

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10088

研究課題名（和文）KCNQ2変異マウスを用いBFNEとEIEEの病態解明に挑む

研究課題名（英文）Elucidation of pathophysiology about BFNE and EIEE in KCNQ2

研究代表者

井原 由紀子（IHARA, YUKIKO）

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：80648874

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：BFNEとEIEEで報告されたKCNQ2変異をもつマウスを確保し、生体レベルでの両者の差を確認することを目的とした。EIEE症例で報告されたT274M、G290D変異マウスはBFNE変異マウス（A306T、Y284C）に対し、自然発生けいれん出現や寿命においての相違がすでに報告されたが、我々が継代、飼育している中で自然発生けいれんは観察されなかった。繁殖率で野生型との違いはみられるものの、行動面、出生後の平均寿命においても明らかな相違はみられなかった。また、脳波所見、および選択的カリウムチャネル抑制薬剤（レチガビン）による脳波抑制効果についての有意差は証明できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

てんかん性脳症は難治性てんかん、重篤な知的障害、運動発達障害を呈し予後不良のてんかん症候群である。多剤抗てんかん薬に抵抗性で、発作コントロールに難治し発達遅滞を合併する。複数の原因遺伝子の報告がされているが、その十分な機能解析、有効な治療法開発はなされていない。よって、その病態解明、治療法の開発には大きな意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The subjects were heterozygous knock-in mice (Kcnq2 T274M, G290D) bearing the T274M or G290D mutation, respectively. We cannot consider the difference about EEG and effectiveness of antiepileptic drug. Although differences in spontaneous onset of convulsion and life span have already been reported for the T274M, G290D mutant mice in the EIEE case compared to the BFNE mutant mice (A306T, Y284C), no spontaneous convulsions were observed when we were engaged in passage and rearing. Further, although the fecundity of the mutant mice differed from that of the wild type, there were no obvious differences in the behavioral aspects or postnatal life expectancy.

研究分野：てんかん

キーワード：KCNQ2 新生児てんかん てんかん 発達性てんかん性脳症

1. 研究開始当初の背景

てんかんは全人口の約 1-2%が罹患する神経疾患の中で頻度の高い疾患である。年齢依存性があり、小児期に発症する多くのてんかんは予後良好な特発性てんかんである。これに対し、てんかん性脳症 (EIEE Early Infantile epileptic encephalopathy、2017 年 ILAE てんかん分類では発達性てんかん性脳症 (Developmental and epileptic encephalopathies) と定義) は、新生児期から幼児期にかけ発症し、難治性てんかん発作、重篤な知的障害、運動発達障害を合併する予後不良のてんかん症候群の総称である。多剤抗てんかん薬に抵抗性で発作コントロールは不良、寝たきりや言語獲得がなく、重症心身障がい児として経過する症例は少なくない。脳形成障害や代謝異常、低酸素性虚血性脳症などの原因以外に、遺伝子解析の進歩により、様々な原因遺伝子の報告がなされている。しかし、その十分な機能解析、病態機序解明、有効な治療法開発へは未だ至っていない。*KCNQ2* は電位依存性カリウムチャネル Kv7.2 をコードする遺伝子で *KCNQ3* と 4 量体を形成し、6 回膜貫通型の M-channel を形成する。M チャネルによる K^+ 電流は神経細胞の膜興奮性を制御していると考えられており、その変異は予後良好な経過をとる良性家族性新生児てんかん (BFNE; Benign Familial Neonatal Epilepsy) の原因遺伝子として報告された。2012 年にてんかん性脳症症例でも *KCNQ2* 変異が報告され、*KCNQ2* 脳症 (早期新生児てんかん性脳症 7 型; EIEE7) として認識されるに至ったが、同じチャネル異常による BFNE と EIEE7 の臨床像の違いについて詳細な原因は不明だった。前者はハプロ不全による機能喪失に対し、後者は機能障害による病態相違や変異箇所の違いによるチャネルへのダメージの差、*KCNQ2* 以外の別の修飾因子の存在とその影響などが推測された。in vitro の報告では EIEE で認める *KCNQ2* 変異による M カレントが BFNE 変異に比し、より有意に抑制されることが報告されていた。

2. 研究の目的

年齢依存性てんかん性脳症は新生児期から幼児期にかけ特徴的なてんかん発作で発症し、難治性経過で重篤な発達障害を合併する予後不良の疾患群である。*KCNQ2* 遺伝子は良性家族性新生児てんかん (BFNE) の原因遺伝子として報告されたが、てんかん性脳症患者においても、その変異が原因遺伝子として報告された。同一の遺伝子による疾患が一方で予後良好な経過をとり、一方ではてんかん性脳症を発症し、異なる病態を引き起こしている。EIEE で報告されている *KCNQ2* モデルマウスを用い、BNNE 変異マウスとの比較解析を行い、*KCNQ2* 変異の違いによる病態機序解明や有効な治療法の開発、創薬を目指すことを目的とした。

- 1) EIEE 変異マウスの自然発生けいれんの有無、平均寿命、行動解析、脳波解析
- 2) 薬剤誘発てんかん発作の評価、けいれん閾値の検討
- 3) てんかん発作に対する抗てんかん薬の有効性、発作抑制効果の検討
- 4) 電気生理学的レベルでの M カレントの相違や *KCNQ2* 発現相違などの検討

3. 研究の方法

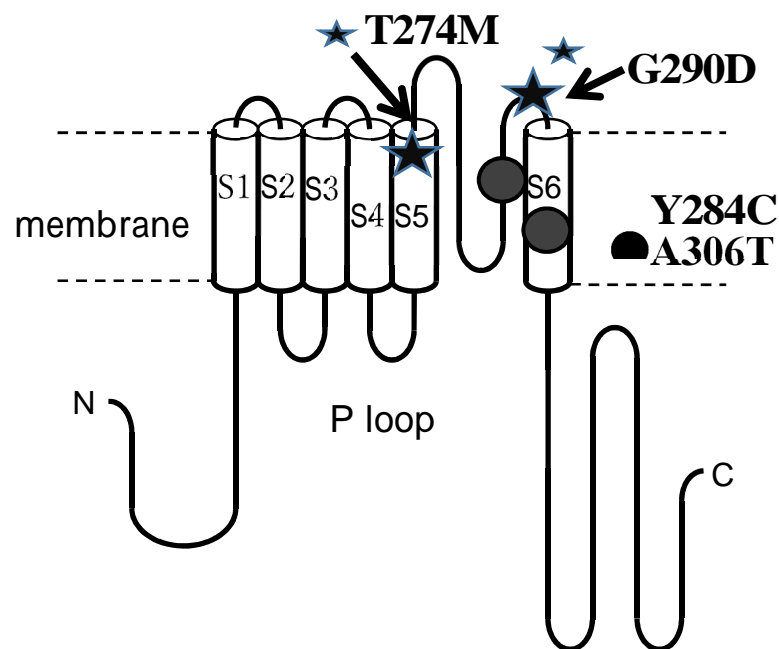
我々は BFNE で既知の変異である Y284C, A306T ノックインマウスを作成し、その行動評価やてんかん発作評価を行い、野生型より有意にてんかん原性を獲得していること、また、カリウムチャネルに選択的に作用する抗てんかん薬レチガビンを用い、発作抑制効果、脳波改善効果を確認した。新生児けいれんで一般的に用いられるフェノバルビタールとの比較検討を行い、レチガビンの有効性を確認した。今回の研究では EIEE7 で同定された T274M、G290D 変異をもつ *Kcnq2* 変異マウスを新たに作成、継代し、これらの変異マウスを用い解析評価を行うとともに、BFNE、EIEE7 群間での行動解析、てんかん発作解析、薬剤有効性の比較検討をする。

- 1) 自然発生けいれんの観察、オープンフィールドテストやロタロッドテストなどの行動解析、前頭部、海馬へ脳波電極を埋め込み安静時脳波、睡眠脳波解析
- 2) グルタミン酸レセプターアゴニストであるカイニン酸や GABA-A 受容体遮断薬であるペンチレンテトラゾールを用いた薬剤誘発発作解析評価
- 3) 抗てんかん薬フェノバルビタール、カリウムチャネルに対し直接の開口作用をもつレチガビンを用い、薬剤誘発発作に対する有効性の確認、および脳波所見の変化確認

同一アミノ酸のミスセンス変異による表現型の違いについて、上記解析以外に電気生理学的評価、発達期の皮質興奮性神経細胞の移動、形態、シナプスネットワーク構築などの形態解析について in vivo 解析を追加する。

4. 研究成果

EIEE 症例で報告された T274M, G290D 変異マウスは、個体の肉眼的変異、奇形や体重において、BFNE 変異マウス (A306T, Y284C) と比較し明らかな相違はなかった。BFNE マウスに対し、自然発生けいれん出現や寿命においての相違がすでに報告されたが、我々が継代、飼育している中で自然発生けいれんは観察されなかった。その繁殖、継代は当初の予定通り進まず遅れた。途中世代の個体については 8 - 10 週齢での短時間の脳波記録解析では発作の捕捉には至らず、明らかな脳波異常は指摘されなかった。繁殖率で野生型との違いはみられるものの、行動面、出生後の平均寿命においても明らかな相違はみられなかった。また、脳波所見、および選択的カリウムチャネル抑制薬剤 (レチガビン) による脳波抑制効果についての有意差は証明できなかった。変異マウスの継代の遅れにより、繁殖に用いる個体数の確保に時間を要し、当初予定した通りの脳波解析、薬剤投与によるてんかん発作解析、薬剤有効性について、十分な検討ができなかった。



引用文献

KCNQ2 encephalopathy: emerging phenotype of a neonatal epileptic encephalopathy. / Weckhuysen S, et al. Ann Neurol. 2012;71:15-25

Genotype-phenotype correlations in neonatal epilepsies caused by mutations in the voltage sensor of K(v)7.2 potassium channel subunits. / Miceli F, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2013;110:4386-91

A knock-in mouse model for KCNQ2-related epileptic encephalopathy displays spontaneous generalized seizures and cognitive impairment / Milh M, et al. Epilepsia. 2020;61:878-878

主な関連論文発表

Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock In Mice Harboring Kcnq2 Mutations / Yukiko Ihara, et al. Plos one, 2016

Abnormal γ -aminobutyric acid neurotransmission in a Kcnq2 model of early onset epilepsy / Taku Uchida, Christoph Lossin, Yukiko Ihara, Masanobu Deshimaru, Yuchio Yanagawa, Susumu Koyama, Shinichi Hirose

Characteristics of *KCNQ2* variants causing either benign neonatal epilepsy or developmental and epileptic encephalopathy / Ayako Goto, Atsushi Ishii, Mami Shibata, Yukiko Ihara, Edward C. Cooper, Shinichi Hirose

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------