

ヒト誘導ミクログリアを用いた炎症性シグナルに関する研究

研究分担者 酒井 康成

研究協力者 米元 耕一

九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野(小児科学)

研究要旨

小児急性脳症の発症には、遺伝的要因および環境要因のいずれもが関与する。本研究は、ヒト末梢血由来・誘導ミクログリア様細胞（induced microglia-like cells, iMG）を用いて、健常者および急性脳症罹患児 iMG における自然免疫リガンドに対する自然免疫シグナルの活性化の差異を検証することを目的とする。研究初年度は、iMG を樹立するための条件を最適化した。またヒト iMG を構成する細胞群の不均一性と多様性が支持された。本年度の研究成果にもとづき、急性脳症患児由来 iMG にみられる自然免疫シグナルの特徴を今後さらに明らかにする。

A. 研究目的

ミクログリアは脳内免疫担当細胞として、神経炎症性疾患(Neuroinflammatory diseases, NID)の進行・保護において重要な役割を果たす。今回、神経炎症性疾患患児より末梢血単核球由来・ヒト誘導ミクログリア（induced microglia-like cells, iMG）を誘導し、自然免疫リガンドへの応答性について検証した。

B. 研究方法

倫理的配慮：本研究計画は九州大学臨床研究倫理委員会の承認を得た。各患児の両親に研究の趣旨について丁寧に説明し、文章による同意を得た後に患児血液を採取した。

研究手順：単球表面抗原に対する磁気ビーズを用い、小児神経炎症性疾患患児（24 名）と健常コントロール（22 名）の末梢血から CD11b 陽性単球成分を分解した。研究室で確立された方法に従い、iMG を分化・誘導した。樹立した iMG を自然免疫リガンド（LPS および poly-

I:C）で活性化させ、刺激後の mRNA および上清、細胞を回収した。

C. 研究結果

採血量を 3-5ml に抑え、解析に必要な iMG を樹立するためのプロトコルを確立した。両リガンドによる刺激後、I 型インターフェロンおよび炎症性サイトカインの mRNA 発現上昇を認めた。また、刺激後上清中の炎症性サイトカインの濃度上昇を確認した。iMG の免疫応答性は、患者群とコントロール群の間では差は見られなかった。各個体由来 iMG における NF- κ B 依存性遺伝子（*IL1B* および *TNF*）と I 型インターフェロン遺伝子（*IFNA1* および *IFNB1*）の発現レベルを解析したところ、LPS と poly-I:C に対して異なる反応パターンを示した。フローサイトメトリーにより、iMG は CD14 高発現群と低発現群の細胞集団に分離され、その比率に個体差を認めることが分かった。LPS 刺激後の IL-1 β 発現は、CD14 高発現群の比率と正の相関を示した。両リガンドは共通してミトコンド

リア不安定性とピルビン酸キナーゼアイソフォーム M2 (PKM2) の発現を誘導した。さらに、PKM2 の強力な活性化剤 (DASA-58) は、LPS 刺激後の IL-1 β 産生を減弱させた。

D. 考察

異なる個体由来の iMG は様々な割合の CD14 高発現細胞を有しており、この不均一性が LPS 刺激に対する IL-1 β 産生に大きく寄与している。一方、TNF α や I 型インターフェロンなどの他のサイトカイン産生に関する iMG 細胞の不均一性と多様性には、未知の因子や分子経路が多次元的に関与していると考えられる。

E. 結論

不均一な細胞集団とミトコンドリアの安定性が、生育環境におけるヒト iMG の多様な免疫反応性の根底にあることが示唆された。我々のデータは、ヒト iMG が小児期の様々な神経炎症性疾患の根底にある発症メカニズムを解明するのに役立つことを示す。

[参考文献]

[雑誌]

Masuda T., et al. Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566, 388–392 (2019)

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yonemoto K, Fujii F, Taira R, Ohgidani M, Eguchi K, Okuzono S, Ichimiya Y, Sonoda Y, Chong PF, Goto H, Kanemasa H, Motomura Y, Ishimura M, Koga Y, Tsujimura K, Hashiguchi T, Torisu H, Kira R, Kato T, Sakai Y*, Ohga S. Heterogeneity and mitochondrial vulnerability configure the divergent immunoreactivity of human induced microglia-like cells. *Clin Immunol* 2023; 255: 109756.

Ogata R, Watanabe K, Chong PF, Okamoto J, Sakemi Y, Nakashima T, Ohno T, Nomiyama H, Sonoda Y, Ichimiya Y, Inoue H, Ochiai M, Yamashita H, Sakai Y*, Ohga S. Divergent neurodevelopmental profiles of very-low-birth-weight infants. *Pediatr Res* 2023; 95:233-240.
Ichimiya Y, Chong PF, Sonoda Y, Tocan V, Watanabe M, Torisu H, Kira R, Takahashi T, Kira JI, Isobe N, Sakai Y*, Ohga S. Long-lasting pain and somatosensory disturbances in children with myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease. *Eur J Pediatr* 2023; 182: 3175-3185.

2. 学会発表

米元耕輔、藤井史彦、平良遼志、チョンピンフィー、扇谷昌宏、加藤隆弘、酒井康成、大賀正一：ヒト誘導ミクログリアにおける細胞不均一性の解析. 第 64 回日本小児神経学会学術集会, 高崎, 2022. 6. 3

米元耕輔、藤井史彦、平良遼志、扇谷昌宏、奥園清香、チョンピンフィー、吉良龍太郎、加藤隆弘、酒井康成、大賀正一：ヒト誘導ミクログリアを用いた炎症性シグナルの解析. 第 65 回日本小児神経学会学術集会, 岡山, 2023. 5. 25

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし