

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591257

研究課題名(和文) NIIDの次世代シーケンサーを用いた病因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of NIID causative gene with next generation sequencer

研究代表者

曽根 淳(Sone, Jun)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：40513750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：家族性NIID家系2家系および孤発性NIIDについて、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析および全エクソン解析を行なった。得られたvariant情報をもとに、MERLINソフトウェアを用いた連鎖解析を行ったところ、以前行ったマイクロサテライトマーカーを用いた解析とほぼ一致した結果が得られた。この領域にNIIDの原因遺伝子が存在することはほぼ間違いないと結論した。最終的には原因遺伝子の同定には至らなかったものの、継続して検討する必要があると考えられた。また、近年認知症を主症状とした孤発性NIID例が増加してきており、研究に組み込むとともに皮膚生検により診断が可能であることを論文発表した。

研究成果の概要(英文)：We studied Exome and Whole Genome sequence of 2 familial NIID pedigrees and sporadic NIID cases. We performed Linkage analysis with MERLIN software and obtained almost same result of Linkage analysis with micro satellite markers. We concluded that causative gene of NIID must be exist within this position. We did not find out NIID causative gene, however, we have to study many subjects continuously to find NIID causative gene finally. Besides, the number of sporadic NIID cases exhibiting dementia is growing recently and we include more sporadic NIID cases in our study, and report in the paper that sporadic NIID cases also diagnosed by skin biopsy.

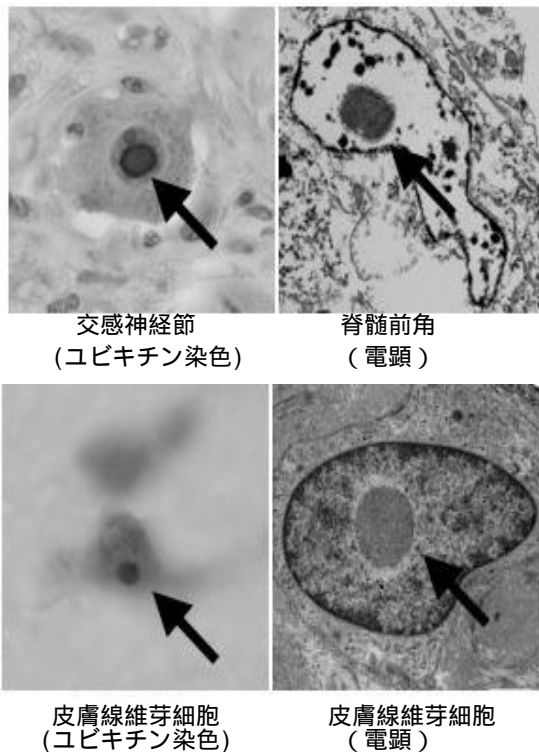
研究分野：神経内科学

キーワード：NIID 核内封入体 皮膚生検 次世代シーケンサー 連鎖解析

### 1. 研究開始当初の背景

Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID:エオジン好性核内封入体病)は、H&E 染色標本にて、エオジン好性に染色される核内封入体が、中枢神経系および末梢神経系の細胞核に広く出現し、様々な程度で神経細胞が脱落することを特徴とする神経変性疾患である。当時、文献報告は約 40 例に過ぎず<sup>1)2)3)</sup>、小脳失調、精神発達遅滞、記憶力障害、錐体路障害、錐体外路障害、全身性痙攣発作、自律神経障害など多岐にわたる症状が緩徐に進行性し、最終的には四肢麻痺、臥床状態に至る。多様な臨床症候を示すために、生前診断は困難とされてきたが、2011 年、我々は皮膚生検組織から NIID の診断が可能である事を発見し報告した<sup>4)5)</sup>(図 1)ため、NIID と診断される患者数が飛躍的に増加する可能性が見込まれていた。

図 1 : NIID で認められる核内封入体(矢印)



本疾患の病態は不明であるため、原因遺伝子を明らかにすることが重要であった。我々は、NIID 2 家系の遺伝子サンプルでマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイドな連鎖解析を行ない、その候補領域を、Lod Score 4.96 を示す 20Mb の領域に絞り込んでいた。

我々の NIID 家系内には、Quartet の DNA が 3 家族分揃っており、さらに候補領域が既に 20Mb に絞り込まれているため、次世代シーケンサーを用いた解析により、この領域を一気に解析することによって、原因遺伝子同定を進めることができると考えられた。

### 2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いた遺伝子配列解析を行うことにより NIID 例の遺伝子配列を決定する。家系内で Quartet で DNA サンプルが採取できている家族について、その遺伝子配列を、発症者および非発症者の間で比較検討する事によって、発症者にのみ認められる遺伝子変異部位を抽出する。最終的に NIID の原因遺伝子を同定する。病因遺伝子同定後は、当該の変異遺伝子産物を高発現する培養細胞モデルを作出し、その遺伝子産物の生理学的な機能の解析、結合蛋白の解析、細胞活性に与える影響、遺伝子変異によって起こる病態、核内封入体の形成過程の解明、タンパク質発現の検討など、NIID の病態解明、さらには治療法の開発につながる研究を推進する。

### 3. 研究の方法

我々は NIID の原因遺伝子が存在する候補領域をヒトゲノム上の 20Mb の領域に見だし、Lod Score 4.96 を得ているため、Illumina 社製の次世代シーケンサーである HiSeq 2000、および Agilent 社製の SureSelect キットを活用する事で迅速に多サンプルの遺伝子配列を広い領域にわたって解読する。そして、得られた遺伝子配列を、ゲノムインフォマティクスの技術を活用しながら、case-control 間で比較検討する事によって原因遺伝子を同定する。並行して、ここ数年、頭部 MRI DWI 画像で特徴的な所見を示し、認知症を呈する NIID 症例が増加していることから、皮膚生検を用いてこれらの新規の NIID 診断症例を蓄積し、順次遺伝子解析および皮膚生検切片を用いた病理学的な解析に組み込む。原因遺伝子の同定後は、同定した遺伝子産物の抗体を作製し、抗ゴビキチン抗体との免疫蛍光二重染色などの技術を用いて、原因遺伝子産物の生理的機能、病原性、封入体構成機構などを分子生物学的に検討する。また、原因遺伝子を用いた NIID 細胞モデル、あるいは動物モデルを作出し、神経変性過程の詳細な分子機構の解析を行い、新規治療法の探索を目指す。

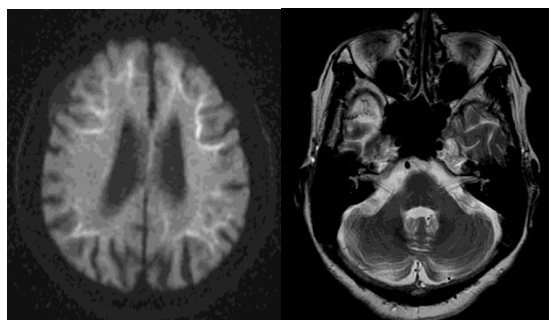
### 4. 研究成果

常染色体優性遺伝形式を示した NIID 家系 2 家系について、DNA サンプルを収集した上で、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析および全エクソン解析を行ない、得られた遺伝子の配列解析を行なった。全ゲノムおよびエクソーム解析により得られた variant 情報をもとに、MERLIN ソフトウェアを用いて、連鎖解析を再度行った。以前行っていたマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析により、Lod Score 4.96 を示す 20Mb の領域が、NIID 原因遺伝子が存在する候補領域として得られていたが、それと、ほぼ一致した結果が得られ、Lod Score 5 程度の高知を示すほぼ同じ範囲の領域を同定できた。

これにより、二つの異なった遺伝子配列解析および連鎖解析方法にて、ほぼ同じ領域に NIID 原因遺伝子の存在が強く疑われる結果が得られたこととなったため、この Lod Score 高値を示す 20Mb の領域に、NIID の原因遺伝子が存在することはほぼ間違いないと結論した。これらの解析により、20Mb の領域の中の特定の領域に、NIID の原因遺伝子が存在する可能性が高いと見込まれた為、それらの領域に存在する遺伝子の産物に対する抗体を用いて、NIID 剖検組織サンプルを用いた免疫染色での検討を行った。皮膚生検組織についても免疫染色を行ったが、最終的には原因遺伝子の同定には至らなかったものの、さらに今後継続して検討する必要があると考えられた。

また、ここ数年の間に、認知症を主症状とし、頭部 MRI 画像上で白質脳症を呈し、DWI 画像で皮髄境界に高信号を呈するといった、特徴的な画像所見が認められる孤発性 NIID の診断例が、皮膚生検を活用することで増加してきており、家族性 NIID 例と同様に、ゲノムおよび免疫組織学的検討に組み込み、平行して解析を行うとともに、孤発性 NIID についても、家族性 NIID と同様に皮膚生検により診断が可能であることを論文にて発表した。

認知症を呈した NIID 例の頭部 MRI 画像



さらに、今まで行ってきたゲノム解析データを、再度パイオインフォマティクスのデータを用いて詳しく検討し直すことを行った。特に、一塩基変異である SNV が原因遺伝子変異ではない可能性にも検索の範囲を広げ、検討を進めた結果、現時点で有望な候補領域をいくつか同定している。Repeat 配列の延長が疾患の原因と成っている可能性も考慮し、

連鎖解析で得られた候補領域内の Repeat 配列について、PacBio シークエンサーなどの最新型の次世代シークエンサーを用いた解析についても情報収集を行った。これらの解析、情報収集の結果、今までは short read タイプの次世代シークエンサーのみを用いた解析を行っていたため、今後は long read タイプの次世代シークエンサーでのさらなる検討が必要であると考えられた。

#### 参考文献

- 1) Woulfe JM. Abnormalities of the nucleus and nuclear inclusions in neurodegenerative disease: a work in progress. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007; 33.
- 2) Sone J et al. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease showing motor-sensory and autonomic neuropathy. *Neurology* 2005; 65.
- 3) Takahashi-Fujigasaki J. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease. *Neuropathology* 2003;23.
- 4) Sone J et al. Skin biopsy is useful for the antemortem diagnosis of neuronal intranuclear inclusion disease. *Neurology* 2011; 76:1372-1376.
- 5) K. Josephs. Neuronal intranuclear inclusion disease No longer a pain in the butt. *Neurology* 2011; 76:1368-1369.

#### 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2件)

Sone J, Kitagawa N, Sugawara E, Iguchi M, Nakamura R, Koike H, Iwasaki Y, Yoshida M, Takahashi T, Chiba S, Katsuno M, Tanaka F, Sobue G. Neuronal intranuclear inclusion disease cases with leukoencephalopathy diagnosed via skin biopsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014 Mar; 85(3): 354-6. (査読有り)

Kitagawa N, Sone J, Sobue G, Kuroda M, Sakurai M. Neuronal intranuclear inclusion disease presenting with resting tremor. *Case Rep Neurol*. 2014 28; 6(2): 176-80. (査読有り)

[学会発表](計16件)

- 1) 曽根淳: 皮膚生検により診断した Neuronal intranuclear inclusion disease 15 例の検討. 第 33 回日本認知症学会学術集会. 2014.12/1, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

- 2) 曾根 淳: 皮膚生検による Neuronal intranuclear inclusion disease の診断について. 第 32 回日本神経治療学会総会. 2014.11/22, 東京ドームホテル(東京都文京区)
- 3) Jun Sone: Antemortem diagnosis of Neuronal intranuclear inclusion disease. Neuroscience 2014. 2014.11/19. Washington convention center. (Washington, U.S.A)
- 4) Nakamura Ryouichi, Jun Sone: Analysis of major amyotrophic lateral sclerosis genes in Japan. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2014.10/21. San Diego convention center. (San Diego, U.S.A)
- 5) Jun Sone: Strategy to discover new ALS causative genetic variants in Japanese ALS patients. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2014.10/21. San Diego convention center. (San Diego, U.S.A)
- 6) Jun Sone: Clinical feature of 19 cases of Neuronal intranuclear inclusion disease diagnosed by skin biopsy. XVIII International Congress of Neuropathology. 2014.9/15. Sheraton Rio Hotel. (Rio de Janeiro, Brazil)
- 7) 曾根 淳: 皮膚生検により診断した Neuronal intranuclear inclusion disease 18 例の臨床学的特徴. 第 55 回日本神経学会総会. 2014.5/24, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
- 8) 曾根 淳: Neuronal intranuclear inclusion disease の病態解析. 次世代遺伝子解析技術を用いた希少難治性疾患の原因究明及び病態解明に関する研究班平成 25 年度 班会議 2013 年 12 月 13 日, 鹿児島大学鶴陵会館 (鹿児島県鹿児島市)
- 9) 曾根 淳: Neuronal intranuclear inclusion disease 皮膚生検による診断について. 第 41 回 臨床神経病理懇話会, 2013.11.17, 愛知医科大学 (愛知県長久手市)
- 10) 曾根 淳: Neuronal intranuclear inclusion disease の生前診断. 第 24 回日本末梢神経学会学術集会, 2013.8.23, 朱鷺メッセ (新潟県新潟市)
- 11) 曾根 淳: Neuronal intranuclear inclusion disease の原因遺伝子探索. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013.5.30, 東京国際フォーラム (東京都千代田区)
- 12) 曾根 淳: 皮膚生検による Neuronal intranuclear inclusion disease の診断. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会, 2013.4.2, タワーホール船堀(東京都江戸川区)
- 13) 曾根 淳: 皮膚生検により診断した Neuronal intranuclear inclusion disease の症例. 第 135 回日本神経学会東海北陸地方会, 2013 年 3 月 16 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- 14) 田中 章景: Neuronal intranuclear inclusion disease の原因遺伝子探索. 次世代遺伝子解析技術を用いた希少難治性疾患の原因究明及び病態解明に関する研究班 平成 24 年度 班会議, 2012 年 12 月 7 日, 鹿児島大学鶴陵会館 (鹿児島県鹿児島市)
- 15) 曾根 淳: Neuronal intranuclear inclusion disease - 皮膚生検による診断および原因遺伝子の探索. 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- 16) 田中 章景: Toward identifying the causative gene of neuronal intranuclear inclusion disease (NIID): 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 21 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurology/research/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

曾根 淳 (SONE, Jun)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号: 40513750

### (2) 研究分担者

小池 春樹 (KOIKE, Haruki)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 80378174

田中 章景 (TANAKA, Fumiaki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 30378012

(2013 年 7 月まで分担研究者)

### (3) 連携研究者

森下 真一 (MORISHITA, Shinichi)  
東京大学・新領域創成科学研究科・教授  
研究者番号：90292854

菅野 純夫 (SUGANO, Sumio)  
東京大学・新領域創成科学研究科・教授  
研究者番号：60162848