

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22688027

研究課題名(和文)新規てんかんモデル動物：ネコ自然発症性てんかんモデルの確立

研究課題名(英文)A novel model of epilepsy: Familial spontaneous epileptic cats

研究代表者

長谷川 大輔 (Hasegawa, Daisuke)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：20366793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,700,000円、(間接経費) 4,710,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は我々が2009年に発見した自然発症性家族性てんかんネコ(FSEC)をヒトおよび動物の新しい遺伝性てんかんモデルとして確立するために行った一連の研究である。本研究において、FSECの表現形は常染色体性劣性遺伝で発現しており、またFSECのみで系統維持できることが判明した。FSECの発作型はヒト内側側頭葉てんかんおよび過去の側頭葉てんかんモデル(キンドリングやカイニン酸モデル, ELマウス)と相同であり、脳波およびMRIの解析から扁桃体-海馬にてんかん原性領域が存在することが示された。我々は、FSECがヒトおよび動物のてんかん研究にとって貴重かつ重要な真のてんかんモデル動物となると確信する。

研究成果の概要(英文)：This sequential study is performed to establish a family line of spontaneous epileptic cat (FSEC) as a novel animal model of epilepsy. FSEC is thought to be inherited as autosomal recessive and can maintain the strain only affected animals. The seizure types of FSEC correspond to human mesial temporal lobe epilepsy and existing model of temporal lobe epilepsy (kindling, kainate, or EL mice), i.e., limbic focal seizures with/without secondarily generalizations. Electroencephalographic and MRI features also show that the epileptogenic zone of FSEC exist in the amygdala and/or hippocampus. We are convinced that FSEC will be a precious and important animal model of "true" (spontaneous and genetic) epilepsy.

研究分野：農学

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 動物モデル 遺伝 ネコ 脳波 MRI

1. 研究開始当初の背景

てんかんは反復性のてんかん発作を主徴とする、ヒトやイヌ、ネコを含む、すべての哺乳動物に起こりうる慢性機能性脳疾患であり、医学・獣医学において一般的な脳疾患である。

これまで、てんかんの研究には様々な動物モデルが用いられてきている；1) 遺伝性てんかんモデル、2) 電気刺激モデル、3) 薬剤および金属投与モデル、4) 外傷性焦点モデル。中でも実験てんかんの歴史上、最もてんかん研究に貢献したのが 2) 電気刺激モデルにあるキンドリングモデルである。キンドリングモデルは多くの実験動物種で行われているが、再現性が良く、また定位手術などの実験手技も確立され、多くのキンドリング研究に供されているのがラットおよびネコである。近年ではカイニン酸を代表とする興奮性アミノ酸を局所注入することで急性期には発作重積を、慢性期には反復性の自発発作を生じるモデルも開発され、様々な研究に用いられている。これらの薬剤および金属投与モデルもやはりラットおよびネコを用いた実験が主流である。しかしながら、これらの人為的に作成されたてんかんモデルは、発作の病態発生を知る上で、および症候性てんかんにおける病状を良く模写したモデルになりうるものの、その性質上、特発性てんかんを忠実に再現できないという欠点がある。

これに対し、1) 遺伝性てんかんモデルは、遺伝的素因からてんかんを発症するミュータントモデルであり、実質的な特発性てんかんモデルである。代表的な遺伝性てんかんモデルには、セネガルヒヒ (*Papio papio*)、聴原性マウス、トッターリングマウス、EL マウス、genetically epilepsy prone rat (GEPR)、欠伸てんかんラット、自然発生性てんかんラット (SER)、イヌ、てんかんニワトリなどがある。これらの遺伝性てんかんモデルは各々特徴的なてんかん発作を有し、病態生理学的機構の解析や分子生物学的・遺伝子的研究など様々なてんかん研究に用いられている。しかしながら、サルは飼育管理や大規模な研究に困難があり、ラットやマウスは飼育管理や大規模な研究は容易に行えるが、脳回の発達がなく、またサイズも小さいため画像診断や外科的研究などの臨床的研究には不向きである。イヌは中型で、脳回の発達もあり、これらの問題を克服しうるが、イヌの頭蓋には品種差や個体差が大きく再現性のある研究を行うのが困難である。

この様なてんかん研究の現状で、実験動物供給・受託実験等を行っているある業者のネコ繁殖コロニーにおいて、ケージから搬出する、ケージ外で実験操作を行うなどの刺激によりてんかん発作 (全般強直・間代性痙攣) を発現するネコが 2 世代に渡り複数頭確認され、イヌ・ネコのてんかんを中心に研究している申請者 (長谷川) の元に紹介された。このネコの発作発現形態は、放り投げ刺激に

よって発作を生じるという EL マウスに類似していた。これらのてんかんネコは家族性に発症しており、新たな遺伝性てんかんモデルになりうると思われた。

上述の通り、現在てんかん研究および脳科学研究において脳回の発達が認められる中型動物で、かつ飼育管理や繁殖が比較的容易な実験てんかんモデルが求められており、本研究で確立しようとするてんかんモデル動物はネコである。元来、ネコは 1) キンドリングモデルやカイニン酸モデル、その他の薬剤投与モデルなどに汎用されてきた実験動物であること (すなわち文献対照とできる実験結果が多数存在する)、2) また頭蓋の形態にも個体差がほとんどなく、齧歯類と同様に詳細な脳図譜や定位装置も市販されていること、3) 脳回の発達を認める中型動物で、現在市販・普及している CT や MRI 装置等を用いた画像診断学的研究や外科学的研究が行える、4) 飼育管理・繁殖が比較的容易である、などといった他種実験動物での各々のデメリットを克服しうる実験動物種である。またこれまでネコの遺伝性てんかんモデルは報告されておらず、また獣医学領域においてもネコの特発性てんかんで遺伝性てんかんが証明されている報告はない。

従って、本研究ではこれらのてんかんネコの繁殖およびコロニー化を行うことを計画し、それらてんかんネコの病態生理学的・臨床的特性を明らかにすることにより、新しいてんかんモデル動物を確立することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が獣医領域において比較的稀とされているネコの自然発症性 (特発性) てんかんを家族性に発症しているネコ家系 (familial spontaneous epileptic cat; 以下 FSEC と略す) に遭遇したことを機会に、これらのてんかんネコをコロニー化し、その病態生理学的、臨床的特性を明らかにすることで、これまでに報告のないネコの遺伝性てんかんモデル動物の確立を目的とする。この「自然発症性 (遺伝性) てんかんネコモデル」が確立されれば、医学・獣医学を問わず、これまでてんかん研究において多用されてきたキンドリングモデルやカイニン酸モデルなどに並ぶ、あるいは替わりうる画期的な新規てんかんモデル動物として様々なてんかん研究・脳科学研究に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

上述した FSEC を遺伝性てんかんモデルとして確立するため、本研究は以下の方法論によりその目的を達成するものである。なお本研究は日本獣医生命科学大学生命倫理委員会および実験動物委員会の承認を得て行われた。

(1) FSEC の繁殖・コロニー化と遺伝様式の決

定：上述の実験ネコ繁殖コロニーからてんかん発症個体およびその親・兄弟を抽出し、家系図を作成し遺伝様式の推定を行う。また発症個体同士での交配を行い、系統維持および安定した発症個体の生産の可否を検討することで疾患モデルコロニーを確立する。

- (2) FSEC における発作症候学の観察：各 FSEC で 24 時間連続ビデオ監視を一定期間行うことによる自発発作の有無、および業者から報告のあったケージ外への搬出等で誘発される発作の再現性の確認を行う。また観察された発作を詳細に観察することで発作型を確認する。
- (3) FSEC の一般臨床検査：全 FSEC 個体に対し、獣医臨床で行われる各種臨床検査（一般身体検査、神経学的検査、血液検査、生化学検査、心電図、レントゲン検査、ウイルス・原虫抗体価測定、レントゲン検査、タンデムマススクリーニング等）を行うことでてんかん以外の類症鑑別を行い、FSEC が原発性かつ遺伝性のてんかんであることの支持を図る。
- (4) 脳波検査およびてんかん原性領域（発作焦点）の同定：まず、鎮静下および軽麻酔下での頭皮上脳波記録を行う。得られた脳波所見と(2)の発作症候学から予測されるてんかん原性領域に対し、慢性深部電極を設置し、長時間無拘束ビデオ脳波同時記録を行い、発作時ビデオ脳波からてんかん原性領域を同定する。
- (5) 高磁場（3 テスラ）MRI を用いた構造的/機能的 MRI 解析：FSEC において 3 テスラ MRI を用いた各種画像解析を行う。従来の構造的 MRI による器質的病変の有無を確認。3D 撮像による海馬容積の測定と解析。拡散強調画像、拡散テンソル画像、灌流強調画像および MR スペクトロスコピー等の機能的画像解析によるてんかん原性領域および病態生理学的機構の考察。
- (6) 脳脊髄液中アミノ酸解析およびメタボローム解析：てんかん発作の発現は脳内の興奮性と抑制性の不均衡によって生じるものと考えられている。従って脳脊髄液中の興奮性神経伝達物質（グルタミン酸）や抑制性神経伝達物質（GABA）といったアミノ酸やその他の内因性代謝産物の変化を調査するため高速液体クロマトグラフィー（HPLC）およびメタボローム解析を実施する。
- (7) 遺伝子解析：FSEC が遺伝性てんかんであれば、単一あるいは複数のてんかん原因遺伝子または関連遺伝子の存在がある。ゲノム解析を行うことで、FSEC の原因遺伝子を検索する。
- (8) 病理組織学的解析：脳波、MRI および遺伝子解析とともに FSEC で認められる病理組織学的特徴付けを行う。またこれは原因遺伝子の同定を効率的に促進する。

4. 研究成果

- (1) FSEC の繁殖・コロニー化と遺伝様式の決定：FSEC およびその親・兄弟を業者の繁殖コロニーから抽出・分離し、家系図を作成した（簡略化したものを図 1 A に示す）。発症個体と血縁関係のある FSEC 家系は 2010 年の時点で、全 166 頭からなり、発症個体は 23 頭であった。発症ネコは雌雄ともに存在し、また親にはてんかん発作の病歴はなかった。この家系図および遺伝統計から本家系のてんかん表現形は常染色体性劣性遺伝であることが示唆された。

ついで、FSEC をコロニー化し、系統維持するために発症個体（劣性ホモ）同士の交配を行ったところ（図 1B）、6 頭の F1 が出生し、うち 2 頭は死亡（1 頭は死産、1 頭は致命的な奇形のため安楽殺）したものの、残りの 4 頭は正常に発育し、また全例で脳波異常、3 例でてんかん発作が確認された。すなわち、FSEC 家系においててんかんは致死性ではなく、また発症個体のみで系統維持できることが証明された。

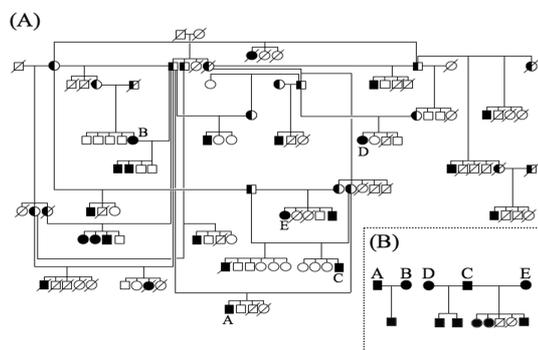


図 1. FSEC の簡略化した家系図。家系図 (A) の A-E の個体は、発症個体同士の交配 (B) の個体に相当する。塗り潰しは発症個体、半塗り潰しは未発症の親（キャリアと推定される）、白抜きは未発症個体。丸が雌、四角が雄。斜線は死亡あるいは追跡不能。

- (2) FSEC の発作症候学：連続的なビデオ監視によって、FSEC は自発的にもてんかん発作を発現することが判明した。発作頻度は個体により異なる。自発的な発作は睡眠中に生じ、注意行動、片側の顔面痙攣、咀嚼、流涎、片側への頭位回旋、點頭、無動といった典型的な辺縁系焦点発作から始まり、二次性に全般強直間代性痙攣へと移行するものであった（辺縁系発作からの二次性全般化）。この発作型はヒト内側側頭葉てんかんおよびその動物モデルであるネコ辺縁系キンドリングおよびカイニン酸モデルと相同のものであった。

一方、約半数の FSEC は、キャリアケージなどへ移し、左右上下に振盪するこ

とで（前庭刺激）、刺激中に全般強直間代性痙攣を発現した。この発作型はやはり側頭葉てんかんの遺伝性モデルである EL マウスの発作型と一致した。

すなわち、FSEC には自発的に生じる辺縁系発作とその二次性全般化、および前庭刺激によって誘発される全般発作という2つの発作型が存在し、それらはいずれも内側側頭葉てんかんを示唆するものであった。

- (3) FSEC の一般臨床検査：FSEC 家系で生存している全ての猫において、方法の項で述べた各種臨床検査を実施したが、いずれの検査結果も発作発現を裏付ける証拠を示さなかった。すなわち FSEC は真性のてんかんであることを示唆する。
- (4) 脳波検査およびてんかん原性領域の同定：FSEC における頭皮上脳波では、前頭-側頭部優位に突発性異常波（棘波や鋭波）が確認され（図2）、FSEC の発作型である辺縁系発作と矛盾しなかった。また、てんかん診断において異常波を誘発するために用いられるベメグリド賦活法を用いたところ、FSEC は正常ネコと比較して有意に低用量で異常波や痙攣が誘発された。これらの結果は FSEC がてんかん素因を有し、てんかん原性領域が側頭葉深部に存在することを示唆する。この頭皮上脳波所見と症候学より、FSEC の数頭において扁桃核、海馬に深部電極を設置し、ビデオ脳波モニタリングを実施したところ、扁桃核および海馬から起始する潜在的/臨床的焦点性発作とその二次性全般化および全般発作の発作時脳波を記録することができた（図3）。このことから、FSEC は我々の推測通り、扁桃核-海馬にてんかん原性領域を有する内側側頭葉てんかんであることを示された。

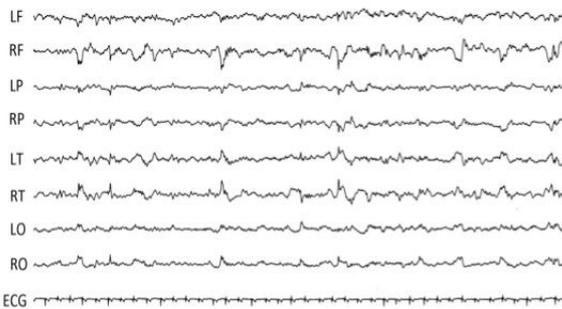


図2 .FSEC における頭皮上脳波 .前頭(LF/RF) -側頭(LT/RT) で優勢な突発性異常波が認められる。

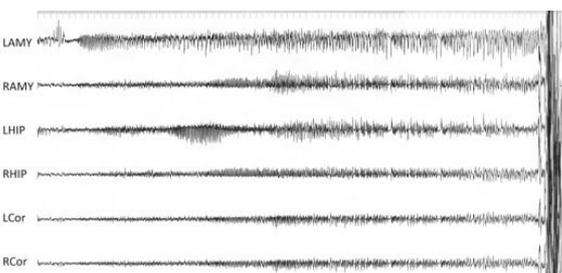


図3 FSEC の発作時深部脳波 左扁桃核(LAMY) から起始し、ついで左海馬(LHIP),そして全般性へと発展する発作波が認められる。

- (5) 高磁場(3テスラ)MRIを用いた構造的/機能的MRI解析:

従来の撮像法による器質的病変の有無:FSECにおいて明らかな器質的な奇形性、炎症性、腫瘍性および代謝性の異常所見は認められなかった。この事は FSEC が正常ネコと同様に脳図譜等を用いた定位手術等の実験が行えることを示唆する。

海馬容積の測定・解析:3D撮像によって得られた脳画像から海馬容積を算出し FSEC と正常ネコを比較した。その結果、総海馬容積に有意差は認められなかったものの、FSEC は正常ネコと比較して有意な海馬容積の左右差を認めた(図4)。この結果は FSEC が内側側頭葉てんかんであることを暗示し、またヒト内側側頭葉てんかんで認められる海馬硬化に類似した病理学的変化を有することを想像させる。

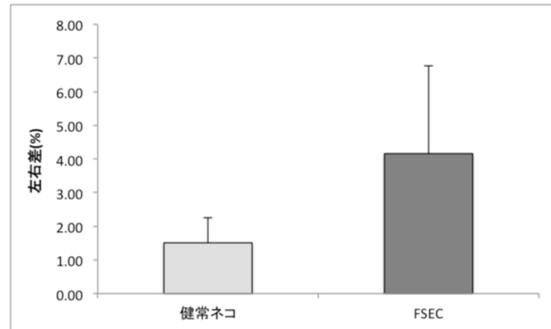


図4 MRI海馬容積測定による正常ネコとFSECの海馬容積左右差の比較 .FSECでは海馬容積の左右差が有意に大きい。

拡散強調画像、拡散テンソル画像、灌流強調画像およびMRスペクトロスコピー等の機能的画像解析:これらの機能的画像解析において、拡散強調画像では FSEC の海馬における拡散係数が正常ネコと比較して上昇傾向を示し、また有意な左右差を認めた。灌流強調画像では FSEC の海馬で血流量・血液量の減少傾向が見られたが有意差は得られなかった。MRスペクトロスコピーでは FSEC において両側の NAA (N アスパラギン酸) 低下、Glx 上昇の傾向が認められたが、有意差は得られなかった。

- (6) 脳脊髄液中アミノ酸解析およびメタボローム解析:FSEC 発症個体、キャリアおよび FSEC と血縁のない正常ネコにおいて脳脊髄液中のアミノ酸解析を行ったところ、キャリア(ヘテロ)において、正常ネコと比較してグルタミン酸の有

意な低下が認められたが、他に有意差のあるアミノ酸はなかった。有意差は得られなかったものの、数頭の発症個体において著しい GABA の高値が認められた。メタボローム解析では発症個体においてグルタミンの有意な低値、ピリドキサールの有意な高値が認められた。グルタミンはグルタミン酸の前駆体であり、またピリドキサルはてんかんの病態生理に關与するビタミン B6 であり、FSEC のてんかん発現と何らかの關連があるものと推測される。脳脊髄液中のこれら興奮性 / 抑制性神経伝達物質の変化はサンプルの採取時期（発作前後や発作間欠期）によって変動する可能性があり、一概に考察することはできないが、FSEC 家系では脳内のグルタミン酸-グルタミンサイクルにおける病的変化を生じている可能性が示唆される。またこの病態生理学的変化は(8)で後述する病理組織学的変化からも疑われる。

- (7) 遺伝子解析：FSEC 家系の発症個体とキャリアと推定される親個体の末梢血ゲノム DNA を用いてエクソーム解析を行った。その結果、変異塩基候補数は各個体で平均 473,920、総数 850,801 であった。これらの変異候補のうち、変異のインパクトが低いもの、性染色体上に位置するものを除外し、発症個体でホモ接合、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に限定することで 130 に絞り込んだ。このうち高インパクトが 9、中等度インパクトが 121 遺伝子あった。しかしながら、この 9 つの高インパクト変異を示した遺伝子にヒトや犬で報告のあるてんかん原因遺伝子は含まれていなかった。今後、我々は残りの候補遺伝子について解析を進める。
- (8) 病理組織学的解析：慢性深部電極を設置しビデオ脳波記録を行った発症個体において、その実験期間終了後に安楽殺を行い、病理組織学的検討を行った。その結果、FSEC では海馬錐体細胞の細胞数減少、細胞外リン酸化タウの蓄積、GLT-1 および EAAC 1 (いずれもグルタミン酸トランスポーター) の低下が認められた。これらの所見はこれまでのてんかんモデルおよびヒトてんかん患者でも認められる変化であるが、本研究では深部電極の挿入が行われていた個体においての結果であり、FSEC 全体を代表する所見とするのは時期尚早である。今後は脳に損傷のない FSEC 個体で解析し、その真意を確認する必要がある。

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 4 件)

Kuwabara T, Hasegawa D (equally contribute, Corresponding), Ogawa F, Kobayashi M, Fujita M, Suzuki K, Matsuki N, Orima H. A familial spontaneous epileptic feline strain: a novel model of idiopathic/genetic epilepsy. *Epilepsy Research* (査読有) 92: 85-88, 2010.

長谷川大輔 . 動物のてんかん：基礎と臨床 . *Epilepsy* (査読無) Vol. 4, No. 2: 21-28, 2010.

長谷川大輔 . てんかんと MRI を主軸とした脳疾患の基礎的・臨床的研究 (梅野信吉賞受賞研究). 日本獣医生命科学大学研究報告 (査読無) 61: 35-41, 2012 .

Hasegawa D, Mizoguchi S, Kuwabara T, Hamamoto Y, Ogawa F, Matsuki N, Uchida K, Fujita M. Electroencephalographic features of familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Research* (査読有), In Press, 2014.

[学会発表](計 5 件)

長谷川大輔, 桑原孝幸, 小林正典, 藤田道郎, 鈴木浩悦, 鈴木勝土, 織間博光 . 新規特発性てんかんモデルとしての自然発症性てんかん猫のコロニー化(第 1 報). 第 43 回日本てんかん学会 . 2009 年 10 月 23 日 . 弘前 .

桑原孝幸, 長谷川大輔, 溝口俊太, 武藤陽信, 藤田道郎 . 自然発症性てんかん猫モデルにおける海馬の MR volumetry . 第 50 回日本獣医画像診断学会 . 2012 年 1 月 8 日 . 大阪 .

長谷川大輔 . てんかん研究と MRI : てんかんと MRI を主軸とした脳疾患の基礎的・臨床的研究 . 第 28 回日本獣医生命科学大学学術交流会 . 2012 年 10 月 21 日 . 名古屋 .

長谷川大輔, 溝口俊太, 桑原孝幸, 小川ふきえ, 松木直章, 藤田道郎 . 新規特発性てんかんモデルとしての自然発症性てんかんネコ (第 2 報) : 脳波の特徴 . 第 47 回日本てんかん学会 . 2013 年 10 月 11 日 . 北九州 .

溝口俊太, 長谷川大輔, 桑原孝幸, 小川ふきえ, 松木直章, 藤田道郎 . 新規特発性てんかんモデルとしての自然発症性てんかんネコ (第 3 報) : MR 画像上の特徴 . 第 47 回日本てんかん学会 . 2013 年 2 月 22 日 . 北九州 .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 大輔 (HASEGAWA, Daisuke)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・講師

研究者番号：20366793