

代シーケンサーを用いて遺伝子配列を網羅的に解析した。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。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いた解析では、ヒト標準配列と異なる1塩基多型 (SNV)、および比較的短い欠失、挿入配列を見出すことは可能であるが、大きな欠失、挿入、およびコピー数変異 (CNV)、繰り返し配列の延長などの遺伝子構造異常を明らかにすることは現時点では困難とされている。従って、今回NIIDの次世代シーケンサー解析で遺伝子変異が明らかにならなかったことで、前述の遺伝子構造異常が疾患の原因である可能性が強く疑われる。今後これらの遺伝子構造異常の探索を進める予定である。

最終的には、同定した遺伝子産物の抗体を作製し、原因遺伝子産物の生理的機能、病原性、封入体構成機構などを分子生物学的に検討する。また、原因遺伝子を用いたNIID細胞モデル、あるいは動物モデルを作出し、神経変性過程の詳細な分子機構の解析を行い、新規治療法の探索を目指したい。

E. 結論

NIIDの原因遺伝子変異は1塩基変異に基づくものではない可能性があり、今後、遺伝子構造異常の探索を進めて行く。

F. 健康危険情報

特記すべきもの無し

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

1. 田中章景: Toward identifying the causative gene of neuronal intranuclear inclusion disease (NIID). : 第35回日本神経科学大会, 2012年9月21日, 名古屋国際会議場
2. 曾根淳: Neuronal intranuclear inclusion disease - 皮膚生検による診断および原因遺伝子の探索. 第35回日本神経科学大会, 2012年9月19日, 名古屋国際会議場
3. 田中章景: Neuronal intranuclear inclusion disease の原因遺伝子探索. 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班 平成24年度 班会議, 2012年12月7日, 鹿児島大学鶴陵会館

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含)

- | | | | |
|-----------|----|--------|----|
| 1. 特許取得 | なし | 3. その他 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし | | |

HAM感受性遺伝子探索に資する臨床的検討に関する研究

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：

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）は、ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1）感染者のごく一部（約 0.3%）に発症する脊髄の慢性炎症性疾患であり、その発症原因はいまだ不明である。これまで HAM の発症や進展のリスクに関与する遺伝子を網羅的に探索・同定された例はない。そのため、本研究班は大規模ゲノム解析により、HAM 感受性遺伝子を探索・同定することを目的としている。そのため、本研究では HAM の発症や進展に遺伝的要因が強く関与していると考えられる HAM の「家族内発症例」および「急速進行例」の検体を大規模ゲノム解析のために提供すると共に、こうした症例の特徴を明らかにすることを目的とした。まず、患者登録サイト「HAM ねっと」の情報を利用し、HAM「家族内発症例」および「急速進行例」の特徴を調べたところ、「家族内発症例」は、304 名中 29 名（27 家系）と全体の 9.5%も存在し、家族内発症のない群と比較して発症年齢が低いことが示された。また、発症から 2 年以内に両手杖歩行レベルまで進行する「急速進行例」は、全体の 5.5%存在し、非急速進行例と比較して発症年齢が高いことが示された。次に、我々が収集・保管している検体のうち、「家族内発症例」および「急速進行例」を大規模ゲノム解析のために提供すると共に、これらの症例が示したウイルス免疫学的マーカーを解析した。その結果、前者は特に有意な所見は認められなかったが、後者は髄液の炎症マーカーである髄液ネオプテリンおよび髄液 CXCL10 が明らかに高値を示す特徴があると判明した。今後は、このようなバイオマーカー所見とゲノム解析情報を組み合わせて解析することで、HAM の発症や進展に重要な感受性遺伝子を同定していくことが必要と考える。

A. 研究目的

ヒトT細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染症は疫学的に我が国に特有の感染症であり、感染者は全国で100万人以上存在する。このHTLV-1感染者の約5%は白血病を発症し、別の一部、約0.3%は慢性炎症性疾患であるHTLV-1関連脊髄症 (HAM) を発症する。このように、HAMはHTLV-1感染者のごく一部にしか発症しない。そのメカニズムについては、これまでウイルス学的、遺伝学的あるいは免疫学的に、さまざまな見地から調べられてきた。このうち遺伝学的な宿主要因として現在までに知られているものとしては、「HLA」と「非HLA宿主遺伝子」がある。「HLA」は、HLAクラスIのHLA-A*02とHLA-Cw*08がHAM発症抑制に関与し、HLAクラスIのHLA-B*54とHLAクラスIIのHLA-DRB1*0101がHAM発症促進に関与していることが報告されている。「非HLA宿主遺伝子」としては、MMP-9, TNF α , SDF-1やIL-10などがHAMの発症に関連するとの報告がある。しかしながら、いずれの報告も候補遺伝子を絞って解析された研究報告であって、これまで遺伝的背景を調べるため大規模にゲノム解析された例はない。

そこで、本研究班は近年開発された次世代遺伝子解析装置を利用して大規模ゲノム解析を実施し、これまで知られていなかった未知のHAM感受性遺伝子を同定することを目標としている。この目標達成のためには、HAM発症に遺伝的要因が強いと思われるHAM患者の一群から得られる検体を解析に用いるのが望ましい。そのような症例群の候補として、「家族内発症例」や「急速進行例」が有望であると考えられたため、今年度はこれらの症例を大規模ゲノム解析のために提供すると共に、こうした症例の臨床的ならび

にウイルス免疫学的な特徴を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

平成25年2月末時点でHAM患者登録サイト「HAMねっと」 (<http://hamtsp-net.com/>) に登録され、電話での聞き取り調査を終了した304名のHAM患者 (表1) の情報から、本研究に資するデータを抽出した。

(1) HAM「家族内発症例」の解析

HAMの家族内発症の有無で2群に分け、「HAMねっと」の調査内容より以下の点を抽出し、両群の比較を行った (表2)。なお、第2度近親者とは「祖父母、おじおば、甥姪、孫」に相当する血縁者のことである。

- A) 患者の属性 (性別、年齢、発症時期、診断時期、家族歴、輸血歴)
- B) 納の運動障害重症度 (0~13、高いほど運動障害度が強い)
- C) HAQ (関節リウマチの生活機能評価、Health Assessment Questionnaire)、HAQ-DI (Disability Index) は、8項目 (着衣と身繕い、起立、食事、歩行、衛生、動作、握力、その他) に分類された20設問に0~3点で回答し、各項目の中の最高点を求め、その平均点を算出する、0~3点、点数が高いほど身体機能障害が重症となる)
- D) その他 : HAMの初発症状、症状発現時の年齢や現在の症状など

(2) HAM「急速進行例」の解析

ここでは「急速進行例」を、運動障害発現年齢から納の運動障害重症度 Grade 6 (両手杖歩行レベル) までの移行年数が2年以下のHAM患者と定義した。そして、

「HAMねっと」登録HAM患者を「急速進行例」と「非急速進行例」の2群に分け、「HAMねっと」の調査内容より(1)と同じ情報を抽出し、両群の比較を行った(表3)。ただし、これらの臨床的な特徴に関する統計解析を実施するには、症例数が少なかったため、2年以内に納の運動障害重症度 Grade5 (片手杖歩行レベル) となった症例においても同様の解析を実施した(表4)。

(3) HAM「家族内発症例」および「急速進行例」のウイルス免疫学的解析

当研究室で収集・保存されていた検体の中から、家族内での発症が認められた4例(うち2例は親子)と、急速な進行が認められた9例をピックアップして検体をゲノム解析センターへ提供した。また、これらの症例のHTLV-1プロウイルス量、血清可溶性IL-2受容体(sIL-2R)濃度、髄液ネオプテリン濃度および髄液CXCL10濃度を測定し、当施設で収集したHAM患者データをもとに決定した基準値との比較を行った。

(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て、患者の人権擁護に努めた。

「HAMねっと」による臨床研究は、聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会で承認された(承認番号:第2044号)同意書を用いて、参加に伴う不利益や危険性の排除等について説明し、書面による同意を得た。患者情報は、個人情報管理者により連結可能匿名化の方法によって患

者ID番号が付与され「本研究専用のコンピュータ」において管理し、同意書は鍵付の書棚で管理している。データ解析においてはID番号を用いることにより個人を特定できないようにし、登録患者の人権擁護、及びプライバシーの保護に最大限の注意を払い、配慮に努めた。

C. 研究結果

(1) HAM「家族内発症例」の解析結果

表1に示すように、登録患者304名中、HAMの家族歴がある者は29名(9.5%、27家系)、一方、ATL家族歴は20名(6.6%)であった。表2に示すように、家族内発症有群は発症無群と比べて、年齢、発症年齢、診断年齢が有意に低く、また罹病期間が有意に長かった。一方、調査時の納の運動障害重症度、HAQ-DI、排尿・排便障害、足のしびれ及び痛みの症状に関しては、両群に差は見られなかった。

(2) HAM「急速進行例」の解析結果

表3に示すように、進行度の解析が可能であった292名中、「急速進行例」が16名(5.5%)であった。しかし、対象人数が少なかったため、Grade5までの移行年数を2年以下として抽出したところ、該当者は55名(18.8%)であった(表4)。比較解析の結果は2年以内にGrade5あるいは6に移行したいずれの場合も同様な傾向が認められた。すなわち、「急速進行例」では、年齢、運動障害発現年齢、診断年齢が有意に高く、また発症から診断までの年数および罹病期間は有意に短かった。なお、「急速進行例」では現在の納のGradeが有意に高いことに伴い、HAQ-DIスコアも高くなっており、日常生活において支障が多く介助を要する生活を送っている者が多いことが示された。

(3) HAM「家族内発症例」および「急速進行例」のウイルス免疫学的解析結果

今年度、「家族内発症例」4例、「急速進行例」9例および「非急速進行例」51例を大規模ゲノム解析(エクソーム解析およびSNP解析)のために提供することができた。「家族内発症例」および「急速進行例」が示すマーカー検査所見について調べたところ、「家族内発症例」はウイルス免疫学的なマーカーにおいて特に特徴は認められなかった。一方、「急速進行例」は全例、髄液の炎症マーカーであるネオプテリンおよびCXCL10の値が一般的なHAM患者よりも有意に高い値を示した(表5)。

D. 考察

HTLV-1感染者はその一部にHAMを発症するが、その確率は約0.3%と極めて低いことが知られている。しかし、HAM患者に限ってみると、家族内にHAM患者のいる割合は9.5%と高く、HAMには家族集積性があると考えられた。この点で、HAM発症には、何らかの遺伝要因が存在する可能性が示唆され、「家族内発症例」は大規模ゲノム解析に適した症例であると考えられた。

今回解析したHAM「家族内発症例」の最大の特徴は発症年齢が低いことである。これは感染ルートが水平感染よりも母子感染の可能性が高いといった背景も原因の1つと考えられるが、「遺伝的に早期にHAMを発症する何らかの要因」をもっている可能性がある。この点からも「家族内発症例」は大規模ゲノム解析に適している。

一方、今回解析したHAM「急速進行例」の最大の特徴は発症年齢が高いことである。以前の邦からの報告でも、こうした例では髄液中のネオプテリンやHTLV-1抗体価が高く、脊髄における強い炎症反応の存在が指摘されている。今回、

我々が収集して提供した「急速進行例」においても、髄液ネオプテリンおよび髄液CXCL10は高値を示していた。したがって、「急速進行例」ではHTLV-1に起因する免疫応答が強く出現しやすい特徴を有している可能性がある。今回「急速進行例」にHAMの家族内発症例が多いという結果は認められなかったため、「急速進行例」に関連する遺伝的要因は家族内発症と関連する要因とは異なる可能性が示唆されるが、「急速進行例」を調べることで、HAMの病態に促進的に作用する遺伝的要因が見いだされる可能性がある。

今後は、特に「家族内発症例」および「急速進行例」が示すプロウイルス量や髄液検査所見等のHAMの病態に密接に関連するバイオマーカーに関する情報を、次世代遺伝子解析装置によって短期間で大量に得られる遺伝子データと組み合わせることで、臨床的に有用なHAM感受性遺伝子を同定することが可能になると考える。同定されたHAM感受性遺伝子は、無症候性HTLV-1感染者におけるHAM発症のハイリスク群を同定することや、HAMの病態解明や発症予防法、新規治療法開発等に役立つものと考えられる。

E. 結論

本研究により、HAMの「家族内発症例」および「急速進行例」の特徴の一部を明らかにすることができた。こうした情報が今後の遺伝子解析に役立つものと思われる。世界的な見地からみると、HTLV-1感染者の多い地域は、日本以外は発展途上国であり、我が国においてHAMの大規模ゲノム解析が実施されることは国際貢献という意味でも意義深いものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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 graftversus-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 Virology**, 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, 2013.
- 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. 学会発表

- 1) Hasegawa A., Tamai Y., 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. Identification of a novel HLA-DR1-restricted dominant epitope recognized by HTLV-1 Tax-specific CD4+ T-cells augmenting HTLV-1-specific CTL expansion in ATL patients after allogeneic HSCT. AACR/JCA Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research, 21-25 February, 2013, Maui, HI, U.S.A.
- 2) Yamano Y. Search for a model of drug efficacy for a rare chronic progressive neurological disease HAM/TSP, The 3rd International Symposium of Early Stage Clinical Trial, February 2, 2013, Yokohama, Japan. [招待講演]
- 3) 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の新規医薬品開発に関する研究. 平成24年度厚生労働科学研究費 HTLV-1 関連疾患研究領域研究班合同発表会, 2013年2月16日, 東京.
- 4) 山野嘉久. HAMにおける免疫異常ならびに家族内発症について. 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」班平成24年度班会議, 2012年12月7日, 鹿児島.
- 5) 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) の進行度に関連するバイオマーカーの同定, 第17回日本神経感染症学会, 2012年10月20日, 京都.

- 6) 山野嘉久、安藤仁、佐藤知雄、外丸詩野、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、吉田眞理、宇都宮與. HAM における CXCL10 の炎症慢性化機構における重要性と治療標的としての可能性, 第 24 回日本神経免疫学会学術集会, 2012 年 9 月 21 日, 軽井沢.
- 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) の進行度に関連する新規バイオマーカーとしての髄液 CXCL10 の重要性, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 8) 齊藤祐美 高田礼子、菊地誠志、藤原一男、中川正法、竹之内徳博、永井将弘、吉良潤一、中村龍文、高嶋博、齊藤峰輝、渡嘉敷崇、法化図陽一、松崎敏男、出雲周二、山野嘉久. HAM 患者登録システム (HAM ねっと) の構築, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 9) 安藤仁、佐藤知雄、新谷奈津美、八木下尚子、山内淳司、山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の炎症慢性化に果たす CXCL10 の役割と治療応用への解析, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 10) 石原誠人、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久、中村祐輔、中川英刀、植田幸嗣. 脳脊髄液プロテオームプロファイリングによる HAM/TSP 重症度指針マーカーの同定, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 11) 山内淳司、安藤仁、新谷奈津美、佐藤知雄、八木下尚子、山野嘉久. ステロイドの血中 HTLV-1 プロウイルス量に対する影響と免疫抑制による HTLV-1 関連疾患発症リスクに関する検討, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.
- 12) 長谷川温彦、高森絢子、宇都宮與、前田裕弘、山野嘉久、増田昌人、清水由紀子、玉井洋太郎、笹田亜麻子、崔日承、鵜池直邦、岡村純、渡邊俊樹、神奈木真理. HTLV-1 感染者における Tax 特異的 T 細胞応答および ATL 発症予防, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 25 日, 東京.
- 13) 山野嘉久. HAM における HTLV-1 感染 T 細胞の異常, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 25 日, 東京.
- 14) 山野嘉久. HAM (HTLV-1 関連脊髄症) 対策に関する現状と課題, 第 3 回 HTLV-1 対策推進協議会, 2012 年 6 月 6 日, 東京.
- 15) 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の臨床経過と関連する疾患活動性マーカーの同定, 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012 年 5 月 24 日, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) US61/668,686、Yoshihisa Yamano、2012.7.6, A Therapeutic Method And Medicament For HTLV-1 Associated Myelopathy(HAM)
- 2) 特願2012-189318、植田幸嗣、石原誠人、

山野嘉久、22012.8.29, ヒトTリンパ球
向性ウイルス I 型関連疾患検出用ポリ
ペプチドとその利用

2. 実用新案登録

該当なし

3.その他

該当なし

表 1. HAM 登録患者の属性 (N=304)

	全体	男性	女性
性 別 (%)	304 (100%)	79 (26.0%)	225 (74.0%)
年 齢 (平均±SD)	62.4±10.6	62.7±10.9	62.3±10.6
発症年齢 (平均±SD)	44.2±14.9	45.4±16.1	43.8±14.5
罹病期間 (年) (平均±SD)	18.2±10.9	17.4±11.3	18.4±10.8
HAM 家族歴 (%)	29 (9.5%)	10 (12.7%)	19 (8.4%)
うち第 2 度近親者以内	28 (9.2%)	9 (11.4%)	19 (8.4%)
ATL 家族歴 (%)	20 (6.6%)	3 (3.8%)	19 (8.4%)
うち第 2 度近親者以内	18 (5.9%)	3 (3.8%)	15 (6.7%)

表 2. HAM 患者内発症（第 2 度近親者以内）の有無による属性比較

	HAM 家族内発症有 (N=28)	HAM 家族内発症無 (N=276)	p 値
性 別：女性 (%)	19 (67.9%)	206 (74.6%)	N.S.
年 齢 (平均±SD)	56.8±11.0	62.9±10.4	0.003
発症年齢 (平均±SD)	33.0±12.5	45.3±14.7	< 0.001
診断年齢 (平均±SD)	40.3±11.4	52.5±12.7	< 0.001
発症から診断までの年数 (平均±SD)	7.3±7.6	7.1±7.2	N.S.
罹病期間 (年) (平均±SD)	23.7±10.2	17.6±10.8	0.004
初発症状 (%)：歩行障害	22 (78.6%)	227 (82.2%)	N.S.
排尿障害	13 (46.4%)	95 (34.4%)	N.S.
足の感覚障害	1 (3.6%)	40 (14.5%)	N.S.
その他	3 (10.7%)	88 (31.9%)	0.028
ATL 家族歴 (%)	4 (14.3%)	16 (5.8%)	N.S.
うち第 2 度近親者以内	4 (14.3%)	14 (5.1%)	N.S.
輸血歴 (%)：あり	3 (10.7%)	62 (22.5%)	N.S.
うち 1986 年以前	3 (10.7%)	54 (19.6%)	N.S.
現在の納の運動障害重症度 (平均±SD)	6.5±2.5	6.0±2.4	N.S.
HAQ-DI (平均±SD)	1.2±0.8	1.2±0.7	N.S.
排尿障害 (%)：なし	2 (7.1%)	18 (6.5%)	N.S.
投薬	17 (60.7%)	164 (59.4%)	
導尿	8 (28.6%)	85 (30.8%)	
他者管理	1 (3.6%)	9 (3.3%)	
排便障害 (%)：なし	7 (25.0%)	54 (19.6%)	N.S.
投薬	18 (64.3%)	195 (70.7%)	
浣腸	2 (7.1%)	23 (8.3%)	
他者管理	1 (3.6%)	4 (1.4%)	
足のしびれ (%)：なし	12 (42.9%)	79 (28.6%)	N.S.
ときどきある	5 (17.9%)	54 (19.6%)	
常にある	11 (39.3%)	143 (51.8%)	
足の痛み (%)：なし	16 (57.1%)	152 (55.1%)	N.S.
ときどきある	9 (32.1%)	54 (19.6%)	
常にある	3 (10.7%)	70 (25.4%)	

表 3. 急速進行性 HAM 患者の属性 (運動障害発現年齢から納の運動障害重症度 Grade 6 までの移行年数が 2 年以下)

	急速進行群 (N=16, 5.5%)	非急速進行群 (N=276)	p 値
性別：女性 (%)	9 (56.3%)	206 (74.6%)	N.S.
年齢 (平均±SD)	66.9±6.7	61.8±10.7	N.S.
運動障害発現年齢 (平均±SD)	59.3±9.4	44.2±14.3	< 0.001
診断年齢 (平均±SD)	60.1±9.7	50.5±13.0	0.004
発症から診断までの年数 (平均±SD)	1.1±1.9	7.5±7.2	< 0.001
罹病期間 (年) (平均±SD)	7.9±6.4	18.9±10.6	< 0.001
初発症状 (%) :			
歩行障害	14 (87.5%)	227 (82.2%)	N.S.
排尿障害	5 (31.3%)	97 (35.1%)	N.S.
下肢の感覚障害	3 (18.8%)	35 (12.7%)	N.S.
その他	10 (62.5%)	79 (28.6%)	0.009
現在の納の運動障害重症度 (平均±SD)	8.3±3.0	5.9±2.2	0.001
HAQ-DI (平均±SD)	1.7±0.7	1.2±0.7	0.001
HAM 家族歴 (%) :			
うち第 2 度近親者以内	2 (12.5%)	25 (9.1%)	N.S.
ATL 家族歴 (%) :			
うち第 2 度近親者以内	1 (6.3%)	18 (6.5%)	N.S.
輸血歴 (%) : あり	4 (25.0%)	57 (20.8%)	N.S.
うち 1986 年以前	3 (18.8%)	51 (18.6%)	N.S.

表 4. 急速進行性 HAM 患者の属性 (運動障害発現年齢から納の運動障害重症度 Grade 5 までの移行年数が 2 年以下)

	急速進行群 (N=55, 18.8%)	非急速進行群 (N=237)	p 値
性別：女性 (%)	43 (78.2%)	172 (72.6%)	N.S.
年齢 (平均±SD)	65.8±9.0	61.2±10.8	0.004
運動障害発現年齢 (平均±SD)	56.6±10.2	42.3±14.0	< 0.001
診断年齢 (平均±SD)	57.6±10.5	49.5±13.2	< 0.001
発症から診断までの年数 (平均±SD)	1.9±3.3	8.3±7.3	< 0.001
罹病期間 (年) (平均±SD)	10.5±6.8	20.0±10.7	< 0.001
初発症状(%)：			
歩行障害	47 (85.5%)	194 (81.9%)	N.S.
排尿障害	17 (30.9%)	85 (35.9%)	N.S.
足の感覚障害	8 (14.5%)	30 (12.7%)	N.S.
その他	19 (34.5%)	70 (29.5%)	N.S.
現在の納の運動障害重症度 (平均±SD)	6.8±2.4	5.9±2.2	0.008
HAQ-DI (平均±SD)	1.4±0.7	1.1±0.7	0.010
HAM 家族歴 (%)：			
うち第 2 度近親者以内	4 (7.3%)	23 (9.7%)	N.S.
ATL 家族歴 (%)：			
うち第 2 度近親者以内	3 (5.5%)	16 (6.8%)	N.S.
輸血歴 (%)：あり	19 (34.5%)	42 (17.9%)	0.010
うち 1986 年以前	17 (30.9%)	37 (15.7%)	0.018

表 5. HAM「家族内発症例」および「急速進行例」のマーカー検査所見

家族内発症例 (n=4)				
症例	プロウイルス量 ¹⁾	血清 sIL-2R ²⁾	髄液ネオプテリン ³⁾	髄液 CXCL10 ⁴⁾
	copies/100 cells	U/ml	pmol/ml	pg/ml
No.1	18.13	668.0	16.0	3438.04
No.2	41.96	354.0	4.0	101.11
No.3	18.27	301.0	10.0	3796.38
No.4	28.44	602.0	40.0	7361.23
	平均値:26.70	平均値:481.3	中央値:13.0	中央値:3617.21

急速進行例 (n=9)				
症例	プロウイルス量 ¹⁾	血清 sIL-2R ²⁾	髄液ネオプテリン ³⁾	髄液 CXCL10 ⁴⁾
	copies/100 cells	U/ml	pmol/ml	pg/ml
No.5	69.92	1199.0	31.0	6503.99
No.6	31.99	658.0	29.0	4294.34
No.7	7.73	345.0	19.0	8930.42
No.8	1.65	250.0	38.0	10419.91
No.9	39.55	497.0	94.0	5402.82
No.10	8.77	308.0	49.0	10983.82
No.11	9.27	データなし	140.0	39297.35
No.12	2.96	データなし	90.0	13442.30
No.13	8.66	871.0	64.0	26772.20
	平均値:20.06	平均値:589.7	中央値:49.0	中央値:10419.91

- 1) これまで当研究室で得られた値 HAM 患者の平均プロウイルス量 20.0 copies/100 cells
- 2) 血清 sIL-2R 濃度の基準値 124-466 U/mL
- 3) これまで当研究室で得られた値 HAM 患者の髄液ネオプテリン中央値 16 pmol/ml
- 4) これまで当研究室で得られた値 HAM 患者の髄液 CXCL10 中央値 1909.3 pg/ml

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

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

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: 現在までに HAM の発症には様々な遺伝的背景があることが報告されてきた。しかし、現在まで家族内に複数 HAM を発症している家系例（家族性 HAM）のみを集めて解析した報告はなかった。我々は家族性 HAM の症例を集め、その臨床症状の特徴を解析するとともに、患者から得た試料を東京大学と共同し次世代シーケンサーを用いたエクソーム遺伝子解析を進めた。家族性 HAM の臨床的特徴は、当院に入院した連続 124 症例と比較した。その結果家族性 HAM では発症年齢が早く、発症後も進行が遅い傾向が明らかとなった。また、現時点までに得られた家族例 HAM のエクソーム遺伝子解析の結果は、我々が独自に開発した遺伝子情報解析のためのソフトウェアを用いて解析され、その結果、HAM 発症に関わる遺伝因子候補の上位 3 つが細胞浸潤や細胞接着、細胞増殖に関わる遺伝子であることが判明した。現在、解析ソフトウェアのさらなる改良を進めており、その手法を用いてすべての家族性 HAM のエクソームデータを解析することでより信頼性の高い HAM 発症に影響を与える候補遺伝子を見出すことができると考えられる。

A. 研究目的

HAM 患者では末梢血中の HTLV-1 プロウイルス量が HTLV-1 キャリアに比して優位に高いが、その患者の家族においてもプロウイルス量が優位に高いことが知られている。いくつかの HLA の違いや遺伝子多型が HAM の発症因子や抑制因子として知られており、これらのことは HAM の発症には遺伝的背景があることを示唆している。しかし、このように HAM を発症しやすい遺伝的背景を

持つ家系の存在が推定されてきたにも関わらず、現在まで家族性に発症した HAM 症例（家族性 HAM）のみを集めて解析した報告はない。今回われわれは家族性 HAM の血液サンプルを用いて、次世代シーケンサーによる遺伝子解析を行い、家族性 HAM の遺伝的特徴を明らかにすることで HAM 発症のメカニズムを探る。加えて家族性 HAM の臨床的特徴を明らかにするために、鹿児島大学病院に入院した連続 124 症例の臨床

特徴と比較した。

B.研究方法

1987年から2012年6月までに鹿児島大学に登録された全てのHAM患者のうち、家族内にほかにもHAMを発症していた症例(家族性HAM)を抽出し、包括的同意の得られている患者からの血液を用意した。これらのサンプルを次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し、家族性HAM特異的な変異および多型を探索する。家族性HAMの特徴を明らかにするために、2002年から2012年まで鹿児島大学病院に入院した包括的同意の得られている連続孤発例124例の特徴を臨床記録を用いて検討比較した。

(倫理面への配慮)

患者情報は連結可能匿名化されたものを用いて解析しているほか、患者情報はこの研究専用を用意されたコンピューターで解析された。

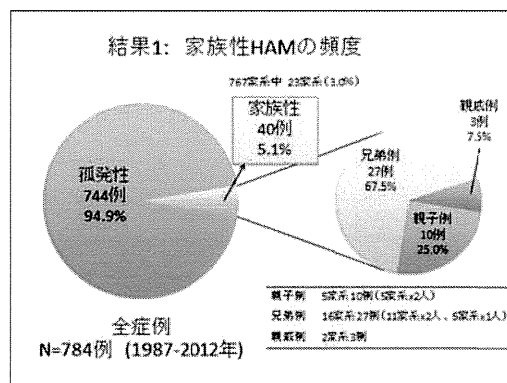
なお、本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」(平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)と「疫学研究に関する倫理指針」(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)を遵守し、当大学の両倫理審査委員会による審査を受けている。

C.研究結果

家族性HAMの割合

データベースを解析した結果、鹿児島大学で登録されているHAM症例

784人のうち、家族内にHAMを複数人発症している家系は23家系存在し、その家系内HAMは40人(5.1%)であった。



上記の家族性HAM40例のうち、30例をエクソーム解析のために東京大学へ送付した。

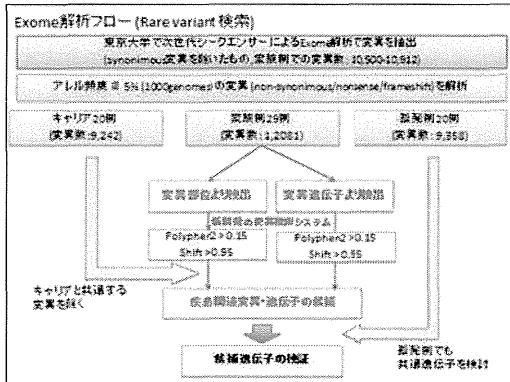
遺伝子解析(対象患者)

解析対象	症例数
家族例	24家系34例
親子例	8家系11例
兄弟例	14家系20例
親戚例	2家系3例
孤発例	20例
HTLV-Iキャリア	20例

本研究は、患者から文書で同意を得、鹿児島大学遺伝子研究倫理委員会に承諾を得ている。

これらのうち、エクソーム解析の終わったサンプルについて遺伝子変異の抽出を独自に開発中の解析ソフトを用いて行った。今回はアミノ酸変位を伴うもの、ナンセンス、フレームシフトについて遺伝子ごとに解析を行った。

エクソーム解析フロー



開発した解析ソフトウェアを用いて家族性 HAM にみられる遺伝子変異を明らかにした。それら遺伝子変異から健常者にも見られうる変異を除いた結果、家族性 HAM29 例に共通する変異は遺伝子別に検討した。結果を下記の表に記した。

遺伝子別解析 変異をもつ家数(家族例HAM)

共通家数	変異遺伝子数
8-29例/29例中	0
7例/29例	3
6例/29例	12
5例/29例	19
4例/29例	130
2-3例/29例	多数

上記の変異遺伝子のうち、29 例中 7 人、あるいは 6 人に共通した遺伝子の機能を調べた。下記に記す。最も多くの 7 人に共通した遺伝子は 3 つあり、細胞増殖や細胞接着因子、細胞浸潤に関わる遺伝子であった。

疾患感受性候補遺伝子

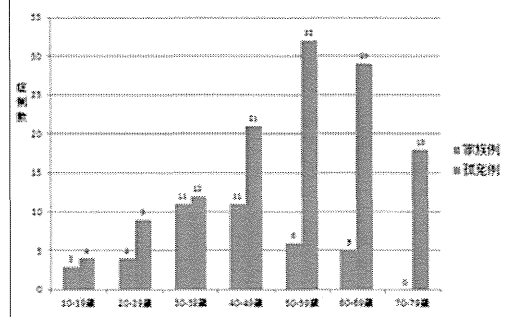
候補遺伝子	家族性HAM	孤発性HAM	キャリア	遺伝子の機能
A/12	7/29	2/20	0/20	cell growth
B/12	7/29	1/20	0/20	cell-cell intact
C/12	7/29	3/20	0/20	cell migration
D/12	6/29	1/20	0/20	
E/12	6/29	0/20	0/20	oncogene
F/12	6/29	4/20	0/20	CNS development
G/12	6/29	1/20	0/20	
H/12	6/29	1/20	0/20	
I/12	6/29	0/20	0/20	
J/12	6/29	2/20	0/20	the cause of retinitis pigmentosa
K/12	6/29	2/20	0/20	axon guidance
L/12	6/29	2/20	0/20	
M/12	6/29	0/20	0/20	cortical development
N/12	6/29	2/20	0/20	TNF- α -induced apoptosis
O/12	6/29	0/20	0/20	Inflammatory process

また同時に進められた、家族性 HAM の臨床的特徴として、対象とした HAM124 例と比較した結果、家族性 HAM は孤発性 HAM と比べて、平均年齢が低く、発症年齢も低いことが明らかとなった。

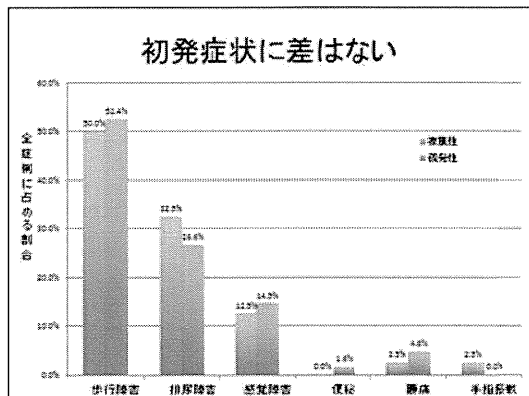
結果2: 患者背景の違い

	家族性 (N=40)	孤発性 (N=124)	P
性別(男性/女性) (女性数多い)	7/33	31/93	N5
年齢 (mean \pm s.d., range)	35.6 \pm 13.0 (23-79)	61.8 \pm 12.5 (15-85)	0.008
発症年齢 (mean \pm s.d., range)	41.3 \pm 13.9 (14-65)	51.6 \pm 13.9 (13-76)	<0.001
診断年齢 (mean \pm s.d., range)	14.0 \pm 11.4 (1-49)	10.2 \pm 9.6 (0-45)	0.026

家族性HAMと孤発性HAMの発症年齢の違い



初発症状は、どちらの群も歩行障害で発症しており、次いで排尿障害、感覚障害が続き、両群に大きな違いはなかった。



家族性 HAM のそのほかの特徴として、発症年齢が低い一方、急速に進行する率が 10%と低く、車いすになるまでの期間も孤発性の HAM に比して長期であった。

家族性HAMは急速進行例が少ない
急速進行例: 観察期間2年の間にEDMSで3段階以上進行した症例

	家族性 (N=40)	孤発性 (N=124)	P
急速進行群	4 (10.0%)	35 (28.2%)	0.019
発症から車イスまで (mean ± s.d., range)	18.3 ± 12.3 (7-50) (N=12)	10.0 ± 10.4 (1-45) (N=38)	0.025

D. 考察

家族性 HAM の臨床的特徴は、初発症状は孤発性 HAM と同じであったが、発症年齢が低く、進行が遅い可能性が示唆された。

家族性 HAM の発症に関与する遺伝子としては細胞増殖や接着、浸潤に関する遺伝子が候補遺伝子として見つかった。これは、脊髄にリンパ球が浸潤するのが HAM の病態であることと通じており、関連遺伝子として期待できるものであった。

さらに解析をすすめるが、あがってきた候補遺伝子についてその機能解析を今後進めていく必要がある。

E. 結論

HAM 発症遺伝子の候補が判明しつつあるが、次年度は家族性 HAM のすべてのエクソーム解析を終了させ、解析ソフトの改良を加えることで HAM 発症に関与する候補遺伝子を狭めるとともにその機能解析を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

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
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, *Retrovirology*, 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

学会発表

1. 松浦英治、久保田龍二、高嶋 博. HTLV-1 キャリアーの脊髄に HTLV-I 特異的細胞障害性 T 細胞は浸潤している. 第 53 回日本神経学会 2012 年 5 月 東京
2. **Eiji Matsuura** Ryuji Kubota, Hiroshi Takashima. HTLV-1 specific cytotoxic T cell migration in the cerebrum of the patient with HAM/TSP. 13th Asian Oceanian Congress of Neurology. June 2012, Melbourne
3. 松浦英治、高嶋博、久保田龍二、出雲周二 HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) 患者大脳、及び、HTLV-1 キャリア脊髄への HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞

の浸潤. 第 53 回日本神経病理学会 総会学術研究会 2012 年 6 月 新潟

4. 松浦英治、久保田龍二、出雲周二、高嶋博 HAM および HTLV-1 キャリアの中枢神経における HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞の分布. 第 5 回 HTLV-1 研究会 2012 年 8 月 東京
 5. 松浦英治、久保田龍二、高嶋博 HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞が関与する病態に関する検討 (HAM 患者の大脳・HTLV-1 carrier の脊髄の検討). 第 24 回日本神経免疫学会学術集会 2012 年 9 月 軽井沢
 6. 松浦英治、久保龍二、出雲周二、高嶋博 HAM/TSP 患者脊髄・大脳および HTLV-1 キャリア脊髄における HTLV-1 ウイルス特異的細胞障害性 T 細胞の検出. 第 17 回日本神経感染症学会 2012 年 10 月 京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表