

長寿医療研究開発費 2023年度 総括研究報告

「認知症発症関連遺伝子変異の機能解析と基盤開発」(23-7)

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

研究要旨

国立長寿医療研究センター (NCGG) バイオバンクには、軽度認知障害者 (MCI)を含む7,000例以上の認知症例と10,000例以上の認知機能正常高齢者の試料・臨床情報が登録されている。またその一部の検体はゲノムシーケンス解析が実施され、データ化されている。申請者らはこれまでこの大規模、高品質な NCGG バイオバンクの全ゲノムシーケンス (WGS) データ・臨床データの統合解析から、日本人を含む東アジア人特異的に認められる新規認知症感受性遺伝子変異 (変異) を複数同定することに成功している (*Mol Med.* 2019, *J Hum Genet.* 2021, *Mol Psychiatry* 2022, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2022.)。しかし、これらの変異の多くが、どのようにして認知症発症に関与しているのかメカニズムの解明に至っていない。そこで本研究課題で、その発症メカニズムの解明、ならびに、その解析基盤の確立を目指す。

主任研究者

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

分担研究者

佐治 直樹 国立長寿医療研究センター もの忘れセンター (客員研究員)
尾崎 浩一 国立長寿医療研究センター メディカルゲノムセンター
疾患ゲノム研究部 (センター長・部長)
新飯田俊平 国立長寿医療研究センター 研究所長特任補佐
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
ゲノム機能解析室 (室長)
小木曾 昇 国立長寿医療研究センター 研究推進基盤センター
実験動物管理室 (研究員)
藤田 康介 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター
予防科学研究部 (研究員)

A. 研究目的

これまで同定したアルツハイマー病 (AD) 変異の *SHARPIN* 変異、*MLKL* 変異、*OR51G1* 変異とレビー小体型認知症 (DLB) 変異の *MRPL43* 変異、*MFSD3* 変異について、細胞レベル、動物レベルでの機能解析、臨床情報との関連解析を実施し、認知症発症メカニズムの解明に資する知見を得ることを目的とする。本研究課題を進めることで、認知症関連遺伝子の機能解析の基盤技術を整備し、今後の研究に活用できる解析プラットフォームの開発を目指す。並行して、上記同遺伝子内の別ローカスの変異探索、ならびに新規遺伝子変異の探索・同定も目指す。

B. 研究方法

研究目的を達成するために、I.大規模ゲノム変異解析、II.細胞レベルでの検証、III.動物レベルでの検証、およびIV.臨床データとの関連解析を行う。

I.大規模ゲノム変異解析： 高品質な大規模の NCGG バイオバンクの WGS データ・臨床データの統合解析から、AD で同定された 3 つの変異、DLB で同定された 2 つの変異以外の、同遺伝子内の別ローカスの変異を網羅的に探索する。

II.細胞レベルでの検証： ヒト神経幹細胞の細胞株である ReNcell VM にゲノム編集 (CRISPR/Cas9 システム) を用いて変異を導入し、神経細胞とグリア細胞のひとつであるアストロサイトへ分化させて表現型の解析を行う。

III.動物レベルでの検証： ゲノム編集技術を利用して、同定した遺伝子のノックアウトおよび相同変異の導入 (ノックイン) マウスとゼブラフィッシュを作成し、変異型個体と野生型個体を比較する。マウスに関しては IntelliCage を用いた多頭飼育下での行動解析を実施し、認知症に関連する表現型の検証を行う。

IV.臨床データとの関連解析： 臨床データのキュレーション・抽出を行い、同定した変異との関連を調査する。

(倫理面への配慮)

本研究で使用する全ての検体は、解析に対する同意を書面で得ている。また、該当検体を使用した研究については国立長寿医療研究センターにおける倫理委員会の承認を得て実施する。

C. 研究結果

【I.大規模ゲノム変異解析】

AD で同定された 3 変異、DLB で同定された 2 変異以外の、同遺伝子内の別ローカスの変異を網羅的に探索した結果、新たに *INPP5J* 遺伝子内に新規東アジア人特異的な AD 感受性遺伝子変異を 2 つ同定した。

【II.細胞レベルでの検証】

ヒト神経幹細胞の細胞株 ReNcell から神経細胞とアストロサイトへの分化条件の検討を行い、安定した両細胞の分化に成功した。また、CRISPR/Cas9 システムを用いて、神経幹細胞に任意の変異を導入する手法の確立にも成功した。そこで、DLB 変異のひとつ、*MFSD3* p.296*変異を導入した神経幹細胞の機能検証を行った。その結果、変異型の細胞が野生型の細胞と比べて増殖速度が遅いこと、神経細胞やアストロサイトへの分化誘導効率が低下することが見出された。これは、この変異が脳における神経新生の低下を引き起こし、認知機能の低下を誘発している可能性を示唆している。現在、もうひとつの DLB 変異 *MRPL43* p.N81H の変異型細胞の作成に取り組んでいる。

【III.動物レベルでの検証】

分担者の下田により作成された *Mfsd3* ノックアウト (KO)マウスを多頭飼育下で InntelliCage を用いて行動解析を行なった。結果として、*Mfsd3* KO マウスが新規好奇心の低下と複雑な学習能力の低下が確認され、これらの表現型は DLB 患者に見られる症状を示唆していた。

細胞レベルの検証で神経新生の低下が確認されたため、一歳齢の *Mfsd3* KO マウスと野生型マウスの脳切片を作成して海馬の形態を比較した。複数個体の *Mfsd3* KO マウスにおいて海馬の縮小が観察され、新生神経の免疫染色を行なったところ、*Mfsd3* KO マウスの海馬歯状回において神経新生の低下が確認された。

これまで作成した *Mfsd3* KO マウスはヒトと大きく異なる変異を持つため、ヒトと相同な *Mfsd3* KI マウスを分担者の小木曾の協力のもと作成している。また、もうひとつの DLB 変異、*Mrpl43* p.N81H 変異を導入した *Mrpl43* KI も作成中である。

分担者の下田によって作成された *Mkl1* KI マウスは、ヒト化 *App* 遺伝子を持つ AD モデルマウスとの掛け合わせを進めており、二重変異体の作成を進めている。

【IV.臨床データとの関連解析】

臨床データのキュレーション・抽出を DLB の患者データを中心に実施した。現在も継続して実施している。

D. 考察と結論

DLB 変異 *MFSD3* p.296*を導入した細胞レベルの解析で、この変異が神経産生能力の低下を引き起こすことを実証した。また、*Mfsd3* KO マウスの解析から、海馬における神経新生の低下と萎縮、および学習能力の低下が確認された。細胞レベルと動物レベルの解析結果は一致しており、機能未知であった *MFSD3* が認知機能に関わる重要な機能を担っていることが明らかになった。この結果は、大規模ゲノム変異解析により同定された *MFSD3* 変異が DLB の発症に関与することを強く示唆するもので、今回構築した大規模ゲノム変異

解析、細胞レベル、動物レベルでの検証が認知症の発症機構の解明の強力な解析手段になることを示した。また、*MFSD3* KI 神経幹細胞で観察された細胞増殖の低下を改善する化合物を探索することで DLB の創薬シードの可能性が期待される。

これまでに大規模ゲノム変異解析で同定した AD 変異、DLB 変異についても *MFSD3* 変異同様、細胞レベル、動物レベルでの検証を行うことで機能解明につながり、それは認知症の発症機構の解明につながると期待している。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表（主任研究者：重水大智）

1. Suganuma M., Furutani M., Hosoyama T., Mitsumori R., Otsuka R., Takemura M., Matsui Y., Nakano Y., Niida S., Ozaki K., Satake S., and **Shigemizu D.*** Identification of potential blood-based biomarkers for frailty by using an integrative approach. *Gerontology*. 2024 Mar. 14.
2. Asanomi Y., Kimura T., Shimoda N., **Shigemizu D.**, Niida S., and Ozaki K. CRISPR/Cas9-mediated knock-in cells of the late-onset Alzheimer's disease-risk variant, SHARPIN G186R, reveal reduced NF- κ B pathway and accelerated A β secretion. *J Hum Genet*. 2024 Feb. 13.
3. **Shigemizu D.**, Fukunaga K., Yamakawa A., Suganuma M., Fujita K., Kimura T., Watanabe K., Mushiroda T., Sakurai T., Niida S., and Ozaki K. The HLA-DRB109:01-DQB103:03 haplotype is associated with the risk for late-onset Alzheimer's disease in APOE ϵ 4-negative Japanese adults. *npj Aging* 2023 accepted.
4. Li J, Hosoyama T, **Shigemizu D.**, Yasuoka M, Kinoshita K, Maeda K, Takemura M, Matsui Y, Arai H, and Satake S. Identification of potential blood-based biomarkers for frailty by using an integrative approach. *Gerontology* 2023 accepted.
5. **Shigemizu D.**, Akiyama S., Suganuma M., Furutani M., Yamakawa A., Nakano Y., Ozaki K., and Niida S. Classification and deep-learning-based prediction of Alzheimer's disease subtypes by using genomic data. *Transl Psychiatry*. 2023 June 29;13:232.
6. Furutani M., Suganuma M., Akiyama S., Mitsumori R., Takemura M., Matsui Y., Satake S., Nakano Y., Niida S., Ozaki K., Hosoyama T., and **Shigemizu D.** RNA-sequencing analysis identification of potential biomarkers for diagnosis of sarcopenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2023 Jun 22;glad150.
7. **重水 大智**: 認知症の遺伝について (2023). *認知症サポート S O M P O 笑顔倶楽部*.
8. **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.

2. 学会発表（主任研究者：重水大智）

1. **Shigemizu D.**: 「 J-MINT study approaching from genomic research 」 NJ-FINGERS Symposium, Obu, Dec 15, 2023.
2. **Shigemizu D.**: 「 Genomic research on dementia in the Japanese population 」 NCGG ICAH TMIG Joint Symposium 2023 IAGG-AOR Sattelite, Tokyo, Oct 17, 2023.
3. **Shigemizu D.**, and Ozaki K.: 「 Genomic research on dementia in the Japanese population 」 Human Genetics Asia 2023, SY7-4, Tokyo, Oct 12, 2023.
4. **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)
5. 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 回日本認知症学会学術集会, 2023, Nov 25, P346, 奈良. (ポスター)
6. 山川 明子、光森 理紗、菅沼 睦美、秋山 真太郎、新飯田 俊平、尾崎 浩一、**重水 大智**. 遺伝子発現データに基づくアルツハイマー病移行予測診断システムの開発. 第 42 回日本認知症学会学術集会, 2023, Nov 25, P339, 奈良. (ポスター)
7. Suganuma M, Furutani M, Hosoyama T, Akiyama S, Mitsumori R, Otsuka R, Takemura M, Matsui Y, Nakano Y, Niida S, Ozaki K, Satake S, and **Shigemizu D.** An integrative approach to detect potential blood-based biomarkers for frailty. ASHG 2023, Nov 4, PB3321, WASHINGTON, DC. (ポスター)
8. Mitsumori R, Asanomi Y, **Shigemizu D.**, Akiyama S, Morizono T, Niida S, and Ozaki K. Identification of an East Asian-specific variant associated with Lewy bodies dementia by genome-wide association study in Japanese subjects. ASHG 2023, Nov 3, PB1583, WASHINGTON, DC. (ポスター)
9. 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. ASHG 2023, Nov 3, PB1109, WASHINGTON, DC. (ポスター)
10. Asanomi Y, Kimura T, Shimoda N, **Shigemizu D.**, Niida S, and Ozaki K. CRISPR/Cas9-mediated knock-in of late-onset Alzheimer's disease-risk variant, SHARPIN G186R, lessens the NF- κ B pathway and accelerates A β secretion. ASHG 2023, Nov 2, PB1063, WASHINGTON, DC. (ポスター)
11. Yamakawa A., Mitsumori R., Suganuma M., Akiyama S., Niida S., Ozaki K., and **Shigemizu D.**: RNA-seq data analysis identifies blood-based biomarkers for diagnosis and disease progression of Alzheimer's disease. ASHG 2023, Nov 2, PB3463, WASHINGTON, DC. (ポスター)

12. **Shigemizu D.**, Sakai Y., Honjo K., Wakao N., Matsui H., Shimada H., Mitsumori R., Ozaki K., and Watanabe K.: Genome-wide association study for non-specific chronic pain in Japanese elderly. Human Genetics Asia 2023, Oct 12, P1-10-7, Tokyo. (ポスター)
13. Suganuma M, Furutani M, Hosoyama T, Akiyama S, Mitsumori R, Otsuka R, Takemura M, Matsui Y, Nakano Y, Niida S, Ozaki K, Satake S, and **Shigemizu D.** Identification of potential blood-based biomarkers for frailty by using an integrative approach. The Congress Secretariat of Human Genetics Asia 2023 (HGA2023), P1-10-6, October 12, 2023. (ポスター)
14. 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 Congress Secretariat of Human Genetics Asia 2023 (HGA2023), P1-10-5, October 12, 2023. (ポスター)
15. Mitsumori R, Asanomi Y, **Shigemizu D.** Akiyama S, Morizono T, Niida S, and Ozaki K. A genome wide association study identifies an East Asian-specific risk variant for Lewy bodies dementia in Japanese. The Congress Secretariat of Human Genetics Asia 2023 (HGA2023), P1-10-4, October 12, 2023. (ポスター)
16. Asanomi Y, Kimura T, Shimoda N, **Shigemizu D.** Niida S, and Ozaki K. Knock-in of late-onset Alzheimer's disease-risk variant SHARPIN G186R lessens NF-κB pathway and accelerates Aβ secretion. The Congress Secretariat of Human Genetics Asia 2023 (HGA2023), P1-10-1, October 12, 2023.(ポスター)
17. Yamakawa A, Mitsumori R, Suganuma M, Akiyama S, Niida S, Ozaki K, and **Shigemizu D.** Exploration of blood-based biomarkers to predict the progression of Alzheimer's disease by RNA-sequencing data analysis. Human Genetics Asia 2023, Oct 12, P1-05-4, Tokyo. (ポスター)
18. 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 12 回日本認知症予防学会学術集会, Sep 15, O4-6, 新潟. (口頭)
19. 山川 明子、光森 理紗、菅沼 睦美、秋山 真太郎、新飯田 俊平、尾崎 浩一、**重水 大智**: RNA-seq データ解析に基づく軽度認知機能障害からアルツハイマー型認知症への移行に関与する血液バイオマーカーの探索. 第 12 回日本認知症予防学会学術集会, Sep 16, O7-3, 新潟. (口頭)
20. 山川 明子、光森 理紗、菅沼 睦美、秋山 真太郎、新飯田 俊平、尾崎 浩一、**重水 大智**: Identification of blood-based biomarkers associated with conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease by RNA-sequencing data analysis. IIBMP2023, Sep 7-8, P-106, 柏. (ポスター)
21. Li J., Yasuoka M., Kinoshita K., Hirano Y., Maeda K., Takemura M., Matsui Y., Hosoyama T.,

- Shigemizu D.**, Arai H., and Satake S.: Association between spatio-temporal gait parameters and the risk of falls in older adults. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, June 14, P670, Yokohama. (ポスター)
22. Li J., Hosoyama T., **Shigemizu D.**, Yasuoka M., Kinoshita K., Maeda K., Takemura M., Matsui Y., Arai H., Satake S.: Circulating CXCL9 levels, but not CXCL10 levels, were associated with frailty in older adults. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, June 14, P260, Yokohama. (ポスター)
23. Ishii K., Ma L., **Shigemizu D.**, Asanomi Y., Nakamura H., Ozaki K., and Watanabe K.: Ferroptotic aspects of cartilage degeneration in mouse osteoarthritis. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, June 13, O1042, Yokohama. (口頭)
24. Kimura T., Suganuma M., Sawamura K., Hosoyama T., Ogiso N., Niida S., Ozaki K., and **Shigemizu D.**: *MFSD3* loss of function with dementia with Lewy bodies causes an increase of butyrylcholinesterase activity in the brain. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, June 13, P633, Yokohama. (ポスター)
25. Mitsumori R., Asanomi Y., **Shigemizu D.**, Akiyama S., Morizono T., Niida S., and Ozaki K.: Genome wide association study identifies new genetic risk loci for dementia with Lewy body in Japanese. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, June 13, P626, Yokohama. (ポスター)
26. Asanomi Y., **Shigemizu D.**, Akiyama S., Mitsumori R., Niida S., Ozaki K.: East Asian-specific late-onset Alzheimer's disease risk variant alters the endogenous SHARPIN function. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, June 13, P420, Yokohama. (ポスター)
27. Yamakawa A., Mitsumori R., Akiyama S., Niida S., Ozaki K., and **Shigemizu D.**: Identification of blood-based biomarkers associated with conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease by RNA-sequencing data analysis. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, June 12, P860, Yokohama. (ポスター)
28. Suganuma M., Furutani M., Hosoyama T., Akiyama S., Mitsumori R., Otsuka R., Takemura M., Matsui Y., Nakano Y., Niida S., Ozaki K., Satake S., and **Shigemizu D.**: Identification of blood-based biomarkers for early diagnosis of frailty through a combined analysis of the clinical data, gene-expression data, and aging-related factors. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, June 12, P632, Yokohama. (ポスター)
29. 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. 第 31 回日本医学会総会 2023 東京, 2023, Apr 22, P11-4, 東京. (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