

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651064

研究課題名(和文) シックハウス症候群感受性候補遺伝子の機能解明と疾患モデル動物開発

研究課題名(英文) Analysis for the function of the candidate gene of Sick House Syndrome and development of disease model mouse

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：有機リン等の被曝が主原因とされるシックハウス症候群の患者単球において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。有機リンが結合したNTEが化学変化を起こすと遅延性のOPIDN(organophosphate-induced delayed neuropathy)を引き起こすとも言われ、有機リン関連疾患の発症機構解析と疾患モデル開発のために、NTEをコードする遺伝子PNPLA6を導入したマウスを作製し、その性状を明らかにすると共に、NTE遺伝子導入細胞での有機リン感受性を検討した。複合体検出系も開発中である。

研究成果の概要(英文)：Sick building syndrome (SBS) is a set of several clinically recognizable symptoms reported by occupants of a building without a clear cause. Neuropathy target esterase (NTE) is a membrane bound serine esterase and its reaction with organophosphates (OPs) can lead to OP-induced delayed neuropathy (OPIDN) and nerve axon degeneration. We found that the enzymatic activity of NTE was significantly higher ( $P < 0.0005$ ) in SBS patients compared with controls. Thus, we constructed the transgenic(TG) mice with PNPLA6 gene encoding human NTE. Eight lines were established and each mouse from 8 lines showed higher activity for NTE than that in non transgenic mouse. The activity level was different in each tissue and the activity became higher in the old TG mice than that in the young TG mice. To elucidate the effect of OP for these mice, the experiments are now on going and the preliminary data showed harmful effects of OP for transgenic embryos. In addition, we try to detect the NTE-OP complex.

研究分野：分子遺伝学・分子生物学

キーワード：シックハウス症候群 疾患感受性遺伝子 疾患モデルマウス 遺伝子操作マウス PNPLA6 有機リン 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは有機リン等の被曝が主原因とされるシックハウス症候群の患者単球において 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。一方、NTE に有機リンが結合し、NTE との複合体が形成された後に、そのアルキル基が離脱すると遅延性の OPIDN (organophosphate-induced delayed neuropathy)を引き起こすとも言われていたが、まだその詳細は明らかでなかった。

また、通常自殺企図で農薬が摂取された場合には、含有する有機リンにはまず、アセチルコリンエステラーゼが反応すると言われていたが、我々の鶏卵を用いた実験ではNTEもその活性を低下させることがわかっていた。しかもニワトリ胎児の頭頂部に出血が検出されていた。このように急性期と思われる反応でも、まだまだ疑問が多く存在した。

そこで、我々の得意とする遺伝子導入技術で NTE 高発現マウスを作成し、NTE と有機リンとの関わりを検定出来る系を開発することを中心に研究を進めることとした。

## 2. 研究目的

本研究では、有機リン関連疾患の発症機構解析と疾患モデル開発のために、NTE をコードする遺伝子 *PNPLA6* を導入したマウスを作製し、その性状を明らかにすると共に、NTE 遺伝子導入細胞での有機リン感受性を検討することを具体的な目的とし、NTE-有機リン複合体を検出する系の開発も同時に狙った。

本研究では、シックハウス症候群や OPIDN の発症メカニズムを遺伝子操作マウスや細胞レベルの実験を駆使して探求することを目的とした、といえる。NTE 高発現マウスと、最近確立した新しい遺伝子変異導入技術をマウス *pnpla6* 遺伝子に応用することにより変異個体を得て、*pnpla6* 遺伝子の個体レベルでの機能を、神経系を中心に明らかにするが、農薬等に良く使用されるジクロロボス(DDVP)をこれらのマウスに投与し、中樞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が本研究の将来的な最終目的

である。

## 3. 研究の方法 (倫理面への配慮を含む)

ヒト *PNPLA6* 遺伝子導入マウス作製とそれを用いた実験は東海大学遺伝子組換え実験安全委員会の審議の結果、大学より承認されている。我々独自の方法で、*ROSA26* 部位に CAG プロモーター下にヒト *PNPLA6* 遺伝子 cDNA および同時に *EGFP* 遺伝子を導入したマウスを作製・使用した(図1)。Founder との交配は Cre マウスとの交配により発現を誘導し、F1 で初めて発現マウスが得られるようにした。

### ROSA26

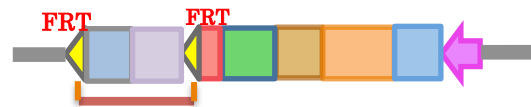


図1。Rosa26 座位に挿入された導入遺伝子。(右から CAG promoter(青), *PNPLA6* cDNA(橙), IRES sequence(茶), *EGFP*(緑), FLPe マウスとの交配によって FRT sequence で挟まれた発現抑制領域を除いた)

F1以降の系統化は C57BL/6 との交配によった。また、同様の遺伝子をヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞を用いて導入し、有機リン DDVP (ジクロロボス)に対する活性の低下や増殖抑制を検討した。さらに、DDVP を上記マウスに腹腔内投与する実験を行った。複合体検出では NTE の一過性高発現細胞を用い、DDVP 複合体を質量分析器(Shimadzu LC-MS)で同定を試みた。

## 4. 研究成果

まず、当初得られた8匹(メス4匹、オス4匹)の Founder Mouse は交配により、系統を維持することができた。一部は精子保存等で系統保存に成功している。現在の系統は Founder Mouse で抑制していた遺伝子発現を FLPe マウスとの交配により惹起する系としたが、得られた系統内では、調べる限り、発現抑制細胞と発現細胞が混在するモザイク状態があるようで、全身発現性の CAG プロモーターを用いているせいいか、

成長遅延の個体も見られた。

NTE 活性を主要臓器で測定したところ、遺伝子を導入していない通常のマウスでは調べた5つの臓器で全て発現があり、中でも腎臓での活性が高く、また遺伝子導入個体ではいずれも通常のマウスに比べすくなくとも数倍の活性上昇があった。特に心臓では 300 倍に近い活性上昇が認められている(図2)。

系統化された遺伝子導入個体に関して、有機リンの一種で殺虫剤等にも使用されているジクロロボス(DDVP)を投与し、その変化を観察したが、成体では今のところ特に変化はない。ただし、症例は少ないが、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。

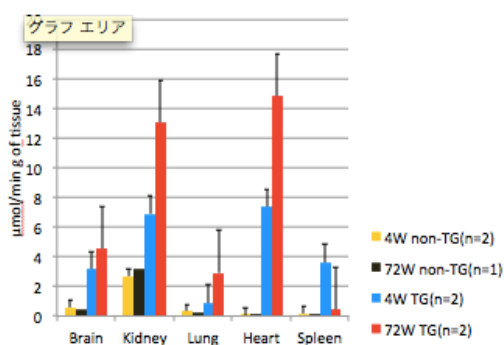


図2. 遺伝子導入マウスの各臓器におけるNTE活性。

一方、ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞に同様の遺伝子を一過性に導入した場合、NTE 活性は数倍から 20 倍程度に上昇し、DDVP 投与によって一日後には一時的に低下しているものの(100  $\mu$  M 程度まで)、さらに一日後には元通りに回復する傾向が観察された。また、安定形質転換細胞では特に細胞増殖の様子は変わらないが、DDVP 添加によって NTE 高発現細胞に増殖の低下が観察された。

CRISPR (Clustered regulatory Interspaced short parindromic repeat) という新しい技術は、遺伝子の特定の配列を利用して、任意の動植物種や細胞に変異を導入することができると思われる画期的な方法で、2013 年以後爆発的な進展を見せている。我々も今年度は他のマウス遺伝子系で条件を検討し、90%以上の個体に変異を入れ、かつ6個体は両方の allele に変異をいれることに成功した。おおよその条件検討がすんだのでマウス *pnpla6* 遺伝子の改変を計画

中である。

上記一過性の NTE 高発現細胞では、一次元の PAGE で CBB 染色によるバンドが確認出来るまで発現が増強している。このバンドが NTE であることを質量分析系で確認した。現在は、DDVP との複合体の検出を試みている。機器の性能やペプチド断片の化学的性質から現在苦戦中ではあるが、いくつかのアプローチを検討中である。

以下、考察と展望を述べる。

我々が開発した独自の方法で、発現の約束された染色体上の位置に遺伝子を導入し、全身で NTE の高発現を示すトランスジェニックマウスの系統化に成功したが、NTE の全身性の高発現は個体維持にとって不味らしい。これは今後神経系特異的な NTE 発現マウスを開発する事でより詳細な神経系への影響が解明出来ると考える。

すでに我々が行っている、シックハウス症候群患者ヒト単核球での NTE 活性の上昇や NTE 高発現ヒト細胞レベルでの DDVP 感受性上昇は、ヒト個体での NTE 発現と有機リン感受性の関係を考える上で重要な知見と考える。現在、DDVP-NTE 複合体の質量分析器での検出にチャレンジしているが、海外では、別のエステラーゼと DDVP のヒト血液での検出に成功しており、診断等の面での開発にも役立てていきたい。

最近、NTE をコードする *PNPLA6* 遺伝子の変異が ataxia 等の運動神経系の疾患に関与する事が続々報告されているので、その関係からも CRISPR 技術でマウスの相同遺伝子に変異を入れることを計画している。

NTE 高発現マウスの系統化に成功したが、図2に示すように発現の程度は臓器や週齢によって異なることが分かった。有機リン投与による脳内 NTE 活性の変化を追跡中である。また、高発現 HEK293 細胞は有機リン DDVP に対する感受性が高いことが判明した。現在、ヒトで報告される *PNPLA6* 遺伝子変異に相当するマウスを CRISPR 法で作製する準備が完成し、一方で DDVP-NTE 複合体解析を進行中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件) すべて査読あり。

1. 加賀谷徹、割田貴之、三浦浩美、大塚正人、

大久保朋一、坂部貢、木村穰: Neuropathy Target Esterase (神経障害標的エステラーゼ)遺伝子導入マウスの作製 臨床環境医学 23 巻 1 号 34-40 (2014)

2. Tsuchiya, K., Saidin, MYB., Inoue, T., Kajiwara, K and Kimura, M. Qualitative measurement of pain by analyzing the salivary alpha amylase. Precision Engineering. 38 257-260 (2014)

3. Tsuchiya, K., Iimori, S., Kajiwara, K. and Kimura, M. Interaction between carbon nanotubes and human cell. Precision Engineering. 38, 116-120 (2013)

4. Mitsunaga, S., Shimizu, S., Okudaira, Y., Oka, A., Tanaka, M., Kimura, M., Kulski, J.K. Inoue, I. and Inoko H.: Improved loop-mediated isothermal amplification for HLA-DRB1 genotyping using RecA and a restriction enzyme for enhanced amplification specificity Immunogenetics 65(6):405-15 (2013)

5. Mizutani, R., Taguchi, K., Ohtsuka, M., Kimura, M., Takeuchi, A., Uesugi, K. and Suzuki, Y.: X-ray microtomographic visualization of *Escherichia coli* by metalloprotein overexpression Journal of Synchrotron Radiation 20, 581-586 (2013)

6. 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. 65(6) 405-415 (2013)

7. Ohtsuka, M., Miura, H., Hayashi, H., Nakaoka, H., Kimura, M., Sato, M. and Gurumurthy, CB: Improvement of pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) by

iCre mRNA-mediated site-specific recombination. Transgenic Research 22(4):873-5. (2013)

8. Ohtsuka, M., Miura H., Gurunurthy, C.B., Kimura, M., Inoko H., Yoshimura, S. and Sato, M.: Fluorescent transgenic mice suitable for multi-color aggregation chimera studies. Cell Tissue Res. 350(2):251-60. (2012)

9. Ohtsuka, M., Miura, H., Sato, M., Kimura, M., Inoko H., Gurumurthy, CB: PITT: Pronuclear Injection-Based Targeted Transgenesis, a Reliable Transgene Expression Method in Mice Exp Anim. 61(5):4 89-502. (2012)

#### [学会発表] (計 20 件)

1. 渡部聡、桜井敬之、中村伸吾、梶原景正、木村穰、佐藤正宏: EndoGalCとtargeted toxinの組み合わせを用いたCRISPR系でノックアウトされた遺伝子改変細胞濃縮法の開発第 37 回日本分子生物学会年会 2014. 11. 27 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

2. 山村勇貴、本杉奈美、三浦浩美、大塚正人、大久保朋一、吉野美千代、笹川昇、坂部貢、木村穰: NTE (神経障害標的エステラーゼ) 遺伝子発現マウスと有機リン代謝 第 37 回日本分子生物学会年会 2014. 11. 27 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

3. 木村穰、加賀谷徹、本杉奈美、割田貴之、三浦浩美、大塚正人、大久保朋一、坂部貢: Neuropathy Target Esterase (神経障害標的エステラーゼ) 遺伝子導入マウスの特徴 第 23 回日本臨床環境医学会学術集会 2014年6月 6日 京都大学 (京都府・京都市)

4. 本杉奈美、加賀谷徹、田中正史、大久保朋一、坂部貢、木村穰: 有機リンの培養細胞に及ぼす影響について第 23 回日本臨床環境医学会学術集会 2014年6月 6日 京都大学 (京都府・京都市)

5. Ohtsuka, M., Miura, H., Kimura, M., Isotani, A., Ikawa, M., Sato, M and Gurumurthy, C. : Concorrent production of multiple targeted transgenic mouse lines with C57BL/6N genetic background by improved PITT. 12<sup>th</sup> Transgenic Technology Meeting(TT2014) Oct.15 2014 Madrid, Spain

6. Miura, H., M Kimura, M., Sato, M and Ohtsuka, M., : Presence/absence of a marker gene in artificial microRNA expression constructs affects knockdown efficiencies in a targeted transgenic system. 12<sup>th</sup> Transgenic Technology Meeting(TT2014) Oct.15 2014 Madris, Spain

7. 梶原景正, 渡部聡, 木村穰 : マウスDgcr2遺伝子は軟骨細胞の増殖分化制御により骨格形成に影響を与える。第37回日本分子生物学会年会 2014年11月26日パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

8. 渡部聡, 桜井敬之, 中村伸吾, 梶原景正, 木村穰, 佐藤正宏 : EndoGalCとtargeted toxinの組み合わせを用いたCRISPR系でノックアウトされた遺伝子改変細胞濃縮法の開発 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月26日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

9. 大塚正人, 三浦浩美, 磯谷綾子, 伊川正人, 佐藤正宏, 木村穰 : C57BL/6N を遺伝子背景に持つターゲットトランスジェネシス用種マウスの作製と評価 第61回日本実験動物学会総会 2014年5月28日 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

10. 割田貴之, 本杉奈美, 田中正史, 大久保朋一, 坂部貢, 木村穰 : 有機リンの培養細胞に及ぼす効果について(1) 第22回日本臨床環境医学会学術集会 2013年06月08日~2013年06月09日 日本歯科大学東京短期大学(東京都・23区内)

11. 加賀谷徹, 割田貴之, 三浦浩美, 大塚正人, 大久保朋一, 坂部貢, 木村穰 : Neuropathy target esterase(神経障害標的エステラーゼ)遺伝子導入マウスの作成第22回日本臨床環境医学会学術集会 2013年06月08日~2013年06月09日 日本歯科大学東京短期大学(東京都・23区内)

12. 梶原景正, 麥倉信一郎, 渡部聡, 木村穰 : 22q11.2欠失症候群で欠失するヒトDGCR2遺伝子のマウスホモログDgcr2のTGF- $\beta$ シグナルへの影響 第86回日本生化学会大会 2013年9月15日 京都国際会議場(京都府・京都市)

13. 加賀谷徹, 大塚正人, 三浦浩美, 大久保朋一, 田中正史, 割田貴之, 本杉奈美, 坂部貢, 梶原景正, 加藤明, 吉川枝里, 木村穰 : pnpla6遺伝子と有機リン感受性トランスジェニックマウス作製と遺伝子導入細胞の性質 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月5日 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

14. 本杉奈美, 亀山洋子, 木村穰 : 雄性不妊を呈するヒト疾患モデルマウスでの造精機能回復の試み 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月5日 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

15. 梶原景正, 渡部聡, 麥倉信一郎, 木村穰 : 22q11.2欠失症候群で欠失するヒトDGCR2遺伝子のTGF- $\beta$ /BMPシグナルとの相互作用 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月7日 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

16. 梶原景正, 麥倉信一郎, 渡部聡, 木村穰 : 22q11.2欠失症候群で欠失するヒトDGCR2遺伝子のマウスホモログDgcr2の軟骨細胞分化への影響 第35回日本分子生物学会 2013年12月7日 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

17. 麥倉信一郎, 渡部聡, 梶原景正, 木村穰 : マウス繊維芽細胞においてSez12はTGF $\beta$ /BMPシグナルに関与している 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月7日 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

18。大塚正人、三浦浩美、木村穰、猪子英俊：  
Recombinase 及び Integrase による部位特異的遺  
伝子導入効率の比較検討 第59回日本実験動物  
学会総会2012年5月28日 つくば国際会議場(茨  
城県・つくば市)

19。大塚正人、三浦浩美、佐藤正宏、木村穰：受  
精卵へのiCre mRNA注入によるターゲットトランス  
ジェネシス法(PITT法)の効率改善 第59回日本実験  
動物学会総会2012年5月26日 別府国際会議場(大  
分県・別府市)

20。麥倉信一郎、渡邊聡、梶原景正、木村穰：新  
型レクチンをコードするSez12遺伝子はT細胞増殖  
シグナルを調節する 第35回日本分子生物学会  
2012年12月5日 福岡ドームほか(福岡県・福岡市)

[図書] (計1件)

木村穰 シックハウス症候群の概念-病態-シ  
ックハウス症候群 「シックハウス症候群マニ  
ュアル-日常診療のガイドブック」 pp. 7-10  
東海大学出版会 (2013)

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：10145706

(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, Koh)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：70162302

大塚 正人(OHTSUKA, Masato)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：90372945