

<研究課題> 全ゲノム解析を基盤としたレビー小体型認知症の病態メカニズムの解明

代表研究者 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 重水 大智

共同研究者 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 木村 哲晃

【抄録】

申請者らは、東アジア人に特異的に認められる新規レビー小体型認知症（DLB）関連遺伝子変異として、*MFSD3* p.C293*変異および *MRPL43* p.N81H 変異を同定した。本研究では、これらの変異の機能的意義を明らかにするため、ヒト神経幹細胞およびマウスモデルを用いた解析を行った。ゲノム編集により *MFSD3* 変異を導入した細胞では、細胞増殖能および神経細胞・アストロサイトへの分化効率の低下が認められた。さらに、*Mfsd3* 欠損マウスでは、海馬神経新生の低下、側脳室拡大、活動量の低下が観察された。一方、*MRPL43* 変異導入細胞ではミトコンドリア機能の低下が認められたが、ノックインマウスでは明確な異常は認められなかった。したがって、これらの変異は単独では顕著な DLB 表現型を誘導しないものの、神経新生やミトコンドリア機能を介して DLB 発症に対する脆弱性に関与する可能性が示唆された。

1. 研究の目的

1-1. 細胞レベルの解析

現在の DLB 治療はコリンエステラーゼ阻害薬による対症療法が中心であり、病態機構に基づく治療標的は十分に解明されていない。申請者らは、東アジア人に特異的な DLB 関連遺伝子変異として *MFSD3* p.C293*変異および *MRPL43* p.N81H 変異を同定した。*MFSD3* は機能未解明の膜タンパク質であり、*MRPL43* はミトコンドリアリボソーム構成因子であるが、DLB における役割は不明である。

本研究では、ゲノム編集により、これらの変異をヒト神経幹細胞に導入し、細胞増殖、神経分化、およびミトコンドリア機能への影響を解析することで、変異の機能的意義と DLB 発症機構の解明を目的とする。

1-2. 個体レベルの解析

細胞レベルの知見を踏まえ、個体レベルでの機能的影響を明らかにすることを目的とする。具体的には、ゲノム編集により *MFSD3* p.C293*変異および *MRPL43* p.N81H 変異を導入したマウスを作製し、野生型マウスとの比較解析を行う。さらに、行動解析による運動機能および認知機能の評価に加え、脳組織学的解析によりレビー小体病変の形成、神経変性、および脳構造変化を検討する。

2. 研究方法と経過

2-1. *MFSD3* 変異導入細胞の解析

ゲノム編集により *MFSD3* p.C293*変異を導入したヒト神経幹細胞（*MFSD3*-KI 細胞）を作製し、野生型細胞と比較した。細胞増殖能は CyQUANT® Cell Proliferation Assay を用いて評価し、独立した 3 回の実験を行った。統計解析には Welch の t 検定を用いた。

また、神経細胞およびアストロサイトへの分化誘導を行い、分化マーカーの発現を指標として分化効率を評価した。

2-2. *MRPL43* 変異導入細胞の解析

MRPL43 p.N81H 変異を導入したヒト神経幹細胞（*MRPL43*-KI 細胞）を作製し、野生型細胞と比較した。ミトコンドリア機能は JC-1 染色を用いて評価し、赤色／緑色蛍光強度比により膜電位を定量した。統計解析には Welch の t 検定を用いた。

2-3 *Mfsd3* ノックアウトマウスの解析

ヒトの変異がストップゲイン変異であることから、*Mfsd3* ノックアウトマウスを作製し、ホモ接合体を確立した。6 か月齢および 12 か月齢において脳切片を作製し、形態学的解析を行った。海馬神経新生は Dcx 免疫染色により評価した。

さらに、脳組織中の α -シヌクレイン量を

ELISA により測定した。行動解析には IntelliCage を用い、長期的な行動および学習機能を評価した。

2-4. *Mrpl43* ノックインマウスの解析

ヒトと相同な *Mrpl43*p.N81H 変異を導入したノックインマウスを作製し、ホモ接合体を確立した。野生型マウスと比較し、脳構造の形態学的解析を行った。

3. 研究の成果

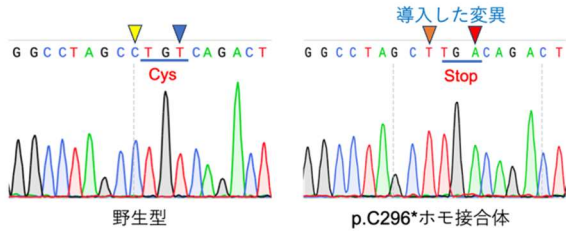


図1. ゲノム編集による神経幹細胞へのp.C296*変異の導入結果

ゲノム編集により変異を導入してCysteineからStopへとコドンを変更した(青三角から赤三角へ)。同時に、Cas9による編集後の再切断を防ぐための変異も導入した(黄三角から橙三角へ)。

3-1. *Mfsd3* 変異は神経幹細胞の増殖と分化を低下させる

Mfsd3-KI 細胞 (図1) では、野生型と比較して細胞増殖能の有意な低下が認められた (図2)。

また、神経細胞およびアストロサイトへの分化誘導後の細胞数も減少

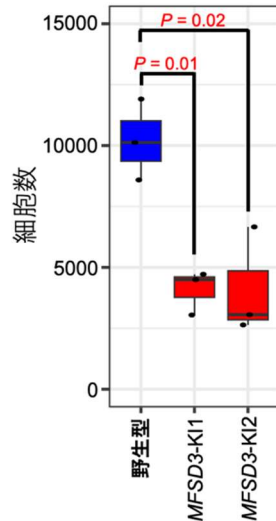


図2. 増殖速度の比較

アストロサイト

神経細胞

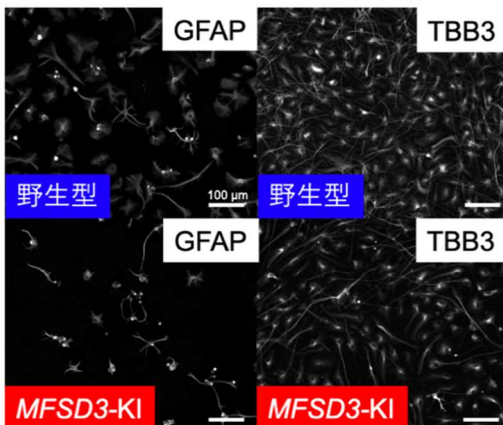


図3. 分化効率の比較

Aアストロサイト分化マーカーのGFAPと神経細胞分化マーカーのTBB3で細胞が分化した事を確認した。*Mfsd3*-KI細胞は野生型と比較して分化後の細胞数が少ない。

していた (図3)。

これらの結果から、本変異は細胞増殖および分化効率の低下に関与することが示唆された。

3-2. *MRPL43* 変異はミトコンドリア機能低下と関連する

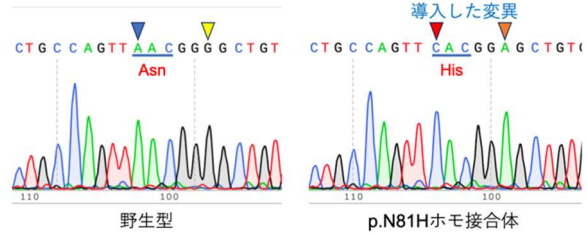


図4. ゲノム編集による神経幹細胞へのp.N81H変異の導入結果

ゲノム編集により変異を導入してAsparagineからHistidineへとコドンを変更した(青三角から赤三角へ)。同時に、Cas9による編集後の再切断を防ぐための変異も導入した(黄三角から橙三角へ)。

MRPL43-KI

細胞 (図4) では、JC-1 解析によりミトコンドリア膜電位の低下が認められ、ミトコンドリア機能障害への関与が示唆された。(図5)。

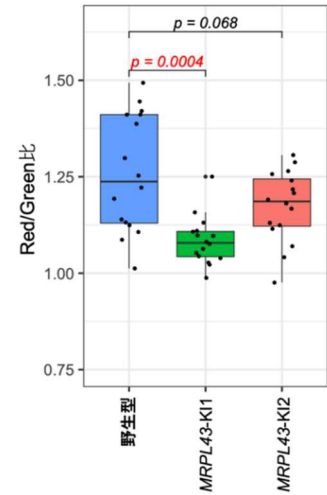


図5. ミトコンドリア活性の比較

3-3. *Mfsd3* KO

マウスでは加齢

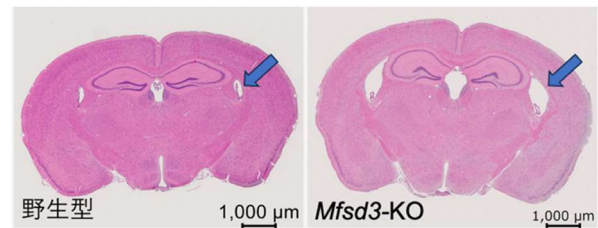


図6. マウス脳形態の比較

Mfsd3-KOマウスでは野生型よりも脳室 (矢印) が大きい個体が見られた。

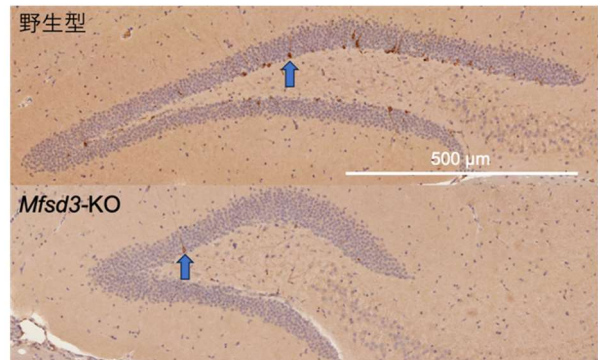


図7. Dcx染色による新生神経の検出

新しく分化した神経細胞のマーカーであるDcxを検出して神経新生を比較した。上の野生型と比べて下の*Mfsd3*-KOではDcxで染色される神経細胞 (新生神経) の数が少ない。

Elucidation of the Pathogenic Mechanisms of Dementia with Lewy Bodies Based on Whole-Genome Sequence Analysis

Primary Researcher: Daichi Shigemizu
Professor, National Center for Geriatrics and Gerontology

Co-researchers: Tetsuaki Kimura
Researcher, National Center for Geriatrics and Gerontology

Dementia with Lewy bodies (DLB) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by cognitive decline and motor dysfunction, for which disease-modifying mechanisms remain largely unclear. We previously identified two East Asian–specific rare variants associated with DLB: *MFSD3* p.C293* and *MRPL43* p.N81H. In this study, we investigated their functional roles using human neural stem cell models and genetically engineered mouse models.

CRISPR/Cas9-mediated introduction of *MFSD3* p.C293* into human neural stem cells resulted in reduced cell proliferation and impaired differentiation into neurons and astrocytes. In *Mfsd3* knockout mice, age-dependent phenotypes were observed, including ventricular enlargement, reduced hippocampal neurogenesis, and decreased locomotor activity; however, no Lewy body formation or α -synuclein accumulation was detected. *MRPL43* p.N81H mutant cells exhibited reduced mitochondrial membrane potential, whereas *MRPL43* knockout mice were embryonically lethal, indicating that *MRPL43* is essential for survival and that the p.N81H variant retains partial function.

These findings suggest that *MFSD3* and *MRPL43* variants contribute to neuronal vulnerability and mitochondrial dysfunction, respectively, but are insufficient to induce full DLB pathology in isolation. Instead, they may act as genetic susceptibility factors that require additional pathological stress, such as α -synuclein burden, to trigger disease onset. This study provides new insights into genotype-dependent vulnerability mechanisms underlying DLB pathogenesis.