

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：23101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08488

研究課題名(和文) Dystoninコンディショナルマウスを用いたジストニア症状の責任脳回路解明

研究課題名(英文) Elucidation of the causative neural circuits in Dystonin conditional mice

研究代表者

堀江 正男 (Horie, Masao)

新潟県立看護大学・看護学部・教授

研究者番号：70322716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々が作製したジストニン遺伝子トラップアレル(DstGtアレル)は、末梢の感覚神経変性とジストニア様症状などの運動失調を示す。DstGtアレルを用いて、Cre組換えシステムによる条件付きノックアウト(cKO)実験を行い、部位、細胞種特異的に不活性化したDstタンパクを生じさせた。P0プロモーターによりCreを発現するP0-Creトランスジェニックマウスとの掛け合わせにより、末梢神経系のミエリン形成細胞であるシュワン細胞でDst変異を誘導した。このP0-Cre; Dst cKOマウスでは、遅発性の歩様異常などの運動失調の症状が観察された。組織学的解析と筋電図解析を行い、論文報告を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、(1)シュワン細胞におけるはDstタンパクの不活性化はジストニア様症状の直接的な原因ではないが、歩様異常の原因となること、(2)全身性ジストニア様症状発症には、シュワン細胞でのDstタンパクの不活性化に加えて、他の末梢神経あるいは中枢神経においてもDstタンパクの不活性化が必要であることが示唆している。これらの知見は、今後の神経難病であるジストニアの治療法の開発研究に一步になる。

研究成果の概要(英文)：The Dystonin gene (Dst) is responsible for dystonia musculorum (dt), an inherited mouse model of hereditary neuropathy accompanied by progressive motor symptoms such as dystonia. We examined Dst-deficient mice that showed motor abnormalities in homozygous dt23Rbrc/dt23-Rbrc mice are not as severe as homozygous DstGt/DstGt mice. Histological analyses showed abnormal neurofilament(NF) accumulation in the nervous system of homozygous dt23Rbrc/dt23Rbrc mice, which is characteristic of the dt phenotype. We mapped the distribution of abnormal NF-accumulated neurons in the brain and found that they were located specifically in the brainstem, spinal cord, and in regions such as the vestibular nucleus, reticular nucleus, and red nucleus, which are implicated in posture and motor coordination pathways. which causes histological abnormalities in the central nervous system that may account for the abnormal motor phenotype.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ジストニン マウス ジストニア

### 1. 研究開始当初の背景

全身性ジストニアは主動筋と拮抗筋が同時収縮するために四肢や体幹などに不随意の捻転を生じる神経難病である。我が国には現在約 2 万人のジストニア患者がいると推定されており、一刻も早い治療法の確立が求められているが、ジストニアの病態の詳細については未だ解明されていない。全身性ジストニア様の症状を示す *Dystonin(Dst)* 遺伝子のアイソフォームの一つを変異させたマウス (*dt* マウス) は、初期病変として一次知覚神経細胞に変性を生じることがわかっている (図 1)。しかし、ジストニア様症状の原因と考えられる *dt* マウスの神経系における病態および責任領域等、病態解明に直結する部分は依然未解明である。

図 1

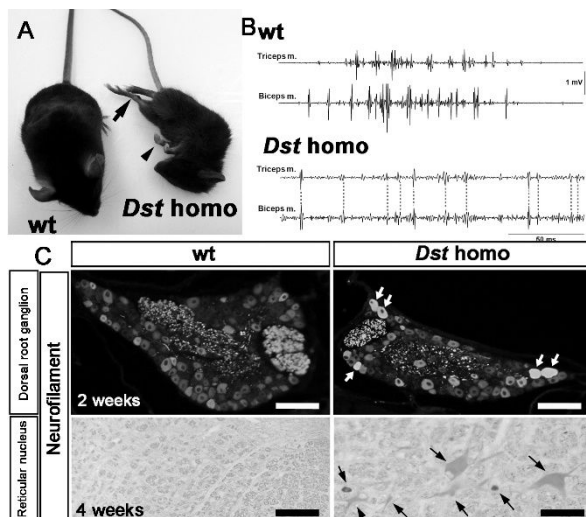
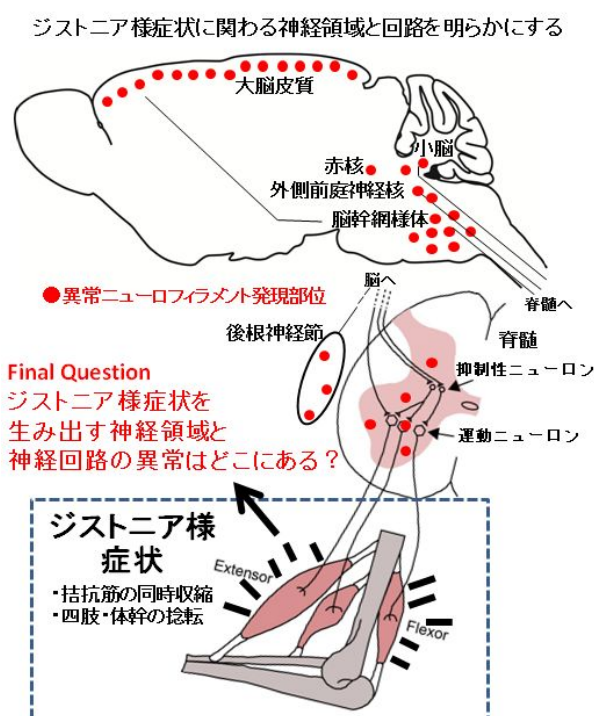


図 2



### 2. 研究の目的

我々は *Dst* 遺伝子のコンディショナル実験が可能な、*Dst* 遺伝子トラップマウス (*Dst* マウス) を作製し、このホモマウスの神経系、特に神経系にニューロフィラメントが異常蓄積する病態を明らかにしたが、依然として異常を示す領域とジストニア様症状との因果関係は不明である。本研究では、*Dst* マウスのジストニア様症状の原因領域や細胞種を明らかにすることを目的とし、異常部位とジストニア発症との関係を明らかにする目的で、部位特異的に *Dystonin* タンパクを不活性化させたマウスを作製して、ジストニア症状の有無を検証し、どの神経回路や細胞種の異常によりジストニア様症状が発生するのか、を明らかにする (図 2)。

### 3. 研究の方法

本研究ではジストニア様症状の原因領域および細胞種を同定するため、【1】全身【2】末梢神経系【3】中枢神経系特異的に *Dst* タンパクを不活性化 (コンディショナル KO 実験) するアレルを作製してジストニア様症状の有無を確認し (運動所見および表面筋電図解析) X-gal 染色を用いた不活性化 *Dst* タンパク発現部位の確認および各種組織学的解析を行った。

### 4. 研究成果

【1】全身性に *Dst* タンパクを不活性化させたマウス 2 系統 (*Actin-Cre; Dst* cKO マウスおよび *TLCN-Cre; Dst* cKO マウス) を解析した。その結果、*Actin-Cre; Dst* cKO マウスは *Dst* マウスと同様の体幹および四肢の捻転を主徴とするジストニア様症状を示した。一方、*TLCN-Cre; Dst* cKO マウスはジストニア様症状を示さなかったが、歩様異常および安静時における両下肢開脚などの運動異常を示した。【2】末梢神経系で *Dst* タンパクを不活性化させたマウス (*P0-Cre; Dst* cKO マウス) はジストニア様症状を示さなかったが、*TLCN-Cre; Dst* cKO マウスと同様の歩様異常および安静時における両下肢開脚などの運動異常を

示した(図3)【3】中枢神経系特異的に Dst タンパクを不活性化させたマウス (*Nestin-Cre; Dst cKO* マウス) は健常マウスと変わりはない。以上の結果から、(1) *Dst* マウスのジストニア様症状出現には、末梢神経系と中枢神経系の両方において不活性化 Dst タンパクを必要とする可能性が考えられた。

歩様などの運動異常が認められた【2】の *P0-Cre; Dst cKO* マウスについて、さらに詳細な解析を進め、以下の結果を得た。(1) 本マウスの Dst タンパクの不活性化は主としてシュワン細胞で起こっていることが分かった。(2) 本マウスは、幼若期においては健常マウスと変わらないが、三か月齢ころから歩様異常が現れた。(3) 電子顕微鏡鏡像解析から、本マウスの末梢神経においてミエリンが有意に薄くなっていること、マクローファージ様の細胞が多数存在することがわかった(図4)。以上の結果から、シュワン細胞における *Dst* タンパクの不活性化はジストニア様症状の直接的な原因ではないが、歩様異常の原因となることが示唆された。

図 3

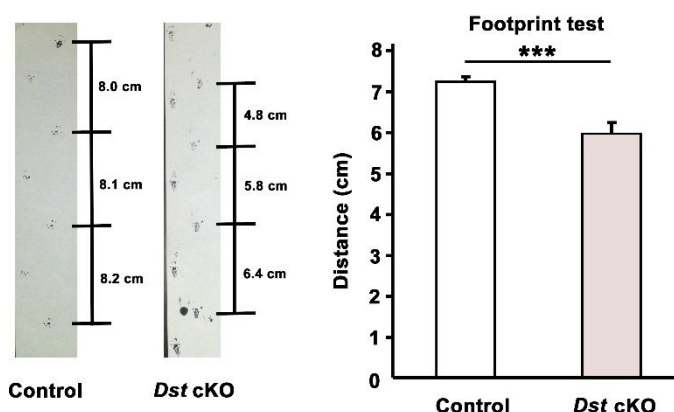
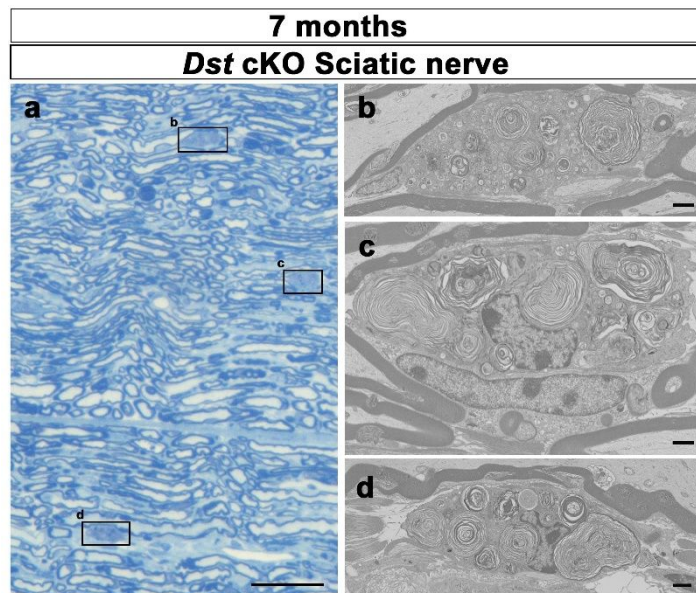


図 4



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Masao Horie, Nozomu Yoshioka, Hirohide Takebayashi	4. 巻 69
2. 論文標題 BPAG1 in muscles: Structure and function in skeletal, cardiac and smooth muscle	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Seminars in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 26 と 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.semcdb.2017.07.016	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 -

1. 著者名 Horie Masao, Yoshioka Nozomu, Kusumi Satoshi, Sano Hiromi, Kurose Masayuki, Watanabe Iida Izumi, Hossain Ibrahim, Chiken Satomi, Abe Manabu, Yamamura Kensuke, Sakimura Kenji, Nambu Atsushi, Shibata Masahiro, Takebayashi Hirohide	4. 巻 68
2. 論文標題 Disruption of dystonin in Schwann cells results in late onset neuropathy and sensory ataxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2330 と 2344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23843	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 堀江正男、吉岡望、久住聡、佐野裕美、イブラヒムホサイン、飯田-渡辺和泉、知見聡美、阿部学、崎村建司、南部篤、柴田昌宏、竹林浩秀
2. 発表標題 Disruption of Dystonin in Schwann cells results in peripheral neuropathy
3. 学会等名 第42回神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀江正男、久住聡、柴田昌宏
2. 発表標題 Connection of pontomedullary reticular formation and facial nucleus in mice
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masao Horie, Kazuyuki Mekada, Hiromi Sano, Yoshiaki Kikkawa, Satomi Chiken, Takuro Someya, Keisuke Saito, M Ibrahim Hossain, Masaaki Nameta, Kuniya Abe, Kenji Sakimura, Katsuhiko Ono, Atsushi Nambu, Atsushi Yoshiki, Hirohide Takebayashi
2. 発表標題 Identification and characterization of novel dystonia musculorum mutant mice
3. 学会等名 第8回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2018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

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