

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07423

研究課題名(和文) CaMK2 変異が引き起こす神経発達障害の疾患メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of neurodevelopmental disorder caused by CaMK2 mutant mice

研究代表者

武藤 弘樹 (Mutoh, Hiroki)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：60443040

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)：神経発達障害患者より同定したCaMK2 変異を導入したヒト疾患モデルマウスは、患者同様に運動機能障害、発育遅滞を生じ、小脳においてCaMK2 タンパク質の発現量が顕著に減少していることを明らかにした。さらに、モデルマウスでは、大脳皮質や海馬におけるタンパク質の発現量が多少減少することでも、神経回路の興奮性・抑制性のバランスを崩壊し異常脳波を生じることが判明した。また、興奮性・抑制性のバランスが崩れたことで、てんかん感受性を増加していることが明らかになった。本研究により、CaMK2 変異を導入したヒト疾患モデルマウスの確立をすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果により、CaMK2 が神経回路形成における興奮性・抑制性のバランス制御に必要である学術的に重要な発見をした。また、難治性神経疾患の患者より同定した変異を導入したヒト疾患モデルマウスの作出、機能解析することで病態の一端を解明することにも成功し、難治性疾患の病態解明と新たな薬剤開発や治療法につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Mouse models of human disease in which CaMK2 mutations were introduced, identified from patients with neurodevelopmental disorders, showed motor dysfunction and growth retardation similar to patients, and a remarkably decreased expression level of CaMK2 protein in the cerebellum. Furthermore, in the model mice, even a slight decrease in protein expression in the cerebral cortex and hippocampus was found to disrupt the excitatory/inhibitory balance of the neuronal circuitry and produce abnormal EEG. The disruption of the excitatory-inhibitory balance was also found to increase susceptibility to epilepsy. This study successfully established a mouse model of human disease in which CaMK2 mutations were introduced.

研究分野：神経生理学

キーワード：CaMK2 ヒト疾患モデル動物 脳波異常 興奮性/抑制性のバランス

1. 研究開始当初の背景

興奮性神経細胞と抑制性神経細胞が複雑なシナプスを形成し、バランスの取れた神経回路を構築することが正常な脳機能発現に重要である。この興奮性/抑制性のバランスが乱れると、てんかん、統合失調症などのさまざまな神経疾患が引き起こされる^{1,2}。そのシナプス形成などに重要な役割を担っている1つのタンパク質がCa²⁺/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (CaMK2) である。4つのアイソフォームのうちCaMK2 α とCaMK2 β が脳で特異的に発現し、記憶・学習に重要な神経の可塑性³やスパイン構造⁴を制御することで正常な脳機能発現に関与していることから、多くの研究が行われている。最近、申請者のグループ⁵ともう一つのグループ⁶は、てんかんなど神経発達障害の患者を網羅的に遺伝子解析し、CaMK2 または CaMK2 の変異が生じた変異が神経発達障害の原因となることを同定した。しかしながら、CaMK2 または CaMK2 の変異がどのようなメカニズムで神経発達障害を引き起こしているのかまだ解明されていない。この学術的・臨床的問いを解決するため、患者と相同な変異を導入したヒト疾患モデルマウスを作製し、特に、CaMK2 変異により生じる神経発達障害の病態メカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

CaMK2 は、記憶・学習など高次機能や運動機能⁷に重要なタンパク質であるため、CaMK2 を欠損させたマウス⁸やCaMK2 のリン酸化部位 (シナプス可塑性に重要) に変異を導入したマウス⁸を用いて研究されている。しかしながら、CaMK2 欠損やリン酸化部位の変異は、神経発達障害やてんかん患者の網羅的遺伝子解析において、これまで確認されておらず、それらとの関連を報告する研究も存在しない。本申請で使用されるCaMK2 の213番目アミノ酸プロリンがロイシンに置換された変異 (Pro213Leu) は、申請者らが神経発達障害患者より同定した。その変異を導入したヒト疾患モデルマウスを機能解析することで、CaMK2 変異が生じる神経発達障害の病態メカニズムを解析し、さらに、神経回路形成におけるCaMK2 の新しい機能を明らかにする。また、新規治療法や新薬の開発のため、ヒト疾患モデルマウスの確立を目的とする。

3. 研究の方法

神経発達障害患者より同定したCaMK2 Pro213Leu変異を導入したヒト疾患モデルマウスを作製し、表現型の解析を行った。

CaMK2 変異の患者が示す症状とヒト疾患モデルマウスの表現型を比較・検討するため、運動機能テスト、脳波測定を行った。

CaMK2 変異によるタンパク質の発現量と活性化の違いを、生化学的手法を用い異なる脳部位で調べた。

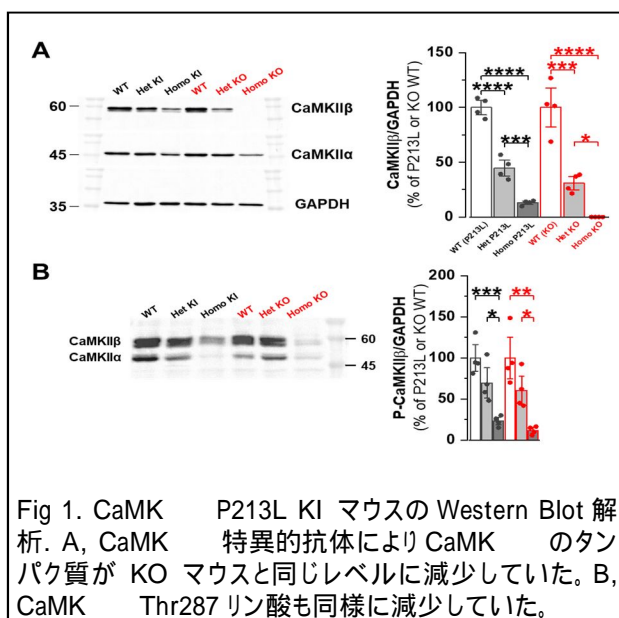
4. 研究成果

CaMK2 変異の患者は小脳失調を示すため、Beam Walking Test を用いヒト疾患モデルマウスの運動機能を調べたところ、CaMK2 変異 Homo ノックインマウスだけが顕著な運動障害と歩行障害を示した。

ヒト疾患モデルマウスの小脳におけるCaMK2 の発現量を調べたところ、他の脳部に比べCaMK2 の発現量が劇的に減少していた (Fig. 1)。

この成果より、CaMK2 Pro213Leu 変異による機能喪失が小脳失調の原因であることが明らかとなり、CaMK2 機能喪失とヒトの運動機能障害を関連付けること論文発表した (Mutoh H, et al. J Neurosci Res. 2022)。

この患者はてんかん症状を示すため、ヒト疾患モデルマウスの脳波測定を行ったところ、CaMK2 変異 Het



または Homo ノックインマウスが 20 ~ 50Hz に異常なピークを示した。

この異常脳波は、発作誘発剤ペンチレンテトラゾールの投与で異常ピークがより低周波数へシフトし、抗てんかん薬ジアゼパム、バルプロ酸、イソフルランの投与で異常ピークが消失することが判明した。

また、ヒト疾患モデルマウスに低濃度ペンチレンテトラゾールを投与することで、薬剤誘発性発作の回数、頻度、スコアの増加がみられたので、CaMK2 変異によりてんかん感受性が増加することが明らかになった。

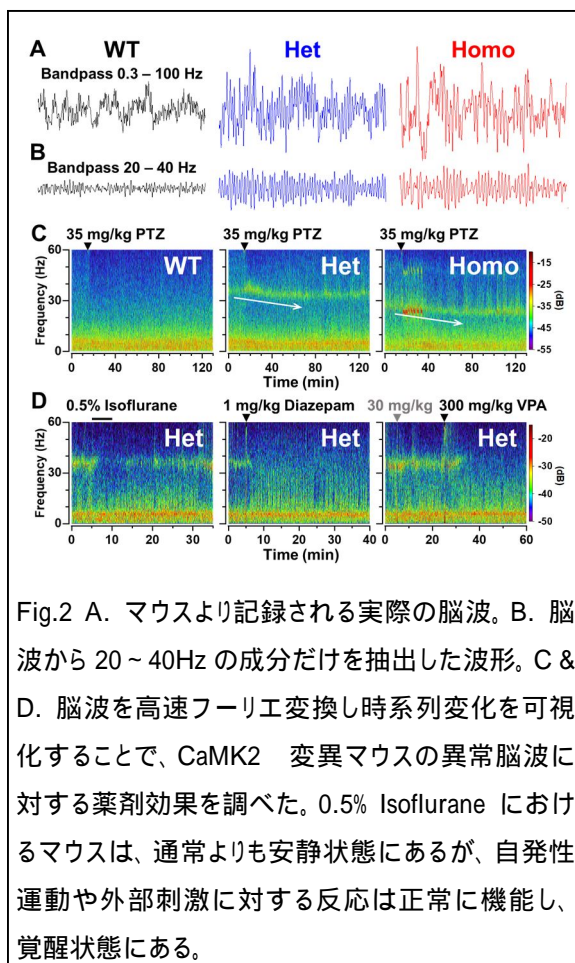


Fig.2 A. マウスより記録される実際の脳波。B. 脳波から 20 ~ 40Hz の成分だけを抽出した波形。C & D. 脳波を高速フーリエ変換し時系列変化を可視化することで、CaMK2 変異マウスの異常脳波に対する薬剤効果を調べた。0.5% Isoflurane におけるマウスは、通常よりも安静状態にあるが、自発性運動や外部刺激に対する反応は正常に機能し、覚醒状態にある。

引用論文

1. Shao LR, et al. Children. 2019
2. Patel DC, et al. Nat Rev Neurosci. 2019
3. Silva AJ, et al. Science. 1992
4. Hell JW. Neuron. 2014
5. Akita T, et al. Ann Clin Transl Neurol. 2018
6. Küry S, et al. Am J Hum Genet. 2017
7. van Woerden GM, et al. Nat Neurosci. 2009
8. Kool MJ, et al. J Neurosci. 2019
9. Incontro S, et al. Nat Commun. 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mutoh Hiroki, Aoto Kazushi, Miyazaki Takehiro, Fukuda Atsuo, Saitsu Hiroto	4. 巻 100
2. 論文標題 Elucidation of pathological mechanism caused by human disease mutation in CaMKII	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 880 ~ 896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jnr.25013	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 -
1. 著者名 Miyamoto Sachiko, Kato Mitsuhiro, Sugiyama Kenji, Horiguchi Ryo, Nakashima Mitsuko, Aoto Kazushi, Mutoh Hiroki, Saitsu Hiroto	4. 巻 66
2. 論文標題 A boy with biallelic frameshift variants in TTC5 and brain malformation resembling tubulinopathies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1189 ~ 1192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-021-00953-7	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 -
1. 著者名 Aoto K, Kato M, Akita T, Nakashima M, Mutoh H, Akasaka N, Tohyama J, Nomura Y, Hoshino K, Ago Y, Tanaka R, Epstein O, Ben-Haim R, Heyman E, Miyazaki T, Belal H, Takabayashi S, Ohba C, Takata A, Mizuguchi T, Miyatake S, Miyake N, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H.	4. 巻 12
2. 論文標題 ATP6VOA1 encoding the a1-subunit of the V0 domain of vacuolar H+-ATPases is essential for brain development in humans and mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22389-5	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 該当する
1. 著者名 Aoto Kazushi, Takabayashi Shuji, Mutoh Hiroki, Saitsu Hiroto	4. 巻 23
2. 論文標題 Generation of Flag/DYKDDDDK Epitope Tag Knock-In Mice Using i-GONAD Enables Detection of Endogenous CaMKII and Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11915 ~ 11915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231911915	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 Islam Md. Monirul, Mutoh Hiroki, Aoto Kazushi, Belal Hazrat, Saitsu Hiroto	4. 巻 383
2. 論文標題 Cnpy3 mice reveal neuronal expression of Cnpy3 in the brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Methods	6. 最初と最後の頁 109730 ~ 109730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jneumeth.2022.109730	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 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 武藤弘樹 青戸一司 宮寄岳大 福田敦夫 才津浩智
2. 発表標題 CaMKII のヒト疾患変異が生じる病態メカニズムの解明
3. 学会等名 第100回日本生理学会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Md Monirul Islam 武藤弘樹 青戸一司 Hazrat Belal 才津浩智
2. 発表標題 Cnpy3-2xHA マウスは、脳における Cnpy3 の神経特異的発現を明らかにした
3. 学会等名 第100回日本生理学会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青戸一司 高林秀次 武藤弘樹 才津浩智
2. 発表標題 簡便なi-GONAD法によるFlag (DYKDDDDK) タグを挿入したマウスの作製とその有用性
3. 学会等名 第128回日本解剖学会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------