

のパラフィン法埋切片でのハイブリダイゼーションでは ATL 患者 PBMC で細胞質が陽性の細胞が多数検出された。健常者 PBMC でも若干の陽性細胞があり、また、ATL でも検出されない症例もあった。

2) キャリア外来初回受診者 362 例中 6 例が早期 HAM と診断された。6 例中 4 例は家族内発症 HAM であった。2 例はブドウ膜炎合併、1 例は IgA 腎症を合併していた。6 例とも髄液抗 HTLV-1 抗体陽性で運動機能は 0-1/13 段階でいずれも発汗障害、病的反射陽性、下肢反射亢進、軽度の下肢痙性があり、測定した 6 例の HTLV-1 ウイルス量は 386-2181 コピー/104PBMC と高値であった。治療を行なった 2 例につき経過を観察し、症例 1 はプレドニゾン 2 週間内服、症例 2 はデキサメサゾン注射後ミノマシ 200mg 内服 1 ヶ月で自覚症状改善とウイルス量低下を認めた。今後 5 年以上の長期フォローが必要であった。早期 HAM の診断を診断する際の重要ポイントとして発汗障害・下肢病的反射陽性・髄液 HTLV-1 抗体陽性に軽度の下肢痙性、排尿障害が加わり、再発・寛解は繰り返さない事をあげた。

3) 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 HAM で有意に高発現だった (One-way ANOVA で各々 $p=0.001, 0.006$)。糖鎖担体蛋白の探索では、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。

D. 考察

1) HBZ の HAM 患者での発現は Saito らが PBMC を用いて real time PCR により mRNA の発現を検討し、HBZ は全例で発現しており、プロウイルス量や髄液ネオプテリン値との相関を認めたと報告している。しかし組織での HBZ in situ hybridization は 2011 年に Ohshima らが報告したのみで、ATL 脊髄病巣での検出の報告はない。これまでの種々の報告では HBZ は HTLV-1 感染細胞では高率に発現しているものと思われ、HBZ in situ hybridization は少なくとも感染細胞のマーカーとして組織での局在を

探る良い指標となることが期待される。

2) HAM の早期診断ポイントとして発汗障害・下肢病的反射陽性・運動機能障害 0/13・髄液 HTLV-1 抗体陽性必発に軽度の下肢痙性、排尿障害が加わると確実とし、再発・寛解は繰り返さない事をあげた。当科に登録された HAM638 人のうちで排尿障害のみで初発した例が 15.6%、腰下肢痛初発が 8.1%あり、初期の診断がみのがされている可能性があると考えられる。HTLV-1 キャリア外来の存在により初期の段階で HAM の診断と治療介入することが可能となり、キャリア外来での定期検診は重要であると思われる。

3) 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-acetyl-lactosamine) 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、ウイルスの Cell-to-cell spread に関与するという仮説が成り立つ。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

1) HBZ in situ hybridization 法により HTLV-1 感染細胞を組織標本で特定できる可能性がある。

2) 早期 HAM を診断しうるので、キャリア外来での定期検診は重要である。

3) HAM の HTLV-1 感染細胞上には N 型糖鎖 N-acetyllactosamine が有意に発現し、プロウイルス量の増大に関与している可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 出雲周二, 松崎敏男, 久保田龍二. HAM の新しい展開. 神経内科 2011;75(4):369-373.

2) 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.
- 3) 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.
- 4) Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, Matsuyama T. Development of ultra-super sensitive immune-histochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Histochem Cytochem.* 45(2):83-106, 2012.
- 5) 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.
- 6) 出雲周二. HTLV-1 感染症で起こる疾患—白血病・HAM など. HTLV-1 母児感染予防のための基礎知識. 特集 クローズアップ感染症. 小児内科 44: 973-977 (2012).
- 7) 出雲周二. HAM の最新の話. *Neuroinfection.* 17: 6-10 (2012)
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 松崎敏男、出雲周二. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) と妊娠・出産. 特集: 神経疾患を持つ患者の妊娠・出産. *神経内科* 78(5):509-503, 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

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

遺伝性ニューロパチーの臨床的、遺伝学的研究

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。この3年間で自験例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、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。治療に関しては、アスコルビン酸内服と末梢神経軸索興奮性の変化を検討した。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。

共同研究者

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)

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CMT1A患者8名(男性3名、女性5名、平均49.9歳)について、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した。

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 (CMT 1、4、CMTX) と軸索型 CMT (CMT2) に分類した。CMT1 型 47 例中 CMT1A が 33 例(男 17 例、女 16 例)であった。CMT2 型は 33 例(男 18 例、女 15 例)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。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。

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) の末梢血中リンパ球より 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が必要である。

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、CMT1A 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。

この 3 年間で CMT 患者血液由来の iPS 細胞の確立体制を整えた。今後、iPS 細胞から神経細胞、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、CMT の新たな治療法開発を進めたい。

E. 結論

この 3 年間で、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、エク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、CMT2A2 iPS 細胞由来の運動ニューロンを用いて、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) を検討することが重要である。さらに、他の病型の CMT 患者からも iPS 細胞の作成を行い、CMT の病態解明と治療法の開発に結びつけたい。

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、滋賀健介。Charcot-Marie-Tooth 病の治療。神経治療学 28(2):129-133, 2011
- 2) 中川正法。Charcot-Marie-Tooth 病の診断と治療・ケア。Peripheral Nerve 22 (2):125-131, 2011
- 3) 伊佐敷 靖、中川正法。難聴と視神経萎縮。日本眼科学会雑誌 115(4):409-412, 2011
- 4) Noto Y, Misawa S, Kanai K, Sato Y, Shibuya K, Iose S, Nasu S, Sekiguchi Y, Fujimaki Y, Ohmori S, Nakagawa M, Kuwabara S. Activity-dependent changes in impulse conduction of single human motor axons: A stimulated single fiber electromyography study.

- Clin Neurophysiol. 122:2512-2517, 2011
- 5) 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
- 6) 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.
- 7) 中川正法。Charcot-Marie-Tooth 病 1.病態・治療。最新医学 別冊 新しい診断と治療の ABC75 末梢神経障害。152-160, 2012
- 8) 中川正法。「Charcot-Marie-Tooth 病に対する治療の進歩」。Annual review 神経。211-222, 2013。
- 9) 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.
- 10) Shiga K, Tsuji Y, Fujii C, Noto Y, Nakagawa M. Demyelinating features in sensory nerve conduction in Fisher syndrome. Intern Med 51: 2307-2312; 2012.
- 11) Shiga K, Tanaka E, Isayama R, Mizuno T, Itoh K, Nakagawa M. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy due to administration of pegylated interferon- α 2b: a neuropathological case report. Intern Med 51:217-221; 2012.
- 12) 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
- 13) 中川正法。Charcot-Marie-Tooth 病。Clinical Neuroscience 31(8):980-981, 2013
- 14) 中川正法。Charcot-Marie-Tooth 病の治療戦略。Brain Medical 25(3):243-250, 2013
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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

- 18) Tomita M, Koike H, Nakagawa M, Sobue G, et al. Clinicopathological features of neuropathy associated with lymphoma. *Brain* 136(Pt 8):2563-2578, 2013
- 19) 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

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 野元 正弘 愛媛大学大学院薬物療法・神経内科

研究要旨

遺伝性疾患の臨床症状の多様性を検討した。パーキンソン病、小脳変性症、Motor Neuron Disease、痙性麻痺として加療していた症例において、近親者を診察、検査する機会が得られ、SCA2、あるいは SCA31 であることが明らかとなった。同じ遺伝子変異であっても phenotype には大きな差がみられ神経学的臨床診断は異なっており、臨床症状の多様性を明らかにできた。遺伝子変異から phenotype に至る経路の研究の推進が期待される

A. 研究目的

遺伝性疾患における臨床症状の多様性を検討する。神経変性疾患において、小脳失調症、痙性麻痺の症例を中心に遺伝子を検査し、臨床症状の多様性を検討する。構音障害を呈し小脳変性症として加療していた症例の siblings が神経変性疾患であった。また、痙性麻痺の症例について親族を検討し、遺伝子疾患における臨床症状の多様性を検討した。

B. 研究方法

症例はパーキンソン病(PD)、小脳変性症(SCA)、Motor Neuron Disease、痙性麻痺として加療していた。PD 例では抗パ薬は有効であった。SCA 例では抗パ薬の効果を認め、OPCA として加療していた。MND(motor neuronopathy)では有効な治療は見られていなかったが、進行は極めて緩やかであった。この 3 例は siblings である。痙性麻痺麻痺の例では tremor, dysarthria, dysmetria などの小脳症状は認めなかった。母親が慢性の経過で歩行、会話、嚥下が困難となっており、神経変性疾患が疑われた。

(倫理面への配慮)

遺伝子検査は十分な説明の上、本人の同意のもとに行った。結果は本人の希望のある場合に告知した。

C. 研究結果

PD, SCA, MND(motor neuronopathy) の siblings では SCA2 の遺伝子変異が確認された。Repeats 回数と臨床症状、発症年齢に関係は認めなかった。痙性麻痺の母子例では SCA31 の変異が確認された。また 16qADCA は認めな

かった。本症例は下肢の痙性麻痺で発症し、現在まで他の症状を示さず、母親は診察時には bedridden であり、構音障害、嚥下障害が認められ下肢は拘縮していた。このことから本家系においては SCA31 遺伝子異常は、痙性麻痺を起こす可能性を示唆する。

D. 考察

神経変性疾患の家族内発症例について臨床症状と遺伝子検査を行ったところ、PD, SCA, MND の臨床症状を呈していた家系は SCA2 の異常を認めた。また、痙性麻痺の家系の検討では SCA31 の遺伝子異常が痙性麻痺を呈する可能性が示唆される。なお 16qADCA 遺伝子異常は認めなかった。SCA2 の遺伝子異常では小脳症状とパーキンソニズムを呈することが報告されてきたが、今回 MND 様の症状を呈する可能性を指摘した。また、SCA31 遺伝子異常の症状として、これまで痙性麻痺が主症状となる症例は報告されておらず、他の遺伝子異常を含めて、家系の調査と症状の経過観察を今後も継続し、臨床症状の多様性を検討していきたい。今後は遺伝子変異から臨床症状を起こす過程の研究の発展が期待される。

E. 結論

パーキンソン病、小脳変性症、Motor Neuron Disease、痙性麻痺など、神経変性疾患の家族例を検討したところ、臨床症状の多様性を確認できた。今後、他の遺伝子異常を含めて、遺伝子と臨床症状の関係を検討していきたい。

F. 健康危険情報

認めない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Noriko Nishikawa, Masahiro Nagai,
Tomoaki Tsujii, Nachi Tanabe, Hiroshi
Takashima and Masahiro Nomoto
Three Spinocerebellar Ataxia Type 2 Siblings
with Ataxia, Parkinsonism, and Motor
Neuronopathy
INTERNAL MEDICINE 50:1429-1432,2011.

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

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

研究分担者 永井将弘 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・神経内科における多系統萎縮症（MSA）、小脳失調を伴う進行性核上性麻（PSP-C）、Charcot-Marie-Tooth 病(CMT)の臨床像を検討した。病態解明のためにも今後更なる症例の蓄積、解析が必要である。

A. 研究目的

多系統萎縮症（MSA）は小脳系、錐体外路系、自律神経系が障害される神経変性疾患で、四肢、体幹失調、筋強剛、動作緩慢、起立性低血圧、排尿障害など多彩な神経症状を呈する。本疾患は小脳症状を主体とした MSA-C とパーキンソニズムを主体とした MSA-P に分類される。本疾患は有病率約 4 人/万人の希少難治性疾患であり、その発症機序は未だ明らかにされていないが、外的要因に加えてなんらかの遺伝的要因が発病機序に関与していると推測されている。

進行性核上性麻痺（progressive supranuclear palsy: PSP）は異常タウ蛋白が脳に蓄積する神経変性疾患である。垂直性眼球運動障害、姿勢反射障害、動作緩慢、皮質下認知症、頸部ジストニアなどを中核症状とするが、非典型例も多くさまざまな亜型が報告されている。近年、本邦において病的に PSP と診断された中に、発症時より小脳症状が目立つ症例が報告されており、この一群は PSP with cerebellar ataxia (PSP-C) と提唱されている。

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) などの病型が存在し、確定診断には遺伝子診断が不可欠であり、遺伝子解析を鹿児島大学神経病学講座に依頼している。

これらの疾患は全て希少疾患であり病態解明のためには遺伝学的アプローチに加えて症例の蓄積と臨床像の解析が不可欠である。本研究では当科におけるこれら疾患の臨床像等を検討した。

B. 研究方法

愛媛大学医学部附属病院薬物療法・神経内科を研究対象期間内に受診した MSA 症例、PSP-C 症例、遺伝性ニューロパチー症例について臨床像および遺伝子変異について検討した。

（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

MSA 6 例の内訳は男性 2 例、女性 4 例、平均年齢 72.5 才（64～79 才）、平均罹病期間 6 年（3～13 年）であった。タイプとしては MSA-C が 4 例（平均罹病期間 7.5 年）、MSA-P が 2 例（平均罹病期間 3 年）と MSA-C : MSA-P は 2 : 1 であった。血縁者に MSA を発症した症例はなかった。

臨床的に PSP-C と診断したのは 4 例で、内訳は男性 3 例、女性 1 例、平均発症年齢 65.6 歳で全例とも家系内発症は認められなかった。初発症状は 3 例が歩行時のふらつき、1 例が呂律の回りにくさであった。当科初診時には全例で左右差のある四肢の運動失調をみとめた。また経過中に全例で垂直性眼球運動、アプローズサインが認められた。四肢筋強剛を呈した症例はなかった。頭部 MRI にて全例で中脳被蓋部、小脳の萎縮がみられた。

遺伝性ニューロパチーを疑われた患者は 6 例で内訳は男性 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。

D. 考察

MSA は 6 例と解析には十分な症例数ではなかったが、本邦での過去の報告と同じく MSA-C 症例数が MSA-P 症例数を上回っていた。しかし、パーキンソン病と診断された中に MSA-P が含まれている可能性はある。MSA は孤発性の神経変性疾患だが、2011 年に SHC2 遺伝子の copy number loss が MSA 発症に関与していることを示唆する報告がなされた。MSA は SCA などと異なり単一遺伝子が発症に起因する疾患ではなく、外的要因に加えてなんらかの遺伝的要因が発病機序に関与していると推測されている。今回の検討でも親族に MSA を発症した症例はいなかった。発症機序を明らかにするためには多数の症例が必要であり、今後、当科においても更なる MSA 症例の蓄積が必要である。

PSP-C は 4 例であった。現在まで本邦から報告された PSP-C の臨床像は (1) 男性に多い (2) 小脳症状が前景に立ち、左右差を認めることも多い (3) 前頭葉症状や性格変化が初期にある (4) 垂直性眼球運動障害は経過とともに目立つようになるなどであり、自験例もこれら臨床像と矛盾がなかった。剖検では歯状核のグリオースを伴う神経細胞脱落などが報告されているが、本研究では病理像は検討できていない。PSP-C の報告の多くは本邦からであり、欧米からの PSP-C の報告は稀である。日本人と欧米人間での発症頻度の差異に、遺伝的背景の違いが関与している可能性がある。PSP の疾患感受性遺伝子としてタウ遺伝子、STX6、EIF2AK3、MOBP が報告されているが、今後、PSP-C における疾患感受性遺伝子の同定を含めた病態解明に関する研究が必要である。そのためにも、更なる症例の蓄積が必要である。

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。

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

当科における MSA、PSP-C、CMT の臨床像を検討したが、全ての疾患が 10 症例以下であり、病態解明のためにも今後更なる症例の蓄積、解析が必要である。

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) 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

3) 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

Iwaki H, Yamashita R, Tsujii T, Nishikawa N, Nagai M, Higo Y, Miyauchi S, Nomoto M

Observations derived from the review of clinical studies related to rare diseases in the department of neurology in Ehime university
International Conference of Orphan Drugs and Rare Diseases 2012 Conference
Feb.4-6, 2012, Tokyo

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

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
氏名 高橋祐二 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、693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た神経筋疾患の病態解明が待たれる。

A. 研究目的

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を整備し、一般研究班との連携のもとに神経系の希少難治性疾患の大規模解析を行い、あわせてデータベースを構築し、研究の進展に寄与する。

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 693 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。

ライブラリー調製の自動化、情報解析設備の拡充等により、当施設としては年間でエクソーム解析を 1,600 件実施可能となった。

(倫理面への配慮)

本研究については、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、東京大学医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会からの承認を受けて実施する。

C. 研究結果

平成 24 年度には 391 検体、平成 25 年度には 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

拠点として大規模エクソーム解析が可能な体制を整備できた。今後は、情報解析の改善、データベースの拡充など、研究の進展に寄与できる体制を整備していきたい。

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
なし

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

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 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

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 は、HTLV-I 感染によって起こる神経難病である。HAM の病態解明および治療法開発のためには、HAM 患者および未発症 HTLV-I キャリアの臨床検体を用いた疾患感受性遺伝子解析が必須であり、本事業ではこれらの臨床検体を用いてのエクソーム解析等を行っている。分担研究ではそのための検体の収集および整備を行ない、一部を用いて病態解明のための HAM の遺伝学的・免疫学的検討を行った。HAM および HTLV-I キャリアよりインフォームド・コンセントのもと血液を採取しリンパ球分離を行い、DNA・RNA・蛋白質解析が可能な状態で液体窒素中に保存し管理を行った。これらのリンパ球検体および抽出した DNA 検体のデータベースを作製した。これらの検体のうち鹿児島大学で診療を行っている、HAM319 例、無症候性 HTLV-1 キャリア 227 例の DNA を用い、マイクロアレイにより網羅的 SNP 解析 (GWAS) 解析を行った。結果は HAM とキャリアの両群間で有意な SNP は検出されなかった。現在共同研究施設に DNA 検体を送り、エクソーム解析中である。また、保存検体の一部を用い、HAM 発症病理に重要な HTLV-I 感染細胞および HTLV-I 特異的 CTL の機能解析を合わせて行った。HTLV-I 感染細胞では、TCR/CD3 の発現およびシグナルが低下しており感染細胞の機能不全が明らかとなった。ウイルス排除に重要な CTL の機能を HAM とキャリアで比較し、両者のサイトカイン・ケモカイン産生能および細胞傷害性分子の脱顆粒能には差がないことが明らかとなった。また、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、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。これらの保存検体は、GWAS 解析、エクソーム解析および細胞の機能解析に有用であった。

A. 研究目的

HAM は HTLV-I 感染によって起こる神経難病であり、全国に約 3600 名の患者がいると推定されている。HAM では脊髄の障害により、歩行障害、排尿障害が出現し、重症化すると車椅子使用となるが、未だ根治療法は開発されておらず、その確立は急務である。HAM は感染者の約 0.3%にしか発症しない希少疾患であり、また家族性発症率が高い。これらことから、多因子による遺伝的関与が推定され、宿主の疾患感受性遺伝子の検索が行われてきた。しかし、現在までに網羅的な疾患感受性遺伝子の探索は行われていない。近年、マイクロアレイの開発などによる遺伝子解析技術の進歩により、ヒト遺伝子の網羅的解析が可能となってきた。そのため本研究班の大きな柱である HAM 発症感受性遺伝子を明らかにする研究において、分担研究者は 3 年間に以下の研究を行った。

①分担研究では上記遺伝子研究に耐えうる多数の HAM および HTLV-1 キャリアの検体の収集および整備を行なう。京都大学ゲノム医学センターとの共同研究により、HAM のマイクロアレイを用いた網羅的 SNP 解析 (GWAS) を行う。また東京大学との共同研究でエクソーム解析を行う。

②保存検体の一部を用いて病態解明のための HAM の免疫学的検討を行う。HAM においては、HTLV-I プロウイルス量が多いこと、すなわち HTLV-I 感染細胞が多いことが最大の発症リスクであるが、生体内における HTLV-I 感染細胞の性状については、よくわかっていない。また、HAM で増大している HTLV-I ウイルスを細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が排除しきれないことより、HAM における CTL の機能不全の可能性が指摘されているが、本当に機能不全があるかは不明である。これらの課題に検討を行った。

③ウイルス特異的 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。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

①HAM および未発症 HTLV-I キャリアの臨床検体の整備：HAM および HTLV-I キャリアよりインフォームド・コンセントのもと、血液採取を行なった。リンパ球分離を行い、DNA・RNA・蛋白質解析が可能な状態で液体窒素中に保存し管理を行った。また、これらリンパ球検体および抽出した DNA 検体のデータベースをつくり準備を行った。鹿児島大学で診療を行っている、HAM319 例、無症候性 HTLV-1 キャリア 227 例を対象とし、常法によりゲノミック DNA を抽出し、濃度調整を行った。京都大学ゲノム医学センターに DNA 検体を送付し、マイクロアレイにより GWAS 解析を行い、HAM とキャリアの SNP 頻度を比較した。さらに、東京大学へ末梢血由来の DNA をエクソーム解析用に送付した。

②生体内 HTLV-I 感染細胞の性状の解析：HAM 患者の PBMC を短時間培養し、ウイルス蛋白が発現した後、Tax 蛋白を細胞内染色し感染細胞を同定し、表面マーカーを検討した。また CD3 刺激後、感染細胞を抗 Tax 抗体で染色した後、T 細胞レセプター (TCR) からのシグナル伝達分子である、Lck および ZAP70 のリン酸化を検討した。HTLV-I 特異的 CTL の HAM および HTLV-I キャリアでの比較検討：CD8 分画における、HLA-A24 拘束性 Tax301-309 特異的 CTL を Tetramer で検出した。Tax301-309 ペプチド抗原を 1 μ M で添加し、5 時間培養後の Tax301-309 抗原特異的サイトカイン (IFN- γ) 産生細胞、ケモカイン (MIP-1 β) 産生細胞、および脱顆粒のマーカーである CD107a 陽性細胞の Tetramer 陽性細胞に対する頻度と MFI の比較を行った。

③HAM 患者の末梢血リンパ球より 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、シークエンスを行い、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

①全エクソーム解析に用いることが可能な HAM およびキャリアの臨床検体数は、それぞれ 300 検体および 200 検体以上あることがわかった。京都大学との共同研究での GWAS 解析では、HAM とキャリアの両群間で有意な SNP は検出されなかった。しかしながら、P 値が 10^{-7} 程度であるが 12 番染色体の LOC644908 (蛋白機能未同定) 周辺の多型に、多くの関連が認められた。エクソーム解析は現在進行中である。

②HTLV-I 感染細胞では、TCR および CD3 の発現が低下していた。HAM では正常コントロールと比べ、CD4+細胞での Lck および ZAP70 の TCR シグナルは低下していた。同一患者の感染細胞は、非感染細胞より優位に TCR シグナルは低下していた。しかし、HTLV-I 感染者の非感染 CD4+細胞でも、軽度であるが TCR 発現の低下が認められた。HLA-A24 拘束性 HTLV-I 特異的 CTL の機能を HAM とキャリアで比較検討した。CTL の頻度は HAM で高かったが、抗原刺激による IFN- γ 産生、MIP-1 β 産生および、細胞傷害性顆粒の脱顆粒を表す CD107a 発現には、両者で差を認めなかった。

③HAM 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、高い例ではほぼ同じであった。

D. 考察

①HAMはキャリアの約0.3%の頻度で発症しており、HAMの発症機序および治療法開発にはHAMとキャリアを比較して研究を進める必要がある。本研究ではGWAS解析で、HAM 319検体およびキャリア 227検体で解析を行ったが、P値が低く有意なSNPは検出されなかった。そのため、精度を上げるため、セカンドセットのHAM患者およびキャリアの検体を収共同研究施設に送付し、解析中である。これと並行して家族性HAMのエクソーム解析を進行中である。今回のリンパ球およびDNA検体の保存状態のチェック、およびデータベース化により、HAMおよびキャリアでそれぞれ300検体および200検体以上の検体を使用可能であることがわかった。しかし、データの精度を上げるためには、さらなる検体収集を行っていく必要がある。また、われわれのリンパ球保存システムを用いたリンパ球は、感染細胞および免疫細胞の機能実験に十分使用できたことより、エクソーム解析後のデータを用いての種々の細胞機能解析にも、十分耐え得るものと考えられた。

②本研究により、HTLV-I感染細胞ではTCR/CD3の発現が低下しており、そのためTCRよりのシグナル伝達の低下を起し、免疫機能の低下を起していることが明らかとなった。しかし、HTLV-I感染者の非感染CD4+細胞でも軽度のTCR発現の低下が認められ、他のメカニズムによる広範囲のCD4+細胞の免疫低下も示唆された。今後さらなる検討が必要である。HAMとキャリアにおけるCTLの比較検討では、最大抗原刺激によるCTL中のサイトカイン産生、ケモカイン産生およびCD107a発現細胞の頻度およびMFIには差を認めなかった。今後、T細胞avidity、細胞増殖能、CTL活性、表面抗原発現等で、HAMとキャリアのHTLV-I特異的CTLの機能に差がないかにつき、検討が必

要である。

③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

①全エクソーム解析に用いるHAMおよびキャリアの臨床検体は、HAMで300例以上、キャリアで200例以上確認できた。今後も検体数を増やしていく。鹿児島島のHAMおよび無症候性HTLV-1キャリア検体を用いたGWAS解析では、HAMに有意な関連を示すSNPは検出されなかった。また、エクソーム解析でHAMの疾患感受性遺伝子を検索中である。

②HAMのHTLV-I感染細胞は、TCRおよびCD3の発現が低下し、シグナル伝達が不十分となり免疫能が低下していた。

サイトカイン、ケモカイン、および脱顆粒について、HAMとキャリアのHTLV-I特異的CTLの機能には差がなかった。

これらの機能実験より、我々の検体保存システムが、全エクソーム解析後の種々の細胞機能解析にも、十分耐えうるものであると考えられた。

③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

- 1) Kozako T, Akimoto M, Toji S, White Y, Suzuki S, Arima T, Suruga Y, Matsushita K, Shimeno H, Soeda S, Kubota R, Izumo S, Uozumi K, Arima N: Target epitopes of HTLV-1 recognized by class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes in HAM/TSP patients and infected patients with autoimmune disorders. *J Med Virol.* 83(3):501-9, 2011
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Kozako T, Yoshimitsu M, Akimoto M, White Y, Matsushita K, Soeda S, Shimeno H, Kubota R, Izumo S, Arima N. Programmed death-1 (PD-1)/PD-1 ligand pathway-mediated immune responses against human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and carriers with autoimmune disorders. *Hum Immunol.* 72(11):1001-6, 2011
- 5) Kawabata T, Higashimoto I, Takashima H, Izumo S, Kubota R: Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ cells accumulate in the lungs of patients infected with HTLV-I with pulmonary involvement. *J Med Virol.* 84(7): 1120-7, 2012
- 6) 久保田龍二 : HAM スペクトラム。臨床神経学。51: 1044-6, 2011
- 7) 久保田龍二 : HAM スペクトラム。神経内科。77: 283-8, 2012

2. 学会発表

- 1) 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. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
- 2) Kubota R, Takenouchi N, Matsuzaki T, Takashima H, Izumo S: HLA-A24-restricted HTLV-I-specific CTL response reduces the HTLV-I proviral load but the HLA increases the risk of HAM/TSP. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
- 3) Matsuzaki T, Kodama T, Kubota R, Izumo S: Recent epidemiologic trends of HAM/TSP in Japan. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
- 4) 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. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
- 5) Kodama D, Kubota R, Izumo S: Gene expression and glycan profiling of CD4+ T cells in HAM/TSP. *15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV & Related Viruses*, Leuven, Belgium, 2011
- 6) Matsuura E, Kubota R, Tanaka Y, Takashima H, Izumo S: Neural bystander damage by infiltrating virus-infected T cells and the cytotoxic lymphocytes in HTLV-I-associated neurological disease. *15th International Conference on Human*

Retrovirology: HTLV & Related Viruses,
Leuven, Belgium, 2011

- 7) Kodama D, Kubota R, Izumo S. Pathway analysis of HAM/TSP. *25th Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases*, Tokyo, Japan, 2011
- 8) Matsuura E, Watanabe O, Takashima H, Kubota R, Izumo S: HTLV-1-specific cytotoxic T cell migration in the cerebrum of the patients with HAM/TSP. *13th Asian Oceanian Congress of Neurology*. Melbourne, Austria, 2012
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 久保田龍二: HAM スペクトラム。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋
- 15) 久保田龍二、Abdelbary NH、松崎敏男、林 大輔、高嶋 博、出雲周二: HAM の HTLV-I 特異的 CTL における T 細胞疲労関連分子の検討。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋
- 16) 児玉大介、久保田龍二、出雲周二: HTLV-I 関連脊髄症(HAM)における糖鎖グライコミクス解析。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋
- 17) 松崎敏男、久保田龍二、出雲周二: HAM 患者の全国疫学調査。第 52 回日本神経学会総会。2011 年 5 月 名古屋
- 18) 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
- 19) 久保田龍二、竹之内徳博、松崎敏男、高嶋博、出雲周二: HLA-A24 拘束性 CTL はウイルス量を減少させるが HAM 発症リスクを上げる。第 4 回 HTLV-I 研究会。2011 年 9 月 東京
- 20) 児玉大介、久保田龍二、出雲 周二: HTLV-1 関連脊髄症 (HAM/TSP) のパスウェイ解析。第 4 回 HTLV-I 研究会。2011 年 9 月 東京
- 21) 久保田龍二、Abdelbary NH、松崎敏男、林 大輔、高嶋 博、出雲周二: HAM における T 細胞疲労関連分子 Tim-3 発現の低下。第 16 回日本神経感染症学会。2011 年 11 月 東京
- 22) 久保田龍二、有島志保、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二: HAM とキャリアにおける

HTLV-I 特異的 CTL 機能の比較検討。第 53 回日本神経学会総会。2012 年 5 月 東京

- 23) 松崎敏男、久保田龍二、斎藤峰輝、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 年 5 月 東京
- 24) 松浦英治、久保田龍二、高嶋 博：HTLV-1 キャリアの脊髄に HTLV-1 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 年 5 月 東京
- 25) 久保田龍二、有島志保、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二：HAM とキャリアにおける HTLV-I 特異的 CTL 機能の比較。第 5 回 HTLV-I 研究会。2012 年 8 月 東京
- 26) 松崎敏男、久保田龍二、斎藤峰輝、吉村 玲、高嶋 博、出雲周二：HAM からみた ATL の臨床。第 5 回 HTLV-I 研究会。2012 年 8 月 東京
- 27) 松浦英治、久保田龍二、高嶋 博：HAM および HTLV-1 キャリアの中樞神経における HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞の分布。第 5 回 HTLV-I 研究会。2012 年 8 月 東京
- 28) 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 21 回日本組織適合性学会大会。2012 年 9 月 東京
- 29) 久保田龍二、有島志保、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二：HTLV-I 特異的 CTL 機能は HAM とキャリアで異なるのか？第 24 回日本神経免疫学会。2012 年 9 月 長野
- 30) 松浦英治、久保田龍二、高嶋 博：HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞が関与する病態に関する検討（HAM 患者の脳・HTLV-1 carrier の脊髄の検討）。第 24 回日本神経免疫学会。2012 年 9 月 長野
- 31) 久保田龍二、高嶋 博、出雲周二：HAM 患者 HTLV-1 感染細胞における免疫反応低下。第 17 回日本神経感染症学会総会。2012

年 10 月 京都

- 32) 松浦英治、久保田龍二、出雲周二、高嶋 博：HAM/TSP 患者脊髄・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 年 10 月 京都
- 33) 児玉大介、久保田龍二、出雲周二：オミクス解析手法を用いた HAM 病態の検討と治療標的候補遺伝子の探索。第 17 回日本神経感染症学会総会。2012 年 10 月 京都
- 34) 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
- 35) 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
- 36) 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
- 37) 松崎敏男、久保田龍二、斎藤峰輝、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
- 38) 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
- 39) 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
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 田中 章景 (H23~H24) 名古屋大学大学院医学系研究科
(現 横浜市立大学 神経内科・脳卒中内科)
熱田 直樹 (H25) 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。

平行して、孤発性ALSの疾患関連遺伝子を明らかにするため、名古屋大学において集積したDNAサンプルを含めオールジャパン体制で集積されたサンプルを基にゲノムワイド関連解析(GWAS)を行った。この結果、ZNF512B遺伝子内のrs2275294が $P=9.3 \times 10^{-10}$ を以て孤発性ALSの易罹患性に関与していることが明らかとなった(オッズ比1.30)。ZNF512B遺伝子rs2275294のリスクアレルを持つと、ZNF512Bの発現が低下しTGF- β シグナル経路の障害を介してALSに罹患しやすくなる可能性が示唆された。引き続き次世代シーケンサーを用いた既知の家族性ALS原因遺伝子のスクリーニング解析、および全エクソン解析を進めており、孤発性ALSのゲノムレベルでの病態解明を進めている。

A. 研究目的

次世代シーケンサーを活用する事により、希少難治性神経疾患である Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID)、および筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の疾患関連遺伝子を同定し、ゲノムレベルでの病態解明、治療法開発を目指す。

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、病理学的に診断が確定している NIID 患者家系の DNA サンプルを用いて、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析、および次世代シーケンサー HiSeq 2000 を用いた全ゲノム解析、および SureSelect キットを用いた全エクソン解析を行なって

SNV 情報を収集した上で、連鎖解析を行なった。

ALS に関しては、2006 年以降、孤発性 ALS の DNA サンプル、臨床データリソースを構築しており、他施設で集積された孤発性 ALS の DNA サンプルも加えて、JSNP に登録されている 52608 個の SNPs についてタイピングを行った。まずスクリーニングとして ALS 454 例、そして対照 958 例について 48939 個の SNPs について関連解析を行い候補遺伝子を絞り込んだ。そして、2 段階の検証実験（追加セット 1: ALS サンプル 249 例と対照 1030 例、追加セット 2: 602 例の ALS と 2256 例の対照）を行った。同定した SNP が遺伝子の転写活性に及ぼす影響について、SNP を含む DNA フラグメントを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。また、同定 SNP を含むオリゴヌクレオチドを DIG でラベルし SKNAS 細胞の核抽出液と反応させ、SNP による核抽出タンパクとの結合程度の違いを検討した。また、同定した遺伝子と TGF- β シグナル系の関係が示唆されたため、

SBE(Smad binding element)を組み込んだルシフェラーゼベクターを用い、TGF- β 添加下において同定した遺伝子の過剰発現および siRNA による発現低下でルシフェラーゼ活性を検討した。

さらに、ALS 患者運動ニューロンにおいて同定した遺伝子の発現を免疫組織化学的に検討した。

(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

臨床的に NIID が疑われた患者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 で認められる物と同様であった。また、次世代シーケンサーを用いた遺伝子配列解析の SNV 結果を基に、連鎖解析を行なった結果、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。この領域内で SNV を検討しているが、現在のところ NIID の原因遺伝子は同定出来ていない。

ALS の遺伝子解析では、スクリーニングおよび検証実験における関連解析の結果、rs2275294 という 1 つの SNP のみが同定され、もう 1 つの追加セットにおける検証でも本 SNP の有意性が確認された。これらすべてを統合したメタ解析で、rs2275294 は 9.3×10^{-10} という P 値を示した。ALS でリスクアレルをとる頻度は、

スクリーニングで 0.491、追加セット 1 で 0.512、追加セット 2 で 0.481 であるのに対し、対照では各々 0.422、0.434、0.416 であり、オッズ比は各々 1.32、1.37、1.30 であった。rs2275294 は ZNF512B という遺伝子のイントロン内に存在しており、連鎖不平衡マップの解析により、周辺 SNPs の中でも本 SNP のみが有意であることが確認された。この SNP が ZNF512B の転写活性に及ぼす影響を調べたところ、リスクアレルではエンハンサー活性が低下しており、さらに、ゲルシフトアッセイの結果、リスクアレルでは核抽出タンパクとの結合が弱いことがわかり、エンハンサー活性が弱いことと対応していると考えられた。ZNF512B は TGF- β シグナル経路の調節因子であることが既報告より示唆されており、TGF- β は受容体との結合後、Smad 複合体が核に移行し、SBE(Smad binding element)に結合することで標的遺伝子の発現を制御する。このためルシフェラーゼアッセイにおいて TGF- β を加えるとレポーター活性は上昇するが、特に ZNF512B を過剰発現させた際に活性が高くなった。逆に siRNA で ZNF512B の発現を低下させると活性は低下した。

また、脊髄運動ニューロンにおいて、ZNF512B はコントロールではほとんど発現が見られないのに対して ALS では高発現を呈していた。

D. 考察

NIID の DNA サンプルについて、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。

ALS のゲノム解析で今回同定した ZNF512B