

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小川 ふきえ

てんかんとは、種々の成因によってもたらされる慢性の脳疾患であって、大脳ニューロンの過剰な発射に由来する反復性の発作を特徴とし、それにさまざまな臨床症状及び検査所見が伴うものと定義されている。ヒトのてんかん有病率は全人口の1%におよび、発作に伴う事故はときに社会問題にもなることから、てんかんの病態解明とその解決が急務である。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利用可能性を検討したものであり、以下の3章から構成されている。

第1章では脳脊髄液（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について評価した。本研究に供試したてんかん猫の家系は、てんかん発症という表現型が常染色体劣性遺伝様式で遺伝することがほぼ確実となっている。家系内で、てんかんを発症しており遺伝的に劣性ホモ接合体であると判断された猫（ホモ群）、てんかんを発症しておらず遺伝的にヘテロ接合体であると判断された猫（ヘテロ群）、本家系と血縁関係のない臨床的に健康な猫（野生型群）について、発作間歇期/平常安静時のCSFを採取した。さらに、猫を入れたケージごと揺動し、その直後（発作誘発/前庭刺激直後）のCSFも採取した。得られたCSFについて、興奮性アミノ酸および抑制性アミノ酸を定量した。その結果、発作間歇期のグルタミン酸濃度は野生型群と比較してヘテロ群で低値であったが、ホモ群と野生型群間に差はなかった。GABA濃度はホモ群でのみ著しく高値の個体が認められた。また、前庭刺激後のグルタミン酸濃度は全ての群で発作間歇期に比較して上昇したが、ホモ群では有意ではなかった。また、同じCSFを用いてメタボローム解析を行ったところ、ホモ群のグルタミン濃度は野生型群と比較して低値であった。これらの結果から、本家系のてんかん発症猫では、CSF中のグルタミン濃度の低下とGABA濃度の上昇が起きていることが示され、グルタミン酸-グルタミンサイクル（GGC）に変化が生じていることが示唆された。

第2章では、GGCに關与するグルタミン酸トランスポーター（GLAST、GLT-1、EAAC1）およびグルタミン合成酵素（GS）について、ホモ群の海馬CA1、CA2およびCA3領域における発現を、野生型群と免疫組織化学的に比較検討した。さらに、神経細胞数およびアストロサイトのマーカーであるGFAP発現についても併せて評価した。その結果、ホモ群のGLASTの免疫反応性（IR）は、野生型群と比較してCA1およびCA3領域で低値であった。ホモ群のGLT-1およびEAAC1のIRは海馬の全領域で低い傾向にあった。一方、ホモ群のGSのIRは全ての海馬領域で高い傾向を示した。また、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。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することが、GGCの変化に関与している可能性が示唆された。

第3章では、本家系におけるてんかん原因遺伝子を探索した。ホモ群およびヘテロ群についてエクソーム解析を実施し、変異塩基候補を検出した。これらの変異から、アノテーションツールを用いて、変異の影響（Impact）が大きいと予想される **Impact High** および **Moderate** の変異を抽出した。さらに常染色体上の変異、ホモ群でホモ接合、ヘテロ群でヘテロ接合の変異を抽出した。抽出した変異のうち、**Impact High** の変異について、家系内で個体数を増やして該当する変異を確認した。結果として、抽出された変異塩基候補は130であった。このうち、**Impact High** の変異は9、**Impact Moderate** の変異は121であった。**Impact High** の変異については、変異の確認の結果、ホモ群全頭でホモ接合、ヘテロ群全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の原因ではない可能性が高いと考えられた。

本論文の結果から、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、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。これらの結果は、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ると考えられる。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。