

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2015～2017
課題番号：15K09312
研究課題名(和文) NIID(エオジン好性核内封入体病)の病態の解明および原因遺伝子探索

研究課題名(英文) Investigation of clinical picture and causative gene of NIID

研究代表者
曽根 淳(Sone, Jun)
名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：40513750
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：NIID症例を、皮膚生検所見、頭部MRI所見から診断し、臨床情報、ゲノムサンプルを蓄積した。
平成29年度末までに、孤発性NIID80例以上、家族性NIID症例を24例以上蓄積した。また、国内外の神経関連の各学会にて、上記の成果について発表するとともに、国内の専門誌にNIIDについての総論を執筆し、疾患概念の啓発に努めた。
NIID原因遺伝子の探索に関しては、連鎖解析、次世代シーケンサーを用いたエクソームおよび全ゲノム解析に加えて、ロングリードの解析可能なPACBIO RS II シーケンサーを用いて解析を行った。今後、大きなゲノム構造変化を含めた包括的なゲノム解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：We diagnosed NIID cases from skin biopsy findings and head MRI findings, and clinical information and genomic samples were accumulated.
By the end of 2017, over 80 sporadic NIID and 24 cases of familial NIID were accumulated. In addition, at each academic conference in Japan and abroad, we announced the above results and also wrote the review on NIID in domestic journals and enlighten the concept of NIID.
Regarding the search for NIID causative genes, we have pursued whole genome analysis using Pacbio sequencer in addition to linkage analysis, exome and whole genome analysis using the next generation sequencer. We now compares with the sequence data of Pacbio of the normal control sample and examines the data.

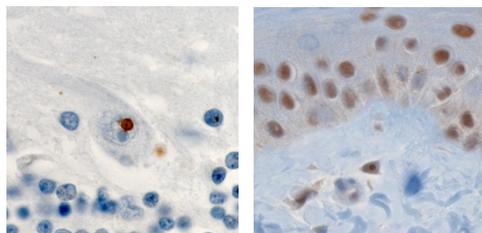
研究分野：神経内科学

キーワード：核内封入体 白質脳症 皮膚生検 DWI 認知症 末梢神経障害 自律神経障害

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、抗ユビキチン抗体を用いた免疫染色によりこれらの核内封入体が陽性に染色され、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¹⁾²⁾³⁾。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、我々が皮膚生検組織からNIIDの診断が可能である事を発見し報告して⁴⁾⁵⁾(図1)以降、NIIDと診断される患者数が飛躍的に増加してきた。特に、頭部MRI画像上で、白質脳症を呈しDWI(Diffusion weighted image)画像にて、大脳の皮髄境界が高信号を呈するといった特徴的な所見を呈し、認知症を初発とする症例が次々と報告されてきていた(図2)⁶⁾⁷⁾。NIIDの文献報告は散発的な症例報告のみにとどまっていたため、本疾患の自然歴、病態は不明であり、疾患としての位置づけも不明な点が多いままとなっていた。皮膚生検を活用しNIID症例を多数蓄積した上で、病態を明らかにするとともに、原因遺伝子を明らかにすることが求められていた。

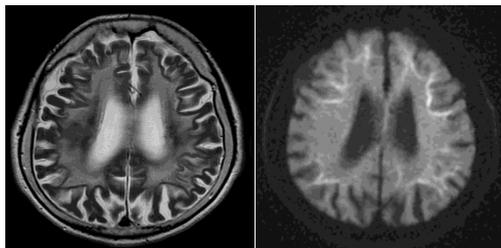
図1: NIIDで認められる核内封入体



プルキンエ細胞
(ユビキチン染色)

皮膚線維芽細胞
(ユビキチン染色)

図2: 認知症を呈したNIID例の頭部MRI画像



T2画像

DWI画像

2. 研究の目的

近年、高齢発症の認知症で発症し、頭部MRI検査で白質脳症を呈するNIID例が多数報告されるようになってきたが、このようにNIIDが臨床的に疑われる患者に対し、皮膚生検を施行し、NIID診断例を蓄積する。学会発表などを通じて、疾患概念および皮膚生検の有用性の啓蒙を並行して行いながら、多数のNIID症例の臨床情報を蓄積し、自然歴を含めた病態を明らかにする。また皮膚生検

組織とともに剖検組織、および遺伝子についても蓄積し、以前より推進しているNIID家系例の原因遺伝子探索研究と同じ手法を用いて、次世代シーケンサーを用いた解析を軸に、NIID原因遺伝子の探索を進める。

3. 研究の方法

国内外の学会、論文発表等を通じて、皮膚生検がNIIDの診断に有効である事を広く啓蒙し、臨床症状および画像所見などからNIIDが疑われる症例については、皮膚生検による診断を考慮して頂くように各医療施設に依頼する。皮膚生検により得られた皮膚サンプルを送付して頂き、パラフィン包埋切片を作成、抗ユビキチン抗体を用いた免疫染色、免疫蛍光染色での検討、さらにエポキシ包埋標本を作成した上で電子顕微鏡での検討を行い、線維芽細胞、汗腺細胞、脂肪細胞にユビキチン陽性の核内封入体が同定される事を根拠に、NIIDの診断を行なう(図1)。このようにして日本全国から、NIID症例を広く集めることによって、細かな神経所見、および検査異常などの臨床データを蓄積、多数例での解析を行ない、NIIDの病態および自然歴を明らかにする。

これと並行して、皮膚生検など病理学的にNIIDと診断が確定した例について、DNAサンプルを収集し、NIIDの原因および病態についてゲノム解析からも解析を進める。すでに行っている連鎖解析の結果Lod Scoreが高値を示す領域に重点を絞って、次世代シーケンサーを活用してデータ解析を進める。特に近年発展が著しい、ロングリードの解析可能な次世代シーケンサーである、Pacific Bioscience社PACBIO RS IIシーケンサーを用いた解析を行うことによって、今までの次世代シーケンサーでは不可能であった1000bpを超えるロングリードによる解析を行ない、大きなゲノム構造変化を含めた包括的なゲノム解析を進める。これらの次世代シーケンサー解析で得られた結果について、NIID患者由来の配列と、正常対象由来の配列、および既にデータベース上に公開されているヒト正常遺伝子配列、SNP配列の情報などといったゲノムインフォマティクスの情報を活用し、お互いに比較検討する事によって、NIIDを引き起こす原因遺伝子を同定する。特に家系例については、各家族構成員の中において、発症者と非発症者の間で、遺伝子配列を比較検討し、発症者にのみ認められる遺伝子変異を抽出する。

4. 研究成果

国際神経学会、アメリカ神経学会などといった海外の学会を含め、国内外の主要な神経内科学、神経病理学、認知症などの学会にてNIIDに関する発表を精力的に行った。主なもののみで14回であるが、神経学会地方会など全てを含めると、その倍近くにのぼった。これらの学会活動の結果、全国の医療施設

から NIID の診断について多くの症例をコンサルトしていただいた。H30 年 3 月時点で、孤発性 NIID 97 例、家族性 NIID 21 例となっている。これだけ多くの症例数が集まっている NIID のコホートは海外でも類を見ず、NIID 研究の領域では随一となっている。これらの症例について、臨床症状、経過、頭部画像所見、検査結果などについて精査を行い、成人発症の NIID の臨床像を明らかにした。その結果、孤発性 NIID では高齢発症のもの忘れを主訴に受診する場合が 97% 近く、発症年齢は平均で 63.6 才であった。もの忘れ以外では、縮瞳が 94% で認められたほか、失調を約 50%、遷延する意識障害を 39%、膀胱直腸障害を 33% で認めた。全身性痙攣も 13% で認められた。また、意識障害、発熱、頭痛および嘔吐を呈する亜急性の脳炎様の症状を約 20% の症例で認めた。これらの症状以外には、振戦、筋固縮、四肢筋力低下、感覚障害、異常行動が認められた。検査結果では、頭部 MRI DWI 画像で皮髄境界の異常高信号領域をすべての症例で認めており、T2 画像上白質脳症を 97% で認めた。髄液検査では、髄液蛋白の上昇が 65% の症例で認められ、神経伝導速度検査異常（伝導速度遅延、もしくは振幅の低下）を 97% の症例で認めた。高次脳機能検査では、MMSE で 24 点以下に低下していた例が 53% であったのに対し、FAB での低下を認めた例が 94% とより高頻度で認められ、NIID での高次脳機能低下を検出するには FAB の方がより鋭敏である可能性が示唆された。一方、家族性 NIID では、もの忘れを初発症状とする群と、四肢筋力低下を初発とする群との 2 群が存在し、さらに両方の症状を併せ持つ症例も認められた。筋力低下群では発症年齢が 27.5 歳と低い傾向があり、もの忘れ群では 53.2 歳と、孤発例の平均年齢により近かった。高頻度に認められた症候としては、四肢筋力低下が 100%、感覚障害 80%、膀胱直腸障害 66% で認められた。遷延する意識障害も 25% で認められ、全身性痙攣、脳炎様症状もまれながら認められた。白質脳症は 70% で認められ、DWI 高信号を認めたのは 75% であった。髄液蛋白上昇は 33%、NCV 異常は 83% で認められた。これらの結果から、NIID 診断フローチャートを考案し、これらの研究成果とともに Brain 誌⁸⁾ に投稿した(図 3)。

図 3 成人発症 NIID 診断フローチャート

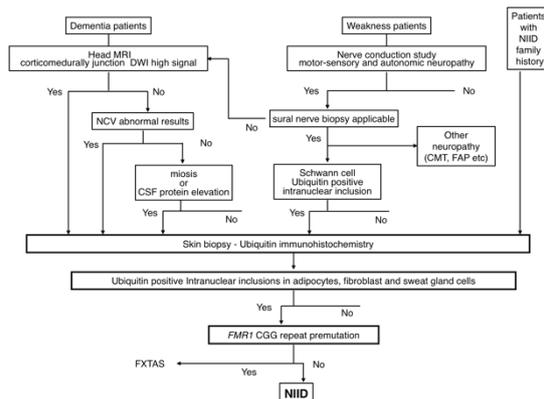
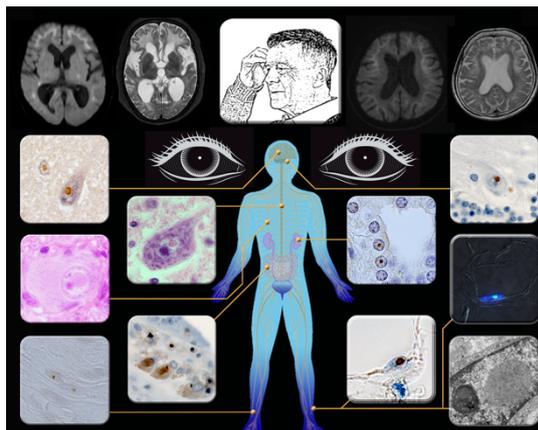


図 4 Brain 誌 139(12) の表紙に採用された NIID のイラスト



Brain 誌では、NIID のイラストが表紙として採用された(図 4)。

また、遺伝子解析については、既に常染色体優性遺伝形式をとる NIID 2 家系について、発症者 15 名のうち 8 名について次世代シーケンサーを用いたエクソームおよび全ゲノム解析を行ない、得られたデータを用いて連鎖解析を行った結果、ヒトゲノム上 20Mbp の領域に、原因遺伝子の存在領域を絞り込んでいるため、新たな NIID 症例の DNA サンプルを順次これらの解析に組み込み、解析を行った。ロングリードの解析可能な次世代シーケンサーである、PACBIO RS II シーケンサーを用いて、シーケンス解析を行った。今までの次世代シーケンサーでは不可能であった 1000bp を超えるロングリードによるデータが得られたため、今後、大きなゲノム構造変化を含めた包括的なゲノム解析が必要である。

<引用文献>

- 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) Sone J et al. Neuronal intranuclear inclusion disease cases with leukoencephalopathy diagnosed via skin biopsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014 Mar; 85(3): 354-6
- 6) Toyota T et al. Neuronal intranuclear inclusion disease manifesting with new-onset epilepsy in the elderly. *Neurology and Clinical Neuroscience* 2015, 3(6), 238-240.
- 7) Sakurai T et al. Sporadic adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease with the main presentation of repeated cerebellar ataxia: a case

study. Rinsho Shinkeigaku: 2016, 56(6), 439-43.
8) Sone J et al. Clinicopathological features of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease. Brain 2016, 139(12), 3170-3186.

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 12 件)

- 1) Sone J et al. Reply: Neuronal intranuclear (hyaline) inclusion disease and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: a morphological and molecular dilemma. Brain. 査読有 2017, 140(8), e52-e52, DOI: 10.1093/brain/awx158
- 2) 吉本武史, 高松和弘, 倉重毅志, 曾根淳, 祖父江元, 栗山勝 家族発症と思われる成人発症神経核内封入体病の姉妹例 BRAIN and NERVE – 神経研究の進歩 査読有 2017, 69(3), 267-274, DOI: 10.11477/mf.1416200737
- 3) 徳永隆司, 西村裕之, 立花久大, 曾根淳, 祖父江元. 発症後 10 年以上経過観察し得た神経核内封入体病の 1 例. 神経内科 2017 査読有 86(2), 251-254
- 4) 曾根淳, 祖父江元 Neuronal Intranuclear Inclusion Disease (NIID) エオジン好性核内封入体病 BRAIN and NERVE – 神経研究の進歩. 査読無 2017, 69(1), 5-16, doi: 10.11477/mf.1416200628.
- 5) 曾根淳 Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID) の臨床症候と画像所見 Dementia Japan. 査読無 2017, 31(1), 18-23.
- 6) Yamada W, Takekoshi A, Ishida K, Mochizuki K, Sone J, Sobue G, Hayashi Y, Inuzuka T, Miyake Y. Case of adult-onset neuronal intranuclear hyaline inclusion disease with negative electroretinogram. Documenta Ophthalmologica. 査読有 2017, 134(3), 221-226, DOI: 10.1007/s10633-017-9584-z
- 7) 曾根淳 エオジン好性核内封入体病 Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID) の臨床病理学的多様性. 自律神経. 査読有 53(4), 2016, 280-282.
- 8) 曾根淳, 祖父江元. 神経核内封入体病総論. 神経内科 査読無 85(6), 2016, 585-593

9) Sone J, Mori K, Inagaki T et al. Clinicopathological features of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease. Brain 2016, 査読有 139(12), 3170-3186: DOI: 10.1093/brain/aww249.

- 10) Yokoi S, Yasui K, Hasegawa Y, Niwa K, Noguchi Y, Tsuzuki T, Mimuro M, Sone J, Watanabe H, Katsuno M, Yoshida M, Sobue G. Pathological background of subcortical hyperintensities on diffusion-weighted images in a case of neuronal intranuclear inclusion disease. Clinical neuropathology, 査読有 35(6), 2016, 375-380. DOI: 10.5414/NP300961
- 11) Araki K, Sone J, Fujioka Y et al. Memory Loss and Frontal Cognitive Dysfunction in a Patient with Adult-onset Neuronal Intranuclear Inclusion Disease. Internal Medicine. 査読有 55(16), 2016, 2281-4.
- 12) Tomoko Toyota, Zhe Huang, Souhei Nohara, Kazumasa Okada, Shingo Kakeda, Yukunori Korogi, Toshiyuki Nakayama, Jun Sone, Gen Sobue, Hiroaki Adachi. Neuronal intranuclear inclusion disease manifesting with new-onset epilepsy in the elderly. Neurology and Clinical Neuroscience. 査読有 3(6), 2015. 238-240.

[学会発表] (計 14 件)

- 1) Sone J et al. CLINICAL PRESENTATION AND DIAGNOSIS OF NEURONAL INTRANUCLEAR INCLUSION DISEASE. XXIII World Congress of Neurology. 2017
- 2) 曾根淳 成人発症 Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID) の診断 flowchart 第 58 回日本神経病理学会総会学術研究会 2017.
- 3) Sone J, et al. Diagnostic flowchart of adult onset neuronal intranuclear inclusion disease. American Academy of Neurology annual meeting 2017. 2017.
- 4) 曾根淳 成人発症 Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID) の臨床症候 第 35 回日本認知症学会学術集会 2017
- 5) 曾根淳 成人発症 Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID) の臨床病理像 第 106 回日本神経学会近畿地方会 2017.
- 6) 曾根淳 成人発症 Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID)

の臨床症候 第 57 回日本神経病理学会総
会学術研究会 2017.

- 7) 曾根 淳 Neuronal intranuclear
inclusion disease (NIID) の臨床症候 第
57 回日本神経学会学術大会 2016
- 8) Sone J et al. Clinical Manifestations of Adult
Onset Neuronal Intranuclear Inclusion
Disease Cases Presenting
Leukoencephalopathy. American Academy
of Neurology annual meeting 2016. 2016.
- 9) R Nakamura, J Sone, N Atsuta et al.
COMPREHENSIVE GENETIC
SCREENING OF 28 ALS-RELATED
GENES IN A JAPANESE ALS COHORT.
26th International Symposium on ALS/MND.
2015.
- 10) 曾根淳 白質脳症の鑑別診断と治療. 第
33 回日本神経治療学会総会. 2015
- 11) 曾根淳 エオジン好性核内封入体病
(Neuronal intranuclear inclusion
disease; NIID) の臨床病理学的多様性.
第 68 回日本自律神経学会総会. 2015
- 12) 曾根 淳 Neuronal Intranuclear
Inclusion disease (NIID). 第 34 回日本
認知症学会学術集会. 2015
- 13) 曾根淳 Clinical features of 32 cases
of Neuronal intranuclear inclusion
disease diagnosed by skin biopsy. 第
56 回日本神経病理学会総会学術研究会.
2015
- 14) 曾根淳 Clinical feature of 24 cases of
sporadic Neuronal intranuclear
inclusion disease. 第 56 回日本神経学
会総会 2015

[図書] (計 1 件)

- 1) 曾根淳 中外医学社 **Annual Review
神経** 2018. 2018. 344 (97-106).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾根 淳 (Sone, Jun)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号 : 40513750

(2) 研究分担者

祖父江 元 (Sobue, Gen)

名古屋大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号 : 20148315

中村 亮一 (Nakamura, Ryouichi)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号 : 80723030