

長寿医療研究開発費 2022年度 総括研究報告

「認知症発症関連因子・機能モジュールの探索と人工知能を用いた発症予測モデルの開発」
に関する研究（21-24）

主任研究者 重水 大智 国立長寿医療研究センター（NCGG）
メディカルゲノムセンター（MGC）
バイオインフォマティクス研究部（部長）

研究要旨

認知症高齢者は毎年増加傾向にあり、2025年にその数は750万人に上ると推定されている。これは65歳以上の高齢者5人に1人が認知症を発症する数字である。一方で、現在認知症の有効な治療法、薬剤は開発されていない。そのため認知症への移行が確認されると完治は難しい。したがって、早期発見の診断法の確立が急務である。

近年、ヒトゲノム全体の一塩基多型（SNP）をジェノタイピングし、疾患群（ケース群）と健常者群（コントロール群）を比較することで疾患発症リスク因子を網羅的に調べるゲノムワイド関連解析（Genome-Wide Association Study: GWAS）が様々な疾患で実施されている。我々も認知症の中で最も患者数が多いアルツハイマー病（AD）のGWAS解析から新規AD関連遺伝子を報告している。

ADに次ぐ認知症患者数が多いのがレビー小体型認知症（DLB）である。本年度はGWAS解析では見つからないレアバリエントに着目したDLB発症リスク因子の探索に取り組んだ。全ゲノムシーケンス解析（WGS）からDLB発症リスク因子（変異）を網羅的に探索し、日本人特異的に見られる遺伝子変異を新たに2個同定した。その一つの変異についてモデル動物による機能解析を実施し、発症機序解明の一端を明らかにした。今後、検体数の増加が、さらなる新規日本人特異的DLB発症関連遺伝子変異の同定につながると期待している。

主任研究者

重水 大智 国立長寿医療研究センター バイオインフォマティクス研究部 (部長)

分担研究者

森園 隆 国立長寿医療研究センター 疾患ゲノム研究部 (研究員)

秋山真太郎 国立長寿医療研究センター バイオインフォマティクス研究部 (研究員)

菅沼 睦美 国立長寿医療研究センター バイオインフォマティクス研究部 (特任研究員)

木村 藍 国立長寿医療研究センター データ管理室 (研究員)

A. 研究目的

本研究では、NCGG バイオバンクに登録されている認知症検体の臨床情報やゲノム配列データ等の分子データ (DNA、RNA、miRNA 等) を用いて、①認知症発症関連因子 (ゲノム変異、感受性遺伝子等) や機能モジュール (ハブ遺伝子、パスウェイ) の同定、ならびに②分子データの統合データベースの構築、③人工知能を用いた認知症発症予測モデルの開発を目指す。本年度はまず①GWAS 解析では見つからないレアバリエントに着目したWGS 解析から DLB 発症関連遺伝子変異の同定を試みる。

B. 研究方法

具体的には次のようなアプローチで解析を進める。

1. DLB 患者群 (ケース群) と認知機能正常者 (CN) 群 (コントロール群) の WGS 解析を実施する。
2. GATK 用いて Variant Call を行い、バリエントごと、遺伝子ごとにケース・コントロール解析 (関連解析) を実施し、DLB 発症関連遺伝子変異の網羅的探索を行う。
3. 上記関連解析で同定された遺伝子変異の人種別アレル頻度の検証、モデル動物を用いた機能解析を実施する。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒト由来検体を用いた研究は「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」、動物実験、遺伝子組み換え実験も倫理指針に順守して実施する。またこれらの研究計画は、国立長寿医療研究センター倫理・利益相反委員会の承認を得て行う。診療施設、患者より検体提供を受け、検証するため、患者の人権擁護のために、情報管理などに十分な配慮を行う。これは個人情報保護法および人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に準拠して進める。成人が主な対象となるために、高齢者に配慮した説明書、同意書を作成する。

データベースは、ネットワークから切り離された独立した計算機サーバー内に格納する。検体には番号が割り当てられ、データ管理者が匿名化情報を保有する。

C. 研究結果

■ 疾患関連因子の探索, PPI 解析から機能モジュール同定, 独立検体検証

DLB: 日本人 DLB 患者 61 名と NC 者 45 名の WGS 解析、および 7,274 名の大規模日本人検証コホート検証解析から *MFSD3* 遺伝子のストップゲイン変異 (rs143475431, C296X, 図 1a) が疾患感受性遺伝子変異として見出された。興味深いことにこの変異は東アジア人特異的な遺伝子変異であること

であった。
MFSD3 遺伝子はアセチル CoA の膜輸送に関わる膜タンパク質と推定されている。アセチル CoA の代謝産物であるアセチルコリン (ACh) は神経伝達物質であり、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) とブチリルコリン

エステラーゼ (BuChE) によって加水分解される。同定した *MFSD3* 遺伝子のストップゲイン変異は、血漿中での BuChE の増加に関与したことから (図 2, $P = 0.029$)、アセチルコリンの分解に関与して DLB 発症に貢献した可能性が示唆された。

また DLB 患者で変異が蓄積している 16 個の遺伝子を用いた PPI 解析を実施した。その結果、2 つのハブ遺伝子 (*RASSF1*、*MRPL43*) が新たな DLB 発症リスク遺伝子候補として同定された。その後の大規模日本人コホート検証解析から *MRPL43* 遺伝子のミスセンス変異 (図 1b, chr10:102746730, p.N81H) も *MFSD3* 遺伝子変異同様、DLB の発症に寄与していることが示唆された。

DLB とパーキンソン病は深い関わりがある。*MRPL43* 遺伝子はパーキンソン病発症リスク遺伝子のひとつ *PARK7* と共発現することが知られている。また *MRPL43* 変異を有する DLB 患者の多くがパーキンソニズムの症状を呈することからも、*MRPL43* 変異が DLB 発症に寄与する可能性が高いと予想される。この変異は *MFSD3* 遺伝子変異同様、日本人以外では見つかっておらず、人種特異的な DLB 発症リスク遺伝子変異であった。

この研究成果は、神経科学分野の国際専門誌「*Neuropsychiatric Genetics*」に、2022 年 6 月 29 日付で掲載された。

■ 動物モデルによる機能検証

DLB の発症機序を解明する目的で、同定した DLB の疾患感受性変異をモデル動物に

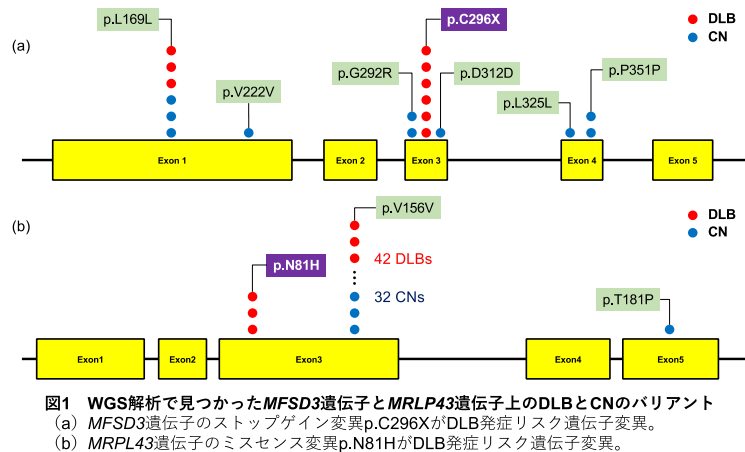


図1 WGS解析で見つかった*MFSD3*遺伝子と*MRPL43*遺伝子上のDLBとCNのパリアント
(a) *MFSD3*遺伝子のストップゲイン変異p.C296XがDLB発症リスク遺伝子変異。
(b) *MRPL43*遺伝子のミスセンス変異p.N81HがDLB発症リスク遺伝子変異。

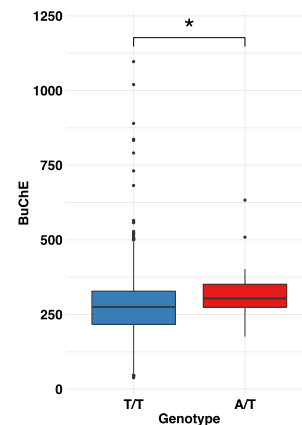


図2 *MFSD3*遺伝子変異と血漿中でのBuChE濃度

CRISPR-Cas9 を用いて変異導入を行った。*MFSD3* と *MLKL* のストップゲイン変異のホモ接合体のノックアウトマウス・ゼブラフィッシュを作製した。

まず DLB の感受性変異 *MFSD3* の脳組織での機能解析を実施した。ノックアウトゼブラフィッシュから脳を取り出し、BuChE の濃度測定を行った。血中同様、変異体で脳組織でも BuChE が有意に上昇することが確認されたことから (図 3)、DLB 発症に寄与していることが実証された。現在、AChE、ノックアウトマウスでも同様の結果が得られるか検証を行なっている。

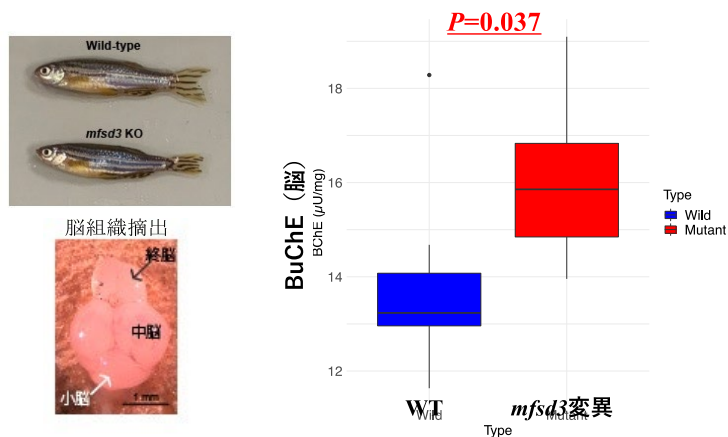


図3 脳組織における*MFSD3*変異体とWTのBuChEの比較検証

並行してヒト神経幹細胞から神経細胞とグリア細胞に分化させる系を構築しているが、系の確立には一定の時間を要する。

■ 免疫細胞の多様性と認知症の関連について

以前、研究代表者はアルツハイマー病 (AD) の進行に伴い、血中に含まれる好中球の細胞の割合が増加することを見出した (Shigemizu D. et al *Alzheimers Res Ther.* 2020 Jul 16;12(1):87.). そこで、AD と免疫システムとの関連性を網羅的に調べた。その結果、好中球だけでなく、B 細胞、形質細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞においても同様の傾向が得られた。また B 細胞と T 細胞におけるレパトア解析も実施し、年齢上昇に伴い、B 細胞、T 細胞の多様性が減少することを明らかにした (図 4a)。

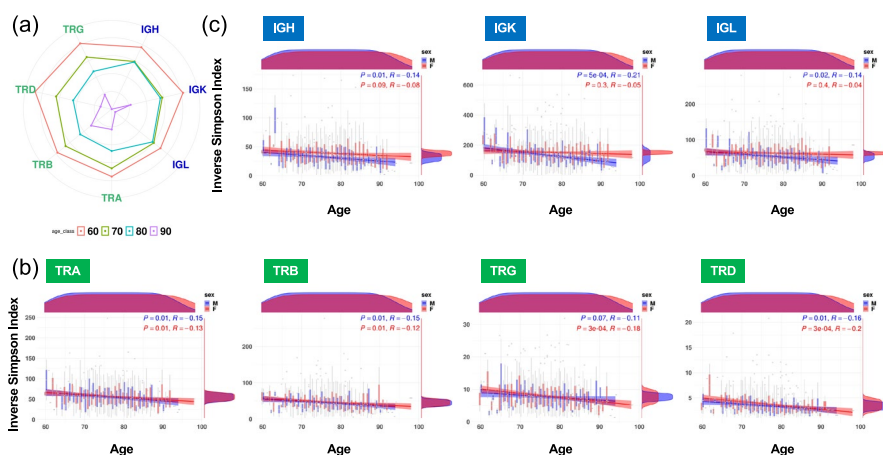


図4 B細胞とT細胞の年齢と性別による多様性

興味深いことに T 細胞は性別に関係なくこの傾向が示されるが (図 4b)、B 細胞は男性に顕著な傾向が認められた (図 4c)。これらの解析結果はオンライン英国科学誌「*NPJ Aging*」に 2022 年 11 月 4 日付で掲載された。

D. 考察と結論

本研究の最終目的は、認知症発症関連遺伝子の同定、ならびに臨床応用を目指した疾患発症予測モデルの開発である。本年度はまず、GWAS 解析では見つからないレアバリエントに着目した DLB 発症遺伝子変異に焦点をあて、WGS 解析を実施し、新規遺伝子変異を同定した。今後、検体数を増やすことで、さらなる新規遺伝子変異の同定が期待される。これらの解析は DLB の早期発見、早期予防への研究に貢献すると信じている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **Shigemizu D.**, Akiyama S., Mitsumori R., Niida S., and Ozaki K. Identification of potential blood biomarkers for early diagnosis of Alzheimer's disease through immune landscape analysis. *NPJ Aging*. 2022 Nov 4;8(1):15.
2. **Shigemizu D.**, Asanomi Y., Akiyama S., Higaki S., Sakurai T., Ito K., Niida S., and Ozaki K. Network-based meta-analysis and the candidate gene association studies reveal novel ethnicity-specific variants in *MFSD3* and *MRPL43* associated with dementia with Lewy bodies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2022 Jun 28
3. **Shigemizu D.**, Asanomi Y., Akiyama S., Mitsumori R., Niida S., and Ozaki K. Whole-genome sequencing reveals novel ethnicity-specific rare variants associated with Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2022 Mar 10
4. **重水 大智**: バイオインフォマティクスの世界 (2023). *別冊 医学のあゆみ*, pp.51-59.
5. **重水 大智**: 疾患バイオマーカーとしてのマイクロ RNA と診断応用. シーエムシー出版, 第I編第 22 章 pp.176-181.
6. **重水 大智**: 疾患ゲノム解析 II: GWAS 解析. *医学のあゆみ*, Vol.281, No.9, 920-923.
7. **重水 大智**: 疾患ゲノム解析 I: NGS 解析. *医学のあゆみ*, Vol.281, No.8, 854-858.

2. 学会発表

1. **重水 大智**: 「大規模ヒトゲノム・オミクス解析における認知症研究」ゲノム医科学とバイオインフォマティクスの接点と集学研究, 三島, Feb 22, 2023. (招待講演)

2. **Shigemizu D.:** 「 RNA-sequencing analysis identification of potential biomarkers for diagnosis of sarcopenia 」 **Sarcopenia Symposium 2022, Seoul, Korea, Dec 20, 2022.** (招待講演)
3. **重水 大智:** 「 大規模ヒトゲノム・オミクス解析における認知症原因・感受性遺伝子の同定と発症予測モデルの開発 」 **熊本大学大学院生命科学研究部附属健康長寿代謝制御研究センター・国立長寿医療研究センター 第一回共同シンポジウム, 熊本, Dec 10, 2022.** (招待講演)
4. **重水 大智:** 「 認知症における日本人大規模ゲノム研究の最前線 」 **九州大学セミナー, 福岡, Sep 22, 2022.** (招待講演)
5. **重水 大智:** 「 全ゲノム解析による認知症関連レアバリエーション解析 」 **第 11 回生命医薬情報学連合大会, 大阪, Sep 14, 2022.** (招待講演)
6. **重水 大智:** 「 大規模ゲノム・オミクス解析を使った認知症研究の最前線 」 **第 765 回新潟医学会例会シンポジウム, WEB, May 19, 2022.** (招待講演)
7. **重水 大智:** 「 認知症における日本人大規模ゲノム研究の最前線 」 **東レ バイオ要素技術連絡会, 鎌倉, Mar 14, 2022.** (招待講演)
8. 古谷 元樹, 森園 隆, 光森 理紗, 呉谷 文, 中野 由紀子, 新飯田 俊平, **重水 大智**, 尾崎 浩一: 日本人集団における QTL 解析. **日本人類遺伝学会第 67 回大会, 2022, Dec 15, PE2-5, 横浜.** (ポスター)
9. 光森 理紗, 浅海 裕也, **重水 大智**, 秋山 真太郎, 森園 隆, 新飯田 俊平, 尾崎 浩一: 日本人および民族間横断的ゲノムワイド関連解析によるレビー小体認知症感受性座位の探索. **日本人類遺伝学会第 67 回大会, 2022, Dec 15, P-12-12, 横浜.** (ポスター)
10. 浅海 裕也, **重水 大智**, 秋山 真太郎, 光森 理紗, 新飯田 俊平, 尾崎 浩一: 日本人における遅発性アルツハイマー病関連遺伝子 SHARPIN の同定と解析. **日本人類遺伝学会第 67 回大会, 2022, Dec 15, P-12-10, 横浜.** (ポスター)
11. 木村 哲晃, 浅海 裕也, 秋山 真太郎, 光森 理紗, 森園 隆, 新飯田 俊平, 尾崎 浩一, **重水 大智:** 全ゲノムシーケンスによるアルツハイマー病に関連した MLKL 遺伝子の日本人に特異的な新規希少バリエーションの発見. **日本人類遺伝学会第 67 回大会, 2022, Dec 16, P-21-1, 横浜.** (ポスター)
12. 呉谷 文, 森園 隆, 秋山 真太郎, 新飯田 俊平, 尾崎 浩一, **重水 大智:** 日本人大規模データを用いたアルツハイマー病トランスクリプトームワイド関連解析. **第 45 回日本分子生物学会年会, 2022, Nov 30, 1P-718, 幕張.** (ポスター)
13. 古谷 元樹, 菅沼 睦美, 秋山 真太郎, 光森 理紗, 細山 徹, 竹村 真里枝, 松井 康素, 佐竹 昭介, 中野 由紀子, 尾崎 浩一, **重水 大智:** 網羅的遺伝子発現解析によるサルコペニアに関わるバイオマーカーの探索. **第 9 回日本サルコペニア・フレイル学会大会, 2022, Oct. 29-30, I-064, 草津.** (ポスター)
14. Furunani M., Suganuma M, Akiyama S., Mitsumori R., Hosoyama T., Takemura M., Matsui Y., Satake S., Nakano Y., Niida S., Ozaki K., and **Shigemizu D.:** Identification of potential blood

biomarkers for Sarcopenia through RNA sequencing analysis. **The 8th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia**, 2022, Oct. 28, P07-2, Nagoya. (ポスター)

15. Asanomi Y., **Shigemizu D.**, Akiyama S., Mitsumori R., Niida S., and Ozaki K.: Identification of a novel functional missense variant associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese. **第 11 回生命医薬情報学連合大会**, 2022, Sep. 14, P-82, Osaka. (ポスター)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし