

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860933

研究課題名(和文) ヒト体細胞由来ミクログリア作製法の確立と精神疾患研究への応用

研究課題名(英文) Establishment of human microglial cells and application to psychiatric disorders

研究代表者

扇谷 昌宏 (Ohgidani, Masahiro)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：60636455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：・ヒト末梢血単球からミクログリア様細胞を作製する手法を確立した。

- ・精神疾患を含むミクログリア病において、細胞機能の異常が見られた。
- ・本技術は今後のミクログリア研究に有益なものとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：・It was succeeded that establishment of human microglia-like cells from monocyte.

- ・Abnormality of microglial function was observed in microglial disease including psychiatric disorders.
- ・It was suggested that this technique will be useful for future microglial studies.

研究分野：生物学的精神医学

キーワード：ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

精神疾患による医療・社会・経済への打撃は深刻で、治療法の確立が急務である。特に、統合失調症は100人に1人が罹患し、うつ病や双極性障害に代表される気分障害は自殺の主な要因となっており、日本の深刻な社会的問題となっている。

これまでの精神疾患研究は、ニューロン（神経細胞）を中心に行われており、ほぼ全ての向精神薬はニューロンをターゲットにしている。例えば、抗うつ薬は、ニューロンのシナプスにおけるモノアミンの再取り込みを阻害し、一定の濃度を維持する薬理作用を有する。これは、1950年代に提唱されたモノアミン仮説を元に開発されたものであるが、モノアミン仮説と矛盾する症例も多く存在し、依然として決定的な病態機序の解明や治療法の開発には至っていないのが現状である。

一方、脳内にはニューロン以外にもグリア細胞（ミクログリア・オリゴデンドロサイト・アストロサイト）と呼ばれる様々な脳細胞が存在している。グリア細胞は、以前は単なるニューロンの支持細胞としての認識しかされていなかったが、近年、ネットワークを構成し多様な機能を有していることが明らかとなっている。その中でもミクログリアは脳内の免疫細胞と呼ばれ、周囲の環境変化に敏速に反応し、異物の貪食や細胞傷害因子（サイトカインや活性酸素）を産生することで神経免疫の中心として機能している。さらに、ミクログリアはニューロンと密にコンタクトしてその機能をコントロールし合っており、傷害作用だけでなくニューロンの修復やシナプス可塑性といった脳内の恒常性維持に重要な役割を担っている。

近年、精神疾患においてもミクログリアが注目され、動物モデルを用いた実験や死後脳・脳画像研究において興味深い報告がなされている。例えば、統合失調症のモデル動物でミクログリアの活性化が報告されている。臨床研究においても、統合失調症患者の死後脳やPETを用いた研究でミクログリアの活性化が示唆されており、特にPANSS（精神症状の評価尺度）と末梢性ベンゾジアゼピン受容体の量（ミクログリア活性化の指標）が正相関することが報告されている。また、自殺した気分障害患者の死後脳でもミクログリアの活性化が報告されている。この他にも自閉症の死後脳、脳画像研究によりミクログリアの活性化が近年報告されている。興味深いことに、抗炎症薬(COX2阻害薬)、抗酸化剤、さらには、ミクログリア活性化抑制作用を有するミノサイクリンに抗精神病作用を認めたとした臨床薬理学的研究報告が近年なされている。

そのような中、申請者の所属する九州大学精神科（主任教授：神庭重信）では精神疾患における活性化ミクログリアに早期から注

目し、活性化ミクログリアが産生する炎症性サイトカインが精神疾患の病態に關与するという“ミクログリア炎症仮説”を発表してきた。本教室では、げっ歯類由来のミクログリア細胞株を用いたin vitro実験で、向精神薬が活性化ミクログリアに作用し、細胞傷害因子の産生を抑制することを発見した。また、ニューロンやオリゴデンドロサイトとの共培養実験系を構築し、向精神薬がミクログリアの活性化を阻害してニューロンやオリゴデンドロサイト傷害を保護することを報告している。申請者はこのような知見から、活性化ミクログリアは細胞傷害因子の産生を通じて精神疾患の病態に關与し、新規治療標的となりうる活性化ミクログリアに注目している。

しかし、上述したミクログリア研究は、全て死後脳や脳画像（臨床研究）もしくは、げっ歯類由来の細胞株や動物実験（基礎研究）を用いて行われた研究である。ミクログリアを標的とした精神疾患研究における最大の問題点は、生検が困難な脳にしか存在しないため“ヒトのミクログリアを用いて実験ができない”という点にあった。

2. 研究の目的

本研究は、体細胞からヒトのミクログリアを作製し、精神疾患研究に応用することを目的とする。

3. 方法

(1) 血液からのヒト由来ミクログリア作製
上腕静脈より約20mlの採血を行い、フィコールによる密度勾配遠心を行う。無菌的に単核球層を回収し、培養容器に移す。その後、種々の化合物を添加し14日間培養を行う。

(2) 作製したヒト由来ミクログリアの同定
作製したミクログリアは、ミクログリア特異的なマーカーを解析し、ミクログリアとして同定する。

(3) 作製したミクログリアを用いた比較解析

健常群および患者群からミクログリアを作製し、サイトカイン産生異常や貪食能および遺伝子発現異常などを比較解析する。

また、同時に臨床所見（各種テスト）を行い、臨床所見と実験データとの相関を精神科医と共に検討する。

4. 研究成果

(1) 血液からのヒト由来ミクログリア作製と同定

申請者は、ヒト末梢血から単球を分離し、GM-CSFとIL-34の二種類のサイトカインによってミクログリア(induced microglia-like cells: iMG)を作製することに成功した。

ミクログリアとしての性質を有するかを確認するため、単球およびマクロファージとの比較を行った。細胞表面抗原のCCR2、CX3CR1、CD11b、CD45、CD14およびCD200Rをフローサイトメーターでフェノタイピングした。さらに、貪食能およびサイトカイン産生能も検討した。その結果、申請者が作製したiMG細胞はヒトのミクログリアとしての性質を有していることが明らかとなった。

(2) 作製したミクログリアを用いた比較解析

申請者は、(1)で確立したiMG細胞を用いて一次性ミクログリア病として知られる那須・ハコラ病、双極性障害および線維筋痛症でのミクログリア異常を明らかにした。

那須・ハコラ病患者のiMG細胞では健常者と比べて貪食時のサイトカイン産生に遅延が見られた。また、この現象は那須・ハコラ病の原因遺伝子であるDAP12をノックダウンした健常者由来のiMG細胞でも再現され、那須・ハコラ病の病態生理に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

双極性障害(ラピッドサイクラー)患者ユリアのiMG細胞において、躁状態とうつ状態ではミクログリアの遺伝子発現に違いがみられ、特にCD206の発現量が異なることが明らかとなった。

線維筋痛症患者のiMG細胞では、外部刺激による炎症性サイトカイン産生に異常が見られ、健常群と比べて高レベルで炎症が誘発される状態にあることが明らかとなった。さらに興味深いことに、炎症性サイトカインと種々の臨床スコア(自覚的な痛みスケールや抑うつ・不安尺度など)との間に有意な相関がみられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Ohgidani M, Kato TA, Haraguchi Y, Matsushima T, Mizoguchi Y, Murakawa-Hirachi T, Sagata N, Monji A, Kanba S, Microglial CD206 gene has potential as a state marker of bipolar disorder, *Frontiers in Immunology*, 7, 676 (2017)

Kato TA, Ohgidani M, Sagata N, Directly induced glial/neuronal cells from human peripheral tissues: A novel translational research tool for neuropsychiatric disorders,

Advances in Neuroimmune Biology, 6, 95 (2016)

Sato-Kasai M, Kato TA, Ohgidani M, Mizoguchi Y, Sagata N, Inamine S, Horikawa H, Hayakawa K, Shimokawa N, Kyuragi S, Seki Y, Monji A, Kanba S, Aripiprazole inhibits polyI:C-induced microglial activation possibly via TRPM7, *Schizophrenia Research*, 178, 35 (2016)

Ohgidani M, Kato TA, Kanba S. Introducing directly induced microglia-like (iMG) cells from fresh human monocytes: A novel translational research tool for psychiatric disorders. *Front Cell Neurosci*, 9, 184 (2015).

Ohgidani M, Kato TA, Setoyama D, Sagata N, Hashimoto R, Shigenobu K, Yoshida T, Hayakawa K, Shimokawa N, Miura D, Utsumi H, Kanba S. Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: Dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease. *Scientific reports*, 4, 4957 (2014).

[学会発表](計11件)

扇谷昌宏, 加藤隆弘, 細井昌子, 津田誠, 早川公平, 早木千絵, 岩城里恵, 橋本亮太, 井上和秀, 須藤信行, 神庭重信: 線維筋痛症とミクログリア由来TNF- α : ヒトミクログリア様細胞を用いたトランスレーショナル研究, 第38回日本生物学的精神医学会-第59回神経化学会, 2016. 9.9. 福岡県

扇谷昌宏, 加藤隆弘, 細井昌子, 津田誠, 早川宏平, 須藤信行, 神庭重信: 線維筋痛症のトランスレーショナル研究: ミクログリアの異常活性化とTNF- α , 第46回日本精神神経薬理学会, 2016. 7.2., 韓国

扇谷昌宏: 線維筋痛症の病態解明に向けたトランスレーショナル研究: ミクログリアの異常活性化とTNF- α , 第46回日本精神神経薬理学会, 2016. 7.3. 韓国

扇谷昌宏: 九州大学精神科におけるミクログリアに着目した橋渡し研究の紹介, 第3回サイコグリア研究会, 2016. 5.21. 鳥取県

扇谷昌宏, 加藤隆弘, 細井昌子, 佐方功明, 佐藤美那, 早川宏平, 下川憲宏, 堀川英喜, 神庭重信: 気分障害患者由来誘導ミクログリア細胞を用いた病態・薬効評価システム開発, 第48回精神神経系薬物治療研究報告会, 2015.12.4, 大阪

府

扇谷昌宏、加藤隆弘、細井昌子、津田誠、早川宏平、須藤信行、神庭重信：ヒト末梢血由来ミクログリア細胞を用いた慢性疼痛のトランスレショナルリサーチ，第45回日本神経精神薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会合同年会，2015.9.24, 東京都

加藤隆弘，扇谷昌宏，渡部幹，神庭重信：こころのミクログリア仮説説明に向けたトランスレショナル研究．シンポジウム1「神経炎症・酸化ストレスをキーワードにした精神疾患の理解」，第45回日本神経精神薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会合同年会，2015.9.24, 東京都

Ohgidani M, Kato TA, Hosoi M, Tsuda M, Hayakarwa K, Sudo N, Kanba S: Translational research of chronic pain patients using human blood-induced microglia-like (iMG) cells, The 58th Annual meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, 2015.9.12, 埼玉県

Kato TA, Ohgidani M, Watabe M, Hosoi M, Kanba S: Translational research focusing on human microglia (human blood induced microglia-like (iMG) cells / minocycline-trial). Symposium - Basic and psychological research on microglia (organized by Mami N), Neuro 2015, 2015.7.29, Kobe International Exhibition Hall, 兵庫県

加藤隆弘，扇谷昌宏，渡部幹，堀川英喜，神庭重信：統合失調症のミクログリア仮説説明のためのトランスレショナルリサーチ．会長企画シンポジウム「統合失調症のトランスレショナルリサーチ」，第111回日本精神神経学会学術総会，2015.6.4, 大阪府

扇谷昌宏，加藤隆弘：ヒト末梢血由来直接誘導ミクログリア様細胞(iMG)第2回サイコグリア研究会，2015.5.30, 九大精神科ウエストウイング・カンファレンスルーム，福岡県

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称：Method of producing microglial cells
発明者：扇谷昌宏、加藤隆弘、神庭重信：九州大学
権利者：扇谷昌宏、加藤隆弘、神庭重信：九州大学
番号：特願 2014-002129
出願年月日：2014年1月9日

国内外の別：国内

名称：Method of producing microglial cells
発明者：扇谷昌宏、加藤隆弘、神庭重信：九州大学
権利者：扇谷昌宏、加藤隆弘、神庭重信：九州大学
番号：G1301WO-PCT
出願年月日：2015年1月9日
国内外の別：国外

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
扇谷 昌宏 (Ohgidani Masahiro) 特任講師
九州大学大学院医学研究院精神病態医学分野
研究者番号：60636455