

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）
分担研究報告書

当科における遺伝性ニューロパチーの臨床的研究

研究分担者 永井将弘、野元正弘
愛媛大学医学部附属病院薬物療法・神経内科

研究要旨

愛媛大学医学部附属病院薬物療法・神経内科における遺伝性ニューロパチーの臨床像を検討した。6例で遺伝性ニューロパチーが疑われ、脱髄型が4例、軸索型が2例であった。遺伝子異常が検出されたのは4例で、PMP22 遺伝子重複が3例、NEFL 遺伝子変異が1例であった。

A. 研究目的

遺伝性ニューロパチーには、hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN) または Charcot-Marie-Tooth (CMT)、hereditary sensory and autonomic neuropathy (HSAN)、hereditary motor neuropathy (HMN)、familial amyloid polyneuropathy (FAP)などの病型が存在する。確定診断には遺伝子診断が不可欠であり、当科では脱髄型 CMT が疑われた症例に関しては、FISH 法で PMP22 遺伝子の重複の有無を確認し、その他の遺伝子解析は鹿児島大学神経病学講座に依頼している。今回、当科において診断された遺伝性ニューロパチー臨床像について検討したので報告する。

B. 研究方法

2010年以降、当科において遺伝性ニューロパチーが疑われた6症例について遺伝子解析（PMP22 or 鹿児島大学）を施行した。臨床症状、神経伝導検査の結果とあわせて検討した。

（倫理面への配慮）

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従って行った。遺伝子検査の際は文書にて説明した後、被験者本人の文書同意を得たうえで施行した。個人情報および診療情報などのプライバシーに関する情報は万全な管理対策を講じ、プライバシーの保護に努めた。発表の際は個人が特定されないよう配慮した。

C. 研究結果

2010年より当科にて遺伝性ニューロパチーを疑われた患者は6例（男性3例、女性3例、平均年齢56才）であった。神経伝導検査による分類では脱髄型が4例、軸索型が2例であった。脱髄型4例中3例で PMP22 遺伝子の重複が認められ CMT1A と診断された。1例は腓腹神経生検等で CMTX が疑われたが、遺伝子変異は検出されなかった。軸索型2例中1例には遺伝子変異はされなかったが、残り1例で neurofilament light polypeptide (NEFL) 遺伝子に c. 998T>C、p. L333P 変異が認められ、CMT2E と診断された。本症例は65才女性で、家族歴として息子にも下肢筋力低下が認められている。病歴は20才頃につま先立ちができなくなり、45才頃よりつたい歩き、50才頃より車いす移動と緩徐進行性の経過であった。また、中耳炎後の難聴を合併していた。

D. 考察

CMT 有病率は10万人あたり5~40人と推定されており、人口約140万人の愛媛県においては70人以上の CMT 患者数が推計される。しかし、当科における CMT（疑い）患者は6名であり、愛媛県内に神経内科を有する総合病院が当院を含めて3施設しかないことを考慮すると、診断された CMT の患者数が明らかに少ない。一方、CIDP 有病率（2008年）は

10万人あたり1.6人であり、当科におけるCIDP(疑い)患者は20名である。CIDPを疑われ遺伝子検査が施行されていない症例の中にもCMTが紛れている可能性がありChronic polyneuropathyの症例においては、家族歴が明らかでなくても遺伝子検査を行う必要があると考えられる。CMTの病態解明、治療法の開発のためには更なる症例の蓄積、解析が必要である。

E. 結論

当科において6例で遺伝性ニューロパチーが疑われ、神経伝導検査による分類では脱髄型が4例、軸索型が2例であった。遺伝子異常が検出されたのは4例でPMP22遺伝子重複が3例、NEFL遺伝子変異が1例であった。

F. 健康危険情報

特記すべき事項無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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-I-associated myelopathy
Internal Med. 52:2203-2208, 2013

2) 永井将弘、山崎知恵子、山下梨沙子、野元正弘

大学における自主臨床研究の支援体制について

愛媛医学 32 : 192-195, 2013

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）
分担研究報告書

神経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

研究分担者 氏名 石浦浩之 所属 東京大学神経内科

研究要旨

我々は効率よくエクソーム解析を行うための基盤整備を行ってきており、今回は多検体のエクソーム解析を行った。基盤整備が順調であり、300検体のエクソーム解析を順調に終わらせることができた。今後は本データを用いての神経筋疾患の病態解明が待たれる。

A. 研究目的

遺伝性末梢神経障害（Charcot-Marie-Tooth病, hereditary motor and sensory neuropathy）を始めとし、神経疾患の中には遺伝性を強く示す疾患が存在する。これらの原因を究明し治療法の開発を行うために、遺伝子を解析することは必須である。我々は、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行うよう基盤を整備し、主にエクソーム解析を行うことでこれらの疾患の解明を目指した。

B. 研究方法

検体は、鹿児島大学で収集された遺伝性末梢神経障害を始めとする神経筋疾患302症例。

東京大学医学部附属病院ゲノム医学センター内において、エクソーム解析を行った。具体的には、サンプル調整ロボットシステム（Bravo）を導入して、効率よくエクソン領域を濃縮し（SureSelect V5+UTR, Agilent）、次世代シーケンサー（HiSeq2000もしくはHiSeq2500, Illumina）を用いた網羅的な塩基配列解析を行った。得られた100塩基の短鎖長配列についてはBWAを用いて参照配列hg19にalignmentを行い、PCR duplicationと思われる配列を除いた後、SAMtoolsを用いてvariant callを行った。Variantについてはannotationを行った。（倫理面への配慮）

東京大学医学部附属病院、鹿児島大学においてIRB承認を得て、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って適切に実施した。

C. 研究結果

302検体のエクソーム解析を行い、variantのリストを作成し、quality checkを行った上で共同研究者である鹿児島大学にデータを返却した。

D. 考察

Bravoを用いた自動化システムによる基盤整備により、効率よく多検体のエクソーム解析を行うことができた。

E. 結論

302検体のエクソーム解析を潤滑に行うことができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 著者名：論文名、雑誌名、巻（号）：最初頁-最後頁、発表年
なし

2. 学会発表

1) 発表者名：演題名、学会名、発表年月日、開催地
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）
分担研究報告書

HAM における HTLV-1 抗原遺伝子変異と CTL 認識

研究分担者 久保田龍二 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科難治ウイルス研

研究要旨

HAM の発症および増悪には HTLV-1 ウイルス量が高いことが関連していると指摘されている。ウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) はウイルス排除に重要な役割をはたすが、HAM における HTLV-1 特異的 CTL のウイルス量に与える因子についてはよく分かっていない。今回、HTLV-1 Tax 特異的 CTL の抗原認識の多様性が HTLV-1 抗原の遺伝子変異およびウイルス量変化と関連があるかにつき検討した。結果は、HAM 患者における HTLV-1 Tax11-19 におけるアミノ酸変異を伴う変異は 0-10% で観察された。CTL の抗原認識多様性が高い患者ほどウイルス量は低く、また CTL 頻度も低かった。抗原認識多様性が高い患者群は低い群と比べ、CTL エピトープ部位での非同義置換数が有意に高かった。CTL エピトープの各アミノ酸部位での dN/dS 解析では、CTL 多様性の高い群で正の淘汰圧が高かった。また、CTL の抗原認識多様性が高いほど自然発生変異抗原をよく認識した。以上より、抗原認識多様性の高い CTL は、ウイルス排除により有効に働く可能性が考えられた。

A. 研究目的

ウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) はウイルス排除に重要な役割をはたすが、HAM における HTLV-1 特異的 CTL のウイルス量に与える因子についてはよく分かっていない。われわれは以前、HAM の HTLV-1 ウイルス量が増加した時に HTLV-1 特異的 CTL の抗原認識の多様性が増加後、ウイルス量が減少した時に多様性が低下することを報告した。この現象は、CTL の抗原認識の多様性がウイルス排除に何らかの影響を与えている可能性を示唆するが、ウイルスとの相互関係についてはよく分かっていない。今回、HTLV-1 Tax 特異的 CTL の抗原認識の多様性が HTLV-1 抗原の遺伝子変異とウイルス量変化と関連があるかにつき検討した。

B. 研究方法

文書により承諾を得た HAM 患者の末梢血より末梢血リンパ球を比重法で分離し、DNA を抽出後 HLA 特異的プライマ

ーを用いて HLA を調べた。HLA-A2 陽性の 24 名の HAM 患者の末梢血リンパ球を用いた。HLA-A2 での主な CTL エピトープは Tax11-19 であり、細胞内 IFN- γ 陽性細胞を検出して CTL を同定した。このエピトープの TCR 結合部位の人工変異抗原を用いて、HTLV-1 Tax 特異的 CTL の抗原認識の特異度を測定した (TCR finger printing 法)。ウイルス量は定量的 PCR にて測定した。CTL のエピトープ部位を PCR で増幅後クローニングし、シーケンスを行い、エピトープ部における遺伝子変化を調べ、自然発生変異抗原を検出した。エピトープの変異を導入した各アナログ抗原に関して、患者を抗原認識多様性の平均値により高い群と低い群とに分けて、ウイルス抗原遺伝子の非同義置換部位数および同義置換部位数を調べた。また CTL エピトープの各アミノ酸部位での非同義置換/同義置換 (dN/dS ratio) を計測することにより、CTL のウイルスへの淘汰圧を検討した。

(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倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

HAM 患者における HTLV-1 Tax11-19 におけるアミノ酸変異を伴う変異は 0-10% で観察された。エピトープの 4 番目のアミノ酸であるグリシンのアルギニンへの変化が高頻度に観察された。CTL の抗原認識多様性が高い患者ほどウイルス量は低く、また CTL 頻度も低かった。抗原認識多様性が高い患者群は低い群と比べ、CTL エピトープ部位での非同義置換数が有意に高かった。また、CTL エピトープの各アミノ酸部位での dN/dS 解析では、CTL 多様性の高い群で正の淘汰圧が高かった。また、CTL の抗原認識多様性が高いほど自然発生変異抗原をよく認識した。CTL の avidity は抗原認識多様性が低い例、高い例でほぼ同じであった。

D. 考察

ウイルス感染の排除にはウイルス特異的 CTL が重要な働きをする。しかし、生体内ではウイルス遺伝子の変異が高頻度に起こり、主要なウイルス株が CTL に排除されても、変異ウイルス株が CTL の監視機構から逸脱し完全な排除には至らないことが指摘されてきた。今回のわれわれの研究では HTLV-1 の遺伝子は安定と言われていたが、少なくとも CTL エピトープに関しては変異頻度が高いことが示された。これは CTL の生物学的プレッシャーによるものと考えられた。CTL の抗原認識の多様性が高い集団で、ウイルス量が低く、また CTL エピトープの各アミノ酸部位で非同義置換が高いことより、生体内では CTL の多様性がウイルス排除に有利に働いていることが示された。これらのことより、変異ウイルスを含めたウイルス感染に対しては、単独の CTL 集団より、多様性の高い CTL 集団の方の誘導が重要であると考えられた。

E. 結論

抗原認識多様性の高い CTL の HAM 患者の方が低い CTL の患者より、CTL 頻度が低いにもかかわらず、HTLV-1 に対するウイルス淘汰圧が高く、HTLV-1 ウイルス量が低かった。抗原認識多様性の高い CTL は、変異抗原ウイルスを効率よく認識することで、ウイルス排除により有効に働く可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

- 1) Kubota R, Takashima H, Izumo S: Impaired T cell receptor signaling in HTLV-1-infected CD4+ cells from HAM/TSP patients. *16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, June 2013 Montreal, Canada
- 2) Kodama D, Izumo K, Kubota R, Matsuzaki T, Takashima H, Izumo S: Characterization of glycans of CD4+T cells in HAM/TSP. *16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, June 2013 Montreal, Canada
- 3) Nozuma S, Matsuura E, Matsuzaki T, Watanabe O, Kubota R, Izumo S, Takashima H: Clinical features of familial HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, June 2013 Montreal,

- Canada
- 4) Matsuura E, Nozuma S, Matsuzaki T, Watanabe O, Kubota R, Izumo S, Takashima H: Inflammation with HTLV-1-specific CTLs occurs in the spinal cord of HTLV-1 carriers and the brain of the patients with HAM/TSP. *16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, June 2013 Montreal, Canada
- 5) Matsuzaki T, Kubota R, Takashima H, Izumo S: Early diagnosis of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP) in HTLV-1 carrier clinic. *16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, June 2013 Montreal, Canada
- 6) 久保田龍二、高嶋 博、出雲周二: HAM 患者 HTLV-1 感染 CD4+T 細胞における免疫能低下。第 54 回日本神経学会総会。2013 年 5 月 東京
- 7) 久保田龍二、高嶋 博、出雲周二: HTLV-1 HBZ 特異的 CTL エピトープの探索。第 6 回 HTLV-I 研究会。2013 年 8 月 東京
- 8) 児玉大介、出雲公子、久保田龍二、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二: HAM/TSP の CD4+T 細胞における糖鎖の特徴。第 6 回 HTLV-I 研究会。2013 年 8 月 東京
- 9) 松崎敏男、久保田龍二、斉藤峰輝、高嶋 博、出雲周二: 神経内科における 13 年間の HTLV-1 キャリア外来の実態。第 6 回 HTLV-I 研究会。2013 年 8 月 東京
- 10) 野妻智嗣、松浦英治、松崎敏男、渡邊修、久保田龍二、出雲周二、高嶋 博: 家族性 HAM の臨床的解析。第 6 回 HTLV-I 研究会。2013 年 8 月 東京
- 11) 児玉大介、出雲公子、久保田龍二、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二: HAM/TSP の CD4+T 細胞における特異的糖鎖の探索。第 18 回日本神経感染症学会総会。2013 年 10 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）
分担研究報告書

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

研究分担者 熱田 直樹 名古屋大学医学部附属病院
研究協力者 曾根 淳 名古屋大学医学部附属病院

研究要旨

Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID) は、エオジン好性に染色される核内封入体が、神経細胞および一般臓器の細胞で広く認められることを病理学的な特徴とする神経変性疾患である。進行性の疾患であり、発症の原因は不明で有効な治療法も確立されていない。我々はNIIDの2大家系についての臨床症状・病理所見、さらには皮膚生検による生前診断が可能であることを報告してきた。NIIDの原因を究明し有効な治療法を確立すべく、家族性NIIDの原因遺伝子探索を進めている。

A. 研究目的

我々は、Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID:エオジン好性核内封入体病)の大家系について、臨床・病理所見を報告し、皮膚生検により診断が可能である事を報告している。その後、認知症を呈し、頭部MRI画像で特徴的な像を呈するNIID例の報告が相次いでおり、これらの症例に関して、臨床病理学的に検討し、家系例で行なっている大規模な連鎖解析、および次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子配列とあわせて、原因遺伝子の同定、病態の解明を目指す。

B. 研究方法

頭部MRI画像などの検査結果および臨床症候からNIIDが疑われる患者に対して、皮膚生検を施行、パラフィン切片を作成し、H&E染色、および抗Ubiquitin抗体を用いた免疫染色および免疫蛍光染色を行い、核内封入体の有無を検討した。また、我々は既にNIIDの原因遺伝子が存在する候補領域を、染色体A上に見いだし、Lod Score 4.96を示す領域を特定し、その領域を次世代シーケンサーHiSeq 2000、およびAgilent社製のSureSelectキットを用いて全ゲノムおよび全エクソンシーケンスにより解析し

た。

(倫理面への配慮)

患者および剖検検体からの組織の採取、あるいは、患者DNAおよび正常対照者のDNA採取、および次世代シーケンサーによる原因遺伝子解析については、遺伝子解析を含む医学研究についてのインフォームド・コンセントを患者本人、および家族より文書にて得ている。これらを解析する本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得ている(課題名:「神経変性疾患の補助診断としての皮膚生検」、「エオジン好性核内封入体病の原因遺伝子の検索」、「遺伝性神経変性疾患の遺伝子診断」および「ゲノム多型解析による神経変性疾患の遺伝素因の検索」)。また、DNA採取に伴って、遺伝カウンセリングが必要となった場合には、名古屋大学附属病院遺伝カウンセリング室と連携を取りながら、カウンセリングを行うといった体制を取っている。

C. 研究結果

高次脳機能障害を初発症状とし、頭部MRI DWI画像にて、皮髄境界に沿った高信号域を呈し、NIIDが疑われた患者10名に対して皮膚生検を行い検討したところ、すべての患者で線維芽細胞、汗腺

細胞、脂肪細胞にユビキチン陽性の核内封入体を認めた。電顕所見も、家族性 NIID で認められる者と同様であった。また、NIID 家系のうちインフォームド・コンセントに基づき DNA が得られた合計 14 名につき、次世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い、連鎖解析を行なった。Lod score 4 前後を示す領域を特定したが、この領域は、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析で得られた Lod Score 4 程度の領域とほぼ重なる領域であった。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いて SNV を同定し、連鎖解析を行なった結果、マイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行なった結果とほぼ同一の結果が得られた。これにより、この Lod Score 4 程度を示す領域内に、NIID の原因遺伝子が存在することがほぼ間違いないと考えられる。

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析では、ヒト標準配列と異なる 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疑われ、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。

E. 結論

NIID は皮膚生検により、診断が可能であると考えられる。NIID 診断症例を増やしながら、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を念頭に、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) 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.
- 2) Ohyama K, Koike H, Masuda M, Sone J, Hashimoto R, Tomita M, Kawagashira Y, Iijima M, Nakamura T, Watanabe H, Sobue G. Autonomic manifestations in acute sensory ataxic neuropathy: a case report. *Auton Neurosci*. 2013 Dec;179(1-2):155-8.
- 3) 曾根 淳、田中章景、祖父江 元. ALS の関連遺伝子解析—ゲノムワイド関連解析の発展と現状を中心に. *アクチュアル脳・神経疾患の臨床*:188-193, 2013

2. 学会発表

- 1) 曾根 淳 : 皮膚生検による Neuronal intranuclear inclusion disease の診断. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会, H25.4.2, タワーホール船堀
- 2) 曾根 淳 : Neuronal intranuclear inclusion disease の原因遺伝子探索. 第 54 回日本神経学会学術大会, H25.5.30, 東京国際フォーラム
- 3) 曾根 淳 : Neuronal intranuclear inclusion disease の生前診断. 第 24 回日本末梢神経学会学術集会, H25.8.23, 朱鷺メッセ
- 4) 曾根 淳 : Neuronal intranuclear inclusion disease 皮膚生検による診断について. 第 41 回 臨床神経病理懇話会, H25.11.17, 愛知医科大学
- 5) 曾根 淳 : Neuronal intranuclear inclusion disease の病態解析. 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 25 年度 班会議, 2013 年 12 月 13
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

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

特記すべきもの無し

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業（難病関係研究分野）
分担研究報告書

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の発症機構に関する研究

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るが、その発症原因となる遺伝素因や脊髄の炎症が慢性化する機構については、いまだ不明な点が多い。そこで本研究では、1) 遺伝素因を調べる目的で実施されるエクソーム解析、ゲノムワイド関連解析（GWAS）を推進するために、HAM 患者および無症候性キャリア検体を提供すること、2) HAM における炎症の慢性化機構を解明する目的で、これまで知られていない HAM 患者脊髄組織における CXCL10 産生細胞を同定し、その産生メカニズムを検討することの 2 点を目的とした。

その結果、1) については、今年度、HAM 患者検体 41 例、無症候性キャリア 148 例を GWAS のために提供することができた。2) は、アストロサイトが CXCL10 の主たる産生細胞であること、また、感染細胞を含む HAM 患者 CD4+細胞が産生する IFN- γ が、アストロサイトからの CXCL10 産生を誘導することを明らかとし、アストロサイトを介した CXCL10-CXCR3 炎症ループが HAM の炎症慢性化の維持に非常に重要であると考えられた。今後は、ゲノム解析より明らかとなってくる HAM 感受性遺伝子を病態研究と組み合わせる解析することによって、HAM の病態理解を加速し、根本的な治療法の開発に結び付くことが期待される。

A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1）の感染者は本邦で約 110 万人存在し、感染者の一部に難治性の HTLV-1 関連脊髄症（HAM）あるいは成人 T 細胞白血病（ATL）を発症する。HAM は感染者のごく一部（約 0.3%）にのみ発症するため、その発症機構に遺伝的要因の関与が示唆されるが、これまで報告された遺伝子は、HLA と少数の非 HLA 遺伝子のみで大規模にゲノム解析された例はない。そこで本研究では、これまでと同様、引き続きエクソーム解析、ゲノムワイド関連解析（GWAS）を推進し、将来的なフルゲノム解析、メタボローム解析等が実施出来ることを視野に入れ、検体の保存とゲノム解析拠点機関との連携体制構築を進める。さらに、本研究で推進する遺伝素因と病態との関連性の研究も重要である。そこで本研究

では、HAM の脊髄病変での炎症慢性化機構について研究を進めた。

HAM の炎症の慢性化機構に関して、我々はこれまでリンパ球の炎症部位への浸潤に重要なケモカインに着目して研究を進めてきた。その結果、HAM 患者のケモカイン CXCL10 濃度が血中よりも髄液中で有意に高く、この濃度勾配と一致して HAM 患者髄液細胞の約 90% が CXCR3 陽性細胞によって占められていることを明らかにした。また、髄液 CXCL10 濃度が HAM の進行度とも相関していることを報告した。以上の点から、HAM 患者脊髄で産生される CXCL10 が CXCR3 陽性細胞を中枢神経系内へ遊走させ、脊髄の炎症を慢性化させている可能性が示唆された。そこで本研究では、これまで知られていない HAM 患者脊髄組織における CXCL10 産生細胞の同定と、

その産生メカニズムについて検討し、HAM における炎症の慢性化機構の一端を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) HAM 発症の遺伝素因の解明について

今年度もエクソーム解析、GWASを推進し、将来的なフルゲノム解析、メタボローム解析等を視野に入れ、倫理委員会で承認済みの同意書を得て検体を収集し、PBMC、血清、血漿、DNAを分離して保存・バンク化した。同時に、患者の家族歴、重症度、治療内容や経過に関する詳細な臨床情報を蓄積した。

2) HAM における炎症の慢性化機構について

HAM 患者 (n = 4) および脊髄に病変のない対照群 (剖検例; n = 6) の胸髄組織を用いて、HE 染色、免疫組織化学および免疫蛍光法を実施した。抗 CXCL10 抗体を用いた免疫組織化学は DAB 染色により検出し、1mm²あたりの平均 CXCL10 陽性細胞数を鏡検により測定した。また免疫蛍光法は、1次抗体に抗 CXCL10 抗体と抗 GFAP 抗体を使用し、それぞれ Alexa488、Alexa 594 で標識された2次抗体を用いて検出した。

次に、HAM患者、無症候性キャリアおよび健常者の末梢血単核球 (PBMC) より CD4⁺, CD8⁺, または CD14⁺細胞を分離培養し、無刺激で産生される培地中の IFN- γ 濃度を0h, 24h, 48h, 72h後に測定した。ヒトアストロサイトーマ由来の細胞株である U251 と HAM患者 CD4⁺細胞を単独または組み合わせて培養し、U251が産生する CXCL10量を測定した。さらに IFN- γ や TNF- α の中和抗体の存在下で、U251をHAM患者 CD4⁺細胞の培養上清によって刺激培養し、産生される CXCL10を測定し、中和抗体の阻害効果を検討した。統計学的解析として、平均 CXCL10陽性細胞数の比較など2群間の比較にはMann-Whitney U testを用いた。

(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、個人情報管理者により連結可能匿名化による番号化を行い、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。

C. 研究結果

1) HAM 発症の遺伝素因の解明について

今年度、HAM患者検体41例、無症候性キャリア148例をGWASのために提供することができた。

2) HAM における炎症の慢性化機構について

HAM 患者の胸髄組織中には、対照群の胸髄と比較して CXCL10 産生細胞が有意に多く存在した ($p = 0.0095$)。また、同一 HAM 患者の延髄と比較しても、胸髄組織に CXCL10 産生細胞が多く認められた。この CXCL10 産生細胞は星状で、放射状に広がる細胞質突起を広範囲に伸ばしていることから活性化されたアストロサイトであることが示唆された。実際、この CXCL10 産生細胞はアストロサイトのマーカーである GFAP 陽性であった。

次に、CXCL10がIFN- γ で産生誘導されることが知られているため、CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺細胞をそれぞれ分離培養して産生されるIFN- γ 量を測定した。その結果、HAM患者由来のCD4⁺細胞が最も多くのIFN- γ を産生し、無症候性キャリア由来のCD4⁺細胞よりも有意に高値を示した ($p = 0.0222$)。このIFN- γ 産生能の高いHAM患者由来のCD4⁺細胞をアストロサイト細胞株U251と共培養すると、CD4⁺細胞数に応じてU251からのCXCL10産生が誘導された。また、IFN- γ 中和抗体存在下では、HAM患者由来CD4⁺細胞の培養上清によるU251からのCXCL10産生をほぼ完全に抑制すること

ができた。

D. 考察

HAMの脊髄炎症の慢性化機構に関して、HAM患者脊髄組織におけるCXCL10の主たる産生細胞がアストロサイトであることが判明した。このCXCL10を産生するアストロサイトが多く認められた部位は胸髄で、以前よりHAM脊髄における慢性炎症巣の中心と考えられていた部位と一致していた。また、HAM患者由来の感染細胞を含むCD4⁺細胞が産生するIFN- γ が、アストロサイトからのCXCL10産生を誘導した。したがって、感染細胞の脊髄への浸潤がアストロサイトからのCXCL10産生を誘導し、一旦、CXCL10が誘導されるとCXCR3陽性細胞（IFN- γ 産生性のTh1細胞や Tc1細胞を含む）が脊髄中へ呼び込まれ、更なるCXCL10産生誘導が起こるというpositive feedback loopが形成されている可能性が示唆された。

E. 結論

本研究により、アストロサイトを介したCXCL10-CXCR3からなる炎症ループが、HAMの炎症慢性化の維持に非常に重要と考えられた。今後は、ゲノム解析より明らかとなってくるHAM感受性遺伝子を病態研究と組み合わせることで解析することによって、HAMの病態理解を加速し、速やかに根本的な治療法の開発に結び付くことが期待される。

F. 健康危険情報

特記すべき事項はありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 新谷奈津美, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) に対する分子標的治療薬開発の現状と将来. *血液内科*, 68 (1) 30-35, 2014.
- 5) 山野嘉久, 佐藤知雄, 宇都宮與. 白血病 非定型白血病および特殊型 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM). 別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ 血液症候群 (第2版), 23(III): 195-199, 2013.
- 6) 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*, 71(5): 870-875, 2013.
- 7) 宇都宮與, 山野嘉久. 慢性型 ATL の自然寛解後に HTLV-1 関連脊髄症を発症した症例. *血液フロンティア*, 23(3): 5-10, 2013.

2. 学会発表
- 1) Yamano Y., Sato T., Ando H., Araya N., Yagishita N., Yamauchi J., Coler-Reilly A., Utsunomiya A., Jacobson S., Izumo S. CXCL10 and Neopterin in cerebrospinal fluid are Candidate Prognostic Biomarkers for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.
 - 2) Sato T., Ando H., Tomaru U., Yoshida M., Utsunomiya A., Yamauchi J., Araya N., Yagishita N., Coler-Reilly A., Jacobson S., Yamano Y. Virus-induced CXCL10-CXCR3 positive feedback loop via astrocytes is critical for maintaining chronic inflammatory lesions in HAM/TSP. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.
 - 3) Coler-Reilly A., Hashimoto M., Yagishita N., Sato T., Ando H., Yamauchi J., Araya N., Kimura M., Yamano Y., Takata A. Nation-wide epidemiological study in Japan on HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis using HAM-net, a novel patient registration system. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.
 - 4) Yamano Y., Sato T., Coler-Reilly A., Ando H., Araya N., Yagishita N., Yamauchi J., Utsunomiya A., Jacobson S., Izumo S. CXCL10, CXCL9 and Neopterin in cerebrospinal fluid as Candidate Prognostic Biomarkers for HAM/TSP. The 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, 26-30 June, 2013, Montréal, Canada.
 - 5) Yamano Y. Development of novel molecular targeted therapies for HAM/TSP. 第6回 HTLV-1 研究会・シンポジウム／第3回 HTLV-1 国際シンポジウム 2013年8月23日・24日・25日 東京都(港区)。
 - 6) 佐藤知雄、新谷奈津美、安藤仁、Ariella Coler-Reilly、山内淳司、八木下尚子、山野嘉久。HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の治療標的としての CCR4+CD4+T 細胞。第6回 HTLV-1 研究会・シンポジウム 2013年8月23日・24日・25日 東京都(港区)。
 - 7) Coler-Reilly A.L.G., Hashimoto M., Yagishita N., Sato T., Ando H., Yamauchi J., Araya N., Kimura M., Yamano Y., and Takata A. The “HAM-net” HAM/TSP Patient Registration System and its Applications: A Sampling of Epidemiological Findings in Japan. 第6回 HTLV-1 研究会・シンポジウム 2013年8月23日・24日・25日 東京都(港区)。
 - 8) Hasegawa A., Tamai Y., Takamori A., Sasada A., Tanosaki R., Choi I., Utsunomiya A., Suehiro Y., Maeda Y., Yamano Y., Uike N., Kannagi M. 同種造血幹細胞移植後 ATL 患者からの新規 HTLV-1 特異的 CD4 エピトープの同定 (Identification of novel HTLV-1-specific CD4 epitopes in ATL patients after hematopoietic stem cell transplantation.) 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月

3～5 日, 神奈川県 (横浜市) .

- 9) 山野嘉久, 山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, Ariella Color-Reilly, 八木下尚子, 宇都宮與, 佐藤知雄. HAM における抗 CCR4 抗体製剤の有用性に関する検討, 第 25 回日本神経免疫学会学術集会, 2013 年 11 月 27～29 日 (29 日), 山口県 (下関市)
- 10) 山野嘉久, Ariella Coler-Reilly, 八木下尚子, 佐藤知雄, 新谷奈津美, 橋本充代, 木村美也子, 高田礼子. HAM 患者登録システム (HAM ねっと) の構築による疫学調査と満足度調査の概要報告, 第 34 回日本臨床薬理学会学術総会, 2013 年 12 月 4～6 日 (6 日), 東京都 (千代田区) .

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

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-I 関連脊髄症の遺伝的素因の同定の研究 H25 年度報告書

研究分担者 氏名 松浦英治 所属 鹿児島大学神経内科

研究要旨

【目的】いくつかの宿主遺伝子が HAM の発症因子や抑制因子として知られており、HAM の発症には遺伝的背景があることを示唆している。近年、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の進歩により、多因子疾患においても疾患感受性遺伝子の解明が進んでおり、特に家族内集積例を解析することが病態解明につながるとされる。われわれは以前、家族内に複数の HAM を発症した家系例を報告した。今回、HAM 発症の疾患感受性遺伝子を同定するために、エクソーム解析を行った。【対象・方法】32 例の家族性 HAM、20 例の孤発性 HAM、20 例の無症候性キャリアの全エクソーム解析を行った。候補変異の対象をアレル頻度が 5%未満と定義した rare variant とし、Polyphen-2 による変異機能予測、家系内で共有する変異、キャリアに比べ家族性 HAM に有意に多い変異を考慮に入れたフィルターを用いた。この方法により候補遺伝子を抽出し、別の孤発性 HAM 200 例、キャリア 200 例を患者・対照群として関連を検定した。【結果】候補遺伝子を孤発性 HAM 群、キャリア群で検討したところ、1 個の遺伝子が有意に孤発性 HAM 群に多く（オッズ比 3.4、 $P=0.04436$ ）、また他の 1 個の遺伝子も有意に多い傾向を示した（オッズ比 2.4、 $P=0.05383$ ）。【結論】エクソーム解析により HAM 発症に関わる疾患関連遺伝子の同定に成功した。症例数を増やすことでよりオッズ比の高い因子を同定することが可能と考えられた。

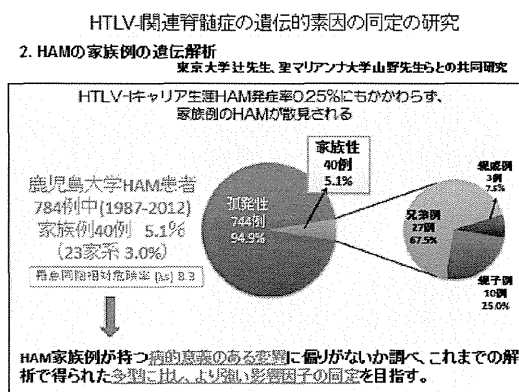
A. 研究目的

HAM 患者の遺伝子解析により明らかとなったいくつかの発症因子や抑制因子の存在は、HAM の発症に遺伝的背景が強く関係していることを示唆している。近年、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析の進歩により、多因子疾患においても疾患感受性遺伝子の解明が進んでいる。我々はいままで、家族内に複数の HAM を発症した家系例を経験してきた。今回、HAM 発症の疾患感受性遺伝子を同定するために、この家族内集積例のエクソーム解析的を行うとともに臨床的解析を行った。

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

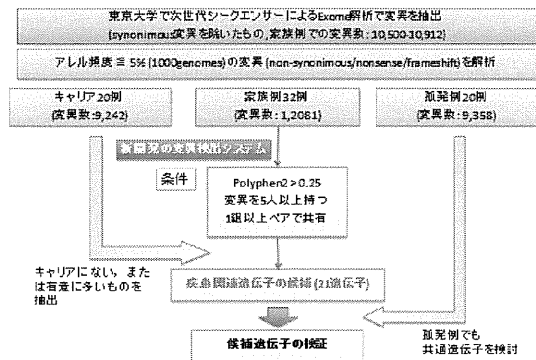
ち、家族内にはかにも HAM を発症していた症例（家族性 HAM と呼ぶ）を抽出する。



臨床的解析を行うとともに解析可能な 32 例の家族性 HAM、20 例の孤発性 HAM、20 例の無症候性キャリアの全エクソーム

解析を行った。候補変異の対象をアレル頻度が 5%未満と定義した rare variant とし、Polyphen-2 による変異機能予測、家系内で共有する変異、キャリアに比べ家族性 HAM に有意に多い変異を考慮に入れたフィルターを用いた。この方法により候補遺伝子を抽出し、別の孤発性 HAM 200 例、キャリア 200 例を患者・対照群として関連を検定した。

エクソーム解析フロー



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

家族性 HAM の中で、最も多く共通に変異を持つ人数は 11 人であった。

共通した遺伝子変異をもつ人数

遺伝子別解析 変異をもつ症例数(家族例HAM)

症例数	変異遺伝子数
9 例 / 32 例	0
8 例 / 32 例	0
7 例 / 32 例	3
6 例 / 32 例	12
5 例 / 32 例	19
4 例 / 32 例	130

今回の上記遺伝子は、HTLV4キャリア20例に認められなかったものを抽出した

候補遺伝子一覧

候補遺伝子

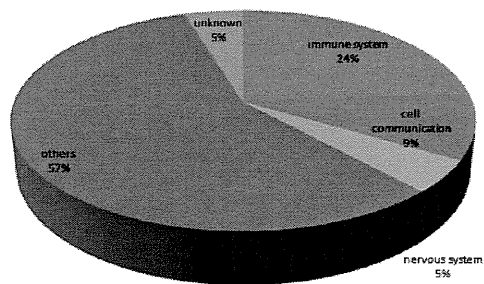
Gene	Variant Type	Count	Frequency	Category	Function
RS1	nonsynonymous	15	0	0	cell migration
SH2B6	nonsynonymous	8	1	0	cytolytic activity of lymphocyte
Gene4	nonsynonymous	6	2	0	immune system
CCDC148	nonsynonymous	6	0	0	
NOX5	nonsynonymous	6	2	0	expressed in lymphoid tissue
Gene Y	nonsynonymous	6	0	0	transporter
TRIM11	nonsynonymous	6	2	0	E3 ubiquitin-protein ligase
ABT2	nonsynonymous	5	1	0	hepatocyte growth
CACNA1B	nonsynonymous	5	0	0	Ca Channel, Neurotransmitter
CER3B	nonsynonymous	5	3	0	CAZ-Gly domain
DUG3	nonsynonymous	5	0	0	cell-cell contact
PKO3	nonsynonymous	5	0	0	drug-metabolizing enzymes
HIST1H1C	nonsynonymous	5	1	0	histone H1 family
LEP1	nonsynonymous	5	0	0	TGF-alpha enhancer
MUC5	nonsynonymous	5	0	0	gastric mucin
PLSD1	nonsynonymous	5	1	0	Phospholipase
RP11	nonsynonymous	5	1	0	retinoid-specific protein
ULP3	nonsense	5	2	0	signal pathways in NK cells
PRK5H	frameshift	17	8	5	beta-subunit of glucosylase II
NK2	frameshift	7	2	0	Wnt receptor signaling
MST1	frameshift	5	0	0	hydroperoxide reduction

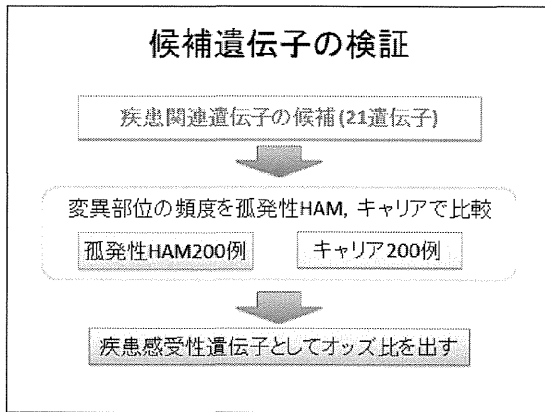
少なくとも家族性 HAM の中で 5 人以上共通に持つ変異を解析対象とし、21 個を候補遺伝子とした。その中で、5 個は免疫に関係し、2 個は cell communication に関係し、1 個は神経系に関するものであった。候補遺伝子を新たな孤発性 HAM 群、キャリア群で検討したところ、1 個の遺伝子が有意に孤発性 HAM 群に多く (オッズ比 3.4、P=0.04436)、また他の 1 個の遺伝子も有意に多い傾向を示した (オッズ比 2.4、P=0.05383)。

D. 考察

家族性、孤発性 HAM の比較検討によりいくつかの HAM の臨床的特徴が明らかになった。エクソーム解析により HAM 発症に関わる疾患関連遺伝子を同定した。

候補遺伝子の機能別分類





しかし、候補遺伝子の多くが、孤発性 HAM 200 例、キャリア 200 例を患者・対照群とした検定でオッズ比を上げないものであることが判明した。この原因として、一つには当初解析したサンプルの数が少ないため非特異的な候補遺伝子を多く抽出してしまったことが考えられる。また、因子を見つけるために比べた二群、家族性 HAM と無症候性キャリア、という分け方による比較以外に、HAM に影響を与えた因子を反映したと考えられる様な新しいグルーピングによる比較を検討することも新しい因子の発見につながると考えられた。

候補遺伝子の検定

候補遺伝子の孤発性HAMにおける頻度

Gene/Protein	HAM (n=200)	% (n=200)	Carriers (n=200)	% (n=200)	OR	P-value
FBP1	45	12.0%	40	10.0%		
RNF158	27		22	5.5%		
Gene X	20	5.0%	9	2.3%	2.3	0.05855
CCDC158	2	0.5%	2	0.5%		
FOX3	27	6.8%	20	5.0%		
Gene Y	32	8.0%	4	1.0%	8.0	0.04716
TAF11	6	1.5%	12	3.0%		
AST2	7	1.8%	8	2.0%		
CADNA2B	12	3.0%	10	2.5%		
CEP350	15	3.8%	12	3.0%		
DLAG3	5	1.3%	11	2.8%		
FKBP3	15	3.8%	8	2.0%		
HIST1H1C	11	2.8%	15	3.8%		
LEP1	7	1.8%	12	3.0%		
MUC6	5	1.3%	13	3.3%		
P.LBD1	149	37.3%	159	39.8%		
RPL1L	45	10.8%	51	12.8%		
ULBP3	6	1.5%	25	6.3%		
PRKCSH	29	7.3%	25	6.3%		
NKD2	29	7.3%	25	6.3%		
MST1	2	0.5%	7	1.8%		

具体的には今回行った孤発例の解析で分けられたような、疾患の経過や特異的症状、重症度などの新しいグループ分けによって探索することが必要と思われた。

E. 結論

今回、エクソーム解析数が 32 例という少ない症例数にも拘わらず、家族性 HAM

という因子で二群に分類すると一つの候補遺伝子が同定された。今後は、孤発例の解析で判明したいくつかの因子、たとえば進行度の違い、急速進行例・緩徐進行例、などの二群に分類することにより新たな因子が判明することが予想された。新たな分類に加えて、エクソーム解析の絶対数を今後増やすことでオッズ比に影響を与えるより確かな変異を同定出来ると考えられる。このようにして判明する因子を複数組み合わせることで個別の症例に於いて HAM の発症や進行度を予想できるようになると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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.
- 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. 80(18):1641-9
- 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>

2. 学会発表

国内学会

1. 野妻智嗣, 松浦英治, 松崎敏男, 渡邊修, 久保田龍二, 出雲周二, 高嶋博
家族性 HAM の臨床的解析 2013 年
5 月 31 日 第 53 回日本神経学会 東京
 2. 松浦英治, 野妻智嗣, 松崎敏男, 渡邊修, 久保田龍二, 出雲周二, 高嶋博
過去 10 年間に当院に入院した連続
HAM 症例の臨床的解析 2013 年 5
月 31 日 第 53 回日本神経学会 東京
 3. 家族性 HAM の臨床的解析 野妻智
嗣, 松浦英治, 松崎敏男, 渡邊修,
久保田龍二, 出雲周二, 高嶋博 第
6 回 HTLV-1 研究会 2013 年 8 月 24
日東京国際学会
1. Clinical features of familial
HAM/TSP Satoshi Nozuma, Eiji
Matsuura, Toshio Matsuzaki,
Osamu Watanabe, Ryuji Kubota,
Shuji Izumo, Hiroshi Takashima
16th International Conference on
Human Retrovirology: HTLV and
Related Viruses 2013 年 6 月 28 日
Montreal
 2. Inflammation with HTLV-1-specific
CTLs occurs in the spinal cord of
HTLV-1 carriers and the brain of
the patients with HAM/TSP Eiji
Matsuura¹, Satoshi Nozuma¹,
Toshio Matsuzaki ², Osamu
Watanabe¹, Ryuji Kubota², Shuji
Izumo², Hiroshi Takashima 16th
International Conference on
Human Retrovirology: HTLV and
Related Viruses 2013 年 6 月 28 日
Montreal
 3. Exome sequencing identifies novel
rare variants in human T-cell
leukemia virus type-1-associated
myelopathy/tropical spastic
paraparesis. Satoshi Nozuma Eiji
Matsuura, Yujiro Higuchi Junhui
Yuan, Yusuke Sakiyama, Akihiro
Hashiguchi, Yuji Okamoto, Akiko
Yoshimura, Toshio Matsuzaki, Jun
Mitsui, Hiroyuki Ishiura, Yuji

Takahashi, Jun Yoshimura,
Koichiro Doi, Ryuji Kubota,
Shinichi Morishita, Shoji Tsuji,
Shuji Izumo, Hiroshi Takashima
The 63rd Annual Meeting of the
American Society of Human
Genetics 2013 Oct Boston

- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含)
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 関連脊髄症発症関連因子としての HTLV-1 ウイルス型の解析

研究分担者 齊藤 峰輝 川崎医科大学微生物学教室

研究要旨

HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 発症に関連する HTLV-1 ウイルス型の病因的意義解明のため、HAM 患者の末梢血単核球中のプロウイルス量 (PVL)、HTLV-1 の転写制御因子である Tax および HBZ mRNA 発現量、HTLV-1 標的宿主因子であり慢性炎症形成に関与する FoxP3 mRNA 発現量との関連を解析した。さらに、各ウイルス型の Tax または HBZ の転写制御因子としての機能を比較するため、レポーターアッセイを行った。その結果、HAM 発症リスクが低い TaxB に感染した HAM 患者 (TaxB+ HAM) の感染細胞あたりの HBZ mRNA 発現量が HAM 発症リスクが高い TaxA に感染した HAM 患者 (TaxA+ HAM) より有意に高いこと、TaxB+ HAM では PBMC 中の HBZ mRNA 発現量と FoxP3 mRNA 発現量との間に有意な正の相関関係が認められるが、TaxA+ HAM では認められないことを明らかにした。レポーターアッセイでは、各ウイルス型の Tax および HBZ の活性に有意差は認められなかった。以上より、HTLV-1 Tax サブタイプが異なる感染者において、ウイルス遺伝子・細胞遺伝子の制御が異なり、HAM 発症に関与する可能性が示唆された。

A. 研究目的

HTLV-1 は世界ではじめてヒトの疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、HAM および成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。従来、HTLV-1 ウイルス型と関連疾患 (ATL および HAM) との間に疾患特異的な対応はないとされていたが、HAM 発症に関しては、2000 年に鹿児島県内の HTLV-1 感染者の解析から、HTLV-1 の転写制御因子 Tax の遺伝子配列に 2 つのウイルス型が存在し、そのうちウイルス型 A (TaxA) を持つ感染者はウイルス型 B (TaxB) を持つ感染者と比較して、HLA の影響とは独立して HAM 発症の Odds が約 2 倍高いことが報告された (Furukawa Y et al. *J Infect Dis* 182:1343-9, 2000.)。HTLV-1 感染においては、ほとんどの感染者が生涯にわたって未発症の無症候性キャリアとして経過するとはいえ、最も難治性の白血病の 1 つである ATL は死亡者数が年間 1000 人を超え、HAM 患者では約 40%が経過中に歩行不能となり生活

の質が著しく障害されるため、その発症を規定する因子と病態への関与を解明することはきわめて重要である。

本研究の目的は、HTLV-1 のウイルス遺伝子型が HAM 発症に関与するメカニズムを解明し、発症危険群の同定法と発症予防法の開発に寄与することである。

B. 研究方法

HTLV-1 ウイルス型の HAM 発症における病因的意義解明のため、TaxA、TaxB それぞれに感染している HAM 患者の末梢血単核球 (PBMC) を用いて、HTLV-1 プロウイルス量 (PVL)、HTLV-1 の転写制御因子である Tax および HBZ mRNA 発現量、HBZ の標的宿主遺伝子であり、HTLV-1 トランスジェニックマウスと HAM 患者双方で慢性炎症形成に関与することが報告された FoxP3 mRNA 発現量を Real Time PCR 法で定量し、相互の関連を解析した。

まず、HAM 患者の PBMC をフィコール