

***CSF1R* 関連白質脳症の分子病態メカニズムの解明**

ZHU BIN

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 分子細胞医学専攻 神経病因遺伝学分野

(主指導教官 池内健 教授)

Molecular mechanism underlying in *CSF1R*-related leukoencephalopathy

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

Course for Molecular and Cellular Medicine, Molecular Genetics

(Director: Professor Takeshi Ikeuchi)

別刷請求先

郵便 951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学 脳研究所 生命科学リソース研究センター 遺伝子機能解析学

要旨

CSF1R の遺伝子変異を原因とする *CSF1R* 関連白質脳症は、ヘテロ接合体変異を原因とする常染色体顕性（優性）遺伝性の adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroid and pigmented glia (ALSP) と、常染色体潜性（劣性）遺伝性を呈し、両アレル性変異により生じる brain abnormalities, neurodegeneration, and dysosteosclerosis (BANDDOS) に分類される。ALSP は成人期に発症するのに対し、BANDDOS は小児期に発症し重篤な臨床像を呈する。*CSF1R* 関連白質脳症の遺伝子変異の大部分は *CSF1R* チロシンキナーゼ領域に存在する。チロシンキナーゼ領域に存在する *CSF1R* ミスセンス変異は、リガンド依存性に誘導される *CSF1R* の自己リン酸化を消失させ、チロシンキナーゼ活性の喪失が ALSP の病態機序の一因として考えられている。本研究は *CSF1R* 関連白質脳症の分子病態機序を明らかにするために、リガンド依存性 *CSF1R* の自己リン酸化、*CSF1R* のヘテロ 2 量体形成、変異型 *CSF1R* の顕性阻害効果について検討した。ALSP で報告されている顕性型バリエント、BANDDOS で報告されている潜性型バリエント、良性型バリエントを選抜し、発現コンストラクトを作製した。培養細胞に *CSF1R* バリエントを一過性に発現させ、リガンド依存性に生じる *CSF1R* の自己リン酸化を検討した。野生型 *CSF1R* ではリン酸化 *CSF1R* が検出されたが、顕性型バリエントを発現する細胞では、リン酸化 *CSF1R* は検出されなかった。潜性型バリエントを発現する細胞では、リガンド刺激による *CSF1R* のリン酸化は減弱しているものの部分的に残存していた。良性型バリエントでは、*CSF1R* のリン酸化は保たれていた。*CSF1R* のリン酸化の程度は、*CSF1R* 関連白質脳症の表現型と相関した。野生型と変異型 *CSF1R* を共発現させた実験では、両者のヘテロ 2 量体形成が示唆された。次に野生型 *CSF1R* を安定発現する細胞に、過剰な変異型 *CSF1R* を発現させ、顕性阻害効果を検証したところ、野生型 *CSF1R* のリン酸化の減弱は認めず、顕性阻害効果は否定的と考えられた。以上の結果から、*CSF1R* のリン酸化を介したキナーゼ活性は、*CSF1R* 関連脳症の臨床表現型と関連することが示唆された。

キーワード : CSF1R 関連白質脳症、ALSP、BANDDOS、自己リン酸化、
チロシンキナーゼ、2量体形成、顕性阻害効果

序文

卵黄囊を由来とする脳常在性マクロファージであるミクログリアは、必要に応じて脳内で自己複製し、定常状態では骨髄から単球系細胞の補充をうけない。脳内で多彩な機能を担うミクログリアは、アポトーシスをおこした神経細胞や神経幹細胞の貪食や、不要なシナプスの刈り込みを発達期において行う。成人期においては、髄鞘の修復再生、シナプス伝達の調整を行うなど、脳内環境の恒常性を保つためにミクログリアは活発に活動している¹⁻³⁾。ミクログリアに強く発現する colony stimulating factor-1 receptor (CSF1R) は、ミクログリアの増殖・維持に重要な働きを担っている^{4,5)}。 *Csf1r* 欠失マウスの脳内ではミクログリアが消失し、脳の形態異常や骨系統の異常を呈する⁶⁾。

CSF1R 関連白質脳症は CSF1R の遺伝子変異を原因とする大脳白質変性症である⁷⁾。CSF1R 関連白質脳症は、ヘテロ接合体変異を原因とする常染色体顕性（優性）遺伝性の adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroid and pigmented glia (ALSP: OMIM 221820) と、常染色体潜性（劣性）遺伝を呈し、両アレル性変異により生じる brain abnormalities, neurodegeneration, and dysosteosclerosis (BANDDOS: OMIM 618476) に分類される^{8,9)}。ALSP は成人期に発症し、臨床的には認知機能低下、精神症状、運動障害、てんかん発作が認められる⁹⁾。ALSP よりも重篤な臨床像を呈する BANDDOS は小児期に発症し、臨床的には精神発達遅滞に加え、骨系統の異常を併発する^{8,10)}。

CSF1R 関連白質脳症の原因となる遺伝子変異の大部分は、CSF1R のチロシンキナーゼドメイン領域 (TKD: tyrosine kinase domain) に存在する¹¹⁾。TKD に存在する CSF1R ミスセンス変異は、リガンド依存性に誘導される CSF1R の自己リン酸化を消失させることが報告されている^{12,13)}。CSF1R の自己リン酸化の障害によりチロシンキナーゼ活性を喪失することが、ALSP の病態機序の一因として考えられている^{7,14,15)}。本研究は、リガンド依存性 CSF1R の自己リン酸化、CSF1R のヘテロ二量体

形成、変異型 CSF1R の顕性阻害効果に関する検討を行い、CSF1R 関連白質脳症の分子病態機序を明らかにすることを目的とした。

方法

発現コンストラクトの作製

ALSP 患者で報告されている顕性型バリエント (p.R777W, p.L786S, p.I794T, p.K820N)¹¹⁾、BANDDOS 患者で報告されている潜性型バリエント (p.P132L, p.K627del, p.H643Q, p.T833M)¹⁰⁾、健常者データベース gnomAD

(<https://gnomad.broadinstitute.org/>) に登録されている良性型バリエント (p.R106Q, p.T587I, p.T600M, p.R753Q) を選抜し、発現コンストラクトを作製した。2 量体形成を検討するために、His*6 タグを C 末に付加した野生型および Myc タグを C 末に付加した変異型 (p.I794T) をコードするコンストラクトを作製した。野生型プラスミド (pcDNA3.1 ベクター) を鋳型に Gene Art Site-Directed Mutagenesis Kit

(ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) を用い、選抜したバリエントをプラスミド DNA に導入した。目的とするバリエントは、プラスミドの塩基配列を決定して確認した。

培養細胞実験

作成したプラスミド DNA を Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific) を用いて HEK293T と human microglia clone3 (HMC3) 細胞に遺導入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; ThermoFisher Scientific) に 10%ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS) を添加した培地で細胞を培養した。Geneticin (G418 sulfate; Roche, Basel, Switzerland) に耐性を有する細胞集団を選択し、His*6 タグを付加した野生型 CSF1R を安定発現する細胞を作製した。

リガンド依存性 CSF1R 自己リン酸化の誘導

野生型およびバリエント CSF1R を発現させた HEK293T/HMC3 細胞に、リガンド

として colony stimulating factor-1 (CSF1 : 終濃度 25ng/mL) および Interleukin-34 (IL-34 : 終濃度 25ng/mL) を FBS 非存在下に培養液に添加し、CSF1R の自己リン酸化を誘導した。リガンド添加 20 分後に細胞ライセイトを回収した。

ウエスタンブロット

細胞溶解バッファー (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl [pH7.4], 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 5mM EDTA) を用いて細胞ライセイトを回収した。2 量体形成を検討する実験では、比較のため RIPA バッファー (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl [pH7.4], 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 5mM EDTA) を用いて細胞ライセイトを回収した。可溶性タンパクをサンプルバッファー (50 mM Tris-HCl [pH6.8], 2% SDS, 5% β -メルカプトエタノール, 10% グリセロール, 0.03% ブロモフェノールブルー) により変性し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。分離したタンパクはポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride: PVDF; Merck Millipore, Billerica, USA) に電氣的に転写し、免疫プロットを行った。一次抗体として CSF1R CT 抗体 (ThermoFisher Scientific) を用い総 CSF1R を検出した。抗 His*6 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) および抗 Myc 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用い、タグが付加された CSF1R を検出した。Y546, Y708, および Y723 においてリン酸化された CSF1R は、抗リン酸化 CSF1R 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly USA) を用いて検出した。

プルダウンアッセイ

HA tagged Protein PURIFICATION KIT (MBL, Beverly, USA) と c-Myc tagged Protein MILD PURIFICATION KIT Ver.2 (MBL) を用いてプルダウンアッセイを行った。

統計分析

免疫プロットで検出したバンドのシグナル強度は Image Quant LAS 800 (GE Health Science, Piscataway, USA) を用いて半定量的に解析した。CSF1R の自己リン酸化シグナルは、総 CSF1R を用いて補正した。データは平均 \pm 標準偏差もしくは平均値 \pm

標準誤差で表示した。統計的有意性は ANOVA (analysis of variance) および Tukey の事後検定により検定した。 $P < 0.05$ を有意水準として GraphPad Software 8.2.0

(GraphPad Software Inc., San Diego, USA) を用いて統計解析を行った。

結果

CSF1R バリエーションの特徴

解析対象とした CSF1R バリエーションの特徴を表 1 に示した。10 種類のバリエーションは TKD に、2 種類のバリエーション (p.Arg106Gln, p.Pro132Leu) は細胞外ドメインに位置していた (図 1)。バリエーションの病原性を *in silico* 解析したところ、顕性型バリエーションの CADD スコアは 27.0 ± 0.9 (平均 \pm 標準偏差)、潜性型バリエーションは 22.9 ± 3.3 、良性型バリエーションは 17.0 ± 4.5 であった。顕性型バリエーションの CADD は、良性型よりも有意にスコアが高かった ($P < 0.05$)。Polyphen-2/SIFT では、顕性型バリエーションはすべて probably damaging/deleterious、評価できなかった p.K627del 以外の潜性型バリエーションは probably damaging/deleterious、良性型バリエーションでは 3 種類で benign/tolerated、1 種類で probably damaging/deleterious であった (表 1)。頻度が最も高い CSF1R 遺伝子変異である p.I794T^{9,10}を除き顕性型バリエーションは、公共のデータベースに登録されていなかった (表 1)。潜性型バリエーションの中では、p.T833M が 0.0004% の頻度で gnomAD に登録されていた。良性型バリエーションは、0.02%~0.068% の頻度で gnomAD に登録されていた。

CSF1R バリエーションのキナーゼ活性

HMC3 細胞に CSF1R バリエーションを一過性に発現させ、リガンド依存性に生じる CSF1R の自己リン酸化をリン酸化特異抗体により検討した。リガンド刺激 20 分後、野生型 CSF1R では Y546, Y708, および Y723 におけるリン酸化 CSF1R が検出された (図 2A-C)。顕性型バリエーション (p.R777W, p.L786S, p.I794T, p.K820N) を発現する細胞では、リン酸化 CSF1R は検出されなかった (図 2A)。潜性型バリエーションを発現す

る細胞では、リガンド刺激による CSF1R の自己リン酸化は減弱しているものの部分的に残存していた (図 2B)。良性型バリエントでは、CSF1R の自己リン酸化は保たれていた (図 2C)。良性型バリエントと比較して、顕性型、潜性型バリエントでは CSF1R の自己リン酸化は有意に低下していた (表 2, 図 3)。

CSF1R 自己リン酸化と臨床表現型の相関

CSF1R の自己リン酸化 (pY723) を定量化し、CSF1R 関連白質脳症の発症状態や表現型と比較した (図 4)。ALSP と BANDDOS の臨床像の比較を表 3 に示した。ALSP は成人期に発症するのに対し、BANDDOS は小児期に発症し重篤な臨床像を呈する。ALSP の原因となるヘテロ接合性を示す顕性型バリエントでは、CSF1R の自己リン酸化は健常者の約 50% と予想された (図 4)。一方、潜性型バリエントを両アレル性に有する BANDDOS 患者の自己リン酸化は約 26% と推定された。既報では BANDDOS の両親は無症状であることが報告されている^{8,10)}。このような潜性型バリエントのヘテロ接合体・保因者の自己リン酸化は約 63% と推定された。これらの知見から、CSF1R 関連白質脳症の臨床表現型や発症の有無は、CSF1R の自己リン酸化の程度と相関することが示唆された。

CSF1R ヘテロ 2 量体形成

リガンドが CSF1R に結合すると、CSF1R は 2 量体を形成することが報告されている¹⁶⁾。そこで、野生型と変異型 (p.I794T) CSF1R がヘテロ 2 量体を形成するか否かをプルダウンアッセイにより検討した。His*6 タグを付加した野生型と Myc タグを付加した変異型 (p.I794T) CSF1R を HEK293T 細胞に共発現させ、2 量体を保持する細胞溶解バッファーを用いて細胞ライセイトを回収した。ライセイトを抗 Myc 抗体あるいは抗 His*6 抗体ビーズを用いたプルダウンキットにより精製した。抗 Myc 抗体でプルダウンを行ったところ、抗 His*6 抗体により野生型 CSF1R が検出された (図 5)。一方、SDS を含む RIPA バッファーで溶解したライセイトを用いたプルダウンアッセイでは、ヘテロ 2 量体は検出されなかった。このことから野生型と変異

型 (p.I794T) CSF1R はヘテロ 2 量体を形成していることが示唆された。

次にヘテロ 2 量体のリン酸化が交差性 (*trans*) もしくは同側性 (*cis*) に生じるのかを検討した。2 量体を保持する溶解バッファーにより回収した細胞ライセイトを抗 Myc 抗体ビーズで精製すると、抗 His*6 抗体で認識される野生型 CSF1R は抗リン酸化 Y723 抗体と抗リン酸化チロシンキナーゼ抗体に陽性であった (図 5)。一方、RIPA バッファーで細胞ライセイトを回収し、抗 Myc 抗体でプルダウンしたところ、変異型 CSF1R は、抗リン酸化抗体に陰性を示した (図 5)。このことから、ヘテロ 2 量体のリン酸化は、変異 CSF1R 側では生じておらず、キナーゼ活性の交差性 (*trans*) 作用は否定的と思われた。

変異型 CSF1R の顕性阻害効果

野生型と変異型 CSF1R がヘテロ 2 量体を形成することから、変異型 CSF1R が野生型に対して顕性阻害効果を示す可能性がある。顕性阻害効果を検証するために、His*6 タグを付加した野生型を安定発現する細胞に変異型 (I794T、K820N) CSF1R を過剰発現させ、野生型 CSF1R の自己リン酸化の変化を検討した。変異型 CSF1R (I794T、K820N) は、安定発現する野生型 CSF1R よりも多く発現していた (図 6A)。野生型 CSF1R に由来するリガンド依存性のリン酸化は、変異型 CSF1R (I794T、K820N) の導入による変化は認めなかった (図 6B)。この結果から、変異型 CSF1R の顕性阻害効果は否定的と思われた。

考察

成人期に発症する ALS は、ヘテロ接合体型の *CSF1R* 変異を原因とし、小児期に発症する BDNF 欠損症は両アレル性の *CSF1R* 変異が原因となるが、*CSF1R* 変異の特性と臨床病型の関連は不明であった。本研究では顕性型、潜性型、良性型の *CSF1R* バリエーションの機能アッセイを行い、*CSF1R* 関連白質脳症の病態解析を行った。既報で示されているように顕性型 *CSF1R* バリエーションは、リガンド依存性 *CSF1R* 自己リ

ン酸化が消失していた^{12,13})。潜性型 CSF1R バリエントは、リガンド依存性 CSF1R 自己リン酸化が減弱していたが部分的に残存していた。健常人に認める良性型 CSF1R バリエントは、リガンド依存性 CSF1R 自己リン酸化が保たれており、機能アッセイからも病原性を欠いていることが示唆された。リガンド依存性 CSF1R 自己リン酸化の程度は、CSF1R 関連白質脳症の発症の有無、ALSP と BANDDOS 病型と関連していた。この結果から、CSF1R の自己リン酸化とキナーゼ活性障害の程度が、CSF1R 関連白質脳症の臨床表現型を規定している可能性が示唆された。

リガンド結合により CSF1R は、2 量体形成が惹起されることが報告されている¹⁶)。2 量体形成によりキナーゼ活性が生じ、CSF1R の細胞質ドメインのチロシン残基がリン酸化され、Src homology 2 (SH2) や phosphotyrosine binding (PTB) が結合し CSF1R シグナル伝達が誘導される¹⁷)。申請者は、異なるタグ (His*6 と Myc) を付加した野生型および変異型 CSF1R を共発現することにより、野生型と変異型がヘテロ 2 量体を形成することをプルダウンアッセイにより明らかにした。変異型であっても、2 量体形成は保持されることが示唆された。既報においても、野生型と変異型の 2 量体形成を示唆する所見が報告されている¹⁸)。

CSF1R が 2 量体を形成した後、細胞質内のリン酸化は交差性 (*trans*) に生じることが示唆されている¹⁹)。野生型と変異型のヘテロ 2 量体を形成した場合、キナーゼ活性が交差性 (*trans*) に作用すれば、変異型 CSF1R 側がリン酸化されることが想定される。しかしながら、申請者の検討では、ヘテロ 2 量体を形成する条件下において変異型 CSF1R のリン酸化は認められなかった。このことから、CSF1R のヘテロ 2 量体形成を介した自己リン酸化は同側性 (*cis*) に生じている可能性が考えられた。この場合、ヘテロ 2 量体の野生型 CSF1R に自己リン酸化が生じることが想定される。

一方で、野生型と変異型 CSF1R がヘテロ 2 量体を形成することから、変異型 CSF1R が野生型に対して顕性阻害効果を示す可能性が考えられる。申請者は、野生

型 CSF1R を安定発現する細胞に、過剰な変異型 CSF1R を発現させることで、野生型 CSF1R の自己リン酸化が減弱するか否かを検討した。顕性阻害効果が存在すれば、野生型 CSF1R の自己リン酸化が減弱することが予想されたが、そのような効果は認めなかった。この結果からは、変異型 CSF1R の顕性阻害効果は否定的と考えられた。ALSP 患者の発症年齢をミスセンス型と機能喪失型（ハプロ不全）で比較したところ、両者の発症年齢には明らかな差がないことが報告されている¹⁵⁾。ヘテロ 2 量体を形成するミスセンス変異が顕性阻害効果を発揮するのであれば、機能喪失型（ハプロ不全）よりもミスセンス型のチロシンキナーゼ活性はより強く減弱することが想定される。その結果、発症が若年化するなどの表現型の重症化が想定されが、そのような遺伝型－臨床・病理表現型相関に関する知見は得られていない^{7,11,20)}。一方で、CSF1R 変異の顕性阻害効果を支持する報告がある。Pridans らは、変異型 CSF1R を Ba/F3 細胞に導入すると、リガンド依存性の細胞増殖が生じないことを報告している¹⁸⁾。また Stables らは、CSF1R ミスセンス変異 p.E631K を導入したマウスを作製し、*csflr* ノックアウトマウスのヘテロ接合体（ハプロ不全）と比較して、強い表現型を呈したことを報告している²¹⁾。CSF1R 変異体の顕性阻害効果については、更なる検討が必要と思われた。

結論

CSF1R バリエントによる CSF1R 自己リン酸化と臨床表現型には相関がみられた。野生型と変異型 CSF1R はヘテロ 2 量体を形成するが、変異型 CSF1R の顕性阻害効果は否定的と思われた。

謝辞

本研究のご指導をいただきました新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター 池内健教授，宮下哲典准教授，春日健作助教，原範和特任助教に深謝します。

参考文献

1. Sierra A, Tremblay MÈ, Wake H. Never-resting microglia: physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Front Cell Neurosci.* 8:240, 2014.
2. Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia biology: one century of evolving concepts. *Cell.* 179:292-311, 2019.
3. McNamara NB, Munro DAD, Bestard-Cuche N, Uyeda A, Bogie JFJ, Hoffmann A, Holloway RK, Molina-Gonzalez I, Askew KE, Mitchell S, Mungall W, Dodds M, Dittmayer C, Moss J, Rose J, Szymkowiak S, Amann L, McColl BW, Prinz M, Spires-Jones TL, Stenzel W, Horsburgh K, Hendriks JJA, Pridans C, Muramatsu R, Williams A, Priller J, Miron VE. Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity. *Nature.* 613:120-129, 2023.
4. Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82:380-397, 2014.
5. Chitu V, Gokhan Ş, Nandi S, Mehler MF, Stanley ER. Emerging Roles for CSF-1 Receptor and its Ligands in the Nervous System. *Trends Neurosci.* 39:378-393, 2016.
6. Erbllich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoSOne.* 6:e26317, 2011.
7. Konno T, Kasanuki K, Ikeuchi T, Dickson DW, Wszolek ZK. *CSF1R*-related leukoencephalopathy: A major player in primary microgliopathies. *Neurology.* 91:1092-1104, 2018.
8. Guo L, Ikegawa S. From HDLS to BANDDOS: fast-expanding phenotypic spectrum of disorders caused by mutations in *CSF1R*. *J Hum Genet.* 66:1139-1144, 2021.
9. Konno T, Yoshida K, Mizuno T, Kawarai T, Tada M, Nozaki H, Ikeda SI, Nishizawa M, Onodera O, Wszolek ZK and Ikeuchi T. Clinical and genetic characterization of adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia associated with *CSF1R* mutation. *Eur J Neurol.* 24:37-45, 2017.

10. Tamhankar PM, Zhu B, Tamhankar VP, Mithbawkar S, Seabra L, Livingston JH, Ikeuchi T, Crow YJ. Novel Hypomorphic CSF1R Gene Mutation in the Biallelic State Leading to Fatal Childhood Neurodegeneration. *Neuropediatrics*. 51:302-306, 2020.
11. Papapetropoulos S, Pontius A, Finger E, Karrenbauer V, Lynch DS, Brennan M, Zappia S, Koehler W, Schoels L, Hayer SN, Konno T, Ikeuchi T, Lund T, Orthmann-Murphy J, Eichler F, Wszolek ZK. Adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia: review of clinical manifestations as foundations for therapeutic development. *Front Neurol*. 12:788168, 2022.
12. Rademakers R, Baker M, Nicholson AM, Rutherford NJ, Finch N, Soto-Ortolaza A, Lash J, Wider C, Wojtas A, De Jesus-Hernandez M, Adamson J, Kouri N, Sundal C, Shuster EA, Aasly J, MacKenzie J, Roeber S, Kretzschmar HA, Boeve BF, Knopman DS, Petersen RC, Cairns NJ, Ghetti B, Spina S, Garbern J, Tselis AC, Uitti R, Das P, Van Gerpen JA, Meschia JF, Levy S, Broderick DF, Graff-Radford N, Ross OA, Miller BB, Swerdlow RH, Dickson DW, Wszolek ZK. Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Nat Genet* 44:200-205, 2012.
13. Konno T, Tada M, Tada M, Koyama A, Nozaki H, Harigaya Y, Nishimiya J, Matsunaga A, Yoshikura N, Ishihara K, Arakawa M, Isami A, Okazaki K, Yokoo H, Itoh K, Yoneda M, Kawamura M, Inuzuka T, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O, Kakita A, Ikeuchi T. Haploinsufficiency of CSF-1R and clinicopathologic characterization in patients with HDLS. *Neurology* 82:139-148, 2014.
14. Hume DA, Caruso M, Ferrari-Cestari M, Summers KM, Pridans C, Irvine KM. Phenotypic impacts of CSF1R deficiencies in humans and model organisms. *J Leukoc Biol*. 107:205-219, 2020.
15. Chitu V, Gökhan Ş, Stanley ER. Modeling CSF-1 receptor deficiency diseases - how close are we? *FEBS J*. 289:5049-5073, 2022.
16. Li W, Stanley ER. Role of dimerization and modification of the CSF-1 receptor in its activation and internalization during the CSF-1 response. *EMBO J*. 10:277-88, 1991.
17. Bourette RP, Rohrschneider LR. Early events in M-CSF receptor signaling. *Growth Factors*. 17:155-66, 2000.

18. Pridans C, Sauter KA, Baer K, Kissel H, Hume DA. CSF1R mutations in hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids are loss of function. *Sci Rep.* 3:3013, 2013.
19. Honegger AM, Kris RM, Ullrich A, Schlessinger J. Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular cross-phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:925-9, 1989.
20. Tada M, Konno T, Tada M, Tezuka T, Miura T, Mezaki N, Okazaki K, Arakawa M, Itoh K, Yamamoto T, Yokoo H, Yoshikura N, Ishihara K, Horie M, Takebayashi H, Toyoshima Y, Naito M, Onodera O, Nishizawa M, Takahashi H, Ikeuchi T, Kakita A. Characteristic microglial features in patients with hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. *Ann Neurol.* 80:554-65, 2016.
21. Stables J, Green EK, Sehgal A, Patkar OL, Keshvari S, Taylor I, Ashcroft ME, Grabert K, Wollscheid-Lengeling E, Szymkowiak S, McColl BW, Adamson A, Humphreys NE, Mueller W, Starobova H, Vetter I, Shabestari SK, Blurton-Jones MM, Summers KM, Irvine KM, Pridans C, Hume DA. A kinase-dead Csf1r mutation associated with adult-onset leukoencephalopathy has a dominant inhibitory impact on CSF1R signalling. *Development.* 149:dev200237, 2022.

図の説明

図 1. CSF1R の構造と本研究で解析した CSF1R バリエント

各ドメインの位置は UniProt (<https://www.uniprot.org/>) の情報に基づいて作成した。

図 2. 免疫ブロット解析によるリガンド依存性 CSF1R 自己リン酸化

A 顕性型バリエントを HMC3 細胞に導入しリガンド (CSF1) 添加 20 分後に細胞ライセイトを回収した。総 CSF1R を CSF1R CT 抗体で検出し、pY546, pY708, pY723 のリン酸化をリン酸化特異抗体で検出した。野生型 CSF1R を発現する細胞ではリン酸化 CSF1R が検出されるのに対し、顕性型バリエントを発現する細胞ではリン酸化 CSF1R は検出されなかった。

B 潜性型バリエントを発現する細胞では CSF1R の自己リン酸化は減弱していたが、部分的に残存していた。

C 良性型バリエントを発現する細胞では、CSF1R のリン酸は保持されていた。

図 3. リガンド依存性 CSF1R 自己リン酸化の定量解析

A CSF1 刺激により生じる CSF1R のリン酸化バンドを半定量化し、統計学的に解析した。良性型バリエントと比較して、顕性型および潜性型バリエントは CSF1R の自己リン酸化が有意に低下していた。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

B IL34 刺激により生じる CSF1R 自己リン酸化を統計学的に解析した。良性型と比較して、顕性型および潜性型バリエントは CSF1R の自己リン酸化が有意に低下していた。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

図 4. CSF1R 自己リン酸化レベルと臨床表現型の相関

CSF1R バリエントの自己リン酸化の推定値と CSF1R 関連白質脳症の臨床的表現型との相関を図示した。顕性型バリエントをヘテロ接合体で有する ALSP 患者のキナーゼ活性は約 50%と推定された。一方、潜性型バリエントを両アレル性に有する BANDDOS 患者のキナーゼ活性は約 26%と推定された。潜性型バリエント

をヘテロ接合体で有する保因者のキナーゼ活性は 63%と推定され、発症を免れる。

図 5. プルダウンアッセイによる CSF1R ヘテロ 2 量体形成とリン酸化

HEK293T 細胞に His*6 を付加した野生型と Myc を付加した変異型 (p.I794T) を共発現させた細胞から細胞ライセイトを回収した。2 量体を保持する溶解バッファー (IP) により回収した細胞ライセイトを用い、抗 Myc 抗体でプルダウンしたところ、リン酸化された野生型 CSF1R を検出した (レーン 6)。一方、2 量体を乖離させる RIPA バッファーにより回収した細胞ライセイトを用い、抗 Myc 抗体でプルダウンしたところ、リン酸化を欠く変異型 CSF1R が検出された (レーン 5)。

図 6. CSF1R 病的バリエーションによる顕性阻害効果

A His*6 タグを付加した野生型 CSF1R を安定発現する細胞に、変異型 (p.I794T, p.K820N) を過剰に発現させ、CSF1R の自己リン酸化を評価した。

B 抗 CSF1R 抗体で総 CSF1R 量を検討したところ、安定発現している野生型 CSF1R よりも、変異型 CSF1R は有意に多く発現していた。野生型 CSF1R に由来するリン酸化 CSF1R (pY723, PY) は変異型 CSF1R の導入による変化は認めなかった。

表 2. CSF1R のリン酸化の定量値

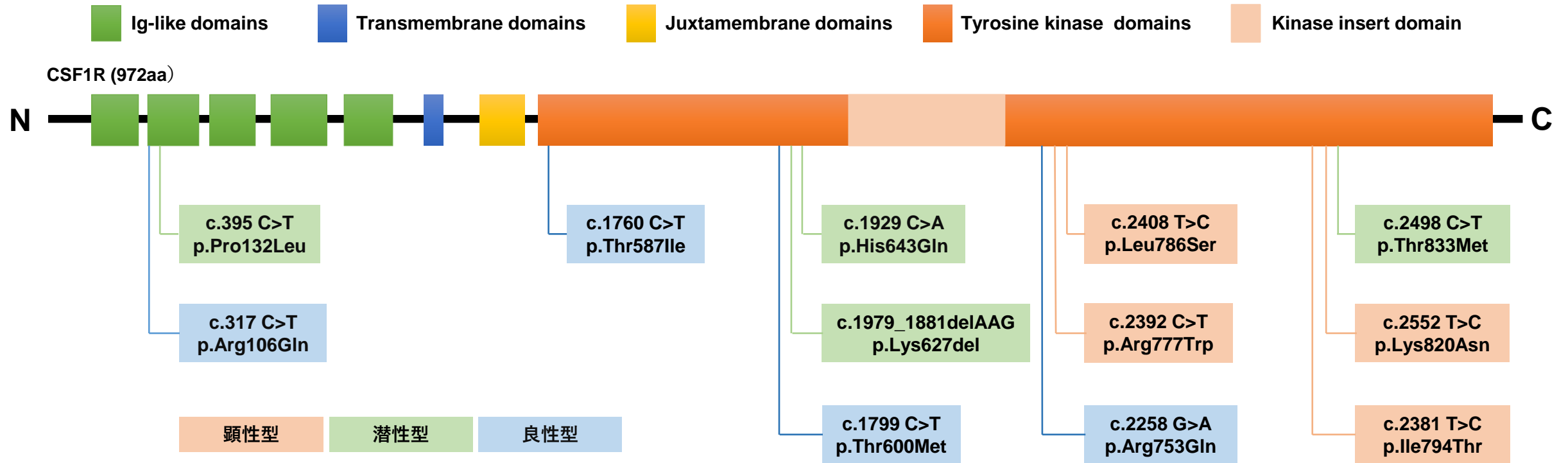
	リン酸化部位	顕性型	潜性型	良性型
CSF1 刺激	pY546	0%	19 ± 17%	72 ± 14%
	pY708	0%	17 ± 16%	68 ± 14%
	pY723	0%	26 ± 15%	72 ± 18%
IL34 刺激	pY546	0%	17 ± 16%	70 ± 12%
	pY708	0%	18 ± 16%	71 ± 12%
	pY723	0%	28 ± 13%	70 ± 11%

野生型のリン酸化との比較を示した

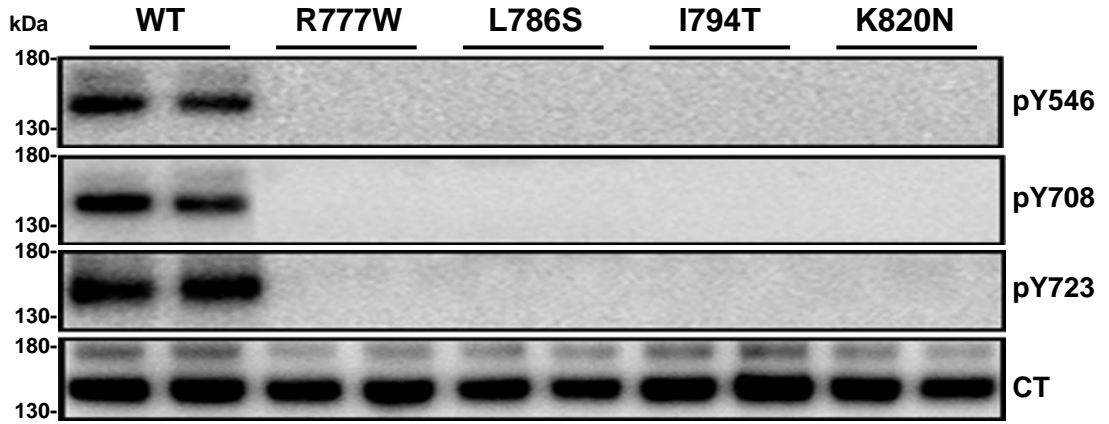
表 3. CSF1R 関連白質脳症 : ALSP と BANDDOS の比較

	ALSP	BANDDOS
遺伝形式	常染色体顕性（優性）遺伝	常染色体潜性（劣性）遺伝
発症年齢	18～78 歳（平均 44 歳）	0～37 歳
臨床症状	認知機能低下、精神症状、運動症状、痙攣など	認知機能低下、神経運動発達遅滞、痙攣、骨折など
骨変化	なし	頭蓋骨硬化、脊椎硬化
脳画像所見	大脳白質変性、石灰化	大脳白質変性、石灰化、水頭症
神経病理	大脳白質変性、スフィロイド形成	大脳白質変性、スフィロイド形成、脳奇形

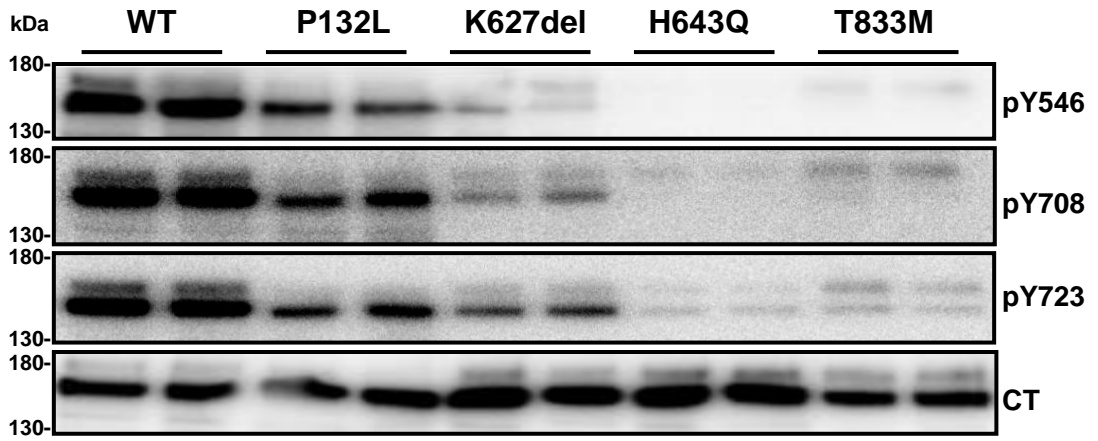
図1



A



B



C

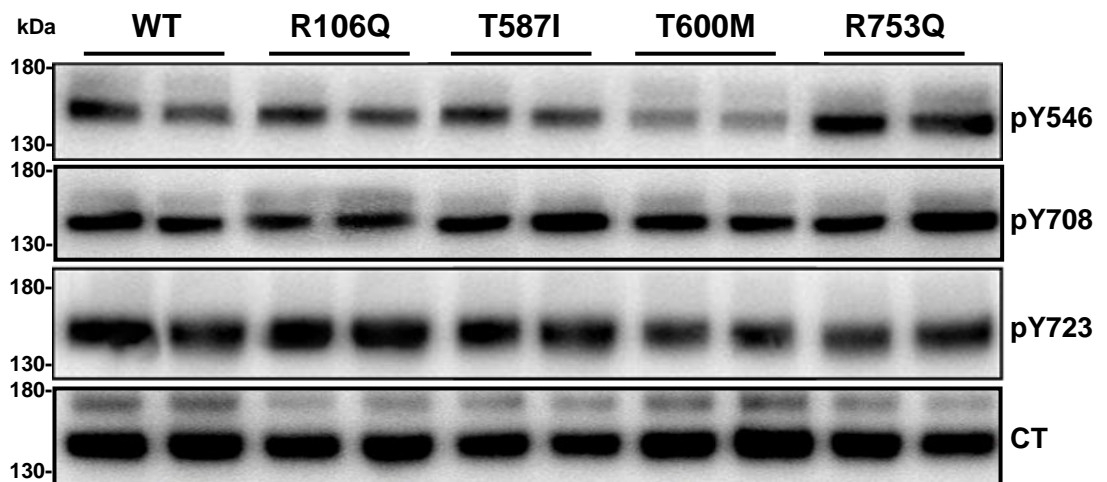
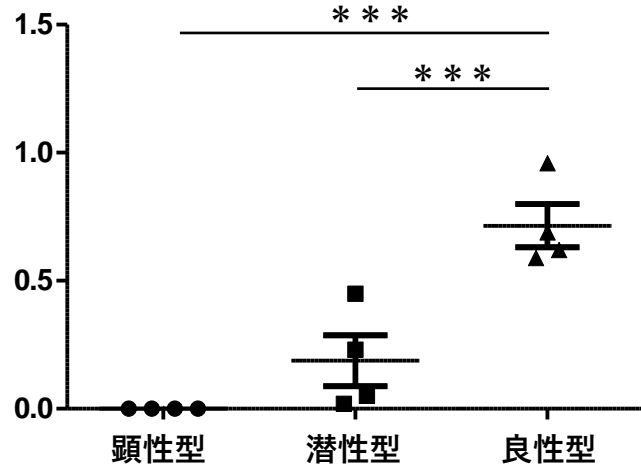


图3

CSF1刺激

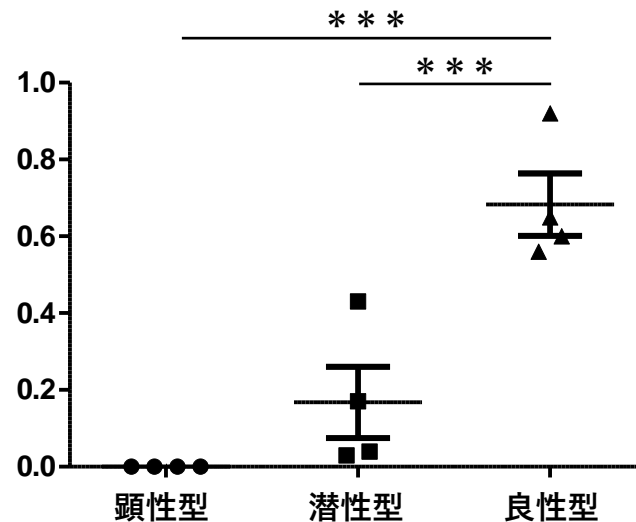
Relative Phosphorylation levels

pY546



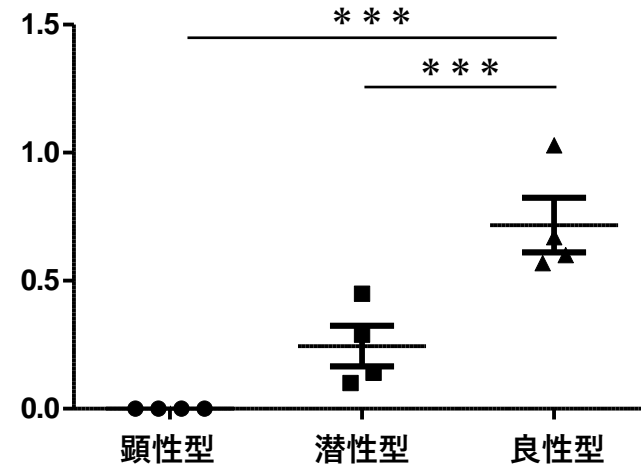
pY708

Relative Phosphorylation levels



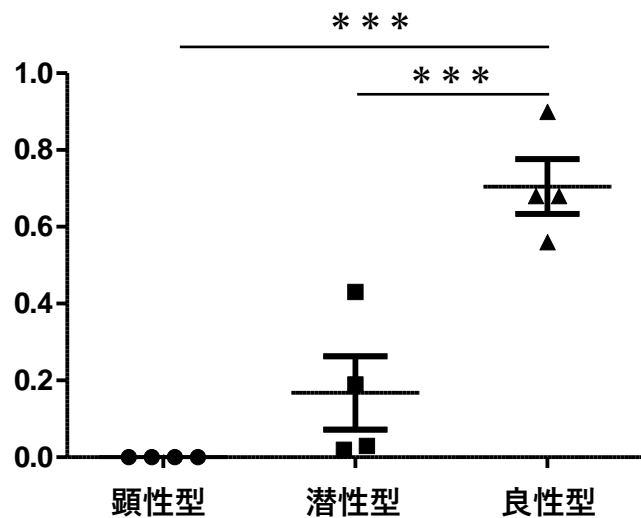
pY723

Relative Phosphorylation levels

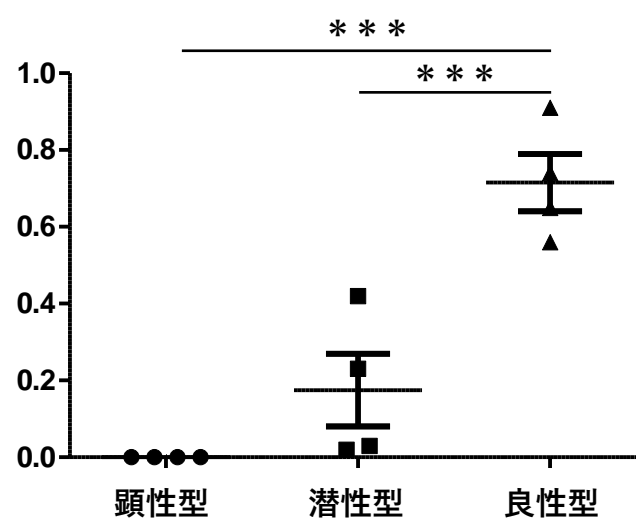


IL34刺激

Relative Phosphorylation levels



Relative Phosphorylation levels



Relative Phosphorylation levels

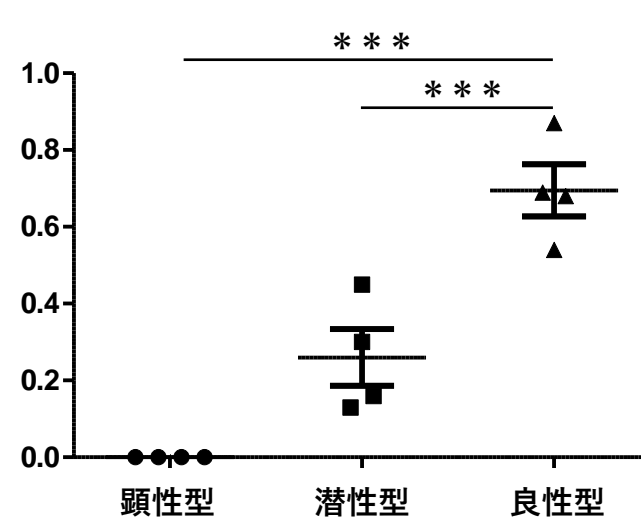


図4

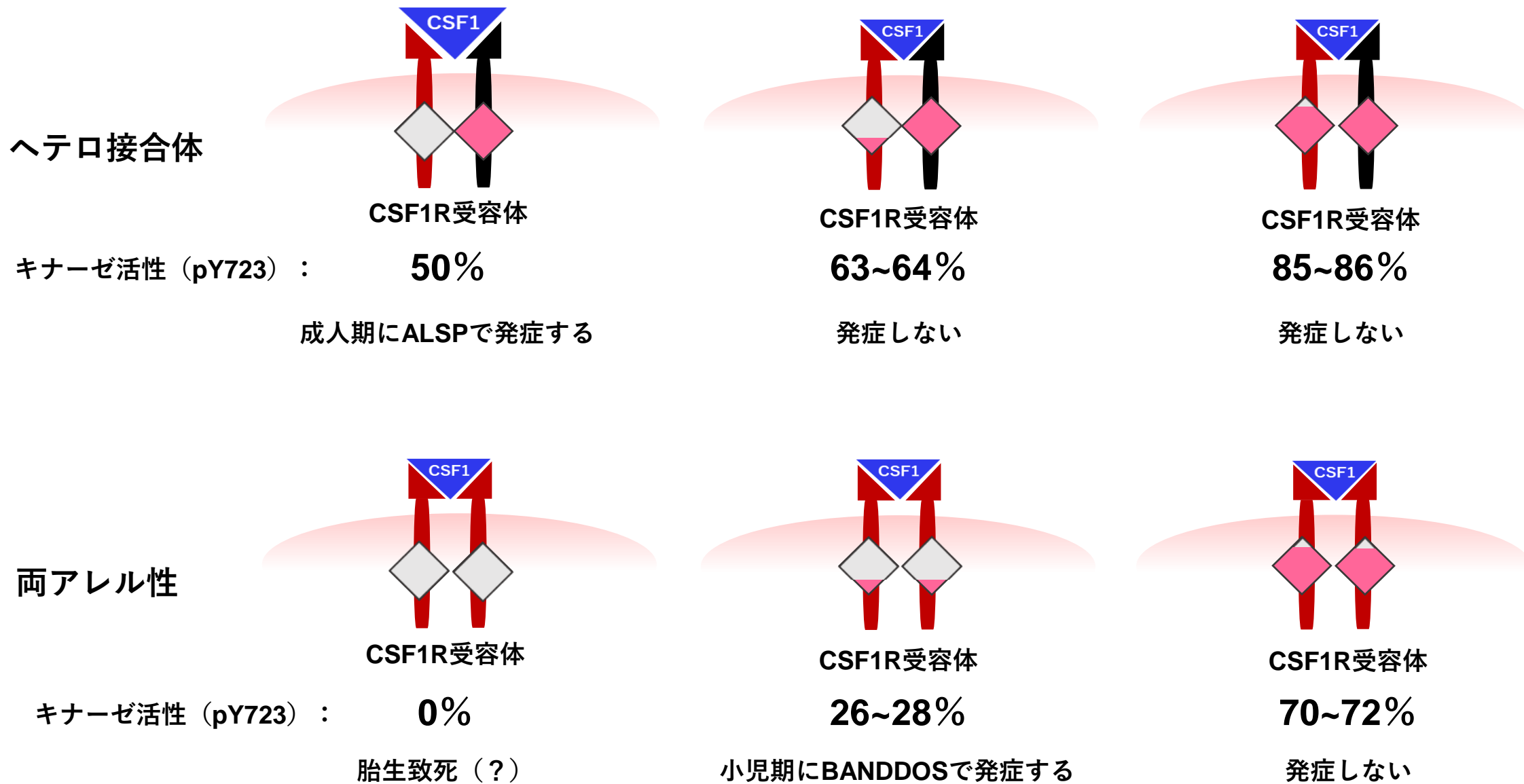


図5

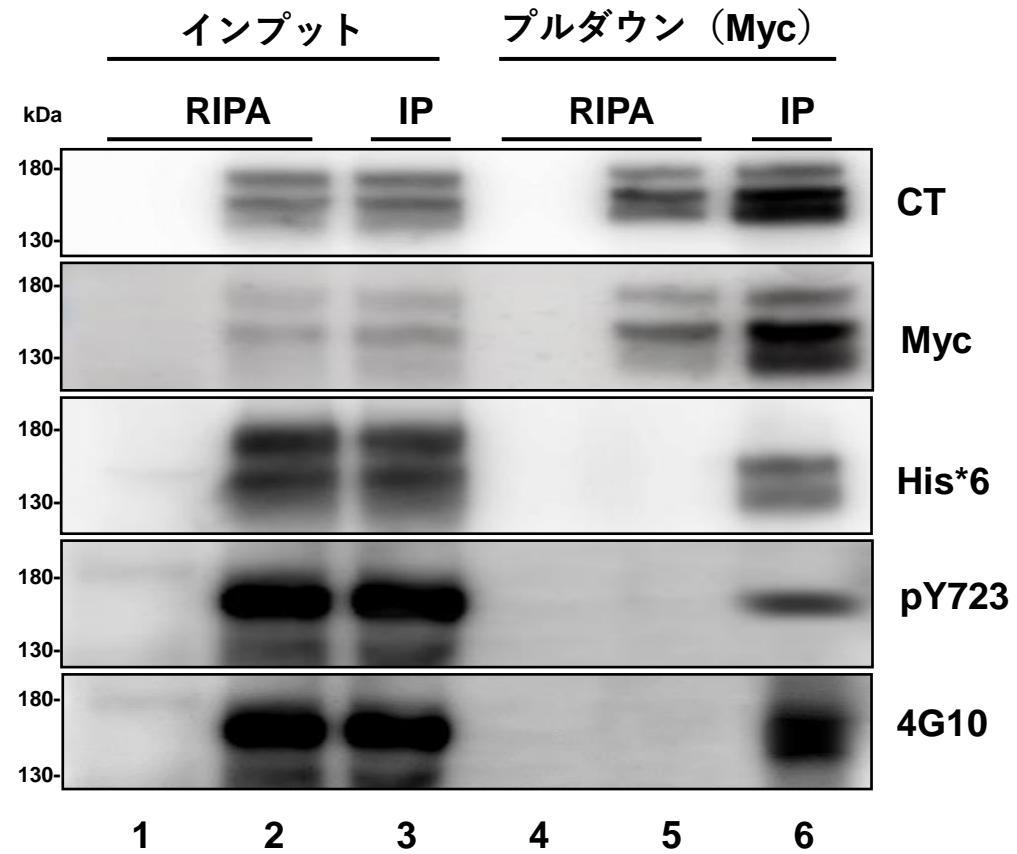
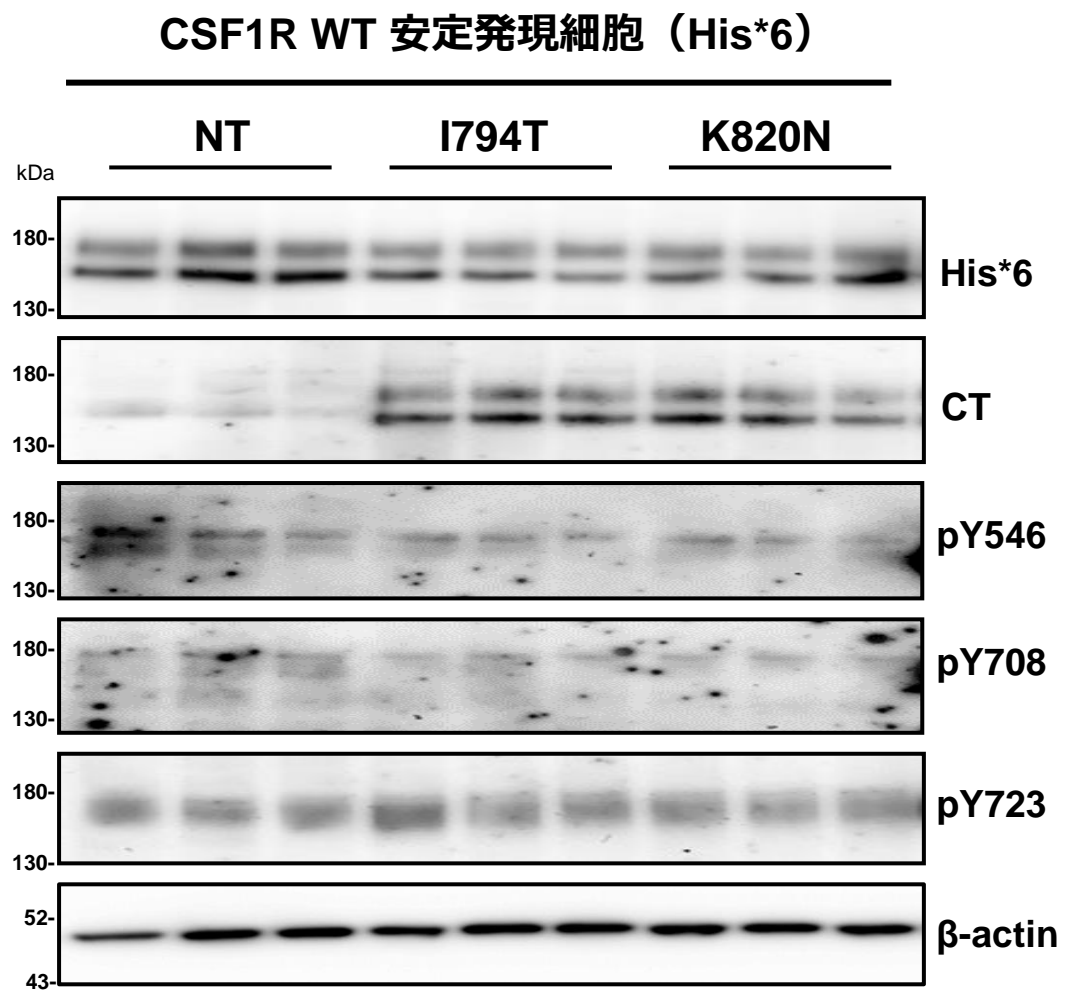


図6

A



B

