

氏名	ごとう あやこ 後藤 綾子		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1822 号		
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 16 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	Characteristics of <i>KCNQ2</i> variants causing either benign neonatal epilepsy or developmental and epileptic encephalopathy （良性（家族性）新生児てんかんと <i>KCNQ2</i> 脳症の原因となる <i>KCNQ2</i> 遺伝子のバリエーションの特徴）		
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	安永 晋一郎
	福岡大学	教授	川寄 弘詔
	福岡大学	講師	根本 隆行

## 内 容 の 要 旨

### 【目的】

*KCNQ2* 遺伝子は電位依存性 K<sup>+</sup>チャンネルをコードする遺伝子で、セグメント 1 (S1) からセグメント 6 (S6) の膜貫通受容体領域と N 末端と C 末端からなる。C 末端側には、 $\alpha$ ヘリックスの A-D 領域がある。*KCNQ2* 遺伝子は良性（家族性）新生児てんかん（Benign (familial) neonatal epilepsy: B(F)NE）と *KCNQ2* 脳症の原因遺伝子の一つであるが、そのバリエーションの特徴として病原性と非病原性、また、B(F)NE と *KCNQ2* 脳症を区別に関与するものがあるかどうかを明らかにする。

### 【対象と方法】

小児神経科医に臨床的に B(F)NE か *KCNQ2* 脳症の可能性があると判断された症例で解析により *KCNQ2* 遺伝子に変異を認めた症例と、*KCNQ2* 遺伝子異常の症例を集めた 2 つのデータベース（Epilepsygene と RIKEE）の症例を集積した。また非病原性の症例はコントロールとして Genome Aggregation Database (gnomAD) から集積した。集積したミスセンスバリエーションを B(F)NE 群と *KCNQ2* 脳症群とコントロール群に分け、累積分布関数で比較した。また、どの予測スコア（CADD、PolyPhen-2、SIFT、phyloP100、Mutation Assessor、FATHMM、PROVEAN、PAM30）が病原性や B(F)NE と *KCNQ2* 脳症を区別するものとして役に立つのかも比較し統計を行った。

## 【結果】

259 の *KCNQ2* 遺伝子の病原性バリエントを認め、そのうち 148 が B(F)NE で 111 が *KCNQ2* 脳症であった。148 の B(F)NE のうち、56 がミスセンスであった。111 の *KCNQ2* 脳症のうち、109 がミスセンスであった。コントロールは 2963 ミスセンスバリエントがあった。それぞれのミスセンスバリエントを累積分布関数で比較した。B(F)NE とコントロールを比較し、5 つの領域 (S3-S6 やヘリックス A-D を形成している部位) が B(F)NE が有意に多く、2 つの領域 (セグメントやヘリックス以外の領域) でコントロールが有意に多かった。*KCNQ2* 脳症とコントロールを比較し、3 つの領域 (セグメントやヘリックス以外の領域) で *KCNQ2* 脳症が有意に多く、3 つの領域 (セグメントやヘリックス以外の領域) でコントロールが有意に多かった。B(F)NE と *KCNQ2* 脳症とを比較し、2 つの領域 (イオン膜孔から S6 の領域, S6 から Helix A の領域) で *KCNQ2* 脳症が有意に多く、1 つの領域 (S2-S3 領域) で B(F)NE が有意に多かった。予測スコアについては、AUC の比較では PROVEAN (0.847) と SIFT (0.82) が良かった。PROVEAN でさらに、B(F)NE と *KCNQ2* 脳症とコントロールで部位も合わせて比較してみたところ、S3-Helix A の間の領域では、B(F)NE と *KCNQ2* 脳症のバリエントの PROVEAN のスコアは、コントロールに比べて、有意に低かったが、B(F)NE と *KCNQ2* 脳症のバリエントを比較すると有意な差はなかった。PAM30 というアミノ酸単位の変化で評価する予測スコアで B(F)NE と *KCNQ2* 脳症とコントロールでスコアを比較したところ、S1-S3 領域では、B(F)NE が有意に *KCNQ2* 脳症とコントロールに比べて低く、S3-Helix A の間の部位では、*KCNQ2* 脳症がコントロールと B(F)NE より有意に低かった。Helix A-Helix B 領域と、Helix D-C 末端領域は、コントロールの方が、PAM30 スコアが低かった。種の保存性を確認すると、S1-S3 領域と S3-Helix A 領域の保存性は Helix A-Helix B 領域と Helix D-C terminal 領域より高かった。

## 【結論】

S3-S6 やヘリックス A-D を形成している部位のバリエントは病原性が多く、セグメントやヘリックス以外の領域のバリエントは非病原性が多くなっていた。それは、セグメントは重要な役割を持っていて、ヘリックス A-D は重要な蛋白が結合する部位だからであると考えられる。累積分布関数で B(F)NE のバリエントが多かった S2-S3 領域は PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) が結合する部位で重要であるが、*KCNQ2* 脳症のバリエントが多かったイオン膜孔から S6 までの領域は、イオン膜孔を形成し当然ながら非常に重要な役割を担っている部分であり、S6 から Helix A の領域は複数の蛋白が結合する部位として重要である。また、予測スコアの中で、PROVEAN のスコアが、S3-Helix A の間の領域で、B(F)NE と *KCNQ2* 脳症のバリエントが、コントロールより有意に低く、バリエントが病原性と非病原性でありうる可能性を区別するのに役に立つ可能性を示唆した。さらに S3-Helix A の間の領域においては、PAM30 のスコアが *KCNQ2* 脳症のバリエントが B(F)NE のバリエントに比べ有意に低かった。一方で S1-S3 の領域では、PAM30 の点数が B(F)NE のバリエントが *KCNQ2* 脳症のバリエントに比べ有意に低かった。種の保存性を確認すると、

S1-S3 領域と S3-Helix A 領域の保存性は Helix A-Helix B, 領域と Helix D-C terminal 領域より高いことから、S1-S3 領域と S3-Helix A 領域は進化においても変化することなく非常に重要な部位であることを示しており、その部位で変異を起こすことは病原性につながるのではないかと考える。S1-S3 領域と S3-Helix A 領域の間では保存性の差はないが、S3-Helix A は、ボルテージセンサーとイオン膜孔のドメインを形成しており、よりその変異が重症なものとなり脳症のフェノタイプになっていくのではないかと考える。

## 審査の結果の要旨

本論文は、良性（家族性）新生児てんかん (B(F)NE) と *KCNQ2* 脳症の原因となる *KCNQ2* 遺伝子のバリエントの特徴に関するものである。*KCNQ2* 遺伝子にバリエントがある場合、それは多くの人々が有し症状を示さない非病原性のものと、症状を示す B(F)NE と *KCNQ2* 脳症の 2 つの病原性がある。非病原性のバリエントと B(F)NE と *KCNQ2* 脳症のバリエントにはそれぞれ hot spots があることを明らかにした。また予測スコアを部位別に見ると、特定の場所で、PROVEAN が非病原性と病原性のバリエントを区別するのに有用であり、PAM30 が B(F)NE と *KCNQ2* 脳症のバリエントを区別するのに有用であることが示唆された。

### 1. 斬新さ

- 1) B(F)NE と *KCNQ2* 脳症のバリエントの hot spots について書かれた論文は散見されるが、それを、累積分布関数で比較し、統計を行っている論文はなく斬新である。また、それに非病原性も含めて比較したのも新しい目線である。
- 2) 遺伝子研究でそれぞれの予測スコアの精度を比較した論文はあるが、それを、部位別にスコアを比較している論文はなく、斬新である。

### 2. 重要性

あくまで B(F)NE と *KCNQ2* 脳症の区別は臨床経過、脳波所見からされるべきであるが、遺伝子検査を行い、*KCNQ2* 遺伝子にバリエントが見つかった場合、それが原因であるかどうか、B(F)NE と *KCNQ2* 脳症の hot spots にあるかどうかなどの参考に今回の研究結果が有用であると思われる。

### 3. 研究方法の正確性

症例数は、*KCNQ2* 遺伝子の病原性のバリエントが 259 症例、非病原性のバリエントが 2967 症例と十分な数を集積しており、研究は正確に遂行されている。2 つの病原性のデータベースを使うことで、症例の漏れを防いでいる。福岡大学の研究室の症例においては、サンガーや次世代シーケンスでは見落とされるエクソン単位の欠失を MLPA で検出しており、より正確な研究を行なっている。予測スコアは全体の感度特異度だ

けでなく、部位別に *KCNQ2* 脳症と B(F)NE とコントロールのスコアを比較しており、より詳細にスコアを評価できている。

#### 4. 表現の明瞭性

研究デザインも結果も明瞭なもので、図表も整理されており発表においても多数のスライドで丁寧に解説されていた。

#### 5. 主な質疑応答

Q: *KCNQ2* と *KCNQ3* はヘテロ接合体を作っているが、*KCNQ3* 遺伝子のバリエーションも同じような症状を呈するのか？

A: *KCNQ3* 遺伝子バリエーションも良性新生児けいれんの報告があり、最近発達障害を示す重症なフェノタイプの症例報告も出ているが、*KCNQ2* より症例は少ない。

Q: *KCNQ2* のバリエーションで機能解析までしている報告はあるのか？

A: 全てではないが、機能解析までしている報告はある。

Q: 神経細胞の中でも興奮性と抑制性のどちらに発現しているか

A: 興奮性神経に発現し抑制に働いている

Q: 遺伝子の変異で作られた異常なタンパクはどのように症状を呈するのか？

A: B(F)NE のトランケーションは haploinsufficiency で異常タンパクは除去され、正常なタンパクの量では発現量が少ないため発症し、脳症の dominant negative は異常タンパクが正常タンパクの機能を抑制することで発症すると考えられている

Q: これをターゲットとした創薬はどこまで進んでいるのか

A: カリウムチャンネルにダイレクトに働きかけて開口させるレチガビンという薬剤があり、海外では成人の部分発作に使用されたりしているが、本邦では、色素沈着や視力低下などの副作用のため、承認されていない。また、新生児期の GABA 受容体の興奮性を抑制性にするための NKCC 1 阻害剤であるブメタニドという薬剤もあるが、これは強力な利尿薬のためかえって、電解質のバランスを崩してけいれんを発症させたりするため、まだ研究段階である。

Q: 同一家族内に異なるフェノタイプがあるというのはどういうことか？

A: 同一家族内に異なるフェノタイプがあるのは、環境因子が関与しているまたは、親がモザイクで一部生殖細胞にもあり、それが子に遺伝した場合は、子の方の重症度が重くなると言われている。

Q: 臨床的にけいれんを発症してすぐに B(F)NE と *KCNQ2* 脳症かを判断することはできるか？

A: *KCNQ2* 脳症は薬剤抵抗性や、脳波の異常などから経験豊富な神経臨床医なら区別できると思われる。

以上、いくつかにも質問にも的確かつ丁寧に説明でき、考察もしっかりしたものであった。本論文は、既に評価の高い雑誌にも掲載されており学位論文に値すると評価された。