

神経軸索スフェロイドおよび色素性グリアを伴う成人発症白質脳症患者における

CSF1R 新規変異の同定と機能解析

三浦 健

新潟大学大学院医歯学総合研究科

神経内科学分野

(指導：小野寺 理 教授)

Identification and Functional Characterization of Novel *CSF1R* Mutations

in Patients with ALSP

Takeshi MIURA

Department of Neurology, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Science

(Director: Professor Osamu ONODERA)

別刷請求先：

〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学脳研究所神経内科

三浦 健

Reprint requests to: Takeshi MIURA

Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

1-757 Asahimachi-dori, Chuo-ku,

Niigata 951-8585 Japan

要旨

神経軸索スフェロイドおよび色素性グリアを伴う成人発症白質脳症（Adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia: ALSP）は，コロニー刺激因子 1 受容体遺伝子（*Colony stimulating factor 1 receptor: CSF1R*）の変異を原因とする．既報例における全ての病的変異は，*CSF1R* のチロシンキナーゼドメイン（Tyrosine Kinase Domain: TKD）をコードする配列を含むエクソン 12～22 に同定されている．本研究は，ALSP と臨床診断された成人発症大脳白質脳症患者における *CSF1R* 変異の同定，および同定した新規 *CSF1R* 変異の病原性を明らかにすることを目的とする．

ALSP の臨床診断基準を満たした 61 人の患者において，*CSF1R* の全エクソン及び周辺のイントロン配列について遺伝子解析を行った．*CSF1R* 遺伝子解析により 2 つの新規フレームシフト変異，5 つの新規ミスセンス変異，2 つの既知のミスセンス変異，1 つの既知のミスセンスバリエーションを同定した．この内 8 つが TKD に存在した．フレームシフト変異（p.P104LfsTer8）およびミスセンスバリエーション（p.H362R）は，細胞外ドメインに位置していた．フレームシフト変異による *CSF1R* ハプロ不全の有無を検討するため末梢血白血球由来 RNA を用いた逆転写（Reverse Transcript: RT）-PCR 解析を行った．RT-PCR 解析により p.P104LfsTer8 変異はナンセンス介在性 mRNA 分解（Nonsense-mediated mRNA decay: NMD）を引き起こすことが示唆された．次に，野生型及び変異型 *CSF1R* を発現する培養細胞を用いてリガンド依存性に

生じる CSF1R の自己リン酸化の有無を調べた。培養細胞を用いた機能アッセイでは、TKD 内の変異はいずれも CSF1R の自己リン酸化を示さなかった。細胞外ドメインに位置する p.H362R バリエントは野生型と同等の自己リン酸化を呈し、病的変異ではない可能性が示唆された。

TKD をコードする領域外に病的と考えられる *CSF1R* 変異を同定した。ALSP が臨床的に疑われる患者においては、*CSF1R* の全翻訳領域について遺伝子解析を考慮する必要がある。

Key words

CSF1R, ALSP, 神経軸索スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症, HDLS, ハプロ不全, NMD

序文

神経軸索スフェロイドおよび色素性グリアを伴う成人発症白質脳症（Adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia: ALSP）は、大脳白質に病変の主座を持つ常染色体優性遺伝性の神経変性疾患である¹⁾。ALSPの臨床像は遂行機能障害、記憶障害、人格変化、運動障害及びてんかん発作に特徴づけられる²⁾。発症の平均年齢は43歳（範囲：18～78歳）であり³⁾、最終的には臥床状態となる。発症から死亡までの平均罹病期間は6.8年である³⁾。

コロニー刺激因子1受容体 *Colony stimulating factor 1 receptor*（*CSF1R*）の突然変異がALSPの原因として同定され⁴⁾、現在までに58の病的変異が国内外のALSP症例において同定されている³⁾。既報の病的変異は、*CSF1R*のチロシンキナーゼドメイン（Tyrosine Kinase Domain: TKD）コード配列を含むエクソン12～22に同定されている。*CSF1R*変異を介した発症機序として、ハプロ不全または*CSF1R*介在シグナルの喪失が報告されている⁵⁾。*CSF1R*は中枢神経ではミクログリアに多く発現しており、ミクログリアの分化や機能に関わると考えられている⁶⁾⁻⁸⁾。ALSP患者脳においてはミクログリアの分布・形態に異常が見られ⁹⁾、*CSF1R*介在シグナル異常を介したミクログリアの機能異常がALSPの病態に深く関与していると推測されている⁵⁾⁸⁾⁹⁾。

本研究において、臨床的にALSPが疑われた成人発症白質脳症59家系61症例の遺伝子解析を行い、ALSPの原因となる*CSF1R*変異を検索した。この解析により

TKD をコードする領域外であるエクソン 4 の新規フレームシフト変異を含む新規および既知の *CSF1R* 変異を同定した。さらに、同定し新規 *CSF1R* 変異が惹起する病的機序について解析した。

方法

対象

Konno らにより策定された ALSP の臨床診断基準に従い¹⁰⁾、possible 基準または probable 基準を満たした 59 家系 61 人の患者を対象に *CSF1R* 遺伝子解析を行った。遺伝子解析に際して患者または代諾者からインフォームドコンセントを取得した。本研究は新潟大学の遺伝子倫理委員会の承認を受けた。

遺伝子解析および mRNA 解析

ゲノム DNA を末梢白血球から QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, German) を用いて抽出した。*CSF1R* の遺伝子解析は、全てのエクソンおよび隣接するイントロン配列についてポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) 法により増幅し、サンガー法により塩基配列を決定した⁴⁾⁵⁾。同定した変異について PolyPhen-2¹¹⁾、SIFT¹²⁾、PROVEAN¹³⁾ アルゴリズムを用いて *in silico* 解析を行い、変異の病原性を予測した。

mRNA 解析のため、末梢血白血球から PAXgene blood RNA tubes (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて全 RNA を抽出した。抽出した RNA に ReverTra Ace

(TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写 (Reverse Transcript: RT) -PCR を行い, 相補的 DNA を合成した. 合成した相補的 DNA を PCR 法で増幅し, サンガー法で塩基配列を決定した.

培養細胞を用いた機能解析及び免疫ブロット解析

GeneArt Site-Directed Mutagenesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて *CSF1R* 変異を組み込んだプラスミド DNA を作成した. 作成したプラスミド DNA を Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションし, 野生型または変異型 *CSF1R* を一過性発現させ, 10% ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS) を含む培地で培養した.

CSF1R を一過性発現させた HEK293T 細胞に, リガンドとして Colony stimulating factor-1 (CSF1) (終濃度 25 ng/mL) および Interleukin-34 (IL-34) (終濃度 25 ng/mL) を用いて FBS 非存在下に刺激試験を行い *CSF1R* の自己リン酸化を誘導した.

培養細胞を 0.5 mM Na_3VO_4 および 1 mM NaF を添加した可溶化バッファー (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 5 mM EDTA) に溶解した. 可溶性タンパクを変性条件下で sodium dodecyl sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行い分離し, さらにポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride: PVDF) 膜 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) に電氣的に転写した.

免疫ブロットに用いた抗体は以下の通りである. C-20 抗体 (*CSF1R* の C 末端側を

認識, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) および B-8 抗体 (CSF1R の N 末端側を認識, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) を用いて, 総 CSF1R を検出し, 抗リン酸化 CSF1R 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) を用いて Tyr546, Tyr708, および Tyr723 においてリン酸化 CSF1R を検出した.

臨床および神経画像解析

CSF1R 変異を有する患者の臨床像および神経画像を後方視的に評価した. MRI は, 1.5 テスラシステムを用いて撮像した. 7 例の患者で thin slice CT を用いて微小石灰化の有無を確認した.

神経病理学的検査

症例 10 において既報の方法に従い神経病理学的解析を行った¹⁴⁾¹⁵⁾. パラフィン包埋切片を Hematoxylin-Eosin (H&E) および Luxol fast blue で染色した. また CD68, リン酸化ニューロフィラメント, および α B-クリスタリンに対する特異抗体で免疫組織染色した.

統計解析

免疫ブロットのシグナル強度は, LAS 4000 アナライザー (GE Health Science, Piscataway, NJ, USA) を用いて半定量的に解析した. CSF1R の各自己リン酸化シグナルは, 総 CSF1R によって補正した. 統計学的解析は, GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) で行った. データは平均値 \pm 標準誤差で示した. 2 元配置分散分析により統計解析を行った.

結果

CSF1R 変異の同定

CSF1R 遺伝解析の結果、2つの新規フレームシフト変異 (p.P104LfsTer8, p.Y886QfsTer55)、5つの新規ミスセンス変異 (p.I662T, p.D778E, p.I794F, p.P878S, p.P878A)、2つの既知の病的ミスセンス変異 (p.G765D, p.I794T)、1つの既知のバリエーション (p.H362R, ホモ接合体) を同定した (図 1)。8つの変異が TKD に存在した。1つのフレームシフト変異 (p.P104LfsTer8) および 1つのミスセンスバリエーション (p.H362R) は、細胞外ドメインに位置していた。In silico 解析では、TKD 内の変異はいずれも高い確率で病原性であると予測された (表 1)。これらの変異は、ALSP において最も頻度が高い病的 CSF1R 変異である p.I794T を除き、ExAC データベースには登録されていなかった (表 1)。TKD 外の p.H362R バリエーションの病原性は、in silico 解析アルゴリズムにより結果が異なっていた。p.H362R バリエーションの一般人口におけるアレル頻度は ExAC データベース (<http://exac.broadinstitute.org/>) では全人口で 0.049、東アジア人集団では 0.368 であった。

CSF1R フレームシフト変異の mRNA 発現の解析

p.P104LfsTer8 および p.Y886QfsTer55 のフレームシフト突然変異の mRNA 発現を解析するため、末梢血白血球から抽出した全 RNA を用いて RT-PCR を行った。

p.P104LfsTer8 変異に由来する変異アレルの発現は、野生型と比較し顕著に低下して

いた (図 2A). この結果は, p.P104LfsTer8 変異がナンセンス介在性 mRNA 分解 (nonsense mediated mRNA decay: NMD) を受けることを示唆している. 一方, p.Y886QfsTer55 変異アリルは, 野生型のレベルと同等の発現が認められた (図 2B).

野生型及び変異型 CSF1R の自己リン酸化の検出

ミスセンス変異の病原性を調べるために, 野生型または変異型 CSF1R を一過性に発現させた HEK293T 細胞において CSF1R の自己リン酸化を検討した. FBS 存在下で培養した場合, 野生型 CSF1R では Tyr546, Tyr708, および Tyr723 におけるリン酸化 CSF1R が検出された (図 3A). TKD 内の変異である p.I662T, p.G765D, p.D778E, p.I794F, p.P878S, p.P878A および p.Y886QfsTer55 (図 3A) を発現する細胞ではリン酸化 CSF1R は検出されなかった. 細胞外ドメインに位置する p.H362R 変異体は, 野生型と同等の自己リン酸化を呈した (図 3A).

次に CSF1R のリガンド依存性に生じる自己リン酸化を検討した. TKD 内のミスセンス変異またはフレームシフト変異 p.Y886QfsTer55 は, CSF1 または IL-34 いずれのリガンド刺激でも自己リン酸化を示さなかった (図 3B, 3D). p.H362R 変異体は CSF1R の野生型と同等の自己リン酸化を示し, CSF1R 介在シグナルの喪失を引き起こさないことが示唆された (図 3B, 3C, 3D).

臨床症状及び神経画像上の特徴

CSF1R に変異が同定された 11 例の臨床的特徴を表 2 に示す. 3 例において常染色

体優性遺伝形式に矛盾しない家系内類症を認めた。p.G765D 突然変異を有する症例 4 の兄は以前に報告されている⁵⁾。8 人は明らかな家族歴は認めなかった。平均発症年齢は 42.8 歳（範囲：22～60 歳）であった。認知機能低下は全例で観察され、錐体路徴候を 11 例中 6 例（55%）に認めた。

MRI における白質病変は、左右対称に分布していたが、症例 1 のように非対称性の分布を示す症例も存在した（図 4）。11 例中 8 例（73%）で拡散強調画像において高信号を呈する病変が認められた。Thin slice CT が撮影された 7 例中 6 例（86%）で微細な石灰化病変を前頭葉・頭頂葉深部白質に認めた。これらの画像所見は既報の ALSP 症例の特徴に合致していた（図 5）^{16) 17)}。

神経病理学的所見

症例 10 は 64 歳の男性で、57 歳で抑うつおよび不安症状で発症した。その後、認知機能低下および性格変化、行動変化を来した。62 歳で筋強剛、運動緩慢、歩行障害を特徴とするパーキンソニズムを発症した。63 歳時に全介助状態となり、64 歳で死亡した。

神経病理学的検索において、側脳室前角の拡大および脳梁の菲薄化が顕著であった（図 6A）。Luxol fast blue 染色では大脳白質における脱髄が見られた（図 6B）。H & E 染色では色素性マクロファージを認め、色素は自家蛍光を呈した（図 6C, F, G）。抗リン酸化ニューロフィラメント抗体を用いた免疫組織化学的解析では、神経軸索スフェロイドを認めた（図 6D）。多数の風船様神経細胞が前頭葉皮質で検出さ

れた (図 6E). これらの神経病理学的所見は, ALSP における既報と合致していた⁵⁾

14) 15)

考察

ALSP の臨床診断基準を満たした患者において 7 つの新規 *CSF1R* 変異および 2 つの既知の病的変異, 1 つの既知のバリエーションを同定した. 本研究で得られた結果に基づき, *CSF1R* 変異により ALSP を発症する分子遺伝学的機序を考察する.

第 1 に, 細胞外ドメインをコードしているエクソン 4 の一塩基欠失 (c.310delC) に起因する新規フレームシフト変異 p.P104LfsTer8 について考察する. これまでに報告された ALSP の病的変異は, TKD をコードする領域を含むエクソン 12~22 内に同定されていた³⁾⁻⁵⁾. ハプロ不全を呈するエクソン 12~22 内のフレームシフト変異例が報告されていることから^{5) 18)}, エクソン 1~11 においてもハプロ不全を介した病的変異が存在する可能性が指摘されていた³⁾. 今回同定したエクソン 4 のフレームシフト変異 p.P104LfsTer8 は, NMD が生じると予測された¹⁹⁾. RT-PCR による発現解析では, 変異アリルに由来する mRNA の発現が低下していた (図 2A). このことから p.P104LfsTer8 変異は, *CSF1R* のハプロ不全が ALSP の発症機序として想定される. *CSF1R* エクソン 1~11 においても ALSP の原因となる変異が存在することから, ALSP の遺伝子解析には *CSF1R* の全エクソンの遺伝子検索が必要と思われた.

第 2 に, エクソン 21 における 2 塩基欠失 (c.2655_2656delAT) によって引き起こ

されるフレームシフト変異 p.Y886QfsTer55 について考察する。このフレームシフト変異は、新たに生成される終止コドンが *CSF1R* の最終エクソンであるエクソン 22 内に存在するため、NMD の基準を満たさない¹⁹⁾。RT-PCR による発現解析では、変異アリル由来の mRNA 発現レベルは野生型アリルと同等であり (図 2B)、このフレームシフト変異は NMD によるハプロ不全を来さないと考えられる。一方、この変異は TKD 内に位置するため、p.Y886QfsTer55 変異をもつ *CSF1R* がリガンド刺激時の自己リン酸化に影響するか否かを検討した。培養細胞を用いた機能解析では p.Y886QfsTer55 変異をもつ *CSF1R* は自己リン酸化を示さなかった (図 3A, 3B, 3D)。したがって、p.Y886QfsTer55 変異によって引き起こされる病態機序は、ハプロ不全ではなく *CSF1R* 介在シグナルの喪失であると考えられる。

第 3 に、TKD 内の新規ミスセンス変異 (p.I662T, p.D778E, p.I794F, p.P878S および p.P878A) では *CSF1R* 自己リン酸化が障害されていることを示した。この結果は、TKD 内のこれらのミスセンス変異が既報と同様に ALSP を引き起こす病的変異であることを示唆している⁴⁾⁵⁾。これまでの報告と同様に³⁾、本研究で同定した病的変異は、TKD の近位部よりも遠位部における頻度が高かった。TKD の近位部内の p.I662T 変異体と TKD 遠位部内の変異体には、自己リン酸化障害の程度に明らかな差は見出されず、TKD 部位による機能的差異は明らかではなかった。

最後に、ALSP の臨床診断基準を満たした症例 2 の細胞外ドメインに位置する p.H362R ホモ接合性 *CSF1R* バリエーションについて考察する。以下の 2 つの理由から、

p.H362R ミスセンスバリエントは病的変異ではないと考える。第 1 に、この変異体の自己リン酸化の程度は、野生型と同等であった（図 3）。第 2 に、このバリエントは ExAC データベースにおいて全人口で 0.049、東アジア人集団では 0.368 のアレル頻度を有することが報告されており、一般人口においても一定の頻度で見出される多型である。したがって、症例 2 における白質脳症の原因は、このバリエント以外に起因するものと考えた。CSF1R 変異陰性の ALSP 患者において、AARS2 変異が最近報告された²⁰⁾。症例 2 に対し AARS2 の遺伝子解析を行ったが、AARS2 には病的変異が見られず、本例の原因特定には至らなかった。

結論

ハプロ不全により ALSP を来す CSF1R エクソン 4 における変異を含めた新規 CSF1R 変異を同定した。臨床的に ALSP が疑われる患者において、CSF1R の全翻訳領域の遺伝子解析を考慮すべきである。

謝辞

貴重な ALSP 症例をご紹介頂きました全国の医療機関の先生方、本研究をご指導頂きました新潟大学脳研究所 遺伝子機能解析学分野教授 池内健先生、遺伝子解析に技術的協力を頂きました河合麗子さん、本論文をご高閲頂きました新潟大学脳研究所 神経内科学分野教授 小野寺理先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) Nicholson AM, Baker MC, Finch NA, Rutherford NJ, Wider C, Graff-Radford NR, Nelson PT, Clark HB, Wszolek ZK, Dickson DW, Knopman DS, Rademakers R: *CSF1R* mutations link POLD and HDLS as a single disease entity. *Neurology* 80:1033-1040, 2013.
- 2) Lynch DS, Jaunmuktane Z, Sheerin UM, Phadke R, Brandner S, Milonas I, Dean A, Bajaj N, McNicholas N, Costello D, Cronin S, McGuigan C, Rossor M, Fox N, Murphy E, Chataway J, Houlden H: Hereditary leukoencephalopathy with axonal spheroids: a spectrum of phenotypes from CNS vasculitis to parkinsonism in an adult onset leukodystrophy series. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87: 512-519, 2016.
- 3) Konno T, Yoshida K, Mizuno T, Kawarai T, Tada M, Nozaki H, Ikeda SI, Nishizawa M, Onodera O, Wszolek ZK, 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.
- 4) Rademakers R, Baker M, Nicholson AM, Rutherford NJ, Finch N, Soto-Ortolaza A, Lash J, Wider C, Wojtas A, DeJesus-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.

5) 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.

6) Erblich 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. *PLoS One*. 6:e26317, 2011.

7) 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: 380-97, 2014.

8) Chitu V, Gokhan S, Gulinello M, Branch CA, Patil M, Basu R, Stoddart C, Mehler MF, Stanley ER: Phenotypic characterization of a *Csf1r* haploinsufficient mouse model of adult-onset leukodystrophy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP). *Neurobiol Dis* 74: 219-228, 2015.

9) 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.

10) Konno T, Yoshida K, Mizuta I, Mizuno T, Kawarai T, Tada M, Nozaki H, Ikeda SI,

Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T: Diagnostic criteria for adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia due to *CSF1R* mutation. Eur J Neurol 25:142-147,

2018.

11) Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov

AS, Sunyaev SR: A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat

Methods 7:248-249, 2010.

12) Kumar P, Henikoff S, Ng PC: Predicting the effects of coding non-synonymous variants

on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc 4: 1073-1081, 2009.

13) Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP: Predicting the Functional Effect of

Amino Acid Substitutions and Indels. PLoS ONE 7: e46688, 2012.

14) Baba Y, Ghetti B, Baker MC, Uitti RJ, Hutton ML, Yamaguchi K, Bird T, Lin W, DeLucia

MW, Dickson DW, Wszolek ZK: Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids:

clinical, pathologic and genetic studies of a new kindred. Acta Neuropathol 111: 300-311,

2006.

15) Sundal C, Fujioka S, Van Gerpen JA, Wider C, Nicholson AM, Baker M, Shuster EA,

- Aasly J, Spina S, Ghetti B, Roeber S, Garbern J, Tselis A, Swerdlow RH, Miller BB, Borjesson-Hanson A, Uitti RJ, Ross OA, Stoessl AJ, Rademakers R, Josephs KA, Dickson DW, Broderick D, Wszolek ZK: Parkinsonian features in hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids (HDLS) and *CSF1R* mutations. *Parkinsonism Relat Disord* 19: 869-877, 2013.
- 16) Sundal C, Van Gerpen JA, Nicholson AM, Wider C, Shuster EA, Aasly J, Spina S, Ghetti B, Roeber S, Garbern J, Borjesson-Hanson A, Tselis A, Swerdlow RH, Miller BB, Fujioka S, Heckman MG, Uitti RJ, Josephs KA, Baker M, Andersen O, Rademakers R, Dickson DW, Broderick D, Wszolek ZK: MRI characteristics and scoring in HDLS due to *CSF1R* gene mutations. *Neurology* 79: 566-574, 2012.
- 17) Konno T, Broderick DF, Mezaki N, Isami A, Kaneda D, Tashiro Y, Tokutake T, Keegan BM, Woodruff BK, Miura T, Nozaki H, Nishizawa M, Onodera O, Wszolek ZK, Ikeuchi T: Diagnostic Value of Brain Calcifications in Adult-Onset Leukoencephalopathy with Axonal Spheroids and Pigmented Glia. *AJNR Am J Neuroradiol* 38: 77-83, 2017.
- 18) Guerreiro R, Kara E, Le Ber I, Bras J, Rohrer JD, Taipa R, Lashley T, Dupuits C, Gurunlian N, Mochel F, Warren JD, Hannequin D, Sedel F, Depienne C, Camuzat A, Golfier V, Du Boisguéheneuc F, Schottlaender L, Fox NC, Beck J, Mead S, Rossor MN, Hardy J, Revesz T, Brice A, Houlden H: Genetic analysis of inherited leukodystrophies: genotype-phenotype correlations in the *CSF1R* gene. *JAMA Neurol* 70: 875-882, 2013.

- 19) Kuzmiak HA, Maquat LE: Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 12: 306-316, 2006.
- 20) Lynch DS, Zhang WJ, Lakshmanan R, Kinsella JA, Uzun GA, Karbay M, Tüfekçioğlu Z, Hanagasi H, Burke G, Foulds N, Hammans SR, Bhattacharjee A, Wilson H, Adams M, Walker M, Nicoll JA, Chataway J, Fox N, Davagnanam I, Phadke R, Houlden H: Analysis of Mutations in *AARS2* in a Series of *CSF1R*-Negative Patients With Adult-Onset Leukoencephalopathy With Axonal Spheroids and Pigmented Glia. *JAMA Neurol* 73: 1433-1439, 2016.

図の説明

図 1. *CSF1R* mRNA 及び翻訳されるタンパクドメインと変異部位

同定した変異の位置を矢印で示す。本研究で用いた *CSF1R* に対するリン酸化特異抗体の部位をタンパク上に示した。各ドメインの位置は、UniProt

(<http://www.uniprot.org/uniprot/P07333>) の情報に基づいて図示した。

図 2. *CSF1R* フレームシフト変異の mRNA 発現

(A) NMD を受けると予測されたエクソン 4 (p.P104LfsTer8) におけるフレームシフト変異。変異アリの発現レベルは野生型と比較して著しく減少し、本フレームシフト変異が NMD を来することが示唆された。

(B) エクソン 21 (p.Y886QfsTer55) におけるフレームシフト変異は、新たな終止コドンが *CSF1R* の最終エクソンであるエクソン 22 に存在するため NMD を受けないと予測された。変異アリの発現レベルは野生型と同等であり、NMD は生じないことが示唆された。

図 3. 変異体 *CSF1R* の機能アッセイ

(A) 野生型または変異型 *CSF1R* を一過性発現させた HEK293T 細胞を、10%FBS 含有培地で培養した。ライセイトを回収し、抗 *CSF1R* 抗体 (C-20 及び B-8) を用いて行った免疫ブロットでは、野生型 *CSF1R* と変異型 *CSF1R* とで *CSF1R* の発現レベルは同等だった。 *CSF1R* の C 末端部分を欠く Y886QfsTer55 の変異型 *CSF1R* は、抗 C 末端抗体 (C-20) では検出されなかったが、抗 N 末端抗体 (B -8) では野生型と同

等に検出した。TKD 内の変異体はいずれもリン酸化抗体で検出される CSF1R の自己リン酸化が見られなかった。細胞外ドメインに存在する p.H362R 変異体は、野生型と同等の自己リン酸化が見られた。抗 β アクチン抗体をローディングコントロールとして使用した。

(B) 野生型または変異型 CSF1R を一過性発現させた HEK293T 細胞を用いて CSF1R のリガンド依存性自己リン酸化を検討した。刺激前及び CSF1 刺激後 10 分、20 分、30 分の時点でライセイトを回収した。リン酸化 CSF1R は野生型および p.H362R 発現細胞において同等であった。TKD 内のいずれの変異体もリガンド依存性の CSF1R 自己リン酸化を認めなかった。

(C) 免疫ブロットデータの半定量解析 ($n=3$)。野生型と p.H362R 変異体の間のリガンド依存性自己リン酸化の程度に統計的な有意差は認めなかった (two-way ANOVA)。データは平均 \pm 標準誤差で提示した。

(D) CSF1R のリガンド依存性自己リン酸化。培養細胞を CSF1 (左) または IL-34 (右) で刺激した。リガンド刺激後 20 分で細胞を溶解し、回収した。リン酸化 CSF1R レベルは、野生型と p.H362R の間では同等であったが、TKD 内に変異をもつ CSF1R 変異体ではリガンド依存性の自己リン酸化を認めなかった。

図 4. CSF1R 変異を有する患者の脳 MRI

FLAIR 画像にて大脳白質病変が両側性に認められた。多くは左右対称性であったが、症例 1 では顕著な左右差を認めた。

図 5. *CSF1R* 変異を有する患者の脳 CT

Thin slice CT による微小石灰化像を示した。前頭葉深部白質と頭頂葉深部白質に微小な石灰化が症例 1, 4, 5, 7, 9, 11 において認められた。

図 6. p.P878A 変異を有する ALSP 患者の神経病理学的所見

- (A) 冠状切片による大脳の前頭白質病変.
- (B) Luxol fast blue 染色により大脳白質の脱髄が観察された.
- (C) 前頭葉白質のマクロファージ (CD68).
- (D) 前頭葉白質における軸索スフェロイド (リン酸化ニューロフィラメント).
- (E) 前頭葉皮質における風船様神経細胞 (α B クリスタリン).
- (F) 褐色の顆粒状色素 (矢印) を有する白質のマクロファージ (H&E 染色).
- (G) 白質のマクロファージ中の色素は自己蛍光を示した.

bar in a = 1 cm; bar in b = 200 μ m; bars in c, d, and e = 50 μ m; bars in f and g = 20 μ m

1.

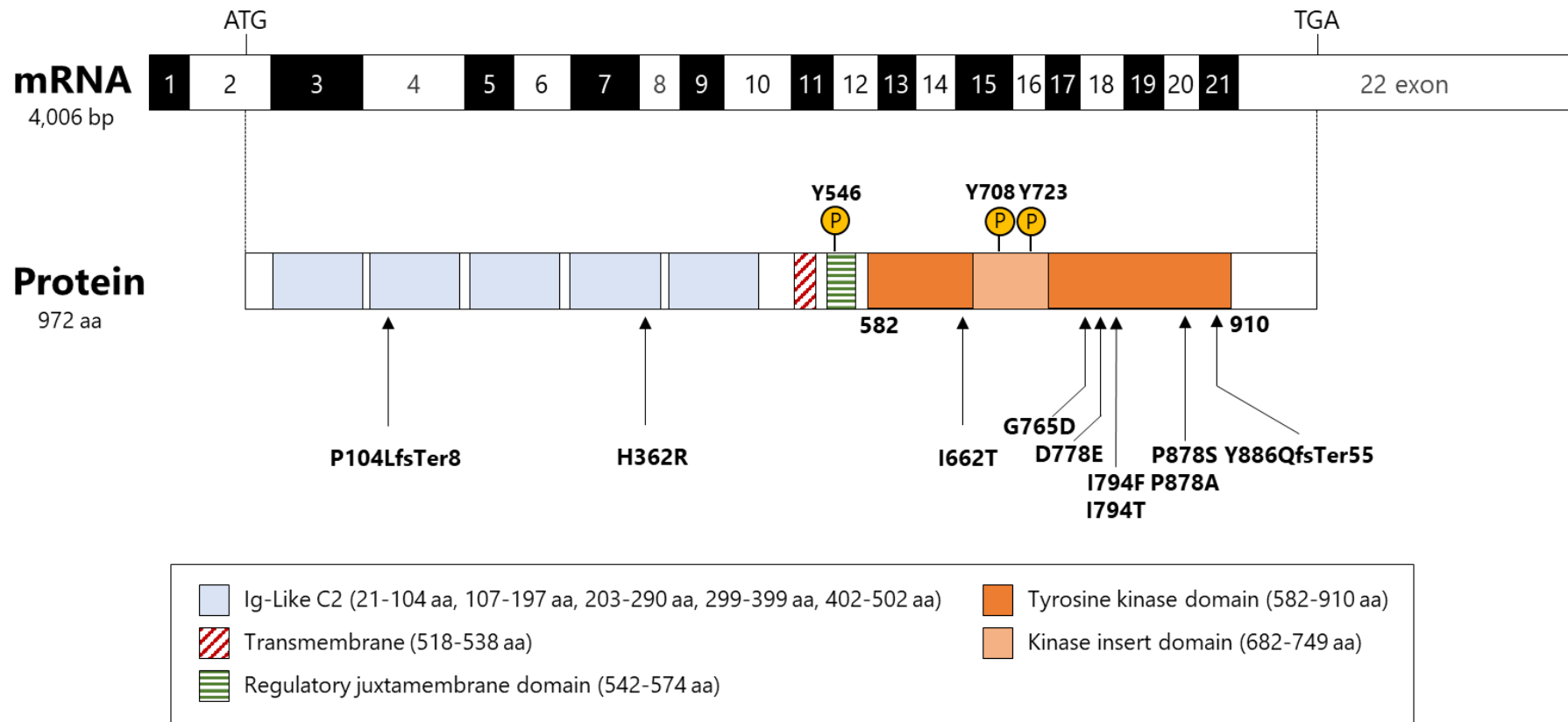
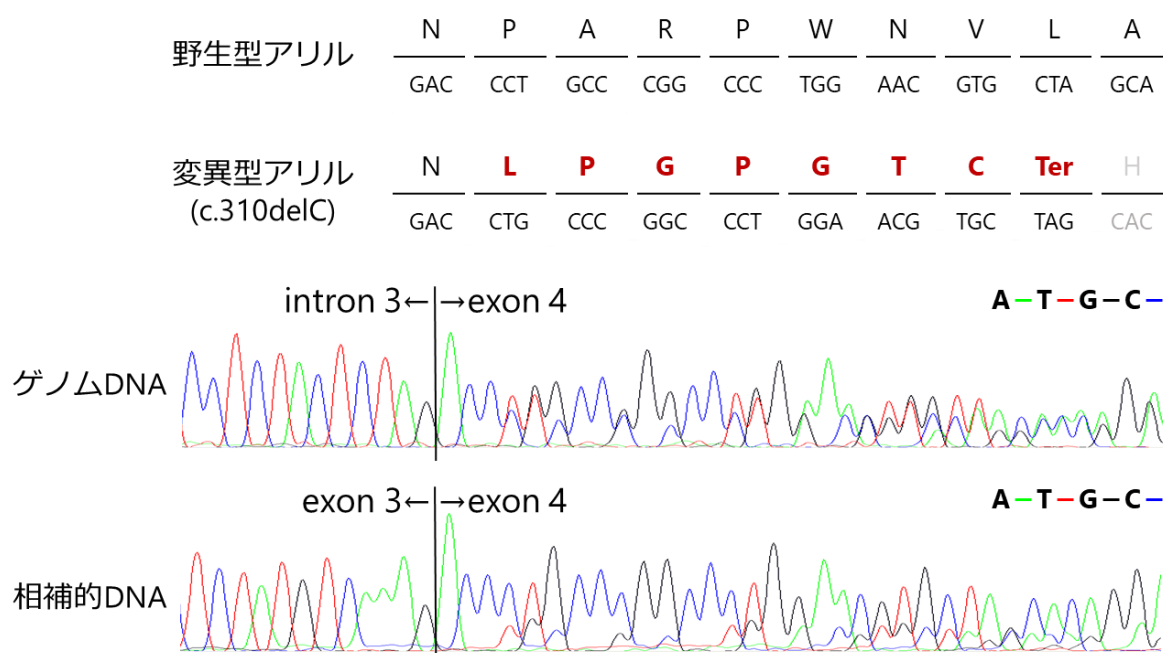


図 2.

A



B

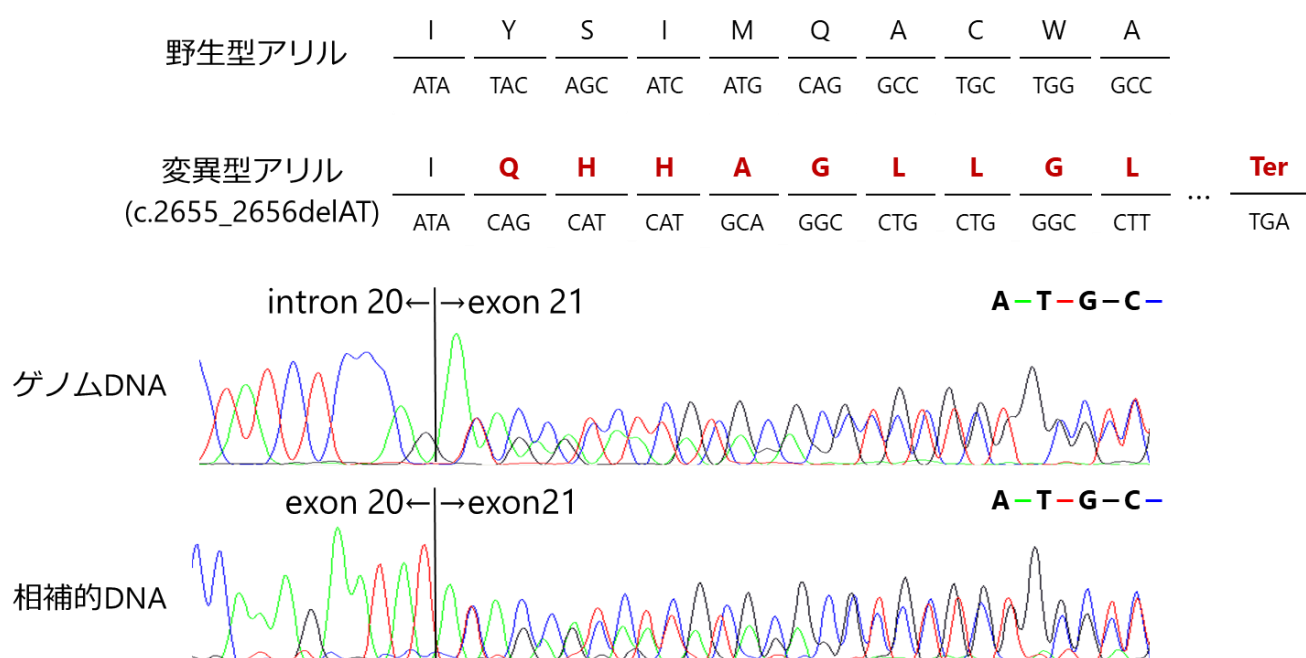
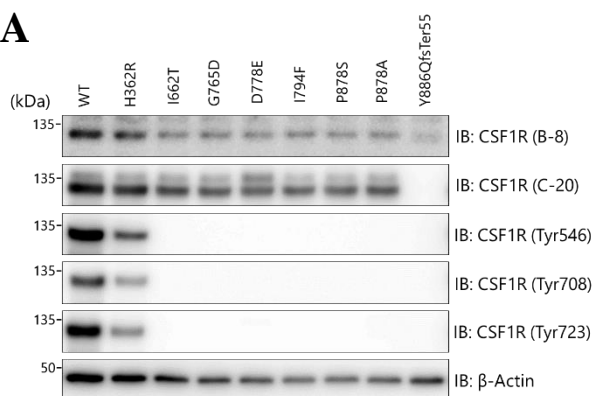
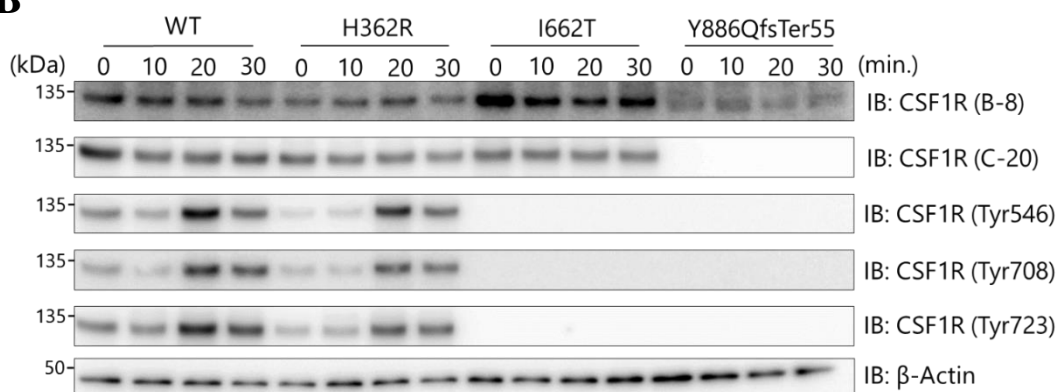


图 3.

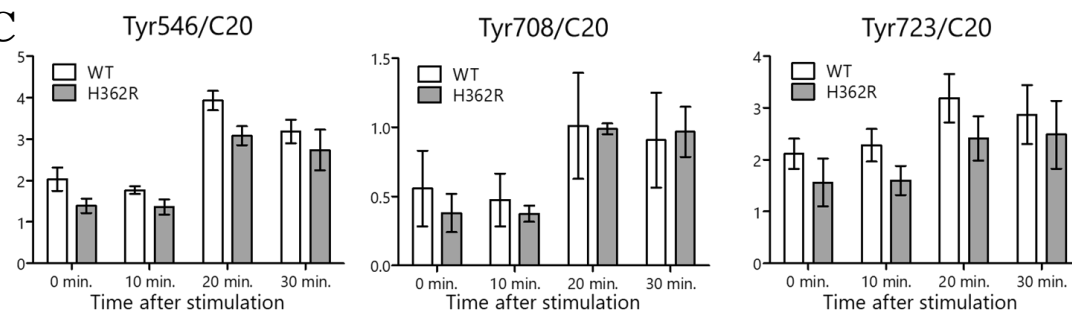
A



B



C



D

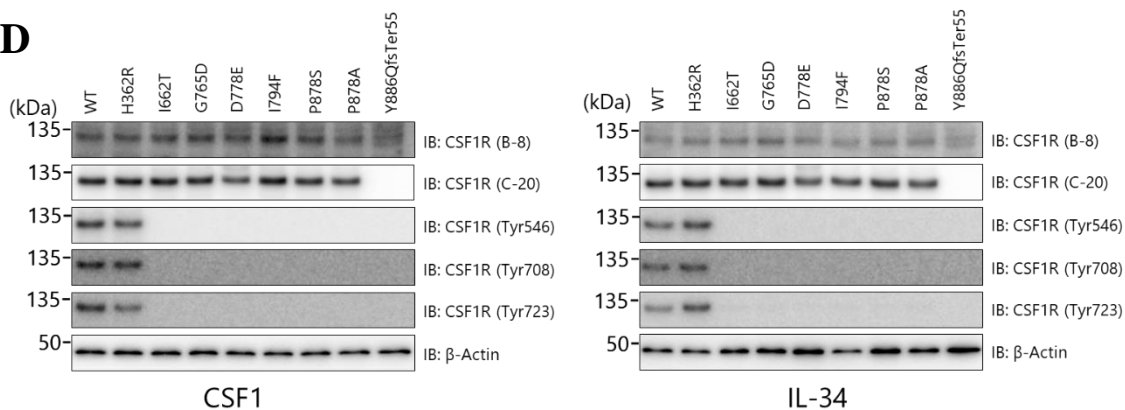


図 4.

症例 1:
p.P104LfsTer8
24 歳, 女性
発症後2年

症例 2:
p.H362R, 本毛接合
29 歳, 男性
発症後4年

症例 3:
p.I662T
46 歳, 男性
発症後6年

症例 4:
p.G765D
47 歳, 男性
発症後3年

症例 5:
p.D778E
66 歳, 女性
発症後6年

症例 6:
p.I794F
57 歳, 男性
発症後1年

症例 9:
p.P878S
55 歳, 男性
発症後6年

症例 10:
p.P878A
62 歳, 男性
発症後5年

症例 11:
p.Y886QfsTer55
46 歳, 男性
発症後1年

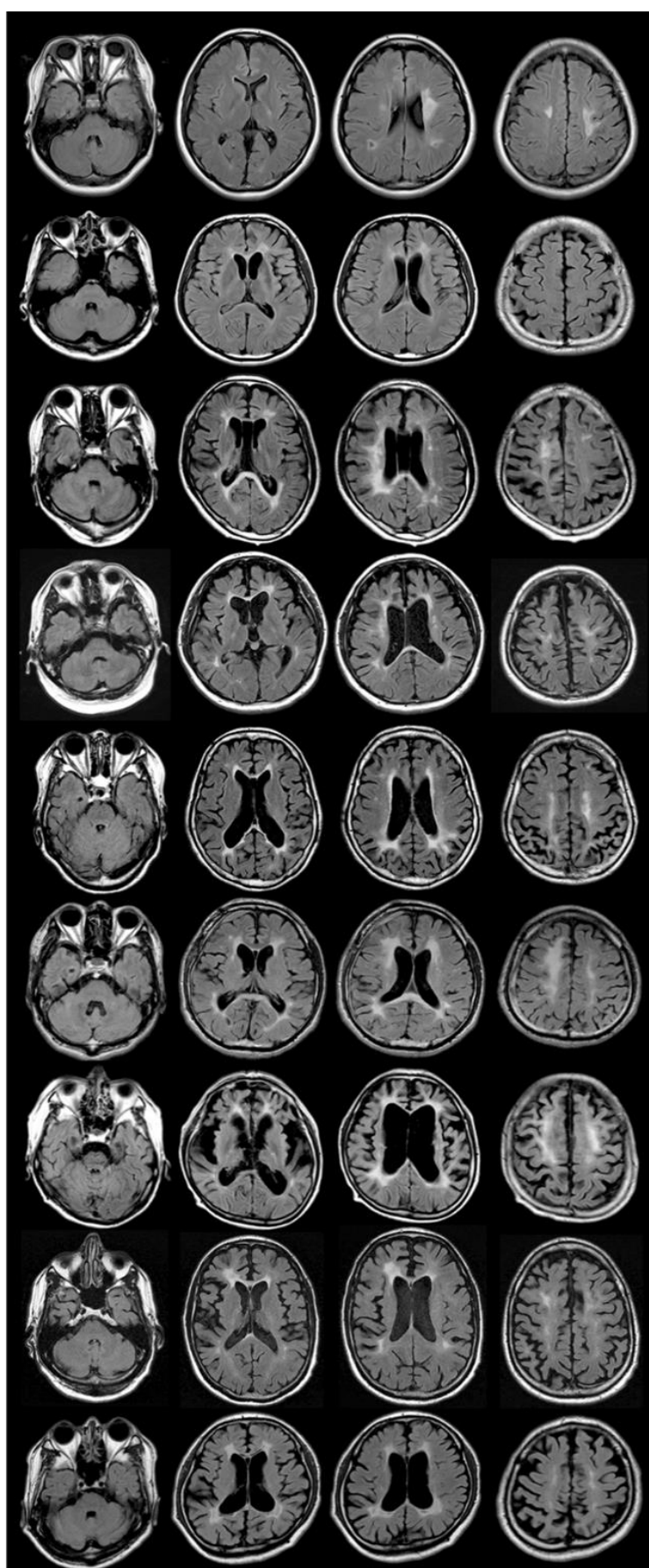


図 5.

症例 1:
p.P104LfsTer8
24 歳, 女性
発症後2年

症例 2:
p.H362R, 木口接合
29 歳, 男性
発症後4年

症例 4:
p.G765D
47 歳, 男性
発症後3年

症例 5:
p.D778E
66 歳, 女性
発症後6年

症例 7:
p.I794T
35 歳, 女性
発症後2年

症例 9:
p.P878S
55 歳, 男性
発症後6年

症例 11:
p.Y886QfsTer55
46 歳, 男性
発症後1年

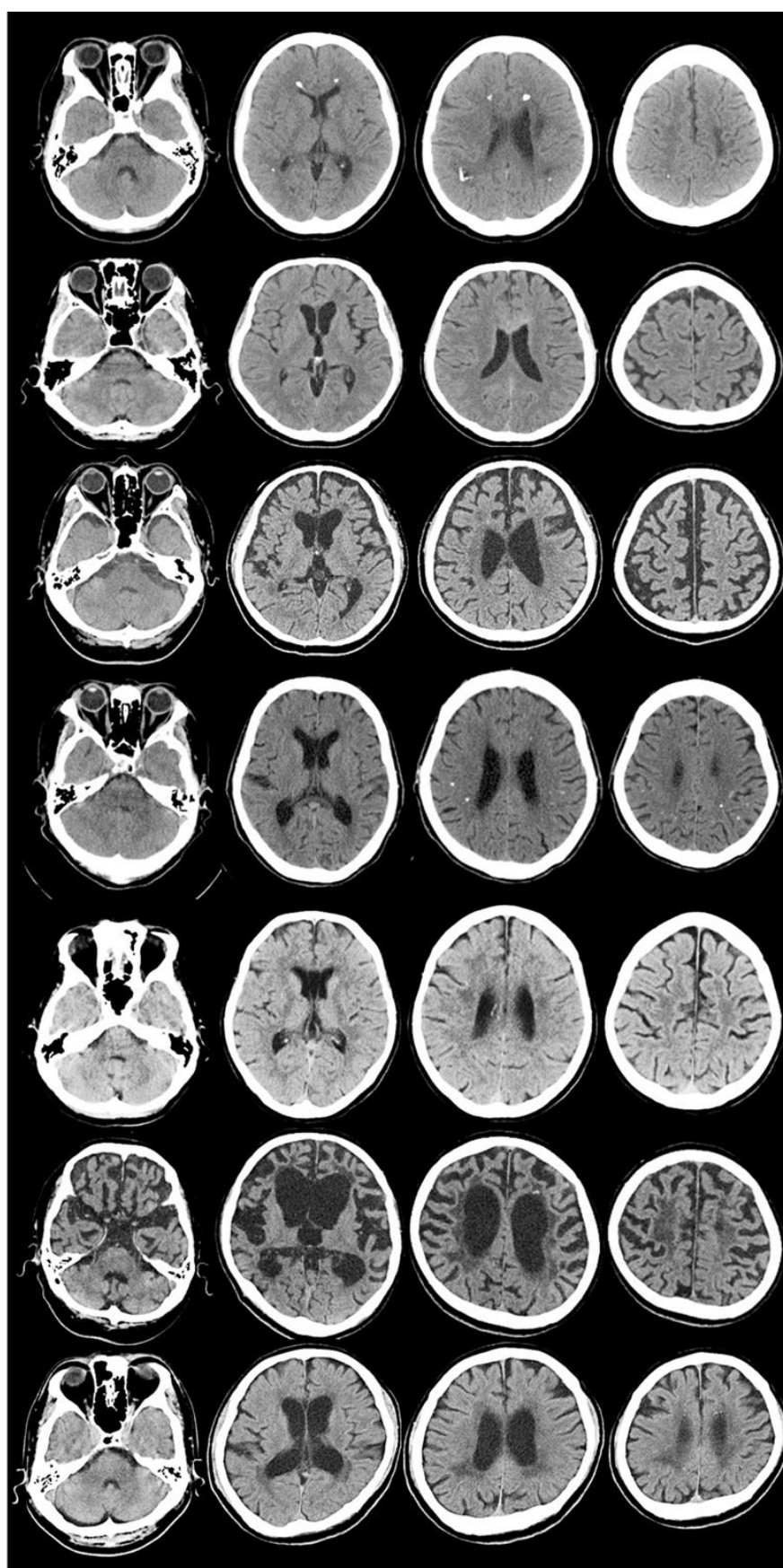


图 6.

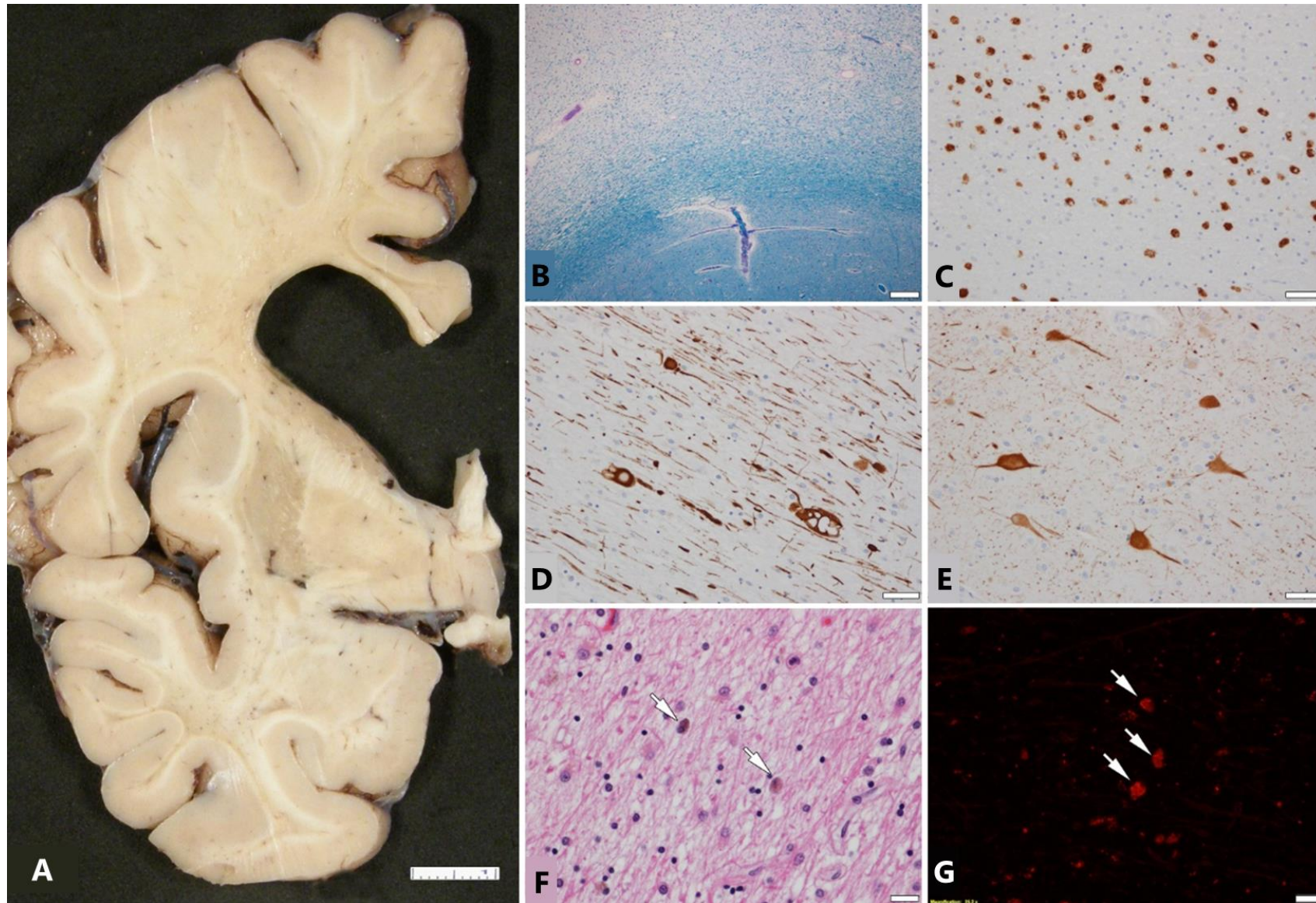


表 1. 本研究において同定した *CSF1R* 変異, 及び位置するドメインと *in silico* 解析の結果

症例	変異	エクソン	存在する ドメイン	rs 番号	ExAC データベース におけるアレル頻度	<i>In silico analysis</i> 解析結果		
						Polyphen-2	SIFT	PROVEAN
1	p.P104LfsTer8 c.310delC	4	Ig-like C2	新規	-	-	-	-
2	p.H362R (homo) c.1085A>G	8	Ig-like C2	rs10079250	0.049 (East Asia 0.364)	0.065 Benign	0.061 Tolerated	-3.36 Deleterious
3	p.I662T c.1985T>C	15	TKD (Proximal)	新規	-	1.000 Probably damaging	0.001 Damaging	-4.28 Deleterious
4	p.G765D c.2294G>A	18	TKD (Distal)	rs690016566	-	1.000 Probably damaging	0.000 Damaging	-5.99 Deleterious
5	p.D778E c.2334C>A	18	TKD (Distal)	新規	-	1.000 Probably damaging	0.000 Damaging	-3.33 Deleterious
6	p.I794F c.2380A>T	18	TKD (Distal)	新規	-	1.000 Probably damaging	0.000 Damaging	-3.33 Deleterious
7, 8	p.I794T c.2381T>C	18	TKD (Distal)	rs281860274	8.95351e-06 (East Asia 0.000)	1.000 Probably damaging	0.000 Damaging	-4.17 Deleterious
9	p.P878S c.2632C>T	20	TKD (Distal)	新規	-	1.000 Probably damaging	0.021 Damaging	-6.44 Deleterious
10	p.P878A c.2632C>G	20	TKD (Distal)	新規	-	1.000 Probably damaging	0.010 Damaging	-6.44 Deleterious
11	p.Y886QfsTer55 c.2655_2656delAT	21	TKD (Distal)	新規	-	-	-	-

ExAC database, <http://exac.broadinstitute.org/>
Polyphen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; SIFT, <http://sift.jcvi.org/>; PROVEAN, <http://provean.jcvi.org/index.php>

表 2. *CSF1R* に変異を同定した症例の臨床的特徴

症例	変異	性別	家族歴	発症年齢	検査時 年齢	初発症状	認知機能 障害	錐体路徴候	パーキンソン 症状	痙攣	臨床診断 基準*
1	p.P104LfsTer8 c.310delC	女	-	22	24	右片麻痺	+	+	-	-	Possible
2	p.H362R c.1085A>G (homozygote)	男	-	25	29	健忘	+	-	+	-	Possible
3	p.I662T c.1985T>C	男	+	40	46	健忘	+	+	-	-	Probable
4	p.G765D c.2294G>A	男	+	44	47	寡動	+	-	+	-	Possible
5	p.D778E c.2334C>A	女	-	60	66	肢節運動失行	+	-	-	-	Possible
6	p.I794F c.2380A>T	男	-	56	57	集中困難	+	+	+	-	Possible
7	p.I794T c.2381T>C	女	-	33	36	右手筋力低下	+	-	-	-	Probable
8	p.I794T c.2381T>C	男	-	43	56	アバシー	+	+	-	+	Probable
9	p.P878S c.2632C>T	男	-	45	55	認知機能低下	+	+	-	+	Probable
10	p.P878A c.2632C>G	男	+	57	62	抑うつ, 不安	+	+	+	-	Probable
11	p.Y886QfsTer55 c.2655_2656delAT	男	-	46	46	見当識障害	+	-	-	-	Possible

* 臨床診断基準¹⁰⁾を各症例に照らし合わせ判定した.