

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04667

研究課題名(和文) 不随意運動の原因となる中枢神経回路の解析と症状改善の試み

研究課題名(英文) Analysis on neuronal circuits responsible for involuntary movements

研究代表者

竹林 浩秀 (Takebayashi, Hirohide)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：60353439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：Dystonia musculorum (dt) マウスは、細胞骨格制御因子をコードするDystonin (Dst) 遺伝子変異により、感覚神経変性および小脳失調やジストニア様症状を示す。dtマウスは、生後4週ほどで死亡するので、この早期死亡と全身症状に影響を与える要因について検索を行った。三叉神経運動核の運動ニューロンの変性と咀嚼に関わる咬筋の萎縮や活動異常が観察された。咬筋とそれを支配する運動神経の異常により、餌をうまく食べられないために全身症状が悪化する可能性が示唆された。また、dtマウスの脳において、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖低下が観察された。

研究成果の概要(英文)：Dystonia musculorum (dt) mice have a loss-of-function mutation in the Dystonin (Dst) gene, which encodes a cytoskeleton regulator. Dt mice show movement disorders, such as cerebellar ataxia and dystonia, as well as sensory neuropathy. Since dt mice die around four weeks old, we investigated why they show growth retardation and die at premature stage. We observed neuronal cell death in the trigeminal motor nucleus (Mo5 nucleus). We also report atrophy and weak contraction of the masseter muscles in dt mice by histological analyses and electromyographic recording, which are innervated by Mo5 motoneurons. Taken together, our findings strongly suggest that mastication in dt mice is affected due to abnormalities of Mo5 motoneurons and masseter muscles, which is one possible reason of growth retardation at the post-weaning stages. In addition, we observed reduced proliferation of oligodendrocyte progenitor cells in the brain of dt mice.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ジストニン 三叉神経運動核 運動神経 咬筋 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

ジストニアは、持続的または不随意的な筋収縮あるいは筋固縮を示す神経難病であり、その病態の詳細は不明である。我々は、ジストニア症状を示す新たな病態モデルマウスを作製した。本マウスは、細胞骨格制御因子ジストニン遺伝子トラップマウス (*Dst^{Gt}* マウス) であり、自然発生変異マウスの *dystonia musculorum* (*dt*) マウスと同様に、ジストニア症状や小脳失調などの運動障害と感覚神経変性を示す。*Dst^{Gt}* マウスは、Cre 組換え酵素により、*Dst* 遺伝子を正常型から異常型へ、あるいは、異常型から正常型へ変換させることができるコンディショナルアレルをもつ。この *Dst^{Gt}* マウスを用いてジストニア症状発現に関わる神経回路の同定を行い、さらに、治療の対象となる神経回路の同定につなげるための基礎となる知識を得るためにレスキュー実験を行う。また、理化学研究所バイオリソースセンターで樹立された、新規の自然発生ミュータントマウスの遺伝子変異の同定とその表現型解析を試みた。

2. 研究の目的

ジストニアおよび小脳失調などの運動失調と感覚神経変性を示す *dt* マウスの表現型解析を行う。具体的な目的を以下に列挙する。

- (1) *Dst^{Gt}* ホモマウスの組織学および電気生理学的な表現型解析。
- (2) 新規の自然発生変異 *dt* マウスの遺伝子変異の同定および表現型解析。
- (3) 神経堤細胞由来の細胞と末梢神経系におけるコンディショナル ノックアウト (cKO) マウスの作製と解析、さらに、レスキューマウスの作製と解析。
- (4) ジストニアの症状発現には、小脳の関与が知られているので、小脳をなくしたときに *dt* マウスのジストニア症状がどのように変化するかを解析する。

3. 研究の方法

- 具体的な実験内容は、以下の通りである。
- (1) *Dst^{Gt}* ホモマウスおよびコントロールマウスの組織を回収し、免疫染色法や *in situ* ハイブリダイゼーション法にて組織学的な解析を行う。ニューロフィラメント (NF) の異常蓄積、小胞体ストレスによって誘導される *CHOP* の発現上昇などを指標として解析を行う。
 - (2) 理研 BRC にて樹立された自然発生ミュータント (*Dst^{dt-23Rbrc}* マウス) のゲノム DNA を回収し、エクソン-イントロン部分を PCR で増幅してシークエンスによる変異の同定を行う。さらに、*Dst^{dt-23Rbrc}* ホモマウスとコントロールマウスの組織学的解析と行動解析を行う。表現型については、*Dst^{Gt}* ホモマウスと重症度の比較を行う。
 - (3) *P0*-Cre トランスジェニックマウスとの掛

け合わせにより、cKO マウスの作製と表現型解析、レスキューマウスの作製と表現型解析を行う。

- (4) 小脳が変性し消失する *cerebellless* マウスと *Dst^{Gt}* マウスの掛け合わせを行い、小脳がないときに *dt* マウスのジストニアの症状が軽減するかどうか検討する。

4. 研究成果

- 各々の実験の主な成果は次の通りである。
- (1) NF の異常蓄積や、小胞体ストレスマーカー *CHOP* の発現上昇などを指標として、*Dst^{Gt}* ホモマウスにおいて、三叉神経運動核の運動ニューロンの異常を組織学的に検出した。また、当該運動神経が支配する咬筋の組織学的な異常と筋電図解析による活動異常を検出した。この結果は、離乳後に *dt* マウスの体重が増えない理由として、咀嚼の異常により餌をうまく食べられない可能性を示唆するものである (論文 1)。また、生後 3 週齢の *Dst^{Gt}* ホモマウスの中枢神経系において、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖低下を見出した (論文 2)。
 - (2) 自然発生ミュータント (*Dst^{dt-23Rbrc}* マウス) の遺伝子変異の検索により、全てのジストニン・アイソフォームに挿入されているプラキンドメインにナンセンス変異 (終止変異) が入っていることが判明した (図 1、論文 5)。

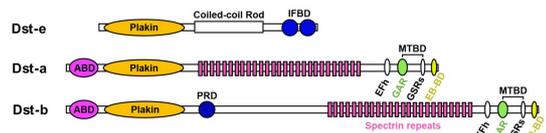


図 1. ジストニンのアイソフォーム。Dst-e、Dst-a、Dst-b のすべてのアイソフォームにプラキンドメイン (黄色) が存在する。

- プラキンドメインは皮膚型ジストニン (*Dst-e* / *BPA1e*) にも含まれているので、*Dst^{dt-23Rbrc}* ホモマウスは、神経系のみならず皮膚にも表現型があることが示唆され、実際に単純性水疱が観察された (論文 7)。*Dst^{dt-23Rbrc}* マウスと *Dst^{Gt}* ホモマウスの表現型を比べると *Dst^{Gt}* ホモマウスの方が若干早くに死亡し、神経症状も重いことが判明した。
- (3) *P0*-Cre トランスジェニックマウスを用いて、cKO マウスを作製したところ、予想通り運動失調が観察された。小脳失調の詳細について行動実験を行うとともに、組織学的、生理学的実験を継続して、論文化を目指している。ジストニア症状の有無については、長期的な経過観察も含めて解析を進めている。レスキューマウスについては、メンデルの法則で予想されるよりも遥かに低い確率でしか得られず、ほとんどが生育途中で致死になっていることが判った。
 - (4) 小脳のない *cerebellless* マウス (*Ptfla* 遺伝子の変異マウス) と *Dst^{Gt}* マウスの掛け合わせを行うと、なかなか目的のダブルホモマウ

スを得ることができなかつた。この結果から、生育途中で致死になる可能性が考えられた。稀に得られたダブルホモマウスについて解析を行うと、ジストニア症状の減弱は観察されず、当初の期待どおりの結果を得る事ができなかつた。

今回の基盤研究(B)のプロジェクトを遂行することにより、まず、生後4週齢ほどで死亡する *dt* マウスの全身症状の悪化が、うまく餌を食べる事ができないことによる可能性が示唆された。また、生後の中枢神経系で観察されたオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖低下はこれまでに報告がほとんどなされていない表現型であり、他の神経病態においてもオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖低下が観察されるかどうか、また、どのようなメカニズムで起こっているのか、今後調べていく必要がある。自然発生変異 *Dst^{dt-23Rbrc}* アリールの遺伝子変異を同定できたことにより、神経系のみならず、*Dst^{dt-23Rbrc}* ホモマウスの皮膚における表現型の存在が示唆され、実際に単純性水疱があることが判明した。*Dst^{dt-23Rbrc}* ホモマウスは遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー6型(HSAN6)の病態モデルとしてだけではなく、単純性表皮水疱症(EBS)の病態モデルマウスとして用いることができると考えられる。*P0-Cre* マウスを用いた *Dst* cKO マウスについては、運動失調の発現における末梢神経系の関与を示すことができた。レスキューマウスが得られなかつた理由は、未だに判っておらず、今後の研究課題の1つである。

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8件)

Motoneuron degeneration in the trigeminal motor nucleus innervating masseter muscle in *dystonia musculorum* mice.

Hossain M.I., Horie M., Yoshioka N., Kurose M, Yamamura K. Takebayashi H. **Neurochemistry International** 査読有 *in press*

DOI: 10.1016/j.neuint.2017.10.009

Reduced proliferation of oligodendrocyte progenitor cells in the postnatal brain of *dystonia musculorum* mice. Hossain M.I., Horie M., Takebayashi H.

Neurochemical Research 査読有 2018; 43(1): 92-100.

DOI: 10.1007/s11064-017-2342-5

Histological detection of dynamic glial responses in the dysmyelinating *Tabby-jimpy* mutant brain. Ikeda M., Hossain M.I., Zhou L., Horie M., Ikenaka K., Horii A., Takebayashi H. **Anatomical Science International** 査読有 2018; 93(1): 119-127.

DOI: 10.1007/s12565-016-0383-5

BPAG1 in muscles: structure and function in skeletal, cardiac and smooth muscle. Horie M., Yoshioka N., Takebayashi H. **Seminars in Cell and Developmental Biology** 査読有 2017; 69: 26-33.

DOI: 10.1016/j.semcd.2017.07.016

Characterization of novel *dystonia musculorum* mutant mice: implications for central nervous system abnormality. Horie M., Mekada K., Sano H., Kikkawa Y., Chiken S., Kikkawa Y., Someya T., Saito K., Hossain M.I., Nameta M., Abe K., Sakimura K., Ono K., Nambu A., Yoshiki A., Takebayashi H. **Neurobiology of Disease** 査読有 2016; 96: 271-283.

DOI: 10.1016/j.nbd.2016.09.016

ジストニア様の運動症状と感覚神経変性を示す *dystonia musculorum* マウスの病態解析 竹林浩秀 **生化学** 査読無 2017; 89 (5): 756-760.

DOI:

10.14952/SEIKAGAKU.2017.890756

単純性表皮水疱症モデルとしての新規 *Dystonin/Bpag1* 遺伝子変異マウスの解析 栗山桃奈、吉岡望、加畑雄大、牛木辰男、吉木淳、Thomas J Sproule、阿部理一郎、竹林浩秀 **新潟医学会雑誌** 査読有 2017; 131: 655-663.

ジストニア症状を示す遺伝性神経難病モデルマウスの作製と解析 竹林浩秀、堀江正男 **新潟医学会雑誌** 査読有 2015; 129: 491-497.

[学会発表](計18件)

Dystonin 遺伝子変異マウスにおける腎病変の組織学的解析降旗敏熙、吉岡望、竹林浩秀 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28.-30. 日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市)

単純性表皮水疱症モデルとしての新規 *Dystonin/Bpag1* 遺伝子変異マウスの解析 栗山桃奈、吉岡望、加畑雄大、牛木辰男、吉木淳、Thomas Sproule、阿部理一郎、竹林浩秀 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会 2018.3.28.-30. 日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市)

Identification and characterization of novel *dystonia musculorum* mutant mice. Takebayashi H., Horie M., Mekada K., Sano H., Kikkawa Y., Chiken S., Someya T., Saito K., Hossain M.I., Nameta M., Abe K., Sakimura K., Ono K., Nambu A., Yoshiki A. 2017 ISN-ESN meeting 2017.8.20.-24. Le Palais des Congres de Paris (フランス パリ)

Dystonia musculorum マウスの生後脳におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖低下 MD Ibrahim Hossain, 堀江正男、竹林

浩秀 第3回日本ミエリン研究会 2017.7.19. TKP 東京駅前会議室(東京都中央区)
オリゴデンドロサイト最終分化におけるミエリン形成機構の解析 松岡崇史、備前典久、池田正直、周麗、崎村建司、竹林浩秀 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.28.-30. 長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)
新規 Olig2 結合因子によるオリゴデンドロサイト分化機構の解析 備前典久、松岡崇史、Hossain MD Ibrahim、周麗、崎村建司、竹林浩秀 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.28.-30. 長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)
新規自然発生 *dystonia musculorum* マウスの樹立と中枢神経系についての組織学的解析 堀江正男、日加田和之、佐野裕美、吉川欣亮、知見聡美、染谷拓郎、斎藤慶介、ホサイン MD イブラヒム、行田正晃、阿部訓也、崎村建司、小野勝彦、南部篤、吉木淳、竹林浩秀 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会 2017.3.28.-30. 長崎大学坂本キャンパス(長崎県長崎市)
新規自然発生 *dystonia musculorum* マウスの樹立とその表現型解析 堀江正男、日加田和之、佐野裕美、吉川欣亮、知見聡美、染谷拓郎、斎藤慶介、ホサイン MD イブラヒム、行田正晃、阿部訓也、崎村建司、小野勝彦、南部篤、吉木淳、竹林浩秀 第38回神経組織培養研究会 2016.11.26. 横浜ランドマークタワー(神奈川県横浜市)
Reactive astrocytes observed in the brain of *dystonia musculorum* mice. ホサイン イブラヒム、堀江正男、行田正晃、小野勝彦、竹林浩秀 第59回日本神経化学学会大会 2016.9.8.-10. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
Examination for possible involvement of the vestibular and reticular nuclei in the emergence for dystonia-like movements in *Dystonin*-deficient mice. Horie M., Sano H., Chiken S., Kobayashi K., Ono K., Nambu A., Takebayashi H. 第39回日本神経科学大会 2016.7.20.-22. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
Establishment of conditional *dystonin* allele for analysis of *dystonia musculorum* mice Takebayashi H., Hossain M.I., Sano H., Chiken S., Kobayashi K., Nambu A., Horie M. 10th FENS 2016.7.2.-6. Bella Center (コペンハーゲン デンマーク)
Activated glial cells in the brainstem of *dystonin* mutant mice. Hossain M.I., Horie M., Takebayashi H. 第57回新潟生化学懇話会 2016.6.25. 新潟大学(新潟県新潟市)
Dystonia musculorum マウスにおける姿勢制御異常に関わる神経回路の解析 竹林浩秀、Hossain M.I., 染谷拓郎、小林憲太、堀江正男 第121回日本解剖学会総会・全国学

術集会 2016.3.28.-30. ビックパレット福島(福島県郡山市)
新規自然発生ジストニン変異マウスの神経系における異常ニューロフィラメントの分布解析 染谷拓郎、堀江正男、目加田和之、吉木淳、竹林浩秀 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 2016.3.28.-30. ビックパレット福島(福島県郡山市)
Glial activation in the brainstem of adult *dystonin* mutant mice Hossain M.I., Horie M., Takebayashi H. 第2回 N-hybrid conference 2016.1.30. 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)
脳のできるしくみから学ぶ 竹林浩秀 第16回日本早期認知症学会学術大会 2015.10.10-11. 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)
Astroglial activation in the brainstem with abnormal neurofilament immunoreactions in *dystonia musculorum* mice Hossain M.I., Horie M., Takebayashi H. 第20回グリア研究会 2015.12.5. 名古屋市立大学(愛知県名古屋市)
Analyses of neuronal and glial cell phenotypes of *dystonia musculorum* mice Takebayashi H. 第58回日本神経化学学会大会 2015.9.11.-13. 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

〔図書〕(計1件)

森泰生、尾藤晴彦 編
脳神経化学 化学同人 2018、368 ページ
第一章 脳はどのようにできているか
竹林浩秀 p2-10, 2018.

〔その他〕

受賞
第70回 新潟日報文化賞(学術部門)
「グリア細胞の発生と機能に関する研究」
竹林浩秀
平成29年11月1日

アウトリーチ活動
第8回 新潟ジュニアメディカルフォーラム
「脳の不思議」
竹林浩秀
平成27年10月3日 新潟大学医学部(新潟県新潟市)

研究室ホームページ
新潟大学大学院医歯学総合研究科 神経生物・解剖学
<http://www.med.niigata-u.ac.jp/an2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者
竹林 浩秀 (TAKEBAYASHI HIROHIDE)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 60353439

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

南部 篤 (NAMBU, ATSUSHI)
生理学研究所統合生理研究系・教授
研究者番号：80180553

知見 聡美 (CHIKEN, SATOMI)
生理学研究所統合生理研究系・助教
研究者番号：30396262

佐野 裕美 (SANO, HIROMI)
生理学研究所統合生理研究系・助教
研究者番号：00363755

堀江 正男 (HORIE, MASAO)
鹿児島大学・医歯学系・准教授
研究者番号：70322716

備前 典久 (BIZEN, NORIHISA)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：40751053

(4)研究協力者

ホサイン MD イブラヒム (HOSSAIN, MD
IBRAHIM)
新潟大学・医歯学系・大学院生

森 由紀子 (MORI, YUKIKO)
新潟大学・医学部・研究補助員