

シロリムスのミクログリアの極性転換を介した てんかんTANDの発症機序解明に関する研究

研究分担者 金田眞理 熊谷牧子
大阪大学大学院 医学系研究科

研究要旨

結節性硬化症(TSC)のてんかんやTANDはmTORC1阻害剤であるシロリムスの投与により軽快治癒するが、その機序は不明である。今回我々はてんかん、TAND、を発症しシロリムスの投与でこれらの症状が軽快治癒するTSC2モデルマウスを用いて、TSCのてんかんやTANDにおける、ミクログリアの役割を検討した。その結果、TSCのモデルマウスの脳ではミクログリアがM1よりの極性を示しており、シロリムスを投与することによりミクログリアがM2よりの極性に変化することが明らかになった。このミクログリアの極性の変化がTSCのてんかんや、TANDの症状発現やシロリムスによる症状の軽快や治癒を起こす機序の1つであると考えられた。

A. 研究目的

TSC1, TSC2 遺伝子の異常の結果それぞれの遺伝子産物ハマルチン、チュベリンに異常をきたし、下流のmTORC1（メカニスティックターゲットオブラパマイシンコンプレックス1）が恒常的に活性化する為におこる結節性硬化症(TSC)のてんかんやTAND（TSC associated neuropsychiatric disorders）はmTORC1阻害剤であるシロリムスの投与により軽快治癒するが、その機序は不明である。ところで、アルツハイマー病(AL)やパーキンソン病(PS)、筋萎縮性側索硬化症(AML)などの神経変性疾患や炎症性疾患ではミクログリアがその病態に重要な役割を果たしていることが知られている。最近ではてんかんにおいてもミクログリアの関与が報告されてきている。そこで、TSCのてんかんやTANDの発症機序にもミクログリアが関係していると考え、てんかん、TAND、を発症しシロリムスの投与でこれらが軽快するコンディショナルなTSC2モデルマウスを用いて、TSCすなわちmTORC1の恒常的な活性化で起こるてんかんやTANDの発症における、ミクログリアの役割を検討し、ひいてはmTORC1阻害剤であるシロリムスのてんかん抑制におけるミクログリアの作用機序の解明を目指すことにした。

B. 研究方法

Cre-Loxp システムを用いて、MITF 特異的にTSC2 遺伝子をノックアウトしたMitf-Cre, Tsc2 floxed/floxed マウスを作製した。本マウスは通常生後5週あたりで、てんかんやTANDを発症し、9週頃にはてんかんの重責発作

で死亡する。しかしながらてんかん発症直後からシロリムスの投与を行うと、4日ほどで有意にてんかん発作が消失する。そこでてんかん発作が出現する生後5週目から1週間シロリムスとプラセボを1日1回腹腔内に投与し、てんかん発作の消失しているグループとプラセボ投与によりてんかん発作が起こっているマウスについて、てんかん発作の回数測定や、open field test や 8 arm radial maze test などにてんかんやTANDの程度を検討後、生後6週の脳を採取し、Creの発現が最も高い嗅球より細胞を集めてflow cytometryでミクログリアの分画を採取し、M1, M2のマーカーを用いてそれぞれの分画の細胞の割合を比較検討した。さらに、シロリムスもしくはプラセボ投与のてんかんモデルマウスの脳のサンプルを作製し、組織学的に形態を調べるとともに、様々なサイトカインの発現を免疫組織科学的に検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、大学や施設の倫理委員会で承認を得て施行した。

C. 研究結果

X-gal 染色による Mitf cre 発現部位の確認：
X-gal 染色による Mitf cre 発現部位の確認を行ったところ、嗅球、海馬、梨状皮質、糸球体層では有意に Mitf cre の発現増加が認められたが、大脳皮質ではコントロールと差が認められなかった。

TSC2 モデルマウスの嗅球におけるミクログリ

アのシロリムス 投与前後の変化

そこで *Mitf cre* 発現が最も高く認められた嗅球におけるミクログリアの変化を調べた。コントロールマウスも cK0 マウスも形態学的には大きな変化は認められなかったが、シロリムス投与により cK0 マウスのミクログリアが増大し、突起が伸長した。ついで、ミクログリアの発現マーカーについて検討した。IL-6、FcγRIIb、IL-1b の発現は cK0 マウスで有意に高く、IL-10 の発現は cK0 Cont マウスで違いがなかった。一方、Arg1、CD206 の発現は cK0 マウスで低い傾向にあり、モデルマウスのミクログリアは M1 よりの性状を示すと考えられた。一方これらのマウスにシロリムスを投与すると、IL-10、Arg1、IL10、CD206 の発現は cK0 マウスでは有意に上昇するが、コントロールマウスでは変化がなかった。IL-6 の発現はシロリムス投与で変化しなかった。IL-1b、FcγRIIb はシロリムス投与で下降する傾向があった。

cK0 マウスではコントロールマウスに比して、M1 型のミクログリアが有意に増加しており、シロリムス投与により、コントロールマウスでは変化を認められないが、cK0 マウスでは中間型、M1 型のミクログリアが減少し、M2 型のミクログリアの数が増加していることがわかった。さらにミクログリアを様々なマーカーで染色しその特徴を調べたところ、cK0 マウスでは P2Y12 レセプターの発現が低いシロリムス投与で有意に上昇した。また、cK0 マウスでは A2a レセプターの発現が高いシロリムス投与で有意に低下した。さらに、cK0 マウスではシロリムス投与で NTPDase2 の発現が有意に増加した。cK0 マウスではシロリムス投与で、ATP、ADP、ATP/ADP 比が有意に増加することもわかった。

D. 考察

TSC モデルマウスの嗅球のミクログリアの形態と遺伝子発現を表 1 にまとめた。cK0 マウスでコントロールマウスと比較して、Arg1 IL-10、CD206 などの M2 ミクログリアのマーカーや purinergic receptor の P2Y12、Adenocine receptor の A1 が減少しており、それらはシロリムスを投与することによって増加する。一方 IL-6、IL-1b、FcγRIIb、などの M1 マーカーや purinergic レセプターの P2X7 や Adenocine receptor の A2a は増加しており、これらはシロリムス投与で減少する。形態学的に cK0 マウスとコントロールマウスで大きな違いは認められなかったが cK0 マウスにシロリムスを投与することによって、細胞が大きくなり、突起が伸長した。以上より、TSC2cK0 マウスの嗅球のミクログリアは M1 よりの極性を示しており、シロリムスを投与することによりミクログリアが M2 よりの極性に変化すると考えられた。(図 2)

E. 結論

TSC2K0 マウスの嗅球のミクログリアでは M1 よりの極性を示しており、シロリムスを投与することによりミクログリアが M2 よりの極性に変化する。M1 よりのミクログリアがシナップスにおける神経細胞を刺激し、てんかんや TAND をおこしてくるがシロリムス投与によりミクログリアが M2 型に変化することにより神経細胞の興奮を抑制することによって、てんかんや TAND などの症状が抑えられると考えられた。以上より、結節性硬化症の中核神経症状はこのミクログリアの極性の変化によって生じ、シロリムス投与によりこの極性が正常に戻ることに、症状が軽快治癒すると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

① Wei-Ning Wang, Hanako Koguchi-Yoshioka, Keisuke Nimura, Atsushi Tanemura, Rei Watanabe, Manabu Fujimoto, and Mari Wataya-Kaneda* *Distinct transcriptional profiles in the different phenotypes of neurofibroma from the same neurofibromatosis 1 subject* Journal of Investigative Dermatology in press

② Makiko Koike-Kumagai, Mari Wataya-Kaneda* *Neuroinflammation and Microglial Polarity: Sirolimus Shifts Microglial Polarity to M2 phenotype in a Mouse Model of Tuberous Sclerosis Complex* J Exp Neurol. 2022;3(3):63-70.

③ Mari Wataya-Kaneda, M.D., Ph.D.*, Yoshiyuki Watanabe, M.D., Ph.D., Ayumi Nakamura, BPharm, Kouji Yamamoto, Ph.D., Kiyoshi Okada, M.D., Ph.D., Shinichiro Maeda, Ph.D., Keisuke Nimura, Ph.D., Kotaro Saga, Ph.D., and Ichiro Katayama, M.D., Ph.D. *Pilot Study for the Treatment of Cutaneous Neurofibromas in Neurofibromatosis Type 1 Patients Using Topical Sirolimus Gel* J Am Acad Dermatol. 2022 Nov 2:S0190-9622(22)02808-0.

④ Patricia E. Dill, MD1*, Didier Bessis, MD, PhD, Beatrice Guidi, MD, Smail Hadj-Rabia, MD, Peter Itin, MD, Mary Kay Koenig, MD, Ester Moreno-Artero, MD, Tobias E. Erlanger, PhD, Marco Cattaneo, PhD, Peter Weber, MD Mari Wataya-Kaneda, MD *Validation of the index for facial angiofibroma (IFA), a new scoring tool to assess facial angiofibromas in the tuberous sclerosis complex* J Am Acad Dermatol. 2022 Dec;87(6):1448-1450.

⑤ Koguchi-Yoshioka, Hanako; Nakano, Hajime; Akasaka, Eijiro; Tanemura, Atsushi; Katayama,

Ichiro; Sawamura, Daisuke; Fujimoto, Manabu; Wataya-Kaneda, Mari* Author Reply to "WNT10A variant and severe scoliosis?. Revisiting a case with whole genome sequencing J Dermatol 2022 Nov;49(11):e424-e425.

⑥ Akemi Sato, Koji Tominaga, Yoshiko Iwatani, Yoko Kato, Mari Wataya-Kaneda, Kai Makita, Kiyotaka Nemoto, Masako Taniike and Kuriko Shimono Abnormal white matter microstructure in the limbic system is associated with tuberous sclerosis complex-associated neuropsychiatric disorders Front Neurol. 2022 Mar 14;13:782479

⑦ Mami Hayashi, M. Wataya-Kaneda* Hanako Koguchi-Yoshioka, Noriko Arase, Tateki Kubo, Hajime Nakano, Manabu Fujimoto Familial Michelin Tire Baby Syndrome J Dermatol 2022 Jul;49(7):e219-e220.

⑧ Iwanaga A, Utani A, Koike Y, Okubo Y, Kuwatsuka Y, Endo Y, Tanizaki H, Wataya-Kaneda M, Hatamochi A, Minaga K, Ogi T, Yamamoto Y, Ikeda S, Tsuiki E, Tamura H, Maemura K, Kitaoka T, Murota H. Clinical Practice Guidelines for Pseudoxanthoma Elasticum (2017) J Dermatol 2022 Mar;49(3):e91-e98.

図1 TSCモデルマウスの嗅球のミクログリアの形態と遺伝子発現

Microglial gene expression		Ct / Veh	cKO / Veh	Ct / Siro	cKO / Siro
Microglia markers	Arg1	1.000	0.495	0.876	2.507
	IL-10	1.000	1.050	0.899	3.561
	CD206	1.000	0.527	0.771	1.890
	IL-6	1.000	2.113	0.884	1.240
	IL-1β	1.000	2.360	1.196	1.943
	FcγRIIb	1.000	1.343	0.608	0.868
Purinergic receptors	P2Y12	1.000	0.629	2.324	6.108
	P2X7	1.000	2.615	1.009	0.624
	P2X4	1.000	1.206	1.018	1.009
Adenocine receptors	A1.	1.000	0.629	1.940	2.051
	A2a	1.000	2.615	1.400	1.132
	A3	1.000	1.206	0.963	1.139
Ectonucleotidase	NTPDase1	1.000	1.541	1.229	0.720
	NTPDase2	1.000	0.884	1.134	2.015
	5'-NT	1.000	1.167	1.025	0.821
Morphology of microglia	Iba1 (+) Hoechst				
Change of microglial processes					

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

- てんかん治療用又は自閉症スペクトラム障害治療用外用剤 日本 2019/10/16
- てんかん治療用又は自閉症スペクトラム障害治療用外用剤 WIPO PCT/JP2020/037986 2020/10/7
- 脈管異常治療用外用 WIPO PCT/JP2020/005252
- シロリムスまたはその誘導体を含む局所適用外用剤 WIPO PCT/JP2020/006717
- シロリムスまたはその誘導体を含む全身作用型外用剤 WIPO PCT/JP2020/006722

図2 ミクログリアの極性の変化

