

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 湯 祥彦

反復性てんかん発作に特徴付けられるてんかん発症の原因の大部分には遺伝的要因が関与していると考えられている。てんかんの一つである側頭葉てんかん (TLE)は、人において一般的なてんかん型であり、外側側頭葉てんかん (LTE)と内側側頭葉てんかん (MTLE)が存在し、ともに家族性に発症することが知られている。家族性外側側頭葉てんかん (FLTE)では原因遺伝子の同定が報告されているが、家族性内側側頭葉てんかん (FMTLE)では疾患に関連していると考えられる座位は報告されているものの、原因遺伝子・疾患感受性遺伝子の同定には至っていない。一方、家族性自然発症性てんかん猫 (FSEC)は、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猫で唯一のてんかんの家族集積性を伴う系統であり、これまでの脳波および磁気共鳴画像法 (MRI)を用いた解析によって、FMTLE のモデル動物となり得ることが示唆されている。本研究では、FSEC におけるてんかん発症に関与する遺伝学的原因の解明を目的とし、海馬・扁桃体の病理学的検討 (第 2 章)、これまでの人・動物より示唆された候補遺伝子におけるクローニング・変異解析 (第 3 章)、ゲノムワイド関連解析 (GWAS)を用いたてんかん関連座位の検討 (第 4 章)、ゲノムワイド連鎖解析を用いた座位の検出 (第 5 章)、そして全ゲノムシーケンシング (WGS)を用いた FSEC にユニークなバリエーションの検出 (第 6 章)を実施した。

第 2 章では、FSEC の病理学的表現型を特徴付けるために発作起始領域である海馬・扁桃体における病理学的評価を実施した。FSECs では健常群と比較して海馬 CA3 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が認められた。同時に、FSEC のてんかん発作発症個体では海馬 CA4 領域に神経細胞数の減少を伴わ

ないグリオシスを認めた。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を特徴とする海馬硬化 (**HS**)を呈することが知られている。**FSEC** では **HS** に一致した神経病理学的変化を認めなかったが、海馬および扁桃体における神経細胞数の減少という独特な所見を認め、これには **FSEC** における遺伝的な背景が関連しているものと推察された。また海馬 **CA4** 領域における神経細胞脱落を伴わないグリオシスは、人 **MTLE** 患者でも認められる所見であり、人 **MTLE** と **FSEC** における部分的な相同性が示唆された。

第 3 章では、これまでに人やモデル動物において示唆されている候補遺伝子が、**FSEC** において関与しているかどうかを検討す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および髄鞘形成などの神経系の発達・機能に関して重要な役割を担っており、特に **LGI1** は人の **FLTE** の原因遺伝子として報告されている。同様に、ほかの **LGI** ファミリー遺伝子およびタンパクが人および犬・猫においても、てんかん発症に関与していることが報告されているため、**FSEC** における本遺伝子ファミリーのクローニングおよび変異解析を実施した。その結果、幾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ことより、**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。

第 4 章では猫の一塩基多型 (**SNP**)アレイを用いてジェノタイピングを実施し、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 種類のゲノムワイド関連解析 (**GWAS**)を実施した。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。

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 (136.1 Mb)、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 (42.4 Mb)、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 (35.6 Mb)において、各々最も高い関連を認めたが、いずれもゲノムワイドに有意ではなかった。ケース・コントロール試験において認められた最も高い関連は、同様の順で、染色体 C1 (48.3 Mb)、染色体 A2 (133.5 Mb)、染色体 A2 (122.6 Mb)において認められたが、これらもまたゲノムワイドに有意ではなかった。

第 5 章では、第 4 章に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第 4 章と同様の 3 通りのパターンで各々解析を実施した。いずれの場合においてもゲノムワイドに有意な連鎖は認めなかったが、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、そして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。

第 6 章では、FSECs から両方の発作型を有する 1 個体、自発性発作のみを呈する 1 個体、前庭刺激誘発性発作のみを呈する 2 個体の計 4 頭の FSECs を選出し、WGS を実施した。本解析におけるコントロールとして猫の WGS コンソーシアムである 99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative に登録されている 191 頭の猫の WGS データを用い、第 4 章および第 5 章にて示唆された領域について WGS データを用いてバリエーションの検出を試みた。その結果、4 頭の FSECs におい

て、これまでの GWAS や連鎖解析において示唆された領域においてすべての個体に共通して存在し、かつアミノ酸置換をもたらす変異は認められず、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、表現型ごとで解析した場合、GWAS や連鎖解析において示唆された領域において表現型と変異保有個体が一致するバリエーションを認め、それらの中にはてんかんに関連すると考えられる遺伝子も存在した。それらの多くのバリエーションはイントロン・バリエーションであったことから、FSEC におけるてんかん発症は、大きな影響をもたらす得る単一のバリエーションというよりも、むしろ小さな影響をもたらす多数のバリエーションが疾患発症に寄与している可能性が考えられた。

本研究では、FSEC の遺伝学的原因を解明すべく包括的遺伝学的解析を実施した結果、GWAS および連鎖解析によって複数の座位が検出され、FSEC のてんかん発症に関与するバリエーションが単一ではなく、複数存在していることが示唆された。また、本研究で用いた現在利用可能な猫 SNP アレイは低密度アレイであり、将来高密度 SNP アレイが利用可能となれば、より詳細かつ正確な GWAS および連鎖解析が可能となると思われる。てんかんの原因や疾患感受性遺伝子を同定することは、てんかん発生における生物学的経路に関する新たな知見をもたらすだけでなく、最適な薬剤選択やドラッグリポジショニングを含む新たな治療法の提案につながることを期待される。

以上のように、本論文は猫のてんかん、ひいては人の FMTLE を始めとするてんかんの遺伝学的アーキテクチャの理解に一助をもたらし、さらに今後、猫におけるゲノム解析技術の進歩に伴って、より詳細に遺伝学的アーキテクチャが解明されることが期待されるなど学術上、応用上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。