

201331010A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高嶋 博

平成 26 年（2014）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頁
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	11頁
2. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) における CD4+T 細胞表面の糖鎖修飾の特徴 出雲 周二	15頁
3. 遺伝性ニューロパチーの臨床的、遺伝学的研究 -第3報- 中川 正法	18頁
4. 当科における遺伝性ニューロパチーの臨床的研究 永井 将弘、野元 正弘	21頁
5. 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 石浦浩之	23頁
6. HAM における HTLV-1 抗原遺伝子変異と CTL 認識 久保田 龍二	25頁
7. 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 熱田 直樹	28頁
8. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の発症機構に関する研究 山野嘉久	31頁
9. HTLV-I 関連脊髄症の遺伝的素因の同定の研究 松浦 英治	36頁
10. HTLV-1 関連脊髄症発症関連因子としての HTLV-1 ウイルス型の解析 齊藤 峰輝	40頁
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	45頁
IV. 研究成果の刊行物・別刷	55頁

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

難治性神経疾患の次世代シーケンス解析による原因探索の研究

研究代表者 高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経病学

研究要旨：本研究の目的は、最新のゲノム解析技術を用いて本邦における希少難治性神経・筋疾患の遺伝的原因を決定し、その結果をふまえて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病態を明らかにし、治療への道筋を立案することである。

我々は、次世代ゲノムシーケンサーLife Technology 社 Ion Proton、Illumina 社 MiSeq 他を導入し、大規模シーケンス配列決定をおこなった。さらに解析ソフトウェアを作成し、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、周期性四肢麻痺、先天性ミオトニア、Ullrich 型筋ジストロフィー、認知症など)の包括的な遺伝子診断法を開発した。一方、既知の遺伝子検査陰性例については、拠点研究機関（東京大学）における Illumina 社 (HiSeq2000/2500)を用いた大規模なエクソーム解析データをもとに、高精度の遺伝子診断、新規の原因遺伝子の同定を行った。他方、多因子遺伝病や HTLV-I 関連脊髄症 (HAM)などの非遺伝性疾患の感受性遺伝子の同定を行った。

希少性遺伝性疾患については、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を MIMECK (mitochondrial myopathy with episodic hyper-CKemia) と名付け報告し、その急性期治療法についても見出した。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) の異常を発見し、さらに *SCN9A* 遺伝子異常による遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチーを新病型 HSN2D として報告した。さらに大規模なエクソーム解析による解析数は 500 例以上となり、CMT では高精度の遺伝子診断とともに新規の遺伝的原因検索では CMT については複数の原因を同定できた。Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID)の家族例のポジショナルクローニングを用いた解析も進めている。

HAM の病態解明および治療法開発のために、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った。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な部分も多い。我々は家族性の HAM の検体および臨床像を解析した。膨大な遺伝情報から、HAM の疾患感受性因子を抽出する手法を考案し、HAM 発症の遺伝的因子候補を検出した。それぞれの HAM 感受性因子についてはさらに検討を進めている。

研究分担者

出雲周二 (鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター分子病理病態研)
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)
石浦浩之 (東京大学神経内科)
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)
熱田直樹 (名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学)
山野嘉久 (聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター)
松浦英治 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学講座)
齋藤 峰輝 (川崎医科大学微生物学)

A. 研究目的

多数の原因遺伝子を持つ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、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、検出率の限界が認められた。そこで、本邦における希少難治性神経・筋疾患の遺伝子遺伝的原因を決定するため、次世代ゲノムシーケンサーによる遺伝子診断システムの開発を行う。また、CMT以外の高度に遺伝的多様性がみられる疾患(遺伝性感覚性ニューロパチー、遺伝性運動性ニューロパチー、脊髄小脳変性症、ミトコンドリア病など)についても、包括的な遺伝子検査法を開発する。その結果をふまえて遺伝的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。そのほかのさまざまな希少性の遺伝性疾患についても原因究明を行う。

さらに遺伝子異常に基づいた新疾患概念の確立、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。原因別に病態を明らかにし、治療への道筋を明確にし、機序に合わせた治療を開発する。

HTLV-I 関連脊髄症(HAM)について、発症素因、重症化因子、治療感受性因子などを遺伝子学的手法で明らかにする。

B. 研究方法

1.研究施設

分担研究施設

鹿児島大学難治性ウイルス研究センター
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
川崎医科大学
拠点研究施設
東京大学神経内科
京都大学医学部研究科附属ゲノム医学センター

2.対象疾患

対象疾患は本邦にみられる神経・筋疾患・難病

a. **単一遺伝子病**： Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT)、ミトコンドリア病、脊髄小脳変性症、周期性四肢麻痺、先天性ミオトニア、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、家族性 ALS、細胞内封入体病、HDLs、CADASIL、NIID、Ullrich 型筋ジストロフィー等

b. **遺伝的素因が疾患の発症と関連するもの**： HTLV-I 関連脊髄症(HAM)、多系統萎縮症(MSA)、ALS

c. **原因未解明の地域性の疾患**：沖縄型筋萎縮症(HMSN-P)、遺伝性多系統変性症、地域性認知症(後に脳炎と判明)

3.検体収集

全施設にて 10000 検体以上収集している。

さらに検体収集について、他の研究班との連携し、特に CMT、HAM では患者会と連携して行っている。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

包括的に既知の遺伝子診断を行うため、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析システムを構築した。配列決定プロセスの最適化、効率的な遺伝子異常の検出ソフトウェアの構築の開発もおこなった。診断陰性の検体を拠点研究機関(東京大学神経内科)において、大規模エクソーム解析を行い、DNA 配列情報をもとに既知および新規の原因の同定を行った。

また、多因子遺伝病や HAM などの非遺伝性疾患の感受性遺伝子の同定を行った。

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行う。同一疾患において多数例で行うことにより、遺伝子異常の共通性を利用し、原因遺伝子の同定を試みる。新しく遺伝子変異の家系間での変異抽出ソフトウェアを作

成し、抽出を容易にした。

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

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の塩基配列を次世代ゲノムシーケンシング法で決定し、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。

7. CMT 患者 iPS 細胞作成と病態解明

文科省疾患特異的 iPS 細胞拠点と協力し、CMT2A2 患者、2 家系 3 名の末梢血を採取し、末梢血中のリンパ球より CMT2A2 疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。次に作成した iPS 細胞から無血清凝集浮遊培養法により神経細胞への分化誘導を行った。

8. 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、複数の感受性遺伝子が関与していることを明らかにし、家族例の HAM の特徴について報告した。さらに今回、多因子遺伝性疾患のモデルとして、HAM を対象に全遺伝子について包括的に検討を行った。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った。特にははじめのアプローチとして、HAM の家系列を抽出し、エクソーム解析を行い、家族性の HAM 患者において遺伝的な素因を確認した。HAM 由来の検体を用いて感染細胞外側に O 型糖鎖や、糖鎖と結合するレクチンの一種で HTLV-1 Tax 誘導性の高発現分子 galectin-3 などと HTLV-1 p19Gag との共局を解析した。また、TaxA を持つ感染者は TaxB を持つ感染者と比較して、HAM 発症の Odds が約 2 倍高いことが報告されているが、本研究では、ウイルス型を決定した合計 77 例の HAM 患者について各症例の PBMC 1 個あたりの HBZ、Tax および FoxP3 mRNA 発現を定量し、ウイルス型、HTLV-1 PVL との関連を解析した。

(倫理面への配慮)

これらの実験に使用する DNA 検体の使用については、各大学のヒトゲノム使用研究に関する倫理委員会で承認され、研究目的での原因検索の施行および厳重な保存について患者または家族に十分に説明し、文書で遺伝子検査に関する同意書を得た。

C. 研究結果

新遺伝子診断システムの構築

CMT、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、Ullrich 型筋ジストロフィー、先天性ミオトニアについて遺伝子診断システムを構築した。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を行い、迅速に結果の判定が可能となった。700 例の解析で CMT に 145 名の原因遺伝子を同定し、CMT の亜型で、遺伝性運動性ニューロパチーの原因 *AARS* を同定、抗がん剤の副作用を増強する *EGR2* 遺伝子異常など多くの研究報告を行った。*SCN9A* 遺伝子異常による遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチーを新病型 HSN2D として報告した。

希少性遺伝性疾患の新規原因遺伝子同定

拠点である東京大学神経内科に 600 検体のエクソーム解析を依頼し、500 検体の結果を得た。CMT については 307 例を解析し、劣性遺伝性 CMT の全くの新規の原因を同時に 8 遺伝子確認し得た。

(特許出願中)。優性遺伝性 CMT についても、新手法で多くの新規の原因を同定しつつある。

未解明の地域性の疾患は、ほとんど原因が判明し、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 MIMICK (mitochondrial myopathy with episodic hyper-CKemia) と名付けたが、今回その筋症状の治療として L-Arginine 注射薬の有効性を発見した。沖縄型筋萎縮症 HMSN-P の原因 TFG の異常、南九州の遺伝性多系統変性症は、SCA36(Ashidan)であることが明らかとなった。NIID の連鎖解析にはほぼ成功した。原因同定に向けて解析を継続している。

CMT 患者 iPS 細胞作成と病態解明

CMT2A2 患者、2 家系 3 名 (R94Q 変異 2 名、H128Y 変異 1 名) の末梢血を採取し、末梢血中のリンパ球より CMT2A2 疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。ミトコンドリアに関連した病態を解明しつつある。

多因子遺伝病の解析

HTLV-I は、発症感受性素因を調べるため、34 例の家族歴のある HAM 検体 34 例、HAM20 例、HTLV-I キャリア 20 例のエクソーム解析から疾患感受性遺伝子の候補を同定した。さらに HAM、HTLV-I キャリアのエクソーム解析結果が追加され計 170 例になる予定である。また、京都大学の松田班と共同で HAM の GWAS(マイクロアレイによる Genome wide association study)を行い、HAM 関連因子が見つかった。

MSA の関連因子の抽出の研究に検体を東京大学に提供し、MSA と CoQ2 の関連が見つかった。

D 考察

遺伝子診断を年間 600 検体以上行う中で、患者・主治医に結果を返しながらか、研究に参加してもらうことで良好な関係を築いた。加え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た。主治医および患者に、極力迅速に結果が返せるように努力した。

遺伝性ニューロパチー、小脳失調症など遺伝性神経疾患の包括的遺伝子診断システムの構築については、その開発、および運用も軌道に乗り、多くの臨床医からの依頼に応えることができるようになった。その運用コストと結果の報告期間も大幅に短縮でき、この面の達成度は高い。国際的にも最高水準の遺伝子診断システムを構築した。社会的にも患者・主治医に迅速に結果を返すことで、診断を確実とし他疾患との鑑別に有用性があり、診療に役立っている。また、分子疫学が明らかとなり、治療に向けての方向性がはっきりとした。

希少性疾患の研究では複数個の新規原因遺伝子の発見に成功し、その手法は他疾患に応用可能で、極めて先進的である。その点の達成度は高く、世界でもトップレベルと思われる。CMT の原因の多くは、機序的に ALS や脊髄小脳変性症と重なりが大きく、本研究の発展は CMT のみならず、様々な難病の病態解明に結びつくであろう。疾患は多様で、研究すべき疾患数も多く、今後も継続して研究を進める必要がある。MIMECK などの新規の疾患についても治療法を見いだし社会的にも貢献できた。これらの発見は、新発見で神経難病の病態解明と治療法開発のブレイクスルーとなるであろう。

HAM 研究については、疾患感受性遺伝子の抽出に成功し一定の成果が得られ、エクソーム解析から得られた大量のデータから、因子を抽出する手法を考案したが、このような解析は世界に報告はない。達成度は中等度で、より正確な発症予測をするには、さらなる症例数での検討が必要である。遺伝子解析のソフトウェアの開発にも成功し、解析技術は向上している。最終的には HTLV-I キャリアにおける、より正確な HAM 発症予測により、ハイリスク群の予防・早期治療を目指す。

MSA や ALS については、オールジャパンの拠点研究の検体の収集に積極的に協力し、東京大学の MSA の発症因子 CoQ2 の発見につながった。今後も、研究すべき疾患は多いと考えられる。

加えて次世代シーケンサーによる解析は、HAM のようなウイルス性疾患や全く新規の感染症の診断にも有効であった。

治療への道筋を明確にするという点においては、一部の疾患で治療法も見いだせた。より多くの疾患について、疾患の原因も治療も見いだす必要がある、それは可能である。今後も引き続き研究を継続する必要がある。

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。

②CMT の分子疫学が明らかとなった。

③新しい疾患として MIMECK を樹立し、原因を報告し、急性期の治療法を発見した。

④HMN の原因として、AARS の異常を世界で初めて同定した。

⑤SCN9A 遺伝子異常による遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチーを新病型 HSAN2D として報告した。

⑥HAM の家系列の集積と臨床像の解析が行われた。

⑦HAM 病態機序として HTLV-1 Tax 誘導性の高発現分子 galectin-3 などについて病態を明らかにした。

⑧全エクソーム解析が 500 検体について終了し、CMT の新規の原因遺伝子を 8 個同定し、HAM の感受性遺伝子が解明されつつある。

F. 健康危険情報

なし

G. 論文発表

(高嶋分)

1. 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*. 2013 Mar;18(1):89-93.

2. 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* 2013 Apr 30;80(18):1641-9.

3. 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. 66(8):659-64

4. 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.** 2013 Apr;260(4):1147-51. doi: 10.1007/s00415-012-6782-1. Epub 2012 Dec 12.

(中川分)

5. Noto Y, **Nakagawa M**, Kuwabara S et al. Prominent fatigue in spinal muscular atrophy and spinal and bulbar muscular atrophy: evidence of activity-dependent conduction block. **Clin Neurophysiol** 124(9):1893-1898, 2013

6. Noto Y, Shiga K, Tsuji Y, Kondo M, Tokuda T, Mizuno T, **Nakagawa M**. Contrasting echogenicity in FDP-FCU: A diagnostic ultrasound pattern in sporadic inclusion body myositis. **Muscle Nerve** 2013 Aug 27. doi: 10.1002/mus.24056. [Epub ahead of print] 2013

(野元、永井分)

7. **Nagai M**, Tsujii T, Iwaki H, Nishikawa N, **Nomoto M** Cerebrospinal fluid neopterin, but not osteopontin, is a valuable biomarker for the treatment response in patients with HTLV-1-associated myelopathy. **Internal Med.** 52:2203-2208, 2013

(山野分)

8. Ando H., Sato T., Tomaru U., Yoshida M., Utsunomiya A., Yamauchi J., Araya N., Yagishita N., Coler-Reilly A., Shimizu Y., Yudoh K., Hasegawa Y., Nishioka K., Nakajima T., Jacobson S., **Yamano Y**. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. **Brain**, 136(9) : 2876-2887, 2013.

9. Sato T., Coler-Reilly A., Utsunomiya A., Araya N., Yagishita N., Ando H., Yamauchi J., Inoue E., Ueno T., Hasegawa Y., Nishioka K., Nakajima T., Jacobson S., Izumo S., **Yamano Y**. CSF CXCL10, CXCL9, and Neopterin as Candidate Prognostic Biomarkers for HTLV-1-Associated Myelopathy/ Tropical

Spastic Paraparesis. **PLoS Negl Trop Dis.**, 7(10): e2479, 2013.

10. Ishihara M., Araya N., Sato T., Tatsuguchi A., Saichi N., Utsunomiya A., Nakamura Y., Nakagawa H., **Yamano Y**, Ueda K. Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia. **Blood**, 121(21): 4340-4347, 2013.

(田中、熱田分)

11. Sone J, Kitagawa N, Sugawara E, Iguchi M, Nakamura R, Koike H, Iwasaki Y, Yoshida M, Takahashi T, Chiba S, Katsuno M, **Tanaka F**, Sobue G. Neuronal intranuclear inclusion disease cases with leukoencephalopathy diagnosed via skin biopsy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2014 Mar;85(3):354-6.

(松浦分)

12. Satoshi Nozuma , **Eiji Matsuura**, Toshio Matsuzaki, Osamu Watanabe, Ryuji Kubota, Shuji Izumo, Hiroshi Takashima Familial clusters of HTLV-1-associated myelopathy / tropical spastic paraparesis **PLOS ONE** 2014 May <in press>

(齊藤分)

13 **Saito M**, Tanaka R, Arishima S, Matsuzaki T, Ishihara S, Tokashiki T, Ohya Y, Takashima H, Umehara F, Izumo S, Tanaka Y. Increased expression of OX40 is associated with progressive disease in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Retrovirology.** 10:51, 2013.

14. Kodama A, Tanaka R, **Saito M**, Ansari AA, Tanaka Y. A novel and simple method for generation of human dendritic cells from unfractionated peripheral blood mononuclear cells within 2 days: its application for induction of HIV-1-reactive CD4(+) T cells in the hu-PBL SCID mice. **Front Microbiol.** 4:292, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況
知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1 特許取得

高嶋 博

① CMTのあたらしい8原因遺伝子の同定
遺伝子診断への応用 (国内特許出願中)

② 認知症(新規感染性脳炎)の新規治療薬

(国内特許出願中、 国際特許準備中)

熱田直樹

ALS 疾患関連遺伝子配列解析用の補足 PCR プライマーセット、ALS 疾患関連遺伝子配列の解析方法、及び ALS 疾患の検査方法 特願 2013-234055

2 実用新案登録 特になし

3 その他 特になし

I. 研究発表

1) 国内

頭発表

32件

原著論文による発表 2件

それ以外（レビュー等）の発表6件

2) 海外

口頭発表 12件

原著論文による発表 11件

それ以外（レビュー等）の発表0件

口

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ズ解析による原因探索の研究

研究代表者 高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

研究要旨：本研究の目的は、最新のゲノム解析技術を用いて本邦における希少難治性神経・筋疾患の遺伝的原因を決定し、その結果をふまえて未同定の疾患について遺伝子診断法を開発し、個々の患者の診断を明確にする。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病態を明らかにし、治療への道筋を立案することである。

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)の遺伝子検査を行い、より効率的で多項目の遺伝子診断システムの開発を行ってきた。加えて、新しい原因遺伝子の発見に注力してきた。本研究では、次世代シーケンサーを用いてより効率的で網羅的、安価な遺伝子診断システムの構築を行った。一方、既知の遺伝子検査陰性例については、拠点研究機関における Illumina 社(HiSeq2000)を用いた大規模なエクソーム解析データをもとに、CMT の高精度の遺伝子診断、新規の原因遺伝子の同定を行った。他方、多因子遺伝病や HAM などの非遺伝性疾患の感受性遺伝子の同定を行った。

次世代シーケンサーを用いた新しい遺伝子診断システムは、安価で高速な遺伝子診断を可能にし、CMT、HSAN、SCA、周期性四肢麻痺、先天性ミオトニアの遺伝子診断を可能とした。さらに大規模なエクソーム解析による解析数は 500 例以上となり、CMT では高精度の遺伝子診断とともに新規の遺伝的原因検索では複数の原因を同定できた。HAM 研究については膨大な遺伝情報から、疾患感受性因子を抽出する手法を考案し、HAM 発症の遺伝的因子候補を検出した。

研究協力者

鹿児島大学神経内科・老年病学

橋口昭大 樋口雄二郎 吉村明子

野妻智嗣 松浦英治 袁 軍輝

岡本裕嗣 石原 聡 田邊 肇

崎山佑介 中村友紀 西郷隆二

大窪隆一 徳永章子

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、検出率の限界が認められた。そこで、本邦における希少難治性神経・筋疾患の遺伝子遺伝的原因を決定するため、次世代ゲノムシーケンサーによる遺伝子診断

システムの開発を行う。また、CMT 以外の高度に遺伝的多様性がみられる疾患（遺伝性感覚性ニューロパチー、遺伝性運動性ニューロパチー、脊髄小脳変性症、ミトコンドリア病など）についても、包括的な遺伝子検査法を開発する。その結果をふまえて遺伝的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。

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

対象疾患は本邦にみられる神経・筋疾患・難病

A. 単一遺伝子病： Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT)、ミトコンドリア病、脊髄小脳変性症、周期性四肢麻痺、先天性ミオトニア、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、家族性 ALS 等

B. 遺伝的素因が疾患の発症と関連するもの： HTLV-I 関連脊髄症 (HAM)、多系統萎縮症 (MSA)、ALS

C. 原因未解明の地域性の疾患： 沖縄型筋萎縮症 (HMSN-P)、遺伝性多系統変性症、地域性認知症 (後に脳炎と判明)

対象は、脊髄小脳変性症 1200 例、ミトコンドリア病 700 例、CMT 800 例、HAM 700 例。さらに検体収集について、他の研究班とも連携し、特に CMT、HAM では患者会と連携して行っている。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。

C. 遺伝子診断・解析

包括的に既知の遺伝子診断を行うため、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析システムを構築した。配列決定プロセスの最適化、効率的な遺伝子異常の検出ソフトウェアの構築の開発もおこなった。診断陰性の検体を拠点研究機関(東京大学神経内科)において、大規模エクソーム解析を行い、DNA 配列情報をもとに既知および新規の原因の同定を行った。

また、多因子遺伝病や HAM などの非遺伝性疾患の感受性遺伝子の同定を行った。

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、遺伝子異常の共通性を利用し、原因遺伝子の同定を試みる。新しく遺伝子変異の家系間での変異抽出ソフトウェアを作成し、抽出を容易にした。

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

家族性の地域の疾患についてマイクロアレイでマッピングし、候補領域の全ゲノムの塩基配

列を次世代ゲノムシーケンス法で決定し、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。**多因子遺伝病・感受性遺伝子の同定 (HAM 研究)**

我々は HAM の発症には、HTLV-I 感染に加え、複数の感受性遺伝子が関与していることを明らかにした。さらに今回、多因子遺伝性疾患のモデルとして、HAM を対象に全遺伝子について包括的に検討を行った。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った。

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

(倫理面への配慮)

これらの実験に使用する DNA 検体の使用については、各大学のヒトゲノム使用研究に関する倫理委員会で承認され、研究目的での原因検索の施行および厳重な保存について患者または家族に十分に説明し、文書で遺伝子検査に関する同意書を得た。

C. 研究結果

新遺伝子診断システムの構築

CMT、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、Ullrich 型筋ジストロフィーについて遺伝子診断システムを構築した。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を行い、迅速に結果の判定が可能となった。700 例の解析で CMT に 145 名の原因遺伝子を同定し、CMT の垂型で、遺伝性運動性ニューロパチーの原因 *AARS* を同定、ALS4 の世界第 2 報、抗がん剤の副作用を増強する *EGR2* 遺伝子異常など多くの研究報告を行った。

希少性遺伝性疾患の新規原因遺伝子同定

拠点である東京大学神経内科に 600 検体のエクソーム解析を依頼し、500 検体の結果を得た。CMT については 307 例を解析し、劣性遺伝性 CMT の新規の原因を同時に 8 遺伝子確認し得た(特許出願中)。優性遺伝性 CMT についても、新手法で多くの新規の原因を同定しつつある。未解明の地域性の疾患は、ほとんど原因が判明し、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 MIMICK (mitochondrial myopathy with episodic hyper-CKemia) と名付けたが、今回その筋症状の治療として

L-Arginine 注射薬の有効性を発見した。*SCN9A* 遺伝子異常による遺伝性感覚性自律神経性ニューロパチーを新病型 HSN2D として報告した。沖縄型筋萎縮症 HMSNP の原因 *TFG* の異常、南九州の遺伝性多系統変性症は、SCA36(Ashidan)であることが明らかとなった。

多因子遺伝病の解析

HTLV-I は、発症感受性素因を調べるため、家族歴のある HAM 検体 34 例、HAM20 例、HTLV-I キャリア 20 例のエクソーム解析から疾患感受性遺伝子の候補を同定した。さらに HAM、HTLV-I キャリアのエクソーム解析結果が追加され計 170 例になる予定である。また、京都大学の松田班と共同で HAM の GWAS(マイクロアレイによる Genome wide association study)を行い、HAM 関連因子が見つかった。MSA の関連因子の抽出の研究に検体を東京大学に提供し、MSA と CoQ2 の関連が見つかった。

D 考察

遺伝子診断を年間 600 検体以上行う中で、患者・主治医に結果を返しながらか、研究に参加してもらうことで良好な関係を築いた。加え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た。主治医および患者に、極力迅速に結果が返せるように努力した。

遺伝性ニューロパチー、小脳失調症など遺伝性神経疾患の包括的遺伝子診断システムの構築については、その開発、および運用も軌道に乗り、多くの臨床医からの依頼に応えることができるようになった。その運用コストと結果の報告期間も大幅に短縮でき、この面の達成度は高い。国際的にも最高水準の遺伝子診断システムを構築した。社会的にも患者・主治医に迅速に結果を返すことで、診断を確実とし他疾患との鑑別に有用性があり、診療に役立っている。また、分子疫学が明らかと成り、治療に向けての方向性がはっきりとした。

希少性疾患の研究では複数個の新規原因遺伝子の発見に成功し、その手法は他疾患に応用可能で、極めて先進的である。その点の達成度は高く、世界でもトップレベルと思われる。CMT の原因の多くは、機序的に ALS や脊髄小脳変性症と重なりが大きく、本研究の発展は CMT のみならず、様々な難病の病態解明に結びつくであろう。

我々の研究すべき疾患数が多く、今後も継続して研究を進める必要がある。MIMECK など

の新規の疾患についても治療法も見いだし社会的にも貢献できた。これらの発見は、新発見で神経難病の病態解明と治療法開発のブレイクスルーとなる。

HAM 研究については、疾患感受性遺伝子の抽出に成功し一定の成果が得られ、エクソーム解析から得られた大量のデータから、因子を抽出する手法を考案し、このような解析は世界で初めてである。達成度は中等度で、より正確な発症予測をするには、さらなる症例数での検討が必要である。多くの症例を重ねることにより、すでに解析ソフトウェアの開発にも成功しており、順調に実験は進むと考えられる。最終的には HTLV-I キャリアにおける、より正確な HAM 発症予測により、ハイリスク群の予防・早期治療を目指す。

MSA や ALS については、オールジャパンの拠点研究の検体収集に積極的に協力し、東京大学の MSA の発症因子 CoQ2 の発見につながった。今後も、研究すべき疾患は多いと考えられる。

加えて次世代シーケンサーによる解析は、HAM のようなウイルス性疾患や全く新規の感染症の診断にも有効であった。

治療への道筋を明確にするという点においては、一部の疾患で治療法も見いだせた。より多くの疾患について、疾患の原因も治療も見いだす必要があり、それは可能である。今後も引き続き研究を継続する必要がある。

E. 結論

- ①遺伝子診断陰性例に対する包括的な既知の遺伝子診断は、小型のゲノムシーケンサーを用いることで、安価、迅速に実行できる。
- ②新しい疾患として MIMECK を樹立し、原因を報告した。
- ③HMN の原因として、AARS の異常を世界で初めて同定した。
- ④全エクソーム解析を行う体制がととのい、CMT の新規の原因遺伝子、HAM の感受性遺伝子が解明されつつある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.**

2013 Apr;260(4):1147-51. Epub 2012 Dec 12.

2) 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**. 2013 Mar;18(1):89-93.

3) 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** 2013 Apr 30;80(18):1641-9.

4) 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.

5) 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**. 2013 Jan;48(1):59-62.

6) Saito M, Tanaka R, Arishima S, Matsuzaki T, Ishihara S, Tokashiki T, Ohya Y, **Takashima H**, Umehara F, Izumo S, Tanaka Y. Increased expression of OX40 is associated with progressive disease in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Retrovirology**. 2013 May 7;10:51. doi: 10.1186/1742-4690-10-51.

7) Sano K, Satoh K, Atarashi R, **Takashima H**, Iwasaki Y, Yoshida M, Sanjo N, Murai H, Mizusawa H, Schmitz M, Zerr I, Kim YS, Nishida N. Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC assay. **PLoS One**. 2013;8(1)

8) Multiple-System Atrophy Research Collaboration. Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy Multiple-System Atrophy Research Collaboration. **N Engl J Med**. 2013 Jul

18;369(3):233-44.

doi:

10.1056/NEJMoa1212115. Epub 2013 Jun 12. (73人中23番)

2. 学会発表

1) Yujiro Higuchi, Junhui Yuan, Akiko Yoshimura, Yusuke Sakiyama, Ryuji Saigo, Ryuki Hirano, Akihiro Hashiguchi, Yuji Okamoto, Ryuichi Okubo, **Hiroshi Takashima**. Comprehensive genetic analysis of autosomal dominant spinocerebellar ataxia using a next generation sequencer. 第54回日本神経学会学術大会, East Asian Neurology Forum 2013.5.29, 東京都

2) 樋口 雄二郎, 吉村 明子, 袁 軍輝, 崎山 佑介, 西郷 隆二, 平野 隆城, 岡本 裕嗣, 大窪 隆一, 高嶋 博, 脊髄小脳変性症の次世代シーケンス法による網羅的遺伝子解析. 第54回日本神経学会学術大会 2013.5.29 東京都

3) 大窪 隆一, 平野 隆城, 崎山 佑介, 西郷 隆二, 井上 輝彦, 三山 吉夫, 高嶋 博 宮崎県南西部に集積するSCA36 (Asidan) の臨床病理学的検討. 第54回日本神経学会学術大会 2013.5.29 東京都

4) Yujiro Higuchi, Ryuki Hirano, Akiko Yoshimura, Junhui Yuan, Yusuke Sakiyama, Ryuji Saigo, Akihiro Hashiguchi, Yuji Okamoto, Ryuichi Okubo, **Hiroshi Takashima**. Comprehensive genetic analysis of autosomal dominant spinocerebellar ataxia using the next generation sequencing system. The 63rd Annual Meeting of the American society of human genetics 2013. 10.24, Boston, U.S.A.

H. 知的財産権の出願・登録状況

知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1 特許取得 2件

① CMTのあたらしい8原因遺伝子の同定遺伝子診断への応用 (国内特許出願中)

② 認知症(新規感染性脳炎)の新規治療薬(国内特許出願中、国際特許準備中)

2 実用新案登録 特になし

3 その他 特になし

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/TSP）における CD4+T 細胞表面の糖鎖修飾の特徴

研究分担者 出雲 周二

研究協力者 児玉大介 1)、出雲公子 1)、久保田龍二 1)、松崎敏男 1)、高嶋 博 2)

所属：鹿児島大学大学院医歯学総合研究科

1) 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

2) 神経内科・老年病学分野

研究要旨

最近 HTLV-1 関連脊髄症（HAM/TSP、以下 HAM）由来の検体を用いて感染細胞外側に O 型糖鎖や、糖鎖と結合するレクチンの一種で HTLV-1 Tax 誘導性の高発現分子 galectin-3 などが HTLV-1 p19Gag と共局在しており、ウイルスシナプスでは糖鎖関連分子が重要であることが示された。そこで我々は HTLV-1 感染病態で最も重要な糖鎖は何かを検討するため、HAM 由来の CD4+T 細胞を用いてレクチンアレイによる包括的糖鎖解析を少数例で行い、N 型糖鎖 N-acetyl lactosamine が有意に発現しているという結果を得た。HAM 病態への関与が示唆される。

A. 研究目的

HAM 発症の最大の危険因子はプロウイルス量である。プロウイルス量拡大は、HTLV-1 感染 CD4 + T 細胞と非感染 CD4+T 細胞の間に形成されるウイルスシナプスを介した cell- to-cell spread によるとされる。最近 HAM 由来検体を用いて、糖鎖と結合するレクチンの一種で HTLV-1 Tax 誘導性に感染細胞に高発現する galectin-31 や、O 型糖鎖など糖鎖関連分子が HTLV-1 p19Gag と共局在する Biofilm- like extracellular virus assemblies がウイルスシナプスの本態と報告された。

我々は HAM 病態で最も重要な糖鎖を同定するため、網羅的糖鎖研究のツールとして開発されたレクチンアレイ 3 を用いて検討した。

B. 研究方法

対象：WHO 診断基準により診断した HAM 患者、無症候性 HTLV-I キャリア (AC)、HTLV-1 陰性健康者対照(NC)各 4 例を無作為に選んだ。

CD4+T 細胞の抽出：CD4+Tcell Isolation Kit II(ヒト)(Miltenyi)で CD4+T 細胞を

回収した。

膜蛋白精製：CD4+T 細胞から TM-PEK Proteo-Extract Transmembrane Extraction Kit Novagen (Merck)で膜蛋白を塩析し、BCA 法で蛋白濃度を測定。細胞溶解液の作製：CD4+T 細胞から RIPA buffer で作製し BCA 法で蛋白濃度を測定。

レクチンアレイ：膜蛋白を Cy3 標識し脱塩カラムで洗浄，45 種の天然型レクチンを搭載した LecChip (GP Bioscience) のプロトコールに従った。GlycoStation Reader 1200 (GP Bio science)で読取り、ArrayProAnalyzer (Media Cybernetics)、Glyco- Station Tools software (GP Bioscience)で数値化、規格化、解析した。統計解析は同蛋白濃度(250 ng/mL)，規格化信号強度で群内比較した。

MALDI-TOF MS による N-glycan profiling：HAM6 例の細胞膜蛋白に対して PNGase F で N-glycan を切断後、GlycoBlot（住友ベークライト）で標識し MALDI-TOF MS (Autoflex III smartbeam, Bruker Daltonics)を行った。

SDS-PAGE、Coomassie Brilliant Blue(CBB)染色、Lectin blotting、PMF(Peptide Mass Fingerprinting) : HAM・NC各3例の細胞溶解液を用いてで平行に泳動し、1枚はCBB染色しバンドを切り出しPMFを行い、他方はさらに転写後、ビオチン化UDA、Streptavidin- HRP conjugate (Thermo Scientific)で染色しFluor Chem FC2 Imager (Alpha Innotech)で撮像した。

蛍光免疫組織化学: HAM・NCのCD4+T細胞貼付標本でビオチン化UDA、Streptavidin Alexa 488 (Green, Invitrogen) ; rabbit polyclonal anti-Galectin-3, goat anti-rabbit IgG Alexa 635(Far red, Invitrogen)で二重染色。

FCM: HAM、NC各2例のPBMCをN-glycan 生合成阻害剤 tunicamycin 非存在下または2μg/mL存在下で48時間培養後、ビオチン化UDA、Streptavidin Alexa488 (Invitrogen) ; CD4-PEあるいはrabbit polyclonal galectin-3 antibody, goat anti-rabbit IgG (H+L)で染色しFCMを行った。

(倫理面への配慮)

採血、検体保存は説明と文書での同意を得て行った。患者と検体は非連結匿名化し鹿児島大学倫理委員会の承諾を得た。

C. 研究結果

1) HAM由来CD4+T細胞の糖鎖

レクチンアレイではSTL(ジャガイモレクチン)、UDA(セイヨウイラクサレクチン)の信号が有意に高発現だった(One-way ANOVAで各々p=0.001, 0.006)(図1)。

一方N型糖鎖のMALDI-TOS MSでは6例中2例のみでシグナルがみられ濃縮が必要と判明した(図略)。

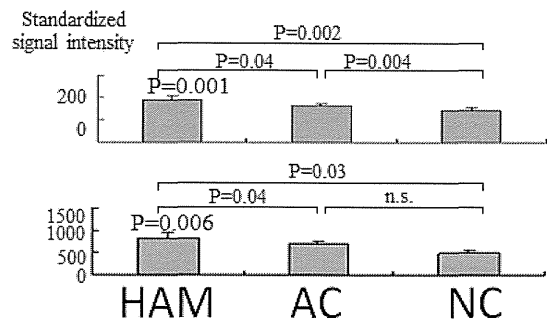


図1. レクチンアレイ結果

2) 糖鎖担体蛋白の探索

細胞溶解液のSDS-PAGE・CBB染色では多数のバンドが可視化され、Lectin blotでも絞り込み困難だった。PAGEゲルからバンドを切り出しPMF後、MASCOTデータベースでヒットした候補から、N-グリコシル化サイトを持つ細胞膜蛋白の条件に合致するものとしてC6orf25が見つかった(図略)。

3) 蛍光免疫組織化学

UDAすなわちN-acetyllactosamineはNCに比しHAMのCD4+T細胞で染色性が良かった。Galectin-3(CRDを認識する抗体)の染色性は両者とも不良だった(図2)。

図2. CD4+T細胞貼付標本のUDAレクチン・抗galectin-3抗体二重染色(×400, UDA:Green, Gal-3: Far Red, DAPI: Blue)

4) PBMCを用いたFCM(代表例)

HAM、NCでUDA(N-acetyllactosamine)陽性率は98.1%、98.5%と差はないが、CD4+T細胞中での陽性率は55.5%、38.7%とHAMでより高頻度だった(図3)。N型糖鎖生合成阻害剤 tunicamycin 曝露非存在下培養48時間後のgalectin-3陽性率はHAM、NCで各々24.8%、24.0%から、存在下培養後に8.7%、8.9%と両者とも低下した(図4)。

図3. HAM・NCのPBMCを用いたFCM

図4. N-グリカン生合成阻害剤

tunicamycin を用いた N-acetyl lactosamine と galectin-3 陽性率の変化

D. 考察

レクチンアレイ結果から STL、UDA が認識する N 型糖鎖 Gal β 1-4GlcNAc(N-acetyllactosamine) が有意に発現していると考えられた。よって感染細胞担体膜蛋白はこの糖鎖を発現し、Tax 誘導性に高発現の galectin-3 はそのリガンドなのでレクチン-グリカン格子を形成し、Cell-to-cell spread に関与するという仮説が成り立つ。FCM から galectin-3 は N-acetyllactosamine を認識していると考えられる。IHC で galectin-3 の染色性が不良だったのは通常の抗体が C 端の CRD (糖鎖認識部位) を認識するので、N-acetyl lactosamine を UDA と galectin-3 が奪い合ったためと考えられ、galectin-3 N 端に対する抗体で再検討が必要と思われる。

N-acetyl lactosamine の担体候補蛋白は今後 western blot での確認が必要である。

E. 結論

HAM の HTLV-1 感染細胞上には N 型糖鎖 N-acetyl lactosamine が有意に発現しているかもしれない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato T, Coler-Reilly A, Utsunomiya A, Araya N, Yagishita N, Ando H, Yamauchi J, Inoue E, Ueno T, Hasegawa Y, Nishioka K, Nakajima T, Jacobson S, Izumo S, Yamano Y. CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. PLoS Negl Trop Dis. 7(10):e2479, 2013.

2) Saito M, Tanaka R, Arishima S,

Matsuzaki T, Ishihara S, Tokashiki T, Ohya Y, Takashima H, Umehara F, Izumo S, Tanaka Y. Increased expression of OX40 is associated with progressive disease in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Retrovirology; 10:51, 2013.

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
3. その他
なし

遺伝性ニューロパチーの臨床的、遺伝学的研究 -第3報-

研究分担者 中川正法 京都府立医科大学附属北部医療センター 病院長

研究要旨

遺伝性ニューロパチーには、Charcot-Marie-Tooth病(CMT)、hereditary motor neuropathy、familial amyloid neuropathy (FAP) 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。今回、自験例 98 例について遺伝子診断を行い臨床病型との関連を検討した。また、今年度は新たな診断法として、末梢神経の神経エコーと神経軸索興奮性の検討を行い、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した。更に、CMT2A2 患者、2 家系 3 名 (R94Q 変異 2 名, H128Y 変異 1 名) の末梢血中リンパ球より CMT2A2 疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。

研究協力者

高嶋 博 (鹿児島大神経内科・教授)
橋口昭大 (鹿児島大神経内科・助教)
井上治久 (京都大学 iPS 研究所・准教授)
水野敏樹 (京都府立医大神経内科・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)
大原 亮 (京都府立医大神経内科・助教)
能登裕一 (京都府立医大神経内科・助教)
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)

遺伝子解析用 DNA チップおよび次世代シーケンサーで解析した。一部の症例はエキソーム解析を行った。本人自身または両親の同意を得て遺伝子解析を行った。

新たな診断法として、末梢神経の神経エコーと神経軸索興奮性の検討を行い、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した。神経エコーは、正中神経、腓腹神経、大耳介神経にて神経断面積を測定し、CMT の遺伝子異常別に比較した。症例数の多い PMP22 重複 (CMT1A) 群において、神経断面積と CMT neuropathy score (CMTNS)、年齢、神経伝導検査の各パラメーターとの相関を検討した。

当科にてアスコルビン酸投与 (20/kg/日) を、1 年間以上継続し、投与前、投与後 12 週間、48 週間 (1 年) の 3 回の QTRAC ソフトウェアを用いた軸索興奮性測定的全プログラムがエラーなく遂行できた CMT 1 A 患者 8 名 (男性 3 名、女性 5 名、平均 49.9 歳)。握力を含めた臨床評価と神経伝導検査を併せて行い、投与前後での短期 (投与後 12 週) と長期 (投与後 48 週) での各パラメーター変化を解析する。

文科省疾患特異的 iPS 細胞拠点と協力し、CMT2A2 患者、2 家系 3 名 (R94Q 変異 2 名, H128Y 変異 1 名) の末梢血を採取し、末梢血中のリンパ球より CMT2A2 疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。次に作成した iPS 細胞から無血清凝集浮遊培養法 (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like aggregates with quick reaggregation: SFEBq) により神経

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、familial amyloid neuropathy (FAP) 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

対象は臨床的に遺伝性ニューロパチーが疑われた 98 例 (男 54 例、女 44 例) である。平均年齢は、46±18 歳、発症年齢 26±22 歳であった。臨床症状、電気生理学的検査所見から脱髄型 CMT が疑われた場合は PMP22 重複または欠失の有無を FISH 法で検討した。FISH 法で異常を認めなかった例および軸索型 CMT が疑われた例は、CMT

細胞への分化誘導を行った。また、HEK293細胞を用い、MFN2 WT、R94Q、H128Y変異を強制発現させ、細胞免疫染色を施行し細胞体内のミトコンドリアの局在を観察した。各群での酸素消費速度、ATP産生量、ミトコンドリア膜電位差について比較検討した。

(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

臨床症状、遺伝形式、電気生理学的検査所見に基づいて、脱髄型CMT(CMT1、4、CMTX)と軸索型CMT(CMT2)に分類した。遺伝子解析では98例中、PMP22重複が33例(34%)と最も多く、MFN2変異8例、NFL変異3例、MPZ変異3例、PMP22欠失3例、EGR2変異2例、TFG変異2例、DNMT1変異1例、TTR変異1例など計71例(72%)に遺伝子異常を認めた。CMT2型33例中13例(39%)で検索した限りでは遺伝子異常がみつからなかった点が特徴的であった。CMT1型と2型の発症年齢は両型ともに20歳以下の発症が過半数であったが、50歳以降にもピークがあり発症年齢に二峰性を認めた。

末梢神経の神経エコーは、2011年4月から2012年10月までに当施設を受診したCMT患者連続40名(男性24名、女性16名、平均年齢47歳(10-80歳))と正常コントロール群は27名(男性18名、女性9名、平均年齢42歳(24-79歳))に施行した。PMP22重複群(20名)は正常群に比し、有意に、施行した全神経で断面積が増大していた($p < 0.01$)。NEFL遺伝子変異群(3名)では、神経伝導検査上、脱髄型も含まれたが、神経断面積の増大は認めなかった。PMP22重複群で正中神経断面積と年齢との相関はみられなかったが、上腕部での正中神経断面積とCMTNSの間に正の相関が認められた。また、前腕部の正中神経断面積と前腕部の運動神経伝導速度の間に負の相関が認められた。

アスコルビン酸投与後1年で、握力、ONLS(Overall Neuropathy Limitations Scale)に有意な変化は認めなかった。正中

神経CMAPは投与後1年の時点で軽度増大があったが、有意差は認めなかった。軸索興奮性測定では、既報告同様、投与前、必要刺激強度の増大と電気緊張閾値法(Threshold electrotonus)では大きな閾値変化(fanning-out)とK⁺チャンネルの機能の亢進の所見を認めた。投与後短期の評価では、電気緊張閾値法にて、有意差は認めなかったが、投与前と比較してfanning-outの程度が小さくなった。長期の評価では、Stimulus-response curveにおいて、治療前と比較して必要刺激強度の増大の程度が小さくなる所見を得たが、電気緊張閾値法でのfanning-outの程度は投与前よりも大きい結果となった。60歳未満(4人)、60歳以上(4人)のサブグループに分けた検討では、前述の必要刺激強度の増大の改善、電気緊張閾値法で認めた投与後のfanning-outの程度の変化は60歳以上の症例により強くみられることがわかった。軸索興奮性測定における各パラメーターの変化と、臨床・神経伝導検査データとの関連は認めなかった。

CMT2A2患者、2家系3名(R94Q変異2名、H128Y変異1名)の末梢血を採取し、末梢血中のリンパ球よりCMT2A2疾患特異的iPS細胞を樹立した。HEK293細胞を用いた免疫染色ではMFN2 WT、R94Q、H128Yいずれにおいても細胞体内にミトコンドリアの異常凝集体を認めたが、CMT2A2 iPS細胞では認めなかった。ミトコンドリアの異常凝集体はMFN2を強制発現した影響が考えられたが、CMT2A2 iPS細胞由来運動ニューロンでも検討する必要がある。また、HEK293の実験では酸素消費速度、ATP産生量、ミトコンドリア膜電位差は各群では有意な差を認めず、ミトコンドリアによる酸化的リン酸化障害と病因との関連性は示唆されなかった。

D. 考察

これまでCMT疑い例の半数以上で遺伝子異常が未同定であると報告されているが、今回の自験例の検討ではCMT1の約9割、CMT2の約4割の症例で遺伝子異常が明らかとなった。これは、新たな原因遺伝子の発見と解析技術の向上によるものと考えられる。原因遺伝子未確定例が約3割であり、今後、エキソーム解析を含めた詳細な検討を計画し

ている。

神経エコーは、リアルタイムで末梢神経の変化を観察することが出来、他の検査法と組み合わせて用いることでより有用性が高まると考えられた。

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、さらに症例数を増やして検討する必要がある。

今年度は、CMT の iPS 細胞の確立体制を整えた。今後、iPS 細胞の神経細胞、シュワン細胞への分化誘導をすすめ、病態解明へと発展させることが重要である。

E. 結論

今年度は、98 例の遺伝性ニューロパチーの臨床診断と遺伝子診断を行い、いくつかの新たな遺伝子変異を明らかにした。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継続したい。

CMT の病態解明に向けて、患者血液由来の iPS 細胞から運動ニューロンへ分化させ、その phenotype (形態異常、ミトコンドリアの細胞体での異常凝集、軸索上の分布異常などを) を検討し、新たな治療法の開発に発展させたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中川正法。シャルコー・マリー・トゥース病とは、どんな病気ですか。健 42(4):8-10, 2013
- 2) 中川正法。Charcot-Marie-Tooth 病。Clinical Neuroscience 31(8):980-981, 2013
- 3) 中川正法。Charcot-Marie-Tooth 病の治療戦略。Brain Medical 25(3):243-250, 2013
- 4) 中川正法、高嶋 博。近位筋優位運動感覚ニューロパチーの疾患概念の確立。神経内科 79(6):726-731, 2013
- 5) Noto Y, Nakagawa M, Kuwabara S et al. Prominent fatigue in spinal muscular

atrophy and spinal and bulbar muscular atrophy: evidence of activity-dependent conduction block. Clin Neurophysiol 124(9):1893-1898, 2013

- 6) Nakamura R, Atsuta N, Imai T, Nakagawa M, Tsuji S, Kaji R, Nakano I, Sobue G, et al. Neck weakness is a potent prognostic factor in sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. J Neurol Neurosurg Psychiatry 84(12):1365-1371, 2013
- 7) Tomita M, Koike H, Nakagawa M, Sobue G, et al. Clinicopathological features of neuropathy associated with lymphoma. Brain 136 (Pt 8):2563-2578, 2013
- 8) Noto Y, Shiga K, Tsuji Y, Kondo M, Tokuda T, Mizuno T, Nakagawa M. Contrasting echogenicity in FDP-FCU: A diagnostic ultrasound pattern in sporadic inclusion body myositis. Muscle Nerve 2013 Aug 27. doi: 10.1002/mus.24056. [Epub ahead of print] 2013

2. 学会発表

- 1) 中川正法。教育講演「遺伝子変異 Up date」。第 54 回日本神経学会学術集会 平成 25 年 5 月 31 日、東京
- 2) 中川正法、能登祐一、水田依久子、滋賀健介、高嶋 博、橋口昭大。「遺伝性ニューロパチー 75 例の臨床的、遺伝学的研究」。第 54 回日本神経学会学術集会 平成 25 年 5 月 31 日、東京
- 3) Masanori Nakagawa. 「What are the news in HMSN-P?」。The morning lecture in Sao Paulo University, Department of Neurology. Aug 8 (Fri), 2013. Sao Paulo, Brazil.
- 4) 丹羽 文俊、徳田 直輝、笠井 高士、栗山 長門、中川 正法。軸索型 Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT2J) の一例における心拍変動スペクトル解析を用いた自律神経障害の評価。第 66 回日本自律神経学会総会 2013 年 10 月 24 日名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし