

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17347

研究課題名(和文)mRNA-Seq解析を用いた難治性小児てんかんKCNQ2脳症の治療薬候補探索

研究課題名(英文)mRNA-Seq analysis in KCNQ2-related epilepsy model mice and the exploration of novel therapeutic drug candidates for KCNQ2-EE

研究代表者

柴田 磨己 (Shibata, Mami)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：20816392

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)：良性(家族性)新生児てんかん(SFNE)と早期乳児てんかん性脳症(KCNQ2-EE)は、共に、KCNQ2遺伝子の一塩基変異(ミスセンス変異)に起因しながら、SFNEは、乳児期には自然寛解し、予後良好である一方、KCNQ2-EEは、精神運動発達遅滞を呈する上、抗てんかん薬に抵抗性である。本研究は、SFNE患者とKCNQ2-EE患者由来の遺伝子変異を保有するモデルマウスを用い、SFNEマウスとKCNQ2-EEマウスの海馬組織では遺伝子発現パターンが異なり、特に、より重症であるKCNQ2-EEマウスではKCNQ2遺伝子発現量が減少していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一遺伝子の変異に起因するSFNEとKCNQ2-EEの重症度の違いは、Kv7.2/Kv7.3チャネルの機能不全レベルに依存すると考えられてきた。本研究では、SFNE、KCNQ2-EE患者の遺伝子変異を保有するモデルマウスを用い、SFNEとKCNQ2-EEの分子病態はmRNAレベルで異なることを明らかにした。この成果はKCNQ2-EEに対する治療薬開発において、核酸治療薬という全く新規の可能性を示すものである。また、本研究ではSFNE、KCNQ2-EEモデルマウスでのてんかんに関する表現形、その重症度の違いを明らかにしたことから、これらモデルマウスのKCNQ2-EE創薬開発への有用性を確立した。

研究成果の概要(英文)：KCNQ2 gene encodes potassium channel subunits Kv7.2, which form heterotetrameric Kv7.2/Kv7.3 channel with Kv7.3 (encoded by KCNQ3 gene). Kv7.2/Kv7.3 channels are highly expressed in the brain, are enriched at the axonal initial segment, suppressing neuronal excitability. Mutations in KCNQ2 gene commonly cause two types of epilepsy: Self-limited Benign Familial Neonatal Epilepsy (SFNE) and Epileptic Encephalopathy (EE), with the haplo-insufficient and dominant-negative effects on Kv7.2/Kv7.3 channels, respectively. However, in this study, we uncovered that transcriptional patterns of hippocampus were different between SFNE and KCNQ2-EE in model mice, especially of the expression levels of Kcnq2 were less in KCNQ2-EE mice compared with those in control litters, through all postnatal ages. These findings would provide insight into the development of novel therapeutics for KCNQ2-related epilepsy.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：KCNQ2 てんかん RNA-Seq トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

良性(家族性)新生児てんかん(KCNQ2-related self-limited familial neonatal epilepsy: SFNE)と早期乳児てんかん性脳症(KCNQ2-related epileptic encephalopathy: KCNQ2-EE)は、共に、KCNQ2 遺伝子のミスセンス変異に起因する。しかしながら、SFNE は、乳児期には自然寛解し、予後良好である一方、KCNQ2-EE は、精神運動発達遅滞を呈する上、既存抗てんかん薬に抵抗性である。

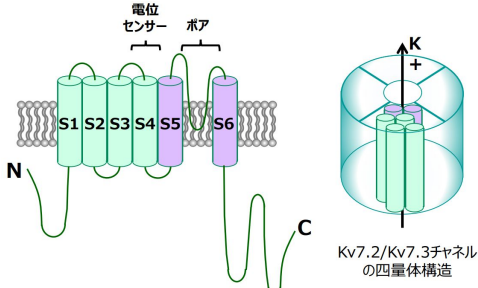


図 1. Kv7.2/Kv7.3 チャンネルの構造

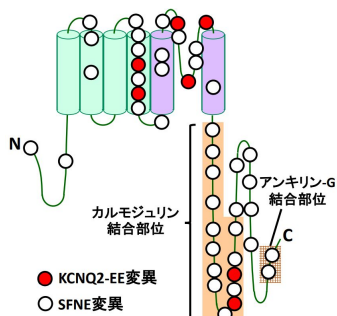


図 2. KCNQ2 遺伝子変異の位置

KCNQ2 遺伝子は、電位依存性カリウムイオンチャネル Kv7.2 をコードし、神経細胞の興奮性調節に重要な役割を担う。Kv7.2 チャンネルは 6 回膜貫通ドメイン (S1-S6) 構造で、S4 は電位センサー、S5 と S6 間の細胞外ループがイオン孔(ポア)を形成する(図 1)。SFNE の原因変異は、Kv7.2 チャンネルの多様な箇所では報告されている一方、KCNQ2-EE の原因変異は、Kv7.2 チャンネルの活性に重要な、S4 領域やポア部分で報告されている(図 2)。このことから、SFNE は対立遺伝子のハプロ不全、KCNQ2-EE は、Kv7.2 チャンネルの活性変化が発症機序と謳われている。しかし、

SFNE と KCNQ2-EE の変異位置は、一部重複していることから、変異位置の違いは、SFNE と KCNQ2-EE の病状の違いを、完全に説明するものではない。

代表者らは先行研究として、野生型マウスと、SFNE 患者由来の変異を保有するマウス(SFNE マウス)の海馬組織を、幼若期から成体期までの計 6 つのタイムポイント(8、12、16、20、32、64 日齢)において、次世代シーケンシングで mRNA-Seq 解析し、遺伝子の発現パターンを網羅的に調査した。その結果、20 日齢の SFNE マウスと野生型マウスには、遺伝子発現パターンに明確な差があることを発見した。また、8、10、20、63~100 日齢のマウスで、発作誘発実験を行った結果、20 日齢以上の野生型マウスと SFNE マウスにおいて、表現形に差が認められた。これらの結果は、生後 20 日における遺伝子発現パターンの変化が、SFNE の病状に影響を及ぼすことを示唆するものである。したがって、KCNQ2-EE の発作発症機序には、Kv7.2 チャンネルの活性変化だけでなく、他分子の発現パターンの変化が関与している可能性が極めて高い。

## 2. 研究の目的

本研究は、KCNQ2-EE に関わる他分子の発現パターン変化を網羅的に同定し、同定した分子の発現パターン変化から、KCNQ2-EE 治療薬候補のとなりうる化合物を特定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

上記を目的とし、以下の 3 点の実施を計画した。

- (1) mRNA-Seq 解析により、KCNQ2-EE に関わる他分子の発現パターン変化を同定する
- (2) *in silico* スクリーニングによって化合物データベースから治療薬候補を探索する
- (3) 同定された KCNQ2-EE 特異的な発現変化を指標としながら KCNQ2-EE マウスへの化合物投与実験を行い、有力な KCNQ2-EE 治療薬候補を同定する

## 4. 研究成果

- (1) mRNA-Seq 解析により、KCNQ2-EE に関わる他分子の発現パターン変化を同定する

本研究では、ニューロン分化やシナプス形成が起こる幼若期から、シナプス成熟が起こる成体期までの、生後 8、12、16、20、32、64 日の計 6 つのタイムポイントで、野生型マウスと KCNQ2-EE マウスから海馬組織を採取し、Illumina NovaSeq で mRNA-Seq 解析を実施した(図 3)。SFNE マウスを用いた mRNA-Seq 解析と同様に、同腹の野生型マウスと KCNQ2-EE マウス間で発現変化を示す遺伝子を網羅的に同定した。

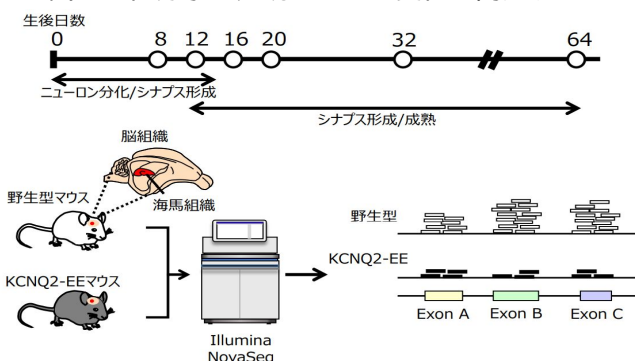


図 3. mRNA-Seq 解析略図

各日齢における、SFNE マウスと野生型マウス間で同定された発現変化遺伝子(先行研究成果)と KCNQ2-EE マウスと野生型マウス間で同定された発現変化遺伝子の Heatmap を図 4 に示す。SFNE マウスでは、12 日齢と 20 日齢で遺伝子の発現変化が著しく、特に、12 日齢では野生型マウスと比較して発現増加していた遺伝子が多く(152 遺伝子)、20 日齢では発現減少していた遺伝子が多く見られた(174 遺伝子)。一方、KCNQ2-EE マウスでは、8 日齢と 32 日齢で遺伝子の発現変化が比較的多く見られ、野生型マウスと比較し、8 日齢では発現減少していた遺伝子が多く(40 遺伝子)、32 日齢では発現増加していた遺伝子が多く確認された(63 遺伝子)。

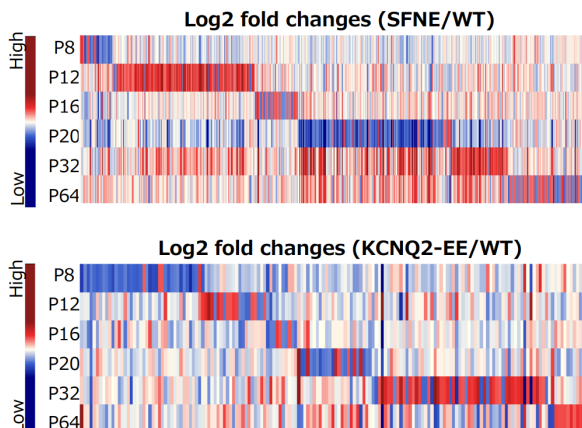


図 4. 発現変化遺伝子の Heatmap

各日齢の KCNQ2-EE マウスと野生型マウス間で同定された発現変化遺伝子数、および、SFNE マウスと野生型マウス間で同定された発現変化遺伝子数を表 1 に示した。8 日齢を除く全ての日齢で、KCNQ2-EE マウスにて発現変化が生じていた遺伝子数は SFNE マウスにて発現変化が生じていた遺伝子数よりも少なかった。また、両群の遺伝子数を比較した結果、8 日齢で 4 遺伝子(*Aldh1a2*, *Satb2*, *Tmem212*, *Crocc2*)、20 日齢で 3 遺伝子(*Lamc2*, *Cbln1*, *Cbln4*)、32 日齢で 6 遺伝子(*Scn5a*, *C130074G19Rik*, *Col6a3*, *Zic3*, *Gpr88*, *Apold1*)が重複していた以外、ほぼ重複は見られなかった。

表 1. 発現変化遺伝子数と重複遺伝子

日齢	SFNE	KCNQ2-EE	重複遺伝子
8	33	40	<i>Aldh1a2</i> , <i>Satb2</i> , <i>Tmem212</i> , <i>Crocc2</i>
12	152	22	-
16	49	15	-
20	174	26	<i>Lamc2</i> , <i>Cbln1</i> , <i>Cbln4</i>
32	109	63	<i>Scn5a</i> , <i>C130074G19Rik</i> , <i>Col6a3</i> , <i>Zic3</i> , <i>Gpr88</i> , <i>Apold1</i>
64	116	25	-

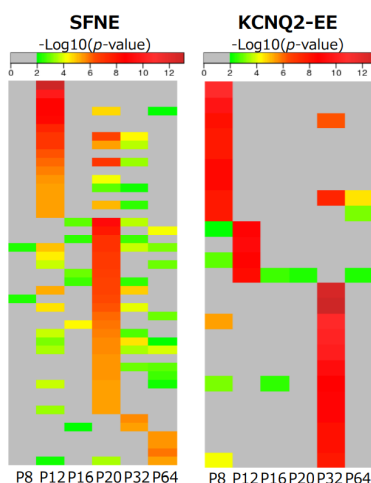


図 5. GOterm の Heatmap

また、上記の発現変化遺伝子群に対して、Gene Ontology (GO) 解析を行った。Enrichment された GOterm (Biological process) の  $p$ -value を Heatmap にて図 5 に示した。GO 解析の結果、KCNQ2-EE マウスでは、8 日齢、12 日齢、32 日齢で有意な GOterm ( $p$  value < 0.05) が検出でき(図 5 右図)、8 日齢で同定された遺伝子群は細胞の発達や形態形成 ("Cellular component assembly involved in morphogenesis" [ $p$ -value =  $6.3E-08$ ], "Tissue development" [ $p$ -value =  $4.8E-06$ ] など)、12 日齢で同定された遺伝子群は、カルシウムイオン濃度の調節や G タンパク関連シグナル伝達 ("Positive regulation of cytosolic calcium ion concentration involved in phospholipase C activating G protein coupled signaling pathway" [ $p$ -value =  $7.6E-07$ ], "G protein coupled receptor signaling pathway coupled to cyclic nucleotide second messenger" [ $p$ -value =  $1.0E-06$ ], "Adenylate cyclase activating G protein coupled receptor signaling pathway" [ $p$ -value =  $1.8E-06$ ], など)、32 日齢で同定された遺伝子群は、転写因子活性 ("RNA polymerase II transcription factor activity sequence specific DNA binding" [ $p$ -value =  $2.5E-09$ ], "Transcription factor activity RNA polymerase II core promoter proximal region sequence specific binding" [ $p$ -value =  $1.3E-09$ ], "Transcriptional activator activity RNA polymerase II transcription regulatory region sequence specific binding" [ $p$ -value =  $1.0E-07$ ] など) に関与していることが明らかとなった。

一方、SFNE マウスにおける発現変化遺伝子群の GO 解析では、SFNE マウスは主に 12 日齢、20 日齢で有意な GOterm が顕著に検出されており(図 5 左図)、12 日齢の SFNE マウスで同定された発現変化遺伝子群は、オリゴデンドロサイト、グリア細胞の分化 ("Oligodendrocyte differentiation" [ $p$ -value =  $1.3E-10$ ], "Glial cell differentiation" [ $p$ -value =  $3.0E-09$ ] など) に関与していること、また、20 日齢の SFNE マウスで同定された発現変化遺伝子群は、イオン輸送、シナプスシグナル伝達 ("Ion transport" [ $p$ -value =  $1.3E-08$ ], "Synaptic signaling" [ $p$ -value =  $2.2E-07$ ] など) に関与していることが明らかとなっている。本研究における KCNQ2-EE マウスで検出された GOterm は、これらの GOterm と重複しておらず、SFNE マウスと KCNQ2-EE の分子病態はいずれの日齢においても同じではないことが示唆された。



さらに、同定された遺伝子を日齢間で比較した。その結果、**SFNE** マウスで同定された遺伝子は、**20日齢**と**32日齢**間で**31**遺伝子の重複が確認できたものの、他に顕著な重複は無く、全ての日齢を通して、共通して発現変化を示した遺伝子は存在しなかった(図6)。一方、**KCNQ2-EE** マウスで同定された遺伝子を比較した結果、全ての日齢を通して、**Kcnq2** 遺伝子の発現が変化していた。

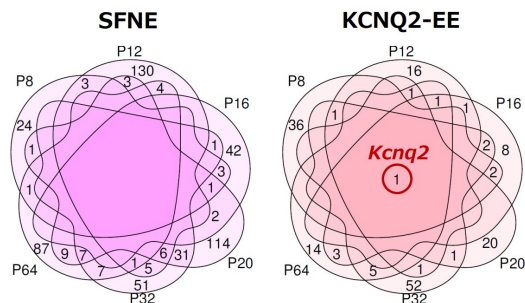


図6. 日齢間における発現変化遺伝子の比較

**Kcnq2** 遺伝子発現の減少は、神経細胞死を生じ、**Kv7** チャネルの機能異常を引き起こすことが報告されている(参考文献)。したがって、**KCNQ2-EE** マウスの分子病態は、**SFNE** マウスの分子病態とは明確に異なり、**Kcnq2** 遺伝子自体の発現変化による神経細胞死、**Kv7** チャネルの機能異常である可能性が高い。

図6. 日齢間における発現変化遺伝子の比較

(2) *in silico* スクリーニングによって化合物データベースから治療薬候補を探索する

分子シミュレーションソフトウェアである **MOE (Molecular Operating Environment : <https://www.molsis.co.jp/lifescience/moe/>)** と低分子化合物データベース(キシダ化学株式会社)を用いて、**Kv7.2/Kv7.3** チャネルと相互作用する低分子化合物を網羅的に探索した。

**Kv7.2/Kv7.3** チャネルは、**Kv7.2(KCNQ2)** 遺伝子由来)と **Kv7.3(KCNQ3)** 遺伝子由来)から成るヘテロ二量体である。本研究では、より実際の三次元構造に近づくため、ヒトの **KCNQ2, KCNQ3** アミノ酸配列(Uniprot データベース: **043526, 043525**)と、PDB ファイル(RCSB PDB データベース: **6EBK**)を用い、ホモロジーモデリングによって、**Kv7.2/Kv7.3** チャネルを作製した(図7左図)。

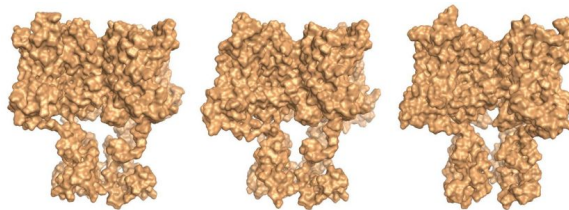


図7. ホモロジーモデリングにより作製した **Kv7** チャネル三次元構造

また、本研究では、**Seefeld** らと同様に(参考文献)、**Kv7.3/Kv7.5** チャネル、および **Kv7.4** チャネルへの結合力も確認するため、ヒト **KCNQ3, KCNQ4, KCNQ5** アミノ酸配列(Uniprot データベース: **043525, P56696, Q9NR82**)を用い、**Kv7.3/Kv7.5** チャネル、**Kv7.4** チャネルも作成した(図7中央図、右図)。

**Kv7.3/Kv7.5** チャネルは、その機能不全が自閉症に関与すること、また、**Kv7.4** チャネルは、脳幹の内耳と中枢聴覚経路で発現し、遺伝子変異によって **DFNA2** と呼ばれる聴覚障害を引き起こすことが報告されている(参考文献)。本研究では、**off-target** による副作用が発生するリスクを回避するため、**Kv7.3/Kv7.5** チャネル、**Kv7.4** チャネルへの結合力と比較し、**Kv7.2/Kv7.3** チャネルへ最も優先的に結合する化合物を探索した。MOE によるドッキングシミュレーションの結果、低分子化合物データベースの中から、**5** 種類の化合物を選出した。

(3) 同定された **KCNQ2-EE** 特異的な発現変化を指標としながら **KCNQ2-EE** マウスへの化合物投与と実験を行い、有力な **KCNQ2-EE** 治療薬候補を同定する

上記化合物の薬効を評価するに先立ち、**KCNQ2-EE** マウスのでんかん表現形を確認した。先行研究により既に、**20日齢**の **SFNE** マウスがカイニン酸によって発作誘発され、また、既知の抗てんかん薬であるレチガピンによって誘発された発作を抑制されることが明らかとなっている(参考文献)。

本研究においても、**KCNQ2-EE** マウスへカイニン酸を投与し、てんかん発作を誘発した。その結果、同腹の野生型マウスと比較してけいれん発作後の致死率が有意に高いことが確認できた(**p-value < 0.0001**, 図8)。さらに、**KCNQ2-EE** マウスの致死率(**71.4% [N=15/21]**)は **SFNE** マウスの致死率(**45.5% [N=10/22]**)よりも有意に低く(**p-value = 0.028**)、**Kcnq2** 遺伝子の発現量が低下している **KCNQ2-EE** マウスの方が、より重度の表現形を示した。また、この **KCNQ2-EE** の致死率は、レチガピンの投与によって改善することも確認できた。

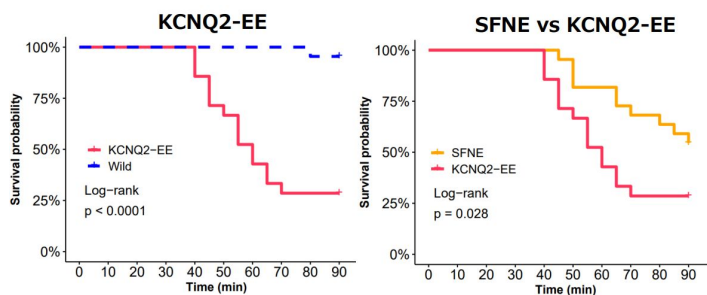


図8. カイニン酸投与後の生存曲線

これらの **KCNQ2** 遺伝子変異マウスの表現形を指標とし、上記 **5** 種類の化合物の薬効評価を実施しようとした。しかしながら、これらの化合物は脂溶性が高く、脂溶性溶媒への溶解が困難であり、投与不可であった。

本研究は先行研究成果と併せ、**Kcnq2** 遺伝子変異マウスは変異箇所の違いにより 2 種類の分子病態が生じることを示すものである。先行研究では、**SFNE** マウスは 12 日齢、20 日齢で神経細胞形態形成やシグナル伝達経路に関する遺伝子の発現が顕著に変化することが示唆された。一方、本研究により **KCNQ2-EE** マウスでは、8 日齢、12 日齢、32 日齢で **SFNE** マウスとは異なる他分子の顕著な発現変化が確認できた。特に、**Kcnq2** 遺伝子の発現量は全日齢の **KCNQ2-EE** マウスで減少しており、この **Kcnq2** 遺伝子の発現量減少は **SFNE** マウスでは確認できていない。また、**SFNE** 患者と **KCNQ2-EE** 患者の症状と同じく、**KCNQ2-EE** マウスは **SFNE** マウスよりも重度のてんかん関連表現形を示した。したがって、**Kcnq2** 遺伝子を含む、これら他分子の発現変化の違いが、**SFNE** マウスと **KCNQ2-EE** マウスの表現形を区分している可能性が高い。

これまでに *in vitro* においてミスセンス変異が **Kcnq2** 遺伝子発現量を減少させることは報告されているが、*in vivo* において上記現象が明らかにされた報告は無く、また、**Kcnq2** 遺伝子変異がオリゴデンドロサイトやグリア細胞分化に関する他遺伝子の発現量を変化させるという報告も無い。一方で、近年の報告では、**Kcnq2** 遺伝子発現量を制御する **microRNA** の存在が明らかとなってきている(参考文献)。 **Kcnq2** 遺伝子発現変化を病因としうる **KCNQ2-EE** では、このような **microRNA** などの核酸治療薬の開発が有効である可能性がある。本研究では、目的とする治療薬候補化合物の取得は達成できなかったが、**KCNQ2** 遺伝子関連てんかんの根治治療薬に大きく貢献する知見を得ることに成功した。今後、本研究によって明らかとなった知見を基に、**KCNQ2** 遺伝子関連てんかんの分子病態に基づく創薬研究を進めていく。

#### 【参考文献】

- Kim, Eung Chang, et al. "Reduced axonal surface expression and phosphoinositide sensitivity in Kv7 channels disrupts their function to inhibit neuronal excitability in *Kcnq2* epileptic encephalopathy." *Neurobiology of disease* 118 (2018): 76-93.
- Seefeld, Mark A., et al. "Novel KV7 ion channel openers for the treatment of epilepsy and implications for detrusor tissue contraction." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28.23-24 (2018): 3793-3797.
- Gilling, Mette, et al. "Dysfunction of the heteromeric KV7.3/KV7.5 potassium channel is associated with autism spectrum disorders." *Frontiers in genetics* 4 (2013): 54.
- Kubisch, Christian, et al. "KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness." *Cell* 96.3 (1999): 437-446.
- Ihara, Yukiko, et al. "Retigabine, a Kv7. 2/Kv7. 3-channel opener, attenuates drug-induced seizures in knock-in mice harboring *Kcnq2* mutations." *PloS one* 11.2 (2016): e0150095.
- Kim, Kwon-Woo, et al. "Posttranscriptional modulation of *KCNQ2* gene expression by the miR-106b microRNA family." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.47 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Goto Ayako, Ishii Atsushi, Shibata Mami, Ihara Yukiko, Cooper Edward C., Hirose Shinichi	4. 巻 60
2. 論文標題 Characteristics of KCNQ2 variants causing either benign neonatal epilepsy or developmental and epileptic encephalopathy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Epilepsia	6. 最初と最後の頁 1870 ~ 1880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/epi.16314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mami Shibata, Masanobu Deshimaru, Atsushi Ishii, Shinichi Hirose
2. 発表標題 Developmental transcriptome alterations in the hippocampus of mice harboring a Kcnq2 mutation
3. 学会等名 Asian Oceanian Congress of Child Neurology（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------