

KCNQ 2 遺伝子異常を共有する悪性てんかんと 良性てんかんの分子病態を mRNA-Seq により解明する

(課題番号：187202)

- ・ 研究期間：平成30年 7 月31日～平成31年 3 月31日
- ・ 研究代表者：柴田磨己

【緒言】

良性（家族性）新生児てんかん（BFNE）と早期乳児てんかん性脳症（KCNQ 2 脳症）は、共に電位依存性カリウムイオンチャンネル Kv7.2 をコードする *KCNQ 2* 遺伝子に異常を呈する。BFNE と KCNQ 2 脳症の表現形は対照的で、BFNE は乳児期には自然寛解し、予後良好である一方、KCNQ 2 脳症は精神運動発達遅滞、筋緊張低下、ジストニアを呈する。現状、既存の有効な抗てんかん薬は無い。先行研究として、BFNE 患者由来の変異を有するてんかんモデルマウス（BFNE マウス）を作出し、生後63日～100日の成体期にある BFNE マウスが、発作誘発薬剤であるカイニン酸に野生型マウスよりも有意に高い感受性を示すこと、さらにカリウムイオンチャンネル開口因子として報告されているレチガビンが、BFNE マウスにおけるカイニン酸誘導てんかん発作に有効であることを明らかにしてきた（Ihara et al., 2016）。しかしながら、BFNE の分子病態や発症機序については、未だ不明のままである。

近年の次世代シーケンシング技術、特に RNA シーケンシング（RNA-Seq）を用いたてんかんの分子病態研究では、てんかんの発症、および重症度に他分子の発現変化が関与していることが報告されている（Hawkins et al., 2016 ; Sprissler et al., 2017）。本研究では、*KCNQ 2* 遺伝子の異常に起因するてんかんの分子病態解明を目的とし、BFNE 患者由来の変異を保有する BFNE マウス、および野生型マウスの海馬を RNA-Seq 解析した。さらに、BFNE マウスと野生型マウスに対して、カイニン酸、およびレチガビンの投与実験を行うことで、RNA-Seq 解析によって明らかとなった転写産物変化とカイニン酸誘導てんかん発作症状との関係性について調査を行った。

参考文献

- Hawkins, Nicole A., et al. “Fine mapping of a Dravet syndrome modifier locus on mouse chromosome 5 and candidate gene analysis by RNA-seq.” *PLoS genetics* 12.10 (2016):e 1006398.
- Sprissler, Ryan S., et al. “Altered gene expression profile in a mouse model of SCN 8 A encephalopathy.” *Experimental neurology* 288 (2017):134-141.
- Ihara, Yukiko, et al. “Retigabine, a Kv 7.2/Kv 7.3-channel opener, attenuates drug-induced seizures in knock-in mice harboring *Kcnq 2* mutations.” *PLoS One* 11.2 (2016):e 0150095.

【研究成果】

■ シーケンシング結果

本研究では、生後 8、12、16、20、32、64 日の幼若期から成体期にかけて、6 つのタイムポイントで RNA-Seq を実施した。各タイムポイントで野生型マウス、および BFNE マウスの 3 個体ずつより海馬を採取し、RNA 抽出後、次世代シーケンサー Illumina NovaSeq で、paired-end 101bp の条件にてシーケンシングを実施した。シーケンシングによって得られた配列は、エラー等を含む低品質の配列が含まれることがあり、以降の解析に支障を来す可能性がある。このため、本研究では FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)、および Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) を用いて、得られた配列の品質調整を行い、高品質の配列のみを抽出した。また、抽出した配列を HISAT 2 (<https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/index.shtml>)にて、マウスの参照ゲノム配列 (*M. musculus*, GRCm 38; <https://cloud.biohpc.swmed.edu/>

index.php/s/grcm38_snp_tran) 上へ、貼り付け (マッピング) した。また、この時、ゲノム配列上の只一か所のみマッピングされた配列のみを以降の解析に使用した。

海馬を採取したマウス、シーケンシングによって得られた配列数、マッピングされた配列数等の情報を、Table 1 に示す。

Table 1. シーケンシング、およびマッピングの集計結果

Postnatal days	Genotype	Sex	Biological replicates	Raw reads (Average)	Mapped reads (Average)	% (Mapped/Raw)
8	Wild-type	Male	3	54,656,759	50,701,600	92.8
8	BFNE	Male	3	59,981,411	52,287,584	87.2
12	Wild-type	Male	3	59,959,598	54,932,683	91.6
12	BFNE	Male	3	62,047,089	53,538,898	86.3
16	Wild-type	Male	3	61,400,879	54,525,016	88.8
16	BFNE	Male	3	53,000,226	47,369,776	89.4
20	Wild-type	Male	3	51,765,279	46,160,190	89.2
20	BFNE	Male	3	52,967,829	47,161,099	89.0
32	Wild-type	Male	3	52,534,697	46,519,639	88.6
32	BFNE	Male	3	50,333,969	44,763,378	88.9
64	Wild-type	Male	3	55,812,121	49,716,882	89.1
64	BFNE	Male	3	49,072,804	43,620,561	88.9

■ 発現変化遺伝子群の同定

BFNE マウスと野生型マウスの間で、発現量に有意な変化を示す遺伝子を網羅的に同定した。始めに、htseq-count (https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.11.1/) を用いて、マッピング結果から各遺伝子の発現量値を算出した。算出された発現量値を DESeq 2 (R パッ

ケージ : https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html) を用いて比較し、タイムポイントごとに、BFNE マウスと野生型マウス間で有意に発現量変化が生じている遺伝子を同定した (例 : 図 1 A)。

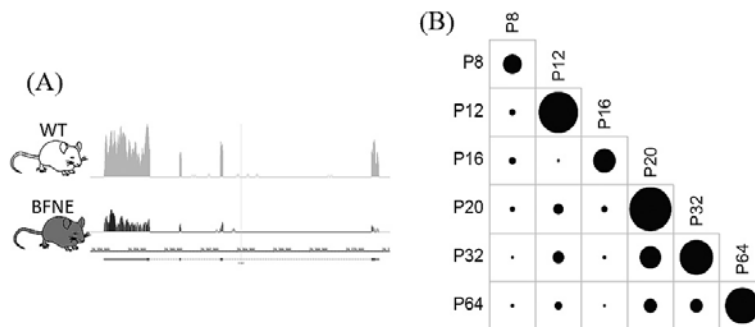


図 1. 発現変化遺伝子例と各遺伝子群の重複関係図

(A) 野生型マウス (上段) と BFNE マウス (下段) における、同定された遺伝子の発現状態を表す。Y 軸はシーケンスされた配列数、すなわち発現量値を、X 軸は遺伝子の構造を表す。

(B) 同定された遺伝子群の重複関係を表す。円の大きさは重複遺伝子数を表す。

その結果、生後 8、12、16、20、32、64 日では、それぞれ、33、152、49、174、109、116 個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子は、生後 20 日と 32 日間で 44 遺伝子の重複があったものの、全体的に、タイムポイント間ではほぼ重複がなかった (図 1 B)。

また、同定された遺伝子数が多かった生後 12 日の遺伝子群の多くは、BFNE マウスの発現量が野生型マウスの発現量よりも増加していた一方、同じく、同定された遺伝子数が多かった生後 20 日の遺伝子群の多くは、

BFNE マウスの発現量が野生型マウスの発現量よりも減少していた。これら生後 12 日、20 日で同定された遺伝子群のうち、それぞれ 10 個、および 9 個の遺伝子については、qPCR にて実験的にも有意な発現変化を確認している。図 2 に例として、生後 12 日、および生後 20 日の各 5 遺伝子の qPCR 結果を示す。

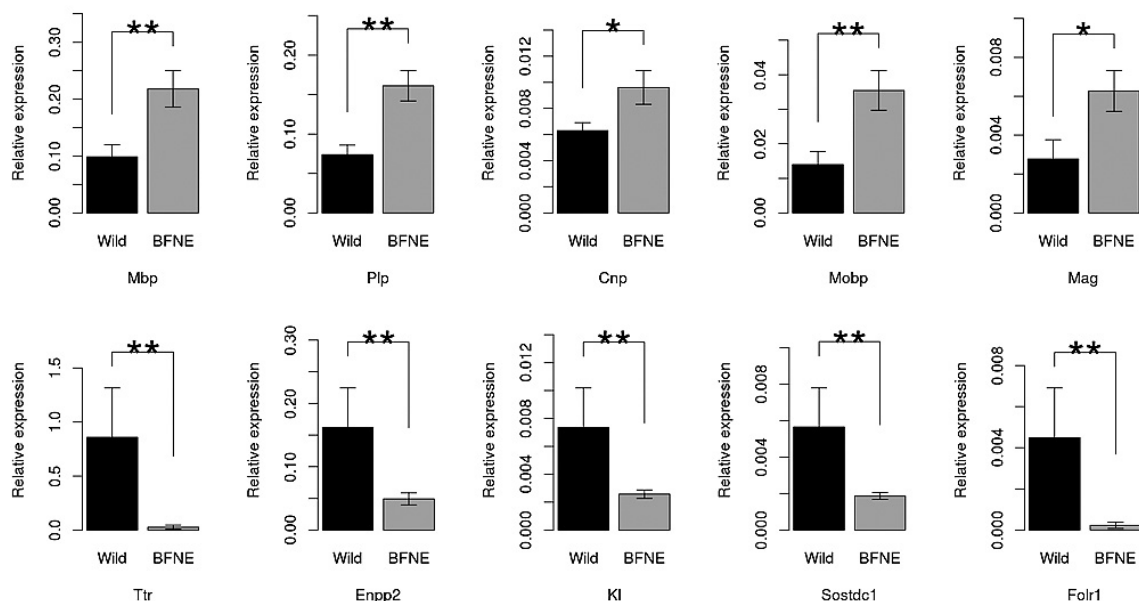


図 2. 発現変化遺伝子群の qPCR 結果

上段 5 遺伝子は、生後12日で同定された遺伝子の qPCR 結果を、下段 5 遺伝子は、生後20日で同定された遺伝子の qPCR 結果を示す。「*」、「**」はそれぞれ、t 検定によって算出された p 値が0.05未満、または0.01未満であることを表す。

■ 発現変化遺伝子群の *in silico* 機能解析

各タイムポイントで同定された発現変化遺伝子群が、どのような生物学的プロセスに関与しているかを調べるため、*in silico* 機能解析 (Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)) を実施した。GSEA には、EGSEA (R パッケージ : <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/EGSEA.html>)、と MSigDB ([http://](http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/collections.jsp)

software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/collections.jsp) からダウンロードした Gene Ontology (GO) gene sets ファイル (c5.bp.v7.0.symbols.gmt) を用いた。

GSEA の結果として、各タイムポイントで同定された遺伝子群が、主要に関与する生物学的プロセスを Table 2 に集約した。発現変化遺伝子数が多かった、生後12日の遺伝子群は、「Oligodendrocyte development」($p =$

Table2. 発現変化遺伝子群の GSEA 結果

「GO term」は関与する生物学的プロセスを、数値は解析によって算出された p 値を表す。

GO term	P 8	P12	P16	P20	P32	P64
Neurotransmitter transport	3.79. E-03	—	5.88. E-03	9.41. E-06	—	—
Ion transmembrane transport	8.22. E-03	—	9.03. E-05	1.46. E-09	3.60. E-03	1.74. E-03
Synaptic signaling	8.35. E-03	—	3.21. E-04	9.76. E-06	—	—
Ensheathment of neurons	—	4.32. E-16	—	—	—	—
Glial cell development	—	1.41. E-12	—	—	—	—
Oligodendrocyte development	—	1.73. E-12	—	—	—	—
Gliogenesis	—	5.79. E-12	—	—	—	—
Axon ensheathment in central nervous system	—	1.39. E-11	—	—	—	—
Central nervous system development	—	5.27. E-09	—	8.78. E-03	—	1.58. E-04
Microtubule bundle formation	—	5.96. E-07	—	2.24. E-03	4.68. E-03	—
Regulation of myelination	—	1.73. E-06	—	—	—	—
Cilium movement	—	2.38. E-05	—	1.13. E-07	9.27. E-05	—
Cell projection organization	—	3.78. E-05	—	9.52. E-06	6.63. E-05	—
Cell cell signaling	—	—	2.24. E-04	9.61. E-07	9.23. E-03	—
Calcium ion transmembrane transport	—	—	7.84. E-04	4.57. E-06	—	—
Signal release	—	—	3.54. E-03	8.99. E-06	9.68. E-03	—
Secretion	—	—	4.28. E-03	1.56. E-06	6.92. E-03	—
Cellular response to endogenous stimulus	—	—	—	1.12. E-07	7.35. E-04	3.43. E-03
Response to growth factor	—	—	—	1.62. E-07	4.89. E-04	1.72. E-04
Regulation of cellular response to growth factor stimulus	—	—	—	1.78. E-06	1.10. E-04	1.01. E-03
Circulatory system development	—	—	—	2.14. E-06	—	5.87. E-04
Regulation of ion transport	—	—	—	4.65. E-06	—	—
Embryonic morphogenesis	—	—	—	8.38. E-05	2.54. E-06	1.28. E-04
Dopaminergic neuron differentiation	—	—	—	—	—	4.65. E-07

1.73e-12)、「Gliogenesis」($p=5.79e-12$)、「Regulation of myelination」($p=1.73e-06$)等に関与している一方、生後20日で同定された遺伝子群は、「Synaptic signaling」($p=9.76e-06$)、「Cell cell signaling」($p=9.61e-07$)、「Signal release」($p=8.99e-06$)、に関与していることが示された。

■ スプライシング変化遺伝子群の同定

スプライシング変化は、異常な転写産物を生成することで機能異常タンパク質の生成を誘発しうる。このような機能異常タンパク質は、てんかんの分子病態形成に関与する可能性が高い。本研究では、発現変化遺伝子だけでなく、BFNE マウスと野生型マウス間でスプライシング変化が生じている遺伝子も網羅的に同定した。

スプライシング変化遺伝子群の同定では、htseq-count によって算出された発現量値を、DEXSeq (R パッケージ

ジ: <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DEXSeq.html>) で比較することで、BFNE マウスと野生型マウス間で発現量が顕著に異なる exon 領域、すなわち、スプライシング変化が生じている exon 領域、および、その exon 領域を含む遺伝子を網羅的に同定した (例: 図3A)。

解析の結果、生後8、12、16、20、32、64日では、69領域 (65遺伝子)、248領域 (199遺伝子)、830領域 (616遺伝子)、69領域 (68遺伝子)、70領域 (70遺伝子)、84領域 (75遺伝子) がスプライシング変化領域、またはスプライシング変化遺伝子として、それぞれ同定された。また、タイムポイント間において、これらの遺伝子群に重複はほぼ無かった (図3B)。現在、同定されたスプライシング変化領域に対して、qPCR による実験的検証を行っている。

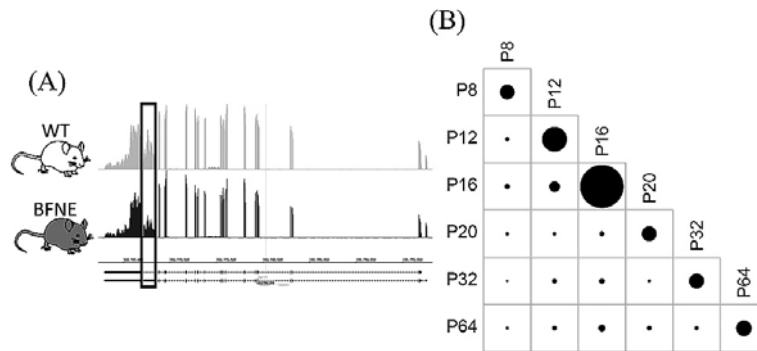


図3. スプライシング変化遺伝子例と各遺伝子群の相関関係
 (A) 野生型マウス (上段) と BFNE マウス (下段) における、同定された遺伝子の発現状態を表す。Y 軸はシーケンスされた配列数、すなわち発現量値を、X 軸は遺伝子の構造を表す。太枠は同定されたスプライシング変化領域を示す。
 (B) 同定された遺伝子群の重複関係を表す。円の大きさは重複遺伝子数を表す。

■ スプライシング変化遺伝子群の *in silico* 機能解析

各タイムポイントで同定された、スプライシング変化遺伝子群に対して GSEA を実施し、各遺伝子群に関わる生物学的プロセスを調査した。GSEA には、Pathway Splice (R パッケージ: <http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/PathwaySplice.html>)、および MSigDB (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/collections.jsp>) からダウンロードした Gene Ontology (GO) gene sets ファイル (c5. bp.v7.0. symbols.gmt) を用いた。

GSEA の結果として、各タイムポイントで同定された遺伝子群が主要に関与する生物学的プロセスを Table 3 に集約した。BFNE マウスにおいて、特にスプライシング変化が顕著であった、生後16日で同定された遺伝子群は、「Ephrin receptor signaling pathway」($p=1.06e-04$)、「Positive regulation of potassium ion transport」($p=2.12e-04$) などに関与していることが明らかとなった。

■ 発現変化遺伝子群とスプライシング変化遺伝子群の比較

上記で同定された、発現変化遺伝子群とスプライシング変化遺伝子群を、各タイムポイントで比較したところ、重複はほぼ見られなかった (図4)。この結果は、

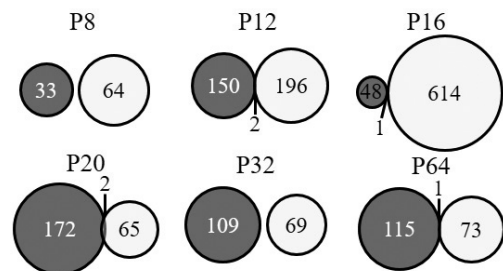


図4. 発現変化遺伝子群とスプライシング変化遺伝子群の比較
 濃色の円は、発現変化遺伝子群を、淡色の円は、スプライシング変化遺伝子群を表す。円内の数値は、遺伝子数を表す。

Table3. スプライシング変化遺伝子群の GSEA 結果

「GO term」は関与する生物学的プロセスを、数値は解析によって算出された p 値を表す。

GOterm	P 8	P12	P16	P20	P32	P64
Negative regulation of gene expression epigenetic	3.02. E-04	-	-	-	-	-
Protein destabilization	4.32. E-04	-	-	-	-	-
Chromatin silencing at rDNA	6.59. E-04	-	-	-	-	-
Magnesium ion transport	7.45. E-04	-	-	-	-	-
DNA methylation or demethylation	4.02. E-03	-	-	4.41. E-04	-	-
Membrane biogenesis	9.35. E-03	-	7.03. E-04	9.77. E-03	-	-
Fatty acid transport	-	1.92. E-04	-	-	-	-
Potassium ion import across plasma membrane	-	7.61. E-04	-	-	-	-
Ephrin receptor signaling pathway	-	-	1.06. E-04	-	-	-
Positive regulation of potassium ion transport	-	-	2.12. E-04	-	-	-
Glial cell proliferation	-	-	2.84. E-04	-	-	-
Positive regulation of sodium ion transmembrane transport	-	-	3.19. E-04	-	-	-
Positive regulation of sodium ion transport	-	-	3.88. E-04	-	-	-
Positive regulation of dendrite development	-	-	7.56. E-04	-	-	-
Postsynaptic specialization organization	-	-	9.14. E-04	-	-	-
Regulation of DNA methylation	-	-	-	8.96. E-05	-	-
Macromolecule depalmitoylation	-	-	-	4.81. E-04	-	-
Histone H 3 K 9 acetylation	-	-	-	7.06. E-04	-	-
Lipoprotein catabolic process	-	-	-	7.70. E-04	-	-
Motor neuron axon guidance	-	-	-	-	1.68. E-04	-
Cell cell signaling involved in cardiac conduction	-	-	-	-	4.59. E-04	3.83. E-04
Detection of calcium ion	-	-	-	-	6.76. E-04	-
Atrial cardiac muscle cell membrane repolarization	-	-	-	-	-	4.66. E-04

KCNQ2 遺伝子異常に起因する発現変化とスプライシング変化の標的遺伝子が異なることを示唆している。また、発現変化が顕著であるタイムポイントは生後12、20日である一方、スプライシング変化が顕著であるタイムポイントは生後16日であることから、KCNQ2 遺伝子異常による発現変化とスプライシング変化が、最も顕著となる時期も異なることが示唆された。

■ BFNE マウスにおけるカイニン酸誘導てんかん発作と発現変化の関係調査

発作誘発薬剤であるカイニン酸を、発現変化が特に顕著であった12日齢、および20日齢の BFNE マウス、および野生型マウスへ投与し、発作症状の違いを調査した。

カイニン酸投与実験の結果、12日齢にある BFNE マウス (n=3) と野生型マウス (n=7) は、けいれん発作後、ほぼ全てのマウスが死亡し、その死亡率に有意差は見られなかった (図 5A : p=0.42)。一方、20日齢の BFNE マウス (n=19) と野生型マウス (n=19) にカイニン酸を投与した結果、けいれん発作後の死亡率は、BFNE マウスの方が有意に高かった (図 5B : p=0.0026)。この結果は、12日齢の BFNE マウスにおける発現変化よりも、20日齢の BFNE マウスにおける発現変化の方が、野生型マウスよりも高いカイニン酸感受性の獲得に有意に貢献していることを示唆している。

本研究ではさらに、KCNQ2 遺伝子がコードするカリウムイオンチャネルの開口因子であり、既に KCNQ2 遺伝子関連てんかんの有効薬剤として報告されている

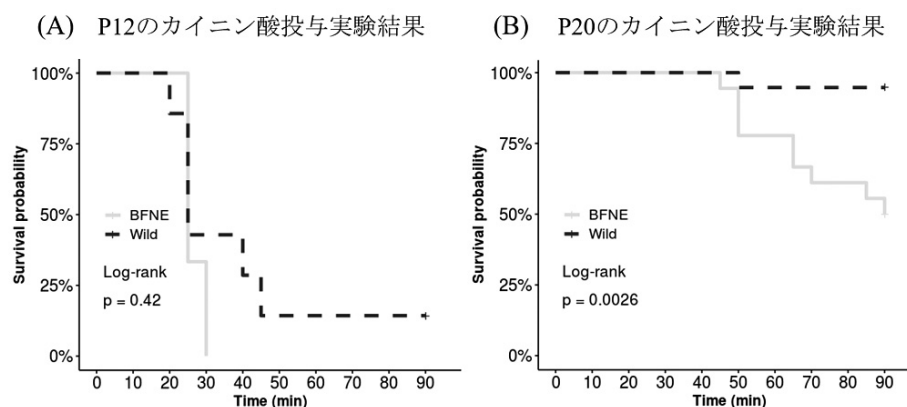


図 5. 12日齢マウスと20日齢マウスのカイニン酸投与実験結果
 (A) カイニン酸投与後の12日齢の BFNE マウスと野生型マウスの生存曲線を示す。
 (B) カイニン酸投与後の20日齢の BFNE マウスと野生型マウスの生存曲線を示す。

レチガビンの投薬実験を行うことで、BFNE マウスのカイニン酸投与後の死亡率が改善されることを確認した。

20日齢のBFNE マウス、および野生型マウスへレチガビンを投与した後、さらにカイニン酸を投与し、けいれん発作後の死亡率を調査した。その結果、レチガビンを投与した野生型マウス (n=10) と、投与しなかった野生型マウス (n=19) では死亡率に有意差が見られなかった一方 (図 6 A : $p=0.47$)、レチガビンを投与した

BFNE マウス (n=16) では、レチガビンを投与しなかったBFNE マウス (n=19) と比較して、有意に死亡率が改善された (図 6 B : $p=0.0053$)。この結果は、20日齢という幼若期のBFNE マウスのカイニン酸誘導発作に対して、レチガビンが有効であることを示しており、20日齢のBFNE マウスの発現変化と、カリウムイオンチャネルの開口が直接的に関連している可能性があることを示唆している。

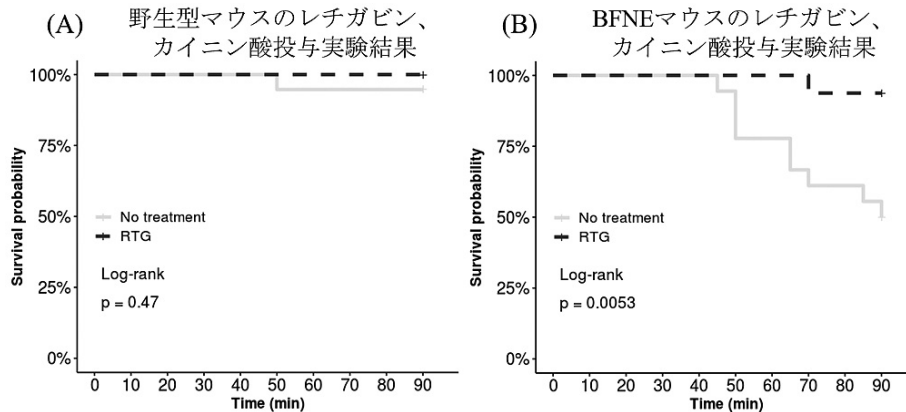


図 6. 生後20日における野生型マウスとBFNE マウスのレチガビン、カイニン酸投与実験結果
 (A) レチガビン、カイニン酸投与後の20日齢の野生型マウスの生存曲線を示す。
 (B) レチガビン、カイニン酸投与後の20日齢のBFNE マウスの生存曲線を示す。

■ KCNQ 2脳症マウスにおけるカイニン酸誘導てんかん発作の調査

本研究では、さらに、KCNQ 2脳症患者由来の変異を有するマウス (KCNQ 2脳症マウス) を用い、20日齢のKCNQ 2脳症マウスのカイニン酸に対する感受性、および、20日齢にあるBFNE マウスとKCNQ 2脳症マウス間での、カイニン酸誘導発作後の死亡率の違いについて調査を行った。

20日齢のKCNQ 2脳症マウス (n=6) と野生型マウス (n=9) へカイニン酸を投与し、けいれん発作後の

死亡率を確認した。その結果、野生型マウスと比較し、KCNQ 2脳症マウスの死亡率の方が有意に高いことが明らかとなった (図 7 A : $p=0.004$)。また、KCNQ 2脳症マウス (n=6) とBFNE マウス (n=19) の死亡率を比較した結果、有意差は見られなかったものの、KCNQ 2脳症マウスの死亡率の方がBFNE マウスの死亡率よりも高いという結果が得られた (図 7 B : $p=0.32$)。上記の結果は、BFNE マウスと同様に、20日齢のKCNQ 2脳症マウスもまた、野生型マウスよりもカイニン酸に有意に高い感受性を示すことを表し、KCNQ 2脳症マウ

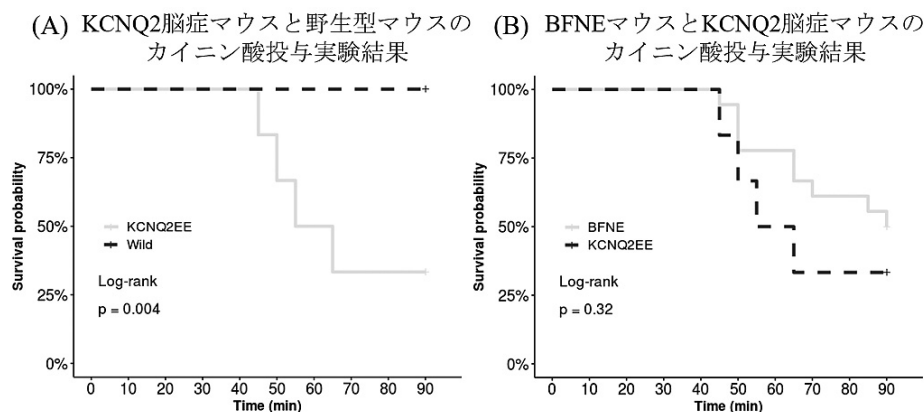


図 7. 生後20日におけるKCNQ 2脳症マウスのカイニン酸投与実験結果
 (A) カイニン酸投与後の20日齢の野生型マウス、KCNQ 2脳症マウスの生存曲線を示す。
 (B) カイニン酸投与後の20日齢のBFNE マウス、KCNQ 2脳症マウスの生存曲線を示す。

の方が BFNE マウスよりも重篤な症状を呈すことを示唆している。

【結言】

本研究の RNA-Seq 解析により、KCNQ2 遺伝子異常を有する BFNE マウスでは、生後12日において、オリゴデンドロサイトやミエリン形成などに関わる遺伝子群の発現が増加していること、生後16日において、イオン輸送の制御に関わる遺伝子群にスプライシング変化が生じていること、また、生後20日においては、シグナル伝達やイオン輸送などに関与する遺伝子群の発現が減少していることが明らかとなった。また、薬剤投与実験から、特に BFNE マウスにおける生後20日の発現変化は、野生型マウスよりも高感度のカイニン酸感受性獲得に貢献している可能性が高いことが示唆された。さらに、20日齢の KCNQ2 脳症マウスは、野生型、および BFNE マウスよりも高いカイニン酸感受性を示し、KCNQ2 脳症のモデル動物として有用であることが示唆された。今後は、生後20日における発現変化と、てんかん発作症状との関係性について、さらに調査を行っていくと共に、KCNQ2 脳症マウスにおいても RNA-Seq 解析を実施し、その分子病態についても精査していく予定である。

【研究業績】

該当なし