

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09614

研究課題名(和文) CDKL5遺伝子変異によるてんかん性脳症のシナプス分子病態機序と治療法の解明

研究課題名(英文) Elucidating synaptic mechanisms and treatment of epileptic encephalopathy associated with CDKL5 mutations

研究代表者

田中 輝幸 (TANAKA, Teruyuki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：10246647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CDKL5遺伝子変異は、小児の難治性てんかん性脳症を引き起こすが、その病態機序は全く不明であった。本研究で私は、Cdk15ノックアウト(KO)マウスの海馬において、興奮性伝達物質受容体の一型(GluN2B型NMDA受容体)がシナプス後部に過剰集積する事で、ニューロンの電氣的興奮性が亢進し、痙攣感受性が異常亢進する事を明らかにした。更にGluN2Bに対する選択的阻害薬がCdk15 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事を示した。

本研究の成果は、CDKL5変異による小児難治性てんかんの分子病態機序の解明と効果的治療法の開発への重要な基盤となる。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the CDKL5 gene cause severe epileptic encephalopathy. Cdk15 KO mice showed normal sensitivity to kainic acid; however, they displayed significant hyperexcitability to NMDA. Electrophysiological analysis in the hippocampus disclosed an increased ratio of NMDA/AMPA receptor-mediated excitatory postsynaptic currents (EPSCs) and a significantly larger decay time constant of NMDA receptor-mediated EPSCs in Cdk15 KO mice. Subcellular fractionation of the hippocampus from Cdk15 KO mice revealed a significant increase of GluN2B and SAP102 in the postsynaptic density fraction. Immunoelectron microscopic analysis of the hippocampus further confirmed postsynaptic overaccumulation of GluN2B and SAP102 in Cdk15 KO mice. Ifenprodil abrogated the NMDA-induced hyperexcitability in Cdk15 KO mice. These data indicate that CDKL5 plays an important role in controlling postsynaptic localization of the GluN2B-SAP102 complex in the hippocampus and thereby regulates seizure susceptibility.

研究分野：発達神経科学

キーワード：CDKL5 ノックアウトマウス 海馬 NMDA受容体 GluN2B てんかん けいれん キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

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 蛋白質をコードする。近年、小児の難治性てんかん性脳症である、X連鎖性ウェスト症候群及び非定型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る。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不明であった。

私はこれまで、*CDKL5* の分子機能と遺伝子変異による病態機序解明の目的で、yeast two-hybrid 法及びアフィニティーカラムクロマトグラフィー+ショットガン LC-MS/MS を用いたインタラクトーム解析による相互作用分子の網羅的探索を行い、*CDKL5* の新規相互作用蛋白とリン酸化基質を同定し、*Cdkl5* ノックアウト(KO)マウス作製・初期解析を行い、KO マウスの NMDA(N-メチル-D-アスパラギン酸)に対する易痙攣性の亢進、記憶/学習/情動の顕著な異常等の行動異常を同定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は「*CDKL5* 遺伝子変異によるてんかん性脳症の分子病態機序とその効果的治療法の解明」であり、*CDKL5* 欠失による興奮性シナプス機能異常の分子機構、*CDKL5* 欠失による神経学的異常(易痙攣性亢進、記憶/学習/情動異常)の病態、更に *CDKL5* 欠失による神経学的異常のシナプス作用薬を用いた治療法の解明、を具体的目標とした。

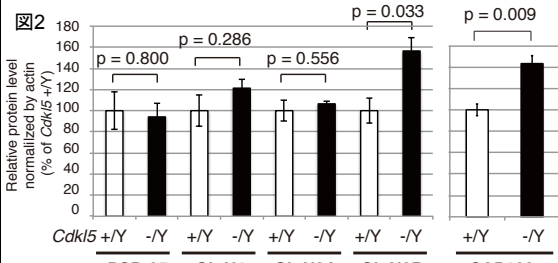
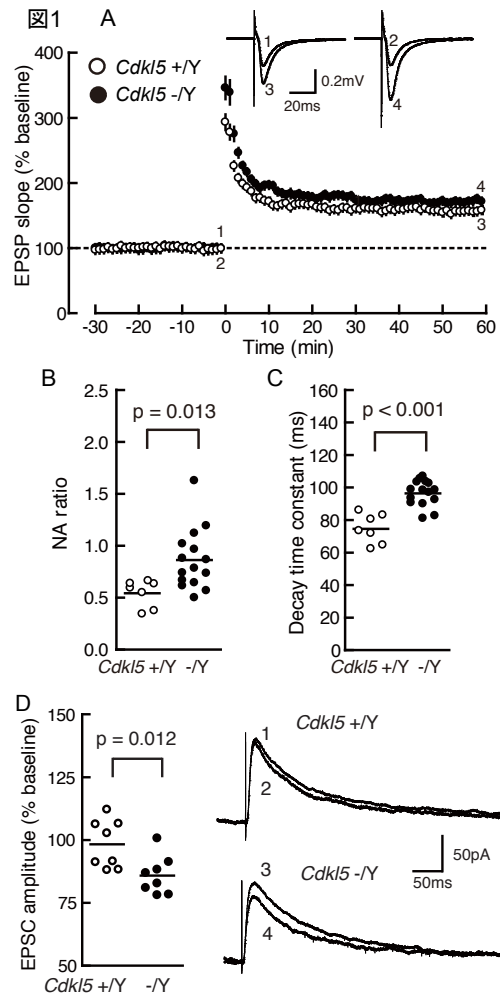
3. 研究の方法

- (1) *Cdkl5* KO マウス海馬の電気生理学的解析
- (2) *Cdkl5* KO マウス海馬のグルタミン酸受容体蛋白生化学的解析
- (3) *Cdkl5* KO マウス海馬の免疫組織化学及び免疫電子顕微鏡解析
- (4) *Cdkl5* KO マウスに対するシナプス作用薬投与による痙攣感受性変化の解析

4. 研究成果

(1) 電気生理学的解析

Cdkl5 KO マウスの海馬 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(図 1A)、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(図 1B)、NMDA-EPSC の減衰時定数の増大(図 1C)、NMDA-EPSC の GluN2B 選択的阻害薬による強い抑制(図 1D)、などの所見を得た。



(2) グルタミン酸受容体蛋白の生化学的解析

Cdkl5 KO マウス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 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)が明らかとなった。

(3) 免疫組織化学・免疫電子顕微鏡解析

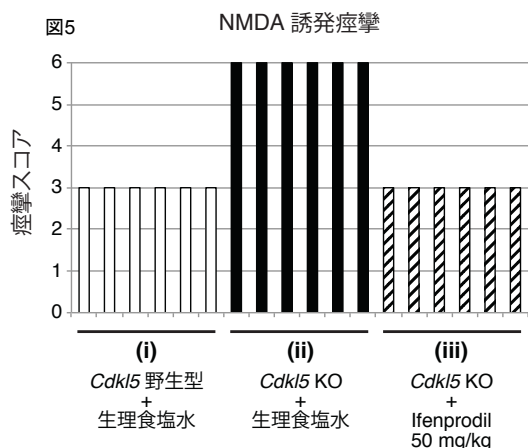
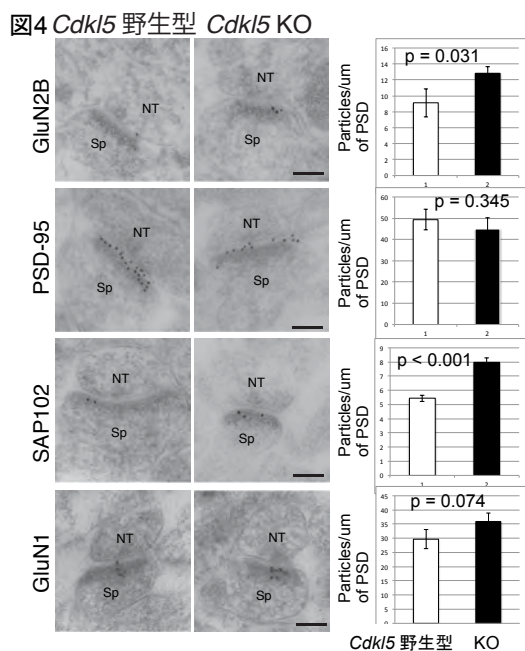
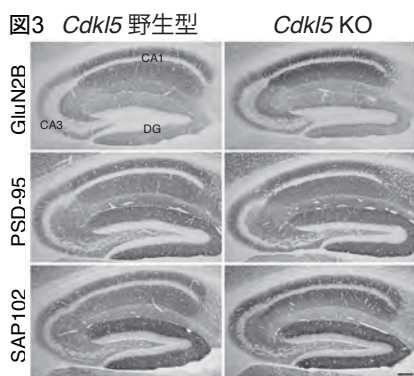
Cdkl5 KO マウス海馬の免疫組織化学(図 3)及び免疫電子顕微鏡解析によって、興奮性シナプス後部における GluN2B 及び SAP102 の有意な過剰集積(図 4)が明らかとなった。

(4) *Cdkl5* KO マウスシナプス活動性の解析

Cdkl5 KO マウス海馬において、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く、シナプス前部の活動性の障害は認められなかった。

(5) *Cdkl5* KO マウスの痙攣感受性亢進に対する抗 GluN2B 薬物による抑制

Cdkl5 KO マウスの NMDA に対する易痙攣



性の著明な亢進が、GluN2B型NMDA受容体のシナプス後部過剰集積に因るものかを検証するため、GluN2B選択的阻害薬ifenprodilを前投与し、NMDA誘発性痙攣を行ったところ、KOマウスにおけるNMDA誘発性痙攣の強度が野生型と同等まで抑制された(図5)。

以上の研究結果から、CDKL5は海馬興奮性シナプスにおけるGluN2B型NMDA受容体の局在を制御し、CDKL5欠損は興奮性シナプス後部にGluN2B型NMDA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った。

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蛋白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となる意義がある。

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3件)

① Okuda K, Takao K, Watanabe A, Miyakawa T, Mizuguchi M, and Tanaka T. Comprehensive behavioral analysis of the *Cdkl5* knockout mice revealed significant enhancement in anxiety- and fear-related behaviors and impairment in both acquisition and long-term retention of spatial reference memory. *PLoS One*. 2018;13(4):e0196587. Epub 2018/04/28. PubMed PMID: 29702698. (査読有り)

② Okuda K, Kobayashi S, Fukaya M, Watanabe A, Murakami T, Hagiwara M, Sato T, Ueno H, Ogonuki N, Komano-Inoue S, Manabe H, Yamaguchi M, Ogura A, Asahara H, Sakagami H, Mizuguchi M, Manabe T, and Tanaka T. CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility. *Neurobiol Dis*. 2017;106:158-70. PubMed PMID: 28688852. (査読有り)

③ 奥田耕助, 田中輝幸. 難治性てんかんを伴う神経発達障害の原因遺伝子CDKL5のシナプス伝達調節機構の解明に向けて. *日薬理誌 (Folia Pharmacol Jpn)*. 2015;145(4):183-6. (査読なし)

[学会発表] (計10件)

① 田中輝幸, 奥田耕助, 小林静香, 村上拓冬, 深谷昌弘, 高雄啓三, 渡邊紀, 萩原舞, 阪上洋行, 水口雅, 宮川剛, 真鍋俊也, CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus, and regulates seizure susceptibility, emotional behaviors, and memory, The 8th Brain Research Institute International Symposium, 2018年

② T. TANAKA, K. OKUDA, S. KOBAYASHI, M. FUKAYA, K. TAKAO, A. WATANABE, T. MURAKAMI, M. HAGIWARA, S. KOMANO-INOUE, H. MANABE, M. YAMAGUCHI, H. SAKAGAMI, T. MIYAKAWA, M. MIZUGUCHI, T. MANABE, CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility, 2017 CDKL5 Forum Meeting in Boston, 2017年

③ T. TANAKA, K. OKUDA, S. KOBAYASHI,

M. FUKAYA, K. TAKAO, A. WATANABE, T. MURAKAMI, M. HAGIWARA, S. KOMANO-INOUE, H. MANABE, M. YAMAGUCHI, H. SAKAGAMI, T. MIYAKAWA, M. MIZUGUCHI, T. MANABE
CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility、2017 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, DC、2017年

④ 田中輝幸, 奥田耕助, 小林静香, 村上拓冬, 深谷昌弘, 高雄啓三, 渡邊紀, 萩原舞, 阪上洋行, 水口雅, 宮川剛, 真鍋俊也、Comprehensive analyses of CDKL5, a causative gene product for neurodevelopment disorders West syndrome or atypical Rett syndrome、第40回日本神経科学大会、2017年

⑤ 村上拓冬, 奥田耕助, 小林静香, 深谷昌弘, 高雄啓三, 近江信次, 渡邊紀, 萩原舞, 阪上洋行, 水口雅, 宮川剛, 真鍋俊也, 田中輝幸、CDKL5 controls postsynaptic NMDA receptor localization and regulates memory, emotion and seizure susceptibility、第39回日本分子生物学会年会、2016年

⑥ 村上拓冬, 奥田耕助, 小林静香, 深谷昌弘, 高雄啓三, 渡邊紀, 萩原舞, 阪上洋行, 水口雅, 宮川剛, 真鍋俊也, 田中輝幸、CDKL5 controls postsynaptic NMDA receptor localization and regulates memory, emotion and seizure susceptibility、第39回日本神経科学大会、2016年

⑦ 田中輝幸, 奥田耕助, 小林静香, 村上拓冬, 深谷昌弘, 高雄啓三, 渡邊紀, 萩原舞, 阪上洋行, 水口雅, 宮川剛, 真鍋俊也、West症候群・Rett症候群の原因遺伝子 CDKL5 は、NMDA 受容体機能を制御し、記憶・学習、情動、易痙攣性を調節する、第45回日本神経精神薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会、2015年

⑧ 田中輝幸, 奥田耕助, 小林静香, 深谷昌弘, 高雄啓三, 渡邊紀, 村上拓冬, 萩原舞, 阪上洋行, 水口雅, 宮川剛, 真鍋俊也、CDKL5 controls NMDA receptor function and regulates memory, emotion and seizure susceptibility、第38回日本神経科学大会、2015年

⑨ 田中輝幸, 奥田耕助, 小林静香, 深谷昌弘, 高雄啓三, 渡邊紀, 村上拓冬, 萩原舞, 阪上洋行, 水口雅, 宮川剛, 真鍋俊也、West症候群/Rett症候群の原因遺伝子 CDKL5 は、グルタミン酸受容体局在を制御し、記憶/情動/易痙攣性を調節する、第55回日本先天異常学会学術集会・第38回日本小児遺伝学会学術集会、2015年

⑩ 田中輝幸, 水口雅、CDKL5 controls glutamate receptor function and regulates memory, emotion and seizure susceptibility、第57回日本小児神経学会総会、2015年

〔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：

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 輝幸 (TANAKA, Teruyuki)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10246647

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

水口 雅 (MIZUGUCHI, Masashi)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20209753

真鍋 俊也 (MANABE, Toshiya)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号：70251212

深谷 昌弘 (FUKAYA, Masahiro)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：10360900

高雄 啓三 (TAKAO, Keizo)
富山大学・研究推進機構研究推進総合支援センター・講師
研究者番号：80420397

(4)研究協力者

奥田 耕助 (OKUDA, Kosuke)
東京大学・大学院医学系研究科・大学院学生

村上 拓冬 (MURAKAMI, Takuto)
東京大学・大学院医学系研究科・大学院学生