

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03571

研究課題名(和文) ミクログリアの本質的機能の破綻を基盤としたHDLS/ALSPの分子病態の解明

研究課題名(英文) Impaired essential function of microglia in the pathogenesis of HDLS/ALSP

研究代表者

池内 健 (Ikeuchi, Takeshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20372469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、一次性ミクログリア病HDLS/ALSPにおいて生じるCSF1R異常を介したミクログリア機能破綻を、培養細胞、剖検脳、患者由来生体試料を用いた多面的アプローチを用いて解析した。CSF1Rを導入した培養HEK細胞におけるCSF1R自己リン酸化依存性シグナル伝達は、変異型CSF1Rでは消失していた。一方、健常人で認められる良性バリエーションCSF1Rのキナーゼ活性は野生型と変わらなかった。CSF1Rキナーゼ活性の程度とCSF1R関連疾患の表現型には有意な相関と認めた。ハプロ不全が主なCSF1R変異病態として考えられ、ミスセンス変異の優性阻害効果の可能性が低いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次性ミクログリア病HDLS/ALSPは脳白質を病変の主座とする希少性神経難病である。根本的な治療法は未確立であり、発症後の症状の進行は速い。HDLS/ALSPの病態は不明な点が多かった。本研究課題では、原因遺伝子CSF1Rがミクログリアにおいて重要な役割を果たしていることに着目し、HDLS/ALSPのミクログリア異常を多面的に明らかにした。この知見を基盤とした、細胞移植療法の検討が進められており、その有効性を示唆する知見が蓄積されている。また、ミクログリアを標的とした治療法は、他の神経疾患にも応用が可能であり、ミクログリアを起点とした種々の神経疾患の病態解明が進むものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In this project, we took a multimodal approach using cultured cells, autopsy brains, and patient-derived biological specimens to investigate microglial dysfunction mediated by CSF1R mutations in HDLS/ALSP, which is caused by an intrinsic defect in microglial function. We showed that CSF1R kinase activity was abolished in cultured cells transfected with mutant CSF1R. In contrast, the kinase activity of the nonpathogenic variant of CSF1R was not different from that of the wild type. Furthermore, we found a significant correlation between the degree of CSF1R kinase activity and ALSP/HDLS phenotypes. Haploinsufficiency is considered to be the main pathogenesis caused by CSF1R mutations, and dominant-negative effects are unlikely.

研究分野：神経内科学

キーワード：ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

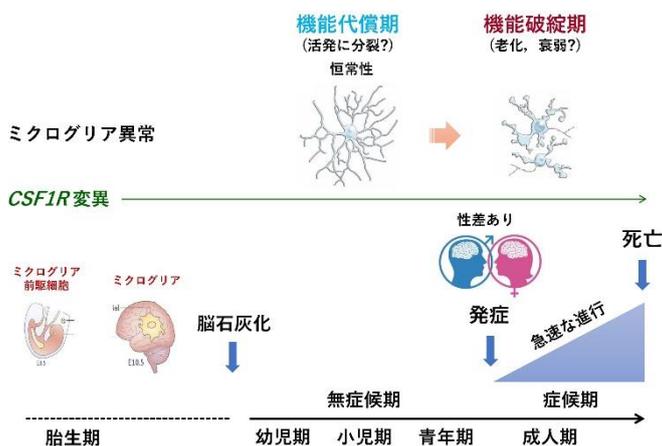
Yolk sac を発生起源とする脳常在性マクロファージであるミクログリアは、脳内で多彩な生理的機能を担っている。定常状態では骨髄から単球系細胞の補充をうけることなく、ミクログリアは脳内で自己複製する。発達期においては、アポトーシスをおこした神経細胞や神経幹細胞を貪食したり、不要なシナプスの刈り込みをミクログリアが担う。成人期においては髄鞘の修復再生、シナプス伝達の調整を行うなど脳内環境の恒常性を保つために活発に活動している。

ミクログリアの異常がさまざまな神経疾患の病態に関与することが明らかにされている。活性化したミクログリアがアルツハイマー病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症の病態を悪化させるという知見が、その例としてあげられる。神経疾患の病態を悪化させるミクログリアは、DAM (disease-associated microglia) と呼ばれる。ミクログリアの機能が一次的に障害されることで発症する一次性ミクログリア病の代表的な疾患として、HDLS (hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroid) / ALSP (adult-onset leukoencephalopathy with spheroids and pigmented glia) がある。HDLS/ALSP は常染色体顕性 (優性) 遺伝性の成人発症・大脳白質脳症であり、臨床的には若年性認知症を呈する。神経病理学的には、広範な大脳白質変性と神経軸索スフェロイドが認められる。HDLS/ALSP の原因遺伝子として CSF1 受容体遺伝子 (*CSF1R*) が同定されている。CSF1 受容体は、中枢神経ではミクログリアに主に発現していることから、HDLS/ALSP とミクログリアの機能異常の関連が推察されている。

HDLS/ALSP 患者において報告されている既報の *CSF1R* のミスセンス変異のほとんどは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のミスセンス変異は、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から、*CSF1R* シグナル伝達不全が ALSP の病態として関与している。機能喪失が生じるナンセンス変異やフレームシフト変異は、チロシンキナーゼ領域とそれ以外の部位にも同定されており、未成熟終止コドンが生じるためナンセンス介在 mRNA 分解が生じるため、*CSF1R* のハプロ不全が病態となる。

HDLS/ALSP の神経病理学的特徴は、神経軸索とミエリン脱落を伴う大脳白質変化である。変性した大脳白質には、軸索が腫大したスフェロイドが認められる。大脳白質変性が生じる前からスフェロイド形成がみられ、大脳白質変性が進むにつれて、スフェロイドの数は減少する。この知見からは、軸索変性が初期イベントであり、ミエリン変性が続発することを示唆している。我々は、先行研究により ALSP 脳ではミクログリアの密度の減少と形態異常が生じることを報告した。ミクログリアは偏在して ALSP 脳に集簇する。形態的には胞体が狭小化し、細胞突起が起始部から細く、多数の結節状の径不同を認める等の変化を認めた。

図1) HDLS/ALSPの病態仮説



これらの分子遺伝学及び神経病理学的所見を考え合わせると、HDLS/ALSP では次のような病態仮説が考えられる。HDLS/ALSP 患者は生来 *CSF1R* 変異を保有しているものの、成人期に至るまではミクログリアは代償的に機能し、臨床症状を呈さない。成人期のある時点で、ミクログリアの代償機能が臨界に達し、大脳白質変性による臨床症状が顕在化する。一旦発症すると、ミクログリアの機能破綻は不可逆的に進行し、それに伴い症状も急速に悪化し、数年の経過で死亡転帰をとる（図 1）。この仮説を実証するためには、HDLS/ALSP の分子病態の多面的な解析が必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、一次性ミクログリア病である HDLS/ALSP において、*CSF1R* 変異により生じる *CSF1R* シグナル不全がミクログリア異常を引き起こす分子機序を多面的に実証することである。

3. 研究の方法

小児発症白質脳症および成人発症大脳白質変性症患者を対象に *CSF1R* 遺伝子解析を行った。*CSF1R* 野生型、ヘテロ接合体変異（ALSP/HDLS）、ホモ接合体変異（小児発症白質脳症）、健常者で認める良性バリエントを培養細胞に発現させ、*CSF1R* チロシンキナーゼ活性をリン酸化特異抗体（pY546, pY708, pY723）を用いて定量した。ヘテロ接合体 *CSF1R* 変異とホモ接合体変異の表現型の比較を図 2 に示した。ミスセンス型 *CSF1R* 変異の優性阻害効果を検討するために、野生型 *CSF1R* を安定発現する細胞に変異型 (p.I794T) *CSF1R* を過剰に発現させ、野生型由来の *CSF1R* キナーゼ活性の変化を検討した。

図2) *CSF1R*ヘテロ変異と両アレル変異

	ヘテロ接合体	両アレル ホモ/複合ヘテロ接合体
遺伝形式	常染色体優性	常染色体劣性
発症年齢	成人期（平均44歳：18～78歳）	胎児期～若年期（0～37歳）
症状	認知機能低下、精神症状、運動症状、けいれん	精神運動発達遅滞、けいれん、骨折
骨変化	なし	頭蓋骨・脊椎硬化、大理石病様変化
脳画像所見	大脳白質変性、脳梁菲薄化、微小石灰化	水頭症、脳内石灰化（高度）、大脳白質変性
神経病理	大脳白質変性、スフェロイド形成	脳形成異常、大脳白質変性、スフェロイド形成
ミクログリア	密度減少、形態異常	ほぼ消失



4. 研究成果

小児発症の白質脳症同胞例において *CSF1R* p.T833M ホモ接合体変異を同定した。血族結婚を認める家系であり、小児同胞発症である。発症年齢は6ヶ月と4歳であった。脳CTでは著明な石灰化を示し、脳MRIでは白質病変を認めた。この変異をヘテロ接合体で有する両親には症状は認められなかった。*CSF1R* p.T833M 変異を発現させた培養細胞では、リガンド依存性に生じる自己リン酸化 (pT723) は低下していた。

健常者に認められる *CSF1R* バリエントのキナーゼ活性は野生型と差を認めなかった。一方、ヘテロ接合体変異（ALSP/HDLS）では *CSF1R* キナーゼ活性が完全消失していた。ホモ接合体変異（小児発症白質脳症）ではキナーゼ活性は減弱しているものの残存していた（図 3）。この所見から、*CSF1R* キナーゼ活性 50%減少により成人発症 ALSP/HDLS を発症するのに対し、*CSF1R* が 50%を超えて残存する場合には発症を免れることが示唆された。このことから、*CSF1R* キナ

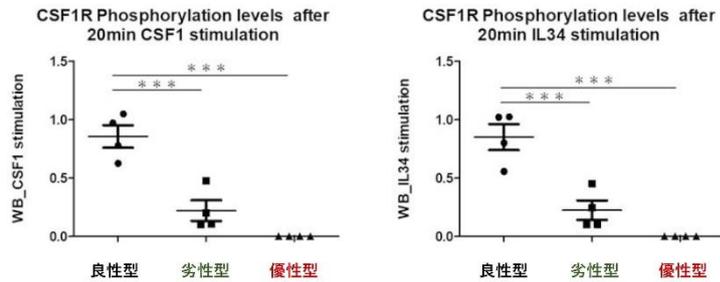
一ゼ活性は、CSF1R 関連疾患の表現型および発症を規定していることが推察された。

野生型 CSF1R を安定発現する培養細胞に変異型 (p.I794T) CSF1R を過剰に発現させたところ、野生型 CSF1R のキナーゼ活性は変化を認めなかった。この結果からは、ミスセンス型 CSF1R 変異は優性阻害効果を示さないことが示唆された。

図3) CSF1受容体キナーゼ活性と表現型

リガンド刺激	野生型	良性	劣性型	優性型
	CSF1Rキナーゼ活性			
CSF1 刺激	100% (対照)	85.6 ± 6.4	22.5 ± 3.4	0.03 ± 0.03
IL-34刺激	100% (対照)	87.1 ± 6.3	24.5 ± 2.2	0.03 ± 0.02

平均 ± 標準偏差



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamhankar PM, Zhu B, Tamhankar VP, Withbawkar SM, Seabra L, Livingston J, Ikeuchi T, Crow YJ.	4. 巻 51
2. 論文標題 Biallelic hypomorphic mutations in CSF1R associated with fatal childhood neurodegeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropediatrics	6. 最初と最後の頁 302-306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0040-1702161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Senzaki S, Miura S, Ochi M, Kato T, Okada T, Matsumoto S, Shiraoka A, Ochi H, Igase M, Kitazawa R, Zhu B, Ikeuchi T, Ohyagi Y	4. 巻 8
2. 論文標題 Sporadic Japanese case of adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia caused by a de novo p.Phe849del mutation in CSF1R.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurology Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 96-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ncn3.12367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawazoe T, Abe K, Ikeuchi T, Miura T, Mezaki N, Tsukamoto T, Takahashi Y	4. 巻 7
2. 論文標題 A sporadic case of young-onset rapidly progressive dementia with a novel frameshift mutation in exon 3 of the CSF1R gene.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 103 - 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ncn3.12259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Funayama M, Sugihara M, Takata T, Mimura M, Ikeuchi T.	4. 巻 2019
2. 論文標題 Remarkable behavioral signs and progressive non-fluent aphasia in a patient with adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia (ALSP)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychogeriatrics	6. 最初と最後の頁 282 - 285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/psyg.12387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 池内 健, 朱 斌	4. 巻 37
2. 論文標題 ミクログリアの機能破綻を原因とする一次性ミクログリオパチー	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2926-2930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 12
2. 論文標題 Adult-onset leukoencephalopathy with axonal spheroids and pigmented glia: review of clinical manifestations as foundations for therapeutic development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers Neurology	6. 最初と最後の頁 788168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2021.788168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 池内 健
2. 発表標題 中枢性希少難病に対するミクログリアを標的とした新規治療アプローチ
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池内 健
2. 発表標題 神経軸索スフェロイド形成をともなう遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS) の画像と病理
3. 学会等名 第61回日本神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池内 健
2. 発表標題 一次性的マイクログリア病の病態から考えるマイクログリアを標的とした治療の可能性
3. 学会等名 第63回日本神経化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池内 健
2. 発表標題 一次性的マイクログリア病：病態研究の進歩と新規治療法
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 朱 斌, Liu Lixin, 樋口 陽, Yusran Ady Fitrah, 三浦 健, 目崎直実, 原 範和, 月江珠緒, 今野卓哉, 春日健作, 宮下哲典, 池内 健
2. 発表標題 CSF1RバリエーションのキナーゼアッセイによるCSF1R関連脳症の発症機序解明
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 今野卓哉, 野崎洋明, 池内 健, 小野寺理	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 82-88
3. 書名 Annual Review神経2019	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今野 卓哉 (Konno Takuya) (20837372)	新潟大学・脳研究所・助教 (13101)	
研究分担者	三浦 健 (Miura Takeshi) (10838329)	新潟大学・脳研究所・非常勤講師 (13101)	
研究分担者	目崎 直実 (Mezaki Naomi) (30838404)	新潟大学・脳研究所・非常勤講師 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関