013).
67. J. D. Ashwell, The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **6**, 532-540 (2006).
68. H. Iwasa, J. Han, F. Ishikawa, Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 131-144 (2003).
69. A. Baudet *et al.*, RNAi screen identifies MAPK14 as a druggable suppressor of human hematopoietic stem cell expansion. *Blood* **119**, 6255-6258 (2012).
70. Y. Wang, L. Liu, D. Zhou, Inhibition of p38 MAPK attenuates ionizing radiation-induced hematopoietic cell senescence and residual bone marrow injury. *Radiat Res* **176**, 743-752 (2011).
71. M. Yamashita, T. Suda, Low-dose ionizing radiations leave scars on human hematopoietic stem and progenitor cells: the role of reactive oxygen species. *Haematologica* **106**, 320-322 (2021).
72. D. Karigane *et al.*, p38 $\alpha$  Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress. *Cell Stem Cell* **19**, 192-204 (2016).
73. S. Hayashi, A. P. McMahon, Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Dev Biol* **244**, 305-318 (2002).
74. K. Nishida *et al.*, p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. *Mol Cell Biol* **24**, 10611-10620 (2004).
75. S. Zha *et al.*, Ataxia telangiectasia-mutated protein and DNA-dependent protein kinase have complementary V(D)J recombination functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2028-2033 (2011).
76. A. Freund, C. K. Patil, J. Campisi, p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *Embo j* **30**, 1536-1548 (2011).
77. C. Gekas, T. Graf, CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood* **121**, 4463-4472 (2013).
78. S. M. Chambers *et al.*, Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol* **5**, e201 (2007).
79. E. F. Wagner, A. R. Nebreda, Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* **9**, 537-549 (2009).
80. A. Cuenda, S. Rousseau, p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1358-1375 (2007).



81. M. Wahlestedt *et al.*, An epigenetic component of hematopoietic stem cell aging amenable to reprogramming into a young state. *Blood* **121**, 4257-4264 (2013).
82. L. Bai *et al.*, Polymerase I and transcript release factor transgenic mice show impaired function of hematopoietic stem cells. *Aging (Albany NY)* **12**, 20152-20162 (2020).
83. C. Chen *et al.*, TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med* **205**, 2397-2408 (2008).
84. A. Hirao, T. Hoshii, Mechanistic / mammalian target protein of rapamycin signaling in hematopoietic stem cells and leukemia. *Cancer Sci* **104**, 977-982 (2013).
85. F. Wu, Z. Chen, J. Liu, Y. Hou, The Akt-mTOR network at the interface of hematopoietic stem cell homeostasis. *Exp Hematol* **103**, 15-23 (2021).
86. G. de Haan, S. S. Lazare, Aging of hematopoietic stem cells. *Blood* **131**, 479-487 (2018).
87. M. C. Florian *et al.*, Aging alters the epigenetic asymmetry of HSC division. *PLoS Biol* **16**, e2003389 (2018).
88. J. Lee, S. R. Yoon, I. Choi, H. Jung, Causes and Mechanisms of Hematopoietic Stem Cell Aging. *Int J Mol Sci* **20** (2019).
89. H. Geiger, G. de Haan, M. C. Florian, The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol* **13**, 376-389 (2013).
90. H. Jung *et al.*, Thioredoxin-interacting protein regulates haematopoietic stem cell ageing and rejuvenation by inhibiting p38 kinase activity. *Nat Commun* **7**, 13674 (2016).
91. G. Karlsson *et al.*, The tetraspanin CD9 affords high-purity capture of all murine hematopoietic stem cells. *Cell Rep* **4**, 642-648 (2013).
92. K. B. Kaufmann *et al.*, A latent subset of human hematopoietic stem cells resists regenerative stress to preserve stemness. *Nat Immunol* **22**, 723-734 (2021).
93. E. M. Pietras, Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease. *Blood* **130**, 1693-1698 (2017).
94. P. Bianco, P. G. Robey, P. J. Simmons, Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* **2**, 313-319 (2008).
95. M. Al-Nbaheen *et al.*, Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev Rep* **9**, 32-43 (2013).
96. J. S. Heo, Y. Choi, H. S. Kim, H. O. Kim, Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med* **37**, 115-125 (2016).
97. A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, K. S. Lalykina, The development of fibroblast

- colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* **3**, 393-403 (1970).
98. A. I. Caplan, Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **9**, 641-650 (1991).
  99. T. Squillaro, G. Peluso, U. Galderisi, Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant* **25**, 829-848 (2016).
  100. N. G. Chung *et al.*, Cotransplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* **80**, 370-376 (2004).
  101. K. Le Blanc *et al.*, Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* **363**, 1439-1441 (2004).
  102. K. Le Blanc *et al.*, Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* **371**, 1579-1586 (2008).
  103. B. Delorme *et al.*, Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* **111**, 2631-2635 (2008).
  104. M. C. Kastrinaki, I. Andreakou, P. Charbord, H. A. Papadaki, Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells using different membrane markers: comparison of colony/cloning efficiency, differentiation potential, and molecular profile. *Tissue Eng Part C Methods* **14**, 333-339 (2008).
  105. L. da Silva Meirelles, A. I. Caplan, N. B. Nardi, In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**, 2287-2299 (2008).
  106. F. Deschaseaux, P. Charbord, Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol* **184**, 319-325 (2000).
  107. F. J. Lv, R. S. Tuan, K. M. Cheung, V. Y. Leung, Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **32**, 1408-1419 (2014).
  108. U. Kozłowska *et al.*, Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues. *World J Stem Cells* **11**, 347-374 (2019).
  109. M. Crisan *et al.*, A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301-313 (2008).
  110. S. Stier *et al.*, Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* **201**, 1781-1791 (2005).
  111. G. Klein, The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia* **51**, 914-926 (1995).
  112. K. Probst *et al.*, Depletion of Collagen IX Alpha1 Impairs Myeloid Cell Function. *Stem Cells* **36**, 1752-1763 (2018).
  113. A. Nakamura-Ishizu *et al.*, Extracellular matrix protein tenascin-C is required in the bone

- marrow microenvironment primed for hematopoietic regeneration. *Blood* **119**, 5429-5437 (2012).
114. D. Verma *et al.*, Bone marrow niche-derived extracellular matrix-degrading enzymes influence the progression of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **34**, 1540-1552 (2020).
115. H. Xie *et al.*, Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Support Ex Vivo Expansion of Cord Blood-Derived CD34(+) Cells. *Stem Cells Int* **2016**, 6493241 (2016).
116. S. Mardpour *et al.*, Interaction between mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles and immune cells by distinct protein content. *J Cell Physiol* **234**, 8249-8258 (2019).
117. W. S. Toh, B. Zhang, R. C. Lai, S. K. Lim, Immune regulatory targets of mesenchymal stromal cell exosomes/small extracellular vesicles in tissue regeneration. *Cytotherapy* **20**, 1419-1426 (2018).
118. Y. Omatsu *et al.*, The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* **33**, 387-399 (2010).
119. B. O. Zhou, R. Yue, M. M. Murphy, J. G. Peyer, S. J. Morrison, Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* **15**, 154-168 (2014).
120. S. Morikawa *et al.*, Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* **206**, 2483-2496 (2009).
121. A. N. Tikhonova *et al.*, The bone marrow microenvironment at single-cell resolution. *Nature* **569**, 222-228 (2019).
122. K. Ning *et al.*, Functional Heterogeneity of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Subpopulations in Physiology and Pathology. *Int J Mol Sci* **23** (2022).
123. Z. Xie *et al.*, Single-cell RNA sequencing analysis of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and functional subpopulation identification. *Exp Mol Med* **54**, 483-492 (2022).
124. S. Kanazawa *et al.*, Mesenchymal stromal cells in the bone marrow niche consist of multi-populations with distinct transcriptional and epigenetic properties. *Sci Rep* **11**, 15811 (2021).
125. C. Baccin *et al.*, Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization. *Nat Cell Biol* **22**, 38-48 (2020).
126. S. Neri, R. M. Borzi, Molecular Mechanisms Contributing to Mesenchymal Stromal Cell Aging. *Biomolecules* **10** (2020).
127. M. Al-Azab, M. Safi, E. Idiatullina, F. Al-Shaebi, M. Y. Zaky, Aging of mesenchymal stem

- cell: machinery, markers, and strategies of fighting. *Cell Mol Biol Lett* **27**, 69 (2022).
128. F. Massaro *et al.*, Aging of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: Hematopoiesis Disturbances and Potential Role in the Development of Hematologic Cancers. *Cancers (Basel)* **13** (2020).
129. P. Coipeau *et al.*, Impaired differentiation potential of human trabecular bone mesenchymal stromal cells from elderly patients. *Cytotherapy* **11**, 584-594 (2009).
130. N. Baker, L. B. Boyette, R. S. Tuan, Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone* **70**, 37-47 (2015).
131. M. A. Baxter *et al.*, Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells* **22**, 675-682 (2004).
132. J. Cmielova *et al.*, Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow and periodontal ligaments. *Int J Radiat Biol* **88**, 393-404 (2012).
133. D. Y. Zhang, H. J. Wang, Y. Z. Tan, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling induces the aging of mesenchymal stem cells through the DNA damage response and the p53/p21 pathway. *PLoS One* **6**, e21397 (2011).
134. P. Ganguly *et al.*, Age-related Changes in Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: A Potential Impact on Osteoporosis and Osteoarthritis Development. *Cell Transplant* **26**, 1520-1529 (2017).
135. N. Charif *et al.*, Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: Implications on autologous regenerative medicine. *Biomed Mater Eng* **28**, S57-s63 (2017).
136. S. Matsuda, Y. Nakagawa, Y. Kitagishi, A. Nakanishi, T. Murai, Reactive Oxygen Species, Superoxide Dismutases, and PTEN-p53-AKT-MDM2 Signaling Loop Network in Mesenchymal Stem/Stromal Cells Regulation. *Cells* **7** (2018).
137. M. Meyer, M. Seetharam, First-Line Therapy for Metastatic Soft Tissue Sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* **20**, 6 (2019).
138. V. Damerell, M. S. Pepper, S. Prince, Molecular mechanisms underpinning sarcomas and implications for current and future therapy. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 246 (2021).
139. Anonymous, Comprehensive and Integrated Genomic Characterization of Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cell* **171**, 950-965.e928 (2017).
140. L. J. Helman, P. Meltzer, Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* **3**, 685-694 (2003).
141. D. G. Kirsch *et al.*, A spatially and temporally restricted mouse model of soft tissue sarcoma. *Nat Med* **13**, 992-997 (2007).
142. P. P. Lin *et al.*, Targeted mutation of p53 and Rb in mesenchymal cells of the limb bud

- produces sarcomas in mice. *Carcinogenesis* **30**, 1789-1795 (2009).
143. T. Quist *et al.*, The impact of osteoblastic differentiation on osteosarcomagenesis in the mouse. *Oncogene* **34**, 4278-4284 (2015).
  144. J. R. Toro *et al.*, Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978-2001: An analysis of 26,758 cases. *Int J Cancer* **119**, 2922-2930 (2006).
  145. D. Winchester *et al.*, Undifferentiated pleomorphic sarcoma: Factors predictive of adverse outcomes. *J Am Acad Dermatol* **79**, 853-859 (2018).
  146. H. Li *et al.*, Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer Res* **67**, 10889-10898 (2007).
  147. Y. Liu *et al.*, p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* **4**, 37-48 (2009).
  148. X. Li, A. F. Wilson, W. Du, Q. Pang, Cell-Cycle-Specific Function of p53 in Fanconi Anemia Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Proliferation. *Stem Cell Reports* **10**, 339-346 (2018).
  149. A. Marusyk, C. C. Porter, V. Zaberezhnyy, J. DeGregori, Irradiation selects for p53-deficient hematopoietic progenitors. *PLoS Biol* **8**, e1000324 (2010).
  150. P. Wlodarski *et al.*, Role of p53 in hematopoietic recovery after cytotoxic treatment. *Blood* **91**, 2998-3006 (1998).
  151. M. Dumble *et al.*, The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood* **109**, 1736-1742 (2007).
  152. M. Yamashita, E. Nitta, T. Suda, Aspp1 Preserves Hematopoietic Stem Cell Pool Integrity and Prevents Malignant Transformation. *Cell Stem Cell* **17**, 23-34 (2015).
  153. S. V. Boregowda *et al.*, Basal p53 expression is indispensable for mesenchymal stem cell integrity. *Cell Death Differ* **25**, 679-692 (2018).
  154. R. Pourebrahim *et al.*, Mdm2/p53 levels in bone marrow mesenchymal stromal cells is essential for maintaining the hematopoietic niche in response to DNA damage. *Res Sq* 10.21203/rs.3.rs-2544760/v1 (2023).
  155. T. Velletri *et al.*, Loss of p53 in mesenchymal stem cells promotes alteration of bone remodeling through negative regulation of osteoprotegerin. *Cell Death Differ* **28**, 156-169 (2021).
  156. M. Logan *et al.*, Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer. *Genesis* **33**, 77-80 (2002).
  157. J. Jonkers *et al.*, Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* **29**, 418-425 (2001).

158. A. Mayakonda, D. C. Lin, Y. Assenov, C. Plass, H. P. Koeffler, Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer. *Genome Res* **28**, 1747-1756 (2018).
159. K. Ellrott *et al.*, Scalable Open Science Approach for Mutation Calling of Tumor Exomes Using Multiple Genomic Pipelines. *Cell Syst* **6**, 271-281.e277 (2018).
160. S. Hänzelmann, R. Castelo, J. Guinney, GSVA: gene set variation analysis for microarray and RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* **14**, 7 (2013).
161. T. Stuart *et al.*, Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell* **177**, 1888-1902.e1821 (2019).
162. K. D. Sullivan, M. D. Galbraith, Z. Andrysik, J. M. Espinosa, Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ* **25**, 133-143 (2018).
163. V. Stambolic *et al.*, Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* **8**, 317-325 (2001).
164. D. Augsburger *et al.*, Current diagnostics and treatment of fibrosarcoma -perspectives for future therapeutic targets and strategies. *Oncotarget* **8**, 104638-104653 (2017).
165. A. Orimo *et al.*, Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335-348 (2005).
166. A. Orimo, R. A. Weinberg, Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. *Cancer Biol Ther* **6**, 618-619 (2007).
167. F. Strutz *et al.*, Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* **130**, 393-405 (1995).
168. Y. Guo *et al.*, Mitochondria transfer enhances proliferation, migration, and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell and promotes bone defect healing. *Stem Cell Res Ther* **11**, 245 (2020).
169. L. C. Shum, N. S. White, B. N. Mills, K. L. Bentley, R. A. Eliseev, Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation. *Stem Cells Dev* **25**, 114-122 (2016).
170. S. Assefnia *et al.*, Cadherin-11 in poor prognosis malignancies and rheumatoid arthritis: common target, common therapies. *Oncotarget* **5**, 1458-1474 (2014).
171. Z. R. Chalmers *et al.*, Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* **9**, 34 (2017).
172. L. B. Alexandrov *et al.*, Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415-421 (2013).
173. V. Dexheimer *et al.*, Differential expression of TGF- $\beta$  superfamily members and role of Smad1/5/9-signalling in chondral versus endochondral chondrocyte differentiation. *Sci*

- Rep* **6**, 36655 (2016).
174. U. R. Goessler *et al.*, In-vitro analysis of the expression of TGFbeta -superfamily-members during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes during dedifferentiation in cell culture. *Cell Mol Biol Lett* **10**, 345-362 (2005).
  175. M. Seike, Y. Omatsu, H. Watanabe, G. Kondoh, T. Nagasawa, Stem cell niche-specific Ebf3 maintains the bone marrow cavity. *Genes Dev* **32**, 359-372 (2018).
  176. K. Kirschner *et al.*, Proliferation Drives Aging-Related Functional Decline in a Subpopulation of the Hematopoietic Stem Cell Compartment. *Cell Rep* **19**, 1503-1511 (2017).
  177. M. S. Choudhery *et al.*, Bone marrow derived mesenchymal stem cells from aged mice have reduced wound healing, angiogenesis, proliferation and anti-apoptosis capabilities. *Cell Biol Int* **36**, 747-753 (2012).
  178. G. Despars, C. L. Carbonneau, P. Bardeau, D. L. Coutu, C. M. Beausejour, Loss of the osteogenic differentiation potential during senescence is limited to bone progenitor cells and is dependent on p53. *PLoS One* **8**, e73206 (2013).
  179. Y. Liu, P. Lei, S. Row, S. T. Andreadis, Cadherin-11 binds to PDGFR  $\beta$  and enhances cell proliferation and tissue regeneration via the PDGFR-AKT signaling axis. *Faseb j* **34**, 3792-3804 (2020).
  180. S. Alimperti, S. T. Andreadis, CDH2 and CDH11 act as regulators of stem cell fate decisions. *Stem Cell Res* **14**, 270-282 (2015).
  181. A. Molchadsky, N. Rivlin, R. Brosh, V. Rotter, R. Sarig, p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention. *Carcinogenesis* **31**, 1501-1508 (2010).
  182. C. X. Zhao, Z. Yang, Biological function and molecular mechanism of Twist2. *Yi Chuan* **37**, 17-24 (2015).
  183. Y. Omatsu, M. Seike, T. Sugiyama, T. Kume, T. Nagasawa, Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation. *Nature* **508**, 536-540 (2014).
  184. G. Lonetto *et al.*, Mutant p53-dependent mitochondrial metabolic alterations in a mesenchymal stem cell-based model of progressive malignancy. *Cell Death Differ* **26**, 1566-1581 (2019).
  185. G. Zhu *et al.*, p53 coordinates glucose and choline metabolism during the mesendoderm differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* **49**, 102067 (2020).
  186. M. Lacroix, R. Riscal, G. Arena, L. K. Linares, L. Le Cam, Metabolic functions of the tumor suppressor p53: Implications in normal physiology, metabolic disorders, and

cancer. *Mol Metab* **33**, 2-22 (2020).



## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名： 反町 優理子

印

(2024年 1月 24日 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	Motoharu Awazawa, Maya Matsushita, Ikumi Nomura, Naoki Kobayashi, Miwa Tamura-Nakano, Yuriko Sorimachi, Keiyo Takubo, Kohjiro Ueki. Imeglimin improves systemic metabolism by targeting brown adipose tissue and gut microbiota in obese model mice. <i>Metabolism</i> 2024 Jan 21;155796:ISSN 0026-0495.
論文	Kohei Shiroshita, Hiroshi Kobayashi, Shintaro Watanuki, Daiki Karigane, Yuriko Sorimachi, Shinpei Tamaki, Miho Haraguchi, Masamichi Yamamoto, Ayako Nakamura-Ishizu, Shinichiro Okamoto, Keisuke Kataoka, Keiyo Takubo. Distinct roles of the preparatory and payoff phases of glycolysis in hematopoietic stem cells. <i>Exp Hematol.</i> 2023 Aug;124:56-67.
論文	○Yuriko Sorimachi, Hiroshi Kobayashi, Yusuke Shiozawa, Shuhei Koide, Ryuichiro Nakato, Yukiko Shimizu, Tadashi Okamura, Katsuhiko Shirahige, Atsushi Iwama, Nobuhito Goda, Kaiyo Takubo, Keiyo Takubo. Mesenchymal loss of p53 alters stem cell capacity and models human soft tissue sarcoma traits. <i>Stem Cell Reports.</i> 2023 May 9;18(5):1211-1226.
論文	Kohei Shiroshita, Hiroshi Kobayashi, Shintaro Watanuki, Daiki Karigane, Yuriko Sorimachi, Shinya Fujit, Shinpei Tamaki, Miho Haraguchi, Naoki Itokawa, Kazumasa Aoyoama, Shuhei Koide, Yosuke Masamoto, Kenta Kobayashi, Ayako Nakamura-Ishizu, Mineo Kurokawa, Atsushi Iwama, Shinichiro Okamoto, Keisuke Kataoka, Keiyo Takubo. A culture platform to study quiescent hematopoietic stem cells following genome editing. <i>Cell Rep Methods.</i> 2022 Dec 5;2(12):100354.
論文	Toshihiko Kobayashi*, Dat Nguyen Tien*, Yuriko Sorimachi*, Yuki Sugiura, Takehiro Suzuki, Hitomi Karyu, Shiho Shimabukuro-Demoto, Tatsuki Uemura, Tadashi Okamura, Tomohiko Taguchi, Kohjiro Ueki, Norihiro Kato, Nobuhito Goda, Naoshi Dohmae, Keiyo Takubo, Makoto Suematsu, Noriko Toyama-Sorimachi. SLC15A4 mediates M1-prone metabolic shifts in macrophages and guards immune cells from metabolic stress. <i>PNAS.</i> 2021 Aug 17;118(33):e2100295118. (*These authors contributed equally)
論文	○Yuriko Sorimachi, Daiki Karigane, Yukako Ootomo, Hiroshi Kobayashi, Takayuki Morikawa, Kinya Otsu, Yoshiaki Kubota, Shinichiro Okamoto, Nobuhito Goda, Keiyo Takubo. p38 $\alpha$ plays differential roles in hematopoietic stem cell activity dependent on aging contexts. <i>J Biol Chem.</i> 2021 Jan-Jun;296:100563.
論文	Hironobu Morinaga, Yasuaki Mohri, Marina Grachtchouk, Kyosuke Asakawa, Hiroyuki Matsumura, Motohiko Oshima, Naoya Takayama, Tomoki Kato, Yuriko Nishimori, Yurik Sorimachi, Keiyo Takubo, Takayoshi Suganami, Atsushi Iwama, Yoichiro Iwakura, Andrzej Dlugosz. Obesity accelerates hair thinning by stem cell-centric converging mechanism. <i>Nature.</i> 2021 Jul;595(7866):266-271.
論文	Shintaro Watanuki, Hiroshi Kobayashi, Yuriko Sorimachi, Masamichi Yamamoto, Shinichiro Okamoto, Keiyo Takubo. ATP turnover and glucose dependency in hematopoietic stem/progenitor cells are increased by proliferation and differentiat on. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 2019 Jun 18;514(1):287-294.
講演	反町優理子, 田久保圭誉. マクロファージ投与によるニッチ修復誘導と造血回復促進. 【AMED適応・修復領域】R5若手主体の会議. 熊本. 2023. ポスター.
講演	反町優理子, 田久保圭誉. マクロファージ投与によるニッチ修復誘導と造血回復促進. 第十回早稲田大学生命医科学科ポスター交流会. 東京. 2023. ポスター. (ポスター賞 4位)
講演	反町優理子, 田久保圭誉. マクロファージ投与によるニッチ修復誘導と造血回復促進. NCGM夏季リポート. 東京. 2023. 口頭, ポスター. (NCGMRI Director's Award 最優秀賞受賞)

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名： 反町 優理子

印

(2024年 1月 24日 現在)

種類別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	Yuriko Sorimachi, Hiroshi Kobayashi, Nobuhito Goda, and Keiyo Takubo. 間葉系幹細胞特異的p53欠損は幹細胞特性を変化させて未分化軟部肉腫を発症する. 第9回がんと代謝研究会in松山. 2023. ポスター.
講演	Yuriko Sorimachi, Nobuhito Goda, and Keiyo Takubo. p53 Deficiency in Mesenchymal Stem Cells Alters Stress Hematopoiesis and Develops Fibrosarcoma. 第20回 幹細胞シンポジウム. 兵庫. 2023. ポスター.
講演	伊藤亜里, 富澤麻利子, 梶田博志, 鈴木那穂子, 反町優理子, 佐藤麻衣子, 五月女孝子, 松本 武久, 白水美香子, 田久保圭誉, 齊藤頼子, 石川文彦. キメラ抗原受容体T細胞治療時の組織依存的な代謝機構の解明. 日本生化学会大会. 福岡. 2023. 口頭.
講演	Ari Itoh-Nakadai, Yoriko Saito, Mariko Murasawa-Tomizawa, Hiroshi Kajita, Ikuko Ogahara, Saera Fujiki Nahoko Suzuki, Matsumoto Takehisa, Matsuda Masashi, Yuriko Sorimachi, Shinsuke Takagi, Mikako Shirouzu, Uchida Naoyuki, Keiyo Takubo, Koseki Haruhiko, Shultz Leonard, Shuichi Taniguchi, Fumihiko Ishikawa. Targeting poor prognosis leukemia with CD25-targeted chemokine receptor expressing CAR Tcell therapy. 第84回 日本血液学会. 福岡. 2022. 口頭.
講演	Yuriko Sorimachi and Keiyo Takubo. p38 $\alpha$ plays differential roles in hematopoietic stem cell activity dependent on aging contexts. Hemato-Retreat 2022 in Okinawa. 沖縄. 2022. 口頭.
講演	Yuriko Sorimachi. 間葉系幹細胞の老化とがん化の分子機構の解析. 次世代研究者挑戦的研究プログラム キックオフシンポジウム. 2022. 口頭.
講演	Yuriko Sorimachi, Nobuhito Goda, and Keiyo Takubo. Trp53 regulates mesenchymal stem cell capacity and tumorigenesis during aging. Joint Symposium between Waseda University and the Unviersity of Bonn. 2021. 口頭.
講演	Yuriko Sorimachi, Amir Kayvanjoo, Nobuhito Goda, and Elvira Mass. The Effect of Diet Induced Obesity on HSC development. 21th German-Japanese Joint Symposium on Life and Medical Sciences. 2020. 口頭.
講演	Yuriko Sorimachi, Nobuhito Goda, and Keiyo Takubo. Mesenchymal loss of Trp53 results in defects in hematopoietic stem cell capacity and tumorigenesis. Joint Symposium between Waseda University and the Unviersity of Bonn. 2019. 口頭.
講演	Yuriko Sorimachi, Nobuhito Goda, and Keiyo Takubo. p53 Deficiency in Mesenchymal Stem Cells Alters Stress Hematopoiesis and Develops Fibrosarcoma. 第17回 幹細胞シンポジウム. 兵庫. 2019. ポスター.