

博士論文

自然発生性家族性てんかんの猫における
発症機序と病態生理に関する研究

小川 ふきえ

目 次

諸 論	-----	1
第一章	-----	8
脳脊髄液中のアミノ酸解析およびメタボローム解析		
第二章	-----	26
てんかん発症個体の海馬のグルタミン酸トランスポーターおよび グルタミン酸合成酵素の発現に関する免疫組織化学的検討		
第三章	-----	43
てんかん原因遺伝子の同定に向けたエクソーム解析		
総 括	-----	64
謝 辞	-----	68
引用文献	-----	69

緒 論

てんかんは、世界保健機構（World Health Organization: WHO）および国際抗てんかん連盟（International League Against Epilepsy: ILAE）によると、種々の病因によってもたらされる慢性の脳疾患であり、大脳神経細胞の過剰な発射に由来する反復性の発作を主徴とし、それに変化に富んだ臨床ならびに検査所見の表出を伴うものと定義されている。

ヒトにおけるてんかんの有病率はおよそ 1%であり、全世界で患者は約 5000 万人にもものぼる(Pitkänen, 2010)。治療は抗てんかん薬による維持療法が一般的である。ヒトではてんかん原性病変の外科的切除も実施されているが、現状ではてんかんを根治に導く治療法は存在しない。

てんかんは獣医学領域においても一般的に認められる神経学的疾患であり、その有病率は犬では 0.5-5%(Podell *et al.*, 1995)、猫では 0.5%(LeCouteur and Child, 1989)である。

犬、猫における正式なてんかん分類は存在しないが、発作の現象論はヒトのてんかん発作と類似しているため、ヒトの国際分類 (ILAE) の適応が提唱されている (Berendt and Gram, 1999; Berendt *et al.*, 2004; Licht *et al.*, 2002)。現時点では 1981 年に提唱されたヒトのてんかん発作の国際分類を基盤として、その病因により特発性 (idiopathic)、症候性 (symptomatic)、おそらく症候性 (probably symptomatic) に分類されている (The commission on classification and terminology of the ILAE)。医学領域においては、画像診断技術や遺伝子解析技術などの進歩により、新たな疾患・症候群が多数報告され (Engel, 2006, 2001)、これに伴い国際分類の改訂や変更作業が進められている (Berg *et al.*, 2010)。

新たに提案された分類では素因性 (genetics)、構造的/代謝性 (structural/metabolic) および原因不明 (unknown cause) とされ、遺伝子異常によるてんかんの概念が明確にされた。

犬と猫のてんかん分類もこれに従い変更されつつあるが(Mariani, 2013; Podell, 2013)、医学・獣医学の双方において複雑に変化しており、未だに一貫性を欠いている。

特発性てんかんは脳の器質的病変あるいは発作以外の神経徴候のない、慢性的な反復性発作を特徴とする原発性のてんかんである。即ち特発性てんかんは原因不明であり、遺伝的な影響を受けていると予測されている。獣医学領域では、慢性的な発作を有する犬のおよそ 60-70%が特発性てんかんであるが、猫において特発性てんかんは極めて少なく、頭蓋内の異常に起因する続発性のてんかんが一般的である(Patterson, 2013)。

てんかん発作は、内因性あるいは外因性の様々な因子によって引き起こされると考えられている。発作の感受性に関与するひとつのメカニズムとして、中枢神経系 (central nervous system: CNS) における興奮性神経伝達物質と抑制性神経伝達物質の不均衡が示唆されている(Wei *et al.*, 2012)。グルタミン酸は哺乳動物の CNS における主要な興奮性神経伝達物質である。グルタミン酸は興奮性アミノ酸としての作用に加えて学習、記憶などの脳の高次機能に密接に関与しているが(Platt, 2007; Tzschentke, 2002)、一方で過剰なグルタミン酸は神経毒性を有し、てんかんを含む様々な神経疾患の病態生理に極めて重要な役割を果たすと考えられている(Chapman *et al.*, 1996; Meldrum, 1994; Platt, 2007)。 γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid: GABA) は CNS、特に脳における主要な抑制性神経伝達物質であり、神経細胞体や神経終末においてグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamic acid decarboxylase: GAD) によってグルタミン酸から合成される。医学および獣医学領域において、GABA はてんかんの抑制機序と薬物治療に重要な役割を担っていることが示唆されており、例えばヒトのてんかん患者の脳脊髄液 (cerebrospinal fluid: CSF) 中では GABA

濃度が減少していることが報告されている(Löscher and Schwartz-Porsche, 1986; Petroff *et al.*, 1996; Podell and Hadjiconstantinou, 1997)。さらに、興奮性神経伝達物質であるアスパラギン酸、抑制性神経伝達物質であるグリシン、セリンおよびタウリンも、てんかんの病態生理に役割を果たしているとする報告もある(Meldrum *et al.*, 1999; Sherwin, 1999)。しかしながら、発作の明確な病態発生メカニズムは未だに明らかになっていない。

猫は古くから多くの脳科学研究に頻用されてきた動物種であり、てんかん研究においても、反復電気刺激（キンドリング）(Shouse *et al.*, 2004)、カイニン酸注入(Ben-Ari, 1985; Tanaka *et al.*, 1992)、ペニシリン塗布(Cortez and Snead, 2006) およびペンチレンテトラゾール投与(Magistris *et al.*, 1988; Testa and Gloor, 1974)などにより作出された猫の発作/てんかんモデルが用いられてきた。しかしながら、これらのモデルは人工発作モデルであり、自然発生性のてんかんに完全に再現しない。一方、遺伝子変異により自然発生性のてんかんに呈する遺伝性モデルは本質的なてんかんモデルである。このモデルの利点はヒトのてんかんと相同であるという点にあり、てんかん原性のメカニズムを解明するための貴重なツールである。これまでに光過敏性ヒヒ(Jobe and Browning, 2006a)、聴原性マウス(Fuller and Sjursen, 1967)、tottering マウス(Green and Sidman, 1962)、EL (epilepsy-like) マウス(Imaizumi *et al.*, 1959; Suzuki and Nakamoto, 1977)、遺伝性てんかん易発症ラット (genetically epilepsy prone rat: GEPR) (Jobe and Browning, 2006b)、遺伝性欠神てんかんラット (genetic absence epilepsy rat: GAERS) (Marescaux and Vergnes, 1995)、および犬(Lohi *et al.*, 2005; Löscher, 1997; Morita *et al.*, 2002)などの遺伝性てんかん動物が報告されている。しかしながら、猫の特発性てんかんは臨床獣医療においても比較的稀

であり、猫における特発性/遺伝性てんかんモデルは未だ確立されていない。

本研究では、ある繁殖コロニーにおいて自発性のてんかん発作を発症することが発見され、自然発生性特発性/遺伝性てんかんモデルとして確立が試みられている猫の家系を対象とした。本家系は 2009 年頃に発見され、民間の動物繁殖施設ならびに日本獣医生命科学大学 (Tokyo, Japan) で維持管理されている約 150 頭の在来種のコロニーである (図 1)。これまでに、当該繁殖コロニー内でのてんかん発症個体に関する家系図の作製および χ^2 検定の結果から、本家系におけるてんかんは常染色体劣性遺伝の形式で発症していることがほぼ確実となっている (Kuwabara *et al.*, 2010)。発症個体同士の交配により出生した個体の中に発作を呈する個体が認められており、残りの個体においてもてんかん性異常脳波が認められていることから、てんかん原性を有することが示唆されている。また、本家系のてんかん発症猫で認められる発作は、辺縁系発作からの二次性全般化、および前庭刺激により誘発される全般性発作である。さらに発作間歇期の頭皮上脳波解析により、てんかん猫で側頭部領域にてんかん性異常波が認められたことから、本家系のてんかん猫で認められる発作が内側側頭葉、特に海馬・扁桃核に起始するものであることが示唆されている。

本研究では、この自然発生性の特発性てんかんを呈する猫の家系を対象として、その病態にさらに解析を加えることで、ヒトの特発性てんかんと相同な動物モデルとしての有用性を検討した。第一章では、CSF 中の興奮性/抑制性アミノ酸濃度および内因性代謝産物について評価した。第二章では、CNS において細胞外グルタミン酸濃度の調節に関与しているグルタミン酸トランスポーターおよびグルタミン合成酵素の発現の変化を病理組織学的に検討した。第三章では、本家系におけるてんかん原因遺伝子の同定に向けたエクソーム

解析を実施した。

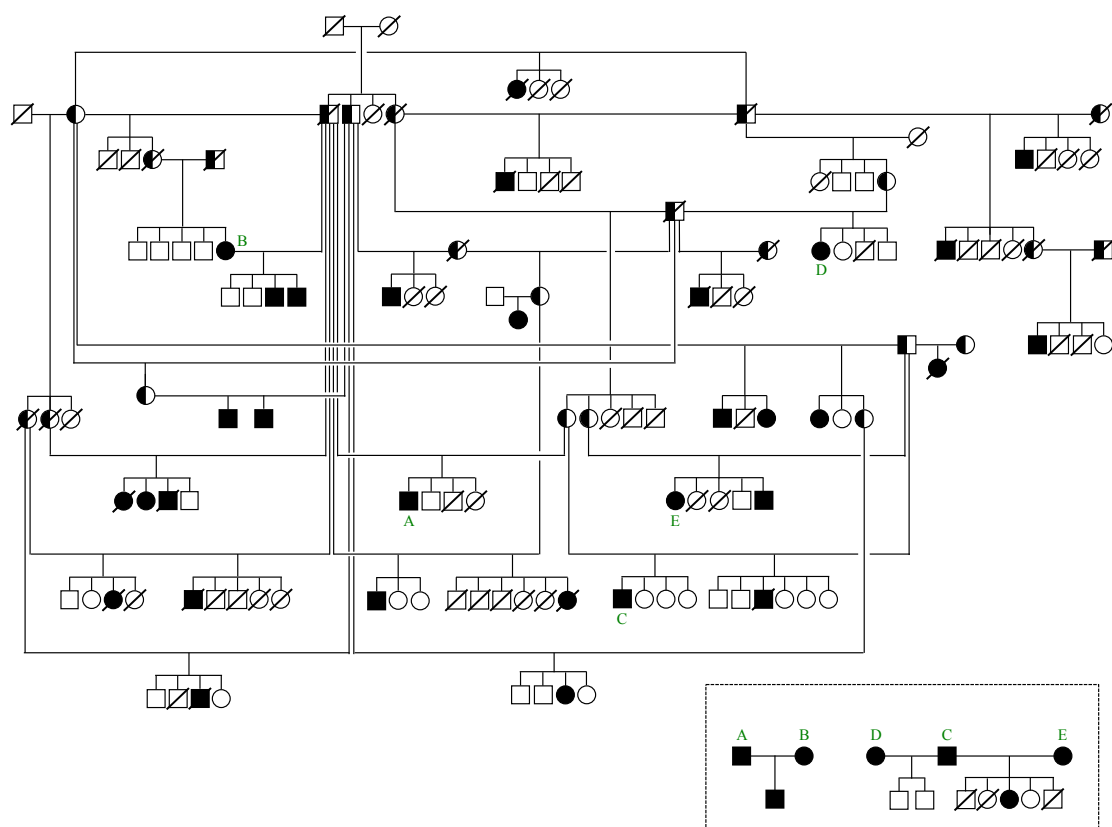


図 1. 本研究に用いた自然発生性の特発性てんかんを呈する猫の家系図

□ : オス、○ : メス、■ : 発症、◐ : 非発症キャリア、/ : 死亡あるいは医療記録なし。

同じアルファベットは同一個体を示す。

第一章

脳脊髄液中のアミノ酸解析およびメタボローム解析

【緒言】

ヒトのてんかん患者や実験てんかんモデル動物では、てんかんの病態生理の解明を目的として CSF、脳の細胞外液および組織内におけるアミノ酸濃度に関する解析が行われてきた。獣医学領域においても、特発性てんかんの犬における CSF 中のアミノ酸の解析が行われてきた。これらの研究の多くでは、興奮性アミノ酸濃度の上昇と抑制性アミノ酸濃度の低下のいずれかまたは両方が報告されている (Kälviäinen *et al.*, 1993; Löscher and Schwartz-Porsche, 1986; Mally *et al.*, 1996; Podell and Hadjiconstantinou, 1997; Szyndler *et al.*, 2008)。一方、猫では人為的なてんかんモデルを用いて CSF 中アミノ酸を解析した少数の報告があるのみで (Griffith *et al.*, 1991; Qu *et al.*, 2000)、自然発生性のてんかん猫での報告はない。

また近年、メタボローム解析が疾患の分子学的メカニズムの研究やバイオマーカーの同定に広く用いられるようになってきた。メタボローム解析はアミノ酸、脂肪酸および有機酸などの低分子代謝産物を網羅的に解析する方法である。てんかん研究においても、ヒトでてんかん原性メカニズムの解明を目的としたメタボローム解析が実施されており、代謝の変化を示唆する結果が報告されている (Sugiura *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2012)。

本章では、自然発生性家族性てんかん猫におけるてんかんの病態生理の理解を目的として、CSF 中の興奮性/抑制性アミノ酸濃度および内因性代謝産物について評価した。

【材料および方法】

1. 供試動物

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会・生命倫理委員会の承認を経て行われた。

本研究には民間の動物繁殖飼育施設ならびに日本獣医生命科学大学にて飼育・維持している家族性のてんかん猫を用いた。家系内でてんかん発作を発症しており、家系解析から遺伝的に劣性ホモ個体であると判定した猫 13 頭（1 歳 4 ヶ月齢-7 歳 0 ヶ月齢、平均 3 歳 9 ヶ月齢、2.5-4.2 kg）をホモ群として用いた。家系内で発症個体の親であるてんかん非発症個体（即ちキャリアと考えられる個体）で、家系解析からヘテロ個体であると判定した猫 9 頭（5 歳 9 ヶ月齢-9 歳 6 ヶ月齢、平均 7 歳 4 ヶ月齢、2.6-4.5 kg）をヘテロ群として用いた（図 1-1）。また、日本獣医生命科学大学にて飼育・維持している、家系と血縁関係にない臨床的に健康な猫 6 頭（9 ヶ月齢-1 歳 3 ヶ月齢、平均 1 歳 1 ヶ月齢、2.2-3.8kg）を野生型群として用いた。

2. CSF サンプル採取

猫を塩酸メデトミジン（ドミツール、ZENOAQ, Fukushima, Japan）70-80 $\mu\text{g/kg}$ 筋肉内投与により鎮静下におき、23 ゲージのスパイナル針を用いた大槽穿刺により CSF を採取した。ホモ群では、少なくとも 2 週間にわたって発作が観察されていない発作間歇期に CSF を採取した。さらに、意識下の猫をケージごと手動にて上下、左右に 2 分間揺動することで前庭刺激を与えて発作を誘発し、発作開始後 30 分以内の CSF を採取した。ヘテロ群と野生型群では、平常安静時およびホモ群と同様の方法で前庭刺激を与えた後 30 分以内に

CSF を採取した。CSF サンプルは血液の混入がないことを確認し、解析まで -80°C にて保存した。

3. 高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC) 法による CSF 中アミノ酸解析

CSF 中のグルタミン酸、アスパラギン酸、グリシン、セリン、タウリンおよび GABA の濃度はオルソフタルアルデヒド (OPA) ・プレカラム誘導 HPLC 法を用いて測定した。アミノ酸濃度測定に使用した HPLC 装置 (Jasco, Tokyo, Japan) の構成は 2 台のポンプ (PU-980)、オートサンプラー (AS-950)、カラム恒温槽 (CO-965)、蛍光分光検出器 (FP-1520S)、および HPLC 分析システム (LCSS-905) とした。2 種の ODS カラム (Pegasil ODS、 $250\text{ mm} \times 4.6\text{ mm} + 30\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$ 、Senshu, Tokyo, Japan) を用い、カラム温度は 40°C とした。CSF は解析の直前に解凍し、 $40\text{ }\mu\text{L}$ の CSF に 0.6 M HClO_4 $120\text{ }\mu\text{L}$ を加え 1 分間混合して除蛋白し、 $2\text{ M K}_2\text{CO}_3$ $40\text{ }\mu\text{L}$ を加えて中和した。これを $10000 \times \text{g}$ 、室温で 5 分間遠心分離した。この上清 $60\text{ }\mu\text{L}$ を OPA 溶液 (13.5 mg OPA , $25\text{ }\mu\text{L 2-Mercaptoethanol}$, $4\text{ mL 0.1 M Borate buffer}$ の混合溶液) $15\text{ }\mu\text{L}$ と混合し、30 秒間の反応の後、 $10\text{ }\mu\text{L}$ の反応液を自動的にカラムに注入した。移動相には A 液として $50\text{ mM CH}_3\text{COONa}$, 3.0% N,N -ジメチルホルムアミド ($\text{pH } 5.80$)、B 液として 100% メタノールを用い、流速 1.0 mL/min に設定しグラジエント分析を行った。測定開始から 55 分は A 液の割合が 85% から 15% のリニアグラジエントとし、励起波長 340 nm 、蛍光波長 455 nm で溶出液の蛍光強度を測定した。測定間にはカラム再平衡のために A 液の割合 85% の移動相を 14 分間送液した。各々のア

ミノ酸のピークは既知の濃度のアミノ酸標準溶液を CSF 検体に添加することにより同定した。測定はすべての検体について二重測定で行い、検体中のアミノ酸濃度は既知濃度の標準液を測定したピーク面積から算出した。

4. メタボローム解析による CSF 中の内因性代謝産物の解析

メタボローム解析にはホモ群 13 頭中 5 頭の発作間歇期、ヘテロ群 9 頭中 4 頭および野生型群 6 頭中 3 頭の平常安静時の CSF サンプルを任意に選び使用した (図 1-1)。メタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社 (Yamagata, Japan) に解析を依頼し、以下の手順にて実施した。まず、内部標準物質の濃度が 10 μM となるように調整した 900 μL のメタノール溶液に、100 μL の猫 CSF を添加して攪拌した。これに 1000 μL のクロロホルムおよび 400 μL の超純水を加えて攪拌し、遠心 ($2,300 \times g$, 4°C , 5 分) した。遠心後、水層を限外ろ過チューブ (ウルトラフリー MC PLHCC HMT 遠心式フィルターユニット 5 kDa, Millipore, Billerica, MA, USA) に 400 $\mu\text{L} \times 2$ 本移し取った。これを遠心 ($9,100 \times g$, 4°C , 120 分) し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固した後、50 μL の超純水に再溶解したものを試料として、Agilent CE-TOFMS system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) を用いて CSF 中の代謝産物を測定した。CE-TOFMS にて検出された各物質のピークを自動分析ソフトウェアである MasterHands ver.2.9.0.9 (慶応義塾大学開発) を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 (m/z)、泳動時間 (Migration time: MT) およびピーク面積値を得た。

5. 統計

すべての統計解析は Prism (Ver. 5, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて行った。各群の CSF 中アミノ酸濃度の測定結果は平均±標準偏差で示し、発作間歇期および平常安静時の各群間の CSF 中アミノ酸濃度の比較には Kruskal-Wallis test を用い、有意差が認められた場合には post-hoc test として Dunn's multiple comparison test を行った。発作間歇期と発作後、平常安静時と前庭刺激後の各群内の CSF 中アミノ酸濃度の比較には Wilcoxon signed rank test を用いた。また、発作後と発作間歇期、前庭刺激後と平常安静時の CSF 中アミノ酸濃度の差分を各群で算出し、濃度の差分についての各群間の比較に Kruskal-Wallis test を用い、有意差が認められた場合には post-hoc test として Dunn's multiple comparison test を行った。メタボローム解析の結果はホモ群とヘテロ群について、野生型群を 1 とした場合の比で示した。メタボローム解析の結果についての各群間の比較には Kruskal-Wallis test を用い、有意差が認められた場合には post-hoc test として Dunn's multiple comparison test を行った。 $p < 0.05$ をもって有意であるとした。

【結果】

1. HPLC による CSF 中アミノ酸解析

図 1-2 にホモ群の発作間歇期およびヘテロ群と野生型群の平常安静時における CSF 中のアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、グリシン、タウリンおよび GABA 濃度を示した。

CSF 中グルタミン酸濃度は野生型群と比較してヘテロ群で有意に低値であったが、ホモ群とヘテロ群の間、およびホモ群と野生型群の間に有意差はなかった。CSF 中のアスパラギン酸、セリン、グリシン、タウリンおよび GABA 濃度に各群間の有意差は認められなかった。ホモ群においてのみ CSF 中の GABA 濃度が著しく高い個体が認められた。

図 1-3 に前庭刺激後と発作間歇期あるいは平常安静時の各アミノ酸濃度の差分を示した。この差分はつまり発作/前庭刺激による CSF 中アミノ酸濃度の上昇を示す。ホモ群では、13 頭中 5 頭で前庭刺激による発作後の CSF を採取できたため、これら 5 頭の猫について発作後の CSF 中アミノ酸濃度を測定した。ヘテロ群では 9 頭中 8 頭、野生型群では 6 頭全てで誘発刺激後の CSF 中アミノ酸濃度を測定した（図 1-1）。アスパラギン酸、セリン、グリシン、タウリンおよび GABA については、各群内で前庭刺激による有意な変動は認められず、各群間の比較でも有意差は認められなかった。グルタミン酸では、全ての群内で前庭刺激後の濃度は上昇していたが、ホモ群では有意ではなかった。また、各群間の比較では有意差は認められなかった。

2. CSF のメタボローム解析

CSF のメタボローム解析により 95 種の内因性代謝産物が検出された。表 1 に検出された

アミノ酸 21 種と各群間で有意差が認められた他の低分子代謝産物 5 種を示した。CSF 中グルタミン濃度はホモ群で野生型群に比較して有意に低値であった。他の内因性代謝産物については表 1 に示す通りであった。アミノ酸以外の代謝産物は代謝マップ上で重大な関連はなかった。

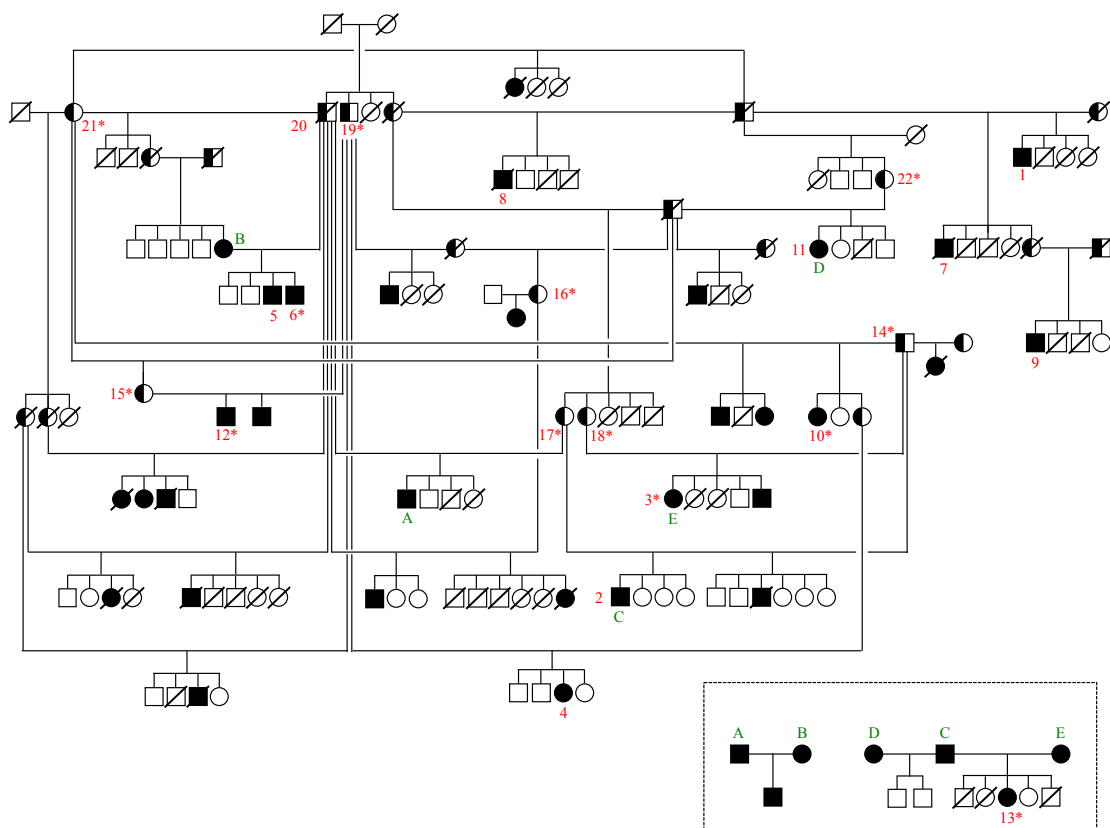


図 1-1. アミノ酸解析およびメタボローム解析に用いたてんかんの猫の家系図

1-13 : アミノ酸解析に用いたホモ群の個体。14-22 : アミノ酸解析に用いたヘテロ群の個体。アミノ酸解析に用いた個体の中から 1-5、14-16 の個体をメタボローム解析に用いた。

* : 発作後/誘発刺激後のアミノ酸解析に用いた個体。

□ : オス、○ : メス、■ : 発症、◐ : 非発症キャリア、／ : 死亡あるいは医療記録なし。

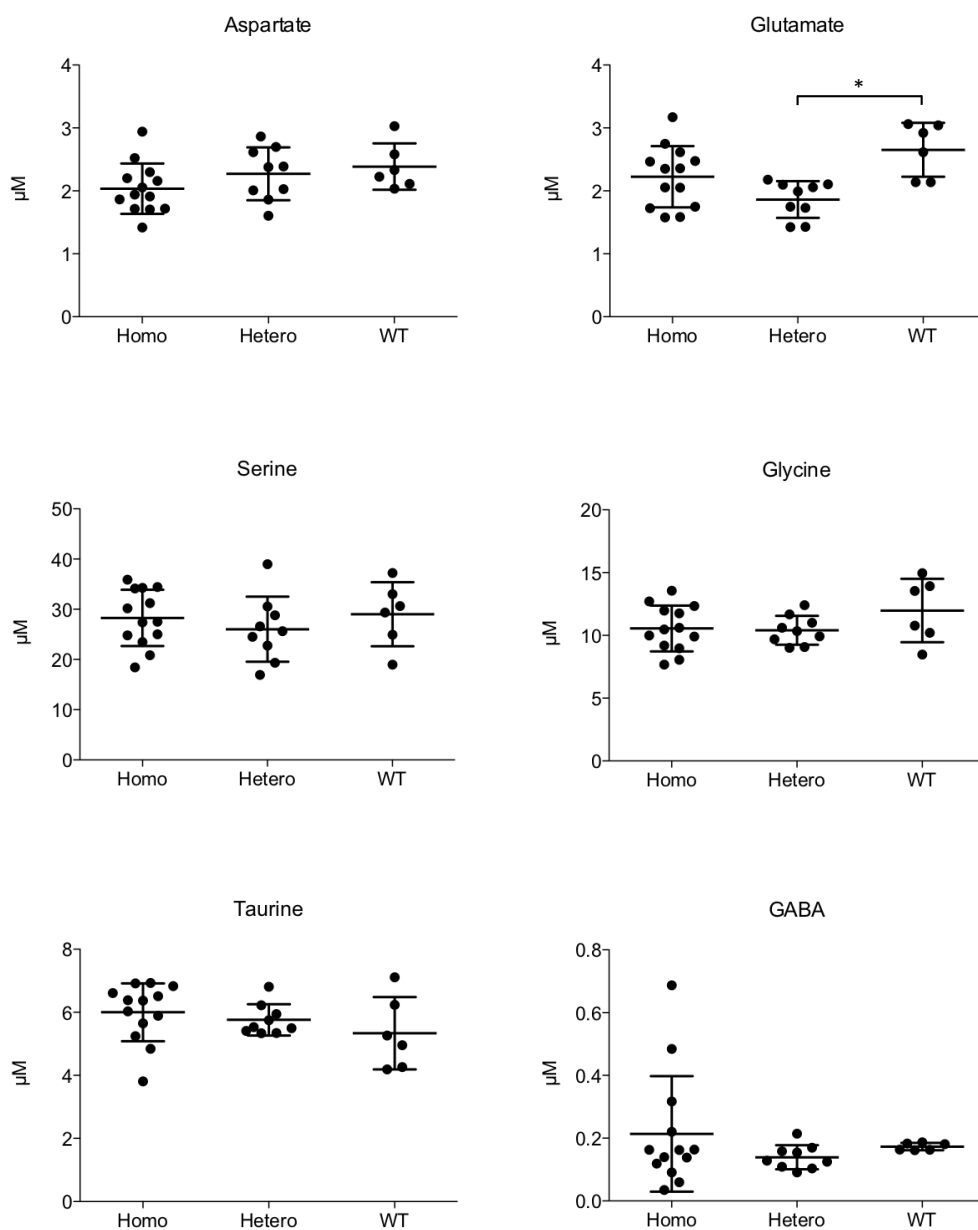


図 1-2. ホモ群 (Homo: $n = 13$) の発作間歇期、ヘテロ群 (Hetero: $n = 9$) および野生型群 (WT: $n = 6$) の平常安静時における CSF 中アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、グリシン、タウリンおよび GABA 濃度
グラフは標準 \pm 標準偏差を示す。

* : $p < 0.05$

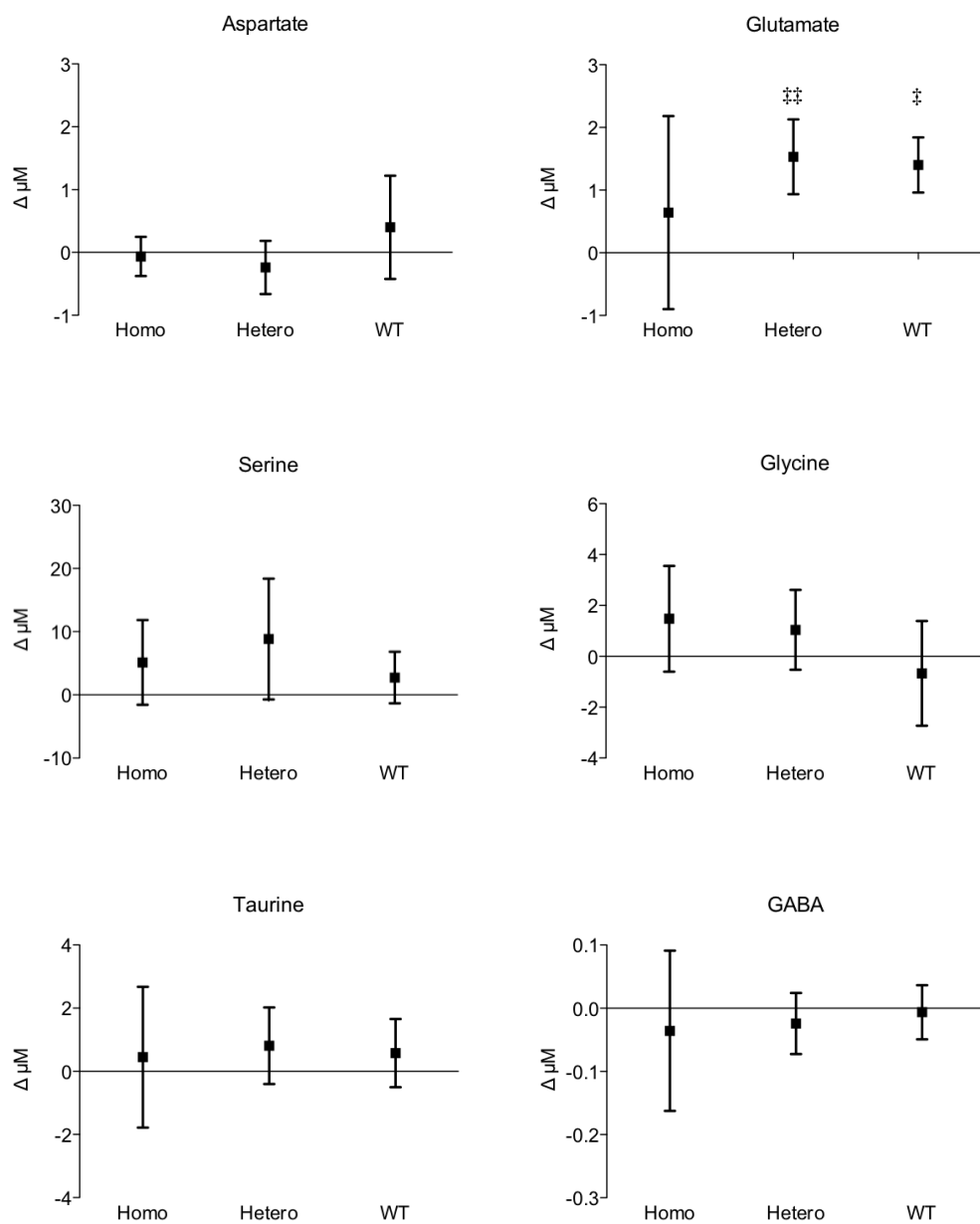


図 1-3. 発作間歇期/平常安静時と誘発発作後/誘発刺激後の CSF アミノ酸濃度の変動
 値は（誘発発作後/誘発刺激後 - 発作間歇期/平常時）の差分（標準±標準偏差）を示す。
 ‡: $p < 0.05$ 、 ‡‡: $p < 0.01$ （群内での変動）

表 1. メタボローム解析により検出されたアミノ酸および各群間にて有意差が認められた他の低分子代謝産物

	Ratio (Mean \pm SD)					
	Homo /WT			Hetero /WT		
	n = 5			n = 4		
Amino acids						
Aspartate	0.82	\pm	0.11	0.95	\pm	0.25
Glutamate	0.80	\pm	0.12	0.85	\pm	0.17
Serine	0.74	\pm	0.13	0.90	\pm	0.14
Glycine	0.90	\pm	0.06	1.03	\pm	0.13
Methionine	0.79	\pm	0.14	1.12	\pm	0.88
Glutamine	0.80	\pm	0.05*	0.86	\pm	0.07
Lysine	2.10	\pm	0.44	1.89	\pm	0.67
Arginine	1.60	\pm	0.40	1.68	\pm	0.32
Tryptophan	1.17	\pm	0.09	1.18	\pm	0.19
Phenylalanine	1.02	\pm	0.08	1.00	\pm	0.16
Leucine	0.94	\pm	0.10	1.15	\pm	0.20
Isoleucine	0.91	\pm	0.11	1.15	\pm	0.18
Histidine	0.90	\pm	0.14	1.00	\pm	0.38
Valine	0.82	\pm	0.10	0.83	\pm	0.11
Threonine	0.74	\pm	0.18	0.74	\pm	0.12
Asparagine	0.88	\pm	0.10	0.86	\pm	0.14
Tyrosine	0.83	\pm	0.12	0.78	\pm	0.15
Proline	0.77	\pm	0.11	0.77	\pm	0.15
Alanine	0.70	\pm	0.07	0.69	\pm	0.19
Ornithine	1.36	\pm	0.26	1.54	\pm	0.27
2-Aminobutyric acid	0.59	\pm	0.11*	0.93	\pm	0.31
Other metabolites						
Pyridoxal	1.35	\pm	0.18†	0.86	\pm	0.12
2-Hydroxybutyric acid	0.71	\pm	0.11*†	0.94	\pm	0.12
3-Hydroxybutyric acid	0.64	\pm	0.12*	0.76	\pm	0.14
Cyridine	0.76	\pm	0.08	0.66	\pm	0.10*
Saccharopine	0.61	\pm	0.07*	0.68	\pm	0.06

Homo: ホモ群、Hetero: ヘテロ群、WT: 野生型群

* p < 0.05 vs WT、† p < 0.05 vs Hetero

【考察】

本研究では、家族性てんかんの猫における CSF 中の興奮性/抑制性アミノ酸およびその他の低分子代謝産物を評価した。本家系の概要については既に報告しており、本家系におけるてんかんが常染色体劣性遺伝形式に従って発症することが予測されている(Kuwabara *et al.*, 2010)。本研究では、家系内で劣性ホモであると予測される個体（ホモ群）およびヘテロであると予測される個体（ヘテロ群）を用いた。この 2 群を比較することで、CSF 中のアミノ酸および他の低分子代謝産物の差異や発作誘発による変動が病態に関連する可能性を検討した。さらに、家系と血縁関係にない健康な個体を対照に加えることで、家系に特有の傾向を抽出することも試みた。加えて、本研究では 4 種のアミノ酸を HPLC とメタボローム解析の双方で検出したが、2 種類の測定で得られた結果に矛盾はなかった。

発作間歇期の CSF 中グルタミン酸濃度は野生型群と比較してヘテロ群で有意に低値であったが、ホモ群と他の 2 群との間には有意差は認められなかった。ヒトのてんかん患者やモデル動物で CSF 中グルタミン酸濃度を測定した研究では、健康対照と比較してグルタミン酸濃度が高値であるとする複数の報告があり、グルタミン酸高値とてんかんの関連が疑われているが(Mally *et al.*, 1996; Morita *et al.*, 2002; Podell and Hadjiconstantinou, 1997)、本研究の結果はこれらの報告とは異なるものであった。また、前庭刺激により全ての群で CSF 中のグルタミン酸濃度が上昇したが、ホモ群での上昇は他群と比較して軽度であった。ヒトのてんかん患者において微小透析法により細胞外液のグルタミン酸濃度を測定した研究では、発作開始前にグルタミン酸濃度が著しく上昇し、発作終了後に発作間歇期の濃度に戻った(During and Spencer, 1993)。この結果はグルタミン酸がてんかん発作の

発現に関与していることを示唆している。発作前あるいは発作時に細胞外でグルタミン酸濃度が上昇する原因は明らかになっていないが、発作発現の機序にグルタミン酸の放出促進、トランスポーターによる取り込み能の低下、あるいはシナプス後レセプター活性の促進などが関与していることが考えられている(Meldrum, 1994)。また、げっ歯類のキンドリリングモデルにおいて発作後にグルタミン酸トランスポーターの発現が変化することが報告されており(Miller *et al.*, 1997)、アストロサイトに発現しているexcitatory amino acid transporter 1 (EAAT1) /GLASTおよびEAAT2/GLT-1の減少が、発作時のグルタミン酸の異常な上昇に関与している可能性が示されている。一方、神経細胞に発現しているグルタミン酸トランスポーターであるEAAT3/EAAC1の増加が発作時に上昇した細胞外グルタミン酸の急速な取り込みに関与していると考えられている(Medina-Ceja *et al.*, 2012; Ross *et al.*, 2011)。これはシナプス間隙に過剰に放出されたグルタミン酸に対する代償性あるいは防御性反応であると予測されている。本研究では発作直前のCSF中グルタミン酸濃度を評価することはできなかったが、ヒトのてんかん患者と同様に、本家系のホモ群においても発作に関連したグルタミン酸濃度の上昇が起こった可能性がある。ホモ群でのみ発作後のCSF中グルタミン酸濃度が有意に上昇しなかったことは、グルタミン酸トランスポーターが代償性に増加していたためであるかもしれない。しかし一方で、前庭刺激によるこれらグルタミン酸濃度の上昇は猫に共通してみられる生理的な反応である可能性があり、本てんかん家系における発作の発現にグルタミン酸濃度の上昇は関与していないことを示唆しているかもしれない。

本研究ではホモ群の CSF 中グルタミン濃度が野生型群に比較して低値であった。また、

ヘテロ群のグルタミン濃度も低い傾向にあった。従って本家系は CSF 中のグルタミン濃度が低い傾向をもつと考えられた。グルタミンはグルタミン酸の主要な前駆体である (Armano *et al.*, 2002)。シナプス前終末から放出されたグルタミン酸はトランスポーター (GLAST, GLT-1) によりアストロサイトに取り込まれ、グリア細胞に特異的に発現しているグルタミン合成酵素 (glutamine synthetase: GS) によりグルタミンに変換される。グルタミンはニューロンへと輸送され、グルタミナーゼにより分解されてグルタミン酸が生成され、その一部がグルタミン酸脱炭酸酵素により GABA へと変換される (Bak *et al.*, 2006)。この過程はグルタミン酸-グルタミンサイクル (glutamate-glutamine cycle : GGC) と呼ばれている。ヒトの側頭葉てんかん (temporal lobe epilepsy: TLE) の患者とげっ歯類のてんかんモデルでは、発作時に細胞外グルタミン酸濃度の上昇とグルタミン濃度の低下が報告されており (Kanamori and Ross, 2011)、これは GS の活性低下あるいは GGC の遅延に起因すると考えられている (Cavus *et al.*, 2005; Eid *et al.*, 2004; Petroff *et al.*, 2002)。本研究では発作後の CSF グルタミン濃度は評価しなかったが、本家系のホモ群の個体においても GS 活性の低下、あるいは GGC の遅延が生じている可能性がある。また、細胞外グルタミン濃度の減少は、発作時のグルタミン酸の過剰放出により枯渇したシナプス前終末のグルタミン酸プールを補充するために、神経細胞による取り込み量がアストロサイトからの供給を上回った場合にも生じる可能性がある (Kanamori and Ross, 2011)。さらに、前述のような EAAC1 の発現増加がホモ群で生じていると仮定すれば、シナプス間隙に放出されたグルタミン酸の多くが神経細胞に取り込まれ、アストロサイトに取り込まれるグルタミン酸量が減少することで GGC を介したグルタミン放出量がさらに減少した可能性もある。

る。

本研究では、ホモ群の CSF 中 GABA 濃度に著しい個体差が認められ、一部の個体では非常に高値であった。GABA 作動性ニューロンのシナプス前終末では、GGC を経由してグルタミン酸から GABA が合成される(Bak *et al.*, 2006)。本家系のホモ群では、この GGC 由来の GABA 合成の促進が生じていたと考えられる。また、GABA は GGC 由来のみでなく、EAAC1 により取り込まれたグルタミン酸からも合成されることが報告されている(Mathews and Diamond, 2003; Medina-Ceja *et al.*, 2012; Sepkuty *et al.*, 2002)。前述のようにてんかん脳では EAAC1 の発現が上昇していることから、GABA 作動性ニューロンのシナプス前終末では、このトランスポーターにより取り込まれたグルタミン酸の脱炭酸により多量の GABA が合成され、シナプス間隙へと放出されている可能性がある。GABA トランスポーターは細胞外の GABA 濃度を調節している。シナプス間隙に放出された GABA は GABA トランスポーターにより神経細胞やアストロサイトに取り込まれる。一方、生理的あるいは病的状態において、GABA トランスポーターの逆輸送により、神経細胞やアストロサイトから細胞外へ非小胞性の GABA の放出が生じることが報告されている。さらに、この GABA トランスポーターの逆輸送による GABA の放出は、興奮性活動に対する代償性反応であり、過剰な興奮や発作活動を低下させるために細胞外の GABA を増加させていると予測されている(Héja *et al.*, 2012; Richerson and Wu, 2003; Wu *et al.*, 2007)。これらの代償性の GABA の増加が本家系のホモ群においても生じている可能性がある。

本研究では、CSF 中のピリドキサル濃度が野生型群に比較してホモ群で高値であった。ピリドキサルはビタミン B6 誘導体の一種であり、ヒトにおいては、ビタミン B6 の欠乏

がてんかんの病態生理に関与していると報告されている(Clayton, 2006; Ohtahara *et al.*, 2011)。このことからビタミン B6 の代謝が変化しており、本家系のてんかんに関与している可能性も考えられた。

【小括】

本章では、自然発生性家族性てんかんの猫における CSF 中のアミノ酸および内因性代謝産物について評価した。

本研究ではこれまで複数の研究で報告されてきたようなグルタミン酸濃度の上昇および GABA 濃度の低下は認められなかった。しかしながら、本家系でてんかんを発症している猫の脳において GGC に変化が生じている可能性が示唆された。さらに、メタボローム解析の結果より、ビタミン B6 の代謝変化など、アミノ酸以外の要因が本家系におけるてんかん発症に関与している可能性も示された。

第二章

てんかん発症個体の海馬のグルタミン酸トランスポーターおよび
グルタミン合成酵素の発現に関する免疫組織化学的検討

【緒言】

CNSにおいて、細胞外のグルタミン酸は主にグルタミン酸トランスポーターによりグリア細胞や神経細胞に取り込まれる。このため、細胞外グルタミン酸濃度を決定している主要な要因はグルタミン酸の細胞内への取り込みである(Gorter *et al.*, 2002)。哺乳動物のグルタミン酸トランスポーターは、EAAT1/GLAST (Arriza *et al.* 1994; Kawakami *et al.* 1994)、EAAT2/GLT-1 (Arriza *et al.*, 1994)、EAAT3/EAAC1 (Kanai and Hediger, 1992)、EAAT4(Fairman *et al.*, 1995)およびEAAT5(Arriza *et al.*, 1997)という複数のサブタイプが同定されている。GLAST、GLT-1およびEAAC1は脳の全域に発現しており、GLASTおよびGLT-1は主にアストロサイトに、EAAC1は神経細胞の樹状突起や細胞体に豊富に発現している。EAAT4およびEAAT5はそれぞれ小脳プルキンエ細胞と網膜に局限して発現している(Gorter *et al.*, 2002; Maragakis and Rothstein, 2001)。

てんかん患者やてんかんモデル動物の脳において、グルタミン酸トランスポーター発現の変化が報告されており、これらの変化が細胞外グルタミン酸濃度の変化に関与していることが示唆されている(Medina-Ceja *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 2011)。獣医学領域では、家族性の特発性てんかんの犬の脳におけるGLAST、GLT-1およびGSの免疫組織化学的研究でGLT-1の減少が報告されている(Morita *et al.*, 2005)。しかしながら、特発性てんかんの猫における免疫組織化学的研究は行われていない。第一章ではてんかん家系の猫においてGGCおよびGABA代謝の変化を示唆する結果が得られたことから、これらの代謝経路に関与しているグルタミン酸トランスポーターおよびグルタミン合成酵素について、本家系のてんかん発症猫の海馬における発現に着目し、免疫組織化学的に検討した。

【材料と方法】

1. 供試動物

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会・生命倫理委員会の承認を経て行われた。

本研究には、日本獣医生命科学大学にて維持されている、家族性のもてんかん猫を用いた。

家系内で自発性のもてんかん発作を発症しており、家系解析から遺伝的に劣性ホモであると判定した猫 4 頭（1 歳 5 ヶ月齢・7 歳 6 ヶ月齢、平均 5 歳 5 ヶ月齢、2.6-4.6 kg）をホモ群として用いた（図 2-1）。これらホモ群の猫のうち 3 頭は、生前に発作焦点検索を目的とした定位的な頭蓋内深部脳波電極の挿入を実施した個体であった（電極は左右の扁桃体と背側海馬の計 4 部位に設置）。また、家系と血縁関係にない臨床的に健康な猫 3 頭（6 歳 10 ヶ月齢・8 歳 6 ヶ月齢、平均 7 歳 7 ヶ月齢、3.3-4.2 kg）を野生型群として用いた。

2. 脳組織採取

全ての猫はペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル，共立製薬，Tokyo, Japan）50 mg/kg IV にて安楽殺処置を行った後、速やかに脳を摘出した。病理組織学的評価には、脳の横断面にて乳頭体より尾側に 5 mm の範囲内の海馬を用いた。10%中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定し、常法に従ってパラフィンに包埋した。パラフィン包埋した組織を回転式ミクロトームで 4 μ m 厚に薄切し、脱脂したスライドガラス上にマウントした。

3. 染色

全ての標本についてヘマトキシリン-エオジン（HE）および Klüber-Barrela（KB）染色

を実施した。また、神経細胞のマーカーとして NeuN、アストロサイトのマーカーとして グリア線維性酸性タンパク質 (glial fibrillary acidic protein: GFAP) に対する免疫組織化学を実施した。さらにグルタミン酸トランスポーター (GLAST、GLT-1、EAAC1) および GS に対する免疫組織化学を実施した。

免疫組織化学は酵素抗体法を用いて行った。脱パラフィンした標本を、GFAP を除く全ての免疫組織化学で 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0 あるいは 9.0) に浸漬し、オートクレーブで 121°C、10 分熱処理して抗原賦活を行った。以降、切片の洗浄にはトリス緩衝液 (Tris-buffered solution: TBS) を用いた。TBS で 3 回洗浄した後、全ての切片を 3%過酸化水素水・メタノール溶液を用いて室温で 5 分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活化し、ブロッキング溶液 (8%スキムミルク・TBS) で 37°C、30 分間処理した。再び TBS で 3 回洗浄し、TBS で希釈した一次抗体を 37°C、40 分反応させた。使用した一次抗体の詳細は表 2-1 に示した。二次抗体は EAAC1 を除く全ての免疫組織化学で horseradish peroxidase (HRP) 標識ポリマー試薬 (抗ウサギ・または抗マウス-IgG, Envision polymer, Dako, Glostrup, Denmark) を使用した。EAAC1 に対する免疫組織化学では、二次抗体として抗ヒツジポリマー試薬 (KPL, Baltimore, MD, USA) を使用し、37°C、40 分反応させた後、HRP 試薬 (Dako) を用いて標識した。発色には DAB (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) に最終濃度 0.1%になるように H₂O₂ (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を添加して使用した。NeuN に対する免疫組織化学ではメチルグリーンを用いて核染色を行った。NeuN を除く全ての免疫組織化学では核染色にヘマトキシリンを用いた。

4. 形態観察およびデータ解析

海馬のルーペ像は Nikon COOLSCAN IV ED (Nikon Imaging, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。顕微鏡像（組織像）は Nikon DXM1200F デジタルカメラおよび ACT-1 ソフトウェア (Nikon Instruments, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

NeuN 標本は神経細胞数の計測に用いた。各個体で海馬 CA1、CA2 および CA3 領域を 100 倍視野にて撮影し、NeuN 陽性の核を持ち神経細胞の形態学的特徴を有する細胞の数をカウントした。この際、盲検的に評価を行うために撮影者と評価者を別にし、個体情報を知らされていない一人の評価者が細胞数をカウントした。GFAP、各グルタミン酸トランスポーターおよび GS に対する免疫組織化学では、各染色における陽性面積率を免疫反応性 (immunoreactivity: IR) として評価した。各海馬標本の CA1、CA2 および CA3 領域で各々異なる 3 部位を 200 倍視野にて撮影し視野内の陽性面積率を計測した。画像解析には National Institute of Health (NIH) Image J ソフトウェアを用いた。即ち、カラーチャンネルを RGB 8-bit イメージに分離し、各染色にて定めた threshold (GFAP; 0-100、GLAST; 0-185、GLT-1; 0-160、EAAC1; 0-185、GS; 0-160) の領域を陽性とした。海馬の各領域で 3 視野における陽性面積率の平均値を算出した。

5. 統計

海馬の評価には左右腹側海馬および左右背側海馬を各々 1 海馬として用いた。結果は平均 ± 標準偏差で示した。統計解析は Prism (Ver. 5, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用いて Mann-Whitney *U* test を行い、 $p < 0.05$ のときに有意であると判断した。

【結果】

本研究では、染色行程で切片が剥離したものを除外し、評価可能な標本のみを評価に用いた。HE および KB 染色による評価では、野生型群、ホモ群ともに明らかな組織学的異常は認められなかった。

神経細胞数の評価には、NeuN に対する免疫組織化学の野生型群 3 頭 12 海馬標本（左海馬 6、右海馬 6）、ホモ群 4 頭 10 海馬標本（左海馬 5、右海馬 5）を用いた（図 2-2A, B）。各海馬領域における NeuN 陽性細胞数を図 2-4 に示した。ホモ群の NeuN 陽性細胞数は、野生型群と比較して CA3 で有意に少なかった（ $p = 0.027$ ）。CA1 および CA2 では 2 群間に差は認められなかった（CA1: $p = 0.429$, CA2: $p = 0.741$ ）。

GFAP に対する免疫組織化学の評価には、野生型群 3 頭の 9 海馬標本（左海馬 4、右海馬 5）、ホモ群 4 頭の 10 海馬標本（左海馬 5、右海馬 5）を用いた。野生型群の海馬では、アストロサイトは GFAP 陽性細胞として明瞭に描出され、錐体細胞や顆粒細胞の周囲に広く存在していた（図 2-2C, D）。ホモ群の海馬でも、染色パターンに明らかな相違は認められなかった。各海馬領域における GFAP 陽性面積率の 3 視野の平均値を図 2-4 に示した。ホモ群の GFAP 陽性面積率は CA1 および CA3 領域で野生型群と比較して少ない傾向があったが、有意な差はなかった（CA1: $p = 0.683$, CA3: $p = 0.287$ ）。また CA2 領域では 2 群間に差はなかった（ $p = 0.549$ ）。

GLAST に対する免疫組織化学の評価には、野生型群 3 頭の 4 海馬標本（左海馬 3、右海馬 1）、ホモ群 4 頭の 9 海馬標本（左海馬 4、右海馬 5）を用いた。野生型群の海馬では、神経細胞体（錐体細胞層、顆粒細胞層）は GLAST 陰性であったが、一方で神経網（neuropil）

領域においては均一な染色パターンを示した（図 2-3A）。ホモ群でも、野生型群と同様の染色パターンを示した（図 2-3B）。各海馬領域における GLAST 陽性面積率の 3 視野の平均値を図 2-4 に示した。ホモ群の GLAST 陽性面積率は全ての海馬領域において野生型群と比較してホモ群で少ない傾向にあった（CA1: $p = 0.414$, CA2 : $p = 0.414$, CA3 : $p = 0.076$ ）。

GLT-1 に対する免疫組織化学の評価には、野生型群 3 頭の 7 海馬標本（左海馬 5、右海馬 2）、ホモ群 4 頭の 10 海馬標本（左海馬 5、右海馬 5）を用いた。野生型群の海馬では、これまでの報告と同様に ‘patchy’ パターン(Milton *et al.*, 1997; Proper *et al.*, 2002)と呼ばれる、斑状の GLT-1 陽性領域を認めた（図 2-3C）。野生型群の海馬において、神経細胞体は GLT-1 陰性であり、neuropil 領域は強陽性を示した。海馬支脚（subiculum）および歯状回上顆粒層ではアストロサイト様の細胞を認めた。また、CA2 から CA3 領域にかけて均一な染色パターンを示し、主に錐体細胞と顆粒細胞の周囲に存在していた。ホモ群の海馬では、野生型群と比較的類似した染色像を示したが、野生型群に比較してさらに広範な染色パターンを示し、明らかな patchy パターンは認められなかった（図 2-3D）。各海馬領域における GLT-1 陽性面積率の 3 視野の平均値を図 2-4 に示した。ホモ群の CA1 領域における GLT-1 陽性面積率は野生型群と比較して有意に少なかった（ $p = 0.022$ ）。CA2 および CA3 領域においては、野生型群と比較してホモ群で少なかったが、有意な差はなかった（CA2 : $p = 0.305$, CA3 : $p = 0.130$ ）。

EAAC1 に対する免疫組織化学の評価には、野生型群 3 頭の 5 海馬標本（左海馬 3、右海馬 2）、ホモ群 4 頭の 10 海馬標本（左海馬 5、右海馬 5）を用いた。野生型群の海馬では、錐体細胞および顆粒細胞が EAAC1 陽性であった（図 2-3E）。ホモ群においても同様の染色

パターンが認められた (図 2-3F)。EAAC1 の分布は野生型群とホモ群で明らかな相違は認められなかった。各海馬領域における EAAC1 陽性面積率の 3 視野の平均値を図 2-4 に示した。ホモ群の全ての海馬領域における EAAC1 陽性面積率は、野生型群と比較して少ない傾向にあり、CA1 および CA2 領域では野生型群と比較して有意に少なかった (CA1 : $p = 0.023$, CA2 : $p = 0.022$, CA3 : $p = 0.158$)。

GS に対する免疫組織化学の評価には、野生型群 3 頭の 9 海馬標本 (左海馬 6、右海馬 3)、ホモ群 4 頭の 8 海馬標本 (左海馬 5、右海馬 3) を用いた。野生型群およびホモ群の海馬では、GS を含有するアストロサイトは GS 陽性細胞として描出され、錐体細胞や顆粒細胞の周囲に広く存在していた (図 2-3G, H)。GS の分布は野生型群とホモ群で明らかな相違は認められなかった。各海馬領域における GS 陽性面積率の 3 視野の平均値を図 2-4 に示した。ホモ群の全ての海馬領域、特に CA2 領域において野生型群に比較して GS 陽性面積率が多い傾向にあったが、有意差はなかった (CA1 : $p = 0.210$, CA2 : $p = 0.163$, CA3 : $p = 0.194$)。

表2-1 免疫組織化学に用いた抗体

Antibody	Type	Marker for	Antigen Retrieval	Dilution	Source, Cat. No.
NeuN	Mouse, m	Neuron	Citrate buffer, pH 6.0	1:500	Chemicon (Millipore), MAB377
GFAP	Rabbit, p	Astrocyte	none	1:400	Dako, Z0334
GLAST	Rabbit, p	-	Citrate buffer, pH 6.0	1:100	Sato <i>et al.</i> , 2000
GLT-1	Rabbit, p	-	Citrate buffer, pH 6.0	1:1000	Wako Pure Chemical Industries, 015-16421
EAAC1	Goat, p	-	Citrate buffer, pH 9.0	1:1000	Chemicon (Millipore), Ab1520
GS	Mouse, m	-	Citrate buffer, pH 6.0	1:200	BD Biosciences, 610518

m:モノクローナル抗体、p:ポリクローナル抗体

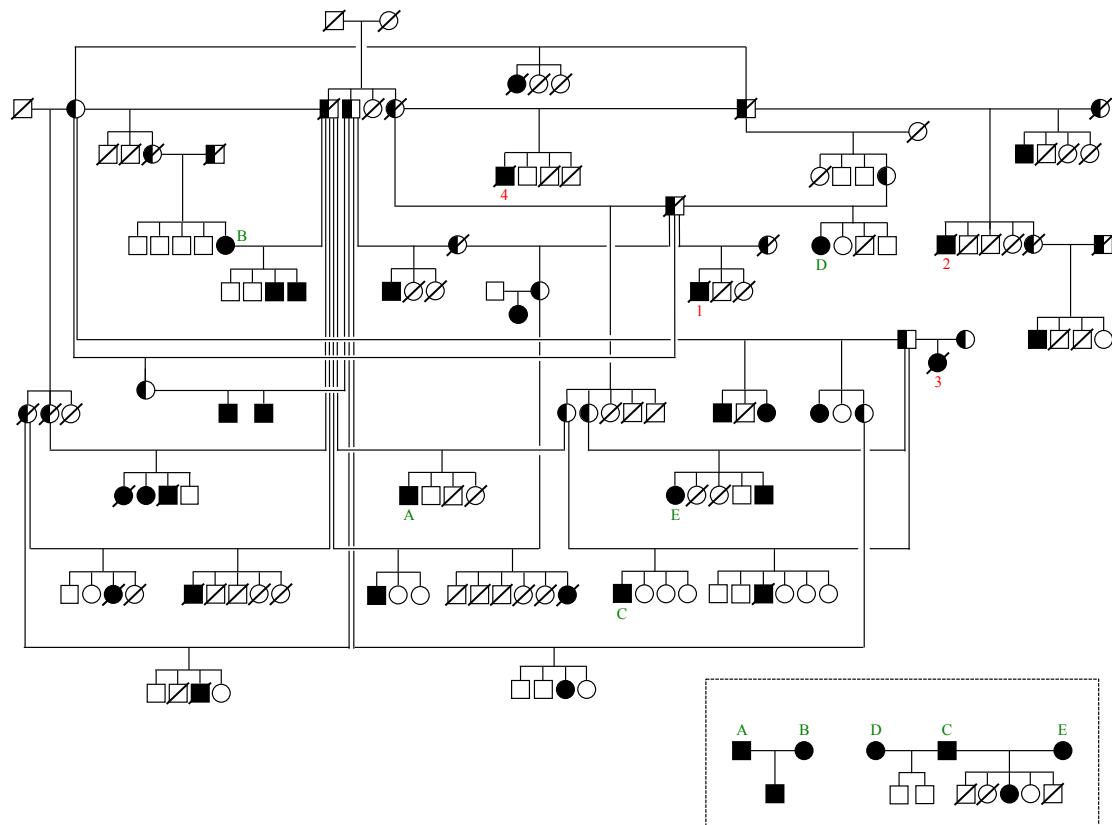


図 2-1. 病理組織学的解析に用いたてんかんの猫の家系図

1-4：病理組織学的解析に用いたてんかん発症個体。

□：オス、○：メス、■：発症、◐：非発症キャリア、／：死亡あるいは医療記録なし。

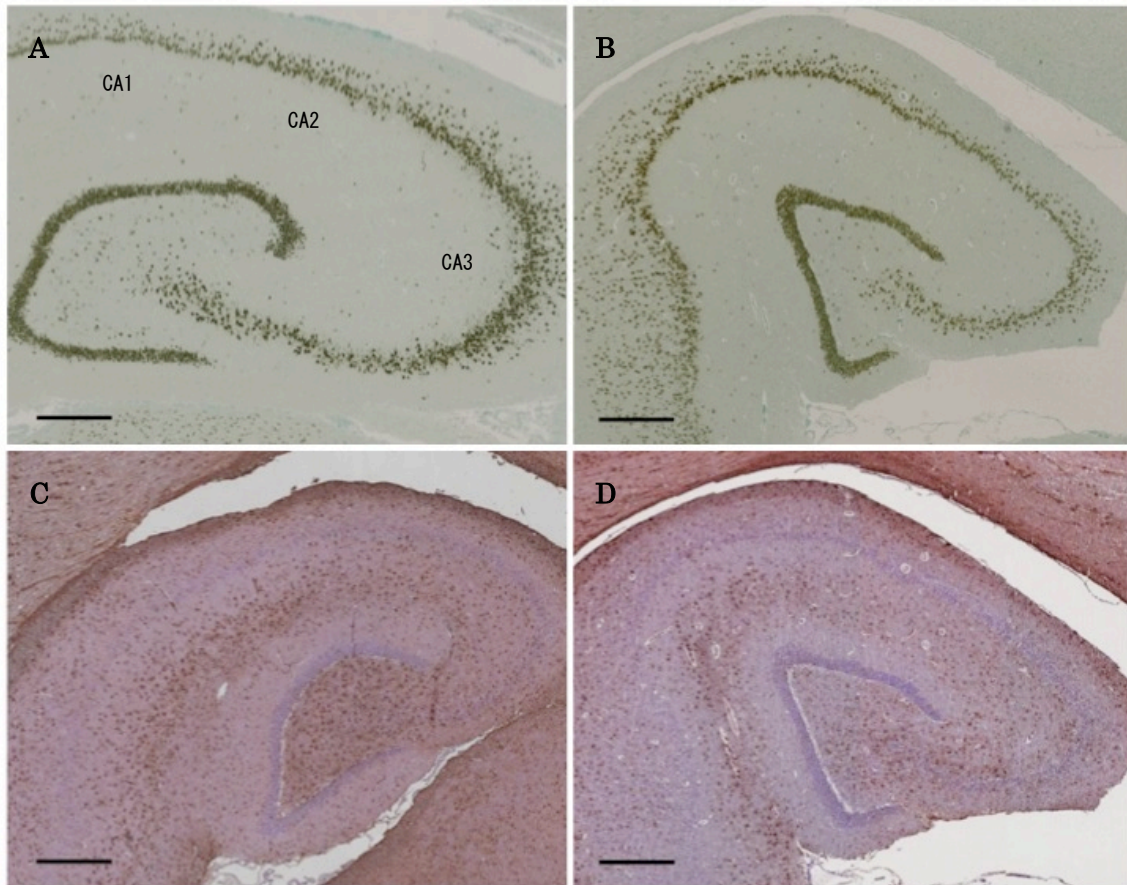


図 2-2. 野生型群およびホモ群の海馬における NeuN および GFAP に対する免疫組織化学
 野生型群 (A) およびホモ群 (B) 海馬の NeuN に対する免疫組織化学。野生型群 (C) およびホモ群 (D) 海馬の GFAP に対する免疫組織化学。スケールは 500 μm 。

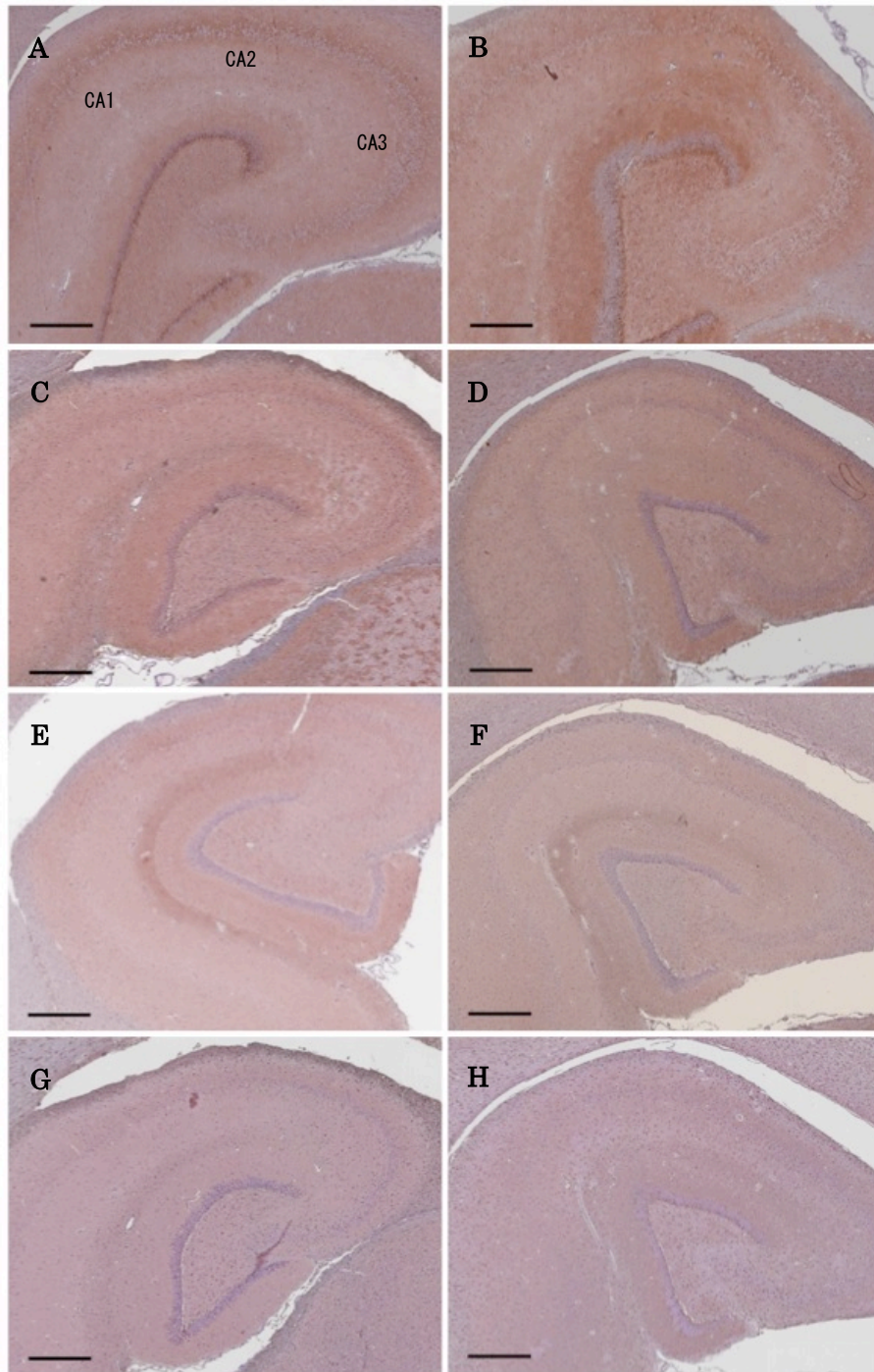


図 2-3. 野生型群およびホモ群の海馬におけるグルタミン酸トランスポーターおよび GS に対する免疫組織化学

野生型群 (A) およびホモ群 (B) 海馬における GLAST に対する免疫組織化学。野生型群 (C) およびホモ群 (D) 海馬における GLT-1 に対する免疫組織化学。野生型群 (E) およびホモ群 (F) 海馬における EAAC1 に対する免疫組織化学。野生型群 (G) およびホモ群 (H) 海馬における GS に対する免疫組織化学。スケールは 500 μm 。

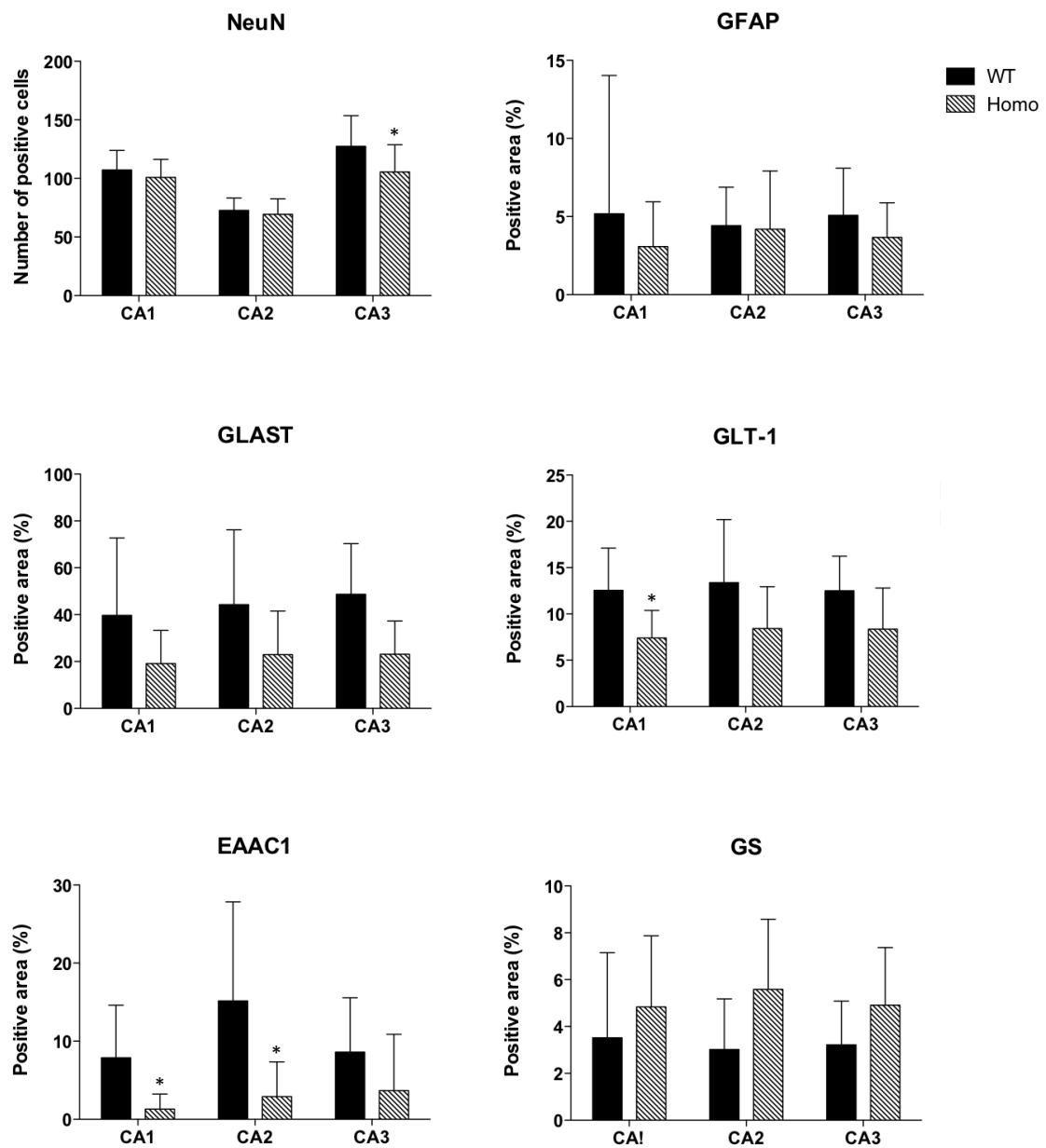


図 2-4. 海馬の各領域における神経細胞数および GFAP、GLAST、GLT-1、EAAC1、GS の陽性面積率 (%)

グラフは平均±標準偏差を示す。 * : $p < 0.05$ vs 野生型群。

【考察】

本章では、CNS でグルタミン酸の代謝に関与するグルタミン酸トランスポーターおよび GS について免疫組織化学的に評価した。

ホモ群の CA3 領域では野生型群と比較して神経細胞数が有意に少なかったが、CA2 領域では比較的温存されていた。さらに GFAP 陽性面積率も同様の傾向があった。ヒトでは、海馬の CA1、CA3 および CA4 領域は発作に対し脆弱であるのに対し、CA2 領域は抵抗帯と呼ばれ、神経細胞が比較的温存されやすいことが知られている (Corsellis and Bruton, 1983)。本研究でも CA2 領域の神経細胞数は比較的温存されており、ヒトの特徴と一致していた。

ヒトのてんかん患者で最も一般的な病理組織学的所見は、内側側頭葉てんかん (mesial temporal lobe epilepsy: MTLE) の患者で認められる海馬硬化 (Hippocampal sclerosis: HS) であり、錐体細胞層の神経細胞脱落およびグリオシスに伴う海馬萎縮を特徴とする。猫でも、カイニン酸注入による発作誘発後に神経細胞脱落とグリオシスが認められており、HS に相当する所見であるとされている (Tanaka *et al.*, 1992)。本研究のホモ群の個体では神経細胞の脱落を示唆する所見は得られたが、明らかなグリオシスは認められなかった。従って、ホモ群の海馬では HS とは異なる病態が生じていることが示唆された。詳細な病態は現時点では不明であるが、ホモ群の海馬において神経細胞およびアストロサイトが脱落している可能性が考えられた。

本研究では、ホモ群の全ての海馬領域で、野生型群と比較して GLAST および GLT-1 陽性面積率が低い傾向にあり、CA1 領域では GLT-1 陽性面積率が有意に低かった。さらに、

ホモ群の全ての海馬領域において、EAAC1 陽性面積率も低い傾向にあり、CA1 および CA2 では有意に低かった。ラットのカイニン酸注入により発作を誘発した慢性てんかんモデルでは、海馬の GLAST、GLT-1 発現の減少が報告されており、これら GLAST および GLT-1 の減少は、細胞外グルタミン酸濃度を上昇させ興奮性の増強へとつながる可能性があると考えられている(Miller *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 2001)。ヒトの TLE 患者における EAAC1 の発現の変化に関する研究では、海馬硬化を伴わない症例ではトランスポーターの発現はてんかんに罹患していないヒトの剖検海馬と比較して変化は認められなかったが、海馬硬化を伴う症例では神経細胞の減少に付随して減少していたと報告されている(Mathern *et al.*, 1999)。本研究では、第一章における CSF 中アミノ酸解析で発作時のグルタミン酸濃度の上昇を示唆する結果が得られており、グルタミン酸トランスポーターの発現が少ないことが関連している可能性が考えられた。また、ホモ群の NeuN 陽性細胞数および GFAP 陽性面積率が低かったことから、グルタミン酸トランスポーターがこれらを発現する細胞の減少に伴って減少していることが推測された。

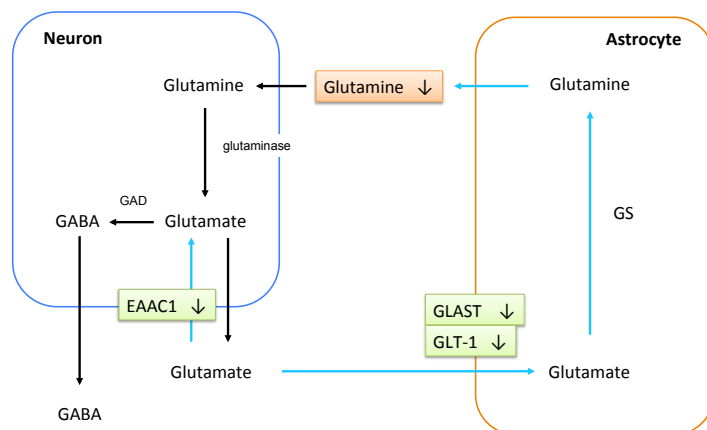
ホモ群の海馬では、GS 陽性面積率は全ての海馬領域で野生型群と比較して多い傾向にあり、特に CA2 領域で多かった。第一章における CSF 中のアミノ酸解析において、ホモ群に GABA 濃度が著しく高値である個体が存在し、発作時の興奮性の上昇に対して代償性に GABA の合成、放出が上昇していることが示唆された。GABA 作動性ニューロンのシナプス前終末では、GGC を経由してグルタミン酸から GABA が合成される(Bak *et al.*, 2006)。従って、本研究において認められた GS 陽性面積率の増加は、発作時の細胞外グルタミン酸濃度の増加に対して、GGC を介した GABA の合成が代償性に増加していることを反映す

る可能性がある。さらに興味深いことに、ホモ群の神経細胞数および GFAP 陽性面積率は野生型群と比較して CA2 領域で最も差がなかった。前述したように、CA2 は発作に対する抵抗帯である。これらのことは、GGC を介した代償性反応を温存された CA2 領域が担っている可能性を示唆しているかもしれない。

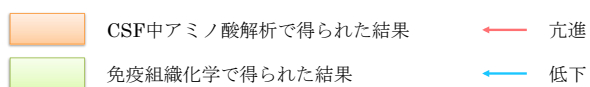
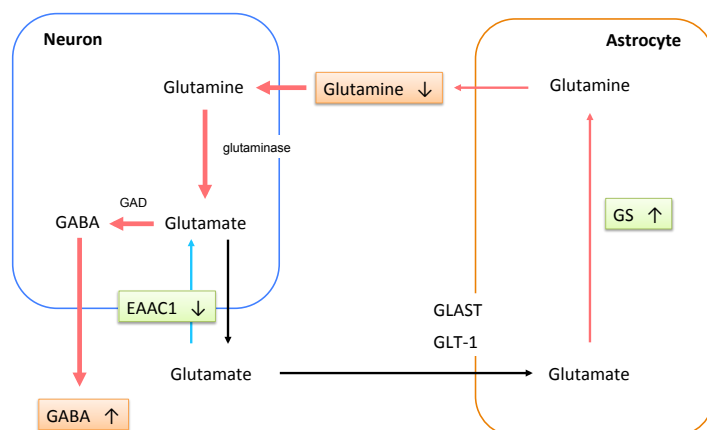
【小括】

てんかん発症猫では、海馬の神経細胞数やアストロサイトの減少に伴い、これらの細胞に発現しているグルタミン酸トランスポーターが減少している可能性が示唆された。また、てんかん発症猫の海馬はグルタミン酸合成酵素の免疫反応性が高かったことから、発作時の興奮性の増加に対する代償性反応として、GGC を介した GABA 合成が亢進していることが考えられた。

CA1/CA3



CA2



第三章

てんかん原因遺伝子の同定に向けたエクソーム解析

【緒言】

次世代シーケンサーが広く利用できるようになり、ゲノムシーケンスはこれまでのサングー法に比較して低コストでの実施が可能となった。さらに、ターゲット領域のキャプチャー技術の発展に伴い、費用効果的にゲノムに存在するほぼ全てのタンパク質コーディング領域の変異を決定するエクソーム解析が可能になった (Bamshad *et al.*, 2011)。この解析法は、従来の解析法では困難であったメンデル遺伝性疾患の原因遺伝子の同定に有用である。さらに従来の方法による原因遺伝子の同定が可能な場合でも、エクソーム解析と組み合わせることで、より迅速な同定が可能になる。

近年ヒトにおいては、遺伝学、分子生物学の進展に伴い単一遺伝形式のてんかんに関連する遺伝子が同定され、そのリストは拡大しつつある(Baulac and Baulac, 2010; Coorg *et al.*, 2013)。これまでに特発性てんかんと関連する 20 以上の遺伝子が報告されている(Cherepanova *et al.*, 2013; Ottman *et al.*, 2010)。さらに、ここ数年でエクソーム解析技術を用いたてんかん関連遺伝子の探索が行われるようになっている(Dibbens *et al.*, 2013; Ishida *et al.*, 2013)。獣医学領域においても、犬でてんかんと関連する 9 の遺伝子が報告されている(Ekenstedt *et al.*, 2012; Jokinen *et al.*, 2007; Lohi *et al.*, 2005)。一方猫においては、近年実施された全ゲノムシーケンス解析により、ゲノムの解読は大きく進展した(Pontius *et al.*, 2007)。しかしながら、全ゲノムの解読には至っておらず、猫ゲノム解読の遅れから猫で同定されている疾患関連遺伝子は少なく、またてんかん原因遺伝子も未だに同定されていない。

そこで本章では、エクソーム解析を用いて、自然発生性家族性てんかん猫の家系におけ

るてんかん原因遺伝子の同定を試みた。

【材料と方法】

1. エクソーム解析

1.1. 供試動物

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会・生命倫理委員会の承認を経て行われた。

本研究には民間の動物繁殖飼育施設ならびに日本獣医生命科学大学にて飼育・維持している家族性のもんかん猫を用いた。家系内で自発性のもんかん発作を発症しており、家系解析から遺伝的に劣性ホモ接合体であると判定した個体2頭(3歳0ヶ月齢、4歳9ヶ月齢)、非発症キャリア、即ちヘテロ接合体であると判定した個体4頭(6歳3ヶ月齢-8歳3ヶ月齢、平均7歳6ヶ月齢)の計6頭を用いた(図3-1)。

1.2. ゲノム DNA 抽出

供試動物の頸静脈より末梢血を採取し、EDTA-2Na添加後4℃で保存した。DNeasy Blood & Tissue KIT (QIAGEN, Hilden, Germany)を用いて採取した血液よりゲノムDNAを抽出した。

1.3. エクソームシーケンス解析

エクソームシーケンス解析はタカラバイオ株式会社 (Shiga, Japan) にて実施した。抽出したゲノムDNAから、SureSelectXT Custom kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA)を用いて以下の方法でシーケンスライブラリーを作製した。抽出したゲノムDNAをアコースティックソルビライザーCovaris (Covaris Inc., Woburn, MA, USA) を用いて

物理的に数百 bp に断片化した。断片化した DNA の両末端を平滑化・リン酸化処理した後、3'-dA 突出末端処理を行った。末端修飾した DNA の両端にアダプターを連結した後、アガロースゲル電気泳動を用いてサイズ選別を行った。サイズ選別した DNA を鋳型とし、PCR による増幅を行い、得られた PCR 産物を DNA ライブラリーとした。作製した DNA ライブラリーを SureSelect Oligo Capture ライブラリー（標的領域とハイブリダイズするビオチン化 RNA）とハイブリダイゼーションさせ、ハイブリダイズした DNA ライブラリーをストレプトアビジン磁気ビーズにより回収した。回収した DNA ライブラリーを鋳型として PCR による増幅を行い、シーケンスライブラリーとした。作製したシーケンスライブラリーを用いて、cBot (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)によりシーケンスの鋳型となるクラスターを形成した。HiSeq2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)を用いた 100 塩基ペアエンドシーケンス解析により、鋳型 DNA の塩基配列を取得した。

1.4. エクソームデータ解析

シーケンス解析により得られた塩基配列を Burrows-Wheeler Aligned Software (Li and Durbin, 2009)を用いて Ensembl Genome Browser から取得した猫の参照配列 (Felis catus 6.2 ver.71) に対してマッピングした。Picard (MarkDuplicates) を用い、マッピング結果より PCR Duplicates と思われるリードを除去した。また、BEDTools を用いて参照配列に対するカバー率を算出した。マッピングしたリードが参照配列と異なる箇所を SAMtools (Li *et al.*, 2009) を用いて変異塩基候補として検出した。検出された変異塩基候補を対象に、Ensembl Genome Browser の遺伝子位置情報と dbSNP 127 の既知多型情報

を用い、アノテーションツールである snpEff により遺伝子構造からみた変異の影響 (Impact) を High、Moderate、Low および Modifier の 4 段階で判定した (表 3-1)。検出された変異塩基候補の中で Impact Low および Modifier に分類されたものは疾患に関連する重大な影響を及ぼす可能性が低いものとして本解析から除外した。また、本家系におけるてんかんは常染色体劣性形式で遺伝していると予測していることから、性染色体上で検出された変異を除外し、さらに発症個体でホモ接合、非発症キャリア個体でヘテロ接合の変異を抽出した。

2. 変異塩基候補の確認

抽出した変異塩基候補の中で snpEff により Impact High に分類された変異について、サングー法による DNA シーケンス解析およびフラグメント解析を用いて、該当する変異を確認した。

2.1. 供試動物

エクソーム解析に用いた 6 個体を含む、家系内の 18 個体 (発症 10 個体 : 3 歳 0 ヶ月齢 - 8 歳 10 ヶ月齢、平均 4 歳 10 ヶ月齢、非発症キャリア 8 個体 : 6 歳 3 ヶ月齢 - 11 歳 4 ヶ月齢、平均 8 歳 3 ヶ月齢) を用いた (図 3-1)。

2.2. ゲノム DNA 抽出

供試動物の頸静脈より末梢血を採取し、EDTA・2Na 添加後 4℃で保存した。DNeasy

Blood & Tissue KIT (QIAGEN)を用いて採取した血液よりゲノム DNA を抽出した。

2.3. サンガー法を用いた DNA シーケンス解析

表 3-3 に示す PCR プライマー、および AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い PCR 産物を得た。アガロースゲル電気泳動にて PCR 産物のサイズを確認した後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI USA) を用いて PCR 産物の精製を行った。精製した PCR 産物を BigDye terminator v3.1/1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および Applied Biosystems 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いてシーケンス解析を実施した。さらに、ダイレクトシーケンスにて遺伝子型の判定が困難であったサンプルについて、TA クローニングおよびフラグメント解析を実施した。

2.4. TA クローニングを用いた DNA シーケンス解析

精製した PCR 産物を T/A クローニングベクター (pGEM-T Easy; Promega) に挿入した。これを Competent *Escherichia Coli* (strain DH5 α) へ導入、形質転換した後に、NucleoSpin Plasmid Quick Pure (Macherey-Nagel) を用いてプラスミド DNA を抽出した。BigDye terminator v3.1/1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および Applied Biosystems 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて抽出したプラスミド DNA のシーケンス解析を実施した。

2.5. フラグメント解析による遺伝子型判定

5'末端を蛍光(FAM)で標識したプライマーおよび AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) を用い PCR 産物を得た。アガロースゲル電気泳動にて PCR 産物のサイズを確認した後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて PCR 産物の精製を行った。精製した PCR 産物をサイズスタンダード (600LIS; Applied Biosystems) と混合し、Applied Biosystems 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems) による電気泳動にてフラグメント長を決定した。決定したフラグメント長により遺伝子型を判定した。

【Web resources】

Ensembl Genome Browser, <http://www.ensembl.org/index.html>

dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

snpEff, <http://snpeff.sourceforge.net/>

Picard (MarkDuplicates), <http://picard.sourceforge.net/>

BEDTools, <http://code.google.com/p/betools/>

【結果】

エクソーム解析により検出された変異塩基候補数は各個体で平均 473,920、総数 850,801 であった。これらの変異から snpEff により Impact Low および Modifier と判定された変異、性染色体上に認められた変異を除外し、さらに発症個体でホモ接合の変異、非発症キャリア個体でヘテロ接合の変異として認められたものを抽出した結果、変異塩基候補数は 130 であった。これら 130 の変異塩基候補のうち、Impact High に分類された変異は 9 遺伝子に認められた (表 3-2)。また、Impact Moderate に分類された変異の数は 121 であり、全て非同義置換であった。

Impact High に分類された変異塩基候補について実施した、サンガー法による DNA シーケンス解析およびフラグメント解析の結果を表 3-4 に示した。遺伝子 A では、エクソーム解析にて検出された A の欠失は認められず、隣接する塩基である C の欠失が全個体にホモ接合で存在した。遺伝子 B では、発症個体でホモ接合の変異を有する個体が 4/10 頭 (40%)、非発症キャリア個体でヘテロ接合の変異を有する個体が 7/8 頭 (87.5%) であった。遺伝子 C では、発症個体でホモ接合の変異を有する個体が 4/10 頭 (40%)、非発症キャリア個体でヘテロ接合の変異を有する個体が 7/8 頭 (87.5%) であった。遺伝子 D では、発症個体でホモ接合の変異を有する個体が 4/10 頭 (40%)、非発症キャリア個体でヘテロ接合の変異を有する個体が 8/8 頭 (100%) であった。遺伝子 E では、発症個体でホモ接合の変異を有する個体が 4/10 頭 (40%)、非発症キャリア個体でヘテロ接合の変異を有する個体が 4/8 (50%) 頭であった。遺伝子 F では、発症個体でホモ接合の変異を有する個体が 7/10 (70%) 頭、非発症キャリア個体でヘテロの接合変異を有する個体が 5/8 頭 (62.5%) であった。遺伝子

G では、エクソーム解析にて検出された C の挿入は存在せず、隣接する塩基である T の欠失が全個体にホモ接合で存在した。遺伝子 H では、発症個体でホモ接合の変異を有する個体が 6/10 頭(60%)、非発症キャリア個体でヘテロ接合の変異を有する個体が 7/8 頭(87.5%)であった。遺伝子 I では、発症個体でホモの変異を有する個体が 4/10 例 (40%)、非発症キャリア個体でヘテロの変異を有する個体が 6/8 例 (75%) であった。

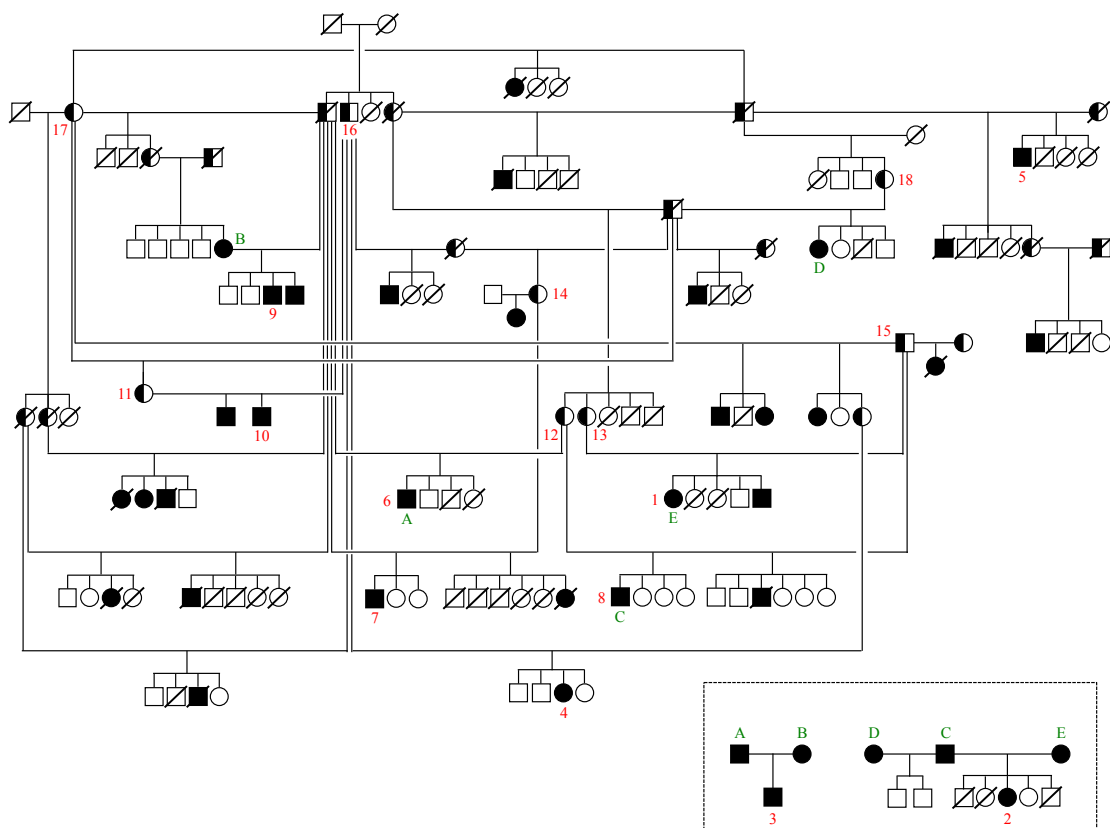


図 3-1. 遺伝子解析に用いたてんかんの猫の家系図

1,2 : エクソーム解析に用いたてんかん発症個体。3-10 : サンガー法による DNA シーケンス解析およびフラグメント解析時に追加したてんかん発症個体。11-14 : エクソーム解析に用いた非発症キャリア個体。15-18 : サンガー法による DNA シーケンス解析およびフラグメント解析時に追加したてんかん非発症キャリア個体。

□ : オス、○ : メス、■ : 発症、□ : 非発症キャリア、／ : 死亡あるいは医療記録なし。

表 3-1. snpEff における Impact と Effect の対応

Impact	Effect
High	SPILICE_SITE_ACCEPTOR SPLICE_SITE_DONOR START_LOST EXON_DELETED FRAME_SHIFT STOP_GAINED STOP_LOST RARE_AMINO_ACID
Moderate	NON_SYNONYMOUS_CODING CODON_CHANGE CODON_INSERTION CODON_CHANGE_PLUS_CODON_INSERTION CODON_DELETION CODON_CHANGE_PLUS_CODON_DELETION UTR_5_DELETED UTR_3_DELETED
Low	SYNONYMOUS_START NON_SYNONYMOUS_START START_GAINED SYNONYMOUS_CODING SYNONYMOUS_STOP
Modifier	UTR_5_PRIME UTR_3_PRIME REGULATION UPSTREAM DOWNSTREAM GENE TRANSCRIPT EXON INTRON_CONSERVED INTRON INTRAGENIC INTERGENIC INTERCENIC_CONSERVED NONE CHROMOSOME CUSTOM CDS

表3・2. エクソーム解析により抽出した変異のうちImpact Highに分類された変異

Gene	Chromosome	DNA change	Effect	Amino acid change
A	A1	delA	FRAME_SHIFT	—
B	A2	delCT	FRAME_SHIFT	—
C	A2	G > T	STOP_GAINED	E357*
D	B3	insC	INTRON_SPLICE_SITE_DONOR	—
E	C1	insGGAGG	FRAME_SHIFT	—
F	D1	delTTATA	INTRON_SPLICE_SITE_ACCEPTOR	—
G	D4	insC	FRAME_SHIFT	*330S
H	E2	insCGCA	INTRON_SPLICE_SITE_ACCEPTOR	—
I	F1	A > G	INTRON_SPLICE_SITE_ACCEPTOR	—

* : stop codon

表3-3. Impact Highに分類された変異について実施したDNAシーケンス解析に使用したプライマー

Gene	Primer Sequence	Amplicon Length (bp)
A	Foeward 5'-GAAGACTCATTTGGGTGGC-3'	164
	Reverse 5'-GGGAAAGCTCACTGAGGCTTTGC-3'	
B	Foeward 5'-TTTCCCTGAGGGCAGTGTAGAG-3'	190
	Reverse 5'-TTCAGGATGAACACAGCACAC-3'	
C	Foeward 5'-AATTGTGGCATTACGGTCCATG-3'	173
	Reverse 5'-CATTGAGGATTTGAGATGTCGC-3'	
D	Foeward 5'-AATGTTGGCCTTATCCGGCTG-3'	135
	Reverse 5'-TTTTGTGATGGCCATTCCCAGC-3'	
E	Foeward 5'-CCTGGCACATGGTAGGTTCTTG-3'	178
	Reverse 5'-ATCCTGCAGTAAGTATCCCTTGC-3'	
F	Foeward 5'-ATTACGCATTCTGTGGTAATGATGTGT-3'	114
	Reverse 5'-GATTCTTCATCAAAGCACACGCTG-3'	
G	Foeward 5'-GACATGACTGGCCATTGTTCACTCTG-3'	261
	Reverse 5'-TGCCAGCTGCGTTTATGGGAATGCTG-3'	
H	Foeward 5'-CACCCAGAGAACCTGGGACTG-3'	167
	Reverse 5'-TGGATCGTCTTCTTGATGCCGAAG-3'	
I	Foeward 5'-GCAC TGGATCAGGGCTTCC TTC-3'	140
	Reverse 5'-CCTGTGGGATTCTCCATTCGG-3'	

表3-4. Impact Highに分類された変異について実施したDNAシーケンス解析およびフラグメント解析の結果

Gene	Chromosome	DNA change	発症 (n = 10)		非発症キャリア (n = 8)		
			+/+	+/-	+/+	+/-	-/-
A	A1	delA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)
B	A2	delCT	4 (40)	2 (20)	0 (0)	7 (87.5)	1 (12.5)
C	A2	G > T	4 (40)	2 (20)	0 (0)	7 (87.5)	1 (12.5)
D	B3	insC	4 (40)	3 (30)	0 (0)	8 (100)	0 (0)
E	C1	ins GGAGG	4 (40)	4 (40)	2 (25)	4 (50)	2 (25)
F	D1	del TTATA	7 (70)	3 (30)	3 (37.5)	5 (62.5)	0 (0)
G	D4	insC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)
H	E2	insCGCA	6 (60)	4 (40)	1 (12.5)	7 (87.5)	0 (0)
I	F1	A > G	4 (40)	6 (60)	2 (25)	6 (75)	0 (0)

数字は個体数、 () は各群における割合 (%) を示す。

【考察】

本研究ではエクソーム解析により本家系におけるてんかんの原因となる変異塩基候補を抽出した。さらに、抽出した変異塩基候補について、サンガー法による DNA シーケンス解析とフラグメント解析によりエクソーム解析に用いた個体および家系内の他個体における変異の確認を行った。

エクソーム解析により抽出した変異塩基候補数は 130 であった。現在ヒトでは特発性てんかんに関連する 20 以上の遺伝子が報告されている(Cherepanova *et al.*, 2013; Ottman *et al.*, 2010)。獣医学領域でも、犬でてんかんに関連する 9 の遺伝子が報告されている(Ekenstedt *et al.*, 2012)。しかしながら、本研究にて抽出した 130 個の変異が存在する遺伝子の中にこれらの遺伝子はなかった。

家系解析より、本家系におけるてんかんは常染色体劣性遺伝形式で発症していると予測されている。しかしながら、Impact High に分類された変異塩基候補のうち全発症個体でホモ接合、非発症キャリアと予測される全個体でヘテロ接合の変異は存在しなかった。このことから、これら Impact High に分類された変異は本家系におけるてんかん発症の原因となる変異ではなく、原因となる他の変異が存在する可能性がある。

ヒトや犬において家系図から単一遺伝子による遺伝性てんかん発症が強く疑われた家系においても複数の遺伝子の関連が示唆されるなど原因遺伝子の証明は難航している(Patterson *et al.*, 2003)。特に犬においては、発作徴候を飼い主の報告から得ていることが多く、発作型の詳細な分類が困難である。この発作徴候のわずかな違いが遺伝的原因の違いを表している可能性があり、不用意に同集団としてしまうことが関連遺伝子同定を困難

にしている一因であると考えられている。また、ヒトの側頭葉てんかんモデルである EL マウスの系統では、1 つ以上の遺伝子座が発作に関連していることが明らかになっており (Ekenstedt *et al.*, 2012)、このマウスにおけるてんかんは多因子遺伝疾患であることが示されている。本家系のてんかん発症個体においては、発作徴候の観察により焦点性発作からの二次性全般化、および前庭刺激による全般発作が認められている。いずれの発作も海馬・扁桃核に起始する発作であることが示唆されているが (Kuwabara *et al.*, 2010)、これらの発作徴候がそれぞれ異なる原因遺伝子に起因している可能性もある。また、EL マウスは本家系のてんかん猫で認められた前庭刺激により誘発される発作に類似する誘発発作を示す (Suzuki, 1982)。このマウス系統において、1 つ以上の遺伝子座の関連が示されていることから、本家系におけるてんかんに複数の原因遺伝子に関連している可能性が考えられる。本家系におけるてんかんの原因遺伝子が複数である場合は、本研究で **Impact High** の変異として挙げた 9 つの変異のうち、とくに発症個体にてホモ接合の変異の割合が高い変異は本家系のてんかん発症に関連している可能性がある。

抽出した変異塩基候補の中で **Impact High** に分類された変異は 9 つであったが、このうち 2 つの変異ではエクソーム解析で検出された変異は存在せず、いずれも隣接する部位に全個体に共通のホモ接合の変異が存在した。この変異は本家系内の個体が共通して持っている変異であると推測される。しかしながら、てんかんの原因となる素因が家系内で固定されており、発症が遺伝子修飾や環境因子の影響に依存する可能性もある。実際に犬の家族性てんかんでは、遺伝子変異以外の要因がてんかんの発症に関与している可能性も示唆されている (Ekenstedt *et al.*, 2012)。このことから、これら 2 つの変異が本家系におけるて

んかんに関与している可能性も否定できない。

本研究では、エクソーム解析を用いて本家系のてんかん原因遺伝子の探索を行ったが、本解析法には技術的な制限もある。この一つとして原因遺伝子の全てあるいは一部がターゲット領域に存在しない可能性がある。この理由として原因遺伝子が既知の遺伝子ではない、あるいはターゲット領域のデザインが原因遺伝子をキャプチャーできないものであることなどが挙げられる。また、マッピングやアラインメントのエラーにより誤ったバリエーションが検出される可能性もある(Bamshad *et al.*, 2011)。Impact High に分類された変異のうち 2 つの変異では、サンガー法による DNA シーケンス解析およびフラグメント解析により該当する変異が存在しないことが示されており、本研究においても、これらのエラーが生じている可能性は否定できない。また、本研究では Ensembl Genome Browser 上に公開されている猫のゲノム配列を参照配列として解析を実施したが、猫のゲノムは未だに完全には解読されていないため、キャプチャー出来ていない遺伝子が存在する可能性は高くなると考えられる。さらに、エクソン以外の non-coding 領域に原因となる変異があることも考えられる。しかしながら、本研究にて変異塩基候補として決定した 130 の変異は、今後本家系におけるてんかん原因遺伝子を探索する上で貴重なデータとなると考えられる。

本研究にて抽出した変異のうち、Impact Moderate に分類された変異は全て非同義置換であったが、これらの変異もコードしているタンパク質の構造や機能に大きく影響を及ぼす可能性があり、本家系におけるてんかんの原因変異候補として探索する価値があるものとする。今後、これら Impact Moderate に分類された変異についてもさらに個体を増やして変異の存在を確認することで、本家系におけるてんかん原因遺伝子の同定につながる

可能性もある。また、**Impact High** に分類された変異についても家系内の他個体および家系と関係のない健康な猫で該当する変異の確認を行うことで、発症個体で高頻度に認められる変異や家系内の個体のみが共通して持つ変異を明らかにできる可能性がある。さらに、連鎖解析などを併用することにより、さらに変異塩基候補を絞り込むことも有効である。

【小括】

本章では、エクソーム解析を用いて、本家系におけるてんかん原因遺伝子の同定を試みた。さらに、エクソーム解析により検出された変異塩基候補から最も疑わしい 9 つの変異について、個体数を増やしサンガー法を用いた DNA シーケンス解析およびフラグメント解析を用いて該当する変異を確認した。

エクソーム解析により抽出された変異塩基候補数は各個体で平均 473,920、総数 850,801 であった。これらの変異から抽出を行った結果、変異塩基候補は 130 であった。この中で、Impact High に分類された変異の数は 9 であった。また、Impact Moderate に分類された変異の数は 121 であった。Impact High に分類された変異については、発症個体全 10 頭でホモ接合、比発症キャリアと予測される個体全 8 頭でヘテロ接合となっている変異は存在しなかった。以上より、これら 9 つの変異は本家系のてんかんが単一遺伝子によるものである場合、原因となる変異ではない可能性が高いと考えられた。

総 括

本研究では、近年発見された自然発生性の特発性てんかんを呈する猫の家系を対象として、その病態を解析することで、ヒトの特発性てんかんと相同な動物モデルとしての有用性を検討した。

第一章では CSF 中の興奮性および抑制性アミノ酸濃度ならびに内因性代謝産物濃度について検討した。その結果、本研究ではこれまで複数の研究で報告されてきたようなグルタミン酸濃度の上昇および GABA 濃度の低下は認められなかった。しかしながら、本家系でてんかんを発症している猫の脳において GGC に変化が生じている可能性が示唆された。さらに、ビタミン B6 など興奮性/抑制性アミノ酸以外の物質の代謝が変化している可能性も示された。

第二章では、CNSにおいて細胞外グルタミン酸濃度の調節に関与するグルタミン酸トランスポーター（GLAST、GLT-1、EAAC1）およびGSの海馬CA1、CA2およびCA3領域における発現を、ホモ群と野生型群で免疫組織化学的に比較検討した。さらに、神経細胞数、アストロサイトのマーカーとしてのGFAP発現についても併せて評価した。その結果、ホモ群の神経細胞数はCA3領域で有意に低値であり、GFAPのIRはCA1およびCA3領域で低い傾向にあった。また、ホモ群のGLASTのIRはCA1およびCA3領域で低値であった。さらにGSのIRは高く、とくに神経細胞およびアストロサイトが比較的温存されていると考えられるCA2領域で高値であった。これらの結果から、ホモ群では神経細胞やアストロサイトの減少に伴い、これらの細胞に発現しているグルタミン酸トランスポーターが減少していることが示唆された。また、発作時の興奮性に対する代償性反応として、特にCA2領域でGSを介したGABA合成が増加している可能性が示された。

第三章では、本家系におけるてんかん遺伝子の同定を目的としてエクソーム解析を実施し、130 の変異塩基候補を検出した。さらに、エクソーム解析により検出された変異塩基候補から最も疑わしい 9 つの変異について、個体数を増やしサンガー法を用いた DNA シーケンス解析およびフラグメント解析を用いて該当する変異を確認した。この結果、これら 9 つの変異にてんかんを発症している全個体でホモ接合、非発症キャリアと判定した全個体でヘテロ接合となっている変異は存在しなかった。以上より、これら 9 つの変異は本家系のてんかんが単一遺伝子によるものである場合、てんかんの原因ではない可能性が高いと考えられた。

本研究の結果から、自然発生性特発性てんかんの猫の脳において興奮性/抑制性アミノ酸代謝に変化が生じていることが病態生理学的・病理組織学的に示された。また、アミノ酸以外の物質の代謝が変化している可能性も示された。しかしながら、エクソーム解析において抽出した変異にこれらの物質の代謝に直接関与する遺伝子の変異は存在しなかった。このことから、第一章、第二章にててんかん発症猫において認められた変化は、てんかん発作の原因ではなく結果を反映している可能性がある。また、本家系の猫のてんかん遺伝子候補について一定の絞り込みを行うことができたが、エクソーム解析により抽出した変異塩基候補の中で変異の影響が最も大きいと考えられた 9 つの遺伝子については、本家系におけるてんかんの原因ではない可能性が高いことが示され、原因遺伝子の同定には至らなかった。本家系におけるてんかんは常染色体劣性の様式で遺伝していることが強く示唆されており、遺伝性てんかんモデルとして確立するためには原因遺伝子が同定されるべきである。今後、検出された他の原因変異候補についても探索を行うことで、原因遺伝子の

同定につながる可能性もある。また、現時点でネコのゲノム解読は完了していないが、ネコゲノムプロジェクトは進行しつつある。今後ゲノム情報の解明が進むことで、本家系におけるてんかん原因遺伝子の探索のさらなる進展にも繋がることが期待できる。本研究の成果は、今後この猫の家系を遺伝性てんかんモデルとして確立する上で有意義であり、てんかんの病態解明や診断法・治療法の開発に貢献しうると考える。

謝辞

本研究を行うにあたり貴重なご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学研究室 松木 直章教授に心から深謝申し上げます。また、実験遂行にあたり貴重なご助言を頂戴しました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学研究室 米澤 智洋准教授、玉原 智史助教、日本獣医生命科学大学獣医放射線学教室 長谷川 大輔講師、並びに東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室 内田 和幸准教授、チェンバーズ ジェームズ助教に深く感謝いたします。

また実験遂行にあたり多大なるご協力を頂きました日本獣医生命科学大学獣医放射線学教室 溝口 俊太氏、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室 坪井 誠也氏、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医内科学研究室 富安 博隆氏に心より感謝いたします。最後に、実験遂行にあたりご協力をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医臨床病理学研究室、日本獣医生命科学大学獣医放射線学教室、東京大学大学院農学生命科学研究科病理学研究室の教職員各位に深く感謝の意を表します。

引用文献

- Armano, S., Coco, S., Bacci, A., Pravettoni, E., Schenk, U., Verderio, C., Varoqui, H., Erickson, J.D., Matteoli, M., 2002. Localization and functional relevance of system a neutral amino acid transporters in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 10467–73.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4155–60.
- Arriza, J.L., Fairman, W.A., Amara, S.G., Kavanaugh, P., Wadiche, I., Murdoch, H., 1994. Functional Comparisons of Three Glutamate Cloned from Human Motor Cortex Transporter. *J. Neurosci.* 14, 5559–5569.
- Bak, L.K., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* 98, 641–53.
- Bamshad, M.J., Ng, S.B., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Emond, M.J., Nickerson, D. a, Shendure, J., 2011. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat. Rev. Genet.* 12, 745–55.
- Baulac, S., Baulac, M., 2010. Advances on the genetics of Mendelian idiopathic epilepsies. *Clin. Lab. Med.* 30, 911–29.
- Ben-Ari, 1985. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14, 375–403.
- Berendt, M., Gram, L., 1999. Epilepsy and seizure classification in 63 dogs: a reappraisal of veterinary epilepsy terminology. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 14–20.

- Berendt, M., Gredal, H., Alving, J., 2004. Characteristics and phenomenology of epileptic partial seizures in dogs: similarities with human seizure semiology. *Epilepsy Res.* 61, 167–73.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T. a, Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D., Plouin, P., Scheffer, I.E., 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51, 676–85.
- Cavus, I., Kasoff, W.S., Cassaday, M.P., Jacob, R., Gueorguieva, R., Sherwin, R.S., Krystal, J.H., Spencer, D.D., Abi-Saab, W.M., 2005. Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann. Neurol.* 57, 226–35.
- Chapman, A.G., Elwes, R.D., Millan, M.H., Polkey, C.E., Meldrum, B.S., 1996. Role of glutamate and aspartate in epileptogenesis: contribution of microdialysis studies in animal and man. *Epilepsy Res. Suppl.* 12, 239–46.
- Cherepanova, N.S., Leslie, E., Ferguson, P.J., Bamshad, M.J., Bassuk, A.G., 2013. Presence of epilepsy-associated variants in large exome databases. *J. Neurogenet.* 27, 1–4.
- Clayton, P.T., 2006. B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29, 317–26.
- Coorg, R., Weisenberg, J.L.Z., Wong, M., 2013. Clinical neurogenetics: recent advances in the genetics of epilepsy. *Neurol. Clin.* 31, 891–913.
- Corsellis, J.A., Bruton, C.J., 1983. Neuropathology of status epilepticus in humans. *Adv. Neurol.* 34, 129–39.

- Cortez, M.A., Snead, O.C., 2006. Pharmacologic models of generalized absence seizures in rodents., in: Pitkänen, A., Schwartzkroin, P.A., L, M.S. (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Ac Press, San Diego,CA, p. 114.
- Dibbens, L.M., de Vries, B., Donatello, S., Heron, S.E., Hodgson, B.L., Chintawar, S., Crompton, D.E., Hughes, J.N., Bellows, S.T., Klein, K.M., Callenbach, P.M.C., Corbett, M. a, Gardner, A.E., Kivity, S., Iona, X., Regan, B.M., Weller, C.M., Crimmins, D., O'Brien, T.J., Guerrero-López, R., Mulley, J.C., Dubeau, F., Licchetta, L., Bisulli, F., Cossette, P., Thomas, P.Q., Gecz, J., Serratosa, J., Brouwer, O.F., Andermann, F., Andermann, E., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Pandolfo, M., Berkovic, S.F., Scheffer, I.E., 2013. Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nat. Genet.* 45, 546–51.
- During, M.J., Spencer, D.D., 1993. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet* 341, 1607–1610.
- Eid, T., Thomas, M.J., Spencer, D.D., Lai, J.C.K., Malthankar, G. V, Kim, J.H., Danbolt, N.C., Ottersen, O.P., 2004. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet* 363, 28–37.
- Ekenstedt, K.J., Patterson, E.E., Mickelson, J.R., 2012. Canine epilepsy genetics. *Mamm. Genome* 23, 28–39.
- Engel, J., 2001. ILAE Commission Report A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 42, 796–803.
- Engel, J., 2006. Report of the ILAE classification core group. *Epilepsia* 47, 1558–68.

- Fairman, W., Vandenberg, R., Arriza, J., Kavanaugh, M., Amara, S., 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375, 599–603.
- Fuller, J.L., Sjursen, F.H., 1967. Audiogenic seizures in eleven mouse strains. *J. Hered.* 58, 135–40.
- Gorter, J. a, Van Vliet, E. a, Proper, E. a, De Graan, P.N.E., Ghijsen, W.E.J.M., Lopes Da Silva, F.H., Aronica, E., 2002. Glutamate transporters alterations in the reorganizing dentate gyrus are associated with progressive seizure activity in chronic epileptic rats. *J. Comp. Neurol.* 442, 365–77.
- Green, M.C., Sidman, R.L., 1962. Tottering—a neuromuscular mutation in the mouse. *J. Hered.* 53, 233–237.
- Griffith, N.C., Cunningham, A.M., Goldsmith, T., Bandler, R., 1991. Interictal Behavioral Alterations and Cerebrospinal Fluid Amino Acid Changes in a Chronic Seizure Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 32, 767–777.
- Héja, L., Nyitrai, G., Kékesi, O., Dobolyi, A., Szabó, P., Fiáth, R., Ulbert, I., Pál-Szenthe, B., Palkovits, M., Kardos, J., 2012. Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. *BMC Biol.* 10, 26.
- Imaizumi, K., Ito, S., Kutsukake, G., Takizawa, T., Fujiwara, K., Tsuchikawa, K., 1959. Epilepsy like anomaly of mice. *Exp. Animal (Jpn.)* 8, 6—10.
- Ishida, S., Picard, F., Rudolf, G., Noé, E., Achaz, G., Thomas, P., Genton, P., Mundwiler, E., Wolff, M., Marescaux, C., Miles, R., Baulac, M., Hirsch, E., Leguern, E., Baulac, S., 2013. Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nat. Genet.* 45, 552–5.
- Jobe, P.C., Browning, R.A., 2006a. Mammalian models of genetic epilepsy characterized by sensory-evoked seizures and generalized seizure

- susceptibility., in: Pitkänen, A., Schwartzkroin, P.A., Moshé, S.L. (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Ac Press, San Diego, CA, pp. 261–265.
- Jobe, P.C., Browning, R.A., 2006b. Mammalian models of genetic epilepsy characterized by sensory-evoked seizures and generalized seizure susceptibility., in: Pitkänen, A., Schwartzkroin, P.A., Moshé, S.L. (Eds.), *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Ac Press, San Diego, CA, pp. 265–268.
- Jokinen, T.S., Metsähonkala, L., Bergamasco, L., Viitmaa, R., Syrjä, P., Lohi, H., Snellman, M., Jeserevics, J., Cizinauskas, S., 2007. Benign familial juvenile epilepsy in Lagotto Romagnolo dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 464–71.
- Kälviäinen, R., Halonen, T., Pitkänen, a, Riekkinen, P.J., 1993. Amino acid levels in the cerebrospinal fluid of newly diagnosed epileptic patients: effect of vigabatrin and carbamazepine monotherapies. *J. Neurochem.* 60, 1244–50.
- Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360, 467–471.
- Kanamori, K., Ross, B.D., 2011. Chronic electrographic seizure reduces glutamine and elevates glutamate in the extracellular fluid of rat brain. *Brain Res.* 1371, 180–91.
- Kawakami, H., Tanaka, K., Nakayama, T., Inoudm, K., S, N., 1994. Cloning and expression of a human glutamate transporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 171–176.
- Kuwabara, T., Hasegawa, D., Ogawa, F., Kobayashi, M., Fujita, M., Suzuki, H., Matsuki, N., Orima, H., 2010. A familial spontaneous epileptic feline strain: a novel model of idiopathic/genetic epilepsy. *Epilepsy Res.* 92, 85–8.

- LeCouteur, R.A., Child, G., 1989. Clinical management of epilepsy of dogs and cats. *Probl. Vet. Med.* 1, 578–95.
- Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754–60.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–9.
- Licht, B.G., Licht, M.H., Harper, K.M., Lin, S., Curtin, J.J., Hyson, L.L., Willard, K., 2002. Clinical presentations of naturally occurring canine seizures: similarities to human seizures. *Epilepsy Behav.* 3, 460–470.
- Lohi, H., Young, E.J., Fitzmaurice, S.N., Rusbridge, C., Chan, E.M., Vervoort, M., Turnbull, J., Zhao, X.-C., Ianzano, L., Paterson, A.D., Sutter, N.B., Ostrander, E.A., André, C., Shelton, G.D., Ackerley, C.A., Scherer, S.W., Minassian, B.A., 2005. Expanded repeat in canine epilepsy. *Science* 307, 81.
- Löscher, W., 1997. Animal models of intractable epilepsy. *Peogress in Neuroniology* 53, 239–258.
- Löscher, W., Schwartz-Porsche, D., 1986. Low levels of gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid of dogs with epilepsy. *J. Neurochem.* 46, 1322–5.
- Magistris, M.R., Mouradian, M.S., Gloor, P., 1988. Generalized convulsions induced by pentylenetetrazol in the cat: participation of forebrain, brainstem, and spinal cord. *Epilepsia* 29, 379–88.
- Mally, J., Baranyi, M., Vizi, E.S., 1996. Change in the concentrations of amino acids in CSF and serum of patients with essential tremor. *J. Neural Transm.* 103, 555–560.

- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2001. Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 58, 365–70.
- Marescaux, C., Vergnes, M., 1995. Genetic Absence Epilepsy in Rats from Strasbourg (GAERS). *Ital. J. Neurol. Sci.* 16, 113–8.
- Mariani, C.L., 2013. Terminology and classification of seizures and epilepsy in veterinary patients. *Top. Companion Anim. Med.* 28, 34–41.
- Mathern, G.W., Mendoza, D., Lozada, a., Pretorius, J.K., Dehnes, Y., Danbolt, N.C., Nelson, N., Leite, J.P., Chimelli, L., Born, D.E., Sakamoto, a. C., Assirati, J. a., Fried, I., Peacock, W.J., Ojemann, G. a., Adelson, P.D., 1999. Hippocampal GABA and glutamate transporter immunoreactivity in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 52, 453–453.
- Mathews, G.C., Diamond, J.S., 2003. Neuronal glutamate uptake Contributes to GABA synthesis and inhibitory synaptic strength. *J. Neurosci.* 23, 2040–8.
- Medina-Ceja, L., Sandoval-García, F., Morales-Villagrán, A., López-Pérez, S.J., 2012. Rapid compensatory changes in the expression of EAAT-3 and GAT-1 transporters during seizures in cells of the CA1 and dentate gyrus. *J. Biomed. Sci.* 19, 78.
- Meldrum, B.S., 1994. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 44, S14–23.
- Meldrum, B.S., Akbar, M.T., Chapman, a G., 1999. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res.* 36, 189–204.
- Miller, P., Levey, I., Rothstein, J.D., Tzingounis, A. V, Conn, J., 1997. Alterations in Glutamate Transporter Protein Levels in Kindling-Induced Epilepsy. *J. Neurochem.* 68, 1564–1570.

- Milton, I.D., Banner, S.J., Ince, P.G., Piggott, N.H., Fray, a E., Thatcher, N., Horne, C.H., Shaw, P.J., 1997. Expression of the glial glutamate transporter EAAT2 in the human CNS: an immunohistochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 52, 17–31.
- Morita, T., Shimada, a, Takeuchi, T., Hikasa, Y., Sawada, M., Ohiwa, S., Takahashi, M., Kubo, N., Shibahara, T., Miyata, H., Ohama, E., 2002. Cliniconeuropathologic findings of familial frontal lobe epilepsy in Shetland sheepdogs. *Can. J. Vet. Res.* 66, 35–41.
- Morita, T., Takahashi, M., Takeuchi, T., Hikasa, Y., Ikeda, S., Sawada, M., Sato, K., Shibahara, T., Shimada, A., 2005. Changes in extracellular neurotransmitters in the cerebrum of familial idiopathic epileptic shetland sheepdogs using an intracerebral microdialysis technique and immunohistochemical study for glutamate metabolism. *J. Vet. Med. Sci.* 67, 1119–26.
- Ohtahara, S., Yamatogi, Y., Ohtsuka, Y., 2011. Vitamin B(6) treatment of intractable seizures. *Brain Dev.* 33, 783–9.
- Ottman, R., Hirose, S., Jain, S., Lerche, H., Lopes-Cendes, I., Noebels, J.L., Serratos, J., Zara, F., Scheffer, I.E., 2010. Genetic testing in the epilepsies-report of the ILAE Genetics Commission. *Epilepsia* 51, 655–70.
- Patterson, E.E., Mickelson, J.R., Da, Y., Roberts, M.C., McVey, A.S., O'Brien, D.P., Johnson, G.S., Armstrong, P.J., 2003. Clinical characteristics and inheritance of idiopathic epilepsy in Vizslas. *J. Vet. Intern. Med.* 17, 319–25.
- Patterson, E.N.E., 2013. Epileptogenesis and companion animals. *Top. Companion Anim. Med.* 28, 42–5.

- Petroff, O. a C., Errante, L.D., Rothman, D.L., Kim, J.H., Spencer, D.D., 2002. Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. *Epilepsia* 43, 703–10.
- Petroff, O.A.C., Rothman, D.L., Behar, K.L., Lamoureux, D., Mattson, R.H., 1996. The Effect of Gabapentin on Brain Gamma-aminobutyric Acid in Patients with Epilepsy. *Ann. Neurol.* 39, 95–99.
- Pitkänen, A., 2010. Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. *Epilepsia* 51 Suppl 3, 2–17.
- Platt, S.R., 2007. The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. *Vet. J.* 173, 278–86.
- Podell, M., 2013. Seizures, in: Platt, S., Olby, N. (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology*. Gloucester: John Wiley & Sons, pp. 117–135.
- Podell, M., Fenner, W.R., Powers, J.D., 1995. Seizure classification in dogs from a nonreferral-based population. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 206, 1721–8.
- Podell, M., Hadjiconstantinou, M., 1997. Cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid and glutamate values in dogs with epilepsy. *Am. J. Vet. Res.* 58, 451–6.
- Pontius, J.U., Mullikin, J.C., Smith, D.R., Lindblad-Toh, K., Gnerre, S., Clamp, M., Chang, J., Stephens, R., Neelam, B., Volfovsky, N., Schaffer, A. a, Agarwala, R., Narfström, K., Murphy, W.J., Giger, U., Roca, A.L., Antunes, A., Menotti-Raymond, M., Yuhki, N., Pecon-Slattery, J., Johnson, W.E., Bourque, G., Tesler, G., O'Brien, S.J., 2007. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res.* 17, 1675–89.
- Proper, E. a, Hoogland, G., Kappen, S.M., Jansen, G.H., Rensen, M.G. a, Schrama, L.H., van Veelen, C.W.M., van Rijen, P.C., van Nieuwenhuizen, O., Gispen, W.H., de Graan, P.N.E., 2002. Distribution of glutamate transporters in the

- hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain* 125, 32–43.
- Qu, Y., Arckens, L., Vandesande, F., Vandenbussche, E., 2000. Sampling extracellular aspartate, glutamate and gamma-aminobutyric acid in striate cortex of awake cat by in vivo microdialysis: surgical and methodological aspects. *Brain Res.* 866, 116–27.
- Richerson, G.B., Wu, Y., 2003. Dynamic equilibrium of neurotransmitter transporters: not just for reuptake anymore. *J. Neurophysiol.* 90, 1363–74.
- Ross, J.R., Porter, B.E., Buckley, P.T., Eberwine, J.H., Robinson, M.B., 2011. mRNA for the EAAC1 subtype of glutamate transporter is present in neuronal dendrites in vitro and dramatically increases in vivo after a seizure. *Neurochem. Int.* 58, 366–75.
- Sato, K., 2000. Inherited Defects of Sodium-dependent Glutamate Transport Mediated by Glutamate/Aspartate Transporter in Canine Red Cells Due to a Decreased Level of Transporter Protein Expression. *J. Biol. Chem.* 275, 6620–6627.
- Sepkuty, J.P., Cohen, A.S., Eccles, C., Rafiq, A., Behar, K., Ganel, R., Coulter, D.A., Rothstein, J.D., 2002. A Neuronal Glutamate Transporter Contributes to Neurotransmitter GABA Synthesis and Epilepsy. *J. Neurosci.* 22, 6372–6379.
- Sherwin, a L., 1999. Neuroactive amino acids in focally epileptic human brain: a review. *Neurochem. Res.* 24, 1387–95.
- Shouse, M.N., Scordato, J.C., Farber, P.R., 2004. Ontogeny of feline temporal lobe epilepsy in amygdala-kindled kittens: an update. *Brain Res.* 1027, 126–43.

- Sugiura, Y., Taguchi, R., Setou, M., 2011. Visualization of spatiotemporal energy dynamics of hippocampal neurons by mass spectrometry during a kainate-induced seizure. *PLoS One* 6, e17952.
- Suzuki, J., 1982. Jiro suzuki. *Exp. Neurol.* 452, 440–452.
- Suzuki, J., Nakamoto, Y., 1977. Seizure patterns and electroencephalograms of El mouse. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 43, 299–311.
- Szyndler, J., Maciejak, P., Turzyńska, D., Sobolewska, A., Lehner, M., Taracha, E., Walkowiak, J., Skórzewska, A., Wisłowska-Stanek, A., Hamed, A., Bidziński, A., Płaźnik, A., 2008. Changes in the concentration of amino acids in the hippocampus of pentylenetetrazole-kindled rats. *Neurosci. Lett.* 439, 245–9.
- Tanaka, T., Tanaka, S., Fujita, T., Takano, K., Fukuda, H., Sako, K., Yonemasu, Y., 1992. Experimental complex partial seizures induced by a microinjection of kainic acid into limbic structures. *Prog. Neurobiol.* 38, 317–34.
- Testa, G., Gloor, P., 1974. Intracarotid Pentylenetetrazol Injections in the Cat. *Epilepsia* 15, 91–107.
- Tzschentke, T.M., 2002. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications -- an introduction. *Amino Acids* 23, 147–52.
- Ueda, Y., Doi, T., Tokumaru, J., Yokoyama, H., Nakajima, a, Mitsuyama, Y., Ohya-Nishiguchi, H., Kamada, H., Willmore, L.J., 2001. Collapse of extracellular glutamate regulation during epileptogenesis: down-regulation and functional failure of glutamate transporter function in rats with chronic seizures induced by kainic acid. *J. Neurochem.* 76, 892–900.

- Wei, C., Li, Y., Yao, H., Liu, H., Zhang, X., Guo, R., 2012. A metabonomics study of epilepsy in patients using gas chromatography coupled with mass spectrometry. *Mol. Biosyst.* 8, 2197–204.
- Wu, Y., Wang, W., Díez-Sampedro, A., Richerson, G.B., 2007. Nonvesicular inhibitory neurotransmission via reversal of the GABA transporter GAT-1. *Neuron* 56, 851–65.