

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	三浦 健
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第 794 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	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
論文審査委員	主査 教授 柿田 明美 副査 教授 竹林 浩秀 副査 教授 小野寺 理

博士論文の要旨

背景と目的

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。ALSP は *CSF1R* 変異を原因とし、既報の病的変異はチロシンキナーゼドメイン (Tyrosine Kinase Domain: TKD) をコードする領域を含むエクソン 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いて *CSF1R* 変異の同定を試み、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。

方法

ALSP の臨床診断基準を満たす 61 症例を対象に *CSF1R* の全てのエクソンについて塩基配列を決定した。同定したフレームシフト変異に対しては、患者末梢血白血球から全 RNA を抽出し、逆転写 (Reverse Transcript: RT)-PCR 解析により、変異アレルの発現レベルを解析した。

新規 *CSF1R* 変異が惹起する病的機序を解析するため、HEK293T 細胞に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) 含有培地で培養した。培養細胞からライセイトを回収し、免疫ブロットにより *CSF1R* の自己リン酸化を検討した。次に、*CSF1R* を一過性発現させた HEK293T 細胞に FBS 非存在下でリガンドである CSF1, IL-34 を添加し、リガンド依存性の *CSF1R* 自己リン酸化を免疫ブロットにより解析した。

CSF1R 変異を有する患者の臨床・画像・病理学的特徴を後方視的に評価した。

結果

CSF1R の遺伝子解析の結果、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。8つの変異は TKD 内に存在した。一方、p.P104LfsTer8 および p.H362R は細胞外ドメインに位置していた。末梢血白血球由来全 RNA を用いた RT-PCR 解析では、

p.P104LfsTer8 変異に由来する変異アリルの発現は、野生型と比較し顕著に低下しており、ナンセンス介在性 mRNA 分解 (nonsense mediated mRNA decay: NMD) が生じていた。

p.Y886QfsTer55 変異アリル由来の mRNA は野生型と同等に発現しており、NMD を受けないものと思われた。

次に、HEK293T 細胞を用いた CSF1R 機能解析を行った。FBS 存在下では野生型 CSF1R 発現細胞ではリン酸化 CSF1R が検出された。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 を発現する細胞では、リン酸化 CSF1R は検出されなかった。p.H362R 変異体は、野生型と同等の自己リン酸化を呈した。FBS 非存在下にリガンド依存性 CSF1R 自己リン酸化を検討し、同様の結果を得た。

最後に、臨床病理学的検討を行った。変異を伴う症例の臨床的特徴として、認知機能低下を全例に認めた。脳 MRI 上の大脳白質病変は全例、両側性にみられた。Thin slice CT が撮影された 7 例中 6 例で前頭葉・頭頂葉深部白質に微小石灰化病変を認めた。p.P878A 変異症例の神経病理学的所見としては、広範な脱髄と神経軸索スフェロイド、色素性マクロファージを認めた。これらの特徴は ALSP の既報例と合致していた。

考察

ALSP の既報の *CSF1R* 変異は TKD をコードする領域を含むエクソン 12~22 に報告されていた。本研究において、TKD 外であるエクソン 4 においてフレームシフト変異 p.P104LfsTer8 を同定した。p.P104LfsTer8 の変異アリル由来の mRNA 発現量が低下しており、CSF1R のハプロ不全が病態機序として想定された。

エクソン 21 において同定したフレームシフト変異 p.Y886QfsTer55 における変異アリルの mRNA 発現量は野生型アリルと同等であった。一方、この変異は TKD 内に存在し、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。したがって、この変異が惹起する病態は CSF1R 介在シグナルの喪失であると考えられる。TKD 内の新規ミスセンス変異はいずれも CSF1R 自己リン酸化が障害されており、既報と同様に CSF1R 介在シグナルの喪失が ALSP 発症に関与すると思われる。

細胞外ドメインに位置する p.H362R バリエントは ExAC データベースにおいても一定の頻度で見出され、培養細胞における機能解析でも野生型と同等の CSF1R 自己リン酸化が検出された。したがって、この症例における白質脳症の原因は、p.H362R 以外に起因するものと考えられる。

結論

ハプロ不全により ALSP を来す *CSF1R* エクソン 4 における新規 *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* の全エクソン配列の解析を考慮すべきである。

審査結果の要旨

本論文は、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) と臨床診断された 61 名の患者を対象に、原因遺伝子 *CSF1R* の全エクソンの塩基配列を決定し、新規変異を同定し、その病原性を解析したものである。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) が同定された。8つの変異はチロシンキナーゼドメイン内に存在していた。一方, p.P104LfsTer8 および p.H362R は細胞外ドメインに位置していた。p.P104LfsTer8 変異アリル由来 mRNA は, 野生型と比較し顕著に低下しており, ナンセンス介在性 mRNA 分解が生じていた。CSF1R のハプロ不全が病態機序として想定された。一方, p.Y886QfsTer55 変異アリル由来の mRNA は野生型と同等に発現していた。培養細胞を用いた機能解析では CSF1R は自己リン酸化を示さず, この変異が惹起する病態は CSF1R 介在シグナルの喪失と考えられた。p.H362R ミスセンスバリエーションは病的変異ではないと考えられた。

本論文は ALSP をきたす新規 *CSF1R* 変異を同定し, ALSP の分子病態機序を理解する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。