

長寿医療研究開発費 2025年度 総括研究報告（総合報告）

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、ゲノムワイド連鎖解析 (GWAS) やエピゲノムワイド連鎖解析 (EWAS) によりこれまでに主に認知症に関連する DNA の塩基置換（バリエーション）や塩基修飾（メチル化異常）を数多く見出している。そこで現在それら DNA の構造変化と疾患・老化との関連を評価することを可能にする実験系、一遺伝子改変動物や培養細胞、あるいは *in vitro* 系を利用した一の確立を目指している。その第一歩として本研究では、認知症や老化に関連する DNA の変化をモデル生物個体に導入し、免疫組織学的解析、生化学的解析、脳画像解析、さらには行動解析などを通じて、老年病や老化に関連する DNA の変化が個体にもたらす影響を解析する。

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）

研究期間 2024 年（令和 6 年）4 月 1 日～2026（令和 8 年）年 3 月 31 日

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、あるいは見られないのかを確かめる必要があると考えた。そこで本研究では *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、クラミドモナスの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の数は多く、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正に関連していたため、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

### 【*Cfap74* 変異マウス行動解析のための準備】

令和 6 年度は行動実験用の *Cfap74* 変異体およびその対照としての野生型ジェノタイプ *Cfap74* +/+マウスの準備を行った。行動実験では限られた時期に特定の週齢のマウスを多数準備する必要がある。これは慎重なスケジュール管理に基づく長時間の作業となる。したがってその手順やおよび手順理由は詳述するに値すると考え以下に記す。

### 【マウスの匹数について】

実際に行動実験を請け負う共同研究先 (藤田医科大学) の指示に従い、split-litter technique に基づき、最終的にコントロール群 (野生型のオス 20 とメス 20) 40 匹、実験群

(*Cfap74* 変異体のオス 20 とメス 20) 40 匹を準備することとした (このグループをファーストバッチと呼ぶ)。なおここでの野生型とは、通常の野生型マウスではなく、*Cfap74* +/-ヘテロ個体同士の掛け合わせから産まれた *Cfap74* +/+マウスを指す。先方の経験上、これだけの数があれば行動に差があるものであれば統計的な有意差が出るが、なければ出ないとのことである。少ない匹数だと 2~3 匹の外れ値を持つマウスの存在によって、あるはずの差がマスクされてしまったり、無いはずの差が見た目で出てしまったりするとのことである。

#### 【オス・メスについて】

行動実験ではこれまで、特別な理由がない限りオスを使用することが一般的であった。この理由は 1) オスとメスで行動の特性が異なることが普通であるため、オスメスのデータを合わせて統計検定にかけるとに問題があること、2) 必要な N の数が 2 倍近くに増えてしまい飼育ケージ数が増え実験に長い時間がかかってしまうことと、3) 装置や飼育ラックに残ったメスの匂いによってオスの行動が影響されてしまうことを防ぐ、等の理由からである。ただし最近になり、メスはメスだけの集団で比較することも論文査読の際に求められることがあるとのことから、今回はメスの野生型(*Cfap74* +/+)およびメスの *Cfap74* 変異体も 20 匹ずつ準備した。

#### 【行動実験用マウスの準備 1 — ヘテロの雌マウス 40 匹の作成方法】

日本エスエルシーより野生型マウス (C57BL/6J) ♀を 34 匹購入し、1 ケージに *Cfap74* ヘテロのオス 1 匹と野生型バックグラウンドのメス 4 匹を一緒に入れたケージを 8 セット、加えて 1 ケージに *Cfap74* ヘテロのオス 1 匹とバックグラウンドのメス 2 匹を一緒に入れたケージを 1 セット作り、合計 9 匹のオスと 34 匹のメスを同時に掛け合わせた。この掛け合わせにおいて不妊であった雌 (16 匹、47%) は 19 日後、再度 *Cfap74* ヘテロのオスと掛け合わせた。そのほか、期待する産仔数 (N=160、後述) が取れなかったときのバックアップとして、念のため、動物棟で繁殖した *Cfap74* 変異継代中のバックグラウンド (*Cfap74* +/+) の ♀8 匹と *Cfap74* +/- ヘテロの ♀11 匹も *Cfap74* ヘテロのオスとの掛け合わせに使用した。C57BL/6J の場合、通常 ♀32 匹から 160 匹程度の子供のマウスが得られると期待され (n=5/♀親)、そこからヘテロの雌マウスが 40 匹程度得られると期待された (160×1/4)。

#### 【行動実験用マウスの準備 2 — ホモの雄雌マウス 20 匹ずつの作成方法】

1 ケージに *Cfap74* ヘテロの雄 1 匹と *Cfap74* ヘテロの ♀4 匹を一緒に入れた。これを 10 セット作り、合計 10 匹のヘテロ雄と 40 匹のヘテロ雌を掛け合わせた。これにより C57BL/6J の場合、一腹 5 匹として、通常 200 匹程度の子供のマウスが得られ、そこから *Cfap74* ホモと野生型 (*Cfap74* +/+) の雄雌がそれぞれ 20 匹ずつ得られると期待された。

### 【行動実験用マウスの準備 — ジェノタイピング】

産仔は 25～30 日齢で離乳と個体識別を済ませると同時に、テールチップからゲノム DNA をアルカリボイル法により抽出後、*Cfap74* の遺伝子型判定（ジェノタイピング）をメルトカーブ解析により行った。不慮のコンタミネーションを防ぐためにジェノタイピングはライトサイクラー（ロッシュ社）を利用することですべての過程において密閉容器中で行った。

### 【*Cfap74* 変異マウス脳での老人斑形成】

*Cfap74* 変異マウス脳におけるアミロイド  $\beta$  (amyloid- $\beta$  ;以降 “A $\beta$ ” と記す)蓄積を野生型マウスと比較するため、まず *Cfap74* 変異マウスに、理化学研究所で作成されたトランスジェニックマウス *App*<sup>NL-G-F</sup>（マウスの脳内に 3 ヶ月齢で老人斑形成が形成される）を掛け合わせ、*Cfap74*<sup>-/-</sup>; *App*<sup>NL-G-F</sup>/*App*<sup>NL-G-F</sup> 二重変異体を作成した。*Cfap74* 変異マウス（*Cfap74*<sup>-/-</sup>; *App*<sup>NL-G-F</sup>/*App*<sup>NL-G-F</sup>）および野生型 *Cfap74* マウス（*Cfap74*<sup>+/+</sup>; *App*<sup>NL-G-F</sup>/*App*<sup>NL-G-F</sup>）の脳を摘出した後、脳を正中で二分し、その半球ずつを液体窒素で急速凍結した。脳を二分したのは同じ個体で免疫組織学的解析と生化学的解析をそれぞれ行えるようにするためである。安楽殺したマウスから脳組織を摘出し、片方の大脳半球は 4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて 48 時間固定（4℃）後パラフィン固定し、組織学的検索に備えた。もう一方の大脳半球からは 6 M グアニジン酸溶液中で蛋白質を抽出して酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)により A $\beta$  の定量を行った。

### 【*Cfap74* 変異マウス脳の核磁気共鳴画像法 (MRI)】

*Cfap74* 遺伝子の脳構造に与える影響を調べるため *Cfap74* 遺伝子単独変異体（3 ヶ月齢及び 18 ヶ月齢）の脳を、当センター脳機能画像診断開発部の山田雅之研究員（現大阪物療大学教授）並びに木村泰之副部長の協力を得て MRI により解析した。撮像に必要な最大時間は一匹あたり 5 時間を見込んだ。撮像中は注意深く呼吸数をモニタリングした。MRI に使用する *Cfap74* 遺伝子単独変異体は、撮像後ただちに脳の病理組織学的解析のため脳を摘出するか、脳組織摘出しない場合は撮像後に頸椎脱臼にて安楽殺した。安楽殺したマウスからは脳組織を摘出し 4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて 48 時間固定（4℃）し、ヘマトキシリンエオシン染色を行えるようにした。

令和 7 年度

### 【*Cfap74* 変異体マウスの行動実験】

共同研究先の藤田医科大学で実施した。当初、分担研究者・下田の研究室から研究員あるいは実験補助員を派遣することが求められていたが、先方からのリクエストがなく、テストバッテリーは藤田医科大学のスタッフのみで行われた。

(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した。

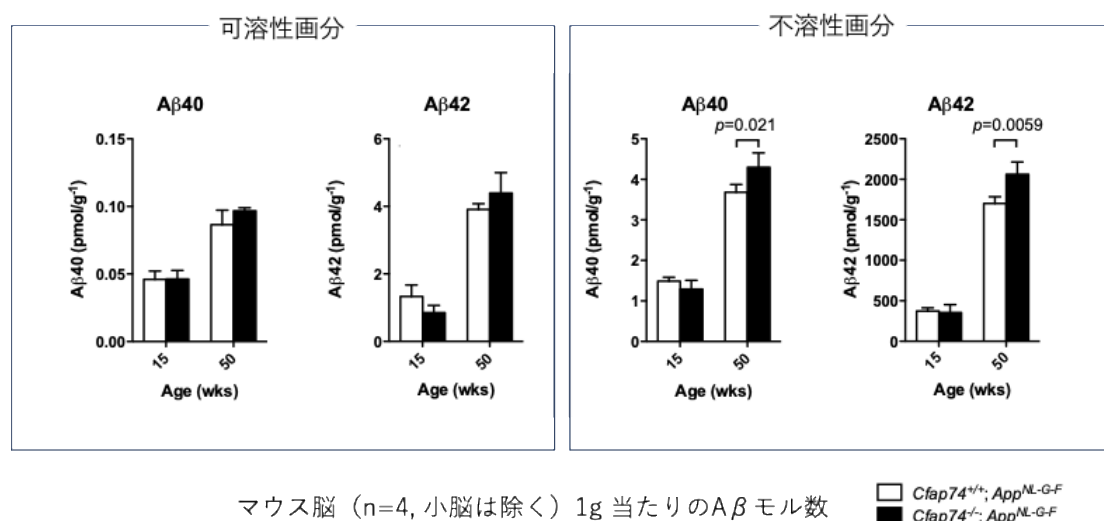
## C. 研究結果

【2024年度】

### 1) 脳アミロイドーシス関連遺伝子のマウスでの機能抑制と表現型の解析

主任研究者はヒトの脳アミロイドーシスと関連する遺伝子、*CFAP74*を見出した(未発表)。そして以前の研究では、マウスの神経培養細胞における *Cfap74* タンパク質の活性を低下させると、培養液に分泌される  $A\beta$  40 および  $A\beta$  42 量がともに高まることを明らかにしていた。そこでマウス個体でも、*Cfap74* 変異(*Cfap74*<sup>-/-</sup>と表す)により脳における  $A\beta$  40 および  $A\beta$  42 量の増加を引き起こすのかを、*Cfap74* マウス変異体を用いて生化学的に解析した(図1)。なおこの実験では *Cfap74* が正常なマウス(*Cfap74*<sup>+/+</sup>と表す)と *Cfap74* マウス変異体の遺伝的背景として、脳内にアミロイドをたまりやすくしたヒトの変異型アミロイド前駆体タンパク質遺伝子(*App*<sup>NL-G-F</sup>)が内在の *App* 遺伝子の代わりにノックインされている。

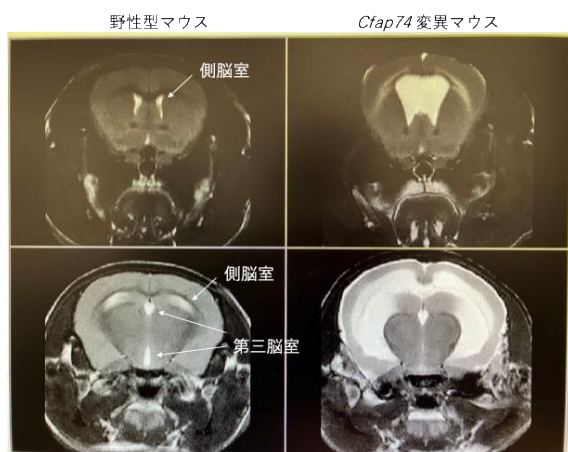
図1



その結果、*Cfap74* の機能が失われると脳実質の不溶性画分に  $A\beta$  が蓄積しやすくなることが判明した。この結果はヒト *CFAP74* と脳アミロイドーシスの関連を調べるうえでマウスがよい実験系になることを示唆した。そこでマウス脳での脳アミロイドーシスを免疫組織学的に調べるための準備も開始した。さらに MRI により *Cfap74* マウス変異体脳に萎縮が見られないか、脳構造の異常を探った。

その結果、側脳室に脳脊髄液の顕著な貯留が認められ、*Cfap74* マウス変異体は水頭症を発症していることが明らかになった（図2）。また画像の3D解析の結果、各脳室内をつなぐ部位（水道）に狭窄が認められなかったことからこの水頭症は交通性であることが明らかになった。以上の結果から *Cfap74* の機能低下は脳脊髄液のフローが滞ること、そして一つの可能性としてそれが  $A\beta$  の蓄積につながり、最終的に老人斑形成を促進する可能性が示唆された。ただし水頭症に対する GWAS からは、ヒトの第一染色体に存在する *CFAP74* と水頭症の関連は示されていない。したがって *CFAP74* の機能低下は水頭症とは別のメカニズムで脳アミロイドーシスを引き起こすことも考えられる。

図2



と、そして一つの可能性としてそれが  $A\beta$  の蓄積につながり、最終的に老人斑形成を促進する可能性が示唆された。ただし水頭症に対する GWAS からは、ヒトの第一染色体に存在する *CFAP74* と水頭症の関連は示されていない。したがって *CFAP74* の機能低下は水頭症とは別のメカニズムで脳アミロイドーシスを引き起こすことも考えられる。

## 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 メチル化をリセットすることにより細胞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の同定を試みた。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、初期卵割期に *de novo* メチル化することにより生じる（図3）。

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

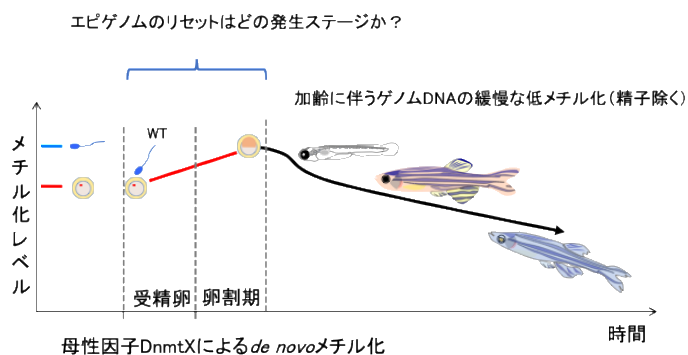


図3 ゼブラフィッシュにおけるエピゲノムサイクル

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、すなわち哺乳動物 *dnmt3a* 系の4遺伝子 *dnmt3*, *dnmt4*, *dnmt5*, *dnmt7*, および哺乳動物 *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破壊した

後、掛け合わせることで *dnmt3*, *4*, *5*, *6*, *7*, *8* のすべてに変異を持つ *dnmt* の6重のゼブラ

フィッシュ変異体を作製した。その結果、*dnmt* の 6 重変異体においてもエピゲノムは正常にリセットし、生存可能であることが判明した。つまり予想に反して、ゼブラフィッシュのエピゲノムをリセットする活性は既知の *de novo* 型 DNA メチル化酵素遺伝子とは異なる遺伝子によりもたらされることが判明した。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の変異がエピゲノムリセットに必須であり、また *de novo* 型メチル化酵素遺伝子変異体が致死になることと対照的な結果であった。

## 【2025年度】

### 1) *Cfap74* 遺伝子変異がマウスの記憶・学習機能に与える影響の解析

2024 年度の MRI および組織学的解析からマウス *Cfap74* タンパク質が欠損するとマウス脳内に水頭症を引き起こすことが明らかになった。ヒトの水頭症は、1. 認知機能の低下、2. 歩行異常、3. 尿失禁の 3 徴を引き起こすことが知られている。そこで藤田医科大学医科学共同センターとの共同研究で、*Cfap74* 変異マウスに対し、認知・学習、歩行、社会性など、さまざまな行動解析（ひとまとめにしてテストバッテリーと呼ぶ）を実施し、*Cfap74* 変異マウス表現型とヒト水頭症との類似性および差異を明らかにすることを試みた。以下のテーブルにその行動解析の内容を示す。

| 順番 | 行動テスト                                                                      | 評価項目                         |
|----|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| 1  | 一般身体所見・神経学的スクリーニング(General health and neurological screen (Day 1))         | 身体的特徴・神経学的症状（体重・直腸温測定・握力・筋力） |
|    | 一般身体所見・神経学的スクリーニング(General health and neurological screen (Day 2))         | 〃                            |
| 2  | 明暗選択テスト (Light/dark transition test)                                       | 不安様行動、活動性                    |
| 3  | オープンフィールドテスト (Open field test)                                             | 活動性、不安様行動                    |
| 4  | 高架式十字迷路テスト (Elevated plus maze test)                                       | 不安様行動、活動性                    |
| 5  | ホットプレートテスト (Hot plate test)                                                | 痛覚感受性                        |
| 6  | 社会的行動テスト (Social interaction test)                                         | 新しい環境下での社会的行動                |
| 7  | ローターロッドテスト (Rotarod test (Day 1))                                          | 運動学習・協調運動                    |
|    | ローターロッドテスト (Rotarod test (Day 2))                                          | 〃                            |
| 8  | 社会性テスト (Three-chamber social approach test)                                | 社会的行動、自閉症傾向                  |
| 9  | 聴覚性驚愕反応/プレパルス抑制テスト (Acoustic startle response/prepulse inhibition test)    | 感覚運動ゲーティング、驚愕反応              |
| 10 | ポーソルト強制水泳テスト (Porsolt forced swim test (Day 1))                            | うつ様行動                        |
|    | ポーソルト強制水泳テスト (Porsolt forced swim test (Day 2))                            | 〃                            |
| 11 | T字型迷路テスト (T-maze spontaneous alternation test)                             | 作業記憶                         |
| 12 | バーンズ迷路テスト (馴化) (Barnes maze test (habituation))                            | 空間学習と記憶                      |
|    | バーンズ迷路テスト (トレーニング) (Barnes maze test (training))                           | 〃                            |
|    | バーンズ迷路テスト (試験1) (Barnes maze test (probe trial 1, 1 day after training))   | 〃                            |
|    | バーンズ迷路テスト (試験2) (Barnes maze test (probe trial 2, 28 days after training)) | 〃                            |
| 13 | 尾懸垂テスト (Tail suspension test)                                              | うつ様行動                        |
| 14 | 恐怖条件づけテスト (Fear conditioning test (Day 1))                                 | 文脈記憶                         |
|    | 恐怖条件づけテスト (Fear conditioning test (Day 2))                                 | 〃                            |
|    | 恐怖条件づけテスト (Fear conditioning test (remote memory, Day 29))                 | 〃                            |
| 15 | ホームケージ社会的行動テスト (Home cage social interaction test)                         | 慣れ親しんだ環境下での社会的行動             |

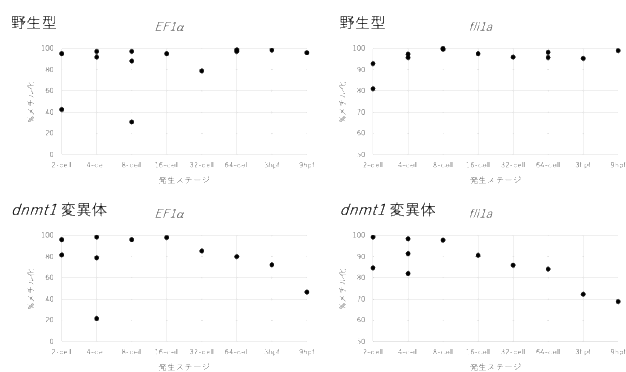
現段階において、上記テーブルの 1～11、および追加テストとしての歩行テストまでが終了した。1～11 項目にはマウスの生理学的な状態（体重、筋力、体温）や一部の行動（不安様行動、探索行動、社会性）、そして運動機能が含まれるが、これまでのところ行動異常は確認されていない。ただし 11 項目目の T 字型迷路を利用した自発的交替（こうかん）試験での 1 セクションにおいては変異体で野生型との差が確認された。まず遅延交替課題(delayed alternation)の標準待機時間の 3 秒、10 秒、30 秒では変異体と野生型の間で差は見られなかった。もし待機 3 秒でも変異体の成績が悪ければ、これ

は記憶ではなく運動能力の低下、不安の亢進（じっとしている）、学習機能の毀損が考えられたが、そうではなかった。ところが唯一、60 秒という長い待機時間になると変異体では雄雌ともに正解率の低下（前回と同じ通路を再び選んでしまう）が見られ、その差は有意であった ( $p=0.0262$ )。したがって Cfap74 の欠損マウスではワーキングメモリの低下が示唆され、ヒトの水頭症と同じく記憶障害を引き起こす可能性が生まれた。そこで同アッセイをより困難な条件で、具体的にはアッセイ間の標準待機時間を 120 秒と 180 秒に伸ばして行った。しかし待機時間 120 秒、並びに 180 秒では野生型マウスと変異体マウスの間で結果に有意差は見られなかった。なお遅延時間“Time”が伸びるとともに、正答率が下がったことは ( $p<0.0001$ )、本課題 11 が実験の期待通り作業記憶 (working memory) を測れていることを裏づけた。現在、第 12 項目の「バーンズ迷路テスト」で空間学習と記憶についてアッセイを行っている。また水頭症の症状の一つである、ふらつき歩行を検出するアッセイも追加で行ったが、このアッセイについても野生型マウスと変異体マウスの間で変化は見られなかった。

## 2) DNA メチル化リセットと老化の関連

前年度にゼブラフィッシュにおいて受精後の DNA メチル化リセットを行う遺伝子が、意外なことに、従来の *de novo* DNA メチル化酵素 (Dnmt3, 4, 5, 6, 7, 8) ではないことが強く示唆された。そのため、一般的には維持 DNA メチル化酵素として知られている Dnmt1 には同時に *de novo* DNA メチル化酵素活性も示す可能性を考えた。そこでゼブラフィッシュの維持 DNA メチル化酵素遺伝子である *dnmt1* のハイボモルフ（機能低下型）

図4 野生型胚および *dnmt1* 母性変異体由来胚の初期発生における DNA メチル化の変動



変異体を使用して、母性 *dnmt1* 変異体（母親が *dnmt1*<sup>-/-</sup>）から生じる胚における DNA メチル化リセットを、*EF1a* および *flil1a* という二つの遺伝子に着目して解析した（図4）。その結果、まだサンプル数が不足しているが、母性 *dnmt1* 変異体

由来の胚でも野生型胚と同様に、16 細胞期（16-cell；受精後 1.5 時間）までにゲノムは高メチル化状態に至るが、*dnmt1* 変異体由来の胚では 16 細胞期以降のステージでは徐々に低メチル化することがわかった。この結果は母性 *dnmt1* ハイボモルフ変異体胚においても、受精後に働く *de novo* メチル化酵素活性は存在することを示唆している。また同時に *de novo* メチル化酵素活性は受精後 1.5 時間以降には消失することが示唆され

た。したがってゼブラフィッシュにおけるエピゲノムのリセット、すなわちエピゲノムの若返りは受精後 1.5 時間という短い時間の間に生じることが明らかになった。なお、この *dnmt1* 変異体における Dnmt1 はあくまで機能低下型であり DNA メチル化維持活性を完全には失っていない。したがってこのハイポモルフ Dnmt1 に *de novo* メチル化酵素活性がないとは現段階では言えない。

## D. 考察と結論

### 【CFAP74 と水頭症】

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における変異と *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、老人斑形成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。もともとはクラミドモナスの鞭毛を構成するタンパク質と免疫沈降法により今日チンするタンパク質として見つかった。ヒトの **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。われわれが *Cfap74* 変異マウスを作成したところ雄雌とも不妊であることが判明し、マウスの **Cfap74** とヒトの **CFAP74** の機能が保存していることがうかがわれた。したがってこれらの知見から **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、精子以外でのヒト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。たとえば **CFAP74** は脳内の大脳皮質において発現するが、そこには動繊毛を持つ細胞種は報告されていない。また **CFAP74** には特徴的な既知ドメインが存在せず、そのタンパク質情報から脳内での機能について推測することが困難であった。ところがヒントは予期しない二つの疾患からもたらされた。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のである。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おり、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。そこでマウス **Cfap74** 遺伝子の変異体を作成し、MRI ならびに組織学的解析を行ったところ、**Cfap74** 変異体マウスは水頭症を発症していることが明らかになった。なおヒト **CFAP74** の変異による精子形成不全患者では水頭症を引き起こすことは報告されていない。この結果については三つの可能性を考えている。一つ目はヒト **CFAP74** ホモ変異患者の数は数例と少なすぎて判断するに足るデータが集まっていない。もしくは論文発表時点では精子形成不全の患者は水頭症を発症する年齢に達していなかった。精子形成不全は成人男性の壮年期以前に気づくことが多いと予想されるが、突発性水頭症は高齢者で発症するケースがほとんどであり、この発症の時間的ずれが精子形成不全に比べ水頭症の発症への気づきを不確かなものになっている可能性はある。二つ目は **CFAP74** ホモ変異患者のアレルが機能低下型(ハイポモルフ)のため、完全な **CFAP74** 機能を要求する精子形成においては表現型が出るが、ハイポモルフでは水頭症にまでは至らないという可能性。三つ目は生物種の違いで、**CFAP74** 機能不全によりマウスでは水頭症を発症するが、ヒトでは発症しない。そこで現在、ヒ

ト水頭症と CFAP74 の関連を主任研究者が調べることのできる範囲での解析ということで、ヒトでの水頭症発症と CFAP74 発現低下アレルとの関連を調べる計画を立てている（倫理審査申請中）。

### 【CFAP74 と老人斑形成】

老人斑形成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*  $\epsilon 4$  多型程度しか知られていなかった。主任研究者は以前行った遺伝学的解析から *CFAP74* という繊毛関連遺伝子の発現低下アレルが老人斑形成と関連することを見いだしており、今回、CFAP74 と老人斑形成の関連をマウスで調べるため、Cfap74 変異マウスと Cfap74 正常マウス脳の  $A\beta$  量を ELISA により測定したところ、50 週齢のマウスにおいて  $A\beta 40$  ならびに  $A\beta 42$  とも Cfap74 変異マウス脳で増加していた。その結果、マウス Cfap74 遺伝子の機能喪失がマウス脳内での  $A\beta$  の蓄積を促進することが生化学的解析により確かめられた。現在、ELISA の結果を裏付けられるか、抗  $A\beta$  抗体によるマウス脳の免疫組織学的解析を進めている。

主任研究者は以前にも共同研究者とともに、マウス神経培養細胞において Cfap74 活性を低下させると、培養液中の  $A\beta$  量が増加することを見いだしている。したがってマウス Cfap74 はたとえば  $A\beta$  の細胞外への分泌の抑制する可能性が考えられるが、マウス神経細胞で Cfap74 機能を抑制しても細胞内  $A\beta$  量は変化しないという結果も得ている。もう一つの可能性は Cfap74 が細胞外での  $A\beta$  分解に関与する可能性である。たとえばネプリライシン(neprilysin)細胞外で  $A\beta$  を分解する酵素として細胞膜に存在し、細胞外の  $A\beta$  を分解することができる酵素活性部位を細胞外に突出する構造を持っている。またインシュリン分解酵素(insulin-degrading enzyme; IDE)にも  $A\beta$  を分解する活性が報告されている。Cfap74 にはこれら  $A\beta$  分解酵素の活性に影響するタンパク質なのかもしれない。今後、ネプリライシンや IDE の存在量変化をウェスタンブロットで測定することを計画している。

あるいは Cfap74 は  $A\beta$  のエンドサイトーシスに関与する可能性もある。以下にその理由を説明する。神経細胞外に存在する  $A\beta$  はエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれることが知られている（アストロサイト、ミクログリア、血管周囲細胞なども  $A\beta$  の取り込みは行う）。代表的な経路としては 1) クラスリン依存エンドサイトーシス(clathrin-dependent endocytosis)、特に凝集性  $A\beta$  に関与することがあるマクロピノサイトーシス、3)ミクログリアによる貪食が挙げられる。そして取り込まれた  $A\beta$  は通常、エンドソームやリソソームへ送られ、分解される。ただし、アルツハイマー病では、1)  $A\beta$  の分解が追いつかない、2) エンドソーム機能異常、あるいは 3) リソソーム障害などにより、細胞内  $A\beta$  蓄積や毒性につながると考えられている。また興味深いのは、 $A\beta$  産生自体もエンドサイトーシス系と強く関係していることである。APP は細胞膜から内在化され、産生エンドソーム内で BACE1 に切断されやすくなるため、APP

internalization→endosome→A $\beta$  production という流れが病態上重要である。つまり、アルツハイマー病では「A $\beta$ を作る場所もエンドソーム」「A $\beta$ を取り込む場所もエンドソーム」という点が重要になる。ここで注目すべきは、繊毛とエンドサイトーシスはどちらも、1) 微小管(microtubule)、2) モータータンパク (ダイニン/キネシン)、3) 小胞輸送(vesicle trafficking)に依存し、より具体的には、多くの繊毛関連タンパク (CFAP74 もその一つ)は基底小体(basal body)周辺や細胞膜近傍の輸送ハブで働き、エンドサイトーシス経路 (clathrin 依存など) ととも交差するという知見である。したがって、その結果 Cfap74 の機能低下で A $\beta$  の膜からの取り込み (エンドサイトーシス) や小胞輸送が非効率になり、細胞外 A $\beta$  が増える可能性がある。前者の可能性については FITC-A $\beta$  (または HiLyte A $\beta$ ) の取り込みアッセイで検証できると考えている。さらにトランスフェリン取り込みアッセイおよびデキストラン取り込みにより、異常を来すのが、それぞれ、クラスリン依存エンドサイトーシスなのかあるいは課黒ピノサイトーシスなのか、を区別できるはずである。また後者の、小胞輸送の可能性については小胞輸送マーカーで局在変化を見ればよいはずである。具体的には初期エンドソームのマーカーとして Rab5、後期エンドソームに対して Rab7、リソソームに対して LAMP1 が使用できる。脳の cortex,つまり大脳皮質(cerebral cortex)では、基本的には、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア、などの細胞は一次繊毛を持つが、典型的な動繊毛(motile cilia)を持つ細胞は通常ほとんどない。したがって、これらの可能性は細胞自立的に A $\beta$  を細胞の周囲に蓄積するメカニズムといえる。

それとは別に、CFAP74 の機能低下による老人斑形成の促進については、上記の、A $\beta$  の分解経路そして A $\beta$  の取り込み経路、に加えもう一つ、水頭症による脳脊髄液 (CSF)の流動低下・貯留が原因として考えられる。最近、CSF による脳実質内にたまる、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアからの排泄物のクリアランス、いわゆるグリンファティックシステムが脳機能を維持するために重要であるとの報告が相次いでいる。Cfap74 変異体マウスでは顕著な水頭症を発症したことから、50 週齢 Cfap74 変異体脳での A $\beta$  の蓄積促進は、このグリンファティックシステム不全がその原因の一つである可能性がある。

この CSF の流動低下による A $\beta$  クリアランス低下とエンドサイトーシス低下は互いに排他的ではない。したがって CFAP74 は「流れ」だけでなく「取り込み」にも関与し、A $\beta$  の二重のクリアランス経路を支えている可能性もある。したがって A $\beta$  代謝における Cfap74 の機能を解析することはアルツハイマー病で見られる脳内 A $\beta$  蓄積のメカニズムを解明する足がかりになると期待される。

### 【DNA メチル化と若返り】

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か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、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す因子が *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

論文発表（主任研究者）

1. Identification of diagnostic DNA methylation markers in the blood of Japanese Alzheimer's disease patients using methylation capture sequencing. R. Mitsumori, K. Sawamura, K. Yamakoshi, A. Nakamura, Y. Arahata, S. Niida, D. Shigemizu, K. Ozaki, Nobuyoshi Shimoda *Clin. Epigenetics* (2025) 17: 107.
2. Plasma IL-6 Levels as a Biomarker for Behavioral Changes in Alzheimer's Disease. F. Yasuno, A. Watanabe, Y. Kimura, Y. Yamauchi, A. Ogata, H. Ikenuma, J. Abe, H. Minami, T. Nihashi, K. Yokoi, Nobuyoshi Shimoda, K. Kasuga, T. Ikeuchi, A. Takeda, T. Sakurai, K. Ito, T. Kato *Neuroimmunomodulation* (2025) Aug 16:1-21.

3. Leptin and inflammatory pathways in the Alzheimer' s disease continuum: Implications for glial activation and neuropsychiatric symptoms. F. Yasuno, K. Nakagome, Y. Omachi, Y. Kimura, A. Ogata, H. Ikenuma, J. Abe, H. Minami, T. Nihashi, K. Yokoi, S. Hattori, Nobuyoshi Shimoda, K. Kasuga, T. Ikeuchi, A. Takeda, T. Sakurai, K. Ito, T. Kato *Brain, Behavior, & Immunity - Health* (2025) 47:101018.
4. 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.
5. CRISPR/Cas9-mediated knock-in cells of the late-onset Alzheimer' s disease-risk variant, SHARPIN G186R, reveal reduced NF- $\kappa$ B pathway and accelerated A $\beta$  secretion. Y. Asanomi, T. Kimura, Nobuyoshi Shimoda, D. Shigemizu, S. Niida, K. Ozaki *Journal of Human Genetics* (2024) 69(5):171-176.

#### 総説

1. From research to clinical practice: DNA methylation signatures as diagnostic tools for Alzheimer' s disease. Nobuyoshi Shimoda *Epigenomics* (2026) 18:1-8.

2. 卵子の老化と若返り 下田修義 基礎老化研究 48 (3) 33-36, 2024 年 9 月

#### 学会発表

1. 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探索モデルの構築 光森理紗, 澤村嘉代子, 山越貴水, 中村昭範, 新畑豊, 新飯田俊平, 重水大智, 尾崎浩一, 下田修義 第 18 回エピジェネティクス研究会年会 令和 7 年 6 月 19 日
2. ゼブラフィッシュで初めて発見されたエピ変異 下田修義, 山越貴水, 澤村嘉代子 第 17 回日本エピ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
3. 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