

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22591118

研究課題名(和文) 発達期脳に及ぼすてんかん発作の影響 皮質形成異常を有するモデル動物を用いた研究

研究課題名(英文) Impact of epileptic seizures on developing brain: a study using forebrain-specific Cdk5 conditional knockout mice

研究代表者

高橋 悟 (Takahashi, Satoru)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：10431404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん発作が発達期脳へ与える影響について明らかにするため、皮質形成異常を有する遺伝子改変モデル動物(Cdk5cK0マウス)を用いて、その神経病理所見を解析した。Cdk5cK0マウスでは、けいれん発作の出現に伴い神経変性を生じ、マイクログリアの活性化を伴っていた。PPAR- γ アゴニストである抗炎症薬ピオグリタゾン投与すると、グリア細胞の活性化は抑制され、神経変性は軽減された。このように、てんかん発作に関連する神経変性に対して、炎症抑制が神経保護効果を示すことが明らかとなった。この結果は、てんかん性脳症の治療において、抗炎症薬の効果を検討する研究が重要となることを示唆するものであった。

研究成果の概要(英文)：Neuronal migration disorders are often identified in patients with epilepsy refractory to medical treatment. The prolonged or repeated seizures are known to cause neuronal death; however, the mechanism remains to be elucidated. The objective of this study is to elucidate the impact of epileptic seizures on the developing brain using forebrain-specific Cdk5 knockout (Cdk5cK0) mice which show neuronal migration defects and seizures. The forebrain of the mice showed neurodegenerative changes accompanied by neuronal loss and microglial activation. Treatment with PPAR- γ agonist pioglitazone ameliorated gliosis and neuronal loss in Cdk5cK0 mice, suggesting that inflammation contributes to the pathogenesis of the seizure-induced neuronal death. This study may provide impetus for considering the development of anti-inflammatory therapies that can be used to avoid the progressive decline of neuronal function in patients with neuronal migration disorders and epilepsy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：てんかん けいれん 神経変性 炎症 皮質形成異常 Cdk5

1. 研究開始当時の背景

ヒトの脳皮質を構成する神経細胞は、脳室下帯で誕生し、細胞分裂を終えた後に移動して、特定の位置に配置される。このプログラムされた神経細胞の移動は、脳皮質に6層構造をつくり、これはヒト脳における高次脳機能発現のための構造的基盤であると考えられている。近年の画像検査法の進歩により、難治性てんかんや精神遅滞を有する患者に神経細胞の遊走障害が見出されている。また、神経細胞の移動に関わる分子の研究も進み、皮質形成異常を有する患者において *LIS1* や *DCX* といった遺伝子の異常も同定されている。これらの疾患関連遺伝子のノックアウトマウスの解析は、脳形成異常を有する患者の病態理解に寄与してきた。我々は、神経細胞の遊走に必須の分子である cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) の役割について研究を行ってきた。Cdk5 は *DCX* がコードする蛋白をリン酸化し、その微小管結合能を低下させることが知られており、ヒトでみられる皮質形成異常の病態にも関与していると考えられている。Cdk5 ノックアウトマウス (Cdk5^{-/-}) の脳皮質では、本来の6層構造が逆転した異常構造がみられるのみならず、小脳・脳幹部の神経細胞移動も障害され、マウスは胎生後期に死亡し、生後脳での解析を困難にしていた。

そこで、我々は前脳特異的に Cdk5 を欠損したコンディショナルノックアウトマウス (Cdk5^{ck0}) を作出した。Cdk5^{ck0} マウスは、*Cdk5* 遺伝子を loxP 配列で挟んだ Cdk5^{fllox/fllox} マウスと Cdk5^{+/-} マウスおよび CaMKII-cre transgenic マウス (CaMKII- α 遺伝子のプ

ロモーターの制御下に Cre リコンビナーゼを発現する) を交配することにより作出した。遺伝子組み換え効率の違いから残存 Cdk5 活性の異なる2種類の Cdk5^{ck0} マウス

(Cdk5^{ck01} マウス: Cdk5^{fllox/-}; CaMKII^{cre+} と Cdk5^{ck02} マウス:

Cdk5^{fllox/fllox}; CaMKII^{cre+}) を得た。Cdk5^{ck01} マウスは、生後20日目以降に早期死亡したが、Cdk5^{ck02} マウスは、生後2ヶ月以降も生存し、けいれん発作を呈するようになった。この Cdk5^{ck02} マウスをモデル動物として用いることにより、皮質形成異常を有する脳の生後発達に伴う変化を解析することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、皮質形成異常を有する遺伝子改変モデル動物 (Cdk5^{ck0} マウス) を用い、けいれん発作に関連した神経病理所見の変化を解析し、小児期発症のてんかんの特徴である年齢依存性変化の背景にある病態を理解することを目的とした。

Cdk5^{ck0} マウスでは、けいれん発作の出現に伴い神経変性を生じ、マイクログリアの活性化を伴っていた。我々のこれまでの研究において、マイクログリアの活性化には神経細胞の過剰興奮の繰り返しにより分泌される組織性プラスミノゲン活性化因子

(tissue-type plasminogen activator, t-PA) が関与している可能性が考えられていた

(Takahashi S, et al. Am J Pathol 176: 320-329, 2010)。そこで、Cdk5^{ck0} マウスにみられた神経変性のメカニズムを解明するた

めに、動物に抗炎症薬を投与して、炎症抑制が神経保護効果を示すかという点について検討した。また、神経変性における t-PA の関与についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 炎症抑制による神経保護効果の検討

Peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)は、核内受容体の一つで、標的遺伝子のプロモーター領域に結合することにより遺伝子発現を制御している転写因子である。PPARは、 α 、 β 、 γ の3種類のサブタイプが存在し、PPAR α は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経疾患モデル動物の脳で炎症を抑制することが知られている。我々は、抗炎症薬としてピオグリタゾン(PPAR α アゴニスト)を用い、生後30日目より治療を開始して、生後60日目、90日目に生存率、神経病理所見について検討した。神経細胞、アストログリア、マイクログリアの細胞数は、それぞれの細胞特異的マーカーに対する免疫組織化学法、Western blot法を用い、検討した。

(2) 神経変性におけるt-PAの関与

Cdk5cK0 マウスと t-PA ノックアウトマウスを交配し、t-PA を欠損した Cdk5cK0 マウス (Cdk5cK0; tPA $^{-/-}$) を作出して、その表現型と神経病理変化を検討した。

4. 研究成果

(1) 炎症抑制による神経保護効果

生後60日目での生存率は、ピオグリタゾン投与群で76%、非投与群で33%と、ピ

オグリタゾン投与により動物の生存率は改善した。同様の傾向は、生後90日目でも観察された。神経病理学的検討によると、ピオグリタゾン投与群では、アストログリアおよびマイクログリアの活性化は抑制され、神経細胞の減少も抑えられていることが判明した。Cdk5cK0 マウスにみられた神経変性の病態には、炎症が関与していることが明らかとなった。てんかんに関連する神経変性に対して、抗炎症薬の効果を検討する研究が重要と考えられた。

(2) 神経変性におけるt-PAの関与

Cdk5cK0 マウスと Cdk5cK0; tPA $^{-/-}$ マウスとの生存率には、差はなかった。また、神経病理学的検討によっても、Cdk5cK0; tPA $^{-/-}$ マウスでは神経変性所見に改善がみられなかった。この結果は、Cdk5cK0 マウスにみられた神経変性の病態には、tPA が関与しないメカニズムが存在することを示している。

5. 主な発表論文等

[論文発表] (計2件)

He X, Takahashi S, Suzuki H, Hashikawa T, Kulkarni AB, Mikoshiba K, Ohshima T: Hypomyelination phenotype caused by impaired differentiation of oligodendrocytes in Emx1-cre mediated Cdk5 conditional knockout mice. *Neurochem Res* 36: 1293-1303, 2011 (査読あり), doi: 10.1007/s11064-010-0391-0.

Utreras E, Hamada R, Prochazkova M, Terse A, Takahashi S, Ohshima T, Kulkarni AB: Suppression of neuroinflammation in

forebrain-specific Cdk5 conditional
knockout mice by PPAR-gamma agonist
improves neuronal loss and early lethality.
J Neuroinflammation 2014 (査読あり),
doi: 10.1186/1742-2094-11-28.

[学会発表] (計 2 件)

Utreras E, Prochazkova M, Terse A,
Takahashi S, Kulkarni AB: Inhibition of
tissue-type plasminogen activator
expression does not ameliorate
neuro-inflammation in forebrain-specific
Cdk5 conditional knockout mice. Society
for Neuroscience Annual Meeting Oct.13-17,
2012, New Orleans, LA, USA

Hamada R, Takahashi S, Kulkarni AB,
Ohshima T: PPARg agonist treatment of
neurodegeneration in Cyclin-dependent
kinase 5 conditional KO mice、Neuro 2013
(第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神
経化学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会
合同大会) 平成 25 年 6 月 20 日、京都市

6 . 研究組織

研究代表者

高橋 悟 (TAKAHASHI SATORU)

旭川医科大学・小児科・講師

研究者番号 : 10431404