

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791096

研究課題名(和文) HCN2 遺伝子異常により発症する熱性けいれんの iPS 細胞を用いた病態解明

研究課題名(英文) Functional analysis using iPS cells for novel HCN2 mutation found in febrile seizure patients.

研究代表者

中村 友紀 (NAKAMURA, Yuki)

福岡大学・医学部・助手

研究者番号：90535072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：熱性けいれん患者より発見された過分極活性型環状ヌクレオチド依存性チャンネル(HCN)変異遺伝子をiPS細胞と神経系の細胞に遺伝子導入し、神経分化に伴うHCN2の働きの変化をパッチクランプ法を用いて検討したところ、ラット海馬CA1細胞において変異型ではコンダクタンスが上昇していた。また細胞内のチャンネル蛋白の分布については、PC-12において細胞膜への移行が確認された。動物神経細胞実験においても培養細胞と同様の結果が得られ、今回の研究はこの遺伝子変異をもつことにより個体が熱性けいれんを発症しうる可能性を示唆した結果になり、熱性けいれんの病態解明の一助になることが大いに期待されるものである。

研究成果の概要(英文)：Novel HCN2 mutation (S126L) found in Febrile Seizure patients was transfected to iPS cells and cultured neurons. The function of HCN mutant protein was examined by using the patch clamp method. The conductance in rat CA1 neurons transfected mutant HCN2 was increased and the distribution of the channel protein showed migration to the cell membrane in PC12 cells. These results of the neuronal cells' experiment was similar to that of the cultured cells' experiment. These results suggest that animals with this HCN2 mutation might have the possibility of causing Febrile Seizure. And these results might help to elucidate the mechanism of Febrile Seizure.

研究分野：パッチクランプ法を用いたイオンチャンネル電流の測定ならびに電気生理学的解析

キーワード：イオンチャンネル パッチクランプ 電気生理 熱性けいれん 遺伝子変異 過分極活性型環状ヌクレオチド依存性チャンネル iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

熱性けいれんは生後6ヶ月から5歳ごろに好発する、38度以上の発熱に伴って発症するけいれん疾患であり頻回に遭遇する救急疾患のひとつである。熱性けいれんが発症する原因として「サイトカイン値の上昇」「ウイルス感染」などがあげられているが、詳細なメカニズムについては未だ明らかにされていない。

申請者は熱性けいれんと脳内の過分極活性化型環状ヌクレオチド依存性陽イオンチャンネル(HCN)を構成する遺伝子である *HCN2* の関係に注目した。HCNチャンネルの働きはナトリウム・カリウムイオンの細胞内外への移動であり( $I_h$  電流と呼ばれる)、神経細胞の静止膜電位の決定に大きく関与していると考えられている。

申請者は熱性けいれん患者をスクリーニングし、本邦において初めて熱性けいれん患者から *HCN2* 遺伝子変異(S126L)を発見し *HCN2* 遺伝子変異体の機能解析を行った。この結果、*HCN2* 変異遺伝子を持つチャンネルは野生型 *HCN2* チャンネルよりも温度に対する感受性が上昇したことを発見した。この実験では培養細胞に *HCN2* 変異遺伝子のみを導入した系であり、変異型 *HCN2* チャンネルが活動電位にどのような影響を及ぼしているのか不明であり、またヒト神経細胞における変異型 *HCN2* チャンネルの機能評価が不可能であった。以上から申請者は *HCN2* と熱性けいれんの因果関係を探るべく、以下を目的として研究を行う。

### 2. 研究の目的

- (1) 変異型 *HCN2* 遺伝子と神経系に発現しているイオンチャンネルをコードする遺伝子を数種類の培養細胞に導入し、生理的評価を行う。
- (2) ラット海馬の CA1 錐体細胞を単離・培養し変異型 *HCN2* 遺伝子を導入する。野生型との違いを生理学的、生化学的に評価する。
- (3) iPS細胞に変異型 *HCN2* 遺伝子を導入し、神経細胞に分化・誘導する。分化誘導後、*HCN* チャンネルの発現形態に変化が見られるか、また静止膜電位や活動電位の発火パターンに変化が見られるかを経時的に観察し野生型と比較検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) GFP 遺伝子などのマーカー遺伝子と連結した *HCN2* 変異遺伝子と、脳神経細胞に発現しているナトリウムチャンネルを構成する遺伝子(*SCN1A*, *SCN8A*)を遺伝子導入試薬又はエレクトロポレーション法を用いて培養細胞に導入し、変異型 *HCN2* チャンネルとナトリウムチャンネルを共発現させる。またラット海馬から単離・培養した CA1 錐体細胞に対しても同様の遺伝子導入を行う。

- (2) 蛋白発現後、パッチクランプ法を用いて

*HCN2* チャンネル電流の測定、膜電位の測定、活動電位の測定を行い、変異型 *HCN2* 遺伝子が静止膜電位や活動電位にどのような影響を与えているのかを野生型と比較検討する。「熱性けいれん」を同様の環境による実験を行うため温度上昇時の静止膜電位や電流の変化の測定もあわせて行う。*HCN* チャンネルは樹状突起において多く発現しているという報告があるので PC-12 や CA1 細胞を使用した場合は GFP などのマーカー遺伝子を用いて変異型 *HCN2* チャンネルの分布も観察する。

- (3) iPS細胞は健常人由来の 201B7 を使用する。iPS細胞から分化した神経幹細胞球に *HCN2* 変異遺伝子を導入する。分化・誘導については、マウス ES 細胞における分化誘導法を一部改良し、神経幹細胞球を経て神経細胞へ分化する方法で行う。FGF-2 などの神経成長因子・誘導因子を投与し神経分化・誘導を進める。

- (4) 変異型 *HCN2* 遺伝子を導入した分化神経細胞に対し、変異型 *HCN2* チャンネルの局在や膜電位・活動電位の測定など前年度に行った実験を各分化段階でも行い、比較検討する。また変異型 *HCN2* 遺伝子を導入した iPS細胞と、野生型の iPS細胞を比較して同様な分化形態を取るのか、分化形態が変化していればどのように違うのかを追跡する。

### 4. 研究成果

*HCN2* 変異体遺伝子をラット海馬細胞に導入し、パッチクランプ法を用いて *HCN2* チャンネル活性の評価を行い、変異型 *HCN2* 遺伝子と野生型の比較を行った。また PC-12 や CA1 細胞を使用し変異型 *HCN2* チャンネルの組織内分布も観察した。さらに変異型 *HCN2* 遺伝子を iPS細胞から分化した神経幹細胞球に導入し分化誘導を行った。

上記の実験の結果、ラット海馬 CA1 細胞における機能評価では、培養細胞と同様の結果(変異型では野生型よりもコンダクタンスが上昇していた)が得られた。また細胞内の分布については、PC-12 において細胞膜への移行が確認された。

変異型 *HCN2* 遺伝子を iPS細胞から分化した神経幹細胞球に導入する実験については、変異遺伝子を神経幹細胞球に導入する過程が非常に困難であったため予定通りに進行せず大幅に遅れ現在分化誘導中であるため現時点で比較が困難な状態である。

以上の結果から動物神経細胞においても培養細胞と同様の結果が得られた。このことから今回の研究は熱性けいれんが個体レベルでも起こりうる可能性を示唆した結果になり、熱性けいれんの病態解明の一助になることが大いに期待されるものである。

また申請者は上記実験と同時期に培養細胞での実験をまとめ、2013年に論文を発表した(PLOS ONE, 8:e80376, 2013)。以下

に結果を報告する

(1) 単純性熱性けいれん患者 126 人の血液より DNA を抽出しダイレクトシーケンスを行った結果、本邦において初めて熱性けいれん患者からヘテロ型の *HCN2* 遺伝子変異 (S126L) を発見した。

(2) *HCN2*cDNA を鋳型にして overlap 法にて S126L の点変異体を作成し、HEK293 細胞に遺伝子導入した。変異蛋白を発現した細胞を用いて、チャンネル電流を測定した。実験温度を 25 から 38 に上昇させた際(熱性けいれんと同様の環境)、全てのサンプルにおいて活性は増大したが *HCN2* 変異遺伝子を持つチャンネル(ホモ変異型とヘテロ変異型)は野生型 *HCN2* チャンネルよりも温度に対する感受性が上昇した(図 1, 2)。また電流密度については、*HCN2* 変異遺伝子を持つチャンネルで電流密度の増大が見られた(図 3)。

(3) cyclicAMP の細胞内投与の実験では、活性の変化の割合は野生型と変異型で有意な差は認められなかった。

(1)~(3)の結果から、*HCN2* 遺伝子変異を持つチャンネル蛋白と温度上昇との両方の条件が重なった場合、脳神経細胞の静止膜電位が上昇し神経の易興奮性(neuronal hypersensitivity)に繋がった結果けいれんを発症することが示唆された。

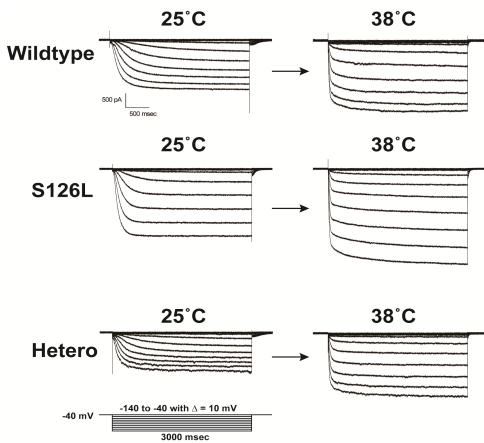


図 1 *HCN2* 野生型・変異型・ヘテロ型のホールセル電流

	25°C		38°C		Δ change
	n	V <sub>1/2</sub> (mV)	n	V <sub>1/2</sub> (mV)	
wildtype	12	-95.1±1.9	8	-92.7±2.0	2.4
S126L	12	-99.0±2.1	8	-90.1±2.6	8.9*
hetero	8	-94.9±1.3	7	-91.5±2.9	3.4

Data are mean ± SEM. Δ = (V<sub>1/2</sub> at 38°C) - (V<sub>1/2</sub> at 25°C). \*indicates p<0.05 compared with the wildtype.

図 2 *HCN2* 野生型・変異型・ヘテロ型の V<sub>1/2</sub> と温度上昇時の V<sub>1/2</sub> の変化

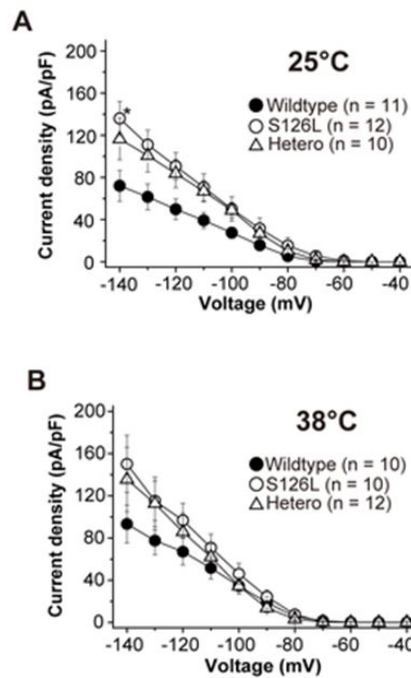


図 3 電流密度の高温下における温度依存性

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Nakamura Y, Shi X, Numata T, Mori Y, Inoue R, Lossin C, Baram T Z, Hirose S Novel *HCN2* mutation contributes to febrile seizures by shifting the channel's kinetics in a temperature-dependent manner. PLOS ONE (8 : e80376, 2013) 査読有り

DOI : 10.1371/journal.pone.0080376

石井敦士 内田琢 中村友紀 廣瀬伸一 てんかんにおける GABA 受容体と K<sup>+</sup>チャンネルの異常 Clinical Neuroscience (30:1397-1400, 2012) 査読無し

井原由紀子 石井敦士 日暮憲道 内田琢 中村友紀 友納優子 廣瀬伸一 てんかんの分子病態 Medical Science Digest (38:292-295, 2012) 査読無し

廣瀬伸一 日暮憲道 中村友紀 黄壽卿 石井敦士 てんかんと遺伝子 Modern Physician (32:282-288, 2012) 査読無し

[学会発表](計 7 件)

Nakamura Y Novel *HCN2* mutation found in febrile seizure patients shifts the temperature sensitivity. The 45th NIPS International Symposium, co-sponsored by The Journal of Physiology (2014, November 25, 生理学研究所, 愛知県岡崎市)

中村友紀、石秀玉、沼田朋大、森泰生、井上隆司、廣瀬伸一 / 家族性熱性けいれん

にて発見された HCN チャネル遺伝子変異の機能解析 - 第 91 回日本生理学会大会 (2014, March 18, 鹿児島大学、鹿児島県鹿児島市)

Nakamura Y / Novel HCN2 mutation causing febrile seizure shifts the activation voltage in a temperature dependent manner. - The 11th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscle Sciences (2013, Sept. 6, Act City Hamamatsu Congress Center, 静岡県浜松市)

Nakamura Y / Electrophysiological analysis of mutant HCN channels found in febrile seizure patients - Korean Epilepsy Congress 2013 (2013, June 13, Grand Hilton Hotel, Korea)

中村友紀、石秀玉、沼田朋大、森泰生、井上隆司、廣瀬伸一 / 熱性けいれん患者において発見された HCN2 変異遺伝子の生理的温度付近における機能解析 - 第 90 回日本生理学会大会 (2013, March 27, タワーホール船堀、東京都)

Nakamura Y / Novel HCN2 mutation causing febrile seizure shifts the activation voltage in a temperature dependent manner. - The 2nd International Symposium of Central Research Institute for the Molecular Pathomechanisms of Epilepsy (2012, Aug. 6, Fukuoka Univ., 福岡県福岡市)

Nakamura Y / Effects of hyperthermia on novel HCN2 mutant channels found in febrile seizure patients - Joint Congress of the 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (2012, May 29, Brisbane Convention & Exhibition Center, Australia)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/epilepsy/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

中村 友紀 (NAKAMURA, Yuki)

福岡大学筑紫病院・小児科・助手

研究者番号：90535072