(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年4月27日(27.04.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/068212 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/038495

(22) 国際出願日： 2022年10月11日(11.10.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-173338 2021年10月22日(22.10.2021) JP

(71) 出願人: 公益財団法人東京都医学総合研究所 (**TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCE**) [JP/JP]; 〒1568506 東京都世田谷区上北沢二丁目１番６号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 村 上 誠 (**MURAKAMI Makoto**); 〒1568506 東京都世田谷区上北沢二丁目１番６号 公益財団法人東京都医学総合研究所内 Tokyo (JP). 平林 哲也 (**HIRABAYASHI Tetsuya**); 〒1568506 東京都世田谷区上北沢二丁目１番６号 公益財団法人東京都医学総合研究所内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小林 浩，外 (**KOBAYASHI Hiroshi** et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目８番７号 福岡ビル９階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

(54) **Title:** NEURODEGENERATIVE AND AMYOTROPHIC MODEL ANIMAL

(54) 発明の名称： 神経変性及び筋萎縮モデル動物

(57) **Abstract:** Provided are: a neurodegenerative model animal also exhibiting amyotrophy, the neurodegenerative model animal comprising a nonhuman animal from which both the PNPLA6 gene and the PNPLA7 gene have been deleted; and a method for screening a drug for neurodegenerative disease or a drug for a disease that causes amyotrophy, the screening method involving causing contact of a substance to be examined with said animal or with a biological sample collected from the animal, and using, as an index, an improvement effect with regards to neurodegeneration or amyotrophy of the nonhuman animal or biological sample after contact with the substance to be examined.

(57) 要約：ＰＮＰＬＡ６遺伝子及びＰＮＰＬＡ７遺伝子がともに欠損した非ヒト動物からなる、筋萎縮を伴う神経変性モデル動物、並びに、前記動物、又は当該動物から採取された生体試料に被検物質を接触させ、当該被検物質接触後の前記非ヒト動物又は生体試料における神経変性又は筋萎縮に対する改善効果を指標として、神経変性疾患用医薬又は筋萎縮を引き起こす疾患に対する医薬をスクリーニングする方法。

WO 2023/068212 A1

明 細 書

[発明の名称]

神経変性及び筋萎縮モデル動物

[技術分野]

[０００１]

本発明は、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子がともに欠損した筋萎縮を伴う神経変性モデル動物、並びに当該動物を用いた神経変性疾患に対する医薬等のスクリーニング方法に関する。

[背景技術]

[０００２]

PNPLA(Patatin-like phospholipase domain containing)ファミリーは、patatin ドメインを触媒領域として共通に持つ一連の脂質代謝酵素であり(図 1)、ヒトには 9 つの分子種が存在する。これらの酵素は中性脂質やリン脂質を基質とし、これらをコードする遺伝子の変異や一塩基多型が原因の先天性代謝疾患が数多く知られている。例えば、PNPLA1 はアシルセラミド合成異常による先天性魚鱗癬、PNPLA2/ATGL (adipose triglyceride lipase)は中性脂質蓄積症、PNPLA3 は脂肪肝の原因となる(非特許文献１)。

[０００３]

PNPLA6～9 は、いずれもリン脂質を基質とするホスホリパーゼ A_2 活性やリゾホスホリパーゼ活性を有する酵素の一群である（図 1）。PNPLA6 は神経系や腎臓を含めて多くの組織に発現し、N 末端の膜貫通領域を介して小胞体膜に局在する。有機リン系殺虫成分によって生じる誘発性遅発性神経障害の標的遺伝子として同定された経緯があり、neuropathy target esterase (NTE)と呼ばれることも多い。ヒトの PNPLA6 遺伝子の変異は、小脳性運動失調、痙縮、ニューロパチー、性腺機能低下、網膜色素変性症、網膜脈絡膜萎縮などを含む幅広い臨床スペクトラムを呈する遺伝性疾患の原因となり、これまでに Boucher-Neuhauser 症候群、Laurence-Moon 症候群、Oliver-McFarlane 症候群、遺伝性痙性対麻痺 (spastic paraplegia) の SPG39 などとの関連が明らかとなっている(非特許文献２，３)。PNPLA8/iPLA$_2\gamma$ 変異が関わるヒト疾患としては、乳酸アシドーシスを伴うミトコンドリアミオパチー(mitochondrial myopathy with lactic acidosis:MMLA) が知られている。PNPLA9/PLA2G6/iPLA$_2\beta$ の変異に

よって生じる神経変性疾患はPLA2G6-associated neurodegeneration (PLAN) とも呼ばれ、乳児型神経軸索ジストロフィー（INAD: Infantile neuroaxonal dystrophy）、脳内鉄蓄積を伴う神経変性 (NBIA: neurodegeneration with brain iron accumulation) 2型、パーキンソニズム・ジストニア症候群 PARK14 などが含まれる(非特許文献４)。

[０００４]

PNPLA ファミリーは植物や酵母などにも広く存在することから、生命活動に不可欠な脂質代謝に関わる酵素群であると想定される。これらの分子種のうち、PNPLA6 と PNPLA7 は互いにアミノ酸配列相同性が高い一次構造を持ち(図 1)、in vitro でリゾホスホリパーゼ活性を示す(非特許文献５)。遺伝子欠損マウスを用いた研究では、PNPLA6 遺伝子を全身で欠損させると胎盤異常により胎生致死となるが、ヘテロ欠損マウスは自発運動量が亢進する多動性障害モデルとされる(非特許文献６)。一方、中枢神経特異的に PNPLA6 遺伝子を欠損させると、6 週齢頃までに海馬、視床、小脳プルキンエ細胞などの神経変性が生じはじめ、5 ヶ月齢において下肢反射異常や、協調運動・運動学習の低下が見られる (非特許文献７，８)。しかしながら、こうした神経変性に至る分子メカニズムについては未だ十分解明されていない。

[０００５]

一方、PNPLA7 に関しては、一塩基多型が精神疾患のエンドフェノタイプの一つと相関するという報告があるものの(非特許文献９)、PNPLA7 遺伝子の変異によるヒト先天性代謝疾患や神経変性との関連性はよく分かっていない。

[先行技術文献]

[非特許文献]

[０００６]

[非特許文献１] Murakami M, Taketomi Y, Miki Y, Sato H, Hirabayashi T, Yamamoto K. Recent progress in phospholipase A_2 research: from cells to animals to humans. Prog Lipid Res 50:152-192, 2011

[非特許文献２] Synofzik M, et al. PNPLA6 mutations cause Boucher-Neuhauser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum. Brain 137:69-77, 2014

[非特許文献３] Kmoch S, Majewski J et al. Mutations in PNPLA6 are linked to photoreceptor degeneration and various forms of childhood blindness. Nat Commun 6, 5614, 2015

[非特許文献４] Gregory A, Kurian MA, Maher ER, Hogarth P, Hayflick SJ. PLA2G6-associated neurodegeneration. GeneReviews（登録商標）[Internet], 2017

[非特許文献５] Kienesberger PC, Lass A, Preiss-Landl K, Wolinski H, Kohlwein SD, Zimmermann R, Zechner R. Identification of an insulin-regulated lysophospholipase with homology to neuropathy target esterase. J. Biol. Chem. 283:5908-5917, 2008

[非特許文献６] Winrow CJ et al. Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. Nat Genet 33:477-85, 2003

[非特許文献７] Akassoglou K, Malester B, Xu J, Tessarollo L, Rosenbluth J, Chao MV. Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 5075-5080, 2004

[非特許文献８] Read DJ, Li Y, Chao MV, Cavanagh JB, Glynn P. Neuropathy target esterase is required for adult vertebrate axon maintenance. J Neurosci 29: 11594-11600, 2009

[非特許文献９] Vrieze SI, Malone SM, Pankratz N, et al. Genetic associations of nonsynonymous exonic variants with psychophysiological endophenotypes. Psychophysiology 51:1300-1308, 2014

[発明の概要]

[０００７]

[発明が解決しようとする課題]

[０００８]

上記背景により、神経変性及び神経原性筋萎縮の発症機序の解明や治療薬の薬効評価に有用なツールの開発が望まれている。

[課題を解決するための手段]

[０００９]

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、中枢神経系における PNPLA6 及び PNPLA7 の構造がよく似たリゾホスホリパーゼの機能を解析するために、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を神経系特異的に同時に欠損させたマウスを作製して表現型解析を行ったところ、重度の筋萎縮を伴う神経変性を生じ、短寿命であることが判明した。

本発明は上記知見に基づくものである。

[００１０]

すなわち、本発明は以下の通りである。

[１]PNPLA6遺伝子及びPNPLA7遺伝子がともに欠損した非ヒト動物からなる、筋萎縮を伴う神経変性疾患モデル動物。

[２] PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を神経細胞及び/又はグリア系細胞特異的に欠損させた、[１]に記載の動物。

[３] 筋萎縮が神経原性筋萎縮である、[１]に記載の動物。

[４] 神経変性疾患症状が、寿命の短縮、体重減少、運動能力の低下、歩行異常、安静時振戦、痙縮、下肢反射異常、筋萎縮、背骨の彎曲、運動ニューロンの脱落、神経筋接合部の変性、アストロサイトの活性化、ミクログリアの活性化、ｐ６２陽性凝集体の蓄積、リン酸化 TDP-43 凝集体の蓄積、及びミエリン髄鞘のスフィンゴ脂質群減少からなる群から選ばれる少なくとも１つを伴うものである、[３]に記載の動物。

[５] 神経細胞がコリン作動性神経細胞である、[２]に記載の動物。

[６] 神経変性疾患症状が、寿命の短縮、体重減少、運動能力の低下、歩行異常、下肢反射異常、筋萎縮、背骨の彎曲、アストロサイトの活性化、及びミクログリアの活性化からなる群から選ばれる少なくとも１つを伴うものである、[５]に記載の動物。

[７] グリア系細胞がアストログリア系細胞である、[２]に記載の動物。

[８] 神経変性疾患症状が、寿命の短縮、体重減少、運動能力の低下、歩行異常、安静時振戦、痙縮、下肢反射異常、筋萎縮、背骨の彎曲、運動ニューロンの脱落、神経筋接合部の変性、アストロサイトの活性化、ミクログリアの活性化、ｐ６２陽性凝集体の蓄積、及びリン酸化 TDP-43 凝集体の蓄積からなる群から選ばれる少なくとも１つを伴うものである、[７]に記載の動物。

[９] 非ヒト動物がマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、マーモセット又はサルである、[１]に記載の動物。

[１０]PNPLA6遺伝子及びPNPLA7遺伝子がともに欠損された動物細胞を含む、筋萎縮を伴う神経変性疾患のモデル細胞又はオルガノイド。

[１１] PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を神経細胞及び/又はグリア系細胞特異的に欠損させた、[１０]に記載のモデル細胞又はオルガノイド。

[１２] 神経細胞がコリン作動性神経細胞である、[１１]に記載のモデル細胞又はオルガノイド。

[１３] グリア系細胞がアストログリア系細胞である、[１１]に記載のモデル細胞又はオルガノイド。

[１４] [１]～[９]のいずれか１項に記載の動物、若しくは当該動物から採取された生体試料、又は[１０]～[１３]のいずれか１項に記載のモデル細胞若しくはオルガノイ

ドに被検物質を接触させ、当該被検物質接触後の前記非ヒト動物、生体試料又はモデル細胞において神経変性に対する改善効果が得られたときは、当該被検物質を神経変性疾患用医薬として選択する工程を含む、神経変性疾患に対する医薬のスクリーニング方法。

[１５] [１]～[９]のいずれか１項に記載の動物、若しくは当該動物から採取された生体試料、又は[１０]～[１３]のいずれか１項に記載のモデル細胞若しくはオルガノイドに被検物質を接触させ、当該被検物質接触後の前記非ヒト動物、生体試料又はモデル細胞若しくはオルガノイドにおいて筋萎縮の改善効果が得られたときは、当該被検物質を、筋萎縮を有する疾患用医薬として選択する工程を含む、筋萎縮を有する疾患に対する医薬のスクリーニング方法。

[１６] 筋萎縮が神経原性筋萎縮である、[１５]に記載の方法。

[１７] 神経原性筋萎縮を有する疾患が、筋萎縮性側索硬化症、原発性側索硬化症、前頭側頭葉変性症、脊髄性筋萎縮症、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症、痙性対麻痺、及び多巣性運動ニューロパチーからなる群から選ばれる少なくとも１つである、[１６]に記載の方法。

[発明の効果]

[００１１]

本発明により、重度の筋萎縮を伴う神経変性を生じるモデル動物が提供される。このモデル動物は、神経変性及び神経原性筋萎縮の発症機序の解明ならびに治療薬の薬効評価において、従来とは異なるタイプの新規の有用なツールとなることが期待される。

[図面の簡単な説明]

[００１２]

[図１] PNPLA ファミリーとヒト神経変性疾患との関係を示す図である。

[図２] 中枢神経系特異的 PNPLA6 及び PNPLA7 欠損による成長不良及び生存曲線を示す図である。

[図３] PNPLA6 及び PNPLA7 欠損マウスにおける各種表現型を示す図である。

[図４] PNPLA6 及び PNPLA7 欠損マウスにおける協調運動能力の低下を示す図である。

[図５] PNPLA6 及び PNPLA7 欠損マウスにおける筋萎縮及び神経筋接合部における除神経を示す図である。

[図６]PNPLA6及びPNPLA7欠損マウスの脳白質及び脊髄におけるｐ６２陽性凝集体を伴う神経変性を示す図である。

[図７] クリューバ・バレラ（KB）染色において脊髄前角の運動ニューロンが変性及び脱落して減少する様子を示す図である。dcKO（右パネル）では、大きな細胞体を持つのが特徴である運動ニューロンが減少している。
パラフィン切片、5 μm、KB染色、♀12週齢、腰髄

[図８]PNPLA6及びPNPLA7欠損マウスの脳におけるミエリン髄鞘の主要脂質の減少（経時変化）を示す図である。

dcKOではGalCer（ガラクトシルセラミド）、Hydroxy GalCer（水酸化ガラクトシルセラミド）、及びSultatide（スルファチド）の減少が見られる。この結果は、dcKOではミエリン髄鞘の異常も生じている可能性を示唆する。

[図９]PNPLA6又はPNPLA7の単独欠損マウスの脳ではミエリン髄鞘の主要脂質の減少が生じないことを示す図である。dcKOマウスで生じるミエリン髄鞘の主要スフィンゴ脂質の減少は、PNPLA6の単独欠損マウス（6-scKO）またはPNPLA7の単独欠損マウス（7-scKO）では見られない。

[図１０]ChAT dcKOマウスの表現型を示す図である。

[図１１]GFAP dcKOマウスの表現型を示す図である。KB染色像において、左上パネルは外見上正常の個体、左下パネルは外見上の異常が顕著で体重減小と脊髄の運動ニューロン変性が見られる個体のものである。

[図１２]GFAP dcKOマウスの表現型を示す図である。

[図１３] PNPLA6及びPNPLA7欠損マウスと従来の代表的なALSモデルマウス（SOD^{G93A} Tgマウス）との表現型の比較を示す図である。

[図１４]PNPLA6及びPNPLA7欠損マウスを作製するためのターゲティングベクター、並びにジェノタイピングPCRの結果を示す図である。

[図１５]dcKO、ChAT dcKO、GFAP dcKOの各マウス系統の表現型を比較する図である。

[発明を実施するための形態]

[００１３]

本発明は、PNPLA6遺伝子及びPNPLA7遺伝子がともに欠損した非ヒト動物からなる、筋萎縮を伴う神経変性疾患モデル動物に関する。

また別の態様において、本発明は、PNPLA6遺伝子及びPNPLA7遺伝子がともに欠損された動物細胞を含む、筋萎縮を伴う神経変性疾患のモデル細胞に関する。

[００１４]

リゾリン脂質を分解する２種類のリゾホスホリパーゼ(PNPLA6 と PNPLA7)を中枢神経系で同時に欠損させた遺伝子改変マウスは、脳の広範囲と脊髄において p62 陽性凝集体を伴う神経変性が生じ、神経筋接合部での除神経、重度の筋萎縮、および筋力と運動機能の低下を経て、早期に死亡した。両酵素をコリン作動性神経特異的もしくはアストログリア特異的に欠損させた場合も、発症時期は異なるものの、神経変性と筋萎縮が進行した。これらのモデル動物は、神経変性と神経原性筋萎縮の発症機序の解明ならびに治療薬の薬効評価において、従来とは異なるタイプの新規の有用なツールとなることが期待される。

[００１５]

本明細書において、「PNPLA6」と表記したときはタンパク質（酵素）を、「Pnpla6」と表記したときは遺伝子を意味するが、説明の便宜上、PNPLA6 をコードする遺伝子を「PNPLA6 遺伝子」と表記することもある。「Pnpla6」と「PNPLA6 遺伝子」とは同義である。

「PNPLA7」及び「Pnpla7」についても上記と同様である。

[００１６]

１．PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子のダブルノックアウト動物又はモデル細胞の作製

特定の遺伝子の機能をマウスなど動物個体で解析することを目的として、その遺伝子を欠損させた遺伝子ノックアウト動物が用いられる。

しかし本願発明においては、対象とする PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を全身で欠損させると胎生致死となるため目的の解析をすることができなくなる。そこで本発明においては、特定の組織や細胞種だけで遺伝子を欠損することでこの問題を回避できる。本発明においては、例えば中枢神経系、末梢神経系、特定の神経細胞集団やグリア細胞などにおいて欠損させることが可能である。

[００１７]

例えば、欠損させたい PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子の特定領域の両端に loxP 配列をジーンターゲティング法又はゲノム編集により挿入した遺伝子改変動物を作製し、さらに組織特異的プロモーターあるいは細胞種特異的プロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニック動物と交配する。

得られた動物個体内では組織特異的又は細胞種特異的プロモーターが働く部位でのみ遺伝子が欠損する。

[００１８]

本発明の一態様においては、例えば、実施例に示すように、PNPLA6 遺伝子のエクソン７の上流に FRT-LacZ-loxP-Neo-FRT-loxP 配列、エクソン 8 の下流に loxP 配列を挿入した構造のターゲティングベクター（図１４Ａ）を ES 細胞に導入し、相同組換え ES 細胞の選択を行う。キメラマウスおよび F1 マウスを作製し、Flippase 過剰発現マウスと交配して Pnpla6 flox/＋マウス（Pnpla6 f/＋マウス）を作製し、さらに Pnpla6 f/＋マウス同士を交配することで Pnpla6f/f マウスを得る。

[００１９]

PNPLA7 遺伝子欠損マウスは、例えばエクソン 26 を Cre-loxP システムによって欠失させるためのターゲッティングベクターを作製し（図１４Ｂ）、ES 細胞に導入してキメラマウスを作出し、germ line transmission の確認された F1 マウスを Flippase 過剰発現マウスと交配することで、Pnpla7 flox/＋マウス（Pnpla7 f/＋マウス）を樹立する。Pnpla7 f/＋マウス同士を交配することで、Pnpla7 f/f マウスを得る。Pnpla6f/f 及び Pnpla7 f/f は、CRISPR/Cas9、Cas9 Nikase、ZFN (zinc finger nuclease)、TALEN その他のヌクレアーゼを含む複合体を利用したゲノム編集技術でも作製することが出来る。

[００２０]

さらに所定のプロモーター制御下で神経系細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと交配することで、ダブルコンディショナルノックアウトマウスを樹立する。

また本発明の一態様においては、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子がともにノックアウトされた動物細胞を含む、筋萎縮を伴う神経変性疾患モデル細胞（以下、単に「モデル細胞」という。）に関する。

[００２１]

本発明において、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を神経細胞及び/又はグリア系細胞特異的に欠損させた動物の表現型は筋萎縮であり、神経原性筋萎縮が主な表現型である。

上記神経変性疾患モデルにおいて、神経変性疾患症状に関わる表現型としては、寿命の短縮、体重減少、運動能力の低下、歩行異常、安静時振戦、痙縮、下肢反射異常、筋肉の萎縮、背骨の彎曲、運動ニューロンの脱落、神経筋接合部の変性、アストロサイトの異常活性化、ミクログリアの活性化、ｐ６２陽性凝集体の蓄積、リン酸化 TDP-43 凝集体の蓄積、及びミエリン髄鞘のスフィンゴ脂質群減少、あるいはこれらの組み合わせを伴う。

[００２２]

また本発明の別の態様では、神経細胞としてコリン作動性神経細胞特異的にPNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を欠損させることができる。この場合の神経変性疾患に関わる表現型として、寿命の短縮、体重減少、運動能力の低下、歩行異常、安静時振戦、痙縮、下肢反射異常、筋萎縮、背骨の彎曲、運動ニューロンの脱落、神経筋接合部の変性、アストロサイトの異常活性化、ミクログリアの活性化、あるいはこれらの組み合わせの表現型を伴う。

[００２３]

さらに本発明の別の態様では、グリア系細胞としてアストログリア系細胞特異的に PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を欠損させることができる。この場合の神経変性疾患に関わる表現型として、寿命の短縮、体重減少、運動能力の低下、歩行異常、安静時振戦、痙縮、下肢反射異常、筋萎縮、背骨の彎曲、運動ニューロンの脱落、神経筋接合部の変性、アストロサイトの異常活性化、ミクログリアの活性化、ｐ６２陽性凝集体の蓄積、リン酸化 TDP-43 凝集体の蓄積、あるいはこれらの組み合わせを伴う。

[００２４]

PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子がともにノックアウトされた動物細胞としては、前記 PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子ダブルノックアウト動物から採取することもできるが、目的の細胞にゲノム編集を利用して PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子をノックアウトしたり、RNA 干渉により遺伝子発現をノックダウンすることもできる。

ゲノム編集、RNA 干渉はいずれも当分野における周知技術であり、当業者であれば適宜選択して実施することができる。これらの手法を行うため、以下のキットを用いて、又は公知文献に従って実施することも可能である。

[００２５]

ゲノム編集：Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337: 816-821, 2012.

CRISPR/Cas9 技術の利用に関する特許（JP6692856）：RNA 依存性標的 DNA 修飾および RNA 依存性転写調節のための方法および組成物

[００２６]

RNA 干渉：Dharmacon RNAi 研究用試薬（Horizon Discovery 社)、Silencer Select siRNA（Thermo Fisher Scientific 社)など

[００２７]

目的の動物細胞としては、神経細胞、グリア細胞、あるいは各種細胞に分化可能な iPS 細胞、幹細胞などが挙げられる。

[００２８]

ここで、目的の動物細胞として iPS 細胞を使用する場合は、入手源は特に限定されるものではなく、購入することができる。あるいは、いわゆる山中因子と呼ばれる４つの遺伝子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）を、適当なベクター（例えばレトロウイルスベクター)を使って例えば線維芽細胞に導入し、数週間培養することにより、リプログラミングされた細胞（多能性幹細胞）を得ることができる。

[００２９]

iPS 細胞の PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を欠損させた後は、増殖因子、各種分化因子の存在下で培養することにより、所定の細胞を得ることができる。例えば、運動ニューロンに分化させる場合は、無血清凝集浮遊培養法(Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, et al. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. Sci Transl Med 4:145ra104,2012)などを適用すればよく、またマイクロデバイスの培養チャンバーで培養することで束状神経線維に分化させ、培養筋細胞と連結して神経筋組織モデルとしてもよい。

[００３０]

このようにして得られた細胞は、筋萎縮を伴う神経変性疾患モデル細胞として使用することができる。

なお、細胞には、前記生体試料由来の細胞と、目的の動物細胞から PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子をダブルノックアウトさせた細胞の両者がある。本発明においては、前記非ヒト動物から採取された生体試料由来の細胞も、広義には「モデル細胞」として理解することができる。

さらに、本発明は、前記細胞由来の細胞集合体もオルガノイドも、神経変性疾患モデルオルガノイドとして使用することができる。「オルガノイド」とは、試験管内など生体外（in vitro）で 3 次元的に作製された臓器（細胞集合体）である。オルガノイドは、組織の細胞、ES 細胞又は iPS 細胞を 3 次元的に培養し、これらの細胞の自己複製能力や分化能力を利用して、自己組織化により形成することができる。

[００３１]

本発明のモデル細胞又はモデルオルガノイドは、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を神経細胞及び/又はグリア系細胞特異的に欠損させた細胞又はオルガノイドである。モデル細胞又はモデルオルガノイドを構成する神経細胞として、例えばコリン作動性神経細胞特異的に PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を欠損させた細胞、あるいは、グリア系細胞としてアストログリア系細胞特異的に PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を欠損させた細胞などが挙げられる。

[００３２]

２．スクリーニング方法

本発明のスクリーニング方法は、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子が欠損した非ヒト動物に被検物質を接触させ、当該被検物質接触後の前記非ヒト動物において神経変性の改善効果、筋萎縮の改善効果、運動機能改善効果、又はこれらのうち複数の効果が得られたときは、当該被検物質を神経変性疾患用医薬、又は筋萎縮を有する疾患に対する医薬として選択する工程を含む。

[００３３]

別の態様では、本発明のスクリーニング方法は、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子が欠損した非ヒト動物から採取された生体材料、又は前記モデル細胞に被検物質を接触させた後、神経変性の改善効果、筋萎縮の改善効果、又はこれらの両者の効果を検出し、得られる結果を指標として神経変性疾患用医薬、又は筋萎縮を有する疾患に対する医薬を選択する工程を含む。

[００３４]

本発明において、医薬の候補となる被検物質（候補物質）は、特に限定されるものではなく、例えば、ペプチド、タンパク質、核酸、脂質、糖、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規化合物であってもよいし、公知化合物であってもよい。これら被検物質は塩を形成していてもよく、被検物質の塩としては、生理学的に許容される酸（例えば無機酸など）や塩基（例えば有機酸など）などとの塩が用いられ、生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。

[００３５]

この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

[００３６]

被検物質は、単一の物質を独立に試験しても、混合物（ライブラリーなどを含む）について試験をしてもよい。複数の被検物質を含むライブラリーとしては、合成化合物ライブラリー（コンビナトリアルライブラリーなど）、ペプチドライブラリー（コンビナトリアルライブラリーなど）などが挙げられる。

[００３７]

「接触させる」とは、被検物質を非ヒト動物に投与する態様、被検物質を生体材料又は前記モデル細胞に添加する態様、被検物質の存在下で培養する態様などを意味する。

[００３８]

被検物質の非ヒト動物への接触方法としては、例えば投与などが挙げられる。投与方法は特に限定されるものではなく、例えば経口投与、非経口投与（注射、塗布等）などが用いられ、動物の種類、被検物質の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、被検物質の投与量は、投与方法、被検物質の性質などに応じて適宜選択することができる。非ヒト動物自体に被検物質を接触させるには、被検物質をこれらの動物に注射等により接種する、被検物質を皮膚に塗布する等の態様がある。

[００３９]

被検物質を生体材料又はモデル細胞若しくはオルガノイドに添加する態様は、細胞の培養物に被検物質を添加すること、体液、血液又はリンパ液等に被検物質を添加することなどが挙げられる。「培養物」とは、細胞、培養液、細胞抽出物のいずれをも意味する。「被検物質の存在下で培養する」とは、細胞と被検物質とが接触する条件下で培養することを意味し、被検物質の上記細胞等との接触は、例えば、細胞培養培地や各種緩衝液（例えば、HEPES 緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水など）の中に被検物質を添加して、細胞を一定時間インキュベートすることにより実施することができる。

[００４０]

培養物中に添加される被検物質の濃度は、その特徴（化合物の種類、溶解度、毒性等）により異なるが、例えば、1 nM～1,000 μM の範囲で適宜選択される。インキュベート時間としては、例えば、24 時間～1 週間が挙げられる。

[００４１]

被検物質投与の対象となる非ヒト動物（被検動物）及び対照動物としては、特に限定されるものではないが、通常、同種の非ヒト動物を用いる。また被検動物及び対照動物は、同腹の動物を用いることが好ましく、同性及び同齢の動物を用いることがより好ましい。非ヒト動物としては、例えばマウス、ラット、モルモット等のげっ歯類のほか、ウサギ、トリ、ヤギ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ、マーモセット、サル等が挙げられる。

[００４２]

本発明においては、非ヒト動物に被検物質を接触させて、変性した神経や萎縮した筋の再生、再成長、修復、増強、回復等、あるいは神経の変性又は筋萎縮の予防（これらを総称して「改善」ともいう）を調べる。

「再生」とは、機能を失った神経の機能を再度生み出すこと、「修復」とは、一部喪失した神経機能又は筋の機能を修正復元すること、「増強」とは、すでに保有している神経又は筋の機能をさらに高めること、予防とは、すでに保有している神経の生存もしくは機能の低下、又は筋の機能の低下を防ぐことを意味する。

[００４３]

被検物質が変性した神経の再生や修復、筋萎縮の回復、あるいは筋力の増強等の改善効果を示したかどうかを評価するための項目としては、例えば、PNPLA6 及び/又は PNPLA7 の発現量や活性の変化、脳神経系における変性神経細胞の減少、脊髄前角に存在する運動神経細胞の減少抑制、アストロサイトやミクログリアの活性化の低下、筋萎縮マーカー遺伝子の発現量の減少、筋肉量の増加(萎縮骨格筋の再成長)、筋衛星細胞の増殖と筋芽細胞への分化、生存期間の延長などが挙げられる。

[００４４]

これらの評価は、動物の外見観察、病理組織学的解析、遺伝子工学的分析、生化学的分析、運動協調性分析等の手法を用いて行うことができる。そして、神経変性疾患における機能促進効果、あるいは筋萎縮を有する疾患における機能促進効果について、PNPLA6 及び/又は PNPLA7 の発現量や活性の増加、筋力の亢進、筋肉量の増加、運動障害の軽減、筋電図による電気生理学的所見の改善、神経筋接合部の再構築、後肢や四肢の麻痺・呼吸筋麻痺の改善などの効果の少なくとも１つが観察されたときは、神経機能の再生、修復、増強又は低下の予防効果が得られたと判断し、被検物質を、神経変性疾患に対する医薬（神経機能促進剤）として選択する。また、上記効果の少なくとも１つが観察されたときは、筋萎縮を有する疾患に対する医薬（筋萎縮改善剤）として選択する。

ここで、「筋萎縮を有する」とは、筋萎縮に起因すること、筋萎縮を伴うことの両者を含む。

[００４５]

本発明において使用される PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子が欠損した非ヒト動物又はモデル細胞は、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子がホモノックアウトされた動物又はモデル細胞でもヘテロノックアウトされた動物又はモデル細胞でもよいが、全身性ホモノックアウト動物は、前述のように出生後早期に死亡することから、神経特異的ホモノックアウト動物またはヘテロノックアウト動物を使用することが好ましい。

[００４６]

本発明においては、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝が欠損した非ヒト動物又はモデル細胞のほか、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝を有するがこれらの遺伝子が変異して機能しない、又は機能が低下した非ヒト動物又はモデル細胞を使用することもできる。変異とは、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子の全長配列のうち、一部の配列に欠失、置換、挿入等の変化が生じ、PNPLA6 活性を有するタンパク質及び PNPLA7 活性を有するタンパク質を正しくコードしない配列を含む遺伝子、すなわち、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝本来の機能を有さない遺伝子を意味する。

[００４７]

さらに、本発明においては、PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子が欠損若しくは変異した非ヒト動物、又は PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子が欠損若しくは変異した非ヒト動物から得られた生体材料、又はモデル細胞を用いるときは、比較対照として PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子がノックアウト又は変異されていない野生型非ヒト動物、あるいは PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子がノックアウト又は変異されていない細胞などを用いることができる。

非ヒト動物から採取された生体材料としては、例えば非ヒト動物由来の細胞（神経細胞、グリア細胞、骨格筋細胞等）、体液、血液、リンパ液、脳脊髄液などが挙げられる。

[００４８]

神経変性疾患としては、特に限定されるものではないが、例えば遺伝性痙性対麻痺、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、パーキンソン症候群（多系統萎縮症，進行性核上性麻痺など）、アルツハイマー病、レビー小体型認知症，皮質基底核変性症などを含む。

[００４９]

筋萎縮を有する疾患（筋萎縮に起因する疾患、筋萎縮を伴う疾患を含む）としては、特に限定されるものではないが、例えば筋萎縮性硬化症（ALS）、前頭側頭葉変性症（FTLD）、脊髄性筋萎縮症（SMA）、脊髄性進行性筋萎縮症（SPMA）、球脊髄性筋萎縮症(SBMA)、多巣性運動ニューロパチーなどを含む。

[実施例]

[００５０]

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

[００５１]

[実施例１]

１．方法

神経特異的 Pnpla6 および Pnpla7 欠損マウスの作製

Pnpla6 欠損マウスは、PNPLA6 遺伝子のエクソン 7 の上流に FRT-LacZ-loxP-Neo-FRT-loxP 配列、エクソン 8 の下流に loxP 配列を挿入した構造のターゲティングベクター(PG00244_Z_7_C03)を European Conditional Mouse Mutagenesis Program（EUCOMM）から購入し、C57BL/6N 由来 ES 細胞の RENKA 株に導入し、相同組換え ES 細胞の選択を行った(図１４A)。キメラマウスおよび F1 マウスを作製し、Flippase 過剰発現マウスと交配して Pnpla6 flox/＋(以下、Pnpla6f/+)マウスを作製し、さらにこれら同士を交配することで Pnpla6f/f マウスを得た。

[００５２]

PNPLA7 遺伝子欠損マウスは、酵素活性中心と予想されるアミノ酸配列を含むエクソン 26 を Cre-loxP システムによって欠失させるためのターゲッティングベクターを作製し(図１４B)、ES 細胞 TT2 に導入してキメラマウスを作出した。germ line transmission の確認された F1 マウスを Flippase 過剰発現マウスと交配することで、Pnpla7 flox/＋(以下 Pnpla7f/+)マウスを樹立し、C57BL/6N の遺伝背景に 10 代以上バッククロスした。Pnpla7 f/＋マウス同士を交配することで、Pnpla7 f/f マウスを得た。

[００５３]

さらに Nestin プロモーターの下流で神経系細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと交配することで、(i)Pnpla6$^{f/f}$; Nes-Cre、

(ii)Pnpla7$^{f/f}$; Nes-Cre、(iii)Pnpla6$^{f/f}$; Pnpla7$^{f/f}$; Nes-Cre (以下、double conditional KO = dcKO)を樹立し、これらを解析に使用した。

[００５４]

遺伝子改変マウスのジェノタイピング用 PCR に使用したプライマーの塩基配列は表１の通りである。

表 1

Pnpla6-F	ACTTGCCTGTTATGTGTAGG（配列番号１）	WT allele：309 bp
Pnpla6-R	TGATGACATCAAGGATGCTC（配列番号２）	flox allele：376 bp
Pnpla7-F	CCCTGGTTCAATTCCCAGTA（配列番号３）	WT allele：299 bp
Pnpla7-R	GGAGTTTGCATGACCACAGA（配列番号４）	flox allele：469 bp
NesCre-F	CCTTCCTGAAGCAGTAGAGCA（配列番号５）	150 bp
NesCre-R	GCCTTATTGTGGAAGGACTG（配列番号６）	

[００５５]

遺伝子発現解析

mRNA の発現量解析は、TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR により行った。ProbeFinder により、primer および Universal Probe Libraly(UPL)をデザインした（遺伝子名、forward primer, reverse primer, UPL 番号の順に記す。）。

遺伝子発現量は、Hprt1 を内在性コントロール遺伝子として使用し、筋萎縮マーカーの検出のみ Tbp を内在性コントロール遺伝子とした。

[００５６]

Hprt1: tgatagatccattcctatgactgtaga（配列番号７）, aagacattctttccagttaaagttgag（配列番号８）, #22

Pnpla6: tgccagcatctatgtggttc（配列番号９）, cacacactccttcccatcag（配列番号１０）, #66

Pnpla7: ggaggggtggagctaga（配列番号１１）, cgccacactctgctagtgc（配列番号１２）, #105

Tbp: ggggagctgtgatgtgaagt（配列番号１３）, ccaggaaataattctggctcat（配列番号１４）, #97

Fbxo32: agtgaggaccggctactgtg（配列番号１５）, gatcaaacgcttgcgaatct（配列番号１６）, #53

Trim63: tgacatctacaagcaggagtgc（配列番号１７）, tcgtcttcgtgttccttgc（配列番号１８）, #83

[００５７]

免疫組織化学

マウス組織を 4%パラホルムアルデヒドで一晩固定し、パラフィン包埋後に 5-10 μm の厚さで薄切し、組織化学的染色および免疫抗体染色を行った。パラフィン切片を免疫染色する際は、10 mM クエン酸バッファー(pH 6.0)による抗原賦活化処理を、オートクレーブ装置を使って 105℃、20 分間行った。神経筋接合部の染色のみ 40 μm の厚さの凍結切片を使用した。組織化学的染色は、クリューバー・バレラ（Kluver-Barrera）染色を行った。

[００５８]

免疫抗体染色で使用した抗体と希釈条件は以下の通りである。

抗 p62 抗体 (Guinea pig anti-p62 C-terminal pAb, MBL PM066) 1:1,000 希釈

抗 p62 抗体 (Mouse anti-SQSTM1/p62 antibody, abcam, ab56416) 1:1,000 希釈

tetramethylrhodamineα-bungarotoxin (Sigma-Aldrich, T0195) 1.5 μg/ml

抗 Neurofilament M 抗体 (DSHB,AB_2314897) 1:50 希釈

抗 Synaptic vesicle2 抗体 (DSHB, AB_2315387) 1:100 希釈

抗 GFAP 抗体 (Proteintech, 60190-1-IG) 1:1,000 希釈

抗 Mac2 抗体（Rat anti-mouse/human Mac2 antibody, Biolegend, 125410) 1:500 希釈

抗 NeuN 抗体 (Novus biologicals, NBP1-92693) 1:1,000 希釈

[００５９]

2 次抗体は、図 5D、および図 6C の GFAP の染色では、F(ab')2-Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, A-11017)、図 6A、B、D の p62 の染色では、Alexa Fluor（登録商標） 546 F(ab')2 fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) (ThermoFisher Scientific, A-11018)、図 6C の p62 の染色では、Goat anti- Guinea Pig IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 633 (ThermoFisher Scientific, A-21105)を、それぞれ 1:1,000 希釈で使用した。

封入剤には VECTASHIELD（登録商標） Antifade Mounting Medium With DAPI (Vector #H-1200)を用いた。

[００６０]

脂質分析

脳からの脂質抽出は、半脳に 20 倍量の hexane/2-propanol=3:2 を加え、ビーズクラシャー(Taitec μT-01)と 5 mm ステンレスビーズで 4,000 rpm, 60 秒間ホモジナイズし、さらにボルテックスミキサーで 5 分間攪拌後、2,000×g、4℃、10 分間遠心した上清を回収した。沈殿に再び 20 倍量 hexane/2-propanol=3:2 を加えて再抽出し、この上清を前のものと合わせた。薄層クロマトグラフィーでは、TLC プレート(Silica gel 60, Merck)1 レーンに 5 mg 湿重量相当の脳に由来する脂質をスポットし、展開溶媒組成は chloroform/methanol/water=65:25:4 を用い、発色は 5%硫酸銅 (15% リン酸水溶液)をスプレーして 180℃で加熱することで行った。

[００６１]

２．結果

1) 神経特異的 Pnpla6 および Pnpla7 欠損マウス (dcKO マウス)は、成長不良と短寿命を示す

PNPLA6 遺伝子のエクソン 7 と 8、又は PNPLA7 遺伝子のエクソン 26 を標的として、それぞれの上流に FRT-LacZ-loxP-Neo-FRT-loxP 配列、下流に loxP 配列を挿入した構造のターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、相同組換え細胞の選択を行い、キメラマウスおよび F1 マウスを作製し、Flippase 過剰発現マウスと交配して flox/＋(f/+)マウスを作製した。さらに Nestin プロモーターの下流で神経系細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと交配することで、(i)Pnpla6$^{f/f}$; Nes-Cre、(ii)Pnpla7$^{fl/f}$; Nes-Cre、(iii)Pnpla6$^{f/f}$; Pnpla7$^{f/f}$; Nes-Cre (以下、double conditional KO = dcKO)を樹立し、解析に使用した。

[００６２]

dcKO マウスの脳から調製した細胞では、Pnpla6 および Pnpla7 mRNA の発現が顕著に減少していることが確認された(図 2A)。各群の体重の経時変化を解析すると、Pnpl6$^{f/f}$; Nes-Cre および Pnpla7$^{f/f}$; Nes-Cre は対照群と比べて体重増加が緩慢であるのに対し、dcKO マウスは顕著な成長不良を示し、5 週齢をピークにそれ以降の体重増加が見られなかった(図 2B)。さらに、dcKO マウスのみが著しく短寿命であり、多くの個体が 100 日齢程度で早期死亡した(図 2C)。

[００６３]

2) 下肢反射異常、歩行異常、筋力および協調運動能力の低下

dcKO マウスは、hindlimb clasping と呼ばれる下肢反射異常を示し(図 3A)、体重減少に伴って歩行異常、安静時振戦、寡動等を呈し(図 3B)、個体により多少の差はあるものの、次第に俊敏性の欠如した緩徐歩行、一側性あるいは両側性の軽度の後肢

不完全麻痺、重度の後肢両側性麻痺による移動困難と、臨床症状が悪化していった。加えて 5 週齢以前から握力が低下するとともに(図 3C)、ロータロッドの回転する棒の上にマウスをのせて徐々に速度を上げてマウスが落下するまでの時間を測定することで協調運動をテストすると、5 週齢以降に対照群($Pnpla6^{f/f}$;$Pnpla7^{f/f}$)に比べてパフォーマンスが次第に低下していく様子が観察された(図 4A および B)。一方、$Pnpla6^{f/f}$; Nes-Cre および $Pnpla7^{f/f}$; Nes-Cre などの単独遺伝子欠損マウスでは、そのような運動機能の低下は少なくとも 9 週齢以前には全く見られず、既報によれば、$Pnpla6^{f/f}$; Nes-Cre の運動能力の低下は 5 ヶ月齢以降で生じるとされている（Akassoglou K, Malester B, Xu J, Tessarollo L, Rosenbluth J, Chao MV. Brain-specific deletion of neuropathy target esterase/swisscheese results in neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 5075-5080, 2004）。

[００６４]

3)筋萎縮、神経筋結合部における除神経

dcKO マウスでは協調運動や握力の低下が見られたため、大腿筋の組織切片をヘマトキシリン-エオジン染色して観察することで筋線維を組織学的に評価すると、dcKO マウスでは 5 週齢までに筋線維の横径が減少しており、8 週齢では大規模かつ全体的な群衆萎縮が生じ、周辺核の増加も観察された(図 5A)。萎縮線維の角化やミオパチーなどで見られる中心核はほとんど見られず、筋萎縮マーカーの Fbxo32 や Trim63 などの遺伝子発現が亢進していた(図 5B)。12 週齢では体のサイズの差が対照群と比べて顕著であるのみならず、全身の骨格筋が重度に萎縮し、背骨の彎曲(矢印)も見られた(図 5C)。

[００６５]

さらに、大腿筋神経筋接合部の組織学的解析を、骨格筋側のアセチルコリン受容体を赤色蛍光標識したα-bungarotoxin で、そこに投射している神経軸索と神経終末を抗 Neurofilament M 抗体および Synaptic vesicle2 抗体(緑色)で染色することにより行うと、dcKO マウスの神経筋接合部では、10 週齢までに神経終末の投射が顕著に減少し、除神経が生じていることが明らかとなった(図 5D)。これらの結果から、dcKO マウスでは運動機能や筋力の低下と同時期に、神経原性筋萎縮が生じていることが示された。

[００６６]

4) 神経変性と脂質組成変化

中枢神経系の異常を免疫組織学的に評価したところ、オートファジー不全などにより蓄積する p62 陽性凝集体が、dcKO マウスの脳および脊髄の白質を中心に広く観察された(図 6A の矢頭)。脊髄においては 3 週齢以降で p62 陽性凝集体が観察され(図 6B の矢頭)、GFAP 陽性のアストログリオーシスや Mac2 陽性のミクログリアの増加も同様の経時変化で進行し、p62 陽性凝集体は高頻度で GFAP 陽性アストログリアと接するような局在を示した(図 6C)。脊髄前角からは下位運動ニューロンが投射しているが、NeuN 陽性の神経細胞マーカーでこの部位を染色すると、8 週齢以降に脊髄前角の神経細胞数が有意に減少することが判明した(図 6D)。クリューバ・バレラ(KB)染色においても、脊髄前角の運動ニューロンが変性及び脱落して減少する様子が観察された(図 7)。

[００６７]

さらに、全脳から hexane/2-propanol=3:2 で抽出した脂質を薄層クロマトグラフィーにより分析したところ(展開溶媒組成は chloroform/methanol/water=65:25:4)、5 週齢以降の dcKO マウスにおいて、ミエリン髄鞘を構成する一連のスフィンゴ脂質群、すなわち、ガラクトシルセラミド(GalCer)、その水酸化体(Hydroxy GalCer)、Sulfatide、および Sphingomyelin などが半分程度に減少していることを見出した(図 8）。

この結果はミエリン髄鞘が豊富な白質に p62 陽性凝集体が多く検出されることとよく一致しており、dcKO マウスではオリゴデンドロサイトの生存や髄鞘形成に異常が生じていることが示唆された。

他方、Pnpla6 又は Pnpla7 のいずれかの遺伝子欠損マウス (scKO マウス)では、上記脂質群の減少は見られなかった（図 9）。

[００６８]

5）限定的な細胞種において *Pnpla6* および *Pnpla7* を欠損させたマウスの表現型

Pnpla6$^{f/f}$; *Pnpla7*$^{f/f}$; Nes-Cre マウスでは Nestin プロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現させるため、神経細胞およびグリア細胞（ミクログリアは除く）において広範に *Pnpla6* 及び *Pnpla7* の遺伝子が欠損する。そこで、上記の神経変性や筋萎縮における神経細胞とアストログリアの寄与度を推定するために、運動ニューロンなどのコリン作動性神経細胞に特異的に発現するコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)のプロモーターを利用した *Pnpla6*$^{f/f}$; *Pnpla7*$^{f/f}$; ChAT-Cre マウス(ChAT dcKO マウス)、及び、アストログリア系の細胞に発現する glial fibrillary acidic protein (GFAP) のプロモーターを利用した *Pnpla6*$^{f/f}$; *Pnpla7*$^{f/f}$; GFAP-Cre マウス(GFAP dcKO マウス)を作製した。

[００６９]

ChATのプロモーターを使用すると、当該プロモーターはコリン作動性神経に作用して遺伝子発現を引き起こす。その結果、*Pnpla6*$^{f/f}$; *Pnpla7*$^{f/f}$マウスにChAT-Creを導入すると、ChATプロモーターの制御下でコリン作動性神経特異的にCreリコンビナーゼが発現し、それらの細胞においてloxP配列に挟まれた配列が組換えを起こすことで、コリン作動性神経特異的にPNPLA6及びPNPLA7が欠損したChAT dcKOが得られる。

また、GFAPのプロモーターを使用すると、当該プロモーターはアストロサイトに作用して遺伝子発現を引き起こす。その結果、*Pnpla6*$^{f/f}$; *Pnpla7*$^{f/f}$マウスにGFAP-Creを導入すると、GFAPプロモーターの制御下でアストロサイト特異的にCreリコンビナーゼが発現し、それらの細胞においてloxP配列に挟まれた配列が組換えを起こすことで、アストロサイト特異的にPNPLA6及びPNPLA7が欠損したGFAP dcKOマウスが得られる。

[００７０]

ChAT dcKOマウスは、8週齢で背骨の彎曲、続いて下肢反射異常が見られ、3～4ヶ月齢頃より、コントロールマウスに比べて体重増加が緩慢となるとともに、歩行異常と筋萎縮が進行した(図１０)。ChAT dcKOマウスは、*Pnpla6*$^{f/f}$; *Pnpla7*$^{f/f}$; Nes-Creマウスとは異なり、p62陽性凝集体は見られず、雌雄とも繁殖可能であった。

[００７１]

一方、GFAP dcKOマウスは、約4分の1の個体で神経変性や筋萎縮が見られ、残りの個体では外見上は明確な異常は検出されなかった。前者では8週齢頃より安静時振戦を呈し、脊髄の運動ニューロンの脱落、白質と灰白質におけるp62陽性凝集体が見られた(図１１)。このマウスでは、筋萎縮性側索硬化症（ALS）や前頭側頭葉変性症（FTLD)等の神経疾患において変性神経細胞やグリア細胞内に蓄積することが報告されている異常リン酸化TDP-43 (pSer409/410)の陽性所見も灰白質で観察された(図１１)。

[００７２]

GFAP dcKOマウスのその後の経過は、dcKO (*Pnpla6*$^{f/f}$; *Pnpla7*$^{f/f}$; Nes-Cre)マウスと同様に、顕著な体重減少に伴って歩行異常を呈し、筋萎縮が進行した（図１２）。外見上は異常がないように見える個体においても、脊髄白質にのみp62陽性凝集体が有意に増加していたが、灰白質の異常リン酸化TDP-43や運動ニューロンの脱落は

観察されなかった(図１１)。また、GFAP dcKOマウスではdcKOマウスやChAT dcKOマウスで生じる背骨の彎曲は見られなかった。

[００７３]

以上の結果から、中枢神経系全体でリゾホスホリパーゼPNPLA6とPNPLA7を同時に欠損させると、アストロサイトの異常活性化と増殖、ミクログリアの活性化、p62陽性凝集体の蓄積、リン酸化TDP-43凝集体の増加、ミエリン髄鞘のスフィンゴ脂質群減少などを伴う脳や脊髄の広範な神経変性が生じるとともに、脊髄前角の運動ニューロンが脱落し、重度の神経原性筋萎縮と体重減少が起こることが明らかとなった。

[００７４]

一方、両酵素をコリン作動性神経細胞特異的に欠損させた場合には、背骨の彎曲が早期に生じたのに対し、筋萎縮や歩行異常の発症時期は大きく遅れた。両酵素をアストログリア特異的に欠損させた場合には、約4分の1の個体で神経変性、筋力低下、筋萎縮、歩行異常などの病態の進行がみられた。したがって、PNPLA6とPNPLA7は神経細胞およびアストロサイトの両者においてそれぞれ機能しており、早期に生じる神経変性や筋萎縮、p62陽性凝集体の形成についてはアストログリアでの酵素欠損の寄与が大きいことが分かった。

[００７５]

３．考察

本発明の成果から、リゾホスホリパーゼ活性を持つPNPLA6とPNPLA7を神経系で特異的に欠損させると、広範囲の神経変性と重度の筋萎縮が生じることが示されたが、リン脂質、コレステロール、スフィンゴ脂質などの代謝酵素の異常は、運動神経などの変性と密接に関わるため(Rickman OJ, Baple EL, Crosby AH. Lipid metabolic pathways converge in motor neuron degenerative diseases. Brain 43:1073-1087, 2020)、多くの関連研究がなされている。しかしながら、変性に至る本質的な分子機序は十分に解明されているとは言えず、有効な治療法も欠如しているのが現状である。

[００７６]

例えば、運動ニューロンの変性を伴う神経原性筋萎縮を引き起こすヒト疾患として、筋萎縮性硬化症(ALS)、前頭側頭葉変性症(FTLD)、脊髄性筋萎縮症（SMA）などがあるが、いずれも進行性の神経難病であり、重症型では最終的に呼吸筋不全により死亡し、有効な治療法が確立されていない。こういった運動ニューロン疾患の中ではALSの頻度が最も多く、日本で約1万人、世界中では30万人近い患者がいる

と推計されている。障害は全身の随意筋に及ぶため、ALS の発症は患者のみならず家族への負担も大きく、また半数が発症からわずか数年で呼吸筋麻痺により致死となる難病であるため、新規治療法の確立は急務である。

[００７７]

研究用途としての ALS モデル動物としては、日本人の家族性 ALS で遺伝子変異頻度の高い superoxide dismutase 1 (SOD1) や、欧米で家族性 ALS の原因として最も多い C9ORF72 の 6 塩基反復配列伸長、あるいは RNA 結合蛋白 FUS(fused in sarcoma)の変異や TDP-43 (TAR DNA-binding protein-43)の変異を導入した齧歯類が多用されており、それらの変異による運動ニューロンの変性の分子機構は重点的に解析されてきた（Rudnick ND, Griffey CJ, Guarnieri P, Valeria Gerbino V, Wang X, Piersaint JA, Tapia JC, Rich MM, Maniatis T. Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1G93A mouse model of ALS. Proc Natl Acad Sci U S A 114: E58294-8303, 2017）。しかしながら、ALS の病態解明や根本的な治療方法の確立に至っていないのが現状である。実際、ヒト由来の変異をそのまま齧歯類に導入したこれらのモデル動物、例えば最もよく利用されている G93A 点変異のヒト変異 SOD1 遺伝子を高コピー数（20～30 コピー）過剰発現させたトランスジェニックマウスは、筋萎縮などの症状がそれほど深刻ではなく、病態解明や治療薬の検討への適用も限定的である。

[００７８]

これに対し、本発明者が樹立した 2 つのリゾホスホリパーゼ PNPLA6 と PNPLA7 を神経系特異的に欠損する dcKO マウスは、神経変性の進行が速く寿命が短いばかりか、歩行困難に至るほどの重度の神経原性筋萎縮を示すことが、特筆すべき特徴である(図 13)。

[００７９]

さらには、コリン作動性神経細胞特異的に *Pnpla6* と *Pnpla7* の両遺伝子を欠損させた ChAT dcKO マウスは発症時期が遅く、欠損マウスのままで繁殖可能という特徴がある。一方、GFAP dcKO マウスは脊髄で異常リン酸化 TDP-43 の蓄積や p62 陽性凝集体がみられ、一部の個体だけが神経変性と筋萎縮を発症するという特徴があり（図 15）、弧発性神経変性疾患モデルとして利用できる可能性がある。

[００８０]

したがって、神経原性筋萎縮の分子機構の解明や、その治療薬候補のスクリーニングおよび作用機序解析にあたって、本研究で作製されたリゾホスホリパーゼを標

的とする遺伝子欠損マウス群は新規の疾患モデル動物としての有用性が高いと考えられる。

[配列表フリーテキスト]

[００８１]

配列番号１～１８：合成 DNA プライマー

請 求 の 範 囲

1．PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子がともに欠損した非ヒト動物からなる、筋萎縮を伴う神経変性疾患モデル動物。

2．PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を神経細胞及び/又はグリア系細胞特異的に欠損させた、請求項１に記載の動物。

3．筋萎縮が神経原性筋萎縮である、請求項１に記載の動物。

4．神経変性疾患症状が、寿命の短縮、体重減少、運動能力の低下、歩行異常、安静時振戦、痙縮、下肢反射異常、筋萎縮、背骨の彎曲、運動ニューロンの脱落、神経筋接合部の変性、アストロサイトの活性化、ミクログリアの活性化、ｐ６２陽性凝集体の蓄積、リン酸化 TDP-43 凝集体の蓄積、及びミエリン髄鞘のスフィンゴ脂質群減少からなる群から選ばれる少なくとも１つを伴うものである、請求項３に記載の動物。

5． 神経細胞がコリン作動性神経細胞である、請求項２に記載の動物。

6．神経変性疾患症状が、寿命の短縮、体重減少、運動能力の低下、歩行異常、下肢反射異常、筋萎縮、背骨の彎曲、下肢反射異常、アストロサイトの活性化、及びミクログリアの活性化からなる群から選ばれる少なくとも１つを伴うものである、請求項５に記載の動物。

7． グリア系細胞がアストログリア系細胞である、請求項２に記載の動物。

8．神経変性疾患症状が、寿命の短縮、体重減少、運動能力の低下、歩行異常、安静時振戦、痙縮、下肢反射異常、筋萎縮、背骨の彎曲、運動ニューロンの脱落、神経筋接合部の変性、アストロサイトの活性化、ミクログリアの活性化、ｐ６２陽性凝集体の蓄積、及びリン酸化 TDP-43 凝集体の蓄積からなる群から選ばれる少なくとも１つを伴うものである、請求項７に記載の動物。

９．非ヒト動物がマウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ブタ、マーモセット、又はサルである、請求項１に記載の動物。

１０．PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子がともに欠損された動物細胞を含む、筋萎縮を伴う神経変性疾患モデル細胞又はオルガノイド。

１１．PNPLA6 遺伝子及び PNPLA7 遺伝子を神経細胞及び/又はグリア系細胞特異的に欠損させた、請求項１０に記載のモデル細胞又はオルガノイド。

１２．　神経細胞がコリン作動性神経細胞である、請求項１１に記載のモデル細胞又はオルガノイド。

１３．　グリア系細胞がアストログリア系細胞である、請求項１１に記載のモデル細胞又はオルガノイド。

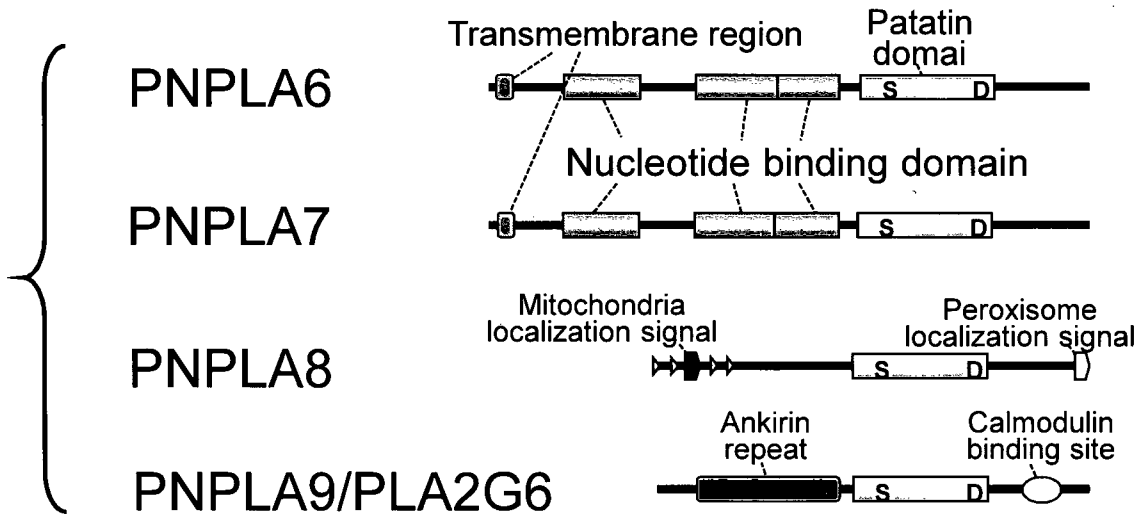
１４．請求項１～９のいずれか１項に記載の動物、若しくは当該動物から採取された生体試料、又は請求項１０～１３のいずれか１項に記載のモデル細胞又はオルガノイドに被検物質を接触させ、当該被検物質接触後の前記非ヒト動物、生体試料、モデル細胞又はオルガノイドにおいて神経変性に対する改善効果が得られたときは、当該被検物質を神経変性疾患用医薬として選択する工程を含む、神経変性疾患に対する医薬のスクリーニング方法。

１５．請求項１～９のいずれか１項に記載の動物、若しくは当該動物から採取された生体試料、請求項１０～１３のいずれか１項に記載のモデル細胞又はオルガノイドに被検物質を接触させ、当該被検物質接触後の前記非ヒト動物、生体試料、モデル細胞又はオルガノイドにおいて筋萎縮の改善効果が得られたときは、当該被検物質を、筋萎縮を有する疾患用医薬として選択する工程を含む、筋萎縮を有する疾患に対する医薬のスクリーニング方法。

１６．筋萎縮が神経原性筋萎縮である、請求項１５に記載の方法。

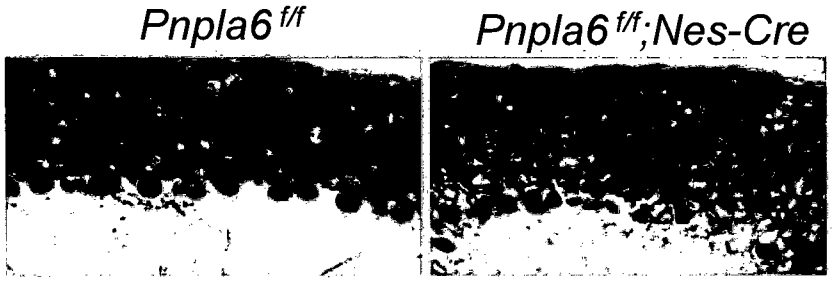
１７．神経原性筋萎縮を有する疾患が、筋萎縮性側索硬化症、原発性側索硬化症、前頭側頭葉変性症、脊髄性筋萎縮症、脊髄性進行性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症、痙性対麻痺、及び多巣性運動ニューロパチーからなる群から選ばれる少なくとも１つである、請求項１６に記載の方法。

PNPLAファミリーに属するリン脂質分解型酵素



ヒト疾患
遺伝性痙性対麻痺（SPG39） 小脳性運動失調 網膜色素変性症
-
ミトコンドリア脳筋症
遺伝性パーキンソン病（PARK14） 乳児神経軸索ジストロフィー(INAD) 鉄沈着を伴う神経変性疾患 (NBIA2A、NBIA2B)

プルキンエ細胞の減少



Akassoglou *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): 5075-80

図1

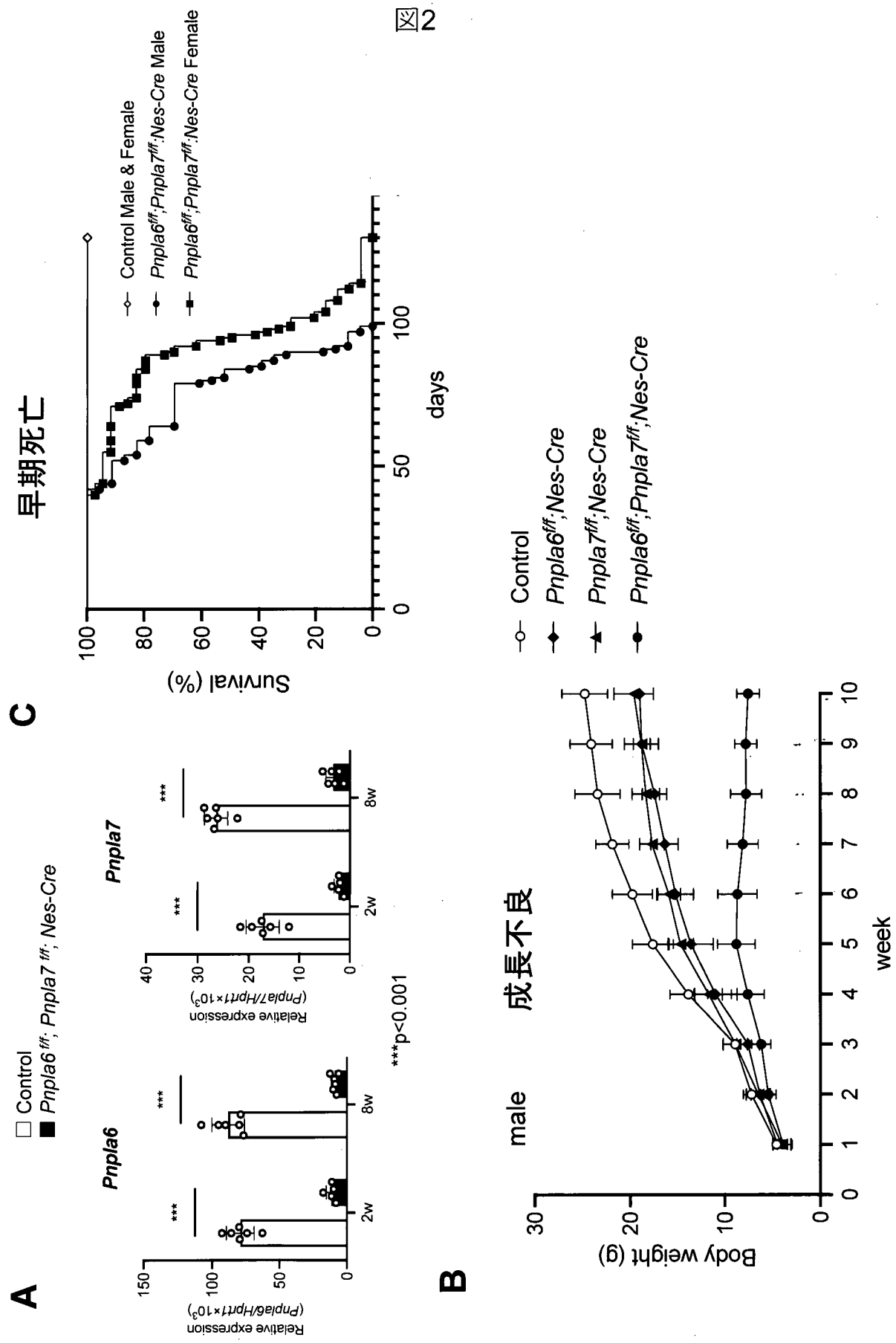

A
□ Control
■ Pnpla6 f/f; Pnpla7 f/f; Nes-Cre
Pnpla6
Relative expression (Pnpla6/Hprt1×10³)
150
100
50
0
***
2w
8w
Pnpla7
Relative expression (Pnpla7/Hprt1×10³)
40
30
20
10
0
***
2w
8w
***p<0.001
B
male
成長不良
Body weight (g)
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
week
Control
Pnpla6f/f;Nes-Cre
Pnpla7f/f;Nes-Cre
Pnpla6f/f;Pnpla7f/f;Nes-Cre
C
早期死亡
Survival (%)
100
80
60
40
20
0
0 50 100
days
Control Male & Female
Pnpla6f/f;Pnpla7f/f;Nes-Cre Male
Pnpla6f/f;Pnpla7f/f;Nes-Cre Female

図2

図3

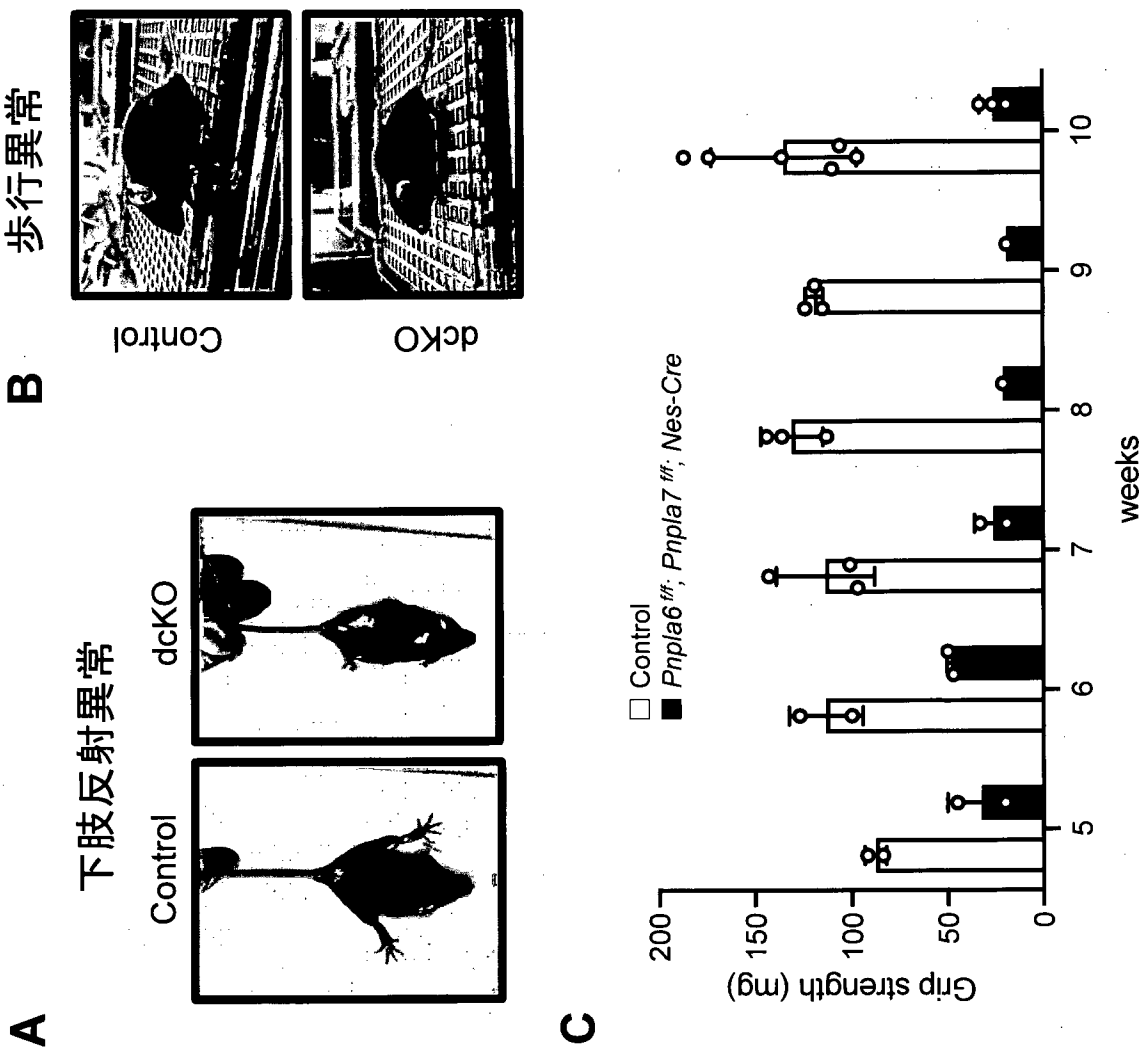

A
下肢反射異常
Control
dcKO
B
歩行異常
Control
dcKO
C
□ Control
■ Pnpla6 f/f; Pnpla7 f/f; Nes-Cre
Grip strength (mg)
200
150
100
50
0
5
6
7
8
9
10
weeks

図4

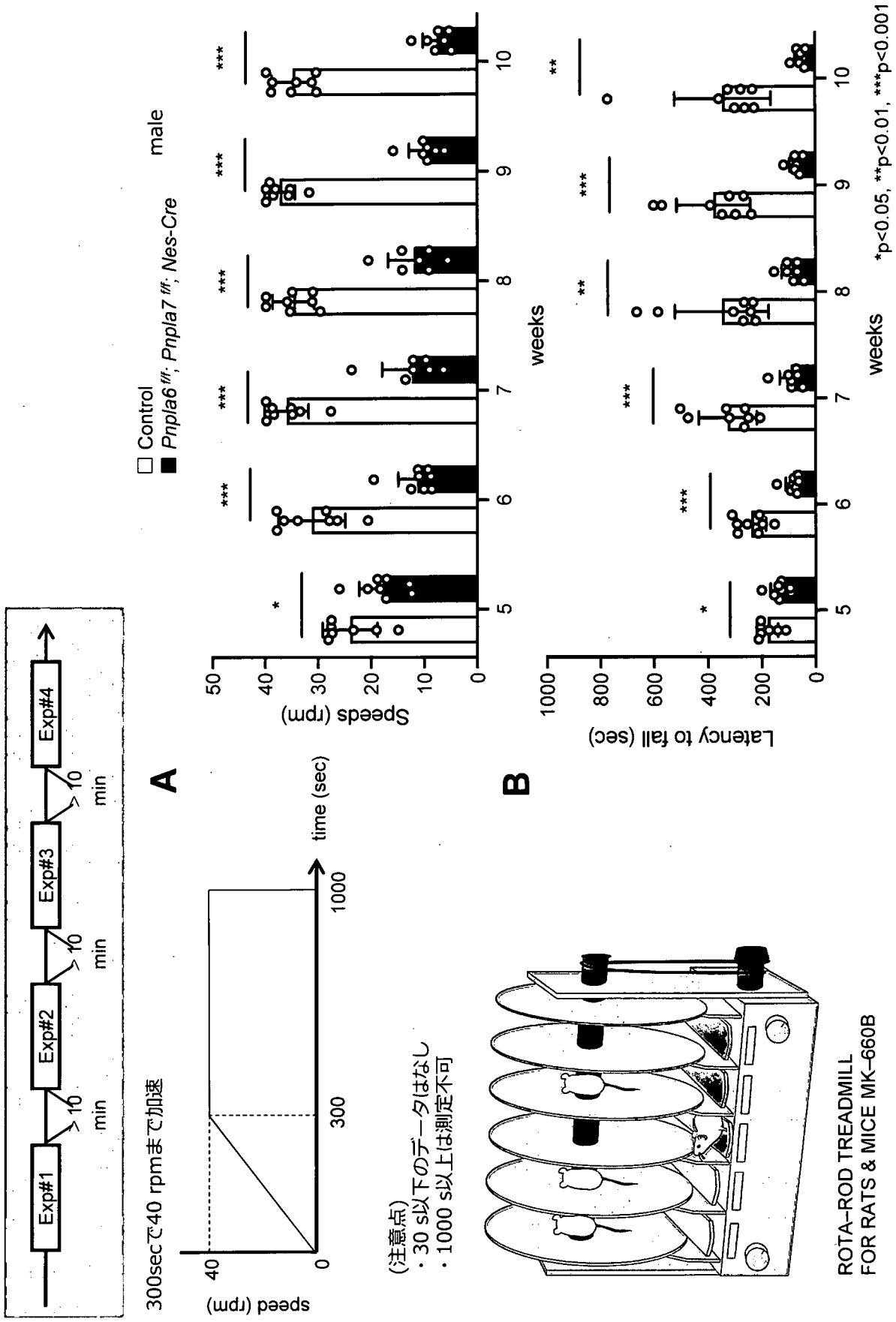

Exp#1
10 min
Exp#2
10 min
Exp#3
10 min
Exp#4
300secで40 rpmまで加速
speed (rpm)
40
0
300
1000
time (sec)
(注意点)
・30 s以下のデータはなし
・1000 s以上は測定不可
ROTA-ROD TREADMILL
FOR RATS & MICE MK-660B
A
□ Control
■ Pnpla6 f/f; Pnpla7 f/f; Nes-Cre
male
Speeds (rpm)
weeks
B
Latency to fall (sec)
weeks
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

図5

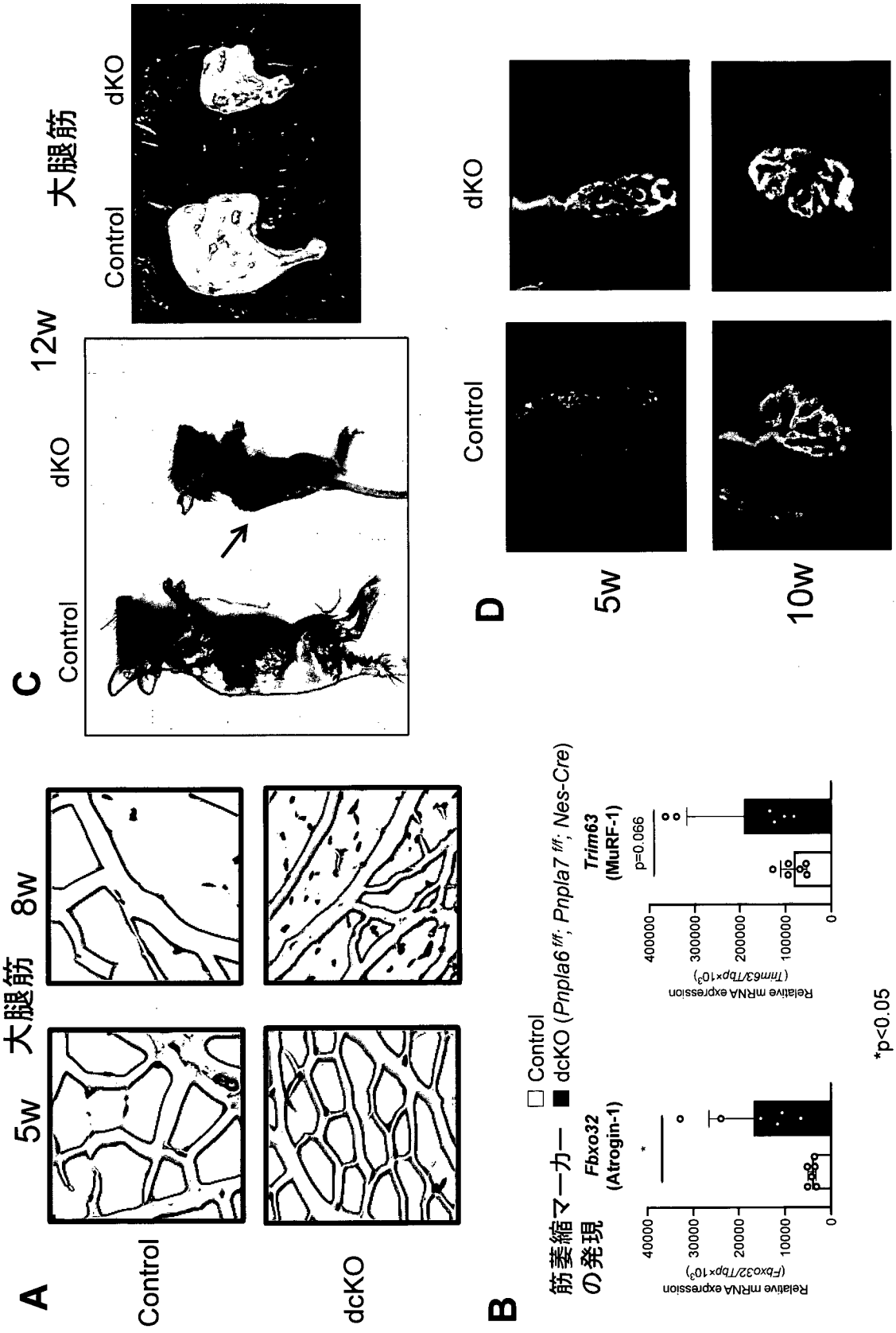

A
大腿筋
5w
8w
Control
dcKO
B
□ Control ■ dcKO (Pnpla6 f/f; Pnpla7 f/f; Nes-Cre)
筋萎縮マーカー の発現
Fbxo32 (Atrogin-1)
Trim63 (MuRF-1)
p=0.066
Relative mRNA expression (Fbxo32/Tbp×10³)
Relative mRNA expression (Trim63/Tbp×10³)
*p<0.05
C
大腿筋
12w
Control
dKO
D
Control
dKO
5w
10w

図6

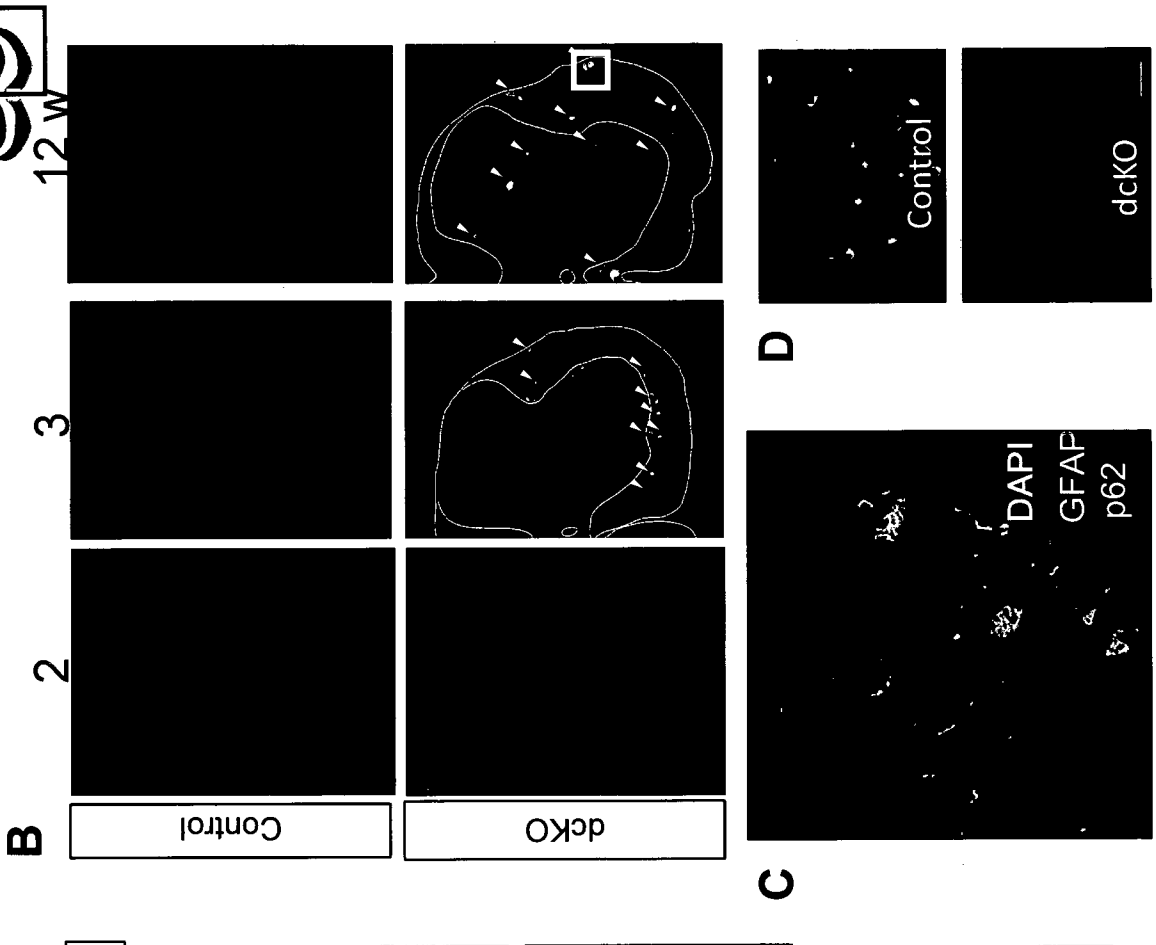

A
5 w
p62
DAPI
Control
dcKO
脳梁
小脳髄体
延髄
B
Control
dcKO
2
3
12 w
C
DAPI
GFAP
p62
D
Control
dcKO

図7

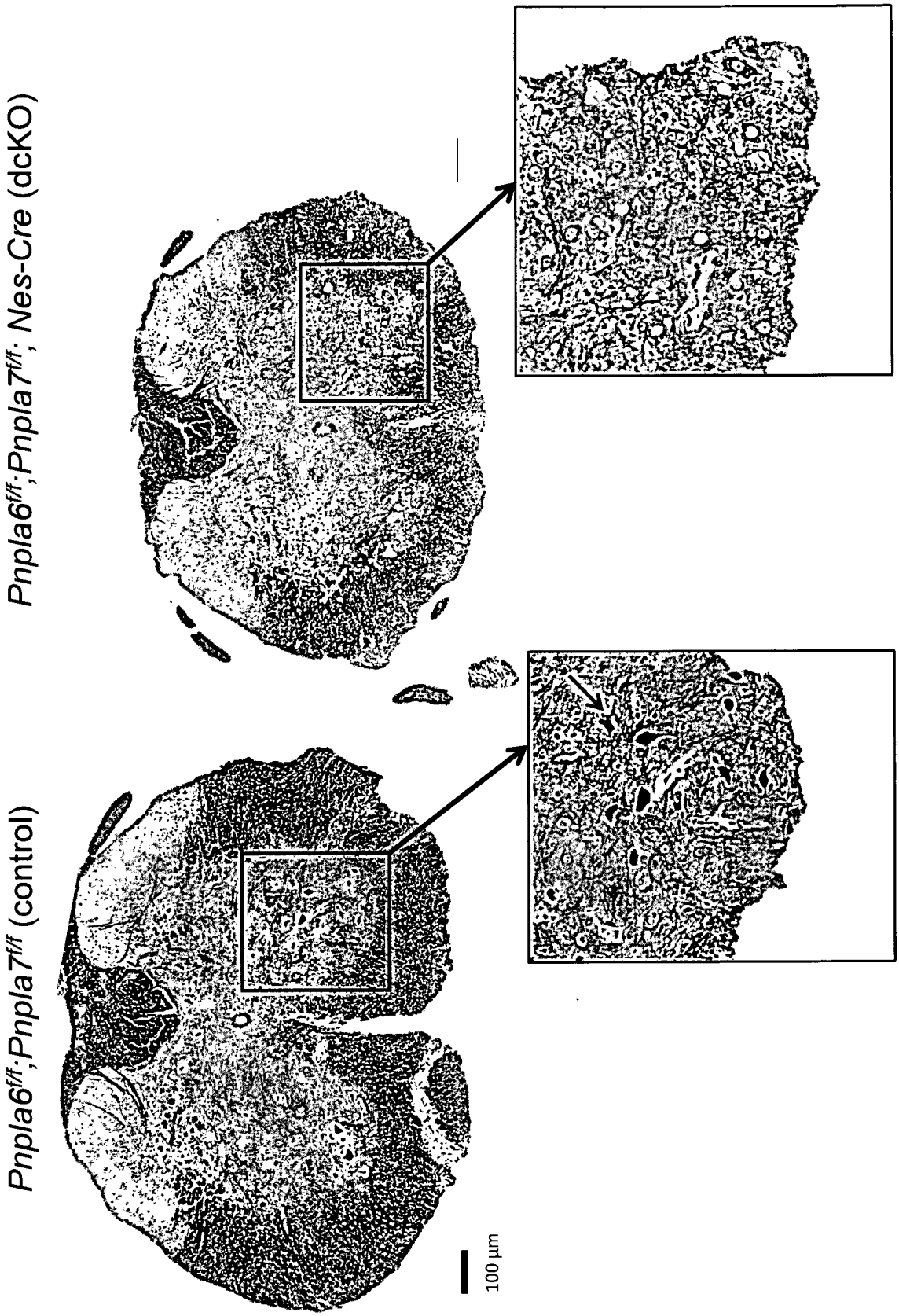

Pnpla6f/f;Pnpla7f/f (control)
Pnpla6f/f;Pnpla7f/f; Nes-Cre (dcKO)
100 μm

図8

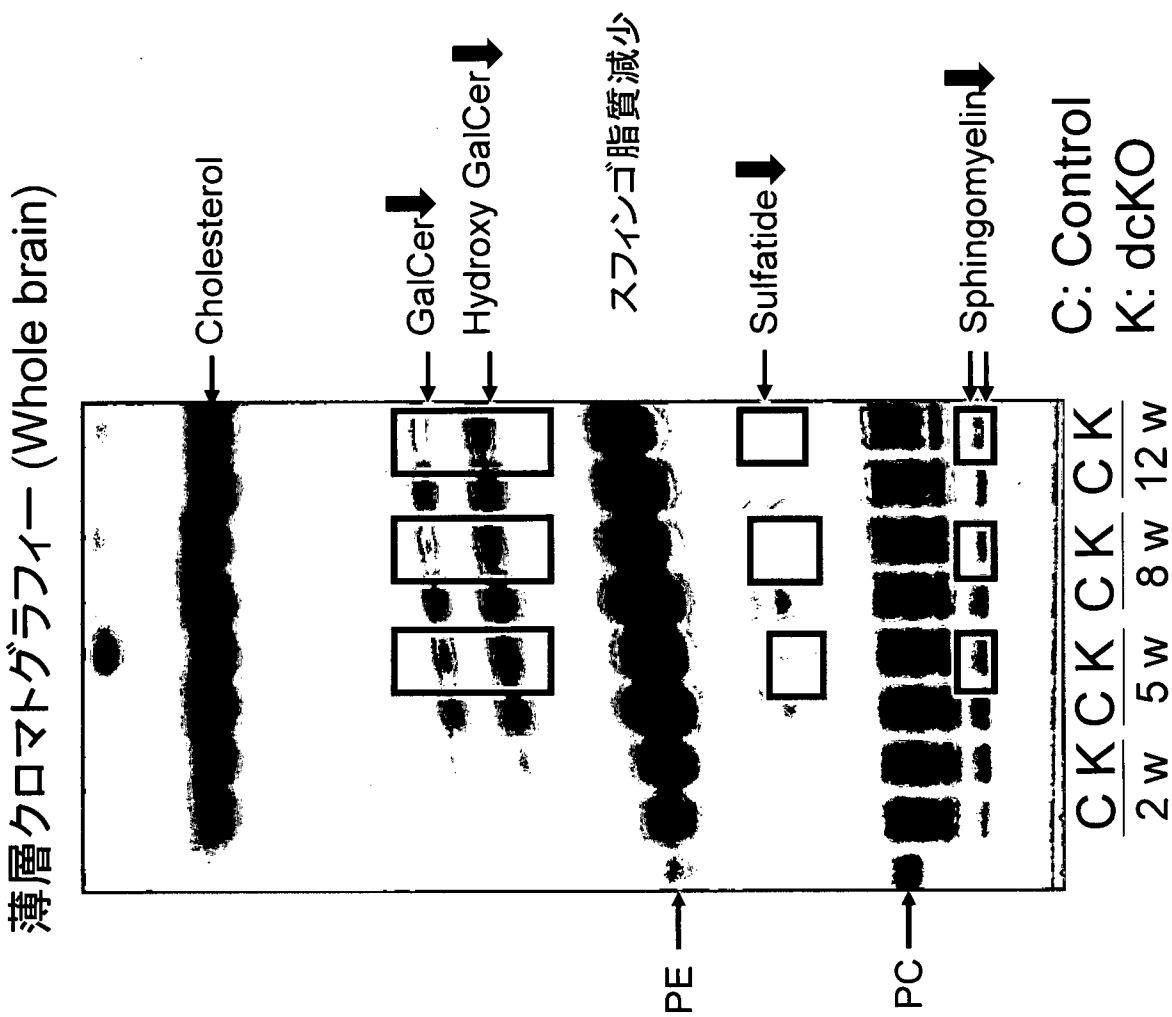

薄層クロマトグラフィー (Whole brain)
Cholesterol
GalCer
Hydroxy GalCer
スフィンゴ脂質減少
Sulfatide
Sphingomyelin
C: Control
K: dcKO
C K C K C K C K
2 w 5 w 8 w 12 w
PE
PC

図9

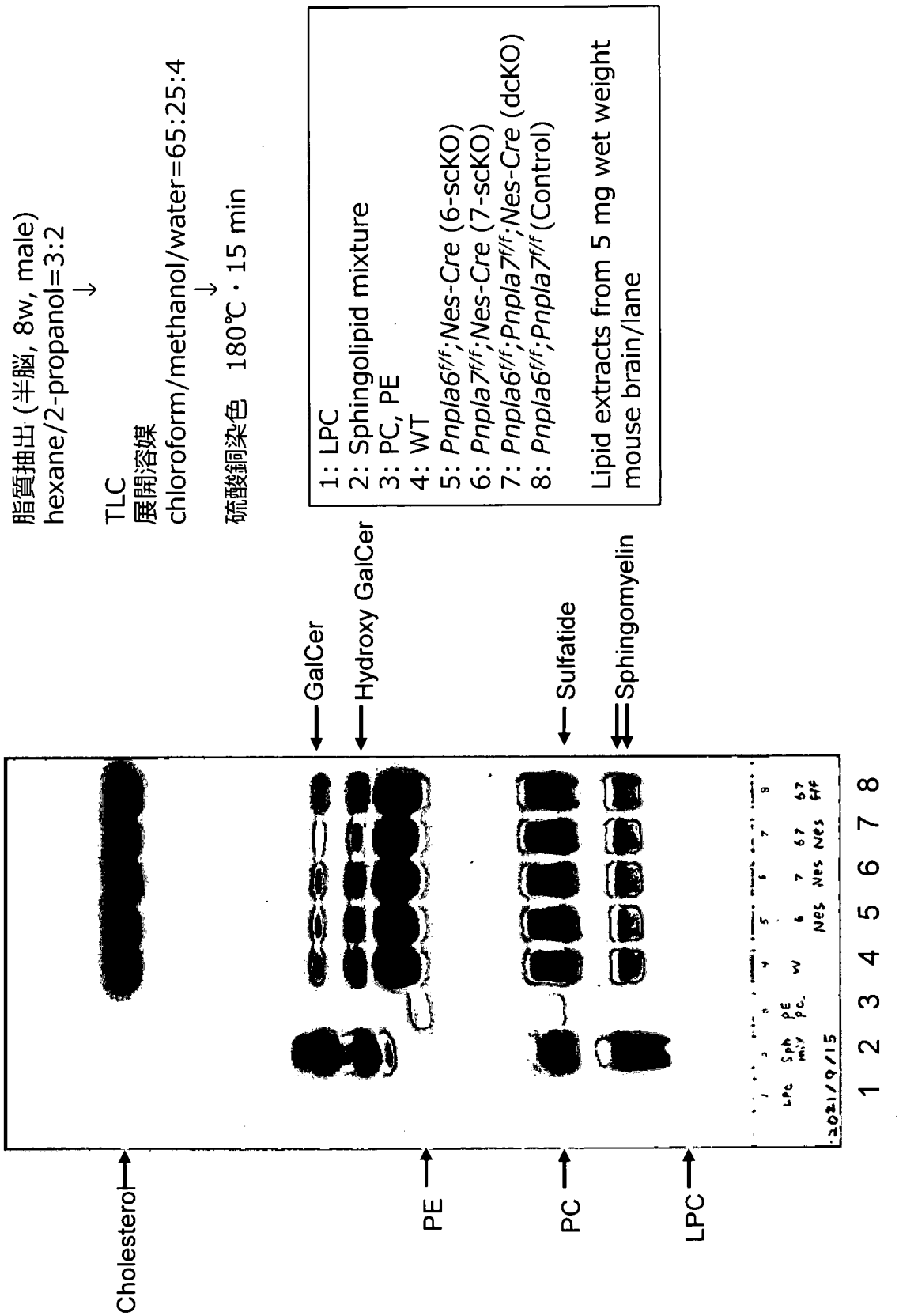

脂質抽出 (半脳, 8w, male)
hexane/2-propanol=3:2
↓
TLC
展開溶媒
chloroform/methanol/water=65:25:4
↓
硫酸銅染色 180℃・15 min
1: LPC
2: Sphingolipid mixture
3: PC, PE
4: WT
5: Pnpla6f/f;Nes-Cre (6-scKO)
6: Pnpla7f/f;Nes-Cre (7-scKO)
7: Pnpla6f/f;Pnpla7f/f;Nes-Cre (dcKO)
8: Pnpla6f/f;Pnpla7f/f (Control)
Lipid extracts from 5 mg wet weight mouse brain/lane
GalCer
Hydroxy GalCer
Sulfatide
Sphingomyelin
Cholesterol
PE
PC
LPC
1 2 3 4 5 6 7 8

図10

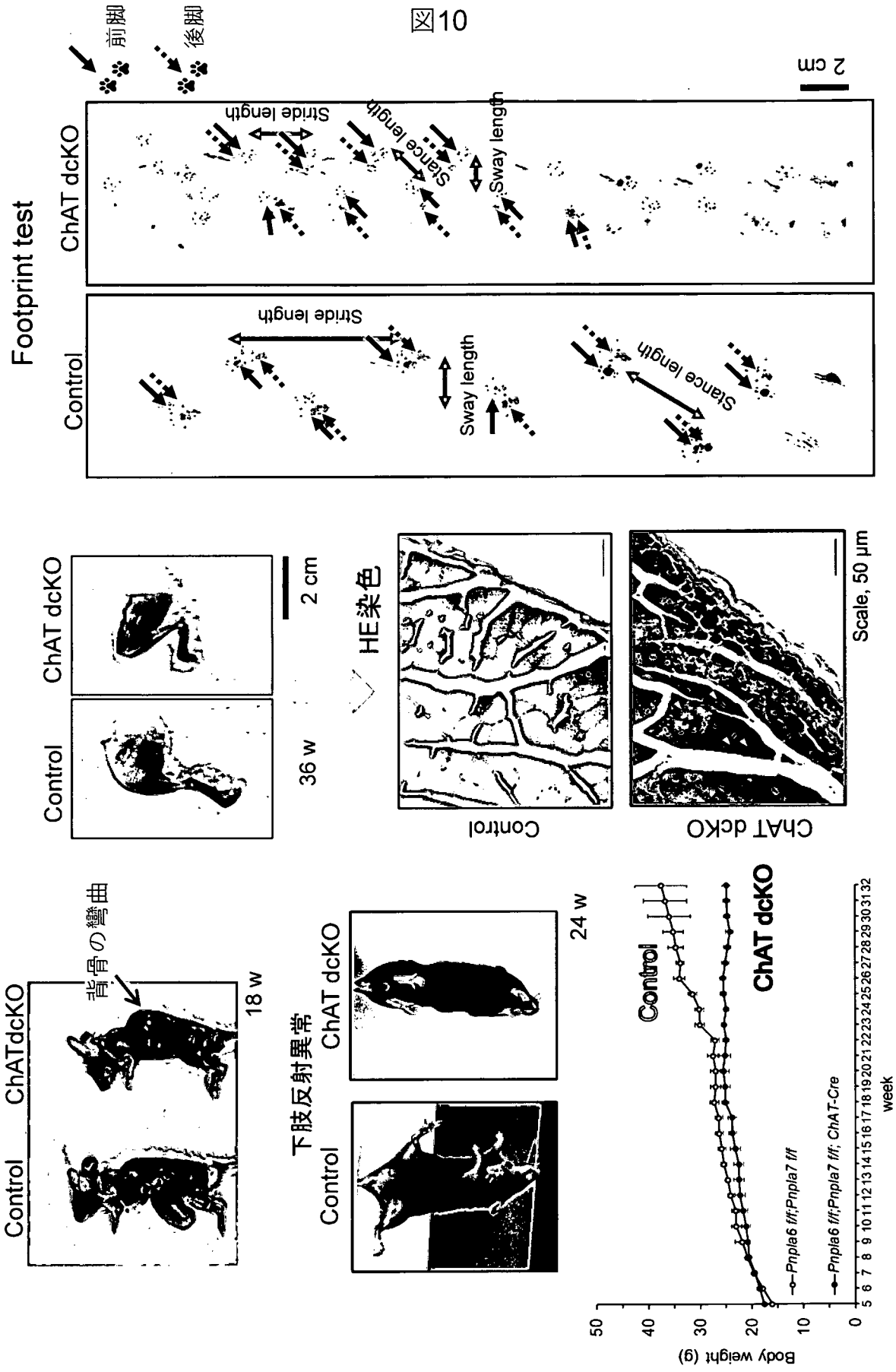

Footprint test
Control
ChAT dcKO
Stride length
Stance length
Sway length
前脚
後脚
2 cm
Control
ChATdcKO
背骨の彎曲
18 w
Control
ChAT dcKO
36 w
2 cm
HE染色
Control
ChAT dcKO
Scale, 50 μm
下肢反射異常
Control
ChAT dcKO
24 w
Body weight (g)
week
Control
ChAT dcKO
Pnpla6 f/f;Pnpla7 f/f
Pnpla6 f/f;Pnpla7 f/f; ChAT-Cre

図11

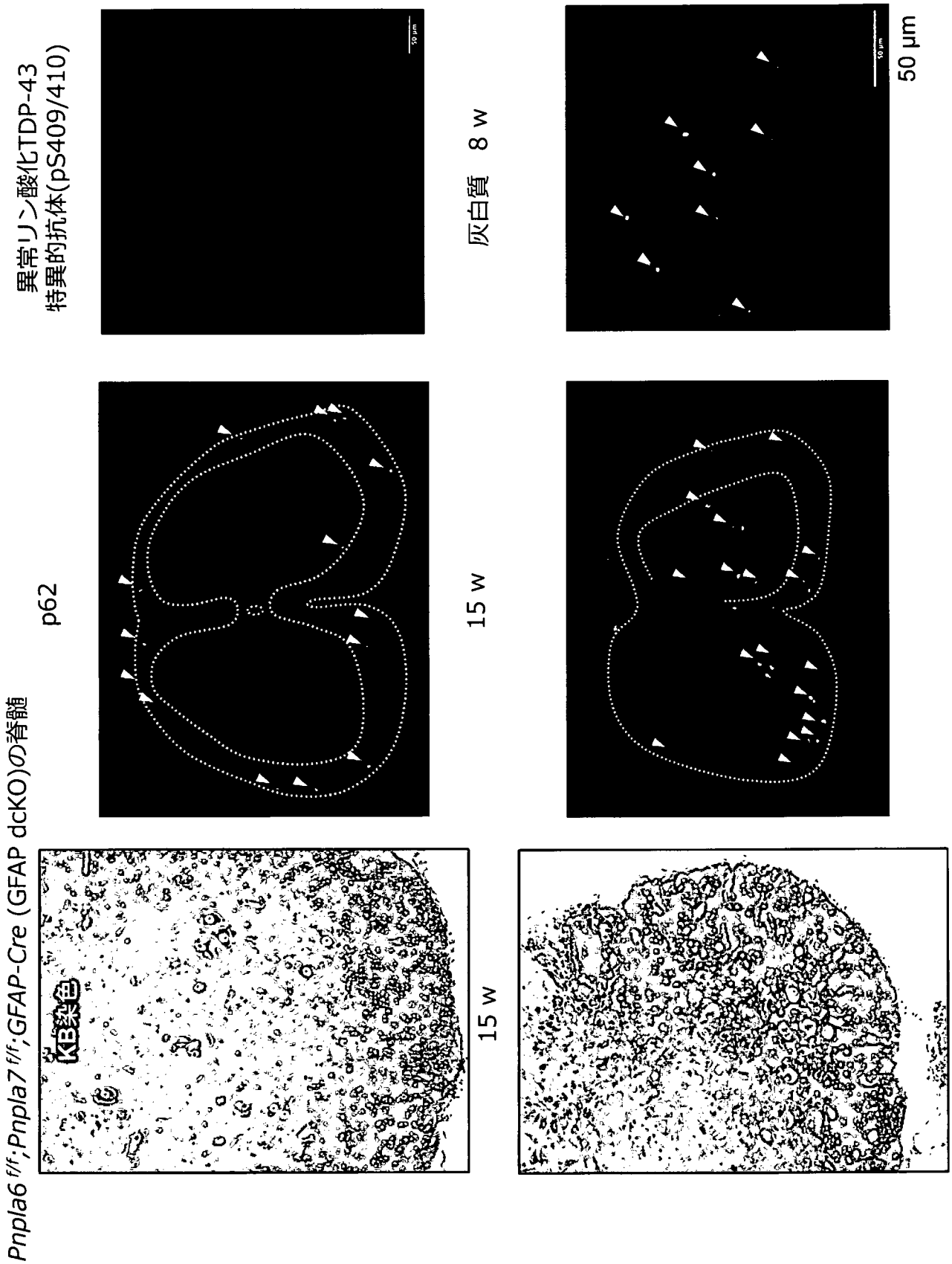

Pnpla6 f/f;Pnpla7 f/f;GFAP-Cre (GFAP dcKO)の脊髄
KB染色
p62
異常リン酸化TDP-43
特異的抗体(pS409/410)
15 w
15 w
灰白質 8 w
50 μm

図12

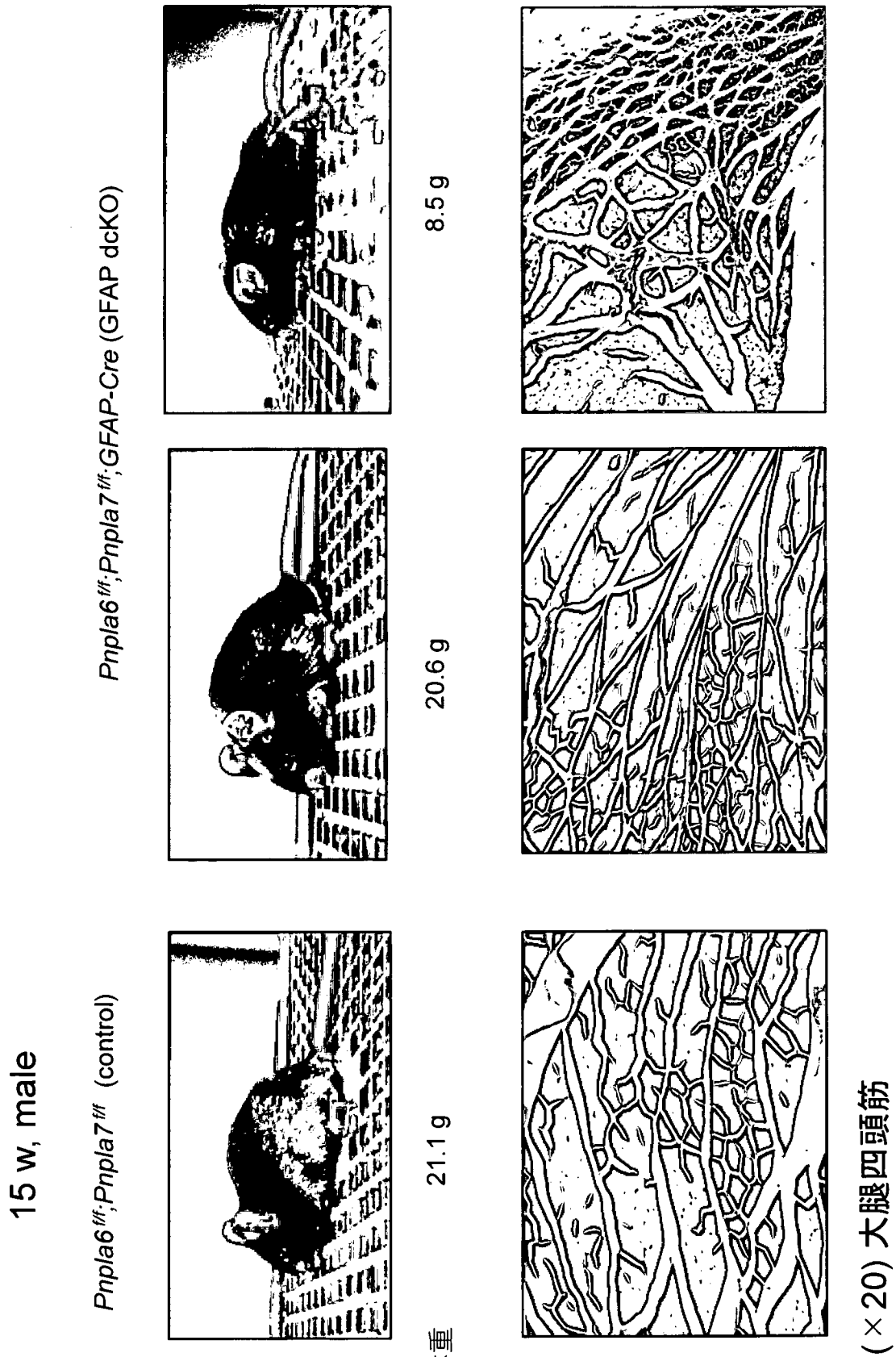

15 w, male
Pnpla6f/f;Pnpla7f/f (control)
Pnpla6f/f;Pnpla7f/f;GFAP-Cre (GFAP dcKO)
体重
21.1 g
20.6 g
8.5 g
(×20) 大腿四頭筋

図13

		Pnpla6-Pnpla7 dcKO	*SOD1*^{G93A} Tg
全身	寿命	12週齢以降	23週齢前後
	体重	Max：5週齢、10%減少：8週齢	Max：10～12週齢、10%減少：14週齢
	安静時振戦	8週齢前後～	18週齢前後～
	ローターロッド	5週齢～異常あり	11週齢～異常あり
	握力	5週齢～異常あり	15週齢前後～異常あり
	歩行異常	8週齢前後～	12週齢前後～異常あり
	尾懸垂反射の消失	△	8週齢～
	背骨の湾曲	10週齢～	20週齢～
脳	GFAP染色	5週齢～	不明
	Ctip2染色（V層神経細胞数）	12週齢で減少	減少する
	p62陽性凝集体	5週齢～	あり
	Ub陽性凝集体	未実施	あり
	p-TDP43陽性凝集体	未実施	あり
脊髄	GFAP染色（アストログリアの活性化）	3週齢～	22週齢～
	Mac2染色（ミクログリアの活性化）	3週齢～	22週齢～
	p62陽性凝集体	3週齢～	運動ニューロンであり
	Ub陽性凝集体	なし	運動ニューロンであり
	ChAT染色（運動ニューロン）	8週齢で減少傾向	14週齢以降減少
	p-TDP43陽性凝集体	8週齢で陽性	60日齢で×、90日齢で陽性
	インターフェロン応答	8週齢で顕著に増加	22週齢で顕著に増加
骨格筋	神経筋接合部の変性	5週齢でなし、10週齢であり	7週齢以降あり
	萎縮	8週齢以降であり	一部あり

図14

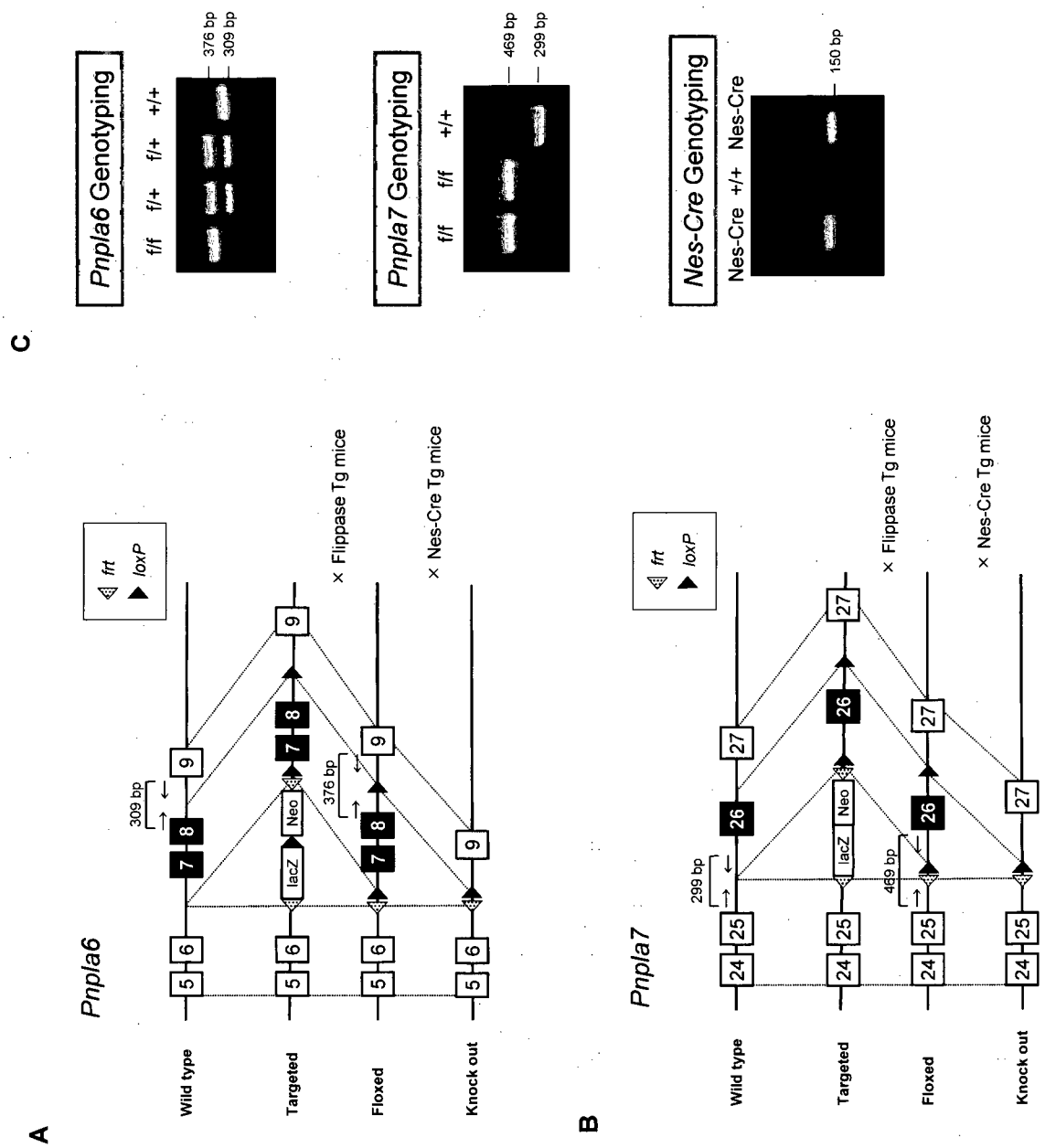

C
Pnpla6 Genotyping
f/f f/+ f/+ +/+
376 bp
309 bp
Pnpla7 Genotyping
f/f f/f +/+
469 bp
299 bp
Nes-Cre Genotyping
Nes-Cre +/+ Nes-Cre
150 bp
A
Pnpla6
frt
loxP
× Flippase Tg mice
× Nes-Cre Tg mice
309 bp
376 bp
Neo
lacZ
Wild type
Targeted
Floxed
Knock out
B
Pnpla7
frt
loxP
× Flippase Tg mice
× Nes-Cre Tg mice
299 bp
489 bp
Neo
lacZ
Wild type
Targeted
Floxed
Knock out

図15

PNPLA6及びPNPLA7の欠損

	神経系広範囲	**ヨリン作動性神経**	**アストロサイト**
全身	寿命 12週齢～	>1年	15週齢～
	体重 減少（Max：5週齢）	減少（Max：20週齢）	減少(Max：11週齢)
	安静時震戦 あり（8週齢前後）	なし	あり
	ローターロッド 5週齢～ 異常あり	30週齢～ 異常あり	未実施
	下肢反射異常 8週齢～	18週齢～	8週齢～
	背骨の湾曲 10週齢～	10週齢～	なし
脳	GFAP染色 5週齢～	検討予定	検討予定
	p62陽性凝集体 5週齢～	検討予定	検討予定
	Ub陽性凝集体 検討予定	検討予定	検討予定
	p-TDP-43陽性凝集体 検討予定	検討予定	検討予定
脊髄	GFAP染色（アストログリア活性化） 3週齢～	8週齢～	8週齢～
	Mac2染色（ミクログリア活性化） 3週齢～	検討予定	検討予定
	p62陽性凝集体 3週齢～	なし	8週齢～
	Ub陽性凝集体 なし	検討予定	検討予定
	p-TDP-43陽性凝集体 8週齢～	なし	8週齢～
	ChAT染色（運動ニューロン） 8週齢で減少	検討予定	検討予定
	インターフェロン応答 8週齢で顕著に増加	検討予定	検討予定
骨格筋	神経筋接合部の変性 あり	検討予定	検討予定
	萎縮 8週齢～	36週齢～	8週齢～

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/038495

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/10(2006.01)i; ***C12N 15/09***(2006.01)i; ***C12Q 1/02***(2006.01)i; ***A01K 67/027***(2006.01)i
FI: A01K67/027 ZNA; C12N5/10; C12Q1/02; C12N15/09 Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/10; C12N15/09; C12Q1/02; A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	READ, David J. et al., Neuropathy Target Esterase Is Required for Adult Vertebrate Axon Maintenance, The Journal of Neuroscience, 16 September 2009, vol. 29, no. 37, pp. 11594-11600, DOI:10.1523/JNEUROSCI.3007-09.2009 In particular, abstract, drawings	1-17
A	MELENTEV, P. A. et al., Human diseases associated with NTE gene, Ecological genetics, 2020, vol. 18, no. 2, pp. 229-242, https://doi.org/10.17816/ecogen16327 in particular, p. 233, left column, the bottom paragraph	1-17
A	KIENESBERGER, Petra C. et al., Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions, Journal of Lipid Research, 2009, April Supplement, S63-S68 In particular, abstract, fig. 1	1-17

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 December 2022	**20 December 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/038495

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	高梨潤一, 超高磁場MR装置を用いたグルタミン酸興奮毒性の病態解明, KAKEN-研究課題をさがす｜2017 年度 実施状況報告書 (KAKENHI-PROJECT-16K10329) [online], 17 December 2018, pp. 1-3, Internet : <URL: https://kaken.nii.ac.jp/report/KAKENHI-PROJECT-16K10329/16K103292017hokoku/> [retrieved on 10 November 2022] non-official translation (TAKANASHI, Junichi. Using ultra-high magnetic field MR devices in understanding the pathology of glutaminic acid excitotoxicity. FY2017 Research Status Report.) in particular, 研究実績の概要 (overview of research results)	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/038495

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

The “form of an Attachment C/ST.25 text file” is replaced with the “form of ST.26.”

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/038495

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i
FI: A01K67/027 ZNA; C12N5/10; C12Q1/02; C12N15/09 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N5/10; C12N15/09; C12Q1/02; A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	READ, David J. et al., Neuropathy Target Esterase Is Required for Adult Vertebrate Axon Maintenance, The Journal of Neuroscience, 2009.09.16, Vol.29, No.37, p.11594-11600, DOI:10.1523/JNEUROSCI.3007-09.2009 特に要旨，図	1-17
A	MELENTEV, P. A. et al., Human diseases associated with NTE gene, Ecological genetics, 2020, Vol.18, No.2, p.229-242, https://doi.org/10.17816/ecogen16327 特に第233頁左欄最下段落	1-17
A	KIENESBERGER, Petra C. et al., Mammalian patatin domain containing proteins: a family with diverse lipolytic activities involved in multiple biological functions, Journal of Lipid Research, 2009, April Supplement, S63-S68 特に要旨，図1	1-17
A	高梨潤一，超高磁場MR装置を用いたグルタミン酸興奮毒性の病態解明，KAKEN-研究課題をさがす｜2017 年度 実施状況報告書 (KAKENHI-PROJECT-16K10329)[オンライン]，2018.12.17，p.1-3，インターネット：<URL:https://kaken.nii.ac.jp/report/KAKENHI-PROJECT-16K10329/16K103292017hokoku/>[検索日：2022年11月10日] 特に「研究業績の概要」	1-17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
13.12.2022	20.12.2022

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
田ノ上　拓自 4B 6115

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/038495

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「付属書C/ST.25テキストファイル形式」は「ST.26形式」と読み替える。