

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17900

研究課題名(和文) 精神神経ループス発症の分子機序と新規治療の開発：ミクログリアの細胞型分化機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of neuropsychiatric lupus pathogenesis and development of novel therapies

研究代表者

河野 通仁 (Kono, Michihito)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：00835192

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)：全身性エリテマトーデス(SLE)は自己免疫性疾患のひとつで若年女性に多く発症し、神経、腎臓、皮膚など様々な臓器病変を伴い生命予後にもかかわる。それらの中でも精神神経ループス(NPSLE)は最も重症な臓器病変のひとつである。本研究では脳細胞のうちミクログリアに注目して研究を行った。

ループスモデルマウスではコントロールマウスと比較し、ミクログリアの活性化が起きていた。さらにRNAシークエンスを行ったところ、複数のpathway、遺伝子で有意差を認めた。これらによりNPSLEにおける新規治療ターゲットが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NPSLEはSLE患者の20-40%に認められ、意識障害やてんかんなどを呈する。一部の患者では高次機能障害などが残存したり、またうつ病症状などから自殺に至る場合もあり、SLEのアンメットニーズの一つとなっている。またNPSLEの後遺症により内服薬のコンプライアンスが悪くなることも知られており、NPSLEはSLEの予後規定因子のひとつと考えられている。しかしその詳細は不明であり、エビデンスのある治療戦略も立てられていないのが現状である。本研究はNPSLEの新たな病態を明らかにし、新規治療薬への開発とつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease that causes multi-organ dysfunction. Neuropsychiatric SLE (NPSLE) occurs in 30-40% of lupus patients and is one of the most severe organ lesions of SLE, sometimes resulting in chronic complications. Recent papers have shown that microglia, tissue-resident macrophages in the central nervous system, are involved in the pathogenesis of NPSLE. We examined the microglial activation in MRL/lpr, lupus-prone mice, and the effect of stimulation with cytokines for microglia using RNA sequencing.

Microglia from MRL/lpr were activated than those from control mice. The results of RNA-Seq had revealed that several new therapeutic target in NPSLE. Intracerebroventricular administration of an inhibitor of gene X ameliorated the disease activity of NPSLE.

研究分野：自己免疫性疾患

キーワード：全身性エリテマトーデス 精神神経ループス ミクログリア 活性化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は自己免疫性疾患のひとつで若年女性に多く発症し、神経、腎臓、皮膚など様々な臓器病変を伴い生命予後にもかかわる。それらの中でも精神神経ループス(NPSLE)はSLE患者の20~40%に認められ、意識障害やてんかんなどを呈する。一部の患者では高次機能障害などが残存したり、またうつ症状などから自殺に至る場合もあり、SLEのアンメットニーズの一つとなっている。またNPSLEの後遺症により内服薬のコンプライアンスが悪くなることも知られており、NPSLEはSLEの予後規定因子のひとつと考えられている。

NPSLEの病態としては、血液脳関門の破壊に加え、自己抗体、サイトカイン、ミクログリアの異常など複数の病態が密接にかかわっていると考えられている。しかしその詳細は不明であり、エビデンスのある治療戦略も立てられていないのが現状である。近年NPSLEの病態にミクログリアが関わっていることが報告されたが、その詳細な機序は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究はNPSLEの病態においてミクログリアがどのように関与しているかを明らかにすることを目的とすることとした。

3. 研究の方法

(1) NPSLEモデルマウスにおける行動解析

NPSLEのモデルマウスとしてMRL/MpJ-FasIpr/J(MRL/lpr)、コントロールマウスとしてMRL/MpJを使用した。動物実験は北海道大学の動物実験倫理委員会の承認のもと(承認番号19-0039)、北海道大学動物実験に関する規定に従い行った。マウスの行動異常は8週令の雌マウスを用い、Open field試験、Novel object recognition試験で評価した。

Open field試験

縦45cm×横45cm×高さ40cmのOpen fieldボックスにマウスを入れ、5分間自由にボックス内を探索させ、総移動距離、中央区画滞在時間を記録した。中央区画はボックスの中央15cm四方の四角形の区域として定義し、中央区画滞在時間は試験時間(5分)に対する割合をパーセントで示した。総移動距離を活動量、中央区画滞在時間を不安傾向の指標とした。

Novel object recognition試験

行動試験の前日にopen fieldボックス内で5分間マウスを自由に探索させ、順化を行った。当日にマウスを2つのオブジェクトが置かれたopen fieldボックス内を5分間自由に探索させた。1時間のインターバルを置き、オブジェクトの1つが別の新奇オブジェクトに変更されたopen fieldボックス内を5分間探索させた。2つのオブジェクトを探索した時間の合計が20秒になるまでに、それぞれのオブジェクトを探索した時間を記録した。20秒間のうち新奇オブジェクトを探索した時間の割合をパーセントで示した。通常マウスは新奇性のあるにより長い時間探索行動を示すため、新規オブジェクトに対する探索時間をマウスの視覚的認知記憶の指標とした。

(2) NPSLEモデルマウスにおけるミクログリアの活性化

MRL/lprならびにMRL/MpJマウスからミクログリアを分離し、real-time PCRや免疫組織化学

染色で活性化を評価した。

(3) NPSLE モデルマウスにおけるミクログリアの遺伝子発現異常の網羅的解析

MRL/lpr ならびに MRL/MpJ マウスからミクログリアを分離し、RNA を分離し、RNA シークエンシングで網羅的遺伝子解析を行った。

(4) Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon (IKBKE)の阻害薬のミクログリア活性化への影響

MRL/lpr マウスからミクログリアを分離し、サイトカイン等で活性化し、IKBKE の阻害薬を添加し、ミクログリアの活性化への影響を評価した。

(5) IKBKE の脳室内投与による行動異常の変化

MRL/lpr マウスの脳室内に浸透圧ポンプを用いて阻害薬を持続投与し、異常行動への治療効果ならびに CD68 の免疫組織化学染色によるミクログリア活性化の評価を行った。

4 . 研究成果

(1) NPSLE モデルマウスにおける行動解析

MRL/lpr は MRL/MpJ と比較して不安の増強と視覚的認知記憶の低下を認めた。

(2) NPSLE モデルマウスにおけるミクログリアの活性化

MRL/lpr マウスのミクログリアでは MRL/MpJ と比較して tumor necrosis factor (TNF) a、interleukin (IL)-6、IL-1b の遺伝子発現量が亢進しており、ミクログリアの活性化を認めた。

(3) NPSLE モデルマウスにおけるミクログリアの遺伝子発現異常の網羅的解析

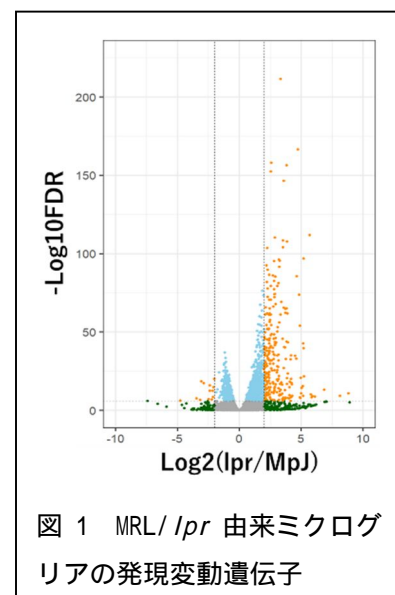
MRL/lpr のミクログリアは MRL/MpJ と比較して 1041 の遺伝子が有意差をもって変動しており、そのうち 901 が発現上昇、140 が発現低下していた。Ingenuity Pathway Analysis(IPA)を用いた pathway 解析では、TNF レセプター、IL-6 などサイトカインに関連する pathway が抽出された。これらの中で、我々は遺伝子 IKBKE に注目することとした。

(4) IKBKE の阻害薬のミクログリア活性化への影響

MRL/lpr マウスからミクログリアを分離し、サイトカインで活性化し、IKBKE の阻害薬を添加し、ミクログリアの活性化への影響を評価したところ、阻害薬によりミクログリアの活性化は抑制された。

(5) IKBKE の脳室内投与による行動異常の変化

MRL/lpr マウスの脳室内に浸透圧ポンプを用いて阻害薬を持続投与したところ、視覚的認知記憶の改善を認め、脳組織の免疫組織化学染色ではミクログリア活性化が抑制されていた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kohei Karino, Michihito Kono, Yuki Kudo, Masatoshi Kanda, Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Masaru Kato, Kenji Oku, Olga Amengual, Tatsuya Atsumi
2. 発表標題 Identification of differentially expressed genes of microglia in lupus-prone mice
3. 学会等名 第65回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------