

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

新潟大学大学院医歯学総合研究科神経生物・解剖学分野

Generation and Analysis of Novel Dystonia Model Mice

Hirohide TAKEBAYASHI and Masao HORIE

Division of Neurobiology and Anatomy, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

要 旨

我々は、アクチン結合部位やチューブリン結合部位をもつ細胞骨格制御因子 Dystonin (Dst) をコードする遺伝子を破壊した *Dst* 遺伝子トラップマウス (*Dst*^{Gt} マウス) を作製し、ジストニア症状を示す遺伝性神経難病モデルマウスの確立に成功した。 *Dst*^{Gt} ホモマウスは、自然発生変異マウスの *dystonia musculorum* マウスと同様の運動障害と感覚神経の変性像を示した。本マウスは、ジストニアなどの運動障害、感覚性ニューロパチーの病態解析、および、治療標的の同定に有用なモデルマウスであると考えられる。

キーワード：ジストニア, *dystonin*, *dystonia musculorum* マウス, コンディショナル・ノックアウト実験, コンディショナル・レスキュー実験

はじめに

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。ジストニアを特徴付ける症候には、[1] ジストニア姿勢（筋緊張亢進により硬直した姿勢異常）、[2] ジストニア運動（四肢

や体幹の捻転を含む、緩慢で持続的な不随意運動）、[3] 動作性ジストニア（目的運動の際に特定の筋群や広範な筋群に発現し、目的運動を妨げるような不随意運動）の3つが知られている。ジストニアは、原因が特定できない一次性ジストニア（primary dystonia）と、脳卒中や脳炎など他の疾患に伴って生ずる、原因が推定される二次性ジ

Reprint requests to: Hirohide TAKEBAYASHI
Division of Neurobiology and Anatomy,
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences,
1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
神経生物・解剖学分野

竹林 浩秀

ストニア (secondary dystonia) に分類される。一次性はさらに遺伝性、非遺伝性 (特発性) に分類される。上記のジストニアの3つの症候は一次性、二次性ジストニアの両方に認められる。我が国におけるジストニアの発症頻度は人口10万人あたり15-20人程度であることから、現在約2万人のジストニア患者がいると推定される¹⁾。ジストニアは日常生活に困難をきたす場合もあり、患者への負担も大きく、一刻も早い治療法の確立が求められているが、ジストニア病態の詳細については、未だ解明されていない。この理由として、ジストニアは他の運動失調と異なり、神経変性像がほとんど見つかっていないことが挙げられる。近年、神経機能画像解析などにより、ジストニア患者の脳内では大脳基底核や小脳活動に異常があること²⁾⁻⁴⁾、感覚情報統合機能に問題があること⁵⁾などがわかってきている。また、大脳基底核の一つである淡蒼球内節を持続的に刺激する脳深部刺激療法 (Deep Brain Stimulation: DBS) がジストニアの有効な治療法の一つとして知られており⁶⁾、現在では小脳系を含めた大脳基底核を中心とする神経回路の異常がその病態機序として考えられている²⁾⁻⁴⁾。

神経系疾患に限らず、種々の疾患の病態を明らかにするためには、動物モデルを確立することが有用である。単一遺伝子の変異による遺伝性疾患であれば、原因遺伝子に同様の変異をもつ遺伝子改変動物を作製することによりモデル動物を作出し、その病態を調べることが可能である。また、パーキンソン病の様に、特定細胞の欠損 (パーキンソン病では中脳ドーパミンニューロンが欠損) に起因する疾患であれば、その細胞 (ニューロンや神経伝導路) へ選択的に傷害を与えることでモデル動物を作出し、その病態を調べることが可能である。ジストニアに関しては、DYTと名付けられた約20の遺伝性ジストニアの遺伝子座が知られている⁷⁾⁸⁾が、原因遺伝子に関連したモデル動物をもちいた詳細な解析が遅れている。その理由として、遺伝性ジストニアには浸透率 (penetration rate) が低いものがあること、そして、同様の遺伝子変異をもつモデル動物を作製してもジス

トニア症状が現れない場合があること、などが挙げられる。最近になって、ヒトジストニアに類似した症状を示すDYT1ジストニアモデルマウスがCre/loxPシステムを駆使して作製された⁹⁾。現在、我々は、四肢や体幹に捻転運動が生じる捻転ジストニアに類似した症状を示す*dystonia musculorum* マウスを用いて、神経解剖学、電気生理学、そして、分子生物学的手法を用いて、これまで十分理解されていなかったジストニア、および、本マウスの感覚神経変性の病態解明を試みている。

ジストニア症状を示す*dystonia musculorum* マウス

dystonia musculorum (*dt*) マウスは、遺伝性感覚性ニューロパチーを示す自然発症のミュータントマウスであり、1963年にDuchenらによって報告された¹⁰⁾。このマウスは生後2週間後から四肢や体幹が捻転するジストニア様の症状を示すことからその名が付けられた。*dt* マウスの感覚神経の異常については、座骨神経中の有髄線維およびシュワン細胞の数が野生型に比して少ないこと、そして、有髄線維および無髄線維に多数の異常な膨張部が観察されることがJanotaにより報告された¹¹⁾。その後、MesserとStromingerは線条体や中脳赤核に、SoteloとGuenetは感覚神経からの入力を受ける中枢神経系の神経細胞に組織学的異常が生じることを報告¹²⁾¹³⁾しており、末梢神経系および中枢神経系のそれぞれに異常があることが明らかとなった。*dt* マウスの原因遺伝子がマウス1番染色体上の*dytonin* であることは、1995年に2つのグループにより示された¹⁴⁾¹⁵⁾。Kotharyらのグループは、まず、*hsp68* プロモーター-*lacZ* のトランスジーンが挿入されたホモ接合マウスが*dt* マウス様の運動症状を生じることを見出した¹⁶⁾。この挿入変異を持つマウスを自然発生*dt* マウス (*dt^J* マウス) と交配させたところ、1/4の確率でジストニア様症状のマウスが生まれてくることから、トランスジーン挿入部位により破壊される遺伝子と*dt^J* マウスの原因遺伝子の遺伝的相補性が確かめられた。続いて、トランスジーン挿入部位がマウス1番染色体上の*bullous pemphigoid1* (BPAG1) 遺伝子のすぐ上

流にあることを確認し¹⁷⁾、さらに、トランスジーン
の挿入部位がBPAG1の神経系アイソフォームを
構成する領域であることをつきとめた¹⁴⁾。BPAG1
タンパク（別名：BP230）は自己免疫疾患である
水疱性類天疱瘡の自己抗原タンパクの一つとして
知られている¹⁸⁾¹⁹⁾が、Fuchsらのグループは、
BPAG1の機能を調べるためにBPAG1欠損マウ
スを作製し、ホモ接合体で*dt*マウスと同様の症
状を示すことを報告した¹⁵⁾。

dystonin 遺伝子はマウスゲノム上でおよそ30
万塩基対を有する巨大な遺伝子であり、これまで
に、その構造と機能について研究がなされてきた。
dystonin 遺伝子には複数の転写開始部位があり、
神経系に多く発現する *dystonin-a*、筋肉に多く
発現する *dystonin-b*、そして、皮膚にのみ発現す
る *dystonin-e* の3種類が確認されている。また
dystonin-a と *dystonin-b* については、ゲノム上
の異なるプロモーターの使用により、N末の異な
る3つのアイソフォーム（a1, a2, a3とb1, b2,
b3）が見つかった²⁰⁾²¹⁾。*dystonin* はその構
造中にアクチン結合ドメイン、チューブリン結合
ドメインなど複数の細胞骨格タンパク結合部位を
有し、F-アクチン、microtubule-associated pro-
tein 1A (MAP1A)、MAP2、ニューロフィラメン
ト、peripherin や clathrin などの細胞骨格タンパ
クと結合して、細胞骨格同士を結合させる作用を
持つと考えられている^{21)–25)}。*dystonin* に対する

抗体を用いた免疫染色の結果から、*dystonin* タン
パクはニューロンでは細胞体、樹状突起そして軸
索中に発現しており、これらの領域には細胞骨格
タンパクが豊富に存在していることも上記の考え
を支持している²³⁾。*dystonin* を欠損したマウスの
後根神経節では、感覚神経のニューロフィラメン
トの構築に異常があることが電子顕微鏡的所見に
より報告されている¹¹⁾²²⁾²³⁾。また近年、*dt* マウス
後根神経節を用いた培養系実験の結果から、*dys-*
tonin-a2 と MAP1B 間の相互作用が、感覚神経に
おける微小管の安定化、ゴルジ装置の維持と ER-
ゴルジ間の輸送に関わっていることが示唆されて
おり²⁶⁾、筋芽細胞の培養系においても *dys-*
tonin-a, b がゴルジ装置の維持に働いていること
が報告されている²⁷⁾。さらに、近年、ヒト *dys-*
tonin 遺伝子のC末の微小管結合ドメインの変異
は、遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー
(Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy
type 6: HSN6) の原因となっていることが報告
され²⁸⁾、*dt* マウスのヒト疾患モデルマウスとし
ての有用性が高まったと考えられる。

コンディショナル・アリアルをもつ *Dst* 遺伝子 トラップマウスの作製と病態解析

dystonin タンパクは末梢神経のみならず、中枢
神経系内にも広く発現しているため、どの部位の
dystonin タンパク発現がなくなることにより、*dt*

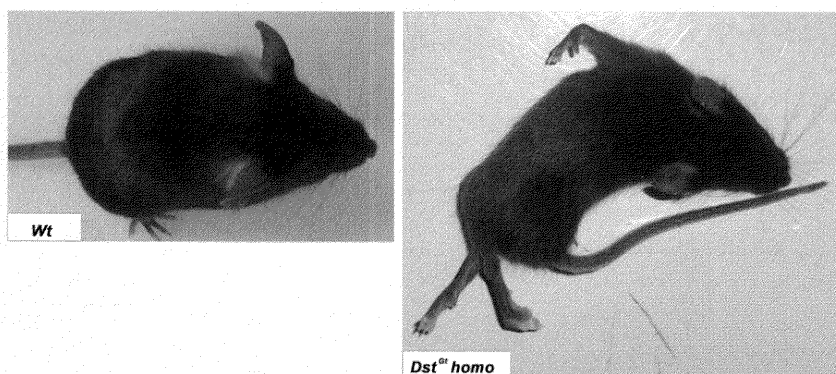


図1 ジストニア様症状を示す *Dst^{Gt}* ホモマウス

左は野生型のマウス、右は *Dst^{Gt}* ホモマウスであり、上肢や体幹の捻転、
下肢の伸展が観察される。

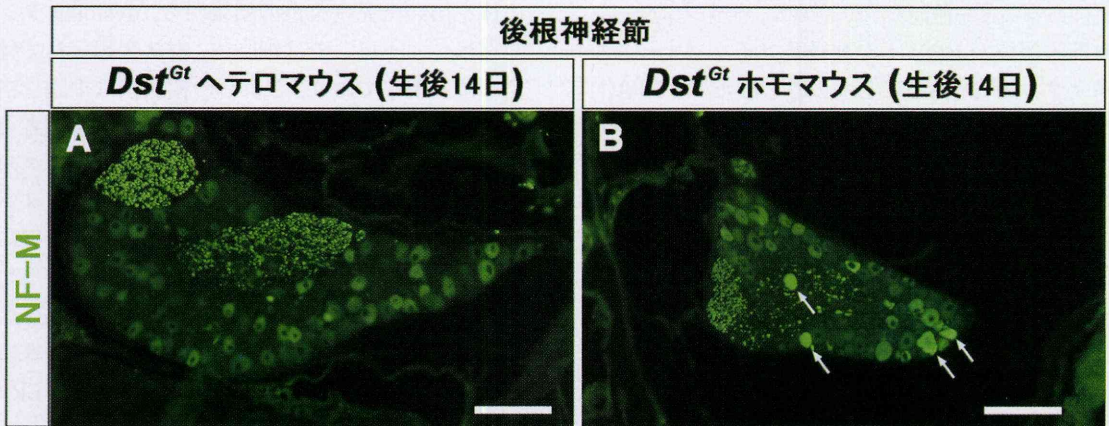
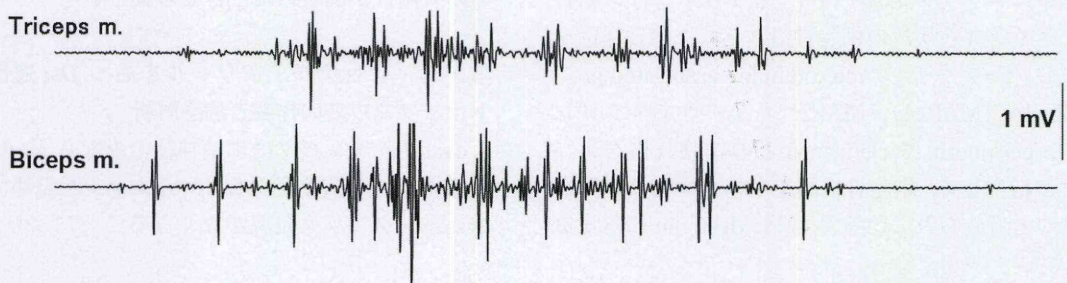


図2 後根神経節の感覚神経におけるニューロフィラメントの異常蓄積
Dst^{Gt} ホモマウスの後根神経節の感覚神経において神経細胞特異的な中間系フィラメントであるニューロフィラメントの異常蓄積(矢印)が認められる。抗NF-Mモノクローナル抗体(1C8)による染色像。スケールバー: 100 μ m。

野生型マウス



Dst^{Gt} ホモマウス

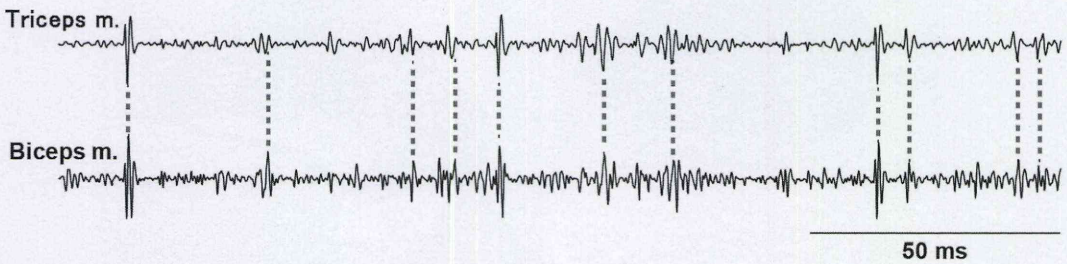


図3 マウス上肢における筋電図検査
Dst^{Gt} ホモマウスの上肢において、三頭筋(Triceps m.)と二頭筋(Biceps m.)が同時収縮していることがわかる(点線部分)。

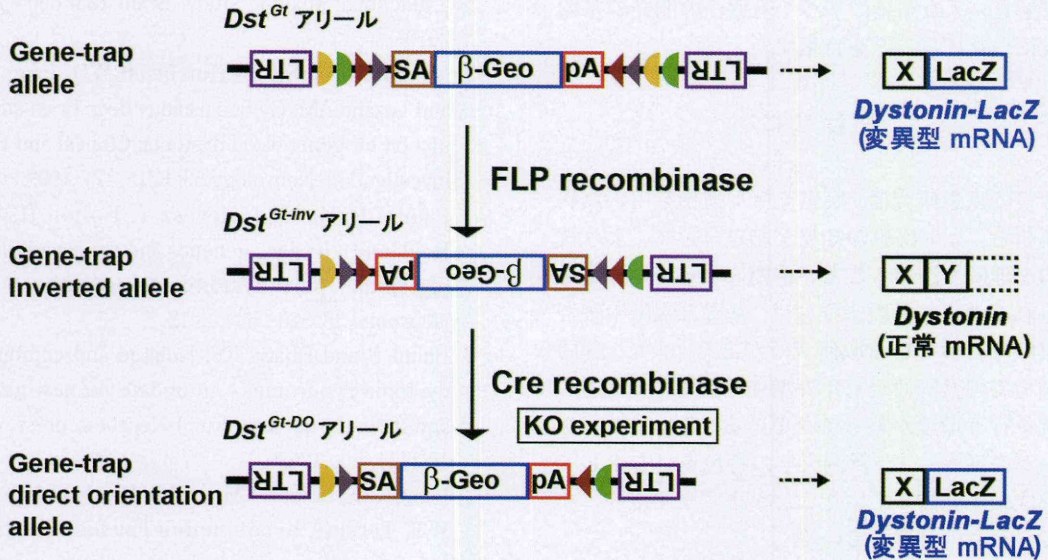


図4 遺伝子トラップアリール (Dst^{Gt}) のコンストラクトと部位特異的 DNA 組換え
 FLP 組換え酵素, あるいは, Cre 組換え酵素を作用させることにより, 遺伝子トラップアリールに FRT 配列, あるいは, loxP 配列の部位で逆位を誘導し, 変異アリール (Dst^{Gt}) から正常アリール (Dst^{Gt-inv}), あるいは, 正常アリール (Dst^{Gt-DO}) から変異アリール (Dst^{Gt-inv}) へ変換することが可能である. 様々な部位や細胞種特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウスと掛け合わせるにより, コンディショナル・レスキュー実験, あるいは, コンディショナル・ノックアウト実験が可能となる.

マウスの表現型を引き起こすのか? という問題には, 自然発生ミュータントマウスなどの全身ノックアウトマウスを調べる実験からは答えることができない. この問題にアプローチするために, 我々は, コンディショナル実験 (特定の領域や細胞種でのみ, 正常あるいは異常 dystonin を発現すること) が可能な *dystonin* トラップマウス (Dst^{Gt} マウス) を作製した²⁹⁾. Dst^{Gt} のホモ接合体では, *dt* マウスと同様に四肢や体幹の捻転運動が生じる他 (図1), 後根神経節の一次知覚ニューロンにおけるニューロフィラメントの異常蓄積が認められた (図2). さらに, 上肢の三頭筋と二頭筋の筋電図計測により, 上肢の主動筋と拮抗筋の同時収縮が高頻度で生じることを明らかにした (図3). この結果は Dst^{Gt} マウスがヒトのジストニアの病態に酷似しており, ジストニアモデルマウスとして有用であることを示している. さらに, 本マウスアリールは, Cre や FLP などの部位特異

的組換え酵素により, コンディショナル・アリールとして使用できるという特徴を有している (図4). 実際に, FLP マウス, あるいは, Cre マウスと交配することにより, 遺伝子トラップコンストラクトに逆位を誘導して, 遺伝子トラップが働かなくなることを確認している²⁹⁾. 今後, Dst^{Gt} マウスのコンディショナル・アリールとしての特性を生かして, コンディショナル・ノックアウト, コンディショナル・レスキュー実験を駆使し, ジストニア発症の原因となる神経系領域の同定を進めていくとともに, どの領域のジストニンを正常にすることにより, *dt* マウスの神経症状がどの程度軽減するか, ということを明らかにして, 治療標的となる神経領域 (細胞種) の同定を行っていく. さらに, 変性領域におけるニューロンの細胞内外の状態について組織学のおよび細胞生物学的な解析を進めていくことにより, 分子, 細胞レベルでの病態解析も進めていき, 神経難病の統合的

な理解と、その知見に基づく治療法の開発の基盤形成につなげることを目指す。

おわりに

今後の疾患研究は、疾患モデル動物を用いた病態解析と、ヒト疾患の知見と結び付けて、より統合的な理解を深めることが重要になっていくと考えられる³⁰⁾³¹⁾。新潟大学には、基礎と臨床の融合と実践を行っている脳研究所があり、また、部局を超えての共同研究も年々増加しており、上述の研究を行う環境が整ってきている。このアドバンテージを活かして、新潟大学の特色を打ち出して研究成果を発信していくことがますます重要になっていくものと考えている。

謝辞

本研究は、医学研究助成金(有任基金)、および、基盤研究(C)、若手研究(B)のご支援を頂き、生理学研究所・池中一裕先生、南部篤先生、京都府立医科大学・小野勝彦先生、熊本大学・山村研一先生、荒木喜美先生、新潟大学 脳研究所・柿田明美先生、解剖学第二のメンバーとの共同研究として推進しました。御礼申し上げます。

文 献

- 1) 梶 龍児：(2013) ジストニアのすべて—最新の治療指針— 診断と治療社。
- 2) Neychev VK, Fan X, Mitev VI, Hess EJ and Jinnah HA: The basal ganglia and cerebellum interact in the expression of dystonic movement. *Brain* 131: 2499 - 2509, 2008.
- 3) Stoessel AJ, Lehericy S and Strafella AP: Imaging insights into basal ganglia function, Parkinson's disease, and dystonia. *Lancet* 384: 532 - 544, 2014.
- 4) Shakkottai VG: Physiologic changes associated with cerebellar dystonia. *Cerebellum* 13: 637 - 644, 2014.
- 5) Carbon M, Argyean M and Habeck C: Increased sensorimotor network activity in DYT 1 dystonia: a functional imaging study. *Brain* 133: 690 - 700, 2010.
- 6) Kumar R, Dagher A, Hutchison WD, Lang AE and Lozano AM: Globus pallidus deep brain stimulation for generalized dystonia: Clinical and PET investigation. *Neurology* 53: 871 - 874, 1999.
- 7) Paudel R, Hardy J, Revesz T, Holton JL and Houlden H: Review: genetics and neuropathology of primary pure dystonia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38: 520 - 534, 2012.
- 8) Balint B and Bhatia KP: Isolated and combined dystonia syndromes - an update on new genes and their phenotypes. *Eur J Neurol* in press, doi: 10.1111/ene.12650.
- 9) Liang CC, Tanabe LM, Jou S, Chi F and Dauer WT: TorsinA hypofunction causes abnormal twisting movements and sensorimotor circuit neurodegeneration. *J Clin Invest* 124: 3080 - 3092, 2014.
- 10) Duchen LW, Falconer DSD and Strich SJ: Dystonia musculorum: a hereditary neuropathy of mice affecting mainly sensory pathways. *J Physiol* 165: 7 - 9, 1963.
- 11) Janota I: Ultrastructural studies of an hereditary sensory neuropathy in mice (dystonia musculorum). *Brain* 95: 529 - 536, 1972.
- 12) Messer A and Strominger NL: An allele of the mouse mutant Dystonia musculorum exhibits lesions in red nucleus and striatum. *Neuroscience* 5: 543 - 549, 1980.
- 13) Sotelo C and Guenet JL: Pathologic changes in the CNS of dystonia musculorum mutant mouse: An animal model for human spinocerebellar ataxia. *Neuroscience* 27: 403 - 424, 1988.
- 14) Brown A, Bernier G, Mathieu M, Rossant J and Kothary R: The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1. *Nat Genet* 10: 301 - 306, 1995.
- 15) Guo L, Degenstein L, Dowling J, Yu Q - C, Wollmann R, Perman B and Fuchs E: Gene targeting of BPAG1: abnormalities in mechanical strength and cell migration in stratified epithelia and neurologic degeneration. *Cell* 81: 233 - 243, 1995.

- 16) Kothary R, Clapoff S, Brown A, Campbell R, Peterson A and Rossant J: A transgene containing lacZ inserted into the dystonia locus is expressed in neural tube. *Nature* 335: 435 - 437, 1988.
 - 17) Brown A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Rossant J and Kothary R: The genomic structure of an insertional mutation in the dystonia musculorum locus. *Genomics*, 20, 371 - 376, 1994.
 - 18) Nishie W: Update on the pathogenesis of bullous pemphigoid: an autoantibody-mediated blistering disease targeting collagen XVII. *J Dermatol Sci* 73: 179 - 186, 2014.
 - 19) 平子善章, 尾張部克志: ヘミデスマソームとデスマソームの分子構築 生化学 第71巻第12号 1417 - 1432.
 - 20) Leung CL, Zheng M, Prater SM and Liem RK: The BPAG1 locus alternative splicing produces multiple isoforms with distinct cytoskeletal linker domains, including predominant isoforms in neurons and muscles. *J Cell Biol* 154: 691 - 698, 2001.
 - 21) Young KG and Kothary R: Dystonin/Bpag1 - a link to what? *Cell Motil Cytoskeleton* 64: 897 - 905, 2007.
 - 22) Yang Y, Dowling J, Yu Q - C, Kouklis P, Cleveland DW and Fuchs E: An essential cytoskeletal linker protein connecting actin microfilaments to intermediate filaments. *Cell*, 86: 655 - 665, 1996.
 - 23) Dalpé G, Leclerc N, Vallée A, Messer A, Mathieu M, De Repentigny Y and Kothary R: Dystonin is essential for maintaining neuronal cytoskeleton organization. *Mol Cell Neurosci* 10: 243 - 257, 1998.
 - 24) Leung CL, Sun D and Liem RK: The intermediate filament protein peripherin is the specific interaction partner of mouse BPAG1 - n (dystonin) in neurons. *J. Cell Biol* 144: 435 - 446, 1999.
 - 25) Bhanot K, Young GK and Kothary R: MAP1B and Clathrin are novel interacting partners of the giant cyto - linker dystonin. *J Proteome Res* 10: 5118 - 5127, 2011.
 - 26) Ryan SD, Bhanot K, Ferrier A, De Repentigny U, Chu A, Blais A and Kothary R: Microtubule stability, Golgi organization, and transport flux require dystonin - a2 - MAP1B interaction. *J Cell Biol* 196: 727 - 742, 2012.
 - 27) Poliakova K, Adebola A, Leung LC, Favre B, Liem RKH, Schepens I and Borradori L: BPAG1a and b associate with EB1 and EB3 and modulate vesicular transport, golgi apparatus structure, and cell migration in C2.7 myoblasts. *PLoS One* 9: e107535, 2014.
 - 28) Edvardson S, Cinnamon Y, Jalas C, Shaag A, Maayan C, Axelrod FB and Elpeleg O: Hereditary sensory autonomic neuropathy caused by a mutation in dystonin. *Ann Neurol* 71: 569 - 572, 2012.
 - 29) Horie M, Watanabe K, Bepari AK, Nashimoto J, Araki K, Sano H, Chiken S, Nambu A, Ono K, Ikenaka K, Kakita A, Yamamura K and Takebayashi H: Disruption of dystonin protein containing actin - binding domain cause *dystonia musculorum* in mice. *Eur J Neurosci* 40: 3458 - 3471, 2014.
 - 30) Watts JC and Prusiner SB: Mouse models for studying the formation and propagation of prions. *J Biol Chem* 289: 19841 - 19849, 2014.
 - 31) Hunn BH, Cragg SJ, Bolam JP, Spillantini MG and Wade - Martins R: Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 38: 178 - 188, 2015.
-