

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450424

研究課題名(和文) 家族性てんかん犬の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 pathogenesis of epilepsy for familial epileptic dog

研究代表者

森田 剛仁 (Morita, Takehito)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：70273901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：家族性てんかん家系犬の脳の過剰興奮に、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ある。本研究では、本家系犬の脳皮質脳溝深部のアストロサイトにおけるGLT-1蛋白の合成過程に着目した。家系犬3例 および対照犬2例の脳について、GLT-1mRNAに相補的なプローブを使用したIn situ hybridizationおよび抗GLT-1抗体を使用した免疫電子顕微鏡学的検索を実施した。その結果、家系犬の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わかった。

研究成果の概要(英文)：We performed In situ hybridization and immunoelectron analysis on the brain of three dogs in the familial idiopathic epileptic Shetland sheepdogs. Immunohistochemical examination demonstrated a decrease of glutamate transporter (GLT-1) immunolabelings in the cerebral cortex, especially along the sulcus in all familial dogs. In situ hybridization showed GLT-1 mRNA positive reaction in the immunohistochemically decreased area of GLT-1. Immunoelectron examination demonstrated that GLT-1 immunolabelings (immunogold positive) were detected on the endoplasmic reticulum of astrocytes, but few immunolabelings on the plasma membranes of astrocytes in familial dogs, while were clearly detected on the endoplasmic reticulum and plasma membranes of astrocytes in control cases. These results suggest that GLT-1 protein may be normally processed in the endoplasmic reticulum of astrocytes in this canine familial idiopathic epileptic model.

研究分野：neuropathology, pathology

キーワード：epilepsy brain neurotransmitter

## 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)マイクロダイアリシス法により、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。

## 2. 研究の目的

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ことから、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(*In situ hybridization*)することとした。

## 3. 研究の方法

家系犬3例(1y9m~4y11m)および対照犬2例(2y4m、4y7m)の大脳について、GLT-1に対する抗体を使用した免疫組織化学的検索、GLT-1 mRNAに相補的なプローブ(DIG oligonucleotide 3'-end labelling kitで標識)を使用した*In situ hybridization*および抗GLT-1抗体(immunogoldで標識)を使用した免疫電子顕微鏡学的検索を実施した。具体的には以下の通りである。

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)。

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での厳格な 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。

#### 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 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。

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-1 mRNA 陽性であることが確認された。また、対照犬と家系犬に陽性像の差は認められなかった。

3) 免疫電子顕微鏡学的検索：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。

以上より、家系犬の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わかった。今後は、蛋白合成後、細胞膜上に発現するまでのどの過程に異常があるのか解析する必要がある。

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 2 件)

吉本侑里、櫻井優、寸田祐嗣、森田剛仁、リチウムピロカルピン投与でんかんモデルラットの梨状葉皮質における神経新生に関する病理学的研究. 第 158 回日本獣医学会、2015. 9.7-9. 北里大学(十和田市).

櫻井 優、鈴木博子、島田章則、寸田祐嗣、森田剛仁、カイン酸投与でんかんモデルラットの梨状葉皮質における神経新生に関する病理学的研究. 第 56 回日本神経病理学会学術集会、2015. 6.3-5. 九州大学(福岡市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔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・教授

研究者番号：70273901

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：