

成人発症神経核内封入体病の封入体形成における,

TGF- $\beta$  シグナル関連タンパクの関与の検討

佐藤 朋江

新潟大学医歯学総合研究科分子細胞医学専攻 (神経内科学)

(主任: 小野寺理教授)

TGF-beta-RELATED PROTEINS IN THE INCLUSIONS OF ADULT-ONSET NEURONAL  
INTRANUCLEAR INCLUSION DISEASE

Tomoe SATO

Department of Neurology, Graduate School of Medicine Niigata University

(Director: Prof. Osamu ONODERA)

別刷請求先

951-8585

新潟市中央区旭町通一番町757番地

新潟大学脳研究所臨床神経科学部門神経内科学分野

佐藤朋江

## 抄録

神経核内封入体病 (Neuronal intranuclear inclusion disease; NIID) はエオジン好性、かつ、p62 陽性の核内封入体 (Nuclear inclusion; NI) が、中枢神経系の神経細胞やグリア細胞のみならず、末梢神経や一般臓器の細胞にも広く出現する神経変性疾患である。成人発症 NIID の大多数は白質脳症 (Leukoencephalopathy; LE) を伴う認知症を呈する。近年、診断に皮膚生検が有用であることが報告された。本疾患の病態機序は不明であるものの、組織学的に、NI の多くはアストロサイトに出現し、病巣においてアストロサイトの形態異常やグリオシス不全が認められることから、アストロサイトの機能障害が疑われている。アストロサイトの活性化や増殖を促進する主要な増殖因子として TGF- $\beta$  が知られている。TGF- $\beta$  シグナル経路は、Smad2/3 のリン酸化と核内移行を介して伝達され、Smurf2 により抑制的に調節されている。我々はこの経路の障害がアストロサイトの機能異常を招き、本疾患の病態に関与していると推測した。本研究では、LE を伴い中枢神経症候を呈した成人発症 NIID の剖検例 5 例と生検例 1 例 (With LE 群)、および、それらを有さず剖検にて偶発的に NI が認められた 3 例 (Without LE 群) の大脳組織と、LE を伴い中枢神経症候を呈し皮膚生検にて成人発症 NIID と診断された 7 例の皮膚組織を対象として、NI の形態学的特徴と TGF- $\beta$  シグナル関連蛋白の発現を検討した。その結果、NI は概ね 90% がグリア細胞に出現し、その出現頻度は LE の有無に関連しなかった。また、With LE 群の NI は、Without LE 群では見られない大きなサイズまで幅広く分布していた。さらに、リン酸化 Smad2/3 の正常な核内の発現は、LE の有無に関わらず、NI を有する細胞で低下や消失していた。また、一部の NI

は Smurf2 陽性を示し、その陽性率は皮質細胞および脳室上衣細胞のいずれにおいても With LE 群において有意に高く、皮膚生検例でも同様であった。以上から、NI 形成は直接的に細胞障害には結びつかず、病態の進行に伴いその構造や組成が変化すると考えられた。また、TGF- $\beta$  シグナル経路の障害が組織障害を来すより以前の段階から生じ、一方で、Smurf2 の過剰発現がアストロサイトの機能障害や LE の発症に関与している可能性が示唆された。また、皮膚生検組織における p62 と Smurf2 に対する抗体を用いた蛍光免疫二重染色による NI の共陽性率の測定は本疾患の診断の参考となり得る。

**キーワード：**神経核内封入体病，認知症，白質脳症，皮膚生検，TGF- $\beta$  シグナル経路

## I. 序文

神経核内封入体病 (Neuronal intranuclear inclusion disease; NIID) はエオジン好性、かつ、ユビキチンや p62 に対する抗体で標識される核内封入体 (Nuclear inclusion; NI) が、中枢神経系の神経細胞やグリア細胞のみならず、末梢神経のシュワン細胞や一般臓器の細胞にも広く出現することを特徴とする、進行性の神経変性疾患である[1]。発症時期は幼少期から老年期まで幅広く、発症年齢により、幼児型、若年型、成人型の三型に分類される。極めて多彩な臨床症状や経過を呈することから、複数の異なる病態を有する疾患群である事が推測されている[2]。

成人発症 NIID には孤発例と家族例がみられる。孤発例では白質脳症を伴う認知症が中核症状であり、一方、家族例では孤発例と同様に認知症を呈する群と、四肢の筋力低下が主体となる群を認める。頭部 MRI 画像では、T2 強調画像や fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) 画像で左右対称な白質高信号を示す、いわゆる白質脳症の像と、大脳皮髄境界域の拡散強調画像高信号が特徴的である[1]。また近年、本疾患の診断に皮膚生検による NI の検索が有用であることが示され、臨床症状や MRI 画像の知見の蓄積と合わせて生前診断が容易となった[3]。一方、本疾患の病態機序は未だ不明である。病理学的には、成人型においては NI は神経細胞に比しグリア細胞、特にアストロサイトに明らかに多く出現し[4]、また大脳白質の海綿状変性を呈する部位には、突起の腫大や不規則な分岐を示す奇怪な形態のアストロサイトの出現や[5]、反応性アストロサイトの減少、GFAP 発現低下が認められている[4]。これらの組織所見から、アストロサイトの機能不全が白質脳症の形成に関わっているのではないかと推測されている[6]。

アストロサイトの活性化や、分化、増殖を促す主要な増殖因子の一つとして TGF- $\beta$  が知られている[8]. TGF- $\beta$  は、TGF- $\beta$  I型受容体を活性化させ、Smad2/3 のリン酸化と核内移行を主要なステップとするシグナル経路を介して、特定の遺伝子発現を制御する. その一方で、E3 リガーゼの一つである Smad ubiquitination regulatory factor-2 (Smurf2) は Smad7 と核内で複合体を形成し、核外に移行し、TGF- $\beta$  I型受容体複合体をユビキチン化し分解することによって、このシグナル経路を抑制的に調節する. マウスにおいては、TGF- $\beta$  がこのシグナル経路を介してアストログリオーシスを活性化することが示されている[7]. これらの知見から、本疾患において TGF- $\beta$  シグナル経路の異常がアストロサイトの形態および機能異常を惹起し、病態に関与しているのではないかと推測が可能である.

また近年、神経症状や画像上の白質脳症を呈していないものの、剖検で偶発的に本疾患で観察される NI と極めて類似した形態や分布を示す NI を認める症例が、稀ながら認められることが報告された[8]. さらに、内臓器の手術検体で偶発的に NIs を認められ、この時点では神経症状を認めなかったものの、10 年以上経過した後に本疾患を発症した例も報告されている[9]. このことから、本疾患で認められる NI と極めて類似していながら、NIID とは異なる機序で形成される NI が存在する可能性も否定はできないものの、本疾患において、NI は形成されていながら白質障害には至っていない、無症候の初期段階が存在する可能性が示唆される.

そこで本研究では、白質脳症を呈し中枢神経症候を有する成人発症 NIID 群と、それらを有さず剖検にて偶発的に NIs が認められた症例群において、NI の形態学的特徴と TGF- $\beta$  シグ

ナル関連蛋白の発現を比較検討し、本疾患の発症病態について考察した。

## II. 対象と方法

### 対象

検索対象は、臨床的に 1) NIID によるとみなされる中枢神経症状を呈し、2) 画像検査や組織検索により白質脳症 (Leukoencephalopathy; LE) を認め、3) 病理学的に神経細胞、グリア細胞を含む多種類の細胞にエオジン好性かつ抗 p62 抗体で標識される NIs が確認され、NIID と病理診断された、剖検例 5 例と生検例 1 例の合わせて 6 例 (白質脳症を呈する群: With LE 群, 表 1 の Pt. 1-6), および、臨床的に NIID によるとみなされる中枢神経症状や白質脳症を呈していなかったものの、剖検による組織検索によって偶発的に、NIID で認められる NI と極めて類似した分布、形態、染色性および超微形態を示す NIs を豊富に有する剖検例 3 例 (白質脳症を欠く群: Without LE 群, 表 1 の Pt. 14-16) の前頭葉および大脳基底核を含む組織である。さらに、臨床症状および白質脳症を呈する画像所見から NIID が疑われ、皮膚生検にて脂肪細胞、腺細胞、線維芽細胞に、NIID の中枢神経系 NI と同様の特徴を有する NIs を豊富に認め、NIID と診断された 7 例 (表 1 の Pt. 7-13) の皮膚組織も検索に加えた。その他、疾患対照として、伸長ポリグルタミン鎖からなる神経細胞核内封入体を豊富に認める Machado-Joseph 病患者剖検例 2 例の橋核を含む組織、正常対照として、非中枢神経疾患剖検例 3 例 (61 歳女性: 神経性食欲不振症, 76 歳男性: Lambert-Eaton 症候群, 73 歳女性: 筋炎) の正常前頭葉組織を用いた。

## 組織学的解析

剖検および生検で得られた前頭葉および大脳基底核を含む脳組織, および皮膚組織のホルマリン固定, パラフィン包埋ブロックから, 4  $\mu$ m 厚切片を作製した. hematoxylin and eosin (HE) 染色を行い, エオジン好性を示す円形～楕円形の NI の存在を確認した. また, 大脳組織では, Klüber-Barrera 染色も行い, 白質における髄鞘・軸索の脱落とグリオーススを認める場合, 白質脳症を有すると判定した.

## 免疫組織化学及び免疫蛍光二重染色

前頭葉, 大脳基底核, および皮膚組織の切片に対して, 一次抗体としてモノクローナル抗 p62 抗体 (BD Transduction Laboratories, USA; 1:1000), 抗 Smurf2 (D-5) (Santa Cruz Biotechnology, USA; 1:30), および, ポリクローナル抗リン酸化 Smad2/3 抗体 (pSmad2/3) (Santa Cruz Biotechnology, USA; 1:100), 抗 Smurf2 (H-50) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, USA; 大脳 1:50, 皮膚 1:200) を用いて免疫組織化学を行った. 免疫組織化学は Histofine Simple Stain MAX-PO kit (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) によるポリマー法で行い, diaminobenzidine (DAB) で発色した. 対比染色にマイヤーヘマトキシリンを用いた. また, 前頭葉, 基底核および皮膚組織切片について, 免疫蛍光二重染色を行った. 一次抗体としてモノクローナル抗 p62 抗体と, ポリクローナルの神経細胞標識混合抗体である Neurochrom™ pan-neuronal marker (Millipore, USA; 1:30), もしくはポ

リクローナル抗リン酸化 Smad2/3 抗体 (pSmad2/3) (1:50), ポリクローナル抗 Smurf2 (H-50) 抗体 (1:25) の組み合わせで使用し, 二次抗体には Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 抗体 と Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG 抗体 (Molecular Probes, USA; 1:1000) を用いた. 切片は Autofluorescence Eliminator Reagent (Millipore, USA) で処理し, VectaShield mounting medium with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear stain (Vector Laboratories, USA) を用いて核を標識し, 封入した. 共焦点画像撮影にはレーザー走査型顕微鏡 (LSM700; Carl Zeiss Co., Ltd.) を用いた.

## 定量解析

NI は抗 p62 抗体で標識し同定した.

### 1. NI の面積

前頭葉皮質 2-3 層において, 連続 50 個の NI を対物 40 倍レンズを用いて撮影した. 得られた画像をグレースケールに変換し, p62 陽性面積をコンピュータ画像解析により測定した. 全ての処理過程は ImageJ (imagej.net) を用いて行った. 面積ごとの出現頻度をヒストグラムで示した.

### 2. 神経細胞内 NI とグリア細胞内 NI

前頭葉の抗 p62 抗体と Neurochrom<sup>TM</sup> pan-neuronal marker による免疫蛍光二重染色切片を用いて, 皮質 2-3 層, 4-6 層および白質の各部位で対物 20 倍レンズを用いてそれぞれ連続 10 枚の画像を撮影した. 撮影面積は各部位 1.02 mm<sup>2</sup> であった. NI を有する Neurochrom<sup>TM</sup> pan-neuronal marker 陽性の神経細胞数と, 同様の Neurochrom<sup>TM</sup> pan-neuronal marker 陰性のグリア細胞数を数えた.



NI を有する神経細胞およびグリア細胞の密度を群ごとに箱ひげ図で示した.

### 3. NI を有する細胞の核内 pSmad2/3 の消失

前頭葉の抗 pSmad2/3 抗体と抗 p62 抗体による免疫蛍光二重染色切片を用いて, 皮質 2-3 層を対物 40 倍レンズを用いて, 連続 10 枚の画像を撮影した. 撮影面積は各例 0.255mm<sup>2</sup>であった. NI を有する細胞の総数と, NI を有しかつ核内の pSmad2/3 の発現を認めない細胞の数を求め, その割合を群ごとに箱ひげ図で示した.

### 4. NI における Smurf2 陽性率

前頭葉および皮膚組織の抗 Smurf2 (H-50) 抗体 と抗 p62 抗体による免疫蛍光二重染色切片を用いて, 皮質 2-3 層もしくは脂肪組織において各連続 50 個の NIs を対物 40 倍レンズで撮影した. Smurf2 (H-50) と p62 に共陽性を示す NIs の数を求め, その割合を前頭葉では群ごとに箱ひげ図で, 皮膚組織では全例で棒グラフで示した.

## 免疫電子顕微鏡的検索

With LE 群と Without LE 群の各 1 例 (Pt. 1, 14) の前頭葉皮質組織を用い, 包埋後免疫電子顕微鏡法により, NI の超微形態を検索した. 一次抗体として抗 p62 抗体 (1:50) を用い, 標識は 15 nm 金コロイド粒子結合 anti-mouse IgG (British BioCell, UK; 1:30) で行った. クエン酸鉛で電子染色し, Hitachi HT7700 電子顕微鏡で観察した.

## 統計学的解析

2 群 (With LE 群, Without LE 群) 各々の群内における NI を有する神経細胞とグリア細胞の密度の比較, および 2 群間における, NI を持つ神経細胞の密度やグリア細胞の密度の比較, および, p62 陽性 NIs に占める p62 と Smurf2 共陽性 NIs の割合の比較には Student t 検定を使用した. 2 群間における, NI を有する細胞に占める, 核内 pSmad2/3 陰性細胞の割合の比較には Mann-Whitney U 検定を使用した. 解析は SPSS (Chicago, IL) v24.0 で行った. 有意水準は  $p < 0.05$  とした.

## III. 結果

### 核内封入体を有する神経細胞およびグリア細胞の密度

With LE 群において, 前頭葉皮質の NI を有するグリア細胞の密度は同様の神経細胞のそれよりも有意に高かった (平均値  $\pm$  標準偏差: 神経細胞  $5.2 \pm 3.5 /\text{mm}^2$ , グリア細胞  $46.4 \pm 15.2 /\text{mm}^2$ ,  $p = 0.004$ ) (図 1A, C). Without LE 群においては, 両者に統計学的差異は認めなかったものの ( $p = 0.063$ ), NI を有する神経細胞の密度は  $2.8 \pm 2.8 /\text{mm}^2$  と極めて低く, 一方, 同様のグリア細胞の密度は  $61.3 \pm 29.4 /\text{mm}^2$  であった. 両群間における比較では, NI を有する神経細胞の密度及び同様のグリア細胞の密度ともに有意差を認めなかった (神経細胞  $p = 0.353$ , グリア細胞  $p = 0.369$ ) (図 1C). さらに前頭葉白質においても, NI を有するグリア細胞の密度には, 両群間で有意差を認めなかった (With LE 群  $30.0 \pm 12.4 /\text{mm}^2$ , Without LE 群  $6.87 \pm 2.05 /\text{mm}^2$ ,  $p = 0.213$ ) (図

1B, D).

### 核内封入体の大きさ

それぞれの封入体の p62 陽性面積の中央値は, With LE 群で  $8.89 (1.64-21.42) \mu\text{m}^2$ , Without LE 群で  $6.05 (1.85-16.17) \mu\text{m}^2$  であった. ヒストグラムのピークは, With LE 群では幅広く ( $4.0-13.0 \mu\text{m}^2$ ), Without LE 群では  $3.0-4.0 \mu\text{m}^2$  にピークを認める鋭い一峰性を示した. さらに,  $17.0 \mu\text{m}^2$  を超えるような大きな封入体は With LE 群のみに認められ, Without LE 群には認めなかった (図 1E, F).

### アストロサイト内核内封入体の超微形態

対象とした両者において, アストロサイトの核内に見られる抗 p62 抗体で標識される封入体は, 膜構造を持たず顆粒を伴いつつランダムに錯走する, 概ね径 10 nm 前後の線維状構造物によって構成されていた (図 2A-D). 加えて Pt. 1 においては, 内部に電子密度の高い均一な構造 (図 2A, C 矢印)を持つ NI が, Pt. 14 (図 2C, D) に比し高頻度に認められた.

### 核内封入体を有する細胞における TGF- $\beta$ シグナル関連蛋白の発現

#### 大脳皮質細胞における, 核内封入体形成に伴う核内 pSmad2/3 発現低下および消失

正常コントロール大脳皮質の観察したすべての細胞, および With LE 群と Without LE 群の大脳皮質の NI を有さない全ての細胞の核が, 抗 pSmad2/3 抗体でびまん性もしくは顆粒状に標識さ

れ、その程度は淡いものから強いものまで幅広かった (図 3A, B). 一方で, With LE 群と Without LE 群の両群において, NI を有する細胞の核の抗 pSmad2/3 抗体に対する標識は淡くもしくは消失していた (図 3B). p62 陽性 NI を持つ細胞に占める, 核内 pSmad2/3 陰性となる細胞の割合には, 2 群間で有意差を認めなかった (平均値  $\pm$  標準偏差: With LE 群  $16.0 \pm 6.3\%$ , Without LE 群  $13.9 \pm 12.8\%$ ,  $p = 0.905$ ) (図 3K). いずれの群においても大部分の NI は抗 pSmad2/3 抗体で標識されなかったものの (図 3D 矢印), 稀に核が淡く標識され, NI がそれよりも強く標識される細胞も認められた (図 3C 矢印). いずれの症例においても胞体は標識されなかった (図 3C, D).

#### 大脳皮質細胞内核内封入体における p62 と Smurf2 の共局在

正常コントロールを含むすべての検索症例において, 神経細胞やグリア細胞の胞体および核内は, NI の有無に関わらず抗 Smurf2 (H-50) 抗体で淡く標識され, さらに一部の NIs は明瞭に強く標識された (図 3E-J). 同様に抗 Smurf2 (D-5) 抗体でも NIs は標識された. 大脳皮質細胞において, p62 陽性 NIs に占める p62 と Smurf2 (H-50) 共陽性の NIs の割合は, Without LE 群に比し, With LE 群で有意に高かった (With LE 群  $76.0 \pm 17.4\%$ , Without LE 群  $28.0 \pm 7.2\%$ ,  $p = 0.003$ ). また, 側脳室周囲の上皮細胞の NIs におけるそれも同様に, Without LE 群に比し, With LE 群で有意に高かった (With LE 群  $84.4 \pm 15.4\%$ , Without LE 群  $46.0 \pm 17.8\%$ ,  $p = 0.018$ ) (図 3L). 一方, 2 例の Machado-Joseph 病患者の橋核細胞における, 1c2 陽性 NIs に占める 1c2 と Smurf2 (H-50) 共陽性の NIs の割合は 6% と 10% と低かった (データ提示無し).

## 皮膚生検組織の脂肪細胞内核内封入体における p62 と Smurf2 の共局在

大脳皮質の細胞と同様に，正常コントロールを含む全ての検索皮膚組織において，脂肪細胞の胞体および核内は，封入体の有無にかかわらず抗 Smurf2 (H-50) 抗体で淡く標識され (図 4A-F)，さらに，一部の NIs は明瞭に強く標識された (図 4C, F)．p62 陽性 NIs に占める p62 と Smurf2 共陽性の NIs の割合は  $90.0 \pm 7.2\%$  であった (図 4G)．

## IV. 考察

本研究では，成人発症 NIID において，白質脳症を発症している群と，それを有さず偶発的に NIs が認められた症例群の NIs について比較検討した．NIs は神経細胞よりもはるかに多くグリア細胞に出現し，その出現頻度は白質脳症の有無に関連しないこと，そして白質脳症を発症している群の NI は，白質脳症を欠く群では見られない大きなサイズまで幅広く分布していることを示した．さらに，TGF- $\beta$  関連蛋白の発現については，NI を形成している細胞の核内では白質脳症の有無に関わらず，pSmad2/3 の正常な発現が低下，消失していること，また一部の NIs は Smurf2 陽性を示し，その割合は白質脳症を発症している群において有意に高いことを示した．

本疾患の最大の組織学的特徴は，障害部位を超えた広範な領域かつ多種の細胞に NI の形成を認める点である．これは，NI 形成が直接的に細胞障害には結びつかない可能性を示唆している．本研究で得られた，大脳における NI の出現頻度は白質脳症の有無に関連しないという

結果も、これを支持すると考えられる。また、NI を有する神経細胞の出現頻度が明らかに低く、かつ白質脳症の有無に関連しないという結果からは、NI を有するアストロサイトの異常が神経細胞の異常に波及して組織障害を引き起こすとは考え難かった。むしろ、既報同様に NI を有するグリア細胞、特にアストロサイトの出現頻度が圧倒的に高いことから、アストロサイトが本疾患の病態に直接的に関与している可能性が考えられた。

本疾患における NI の形成機序は未だ不明である。本研究の検討では、白質脳症を発症している群の NI は、白質脳症を欠く群では見られない大きなサイズまで幅広く分布しており、超微形態でも内部にコア様の電子密度の高い部分を有する NI を高頻度に認めた。これらの結果から、NI の構造や組成が疾患の進展に伴い変化している可能性が考えられた。

さらに本研究では、アストロサイトの生理的機能の調節に関わる TGF- $\beta$  シグナル経路の主要蛋白である pSmad2/3 の正常な核内への発現が、NI の形成に伴い減少、消失することを示した。抗 pSmad2/3 抗体で標識される NI を有する細胞は稀であり、また pSmad2/3 の発現が核内から消失する機序は不明であるものの、NI を形成している細胞において TGF- $\beta$  シグナル経路が障害されている可能性が示唆された。pSmad2/3 が核内から消失している細胞の割合は白質脳症の有無によって差がないという結果から、TGF- $\beta$  シグナル経路の障害は、組織障害を来すより以前の段階から生じている可能性が示された。

一方で、この経路を抑制的に調節する経路の主要蛋白である Smurf2 は、一部の NIs に強く発現していた。白質脳症を発症している群の NIs における Smurf2 陽性率が有意に高かった

ことから、Smurf2 の過剰発現が TGF- $\beta$  シグナル経路を抑制してアストロサイトの活性化やアストログリオーシスを障害し、白質脳症の発症に関与しているのではないかと推測した。また同一群内の大脳皮質細胞と側脳室周囲上衣細胞の NIs における Smurf2 陽性率は近似しており、Smurf2 の過剰発現は部位や細胞種に関わらず進行していると考えられる。疾患対照として行った Machado-Joseph 病の 1C2 陽性 NIs における Smurf2 陽性率は極めて低く、NI 形成の過程において Smurf2 が非特異的に巻き込まれている可能性は否定的であった。

白質脳症を発症している群の皮膚組織の脂肪細胞においても、NIs における Smurf2 陽性率は大脳皮質細胞や脳室周囲上衣細胞のそれと同様に高かった。現在、本疾患の皮膚生検診断において NI のマーカーとして使用されているユビキチンや p62 は、いずれも異常凝集蛋白を広く標識するため、p62 陽性 NIs が高い Smurf2 共陽性率を示すことは診断の参考となり得る可能性がある。

## V. 結語

本研究により、TGF- $\beta$  シグナル経路の異常が成人発症 NIID における NI の形成や、病態機序に関与している可能性が示された。また皮膚生検組織における、抗 p62 抗体と抗 Smurf2 抗体を用いた蛍光免疫二重染色による NIs の共陽性率の測定は、成人発症 NIID の生前診断の参考となる可能性が示された。

## 謝辞

本研究に際しご指導を賜りました新潟大学脳研究所神経内科学分野の西澤正豊先生, 小野寺理先生, 同病理学分野の高橋均先生, 柿田明美先生, 他田真理先生, 新潟大学医歯学総合病院医療情報部の赤澤宏平先生, 愛知医科大学加齢医科学研究所の吉田眞理先生に厚く御礼申し上げます.



## 参考文献

- 1) Sone J, Mori K, Inagaki T, Katsumata R, Takagi S, Yokoi S, Araki K, Kato T, Nakamura T, Koike H, Takashima H, Hashiguchi A, Kohno Y, Kurashige T, Kuriyama M, Takiyama Y, Tsuchiya M, Kitagawa N, Kawamoto M, Yoshimura H, Suto Y, Nakayasu H, Uehara N, Sugiyama H, Takahashi M, Kokubun N, Konno T, Katsuno M, Tanaka F, Iwasaki Y, Yoshida M, Sobue G: Clinicopathological features of adult-onset neuronal intranuclear inclusion disease. *Brain* 139: 3170-3186, 2016.
- 2) Takahashi-Fujigasaki J: Neuronal intranuclear hyaline inclusion disease. *Neuropathology* 23: 351-359, 2003.
- 3) Sone J, Tanaka F, Koike H, Inukai A, Katsuno M, Yoshida M, Watanabe H, Sobue G: Skin biopsy is useful for the antemortem diagnosis of neuronal intranuclear inclusion disease. *Neurology* 76: 1372-1376, 2011.
- 4) Liu Y, Mimuro M, Yoshida M, Hashizume Y, Niwa H, Miyao S, Ujihira N, Akatsu H: Inclusion-positive cell types in adult-onset intranuclear inclusion body disease: implications for clinical diagnosis. *Acta Neuropathol* 116: 615-623, 2008.
- 5) 吉田眞理：神経核内封入体病の病理所見. *神経内科* 85: 614-623, 2016.
- 6) 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. Clin Neuropathol 35: 375-380, 2016.

- 7) Yu Z, Yu P, Chen H, Geller HM: Targeted inhibition of KCa3.1 attenuates TGF- $\beta$ -induced reactive astrogliosis through the Smad2/3 signaling pathway. J Neurochem 130: 41-49, 2014.
- 8) Mori F, Miki Y, Tanji K, Ogura E, Yagihashi N, Jensen PH, Wakabayashi K: Incipient intranuclear inclusion body disease in a 78-year-old woman. Neuropathology 31: 188-193, 2011.
- 9) Morimoto S, Hatsuta H, Komiya T, Kanemaru K, Tokumaru AM, Murayama S: Simultaneous skin-nerve-muscle biopsy and abnormal mitochondrial inclusions in intranuclear hyaline inclusion body disease. J Neurol Sci 372: 447-449, 2017.

## 図表

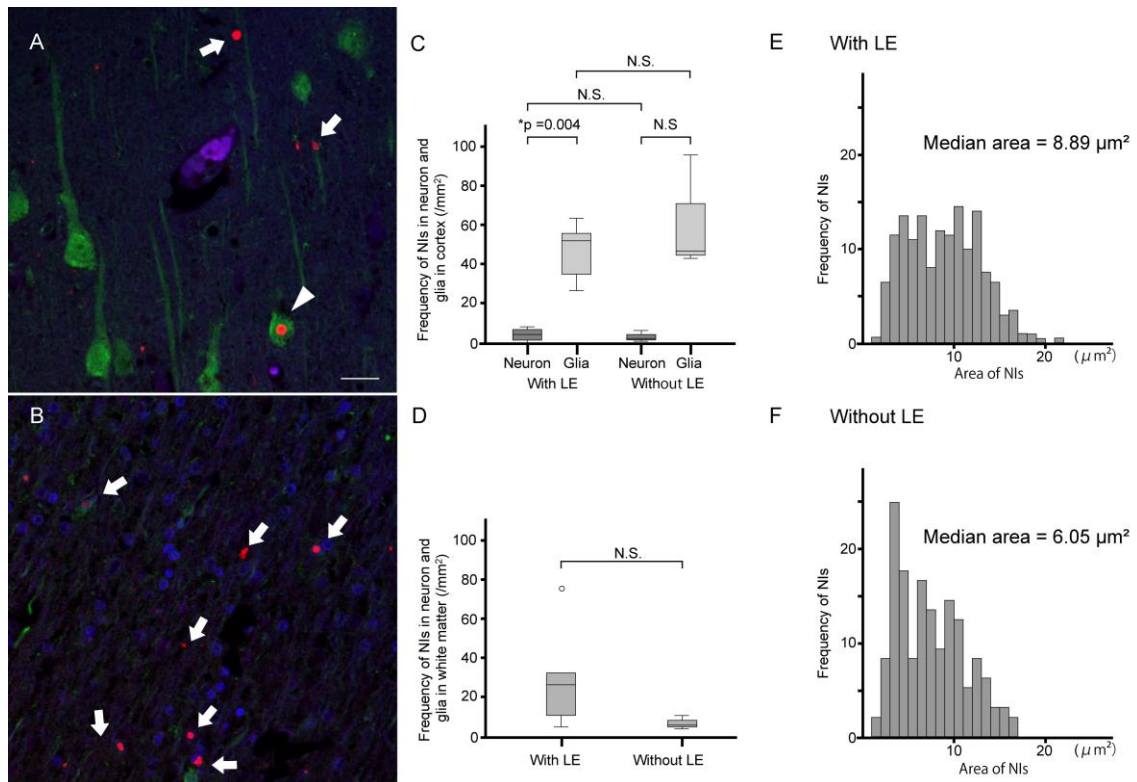


図 1. 核内封入体を有する神経細胞およびグリア細胞の密度と封入体の大きさ

前頭葉皮質 (A) 及び白質 (B) の, Neurochrom™ (緑) と抗 p62 抗体 (赤) を用いた免疫蛍光二重染色画像 (表 1 の Pt. 6). p62 陽性神経細胞核内封入体 (NI) (矢頭) と, 同様のグリア細胞 NI (矢印). 前頭葉皮質 (C) 及び白質 (D) における NI を有する神経細胞及びグリア細胞の密度を, 各群ごとに示した箱ひげ図. 箱の下端と上端は第一四分位数と第三四分位数を, 箱中の水平線は中央値を, 箱より上下に位置する水平線は最小値および最大値を示す. With LE 群 (E) および Without LE 群 (F) における, 各封入体の面積ごとの出現頻度を示すヒストグラム. Bar = 20 μm (A, B). N.S.: not significant

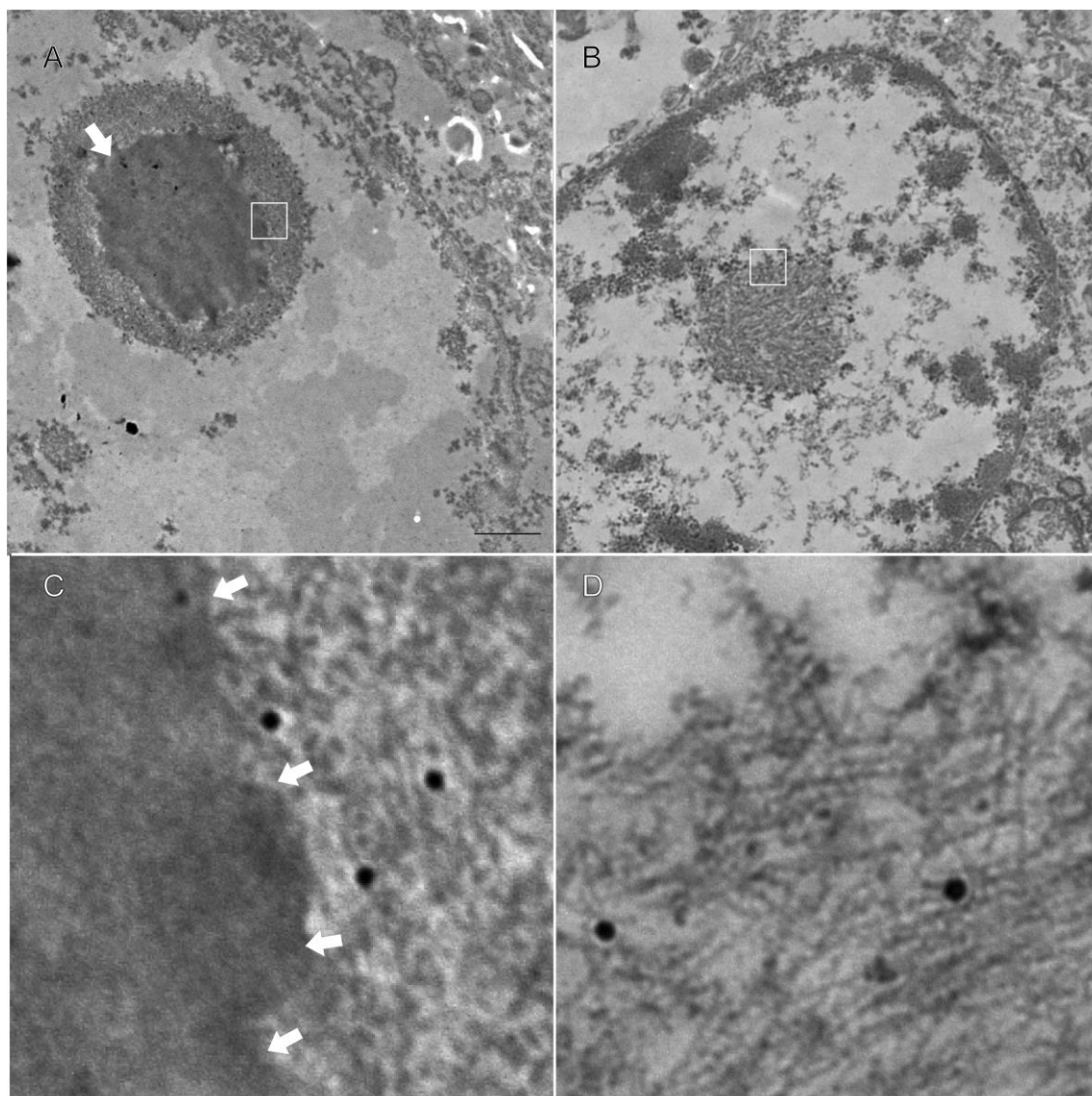


図 2. 核内封入体の超微形態

抗 p62 抗体を用いた包埋後免疫電子顕微鏡法による超微形態画像 (A, C: Pt. 1, B, D: Pt. 14, 表 1 参照). 標識粒子は径 15 nm の金コロイド. Bar = 1  $\mu$ m (A-C), 90 nm (C-D).

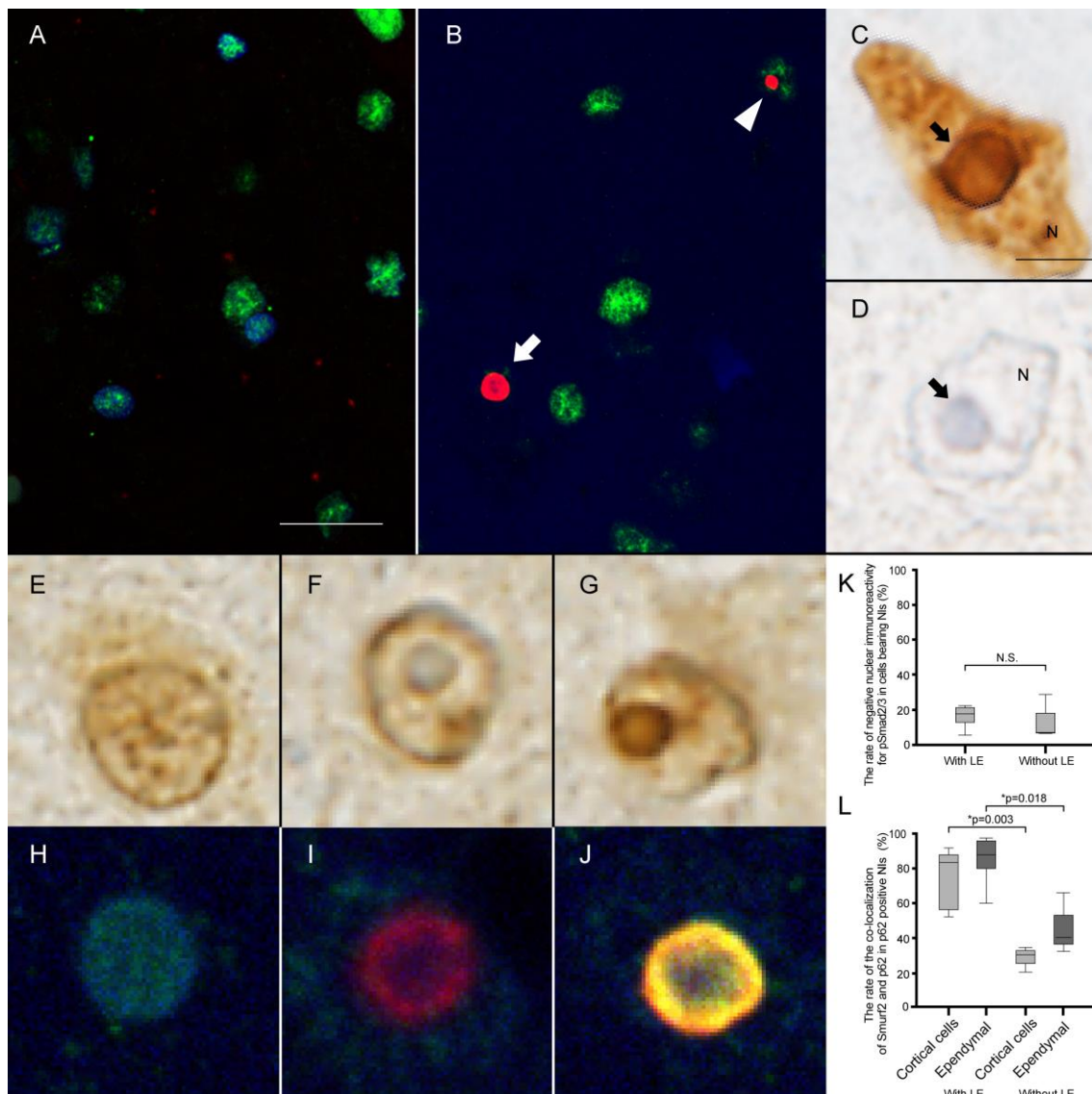


図 3. 大脳皮質における核内封入体形成に伴う核内の pSmad2/3 発現低下と、核内封入体にお

### る p62 と Smurf2 の共局在

前頭葉皮質の抗 pSmad2/3 抗体 (緑) と抗 p62 抗体 (赤) を用いた免疫蛍光二重染色像 (A: 正常

コントロール, B: 表 1 の Pt. 1), および抗 pSmad2/3 抗体による免疫組織化学像 (C, D: 表 1 の Pt.

1). 核内封入体 (NI) を有する細胞の核内の pSmad2/3 に対する染色性 (B) は、淡い (矢頭) も

しくは消失 (矢印) している。少数の NI は抗 pSmad2/3 抗体で核より強く標識され (C 矢印),

大部分の NI は標識されない (D 矢印). With LE 群及び Without LE 群における, NI を有する細胞に占める NI を有しかつ核内 pSmad2/3 発現が消失した細胞の割合を示す箱ひげ図 (K). 前頭葉皮質におけるアストロサイトの抗 Smurf2 (H-50) 抗体による免疫組織化学像 (E-G: 表 1 の Pt. 1) と, 抗 Smurf2 (H-50) 抗体 (緑) と抗 p62 抗体 (赤) を用いた免疫蛍光二重染色像 (H-J: Pt. 2). NI を有さない細胞 (E, H), p62 陽性かつ Smurf2 陰性の NI を有する細胞 (F, I), p62 陽性かつ Smurf2 陽性の NI を有する細胞 (G, J). 大脳皮質細胞及び側脳室上衣細胞における, p62 陽性 NI における p62 と Smurf2 (H-50) の共陽性率を示す箱ひげ図 (L). 箱の下端と上端は第一四分位数と第三四分位数を, 箱中の水平線は中央値を, 箱より上下に位置する水平線は最小値および最大値を示す. Bar = 20  $\mu$ m (A-B), 5  $\mu$ m (C-D), 3.8  $\mu$ m (E), 3  $\mu$ m (F-J). N: Nucleus

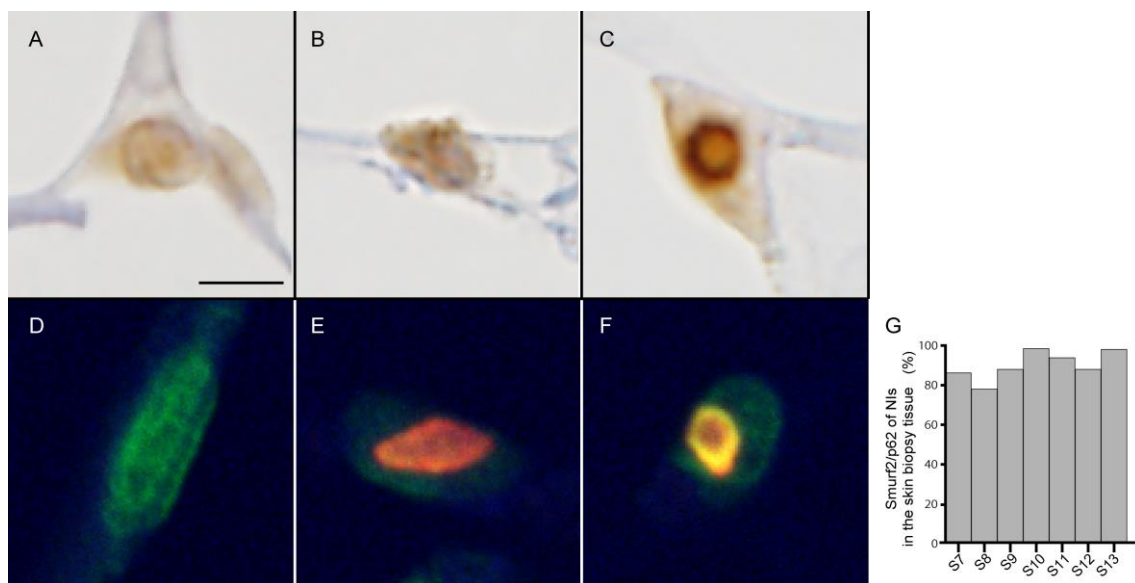


図 4. 皮膚生検組織の脂肪細胞内核内封入体における p62 と Smurf2 の共局在

表 1 で示した患者 10 (A-C) と患者 13 (D-F) から得た皮膚生検組織の脂肪細胞の抗 Smurf2 (H-50) 抗体による免疫組織化学像 (A-C: 表 1 の Pt. 10) および, 抗 Smurf2 (H-50) 抗体(緑) と抗 p62 抗体(赤) を用いた免疫蛍光二重染色像 (D-F: 表 1 の Pt. 13). 核内封入体 (NI) を有さない細胞 (A, D), p62 陽性かつ Smurf2 陰性の NI を有する細胞 (B, E), p62 陽性かつ Smurf2 陽性の NI を有する細胞 (C, F). 各症例における脂肪細胞内 p62 陽性 NI における p62 と Smurf2 (H-50) の共陽性率を示す棒グラフ(G). Bar = 5  $\mu$ m (A-F).

表 1. 対象患者の臨床像および検索組織

Pt.	年齢, 性別	白質脳症	発症年齢	罹病期間 (年)	家族歴	使用部位	
1	71, 男	+	65	6	+	前頭葉	剖検
2	75, 女	+	70	5	-	前頭葉	剖検
3	67, 女	+	67	2 ヶ月	-	前頭葉	剖検
4	75, 女	+	64	11	-	前頭葉	剖検
5	73, 女	+	63	10	-	前頭葉	剖検
6	69, 男	+	56	13	-	前頭葉	生検
7	70, 女	+	63	7	-	皮膚	生検
8	65, 女	+	63	2	-	皮膚	生検
9	68, 女	+	63	5	-	皮膚	生検
10	58, 女	+	57	6 ヶ月	-	皮膚	生検
11	66, 女	+	66	1 ヶ月	-	皮膚	生検
12	81, 女	+	77	4	-	皮膚	生検
13	67, 女	+	63	4	-	皮膚	生検
14	38, 男	-	-	-	-	前頭葉	剖検
15	78, 女	-	-	-	-	前頭葉	剖検
16	43, 男	-	-	-	-	前頭葉	剖検