

12) 脳形成異常の病態解明：一前脳特異的 Cdk5 欠損マウスをモデルとして—

研究代表者 高橋 悟

【研究背景と目的】

大脳皮質を構成する神経細胞は、脳室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、大脳皮質に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。我々は、神経細胞の遊走に必須の分子である cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) の中枢神経系発達およびその成熟における役割について研究を行ってきた。Cdk5 は、その活性化因子である p35 あるいは p39 と結合することにより活性化されるリン酸化酵素であり、p35 と p39 は神経細胞でのみ発現しているために、Cdk5 の酵素活性は神経細胞で検出される。Cdk5 ノックアウトマウス (Cdk5^{-/-}) の大脳皮質では、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する。このため、Cdk5 の生後脳での役割を解析することは困難とされてきた。そこで、前脳特異的 Cdk5 コンディショナルノックアウトマウス (Cdk5 cKO) を作出し、脳形成異常が発達期にある脳へ与える影響を検討することにした。このモデル動物におけるけいれん発作出現前後での神経病理所見とその背景にある分子病態を理解することは、ヒトの皮質形成異常に関連したてんかんおよび認知障害の病態

解明と新たな治療法開発に寄与すると考えられる。

【方法と結果】

Cdk5 cKO マウスは、Cdk5 遺伝子を loxP 配列で挟んだ Cdk5^{loxP/loxP} マウスと CaMKII-cre transgenic マウス (CaMKII- α 遺伝子のプロモーターの制御下に Cre リコンビネースを発現する) を交配することにより作出した。

(1) Cre リコンビネースによる Cdk5 遺伝子の組み換えは、胎生12.5日以降に前脳特異的に起きた (図1)。(2) 前脳における Cdk5 蛋白の発現量および酵素活性は、対照群の20-50%まで低下していた (図2)。(3) Cdk5 cKO マウスは、メンデルの法則に従う比率で出生したが、その60-70%は離乳後1週間以内に早期死亡した。残りの30-40%のマウスは、生後2ヶ月以降にけいれん発作を起こし、死亡した。(4) 神経病理所見：大脳皮質には層構造の異常がみられ、けいれん発作の出現に伴い、神経細胞の脱落とアストロサイトの増生およびマイクログリアの活性化が観察された。(5) マイクログリアの活性化は、神経細胞の過剰興奮により分泌された組織性プラスミノゲン活性化因子 (tissue-type plasminogen activator, t-PA) を介していた。

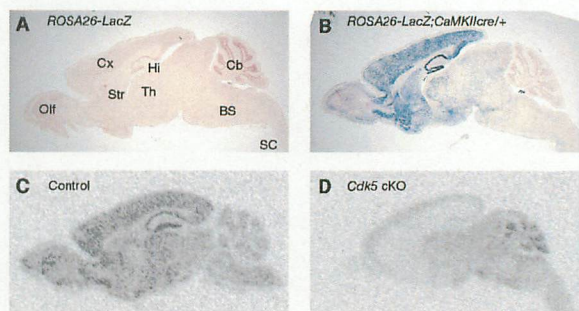


図1 Cdk5 遺伝子の組み換えは、前脳特異的に起きた。(A, B) 生後1ヶ月齢 ROSA26-lacZ reporter マウス脳矢状断切片の X-gal 染色。CaMKIIcre transgene を持たないマウス(A)と持つマウス(B)。Olf, olfactory bulb; Cx, cerebral cortex; Str, striatum; Hi, hippocampus; Th, thalamus; Cb, cerebellum; BS, brain stem and SC, spinal cord。(C, D) in situ hybridization 法により、Cdk5 発現は前脳特異的に減少していることがわかる。Cdk5^{loxP/loxP} マウス(C)、Cdk5^{loxP/loxP}; CaMKIIcre^{+/+} マウス(D)。

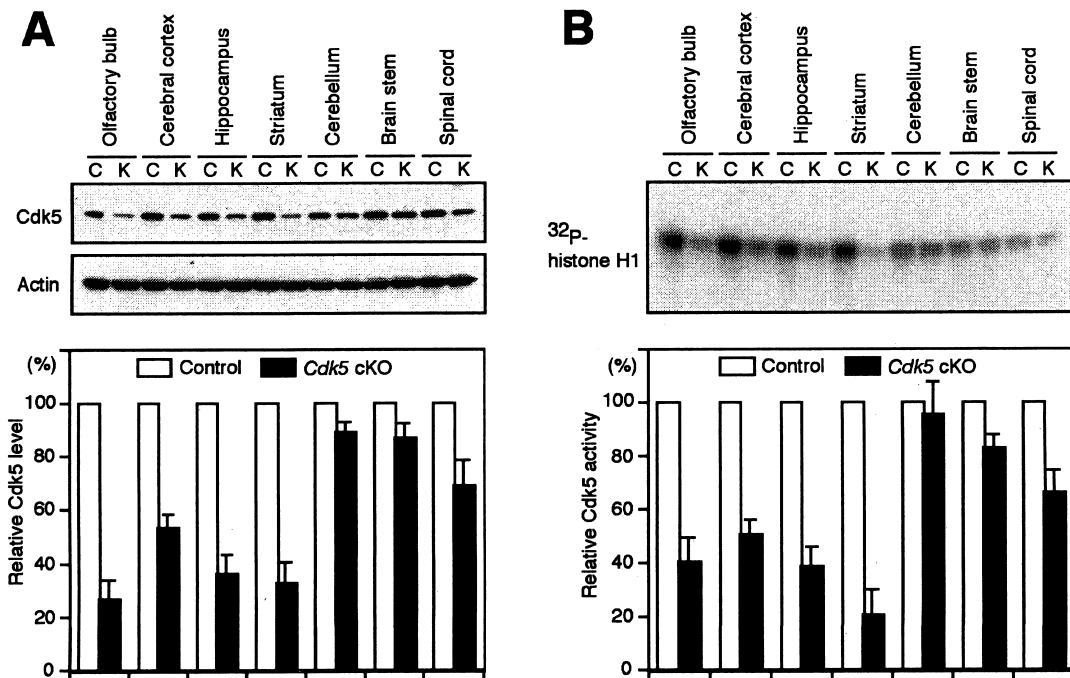


図2 Cdk5 蛋白の発現量およびその酵素活性は前脳特異的に低下している。(A)ウェスタンブロット法。(B) Cdk5 リン酸化活性測定。生後1ヶ月齢マウス脳から抽出した蛋白を用いた。C: *Cdk5^{loxP/loxP}* マウス, K: *Cdk5^{loxP/loxP}; CaMKII α cre^{+/+}* マウス。

[考察]

神経細胞の遊走障害は、大脳皮質に層構造の異常を引き起こし、てんかん発症の原因となる。*Cdk5* cKO マウスでみられたけいれん発作という過剰な神経細胞興奮の繰り返しは、神経細胞から t-PA を分泌させ、マイクログリアの活性化を引き起こしていた。さらに、*Cdk5* cKO マウスの前脳でみられた神経変性変化は、t-PA を介したマイクログリアの活性化と時間的・空間的に一致していた。けいれん発作を繰り返すことにより誘導される炎症関連分子の増加が、てんかん患者にしばしばみられる進行性の認知機能障害の病態に関与している可能性がある。マイクログリアの活性化から神経細胞死へ至る分子機構の解明は、今後の研究課題の一つである。炎症関連分子を標的とした治療が、難治性てんかんを有する患者の神経学的予後を改善する可能性がある。

[謝辞]

米国 NIH (Dr. Kulkarni) への留学中に始めた研究プロジェクトの継続を許可され、常に暖かい励ましを頂いた旭川医科大学小児科学講座教授 藤枝憲二先生

に感謝申し上げます。本研究の成果は、The American Journal of Pathology に掲載予定である。