

機関番号： 11301  
 研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007～2010  
 課題番号：19592110  
 研究課題名(和文) 筋失調症モデルマウスの頭頸部を支配する運動性及び知覚性ニューロンに関する研究  
 研究課題名(英文) The study of sensory and motor neurons in dystonin deficient dystonia musculorum mice.  
 研究代表者  
 市川 博之 (ICHIKAWA HIROYUKI)  
 東北大学・大学院歯学研究科・教授  
 研究者番号：20193435

## 研究成果の概要 (和文)：

筋失調症は筋肉が異常に緊張しコントロールできなくなる疾患である。このような疾患では不随意的に四肢の筋肉が緊張し、痙攣することにより手足の運動が障害される。また、口腔顔面領域においては顔面や舌の連縮や顎の変位等が症状としてあらわれることが知られている。本研究では、筋失調症モデルマウスの頭頸部を支配する運動性及び知覚性ニューロンをワイルドタイプマウスと比較し、筋失調症の原因を明らかにする。

## 研究成果の概要 (英文)：

The trigeminal motor nucleus, mesencephalic trigeminal tract nucleus and trigeminal ganglion were investigated in wild type and dystonia musculorum (*dt*) mice to study the effect of *dystonin* deficiency on motor and sensory neurons in the trigeminal nervous system.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

## 研究分野：口腔解剖学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：ジストニン、ノックアウトマウス、知覚ニューロン、運動ニューロン

## 1. 研究開始当初の背景

筋失調症(ジストニア)は筋肉が異常に緊張しコントロールできなくなる疾患の総称である。この疾患では不随意的に四肢の筋肉が緊張し、痙攣することにより手足の運動が障害される。口腔顔面領域においては顔面や舌の連縮や顎の変位等が症状としてあらわれる。以前からこの筋失調症にはさまざまな原因があると考えられてきたが、それらは特定されていなかった。ところが1995年カナダのKotharyらは筋失調を示すマウスにおいて、ある蛋白の遺伝子に異常が有ることを発見し、この蛋白をジストニンと名付けた。ジストニンをノックアウトしたマウスでは筋組織や運動神経には異常が全く観察されなかった。しかし手足の筋肉

の緊張や弛緩を感受するニューロンが消失していた。このノマウスでは神経栄養物質の輸送が阻害されていることから、発生段階において四肢の筋肉の伸展受容(固有感覚受容)ニューロンに必要な神経栄養物質が枯渇することにより、これらのニューロンに細胞死が生じ、手足の随意運動が損なわれるという可能性が示唆された。しかし、口腔顔面領域における筋失調が哺乳や咀嚼機能を妨げ、生命の維持にも危険をもたらす可能性があるにもかかわらず、この原因に関する研究は全く行われてこなかった。

本申請者はノックアウトマウスを用いて、神経の発生に関わるさまざまな物質の役割について明らかにしてきた。そして神経栄養物質や転写因子が口腔顔面領

域における知覚ニューロンの細胞死を抑制し、突起の伸長を促進する機能を持つことを報告した。そして、2006年、ジストニンの発見者である Kothary 博士との共同研究により、ジストニンの遺伝子欠損の口腔及び頸部領域に対する影響を調べるため迷走、舌咽神経節における一次知覚ニューロンの分布を調べ、この蛋白が味覚を伝達するニューロンや味蕾の発生に関与することを明らかにした。しかし、他のニューロンにおけるジストニンの役割や神経栄養物質や転写因子との関連については全く明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

口腔や顔面の筋を支配する運動ニューロンは顔面神経核・舌下神経核・三叉神経運動核に存在する。三叉神経系における固有感覚受容ニューロンは三叉神経中脳路核に含まれている。これらのニューロンは咀嚼筋中の筋紡錘に軸索を送り咀嚼筋の伸展や緊張を伝える機能を持っている。これらの運動性及び知覚性ニューロンに異常が生じると哺乳や咀嚼運動が障害されると考えられている。また、温覚、冷覚、痛覚、触覚、圧覚などの一般体性感覚を伝える一次知覚ニューロンは三叉神経節に存在している。

本研究では、まず筋失調症において生じる顔面や舌の痙攣や下顎の変位の原因を解明するため、ジストニンノックアウトマウスにおいて(1)表情筋、舌筋及び咀嚼筋を支配する運動ニューロンの分布や細胞死とともに(2)三叉神経中脳路核ニューロンの分布や細胞死を調べ、また(3)三叉神経節における痛覚、触覚、圧覚などの外来性刺激に対する受容ニューロンへの影響についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

実験1 ジストニンノックアウトマウスにおける運動性及び知覚性ニューロンの細胞死について

胎生及び生後14日までのワイルドタイプマウスとジストニンノックアウトマウスを4%ホルムアルデヒドにて固定する。なお、ジストニンノックアウトマウスは出生直後から死亡率が上昇し、多くのノックアウトマウスが生後15日までに死亡するため、ほとんどの分析は生後7日までのマウスで行う。顔面神経、三叉神経、舌下神経の運動性及び知覚性ニューロンの細胞死を調べるために、全身或いは頭部を薄切しTUNEL染色やcaspaseによる免疫染色を行う。また胎生期のマウスのニューロンは時に判別が困難であるため、TUNEL或いはcaspase染色とニューロンの特異的なマーカーであるNeuNとの蛍光二重染色も行う。生後14日のマウスについては脳や三叉神経節の連続切片を作成し、ニッスル染色、NeuN或いはPGP9.5の免疫染色を行い、顔面神経、三叉神経、舌下神経の運動性及び知覚性ニューロンの総数を分析し、ジストニン欠損により消失したニューロン数を明らかにする。

実験2 ジストニンノックアウトマウスにおいて生存している知覚性ニューロンの末梢分布や機能について

生後7日のマウスの表情筋、咀嚼筋、舌筋、顔面皮膚、ひげ、口蓋に逆行性軸索輸送のトレーサーであるフルオロゴールド

(1%水溶液、フルオロクロム社から購入)を1マイクロリットル注入し、2日後に4%ホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)にて灌流固定した後、脳、三叉神経節及び口腔顔面の末梢組織を0.01Mアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水中に保存する。脳・三叉神経節・口腔顔面の末梢組織の凍結切片を作製する。脳・三叉神経節においてはフルオロゴールドでラベルされた運動性及び知覚性ニューロンの数や大きさをワイルドタイプマウスとジストニンノックアウトマウスで比較する。この分析によりジストニンノックアウトマウスで細胞死を起こした運動性及び知覚性ニューロンの末梢分布を明らかにすることが可能である。これらの切片に運動ニューロンに含まれるcholine acetyltransferase、痛みの伝達物質と考えられるsubstance P、calcitonin-gene-related peptideやカプサイシン受容体や熱センサーであるvanilloid receptor, vanilloid receptor like receptor subtype、触覚・圧覚・固有感覚を伝えるニューロンに含まれるカルシウム結合蛋白であるparvalbumin, calbindin D-28、に対する間接蛍光法による免疫染色を行う。この方法によりジストニンノックアウトマウスにおいて生存している運動性及び知覚性ニューロンの機能や末梢分布を調べ、結果、ジストニンの遺伝子欠損による運動麻痺や感覚異常を末梢レベルで明らかにすることができる。

## 4. 研究成果

三叉神経運動核における咀嚼筋の運動ニューロンの分布をジストニンノックアウトマウスとワイルドタイプマウスとで比較した結果、脊髄神経系における運動ニューロンと同様に、いずれのマウスにおいても三叉神経運動ニューロンが豊富に観察された。また、三叉神経中脳路核を調べてもジストニンノックアウトマウスとワイルドタイプマウスにおいて固有感覚受容ニューロンが豊富に観察され、明らかな差は認められなかった。一方、三叉神経節においては小型の侵害受容ニューロンが減少していた。これらジストニンノックアウトマウスと比較するために筋の変性疾患のモデルマウスであるdmuマウスを調べたところ、筋肉によって変性の程度に差があることが明らかとなった。また運動神経終板や脊髄の運動ニューロンにおいて、変性のマーカーであるCGRPの発現が上昇していた。以上の結果から、ジストニンノックアウトマウスにおいては三叉神経系における運動ニューロンや固有感覚受容ニューロンに変性は認められず、侵害受容ニューロンにのみ変性することが明らかとなった。dmuマウスにおいては筋変性ととともに運動ニューロンに変性が生じている可能性も示唆された。以下に本研究に関する発表論文の要旨を記載する。

ジストニンノックアウトマウスにおける茸状乳頭について

The anterior part of the tongue was examined in wild type and dystonia musculorum mice to assess the effect of

dystonin loss on fungiform papillae. In the mutant mouse, the density of fungiform papillae and their taste buds was severely decreased when compared to wild type littermates (papilla, 67% reduction; taste bud, 77% reduction). The mutation also reduced the size of these papillae (17% reduction) and taste buds (29% reduction). In addition, immunohistochemical analysis demonstrated that the dystonin mutation reduced the number of PGP 9.5 and calbindin D28k-containing nerve fibers in fungiform papillae. These data together suggest that dystonin is required for the innervation and development of fungiform papillae and taste buds.

#### ジストニンノックアウトマウスにおける三叉神経節と三叉中脳路核について

The trigeminal ganglion (TG) and mesencephalic trigeminal tract nucleus (Mes5) were investigated in wild type and dystonia musculorum (dt) mice to study the effect of dystonin deficiency on primary sensory neurons in the trigeminal nervous system. At postnatal day 14, the number of TG neurons was markedly decreased in dt mice when compared to wild type mice (43.1% reduction). In addition, dystonin disruption decreased the number of sensory neurons which bound to isolectin B4, and contained calcitonin gene-related peptide or high-affinity nerve growth factor receptor TrkA. Immunohistochemistry for caspase-3 demonstrated that dystonin deficiency induced excess cell death of TG neurons during the early postnatal period. In contrast, Mes5 neurons were barely affected in dt mice. These data together suggest that dystonin is necessary for survival of nociceptors but not proprioceptors in the trigeminal nervous system.

#### dmu マウスの脳における *c-Fos* 及び *c-Jun* について

The degenerating muscle (dmu) mouse harbors a loss-of-function mutation in the *Scn8a* gene, which encodes the alpha subunit of the voltage-gated sodium channel (VGSC) Na(V)1.6. The distribution of *c-Fos* and *c-Jun* was examined in spinal and cranial motoneurons of the dmu mouse. In the cervical spinal cord, trigeminal motor nucleus (Vm), facial nucleus (VII), dorsal motor nucleus of the vagus (X), and hypoglossal nucleus (XII) of wild-type mice, motoneurons expressed *c-Fos* and *c-Jun*-immunoreactivity. The immunoreactivity in wild-type mice was mostly weak and localized to the nucleus of these neurons whereas in the spinal cord and brain stem of dmu mice motoneurons showed intense *c-Fos* and *c-Jun*-immunoreactivity. The number of *c-Fos*-immunoreactive motoneurons was

dramatically elevated in the cervical spinal cord (wild type, 4.8 +/- 1.0; dmu, 17.3 +/- 1.6), Vm (wild type, 76.2 +/- 21.6; dmu, 216.9 +/- 30.9), VII (wild type, 162.4 +/- 43.3; dmu, 533.3 +/- 41.2), and XII (wild type, 58.2 +/- 43.3; dmu, 150.9 +/- 25.7). The mutation also increased the number of *c-Jun*-immunoreactive motoneurons in the cervical spinal cord (wild type, 1.6 +/- 0.8; dmu, 12.1 +/- 2.1), Vm (wild type, 41.4 +/- 18.0; dmu, 123.1 +/- 11.7), and X (wild type, 39.1 +/- 10.7; dmu, 92.8 +/- 17.8). The increase of these transcription factors may be associated with the uncoordinated and excessive movement of forelimbs and degeneration of cardiac muscles in dmu mice.

#### dmu マウスの脳における運動ニューロンについて

The distribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP) was examined in skeletal muscles of fore and hind limb as well as in oral and cranio-facial regions of the degenerating muscle (dmu) mouse, which harbours a null mutation in the voltage-gated sodium channel gene *Scn8a*. In limb, oral and cranio-facial muscles of wild type mice, only a few motor endplates contained CGRP-immunoreactivity. However, many CGRP-immunoreactive motor endplates appeared in the triceps brachii muscle, the biceps brachii muscle, the brachialis muscle, and the gastrocnemius muscle of dmu mice. CGRP-immunoreactive density of motor endplates in the skeletal muscles was also elevated by the mutation. In these muscles, the atrophy of muscle fibers could be detected and the density of cell nuclei in the musculature increased. In the flexor digitorum profundus muscle, the flexor digitorum superficialis muscle, and the soleus muscle as well as in oral and craniofacial muscles, however, the distribution of CGRP-immunoreactivity was barely affected by the mutation. The morphology of muscle fibers and the distribution of cell nuclei within them were also similar in wild type and dmu mice. In the lumbar spinal cord of dmu mice, CGRP-immunoreactive density of spinal motoneurons increased. These findings suggest that the atrophic degeneration in some fore and hind limb muscles of dmu mice may increase CGRP expression in their motoneurons.

#### 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4件)

1. Sato T, Shimizu Y, Kano M, Suzuki T, Kanetaka H, Chu LW, Côté PD, Shimauchi H, Ichikawa H, Increase of CGRP

Expression in Motor Endplates Within Fore and Hind Limb Muscles of the Degenerating Muscle Mouse (Scn8a (dmu)). Cell Mol Neurobiol., 卷未定、査読有、2011年、印刷中

2. Ichikawa H, Kano M, Shimizu Y, Suzuki T, Sawada E, Ono W, Chu LW, Côté PD, Increase of c-Fos and c-Jun Expression in Spinal and Cranial Motoneurons of the Degenerating Muscle Mouse (Scn8a (dmu)). Cell Mol Neurobiol., 査読有、2010年、30: 737-742.
3. Ichikawa H, Terayama R, Yamaai T, De Repentigny Y, Kothary R, Sugimoto T, The number of nociceptors in the trigeminal ganglion but not proprioceptors in the mesencephalic trigeminal tract nucleus is reduced in dystonin deficient dystonia musculorum mice. Brain Res. 査読有、2008, 1226:33-38.
4. Ichikawa H, Terayama R, Yamaai T, De Repentigny Y, Kothary R, Sugimoto T, Dystonin deficiency reduces taste buds and fungiform papillae in the anterior part of the tongue. 査読有、Brain Res. 2007, 1129:142-146.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

市川 博之 (ICHIKAWA HIROYUKI)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 20193435

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号: