

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10169

研究課題名（和文）遺伝性口顎部ジストニアの病態解明に向けた神経基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the neural mechanisms of genetic oral-dystonia

研究代表者

黒瀬 雅之（Kurose, Masayuki）

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：40397162

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：不随意の筋活動により運動動作が障害されるジストニアの1つである口顎部（オーラル）ジストニアは、詳細な病態が明らかになっていません。そこで、全身性ジストニア様の運動障害を呈するDst遺伝子変異マウスを用いて、顎口腔系で発症する不随意運動の原因部位の探索について研究を行いました。その結果、咀嚼運動時に不随意運動を呈する動物で、円滑な下顎運動の遂行に重要な求心性情報を提供する感覚神経線維の明確な変性が、免疫組織学的研究により明らかとなりました。これにより、顎口腔系での不随意運動の発症には、Dst遺伝子変異による感覚神経細胞の変異が大きく影響を及ぼすことが示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不随意の筋の協調障害により運動動作が障害されるジストニアの一症状である口顎部（オーラル）ジストニアは、詳細な病態が明らかになっておらず疾患に対する理解が進んでいません。本研究では、ジストニア遺伝子変位による感覚神経細胞の変性が、口顎部（オーラル）ジストニアの症状を誘発していることが示唆される研究成果が得られました。今後の研究により、新しい治療戦略を構築する上での基盤となる知識を提供出来ることが期待されます。

研究成果の概要（英文）：Oral dystonia is known for common type of dystonia in which jaw movements are impaired due to involuntary muscle activity, however, pathogenesis of this disease is not completely understood. Therefore, we used Dst mutant mice to confirm the responsible neural pathway for evoking involuntary movements in orofacial region. Immunohistological studies have revealed that distinct degeneration of sensory nerve fibers that provide important afferent information for the smooth mandibular movements during mastication and swallowing. This results suggest that mutations in sensory neurons innervated ofofacial regions caused by Dst mutations have a major factor on the developing the involuntary jaw movements.

研究分野：口腔生理学

キーワード：ジストニア オーラルジストニア 不随意運動 神経変性 咀嚼 嚥下

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「異常な筋収縮により運動動作が障害される病態」として定義されるジストニアの大部分は、発症機構が不明な遺伝性疾患であり円滑な運動を妨げる不随意の筋の協調障害 (共収縮) が運動的特徴とされる。咀嚼筋の持続的な異常筋収縮や共収縮を特徴とする顎口腔領域で見られる不随意運動は、全身性ジストニアの一症状として発現する場合と局所的に発現する場合を含めて口顎部(オーラル)ジストニアと呼ばれている。その発症要因は、遺伝性素因と獲得性素因が混在している。よって、その対処が一樣とはならず対症療法が主たる選択肢となり、患者の QOL を著しく低下する疾患であることから病態解明が待たれている。

神経性の難治性疾患であるジストニアの詳細な病態は明らかにされていない。分担研究者らは、全身性ジストニア様の運動障害を示す *dystonia musculorum* (*dt* マウス) の運動的特徴を検索する中で、ヒトの病態と類似する筋の協調障害 (共収縮) を報告してきた (Horie M et al. Characterization of novel dystonia musculorum mutant mice; Implications for central nervous system abnormality. *Neurobiol Dis.* 2016 Dec;96:271-283)。*dt* マウスの表現型は、細胞骨格リンカータンパク質をコードする遺伝子 *Dystonin* (*Dst*: 別名 *BPAG1*) の変異により生ずるとされる (Brown A et al The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nat Genet.* 1995 Jul;10(3):301-6)。近年、ヒト *Dst* 遺伝子に異常のある遺伝病として遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー型 (*HSAN6*) が報告され、*Dst* 遺伝子変異による病態解明の機運が高まっている。研究代表者らは、*Dst* の条件付き遺伝子トランプマウス(全身的な *Dst* 遺伝子の発現を抑制したマウス: *DstGt* マウス)を作製し、咀嚼運動時の共収縮 安静時での異常筋収縮という *DstGt* マウスの示す表現型を明らかとしてきた (Hossain MI et al Motoneuron degeneration in the trigeminal motor nucleus innervating the masseter muscle in Dystonia musculorum mice. *Neurochem Int.* 2018 Oct;119:159-170)。これら表現型は、口顎部ジストニア患者の病態と類似しており、*Dst* 遺伝子変異による神経障害を基盤とした口顎部ジストニアの病態解明や新しい治療戦略の確立に役立つ知識の提供に繋がることが期待される。

### 2. 研究の目的

全身性ジストニアは、大脳基底核に病変が見られることが多く、基底核を中心とした回路異常が発症機構の 1 つとされる。それに加え、脳幹・脊髄あるいは末梢神経の障害でも発症することが臨床・病理解析から明らかとなっている。ジストニア患者で障害が顕著な歩行や咀嚼といった半自動運動は、脳幹の神経細胞に刻まれたプログラムに従い関連筋が動作し遂行されるが、円滑な遂行には筋紡錘などからの感覚情報を基にしたプログラム修正が必須である。

研究代表者らは、*Dst* 遺伝子変異の歩行動作に及ぼす影響を組織・運動解析から行い、神経細胞の変性を意味するニューロフィラメントの脳幹部特に運動調節に関連する領域での蓄積 感覚ニューロンとシュワン細胞の形成不全 Hoffmann 反射での感覚ニューロン由来の H 波の遅延と減弱を報告してきた。

そこで、顎運動に拘わる脳幹部そして筋紡錘・歯根膜などからの感覚ニューロンを、顎口腔領域での不随意運動発症に関連する主要な原因部位と仮説を立て、脳幹と感覚ニューロンの其々に選択的な Cre マウスを用いて *Dst cKO* マウス(部位選択的に *Dst* 遺伝子の発現を抑制したマウス)を作成し、*Dst* 遺伝子を抑制した際の表現型を *Dst cRescue* マウス(部位選択的に *Dst* 遺伝子の発現を回復したマウス)を作成し、*Dst* 遺伝子を回復した際の表現型を、電気生理学・組織学的に解析し原因部位を明らかとし、顎口腔系で発症する不随意運動の原因部位を探索することを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

実験動物の作成: *DstGt* マウスでは、*Cre* と *FLP* の部位特定の組換え酵素により、遺伝子トランプの向きを 2 回逆位が可能で、1 回目の逆位に *Cre* を作用させ *cRescue* マウスを、2 回目の逆位に *Cre* を作用させ *cKO* マウスを作成出来る。この手法を用いて、実験動物の作成を行い、それらを対象に電気生理学的並びに免疫組織学的実験を実施した。

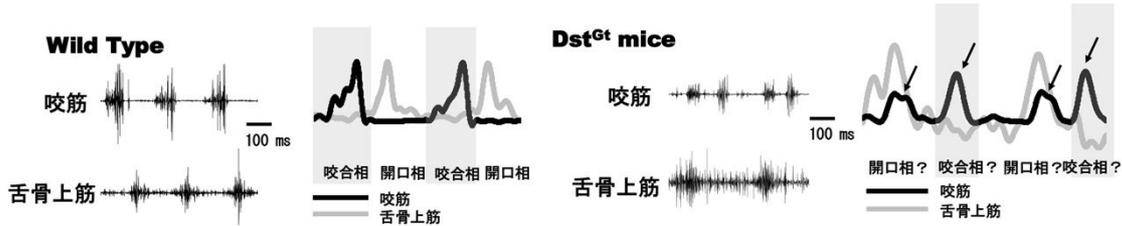
顎口腔系での表現型(運動)解析;咀嚼時・嚥下の運動解析を実施するため、閉口筋である咬筋と開口筋である舌骨上筋群に筋電図記録用電極を刺入した。実験動物は、電極刺入手術後 2 日間の回復期間を設け、頭部に設置したコネクタに出力用ケーブルを記録毎に装着し、自由行動下で提示した飼料(ペレットやチーズ)を咀嚼させた。一連の咀嚼から嚥下に至る運動様式の記録を行い、それぞれの筋活動の onset と offset、筋活動量の解析を行った。

免疫組織学的実験;運動解析実験終了後、灌流固定を行い、三叉神経節を採取し、4%PFA/0.1 M PB で一晩固定し、切片作成のためにパラフィン包埋を行った。パラフィン包埋した三叉神経節をミクロトームを用いて薄切し、10 μm 厚のパラフィン 1 刀片を作製した。作成したパラフィン包埋した三叉神経節を、ストレスマーカーである ATF3 抗体を用いて通常通りに免疫染色を行

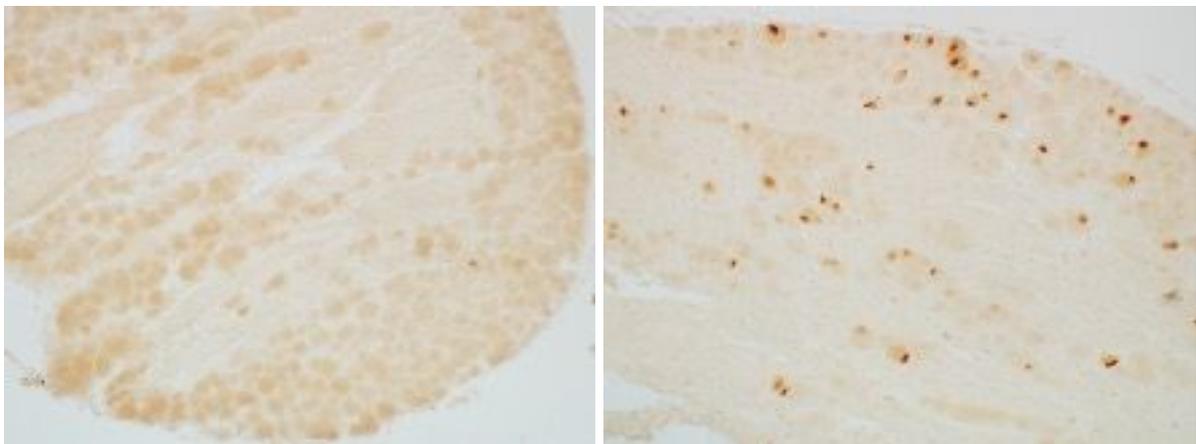
った。

#### 4. 研究成果

咀嚼運動解析；*Wild type* では、閉口筋と舌骨上筋群の onset と offset のタイミングが明確な筋活動が観察されたのに対して、*DstGt* マウスでは、咬筋の活動中に舌骨上筋群の onset が入るなど、開口相と咬合相が明確に区分できない相が頻発した。特に、舌骨上筋群の活動に onset と offset が明確ではなかった（下図）。*Dst* 遺伝子を選択的に抑制することで、感覚神経細胞を選択的に変性させた *Dst cKO* マウスにおいては、舌骨上筋群の onset と offset が明確ではない運動様式を示したことに加え、安静時において咬筋と舌骨上筋群の同時に生じるなど、twitch 様な筋活動が頻発した。



三叉神経節を対象とした免疫組織学的解析；*DstGt* マウス並びに *Dst cKO* マウスでは、三叉神経節においてストレスマーカーである ATF3 の有意な増加が観察された（下図）。*Wild type* では、ATF3 の発現が見られないことから、*DstGt* マウス並びに *Dst cKO* マウスで、*Dst* 遺伝子欠損による神経細胞維持が十分ではなく、ATF3 の発現が誘導されたと言える。



電気生理学的並び免疫組織学的実験の結果から、感覚神経細胞の変性による求心性情報の低下により円滑な咀嚼運動遂行へのフィードバック低下顎反射の抑制が生じたことが示唆される。*Dst* 遺伝子欠損が、顎口腔系における不随意運動の発症の一因であると考えられる。今度は、*Dst cRescue* マウスを用いた実験を継続し、*Dst cKO* マウスの運動障害が、*Dst* 由来か否かを明確とし、論文発表に繋げたい。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshioka Nozomu, Kurose Masayuki, Yano Masato, Tran Dang Minh, Okuda Shujiro, Mori-Ochiai Yukiko, Horie Masao, Nagai Toshihiro, Nishino Ichizo, Shibata Shinsuke, Takebayashi Hirohide	4. 巻 11
2. 論文標題 Isoform-specific mutation in Dystonin-b gene causes late-onset protein aggregate myopathy and cardiomyopathy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e78419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.78419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Yurie, Nihara Jun, Trakanant Supaluk, Kudo Takehisa, Seo Kenji, Iida Izumi, Izumi Kenji, Kurose Masayuki, Shimomura Yutaka, Terunuma Miho, Maeda Takeyasu, Ohazama Atsushi	4. 巻 173
2. 論文標題 Perivascular Hedgehog responsive cells play a critical role in peripheral nerve regeneration via controlling angiogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 62～70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2021.06.003	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉岡望, 黒瀬雅之, 竹林浩秀
2. 発表標題 dystonia musculorumマウスの運動失調に関わる神経回路異常の解析
3. 学会等名 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022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
研究 分 担 者	竹林 浩秀  (Takebayashi Hirohide)  (60353439)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	吉岡 望  (Yoshioka Nozomu)  (20708375)	新潟大学・医歯学系・助教    (13101)	
研究分担者	山村 健介  (Yamamura Kensuke)  (90272822)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	
研究分担者	佐藤 大祐  (Sato Taisuke)  (70778703)	新潟大学・研究推進機構・助教    (13101)	
研究分担者	森川 和政  (Morikawa Kazumasa)  (70514686)	岩手医科大学・歯学部・教授    (31201)	
研究分担者	岡本 圭一郎  (Okamoto Keiichiro)  (50382338)	新潟大学・医歯学系・准教授    (13101)	

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