

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12215

研究課題名(和文)有機リンの慢性毒性解析と診断技術開発

研究課題名(英文)Towards the diagnosis method for the toxicity of organophosphorus

研究代表者

木村 穰(KIMURA, Minoru)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10146706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シックハウス症候群は、ホルムアルデヒドや有機リン等によって引き起こされる健康障害である。発症メカニズム追究を目的として、有機リン代謝関連ヒト神経障害エステラーゼ(NTE)の遺伝子導入マウスを作製し、1)ヒト型NTE発現皮膚への変化、2)ホルマリン暴露による海馬錐体細胞・小脳Purkinje細胞の萎縮を認め、また3)当該遺伝子欠損マウス個体の作製にも成功した。4)鶏卵への有機リンの影響では頭頂部に出血傾向を認め、5)有機リン中毒ヒト死亡個体ではNTE発現の低下、小脳顆粒細胞層での神経細胞の変性・凝集を認めた。6)大腸菌、および動物培養細胞での高発現細胞を取得し、質量分析によりNTEを同定した。

研究成果の概要(英文)：Sick Building Syndrome(SBS) is caused by volatile organic compounds and organophosphorus(OP). However, despite the presence of SBS symptoms in patients the actual pathogenesis has not yet been developed.

Since OP covalently bind Neuropathy Target Esterase (NTE) we construct the transgenic mice carrying human PNPLA6 cDNA which codes human NTE. The skin of the mice could digest the ester bond specific for human NTE and showed the atrophy of pyramidal cells in hippocampus and the Purkinje cells in cerebellum after exposure for high dose formalin. We also developed the new mutant mice of pnpla6 gene using CRISPR/ Cas9 system. Exposure of OP to chick embryos cause hemorrhage at the top of the brain. The NTE expression in a human brain died by drinking OP decreased and paralysis and aggregation of granular cells in the cerebellum occurred.

Using human PNPLA6 cDNA, we made the part of NTE which contain active site in E.coli cells and human cells and partial purification was completed

研究分野：分子生物学

キーワード：有機リン シックハウス症候群 神経障害エステラーゼ 複合体解析

1. 研究開始当初の背景

我々は有機リン等の曝露が原因とされるシックハウス症候群患者単核球において、Neuropathy Target Esterase (以下 NTE) の活性が健常者に比べて高いことを 2013 年に報告したが、NTE は有機リン複合体形成により神経病変を引き起こす可能性がある。そのため、まずは NTE 高発現遺伝子導入マウスを作成中であった。また、近年 NTE をコードする遺伝子 *PNPLA6* に変異を伴う運動失調等の疾患報告が散見されていた。ケ

一方、NTE 有機リン複合体の質量分析による解析を目指し、NTE 高発現系を立ち上げる段階であった。また有機リン中毒患者の脳凍結標本解析を新潟大学から分与していただけるように、倫理申請を双方の大学で進め、承認が得られた。

2. 研究の目的

中枢および末梢神経系における有機リンの影響を、NTE に対する急性および遅延性反応という観点から解析することは、究極の目的の一つであるが、近年この酵素をコードする遺伝子に変異を伴う運動失調等の疾患が見つかってきたことや、ヌル変異のホモ型マウスは胎生致死であることなどからこの遺伝子の機能は単に酵素としての役割だけではないと推測され、遺伝子導入マウスや遺伝子欠損マウス、また暴露実験なども含め、特に神経機能を中心として、その遺伝子機能を明らかにすることを一つの目的とした。また、NTE 有機リン複合体の解析を目指し、NTE 高発現系を立ち上げることを目標の一つとした

3. 研究の方法

大腸菌における NTE の大量産生では pET49 ベクターを用い N 末に相当する部分に His-tag を、C 末に相当する部分に V5-tag さらにその外側に Strept-tag を配置した。な

お、NTE は全体で 1350a.a. 分子量 125kDa 程度であるが、すでに大腸菌に発現させる系で C 末側の 60kDa 程度のペプチドで酵素活性はほぼ 100% 存在することが証明されているため、その部分の cDNA を用いた。有機リンの代表として今年度は DDVP (ジクロロボス、和光純薬) を用い、活性の低下などを検討した。

CRISPR/Cas9 システムについては通常の方法を用いたが、Cas9 は RNA でなく IDT 社のタンパク質を用いた。注入はマウス受精卵細胞質と核の双方もしくは細胞質のみに行っている。

農薬中毒者の凍結死後脳標本については新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター脳疾患標本資源解析学の柿田明美教授より他の疾患で死亡した数例の凍結標本とともに分与いただいた。

なお、本研究の実施にあたっては遺伝子組換え実験計画、動物実験計画を提出し、大学承認を得て実施した。またヒト死後試料を研究材料に用いることについては新潟大学および東海大学の倫理委員会の承認を受けている。本研究における利益相反はない。

4. 研究成果

(1) 有機リンの一種、DDVP を投与したところ妊娠マウスに投与した場合には、遺伝子導入マウスの死亡胎仔の割合が高いという以前の初期結果を追認した。なお成体マウスはホルマリンや DDVP への耐性度がヒトに比して高い。NTE 高発現マウスでは皮膚において発現が数倍以上上昇するとともに、脂肪酸エステルの 2 箇所分解位置のうち、ヒト型に近い分解パターンを示した。このことはヒト型皮膚を持つマウスの出現を意味する。また、高濃度ホルマリン暴露では海馬の錐体細胞や小脳 Purkinje 細胞での萎縮が顕著に見られた。

(2) ついで、有機リン投与による NTE との複合体解析のためのツール作りに専念した。

大腸菌、ヒト胎児腎臓由来 293 細胞、再び大腸菌と 3 回の大量発現方法を試み、最終的には NTE 活性として総タンパク量の 20%程度にまで精製することができた。しかしながら、N 末端側に接続した His タグを先に切断処理しようが、C 末端側に接続した V5 タグを先に切断処理しようが、タグのないサイズのバンドがゲル電気泳動では単一とはならず、2 本のバンドとして検出された。ただ、どちらも活性は十分にあるようである。

(3) マウス受精卵に CRISPR/Cas9 システムで変異マウスを作成する計画では、結果的に複数の変異マウスを得ることができた。しかしながら目的の点突然変異マウスは得られていない。現在交配中であるが、今のところ、ホモ型の個体は生まれない。

(4) 有機リン含有農薬により自殺死亡した方の脳凍結サンプルと病理標本 1 例を解析したところ。急性腹部痛死後脳、多発性神経障害死後脳と比較して、Western Blot では発現が半分程度に低下していた。また病理切片の観察では有機リン中毒患者脳では、顆粒細胞層の神経細胞が変性、凝集し、正常形態の神経細胞では NTE が核を含めて均一に局在するのに対し、NTE 局在が顆粒状に見えるブルキンエ細胞周辺での NTE 発現が見られなかった。

考察

(1) 遺伝子導入マウスの有機リン暴露後の眼球運動解析については、飼育場所の移動等があり、かつ暴露量がかなり高濃度であるため工夫が必要との判断をしている。また、当初鳥類も実験動物の候補と考えたが、眼球運動が複雑で適さないことが判明した。

一方、NTE の大量生産は進み、100 µg オーダーでの精製ができたことから、有機リンとの複合体の分析を今後予定している。しかしながら、精製の過程で tag の切断の順序を変えても分子量の異なる 2 つの分子になって

しまい、これは原因不明であるが、2 本とも酵素活性はあるものと推測される。

(2) NTE 変異マウスの作製に関しては、変異マウスという点では取得に成功したが、本当にヒト疾患に対応する変異を持つ点突然変異マウスは得られていない。とはいうものの、ホモ型もしくはコンパウンドヘテロ型のマウスは生まれてこなかったため、やはりこのタンパク質としての重要な機能を示唆する結果となっている。今後、ヘテロ型マウスでの行動解析などを予定している。

(3) 有機リン中毒死亡個体での解析は、なかなか試料は得られにくいですが、柿田教授のご好意により解析することができた。今後、年齢による発現変化を解析するとともに、症例報告として投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件) 全て査読あり。

1. Hisako Akatsuka; Shuhei Kuga; Kaori Masuhara; Odontuya Davaadorj; Chisa Okada; Yumi Iida; Yoshinori Okada; Nahoko Fukunishi; Takahiro Suzuki; Kazuyoshi Hosomichi; Masato Ohtsuka; Masafumi Tanaka; Ituro Inoue; Minoru Kimura; AMBRA1 is involved in T cell receptor-mediated metabolic reprogramming through an ATG7-independent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2017) Sep 30 ; 491(4):1098-1104. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.019. Epub 2017 Aug 5.
2. Sakabe, K., Kimura, M., Terayama, H., Tsunoda, M., Miyajima, E., Takano, H., Azuma, K., Mizukoshi, A., Matsuda, T., Mori, C., Kawakami, S., Miyata, M., Ishikawa, S. and Aizawa, Y. : Chemical Sensitivity-The Frontier of Diagnosis and Treatment (2016)

Review Japanese Journal of Clinical Oncology
臨床環境医学 Dec. 31 25(2), 49-54

3. 畑中朋美、荻野瑛里奈、山村勇貴、
本杉奈美、竹内絵理、坂部貢、杉野雅浩、
従二和彦、木村穰：シックハウス症候群原
因物質の経皮吸収に及ぼすNTE活性の影響
臨床環境医学 24巻 2号 88-93 (2015)

〔学会発表〕(計9件)

2017 学会発表

- (1) 阿部如子、田中正史、本杉奈美、伊藤
誠敏、大久保朋一、木村穰：有機リンによ
る NTE(Neuropathy Target Esterase)の活
性阻害について。生命科学系合同年次大会
(第40回日本分子生物学会年会、第90回日
本生化学会大会) 2017.12.6-9 神戸
- (2) 畑中朋美、井上貴暁、田中亨、藤堂浩
明、杉林堅次、内堀雅博、青山謙一、太田
嘉英、今川孝太郎、赤松正、宮坂宗男、坂
部貢、木村穰：エステル化合物の経皮吸収
における carboxyesterase の役割-シック
ハウス症候群との関連性- 第26回日本臨
床環境医学会学術集会 2017.6.24-25 東
京
- (3) 木村穰、加藤明、本杉奈美、大久保朋
一、畑中朋美、坂部貢、田中正史：ヒト
Neuropathy Target Esterase 遺伝子導入マ
ウスを用いたシックハウス症候群関連化
学物質の生体影響の解析。第39回日本分
子生物学会年会 2016.11.30-12.2
- (4) 畑中朋美、中村優花、井上貴暁、田中
亨、藤堂浩明、杉林堅次、内堀雅博、太田
嘉英、今川孝太郎、赤松正、宮坂宗男、坂
部貢、木村穰：ヒト皮膚におけるエステル
化合物の経皮吸収挙動。第39回日本分子
生物学会年会 2016.11.30-12.2
- (5) 加藤明、三島亜希子、麥倉信一郎、立
崎武弘、遊部雅生、坂部貢、木村穰：ホル
ムアルデヒドガス暴露による反射性眼球運

動への影響：第25回日本臨床環境医学会学
術集会 2016.6.17-18 郡山

- (6) 畑中朋美、杉野雅浩、従二和彦、内堀
雅博、太田嘉英、今川孝太郎、赤松正、宮
坂宗男、坂部貢、木村穰：ヒトにおけるフ
タル酸エステルの経皮吸収から見たシック
ハウス症候群について。第25回日本臨
床環境医学会学術集会 2016.6.17-18 郡
山
- (7) 畑中朋美、荻野瑛里奈、山村勇貴、本
杉奈美、竹内絵理、坂部貢、杉野雅浩、従
二和彦、木村穰：シックハウス症候群原因
物質の経皮吸収に及ぼす NTE 活性の影響。
第24回日本臨床環境医学会学術集会
2015.6.6-7 東京
- (8) 畑中朋美、荻野瑛里奈、本杉奈美、竹
内絵理、坂部貢、杉野雅浩、従二和彦、木
村穰：シックハウス症候群における NTE 活
性の役割に関する研究-フタル酸エステルの
経皮吸収に及ぼす影響 I：第38回日本分
子生物学会年会 2015.12.1-4 神戸
- (9) 杉野雅浩、畑中朋美、荻野瑛里奈、青
山謙一、内堀雅博、太田嘉英、今川孝太郎、
宮坂宗男、竹内絵理、坂部貢、従二和彦、
木村穰：シックハウス症候群における NTE
活性の役割に関する研究-フタル酸エステ
ルの経皮吸収に及ぼす影響 II：第38日本
分子生物学会年会 2015.12.1-4 神戸

〔図書〕(計1件)

- (1) 坂部貢、寺山隼人、金沢輝久、木村穰：
免疫症候群(第2版)-その他の免疫疾患を
含めて- II V.アレルギー疾患 化学物質
過敏症 pp.458-461 別冊日本臨床 新領
域別症候群シリーズ No.35 (2016)
2016.1.20発行

〔産業財産権〕

なし

〔産業財産権〕

特許

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 穰 (KIMURA, Minoru)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10146706

(2) 研究分担者

梶原 景正 (KAJIWARA, Kagemasa)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00204397

坂部 貢 (SAKABE, Kou)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：70162302

加藤 明 (KATOH, Akira)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：70546746