

しし、自然な会話を促す。患者の独特な認知によって共感はできないことが多いかもしれないが、患者の生育歴も含めた数々の事情を聴いて行くと、独特な考え、感情、行動に至った事情が自然と見えてくるため共感しやすくなる。言葉を返す時に注意すべき点は、なるべく良い悪いなどの価値判断をせず、感情表現に焦点をあて、「そんな場合はそのように感じますよね」と認証する。これは、こんな風に感じてはいけないと感情を抑えることで非適応的認知や行動が起きている場合に治療的であり、これだけで自己評価が少し上がり病態がよくなる場合もある。この対話法を行うことで患者は自身の思考や感情をとらえやすくなり、認知の偏りの修正に有効である。なお、病態やプライベートなことを聴きたいときは、「以前こういう患者さんもおられましたけれど、そのようなことはありませんか？」と一般化して問うと、より答えやすくなるようである。

### 3. 病態評価

#### 1) 病態を捉えるときの視点

##### ① 慢性疼痛治療の目的

米国麻酔学会の慢性疼痛治療の診療ガイドラインによると、慢性疼痛治療の目的として、①痛みがまったくない状態を達成することはできないかもしれないことを認識して、痛みのコントロールを最適に施行する、②合併症や費用を最小限に抑える、③機能と身体的、心理的健康を向上させる、④慢性疼痛患者の生活の質を向上させることの4つをあげており、集学的アプローチを重視している。心身医学的治療の基本方針は、治療目標をこのように「身体的痛みの緩和」中心の考えから、「生き生きとした生活・人生を取り戻す」ことにシフトすることにある<sup>1)</sup>。治療者自身が治療目標の視野を広げ、治療の動機づけとして「痛み以外の大事なものを思い出させる」ことを明確化し、患者の主體的な姿勢を回復させ、患者が自己肯定感や自己効力感を得られるように援助する<sup>5)</sup>。

##### ② 慢性疼痛患者の心理特性

慢性疼痛患者の難治化に関与する心理特性として、下記のものあげられる。これらの心理特性があるかどうかを念頭に置き、心理社会的背景を聴取すると病態がわかりやすい。

###### i) 低い自己肯定感・過剰適応傾向

過剰適応とは、自己評価の低さが根底にあり、

人に気を遣い他者からの高評価を得るために過剰に勤勉に働いたり自己の欲求を抑え他者への献身をしてしまったりする行動特性をいう。疼痛発症後も過剰に頑張り続けようとし、周囲の要求に応えられなくなった時、罪悪感、無力感、(自己に対する)無価値感や不安・抑うつを抱えやすく、身体的にも疲労が蓄積し、痛みをより辛く感じることになる。

###### ii) 強迫性・完璧主義

慢性疼痛患者の中には、その強迫性・完璧主義の性格から体の痛みを抱えながらも長時間作業や労働を徹底的に行い、適度な休息をとらず心身の疲労が蓄積し、痛みが遷延・増悪している人がいる。この強迫的過活動の根底には自己に対する無価値感、罪悪感、劣等感などのネガティブな感情があり、これらを忘れるために、比較的他人から高評価を得やすい作業(家の掃除や草むしり、献身的な家族の世話など)に没頭していることがある。患者に聞くと自己評価が低い「たいしてしてませんよ」「いい加減ですよ」などと言うが、手順やかかった時間を具体的に聴くと完璧・頻回・長時間の作業を行っている場合がしばしばある。

###### iii) アレキシサイミア(失感情症)傾向

自分の感情をとらえたり表現したりすることが苦手で、感情を抑圧しているために自分がどう感じていてどうしたいのか分からない傾向をアレキシサイミアと言う。ストレス事象を聴取すると詳細な事実を冗長に語るが多く、その時どう感じたかという質問に答えることができない(腹が立った、悲しかったなどが言えない)。失感情傾向が強いとストレス対処、感情調整、対人交流などに問題を抱えやすく、蓄積したストレスが身体症状として表出されやすい。我々の久山町一般住民を対象とした研究でも、アレキシサイミア傾向が慢性疼痛症状の有症率や程度と関連していた<sup>6)</sup>。

#### 2) 慢性疼痛に関連する病態

認知(思考)、感情(情動)、行動、身体状況・環境の4つの因子が相互作用していることを念頭に、聞き取りを行う。どのような状況下で痛みが強くなるのかまたは弱くなるのかを聴取していく。当科の慢性疼痛患者で痛みの持続増悪に関連する因子としてよくみられるものを図に示した(図2)。先行研究では、腰痛・背部痛

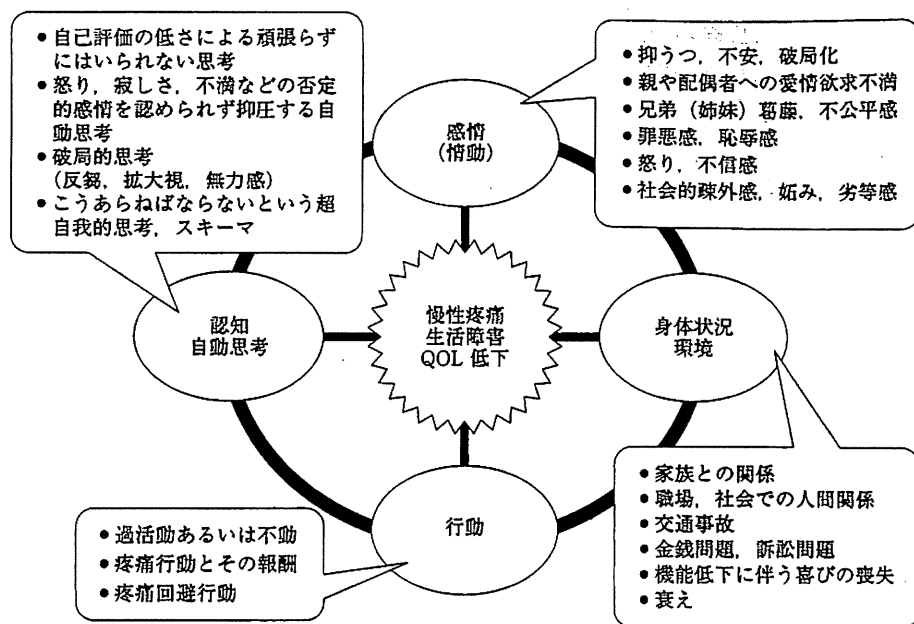


図 2 心理社会的因子と慢性疼痛の相互作用 (文献5より改変引用)

と怒り・非依存的(頼れない)性格の関連が報告されている<sup>7)</sup>。

症状の変化があったとき、どういう状況でどのような気持ちだったかを日記に付けてもらうという方法も効果的である。それでもなお痛みに関連する因子がはっきりしないときは患者が無意識的あるいは意識的に情報を隠している(抑圧あるいは抑制している)場合がある。上記の心理特性を意識して聴取するとよい。

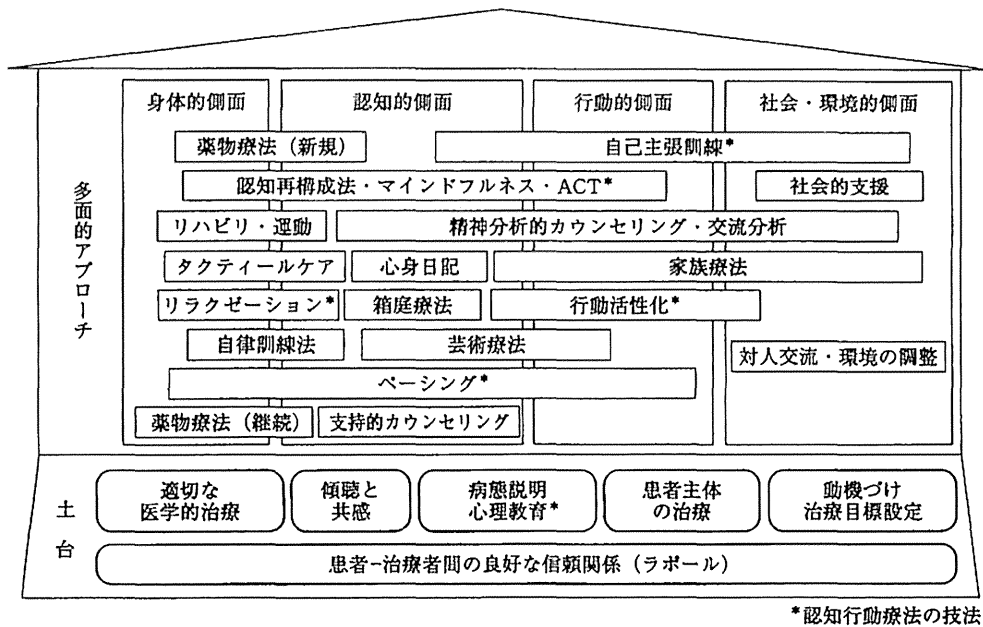
#### 4. 心理教育

患者はなぜ痛いのか、続くのか、自分に何が起きているのかと不安になっている。まず、癌など生命を脅かす病気がないことを確認し、そのうえで病態を説明する。疼痛は単に感覚だけでなく不快な情動との複合体験であること、現在の医学的検査で捉えきれない神経系などの分子レベルの変化や筋骨格系や内分泌・自律神経系を含めた機能的変化が疼痛に関与しうること、疼痛は下行性調整系や中枢レベルでの修飾を受けていること、抑うつや不安、怒りなど感情状態やストレスも身体的痛みに関係することなど、科学的な知見を踏まえて適宜伝える。「痛みのほとんどは何らかの身体的問題がベースにあり、心因だけの痛みは基本的にないと考えている」ことを強調しながらも、「今の状況では薬や処置だけでは不十分であり、より広い観点で治療に取り組んでいく必要がある」という方

向性を話し合う。患者の実際の生活の中での疼痛体験と心理社会的因子の具体的な関連を話し合いながら行っていく。

#### 5. 治療目標設定と動機づけ

心理社会的因子が腰痛に影響していることや、疼痛以外にも苦悩を抱えていることを患者がわかり始めると、「疼痛感覚の軽減」以外にも新たな治療目標を設定することが可能になる。例えば、疼痛を維持・悪化させている考え方や行動パターン、環境的要因を変えていくことに取り組むことや、痛み支配され喜びや活力を失った生活に有意義な活動や対人交流を増やしていくことなどが目標となり得る。カウンセリングが進む過程で、疼痛の維持・増悪の背後にある以前から抱えていた患者の人生の問題や家族との葛藤を本人が気付くようになると、それらの方が疼痛より大きな苦痛・苦悩であることが分かり、その解決にむけ取り組み始めるケースもある。これらの目標は疼痛症状の軽減を直接目指すものではないが、心理的な苦痛の軽減や行動変容を介して結果的に疼痛症状の軽減につながることも少なくない。ただし、これらの取り組みは「受ける治療」と違い、自ら「取り組む治療」であり、主体が医師から患者本人に変わっていく必要がある。そのためには、本来望んでいる自分の生き方や対人関係を患者自身から引き出す援助をしたり、過去の治療による



\*認知行動療法の技法

図 3 慢性疼痛に対する主な多面的心身医学的治療

具体的な改善例なども提示しながら、患者の取り組み次第で状況が変容可能であることなどを話し合ったりすることが患者の動機づけに役立つ<sup>5)</sup>。

### 多面的心身医学的治療

先に述べた段階的治療の第1段階を土台として、病態に応じた多面的なアプローチを検討する。身体的側面、認知的側面、行動的側面、社会・環境的側面に対する主なアプローチ法を図3に示した。これらのアプローチを病態に応じて組み合わせを行い、各段階で治療効果を評価する。

### Ⅲ. 第2段階：安静休養・リラクゼーション

安静休養やリラクゼーションは痛みや痛みに伴う問題を軽減させる目的であるが、心理療法の前提として抑圧を軽減させる効果もある。安静休養やリラクゼーションを行っただけで、不快な情動が出現したり、トラウマ体験が想起されたりする場合もあるので注意したい。

#### 1. 安静休養・ペーシング指導

安静休養を行い自然な心身の回復を促す。患者は安静にすると痛みや不快感が増悪し、安静休養が行えない場合が多いが、安静休養の重要性を強調する。

強迫的な過活動を行っている患者には「ペー

シング（一回に少しずつ作業をすること）」を用いるとよい。患者は作業のペース配分が苦手なため、作業の量ではなく「時間に基づくペース配分」に変える。患者の状態によって作業に優先順位をつけ、10分行って10分休む、一日1回までなどと、病状に応じた具体的な活動スケジュールを作成する。患者は休むことに罪悪感をもつ場合があるが、その感情を認めつつ休むのも作業のうちと考え、休んでいる自分に耐えるように促す。また、うまくペーシングが行えたとき痛みがどうなっているかを聴取し、効果を実感してもらう<sup>2)</sup>。

#### 2. リラクゼーション

リラクゼーションにはエネルギーを高め、筋緊張や疲労を低下させ、睡眠を改善し、血圧を低下させ、痛みを減少させるという効果が報告されている。腹式呼吸、自律訓練法、漸進的筋弛緩法、視覚イメージ法などがある<sup>2)</sup>。

### Ⅳ. 第3段階：感情表出

この段階では、精神分析的観点から、抑圧された感情や苦悩を患者自らの言葉で語らせる（言語化する）ことで症状の訴えを軽減させる。感情を抑圧する超自我的自動思考（ねばならない思考）や非適応的過活動（症状を増悪させるような過度な活動）を軽減させる。

実際には心理面接をベースにその他の治療法

を病態に応じて適宜追加する。基本的に言語的・理論的アプローチ（精神分析的カウンセリング、認知行動療法、心身日記、交流分析）を用いることが多いが、抑圧が強く感情や苦悩を意識化できないタイプや言語的理解が乏しいタイプ、また、過度に言語的・理論的で感情や身体感覚が乏しいタイプには非言語的アプローチ（マインドフルネス・アクセプタンス & コミットメントセラピー [ACT]、箱庭療法、芸術療法、プレイセラピー、タクティールケア、行動活性化など）を行うと効果的である。たとえば、心身相関の気づきを促したい場合は心と体の状態を記録する心身日記を用いる、特定の相手と特定の交流パターンが繰り返されている場合は交流分析の本を読んでもらう、抑圧が強く感情が表出されない場合は箱庭療法・芸術療法などを用いる、自由な感情表現を促したい場合はプレイセラピーを用いる、親との葛藤などで愛情欲求不満がある場合に治療枠組の中でタクティールケア（身体的接触を利用したケア）を用いる、痛みのために動けず楽しみや趣味をやめてしまった患者に可能な楽しめる活動を段階的に増やす行動活性化を用いるなどの工夫が有用である。

ここで中心となる心理面接について以下に解説する。

### 1. 心理面接

心理面接では精神分析的カウンセリング、認知行動療法（認知再構成法、マインドフルネス・ACT）を行っている。実際には患者の病態に応じていくつかの技法を取り入れた心理面接を行う場合が多い。

#### 1) 精神分析的カウンセリング

社会常識からくる遠慮や抑制なしに、心に浮かぶ考え方や感情を自由に話させる自由連想法を用いる。自分自身の無意識領域に抑圧された感情や過去と向き合い、感情を伴った言語として整理する作業をサポートする。患者が、心のわだかまりや不快の原因を明らかにし、自分自身で問題の原因を知り、洞察を深め、自己統制できるようにしていく。過去から続いている親との葛藤の問題へ収束する場合が多い。

#### 2) 認知行動療法

##### ① 自動思考と認知再構成法

さまざまな状況や場面で、それまでの経験や

知識、信念・思い込み、考え方のクセ（スキーマ）にもとづき、自動的に湧き起こってくる考えやイメージ、あるいは記憶のことを「自動思考」という。心理面接の中で現実にそぐわない思考（非適応的自動思考、認知の誤り）にたびたび遭遇する。そのときなぜその考えにいたったのかを聴取しその考えにいたった事情に共感しつつ、「その考え方（自動思考）は100%正しいですか?」「10年後だったら（元気な時だったら）どう考えるでしょう」「もし他の人が同じ考えをしていたらあなたはどうかアドバイスしますか?」など患者の気づきを促すようなソクラテス的対話法（治療者が質問をすることで患者の気づきを促すような面接技法）を行い、より現実に即した役に立つ適応的な思考を採用できる（より気持ちが楽になる現実的な考え方を）ようサポートする。ワークシートを用いながら宿題として行う場合もある。疼痛に対する非現実的な恐怖や心配、破局的思考（疼痛に自分は何も対処できないという思考、症状を拡大的に捉える、痛みのことを繰り返し考えるなど）、その他種々の辛くなるような考え方の癖や思い込みなどの変容に役立つ。

##### ② マインドフルネスストレス低減法とACT（アクセプタンス & コミットメントセラピー）

問題の状況に対し適応的に対処しようとしたとき、強固な非適応的な信念や思考、それによって引き起こされる罪悪感、劣等感、羞恥心、恐れなどのネガティブな感情などが障害となる。患者は無意識のうちにこれらの信念や思考に支配され、辛い感情や記憶を回避しようとするため、あまり効果的な行動の選択が出来なくなっている場合が多い。例えば、「自分は価値のない人間だ」という強固な信念を持っている人の場合、休養することに対しては「人の役に立っていないことは存在意義を失うことだ」という思考を持ちやすく、強い罪悪感や無価値感を覚えてしまう。この辛い感情から逃れるために、とにかく休まず人の役に立つような作業を続けてしまう。療養が必要な腰痛患者がこのようなパターンになった場合、適切な休養をとることが出来ないため疼痛が増悪していく。このような反応の仕方を変えるためには、自分の思考や感情、行動のプロセスに意識的に気づき、非適応

的な信念や思考と距離を置きつつ、適応的な行動を起こす時に感じる辛い感情を避けずに抱えられるようになる必要がある。そこで有効と思われるのが近年広まりつつあるマインドフルネスという技法を取り入れたマインドフルネスストレス低減法やACTなどの第3世代認知行動療法であり、慢性疼痛に対する治療効果が報告されている<sup>8)</sup>。

マインドフルネスとは「今の一瞬に、評価をしないで、意識的に注意を向けること」である。瞬間瞬間の呼吸や五感、思考、感情などに注意を向け、それらをありのまま体験するトレーニングを瞑想など通じて行う。それにより「思考、感情、感覚へ意図的に気づく能力」、「思考を現実と区別し距離をとり客観的に観察する能力」、「辛い感情や疼痛などの感覚もあるがまま体験する能力」などが発展し、とらわれの減少、感情的苦痛や疼痛に対する耐性向上、適応的行動の増加などにつながる。ACTにおいてはさらに、人生において何を大切に考えるかという「価値の明確化」を行うことで、毎日の生活を痛みにとらわれるのではなく、自分にとってもっと有意義な活動に集中していけるようになっていく<sup>9)</sup>。

## V. 第4段階：対人交流介入

### 1. 家族療法

#### 1) 対人交流不全による問題への対応

対人交流の問題は、親子関係や夫婦関係、兄弟関係、嫁姑関係、職場・地域での対人関係など様々だが、認知行動療法では相手の変化を期待するのではなく、自分の考え方（認知）や行動を変えることで問題を解決していく。本人の考え方、感情を認めていくだけでも、別の適応的な思考が出てくることもある。注意したいのは、患者は問題のある家族に対して苦情など否定的なことを多く訴えるが、本当はそれと同じくらい相手から受け入れられたいと感じており、その愛憎の葛藤が患者の苦しみとなっている場合が多い。

家族への心理社会的因子を含めた病態説明は治療として有用である。話に登場する家族に直接治療者が会うことで、患者に共感しやすくなったり、逆に患者の視点とは別の情報が得られ、病態評価に有用である。家族の訴えも傾聴

した上で、機能的（非器質的）痛みの存在や過剰適応による苦しみなどの病態説明、見かけでは判断しにくいことなどの心理教育とともに、治療に家族のサポートを必要としていることや患者への具体的対応などをアドバイスする。家族は患者の疼痛行動で疲労していることがあるので、苦勞をねぎらうことも重要である。

#### 2) 疼痛行動への対応

「疼痛行動」とは疼痛の存在を他者へ伝える全ての行動をいうが、痛みを表現する言語的な訴えのみでなくうめき声を出したり、杖をついたり、介助や薬・処置を要求したりする行動も含める。この疼痛行動を行う事によって何らかの報酬が得られる場合は、疼痛の程度にかかわらず疼痛行動が増えることがある<sup>1)</sup>。例えば、今まで家族に注目されていなかったが、痛みを訴えた時家族が優しくしてくれた（擁護反応）という体験を繰り返す（学習する）と家族に対する疼痛行動が増加する。その結果家族が振り回され、家族からの「何とかしてほしい」という訴えにつながる場合がある。対応としては、家族に対してこのメカニズムの説明をし、痛みがあるときだけ優しくするのではなく、いつも同じように（ときには、痛みがないときほど時間をとって）対応し根底にある患者のさみしさに配慮するように家族にアドバイスすることが有効である。このような、痛みや障害によって、仕事をしなくていい、障害年金がもらえる（現実回避）、自分が痛がることで家族間の関係がよくなった（家族システムの維持）、心理的苦境時に痛みを訴えると葛藤感情を回避することができる（葛藤回避）というような報酬を得ることを「疾病利得」と呼ぶこともある。しかし、多くは、疼痛行動は学習によって患者の無意識に刻みこまれており、患者は自身の疼痛行動と報酬に気づいていないことに注意が必要である。難治例では患者の疼痛行動で逆に救われている苦境が背景にある場合がある。治療者は患者の疼痛行動が不要となるよう背後の問題に患者と共に取り組み、治っても心理的に苦しまないでよい環境をつくることが重要である<sup>5)</sup>。

#### 2. 自己主張訓練

対人交流の改善に有効な方法の一つにアサーショントレーニングがある。アサーション

レーニングは相手も自分も尊重する適切で効果的な自己主張のトレーニングである。自己主張を阻害する自動思考をチェックし、自分も相手も尊重する発言を作成し、ロールプレイで練習すると有用である。

## VI. 第5段階：薬物療法

以前より開始されている薬物療法は治療初期から継続するが、新規の重点的薬物療法は、過活動行動、交感神経亢進状態が軽減し心理状態が安定したこの段階から行うと副作用が起りにくく、治療効果を得やすいことが多い。慢性疼痛の薬物療法の基本は、経口投与、定時投与である。鎮痛薬、麻酔、神経ブロックといった急性疼痛に対する鎮痛法は効果が少ないことが多い。三環系抗うつ薬はうつ病に対する効果だけでなく、下行性抑制系の機能を賦活することによって痛みを緩和することが神経障害性疼痛などでも確認されており、抑うつ症状がない場合でも鎮痛作用を目的に投与することもある。入院患者では塩酸クロミプラミンの点滴静注療法を行う場合があり、疼痛閾値の低下の改善がみられている。また、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) を使用することも多い。抗不安薬、睡眠薬は対症療法的に根本的治療の補助として適宜使用していく。

## VII. 最終段階：治療者からの自立

治療が進むと患者は自ら適応的対処法を考え行動することができるようになる。治療方針を患者本人に立ててもらい実行する練習をし、自己治療力を高めていく。痛みがあっても自分で対応できるというセルフコントロール感を獲得する。また、痛みが再発しても、今まで学んだ方法を今後も自分で工夫しながら行っていくことを強調する。

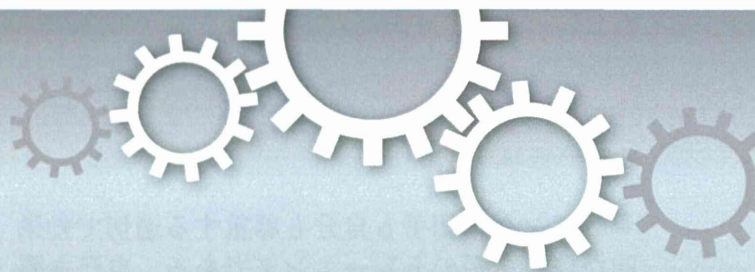
## お わ り に

個々の治療法については、2012年の腰痛診療ガイドラインによると認知行動療法、患者教育、運動療法、抗不安薬のエビデンスレベルはGrade A (強い根拠に基づいている)、抗うつ薬はGrade B (中等度の根拠に基づいている)とあり一定のエビデンスがあると考えられている<sup>10)</sup>。上記の多面的段階的治療ステップに、実際にはリハビリ部門のスタッフにより腰痛の程度に応じた運動療法を適宜導入することで、活動レベルの拡大が得られている。心療内科的観点からの治療を取り入れた集学的アプローチがシステムとして行える集学的痛みセンターの設立といった今後の発展が望まれる。

## 参 考 文 献

- 1) 細井昌子: 疼痛性障害. 心身医学標準テキスト 第3版, 医学書院, 東京, 178-186, 2009.
- 2) ジョン・D・オーティス (伊豫雅臣・清水栄司監訳): 慢性疼痛の治療: 治療者向けガイドー認知行動療法によるアプローチ, 第1版. 星和書店, 東京, 1-123, 2007.
- 3) Henshke, N. et al.: Behavioral treatment for chronic low-back pain. *Cochrane Database Syst Rev*, 7: CD002014, 2010.
- 4) Bados, A. et al.: The efficacy of cognitive-behavioral therapy and the problem of drop-out. *J Clin Psychol*, 63: 585-592, 2007.
- 5) 細井昌子, 安野広三, 柴田舞歌 (山本達郎編): 心身医学的治療, 4. 腰痛のサイエンス, 痛みの Science & Practice. 文光堂, 東京, 199-211, 2014.
- 6) Shibata, M. et al.: Alexithymia is associated with greater risk of chronic pain and negative affect and with lower life satisfaction in a general population: the Hisayama Study. *PLoS One*, 9: e90984, 2014.
- 7) Gregory, R. J. et al.: Personality traits related to chronic pain location. *Ann Clin Psychiatry*, 17: 59-64, 2005.
- 8) Veehof, M. M. et al.: Acceptance-based interventions for the treatment of chronic pain: a systematic review and meta-analysis. *Pain*, 152: 533-542, 2011.
- 9) スティーブン・C・ヘイズほか (武藤崇, 原井宏明, 吉岡昌子, 岡嶋美代訳): ACTをはじめる セルフヘルプのためのワークブック, 初版. 星和書店, 東京, 10-13, 2010.
- 10) 日本整形外科学会, 日本腰痛学会監修: 腰痛診療ガイドライン2012. 南江堂, 東京, 40-56, 2012.





## OPEN

SUBJECT AREAS:  
PSYCHIATRIC DISORDERS  
TRANSLATIONAL RESEARCH  
MICROGLIAReceived  
27 December 2013Accepted  
22 April 2014Published  
14 May 2014Correspondence and  
requests for materials  
should be addressed to  
T.A.K. (takahiro@  
npsych.med.kyushu-u.  
ac.jp)

# Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: Dynamic microglial dysfunction in Nasu-Hakola disease

Masahiro Ohgidani<sup>1</sup>, Takahiro A. Kato<sup>1,2</sup>, Daiki Setoyama<sup>2</sup>, Noriaki Sagata<sup>1</sup>, Ryota Hashimoto<sup>3,4</sup>, Kazue Shigenobu<sup>5</sup>, Tetsuhiko Yoshida<sup>4</sup>, Kohei Hayakawa<sup>1</sup>, Norihiro Shimokawa<sup>1</sup>, Daisuke Miura<sup>2</sup>, Hideo Utsumi<sup>2</sup> & Shigenobu Kanba<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Neuropsychiatry, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, <sup>2</sup>Innovation Center for Medical Redox Navigation, Kyushu University, <sup>3</sup>Molecular Research Center for Children's Mental Development, United Graduate School of Child Development, Osaka University, <sup>4</sup>Department of Psychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine, <sup>5</sup>Department of Psychiatry, Asakayama General Hospital.

Microglia have been implicated in various neurological and psychiatric disorders in rodent and human postmortem studies. However, the dynamic actions of microglia in the living human brain have not been clarified due to a lack of studies dealing with *in situ* microglia. Herein, we present a novel technique for developing induced microglia-like (iMG) cells from human peripheral blood cells. An optimized cocktail of cytokines, GM-CSF and IL-34, converted human monocytes into iMG cells within 14 days. The iMG cells have microglial characterizations; expressing markers, forming a ramified morphology, and phagocytic activity with various cytokine releases. To confirm clinical utilities, we developed iMG cells from a patient of Nasu-Hakola disease (NHD), which is suggested to be directly caused by microglial dysfunction, and observed that these cells from NHD express delayed but stronger inflammatory responses compared with those from the healthy control. Altogether, the iMG-technique promises to elucidate unresolved aspects of human microglia in various brain disorders.

Microglia, immune cells in the brain, play major immunological/inflammatory roles as brain macrophage in the central nervous system (CNS). The origin of resident microglia have been proven to be from primitive myeloid progenitors (primitive macrophage) that arise in the yolk sac before embryonic day 8<sup>1</sup>. Resident microglia form as a ramified type (called ramified microglia), whose branches constantly move and survey the microenvironment under physiological conditions in the CNS<sup>2</sup>, and once activated, shift to an ameboid type, phagocytose, and release various mediators such as pro-inflammatory cytokines<sup>3-5</sup>. Microglia are suggested to contribute to the pathophysiology of various neurological and psychiatric disorders<sup>6-8</sup>. Nasu-Hakola disease (NHD) which is a very rare autosomal recessive disorder, initially reported in Finland and Japan<sup>9,10</sup>, is believed to be caused by microglial dysfunction. Until now, only about 200 cases have been reported worldwide and the majority of cases are in the Finnish and Japanese populations<sup>11</sup>. NHD is characterized by formation of multifocal bone cysts and progressive early-onset dementia with various psychiatric symptoms including personality changes<sup>11,12</sup>, caused by mutations of DNAX-activation protein 12 (DAP12)<sup>13</sup> or triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2)<sup>14</sup>, both of which are expressed in human microglia. A rodent brain study showed that DAP12 is expressed only in microglia and deletion of DAP12 induces synaptic impairments possibly due to microglial dysfunction<sup>15</sup>. A human postmortem study has revealed the absence of DAP12 expression on ramified microglia in the brains of NHD patients<sup>16</sup>.

The above-mentioned reports have strongly supported the theory that human microglia maladaptively contribute to a variety of neurological and psychiatric disorders including NHD, while dynamic analysis of microglial dysfunction in the human brain has yet to be clarified. The most significant limitation in human brain research is the difficulty in obtaining living brain cells including microglial cells from living human brains due to ethical and technical considerations. To solve this limitation, alternative methods have long been warranted. Presently, human neuronal cells can be established from somatic cells (not from the brain) such as skin fibroblasts by

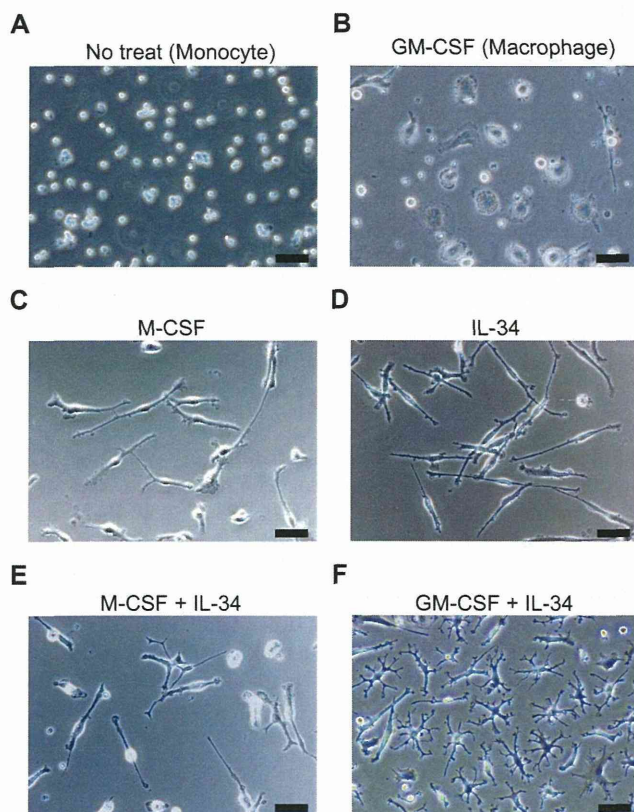




utilizing the gene-modification technique of induced pluripotent stem (iPS) cells<sup>17,18</sup>. In addition, recently, neuronal cells are more easily established from direct conversion of human skin fibroblasts, called induced neuronal (iN) cells<sup>19–21</sup>. Novel methods of establishing ramified microglia from human somatic cells are strongly warranted, based on iPS or direct conversion techniques, while none have yet been reported. Herein, we show a novel technique for developing induced microglia-like (iMG) cells easily and quickly from adult human peripheral blood cells. In addition, by utilizing this iMG-technique, we present the first translational analysis of the dynamic actions of microglia from a patient of NHD.

## Results

**Inducing ramified microglia-like cells.** To determine what cytokines induce ramified microglia from human peripheral monocytes, we selected and tested the effects of the following candidate cytokines; granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and interleukin (IL) -34, all of which are suggested to be essential for developing and maintaining ramified microglia<sup>22–25</sup>. Untreated monocytes showed round shapes (Fig. 1A). Macrophages, induced by GM-CSF (10 ng/ml), shifted to an amoeboid morphology on DAY 14 (Fig. 1B). On the other hand, treatment of M-CSF (10 ng/ml) alone or IL-34 (100 ng/ml) alone showed a spindle morphology (Fig. 1C and D), and the cocktail of both cytokines induced more complicated morphologies than the single treatment (Fig. 1E).



**Figure 1 | Inducing ramified microglia from human peripheral monocytes.** The monocytes on the day of isolation (A) were incubated with the following candidate cytokines; GM-CSF (10 ng/ml; B), M-CSF (10 ng/ml; C), IL-34 (100 ng/ml; D), M-CSF + IL-34 (E) and GM-CSF + IL-34 (F) for 14 days. The optimal cytokine conditions were tested by morphological changes using phase-contrast microscopy. The cocktail of both GM-CSF and IL-34 induced small soma body bearing numerous branched collaterals, which expressed the specific morphology of ramified microglia (F). Scale bar, 50  $\mu$ m.

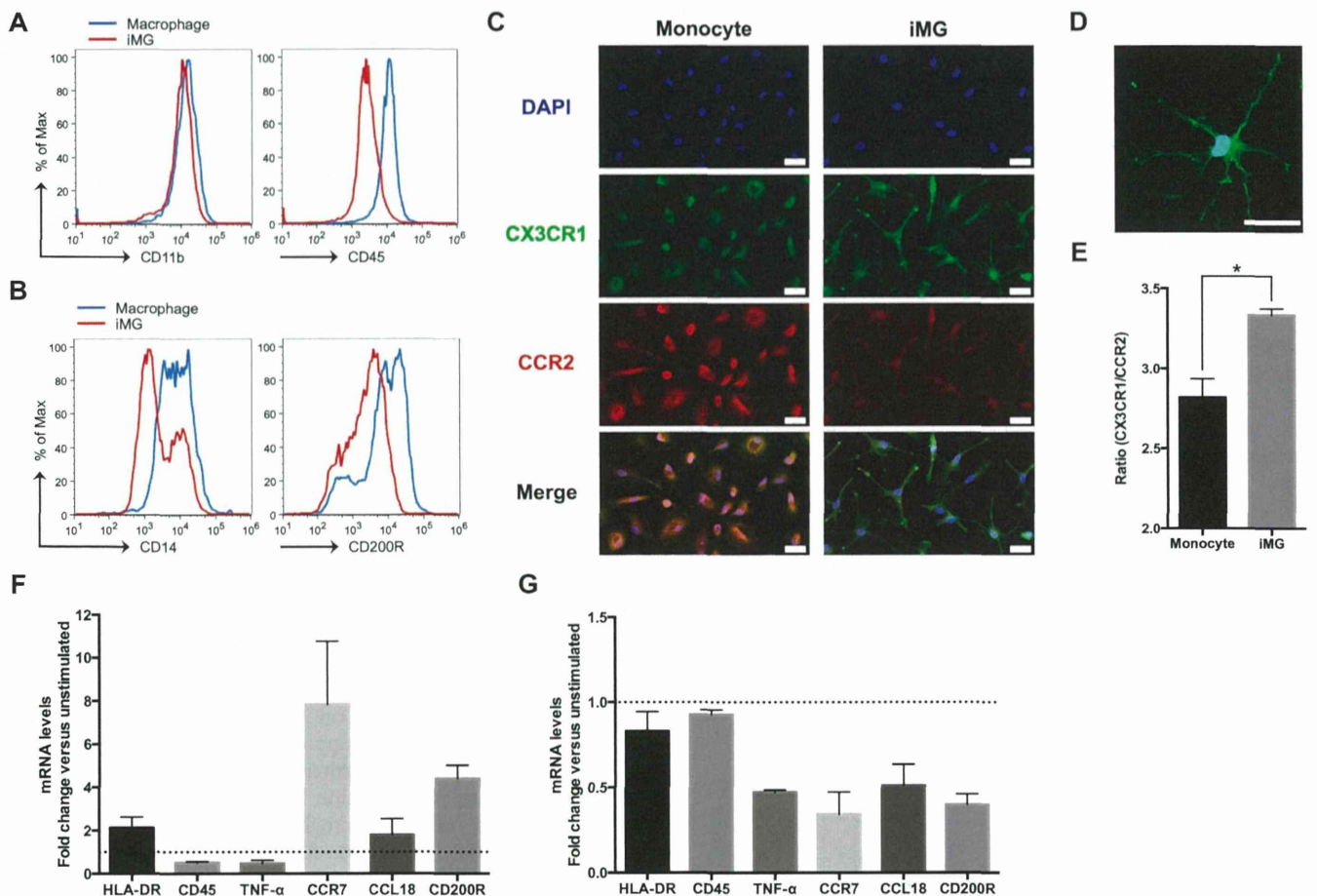
Surprisingly, the cocktail of both GM-CSF (10 ng/ml) and IL-34 (100 ng/ml) induced small soma bodies bearing numerous branched collaterals (Fig. 1F), which expressed the specific morphology of ramified microglia—small soma with extensive radial ramifications. The viability of these cells post 14 days was  $16.7\% \pm 4.2$  ( $n = 3$ , mean  $\pm$  SEM) as compared to the initial cell number (DAY 0). Interestingly, the earliest branched cells were observed on DAY 3 after GM-CSF and IL-34 treatment (Supplementary Fig. S1A). In addition, we confirmed that these cells survive at least one month when medium change was performed once a week (Supplementary Fig. S1B).

**Phenotyping of the induced microglia-like (iMG) cells.** Next, we tested whether the ramified microglia-like cells, named *induced microglia-like (iMG) cells*, have microglial characterization. Generally, it is difficult to distinguish between macrophage and microglia, because useful and specific microglial markers are very limited. Traditionally, CD11b and CD45 are used as a distinction marker between macrophage and microglia<sup>26</sup>. Recently, the phenotype of human microglial cells, isolated from the fresh postmortem brain, has been revealed to have lower expression of CD14 and CD200R compared to macrophage<sup>27</sup>. Thus, we compared the expression level of surface markers between iMG cells and induced macrophage using flow cytometry. The expression level of CD11b on iMG cells did not differ from that on macrophage, while that of CD45 decreased on iMG cells (Fig. 2A). The expression levels of CD14 and CD200R were also decreased on iMG cells compared to those on macrophage (Fig. 2B), which support that iMG cells have the specific phenotype of microglia<sup>27</sup>. Furthermore, Mizutani et al.<sup>28</sup> recently reported a clear-cut distinction between monocytes (CCR2<sup>high</sup>, CX3CR1<sup>low</sup>) and resident microglia (CCR2<sup>low</sup>, CX3CR1<sup>high</sup>) using CX3CR1<sup>+/GFP</sup>CCR2<sup>+/RFP</sup> knockin fluorescent protein reporter mice. Therefore, we compared the expression pattern of CCR2 and CX3CR1 between monocytes and iMG cells. Monocytes were stained with bright red fluorescence (CCR2) bearing round or elliptic morphology (Fig. 2C), and iMG cells were stained with bright green fluorescence (CX3CR1) bearing highly branched forms (Fig. 2, C and D). In addition, we confirmed that the expression ratio (CX3CR1/CCR2) of iMG cells is significantly higher than that of monocytes by flow cytometry (Fig. 2E). These results indicate that the iMG cells induced by GM-CSF and IL-34 show the essential characteristics of resident microglia<sup>28</sup>.

Melief et al.<sup>27</sup> have also revealed that IL-4 and dexamethasone alter specific gene expressions in fresh human microglial cells ([IL-4] HLA-DR, CCR7, CCL18, and CD200R are upregulated, and CD45 and TNF- $\alpha$  are downregulated; [dexamethasone] CCL18 is upregulated, and HLA-DR, CCR7, CD45, TNF- $\alpha$ , and CD200R are downregulated). Therefore, we assessed the above gene expression patterns in iMG cells incubated with IL-4 and dexamethasone using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Except for CCL18 (treated with dexamethasone), almost all gene expression patterns (HLA-DR, CCR7, CD200R, CD45 and TNF- $\alpha$ ) in the iMG cells were in agreement with the above data using fresh human microglia<sup>27</sup> (Fig. 2F, G).

**Functional analysis of the iMG cells.** Microglia reside as a ramified form, and various molecules activate microglia into an amoeboid form, phagocytizing and releasing various cytokines<sup>3</sup>, and overactivation of microglia induces neuronal damage and various brain pathologies via pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$ <sup>6,7</sup>. To examine whether iMG cells have these dynamic functions, we tested the phagocytosis ability and the following TNF- $\alpha$  secretion. Interestingly, the iMG cells showed the ability of phagocytosis with morphological changes into an amoeboid form (Fig. 3A). Next, we tested the ability for TNF- $\alpha$  production during phagocytosis on the iMG cells, and revealed that the mRNA expression and protein level of TNF- $\alpha$  on





**Figure 2** | The iMG cells show the character of human resident microglia. (A and B) The expression levels of surface markers on the iMG cells and induced macrophage were performed by flow cytometer. Peripheral monocytes were incubated with GM-CSF (macrophage) or cocktail of GM-CSF and IL-34 (iMG cells) for 14 days. The iMG cells showed the specific phenotypes of microglia compared to macrophage. (C to E) The expression pattern of CCR2 and CX3CR1 between monocytes and iMG cells were observed by immunocytochemistry. The monocytes and iMG cells were cultured for 14 days, and stained with specific antibodies. (C and D) The iMG cells were stained with bright green fluorescence (CX3CR1) bearing highly branched forms. Scale bar, 50  $\mu$ m. (E) The expression ratio (CX3CR1/CCR2) of iMG cells was significantly higher than that of monocytes by flow cytometry ( $n = 3$ ). The iMG cells were incubated with IL-4 (F) or dexamethasone (G) for 72 hours, and extracted RNA was analyzed by qRT-PCR ( $n = 6$ ). Fold changes were depicted in mRNA levels after stimulation compared with unstimulated cells. \* $P < 0.05$ . Error bars, standard error of the mean (SEM).

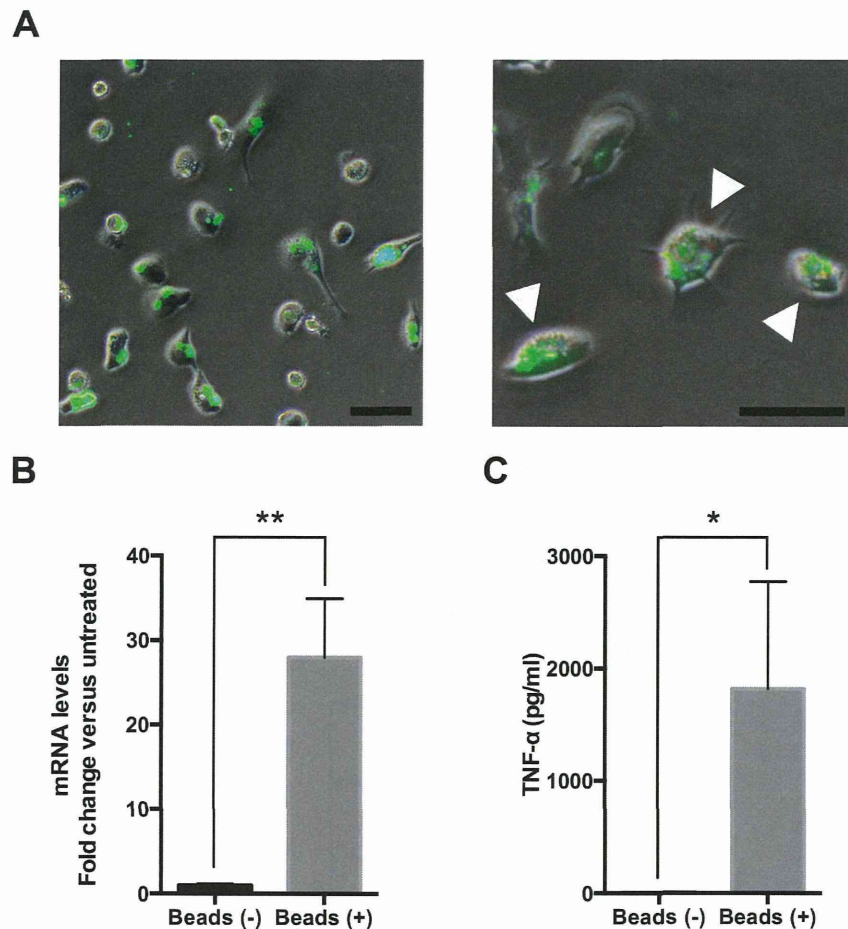
the iMG cells during phagocytosis are significantly higher compared to those on non-treated cells (Fig. 3, B and C).

**Analysis of the iMG cells from a patient of NHD.** The above results demonstrated that the iMG cells have the dynamic functions of human microglia, and we suggest that iMG cells have the possibility to be utilized for analyzing the underlying microglial pathophysiology of brain disorders. As the initial step, we conducted the first translational analysis of the iMG cells derived from a patient of NHD. NHD is believed to be caused by microglial dysfunction, while no investigation exists using living human microglial cells from patients of NHD. We analyzed the dynamic functions of microglia using the iMG cells from a patient of NHD (141delG in DAP12 gene), after obtaining informed consent (under the permission of the Institutional Review Board of Kyushu University and Osaka University). In agreement with genetic diagnosis, the iMG cells from the NHD patient showed significantly lower expression of DAP12 than those from a healthy control, and there was no difference in TREM2 expression (Fig. 4A). Interestingly, the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) was delayed in the iMG cells from the NHD patient as compared to those from the healthy control after 24 hours. Furthermore, the iMG cells from the patient showed a

significantly lower level of anti-inflammatory cytokine (IL-10) than those from the healthy control. The production levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-8) had no significant differences between the NHD and healthy control after 72 hours (Fig. 4B). Next, we examined whether it is possible for iMG cells from the healthy control to silence the target gene with siRNA (DAP12). DAP12 was successfully downregulated in the iMG cells from the healthy control (Supplementary Fig. S2). We assessed the cytokine production of iMG cells treated with siRNA. Predictably, the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) was delayed in the DAP12-silenced iMG cells as compared to the control (Fig. 4C).

## Discussion

We have shown a novel technique for developing directly induced microglia-like cells from human peripheral blood cells. GM-CSF and IL-34 converted human monocytes into iMG cells within 14 days. The iMG cells have microglial characterizations; expressing markers, forming a ramified morphology, and phagocytic activity with various cytokine releases. Until now, some attempts to induce microglia-like cells from hematopoietic cells have been performed using an astrocyte co-culture system or astrocyte-conditioned media<sup>29,30</sup>, and GM-CSF and IL-34 are known to be derived from astrocytes<sup>30,31</sup>.



**Figure 3 | Dynamic functional analysis of the iMG cells.** (A) The iMG cells were incubated with FITC-conjugated latex beads for 24 hours, and phagocytic activity was observed by fluorescent microscopy. The iMG cells showed the ability of phagocytosis with morphological changes into an amoeboid form (arrow head). Scale bar, 50  $\mu$ m. (B and C) The ability of TNF- $\alpha$  production during phagocytosis was measured on the iMG cells. The iMG cells were incubated with latex beads for 72 hours. The extracted RNA and culture supernatant were analyzed by qRT-PCR and Cytometric Beads Array System (CBA), respectively. The mRNA expression (B) and protein level of TNF- $\alpha$  (C) on the iMG cells were significantly higher compared to controls (B,  $n = 4$ ; C,  $n = 6$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ . Error bars, SEM.

Especially, IL-34 has recently come to be known as a key molecule for the proliferation of microglia<sup>32</sup>. The present data have suggested that both GM-CSF and IL-34 from astrocytes are the minimum essential inducing-factors for microglia-like cells from hematopoietic cells.

The present results indicate that the iMG cells from a patient of NHD show slower (24 h) but not weaker (72 h) pro-inflammatory cytokines' responses compared to those from the healthy control, possibly due to the deletion of DAP12. In addition, suppression of IL-10 production from the iMG cells from the NHD patient indicates that human brain microglia of NHD patients tend to be shifted to pro-inflammatory reactions compared to those of healthy controls. Furthermore, the situation observed in the iMG cells from a NHD patient was replicated with iMG cells from a healthy control using siRNA. These data have suggested that DAP12 expression is a key factor in from the perspective of microglial immunoresponse such as cytokine production in NHD patients. In the present study, we examined the iMG cells from a female patient of NHD. Recent studies have suggested microglial functional differences between sexes<sup>33</sup>. Further investigations should focus on sex differences related to microglial dysfunction of NHD. DAP12 and TREM2 are the responsible genes of NHD, which mediate various important roles such as phagocytosis and cytokine production in osteoclasts, macrophages, dendritic cells and microglia<sup>34</sup>. A rodent study showed that deletion of

DAP12 induces synaptic impairments due to microglial dysfunction<sup>15</sup>. Hamerman et al.<sup>35</sup> demonstrated that macrophage from DAP12-deficient mice increase inflammatory cytokines' responses, which suggest that DAP12-deleted microglia increase similar inflammatory response. These previous reports and our present findings based on the iMG cells from a NHD patient suggest that human NHD microglia has the potential to induce stronger and long-acting pro-inflammatory reactions compared to those of healthy human subjects.

In sum, we have shown a novel technique of developing directly induced microglia-like cells, named "iMG cells", with a combination of GM-CSF and IL-34 from adult human monocytes, easily and quickly without any virus, feeder cells, and genetic engineering. The iMG cells proved to have many characterizations of microglial cells, such as expressing CD11b<sup>high</sup>/CD45<sup>low</sup> and CX3CR1<sup>high</sup>/CCR2<sup>low</sup>. Moreover, the iMG cells expressed dynamic functions such as phagocytosis and releasing pro- and anti-inflammatory cytokines. Further investigations such as microarray analysis should be conducted to validate the closeness of iMG cells to human primary microglial cells in the brain. Finally, we presented the translational utilities of the iMG cells for analyzing the underlying microglial pathophysiology of NHD. We believe that this novel technique will shed new light on solving unknown dynamic aspects of human microglial cells in various brain disorders.