

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08322

研究課題名(和文) 結節性硬化症における表現型差異を引き起こす機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the cause of phenotypic differences in tuberous sclerosis complex using model mice

研究代表者

小池・熊谷 牧子 (Koike-Kumagai, Makiko)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：30391949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TSCは、皮膚と神経系を中心に異常が現れる疾患である。TSCの精神神経障害はTANDと呼ばれる。TSCモデルマウスのTANDが、mTOR阻害剤シロリムスで改善することが分かった。また、TANDの病態機序にミクログリアの極性変化が関わっており、シロリムス処理はミクログリアを抗炎症性にシフトすることが分かった。さらにこのマウスのTANDには性差があり、脳内のエストロゲン(E2)とERの転写活性化が性差の原因であることを突き止めた。シロリムスには、ステロイド調節能があり、シロリムス処理が脳内ステロイドレベルの調節を介して、E2とERの転写活性を制御してTANDを改善に導いていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TSCは、てんかん発作や発達障害の罹患率が高く、患者のQOLに影響を与えることが問題となっている。TSCでは、mTORキナーゼの過剰な活性化が原因と考えられており、mTOR阻害剤の有効性は、臨床的にも認知されつつあるが、いまだ病態形成の機序が十分に解明されているとはいえない。我々の研究成果は、TSCの病態機序をさらに明らかにするとともに、シロリムスがステロイドレベルを調節するという新たな機能を見出したことである。神経精神疾患やアルツハイマー病を代表とする神経変性疾患にも性差が認められており、シロリムスがTANDだけでなく、性差のある疾患における突破口となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：TSC is a disease characterized by abnormalities mainly in the skin and nervous system; the neuropsychiatric disorder of TSC is called TAND. sirolimus, an mTOR inhibitor, was found to improve TAND in a mouse model of TSC. We also found that microglial polarity changes are involved in the pathogenesis of TAND and that sirolimus treatment shifts microglia to an anti-inflammatory state. We also found sex differences in TAND in these mice and attributed the sex difference to the transcriptional activation by estrogen (E2) and ER in the brain. We found that sirolimus has steroid-modulating properties and that sirolimus treatment leads to improvement in TAND by regulating the transcriptional activity of E2 and ER through modulation of steroid levels in the brain.

研究分野：神経科学 皮膚科学

キーワード：結節性硬化症(TSC) 結節性硬化症関連精神神経障害(TAND) TSCモデルマウス 行動解析 ミクログリア ER シロリムス mTOR

## 1. 研究開始当初の背景

TSCは、自閉症スペクトル障害(ASD)、注意欠陥多動性障害(ADHD)、てんかん発作を含む神経疾患の罹患率が高い遺伝性の疾患である。これらの精神疾患を総称してTAND(TSC-associated neuropsychiatric disorders)とよぶ。TSCの原因遺伝子であるTSC1/TSC2遺伝子は、mTORキナーゼに抑制的に働くので、TSC1/TSC2遺伝子の機能の低下により、mTORキナーゼが過剰に活性化されるためにTSCが発症すると考えられている。mTORキナーゼ複合体1(mTORC1)の阻害薬であるラパマイシン(シロリムス)は、亢進したmTORキナーゼ活性を抑えるため、TSCの治療薬として注目されている。一方で、TSCでは、年齢、性別による症状の個人差が大きいことが問題となっている。特に、遺伝病であるにもかかわらず、家族内における親子あるいは兄弟間の症状の差が大きいことも治療を難しくしているが、その原因は不明である。

ミクログリアは、脳内免疫担当細胞として中枢神経において恒常性の維持に働いている。そして、神経の異常を感知すると、ミクログリアは病変部に集積し、障害神経細胞や死細胞・デブリを取り除いて脳内環境を保っている。神経疾患では、このミクログリアの機能変調が病態に深く関与していることがある。例えば、ミクログリアの貪食活性の低下は、アルツハイマー病の主要病態であるアミロイドが蓄積する一因とも指摘されている。申請者らのグループが作成したTSCモデルマウス(Mitfプロモータ依存的にCreリコンビナーゼを発現させたTsc2遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス(Mitf-Cre, Tsc2(KO/KO):Tsc2 cK0マウス)の脳でも、ミクログリアの変化起きているかを解析した。さらに、TSCにはリンパ脈管筋腫症(LAM)のように、女性で発症の割合が高い肺疾患がある。LAMでは、mTORC1だけでなくエストロゲン(E2)の影響も唆されている。そこで、TSCの神経障害におけるステロイドホルモンの影響についても調べた。

## 2. 研究の目的

TSCは、mTORキナーゼが過剰に活性化されるためにTSCが発症すると考えられている。TSCにおけるmTOR阻害剤の有効性は、臨床的にも認知されつつあるが、いまだ病態形成の機序が十分に解明されているとはいえない。そこで、TOR阻害剤シロリムスと、TSCモデルマウス:Tsc2 cK0マウスを用いて、中枢神経の恒常性の維持に機能するミクログリアと転写因子として働くE2-ERを解析し、表現型の差異についての原因解明に取り組んだ。

特に、Tsc2 cK0マウスの行動解析の結果、ADHD様行動および作業記憶障害においてメスのほうが症状がシビアに現れる性差があったため、脳内ステロイドのエストロゲン(E2)に注目し、性差の差(表現型の差異)の原因を明らかにする。

## 3. 研究の方法

TSCモデルマウス:Tsc2 cK0マウスの行動解析をおこない、精神神経症状(TAND)を示すかどうかを確認した。

シロリムスを腹腔内投与(7日間)後に、行動解析を行いシロリムスの効果を解析した。

マウスの脳の免疫染色を行い、ミクログリアの形態の比較観察を行った。

マウスの脳のmRNAからRT-PCRを行い、ミクログリアの極性を示すマーカー遺伝子の発現量の解析を行った。

LC/MS/MS(液体クロマトグラフィー質量分析法)により、脳内ステロイドの濃度を測定した。

ステロイド合成酵素の遺伝子発現をRT-PCRにより解析した

E2の受容体ER(ER、ER、GPER)の遺伝子発現をRT-PCRにより解析した。

ERのDNA結合活性を測定した。

## 4. 研究成果

(Tsc2 cK0マウスの行動解析とTsc2 cK0マウスのTANDへのシロリムス処理の効果(研究方法

の ))

Tsc2 cK0 マウスの発作の測定及び行動解析 (不安傾向、多動性、自閉症、記憶) を行った。その結果、Tsc2 cK0 マウスでは、生後 6 週齢以降に自発性のてんかんが出始め、8 週齢前後で発作が原因で死亡に至った。また、Tsc2 cK0 マウスでは、自閉症、不安、多動性を示し、記憶においても異常を示した。てんかん、不安症状、多動性、記憶の異常は、mTOR 阻害剤 シロリムスの 7 日間の腹腔内注射により改善した。一方、自閉症はシロリムス投与により改善しなかった。さらに、多動性と記憶障害においては、メスの Tsc2 cK0 マウスのほうがオスの Tsc2 cK0 マウスよりも優位に症状が強く現れ、性差が確認された。

(シロリムス処理によるミクログリアの変化が TAND を改善する(研究方法の ))

脳切片の免疫染色をおこない、ミクログリアの形態観察により、シロリムス処理がミクログリアの極性を抗炎症性にシフトさせることが分かった。さらに、mRNA 発現量測定により、てんかんを起こす Tsc2 モデルマウスで、ミクログリアの極性が炎症性にシフトしているとき発現するアデノシン受容体 A2 が強く発現することが分かった。また、シロリムスによりミクログリアが抗炎症性に分極しているときには、ADP 受容体 P2Y12 が強く発現することが明らかになった。

(脳内の E2/ER 依存的な遺伝子の転写活性化が性差の原因である(研究方法の ))

脳内ステロイドホルモンの測定をした結果、TAND が強く現れる Tsc2 cK0 メスマウスの E2 レベルが Tsc2 cK0 オスマウスよりも優位に高かった。また脳内の E R の遺伝子発現量を解析した結果、E R のみが Tsc2 cK0 メスマウスで高く、ER の DNA との結合活性調も高かった。そして、Tsc2 cK0 メスマウスにおいて高い E2 レベル、ER の発現および ER の DNA 結合活性は、シロリムス処理により低下した。

さらに、E2 合成酵素アロマターゼの阻害剤レトロゾール処理は、Tsc2 cK0 メスマウスの脳内 E2 レベルを下げ、ADHD 様行動も改善した。

これらの結果は、Tsc2 cK0 マウスの性差の原因が、E2/ER 依存的な転写活性化であることを示す。

(シロリムスは、脳内ステロイドレベルを調節して、E2/ER の転写活性を制御して、TAND を改善する)

脳内ステロイドのプロゲステロン (P4) と E2 の比を計算した。この値は、Tsc2 cK0 メスマウスでは、E2 レベルがたかいこともあり、低くなるが、シロリムス処理により、オスマウスに変わらず、P4/E2 の値がほぼ一定になった。これらの結果から、申請者は、シロリムス処理が脳内のステロイドレベルの調整を介して、E2/ER の転写活性化を制御しており、TAND の改善につながっていると考えた。

これらの結果は、シロリムス処理が、TAND だけでなく、性差がある精神神経疾患や神経変性疾患 (アルツハイマー病やパーキンソン病) においても治療法に糸口を与えるものとなると考えられる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Makiko Koike-Kumagai, Manabu Fujimoto, Mari Wataya-Kaneda	4. 巻 218
2. 論文標題 Sirolimus relieves seizures and neuropsychiatric symptoms via changes of microglial polarity in tuberous sclerosis complex model mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2022.109203.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makiko Koike-Kumagai, Mari Wataya-Kaneda	4. 巻 3
2. 論文標題 Neuroinflammation and Microglial Polarity: Sirolimus Shifts Microglial Polarity to M2 phenotype in a Mouse Model of Tuberous Sclerosis Complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Exp. Neurol.	6. 最初と最後の頁 63-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33696/Neurol.3.064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Makiko Koike-Kumagai, Mari Wataya-Kaneda
2. 発表標題 Sirolimus alters microglial polarity leading to improvement of neuropsychiatric symptoms of tuberous sclerosis complex mice model.
3. 学会等名 1 st. International Conference of Neuroscience and Neurology. (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Emi Kaneda, Makiko Koike-Kumagai and Mari Wataya-Kaneda
2. 発表標題 Epilepsy and TAND in the tuberous sclerosis complex are caused by an alteration in microglial polarity to M1 and sirolimus cures them by returning microglial polarity to M2.
3. 学会等名 2023 International TSC Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Makiko Koike-Kumagai
2. 発表標題 The microglial decreased phagocytosis in olfactory bulb is responsible for neuropsychiatric disorders in tuberous sclerosis complex model mice.
3. 学会等名 50 th Annual ESDR meeting, Virtual, Sep. 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関