

—— 研究褒賞受賞記念報告 ——

自然発生性てんかんモデルとしての 家族性側頭葉てんかんネコの確立

Establishment of Feline Familial Temporal Lobe Epilepsy as a Model of Spontaneous Epilepsy

長谷川 大 輔

要旨：実験動物としてのネコは、過去に様々な実験てんかん研究に用いられてきた動物種であるが、これまで自然発生性のてんかんネコがモデルになることはなかった。我々は2009年に家族性にてんかんを発症するネコ家系を発見、家系分離シコロニー化を行った。家族性自然発症性てんかんネコ（FSEC）と名付けられたこれらのネコは、自発性の辺縁系発作と前庭刺激誘発性の全般発作を有し、頭皮上および頭蓋内脳波から内側側頭葉てんかんであることが示された。通常のMRIでは明らかな異常は認められないものの、volumetryやvoxel-based morphometryでは扁桃体や海馬の容積減少、拡散/灌注MRIでは海馬における変化が認められる。これらに一致して、病理組織では海馬CA3および扁桃体中心核の細胞数減少が明らかにされた。これらの所見から、FSECはヒトの家族性内側側頭葉てんかんに相当する自然発生モデルと考えられる。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2019；30：13-20

Key Words：てんかんモデル、内側側頭葉てんかん、家族性てんかん、海馬、ネコ

1. はじめに

てんかんは脳のある哺乳動物のほぼ全てで認められる脳の機能性疾患であり、その基本的な発生メカニズムは種族を超えて一定の共通メカニズムを有するものと考えられる。ネコはこれまで様々な実験てんかん研究に用いられてきたのは周知の如く、特にキンドリングモデル¹⁾やカイニン酸モデル²⁾、ペンチレンテトラゾールモデル³⁾などは現代てんかん学の基礎を築いてきたと言っても過言ではないだろう。特に海馬や扁桃体に発作焦点を作成するキンドリングやカイニン酸モデルは、内側側頭葉てんかん mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) のモデルとして、あるいはてんかん原性の獲得や薬効薬理の基礎実験として頻用されてきた。しかしながら、これらの実験てんかんモデルは人為

的に作成された、いわば‘てんかん発作モデル’であり、自然発生する‘真の’‘てんかんモデル’ではない。さらに、ネコではイハラてんかんラットやELマウス⁴⁾のような遺伝性てんかんモデルもこれまでに発見されていなかった。

2009年に著者らは2世代に渡り複数回のてんかん発作を発症するネコ家系を発見し、その後その家系を分離し、様々な基礎的・臨床的研究を進めることで、これらのネコがヒトのMTLE、特に家族性familialのもの（FMTLE）に類似した新しいモデル動物になることを示してきた。我々はこのてんかんネコ家系をfamilial spontaneous epileptic cats (FSEC)と名付けた。本稿ではこのFSECについて、これまでの研究成果とその有用性について概説する。

2. 臨床像と発作症候学

FSECは、2009年にある実験動物配給業者のネコ繁殖コロニーにおいて複数回のけいれん発作が観られる個体が複数頭確認され、著者らがその家系調査を行い、分離したことで発見された⁵⁾。現在は著者の所属する日本獣医生命科学大学で系統維持され、現在約30頭のFSECが管理されている。

これまで確認できているFSECの初発発作症年齢は4ヵ月齢から2歳齢までであり、発作頻度は1年に数回のものから1ヵ月に数回のものまでと個体によって様々である（多くは1年に数回の低頻度である）。現在生存している最高齢のFSEC個体は13歳齢であり、これまでてんかんによる、あるいは寿命と考えられる自然死はない。

FSECは2つの発作型を有する。1つは自発性の二次性全般化を伴う、あるいは伴わない焦点性辺縁系発作focal limbic seizuresであり、口部自動症や不動化を主体とする。この発作型はネコの扁桃体/海馬のキンドリングおよびカニンニン酸モデルに酷似するとともに、ペットの猫のてんかんでも最も一般的な発作型である⁶⁾。もう1つは、例えばキャリーバッグを揺らす、飼育ケージを回転させるなどの前庭刺激を加えることで誘発される全般強直間代性発作である。これはELマウス⁴⁾で認められる放り投げ刺激により誘発されるけいれん発作に類似するものと推測される。全てのFSECがこの2つの発作型を有するわけではなく、両方の発作型が観られる個体もあれば、いずれか一方の発作型のみの個体もある。これらの発作型からFSECの症状発現域symptomatogenic zoneは海馬あるいは扁桃体と考えられる。

FSECはこれらの反復性のてんかん発作以外には明らかな臨床的異常は認められない：発作間欠期における身体検査、神経学的検査、血液検査（完全血球計算や血清生化学）、脳脊髄液検査および各種ウイルス抗体価に特筆すべき所見はない。

3. 脳波学的特徴

FSECはメデトミジン鎮静下の発作間欠期頭皮上脳波にて、前頭-側頭部に優勢なspikeを片側性あるいは両側同期性に認め、そのspike count解析からFSECの脳波異常域irritative zoneは側頭領域であることが示された（Fig. 1）^{5, 7)}。加えて、ベメグリド賦活試験において、対照（健常ネコ）群と比較して、初発spike発現、初発ミオクロヌス発現、およびけいれん誘発までのベメグリド投与量は有意に低値を示し、FSECの易てんかん誘発性、すなわちてんかん素因が示されている⁷⁾。

慢性深部電極（両側の扁桃体、海馬、運動皮質）を設置した無鎮静・無拘束の連続ビデオ脳波測定では、片側の海馬あるいは扁桃体から起始するclinicalおよびsubclinicalな焦点発作とその全般発作への進展、および全般発作が記録された（Fig. 2）⁷⁾。このことから、FSECの発作起始域seizure-onset zoneは片側の海馬あるいは扁桃体であることが示された。しかしながら、その側方性や海馬起始か扁桃体起始かは個体によってばらつきがあり、また個体によっては左右各々から独立した発作波が生じていることが判明している。

4. 画像診断学的特徴

FSECは発見当初に撮像された慣例的なMRI（T1強調画像、T2強調画像、FLAIR画像）では、画像上明らかな異常所見が見出されず、MRI negativeなてんかんと考えられた⁵⁾。しかしながら、その後14頭のFSECと8頭のage-matchingさせた健常ネコ（対照群）を用いた3D撮像による海馬のMR volumetryを行ったところ、FSEC（ $4.15 \pm 2.66\%$ ）は対照群（ $0.99 \pm 0.49\%$ ）と比べ有意な海馬容積の左右差を認め、その萎縮側の容積（ $0.206 \pm 0.02 \text{ cm}^3$ ）は対照群の平均片側容積（ 0.227 ± 0.02 ）と比較して有意に減少していた⁸⁾。一方で、ヒトMTLE患者で認められるような海馬硬化で特徴的な海馬萎縮に伴うT2強調/FLAIR高信号のような信号強度の変化は認められなかった。このことから、FSECでは明らかな信号変化を伴わない片側の海馬萎縮を

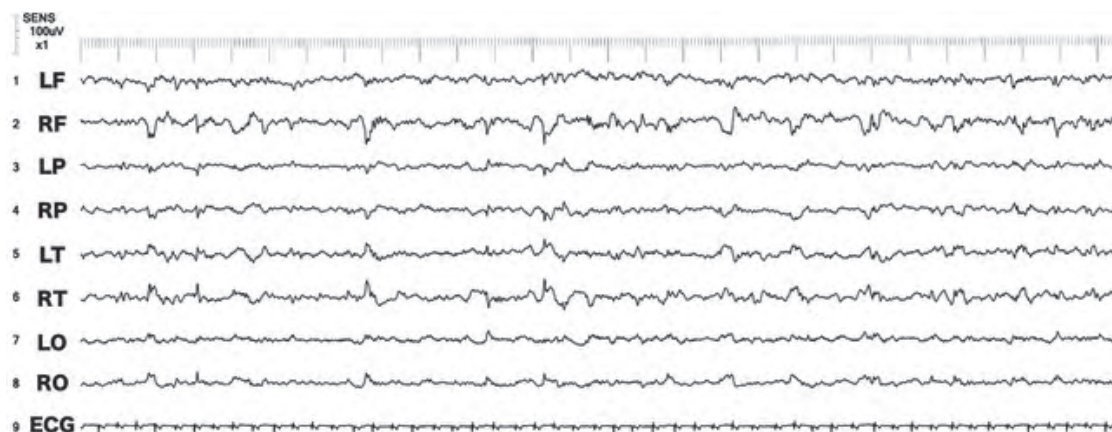


Fig. 1 FSECの発作間欠期頭皮上脳波（メデトミジン鎮静下）
両側の側頭部（特にRT）で優位な棘波が散発的に認められる。LF/RF, 左/右前頭；LP/RP, 左/右頭頂；LT/RT, 左/右側頭；LO/RO, 左/右後頭；ECG, 心電図。

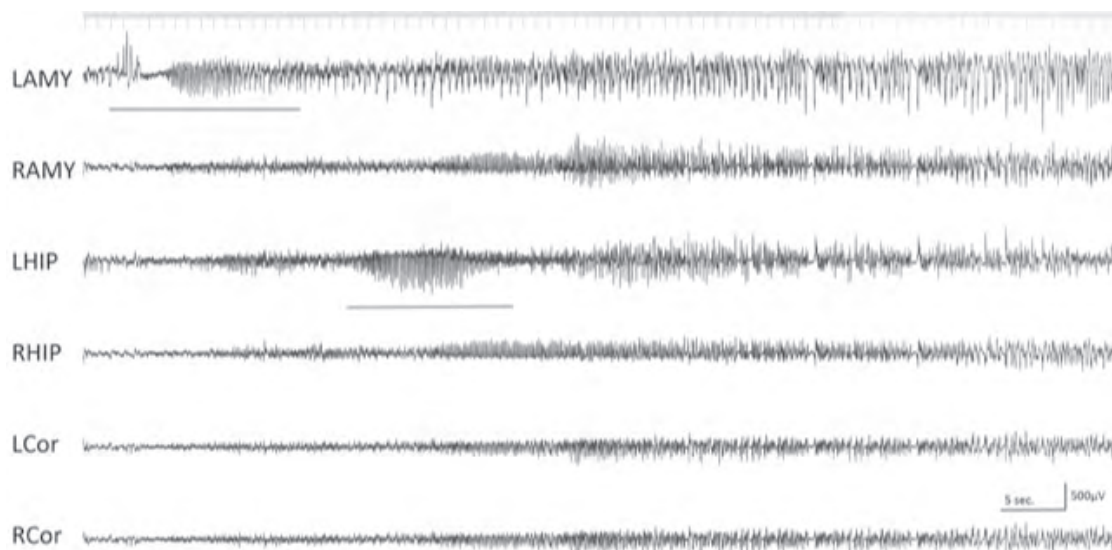


Fig. 2 FSECの発作時頭蓋内脳波
左扁桃体（LAMY）で生じた大きな多棘波から発作波が始まり、同側海馬（LHIP）、対側海馬（RHIP）および扁桃体（RAMY）へと伝播していく。発作徴候も同様に左の顔面けいれん、咀嚼、流涎（LAMYの下線部）から動作停止（LHIPの下線部）、その後点頭、最終的に全般強直間代性けいれんに至る。LCor/RCor, 左/右運動皮質。

生じる可能性が示され、FSECの構造異常域 structurally abnormal zoneが海馬にあることが推定された。さらに我々はこれまでネコでは確立されていなかったfeline brain standard templateを健康ネコ14頭から得られた38データセットを基に作成し、voxel-based morphometry

(VBM) にて対照群 (n=12) とFSEC (n=25) の画像統計解析を行った⁹⁾。その結果、対照群とFSEC群の群間比較では明らかな統計学的有意差は得られなかったものの、対照群対FSEC個体の解析で、20% (5/25頭) のFSECに片側あるいは両側の海馬および扁桃体における有意

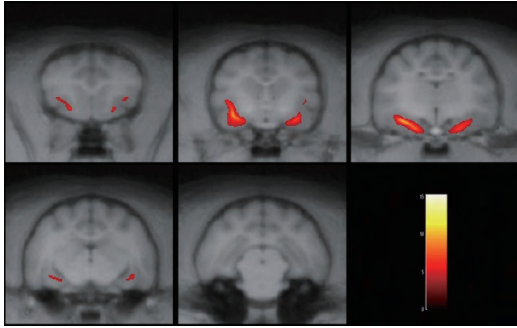


Fig. 3 1頭のFSECで認められた両側扁桃体・海馬の有意な灰白質減少を示すvoxel-based morphometry (VBM) 解析

な灰白質減少を見出した (Fig. 3)。

発作症候学, 脳波, および構造的MRIのそれぞれで示されたFSECにおけるてんかん原性領域を確認するとともに, FSECの機能欠落域 functional deficit zone を特徴付けるために, 発作間欠期¹⁰⁾ および前庭刺激誘発全般発作直後¹¹⁾ のDiffusionおよびPerfusion MRI研究を行った。その結果, FSECでは発作間欠期の海馬あるいは扁桃体において高拡散/低灌流が認められ, それが発作直後早期には逆転し低拡散/高灌流へと変化することが見出された (Fig. 4)。これらの変化はヒトMTLE患者においても認められる所見であり, やはりFSECがMTLEであること, および機能欠落域もまた海馬および扁桃体に存在することを裏付けた。

5. 病理組織学的特徴

上述の研究結果から, FSECのてんかん原性領域が海馬および扁桃体に存在することを証明すべく, 病理組織学的検討を行った¹²⁾。ただしFSECは1頭1頭が貴重なてんかん罹患動物であり, また系統維持のための繁殖や他の実験も並行して行っていることから, 少数例かつ低発作頻度の個体しか病理学的研究に供することができなかった。それでもFSEC (n=6) は対照群 (n=9) と比較して, 海馬CA3および扁桃体中心核での神経細胞数の減少が明らかとなり (Fig. 5), また腹側海馬のCA4ではgliosisが観察された (Fig. 6)。加えて, ヒトの海馬硬化で認められる苔状線維の発芽や顆粒細胞病理も

検討されたが, これらの所見は得られなかった。この研究では, さらにわずか3頭ではあるものの, FSECの親にあたるてんかん未発症ネコも解析され, このてんかん未発症の親ネコにも, FSECより軽度ながら, 海馬CA3および扁桃体中心核の細胞数減少傾向が認められた。一方, これらの親ネコにはCA4でのgliosisは観察されなかった。この結果から, FSECは, その親も含め, 生来性の海馬, 扁桃体における神経細胞数減少が明らかとなり, そして同様な変化はヒトのFMTLEやELマウスでも認められている。このことから, FSECで認められる海馬および扁桃体の神経細胞減少は, この家系に認められるendophenotypeであり, それらがてんかん発症や発作感受性に関連すること, およびFSECにこれらの変化を引き起こす主要な遺伝子の存在が示唆される。一方で, てんかん発症したFSECにのみ海馬CA4のgliosisが観察されたことは, ヒトの海馬硬化分類¹³⁾における‘no hippocampal sclerosis, gliosis only’に相当するし, これが反復性のてんかん発作の結果であることが示唆された。

6. 遺伝子解析

FSECのてんかん遺伝様式は発見当初に描かれた家系図より, 常染色体性潜性遺伝が考えられた⁵⁾。このため, FSECの原因候補遺伝子として, ヒトおよびイヌで家族性外側頭葉てんかんの原因遺伝子に挙げられ, かつヒトおよびペットのネコで知られている自己免疫性辺縁系脳炎のtarget蛋白となっているleucine-rich glioma-inactivated (LGI) ファミリー¹⁴⁾ およびLGI1の関連蛋白であるa disintegrin and metalloprotease domain (ADAM) 22, 23について, サンガー法を用いたfunctional cloningを行った。しかしながらLGIファミリー¹⁵⁾ およびADAM22, 23 (未発表) にはてんかん発症に結びつく変異は認められなかった。

このことから, ゲノムワイドな解析が必要と判断し, Feline 63K SNP Arrayを用いてgenotypingを行い, ゲノムワイド関連解析genome-wide associate study (GWAS) および連鎖解析を行った。その結果, 表現形のパターン (自発発作のみ, 前

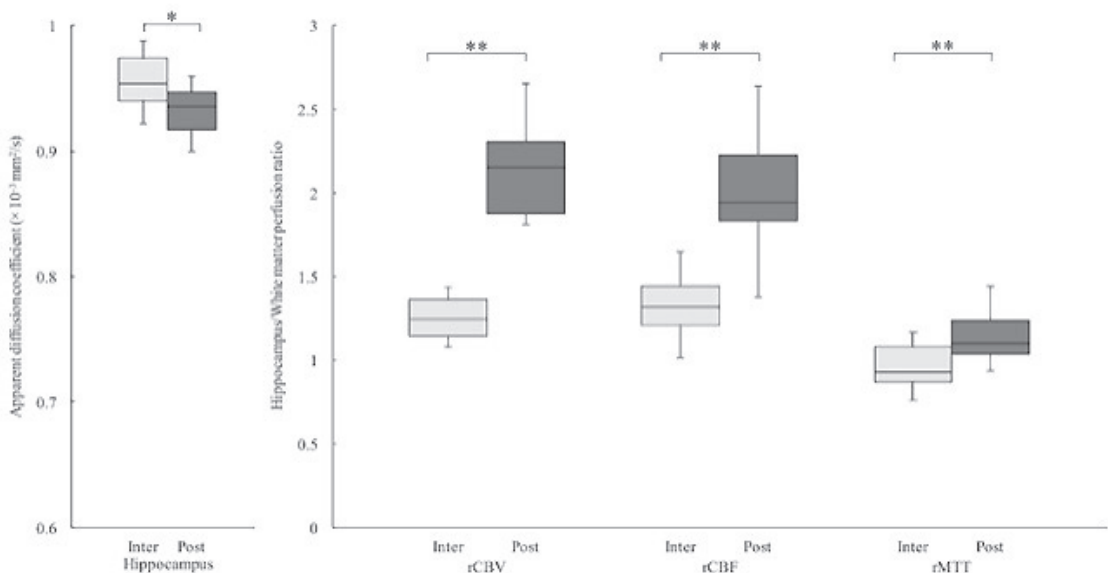


Fig. 4 FSECの海馬における発作間欠期 (Inter) と発作直後 (Post) のDiffusionおよびPerfusion MRIパラメータの変化

図左はDiffusion-weighted imagingから得られた海馬の見かけの拡散係数 (ADC) の変動を示す。FSECのADCは、発作間欠期 (Inter) では正常ネコ (data not shown) と比較して高拡散を示し、発作直後では発作間欠期より低下する。一方、図右はPerfusion MRIにおける血液量 (rCBV)、血流量 (rCBF) および平均通過時間 (MTT) の変化を示す。FSECの発作間欠期におけるこれらのパラメータは正常ネコ (data not shown) に比較して低下しており (低灌流)、発作直後には逆に増加する (高灌流)。*, <0.05; **, <0.01。

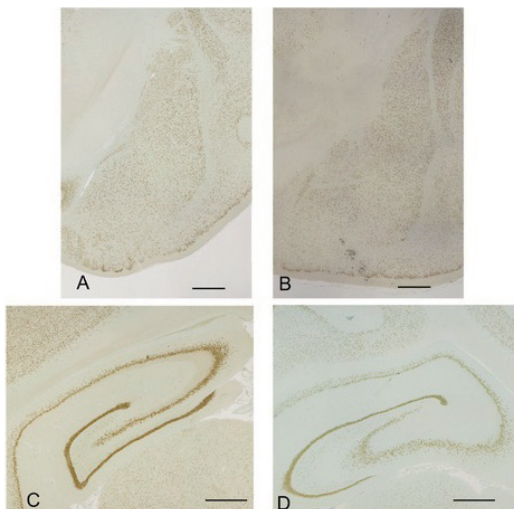


Fig. 5 正常ネコとFSECの扁桃体および海馬の比較
正常猫の扁桃体 (A) と海馬 (C) と比較して、FSECの扁桃体 (B) 中心核と海馬 (D) CA3領域は細胞数が有意に減少していた。NeuN免疫組織化学、弱拡大 ($\times 40$)。Scale bar = 1.0 mm。

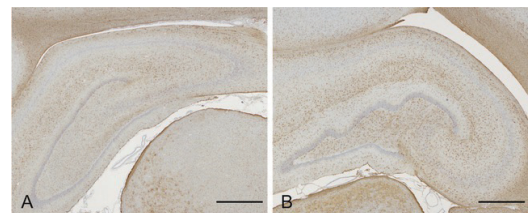


Fig. 6 正常ネコ (A) とFSEC (B) の海馬におけるGFAP免疫組織化学

FSECではCA4領域で有意なGFAP陽性細胞の増加、すなわちgliosisが認められる。Scale bar = 1.0 mm。

庭誘発発作のみ、両方) に応じて、それぞれ関連した座位を複数箇所検出した¹⁶⁾。これらの座位を検証するため、米国Missouri大学との共同研究にて4頭のFSECの全ゲノムシーケンスwhole genome sequence (WGS) を行い、ネコのWGSコンソーシアム (99 Lives Cat Genome Sequencing Initiative) に登録されている191頭のネコと比較し

た。しかしながら、GWASや連鎖解析で示唆された領域にFSEC 4頭全てで共通する変異は認められず、FSECにおけるてんかん発症の複雑性が示唆された。一方で表現形（発作型）ごとに分けた解析では、てんかん発症に関連する可能性のある遺伝子に幾つかのバリエーションが観られた（未発表）。またGWASや連鎖解析で示唆された座位以外に位置するバリエーションも解析したところ、てんかん発症における高いオッズ比を示すものも認められている（未発表）。現在、それらのバリエーションについて追跡研究を行っている。

7. おわりに

FSECはネコで初めての自然発生てんかんモデルであり、加えて（今のところ）獣医学領域も含め、世界唯一の遺伝性てんかんネコ家系である。その貴重性および将来的なてんかん研究への貢献度は計り知れないものと自負している。

我々はFSECがMTLEであることを立証するために、Hans O. Lüdersが提唱するてんかん原性領域に基づいて、症状発現域、脳波異常域、発作起始域、構造異常域、機能欠落域について臨床的な病態解析を行ってきた^{17, 18)}。これはひとえに、FSECを含めたネコやイヌといった中型動物では、ヒトとほぼ同様のてんかん臨床診断が可能であり、医学－獣医学間でのトランスレーショナル研究として、または臨床医学（画像や外科）の基礎研究として犬猫の自然発生てんかんが利用可能であることを強調するためでもある。我々はまた、FSECのてんかん原性領域が扁桃体・海馬であることを証明すべく、FSECを用いたてんかん外科に関する研究を計画している。またFSECでは発作間欠期の脳波異常や、ある程度安定した誘発性の全般発作が得られるため、抗てんかん薬やその他の治療法の治験にも利用できるだろう¹⁹⁾。

一方、現在進行中であるFSECの原因（あるいは関連）遺伝子の同定は、FSECの相同疾患と考えられているヒトのFMTLEでも現時点において明確な原因遺伝子が同定されていないため、医学、獣医学間問わず非常に興味深く、またこれまでに報告のない新たな遺伝子変異が発見

される可能性もある。

8. 謝辞

このFSECに関する一連の研究は、当時または現在大学院生の桑原孝幸、溝口俊太、小川ふきえ、濱本裕仁、湯祥彦、浅田李佳子と日本獣医生命科学大学獣医放射線学研究室神経班学生との仕事であり、彼らなくしてFSEC、そして今回の研究褒賞受賞はなかったものと思います。心から感謝いたします。またFSECに関連して共同研究を行ったオーストリアVienna獣医大学Dr. Pakozdy、アメリカMissouri大学のDr. Lyonsに深謝いたします。加えて、私をてんかん研究に多大なる協力をいただきました織間博光先生（日本獣医生命科学大学名誉教授）、田中達也先生（やまびこ医療福祉センター名誉院長）、橋詰清隆先生（いづみ記念病院）、五十嵐博中先生（新潟大学脳研究所）に心よりお礼申し上げます。

本稿で述べられた研究の一部は、武田科学振興財団生命科学研究奨励、科研費・若手研究A（課題番号：22688027）、てんかん治療研究振興財団研究助成、学術研究振興資金、科研費・基盤研究A（課題番号：17H01507）（以上、年次順）による研究助成を受けて行われている。

9. 文献

- 1) Wada JA, 佐藤光源, 森本清. てんかんの神経機構－キンドリリングによる研究. 世界保健通信社, 1993.
- 2) Tanaka T, Tanaka S, Fujita T, Takano K, Fukuda H, Sako K, et al. Experimental complex partial seizures induced by a microinjection of kainic acid into limbic structures. *Prog Neurobiol* 1992; **38** : 317-334.
- 3) Testa G, Gloor P. Intracarotid pentylentetrazol injections in the cat. *Epilepsia* 1974; **15** : 91-107.
- 4) Suzuki J, Nakamoto Y. Seizure patterns and electroencephalogram of El mouse. *Electroencephalography Clin Neurophysiol* 1977; **43** : 299-311.
- 5) Kuwabara T, Hasegawa D, Ogawa F, Kobayashi M, Fujita M, Suzuki H, et al. A familial spontaneous epileptic feline strain: A novel

- model of idiopathic/genetic epilepsy. *Epilepsy Res*, 2010 ; **92** : 85-88.
- 6) Pakozdy A, Halasz P, Klang A. Epilepsy in cats : Theory and practice. *J Vet Intern Med*, 2014 ; **28** : 255-263.
- 7) Hasegawa D, Mizoguchi S, Kuwabara T, Hamamoto Y, Ogawa F, Matsuki N, et al. Electroencephalographic features of familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Res*, 2014 ; **108** : 1018-1025.
- 8) Mizoguchi S, Hasegawa D, Kuwabara T, Hamamoto Y, Ogawa F, Fujiwara A, et al. Magnetic resonance volumetry of the hippocampus in familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Res*, 2014 ; **18** : 1940-1944.
- 9) Hamamoto Y, Hasegawa D, Yu Y, Asada R, Mizoguchi S, Kuwabara T, et al. Statistical structural analysis of familial spontaneous epileptic cats using voxel-based morphometry. *Front Vet Sci*, 2018 ; **5** : 172.
- 10) Mizoguchi S, Hasegawa D, Hamamoto Y, Yu Y, Kuwabara T, Fujiwara-Igarashi A, et al. Interictal diffusion and perfusion magnetic resonance imaging features of cats with familial spontaneous epilepsy. *Am J Vet Res* 2017 ; **78** : 305-310.
- 11) Hamamoto Y, Hasegawa D, Mizoguchi S, Yu Y, Wada M, Kuwabara T, et al. Changes in the interictal and early postictal diffusion and perfusion magnetic resonance parameters in familial spontaneous epileptic cats. *Epilepsy Res* 2017 ; **133** : 76-82.
- 12) Yu Y, Hasegawa D, Hamamoto Y, Mizoguchi S, Kuwabara T, Fujiwara-Igarashi A, et al. Neuropathologic features of the hippocampus and amígdala in cats with familial spontaneous epilepsy. *Am J Vet Res*, 2018 ; **79** : 324-332.
- 13) Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy : a Task Force report from ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, 2013 ; **54** : 1315-1329.
- 14) Pakozdy A, Patzl M, Zimmermann L, Jokinen TS, Glantschnigg U, Kelemen A, Hasegawa D. LGI proteins and epilepsy in human and animals. *J Vet Intern Med* 29 : 997-1005, 2015.
- 15) Yu Y, Hasegawa D, Fujiwara-Igarashi A, Hamamoto Y, Mizoguchi S, et al. Molecular cloning and characterization of family of feline leucine-rich glioma-inactivated (LGI) genes, and mutational analysis in familial spontaneous epileptic cats. *BMC Vet Res* 2017 ; **13** : 389.
- 16) Yu Y, Hasegawa D, Buckley RM, Fujiwara-Igarashi A, Hamamoto Y, Mizoguchi S, et al. Genetic association analyses of familial spontaneous epileptic cats. In : ACVIM Forum 2018, Oral presentation, 15 June 2018 at Seattle, USA.
- 17) Lüders HO, Najm I, Nair D, Widdess-Walsh P, Bingman W. The epileptogenic zone : General principles. *Epileptic Disord*, 2006 ; **8** : 1-9.
- 18) Hasegawa D. Diagnostic techniques to detect the epileptogenic zone : Pathophysiological and presurgical analysis of epilepsy in dogs and cats. *Vet J*, 2016 ; **215** : 64-75.
- 19) Ukai M, Hamamoto Y, Yu Y, Fujiwara-Igarashi A, Fujita M, Hasegawa D. Efficacy of zonisamide on interictal electroencephalography in familial spontaneous epileptic cats. *J Feline Med Surg*, 2018, **20** : 962-967.

Summary

Establishment of Feline Familial Temporal Lobe Epilepsy as a Model of Spontaneous Epilepsy

Daisuke Hasegawa

The cat is one of the common species that is used in basic and experimental studies of epilepsy, however, there was no report that used spontaneous epileptic cats as an animal model of epilepsy. In 2009, we found and isolated a feline family line with spontaneous epilepsy. These cats, named “familial spontaneous epileptic cats (FSEC)”, show two seizure types; spontaneous limbic seizures with or without generalization, and vestibular stimulation-induced generalized seizures. Scalp and intracranial EEGs are consistent with mesial temporal lobe epilepsy, and structural MRIs such as volumetry and voxel-based morphometry show decreased the volume of amygdala and hippocampus. In addition, diffusion and perfusion MRIs show hippocampal changes as hyperdiffusion/hypoperfusion during the interictal state, while hypodiffusion/hyperperfusion during the early postictal state. Histologically, the lower numbers of neurons without gliosis are observed in CA3 of the hippocampus and central nucleus of the amygdala. Based on these findings, FSEC is considered as a spontaneous animal model of familial mesial temporal lobe epilepsy in human.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2019 ; 30 : 13-20