

201331010B

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 23 年度～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 高嶋 博

平成 26 年（2014）年 3 月

目 次

I. 総合研究報告	
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	3頁
高嶋 博	
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	13頁
高嶋 博	
2. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の発症要因の探索	20頁
出雲 周二	
3. 遺伝性ニューロパチーの臨床的、遺伝学的研究	23頁
中川 正法	
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	27頁
野元 正弘	
5. 神経変性疾患病態解明のための症例の蓄積および臨床像の解析	29頁
永井 将弘	
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	32頁
石浦 浩之	
7. HAM 患者臨床検体の整備とそれを用いた疾患感受性遺伝子検索 および免疫学的検討	33頁
久保田 龍二	
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	39頁
田中 章景、熱田 直樹	
9. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の発症機構に関する研究	43頁
山野 嘉久	
10. HTLV-I 関連脊髄症の遺伝的素因の同定の研究	52頁
松浦 英治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	61頁
IV. 研究成果の刊行物・別刷	67頁

I. 総合研究報告

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）
総合研究報告書

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

研究代表者 高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：医学の発展に伴い疾患の原因も明らかにされてきたが、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ようになってきた。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 検体を収集してきた。今回、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、疾患発症の素因の同定と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。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。

今回我々は、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 HSAN2D 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。*SCA2* の遺伝子異常で同一家系内にパーキンソニズム、多系統変性症、運動ニューロン病が起こりうることを示した。ALS においては、ゲノムワイド関連解析 GWAS に取り組み *ZNF512B* 遺伝子との関連を示した。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 教授)
中川正法 (京都府立医科大学 教授)
野元正弘 (愛媛大学 教授)
永井将弘 (愛媛大学 准教授)
高橋祐二 (東京大学 助教、平成 24 年度)
石浦浩之 (東京大学 助教、平成 25 年度)
久保田龍二 (鹿児島大学 准教授)
田中章景 (名古屋大学 准教授、平成 23-24 年度)
熱田直樹 (名古屋大学 助教、平成 25 年度)
山野嘉久 (聖マリアンナ医科大学 准教授)
松浦英治 (鹿児島大学 講師)
齊藤峰輝 (川崎医科大学 教授、平成 25 年度)

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 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）

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 配列情報をもとに疾患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。

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。

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。特にはじめのアプローチとして、HAM の家系例を抽出し、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。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、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。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 に新規の原因を同時に 8 遺伝子確認し得た (特許出願最終段階)。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 MIMECK (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 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。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。

ALS については、我々が集積した孤発性 ALS サンプルを含むオールジャパン体制で我が国初

の GWAS を行い ALS 易罹患性遺伝子として ZNF512B を同定した。

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。

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 HSN2D として報告した。

⑥HAM の家系例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。

⑨ALS においては、ゲノムワイド関連解析 GWAS に取り組み ZNF512B 遺伝子との関連を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 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) 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.** 2012 13 (1):77-82

5) Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Tokunaga S, Zhu L, Shen H, **Takashima H.** Alanine-tRNA synthetase mutation in a family with distal hereditary motor neuropathy. **Neurology** 78(21):1644-9 2012, May

(中川分)

1) Yoshida T, Sasaki M, Yoshida M, Namekawa M, Okamoto Y, Tsujino S, Sasayama H, Mizuta I, Nakagawa M. The Alexander Disease Study Group in Japan. Nationwide survey of Alexander disease in Japan and proposed new guidelines for diagnosis. **J Neurol.** 258: 1998-2008, 2011

2) 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.

3) 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.

4) 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

5) 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)

1) Nishikawa N, Nagai M, Tsujii T, Tanabe N,

Takashima H, Nomoto M

Three spinocerebellar ataxia type 2 siblings with ataxia parkinsonism and motor neuronopathy

Intern Med. 50:1429-1432, 2011

2) 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

(出雲、久保田分)

1) Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Takashima H, Izumo S. Histopathological differences between human T-lymphotropic virus type 1-positive and human T-lymphotropic virus type 1-negative polymyositis. **Clin Exp Neuroimmunol.** 2011, 2(1):12-24.

2) Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S, Kubota R. Reduced Tim-3 expression on human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax-specific cytotoxic T lymphocytes in HTLV-I infection. **J Infect Dis.** 203:948-959, 2011.

3) 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.

(山野分)

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) Sato T., Araya N., Yagishita N., Ando H., Yamano Y. Host Immune System

Abnormalities Among Patients with Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Associated Disorders. T-Cell Leukemia, 65-80/234, InTech, 2011.

4) Araya N., Takahashi K., Sato T., Nakamura T., Sawa C., Hasegawa D., Ando H., Aratani S., Yagishita N., Fujii R., Oka H., Nishioka K., Nakajima T., Mori N., Yamano Y. Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus type-1-associated neurological disease. *Antivir Ther*, 16(1):89-98, 2011.

(田中、熱田分)

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) Iida A, Takahashi A, Kubo M, Saito S, Hosono N, Ohnishi Y, Kiyotani K, Mushiroda T, Nakajima M, Ozaki K, Tanaka T, Tsunoda T, Oshima S, Sano M, Kamei T, Tokuda T, Aoki M, Hasegawa K, Mizoguchi K, Morita M, Takahashi Y, Katsuno M, Atsuta N, Watanabe H, Tanaka F, Kaji R, Nakano I, Kamatani N, Tsuji S, Sobue G, Nakamura Y, Ikegawa S. A functional variant in ZNF512B is associated with susceptibility to amyotrophic lateral sclerosis in Japanese. *Hum Mol Genet*. 20(18):3684-3692, 2011

(松浦分)

1) 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)

1) 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.

2) 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.

3) Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Kodama A, Fujii H, Hasegawa A, Kannagi M, Ansari AA, Saito M. Elimination of human T cell leukemia virus type-1-infected cells by neutralizing and antibody-dependent cellular cytotoxicity-inducing antibodies against human T cell leukemia virus type-1 envelope gp46. *AIDS Res Hum Retroviruses*. in press, 2014.

4) Saito M. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into Th17 cells: is this also the case for multiple sclerosis? *Clin Exp Neuroimmunol*. in press, 2014.

2. 学会発表
平成 25 年度

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シング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.

平成 24 年度

- 1) Higuchi Y, Yoshimura A, Nakamura T, Tokunaga S, Okamoto Y, Takashima H. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Japan: Genetic, clinical and electrophysiological study of 33 cases. 62nd Annual Meeting on American Society of Human Genetics, November 2012, San Francisco.
- 2) Tokunaga S, Hashiguchi A, Yoshimura A, Maeda K, Suzuki T, Haruki H, Nakamura T, **Takashima H.** Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused By periaxin gene mutation. 62nd Annual Meeting on American Society of Human Genetics, November 2012, San Francisco.
- 3) Hashiguchi A, Yoshimura A, Higuchi Y, Nakamura T, Tokunaga S, Okamoto Y, **Takashima H.** A comprehensive genetic analysis of 421 Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease using DNA microarray chips. 62nd Annual Meeting on American Society of Human Genetics, November 2012, San Francisco.
- 4) Yuan J, Higuchi I, Sakiyama Y, Inamori Y, Matsuura E, Higuchi Y, Yoshimura A, Hashiguchi A, Higashi A, Koreeda Y, Arimura K, **Takashima H.** Novel missense mutations and partial deficiency of collagen VI in Ullrich congenital muscular dystrophy. 62nd Annual Meeting on American Society of Human Genetics, November 2012, San Francisco.
- 5) **Takashima H,** Hashiguchi A, Jing Hu, Zhe Zhao, Higuchi Y, Sakiyama Y, Tokunaga S, Okamoto Y, Yoshimura A. Alanyl- t RNA synthetase mutation in dominant distal hereditary motor neuropathy and Charcot-Marie-Tooth disease. 62nd Annual Meeting on American Society of Human Genetics, November 2012, San Francisco.
- 6) 大窪隆一, 樋口昭大, 荒田 仁, 徳永章子, **高嶋 博**, 平野隆城, 西郷隆二, 田代雄一 家族性筋萎縮性側索硬化症(SOD1;H46R)の進行期臨床像に関する検討. 第 53 回日本神経学会総会 2012. 5. 東京都
- 7) 稲森由恵, 樋口逸郎, 井上輝彦, 崎山佑介, 樋口昭大, 白石匡史, 東 桂子, 大窪隆一,

三山吉夫, 有村公良, **高嶋 博** 封入体筋炎と肥大型心筋症を合併した一剖検例. 第 53 回日本神経学会総会 2012. 5. 東京都

- 8) 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 回日本神経学会総会 2012. 5. 東京都
- 9) 野村美和, 樋口昭大, 荒田 仁, 道園久美子, 出口尚寿, **高嶋 博** 痙性対麻痺を主症状とした NEFL 遺伝子異常を伴う CMT2E 家系の検討. 第 53 回日本神経学会総会 2012. 5. 東京都
- 10) 松崎敏男, 久保田龍二, 齊藤峰輝, **高嶋 博**, 出雲周二 早期 HAM の診断基準提唱と臨床. 第 53 回日本神経学会総会 2012. 5. 東京都
- 11) 徳永章子, 樋口昭大, 中村友紀, **高嶋 博** Charcot-Marie-Tooth 病 4 F の成人発症の 3 例. 第 23 回日本末梢神経学会総会 2012. 8. 福岡市
- 12) 樋口昭大, 中村友紀, 徳永章子, 岡本裕嗣, **高嶋 博**, 有村公良 マイクロアレイ DNA チップを用いた Charcot-Marie-Tooth 病の包括的遺伝子診断. 第 23 回日本末梢神経学会総会 2012. 8. 福岡市
- 13) 樋口昭大, 趙 哲, 中村友紀, 徳永章子, 岡本裕嗣, 胡 静, **高嶋 博**, 有村公良 AARS の遺伝子変異は distal Hereditary Motor Neuropathy の原因である. 第 23 回日本末梢神経学会総会 2012. 8. 福岡市
- 14) 松浦英治, **高嶋 博**, 久保田龍二, 出雲周二 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総会 2012. 10. 京都市

平成 23 年度

- 1) 大窪隆一, 樋口逸郎, 稲森由恵, 岡本裕嗣, 田代雄一, 樋口昭大, **高嶋 博**, 徳永章子, 平野隆城: 嚢胞肺, 腎不全, 脳卒中様発作を合併したミトコンドリアミオパチー家系の検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
- 2) 樋口昭大, 中村友紀, 徳永章子, 岡本裕嗣,

高嶋 博、有村公良：MFN2 点変異を有する軸索型 Charcot-Marie-Tooth 病 13 例の検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋

3) 中村友紀、樋口雄二郎、橋口昭大、徳永章子、岡本裕嗣、**高嶋 博**：MPZ 変異を伴う CMT11 例の検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋

4) 稲森由恵、樋口逸郎、田代雄一、崎山佑介、橋口昭大、岡本裕嗣、白石匡史、東 桂子、出口尚寿、**高嶋 博**：広範な白質病変とミオパチーを認め、DMPK 遺伝子異常を認めた一家系. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋

5) 迫田俊一、樋口逸郎、有村由美子、有村公良、**高嶋 博**：本邦における周期性四肢麻痺の臨床的検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋

6) 樋口逸郎、稲森由恵、橋口昭大、東桂子、白石匡史、**高嶋 博**：ミトコンドリア異常を伴う多発性筋炎の臨床的、筋病理学的検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋

7) 崎山佑介、大窪隆一、西郷隆二、徳永章子、平野隆城、山下秀一、塩見一剛、**高嶋 博**：宮崎県南部に集積する家族性多系統変性症の臨床的特徴について. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋

8) 中村友紀、橋口昭大、徳永章子、有村由美子、有村公良、**高嶋 博**：ピンクリズチンは EGR2 変異を伴う無症候性 Charcot-Marie-Tooth 病を増悪させる. 第 23 回臨床神経生理研究会 2011 年 8 月 鹿児島

9) 橋口昭大、中村友紀、徳永章子、岡本裕嗣、**高嶋 博**、有村公良：MFN2 点変異を有する軸索型 Charcot-Marie-Tooth 病 17 例の臨床像. 第 22 回日本末梢神経学会学術集会 2011.9 宜野湾市

10) 久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、**高嶋 博**、出雲周二：HLA-A*24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL は HAM 発症リスクを下げるか？第 23 回日本神経免疫学会 2011 年 9 月 東京

11) 野村美和、荒田 仁、道園久美子、出口尚寿、高田良治、渡漫修、**高嶋 博**：ST 合剤で治療しえた感染性脳症の一例. 第 16 回日本神経感染症学

会 2011 年 11 月東京

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

山野 嘉久

特願 2011-268019、発明者：山野嘉久、安藤仁、佐藤知雄、出願年月日 (2011 年 12 月 7 日)、HTLV-1 関連脊髄症を治療または予防するための医薬および前記医薬を用いた抗体療法の治療効果の確認方法

US61/668,686、Yoshihisa Yamano、2012.7.6, A Therapeutic Method And Medicament For HTLV-1 Associated Myelopathy(HAM)

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 | 特になし |
| 3 その他 | 特になし |

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

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、我々の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を構築し、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。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として、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 HSAN2D 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。HAM 感受性因子についてはさらに検討が必要である。

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
岡本裕嗣 石原 聡 田邊 肇 崎山佑介

松浦英治 袁 軍輝 大窪隆一
中村友紀 西郷隆二 徳永章子

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。

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。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し、機序に合わせた治療を開発する。

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ったが、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 の家系例を抽出し、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。

(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、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。*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 の新規の原因を同時に 8 遺伝子確認し得た (特許出願最終段階)。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 MIMCECK (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。

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、診断を確実に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。疾患は多様で、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。

MIMCECK 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 MIMCECK を樹立し、原因を報告し、急性期の治療法を発見した。

③HMN の原因として、AARS の異常を世界で初めて同定した。

④SCN9A 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。

⑤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

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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) 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.
- 5) 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: 0.1186/1742-4690-10-51.
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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.
- 9) 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**. 2012 13 (1):77-82
- 10) Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Tokunaga S, Zhu L, Shen H, **Takashima H**. Alanine-tRNA synthetase mutation in a family with distal hereditary motor neuropathy. **Neurology** 78(21):1644-9 2012, May
- 11) Sakiyama Y, Okamoto Y, Higuchi I, Inamori Y, Sangatsuda Y, Michizono K, Watanabe O, Hatakeyama H, Goto Y, Arimura K, **Takashima H**. A new phenotype of mitochondrial disease characterized by familial late-onset predominant axial myopathy and encephalopathy. **Acta Neuropathol**. 2011 121(6):775-783
- 12) Okamoto Y, Higuchi I, Sakiyama Y, Tokunaga S, Watanabe O, Arimura K, Nakagawa M, **Takashima H**. A new mitochondria-related disease showing myopathy with episodic hyper-CKemia **Ann Neurol**. 2011 Vol70(3) 486-492
- 13) Nishikawa N, Nagai M, Tsujii T, Tanabe N, **Takashima H**, Nomoto M. Three SCA2 siblings with Ataxia, Parkinsonism, and Motor Neuronopathy. **Internal Medicine**, 2011, 150(13): 1429-32
- 14) Abdelbary NH, Abdullah HM, Matsuzaki T, Hayashi D, Tanaka Y, **Takashima H**, Izumo S, Kubota R: Reduced Tim-3 expression on HTLV-I Tax-specific cytotoxic T

lymphocytes in HTLV-I infection. **J Infect Dis.** 203(7):948-59, 2011

15) Abdullah HM, Higuchi I, Kubota R, Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, **Takashima H**, Izumo S: Histopathologic differences between human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-positive and HTLV-1-negative polymyositis. **Clin Exp Neuroimmunol.** 2: 12-7, 2011

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

17) 橋口昭大、**高嶋 博**. Hereditary neuropathy: variety of disease-causing genes and progress of molecular genetic diagnosis. **Brain Nerve** 63(6) 2012

18) Nishikawa N, Takashima H, Nomoto M. Three SCA2 siblings with Ataxia, Parkinsonism, and Motor Neuronopathy. **Internal Medicine**, 2011, 150(13): 1429-32

2. 学会発表
平成 25 年度

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シング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.

平成 24 年度

1) Higuchi Y, Yoshimura A, Nakamura T, Tokunaga S, Okamoto Y, **Takashima H**. X-linked Charcot-Marie-Tooth disease type 1 in Japan: Genetic, clinical and electrophysiological study of 33 cases. 62nd Annual Meeting on American Society of Human Genetics, November 2012, San Francisco.

2) Tokunaga S, Hashiguchi A, Yoshimura A, Maeda K, Suzuki T, Haruki H, Nakamura T, **Takashima H**. Late-onset Charcot-Marie-Tooth disease 4F caused By periaxin gene mutation. 62nd Annual Meeting on American Society of Human Genetics, November 2012, San Francisco.

3) Hashiguchi A, Yoshimura A, Higuchi Y, Nakamura T, Tokunaga S, Okamoto Y, **Takashima H**. A comprehensive genetic analysis of 421 Japanese patients with Charcot-Marie-Tooth disease using DNA microarray chips. 62nd Annual Meeting on American Society of Human Genetics, November 2012, San Francisco.

4) Yuan J, Higuchi I, Sakiyama Y, Inamori Y, Matsuura E, Higuchi Y, Yoshimura A, Hashiguchi A, Higashi A, Koreeda Y, Arimura K, **Takashima H**. Novel missence mutations and partial deficiency of collagen VI in Ullrich congenital muscular dystrophy. 62nd Annual Meeting on American Society of Human Genetics, November 2012, San Francisco.

5) **Takashima H**, Hashiguchi A, Jing Hu, Zhe Zhao, Higuchi Y, Sakiyama Y, Tokunaga S, Okamoto Y, Yoshimura A. Alanine tRNA synthetase mutation in dominant distal hereditary motor neuropathy and Charcot-Marie-Tooth disease. 62nd

Annual Meeting on American Society of Human Genetics, November 2012, San Francisco.

- 6) 大窪隆一, 橋口昭大, 荒田 仁, 徳永章子, **高嶋 博**, 平野隆城, 西郷隆二, 田代雄一 家族性筋萎縮性側索硬化症(SOD1:H46R)の進行期臨床像に関する検討. 第 53 回日本神経学会総会 2012. 5. 東京都
- 7) 稲森由恵, 樋口逸郎, 井上輝彦, 崎山佑介, 橋口昭大, 白石匡史, 東 桂子, 大窪隆一, 三山吉夫, 有村公良, **高嶋 博** 封入体筋炎と肥大型心筋症を合併した一剖検例. 第 53 回日本神経学会総会 2012. 5. 東京都
- 8) 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 回日本神経学会総会 2012. 5. 東京都
- 9) 野村美和, 橋口昭大, 荒田 仁, 道園久美子, 出口尚寿, **高嶋 博** 痙性対麻痺を主症状とした NEFL 遺伝子異常を伴う CMT2E 家系の検討. 第 53 回日本神経学会総会 2012. 5. 東京都
- 10) 松崎敏男, 久保田龍二, 齊藤峰輝, **高嶋 博**, 出雲周二 早期 HAM の診断基準提唱と臨床. 第 53 回日本神経学会総会 2012. 5. 東京都
- 11) 徳永章子, 橋口昭大, 中村友紀, **高嶋 博** Charcot-Marie-Tooth 病 4 F の成人発症の 3 例. 第 23 回日本末梢神経学会総会 2012. 8. 福岡市
- 12) 橋口昭大, 中村友紀, 徳永章子, 岡本裕嗣, **高嶋 博**, 有村公良 マイクロアレイ DNA チップを用いた Charcot-Marie-Tooth 病の包括的遺伝子診断. 第 23 回日本末梢神経学会総会 2012. 8. 福岡市
- 13) 橋口昭大, 趙 哲, 中村友紀, 徳永章子, 岡本裕嗣, 胡 静, **高嶋 博**, 有村公良 AARS の遺伝子変異は distal Hereditary Motor Neuropathy の原因である. 第 23 回日本末梢神経学会総会 2012. 8. 福岡市
- 14) 松浦英治, **高嶋 博**, 久保田龍二, 出雲周二 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

経感染症学会総会 2012. 10. 京都市

平成 23 年度

- 1) 大窪隆一, 樋口逸郎, 稲森由恵, 岡本裕嗣, 田代雄一, 橋口昭大, **高嶋 博**, 徳永章子, 平野隆城: 嚢胞肺、腎不全、脳卒中様発作を合併したミトコンドリアミオパチ一家系の検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
- 2) 橋口昭大, 中村友紀, 徳永章子, 岡本裕嗣, **高嶋 博**, 有村公良: MFN2 点変異を有する軸索型 Charcot-Marie-Tooth 病 13 例の検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
- 3) 中村友紀, 樋口雄二郎, 橋口昭大, 徳永章子, 岡本裕嗣, **高嶋 博**: MPZ 変異を伴う CMT11 例の検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
- 4) 稲森由恵, 樋口逸郎, 田代雄一, 崎山佑介, 橋口昭大, 岡本裕嗣, 白石匡史, 東 桂子, 出口尚寿, **高嶋 博**: 広範な白質病変とミオパチーを認め、DMPK 遺伝子異常を認めた一家系. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
- 5) 迫田俊一, 樋口逸郎, 有村由美子, 有村公良, **高嶋 博**: 本邦における周期性四肢麻痺の臨床的検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
- 6) 樋口逸郎, 稲森由恵, 橋口昭大, 東桂子, 白石匡史, **高嶋 博**: ミトコンドリア異常を伴う多発性筋炎の臨床的、筋病理学的検討. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
- 7) 崎山佑介, 大窪隆一, 西郷隆二, 徳永章子, 平野隆城, 山下秀一, 塩見一剛, **高嶋 博**: 宮崎県南部に集積する家族性多系統変性症の臨床的特徴について. 第 52 回日本神経学会総会 2011 年 5 月名古屋
- 8) 中村友紀, 橋口昭大, 徳永章子, 有村由美子, 有村公良, **高嶋 博**: ビンクリスチンは EGR2 変異を伴う無症候性 Charcot-Marie-Tooth 病を増悪させる. 第 23 回臨床神経生理研究会 2011 年 8 月 鹿児島
- 9) 橋口昭大, 中村友紀, 徳永章子, 岡本裕嗣, **高嶋 博**, 有村公良: MFN 2 点変異を有する軸

索型 Charcot-Marie-Tooth 病 17 例の臨床像.
第 22 回日本末梢神経学会学術集会 2011.9
宜野湾市

10) 久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、高嶋博、出雲周二：HLA-A*24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL は HAM 発症リスクを下げるか？第 23 回日本神経免疫学会 2011 年 9 月 東京

11) 野村美和、荒田 仁、道園久美子、出口尚寿、高田良治、渡漫修、高嶋博:ST 合剤で治療しえた感染性脳症の一例. 第 16 回日本神経感染症学会 2011 年 11 月東京

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

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の発症要因の探索

研究分担者 氏名出雲周二 所属鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
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

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-acetyllactosamine 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 は HTLV-1 感染者のごく一部に発症する慢性難治性神経疾患で、難治性疾患克服研究事業の対象疾患に指定されている。胸部脊髄を中心に広く中枢神経に生じており、HTLV-1 感染 T 細胞の脊髄浸潤とそれを排除しようとする宿主の免疫応答がその病態として想定されている。病原体とそれに対する免疫応答という感染症の原則的な過程が生じているにもかかわらず、なぜごく一部の感染者のみが発症するのか、なぜ長期にわたり炎症が持続するのかなど、HAM の発症病態は未だ不明の部分が多い。急速に進行する例から長期にわたり緩徐にしか進行しない例など基本的な症状、所見は同様でも重症度や進行に個人差が大きいことなどより、生体の遺伝的因子や外的因子の発症病態への関与が想定されている。本研究では遺伝的要因の解析に資する患者情報、試料を収集・保存管理し、遺伝子解析に供するとともに、得られた患者情報や、末梢血単核球（PBMC）、病理組織標本を用いて HAM の臨床病態、発症病態を明らかにすることを目的としている。

3 年間の研究を通じて、1) HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) mRNA を標的とした in situ hybridization 法を開発する、2) HAM 発症を早期にとらえる HTLV-1 感染者の長期追跡体制を構築し、その効果を検証する、3) HAM 発症の最大の危険因子である体内でのプロウイルス量拡大に関与する感染細胞表面に発現する糖鎖の特徴を明らかにすることをめざした。

B. 研究方法

1) HTLV-1 遺伝子のマイナス鎖にコードされ

ている HBZ は HTLV-1 感染細胞で高発現しており、HAM の炎症病巣での感染細胞のマーカーや発症病態への関与を解析するツールとして、HBZmRNA を標的とした in situ hybridization 法の開発を目指した基礎研究を行った。

2) 1999 年から 2012 年まで当神経内科の HTLV-1 キャリア外来を初回受診した 362 例について神経学的診察、HTLV-1 プロウイルス量、HTLV-1 抗体価、リンパ球サブセット、インターロイキン 2 受容体を検査した。早期発症 HAM と診断された 6 例の臨床と早期に治療介入した 3 例について経過をまとめた。

3) 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に発現する糖鎖の特徴を明らかにするため、HAM、キャリア、非感染者の CD4+T 細胞を分離し、細胞膜蛋白を抽出、糖鎖修飾の特徴を、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 を用いて比較検討した。また、その担体蛋白質の同定を試みた。

（倫理面への配慮）

患者検体については研究への使用について倫理委員会の承諾のもとに、インフォームドコンセントを得て採取されたものをブラインド化して使用した。

C. 研究結果

1) HBZ in situ hybridization 方の開発

Anti-sense probe にて HTLV-1 感染株 HUT102 細胞では 80% で強い陽性シグナルが検出された。一方、HTLV-1 陰性の CEM 細胞では陽性細胞はみられなかった。一方、PBMC