

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860704

研究課題名(和文)マクロファージコロニー刺激因子受容体遺伝子異常による若年性認知症の病態解明

研究課題名(英文)A study of the pathomechanism in early-onset dementia due to macrophage colony stimulating factor receptor gene mutations.

研究代表者

福島 和広 (FUKUSHIMA, Kazuhiro)

信州大学・医学部・特任准教授

研究者番号：10421835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症(Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroid: HDLS)はコロニー刺激因子1受容体(colony stimulating factor 1 receptor: CSF1R)の遺伝子異常により引き起こされる若年性の認知症性疾患である。剖検脳の検討によりHDLS脳ではCSF1Rのタンパク発現の低下が起きている可能性が示唆された。また患者末梢血単核球の解析では、CSF-1およびIL-34刺激によるマクロファージの誘導・生存が障害されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids (HDLS) is characterized by early-onset cognitive dysfunction caused by mutations in the colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene. We performed biochemical examinations on autopsied brains from patients with HDLS. Our results suggests decreased protein expression of CSF1R in HDLS brain. In analysis of peripheral blood mononuclear cells from HDLS patients suggests impaired induction and survival of macrophages under stimulation with CSF-1 and IL-34.

研究分野：神経内科学

キーワード：HDLS コロニー刺激因子1受容体

1. 研究開始当初の背景

神経軸索スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症 (Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroid: HDLS) は、精神症状と認知機能障害を主徴とする疾患である。一般には常染色体優性遺伝形式を呈するが、孤発例も存在する。40~50歳代に発症し、数年の経過で無為・寝たきりの状態となるが、有効な治療は確立されていない。病理学的には神経細胞の軸索変性が特徴であり、スフェロイドと呼ばれる特異な球状構造物を認める。画像検査で大脳萎縮と白質の異常信号を認める。

診断には生検や剖検による病理学的な検討が必要であり確定診断が困難であったが、2012年に本疾患におけるコロニー刺激因子1受容体 (Colony stimulating factor 1 receptor: CSF1R) の遺伝子変異が報告され ()、生前に遺伝学的診断が可能となった。この報告を受け、研究代表者らは脳生検にて病理学的に診断されていた自験例の遺伝子解析を行い、本症における CSF1R 変異を国内で初めて報告した ()。また、全国医療機関からの依頼による遺伝子解析を開始し、de novo 変異例 () を含め5家系を見出した。

CSF1R はサイトカインの一つであるコロニー刺激因子1 (Colony stimulating factor 1: CSF1) の受容体であり、主に単球系細胞に発現する膜貫通型蛋白である。脳ではミクログリアに発現しており、CSF1R シグナルはミクログリアの分化、増殖や移動に関与することが知られている。当施設が遺伝子変異を同定した家系では既報告の変異も含め、すべての変異が CSF1R の細胞内チロシンキナーゼドメインのコード領域に局在しており、本症では CSF1R の細胞内チロシン残基のリン酸化が阻害され、その下流の細胞内シグナルの変化が発症に関与するものと推測された。

また、大脳白質変性症と骨病変を主徴とする常染色体性劣性遺伝性疾患である那須ハコラ病 (Nasu-Hakola disease: NHD) では、ミクログリアおよび破骨細胞に発現する DNAX-activating protein of 12 kD (DAP12) Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) の遺伝子変異が原因となることが知られている。HDLS と NHD の2疾患は、ともにミクログリア異常症であり、神経病理学的にも類似している。CSF1R は DAP12 と共に β -catenin の安定化と核内移行を促進することが示唆されており ()、HDLS や NHD では共にこの過程の障害が白質脳症の発症機構に関与する可能性を推測した。

2. 研究の目的

HDLS の発症機構の一端を明らかにするため、本疾患における CSF1R シグナルの異常を明らかにすることを目的とし、HDLS 患者の剖検で得た脳組織、患者から提供された末梢血単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を用い CSF1R シグナル伝達に

関連するタンパク、遺伝子発現の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) HDLS 剖検脳における CSF1R, Wnt/ β -catenin シグナル関連分子の検討

本疾患はミクログリアに発現する CSF1R のチロシンキナーゼドメインをコードする領域の遺伝子変異により引き起こされる。本疾患と NHD の類似性から、遺伝学的に HDLS と診断された患者剖検脳を用いて、CSF1R, Wnt/ β -catenin シグナル関連分子のタンパク発現を検討した。

(2) HDLS 患者単球を用いた誘導マクロファージの検討

CSF1R はミクログリアを始め全身諸臓器の単球系細胞にも発現し、その機能に重要な役割を果たしていることが知られる。そのため患者マクロファージの検討は本症に特徴的な CSF1R のシグナル伝達異常の手がかりとなりうる。HDLS 患者および健常者から採取した PBMC から、磁気ビーズ法により CD14 陽性細胞 (単球) を分取した。これらを CSF1R のリガンドである CSF1 および IL-34、また CSF2R のリガンドである CSF2 の存在下でマクロファージに分化させ、細胞形態の検討および免疫組織学的検討、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動の解析を行った。

(3) CSF1R 遺伝子導入 COS 細胞を用いた検討

(1)(2)において当初見込まれた患者由来の試料 (剖検脳検体および PBMC) の充分量の確保が困難であったことから、当施設の遺伝子診断で明らかにした5種類の CSF1R 変異を、細胞内シグナルの解析等の目的でアフリカミドリザル腎臓由来 COS 細胞に導入し検討を行った。ヒト CSF1R の cDNA を含むプラスミドを用い、インビトロ突然変異誘発を用いて目的とする変異の導入を行った。これらが大腸菌にて増幅後精製し、野生型および変異 CSF1R プラスミドをポリエチレンイミン試薬を用いた方法で COS 細胞へ導入し検討を行った。

4. 研究成果

(1) HDLS 剖検脳における CSF1R, Wnt/ β -catenin シグナル関連分子の検討

HDLS 患者剖検脳 (4例) では対照と比較し CSF1R の蛋白発現が著しく低下していた。定量的 PCR 法でも CSF1R の遺伝子発現は HDLS 群で減少傾向を示した。本疾患の大脳においては CSF1R の蛋白発現が低下している可能性があり、病態を反映したものと考えられる。一方、Wnt/ β -catenin シグナル関連分子のタンパク量には対照群と HDLS 群間において一定の変化の傾向を見いだせなかった。これらのシグナル分子が病態の一端に関与している可能性はあるが、剖検脳標本においては死因疾患や死後変化の影響が避けられない

点や、ミクログリアに限定した解析ではない点の問題と考えられた。

(2) HDLS 患者単球を用いた誘導マクロファージの検討

健常者ボランティア 2 例 (40 歳男性、54 歳女性) から採取された単球の培養では、CSF1、IL-34、および CSF2 の存在下いずれにおいても通常の形態の培養マクロファージを得たが、HDLS 患者 2 例 (44 歳男性、58 歳女性) から採取された単球の培養においては、CSF1 および IL-34 存在下では、培養日数を経るごとに細胞密度の減少を認め、通常の spindle form あるいは round form の細胞の出現は認められず、不整な形態を呈するごく少数の小型の細胞のみが見られた。

また、HDLS 単球においても、CSF2 存在下では、健常者と比較すると少数ではあるが spindle form のマクロファージの出現が認められた。これらの細胞においては健常者から得られた細胞と比較して CSF1R と CD163 の免疫染色性が低下していた。

HDLS 患者の末梢血単球では CSF1R シグナル異常により CSF1 および IL-34 添加、さらに CSF2 添加によるマクロファージへの分化・生存が障害されている可能性が推測された。

HDLS 患者 1 例および健常者 1 例から得られた PBMC を用い、単球および CSF1 添加で分化させたマクロファージを用いたマイクロアレイ法による遺伝子の発現変動解析を行った。

(3) CSF1R 遺伝子導入 COS 細胞を用いた検討

免疫組織化学法を用いて、CSF1R タンパクが培養細胞に発現していることを確認した。現在、野生型と各変異型、および CSF1 添加による CSF1R 刺激の有無の条件下で、主要なシグナル伝達分子に関して抗体アレイキットを用いて継続中である。また(2)のマイクロアレイ法で発現変動が示唆された遺伝子に関して定量的 PCR 法による解析を進めている。

(今後の展望)

今後、本疾患に特徴的な細胞内シグナル伝達異常やタンパク発現が同定できれば、病態解明への貢献が期待できる知見となりうる。

<引用文献>

Rademakers R, Baker M, Nicholson AM, et al. Mutations in the colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R) gene cause hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids. Nat Genet 2012;44:200-5.

Kinoshita M, Yoshida K, Oyanagi K, et al. Hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids caused by R782H mutation in CSF1R: Case report. J Neurol Sci 2012;318:115-8.

Kondo Y, Kinoshita M, Fukushima K, Yoshida K, et al. Early involvement of the corpus callosum in a patient with hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids carrying the de novo K793T mutation of CSF1R. Intern Med. 2013; 52:503-6.

McVicar DW, Trinchieri G. CSF-1R, DAP12 and beta-catenin: a ménage à trois. Nat Immunol. 2009;10:681-3.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kinoshita M, Kondo Y, Yoshida K, Fukushima K, Hoshi K, Ishizawa K, Araki N, Yazawa I, Washimi Y, Saitoh B, Kira J, Ikeda S. Corpus callosum atrophy in hereditary diffuse leukoencephalopathy with neuroaxonal spheroids: an MRI-based study. Intern Med 53 (1): 21-27, 2014. 査読あり.

[学会発表](計7件)

近藤 恭史, 木下 通亨, 長崎 園望, 福島 和広, 吉田 邦広, 池田 修一. 白質異常症における CSF1R 変異陽性・陰性例の臨床・脳画像所見の検討. 第 56 回日本神経学会学術大会. 2015 年 5 月 21 日, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市).

福島 和広, 近藤 恭史, 松嶋 聡, 木下 通亨, 星 研一, 矢彦沢 裕之, 吉田 邦広, 池田 修一. 腫大軸索を伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS) 患者の単球由来マクロファージの検討. 第 55 回日本神経学会学術大会. 2014 年 5 月 23 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).

小林 千夏, 近藤 恭史, 木下 通亨, 中村 勝哉, 福島 和広, 吉田 邦広, 池田 修一. 若年性認知症を呈する HDLS, CADASIL, Fabry 病の脳画像の特徴. 2014 年 5 月 23 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市).

吉田 邦広, 木下 朋実, 近藤 恭史, 木下 通亨, 福島 和広, 浅川 美果, 鈴木 絵美, 上原 弥生, 池田 修一, 小柳 清光. 軸索腫大を伴う遺伝性びまん性白質脳症の SPECT 所見とその神経病理学的背景. 第 32 回日本認知症学会学術集会. 2013 年 11 月 8 日, キッセイ文化ホール (長野県松本市).

木下 通亨, 近藤 恭史, 福島 和広, 吉

田 邦広, 星 研一, 矢澤 生, 鷺見 幸彦, 齋藤 万有, 吉良 潤一, 池田 修一. 軸索腫大を伴う遺伝性白質脳症(HDLS)の脳梁萎縮に関する脳画像の定量的検討. 第 54 回日本神経学会学術大会. 2013年6月1日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区).

近藤 恭史, 木下 通亨, 福島 和広, 吉田 邦広, 星 研一, 池田 修一. 軸索腫大を伴う遺伝性白質脳症(HDLS)の CSF1R 遺伝子変異と脳画像所見の対比. 第 54 回日本神経学会学術大会. 2013年6月1日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区).

福島 和広, 近藤 恭史, 木下 通亨, 吉田 邦広, 矢澤 生, 小柳 清光, 池田 修一. 腫大軸索を伴う遺伝性白質脳症(HDLS)剖検脳を用いた CSF-1R シグナル伝達分子の検討. 第 54 回日本神経学会学術大会. 2013年5月31日), 東京国際フォーラム(東京都千代田区).

6. 研究組織

(1)研究代表者

福島 和広(FUKUSHIMA, Kazuhiro)
信州大学・医学部・特任准教授
研究者番号: 10421835

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

吉田 邦広(YOSHIDA, Kunihiro)
信州大学・医学部・特任教授
研究者番号: 90242693

(4)研究協力者

木下 通亨(KINOSHITA, Michiaki)
諏訪赤十字病院・神経内科・医師

近藤 恭史(KONDO, Yasufumi)
信州大学・医学部・助教(特定雇用)

松嶋 聡(MATSUSHIMA, Akira)
鹿教湯三才山リハビリテーションセンター
鹿教湯病院・神経内科・医師