

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19580368  
 研究課題名 (和文) 家族性てんかんシェルティー犬におけるグルタミン酸の代謝に関する分子病理学的研究  
 研究課題名 (英文) Molecular pathological study for glutamate metabolism in the familial epileptic Shetland sheep dog  
 研究代表者  
 森田剛仁 (MORITA TAKEHITO)  
 鳥取大学・農学部・准教授  
 研究者番号：70273901

研究成果の概要：てんかんシェルティー家系犬のてんかん発生メカニズムの解明を目的として、大脳皮質のアストロサイトの細胞質内における GLT-1 蛋白合成過程について検討した。その結果、GLT-1 mRNA の合成、小胞体における GLT-1 蛋白の合成までは正常であることが確認され、小胞体以降の GLT-1 蛋白の合成過程および細胞膜への移送に異常があると考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：獣医病理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：てんかん、グルタミン酸、グルタミン酸トランスポーター、免疫電子顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

獣医臨床現場において犬などの伴侶動物のてんかん発作の発生率が高いことから、てんかん発作の診断、治療に対する社会（飼い主）並びに獣医師の関心は高い。特に特発性てんかんは、その原因が未だ不明であることから画期的な治療方法が無いのが現状である（織間博光ら、獣医神経病、2001）。申請者は、特発性てんかんシェルティー犬の家

系（6 世代：雄 6 匹、雌 8 匹）を維持している。これまでの検索により、(1) 発作の初期の焦点が前頭葉内側皮質であること、(2) 脳脊髄液中に、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸 (Glu)、アスパラギン酸 (Asp) が高値の傾向があること、などが示された。さらに、(3) マイクロダイアリス法により、異常脳波（鋭波および棘波）出現時に Glu および Asp が上昇すること、(4) てんかん発作

重責死亡例では、大脳皮質のシナプスにおける Glu の取り込みの異常を示唆する所見、すなわち免疫組織学的に神経細胞周囲（シナプス）に Glu 陽性像（集積像）およびアストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーター（GLT-1）陽性像の低下が認められること、(5) てんかん発症前の家系犬（脳波検査では鋭波を確認）の大脳皮質（脳溝深部）および視床のアストロサイトにおけるグルタミン酸トランスポーター（GLT-1）陽性像の低下が認められること、すなわち、本家系犬のてんかんの一次的原因としてアストロサイトの GLT-1 の形成（機能）に異常があり、Glu がシナプスに集積し易い状態にある可能性が示された。本研究の意義は次の2点に要約される：これまで 1) 犬の遺伝性特発性てんかんにおいて Glu 代謝系（特に GLT-1）に関する研究報告は無い、2) ヒトを含む哺乳類において「前頭葉てんかん」において Glu 代謝系に関する研究報告は乏しい。

本研究はGLT-1 蛋白形成過程にどのような異常が存在するのか分子病理学的に詳細に検討することにより（発作前の症例（異常脳波検出済み））の脳材料を用いることにより、神経細胞過剰興奮の一次的原因を解明することが可能）、①野外で発生例の多い犬の特発性てんかんの治療に貢献する可能性がある、②本家系犬の臨床・脳波所見はヒトの特発性てんかんの一つである autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE) のそれに類似していることことから (Morita T., et al., *Can. J. Vet. Res.*, 2002)、そのモデル動物としてADNFLEの発作発生機序に有益な情報を提供する可能性がある。

## 2. 研究の目的

①本家系犬の大脳のアストロサイトにおけ

る GLT-1 (Glu の取り込み・輸送を担う蛋白質) に注目し、大脳皮質（特に脳溝深部）および視床外側核のアストロサイトにおける GLT-1 の形成のどの過程に異常があるかに関して、発作前の症例（異常脳波検出済み）の脳材料を用い分子病理学的に解析する (*In situ hybridization*)。

②これまでの組織学的検索結果より、大脳皮質（脳溝深部）および視床のアストロサイトの細胞膜上の GLT-1 の発現（機能）低下があることが示唆された。そこで、大脳皮質（脳溝深部）および視床のアストロサイト由来の培養アストロサイトの Glu の取り込み能について解析する。

## 3. 研究の方法

① GLT-1 に関する分子病理学的検索：アストロサイトにおける GLT-1 mRNA の発現に関する解析

1) イヌ GLT-1 特異プライマー対を用い PCR 法により増幅する。DIG GLT-1 標識 DNA プローブを作製した後、ISH 法を実施し、GLT-1 mRNA の発現に関して正常犬のそれと比較・検討する。

2) (1) と同時に、以前作製したイヌ GLT-1 ウサギポリクローナル抗体を使用した免疫組織学的検索を実施し（連続切片使用）、GLT-1 蛋白並びに GLT-1 mRNA の発現の状態を大脳皮質（脳溝深部）および視床のアストロサイトに注目し、解析する（未発作症例 5 例の材料準備済み）。

② GLT-1 に関する免疫電子顕微鏡的検索：

アストロサイトにおける GLT-1 の細胞内局在  
1) イヌ GLT-1 ウサギポリクローナル抗体を使用した樹脂包埋超薄切片法による免疫電子顕微鏡的検索 (Post-embedding method) を大脳皮質（脳溝深部）および視床のアストロサイトに注目し実施する。この方法により

アストロサイト細胞内小器官レベルの厳格な GLT-1 の局在の解析が可能である。

2) (1) の方法により、大脳皮質（脳溝深部）および視床以外の領域のアストロサイトについても同様の検索を実施し、本家系犬のアストロサイト内 GLT-1 蛋白の形成過程の異常が、脳全体に生じているか否か確認・検討する。

③培養アストロサイトの Glu の取り込み能について解析

1) 本家系犬および正常犬の大脳皮質（脳溝深部）および視床のアストロサイトを定法により培養する。

2) Brown らの方法 (Brown, DR., et al., *Glia*, 1999) に準じ、培養細胞に対する Glu の負荷試験を実施し、Glu の取り込み機能を解析する。

3) 培養細胞における GLT-1 蛋白および mRNA の発現状態を解析する。解析は生体の材料を使用した検索方法に準ずる。

#### 4. 研究成果

1) 免疫組織化学的検索：家系犬の大脳皮質脳溝深部におけるアストロサイトの細胞質および突起の GLT-1 陽性像の減弱を確認した。画像解析の結果、GLT-1 陽性像の減弱に関して、家系犬と対照犬との間に有意差が認められた。すなわち、家系犬の大脳アストロサイトの GLT-1 の低下が示唆された。このことはシナプス間隙における Glu (興奮性神経伝達物質) のアストロサイトによる取り込みが低下していることを意味している。

2) *In situ* hybridization：次に、連続切片を用いた検索により、GLT-1 陽性像低下領域のアストロサイトにおける GLT-1 mRNA 陽性シ

グナルを観察したところ、アストロサイトの細胞質において明らかな陽性シグナルが観察された。この陽性シグナルについて対照犬と比較したところ、対照犬と家系犬に差は認められなかった。このことは、家系犬のアストロサイトの GLT-1 mRNA 合成 (転写) については異常がないことを意味している。

3) 免疫電子顕微鏡学的検索：次に、GLT-1 蛋白の局在について対照犬および家系犬の大脳アストロサイトについて免疫電子顕微鏡的に検討した。その結果、対照犬の大脳皮質脳溝深部のアストロサイトの小胞体膜上および細胞膜上に GLT-1 陽性像が確認されたのに対し、家系犬の同じ領域のアストロサイトにおいては、小胞体膜上に陽性像は確認されたものの、細胞膜上には陽性像は確認されなかった。

1) および 2) の所見から、本家系犬の大脳のアストロサイトの細胞質における GLT-1 mRNA の合成、小胞体における GLT-1 蛋白の合成までは正常であることが確認され、小胞体以降の GLT-1 蛋白の合成過程および細胞膜への移送に異常があると考えられた。今後は、小胞体以降の GLT-1 蛋白の合成過程および細胞膜への移送過程に関する詳細な検討が必要である。

4) 培養アストロサイトにおける Glu の取り込みについて、家系犬および対照犬との間に明確な差をみいだすことはできなかった。今後は培養条件および Glu の濃度について再検討し、詳細に検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 剛仁 (MORITA TAKEHITO)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：70273901