

長寿医療研究開発費 2023年度 総括研究報告（総合報告）

長寿医療研究のための技術基盤形成に資する基礎技術研究 ③疾患モデル動物の作成
(21-27-3)

主任研究者 下田修義 国立長寿医療研究センター メディカルゲノムセンター（室長）

研究要旨

本研究課題開始当初、当室は研究推進基盤センター内の分子機能解析室であったが、本年度の改組によりメディカルゲノムセンターのゲノム機能解析室への変更となった。ただし、新しい所属においても本研究を継続して進めている。なおメディカルゲノムセンターでは主に NCGG のバイオバンクに蓄積されたリソースを活用して、認知症を中心としたゲノム解析により疾患関連遺伝子の特定およびその機能解析を行っている。今回の課題で当室は所内のリクエストに応じて疾患モデル動物の作成ができる体制を整えることを第一の目標とした。第二の目標は作成した疾患モデル動物の機能解析である。現段階では、ゲノム編集技術を利用して高齢者特有の疾患に関連する遺伝子の機能破壊（ノックアウト）と疾患関連バリエーションへの置き換え（ノックイン）をマウスとゼブラフィッシュにおいて実施できる環境を構築し終え、第一の目標はほぼクリアした。現在は疾患モデルマウスの機能解析インフラ整備に取り組んでいる。

主任研究者

下田 修義 国立長寿医療研究センター メディカルゲノムセンター（室長）

研究期間 2021年4月1日～2024年3月31日

A. 研究目的

老年病の発症原因や病態を解明し、その理解に立脚して予防法や治療法を開発するには疾患のモデルとなる動物が必要である。当センター内では現在、バイオバンク試料を活用した、メディカルゲノムセンターによるヒトゲノム解析から、アルツハイマー病やレビー小体型認知症の発症に関連したバリエーション(DNAの塩基置換)を持つ遺伝子が次々と発見されており、次の段階としてそれらバリエーションが生体にもたらす影響をモデル動

物で評価することが必要となっている。この場合、効率やコストの面、またノウハウの蓄積がなされるという点、さらに技術の継承がなされるということから、モデル動物の変異体を集約的に作成する支援体制をセンター内に構築するのが合理的である。そこで本研究ではゲノム編集技術を利用して、高齢者特有の疾患に関連する遺伝子のノックアウトとバリエーションのノックインをマウスとゼブラフィッシュで行い、それらをセンター内研究者に供給できる体制の構築を第一の目的とした。第二の目的は、作成した変異体を効率よく解析するためのインフラ整備である。

B. 研究方法

(1) 全体計画

ゲノム編集動物・細胞を利用した DNA 多型の機能解析と DNA メチル化解析

マウスとゼブラフィッシュというモデル生物に対しゲノム編集技術を駆使できるような環境（人的、技術的、設備的）を整え、DNA および DNA メチル化の多型解析から見出される認知症関連遺伝子、あるいは加齢による免疫低下や高齢者に見られる疼痛といった、高齢者の生活の質に関わる遺伝子の機能解析を支援できるようにする。また加齢による DNA メチル化の変動と、初期胚における DNA メチル化のリセットについて、それらの現象の、老化並びに若返りに対する関与を検証する。

(2) 年度別計画

【2021年度】

1) ゲノム編集技術を認知症研究へ応用するための環境構築

マウス、ゼブラフィッシュ、そしてヒト培養細胞に対し、ゲノム編集（ノックアウトおよびノックイン）を行えるよう環境整備する。センターで見出された5つの新奇認知症関連遺伝子を対象として、有効なガイド RNA のデザイン法や導入法、変異の検出法を見出す。

【2022年度】

1) 認知症、免疫、および疼痛関連遺伝子変異体・変異株の樹立

センター内のゲノム解析チーム、並びに主任研究者が同定した認知症関連 DNA 多型について、ゲノム編集技術を用いてマウスに同等の変異（欠損、あるいはバリエーション）を導入する。ゼブラフィッシュにも当該認知症関連遺伝子（オーソログ）がある場合、具体的には MRPL43 及び MFSD3 については、ゼブラフィッシュにも、DNA の変異を導入する。認知症以外では、高齢者における免疫の低下に関わる可能性がある遺伝子のノックアウトも作成する。また痛み刺激の伝達に関わる遺伝子3種類について、ゼブラフィッ

シュのノックアウト個体を作成する。いずれの場合も、変異を導入したモデル生物は、まず、野生型と交配することで変異を固定する。

【2023年度】

1) 疾患関連遺伝子機能の解析

変異を導入したモデル生物の表現型を解析する。マウスについてはホモ変異個体における老人斑形成の有無を組織免疫染色で、また認知機能の解析をインテリケージ(IntelliCage)などのアッセイ装置を用いて行う。ゼブラフィッシュの変異体については形態異常や行動異常を解析する。また同脳内のブチリルコリンエステラーゼ活性、アセチルコリンエステラーゼ活性を測定する。疼痛に関わる遺伝子のゼブラフィッシュ変異体に対しては、ゼブラフィッシュに熱プローブを近づけたときの逃避行動をビデオカメラで撮影し、画像データをもとに痛覚刺激伝達異常を解析する。また新規の変異体作成のリクエストがあり次第取り組む。

2) DNA メチル化の解析

マウスやゼブラフィッシュでは、受精卵でエピゲノムのリセットがみられる。主任研究者はこの現象が細胞の若返りに寄与すると推測しており、ゼブラフィッシュを利用して、エピゲノムリセットに関与する因子の同定を行う。

(倫理面への配慮)

本研究にはヒト遺伝子解析研究が含まれる。したがって本研究は国立長寿医療研究センターの倫理・利益相反委員会での承認を得たうえで実施した。組み換え DNA 実験についても同機関の承認を受けた上で実施した。

C. 研究結果

【2021年度】

ゲノム編集技術を認知症研究へ応用するための環境構築

マウスおよびゼブラフィッシュにおいてゲノム編集技術を利用したノックアウトおよびノックイン個体の作出を行えるよう環境整備した。具体的には以下の四項目を達成した。

- 1) 簡便なガイド RNA のデザイン法やオーダー法の選択と、それらの情報を希望者に伝えるための文書化
- 2) エレクトロポレーションによるマウス受精卵へのガイド RNA 導入レシピの検討 (実験動物管理室との共同研究による)

- 3) ゼブラフィッシュ受精卵にゲノム編集のためのマテリアル（ガイド RNA と Cas9 タンパク質）を顕微注入するためのシステム立ち上げと実験補助員の顕微注入トレーニング
- 4) ゲノム編集の成否を確認するための簡便な変異検出技術(heteroduplex mobility assay: HMA)の立ち上げ

【2022年度】

認知症、免疫、および疼痛関連遺伝子変異体の樹立

1) マウス変異体について

センター内のゲノム解析チームが同定したアルツハイマー型認知症(AD)関連3遺伝子 *SHARPIN*, *MLKL*, *OR51G*、およびレビー小体型認知症(DLB)1遺伝子 *MRPL43* について、動物実験管理室との共同でゲノム編集技術を用いて、疾患関連バリエント（塩基置換）のマウスゲノムへの導入（ノックイン）を試み、*Mrp143*をのぞきいずれも成功した（ヒト *OR51G*のマウスオーソログは *Olfr578*）。*Mrp143*の疾患関連バリエントを導入したノックイン変異体を得られなかった理由として、マウスではそのバリエントがヘテロ接合体の状態でも致死になるためと考えられた。ただし *Mrp143*バリエント導入の過程で、副産物としてインフレームの6塩基欠損変異（2アミノ酸）が得られたが、その6 bp 欠損変異についてもホモ接合体は得られなかったため、同欠損変異はホモ接合体では致死になると考えられた。また DLB 関連遺伝子として *Mrp143*に加え *MFS3*が同チームにより見出されたが、この遺伝子に見つかったバリエントは終結コドン導入変異であったため、マウスの *Mfsd3*については遺伝子破壊（ノックアウト）変異のみを作成した。*Sharnin*, *Mkl1*, *Olfr578*については *Mrp143*の場合と同じく、ノックインの過程で副産物として遺伝子破壊変異（小さな欠損。ただしフレームシフトなので機能喪失）が得られたため、ノックイン変異に対する対照としての利用を考え、*Sharnin*, *Mkl1*, *Olfr578*については *Mfsd3*と同じく遺伝子破壊変異の系統も維持した。これらの変異体は、後に、依頼主であるメディカルゲノムセンターのバイオインフォマティクス部門並びに疾患ゲノム研究部門に受け渡した。ただし *Sharnin* 変異体のホモ個体については、ノックアウトのヘテロ個体の交配を繰り返したが、得られず、最終年度への持ち越しとなった。またバイオセーフティー室から依頼のあった、免疫関連遺伝子 *Axl*についても同技術によるノックアウトマウスの作成を開始した。

2) ゼブラフィッシュの変異体について

基本的にマウスで遺伝子をゲノム編集するときには平行してゼブラフィッシュの同じ遺伝子（オーソログ）の変異体も作成することを考えている。しかし上記の AD

関連遺伝子のうち、*SHARPIN*, *MLKL*, *OR51G*についてはゼブラフィッシュのオーソログが存在しなかったため、残りの、DLBに関わる上記2遺伝子 *Mrp143*および *Mfsd3* についてゼブラフィッシュのノックアウト変異体作成も試みた。*Mrp143* 変異はマウスのケースと同様に、モザイクの状態で致死となり、変異体は作成できなかったが、*Mfsd3* についてはフレームシフトを起こした、したがって機能を喪失した2系統が単離できた。また認知症研究センターからの依頼で、痛覚刺激の伝達に関わるペプチド、コレシストキニン、のレセプター遺伝子 *cholecystokinin-like neuropeptide receptor* の3つのゼブラフィッシュパラログ、*CCKAR*, *CCKBRa*, *CCKBRb* のノックアウトフィッシュの作成に取り組み、いずれの遺伝子についても欠損変異を導入することに成功した。それらはかけ合わせによりホモ変異体を作成した。

【2023年度】

疾患関連遺伝子機能の解析

- 1) 変異を導入した一部の疾患モデル生物について表現型の解析を開始した。ヒトでは *MFSD3* (major facilitator superfamily domain containing 3) 遺伝子のコーディング領域にストップコドンが入るレアバリエントが DLB 患者で見つかる割合が有意に高かった (MGC 重水らの研究)。またそのバリエントを持つ DLB 患者では血液のブチリルコリンエステラーゼ (BuChE) 活性が有意に上昇していた。*MFSD3* タンパク質の機能は未だ明らかではないが、その構造から形質膜に結合して、溶質 (solute) の輸送、とりわけアセチル CoA の輸送に関わるタンパク質をコードしていると想定された。それは *MFSD3* が、既知のアセチル CoA トランスポーターである *SLC33A1* と比較的高い相同性を示すからである。溶質の輸送は、細胞内への栄養分の取り込み、イオンの輸送、細胞内からの老廃物の除去等の生理学的機能に欠かせない。以上の情報から、DLB と *MFSD3* の関連について以下の仮説を立てた。アセチル CoA は神経細胞内でコリンアセチルトランスフェラーゼの作用によりコリンを原料にして神経伝達物質であるアセチルコリンとなる。*MFSD3* の機能低下はシナプス間隙でのアセチルコリン濃度の低下を引き起こし、認知機能の低下をもたらすが、そこに作用機序は不明であるが BuChE の活性上昇を伴う、という仮説である。そこでゼブラフィッシュの *mfsd3* (DLB 関連) 変異体については成魚の脳を摘出し、ELISA でアセチルコリンエステラーゼ (AChE) およびブチリルコリンエステラーゼ (BuChE) の活性を測定した。初回の ELISA では BuChE が *mfsd3* 変異体で高いという結果が得られたが、二回目の測定では変化が見られず、再現性は得られなかった。この結果は血液 (ヒト) と脳 (ゼブラフィッシュ) という BuChE の活性測定対象とした器官の違いによるものなのか、あるいは魚とヒトという種の違いによるものか明らかではない。今後はゼブラフィッシュの脳におけるアセチルコリン濃度を野生型と *mfsd3* 変異体で比較する必要があると考えている。

- 2) *Mfsd3* 変異体マウスおよび *Sharpin* 変異体マウスについては IntelliCage という装置を用いて、セミナチュラル（準自然的）なコンディションで学習や記憶の能力をテストした。この装置では非接触個体識別 (RFID) 技術をベースにしており、マウスへのストレスを最小化している。その結果概要を以下にまとめた。

解析項目	<i>Mfsd3</i>	<i>Sharpin</i>
新奇環境下での活動性	WT より有意に低下	WT と差は見られず
基底活動量とリズム	規定レベルでより低活動	高活動
常同行動	WT と差は見られず	WT と差は見られず
行動系列の学習と行動柔軟性	各指標において一貫した低活動性。複雑な学習課題において一部学習困難を示した。固執的・衝動的なノーズポーク（装置の四隅に設置されたセンサーを鼻でつつく行為）行動の亢進を示した。	複雑な学習課題において一部学習困難を示した。固執的・衝動的なノーズポーク行動の亢進を示した。
不安惹起刺激に対する反応	WT は光刺激に対して典型的な忌避行動を示した。 <i>Mfsd3</i> 変異マウスでは少なくとも光り刺激に対する不安の誘発が抑制されている、もしくは感覚鈍磨があることが示唆された。	<i>Sharpin</i> 変異マウスでは少なくとも光り刺激に対する不安の誘発が抑制されている、もしくは感覚鈍磨があることが示唆された。
衝動的行動の制御と持続的注意	特筆すべき異常や群間の有意な差は見られず。	特筆すべき異常や群間の有意な差は見られず。
甘味指向性・意欲	群間の有意差なし	群間の有意差なし

この表で示すように、いくつかの項目において *Mfsd3* 変異体と WT の間で、あるいは *Sharpin* 変異体と WT の間で行動の違いが観察された。特に両変異体とも一部のテストで学習困難が認められたのはこれらの変異体の認知症モデル動物としての有用性を示唆している。なおこの行動実験は MGC の重水ラボ、尾崎ラボ、実験動物管理室との共同研究である。

- 3) 疼痛に関わる遺伝子のゼブラフィッシュ変異体に対しては、ゼブラフィッシュに熱プローブを近づけたときの逃避行動をビデオカメラで撮影し、事後的に逃避

行動開始に要する時間を計測した。野生型と比較して、逃避行動開始が遅くなるようであれば変異体は疼痛のリレーに影響があると判断できる。*CCKBRA* 変異体をこの方法で解析したが、野生型とは差が有意とはならなかった。そして続いて *CCKBRa* と *CCKBRb* の変異体を解析する予定であったが、依頼者が本年度上半期をもって異動することになりそれら二つの変異体については残念ながら解析を途中で打ち切ることになった。

- 4) 神経遺伝学研究部から新規のノックインマウス作成のリクエストがあった。このノックインは今まで作成した塩基置換導入と異なり、ゲノムの特定の部位への 10 kb 長の遺伝子のノックインという依頼であった。そのためにはマウス受精卵への試薬導入のため従来用いていたエレクトロポレーションではなくて、顕微注入を行う必要がある。そこで、既報の手法に従い、まず高純度の顕微注入専用バッファー (10T-0.1E) の調整を行った。そしてこの試薬で、以下の材料を溶解した。すなわち、1. sgRNA、2. tracrRNA、3. Cas9 タンパク質、4. ターゲティングベクター、の 4 種類の材料である。最後に、実験動物管理室スタッフが、マウス受精卵への試薬注入、偽妊娠マウスの子宮への移植、帝王切開による仔の摘出、もしくは自然分娩により産仔を取得した。独立した 3 回のインジェクションを行い、計 42 匹の個体が得られたが、ジェノタイピングの結果、いずれの仔マウス (F0) にも期待した遺伝子は導入されていなかった (0%)。そこで、標的部位の DNA を解析したところ、既報によれば 7 割程度の産仔に認められた CRISPR/Cas9 による標的部位の構造変化が一つも検出できなかった。この結果は、遺伝子の標的部位への導入以前に、そもそもその前提条件の一つとなる、標的部位の切断自体が生じていなかったことを示した。

D. 考察と結論

当該研究は当センターにおける認知症等の長寿医療の中核となる疾患の病態解明に資する研究技術開発ならびに疾患モデル動物の提供を行う課題である。ゲノム編集技術を認知症研究へ応用するための環境構築の第一歩である、マウス及びゼブラフィッシュのノックイン・ノックアウト変異体の作成と維持について全般的に順調に進み、安定して変異動物を供給できる体制が整った。今後もセンター内の横断的協力体制により同定されると期待される新規認知症関連遺伝子の機能解析や治療薬開発をするうえで欠かせない疾患モデル生物を迅速かつ安価に所内研究者に対して提供できることが期待される。現在、これまでの実績から、現時点において新たなゲノム編集動物を 2 ライン作成する依頼を受けている。すでに作成されたゲノム編集マウスを含め、それら新たな変異体の機能解析が今後の課題となる。作成されたゲノム編集動物の中から、機能解析により認

知症モデル動物となり得る変異体が現れれば、それを所内の他の研究者に分配することにより、所内での認知症研究が加速することが期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2021 年度

- 1) Yasuno, F., Kimura, Y., Ogata, A., Ikenuma, H., Abe, J., Minami, H., Nihashi, T., Yokoi, K., Hattori, S., Shimoda, N., Ichise, M., Sakurai, T., Ito, K., Kato, T. Kinetic modeling and non-invasive approach for translocator protein quantification with ¹¹C-DPA-713. *Nuclear Medicine and Biology* 108-109 (2022) 76-84.

2022 年度

- 2) Shirai, M., Nara, T., Takahashi, H., Takayama, K., Chen, Y., Hirose, Y., Fujii, M., Awazu, A., Shimoda, N., Kikuchi, Y. Identification of aberrant transcription termination at specific gene loci with DNA hypomethylated transcription termination sites caused by DNA methyltransferase deficiency. *Genes & Genetic Systems*. Vol. 97, p139-152 (2022).
- 3) Shirai, M., Takayama, K., Takahashi, H., Hirose, Y., Fujii, M., Awazu, A., Shimoda, N., Kikuchi, Y. Methylome data derived from maternal-zygotic *DNA methyltransferase 3aa*^{-/-}. *Data in Brief*. Vol. 44, 108514 (2022).
- 4) Yasuno, F., Watanabe, A., Kimura, Y., Yamauchi, U., Ogata, A., Ikenuma, H., Abe, J., Minami, H., Nihashi, T., Yokoi, K., Hattori, S., Shimoda, N., Kasuga, K., Ikeuchi, T., Takeda, A., Sakurai, T., Ito, K., Kato, T. Estimation of blood-based biomarkers of glial activation related to neuroinflammation. *Brain, Behavior, & Immunity-Health* 26 (2022) 100549.
- 5) Yasuno, F., Kimura, Y., Ogata, A., Ikenuma, H., Abe, J., Minami, H., Nihashi, T., Yokoi, K., Hattori, S., Shimoda, N., Watanabe, A., Kasuga, K., Ikeuchi, T., Takeda,

A., Sakurai, T., Ito, K., Kato, T. Involvement of inflammation in the medial temporal region in the development of agitation in Alzheimer's disease: an in vivo positron emission tomography study. *Psychogeriatrics* (2023) 23(1)126-135.

- 6) Shirai, M., Shimoda, N., Takahashi, H., Takayama, K., Kikuchi, Y. Microarray Transcriptome datasets of maternal-zygotic DNA methyltransferase 3aa^{-/-} zebrafish during early developmental stages. *Data in Brief*. Vol. 47, 108967 (2023).
- 7) 新飯田俊平、下田修義 診断バイオマーカーとしての DNA メチル化 基礎老化研究 (2022)10 月

2023 年度

- 8) F. Yasuno, Y. Kimura, A. Ogata, H. Ikenuma, J. Abe, H. Minami, T. Nihashi, K. Yokoi, S. Hattori, N. Shimoda, A. Watanabe, K. Kasuga, T. Ikeuchi, A. Takeda, T. Sakurai, K. Ito, T. Kato. Neuroimaging biomarkers of glial activation for predicting the annual cognitive function decline in patients with Alzheimer's disease. *Brain, behavior, and immunity* (2023) v.114, p.214-220.
- 9) Y. Asanomi, T. Kimura, N. Shimoda, D. Shigemizu, S. Niida, K. Ozaki CRISPR/Cas9-mediated knock-in cells of the late-onset Alzheimer's disease-risk variant, SHARPIN G186R, reveal reduced NF-κB pathway and accelerated Aβ secretion. *Journal of human genetics* (2024) v.69, p.171-176.

2. 学会発表

2022 年度

- 1) 光森 理紗、中村 昭範、新畑 豊、尾崎 浩一、新飯田 俊平、下田 修義。メチローム解析によるアルツハイマー型認知症血液マーカーの探索。第 15 回日本エピジェネティクス研究会・年会 福岡県 2022 年 6 月 9~10 日。
- 2) 白井 均樹、奈良 拓也、高橋 治子、高山 和也、Chen Yuan、廣瀬 湧大、藤井 雅史。栗津 暁紀、下田 修義、菊池 裕 Identification of aberrant transcription termination at specific gene loci with DNA hypomethylated transcription termination sites caused by DNA methyltransferase deficiency。第 45 回日本分子生物学会年会 幕張メッセ 2022/11/30~12/2

2023 年度

- 3) 木村 哲晃、菅沼 睦美、澤村 嘉代子、細山 徹、下田 修義、小木曾 昇、新飯田 俊平、尾崎 浩一、重水 大智 日本人集団で見つかったレビー小体型認知症に関連する MFSD3 多型の機能解析 第13回日本認知症予防学会学術集会 2023年9月15日 新潟県
- 4) 浅海 裕也、木村 哲晃、下田 修義、重水 大智、新飯田 俊平、尾崎 浩一 CRISPR/Cas9 システムを用いた遅発性アルツハイマー病リスクバリエント SHARPIN G186R ノックイン細胞の作製と機能解析 日本人類遺伝学会第68回大会・Human Genetics Asia 2023 (合同開催) 2023年10月12日 東京都
- 5) 木村 哲晃、菅沼 睦美、細山 徹、澤村 嘉代子、下田 修義、小木曾 昇、新飯田 俊平、尾崎 浩一、重水 大智 Functional analysis of MFSD3 associated with dementia with Lewy bodies. 日本人類遺伝学会第68回大会・Human Genetics Asia 2023 (合同開催) 2023年10月12日 東京都
- 6) 木村 哲晃、菅沼 睦美、澤村 嘉代子、浅海 裕也、細山 徹、下田 修義、小木曾 昇、新飯田 俊平、尾崎 浩一、重水 大智 日本人集団で見つかったレビー小体型認知症に関連する MFSD3 多型の機能解析 第42回認知症学会学術集会 2023年11月25日 奈良県
- 7) Kimura T, Suganuma M, Hosoyama T, Sawamura K, Shimoda N, Ogiso N, Niida S, Ozaki K, and Shigemizu D. Functional analysis of MFSD3 associated with dementia with Lewy bodies. The American Society of Human Genetics 3-Nov-23 WASHINGTON, DC.

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