

長寿医療研究開発費 2024年度 総括研究報告

ゲノム解析により同定された老年病関連遺伝子群の機能解析（24-13）

主任研究者 下田 修義 国立長寿医療研究センター ゲノム機能解析室（室長）

研究要旨

申請者の所属するメディカルゲノムセンターでは、全ゲノム解析、ゲノムワイド連鎖解析(GWAS)、あるいはトランスクリプトームによりこれまでに認知症やフレイルなど、高齢者に特有の疾患に関連する塩基置換（バリエーション）を数多く見出している。また認知症については、アルツハイマー型認知症発症に関連する DNA のメチル化異常についても複数発見している。しかしながらそれら DNA の違いと疾患・老化との関連を評価する実験系が未だ確立されていない。その第一歩として本研究では、老年病や老化に関連する DNA の変化をモデル生物個体に導入する技術をメディカルゲノムセンターで確立し、その後、変異導入動物に対して免疫組織学的解析、生化学的解析、脳画像解析、そして行動解析などを行う。そして老年病や老化に関連する DNA の違いが老年病や老化に与える影響の評価を可能にするモデル生物確立を目指す。

主任研究者

下田 修義 国立長寿医療研究センター ゲノム機能解析室（室長）

A. 研究目的

次世代シーケンサーの開発により老年病、とりわけ認知症関連の DNA 多型（バリエーション、構造多型、メチル化）が数多く見出されたが、それらが果たして本当に認知症の発症のしやすさに影響するのか、その評価をするための実験系の構築が、現在大きな課題となっている。そのために申請者はまず、認知症関連バリエーションをマウスに導入したときに、果たして認知症患者の表現型がマウスでどの程度見られるのかを確かめる必要があると考えた。そのために本研究では *CFAP74* という遺伝子を取り上げた。主任研究者はこれまでの研究において、ヒトの *CFAP74* 遺伝子イントロン内に存在する、あるタイプの構造多型が脳アミロイドシスと関連することを遺伝学的解析から見出していた。そしてその

CFAP74 遺伝子の構造多型は CFAP74 遺伝子の発現低下と関連していることが報告されていたため、CFAP74 の機能低下が脳アミロイドシスと関連することが推測された。

CFAP とは線毛鞭毛関連タンパク質 (Cilia-Flagella Associated Protein) の略号で 74 はタンパク質量が 74 キロダルトン (kDa) であることを意味する。CFAP74 は単細胞の鞭毛虫であるクラミドモナスの FAP74 遺伝子の哺乳動物ホモログである。FAP74 はクラミドモナスにおいて、鞭毛を構成するタンパク質と相互作用するタンパク質として同定され、FAP74 遺伝子は鞭毛の滑らかな動きに必要であることが知られている。線毛や鞭毛を構成するタンパク質は数多く、およそ 200 種のタンパク質が知られている。またそれらの遺伝的変異は多種多様な線毛関連疾患 (ciliopathy ; シリオパシー) を引き起こすことも知られており、その代表的な症状の一つに水頭症がある。水頭症は主に 3 つの症状が表れることが知られており、それらは認知機能低下、おぼつかない足取り、そして尿失禁である。また水頭症患者には老人斑が見られやすいことが示されている。前述のように CFAP74 の機能低下アレルは老人斑形成と関連していたため、CFAP74 の機能低下は水頭症様の症状を引き起こすのではないかと推測した。そこで本研究では第一の目的として、ヒト CFAP74 遺伝子のマウスホモログ *Cfap74* のマウス変異体を作成し、免疫組織学的解析、生化学的、脳画像解析等、さらには行動解析を行い、*Cfap74* 変異体が水頭症と類似の表現型を示すのか解析することにした。

本研究の第 2 の研究目的は細胞が若返る仕組みの解明である。脊椎動物では加齢に伴い DNA のメチル化修飾が徐々に変化していく。DNA のメチル化変動は遺伝子の活性に影響を与えることから、近年、加齢依存的な DNA メチル化変動が老化の一因として見なされている。DNA メチル化変動は初期胚で戻るが、それは DNA メチル化のリセットと呼ばれる。DNA メチル化変動が老化の原因であれば、DNA メチル化のリセットは若返りの仕組みであると見なすことができる。そのため最近、細胞や組織の人為的な若返りという応用面への期待から、DNA メチル化のリセットが注目されている。ゼブラフィッシュ初期胚における DNA メチル化のリセットは、哺乳動物の DNA メチル化のリセットに比べシンプルであることから、そのメカニズムを解析しやすい。そこで本研究では、この魚類の特長を活かして、加齢依存性 DNA メチル化変動のリセット (若返り) を解明する。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

組み換え DNA 実験および遺伝子改変動物の作製・飼養についてはそれぞれ、同機関の遺伝子組み換え実験安全委員会および動物実験倫理委員会の承認を受けた上で実施する

C. 研究結果

1) 認知症関連遺伝子の機能抑制と A β 分泌量との関連

主任研究者はヒトの *CFAP74* 遺伝子が脳アミロイドーシスと関連することを偶然に見出した（未発表）。ヒト *CFAP74* 遺伝子の発現低下アレルをホモで有すると脳アミロイドーシスを発症しやすかった。続いてマウス神経培養細胞において

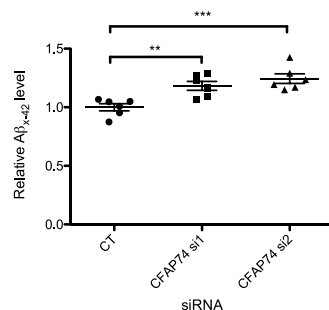


図1 CFAP74の発現抑制により培養上清のAβ量が増える
CT: コントロールのNeuro 2A細胞、si: siRNAのトランスフェクション
ここではAβ42の結果を示すが、Aβ40も同じ傾向であった。

て *Cfap74* 遺伝子の活性を RNAi により低下させると、培養液に分泌される Aβ 40 および Aβ 42 量が高まることが明らかになった（図 1）。そこでマウスに *Cfap74* 変異を導入すると脳アミロイドーシスを引き起こすのではないかとこの予想を立て、*Cfap74* マウス変異体を作成し、免疫組織学的に *Cfap74* マウス変異体の脳の老人斑を解析した（図 2）。なお、野生型マウスは老齢となっても老人斑を形成

しないため、この実験に使用したマウスは *Cfap74* 変異に加えて、マウスの内在 *App* 遺伝子をヒトの遺伝性アルツハイマー型認知症変異をもつ *APP* 遺伝子、*hAPP*^{NL-G-F}（図 3）に置換してある。*hAPP*^{NL-G-F} トランスジェニックマウスでは生後 3 ヶ月になると老人斑が形成される。その結果、解析したのは未だ一例だけであるが、予想に反して、*Cfap74* 変異マウスの脳では Aβ 40 から成る老人斑および Aβ 42 から成る老人斑のどちらの形成も抑制されていた（図 2）。*in vitro* の実験はマウスの正常な Aβ 産生を測定しているが、*hAPP*^{NL-G-F} マウスでは Aβ の内部およびその周辺に Aβ のプロセッシングを促進する 2 つのアミノ酸変異を持つ（図 3、Swedish と Iberian）。特に APP の β 部位での切り出し効率を上昇させるスウェーデン型変異は Aβ 40 および Aβ 42 どちらの産生も上昇させるが、上記のように *Cfap74* の変異も培養細胞 (*in vitro*) とマウス脳 (*in vivo*) の両方の系で Aβ 40 および Aβ 42 の両方の産生効率に影響する。このことから、主任研究者はヒト CFAP74 が APP の β 切断に関与する可能性を考えている。つまり、CFAP74 タンパク質は野生型 APP の β 部位切断には抑制的に機能する。そのためマウス *Cfap74* の機能抑制では APP の β 部位での切断効率がコントロールに比べ高まり、マウス培養細胞上清への Aβ の分泌量が高まる。一方、Swedish 変異を持つ APP では Swedish 型のアミノ酸置換がもたらす APP β 部位切断効率の上昇に対し、CFAP74 がポジティブに働く可能性が考えられた（図 3）。ただし上述のようにこの *Cfap74* 変異による Aβ 産生量低下の結果は 1 例に過ぎない。そこで n 数を増すため、3 ヶ月齢、12 ヶ月齢の *Cfap74* 変異/ *hAPP*^{NL-G-F} マウスそれぞれ 4 匹ずつから脳を摘出し、組織免疫学的解析のためのパラフィン固定を終えたところである。

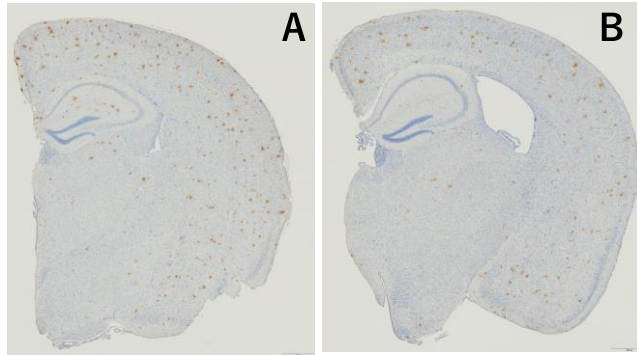


図2 CFAP74変異体マウスの脳では老人斑の形成が抑制される
抗Aβ40抗体による染色。(A) 野生型、(B) CFAP74 ノックアウトマウス

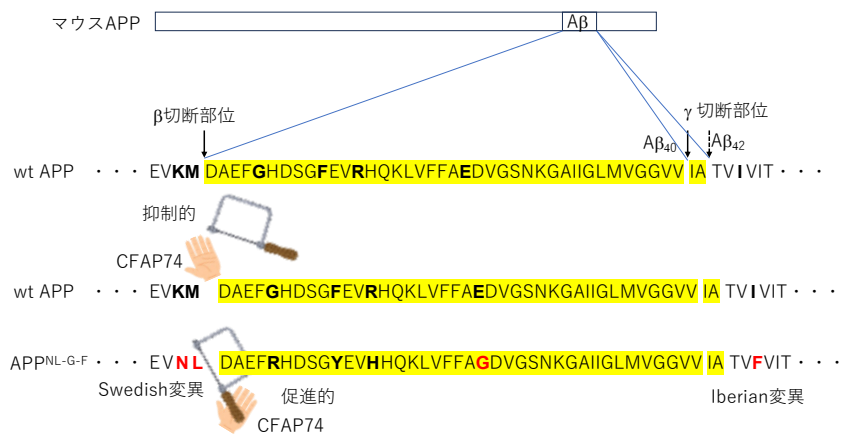


図3 モデル：CFAP74はAPPからのAβの切り出し効率に影響を与える

2) DNA メチル化リセットによる細胞の若返り

最近、米国のグループによりマウスゲノムのDNAメチル化を特定の細胞においてリセットすることにより組織機能が若返ることが示された。この結果はDNAのメチル化が老化に関与することを示唆しており、それは同時に老年病の下地にDNAメチル化の異常が潜んでいる可能性も示唆する。そこで加齢に伴うDNAメチル化の変動がマウスやヒトに比べ単純で、胚の操作が易しいゼブラフィッシュにおいてDNAメチル化をリセットする遺伝子を同定することを試みた。ゼブラフィッシュにおいてはエピゲノムのリセットは、未同定のDNAメチル化酵素(DnmtX)により、低メチル化している卵母細胞のゲノムが、受精後の胚で *de novo* メチル化することにより生じる(図4)。

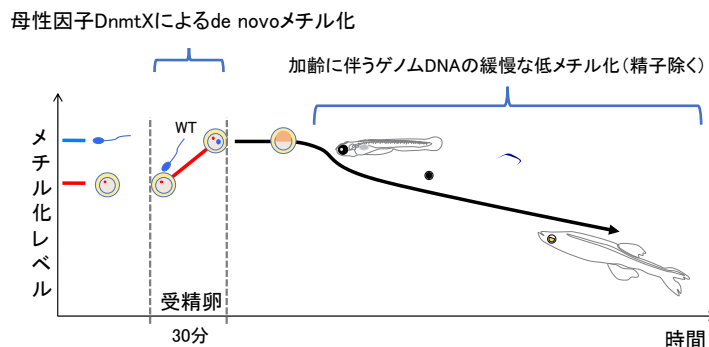


図4 ゼブラフィッシュにおけるエピゲノムサイクル

したがって DnmtX は *de novo* メチル化酵素活性を持ち、卵母細胞に蓄えられた母性因子であることが予想された。そこでゼブラフィッシュに存在する 6 つの *de novo* DNA メチル化酵素遺伝子、すなわち *dnmt3a*

系の 4 遺伝子 *dnmt3*, *dnmt4*, *dnmt5*, *dnmt7*, および *dnmt3b* 系の 2 遺伝子 *dnmt6*, *dnmt8* (*dnmt*=DNA methyltransferase) をゲノム編集技術により、それぞれ潰した。それらどの変異体も正常に発生し、かつ母性変異体でのエピゲノムのリセットは正常であった (図 5)。この結果から、これら 6 つの *de novo* DNA メチル化酵素遺伝子は一部機能的重複しており、その結果、単独の変異ではほかのメチル化酵素遺伝子により機能相補している可能性が考えられた。そこで単独の変異を掛け合わせていくことで、破壊された 6 つの DNA メチル化酵素遺伝子をすべて重複して持つ、6 重のゼブラフィッシュ変異体を作製した。その結果、その 6 重変異体は生存可能であり、6 重変異体においてもエピゲノムは正常にリセットすることが判明した (図 5)。つまり予想に反して、既知の *de novo* 型 DNA メチル化酵素遺伝子にはゼブラフィッシュのエピゲノムをリセットする活性がないことが確かめられた。この結果は、マウスにおいては *de novo* 型メチル化酵素遺伝子 *dnmt3a* および *dnmt3b* の変異がエピゲノムリセットに必須であり、また表現型として致死となることと対照的である。そこで、*de novo* メチル化酵素の最後の候補として、一般的には維持 DNA メチル化酵素として知られる Dnmt1 に目をつけた。維持 DNA メチル化酵素とは DNA の複製に際して、親鎖から娘鎖 (新生鎖) が合成されるときに、親鎖の持つメチル化パターンを娘鎖にもコピーする機能を持つ。古くから Dnmt1 は *in vitro* では *de novo* メチル化活性を示すことが知られており、最近、マウスでも *de novo* メチル化の活性があることが示唆されている。そこで Dnmt1 をコードする *dnmt1* の機能低下型アレル (hypomorph) 変異体 *dnmt1*^{N1390K} についてエピゲノムリセット活性を調べた。まず研究主任者は野生型ゼブラフィッシュ胚でエピゲノムリセットが成立する発生ステージを詳細に調べ、エピゲノムリセットは 8 細胞期 (受精後 75 分) ~ 16 細胞期 (受精後 105 分) の 30 分程度に限定して現れる一過的なもの (transient) であるということを見いだした。続いてそのステージでのエピゲノムリセットを *dnmt1*^{N1390K} 胚において調べたところ、*dnmt1*^{N1390K} 胚でもエピゲノム

はリセットしていることが明らかになった。したがって Dnmt1 には *de novo* DNA メチル化活性はない可能性もあるが、*dnmt1*^{N1390K} はハイポモルフアレルであるため、Dnmt1 (N1390K) の維持メチル化酵素活性は弱くとも存在していることも考えられる。なお授精後 3 時間の *dnmt1*^{N1390K} 胚は同ステージの野生型胚と比較して明らかに低メチル化していたが (図 5)、これは一旦 *de novo* メチル化活性により胚のゲノムが高メチル化状態になったが、その後の維持メチル化酵素活性が不十分であるために徐々に低メチル化した結果であると考えられた。したがって *dnmt1*^{N1390K} 胚では Dnmt1 は、従来から知られている DNA 複製時に機能する維持 DNA メチル化酵素活性だけでなく、受精直後には *de novo* メチル化酵素活性を発揮し、エピゲノムリセット (=細胞の若返り) に寄与するという、二つの異なる機能を持つ酵素かを判定するために、今後は Dnmt1 抗体の受精卵注入による *de novo* DNA メチル化に与える影響を調べる予定である。

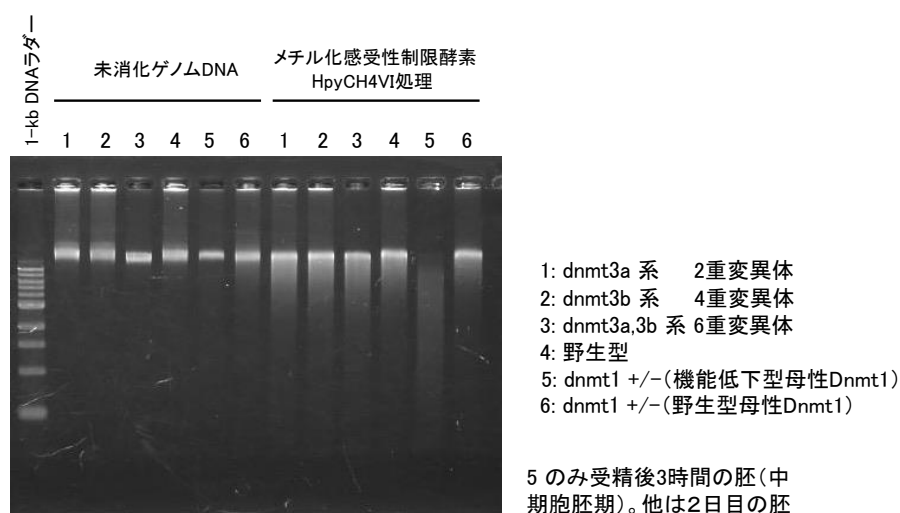


図5 Dnmt1の維持メチル化酵素活性低下による胞胚期のDNA低メチル化

ゲノムDNAをメチル化感受性制限酵素で消化した結果。ゲノムが低メチル化すると切断点が多くなりスメアダウンする。

D. 考察と結論

ヒトの脳アミロイドーシスという表現型を促す遺伝的要因としてはこれまで家族性アルツハイマー病の原因遺伝子と *APOE*ε4 多型程度しか知られていなかった。今回、主任研究者は新たに *CFAP74* という脳アミロイドーシスに関わる可能性のある新たな因子を発見した。*CFAP74* 遺伝子はクラミドモナスで鞭毛の滑らかな動きに必要な FAP74 (鞭毛関連タンパク質 74) をコードする遺伝子のヒトホモログである。*CFAP74* 遺伝子に異常があると精子の鞭毛の動きに異常をきたし男性の不妊の原因となることが報告されていた。*Cfap74* 変異マウスを作成したところ雄雌

とも不妊であり、マウスの **Cfap74** とヒトの **CFAP74** の機能が保存していることがわかった。したがってこれらの治験から **CFAP74** の鞭毛での必要性について、進化的保存性が示唆された。ただし、精子以外での細胞種や組織における **CFAP74** の機能についてはこれまでに報告はなかった。また **CFAP74** には特徴的なドメインが存在せず、その構造から細胞内での機能について推測することが困難であった。ところが最近になり、これまで原因不明とされていたヒトの突発性正常圧水頭症の多くが、実は繊毛・鞭毛関連遺伝子の異常により生じることが明らかにされた。脳室は多数の動繊毛を頂端側(apical)に持つ上衣細胞という細胞種で覆われているが、上衣細胞の動繊毛がスムーズに動くことにより、脳室内の脳脊髄液の流れが生まれる。ところが上衣細胞の動繊毛の動きに支障が生じると脳脊髄液の流れが滞り、それが元で主に側脳室が膨れ上がり、水頭症になると考えられている。そもそも **CFAP74** 遺伝子は脳アミロイドーシスとの関連から見つかった遺伝子であるが、正常圧水頭症の患者では老人斑を形成しやすいという報告がなされていた。そのため **CFAP74** 異常と水頭症の関連が推測された。今回、**Cfap74** 変異マウスを作成し、変異体において $A\beta$ を指標に解析したところ、**Cfap74** が $A\beta$ のプロセッシングに関与することが示唆された。したがって **Cfap74** の解析は、今後の本研究の進展によっては、認知症抑制のための重要なターゲットとなり得る。しかしまだ解析数が少ないため、本年度後半は免疫組織学的解析および **ELISA** に使用するマウス脳のサンプリングを集中的に行った。最終年度はそれら脳サンプルを使用して **Cfap74** が $A\beta$ の産生に与える影響を確定する予定である。

また本研究では細胞の若返りのメカニズムを解明するために、DNA メチル化のリセットに着目した。加齢に伴う DNA のメチル化は様々な脊椎動物で報告されており、DNA のメチル化変動は遺伝子の活性に影響することから、加齢依存的な DNA メチル化変動が老化の一因ではないかと現在推測されている。またその根拠の一つとして変動した DNA メチル化が次世代の初期胚で元に戻ることが挙げられる。仮に DNA メチル化リセットが老化の巻き戻しであれば、メチル化リセットを人為的に操作することで、DNA メチル化の加齢変動が老化原因の一つであることを初めて検証することができる。そこで本研究ではメチル化リセットが哺乳動物に比べ単純であるゼブラフィッシュに着目した。ゼブラフィッシュの DNA メチル化リセットは、低メチル化した卵母細胞が高メチル化状態に戻る現象である。したがってそれは **de novo** メチル化活性に依存する。そこで本研究では卵母細胞に存在するゲノムの **de novo** メチル化酵素を同定することを試みた。主任研究者は以前、ゼブラフィッシュに存在する 6 つの **de novo** メチル化酵素遺伝子を同定しており、6 つそれぞれの遺伝子をゲノム編集技術により破壊した。しかし、どの単独の変異はもちろん、6 つの **de novo** メチル化酵素遺伝子をすべて破壊されたゼブラフィッシュ胚でも DNA メチル化のリセットは生じた。そのため、現在、維持メチル化酵素と

して知られる **Dnmt1** に DNA メチル化リセットの活性がないか調べている。DNA メチル化リセットをもたらし因子が **Dnmt1** であることを実証できれば、**dnmt1** 遺伝子の活性を人為的に変化させることにより、老化に与える影響を解析することができると考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Trait-anxiety and glial-related neuroinflammation of the amygdala and its associated regions in Alzheimer's disease: A significant correlation. F. Yasuno, Y. Kimura, A. Ogata, H. Ikenuma, J. Abe, H. Minami, T. Nihashi, K. Yokoi, S. Hattori, Nobuyoshi Shimoda, A. Watanabe, K. Kasuga, T. Ikeuchi, A. Takeda, T. Sakurai, K. Ito, T. Kato *Brain, Behavior, & Immunity - Health* (2024) 38:100795.
- 2) 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. Y. Asanomi, T. Kimura, Nobuyoshi Shimoda, D. Shigemizu, S. Niida, K. Ozaki *Journal of Human Genetics* (2024) 69(5):171-176.

1. 学会発表

- 1) ゼブラフィッシュで初めて発見されたエピソード変異 下田修義、山越貴水、澤村嘉代子 第17回日本エビジェネティクス研究会年会 令和6年6月13日 口頭発表およびポスター発表 大阪
- 2) Functional analyses for the late-onset Alzheimer's disease-risk variants of *SHARPIN* using CRISPR/Cas9-mediated knock-in cells Y. Asanomi, T. Kimura, Nobuyoshi Shimoda, D. Shigemizu, S. Niida, K. Ozaki. American Society of Human Genetics 2024 Annual meeting, Nov. 6, 2024. Denver, Colorado, U.S.A.

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