

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)

学位論文の内容の要約

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成 27 年入学

湯 祥彦

(指導教授：藤田道郎)

てんかんは、反復性てんかん発作に特徴付けられる一般的神経疾患であり、その疾患発症の原因の大部分は遺伝的要因が関与していると考えられている。てんかんの中でも側頭葉てんかん (TLE)は、人において一般的なたんかん型であり、外側側頭葉てんかん (LTE)と内側側頭葉てんかん (MTLE)が存在する。いずれの型においても家族性に発症することが知られており、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)では疾患に関与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。

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る。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、それら両方を有する個体、および臨床的発作の確認がないものの脳波異常を示す個体から構成されている。FSECの自発性発作は、猫における一般的な発作型を示しているだけでなく、人の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、前庭刺激誘発性発作は遺伝性てんかんモデル動物であるELマウスが示す発作様式に類似している。これまでの脳波および磁気共鳴画像法を用いた解析によって、FSECは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 : 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

本章では, FSEC の病理学的特徴付けのために, 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 では典型的な HS に一致した神経病理学的変化を
認めなかったが, FSEC における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 : 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

本章では、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いる。特に *LGII* 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、本章では本遺伝子ファミリーに関してクローニングおよび FSEC における変異解析を実施した。LGI 遺伝子ファミリーにおいて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。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。

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

本章では猫の一塩基多型 (SNP) アレイを用いてジェノタイプを実施し、ジェノタイプ・データを用いてゲノムワイド関連解析 (GWAS) を実施した。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。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, これらもゲノムワイドに有意ではなかった.

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

本章では, 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実施した. 第 4 章と同様に, すべての表現型が共通した疾患バリエーション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ーションに起因すると仮定した場合で, 各々解析を実施した. 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, 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：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アントの同定

本章では，FSECsの中から，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データを用いた．そして，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アントの検出を試みた．本研究では4頭のFSECsのWGSを実施したものの，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アントを認め，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．それらの多くはイントロン・バリアントであったことから，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アントというよりも，むしろ小さな影響をもたらす多数のバリアント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，家族集積性にてんかんを発症するFSECにおいて，そ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．本研究において，GWASおよび連鎖解析によって，複数の座位が検出されたことは，FSECにおけるて

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、将来猫における高密度 SNP アレイが利用可能となることで、より詳細かつ正確な GWAS および連鎖解析が可能となるだろう。てんかんにおける原因あるいは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。本研究における FSEC の包括的遺伝学的解析は、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。