

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17065

研究課題名(和文) 重篤な精神神経症状を呈するミクログリア病(HDLS)の病態機序解明と治療法の探索

研究課題名(英文) Elucidation of the pathomechanisms of microglial diseases with severe neuropsychiatric symptoms and search for treatment options.

研究代表者

扇谷 昌宏(Ohgidani, Masahiro)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：60636455

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)：ミクログリアは脳内で様々な役割を担っており、その機能異常は重篤な精神神経症状を呈するミクログリア病を引き起こす。本研究は、申請者が開発したヒト末梢血誘導型ミクログリア様細胞技術を用いて、ミクログリアの機能異常を細胞レベルで解析し、ミクログリア病の病態機序の解明と新規治療法の探索を行うことを目的としている。

本研究の成果として、実際のHDLS患者から血液を採取し、作製したミクログリア様細胞の解析から、健常者と比べて明らかに違いがあることを発見した。加えて、マウス脳から採取したミクログリア細胞とsiRNAを用いて作製したモデル細胞において、臨床検体と同様の変化を確認した。現在、論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：本研究によって、原因不明のミクログリア病として知られていたHDLSの病態機序の一端が明らかになった。

社会的意義：本研究によって、将来的にミクログリアの特定の分子を標的とした治療法開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Microglia play various roles in the brain, and their dysfunction causes microglial disease, which presents with severe neuropsychiatric symptoms. This study aims to analyze microglial dysfunctions at the cellular level using the human peripheral blood-induced microglia-like cell technology developed by the applicant, to elucidate the pathomechanisms of microglial diseases and to search for novel therapeutic strategies.

As a result of this research, blood samples were taken from actual HDLS patients, and analysis of the microglia-like cells produced revealed that they were different compared to healthy subjects. In addition, they found similar changes in clinical samples in microglial cells from mouse brains and in model cells generated using siRNA. The paper is currently being submitted for publication.

研究分野：精神神経科学

キーワード：ミクログリア ALSP HDLS 精神神経疾患

## 1. 研究開始当初の背景

ミクログリア病とは、脳細胞の一種であるミクログリア細胞の機能異常によって引き起こされる疾患である。那須・ハコラ病や HDLS (Hereditary Diffuse Leukoencephalopathy with axonal Spheroids: 神経軸索スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症) が代表的なミクログリア病として知られている。いずれも重篤な精神神経症状を呈するが、発症の機序や病態が不明であり、未だ根本的な治療法がないのが現状である。

本研究の対象疾患である HDLS は 2011 年に原因遺伝子 (colony stimulating factor-1 receptor, CSF1R) が同定されたミクログリア病であり、それ以前は剖検によって初めて確定に至った疾患である。初発症状は不安、抑うつ、日常生活行動の異常などの精神症状であるが、しだいに認知機能の低下が顕在化となる。進行すると運動機能障害やパーキンソン徴候、運動失調を呈する。精神症状の発現から臥床状態に至るまでの期間が約 4 年前後であり、急速に症状が進行することが特徴である。原因遺伝子の CSF1R が脳内ではミクログリアに発現していること、死後脳研究においてミクログリアの形態異常が見られることから代表的なミクログリア病として認知されている。

近年、精神神経疾患領域においてミクログリアが注目されており、動物モデルを用いた研究のみならず死後脳や脳画像を用いた臨床研究でもミクログリアの異常な活性化が数多く報告されている。ミクログリアは脳内の免疫細胞であり、活性化して TNF- $\alpha$  や IL-1 などの炎症性サイトカインを放出する。これらの炎症性サイトカインは周辺の神経細胞やその他の細胞に悪影響を及ぼし、脳内炎症を引き起こす。最近では、この脳内炎症こそが精神神経疾患の病態を形成しており、その中心がミクログリアであると考えられている。ミクログリア病の重篤な精神神経症状もミクログリアの異常な活性化による脳内炎症が原因であると考えられているが、現時点では明らかになっていない。

このように、ミクログリアが原因であると考えられているにもかかわらず、その病態機序やミクログリアを標的とした治療法が開発されていない最大の理由は、ヒトの生きたミクログリアを用いて実験が出来ないことに起因している。脳細胞であるミクログリアは容易には生検できない。また、精神神経疾患は疾患の有する臨床症状が複雑であり、マウスでのモデル化が難しくヒトとマウスでの乖離が存在している。このような理由から、現在でもミクログリア病を含む多くの精神神経疾患でミクログリアの病態機序への関与は仮説の域を出ていない。

そのような中、申請者は末梢血液中の単球からミクログリア様細胞を 2 週間で作製する技術を開発した。単球は採血により比較的低侵襲で採取が可能であるため、健常者だけでなく患者からも作製が可能である。実際に申請者は、ミクログリア病の一種である那須・ハコラ病の患者からミクログリア様細胞を作製し、炎症性サイトカインの産生異常という疾患特異的な反応を捉えることに成功している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が開発した末梢血誘導型ミクログリア様細胞技術を用いて、重篤な精神神経症状を呈するミクログリア病におけるミクログリアの機能異常を細胞レベルで詳細に解析し、ミクログリア病の病態機序の解明と新規治療法の探索を行うことである。

## 3. 研究の方法

### 患者・健常者のリクルート

本研究では、代表的なミクログリア病である HDLS (神経軸索スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症) を対象疾患とし、リクルートを行った。リクルートに関しては、各種規定に従って、臨床医がインフォームドコンセントに基づいて同意説明をした上で採血を行った。

### ミクログリア様細胞の作製

申請者が開発した末梢血誘導型ミクログリア様細胞技術を用いて、患者・健常者の血液からミクログリア様細胞を作製した。末梢静脈より採血を行い、フィコールによる密度勾配遠心を行う。単核球層を回収し、単球を分離する。分離した単球を GM-CSF および IL-34 含有 RPMI 培地で 14 日間培養してミクログリア様細胞の作製を行った。

### 発現変動遺伝子の網羅的解析

患者・健常者両群から作製したミクログリア様細胞の Total RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる RNA-Seq を行った。健常群との比較解析から HDLS の疾患特異的に変動が見られた遺伝子を網羅的に解析し、患者群におけるミクログリア以上を捉える。

#### 細胞機能の解析

ミクログリアの細胞機能として重要な遊走能や貪食能および形態変化の解析を行った。遊走能の解析は、培養装置を組み込んだタイムラプス顕微鏡を用いて一定時間における細胞の移動度を解析した。貪食能の測定は、フローサイトメーターを用いて蛍光標識ビーズの取り込み量を細胞あたりで解析した。細胞形態は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

#### サイトカイン産生能の解析

患者・健常者両群から作製したミクログリア様細胞を用いてサイトカイン産生能の解析を行った。

#### マウスモデル細胞の作成と解析

マウスのプライマリーミクログリア細胞を分離し、HDLS の原因遺伝子である CSF1R 遺伝子を siRNA でノックダウンしたモデル細胞を作成した。作成した細胞は、ヒト細胞と同様に、上記のから の実験を実施した。

#### 4 . 研究成果

本研究の成果として、実際の HDLS 患者から血液を採取し、作製したミクログリア様細胞 ( iMG 細胞 ) の解析から、健常者と比べて明らかに違いがあることを発見した。加えて、マウス脳から採取したプライマリーミクログリア細胞と siRNA を用いて作製した HDLS モデル細胞において、臨床検体と同様の変化を確認した。詳細に関しては、現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 扇谷昌宏	4. 巻 31
2. 論文標題 精神神経疾患のトランスレーショナル研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本生物学的精神医学会誌	6. 最初と最後の頁 186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 扇谷昌宏、加藤隆弘
2. 発表標題 精神神経疾患のトランスレーショナル研究ツールとしてのiMG(induced microglia-like)細胞
3. 学会等名 日本精神神経薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 扇谷昌宏、加藤隆弘
2. 発表標題 Direct induction of microglia-like cells from human monocytes: A novel cellular tool for translational research of neuropsychiatric disorders
3. 学会等名 AsCNP2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 扇谷昌宏、加藤隆弘、神庭重信
2. 発表標題 精神神経疾患のトランスレーショナル研究ツールとしてのiMG(induced microglia-like)細胞の開発と応用
3. 学会等名 日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 扇谷 昌宏、稲嶺 翔吾、加藤 隆弘
2. 発表標題 ヒト末梢血由来iMG細胞を用いたミクログリア関連精神神経疾患の病態解明
3. 学会等名 サイコグリア研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 扇谷 昌宏
2. 発表標題 患者血液から作成した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
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会・第51回日本神経精神薬理学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 扇谷 昌宏、細井昌子、加藤 隆弘
2. 発表標題 ヒト末梢血誘導型ミクログリア細胞技術を用いた慢性疼痛研究
3. 学会等名 第62回日本心身医学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ALSP等の程度の判定方法	発明者 加藤隆弘、扇谷昌宏	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-161422	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------