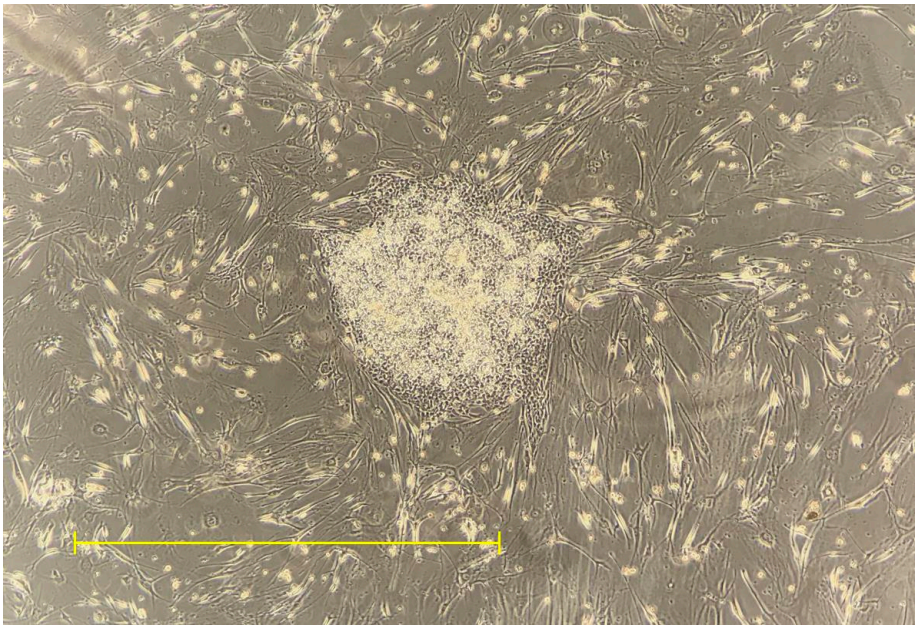
179　精神神経ループスにおける細胞内代謝の役割	河野　通仁

【目的】全身性エリテマトーデス（SLE）は若年女性に多く発症し、皮膚、腎臓、精神などを侵す代表的自己免疫性疾患の一つである。若年に発症するにも関わらず 10 年生存率は 90%前後と一般人口に比較して低い。精神神経ループス（NPSLE）は SLE の最も重要な臓器病変である。病態は不明で積極的治療にもかかわらずしばしば高次機能障害等の後遺症を残し、病態解明と新規治療開発が求められている。NPSLE 患者の脳細胞を得ることは非常に困難であり、SLE モデルマウスもヒトとは異なる点も多い。近年人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を用いてミクログリアへ分化できることが報告された。本研究では NPSLE 患者から iPS 細胞を樹立し、ミクログリアへ分化させることで NPSLE の新たな病態を明らかにすることを目的とした。

【方法】NPSLE 患者の全血 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（図）。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。続いてミクログリアへの分化を試みた。

【結果】NPSLE 患者由来 iPS 細胞の樹立に成功した。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。今後分化させたミクログリアを用いた機能解析を行っていく。

樹立した精神神経ループス患者由来 iPS 細胞の例



179. 精神神経ループスにおける細胞内代謝の役割

河野　通仁

*北海道大学 大学院医学研究院 免疫・代謝内科学教室

Key words：全身性エリテマトーデス，精神神経ループス，iPS 細胞，ミクログリア

緒　言

精神神経ループス（NPSLE）は自己免疫性疾患のひとつである全身性エリテマトーデス（SLE）の最も重要な臓器病変である。現在病態は不明で、実臨床は経験的治療に頼っている。積極的な治療にもかかわらず、しばしば高次機能障害や麻痺、感覚障害の残存が認められ、時に死に至る場合も散見される。SLE 患者の発症年齢は若年であり、これらの後遺症が非常に問題となっており、病態に則した新規治療の開発や早期診断が求められている。

NPSLE 患者は時に統合失調様の性格変化やてんかん、短期記憶障害、高次機能障害、抑うつ症状、麻痺や感覚障害、末梢神経障害など多彩な症状を呈する。しかし、NPSLE 患者の脳細胞を直接得ることはほぼ不可能であり、血清や髄液、あるいは脳 MRI などの画像評価から脳細胞の変化を推測することしかできていない。マウスを用いた研究もされており、NPSLE のモデルとなっている MRL/*lpr* マウスは尿蛋白や精神症状を呈するが、SLE 患者とは異なる面も多く、マウスだけでは実際の NPSLE 患者の異常をとらえきれない可能性が高い。

本研究では上記のような問題点を一掃するため、NPSLE 患者から人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を樹立し、iPS 由来の脳細胞を用いて実験を行うことで NPSLE の新たな病態を明らかにすることを目的とした。

方　法

1. iPS 細胞の樹立

NPSLE 患者 3 名の全血 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。

2. ミクログリアの分化誘導

5 回以上継代を行い、安定したコロニー形成が確認された iPS 細胞を用いて、既報に基づき iPS 細胞由来ミクログリア（iMGLs）への分化誘導を行った［1］。なお本プロトコルは造血前駆細胞（Hematopoietic progenitor：HPCs）を経て二段階で iMGLs へ分化する手法である。

第一段階：iPS 細胞由来 HPCs（iHPCs）への分化誘導（Day0～Day10）

fibroblast growth factor 2（FGF2）、bone morphogenic protein-4（BMP4）、Activin A、lithium chloride（LiCl）、vascular endothelial growth factor （VEGF）、TPO、SCF、IL-3、IL-6 を用いた培養系にて iHPCs への分化誘導を行った。開始（Day0）から Day4 までは低酸素環境下（5% O_2）で培養し、Day4 から通常酸素濃度環境（20% O_2）に戻し、培養を継続した。Day10 でフローサイトメトリー法にて $CD43^+CD41^+CD235a^+$細胞を分取し、この細胞集団を iHPCs として iMGLs への分化誘導に用いた。

第二段階：iHPCs から iMGLs への分化誘導（Day10～Day38）

*現在の所属：北海道大学病院 リウマチ・腎臓内科

Macrophage colony stimulating factor （M-CSF）、IL-34、transforming growth factor-β1（TGFβ-1）、CD200、C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1（CX3CL1）ならびに Insulin を用いた培養系にて iMGLs への分化誘導を行った。Day22 以降に early iMGL が、Day38 以降に mature iMGL が得られる。

結果および考察

1. iPS 細胞の樹立

NPSLE 患者から比重遠心法にて末梢血単核球を分取し、IL-6、SCF、TPO、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（図 1）。

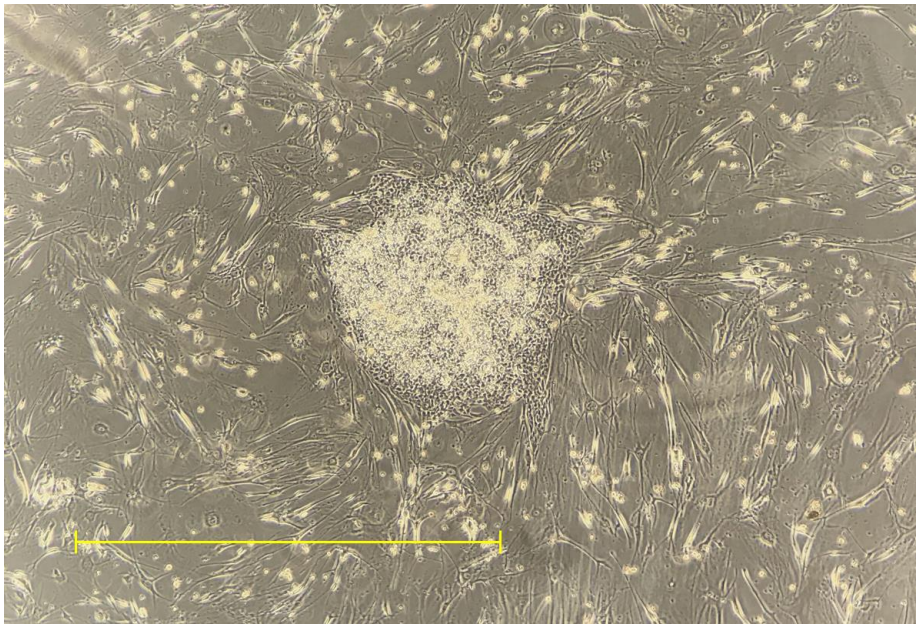


図 1. 樹立した精神神経ループス患者由来 iPS 細胞の例
比重遠心法にて末梢血単核球を分取し、Interleukin-6（IL-6）、stem cell factor（SCF）、Thrombopoietin（TPO）、Fms-like tyrosine kinase 3（Flt-3）含有培地で4日間培養した。その後センダイウイルスベクターを用いてOCT3/4、SOX2、KLF-4、L-MYCを導入し、感染から3日後にフィーダー細胞上に播種、培養を継続することでiPS細胞を樹立した（スケールバー：100μm）。

次に樹立した iPS 細胞が未分化状態であることを確認するため、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（図 2）を行った。ALP 染色ならびに Oct4、Stage specific embryonic antigen 3（SSEA3）などの未分化マーカーが認められ（図 2）、樹立された iPS 細胞は未分化状態であることを確認した。さらにこれらの iPS 細胞を用いて三胚葉分化試験を行った（図 3）。樹立した iPS 細胞は内胚葉、中胚葉、外胚葉すべてに分化が認められ、多分化能を保持すること（図 3）が確認された。

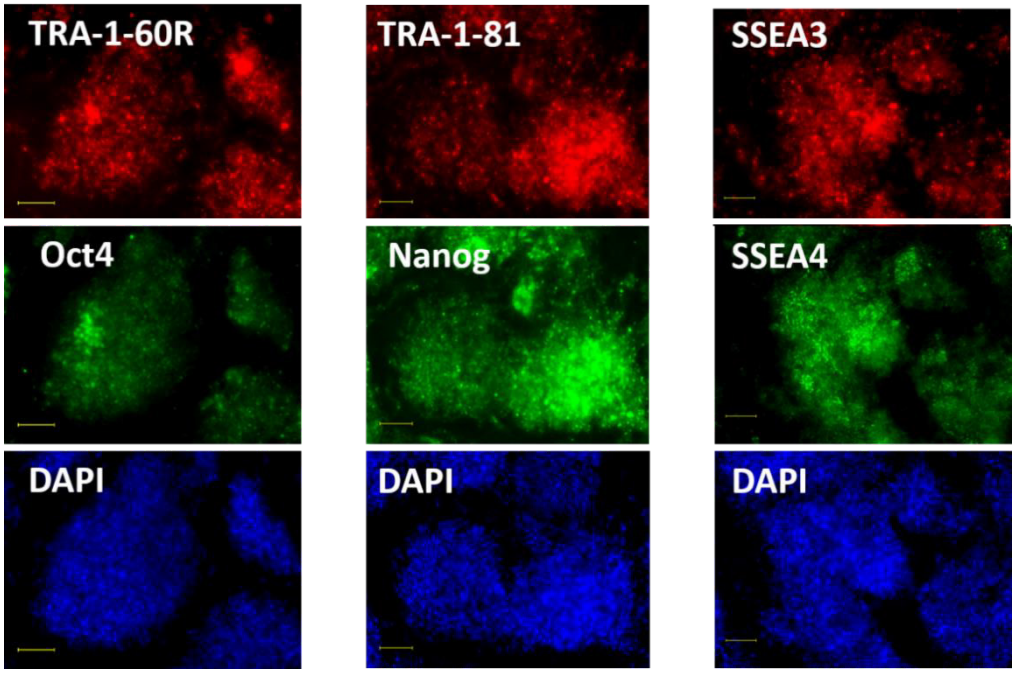


図 2. iPS 未分化マーカーを用いた蛍光免疫染色

樹立した NPSLE 患者由来 iPS 細胞に対し、未分化マーカーを用いた蛍光免疫染色を行った（スケールバー：100 μm）。

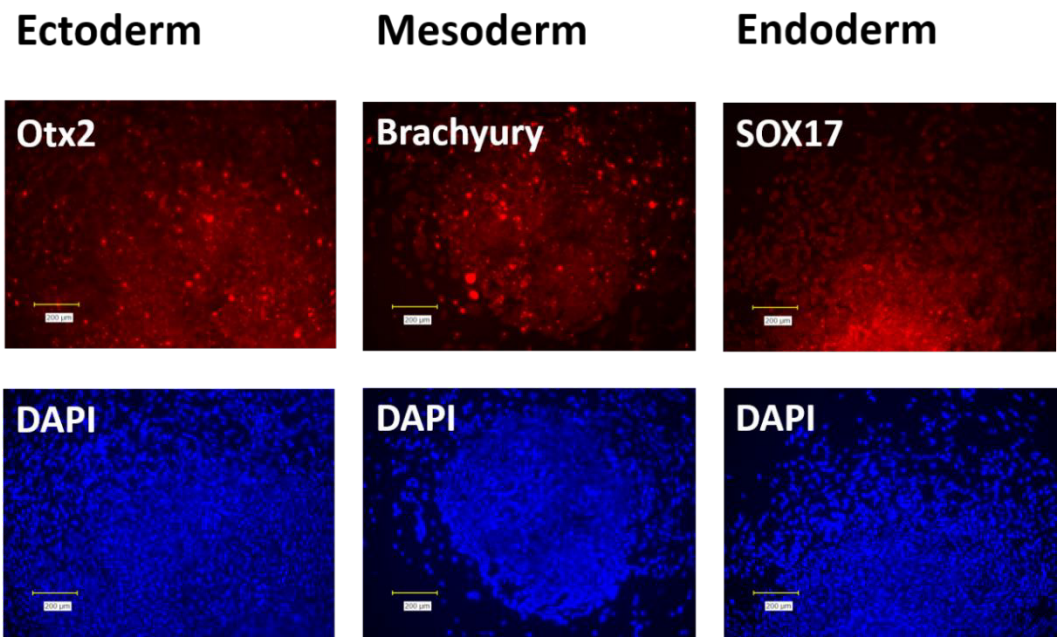


図 3. 樹立した iPS 細胞を用いた三胚葉分化試験

樹立した NPSLE 患者由来 iPS 細胞に対し、三杯葉分化試験を行った（スケールバー：200 μm）。

現在は、樹立した iPS 細胞を用いた iMGL の分化誘導を試みている。今後、作製した NPLSE 由来ミクログリアの機能解析を行っていく。これまでに我々は NPSLE モデルマウスである MRL/*lpr* マウスならびにそのコントロールである MRL/MpJ マウスからミクログリアを分離したところ MRL/*lpr* マウス由来のミクログリアの方が活性化していることを明らかにした。さらにこれらのマウスの RNA シークエンスを行い、MPSLE モデルマウスのミクログリアで、

複数の遺伝子の発現が亢進していることを明らかにした。また、注目した遺伝子の阻害薬により NPSLE モデルマウスの行動異常が改善されることを明らかにした。これらの結果に加え、本研究で樹立した iPS 細胞を用いたミクログリアの機能解析をあわせ、NPSLE の新たな病態や新規治療につながる研究へとつなげていきたい。

謝　辞

本研究の助成をいただいた公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。貴財団の益々のご発展を祈念いたします。

文　献

1）　Edsel M Abud, Ricardo N Ramirez, Eric S Martinez, Luke M Healy, Cecilia H H Nguyen, Sean A Newman, Andriy V Yeromin, Vanessa M Scarfone, Samuel E Marsh, Cristhian Fimbres, Chad A Caraway, Gianna M Fote, Abdullah M Madany, Anshu Agrawal, Rakez Kayed, Karen H Gylys, Michael D Cahalan, Brian J Cummings, Jack P Antel, Ali Mortazavi, Monica J Carson, Wayne W Poon, Mathew Blurton-Jones. Neuron. 2017 Apr 19;94(2):278-293.e9. doi: 10.1016/j.neuron.2017.03.042.