

「感染細胞 (CD4+T 細胞)」と「非感染細胞 (CD4-細胞)」の比較検討法が用いられる。よって、患者由来の PBMC は CD4 ネガティブセクション法にて CD4+T 細胞と CD4-細胞に分離し、それらの細胞群より抽出したゲノム DNA を用いた。

(2) Hyper/Hypo-Methylation Sensitive CpG MCA Microarray 法 (H/H-MCA マイクロアレイ法) を用いた高感度網羅的メチル化解析

無症候キャリア 6 例、HAM 7 例、ATL 7 例の CD4+T 細胞群より得た DNA を H/H-MCA マイクロアレイ法解析に用いた高感度網羅的メチル化解析を行った。H/H-MCA マイクロアレイ法は、CD4+T 細胞 DNA をコントロールとし、各症例の CD4+T 細胞 DNA をターゲットに用いた。各々のゲノム DNA はメチル化シトシンに感受性の制限酵素を用いた切断の後、特異的アダプターをつけることにより PCR にてメチル化 CpG 断片のみ増幅することが可能となる。PCR 産物は Cy3, Cy5 でラベリングした後、アジレント社のカスタムメチル化アレイスライドを用いて網羅的メチル化解析を行った。

(3) クラスター解析による疾患特異的メチル化異常遺伝子の選定

H/H-MCA マイクロアレイ法で得られた結果をクラスター解析し、各疾患にて共通して CD4+T 細胞群のみ高レベルなメチル化を示す遺伝子を候補遺伝子として選出した。

C. 研究結果

今年度は、119 例の HAM 患者が来院し、ゲノム解析拠点機関へ検体を提供できるように生命倫理委員会での改訂・承認済みの同意書を用いて、検体を収集・保存した。そのうち 102 例については経時的に収集・保存できた。また、HAM 親

子 1 家系、HAM の家族歴を有する 2 症例の存在が明らかとなり、それらの検体も収集保存できた。

また、AC、HAM、ATL 由来 CD4+T 細胞 (HTLV-1 感染細胞) 間のメチル化遺伝子の網羅的解析結果の比較より疾患特異的な DAN メチル化の探索を行った結果、ATL 症例では CD4+において CD4-と比較し ATL に共通して高メチル化異常を呈している遺伝子群が抽出されたが、HAM や AC 群からは特異的なメチル化遺伝子は認められなかった。

(倫理面への配慮)

臨床検体の収集に際しては、本学の生命倫理委員会で承認された (承認番号: 第 1646 号) 同意書を用いて、不利益や危険性の排除などに関するインフォームドコンセントを行った。また検体は、個人情報管理者が連結可能匿名化により番号化する為、提供者を特定できないようにし、患者の人権擁護に努めた。

D. 考案

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。今後は、これらの症例を優先的にエクソーム解析を進めていく必要があると考えられた。

また今回の検討では、HAM 特異的なエピジェネティクス異常に着目し、HAM に特徴的なメチル遺伝子の網羅的探索を試みた。その結果、HAM 特異的な DNA メチル化遺伝子は本検討からは抽出されなかった。同条件下において、ATL 症例からは ATL 特異的な DNA メチル化遺伝子として 35 遺伝子が抽出されたことから、ATL では DNA メチル化異常がその疾患

発症や病態形成に関与している可能性が示唆されたが、HAM においては、DNA メチル化による特定遺伝子の発現抑制は、その病態に重大な影響を及ぼしているとは考えにくい結果となった。

また、エピジェネティクス機構は、DNA メチル化のみならずヒストン修飾、クロマチン構造変化などの複数の機構のクロストークから成り立っている。従って、今後、HAM におけるこれらの DNA メチル化以外のエピジェネティクス変化に着目した解析から、HAM 病態を特徴付ける遺伝子発現変異を同定し、その制御機構を明らかに出来る可能性があり、HAM の病態解明や診断、治療標的候補の同定のためにも有用であると考えられる。

E. 結論

HAM の発症リスク遺伝的因子の解明に関する研究を推進するために、SNP 解析の推進、今後のエクソーム解析、メタボローム解析等を視野に入れ、HAM 患者の家族歴も含めた臨床情報、および検体の収集・保存体制を維持し、ゲノム解析拠点機関との連携体制を構築した。特に、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、HTLV-1 感染細胞である CD4+T 細胞に特化した AC、HAM、ATL 症例間の網羅的メチル化解析スクリーニングより、ATL 特異的なメチル化遺伝子が抽出されたが、HAM 特異的なメチル化遺伝子は見いだされなかったことから、HAM 病態における DNA メチル化の影響は ATL に比べ小さいものと予想された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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.

2. 学会発表

国際会議

- 1) Yamano Y., Sato T., Araya N., Yagishita N., Shimizu Y., Ando H., Utsunomiya A., Izumo S., Jacobson S., Suzuki N. Clinical subtype of HAM/TSP based on clinical course and laboratory findings. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related

Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.

- 2) Sato T., Muto M., Araya N., Maekawa R., Suzuki N., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Possibility of T cell immunotherapy for HTLV-1-infected individuals. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
- 3) Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Nakamura T., Tanaka Y., Jacobson S., Yamano Y. The plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 tax in HAM/TSP. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.
- 4) Yamano Y. Human retrovirus promotes the plasticity of regulatory T cells into T helper type 1-like cells through the T-bet transcriptional activation in neuroinflammatory disease. Bio-Rheumatology International Congress (BRIC) Tokyo: The 8th GARN Meeting November 2011, Tokyo.

国内会議

- 1) 山野嘉久、新谷奈津美、佐藤知雄、中村龍文、森直樹、鈴木登 HTLV-1 関連脊髄症(HAM)患者でのフコイダン療法によるウイルス量の減少 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 20 日 名古屋
- 2) 佐藤知雄、武藤真人、新谷奈津美、

八木下尚子、前川隆司、宇都宮與、
神奈木真理、清野研一郎、山野嘉久
HTLV-1 感染者に適用可能なガンマ
デルタ T 細胞療法の開発 第 4 回
HTLV-1 研究会・合同班会議 2011
年 9 月 19 日 東京

3) 山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、
八木下尚子、安藤仁、宇都宮與、出
雲周二 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM)
の臨床病型：臨床経過と検査所見に
基づいた分類 第 4 回 HTLV-1 研究
会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日
東京

4) 新谷奈津美、佐藤知雄、安藤仁、八
木下尚子、神奈木真理、田中勇悦、
宇都宮與、山野嘉久 HTLV-1 関連
脊髄症 (HAM) における HTLV-1
を介した病原性 T 細胞発生機構の解
析 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班
会議 2011 年 9 月 19 日 東京

5) Sato T., Muto M., Araya N., Kojo S.,
Maekawa R., Utsunomiya A.,
Seino K., Yamano Y. Frequency
and functional significance of $\gamma\delta$ T
cells in HTLV-1-infected
individuals. (HTLV-1 感染者におけ
るガンマデルタ T 細胞の頻度および
機能的な重要性) . 第 40 回日本免疫
学会学術集会 2011 年 11 月 27 日
千葉

6) Araya N., Sato T., Utsunomiya A.,
Ando H., Yagishita N., Kannagi M.,
Tanaka Y., Yamano Y. The
molecular mechanism in the
plasticity of HTLV-1 infected
CD4+CD25+CCR4+ T-cells
through HTLV-1 in HAM/TSP. 第
40 回日本免疫学会学術集会 2011 年
11 月 27 日 千葉

7) 佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、山
内淳司、八木下尚子、出雲周二、山

野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM)
の疾患活動性バイオマーカーに関す
る解析 平成 23 年度厚生労働省科
学研究費補助金 難知性疾患克服研
究事業 「免疫性神経疾患に関する
調査研究」班会議 2012 年 1 月 26
日 東京

8) 安藤仁、佐藤知雄、新谷奈津美、山
内淳司、八木下尚子、山野嘉久
HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の慢性
炎症における CXCL10 の重要性に
関する解析 平成 23 年度厚生労働
省科学研究費補助金 難知性疾患克
服研究事業 「免疫性神経疾患に関
する調査研究」班会議 2012 年 1
月 26 日 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定
を含む)

特になし

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

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

研究分担者 松浦英治 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経病学

研究要旨：HTLV-1 関連脊髄症は、成人 T 細胞白血病や HTLV-1 ブドウ膜炎などと同様、その生涯を通じて HTLV-1 キャリアの数%程度（0.3-3%）が発症する疾患である。現在までに発症に関与する遺伝的素因がいくつか報告されてきたが、今回我々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を行い、HAMの発症・病態に関わる因子を明らかにすることで、発症予防につながる新しい予防的治療法の開発、発症後の個別の効果的治療法の選択の指針となりえる遺伝的因子の同定を目標とする。すでに我々は、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、より効率的で多項目の遺伝子診断システムの開発を進め、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てきた。さらに、Illumina 社 (HiSeq2000)を用いた、大規模なエクソーム解析およびポジショナルクローニング法とゲノム解析を融合させ、新規の原因遺伝子の同定を試みる。この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たため HAM 発症の遺伝的因子の同定が可能と思われる。本年度は HAM の患者の同意を得て採取した血液からリンパ球分離、および DNA 抽出を漸次行い症例の蓄積に努めるとともに、HAM 発症の前段階であるキャリア患者の脊髄の病理学的評価を行うことで発症機序の解明を試みた。その結果キャリア患者の脊髄においてもすでに CD8 陽性リンパ球の浸潤が認められ、HAM の発症にリンパ球の脊髄への浸潤を促す因子が先立って動くことが推察された。

A. 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症は HTLV-1 ウイルス感染者の一部だけにみられる炎症性疾患である。遺伝性疾患ではないが大規模な患者サンプルの検討により発症促進因子と抑制因子がいくつか報告されてきた。

しかしながら HAM 発症者の包括的な遺伝子解析は、遺伝子解析力の限界により、これまでほとんど行われていない。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、この手法を用いて HAM の発症因子をあきらかにするべく家計内で複数発症している HAM 家系を調査し、発症した同胞例の血液・リンパ球の解析を行うことで、全く新しい発症因子・遺伝的背景の解明に努める。

B. 研究方法

1. 対象・検体収集

HAM 発症者の兄弟、両親、あるいは子供でやはり HAM を発症している家系を当科のデータベースから検索する。大学病院あるいはその関連病院に通院している HAM の患者の同意を得たうえで血液サンプルを採取、リンパ球分離・DNA 抽出を行い保存する。

2. 遺伝子解析

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。HAM 発症例、特に家系内発症例を多数解析することにより、疾患特異的な遺伝的素因の同定を試みる。

(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。

3. 発症病態の解明

発症に強くかかわる遺伝的背景・因子

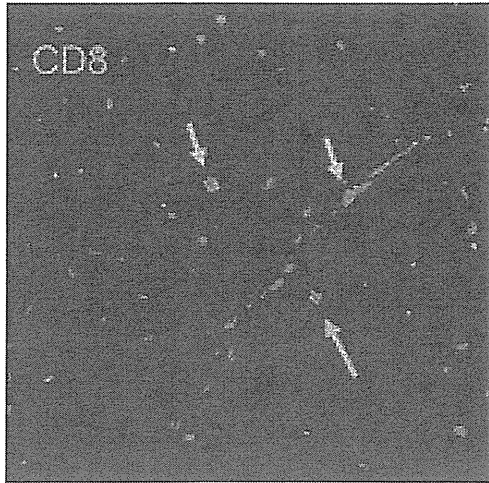
を遺伝子解析により明らかにしていく試みとともに、発症病態を明らかにする試みの一つとして、HAM 発症早期に特異的にみられる変化が存在するかどうか、HTLV-1 感染者の脊髄を用いて病理学的検討を試みた。

HAM 剖検脊髄の検討では発症早期の病理学的変化を捕まえることが難しいため、我々は HTLV-1 キャリアの脊髄を用いて発症早期の変化が存在するのかが検討した。加えてリンパ球浸潤が認められた場合は HTLV-1 特異的なリンパ球であるかを検討するために HLA-A2 あるいは A24-HTLV-1 Tax peptide complex テトラマーを用いた免疫組織学的手法により解析を行った。

C. 研究結果

当大学で保存されている 260 名におよぶ HAM 患者の検体情報をもとに家系内発症例を探索した。家系内発症例は 34 家系存在した。そのうち同意を得られて血液を採取できた家系は 8 家系であるが今後も家系例数を漸次増やしていくところである。

HTLV-1 キャリアの脊髄を 4 例検討した。その結果、脊髄内へのリンパ球浸潤はわずかではあるが 4 例ともに存在を確認した。一部の症例は髄膜でのリンパ球浸潤像のほうが髄内浸潤よりも顕著であった。リンパ球は CD4 陽性リンパ球はさほど多くなく、CD8 陽性リンパ球が中心であった。(図 1) 更に、テトラマーを用いた検討ではこれらの CD8 陽性リンパ球の一部が HTLV-1 特異的な細胞であることが確認できた。

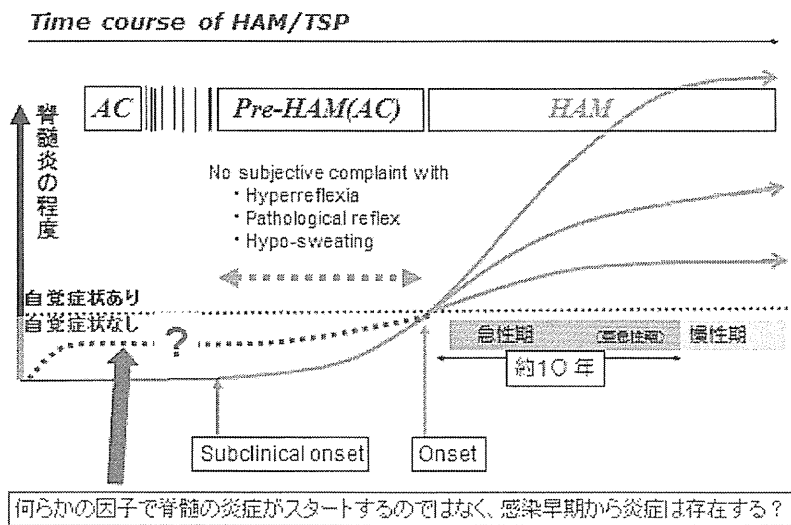


(図1) HTLV-1 キャリア脊髄に認められた CD8 陽性リンパ球

このことは発症早期から HTLV-1 特異的な CD8 陽性リンパ球が脊髄浸潤していることが確認され、発症に先立って CD8 陽性リンパ球浸潤が重要であることを示唆している。

D. 考察

HAM の発症にかかわる因子の検索はいまだ十分になされておらず、今回行う家系内発症 HAM 患者からの生体試料を用いた包括的な遺伝子解析の結果が待たれる。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。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。この解析のための次世代シーケンサーを用いたシステムの構築を完成させるとともに生体試料がどの程度収集できるかが今後の課題である。



E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

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, 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
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

2. 学会発表

1. Matsuura E, Kubota R, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S. Neural bystander damage by infiltrating

virus-infected T cells and the cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I-associated neurological disease. *The 63th AAN (American Academy of Neurology) Annual Meeting* Hawaii, USA 2011

2. 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
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. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011

G. 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

研究協力者

鹿児島大学神経内科・老年病学
野妻智嗣 崎山祐介 橋口昭大

中村友紀 樋口雄二郎 西郷隆二
袁 軍輝 吉村明子
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
久保田龍二

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
橋口昭大、 高嶋 博	Charcot-Marie-Tooth 病 の網羅的遺伝子診断	鈴木則宏、 祖父江元、 荒木信夫、 宇川義一、 川原信孝	Annual Review 神経 2012	中外医学社	東京	2012	267-273
野元正弘	Parkinson 病/ Huntington 病	医療情報科 学研究所	病気がみえ る vol.7 脳・神経	メディック メディア	東京	2011	274-291
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.	Babusikova O, Dovat S, Payne K.J.	T-Cell Leukemia	InTech	Croatia	2011	65-80/ 234

雑誌

著者名	論文題名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	13 (1)	77-82	2012
Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Tokunaga S, Zhu L, Shen H, Takashima H.	Alanyl-tRNA synthetase mutation in a family with distal hereditary motor neuropathy.	Neurology	in press		2012
橋口昭大、 高嶋 博	Hereditary neuropathy: variety of disease-causing genes and progress of molecular genetic diagnosis.	Brain Nerve	63(6)	539-48	2011
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.	121(6)	775-783	2011
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.	70(3)	486-492	2011

出雲周二, 松崎敏男, 久保田龍二	HAMの新しい展開	神経内科	75(4)	369-373	2011
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 Neur oimmunol.	2(1)	12-24	2011
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.	203(7)	948-959	2011
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
中川正法	Charcot-Marie-Tooth 病の診断と治療・ケア	Peripheral Nerve	22 (2)	125-131	2011
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
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
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
Mohammed Emamussalehin Choudhury, Takashi Moritoyo, Madoka Kubo, Win Thiri Kyaw, Hayato Yabe, Noriko Nishikawa, Masahiro Nagai, Seiji Matsuda, Masahiro Nomoto	Zonisamide-induced long-lasting recovery of dopaminergic neurons from MPTP-toxicity.	BRAIN RESEARCH	1384	170-178	2011

Hiroaki Yanagawa, Minoru Irahara, Hitoshi Houchi, Yoshiyuki Kakehi, Takashi Moritoyo, Masahiro Nomoto, Mitsuhiko Miyamura, , and the Shikoku Collaborative Group for Promotion of Clinical Trials.	View and present status of personnel involved in clinical trials: a survey of participants from the First Symposium of the Shikoku Collaborative Group for Promotion of Clinical Trials.	J Med Invest.	58(1,2)	81-85	2011
Takashi Fujiwara, Mai Nishimura, Ryoko Honda, Takashi Nishiyama, Masahiro Nomoto, Naoto Kobayashi, Masayuki Ikeda	Comparison of peer-led versus professional-led training in basic life support for medical students.	Advances in Medical Education and Practice	2	187-191	2011
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(13)	1429-1432	2011
Mohammed Emamussalehin Choudhury, Kana Sugimoto, Madoka Kubo, Masahiro Nagai, Masahiro Nomoto, Hisaaki Takahashi, Hajime Yano & Junya Tanaka	A cytokine mixture of GM-CSF and IL-3 that induces a neuroprotective phenotype of microglia leading to amelioration of (6-OHDA)-induced Parkinsonism of rats	Brain and Behavior	1(1)	26-43	2011
森蓉子, 永井将弘, 田邊奈千, 矢部勇人, 西川典子, 野元正弘	バンコマイシン血中濃度から Munchausen 症候群が疑われた1例	愛媛医学	30(1)	55-58	2011
野元正弘	臨床に役立つ神経薬理・化学／神経伝達物質と身体機能	Clinical Neuroscience	29(1)	8-9	2011
野元正弘	臨床に役立つ神経薬理・化学／ドパミン運動	Clinical Neuroscience	29(2)	136-137	2011
野元正弘	用量の地域差について	臨床評価	38(4)	690-696	2011
野元正弘	臨床に役立つ神経薬理・化学／ドパミン痛み	Clinical Neuroscience	29(5)	496-497	2011
山崎知恵子, 森豊隆志, 山下梨沙子, 野元正弘	ネットワーク治験における「訪問CRC」の有用性－愛媛大学病院における検討－	臨床薬理	42(3)	117-120	2011

野元正弘,立石智則	座長のまとめ	臨床薬理	42(3)	171	2011
野元正弘	病態時薬物動態試験の現状と課題	臨床薬理	42(3)	179-180	2011
野元正弘	第 29 回臨床薬理阿蘇九重カンファレンス/開会の挨拶	臨床評価	39(1)	65-66	2011
野元正弘	マイアミ大学の Phase Unit について	臨床評価	39(1)	117-119	2011
永井将弘,野元正弘	標準的神経治療:本態性振戦 治療:薬物療法	神経治療	28(3)	313-317	2011
岩城寛尚,野元正弘	パーキンソン病治療薬開発における治験計画について	PHARM STAGE	11(4)	22-25	2011
西川典子,野元正弘	ドパミン 消化管運動	Clinical Neuroscience	29(6)	616-617	2011
ウイン・テリー・チョウ,西川典子,野元正弘	ATP受容体とパーキンソン病	Frontiers in Parkinson Disease	4(3)	22-25	2011
矢部勇人,西川典子,永井将弘,野元正弘	レボドパ合剤で発症した Parkinson 病の突発性睡眠	神経内科	75(4)	407-409	2011
西川典子,永井将弘,久保田,田邊奈千,辻井智明,野元正弘	経口摂取不可時の Parkinson 病治療薬の検討	神経治療学	28(6)	677-680	2011
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)	501-509	2011
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)	1001-1006	2011
久保田龍二	HAM スペクトラム	臨床神経学	51	1044-1046	2011
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

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
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
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(9)	1532-1548	2011
Kitazono T., Okazaki T., Araya N., Yamano Y., Yamada Y., Nakamura T., Tanaka Y., Inoue M., Ozaki S.	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

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 synovioyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans.	Arthritis Rheum	63(12)	3833-3842	2011
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
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
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 別冊 機器・試薬	34(4)	472-477	2011
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
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
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	17(5)	604-609	2011

Yao B, Bagnato F, Matsuura E, Merkle H, Gelderen PV, Cantor FK, Duyn JH.	Chronic Multiple Sclerosis Lesions: Characterization with High-Field-Strength MR Imaging.	Radiology	262(1)	206-215	2012
--	---	-----------	--------	---------	------

IV. 研究成果の刊行物・別刷

1) Charcot-Marie-Tooth 病の網羅的遺伝子診断

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経内科・老年病学講座 橋口昭大
同 教授 高嶋 博

key words microarray DNA chip, next generation genome sequencer, *PMP22* duplication, *MFN2*, aminoacyl-tRNA synthetase

要 旨

Charcot-Marie-Tooth病 (CMT) の原因遺伝子は30以上報告されており、臨床的および遺伝子学的に多様である。CMTの最も多い原因である *peripheral myelin protein 22 (PMP22)* の異常は外注委託検査による fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法で検出可能であるが、その他の遺伝子異常を全てスクリーニングするには膨大な労力と費用が必要である。本邦では、従来通常のシーケンス法やDHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) 法による遺伝子診断が行われてきたが、これらに加えてCMTの遺伝子異常を低コストかつ迅速に診断できるマイクロアレイDNAチップが開発され、27の遺伝子を同時にスクリーニング可能となった。その結果およそその原因遺伝子頻度が発表されるにいたった。一方、米国においても詳細なCMTの遺伝子診断が行われ、病型別のおおよその原因遺伝子頻度が発表された。これらから、総合的な遺伝子異常の検出割合は、*PMP22* の重複例であるCMT1Aを除けば約20%であり、原因遺伝子が未解明の症例が多いことが確認された。それ故、今後も新しい原因遺伝子の同定が必要と考えられ、実際に毎年複数の新規原因遺伝子

が報告されている。2010年には次世代シーケンサーを用い、個人のゲノム全塩基配列を解読することで、SH3TC2遺伝子変異によるCMT4Cと確認しえた初めての報告がなされた¹⁾。今後、次世代シーケンサーなどの網羅的遺伝子診断により、原因遺伝子の発見が加速し、包括的な遺伝子診断にも利用されていくことが期待される。

動 向

1991年にLupskiらが*PMP22*の重複がCMT1Aの原因であると報告²⁾して以来、すでに30以上のCMT原因遺伝子が報告されている(表1)。欧米では、いくつかのCMT原因遺伝子診断を、従来のSanger法のシーケンス解析を用いて商業的に行っている。一方、本邦では*PMP22*以外の遺伝子診断は商業的には行われていないが、近年、CMT原因遺伝子を網羅的にスクリーニングする試みが行われている。マイクロアレイDNAチップを用いた手法では、DNAチップ上に搭載された27のCMT原因遺伝子を最短2日で診断可能で、注目されている。

一方、本邦とアメリカでの遺伝子解析にて、原因遺伝子の多様性および病型別遺伝子頻度が報告されており、本稿で概説する。また、近年相次い

表1 Charcot-Marie-Tooth病の原因遺伝子 (文献19より改変)

CMT 1 (脱髄型 常優)	
CMT1A	<i>PMP22</i> (peripheral myelin protein 22)
CMT1B	<i>MPZ</i> (myelin protein zero)
CMT1C	<i>LITAF</i> (lipopolysaccharide-induced TNF factor)
CMT1D	<i>EGR2</i> (early growth response 2)
CHN	<i>SOX10</i> (sex determining region Y-box 10)
CMT1E	<i>MPZ</i> (myelin protein zero)
CMT1F	<i>NEFL</i> (neurofilament, light polypeptide)
CMT 4 (脱髄型 常劣)	
CMT4A	<i>GDAP1</i> (ganglioside-induced differentiation associated protein 1)
CMT4B1	<i>MTMR2</i> (myotubularin related protein 2)
CMT4B2	<i>SBF2</i> (SET binding factor 2)
CMT4C	<i>SH3TC2</i> (SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2)
CMT4D	<i>NDRG1</i> (N-myc downstream regulated 1)
CMT4E	<i>EGR2</i> (early growth response 2)
CMT4F	<i>PRX</i> (periaxin)
CMT4G	<i>HK1</i> (hexokinase 1)
CMT4H	<i>FGD4</i> (FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4)
CMT4J	<i>FIG4</i> (FIG4 homolog, SAC1 lipid phosphatase domain containing)
CMT X (X連鎖性)	
CMTX1	<i>GJB1</i> (gap junction binding protein beta 1)
CMTX5	<i>PRPS1</i> (phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1)
CMT 2 (軸索型 常優)	
CMT2A1	<i>KIF1B</i> (kinesin family member 1B)
CMT2A2	<i>MFN2</i> (mitofusin 2)
CMT2B	<i>RAB7</i> (rab-protein 7)
CMT2C	<i>TRPV4</i> (transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 4)
CMT2D	<i>GARS</i> (glycyl-tRNA synthetase)
CMT2E	<i>NEFL</i> (neurofilament, light polypeptide)
CMT2F	<i>HSPB1</i> (heat shock 27kDa protein 1)
CMT2G	unknown
CMT2H	unknown
CMT2I/J	<i>MPZ</i> (myelin protein zero)
CMT2K	<i>GDAP1</i> (ganglioside-induced differentiation associated protein 1)
CMT2L	<i>HSBP8</i> (heat shock 22kDa protein 8)
CMT2M	<i>DNM2</i> (dynamamin 2)
CMT2N	<i>AARS</i> (alanyl-tRNA synthetase)
CMT 2 (軸索型 常劣)	
AR-CMT2A	<i>LMNA</i> (lamin A/C)
AR-CMT2B	<i>MED25</i> (mediator complex subunit 25)
GAN	<i>GAN1</i> (gigaxonin 1)
ACCPN	<i>KCC3</i> (K-Cl cotransporter family 3)
SCAN1	<i>TDPI</i> (tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1)
AOA1	<i>APTX</i> (aprataxin)
AOA2	<i>SETX</i> (senataxin)
minifascicular neuropathy	<i>DHH</i> (desert hedgehog)
CMT 2 (中間型)	
CMT DIB	<i>DNM2</i> (dynamamin 2)
CMT DIC	<i>YARS</i> (tyrosyl-tRNA synthetase)

CHN: congenital hypomyelinating neuropathy, GAN: giant axonal neuropathy, ACCPN: agenesis of the corpus callosum with peripheral neuropathy, SCAN: spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy, AOA: ataxia with oculomotor apraxia