

小児の難治性てんかん症候群・ウエスト症候群/レット症候群の原因遺伝子 *CDKL5* の欠損が脳の興奮性を異常亢進するメカニズムの一端を解明

1. 発表者：

田中 輝幸（東京大学大学院医学系研究科 国際保健学専攻 発達医科学分野 准教授）
奥田 耕助（東京大学大学院医学系研究科 国際保健学専攻 発達医科学分野 博士）
水口 雅（東京大学大学院医学系研究科 国際保健学専攻 発達医科学分野 教授）
小林 静香（東京大学医科学研究所 基礎医科学部門 神経ネットワーク分野 助教）
真鍋 俊也（東京大学医科学研究所 基礎医科学部門 神経ネットワーク分野 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆ 小児の難治性てんかん症候群・ウエスト症候群（注1）/レット症候群（注2）の原因遺伝子 *CDKL5* を欠損させたマウスを作製し、このマウスでは脳の興奮性シナプス（注3）において興奮伝達を担う受容体の一型が過剰集積することで、ニューロンの興奮性が亢進し、痙攣感受性が異常亢進することを明らかにしました。
- ◆ これまで *CDKL5* 遺伝子変異によるてんかんの発症機序は全く分かっていませんでした。本研究は世界で初めて、*CDKL5* 欠損が脳の興奮性を異常亢進するメカニズムの一端を明らかにしたものです。
- ◆ 本研究は更に、過剰集積する受容体蛋白に対する阻害薬が *CDKL5* 欠損マウスのニューロンの興奮性と痙攣感受性の亢進を効果的に抑制することを示しました。これらの成果は、興奮性シナプス受容体を構成する蛋白質に特異的に作用する薬物が *CDKL5* 変異によるてんかんの治療原理となる可能性を示し、今後の治療法開発への重要な基盤となるものです。

3. 発表概要：

CDKL5 遺伝子の変異は、ウエスト症候群/レット症候群という小児の難治性てんかん症候群を引き起こしますが、これまでその発症機序は全く分かっていませんでした。

東京大学大学院医学系研究科発達医科学分野の田中輝幸准教授、奥田耕助博士らは、*CDKL5* を欠損させた *Cdkl5* ノックアウト(KO)マウスを作製し、東京大学医科学研究所神経ネットワーク分野の小林静香助教、真鍋俊也教授、北里大学医学部解剖学教室の深谷昌弘講師、阪上洋行教授らとの共同研究によって、このマウスでは脳の興奮性シナプスにおいて興奮性神経伝達物質を受け取る受容体の一型 (GluN2BタイプNMDA型) (注4) が過剰集積することで、ニューロンの興奮性が亢進し、痙攣感受性が異常亢進することを明らかにしました。更に過剰集積する受容体蛋白に対する阻害薬が *Cdkl5* KOマウスのニューロンの興奮性と痙攣感受性の亢進を効果的に抑制することを示しました。

本研究は世界で初めて、*CDKL5* 欠損が脳の興奮性を異常亢進するメカニズムの一端を明らかにすると共に、興奮性シナプス受容体を構成する蛋白質に特異的に作用する薬物が *CDKL5* 変異によるてんかんの治療原理となる可能性を示し、今後の小児難治性てんかんの分子病態機序と効果的治療法の解明への重要な基盤になるものです。

本研究成果は、学術誌 *Neurobiology of Disease* (2017年7月6日オンライン版) に掲載されました。

4. 発表内容：

(1) 研究の背景

Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) 遺伝子はXp22領域に位置し、セリン・スレオニン・キナーゼ CDKL5蛋白質をコードします。近年、小児の早期発症難治性てんかん症候群である、X連鎖性ウエスト症候群及びレット症候群の患児においてCDKL5遺伝子変異の報告が相次ぎ、最近の研究では、早期痙攣発作を発症した女兒の8~16%、早期痙攣発作に點頭てんかんを伴った女兒の28%において、CDKL5遺伝子の変異か欠失が同定されています。しかしその臨床的な重要性に拘わらず、CDKL5遺伝子変異によるてんかんの発症機序はこれまで全く分かっていませんでした。

(2) 研究の内容

東京大学大学院医学系研究科発達医学分野の田中輝幸准教授、奥田耕助博士らはCDKL5を欠損させた *Cdkl5* ノックアウト(KO)マウスを作製し、東京大学医科学研究所神経ネットワーク分野の小林静香助教、真鍋俊也教授、北里大学医学部解剖学教室の深谷昌弘講師、阪上洋行教授らと共同研究を行ってきました。その結果、*Cdkl5* KO マウスにおいて、

- ① NMDA (注5) という興奮性アミノ酸に対して強い痙攣感受性 (図1)、
 - ② 海馬 CA1 領域の電気生理学的解析によって、100Hz, 1 秒間刺激に対する長期増強 (LTP)試験における興奮性シナプス後電位 (EPSP)の増強、NMDA 型受容体を介した興奮性シナプス後電流 (NMDA-EPSC) / AMPA 型受容体を介した興奮性シナプス後電流 (AMPA-EPSC)の比 (NMDA/AMPA EPSC ratio) の増加、NMDA-EPSC の減衰時定数の増大、NMDA-EPSC の GluN2B 選択的阻害薬による強い抑制、
 - ③ 海馬シナプス蛋白の生化学的解析によって、興奮性シナプス後部における NMDA 型受容体サブユニット蛋白の一つ GluN2B 及び足場蛋白 SAP102 の有意な増加 (図2)、
 - ④ 海馬の免疫組織化学および免疫電子顕微鏡解析によって、興奮性シナプス後部における GluN2B 及び SAP102 の有意な過剰集積 (図3)、
 - ⑤ シナプス前ニューロンの活動性を反映する興奮性シナプス後部の GluN1 C2'/C2 比及びユビキチン化には変化なし、
 - ⑥ GluN2B 選択的阻害薬による、NMDA 痙攣感受性の抑制 (図4)、
- という、注目すべき所見が得られました。

これらの研究結果から、CDKL5 欠損は脳の興奮伝達を司る興奮性シナプスの後部に GluN2B タイプ NMDA 型受容体の過剰集積を来すことで、ニューロン興奮性を異常亢進し、痙攣感受性を亢進することが明らかとなりました。

(3) 社会的意義・今後の予定

本研究によって、CDKL5 は、興奮性シナプスにおいて GluN2B タイプ NMDA 型受容体の局在を制御する機能を持ち、それによってニューロンの興奮性と痙攣感受性を調節することが、世界で初めて明らかとなりました。更に GluN2B 選択的阻害薬が *Cdkl5* KO マウスの痙攣感受性とニューロンの興奮性の亢進を効果的に抑制するという結果から、興奮性シナプス受容体を構成する蛋白質に特異的に作用する薬物が CDKL5 変異によるてんかんの治療原理となる可能性を示しました。本研究成果は、小児難治性てんかんの分子病態機序と効果的治療法の解明への重要な基盤となります。今後更に CDKL5 変異に伴うてんかんの症状の細かい分子メカニズムの解明と、その治療と予防のための治療法の開発へ向けて、研究を進めていく予定です。

本研究は、科学研究費補助金、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク (包括脳)、厚生労働科学研究費補助金 (障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野))「レット症候群の早期診断と治療をめざした統合的研究」班、公益財団法人てんかん治療研究振興財団研究助成金、公益

財団法人母子健康協会小児医学研究助成、NPO 法人レット症候群支援機構研究助成の支援を得て行われました。

5. 発表雑誌：

雑誌名：Neurobiology of Disease（2017年7月6日オンライン版）

論文タイトル：CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility

著者：Kosuke Okuda*, Shizuka Kobayashi*, Masahiro Fukaya, Aya Watanabe, Takuto Murakami, Mai Hagiwara, Tempei Sato, Hiroe Ueno, Narumi Ogonuki, Sayaka Komano-Inoue, Hiroyuki Manabe, Masahiro Yamaguchi, Atsuo Ogura, Hiroshi Asahara, Hiroyuki Sakagami, Masashi Mizuguchi, Toshiya Manabe, Teruyuki Tanaka**（*共同第一著者、**責任著者）

DOI: 10.1016/j.nbd.2017.07.002

アブストラクトURL：<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.07.002>

6. 問い合わせ先：

東京大学大学院医学系研究科 国際保健学専攻 発達医科学分野

准教授 田中 輝幸（たなか てるゆき）

Tel: 03-5841-3516 (直通), 03-5841-3515 (教室代表) / Fax: 03-5841-3628 (教室代表)

E-mail: tetanaka@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

（注1）ウエスト症候群

主に乳児期、生後3-11ヵ月に発症する難治性のてんかんで別名「點頭てんかん」とも呼ばれる。出生1万に対し1~7の発生率。てんかん発作は、スパズム、別名「點頭てんかん発作」と呼ばれる、1から3秒程度の短い時間に四肢と頭部が瞬間的に強直する（力が入る）特異な発作が数秒~数十秒毎に繰り返し続く。この繰り返しをシリーズ形成と呼び、1日何回もシリーズ形成が出現する。脳波検査でヒプスアリスミアと呼ばれる著しく乱れたてんかん性異常波が特徴的で、多くの患者では精神運動発達の顕著な遅れを認める。小児慢性特定疾患。

（注2）レット症候群

女兒のみに発症する神経発達障害。1万~1万5千出生女兒に1人の発生率。乳児期から1歳半頃より言語・運動の退行と発達遅滞、もみ手様の常同運動、歩行障害、脳波異常、てんかん発作、情動異常が発症し、生涯持続する。約80%の典型例は、X染色体上 *Methyl CpG binding protein 2 (MECP2)* 遺伝子変異による。約20%の非典型例（早期てんかん発症型）の中で *Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)* 遺伝子変異が同定された。小児慢性特定疾患。

（注3）興奮性シナプス

ヒトの脳には約850億個のニューロン（神経細胞）が存在するが、ニューロン同士はシナプスと呼ばれる接合部を介して互いにつながり、信号を伝達していくことで、神経回路を形成し、脳の機能を体現する。

シナプスでは、2つのニューロンの突起同士が非常に狭い隙間（20 nm ナノメートル）を挟んで対面し、一方の面から神経伝達物質と呼ばれる化学物質が放出され、対面の受容体で受け取られる。この神経伝達物質を放出する側を「シナプス前部（放出する側のニューロンは、シ

ナプス前ニューロン)」、神経伝達物質を受け取る側を「シナプス後部(受け取る側のニューロンは、シナプス後ニューロン)」と呼ぶ。

シナプスには、シナプス後ニューロンの興奮(活動電位発生)を促進させる「興奮性シナプス」と、シナプス後ニューロンの興奮を抑える「抑制性シナプス」がある。興奮性シナプスでは、グルタミン酸が神経伝達物質である。

(注4) GluN2B タイプ NMDA 型受容体

興奮性シナプスのシナプス後部には、神経伝達物質(グルタミン酸)を受け取る受容体が存在し、大脳では NMDA 型、AMPA 型、mGluR 型という3種類が主となる。AMPA 型受容体はグルタミン酸が結合すると早い応答性で開口しナトリウム、カリウムなどの陽イオンを流入・流出することで興奮電位を発生し、早い神経伝達を担う。NMDA 型受容体はまず AMPA 型受容体によってシナプス後部が興奮するとグルタミン酸に対して応答出来るようになり、AMPA 型同様に開口して陽イオンを流入・流出するが、AMPA 型との大きな違いとして、カルシウムイオンを流入する機能がある。

NMDA 型受容体は、4つのサブユニット蛋白質が束になった構造で、真ん中のスペースが陽イオンが通過する通路(イオンチャンネル)となる。4つのサブユニットの内、2つは必須サブユニットの GluN1 であるが、残り2つは GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A, GluN3B の6タイプあり、大脳における主な NMDA 型受容体は GluN2A タイプか GluN2B タイプである。GluN2A タイプ NMDA 型受容体と、GluN2B タイプ NMDA 型受容体は、機能的性質が異なり、GluN2B タイプ NMDA 型受容体は、GluN2A タイプに比べて、グルタミン酸に対する効力がより高く、不活性化の速度がより遅く、更により興奮毒性を生じやすい、という特徴がある。

(注5) NMDA

N-メチル-D-アスパラギン酸。NMDA 型受容体に特異的に結合する興奮性アミノ酸。

8. 添付資料:

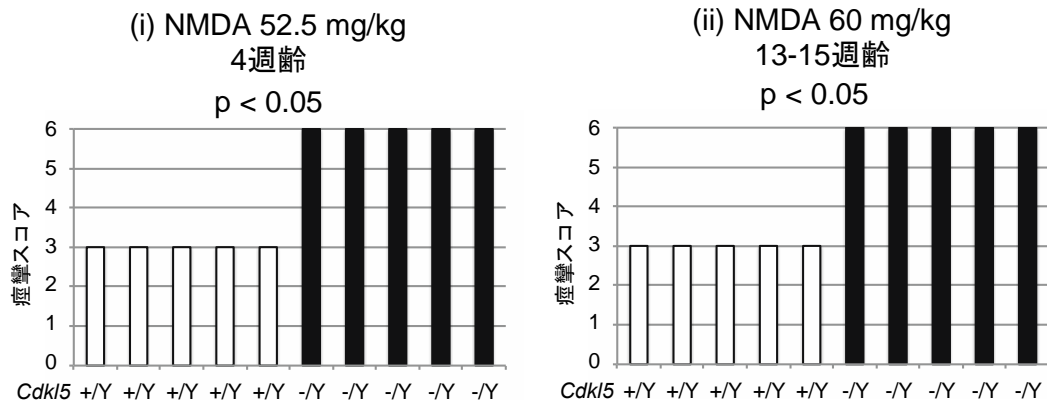


図1. *Cdk15* KO マウスはNMDA に対して痙攣感受性が亢進している

興奮性アミノ酸 NMDA の腹腔内投与 (52.5 mg/kg 体重、4 週齢 ; 60 mg/kg 体重、13-15 週齢) に対して、野生型 (正常) マウス (*Cdk15* +/Y) では痙攣スコア 3 点の軽度びくつきを起こす程度であったのに対して、*Cdk15* KO マウス (*Cdk15* -/Y) は、致死性の高い痙攣スコア 6 点の大発作を起こした。Mann-Whitney U test。

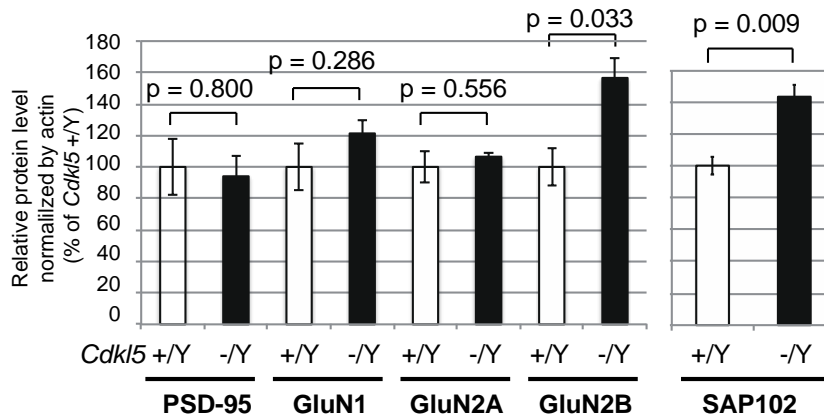


図2. *Cdk15* KO マウスの興奮性シナプス後部において、GluN2B と SAP102 蛋白が有意に増加している

Cdk15 KO マウス (*Cdk15* -/Y) と野生型マウス (*Cdk15* +/Y) の海馬からシナプス後部蛋白を分離し、ウエスタンブロットによる蛋白質定量を行った結果、*Cdk15* KO マウスでは、GluN2B 蛋白量が野生型の 1.57 倍、SAP102 蛋白量が野生型の 1.43 倍に増加していた。GluN1, GluN2A, PSD-95 蛋白量には有意な変化がなかった。Student's t-test。

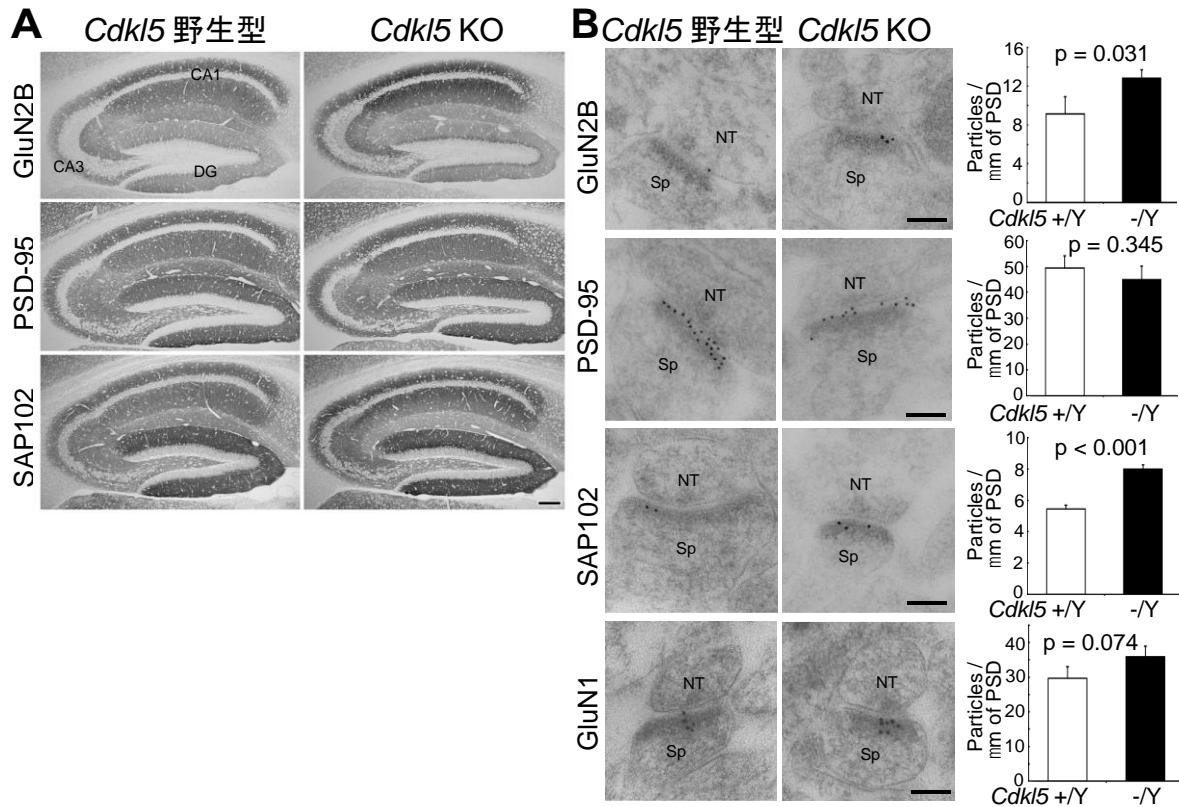


図3. *Cdk15* KO マウスの海馬シナプス後部において、GluN2B と SAP102 が過剰集積している。*Cdk15* KO マウスと野生型マウスの、海馬の免疫組織化学 (A)と海馬 CA1 興奮性シナプス後部の免疫電子顕微鏡 (B) 解析。免疫組織化学解析によって、*Cdk15* KO マウスで海馬の GluN2B と SAP102 の免疫反応性が亢進しているのがわかる。免疫電子顕微鏡解析によって、*Cdk15* KO マウスの海馬興奮性シナプス後部において GluN2B と SAP102 が過剰に集積していることがわかる。Student's t-test.

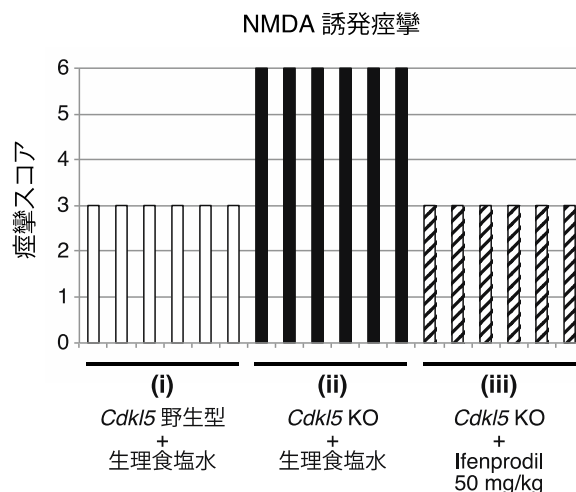


図4. *Cdk15* KO マウスの NMDA 誘発痙攣は GluN2B 選択的阻害薬によって抑制される。*Cdk15* KO マウスに生理食塩水のみ投与した後、NMDA 誘発痙攣試験を行うと、痙攣スコア 6 の大発作を起こす (ii)。それに対し、*Cdk15* KO マウスに GluN2B 選択的阻害薬である ifenprodil を投与した後、NMDA 誘発痙攣試験を行うと、野生型マウスに対する NMDA 誘発痙攣スコア(i)と同等の、痙攣スコア 3 の軽いぴくつきに抑えられた (iii)。