

家族性自然発症性てんかん猫における分子病態学的解析

(Molecular Pathological Evaluation of Familial Spontaneous Epileptic Cats)

湯 祥彦

家族性自然発症性てんかん猫における分子病態学的解析
(Molecular Pathological Evaluation of Familial Spontaneous Epileptic Cats)

湯 祥彦

日本獣医生命科学大学獣医生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成 27 年入学

(指導教授：藤田道郎)

平成 31 年 3 月

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章		
2.1.	緒言	9
2.2.	材料および方法	11
2.3.	結果	17
2.4.	考察	19
2.5.	小括	23
	図および表	
第 3 章		
3.1.	緒言	33
3.2.	材料および方法	35
3.3.	結果	39
3.4.	考察	41
3.5.	小括	43
	図および表	
第 4 章		
4.1.	緒言	54
4.2.	材料および方法	56

4.3.	結果	60
4.4.	考察	65
4.5.	小括	68
	図および表	
第5章		
5.1.	緒言	84
5.2.	材料および方法	86
5.3.	結果	89
5.4.	考察	91
5.5.	小括	94
	図および表	
第6章		
6.1.	緒言	99
6.2.	材料および方法	101
6.3.	結果	104
6.4.	考察	106
6.5.	小括	111
	図および表	
第7章	総括	123

謝辭 133

参考文献 134

第1章

序論

1.1 遺伝学の進歩および様々な遺伝性疾患

地球上の多くの生物において、DNAは遺伝情報の継承および発現を担っている。疾患の発生には遺伝的要因および環境的要因が働くが、疾患の性質によりその割合は様々である。例えば、骨折では遺伝的要因の関与は少なく、環境的要因の関与が大きい。メンデル遺伝病 mendelian disease に分類される疾患では遺伝的要因が決定的因子である。かつては、メンデル遺伝病のような比較的稀な疾患が遺伝学的解析の対象となり、連鎖解析 linkage analysis を用いることで、それらの遺伝学的原因の同定がなされてきた。加えて、一般的な疾患は、疾患集団において一般的なバリエントが関与しているという common disease common variant hypothesis に基づく、ゲノムワイド関連解析 genome-wide association study (GWAS) が2002年に登場した。これに伴い、糖尿病や高脂血症といった一般的な疾患の遺伝学的解析に焦点が向けられた。さらに、次世代シーケンサー next generation sequencer (NGS) の登場によって、個体ごとの全ゲノムシーケンシング whole genome sequencing (WGS) あるいは全エクソームシーケンシング whole exome sequencing (WES) が可能となったことは医学界に大きなインパクトをもたらした。現在、人医学では新生児集中治療ユニットにおいても WGS が利用され、約26時間でのシーケンシングが可能となり、

その後の治療方針の決定に大きな影響を与えている (Saunders et al., 2012; Miller et al., 2015). 疾患の原因遺伝子同定により, 薬剤選択の考慮, そして遺伝子治療が選択肢にあがることは, これまで治療法がなかった難治疾患への貢献のみならず, これまで一律に治療を受けてきた一般的な疾患患者に対しても, 個人単位で適切な治療 (Precision Medicine) が可能となる時代にまで到達している.

地球上に生存する人間をはじめとした生物において, 遺伝的隔離 genetic isolate の存在は少なからず存在する. 遺伝的隔離が発生する一つの理由として, 地理的な隔離によるものがあげられ, これは理論的には全ての生物にて起こりうる. 人で有名なものとして, アイスランド人におけるそれが挙げられる. アイスランド人の大半は, 700~800年代にかけて移住してきたノルウェー人およびケルト人の子孫であり, 遺伝的プールにそれ以外の遺伝的素因はほとんど入ってきていない. このような遺伝的隔離が発生している地域にて, その他の地域よりも発生しやすくなる事象として予想外の近親婚 consanguineous marriage が挙げられる. このような地理的な遺伝的隔離により, 遺伝子プールは狭小化し, その地域にて, ある疾患の罹患率の上昇が起こることが知られている. アイスランドにおける例として, アイスランド人集団においては, 遅発性アルツハイマー病 late-onset Alzheimer's disease に関連している *TM2D3* (TM2 domain containing 3) のアミノ酸置換バリエーションが一般的であることが報告されている (Jakobsdottir et al., 2016). 地理的遺伝的隔離が発生している地域におけるてんかんの罹患率の上昇はカナダのニューファンドランド島における, 家族性および常染色体顕性 autosomal dominant に関連した小児の特発性てんかん

idiopathic epilepsy (IE) が報告されている (Mahoney et al., 2011). さらに、遺伝的隔離が発生する別の理由として、特定の人種などにおける文化的背景が強く関係している場合が挙げられる。広く知られている代表例として、アーミッシュ Amish が挙げられる。アーミッシュは、アメリカ合衆国のいくらかの州に移住するドイツ系移民の宗教集団で、移民当時の生活様式を保持した生活で知られている。このような集団においても、同様に同じ遺伝子プール内の個人同士の結婚により発生する、様々な疾患や形質 (例えば、2 型糖尿病 type 2 diabetes [Rampersaud et al., 2007], 双極性障害 bipolar disorder [Georgi et al., 2014], 長寿 longevity [Khan et al., 2017]) が広く知られている。さらに、アーミッシュにおける家族性てんかん (皮質形成異常-焦点性てんかん cortical dysplasia-focal epilepsy) も知られており、*CNTNAP2* (contactin associated protein like 2) における homozygous mutation が同定されている (Strauss et al., 2006).

1.2 てんかんとその遺伝学

てんかん epilepsy は、反復性のてんかん発作に特徴付けられる機能性脳疾患であり (Fisher et al., 2005), ヒトのみならず犬や猫においても、最も一般的な神経疾患の一つである。てんかん症例のうち大多数は遺伝的要因が関与していると考えられている (Thomas & Berkovic, 2014). 側頭葉てんかん temporal lobe epilepsy (TLE) は人医学において、一般的なてんかん型であり、遺伝的要因および環境因子を含む、多彩な病因により発症する不均一な疾患群である。発作症候学およびその発作症状発現域の解剖学的局在に基づき、本疾患は外側側頭葉てんかん lateral temporal lobe epilepsy (LTE) と、内側側頭葉てんかん mesial

temporal lobe epilepsy (MTLE) に分類される。LTE は、新皮質 neocortex を発作起源とし、比較的稀なてんかんであるのに対し、MTLE は内側側頭葉を発作起源とした一般的なてんかんである。いずれの型も、孤発性のものと家族性のものが存在する。家族性 LTE は、しばしば常染色体顕性外側側頭葉てんかん autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy (ADLTE), 聴覚症状を伴う常染色体顕性てんかん autosomal dominant epilepsy with auditory feature (ADEAF), あるいは聴覚症状を伴う常染色体顕性部分てんかん autosomal dominant partial epilepsy with auditory feature (ADPEAF)などと呼ばれており、初めて本疾患が言及されたのは 1995 年にまでさかのぼる (Ottman et al., 1995)。ADLTE に関しての遺伝学的解析および原因遺伝子の同定は、てんかん遺伝学の歴史の上で、そう真新しいものではなく、2002 年には *LGII* (leucine rich glioma inactivated 1) の変異が同定されている (Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat et al., 2002)。さらに、2015 年には、*LGII* 変異を認めない ADLTE 家系において、*RELN* (reelin) におけるミスセンス変異が同定された (Dazzo et al., 2015)。一方、家族性に MTLE を発症する家族性内側側頭葉てんかん familial mesial temporal lobe epilepsy (FMTLE) は 1990 年代中期に Berkovic らによって紹介された (Berkovic et al., 1994; Berkovic et al., 1996)。その後、FMTLE の遺伝学的解析は、いくつもの研究が行われているものの、現在まで特定の原因遺伝子の同定にはいたっていない。連鎖解析を用いた研究では、疾患座位の同定には成功しているが、それらの多くは研究集団ごとに異なっており (Baulac et al., 2001; Claes et al., 2004; Hedera et al., 2007; Azmanov et al., 2011; Maurer-Morelli et al., 2012; Chahine et al., 2013; Fanciulli et al., 2014a), 本疾患の遺伝的不均一性 genetic heterogeneity が示

唆されている。また、遺伝的隔離を背景に有しているロマ/ジプシー民族において、発作症候学および脳波所見より、海馬硬化 hippocampal sclerosis を伴わない内側側頭葉起源の家族性てんかん、および座位が報告されており (Azmanov et al., 2011)、次に示す家族性てんかん猫に通ずるものがあり興味深い。

1.3 家族性自然発症性てんかん猫

家族性自然発症性てんかん猫 Familial spontaneous epileptic cats (FSEC)は、日本国内の実験猫繁殖業者のコロニー内にて、てんかん発作を呈する猫の存在が報告され、それら一部猫を日本獣医生命科学大学にて飼育・繁殖し、系統維持されているクローズド・コロニーで、猫において遺伝性てんかんが強く疑われている世界唯一の系統である(Kuwabara et al., 2010)。FSECは2つの表現型(発作型)を示す。一つは二次性全般化を伴う、あるいは伴わない自発的な焦点性辺縁系発作であり、これは猫の特発性てんかんの一般的な表現型 (Pákozdy et al., 2013; Wahle et al., 2014; Stanciu et al., 2017)にも一致する。加えて、この表現型は、てんかん学領域において、古くから側頭葉てんかんモデルとして用いられてきた猫のカイニン酸/キンドリングモデル (Kitz et al., 2017) と類似した発作様式である。もう一つの表現型は前庭刺激誘発性発作であり、これはマウスの遺伝性てんかんモデルである EL マウス (King and LaMotte., 1989) と類似した表現型である。FSECは2009年にコロニー化され、てんかん発作の表現型(つまり辺縁系発作)および側頭部優位の突発性異常波が頭皮上脳波にて認められたことから、TLEに類似していると考えられた (Kuwabara et al., 2010)。さらに、頭蓋内深部脳波を検討した研究にて、海馬および/あるいは扁桃体からの発作起始

が認められた (Hasegawa et al., 2014). これらのことから, FSEC は人の FMTLE モデルとなると考えられた. さらに, FSEC は実験猫繁殖業者のクローズド・コロニーから隔離され, その後の繁殖も遺伝学的にかなり近親の個体との交配により系統・維持されているため, 多数の inbreeding loops が存在している (第 4 章, Fig. 1 参照). FSEC におけるてんかん発症は, 人における遺伝的隔離が背景に生じる家系集簇性疾患と酷似した背景によって生じていると推測される. FSEC の遺伝学的解析は, FSEC のてんかん発症の分子的機序の解明のみならず, これら人においてもいくらかの頻度で生じる家系集簇性疾患に対して, 新たな知見を提供すると考える.

1.4. 猫における遺伝学の進歩

猫の低密度 SNP アレイは, 猫ゲノム・アセンブリ FelCat 4 (Felis catus 5.8 ; GTB V17e ; Mullikin et al., 2010 ; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000003115.1/) に基づいて作成され, 62,897 SNPs のジェノタイプを可能し, Illumina Infinium iSelect 63K DNA cat array (Illumina, San Diego, CA, USA) (以下, Feline 63K SNP Array と記載) として一般的に利用できる唯一の猫 SNP Array である (Gandolfi et al., 2018). 猫の SNP Array の開発によって, 関連解析や連鎖解析といった, ゲノムワイド解析の実施が可能となり, 多くの単一遺伝性疾患および形質に関連するバリエントや座位の同定がなされた (Gandolfi et al., 2012; Gandolfi et al., 2013a; Gandolfi et al., 2013b; Alhaddad et al., 2014; Abitbol et al., 2015; Gandolfi et al., 2016a; Gandolfi et al., 2016b; Lyons et al., 2016b). 加えて, 猫における WGS データの共有化 (99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative ; www.felinegene

[tics.missouri.edu/99Lives](https://www.mizzou.edu/99Lives)) により，猫における遺伝学研究が加速している (Gandolfi et al., 2015; Aberdein et al., 2016; Lyons et al., 2016a; Mauler et al., 2017; Oh et al., 2017). 興味深い一例としては，WGS を用いることで，従来であれば，病理学的検査および生化学検査が診断に必要とされる Niemann-Pick type C 病を引き起こす *NPCI* (NPC intracellular cholesterol transporter 1) のミスセンス変異を患者生存中に同定した報告があげられる (Mauler et al., 2016). 本事例は，獣医学領域における Precision Medicine の可能性を示唆している.

1.5 本研究の趣旨

本研究は，人医学領域において，遺伝学的原因が未だ同定されていない FMTLE のモデル動物と考えられる FSEC の遺伝学的解明である．これまで，FSEC に関する電気生理学的・画像学的解析はなされているが，病理学的特徴づけがなされていない．表現型の把握は遺伝学的解析に必要不可欠である．そのため，第 2 章では FSEC において発作起始領域 seizure-onset zone と考えられている海馬および扁桃体について病理学的解析を行った．続いて第 3 章では，FSEC の発作表現型に基づいた候補遺伝子アプローチを用いた遺伝子解析を行った．第 4 章においては，前述の Feline 63K SNP Array を用いてジェノタイプングを行い，ゲノムワイド関連解析としてケース・コントロール研究 case-control study および伝達不平衡試験 transmission disequilibrium test (TDT) を実施した．第 5 章では，第 4 章にて行ったジェノタイプ・データを用いての連鎖解析を実行した．第 6 章においては，FSEC から 4 頭を選出し，WGS を実施して，上記のゲノムワイド解析で示唆された領域に存在し，かつ 99 Lives Cat

Genome Sequencing Initiative との共同により，そのデータベースに存在しないユニークな変異の同定を試みた．

上述したように，てんかんは一般的な疾患であるにもかかわらず，その遺伝学的不均一性から，疾患発生に関する遺伝学および分子病態生理学的なメカニズムは，全ゲノム解析が可能となった昨今でも未解明な部分が多い．本研究では，人の FMTLE モデルであり，かつ猫の特発性てんかんにおける最も一般的な表現型を示す，てんかん猫のクローズド・コロニーである FSEC の遺伝学的原因に迫る．発症 FSEC はクローズド・コロニーとして遺伝的隔離が起こっているため，疾患発生に関して比較的均一な遺伝的背景を持つものと考えられる．FSEC の遺伝学的原因を同定することは，未だ不明な FMTLE の遺伝学的な面での疾患発生メカニズム，さらには一般的な猫における遺伝性てんかんにおけるそれを解き明かす鍵となるだけでなく，ひいてはゲノム薬理学 pharmacogenomics および precision medicine への応用にも重要な役割を担うと考えられる．

第2章

家族性自然発症性てんかん猫における海馬および扁桃体の神経病理学的特徴

2.1 緒言

海馬はてんかんにおいて最も広く研究されている脳の領域である。人医学において、海馬硬化 hippocampal sclerosis (HS) は内側側頭葉てんかん (MTLE) の外科手術によって摘出された海馬組織において最も頻繁に遭遇される組織病理学的所見である (Andrade-Valença et al., 2008; Blümcke et al., 2013)。HS は海馬におけるアストログリオシスを伴う選択的神経細胞脱落と定義される (Blümcke et al., 2013)。さらに、顆粒細胞の病理学的変化 granule cell pathology (GCP) および苔状線維の発芽 mossy fiber sprouting (MFS) は HS に関連して、しばしば認められる付随的所見である (Thom et al., 2002, 2009; Blümcke et al., 2009, 2013; Bandopadhyay et al., 2014)。

MTLE を含めた側頭葉てんかん (TLE) において、扁桃体はてんかん発作の発生および伝播において重要な役割を果たしていると考えられている。人の TLE 患者における神経病理学的研究によって扁桃体における神経細胞脱落とグリオシス (扁桃体硬化 amygdaloid sclerosis [AS] とも言及される) が示されてきた (Hudson et al., 1993; Yilmazer-Hanke et al., 2000)。

獣医学において、てんかんにおける脳の病理学的変化は、そのほとんどが逸話的な症例報告として記載されてきたが、最近、てんかんの猫を対象とした

一つの大規模コホート研究が行われ、猫てんかん脳における HS および GCP が報告された (Wagner et al., 2014b).

前章において、家族性自然発症性てんかん猫 (FSEC) の臨床的特性について簡潔に述べた。以前のビデオモニタリングを伴う頭蓋内深部脳波を用いた研究によって、FSEC は臨床的発作徴候の有無に関わらず、脳波上てんかん発作波が扁桃体または海馬 (あるいはその両方) に由来し、これらの領域が発作起始領域 seizure onset zone であることが明らかとなった (Hasegawa et al., 2014)。この頭蓋内深部脳波を用いた研究では、5 頭の FSECs が供され、その後の海馬の組織学的評価では、CA3 における神経細胞数の減少が認められている (Hasegawa et al., 2014)。しかし、頭蓋内深部脳波測定のため、深部電極が海馬に設置されており、海馬 CA1–CA3 のみしか評価されておらず、また深部電極刺入にともなう組織損傷の影響も否定できない。これらの制限のため、FSEC における多くの神経病理学的特徴は不明なままである。FSEC において、通常の磁気共鳴画像法 (MRI) では、典型的な HS の画像所見は認められないものの、海馬容積測定法では海馬の萎縮または非対称性が認められた (Mizoguchi et al., 2014)。さらに、発作間欠期の MRI 拡散強調画像および灌流画像によって、海馬および扁桃体における微小構造変化の存在が示唆された (Mizoguchi et al., 2017)。したがって、我々は海馬および扁桃体における微小構造異常が FSECs における構造的異常域 structurally abnormal zone を示唆していると仮定した。

本研究の目的は、FSECs の海馬および扁桃体における微小構造変化を評価することである。そのため、我々は HS, AS, MFS, および GCP といったてん

かん関連性病理学的変化について調査し、臨床的に正常かつ FSECs と血縁関係にない猫と比較した。

2.2 材料および方法

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て行われている (承認番号 : 26K-29, 27K-10, 28K-4 ; 研究代表者 : 長谷川大輔)。

2.2.1 供試動物

本研究には、前述した日本獣医生命科学大学獣医放射線学教室にて飼育・維持されている FSEC が用いられた。FSEC の飼育環境は、室温 22–24 °C、湿度 44–55 %、24 時間明期 (連続ビデオモニタリングおよび周年繁殖化のため) が維持されている状態である。さらに、各個体は、幅 60 cm、奥行き 70 cm、高さ 60 cm のステンレススチール製ケージで単頭飼育されており、給餌および給水は 1 日 2 回、自由給餌給水下にて飼育されている。このうちてんかん発作を呈する 6 頭の FSECs (反復性自発性辺縁系発作を呈する 3 頭および前庭刺激誘発性全般性発作を呈する 3 頭) が本章の研究に供された。発作を呈する 6 頭の FSECs の発作頻度は散発的または稀であり、概して 1 年間に平均 1–2 回の発作頻度であった。これら FSECs の発作発症年齢の中央値は 8.5 ヶ月齢であり (範囲 : 3–16 ヶ月齢)、てんかん罹患期間の中央値は 41.4 ヶ月 (範囲 : 7–87 ヶ月) であった。FSECs は 3 頭がオスであり、3 頭がメスであった。FSECs の年

齢中央値は 52.5 ヶ月齢 (範囲 : 15–96 ヶ月齢) であり, 体重中央値は 3.8 kg (範囲 : 3.4–4.4 kg) であった.

FSEC の対照群には, 発作の既往歴および神経学的異常がなく, かつ FSECs と血縁関係のない 9 頭のエイジ・マッチングされた健常猫 (3 頭のオスと 6 頭のメス) を用いた. 対照群の中央年齢値は 81.0 ヶ月齢 (範囲 : 31–138 ヶ月齢) であり, これは FSECs と有意な差は呈さなかった ($P = 0.175$; Mann-Whitney U 検定). 体重の中央値は 3.4 kg (範囲 : 3.2–3.8 kg) であった.

さらに, FSECs の第一世代であり, てんかん発作を呈さない 3 頭の個体 (2 頭のメス, 1 頭のオス) も含まれた. これら 3 頭は明らかなたんかん発作を有する FSEC の親猫である. これらの猫の中央年齢値は 130 ヶ月齢 (範囲 : 108–142 ヶ月齢), および体重の中央値は 3.3 kg (範囲 : 2.5–4.2 kg) であった.

2.2.2 脳組織採取

すべての猫はバルビツール系麻酔薬であるペントバルビタール (100 mg/kg) の静脈内過剰投与により安楽死された. 6 頭の FSECs, 3 頭の健常猫, および 3 頭の FSECs の親猫の脳は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて直ちに固定された. 残りの 6 頭の健常猫の脳は, 脳の片側半球のみが 10% 中性緩衝ホルマリン液にて直ちに固定され, 残りの半球は今後の研究のため, 凍結保存された. これらの 6 頭の使用半球の内訳は右側 5 頭, 左側 1 頭である.

固定完了後, 脳は前頭葉, 線条体, 扁桃体, 海馬, 中脳, 延髄および小脳のレベルにて横断面で切断された. すべての脳スラブは, 段階的濃度のエタノ

ール浸漬に続く，キシレンにより脱水を行った．組織はパラフィンにて包埋され，4- μm のスライス厚にて薄切された．

2.2.3 組織学的 および免疫組織学化学的解析

常法を用いて，H&E 染色および Kluver-Barrera 染色を実施した．免疫組織化学は，神経細胞数およびグリオーシス，GCP，MFS を評価するために neuron-specific nuclear protein (NeuN) (マウス・モノクローナル抗体; 希釈倍率 1:500; Chemicon International Inc. Temecula, CA, USA), glial fibrillary acidic protein (GFAP) (ウサギ・ポリクローナル抗体; 希釈倍率 1:400; DAKO, Carpinteria, CA, USA), および dynorphin A (ウサギ・ポリクローナル抗体; 希釈倍率 1:500, Phoenix Pharmaceuticals Inc, Burlingame, CA, USA) を用いて実施した．組織断面は脱パラフィンされ，GFAP 染色を除くすべての免疫組織化学において，抗原賦活化のため 10 mM クエン酸緩衝液に浸漬した状態で 120°C，10 分間のオートクレーブ処理を行った．その後，スライド標本を内因性ペルオキシダーゼ活性の不活化のため 3%過酸化水素メタノール溶液に 30 分浸漬し，5%スキムミルク入りトリス緩衝生理食塩水にて 37°C，30 分処理し，非特異的な抗原結合を抑制した．その後，スライド標本をトリス緩衝生理食塩水にて希釈した一次抗体を用いて，室温 10 分，37°C40 分，室温 10 分にて反応させた．二次抗体として horseradish peroxidase (HRP) 標識ポリマー試薬 (抗ウサギまたはマウス IgG, EnVision+ System, DAKO, Carpinteria, CA, USA) を使用し，室温 10 分，37°C40 分，室温 10 分で反応させた．発色はトリス塩酸バッファーに溶解した過酸化水素と 3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩 (同仁化学研究所，熊

本, 日本) を溶解し, 行った. 発色後, 抗 NeuN スライドではメチル・グリーンを, その他のスライドではメイヤー・ヘマトキシリンを用いて対比染色を行った.

2.2.4 形態解析およびデジタル画像の取得

海馬の亜領域である CA1-4 を評価した. 海馬においては, 神経細胞数, グリオーシス, GCP, MFS を評価した. 扁桃体は不均一な核の集合体であり, 猫の扁桃体は, 基底外側核, 基底内側核, 外側核, 中心核, 皮質核, および内側核により構成される. 本研究では, 既報の研究にて扁桃体の詳細な核に関して記載された局在位置および命名法を採用した (Marcos et al., 1999). しかし, 扁桃体のそれぞれの領域において正確にそれらを区別することは困難な場合がある (Wolf et al., 1997). そのため, 我々は視覚的に局在同定が容易な 3 つの扁桃体の核, すなわち中心核 central nucleus (CE), 外側核 lateral nucleus (LA), および基底外側核 basolateral nucleus (BLA) において, 神経細胞数およびグリオーシスを評価した. さらに, 海馬および扁桃体以外の領域を含むすべての標本は, 限局性皮質形成異常症やその他の異常 (例えば海馬異常 [Sloviter et al., 2004] や異所性神経細胞集簇 [Baraban et al., 2000]) の存在の有無に関して評価した. すべての標本における組織像は, デジタルカメラ (DXM 1200F, Nikon, 東京, 日本) およびソフトウェア (ACT-1 software, Nikon, 東京, 日本) を搭載した顕微鏡 (BX 50, Olympus, 東京, 日本) を用いて撮影した. 画像解析は画像解析ソフト (Image J, NIH, MD, USA) を用いて, すべての解析はブラインド条件下で, 1 人の測定者が実施した.

2.2.5 神経細胞数の評価

各垂領域における 100X 倍率像の領域 (830 x 663 μm) 内に存在する NeuN 陽性神経細胞核を, Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて, 手動的にタグ付けすることにより測定した. 計測時に標本は匿名化された. NueN 免疫反応性細胞核はコンピューター・スクリーン上にてタグ付けされ, それぞれの海馬垂領域 (つまり, CA1-4), 歯状回の顆粒細胞層, および扁桃体の CE, LA, および BLA で計測された. 細胞数はそれぞれの領域において 4 回, 独立して計測された. さらに, CA4 の計測に関しては 2 つの重複しない関心領域 (830 x 664 μm の範囲内にてそれぞれ 300 x 300 μm) を含んだ. これは CA4 垂領域において, いくつかの画像では CA4 以外の構造物の含有が存在したため, CA4 計測時に特異的に本計測方法を用いた. CA4 を除いて, すべての細胞数測定はそれぞれのスライドにおける NueN 免疫反応神経細胞の総数の平均値の算出により得られ, ユニット領域 (0.55 mm^2) ごとの神経細胞数が算出された. CA4 におけるユニット領域は 2 つの関心領域に相当し (0.18 mm^2), 総細胞数の平均値はユニットごとに決定した.

2.2.6 グリオーシスの評価

グリオーシスの評価は, Image J プラグイン RGB 法を用いて, GFAP 免疫反応性の決定により定量的に評価した. グリオーシスは, 100 倍視野にて撮影した, GFAP 染色標本において (830 x 664 μm), CA1-CA3 にかけて評価された.

CA4 では、神経細胞数の評価と同様に、CA3 や歯状回といった他の構造物の混入をさけるべく、2 つの重複しない関心領域 (830 x 664 μm の範囲内にて 2 つの 300 x 300 μm の関心領域) にて GFAP 免疫反応性は同様に測定した。

2.2.7 苔状線維の発芽の評価

MFS は人の組織サンプルにおいて用いられるグレーディング・システムを適用することにより、dynorphin A 染色標本において評価した (Martinian et al., 2012; Bandopadhyay et al., 2014)。すなわち、グレード 0 は CA3 および CA4 における正常な苔状線維経路、グレード 1 は内分子層における限局性の MFS、グレード 2 は分子層における MFS の広い帯の存在として評価した。

2.2.8 顆粒細胞層の病理学的変化の評価

人医学において、顆粒細胞層の増加 (> 10 層) (Wieser et al., 2004)、乖離現象、異所性細胞、集簇、および二分層化 (Blümcke et al., 2009) を含む神経病理学基準が提案されてきているものの、顆粒細胞の病理学的変化に関する国際的コンセンサスは存在しない。従って、本研究では Blümcke et al. (2009) によって提案された顆粒細胞の病理学的変化に関する分類と定義を歯状回の評価に用いた。歯状回は、構造のそれぞれ 1/3 を構成する 3 つの領域に分割した：歯状回の内側部分 (内脚)、CA2 および CA4 の間に位置する歯状回の外側部分 (外脚)、内脚と外脚の間に位置する中部 (Pauli et al., 2006; Blümcke et al., 2009)。垂直線上にて細胞層の細胞数により反映される顆粒細胞層の厚みは、NeuN 染色標本において内脚および外脚における 3 つの湾曲していないそれぞれの領域で

計測した。それら 3 つの領域のそれぞれにおける細胞層の平均の厚さ (μm) と平均細胞層数が統計解析に用いられた。

2.2.9 統計解析

本研究では海馬の背側面および腹側面を独立して評価した。3 頭の FSECs の親個体と他の 2 群との統計学的比較はサンプル個体数が少ないため、行わなかった。その代わりに、FSEC 群と対照群との比較の結果を考慮するときに、それらの所見を支持的な根拠として用いた。

したがって、FSEC 群と対照群のみを統計学的に比較した。データは中央値と四分位範囲にて示された。FSEC 群と対照群間のすべての統計学的解析は、統計ソフトウェア (EZR, さいたま医療センター, 埼玉, 日本) にて Mann-Whitney U 検定を用いて実施した。統計解析結果は $P < 0.05$ にて有意であるとした。

2.3 結果

2.3.1 組織学的検査および免疫組織化学解析

海馬および扁桃体のスライドを除いて、H&E 染色および Kluver-Barrera 染色を施した全脳の精査にて、いずれの群においても、遺伝性辺縁系様発作を呈するラットである Ihara てんかんラット (Tsuji et al., 2001), メチルアゾキシメタノール酢酸に暴露したラット (Baraban et al., 2000), そして TLE の人患者の一部 (Sloviter et al., 1998) にて報告されているような、限局性皮質形成異常症などの明白な構造的異常は認められなかった。

それぞれの FSECs 個体間にて海馬において、視覚的に明白な病理学的差異は存在しなかった。対照群と比較した際、FSEC 群の海馬の背側面 ($P = 0.010$) および腹側面 ($P = 0.002$) の CA3 において有意な NeuN 陽性神経細胞の減少が認められた (Figure 1)。CA3 の結果と対照的に、海馬の背側面および腹側面の CA1, CA2 および CA4 において、FSEC 群と対照群間にて有意差は認められなかった。

各々の FSECs 個体間において、扁桃体の視覚的に明白な病理学的差異は認められなかった。対照群と比較し、FSEC 群は扁桃体の CE にて神経細胞数の有意な減少 ($P < 0.001$) を呈した。一方で、扁桃体の LA と BLA における神経細胞数に関しては 2 群間の有意差は認められなかった (Figure 2)。

海馬の GFAP 免疫反応性において、FSEC 群と対照群間にて、海馬の腹側面の CA4 において有意差が認められた ($P = 0.015$) (Figure 3)。扁桃体のいずれの核においても GFAP 免疫反応性に関して有意差は認められなかった。

FSEC 群、対照群、および FSECs の第一世代である親猫の海馬における、背側および腹側面の CA3、および扁桃体の CE の神経細胞数を比較すると、減少傾向が認められた (Figure 4)。

CA4 と CA3 は dynorphin A に強い染色性を示し、CA1 に向かって徐々に染色性は低下した (Figure 5)。すべての猫は MFS に関して、グレード 0 を呈した。

顆粒細胞層の厚さと層数の中央値に関して、FSEC 群と対照群間にて、顆粒細胞の病理学的変化に差異は認められなかった。同様に、いずれの実験群においても、異所性細胞、二分層化、集簇、あるいは顆粒細胞層の乖離といった多

様な変化は認められなかった (Figure 1, Figure 5). 顆粒細胞層の厚さおよび層数の中央値は Table. 1 にて示した.

2.4 考察

てんかんの猫における海馬の病理学的変化についてこれまでいくつかの報告がされてきているが、これら著者のほとんどは海馬壊死症に関して記載しており (Fatzner et al., 2000; Brini et al., 2004; Schmied et al., 2008; Pákozdy et al., 2011; Klang et al., 2014; Fors et al., 2015; Klang et al., 2018), 特発性てんかんの猫を含んだ病理学的変化に関する報告は 1 報のみである (Wagner et al., 2014b). 既報の猫における HS あるいは海馬壊死症の報告とは対照的に, 本研究は FSECs における海馬の背側および腹側面の CA3 における, グリオーシスを伴わない神経細胞数の有意な減少を認めた. CA3 に認められた, グリオーシスを伴わない神経細胞の減少は FSEC コロニーにおける遺伝的浮動によって生じている可能性は考えられるが, この微かな海馬の変化がてんかん発作を引き起こす因子の一つである可能性がある. 人の FMTLE におけるある研究において, 孤発性 MTLE と同様の細胞脱落が報告されている一方 (Andrade-Valença et al., 2008), 別の研究では, FMTLE のある患者では錐体細胞層または歯状回における神経細胞脱落の根拠は存在しないと報告された (Crompton et al., 2010). これら以前に報告された研究と本研究の結果を考慮すると, FMTLE は臨床的所見のみならず, 顕微鏡的所見の観点からも不均一な疾患であることが示唆される. さらに, FSECs の扁桃体 CE にてグリオーシスを伴わない有意な神経細胞数の減少が認められた. 我々の知る限り, 自然発症性のてんかん猫における扁桃体の病理学

的变化に関する報告はこれまでに存在しない。TLE のヒト患者 (Wolf et al, 1997; Yilmazer-Hanke et al., 2007) やてんかん患者の突然死 (Thom et al., 1999) における扁桃体 LA における神経細胞脱落, さらに実験的に誘発されたてんかん重積を呈する動物では扁桃体 BLA (Figueiredo et al., 2011) および複合領域 (Tuunanen et al., 1999) における神経細胞脱落が報告されており, それらは重度なてんかん発作の結果であると考えられている。本研究は, 健常群と比較した際, FSECs の扁桃体 CE および海馬 CA3 における神経細胞数の減少を認めたが, それらは発作発生に関連している可能性がある。

一部の研究者は, 人において健常な家族構成員を含む家族性てんかんであるが, 微妙ではあるが遺伝的に決定される海馬の発生学的な奇形が存在すると結論づけている (Fernández et al., 1998; Sloviter et al., 1998)。人における海馬異常は遺伝する可能性があるが, それが必ずしもてんかん発症につながるわけではないことも示唆されている (Kobayashi et al., 2002; Suemitsu et al., 2014)。本研究において, FSECs の発作を呈さない親猫においても, 海馬 CA3 および扁桃体 CE において, 発作発症している FSECs に比較すると軽度ではあるものの神経細胞数の減少が認められた。したがって, 本研究によって, 海馬と扁桃体における神経細胞数の減少は FSECs の endophenotype である可能性あり, それらは発作感受性に関連しているのかもしれない。この FSECs における endophenotype の可能性は, FMTLE は海馬および扁桃体異常につながる主要な遺伝子を包含しており, 表現型はさらなる遺伝性または環境因子によって影響を受けている可能性を支持する (Cendes et al., 2014)。

前述した神経細胞数の減少に加えて、FSECsではCA4に局限したグリオシスが認められ、これは人のHSに関する国際的コンセンサスにおけるカテゴリーの“*No HS, gliosis only*”に相当する (Blümcke et al., 2013). この型の海馬病理学的変化は、人TLE症例において、およそ20%にて認められていると報告されている。“*No HS, gliosis only*”カテゴリーに相当するこの所見は、TLEの自然モデルであり、FSECの1つの発作型(前庭刺激誘発性発作)と類似するELマウスでも認められている(Drage et al., 2002). しかしながら、“*No HS, gliosis only*”は、人のHSがてんかんの原因なのか結果であるのかを結論付けることは単純ではない(Walker., 2015). しかし、FSECsとそれらの親の両者にて認められた神経細胞数の減少とは対照的に、発作を呈するFSECsのみにてグリオシスが認められた事実は、この病変がてんかんに関連していることを想起させる。FSECsの海馬腹側面CA4でグリオシスが認められたことは、猫の海馬腹側面が、人においててんかん関連性変化が最も一般的に生じる(Thom et al., 2012)海馬頭部のホモログである(Sasaki et al., 2004)という事実に一致する。したがって、“*No HS, gliosis only*”がてんかん発作の原因または結果であることを確定することは不可能であるものの、FSECsのCA4におけるグリオシスは反復性の発作の結果である可能性を我々は推測する。

典型的なHSまたは、それに関連する変化(すなわち、GCPやMFS)は本研究における猫では認められなかった。海馬の腹側面における歯状回にて、外脚および内脚の厚さはおおよそ70 μm であり、これは猫において以前に報告された顆粒細胞層の厚さに一致する(Wagner et al., 2014b). HSの程度とGCPとの関連性が人(Thom et al., 2002)と猫(Wagner et al., 2014a)において報告されている。

さらに、dynorphin A 免疫反応性のグレードは GCP と関連することも報告されている (Thom et al., 2009). これら報告は、FSECs が GCP または MFS のいずれも呈さなかった理由となるだろう.

本研究は幾らかの制限を含む. まず, 本研究に用いられた FSECs の発作頻度が比較的少ないことである. しかしながら, 本研究で用いられた神経細胞マーカーである NeuN は確立されたマーカーであり (Gusel'nikova et al., 2015), 視覚検査による手動測定方法を容易に実施することができる. 我々が立体解析学を用いていないため, 微かな測定誤差が生じた可能性を除外することはできないものの, 本研究では NeuN 免疫組織化学解析を含む 容易な手動測定法を採用した.

特発性または遺伝性てんかんの猫における病態生理過程は未だ不明なままである. FSECs は劇的なてんかん関連性変化 (例えば, HS, GCP, および MFS) を示さなかったものの, 本研究は猫における家族性てんかんの病理学的特徴に焦点を当てた. 本研究に用いられた FSECs のてんかん発作頻度は比較的 low 頻度であったとはいえ, FSECs に存在する海馬および扁桃体の異常を理解することは重要である. 我々の知る限り, 遺伝性あるいはそれが疑われるてんかんを呈する猫における病理学的所見を言及した研究はこれまでに存在しない. てんかんの病態生理機序を理解するために, 獣医学において軽度な臨床経過を呈するてんかんを評価することは重要である. したがって, 本研究の結果はてんかんの動物に対して重要な知見を提供するものである.

2.5 小括

- FSECsにおいて、海馬 CA3 および扁桃体 CE における神経細胞数の減少を認めた。
- FSECs の海馬 CA4 においてグリオシスを認めた。
- 海馬および扁桃体の神経細胞数の減少は FSECs の endophenotype である可能性が示唆された。
- FSEC における遺伝性てんかんに、本研究で示された海馬・扁桃体の微小な構造異常が関与している可能性が考えられる。

Table 1. 6頭のFSECs (FSEC群) と9頭の健常猫 (対照群) の海馬の背側および腹側面における, 歯状回の顆粒細胞層の外側 (外脚) および内側 (内脚) の長さ (μm) と層の細胞数の中央値 (四分位範囲)

群	歯状回	外脚		内脚	
		長さ (μm)	細胞数	長さ (μm)	細胞数
FSEC群	背側	76.81 (6.82)	6.33 (0.41)	77.73 (5.79)	6.67 (0.54)
	腹側	71.48 (3.96)	5.50 (0.50)	70.30 (3.18)	5.67 (0.50)
対照群	背側	73.65 (2.62)	6.33 (0.08)	65.36 (5.35)	6.17 (0.38)
	腹側	70.28 (7.00)	6.00 (0.38)	69.67 (5.86)	5.67 (0.33)

有意差は存在しない ($P \geq 0.05$).

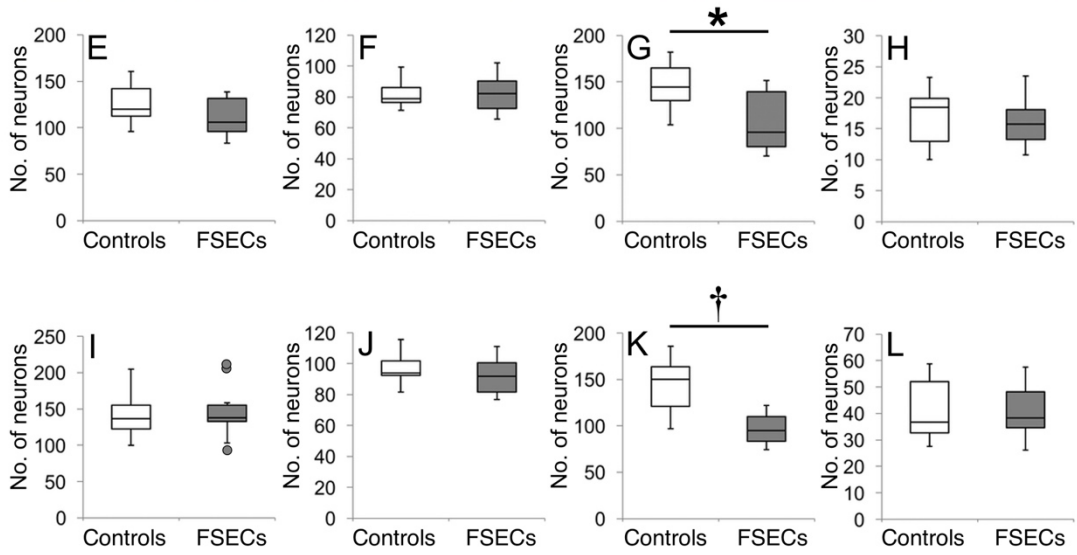
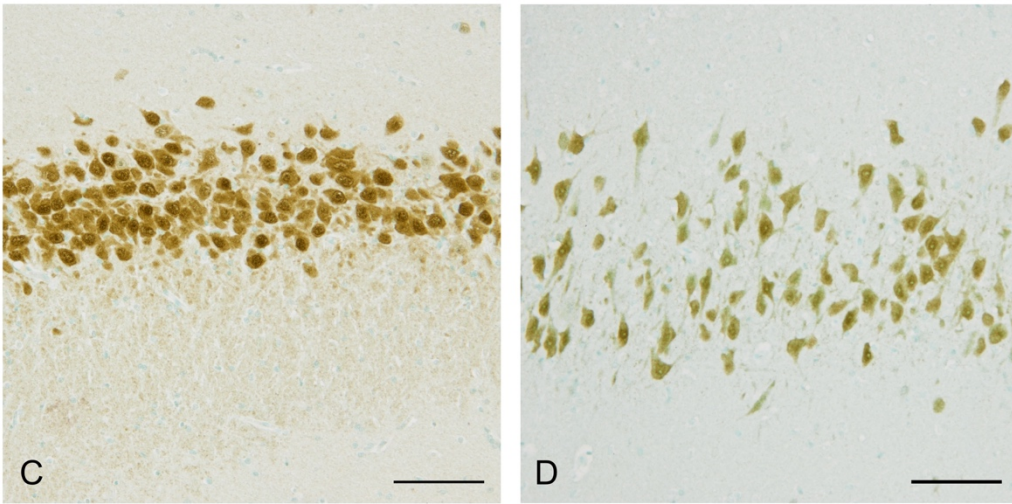
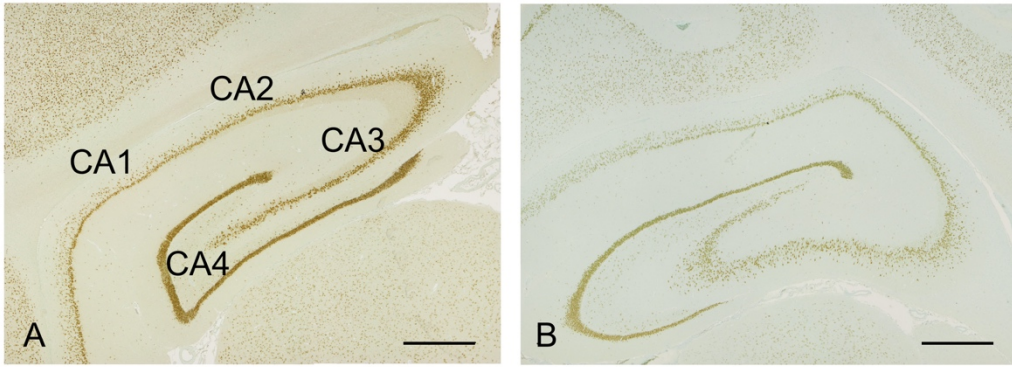


Figure 1. 代表的な健常猫 (A と C) および FSEC (B と D) における、海馬の全体像 (A と B) および CA3 亜領域 (C と D) における NeuN 免疫組織化学後の組織顕微鏡像、および 9 頭の健常猫 (白色箱) および 6 頭の FSECs (灰色箱) の海馬の背側 (E-H) および腹側面 (I-L) の CA1 (E と I), CA2 (F と J), CA3 (G と K), および CA4 (H と L) における NeuN 陽性細胞数の箱ひげ図。光学顕微鏡像において、錐体細胞層 (矢頭) または歯状回 (矢) において、明白な形態学的異常は認められなかったが、FSECs において健常猫と比較すると神経細胞密度は低かった。顆粒細胞の乖離現象は認められなかった。スケール、パネル A と B において 1,000 μm , パネル C と D において 100 μm . 箱ひげ図において、それぞれの箱は四分位範囲の上限および下限を示し、水平線は中央値を示し、ひげは外れ値を除いた最大値および最小値を示す。外れ値は円で示した。パネルごとに y 軸のスケールが異なることに注目。海馬の背側あるいは腹側面内の亜領域内において、健常猫の値と有意に値が異なる ($*P < 0.05$; $\dagger P < 0.01$). Ventral : 腹側, Dorsal : 背側, Controls : 健常猫

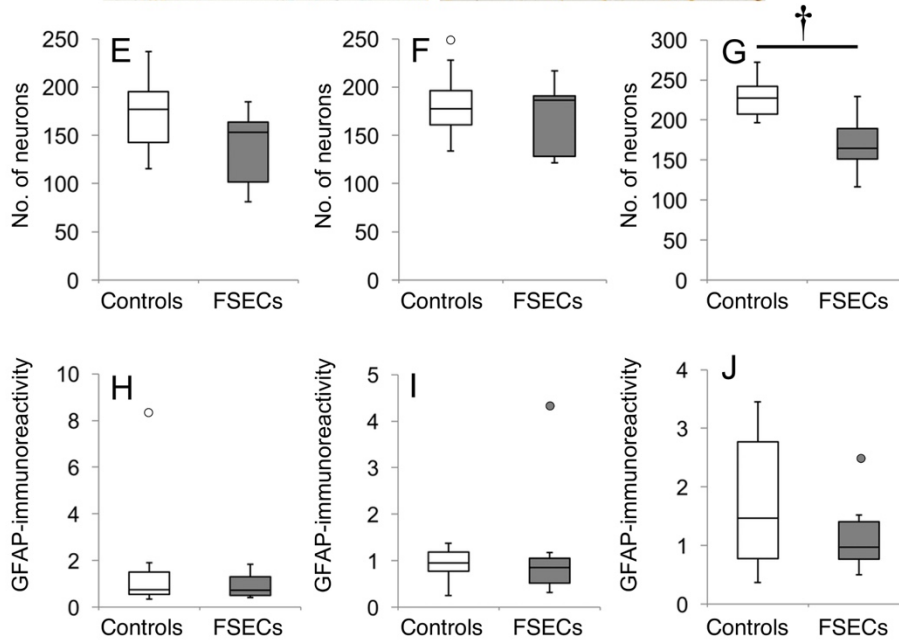
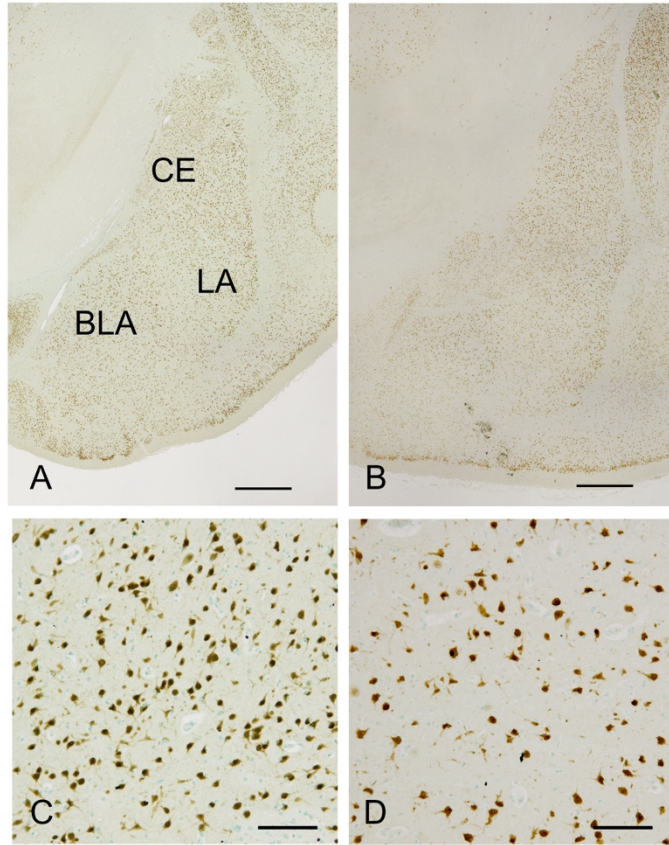


Figure 2. 代表的な健常猫 (A と C) および FSEC (B と D) における，扁桃体の全体像 (A と B) および中心核 (CE)，外側核 (LA)，および基底外側核 (BLA) (C と D) における NeuN 免疫組織化学後の組織顕微鏡像，および 9 頭の健常猫 (対照群；白色箱) および 6 頭の FSECs (FSEC 群；灰色箱) の扁桃体の基底外側核 (E と H)，外側核 (F と I)，および中心核 (G と J) における NeuN 陽性の神経細胞数 (E-G) および GFAP 免疫反応性 (H-J) の箱ひげ図。スケール，パネル A と B において 1,000 μm ，パネル C と D において 100 μm 。箱ひげ図において，パネルごとに y 軸のスケールが異なることに注目。残りの点に関しては **Figure. 1** を参照のこと。

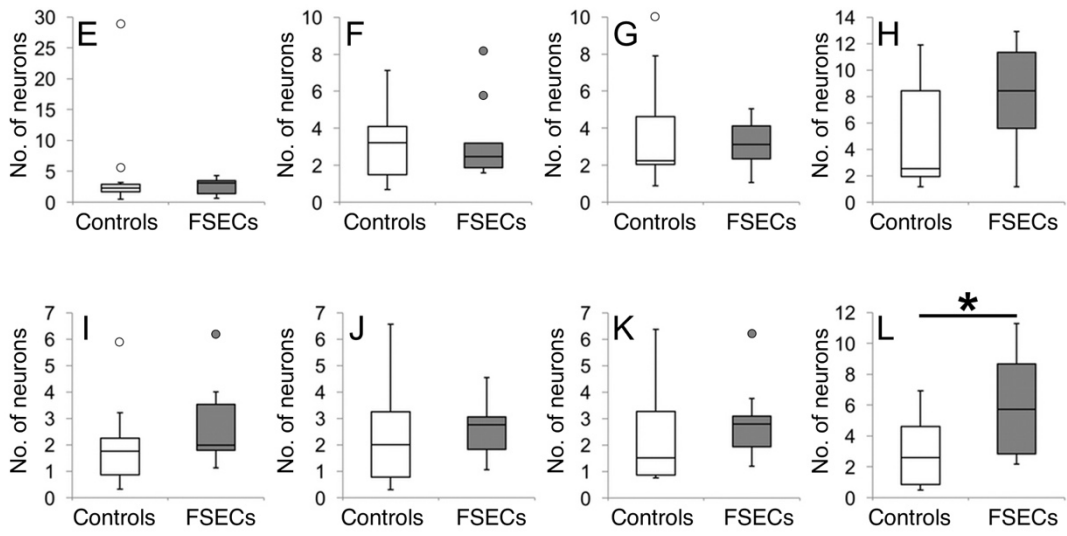
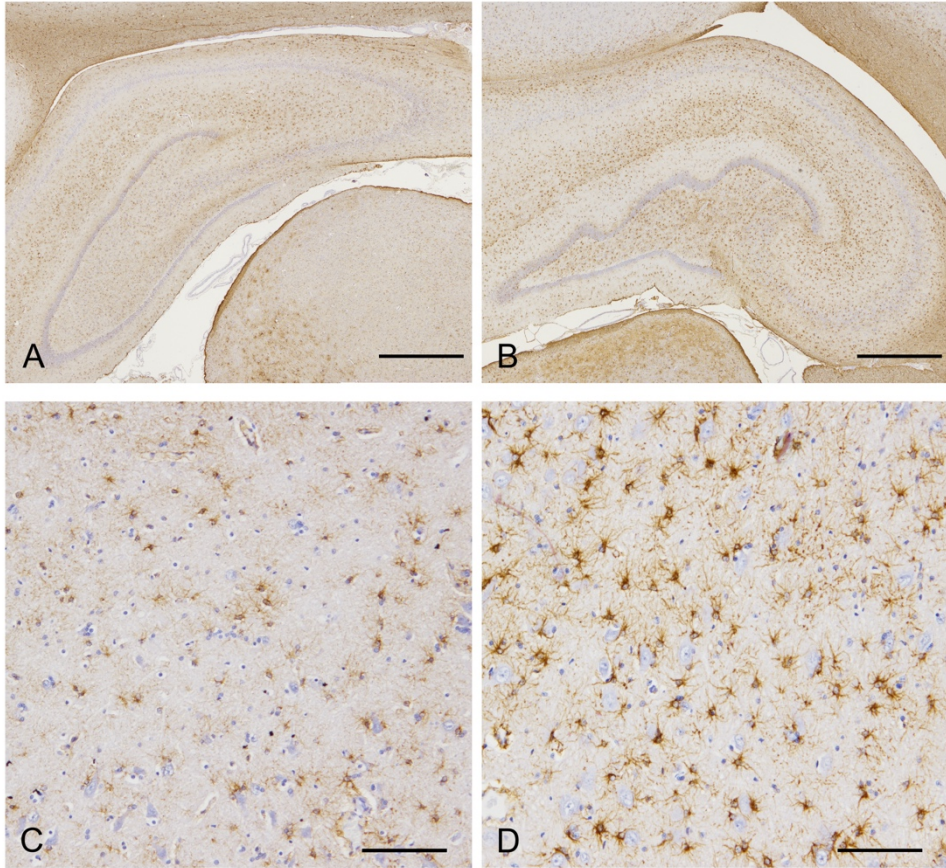


Figure 3. 代表的な健常猫 (A と C) および FSEC (B と D) における, 海馬の全体像 (A と B) および CA3 亜領域 (C と D) における GFAP 免疫組織化学後の組織顕微鏡像, および 9 頭の健常猫 (対照群 ; 白色箱) および 6 頭の FSECs (FSEC 群 ; 灰色箱) の海馬の背側 (E-H) および腹側面 (I-L) の CA1 (E と I), CA2 (F と J), CA3 (G と K), および CA4 (H と L) における GFAP 免疫反応性の箱ひげ図. スケール, パネル A と B において 1,000 μm , パネル C と D において 100 μm . 箱ひげ図において, パネルごとに y 軸のスケールが異なることに注目. 残りの点に関しては **Figure. 1** を参照のこと.

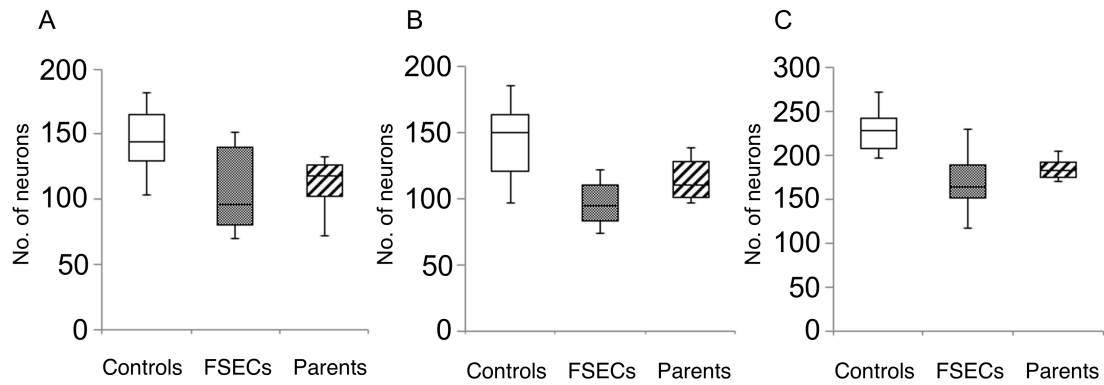


Figure 4. 9頭の健常猫 (対照群；白色箱)，6頭のFSECs (FSEC群；灰色箱)，およびFSECsの第一世代の臨床的発作を呈さない3頭の親における (パネルのx軸にParentsとして示されている) (斜線の箱)，海馬の背側 (A) および腹側 (B) 面におけるCA3および扁桃体の中心核 (C) における神経細胞数の箱ひげ図。パネルごとにy軸のスケールが異なることに注目。残りの点に関しては **Figure. 1** を参照のこと。

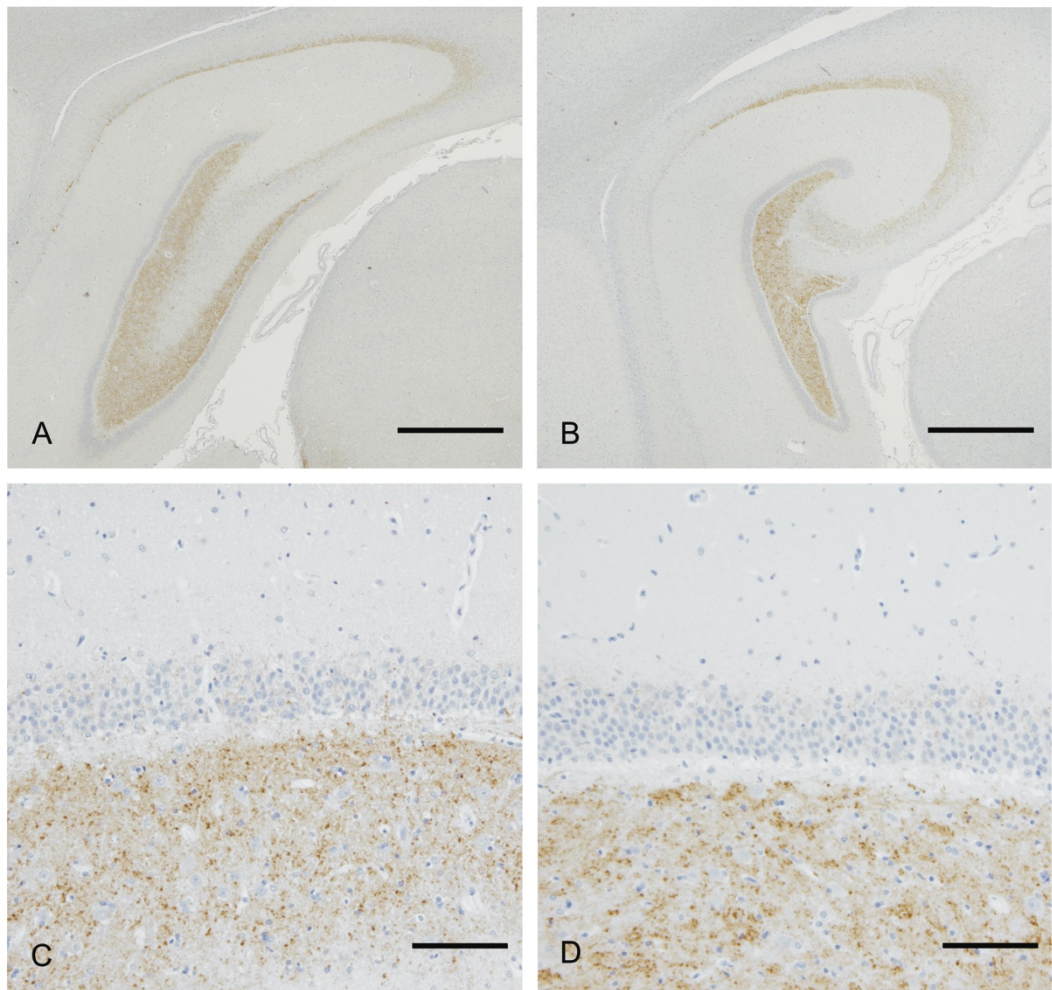


Figure 5. 代表的な健常猫 (A と C) および FSEC (B と D) における, 全体の海馬 (A と B) および海馬の腹側面 (C と D) での, dynorphin A に対する免疫組織化学染色後の組織の光学顕微鏡像. 苔状線維の発芽は認められなかった. スケール, パネル A と B において 1,000 μm , パネル C と D において 100 μm .

第3章

家族性自然発症性てんかん猫における leucine-rich glioma-inactivated (LGI) 遺伝子ファミリーのクローニングおよび変異解析

3.1 諸言

Leucine-rich glioma-inactivated (LGI) protein family (LGI1–4) は、脊椎動物における、シナプス伝達や髄鞘形成を含む、神経系の発達および機能において重要な役割を担っている遺伝子およびタンパクである。これらの遺伝子およびタンパクは、動物およびヒトにおける遺伝性てんかんや自己免疫性辺縁系脳炎といった神経疾患に関与している (Kegel et al., 2013; Pákozdy et al., 2015)。LGI1 は幾らかの家族性外側側頭葉てんかん (FLTE; familial lateral temporal lobe epilepsy, ADLTE; 常染色体顕性外側側頭葉てんかん autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy)の原因遺伝子であることが示唆されている (Kalachikov et al., 2002; Monrante-Redolat et al., 2002)。獣医学領域において、流涎、咀嚼、舌舐めずり、顔面けいれんを伴う反復性の辺縁系発作 (すなわち、突発性の口部顔面自動症) である feline complex partial seizures with orofacial involvement (FEPSO) とその重積による海馬壊死 feline hippocampal necrosis (FHN) が報告されており (Pákozdy et al., 2011; Pákozdy et al., 2013; Pákozdy et al., 2014), FEPSO/FHN の猫においては、電位依存性カリウムチャンネル (VGKC) / LGI 複合体に対する抗体価の上昇が認められることがある (Pákozdy et al., 2011)。そのため、FEPSO

は、人における辺縁系脳炎 limbic encephalitis (LE) に類似する VGKC/LGI1 複合体抗体介在性 LE に少なからず関与していると考えられる。さらには、FSEC は海馬の CA3 亜領域における神経細胞の減少が認められているのに対し (Hasegawa et al., 2014; Yu et al., 2018), 人における VGKC/LGI1 複合体抗体介在性 LE は限局的な CA3 萎縮に関連しており (Miller et al., 2017), 病因学的になんらかの関連性が存在する可能性も考慮される。

LGI2 におけるタンパク切断型ナンセンス変異が、ラゴット・ロマニョーロ犬における良性家族性若齢性てんかんの原因として同定されている (Seppälä et al., 2011)。さらに、*LGI4* は人における良性家族性小児けいれん benign familial infantile convulsion および小児欠神てんかん childhood absence epilepsy の感受性遺伝子として関与している可能性が報告されている (Gu et al., 2004; Ishii et al., 2010)。LGI3 タンパクは発達的および転写的に調節された様式で、正常なマウスの脳において高く発現しているものの (Lee et al., 2006), 人医学あるいは獣医学において *LGI3* と疾患との関与は報告されていない。LGI ファミリーは種間における相同性が高く、同様の構造を示すため (Kegel et al., 2013), 類似した機能を有し、その異常は種間で同様のてんかん罹患傾向を生じさせると考えられる。

本研究は、FSEC の病因が LGI タンパクファミリーの機能不全に関与しているという仮説 (Pakozydy et al., 2015) のもとに行われた。猫の LGI (fLGI) 遺伝子ファミリーの cDNA シーケンスはこれまでに報告されていないため、fLGI ファミリー遺伝子の cDNA をクローニングし、FSECs と健常猫において *fLGI* 変異解析を実施し、てんかんにおけるそれらの関与の有無を検討した。

3.2 材料および方法

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て行われている (承認番号 : 26K-29, 27K-10, 28K-4 ; 研究代表者 : 長谷川大輔).

3.2.1 供試動物およびサンプル採取

cDNA クローニングのために, FSEC とは関連のない健常猫の脳組織が採取され, 液体窒素にて瞬間凍結後, -80°C にて凍結保存された (本脳組織は, 第二章にて解析に用いられた健常猫のうちの 1 頭である). 変異解析のため, 8 頭の FSECs (雄 6 頭, 雌 2 頭, 中央年齢 95.5 ヶ月齢 [範囲 82–180 ヶ月齢], 中央体重 3.9 kg [範囲 3.0–5.6 kg]) および 8 頭の発作の既往歴を有さず, MRI および頭皮上脳波にて異常所見を認めず, FSEC との血縁関係を有さない健常猫 (雄 5 頭, 雌 3 頭, 中央年齢 73 ヶ月齢 [範囲 33–74 ヶ月齢], 中央体重 3.8 kg [範囲 3.0–6.0 kg]) の血液サンプルが供試された.

ゲノム DNA 抽出のため, 8 頭の FSECs および 8 頭の健常猫より, 0.5 ml の末梢血を頸静脈あるいは内股静脈穿刺にて採取し, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) チューブに移行した. FSECs における発作発症中央年齢は 8 ヶ月齢 (範囲 3–35 ヶ月齢) であった. 8 頭中 6 頭の FSECs は 2 つの発作型を呈し, 1 頭は全般性てんかん発作に移行する自発性辺縁系発作のみを呈し, 残りの 1 頭は前庭刺激誘発性全般性てんかん発作のみを呈した. 本研究に用いられたすべての FSECs は頭皮上脳波解析において発作間欠期突発性異常波を呈し, それらは側

頭領域で優位な発生が認められている。自発性発作の頻度は、個体ごとに様々であった (範囲 0–36 回/年)。

3.2.2 RNA 抽出および一本鎖 cDNA 合成

トータル RNA は Illustra RNAspin (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, England) を用いて、メーカー推奨のプロトコルに基づいて脳組織から抽出された。トータル RNA は ReverTra Ace reverse transcriptase (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて、一本鎖 cDNA に逆転写された。

3.2.3 *fLGI* cDNA のクローニング

fLGI1–4 遺伝子のオープン・リーディング・フレーム (ORF) を含むフラグメントの増幅のため、*Felis catus* *LGI1–4* 遺伝子の予測配列 (GenBank accession numbers: XM_003994222.3, XM_011281979.1, XM_003984713.3, および XM_003997904.3) に基づいて、Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) を用いて、プライマーが作成された。猫のリファレンス・ゲノム・アセンブリとして、*Felis_catus_6.2* (*felCat5*) あるいは *Felis_catus_8.0* (*felCat8*) が用いられた。脳 cDNA を鋳型として用いて、AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて行われた。PCR サイクル・コンディションは：初期熱変性 (95 °C, 10 分間)、に続いて、38 サイクルの熱変性 (95 °C, 30 秒)、アニーリング (30 秒)、および伸長反応 (72 °C, 60 秒)を行い、最終伸長 (72 °C, 7 分間) を行った。使用されたプライマーセットおよびそれぞれのアニーリング温度は Table 1 に記載

されている。PCR プロダクトは 2%アガロース・ゲル電気泳動にて確認され、アガロース・ゲルから分離され、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, WI, USA) を用いて抽出・精製された。

TA クローニングのため、cDNA フラグメントは pGEM-T Easy Vector System (Promega) および Competent high DH5 α (Toyobo) を用いて形質転換された。プラスミドは NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて、DH5 α cell から分離された。予測配列において、*fLGI2* の翻訳領域の 5'側領域が不明であったため、5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR が行われた。*fLGI2* の 5'側のシーケンスは SMARTer RACE 5'/3' Kit (Takara Bio) を用いて、メーカー推奨プロトコルに従い行われた。

3.2.4 末梢血からのゲノム DNA 抽出，変異解析のための PCR，および PCR プロダクトの精製

ゲノム DNA が QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、メーカー推奨プロトコルに従い、EDTA チューブに採取された 8 頭の FSECs および 8 頭の健常猫の末梢血より抽出された。PCR は前述されたものと同様の条件にて実施された。前述の cDNA プライマー作成と同様に、*fLGI1-4* 遺伝子の各々の予測ゲノム配列 (NC_018733.2, NC_018726.2, NC_018726.2, and NC_018737.2) に基づき、エキソン/イントロン境界部を包含するようにプライマーが設計された。PCR プロダクトの確認および精製に関しては、用いたアガロース・ゲル濃度が 1.8%であることを除いて、前述した方法と同様の条件で行

われた。プライマー・シーケンスおよびアニーリング温度は Table 2 に記載されている。

3.2.5 シーケンシング

精製されたプラスミド DNA および PCR プロダクトは BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて, Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) または 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) にてシーケンスされた。シーケンシングの結果は, CLC sequence viewer (Version 7.0; CLC Bio, Waltham, MA, USA) を用いて解析された。

3.2.6 他の種における fLGI ファミリーのアミノ酸配列の相同性

得られた fLGI アミノ酸配列に関して, 他種との比較ホモロジー解析を実施した。解析に用いられた他種および, それらのアミノ酸配列は Table 3 に記載されている。

3.2.7 fLGI 遺伝子で検出された変異のバイオインフォマティクス解析

検出された非同義置換の *in silico* 機能解析は SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant : <http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2 : <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), および PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer : <http://provean.jcvi.org/>) を用いて実施された。SIFT 解析において, アミノ酸置換は 0.05 以下のスコアであれば **damaging**, 0.05 を超えるスコアであ

れば tolerated と予測された。PolyPhen-2 のスコアは 0.0 (tolerated) から 1.0 (deleterious) の範囲で示され、PROVEAN では-2.5 が閾値として (つまり, -2.5 を越えれば neutral, -2.5 以下であれば deleterious) として用いられた。

3.3 結果

3.3.1 猫の LGI 遺伝子のコーディング・シーケンス

fLGI1-4 遺伝子の cDNA を用いてのクローニングおよびシーケンスを実施した。1頭の健常猫の脳組織由来の cDNA より得られた *fLGI1-4* のコーディング・シーケンスは DNA Databank of Japan に登録された (accession numbers : LC309277, LC309278, LC309279, および LC309280)。塩基配列解析により, *fLGI1* cDNA は 557 アミノ酸ペプチドをコードする 1674 base pair (bp) ORF, *fLGI2* cDNA は 549 アミノ酸ペプチドをコードする 1650 bp ORF, *fLGI3* cDNA は 548 アミノ酸ペプチドをコードする 1647 bp ORF, *fLGI4* cDNA は 538 アミノ酸ペプチドをコードする 1617 bp ORF をそれぞれ含んでいた。これら ORF が包含するエキソン構造数は, 予測配列と同数であった。ホモロジー解析により, *fLGI1-4* のアミノ酸配列はそれぞれ, 94.7, 92.7, 88.5, および 86.3 %の相同性が示した (Table 4)。さらに, *Homo sapiens* (人), *Canis familiaris* (犬), *Bos taurus* (牛), *Sus scrofa* (豚), *Equus caballus* (馬)といった哺乳類と比較した際, 概して 92%以上の相同性を認めた。

3.3.2 変異解析およびアレル頻度

fLGI2 のエキソン 1 を除いて、コーディング・シーケンスを包含する、すべてのエキソンが 8 頭の FSECs および 8 頭の健常猫由来のゲノム DNA より増幅された。RACE により *fLGI2* の開始コドンを含む領域は得られたものの、*fLGI2* のエキソン 1 のプライマーを設計することは、GC リッチ領域であったため不可能であった。PCR プロダクトは、*Felis_catus_8.0* (felCat8) における各遺伝子領域 (NC_018733.2, NC_018726.2, NC_018726.2, および NC_018737.2) と比較された。*fLGI* 遺伝子ファミリーのシーケンス解析は 41 のバリエーションを検出した。それらのうち、翻訳領域における 3 つの非同義置換および 14 の同義置換 SNP が認められた。これらの結果は Table 5 および Table 6 に記載された。

In silico 機能解析は *fLGI3* における 1 つの非同義置換 SNP (P33A) および *fLGI4* における 2 つの非同義置換 (A17T, E49K) について SIFT, PolyPhen-2, および PROVEAN を用いて行われた。SIFT によって、*fLGI3* における P33A は deleterious と予測され、*fLGI4* における A17T および E49K は tolerated と予測された (SIFT スコアはそれぞれ, 0.02, 0.26, および 0.27)。PolyPhen-2 では、*fLGI3* における P33A は benign, *fLGI4* における A17T および E49K はそれぞれ unknown, benign と予測された (PolyPhen-2 スコアはそれぞれ, 0.002, not available, 0.948)。PROVEAN では、すべての SNPs は neutral と予測された (PROVEAN スコアは, -0.528, -0.346, および 0.948 であった)。これらの結果は Table 5 に記載された。

3.4 考察

LGI タンパクはシナプス伝達における重要な役割を担っていることが知られており、それらの機能不全によって神経細胞の過剰興奮が引き起こされ得る (Pákozdy et al., 2015). *LGII* 変異は人における ADLTE を引き起こし (Kalachikov et al., 2002; Monrante-Redolat et al., 2002), *LGII* コンディショナル・ノックアウト・マウスは海馬を発作起始領域とするてんかん性放電を呈することが報告されている (Boillot et al., 2014). FSECs は海馬や扁桃体を発作起始領域とするてんかん発作を示す (Hasegawa et al., 2014). したがって、これらの知見は *LGII* 機能不全が内側側頭葉を発作起始領域のてんかんを引き起こす可能性があることを示唆する. *LG13* と疾患発生との関連性は未だ不明であるものの、その他の *LGI* 遺伝子ファミリーの変異は、人および動物のどちらにおける遺伝性てんかんにも関与している (Kalachikov et al., 2002; Monrante-Redolat et al., 2002; Gu et al., 2004; Ishii et al., 2010; Seppälä et al., 2011).

ホモロジー解析によって、猫の *LGI* アミノ酸配列は他の動物種における、それらと相同性が高く、特に *Homo sapiens*, *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Sus scrofa*, および *Equus caballus* との間での比較では 90%以上の相同性を示した. これは、*LGI* ファミリーの分子はそれぞれが他の種においても類似した機能を有することを示唆する. 本研究では変異解析において、その高い GC 含有量のためプライマーを設計できなかった *fLGI2* のエキソン 1 を除いて、*fLGI1-4* のエキソンおよびエキソン/イントロン境界部のみを評価している. このため、*fLGI* 遺伝子ファミリーのゲノム領域内に存在するハプロタイプが FSEC の疾患発生に関与している可能性を否定することはできない. さらに、スプライシン

グ異常を引き起こすイントロン領域の変異の存在も除外できない。加えて、*fLGI4* における E49K (c.145G>A) は3頭の FSECs において認められており、この変異がてんかんのリスクを上昇させている可能性は否定はできない。

本研究では、これら *fLGI* 遺伝子ファミリーにおいて、FSEC の表現型と完全に合致する翻訳領域における変異は認められなかった。一方で、獣医学領域では猫の TLE における *VGKC/LGI1* 複合体抗体介在性 LE (Pákozdy et al., 2013), およびラゴット・ロマニョーロ犬における *LGI2* 変異による良性家族性若齢性てんかん (Seppälä et al., 2011) の2つが *LGI* 遺伝子/タンパクに関連した疾患として知られている。さらに *LGII* 変異 (L385R) を呈するラットは聴性誘発性全般性強直間代性発作を示すことが報告されている (Baulac et al., 2012)。*LGI* 遺伝子/タンパクと動物における疾患との関係性の把握にはさらなる研究が必要とされる。

人において、常染色体顕性遺伝様式および複雑遺伝様式を含む、いくらかの家族性側頭葉てんかんが報告されている (Berkovic et al., 1996; Baulac et al., 2004; Striano et al., 2008; Crompton et al., 2010)。FSEC 発見時の初期の家系解析では、FSEC は常染色体潜性遺伝である可能性が示唆されていたが (Kuwabara et al., 2010), 現在の拡大した家系では、低浸透度の常染色体顕性遺伝あるいは複雑遺伝といった、その他の遺伝様式の可能性が示唆されている。これまで数多くの人の FMTLE 家系を対象として遺伝学的研究が行われてきており、連鎖解析を用いて大家系においていくらかの座位が示唆されている (Claes et al., 2004; Hedera et al., 2007; Chahine et al., 2013; Fanciulli et al., 2014a)。これらのほとんどの座位は別家系では再現されておらず、FMTLE の遺伝学的不均一性 genetic

heterogeneity を示唆する。これら研究のうちの1つのみで連鎖解析に加え全エクソームシーケンス whole exome sequencing が実施されが、連鎖解析により示唆された領域において原因であると推測されるバリエントは認められなかった (Fanciulli et al., 2014a)。連鎖解析と全ゲノムシーケンス whole genome sequencing を組み合わせることで、翻訳領域外の調節バリエント regulatory variants あるいはリスク・ハプロタイプ、またゲノム再編成 genome rearrangement といった病因を FMTLE において認めることができるかもしれない。近年、猫 SNP アレイの登場により SNP マーカーを用いての、ゲノムワイド連鎖解析や、伝達不平衡試験 transmission disequilibrium test およびケース・コントロール試験 case control study を含むゲノムワイド関連解析 genome-wide association analysis が可能となり、さらに全ゲノムシーケンスの普及により、猫の遺伝性疾患および遺伝的特性の解明が進んでいる (Alhaddad et al., 2014; Lyons et al., 2016a)。これらの技術の利用が FSECs の遺伝学的解析をさらに進めることとなるだろう。

3.5 小括

- 猫の LGI1-4 遺伝子をクローニングしシーケンシングを実施した。
- 変異解析において、LGI 遺伝子ファミリーにおいて非同義置換を認めた
が、これらは FSECs における疾患発生に関与するものではなかった。
- 本研究により、LGI ファミリー遺伝子の翻訳領域内の単一の変異とは関連
のない FMTLE の存在がさらに認識された。

- FSECs におけるてんかんに関与する遺伝子の同定には，連鎖解析，伝達不平衡試験，そして次世代シーケンシングの組み合わせといったゲノムワイドな戦略が必要である。

Table. 1 *fLGI1-4* の ORF クローニングに用いられたプライマー.

Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Annealing Temperature (°C)
LGI1-R1-F	CCAGAAGCCCTGTTCATGTT	598	53
LGI1-R1-R	TCCACCAGCCACTTCAGTTT		
LGI1-R2-F	TTTCAAAGGCCTGGATTCTTT	591	51
LGI1-R2-R	CCAGCTTTTGAAGTGCAGC		
LGI1-R3-F	CCAGAAGCCCTGTTCATGTT	594	51
LGI1-R3-R	TCCACCAGCCACTTCAGTTT		
LGI1-R4-F	AACTGGGATGCAGAAAAAGC	574	51
LGI1-R4-R	TCAGCATCCATCACCAAGAA		
LGI2-5'RACE	GATGTCGCCCCGGCACGATCCTGGGC	229	*
LGI2-R1-F	CACTTGCAGCTGTACCAAGG	473	57
LGI2-R1-R	CGATGCACAGGACGTCAG		
LGI2-R2-F	CTCCCAAGGGATGTCTTCAG	592	57
LGI2-R2-R	TGTCTGCGATGACGAAGAAC		
LGI2-R3-F	CCTCATTGACGACCAGGTTT	592	57
LGI2-R3-R	CAGGGCCAGGTAGTGGTTAT		
LGI2-R4-F	TGCAGAATGCCCTCTACCTT	566	57
LGI2-R4-R	TAAATGGGAGAACGGACACG		
LGI3-R1-F	AGAGCTTGCTTGCAGTCAG	403	51
LGI3-R1-R	GATAGTGCCAGATGTCATT		
LGI3-R2-F	GTTGCTCAACTCCAACAAGT	600	52
LGI3-R2-R	TACAGCTGGCTGTCTACCA		
LGI3-R3-F	TCCTCAAGTGGGACTATGTT	568	52
LGI3-R3-R	ATCTTGGAGTCACCGATGTA		
LGI3-R4-F	CTGTGAAACACTTCCGTGCT	600	52
LGI3-R4-R	CCTGGTGCGTATAACAAGTCT		
LGI4-R1-F	CTGGCATGGGACGTGTAGTG	549	58
LGI4-R1-R	GAGGTCCACATGAGTTAGGGTCT		
LGI4-R2-F	GGACTTCGCTCACTCACACA	708	55
LGI4-R2-R	GCTCTGGCGAGGGTAGAAG		
LGI4-R3-F	GTCCTCACCTGGGACTACAG	696	55
LGI4-R3-R	GACCTGACTGAAGGCGAAGT		
LGI4-R4-F	GCTACATCGGGGACTCCAT	491	50
LGI4-R4-R	GTCTTGAACTCGGCCTGTG		

* : RACE において、アニーリングは 70 °C, 5 サイクルに続き、68 °C, 20 サイ

クルを行った。

Table. 2 *fLGI1-4* の変異解析における, PCR およびシーケンシングに利用したプライマー.

Primer		Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Annealing Temperature (°C)
LGI1				
Exon1	Forward	AAAGCCATCCTATTTTTGGTAAC	683	55
	Reverse	CCCTCCTACCGATACATACAAA		
Exon2	Forward	GCTAAACCGGATTAACATAAGG	287	50
	Reverse	CTTTTTCTTCCAGAAACACAGT		
Exon3&4	Forward	GACAGACACCTAGACACTTTTCC	496	55
	Reverse	AAGTATGCATGGAGAGAAATCAT		
Exon5	Forward	TCGGGAAAGAATAAAAAGGGACTTAT	248	58
	Reverse	ATTCTAATCCTCAATACCAGGCTTC		
Exon6	Forward	CATGTGTTAATTGCTGAAGTAAAGT	372	48
	Reverse	TTTTAAAAATTAAATCGGTCAGTTG		
Exon7	Forward	TTGTGTGTTTAAAAGCAAAGTAAA	384	52
	Reverse	CCCTATAACCACTTGTCTTTTTTC		
Exon8_1	Forward	CTGTTCACCAAGGAAATCTCTTAT	667	52
	Reverse	ATTCATTACTTTGGAATCACCAAT		
Exon8_2	Forward	CAACACAATTATTAATAACCAAAC	586	52
	Reverse	CAGTTAAGGATGGAGATACTGGTAG		
LGI2				
Exon2	Forward	AGTGGAGGAGTTTGAAATACAG	198	54
	Reverse	AGAGAGAACATCCCATACTCAC		
Exon3	Forward	GTAAATCTCTGCATTGAAATCTGTC	200	56
	Reverse	CTCTAAGAGATGCTGTTCTGCT		
Exon4	Forward	GAATGATACTGCTGTTCTCTTTAG	181	54
	Reverse	CTTAGTTTCCTTGAGAGAATGTTAC		
Exon5	Forward	GCCTGAGGATAATAACCACATTAAC	290	54
	Reverse	CTCTATGAAGAGTCAAATGCTCAAC		
Exon6	Forward	GATGTTAAATCATCGTATTCCTGCT	399	54
	Reverse	CTTTAGAACGCTTAAATGTCACCTA		
Exon7	Forward	TGTCTCAGAGAAGAGAATGTAGAAG	593	52
	Reverse	GTTTCTGTTCTCACCAATAACTGAC		
Exon8_1	Forward	CTTTACATCTCTCCCCGTTTTAC	498	52
	Reverse	CTTTTATCCACTGGAGGATGAT		
Exon8_2	Forward	AAAGGATTCTACTCCTACCAGTC	566	52
	Reverse	CTTCACAAACTTAAGTCAACGACTA		
LGI3				
Exon1	Forward	GAGGGTTGGAGGACTCG	480	53
	Reverse	CTCCCCACGCTTTGTAG		
Exon2	Forward	GTTTATGAGGAGAAGAGAAAGATAG	398	52
	Reverse	CTATCCCATCCAGTAAAAGTAAG		
Exon3	Forward	CTGTTTCTACCCTTGAAGAAGAT	520	52
	Reverse	ATTCTGATTCTGGAGACATTAAG		
Exon4&5	Forward	CAGAAATCTAGATGGAGCAGAG	500	53
	Reverse	CATAGTGTCTCGTGTGTATCAAC		
Exon6&7	Forward	ACCTACTTCTAAAAACCTAGAGAGC	672	54
	Reverse	CTCTCTACCTATAGGAACCCACT		
Exon8_1	Forward	AGACAGATTATTAGCTGTGAAAAGT	693	51
	Reverse	ATCTTGGAGTCACCGATGTA		

Exon8_2	Forward	ACCTGTCATCTATCAGTGGAG	680	53
	Reverse	CCTGGTGCGTATAACAAGTCT		
LGI4				
Exon1	Forward	CTGGCATGGGACGTGTAGT	379	53
	Reverse	ATCCCAACATCCTTTGCTG		
Exon2&3	Forward	CTGGGATGTAAAGGAAATACAT	615	52
	Reverse	CGTGCCAGTAAGTCTCTATACC		
Exon4&5	Forward	CTCCTGGGATTGTAGTCTGG	535	53
	Reverse	AACTTAGTTATGTCAACCGAAAGT		
Exon6	Forward	GTCCTCACATATTCCTCACTC	498	52
	Reverse	ACTGTTTATTACCTCCATTTTACAG		
Exon7&8	Forward	CTGTAGATCAAAAGATTCGCTAT	695	52
	Reverse	CTCTGGCGAGGGTAGAAG		
Exon8	Forward	GTGTCCTGCAAGCCACTG	588	55
	Reverse	GTCGGTGCTGAAAGACCA		
Exon9	Forward	GTGACATGTGTGAAGGTAAGAA	639	52
	Reverse	GTTGCTTCAGACTGGAAGTT		

Table. 3 ホモロジー解析に用いられた LGI タンパクのアミノ酸配列

Species	LGI1	LGI2	LGI3	LGI4
<i>Homo sapiens</i>	NP_005088.1	NP_060646.2	NP_644807.1	NP_644813.1
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_665712.1	NP_001100689.2	NP_001100747.1	NP_955793.1
<i>Mus musculus</i>	NP_064674.1	NP_659194.1	NP_660254.1	NP_653139.2
<i>Canis familiaris</i>	XP_534971.2	XP_013967830.1	XP_543254.3	XP_541696.2
<i>Bos taurus</i>	NP_001040056.2	NP_001179745.1	XP_015320076.1	NP_001096771.1
<i>Sus scrofa</i>	XP_001928756.1	XP_020956221.1	XP_003132845.2	XP_020952816.1
<i>Equus caballus</i>	XP_001502450.3	XP_014594043.1	XP_001491042.1	XP_001491349.1
<i>Gallus gallus</i>	NP_001038120.1	NP_001244245.1	XP_015128838.1	N/A
<i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001072366.1	NP_001096394.1	N/A	NP_001039090.1

N/A : 該当なし

Table. 4 他種における LGI ファミリーのアミノ酸配列の相同性

種	LGI1 (%)	LGI2 (%)	LGI3 (%)	LGI4 (%)
<i>Homo sapiens</i>	99.3	96.2	97.6	93.5
<i>Rattus norvegicus</i>	97.1	95.1	96.5	88.1
<i>Mus musculus</i>	97.1	85.7	97.1	89.0
<i>Canis familiaris</i>	100.0	96.8	96.9	96.1
<i>Bos taurus</i>	95.0	96.2	96.7	92.9
<i>Sus scrofa</i>	99.1	96.6	98.4	92.8
<i>Equus caballus</i>	99.5	97.5	98.0	92.9
<i>Gallus gallus</i>	84.5	87.0	73.9	N/A
<i>Xenopus tropicalis</i>	80.7	81.6	N/A	43.7
平均	94.7	92.7	88.5	86.3

N/A : 該当なし

Table. 5 FSECs およびコントロールの *FLGII-4* における非同義置換 SNPs のア
 リルおよびジェノタイプの分布

	ヌクレオ チド	アミノ 酸	SIFT	PolyPhen-2	PROVEAN	サンプル 群(n)	ジェノタイプ頻度			アレル頻度	
							C/C	C/G	G/G	f(C)	f(G)
LGI3	c.97C>G	p.P33A	Deleterious	Benign	Neutral	FSECs(8)	8	0	0	1	0
						Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
LGI4	c.49G>A	p.A17T	Tolerated	Unknown	Neutral	FSECs(8)	G/G	G/A	A/A	f(G)	f(A)
						Controls(8)	8	0	0	1	0
	c.145G>A	p.E49K	Tolerated	Benign	Neutral	FSECs(8)	G/G	G/A	A/A	f(G)	f(A)
						Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
						G/G	G/A	A/A	f(G)	f(A)	
						Controls(8)	5	3	0	0.8125	0.1875
						Controls(8)	8	0	0	1	0

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant): <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2): <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer): <http://provean.jcvi.org/index.php>

Table. 6 FSECs およびコントロールの *fLGI1-4* におけるイントロン領域の SNPs および同義置換 SNPs のアレルおよびジェノタイプの分布

	Nucleotide	Amino Acid	Accession #	Group (n)	Genotype frequencies			Allele frequencies	
					G/G	G/T	T/T	f(G)	f(T)
LGI1	c.431+9G>T	—	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	6	2	0	0.875	0.125
	c.431+51_55del	—	—	FSECs(8)	8		0	—	—
				Controls(8)	7		1	—	—
	c.492T>C	p.S164S	—	FSECs(8)	4	3	1	0.6875	0.3125
				Controls(8)	8	0	0	1	0
LGI2	c.281+20T>G	—	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
	c.281+67T>G	—	—	FSECs(8)	6	2	0	0.875	0.125
				Controls(8)	4	4	0	0.5	0.5
	c.353+31T>C	—	—	FSECs(8)	0	2	6	0.125	0.875
				Controls(8)	0	3	5	0.1875	0.8125
	c.497+15T>C	—	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
	c.497+21A>G	—	—	FSECs(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
				Controls(8)	5	3	0	0.8125	0.1875
	c.501C>T	p.D167D	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	6	1	1	0.8125	0.1875
	c.576G>T	p.T192T	—	FSECs(8)	4	4	0	0.75	0.25
				Controls(8)	4	4	0	0.75	0.25
	c.667+19G>T	—	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
	c.813G>A	p.R271R	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	6	1	1	0.8125	0.1875
	c.813+22T>C	—	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	6	1	1	0.8125	0.1875
				C/C	C/T	T/T	f(C)	f(T)	

LG13	c.906C>T	p.G302G	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
					T/T	T/C	C/C	f(T)	f(C)
	c.1317T>C	p.S439S	—	FSECs(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
				Controls(8)	6	2	0	0.875	0.125
					C/C	C/G	G/G	f(C)	f(G)
	c.1398C>G	p.R466R	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	4	0	4	0.5	0.5
					A/A	A/G	G/G	f(A)	f(G)
	c.*32A>G	—	—	FSECs(8)	2	2	4	0.375	0.625
				Controls(8)	0	4	4	0.5	0.5
					C/C	C/T	T/T	f(C)	f(T)
	c.*53C>T	—	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
					G/G	G/A	A/A	f(G)	f(A)
	c.*55G>A	—	—	FSECs(8)	4	4	0	0.5	0.5
				Controls(8)	2	3	3	0.4375	0.5625
					C/C	C/A	A/A	f(C)	f(A)
	c.*57G>A	—	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0
				Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
				G/G	G/A	A/A	f(G)	f(A)	
c.-87G>A	—	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0	
			Controls(8)	5	3	0	0.8125	0.1875	
				C/C	C/G	G/G	f(C)	f(G)	
c.350+134C>G	—	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0	
			Controls(8)	5	3	0	0.8125	0.1875	
				T/T	T/C	C/C	f(T)	f(C)	
c.422+27T>C	—	—	FSECs(8)	4	1	3	0.5625	0.4375	
			Controls(8)	6	1	1	0.8125	0.1875	
				A/A	A/G	G/G	f(A)	f(G)	
c.494+44A>G	—	—	FSECs(8)	4	1	3	0.5625	0.4375	
			Controls(8)	6	1	1	0.8125	0.1875	
				G/G	G/A	A/A	f(G)	f(A)	
c.600G>A	p.P200P	—	FSECs(8)	4	1	3	0.5625	0.4375	
			Controls(8)	5	2	1	0.75	0.25	
				C/C	C/T	T/T	f(C)	f(T)	
c.1017C>T	p.G339G	—	FSECs(8)	8	0	0	1	0	
			Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625	
				T/T	T/G	G/G	f(T)	f(G)	
c.1056T>G	p.G352G	—	FSECs(8)	4	2	2	0.625	0.375	
			Controls(8)	2	2	4	0.375	0.625	
				T/T	T/C	C/C	f(T)	f(C)	
c.1582T>C	p.L528L	rs785566903	FSECs(8)	2	2	4	0.375	0.625	
			Controls(8)	2	4	2	0.5	0.5	
				C/C	C/T	T/T	f(C)	f(T)	
c.174-9C>T	—	—	FSECs(8)	4	4	0	0.5	0.5	
			Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625	

				A/A	A/G	G/G	f(A)	f(G)
c.318-46A>G	—	—	FSECs(8)	4	4	0	0.5	0.5
			Controls(8)	7	0	1	0.875	0.125
				T/T	T/C	C/C	f(T)	f(C)
c.318-9T>C	—	rs785273308	FSECs(8)	4	4	0	0.5	0.5
			Controls(8)	5	2	1	0.75	0.25
				A/A	A/G	G/G	f(A)	f(G)
c.389+61A>G	—	—	FSECs(8)	4	4	0	0.5	0.5
			Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
				A/A	A/C	C/C	f(A)	f(C)
c.390-55A>C	—	rs785205043	FSECs(8)	4	4	0	0.5	0.5
			Controls(8)	5	2	1	0.75	0.25
				G/G	G/A	A/A	f(G)	f(A)
c.513G>A	p.L171L	—	FSECs(8)	4	4	0	0.5	0.5
			Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
				A/A	A/G	G/G	f(A)	f(G)
c.631+62A>G	—	—	FSECs(8)	4	4	0	0.5	0.5
			Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
				A/A	A/G	G/G	f(A)	f(G)
c.632-68A>G	—	—	FSECs(8)	4	4	0	0.5	0.5
			Controls(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
				C/C	C/T	T/T	f(C)	f(T)
c.1008C>T	p.D336D	—	FSECs(8)	7	1	0	0.9375	0.0625
			Controls(8)	4	4	0	0.5	0.5
				G/G	G/A	A/A	f(G)	f(A)
c.1137G>A	p.L378L	—	FSECs(8)	6	2	0	0.875	0.125
			Controls(8)	0	6	2	0.375	0.625

第4章

家族性自然発症性てんかん猫における疾患関連座位同定のためのゲノムワイド 関連解析

4.1 諸言

SNP アレイの登場により，ゲノムワイド関連解析 genome-wide association study (GWAS) が可能となり，多くの疾患の座位が同定されている．GWAS には，ケース・コントロール研究 case control study および伝達不平衡試験 transmission disequilibrium test (TDT) といった統計解析方法が含まれ，これらの解析方法は，‘common disease common variant hypothesis’ と呼ばれる，多くの一般的なバリエントが疾患に対して少なからずリスクとして寄与しており，疾患の遺伝学的感受性に関与しているという仮説に基づいている．ケース・コントロール研究は，多くの一般的な疾患 (例えば，糖尿病，統合失調症，そして多くの自己免疫性疾患) における，疾患感受性遺伝子の同定に寄与してきた (Visscher et al., 2017)．また，少なくとも1人の罹患している子どもと未発症の両親などの家系サンプルが利用可能な場合には連鎖不平衡 linkage disequilibrium の伝達を検出する TDT が適応可能となる (Spielman et al., 1993)．

人医学において，GWAS を利用したてんかん関連遺伝子の同定の例として，トリオを対象とした GWAS (つまり，TDT) においては，小児欠伸てんかん childhood absence epilepsy と *GABRB3* (gamma-aminobutyric acid type A receptor

beta3 subunit) プロモーター領域におけるリスク・ハプロタイプの関連性の検出 (Urak et al., 2006) や全般性てんかん熱性けいれんプラス generalized epilepsy with febrile seizures plus におけるてんかん関連座位の同定 (Audenaert et al., 2005) が挙げられる。そして、ケース・コントロール研究を用いた GWAS では、大規模集団を対象とするてんかん関連座位の検出を目的とした研究が報告されている (Kasperaviciūte et al., 2010; Guo et al., 2011; EPICURE Consortium et al., 2012)。さらには、メタ解析 (International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies, 2014) においても、焦点性てんかんではゲノムワイドに有意な関連は認められなかったものの、素因性全般性てんかんに関連するピークを認めている。獣医学領域においてもラゴット・ロマニョーロ犬の良性家族性若齢性てんかん benign familial juvenile epilepsy において、26,578 SNPs を含む低密度の犬 SNP アレイを用いて同胞対である 22 頭の犬を対象とした同胞 TDT を実施することで、てんかん関連座位を同定し、最終的に原因遺伝子である *LGI2* (leucine rich repeat LGI family member 2) の変異を同定した (Seppälä et al., 2011)。さらに、ベルジアン・シェパードの特発性てんかんにおいて、より多くの SNPs のジェノタイピングが可能な高密度 SNP アレイを利用することで、てんかん関連座位の同定 (Seppälä et al., 2012)、さらにはターゲット・リシークエンシングを組み合わせることで *ADAM23* (ADAM metallopeptidase domain 23) におけるリスク・ハプロタイプの同定に至っている (Koskinen et al., 2015)。

猫の 62,897 SNPs のジェノタイプが可能な Illumina Infinium iSelect 63K SNP Array (Illumina, San Diego, CA, USA) (以下、Feline 63K SNP Array) の登場により、猫においても SNP マーカーを用いた GWAS が可能となり、これまでに多

くの遺伝性疾患および遺伝学的形質の原因遺伝子の同定が行われてきている (Gandolfi et al., 2012; Gandolfi et al., 2013a; Gandolfi et al., 2013b; Alhaddad et al., 2014; Abitbol et al., 2015; Gandolfi et al., 2016a; Gandolfi et al., 2016b; Lyons et al., 2016a). なかでも, ペルシャ猫の進行性網膜萎縮を呈する大家系において, Feline 63K SNP Array を用いての GWAS および連鎖解析による疾患関連座位の同定が報告されており (Alhaddad et al., 2014), 大家系を呈する FSEC における Feline 63K SNP Array の利用は, 猫の家族性てんかんに対する新たな遺伝学的知見をもたらすことが予想される. 本研究では, Feline 63K SNP Array を用いて, TDT およびケース・コントロール研究といった GWAS を行うことにより, FSEC のてんかん関連座位の検出を試みた.

4.2 材料および方法

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会, 生命倫理委員会の承認 (承認番号: 28K-4, 29K-4, 30K-4; 研究代表者: 長谷川大輔) および日本獣医生命科学大学附属動物医療センター倫理委員会の承認 (28-5; 研究代表者: 長谷川大輔) を得て行った. また本研究における Feline 63K SNP Array (Illumina, San Diego, CA, USA) の使用に関しては, Morris Animal Foundation (Denver, CO, USA) より承認を得ている (Grant ID #D17FE-553).

4.2.1 Feline 63K SNP Array でのジェノタイピングに用いたサンプルの採取, およびそれらの臨床的特徴

SNP アレイでのジェノタイピングのため、合計 96 頭の猫の DNA が採取された。

48 頭の DNA は日本獣医生命科学大学にて FSEC コロニーとして維持されている、あるいは維持されていた FSEC に由来する； 39 頭の FSECs, 9 頭の FSECs の発作が確認されていない親猫からなる。生存している 30 頭の FSECs および 9 頭の FSECs の親猫から EDTA 全血が採取され、さらに生存していない 9 頭の FSECs の DNA サンプルとして、-20 °C または -80 °C にて冷凍保存されている EDTA 全血 (n = 13), Whatman FTA elute card (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) にて室温保存されている血痕サンプル (n = 3), および -80 °C にて冷凍保存されている極少量の末梢血単核細胞 (PBMC) (n = 2) を用いた。FSEC の家系図は Figure. 1 に示した。

FSEC の創始動物が発見された元のコロニー頭数において 8 頭の猫の発作 (少なくとも 1 回の発作) が報告されたため、それらの血液をコロニーを所有する実験動物配給業者より入手した。家系図解析より、それらの 8 頭のうち 5 頭は FSEC の同腹 sibling であり、1 頭は半同胞 half sibling であり、1 頭は FSEC の子孫であり、1 頭はてんかん発作を呈する子孫を持つ猫の同腹であった。これら 8 頭は実験動物配給業者コロニーでの発作記録 (少なくとも 1 回以上), および家系図解析により共通の祖先を有するということから同じ遺伝学的素因を持つと推測されたため、本研究に含められ、ジェノタイプされた。

FSEC の創始者が発見された元のコロニーにて維持されている 25 頭の EDTA 全血(2mL/個体) を入手した。これら 25 頭の猫は FSEC コロニーと緊密ではないものの幾らかの血縁関係を呈している。これら 25 頭には発作の経歴は

なく、かつ FSEC のいずれの猫より 3 親等あるいはそれ以上離れているとされている。しかしながら、これら猫に関する詳細な臨床的評価 (すなわち、脳波および MRI) は行われていない。

コロニー以外の 48 頭のうち 15 頭は、FSEC とは血縁関係がない猫であるが、FSEC の由来とする品種 (つまり、アビシニアン、アメリカン・ショートヘア、シャム猫、ロシアン・ブルー) が選択された。それらは日本獣医生命科学大学附属動物医療センターにて、特発性てんかんを有しないと推定され、それら以外の疾患のため来院した。この検体採取に関しては、飼い主に趣旨説明を行った後、書面による同意を得ている。

4.2.2 DNA 抽出および SNP ジェノタイピング

DNEasy Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) あるいは QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて、EDTA 全血あるいは PBMC からの DNA 抽出を行った。3 頭の DNA は、Whatman FTA elute card よりメーカー推奨のプロトコルに従い抽出された。さらに、Whatman FTA elute card より抽出された DNA は、NucleoSpin gDNA Clean-up XS (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を用いて濃縮され、さらに GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて全ゲノム増幅された。DNA の質および濃度は、アガロース・ゲル電気泳動にて視覚的に評価された。合計 96 頭のすべての DNA は RIKEN GENESIS (東京, 日本) にてジェノタイプされた。

4.2.3 ジェノタイピング・データのクオリティ・コントロール

ジェノタイプされた全ての SNPs は、R (version 3.3.3 ; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ; <https://www.r-project.org/>) を用いて、最新の猫ゲノム・アセンブリ (Felis_catus_9.0 ; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000181335.3) にリマッピングされた。ジェノタイピング率およびマイナーアレル頻度 minor allele frequency (MAF) は PLINK 1.07 (PLINK; Purcell et al., 2007 ; <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) を用いて算出された。MAF <5% の SNPs, ジェノタイピング率 <90%, および SNPs の 90%以上がジェノタイプされなかった個体は、その後の解析において結果に偽陽性・偽陰性をもたらす得るため、その後の解析から除外された。過去の猫 63K SNP アレイに関する研究 (Gandolfi et al., 2018) に基づき、10%以上のミス・コール率、およびメンデルアン・エラーのため、合計 846 の SNPs が除外された。さらに、5%を超えるメンデルアン・エラーを呈する SNPs は除外され、残りのメンデルアン・エラーを呈する SNPs (<5%) は 0 と設定された。

4.2.4 ゲノムワイド関連解析 (伝達不平衡試験およびケース・コントロール研究)

GWAS は PLINK を用いて実施された。TDT (Spielman et al., 1993) については、「すべての表現型の原因は共通した疾患アレルを有している」という概念に基づいて 9 頭の罹患個体を含む、9 トリオを用いて実施された。さらに、「自発性発作を呈する個体のみ」を含むトリオを用いた TDT、および「前庭刺激誘発性発作を呈する個体のみ」を含むトリオを用いた TDT を実施した。ケース・コントロール研究は、39 頭の発症個体および 9 頭の子発症個体にて行わ

れ、並べかけ検定 permutation test (100,000 t-max) にて補正された。T-max permuted p-values は $P_{genome} < 0.05$ にてゲノムワイドに有意であるとされた。さらに、genomic inflation factor (λ) が算出され、サンプルは多次元尺度構成法 multidimensional scaling (MDS) により可視化された。さらに、自発性発作を呈する個体のみをケースとして用いた解析、および前庭刺激誘発性発作を呈する個体のみをケースとして用いた解析を実施した。MDS プロット、そして TDT およびケース・コントロール研究の結果表示法であるマンハッタン・プロットの作成は R を用いて作成された。

4.3 結果

4.3.1 最新の猫ゲノム・アセンブリ (Felis_catus_9.0/felCat9)への SNPs のリマッピング

Feline 63K SNP Array にてジェノタイプが可能な SNPs の局在位置は、2.8X カバレッジの猫ゲノム・アセンブリ (GTB V17e / Felis catus 5.8/felCat4 ; Mullikin et al., 2010 ; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_000003115.1/) を用いて定義されているため、猫 63K SNP アレイにてジェノタイプされた SNPs は、2017年に公開された 72X カバレッジの猫ゲノム・アセンブリ (Felis_catus_9.0/felCat9) に基づいて再配置され、本研究の解析に使用した。

4.3.2 家系構造およびクオリティー・コントロール

ジェノタイプされた合計 96 頭のうち、FSEC の 1 頭のとんかん猫が 90%未満のジェノタイプピング率を呈したため、それ以降の解析より除外した。2 頭の

FSECsはその母親猫との高いメンデルアン・エラーのため、家系図が誤っていることが明らかになった。これら2頭のFSECsおよび、その他父親猫が不明であった2頭のFSECsでは、メンデルアン・エラーが5%未満となる個体の検索により、それらの正しい親猫の同定を行い、家系図を修正した (Figure. 1)。

Feline 63K SNP Array に搭載されている 62,897 SNPs のジェノタイプ・クオリティーの評価後、14,520 SNPs は5%未満のMAFを呈し、162 SNPs は90%未満のジェノタイピング率を呈した。そのため、48,273 SNPs がダウンストリーム解析に利用可能であり、残りのサンプルにおけるジェノタイピング率は99.9%であった。さらに、低いジェノタイピング率を呈すると報告されている846 SNPs (Gandolfi et al., 2018) のうち637 SNPs が、クオリティー・コントロール後にも存在していたため除外した。家系構造において、メンデルアン・エラーが5%を超えた317 SNPs も除外した。最終的に、合計47,319 SNPs がダウンストリーム解析に利用可能となり、サンプルのジェノタイピング率は99%を超えていた。クオリティー・コントロール後に、実施したMDSプロット解析によって、FSECと遺伝的に関連のない、かつFSECが由来とする品種の合計15頭は、その他の80頭と比較すると乖離したクラスターを形成していたため (Figure 2), 除外した。

4.3.2 伝達不平衡試験 (TDT)

6頭の親猫および9頭のでんかん個体がTDTに利用可能であった (Figure 3)。TDTの結果は、マンハッタン・プロットにて示された (Figure 4)。すべての表現型が共通したバリエントに起因すると仮定した場合には、染色体B3領域

にて、関連を認めたものの、並べ替え検定前および後のいずれにおいてもゲノムワイドに有意ではなかった。有意ではないものの最も強い関連を呈する SNPs は染色体 B3 の 136011741 に局在する chrB3.152091605 ($P_{raw} = 0.0002$, $P_{genome} = 0.6251$), および 120241683 に局在する chrB3.132979173 ($P_{raw} = 0.0005$, $P_{genome} = 0.8766$) であった。染色体 B3 における、強い関連領域は~136.0 から 136.8 Mb の範囲であった。同時に染色体 B3 の~120.2 から 121.6 Mb の領域にも関連を認めた ($P_{raw} = 0.001$, $P_{genome} = 1$)。加えて、染色体 B2 の、~128.6 から 131.7Mb においても関連を認めた ($P_{raw} = 0.001$, $P_{genome} = 1$)。TDT によって関連が検出された SNPs のうち、上位 20 SNPs を Table 1 に記載した。マンハッタンプロットを Figure 4a にそれぞれ示した。

さらに、自発性発作を呈する個体のみを含むトリオを用いた TDT には、6 頭の親猫および 5 頭の自発性発作罹患個体が含まれた。前庭刺激誘発性発作を呈する個体のみを含むトリオを用いた TDT には、5 頭の親猫および 6 頭の前庭刺激誘発性発作罹患個体が含まれた。上記の 2 つの TDT の結果を Table 2, Table 3 に示し、マンハッタンプロットは Figure 4b, c にそれぞれ示した。この表現型を分割した解析により、自発性発作を呈する個体のみを含む TDT 解析では、すべてのトリオを含んだ解析方法の結果と比較すると、新規に染色体 D4 の~42.3 から 44.6 Mb 領域に関連が認められた ($P_{raw} = 0.0027$, $P_{genome} = 0.7516$)。同時に、染色体 B2 の~128.6 から 131.7 Mb 領域を共通して示唆していた ($P_{raw} = 0.005$, $P_{genome} = 1$)。そして、前庭刺激誘発性発作を呈する個体のみを含む TDT 解析では、すべてのトリオを含んだ解析方法の結果と比較すると、chrB3.152091605 (染色体 B3 の 136011741) が共通していたが、新規に染色体

B3 : ~35.4 から 36.1 Mb 領域 ($P_{raw} = 0.0039$, $P_{genome} = 0.7486$) , および染色体

B2 : ~40.6 から 44.2 Mb 領域 ($P_{raw} = 0.0047$, $P_{genome} = 1$) を認めた (Table 3).

4.3.3 ケース・コントロール研究

45 頭のとんかん個体および 34 頭のコントロールがケース・コントロール研究に用いられた (両親はとんかん発症猫であるが, 若齢時にとんかんと関連のない要因により死亡した 1 頭の FSEC は, 十分な表現型が決定されていないため解析から除外した). 最も有意な関連を示す SNP は chrC1. 67320966 であり, 染色体 C1 の 58230528 ($P_{raw} = 5.58E-14$, $P_{genome} = 1.00E-05$) であった. この集団の genomic inflation factor は, $\lambda = 4.5$ であった. MDS によって, 罹患個体とコントロール間の明白に異なった分布が明らかとなった (Figure 5). $\lambda = 1$ である場合, 集団階層化 population stratification が認められず, 集団階層化により関連解析結果は影響しないとされている (Wu et al., 2011). Genomic inflation factor を減少させるため, MDS プロットに基づいて, 罹患個体およびコントロールが再選定され, ケース・コントロール研究が再度実施された. 本解析には 38 頭の罹患個体と 9 頭のコントロール ($\lambda = 1$) にて実施された. 染色体 C1 の 48,296,174 に位置する chrC1.55996414 が, 最も高い関連を示した ($P_{raw} = 0.0003$, $P_{genome} = 0.8582$) (Table 4, Figure 6). λ 補正後のケース・コントロール研究によって, 染色体 A3 の ~61.4 から 63.1 Mb 領域に関連を認め, さらに染色体 C1 の ~53.6 から 55.2 Mb 領域に関連を認めた. さらに, 自発性発作を呈する個体をケースとして用いた 22 頭の罹患個体と 9 頭のコントロール ($\lambda = 1$) の解析において, 表現型を区別しないケース・コントロール研究において認められた染色

体 A3 および染色体 C1 の領域を共通して示唆した (Table 5). また, 前庭刺激誘発性発作を呈する個体をケースとして用いた 23 頭の罹患個体と 9 頭のコントロール ($\lambda = 1$) の解析においては, 表現型を区別しないケース・コントロール研究において認められた染色体 C1 と同様の領域に関連を認め, さらに染色体 C1 の~163.2 から 166.0 Mb 領域に関連を認めた (Table 6).

4.3.4 関連領域に存在する遺伝子

前述の GWAS (つまり, TDT とケース・コントロール研究) によって, 認められた高い関連, およびそれら領域および周辺に存在し, かつアノテーションされている遺伝子を Table 7, 8 にそれぞれ記載した. TDT における, すべての表現型を区別しない解析では, てんかんの候補遺伝子として *CALM1* (calmodulin 1) (Guo et al., 2017), *KCNK13* (potassium two pore domain channel subfamily K member 13) (Köhling et al., 2016), *PSENI* (presenilin 1) (Larner et al., 2011) が関連領域・周辺に存在した. さらに, 自発性発作のみを解析対象の形質とした場合, 候補遺伝子として *SH3GL2* (SH3 domain containing GRB2 like 2, endophilin A1) (Yu et al., 2018), *ADAMTSL1* (ADAMTS like 1) (Mullen et al., 2013) を認め, 前庭刺激誘発性発作のみを解析対象の形質とした場合, 候補遺伝子として *HCN4* (hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4) (Becker et al., 2017; Campostrini et al., 2018) を認めた. ケース・コントロール研究では, いずれのパターンの解析においても強い関連を認めた SNP マーカー周辺に候補遺伝子は認められなかった.

4.4 考察

Feline 63K SNP Array の登場により、ゲノムワイド解析が可能となり数多くの猫の遺伝性疾患および遺伝的形質に関与するバリエーションの同定が飛躍的に進んだ。具体的には、*COLQ* (collagen like tail subunit of asymmetric acetylcholinesterase) ミスセンス変異によるスフィンクスとデボン・レックス先天性筋無力症候群 (Abitbol et al., 2015; Gandolfi et al., 2015), *TRPV4* (transient receptor potential cation channel subfamily V member 4) ミスセンス変異によるスコティッシュ・フォールドの骨軟骨異形成症 (Gandolfi et al., 2016a), *CMAH* (cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) 変異によるラグドールにおける AB 血液型 (Gandolfi et al., 2016b), *KRT71* (keratin 71) のスプライシング・バリエーションによるセルカーク・レックスの巻き毛形質 (Gandolfi et al., 2013b), *ALX1* (ALX homeobox 1) のインフレーム欠失によるバーミーズの前頭鼻異形成 (Lyons et al., 2016b), *WNK4* (WNK lysine deficient protein kinase 4) ミスセンス変異によるバーミーズの低カリウム血性周期性四肢麻痺 (Gandolfi et al., 2012) などの単一遺伝性疾患の原因の同定が報告されてきた。さらに複雑疾患に関する研究としては、バーマンにおける猫伝染性腹膜炎にて複数の関連座位を同定した研究 (Golovko et al., 2013) が報告されている。これら研究のほとんどの手法はケース・コントロール研究であるが、ペルシャ猫の家系における進行性網膜萎縮の座位同定に関する報告 (Alhaddad et al., 2014) では、ケース・コントロール研究、TDT、そして連鎖解析が用いられた。その後の全ゲノムシーケンシング whole genome sequencing (WGS) によって *AIPL1* (aryl hydrocarbon receptor interacting protein like 1) におけるナンセンス変異の同定が報告されている

(Lyons et al., 2016a). 本研究では, Feline 63K SNP Array でのジェノタイプデータを用いて, 関連解析である TDT およびケース・コントロール研究を実施することで, FSEC におけるてんかんの遺伝的原因・感受性に関する関連の同定を試みた.

TDT では, 染色体 B3 の~136.0 から 136.8 Mb の~3 Mb 領域において, 最も強い関連を認めた. これらの領域において認められた遺伝子のなかで, てんかんに関連すると考えられる遺伝子として, カルモジュリン 1 をコードする *CALM1* (Guo et al., 2017), カリウム・チャネルをコードする *KCNK13* (Köhling et al., 2016) が存在した. これらの遺伝子における変異が特定のてんかん症候群を引き起こすことは未だ報告されていないものの, これらの遺伝子における変異が FSEC のてんかん感受性に影響している可能性は考えられる. さらに, 表現型を区別した上での TDT において, ゲノムワイドに有意ではなかったものの, 自発性発作を呈する個体のみ, および前庭刺激誘発性発作を呈する個体群を対象とした TDT にて, それぞれ独自の関連領域を認めたことは興味深い. 特に自発性発作を呈する個体を解析した際, 関連領域に存在する *SH3GL2* がコードする Endophilin A1 は, TLE 患者の側頭葉新皮質および, ペンチレンテトラゾール誘発キンドリングてんかんマウスの海馬および隣接する側頭葉新皮質にて有意に発現がアップレギュレートしていることが報告されている (Yu et al., 2018). さらに, 前庭刺激誘発性発作を示す個体群を対象とした際, 関連領域に存在する *HCN4* における変異が遺伝性全般性てんかんに寄与している可能性が報告されている (Becker et al., 2017). したがって, これら表現型のバリエーションに異なる感受性遺伝子が関与している可能性も考慮される.

ケース・コントロール研究によって、ゲノムワイドに有意な座位が広汎に認められたが (Table 1), MDS プロットによって集団階層化が認められた ($\lambda = 4.6$). 50K SNP 前後の低密度 SNP アレイを用いた場合、集団階層化の存在下および複雑疾患に対する GWAS の実施時に、偽陽性の関連が認められることが知られている (Finno et al., 2014). したがって、初期のケース・コントロール研究によって認められた関連 (Table. 2) は偽陽性の可能性が高く、 λ 補正後の結果 (Table 3) の方が信頼性は高いと考えられる. 本解析では、表現型を区別しない場合に、最も強い関連が認められた染色体 C1 : 48296174 に位置する chrC1.55996414 の近隣に、MTLE 患者およびピロカルピン MTLE モデル・ラットの齒状回前駆細胞において発現の亢進が報告されている Disabled 1 (Gong et al., 2007) をコードする *DABI* (*DAB1*, reelin adaptor protein) を認めたものの、周辺領域において、本 SNP マーカー以外の SNP マーカーに強い関連は認めなかったため懐疑的である.

TDT は、複雑疾患に関連する疾患遺伝子を局在するのに有用な手法であり、集団階層化が存在する場合でも、偽陽性を検出することなく連鎖不平衡による関連を導き出すことができる (Ewens & Spielman., 1995). 本研究が対象とした FSEC におけるてんかんは、TDT においてゲノムワイドに有意な関連が認められなかったことから、複雑疾患・複雑な遺伝様式を呈していることが予想され、さらにコロニー内での過剰な近親交配のため、ケース・コントロール研究においては集団階層化の存在が明らかとなった. したがって、本章において FSEC を対象に行った GWAS では、TDT が適切な解析手法であると考えられる. 加えて、本研究で利用した Feline 63K SNP Array (現在、猫において利用可

能な唯一の SNP アレイ) が低密度アレイであるということが、複雑疾患の原因・感受性遺伝子においては、検出力の低下をもたらしていることなどが考えられる。

今後、Feline 63K SNP Array によるジェノタイピング・データを用いてゲノムワイド連鎖解析を行うことは、FSEC におけるてんかんの遺伝的原因・感受性遺伝子が存在する領域の確認に有用であるかもしれない。トリオを用いることで TDT を実施したが、FSEC コロニーの大家系を対象に連鎖解析を行うことで、少数かつ重複する両親を含んだ TDT よりも検出力の向上が期待される。さらに、これまで GWAS と WGS との組み合わせを用いることで、多くの疾患の原因遺伝子の同定が報告されており、猫では前出のデボン・レックスおよびスフィンクスの先天性筋無力症候群 (Gandolfi et al., 2015) における *COLQ* 変異および、ペルシャ猫の進行性網膜萎縮における *AIPL1* 変異 (Alhaddad et al., 2014; Lyons et al., 2016a) がこの手法により同定された。本研究で認められた関連領域に存在する遺伝子におけるバリエントの有無を評価するには、本疾患の複雑性を考慮するとサンガーシーケンスを用いての候補遺伝子アプローチを行うよりも、数頭の FSEC の WGS を実施し、WGS データを用いて関連領域内に存在するバリエントを評価することが有用と考えられる。

4.5 小括

- FSECs において、Feline 63K SNP Array によるジェノタイピング・データを用いて GWAS を実施した。

- TDT において染色体 B3~136.0 から 136.8 Mb, ケース・コントロール研究において染色体 A3 の~61.4 から 63.1 Mb 領域, および染色体 C1 の~53.6 から 55.2 Mb 領域に関連を認めた.
- さらに, 表現型を区別した TDT およびケース・コントロール研究を行うことでそれぞれに共通, および独立した関連領域を認めた.
- FSEC においては, ケース・コントロール研究よりも TDT の方が適切な解析方法であり, さらに FSEC は複雑な遺伝様式を呈していることにより, 検出力が低下したことが考えられる.
- GWAS, 特に TDT において認められた領域は FSEC のてんかん発症に関連している可能性が考えられる.

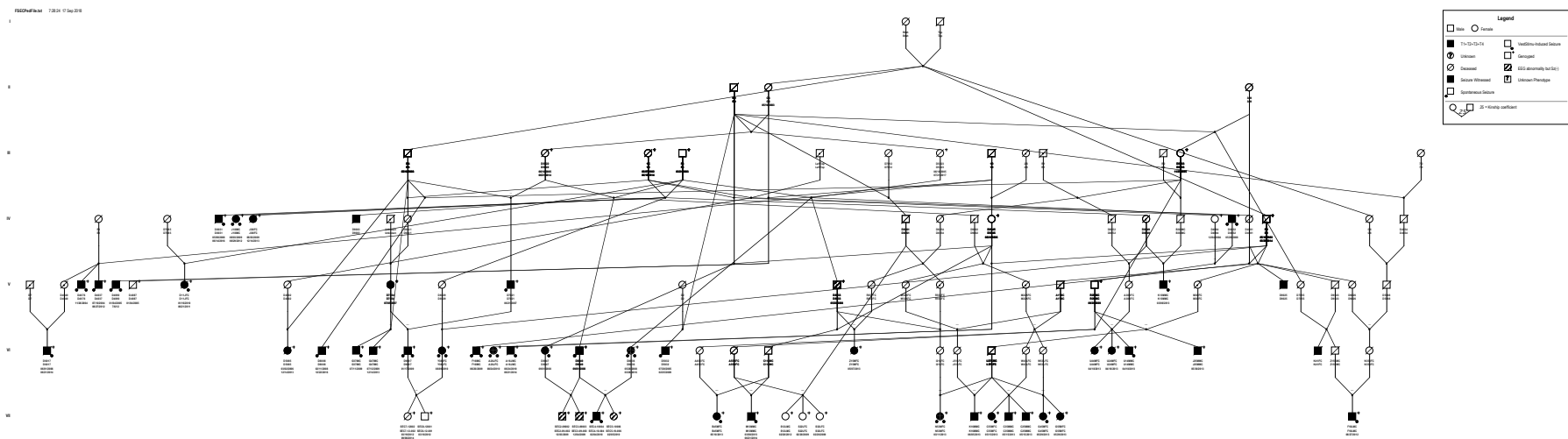


Figure 1. FSEC の家系図. 猫 63K SNP アレイによるジェノタイピング・データにおいてメンデルian・エラーを評価することで家系図は訂正された. 四角：オス，丸：メス，黒色：発作発症個体，白色：発作未確認個体，斜線塗り：発作未確認であるが異常脳波を呈する個体，斜線：死亡個体，左下丸：自発性発作を呈する個体，右下丸：前庭刺激誘発発作を呈する個体，右上プラス：SNP アレイにてジェノタイプを行った個体

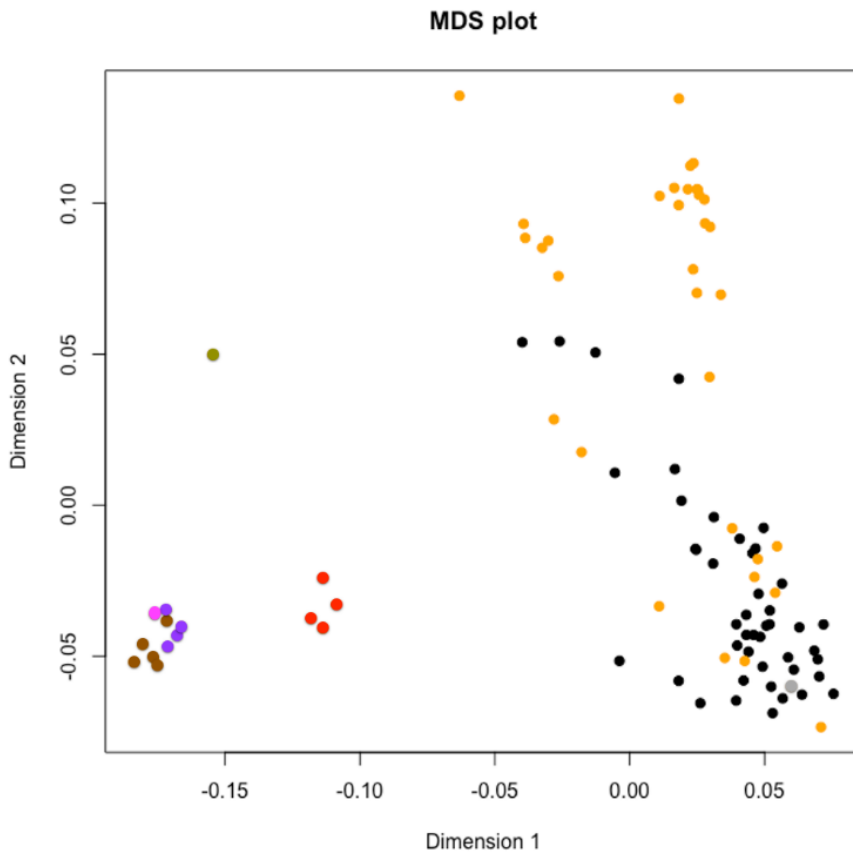


Figure 2. クオリティー・コントロール後の合計 95 頭の猫における MDS プロット。15 頭の FSEC と血縁関係のない、かつ FSEC が起源とする品種は、残りの 80 頭と比較して、乖離したクラスターをそれぞれ形成していた。色付けされた点は以下の情報を示す；黒色：発作発症あるいは脳波異常が確認されている FSEC 個体，黄色：発作および脳波異常が確認されていない FSEC の親あるいは FSEC が由来とするコロニーの猫，灰色：表現型不明の 1 頭の FSEC コロニー内の猫 (両親はてんかん発症猫であるが，若齢時にてんかんに関連のない要因により死亡したため，十分な表現型が決定されていない)，赤色：アメリカン・ショートヘア，茶色：アビシニアン，紫：ロシアン・ブルー，ピンク：アビシニアン×ロシアン・ブルー，深緑：シャム猫。

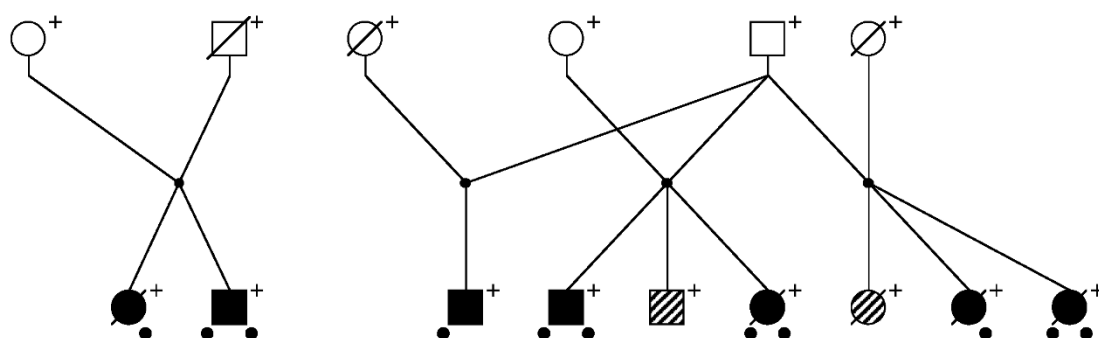


Figure 3. TDT に利用可能であった核家族. 四角：オス，丸：メス，白塗り：てんかん未発症，黒塗り：てんかん発作あり，斜線塗り：発作の記録なし / 脳波異常あり，右上プラス：ジェノタイプされた個体，左下黒点：自発性発作，右下黒点：前庭刺激誘発性発作.

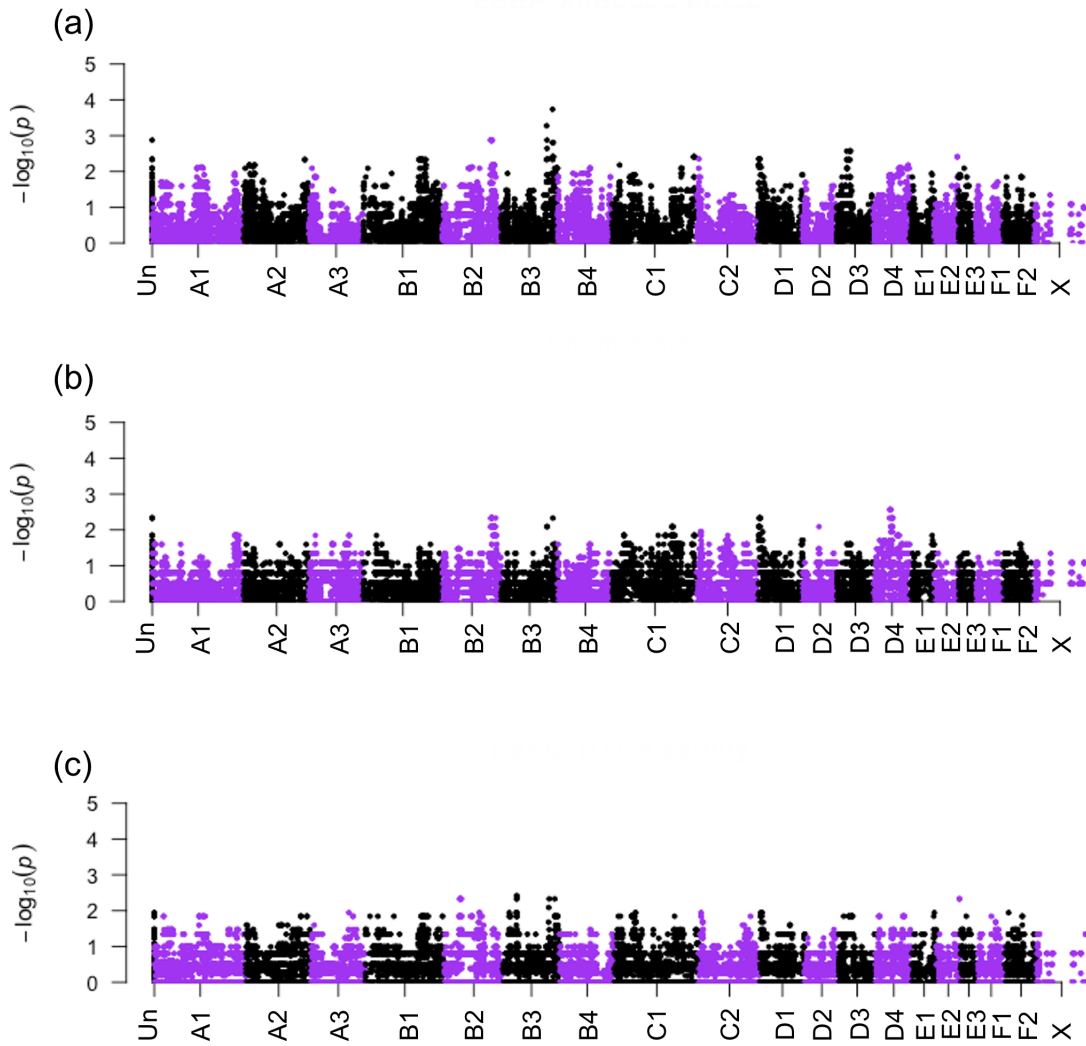


Figure 4. FSEC における TDT 解析. マンハッタン・プロットは, P_{raw} を基に構成された. (a) 解析可能なすべての 9 トリオを用いた TDT. (b) 自発性発作を呈する個体 (5 頭) のみ, およびそれらの 6 頭の親個体を含んだ TDT. (c) 前庭刺激誘発性発作を呈する個体 (6 頭) のみ, およびそれらの 5 頭の親個体を含んだ TDT.

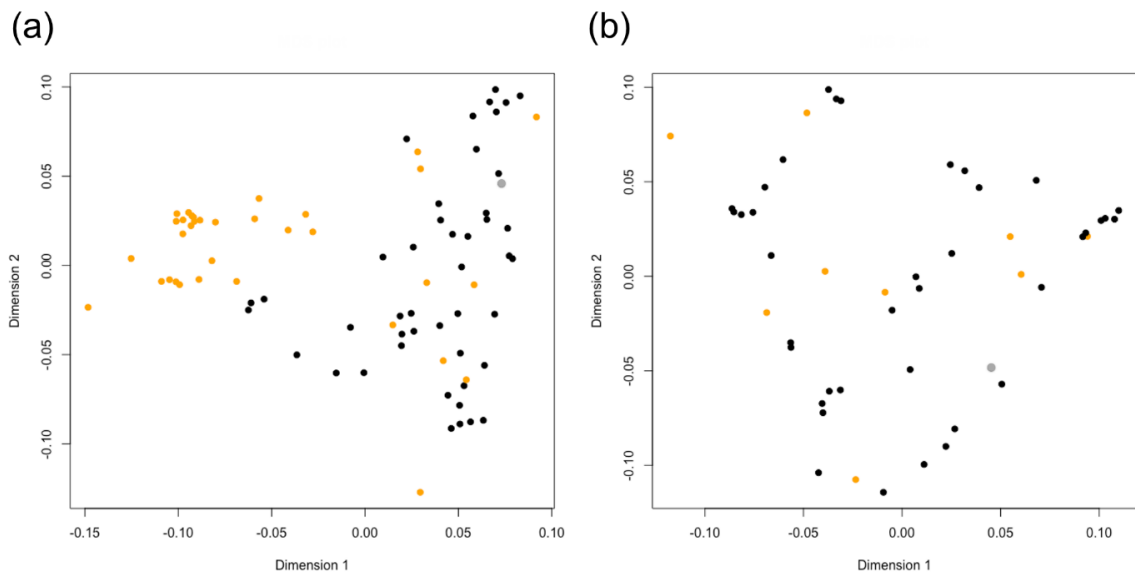


Figure 5. FSEC における MDS プロット. 黒点は FSEC のてんかん発症個体を示し、黄色点はてんかん未発症個体 (FSEC コロニーおよび FSEC が由来するコロニーの個体), 灰色 : 表現型不明の 1 頭の FSEC コロニー内の猫 (両親はてんかん発症猫であるが, 若齢時にてんかんと関連のない要因により死亡したため, 十分な表現型が決定されていない). (a) 初期のケース・コントロールにて用いられた 46 頭のてんかん個体および 34 頭のコントロール個体の MDS プロット. (b) より緊密にクラスターを形成する 39 頭のてんかん個体および 9 頭のコントロール個体の MDS プロット.

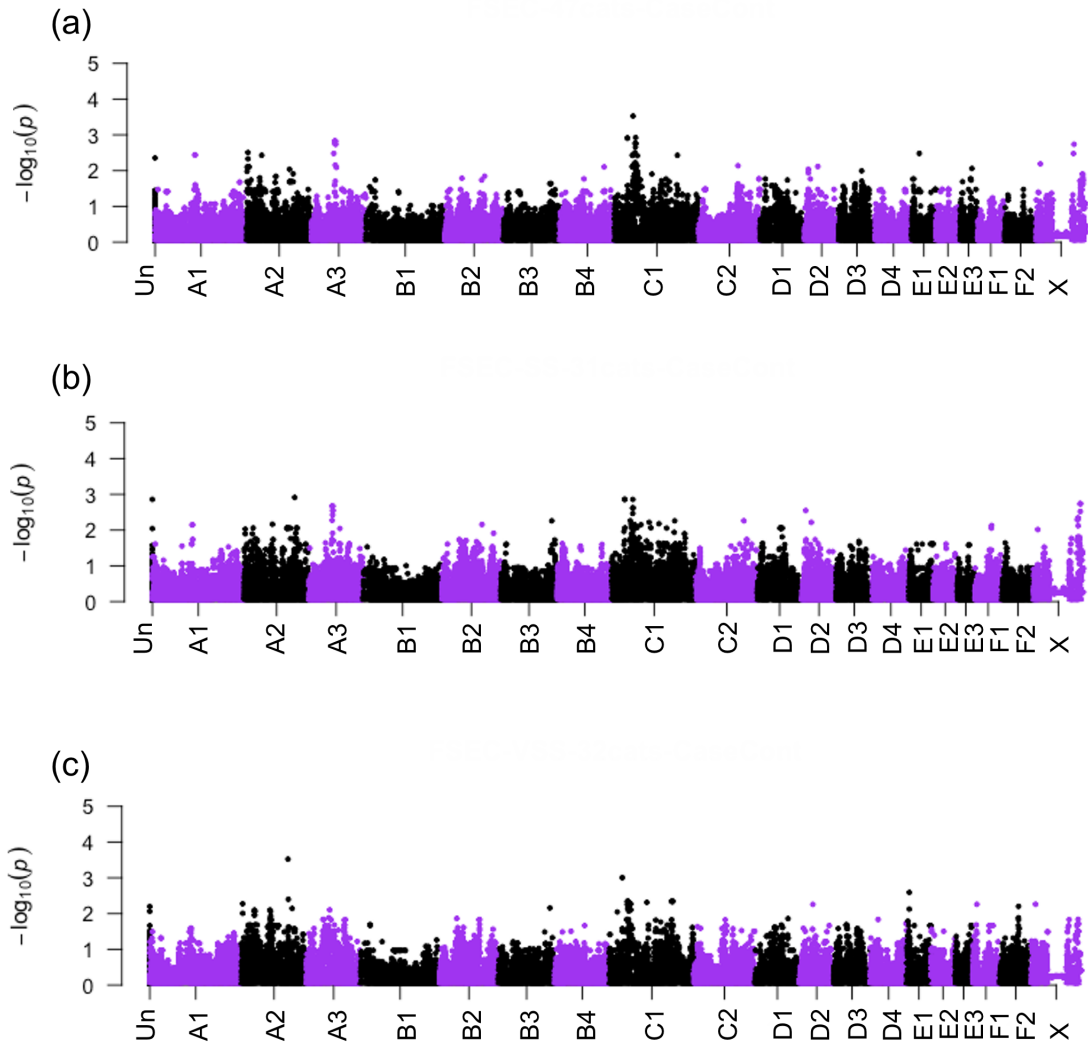


Figure 6. FSEC における，ケース・コントロール解析．マンハッタン・プロットは， P_{raw} を基に構成された．(a) 発作型を区別しない場合のケース・コントロール研究 ($\lambda = 1$) (b) 自発性発作を呈する個体のみを含めた解析 ($\lambda = 1$) (c) 前庭刺激誘発性発作を呈する個体のみを含めた解析 ($\lambda = 1$)

Table 1. 解析可能であった9トリオを用いたTDTにて示唆された関連が示唆されたSNPs

	chromosome	SNP ID	position	P_{raw} value	P_{genome} value
1	B3	chrB3.152091605	136011741	0.0001828	0.6251
2	B3	chrB3.132979173	120241683	0.000532	0.8766
3	Unmapped	chrB2.148168246	NA	0.001341	1
4	B2	chrB2.145991326	128571743	0.001341	1
5	B2	chrB2.146017894	128594485	0.001341	1
6	B2	chrB2.146168378	128719321	0.001341	1
7	B2	chrB2.146443133	128918643	0.001341	1
8	B2	chrB2.147402404	129699370	0.001341	1
9	B2	chrB2.147677421	129910731	0.001341	1
10	B2	chrUn.31107558	130009842	0.001341	1
11	B2	chrB2.148572085	130705883	0.001341	1
12	B2	chrB2.148630730	130751533	0.001341	1
13	B2	chrE3.2719828	130948734	0.001341	1
14	B2	chrE3.2452694	131061063	0.001341	1
15	B2	chrB2.149686261	131744366	0.001341	1
16	B3	chrB3.134306625	121392703	0.001341	1
17	B3	chrB3.152698392	136504115	0.001565	1
18	B3	chrB3.153001896	136767779	0.001565	1
19	B3	chrUn8.1386135	137538829	0.001565	1
20	B3	chrB3.134561304	121606504	0.002282	1

Table 2. 自発性発作を呈する個体のみ, およびそれらの親個体を含んだ TDT にて関連が示唆された SNPs

	chromosome	SNP ID	position	P_{raw} value	P_{genome} value
1	chrD4	chrD4.33746870	42346601	0.0027	0.7516
2	chrD4	chrD4.35050567	43361022	0.0027	0.7516
3	chrD4	chrD4.36458031	44513973	0.0027	0.7516
4	chrD4	chrD4.36557070	44595186	0.0027	0.7516
5	NA	chrB2.148168246	NA	0.004678	1
6	NA	chrD1.6509233	NA	0.004678	1
7	NA	chrE3.43050459	NA	0.004678	1
8	chrB2	chrB2.145991326	128571743	0.004678	1
9	chrB2	chrB2.146017894	128594485	0.004678	1
10	chrB2	chrB2.146168378	128719321	0.004678	1
11	chrB2	chrB2.146443133	128918643	0.004678	1
12	chrB2	chrB2.147402404	129699370	0.004678	1
13	chrB2	chrB2.147677421	129910731	0.004678	1
14	chrB2	chrUn.31107558	130009842	0.004678	1
15	chrB2	chrB2.148572085	130705883	0.004678	1
16	chrB2	chrB2.148630730	130751533	0.004678	1
17	chrB2	chrE3.2719828	130948734	0.004678	1
18	chrB2	chrE3.2452694	131061063	0.004678	1
19	chrB2	chrB2.149686261	131744366	0.004678	1
20	chrB2	chrB2.160295208	140402198	0.004678	1

NA: Felis_catus_9.0/felCat9 にマッピングされなかった SNP

Table 3. 前庭刺激誘発性発作を呈する個体のみ，およびそれらの親個体を含んだ TDT にて関連が示唆された SNPs

	chromosome	SNP ID	position	P_{raw} value	P_{genome} value
1	chrB3	chrB3.42062975	35592997	0.003892	0.7486
2	chrB3	chrB3.42113518	35632174	0.003892	0.7486
3	chrB3	chrB3.42683185	36105726	0.003892	0.7486
4	chrB2	chrB2.47827900	40614011	0.004678	1
5	chrB2	chrB2.48155985	40876460	0.004678	1
6	chrB2	chrB2.48353791	41013610	0.004678	1
7	chrB2	chrB2.50866323	43016974	0.004678	1
8	chrB2	chrB2.52182450	44067444	0.004678	1
9	chrB2	chrB2.52364018	44215096	0.004678	1
10	chrB2	chrB2.52397797	44249554	0.004678	1
11	chrB3	chrB3.41776154	35355016	0.004678	1
12	chrB3	chrB3.42088182	35615814	0.004678	1
13	chrB3	chrB3.134306625	121392703	0.004678	1
14	chrB3	chrB3.152091605	136011741	0.004678	1
15	chrE2	chrE2.75085687	61554352	0.004678	1
16	chrE2	chrE2.75226362	61676856	0.004678	1
17	chrB3	chrB3.132979173	120241683	0.008151	1
18	NA	chrD1.6509233	0	0.01141	1
19	NA	chrE3.43050459	0	0.01141	1
20	chrA3	chrA3.125706471	99772860	0.01141	1

NA: Felis_catus_9.0/felCat9 にマッピングされなかった SNP

Table 4. ケース・コントロール研究 ($\lambda = 1$) において SNPs 関連が示唆された

SNPs

	chromosome	SNP ID	position	P_{raw} value	P_{genome} value
1	chrC1	chrC1.55996414	48296174	0.0002978	0.8582
2	chrC1	chrC1.64392465	55121251	0.00119	0.9707
3	chrC1	chrD2.104542037	33375663	0.001232	0.9736
4	chrC1	chrB3.88220828	33617328	0.001232	0.9736
5	chrA3	chrA3.79567356	61695093	0.001498	0.9813
6	chrA3	chrA3.79709869	61808201	0.001498	0.9813
7	chrA3	chrA3.79868848	61928655	0.001498	0.9813
8	chrA3	chrA3.80313964	62331585	0.001498	0.9813
9	chrA3	chrA3.79142363	61376929	0.001729	0.9859
10	chrC1	chrC1.64031502	54833982	0.001729	0.9859
11	chrC1	chrC1.64132757	54899659	0.001729	0.9859
12	chrC1	chrC1.64477718	55194254	0.001729	0.9859
13	chrA3	chrA3.80970279	62836397	0.001828	0.9872
14	chrA3	chrA3.81266647	63066469	0.001828	0.9872
15	chrX	chrX.118973664	99484594	0.001832	0.9876
16	chrC1	chrC1.63896477	54732644	0.002193	0.9916
17	chrA2	chrA2.3274346	2914893	0.003131	0.998
18	chrC1	chrC1.62537133	53599068	0.003131	0.998
19	chrA3	chrA3.75651962	58479147	0.00331	0.9996
20	chrE1	chrE1.46263995	19788262	0.00331	0.9996

Table 5. ケース・コントロール研究 ($\lambda = 1$) において、自発性発作を呈する個体のみを含めた解析

	chromosome	SNP ID	position	P_{raw} value	P_{genome} value
1	chrA2	chrA2.198468293	133525162	0.001225	0.954
2	NA	chrB3.88251253	NA	0.001383	0.9641
3	chrC1	chrD2.104542037	33375663	0.001383	0.9641
4	chrC1	chrB3.88220828	33617328	0.001383	0.9641
5	chrC1	chrC1.64392465	55121251	0.001388	0.9651
6	chrX	chrX.147710250	123028006	0.001829	0.9791
7	chrX	chrX.147858181	123137257	0.001829	0.9791
8	chrX	chrX.147918317	123194900	0.001829	0.9791
9	chrA3	chrA3.79567356	61695093	0.002146	0.9919
10	chrA3	chrA3.79709869	61808201	0.002146	0.9919
11	chrA3	chrA3.79868848	61928655	0.002146	0.9919
12	chrA3	chrA3.80313964	62331585	0.002146	0.9919
13	chrC1	chrC1.64031502	54833982	0.002407	0.9938
14	chrC1	chrC1.64132757	54899659	0.002407	0.9938
15	chrC1	chrC1.64477718	55194254	0.002407	0.9938
16	chrA3	chrA3.80970279	62836397	0.00285	0.9958
17	chrA3	chrA3.81266647	63066469	0.00285	0.9958
18	chrD2	chrD2.4155098	10091648	0.00285	0.9958
19	chrX	chrX.147799151	123099795	0.003024	0.9962
20	chrC1	chrC1.63896477	54732644	0.003415	0.9975

NA: Felis_catus_9.0/felCat9 にマッピングされなかった SNP

Table 6. ケース・コントロール研究 ($\lambda = 1$) において, 前庭刺激誘発性発作を呈する個体のみを含めた解析

	chromosome	SNP ID	position	Praw value	Pgenome value
1	chrA2	chrA2.184520462	122572639	0.0003	0.6393
2	chrC1	chrD2.104542037	33375663	0.000986	0.9193
3	chrC1	chrB3.88220828	33617328	0.000986	0.9193
4	chrE1	chrE1.2595571	6414554	0.002573	0.9899
5	chrA2	chrA2.185505919	123372613	0.003995	0.9974
6	chrC1	chrC1.54757329	47316062	0.004566	0.9991
7	chrC1	chrC1.54790832	47349171	0.004566	0.9991
8	chrC1	chrC1.54964912	47495309	0.004566	0.9991
9	chrC1	chrC1.55996414	48296174	0.004566	0.9991
10	chrC1	chrC1.179702705	163239037	0.004566	0.9991
11	chrC1	chrC1.182599151	165594933	0.004566	0.9991
12	chrC1	chrC1.183037189	165969528	0.004566	0.9991
13	chrC1	chrB3.164957049	165977753	0.004566	0.9991
14	chrC1	chrC1.183062403	165990544	0.004566	0.9991
15	chrC1	chrUn17.3544798	98228691	0.004852	0.9994
16	chrA2	chrA2.3420092	3039023	0.005306	0.9995
17	chrC1	chrC1.63896477	54732644	0.00536	0.9995
18	chrC1	chrC1.64392465	55121251	0.00536	0.9995
19	chrF1	chrF1.11528370	12865101	0.005503	0.9996
20	chrX	chrX.12623209	10626983	0.005503	0.9996

Table 7. 表現型を区別しない、および表現型により解析対象個体を選別した場合の TDT によって示唆された関連領域および周辺に存在する遺伝子

表現型	染色体 (参照配列)	遺伝子名	遺伝子シンボ			参考文献
			ル	開始位置	終了位置	
All	B3 (NC_018728.3)	calmodulin 1	CALM1	136161704	136172387	Guo et al., 2017
		potassium two pore domain channel subfamily K member 13	KCNK13	135868835	135977613	Köhling et al., 2016
		presenilin 1	PSEN1	120630549	120703551	Larner et al., 2011
		tetratricopeptide repeat domain 39B	TTC39B	42329595	42456380	
SS	D4 (NC_018735.3)	small nuclear RNA activating complex polypeptide 3	SNAPC3	42572145	42642104	
		PC4 and SFRS1 interacting protein 1	PSIP1	42620286	42659885	
		coiled-coil domain containing 171	CCDC171	42698303	43010352	
		basonuclin 2	BNC2	43396608	43825543	
		centlein	CNTLN	44050768	44368683	
		SH3 domain containing GRB2 like 2, endophilin A1	SH3GL2	44439472	44650217	Yu et al., 2018
		ADAMTS like 1	ADAMTSL1	45276015	45655987	Mullen et al., 2013
		hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 4	HCN4	34712671	34755539	Becker et al., 2017
		Bardet-Biedl syndrome 4	BBS4	35321602	35378330	Camprostrini et al., 2018
		ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 1	ARIH1	35386955	35510236	
VSS	B3 (NC_018728.3)	transmembrane protein 202	TMEM202	35522936	35588478	
		hexosaminidase subunit alpha	HEXA	35588614	35615822	
		CUGBP Elav-like family member 6	CELF6	35639015	35669804	
		poly(ADP-ribose) polymerase family member 6	PARP6	35679922	35741761	
		GRAM domain containing 2A	GRAMD2A	35742913	35777281	
		SUMO peptidase family member, NEDD8 specific	SENP8	35791527	35806478	
		myosin IXA	MYO9A	35806421	36086173	
		nuclear receptor subfamily 2 group E member 3	NR2E3	36089719	36096355	

てんかん関連性遺伝子には参考文献が付与されている。All：いずれの表現型も含む。SS：自発性発作を示す個体のみを含む。VSS：前庭刺激誘発発作を示す個体のみを含む。

Table 8. 表現型を区別しない、および表現型により解析対象個体を選別した場合のケース・コントロール研究によって示唆された関連領域に存在する遺伝子

表現						
型	染色体 (参照配列)	遺伝子名	遺伝子シンボル	開始位置	終了位置	参考文献
All	C1 (NC_018730.3)	DAB1, reelin adaptor protein	DAB1	46588246	47725925	Gong et al., 2007
VSS	A2 (NC_018724.3)	chimerin 2	CHN2	122509814	122817712	
		proline rich 15	PRR15	122839913	122843744	
		secernin 1	SCRN1	123049263	123113432	
		FK506 binding protein 14	FKBP14	123119515	123134380	
		pleckstrin homology domain containing A8 maturin, neural progenitor differentiation	PLEKHA8	123136365	123197958	
		regulator homolog	MTURN	123236646	123266581	

てんかん関連性遺伝子には参考文献が付与されている。All：いずれの表現型を示す個体を含む。SS：自発性発作を示す個体のみを含む。VSS：前庭刺激誘発発作を示す個体のみを含む。

第5章

家族性自然発症性てんかん猫におけるゲノムワイド連鎖解析

5.1 諸言

連鎖解析 linkage analysis は、家系における遺伝マッピングを可能とする統計学的アプローチであり、家系データにおけるマーカー座位と表現型の根底に存在する疾患アレルとの共分離の検出を可能とする。連鎖の統計学的指標には対数オッズ Logarithm of the odds (LOD) スコアが用いられる。SNP アレイの普及により、大量の SNPs マーカーを用いたゲノムワイド連鎖解析が可能となり、ゲノムワイド連鎖解析は特に人における家族性遺伝性疾患の原因遺伝子の同定に寄与してきた。連鎖解析は、パラメトリック連鎖解析 (モデル・ベース) およびノンパラメトリック連鎖解析 (モデル・フリー) を含む。パラメトリック連鎖解析は、仮定された形質モデルが正しい場合、強い影響力を呈するリスク座位のマッピングに非常に強力である。ノンパラメトリック連鎖解析は家系内あるいは同胞間での同祖性 identical by descent (IBD) を共有するアレルのパターンを検出する手法であり、本手法は遺伝様式の特定化を必要としないモデル・フリーの解析方法である。猫の遺伝病においては、Feline 63K SNP Array を用いてペルシャ猫家系における進行性網膜萎縮のゲノムワイド連鎖解析を実施することで連鎖座位の同定がなされ (Alhaddad et al., 2014), その後に実施された全ゲノムシーケンシングによって連鎖座位内に疾患バリエーションである *AIPL1*

(aryl hydrocarbon receptor interacting protein like 1) 変異の同定がなされている

(Lyons et al., 2016a).

連鎖解析は、てんかんにおいても疾患関連座位の同定に利用されてきた。ヒトの家族性側頭葉てんかんを示す大家系における利用 (Angelicheva et al., 2009; Azmanov et al., 2011; Bisulli et al., 2014; Claes et al., 2004; Chahine et al., 2013; Fanciulli et al., 2014a; Hedera et al., 2007; Ottman et al., 1995) の他にも、同一のタイプのでんかんを示す多数の核家族 (つまり、てんかんを罹患している親を含む、あるいは含まない、てんかん罹患児を有する) を対象とする連鎖解析が実施されている (Sander et al., 2000; Chioza et al., 2009)。さらには遺伝性全般性てんかんにおいて実施された、連鎖解析のメタアナリシスも報告されており (EPICURE Consortium et al., 2012)、遺伝性/家族性てんかんにおいて連鎖を示す座位の同定に広く用いられている。さらには、連鎖解析により認められた連鎖座位を次世代シーケンシング (つまり、全ゲノムシーケンシング [WGS] あるいは全エクソームシーケンシング [WES]) による結果と組み合わせることで、多様な焦点を持つ家族性焦点性てんかん familial focal epilepsy with variable foci (FFEVF) における *DEPDC5* (DEP domain containing 5) 変異の同定 (Ishida et al., 2013)、家族性外側葉てんかん (FLTE) における *RELN* (Reelin) および *MICAL-1* (microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1) 変異 (Dazzo et al., 2015; Dazzo et al., 2018)、良性成人型家族性ミオクローヌスてんかんにおける繰り返し配列の異常伸長 (Ishiura et al., 2018) といった家族性てんかんの疾患バリエントの同定が行われており、次世代シークエ

ンシングが普及した現在においても、連鎖解析による連鎖座位の同定は極めて重要かつ有用である。

獣医学領域においては、ベルジアン・シェパードの特発性てんかんにおいて、410 個のマイクロサテライト・マーカーを用いた連鎖解析が報告されており (Oberbauer et al., 2010), 示唆された座位のうちの一つは、後の低密度 SNP アレイおよび高密度 SNP アレイを用いたゲノムワイド関連解析 (Seppälä et al., 2012; Koskinen et al., 2015) によって同定されたてんかん関連座位の近隣に位置していた。

本章では、第 4 章において Feline 63K SNP Array を用いて得られたジェノタイプ・データを用いて、ゲノムワイド連鎖解析により、家族性自然発症性てんかん猫 (FSEC) 家系におけるてんかん関連座位の検出が可能であると仮定し、解析を実施した。

5.2 材料および方法

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会、生命倫理委員会の承認 (承認番号: 28K-4, 29K-4, 30K-4; 研究代表者: 長谷川大輔) および日本獣医生命科学大学附属動物医療センター倫理委員会の承認 (28-5; 研究代表者: 長谷川大輔) を得て行われている。また本研究における Feline 63K SNP Array (Illumina, San Diego, CA, USA) の使用に関しては、第 4 章と同様に Morris Animal Foundation (Denver, CO, USA) より承認を得ている (Grant ID: #D17FE-553)。

5.2.1 解析対象個体, DNA 抽出, ジェノタイピング, およびジェノタイピング・データのクオリティ・コントロール

すべての解析対象個体の内訳, DNA 抽出方法, それらのジェノタイピング方法, および最新の猫ゲノム・アセンブリ (Felis_catus_9.0 ; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000181335.3) へのリマッピングは, 第 4 章に記載された通りである.

5.2.2 ゲノムワイド連鎖解析のためのデータ・クリーニングおよびデータ・マニピュレーション

連鎖不平衡 (LD) に基づく SNPs の剪定を PLINK 1.07 (PLINK; Purcell et al., 2007; <http://zzz.bwh.harvard.edu/plink/>) を用いて, 50 マーカー・ウィンドウ, 5 マーカーずつのシフト, および r^2 が最大 0.4 となるウィンドウ内のマーカーが採択されるよう実施し, 18,167 SNPs を解析に用いた.

Lander-Green アルゴリズム (Lander and Green., 1987) を用いる Merlin 1.1.2 (Merlin; Abecasis et al., 2002; <http://csg.sph.umich.edu/abecasis/merlin/index.html>) は, 最大 25-bit complexity までの解析を可能とするため, これまでに大家系において連鎖解析を実施した報告と同様に (Raza et al., 2013; Oikkonen et al., 2016), FSEC 家系を 4 つの小家系に分割した.

連鎖解析において, 必要となったデータ・クリーニングおよびデータ・マニピュレーションは R (version 3.3.3 ; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria ; <https://www.r-project.org/>) を用いて実施した.

5.2.3 ゲノムワイド連鎖解析

Merlin を用いて、FSEC における全ての表現型 (つまり、自発性発作、前庭刺激誘発性発作、および脳波異常のみ) が共顕性遺伝様式 (99% および 70% の浸透度) であると推定して、パラメトリック連鎖解析を実施した。疾患アレル頻度は 0.01 とした。これまでに猫の特発性/遺伝性てんかんの頻度は報告されていないため、以下の算出方法を用いて推定した: 1.1–2.1% (一般猫集団における猫のてんかん発作の発生率) \times 33% (3 つの大規模な回顧的研究における、合計 233 頭のてんかん猫での、特発性てんかんの罹患率 [Barnes et al., 2004; Schriefl et al., 2008; Pákozdy et al., 2010]) = 0.36–0.69%。したがって、フェノコピー率は 0.005 に設定された。臨床的表現型の決定が行われていない個体は、“missing phenotype” として分類する “affected only” デザインを用いた。本デザインは疾患関連アレルを保有する未発症個体による連鎖結果への影響を低下させる。さらに、FSEC における遺伝様式が確定していないため、同様に “affected only” デザインを用いてのノンパラメトリック連鎖解析 (通常のノンパラメトリック連鎖解析および罹患同胞対解析) を実施した。Linear model および exponential model (Kong and Cox., 1997) の両者をノンパラメトリック連鎖解析の LOD スコア算出に用いた。さらに、発作表現型ごとに分類した連鎖解析を実施した; (1) 全ての表現型 (つまり、自発性発作、前庭刺激誘発性発作、および脳波異常のみ) を疾患とした場合、(2) 自発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合、(3) 前庭刺激誘発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合。発作表現型ごと

で分類した場合、つまり(2)および(3)におけるパラメトリック連鎖解析は、共顯性遺伝様式 (70%および 50%の浸透度) であると仮定して実施した。

連鎖は LOD スコアが 3.3 を以上の場合に「有意」とし、1.9 を超えた場合に「示唆される (suggestive linkage)」とした (Lander and Kruglyak., 1995)。

5.3 結果

Merlin 使用のため分割された 4 つの FSEC 小家系を Figure 1 に示した。

5.3.1 パラメトリック連鎖解析

全ての表現型が同一の疾患アレルに起因し、99%の浸透度で解析した場合、染色体 B4 の 79.60Mb において LOD スコア 2.60 の suggestive linkage を認めた (Figure 2a)。浸透度 70%の解析においても、同じ箇所に最も高いピークを認め、新たなピークは認めなかった。

自発性発作を呈する個体を罹患個体とし、70%の浸透度で解析した場合、染色体 B2 の 108.4–119.5 Mb にかけて suggestive linkage (LOD = 2.04)、染色体 D2 の 5.3–6.9 Mb にかけて suggestive linkage (LOD = 2.04)、染色体 D4 の 29.03–39.7 Mb にかけて suggestive linkage (LOD = 2.05) を認めた (Figure 3a)。浸透度 50%の解析においても、同じ箇所に最も高いピークを認め、新たなピークは認めなかった。

前庭刺激誘発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合、染色体 B4 の 74.26 Mb において LOD スコア 2.17 の suggestive linkage を認めた (Figure 4a)。

浸透度 50%の解析においても、同じ箇所にも最も高いピークを認め、新たなピークは認めなかった。

5.3.2 ノンパラメトリック連鎖解析

ノンパラメトリック連鎖解析においても、上述のパラメトリック連鎖解析と同様に3つのパターンにて解析が行われた。通常のノンパラメトリック連鎖解析 nonparametric linkage analysis および罹患同胞対解析 affected sibling pair method の LOD スコアをそれぞれ、NPL および ASP として示す。

全ての表現型を疾患とした場合、染色体 C1 の 78.1 Mb 領域 ($NPL_{exp} = 2.17$, $ASP_{exp} = 2.00$), 染色体 C2 の 9.1 Mb 領域 ($NPL_{exp} = 2.42$, $ASP_{exp} = 2.19$), および染色体 D2 の 7.2 Mb 領域 ($ASP_{exp} = 2.26$) に suggestive linkage を認めた (Figure 2b, c).

自発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合、染色体 B1 の 205 Mb 領域 ($NPL_{exp} = 2.15$, $ASP_{exp} = 2.08$), 染色体 B2 の 35.9 Mb 領域 ($NPL_{exp} = 2.21$) および 108.4 Mb 領域 ($NPL_{exp} = 2.01$), 染色体 B3 の 140.5–149.4 Mb 領域にかけて ($NPL_{exp} = 2.82$, $ASP_{exp} = 2.87$), 染色体 D1 の 5.1 Mb ($NPL_{exp} = 2.76$, $ASP_{exp} = 2.80$) にて、染色体 D2 の 5.6 Mb ($NPL_{exp} = 2.04$) にて、染色体 D4 の 23.8 Mb ($ASP_{exp} = 2.44$) および 39.0 Mb ($NPL_{exp} = 2.34$) にて、染色体 E2 の 21.0 Mb 領域 ($ASP_{exp} = 1.96$), 染色体 F2 の 73.6 Mb 領域 ($NPL_{exp} = 2.22$, $ASP_{exp} = 2.27$), そして染色体 X の 3.3 Mb ($NPL_{exp} = 2.22$, $ASP_{exp} = 2.30$) にて suggestive linkage を認めた (Figure 3b, c).

前庭刺激誘発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合、染色体 B1 の 204.4 Mb ($NPL_{exp} = 2.49$, $ASP_{exp} = 2.43$), 染色体 B3 の 65.5 Mb ($ASP_{exp} = 2.02$), 染色体 C2 の 9.5 Mb ($NPL_{linear} = 2.07$, $NPL_{exp} = 2.38$, $ASP_{exp} = 2.08$), および染色体 D1 の 110.0 Mb 領域 ($ASP_{exp} = 2.27$) にて suggestive linkage を認めた (Figure 4b, c).

5.4 考察

本章では、FSEC 家系における連鎖解析を実施することで、てんかんと連鎖する座位の検出を試みた。大家系における遺伝学的解析の利点として、疾患関連座位およびバリエントにおける家系内座位均一性 *intrafamilial locus homogeneity* が存在するという推測に解析が基づいていることが挙げられる (Wijsman et al., 2012)。FSEC はコロニーとして系統維持されてきているため、この概念が適応されると考えられた。本研究では複数の suggestive linkage を示す座位を認めたが、この結果の1つの解釈として、複数の座位がてんかんに関連しているということが挙げられる。ヒトにおいて自閉症スペクトラム症を罹患する 6-9 世代に渡る 20 の大家系における連鎖解析 (Allen-Brady et al., 2010) や、71 名の家系構成員のうち少なくとも 33 名が吃音の臨床的診断を受けているカメルーンの大家系における連鎖解析 (Raza et al., 2013) において、複数の連鎖座位が認められており、これらの所見は大家系内において頻発する上記の遺伝性疾患が複雑疾患であることを示唆している。表現型を区別した際に、それぞれの表現型ごとに独立した座位が認められたことは興味深い。本所見は、こ

れら 2 つの発作表現型が独立した遺伝的根底に起因している可能性を示唆する。

また別の解釈として、家族内座位不均一性 *intrafamilial locus heterogeneity* の存在の可能性も挙げられる。近年、388 名の家族構成員を含むアーミッシュ大家族系における双極性障害の遺伝学的解析により、大家族系内における座位不均一性を認めたことが報告されており (Georgi et al., 2014)、遺伝学的背景が比較的同質な大家族系における遺伝性疾患においても、座位不均一性を発生させていることは考慮すべきであり、FSEC においてもその可能性が存在することは否定できない。

これまでにヒトの家族性内側側頭葉てんかん (FMTLE) および FLTE といった家族性側頭葉てんかんにおける連鎖解析が報告されている (Angelicheva et al., 2009; Azmanov et al., 2011; Bisulli et al., 2014; Chahine et al., 2013; Fanciulli et al., 2014a; Hedera et al., 2007; Ottman et al., 1995)。FLTE においては連鎖解析の結果に基づいて、*LGII* 変異が同定され (Kalachikov et al., 2002; Morante-Redolat et al., 2002)、さらには連鎖解析により認められた座位を WES により探索することで、*LGII* 変異を呈さない FLTE 家系における *RELN* 変異 (Dazzo et al., 2015) および *MICAL-1* 変異 (Dazzo et al., 2018) が同定されている。さらには、家系内に側頭葉起源のてんかん患者を含む FFEVF 家系においても同様の連鎖解析および WES の組み合わせにより *DEPDC5* 変異が同定された (Ishida et al., 2013)。FSEC の人におけるカウンターパートである FMTLE においては、連鎖解析により疾患関連座位の同定が報告されている (Baulac et al., 2001; Claes et al., 2004; Hedera et al., 2007; Maurermorelli et al., 2012; Chahine et al., 2013; Fanciulli et al.,

2014a). しかしながら、連鎖解析および WES を組み合わせた一つの研究では、座位周辺におけるてんかん発症と一致したアミノ酸置換をもたらす変異は認められず (Fanciulli et al., 2014a), 未だに FMTLE における疾患バリエントは報告されていない. そのため、本疾患の原因メカニズムとして、単一遺伝子のエクソン内のコーディング・バリエントの存在のみならず、ゲノム再編成やリスクハプロタイプの存在が関与している可能性も十分考えられ、本疾患の連鎖解析後の次世代シーケンサー next generation sequencer (NGS)を用いた解析には WES よりも WGS を実施した方が好ましいと考えられる.

第 4 章にて実施したゲノムワイド関連解析と同様に、本研究では Feline 63K SNP Array によるジェノタイプデータを用いて解析された. そのため、GWAS と同様に、低密度 SNP アレイの使用による、ジェノタイプ可能な SNPs 数が比較的少ないことによる制限が存在する. しかしながら、現在、利用可能な猫における SNP Array は本解析で使用した Feline 63K SNP Array しか存在しないため、本解析では猫の SNP アレイにおいて利用可能な最大数の SNPs をマーカーとして用いた.

本章では FSEC における連鎖解析を実施し、複数の座位において suggestive linkage を認めた. これは、FSEC における、てんかん発症の複雑性、さらには遺伝学的に複雑であることを示唆しているかもしれない. しかしながら、FSEC において suggestive linkage を示した座位に疾患関連バリエントが存在している可能性は十分考えらえる. WGS を実施することで、本章で検出された座位に存在するてんかん関連バリエントを検討することが可能と考えられる.

5.5 小括

- FSECs において、Feline 63K SNP Array によるジェノタイプ・データを用いてゲノムワイド連鎖解析を実施した。
- パラメトリックおよびノンパラメトリック連鎖解析において、複数の座位に suggestive linkage を認めた。
- 表現型別に連鎖解析を実施したことにより、異なる座位が suggestive linkage を示し、FSEC における 2 つの発作型は異なる疾患バリエーションに起因している可能性が示唆された。
- 複数の座位が FSEC のてんかん発症に関連している可能性が示唆され、本所見は FSEC におけるてんかん発症の複雑性を支持する。

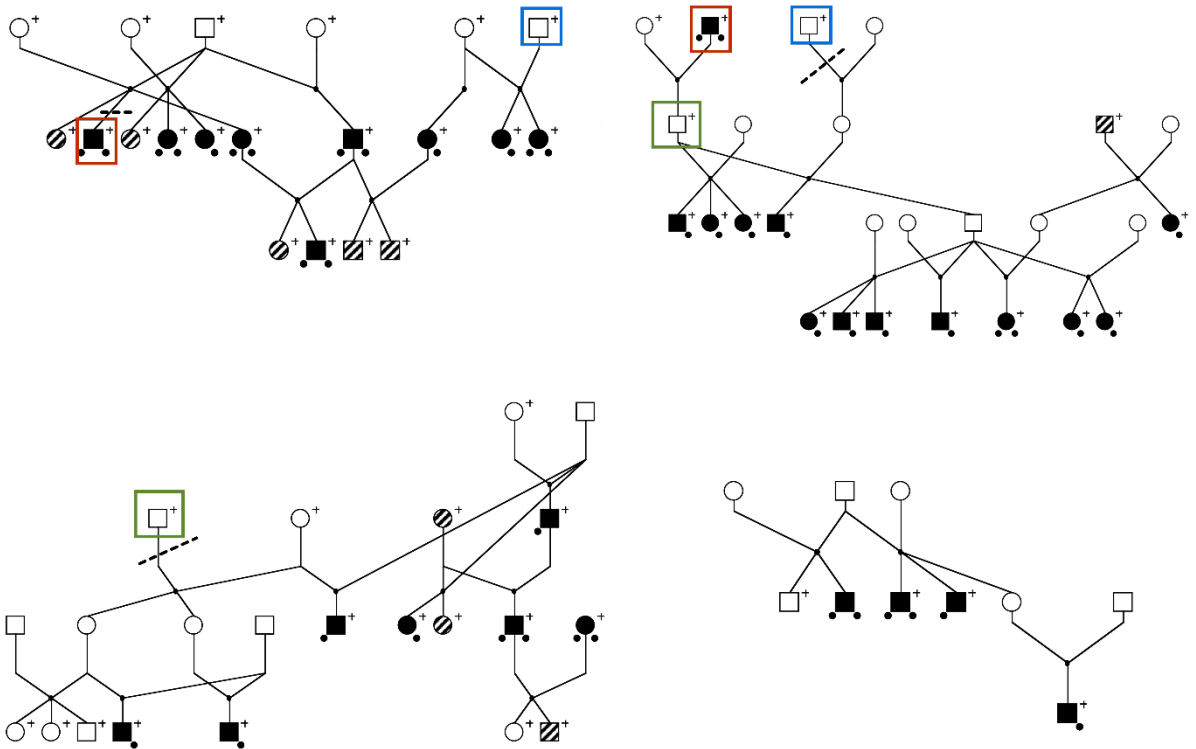


Figure 1. 連鎖解析時に分割された小家系. てんかん発作が確認されている個体は黒塗り, 脳波異常のみが確認されている個体は斜線で示す. 発作型は, 自発性発作 (左下の黒丸) および前庭刺激誘発性発作 (右下の黒丸) で示している. ジェノタイピングがなされた個体は右上の+にて記している. 家系が分断されている部分は点線にて示され, 重複個体は同じ色の四角で囲まれている.

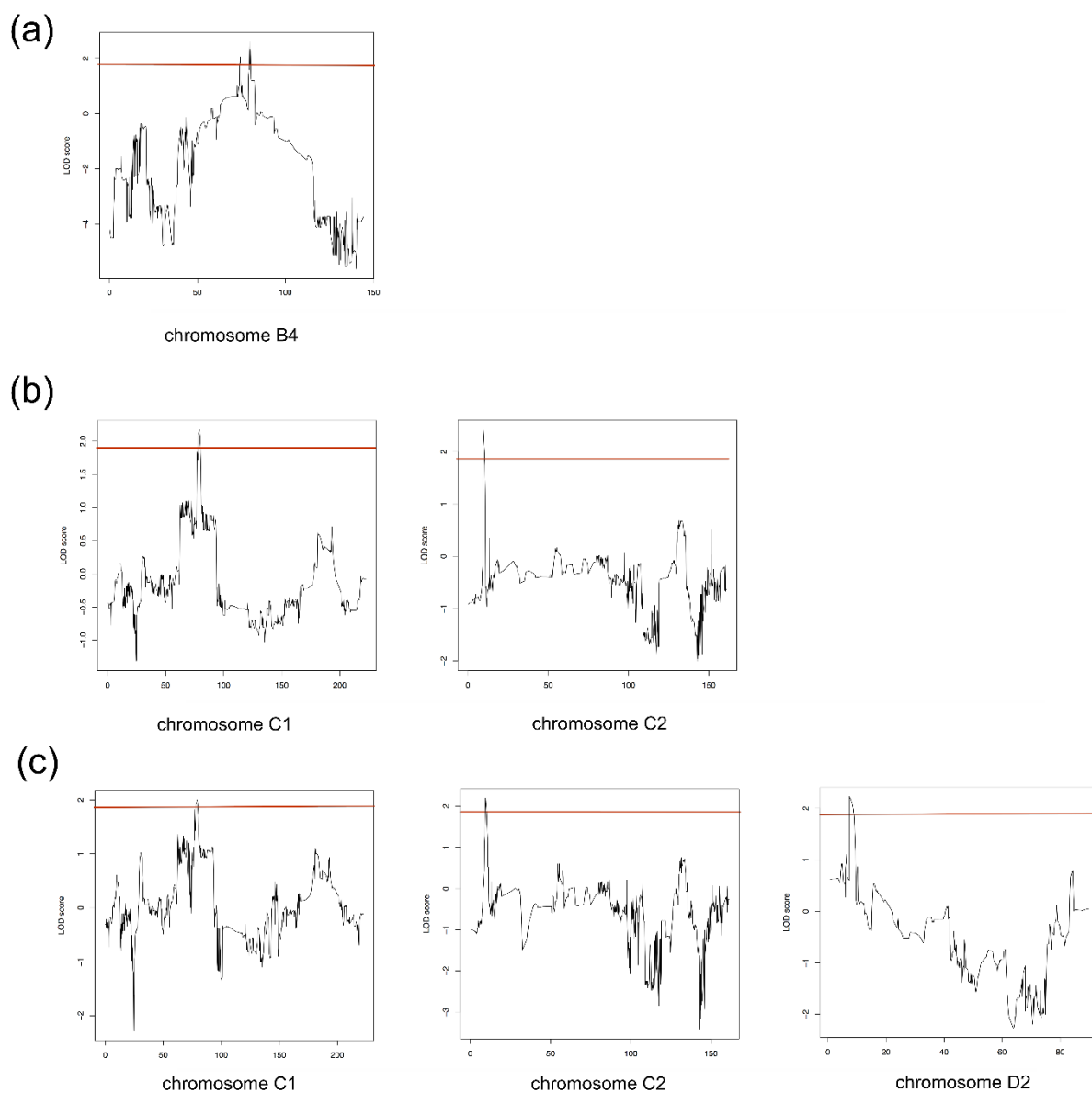


Figure 2. いずれの発作型および脳波異常を呈する個体も罹患個体とした場合の連鎖解析. (a) パラメトリック連鎖解析. (b) ノンパラメトリック連鎖解析 (exponential model). (c) 罹患同胞対解析 (exponential model). Suggestive linkage の閾値である 1.9 は赤線で示されている.

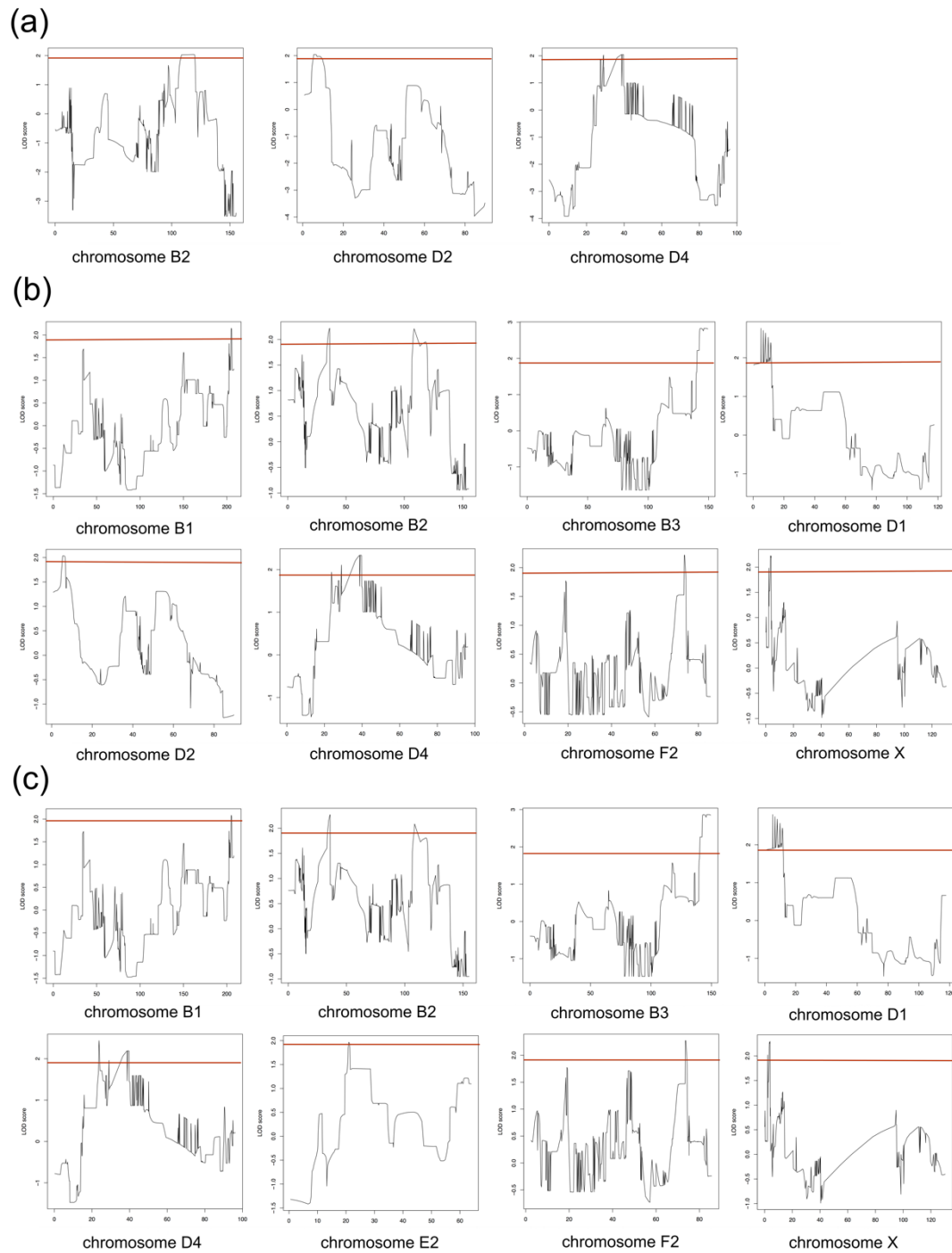


Figure 3. 自発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合の連鎖解析. (a) パラメトリック連鎖解析. (b) ノンパラメトリック連鎖解析 (exponential model). (c) 罹患同胞対解析 (exponential model). Suggestive linkage の閾値である 1.9 は赤線で示されている.

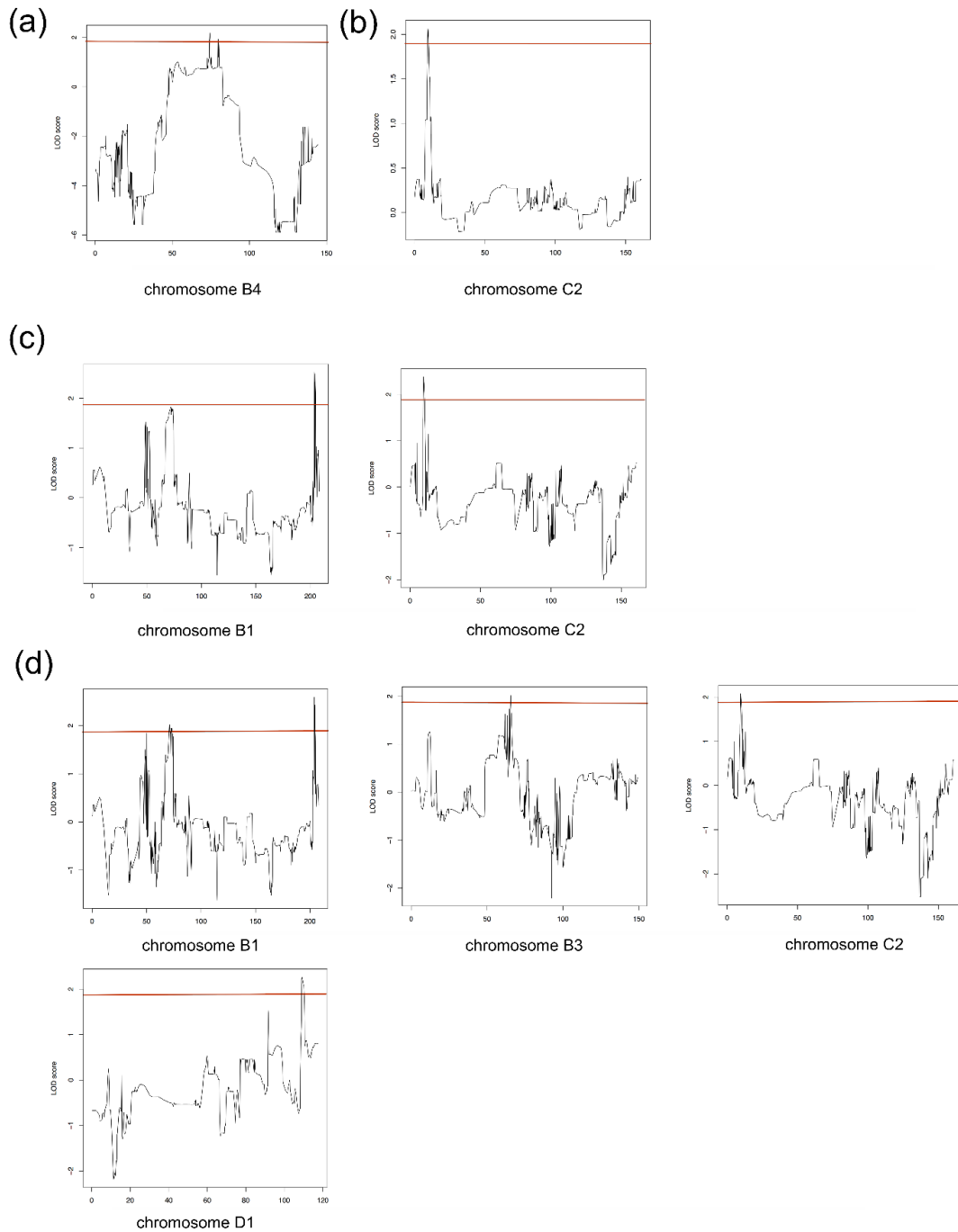


Figure 4. 前庭刺激誘発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合の連鎖解析.

(a) パラメトリック連鎖解析. (b) ノンパラメトリック連鎖解析 (linear model).

(c) ノンパラメトリック連鎖解析 (exponential model). (d) 罹患同胞対解析

(exponential model). Suggestive linkage の閾値である 1.9 は赤線で示されてい

る.

第6章

家族性自然発症性てんかん猫における，全ゲノムシーケンスを用いた疾患関連バリエーションの同定

6.1 諸言

2003年のヒトゲノムプロジェクトの終了以降，ムーアの法則 Moore's law に従う形でシーケンシングコストは数年間の間，予想どおり緩やかに低下していたが，2005年に次世代シーケンサー next generation sequencer (NGS) が登場したことでDNA配列解読の劇的なコストダウンが生じ，2010年にはNGSを利用した Miller 症候群 (Ng et al., 2010) や Charcot-Marie-Tooth 病 (Lupski et al., 2010) といった遺伝性疾患の原因遺伝子の同定がなされた．現在では誰もが全ゲノムシーケンス whole genome sequence (WGS) あるいは全エクソームシーケンス whole exome sequence (WES) を実施できるレベルにまでコストダウンした (具体的には NGS 登場前後は，全ゲノムの配列解読に 1,000,000 USD かかっていたのが 2018年現在は 2,000 USD 程度で可能)．このコストダウンは人医療にプレジジョン・メディスン precision medicine という概念をもたらした．特に小児救急分野における NGS の利用は，従来の医学では診断不可能であった先天性疾患の新生児の診断に多大な恩恵をもたらし，治療方針の早急な変更といった臨床的インパクトをもたらしている (Saunders et al., 2012; Willig et al., 2015; Mestek-Boukhibar et al., 2018)．さらにはシーケンシング・ランタイム，

リード・アラインメント，およびバリエーション・コーリングのすべての過程を 26 時間で完遂できることが報告され (Miller et al., 2015)，NGS を用いた疾患バリエーションの同定が医学ひいては獣医学に変革をもたらすことは明らかである．獣医学においても，その診断に病理学的診断が必要なニーマンピック病 C 型の猫で，WGS による生前の暫定診断が可能となった (Mauler et al., 2016)．

猫における WGS の実施により，前述したニーマンピック病 C 型における *NPCI* (NPC intracellular cholesterol transporter 1) 変異 (Mauler et al., 2016) の他，デボン・レックスおよびスフィンクスの先天性筋無力症候群における *COLQ* (collagen like tail subunit of asymmetric acetylcholinesterase) 変異 (Gandolfi et al., 2015)，ペルシャ猫の進行性網膜萎縮における *AIPL1* (aryl hydrocarbon receptor interacting protein like 1) 変異 (Lyons et al., 2016a)，ブリティッシュ・ショートヘアの自己免疫性リンパ増殖症候群における *FASL* (Fas ligand) 変異 (Aberdein et al., 2016)，さらにクロアシネコの進行性網膜萎縮における *IQCB1* (IQ motif containing B1) 変異 (Oh et al., 2017) といった疾患を引き起こすバリエーションが同定されている．これらはすべて，猫における遺伝性疾患の遺伝学的バリエーションを WGS により同定するために設立されたコンソーシアムである 99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative (www.felinegenetics.missouri.edu/99Lives) の一環として行われており，対象個体の WGS データを 99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative に参加している他の猫の WGS データと比較することで同定された．

本研究の目的は，4 頭の FSECs における WGS を実施し，99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative により開発された猫 DNA バリエーション・データベースに登録されているその他の猫の WGS データには存在しない FSECs に独特な

バリエーションを同定し、さらに第4章および第5章の Feline 63K SNP Array を用いた関連解析・連鎖解析にて示唆された領域に存在するバリエーションを検出し、FSEC のてんかん発症における遺伝アーキテクチャを解明することである。

6.2 材料および方法

本研究は日本獣医生命科学大学動物実験委員会および生命倫理委員会の承認を得て行われている (承認番号: 29K-4, 30K-4; 研究代表者: 長谷川大輔)。

6.2.1 WGS に用いられた FSECs の選択方法, 臨床的特徴, および DNA 抽出

4頭の FSECs が臨床的特徴および家系解析に基づいて WGS 解析個体として選択した。その選択基準, (i) WGS に利用可能な質および量を有する DNA の利用可能性, (ii) 発作頻度 (すなわち, 発作頻度の高い個体と低い個体), (iii) 血縁関係ができるだけ遠い個体とした。最終的に, 自発発作の最も発作頻度の高く, 前庭誘発刺激発作の頻度が低い1頭 (F16IMC), 自発発作の最も発作頻度の高い1頭 (D8040), 前庭誘発発作の発作頻度の高い1個体 (K13MMC), および自発発作および前庭誘発発作の頻度が低い1頭 (D6017) を選択した。これら4頭の臨床的特徴は Table 1 に記載した。WGS 用の DNA 精製のため, これら4頭の FSECs より 6 mL の全血が頸静脈より採血され, フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール法により DNA が抽出された。DNA の質および濃度はアガロース・ゲル電気泳動にて視覚化され, 評価された。

6.2.2 全ゲノムシーケンシングデータ作成

4頭それぞれ、6 µg 以上の DNA が McDonnell Genome Institute - Washington University (St. Louis, MO, USA) へ WGS のために送られた。SciClone G3 NGS Workstation (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) にて KAPA Hyper PCR-free Library Prep Kit (for Illumina) (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA) を用いて 450 bp ライブラリーが作成された。Illumina HiSeq X Ten (Illumina) の最終ライブラリーの濃度は qPCR (KAPA Biosystems) にて決定された。HiSeq X Ten flow cell (Illumina) にて、約 30X カバレッジである約 90 Gb の 2x150 bp ペアエンド・シーケンスデータが産出された。

6.2.3 バリアント・コーリングおよびフィルタリング

本研究における 4 頭の WGS データ処理は、99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative の一部として実施された。全てのリードは、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) version 0.7.17 (Li et al., 2009_Bioinformatics) を用いて最新の猫ゲノムアセンブリである *Felis_catus_9.0* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000181335.3) にマッピングされた。重複は Picard tool MarkDuplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) を用いてマークした。挿入・欠失 (Indels) リアライメントは Genome Analysis Tool Kit (GATK version 3.8; McKenna et al. 2010) IndelRealigner を用いて実施した。バリアント・コーリングは gVCF モードにて GATK Haplotype Caller を用いて行った。4 頭の FSECs の WGS データのフィルタリングは VarSeq 2.0.2 (Golden Helix, Bozeman, MT, USA) を用いて行い、99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative に含まれる 4 頭の FSECs を除いた合計 191 頭のイエネコの WGS データと比較した。99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative に含まれる WG

S データはすべて Illumina シークエンサーによりデータ産生され、これらは概して平均カバレッジ 20–30X のものが含まれている。

フィルタリングは以下の 3 つのパターンにて実施した; (i) 全ての表現型 (つまり、自発性発作、前庭刺激誘発性発作、および脳波異常のみ) を疾患とした場合 (共通の疾患バリエーションに起因するという仮定)、(ii) 自発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合、(iii) 前庭刺激誘発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合。さらに、アミノ酸置換をもたらす全てのエキソン領域における変異に加えて、第 4 章および第 5 章にて同定された疾患座位におけるバリエーション (Table 2) のフィルタリングを行った。イントロン領域を含む遺伝子領域内のみならず、インタージェニック領域におけるレアバリエーションも検出の対象とした。それぞれの表現型別の解析時には、それぞれの表現型を持つ個体に特異的なバリエーションの検出を実施した。同時に、FSECs のてんかん発症に関連するバリエーションは極めて稀なものであると仮定し、191 頭のコントロールに存在しないバリエーションの検出を行なった。さらに、家系内不均一性 *intrafamilial heterogeneity* の存在も考慮し、全ての表現型を同一疾患とした場合、および前庭刺激誘発性発作個体の解析時には、それぞれにおいて、3 個体あるいは 2 個体が共通してホモあるいはヘテロで有しているバリエーションの検出も行った。アミノ酸置換を引き起こす変異が認められた場合には、PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>), SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>), および PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) によってそのアミノ酸置換によるタンパク機能への影響を評価した。

6.3 結果

4頭全てにおいて、おおよそ 30X カバレッジの WGS データが得られた。

6.3.1 全ての表現型が共通の疾患バリエントに起因すると仮定した際の解析

全ての表現型が共通の疾患バリエントに由来しており、かつ本バリエントは FSEC に特異的なレアバリエントであるという仮定を基に本解析を実施した。連鎖解析および TDT において示唆された染色体座位におけるレアバリエントを検出した。連鎖解析および TDT により示唆された領域(つまり、染色体 B3, B4, C1, C2, D2 ; 第 5 章参照) のバリエント・フィルタリングによって、領域周囲にて FSEC に特異的かつエキソン領域の変異(非同義および同義変異を含む) は認められなかった。さらに、4頭が共通して有する遺伝子内およびインタージェニック領域に存在するレアバリエントは存在しなかった。

家系内不均一性を考慮した場合、4頭中 3頭で共通したレアバリエントの検出がなされ (Table 3), それらは全てヘテロ変異であった。これらの中で、てんかんに関連していると考えられた遺伝子として *KCNJ6* (potassium voltage-gated channel subfamily J member 6) が存在した。

6.3.2 自発性発作個体を対象にフィルタリングを実施した際の解析

自発性発作個体 (F16IMC, D8040) をコントロールと比較した場合に、特異的な変異を持つと仮定して本解析を実施した。前庭刺激誘発性発作のみを示す個体に関しては、疾患バリエントを有している可能性も考えられるため、キャリアーとして解析を実施した。連鎖解析および TDT にて、示唆された領域(つ

まり、染色体 B1, B2, B3, D1, D2, D4, E2, F2, X ; 第 5 章参照) におけるバリエント・フィルタリングによって、自発性発作個体の 2 頭が共通して有するレアバリエントが検出された。これらバリエントで翻訳領域内に存在するものは存在しなかった。自発性発作個体の 2 頭が共通して有したイントロンおよびインタージェニック領域のレアバリエントを Table 4 にまとめた。認められた遺伝子としては *ABLIM2* (actin binding LIM protein family member 2), *TRMT44* (tRNA methyltransferase 44 homolog), *TTC7B* (tetratricopeptide repeat domain 7B), *TC2N* (tandem C2 domains, nuclear), *TRIP11* (thyroid hormone receptor interactor 11), *RIN3* (Ras and Rab interactor 3), *LGMN* (legumain), *ITPK1* (inositol-tetrakisphosphate 1-kinase), *BTBD7* (BTB domain containing 7), *AK7* (adenylate kinase 7) が存在した。このうち、*TRMT44* は中心周囲棘波を伴う部分てんかんを呈する家族性てんかん症候群 familial epilepsy syndrome of Partial Epilepsy with Pericentral Spikes の候補遺伝子として報告されている (Leschziner et al., 2011)。

6.3.3 前庭刺激誘発性発作を対象にフィルタリングを実施した際の解析

前庭刺激誘発性発作個体 (F16IMC, K13MMC, D6017) をコントロールと比較した場合に特異的な変異を持つと仮定して本解析を実施した。自発性発作のみを示す個体に関しては、疾患バリエントを有している可能性も考えられるため、キャリアーとして解析を実施した。連鎖解析および TDT において、示唆された領域 (つまり、染色体 B1, B3, B4, C2, D1 ; 第 5 章参照) におけるバリエント・フィルタリングによって検出された、FSECs にのみ認められ他の 191 頭のイエネコに存在しないバリエントを Table 5 にまとめた。3 頭全てがホモと

して有し、かつ 191 頭のコントロールが有さないバリエントは認められなかった。3 頭全てに認められたヘテロのエキソン領域の変異として、染色体 D1 領域の *CHRM1* (cholinergic receptor muscarinic 1) c.122C>T を認め、アミノ置換の有害予測において PROVEAN では Neutral, SIFT では deleterious, PolyPhen-2 では Possibly Damaging であった。他にも同じ領域周辺にて *AHNAK* (AHNAK nucleoprotein) 遺伝子内の複数のイントロン・バリエントを認め、これらは 3 頭全てにおいてヘテロ変異であった。他に染色体 B1 領域における、*ABLIM2* (actin binding LIM protein family member 2) および *TRMT44* 遺伝子内のイントロン・バリエントは 3 頭全てがホモあるいはヘテロとして保有しており、さらにはキャリアーとして解析された自発性発作のみを示す個体においてもヘテロとして認められた。他にも、3 頭中 2 頭においてホモあるいはヘテロとして認められるレアバリエントの検出がなされ (Table 5), その中でてんかんに関連すると考えられる遺伝子としては *KCNJ6* が存在した。

6.4 考察

NGS の普及により、人のてんかん医療における NGS データの利用、およびその臨床応用は年々増加している。特に、てんかん脳症における WES の利用は費用対効果そして臨床的有用性の観点から有用とされている (Palmer et al., 2018)。さらに、640 名の遺伝性全般性てんかん、525 名の家族性焦点性てんかん、および 3877 名のコントロールの WES データを対象とした大規模なケース・コントロール研究によって、既知のてんかん遺伝子におけるウルトラ・レア・バリエントの同定が報告されている (Epi4K consortium, 2017)。これらの研

究は、NGS のさらなる普及により、てんかん診療におけるプレシジョン・メディシンの潜在的可能性を示唆している。しかしながら、同時に遺伝性全般性てんかんを対象とした初期の WES 研究では統計学的な有意差は得られておらず (Heinzen et al., 2012), この研究は遺伝性全般性てんかんにおける高い遺伝的不均一性を示唆した。さらに最近、両親がてんかんおよび熱性けいれんの既往歴を持たない海馬硬化を伴う内側側頭葉てんかん mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis (MTLE-HS) 患者およびその両親を対象とした、23 組の完全なトリオを含む WES 研究が報告された (Wong et al., 2018)。この研究では、幾らかの *de novo* バリアントの同定がなされたものの、MTLE-HS を引き起こす決定的バリアントは検出されなかった。このことは MTLE-HS の根底に存在する遺伝学的アーキテクチャが複雑であるという見解を支持する。

家族性側頭葉てんかん (FTLE) においては、これまで WES を用いたいくつかの研究が報告されている。家族性外側側頭葉てんかん (FLTE) におけるリーリン *RELN* 変異 (Dazzo et al., 2015), *MICAL-1* 変異 (Dazzo et al., 2018), TLE 患者を家系内に含む多様な焦点を持つ家族性焦点性てんかん familial focal epilepsy with variable foci (FFEVF) における *DEPDC5* 変異 (Dibbens et al., 2013; Ishida et al., 2013), そして家系内に TLE 患者を含む幾らかの家系における *NPRL2* (NPR2 like, GATOR1 complex subunit), *NPRL3* (NPR3 like, GATOR1 complex subunit), あるいは *DEPDC5* 変異 (Ricos et al., 2015) といった WES を利用しての変異同定が報告されている。FMTLE においては連鎖解析に加え WES を利用した報告が 1 報のみ存在するが、疾患の原因となり得る翻訳領域の変異は認められなかった (Fanciulli et al., 2014a)。この理由としては、FMTLE における臨床的

不均一性に加え、疾患関連性バリエーションの低浸透度、つまり浸透度の減少および表現度の差異 *reduced penetrance and variable expression* が本疾患に関与するバリエーションの同定を困難にしているとも考えられる。

本研究では、FSEC にみられる全ての表現型が共通の疾患バリエーションに由来すると仮定した場合、および2つの発作型がそれぞれ独立した疾患バリエーションに由来すると仮定した場合の両方の可能性を考慮して解析を実施した。191頭のFSECsではない様々な疾患・表現型を有するイエネコ個体のWGSデータと比較した際、FSECsにおけるこれまでの連鎖解析および関連解析によって示唆された領域において、翻訳領域におけるFSECにユニーク、かつ全ての表現型の根底に存在すると考えられる変異は認められなかった。さらに、いずれの表現型で解析した場合においても、独立した表現型と一致して存在するホモ接合変異は認められなかった。しかしながら、前庭刺激誘発性発作を呈する3頭において、*CHRM1* c.122C>T を認めたことは興味深い。*CHRM1* はムスカリン性アセチルコリン受容体M1をコードし、M1受容体は大脳皮質や海馬といった部位に局在することが知られている。M1受容体はレム睡眠 (Velazquez-Moctezuma et al., 1989)、記憶 (Anagnostaras et al., 2003)、そして、てんかん発作 (Cruickshank et al., 1994) に関与していることが知られている。これまで人において、*CHRM1* 変異に関連したてんかん症候群は報告されていないものの、本変異が前庭刺激誘発性発作になんらかの形で関与している可能性は考慮される。さらに、中心周囲棘波を伴う部分てんかんを呈する家族性てんかん症候群において候補遺伝子として *TRMT44* (*Q8IYL2*) が報告されている (Leschziner et al., 2011)。自発性発作および前庭刺激誘発性発作を独立して解析した場合に、い

れの場合においても FSEC にユニークな *TRMT44* 遺伝子内のイントロン・バリエーションを認めた。これらは翻訳領域内の変異ではなく、イントロン領域の変異であるが、最近では WGS の発展に伴い、このようなディープ・イントロン・バリエーションが疾患発症に関連していることが次々と明らかになってきている (Mendes de Almeida et al., 2017; Inaba et al., 2017; Zernant et al., 2018; Reviewed in Vaz-Drago et al., 2017)。したがって、本研究で認められた FSEC にユニークなイントロン・バリエーションが FSEC の疾患発症に関連している可能性は十分に考えられる。

アーミッシュ (米国の各地にて独自のコミュニティを形成しているドイツ系移民) の巨大家系に認められる双極性障害において、388 名の家系構成員において連鎖解析および関連解析を行い、さらに 50 名において WGS を実施した研究によって、たとえ一つの大家系において頻発する遺伝性疾患であっても、共通するリスク因子の同定ができず、座位異質性 *locus heterogeneity* が示された研究が存在する (Georgi et al., 2014)。FSEC においても、たとえ同じ表現型分類であったとしても、同一家系内での座位異質性の存在は考慮されるべきである。*KCNJ6* の点変異はマウスにおける発作の感受性を低下させることが報告されているが (Signorini et al., 1997)、FSEC において、全ての表現型を解析した場合、および前庭刺激誘発性発作のみを解析した場合のそれぞれにおいて 1 頭を除き *KCNJ6* 遺伝子内に FSEC にユニークなイントロン・バリエーションを認めた。本バリエーションが疾患発症に関与しているかのさらなる検討は必要であるものの、この事は FSEC での座位異質性の存在を想起させる。

てんかんをはじめとする複雑遺伝性疾患の遺伝性には、多くの遺伝子の小さな影響が関与していることが、これまでの人における大規模なゲノムワイド関連解析によって示唆されてきた。近年、これまでに複雑疾患の遺伝性に関しての Polygenic という概念 (Shi et al., 2016; Weiner et al., 2017) に加え、 Omnigenic という概念が提唱された (Boyle et al., 2017)。これはコア遺伝子と言われる疾患に直接関連している遺伝子群ではなく、それらコア遺伝子と同一組織に発現しているコア遺伝子群ではない周辺遺伝子群によって作出されるネットワーク環境の変化によって疾患が形成されているという仮説である。この Omnigenic という概念から、複雑性疾患の疾患関連バリエーションは、必ずしもその疾患のコア遺伝子である必要はないということも考慮されるべきであろう。

さらに、本研究で用いたフィルタリング・ソフトウェアである VarSeq 2.0.2 は、SNP および indel にのみを検出可能であるため、構造多型 structural variants (SV) に関する検討を行っていない。SV は、欠失、重複、新規挿入 novel insertion、逆位 inversion、転座 translocation といった再編集のいくつかのタイプを含む。DNA コピー数に影響を与えるものは、コピー数多型 copy number variants (CNV) として知られており、これまでの研究において、CNV (特に、稀な微細欠失 microdeletion [400 kb 以上、1%未満の頻度]) は素因性全般性てんかん、焦点性てんかんにおいて、疾患発生のリスク因子として関与していることが報告されている (Helbig et al., 2009; de Kovel et al., 2010; Heinzen et al., 2010; Mefford et al., 2010; Reinthaler et al., 2014; Lal et al., 2015; Pérez-Palma et al., 2017; Monlong et al., 2018)。同様に、FSEC が動物モデルとしてのカウンターパートとする FMTLE 患者においても、微細欠失の報告がされている (Catarino et al.,

2011). さらには、常染色体顕性外側側頭葉てんかん家系において、CNV 解析を実施した研究では、同定されたいくらかの CNVs は疾患感受性因子として関与していることが示唆された (Fanciulli et al., 2014b). したがって、FSEC においても、CNV 解析を実施することは有用であると考えられる.

加えて、メチレーション **methylation** 解析や、FSEC の発作起始領域である海馬や扁桃体といった組織における体細胞突然変異 **somatic mutation** によるセカンド・ヒットの検討が FSEC における遺伝アーキテクチャの理解をより深めるものとなるだろう.

結論として、本研究では 4 頭の FSECs において、WGS を実施し 99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative に登録されている 191 頭の他の疾患を持つイェネコの WGS データと比較することにより、FSECs における遺伝学的アーキテクチャの解明を試みた. これまでの連鎖解析および TDT にて示唆された複数の領域において、幾つかの FSECs にユニークなバリエーションを認めた. FSECs におけるてんかん発生の浸透度の減少および表現度の差異の存在のため、遺伝学的に複雑なアーキテクチャを有していることが考慮されるものの、これらの複数の領域におけるバリエーションが、FSEC における疾患発生の根底に寄与している可能性が示唆される.

6.4 小括

- 4 頭の FSECs において、WGS を実施し、191 頭の FSEC ではないイェネコの WGS データと比較した.

- これまでの連鎖解析や関連解析にて示唆された領域において、すべての表現型の疾患バリエントが共通すると仮定した場合と、自発性発作および前庭刺激誘発性発作の疾患バリエントが独立していると仮定した場合とで解析を実施した。
- それぞれの表現型の解析時において、てんかんに関連すると考えられる遺伝子内に FSECs にユニークな非同義置換およびイントロン・バリエントを認めた。
- 本研究は FSEC における、てんかん発症に関する遺伝学的アーキテクチャの複雑性をさらに強調するとともに、その疾患関連候補バリエントを明らかにした。

Table 1. WGS を実施した 4 頭の FSECs の臨床的特徴

猫個体	性別	年齢	発作発症年齢	発作型	発作頻度
F16IMC	M	8y4m	0y6m	SS / VSS	毎月 / まれに誘発される
D8040	M	9y2m	0y8m	SS	毎月
K13MMC	M	4y8m	0y7m	VSS	頻繁に誘発される
D6017	M	8y0m	0y7m	VSS	まれに誘発される

M: オス, y: 年, m: 月齢, SS: 自発性発作, VSS: 前庭刺激誘発性発作

Table 2. 連鎖解析および伝達不平衡試験にて認められた座位

	染色体	位置	方法 (LOD スコアまたは P_{genome} 値)
All	B3	136.12	TDT (0.6251)
	B4	79.598	Parametric (2.6027)
	C1	78.071	NPLexp (2.174), ASPexp (2.002)
	C2	9.142	NPLexp (2.424), ASPexp (2.194)
	D2	7.213	ASPexp (2.226)
SS	B1	205.127–205.178	NPLexp (2.149), ASPexp (2.084)
	B2	35.972	NPLexp (2.219), ASPexp (2.269)
		108.436	NPLexp (2.21), ASPexp (2.084)
		118.179–118.323	PL (2.0382)
		143.542–143.813,	
	B3	146.039–147.919	NPLexp (2.829)
		143.490–143.792,	
		146.039–148.308	ASPexp (2.866)
	D1	5.091	NPLexp (2.763), ASPexp (2.8)
	D2	5.579	PL (2.0435), NPLexp (2.035)
	D4	23.772	ASPexp (2.438)
		38.67	PL (2.0485)
		39.021	NPLexp (2.338)
		42.346	TDT (0.7516)
	E2	21.0	ASPexp = 1.96
F2	73.507–73.669	NPLexp (2.216), ASPexp (2.272)	
X	3.541–3.642	NPLexp (2.224)	
	3.891	ASPexp (2.296)	
VSS	B1	203.848	NPLexp (2.524), ASPexp (2.592)
	B3	35.593	TDT (0.7486)
		65.451	ASPexp (2.029)
	B4	74.261	Parametric (2.1747) NPLlinear (2.065), NPLexp (2.383),
	C2	9.542	ASPexp (2.075)
	D1	109.265	ASPexp (2.266)

All: 全ての表現型を罹患個体として含めた場合, SS: 自発性発作個体のみを罹患個体として含めた場合, VSS: 前庭刺激誘発性発作個体のみを罹患個体として含めた場合, TDT: 伝達不平衡試験, NPL: ノンパラメトリック連鎖解析, ASP:

罹患同胞対試験, PL: パラメトリック連鎖解析, linear: linear model, exp:
exponential model.

Table 3. WGS が行われた 4 頭の FSECs のうち 3 頭において、共通して認められたレアバリエント

染色体: 位置	遺伝子 シンボル	局在	変異	総アレル数	ヘテロ	ホモ
C1:77144173		intergenic_variant		8	3	0
C1:77368015		intergenic_variant		8	3	0
C1:77424189		intergenic_variant		8	3	0
C1:77941921		intergenic_variant		8	3	0
C1:78646507	C1orf146	intron_variant	ENSFCAT00000000151:c.408+189T>C	8	3	0
	GLMN	3_prime_UTR_variant	ENSFCAT00000022453:c.*1972A>G			
C1:79347393		intergenic_variant		8	3	0
C2:7798301	KCNJ6	intron_variant	ENSFCAT00000005148:c.25+4340G>A	8	3	0
C2:7806786	KCNJ6	intron_variant	ENSFCAT00000005148:c.25+12825C>T	8	3	0
C2:7903676	KCNJ6	intron_variant	ENSFCAT00000005148:c.26-7824C>T	8	3	0
C2:8009396		intergenic_variant		8	3	0
C2:8304696		intergenic_variant		8	3	0
C2:8787694	HLCS	intron_variant	ENSFCAT00000002943:c.1455-58296G>A	8	3	0
D2:6206182	PRKG1	intron_variant	ENSFCAT000000040874:c.478+137474G>A	8	3	0
D2:6256873	PRKG1	intron_variant	ENSFCAT000000040874:c.478+86783G>A	8	3	0

上記のバリエントは FSEC ではない、他の 191 頭のイエネコにおいて認められなかった。4 頭の FSECs に共通して認められたレアバリエントは存在しなかった。ヘテロおよびホモの列には、それぞれにおいて認められたアレル数を示す。

Table 4. WGS が行われた 4 頭の FSECs のうち 2 頭の自発性発作個体において、共通して認められたレアバリエント

染色体: 位置	遺伝子シンボル	局在	変異	S	ヘテロ	ホモ	キヤリアー	ヘテロ	ホモ
<u>B1:20467168</u> 9	ABLIM2	intron_variant	ENSFCAT00000060486:c.1466-274G>A	4	2	0	4	1	1
<u>B1:20500342</u> 3	TRMT4	intron_variant	ENSFCAT00000063793:c.705-2340G>A	4	2	0	4	1	1
<u>B1:20500818</u> 9	TRMT4	intron_variant	ENSFCAT00000063793:c.994-100G>A	4	2	0	4	1	1
<u>B1:20500969</u> 4	TRMT4	intron_variant	ENSFCAT00000063793:c.1102-417G>A	4	2	0	4	1	1
<u>B1:20531190</u> 2		intergenic_variant		4	2	0	4	1	1
		intergenic_variant		4	2	0	4	0	0
		intergenic_variant		4	2	0	4	1	0
		intergenic_variant		4	2	0	4	1	0
		intergenic_variant		4	2	0	4	0	1
		intergenic_variant		4	2	0	4	1	1
		intergenic_variant		4	2	0	4	0	0
<u>B2:35580859</u>	GRM4	intron_variant	ENSFCAT00000055425:c.1168+51_1168+52insGGG	4	2	0	4	1	0
<u>B3:13640242</u> 9	TTC7B	intron_variant	ENSFCAT00000058981:c.1152+1265G>A	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13640351</u> 0	TTC7B	intron_variant	ENSFCAT00000058981:c.1152+184G>A	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13640634</u> 8	TTC7B	intron_variant	ENSFCAT00000058981:c.1014+1820G>A	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13641124</u> 4	TTC7B	intron_variant	ENSFCAT00000058981:c.951-3013G>A	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13641266</u> 1	TTC7B	intron_variant	ENSFCAT00000058981:c.950+3478G>A	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13641318</u> 3	TTC7B	intron_variant	ENSFCAT00000058981:c.950+2956T>A	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13641399</u> 5	TTC7B	intron_variant	ENSFCAT00000058981:c.950+2144G>T	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13642252</u> 9	TTC7B	intron_variant	ENSFCAT00000058981:c.699-364C>T	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13688142</u> 2		intergenic_variant		4	2	0	4	0	0
<u>B3:13725214</u> 0		intergenic_variant		4	2	0	4	0	0
<u>B3:13734216</u> 2	TC2N	intron_variant	ENSFCAT00000048914:c.302-2022A>G	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13749736</u> 0	TRIP11	intron_variant	ENSFCAT00000025657:c.5258-793A>G	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13774908</u> 5		intergenic_variant		4	2	0	4	0	0
<u>B3:13808142</u> 5	RIN3	intron_variant	ENSFCAT00000027470:c.381-1424_381-1423insTCTCTCT	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13814048</u> 4	LGMN	intron_variant	ENSFCAT00000007891:c.319-826delT	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13814111</u> 9	LGMN	intron_variant	ENSFCAT00000007891:c.318+228T>A	4	2	0	4	0	0
<u>B3:13814917</u> 0	LGMN	intron_variant	ENSFCAT00000007891:c.138+4700_138+4701delTA	4	2	0	4	0	0

<u>B3:13814917</u>			ENSFCAT0000007891:c.138+4698_138+4700del							
<u>1</u>	LG MN	intron_variant	AAT	4	2	0	4	0	0	
<u>B3:13815315</u>			ENSFCAT0000007891:c.138+712_138+715delG							
<u>6</u>	LG MN	intron_variant	TTT	4	2	0	4	0	0	
<u>B3:13815379</u>			ENSFCAT0000007891:c.138+73C>T							
<u>8</u>	LG MN	intron_variant		4	2	0	4	0	0	
<u>B3:13845267</u>			ENSFCAT00000047980:c.96-8115T>C							
<u>9</u>	ITPK1	intron_variant		4	2	0	4	0	0	
<u>B3:13862264</u>			ENSFCAT00000022070:c.1163-6060_1163-6059delTT							
<u>3</u>	BTBD7	intron_variant		4	2	0	4	0	0	
<u>B3:13865139</u>			ENSFCAT00000022070:c.-106-2401_-106-2400insGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTC							
<u>8</u>	BTBD7	intron_variant		4	2	0	4	0	0	
<u>B3:14144259</u>			ENSFCAT0000006784:c.861+518A>G							
<u>1</u>	AK7	intron_variant		4	2	0	4	2	0	
<u>D1:1049664</u>		intergenic_variant								
<u>9</u>		nt		4	2	0	4	0	0	
<u>D1:1056174</u>		intergenic_variant								
<u>2</u>		nt		4	2	0	4	0	1	

SS およびキャリアーの列には、それぞれ自発性発作個体およびキャリアーの総アレル数が示された。ヘテロおよびホモの列には、それぞれにおいて認められたアレル数が示された。

Table 5. WGS が行われた 4 頭の FSECs のうち 3 頭の前庭刺激誘発性発作個体において、共通して認められたレアバリエント

染色体: 位置	遺伝子 シンボル	局在	変異	V SS	ヘ テ ロ	ホ モ	キ ャ リ ア ー	ヘ テ ロ	ホ モ
<u>B1:2024</u> <u>32683</u>	STK32B	intron_varian t	ENSFCAT00000004075:c.261-38018_261-38012delGAGAGAG	6	2	0	2	0	0
<u>B1:2024</u> <u>35751</u>	STK32B	intron_varian t	ENSFCAT00000004075:c.261-34945delC	6	2	0	2	0	0
<u>B1:2024</u> <u>51851</u>	STK32B	intron_varian t	ENSFCAT00000004075:c.261-18850G>A	6	2	0	2	0	0
<u>B1:2024</u> <u>88939</u>	STK32B	intron_varian t	ENSFCAT00000004075:c.434+18065T>C	6	1	1	2	0	0
<u>B1:2027</u> <u>44399</u>	EVC2	intron_varian t	ENSFCAT00000049596:c.828+227C>A	6	2	0	2	0	0
<u>B1:2040</u> <u>32684</u>	SORCS2	intron_varian t	ENSFCAT00000053991:c.30+22550dupC	6	2	0	2	0	0
<u>B1:2040</u> <u>37705</u>	SORCS2	intron_varian t	ENSFCAT00000053991:c.30+27569_30+27570insATGT	6	1	1	2	0	0
<u>B1:2040</u> <u>37709</u>	SORCS2	intron_varian t	ENSFCAT00000053991:c.30+27573_30+27574insTC	6	1	1	2	0	0
<u>B1:2040</u> <u>52535</u>	SORCS2	intron_varian t	ENSFCAT00000053991:c.30+42400delG	6	2	0	2	0	0
<u>B1:2040</u> <u>52540</u>	SORCS2	intron_varian t	ENSFCAT00000053991:c.30+42405delC	6	2	0	2	0	0
<u>B1:2040</u> <u>52541</u>	SORCS2	intron_varian t	ENSFCAT00000053991:c.30+42406delA	6	2	0	2	0	0
<u>B1:2044</u> <u>28806</u>	SORCS2	intron_varian t	ENSFCAT00000053991:c.1039-379_1039-378insAGA	6	1	1	2	0	0
<u>B1:2044</u> <u>30091</u>	SORCS2	intron_varian t	ENSFCAT00000053991:c.1141+805A>T	6	1	1	2	0	0
<u>B1:2046</u> <u>71689</u>	ABLIM2	intron_varian t	ENSFCAT00000060486:c.1466-274G>A	6	2	1	2	1	0
<u>B1:2050</u> <u>03423</u>	TRMT44	intron_varian t	ENSFCAT00000063793:c.705-2340G>A	6	2	1	2	1	0
<u>B1:2050</u> <u>08189</u>	TRMT44	intron_varian t	ENSFCAT00000063793:c.994-100G>A	6	2	1	2	1	0
<u>B1:2050</u> <u>09694</u>	TRMT44	intron_varian t	ENSFCAT00000063793:c.1102-417G>A	6	2	1	2	1	0
<u>B3:3436</u> <u>4351</u>	C15orf59	3_prime_UT R_variant	ENSFCAT00000060237:c.*3414C>A	6	3	0	2	0	0
<u>B3:3442</u> <u>2599</u>		intergenic_va riant		6	2	1	2	0	0
<u>B3:3469</u> <u>8304</u>		intergenic_va riant		6	3	0	2	0	0
<u>B3:3585</u> <u>2485</u>	MYO9A	intron_varian t	ENSFCAT00000022711:c.840+2056_840+2069delATATTTAAATATAT	6	2	0	2	0	0
<u>B3:3594</u> <u>5709</u>	MYO9A	intron_varian t	ENSFCAT00000022711:c.2302+9921_2302+9922dupCC	6	2	1	2	0	0
<u>B3:3647</u> <u>0257</u>	THSD4	intron_varian t	ENSFCAT00000053617:c.1028-33435G>A	6	3	0	2	0	0
<u>B3:3670</u> <u>0006</u>		intergenic_va riant		6	3	0	2	0	0
<u>B3:6405</u> <u>8308</u>	CHP1	intron_varian t	ENSFCAT00000038834:c.140+3453A>C	6	2	0	2	0	0
<u>B3:6426</u> <u>3641</u>	INO80	intron_varian t	ENSFCAT00000014726:c.3417+2547delC	6	2	0	2	0	0
<u>B3:6433</u> <u>3653</u>	DLL4	missense_var iant	ENSFCAT00000014725:c.1552G>A	6	2	0	2	0	0
<u>B3:6447</u> <u>6973</u>	DNAJC17	intron_varian t	ENSFCAT00000056541:c.79-8328C>T	6	2	0	2	0	0
<u>B3:6469</u> <u>8538</u>		intergenic_va riant		6	2	0	2	0	0
<u>B3:6529</u> <u>9187</u>	ENSFCAG000 00038334	intron_varian t	ENSFCAT00000044218:c.172+31616C>G	6	2	0	2	0	0

B3:65480848	FSIP1	missense_variant	ENSFCAT00000011453:c.1147C>T	6	2	0	2	0	0		
B3:65641154		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B3:65675702		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B3:65746563		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B3:65795540		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B3:66597037	FAM98B	intron_variant	ENSFCAT00000060531:c.730-4826_730-4823delCTGT	6	2	0	2	0	0		
B3:66795500	SPRED1	intron_variant	ENSFCAT00000012382:c.208-8710C>G	6	2	0	2	0	0		
B3:66941120		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:73433054	TMEM117	intron_variant	ENSFCAT00000061463:c.410+50468T>C	6	2	0	2	0	0		
B4:73710424	TMEM117	intron_variant	ENSFCAT00000061463:c.768+381T>C	6	2	0	2	0	0		
B4:73963480	NELL2	intron_variant	ENSFCAT00000030713:c.1663+29453G>A	6	2	0	2	0	0		
B4:74212003	NELL2	intron_variant	ENSFCAT00000030713:c.184+16587_184+16604dupTATAGCTGTAAATAAAAA	6	1	1	2	0	0		
B4:74353891	DBX2	intron_variant	ENSFCAT00000055911:c.518-1529G>A	6	2	0	2	0	0		
B4:74764214		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74969820		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74972621		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74976623		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74976704		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74982568		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74984643		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74985840		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74986089		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74986438		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74986510		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74986847		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74987836		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74988754		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:74989967		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:75000438		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:75007943		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:75012478		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:75013228		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:75047562		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:75048310		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0		
B4:75059442		ARID2		intron_variant	ENSFCAT00000055036:c.284+303G>A	6	2	0	2	0	0
B4:75061445		ARID2		intron_variant	ENSFCAT00000055036:c.284+2306G>A	6	2	0	2	0	0
B4:75070411		ARID2		intron_variant	ENSFCAT00000055036:c.284+11272T>G	6	2	0	2	0	0
B4:75075897		ARID2		intron_variant	ENSFCAT00000055036:c.284+16758A>G	6	2	0	2	0	0

<u>B4:7509</u> <u>8380</u>	ARID2	intron_variant	ENSFCAT00000055036:c.284+39253_284+39254ins AGAGAGAGAGAGAGAGAGAG	6	2	0	2	0	0
<u>B4:7510</u> <u>0011</u>	ARID2	intron_variant	ENSFCAT00000055036:c.284+40872C>T	6	2	0	2	0	0
<u>B4:7511</u> <u>1488</u>	ARID2	intron_variant	ENSFCAT00000055036:c.285-36356dupA	6	2	0	2	0	0
<u>B4:7512</u> <u>7499</u>	ARID2	intron_variant	ENSFCAT00000055036:c.285-20345G>A	6	2	0	2	0	0
<u>C2:7798</u> <u>301</u>	KCNJ6	intron_variant	ENSFCAT00000005148:c.25+4340G>A	6	2	0	2	1	0
<u>C2:7806</u> <u>786</u>	KCNJ6	intron_variant	ENSFCAT00000005148:c.25+12825C>T	6	2	0	2	1	0
<u>C2:7903</u> <u>676</u>	KCNJ6	intron_variant	ENSFCAT00000005148:c.26-7824C>T	6	2	0	2	1	0
<u>C2:8009</u> <u>396</u>		intergenic_variant		6	2	0	2	1	0
<u>C2:8304</u> <u>696</u>		intergenic_variant		6	2	0	2	1	0
<u>C2:8787</u> <u>694</u>	HLCS	intron_variant	ENSFCAT00000002943:c.1455-58296G>A	6	2	0	2	1	0
<u>C2:9116</u> <u>651</u>		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0
<u>C2:9841</u> <u>819</u>		intergenic_variant		6	0	1	2	0	0
<u>C2:1062</u> <u>2576</u>	RUNX1	intron_variant	ENSFCAT00000043785:c.509-6046delG	6	0	1	2	0	0
<u>D1:1082</u> <u>18077</u>		intergenic_variant		6	3	0	2	1	0
<u>D1:1082</u> <u>93400</u>	AHNAK	intron_variant	ENSFCAT000000039791:c.346-7215C>G	6	3	0	2	1	0
<u>D1:1082</u> <u>93663</u>	AHNAK	intron_variant	ENSFCAT000000039791:c.346-7478C>T	6	3	0	2	1	0
<u>D1:1082</u> <u>93756</u>	AHNAK	intron_variant	ENSFCAT000000039791:c.346-7576_346-7571dupTCTCTC	6	3	0	2	1	0
<u>D1:1082</u> <u>96885</u>	AHNAK	intron_variant	ENSFCAT000000039791:c.346-10700G>A	6	3	0	2	1	0
<u>D1:1086</u> <u>17140</u>	CHRM1	missense_variant	ENSFCAT00000000336:c.122C>T	6	3	0	2	0	0
<u>D1:1087</u> <u>33275</u>		intergenic_variant		6	3	0	2	0	0
<u>D1:1090</u> <u>43692</u>	ATL3	intron_variant	ENSFCAT000000031828:c.1219+1959G>A	6	3	0	2	0	0
<u>D1:1096</u> <u>21243</u>	ESRRA	intron_variant	ENSFCAT000000022986:c.240+653T>G	6	2	0	2	0	0
<u>D1:1096</u> <u>39056</u>		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0
<u>D1:1096</u> <u>66604</u>	RPS6KA4	intron_variant	ENSFCAT00000000512:c.907-24dupC	6	3	0	2	0	0
<u>D1:1097</u> <u>06214</u>		intergenic_variant		6	2	0	2	1	0
<u>D1:1097</u> <u>25585</u>		intergenic_variant		6	3	0	2	0	0
<u>D1:1097</u> <u>88532</u>		intergenic_variant		6	3	0	2	0	0
<u>D1:1098</u> <u>40145</u>		intergenic_variant		6	3	0	2	0	0
<u>D1:1101</u> <u>04777</u>	ATG2A	intron_variant	ENSFCAT000000012243:c.5243-51C>T	6	3	0	2	0	0
<u>D1:1102</u> <u>03433</u>	ARL2	intron_variant	ENSFCAT000000038234:c.65+948_65+951delGGGA	6	2	0	2	1	0
<u>D1:1102</u> <u>03434</u>	ARL2	intron_variant	ENSFCAT000000038234:c.65+949_65+951delGGA	6	2	0	2	0	0
<u>D1:1104</u> <u>88174</u>		intergenic_variant		6	2	0	2	0	0

VSS およびキャリアーの列には，それぞれ自発性発作個体およびキャリアーの総アレル数が示された．ヘテロおよびホモの列には，それぞれにおいて認められたアレル数が示された．

第7章

総括

本研究は、2009年に実験猫繁殖業者のコロニー内にて発見され、てんかん発症猫を選択的にコロニー化することで確立された家族性自然発症性てんかん猫 (FSEC) (Kuwabara et al., 2010) における、てんかん発症の根底に存在する分子病態を明らかにすることを目的とした。FSECは自発性の辺縁系発作・全般性発作を示す個体、前庭刺激誘発性発作を示す個体、それら両方の発作型を示す個体、および臨床的発作の確認がされていないものの脳波異常を示す個体から構成されている。FSECの示す自発性辺縁系発作は猫における一般的な発作型を表しているだけでなく (Pákozdy et al., 2013; Wahle et al., 2014; Stanciu et al., 2017), 人の側頭葉てんかん (TLE) のサブタイプである内側側頭葉てんかん (MTLE) および猫辺縁系キンドリング/カイニン酸モデルに類似しており (Kitz et al., 2017), また前庭刺激誘発性発作は遺伝性てんかんモデルである EL マウスが示す発作様式に類似している (King and LaMotte., 1989)。これまでに、FSECの脳波 (EEG) および磁気共鳴画像法 (MRI) を用いての表現型の特徴付けが行われてきた (Hasegawa et al., 2014; Mizoguchi et al., 2014; Mizoguchi et al., 2017; Hamamoto et al., 2017; Hamamoto et al., 2018)。これらの研究によって、FSECは家族性内側側頭葉てんかん (FMTLE) のモデル動物となり得ることが示唆されている。FSECの確立以降の発作頻度のモニタリングによって、幾らかの個体

は月に数回といった高い発作頻度を示すものの、概して FSEC における発作頻度は比較的少ないことが判明している。さらに FSEC および FSEC の起源である繁殖コロニーの家系図解析により、浸透度の減少と表現型の差異 *reduced penetrance and variable expression* が認められている。

人において、MTLE は最も一般的な成人のてんかん型であるが (Engel J, 2001), その中にも海馬硬化 (HS) の有無や発作頻度など個人ごとにバリエーションを呈する症候群であり、臨床的不均一性が存在する。家族型の MTLE を示す FMTLE は 1990 年代中期に双子および小家系において報告された (Berkovic et al., 1994; Berkovic et al., 1996). FMTLE は家系ごとに様々な遺伝様式を示すことが示唆されているが (Crompton et al., 2010), 顕性遺伝様式を示す家系の報告も複数存在し、それらの家系における連鎖解析から、幾つかの疾患座位が報告されている (Hedera et al., 2007; Chahine et al., 2013; Fanciulli et al., 2014a). 加えて、FMTLE は概して疾患経過が良性 (発作頻度が少ない) であることが報告されており (Striano et al., 2008; Gambardella et al., 2009), この点も FSEC と類似する点である。これまで FMTLE の発生頻度は不明であったが、近年の研究により、FMTLE は一般的な遺伝性症候群であることが明らかとなった (Perucca et al., 2017).

第 2 章では、FSEC の病理学的特徴付けを目的に、発作起始領域である海馬・扁桃体の神経病理学的評価を実施した。これにより、コントロール群と比較して FSECs の海馬 CA3 亜領域および扁桃体中心核領域におけるグリオシスを伴わない神経細胞数の減少を認めた。人の MTLE 患者において、神経細胞

脱落とそれに伴うグリオシスによって定義される HS を呈することが広く知られており、HS の有無は MTLE の表現型として重要な項目の一つである。FSECs では神経細胞数の減少を認めたものの、併発するグリオシスは認められなかった。このため、FSECs の海馬 CA3 亜領域および扁桃体中心核領域における神経細胞数の減少は、FSECs が発症する発作により後天的に脱落したのではなく、先天性にこれら領域における神経細胞数が少ないことが示唆された。同時に少数ではあるものの、てんかん発作の既往歴が確認されていない発作発症個体の親猫においても同様の所見が認められ、本所見は FSEC コロニーにおける endophenotype である可能性が示唆された。一方で、海馬 CA4 亜領域においては、てんかん発作発症個体においてのみ、神経細胞の脱落を伴わないグリオシスが認められた。これは国際抗てんかん連盟 (ILAE) が提唱する HS の国際コンセンサス分類 (Blümcke et al., 2013) における、“no hippocampal sclerosis, gliosis only (no-HS)” に相当すると考えられる。てんかん発症個体のみにおいて認められた本所見は、海馬 CA4 領域におけるグリオシスの形成とてんかん発症との間になんらかの関連が存在していることが考えられる。FSEC における神経病理学的研究により、FSECs の海馬・扁桃体における新たに病理学的特徴付けが行われ、特にそれらの亜領域における神経細胞数の減少は FSECs における独特な所見であった。さらに、これらの所見に関連する遺伝学的病因が FSEC の遺伝性てんかんに寄与している可能性も考慮された。

第 3 章では FSEC における、てんかん発症の根底に存在する遺伝学的病因を探索するべく候補遺伝子アプローチを実施した。Leucine-rich glioma-inactivated

(LGI) protein family (LGI1-4) は、脊椎動物におけるシナプス伝達や髄鞘形成といった神経系の発達および機能に関して重要な役割を持っている。なかでも *LGII* はヒトの TLE のサブタイプの 1 つである家族性外側側頭葉てんかん (FLTE) の原因遺伝子として報告されている (Kalachikov et al., 2002; Monrante-Redolat et al., 2002)。また、獣医学領域において辺縁系発作を呈する feline complex partial seizures with orofacial involvement (Pákozdy et al., 2011; Pákozdy et al., 2013; Pákozdy et al., 2014) および猫海馬壊死症 feline hippocampal necrosis のうちの幾らかの症例において、電位依存性カリウムチャンネル/LGI1 複合体に対する抗体価の上昇が報告されている (Pákozdy et al., 2013)。さらには、ラゴット・ロマニョーロ犬の良性家族性若齢性てんかんの原因として *LGI2* 変異が報告されており (Seppälä et al., 2011)、また人の良性家族性小児けいれんおよび小児欠伸てんかんの感受性遺伝子として *LGI4* が関与している可能性も報告されている (Gu et al., 2004; Ishii et al., 2010)。これらのことから、FSEC のてんかん発症の遺伝学的根底に LGI タンパクファミリーの機能不全が関与しているという仮説が提唱され (Pákozdy et al., 2015)、本研究はその仮説検証を目的として行われた。猫の *LGII-4* のクローニングおよびシーケンシングを実施した。その後の変異解析において、LGI 遺伝子ファミリーにおいていくらかの非同義置換を認めたが、これらは FSECs のてんかん発症に関与するものではなかった。本研究により、FSEC のてんかん発症は LGI 遺伝子ファミリーの翻訳領域内の単一のミスセンス変異とは関連しないことが示された。この結果から、FSEC において認められるてんかん発症に関与しているバリエントの同定には、関連

解析，連鎖解析，さらには次世代シーケンシングを利用した包括的なゲノムワイド解析が必要であることが示唆された。

一塩基多型 (SNP) アレイの開発・普及によって，人のみならず産業動物や犬において，ゲノムワイド関連解析 (GWAS) の実施が可能となり，GWAS は多くの一般的な疾患や形質の原因遺伝子や関連座位の同定に貢献してきた．第4章では猫の SNP アレイ (Feline 63K SNP Array) によるジェノタイプデータを利用した GWAS を実施することで，FSEC の根底に存在するてんかん関連座位の検出を試みた．伝達不平衡試験 (TDT) およびケース・コントロール試験からなる2種類の GWAS を行った．すべての表現型が共通の疾患バリエーションに起因すると仮定した場合，そしてそれぞれの発作型（自発性発作と前庭刺激誘発性発作）が独立した疾患バリエーションに起因すると仮定した場合の計3通りのパターンで解析した．リファレンスゲノムアセンブリとして2017年に公開された72X カバレッジの Felis_catus_9.0 を用いた．TDT では，すべての表現型を呈する個体を罹患個体とした場合で染色体 B3 の 136011741，自発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合で染色体 D4 の 42346601，前庭刺激誘発性発作を呈する個体を罹患個体とした場合で染色体 B3 の 42062975 において各々最も高い関連を認めたが，ゲノムワイドに有意ではなかった．ケース・コントロール試験では，集団構層化が存在したため，解析個体を制限することで集団構層化が存在しないと考えられる状態で実施した．認められた最も高い関連は，同様の順で，染色体 C1 の 48296174，染色体 A2 の 133525162，染色体 A2 の

122572639 において認められたが、いずれにおいてもゲノムワイドに有意ではなかった。

これまでの Feline 63K SNP Array を用いた研究においても、単一遺伝性疾患であった場合は、TDT とケース・コントロール試験のいずれにおいてもそれぞれ近隣部位が局在されている (Alhaddad et al., 2014)。本研究のケース・コントロール試験においては、集団階層化が顕著であったため、解析個体数の制限をしなければならなかった。TDT は、複雑疾患において関連座位の局在化に有用とされているが (Ewens & Spielman., 1995)、FSEC コロニー内における近親交配による親猫の重複や、現在猫においては低密度 SNP アレイのみが利用可能なことなどにより、検出力に限界が生じたと考えられる。ゲノムワイドに有意な関連はいずれの解析においても認められなかったものの、これら座位近辺に疾患関連バリエントが存在することは十分考慮されるべきである。

第 5 章では、前章にて Feline 63K SNP Array を用いて得られたジェノタイプデータを用いて、ゲノムワイド連鎖解析を実施した。パラメトリックおよびノンパラメトリック解析を実施し、さらにノンパラメトリック解析では **linear model** および **exponential model** の 2 つの検定方法を用いた。第 4 章と同様に、すべての表現型が共通した疾患バリエントに起因すると仮定した場合と、それぞれの発作型が独立した疾患バリエントに起因すると仮定した場合の計 3 通りのパターンが解析された。連鎖解析によって、有意な連鎖はいずれの解析においても認められなかったが、連鎖が示唆される複数の座位を認めた。すべての

表現型を有する個体を罹患個体として解析した場合には染色体 B4 (79.6 Mb), C1 (78.1 Mb), C2 (9.1 Mb), D2 (7.2 Mb)において suggestive linkage を認め, 自発性発作の形質を解析した場合には染色体 B1 (205.1-2 Mb), B2 (36.0, 108.4, 118.2-3 Mb), B3 (143.5-8 Mb, 146.0-148.3 Mb), D1 (5.1 Mb), D2 (5.6 Mb), D4 (23.8, 38.7, 39.0, 42.3 Mb), E2 (21.0 Mb), F2 (73.5-73.7 Mb), X (3.5-6 Mb, 3.9 Mb)に, 前庭刺激誘発性発作の形質を解析した場合, 染色体 B1 (203.8 Mb), B3 (35.6, 65.4 Mb), B4 (74.3 Mb), C2 (9.5 Mb), D1 (109.3 Mb)に, それぞれ suggestive linkage を認めた.

家族性に発生する複雑疾患を対象とした連鎖解析においても, 本研究で認められたような複数の座位に連鎖, あるいは suggestive linkage が認められることは珍しくなく (Allen-Brady et al., 2010; Arcos-Burgos et al., 2004; Georgi et al., 2014; Guo et al., 2017), 本解析における結果は FSEC における疾患発生の複雑性を支持するものである. 同時に, この結果はこれら座位周辺に疾患バリエントが存在する可能性を示唆するものでもある. さらに, 独立した表現型ごとに解析した際に, 異なる座位が認められたことは興味深く, 異なる座位がそれぞれの発作発症に関与している可能性が考えられる.

第 6 章では, これまでに十分に表現型の特徴付けがされた 4 頭の FSECs (2 つの発作型を呈する 1 個体, 1 つの発作型を呈する 3 個体) において全ゲノムシーケンス (WGS) を実施し, 第 4 章および第 5 章にて実施された TDT および連鎖解析によって示唆された領域について, WGS データを用いて疾患バリエントの検出を試みた. また, これら 4 頭の FSECs の表現型に対応する形で, そ

それぞれの該当領域に存在するバリエーションの検出が行われた。本解析におけるコントロールとして 99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative に登録されている 191 頭の猫の WGS データが用いられた。FSECs のみに存在する特異的なバリエーションが疾患発生に強く関連しているという仮説をもとに、バリエーションの検出が実施された。すべての表現型の形成に共通のバリエーションが根底に存在すると仮定した場合に示唆された領域において、4 頭すべてに共通して存在するバリエーションは認められなかった。しかしながら、独立した発作型にて示唆された領域を解析した場合、自発性発作および前庭刺激誘発発作のいずれにおいても *TRMT44* (tRNA methyltransferase 44) に 3 つのヘテロあるいはホモのイントロン・バリエーションを検出した。さらに、前庭刺激誘発性発作個体においては、3 頭すべてにヘテロの *CHRM1* (cholinergic receptor muscarinic 1) のミスセンス変異 (c.122C>T) を認めた。さらに、家系内不均一性を考慮したところ、*KCNJ6* (potassium voltage-gated channel subfamily J member 6) におけるヘテロのイントロン・バリエーションを 4 頭中 3 頭 (前庭刺激誘発性発作個体 3 頭中 2 頭) にて認めた。

本研究では 4 頭の FSECs の WGS を実施したものの、すべての個体に共通して存在し、アミノ酸置換をもたらすホモ変異は認められず、FSEC におけるてんかん発症の複雑性を示す結果となった。しかしながら、それぞれの解析方法において、*TRMT44*、*CHRM1*、*KCNJ6* といったてんかんに関連すると考えられる遺伝子で FSEC に特異的なイントロン・バリエーションを認められたことは興味深い。疾患発生におけるイントロン・バリエーションの重要性は近年になって

注目され始めており (Reviewed in Vaz-Drago et al., 2017), これらは何らかの形で FSEC のてんかん発症に関与している可能性は否定できない。

本研究では、猫において唯一の遺伝性てんかんが強く示唆され、かつこれまでの電気生理学的・画像学的研究によりヒトの FMTLE モデルとなり得ることが示唆されている FSEC のてんかん発症に関する遺伝学的アーキテクチャを明らかにすべく、病理学的・分子生物学的解析を実施した。人においても、FMTLE の疾患座位は示唆されているものの、特定の原因遺伝子同定には至っておらず、FMTLE の遺伝学的解析は困難を極めている。

また、ヒトにおいて家族性ではない孤発例のてんかんにおいても多くのケース・コントロール試験が行われてきているが (Kasperaviciūte et al., 2010; EPICURE, 2012; Guo et al., 2012), 最近行われたメタ解析では、素因性全般性てんかんにおいて単一のシグナルを認めたものの、焦点性てんかんではゲノムワイドに有意な結果は認められていない (International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies, 2014). このように大規模データを用いた解析においても、一般的なたんかんにおける“失われた遺伝性 missing heritability”の存在が問題となっている。さらに、比較的大多数の素因性てんかん患者において、全エキソームシーケンシングを実施した研究 (Heinzen et al., 2012) では、強い影響をもたらす単独のレア・バリエーションの同定を行うことができず、本疾患における単一バリエーションの影響は少ないことが示唆されている。さらには、近年、新たに提唱された Omnigenic という概念 (Boyle et al., 2017) により、疾患発生のさらなる複雑性が示唆されている。同時に、てんかん発症においてコピ

一多型 (CNV) の関与が知られており、FMTLE においても、疾患発生に関与していることが示唆されているため (Fanciulli et al., 2014b)、今後さらに CNV 解析を実施することは有用と考えられる。

FSEC においても、本研究から複数の座位が認められたため、人における一般的なてんかんと同様に、多数の小さな影響を持つバリエーションが結果的にてんかん発症に関与しているという可能性が考えられる。同時に、本研究の実施時点で利用可能であった Feline 63K SNP Array は、低密度の SNP アレイであり、今後猫においても高密度 SNP アレイが開発されることにより、より詳細な GWAS および連鎖解析が可能となることが期待される。

本研究は FSEC のてんかん発症における分子病態学的根底を理解するための本質的要素を含むものであり、てんかん発症に関与するであろう座位およびそれら領域における候補遺伝子の検出を行った。猫における遺伝学的解析は、Feline 63K SNP Array および WGS が利用可能となったことで、猫における多くの遺伝性疾患・形質の原因遺伝子の同定が行われてきたが、それらはすべて単一性疾患であり、未だに複雑疾患の疾患関連バリエーションの検出は成し遂げられていない。本研究結果は、猫のてんかんおよび人の FMTLE を始めとするてんかん症候群におけるてんかん発生の生物学的経路を解明するための一助となることが期待される。さらに、Feline 63K SNP Array および WGS を用いた猫における複雑疾患へのアプローチを行った一例として、今後の猫の家族集積性を伴う複雑疾患における遺伝学的解析一つのリファレンスとなるであろう。

謝辞

本論文を終えるにあたり，多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました，日本獣医生命科学大学臨床獣医学部門獣医放射線学研究室，藤田道郎教授に甚大なる謝意を表します．本研究を実施するにあたり，研究に対する情熱の享受，丁寧かつ熱心なご指導，ならびに精神的にも支えていただきました日本獣医生命科学大学臨床獣医学部門獣医放射線学研究室，長谷川大輔准教授，ならびに University of Missouri – Columbia, College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine and Surgery, Feline Genetics and Comparative Medicine Laboratory, Leslie A. Lyons教授に深く御礼申し上げます．また，基本的な実験手技に関しましてご指導を頂きました日本獣医生命科学大学臨床獣医学部門獣医放射線学研究室の藤原亜紀講師，本研究に際して様々にご尽力ならびに精神的に支えてくださった同研究室の濱本裕仁，溝口俊太，桑原孝幸，浅田李佳子，そしてUniversity of Missouri – Columbia, College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine and Surgery, Feline Genetics and Comparative Medicine LaboratoryのReuben M. Buckley, Thomas R. Jubaの各氏に深く感謝致します．

本研究を行うに際して，ご支援いただきました日本私立学校振興・共済事業団 学術研究振興資金(平成27–29年度，研究代表者：長谷川 大輔)，てんかん治療研究振興財団 (平成27年度，研究代表者：長谷川 大輔)，Morris Animal Foundation (2017, D17FE-553, 研究代表者：長谷川 大輔)，日本学術振興会 若手研究者海外挑戦プログラム (平成29年度，湯 祥彦) に深く感謝いたします．

参考文献

- Abecasis, G.R., Cherny, S.S., Cookson, W.O., et al., 2002. Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet* 30, 97-101.
- Aberdein, D., Munday, J.S., Gandolfi, B., et al., 2017. Erratum to: A FAS-ligand variant associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome in cats. *Mamm Genome* 28, 152-154.
- Aberdein, D., Munday, J.S., Gandolfi, B., et al., 2017. A FAS-ligand variant associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome in cats. *Mamm Genome* 28, 47-55.
- Abitbol, M., Hitte, C., Bosse, P., et al., 2015. A COLQ Missense Mutation in Sphynx and Devon Rex Cats with Congenital Myasthenic Syndrome. *PLoS One* 10, e0137019.
- Alhaddad, H., Gandolfi, B., Grahn, R.A., et al., 2014. Genome-wide association and linkage analyses localize a progressive retinal atrophy locus in Persian cats. *Mamm Genome* 25, 354-362.
- Allen-Brady, K., Robison, R., Cannon, D., et al., 2010. Genome-wide linkage in Utah autism pedigrees. *Mol Psychiatry* 15, 1006-1015.
- Anagnostaras, S.G., Murphy, G.G., Hamilton, S.E., et al., 2003. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci* 6, 51-58.

Andrade-Valenca, L.P., Valenca, M.M., Velasco, T.R., et al., 2008. Mesial temporal lobe epilepsy: clinical and neuropathologic findings of familial and sporadic forms. *Epilepsia* 49, 1046-1054.

Angelicheva, D., Tournev, I., Guerguelcheva, V., et al., 2009. Partial epilepsy syndrome in a Gypsy family linked to 5q31.3-q32. *Epilepsia* 50, 1679-1688.

Arcos-Burgos, M., Castellanos, F.X., Pineda, D., et al., 2004. Attention-deficit/hyperactivity disorder in a population isolate: linkage to loci at 4q13.2, 5q33.3, 11q22, and 17p11. *Am J Hum Genet* 75, 998-1014.

Audenaert, D., Claes, L., Claeys, K.G., et al., 2005. A novel susceptibility locus at 2p24 for generalised epilepsy with febrile seizures plus. *J Med Genet* 42, 947-952.

Azmanov, D.N., Zhelyazkova, S., Radionova, M., et al., 2011. Focal epilepsy of probable temporal lobe origin in a Gypsy family showing linkage to a novel locus on 7p21.3. *Epilepsy Res* 96, 101-108.

Bandopadhyay, R., Liu, J.Y., Sisodiya, S.M., et al., 2014. A comparative study of the dentate gyrus in hippocampal sclerosis in epilepsy and dementia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40, 177-190.

Baraban, S.C., Wenzel, H.J., Hochman, D.W., et al., 2000. Characterization of heterotopic cell clusters in the hippocampus of rats exposed to methylazoxymethanol in

utero. *Epilepsy Res* 39, 87-102.

Barnes, H.L., Chrisman, C.L., Mariani, C.L., et al., 2004. Clinical signs, underlying cause, and outcome in cats with seizures: 17 cases (1997-2002). *J Am Vet Med Assoc* 225, 1723-1726.

Baulac, S., Gourfinkel-An, I., Nabbout, R., et al., 2004. Fever, genes, and epilepsy. *Lancet Neurol* 3, 421-430.

Baulac, S., Ishida, S., Mashimo, T., et al., 2012. A rat model for LGI1-related epilepsies. *Hum Mol Genet* 21, 3546-3557.

Baulac, S., Picard, F., Herman, A., et al., 2001. Evidence for digenic inheritance in a family with both febrile convulsions and temporal lobe epilepsy implicating chromosomes 18qter and 1q25-q31. *Ann Neurol* 49, 786-792.

Becker, F., Reid, C.A., Hallmann, K., et al., 2017. Functional variants in HCN4 and CACNA1H may contribute to genetic generalized epilepsy. *Epilepsia Open* 2, 334-342.

Berkovic SF, Howell A, Hopper JL. (1994) Familial temporal lobe epilepsy: a new syndrome with adolescent/adult onset and a benign course. In Wolf P (Ed) *Epileptic seizures and syndromes*. John Libbey & Company Ltd, London, pp. 257–263.

Berkovic, S.F., McIntosh, A., Howell, R.A., et al., 1996. Familial temporal lobe epilepsy: a common disorder identified in twins. *Ann Neurol* 40, 227-235.

Bisulli, F., Naldi, I., Baldassari, S., et al., 2014. Autosomal dominant partial epilepsy with auditory features: a new locus on chromosome 19q13.11-q13.31. *Epilepsia* 55, 841-848.

Blümcke, I., Kistner, I., Clusmann, H., et al., 2009. Towards a clinico-pathological classification of granule cell dispersion in human mesial temporal lobe epilepsies. *Acta Neuropathol* 117, 535-544.

Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., et al., 2013. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* 54, 1315-1329.

Boillot, M., Huneau, C., Marsan, E., et al., 2014. Glutamatergic neuron-targeted loss of LGI1 epilepsy gene results in seizures. *Brain* 137, 2984-2996.

Boyle, E.A., Li, Y.I., Pritchard, J.K., 2017. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. *Cell* 169, 1177-1186.

Brini, E., Gandini, G., Crescio, I., et al., 2004. Necrosis of hippocampus and piriform lobe: clinical and neuropathological findings in two Italian cats. *J Feline Med Surg* 6, 377-381.

Campostrini, G., DiFrancesco, J.C., Castellotti, B., et al., 2018. A Loss-of-Function HCN4 Mutation Associated With Familial Benign Myoclonic Epilepsy in Infancy

Causes Increased Neuronal Excitability. *Front Mol Neurosci* 11, 269.

Catarino, C.B., Kasperaviciute, D., Thom, M., et al., 2011. Genomic microdeletions associated with epilepsy: not a contraindication to resective surgery. *Epilepsia* 52, 1388-1392.

Cendes, F., Sakamoto, A.C., Spreafico, R., et al., 2014. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. *Acta Neuropathol* 128, 21-37.

Chahine, L., Abou-Khalil, B., Siren, A., et al., 2013. A new locus for familial temporal lobe epilepsy on chromosome 3q. *Epilepsy Res* 106, 338-344.

Chioza, B.A., Aicardi, J., Aschauer, H., et al., 2009. Genome wide high density SNP-based linkage analysis of childhood absence epilepsy identifies a susceptibility locus on chromosome 3p23-p14. *Epilepsy Res* 87, 247-255.

Claes, L., Audenaert, D., Deprez, L., et al., 2004. Novel locus on chromosome 12q22-q23.3 responsible for familial temporal lobe epilepsy associated with febrile seizures. *J Med Genet* 41, 710-714.

Crompton, D.E., Scheffer, I.E., Taylor, I., et al., 2010. Familial mesial temporal lobe epilepsy: a benign epilepsy syndrome showing complex inheritance. *Brain* 133, 3221-3231.

Cruickshank, J.W., Brudzynski, S.M., McLachlan, R.S., 1994. Involvement of M1

muscarinic receptors in the initiation of cholinergically induced epileptic seizures in the rat brain. *Brain Res* 643, 125-129.

Dazzo, E., Fanciulli, M., Serioli, E., et al., 2015. Heterozygous reelin mutations cause autosomal-dominant lateral temporal epilepsy. *Am J Hum Genet* 96, 992-1000.

Dazzo, E., Rehberg, K., Michelucci, R., et al., 2018. Mutations in MICAL-1 cause autosomal-dominant lateral temporal epilepsy. *Ann Neurol* 83, 483-493.

de Kovel, C.G., Trucks, H., Helbig, I., et al., 2010. Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain* 133, 23-32.

Dibbens, L.M., de Vries, B., Donatello, S., et al., 2013. Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci. *Nat Genet* 45, 546-551.

Drage, M.G., Holmes, G.L., Seyfried, T.N., 2002. Hippocampal neurons and glia in epileptic EL mice. *J Neurocytol* 31, 681-692.

Epi4K consortium., Epilepsy Phenome/Genome, P., 2017. Ultra-rare genetic variation in common epilepsies: a case-control sequencing study. *Lancet Neurol* 16, 135-143.

EPICURE Consortium; EMINet Consortium., Steffens, M., et al., 2012. Genome-wide association analysis of genetic generalized epilepsies implicates susceptibility loci at 1q43, 2p16.1, 2q22.3 and 17q21.32. *Hum Mol Genet* 21, 5359-5372.

EPICURE Consortium., Leu, C., de Kovel, C.G., et al., 2012. Genome-wide linkage meta-analysis identifies susceptibility loci at 2q34 and 13q31.3 for genetic generalized epilepsies. *Epilepsia* 53, 308-318.

Ewens, W.J., Spielman, R.S., 1995. The transmission/disequilibrium test: history, subdivision, and admixture. *Am J Hum Genet* 57, 455-464.

Fanciulli, M., Di Bonaventura, C., Egeo, G., et al., 2014a. Suggestive linkage of familial mesial temporal lobe epilepsy to chromosome 3q26. *Epilepsy Res* 108, 232-240.

Fanciulli, M., Pasini, E., Malacrida, S., et al., 2014b. Copy number variations and susceptibility to lateral temporal epilepsy: a study of 21 pedigrees. *Epilepsia* 55, 1651-1658.

Fatzer, R., Gandini, G., Jaggy, A., et al., 2000. Necrosis of hippocampus and piriform lobe in 38 domestic cats with seizures: a retrospective study on clinical and pathologic findings. *J Vet Intern Med* 14, 100-104.

Fernández, G., Effenberger, O., Vinz, B., et al., 1998. Hippocampal malformation as a cause of familial febrile convulsions and subsequent hippocampal sclerosis. *Neurology* 50, 909-917.

Figueiredo, T.H., Qashu, F., Apland, J.P., et al., 2011. The GluK1 (GluR5) Kainate/ α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor

antagonist LY293558 reduces soman-induced seizures and neuropathology. *J Pharmacol Exp Ther* 336, 303-312.

Finno, C.J., Aleman, M., Higgins, R.J., et al., 2014. Risk of false positive genetic associations in complex traits with underlying population structure: a case study. *Vet J* 202, 543-549.

Fisher, R.S., van Emde Boas, W., Blume, W., et al., 2005. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46, 470-472.

Fors, S., Van Meervenne, S., Jeserevics, J., et al., 2015. Feline hippocampal and piriform lobe necrosis as a consequence of severe cluster seizures in two cats in Finland. *Acta Vet Scand* 57, 41.

Gambardella, A., Labate, A., Giallonardo, A., et al., 2009. Familial mesial temporal lobe epilepsies: clinical and genetic features. *Epilepsia* 50 Suppl 5, 55-57.

Gandolfi, B., Alamri, S., Darby, W.G., et al., 2016a. A dominant TRPV4 variant underlies osteochondrodysplasia in Scottish fold cats. *Osteoarthritis Cartilage* 24, 1441-1450.

Gandolfi, B., Alhaddad, H., Abdi, M., et al., 2018. Applications and efficiencies of the first cat 63K DNA array. *Sci Rep* 8, 7024.

Gandolfi, B., Alhaddad, H., Abdi, M., et al., 2018. Author Correction: Applications and efficiencies of the first cat 63K DNA array. *Sci Rep* 8, 8746.

Gandolfi, B., Alhaddad, H., Affolter, V.K., et al., 2013a. To the Root of the Curl: A Signature of a Recent Selective Sweep Identifies a Mutation That Defines the Cornish Rex Cat Breed. *PLoS One* 8, e67105.

Gandolfi, B., Alhaddad, H., Joslin, S.E., et al., 2013b. A splice variant in KRT71 is associated with curly coat phenotype of Selkirk Rex cats. *Sci Rep* 3, 2000.

Gandolfi, B., Grahn, R.A., Creighton, E.K., et al., 2015. COLQ variant associated with Devon Rex and Sphynx feline hereditary myopathy. *Anim Genet* 46, 711-715.

Gandolfi, B., Grahn, R.A., Gustafson, N.A., et al., 2016b. A Novel Variant in CMAH Is Associated with Blood Type AB in Ragdoll Cats. *PLoS One* 11, e0154973.

Gandolfi, B., Grahn, R.A., Gustafson, N.A., et al., 2018. Correction: A Novel Variant in CMAH Is Associated with Blood Type AB in Ragdoll Cats. *PLoS One* 13, e0194471.

Gandolfi, B., Gruffydd-Jones, T.J., Malik, R., et al., 2012. First WNK4-hypokalemia animal model identified by genome-wide association in Burmese cats. *PLoS One* 7, e53173.

Georgi, B., Craig, D., Kember, R.L., et al., 2014. Genomic view of bipolar disorder revealed by whole genome sequencing in a genetic isolate. *PLoS Genet* 10, e1004229.

- Golovko, L., Lyons, L.A., Liu, H., et al., 2013. Genetic susceptibility to feline infectious peritonitis in Birman cats. *Virus Res* 175, 58-63.
- Gong, C., Wang, T.W., Huang, H.S., et al., 2007. Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J Neurosci* 27, 1803-1811.
- Gu, W., Sander, T., Becker, T., et al., 2004. Genotypic association of exonic LGI4 polymorphisms and childhood absence epilepsy. *Neurogenetics* 5, 41-44.
- Guo, W., Shang, D.M., Cao, J.H., et al., 2017. Identifying and Analyzing Novel Epilepsy-Related Genes Using Random Walk with Restart Algorithm. *Biomed Res Int* 2017, 6132436.
- Guo, Y., Baum, L.W., Sham, P.C., et al., 2012. Two-stage genome-wide association study identifies variants in CAMSAP1L1 as susceptibility loci for epilepsy in Chinese. *Hum Mol Genet* 21, 1184-1189.
- Guo, Y., Wang, F., Li, L., et al., 2017. Genome-Wide Linkage Analysis of Large Multiple Multigenerational Families Identifies Novel Genetic Loci for Coronary Artery Disease. *Sci Rep* 7, 5472.
- Gusel'nikova, V.V., Korzhevskiy, D.E., 2015. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae* 7, 42-47.

Hamamoto, Y., Hasegawa, D., Mizoguchi, S., et al., 2017. Changes in the interictal and early postictal diffusion and perfusion magnetic resonance parameters in familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Res* 133, 76-82.

Hamamoto, Y., Hasegawa, D., Yu, Y., et al., 2018. Statistical Structural Analysis of Familial Spontaneous Epileptic Cats Using Voxel-Based Morphometry. *Front Vet Sci* 5, 172.

Hasegawa, D., Mizoguchi, S., Kuwabara, T., et al., 2014. Electroencephalographic features of familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Res* 108, 1018-1025.

Hedera, P., Blair, M.A., Andermann, E., et al., 2007. Familial mesial temporal lobe epilepsy maps to chromosome 4q13.2-q21.3. *Neurology* 68, 2107-2112.

Heinzen, E.L., Depondt, C., Cavalleri, G.L., et al., 2012. Exome sequencing followed by large-scale genotyping fails to identify single rare variants of large effect in idiopathic generalized epilepsy. *Am J Hum Genet* 91, 293-302.

Heinzen, E.L., Radtke, R.A., Urban, T.J., et al., 2010. Rare deletions at 16p13.11 predispose to a diverse spectrum of sporadic epilepsy syndromes. *Am J Hum Genet* 86, 707-718.

Helbig, I., Mefford, H.C., Sharp, A.J., et al., 2009. 15q13.3 microdeletions increase risk of idiopathic generalized epilepsy. *Nat Genet* 41, 160-162.

Hudson, L.P., Munoz, D.G., Miller, L., et al., 1993. Amygdaloid sclerosis in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 33, 622-631.

Inaba, H., Shinozawa, K., Amano, K., et al., 2017. Identification of deep intronic individual variants in patients with hemophilia A by next-generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Res Pract Thromb Haemost* 1, 264-274.

International League Against Epilepsy Consortium on Complex Epilepsies. 2014. Genetic determinants of common epilepsies: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol* 13, 893-903.

Ishida, S., Picard, F., Rudolf, G., et al., 2013. Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies. *Nat Genet* 45, 552-555.

Ishii, A., Zhang, B., Kaneko, S., et al., 2010. Positive association between benign familial infantile convulsions and LGI4. *Brain Dev* 32, 538-543.

Ishiura, H., Doi, K., Mitsui, J., et al., 2018. Expansions of intronic TTTCA and TTTTA repeats in benign adult familial myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 50, 581-590.

Jakobsdottir, J., van der Lee, S.J., Bis, J.C., Chouraki, V., et al., 2016. Rare Functional Variant in TM2D3 is Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease. *PLoS Genet* 12, e1006327.

Kalachikov, S., Evgrafov, O., Ross, B., et al., 2002. Mutations in LGI1 cause

autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 30, 335-341.

Kasperaviciūte, D., Catarino, C.B., Heinzen, E.L., et al., 2010. Common genetic variation and susceptibility to partial epilepsies: a genome-wide association study. *Brain* 133, 2136-2147.

Kegel, L., Aunin, E., Meijer, D., et al., 2013. LGI proteins in the nervous system. *ASN Neuro* 5, 167-181.

King, J.T., Jr., LaMotte, C.C., 1989. El mouse as a model of focal epilepsy: a review. *Epilepsia* 30, 257-265.

Kitz, S., Thalhammer, J.G., Glantschnigg, U., et al., 2017. Feline Temporal Lobe Epilepsy: Review of the Experimental Literature. *J Vet Intern Med* 31, 633-640.

Klang, A., Hogler, S., Nedorost, N., et al., 2018. Hippocampal necrosis and sclerosis in cats: A retrospective study of 35 cases. *Acta Vet Hung* 66, 269-280.

Klang, A., Schmidt, P., Kneissl, S., et al., 2014. IgG and complement deposition and neuronal loss in cats and humans with epilepsy and voltage-gated potassium channel complex antibodies. *J Neuropathol Exp Neurol* 73, 403-413.

Kobayashi, E., Li, L.M., Lopes-Cendes, I., et al., 2002. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal sclerosis in asymptomatic, first-degree relatives of patients with familial mesial temporal lobe epilepsy. *Arch Neurol* 59, 1891-1894.

Köhling, R., Wolfart, J., 2016. Potassium Channels in Epilepsy. Cold Spring Harb Perspect Med 6.

Koskinen, L.L., Seppälä, E.H., Belanger, J.M., et al., 2015. Identification of a common risk haplotype for canine idiopathic epilepsy in the ADAM23 gene. BMC Genomics 16, 465.

Kuwabara, T., Hasegawa, D., Ogawa, F., et al., 2010. A familial spontaneous epileptic feline strain: a novel model of idiopathic/genetic epilepsy. Epilepsy Res 92, 85-88.

Lal, D., Ruppert, A.K., Trucks, H., et al., 1995. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nat Genet 11, 241-247.

Lander, E.S., Green, P., 1987. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 84, 2363-2367.

Larner, A.J., 2011. Presenilin-1 mutation Alzheimer's disease: a genetic epilepsy syndrome? Epilepsy Behav 21, 20-22.

Lee, S.E., Lee, A.Y., Park, W.J., et al., 2006. Mouse LGI3 gene: expression in brain and promoter analysis. Gene 372, 8-17.

Leschziner, G.D., Coffey, A.J., Andrew, T., et al., 2011. Q8IYL2 is a candidate gene for the familial epilepsy syndrome of Partial Epilepsy with Pericentral Spikes (PEPS).

Epilepsy Res 96, 109-115.

Li, H., Durbin, R., 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25, 1754-1760.

Lupski, J.R., Reid, J.G., Gonzaga-Jauregui, C., et al., 2010. Whole-genome sequencing in a patient with Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *N Engl J Med* 362, 1181-1191.

Lyons, L.A., Creighton, E.K., Alhaddad, H., et al., 2016a. Whole genome sequencing in cats, identifies new models for blindness in *AIPL1* and somite segmentation in *HES7*. *BMC Genomics* 17, 265.

Lyons, L.A., Erdman, C.A., Grahn, R.A., et al., 2016b. *Aristaless-Like Homeobox protein 1 (ALX1)* variant associated with craniofacial structure and frontonasal dysplasia in Burmese cats. *Dev Biol* 409, 451-458.

Mahoney, K., Buckley, D., Alam, M., et al., 2012. High incidence of pediatric idiopathic epilepsy is associated with familial and autosomal dominant disease in Eastern Newfoundland. *Epilepsy Res* 98, 140-147.

Marcos, P., Coveñas, R., Narváez, J.A., et al., 1999. Immunohistochemical mapping of enkephalins, NPY, CGRP, and GRP in the cat amygdala. *Peptides* 20, 635-644.

Martinian, L., Catarino, C.B., Thompson, P., et al., 2012. Calbindin D28K expression in relation to granule cell dispersion, mossy fibre sprouting and memory impairment in

hippocampal sclerosis: a surgical and post mortem series. *Epilepsy Res* 98, 14-24.

Mauler, D.A., Gandolfi, B., Reiner, C.R., et al., 2017. Precision Medicine in Cats: Novel Niemann-Pick Type C1 Diagnosed by Whole-Genome Sequencing. *J Vet Intern Med* 31, 539-544.

Maurer-Morelli, C.V., Secolin, R., Morita, M.E., et al., 2012. A Locus Identified on Chromosome18P11.31 is Associated with Hippocampal Abnormalities in a Family with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Front Neurol* 3, 124.

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., et al., 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20, 1297-1303.

Mefford, H.C., Muhle, H., Ostertag, P., et al., 2010. Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS Genet* 6, e1000962.

Mendes de Almeida, R., Tavares, J., Martins, S., et al., 2017. Whole gene sequencing identifies deep-intronic variants with potential functional impact in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One* 12, e0182946.

Mestek-Boukhibar, L., Clement, E., Jones, W.D., et al., 2018. Rapid Paediatric Sequencing (RaPS): comprehensive real-life workflow for rapid diagnosis of critically ill children. *J Med Genet* 55, 721-728.

Miller, N.A., Farrow, E.G., Gibson, M., et al., 2015. A 26-hour system of highly sensitive whole genome sequencing for emergency management of genetic diseases. *Genome Med* 7, 100.

Miller, T.D., Chong, T.T., Aimola Davies, A.M., et al., 2017. Focal CA3 hippocampal subfield atrophy following LGI1 VGKC-complex antibody limbic encephalitis. *Brain* 140, 1212-1219.

Mizoguchi, S., Hasegawa, D., Hamamoto, Y., et al., 2017. Interictal diffusion and perfusion magnetic resonance imaging features of cats with familial spontaneous epilepsy. *Am J Vet Res* 78, 305-310.

Mizoguchi, S., Hasegawa, D., Kuwabara, T., et al., 2014. Magnetic resonance volumetry of the hippocampus in familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Res* 108, 1940-1944.

Monlong, J., Girard, S.L., Meloche, C., et al., 2018. Global characterization of copy number variants in epilepsy patients from whole genome sequencing. *PLoS Genet* 14, e1007285.

Morante-Redolat, J.M., Gorostidi-Pagola, A., Piquer-Sirerol, S., et al., 2002. Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. *Hum Mol Genet* 11, 1119-1128.

Mullen, S.A., Carvill, G.L., Bellows, S., et al., 2013. Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intellectual disability. *Neurology* 81, 1507-1514.

Mullikin, J.C., Hansen, N.F., Shen, L., et al., 2010. Light whole genome sequence for SNP discovery across domestic cat breeds. *BMC Genomics* 11, 406.

Ng, S.B., Buckingham, K.J., Lee, C., et al., 2010. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet* 42, 30-35.

Oberbauer, A.M., Belanger, J.M., Grossman, D.I., et al., 2010. Genome-wide linkage scan for loci associated with epilepsy in Belgian shepherd dogs. *BMC Genet* 11, 35.

Oh, A., Pearce, J.W., Gandolfi, B., et al., 2017. Early-Onset Progressive Retinal Atrophy Associated with an IQCB1 Variant in African Black-Footed Cats (*Felis nigripes*). *Sci Rep* 7, 43918.

Oh, A., Pearce, J.W., Gandolfi, B., et al., 2018. Corrigendum: Early-Onset Progressive Retinal Atrophy Associated with an IQCB1 Variant in African Black-Footed Cats (*Felis nigripes*). *Sci Rep* 8, 46978.

Oikkonen, J., Kuusi, T., Peltonen, P., et al., 2016. Creative Activities in Music--A Genome-Wide Linkage Analysis. *PLoS One* 11, e0148679.

Ottman, R., Risch, N., Hauser, W.A., et al., 1995. Localization of a gene for partial epilepsy to chromosome 10q. *Nat Genet* 10, 56-60.

Pákozdy, A., Glantschnigg, U., Leschnik, M., et al., 2014. EEG-confirmed epileptic activity in a cat with VGKC-complex/LGI1 antibody-associated limbic encephalitis. *Epileptic Disord* 16, 116-120.

Pákozdy, A., Gruber, A., Kneissl, S., et al., 2011. Complex partial cluster seizures in cats with orofacial involvement. *J Feline Med Surg* 13, 687-693.

Pákozdy, A., Halasz, P., Klang, A., et al., 2013. Suspected limbic encephalitis and seizure in cats associated with voltage-gated potassium channel (VGKC) complex antibody. *J Vet Intern Med* 27, 212-214.

Pákozdy, A., Leschnik, M., Sarchahi, A.A., et al., 2010. Clinical comparison of primary versus secondary epilepsy in 125 cats. *J Feline Med Surg* 12, 910-916.

Pákozdy, A., Patzl, M., Zimmermann, L., et al., 2015. LGI Proteins and Epilepsy in Human and Animals. *J Vet Intern Med* 29, 997-1005.

Palmer, E.E., Schofield, D., Shrestha, R., et al., 2018. Integrating exome sequencing into a diagnostic pathway for epileptic encephalopathy: Evidence of clinical utility and cost effectiveness. *Mol Genet Genomic Med* 6, 186-199.

Pauli, E., Hildebrandt, M., Romstöck, J., et al., 2006. Deficient memory acquisition in temporal lobe epilepsy is predicted by hippocampal granule cell loss. *Neurology* 67, 1383-1389.

Pérez-Palma, E., Helbig, I., Klein, K.M., et al., 2017. Heterogeneous contribution of microdeletions in the development of common generalised and focal epilepsies. *J Med Genet* 54, 598-606.

Perucca, P., Crompton, D.E., Bellows, S.T., et al., 2017. Familial mesial temporal lobe epilepsy and the borderland of déjà vu. *Ann Neurol* 82, 166-176.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., et al., 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81, 559-575.

Rampersaud, E., Damcott, C.M., Fu, M., et al., 2007. Identification of novel candidate genes for type 2 diabetes from a genome-wide association scan in the Old Order Amish: evidence for replication from diabetes-related quantitative traits and from independent populations. *Diabetes* 56, 3053-3062.

Raza, M.H., Gertz, E.M., Mundorff, J., et al., 2013. Linkage analysis of a large African family segregating stuttering suggests polygenic inheritance. *Hum Genet* 132, 385-396.

Reinthal, E.M., Lal, D., Lebon, S., et al., 2014. 16p11.2 600 kb Duplications confer risk for typical and atypical Rolandic epilepsy. *Hum Mol Genet* 23, 6069-6080.

Ricos, M.G., Hodgson, B.L., Pippucci, T., et al., 2016. Mutations in the mammalian target of rapamycin pathway regulators NPRL2 and NPRL3 cause focal epilepsy. *Ann*

Neurol 79, 120-131.

Sander, T., Schulz, H., Saar, K., et al., 2000. Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum Mol Genet* 9, 1465-1472.

Sasaki, M., Tohyama, K., Matsunaga, S., et al., 2004. MRI identification of dorsal hippocampus homologue in human brain. *Neuroreport* 15, 2173-2176.

Saunders, C.J., Miller, N.A., Soden, S.E., et al., 2012. Rapid whole-genome sequencing for genetic disease diagnosis in neonatal intensive care units. *Sci Transl Med* 4, 154ra135.

Schmied, O., Scharf, G., Hilbe, M., et al., 2008. Magnetic resonance imaging of feline hippocampal necrosis. *Vet Radiol Ultrasound* 49, 343-349.

Schriefl, S., Steinberg, T.A., Matiasek, K., et al., 2008. Etiologic classification of seizures, signalment, clinical signs, and outcome in cats with seizure disorders: 91 cases (2000-2004). *J Am Vet Med Assoc* 233, 1591-1597.

Seppälä, E.H., Jokinen, T.S., Fukata, M., et al., 2011. LGI2 truncation causes a remitting focal epilepsy in dogs. *PLoS Genet* 7, e1002194.

Seppälä, E.H., Koskinen, L.L., Gullov, C.H., et al., 2012. Identification of a novel idiopathic epilepsy locus in Belgian Shepherd dogs. *PLoS One* 7, e33549.

Signorini, S., Liao, Y.J., Duncan, S.A., et al., 1997. Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking G protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel GIRK2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 923-927.

Sloviter, R.S., Kudrimoti, H.S., Laxer, K.D., et al., 2004. "Tectonic" hippocampal malformations in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 59, 123-153.

Sloviter, R.S., Pedley, T.A., 1998. Subtle hippocampal malformation: importance in febrile seizures and development of epilepsy. *Neurology* 50, 846-849.

Spielman, R.S., McGinnis, R.E., Ewens, W.J., 1993. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52, 506-516.

Staff, P.G., 2016. Correction: Rare Functional Variant in TM2D3 is Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease. *PLoS Genet* 12, e1006456.

Stanciu, G.D., Packer, R.M.A., Pákozdy, A., et al., 2017. Clinical reasoning in feline epilepsy: Which combination of clinical information is useful? *Vet J* 225, 9-12.

Strauss, K.A., Puffenberger, E.G., Huentelman, M.J., et al., 2006. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. *N Engl J Med* 354, 1370-1377.

Striano, P., Gambardella, A., Coppola, A., et al., 2008. Familial mesial temporal lobe

epilepsy (FMTLE) : a clinical and genetic study of 15 Italian families. *J Neurol* 255, 16-23.

Suemitsu, L.A., Yasuda, C.L., Morita, M.E., et al., 2014. Longitudinal analysis of hippocampal T2 relaxometry in FMTLE. *Epilepsy Behav* 36, 154-158.

Thom, M., Eriksson, S., Martinian, L., et al., 2009. Temporal lobe sclerosis associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: neuropathological features. *J Neuropathol Exp Neurol* 68, 928-938.

Thom, M., Griffin, B., Sander, J.W., et al., 1999. Amygdala sclerosis in sudden and unexpected death in epilepsy. *Epilepsy Res* 37, 53-62.

Thom, M., Sisodiya, S.M., Beckett, A., et al., 2002. Cytoarchitectural abnormalities in hippocampal sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 61, 510-519.

Thomas, R.H., Berkovic, S.F., 2014. The hidden genetics of epilepsy-a clinically important new paradigm. *Nat Rev Neurol* 10, 283-292.

Tsuji, A., Amano, S., Yokoyama, M., et al., 2001. Neuronal microdysgenesis and acquired lesions of the hippocampal formation connected with seizure activities in Ihara epileptic rat. *Brain Res* 901, 1-11.

Tuunanen, J., Lukasiuk, K., Halonen, T., et al., 1999. Status epilepticus-induced neuronal damage in the rat amygdaloid complex: distribution, time-course and

mechanisms. *Neuroscience* 94, 473-495.

Urak, L., Feucht, M., Fathi, N., et al., 2006. A GABRB3 promoter haplotype associated with childhood absence epilepsy impairs transcriptional activity. *Hum Mol Genet* 15, 2533-2541.

Vaz-Drago, R., Custódio, N., Carmo-Fonseca, M., 2017. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet* 136, 1093-1111.

Velazquez-Moctezuma, J., Gillin, J.C., Shiromani, P.J., 1989. Effect of specific M1, M2 muscarinic receptor agonists on REM sleep generation. *Brain Res* 503, 128-131.

Visscher, P.M., Wray, N.R., Zhang, Q., et al., 2017. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet* 101, 5-22.

Wagner E., Rosati M., Fischer A., et al., 2014. Granule cell dispersion in cats with and without epilepsy (abstr). *J Vet Intern Med* 29:1451.

Wagner, E., Rosati, M., Molin, J., et al., 2014. Hippocampal sclerosis in feline epilepsy. *Brain Pathol* 24, 607-619.

Wahle, A.M., Brüschwein, A., Matiasek, K., et al., 2014. Clinical characterization of epilepsy of unknown cause in cats. *J Vet Intern Med* 28, 182-188.

Walker, M.C., 2015. Hippocampal Sclerosis: Causes and Prevention. *Semin Neurol* 35,

193-200.

Weiner, D.J., Wigdor, E.M., Ripke, S., et al., 2017. Polygenic transmission disequilibrium confirms that common and rare variation act additively to create risk for autism spectrum disorders. *Nat Genet* 49, 978-985.

Wieser, H.G; ILAE Commission on Neurosurgery of Epilepsy. ILAE Commission Report. 2004. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 45, 695-714.

Wijmsman, E.M., 2012. The role of large pedigrees in an era of high-throughput sequencing. *Hum Genet* 131, 1555-1563.

Willig, L.K., Petrikin, J.E., Smith, L.D., et al., 2015. Whole-genome sequencing for identification of Mendelian disorders in critically ill infants: a retrospective analysis of diagnostic and clinical findings. *Lancet Respir Med* 3, 377-387.

Wolf, H.K., Aliashkevich, A.F., Blümcke, I., et al., 1997. Neuronal loss and gliosis of the amygdaloid nucleus in temporal lobe epilepsy. A quantitative analysis of 70 surgical specimens. *Acta Neuropathol* 93, 606-610.

Wong, J.K.L., Gui, H., Kwok, M., et al., 2018. Rare variants and de novo variants in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Neurol Genet* 4, e245.

Wu, C., DeWan, A., Hoh, J., et al., 2011. A comparison of association methods

correcting for population stratification in case-control studies. *Ann Hum Genet* 75, 418-427.

Yilmazer-Hanke, D.M., Faber-Zuschratter, H., Blümcke, I., et al., 2007. Axo-somatic inhibition of projection neurons in the lateral nucleus of amygdala in human temporal lobe epilepsy: an ultrastructural study. *Exp Brain Res* 177, 384-399.

Yilmazer-Hanke, D.M., Wolf, H.K., Schramm, J., et al., 2000. Subregional pathology of the amygdala complex and entorhinal region in surgical specimens from patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 907-920.

Yu, X., Xu, T., Ou, S., et al., 2018. Endophilin A1 mediates seizure activity via regulation of AMPARs in a PTZ-kindled epileptic mouse model. *Exp Neurol* 304, 41-57.

Yu, Y., Hasegawa, D., Hamamoto, Y., et al., 2018. Neuropathologic features of the hippocampus and amygdala in cats with familial spontaneous epilepsy. *Am J Vet Res* 79, 324-332.

Zernant, J., Lee, W., Nagasaki, T., et al., 2018. Extremely hypomorphic and severe deep intronic variants in the ABCA4 locus result in varying Stargardt disease phenotypes. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*.