

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

大窪隆一	橋口昭大	徳永章子
崎山佑介	中村友紀	野妻智嗣
樋口雄二郎	西郷隆二	
袁 軍輝	吉村明子	

研究協力者

鹿児島大学神経内科・老年病学

河北医科大学 神経筋学
胡 静 趙 哲

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）
分担研究報告書

HAM の発症要因の探索

研究分担者 出雲周二

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

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

研究要旨： HAM 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。感染細胞株 HUT102 塗末標本で有意の結果を得た。今後パラフィン標本、剖検組織での検出法を開発する。

A. 研究目的

HAM は HTLV-1 感染者のごく一部に発症する慢性難治性神経疾患で、難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定されている。胸部脊髄を中心に広く中枢神経に生じており、HTLV-1 感染 T 細胞の脊髄浸潤とそれを排除しようとする宿主の免疫応答がその病態として想定されている。病原体とそれに対する免疫応答という感染症の原則的な過程が生じているにもかかわらず、なぜごく一部の感染者のみが発症するのか、なぜ長期にわたり炎症が持続するのかなど、HAM の発症病態は未だ不明の部分が多い。急速に進行する例から長期にわたり緩徐にしか進行しない例など基本的な症状、所見は同様でも重症度や進行に個人差が大きいことなどより、生体の遺伝的因子や外的因子の発症病態への関与が想定されている。本研究では遺伝的要因の解析に資する患者試料を収集・保存管理し、遺伝子解析に供するとともに、得られた末梢血単核球

(PBMC) や病理組織標本を用いて HAM の発症病態を明らかにすることを目的としている。HTLV-1 関連疾患の発症過程に関して、近年見出されたウイルス蛋白で、HTLV-1 遺伝子のマイナス鎖にコードされている HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) が、ATL 細胞で高発現し、ATL の発症に関与している可能性が注目されている。本年度は、HAM 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。

B. 研究方法

HTLV-1 感染細胞株 HUT102 と非感染細胞株 CEM を 48 時間培養後、poly-L-lysine コートのスライドに塗末乾燥標本を作製、また、パラフィン包埋組織標本での使用を想定し、ATL 患者及び HTLV-1 陰性健常者の末梢血単核球 (PBMC) のホルマリン固定パラフィン

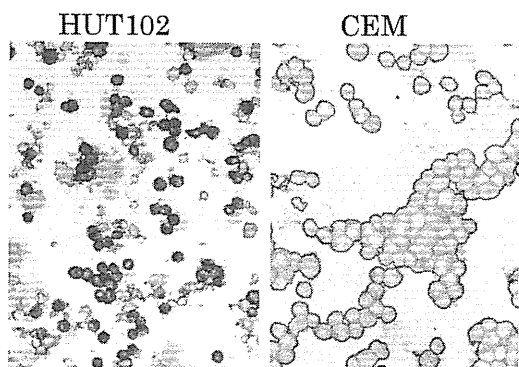
法埋標本を作製した。スプライス型 HBZ mRNA の 14-mer anti-sense および sense PNA probe を作成し、DAKO in situ hybridization kit を用いて 55°C でハイブリダイズし、洗浄後 NBT/BCIP あるいは Fast Red で可視化した。

(倫理面への配慮)

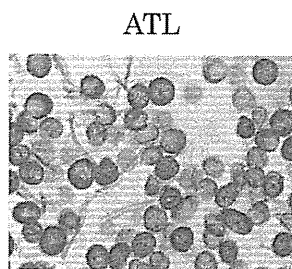
患者検体については研究への使用についてインフォームドコンセントを得て採取されたものをブラインド化して使用した。

C. 研究結果

Anti-sense probe にて HTLV-1 感染株 HUT102 細胞では 80% で強い陽性シグナルが検出された。一方、HTLV-1 陰性の CEM 細胞では陽性細胞はみられなかった。



一方、PBMC のパラフィン法埋切片でのハイブリダイゼーションでは ATL 患者 PBMC で細胞質が陽性の細胞が多数検出された。



健常者 PBMC でも若干の陽性細胞があり、また、ATL でも検出されない症例もあった。

D. 考察

HBZ の HAM 患者での発現は Saito らが PBMC を用いて real time PCR により mRNA の発現を検討し、HBZ は全例で発現しており、プロウイルス量や髄液ネオプテリン値との相関を認めたと報告している。しかし組織での HBZ in situ hybridization は 2011 年に Ohshima らが報告したのみで、ATL 脊髄病巣での検出の報告はない。これまでの種々の報告では HBZ は HTLV-1 感染細胞では高率に発現しているものと思われ、HBZ in situ hybridization は少なくとも感染細胞のマーカーとして組織での局在を探る良い指標となることが期待される。

E. 結論

HBZ in situ hybridization 法により HTLV-1 感染細胞を組織標本で特定できる可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

研究協力者

太院モモエ

久保田龍二

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）
分担研究報告書

遺伝性ニューロパチーの臨床的、遺伝学的研究

研究分担者 中川正法 京都府立医科大学 大学院 神経内科学

研究要旨： 遺伝性ニューロパチーには、Charcot-Marie-Tooth 病（CMT）、hereditary motor neuropathy、hereditary sensory neuropathy、familial amyloid polyneuropathy など種々の疾患が知られているが、その確定診断には遺伝子診断が不可欠である。本研究では、遺伝性ニューロパチーの診断と病態解明および治療法の開発をめざす。当科で遺伝性ニューロパチーが疑われた症例は 51 例（男 29 例、女 22 例）で、遺伝子異常が明らかになったのは、PMP22 重複 17 例、PMP22 欠失 1 例、MFN2 変異 3 例、EGR2 変異 2 例、MPZ 変異 2 例、DNMT1 変異 1 例であった。今後、遺伝子異常が未解明の例に関してエキソーム解析を含めた検討を行う予定である。新たな診断法として、末梢神経の神経エコー、末梢神経軸索興奮性、神経生理学的検査所見、遺伝子異常との関連について検討を開始した。治療に関しては、アスコルビン酸内服と末梢神経軸索興奮性の変化を検討した。

A. 研究目的

遺伝性ニューロパチーには、Charcot-Marie-Tooth 病（CMT）、hereditary motor neuropathy、hereditary sensory neuropathy、familial amyloid neuropathy など種々の疾患が知られているが、その確定診断には遺伝子診断が不可欠である。本研究では、遺伝性ニューロパチーの診断と病態解明および治療法の開発をめざす。

B. 研究方法

当科にて臨床的に遺伝性ニューロパチーが疑われた 51 例（男 29 例、女 22 例）の遺伝子解析を行った。遺伝子解析は、鹿児島大学高嶋教授との共同研究として、主に CMT 遺伝子解析用 DNA チップを用い、一部の症例については、MPZ、GJB1、MFN2 のシーケンス解析を当科にて行った。

新たな診断法として、末梢神経の神経エコー、末梢神経軸索興奮性、神経生理学的検査所見、遺伝子異常との関連について検討を開始した。

治療に関しては、アスコルビン酸を 20mg/kg/日を 1 年間投与し、末梢神経軸索興奮性（Qtrac®）を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究計画書が、京都府立医科大学倫理委員会（学外者を含む）にて承認されている（C-818）。

C. 研究結果

遺伝子解析を行った 51 例中、現時点で遺伝子異常が明らかになったのは、PMP22 重複 17 例、PMP22 欠失 1 例、MFN2 変異 3 例、EGR2 変異 2 例、MPZ 変異 2 例、DNMT1 変異 1 例の計 26 例であった。約半数の例で原因遺伝子が特定されておらず、今後、エキソーム解析を含めた検討を行う予定である。

末梢神経の神経エコーは、現在までに 20 例に施行した。神経生理学的検査所見、軸索興奮性、遺伝子異常との関連については、現在、検討中である。

CMT1A 7 例にアスコルビン酸 20mg/kg/日を 1 年間投与し、末梢神経軸索興奮性を検討した。年齢が比較的若い CMT1A 2 例では軸索興奮性が改善する傾向が見られた。

D. 考察

遺伝性ニューロパチーが疑われ遺伝子異常が明らかになったのは自験例においても約半数であった。未確定例に関しては、今後、エキソーム解析を含めた検討が必要とされている。

これまでの臨床研究では、CMT に対するアスコルビン酸の有効性は認められていない。しかし、今回の検討でアスコルビン酸 20mg/kg/日を1年間投与した場合、比較的若い年齢の CMT1A では末梢神経軸索興奮性は改善傾向を示しており、有効である可能性が示唆された。今後、症例数を増やして検討する必要がある。

E. 結論

初年度である今年度は、遺伝性ニューロパチーの診断と病態解明および治療法の開発を行うための体制づくりと基礎的データの収集を行った。今後、エキソーム解析を含めた遺伝学的検討、末梢神経の神経エコー、末梢神経軸索興奮性、アスコルビン酸の有用性などの検討を行っていく予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

- 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

共同研究者

高嶋 博 (鹿児島大神経内科・教授)
滋賀健介 (京都府立医大神経内科・助教)
水田依久子 (京都府立医大神経内科・医師)
能登裕一 (京都府立医大神経内科・院生)
大竹弘哲 (CMT 友の会・公立七日市病院神経内科・リハビリ科・医師)
山田隆司 (CMT 友の会副代表・楠メンタルホスピタル・作業療法士)

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）
分担研究報告書

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

研究分担者 野元正弘 愛媛大学大学院病態治療内科学

研究要旨： 運動障害疾患を表現型とする希少難治性疾患の病態解明を行った。パーキンソンニズム、多系統変性症、運動ニューロン病の同胞例において検討し、SCA2 の家系であることを明らかにした。運動ニューロン病がSCA2でも起こりうることを示した。

A. 研究目的

希少難治性疾患の解明のため、該当する神経疾患患者の臨床症状を見当するとともに、遺伝子検査を行い、治療薬開発の手掛かりとする。

B. 研究方法

希少神経疾患患者の身体症状、神経症状、画像検査、一般生化学的検査に加えて、遺伝子検査を行った。

（倫理面への配慮）

遺伝子検査について、鹿児島大学、および連携する研究機関で遺伝子検査を行う説明文書及び同意書を作成し、本人および家族に説明し、同意を得て検討した。

C. 研究結果

同胞3人が、それぞれパーキンソン病、OPCA、運動ニューロン病として加療している症例について検討した。第1子は64歳男子で、10歳代から上肢の筋力が弱く体育科目の鉄棒はできなかった。学業、業務は可能で、卒業して仕事を続けている。筋力は緩徐に低下しカバンを持つことが困難となり受診。上肢に強い、全身

の筋力低下、筋萎縮を認めた。電気生理学的検査では神経伝導速度は波形、速度とも正常であった。筋電図では神経原性変化を認めた。血清CKは正常であった。第2子は59歳男性で、42歳から歩きにくくなっている。症状は緩徐に増強し、45歳からパーキンソン病として加療を受け症状は軽快した。56歳まで仕事を継続し、57歳から構音障害が起こり受診。頭部MRIでは小脳、脳幹部の萎縮を認めた。第3子は58歳女性で、39歳から振戦、筋固縮、動作緩慢が起こっている。パーキンソン病の治療により症状は軽快し、15年間仕事を継続した。MIBG心筋シンチグラムではH/M比は早期で1.26、後期で1.09と低下していた。

遺伝子検査では第1子と3子ではCAG repeatが41回で、第2子では42回であった。

D. 考察

SCA2ではOPCA様の臨床症状の起こることが報告され、またパーキンソン病の症状を起こすことが知られていた。この家系ではこの2つの臨床症状とともに、

運動ニューロン病様の臨床症状を起こす例がみられた。このことは運動ニューロン病の病因に SCA2 遺伝子が関わりうることを示唆しており、病態解明の手掛かりとなりうる可能性がある。

E. 結論

SCA2 の同胞例を検討し、運動ニューロン病の病態に SCA2 遺伝子の関わりうる可能性について指摘した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Noriko Nishikawa, Masahiro Nagai, Tomoaki Tsujii, Nachi Tanabe, Hiroshi Takashima and Masahiro Nomoto: Three Spinocerebellar Ataxia Type 2 Siblings with Ataxia, Parkinsonism, and Motor Neuronopathy. **INTERNAL MEDICINE**, 50:1429-1432, 2011

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

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）
分担研究報告書

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

研究分担者 永井将弘 愛媛大学医学部附属病院臨床薬理センター

研究要旨：愛媛大学医学部附属病院薬物療法・神経内科における多系統萎縮症患者（MSA）の現況を調査、検討した。平成23年9月から半年間に当科を受診したMSA患者数は6例で男性2例、女性4例、平均年齢72.5才、平均罹病期間6年であった。また、MSA-CとMSA-P患者数比率は2：1であった。

A. 研究目的

多系統萎縮症（MSA）は小脳系、錐体外路系、自律神経系が障害される神経変性疾患で、四肢、体幹失調、筋強剛、動作緩慢、起立性低血圧、排尿障害など多彩な神経症状を呈する。本疾患は小脳症状を主体としたMSA-Cとパーキンソンズを主体としたMSA-Pに分類される。本疾患は有病率約4人/万人の希少難治性疾患であり、その発症機序は未だ明らかにされていないが、外的要因に加えてなんらかの遺伝的要因が発病機序に関与していると推測されている。病態解明には多数例の解析が必要であり、このため本研究事業を中心とした全国規模の共同研究が進行中である。愛媛大学医学部附属病院薬物療法・神経内科においても今後の効率的な検体収集、解析を目的とした症例のデータベース化が構築されつつある。今回、当科におけるMSA症例の現況について報告する。

B. 研究方法

平成23年9月から平成24年2月までの半年間に愛媛大学医学部附属病院薬物療法・神経内科を受診したpossibleもしくはprobable MSA患者を調査、検討した。

（倫理面への配慮）

個人情報および診療情報などのプライバシーに関する情報は万全な管理対策を講じ、プライバシーの保護に努めている。発表の際は個人が特定されないよう配慮する。

C. 研究結果

データベース上6症例が検出された。男性2例、女性4例、平均年齢72.5才（64～79才）、平均罹病期間6年（3～13年）であった。タイプとしてはMSA-Cが4例（平均罹病期間7.5年）、MSA-Pが2例（平均罹病期間3年）とMSA-C:MSA-Pは2：1であった。血縁者にMSAを発症した症例はなかった。

D. 考察

今回の対象症例は6例と解析には十分

な症例数ではなかったが、本邦での過去の報告と同じく MSA-C 症例数が MSA-P 症例数を上回っていた。しかし、パーキンソン病と診断、データベースに登録された中に MSA-P が含まれている可能性はある。

MSA は孤発性の神経変性疾患だが、2011 年に *SHC2* 遺伝子の copy number loss が MSA 発症に関与していることを示唆する報告がなされた。MSA は SCA などと異なり単一遺伝子が発症に起因する疾患ではなく、外的要因に加えてなんらかの遺伝的要因が発病機序に関与していると推測されている。今回の検討でも親族に MSA を発症した症例はいなかった。発症機序を明らかにするためには多数の症例が必要であり、今後、当科においても更なる MSA 症例の蓄積が必要である。

E. 結論

半年間で当科を受診した MSA 患者数は 6 例で、MSA-C と MSA-P 患者数比率は 2 : 1 であった。

F. 健康危険情報

特記すべき事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

Iwaki H, Yamashita R, Tsujii T, Nishikawa N, Nagai M, Higo Y, Miyauchi S, Nomoto M. Observations derived from the review of clinical studies related to rare diseases in the department of neurology in Ehime university. International Conference of Orphan Drugs and Rare Diseases 2012 Conference. Feb.4-6, 2012, Tokyo

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

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

HAM 患者臨床検体の整備とそれを用いた免疫学的検討

研究分担者 久保田龍二
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
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

研究要旨：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う予定である。今年度はそのための検体の収集および整備を行ない、一部を用いて病態解明のための HAM の免疫学的検討を行った。HAM および HTLV-I キャリアよりインフォームド・コンセントのもと、血液採取を行なった。リンパ球分離を行い、DNA・RNA・蛋白質解析が可能な状態で液体窒素中に保存し、管理を行った。これらリンパ球検体および抽出した DNA 検体のデータベースをつくり準備を行った。また、保存検体の一部を用い、HAM 発症病理に重要な HTLV-I 感染細胞および HTLV-I 特異的 CTL の機能解析を合わせて行った。HTLV-I 感染細胞では、TCR/CD3 の発現およびシグナルが低下しており感染細胞の機能不全が明らかとなった。また、ウイルス排除に重要な CTL の機能を HAM とキャリアで比較し、両者のサイトカイン・ケモカイン産生能および細胞傷害性分子の脱顆粒能には差がないことが明らかとなった。

A. 研究目的

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 では脊髄の障害により、歩行障害、排尿障害が出現し、重症化すると車椅子使用となるが、未だ根治療法は開発されておらず、その確立は急務である。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う予定である。今年度はそのための検体の収集および整備を行ない、一部を用いて病態解明のための HAM の免疫学的検討を行った。HAM においては、HTLV-I プ

ロウイルス量が多いこと、すなわち HTLV-I 感染細胞が多いことが最大の発症リスクであるが、生体内における HTLV-I 感染細胞の性状については、よくわかっていない。また、HAM で増大している HTLV-I ウイルスを細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が排除しきれないことより、HAM における CTL の機能不全の可能性が指摘されているが、本当に機能不全があるかは不明である。本年度はこれらの課題に検討を行った。

B. 研究方法

①HAM および未発症 HTLV-I キャリアの臨床検体の整備：HAM および HTLV-I キャリアよりインフォームド・コンセントのもと、血液採取を行なった。リンパ球分離を行い、DNA・RNA・蛋白質解析が可能な状態で液体窒素中に保存し管理を行った。また、これらリンパ球検体および抽出した DNA 検体のデータベースをつくり準備を行った。

②生体内 HTLV-I 感染細胞の性状の解析：HAM 患者の PBMC を短時間培養し、ウイルス蛋白が発現した後、Tax 蛋白を細胞内染色し感染細胞を同定し、表面マーカーを検討した。また CD3 刺激後、感染細胞を抗 Tax 抗体で染色した後、T 細胞レセプター (TCR) からのシグナル伝達分子である、Lck および ZAP70 のリン酸化を検討した。

③HTLV-I 特異的 CTL の HAM および HTLV-I キャリアでの比較検討：CD8 分画における、HLA-A24 拘束性 Tax301-309

特異的 CTL を Tetramer で検出した。Tax301-309 ペプチド抗原を 1 μ M で添加し、5 時間培養後の Tax301-309 抗原特異的サイトカイン (IFN- γ) 産生細胞、ケモカイン (MIP-1 β) 産生細胞、および脱顆粒のマーカーである CD107a 陽性細胞の Tetramer 陽性細胞に対する頻度と MFI の比較を行った。

(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倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

①全エクソーム解析に用いることが可能な 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 検体以上あることがわかった。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い、今後本研究に追加できる検体の探索を現在行っている。

②HTLV-I 感染細胞では、TCR および CD3 の発現が低下していた。HAM では正常コントロールと比べ、CD4+細胞での Lck および ZAP70 の TCR シグナルは低下していた。同一患者の感染細胞は、非感染細胞より優位に TCR シグナルは低下していた。しかし、HTLV-I 感染者の非感染 CD4+細胞でも、軽度であるが TCR 発現の低下が認められた。

③HLA-A24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL の

機能を HAM とキャリアで比較検討した。CTL の頻度は HAM で高かったが、抗原刺激による IFN- γ 産生、MIP-1 β 産生および、細胞傷害性顆粒の脱顆粒を表す CD107a 発現には、両者で差を認めなかった。

D. 考察

HAM 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。今回のリンパ球および DNA 検体の保存状態のチェック、およびデータベース化により、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ことがわかった。しかし、データの精度を上げるためには、さらなる検体収集を行っていく必要がある。また、われわれのリンパ球保存システムを用いたリンパ球は、感染細胞および免疫細胞の機能実験に十分使用できたことより、全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にも、十分耐え得るものと考えられた。

本研究により、HTLV-I 感染細胞では TCR/CD3 の発現が低下しており、そのため TCR よりのシグナル伝達の低下を起こし、免疫機能の低下を起こしていることが明らかとなった。しかし、HTLV-I 感染者の非感染 CD4+細胞でも軽度の TCR 発現の低下が認められ、他のメカニズムによる広範囲の CD4+細胞の免疫低下も示唆された。今後さらなる検討が必要である。

HAM とキャリアにおける CTL の比較検討では、最大抗原刺激による CTL 中のサイトカイン産生、ケモカイン産生および CD107a 発現細胞の頻度および MFI には差を認めなかった。今後、T 細胞 avidity、細胞増殖能、CTL 活性、表面抗原発現等で、HAM とキャリアの HTLV-I 特異的 CTL の機能に差がないかにつき、検討が必要である。

E. 結論

- ①全エクソーム解析に用いる HAM およびキャリアの臨床検体は、相当数確認できた。今後も検体数を増やしていく。
- ②HAM の HTLV-I 感染細胞は、TCR および CD3 の発現が低下し、シグナル伝達が不十分となり免疫能が低下していた。
- ③サイトカイン、ケモカイン、および脱顆粒について、HAM とキャリアの HTLV-I 特異的 CTL の機能には差がなかった。
- ④これらの機能実験より、我々の検体保存システムが、全エクソーム解析後の種々の細胞機能解析にも、十分耐えうるものであると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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
2. 学会発表
 1. 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. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
 2. **Kubota R**. Takenouchi N, Matsuzaki T, Takashima H, Izumo S: HLA-A24-restricted HTLV-I-specific CTL response reduces the HTLV-I proviral load but the HLA increases the risk of HAM/TSP. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
 3. Matsuzaki T, Kodama T, **Kubota R**, Izumo S: Recent epidemiologic trends of HAM/TSP in Japan. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
 4. 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. *15th International Conference on Human*

- Retrovirology: HTLV & Related Viruses*,
Leuven, Belgium, 2011
5. Kodama D, Kubota R, Izumo S: Gene expression and glycan profiling of CD4+ T cells in HAM/TSP. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
 6. Matsuura E, Kubota R, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S: Neural bystander damage by infiltrating virus-infected T cells and the cytotoxic lymphocytes in HTLV-I-associated neurological disease. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
 7. Kodama D, Kubota R, Izumo S. Pathway analysis of HAM/TSP. *25th Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases*, Tokyo, Japan, 2011
 8. 久保田龍二: HAM スペクトラム。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋
 9. 久保田龍二、Abdelbary NH、松崎敏男、林 大輔、高嶋 博、出雲周二: HAM の HTLV-I 特異的 CTL における T 細胞疲労関連分子の検討。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋
 10. 児玉大介、久保田龍二、出雲周二: HTLV-I 関連脊髄症(HAM)における糖鎖グライコミクス解析。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋
 11. 松崎敏男、久保田龍二、出雲周二: HAM 患者の全国疫学調査。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋
 12. 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
 13. 久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二: HLA-A24 拘束性 CTL はウイルス量を減少させるが HAM 発症リスクを上げる。第 4 回 HTLV-I 研究会。2011 年 9 月 東京
 14. 児玉大介、久保田龍二、出雲 周二: HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) のパスウェイ解析。第 4 回 HTLV-I 研究会。2011 年 9 月 東京
 15. 久保田龍二、Abdelbary NH、松崎敏男、林 大輔、高嶋 博、出雲周二: HAM における T 細胞疲労関連分子 Tim-3 発現の低下。第 16 回日本神経感染症学会。2011 年 11 月 東京
- 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

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）
分担研究報告書

神経疾患の遺伝子解析に基づく病態解明

研究分担者 田中 章景 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学

研究要旨：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。この結果、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）。rs2275294 のリスクアレルは、ZNF512B の発現を低下させるとともに、ZNF512B が神経保護に働く TGF- β シグナル系の positive regulator であることを示した。ZNF512B の脊髄運動ニューロンにおける発現は、コントロールに比し、孤発性 ALS において上昇していた。これらのことより、ZNF512B 遺伝子 rs2275294 のリスクアレルを持つと、ZNF512B の発現が低下し TGF- β シグナル経路の障害を介して ALS に罹患しやすくなる可能性が示唆された。

A. 研究目的

家族性 ALS では、近年次々と新たな病因遺伝子が明らかになってきている。一方、孤発性 ALS については、疾患易罹患性遺伝子や病態関連遺伝子の発見は遅れている。これらの同定のため、現時点で最も現実的な遺伝子解析技術は SNPs タイピングにより ALS に有意な common variants を見いだすゲノムワイド関連解析 (GWAS) である。

我々は DNA サンプルを含む全国規模の孤発性 ALS の疾患コホートを形成しており、これらのサンプル及び他機関において独自に集積されたサンプルを併せ、理化学研究所の飯田有俊先生、池川志郎先生のグループとの共同研究により、日本初の GWAS を行った。

B. 研究方法

我々は、2006 年 2 月の症例登録開始以来、孤発性 ALS の DNA サンプル、臨床データリソースを構築してきている。これらを含め、他施設で集積された孤発性 ALS の DNA サンプルを用い、JSNP に登録されている 52608 個の SNPs についてインベーター法によるタイピングを行った。

スクリーニングの第 1 段階として 92 例の ALS、233 例の対照の間で解析を行い、quality control を経て 48939 個の SNPs について関連解析を行った。次に第 2 段階のスクリーニングとして ALS では 362 例を追加した合計 454 例、そして対照では 725 例を追加した合計 958 例について関連解析を行い、候補遺伝子を絞り込んだ。

そして、これらのスクリーニングを経て、2 段階の検証実験（追加セット 1: ALS サンプル 249 例と対照 1030 例、追加セット 2: 602 例の ALS と 2256 例の対照）を行った。

さらに、同定した SNP が SNP の存在する遺伝子の転写活性に及ぼす影響について、SNP を含む DNA フラグメントを遺伝子プロモーターとともにルシフェラーゼ遺伝子に接続し、Neuroblastoma cell でルシフェラーゼアッセイを行った。また、同定 SNP を含むオリゴヌクレオチドを DIG でラベルし SKNAS 細胞の核抽出液と反応させ、ゲルシフトアッセイを行うことで SNP による核抽出タンパクとの結合程度の違いを検討した。

また、同定した遺伝子と TGF- β シグナル系

の関係が示唆されたため、SBE(Smad binding element)を組み込んだルシフェラーゼベクターを用い、TGF- β 添加下において同定した遺伝子の過剰発現および siRNA による発現低下でルシフェラーゼ活性を検討した。

さらに、ALS 患者運動ニューロンにおいて同定した遺伝子の発現を免疫組織化学的に検討した。

(倫理面への配慮)

研究はヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守し、名古屋大学医学部倫理委員会をはじめ各機関の倫理委員会の承認を受けて行った。研究対象患者、コントロール検体の提供者に対しては文書でのインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

スクリーニングの第 1 段階では、 $P < 0.01$ 以下の有意な差を示す 893 個の SNPs を同定し、第 2 段階のスクリーニングで $P < 0.001$ 以下の 10 SNPs に絞り込むことができた。検証実験における関連解析の結果、rs2275294 という一つの SNP のみが同定され、もう一つの追加セットにおける検証でも本 SNP の有意性が確認された。これらすべてを統合したメタ解析で、rs2275294 は 9.3×10^{-10} という P 値を示した。rs2275294 のリスクアレルは C であり、ALS で C アレルをとる頻度は、スクリーニングで 0.491、追加セット 1 で 0.512、追加セット 2 で 0.481 であるのに対し、対照では各々 0.422、0.434、0.416 であり、オッズ比は各々 1.32、1.37、1.30 であった。rs2275294 は ZNF512B という遺伝子のイントロン内に存在しており、連鎖不平衡マップの解析により、周辺 SNPs の中でも本 SNP のみが有意であることが確認された。

次に、この SNP が ZNF512B の転写活性に及ぼす影響を調べたところ、リスクアレルではエンハンサー活性が低下していることが明らかになった。さらに、ゲルシフトアッセイの結果、

リスクアレルの C アレルでは、T アレルと比較して核抽出タンパクとの結合が弱いことがわかり、エンハンサー活性が弱いことと対応していると考えられた。

ZNF512B は、zinc finger domain を持つことから transcription factor であると考えられ、TGF- β シグナル経路の調節因子であることが報告より示唆されている。TGF- β は受容体との結合後、Smad 複合体が核に移行し、標的遺伝子の転写調節領域に存在する SBE(Smad binding element)に結合することで標的遺伝子の発現を制御する。このためルシフェラーゼアッセイにおいて TGF- β を加えるとレポーター活性は上昇するが、特に ZNF512B を過剰発現させた際に活性が高くなった。逆に siRNA で ZNF512B の発現を低下させると活性は低下した。

また、脊髄運動ニューロンにおいて、ZNF512B はコントロールではほとんど発現が見られないのに対して ALS では高発現を呈していた。

D. 考察

今回同定した ZNF512B は、オッズ比は 1.3 程度と他の GWAS で同定されたものと同様の値であったが、 9.3×10^{-10} という極めて信頼性の高い P 値を示し、ALS の易罹患性遺伝子と考えられた。また、rs2275294 がリスクアレルを持つ場合には ZNF512B の発現が低下することが明らかとなり、機能的にも意義を持つ variant であった。さらに、ZNF512B の発現が低下することは、神経生存、保護に必須の経路である TGF- β シグナル経路に障害を起こすことも明らかとなった。

E. 結論

我々が集積した孤発性 ALS サンプルを含むオールジャパン体制で我が国初の GWAS を行い ALS 易罹患性遺伝子として ZNF512B を同定した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

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）
分担研究報告書

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

研究分担者 山野嘉久 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター

研究要旨： ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1）の感染者は本邦で約 110 万人存在し、感染者の一部に難治性の HTLV-1 関連脊髄症（HAM）あるいは成人 T 細胞白血病（ATL）を発症する。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り、その解明は、病態理解や根本的な治療薬の開発研究に不可欠である。

HAM は、本邦での推定患者数が約 3000 人と稀な神経難病であり、患者は様々な医療機関に点在しているため研究実施に必要な検体が効率的に集約されず、病態・治療研究が進展しない大きな原因となっている。そこで本研究では、HAM の発症リスク遺伝的因子の探索研究としてこれまで進めてきた SNP 解析、さらにはエクソーム解析やメタボローム解析等を推進するために、HAM 患者の家族歴も含めた臨床情報を収集すると共に、生体試料（血清、血漿、PBMC、DNA、髄液）を経時的に収集・バンク化し、その試料をゲノム解析拠点機関へ提供する体制構築を進めた。重要なことに、HAM は発症率が低いにもかかわらず家族内集積例（HAM 親子 1 家系、HAM の家族歴を有する 2 症例）が認められ、その発症に遺伝的因子の関与が示唆された。

また近年、特定遺伝子のプロモーター領域におけるエピジェネティクス変異による遺伝子発現異常が疾患の発症に関与していることが示唆され、様々な疾患においてエピジェネティクス変異に着目した研究が進展し、疾患における有効な診断や治療標的となることが明らかになりつつある。しかしながら、これまでに HAM において特徴的なエピジェネティクス異常遺伝子の解析や同定の報告は成されていない。そこで今年度は、これまで HAM で行われていない「HAM 特異的 DNA メチル化遺伝子の網羅的解析」を実施した。その結果、本実験条件においては ATL からは特異的なメチル化遺伝子が同定されたが、HAM 特異的なメチル化遺伝子は同定されず、HAM 病態における DNA メチル化異常の関連性は乏しいことが予想された。

A. 研究目的

HAM は、HTLV-1 感染者の約 0.3% とごく限られた集団に発症するが、その原因はこれまで不明であり、その解明は病態理解や根本的な治療薬の開発研究に不可欠である。しかしながら、HAM は本邦での推定患者数が約 3000 人と稀な神経

難病であり、研究実施に必要な検体の収集体制の構築が必要である。これまで我々は HAM 患者の臨床情報と生体試料（血清、血漿、PBMC、DNA、髄液）を経時的に収集・バンク化する体制を構築しており、SNP 解析に関してはこれまでも検体を提供してきている。本研究では、

HAM 患者の家族歴に関する情報収集を進め、またこれまで進めてきた SNP 解析の推進と、将来的なエクソーム解析、メタボローム解析等が実施出来ることを視野に入れ、ゲノム解析拠点機関との連携体制構築を進めた。

また近年、様々な疾患でジェネティックな遺伝子異常に加えて、様々なエピジェネティック異常が蓄積していることが明らかになってきた。エピジェネティック異常は疾患発症から進展にいたるまで、その特性に大きく影響を与えている。エピジェネティックな異常の影響は、広範に遺伝子制御異常に及ぶと考えられており、各種疾患におけるエピジェネティック異常の解明は、病態の理解に有用である。エピジェネティック機構には、安定した修飾である DNA メチル化、可逆性を保持しているヒストン修飾、さらにはクロマチン構造変化や、非翻訳 RNA などの複数のエピジェネティクス機構が多彩なクロストークを介して遺伝子発現を調整している。最近 DNA メチル化やヒストン修飾異常を標的とした治療が臨床の場に取り入れられ始めており、エピジェネティクス制御機構を理解することは、疾患発生・進展に関わる制御機構の解明につながり、有効な診断・治療標的としての展望が期待できる。しかしながら、これまでに HAM において特徴的なエピジェネティック異常遺伝子の解析や同定の報告は成されていない。そこで、本研究では、HAM 関連メチル化遺伝子の同定を目的として、HAM および HTLV-1 感染者（無症候キャリア（AC）、ATL）の臨床検体に特化したサンプルを用いて、網羅的 DNA メチル化解析を行った。また、HAM 細胞発生・成立における HAM 関連メチル化遺伝子の意義を分子生物学的に解析することにより、HAM 細胞の臨床的

特性を明らかにすることで、将来的な HAM 治療標的候補分子としての可能性につなげたいと考え、本研究を試みた。本研究目的を達成するため、以下の実験を計画し、解析に着手した。

- ・網羅的メチル化解析スクリーニングによる HAM 特異的メチル化遺伝子の同定
- ・HAM および感染者（AC、ATL）由来 HTLV-1 感染細胞に限定した HAM 特異的メチル化候補遺伝子の発現量比較と診断マーカーとしての有用性の検証
- ・HAM 特異的メチル化遺伝子発現抑制機構の解析
- ・HAM 特異的メチル化遺伝子発現抑制が HAM 感染細胞機能に及ぼす影響とその分子機構の解析

B. 研究方法

本年度は、これまで進めてきた SNP 解析の推進、将来的なエクソーム解析、メタボローム解析を視野に入れ、倫理委員会で承認済みの同意書を得て検体を収集し、末梢血単核球細胞（PBMC）、血清、血漿、DNA を分離して保存・バンク化した。同時に、患者の家族歴、重症度、治療内容や経過に関する詳細な臨床情報を蓄積した。

また本年度は、網羅的メチル化解析スクリーニングによる HAM 特異的メチル化遺伝子の探索を行った。

(1) 比較解析サンプル採取

HAM 特異的メチル化遺伝子を探索において、臨床検体に特化した検体を用いて解析を行うため無症候キャリア 6 例、HAM 7 例、ATL 7 例での比較解析を行った。また、HTLV-1 は主に CD4 陽性細胞群に優位に感染していることから、疾患特異的に認める遺伝子異常の同定には、