

201238010A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高嶋 博

平成 25 年（2013）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 高嶋 博	3
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 高嶋 博	15
2. HTLV-1 キャリア外来の重要性に関する研究 出雲 周二	23
3. 遺伝性ニューロパチーの臨床的、遺伝学的研究 -第2報- 中川 正法	28
4. 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 野元 正弘	31
5. PSP-C の臨床および病態解明の研究 永井 将弘	33
6. 神経系疾患の集中的な遺伝子解析及び原因研究に関する拠点研究 高橋 祐二	35
7. 鹿児島HAM 検体を用いた GWAS 解析の中間報告 久保田 龍二	36
8. 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 田中 章景	40
9. HAM 感受性遺伝子探索に資する臨床的検討に関する研究 山野 嘉久	43
10. 次世代シーケンサーを用いた家族性 HAM の遺伝子解析による HAM 発症因子に関する研究 松浦 英治	55
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	61
IV. 研究成果の刊行物・別刷	69

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：遺伝性神経疾患の原因は年々明らかになってきたが、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、遺伝子診断を行ってきた。今回、遺伝子検査で原因が同定できなかった例について、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、原因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。さらに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。

我々はゲノムシーケンサー、Illumina 社 MiSeq、ライフテクノロジー社の IonProton, Ion PGM を導入し、多数の原因を持つ遺伝性疾患（遺伝性ニューロパチー (CMT、HSAN、HMN) および小脳失調症、の包括的な遺伝子診断法を開発した。また、遺伝子解析の結果から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、および急性期の効果的な治療法を発見した。

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(AARS)異常を世界で初めて同定し、次に遺伝性感覚自律神経ニューロパチー HSAN2D 型の原因(SCN9A)を同定し報告した。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、PSP-C の解析、SCA31 の病態解析も行った。CMT300 例の大規模エクソーム解析により複数の新規原因遺伝子候補が判明した。

HAM の病態解明の研究として、家族性 HAM 患者および未発症 HTLV-I キャリアの検体を用いた全エクソーム解析を行い、エクソーム解析による変異データを分析し、HAM 発症に関わる遺伝子変異を見いだした。HAM 発症関連遺伝子の候補として細胞浸潤や細胞接着、細胞増殖に関わる遺伝子を抽出した。

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）

高橋祐二（東京大学附属病院 神経内科）

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；現 横浜市立大学大学院医学研究科神経内科）

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多数の原因遺伝子を持つ疾患の包括的な遺伝子診断は、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かった。また、HTLV-I 関連脊髄症 (HAM) は、家族性に集積があり、遺伝的な素因が関わっていることが明らかとなっているが、大部分は不明である。

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、これまでは解析量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。

特に CMT、遺伝性感覚・自律神経性ニューロパチー (HSAN)、遺伝性運動性ニューロパチー (HMN)、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。

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(SCA2、SCA31 など)、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、アレクサンダー病、HDLs、CADASIL、遺伝性ミオパチー

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、エオジン好性細胞内封入体病(NIID)

3. 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。

4. 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 などの遺伝子診断を行

い、HAM 患者の血中プロウイルス量を測定し、それらの検査を医療機関に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、次世代ゲノムシーケンサーを用いて、検査システムを構築する。さらに、時間を要するプロセスである変異のコールを行う情報処理プログラムを作成する。

5. 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。

6. 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(Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID:エオジン好性核内封入体病))

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 CNV 解析などの

遺伝子学的手法も幅広く用いる。

7. 多因子遺伝病・感受性遺伝子の同定 (HAM 研究など)

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、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。44 名(25 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、当方にて同意を得た検体 HAM496 例および HTLV-I キャリア群 287 例を京都大学において、マイクロアレイによる多型解析、および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たるが、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。

Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID:エオジン好性核内封入体病)患者 14 名の連鎖解析およびエクソーム解析で原因を検索した。

(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、遺伝性ニ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)を完成させた。また、CMT,HSAN,HMN の遺伝子診断についても完成した。さらに、Ullich 型筋ジストロフィーについても構築した。

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。HSAN2Dの原因としてSCN9Aを報告した。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、拠点研究施設の東京大学神経内科において、CMT、HAMを中心に400検体のエクソーム解析が終了した。現在解析中であり、多くのCMTの原因の同定が期待される。

NIID家系の次世代シーケンサーを用いた解析では、常染色体優性遺伝形式の想定下に、得られた配列をヒト標準配列と比較、疾患に関連する1塩基変異の抽出を行った。さらに、患者間で共通する1塩基変異を探索したが、発症者すべてに共通する変異を同定することはできなかった。

HTLV-I 研究

家族例のあるHAMを34例集め、HTLV-Iキャリア20名、孤発例20例のエクソーム解析を行い、遺伝的素因を解析した。HTLV-Iキャリアに見られず、家族性HAMに見られる遺伝子変異を多数見いだした。

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50以上報告されているが、我々は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し、診断スピードアップのための変異の検出システムを作製した。さらにHSANやHMNにも検査を広げた。コストは60遺伝子を調べる場合で20,000円程度となる。

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、HSAN2Dの原因SCN9Aを報告した。ミトコンドリア病のMIMECKについても急性期の治療法を見つけ、患者の治療に役立っている。

多数例のエクソーム解析によるCMTの原因遺伝子も複数で候補が見つかった。

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、MiSeqシステムを用いて試験的に遺伝子スクリーニングを行い、精度とスピードを増強した。

HAMについては、家族例の解析から、非常に重要な機能を持つ感受性遺伝子が多数見つかっており、本手法が感受性因

子の発見に大きく貢献するのは間違いない。

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、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、治療法を発見した。

③HSAN2D の原因として、SCN9A の異常を世界で初めて同定し HSAN2D を命名した。

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は完成した。

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 の家系例エクソーム解析で、重要な因子が見つかった。

⑦CMT の新しい原因の候補が多数見つかった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表
(高嶋分)

1. Yuan J, Matsuura E, Higuchi Y, Hashiguchi A, Nakamura T, Nozuma S, Sakiyama Y, Yoshimura A, Izumo S, **Takashima H**. Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type IID caused by an SCN9A Mutation.

Neurology 80(18):1641-9, 2013

2. Yuan JH, Sakiyama Y, Higuchi I, Inamori Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, Higashi K, Yoshimura A, **Takashima H**. Mitochondrial myopathy with autophagic vacuoles in patients with the m.8344A>G mutation. J Clin Pathol. 2013 Apr 4.
3. Yuan J, Higuchi Y, Nagado T, Nozuma S, Nakamura T, Matsuura E, Hashiguchi A, Sakiyama Y, Yoshimura A, **Takashima H**. Novel mutation in the replication focus targeting sequence domain of DNMT1 causes hereditary sensory and autonomic neuropathy IE. J Peripher Nerv Syst. 18(1):89-93, 2013
4. Yonekawa T, Komaki H, Saito Y, **Takashima H**, Sasaki M. Congenital hypomyelinating neuropathy attributable to a de novo p.Asp61Asn mutation of the myelin protein zero gene. Pediatr Neurol. 48(1):59-62, 2013
5. Arimura A, Deguchi T, Sugimoto K, Uto T, Nakamura T, Arimura Y, Arimura K, Yagihashi S, Nishio Y, **Takashima H**. Intraepidermal nerve fiber density and nerve conduction study parameters correlate with clinical staging of diabetic polyneuropathy. Diabetes Res Clin Pract. 99(1):24-9, 2013
6. Miki Y, Tomiyama M, Haga R,

- Nishijima H, Suzuki C, Kurihara A, Sugimoto K, Hashiguchi A, **Takashima H**, Baba M.A family with IVIg-responsive Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol*. 260(4):1147-51, 2013
7. Zhao Z, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Li N, Shen H, **Takashima H**. DYSF mutation analysis in a group of Chinese patients with dysferlinopathy. *Clin Neurol Neurosurg*. 2012 Dec 14. doi:pii: S0303-8467(12)00588-4.
 8. 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- 81, 2012
 9. Iguchi M, Hashiguchi A, Ito E, Toda K, Urano M, Shimizu Y, Takeuchi C, Saito K, **Takashima H**, Uchiyama S. Charcot-marie-tooth disease type 4C in Japan: report of a case. *Muscle Nerve*, 47(2):283-286, 2013
 10. Tokunaga S, Hashiguchi A, Yoshimura A, Maeda K, Suzuki T, Haruki H, Nakamura T, Okamoto Y, **Takashima H**. Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused by periaxin gene mutation. *Neurogenetics* 13(4):359-65, 2012
 11. Shiga K, Noto Y, Mizuta I, Hashiguchi A, **Takashima H**, Nakagawa M. A novel EGR2 mutation within a family with a mild demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*. 17(2):206-9, 2012
 12. Kawabata T, Higashimoto I, **Takashima H**, Izumo S, Kubota R. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ cells accumulate in the lungs of patients infected with HTLV-I with pulmonary involvement. *J Med Virol*. 84(7):1120-7, 2012
 13. Saiga T, Tateishi T, Torii T, Kawamura N, Nagara Y, Shigeto H, Hashiguchi A, **Takashima H**, Honda H, Ohyagi Y, Kira J. Inflammatory radiculoneuropathy in an ALS4 patient with a novel SETX mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 83(7):763-4. Epub 2012 May 10
 14. Inamori Y, Higuchi I, Inoue T, Sakiyama Y, Hashiguchi A, Higashi K, Shiraishi T, Okubo R, Arimura K, Mitsuyama Y, **Takashima H**. Inclusion body myositis coexisting with hypertrophic cardiomyopathy: an autopsy study. *Neuromuscul Disord*. 22(8):747-54. Epub 2012 May 4
 15. 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* 78(21):1644-9, 2012

16. 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 鈴木則宏, 祖父江元, 荒木信夫, 宇川義一, 川原信隆編 中外医学社 267-273, 2012

(出雲分)

1. Hasui K, Wang J, Tanaka Y, **Izumo S**, Eizuru Y, Matsuyama T. Development of ultra-super sensitive immune-histochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Histochem Cytochem.* 45(2):83-106, 2012.
2. Kawabata T, Higashimoto I, Takashima H, **Izumo S**, Kubota R. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ cells accumulate in the lungs of patients infected with HTLV-I with pulmonary involvement. *J Med Virol.* 84(7): 1120- 1127, 2012.
3. **出雲周二**. HTLV-1 感染症で起こる疾患ー白血病・HAM など. HTLV-1 母児感染予防のための基礎知識. 特集 クローズアップ感染症. *小児内科* 44: 973-977, 2012
4. **出雲周二**. HAM の最新の話. *Neuroinfection.* 17: 6-10, 2012

(中川分)

1. Ishiura H, Sako W, Yoshida M, **Nakagawa M**, Kaji R, Tsuji S, et al. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement. *Am J Hum Genet* 91:320-329, 2012.
2. **中川正法** Charcot-Marie-Tooth 病 1.病態・治療.最新医学 別冊 新しい診断と治療のABC75 末梢神経障害. 152-160、2012
3. **中川正法** 「Charcot-Marie-Tooth 病に対する治療の進歩」。Annual review 神経.211-222, 2013
4. Shiga K, Noto Y, Mizuta I, Hashiguchi A, Takashima H, **Nakagawa M**. A novel EGR2 mutation within a family with a mild demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Periph Nerv Syst* 17:206-209, 2012.
5. Shiga K, Tsuji Y, Fujii C, Noto Y, **Nakagawa M**. Demyelinating features in sensory nerve conduction in Fisher syndrome. *Intern Med* 51: 2307-2312, 2012.
6. Shiga K, Tanaka E, Isayama R, Mizuno T, Itoh K, **Nakagawa M**. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy due to administration of pegylated interferon- α 2b:a neuropathological case report. *Intern Med* 51:217-221, 2012.

(野元分)
特になし

(永井分)
特になし

(高橋分)
特になし

(久保田分)

1. Kawabata T, Higashimoto I, Takashima H, Izumo S, **Kubota R**: Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ cells accumulate in the lungs of patients infected with HTLV-I with pulmonary involvement. *J Med Virol.* 84(7): 1120-7, 2012
2. **久保田龍二**: HAM スペクトラム。神経内科 77: 283-8, 2012

(田中分)

1. **Tanaka F**, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Adachi H, Sobue G. Current status of treatment of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neural Plast.* 2012:369284, 2012
2. **Tanaka F**, Ikenaka K, Yamamoto M, Sobue G. Neuropathology and omics in motor neuron diseases. *Neuropathology.* 32(4):458-446, 2012
3. 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

4. **田中章景**、曾根 淳、熱田直樹、中村亮一、土井 宏、児矢野 繁、祖父江 元. ALSのパーソナルゲノム解析. *BRAIN and NERVE* 65(3):257-265, 2013

(山野分)

1. Tamai Y., Hasegawa A., Takamori A., Sasada A., Tanosaki R., Choi I., Utsunomiya A., Maeda Y., **Yamano Y.**, Eto T., Koh K., Nakamae H., Suehiro Y., Kato K., Takemoto S., Okamura J., Uike N., Kannagi M. Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4+ T cells to graft versus-Tax effects in adult T-cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Journal of Immunology*, in press, 2013.
2. **Yamano Y.**, Sato T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Frontiers in Microbiology*, 3(389):1-10, 2012.
3. **山野嘉久**、佐藤知雄.HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態・治療とバイオマーカー 日本臨牀, in press 2013.
4. **山野嘉久**、佐藤知雄、宇都宮與. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 日本臨牀, in press 2013.

5. 山野嘉久. HAM (HTLV-1 関連脊髄症) すべての内科医が知っておきたい神経疾患の診かた、考え方とその対応, 279-281, 2012.
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, 2012.
2. Yoshimi Enose-Akahata, Eiji Matsuura, Yuetsu Tanaka, Unsong Oh, Steven Jacobson: Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease, *RetroMicrobiolgy*, 9:16, 2012.
3. 松浦英治、久保田龍二、樋口逸郎. HTLV-1 と筋炎 *Clinical neuroscience*. 30(3):322-333, 2012

(松浦分)

1. Brian Yao, Francesca Bagnato, Eiji Matsuura, Hellmut Merkle, Peter van Gelderen, Frederic K. Cantor, Jeff H. Duyn: Chronic Multiple Sclerosis Lesions: Characterization with High-Field-Strength MR imaging. *Radiology*, 262(1):206-15, 2012

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

主任研究者 高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

研究要旨：我々は、遺伝性神経疾患(Charcot-Marie-Tooth 病、(CMT)、遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチー (HSAN)、遺伝性運動性ニューロパチー(HMN)、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、3 台の次世代シーケンサー(Illumina 社 MiSeq, Life technology 社 IonPGM, IonProton)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た。新しい遺伝子診断システムとして、CMT 病、遺伝性運動性ニューロパチー、感覚性ニューロパチー、遺伝性小脳失調症、筋ジストロフィーの遺伝子診断を構築した。得られた遺伝子配列から高速、正確に遺伝子異常を判定するプログラムの開発も行い、検査コストの圧縮を行った。また、新規の遺伝的原因検索では、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、また HSAN2D 型の原因として *SCN9A* 遺伝子異常を同定した。新しいミトコンドリア病 MIMICK の疾患概念の確立を行い、加えてその治療も開発した。

400 例以上のエクソーム解析が終了し、CMT の遺伝子診断や新しい候補遺伝子が見つかった。

研究協力者

鹿児島大学神経内科・老年病学

大窪隆一	橋口昭大	樋口雄二郎	平野隆城
徳永章子	崎山佑介	中村友紀	岡本裕嗣
西郷隆二	松浦英治	野妻智嗣	袁 軍輝
樋口逸郎	吉村明子		

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、ミオトニアなど）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、先天性ミオトニア

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 5000 検体を越え、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た。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) に変えて、次世代シーケンサーを用いた解析に変更した。

また、ミトコンドリア病は、ミトコンドリアアレイ Chip から、次世代シーケンズ法に変更しミトコンドリア遺伝子配列を決定、ロング PCR 法で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。その陰性例の診断に新世代ゲノムシーケンサーを用い、エクソーム解析により、網羅的に解析する。

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ス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 の家系例を抽出し、34 症例について、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の速度で収集し得た。CMT の遺伝子診断は、依頼のあった 547 例に施行し、69 例の遺伝子診断をし得た。陰性例のうち、病歴より CMT と考えられる 306 例について、エクソーム解析を行い、63 例についてはおおよそ原因を同定した。その中で、*SETX* 遺伝子異常による ALS4 例、HMN の原因 *AARS* の同定、サブクリニカルな *EGR2* 変異が抗がん剤によるニューロパチーを誘発した報告、*SH3TC2* 遺伝子異常による CMT4H 例、*DNMT1* 異常による HMSN1E 本邦初報告、*PRX* 異常の CMT4F の軽症例、免疫療法に反応する CMTX 家系例などの論文報告を行った。

加えて CMT については、既知の様々な遺伝子異常が発見され、新規の病的変異を検索し、いくつかの新規遺伝子の有力な候補を同定した。

小脳失調症については、南九州地域 (鹿児島、宮崎、沖縄)、東九州地域 (大分) における常染色体優性遺伝性の小脳失調を呈した家系について分子疫学的検討を行った。沖縄県で DRPLA と SCA2 の重症型が多く、それ以外の地域では SCA6 と SCA31 の軽症型が多い傾向であった。鹿児島県では GSS と診断される例が増加傾向にあり、小脳失調の鑑別として重要と考えられた。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, 23, 27, 28, 35) を構築し、2 症例で、それぞれ SCA5, SCA11 の原因遺伝子に

アミノ酸置換を伴う新規の 1 塩基置換を確認し病原性について検討中である。特徴的な家系として、SCA31 のリピート挿入部位に(TGGAA)_n を含まないリピートをもつ 1 家系を認め、報告した。宮崎県の南部地域に認められた SCA36 の 2 家系について、自律神経障害と錐体外路症状の合併を報告し、SCA36 の臨床的多様性について検討した。

HAM およびキャリアの臨床検体数は、それぞれ 496 検体および 283 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において、CMT を中心に 306 検体 HAM HTLV-I キャリア併せて 74 検体のエクソーム解析を行い、いくつかの疾患発症の関連遺伝子変異を発見した。MSA 症例を東京大学にて解析中である。

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、運動性ニューロパチー、感覚性自律神経性ニューロパチーの詳細な遺伝子検査を行うため、包括的な遺伝子診断システム構築した。具体的には Illumina 社の MiSeq を利用し、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。さらに、遺伝子変異の抽出をより容易にするべく、いくつかの検出プログラムを完成させた。

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

原因を探索中である。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。

D. 考察

CMT の原因遺伝子は 50 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、実践してきたが、陽性率が低く改善が課題となっていた。それを克服するために、次世代シーケンシング技術を用いて遺伝子診断システムを構築した。具体的には CMT, HSAN, HMN,原因未同定の家族性 SCD 患者について、検査システムを確立し、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った。

一方、HAM についてはキャリアの約 0.25% の頻度で発症していることが知られているが、HAM の家族例が多いことに注目し、その家系例を用いて、発症機序を同定する。エクソーム解析により、強い発症因子を同定することが、発症予測、予防や治療法開発に役立つことと思われる。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。また、それぞれの疾患の

分子疫学も明らかとなった。

② 新しい疾患として樹立した MIMCECK の急性期の治療法を見いだした。

③ HSAN2D の原因として、SCN9A 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い、CMT, HAM の大規模解析で、新しい疾患関連の遺伝子が見いだされつつある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yuan J, Matsuura E, Higuchi Y, Hashiguchi A, Nakamura T, Nozuma S, Sakiyama Y, Yoshimura A, Izumo S, **Takashima H**. Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type IID caused by an SCN9A Mutation. *Neurology* 80(18):1641-9, 2013
2. Yuan JH, Sakiyama Y, Higuchi I, Inamori Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, Higashi K, Yoshimura A, **Takashima H**. Mitochondrial myopathy with autophagic vacuoles in patients with the m.8344A>G mutation. *J Clin Pathol.* 2013 Apr 4.
3. Yuan J, Higuchi Y, Nagado T, Nozuma S, Nakamura T, Matsuura E, Hashiguchi A, Sakiyama Y, Yoshimura A, **Takashima H**. Novel mutation in the replication focus targeting sequence domain of DNMT1 causes hereditary sensory and autonomic neuropathy IE. *J Peripher Nerv Syst.* 18(1):89-93, 2013
4. Yonekawa T, Komaki H, Saito Y, **Takashima H**, Sasaki M. Congenital hypomyelinating neuropathy attributable to a de novo p.Asp61Asn mutation of the myelin protein zero gene. *Pediatr Neurol.* 48(1):59-62, 2013
5. Arimura A, Deguchi T, Sugimoto K, Uto T, Nakamura T, Arimura Y, Arimura K, Yagihashi S, Nishio Y, **Takashima H**. Intraepidermal nerve fiber density and nerve conduction study parameters correlate with clinical staging of diabetic polyneuropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 99(1):24-9, 2013
6. Miki Y, Tomiyama M, Haga R, Nishijima H, Suzuki C, Kurihara A, Sugimoto K, Hashiguchi A, **Takashima H**, Baba M. A family with IVIg-responsive Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol.* 260(4):1147-51, 2013
7. Zhao Z, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Li N, Shen H, **Takashima H**. DYSF mutation analysis in a group of Chinese patients with dysferlinopathy. *Clin Neurol Neurosurg.* 2012 Dec 14. doi:pii: S0303-8467(12)00588-4.

8. 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- 81, 2012
 9. Iguchi M, Hashiguchi A, Ito E, Toda K, Urano M, Shimizu Y, Takeuchi C, Saito K, **Takashima H**, Uchiyama S. Charcot-marie-tooth disease type 4C in Japan: report of a case. *Muscle Nerve*, 47(2):283-286, 2013
 10. Tokunaga S, Hashiguchi A, Yoshimura A, Maeda K, Suzuki T, Haruki H, Nakamura T, Okamoto Y, **Takashima H**. Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused by periaxin gene mutation. *Neurogenetics* 13(4):359-65, 2012
 11. Shiga K, Noto Y, Mizuta I, Hashiguchi A, **Takashima H**, Nakagawa M. A novel EGR2 mutation within a family with a mild demyelinating form of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*. 17(2):206-9, 2012
 12. Kawabata T, Higashimoto I, **Takashima H**, Izumo S, Kubota R. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ cells accumulate in the lungs of patients infected with HTLV-I with pulmonary involvement. *J Med Virol*. 84(7):1120-7, 2012
 13. Saiga T, Tateishi T, Torii T, Kawamura N, Nagara Y, Shigeto H, Hashiguchi A, **Takashima H**, Honda H, Ohyagi Y, Kira J. Inflammatory radiculoneuropathy in an ALS4 patient with a novel SETX mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 83(7):763-4. Epub 2012 May 10
 14. Inamori Y, Higuchi I, Inoue T, Sakiyama Y, Hashiguchi A, Higashi K, Shiraishi T, Okubo R, Arimura K, Mitsuyama Y, **Takashima H**. Inclusion body myositis coexisting with hypertrophic cardiomyopathy: an autopsy study. *Neuromuscul Disord*. 22(8):747-54. Epub 2012 May 4
 15. 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* 78(21):1644-9, 2012
 16. 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 鈴木則宏、祖父江元、荒木信夫、宇川義一、川原信隆編 中外医学社 267-273, 2012
2. 学会発表
 1. Higuchi Y, Yoshimura A,