

—— 研究助成報告 ——

結節性硬化症に対する新しい治療薬の探索

Screening of new therapeutic compounds for tuberous sclerosis complex

山 形 要 人, 島 田 忠 之, 杉 浦 弘 子

要旨：結節性硬化症（Tuberous sclerosis complex, TSC）は、*Tsc1*, *Tsc2*の変異により、全身に過誤腫ができる神経皮膚症候群である。*Tsc1/2*遺伝子の変異により、低分子量G蛋白質Rhebとその下流のmTORC1が活性化され、腫瘍が形成される。一方、TSCは難治性てんかんや知的障害、自閉症などの行動異常（TAND）も合併する。我々は、TSCのモデル動物を用いてシナプス形成異常が見られることを発見し、それがmTORでなく、Rhebの活性化によって生じることを明らかにした。そこで、Rheb活性を阻害する化合物（Rheb阻害薬）をTSCモデルマウスに投与し、中枢症状に対する効果を調べたところ、Rheb阻害薬はてんかん発作を部分的に抑制し、文脈記憶障害や社会性異常を顕著に改善した。以上の結果から、Rheb阻害薬はTSC患者のTANDに対して有効性が期待できると考えられた。

てんかん治療研究振興財団研究年報 2019；30：57-64

Key Words：TSC, epilepsy, memory impairment, social abnormality, Rheb inhibitor

【はじめに】

結節性硬化症（Tuberous sclerosis complex, TSC）は、責任遺伝子*Tsc1*, *Tsc2*の変異により、全身に過誤腫ができる神経皮膚症候群の一種である。*Tsc1/2*遺伝子の変異により、低分子量G蛋白質Rheb¹⁾とその下流のmTORC1が活性化され、腫瘍が出来ることが明らかになっている。そして、TSCの腫瘍性病変（上衣下巨細胞性星細胞腫など）に対して、ラパマイシンアナログのエベロリムスやシロリムスが現在使用されている²⁾。

一方、TSCは難治性てんかんや知的障害、自閉症などの行動異常（TAND）を高率に発症する。エベロリムスのTANDに対する効果が現在調べられているが、確定的な結論に至っていない。てんかんについては一部の患者に有効であるという報告はある³⁾が、自閉症に対しては否定的な速報も出ている⁴⁾。また、動物モデルにラパマイシンを投与した実験で記憶が改善

したという報告はある⁵⁾が、メカニズムは不明である。

私たちは、TSCのモデル動物（Ekerラットや*Tsc2*^{+/-}マウス）を用いて、TSCの神経細胞にシナプス形成の異常が見られることを報告してきた⁶⁾。そして、①そのシナプス形成異常に対してラパマイシンが無効であること、②シナプス異常にはラパマイシンの標的mTORではなく、それを制御するRhebが関与していること、③Rhebは通常synteninというPDZ蛋白質と結合しているが、TSCではsynteninが解離し、別のPDZ蛋白質CASKをシナプスから排除することによって、シナプス形成を阻害すること、などを見出した⁷⁾（Fig. 1）。ちなみに、CASKは大田原症候群の原因遺伝子の一つであることが報告されており⁸⁾、CASKの異常で大田原症候群、synteninによるCASKの排除で結節性硬化症の中枢病態が起きると考えられ、両病態を共通メカニズムで説明できるかもしれない。

本研究では、Rhebを標的とした、TSCに対

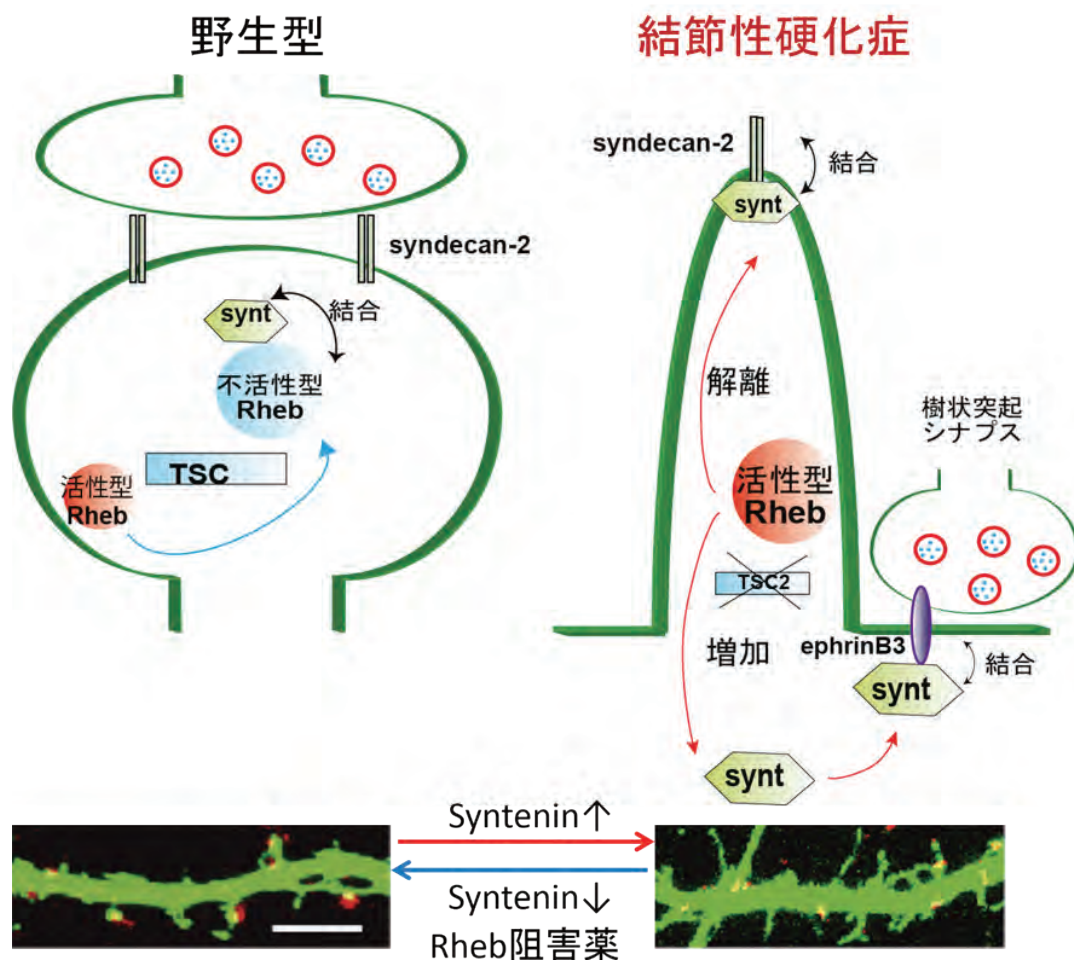


Fig. 1 結節性硬化症のシナプス形成異常の新しいメカニズム

野生型ではTSC複合体が正常に機能しているため、Rhebは主に不活性型（GDP結合型）となっており、さらにsyntenin (synt) というPDZタンパク質と結合している。しかし、結節性硬化症では、TSCの機能低下により、Rhebが活性型（GTP結合型）となり、synteninもRhebから解離する。遊離synteninは樹状突起スパインにおいてスパイン形成因子であるsyndecan-2と結合することにより、スパイン形成を阻害する。一方、synteninは樹状突起においてephrinB3と結合することにより、樹状突起シナプス形成を促す（上図）。そして、synteninの減少あるいはRheb阻害薬の添加により、結節性硬化症のシナプスは野生型へと回復する（下図）。

する新しい治療薬を探索した。

【材料および方法】

(1) モデル動物の作製

ベンチレンテトラゾール (PTZ) キンドリングに用いるため、*Tsc2*^{+/-}マウスと*CamkII-Cre;syntenin*^{fl/+}マウスを交配し、*Tsc2*^{+/-};*CamkII-Cre;syntenin*^{fl/+}マウスを作製した。また、自発のてんかん発作を

起こすモデルとして、興奮性ニューロン特異的に*Tsc1*を欠損する*CamKII-Cre;Tsc1*^{fl/fl}マウス、グリア特異的に欠損する*GFAP-Cre;Tsc1*^{fl/fl}マウスを作製した。しかし、ニューロン特異的なノックアウトである*CamKII-Cre;Tsc1*^{fl/fl}マウスは、生後すぐに死亡したため、タモキシフェン投与により*Tsc1*遺伝子を欠損可能な*CamKII-CreERT2;Tsc1*^{fl/fl}マウスを作製した。

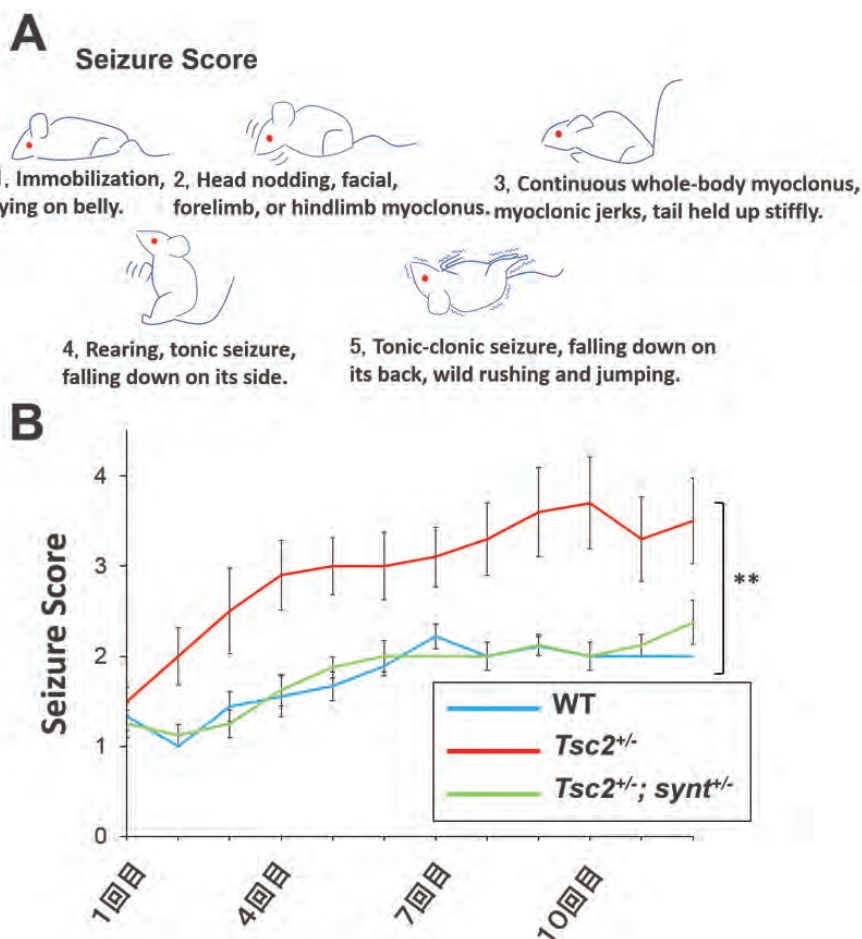


Fig. 2 *Tsc2*^{+/-}マウスを用いたペンチレンテトラゾールキンドリング

A) 発作強度スコアの凡例。ペンチレンテトラゾール注射後のマウスの行動を観察し、凡例に準じてスコアをつけた。B) ペンチレンテトラゾールキンドリングにおける、野生型, *Tsc2*^{+/-} (*Tsc2*^{+/-}), *Tsc2*^{+/-}; *CamkII-Cre;syntenin*^{fl/+} (*Tsc2*^{+/-}; *synt*^{+/-}) マウスの発作強度の変化。*Tsc2*^{+/-}マウスの発作スコアが速く上昇するのに対し、野生型マウス, *Tsc2*^{+/-}; *synt*^{+/-}マウスの発作強度の上昇は緩やかであった。反復測定分散分析による解析では、*Tsc2*^{+/-}マウスは、野生型マウス・*Tsc2*^{+/-}; *synt*^{+/-}マウスの双方に対し、有意な発作強度の上昇を示した (WT vs *Tsc2*^{+/-} *p* = 0.005, *Tsc2*^{+/-} vs *Tsc2*^{+/-}; *synt*^{+/-} *p* = 0.009, WT vs *Tsc2*^{+/-}; *synt*^{+/-} *p* = 1.0)。

(2) 評価系の確立

1. ペンチレンテトラゾールキンドリング

キンドリングは、PTZ投与日のキンドリングスコアを記録した⁹⁾。野生型, *Tsc2*^{+/-}, *Tsc2*^{+/-}; *CamkII-Cre;syntenin*^{fl/+}マウス (5-6か月齢) に対し、30 mg/kgのペンチレンテトラゾール (溶媒は生理的食塩水) を腹腔内注射した。ペンチレンテトラゾールは2 mg/mlの濃度で調製した。注射後30分間マウスの様子を観察し、発作

強度をスコア化した。スコアの目安は以下の通り¹⁰⁾、0: 通常通りの行動、1: 腹ばいに横たわり、しばし動かない、2: 後肢または前肢のみを震わせる。うなずき行動、3: ミオクローヌス、4: 間代性痙攣、5: 強直間代性痙攣、6: 強直発作の後、死亡 (Fig. 2A)。

ペンチレンテトラゾールは隔日投与し、12回投与した。途中で死亡した個体については、以降の発作スコアを6とした。

2. 脳波記録

*CamkII-CreERT2;Tsc1^{fl/fl}*マウス (6週齢) とコントロールマウスに電極設置手術を行った¹¹⁾。ソムノベンチル麻酔下で、マウスの頭蓋骨に直径1 mmの穴をあけた (Bregmaから両側2 mm, 後方2 mmに1つずつ (中央電極), 右1 mm, 前方2 mmに1つ (参照電極))。参照電極はステンレスの金属ねじ, 中央電極は銀線を使用した。それぞれの電極にコネクタをハンダ付けし, 全体をデンタルセメントで固めた。手術後, マウスは個別飼育した。5日間の回復期間の後, タモキシフェン (約100 mg/kg/day) を5日間連続投与した。タモキシフェン投与開始日をday1とし, day6より脳波記録と溶媒 (DMSO 40 μ l) またはRheb阻害薬 (10 mg/kg/day) の投与を開始した。脳波は, BIOTOP 6R12 (日本電気三栄), MAcLab/8s (ADInstruments), LabChartソフト (ADInstruments) を用いて, 参照電極と左右の中央電極との電位差を記録した。

取得した脳波から, 発作回数と発作間脳波グレード (interictal EEG grade) を解析した。発作回数は, 各日24時間分の脳波を観察し, 典型的な発作脳波の回数を数えた。典型的な発作脳波として, 反復スパイクの発生とそれに続くスパイク振幅の増加, そしてバーストパターン¹²⁾の後, 抑制的な低振幅脳波が観察された。死亡するまでに発生した発作脳波の累積回数 (全発作回数) をマウスごとに記録し, 各測定日まで観察された発作回数の全発作回数に対する割合をDMSO-Rheb阻害薬間で比較した。死亡したマウスについてはそれ以降のデータから除外した。

発作間欠期脳波は, Rheb阻害薬投与後, 1時間後から23時間後まで, 2時間おきに1分間の脳波をサンプルとして12か所を選択し, カテゴリー化した。12サンプルの平均をその日のグレードの数値とした。ただし, 選択したタイミングの直前10分間に発作が生じていた場合, 発作終了後10分を経過したタイミングから1分間を選択した。発作間欠期脳波は図3Eの通りに4段階に分類した (1: 正常背景波, 2: 正常背景波にスパイクの発生を認める (通常よりも2倍以上の振幅で, 200 ms以下の波形をスパイク

とみなした), 3: 異常背景波に多数のスパイクを認める, 4: サプレッションバースト波)。Rheb阻害薬の効果を解析するため, 溶媒群と各測定日のグレードの平均を比較した。死亡したマウスについてはそれ以降のデータから除外した。

3. 記憶および社会性試験

記憶は文脈依存性恐怖弁別試験⁵⁾, 社会行動は3チャンバーテスト¹²⁾で評価した。

(3) 薬効の評価

各マウスにvehicleあるいはRheb阻害薬を投与し, (2) の評価系にて, てんかんや記憶障害, 社会行動の異常に対する薬効を評価した。

【結果】

*Tsc2^{+/-}*マウスは自発のてんかん発作を起こさないため, PTZを繰り返し投与することにより, てんかん原性獲得過程を野生型と比較した。その結果, PTZ隔日投与による*Tsc2^{+/-}*マウスのseizure scoreが, 野生型に比べ常に高いことがわかった。これは, *Tsc2^{+/-}*マウスではPTZによるてんかん発作がより速く, 脳全体に伝搬していることを示唆している。そこで, *Tsc2^{+/-}*マウスからsynteninをヘテロノックアウトした (*Tsc2^{+/-};synt^{+/-}*マウス) とし, seizure scoreの進展過程は野生型と同程度にまで回復した (Fig. 2B)。この結果は, syntenin量を減少させたことにより, *Tsc2^{+/-}*マウスの樹状突起スパインが回復し, てんかん原性が低下したと推察される。このように, Rheb-syntenin経路がTSCのてんかん原性にも関与していると考えられた。

次に, 自発てんかん発作を起こすモデルを得るため, 興奮性ニューロンにおいて*Tsc1*遺伝子を欠損する*CamKII-Cre;Tsc1^{fl/fl}*マウスを作製したが, 生後1週間程度で全例死亡した。そこで, 条件的に*Tsc1*が欠損するマウス (*CamKII-CreERT2;Tsc1^{fl/fl}*マウス) を作製した。本マウスは, タモキシフェン投与 (100 mg/kg/day, 5日間) により, *Tsc1*が興奮性ニューロンで欠損し, 投与開始から1週間過ぎた頃より, てんかん発作を起こし始めた (Fig. 3A)。さらに, そ

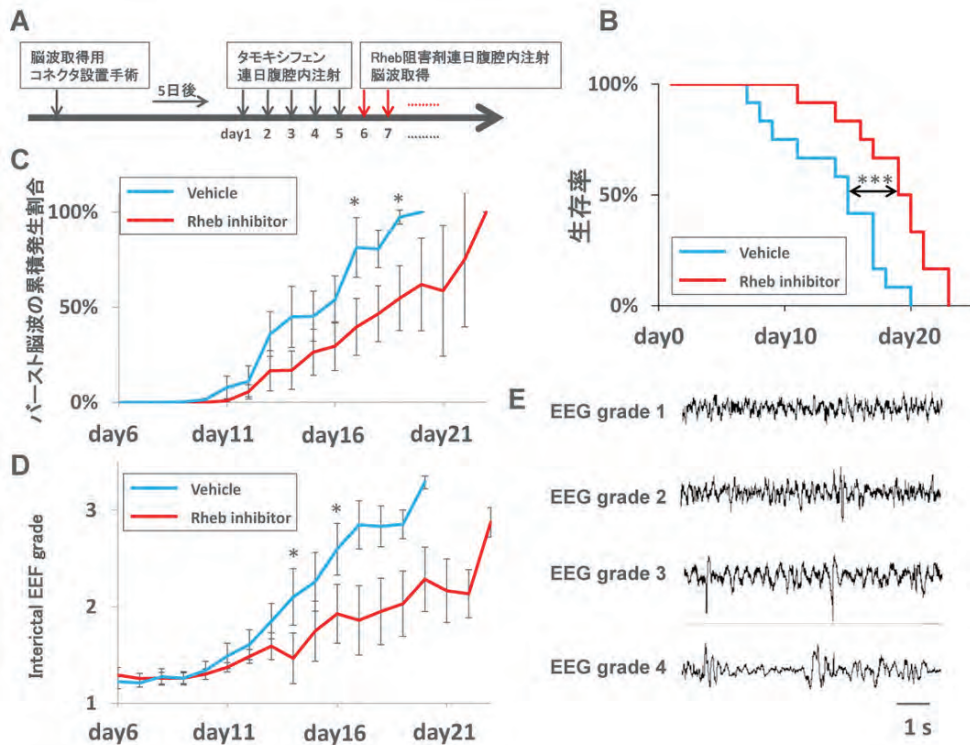


Fig. 3 *CamkII-CreERT2;Tsc1^{fl/fl}*マウスの自発発作に対するRheb阻害薬の効果

A) 実験のタイムスケジュール。脳波取得用コネクタ設置手術終了後、タモキシフェン投与開始日をday1としてデータを取得した。B) Rheb阻害剤投与による延命効果。溶媒投与では平均14日、Rheb阻害剤投与群では18.7日の平均生存日数であった。また、Rheb阻害剤投与に有意な生存期間の延長効果があることが明らかとなった（ログランク検定、 $p = 0.004$ ）。C) Rheb阻害剤投与によるバースト脳波発生の抑制。バースト脳波の累積発生率を計測し、t検定による解析を行った。Day17, 19において、Rheb阻害剤投与群にバースト脳波の有意な発生抑制が認められた（day17, $p = 0.037$; day19, $p = 0.041$ ）。D) Rheb阻害剤投与による発作間脳波グレードの悪化抑制。発作間脳波の異常程度を計測し、t検定による解析を行った。Day14, 16において、Rheb阻害剤投与群に発作間脳波の悪化の有意な抑制が認められた（day14, $p = 0.012$; day16, $p = 0.043$ ）E) 典型的な発作間脳波グレードの例。グレードは4段階で判定した。

の頃よりマウスの死亡が相次ぎ、20日目には全例死亡した。そこで、Rheb阻害薬（10 mg/kg, i.p.）あるいはvehicleを毎日投与し、Rheb阻害薬の自発てんかん発作に対する有効性を検討した。その結果、Rheb阻害薬を投与した群の生存日数は、野生型に比べ長くなり（Fig. 3B）（平均生存日数：溶媒投与群14.0日、Rheb阻害薬投与群18.7日、 $n = 12$, $p = 0.004$ ）、バースト脳波の累積発生割合も有意に低下した（day 17溶媒投与群 $81.4 \pm 15.6\%$ 、Rheb阻害薬投与群 $39.6 \pm 14.9\%$, $n = 8$, $p = 0.037$; day 19溶媒投与群 $81.4 \pm 15.6\%$, $n = 2$, Rheb阻害薬投

与群 $39.6 \pm 14.9\%$, $n = 6$, $p = 0.041$ ）（Fig. 3C）。また、発作間欠期脳波（Fig. 3D-E）もRheb阻害薬投与により有意に改善していた（day 14溶媒投与群 2.10 ± 0.19 、Rheb阻害薬投与群 1.47 ± 0.05 , $n = 9$, $p = 0.012$; day 16溶媒投与群 2.60 ± 0.24 , $n = 6$, Rheb阻害薬投与群 1.93 ± 0.16 , $n = 8$, $p = 0.044$ ）。すなわち、Rheb阻害薬はTSCのてんかん発作を消失させる作用はないが、部分的な抑制効果はあると考えられた。

次に、知的障害や自閉症に対するRheb阻害薬の有効性を検証するため、TSCモデルマウス

の記憶障害や社会性障害の有無を調べたところ、*Tsc2*^{+/-}マウスが文脈記憶の障害、*GFAP-Cre;Tsc1*^{fl/fl}マウスが社会行動異常（文脈記憶の障害も）を示すことが分かった。これらの表現型はTSC患者の知的障害や自閉症にも相当すると考えられる。そこで、これらのモデルマウスに別のRheb阻害薬（40 mg/kg）を一回経口投与し、行動解析を行ったところ、文脈記憶と社会行動の両方が改善することがわかった。以上の結果から、TSCモデルマウスでのてんかん、記憶障害や社会行動異常に対して、Rheb阻害薬が有効であると考えられた。

【考察】

ヒトのTSC患者では、難治性てんかんで発症する症例が多いが、*Tsc2*^{+/-}マウスでは自発のてんかん発作は観察されなかった。そのため、PTZ投与による発作の誘発を試みたところ、野生型に比べ*Tsc2*^{+/-}マウスではseizure scoreが顕著に亢進していた。すなわち、てんかん発作の誘発閾値あるいは伝搬の閾値が*Tsc2*^{+/-}マウスでは下がっていると考えられた。*Tsc2*^{+/-}マウスが自発発作を起こさないのは、種差によるためと考えられる。そこで、*Tsc2*^{+/-}マウスのsynteninをヘテロノックアウトし、synteninを減少させたところ、キンドリングの発達過程は遅くなり、野生型程度にまで回復した。これは、シナプス形成が回復したことにより、てんかん原性が低下したためと考えられる。一方、*CamKII-CreERT2;Tsc1*^{fl/fl}マウスでのてんかん発作を、Rheb阻害薬によって抑制しようとしたが、部分的な効果しか観察されなかった。これは、*Tsc2*^{+/-}マウスはヘテロ欠損ではあるが、*CamKII-CreERT2;Tsc1*^{fl/fl}マウスにおいては、Tsc1タンパク質が興奮性ニューロンにおいて完全欠損するため、完全に抑制しきれなかったためと考えられる。

一方、TSCモデルの文脈記憶や社会性の異常に対してRheb阻害薬が有効であったことから、てんかんと知的障害・自閉症は、異なる分子メカニズムによって生じると考えられる。これまで、知的障害や自閉症の死後脳の研究から、シナプス、特に樹状突起スパインの形・大きさ・

密度などが、正常とは異なることが報告されている¹³⁾。TSCモデルマウスでもフィロポディアが増加しており、スパインの代わりに樹状突起に直接シナプスが出来ることを明らかにしている⁶⁾。スパインシナプスが出来ないことにより、スパイン局所でのCa²⁺の上昇が起きないため、可塑的な変化が起こらず、記憶に障害が出ると予想される。Rheb阻害薬により、スパイン形成が復活したため、記憶が回復したと考えられる。

今後は、TSCモデルマウスを用いて、Rheb阻害薬の非臨床試験を行い、将来的には治験へ進むことを計画している。

【謝辞】

本研究は、順天堂大学医学部病理・腫瘍学講座の樋野興夫教授と小林敏之准教授との共同研究であり、ここに深謝致します。

【文献】

- 1) Yamagata K, Sanders LK, Kaufmann WE, Yee W, Barnes CA, Nathans D, et al. rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. J Biol Chem 1994 ; **269** : 16333-16339.
- 2) Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. N Engl J Med 2006 ; **355** : 1345-1356.
- 3) Krueger DA, Wilfong AA, Holland-Bouley K, Anderson AE, Agricola K, Tudor C, et al. Everolimus treatment of refractory epilepsy in tuberous sclerosis complex. Ann Neurol 2013 ; **74** : 679-687.
- 4) Krueger DA, Sadhwani A, Byars AW, de Vries PJ, Franz DN, Whitemore VH, et al. Everolimus for treatment of tuberous sclerosis complex-associated neuropsychiatric disorders. Ann Clin Transl Neurol 2017 ; **4** : 877-887.
- 5) Ehninger D, Han S, Shilyansky C, Zhou Y, Li W, Kwiatkowski DJ, et al. Reversal of learning deficits in a Tsc2+/- mouse model of tuberous sclerosis. Nat Med 2008 ; **14** : 843-848.
- 6) Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S,

- Shimada T, Tanaka H, Takasaki K, et al. Activation of Rheb, but not of mTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in tuberous sclerosis complex. *Sci Rep* 2014 ; **4** : 5155.
- 7) Sugiura H, Yasuda S, Katsurabayashi S, Kawano H, Endo K, Takasaki K, et al. Rheb activation disrupts spine synapse formation through accumulation of syntenin in tuberous sclerosis complex. *Nat Commun* 2015 ; **6** : 6842.
- 8) Saitsu H, Kato M, Osaka H, Moriyama N, Horita H, Nishiyama K, et al. CASK aberrations in male patients with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. *Epilepsia* 2012 ; **53** : 1441-1449.
- 9) Shimada T, Yamagata K. Pentylene-tetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *J Vis Exp* 2018.
- 10) Itoh K, Watanabe M, Yoshikawa K, Kanaho Y, Berliner LJ, Fujii H. Magnetic resonance and biochemical studies during pentylene-tetrazole-kindling development : the relationship between nitric oxide, neuronal nitric oxide synthase and seizures. *Neuroscience* 2004 ; **129** : 757-766.
- 11) Erbayat-Altay E, Zeng LH, Xu L, Gutmann DH, Wong M. The natural history and treatment of epilepsy in a murine model of tuberous sclerosis. *Epilepsia* 2007 ; **48** : 1470-1476.
- 12) Nadler JJ, Moy SS, Dold G, Trang D, Simmons N, Perez A, et al. Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice. *Genes Brain Behav* 2004 ; **3** : 303-314.
- 13) Fiala JC, Spacek J, Harris KM. Dendritic spine pathology : cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Brain Res Rev* 2002 ; **39** : 29-54.

Summary

Screening of new therapeutic compounds for tuberous sclerosis complex

Kanato Yamagata, Tadayuki Shimada, Hiroko Sugiura

Tuberous sclerosis complex (TSC) is caused by mutations in *Tsc1* or *Tsc2*, whose gene products inhibit the small G-protein Rheb1. Rheb1 activates mTORC1, whose activation has been thought to affect all organs; in particular, neuropsychiatric symptoms, including refractory epilepsy, intellectual disability and autism, are called TSC-associated neuropsychiatric disorders (TAND) and need the greatest care. We previously showed synapse formation is impaired in TSC neurons via activation of Rheb1, but not mTORC1. Therefore, we tested whether pharmacological inhibition of Rheb1 could reverse synaptic abnormalities and cognitive impairments in a mouse model of TSC. Treatment of TSC model mice with a Rheb inhibitor showed partial suppression of epilepsy-related behaviors. On the other hand, the same inhibitor clearly improved contextual memory impairment and social abnormalities of TSC model mice. Thus, the rheb inhibitor could be useful for ameliorating TAND symptoms in TSC patients.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2019 ; 30 : 57-64