

—— 研究助成報告 ——

発達性てんかん性脳症の脳内ネットワーク解析

高橋 悟

要旨：CDKL5欠損症の病態理解のために、「変異アレル頻度と臨床像との関連」および「脳の構造と機能との関連」について検討した。てんかんの発症とその重症度に関しては、ヘミ接合性変異患者とモザイク変異あるいはヘテロ接合性変異患者との間で違いはなかった。てんかん病態には、神経ネットワークにおける興奮性と抑制性のバランスの破綻が関与していると考えられた。一方、てんかん以外の神経症状は変異アレル頻度との関連があり、ヘミ接合性変異男性患者がより重症であった。これらの結果は、発達性てんかん性脳症の概念に一致するものであった。MRI画像の統計的解析で認められたBroca野を構成する左下前頭回の容積減少とその領域に関連する神経束の異常は、本症の言語機能障害の構造的基盤と考えられた。視覚誘発電位のP100潜時と臨床的重症度との関連が認められたことから、P100潜時は臨床的重症度を客観的かつ定量的に評価できる指標となることが期待される。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2024；35：31-36

Key Words：発達性てんかん性脳症、CDKL5欠損症、遺伝子変異、MRI、バイオマーカー

【序論】

Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) 欠損症は、4～6万人出生に1人の頻度でみられ、乳児期発症の発達性てんかん性脳症の主な原因の一つである¹⁾。患者は、精神運動発達遅滞や皮質性視覚障害を高頻度で合併している^{2,3)}。CDKL5遺伝子は、X染色体上(Xp22.13)に位置し、主に神経細胞で発現するリン酸化酵素をコードしている⁴⁾。その発現は生後早期にピークとなり、神経突起伸長やシナプス形成に重要な役割を演じている⁵⁾。CDKL5とてんかんの関連が注目されたのは、2003年にてんかん性スパズムを呈し重度の精神運動発達遅滞を伴う2人の女兒において、CDKL5遺伝子の機能喪失性変異が報告されたことによる⁶⁾。CDKL5欠損症患者の98%以上は、性差なく乳児期にてんかんと発症する⁷⁾。しかし、CDKL5欠損マウスは早発けいれんを呈さなかった^{8,9)}。近年、てんかん発症機序に関連する興味深い研究成果が報

告され、ヘミ接合性雄マウスはけいれんを起こすことはないが、ヘテロ接合性雌マウスは加齢に伴いけいれんを起こすというものである¹⁰⁾。この結果から本症におけるてんかん発症機序として、正常細胞と変異細胞が混在したモザイク状態が必要であるとの仮説が提唱された。本研究では、このてんかん発症機序（モザイク仮説）を検証する。現在、本症に対する根本的治療法は確立していないが、遺伝子補充治療をはじめとする革新的治療法の開発が進められている。その成功のためには、臨床的重症度を客観的かつ定量的に評価できる指標が必要となる。本研究のもう一つの目的は、CDKL5欠損症における脳構造的変化と機能的変化および臨床的重症度との関連を検討し、バイオマーカーとなる評価指標を探索することである。

【方法】

1. 変異アレル頻度と臨床像との関連

対象としたCDKL5欠損症患者は、男子5例（中

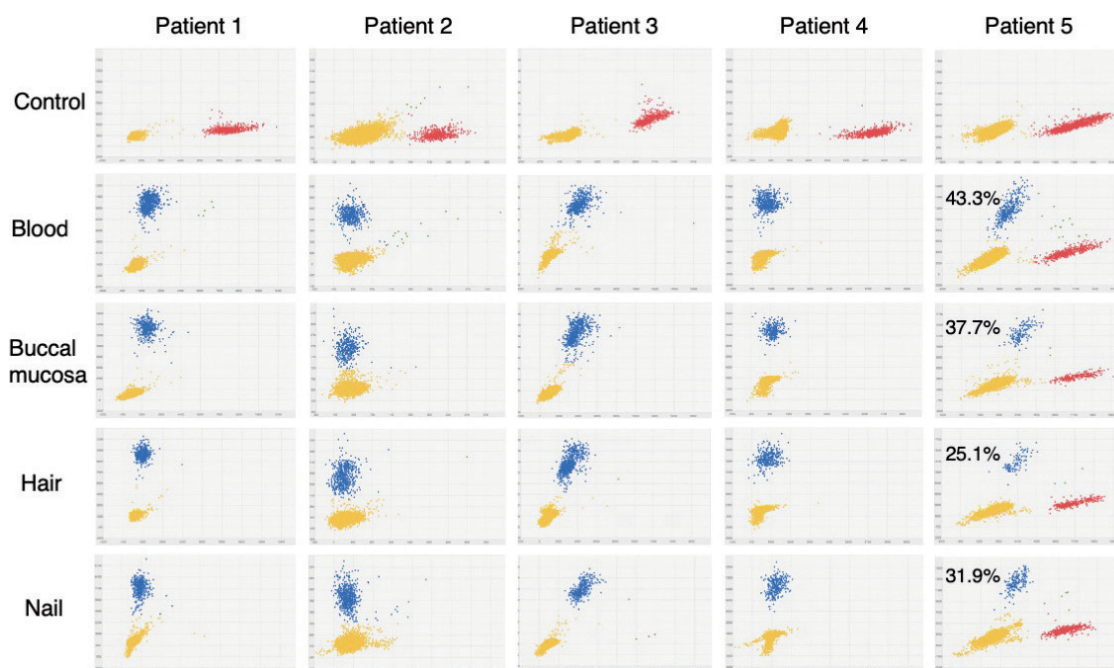


Fig. 1 CDKL5欠損症男子における体細胞モザイク変異の評価

症例5の変異アレル頻度は、25.1%から43.3%であった。それ以外の患者はヘミ接合体であった。青色の点は変異アレル由来のシグナル、赤色の点は正常アレル由来のシグナル、黄色の点は増幅なしを意味している。

中央値 7歳3か月, 4~12歳), 女子6例 (中央値 7歳0か月, 2~25歳) で, 遺伝子変異はサンガー法により確認した。さらに男子患者については, 血液, 頬粘膜, 毛根, 爪からDNAを抽出し, デジタルPCR法によりモザイク状態の評価を行った (変異アレル検出感度 0.1%)。臨床症状は, CDKL5 Clinical Severity Assessment¹¹⁾ と CDKL5 Developmental Score¹²⁾ を用いて定量評価した。

2. 脳の構造的変化と機能的変化との関連

脳画像統計解析と電気生理学的検査を行うことができたCDKL5欠損症患者12名 (女子10名, 年齢中央値 8.5歳, 2~23歳) を対象とした。結果は, 定型発達を示す正常対照群12名 (女子6名, 年齢中央値 10.8歳, 1~23歳) と比較した。脳MRIは, 3テスラMRI機器を使用し, T1強調画像 (T1WI) と拡散テンソル画像 (DTI) を取得した。T1WIはFreeSurfer, DTIはFSLとMRtrix3を用いて計測値を統計解析した。視覚

誘発電位検査 (VEP) は, LEDゴーグルを使用したflash VEPでP100の振幅と潜時を計測した。

本研究は, 旭川医科大学倫理委員会の承認を得て, 患者あるいは保護者への十分な説明と同意が得られた場合に行われた (承認番号775, 17145)。

【結果】

1. 変異アレル頻度と臨床像との関連¹³⁾

男子患者5例を解析し, 体細胞モザイク変異が確認されたのは1例のみであり, 残りの4例はヘミ接合性変異であった (Fig. 1)。男子患者5例は, 全例で薬剤抵抗性てんかんを発症していた。てんかんの重症度については, ヘミ接合性変異の男子患者とモザイク変異男子あるいはヘテロ接合性変異女子との間に違いはなかった (Tab. 1)。一方, てんかんを除く神経症状は, ヘミ接合性男子患者がより重症であった (Tab. 2)。

Tab. 1 CDKL5欠損症のてんかん表現型

中央値 (範囲)	男児 (ヘミ接合性) n=4	男児 (モザイク)・女児 n=7
発症年齢 (月)	1.5 (0.8-24)	2.0 (0.5-4)
初発時発作型		
全身性強直発作 (人)	1	3
スバズム (人)	0	3
部分発作 (人)	2	1
その他 (人)	1	0
現在の発作型		
多相性 (H-T-S) (人)	3	3
強直発作 (人)		3
スバズム (人)	1	4
その他 (人)	1	5
発作頻度		
日単位 (人)	4	7
週単位 (人)	0	0
月単位 (人)	0	0
抗てんかん薬の数		
過去に使用経験	7.5 (4-10)	6 (3-7)
現在使用中	3 (1-4)	3 (2-4)
ハネムーン期間		
有無 (人)	0	4
始まった時期 (月)	0	18.5 (4-38)
持続期間 (月)	0	5 (2-6)

H-T-S: hypermotor-tonic-spasms

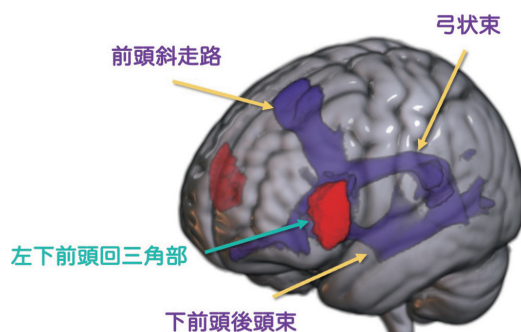


Fig. 2 CDKL5欠損症患者の左下前頭回三角部に関連する白質線維束のROI解析
患者群では、左下前頭回三角部の容積減少と同部位に関連する神経束（前頭斜走路、弓状束、下前頭後頭束）の拡散定量値（FA低下、MDとRDの上昇）の異常が検出された。

Tab. 2 変異アレル頻度と臨床像との関連

	Hemizygous males (n=4)	Mosaic male (n=1) Heterozygous females (n=6)	p-value
Age at completion of questionnaire (years)	9.3 (4-12)	6.5 (2-25)	0.65
Developmental score (Total score 7)	0 (0-2)	1.3 (0-3)	0.27
Severity score (Overall total 83)	55 (45-57)	50 (36-59)	0.25
Epilepsy (Total 21)	14 (12-16)	14 (11-16)	1
Motor (Total 25)	20 (17-22)	21 (14-24)	0.39
Behavior, Speech and Sleep (Total 18)	11 (10-12)	8 (5-15)	0.29
Gastrointestinal and Feeding (Total 9)	4 (2-6)	2 (0-4)	0.07
Respiratory (Total 8)	3 (1-3)	0 (0-3)	0.04
Other comorbidities (Total 2)	2 (1-2)	1 (0-2)	0.3
Data were shown as medians (range).			
Developmental scoreは低値ほど、Severity scoreは高値ほど重度であることを意味する。			

2. CDKL5欠損症患者脳の構造的変化と機能的変化との関連

脳形態画像では皮質・白質・皮質下構造の広範囲な脳領域で容積減少の傾向があり、特に左下前頭回三角部は統計学的に有意な容積減少を示した (Fig. 2)。拡散テンソル画像では広範囲の白質で拡散定量値の異常を示し、容積減少のあった左下前頭回三角部に関連する白質線維束（前頭斜走路、弓状束、下前頭後頭束）の拡散定量値にも異常があることを確認した (Fig. 2)。VEPでは、最重症の3名の患者では再現性のあ

る誘発電位は観察されなかった。残り9名の患者では、P100潜時のZスコアと臨床的重症度との間に有意な正の相関を認めた。

【考察】

CDKL5欠損症の病態理解のために、「変異アレル頻度と臨床像との関連」および「脳の構造的変化と機能的変化との関連」について検討した。男子患者におけるモザイク変異の有無については、低頻度モザイク変異も検出できるデジタルPCR法で解析した。ヘミ接合性変異の男

子患者4名全例が、乳児期発症の薬剤抵抗性てんかんを発症していた。また、ヘミ接合性男子とモザイク変異男子およびヘテロ接合性女子におけるてんかん重症度には違いはなかった。以上の結果から、本症におけるてんかん病態には変異アレル頻度は関係がなく、神経ネットワークにおける興奮性と抑制性のアンバランスの関与が推定された。疾患モデル動物から得られる知見は、必ずしも患者の病態を反映したものでないことに留意する必要がある。一方、てんかん以外の嚥下機能障害や呼吸機能障害などの症状は、ヘミ接合性変異男子患者がより重度であり、本症の病態には発達性脳症の影響が大きいことが示唆された。

脳MRI解析によって患者群で容積減少領域として同定された左下前頭回三角部は、ブロードマン45野として知られ、弁蓋部(44野)とともにBroca野を形成している。さらにDTI解析では左下前頭回三角部に関連する白質線維束の異常も検出されており、これらの構造的異常は本症の言語機能障害の病態に関連していると考えられた。VEPでのP100潜時が臨床的重症度と相関していたことは、本症患者が皮質性視覚障害を高率に合併することやMRI検査で同定された視覚伝導路の拡散定量値変化とも矛盾せず、P100潜時が客観的な重症度評価指標となる可能性が示唆された。

CDKL5欠損症は、遺伝子変異の直接的な影響とてんかん発作による間接的な影響とが混在した発達性てんかん性脳症と考えることができる。脳MRI画像の統計的解析で示された左下前頭回の容積減少とその領域に関連する神経束の異常は、本症患者で認められる言語機能障害の構造的基盤と考えられた。VEPのP100潜時と臨床的重症度との相関が示されたことから、VEP-P100潜時は、患者の臨床的重症度を客観的かつ定量的に評価できる指標となることが期待された。今後、重症度の異なる患者を含めた多数例での検証や治療介入による臨床的重症度の変化を反映するかの検証が必要である。

【謝辞】

本研究を行うにあたり、研究に参加して頂い

たCDKL5欠損症患者家族会(らぶはんず)の皆様、患者主治医の先生方に感謝を申し上げます。また、研究助成を頂きました公益財団法人てんかん治療研究振興財団に御礼を申し上げます。

【文献】

- 1) Lindy AS, Stosser MB, Butler E, Downtain-Pickersgill C, Shanmugham A, Retterer K, et al. Diagnostic outcomes for genetic testing of 70 genes in 8565 patients with epilepsy and neurodevelopmental disorders. *Epilepsia* 2018 ; **59** : 1062-71
- 2) Olson HE, Demarest ST, Pestana-Knight EM, Swanson LC, Iqbal S, Lal D, et al. Cyclin-dependent kinase-like 5 deficiency disorder : Clinical Review. *Pediatr Neurol* 2019 ; **97** : 18-25.
- 3) Leonard H, Downs J, Benke TA, Swanson L, Olson H, Demarest S. CDKL5 deficiency disorder : clinical features, diagnosis, and management. *Lancet Neurol* 2022 ; **21** : 563-76.
- 4) Montini E, Andolfi G, Caruso A, Buchner G, Walpole SM, Mariani M, et al. Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics* 1998 ; **51** : 427-33
- 5) Zhu YC, Xiong ZQ. Molecular and synaptic bases of CDKL5 disorder. *Dev Neurobiol* 2019 ; **79** : 8-19
- 6) Kalscheuer VM, Tao J, Donnelly A, Hollway G, Schwinger E, Kübart S, et al. Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet* 2003 ; **72** : 1401-11
- 7) Fehr S, Wong K, Chin R, Williams S, de Klerk N, Forbes D, et al. Seizure variables and their relationship to genotype and functional abilities in the CDKL5 disorder. *Neurology* 2016 ; **87** : 2206-13.
- 8) Wang IT, Allen M, Goffin D, Zhu X, Fairless AH, Brodtkin ES, et al. Loss of CDKL5 disrupts kinome profile and event-related potentials leading to autistic-like phenotypes in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; **109** : 21516-21

- 9) Okuda K, Takao K, Watanabe A, Miyakawa T, Mizuguchi M, 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** : e0196587.
- 10) Terzic B, Cui Y, Edmondson AC, Tang S, Sarmiento N, Zaitseva D, et al. X-linked cellular mosaicism underlies age-dependent occurrence of seizure-like events in mouse models of CDKL5 deficiency disorder. Neurobiol Dis 2021 ; **148** : 105176
- 11) Demarest S, Pestana-Knight EM, Olson HE, Downs J, Marsh ED, Kaufmann WE, et al. Severity assessment in CDKL5 deficiency disorder. Pediatr Neurol 2019 ; **97** : 38-42
- 12) Demarest ST, Olson HE, Moss A, Pestana-Knight E, Zhang X, Parikh S, et al. CDKL5 deficiency disorder : Relationship between genotype, epilepsy, cortical visual impairment, and development. Epilepsia 2019 ; **60** : 1733-42
- 13) Takahashi S, Takeguchi R, Tanaka R, Fukuoka M, Koike T, Ohtani H, et al. CDKL5 deficiency causes epileptic seizures independent of cellular mosaicism. J Neurol Sci 2022 ; **443** : 120498

