

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 ZHU Bin
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 1113 号
学位授与の日付 令和5年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 CSF1R 関連白質脳症の分子メカニズムの解明

論文審査委員 主査 教授 柿田 明美
副査 教授 笹岡 俊邦
副査 講師 石原 智彦

博士論文の要旨

背景と目的：

CSF1R 関連白質脳症は、CSF1R のヘテロ接合体変異を原因とする常染色体顕性遺伝性の adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroid and pigmented glia (ALSP) と、常染色体潜性遺伝を呈し、両アリ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。チロシンキナーゼ領域に存在する CSF1R 変異は、リガンド依存性に誘導される CSF1R のリン酸化を消失させ、チロシンキナーゼ活性の喪失が ALSP の病態機序として考えられている。本研究は、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：

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、健常者に存在する良性型バリエントを各 4 種類選抜し、発現コンストラクトを作製した。

野生型およびバリエント CSF1R を発現させた培養細胞に、リガンド (CSF1/IL-34) を添加し CSF1R のリン酸化を誘導した。細胞ライセイトを回収し、免疫ブロットを行った。一次抗体として CSF1R CT 抗体、抗 His*6 抗体、抗 Myc 抗体を用い CSF1R を検出した。Y546, Y708, および Y723 に対する抗リン酸化 CSF1R 抗体を用いてリン酸化を検出した。

結果：

培養細胞に CSF1R バリエントを発現させ、リガンド依存性に生じる CSF1R の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、顕性型ではリン酸化は検出されなかった。潜性型ではリン酸化は減弱しているものの、部分的に残存していた。良性型ではリン酸化は保たれていた。

CSF1R のリン酸化を定量化し、CSF1R 関連白質脳症の表現型と比較した。ALSP 患者では、CSF1R のリン酸化は健常者の約 50%と予想された。一方、BANDDOS 患者のリン酸化は約 26%と推定された。既報では無症状である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。CSF1R 関連白質脳症の臨床表現型は、CSF1R のリン酸化と相関していた。

CSF1R はリガンド結合依存性に 2 量体を形成する。そこで、野生型と変異型 CSF1R がヘテロ 2 量体を形成するか否かを検討した。His*6 を付加した野生型と Myc を付加した変異型 CSF1R を培養細胞に共発現させ、細胞ライセイトを抗 Myc 抗体あるいは抗 His*6 抗体ビーズを用いて精製した。抗 His*6 抗体を用いた精製により、抗 Myc 抗体により変異型 CSF1R が検出された。また、抗 Myc 抗体で精製したところ、抗 His*6 抗体により野生型 CSF1R が検出されたことから、野生型と変異型 CSF1R はヘテロ 2 量体を形成していると思われた。

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 を付加した野生型を安定発現する細胞に変異型 CSF1R を過剰発現させ、野生型 CSF1R のリン酸化を検討した。野生型 CSF1R に由来するリン酸化は、変異型 CSF1R の導入によって変化しなかった。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 ALSP はヘテロ接合体性の CSF1R 変異を原因とし、小児期に発症する BANNDOS 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 バリエント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。CSF1R のリン酸化の程度は、CSF1R 関連白質脳症の発症、ALSP と BANNDOS 病型と関連していた。この結果から、CSF1R の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。

申請者は、野生型および変異型 CSF1R を共発現することにより、両者がヘテロ 2 量体を形成することを明らかにした。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。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たため、過剰な変異型 CSF1R を発現させることで、野生型 CSF1R の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。一方で、CSF1R 変異の顕性阻害効果を支持する知見が報告されていることから、顕性阻害効果については更なる検討が望まれる。

結論：

CSF1R バリエントによる CSF1R リン酸化と臨床表現型には相関がみられる。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。

審査結果の要旨

CSF1R 関連白質脳症には、CSF1R のヘテロ接合体変異を原因とする常染色体顕性遺伝性の ALSP と、両アレル性変異により生じる常染色体潜性遺伝性の BANDDO が知られている。チロシンキナーゼ領域の CSF1R 変異はリガンド依存性に CSF1R のリン酸化を消失させ、チロシンキナーゼ活性の喪失が ALSP の病態機序と考えられる。本研究は、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 の顕性阻害効果を検証した。顕性型、潜性型、良性型の各バリエントのコンストラクトを作製し、培養細胞に発現させ、リガンド依存性に生じる CSF1R のリン酸化を検討した。野生型ではリン酸化 CSF1R が検出されたが、顕性型では検出されなかった。潜性型ではリン酸化は減弱しつつも部分的に残存し、良性型では保たれていた。CSF1R のリン酸化は臨床表現型と関連していた。野生型と変異型を共発現させたところ両者のヘテロ 2 量体形成が示唆された。顕性阻害効果は否定的であった。

この様に本研究は、CSF1R のリン酸化とキナーゼ活性障害の程度が臨床表現型を規定している可能性を示し、CSF1R 関連白質脳症の病態理解に向けた重要な知見を見出した。ここに学位論文としての価値を認める。