

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580373

研究課題名（和文） 家族性てんかん犬におけるてんかん発生機序に関する分子病理学的研究

研究課題名（英文） Molecular pathological study on the mechanism of epilepsy in familial epileptic 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（和文）：本てんかん家系犬のこれまでの研究により、大脳皮質脳溝深部のアストロサイトの細胞質内における GLT-1 蛋白の減少が異常脳波の発生に関与している可能性が示唆された。本研究では GLT-1 蛋白の合成過程においてどの過程に異常があるかを検討した。免疫組織学的に、大脳皮質脳溝深部のアストロサイトの細胞質内における GLT-1 蛋白の減少が認められ、*In situ hybridization* では、GLT-1 mRNA の発現について本家系犬と対照例と差が認められなかった。免疫電子顕微鏡的検索では、アストロサイトの細胞質の小胞体における GLT-1 蛋白合成は正常に行われているが、その膜には認められなかった。今後、小胞体以降の GLT-1 蛋白の合成過程（ゴルジ装置における糖付加など）および細胞膜への移送に関する検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：Prior study in this familial epileptic Shetland sheepdog has suggested that a decrease of GLT-1 expression in astrocytes in the cortex under the sulcus may be responsible for the occurrence of abnormal electroencephalographic waves. In this study, we investigated where the process of GLT-1 synthesis would be affected in astrocytes. Immunohistochemically, a decrease of GLT-1 immunolabellings was found in the cerebral cortex under the sulcus. *In situ hybridization* demonstrated no significant changes of GLT-1 mRNA labellings in the cortex under the sulcus of all familial dogs. In immunoelectron microscopy, GLT-1 immunolabellings were detected in endoplasmic reticulum (ER), while not the plasma membrane of astrocytes in the familial cortex under the sulcus. These results suggested at least two possibilities that GLT-1 synthesis process may stop in ER following an incomplete translation, or that the post-translational process of GLT-1 synthesis may be affected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：イヌ、遺伝、グルタミン酸、グルタミン酸トランスポーター、てんかん、脳

### 1. 研究開始当初の背景

本教室では、特発性前頭葉てんかん家系犬を維持しており、大脳皮質における免疫組織化学的検索から、本家系犬の大脳皮質におけるグルタミン酸トランスポーター(GLT-1)の陽性像の低下が認められ、グルタミン酸(Glu)が細胞間隙に集積しやすい状態にある可能性が示唆された。よって、本家系犬の大脳の神経細胞過剰興奮に、GLT-1 蛋白の合成低下とそれに伴う Glu のシナプス間隙における集積が関連している可能性が示唆された。また、同部位には神経細胞壊死および神経細胞周囲に Glu 陽性像が観察され、神経細胞壊死の発生機序に Glu による興奮毒性の関与が推察された。

### 2. 研究の目的

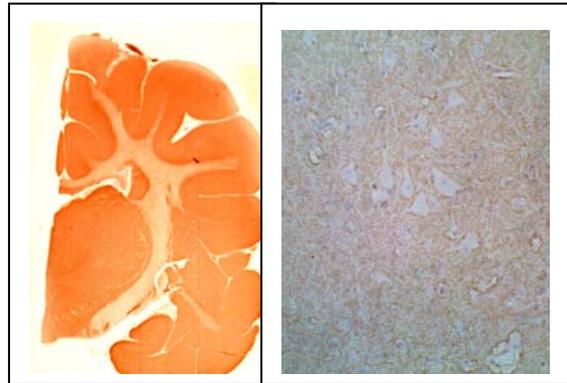
本家系犬（異常脳波を示すが、てんかん発作未発症）の大脳皮質脳溝深部のアストロサイトにおける GLT-1 蛋白の合成過程のどの過程において異常があるのかという点に注目し検索を行った。また、発作重責例の神経細胞壊死とミクログリアのサイトカイン産生との関連について検討した。

### 3. 研究の方法

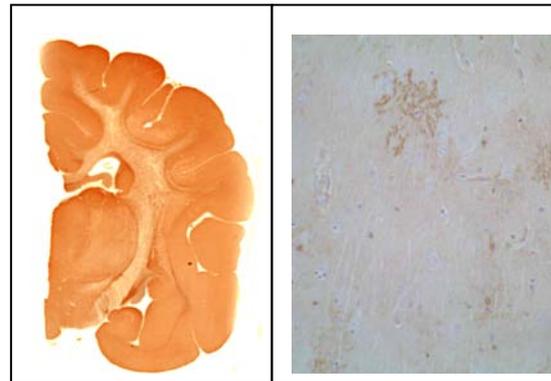
①免疫組織化学的検索：家系犬 3 例（異常脳波を示すが、てんかん発作未発症）および対照犬 3 例の大脳ホルマリン固定材料および抗 GLT-1 抗体、TNF- $\alpha$  抗体および IL-6 抗体を用いた。② *In situ* hybridization：上記ホルマリン固定材料および GLT-1 mRNA に相補的なプローブ (DIG oligonucleotide 3'-end labelling kit で標識) を用いた。③免疫電子顕微鏡学的検索：上記ホルマリン固定材料および抗 GLT-1 抗体 (immunogold で標識) を用いた。

### 4. 研究成果

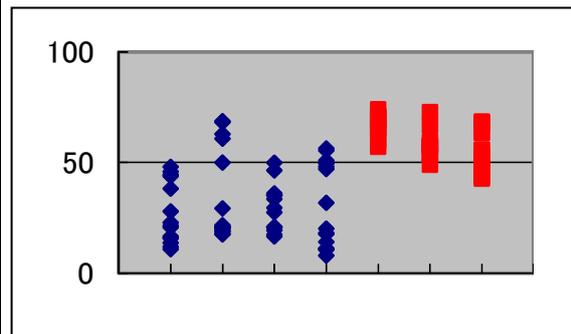
①免疫組織化学的検索：対照犬の大脳では GLT-1 陽性像が皮質および中心灰白質に慢性に顆粒状に陽性像が確認された (図 1)。一方、家系犬の大脳では大脳皮質脳溝深部および視床内側核における GLT-1 陽性像の減弱を確認した (図 2)。家系犬の GLT-1 陽性像は対照犬のそれに比し、有意に減少していた (図 3)。



(図 1. 対照犬、海馬のレベル、大脳)  
(右図は大脳皮質の拡大図)



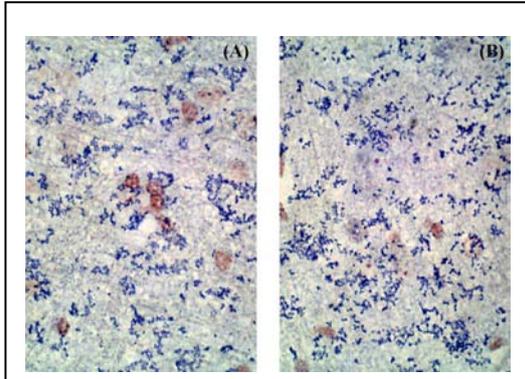
(図 2. 家系犬、海馬のレベル、大脳)  
(右図は大脳皮質の拡大図)



(図 3. GLT-1 陽性領域の面積の統計学的検索。左の青印は家系犬 4 例、右の赤色は対照犬 3 例の各々同じ領域の大脳皮質の GLT-1 陽性像。)

(家系犬の陽性像の低下を示している、有意差あり、 $P < 0.05$ )

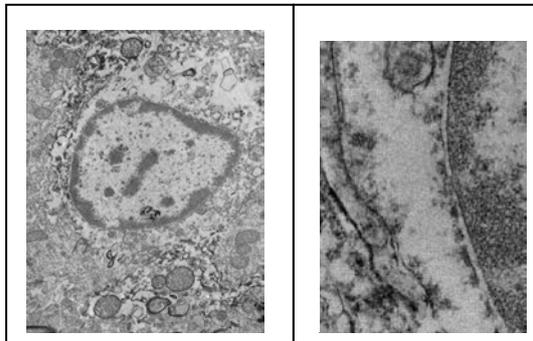
② *In situ* hybridization : 連続切片を用いた検索により、GLT-1 陽性像低下領域のアストロサイトは GLT-1mRNA 陽性であることが確認された (図 4)。また、対照犬と家系犬に陽性像の差は認められなかった。



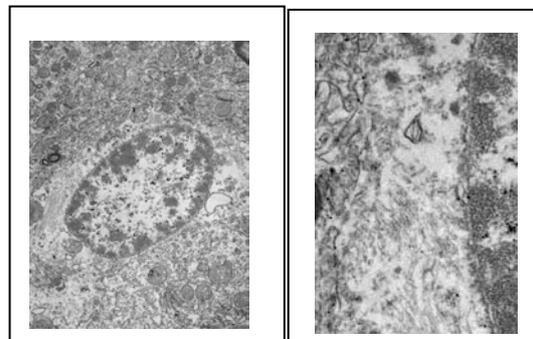
(図 4. 左 : 対照犬の脳皮質 GLT-1mRNA の像.)

(右 : 家系犬の脳皮質 GLT-1 陽性像低下領域 GLT-1mRNA の像.)

③ 免疫電子顕微鏡学的検索 : 対照犬の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 (図 5-1)、家系犬のこの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 (図 5-2)。

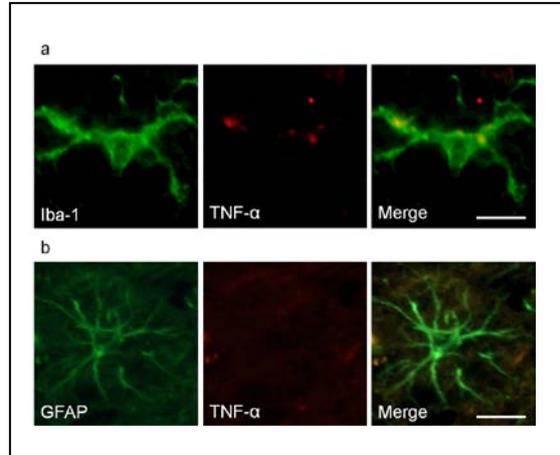


(図 5-1. 対照犬、海馬のレベル、右大脳)  
(アストロサイトの細胞膜上に陽性シグナルが観察される.)



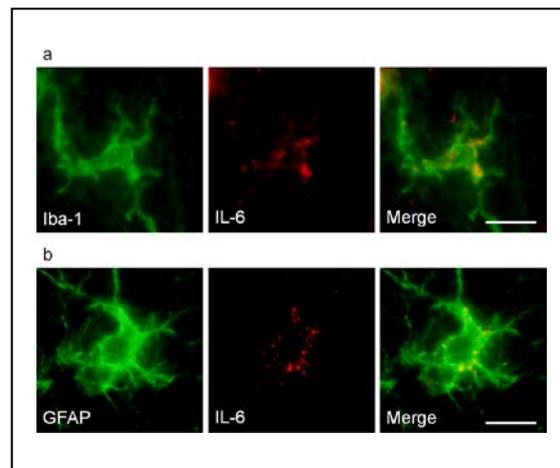
(図 5-2. は家系犬、海馬のレベル、右大脳)  
(細胞膜上に陽性シグナルを認めず.)

④ 発作重責死亡例の脳皮質の神経細胞壊死領域において、免疫組織学的にミクログリアの活性化および活性化ミクログリアにおける TNF- $\alpha$  陽性像および IL-6 陽性像が観察された (図 6, 7)。また、発作重責死亡例の脳皮質のアストロサイトは IL-6 陽性であり、TNF- $\alpha$  陰性であった (図 6, 7)。



(図 6. 脳皮質の神経細胞壊死領域における TNF- $\alpha$  免疫染色像.)

(ミクログリア (Iba-1 陽性細胞) の細胞質に TNF- $\alpha$  陽性シグナルが観察される. アストロサイト (GFAP 陽性細胞) は陰性.)



(図 7. 脳皮質の神経細胞壊死領域における IL-6 免疫染色像.)

(ミクログリア (Iba-1 陽性細胞) の細胞質に TNF- $\alpha$  陽性シグナルが観察される. アストロサイト (GFAP 陽性細胞) は陰性.)

【考察】家系犬 (異常脳波を示すが、てんかん発作未発症) の脳皮質脳溝深部および視床内側核のアストロサイトにおける GLT-1 陽性像の減弱が確認された。この結果より、本家系犬の異常脳波の発生に GLT-1 蛋白合成

機能の低下に基づくシナプスにおける Glu の過剰集積が推測された。また、免疫電子顕微鏡的検索より、アストロサイトの細胞質における GLT-1 蛋白合成過程において、小胞体における蛋白合成までは正常に行われていることが確認された。今後、小胞体以降の GLT-1 蛋白の合成過程（ゴルジ装置における糖付加など）および細胞膜への移送に関する検討が必要である。

また、発作重責死亡例の犬脳皮質の神経細胞壊死領域において、免疫組織学的にミクログリアの活性化および活性化ミクログリアにおける TNF- $\alpha$  陽性像および IL-6 陽性像が観察された。したがって、神経細胞壊死に活性化型ミクログリアが産生・放出するサイトカイン（TNF- $\alpha$  陽性像および IL-6）が関与する可能性が示唆された。今後は、何故、ミクログリアが活性化するのかという点に注目し、実験動物を使用したミクログリアに関する経時的解析を実施する予定である。

## 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）

〔学会発表〕（計 1 件）

櫻井 優ほか、てんかん家系シェルティー犬における神経細胞壊死の発生機序に関する病理学的研究. 第 152 回日本獣医学会学術集会、大阪府立大学、9 月 19 日～9 月 21 日、2011 年

## 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