

氏名	いはら ゆきこ 井原 由紀子		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第1627号		
学位授与の日付	平成28年9月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（課程博士）		
学位論文題目	Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock-In Mice Harboring Kcnq2 Mutations (K+チャネル開口薬レチガビンは kcnq2 変異マウスの薬剤誘発てんかん発作に対し有効である)		
論文審査委員	(主査) 福岡大学	教授	廣瀬 伸一
	(副査) 福岡大学	教授	坪井 義夫
	福岡大学	教授	井上 隆司
	福岡大学	教授	小川 厚

内容の要旨

【目的】

KCNQ2遺伝子は電位依存性K⁺チャネルをコードする遺伝子で、良性家族性新生児てんかん（BFNE）の原因遺伝子の一つである。チャネルにより細胞外向きに生じるK⁺電流は、M-カレントと呼ばれる抑制系の電流を発生し新生児期の脳において主要な抑制系として働き、変異によるK⁺電流の減少はニューロンの興奮性を高めててんかん発作をきたすと考えられている。近年、難治性のてんかん発作、重度発達遅滞を示すてんかん性脳症症例においてもKCNQ2変異が報告され有効な治療薬開発が望まれている。K⁺チャネルを直接開口させる薬剤投与は、KCNQ2機能異常に基づく発作を軽減させる可能性が考えられる。我々はBENEで既報告の変異をもつKcnq2変異モデルマウスを用い、K⁺チャネル開口薬レチガビンの薬剤誘発てんかん発作や脳波所見に対する有効性を検討し、新生児けいれんの治療代表薬であるフェノバルとの比較検討を行った。

【対象と方法】

日齢63-100のY284CとA306Tヘテロノックインマウスに頭蓋内電極を設置し、グルタミン酸受容体アゴニストの一つであるカイニン酸（KA）12mg/kgを腹腔内投与しけいれん発作を誘発した。ビデオ脳波同時モニタリングを施行し、KA投与後2時間以内に発作の観察、脳波評価を行った。次にKA投与30分前に生食、RTGあるいはPB(5mg/kgおよび15mg/kg)をそれぞれ腹腔内投与し薬剤投与効果、容量依存効果について評価した。各群n=6-10で施行し、発作はModified Racine's scaleを用い5段階スコアで比較（発作スコアが高い程より重度の発作を示す）、さらに脳波の棘波群発回数、棘

波群発持続時間について比較検討した。

【結果】

1) 野生型と変異マウスの比較：野生型はすべて発作score3以下に対しY284C, A306T変異マウスはともに高い発作スコアを認めた ($p = 0.0002$, Y284C vs. WT; $p = 0.0024$, A306T vs. WT)。

脳波はY284C群が野生型およびA306T群に比べ棘波バースト回数が多く、持続時間は長く、いずれも有意差を認めた(棘波バースト回数 $p = 0.0001$, Y284C vs. WT; $p = 0.0102$ Y284C vs. A306T) (棘波持続時間 $p = 0.0001$, Y284C vs. wild; $p = 0.0131$; Y284C vs. A306T)。A306T群と野生型では脳波所見の有意差はなかった。

2) Y284C群における薬剤効果：PB, RTG投与群ともに生食投与群に比し有意に発作抑制を認めた ($p = 0.00135$; PB vs. vehicle; $p < 0.0001$, RTG vs. vehicle)。また、RTG群はPB群に比しより発作抑制傾向がみられ ($p = 0.0766$)、PB群が15mg/kg投与でのみ有意差を認めたのに対し、RTG群は5mg/kg, 15mg/kgいずれの群も発作抑制効果を認めた。容量依存効果はなかった。脳波では棘波バースト回数でPBは5mg/kgのみ、RTGは5mg/kg, 15mg/kg両群 ($p = 0.0256$, 5mg/kg PB vs. Vehicle) ($p = 0.0049$, 5mg/kg RTG vs. vehicle; $p = 0.0012$, 15mg/kg RTG vs. vehicle)、バースト持続時間でも同様にPB群は5mg/kgのみ有意差を認めたのに対し、RTG群は5mg/kg, 15mg/kgいずれも有意差を認め ($p = 0.0851$, 5mg/kg PB vs. Vehicle) ($p = 0.0011$, 5mg/kg RTG vs. vehicle; $p = 0.0003$, 15mg/kg RTG vs. vehicle)、PBに比しRTGが有効だった。

3) A306T群における薬剤効果：RTG群でのみ有意に発作抑制効果を認めた ($p = 0.0015$, RTG vs. Vehicle)。RTG群は5mg/kg, 15mg/kgいずれの群も発作抑制効果を認めた。容量依存効果はなかった。脳波所見においては、棘波バースト数ではRTG群のみにおいて生食群に比し有意にバースト数減少を認めた ($p < 0.0001$, 5mg/kg RTG vs. vehicle; $p = 0.0224$, 15mg/kg RTG vs. vehicle)。バースト持続時間ではPBは15mg/kgのみ、RTGでは5mg/kg, 15mg/kgいずれの群でも改善効果を認めた ($p = 0.0413$, 15mg/kg PB vs. vehicle) ($p < 0.0001$, 5mg/kg RTG vs. vehicle; $p = 0.0117$, 15mg/kg RTG vs. vehicle)。RTG群とPB群の比較ではRTG群が棘波バースト数、持続時間いずれもPB群に比し有意な改善効果を認めた ($p = 0.0603$; $p = 0.0740$, RTG vs. PB)。

【結論】

1. Y284C, A306T変異マウスは野生型に比し高い発作スコアを示した
2. レチガビンは発作スコア、脳波所見ともに改善効果を示し、PBに比し有意な改善効果を認めた
3. K⁺チャンネル開口薬はカリウムチャンネル異常によるてんかん発作に対し新たな治療薬となりうる

審査の結果の要旨

本論文は、電位依存性 K⁺チャンネルをコードする KCNQ2 ノックインマウスを用い、K⁺チャンネル開口薬レチガビンの薬剤誘発てんかん発作に対する発作抑制効果や脳波所見の改善効果を、新生児けいれんの治療代表薬であるフェノバルと比較検討し、評価した論文である。

1. 斬新さ

同一エクソン内にある複数の種類の *Kcnq2* 変異マウスを用い、ビデオ同時脳波記録で実際の発作症状と脳波を客観的に評価し、カリウムチャンネル開口薬の有効性を確認した。既報告では、動物実験レベルにおいて、また *Kcnq2* 遺伝子単独の変異において、レチガビンの有効性を評価した論文はない。この点で初の報告となっており、独自性があり斬新さを有するといえる。

2. 重要性

近年 KCNQ2 遺伝子は、新生児期にてんかん発作が限定され発達予後良好な良性家族性新生児てんかんのみならず、難治性発作、重度の発達遅滞を呈するてんかん性脳症症例でも変異が発見され、KCNQ2 脳症として報告されている。てんかん性脳症では発作コントロールは不良で有効な治療法がなく、複数の抗てんかん薬治療を要し、その予後は極めて不良である。今回変異マウスにおいてレチガビンの有効性が確認されたことはカリウムチャンネル開口薬の臨床治療への応用、今後の新たな創薬、開発に重要な役割を果たすと思われる。

3. 実験方法の正確性

本実験にあたっては、マウス作成の段階から電気泳動、DNA 直接シーケンスを用い、変異の有無の確認をしている（先行論文あり）。マウスは 10 世代以上継代され、適切な管理のもと飼育されたマウスを用いている。これらのマウスに関しては、すでに形態学、行動、睡眠脳波、電気生理、別の薬理実験の手法を用い、マウスの特徴や、中枢神経の易刺激性を確認している。研究方法の正確性は高い。

4. 表現の明確さ及び結論

結論は明確で、変異マウスは野生型マウスと比較し、高いてんかん発作スコアを有し、よりてんかん発作が起りやすかった。これらの変異マウスに対し、レチガビンを前投与することで、明らかな発作抑制効果が得られ、かつ、脳波所見においても棘波バースト回数、持続時間は有意に改善され、フェノバルに比し有効だった。Y284C、A306Tいずれの変異マウスにおいても同様の改善効果が得られ、レチガビンが *Kcnq2* 変異マウスの薬剤誘発てんかん発作に対し有効であることが結論づけられた。

主な質疑応答

<井上 隆司副査>

Q. 今回用いられているマウスの日齢は遅いと思われるが？GABA系の未熟性を考慮する日齢に値しないのではないかと？その点についてはどうか？

A. 指摘のとおり、今回用いたマウスはヒトでの年齢に照合すると新生児期には該当せず、10代後半以降となり、厳密な意味では新生児期のけいれんを評価しているわけではない。脳波電極サイズ、手術主義的な問題、離乳し実験に耐えうる時期などを考慮し今回の日齢マウスを実験に用いた。

Q. KCNQ2の発現に対し確認実験、ウエスタンブロットなどの基礎実験データ、確認はしているのか？脳内での発現がどのようになっているか、基礎実験データの裏付けとともに明示される方がよい。

A. 今回の実験での直接的な確認はしていないが、先行実験で確認されている。

Q. 発作誘発については大脳皮質のみならず、視床機能の問題など他の要因もあるかと思われるが、

KCNQ2の発現の観点から、発作抑制効果や脳波改善効果が単純にレチガビンの効果と判断していいのか？その裏付けは？

A. 神経細胞の興奮発現、脳波変化においては興奮系と抑制系の関与、様々な神経伝達物質ネットワークを介しているが、KCNQ2は海馬、新皮質、小脳顆粒層に発現し、膜電位安定化、神経興奮性をコントロールしているとされる。カリウム開口薬投与により電気生理学的評価において実際にMカレントの改善効果が示される。発作や脳波所見の変化はレチガビンの効果と判断する。

Q. なぜ、今回の二つの変異を選んだのか？電気生理学的なMカレント抑制の確認はしているか？

各変異の電位変化は？

A. 2つの変異はチャンネルのポア付近をコードする箇所、ポアはカリウムが通過する

ところであるため、イオン選択性フィルター、選択的カリウムイオン透過機能、開閉ゲート機能を担っている。

より発作症状が明確にでることが予想された。ただし、人での報告では明らかな臨床経過の違いは報告されていない。変異による電気生理学的な M カレント抑制については先行実験で確認されている。

変異間の差はなかった。

Q. ホモの変異マウスの評価はないのか。

A. ホモのマウスの出生はあるが、数が少なく、実験評価に用いる十分な匹数は確保できない。

また人ではホモの変異はみられない。

Q. いくつかの統計学的評価が用いられているが、その妥当性、整合性についてはどうか？論文内で明確にこの点について言及したほうがよかったと思われる。

A. 御指摘された点について今後の改善につなげたい。データの特異性、ばらつきなどを踏まえ、いくつかの統計学的手法を検討した後、今回のデータに対し適切な統計方法を用い評価を行った。

過去の論文で用いられている統計学的手法についても参照した。

<坪井 義夫副査>

Q. 今回の研究はどれくらいの人に役に立つのか？その疫学的な頻度はどうなのか？

A. 明確な発症頻度については言及できなかった。てんかん全体の発症頻度が約 100 人に一人程度の頻度で、新生児期に発症する良性家族性新生児てんかんはさらに少ない頻度である。また、本疾患事態は発作は新生児期に限定され発達予後は良好とされる。ただし、発作群発を認めること、カリウムチャネル変異をもつ予後不良の脳症症例に対する治療薬として臨床的な応用、効果が期待される。

家族性、孤発例を含め KCNQ2, KCNQ3 変異をもつ良性新生児けいれん症例は本邦では約 50%程度にとどまっている。

Q. 実験に用いたマウスの匹数は？今回 6-10 匹程度での評価だがこの匹数で妥当性があるのか？

A. 動物実験における倫理的問題から実験に使用する匹数は最低限に限られる。実験に用いる匹数としては特に問題ないと考えられ、過去の動物実験の論文と比較しても妥当な数と考える。

Q. ノックインマウスの発現のばらつきはどうか？

A. 個々のマウス間では発作や脳波の発現の差はあるが、全体的には一定分布を示す。ただし、今回の論文では Y284C と A306T の個体間では、脳波所見において棘波バース

ト回数、持続時間が有意差をもって Y284C 群で多く長い所見で、発作スコアは統計学的有意差はなかったが、Y284C が発作スコアは高い傾向にはあった。

Q. フェノバールを比較薬剤として用いたのは何故か？

A. 臨床的に新生児けいれんの治療薬としてまず第一に使用される薬剤であるため、比較検討した。

<小川 厚副査>

Q. 創薬を考慮する研究だと思われるが、レチガビンの薬理作用、何故この薬剤を選出したのか？

臨床的に実際どのように応用されているのか？ 日本での使用はどうなっているのか？

A. カリウムチャネルの直接開口作用を有し変異体の活性閾値をより正常な陰性電位にシフトし

チャネルを安定化させる作用を持つ。カリウムチャネル変異に対しより直接的な作用を持つことで、有効性が期待される。海外ではすでに成人の部分てんかんに対し臨床応用、治療薬として使用されている。ただし、近年粘膜への色素沈着報告がなされ、その使用にあたっては注意勧告がなされている状況がある。このため、本邦では治療薬としての臨床治験が開始される予定だったが、頓挫している経緯がある。

Q. レチガビン以外の薬剤は考えられているのか？新たな創薬につなげていけるのか？

A. レチガビンで報告されている副作用がない、新たなカリウムチャネル開口薬の創薬がすすんでいる。

Q. 今回用いた 2 種類の変異マウス以外のモデルマウス作成はあるのか？

A. KCNQ2 脳症症例で報告されている新規変異を導入したモデルマウスを作成している。今後実験評価を行い、良性家族性新生児てんかん症例での変異と比較検討をすすめていく必要がある。

【追加質問】

井上副査：野生型と変異マウスの高次脳機能の差はあるのか？ ヒトではどうか？

A. 高次機能評価方法が難しいかと思われるが、先行実験において少なくとも睡眠、行動面において明らかな差は認めなかった。飼育中の死亡率においても明らかな差はないと判断している。

ヒトでは基本的にその後の発達経過としては良好とされているが、一部の症例では二次性てんかんの報告や、またてんかんそのものが、発達障害など有する症例がない症

例よりもてんかん発症リスクは高いとされており、この点では脳機能の差を考慮すべき問題と考える。

井上副査：レチガビンは KCNQ1 への効果はあるのか？

A. ない

井上副査：レチガビンの投与量の血中濃度は？

A. 測定していない。マウスとヒトの換算ではヒトで臨床的に用いられる投与量より少ない投与量にあたる。実際の投与量については過去の文献を参考に、予備実験を行った上で決定した。

坪井副査：このてんかん発作は focal な発作と考えて良いのか？

A. 脳波所見は 2 電極埋め込みにより得られる脳波で評価しており単一誘導での脳波記録となる。

脳波分布評価は困難であるが、一般的に新生児てんかんの発作起源としては全般てんかんというより、focal な要素が強いと考えられている。

坪井副査：複数の抗てんかん薬による効果は？

A. 確認していない。単剤投与のみしか行っていない。

本論文は、KCNQ2 の遺伝子変異マウスに対する薬剤有効性を明確に示しており、また申請者も質疑に適切に対応しており、学位論文に値すると評価された。