

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06847

研究課題名(和文) 遺伝子操作マウスを用いた神経障害エステラーゼの新規機能解明

研究課題名(英文) Analyses for the new function of the neuropathy target esterase using genetically engineered mice.

研究代表者

木村 稯 (Kimura, Minoru)

東海大学・医学部・客員教授

研究者番号：10146706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：有機リン代謝に関与する神経障害標的エステラーゼ(Neuropathy Target Esterase: NTE)をコードするヒトPNPLA6(Patatin-like phospholipase domain containing 6) cDNAを導いた遺伝導入マウスおよびマウスpnp1a6遺伝子変異マウスを用いて、当該酵素遺伝子の神経系における機能を解析した。過剰発現のマウスに生育低下、また、いくつかの変異マウス系統ではホモ型は胎生致死を招き、ヘテロ型ではややブルキンエ細胞数が低下する傾向が認められ、協調運動の低下も一部に観察された。系統樹立とヘテロ型胎仔由来線維芽細胞の取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子名にあるPatatinはジャガイモなどの貯蔵タンパク質であり、脂肪酸を分解するリパーゼの活性を持つ。PNPLA群の遺伝子は複数種知られ、真核生物から原核生物にまで保存されている。脂質代謝酵素の発現量や分子の一部の変化によって個体の生存までが影響され、脳神経系の機能に影響を及ぼす可能性も示せたことは分子生物学あるいは生物進化学の上で極めて重要な発見と考える。また同様の変異をもつヒト疾患や有機リンの結合によって生じる種々の神経症状に対する発症機構を考え、同時に今後の治療法を探索するためのヒト疾患モデルマウスを提供できる成果を挙げられたことは社会的貢献度の高い成果となったと自負する。

研究成果の概要(英文)：Neuropathy target esterase (NTE) is a type of lysophospholipase whose amino acid sequence is well conserved across species, and mutations in its gene, PNPLA6, are found in the human motor function diseases. In addition, NTE covalently binds to organophosphorus and causes a variety of neurological symptoms with chemical changes of the complex. As a clue to the pathogenesis of these diseases, we generated six strains of mice with partial mutations in the vicinity of the active center of the NTE and conducted phenotypic analysis focusing on brain function in some of the strains. In our strains we examined, no homozygous mutant mice were born, suggesting that, as in the case of the large deletion knockout mice, a reduced normal NTE activity or a partially mutated NTE itself caused the early developmental abnormalities that resulted in embryonic lethality. Behavioral analysis of some lines of heterozygous partial NTE mutant mice showed reduced function in Rotarod and Open field tests.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経障害エステラーゼ Transgenic Mice Gene Knockout Mice Brain Function Behavior Organophosphate lipid metabolism PNPLA6

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

Neuropathy Target Esterase(NTE:神経障害標的エステラーゼ))は lysophospholipase の一種であり、膜の脂質合成に関与するとされる。進化的によく保存された NTE に有機リンが結合すると遅延性の神経変性(OPIDN : Organophosphate Induced Delayed Neuroathy)が引き起こされる。シックハウス症候群(SHS:Sick House Syndrome)は OPIDN がそのモデルと考えられているが、我々は患者単核球において NTE 活性が高いことを報告しており(引用文献 )、ヒト NTE の高発現マウスも作成していた。

一方、2014 年以降 Gordon Holmes 症候群など運動失調を示す複数の遺伝性希少疾患に NTE のアミノ酸置換を伴う点変異が次々と報告され *PNPLA6* 遺伝子変異症候群とも呼ばれるようになってきたが(引用文献 )、Winrow らは *pnpla6* 遺伝子欠損マウスを作成し、ホモ型は胎生致死、ヘテロ型は多動性を示すことを報告し(引用文献 )、Akassoglou らは脳特異的プロモーター下に *pnpla6* 遺伝子を欠損するマウスを作成し、海馬での空胞変性や協調運動低下を報告していた(引用文献 )。本研究計画提案時、申請者らは患者変異に対応する NTE の機能ドメインの変異マウスを 6 種を CRISPR-Cas9 法により作製したところであった。

### 2. 研究の目的

本研究はヒト *PNPLA6* 遺伝子高発現マウスと、患者変異に対応する NTE の機能ドメインの変異マウス 6 種をまずは系統として樹立し、その発現と生物学的影響、特に神経系での機能を解析することにより、NTE の機能、特に主として小脳における機能的解明を行い、NTE の生物学的機能ドメインの解明に資することを目的とした。また、できればこのマウスを用いて上記疾患発症機構の解明と治療法の開発を目指し、遺伝子操作マウスと有機リン投与マウスにおける症状発症メカニズム追求を本研究の目的としたいと考えた。

### 3. 研究の方法

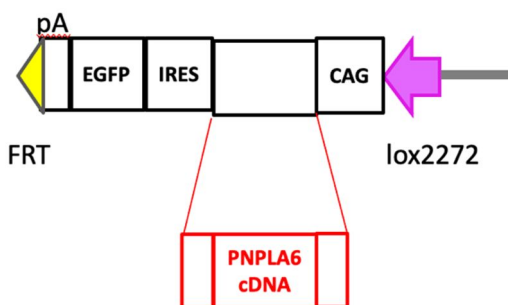
本研究で用いた遺伝子操作マウスにおける *PNPLA6* 導入遺伝子カセットの構造(右上図)と、マウス *pnpla6* 遺伝子上の変異の位置(右下図)を示す。

まず、*PNPLA6* 導入遺伝子カセットは高発現汎用性 CAG プロモーターの支配下に、ヒト *PNPLA6*cDNA を接続し、さらに発現を容易にモニターするために EGFP を IRES によって下流に接続している。当初の発現 ON-OFF のトリックのために CRE によって認識される lox2272 配列と FLPe によって認識される FRT 配列が上下に残っている(右上図)。

一方、マウス *pnpla6* 遺伝子部分欠損変異体は、ヒト疾患で重要とされる Val1100 の部分を狙って同じ変異ヌクレオチドとともに CRISPR-Cas9 システムを用いて作成したマウス個体群であり、これまでに右図の 6 系統を得ている。このうち 12P19

と 12P20 は同じ場所に変異があったので、12P19 を代表とした。なお、変異個体のスクリーニングは PCR 産物を HhaI で切断する(認識配列 CGCG)ことにより行い、必要に応じて塩基配列決定を行なった。いずれも全体で 1345aa.のところ 14P17, 14P18 以外は、1080-1134aa.程度で停止コドンが生じる。

組織学的解析、Western Blot 解析、酵素活性測定、細胞への DNA 形質転換、細胞培養、細胞株の樹立、受精卵及び精子凍結等は定法に従って行なった。質量分析には島津製作所の LC-MS システ



Sample	Change	Sequence
CTTCAATGTG ACCACAFACA TCACTGCCTC TGCCATGCGC GTCCACAAAG ATGGTGGGTG CCATCCTGCC AAGCCCTGCT ACAACCTTGT		
<b>CATCAT</b>		
A 14-P14	+ 6bp	CTTCAATGTG ACCACAFACA TCACTGCCTC TGCCATGCGC  -  GTCCACAAAG ATGGTGGGTG
A 14-P17	trns 1bp	CTTCAATGTG ACCACAFACA TCACTGCCTC TGCCATG <b>CCC</b> GTCCACAAAG ATGGTGGGTG
A 14-P18	trns 4bp	CTTCAATGTG ACCACAFACA TCACTGCCTC TGCCATG <b>CAG</b> GGCCACAAAG ATGGTGGGTG
A 14-P24	trns 4bp	CTTCAATGTG ACCACAFACA TCACTGCCTC TGCCATGCGC CCACAAAG ATGGTGGGTG
A 14-P11	trns -10bp	CTTCAATGTG ACCACAFACA TCACTGCCTC TGCCATG -----10bp----- AAAG ATGGTGGGTG
A 12-P20, P19	trns +1bp	CTTCAATGTG ACCACAFACA TCACTGCCTC TGCCATGCG <b>C</b> GTCCACAAAG ATGGTGGGTG
+		
No Mutation: P4, P5,		

ムを利用した。また Open field は 600mm x 600mm のエリアを 15 分間自由行動、その動画を DuoMouse により解析、Rotarod は 16rpm, 300min での落下までの時間を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子操作マウスの系統樹立と維持

ヒト *PNPLA6* cDNA 遺伝子導入マウスについては遺伝子発現を確認し、その後1系統 (hNTE365) をヘミ接合体として維持し、精子ストックを保管している。またマウス *pnpla6* 遺伝子部分変異マウスについても F1 及び F2 以後の段階でヘテロ接合体由来の精子を各系統 10 ストロー分凍結保存した。また本研究では hNTE365 及びマウス *pnpla6* 遺伝子部分変異マウス3系統 (12P19, 14P17, 14P24) について、過排卵雌マウスの未受精卵を用いて体外受精を行い、偽妊娠マウスに受精卵を移植後、各系統 50 匹以上の復元を行い、ヘテロ型マウスを得た。理論的には半数がヘテロもしくはヘミ型となるはずであったが、hNTE365 のオスの場合、20 匹のオスマウス中2匹しかヘミ接合体が得られなかった。これは精子に体外受精時を含めて受精卵の発生にヒト *PNPLA6* 遺伝子の存在が影響を与えているものと思われる。なお hNTE3 は F0 で BDF1 を使用しているため、以後は B6N へのバッククロスを行っている。

##### (2) ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウス

元々マウス生体では体内のすべての組織で発現が見られるが、当該マウス系統 hNTE365 においても活性が調べた6組織でも加齢とともに上昇していた。特に心臓では 300 倍に活性が上昇している個体もあった。F0 や F1 レベルでは脳などでの下流 EGFP 発現がモザイクで、かつ発現が以上に高い個体も散見された。継代中にも数%の個体が成育不良、中には死亡する個体も散見された。継代過程で発現が epigenetic な影響などにより、それほど高くない系統に変化している可能性もあると考える。

脂質の質量分析において特定の脂肪酸などの組成が変化していることは認められなかった。

##### (3) *pnpla6* 遺伝子部分変異マウス

いくつかの系統でホモ型の胎生致死が認められた。ヘテロ型同士の交配ではホモ型個体は得られず、これは引用文献3の遺伝子欠失個体と同じく、ほんの一部の部分変異によっても胎子の発生に影響が出るものと考えられる。このホモ胎子で本来より短いポリペプチドが産生されているのかどうかを調べることは極めて興味深い。胎生致死になる時期はかなり初期であることが判明し (egg cylinder 期直後ぐらい?) 十分な材料が得られていない。また胎生致死は胎盤の血管形成不全によるものであることが知られており、その辺も今後追求してみたい。

ヘテロ型で Open field や Rotarod で野生型に比べ行動変化があったことが今回の研究計画の着想となったが、ヘテロ型およびヘミ型 (12P19, 14P17, 14P18, hNTE365) での脳組織学的を行った。パラフィン切片の Coronal section で観察したところ、プルキンエ細胞数の低下様画面が観察されたが、細胞数を検討する試みはうまくいかなかった。また(1)で復元したマウス系統を用いて、さらに例数を増やすべく Open field や Rotarod 解析を行ったが、生後2ヶ月ぐらいまではあまり差が出なかった。これは引用文献4でも aging との関係で議論されており、現在6ヶ月齢での比較を行っている。

脳の機能としては協調運動に現在のところ関心があるが、引用文献4では大脳海馬でも影響が出ている。非常にキュ近江深い。なお、脂質代謝酵素であることから脳脂質組成の変化も質量分析で調べてみたが、さしたる変化はなかった。代償性に多くの酵素が機能するものかもしれない。

##### (4) 細胞レベルの研究成果

マウス個体レベルでは後述のように DDVP などの有機リンに対する生体反応の解析は難しいことから、今後の細胞レベルでの解析を考慮して、ヘテロ型マウス *pnpla6* 部分変異胎子由来線維芽細胞の取得に挑戦した。その結果、12P19, 14P17, 14P18, 14P24 由来の初代内容細胞の取得に成功した。一部は発現解析に使用したが、今後は株化にも使用できると期待している。

また HEK293 細胞に hNTE365 で使用したベクターと同様のヒト cDNA を導入し、高発現で NTE 活性が 10 倍から 20 倍に上昇する株を得たが、DDVP に対する耐性は獲得されず、10uM/mL 程度で増殖阻害が起こる一方、50uM/mL 程度でも1日後には活性を回復することが判明した。遺伝子発現が回復したものと考えられる。

##### (5) NTE 分子レベルでの解析

Tag 付きのベクターを用いて NTE 酵素活性の高い細胞株を得て、有機リン (DDVP を用いた) を結合したトリプシン分解ペプチドの検出を試みた。前段階としての Mascot 解析では全体のトップで NTE が、また NTE 全体の 11% のペプチドを検出し、活性中心を含むペプチドも存在した。また粗抽出液に有機リンを作用させ、Malation に対する結合を Phos-tag ゲルで認めた。

当初は3年間にオートファジーのシステムへの影響や DDVP 投与による影響を検討したいと考えていたが、前者ではオートファジー関連マウスの入手に時間がかかり、また後者では通常マウスの場合でも DDVP の腹腔内投与により胎子に影響が出ることは判明したが、成体マウスでの投与量の調節が微妙であり (少しの投与量の差で投与直後 30 分以内の死亡個体が多数発生)、実験系を断念した。ニワトリでは酵素活性量が高く、有機リンへの感受性も高いことから、今後、他の動物種を含めた解析が有効かもしれない。

最近では *PNPLA6* 体細胞変異とがんの関係性を報告する学会発表も散見されることから、遺伝性疾患のみならずがんを含めた多くのヒト疾患にこの遺伝子が関与することが推察され、有機リン中毒に端を発するこの遺伝子の機能は多くの分野で解析される必要があろう。

なお、本報告の主な発表論文にはマウスを用いた他の論文も含めているが、一つにはシックハウス症候群の患者では視覚の追従運動が滑らかでないことや重心が不安定であることが報告されていることから視覚と動揺病(乗り物酔い)との関係との関連を含めておいた。また二つ目にはシックハウス症候群では原因候補物質(フタル酸エステルもその一つ)の経皮吸収にも注目していたことから、分担研究者の畑中とヒトNTE高発現マウスの皮膚の代謝型がヒト型に変換していることを見出し、さらに接触を防ぐためのナノシート開発も行っているため、紫外線防御型組織親和性のシートに関する研究も挙げておいた。また三つ目には、低線量放射線被曝と突然変異の関係を調べた成果を挙げておいたが、放射線によるPNPLA6遺伝子発現、NTE活性変化に及ぼす影響も今後は研究対象になると予測し、あえて挙げておいた。

本研究には旧東海大学伊勢原研究推進部生命科学統合支援センターの技術職員の方々に大変お世話になり、ここに感謝を申し上げたい。またここで得られた遺伝子操作マウスの精子、受精卵などの研究資源は(公財)実験動物中央研究所及び理化学研究所に寄託する予定である。今後の研究に利用されることを期待してやまない。

#### < 引用文献 >

Matsuzaka, Y., Ohkubo, T., Yukie Y. Kikuti, Mizutani A., Tsuda, M., Aoyama, Y., Kakuta, K., Oka, A., Inoko, H., Sakabe, K., Ishikawa, S., Kulski, JK. and Kimura, M. : Association of sick building syndrome with neuropathy target esterase (NTE) activity in Japanese. *Environmental Toxicology Jun*;65(6):405-415 (2013) 2013 Feb 18. doi: 10.1002/tox.21839.

Matthis Synofzik, MD, Robert B Hufnagel, MD, PhD, and Stephan Züchner, MD, PhD. : PNPLA6 Disorders. In NIH Gene Reviews Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. Seattle (WA): [University of Washington, Seattle](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/books/40146/); 1993-2024.

Winrow, C.J., Hemming, M.L., Allen, D.M., Quistad, G.B., Casida, J.E. and Barlow, C.: Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperreactivity. *Nature Genetics* 33 (4), 477-485 (2003)

Akassoglou, K., Malester B., Xu, J., Tessarillo, L., Rosenbluth, J. and Chao, M.V.: Brain-specific deletion of neuropathy target esterase / *swisscheese* results in neurodegeneration. *PNAS* 101(14) 5075-5080 (2004)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 加藤明、中谷七海、志村史子、木村穰	4. 巻 32
2. 論文標題 マウスを用いた動揺病を引き起こす前庭 視覚環境条件の探索とその予防へのアプローチ	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 臨床環境医学	6. 最初と最後の頁 77-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 加賀谷徹、本杉奈美、水谷晃子、坂部貢、加藤明、田中正史、木村穰	4. 巻 32
2. 論文標題 ヒト神経障害エステラーゼ遺伝子導入細胞の樹立と有機リンの影響について	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 臨床環境医学	6. 最初と最後の頁 18-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hatanaka Tomomi, Ramphai Khampeeraphan, Takimoto Shun, Kanda Hiromi, Motosugi Nami, Kimura Minoru, Mabuchi Tomotaka, Oyama Midori, Takeuchi Tomoharu, Okamura Yosuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Potential UV-Protective Effect of Freestanding Biodegradable Nanosheet-Based Sunscreen Preparations in XPA-Deficient Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 431 ~ 431
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics14020431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 木村穰、赤塚尚子、水谷晃子、畑中朋美、伊藤誠敏、坂部 貢、加藤明
2. 発表標題 神経障害エステラーゼ遺伝子操作マウスの解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Gondo, Y and Kimura, M.
2. 発表標題 Simple and Effective Gamma-Ray Exposure System for Low-Dose-Rate Long Exposure to Mice.
3. 学会等名 Biological Effects and Application of Radiation
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 加藤明、木村穰
2. 発表標題 動揺病を引き起こす前庭 視覚環境変化とその予防へのアプローチ
3. 学会等名 第31回日本臨床環境医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Katoh, A., Nakaya, N., Shimura, F and Kimura, M
2. 発表標題 前庭 視覚組み合わせ刺激が引き起こす動揺病症状と先行刺激による動揺病抑制
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤明、木村穰
2. 発表標題 前庭 視覚組み合わせ刺激がマウスに食欲不振を引き起こす
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 木村穰、赤塚尚子、伊藤誠敏、坂部貢、畑中朋美、加藤 明
2. 発表標題 神経障害エステラーゼ遺伝子変異マウスの解析
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村穰、赤塚尚子、坂部貢、畑中朋美、加藤 明
2. 発表標題 遺伝子操作マウスを用いた神経障害エステラーゼの遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村穰、加藤明、赤塚尚子、伊藤正敏、坂部貢
2. 発表標題 神経障害エステラーゼのマウス脳における機能
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畑中朋美、大山翠、武内智春、馬淵智生、木村穰
2. 発表標題 フタル酸エステルの経皮吸収におけるエステラーゼの機能解析
3. 学会等名 第29回日本臨床環境医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加賀谷徹、本杉奈美、坂部貢、木村稯
2. 発表標題 神経障害エステラーゼ活性および細胞増殖に対する有機リンの影響について
3. 学会等名 第29回日本臨床環境医学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	畑中 朋美 (Hatanaka Tomomi)  (10198749)	城西大学・薬学部・教授  (32403)	
研究分担者	赤塚 尚子 (Akatsuka Hisako)  (20826317)	東海大学・医学部・特定研究員  (32644)	
研究分担者	坂部 貢 (Sakabe Kou)  (70162302)	千葉大学・予防医学センター・特任教授  (12501)	
研究分担者	加藤 明 (Katou Akira)  (70546746)	東海大学・医学部・准教授  (32644)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------