

論文の内容の要旨

論文題目 結節性硬化症モデルマウスの自閉症様症状に対する
行動薬理的解析および遺伝子発現解析

氏名 柏井 洋文

【背景】 結節性硬化症は (Tuberous sclerosis complex: TSC) は脳、腎臓、皮膚などの多臓器に過誤腫性病変を認める常染色体顕性遺伝の疾患である。TSC の原因遺伝子である *TSC1* と *TSC2* の遺伝子産物は TSC 複合体を形成しており、いずれかの遺伝子の機能喪失型変異により TSC 複合体の下流の mechanistic target of rapamycin (mTOR) 信号伝達系が過活性化することが TSC の主病態である。TSC は中枢神経症状として、てんかんおよび知的障害、自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder: ASD) などの精神神経症状を高率に合併する。これらの精神神経症状は tuberous sclerosis complex associated neuropsychiatric disorder (TAND) と総称され、この TAND に対する治療の必要性の認識が高まっている。この精神神経症状も主に *TSC1* と *TSC2* 遺伝子のハプロ不全に起因する中枢神経系における mTOR 信号伝達系の過活性化によるものと考えられ、その他の症候性 ASD および非症候性の ASD の一部にも同様に mTOR 信号伝達系の関与が想定されており、TSC は自閉症の一疾患モデルでもある。動物モデルでは、成獣の *Tsc1* および *Tsc2* のヘテロ遺伝子欠損マウスは、自発けいれんや明らかな脳病変は認めないが、学習障害・社会性行動障害を示すことが報告されている。さらに mTOR 阻害薬のラパマイシンがこれらの障害を改善させることから、ヒトにおいても TSC の精神神経症状に対する mTOR 阻害薬の効果が期待されている。しかしながら、遺伝子型と表現型の関係、てんかんおよび精神神経症状の発症機序、mTOR 阻害薬を含めた薬物介入のタイミング・用量・期間・副作用など、TSC 診療において解決すべき点は多い。

本研究では、TSC 診療のトランスレーショナルな研究として、*Tsc1* および *Tsc2* 遺伝子のヘテロ欠損マウスを用いて以下の 3 つの研究を行った。

【研究 1】 *Tsc1*、*Tsc2* ダブルヘテロ遺伝子欠損マウスにおける自閉症様行動を解析し、同時に自閉症様行動に関連する遺伝子発現の変化を検討した。

[序文] 臨床的には *TSC2* 変異を有する患者のほうが *TSC1* 変異を有する患者より重症化し

やすい。*TSC1* あるいは *TSC2* の変異が TSC 複合体全体の活性に及ぼすと考えられるが、その影響の差異は明らかではなく、*TSC1* と *TSC2* のエピスタティックな影響についても不明である。本研究では *Tsc1*、*Tsc2* ダブルヘテロ遺伝子欠損マウスを作製し、ダブルヘテロ遺伝子欠損が行動および遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。また TSC における社会性障害に関わるメカニズムに迫るため、変異マウスにおいてラパマイシンによる社会性行動改善効果と連動して変動している遺伝子を解析した。

[方法] *Tsc1*^{+/-}マウスと *Tsc2*^{+/-}マウスの交配により *Tsc1*^{+/-};*Tsc2*^{+/-} (*TscD*^{+/-})マウスを得た。ASD に関連した行動として、自己グルーミング試験、ソーシャルインタラクション試験、スリーチャンバー社会性試験を行い、*TscD*^{+/-}マウスの行動を野生型、*Tsc1*^{+/-}マウスおよび *Tsc2*^{+/-}マウスと比較した。5 mg/kg ラパマイシンを2日間投与による社会性行動障害の改善効果も検討した。また野生型および3種の変異マウスのそれぞれ溶媒群と投与群で右半脳から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

[結果] 自己グルーミング試験において *TscD*^{+/-}マウスは *Tsc1*^{+/-}マウスおよび *Tsc2*^{+/-}マウスと同程度のグルーミング時間が増加していた。またソーシャルインタラクション試験でも同程度に active interaction 時間の低下していた。スリーチャンバー社会性試験では、cage-mate を用いた social preference session にて *TscD*^{+/-}マウスは *Tsc2*^{+/-}マウス同様に新奇マウスへの嗜好性を認めず、*Tsc1*^{+/-}マウスは野生型と *Tsc2*^{+/-}マウスの中間の嗜好性を呈した。このソーシャルインタラクション試験とスリーチャンバー社会性試験における社会性行動の障害は、2日間のラパマイシン投与によりいずれの変異マウスにおいても改善した。

遺伝子発現解析については、*TscD*^{+/-}マウスでは *Tsc1*^{+/-}および *Tsc2*^{+/-}マウスよりも対象 transcript 全体の fold change の変化が大きかった。また2つ以上の変異マウスで共通して変動している 1,119 transcript に対するクラスタリング解析からは、*TscD*^{+/-}マウスの発現パターンは *Tsc1*^{+/-}マウスよりも *Tsc2*^{+/-}マウスに類似していた。3つの変異マウスで共通して変動していた 148 の transcript からは canonical pathway がエンリッチしている7つのネットワークが導出された。変異によって変動している transcript の中で、ラパマイシンによってその変動が打ち消される方向に変動している transcript を各変異マウスで導出し、それぞれのデータセットに対し canonical pathway がエンリッチしているネットワークを導出した。その結果3つの変異マウスで“STAT3, IRF1, IRF4, IL-2R alpha chain, IFN-gamma”ネットワークのみが共通していた。またこのネットワークは変異マウスで共通した transcript から導出された7つのネットワークにも含まれていた。ラパマイシンの効果も含めて3つの変異マウスで共通して変動していた唯一の遺伝子は *Pdlim2* (PDZ and LIM domain protein2) で、“STAT3, IRF1, IRF4, IL-2R alpha chain, IFN-gamma”ネットワークの1構成要素であった。

[結論] *Tsc1* および *Tsc2* のダブルヘテロ遺伝子欠損は行動上の表現型では *Tsc2* のシングルヘテロ遺伝子欠損と類似していたが、遺伝子発現の変化では *Tsc1* と *Tsc2* のヘテロ欠損の相加的な影響が示された。また変異マウスが示す社会性行動とラパマイシンの改善効果に連動して変化しているネットワークは“STAT3, IRF1, IRF4, IL-2R alpha chain, IFN-gamma”であ

り、*Tsc* 変異マウスの社会性障害の病態には神経炎症のメカニズムの関与が示唆された。

【研究 2】*Tsc2* ヘテロ遺伝子欠損マウスにおけるラパマイシンの継続投与による影響を検討した。

【序文】 mTOR 阻害薬は TSC の腫瘍性病変に対し継続的な投与が行われ、腫瘍縮小効果を認め、比較的忍容性が高いことが示されてきている。精神神経症状に対する mTOR 阻害薬の応用においても継続的な投与が見込まれる。動物モデルでは *Tsc1*^{+/-}マウスと *Tsc2*^{+/-}マウスで学習障害、社会性障害に対する短期間のラパマイシン投与が奏功しているが、継続投与の効果は検討されていない。本研究では *Tsc2*^{+/-}マウスに対する継続投与の効果と影響を解析した。

【方法】 生後 10 週齢の野生型および *Tsc2*^{+/-}マウスに対し、5 mg/kg ラパマイシンを 2 日間（短期投与）または 2 週間（継続投与）腹腔内投与した。投与終了 24 時間後に脳、腎、脾臓、胸腺を採取し湿重量を測定した。溶媒群とラパマイシン継続投与群については投与終了翌日にソーシャルインタラクション試験を行った。脳に関しては半脳から RNA を抽出し、網羅的遺伝子発現解析を行った。

【結果】 脳重量は *Tsc2*^{+/-}マウスで野生型に比して重く、ラパマイシン継続投与群で有意に減少を認めた。胸腺、脾臓の重量はラパマイシンの短期および継続投与に伴い減少した。ソーシャルインタラクション試験では *Tsc2*^{+/-}マウスにおける社会的相互作用の障害がラパマイシン短期・継続投与により回復した。ラパマイシン短期・継続投与により共通して変動していた遺伝子の中では、ステロイド・脂質代謝に関わる遺伝子が多く含まれていた。また継続投与群において短期投与群と比べて変動していた遺伝子の中には翻訳、ステロイド・脂質代謝、免疫反応に関連する遺伝子が多く含まれていた。

【結論】 ラパマイシンの継続投与は *Tsc2*^{+/-}マウスの社会性障害に対する治療効果を維持しており、*Tsc2*^{+/-}マウスの脳重量増加を補正する作用を持つこと示された。ラパマイシンの投与は全身の免疫系に影響を及ぼすとともに、脳のステロイド・脂質代謝系に関わる遺伝子の発現を変化させていた。特に継続投与群では翻訳に関わる遺伝子の発現が変化しており、脳重量の減少に寄与している可能性が示唆された。

【研究 3】 *Tsc1* および *Tsc2* のヘテロ遺伝子欠損マウスが TSC の幼若期から青年期の精神神経症状の表現型の動物モデルとなるかどうかを解析した。

【序文】 TSC のてんかんおよび ASD 症状も乳幼児期より出現することから、幼若期からの治療的介入が求められている。そのための動物モデルの確立が必要である。本研究では TSC 患者の主要な精神神経症状である①早期発症のてんかん、②精神運動発達遅滞、③ASD に相当する表現型について、*Tsc* のヘテロ遺伝子欠損マウスを用いて解析した。

【方法】 早期発症てんかんに関しては、13 日齢の *Tsc1*^{+/-}、*Tsc2*^{+/-}マウスに対し N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)、カイニン酸あるいはペンチレンテトラゾールを投与によりけいれ

んを誘発し、けいれんの重症度の評価によりけいれん感受性の亢進の有無を解析した。精神運動発達遅滞に関しては、*Tsc2*^{+/-}マウスの感覚器官・反射機能・筋力の発達マイルストーンの評価を行った。ASD 症状に関しては、離乳後の 4 週齢の *Tsc2*^{+/-}マウスでソーシャルインタラクション試験を行った。

【結果】*Tsc1*^{+/-}、*Tsc2*^{+/-}マウスともに NMDA で誘発した痙攣の重症度に野生型と差は認めず、*Tsc2*^{+/-}マウスではカイニン酸またはペンチレンテトラゾールで誘発したけいれんの重症度においても野生型と差はなかった。発達マイルストーンにおいても、*Tsc2*^{+/-}マウスは野生型と比べて差はなかった。一方 4 週齢の *Tsc2*^{+/-}マウスにおいては、成獣期と同様に野生型に比して相互インタラクション時間が低下していた。またその社会性の障害は 2 日間のラパマイシン投与により改善した。

【結論】ヒト TSC 患者と同じ遺伝子型である *Tsc1*^{+/-}マウスおよび *Tsc2*^{+/-}マウスは、てんかんモデル、精神運動発達遅滞のモデルにはならないが、青年期 ASD モデルとしては有用であることが示された。

【考察】本研究では *Tsc1* および *Tsc2* 遺伝子が遺伝子発現レベルにおいて相加的な影響を及ぼすこと、TSC の社会性障害の病態に STAT3 を介する神経炎症のメカニズムが関与している可能性があること、mTOR 阻害薬の継続投与により行動の改善とともに脳重量が減少することを明らかにした。本研究は TSC の中枢神経病態の一端を明らかにし、TSC の精神神経症状に対する mTOR 阻害薬の臨床応用において有用な情報を提供するものと思われる。