

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03718

研究課題名(和文) 抗リン脂質抗体による中枢神経障害メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of antiphospholipid antibody-induced central nervous system impairment

研究代表者

渥美 達也 (Atsumi, Tatsuya)

北海道大学・大学病院・教授

研究者番号：20301905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗リン脂質抗体であるマウスモノクローナル抗 2グリコプロテインI (GPI)抗体 WBCAL-1の浸透圧ポンプを用いた14日間投与モデルで、海馬CA2-3領域の神経細胞におけるマウスIgG沈着を発見した。神経細胞死は認められなかったが、CD68陽性活性化ミクログリアをWBCAL-1群で多く認めた。海馬領域のbulk-RNAシーケンスによる網羅的遺伝子解析では、コントロール群と差が認められず、2GPI KOマウスを用いた検討で 2GPIは海馬CA2-3領域に認めなかった。2GPI以外の結合因子ならびにミクログリアの活性化機序、表現型に対する影響について、今後も検討を重ねていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経症状は数ある膠原病の病変のなかでも重要で、免疫抑制療法は進歩しているが、中枢神経症状を発症し寛解導入できなかった患者は社会的制限を強いられる。本研究は、抗リン脂質抗体が中枢神経へどのように影響を与えるかを評価した。特に抗リン脂質抗体は海馬CA2-3領域の神経細胞に沈着し、機能へ直接影響を与える可能性、その結合に 2GPIを介さない可能性、また同領域のミクログリア活性化が明らかとなった。局所的な神経機能変化や炎症が、若年者に重篤な後遺症をもたらす抗リン脂質抗体を介した神経病変に関わる可能性を示し、今後の研究、病態予防や治療の原石となるという点で社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：WBCAL-1, immunoglobulin G (IgG) isotype of mouse monoclonal anti- 2 glycoprotein I (GPI) antiphospholipid antibody was cerebroventricularly infused with the osmotic pump and was deposited in hippocampal CA 2-3 region. Although neuronal death was not observed using TUNEL staining, CD68-positive activated microglia were abundant around the CA 2-3 region. Bulk-RNA sequencing of the hippocampus revealed no difference of genes expressions between the WBCAL-1- and control IgG-infused groups, and specific expression of 2GPI in the CA2-3 region was not found using 2GPI-knock out mice. Further investigation will be needed to confirm the WBCAL-1 binding factor except 2GPI in the hippocampus, the pathogenesis of microglial activation and the effects on neuropsychiatric phenotype.

研究分野：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：精神神経SLE 抗リン脂質抗体(aPL) 全身性エリテマトーデス 認知機能障害

1. 研究開始当初の背景

抗リン脂質抗体症候群 (APS) は抗リン脂質抗体 (aPL) の存在下で発症する血栓性自己免疫疾患で、若年性脳梗塞や習慣流産の主因であり、機能予後が不良である。また、全身性エリテマトーデス (SLE) の類縁疾患で、病態や免疫・遺伝子異常を共有し、SLE 患者の 30-50% が aPL 陽性を示す。精神神経 SLE (NPSLE) は SLE 患者の 40% でみられ罹患頻度は高い。NPSLE では血管炎や神経炎症の関与を想定し、大量グルココルチコイド投与を含めた強力な免疫抑制療法を行うが、治療中の増悪やうつ病、精神病症状が後遺症として持続する可能性もあり、長期には前頭葉を中心とする大脳皮質の萎縮やこれに伴う認知機能障害や高次脳機能障害を併発するなど未だ解決されない点が残されている。加えて、NPSLE の aPL 陽性率は 50% 程度とその他の自己抗体と比べて非常に高い。In vitro の研究では、APS 患者から得られたヒトポリクローナル aPL をマウスに脳室内投与することで、過活動などの異常行動や認知機能障害が起こることなどが示されているものの、病態の詳細な解析はほとんどない。現在までの研究の問題点はマウスに対して異種抗体であるヒト aPL の投与や 2 グリコプロテイン I (GPI) による能動的免疫誘導など、aPL の中枢神経系細胞への純粋な働きを評価することは困難であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が精製したマウスモノクローナル aPL である WBCAL-1 を用いて、マウスの aPL 受動的投与モデルを作成し、aPL が神経系細胞にどのような変化をもたらすのかを検討し、その責任分子や細胞を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) WBCAL-1 による APS/SLE の中枢神経障害マウスモデルの確立

本モデルにおいて以下の方法で研究を実施した。

aPL がどの中枢神経系細胞に結合し、またその他の細胞とどのように相互作用するのかを解析した。マウスモノクローナル aPL である WBCAL-1 の浸透圧ポンプによる 14 日間の持続的脳室内投与で WBCAL-1 がどの中枢神経系細胞に結合し、周囲の細胞に対する影響を評価した。すなわち aPL と中枢神経系細胞の結合について、免疫組織化学で解析するとともに、aPL と細胞の結合のためには、2 GPI が必要であるが、中枢神経組織での発現を 2 GPI ノックアウトマウスも用いて、免疫組織化学で確認した。また、神経細胞死・脱落については、TUNEL 染色を実施し、グリア細胞の活性化の有無についても、ミクログリア活性化マーカーである Iba-1 と CD68 やアストログリオシスを GFAP で評価した。

申請者らは、予備検討で海馬 CA3 領域への WBCAL-1 沈着を免疫組織化学で確認した。本項目では、中枢神経障害を担う責任分子を決定するために、海馬領域における遺伝子発現変化を評価するために、RNA sequence による網羅的遺伝子発現解析を実施した。

(2) 抗リン脂質抗体産生 SLE モデルである MRL/lpr のストレスと中枢神経症状の関連

ストレスは精神神経生理やその病態生理に影響を与えるが SLE の精神症状との関連は明らかとはなっておらず、これに着目した。aPL 産生 SLE モデルである MRL/lpr マウスを用いて、睡眠障害ストレスを負荷した。行動試験、脳組織の RNA sequence、ミクログリアやニューロンのフローサイトメトリーや免疫組織化学、形態学的解析を行い、表現型に対するメカニズムを解析した。

4. 研究成果

(1) WBCAL-1 による APS/SLE の中枢神経障害マウスモデルの確立

aPL を産生する SLE モデルマウスの NZW × BXSB F1 マウスよりハイブリドーマを樹立し、代表的な aPL である抗 2 GPI 抗体のマウスモノクローナル抗体 WBCAL-1 を作成した(図 1)。同抗体を C57BL/6 マウスへ脳室内 14 日間持続投与することで、マウスの認知機能障害と海馬 CA3 領域へ有意に沈着と CA3 ニューロンの NeuN 発現低下を確認していた(図 2, 3)。

aPL の中枢神経系細胞系における結合細胞の免疫組織化学法を用いた結合評価では、ニューロン周囲に IgG 沈着を示唆する所見を認めた(図 4)。また、周囲の細胞に対する影響として、Iba-1 陽性ミクログリアの活性化を示す CD68 凝集を海馬 CA2-3 領域に認めた(図 5)。TUENL 染色による神経細胞死や GFAP 染色によるアストログリオシスに差はなかった。同部位にお

図1. 抗リン脂質活性の固相酵素免疫定量法(solid-phase ELISA)による評価

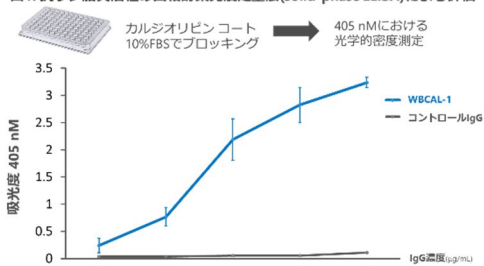
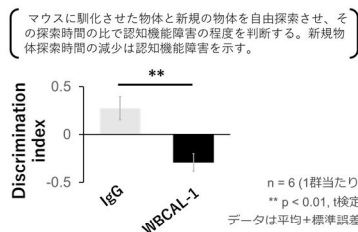


図2. 新規物体認識試験による認知機能評価



*Discrimination index (-1 ~ 1の範囲で変動: 低いほど認知機能障害有り)
= (馴化物体探索時間 - 新規物体探索時間) / (馴化物体探索時間 + 新規物体探索時間)

図4. aPLの中枢神経細胞への結合

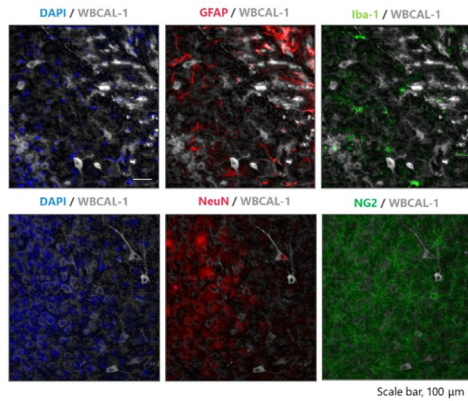


図3. 海馬CA2-3領域におけるNeuN発現

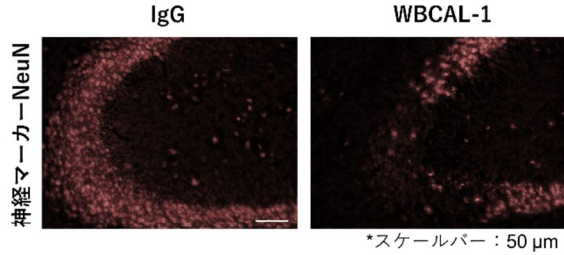
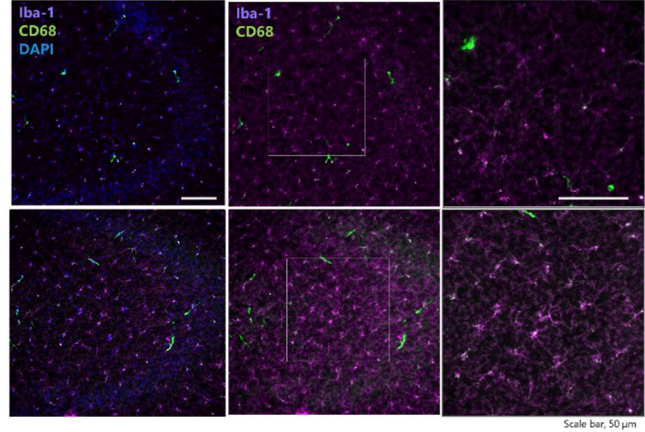


図5. ミクログリア活性化評価



ける 2GPI を評価したが、2GPI ノックアウトマウスでもシグナルが認められ、非特異的シグナルと考えられ、結合因子については更なる検討が必要であった。

海馬領域の bulk-RNA sequence による網羅的遺伝子発現解析では WBCAL-1 投与群とコントロール群に差が認められなかった。

(2) 抗リン脂質抗体産生 SLE モデル MRL/lpr のストレスと中枢神経症状の関連 (文献 1)

行動試験である高架式十字迷路試験において、睡眠障害による慢性ストレス負荷 (SD, sleep disturbance) をしたコントロール (MRL/MpJ) マウスでは不安様行動は増したが、SD 負荷ループスモデルマウス (MRL/lpr) ではむしろ不安様行動が有意に減少した。

ストレス感受脳領域の中で、内側前頭前皮質 (medial prefrontal cortex: mPFC) に着目し、SD 負荷 MRL/lpr では、リン酸化 Fos 陽性細胞は他のマウス群と比べて有意に増加した。

PFC の RNA sequence で、SD 負荷 MRL/lpr で発現亢進のある遺伝子群はパスウェイ解析でサイトカイン相互作用などの炎症に関連していた。炎症関連遺伝子に注目すると、*H2-Eb1*, *Nos2* や *I12b* などのミクログリア活性化遺伝子の発現亢進を認めた。SD 負荷 MRL/lpr の髄液では、*I12b* にコードされる IL-12/23p40 の濃度が有意に高値であった (図 6)。

SD 負荷 MRL/lpr で、ミクログリア活性化やミクログリアの IL-12/23p40 産生亢進が確認され、ニューロンの IL-12/23p40 下流シグナルである Stat4 のリン酸化亢進と神経樹状突起スパイン密度上昇を認めた (図 7)。

IL-12/23p40 中和抗体の脳室内投与や Tyk2 阻害薬の投与により、SD 負荷 MRL/lpr の上記の表現型はキャンセルされた。ヒト検体を用いた検討では、北海道大学病院と北里大学病院のコホートにおける SLE 患者の髄液で、精神症状を伴う NPSLE 患者が精神症状を伴わない SLE 患者よりも IL-12/23p40 は高値だった。

図6. 各マウス群における髄液IL-12/23p40濃度

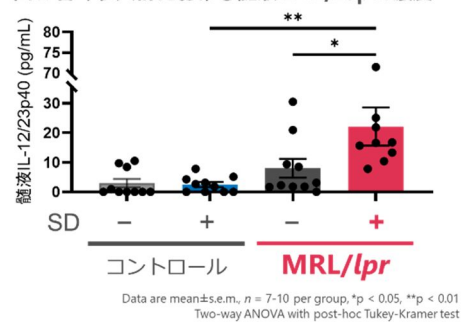
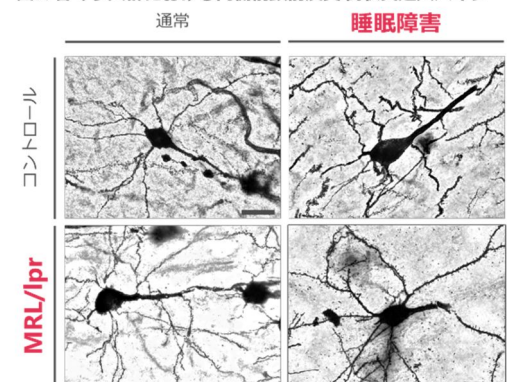


図7. 各マウス群における内側前頭前皮質 樹状突起スパイン



<文献>

1. Abe N, Tarumi M, Fujieda Y, Takahashi N, Karino K, Uchida M, Kono M, Tanaka Y, Hasebe R, Kato M, Amengual O, Arinuma Y, Oku K, Sato W, Tha KK, Yamasaki M, Watanabe M, Atsumi T, Murakami M. Pathogenic neuropsychiatric effect of stress-induced microglial interleukin 12/23 axis in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2022;81(11):1564-1575.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Karino K, Kono M, Takeyama S, Kudo Y, Kanda M, Abe N, Aso K, Fujieda Y, Kato M, Oku K, Amengual O, Atsumi T	4. 巻 75(3)
2. 論文標題 Inhibitor of NF- B Kinase Subunit Contributes to Neuropsychiatric Manifestations in Lupus-Prone Mice Through Microglial Activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arthritis Rheumatol	6. 最初と最後の頁 411-423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.42352	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 -

1. 著者名 Abe N, Tarumi M, Fujieda Y, Takahashi N, Karino K, Uchida M, Kono M, Tanaka Y, Hasebe R, Kato M, Amengual O, Arinuma Y, Oku K, Sato W, Tha KK, Yamasaki M, Watanabe M, Atsumi T,	4. 巻 8(11)
2. 論文標題 Murakami M. Pathogenic neuropsychiatric effect of stress-induced microglial interleukin-12/23 axis in systemic lupus erythematosus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ann Rheum Dis.	6. 最初と最後の頁 1564-1575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/ard-2022-222566.	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 -

1. 著者名 阿部靖矢、垂水政人、藤枝雄一郎、渥美達也、村上正晃	4. 巻 97(2):
2. 論文標題 ストレスで誘導されるミクログリア由来のインターロイキン-12/23軸による精神神経ループスへの影響	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 北海道医学雑誌	6. 最初と最後の頁 74-74
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 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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Abe N, Fujieda Y, Oku K, Takahashi N, Karino K, Uchida M, Kono M, Tanaka Y, Hasebe R, Kato M, Atsumi T, Murakami M.
2. 発表標題 Chronic stress-induced microglial interleukin-12/23 axis and medial prefrontal cortex impairment in neuropsychiatric lupus.
3. 学会等名 第50回 日本免疫学会 学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	阿部靖矢、藤枝雄一郎、垂水政人、狩野皓平、河野通仁、田中勇希、加藤将、有沼良幸、奥健志、佐藤和貴郎、村上正晃、渥美達也
2. 発表標題	全身性エリテマトーデスにおける慢性ストレス誘導性ミクログリア・IL-12/23軸賦活を介した精神神経学的影響
3. 学会等名	第8回 JCRベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	阿部靖矢、藤枝雄一郎、奥健志、河野通仁、田中勇希、加藤将、有沼良幸、佐藤和貴郎、村上正晃、渥美達也
2. 発表標題	ループモデルマウスにおける慢性ストレス誘導性IL-12/23p40による精神神経病態への影響
3. 学会等名	第49回 日本臨床免疫学会総会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	阿部靖矢、奥健志、藤枝雄一郎、狩野皓平、河野通仁、加藤将、田中勇希、村上正晃、渥美達也
2. 発表標題	ループモデルマウスにおける慢性ストレス誘導性IL-12p40による精神神経病態への影響
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

1. 発表者名	Abe N, Oku K, Kudo Y, Karino K, Kono M, Fujieda Y, Amengual O, Kato M, Kamimura D, Yasuda S, Murakami M, Atsumi T.
2. 発表標題	The effect of antiphospholipid antibody on cognitive function and microglial activation in mice.
3. 学会等名	第64回日本リウマチ学会総会・学術集会 (WEB)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 Abe N, Oku K, Fujieda Y, Takahashi N, Karino K, Kono M, Kato M, Tanaka Y, Hasebe R, Amengual O, Yamasaki M, Watanabe M, Murakami M, Atsumi T.
2. 発表標題 Pathogenic Effect of Chronic Stress-induced interleukin-12/23p40 on Neuropsychiatric System in Lupus-prone Mouse.
3. 学会等名 The American College of Rheumatology Convergence 2020 Annual Meeting, virtual congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部靖矢、奥健志、藤枝雄一郎、渥美達也、村上正晃.
2. 発表標題 ループモデルマウスにおける慢性ストレス誘導性IL-12/23p40による精神神経病態への影響
3. 学会等名 第6回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakiyama K, Fujieda Y, Tada M, Tsuchida N, Nishino K, Moriya H, Yasuda M, Kono M, Kato M, Amengual O, Atsumi T.
2. 発表標題 Improvement of long COVID-associated brain fog after COVID-19 vaccination in a patient with antiphospholipid antibodies.
3. 学会等名 ICAPA2022, Cordoba, Argentina
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fujieda Y, Abe N, Kono M, Kato M, Amengual O, Atsumi T
2. 発表標題 Microglial activation mediated by anti-b2GPI antibody leads to cognitive impairment and anxiety-like behavior in mice model.
3. 学会等名 17th International Congress on Antiphospholipid Antibodies, Cordoba, Argentina (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tanaka Y, Abe N, Tarumi M, Hasebe R, Atsumi T, Murakami M.
2. 発表標題 Pathogenic neuropsychiatric effect of stress-induced microglial interleukin 12/23 axis in SLE.
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会 学術集会
4. 発表年 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
研究分担者	藤枝 雄一郎 (Fujieda Yuichiro) (70790872)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	
研究分担者	奥 健志 (Oku Kenji) (70544295)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	

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
---------	---------