

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700351

研究課題名(和文)新規ジストニアモデルマウスを用いた病態の解明

研究課題名(英文)Pathological analysis for mouse model showing dystonia

## 研究代表者

堀江 正男 (HORIE, Masao)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：70322716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ジストニアは四肢および体幹の捻転と拮抗筋の同時収縮を主徴とする難治性の神経疾患であるが、その病態については不明な点が多い。本研究はジストニアの病態を明らかにすることを目的とし、我々が作製したジストニア様症状を示すマウスの解析を行った。その結果、本マウスでは中枢神経系と末梢神経系の両方に変性が生じており、特に、脳内の複数の運動性・感覚性領域において、骨格タンパクが細胞体や軸索に異常に蓄積する変性所見を認めた。

研究成果の概要(英文)：Dystonia is a disorder characterized by involuntary muscle contractions that cause slow repetitive movements, abnormal postures, or both. We had generated a novel Dystonin gene trap (DstGt) mice, in which actin-binding domain-containing isoforms are disrupted. Homozygous DstGt mice showed typical progressive neurological symptoms: severe motor disorders in their limbs and twisted postures. Electromyogram showed abnormal co-contractions of agonist and antagonist muscle in DstGt homozygotes. In histological analyses, abnormal neurofilament accumulation was observed in both peripheral and central nervous system. In order to know the abnormal neural regions possibly affecting the motor disorder in these mice, we mapped the distribution of abnormal neurofilament protein and found that it mainly concentrated in the motor-related neurons, suggesting that they are involved in the abnormal motor phenotype in DstGt.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ジストニア ジストニン マウス 中枢神経系 末梢神経系

### 1. 研究開始当初の背景

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運動が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。ジストニア様の症状を示す *Dystonin(Dst)* の一つのアイソフォームを欠失した新規遺伝子変異マウスは、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。しかし、*Dst* 遺伝子変異マウスの中枢神経系における病態そしてジストニア発症と中枢・末梢神経系における責任領域との関係等、病態解明に直結する部分は依然未解明である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は申請者らが作製した *Dst* 遺伝子変異マウス (*Dst<sup>Gt/Gt</sup>* マウス) を用いてジストニア発症と中枢・末梢神経系の責任領域との関係など、これまで十分理解されていなかったジストニアの病態について組織学、電気生理学、そして分子生物学的手法を用いて解明し、治療法の開発に役立てることである。

### 3. 研究の方法

*Dst<sup>Gt</sup>* マウスを用いたジストニアの病態を理解するため、以下の方法を用いて解析を進めた。  
(1) 初めに *Dst<sup>Gt</sup>* マウスにおけるジストニア症状の有無について、肉眼観察および電気生理学的手法 (拮抗筋の筋電図測定) により確認した。

(2) *Dst<sup>Gt</sup>* マウスの神経系 (中枢および末梢神経系) における病態を理解するため、*Dst<sup>Gt</sup>* マウスと正常マウスの脳、脊髄および後根神経節の組織標本作製し、組織学的手法を用いて解析した。具体的には、作製した組織標本を用いて、神経細胞やグリア細胞の形態を観察するために色素染色 (ヘマトキシリン・エオジン染色等) を、また種々の機能分子の発現様式を観察するため、mRNA 発現を検出する *in situ hybridization* 法、タンパクを検出する免疫組織化学法を行い、所見の解析を行った。

(3) *Dst<sup>Gt</sup>* マウスは Cre 組換え酵素により部位特異的に *Dst* タンパクを不活性化あるいは正常化できるように設計されている。本研究では、ジストニア症状の原因領域を同定するため、【1】全身【2】末梢神経系【3】中枢神経系【4】小脳【5】GABA 神経細胞【6】変性神経核特異的に Cre 組換え酵素を発現させて *Dst* タンパクを不活性化するアレルを作製し (コンディショナル実験) ジストニア症状の有無を運動所見および上肢表面筋電図解析により確認した後、種々の組織学的解析を行

った。

### 4. 研究成果

(1) *Dst<sup>Gt</sup>* マウスでは、生後 10 日目頃から四肢や体幹が捻れる捻転性運動異常が見られ始め、その後、日齢と共に捻転性運動異常は高頻度で起こるようになった (図 1A)。この捻転性運動異常がジストニアであることを確認するため、上腕二頭筋と三頭筋の筋電図を測定した結果、ジストニアの特徴である主動筋と拮抗筋のリズミクな同時収縮が高頻度で生じていることから (図 1B)、捻転性運動異常がジストニアの特徴を良く現していることが分かった。以上の結果から、*Dst<sup>Gt</sup>* マウスがジストニアモデルマウスとして有用であることを確認した。

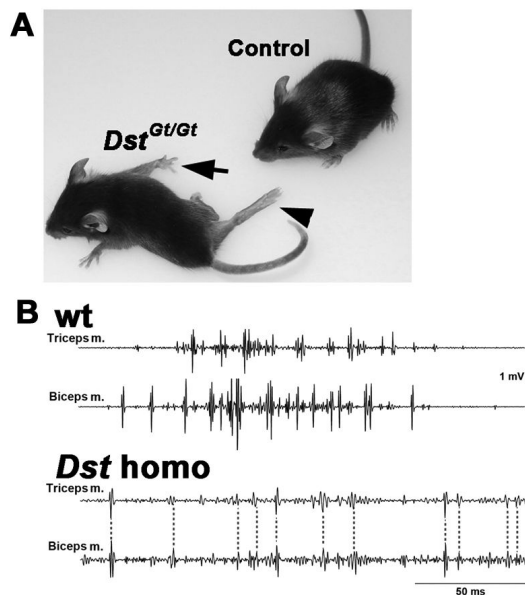


図 1 *Dst<sup>Gt</sup>* マウス (A の *Dst<sup>Gt/Gt</sup>*、B の *Dst homo*) とその同腹子のコントロール (A の Control、B の wt) および上肢の筋電図。図中の点線部分は拮抗筋の同時収縮を示す。

(2) *Dst* 変異マウスの組織学的な特徴として、末梢感覚神経節および脊髄に細胞骨格タンパクであるニューロフィラメントの異常な蓄積が生じること、また脳幹の三叉神経運動核ニューロンが脱落するなどの異常が報告されている。我々は *Dst<sup>Gt</sup>* マウスにおいても上記の神経領域に、他の *Dst* 変異マウスと同様の変性所見を確認し (図 2)、さらに、これまで報告に無い、脳内の複数の運動性 (大脳皮質運動野、脳幹網様体および外側前庭神経核など)・感覚性領域 (大脳皮質体性感覚・視覚・聴覚野、三叉神経主知覚など) の神経細胞の細胞体や軸索にニューロフィラメントの異常な蓄積を認めた (図 3)。

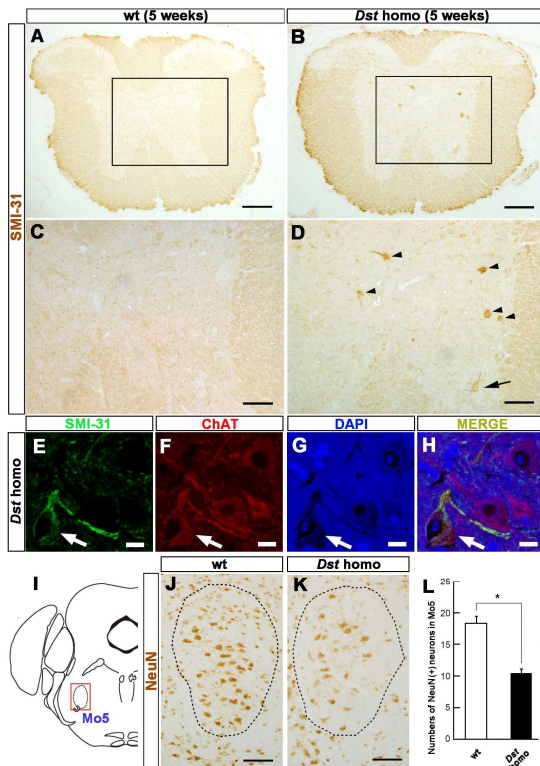


図2 野生型 (wt) と *Dst<sup>Gt</sup>* マウス (*Dst homo*) の脊髄における異常ニューロフィラメントの免疫染色像 (A-H) および三叉神経運動核ニューロンの脱落を示す所見 (I-L)。

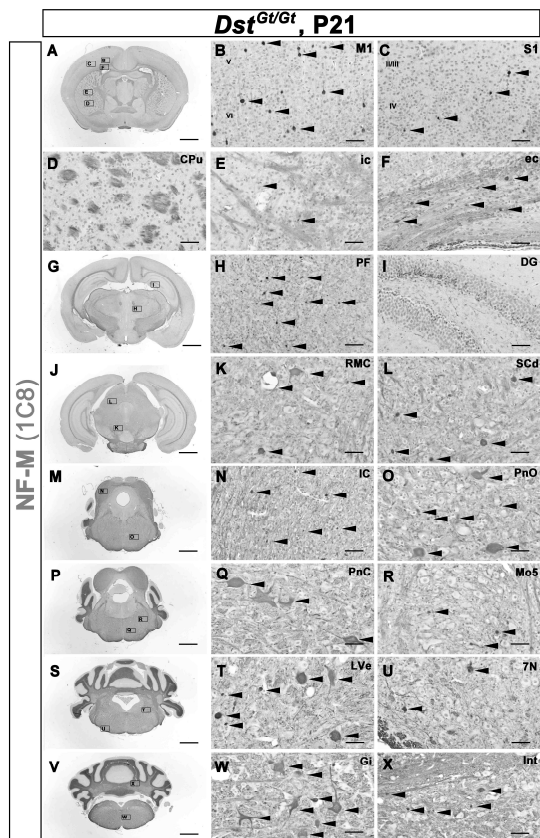


図3 *Dst<sup>Gt</sup>* マウス脳内で見られる異常なニューロフィラメント (NF-M) の免疫陽性所見。略語; M1: 大脳皮質運動野、S1: 大脳皮質体性感覚野、CPu: 線条体、ic: 内包、ec:

外包、PF: 束傍核、DG: 歯状核、RMC: 赤核、SCd: 上丘深層、IC: 下丘、PnO: 橋網様体口唇部、PnC: 橋網様体尾側核、Mo5: 三叉神経運動核、LVe: 外側前庭神経核、7N: 顔面神経核、Gi: 脳幹網様体巨大細胞核、Int: 小脳核中位核

(3) *Dst<sup>Gt</sup>* マウスのジストニア症状を生み出す原因神経領域を同定するため、【1】全身【2】末梢神経系【3】中枢神経系【4】小脳【5】GABA神経細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現させて *Dst* タンパクを不活性化するコンディショナル実験を行った。その結果、いずれのコンディショナル実験マウスにおいても、ジストニアは認められなかったが、全身あるいは末梢神経系特異的に *Dst* タンパクを不活性化させたコンディショナル実験マウスは生後3ヶ月くらいから、後肢を大きく広げるなどの小脳失調様運動異常を示した。

(4) (2) で変性が認められた運動性領域特異的に異常ジストニンを発現させるコンディショナル実験を行った結果、コンディショナル実験マウスは頭部および体幹の偏倚を示し、旋回運動を頻繁に行うなどの運動異常が現れたが、ジストニアの特徴である四肢・体幹の捻転は生じなかった。

#### 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2件)

竹林浩秀、堀江正男、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、新潟医学会誌、査読無、129巻、2015、491-497.

Horie M, Watanabe K, Bepari AK, Nashimoto J, Araki K, Sano H, Chiken S, Nambu A, Ono K, Ikenaka K, Kakita K, Yamamura K, Takebayashi H. Disruption of actin-binding domain-containing dystonin protein causes *dystonia musculorum* in mice, *European Journal of Neuroscience*, 査読有、40巻、2014、3458-3471. DOI: 10.1111/ejn.12711.

〔学会発表〕(計9件)

堀江正男、竹林浩秀、Analyses of mouse model showing dystonia with sensory neurodegeneration、第121回日本解剖学会、2016年3月27日から2016年3月30日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

堀江正男、佐野裕美、知見聡美、小林憲太、小野勝彦、南部篤、竹林浩秀、Examination for possible involvement of the vestibular and reticular nuclei in the emergence for dystonia-like movements in

Dystonin-deficient mice、第38回日本神経科学大会、2015年7月21日から2015年7月31日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

Masao Horie, Hiromi Sano, Satomi Chiken, Kenta Kobayashi, Katsuhiko Ono, Atsushi Nambu, Hirohide Takebayashi, Histological analysis of the brain in Dystonin-deficient mice、第120回日本解剖学会、2015年3月21日から2015年3月23日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

堀江正男、Dystonin 変異ジストニアモデルマウスにおけるニューロン・グリアの表現型解析、第20回グリアクラブ、2015年1月26日から2015年1月28日、KKR はこだて(北海道、函館市)

Masao Horie, Hiromi Sano, Satomi Chiken, Kenta Kobayashi, Katsuhiko Ono, Atsushi Nambu, Hirohide Takebayashi, Examination of possible involvement of the vestibular and reticular nuclei in the emergence for dystonia-like movements in Dystonin-deficient mice、第37回日本神経科学大会、2014年9月11日から2014年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

堀江正男、渡辺啓介、佐野裕美、梨本淳一郎、知見聡美、南部篤、小野勝彦、柿田明美、竹林浩秀、Histological analysis of the brain in Dystonin-deficient mice、第119回日本解剖学会、2014年3月27日から2014年3月29日、自治医科大キャンパス(栃木県下野市)

堀江正男、渡辺啓介、ベパリオシム、竹林浩秀、Essential role of actin binding domain-containing Dystonin in the pathogenesis of dystonia musculorum、第23回国際形態科学学会、2013年9月10日から2013年9月13日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市)

堀江正男、渡辺啓介、ベパリオシム、梨本淳一郎、荒木喜美、小野勝彦、池田一裕、柿田明美、山村研一、竹林浩秀、Essential role of actin binding domain-containing Dystonin in the pathogenesis of dystonia musculorum、第37回峠の会、2013年8月2日から2013年8月3日、リゾートインぼなり(福島県猪苗代町)

堀江正男、渡辺啓介、Asim K Bepari、荒木喜美、小野勝彦、池田一裕、竹林浩秀、Dystonin 遺伝子改変ジストニアモデルマウスにおける原因遺伝子発現領域の解析、第118回日本解剖学会、2013年3月28日から

2013年3月30日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場(香川県高松市)

〔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  
堀江 正男(HORIE Masao)  
新潟大学・医歯学系・講師  
研究者番号：70322716

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：