

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16280

研究課題名(和文) ミクログリアに注目した精神神経ループスの病態解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: Focus on microglia

研究代表者

河野 通仁 (Kono, Michihito)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：00835192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000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、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おり、原因としてNF- κ Bを活性化させるinhibitor of nuclear factor kappa B kinase, subunit epsilon (IKBKE)を含む複数のターゲットが明らかとなり、これらの阻害でモデルマウスの行動異常が改善した。

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 IKBKE ameliorated the disease activity of NPSLE.

研究分野：自己免疫疾患

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 IKBKE 解糖系

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する場合や、また抑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ミクログリアの遺伝子発現異常の網羅的解析

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。これらのマウスからミクログリアを分離し、RNAを分離し、RNAシーケンシングで網羅的遺伝子解析を行った。

(2) 注目したターゲット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、(1)で注目したInhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon (IKBKE)阻害薬または遺伝子Y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。

(3) 注目したターゲットの阻害薬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。行動解析についてはOpen field試験ならびにNovel object recognition試験を行った。

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。

(4) 健常者ならびに SLE 患者由来 iPS 細胞の作成

NPSLE 患者ならびに健常人の全血 20 ml から、比重遠心法にて末梢血単核球を分取し、Interleukin-6 (IL-6)、stem cell factor (SCF)、Thrombopoietin (TPO)、Fms-like tyrosine kinase 3 (Flt-3)含有培地で 4 日間培養した。その後センダイウイルスベクターを用いて OCT3/4、SOX2、KLF-4、L-MYC を導入し、感染から 3 日後にフィーダー細胞上に播種、培養を継続することで iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は、未分化状態の評価のため Alkaline Phosphatase (ALP)染色、ならびに iPS 細胞未分化マーカーを用いた蛍光免疫染色を、三胚葉全てへの分化能保持を確認するため三胚葉分化試験を実施した。

4 . 研究成果

(1) 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 1022 の遺伝子が有意差をもって変動しており、そのうち 887 が発現上昇、135 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 IKBKE ならびに遺伝子 Y に注目することとした。

(2) 注目したターゲット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、X 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。

(3) 注目したターゲットの阻害薬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 IKBKE 阻害薬を持続投与したところ、Open field 試験ならびに Novel object recognition 試験による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。また阻害薬 Y の投与でも同様の効果を認めた。

(4) 健常者ならびに SLE 患者由来 iPS 細胞の作成

NPSLE 患者ならびに健常人由来 iPS 細胞の樹立に成功し、両者間において形態的な差異は認めなかった。ALP 染色、ならびに iPS 未分化マーカーを用いた蛍光免疫染色により、iPS 細胞が未分化状態であることを、また三胚葉分化試験より樹立した iPS 細胞は多分化能を保持することが確認された。現在ミクログリアへの分化を進めている。

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 0件）

1. 著者名 Karino Kohei, Kono Michihito, Takeyama Shuhei, Kudo Yuki, Kanda Masatoshi, Abe Nobuya, Aso Kuniyuki, Fujieda Yuichiro, Kato Masaru, Oku Kenji, Amengual Olga, Atsumi Tatsuya	4. 巻 75
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 & Rheumatology	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 Karino Kohei, Kono Michihito, Kanda Masatoshi, Atsumi Tatsuya	4. 巻 -
2. 論文標題 Reply	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.42443	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0件

〔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
---------	---------