



Title	自己免疫疾患における精神神経学的側面と病態生理の関連に関する研究
Author(s)	阿部, 靖矢
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14697号
Issue Date	2021-09-24
DOI	10.14943/doctoral.k14697
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/90696
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2642
File Information	Nobuya_Abe.pdf



[Instructions for use](#)

学 位 論 文

自己免疫疾患における精神神経学的側面と
病態生理の関連に関する研究

**(Altered neuropsychiatric aspect and pathophysiology
in autoimmune disorders including systemic lupus
erythematosus and inflammatory arthritis)**

2021 年 9 月

北海道大学

阿部 靖矢

Nobuya Abe

学 位 論 文

自己免疫疾患における精神神経学的側面と
病態生理の関連に関する研究

**(Altered neuropsychiatric aspect and pathophysiology
in autoimmune disorders including systemic lupus
erythematosus and inflammatory arthritis)**

2021 年 9 月

北海道大学

阿部 靖矢

Nobuya Abe

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	7
1. 要旨.....	9
2. 略語表.....	13
3. 緒言.....	16
4. 第一章 慢性睡眠障害ストレスの精神神経ループス病態への関与.....	18
4.1 緒言.....	19
4.2 目的.....	21
4.3 MRL/lpr マウスにおける慢性睡眠障害ストレスモデルの作成.....	22
4.3.1 方法.....	23
4.3.1.1 睡眠障害ストレス負荷.....	23
4.3.1.2 概日リズム障害とストレス負荷の検証.....	23
4.3.2 結果.....	25
4.3.3 結論.....	29
4.4 慢性睡眠障害ストレスによる MRL/lpr の行動変化.....	30
4.4.1 方法.....	31
4.4.1.1 高架式十字迷路試験 (EPM).....	31
4.4.1.2 オープンフィールド試験 (OF).....	31
4.4.2 結果.....	32
4.4.3 結論.....	36
4.5 SD 負荷 MRL/lpr マウスの活性化脳領域の探索.....	37
4.5.1 方法.....	39
4.5.1.1 ストレス関連脳領域における免疫組織化学.....	39
4.5.1.2 神経活性化の定量化.....	39
4.5.2 結果.....	40
4.5.3 結論.....	50

4.6 SD 負荷 MRL/lpr の前頭前皮質の分子生物学的評価	51
4.6.1 方法.....	52
4.6.1.1 前頭前皮質 RNA sequencing (RNA-seq)による遺伝子発現解析.....	52
4.6.1.2 定量的 real-time polymerase chain reaction (PCR) 法	52
4.6.1.3 マウス血清・髄液における蛋白量の測定	53
4.6.2 結果.....	54
4.6.3 結論.....	69
4.7 IL-12/23p40 の中枢神経系における産生・標的細胞.....	70
4.7.1 方法.....	73
4.7.1.1 中枢神経系細胞の免疫組織化学染色による解析.....	73
4.7.1.2 活性化ミクログリアの定量解析.....	73
4.7.1.3 中枢神経系細胞の単細胞化と FCM による解析	75
4.7.1.4 Golgi-Cox 染色による神経軸索突起スパイン評価・定量.....	77
4.7.1.5 Recombinant IL-12/23p40 の mPFC への定位微量注射.....	77
4.7.2 結果.....	78
4.7.3 結論.....	93
4.8 IL-12/23 シグナル経路抑制による SD 負荷 MRL/lpr の表現型改善.....	94
4.8.1 方法.....	95
4.8.1.1 抗 IL-12/23p40 抗体の浸透圧ポンプを用いた脳室内持続投与	95
4.8.1.2 Tyk2 阻害薬の全身投与.....	95
4.8.2 結果.....	98
4.8.3 結論.....	117
4.9 ループスモデルマウス実験結果の NPSLE 患者への外挿.....	118
4.9.1 方法.....	120
4.9.1.1 SLE 患者の臨床データ収集	120
4.9.1.2 髄液・血清ヒト検体の収集	120
4.9.1.3 ELISA によるヒト IL-12/23p40 濃度の定量.....	121
4.9.1.4 脳 MRI 取得, 前処理と VBM 解析	121
4.9.2 結果.....	123
4.9.3 結論.....	149
4.10 考察	150
4.11 結語.....	154

5. 第二章 炎症性関節炎における安静時脳機能的結合と疾患活動性の連関.....	156
5.1 緒言.....	157
5.2 目的.....	158
5.3 方法.....	159
5.3.1 患者および参加者.....	159
5.3.2 画像取得パラメータ設定.....	160
5.3.3 画像処理と時系列データ抽出.....	161
5.3.4 静的機能的連関解析.....	167
5.3.5 動的機能的連関解析.....	168
5.3.6 次元削減.....	169
5.3.7 統計解析.....	169
5.4 結果.....	170
5.4.1 炎症性関節炎患者に特異的な静止脳機能的連関.....	170
5.4.2 炎症性関節炎患者における左 IC 詳細領域と ACC 間の 静的脳機能連関の正確な 治療反応予測性.....	182
5.4.3 動的脳機能的連関パターンによる治療反応性予測と臨床指標との相関性.....	202
5.4.4 左前長島回と ACC を含む皮質間動的脳機能連関による治療反応性予測.....	218
5.5 考察.....	222
5.6 結語.....	224
6. 総括.....	226
7. 謝辞.....	228
8. 利益相反.....	230
9. 引用文献.....	231

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は下記の論文として投稿した.

1. Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Kenji Oku, Nobuhiko Takahashi, Masato Tarumi, Kohei Karino, Mona Uchida, Michihito Kono, Yuki Tanaka, Rie Hasebe, Masaru Kato, Olga Amengual, Khin Khin Tha, Yoshiyuki Arinuma, Wakiro Sato, Miwako Yamasaki, Masahiko Watanabe, Tatsuya Atsumi, and Masaaki Murakami. Pathogenic neuropsychiatric effect of chronic stress-induced microglial interleukin-12/23 axis in systemic lupus erythematosus. *Nature Medicine*, submitted.
2. Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Khin Khin Tha, Hisashi Narita, Kuniyuki Aso, Kohei Karino, Masatoshi Kanda, Michihito Kono, Masaru Kato, Olga Amengual, Kenji Oku, and Tatsuya Atsumi. Altered resting-state functional coordination associated with interoception dominating disease activity in inflammatory arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, submitted.

本研究の一部は下記の学会で発表した.

1. Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Kohei Karino, Michihito Kono, Masaru Kato, Toshiyuki Bohgaki, Shinsuke Yasuda, and Tatsuya Atsumi. Enhanced resting-state functional connectivity of pain processing regions associated with insufficient response to biologics in inflammatory arthritis. 第 63 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2019 年 4 月 15 日, 京都.
2. 阿部 靖矢, 奥 健志, 狩野 皓平, 河野 通仁, 藤枝 雄一郎, アメングアル オルガ, 田中 勇希, 上村 大輔, 保田 晋助, 村上 正晃, 渥美 達也. マウスモデルにおける抗リン脂質抗体の精神神経症状や中枢神経系細胞への影響, 第 47 回日本臨床免疫学会総会, 2019 年 10 月 19 日, 札幌
3. Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Kuniyuki Aso, Kohei Karino, Michihito Kono, Hisashi Narita, Masaru Kato, Kenji Oku, Khin Khin Tha, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, and Tatsuya Atsumi. Resting-State Functional Connectivity of Pain Processing Brain Region Associated with Therapeutic Response to Biologics in Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis. The American College of

Rheumatology/The Association of Rheumatology Health Professionals 2019 Annual Meeting, Atlanta, USA, 11 Nov. 2019.

4. Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Kuniyuki Aso, Kohei Karino, Michihito Kono, Hisashi Narita, Masaru Kato, Kenji Oku, Khin Khin Tha, Olga Amengual, Shinsuke Yasuda, and Tatsuya Atsumi. Resting-State Functional Connectivity of Pain Processing Brain Region Associated with Therapeutic Response to Biologics in Rheumatoid Arthritis and Spondyloarthritis. The American College of Rheumatology/The Association of Rheumatology Health Professionals 2019 Annual Meeting, Atlanta, USA, 11 Nov. 2019.
5. Nobuya Abe, Kenji Oku, Yuki Kudo, Kohei Karino, Michihito Kono, Yuichiro Fujieda, Olga Amengual, Masaru Kato, Daisuke Kamimura, Shinsuke Yasuda, Masaaki Murakami, and Tatsuya Atsumi. The effect of antiphospholipid antibody on cognitive function and microglial activation in mice. 第 64 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2020 年 8 月 17 日-9 月 15 日, WEB 開催.
6. Nobuya Abe, Kenji Oku, Yuichiro Fujieda, Nobuhiko Takahash, Kohei Karino, Michihito Kono, Masaru Kato, Yuki Tanaka, Rie Hasebe, Olga Amengual, Miwako Yamasaki, Masahiko Watanabe, Masaaki Murakami, and Tatsuya Atsumi T. Pathogenic Effect of Chronic Stress-induced interleukin-12/23p40 on Neuropsychiatric System in Lupus-prone Mouse. The American College of Rheumatology Convergence 2020, 7 Nov. 2020, Online.
7. 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. 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. 第 65 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2021 年 4 月 28-5 月 31 日, WEB 開催.
8. Nobuya Abe, Yuichiro Fujieda, Hisashi Narita, Michihito Kono, Masaru Kato, Kenji Oku, Khin Khin Tha, and Tatsuya Atsumi T. Alternation of interoceptive functional connectivity between left insular cortex and anterior cingulate cortex relevant to disease activity in inflammatory arthritis. 23rd Asia-Pacific League of Associations for Rheumatology Virtual Congress, 28-31 Aug. 2021, Kyoto, Japan.

1. 要旨

脳は生物の恒常性を維持に働くが、病的状態においては恒常性破綻をもたらさしめる。精神・神経疾患の病態において、脳による神経生物学的調節の関与を示す報告は多いが、全身性自己免疫疾患においては未だ明らかではない。脳機能の観点から、自己免疫疾患の病態生理を解析することで、神経免疫学的な新規治療法の開発に役立つと考えられる。

<第一章>

【背景と目的】全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) は若年女性に好発する自己免疫性疾患であり、様々な臓器障害を認める。中でも重要臓器病変である精神神経ループス (neuropsychiatric SLE: NPSLE) の発症機序として、血液脳関門の破綻や血管閉塞による虚血、自己抗体やサイトカインによる直接的神経障害やミクログリアの活性化が想定されているが、依然として病態生理は不明な点が多く、その解明は新規治療法の確立に重要である。一方で、多様な心身の変化を誘導する精神・身体ストレスは免疫へ影響を与え、臨床研究で自己免疫疾患のリスクであることが示されている他、実験的自己免疫性脳炎マウスモデルで、睡眠障害ストレスが直接脳内の微小炎症を増悪させ、突然死をもたらす。NPSLEにおいても、精神・身体ストレスが発症機序に直接関与している可能性があるものの、メカニズムは明らかではなく、その解明は脳内の細胞を標的とした新規治療・予防法の確立に繋がりうる。SLEモデルマウスの精神神経病態において、中枢神経系細胞へ睡眠障害ストレスが与える影響を解析し、びまん性精神神経症状 (diffuse manifestation) を示す NPSLE 患者 (dNPSLE) の新規治療・発症予防法の確立を目的とした。

【方法】SLEモデルマウスとして、6-8週齢で雌の MRL/MpJ-Fas^{lpr}/J (MRL/lpr) を、コントロールマウスとして MRL/MpJ.JmsSlc-+/+ (MRL/MpJ) を使用した。睡眠障害ストレス (sleep disturbance stress: SD) ケージにマウスを2週間配置し、行動試験を含めた解析を行った。行動試験は不安様行動を測定する高架式十字迷路 (elevated plus maze test: EPM) を採用した。解析では、ストレス感受性の脳領域について、神経活性化評価目的にリン酸化 cFos (p-cFos) による免疫組織化学を実施した。更なる評価目的にマウスから前頭皮質を肉眼的に切除し、RNA sequencing (RNA-seq) 法による網羅的遺伝子発現解析を実施し、ストレス負荷を受けた MRL/lpr マウスの特徴的な遺伝子・パスウェイの変化を評価するとともに、定量的 real-time PCR 法による検証、および、髄液を用いてマルチプレックス

ビーズアッセイや Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法による蛋白定量を実施した。これらの結果から興味分子について、ミクログリア活性化・サイトカイン産生、神経のシグナル下流因子リン酸化や神経樹状突起の形態学的変化について、それぞれ免疫組織化学、フローサイトメトリー (flowcytometry: FCM) や Golgi-Cox 染色を行った。また、興味分子に対する中和抗体や阻害薬をマウスに投与し、表現型の改善を評価した。最後に、解析対象分子について、dNPSLE 患者、non-dNPSLE 患者と健常者の髄液・血清を用いて ELISA による定量化を、北海道大学病院と北里大学病院のコホートで実施した。また、北海道大学病院で脳磁気共鳴画像を撮像した dNPSLE を含む SLE 患者で voxel-based morphometry 法 (VBM) による脳領域容積解析を実施した。これらの結果と臨床特徴、指標について相関解析した。

【結果】EPM で、SD 負荷 MRL/MpJ では通常のマウスモデル同様に慢性ストレス負荷で不安様行動が増強したが、SD 負荷 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で、内側前頭前皮質 (medial prefrontal cortex: mPFC) に着目し、SD 負荷 MRL/lpr では、SD 非負荷 MRL/lpr や SD 感受 MRL/MpJ と比べて p-cFos 陽性細胞は有意に増加した。PFC のトランスクリプトーム解析で、SD 負荷 MRL/lpr で特異的変動のある 3124 遺伝子を同定した。SD 負荷 MRL/lpr で発現亢進した 1863 の遺伝子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おり、炎症関連遺伝子の解析では、*H2-Eb1*, *Nos2* や *Il12b* などのミクログリア活性化遺伝子の発現亢進と *Arg1* などのミクログリア不活性化遺伝子の発現減少を認めた。SD 負荷 MRL/lpr の髄液では、*Il12b* にコードされる IL-12/23p40 の濃度が有意に高値であった。RNA-seq 解析結果の通り、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。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 の表現型はキャンセルされた。当院コホートにおける SLE 患者の髄液で、dNPSLE 患者が non-dNPSLE 患者よりも IL-12/23p40 は高値で、これは北里大学病院のコホートでも同様だった。VBM 解析で、dNPSLE 患者は non-dNPSLE 患者に比べ、有意な mPFC 萎縮があった。

【考察】IL-12/23p40 は IL-12 と IL-23 に共通するサブユニットであり、その中和抗体やシグナル下流酵素である Tyk2 の阻害薬は乾癬や Crohn 病などで既に臨床応用されている。また、mPFC は NPSLE 患者で構造変化や代謝異常が報告されている領域であり、dNPSLE でみられる脱抑制性の精神異常と神経学的な観点から

関連があると考えられる。また、dNPSLE 患者で多くみられるグルココルチコイドによる精神症状増悪も mPFC の機能障害が誘発されている可能性がある。SLE の背景としてサイトカインによる向炎症状態があり、ストレスにより誘導される IL-12/23p40 にプライムされたミクログリアや神経細胞が、dNPSLE の表現型に関わる可能性が考えられ、IL-12/23 シグナル経路の阻害は dNPSLE の特異的な治療標的となりうる。

【結論】ループモデルマウスにおいて、ストレスで誘導される IL-12/23 シグナル経路はミクログリア活性化や神経の形態学的変化を誘導した。dNPSLE 患者でも、IL-12/23p40 の特異的発現亢進が示唆され、この経路を標的とした治療は dNPSLE の新たな治療となりうる。

<第二章>

【背景と目的】炎症性関節炎 (Inflammatory arthritis: IA) の疾患活動性を評価し、治療方針を決定するためには、個人の脳機能を分析し、疼痛感受性や炎症状態を理解することが重要である。しかし、患者の痛覚に関する脳機能と治療感受性の関連性を評価する方法は確立されていないため、課題となっている。安静時脳機能的 MRI (resting-state functional MRI: rs-fMRI) で、IA 患者における縦断的な臨床指標と脳機能連関との相関評価を目的とした。

【方法】疾患に特徴的な脳機能的連関の変化を同定し、抗リウマチ治療への有効性の予測性を評価するために、IA 患者、変形性関節症患者および健常対照者の rs-fMRI データを分析した。静的および動的脳機能的連関指標を疾患別または治療反応性に応じて比較し、導出および検証のために 2 つのデータセットを用いた。

【結果】IA 患者では、変形性関節症患者や健常者と比べて、内受容感覚に関する左島皮質 (insular cortex: IC) と前帯状皮質 (anterior cingulate cortex: ACC) の静的脳機能的連関が特異的に変化していることを確認した。左 IC の詳細領域である左前長島回と ACC の静的機能的結合は、IA 患者の全般的疾患活動性評価の改善の有無から、抗リウマチ薬の治療効果を予測できることを実証した。また、IC と ACC を含む脳皮質領域間の動的機能的連関推移も同様に、IA の疾患活動性と相関した。

【考察】IC と ACC は大脳辺縁系に含まれ、自律神経、代謝、免疫の状態を推定・

調和するための身体の生理学的状態に対する感覚である「内受容感覚」に関わる。IA 患者における ACC-IC 間の機能的結合の低下は、身体の恒常性維持に関連する感受や予測運動の異常から、適切な抗リウマチ治療にもかかわらず疾患活動性の持続や治療満足度の低さへと繋がっている可能性がある。

【結論】 rs-fMRI で評価された脳機能的連関の違いは、IA における疾患活動性に対する脳機能の優位性を示唆し、また、疾患の病態を推測する手段となりうる。また、IA 患者の適切な治療予測を可能にする有用な臨床的意思決定手段となるかもしれない。

本研究により、精神神経学的な観点から自己免疫疾患の病態を解析することで、新たな病態生理の解明と治療標的、および神経生物学的マーカーの発見につながった。

2. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ACC	anterior cingulate cortex
ACR	American College of Rheumatology
ACS	acute confusional state
ASAS	Assessment of SpondyloArthritis international Society
ASDAS-CRP	Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score based on CRP
AUC	area under the curve
BASDAI	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BASFI	Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index
BSA	bovine serum albumin
BOLD	blood oxygenation level-dependent
CCL	C-C chemokine ligand
cDNA	complementary DNA
CI	confidence interval
CNS	cerebral nervous system
CRP	C-reactive protein
CXCL	C-X-C chemokine ligand
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAS28-CRP	Disease Activity Score 28 based on CRP
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGA	evaluator's global assessment
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPM	elevated plus maze test
ETL	echo train length
EQ-5D-5L	EuroQol 5 dimensions 5 level
FWE	family-wise error
FCM	flowcytometry
FIQR	Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire
FLAIR	fluid-attenuated inversion recovery
fMRI	functional magnetic resonance imaging
GO	Gene Ontology
HBSS	Hanks' balanced salt solution

HLA	human leukocyte antigen
IA	inflammatory arthritis
IC	insular cortex
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC	locus coeruleus
mHAQ	modified Health Assessment Questionnaire
mPFC	medial prefrontal cortex
MPRAGE	magnetization-prepared rapid gradient echo
MRI	magnetic resonance imaging
NAc	nucleus accumbens
MNI	Montreal Neurological Institute
NPSLE	neuropsychiatric systemic lupus erythematosus
OF	open field test
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	paraformaldehyde
PGA	patient's global assessment
PVN	paraventricular nucleus
RA	rheumatoid arthritis
RNA-seq	RNA sequencing
ROC	receiver operating characteristic
ROI	region of interest
SD	sleep disturbance stress
SDAI	simplified disease activity index
SDI	SLICC/ACR damage index
SLE	systemic lupus erythematosus
SLEDAI-2K	SLE disease activity index 2000
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
SpA	spondyloarthritis
TE	Echo Time
TI	Inversion Time
TNF	tumor necrosis factor
TR	Repetition Time
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection

VBM voxel-based morphometry
VTA ventral tegmental area

3. 緒言

脳は神経伝達を介して、生物の生命維持に必要な知覚、運動調節、認知、感情や知性をコントロールする中心的役割を担う臓器である (Bressler and Menon, 2010; Damasio and Carvalho, 2013; Rizzolatti and Sinigaglia, 2016; Romo and Rossi-Pool, 2020). 脳は更に自律神経と相互作用し、神経内分泌システムを介して、生物の恒常性を維持し、これには中枢・末梢性免疫調節も含まれている (Dantzer, 2018; Ulrich-Lai and Herman, 2009). 様々な精神疾患や神経変性疾患の発症機序に対して、神経生物学的な調節が関与していることが多くの研究で示されている一方で、全身性自己免疫疾患においてはその関与は未だ明らかにはなっていない (Chavan et al., 2017; Dantzer, 2018). 例えば、自己免疫性炎症性関節炎 (inflammatory arthritis: IA) である関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) や脊椎関節炎 (spondyloarthritis: SpA) においては、脳の機能が免疫機能や疼痛知覚に関与して、全身性炎症状態や患者自身の痛みの評価に影響を与えうる (Basu et al., 2018; Bidad et al., 2017; Chavan et al., 2017; Hemington et al., 2016; Schrepf et al., 2018). そのため、脳機能の変化が、自己免疫疾患において知覚や自己免疫にどのような影響を与え、その臨床経過に変化をもたらすのかを解析することは、自己免疫疾患の新規病態生理の解明や、神経免疫学的な新規治療法の開発に役立つと考えられる. 以上から、我々は自己免疫疾患のうち、難治性神経病態を臨床症状としうる全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) と脳機能と知覚の関連が疾患活動性や治療方針に影響を与える IA の2疾患に焦点を当てた.

SLEは20-40歳代の女性に好発する慢性自己免疫疾患であり、妊娠適齢期に多く発症することから、発症患者の人生に多大な影響を及ぼし得る. 抗核抗体や抗二本鎖 DNA 抗体などの多様な自己抗体産生を背景として、皮疹、関節炎、漿膜炎や血液学的異常などの軽症病変から、腎炎や中枢神経障害などの致命的病態を含む、幅広い重症度の多臓器病変を特徴とする (Kaul et al., 2016). 中でも、中枢神経病態は50%程度の患者で見られ、頭痛、脳血管障害、不安、気分障害、認知機能障害、痙攣、精神病や急性昏迷状態 (acute confusional state: ACS) と呼ばれるせん妄など、多彩な臨床症状を示す. この中枢神経病態は精神神経 SLE (neuropsychiatric SLE: NPSLE) と呼ばれ、SLEにおける最重症臓器病変の一つである. NPSLEは、精神的または神経心理学的徴候などのびまん性徴候を示す diffuse NPSLE と脳卒中、痙攣、末梢神経障害、脊髄症や脱髄症候群などの局在性徴候を示す focal NPSLE に更に分類される. Focal NPSLEは、血栓性・虚血性血管

障害による局所的な神経障害が原因と考えられているが、diffuse NPSLE の病態生理は未だに明らかではない。我々は、精神神経疾患の病態や臨床経過に影響を与える精神身体ストレスが (McEwen, 2007), NPSLE の脳機能や病態生理に対してどのように影響を与えるのかについての検討が現在までほとんどされていない点に着目し、新規の病態生理や治療法の解析・探索を実施した。

また、IA は自己免疫機序による慢性多発性関節炎であり、RA や SpA が含まれる。RA は関節滑膜の肥厚・増殖に伴う骨破壊を特徴とする最も頻度の高い自己免疫疾患の一つであり (Smolen et al., 2016), 我が国では 70~80 万人程度の患者数があると想定されている。SpA は強直性脊椎炎、乾癬性関節炎、反応性関節炎や消化器疾患に伴う関節炎などが含まれる疾患群で、仙腸関節を含む体軸関節炎、非対称性末梢性関節炎、指炎や腱付着部炎などの共通した臨床症状を示すことがある。RA に比べ、より若年に多く、骨造成や強直性変化などを来す (Dougados and Baeten, 2011)。IA は早期に診断し、適切に治療されなければ、不可逆的な骨変形を引き起こし、日常生活や患者のその後の人生に多大な影響を及ぼしうる病態である。一方で、臨床的滑膜炎、血液検査所見や画像所見などの客観的所見に加えて、疼痛や日常生活動作の障害度合といった患者報告アウトカムなどの主観的所見を組み合わせた疾患活動性を評価した上で、IA に対する治療方針を決定することになるが、治療方針が患者の主観のみに依存することは治療必要性の是非に対して懸念を孕む (Bidad et al., 2017; Ferreira et al., 2020)。抗リウマチ薬や生物学的製剤による抗炎症・免疫抑制療法は易感染性副作用など患者に対して必ずしも良い効果のみをもたらすものではなく、また、その薬価の高さは医療経済に対する影響が大きく、安易に導入しないように検討が必要である。そこで、我々は患者の脳機能が IA の疾患活動性に影響を与えるのかについて解析を行った。

これら自己免疫疾患における精神神経機能と病態との関わりについて、新たな病態メカニズムの解明と新規治療標的、および脳機能から見た新たな診断マーカーの探索を本研究の目的とした。

4. 第一章

慢性睡眠障害ストレスの 精神神経ループス病態への関与

4.1 背景

NPSLE は SLE を背景として、中枢神経、末梢神経や自律神経障害の他、精神・神経症状などを示す疾患であり、ループス腎炎と並ぶ SLE の主要重症臓器障害のひとつであり、生命予後に関連する因子として知られている (Hanly, 2014; Schwartz et al., 2019). NPSLE は精神的または神経心理学的徴候などのびまん性徴候を示す diffuse NPSLE と神経局在性症候を示す focal NPSLE に分けられるが、diffuse NPSLE の病態生理は未だ不明な点が多い. Diffuse NPSLE の発症に関与すると考えられている因子には focal NPSLE と同様の機序である血管障害の他に、血液脳関門障害、サイトカインや自己抗体の中枢神経系 (cerebral nervous system: CNS) への浸潤や、直接的な神経系細胞・グリア細胞の障害・細胞死などが含まれるが (Jeltsch-David and Muller, 2014b; Schwartz et al., 2019), 病態メカニズムの解明は未だ研究の余地がある. 更に、NPSLE の精神神経症状は SLE 患者において、全身の疾患活動性から独立して出現することがしばしば認められ、diffuse NPSLE 発症の予測を困難にしている (Hanly et al., 2010). 更に、我々は NPSLE の治療薬として、グルココルチコイドや汎細胞毒性免疫抑制薬であるシクロフォスファミドなどを使用しており、diffuse NPSLE の神経組織における疾患特異的な病原分子に対する標的治療選択は未だにない (Hanly, 2014; Kaul et al., 2016). 以上より、diffuse NPSLE の病態生理の解明と特異的治療の確立は重要といえる.

ストレスは情動的または生理的な課題を伴う経験を意味し、脳に対して影響を与える因子である. 身体精神的ストレスは 2 面性があり、短期間における適切な負荷は環境・社会への適応を促進させることで恒常性維持を促す一方で、長期間における過剰な負荷は身体的・精神的な疲弊を誘導する. また、ストレスは、神経内分泌経路を介して、脳と循環、呼吸、代謝や免疫などの身体機能との 2 方向性伝達に関与する. CNS の細胞の構造的・機能的な再改変にも関わることで、行動学的・生理学的反応に影響を及ぼす (McEwen, 2007). 例えば、慢性睡眠障害ストレス (sleep disturbance stress: SD) は身体・精神の疲弊に繋がり、恒常性維持に支障を起こす. 動物モデルにおいて、SD は記憶・注意、遂行機能に関わる脳領域である海馬や前頭皮質ニューロンの萎縮を誘導し (McEwen, 2007), 学習や記憶行動の機能異常をもたらす (Silva et al., 2004; Youngblood et al., 1997). また、SD はニューロンのサイトカイン濃度や酸化ストレスレベルを変化させることで、CNS 機能を障害する (McEwen, 2007). 我々は、実験的脳脊髄炎マウスモデルに SD 負荷することで、脳内微小炎症増悪を介した疾患活動性上昇が起こり、突然死を引き起こすことを報告した (Arima et al., 2017).

このように、SD を含む精神神経ストレスは慢性的に構造・機能の観点から神経組織の再構築を誘導し、自己免疫疾患においては臨床経過すら変えてしまう

働きを持つといえる。

確かに、SD はヒトにおいても代謝を障害し、炎症性サイトカインを亢進すると報告されている (Gangwisch et al., 2005; Vgontzas et al., 2004). 慢性ストレス暴露は SLE を含む自己免疫疾患発症リスクであることも知られている (Song et al., 2018). 更には、SD が SLE 患者の精神神経症状に悪影響を与え、疾患活動性に影響を与える可能性も示唆されている (Sharif et al., 2018). しかし、慢性ストレスが中枢神経系組織や疾患に悪影響を与えることは確定的とは考えられるものの、diffuse NPSLE 発症に関連する分子的または機能的なメカニズムは未だ不明である。

4.2 目的

本研究の目的は、ループモデルマウスを用いて、慢性ストレスがNPSLEのびまん性精神症状を誘導するかどうかを明らかにし、その病態生理を解明することで、新規治療標的を見出すこととした。

4.3 MRL/MpJMsSlc-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*) マウスにおける

慢性睡眠障害ストレスモデルの作成

ループモデルマウスである MRL/MpJMsSlc-*lpr/lpr* (MRL/*lpr*) は, Fas 蛋白をコードする *lpr* 遺伝子の突然変異のホモ接合体マウスであり, Fas 誘導性アポトーシスの異常により, 自己反応性 T 細胞増殖を来し, 腎炎や CNS 症状などの SLE 様症状を示す (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). なお, MRL/*lpr* マウスは 6-8 週齢で既に CNS 症状を示しており, 10 週例以降では全身性炎症を伴う腎炎を発症する. 全身性炎症の影響を避け, 女性患者に NPSLE 発症が多いことを考慮し, 6-8 週齢の雌 MRL/*lpr* を実験に用いることとした (Jeltsch-David and Muller, 2014a). このマウスを SLE モデルマウスとして, また, MRL/MpJMsSlc-+/+ (MRL/MpJ) をコントロールとして, SD モデル作成を行った.

動物実験は北海道大学の動物実験倫理委員会の承認のもと (承認番号: 14-0083), 北海道大学動物実験に関する規定に従い, 実施した.

4.3.1 方法

実験に用いる 6-8 週齢の雌 MRL/lpr マウスと MRL/MpJ マウスは日本エスエルシー(Tokyo, Japan) から購入し, 13 時間明期と 11 時間暗期の明暗期サイクルで, 自由給餌・給水が可能な Specific pathogen-free 環境下で飼育した. 統計解析は JMP Pro 14 (SAS Institute Inc., USA) を用いて実施した.

4.3.1.1 睡眠障害ストレス負荷

マウスを 140 cm 径のランニングホイールのみからなる SD ケージ (SW-15-SD, Melquest Co., Japan) に 2 週間配置した (Figure 1A). 自由給餌・給水は可能で, 紙製床敷は 2 日毎に交換した (Figure 1B).

4.3.1.2 概日リズム障害とストレス負荷の検証

マウスに対する SD 負荷効果の検証として, 概日リズム障害とストレス負荷時にマウスにおいて上昇する血中ホルモンであるコルチコステロンの血清中濃度の変化を評価した.

SD 実験期間の第 7 日から第 9 日に, それぞれのマウスのランニングホイールの回転頻度を 1 時間毎に歩行活動量として計測器 (CIF-4M, Melquest, Japan) を用いて記録し, 概日リズム破綻を評価した. ランニングホイールの活動性は全回転数に対する活動時間と休息時間の比として評価し, 正常の概日リズムは同期間にランニングホイール付きの通常の飼育ケージに配置された SD 負荷をかけていないマウスで評価した.

血清コルチコステロン測定のために, SD 実験前および SD 実験後のマウス血清を採取した. 血液は右下顎静脈より 0.3–0.5 mL 程度採取し, 氷冷静置後に 3000 rpm, 15 分間, 4 °C の条件で遠心し, 上清を血清として保存した. コルチコステロン測定には Corticosterone ELISA キット (Cayman Chemical, USA) を用いた.

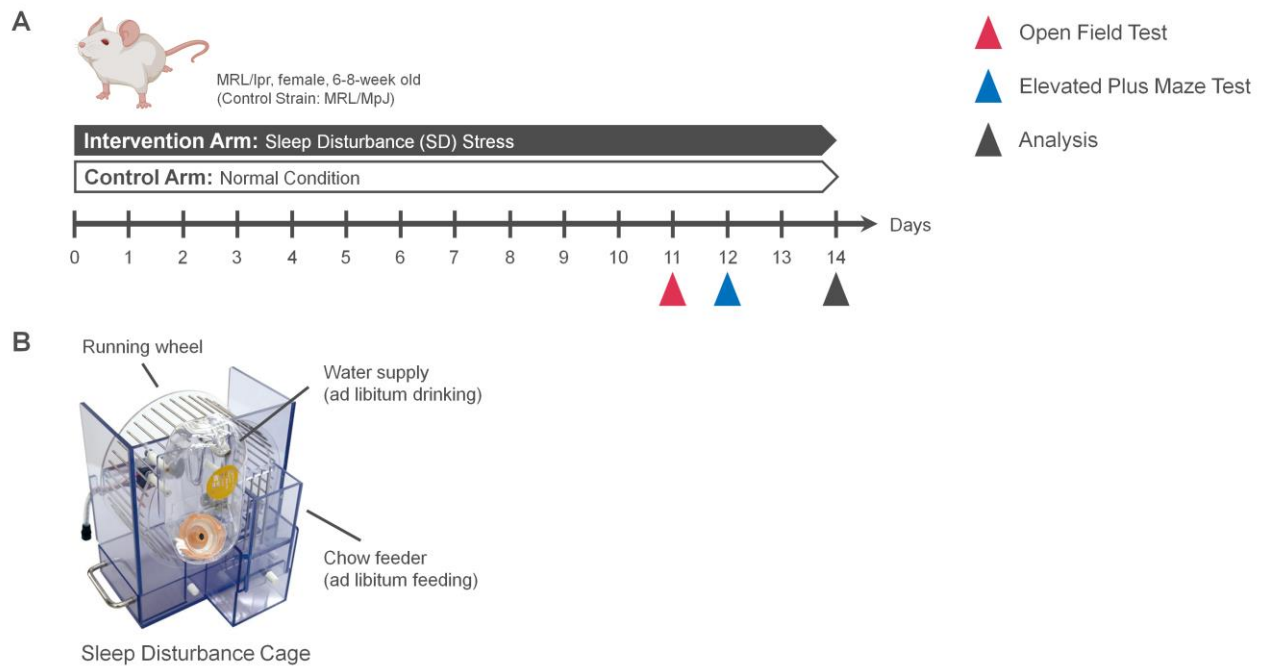


Figure 1. SD 実験の概要と SD ケージの外観

(A) 慢性 SD 負荷の実験プロトコール. SD 負荷後の第 11-12 日に行動実験を, 第 14 日に解析を実施した. (B) ランニングホイール, 給水瓶と給餌箱を備えた SD ケージの外観.

4.3.2 結果

SD ケージに配置されたマウスはマウス株によらず、夜間を通して活動性上昇を認めた (Figure 2, A and B). SD 実験期間の第 7 日から第 9 日の 3 日間の活動性, すなわち活動時間と休息時間の比は SD 非負荷群と比べて, SD 群で上昇した (Figure 2, C and D).

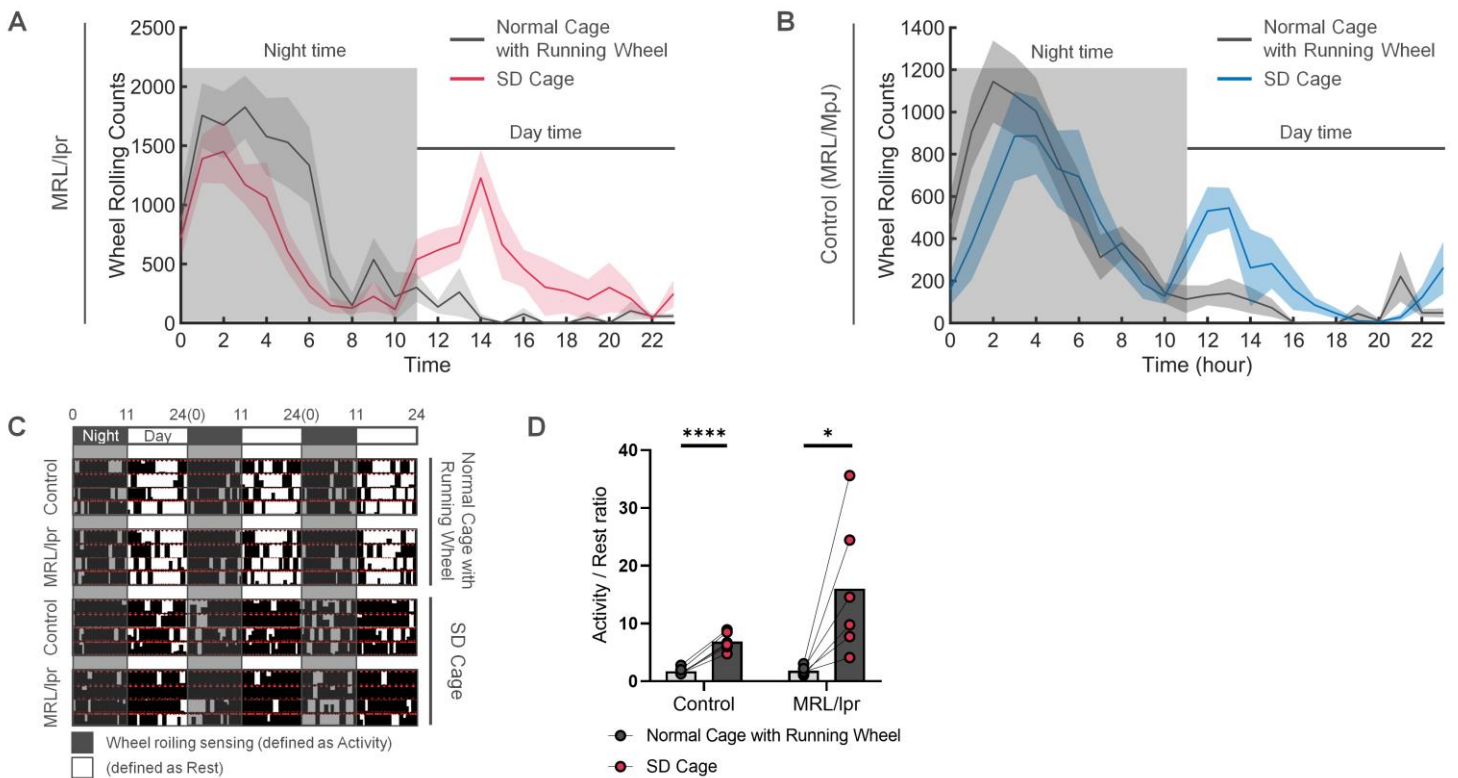


Figure 2. SD による概日リズム障害

(A, B) ランニングホイール回転数による (A) MRL/lpr マウスと (B) コントロールマウスの SD 負荷に応じた一日の活動量の推移 ($n = 10-11$ per group). データは平均値(実線) ± 標準誤差(帯)で示した. (C) SD 負荷および非負荷 MRL/lpr マウス, またはコントロールマウスにおける時間に応じた活動性の代表的アクトグラム. 黒色はホイール回転の感知, すなわち活動を意味し, 白色は休息を意味する. SD 負荷マウスはマウス株によらず, SD 非負荷マウスと比べて夜間の活動がより増加している. 1 ラインは連続 3 日間のマウスの活動に対応する ($n = 4$ per group). (D) 活動時間 (黒) / 休息時間 (白) の比 ($n = 6$ per group). データは平均で示した. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, 対応のある T 検定.

SD 負荷前と 2 週間の SD 負荷後の血清コルチコステロン値は MRL/lpr マウスでは統計学的有意差は得られていないものの, SD 非負荷群と比べて, 各マウス株共に明らかに上昇していた (Figure 3).

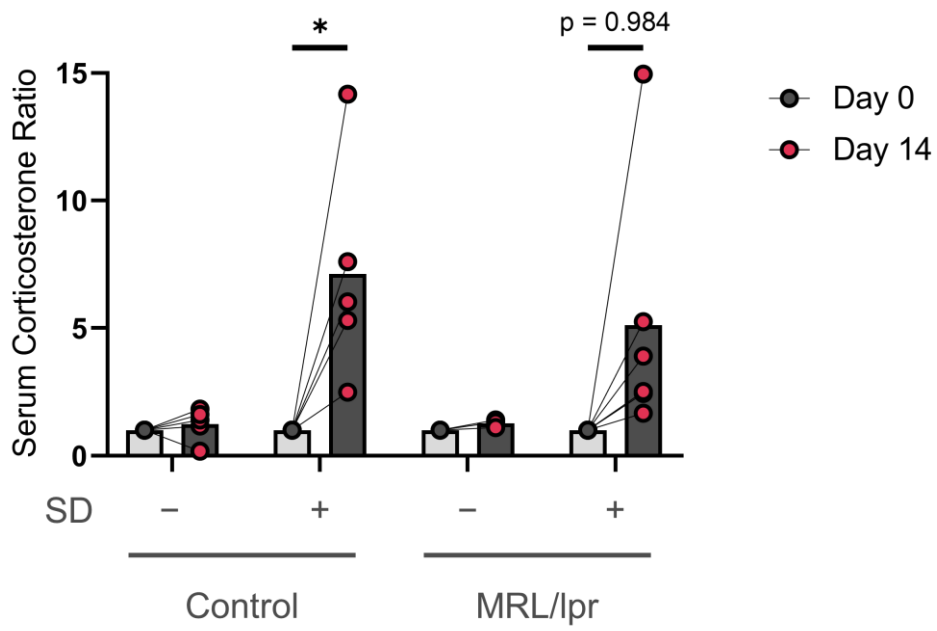


Figure 3. SD 負荷による血清コルチコステロン濃度の上昇データは平均値で示した. * $p < 0.05$, 対応のある T 検定.

4.3.3 結論

SD 負荷は, MRL/lpr およびコントロールマウスの両マウス株で, 夜間を通じた活動量増加を認め, ストレス感受性ホルモンであるコルチコステロンの血清値を上昇させた. SD モデルは, マウス株によらず, 慢性ストレス負荷が可能な系であると考えられた.

4.4 慢性睡眠障害ストレスによる MRL/lpr の行動変化

構築した SD モデルを用いて、我々は SD 負荷 MRL/lpr の行動解析を MRL/MpJ マウスをコントロールとして実施することとした。Diffuse NPSLE 患者は ACS と呼ばれるせん妄症状を示し、不眠や攻撃性、興奮性、幻覚や妄想などの精神的過活動状態に陥ることがある。この脱抑制性行動異常には危険行動の増加や不安の減少も含まれる (Bortolato et al., 2009; Hirshfeld-Becker et al., 2003)。そのため、我々は SD モデルにおいて、高架式十字迷路試験 (elevated plus maze test: EPM) とオープンフィールド試験 (open field test: OF) を用いて、不安様行動の変化から行動異常を評価することとした。

4.4.1 方法

6-8 週齢の雌 MRL/lpr マウスと MRL/MpJ マウスを SD 負荷および非負荷群に分けて, SD 実験中の第 11 日に OF を, 第 12 日に EPM を実施した (Figure 1). 統計解析は JMP Pro 14 (SAS Institute Inc., USA) を用いて実施した.

4.4.1.1 高架式十字迷路試験 (EPM)

迷路は 2 本の開いたアームと 2 本の閉じたアームが中心正方形から伸びており, それぞれのアームは 30 cm 長で 5 cm 幅で, 台は床から 50cm 高にあるものを用いた. 実験開始時にマウスは, 開いたアームへ向いた状態で迷路中心部に配置し, 5 分間の自由探索を行わせた. ビデオ・トラッキングシステムの Smart 3.0 (Panlab-Harvard Apparatus, USA)を用いて, 両アーム滞在時間を別々に測定した. 開いたアームの滞在時間の割合を不安様行動の指標とした. また, 総移動距離は一般運動能力の指標として測定した.

4.4.1.2 オープンフィールド試験 (OF)

50 cm 幅の正方形黒色床で 50 cm 高の不透明白色壁を備えたチャンバーボックスを用いた. マウスに 10 分間の自由探索をさせ, 行動をビデオ・トラッキングした. 中心領域滞在時間の割合を不安様行動の指標として記録するとともに, 総移動距離を一般運動能力の指標として記録した.

4.4.2 結果

EPM では, SD 負荷コントロールマウスでは SD 非負荷と比べて, 不安様行動の増強がみられ (Figure 4, A and B), これは慢性ストレス負荷通常のマウスモデルで通常みられる反応である. 一方で, SD 負荷 MRL/lpr は SD 非負荷と比べて, 不安様行動は減弱した (Figure 4, A and B). また, SD 負荷・非負荷マウス間における総移動距離の差は僅かに留まった (Figure 4C).

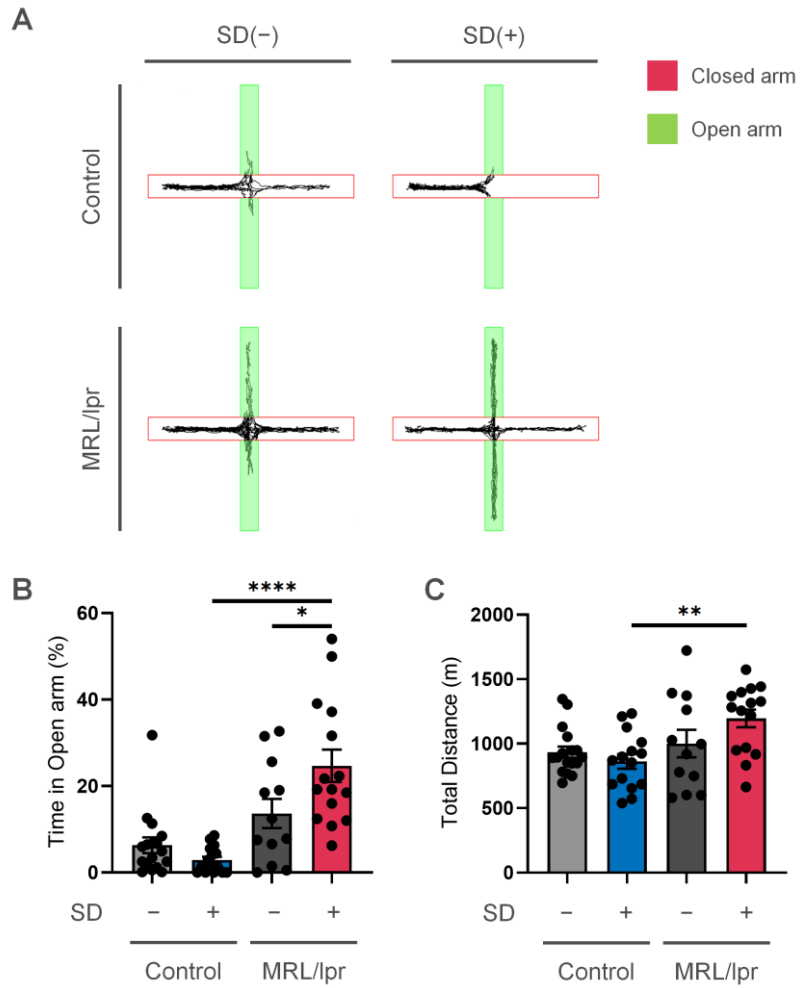


Figure 4. EPM における MRL/lpr および MRL/MpJ マウスの SD 負荷効果
 (A) 代表的行動軌跡. (B) 不安様行動を評価する開いたアーム滞在時間の割合.
 (C) 一般運動能力を評価する総移動距離 ($n = 12-17$ per group). データは平均値±標準誤差で示した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

OF でも EPM と矛盾しない結果で, SD 負荷 MRL/lpr では, SD 非負荷マウスと比べて, 不安様行動は減弱した一方で, 総移動距離からみた一般運動能力の差は認めなかった (Figure 5, A-C).

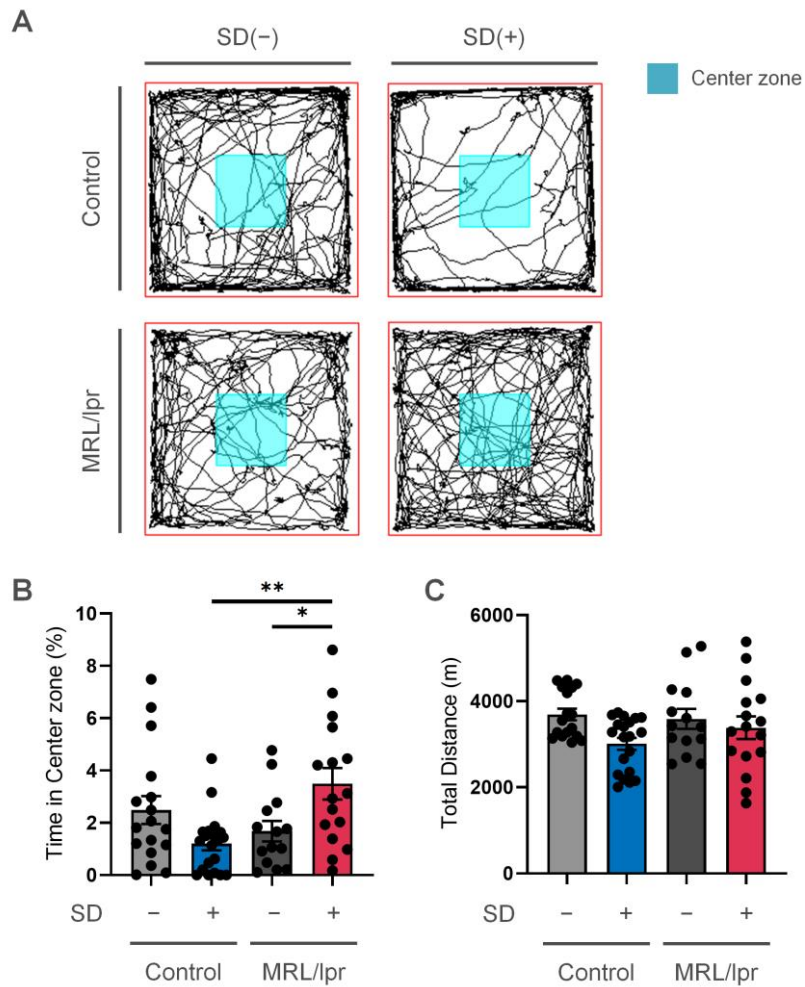


Figure 5. OF における MRL/lpr および MRL/MpJ マウスの SD 負荷効果 (A) 代表的行動軌跡. (B) 不安様行動を評価する中心領域滞在時間の割合. (C) 一般運動能力を評価する総移動距離 ($n = 14-20$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

4.4.3 結論

SD 負荷 MRL/lpr は慢性ストレス負荷にもかかわらず、不安様行動が減少するという通常のマウスにはみられない異常行動を示した。MRL/lpr に対する慢性ストレス負荷は脱抑制状態を誘導することが示唆された。

4.5 SD 負荷 MRL/lpr マウスの活性化脳領域の探索

ストレス刺激を受容する脳領域の代表例として、室傍核 (paraventricular nucleus: PVN) がある。PVN は視床下部-下垂体-副腎皮質のストレス応答経路を調節し、恒常性維持に働く (Herman et al., 2003; Pacak et al., 1995)。PVN のニューロンはドパミン作動性ニューロンの起源となる腹側被蓋野 (ventral tegmental area: VTA) に投射しており、VTA は内側前頭前皮質 (medial prefrontal cortex: mPFC) や、側坐核 (nucleus accumbens: NAc) へニューロンを投射する (Hung et al., 2017; Lammel et al., 2011)。既報から、単回の急性ストレスは mPFC を活性化し、不安様行動を含む社会忌避行動を抑制する一方で、繰り返しの慢性ストレスは mPFC 活動を抑制し、社会忌避行動を誘発する (Tanaka et al., 2012)。対照的に、慢性ストレスはドパミン作動性神経活動に対する NAc の反応性を高め、社会忌避行動を促進させる (Chaudhury et al., 2013)。更に、ストレス入力は青斑核 (locus coeruleus: LC) のノルアドレナリン作動系を刺激する (McCall et al., 2015)。LC から投射されるニューロンは mPFC に入力し、この神経回路の抑制はげっ歯類の不安様行動を誘導することが知られている (Mutso et al., 2012; Uematsu et al., 2017)。これらの脳領域における神経活性化の違いは、SD 誘導性行動変化を説明しうるかもしれないため (Figure 6A)、我々は神経活性化マーカーであるリン酸化 cFos (phosphorylated cFos: p-cFos) を用いた免疫組織化学法を介して、ストレス誘導性神経活性化について評価した (Figure 6B)。

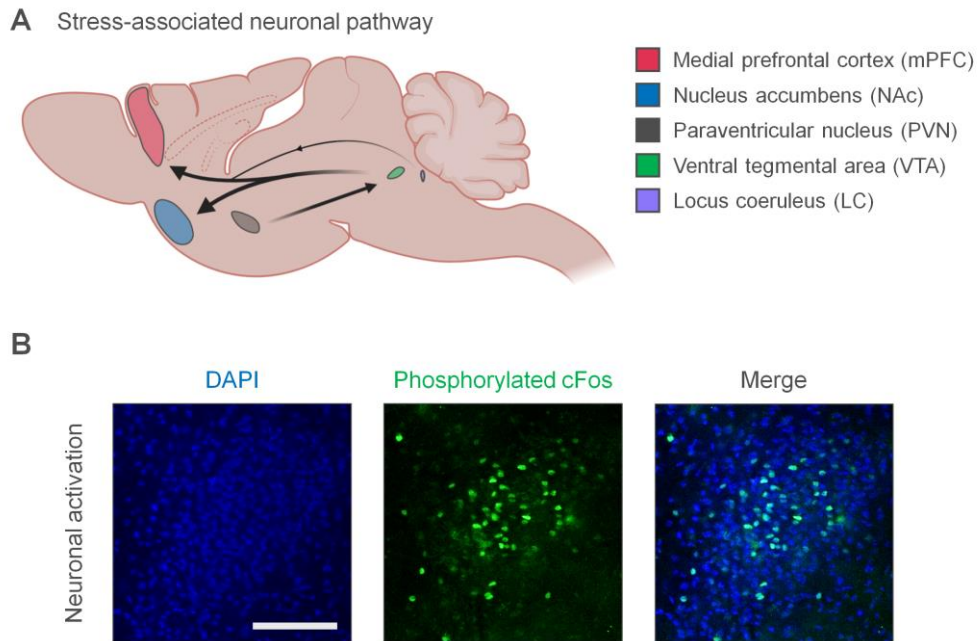


Figure 6. ストレス関連脳領域と神経活性化の評価

(A) ストレス反応性神経回路. ストレス反応性室傍核 (PVN) は軸索を腹側被蓋野 (VTA) へ接続し, VTA は内側前頭前皮質 (mPFC) と側坐核 (NAc) へニューロンを投射する. 青斑核 (LC) も mPFC へニューロンを投射している. (B) 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による核染色と p-cFos による免疫染色の代表図. スケールバー, 20 μ m.

4.5.1 方法

4.5.1.1 ストレス関連脳領域における免疫組織化学

2週間のSD実験を実施したMRL/lprマウスとコントロールマウスから脳を採取し、免疫組織化学法を用いて、神経活性化について、p-cFos陽性細胞を評価した。

マウスを麻酔下で安楽死処理し、脳は氷冷したリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS) および10%ホルマリン液による経心的灌流後に採取した。組織は4℃で一晩、10%ホルマリン内で浸透固定し、その後に30%スクロースで48時間処理した。処理後の組織は、40-50 μmの冠状断薄切切片として、PBS内に集めた。切片は0.3% Triton X-100 添加 5%ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin: BSA)を用いて、室温1時間でブロッッキングを実施し、その後2%BSAと0.3% Triton X-100を添加したPBSに希釈した1次抗体と一晩、4℃で反応させた。1次抗体は、抗p-cFos(1000倍希釈, D82C12, Cell Signaling Technology)を用いた。反応後に洗浄を3回実施し、二次抗体のAlexa Fluor色素標識抗体(Invitrogen)を200倍希釈で室温、2時間で反応させた。切片はProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI(ThermoFisher Scientific)でスライドガラスに塗抹し、倒立型蛍光顕微鏡のBZ-9000(Keyence, Japan)で観察した。Z軸方向にスタックした画像を、フルフォーカス解析機能を用いて処理・解析した。

4.5.1.2 神経活性化の定量化

画像はImageJソフトウェア(National Institutes of Health, USA)を用いて解析した。P-cFos免疫染色を実施した脳領域について、20倍視野でマウス1匹当たり、それぞれ2枚取得した。活性化神経細胞はp-cFos陽性のDAPI染色細胞と定義し、細胞数を手動で数え、マウス毎に平均化して、その密度を算出した。

4.5.2 結果

PVN においては, SD を負荷した MRL/lpr およびコントロールの両マウスで SD 非負荷マウスと比べて, より多くの p-cFos 陽性細胞を認めた (Figure 7, A-C).

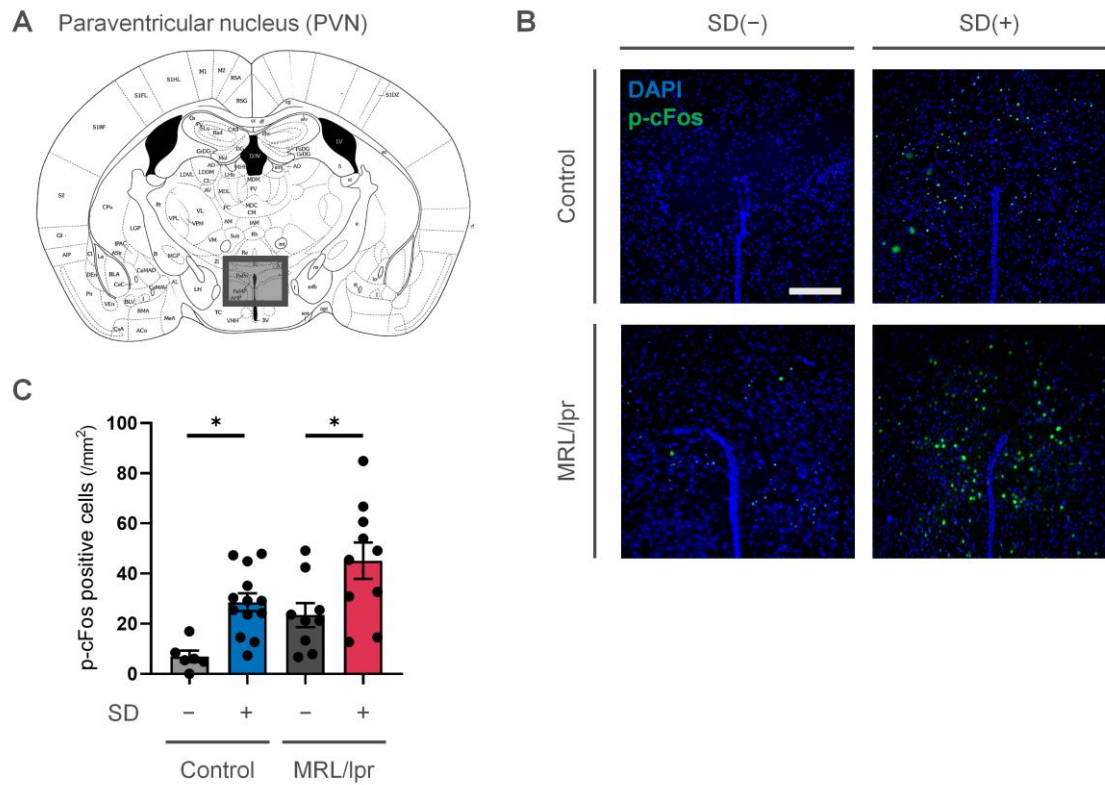


Figure 7. PVN における SD 負荷とマウス株に応じた神経活性化評価
 (A) PVN の略図 (Paxinos and Watson, 2007). (B) PVN における p-cFos 陽性活性化神経細胞の代表的免疫組織染色図. (C) PVN における p-cFos 陽性細胞数の定量化 ($n = 6-13$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. $*p < 0.05$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

VTAにおいてもSDを負荷したMRL/lprおよびコントロールの両マウスでSD非負荷マウスと比べて、より多くのp-cFos陽性細胞を認めた (Figure 8, A-C).

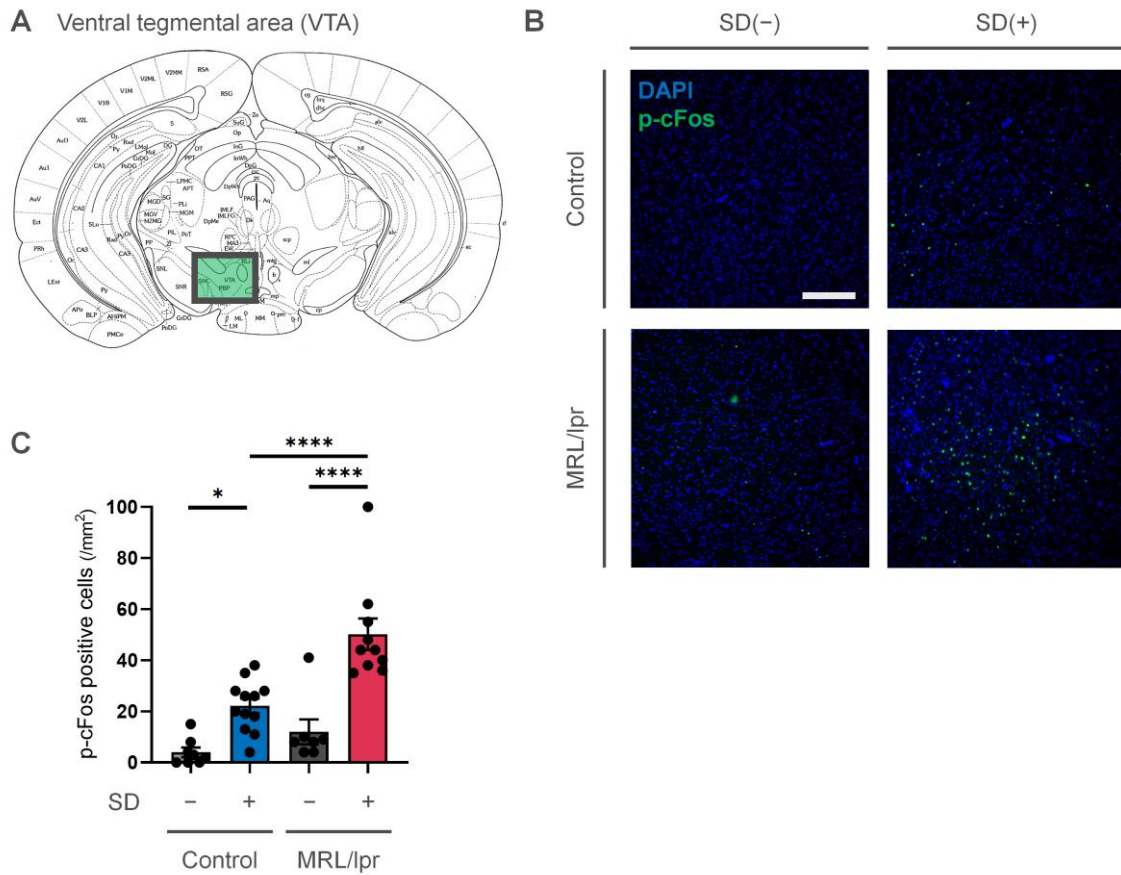


Figure 8. VTA における SD 負荷とマウス株に応じた神経活性化評価
 (A) VTA の略図 (Paxinos and Watson, 2007). (B) VTA における p-cFos 陽性活性化神経細胞の代表的免疫組織染色図. (C) VTA における p-cFos 陽性細胞数の定量化 ($n = 7-12$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

我々は続いて, mPFC と NAc の神経活性化を評価した. SD 負荷 MRL/lpr は, その他のマウス群と比較して, 特徴的に mPFC の p-cFos 陽性細胞数増加を伴う神経活性化を認めた (Figure 9, A-C).

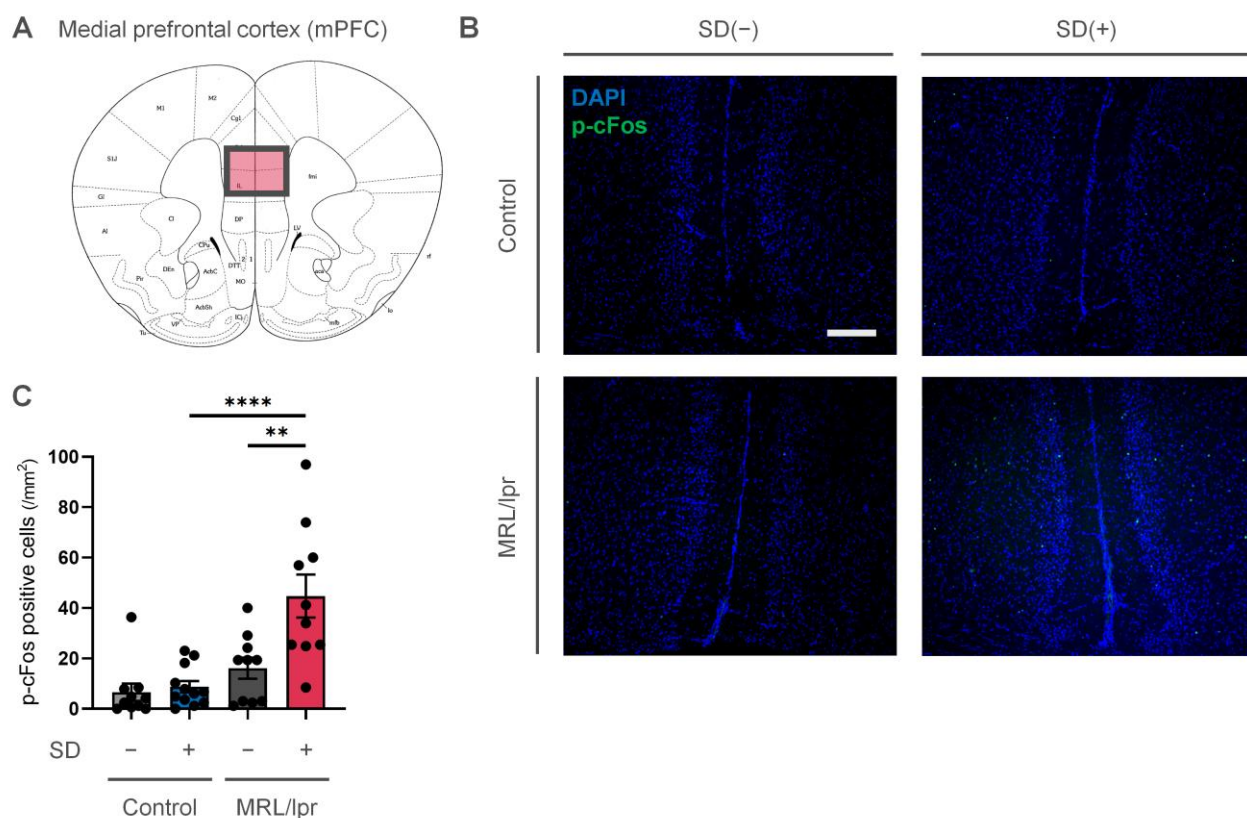


Figure 9. mPFC における SD 負荷とマウス株に応じた神経活性化評価
 (A) mPFC の略図 (Paxinos and Watson, 2007). (B) mPFC における p-cFos 陽性活性化神経細胞の代表的免疫組織染色図. (C) mPFC における p-cFos 陽性細胞数の定量化 ($n = 10-12$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

一方で, NAc においては, SD を負荷した MRL/lpr およびコントロールの両マウスで SD 非負荷マウスと比べて, より多くの p-cFos 陽性細胞を認めた (Figure 10, A-C).

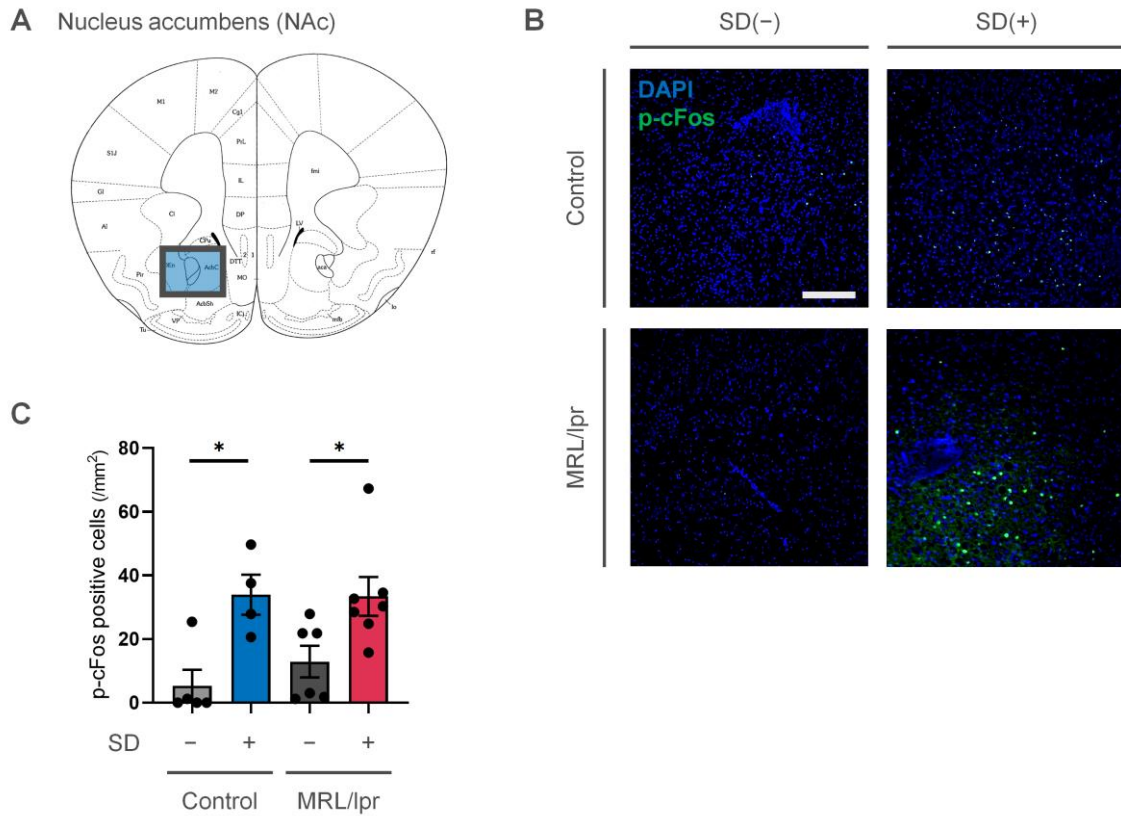


Figure 10. NAc における SD 負荷とマウス株に応じた神経活性化評価
 (A) NAc の略図 (Paxinos and Watson, 2007). (B) NAc における p-cFos 陽性活性化神経細胞の代表的免疫組織染色図. (C) NAc における p-cFos 陽性細胞数の定量化 ($n = 4-8$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $p < 0.05$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

LC においては, SD を負荷した MRL/lpr およびコントロールの両マウスで SD 非負荷マウスと比べて, より多くの p-cFos 陽性細胞を認めた (Figure 11, A-C).

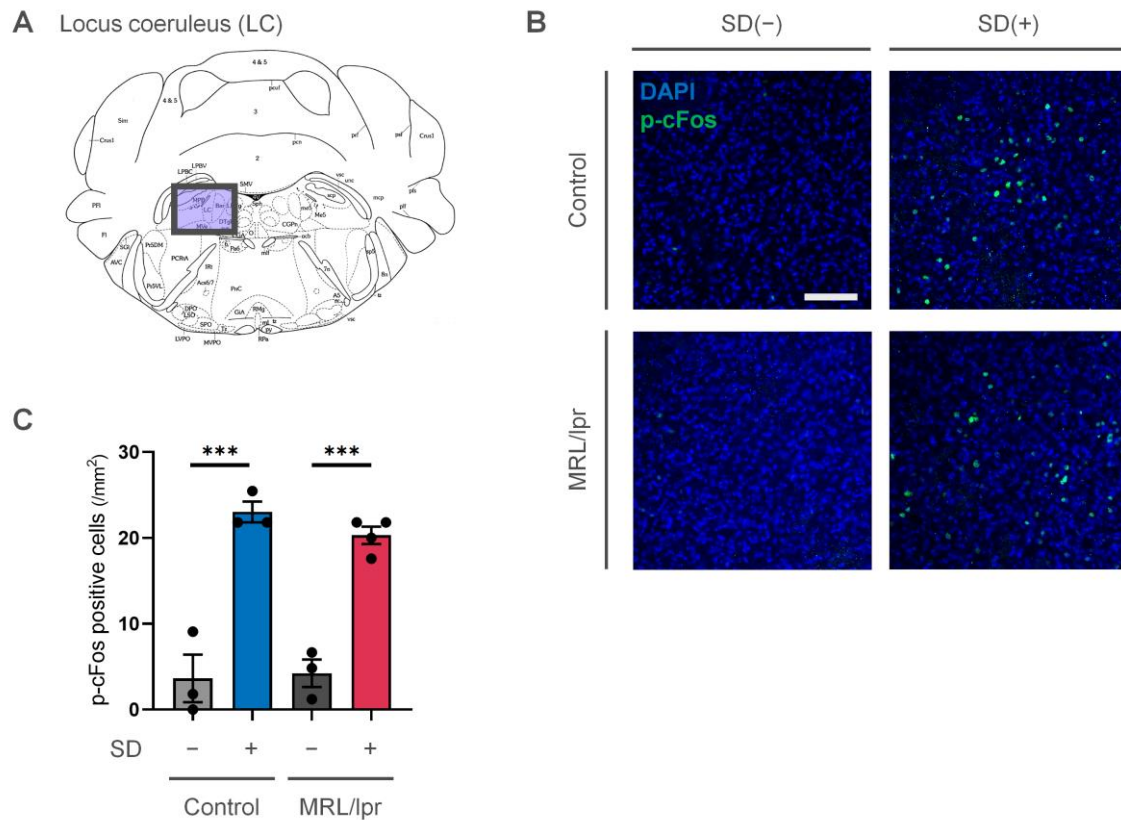


Figure 11. LC における SD 負荷とマウス株に応じた神経活性化評価

(A) LC の略図 (Paxinos and Watson, 2007). (B) LC における p-cFos 陽性活性化神経細胞の代表的免疫組織染色図. (C) LC における p-cFos 陽性細胞数の定量化 ($n = 3-4$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. *** $p < 0.001$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

4.5.3 結論

SD 負荷 MRL/lpr マウスにおいて, 十分な慢性ストレス負荷下にもかかわらず, 著明な mPFC 活性化を特徴的所見として認めた. これらの脳領域活性化による不安および抗不安作用を考慮すると, mPFC は SD 負荷 MRL/lpr における抗不安様行動に対する重要な領域である可能性があり, mPFC の活性化の行動変容に対する効果は NAc の活性化による不安様行動の誘導効果を上回っていることを示唆する. 総合して, 我々は慢性 SD 負荷にもかかわらず, MRL/lpr の mPFC は持続的神経活性化を示した. これは, 慢性ストレス下の不安様行動の減少という MRL/lpr の異常行動を説明しうる.

4.6 SD 負荷 MRL/lpr の前頭前皮質の分子生物学的評価

これまでの実験結果より、我々は慢性ストレス負荷が MRL/lpr の前頭前皮質領域に他のマウスとは異なる変化をもたらすと考えた。実際に、ループモデルマウスでは前頭皮質内の神経伝達物質濃度の異常が報告されている (Jeltsch-David and Muller, 2014a)。NPSLE 患者でも神経画像研究で前頭葉の構造的・機能的変化が認められている (Mackay et al., 2019; Weiner et al., 2000)。したがって、我々は SD モデルの MRL/lpr マウスおよびコントロールマウスの前頭皮質における分子生物学的な遺伝子・蛋白発現解析を実施した。前頭前皮質におけるトランスクリプトーム解析を RNA sequencing (RNA-seq) 法を介して、また、そこから得られた結果を、蛋白レベルでも血清や髄液を用いて検証した。

4.6.1 方法

4.6.1.1 前頭前皮質 RNA sequencing (RNA-seq)による遺伝子発現解析

マウスを 20 mL の冷却 PBS で灌流後に、前頭皮質領域を機械的に細断し、ポリトロンホモジナイザーで均質化後に、ISOSPIN Cell & Tissue RNA (Nippon Gene, Japan) を用いて、total RNA を抽出した。RNA の質および量は Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) で評価した。RNA の質は RNA Integrity Number で行い、全てのサンプルは 7.5 以上であることから、続いてライブラリ調整を実施した。ポリ(A)RNA を total RNA からオリゴ d(T)25 磁気ビーズを用いて精製し、SureSelect Strand Specific RNA library preparation kit (G9691A, Agilent Technologies)を用いて、全長相補的 DNA (complementary DNA: cDNA) へ転写させた。処理したライブラリは、AMPure XP beads (A63880, Beckman Coulter)で精製し、HiSeq 2500 (single-read, 2 × 50 bp) sequencer (Illumina)でシーケンスした。RNA-seq リードは Strand NGS software (Agilent Technologies)を用いて、マウスリファレンスゲノム mm10 へアラインメントした。クオリティコントロールは同様に Strand NGS を用いて実施し、部分リードを含むアラインしたリードはクオリティ閾値 (≥ 20)でフィルターし、閾値以下のクオリティのリードは解析より除去した上で、DESeq2 アルゴリズムを用いて正規化および定量化した。遺伝子発現情報、主成分分析やヒートマップなどの図表作成には Matlab (MathWorks, USA) を用いた。着目した遺伝子セットは、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway (www.genome.jp/kegg/), Reactome pathway (reactome.org), GO (Gene Ontology) biological set (geneontology.org/) や TRRUST database (www.grnpedia.org/trrust/) などを用いて解析した。解析に用いた炎症経路に関わる遺伝子セットには KEGG pathway の cytokine-cytokine receptor interaction pathway および、GO biological process の leukocyte-mediated cytotoxicity pathway に含まれる遺伝子を使用した。

4.6.1.2 定量的 real-time polymerase chain reaction (PCR) 法

抽出した total RNA から SuperScript VILO (Invitrogen)を用いて、cDNA を合成した。転写産物量は Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System を用いて測定した。プローブは *Ili2b* (Mm01288989_m1), および *Actb* (Mm02619580_g1)に特異的な TaqMan Minor Groove Binder probes を用いた。*Ili2b* 発現量は *Actb* 発現量で正規化する $\Delta\Delta Ct$ 法で算出した。

4.6.1.3 マウス血清・髄液における蛋白量の測定

麻酔マウスから脳を採取する際に、PBS 灌流実施前に右下顎静脈から 0.5 mL の血液を採取し、氷冷静置後に 3000 rpm, 15 分間, 4 °C の条件で遠心し、上清を血清として回収した。髄液は、マウスの頭皮を除去後に、浅頸部筋群を切除し、大槽直上にある環椎後頭部膜を露出させた。同部位を紙タオルで乾燥させ、30 G の微小針 (BD) で穿刺し、髄液を吸引した。血液による汚染がある髄液は廃棄した。血清と髄液は-30 °C で保存した。

髄液では、Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Assay (Bio-Rad)を用いて、interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12/23p40, IL-13, IL-17A, interferon- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, C-C chemokine ligand (CCL) 2, CCL3, CCL5, CCL11, C-X-C chemokine ligand (CXCL) 1 を含むアナライト濃度を測定した。測定データは Luminex 200 xPONENT System (Merck KGaA)を用いて算出した。

また、血清と髄液で、Mouse IL-12/IL-23p40 ELISA kit (431604, BioLegend)を用いて、IL-12/23p40 濃度を測定した。

4.6.2 結果

シーケンスで得られた 30620 の遺伝子のうち、各マウス群間で 1.5 以上の倍率変化を示す発現変動遺伝子数は 7952 遺伝子で、主成分分析により、SD 負荷が各マウス株に応じて、遺伝子発現に対して異なる効果を有することを示した (Figure 12A). これらの遺伝子のうち、3124 遺伝子は SD 負荷 MRL/lpr で特異的に変動のある遺伝子であり、1863 遺伝子は倍率変化 1.5 以上の発現亢進を、また、1261 遺伝子は倍率変化 1.5 未満の発現低下を示していた (Figure 12B).

この SD 負荷 MRL/lpr にみられる 1863 の発現亢進遺伝子において、KEGG pathway を用いたパスウェイ解析では神経活性リガンド-受容体相互作用 (neuroactive ligand-receptor interaction), チロシン代謝 (tyrosine metabolism) や サイトカイン相互作用 (cytokine interaction)などが含まれていた (Figure 13). 同様に Reactome pathway や Gene Ontology (GO) biological process を利用した解析でも、SD 負荷 MRL/lpr で発現変動のある遺伝子では、神経伝達物質反応や免疫学的現象などに関連したパスウェイの変化を認めた (Figure 14 and 15).

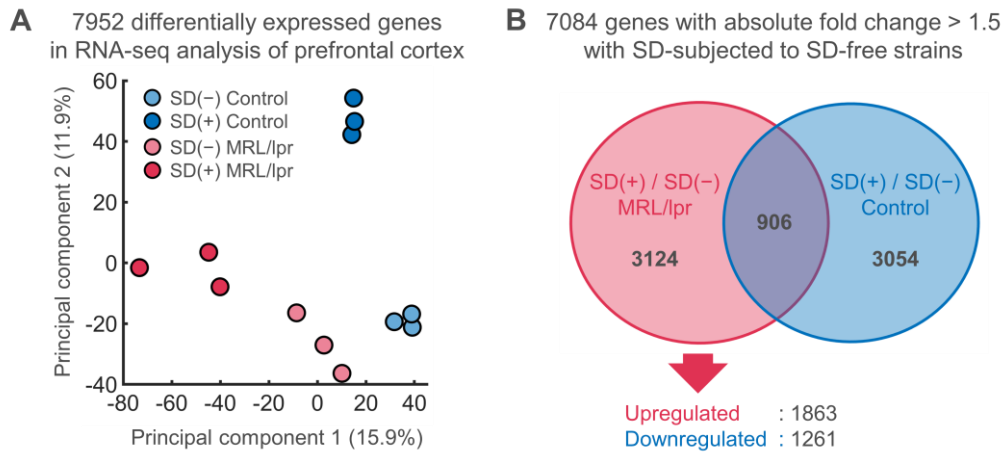


Figure 12. SD 負荷による発現変化遺伝子の解析

(A) 発現変動遺伝子の主成分分析. 各マウス株と SD 負荷に応じて, 各サンプルはクラスターを形成した. (B) MRL/lpr 群またはコントロール群における SD 負荷により倍率変化絶対値 1.5 以上で発現変化する遺伝子群に関するベン図. SD 負荷 MRL/lpr では, 特徴的に 1863 遺伝子に発現亢進の, また 1261 遺伝子に発現低下の変動を認めた.

KEGG pathway: Upregulated genes

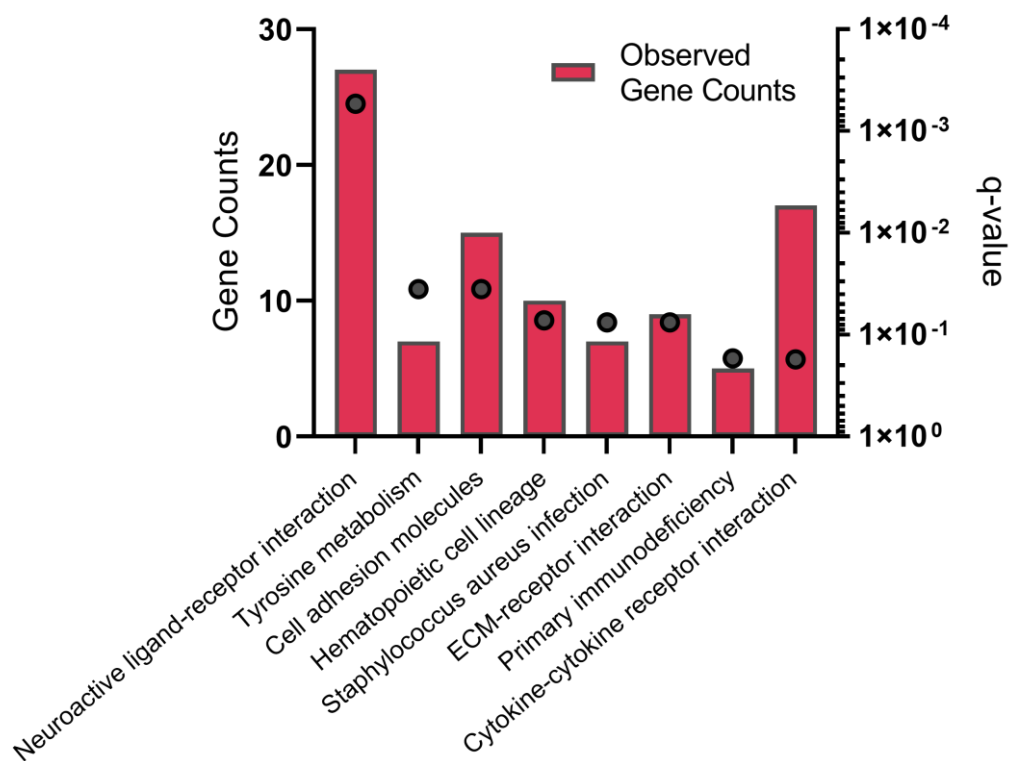


Figure 13. SD 負荷 MRL/lpr において特徴的な発現亢進遺伝子に関連するパスウェイ (KEGG pathway)

SD 負荷 MRL/lpr において特徴的に発現亢進している 1863 遺伝子を用いて、KEGG pathway 解析で抽出された上位 8 個のパスウェイを示す。

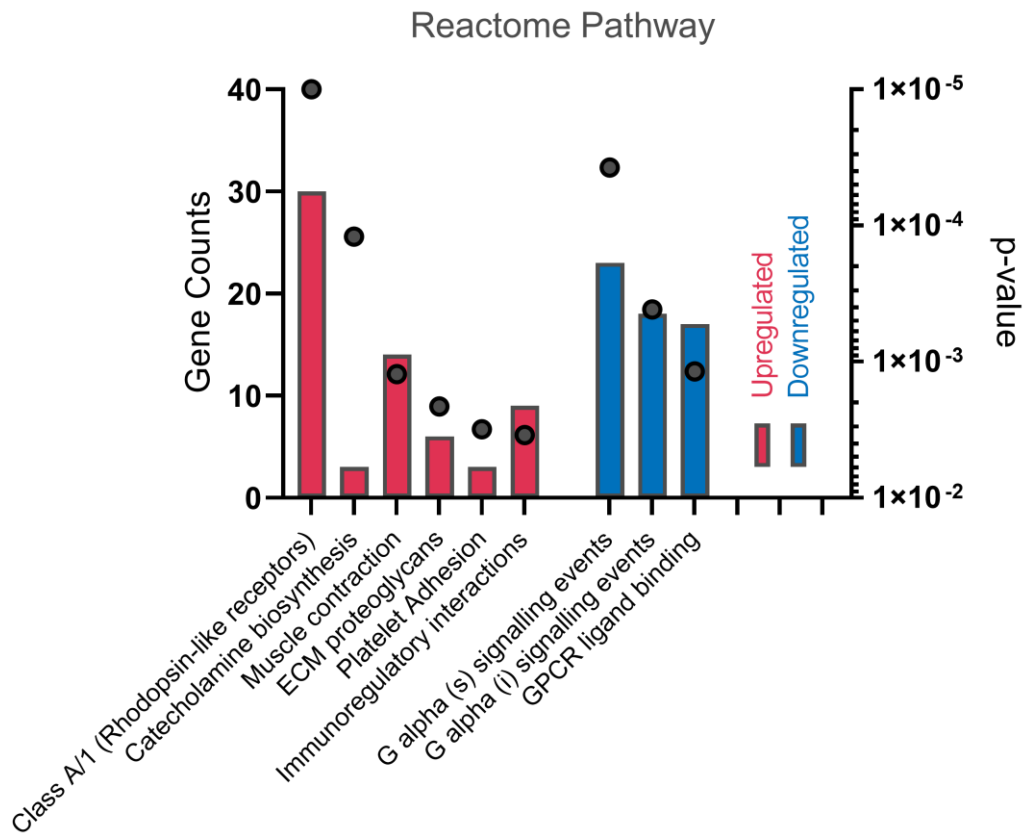


Figure 14. SD 負荷 MRL/lpr において特徴的な差異発現遺伝子に関するパスウェイ (Reactome pathway)

SD 負荷 MRL/lpr において特徴的に発現変化している遺伝子を用いて, Reactome pathway 解析で抽出されたパスウェイを示す.

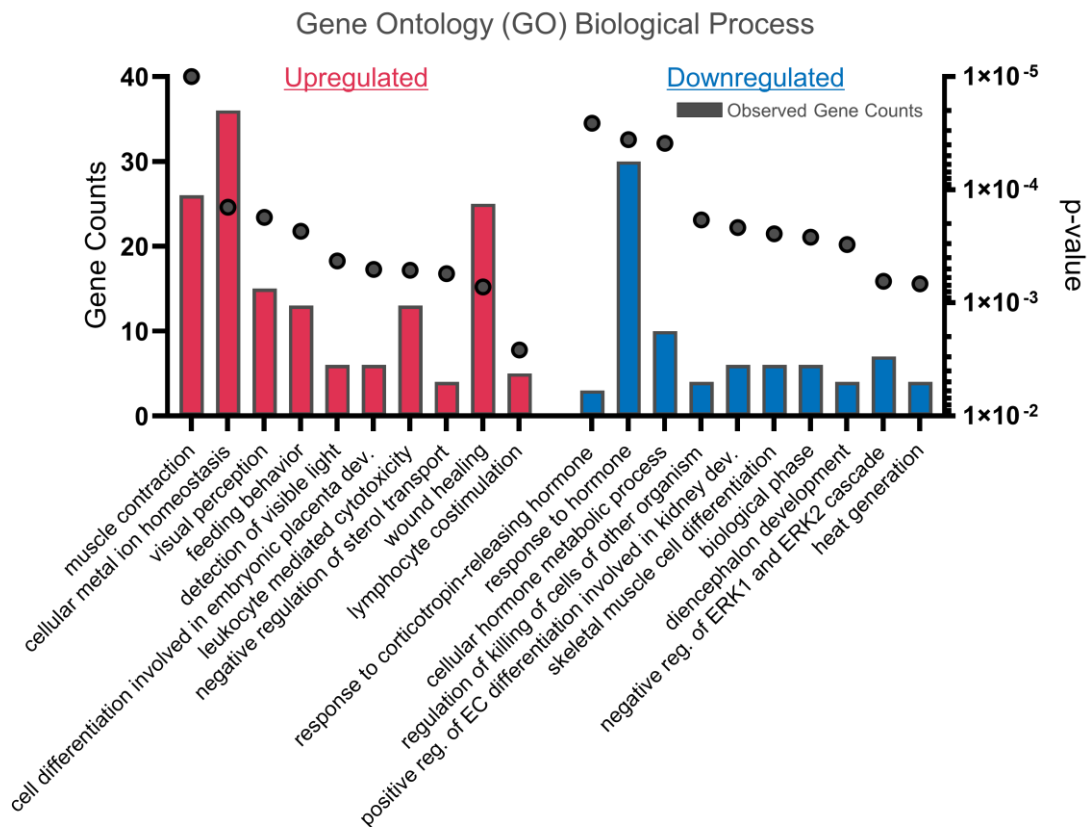


Figure 15. SD 負荷 MRL/lpr において特徴的な差異発現遺伝子に関する生物学的機能 (GO Biological Process)

SD 負荷 MRL/lpr において特徴的に発現変化している遺伝子を用いて, GO Biological Process 解析で抽出された生物学機能を示す.

SLEは自己免疫性の全身性炎症疾患であり、我々は炎症に関連する遺伝子について着目した。上述のパスウェイ解析から372の炎症関連遺伝子を抽出し、解析を実施した。SD 負荷 MRL/lpr マウスでは、*H2-Eb1*, *C3*, *Nos2*, *Il12b* や *Fcgr4* などの27のミクログリア活性化遺伝子の発現亢進と *Arg1* や *Trem14* などの13のミクログリア不活性化遺伝子の発現低下を認めた (Figure 16)。

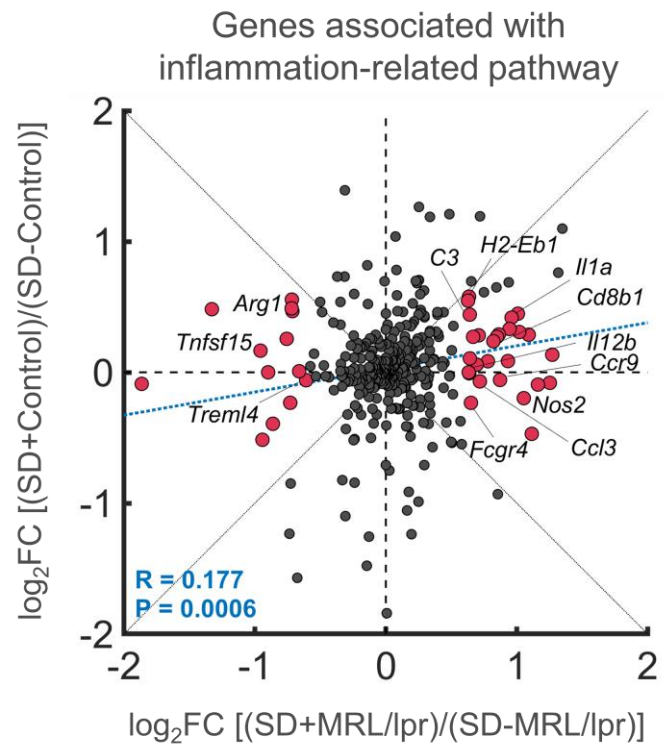


Figure 16. MRL/lpr と MRL/MpJ における SD 負荷による前頭前皮質の炎症関連遺伝子発現の変化

MRL/lpr およびコントロールマウスの前頭皮質組織における SD 負荷による炎症関連遺伝子発現の変化. SD 負荷により MRL/lpr で特徴的に発現が変化する遺伝子を赤で示した. $R = 0.177$, 線形回帰による Pearson の相関係数.

これらのミクログリア活性化遺伝子を用いて, TRRUST データベースによる上流制御遺伝子検索で, *Nfatc2*, *Nfkb1*, *Rel*, *Irf1* や *Hdac1* といった 10 の遺伝子が同定された (Figure 17A). これらの遺伝子は過去に SLE 発症の危険因子として指摘されている. このうち, 9/10 は *Il12b* 発現を制御しており, SD 負荷 MRL/lpr で発現が大きく異なっていることがわかった (Figure 17B).

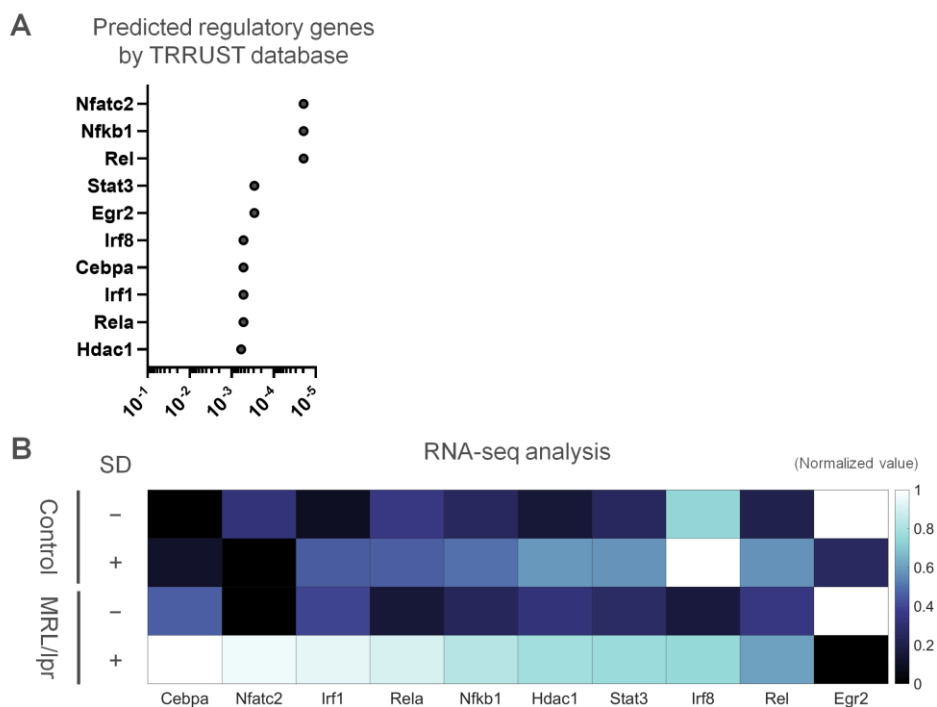


Figure 17. TRRUST データベースを用いた上流制御遺伝子の検索

(A) TRRUST データベースを用いた SD 誘発性炎症関連遺伝子の制御因子予測. 点は偽陽性発見率調整 p 値 (q 値) を示す. (B) ヒートマップは TRRUST データベースから選択された 10 遺伝子の, RNA-seq における各遺伝子毎の正規化発現量を示す.

我々は, SD 負荷 MRL/lpr の前頭前皮質領域の *Il12b* 発現は他のマウス群と比較して, RNA-seq で有意に高発現していることを示すととも (Figure 18A), 定量的 real-time PCR 法でも同様の高発現を確認した (Figure 18B).

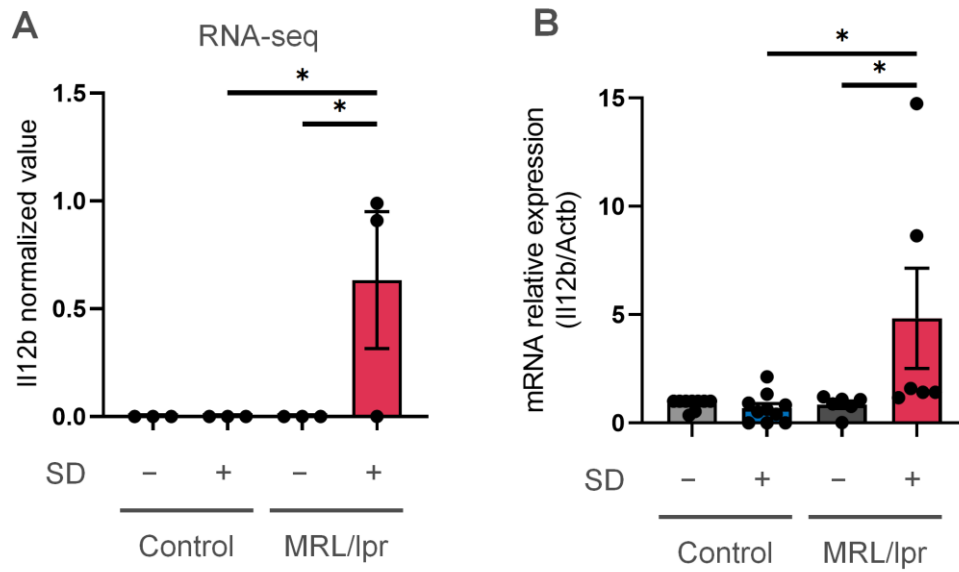


Figure 18. 前頭前皮質における *I112b* 発現

(A) SD 負荷および非負荷 MRL/lpr マウス, コントロールマウスにおける *I112b* 発現正規化値 ($n = 3$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. $*q < 0.05$, SD 負荷 MRL/lpr と SD 非負荷 MRL/lpr, SD 負荷および非負荷コントロールマウスとの比較, Benjamini-Hochberg 法. (B) SD 非負荷 MRL/MpJ に対する各マウス群の *I112b* メッセンジャーRNA 発現量 ($n = 6$ to 10 per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. $*p < 0.05$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

次に、我々は SD システムの系において、髄液中の複数のサイトカインやケモカインの濃度を、マルチプレックスビーズアッセイを用いて測定した。SD 負荷 MRL/lpr は他のマウス群と比較して、TNF- α , IL-3, IL-17A, CCL2, CCL5 や IL-12/23p40 の濃度が最も高値であった (Figure 19).

Multiplex cytokine/chemokine beads analysis of CSF

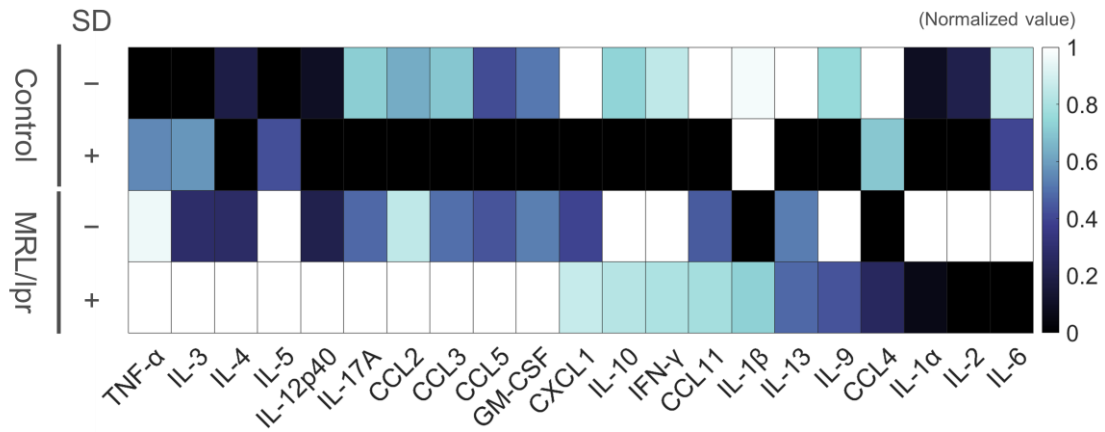


Figure 19. 髄液のマルチプレックスビーズサイトカイン・ケモカインアッセイヒートマップは髄液サイトカイン・ケモカインのマルチプレックスビーズアッセイによるアナライト毎に正規化した濃度を示す。

最後に ELISA で、マルチプレックスアッセイの結果を検証した. SD 負荷 MRL/lpr の血清 IL-12/23p40 値は SD 非負荷 MRL/lpr より低かったが (Figure 20A), 確かに髄液 IL-12/23p40 値は SD 負荷 MRL/lpr で高値を認めた (Figure 20B).

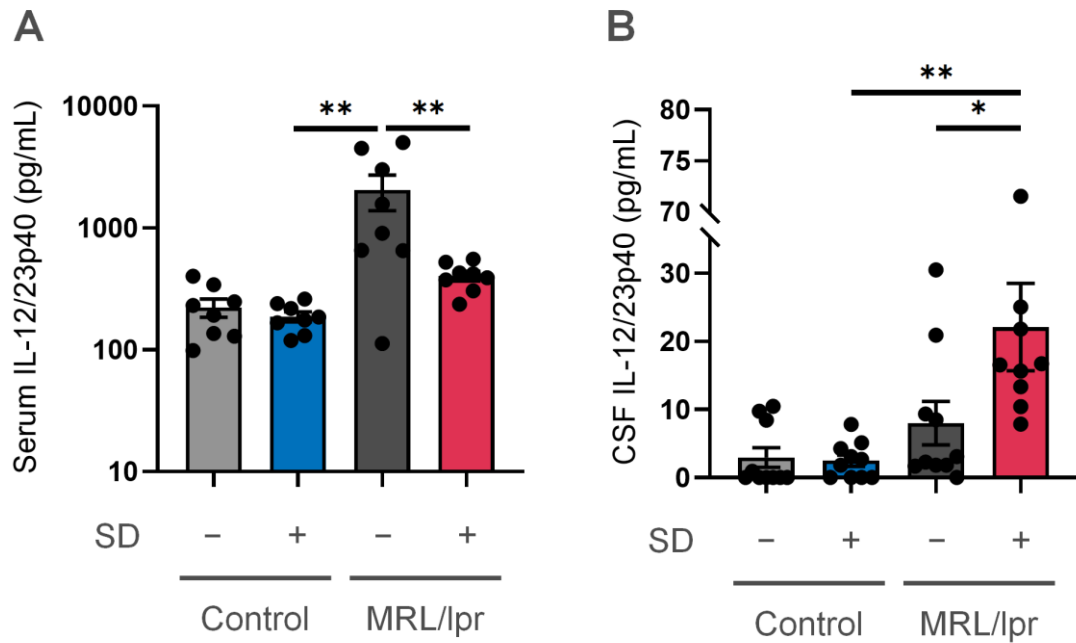


Figure 20. ELISA 法による血清・髄液 IL-12/23p40 値の定量・比較
 (A) 血清 IL-12/23p40 値 ($n = 8$ per group). (B) 髄液 IL-12/23p40 値 ($n = 9-10$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

4.6.3 結論

我々は SD 負荷 MRL/lpr の前頭皮質組織における *Il12b* を含む炎症関連遺伝子発現亢進を発見し、これらはミクログリア活性化に関連するものであった。更に *Il12b* 遺伝子は IL-12 の p40 サブユニットをコードしており、蛋白レベルにおいても、SD 負荷 MRL/lpr マウスでは髄液中で高値を認めた。この p40 サブユニットは IL-23 にも利用されており、すなわち IL-12/23p40 は IL-12 と IL-23 は炎症や免疫制御に重要な役割を果たす。この IL-12/23p40 は現在、臨床において自己免疫疾患の治療標的となっている (Teng et al., 2015)。SD 負荷 MRL/lpr では IL-12/23 経路の亢進が示唆され、表現型との関連がある可能性が考えられた。

4.7 IL-12/23p40 の中枢神経系における産生・標的細胞

我々は次に中枢神経系において、どの細胞が IL-12/23p40 を産生するのか、また、引き続いて、どの細胞が IL-12/23p40 を受容し、ストレスを受けた MRL/lpr の異常行動に影響を与えるのかを、フローサイトメトリー (flowcytometry: FCM) 法や免疫組織化学法などを用いて評価した。

中枢神経系細胞の遺伝子発現に関する公共データベースでは、中枢神経系細胞のうちで、唯一ミクログリアで *Ill2b* 発現を認めることが示されている (Figure 21 and 22) (Consortium, 2020; Zhang et al., 2014).

また、IL-12 の受容側として、既報では、ニューロンが IL-12 受容体を発現しており、IL-12 が神経突起の外測への成長を促進することが報告されている (Ireland and Reiss, 2004; Lin et al., 2000).

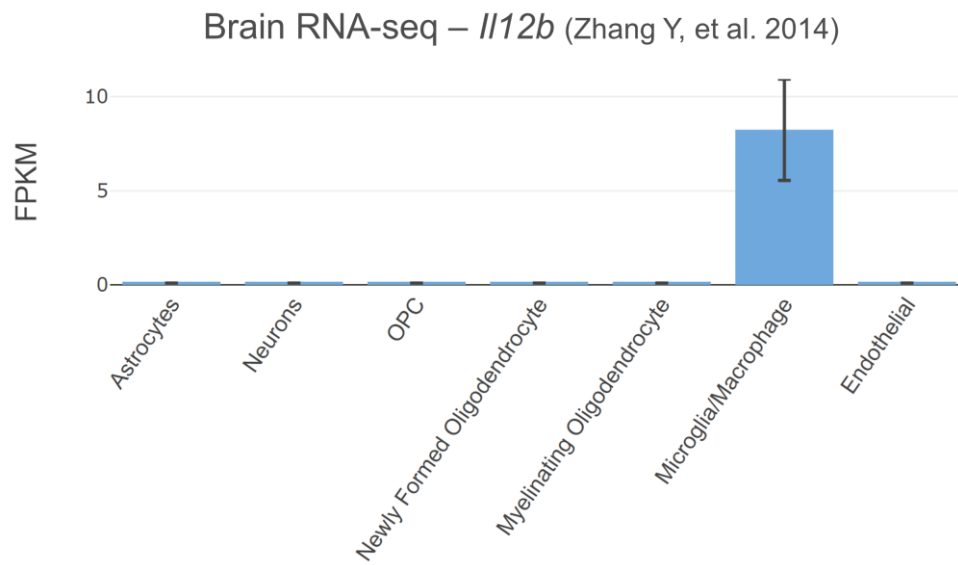


Figure 21. Bulk-RNA-seq によるマウス中枢神経系細胞の *I112b* 発現
 マウス中枢神経系細胞の *I112b* 遺伝子発現. ミクログリアで *I112b* は突出して発現を認めている. データは Barres 研究室の RNA-seq データより引用した (www.brainrnaseq.org/). データは平均値±標準誤差で示した (Zhang et al., 2014).

Tabula Muris Senis – Brain-myeloid cells (The Tabula Muris Consortium. 2020)

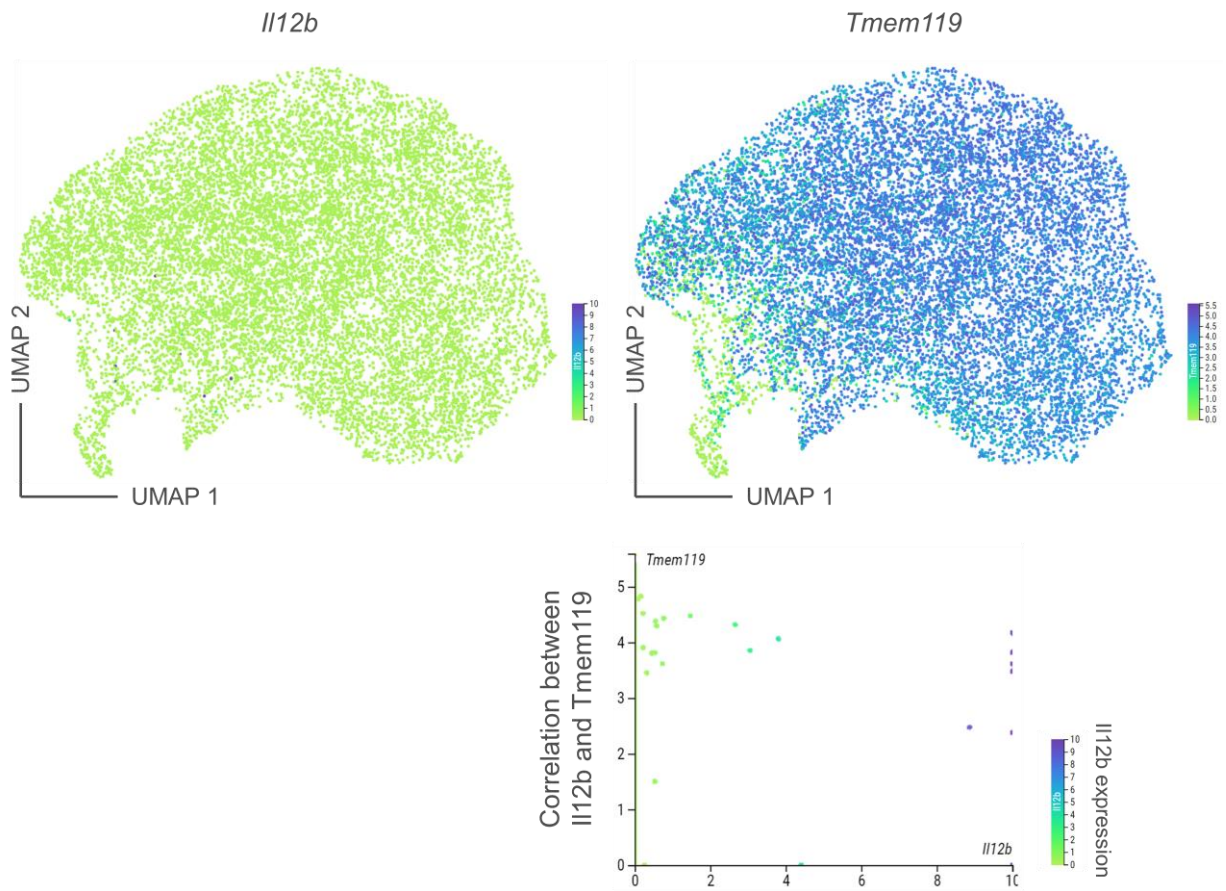


Figure 22. Single cell-RNA-seq によるマウス中枢神経内単球系細胞の *Il12b* 発現 Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) 法により色付けされた *Il12b* とミクログリア特異的遺伝子である *Tmem119* のマウス中枢神経系単球系細胞における発現. 右下図は *Il12b* および *Tmem119* の発現量の相関を示した. データは the Tabula Muris Consortium より引用した (Consortium, 2020).

4.7.1 方法

4.7.1.1 中枢神経系細胞の免疫組織化学染色による解析

免疫組織化学法は 4.5.1.1 のプロトコールを用いて実施した。なお、1 次抗体として、抗 Iba-1 抗体 (1:400, 013-27691, Wako and NB100-1028, Novus Biomedicals), 抗 CD68 抗体 (1:300, MCA1957GA, Serotec), 抗 TCR β 抗体 (1:200, 109208, BioLegend), 抗 I-A/I-E 抗体 (1:200, 107614, BioLegend), 抗 IL12R β 1 抗体 (1:100, A1886, ABclonal) と抗 NeuN 抗体 (1:500, ABN90, Merck) を用いた。

4.7.1.2 活性化ミクログリアの定量解析

1 匹のマウス当たり mPFC 領域を含む 2 枚の 50 μ m 冠状断切片をミクログリアマーカーである Iba-1 とミクログリア活性化を示すリソソームマーカーである CD68 を用いて免疫染色した。各切片では、2 枚の 20 倍視野フルフォーカス像を撮像し、解析を実施した。ミクログリア活性化状態は CD68 発現パターンに応じて、0 点 (最も低い活性化状態) から 4 点 (最も高い活性化状態) までスコア化した。具体的には、CD68 発現が「無いか非常に少ない」は 0 から 1 点、「点状で認める」は 2 点、「複数の点状で認める」は 3 点で「凝集して認める」は 4 点とした。スコアが 3-4 点の活性化ミクログリアを反応性ミクログリアとして、マウス群毎に反応性ミクログリアの平均割合を算出した (Figure 23)。

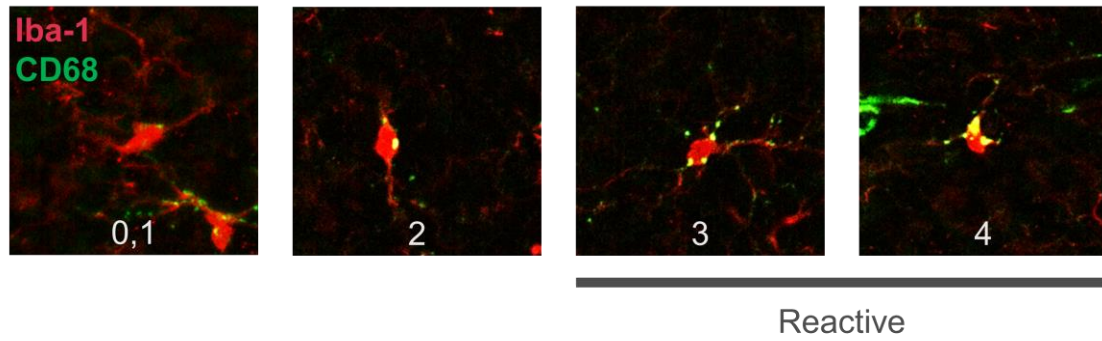


Figure 23. ミクログリア活性化の定量的スコアリング

マウス脳神経組織における Iba-1 と CD68 染色によるミクログリア活性化に関するスコアリングの代表的免疫組織染色図. スコアが3点以上のミクログリアを反応性ミクログリアと定義した.

4.7.1.3 中枢神経系細胞の単細胞化と FCM による解析

ペントバルビタール塩で麻酔したマウスを 20 mL の無菌性 PBS で経心的灌流し、大脳皮質を切除した。皮質組織は Hanks 平衡塩溶液 (Hanks' balanced salt solution: HBSS) で洗浄後に、機械的細断および Neural Tissue Dissociation kit (P) (Miltenyl Biotec) を用いたパパイイン酵素的に分解した。ミエリン除去のために、細胞は 0.9 M のスクロース溶液に再懸濁し、400 g, 10 分間で遠心処理し、ミエリンを含む上清を吸引し、ペレットの混合グリア細胞を回収し、HBSS で洗浄の上で更なる解析へ進んだ。

なお、ミクログリアのサイトカイン検出においては、大脳皮質切除の 18 時間前にマウスに 200 のリポ多糖 (L8274, Sigma-Aldrich) を腹腔内投与し、グリア細胞の単細胞化後に抽出細胞を 10% 胎児ウシ血清 (fetal bovine serum: FBS) と brefeldin A を含む Golgi plug (BD) が添加された Ham F-12 栄養栄養混合 Dulbecco 改変 Eagle 培地で 4 時間培養を実施してから解析へ進んだ。

また、神経細胞分離は、Adult mouse Neuron Isolation Kit (Miltenyl Biotec) を用いて、取り扱い説明書に則り、磁気細胞分離システムで負の選択を受けた細胞をニューロンとして集めた。

細胞は、生細胞・死細胞分離のために Zombie Fixable Viability Kit (BioLegend) で染色し、抗 CD16/CD32 抗体 (clone: 2.4G2) で 10 分間ブロッキングを実施した。細胞表面染色では、抗体は抗 5% FBS および 5 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) 添加 PBS で希釈した。細胞内染色では、細胞を固定・透過処理 (Fixation/Permeabilization Solutions, BD) してから、染色作業を行った。使用した抗体は CD11b (clone: M1/70, BioLegend), CD45 (30-F11, BioLegend), CX3CR1 (SA011F11, BioLegend), CD140a (APA5, BioLegend), ACSA-2 (REA969, Miltenyl Biotec), MBP (2H9, Novus Biologicals), IL-12/IL-23p40 (C15.6, BioLegend), TUBB3 (TUJ1, BioLegend) and phospho-Stat4 (4LURPIE, eBioscience) の抗原に対するモノクローナル抗体を使用した。染色後の細胞は CytoFLEX S (Beckman Coulter) で検出し、データは FlowJo ソフトウェア (BD) で解析した (Figure 24).

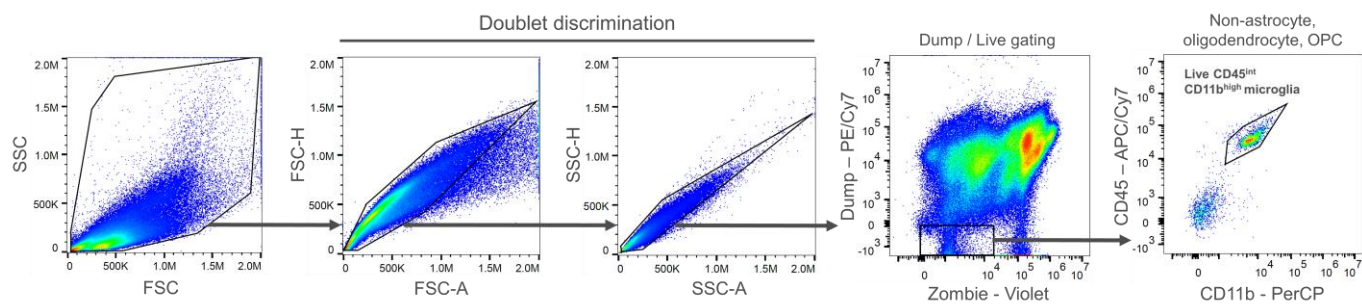


Figure 24. ミクログリアのゲート戦略

ミクログリア同定のためのゲート戦略の代表図. ダブレット処理後に Zombie 陽性 (死細胞), ACSA-2 陽性 (アストロサイト), CD140a 陽性 (オリゴデンドロサイト前駆細胞), MBP 陽性 (オリゴデンドロサイト) を除外した. $CD45^{int}CD11b^{high}$ 細胞群を生存ミクログリアとして選択した.

4.7.1.4 Golgi-Cox 染色による神経軸索突起スパイン評価・定量

Golgi-Cox 染色は superGolgi Kit (Bioenno Lifesciences) を用いて実施した。脳は 20 mL の冷却生理食塩水で経心的灌流後にマウスより採取した。摘出した脳は両側 mPFC 領域が含まれるように前方鼻側で約 $1 \times 2 \times 1 \text{ cm}^3$ のサイズに切断した。染色後の脳ブロックはビブラトーム (Leica) を用いて $200 \mu\text{m}$ 切片に薄切し、切片はゼラチン塗布スライドに塗抹し、Mount Quick (Daido Sangyo) で包埋した。Z 軸方向にスタックした画像を BZ-X800 (Keyence, Japan) で撮像し、フルフォーカス解析機能を用いて処理・解析した。

神経軸索突起スパインの解析では、100 倍視野環状断切片の第 2/3 層錐体神経細胞について観察した。各撮影像の 1-2 枚のフルフォーカス画像に含まれる 1 ニューロン当たり 5-7 樹状突起について、細胞体より $40 \mu\text{m}$ 近位にある樹状突起スパインの密度を計算した。同部位は通常スパイン密度は低いとされている (Spruston, 2008)。また、第 2/3 層ニューロンは慢性生理学的なストレスの影響を受けやすいと報告されていることから、同部位の樹状突起スパインについて観察することとした。

4.7.1.5 Recombinant IL-12/23p40 の mPFC への定位微量注射

8 週齢の MRL/MpJ コントロールマウスを脳定位装置 (Narishige, Japan) に固定した。頭蓋骨表面を露出され、70%エタノールで清拭し、ハミルトンシリンジを接続した 26 ゲージ針を mPFC 領域へ刺入した。mPFC 領域は冠状縫合と矢状縫合が結合する Bregma より側方+0.3 mm, 前後方+1.8 mm と深度-2.0 mm と定義した。Recombinant マウス IL-12/23p40 (150 ng/0.5 μL , BioLegend) または PBS を 8 分以上かけて、mPFC 領域へ微量注射し、48 時間後にマウスを解析した。

4.7.2 結果

我々はまず末梢免疫細胞の中樞神経浸潤を解析することとした。高齢の MRL/lpr マウスの脳では特に T 細胞が見られることが報告されている (Ma et al., 2006)。14 週齢の MRL/lpr では CNS における末梢 T 細胞浸潤が見られたが、8 週齢の MRL/lpr では末梢免疫細胞はほとんど認めなかった (Figure 25 and 26)。したがって、我々は IL-12/23p40 産生細胞として、中枢神経系細胞に着目した。

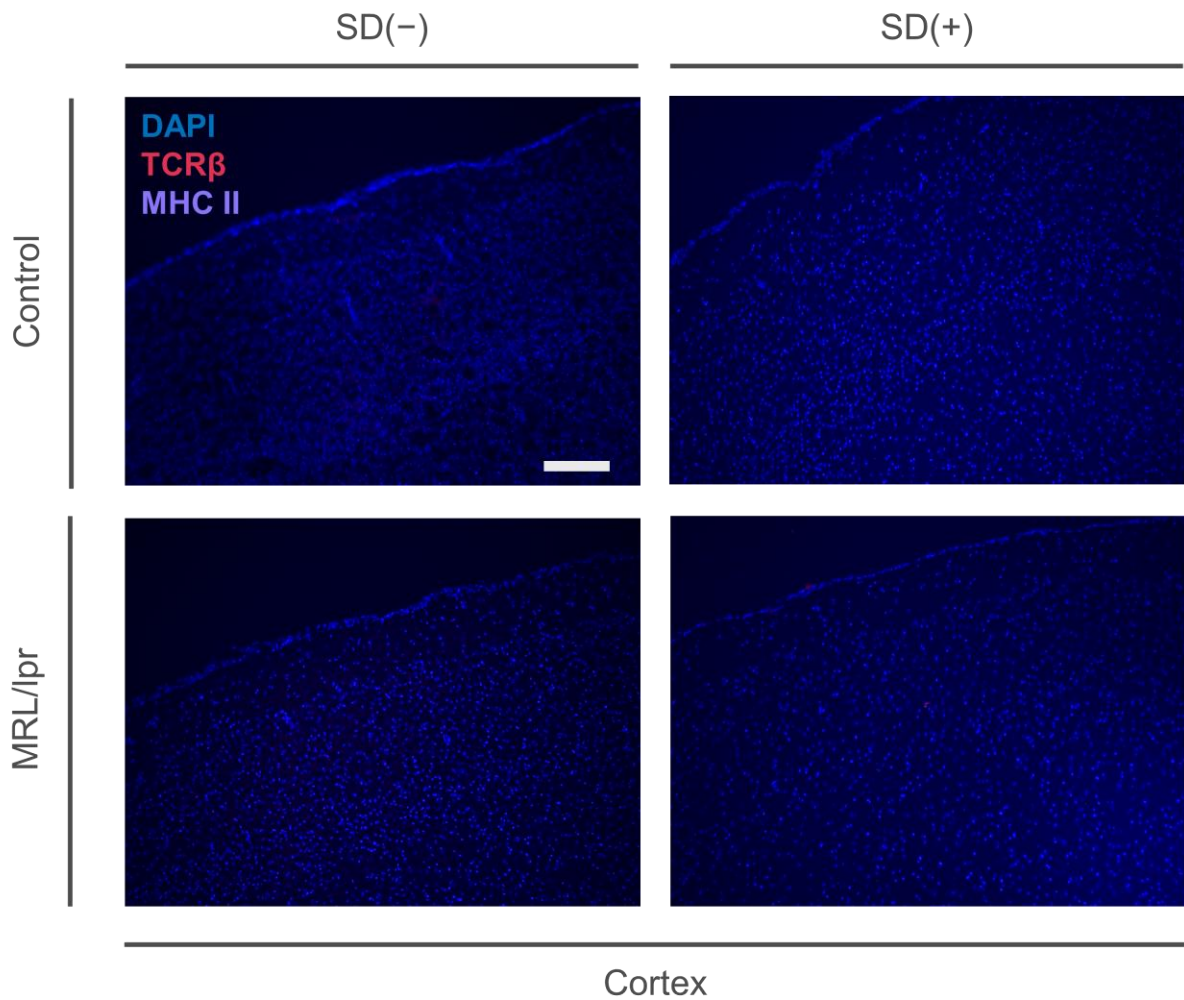


Figure 25. 免疫組織化学による SD モデルでの T 細胞を含む末梢免疫細胞の CNS 浸潤の乏しさ

SD 負荷または非負荷マウスの大脳皮質における TCR β と MHC Class II (I-A/I-E) 陽性細胞の免疫組織染色代表図. スケールバー, 200 μm .

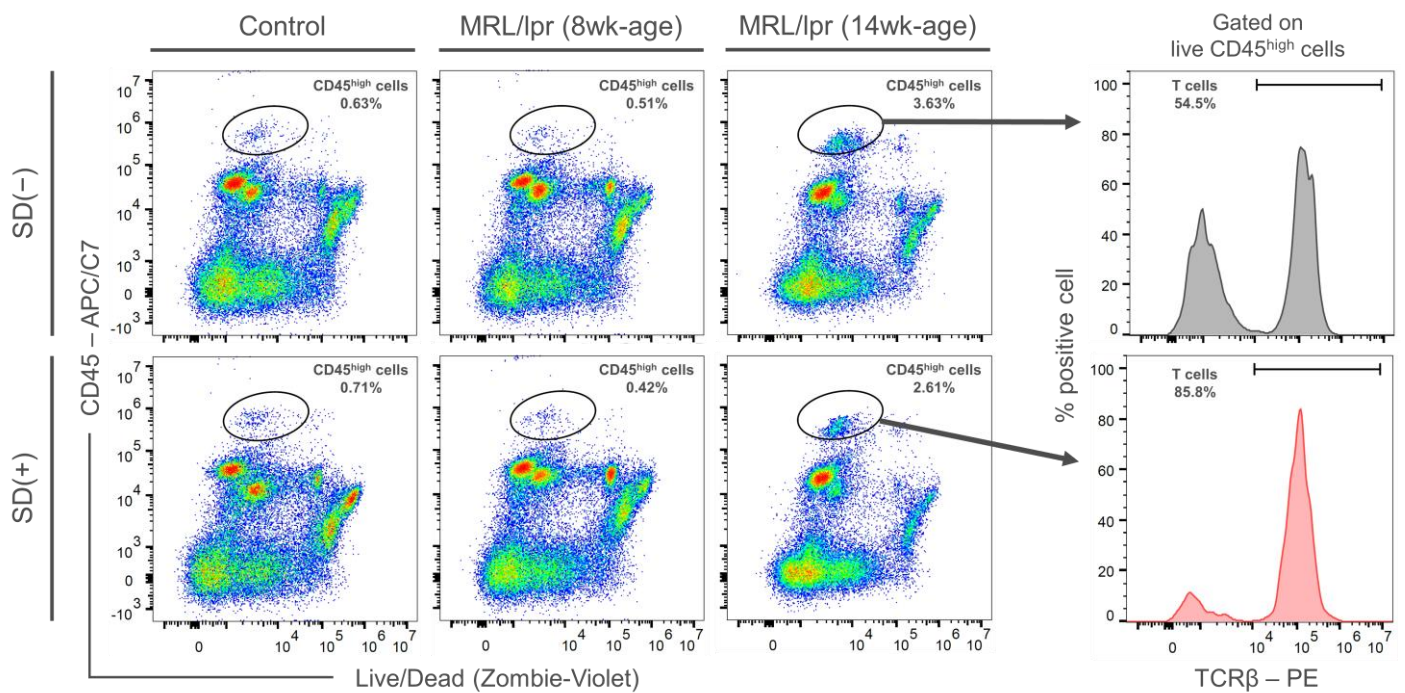


Figure 26. FCM による SD モデルでの T 細胞を含む末梢免疫細胞の CNS 浸潤の乏しさ

CD45^{high} 陽性細胞浸潤を評価するための、大脳皮質の代表的ゲート図. 特に TCRβ 陽性細胞を含む CD45^{high} 陽性細胞は SD 負荷に関連なく週齢依存性に CNS 浸潤を認め、6-8 週齢ではほとんど CNS 浸潤を認めないことを確認した.

SD 負荷 MRL/lpr では 4.6.3 の RNA-seq 解析よりミクログリア活性化が示唆されていた. SD 負荷 MRL/lpr では mPFC 領域において, ミクログリア密度に影響なく, CD68 陽性シグナルが豊富な活性化ミクログリアが増多していた (Figure 27, A-C).

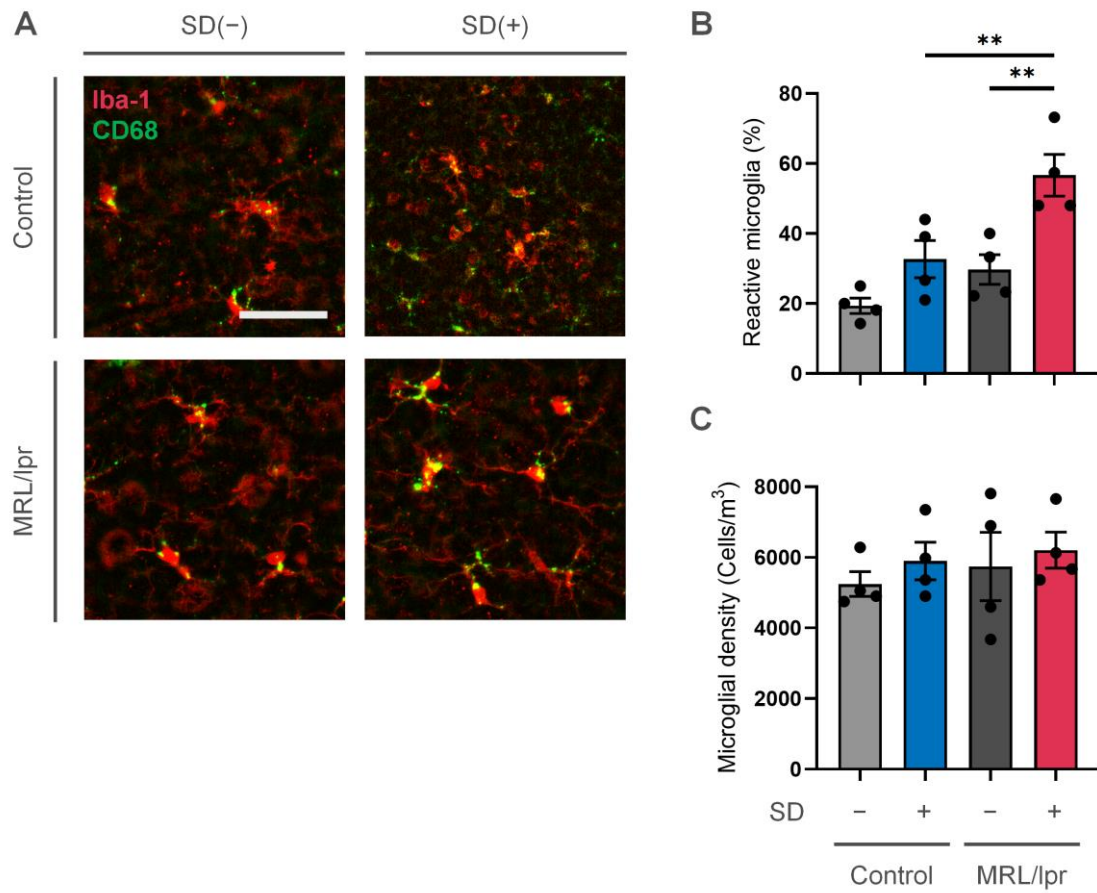


Figure 27. mPFC 領域におけるミクログリア活性化状態に関する解析
 (A) リソソームマーカーCD68 と Iba-1 陽性ミクログリアの免疫組織化学代表図.
 (B) 活性化ミクログリアの割合と (C) ミクログリア密度 ($n = 4$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. $**p < 0.01$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

更に, FCM 解析でも IL-12/23p40 産生する皮質ミクログリアの割合は SD 負荷 MRL/lpr で増加していた (Figure 28, A and B).

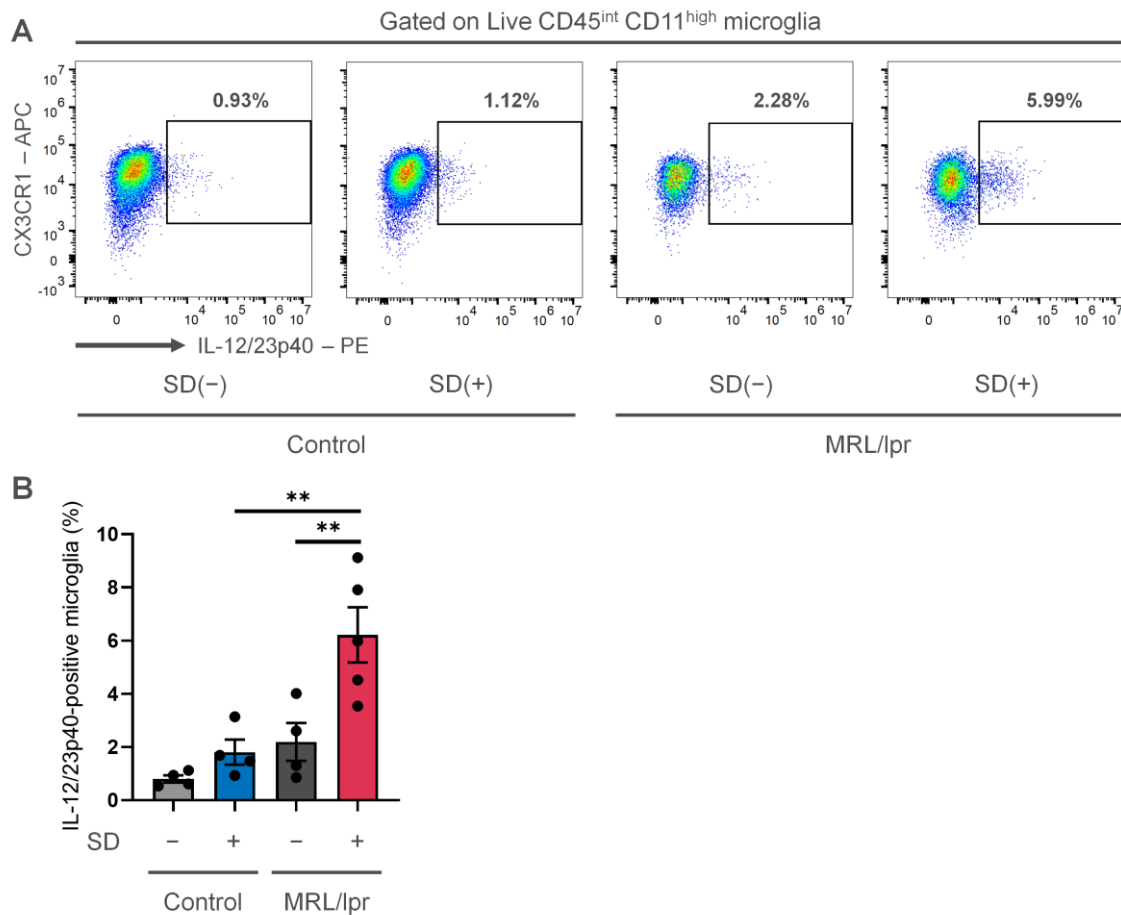


Figure 28. IL-12/23p40 産生する生存 CD45^{int}CD11b^{high}CX3CR1 陽性皮質ミクログリアの FCM 解析

(A) IL-12/23p40 陽性ミクログリアの代表ゲート図. (B) IL-12/23p40 産生ミクログリアの割合 ($n = 4-5$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. ** $p < 0.01$, 2元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

次に IL-12/23p40 を受容する細胞について検討した. 我々のモデルにおいて, MRL/lpr マウスとコントロールマウスの両マウス株で mPFC 領域のニューロンに IL-12/23p40 の受容体である IL12R β 1 の発現を認めた (Figure 29).

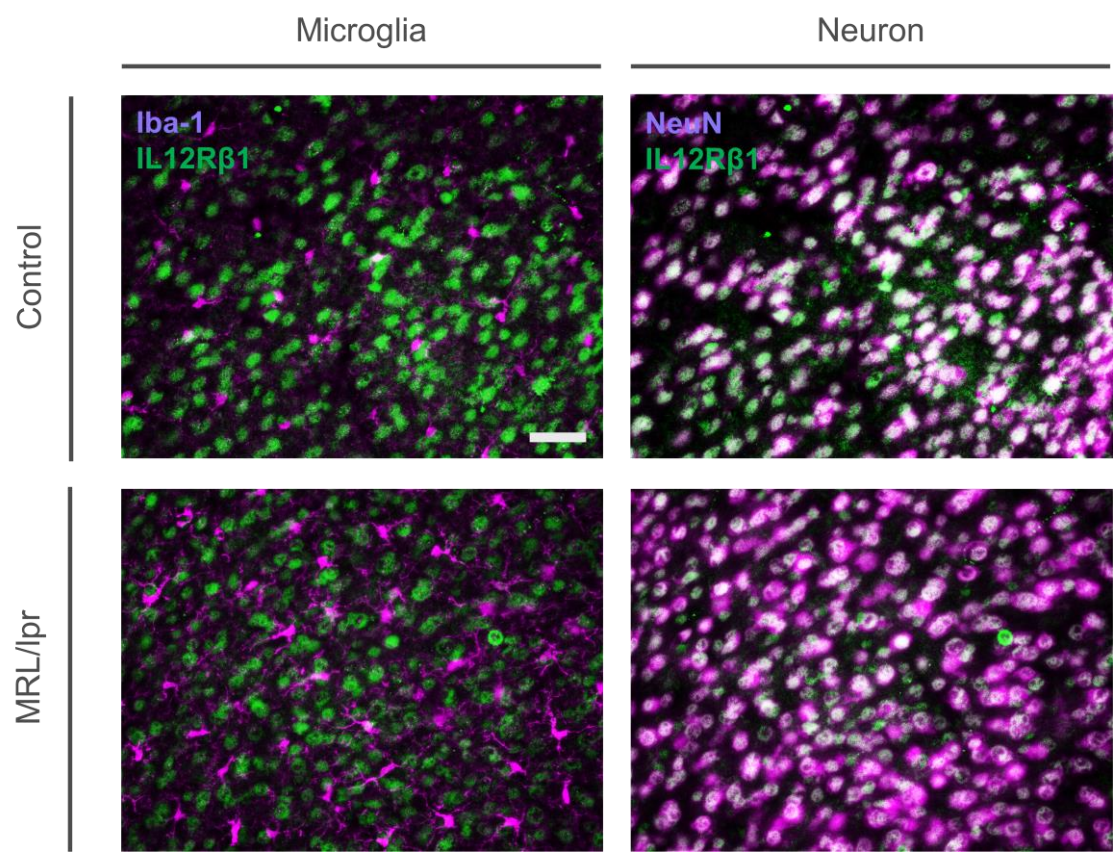


Figure 29. 神経の IL12R β 1 発現

Iba-1 陽性ミクログリアと NeuN 陽性ニューロンと IL12R β 1 の免疫組織化学法による共発現解析. スケールバー, 100 μ m.

我々は IL-12/23 シグナル経路の下流に存在する Stat4 のリン酸化が SD 負荷 MRL/lpr で最も強く起こっていることを確認した (Figure 30). これは, ストレス負荷 MRL/lpr の mPFC ニューロンにおける IL-12/23 シグナルの活性化を示唆している (Figure 30, A and B).

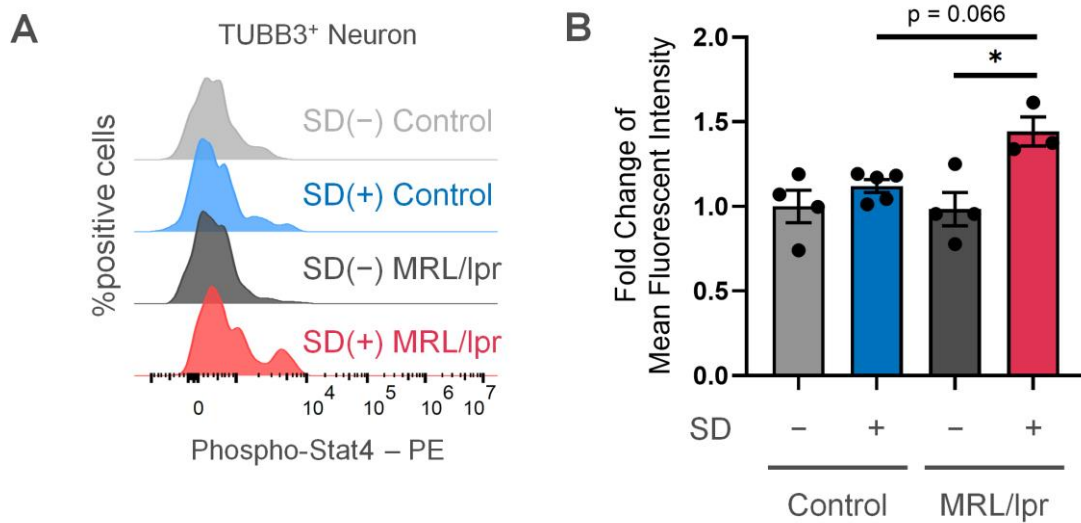


Figure 30. TUBB3 陽性ニューロンにおけるリン酸化 Stat4 発現解析

(A) リン酸化 Stat4 についての、FCM の代表的ヒストグラム. (B) SD 非負荷コントロールマウスに対する平均蛍光強度の倍率変化 ($n = 4-5$ per group). データは平均値±標準誤差で示した. * $p < 0.05$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

更に, Goigi-Cox 染色を用いて, SD 負荷 MRL/lpr で mPFC の神経細胞体近位樹状突起スパインの増多を認めることがわかった (Figure 31, A and B).

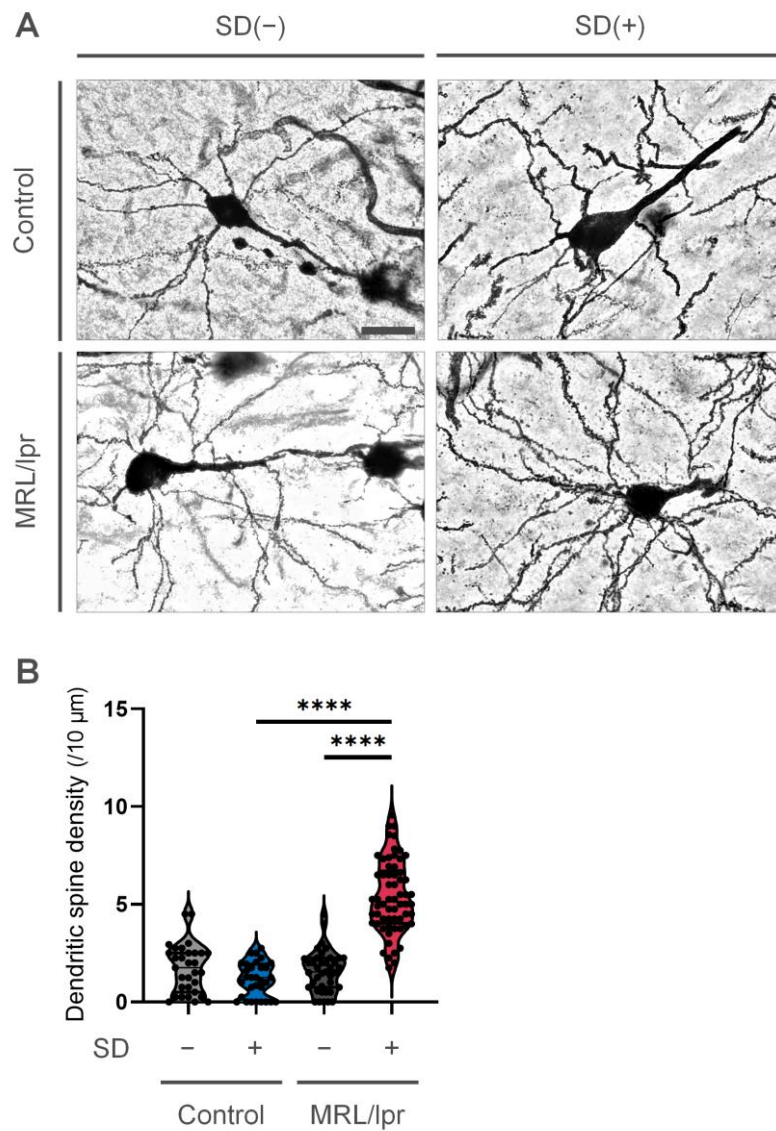


Figure 31. mPFC ニューロンにおける Golgi-Cox 染色

(A) 第 2-3 層錐体ニューロンの代表図. スケールバー, 20 μm. (B) 第 2-3 層錐体ニューロン細胞体近位の樹状突起スパイン密度定量化 ($n = 31-62$ dendrites per group). データは中央値(四分位範囲)で示した. **** $p < 0.0001$, 2 元配置分散分析および Tukey-Kramer 多重比較検定.

また、リコンビナント IL-12/23p40 を mPFC へ定位投与した MRL/MpJ コントロールマウスにおいても、SD 負荷 MRL/lpr マウスに類似した異常な樹状突起スパインを同部位で認めた (Figure 32).

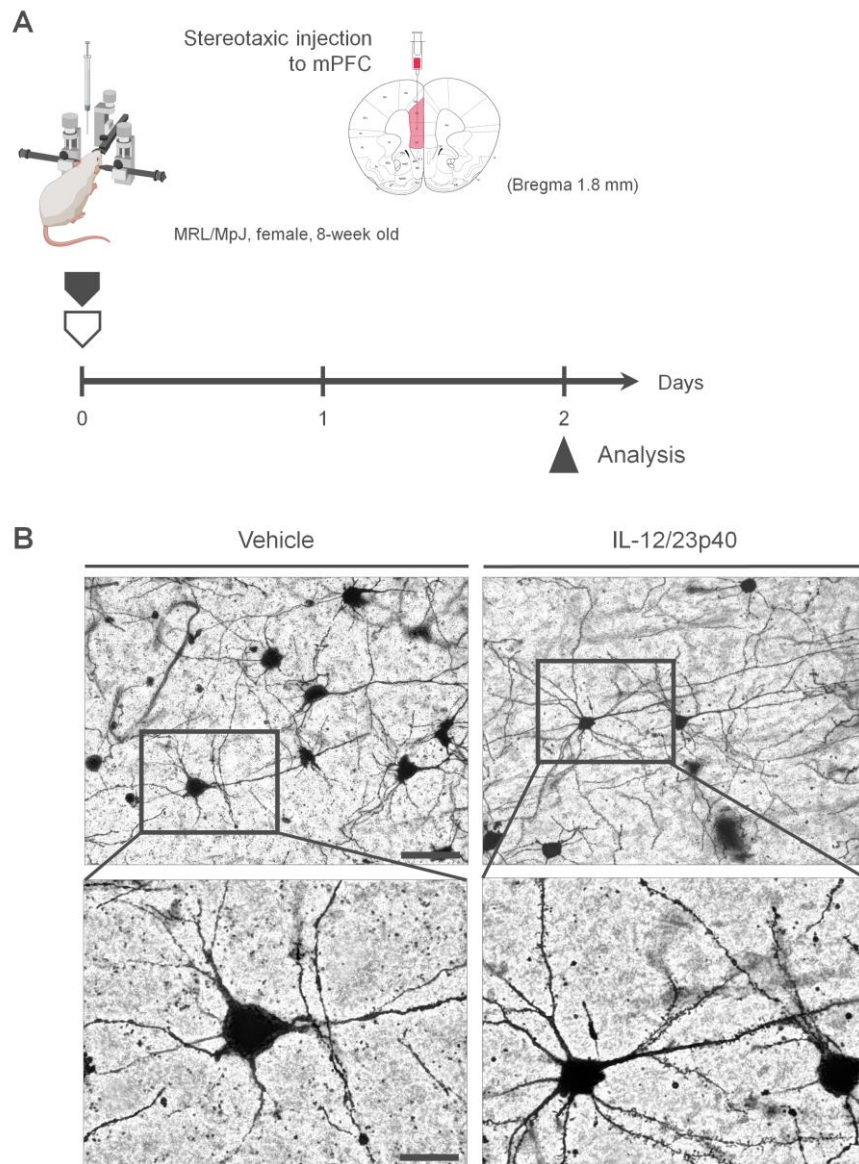


Figure 32. IL-12/23p40 の脳定位注射による樹状突起スパインの形態変化
 (A) 脳定位注射による IL-12/23p40 の mPFC ニューロンに対する効果の評価のための実験デザイン. (B) IL-12/23p40 または担体投与 MRL/MpJ マウスにおける mPFC ニューロンの Golgi-Cox 染色図. 下図は上図内の四角で示される領域の拡大を示す. スケールバー, (上図) 100 μm , (下図) 20 μm .

4.7.3 結論

SD 負荷 MRL/lpr マウスでは慢性ストレス負荷によりミクログリアが活性化し, IL-12/23p40 産生が促進された. IL-12/23p40 は mPFC ニューロンの樹状突起スパイン増多という形態変化を誘導し, ループモデルマウスにおける精神神経病態に重要である可能性が示唆された.

4.8 IL-12/23 シグナル経路抑制による

SD 負荷 MRL/lpr の表現型改善

IL-12/23 シグナル経路の抑制が神経やミクログリアの表現型に影響を与えるかについて、IL-12/23p40 の中和抗体投与や IL-12/23p40 下流シグナルに関連するチロシンキナーゼ 2 (tyrosine kinase 2: Tyk2) 阻害薬の投与の実験系で解析を実施した。なお、Tyk2 は Janus-kinase ファミリーに含まれる酵素の 1 つであり、interferon- α , IL-6, IL-10, IL-12 や IL-23 の働きに関連している (Stark and Darnell, 2012).

4.8.1 方法

4.8.1.1 抗 IL-12/23p40 抗体の浸透圧ポンプを用いた脳室内持続投与

マウスモノクローナル IL-12/23p40 中和抗体 (C17.8, BioLegend, 1 mg/mL, 生理食塩水希釈) またはマウス immunoglobulin (Ig) G2a isotype control 抗体 (MG2a-53, BioLegend, 1 mg/mL) を 200 μ L の浸透圧ポンプ (Alzet) へ充填し, 14 日間かけて 1 時間 0.5 μ L の速度で投与した. 浸透圧ポンプはカニューラ (Brain infusion kit III, Alzet) に接続して, Bregma より側方+1.1 mm, 前後方-0.5 mm と深度-2.5 mm の右側脳室領域に先端を留置した. ポンプは皮下に設置した (Figure 33).

4.8.1.2 Tyk2 阻害薬の全身投与

マウスは 6 mg/kg の dimethyl sulfoxide (DMSO) に希釈した BMS-986165 (deucravacitinib) (10 mM, MedChemExpress, USA) または, 等量の DMSO を 2 週間 SD 実験下で毎日腹腔内注射した. BMS-986165 投与量は乾癬への臨床応用量を参考に決定した (Figure 34).

各種薬剤で IL-12/23 シグナル経路の抑制を行ったマウスの解析は 4.7.1 に示した方法と同様に実施した.

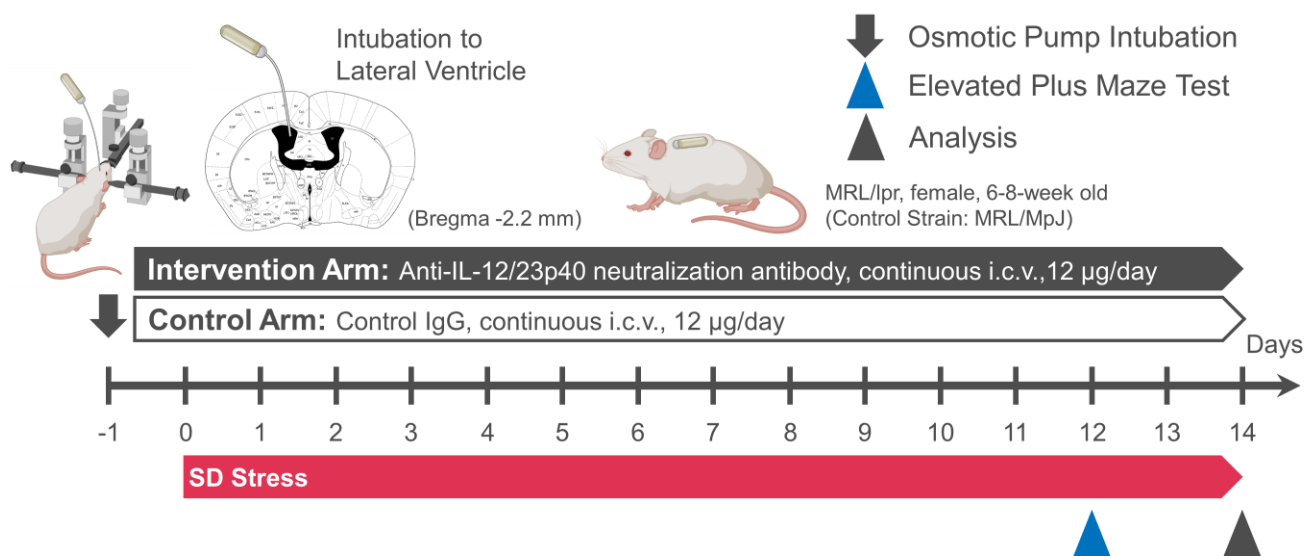


Figure 33. CNS 標的 IL-12/23p40 中和抗体阻害実験のシエーマ

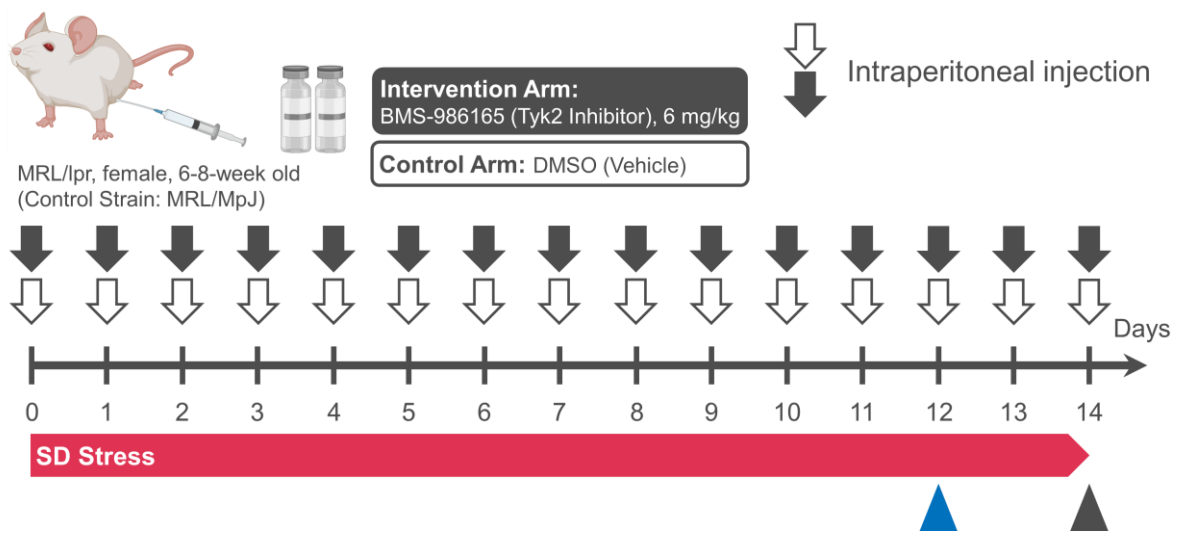


Figure 34. Tyk2 阻害薬の全身投与実験プロトコール

4.8.2 結果

まず, SD 負荷 MRL/lpr に浸透圧ポンプを埋め込み, 側脳室への IL-12/23p40 中和抗体の持続投与を 2 週間実施した. 投与された IgG は確かに mPFC 領域へ浸潤することを確認した (Figure 35). また, 中和抗体投与群の髄液 IL-12/23p40 濃度は有意に減少を認めた (Figure 36A). 血清 IL-12/23p40 濃度に影響は与えず (Figure 36B), CNS 特異的な IL-12/23p40 の阻害を確認した.

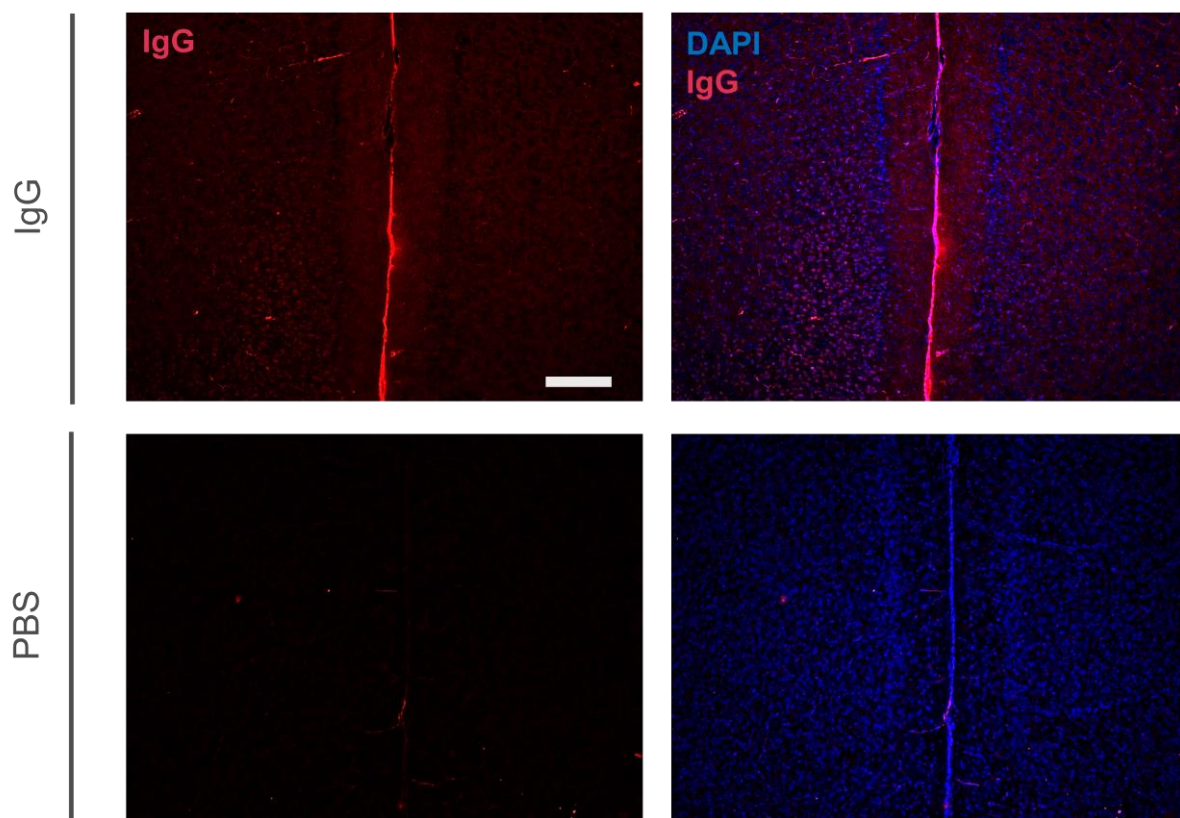


Figure 35. IgG の mPFC 領域への浸潤

浸透圧ポンプによる IgG または PBS の持続脳室内投与モデルの免疫組織染色代表図. IgG の mPFC 領域への浸潤を認めた. スケールバー, 200 μm .

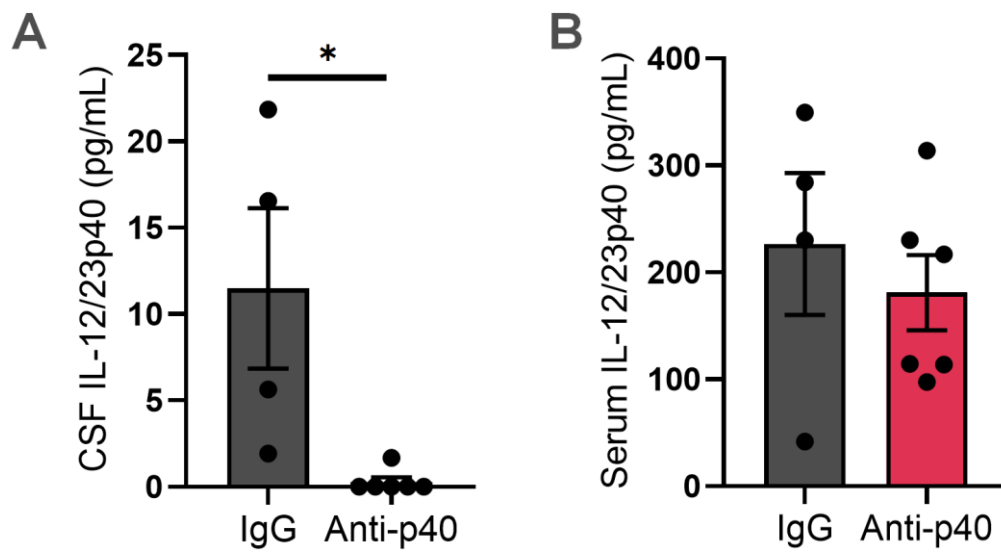


Figure 36. IL-12/23p40 投与モデルにおける髄液または血清 IL-12/23p40 濃度 (A) SD 負荷 MRL/lpr の中和抗体またはコントロール抗体脳室内投与による SD 負荷 MRL/lpr の髄液 IL-12/23p40 濃度 ($n = 4-6$ per group). (B) CNS IL-12/23p40 阻害による血清 IL-12/23p40 濃度に対する無効性 ($n = 4-6$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $p < 0.05$, 対応のない Student の T 検定.

このモデルにおいて、CNS IL-12/23p40 阻害は MRL/lpr において、コントロール IgG 投与群と比較して、慢性ストレス負荷による EPM における不安様行動の減少という行動異常を改善させた (Figure 37, A-C).

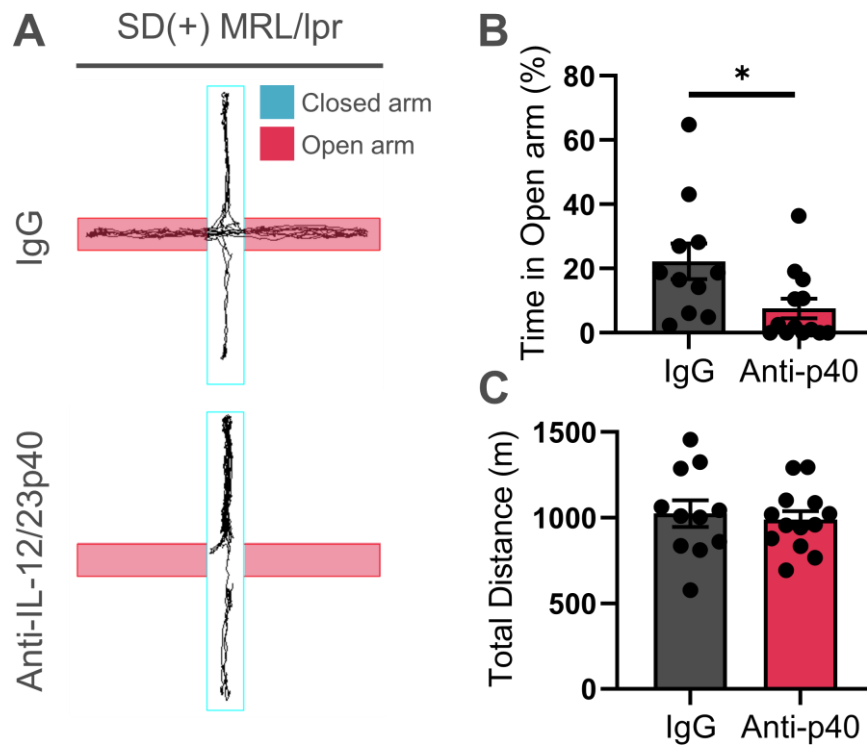


Figure 37. IL-12/23p40 中和による SD 誘導抗不安様行動の改善
 (A) EPM の代表的行動軌跡. (B) 開いたアーム滞在時間の割合と (C) 総移動距離 ($n = 11-13$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $p < 0.05$, 対応のない Student の T 検定.

更に, SD 負荷 MRL/lpr で観察される神経細胞体近位樹状突起スパインの異常な増加も IL-12/23p40 中和により改善した (Figure 38).

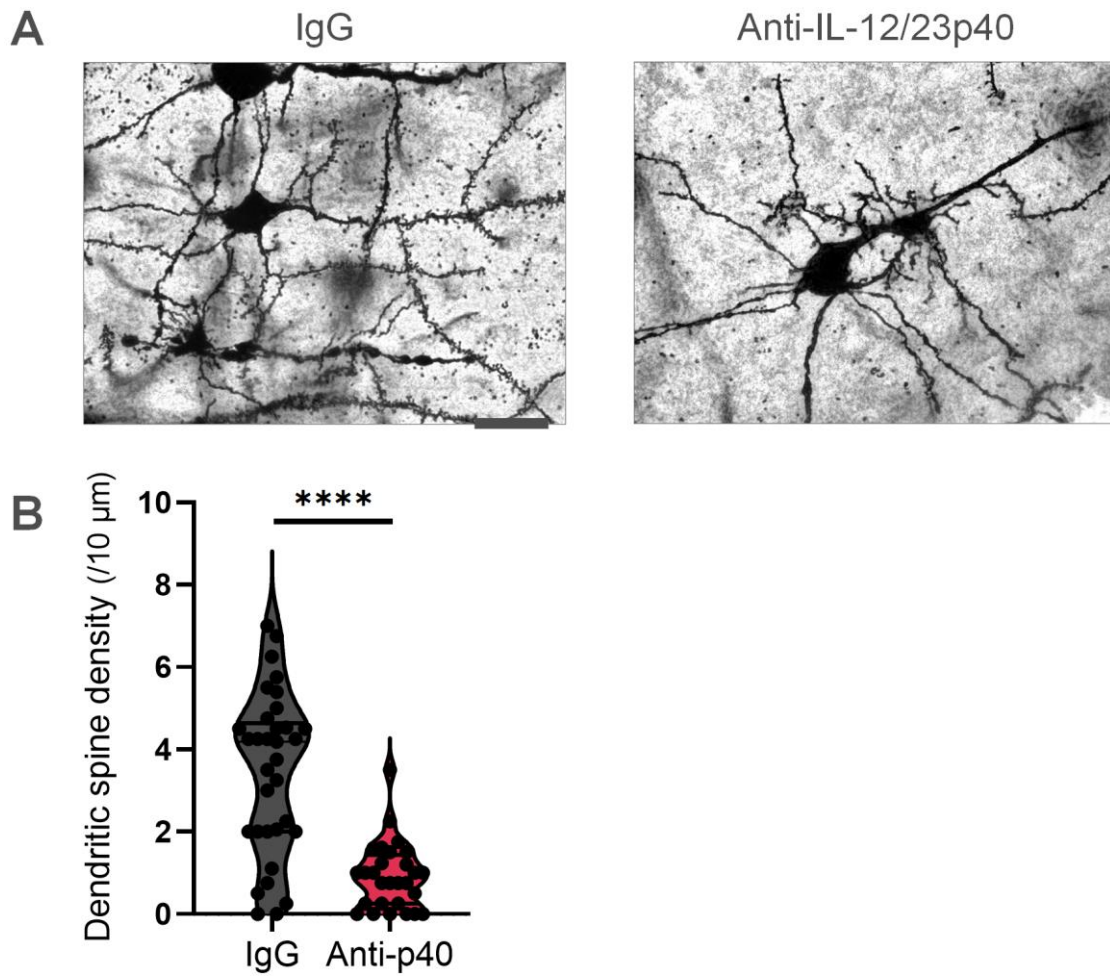


Figure 38. IL-12/23p40 中和による SD 誘導樹状突起スパイン異常増加の改善
 (A) mPFC における第 2-3 層錐体ニューロンの代表的 Golgi-Cox 染色像. (B) 細胞
 体近位樹状突起スパイン密度の定量化 ($n = 28-33$ dendrites per group). データは
 中央値 (四分位範囲) で示した. **** $p < 0.0001$, 対応のない T 検定.

次に、既に臨床応用されている選択的 Tyk2 阻害薬である BMS-986165 (deucravacitinib) を用いて、SD 負荷 MRL/lpr における Tyk2 阻害実験を実施した。我々は、BMS-986165 を 2 週間毎日マウスへ腹腔内投与した。全身性の Tyk2 阻害は MRL/lpr の脾臓重量を有意に減少させ、Tyk2 シグナル経路阻害による全身性免疫抑制は成功していると考えられた (Figure 39)。

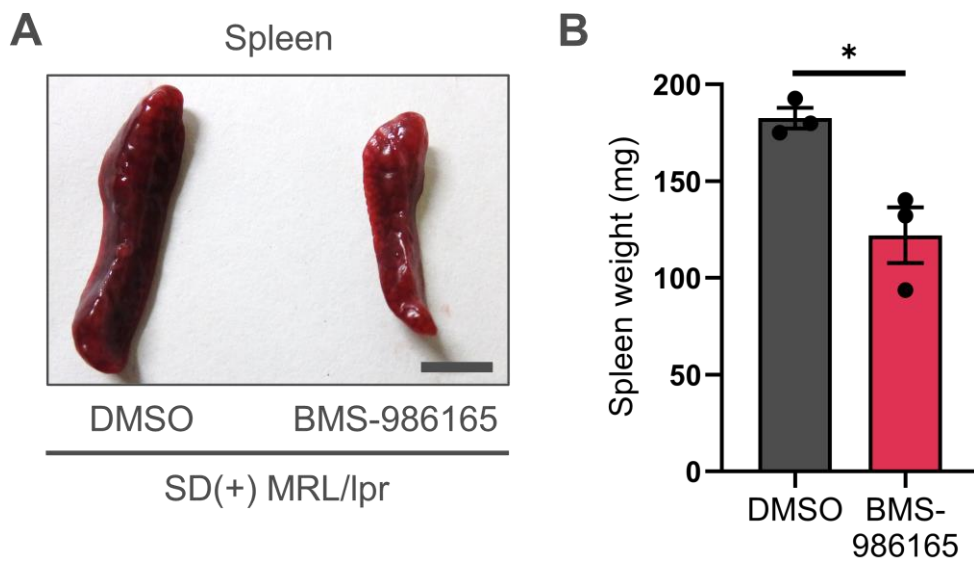


Figure 39. Tyk2 阻害による脾臓縮小

(A) 脾臓の肉眼的所見. スケールバー, 500 mm. (B) 脾臓重量比較 ($n = 3$ per group). データは平均値 \pm 標準誤差で示した. * $p < 0.05$, 対応のない Student の T 検定.

Tyk2 阻害薬は SD 負荷 MRL/lpr マウスの mPFC におけるミクログリア活性化を有意に抑制した (Figure 40, A and B).

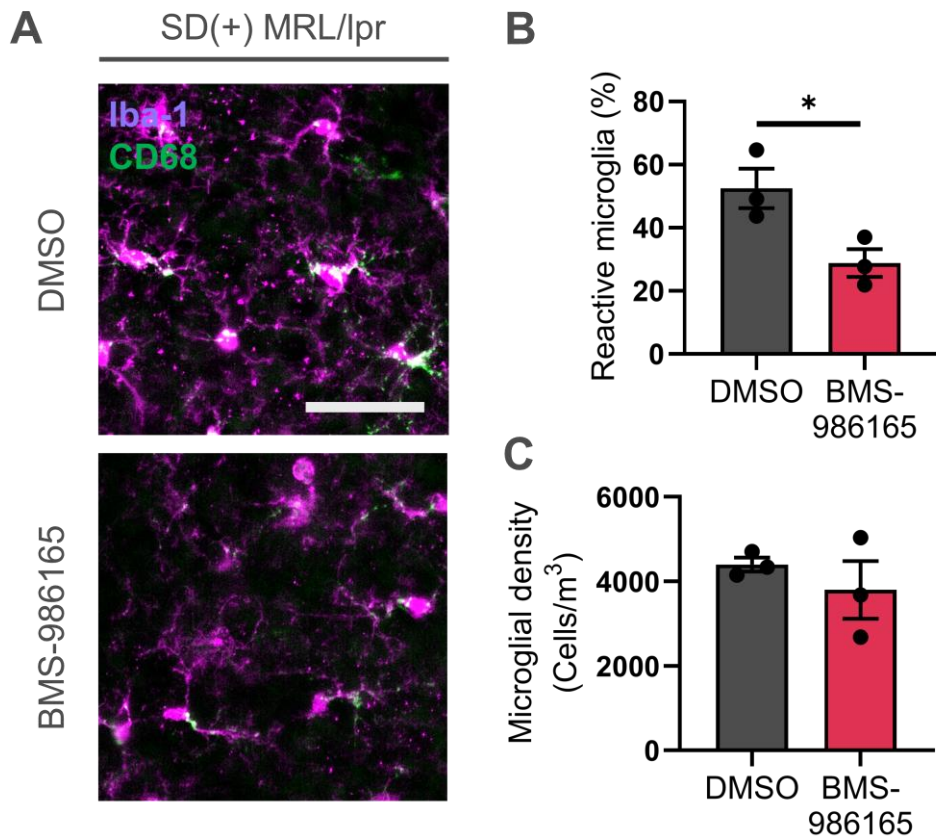


Figure 40. Tyk2 阻害薬によるミクログリア活性化抑制
 (A) 活性化ミクログリア免疫染色代表図. (B) 反応性ミクログリアの割合と (C) ミクログリア密度 ($n = 3$ per group). データは平均値±標準誤差で示した. * $p < 0.05$, 対応のない Student の T 検定.

更に, BMS-986165 は SD 負荷 MRL/lpr の皮質ミクログリアによる IL-12/23p40 産生を有意に抑制した (Figure 41, A and B).

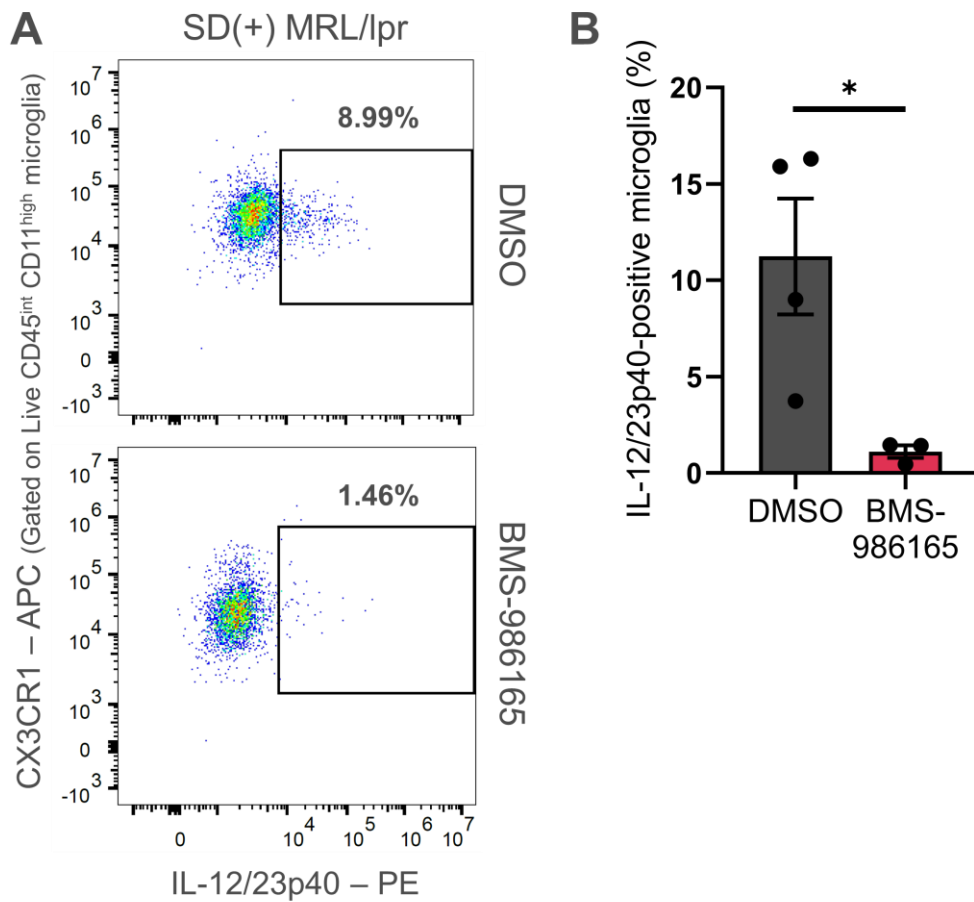


Figure 41. Tyk2 阻害薬による皮質ミクログリアにおける IL-12/23p40 産生の減少 (A) IL-12/23p40 陽性ミクログリアの代表的ゲート図. (B) IL-12/23p40 陽性ミクログリアの割合 ($n = 3-4$ per group). データは平均値±標準誤差で示した. * $p < 0.05$, 対応のない Student の T 検定.

我々は Tyk2 阻害薬投与により SD 負荷 MRL/lpr マウスの皮質ニューロンの Stat4 リン酸化の減少も確認した (Figure 42, A and B).

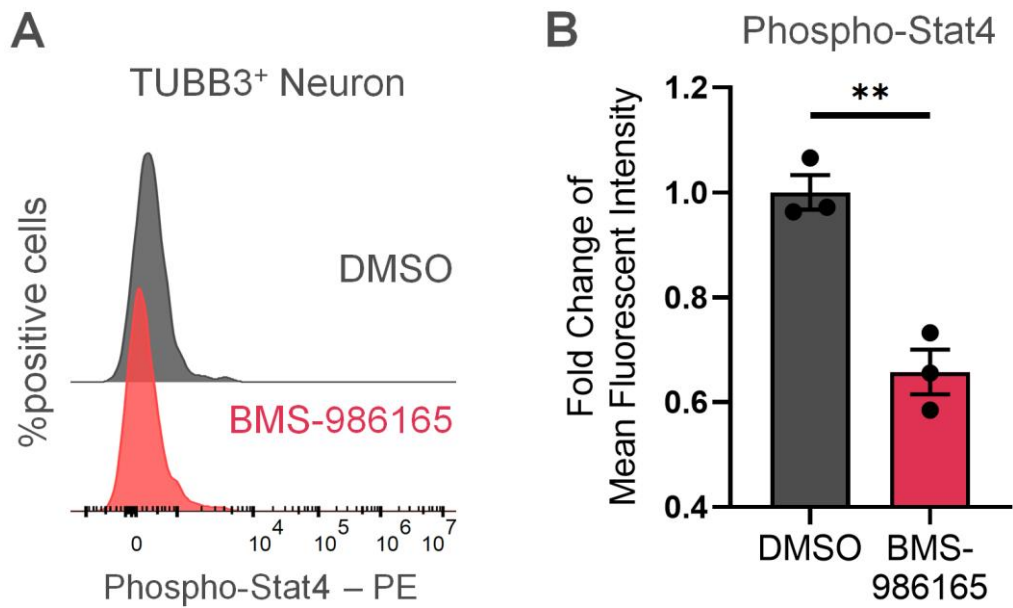


Figure 42. SD 負荷 MRL/lpr 皮質ニューロンにおけるリン酸化 Stat4 発現の Tyk2 阻害による変化

(A) TUBB3 陽性ニューロンにおけるリン酸化 Stat4 発現のヒストグラム. (B) DMSO コントロールマウスに対する Tyk2 阻害薬投与マウスにおけるリン酸化 Stat4 の平均蛍光強度の倍率変化 ($n = 3$ per group). データは平均値±標準誤差で示した. ** $p < 0.01$, 対応のない Student の T 検定.

表現型解析においては, BMS-986165 は MRL/lpr でみられる慢性ストレス負荷の脱抑制様抗不安様行動を改善させた. 一般運動機能そのものには影響を与えなかった (Figure 43, A-C).

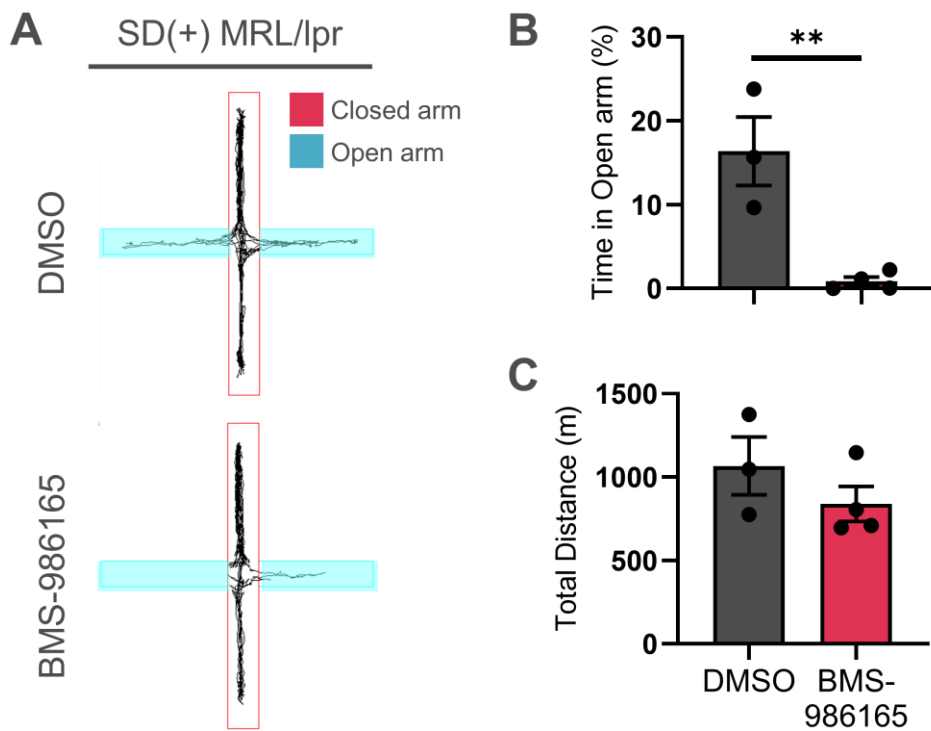


Figure 43. Tyk2 阻害による SD 誘導抗不安様行動の改善

(A) EPM の代表的軌跡. (B) EPM における開いたアームの滞在時間割合と (C) 総移動距離 ($n = 3-4$ per group). データは平均値±標準誤差で示した. ** $p < 0.01$, 対応のない Student の T 検定.

更に Tyk2 阻害は SD 誘発性の神経細胞体近位樹状突起の異常スパイン増多を改善させた (Figure 44).

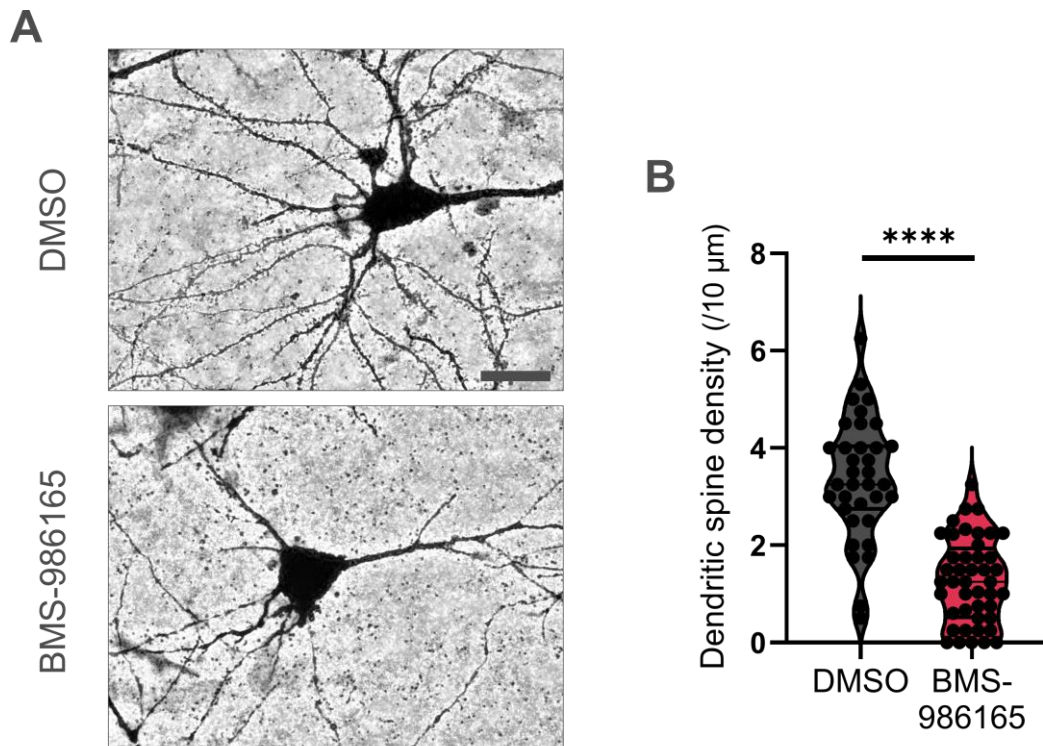


Figure 44. Tyk2 阻害による SD 誘導樹状突起スパイン異常増加の改善
 (A) mPFC における第 2-3 層錐体ニューロンの代表的 Golgi-Cox 染色像. (B) 細胞体近位樹状突起スパイン密度の定量化 ($n = 35-44$ dendrites per group). データは中央値 (四分位範囲) で示した. **** $p < 0.0001$, 対応のない T 検定.

4.8.3 結論

慢性ストレス負荷に誘導される精神神経病態の表現型は IL-12/23p40 中和や Tyk2 阻害を介して改善を示した.

4.9 ループスモデルマウス実験結果の NPSLE 患者への外挿

最後に我々は diffuse NPSLE 患者における病態生理に慢性ストレスや CNS 中の IL-12/23p40 が影響を与えるかについて評価しようと考えた。しかし、慢性ストレス負荷実験をヒトで実施することは倫理的に難しい。そのため、我々は、mPFC 領域の関わりや CNS での IL-12/23p40 発現亢進など、慢性ストレス負荷 MRL/lpr の実験結果を diffuse NPSLE 患者に外挿することとした。

我々は髄液・血清 IL-12/23p40 濃度を diffuse NPSLE 患者, diffuse manifestation を持たない focal NPSLE を含む SLE 患者 (non-diffuse NPSLE と定義) と健常者で測定した。また、mPFC の構造的変化について、脳磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging: MRI) による voxel-based morphometry (VBM) 法を用いて解析した。最後に、SLE 患者の臨床指標と IL-12/23p40 濃度や mPFC 萎縮度の関連について、non-diffuse NPSLE 患者および diffuse NPSLE 患者において、相関解析を実施した (Figure 45)。

本研究は北海道大学臨床研究審査委員会の承認のもと (承認番号: 019-0055, 020-0110), ヘルシンキ宣言に基づいて、実施した。本研究の実施に関するインフォームドコンセントは研究に含まれる全ての患者ならびにその親類より取得した。

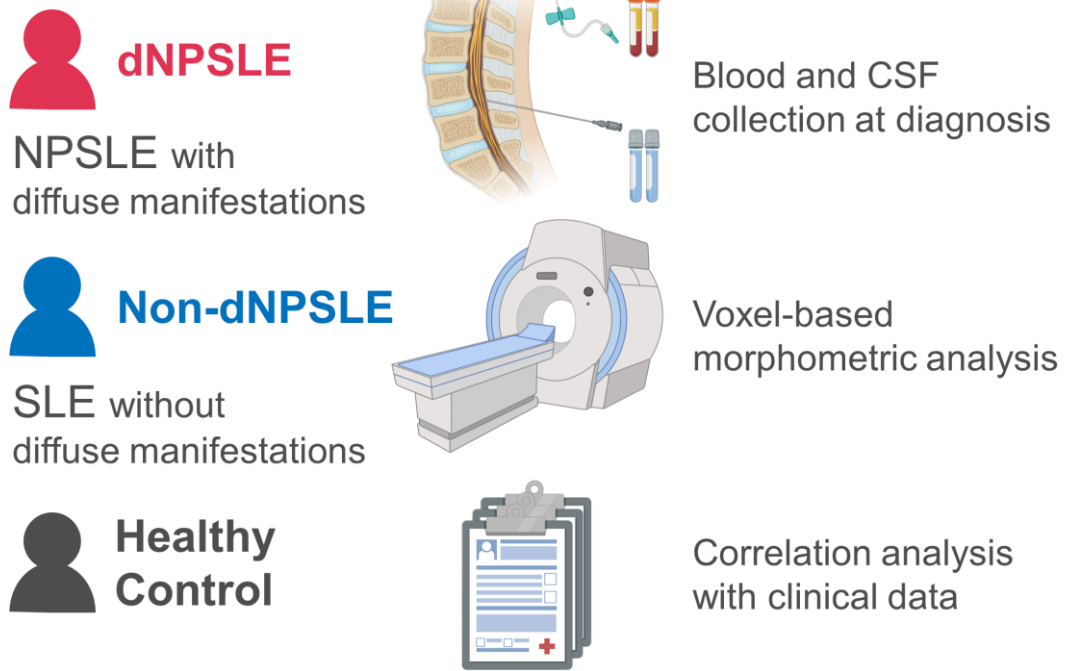


Figure 45. ヒト検体と臨床データの解析についてのシェーマ

4.9.1 方法

4.9.1.1 SLE 患者の臨床データ収集

本研究の SLE 患者の診断は, 1997 年更新版アメリカリウマチ学会 (American College of Rheumatology: ACR) 改訂基準, または 2012 年 Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) 分類基準に基づいて行われた (Kaul et al., 2016; Petri et al., 2012). 臨床データは電子カルテより, 性, 罹病期間や疾患活動性などの臨床的特徴, 高血圧, 2 型糖尿病, 脂質異常症などの合併症, 皮疹, 関節炎, 腎炎, 抗リン脂質抗体症候群や精神神経症状などの臨床症状, 抗 DNA 抗体, 抗 Ro/SSA 抗体, 抗リン脂質抗体や補体などの検査所見, グルココルチコイド, 免疫抑制薬や抗血栓薬などの治療内容などを抽出した. 疾患活動性は SLE disease activity index 2000 (SLEDAI-2K) に基づいて (Gladman et al., 2002), また障害度は SLICC/ACR damage index (SDI) に基づいて評価した (Gladman et al., 1996).

NPSLE 患者は臨床および検査所見に基づき, 診断した (Schwartz et al., 2019). NPSLE における diffuse manifestation は精神病, ACS, 気分障害と認知機能障害を含み, focal manifestation は頭痛, 痙攣, 脳血管障害, 脱髄性疾患や末梢神経障害などの神経学的徴候とした. 本研究では, 髄膜炎や脊髄症の患者は除外した.

4.9.1.2 髄液・血清ヒト検体の収集

電子カルテ記録を閲覧し, 2006 年から 2020 年までの間に北海道大学病院 (Table) と北里大学病院に髄液が保存された NPSLE 含む SLE 患者の臨床データを抽出した. 初発時または再燃時に SLE 患者から血清と髄液検体を採取した. 腰椎穿刺は患者を側臥位にして実施し, 髄液をポリプロピレンチューブに採取した. 検体は 3,000 rpm, 15 分間, 4 °C で遠心し, 上清を分注し, 凍結・再融解を避けて, -80 °C で使用時まで保存した.

健常者の血清・髄液検体はナショナルセンター・バイオバンクネットワークの一員である, 国立精神・神経医療センターのバイオバンク (Tokyo, Japan) より提供を受けた.

4.9.1.3 ELISA によるヒト IL-12/23p40 濃度の定量

ヒト血清, 髄液検体の IL-12/23p40 濃度は BD OptEIA human IL-12 (p40) kit を用いて測定した.

4.9.1.4 脳 MRI 取得, 前処理と VBM 解析

北海道大学病院で 2019 年から 2020 年の間に 71 名の SLE 患者の脳 MR 画像を撮像した. 全ての画像データは北海道病院内で 3.0 T MRI スキャナー (Achieva TX, Philips Medical Systems) と標準 32 チャンネル radio frequency ヘッドコイル (Philips Medical Systems, Best, the Netherlands) を用いて取得された. 頭部の 3 次元-T1 磁化準備型高速グラディエントエコー (magnetization-prepared rapid gradient echo: MPRAGE) 画像は, 「TR (Repetition Time) 6 ms, TE (Echo Time) 3 ms, フリップアングル 8°, 撮像領域 (field of view) 24 cm × 24 cm, マトリクスサイズ 240 × 240, スライス厚 1.0 mm, スライス間隙 1.0 mm, 180 矢状断」のパラメータで取得した. FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) 画像取得パラメータは「TR 10000 ms, TE 100 ms, TI (Inversion Time) 2700 ms, ETL (echo train length) 20, 撮像領域 20 cm × 20 cm, frequency encoding 256, phase encoding 192, スライス厚 5.0 mm, スライス間隙 6.5 mm, 23 水平断」とした.

MRI スキャンは Brain Anatomical Analysis using Diffeomorphic deformation (BAAD) ソフトウェア (version 4.3, [www.shiga-med.ac.jp/~hqbiph/BAAD\(English\)/BAAD.html](http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbiph/BAAD(English)/BAAD.html)) を用いて処理した. 3D-T1 MPRAGE 画像から, 改訂グラフカット法に基づく頭蓋除去, 灰白質・白質・髄液へのセグメンテーション, Montreal Neurological Institute (MNI) 空間への歪曲を介して, 脳を抽出した. 画像は前交連-後交連ラインに合わせ, 1 mm³ のボクセルサイズで再調整された. 組織セグメンテーションと信号強度不均一のバイアス補正は Computational Anatomy Toolbox 12 (The Structural Brain Mapping Group at the University of Jena, Germany) を用いた Adaptive Maximum A Posterior 法により実施し, 組織確率に関する推測的情報を回避した. 組織確率マップは空間的な正規化, 初期頭蓋除去とセグメンテーション推定に用いた. 灰白質と白質のセグメンテーション前に自動化白質病変は, FLAIR 画像を使い, 正常白質周辺の平均信号強度マスクにより補正する Lesion Segmentation Toolbox を用いて実施した. 白質病変は脳室周囲領域と深部白質領域に分け, 両領域の容積を FLAIR 画像から計算した. ノイズ除去のために, Adaptive Maximum A Posterior 法によるセグメンテーション間に空間適応 Non-Local Means フィルターと Markov 確率場法を適用した. 元の空間から NMI 空間への座標返還は Diffeomorphic Anatomical

Registration Through Exponentiated Lie Algebra (DARTEL) アルゴリズムを用いて実施し、ボクセル容積をボクセル信号へ変換した。

関心領域 (region of interest: ROI) 観点からの容積解析は, LONI Probabilistic Brain atlas (LPBA40) の ORI プリセットを用いて, MarsBar Toolbox (marsbar.sourceforge.net) で実施した. 両側 mPFC の追加 ROI は Brainnetome atlas (atlas.brainnetome.org) の脳マスクを組み合わせて作成した. 局所容積は総頭蓋内容積, 年齢, 性別と白質病変で補正した. Z スコア推定では, IXI データセットに含まれる年齢を合致させたヒトデータを対照として用いて, 年齢, 性別, 総頭蓋内容積を交絡因子とした. Z スコアは以下の方程式で計算した.

$$Z \text{ スコア} = \frac{\text{対照平均} - \text{個人の値}}{\text{対照標準偏差}}$$

4.9.2 結果

北海道大学病院におけるコホートに含まれる患者の特徴を Table 1 に示した。髄液 IL-12/23p40 濃度は健常者や non-diffuse NPSLE 患者と比べて, diffuse NPSLE 患者で有意に高値だった一方で, 血清 IL-12/23p40 濃度は全ての群で類似した値を示した (Figure 46, A and B)。IL-12/23p40 の血清に対する髄液の比は diffuse NPSLE 患者で最も高かった (Figure 47)。これらの結果は SD 負荷 MRL/lpr マウスで観察された変化と同様に diffuse NPSLE 患者でも CNS に限局して IL-12/23p40 の著明な発現亢進を示唆した。

Table 1. IL-12/23p40 測定を実施した北海道大学病院における SLE 患者の特徴

Characteristics	All SLE (n=47)	Non-dNPSLE (n=19)	dNPSLE (n=28)
Demographics			
Age at lumbar puncture, years	30 [23-41]	29 [21-37]	31 [25-44]
Sex, female	40 (85%)	18 (95%)	22 (79%)
Disease duration, years	6 [0-15]	2 [0-9]	11 [0-17]
SLEDAI-2K	14 [10-19]	12 [8-16]	15 [11-22]
Disease onset			
Initial onset	18 (38%)	12 (63%)	6 (21%)
Relapse	29 (62%)	7 (37%)	22 (89%)
Complications			
Hypertension	13 (28%)	4 (21%)	9 (32%)
Dyslipidemia	7 (15%)	2 (11%)	5 (18%)
Diabetes	2 (4%)	0	2 (7%)
Symptoms except diffuse neuropsychiatric manifestations			
Rash	16 (34%)	8 (42%)	8 (29%)
Oral ulcer	7 (15%)	4 (21%)	3 (11%)
Arthritis	11 (23%)	6 (32%)	5 (18%)
Myositis	1 (2%)	1 (5%)	0
Serositis	5 (11%)	4 (21%)	1 (4%)
Nephritis	12 (26%)	7 (37%)	5 (18%)
Headache	1 (2%)	1 (5%)	0
Peripheral neuropathy	2 (4%)	2 (11%)	0
Seizure	0		
Leucopenia	14 (30%)	8 (42%)	6 (21%)
Hemolytic anemia	6 (13%)	3 (16%)	3 (11%)
Thrombocytopenia	11 (23%)	7 (37%)	4 (14%)
Hemophagocytic syndrome	2 (4%)	2 (11%)	0
Antiphospholipid syndrome	3 (6%)	1 (5%)	2 (7%)
Classification of diffuse neuropsychiatric manifestations			
Anxiety			0
Mood disorder			8 (29%)
Cognitive dysfunction			1 (6%)
Psychosis			4 (14%)
Acute confusional state			15 (54%)

(次頁へ続く)

Laboratory findings

Serum

Immunoglobulin G (IgG), mg/dL	1599 [983-2016]	1599 [981-2212]	1609 [998-1912]
Anti-DNA antibody (RIA), IU/mL	9.8 [0-170.2]	21 [0-278.1]	9.8 [0-42.3]
Anti-dsDNA antibody (ELISA), IU/mL	8 [0-92.1]	26.4 [0-93.3]	0 [0-147.7]
Anti-Ro/SSA antibody, U/mL	39.7 [0-126.9]	59.4 [10.2-136.5]	29.9 [0-117.5]
Anti-cardiolipin (CL) IgG	10/16 (62%)	3/5 (60%)	7/11 (64%)
Anti-CL/ β 2-glycoprotein complex antibody	5 (11%)	2 (13%)	3 (11%)
Lupus anticoagulant (DRVVT)	13 (37%)	6 (46%)	7 (32%)
Complement C3, mg/dL	57 [32-87]	47 [30-107]	70 [40-82]
Complement C4, mg/dL	10 [3-17]	6 [3-27]	11 [2.3-16]
CH50, IU/mL	26.1 [10.1-48.1]	16.4 [9.6-55.7]	29.8 [10.9-45.8]

Cerebrospinal fluid

cell count, / μ L	1 [0-3]	1 [0-3]	1 [0-3]
mononuclear cell count, / μ L	1 [0-3]	1 [0-3]	1 [0-2.8]
Protein, mg/dL	30 [23-46]	26 [21.8-41.5]	35.5 [23.8-55.8]
Glucose, mg/dL	55 [52-68]	55 [53-66.8]	54 [50.3-70.3]
IgG index, ratio	0.82 [0.73-0.97]	0.76 [0.68-0.93]	0.85 [0.73-0.98]
Interleukin-6 (IL-6), pg/mL	5.9 [2.5-15.5]	2.9 [1.9-5.6]	8.9 [3.2-26.3]
IL-8, pg/mL	48.9 [4.98-160.8]	23.5 [1-45.9]	99.9 [17.7-186.3]

Treatment

Glucocorticoid	33 (70%)	12 (63%)	21 (75%)
Cyclophosphamide	6 (13%)	2 (11%)	4 (14%)
Mycophenolate mofetil	4 (9%)	2 (11%)	2 (7%)
Azathioprine	3 (6%)	0	3 (11%)
Hydroxychloroquine	2 (4%)	0	2 (7%)
Tacrolimus	7 (15%)	5 (26%)	2 (7%)
Cyclosporine	4 (9%)	0	4 (14%)
Belimumab	1 (2%)	1 (5%)	0
Warfarin	1 (2%)	1 (5%)	0
Direct oral anticoagulant	0	0	0
Aspirin	7 (15%)	3 (16%)	4 (14%)
Clopidogrel	1 (2%)	0	1 (4%)
Cilostazol	3 (6%)	2 (11%)	1 (4%)
Sleep medication	26 (55%)	6 (32%)	20 (71%)

(次頁へ続く)

データは数 (割合), または中央値 (四分位範囲) で示した.

略語: SLE, systemic lupus erythematosus; NP, neuropsychiatric; dNPSLE, NPSLE with diffuse manifestations;

SLEDAI-2K, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000; DRVVT, dilute Russel's viper venom time;

CH50, 50% hemolytic complement activity

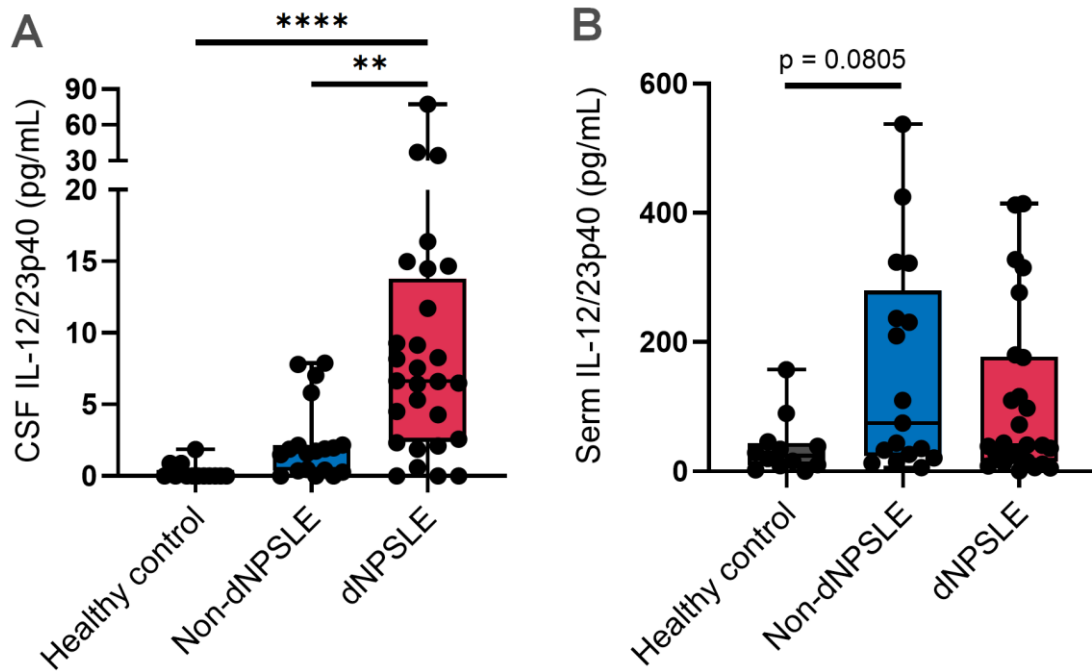


Figure 46. 北海道大学病院コホートにおける SLE 患者と健常者の髄液・血清 IL-12/23p40 濃度

(A) 髄液 IL-12/23p40 濃度 ($n = 13$ 健常者, $n = 19$ non-diffuse NPSLE, $n = 28$ diffuse NPSLE). (B) 血清 IL-12/23p40 濃度 ($n = 12$ 健常者, $n = 17$ non-diffuse NPSLE, $n = 26$ diffuse NPSLE). データは中央値 (四分位範囲) で示した. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 多重比較検定.

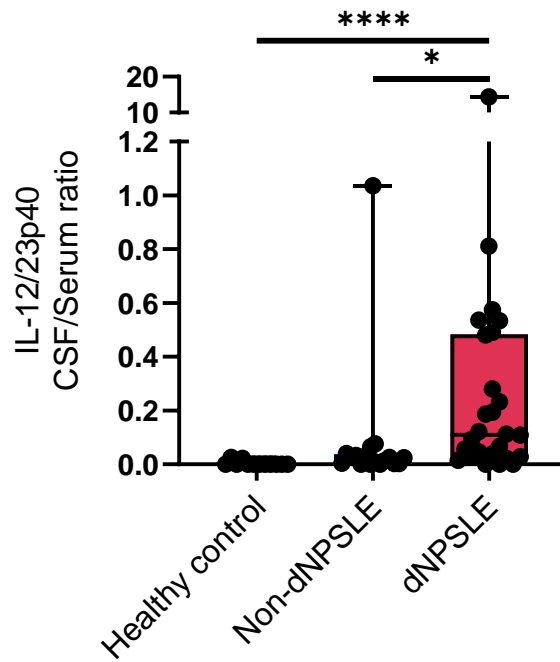


Figure 47. 北海道大学病院コホートにおける SLE 患者と健常者の IL-12/23p40 濃度 髄液・血清比
 IL-12/23p40 濃度 髄液・血清比 ($n = 12$ 健常者, $n = 17$ non-diffuse NPSLE, $n = 26$ diffuse NPSLE). データは中央値 (四分位範囲) で示した. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, Kruskal-Wallis 検定および Steel-Dwass 多重比較検定.

更に、髄液 IL-12/23p40 濃度は diffuse NPSLE に対して、受信者操作特性 (receiver operating characteristic: ROC) 解析で曲線下面積 (area under the curve: AUC) 0.8438 (95%信頼区間 (confidence interval: CI) 0.7377-0.9498) と高い診断的有用性を示した (Figure 48).

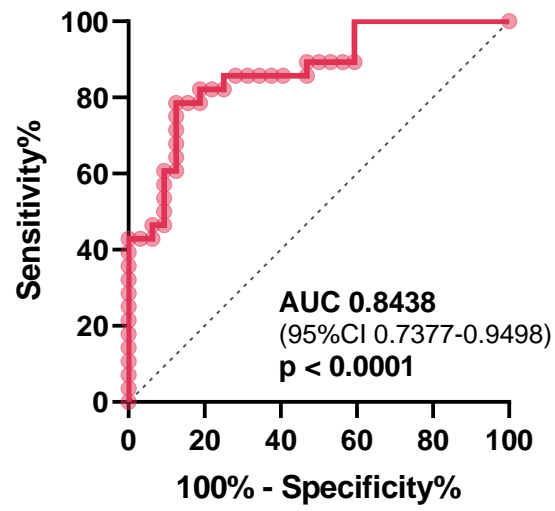


Figure 48. 北海道大学病院コホートにおける髄液 IL-12/23p40 の diffuse NPSLE に対する診断能

我々は北里大学病院で採取された focal または diffuse NPSLE 患者の髄液と血清を用いて、前述の結果を検証した。北里大学病院の NPSLE 患者の臨床的特徴を Table 2 に示した。血清 IL-12/23p40 濃度は, diffuse NPSLE と focal NPSLE 患者間で差は認めなかったが, 髄液 IL-12/23p40 濃度は一貫して, diffuse NPSLE 患者で高値を示した (Figure 49, A and B).

Table 2. IL-12/23p40 測定を実施した北里大学病院における SLE 患者の特徴

Characteristics	All NPSLE (n=27)	fNPSLE (n=9)	dNPSLE (n=18)
Demographics			
SLEDAI-2K	13 [10-18]	6 [0-16]	15 [12-19]
Disease onset			
Initial onset	12 (44%)	3 (33%)	9 (50%)
Relapse	15 (56%)	6 (67%)	9 (50%)
Complications			
Hypertension	3 (11%)	0	3 (17%)
Dyslipidemia	0		
Diabetes	2 (7%)	0	2 (11%)
Symptoms except diffuse neuropsychiatric manifestations			
Rash	7 (26%)	0	7 (39%)
Oral ulcer	3 (11%)	1 (11%)	2 (11%)
Arthritis	4 (15%)	1 (11%)	3 (17%)
Myositis	1 (2%)	0	1 (6%)
Serositis	5 (19%)	0	5 (28%)
Nephritis	10 (37%)	2 (22%)	8 (44%)
Headache	1 (2%)	1 (11%)	0
Peripheral neuropathy	6 (22%)	6 (67%)	0
Seizure	2 (7%)	2 (22%)	0
Leucopenia	2 (7%)	2 (22%)	1 (6%)
Hemolytic anemia	2 (7%)	0	2 (11%)
Thrombocytopenia	3 (11%)	0	3 (17%)
Hemophagocytic syndrome	2 (7%)	1 (11%)	1 (6%)
Antiphospholipid syndrome	10 (37%)	4 (44%)	6 (33%)
Classification of diffuse neuropsychiatric manifestations			
Anxiety			1 (6%)
Mood disorder			2 (11%)
Cognitive dysfunction			0
Psychosis			3 (17%)
Acute confusional state			12 (67%)
Laboratory findings			
<i>Serum</i>			
Immunoglobulin G (IgG), mg/dL	1654 [1159-2004]	1691 [1270-2915]	1602 [1120-1891]

(次頁へ続く)

Anti-DNA antibody (RIA), IU/mL	8.9 [0-44]	3.8 [0-32]	9.4 [3.93-76.8]
Anti-dsDNA antibody (ELISA), IU/mL	8 [0-92.1]	23 [23-23]	23 [10-56]
Anti-Ro/SSA antibody	16 (59%)	6 (67%)	10 (56%)
Anti-NR2 antibody	8 (33%)	4 (50%)	4 (25%)
Anti-cardiolipin (CL) IgG	9 (33%)	4 (44%)	5 (28%)
Anti-CL/β2-glycoprotein complex antibody	4 (15%)	2 (22%)	2 (11%)
Lupus anticoagulant (DRVVT)	6 (22%)	2 (22%)	4 (22%)
Complement C3, mg/dL	65 [40-79]	78 [59.5-127]	58 [37-76.8]
Complement C4, mg/dL	17 [5-23]	18 [9-36]	13 [5-20]
CH50, IU/mL	31 [12-40]	40 [20.5-49.5]	27.5 [11.5-36]
<i>Cerebrospinal fluid</i>			
cell count, /μL	2 [0-12]	3 [0-23]	2 [0-13]
mononuclear cell count, /μL	2 [0-7]	3 [0-23]	2 [0-9]
Protein, mg/dL	64 [37-104]	46 [34.5-74]	83.5 [48.3-124]
Glucose, mg/dL	58 [46-72]	59 [47-71]	54 [46-74]
IgG index, ratio	0.56 [0.49-0.74]	0.53 [0.44-0.69]	0.60 [0.49-0.76]
Interleukin-6 (IL-6), pg/mL	18.5 [4.1-150.8]	30.7 [2.2-941]	15.1 [4.85-110.1]
Anti-NR2 antibody	17 (74%)	6 (86%)	11 (69%)
Treatment			
Glucocorticoid	27 (100%)	9 (100%)	18 (100%)
Cyclophosphamide	10 (37%)	2 (22%)	8 (44%)
Mycophenolate mofetil	2 (7%)	0	2 (11%)
Azathioprine	1 (4%)	0	1 (6%)
Hydroxychloroquine	3 (11%)	1 (11%)	2 (11%)
Tacrolimus	4 (15%)	0	3 (17%)
Cyclosporine	4 (9%)	1 (11%)	3 (17%)
Belimumab	1 (4%)	0	1 (6%)
Warfarin	5 (19%)	1 (11%)	4 (22%)
Direct oral anticoagulant	0	0	0
Aspirin	6 (22%)	3 (33%)	3 (17%)
Clopidogrel	1 (4%)	0	1 (6%)
Cilostazol	1 (4%)	0	1 (6%)

データは数 (割合), または中央値 (四分位範囲) で示した.

(次頁へ続く)

略語: NPSLE, neuropsychiatric systemic lupus erythematosus; fNPSLE, NPSLE with focal manifestations; dNPSLE, NPSLE with diffuse manifestations; SLEDAI-2K, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000; NR2, N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptor 2; DRVVT, dilute Russel's viper venom time; CH50, 50% hemolytic complement activity

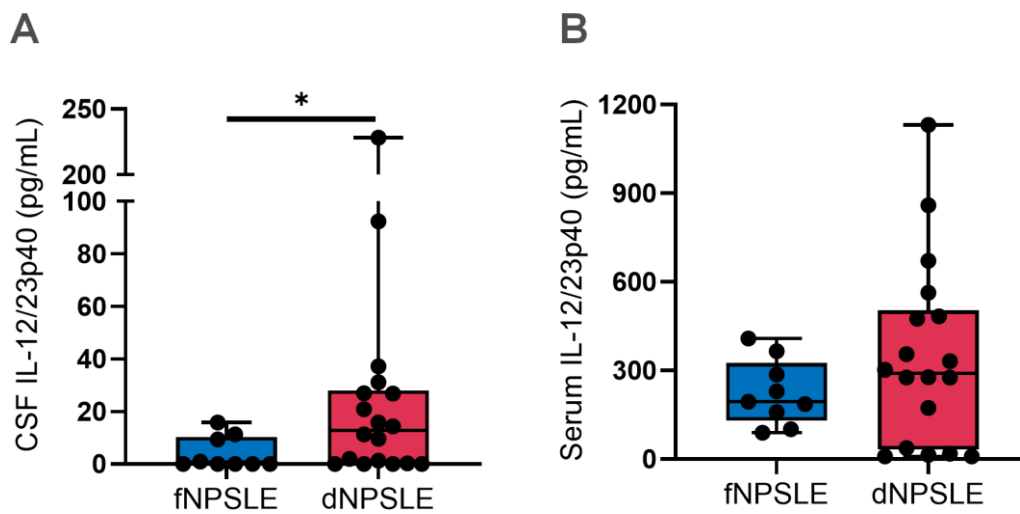


Figure 49. 北里大学病院コホートにおける NPSLE 患者の髄液・血清 IL-12/23p40 濃度
 (A) 髄液, および (B) 血清 IL-12/23p40 濃度 ($n = 9$ focal NPSLE, $n = 18$ diffuse NPSLE). データは中央値 (四分位範囲) で示した. $*p < 0.05$, Mann-Whitney U 検定.

更に、北里大学病院コホートにおいても、髄液 IL-12/23p40 濃度は diffuse NPSLE に対して、ROC 解析で AUC 0.7346 (95%CI 0.5472-0.9220)と統計学的にはほぼ有意な診断的有用性を示した (Figure 50).

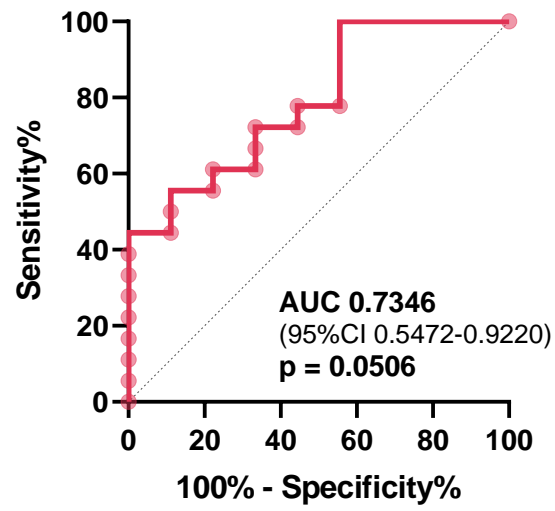


Figure 50. 北海道大学病院コホートにおける髄液 IL-12/23p40 の diffuse NPSLE に対する診断能

次に, diffuse NPSLE 患者と non-diffuse NPSLE 患者の mPFC における構造的変化を, 北海道大学病院 VBM コホートを用いて, 評価することとした (Table 3). IXI データセットの健常者を参照として, diffuse NPSLE 患者は non-diffuse NPSLE 患者と比べて, 総灰白質容積, 総白質容積や前頭葉容積の有意な減少を年齢, 性別, SLE 罹病期間, 白質容積や頭蓋内容積の調整下で認めた (Figure 51, A-C). 更に, 白質病変も diffuse NPSLE 患者で non-diffuse NPSLE 患者と比べて有意に多かった (Figure 51D).

Table 3. VBM を実施した北海道大学病院における SLE 患者の特徴

Characteristics	All SLE (n=71)	Non-dNPSLE (n=56)	dNPSLE (n=15)
Demographics			
Age at lumbar puncture, years	43 [36-49]	45 [37-49]	41 [31-52]
Sex, female	65 (92%)	53 (95%)	12 (80%)
Disease duration, years	11 [7-19]	11 [6-18]	16 [7-21]
SLICC Damage index	1 [0-1]	0.5 [0-1]	1 [1-2]
Complications			
Hypertension	24 (34%)	18 (32%)	6 (40%)
Dyslipidemia	28 (39%)	20 (36%)	8 (53%)
Diabetes	2 (3%)	2 (4%)	0
Disease classification			
NPSLE	17 (24%)	2 (11%)	15 (100%)
- Focal manifestations (fNPSLE)	- 2 (12%)	- 2 (100%)	- 0
- Diffuse manifestations (dNPSLE)	- 15 (88%)	- 0	- 15 (100%)
Antiphospholipid syndrome	38 (54%)	30 (54%)	8 (53%)
Voxel based morphometric parameters			
Stroke or white matter lesions	35 (49%)	24 (43%)	11 (73%)
Total intracranial volume, mL	1469 [1430-1571]	1466 [1418-1570]	1482 [1440-1632]
Cerebrospinal fluid, mL	380 [345-435]	366 [340-424]	445 [380-501]
Laboratory findings			
<i>Serum</i>			
Antinuclear antibody	67 (94%)	53 (95%)	14 (93%)
Anti-DNA antibody (RIA), IU/mL	2.75 [0.35-11.4]	3.9 [0-19.3]	2.5 [1-4.5]
Anti-dsDNA antibody (ELISA), IU/mL	0.6 [0-14.7]	0.6 [0-18.7]	0.7 [0-5.8]
Anti-Ro/SSA antibody	19.6 [0-122]	11.5 [0-121]	56 [1.4-138]
Anti-cardiolipin (CL) IgG	12/24 (50%)	10/19 (53%)	2/5 (40%)
Anti-CL/ β 2-glycoprotein complex antibody	23 (41%)	18 (32%)	5 (33%)
Lupus anticoagulant (DRVVT)	27 (38%)	20 (36%)	7 (47%)
Complement C3, mg/dL	91 [72-112]	90 [72.3-112]	99 [65-112]
Complement C4, mg/dL	19 [11-24]	18 [11-24]	20 [12-27]
CH50, IU/mL	48.8 [37.3-54.6]	49.1 [37.2-55.9]	46.8 [38.5-54.1]
Treatment			
Glucocorticoid	58 (82%)	43 (77%)	15 (100%)
Mycophenolate mofetil	13 (18%)	8 (14%)	5 (33%)

(次頁へ続く)

Azathioprine	5 (7%)	4 (7%)	1 (7%)
Hydroxychloroquine	23 (32%)	18 (32%)	5 (33%)
Tacrolimus	29 (41%)	21 (38%)	8 (53%)
Belimumab	2 (3%)	1 (2%)	1 (7%)
Sleep medication	15 (21%)	10 (18%)	5 (33%)
Post-treatment history of cyclophosphamide	17 (24%)	7 (13%)	10 (67%)
Anticoagulation	14 (20%)	10 (18%)	4 (27%)
- Warfarin	- 11 (79%)	- 9 (90%)	- 2 (50%)
- Direct oral anticoagulant	- 3 (21%)	- 1 (18%)	- 2 (50%)
Antiplatelets	31 (44%)	25 (44%)	6 (40%)
- Aspirin	- 25 (81%)	- 20 (80%)	- 5 (83%)
- Clopidogrel	- 11 (35%)	- 9 (38%)	- 2 (33%)
- Cilostazol	- 2 (7%)	- 2 (8%)	- 0

データは数 (割合), または中央値 (四分位範囲) で示した.

略語: NPSLE, neuropsychiatric systemic lupus erythematosus; dNPSLE, NPSLE with diffuse manifestations; SLICC, Systemic Lupus International Collaborating Clinics; DRVVT, dilute Russel's viper venom time; CH50, 50% hemolytic complement activity

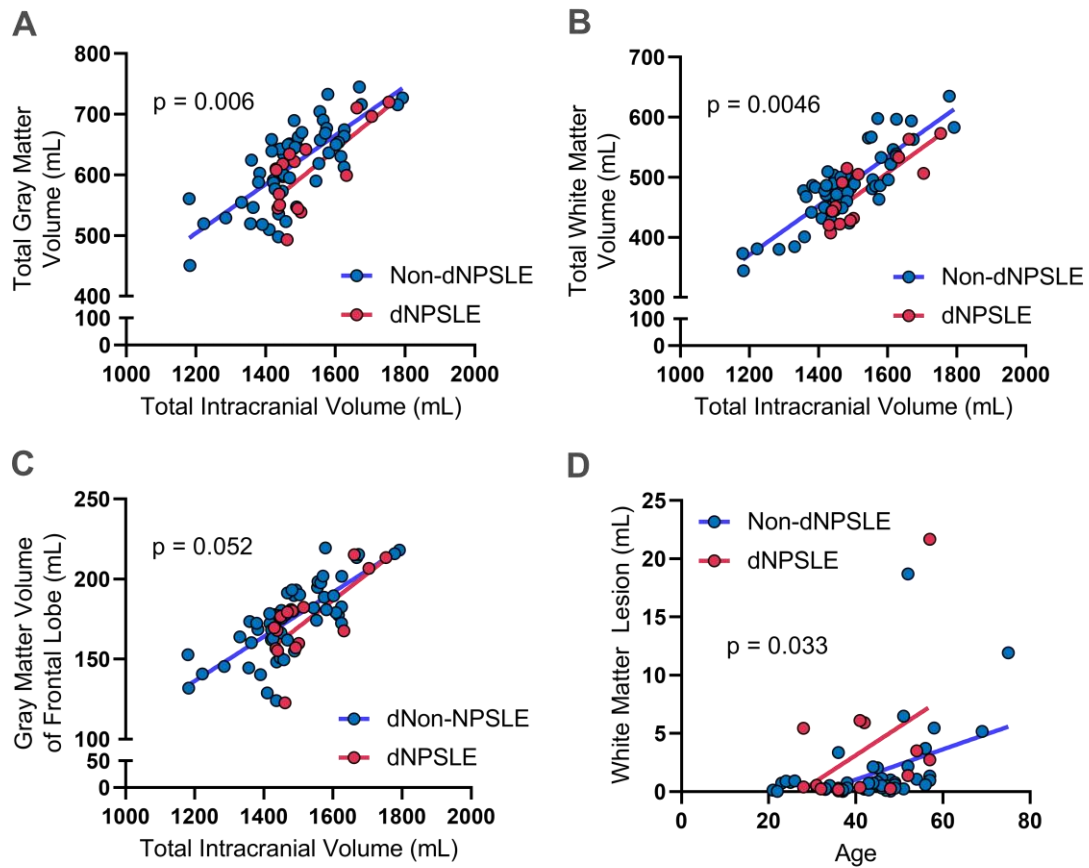


Figure 51. SLE 患者における VBM 解析

総頭蓋内容積, または年齢に対する (A) 総灰白質容積, (B) 総白質容積, (C) 前頭葉容積と (D) 白質病変容積の相関図 ($n = 56$ non-diffuse NPSLE: 青, $n = 15$ diffuse NPSLE: 赤). 統計解析は頭蓋内容積, 白質容積 (B を除く), 年齢, 性別および SLE 罹患期間を調整した共分散分析で実施した.

我々は慢性ストレス負荷ループモデルマウスの精神神経症状の責任病巣と考えられた mPFC に着目した (Figure 52).

IXI データセットの健常者を参照として, 年齢, 性別, SLE 罹病期間と総頭蓋内容積, 白質容積の共変量で調整された脳萎縮についての Z スコアを計算した. mPFC 容積の脳萎縮 Z スコアは non-diffuse NPSLE 患者と比べて, diffuse NPSLE 患者で有意に高かった (Figure 53A). また, mPFC 容積そのものも, 共変量調整下で, diffuse NPSLE 患者において, non-diffuse NPSLE 患者と比べて有意に小さかった (Figure 53B).

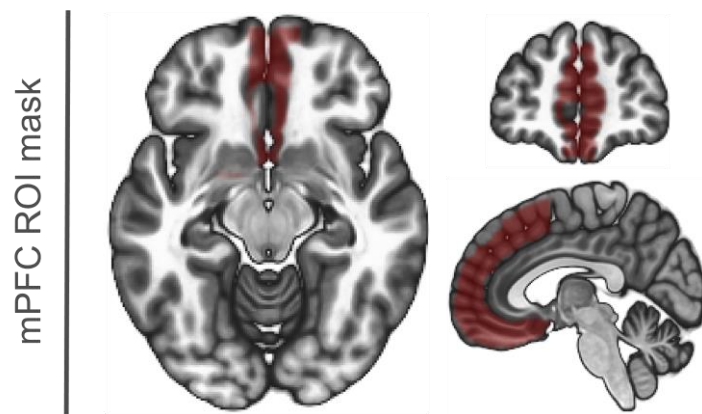


Figure 52. mPFC の参照画像
mPFC は赤で示した.

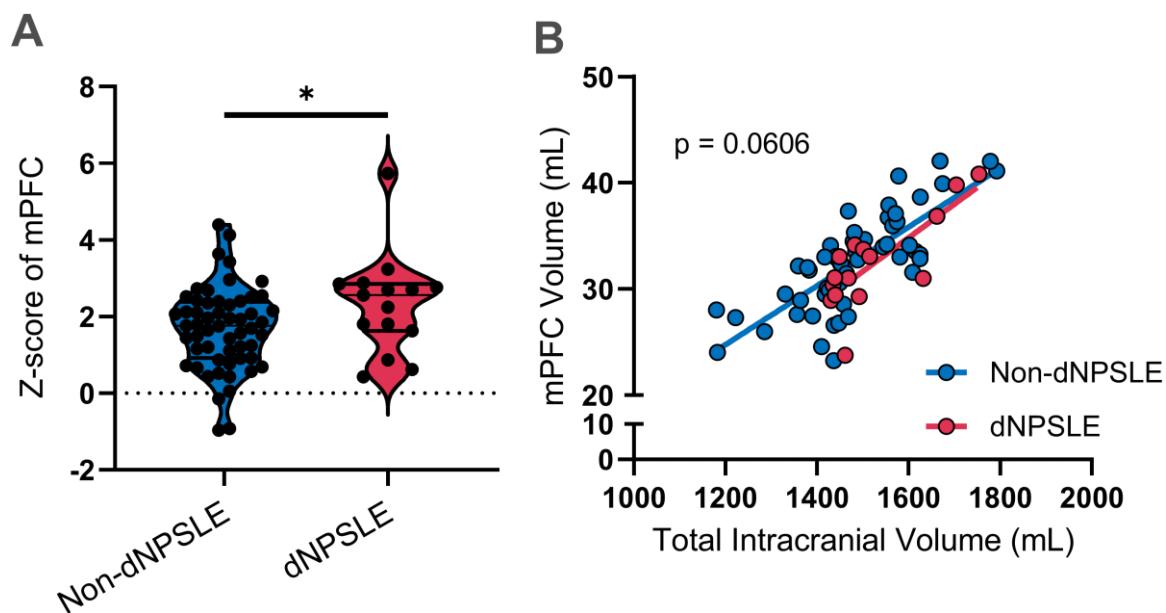


Figure 53. VBM による mPFC 萎縮評価

(A) IXI データセットに対する mPFC 萎縮の Z スコア. データは中央値 (四分位範囲) で示した. (B) mPFC 容積と頭蓋内容積の相関 ($n = 56$ non-diffuse NPSLE: 青, $n = 15$ diffuse NPSLE: 赤). $*p < 0.05$, (A) Mann-Whitney U 検定, (B) 頭蓋内容積, 性別, 年齢, 白質容積と SLE 罹病期間で調整した共分散分析.

最後に我々は臨床情報を抽出した。北海道大学病院コホートにおいて, diffuse NPSLE 患者は non-diffuse NPSLE 患者と比べて髄液採取周辺でより多くの睡眠薬処方を受けていた (21/28, 71% vs 6/19, 32%, $p = 0.0064$, カイ二乗検定, Figure 54). これは diffuse NPSLE 発症時に睡眠障害罹患率が高いことを示唆している.

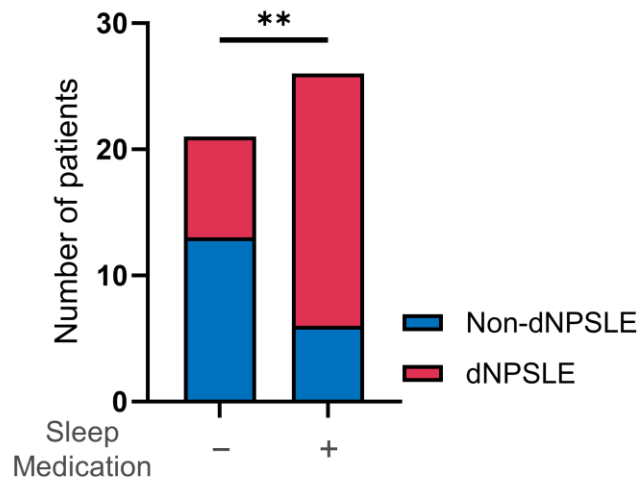


Figure 54. SLE 疾患分類に応じた睡眠薬処方
 **p < 0.01, カイ二乗検定.

更に、2つの大学病院コホートを用いることで、NPSLEの従来型診断指標の一つである髄液IL-6濃度 (Yoshio et al., 2016) は、髄液IL-12/23p40と相関していなかった (Figure 55). これらの結果はCNSにおける炎症性サイトカイン産生には異なる機序が関わっており、IL-12/23p40はdiffuse NPSLEの病態生理に比較的特異的に関与している可能性が考えられた.

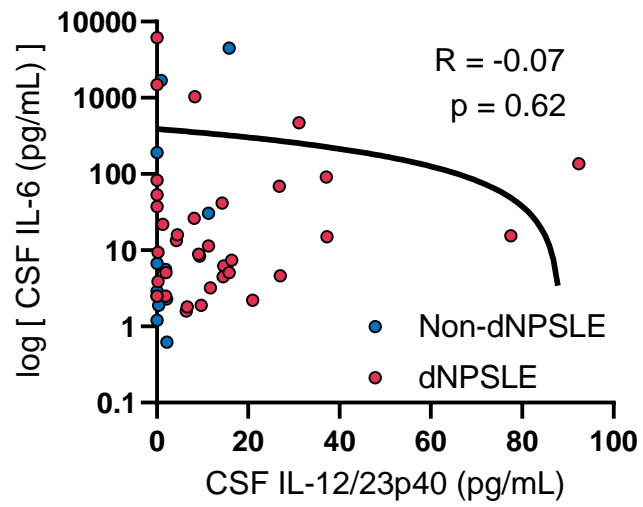


Figure 55. 髄液 IL-12/23p40 濃度と髄液 IL-6 log 変換濃度の相関
 $n = 8$ non-diffuse NPSLE: 青, $n = 34$ diffuse NPSLE: 赤. Pearson の相関係数 $R = -0.07$, 線形回帰.

4.9.3 結論

Diffuse NPSLE 患者では, 髄液 IL-12/23p40 濃度が non-diffuse NPSLE 患者と比べて有意に高く, 2つのコホートで検証した. また, diffuse NPSLE 患者では mPFC 領域の有意な萎縮が認められた. 臨床情報では, 発症時 (髄液採取時) 周辺の睡眠薬処方量が non-diffuse NPSLE 患者と比べて有意に多く, 睡眠障害の存在が示唆されると共に, 髄液 IL-12/23p40 濃度は IL-6 と相関しないことから, diffuse NPSLE 発症に関して, IL-12/23p40 の比較的特異的な関与が示唆された.

4.10 考察

我々はループモデルマウスにおいて、慢性 SD 負荷が持続的神経活性化やミクログリア活性化を誘導し、炎症シグナル経路を巻き込み、精神神経病態を引き起こすメカニズムを解明した。本研究の結果は、慢性精神身体ストレスが SLE における精神神経症状の病態生理に貢献するという我々の仮説を支持している。

既報で、慢性ストレスは前頭葉前頭皮質機能を樹状突起スパイン密度減少と共に機能障害すると報告された。この現象は戦略・計画の作成、規律学習、行動抑制や空間記憶などの行動の柔軟性を障害し (Chaudhury et al., 2013; Liston et al., 2006; McEwen and Morrison, 2013; McKlveen et al., 2016; Popoli et al., 2011; Tanaka et al., 2012), 精神神経疾患の発症や臨床経過に悪影響をおよぼす (Duman and Aghajanian, 2012; Krishnan and Nestler, 2008; McEwen and Morrison, 2013)。神経の可塑性のみでなく、慢性ストレスはミクログリアの活性化状態に影響を与える。神経伝達物質による免疫調整効果は相反する結果が報告されているが (Xu et al., 2018; Yan et al., 2015), 慢性ストレスはノルアドレナリン- β 受容体シグナル経路を介してミクログリアを活性化させることが報告されている (Sugama et al., 2019; Wohleb et al., 2011)。活性化ミクログリアは神経炎症を誘導し、精神神経・神経変性疾患に感受性のある患者の疾患発症を促進する (Giovanoli et al., 2013; Kreisel et al., 2014; Nie et al., 2018)。ニューロンとミクログリアの相互作用として報告されているように、これらの細胞は構造的・機能的に互いに制御し合い、恒常性を保つが、病的状態においては、神経疾患増悪に働く可能性がある (Bartels et al., 2020; Cserép et al., 2021)。神経・免疫の相互作用においては、神経伝達物質やサイトカインを含む細胞外小胞が遠隔的にニューロンやミクログリアに影響を与える重要な因子である (Bar and Barak, 2019)。例えば、ミクログリアは神経過活動から脳を守るために、細胞外アデノシン三リン酸を介した活性化ニューロンの **negative feedback** 抑制機能を健康状態においては有している。しかし、炎症性ミクログリアはこの神経保護機能を失っている (Badimon et al., 2020)。更に、**interferon- γ** に刺激されたミクログリアは γ 神経振動を減衰させ、慢性ストレスにより惹起された神経コロニー刺激因子 1 は mPFC の錐体細胞樹状突起スパインのミクログリアによる除去を促進させる (Ta et al., 2019; Wohleb et al., 2018)。ループモデルマウスでは、精神神経症状は血清炎症性サイトカイン濃度の上昇とともに変動する (Crupi et al., 2010; Schwartz et al., 2019)。また、IL-6 や IL-8 などの炎症性サイトカインの髄液濃度も diffuse NPSLE 患者で高値を示す (Yoshio et al., 2016)。前述の炎症性サイトカインにより構成される SLE の向炎症性環境はニューロンやミクログリアを病的状態へと誘導する有害な環境を提供し得る。本研究では、我々は慢性ストレスによって促進された mPFC の著明

なミクログリア活性化と樹状突起スパイン密度増加を伴う持続的神経活性化は、ループモデルマウスの異常脱抑制様行動を誘導された。サイトカインにより誘導されたミクログリアは神経の過剰活性化を抑制できず、IL-12/23p40 軸を介して、更に神経活性化を増悪させることは理に適っている。したがって、我々の発見は精神神経ループスの炎症性質の病態生理が慢性ストレスによる神経炎症と神経異常活性化の悪循環へと陥らせることを示唆している。SLE 患者の精神神経症状増悪を防ぐために、神経活動の正常化とともに炎症を改善させることが共に重要であると考えられる。

本研究ではループモデルマウスにおいて慢性ストレス誘導活性化ミクログリアから産生される IL-12/23p40 に着目した。上述の通り、IL-12/23p40 サブユニットは IL-12p35 と IL-23p19 と二量体化し、それぞれ IL-12 と IL-23 を形成する (Teng et al., 2015)。Crohn 病、乾癬、多発性硬化症を含む自己免疫疾患において、IL-12 と IL-23 はリンパ球介在免疫優位の病態生理に関与している。比較的 CNS 特異的な疾患としての Alzheimer 病でも、IL-12 と IL-23 は病理を増悪させる原因の 1 つであり、IL-12/23 シグナル経路の抑制で病態が改善することが報告されている (Vom Berg et al., 2012)。慢性ストレス誘導の IL-12/23p40 分泌を伴うミクログリア活性化は近傍の IL-12Rβ1 受容体をもつ mPFC ニューロンを傍分泌調節により刺激し、過去に *in vitro* 研究で報告されたように、樹状突起スパイン増多を伴う神経構造を引き起こす可能性が考えられる (Lin et al., 2000)。前頭皮質の樹状突起スパイン増多は抗不安様または抑うつ様過活動行動を伴う調整・統一された皮質活動の保護に関連しており (Holmes et al., 2019; Li et al., 2010; Moda-Sava et al., 2019)、自閉症スペクトラム疾患や抗うつ薬使用、グルタミン酸や N-メチル-D-アスパラギン酸投与でも観察される事象である (Forrest et al., 2018; Li et al., 2010)。SLE 患者では、IL-12/23p40 を含む炎症性サイトカインの全身性濃度は、健常者と比べて本質的に高値で、中枢神経細胞に病的影響を与えうる。SLE における IL-12/23p40 中和抗体の第 3 相臨床試験は有効性がないことから中止となったが、本試験では NPSLE 患者が除外されていた (Ustekinumab[®] Press Release) (2020)。更に我々の研究では、diffuse NPSLE 患者においては血清ではなく、髄液 IL-12/23p40 濃度が特に高値であり、CNS におけるミクログリアからの IL-12/23p40 が特異的な役割を果たすかもしれない。これらは、IL-12/23p40 シグナル阻害が diffuse NPSLE 患者の異常調節された神経細胞に改善効果をもたらす可能性があることを示唆する。更に、基礎と臨床の橋渡し観点から、IL-12/23p40 シグナル下流分子である Tyk2 の内服可能な阻害薬は diffuse NPSLE の有望な治療薬となるかもしれない。

mPFC の観点からは、SLE 患者では意思決定課題における活動状態変化や (Wu et al., 2018), mPFC 代謝の減少や萎縮 (Mackay et al., 2019) や、脳血流の減少を認める (Papadaki et al., 2019). 前頭皮質領域は SLE の病態生理により、ある程度構造的・機能的に変化がもたらされると考えられる. ループモデルマウスからの我々の結果を考慮すると、diffuse NPSLE 患者においては、慢性精神神経ストレスと誘導されるミクログリア産生 IL-12/23p40 が NPSLE 急性発症時に見られるように、短期的には mPFC ニューロンの持続的過剰活性化による脱抑制性状態をもたらす、最終的には神経の活性化毒性や神経炎症を媒介したミクログリアによる神経貪食をによる mPFC の萎縮に至らしめるものと考えられる. 更に、我々はグルココルチコイド投与後に精神神経症状を増悪させる SLE 患者をしばしば経験する. 興味深いことに、グルココルチコイド投与後の精神神経症状は他の自己免疫疾患と比較して、SLE で多くみられる. 更に、グルココルチコイド誘発性精神神経症状は diffuse NPSLE の症状とほとんど区別できない (Shimizu et al., 2016). SLE におけるグルココルチコイド誘発性精神神経症状の病態生理は未だに明らかではなく、グルココルチコイドが今でも主要な治療薬であることから、急性 diffuse NPSLE 患者の適切な治療のためにはその病態の解明が望ましい. 既報で、グルココルチコイドは mPFC においてノルアドレナリンやドパミンなどの神経伝達物質による神経トランスシグナリングを変化させ (Barsegyan et al., 2010; Butts et al., 2011), mPFC の機能を障害する. 我々の研究結果と既報を踏まえると、採血、検査、家族と離れた集団生活、騒音や不眠などの入院に伴う環境変化からくる様々な精神身体ストレスとグルココルチコイドの急性期治療投与が SLE 患者の特異的な炎症環境において急激に脱抑制性に mPFC 機能を障害し、急性期の精神神経症状増悪をもたらす可能性が想定される.

本研究はいくつかの限界がある. まず、我々は慢性 SD モデルという単一のモデルで検討した. 急性ストレスモデルとして、拘束ストレスや社会敗北ストレスなどがあるが、慢性 SD は diffuse NPSLE 患者の睡眠障害の高い罹患率からは適当なストレス負荷モデルと考えられる. 次に、我々はミクログリア特異的な *Il12b* 遺伝的な介入ができなかった. しかし、本研究の橋渡し観点からの長所として、既に臨床使用されている IL-12/23p40 中和抗体ウステキヌマブや Tyk2 阻害薬 BMS-986165 (deucravacitinib) で治療効果が得られた点が挙げられる. もちろん、NPSLE の病態生理を明らかにするためには遺伝学的な観点からの更なる研究が必要である. 3 個目として、IL-12/23p40 シグナル阻害により、SD 負荷ループモデルマウスを完全な不安状態へ陥らせている点が挙げられる. IL-12/23p40 阻害による不安効果が望ましい反応かどうかは議論が必要だが、慢性ストレスに対する適切な行動の回復、持続する神経炎症の改善、また

ACS や精神病を認める diffuse NPSLE 患者の容易な臨床管理という観点からは重要な治療法であると考えている.

我々の研究データは CNS における慢性ストレス誘導性 IL-12/23 シグナルがマイクログリア活性化や樹状突起スパインの異常制御を伴う神経過剰活性化が、最も重症な精神神経症状である ACS 類似の脱抑制様異常行動を誘導するという観点から, diffuse NPSLE の病態生理に関与するという知見を与える. 過去の研究も踏まえると, 我々の発見は, diffuse NPSLE 患者の著明な前頭皮質萎縮は持続する神経炎症の最終的な結果とも捉えられる. 正確な病態生理は研究途上だが, SD 負荷マウスの実験結果が diffuse NPSLE 患者へ外挿できたことは, IL-12/23p40 阻害や Tyk2 阻害が気分障害, 精神病や ACS などの症状を示す重症 diffuse NPSLE 患者の有望な治療法である可能性がある.

4.11 結語

我々は、ループモデルマウスにおいてミクログリアから分泌される慢性ストレス誘発性 IL-12/23p40 が mPFC ニューロンの樹状突起スパインの変化を伴う精神神経病態に関与していることを示した。また、diffuse NPSLE 患者でも、類似の結果が得られ、慢性ストレスにより誘導される IL-12/23p40 軸は diffuse NPSLE の病態生理に関与する可能性が考えられた (Figure 56)。

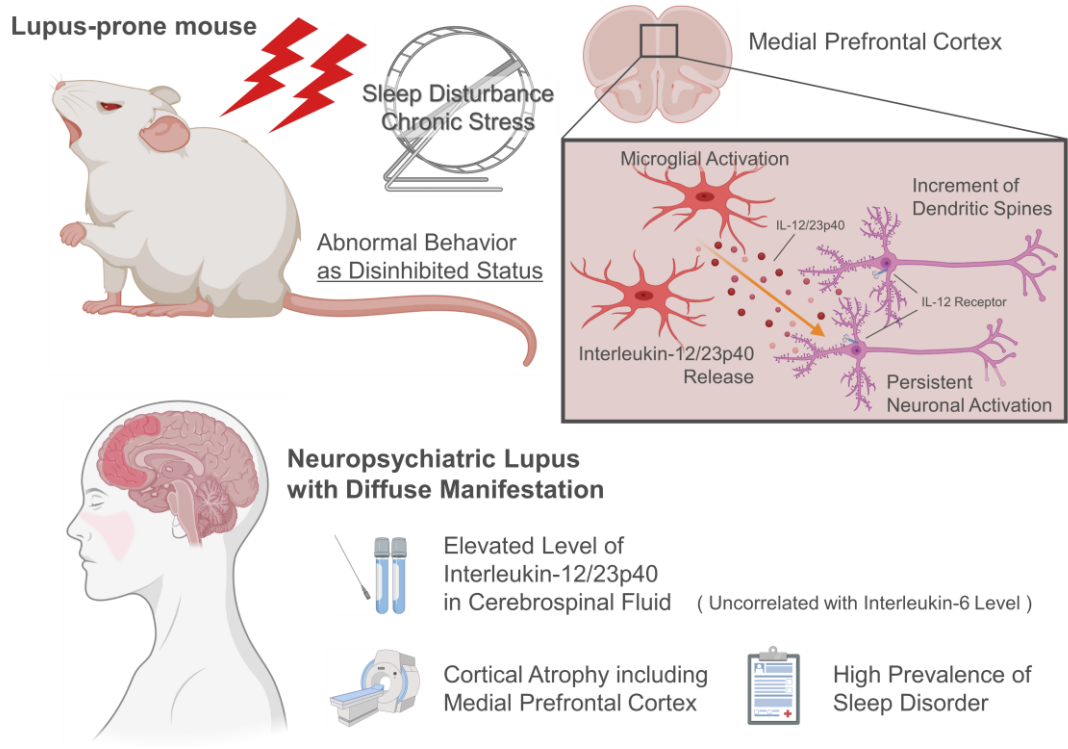


Figure 56. 第一章の図解要旨

5. 第二章

炎症性関節炎における 安静時脳機能的結合と疾患活動性の連関

5.1 緒言

RA や SpA は自己免疫機序による慢性多発性関節炎である。RA は関節滑膜の肥厚・増殖に伴う骨破壊を特徴とする最も頻度の高い自己免疫疾患の一つであり (Smolen et al., 2016), SpA は強直性脊椎炎, 乾癬性関節炎や反応性関節炎などが含まれる疾患群で, 骨造成を特徴とする体軸関節炎, 非対称性末梢性関節炎, 指炎や腱付着部炎などの筋・骨格系症状の他, ぶどう膜炎や炎症性腸疾患などの共通する臨床症状を示すことがある (Dougados and Baeten, 2011)。IA は早期診断・治療がなされなければ, 不可逆的な骨変形を引き起こし, 患者の日常生活に多大な影響を及ぼしうる。IA の治療方針の決定には, 臨床的滑膜炎, 血液検査所見や画像所見などの客観的所見に加えて, 疼痛や日常生活動作の障害度合といった患者報告アウトカムなどの主観的所見を組み合わせた疾患活動性を用いる。しかしながら, 治療方針が患者の主観に依存することは治療必要性の是非に対しての懸念を孕んでいる (Bidad et al., 2017; Ferreira et al., 2020)。特に患者が感じる疼痛に関しては客観的評価が困難であり, 抗リウマチ薬や生物学的製剤を適切に選択していない可能性がある。また, その高い薬価は逼迫する医療経済に悪影響を与えうるため, 患者毎の治療必要性を検討することは肝要である。

脳機能的 MRI (functional MRI: fMRI) は脳の活動に関連した血流動態反応を視覚化する非侵襲的な脳皮質機能モニタリング法の一つとして臨床応用されており, 高い空間分解能で局在した脳機能を評価することができる。近年, fMRI を使った研究で, IA 患者の痛みを感じる脳部位と血清学的炎症所見が相関していることが報告されている (Basu et al., 2018; Hemington et al., 2016; Schrepf et al., 2018)。しかしこれらのデータは横断的な解析のみで, IA 患者の治療反応性と関連した脳機能を評価した報告はこれまでにない。

5.2 目的

本研究の目的は、安静時 (resting-state: rs) fMRI を用いて、IA 患者における縦断的な臨床指標と脳機能との相関を調べ、IA 患者の疾患活動性と関連する疾患特異的な脳機能的連関を明らかにすることとした。

5.3 方法

5.3.1 患者および参加者

IA 患者データは北海道大学病院における 51 名の後ろ向きコホート研究ならびに 31 名の前向きコホート研究で収集された。IA は RA と SpA を含み、RA 患者は 2010 年 ACR RA 分類基準 (Aletaha et al., 2010), また, SpA 患者は軸性または末梢性 SpA に対する Assessment of SpondyloArthritis international Society (ASAS) 分類基準 (Rudwaleit et al., 2009; Rudwaleit et al., 2011) を満たすものとした。後ろ向きデータセットにおける IA 患者は 33 人が生物学的製剤による治療強化を必要としており, 治療前後の臨床データを収集した。前向きデータセットでは 31 人の IA 患者全員が生物学的製剤治療を必要とし, 治療前後で臨床的評価を実施し, また, fMRI 撮像も治療前後で 1 回ずつ実施した。RA の臨床評価は, 疼痛・腫脹関節数, 患者による包括的評価 (patient's global assessment: PGA), 評価者による包括的評価 (evaluator's global assessment: EGA) と血清 C 反応性蛋白 (C-reactive protein: CRP) を用いる Simplified disease activity index (SDAI) (Smolen et al., 2003), 疼痛・腫脹関節数, PGA と血清 CRP を用いる Disease Activity Score 28 based on CRP (DAS28-CRP) (Wells et al., 2009) で実施した。腫脹・疼痛関節評価は肩, 肘, 膝, 手及び手指関節 (中手指節関節, 近位指節間関節) で行った。PGA と EGA は visual analogue scale を用いて, 0 から 10 点で点数化した。SpA の臨床評価は, 背部痛, 末梢部痛・腫脹, 朝のこわばり時間, PGA と血清 CRP を用いる Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score based on CRP (ASDAS-CRP) (Lukas et al., 2009), 全身倦怠感, 背部痛, 関節痛・腫脹, 腱付着部炎および朝のこわばり時間に基づく Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) (Garrett et al., 1994), 身体機能に関する 10 の質問からなる Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) を用いた (Calin et al., 1994)。治療反応は RA では ACR コアセットの 20%以上の改善を (Felson et al., 1993), また, SpA では PGA, 疼痛評価スケール, BASFI による機能評価, BASDAI 質問表の質問 5, 6 の平均で表される炎症の 4 ドメインからなる ASAS20 改善と定義した (Anderson et al., 2001)。両データセットの IA 患者で, 日常生活動作における機能的状態についての修正健康度評価質問票 (modified Health Assessment Questionnaire: mHAQ, 0-3 点) (Pincus et al., 1983), 全般的健康状態についての EuroQol 5 dimensions 5 level (EQ-5D-5L) スコアリング法 (最高値: 1.0) (Herdman et al., 2011), 持続する慢性疼痛性疾患である線維筋痛症における様々な問題点を総合した改訂版線維筋痛症質問票 (Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire: FIQR) などで機能的に評価した。FIQR は (i) 日常生活機能 (9 項目), (ii) 目標達成可能性と圧倒される感覚 (2 項

目), (iii) 疼痛, 倦怠感や精神状態などの徴候 (10 項目) の 3 つのドメインから構成され, 各項目は 0-10 点の数値スケールで評価した (Bennett et al., 2009).

17 人の健常者データは同様に北海道大学で取得された. 健常者の選択基準は 18 歳以上の精神疾患や神経学的異常を有さないものとした.

56 人の変形性関節症患者データは神経画像データセット共有のオープンプラットフォームである OpenNeuro より取得した (Tétreault et al., 2016).

本研究は北海道大学臨床研究審査委員会の承認のもと (承認番号: 010-0031, 018-0128, 018-0222), ヘルシンキ宣言に基づいて, 実施した. 本研究の実施に関するインフォームドコンセントは研究に含まれる全ての患者および健常者から取得した.

5.3.2 画像取得パラメータ設定

全ての画像データは 3.0 T MRI スキャナー (Achieva TX, Philips Medical Systems) と標準 32 チャンネル radio frequency ヘッドコイル (Philips Medical Systems, Best, the Netherlands) を用いて取得された. T2*強調画像を, エコープラナー法を用いて, 約 7 分の時間で, 「TR 3000 ms, TE 30 ms, フリップアングル 80°, 撮像領域 24 cm × 24 cm, マトリクスサイズ 64 × 64, スライス厚 3.3 mm, スライス間隙 3.3 mm, 48 冠状断, 140 ボリューム」のパラメータで取得した. MRI スキャン中, 患者は眼を開けたまま眠らないようにし, 穏やかに安静でいるように指導した. 構造的 T1-MPRAGE 画像は 「TR 7 ms, TE 3 ms, フリップアングル 8°, 撮像領域 24 cm × 24 cm, マトリクスサイズ 256 × 256, スライス厚 1.2 mm, スライス間隙 1.2 mm, 170 矢状断」とした.

5.3.3 画像処理と時系列データ抽出

画像の前処理は Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA) ソフトウェアである Statistical Parametric Mapping 12 (Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK) と CONN toolbox (www.nitrc.org/projects/conn) (Whitfield-Gabrieli and Nieto-Castanon, 2012) を用いて実施した。前処理は動作補正, 再アラインメント, スライスタイミング補正, 外れ値検出, 構造画像への位置合わせ, セグメンテーション, MNI 空間への正規化と空間補正 (8 mm Gaussian kernel) などを実施した。構造画像は頭蓋骨除去後に, 灰白質, 白質, 髄液マスクへのセグメンテーションを実施した。機能的データでは, 最初の 4 ボリュームは磁場の安定化のために使用せず, 動作アーチファクト検出は artifact detection toolbox (ART toolbox) で実施した。外れ値をもつ画像は不要な共変量として, 個人データ解析時の一般線形モデルに組み込んだ。データの質評価のために, 動作による外れ値画像数を計算した。後ろ向きデータセットでは変形性関節症患者のデータセットは僅かに外れ値画像数が多かった (中央値 75) 一方で, IA 患者 中央値 52 と健常者 中央値 51 であった (Kruskal-Wallis 検定, $H(2) = 15.02$, $P < 0.001$)。身体的ノイズなどの除去のために, ノイズを CompCor (component-based noise correction) 法を用いて (Behzadi et al., 2007) で計算した。ノイズ領域の主成分解析により推定ノイズ領域をボクセル特異的な線形量にモデル化し, 一般線形モデルの変量として組み込んだ。白質および髄液マスクはノイズ領域として, 回帰によりその影響を除去した。時間的バンドパスフィルターは 0.008 から 0.09 Hz で適用し, 心臓や呼吸に関連する高周波活動を除去した。残る血流の酸素化具合に依存した (blood oxygenation level-dependent: BOLD) 信号の時系列データを抽出し, 以後の解析に用いた。

132 のアトラス由来 ROI は FSL Harvard-Oxford Atlas maximum likelihood cortical atlas および subcortical atlas, または AAL atlas から選択した (Desikan et al., 2006; Tzourio-Mazoyer et al., 2002)。島皮質の詳細な解析のために, 島皮質を, 確率アトラスを用いて, 前部島皮質 (前極, 前短回, 中短回, 後短回) と後部島皮質 (前長回, 後長回) の 6 領域に分けた (Faillenot et al., 2017) (Table 4)。

Table 4. ROI の MNI 中心座標

Atlas	Brain Area	MNI coordinates		
		x	y	z
FSL Harvard-Oxford Atlas maximum likelihood cortical atlas: divided bilateral areas into left/right hemisphere				
(91 ROIs)				
	Frontal Pole, Right (FP r)	26	52	8
	Frontal Pole, Left (FP l)	-25	53	8
	Insular Cortex, Right (IC r)	37	3	0
	Insular Cortex, Left (IC l)	-36	1	0
	Superior Frontal Gyrus, Right (SFG r)	15	18	57
	Superior Frontal Gyrus, Left (SFG l)	-14	19	56
	Middle Frontal Gyrus, Right (MidFG r)	39	19	43
	Middle Frontal Gyrus, Left (MidFG l)	-38	18	42
	Inferior Frontal Gyrus, pars triangularis, Right (IFG tri r)	52	28	8
	Inferior Frontal Gyrus, pars triangularis, Left (IFG tri l)	-50	28	9
	Inferior Frontal Gyrus, pars opercularis, Right (IFG oper r)	52	15	16
	Inferior Frontal Gyrus, pars opercularis, Left (IFG oper l)	-51	15	15
	Precentral Gyrus, Right (PreCG r)	35	-11	50
	Precentral Gyrus, Left (PreCG l)	-34	-12	49
	Temporal Pole, Right (TP r)	41	13	-30
	Temporal Pole, Left (TP l)	-40	11	-30
	Superior Temporal Gyrus, anterior division, Right (aSTG r)	58	-1	-10
	Superior Temporal Gyrus, anterior division, Left (aSTG l)	-56	-4	-8
	Superior Temporal Gyrus, posterior division, Right (pSTG r)	61	-24	2
	Superior Temporal Gyrus, posterior division, Left (pSTG l)	-62	-29	4
	Middle Temporal Gyrus, anterior division, Right (aMTG r)	58	-2	-25
	Middle Temporal Gyrus, anterior division, Left (aMTG l)	-57	-4	-22
	Middle Temporal Gyrus, posterior division, Right (pMTG r)	61	-23	-12
	Middle Temporal Gyrus, posterior division, Left (pMTG l)	-61	-27	-11
	Middle Temporal Gyrus, temporooccipital part, Right (toMTG r)	58	-49	2
	Middle Temporal Gyrus, temporooccipital part, Left (toMTG l)	-58	-53	1
	Inferior Temporal Gyrus, anterior division, Right (aITG r)	46	-2	-41
	Inferior Temporal Gyrus, anterior division, Left (aITG l)	-48	-5	-39

(次頁へ続く)

Inferior Temporal Gyrus, posterior division, Right (pITG r)	53	-23	-28
Inferior Temporal Gyrus, posterior division, Left (pITG l)	-53	-28	-26
Inferior Temporal Gyrus, temporooccipital part, Right (toITG r)	54	-50	-17
Inferior Temporal Gyrus, temporooccipital part, Left (toITG l)	-52	-53	-17
Postcentral Gyrus, Right (PostCG r)	38	-26	53
Postcentral Gyrus, Left (PostCG l)	-38	-28	52
Superior Parietal Lobule, Right (SPL r)	29	-48	59
Superior Parietal Lobule, Left (SPL l)	-29	-49	57
Supramarginal Gyrus, anterior division, Right (aSMG r)	58	-27	38
Supramarginal Gyrus, anterior division, Left (aSMG l)	-57	-33	37
Supramarginal Gyrus, posterior division, Right (pSMG r)	55	-40	34
Supramarginal Gyrus, posterior division, Left (pSMG l)	-55	-46	33
Angular Gyrus, Right (AG r)	52	-52	32
Angular Gyrus, Left (AG l)	-50	-56	30
Lateral Occipital Cortex, superior division, Right (sLOC r)	33	-71	39
Lateral Occipital Cortex, superior division, Left (sLOC l)	-32	-73	38
Lateral Occipital Cortex, inferior division, Right (iLOC r)	46	-74	-2
Lateral Occipital Cortex, inferior division, Left (iLOC l)	-45	-76	-2
Intracalcarine Cortex, Right (ICC r)	12	-74	8
Intracalcarine Cortex, Left (ICC l)	-10	-75	8
Frontal Medial Cortex (MedFC)	0	43	-19
Juxtapositional Lobule Cortex, Right (SMA r)	6	-3	58
Juxtapositional Lobule Cortex, Left (SMA l)	-5	-3	56
Subcallosal Cortex (SubCalC)	0	21	-15
Paracingulate Gyrus, Right (PaCiG r)	7	37	23
Paracingulate Gyrus, Left (PaCiG l)	-6	37	21
Cingulate Gyrus, anterior division (AC)	1	18	24
Cingulate Gyrus, posterior division (PC)	1	-37	30
Precuneus Cortex (Precuneus)	1	-59	38
Cuneal Cortex, Right (Cuneal r)	9	-79	28
Cuneal Cortex, Left (Cuneal l)	-8	-80	27
Frontal Orbital Cortex, Right (FOrb r)	29	23	-16
Frontal Orbital Cortex, Left (FOrb l)	-30	24	-17
Parahippocampal Gyrus, anterior division, Right (aPaHC r)	22	-8	-30

(次頁へ続く)

Parahippocampal Gyrus, anterior division, Left (aPaHC l)	-22	-9	-30
Parahippocampal Gyrus, posterior division, Right (pPaHC r)	23	-31	-17
Parahippocampal Gyrus, posterior division, Left (pPaHC l)	-22	-32	-17
Lingual Gyrus, Right (LG r)	14	-63	-5
Lingual Gyrus, Left (LG l)	-12	-66	-5
Temporal Fusiform Cortex, anterior division, Right (aTFusC r)	31	-3	-42
Temporal Fusiform Cortex, anterior division, Left (aTFusC l)	-32	-4	-42
Temporal Fusiform Cortex, posterior division, Right (pTFusC r)	36	-24	-28
Temporal Fusiform Cortex, posterior division, Left (pTFusC l)	-36	-30	-25
Temporal Occipital Fusiform Cortex, Right (TOFusC r)	35	-50	-17
Temporal Occipital Fusiform Cortex, Left (TOFusC l)	-33	-54	-16
Occipital Fusiform Gyrus, Right (OFusG r)	27	-75	-12
Occipital Fusiform Gyrus, Left (OFusG l)	-27	-77	-14
Frontal Operculum Cortex, Right (FO r)	41	19	5
Frontal Operculum Cortex, Left (FO l)	-40	18	5
Central Opercular Cortex, Right (CO r)	49	-6	11
Central Opercular Cortex, Left (CO l)	-48	-9	12
Parietal Operculum Cortex, Right (PO r)	49	-28	22
Parietal Operculum Cortex, Left (PO l)	-48	-32	20
Planum Polare, Right (PP r)	48	-4	-7
Planum Polare, Left (PP l)	-47	-6	-7
Heschl's Gyrus, Right (HG r)	46	-17	7
Heschl's Gyrus, Left (HG l)	-45	-20	7
Planum Temporale, Right (PT r)	55	-25	12
Planum Temporale, Left (PT l)	-53	-30	11
Supracalcarine Cortex, Right (SCC r)	8	-74	14
Supracalcarine Cortex, Left (SCC l)	-8	-73	15
Occipital Pole, Right (OP r)	18	-95	8
Occipital Pole, Left (OP l)	-17	-97	7

FSL Harvard-Oxford Atlas maximum likelihood subcortical atlas: disregarded Cerebral White Matter, Cerebral Cortex, and Lateral Ventricular areas (15 ROIs)

Thalamus, Right (Thalamus r)	11	-18	7
Thalamus, Left (Thalamus l)	-10	-19	6
Caudate, Right (Caudate r)	13	10	10

(次頁へ続く)

Caudate, Left (Caudate l)	-13	9	10
Putamen, Right (Putamen r)	25	2	0
Putamen, Left (Putamen l)	-25	0	0
Pallidum, Right (Pallidum r)	20	-4	-1
Pallidum, Left (Pallidum l)	-19	-5	-1
Hippocampus, Right (Hippocampus r)	26	-21	-14
Hippocampus, Left (Hippocampus l)	-25	-23	-14
Amygdala, Right (Amygdala r)	23	-4	-18
Amygdala, Left (Amygdala l)	-23	-5	-18
Accumbens, Right (Accumbens r)	9	12	-7
Accumbens, Left (Accumbens l)	-9	11	-7
Brain-Stem	0	-30	-35

AALAtlas: Cerebellar parcellation (26 ROIs)

Cerebellum Crus1, Left (Cereb1 l)	-36	-66	-30
Cerebellum Crus1, Right (Cereb1 r)	38	-67	-30
Cerebellum Crus2, Left (Cereb2 l)	-29	-73	-38
Cerebellum Crus2, Right (Cereb2 r)	32	-69	-40
Cerebellum 3, Left (Cereb3 l)	-9	-37	-19
Cerebellum 3, Right (Cereb3 r)	12	-35	-19
Cerebellum 4 5, Left (Cereb45 l)	-14	-44	-17
Cerebellum 4 5, Right (Cereb45 r)	16	-44	-19
Cerebellum 6, Left (Cereb6 l)	-23	-58	-24
Cerebellum 6, Right (Cereb6 r)	24	-58	-25
Cerebellum 7b, Left (Cereb7 l)	-32	-60	-45
Cerebellum 7b, Right (Cereb7 r)	33	-63	-48
Cerebellum 8, Left (Cereb8 l)	-26	-55	-48
Cerebellum 8, Right (Cereb8 r)	25	-56	-49
Cerebellum 9, Left (Cereb9 l)	-11	-49	-46
Cerebellum 9, Right (Cereb9 r)	9	-49	-46
Cerebellum 10, Left (Cereb10 l)	-23	-34	-42
Cerebellum 10, Right (Cereb10 r)	26	-34	-41
Vermis 1 2 (Ver12)	1	-39	-20
Vermis 3 (Ver3)	1	-40	-11
Vermis 4 5 (Ver45)	1	-52	-7

(次頁へ続く)

Vermis 6 (Ver6)	1	-66	-16
Vermis 7 (Ver7)	1	-72	-25
Vermis 8 (Ver8)	1	-64	-34
Vermis 9 (Ver9)	1	-55	-35
Vermis 10 (Ver10)	0	-46	-32

Probabilistic atlases of left insular subregions

Anterior Long Gyrus, Left	-37	-12	6
Anterior Pole, Left	-36	9.3	-11
Anterior Short Gyrus, Left	-33	19	-0.1
Middle Short Gyrus, Left	-34	7.8	5.3
Posterior Long Gyrus, Left	-37	-12	-4.8
Posterior Short Gyrus, Left	-37	2.2	6.2

5.3.4 静的機能的連関解析

CONN toolbox で ROI-to-ROI 解析を実施し、各個体における ROI 間の BOLD 時系列に関する Pearson 相関係数を算出した。相関係数は Fisher の Z 変換を実施した。

個人レベルの解析では、BOLD 時系列全体を使って、静止機能的連関を計算した。群レベルの解析では、ROI に基づく推定法を使って偽陽性を調整した。まず、ROI-to-ROI マトリクスのそれぞれの行を連関の異なるクラスターとして定義し、全ての ROI 同士の連関をグループ化した。次にクラスターに含まれる全ての連関で多変量一般線形モデル解析を行い、それぞれの ROI-to-ROI に対する F 統計量とともに未調整 ROI レベル p 値を算出する。Benjamini-Hochberg 法で偽陽性発見率調整 ROI レベル p 値を計算した。機能的相関絶対値が 0.2 を超えるトップの 10% の ROI-to-ROI 相関について、BrainNet Viewer software (Xia et al., 2013) を使って、水平断解剖学的脳に当てはめて描画した。

前向きデータセットにおける統計解析は、該当機能的相関について、年齢と性別を調整した共分散分析と Tukey-Kramer 多重比較検定で family-wise error (FWE) 調整 p 値を算出した。

5.3.5 動的機能的連関解析

短時間のウインドウ毎に分けた BOLD 時系列の各ウインドウにおける機能的相関を計算し、時間変動性を評価した。個人レベルの解析では、sliding window 法を用いて、BOLD 時系列をウインドウ毎に分けた。この手法では、時間経過を 18 秒は前のウインドウと重なった 36 秒毎のウインドウに分け (Leonardi and Van De Ville, 2015), Fisher 変換相関係数を、ウインドウ毎に計算した。群レベルの解析では、後ろ向きデータセットの IA 患者 ($n=33$) において、繰り返し出現する連関パターンを評価した (Demertzi et al., 2019)。まず、ROI-to-ROI マトリクスを 1 行 ($C(132,2)=8646$ 次元) に再配置し、ウインドウはそれぞれ異なる次元 (18 行) とし、 $8646 \times 18 \times 33$ (患者数) の要素からなるマトリクスを再構成した。最後に、コサイン類似度を距離指標に用いて k -平均++クラスタ解析法をマトリクスに適用した。クラスタ解析は重心位置のランダム開始性による影響を回避するために 500 回適用した。この解析で、(i) コサイン類似度による k クラスタ重心位置 (132×132 マトリクス)、(ii) それぞれのウインドウに対応したパターンのクラスタラベルを得た。代表的な機能的相関値の繰り返し重心マトリクスパターンはそれぞれのクラスタパターンの ROI-to-ROI マトリクスの平均値として算出した。クラスタ数 k は 3 から 7 を代入して探索的に調べた。

前向きデータセットでは、各機能的連関マトリクスのコサイン類似度を算出した。後ろ向きデータセットで決定したクラスタ重心を利用して、重心と最も短い距離となるクラスタラベルを前向きデータセットの機能的連関マトリクスに当てはめた。

作成したクラスタリングを用いて、個人でクラスタパターンの発生確率を計算した。クラスタパターンの理解のために、各クラスタパターン内の差異のある機能的連関を前述の ROI に基づく推定法を介して探索・抽出し、一般線形モデルによる多変量解析で F 統計量を ROI 毎に算出し、ROI レベル未調整 p 値を算出した。Benjamini-Hochberg 法で偽陽性発見率調整 p 値に補正した。Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて、各クラスタパターンで統計学的有意差を示す ROI-to-ROI 機能的連関を各クラスタパターンで抽出した。

5.3.6 次元削減

Matlab (Mathworks, Natick, MA, USA) 内の機能である Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) (Meehan C, Meehan S, Ebrahimian J, et al: www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/71902) を用いて, ROI-to-ROI 機能的連関の次元削減を実施した. 使用したパラメータは「距離指標 = cityblock 距離 (Manhattan 距離), 各点近傍のサンプルデータ点の数 ($n_neighbors$) = 50, まとめ埋め込みの最低距離 (min_dist) = 0.3」とした. UMAP による次元削減前に, 全ての ROI 間の機能的連関で, 群比較で統計学的に有意な変化をしている連関を抜き出した. この処理過程で次元削減され, 更に UMAP を当てはめることで, 2次元への削減を行った.

動的機能的連関解析においては, 後ろ向きデータセットの IA 患者のパラメータを UMAP で削減し, 教師テンプレートとして保存した. 前向きデータセットの IA 患者のパラメータを上述の教師テンプレートに UMAP を用いて当てはめた.

5.3.7 統計解析

年齢, 性別を共変量とした共分散分析で連続変数を比較した. 多重比較検定では, Benjamini-Hochberg 法による偽陽性発見率補正と Tukey-Kramer 法によるファミリーワイズエラー補正による調整 p 値を算出した. Pearson 相関係数は臨床指標と fMRI データ指標の線形相関をみるために用いた. ROC 解析は静止脳機能的相関と動的機能的連関パターン出現率の治療反応性予測性評価目的に, AUC 算出を介して実施した. 混合効果モデルは, 年齢, 性別とウインドウを固定効果共変量とした第一次自己回帰モデルを用いて, 反復測定指標の統計解析に使用した. 全ての統計解析は JMP Pro 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) で行った. 解析結果は, 偽陽性発見率調整 p 値およびファミリーワイズエラー調整 p 値を含め, p 値が 0.05 を下回った場合に統計学的有意差があると判断した. 全ての統計解析は両側検定で行った.

5.4 結果

5.4.1 炎症性関節炎患者に特異的な静止脳機能的連関

IA 患者の疾患活動性と関連する疾患特異的な脳機能的連関を明らかにするために、resting-state fMRI を用いて、各脳領域の機能的連関を健常者や非炎症性関節痛コントロールとしての変形性関節症患者と、後ろ向きデータセットで比較した。続いて、検出した脳機能的連関の疾患活動性・治療反応性の予測能について、前向きデータセットを用いて検証することとした。

2つのデータセットの臨床的特徴を Table 5 および Table 6 に示した。

Table 5. 後ろ向きデータセットに含まれる被検者の臨床的特徴

Characteristics	IA (n=51)			HC (n=17)	OA (n=56)
	All (n=51)	Before Treatment (n=33)	After Treatment (n=33)		
Demographics					
Age at fMRI, years	62 [38-70]	62 [43-71.5]		38 [33-46]	57 [54-64]
Sex, female	36 (71%)	25 (76%)		10 (59%)	30 (54%)
PGA (0-10)	5 [3-7]	7 [5-9]	3.2 [0.7-5.1]		
Disease duration, years	5 [1-18]	5 [0.5-15]			
Disease classification					
RA	34 (67%)	22 (67%)			
SpA	17 (33%)	11 (33%)			
Laboratory findings					
Rheumatoid factor	28 (55%)	20 (61%)			
ACPA	26 (51%)	19 (58%)			
C-reactive protein, mg/dL	0.33 [0.03-1.96]	0.34 [0.05-2.02]	0.03 [0-0.135]		
ESR, mm/h	27 [13-52]	27 [16-56]	12 [8-26]		
Disease activity score					
<i>for RA</i>	<i>(n = 34)</i>	<i>(n = 22)</i>	<i>(n = 22)</i>		
TJC (0-28)	4 [1.8-9.3]	6 [3-10]	1.5 [0-4]		
SJC (0-28)	2.5 [0.8-6.3]	4 [2-7]	0 [0-1]		
EGA (0-10)	3.8 [1.9-5]	4 [3-5]	1.5 [0.5-4]		
DAS 28-CRP	3.95 [2.85-5.02]	4.06 [3.30-5.23]	2.41 [1.34-2.96]		
CDAI	17.5 [7.75-25.9]	21 [14-27]	7 [2.88-12.4]		
SDAI	17.7 [8.08-29.9]	21.8 [14.4-32.3]	7.1 [2.88-12.4]		
<i>for SpA</i>	<i>(n = 27)</i>	<i>(n = 11)</i>	<i>(n = 11)</i>		
ASDAS-CRP	2.41 [1.85-3.25]	2.45 [2.15-3.40]	2.25 [1.69-2.64]		
BASDAI	5.5 [4.2-6.6]	5.6 [5.2-6.5]	4.4 [1.4-5.1]		
BASFI	4.2 [2.3-5.3]	3.2 [2.1-5.2]	1.4 [0.4-6.7]		
Functional score					
mHAQ score	0.4 [0.163-1.31]	0.45 [0.175-1.5]	0.25 [0.05-1.1]		
FIQR domain 1	7.7 [2.9-18.3]	7.3 [2.3-18.8]	5 [0.5-11.5]		
FIQR domain 2	5.5 [2-12.8]	7 [2-13.5]	5 [2-8]		

(次頁へ続く)

FIQR domain 3	17.5[9.1-27.5]	19 [9.8-29.3]	14.5 [7-26]
FIQR total score	31.9 [16.0-57]	33.8 [16.3-60.8]	25.3 [12.3-44.2]
EQ-5D-5L	0.60 [0.45-0.72]	0.59 [0.43-0.71]	0.66 [0.56-0.77]

Therapeutic Regimen

Anti-TNF- α antibody	12 (36%)
Infliximab	0
Adalimumab	9 (27%)
Etanercept	0
Golimumab	3 (9%)
Certolizumab Pegol	0
Anti-interleukin-6 antibody	6 (18%)
Abatacept	5 (16%)
Janus-kinase inhibitor	6 (18%)
Rituximab	1 (6%)
Anti-interleukin-17 antibody	2 (6%)
Anti-interleukin-12/-23 antibody	0

Concomitant Medication

Glucocorticoid, mg/day	16 (48%), 5 [5-10]
Methotrexate, mg/week	10 (42%), 9 [6-10.5]
Salazosulfapyridine	11 (46%)
Tacrolimus	5 (21%)
Iguratimod	4 (17%)

データは数 (割合), または中央値 (四分位範囲) で示した。

略語: IA, inflammatory arthritis; HC, healthy control; OA, osteoarthritis; fMRI, functional magnetic resonance imaging; PGA, patient global assessment; RA, rheumatoid arthritis; SpA, spondyloarthritis; ACPA, anti-citrullinated protein antibody; ESR, erythrocyte sedimentation rate; TJC, tenderness joint count; SJC, swollen joint count; EGA, evaluator global assessment; DAS, Disease Activity Score; CDAI, clinical disease activity index; SDAI, simplified disease activity index; ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; mHAQ, modified Health Assessment Questionnaire; FIQR, Fibromyalgia Impact Questionnaire; EQ-5D-5L, EuroQOL 5 dimensions 5-level; TNF, tumor necrosis factor

Table 6. 前向きデータセットに含まれる患者の臨床的特徴

Characteristics	IA (n=31)	
	Before Treatment	After Treatment
Demographics		
Age at fMRI, years	56 [45-68]	
Sex, female	21 (68%)	
PGA (0-10)	7 [5-9]	4.5 [1.5-7]
Disease duration, years	7 [1-12]	
Disease classification		
RA	19 (61%)	
SpA	12 (39%)	
Laboratory findings		
Rheumatoid factor	15 (48%)	
ACPA	15 (48%)	
C-reactive protein, mg/dL	0.81 [0.04-3.1]	0.03 [0-0.07]
ESR, mm/h	25 [9-52]	8 [5-14]
Disease activity score		
<i>for RA</i>		
TJC (0-28)	4 [1-9]	1 [0-2]
SJC (0-28)	4 [0-6]	0 [0-2]
EGA (0-10)	6 [3-8]	1.5 [0.5-4]
DAS 28-CRP	4.38 [2.86-5.43]	2.24 [1.33-2.85]
CDAI	18.5 [10-31]	7 [3-12]
SDAI	25.2 [11.2-33.3]	7.1 [3-12]
<i>for SpA</i>		
ASDAS-CRP	3.11 [2.06-3.89]	1.80 [1.06-2.99]
BASDAI	5.3 [3.1-7.7]	4.5 [2.3-7.4]
BASFI	4.6 [1.1-8.6]	4.7 [0.53-6.6]
Functional score		
mHAQ score	0.55 [0.15-1.9]	0.58 [0.01-0.89]
FIQR domain 1	14.7 [3.6-22]	8.7 [2.1-17]
FIQR domain 2	10 [3.8-17]	6 [2-11.8]
FIQR domain 3	27 [15.5-36.3]	21.5 [9.9-32.4]

(次頁へ続く)

FIQR total score	53.7 [26.3-74.3]	33.5 [16.2-54.2]
EQ-5D-5L	0.60 [0.48-0.70]	0.66 [0.53-0.77]
Therapeutic Regimen		
Anti-TNF- α antibody	9 (29%)	
Infliximab	1 (3%)	
Adalimumab	3 (10%)	
Etanercept	1 (3%)	
Golimumab	0	
Certolizumab Pegol	3 (10%)	
Anti-interleukin-6 antibody	11 (35%)	
Abatacept	0	
Janus-kinase inhibitor	2 (6%)	
Rituximab	2 (6%)	
Anti-interleukin-17 antibody	5 (16%)	
Anti-interleukin-12/-23 antibody	1 (3%)	
Concomitant Medication		
Glucocorticoid, mg/day	9 (29%), 5 [4.5-6.5]	
Methotrexate, mg/week	11 (33%), 10 [8-12]	
Salazosulfapyridine	6 (19%)	
Tacrolimus	1 (3%)	
Iguratimod	0	

データは数 (割合), または中央値 (四分位範囲) で示した.

略語: IA, inflammatory arthritis; HC, healthy control; OA, osteoarthritis; fMRI, functional magnetic resonance imaging; PGA, patient global assessment; RA, rheumatoid arthritis; SpA, spondyloarthritis; ACPA, anti-citrullinated protein antibody; ESR, erythrocyte sedimentation rate; TJC, tenderness joint count; SJC, swollen joint count; EGA, evaluator global assessment; DAS, Disease Activity Score; CDAI, clinical disease activity index; SDAI, simplified disease activity index; ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; mHAQ, modified Health Assessment Questionnaire; FIQR, Fibromyalgia Impact Questionnaire; EQ-5D-5L, EuroQOL 5 dimensions 5-level; TNF, tumor necrosis factor

これらのデータセットを用いて、全脳の重なり合わない 132 の ROI 同士の BOLD 信号相関を算出した。我々は最初に後ろ向きデータセット群間の静的脳機能連関を評価し、統計学的有意差をもつ 1283 の差異相関を見出した (Figure 57).

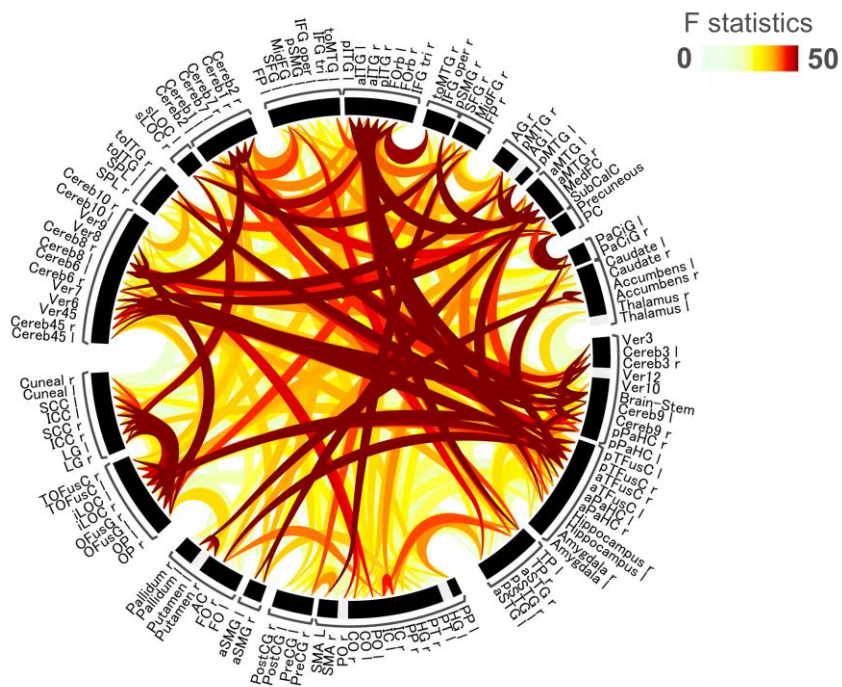


Figure 57. 後ろ向きデータセット群間の機能的相関比較による F 統計量マトリクス線は年齢と性別を調整した共分散分析で統計学的有意差があることを示し, F 統計量の値で色付けした.

この差異のある脳機能的相関を用いて,UMAPによる次元削減で後ろ向きデータセットの特徴を2次元で表現した (Figure 58).

Dimension Reduction with UMAP
1283 Differential Correlations

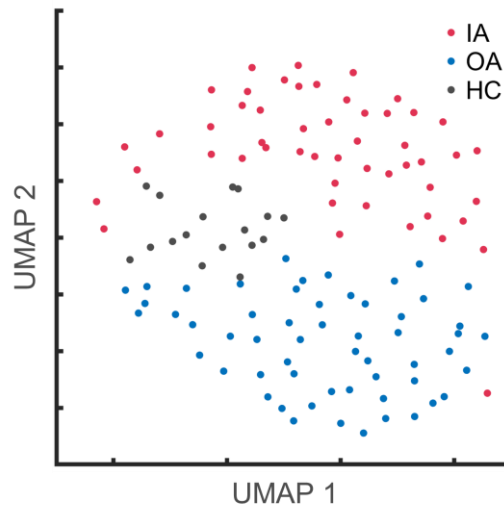


Figure 58. 後ろ向きデータセットにおける 1283 差異相関の UMAP による 2 次元投射

IA に特異的な脳機能的相関を検索するために、我々は痛みや炎症に感受性のある脳領域である島皮質 (insular cortex: IC) と前帯状皮質 (anterior cingulate cortex: ACC) に着目した (Basu et al., 2018; Labrenz et al., 2016; Schrepf et al., 2018). 結果として、IA 患者において左 IC と ACC が Fisher Z 変換脳機能的連関指標が最も低値を示すことがわかった (Figure 59).

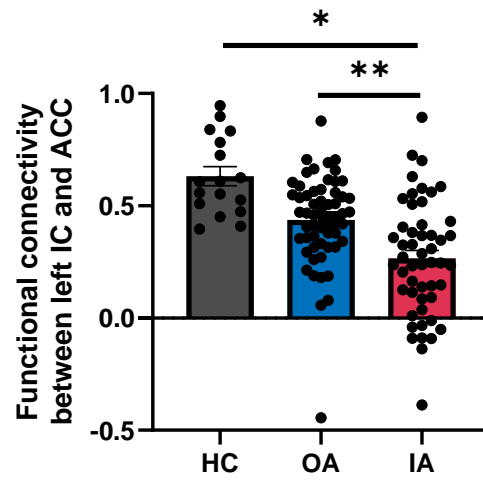


Figure 59. 左 IC と ACC の脳機能的相関値
 データは平均値±標準誤差で示した。*偽陽性発見率調整 $p(q) < 0.05$, ** $q < 0.01$, 年齢、性別調整共分散分析と Benjamini-Hochberg 法。

健常者や非炎症性関節痛コントロールとしての変形性関節症患者と比較して, IA 患者では左 IC と ACC の静的脳機能連関値が有意に低値であることがわかり, IA 患者特異的な脳機能的連関異常が示唆された.

5.4.2 炎症性関節炎患者における左 IC 詳細領域と ACC 間の

静的脳機能連関の正確な治療反応予測性

脳機能的連関の詳細な理解のために、我々は解剖学的な IC の 6 つの詳細領域として、前極、前・中・後短回と前・後長回について検討した (Benarroch, 2019) (Figure 60).

Left Insular Cortex (IC)

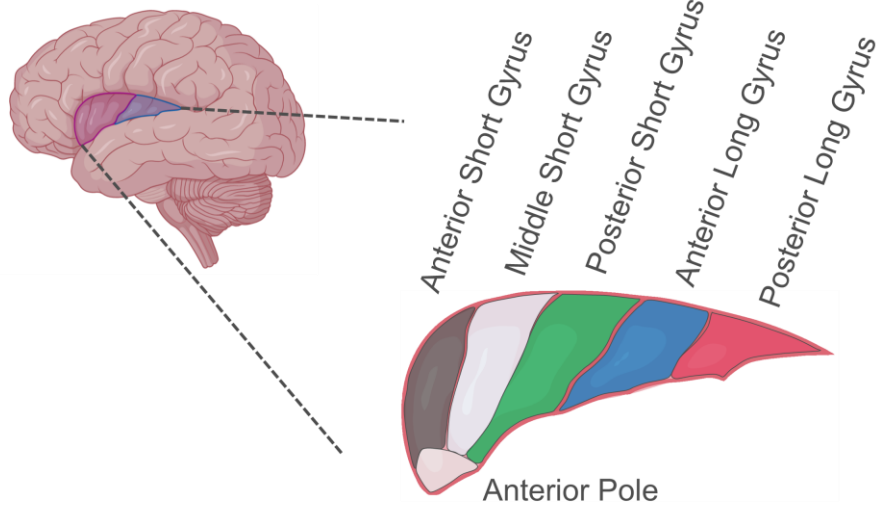


Figure 60. 島皮質の6つの詳細領域

後ろ向きデータセットで ACC と左 IC 詳細領域の機能的連関を評価し, IA 患者で最も低値を示す ACC と前長島回の機能的連関を検出した (Figure 61).

Functional Connectivity between subdivided left IC and ACC

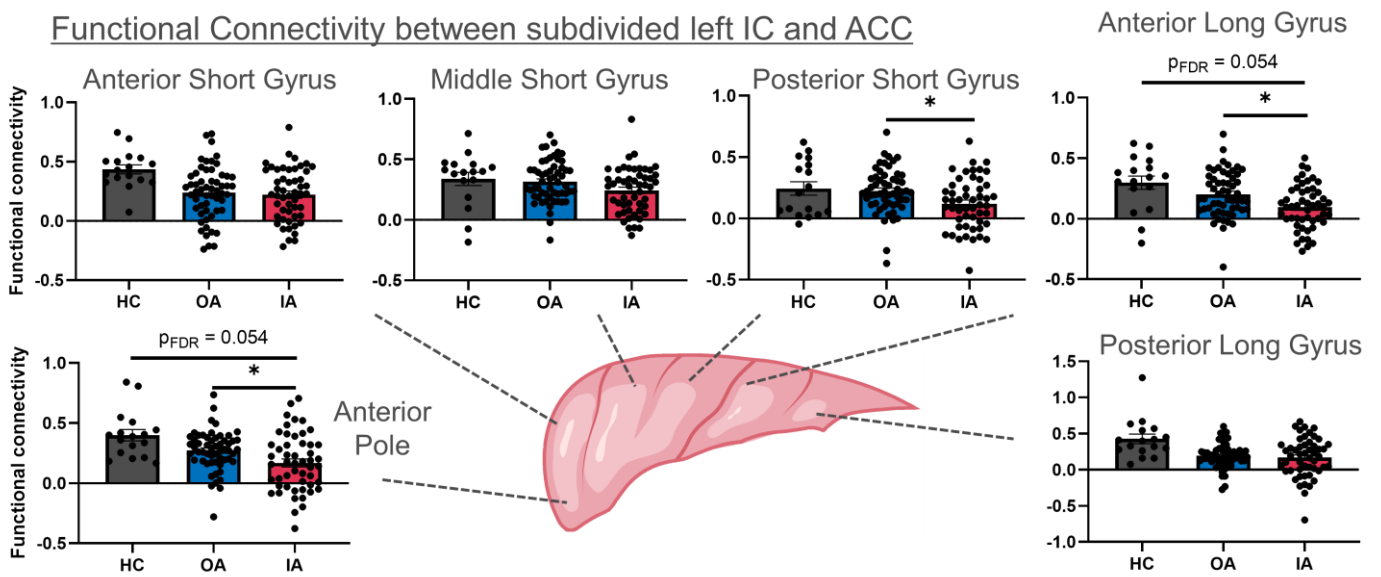


Figure 61. ACC と IC 詳細領域との機能的結合値の各群における比較
 データは平均値±標準誤差で示した。* $q < 0.05$, 年齢, 性別調整共分散分析と
 Benjamini-Hochberg 法.

我々は次に ACC-左前長島回間の機能的連関による生物学的製剤への治療反応性について評価した. 後ろ向きデータセットの生物学的製剤による治療強化が必要な 33 人の IA 患者で検討した. この患者群で治療反応・非反応患者群間の治療前における臨床的特徴に差は認めなかった (Table 7). ACC-左前長島回間の機能的連関値は治療非反応群と比べて治療反応群において有意に低かった (Figure 62A). また, 治療反応性に対して, ROC 解析で AUC 0.7269 (95%CI 0.5394-0.9145) と有意に良い予測能を示した (Figure 62B).

Table 7. 後ろ向きデータセットにおける IA 患者の臨床的特徴

Characteristics	IA (n = 33)	
	Treatment Effective (n=20)	Treatment Ineffective (n=13)
Demographics		
Age at fMRI, years	64 [55-72]	49 [36-69]
Sex, female	15 (61%)	10 (39%)
PGA (0-10)	5 [4-7.8]	7 [3.3-7]
Disease duration, years	5 [0-22]	4 [1.5-13]
Disease classification		
RA	14 (70%)	8 (62%)
SpA	6 (30%)	5 (38%)
Laboratory findings		
C-reactive protein, mg/dL	0.53 [0.03-2.04]	0.28 [0.07-2.39]
ESR, mm/h	27 [16-51]	30 [13-61]
Disease activity score		
<i>for RA</i>	<i>(n = 14)</i>	<i>(n = 8)</i>
TJC (0-28)	4 [3-6]	10 [6-13]
SJC (0-28)	3 [1-5]	5 [2-8]
EGA (0-10)	4 [3-5]	3.8 [2.3-6.5]
DAS 28-CRP	3.95 [3.24-4.97]	5.11 [3.36-5.76]
CDAI	18 [13-22]	23 [14.8-32.8]
SDAI	17.7 [13.4-26.4]	29.5 [14.8-34.8]
<i>for SpA</i>	<i>(n = 6)</i>	<i>(n = 5)</i>
ASDAS-CRP	2.43 [2.0-3.82]	2.64 [1.82-3.25]
BASDAI	5.6 [4.5-6.9]	5.6 [4.1-6.5]
BASFI	2.8 [2.1-5.4]	4.2 [1.8-5.3]
Functional score		
mHAQ score	0.38 [0.16-1.39]	0.75 [0.15-1.6]
FIQR domain 1	6.17 [1.83-18.1]	9.3 [5.67-19]
FIQR domain 2	2 [5-14]	10 [3-14]

(次頁へ続く)

FIQR domain 3	18 [9.1-32.9]	26.5 [14.8-29.3]
FIQR total score	25.4 [13.1-59.0]	50.8 [19.8-60.8]
EQ-5D-5L	0.59 [0.33-0.72]	0.53 [0.43-0.68]

データは数 (割合), または中央値 (四分位範囲) で示した.

略語: IA, inflammatory arthritis; fMRI, functional magnetic resonance imaging; PGA, patient global assessment; RA, rheumatoid arthritis; SpA, spondyloarthritis; ESR, erythrocyte sedimentation rate; TJC, tenderness joint count; SJC, swollen joint count; EGA, evaluator global assessment; DAS, Disease Activity Score; CDAI, clinical disease activity index; SDAI, simplified disease activity index; ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; mHAQ, modified Health Assessment Questionnaire; FIQR, Fibromyalgia Impact Questionnaire; EQ-5D-5L, EuroQOL 5 dimensions 5-level

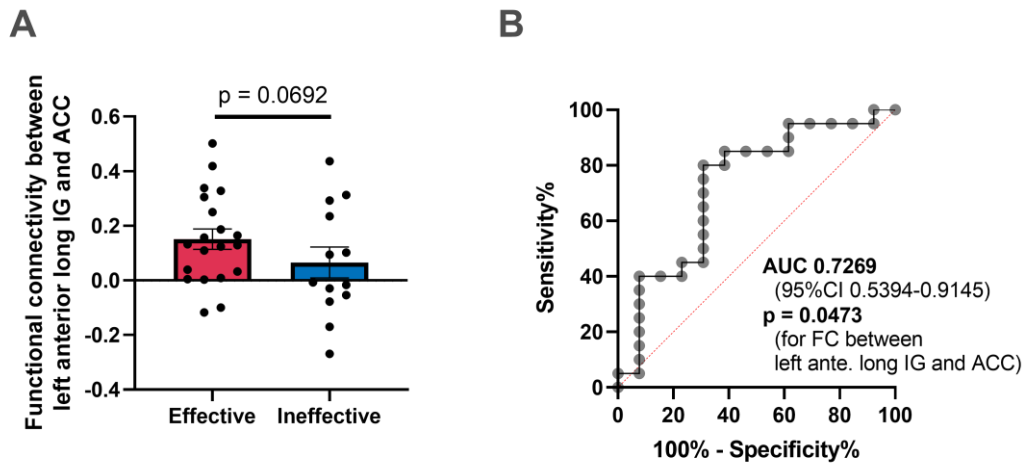


Figure 62. 後ろ向きデータセットの IA 患者における脳機能的連関比較・治療反応予測能の解析

(A) 左前長島回-ACC 間脳機能的連関値の IA 患者における治療反応性に応じた比較 ($n = 33$). データは平均値±標準誤差で示した. 年齢, 性別調整共分散分析. (B) 左前長島回-ACC 間脳機能的連関値の治療反応性予測能に関する ROC 解析

検証目的に我々は前述の結果を前向きデータセットに含まれる 31 人の類似した臨床徴候をもつ IA 患者に当てはめた (Table 8). 治療前後で左前長島回-ACC 間脳機能的連関値に変化はなかったが, 治療反応性が良好な IA 患者ではこの脳機能的連関地は治療抵抗性の患者と比較して有意に高値だった (Figure 63).

Table 8. 前向きデータセットにおける IA 患者の臨床的特徴.

Characteristics	IA (n = 31)	
	Treatment Effective (n=19)	Treatment Ineffective (n=12)
Demographics		
Age at fMRI, years	54 [45-67]	47 [61-70]
Sex, female	13 (68%)	8 (67%)
PGA (0-10)	6 [5-8]	7.5 [5-9.8]
Disease duration, years	7 [1-12]	4 [1-17]
Disease classification		
RA	12 (63%)	7 (58%)
SpA	7 (37%)	5 (42%)
Laboratory findings		
C-reactive protein, mg/dL	1.46 [0.04-4.52]	0.30 [0.04-2.04]
ESR, mm/h	26 [8-64]	15 [10-49]
Disease activity score		
<i>for RA</i>	<i>(n = 12)</i>	<i>(n = 7)</i>
TJC (0-28)	6 [1-9]	2 [0-10]
SJC (0-28)	4 [0-6]	2 [0-6]
EGA (0-10)	5.5 [3-7]	6 [3-8]
DAS 28-CRP	4.54 [2.95-5.26]	3.19 [2.86-5.83]
CDAI	19.8 [10.3-29.7]	18 [10-31]
SDAI	25.5 [11.4-33.6]	18 [11.2-33.3]
<i>for SpA</i>	<i>(n = 7)</i>	<i>(n = 5)</i>
ASDAS-CRP	3.77 [2.11-3.96]	3.1 [1.94-3.46]
BASDAI	4.9 [2.8-6.8]	5.6 [2.9-9.5]
BASFI	2.9 [0.3-8.4]	5.7 [3.1-9.6]
Functional score		
mHAQ score	0.45 [0.04-1.9]	0.58 [0.05-1.7]
FIQR domain 1	13.7 [2.08-22.8]	15.3 [8.25-21.8]
FIQR domain 2	11 [2.8-17.3]	10 [5-14.8]
FIQR domain 3	27 [14.6-36.3]	28.5 [15.5-38.8]
FIQR total score	55.1 [23.2-74.3]	52.8 [32.3-76.2]
EQ-5D-5L	0.57 [0.47-0.77]	0.60 [0.48-0.66]

(次頁へ続く)

データは数 (割合), または中央値 (四分位範囲) で示した.

略語: IA, inflammatory arthritis; fMRI, functional magnetic resonance imaging; PGA, patient global assessment; RA, rheumatoid arthritis; SpA, spondyloarthritis; ESR, erythrocyte sedimentation rate; TJC, tenderness joint count; SJC, swollen joint count; EGA, evaluator global assessment; DAS, Disease Activity Score; CDAI, clinical disease activity index; SDAI, simplified disease activity index; ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; mHAQ, modified Health Assessment Questionnaire; FIQR, Fibromyalgia Impact Questionnaire; EQ-5D-5L, EuroQOL 5 dimensions 5-level

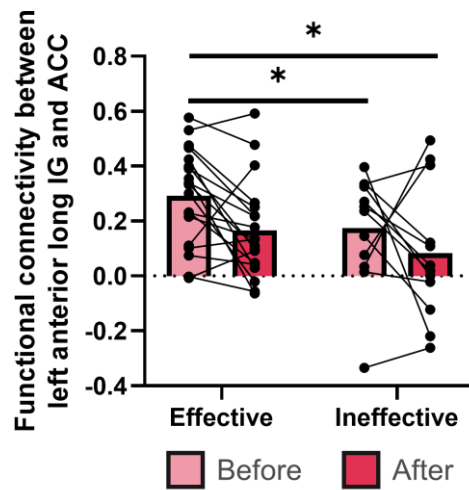


Figure 63. 前向きデータセットの IA 患者における脳機能的連関比較
 左前長島回-ACC 間脳機能的連関値の IA 患者における治療反応性に応じた比較 ($n = 31$). データは平均値で示した. *ファミリーワイズエラー調整 $p < 0.05$. 年齢, 性別調整共分散分析と Tukey-Kramer 多重比較検定.

脳全体の領域における脳機能的連関は生物学的製剤治療前後で同一個体では自己相関していたため (Figure 64, A and B), 我々は治療前データに着目した. 左前長島回-ACC 間脳機能的連関値は前向きデータセットにおいても, AUC 0.8070 (95%CI 0.6561-0.9579) と高い治療反応予測性を示した (Figure 65).

A Comparing FC matrix before/after tx.
in IA (n=31) of Prospective Dataset

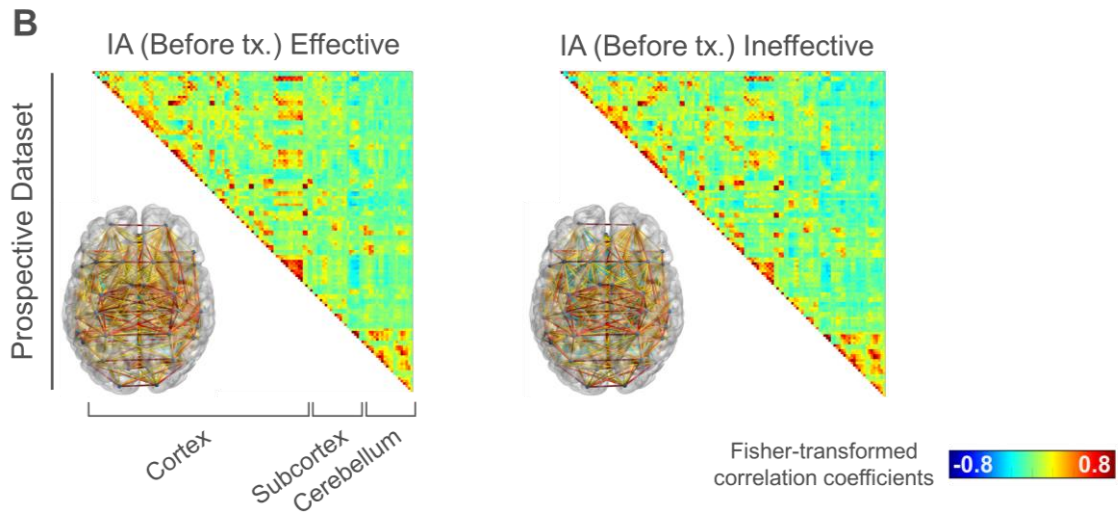
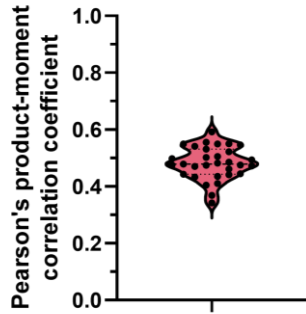


Figure 64. 前向きデータセット内 IA 患者の治療前後脳機能的連関の自己相関性
(A) 個人レベルにおける治療前後の脳機能的相関マトリクス同士の Pearson 相関係数.
(B) 治療前後の IA 患者における平均化脳機能的相関マトリクス ($n = 31$ per group). 脳画像に絶対値 0.2 以上の脳機能的連関を描画した.

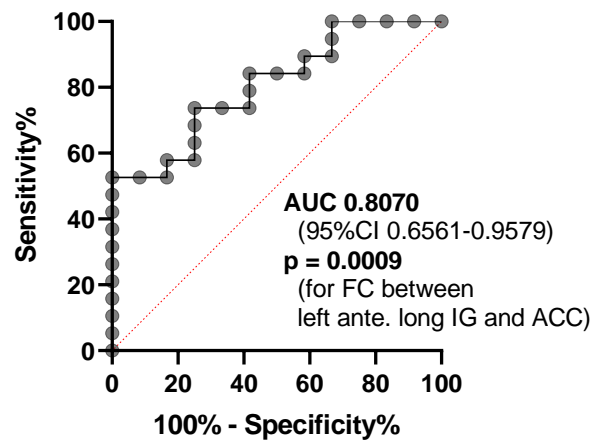


Figure 65. 前向きデータセットの IA 患者における左前長島回-ACC 間脳機能的連関値の治療反応性予測能に関する ROC 解析

更に、後ろ向き及び前向きデータセットに含まれる IA 患者において、左前長島回-ACC 間の静的脳機能的連関値は治療による SDAI や ASDAS-CRP によって評価された疾患活動性スコアの改善と有意な相関を示した (Figure 66). 同様に、この連関は患者報告アウトカムである PGA や FIQR の改善程度とも相関を示すとともに (Figure 67, A and B), 治療後の臨床指標である PGA や EGA, 疼痛関節に加えて、身体機能, 疼痛知覚や生活の質に関する指標の有意な予測性を示した (Table 9).

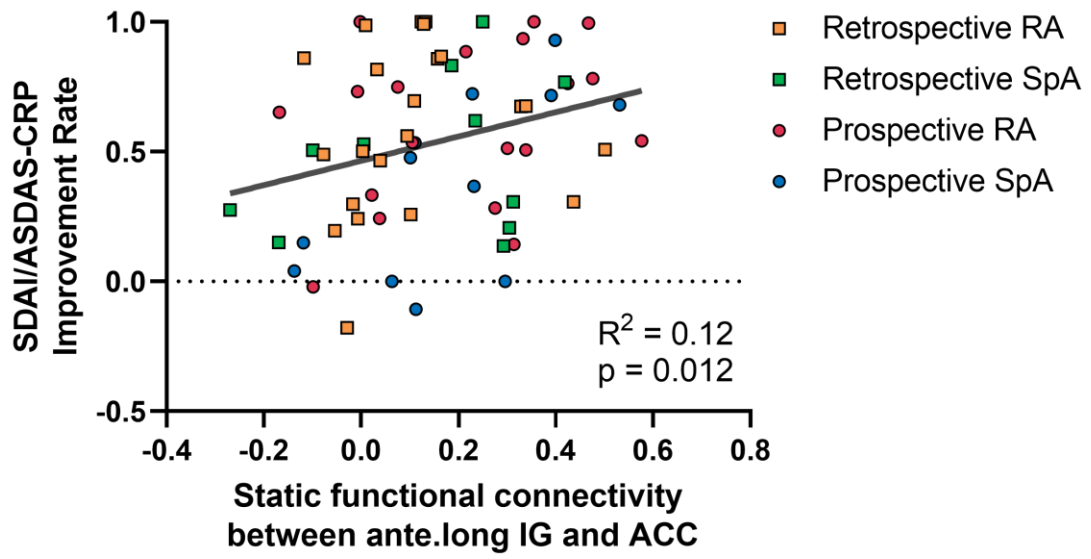


Figure 66. 左前長島回-ACC 間静的脳機能的連関と疾患活動性指標との Pearson 相関解析

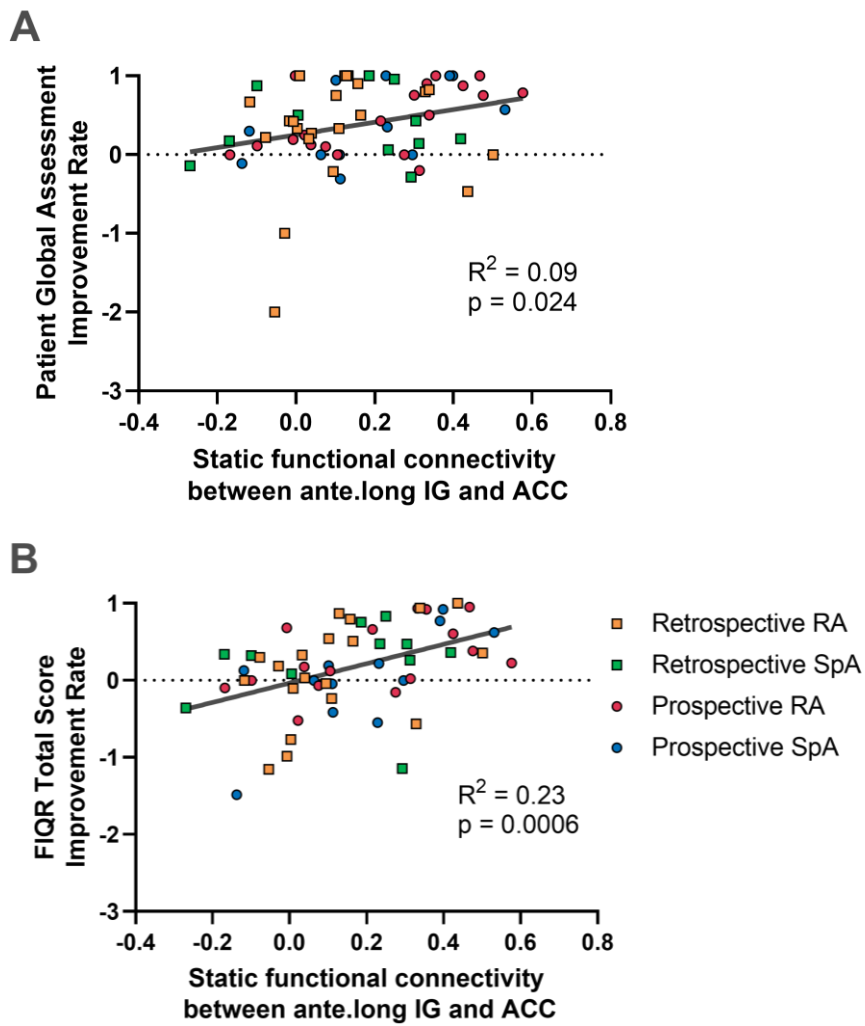


Figure 67. 左前長島回-ACC 間静的脳機能的連関と臨床的機能指標との Pearson 相関解析

(A) PGA 改善率, (B) FIQR 総合スコア改善率

Table 9. 左前長島回-ACC 間静的脳機能的連関と臨床指標の相関

Parameters	Coefficient of determination (R squared), adjusted p-value	
	Before Treatment (n = 64)	After Treatment (n = 64)
Demographics		
PGA	0, 0.982	0.10, 0.0131
Disease duration, years	0.06, 0.487	
Laboratory findings		
C-reactive protein, mg/dL	0.15, 0.1211	0.03, 0.203
ESR, mm/h	0.28, 0.493	0.05, 0.291
Disease activity score		
<i>for RA</i>		
TJC	0.10, 0.1137	0.16, 0.0303
SJC	0.06, 0.214	0.11, 0.332
EGA	0, 0.982	0.20, 0.0369
DAS 28-CRP	0.09, 0.0861	0.14, 0.0464
CDAI	0.06, 0.1964	0.18, 0.0216
SDAI	0.07, 0.1075	0.19, 0.0172
<i>for SpA</i>		
ASDAS-CRP	0.16, 0.628	0.32, 0.0858
BASDAI	0.06, 0.360	0.28, 0.0544
BASFI	0.16, 0.1629	0.25, 0.123
Functional score		
mHAQ score	0.07, 0.1651	0.29, 0.0003
FIQR domain 1	0.02, 0.368	0.24, 0.0004
FIQR domain 2	0.02, 0.423	0.07, 0.0977
FIQR domain 3	0.02, 0.469	0.24, 0.0002
FIQR total score	0.02, 0.392	0.22, 0.0004
EQ-5D-5L	0.03, 0.379	0.16, 0.0049

相関係数はロジスティック回帰モデルにより年齢、性別で調整された。

略語: IA, inflammatory arthritis; HC, healthy control; OA, osteoarthritis; fMRI, functional magnetic resonance imaging; PGA, patient global assessment; RA, rheumatoid arthritis; SpA, spondyloarthritis; ACPA, anti-citrullinated protein antibody; ESR, erythrocyte sedimentation rate; TJC, tenderness joint count; SJC, swollen joint count; EGA, evaluator global assessment; DAS, Disease Activity Score; CDAI, clinical disease activity index; SDAI, simplified disease activity index; ASDAS, Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score; BASDAI, Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; BASFI, Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index; mHAQ, modified Health Assessment Questionnaire; FIQR, Fibromyalgia Impact Questionnaire; EQ-5D-5L, EuroQOL 5 dimensions 5-level; TNF, tumor necrosis factor

以上より, 左前長島回-ACC 間の静的脳機能的連関は疾患活動性や患者報告アウトカムを含む正確な治療反応性予測能を有していた.

5.4.3 動的脳機能的連関出現パターンによる

治療反応性予測と臨床指標との相関性

次に我々は、脳全体の機能的相関の動的変化が IA 患者の臨床経過を予測しうるかを検討した。昨今、脳機能的連関の値は時間とともに揺らぐことが報告されており、前述の静的解析手法は安静時の脳機能の全体像を推定するにはあまりに簡易化されたモデルである可能性がある (Preti et al., 2017)。動的脳機能的連関マトリクスは、fMRI データからスライドウィンドウ法による BOLD シグナルのセグメンテーションにより抽出される (Leonardi and Van De Ville, 2015)。

我々はまず後ろ向きデータセットに k -平均++クラスタリング法を適用することで IA 患者における動的機能的連関を分類し、異なる脳全体の連関パターンを見出すこととした (Figure 68)。本クラスタ解析において、最も小さい級内相関係数は $k=5$ で得られるが、 $k=5$ の第 1 連関パターンは第 2 から 5 パターンと自己相関していた (Figure 69, A and B)。そこで $k=5$ の場合の第 2 から 5 のパターンを使用した、修正 $k=4$ パターンを考えると、元来の $k=4$ パターンと比べてより低い級内相関係数となった (Figure 69C)。したがって、我々は $k=5$ の場合の第 2 から 5 パターンである修正 $k=4$ を、IA 患者における動的脳機能的連関のクラスターラベルとして決定した。

Dynamic functional connectivity analysis pipeline

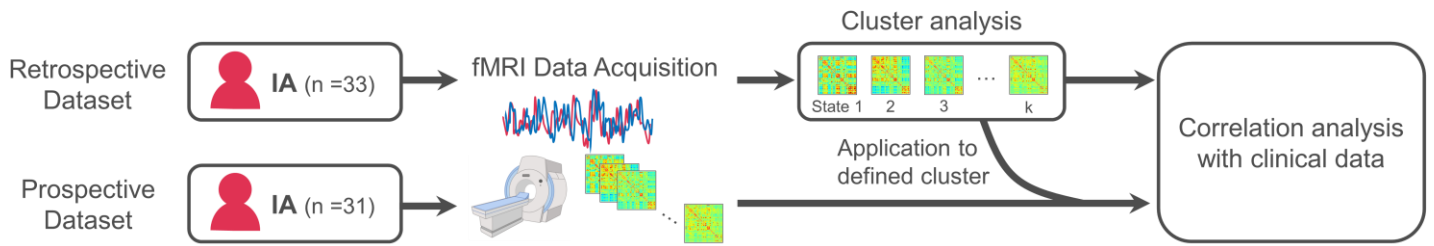


Figure 68. 動的脳機能的連関解析のシエーマ

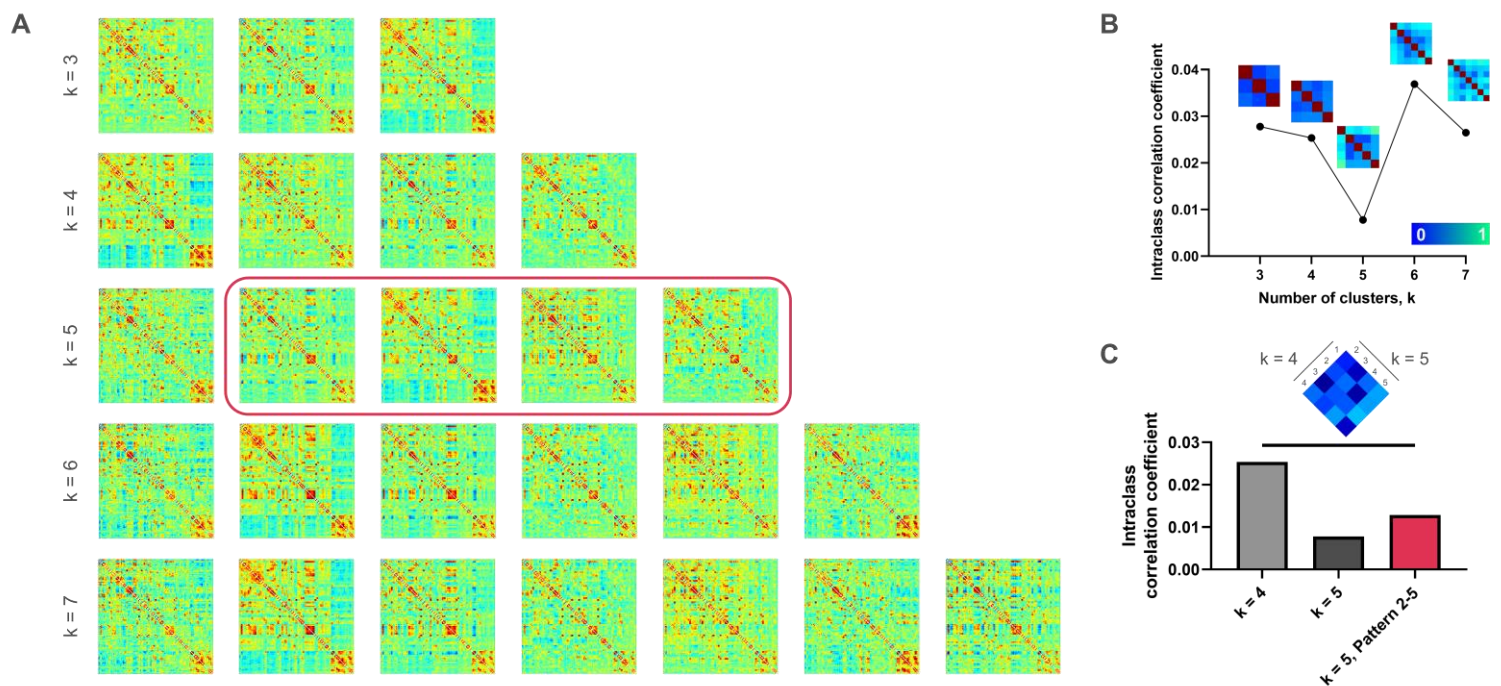


Figure 69. k -平均++クラスタリング法による動的脳機能的連関パターンの決定
 (A) 後ろ向きデータセットにおける k -平均++クラスタリング法による, $k=3-7$ とした場合の動的脳機能的連関パターン. (B) k 値変動に対する動的脳機能的連関パターンの級内相関係数. マトリクスは脳機能的連関の自己相関を示している. $k=5, 6, 7$ では強い自己相関がみられる. (C) $k=5$ における第2から5の連関パターンを使った修正 $k=4$ パターンの級内相関係数は元の $k=4$ パターンのものと比べて低い値を示した. 自己相関マトリクスにおいても, $k=4$ パターンと修正 $k=4$ パターンの相関は弱かった.

同定されたクラスターパターンの中で, 5243 の機能的連関が共分散分析で統計学的有意差を示した (Figure 70).

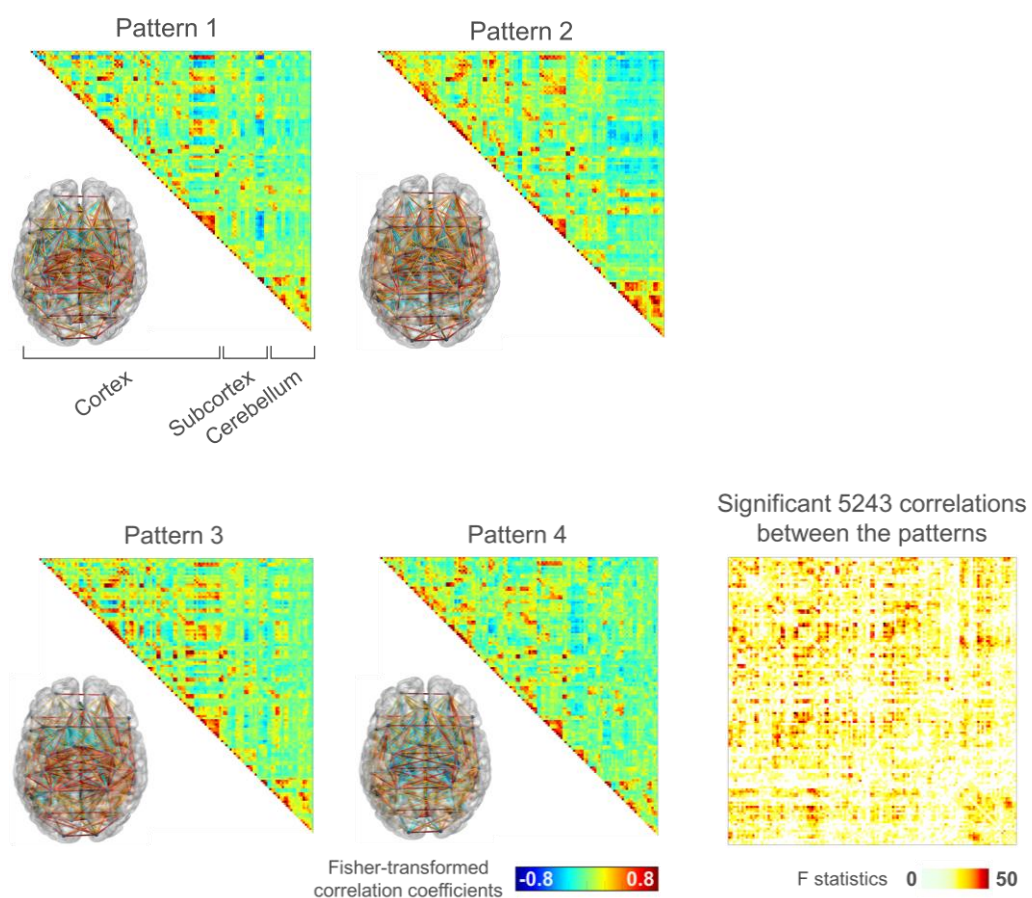


Figure 70. クラスター分析による脳機能的連関パターンと共分散分析による差異連関後ろ向きデータセットにおける動的脳機能的連関のクラスター解析による4連関パターン. 連関絶対値 0.2 を超える結合を解剖学的脳画像に重ね合わせた. 最右のパネルは4つのクラスターパターンにおいて共分散分析で統計学的に有意な差異がある結合部をF統計量で色付けして示した.

これらの統計学的有意な差異をもつ機能的連関について、後ろ向きデータセットを UMAP で 2 次元描記した (Figure 71A). 作成した 4 つのクラスターパターンを前向きデータセットに当てはめた (Figure 71B). なお、前向きデータセットにおいては、同一個体における治療前後の各ウインドウの連関マトリクスパターンは自己相関しており、我々は治療前の動的機能的連関を解析に採用した (Figure 72).

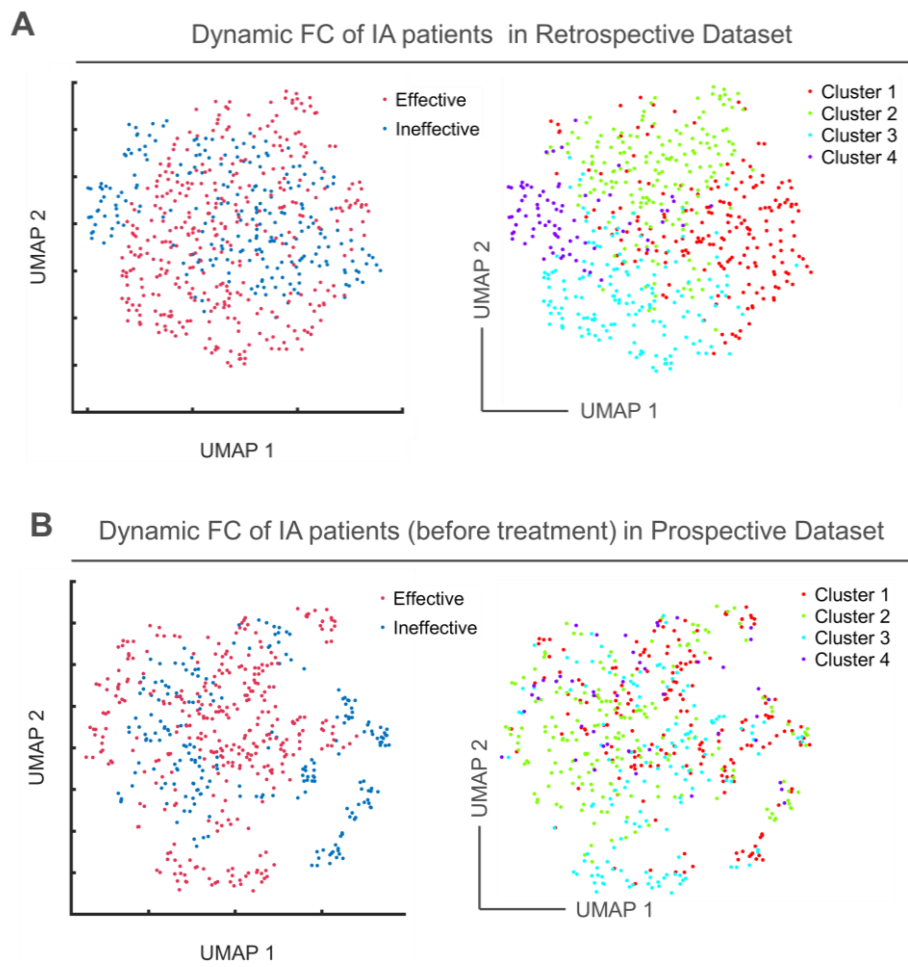


Figure 71. 各データセットにおける治療効果とクラスターパターンによる UMAP 投射
 (A) 後ろ向きデータセット, (B) 前向きデータセット

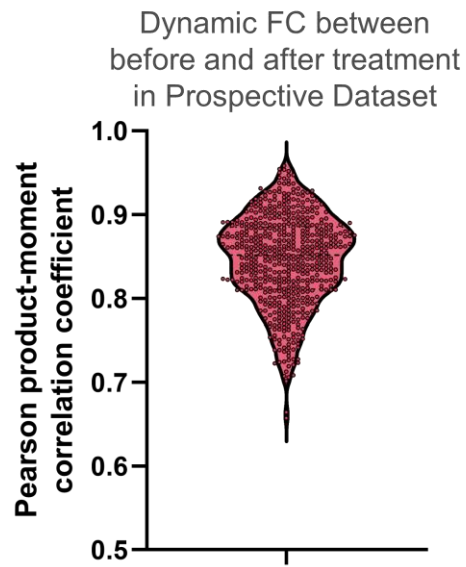
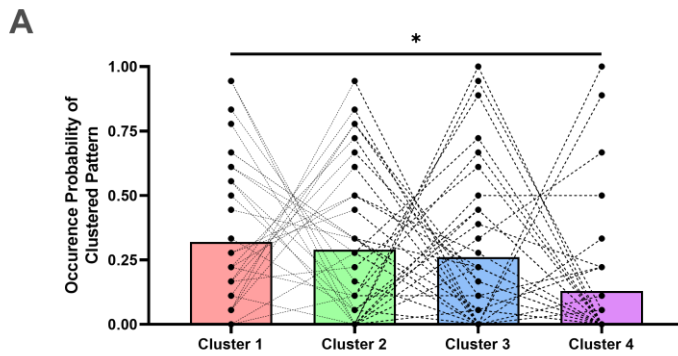


Figure 72. 前向きデータセット内 IA 患者の治療前後の対応する各スライドウィンドウの Pearson 相関係数

後ろ向きデータセットの連関パターン発生確率解析では、パターン4の出現率が最も低かった (Figure 73A). この結果は、上述の通りに定義したクラスターパターンを当てはめた前向きデータセットの連関パターンでも一貫して認めた (Figure 73B).

Dynamic FC of IA patients in Retrospective Dataset



Dynamic FC of IA patients (before treatment) in Prospective Dataset

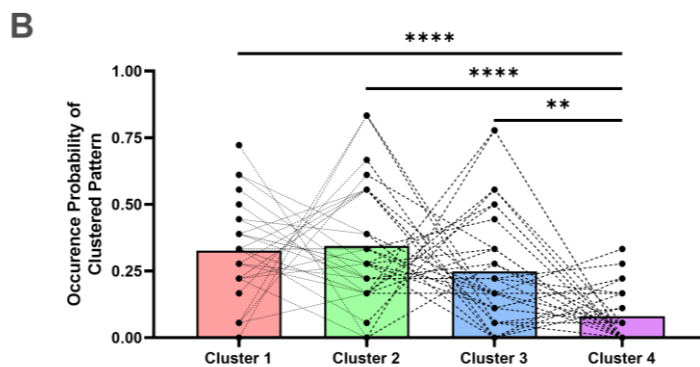


Figure 73. 各データセットにおける連関パターン出現率

(A) 後ろ向きデータセット, (B) 前向きデータセット. データは平均で示した. *ファミリーワイズエラー調整 $p < 0.05$, **ファミリーワイズエラー調整 $p < 0.01$, ****ファミリーワイズエラー調整 $p < 0.0001$, 年齢・性別を調整した共分散分析と Tukey-Kramer 多重比較検定.

連関パターンの出現と治療効果の関連を検討した。後ろ向きデータセットにおいて、連関パターン3が治療反応性のあるIA患者において、治療無効の患者と比べて、高頻度に出現していた (Figure 74A)。前向きデータセットにおいても、同様の結果が得られた (Figure 74B)。

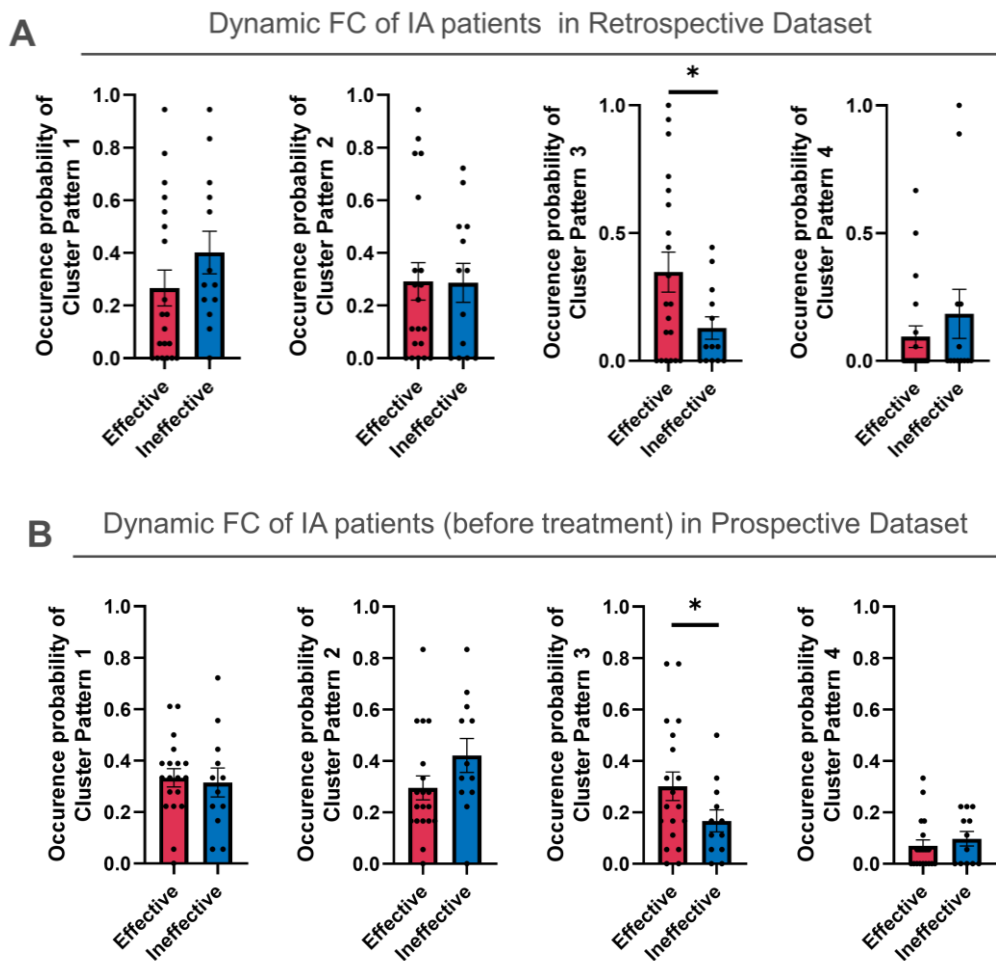


Figure 74. 各データセットにおける治療反応性に応じた各クラスターパターン出現率 (A) 後ろ向きデータセット, (B) 前向きデータセット. データは平均±標準誤差で示した. * $p < 0.05$, 年齢・性別を調整した共分散分析.

更に, クラスタ3 の発生確率は, 後ろ向きデータセットにおいて AUC 0.7462 (95%CI 0.5771-0.9152) で, また前向きデータセットにおいて AUC 0.7083 (0.5224-0.8943) で統計学的有意差をもって治療反応性を予測できた (Figure 75, A and B).

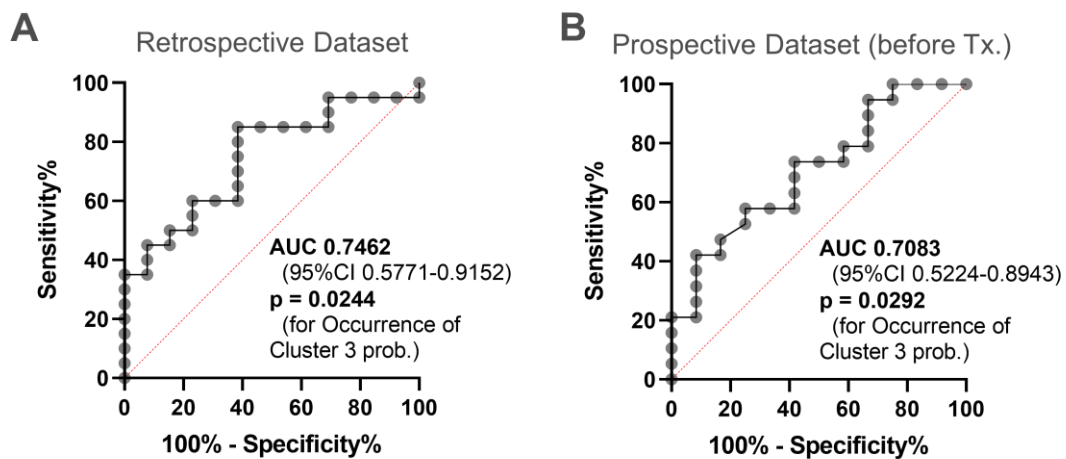


Figure 75. 連関パターン3の出現率による治療有効性に対するROC解析
(A) 後ろ向きデータセット, (B) 前向きデータセット.

更に, 全てのデータセットを用いて, クラスター3 発生確率は SDAI や ASDAS-CRP, PGA の治療による改善率と有意な正の相関を認めた (Figure 76, A and B).

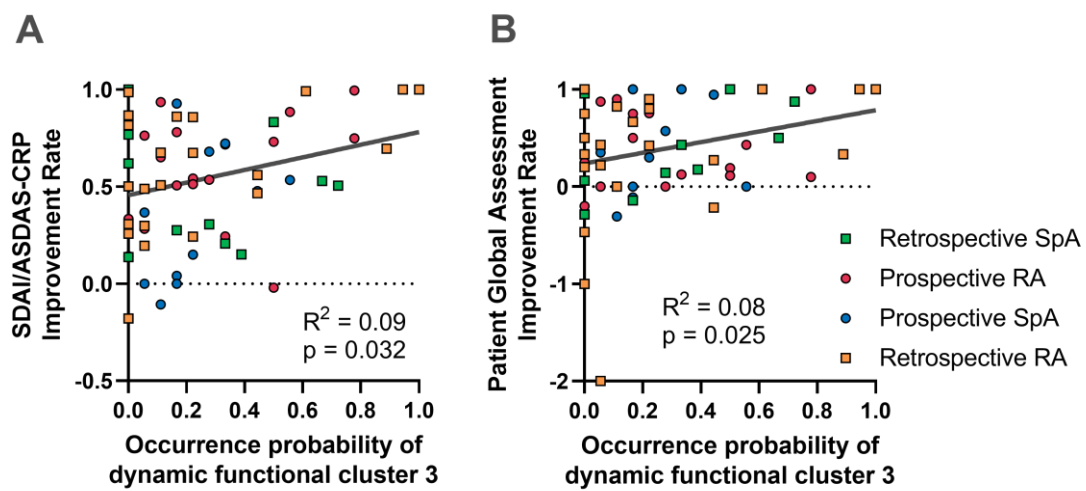


Figure 76. 臨床指標とクラスターパターン3 発生率間の Pearson 相関係数
全てのデータセットにおける(A) SDAI と ASDAS-CRP の疾患活動性, (B) PGA.

5.4.4 左前長島回と前帯状皮質を含む皮質間の

動的脳機能的連関による炎症性関節炎の治療反応性分類

前述の通りに分類した脳機能的連関クラスターパターンの神経生物学的機能の評価するために、クラスター間で有意な相関値を示す脳領域について評価した。

我々は、クラスター3は他のクラスターパターンと比較して皮質下領域を含む皮質間の機能的相関値が有意に高いことを見出した (Figure 77).

Differential Functional Connectivity
in Cluster Pattern 3

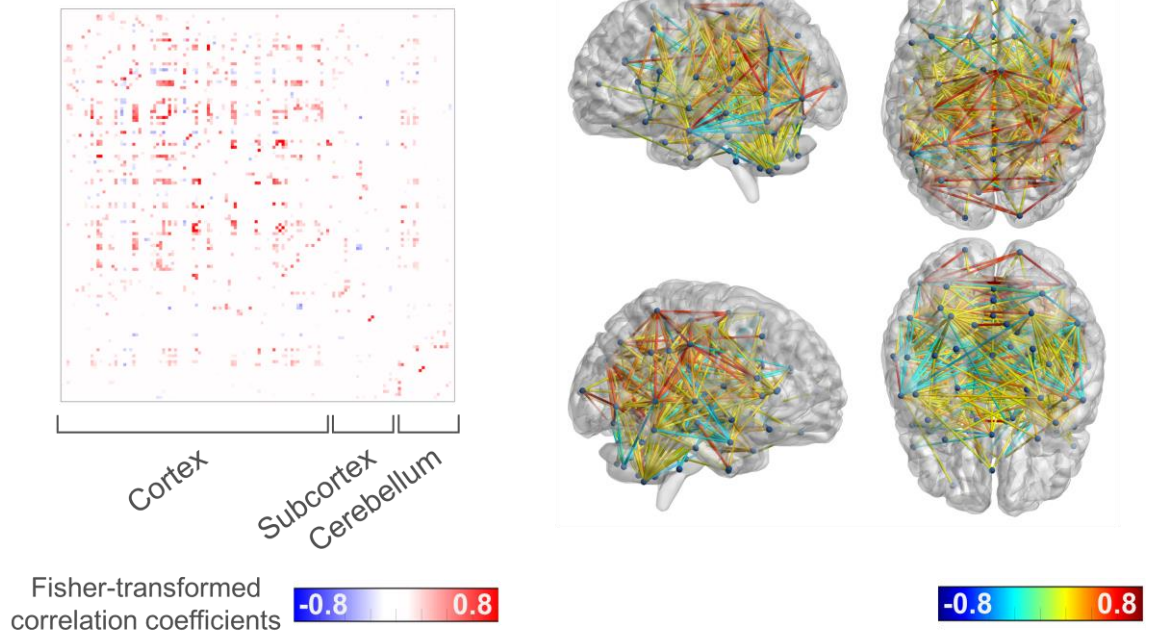


Figure 77. 連関パターン3における統計学的有意な動的脳機能的相関
クラスターパターン3における他のクラスターパターンと比較して、統計学的に有意
な皮質間脳機能的相関. 連関は年齢・性別を調整した分散解析および Tukey-Kramer
多重比較検定で算出した F 統計量で色付けした.

したがって、我々は最後に、静的脳機能的連関解析で IA 患者に対する治療反応性について意義のある連関として検出した ACC と左前長島回領域間の動的脳機能的連関を評価した。この動的脳機能的連関値を後ろ向きデータセットおよび前向きデータセットの IA 患者から抽出し、年齢、性別、ウインドウを調整した混合効果モデルを用いると、この動的脳機能的連関値は、両データセットにおいて治療反応性がある患者群で治療反応性がない患者群と比較して、有意に高値であった (Figure 78)。

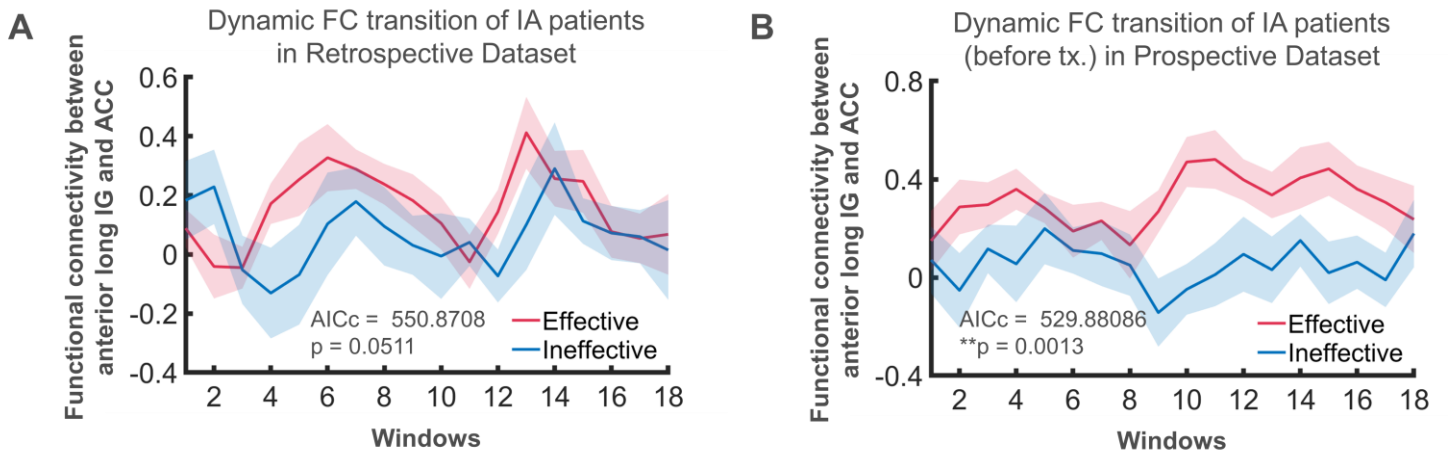


Figure 78. ACC と左前長島回間のスライドウィンドウに応じた動的脳機能的連関 (A) 後ろ向きデータセット, (B) 前向きデータセット. データは平均 (実線) ± 標準誤差 (帯) で示した. 治療効果がある患者を赤, 治療効果がない患者を青で示した. 反復測定指標に対して, 年齢, 性別とウィンドウを固定効果共変量とした第一次自己回帰モデルを用いた混合効果モデル解析.

5.5 考察

我々が今回同定した IC と ACC の脳機能的連関の異常は、慢性疼痛で報告されている領域であるが、治療前後での変化が乏しく、さらに罹病期間と無関係であることが明らかとなった。したがって、IA 患者においては、本機能的連関の異常は慢性疼痛のみでは説明できない別の機序が存在することが示唆された。IC と ACC は大脳辺縁系に含まれ、自律神経、代謝、免疫の状態を推定・調和するための身体の生理学的状態に対する感覚である「内受容感覚」を司る (Barrett and Simmons, 2015; Craig, 2002; Critchley et al., 2004; Khalsa et al., 2009)。IC 内の領域について考えると、後側 IC の前長島回は内受容予測において、前側 IC や ACC などの内臓運動に関わる皮質領域から投射を受けるため、内臓受容に関わる最初の皮質として特別な役割をもっている。視床などから感覚に関わる神経伝達を受ける皮質第四層が発達した前長島回などの顆粒状皮質は、無顆粒状内臓運動関連領域に予測誤差の伝達を行い、予測運動を変更させ、内受容推定を活動させることで恒常性維持に働く (Barrett and Simmons, 2015)。我々の研究は IA 患者がこれら ACC や IC などの内受容に関わる機能的結合の破綻を明らかにした。これは、無顆粒状皮質においてはある状況に面した時の不適切な予測反応を、また、顆粒状皮質においてはノイズの多い内受容刺激の享受を介して、内受容感覚が拙劣であることを示唆する。つまり、内受容感覚に関わる脳機能的連関値が低い患者では、抗リウマチ薬治療による十分な治療効果にもかかわらず、低い満足度に繋がる可能性がある。

慢性疼痛と末梢炎症は中枢性感作という観点から、ともに痛みの処理に関わる脳領域の構造的または機能的な変化を誘導する (Basu et al., 2018; Schrepf et al., 2018)。動機や評価に関連する皮質・辺縁系の機能的結合は持続性の痛みをコントロールする重要な因子であり、皮質・辺縁系の機能的結合そのものが IA 患者の疼痛感受性や臨床経過と関連があるともいえるだろう (Baliki et al., 2012)。

我々のデータは、全身性自己免疫性炎症性疾患において、静的・動的脳機能的連関は診断や病態により分類されることを示唆している。今後の研究においては、本機能的連関に関わる実際の神経回路がどのように自律神経や、代謝や免疫から身体環境を調整するのかを明らかにすることが重要である。

本研究のいくつかの限界について報告する。まず、本研究は単施設研究である点である。多施設研究が望ましいが、我々の研究は結果を検証できており、信頼性は高いと考えている。次に、我々はアメリカ人からなる変形性関節症のデータセットを用いた点である。人種による違いは無視できないものではあるが、我々の検出した IA 特異的な脳機能的連関は日本人健常者との比較でも見出された領域であり、変形性関節症患者のデータセットを用いなくとも、IC-ACC 間を IA 患者の特徴的脳機能的連関として見出すことはできた。最後に、脳機能的連関の変化と疾患活動性変化の因果関係は不明なままの点である。今後のマウスを用いた研究やヒトでの介入研究などが、詳細な神経回路を含めた神経そのものと IA の疾患活動性に対するメカニズムの関係を明らかにしていくために必要である。

5.6 結語

本研究は特に左前長島回と ACC 間の静的・動的脳機能的連関が IA 患者の治療反応性を予測することを示した。我々の研究結果は脳機能が活動性を支配し、臨床的特徴に影響を与え、ひいては治療選択の意思決定に影響を与えうるという画期的な考えに繋がる (Figure 79)。

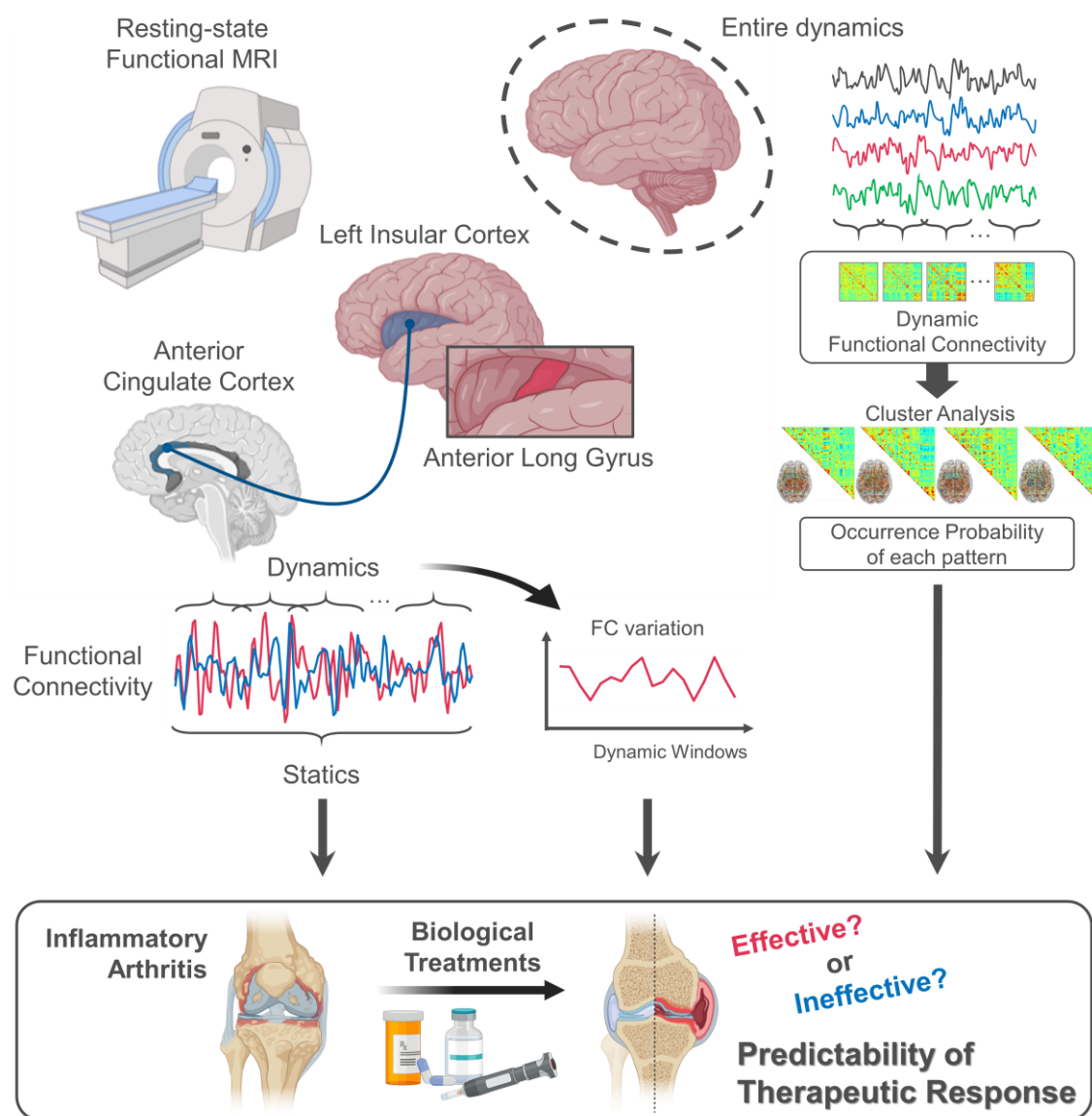


Figure 79. 第二章の図解要旨

6. 総括

本研究から得られた新知見は以下の通りである。1, 2 の知見はそれぞれ第一章、第二章で得られた知見に該当する。新知見の詳細を箇条書きに示す。

1. 慢性ストレスが IL-12/23 シグナル経路を介してミクログリアや神経の持続的活性化に繋がることから、NPSLE のびまん性精神症状の発症機序の 1 つである可能性があり、IL-12/23 軸は NPSLE の新規治療標的となり得る。
 - SD 負荷 MRL/lpr では、不安様行動が減弱した。
 - SD 負荷 MRL/lpr では、mPFC の持続的な神経活性化を認めた。
 - SD 負荷 MRL/lpr の PFC では、*Il12b* などのミクログリア活性化遺伝子の発現亢進とミクログリア不活性化遺伝子の発現減少を認めた。
 - SD 負荷 MRL/lpr の CSF は IL-12/23p40 の濃度上昇を認めた。
 - SD 負荷 MRL/lpr の mPFC では IL-12/23p40 産生ミクログリアの増加・活性化とニューロンにおける pStat4 および樹状突起スパインの増加を認めた。
 - SD 負荷 MRL/lpr において、IL-12/23p40 中和抗体の脳室内持続投与や Tyk2 阻害薬投与により、上述の精神神経病態は改善した。
 - dNPSLE 患者において、CSF IL-12/23p40 濃度の有意な上昇を 2 種類のコホートで確認した。同じく dNPSLE 患者で有意な萎縮を認めた。
2. IA において、内受容感覚に関係した脳領域である左前長島回と ACC の静的・動的脳機能的連関は疾患特異的に減少しており、また、その機能的連関値は生物学的製剤による治療反応性を予測しうる。
 - OA 患者や HC と比べて、IA 患者では左 IC と ACC の静的脳機能的連関値の減少が特異的に見られた。
 - 左 IC の詳細な部位である左前長島回と ACC の静的脳機能的連関値の減少が特異的に見られ、疾患活動性からみた生物学的製剤の治療反応性の予測に有用だった。
 - 動的脳機能的連関は 4 つのクラスターに分けられ、そのうちパターン 3 が疾患活動性からみた生物学的製剤の治療反応性の予測に有用だった。
 - 上記パターン 3 は皮質間機能的連関を表し、左前長島回と ACC の動的機能的連関推移もまた、疾患活動性からみた生物学的製剤の治療反応性の予測に有用だった。

第一章では、SLEの中でも最重症臓器病変であるdNPSLEを対象とした研究を行った。病態に関与する因子として慢性ストレス誘導性の神経・ミクログリア活性化に着目し、RNA-seqやマルチプレックス解析を用いた網羅的解析で、病態形成に関わる重要な因子として、IL-12/23p40を同定した。IL-12/23シグナル経路を阻害することで、マウスの慢性ストレス誘導性精神神経症状を改善させ、本治療法はNPSLEの新たな治療となりうる可能性を示した。

第二章では、IAにおいて疼痛受容感覚や末梢炎症に影響を与えうる因子として、脳機能的連関を調べるためにresting-state fMRIを用いた探索的研究を行った。静的・動的脳機能的連関解析を介して、左前長島回とACCの機能的連関が、生物学的製剤治療による疾患活動性などの改善率と相関することを見出し、脳機能的連関が治療反応性の予測因子となりうることがわかった。脳機能が治療意思決定に影響を与えうることがわかり、患者の疼痛感受性や治療方針の選択などの一つの指針となることが期待される。

本研究では、精神神経学的な観点から自己免疫疾患の病態をとらえることで、新規病態生理・治療法や新規臨床評価指標の開発につながることを示された。本研究で得られた結果は、今後さらに継続的に検討していく必要があるが、自己免疫性疾患患者に対する診療や治療の一助となることを願う。

7. 謝辞

本論文は筆者が北海道大学大学院医学院 内科学分野 免疫・代謝内科学教室博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。同教室の渥美達也教授には指導教官として本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって終始、御指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。

同大学遺伝子制御研究所 医学院 分子神経免疫学教室の村上正晃教授、本教室膠原病グループ奥健志講師ならびに藤枝雄一郎助教には本研究の遂行にあたり、終始、丁寧かつ熱心に御指導、適切な御助言をいただきました。ここに心より深く感謝の意を表します。

第一章における NPSLE の研究に関しては、北里大学医学部 膠原病・感染症内科学有沼良幸講師ならびに国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 佐藤和貴郎 免疫研究部室長には、それぞれ NPSLE 患者と健常者の髄液・血清のご提供をいただきました。また、当学医学研究院 解剖発生学分野の渡邊雅彦教授と山崎美和子准教授には、ビブラトームによる脳切片作成についてご指導、ご助言を賜りました。第二章における脳 fMRI の研究に関しては、北海道大学病院 放射線診断科 Khin Khin Tha 准教授ならびに同院 精神科神経科 成田尚助教に研究の発案段階からご協力いただき、fMRI の撮像・解析方法などについて、丁寧にご指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

当教室の Olga Amengual 講師、加藤将講師、河野通仁助教には、カンファレンスや相談などを通じて適切なお助言、励ましをいただきました。また、分子神経免疫学教室の長谷部理絵講師、田中勇希助教、内田萌菜研究員、当教室の工藤友喜大学院生には基礎実験の基本的な手技について懇切丁寧なお指導を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

当教室狩野皓平先生や垂水政人先生、分子神経免疫学教室の高橋伸彦大学院生には同じ大学院の仲間としていつも良き研究の相談相手となってくださり、多くの助言をいただきました。更に、当教室の下山修平先生や麻生邦之先生には、日頃から有益な御助言をいただき、心より感謝しております。

当科実験助手の金子由美子さん, 石倉唯さん, 寿楽弘子さんのご協力なしに実験は遂行できませんでした. 心より感謝を申し上げます. この他にもこの論文作成にあたり, ここには記載できないほど多くのご協力, ご助言, ご支援をいただきました. 重ねまして心より感謝を申し上げます. 何より筆者の基礎・臨床研究は患者さんのご協力なしには成り立たないものです. 研究の趣旨にご理解とご協力をいただき, 研究の遂行を可能にしてくれた多くの患者さんたちに心より感謝申し上げます.

最後にこれまで見守ってくれていた両親, 仕事に理解を示し, 支え続けてくれた妻と子供たち家族に心から感謝致します.

8. 利益相反

第一章の研究はブリストル・マイヤーズ スクイブ株式会社 研究助成からの支援を受けた。

9. 引用文献

- Ustekinumab® Press Release. Janssen announces discontinuation of phase 3 LOTUS study evaluating ustekinumab in Systemic Lupus Erythematosus. Available at: <https://www.jnj.com/janssen-announces-discontinuation-of-phase-3-lotus-study-evaluating-ustekinumab-in-systemic-lupus-erythematosus> (Accessed: 1 June 2021)
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., 3rd, Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., *et al.* (2010). 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 1580-1588.
- Anderson, J.J., Baron, G., van der Heijde, D., Felson, D.T., and Dougados, M. (2001). Ankylosing spondylitis assessment group preliminary definition of short-term improvement in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* *44*, 1876-1886.
- Arima, Y., Ohki, T., Nishikawa, N., Higuchi, K., Ota, M., Tanaka, Y., Nio-Kobayashi, J., Elfeky, M., Sakai, R., Mori, Y., *et al.* (2017). Brain micro-inflammation at specific vessels dysregulates organ-homeostasis via the activation of a new neural circuit. *eLife* *6*, e25517.
- Badimon, A., Strasburger, H.J., Ayata, P., Chen, X., Nair, A., Ikegami, A., Hwang, P., Chan, A.T., Graves, S.M., Uweru, J.O., *et al.* (2020). Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature* *586*, 417-423.
- Baliki, M.N., Petre, B., Torbey, S., Herrmann, K.M., Huang, L., Schnitzer, T.J., Fields, H.L., and Apkarian, A.V. (2012). Corticostriatal functional connectivity predicts transition to chronic back pain. *Nat. Neurosci.* *15*, 1117-1119.
- Bar, E., and Barak, B. (2019). Microglia roles in synaptic plasticity and myelination in homeostatic conditions and neurodevelopmental disorders. *Glia* *67*, 2125-2141.
- Barrett, L.F., and Simmons, W.K. (2015). Interoceptive predictions in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*, 419-429.
- Barsegyan, A., Mackenzie, S.M., Kurose, B.D., McGaugh, J.L., and Roozendaal, B. (2010). Glucocorticoids in the prefrontal cortex enhance memory consolidation and impair working memory by a common neural mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 16655-16660.
- Bartels, T., De Schepper, S., and Hong, S. (2020). Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Science* *370*, 66-69.
- Basu, N., Kaplan, C.M., IchESCO, E., Larkin, T., Harris, R.E., Murray, A., Waiter, G., and Clauw,

- D.J. (2018). Neurobiologic Features of Fibromyalgia Are Also Present Among Rheumatoid Arthritis Patients. *Arthritis Rheumatol.* *70*, 1000-1007.
- Behzadi, Y., Restom, K., Liau, J., and Liu, T.T. (2007). A component based noise correction method (CompCor) for BOLD and perfusion based fMRI. *Neuroimage* *37*, 90-101.
- Benarroch, E.E. (2019). Insular cortex: Functional complexity and clinical correlations. *Neurology* *93*, 932-938.
- Bennett, R.M., Friend, R., Jones, K.D., Ward, R., Han, B.K., and Ross, R.L. (2009). The Revised Fibromyalgia Impact Questionnaire (FIQR): validation and psychometric properties. *Arthritis Res. Ther.* *11*, R120.
- Bidad, K., Gracey, E., Hemington, K.S., Mapplebeck, J.C.S., Davis, K.D., and Inman, R.D. (2017). Pain in ankylosing spondylitis: a neuro-immune collaboration. *Nat. Rev. Rheumatol.* *13*, 410-420.
- Bortolato, M., Godar, S.C., Davarian, S., Chen, K., and Shih, J.C. (2009). Behavioral disinhibition and reduced anxiety-like behaviors in monoamine oxidase B-deficient mice. *Neuropsychopharmacology* *34*, 2746-2757.
- Bressler, S.L., and Menon, V. (2010). Large-scale brain networks in cognition: emerging methods and principles. *Trends Cogn. Sci.* *14*, 277-290.
- Butts, K.A., Weinberg, J., Young, A.H., and Phillips, A.G. (2011). Glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex regulate stress-evoked dopamine efflux and aspects of executive function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 18459-18464.
- Calin, A., Garrett, S., Whitelock, H., Kennedy, L.G., O'Hea, J., Mallorie, P., and Jenkinson, T. (1994). A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J. Rheumatol.* *21*, 2281-2285.
- Chaudhury, D., Walsh, J.J., Friedman, A.K., Juarez, B., Ku, S.M., Koo, J.W., Ferguson, D., Tsai, H.C., Pomeranz, L., Christoffel, D.J., *et al.* (2013). Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. *Nature* *493*, 532-536.
- Chavan, S.S., Pavlov, V.A., and Tracey, K.J. (2017). Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity* *46*, 927-942.
- Consortium, T.M. (2020). A single-cell transcriptomic atlas characterizes ageing tissues in the mouse. *Nature* *583*, 590-595.
- Craig, A.D. (2002). How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of

the body. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 655-666.

Critchley, H.D., Wiens, S., Rotshtein, P., Ohman, A., and Dolan, R.J. (2004). Neural systems supporting interoceptive awareness. *Nat. Neurosci.* 7, 189-195.

Crupi, R., Cambiaghi, M., Spatz, L., Hen, R., Thorn, M., Friedman, E., Vita, G., and Battaglia, F. (2010). Reduced adult neurogenesis and altered emotional behaviors in autoimmune-prone B-cell activating factor transgenic mice. *Biol. Psychiatry* 67, 558-566.

Cserép, C., Pósfai, B., and Dénes, Á. (2021). Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. *Neuron* 109, 222-240.

Damasio, A., and Carvalho, G.B. (2013). The nature of feelings: evolutionary and neurobiological origins. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 143-152.

Dantzer, R. (2018). Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiol. Rev.* 98, 477-504.

Demertzi, A., Tagliazucchi, E., Dehaene, S., Deco, G., Barttfeld, P., Raimondo, F., Martial, C., Fernández-Espejo, D., Rohaut, B., Voss, H.U., *et al.* (2019). Human consciousness is supported by dynamic complex patterns of brain signal coordination. *Sci Adv.* 5, eaat7603.

Desikan, R.S., Ségonne, F., Fischl, B., Quinn, B.T., Dickerson, B.C., Blacker, D., Buckner, R.L., Dale, A.M., Maguire, R.P., Hyman, B.T., *et al.* (2006). An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* 31, 968-980.

Dougados, M., and Baeten, D. (2011). Spondyloarthritis. *Lancet* 377, 2127-2137.

Duman, R.S., and Aghajanian, G.K. (2012). Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science* 338, 68-72.

Faillenot, I., Heckemann, R.A., Frot, M., and Hammers, A. (2017). Macroanatomy and 3D probabilistic atlas of the human insula. *Neuroimage* 150, 88-98.

Felson, D.T., Anderson, J.J., Boers, M., Bombardier, C., Chernoff, M., Fried, B., Furst, D., Goldsmith, C., Kieszak, S., Lightfoot, R., *et al.* (1993). The American College of Rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. The Committee on Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. *Arthritis Rheum.* 36, 729-740.

Ferreira, R.J.O., Welsing, P.M.J., Jacobs, J.W.G., Gossec, L., Ndosi, M., Machado, P.M., van der Heijde, D., and Da Silva, J.A.P. (2020). Revisiting the use of remission criteria for rheumatoid arthritis by excluding patient global assessment: an individual meta-analysis of 5792 patients.

Ann. Rheum. Dis.

Forrest, M.P., Parnell, E., and Penzes, P. (2018). Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *19*, 215-234.

Gangwisch, J.E., Malaspina, D., Boden-Albala, B., and Heymsfield, S.B. (2005). Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES I. *Sleep* *28*, 1289-1296.

Garrett, S., Jenkinson, T., Kennedy, L.G., Whitelock, H., Gaisford, P., and Calin, A. (1994). A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J. Rheumatol.* *21*, 2286-2291.

Giovanoli, S., Engler, H., Engler, A., Richetto, J., Voget, M., Willi, R., Winter, C., Riva, M.A., Mortensen, P.B., Feldon, J., *et al.* (2013). Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. *Science* *339*, 1095-1099.

Gladman, D., Ginzler, E., Goldsmith, C., Fortin, P., Liang, M., Urowitz, M., Bacon, P., Bombardieri, S., Hanly, J., Hay, E., *et al.* (1996). The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* *39*, 363-369.

Gladman, D.D., Ibañez, D., and Urowitz, M.B. (2002). Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J. Rheumatol.* *29*, 288-291.

Hanly, J.G. (2014). Diagnosis and management of neuropsychiatric SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* *10*, 338-347.

Hanly, J.G., Urowitz, M.B., Su, L., Bae, S.C., Gordon, C., Wallace, D.J., Clarke, A., Bernatsky, S., Isenberg, D., Rahman, A., *et al.* (2010). Prospective analysis of neuropsychiatric events in an international disease inception cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* *69*, 529-535.

Hemington, K.S., Wu, Q., Kucyi, A., Inman, R.D., and Davis, K.D. (2016). Abnormal cross-network functional connectivity in chronic pain and its association with clinical symptoms. *Brain Struct. Funct.* *221*, 4203-4219.

Herdman, M., Gudex, C., Lloyd, A., Janssen, M., Kind, P., Parkin, D., Bonse, G., and Badia, X. (2011). Development and preliminary testing of the new five-level version of EQ-5D (EQ-5D-5L). *Qual. Life Res.* *20*, 1727-1736.

Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., and Cullinan, W.E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* *24*,

151-180.

Hirshfeld-Becker, D.R., Biederman, J., Calltharp, S., Rosenbaum, E.D., Faraone, S.V., and Rosenbaum, J.F. (2003). Behavioral inhibition and disinhibition as hypothesized precursors to psychopathology: implications for pediatric bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* *53*, 985-999.

Holmes, S.E., Scheinost, D., Finnema, S.J., Naganawa, M., Davis, M.T., DellaGioia, N., Nabulsi, N., Matuskey, D., Angarita, G.A., Pietrzak, R.H., *et al.* (2019). Lower synaptic density is associated with depression severity and network alterations. *Nat. Commun.* *10*, 1529.

Hung, L.W., Neuner, S., Polepalli, J.S., Beier, K.T., Wright, M., Walsh, J.J., Lewis, E.M., Luo, L., Deisseroth, K., Dölen, G., *et al.* (2017). Gating of social reward by oxytocin in the ventral tegmental area. *Science* *357*, 1406-1411.

Ireland, D.D., and Reiss, C.S. (2004). Expression of IL-12 receptor by neurons. *Viral Immunol.* *17*, 411-422.

Jeltsch-David, H., and Muller, S. (2014a). Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and cognitive dysfunction: the MRL-lpr mouse strain as a model. *Autoimmun. Rev.* *13*, 963-973.

Jeltsch-David, H., and Muller, S. (2014b). Neuropsychiatric systemic lupus erythematosus: pathogenesis and biomarkers. *Nat. Rev. Neurol.* *10*, 579-596.

Kaul, A., Gordon, C., Crow, M.K., Touma, Z., Urowitz, M.B., van Vollenhoven, R., Ruiz-Irastorza, G., and Hughes, G. (2016). Systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Dis. Primers* *2*, 16039.

Khalsa, S.S., Rudrauf, D., Feinstein, J.S., and Tranel, D. (2009). The pathways of interoceptive awareness. *Nat. Neurosci.* *12*, 1494-1496.

Kreisel, T., Frank, M.G., Licht, T., Reshef, R., Ben-Menachem-Zidon, O., Baratta, M.V., Maier, S.F., and Yirmiya, R. (2014). Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol. Psychiatry* *19*, 699-709.

Krishnan, V., and Nestler, E.J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature* *455*, 894-902.

Labrenz, F., Wrede, K., Forsting, M., Engler, H., Schedlowski, M., Elsenbruch, S., and Benson, S. (2016). Alterations in functional connectivity of resting state networks during experimental endotoxemia - An exploratory study in healthy men. *Brain. Behav. Immun.* *54*, 17-26.

Lammel, S., Ion, D.I., Roeper, J., and Malenka, R.C. (2011). Projection-specific modulation of dopamine neuron synapses by aversive and rewarding stimuli. *Neuron* *70*, 855-862.

Leonardi, N., and Van De Ville, D. (2015). On spurious and real fluctuations of dynamic

functional connectivity during rest. *Neuroimage* 104, 430-436.

Li, N., Lee, B., Liu, R.J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.Y., Aghajanian, G., and Duman, R.S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329, 959-964.

Lin, H., Hikawa, N., Takenaka, T., and Ishikawa, Y. (2000). Interleukin-12 promotes neurite outgrowth in mouse sympathetic superior cervical ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* 278, 129-132.

Liston, C., Miller, M.M., Goldwater, D.S., Radley, J.J., Rocher, A.B., Hof, P.R., Morrison, J.H., and McEwen, B.S. (2006). Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J. Neurosci.* 26, 7870-7874.

Lukas, C., Landewé, R., Sieper, J., Dougados, M., Davis, J., Braun, J., van der Linden, S., and van der Heijde, D. (2009). Development of an ASAS-endorsed disease activity score (ASDAS) in patients with ankylosing spondylitis. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 18-24.

Ma, X., Foster, J., and Sakic, B. (2006). Distribution and prevalence of leukocyte phenotypes in brains of lupus-prone mice. *J. Neuroimmunol.* 179, 26-36.

Mackay, M., Vo, A., Tang, C.C., Small, M., Anderson, E.W., Ploran, E.J., Storbeck, J., Bascetta, B., Kang, S., Aranow, C., *et al.* (2019). Metabolic and microstructural alterations in the SLE brain correlate with cognitive impairment. *JCI Insight* 4.

McCall, J.G., Al-Hasani, R., Siuda, E.R., Hong, D.Y., Norris, A.J., Ford, C.P., and Bruchas, M.R. (2015). CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. *Neuron* 87, 605-620.

McEwen, B.S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol. Rev.* 87, 873-904.

McEwen, B.S., and Morrison, J.H. (2013). The brain on stress: vulnerability and plasticity of the prefrontal cortex over the life course. *Neuron* 79, 16-29.

McKlveen, J.M., Morano, R.L., Fitzgerald, M., Zoubovsky, S., Cassella, S.N., Scheimann, J.R., Ghosal, S., Mahbod, P., Packard, B.A., Myers, B., *et al.* (2016). Chronic Stress Increases Prefrontal Inhibition: A Mechanism for Stress-Induced Prefrontal Dysfunction. *Biol. Psychiatry* 80, 754-764.

Moda-Sava, R.N., Murdock, M.H., Parekh, P.K., Fetcho, R.N., Huang, B.S., Huynh, T.N., Witzum, J., Shaver, D.C., Rosenthal, D.L., Alway, E.J., *et al.* (2019). Sustained rescue of

- prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced spine formation. *Science* 364.
- Mutso, A.A., Radzicki, D., Baliki, M.N., Huang, L., Banisadr, G., Centeno, M.V., Radulovic, J., Martina, M., Miller, R.J., and Apkarian, A.V. (2012). Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *J. Neurosci.* 32, 5747-5756.
- Nie, X., Kitaoka, S., Tanaka, K., Segi-Nishida, E., Imoto, Y., Ogawa, A., Nakano, F., Tomohiro, A., Nakayama, K., Taniguchi, M., *et al.* (2018). The Innate Immune Receptors TLR2/4 Mediate Repeated Social Defeat Stress-Induced Social Avoidance through Prefrontal Microglial Activation. *Neuron* 99, 464-479.e467.
- Pacak, K., Palkovits, M., Kopin, I.J., and Goldstein, D.S. (1995). Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Front. Neuroendocrinol.* 16, 89-150.
- Papadaki, E., Kavroulakis, E., Bertsiaris, G., Fanouriakis, A., Karageorgou, D., Sidiropoulos, P., Papastefanakis, E., Boumpas, D.T., and Simos, P. (2019). Regional cerebral perfusion correlates with anxiety in neuropsychiatric SLE: evidence for a mechanism distinct from depression. *Lupus* 28, 1678-1689.
- Petri, M., Orbai, A.-M., Alarcón, G.S., Gordon, C., Merrill, J.T., Fortin, P.R., Bruce, I.N., Isenberg, D., Wallace, D.J., Nived, O., *et al.* (2012). Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 64, 2677-2686.
- Pincus, T., Summey, J.A., Soraci, S.A., Jr., Wallston, K.A., and Hummon, N.P. (1983). Assessment of patient satisfaction in activities of daily living using a modified Stanford Health Assessment Questionnaire. *Arthritis Rheum.* 26, 1346-1353.
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., and Sanacora, G. (2011). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 22-37.
- Preti, M.G., Bolton, T.A., and Van De Ville, D. (2017). The dynamic functional connectome: State-of-the-art and perspectives. *Neuroimage* 160, 41-54.
- Rizzolatti, G., and Sinigaglia, C. (2016). The mirror mechanism: a basic principle of brain function. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 757-765.
- Romo, R., and Rossi-Pool, R. (2020). Turning Touch into Perception. *Neuron* 105, 16-33.
- Rudwaleit, M., Landewé, R., van der Heijde, D., Listing, J., Brandt, J., Braun, J., Burgos-Vargas, R., Collantes-Estevez, E., Davis, J., Dijkmans, B., *et al.* (2009). The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial

spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 770-776.

Rudwaleit, M., van der Heijde, D., Landewé, R., Akkoc, N., Brandt, J., Chou, C.T., Dougados, M., Huang, F., Gu, J., Kirazli, Y., *et al.* (2011). The Assessment of SpondyloArthritis International Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 25-31.

Schrepf, A., Kaplan, C.M., Ichesco, E., Larkin, T., Harte, S.E., Harris, R.E., Murray, A.D., Waiter, G.D., Clauw, D.J., and Basu, N. (2018). A multi-modal MRI study of the central response to inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat. Commun.* 9, 2243.

Schwartz, N., Stock, A.D., and Putterman, C. (2019). Neuropsychiatric lupus: new mechanistic insights and future treatment directions. *Nat. Rev. Rheumatol.*

Sharif, K., Watad, A., Coplan, L., Lichtbroun, B., Krosser, A., Lichtbroun, M., Bragazzi, N.L., Amital, H., Afek, A., and Shoenfeld, Y. (2018). The role of stress in the mosaic of autoimmunity: An overlooked association. *Autoimmun. Rev.* 17, 967-983.

Shimizu, Y., Yasuda, S., Kako, Y., Nakagawa, S., Kanda, M., Hisada, R., Ohmura, K., Shimamura, S., Shida, H., Fujieda, Y., *et al.* (2016). Post-steroid neuropsychiatric manifestations are significantly more frequent in SLE compared with other systemic autoimmune diseases and predict better prognosis compared with de novo neuropsychiatric SLE. *Autoimmun. Rev.* 15, 786-794.

Silva, R.H., Abílio, V.C., Takatsu, A.L., Kameda, S.R., Grassl, C., Chehin, A.B., Medrano, W.A., Calzavara, M.B., Registro, S., Andersen, M.L., *et al.* (2004). Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology* 46, 895-903.

Smolen, J.S., Aletaha, D., and McInnes, I.B. (2016). Rheumatoid arthritis. *Lancet* 388, 2023-2038.

Smolen, J.S., Breedveld, F.C., Schiff, M.H., Kalden, J.R., Emery, P., Eberl, G., van Riel, P.L., and Tugwell, P. (2003). A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)* 42, 244-257.

Song, H., Fang, F., Tomasson, G., Arnberg, F.K., Mataix-Cols, D., Fernández de la Cruz, L., Almqvist, C., Fall, K., and Valdimarsdóttir, U.A. (2018). Association of Stress-Related Disorders With Subsequent Autoimmune Disease. *JAMA* 319, 2388-2400.

Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 206-221.

- Stark, G.R., and Darnell, J.E., Jr. (2012). The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 36, 503-514.
- Sugama, S., Takenouchi, T., Hashimoto, M., Ohata, H., Takenaka, Y., and Kakinuma, Y. (2019). Stress-induced microglial activation occurs through β -adrenergic receptor: noradrenaline as a key neurotransmitter in microglial activation. *J. Neuroinflammation* 16, 266.
- Ta, T.T., Dikmen, H.O., Schilling, S., Chausse, B., Lewen, A., Hollnagel, J.O., and Kann, O. (2019). Priming of microglia with IFN- γ slows neuronal gamma oscillations in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 4637-4642.
- Tanaka, K., Furuyashiki, T., Kitaoka, S., Senzai, Y., Imoto, Y., Segi-Nishida, E., Deguchi, Y., Breyer, R.M., Breyer, M.D., and Narumiya, S. (2012). Prostaglandin E2-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *J. Neurosci.* 32, 4319-4329.
- Teng, M.W., Bowman, E.P., McElwee, J.J., Smyth, M.J., Casanova, J.L., Cooper, A.M., and Cua, D.J. (2015). IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Med.* 21, 719-729.
- Tétreault, P., Mansour, A., Vachon-Preseu, E., Schnitzer, T.J., Apkarian, A.V., and Baliki, M.N. (2016). Brain Connectivity Predicts Placebo Response across Chronic Pain Clinical Trials. *PLoS Biol.* 14, e1002570.
- Tzourio-Mazoyer, N., Landeau, B., Papathanassiou, D., Crivello, F., Etard, O., Delcroix, N., Mazoyer, B., and Joliot, M. (2002). Automated anatomical labeling of activations in SPM using a macroscopic anatomical parcellation of the MNI MRI single-subject brain. *Neuroimage* 15, 273-289.
- Uematsu, A., Tan, B.Z., Ycu, E.A., Cuevas, J.S., Koivumaa, J., Junyent, F., Kremer, E.J., Witten, I.B., Deisseroth, K., and Johansen, J.P. (2017). Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. *Nat. Neurosci.* 20, 1602-1611.
- Ulrich-Lai, Y.M., and Herman, J.P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 397-409.
- Vgontzas, A.N., Zoumakis, E., Bixler, E.O., Lin, H.M., Follett, H., Kales, A., and Chrousos, G.P. (2004). Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2119-2126.
- Vom Berg, J., Prokop, S., Miller, K.R., Obst, J., Kalin, R.E., Lopategui-Cabezas, I., Wegner, A., Mair, F., Schipke, C.G., Peters, O., *et al.* (2012). Inhibition of IL-12/IL-23 signaling reduces Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Nat. Med.* 18, 1812-1819.

- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nagata, S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- Weiner, S.M., Otte, A., Schumacher, M., Klein, R., Gutfleisch, J., Brink, I., Otto, P., Nitzsche, E.U., Moser, E., and Peter, H.H. (2000). Diagnosis and monitoring of central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus: value of F-18 fluorodeoxyglucose PET. *Ann. Rheum. Dis.* 59, 377-385.
- Wells, G., Becker, J.C., Teng, J., Dougados, M., Schiff, M., Smolen, J., Aletaha, D., and van Riel, P.L. (2009). Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Ann. Rheum. Dis.* 68, 954-960.
- Whitfield-Gabrieli, S., and Nieto-Castanon, A. (2012). Conn: a functional connectivity toolbox for correlated and anticorrelated brain networks. *Brain Connect.* 2, 125-141.
- Wohleb, E.S., Hanke, M.L., Corona, A.W., Powell, N.D., Stiner, L.M., Bailey, M.T., Nelson, R.J., Godbout, J.P., and Sheridan, J.F. (2011). β -Adrenergic receptor antagonism prevents anxiety-like behavior and microglial reactivity induced by repeated social defeat. *J. Neurosci.* 31, 6277-6288.
- Wohleb, E.S., Terwilliger, R., Duman, C.H., and Duman, R.S. (2018). Stress-Induced Neuronal Colony Stimulating Factor 1 Provokes Microglia-Mediated Neuronal Remodeling and Depressive-like Behavior. *Biol. Psychiatry* 83, 38-49.
- Wu, B.B., Ma, Y., Xie, L., Huang, J.Z., Sun, Z.B., Hou, Z.D., Guo, R.W., Lin, Z.R., Duan, S.X., Zhao, S.S., *et al.* (2018). Impaired decision-making and functional neuronal network activity in systemic lupus erythematosus. *J. Magn. Reson. Imaging* 48, 1508-1517.
- Xia, M., Wang, J., and He, Y. (2013). BrainNet Viewer: a network visualization tool for human brain connectomics. *PLoS One* 8, e68910.
- Xu, H., Rajsombath, M.M., Weikop, P., and Selkoe, D.J. (2018). Enriched environment enhances β -adrenergic signaling to prevent microglia inflammation by amyloid- β . *EMBO Mol. Med.* 10.
- Yan, Y., Jiang, W., Liu, L., Wang, X., Ding, C., Tian, Z., and Zhou, R. (2015). Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 160, 62-73.
- Yoshio, T., Okamoto, H., Kurasawa, K., Dei, Y., Hirohata, S., and Minota, S. (2016). IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 and G-CSF are significantly increased in cerebrospinal fluid but not in sera of

patients with central neuropsychiatric lupus erythematosus. *Lupus* 25, 997-1003.

Youngblood, B.D., Zhou, J., Smagin, G.N., Ryan, D.H., and Harris, R.B. (1997). Sleep deprivation by the "flower pot" technique and spatial reference memory. *Physiol. Behav.* 61, 249-256.

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keefe, S., Phatnani, H.P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., *et al.* (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 34, 11929-11947.