

神経核内封入体病(NIID)の病態解明および原因遺伝子同定

国立病院機構鈴鹿病院 脳神経内科
第二脳神経内科医長 曾根 淳

(共同研究者)

愛知医科大学加齢医科学研究所 教授 吉田 眞理
横浜市立大学 神経内科・脳卒中医学 教授 田中 章景
国立病院機構 鈴鹿病院 臨床研究部長 南山 誠

はじめに

神経核内封入体病 (Neuronal intranuclear inclusion disease : NIID) は、共通する病理組織学的な特徴に基づいて提唱されてきた疾患である。H&E染色標本にて、エオジン好性に染色される異常な核内封入体が、中枢神経系および末梢神経系、さらには一般臓器の細胞核に広く出現し、抗ユビキチン抗体あるいは抗p62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)。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、我々は家族性NIID家系例の検討から、皮膚生検がNIIDの生前診断に有効であることを報告し⁽³⁾、さらに2014年には、孤発性NIIDに関しても同様に皮膚生検がNIIDの診断に有効であることを報告した⁽⁴⁾。以降、NIIDと診断される患者数が飛躍的に増加してきている。特に、頭部MRI画像上で、白質脳症を呈しDWI (Diffusion weighted image) 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、認知症を初症状とする症例が次々と報告されている⁽⁵⁾。厚生労働省は、2025年には、全国の認知症有病者数が約700万人に達すると推計している。認知症患者に対する根本的な治療法開発が喫緊の課題となっており、NIIDと診断される認知症患者が飛躍的に増加している事を考慮すると、NIIDの病態および原因の解明、そして治療法の開発が重要となっているのは明らかであるため、我々は、NIIDの原因遺伝子探索研究に着手した。

結 果

我々は、先行研究として、剖検および皮膚生検にて組織学的にNIIDと診断された2家系のサンプルを用いて、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析の結果、第1染色体上の広い領域でLOD Score 4前後を示す領域を同定していた (図1)。この領域を精査するために、次にショートリード型の次世代シーケンサー (Illumina HiSeq 4000など) を用いて全エクソンおよび全ゲノム解析を行い、主に一塩基多型の検索を網羅的に行った

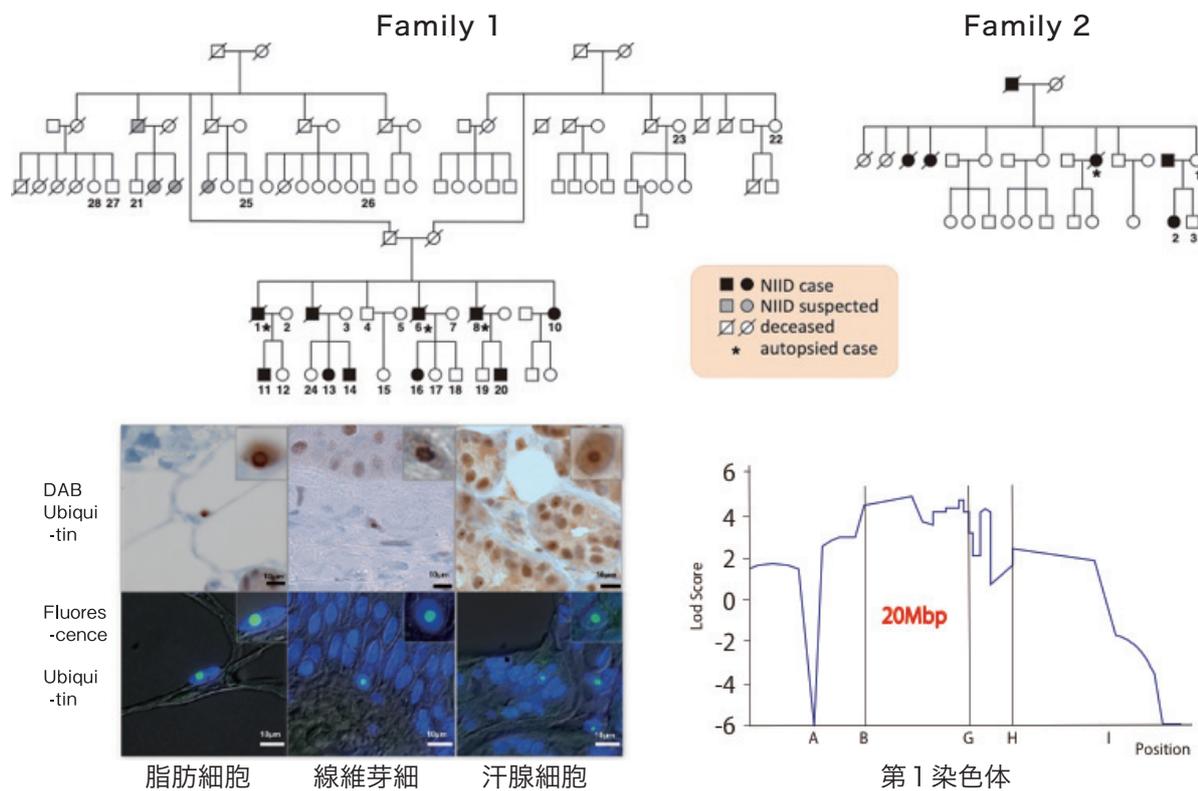


図1：連鎖解析を行った家系図と皮膚生検所見、および Lod Score
 第一染色体上に Lod Score 4 以上を示す部位が広範囲に認められた。

が、NIID患者にのみ共通して認められる一塩基変異あるいは挿入、欠失は認められず、原因遺伝子同定には至らなかった。これらの結果から原因は一塩基変異ではないと考え、ロングリード型次世代シーケンサー（Oxford Nanopore PromethION および Pacbio RSII）を用いて解析を行った。皮膚生検による生前診断を活用することで、さらに7家系のサンプルを追加し、合計9家系のサンプルを用いて解析を行った（表1）。平均で最低でも1リ

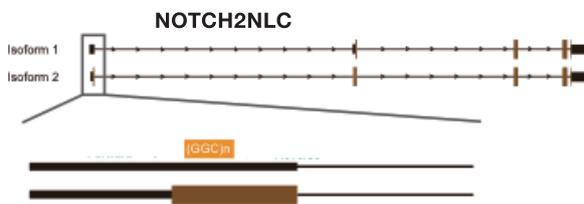
表1：ロングリード型次世代シーケンサーでの解析結果の詳細

individual ID	disease status	sequencer	number of reads	total base	average read length	predicted coverage	total number of tandem-genotype: call	number of read with repeat expansion
F1-1	affected	PromethION	2,112,375	19,006,257,320	8,998	6	9	7
F1-3	unaffected	PromethION	23,303,818	54,535,886,940	2,340	17	11	0
F1-6	affected	PacBio RSII	9,064,262	74,975,739,315	8,272	23	14	8
F1-9	unaffected	PromethION	9,635,261	35,004,315,947	3,633	11	19	0
F1-11	affected	PromethION	10,589,493	57,885,853,963	5,466	18	13	6
F1-12	unaffected	PromethION	9,091,759	63,874,106,363	7,026	19	19	0
F1-13	affected	PromethION	4,790,029	27,954,971,034	5,836	8	9	2
F1-20	affected	PromethION	12,830,261	57,451,863,375	4,478	17	22	11
F2-2	affected	PromethION	15,926,839	82,870,233,437	5,203	25	32	16
F2-3	unaffected	PromethION	18,339,946	23,268,659,841	1,269	7	6	0
F3-1	affected	PromethION	11,109,622	62,195,375,599	5,598	19	21	6
F4-2	affected	PromethION	10,658,181	72,698,332,750	6,821	22	22	13
F7-1	affected	PromethION	5,529,417	38,773,128,508	7,012	12	13	7
F8-1	affected	PromethION	17,969,232	49,838,565,927	2,774	15	11	9
F9-1	affected	PromethION	6,786,707	55,398,873,781	8,163	17	13	9
FD-1	affected	PromethION	11,467,114	56,214,013,607	4,902	17	21	7
FD-2	affected	PromethION	13,655,084	78,995,795,042	5,785	24	16	16

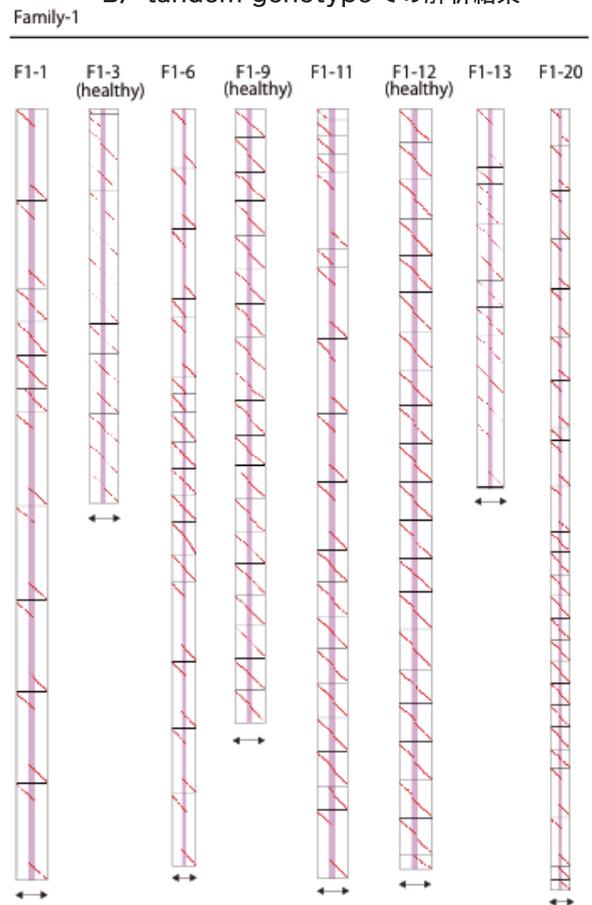
ードあたり1,200塩基と、ショートリード型シーケンサーの150塩基と比較して、かなりの長さでシーケンスが解析できていた。これらのシーケンスで得られたリードを、tandem genotypes という解析ソフト⁽⁶⁾を用いて、繰り返し配列の延長の有無を検討したところ、*NOTCH2NLC*遺伝子のGGCリピート配列が、NIID発症者のサンプルでのみ延長していることが明らかとなった(図2B)。さらに、CRISPER-Cas9システムを用いて、*NOTCH2NLC*遺伝子のGGCリピート配列の周辺に領域をしぼって、ロングリード型次世代シーケンサーでさらに詳細に解析をしたところ、GGCリピートの延長に加えて一部GGAリピート配列も含まれていることが明らかとなった(図2C)。

図2: *NOTCH2NLC* 遺伝子の詳細と tandem genotypes での解析結果

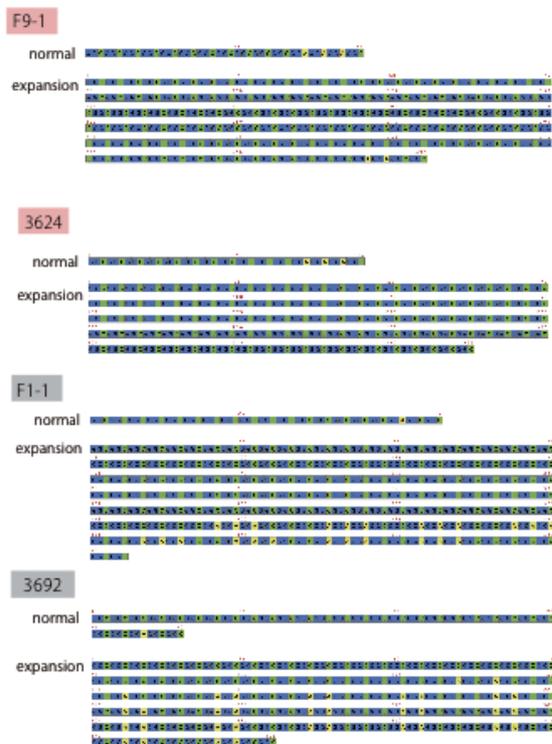
A) *NOTCH2NLC* 遺伝子と GGCrepeat 配列の関係



B) tandem genotype での解析結果



C) GGC リピート配列の詳細 (F9-1, F1-1 家族性, 3624, 3692 孤発性)



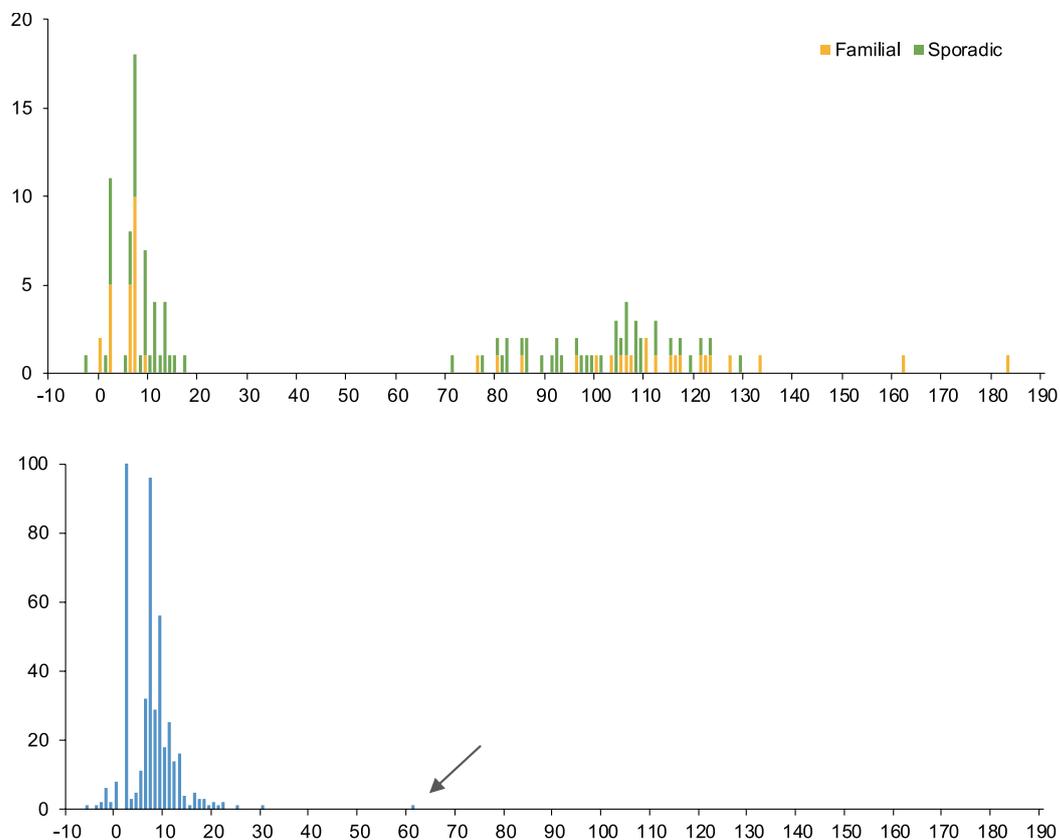
黒い線で囲まれたものが一本のリード、横方向にヒト標準配列、縦方向に実際の呼ばれたリード配列を配置。実際に読まれている部分を赤い点で示している。ピンクの部分がGGCリピート部分。NIID患者ではリードの約半分が、GGC が繰り返し登場するため、縦に長く伸びている。

さらに、家族性NIIDに加えて、孤発性NIIDに関しても*NOTCH2NLC*遺伝子のGGCリピート配列を検討したところ、40例についても、家族性NIID同様にGGCリピートの延長を認めた(図2C)。また、正常コントロールサンプルではリピート配列の延長は認められなかったため、*NOTCH2NLC*遺伝子のGGCリピート配列がNIIDの原因遺伝子であると結論した。また、GGCリピートの延長数を検討してみたが、家族性NIIDと孤発性NIIDの間で有意なリピート数の差は認められなかった(図3)。これらの成果をNature Genetics誌に投稿し、発表した⁽⁷⁾。今後は、*NOTCH2NLC*遺伝子のGGCリピート配列の延長が、神経細胞にどのような影響を及ぼすのか、さらにはどのようにして核内封入体の形成をきたすのかを、iPS細胞、動物モデルなどを開発して分子生物学的に解明し、最終的に根治的な治療法の開発を目指していく予定である。

考 察

当初は、ショートリード型次世代シーケンサーを用いて原因遺伝子の探索を行ったが、原因遺伝子の同定には至らなかった。ヒトの全ゲノムの約50%が繰り返し配列で占められていることを考えると、たとえ、全ゲノム解析を行ったとしてもヒトの全ゲノムの約半分程度しか解析できていないことになる。ショートリード型次世代シーケンサーの解析で結果

図3：*NOTCH2NLC*遺伝子のGGCリピート延長数の分布



が得られない場合には、ロングリード型次世代シーケンサーの活用を考慮すべきと考えられた。さらに、*NOTCH2NLC* 遺伝子は、現在のヒトの標準ゲノム配列 (hg38) に改訂が行われた際には初めてゲノム上に記載された遺伝子であり、前のバージョンである hg19 では記載されていない遺伝子であった。ヒトゲノムの hg38 の改訂の際にも、ロングリード型次世代シーケンサーでの解析結果が大きな情報をもたらしたと言われており、今後、ロングリード型次世代シーケンサーを用いた解析によって様々な疾患の遺伝子が新たに解明される可能性があると考えられる。

NIID の遺伝子診断が可能となったことで、他の認知症性疾患との鑑別がより正確に行えるようになった。特に慢性虚血性変化による起こる Binswanger 病との鑑別については、頭部 MRI 画像が類似しているため、*NOTCH2NLC* 遺伝子の検査が有用と思われる。さらに GGC リピートの延長により発症する他の神経疾患としては、*FMRI* 遺伝子の GGC リピート配列の延長によって発症する脆弱 X 症候群および脆弱 X 関連疾患が挙げられる。脆弱 X 関連疾患のうち、FXTAS (Fragile X associate tremor-ataxia syndrome) は、臨床症状および病理組織学的所見が極めて類似しているため、NIID との鑑別が重要であったが、今回 NIID の原因遺伝子が明らかとなったことで、遺伝子検査による鑑別診断が可能となった。

今後、GGC リピート配列により引き起こされる神経変性のメカニズムについて分子生物学的な検討を進めていく予定である。特に FXTAS ですでに検討されているような Ran translation による異常なタンパク質の生成あるいは異常な mRNA の生成による神経毒性に焦点を当て、今後の研究を進めていき、NIID の根本的な治療法開発を目指していく。

要 約

家族性 NIID 症例の遺伝子を用いて、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析、ショートリード型次世代シーケンサーおよびロングリード型次世代シーケンサーを用いて解析を行った結果、*NOTCH2NLC* 遺伝子上の GGC レピート配列の延長が NIID の原因であることを解明し、*Nature Genetics* 誌に投稿し、掲載された⁽⁷⁾。

文 献

1. Lindenberg, R., Rubinstein, L. J., Herman, M. M. & Haydon, G. B. A light and electron microscopy study of an unusual widespread nuclear inclusion body disease. A possible residuum of an old herpesvirus infection. *Acta Neuropathol.* 10, 54–73 (1968) .
2. Takahashi-Fujigasaki, J. Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease. *Neuropathology* 23, 351–359 (2003) .
3. Sone, J. et al. Skin biopsy is useful for the antemortem diagnosis of neuronal intranuclear inclusion disease. *Neurology* 76, 1372–1376 (2011)

4. Sone, J. et al. Neuronal intranuclear inclusion disease cases with leukoencephalopathy diagnosed via skin biopsy. **J. Neurol. Neurosurg Psychiatry** 85, 354–356 (2014)
5. Sone, J. et al. Clinicopathological features of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease. **Brain** 139, 3170–3186 (2016)
6. Mitsuhashi S et al. Tandem-genotypes: robust detection of tandem repeat expansions from long DNA reads. **Genome Biol.** 2019;20:58.
7. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. **Nature Genetics.** 2019, 51:1215–1221.