

201135010A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野)

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

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高嶋 博

平成 24 年(2012)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
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	3
高嶋 博	
II. 分担研究報告	
1. 難治性神経疾患の次世代シーケンス解析による原因探索の研究	15
高嶋 博	
2. HAM の発症要因の探索	22
出雲 周二	
3. 遺伝性ニューロパチーの臨床的、遺伝学的研究	25
中川 正法	
4. 遺伝性希少難治性疾患の原因究明及び病態解明に関する研究	27
野元 正弘	
5. 当科における多系統萎縮症の疫学および病態解明の研究	29
永井 将弘	
6. HAM 患者臨床検体の整備とそれを用いた免疫学的検討	31
久保田 龍二	
7. 神経疾患の遺伝子解析に基づく病態解明	36
田中 章景	
8. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の発症リスク遺伝的因子の解明に関する研究	39
山野 嘉久	
9. 次世代シーケンサーを用いた HTLV-1 脊髄症発症因子の解明に関する研究	45
松浦 英治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	51
IV. 研究成果の刊行物・別刷	61

I. 総括研究報告

厚生労働省科学研究費補助金

(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業 (難病関係研究分野))

総括研究報告書

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

代表研究者 高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経病学

研究要旨: 医学の発展に伴い疾患の原因も明らかにされてきたが、今なお原因不明のものも多い。特に神経難病においては種類も多く、解決すべき問題が山積している。一方、近年のゲノム解析技術の進歩は著しく、個人のレベルにまで全エクソン解析や全ゲノム解析を行いうる様になってきた。我々は、遺伝性神経疾患(Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT)、遺伝性脊髄小脳変性症、プリオン病、ミトコンドリア病、認知症など)および HTLV-I 関連脊髄症(HAM)を含めて、全国的な枠組みで 10000 例を超える多数の DNA 検体を収集してきた。今回、次世代シーケンサーを用いて、本邦における希少難治性疾患の遺伝的原因を決定する。また、疾患発症の素因の同定とその結果をふまえて未同定の疾患について遺伝子診断法を開発し、個々の患者の診断を明確にする。遺伝性神経難病の本邦の分子疫学および疾患原因別に明らかにし、治療への道筋を立案する。

今回我々は、簡易型のゲノムシーケンサー(Roche 社 GS junior, Illumina 社 MiSeq)を導入し、包括的な遺伝子診断法を開発した。新しいミトコンドリア病として、MIMECK の疾患概念の確立と同定を行った。さらに、運動性ニューロパチー (HMN) の原因として一つのアミノアシル tRNA 合成酵素の異常を世界で初めて同定した。SCA2 の遺伝子異常で同一家系内にパーキンソニズム、多系統変性症、運動ニューロン病が起こりうることを示した。基礎的なデータとして重要な、地域的な遺伝性ニューロパチーの分子疫学や多系統萎縮症の疫学調査も行った。ALS においては、ゲノムワイド関連解析 GWAS に取り組み ZNF512B 遺伝子との関連を示した。

HAM は、HTLV-I 感染によって起こる神経難病である。HAM の病態解明および治療法開発のためには、HAM 患者および未発症 HTLV-I キャリアの臨床検体を用いた解析が必須であり、本事業ではこれらの臨床検体を用いての全エクソーム解析等を行いつつある。HAM は、感染者のごく一部(約 0.3%)にのみ発症するためその発症機構に遺伝的要因の関与が示唆されるがその原因はいまだ不明であるが、我々は家族性の HAM を 10 家系以上同定でき、HAM の遺伝的なバックグラウンドの存在は確実で、これらが解析に有効と考えている。

拠点研究機関による HiSeq2000 を用いた、大規模なエクソーム解析実施のパイプラインが完成し、300 例以上の CMT など順次多数例での解析が進んでおり、HAM 発症の遺伝的因子の検索を含めて今後多数の新規の原因遺伝子同定が可能と考えられる。

研究分担者

出雲周二 (鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター分子病理病態研究分野)

中川正法 (京都府立医科大学 大学院 神経内科学)

野元正弘 (愛媛大学大学院病態治療内科学)

永井将弘 (愛媛大学医学部附属病院臨床薬理センター)

久保田龍二 (鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター分子病理病態研究分野)

田中章景 (名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学)

山野嘉久 (聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター)

松浦英治 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学)

A. 研究目的

脊髄小脳変性症や遺伝性ニューロパチーなどの包括的な遺伝子診断は、遺伝子解析力の限界により、一般にはこれまでほとんど行われていなかった。また、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) の遺伝的な原因も一部は明らかとなっているが、わからない部分も多い。

我々は、今回、大規模な遺伝子解析を実現した次世代ゲノムシーケンサーを用いて、これまで解析の限界から踏み込めなかった新しい包括的な遺伝子診断システムの開発、網羅的な新規遺伝性疾患の同定、HAM など非遺伝性疾患の発症素因である感受性遺伝子の同定を行う。

CMT、遺伝性感覚性ニューロパチー、遺伝性運動性ニューロパチー、脊髄小脳変性症、ミトコンドリア病などの包括的な遺伝子検査法を開発する。

その一方、遺伝性疾患の中には原因未同定の疾患も多く、その新しい原因の発見を目指す。最終的には個々の患者の診断を正確に行い、遺伝性神経難病の本邦の分子疫学を明らかにする。さらに原因別に病態を明らかにし、治療への道筋を明確にする。

HTLV-I 関連として、HAM は HTLV-I 感染によって起こる神経難病であり、全国に約 3600 名の患者がいると推定されている。HAM は HTLV-I 感染者のごく一部 (0.3%) に発症するため、HAM の病態解明および治療法開発のためには、HAM 患者および未発症 HTLV-I キャリアからの臨床検体を用いた関連解析が必須であり、本事業ではこれらの臨床検体を用いての全エクソーム解析を行う。

今回の研究は、神経変性疾患、免疫性神経疾患の発症機序研究のブレイクスルーになるであろう。さらに治療への道筋が明らかになるような成果を得ることを期待している。

B. 研究方法

1. 研究施設

分担研究施設

鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター

名古屋大学神経内科

京都府立医科大学神経内科

愛媛大学大学院病態治療内科学

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター
拠点研究施設
東京大学神経内科
京都大学医学部研究科附属ゲノム医学センター

2. 対象疾患

単一遺伝子病： CMT、ミトコンドリア病、脊髄小脳変性症、周期性四肢麻痺、遺伝性感覚性ニューロパチー、遺伝性運動性ニューロパチー、脊髄性筋萎縮症、SCA2、アレクサンダー病、HDLS、CADASIL

遺伝的素因が疾患の発症と関連するもの： HAM と HTLV-I キャリア 多系統萎縮症 ALS、パーキンソン病

原因未解明の地域性の遺伝性疾患：沖縄型筋萎縮症 (HMSN-P)、遺伝性多系統変性症 家族性認知症

2. 検体収集

全施設にて 10000 検体以上収集しており、内訳は、脊髄小脳変性症、ミトコンドリア病、CMT、HAM などである。さらに検体収集について、他の研究班との連携、ホームページの開設、市民公開講座など様々な場で広報を行っている。

3. 遺伝子診断・解析・疫学

脊髄小脳変性症、CMT、ミトコンドリア病、CADASIL などに遺伝子診断を行い、HAM 患者の血中プロウイルス量測定を通常の医療として提供することにより、一般の病院から検体を収集する。

遺伝性ニューロパチーや小脳変性症については、地域的および全国的な分布についても検討する。CMT や優性遺伝性小脳失調症については、遺伝子診断に基づく

分子疫学調査も行う。

さらにこれまでは、Sanger 法やマイクロアレイ法などで診断を行ってきたが、遺伝子診断をより低コストで簡易、包括的におこなうため、新世代ゲノムシーケンサーを用いて、検査システムの構築が可能かどうか検討する。

4. 単一遺伝子病の新規遺伝的原因の同定

遺伝子診断の陰性例については、次世代ゲノムシーケンサーを用いた包括的ゲノム解析、主としてエクソーム解析により、原因の同定を試みる。同一疾患患者を多数解析することにより、複数例のピックアップが可能となり、より容易に原因遺伝子の同定が可能となる。

5. 単一遺伝子病のポジショナルクローニング法、およびその他の手法を用いた原因遺伝子の同定

家族性の地域の疾患については、マイクロアレイ法による遺伝子マッピングが可能で、候補領域の全ゲノムを次世代ゲノムシーケンズ法で塩基配列を決定し、その遺伝情報に基づいて遺伝的原因を同定する。また、その他 CNV 解析などの遺伝子学的手法も幅広く用いる。

6. 多因子遺伝病・感受性遺伝子の同定 (HAM 研究)

我々は HAM の発症には、HTLV-I 感染に加えて、複数の感受性遺伝子が関与していることを明らかにし、多因子遺伝性疾患のモデルとして考えている。HAM を対象に全遺伝子について関連解析を行う。具体的には、特にはじめのアプローチとし

て、HAM の家系例を抽出する。10 家系以上を確認しており、その全例にエクソーム解析を行い、家族性 HAM 患者において遺伝的な素因を同定する。さらに、HAM300 例および HTLV-I キャリア群 200 例において、エクソーム解析を行い、より広範な発症素因を検索する。

HAM 研究は、主として鹿児島大、京都府立医大、聖マリアンナ医大が連携であったが、ゲノム配列解析拠点である東京大学および HTLV-I ゲノム解析を行う京都大学チームおよびデータ解析センターと我々が一体となって行う。

孤発性 ALS の疾患易罹患性遺伝子を明らかにする目的で、名古屋大学において集積した DNA サンプルを含めオールジャパン体制で集積されたサンプルを基に理化学研究所と共同してゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行った。

(倫理面への配慮)

臨床検体採取にあたっては、インフォームドコンセントのもとに採血を行った。サンプルは匿名化して用いた。本研究は鹿児島大学など遺伝子解析を行なう参加各大学において、倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

検体収集は、十分に行われ、特に遺伝子検査を提供しているものについては十分な検体数を収集し得た。CMT、小脳失調症、HSN、筋疾患、ミトコンドリア病などの遺伝子診断を行った。鹿児島、愛媛、京都において、小脳失調症や、遺伝性二

ューロパチーの疫学について報告した。

次世代シーケンサーを用いた効率的な遺伝子診断法を構築するため、脊髄小脳変性症においてはリピート伸長変異が確認できなかった原因未同定の家族性・優性遺伝性小脳失調症 (AD-SCD) については、次世代シーケンス法を用いた遺伝子スクリーニング法 (SCA5, 11, 13, 14, 15, 16, 23, 27, 28, 35) を構築し、試験的にはおおよそ良好な配列が得られた。また、マイクロアレイ法で行っていた CMT の遺伝子診断についても次世代シーケンス法で同等以上の効率で、行い得た。さらに、HSN や Ullrich 型筋ジストロフィーについても構築し得た。

希少性遺伝性疾患の新規原因遺伝子同定

一方で、小型のゲノムシーケンサーやマイクロアレイ法を用いて希少疾患の原因を見つけるアプローチも行う。一つは、新しい発作性筋力低下を呈する新しいミトコンドリア病として、MIMECK (mitochondrial myopathy with episodic hyper-CKemia) と名付け報告した疾患で、本症患者 8 家系 10 例を確認し、発作性の脱力の治療法も発見し、総説執筆や学会発表などで周知するべく活動を行っている。

さらには、CMT や運動ニューロン病の類縁疾患である疾患、優性遺伝性の HMN (hereditary motor neuropathy) の遺伝的原因としてアラニル tRNA 酵素 (AARS) の遺伝子異常を発見した。これは世界で初めての報告である。その他にも、ミトコンドリア病の新しい疾患概念を確立し、他の希少疾患の原因の究明を確実に実行

している。

大規模エクソーム解析による原因同定

今年度は、拠点である東京大学神経内科のゲノムシーケンサーの解析パイプラインが整い、研究は進んでいる。ゲノムシーケンサーをフルに活用したデータは出ていないが、CMTを中心に300検体のエクソーム解析が進行中である。多くのCMTの原因の同定が期待される。

ALSのGWASから*ZNF512B*遺伝子内のrs2275294が $P=9.3 \times 10^{-10}$ を以て孤発性ALSの易罹患性に関与していることが明らかとなった(オッズ比1.30)

HTLV-I 研究

家族例のあるHAMを10家系以上集め、一般的な発症率0.3%から考えると極めて高率であり、遺伝的素因が示唆された。本家系例から解析を開始する。

また、HAMおよびキャリアの臨床検体数は、それぞれ300検体および200検体以上あり、エクソーム解析による網羅的な解析を行いつつある

D. 考察

総合的に遺伝性ニューロパチー、脊髄小脳変性症、HAMなど神経系の難病に対して次世代ゲノム解析に加えて、これまでの様々な遺伝学的解析手法を加えて研究を開始した。

CMTでは原因遺伝子は35以上報告されており、これまでマイクロアレイ技術を活用したCMTの包括的遺伝子診断法を開発し、実践してきた。しかし、既知のCMT包括的遺伝子診断スクリーニングは本手

法である程度可能となったが、精度、簡便さ、コスト、そして検査の陽性率を考えると遺伝子診断システムの改良が必要であった。そのため、次世代シーケンシング技術を用いた遺伝子診断システムを構築すること、新しい原因遺伝子を本年度は、見つけ出すことを目標にし、HMNの原因AARSを新規に同定し、新しい遺伝性診断システムの構築もおおよそ完成した。

また、脊髄小脳変性症についても、原因未同定の家族性SCD患者について、GS juniorシステムを用いて試験的に遺伝子スクリーニング(SCA5, 11, 13, 14, 15, 16, 23, 27, 28, 35)を行い、複数箇所に点変異を確認に成功した。GS juniorシステムの処理能力を考慮すると、1ランで約10症例の検体を同時に解析することが可能であった。また、SCA2の変異で同一家系内にALS、パーキンソン病、小脳失調症が存在することは、興味深く、実際ALSにおいてSCA2は強い発症素因であることが報告された。

ALSについても、GWASで発症関連因子が同定され、今後の発展が期待される。

一方、HAMについてはキャリアの約0.3%の頻度で発症しており、HAMの発症機序および治療法開発にはHAMとキャリアを比較して研究を進める必要がある。本研究ではHAMとキャリアの全エクソーム解析を行い、これらを進めていく予定である。検体としてHAMおよびキャリアでそれぞれ300検体および200検体以上の検体が可能であるが、まず、HAMの家族例を中心に解析する。エクソーム解析後のデータを用いての種々の細胞機

能解析も重要である。

今後、エクソーム解析にデータが重ねられるごとに新規の発見が出てくるであろう。

E. 結論

①遺伝子診断陰性例に対する包括的な既知の遺伝子診断は、小型のゲノムシーケンサーを用いることで、安価、迅速に実行できる。

②新しい疾患として MIMICK を樹立し、原因を報告した。

③HMN の原因として、AARS の異常を世界で初めて同定した。

④全エクソーム解析を行う体制がととのい、CMT, HAM およびキャリアなどをエクソーム解析が開始された。

⑤小脳失調症、遺伝性ニューロパチーの地域的な分子疫学が明らかとなった。

⑥HAM の炎症病巣での HBZ の関与を解析するツールとして、HBZmRNA を標的とした in situ hybridization 法の開発を目指した基礎研究を行った。

⑦HAM の家系例の集積が行われた。

⑧ALS においては、ゲノムワイド関連解析 GWAS に取り組み ZNF512B 遺伝子との関連を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(高嶋分)

1. Nakamura T, Hashiguchi A, Suzuki S, Uozumi K, Tokunaga S, Takashima H.

Vincristine exacerbates asymptomatic Charcot-Marie-Tooth disease with a novel EGR2 mutation. *Neurogenetics*. 2012 13 (1) 77-82

2. Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Tokunaga S, Zhu L, Shen H, Takashima H. Alanine-tRNA synthetase mutation in a family with distal hereditary motor neuropathy. *Neurology* in press 2012, May
3. Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Inamori Y, Sangatsuda Y, Michizono K, Watanabe O, Hatakeyama H, Goto Y, Arimura K, Takashima H. A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy. *Acta Neuropathol*. 2011 121 (6) 775-783
4. Okamoto Y, Higuchi I, Sakiyama Y, Tokunaga S, Watanabe O, Arimura K, Nakagawa M, Takashima H. A new mitochondria-related disease showing myopathy with episodic hyper-CKemia *Ann Neurol*. 2011 Vol70 (3) 486-492
5. Nishikawa N, Nagai M, Tsujii T, Tanabe N, Takashima H, Nomoto M. Three SCA2 siblings with Ataxia, Parkinsonism, and Motor Neuronopathy. *Internal Medicine*, 2011, 150 (13) : 1429-32
6. Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y,

- Takashima H, Izumo S, Kubota R: Reduced Tim-3 expression on HTLV-I Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. *J Infect Dis.* 203 (7) :948-59, 2011
7. Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Takashima H, Izumo S: Histopathologic differences between human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-positive and HTLV-1-negative polymyositis. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2: 12-7, 2011
8. 橋口昭大、高嶋 博. Charcot-Marie-Tooth 病の網羅的遺伝子診断. *Annual Review 神経* 2012、中外医学社、東京、267-273, 2012
9. 橋口昭大、高嶋 博. Hereditary neuropathy: variety of disease-causing genes and progress of molecular genetic diagnosis. *Brain Nerve* 63 (6) 539-548, 2012
- (出雲分)
1. 出雲周二, 松崎敏男, 久保田龍二. HAM の新しい展開. *神経内科* 2011;75 (4) ;369-373.
2. Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Takashima H, Izumo S. Histopathological differences between human T-lymphotropic virus type 1-positive and human T-lymphotropic virus type 1-negative polymyositis. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2011, 2 (1) :12-24.
3. Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R. Reduced Tim-3 expression on human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. *J Infect Dis.* 2011, 203:948-959.
- (中川分)
1. 中川正法, 滋賀健介 Charcot-Marie-Tooth 病の治療. *神経治療学* 28 (2) :129-133, 2011
2. 中川正法 Charcot-Marie-Tooth 病の診断と治療・ケア *Peripheral Nerve* 22 (2) :125-131, 2011
3. 伊佐敷 靖、中川正法 難聴と視神経萎縮. *日本眼科学会雑誌* 115 (4) :409- 412, 2011
4. Noto Y, Misawa S, Kanai K, Sato Y, Shibuya K, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Ohmori S, Nakagawa M, Kuwabara S. Activity-dependent changes in impulse conduction of single human motor axons: A stimulated single fiber electromyography study. *Clin Neurophysiol.* 122:2512-2517, 2011
5. Yoshida T, Sasaki M, Yoshida M, Namekawa M, Okamoto Y, Tsujino S, Sasayama H, Mizuta I, Nakagawa M. The Alexander Disease Study Group in Japan. Nationwide survey of

Alexander disease in Japan and proposed new guidelines for diagnosis. *J Neurol.* 258: 1998-2008, 2011

(野元、永井分)

Nishikawa N, Nagai M, Tsujii T, Tanabe N, Takashima H, Nomoto M. Three spinocerebellar ataxia type 2 sibs with ataxia parkinsonism and motor neuronopathy. *Intern Med.* 50:1429-1432, 2011

(久保田分)

1. Kozako T, Akimoto M, Toji S, White Y, Suzuki S, Arima T, Suruga Y, Matsushita K, Shimeno H, Soeda S, Kubota R, Izumo S, Uozumi K, Arima N: Target epitopes of HTLV-1 recognized by class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes in HAM/TSP patients and infected patients with autoimmune disorders. *J Med Virol.* 83 (3) :501-9, 2011
2. Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R: Reduced Tim-3 expression on HTLV-I Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. *J Infect Dis.* 203 (7) :948-59, 2011
3. Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Takashima H, Izumo S: Histopathologic differences

between human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-positive and HTLV-1-negative polymyositis. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2: 12-7, 2011

4. Kozako T, Yoshimitsu M, Akimoto M, White Y, Matsushita K, Soeda S, Shimeno H, Kubota R, Izumo S, Arima N. Programmed death-1 (PD-1)/PD-1 ligand pathway-mediated immune responses against human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and carriers with autoimmune disorders. *Hum Immunol.* 72 (11) :1001-6, 2011
5. 久保田龍二: HAM スペクトラム. *臨床神経学* 51: 1044-6, 2011

(田中分)

1. Iida M, Koike H, Ando T, Sugiura M, Yamamoto M, Tanaka F, Sobue G. A novel MPZ mutation in Charcot-Marie-Tooth disease type 1B with focally folded myelin and multiple entrapment neuropathies. *Neuromuscul Disord.* 22 (2) :166-169, 2012
2. Iida A, Takahashi A, Kubo M, Saito S, Hosono N, Ohnishi Y, Kiyotani K, Mushiroda T, Nakajima M, Ozaki K, Tanaka T, Tsunoda T, Oshima S, Sano M, Kamei T, Tokuda T, Aoki M, Hasegawa K, Mizoguchi K, Morita M, Takahashi Y, Katsuno M, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Kaji R, Nakano

- I, Kamatani N, Tsuji S, Sobue G, Nakamura Y, Ikegawa S. A functional variant in ZNF512B is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Hum Mol Genet.* 20 (18) :3684-3692, 2011
3. Iida A, Takahashi A, Deng M, Zhang Y, Wang J, Atsuta N, Tanaka F, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Morita M, Akimoto C, Nakajima M, Kubo M, Kamatani N, Nakano I, Sobue G, Nakamura Y, Fan D, Ikegawa S. Replication analysis of SNPs on 9p21. 2 and 19p13. 3 with amyotrophic lateral sclerosis in East Asians. *Neurobiol Aging.* 32 (4) :757. e13-14, 2011
- (山野分)
1. Sato T., Araya N., Yagishita N., Ando H., Yamano Y. Host Immune System Abnormalities Among Patients with Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) - Associated Disorders. *T-Cell Leukemia,* 65-80/234, InTech, 2011.
 2. Araya N., Sato T., Yagishita N., Ando H., Utsunomiya A., Jacobson S., Yamano Y. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory Disease. *Viruses,* 3: 1532-1548, 2011.
 3. Kitazono T., Araya N., Yamano Y., Yamada Y., Nakamura T., Tanaka Y., Inoue M., Ozaki S. Corresponding Author: Okazaki T. Advantage of higher-avidity CTL specific for Tax against human T-lymphotropic virus-1 infected cells and tumors. *Cell Immunol,* 272 (1) :11-17, 2011.
 4. Sato T., Fujii R., Konomi K., Yagishita N., Aratani S., Araya N., Aono H., Yudoh K., Suzuki N., Beppu M., Yamano Y., Nishioka K., Nakajima T. Overexpression of SPACIA1/SAAL1, a new gene that is involved in synoviocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans. *Arthritis Rheum.* 63 (12) : 3833-3842, 2011.
 5. Takamori A., Hasegawa A., Utsunomiya A., Maeda Y., Yamano Y., Masuda M., Shimizu Y., Tamai Y., Sasada A., Zeng N., Choi I., Uike N., Okamura J., Watanabe T., Masuda T., Kannagi M. Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. *Retrovirology,* 7 (8) :100 (1-15), 2011.
 6. 山野嘉久, 佐藤知雄, 安藤仁, 新谷奈津美, 八木下尚子 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の治療法を確立していくために—その現状と展望— *日本臨牀* 70 (4) ; 705-713, 2011
 7. 山野嘉久, 佐藤知雄, 新谷奈津美, 安

- 藤仁、八木下尚子 HAM 専門外来の取り組み 神経内科, 75 (4) 387-392, 2011.
8. 安藤仁、八木下尚子、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態と治療 医療と検査機器・試薬 34 (4) 別冊 機器・試薬 34 (4) : 472-477, 2011.
9. 山野嘉久 HTLV-1 キャリアー, HTLV-1-associated myelopathy (HAM) 患者診療の現状と問題点 血液内科 63 (1) : 81-86, 2011.
- (松浦分)
1. Wuest SC, Edwan JH, Martin JF, Han S, Perry JS, Cartagena CM, Matsuura E, Maric D, Waldmann TA, Bielekova B. A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nature Medicine* 2011 May;17 (5) :604-9.
2. Yao B, Bagnato F, Eiji Matsuura E, Merkle H, Gelderen PV, Cantor FK, Duyn JH. Chronic Multiple Sclerosis Lesions: Characterization with High-Field-Strength MR Imaging. *Radiology*. 2011 Nov 14
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 : なし
2. 実用新案登録 : なし

II. 分担研究報告

厚生労働省科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）
分担研究報告書

難治性神経疾患の次世代シーケンス解析による原因探索の研究

研究代表者 高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経病学

研究要旨：我々は、遺伝性神経疾患(Charcot-Marie-Tooth 病(CMT)、遺伝性脊髄小脳変性症、プリオン病、ミトコンドリア病、認知症など)の遺伝子検査を行ってきたが、実際には遺伝子診断が陰性で原因が同定出来ない場合も多く、より効率的で多項目の遺伝子診断システムの開発や新しい原因遺伝子の発見の必要性を認識してきた。それゆえ、2 台の次世代シーケンサー(Roche 社 GS junior、Illumina 社 MiSeq)を用いて、より効率的で網羅的、加えて安価な遺伝子診断システムの構築を行った。また、Illumina 社(HiSeq2000)を用いた大規模なエクソーム解析、ポジショナルクローニング法およびゲノム解析を融合させ、新規の原因遺伝子の同定を試みた。

その結果、小型のゲノムシーケンサーでも遺伝性ニューロパチー（CMT, HSN など）および脊髄小脳変性症の数十にわたる遺伝子の解析を効率的におこなうことは十分に可能であった。また、新規の遺伝的原因検索では、新しいミトコンドリア病 MIMICK の疾患概念の確立を行い、その原因も同定し得た。加えてその治療法も開発しつつある。さらに、Hereditary motor neuropathy(HMN)の原因として一つのアミノアシル tRNA 合成酵素の異常を世界で初めて同定した。

大規模なエクソーム解析は解析全体のパイプラインが完成し、300 例以上の CMT など順次多数例での解析が進んでおり、HAM 発症の遺伝的因子の検索を含めて今後多数の新規の原因遺伝子同定が可能と思われる。

A. 研究目的

脊髄小脳変性症や遺伝性ニューロパチーなどの包括的な遺伝子診断は、遺伝子解析力の限界により、一般にはこれまでほとんど行われていなかった。我々は、CMT において、マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子診断を行ってきたが、デザインやコスト面、検出率の限界も有り、

よりフレキシブルに解析できる次世代ゲノムシーケンサーによる遺伝子診断システムの開発を行う。また、CMT 以外の高度に遺伝的多様性がみられる疾患（遺伝性感覚性ニューロパチー、遺伝性運動性ニューロパチー、脊髄小脳変性症、ミトコンドリア病など）についても、包括的な遺伝子検査法を開発する。

その一方、遺伝性疾患であっても原因未同定の疾患も多く、その新しい原因の発見を目指す。最終的には個々の患者の診断を正確に行い、遺伝性神経難病の本邦の分子疫学を明らかにする。さらに原因別に病態を明らかにし、治療への道筋を明確にする。

B. 研究方法

1. 対象疾患

単一遺伝子病： CMT、ミトコンドリア病、脊髄小脳変性症、周期性四肢麻痺、遺伝性感覚性ニューロパチー、遺伝性運動性ニューロパチー、脊髄性筋萎縮症

遺伝的素因が疾患の発症と関連するもの： HAM と HTLV-I キャリア 多系統萎縮症 ALS、パーキンソン病

原因未解明の地域性の遺伝性疾患 沖縄型筋萎縮症、遺伝性多系統変性症 家族性認知症

2. 検体収集

これまでの遺伝子検査実績は 4500 検体以上であり、内訳は、脊髄小脳変性症、ミトコンドリア病、CMT、HAM などがすでに収集され、特に CMT、HAM では患者会と連携して行っている。

さらに検体収集について、他の研究班との連携、ホームページの開設、市民公開講座など様々な場で広報を行っている。

3. 遺伝子診断・解析

遺伝子診断の一時スクリーニング検査として、既知疾患遺伝子の遺伝子検査を網羅的に行う。CMT については、自作の CMT 遺伝子診断用 DNA Chip (Affymetrix) より 28 遺伝子を網羅的に解析する。

また、ミトコンドリア病は、ミトコン

ドリアアレイ Chip により、ミトコンドリア遺伝子配列の決定、欠失変異の同定を行う。脊髄小脳変性症は、はじめにリピート配列の延長の検出を試みる。その陰性例を診断するため、これまで行ってきた遺伝子診断よりも低コストで簡易、包括的な遺伝子検査を、新世代ゲノムシーケンサーを用いて構築が可能かどうか検討する。

4. 単一遺伝子病の新規遺伝的原因の同定

遺伝子診断の陰性例については、次世代ゲノムシーケンサーを用いた包括的ゲノム解析、主としてエクソーム解析により行う。同一疾患において多数例で行うことにより、原因遺伝子の同定を試みる。

5. 単一遺伝子病のポジショナルクローニング法、およびその他の手法を用いた原因遺伝子の同定

我々は家族性の地域の疾患についてマイクロアレイでマッピングし、候補領域の全ゲノムを次世代ゲノムシーケンシング法で塩基配列を決定し、その遺伝情報に基づいて遺伝的原因を同定する。また、その他の遺伝子学的手法も幅広く用いる。

6. 多因子遺伝病・感受性遺伝子の同定 (HAM 研究)

我々は HAM の発症には、HTLV-1 感染に加えて、複数の感受性遺伝子が関与していることを明らかにし、今回、多因子遺伝性疾患のモデルとして、多数の患者試料が蓄積されている HAM を対象に全遺伝子について包括的に検討を行う。本研究は、鹿児島大、京都府立医大、聖マリア

ンナ医大が連携であるが、ゲノム配列解析拠点である東京大学およびHTLV-Iゲノム解析を行う京都大学チームおよびデータ解析センターと我々が一体となって行う。

特にはじめのアプローチとして、HAMの家系例を抽出（10家系以上あり）し、エクソーム解析を行い、家族性のHAM患者において遺伝的な素因を確認する。

（倫理面への配慮）

臨床検体採取にあたっては、インフォームドコンセントのもとに採血を行った。サンプルは匿名化して用いた。本研究は鹿児島大学倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

検体収集は、十分に行われ、特に遺伝子検査を提供しているものについてはかなり短期間に収集し得た。CMTの遺伝子診断は、依頼のあった446例に施行し、10-15%の患者の遺伝子異常を同定した。失調性疾患においては、南九州地域（鹿児島、宮崎、沖縄）、東九州地域（大分）、愛媛における常染色体優性の小脳失調211家系について分子疫学的検討を行い、鹿児島ではSCA31が22%と最も多く、次いでSCA6、GSS、SCA3の順で多い事を確認した。リピート伸長変異が確認できなかった原因未同定の家族性・優性遺伝性小脳失調症（AD-SCD）については、次世代シーケンス法を用いた遺伝子スクリーニング法（SCA5, 11, 13, 14, 15, 16, 23, 27, 28, 35）を構築し、試験的にはおおそ良好な配列が得られた。

HAMおよびキャリアの臨床検体数は、それぞれ300検体および200検体以上あり、エクソーム解析による網羅的な新規遺伝子発見を目指す。また、すでに遺伝子解析のため共同研究施設に送った検体のチェックを行っている。

大規模エクソーム解析による原因同定
今年度は、現時点では拠点である東京大学神経内科のゲノムシーケンサーのパイプラインが整い、研究は進んでいる。ゲノムシーケンサーをフルに活用したデータは出ていないが、CMTを中心に300検体のエクソーム解析が進行中である。多くのCMTの原因の同定が期待される。

新遺伝子診断システムの構築

CMT病の遺伝子診断や小脳失調症の遺伝子診断の陰性例について、より詳細な遺伝子検査を行うための包括的な遺伝子診断システム構築した。具体的にはGS junior シーケンサーおよびIllumina社のMiSeqを利用した。検査は順調で、多数の遺伝子を安価で高速に診断出来るシステムを開発した。

希少性遺伝性疾患の新規原因遺伝子同定
一方で、小型のゲノムシーケンサーやマイクロアレイ法を用いて希少疾患の原因を見つける。一つは、新しい発作性筋力低下を呈する新しいミトコンドリア病として、MIMECK（mitochondrial myopathy with episodic hyper-CKemia）と名付け報告した。本症患者8家系10例を確認し、発作性の脱力の治療法も発見し、総説執筆や学会発表などで周知するべく活動を行っている。

さらには、CMT や運動ニューロン病の類縁疾患である疾患、優性遺伝性の HMN (hereditary motor neuropathy) の遺伝的原因としてアラニル tRNA 酵素 (AARS) の遺伝子異常を発見した。これは世界で初めての報告である。その他にも、ミトコンドリア病の新しい疾患概念を確立したり、その希少疾患の原因の究明を確実に実行している。

D. 考察

CMT の原因遺伝子は 35 以上報告されている。マイクロアレイ技術を活用した CMT の包括的遺伝子診断法を開発し、実践した。446 例の CMT の分子疫学や薬剤性の重度ニューロパチー発症例が EGR2 変異による未発症の CMT であることを遺伝子チップで見いだした。既知の CMT 包括的遺伝子診断スクリーニングは本手法である程度可能となったが、精度、簡便さ、コスト、を考えると遺伝子診断システムの改良が必要であった。そのため、次世代シーケンシング技術を中心に遺伝子診断システムをデザインし、いくつかの疾患でシステムの構築を行った。具体的には原因未同定の家族性 SCD 患者については、GS junior システムを用いて試験的に遺伝子スクリーニング (SCA5, 11, 13, 14, 15, 16, 23, 27, 28, 35) を行い、複数箇所点変異を確認に成功した。GS junior システムの処理能力を考慮すると、1 ランで約 10 症例の検体を同時に解析することが可能となった。他社のゲノムシーケンサーに移植を成功し、CMT や HSN でも順調に検査法が確立されつつある。それを用いることで、より短期間かつ低コスト

での遺伝子検査が実現可能となるだろう。

一方、HAM についてはキャリアの約 0.3% の頻度で発症しており、HAM の発症機序および治療法開発には HAM とキャリアを比較して研究を進める必要がある。本研究では HAM とキャリアの全エクソーム解析を行い、これらを進めていく予定である。検体として HAM およびキャリアでそれぞれ 300 検体および 200 検体以上の検体を使用可能であるが、まず、HAM の家族例を中心に解析する。エクソーム解析後のデータを用いての種々の細胞機能解析も重要である。

E. 結論

① 遺伝子診断陰性例に対する包括的な既知の遺伝子診断は、小型のゲノムシーケンサーを用いることで、安価、迅速に実行できる。

② 新しい疾患として MIMECK を樹立し、原因を報告した。

③ HMN の原因として、AARS の異常を世界で初めて同定した。

④ 全エクソーム解析を行う体制がととのい、CMT, HAM およびキャリアなどを順次調べている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura T, Hashiguchi A, Suzuki S, Uozumi K, Tokunaga S, **Takashima H**. Vincristine exacerbates asymptomatic Charcot-Marie-Tooth

- disease with a novel EGR2 mutation. **Neurogenetics**. 2012 13 (1)77-82
2. Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Tokunaga S, Zhu L, Shen H, Takashima H. Alanine-tRNA synthetase mutation in a family with distal hereditary motor neuropathy. **Neurology** in press 2012, May
 3. Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Inamori Y, Sangatsuda Y, Michizono K, Watanabe O, Hatakeyama H, Goto Y, Arimura K, Takashima H. A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy. **Acta Neuropathol**. 2011 121(6)775-783
 4. Okamoto Y, Higuchi I, Sakiyama Y, Tokunaga S, Watanabe O, Arimura K, Nakagawa M, Takashima H. A new mitochondria-related disease showing myopathy with episodic hyper-CKemia **Ann Neurol**. 2011 Vol70(3) 486-492
 5. Nishikawa N, Nagai M, Tsujii T, Tanabe N, Takashima H, Nomoto M. Three SCA2 siblings with Ataxia, Parkinsonism, and Motor Neuronopathy. **Internal Medicine**, 2011, 150(13): 1429-32
 6. Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R: Reduced Tim-3 expression on HTLV-I Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. **J Infect Dis**. 203(7):948-59, 2011
 7. Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Takashima H, Izumo S: Histopathologic differences between human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-positive and HTLV-1-negative polymyositis. **Clin Exp Neuroimmunol**. 2: 12-7, 2011
 8. 橋口昭大、高嶋 博. Charcot-Marie-Tooth 病の網羅的遺伝子診断. **Annual Review 神経** 2012、中外医学社、東京、267-273, 2012
 9. 橋口昭大、高嶋 博. Hereditary neuropathy: variety of disease-causing genes and progress of molecular genetic diagnosis. **Brain Nerve** 63(6)539-548, 2012
2. 学会発表
 1. 大窪隆一、樋口逸郎、稲森由恵、岡本裕嗣、田代雄一、橋口昭大、高嶋 博、徳永章子、平野隆城: 嚢胞肺、腎不全、脳卒中様発作を合併したミトコンドリアミオパチー家系の検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
 2. 橋口昭大、中村友紀、徳永章子、岡本裕嗣、高嶋 博、有村公良: MFN2 点変異を有する軸索型 Charcot-Marie-Tooth 病 13 例の検討.

- 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
3. 中村友紀、樋口雄二郎、橋口昭大、徳永章子、岡本裕嗣、高嶋 博：MPZ 変異を伴う CMT11 例の検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
 4. 稲森由恵、樋口逸郎、田代雄一、崎山佑介、橋口昭大、岡本裕嗣、白石匡史、東桂子、出口尚寿、高嶋 博：広範な白質病変とミオパチーを認め、DMPK 遺伝子異常を認めた一家系. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
 5. 迫田俊一、樋口逸郎、有村由美子、有村公良、高嶋 博：本邦における周期性四肢麻痺の臨床的検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
 6. 樋口逸郎、稲森由恵、橋口昭大、東桂子、白石匡史、高嶋 博：ミトコンドリア異常を伴う多発性筋炎の臨床的、筋病理学的検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
 7. 崎山佑介、大窪隆一、西郷隆二、徳永章子、平野隆城、山下秀一、塩見一剛、高嶋 博：宮崎県南部に集積する家族性多系統変性症の臨床的特徴について. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
 8. 中村友紀、橋口昭大、徳永章子、有村由美子、有村公良、高嶋 博：ビンクリスチンは EGR2 変異を伴う無症候性 Charcot-Marie-Tooth 病を増悪させる. 第 23 回臨床神経生理研究会 2011 年 8 月 鹿児島
 9. 橋口昭大、中村友紀、徳永章子、岡本裕嗣、高嶋 博、有村公良：MFN2 点変異を有する軸索型 Charcot-Marie-Tooth 病 17 例の臨床像. 第 22 回日本末梢神経学会学術集会 2011. 9 宜野湾市
 10. 久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二：HLA-A*24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL は HAM 発症リスクを下げるか？第 23 回日本神経免疫学会 2011 年 9 月 東京
 11. 野村美和、荒田 仁、道園久美子、出口尚寿、高田良治、渡漫修、高嶋 博：ST 合剤で治療しえた感染性脳症の一例. 第 16 回日本神経感染症学会 2011 年 11 月東京
 12. 林大輔、高口 剛、樋口雄二郎、市来征仁、東桂子、出口尚寿、渡漫修、新名主宏一、佐藤克也、高嶋 博：パーキンソンニズム、認知症を呈する神経変性疾患との鑑別を要した家族性 Creutzfeldt-Jakob 病 (M232R) の 1 例. 第 293 回日本内科学会九州地方会 2011 年 5 月 長崎
 13. 武井潤、篠原和也、田代雄一、崎山佑介、荒田 仁、橋口昭大、道園久美子、東桂子、出口尚寿、樋口逸郎、高嶋 博：顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの遺伝子異常を有する axial myopathy の家系. 第 194 回日本神経学会九州地方会 2011 年 6 月 久留米
 14. 吉田 剛、難波雄亮、金城正高、城之園学、末吉健志、高嶋 博：側頭葉全曲の白質病変を欠き、Notch3 遺伝子解析で R75P 変異を認めた CADASIL の 1 例. 第 194 回日本神経学会九州地方会 2011 年 6 月 久留米