

は、オッズ比は 1.3 程度と他の GWAS で同定されたものとほぼ同様の値であったが、 9.3×10^{-10} という極めて信頼性の高い P 値を示し、ALS の易罹患性遺伝子と考えられた。また、rs2275294 がリスクアレルを持つ場合には ZNF512B の発現が低下することが明らかとなり、機能的にも意義を持つ variant であった。さらに、ZNF512B の発現が低下することは、神経生存、保護に必須の経路である TGF- β シグナル経路に障害を起こすことも明らかとなった。

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。

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。

F. 健康危険情報

特記すべき者無し

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) 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
- 3) 田中章景、曾根 淳、熱田直樹、中村亮一、土井 宏、児矢野 繁、祖父江 元. ALS のパーソナルゲノム解析. *BRAIN and NERVE* 65(3):257-265, 2013
- 4) Tanaka F, Ikenaka K, Yamamoto M, Sobue G. Neuropathology and omics in motor neuron diseases. *Neuropathology*. 32(4):458-446, 2012
- 5) 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
- 6) Iida A, Takahashi A, Deng M, Zhang Y, Wang J, Atsuta N, Tanaka F, Kamei T, Sano M, Oshima S, Tokuda T, Morita M, Akimoto C, Nakajima M, Kubo M, Kamatani N, Nakano I, Sobue G, Nakamura Y, Fan D, Ikegawa S. Replication analysis of SNPs on 9p21.2 and 19p13.3 with amyotrophic lateral sclerosis in East Asians. *Neurobiol Aging*. 32(4):757.e13-14, 2011
 - 7) Sone J, Tanaka F, Koike H, Inukai A, Katsuno M, Yoshida M, Watanabe H, Sobue G. Skin biopsy is useful for the antemortem diagnosis of neuronal intranuclear inclusion disease. *Neurology*. 19;76(16):1372-6, 2011

2. 学会発表

- 1) 発表者名：演題名. 学会名, 発表年月日, 開催地
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
- 6) 田中章景 : Toward identifying the causative gene of neuronal intranuclear inclusion disease (NIID): 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 21 日, 名古屋国際会議場
- 7) 曾根 淳 : Neuronal intranuclear inclusion disease - 皮膚生検による診断および原因遺伝

子の探索. 第35回日本神経科学大会, 2012年9月19日, 名古屋国際会議場

8) 田中章景: Neuronal intranuclear inclusion disease の原因遺伝子探索. 次世代遺伝子解析技術を用いた希少難治性疾患の原因究明及び病態解明に関する研究班 平成24年度 班会議, 2012年12月7日, 鹿児島大学鶴陵会館

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含)

1. 特許取得

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り、その発症原因はいまだ不明である。これまでHAMの発症や進展のリスクに関与する遺伝子を網羅的に探索・同定された例はない。そのため、本研究事業は大規模ゲノム解析により、HAM感受性遺伝子を探索・同定することを目的の1つとしている。そこで我々は、本研究期間を通してエクソーム解析、ゲノムワイド関連解析（GWAS）に必要な臨床検体を提供することにより、HAM感受性遺伝子探索を推進した（家族内発症HAM4例、急速進行性HAM9例を含むHAM54例、無症候性キャリア148例）。また、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、検体の収集・保存とゲノム解析拠点機関との連携体制構築を進めた。

さらに上記のゲノム解析に協力するだけでなく、関連して重要と考えられる以下の研究を各年度で実施した。

1) HAM特異的メチル化遺伝子の探索（H23年度）

HAM病態におけるDNAメチル化の影響はATLに比べ小さいことが示唆された。

2) 遺伝素因の強いHAM患者群の解析（H24年度）

HAMには家族集積性が認められ、HAM発症には、何らかの遺伝素因が存在する可能性が示唆された。また、急速に進行するHAM患者の発症年齢は高く、脊髄における免疫応答が強く出やすい特徴が認められた。

3) HAM 炎症の慢性化機構の解明（H25年度）

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重要であることが判明した。

こうした情報は、今後の大規模ゲノム解析より明らかとなってくるHAM感受性遺伝子の役割を理解するために有用である。また、同定された遺伝子の機能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の病態理解を加速できるものと思われ、その研究成果は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) 感染症は疫学的に我が国に特有の感染症であり、感染者は全国で 100 万人以上存在する。この HTLV-1 感染者の約 5%が成人 T 細胞白血病 (ATL) を発症し、別の一部、約 0.3%が慢性炎症性疾患である HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) を発症する。このように HAM は HTLV-1 感染者のごく一部にしか発症しないため、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。そのため、本研究事業の目的の 1 つが、次世代遺伝子解析技術を用いて、HAM の発症素因となる感受性遺伝子を網羅的に調査・同定することになっている。そこで、研究分担者として我々は、本研究期間を通してエクソーム解析、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) に必要な臨床検体を提供することにより、HAM の発症や進展に関わる遺伝子の探索を推進した。また、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た。

さらに上記のゲノム解析に協力するだけでなく、関連して重要と考えられる以下の研究を各年度で実施した。

<平成 23 年度>

近年、様々な疾患においてジェネティック異常のみならず、エピジェネティック異常に着目した研究が進展し、疾患における有効な診断や治療標的となることが明らかになりつつある。しかしながら、これまでに HAM において特徴的なエピジェネティック異常が同定されたという報告は成されていない。そこで、エピジェネティック異常の 1 つである DNA メチル化に着目し、HAM 関連メチル化遺伝子の同定を目的として、HAM および HTLV-1 感染者 (無症候キャリア (AC)、ATL) の臨床検体に特化したサンプルを用いて、網羅的 DNA メチル化解析を行った。

<平成 24 年度>

未知の HAM 感受性遺伝子を同定するためには、発症に遺伝素因が強い HAM 患者の一群から得られる検体を集中的に解析に用いるのが望ましい。そのような患者群の候補として、「家族内発症例」や「急速進行例」が有望であると考えられた。そのため、これらの症例を大規模ゲノム解析のために提供すると共に、こうした症

例の臨床的ならびにウイルス免疫学的な特徴を明らかにすることを目的とした研究を遂行した。

<平成 25 年度>

HTLV-1感染者のHAM発症に関わる遺伝素因の研究と組み合わせて、HAMの脊髄における炎症慢性化のメカニズムを解明する病態研究も非常に重要である。

HAM の脊髄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

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、末梢血単核球 (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 特異的メチル化遺伝子の探索

無症候キャリア (AC) 6 例、HAM7 例、ATL7 例の CD4+T 細胞群より得たゲノム DNA を材料に、Hyper/Hypo- Methylated CpG island amplification (H/H-MCA) マイクロアレイ法に用い高感度網羅的メチル化解析を行った。その際、CD4-T 細胞ゲノム DNA をコントロールに用いた。各々のゲノム DNA はメチル化シトシンに感受性の制限酵素を用いた切断の後、特異的アダプターをつけることにより PCR にてメチル化 CpG 断片のみ増幅することが可能となる。PCR 産物は Cy3, Cy5 でラベリングした後、アジレント社のカスタムメチル化アレイスライドを用いて網羅的メチル化解析を行った。

得られた結果をクラスター解析し、各疾患にて共通してCD4+T細胞群のみ高レベルなメチル化を示す遺伝子を候補遺伝子として選出した。

3) 遺伝素因の強いHAM患者群の解析

平成25年2月末時点でHAM患者登録サイト「HAMねっと」(<http://hamtsp-net.com/>)に登録され、電話での聞き取り調査を終了した304名のHAM患者の情報から、まずHAMの家族内発症の有無で2群に分け、両群の比較を行った。また、運動障害発現年齢から納の運動障害重症度 Grade 6 (両手杖歩行レベル) までの移行年数が2年以下のHAM患者を「急速進行例」と定義し、「HAMねっと」登録HAM患者を「急速進行例」と「非急速進行例」の2群に分け、両群の比較を行った。

次に、当研究室で収集・保存されていたHAM「家族内発症例」および「急速進行例」について、HTLV-1プロウイルス量、血清可溶性IL-2受容体 (sIL-2R) 濃度、髄液ネオプテリン濃度および髄液CXCL10濃度を測定し、当施設で収集したHAM患者データをもとに決定した基準値との比較を行った。

4) HAM 炎症の慢性化機構の解明

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で培養し、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、個人情報管理者が連結可能匿名化により番号化する為、提供者を特定できないようにして、患者の人権擁護に努めた。

「HAMねっと」による臨床研究は、聖マリアンナ医科大学の生命倫理委員会で承認された (承認番号: 第2044号) 同意書を用いて、参加に伴う不利益や危険性の排除等について説明し、書面による同意を得た。患者情報は、個人情報管理者により連結可能匿名化の方法によって患者ID番号が付与され「本研究専用のコンピュータ」において管理し、同意書は鍵付の書棚で管理している。データ解析においてはID番号を用いることにより個人を特定できないようにし、登録患者の人権擁護、及びプライバシーの保護に最大限の注意を払い、配慮に努めた。

C. 研究結果

1) HAM 発症の遺伝素因の解明

当研究室で収集・保存されていた検体の中から、家族内での発症が認められた4例 (うち2例は親子) と、急速な進行が認められた9例をピックアップして検体をゲノム解析センターへ提供した。

また、GWAS用にHAM患者検体41例、無症候性キャリア検体148例も提供した。

2) HAM 特異的メチル化遺伝子の探索

AC、HAM、ATL由来CD4+T細胞 (HTLV-1感染細胞) 間のメチル化遺伝子の網羅的解析結果の比較より疾患特異的なDNAメチル化の探索を行った結果、ATL症例ではCD4+においてCD4-と比較しATLに共通して高メチル化異常を呈している遺伝子群が抽出されたが、HAMやAC群からは特異的なメチル化遺伝子は認められなかった。

3) 遺伝素因の強いHAM患者群の解析

登録患者304名中、第2度近親者以内にHAMの家族歴がある者は29名 (9.5%、27家系)、一方、ATL家族歴は20名 (6.6%) であった。家族内発症有り群は発症無し群と比べて、年齢、発症年齢、診断年齢が有意に低く、また罹病期間が有意に長かった。一方、調査時の納の運動障害重症度、HAQ-DI、排尿・排便障害、足の

しびれ及び痛みの症状に関しては、両群に差は見られなかった。また、進行度の解析が可能であった292名中、「急速進行例」が16名(5.5%)であった。Grade 5までの移行年数を2年以下として抽出したところ、該当者は55名(18.8%)にのぼった。比較解析の結果は2年以内にGrade 5あるいは6に移行したいずれの場合も同様な傾向が認められた。すなわち、「急速進行例」では、年齢、運動障害発現年齢、診断年齢が有意に高く、また発症から診断までの年数および罹病期間は有意に短かった。なお、「急速進行例」では現在の納のGradeが有意に高いことに伴い、HAQ-DIスコアも高くなっており、日常生活において支障が多く介助を要する生活を送っている者が多いことが示された。次に、「家族内発症例」および「急速進行例」が示すマーカー検査所見について調べたところ、「家族内発症例」はウイルス免疫学的なマーカーにおいて特に特徴は認められなかった。一方、「急速進行例」は髄液の炎症マーカーであるネオプテリンおよびCXCL10の値が当科の急速進行例以外のHAM患者平均値よりも有意に高い値を示した(表1)(ネオプテリン: $p = 0.016$, CXCL10: $p = 0.009$)。

表 1

急速進行例 (n = 9)	
プロウイルス量 copies/100cells (当科HAM平均値* copies/100cells)	20.1 22.0
血清sIL-2R (当科HAM平均値* 631 U/mL)	590 U/mL
髄液ネオプテリン (当科HAM平均値* 16 pmol/mL)	49 pmol/mL
髄液CXCL10 (当科HAM平均値* 2176 pg/mL)	10420 pg/mL

*急速進行例を除く (n = 50)

4) HAM 炎症の慢性化機構の解明

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

本研究期間を通じて提供した検体はエクソーム解析および GWAS に供され、今後、未知のHAM 感受性遺伝子が同定されてくることが期待される。同定された HAM 感受性遺伝子は、無症候性 HTLV-1 感染者における HAM 発症のハイリスク群の同定や、HAM の病態解明、発症予防法、新規治療法開発等に役立つものと考えられる。

本研究の初年度(平成23年度)は、エピジェネティクス異常に着目し、HAM に特徴的なメチル化遺伝子の網羅的探索を試みた。しかしながら、本検討からは HAM 特異的な DNA メチル化遺伝子は抽出されなかった。同条件下において、ATL 症例からは ATL 特異的な DNA メチル化遺伝子として 35 遺伝子が抽出されたことから、ATL では DNA メチル化異常がその疾患発症や病態形成に関与している可能性が示唆されたが、HAM においては、DNA メチル化による特定遺伝子の発現抑制は、その病態に重大な影響を及ぼしているとは考えにくい結果となった。

次年度(平成24年度)は、遺伝素因の強いHAM患者群が示す臨床的およびウイルス免疫学的な特徴を調査した。その結果、HTLV-1感染者におけるHAMの生涯発症率は0.3%と低いにもかかわらず

わらず、家族内にHAM患者のいる割合は9.5%と高く、HAMには家族集積性があると考えられた。この点で、HAM発症には、何らかの遺伝素因が存在する可能性が示唆された。したがって、この「家族内発症例」はゲノム解析に適した症例であると考えられ、実際に大規模ゲノム解析に提供することができた。一方、今回解析したHAM「急速進行例」の最大の特徴は発症年齢が高いことであった。以前の本邦からの報告でも、こうした例では髄液中のネオプテリンやHTLV-1抗体価が高く、脊髄における強い炎症反応の存在が指摘されている。今回、我々が収集して提供した「急速進行例」においても、髄液ネオプテリンおよび髄液CXCL10は高値を示していた。したがって、「急速進行例」ではHTLV-1に起因する免疫応答が中心系組織内で強く出現しやすい特徴（素因）を有している可能性が示唆された。

そこで最終年度（平成25年度）は、HAMの脊髄炎症の慢性化機構について検討した。その結果、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、

- 1) HAM病態におけるDNAメチル化の影響はATLに比べ小さいことが示唆された（平成23年度）。
- 2) また、HAMの「家族内発症例」および「急速進行例」の特徴の一部を明らかにすることができた（平成24年度）。
- 3) さらに、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重要であることが判明した（平成25年度）。

こうした情報は、今後の大規模ゲノム解析より明らかとなってくるHAM感受性遺伝子の役割を理解するために有用である。また、同定された遺伝子の機能を病態研究と組み合わせて解析することによって、HAMの病態理解を加速できるものと思われ、その研究成果を速やかに根本的な治療法の開発に結び付けることが重要である。

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

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.

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.

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.

Yamano Y., Sato T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Front Microbiol.*, 3:389:1-10, 2012.

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.

Araya N., Sato T., Yagishita N., Ando H., Utsunomiya A., Jacobson S., Yamano Y. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory Disease. *Viruses*, 3: 1532-1548, 2011.

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. *Antiviral Ther*, 16(1):89-98, 2011.

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.

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.

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.

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.

山野嘉久. HAM (HTLV-1 関連脊髄症). すべての内科医が知っておきたい神経疾患の診かた, 考え方とその対応, (編集: 大生定義), 279-281/373, 2013, 羊土社.

山野嘉久, 佐藤知雄, 安藤仁, 新谷奈津美, 八木下尚子. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の治療法を確立していくために—その現状と展望—. *日本臨牀*, 70(4):705-713, 2012.

山野嘉久, 佐藤知雄, 新谷奈津美, 安藤仁, 八木下尚子. HAM 専門外来の取り組み *神経内科*, 75 (4) 387-392, 2011.

安藤仁, 八木下尚子, 新谷奈津美, 佐藤知雄, 山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の病態と治療. *医療と検査機器・試薬* 34(4)別冊 機器・試薬, 34 (4) : 472-477, 2011.

山野嘉久. HTLV-1 キャリアー, HTLV-1-associated myelopathy(HAM)患者診療の現状と問題点. *血液内科*, 63 (1) :81-86, 2011.

2. 学会発表

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.

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.

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.

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.

Yamano Y. Search for a model of drug efficacy for a rare chronic progressive neurological disease HAM/TSP, The 3rd International Symposium of Early Stage Clinical Trial, February 2, 2013, Yokohama, Japan. [招待講演]

Hasegawa A., Tamai Y., Takamori A., Sasada A., Tanosaki R., Choi I., Utsunomiya A., Maeda Y., Yamano Y., Eto T., Koh K., Nakamae H., Suehiro Y., Kato K., Takemoto S., Okamura J., Uike N., Kannagi M. Identification of a novel HLA-DR1-restricted dominant epitope recognized by HTLV-1 Tax-specific CD4+ T-cells augmenting HTLV-1-specific CTL expansion in ATL patients after allogeneic HSCT. AACR/JCA Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research, 21-25 February, 2013, Maui, HI, U.S.A.

Yamano Y., Sato T., Araya N., Yagishita N., Shimizu Y., Ando H., Utsunomiya A., Izumo S., Jacobson S., Suzuki N. Clinical subtype of HAM/TSP based on clinical course and laboratory findings. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.

Sato T., Muto M., Araya N., Maekawa R., Suzuki N., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Possibility of T cell immunotherapy for HTLV-1-infected individuals. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.

Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Nakamura T., Tanaka Y., Jacobson S., Yamano Y. The plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 tax in HAM/TSP. 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 2011, Leuven, Belgium.

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).

山野嘉久, 山内淳司, 新谷奈津美, 安藤仁, Ariella Coler-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)

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).

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).

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 T cell immunotherapy. 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).

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-25日 東京都(港区).

山野嘉久. HAMにおける免疫異常ならびに家族内発症について. 厚生労働科学研究費補助金難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(難病関係研究分野)「次世代遺伝子解析技術

を用いた希少難治性疾患の原因究明及び病態解明に関する研究」班平成 24 年度班会議, 2012 年 12 月 7 日, 鹿児島.

佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、出雲周二、山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の進行度に関連するバイオマーカーの同定, 第17回日本神経感染症学会, 2012年 10月20日, 京都.

山野嘉久、安藤仁、佐藤知雄、外丸詩野、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、吉田眞理、宇都宮與 HAMにおけるCXCL10の炎症慢性化機構における重要性と治療標的としての可能性 第24回日本神経免疫学会学術集会 2012年9月 21日 長野県(軽井沢町).

山野嘉久 HAMにおけるHTLV-1感染T細胞の異常 第5回HTLV-1研究会・第1回ATLシンポジウム・HTLV-1国際シンポジウム 2012年8月 25日 東京 (港区) .

佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、出雲周二、山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の進行度に関連する新規バイオマーカーとしての髄液 CXCL10 の重要性, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.

齊藤祐美 高田礼子、菊地誠志、藤原一男、中川正法、竹之内徳博、永井将弘、吉良潤一、中村龍文、高嶋博、齊藤峰輝、渡嘉敷崇、法化図陽一、松崎敏男、出雲周二、山野嘉久. HAM 患者登録システム (HAM ねっと) の構築, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.

安藤仁、佐藤知雄、新谷奈津美、八木下尚子、山内淳司、山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の炎症慢性化に果たす CXCL10 の役割と治療応用への解析, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.

石原誠人、新谷奈津美、佐藤知雄、山野嘉久、中村祐輔、中川英刀、植田幸嗣. 脳脊髄液プロテオームプロファイリングによる HAM/TSP 重症度指針マーカーの同定, 第 5 回 HTLV-1 研究

会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.

山内淳司、安藤仁、新谷奈津美、佐藤知雄、八木下尚子、山野嘉久. ステロイドの血中 HTLV-1 プロウイルス量に対する影響と免疫抑制による HTLV-1 関連疾患発症リスクに関する検討, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 26 日, 東京.

長谷川温彦、高森絢子、宇都宮與、前田裕弘、山野嘉久、増田昌人、清水由紀子、玉井洋太郎、笹田亜麻子、崔日承、鶴池直邦、岡村純、渡邊俊樹、神奈木眞理. HTLV-1 感染者における Tax 特異的 T 細胞応答および ATL 発症予防, 第 5 回 HTLV-1 研究会・第 1 回 ATL シンポジウム・HTLV-1 国際シンポジウム, 2012 年 8 月 25 日, 東京.

山野嘉久. HAM (HTLV-1 関連脊髄症) 対策に関する現状と課題 第3回HTLV-1対策推進協議会 2012年6月6日 東京 (千代田区) .

佐藤知雄、安藤仁、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、出雲周二、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の疾患活動性バイオマーカーに関する解析 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班会議 2012 年 1 月 26 日 東京

安藤仁、佐藤知雄、新谷奈津美、山内淳司、八木下尚子、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の慢性炎症における CXCL10 の重要性に関する解析 平成 23 年度厚生労働省科学研究費補助金 難知性疾患克服研究事業 「免疫性神経疾患に関する調査研究」班会議 2012 年 1 月 26 日 東京

山野嘉久. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の臨床経過と関連する疾患活動性マーカーの同定 第 53 回日本神経学会学術大会 2012 年 5 月 24 日 東京 (千代田区) .

Sato T., Muto M., Araya N., Kojo S., Maekawa R., Utsunomiya A., Seino K., Yamano Y. Frequency and functional significance of $\gamma\delta$ T cells in HTLV-1-infected

individuals. (HTLV-1 感染者におけるガンマデルタ T 細胞の頻度および機能的な重要性). 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉

Araya N., Sato T., Utsunomiya A., Ando H., Yagishita N., Kannagi M., Tanaka Y., Yamano Y. The molecular mechanism in the plasticity of HTLV-1 infected CD4+CD25+CCR4+ T-cells through HTLV-1 in HAM/TSP. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011 年 11 月 27 日 千葉

山野嘉久、佐藤知雄、新谷奈津美、八木下尚子、安藤仁、宇都宮與、出雲周二. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) の臨床病型: 臨床経過と検査所見に基づいた分類 第 4 回 HTLV-1 研究会 2011 年 9 月 19 日 東京.

佐藤知雄、武藤真人、新谷奈津美、八木下尚子、前川隆司、宇都宮與、神奈木真理、清野研一郎、山野嘉久 HTLV-1 感染者に適用可能なガンマデルタ T 細胞療法の開発 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京

新谷奈津美、佐藤知雄、安藤仁、八木下尚子、神奈木真理、田中勇悦、宇都宮與、山野嘉久 HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) における HTLV-1 を介した病原性 T 細胞発生機構の解析 第 4 回 HTLV-1 研究会・合同班会議 2011 年 9 月 19 日 東京

山野嘉久、新谷奈津美、佐藤知雄、中村龍文、森直樹、鈴木登. HTLV-1 関連脊髄症 (HAM) 患者でのフコイダン療法によるウイルス量の減少 第 52 回日本神経学会学術大会 2011 年 5 月 20 日 名古屋 (愛知).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定含)

1. 特許取得

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、2012.8.29、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

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（H23-25 年度総合報告）

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いる。我々は HAM が家族内に集積する家系を臨床的解析と網羅的遺伝子解析（エクソーム解析）を同時に行った。

【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。家族性 HAM の臨床的特徴は、当院に最近入院した連続 124 症例の孤発性の HAM 患者と比較した。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】家族性 HAM では発症年齢が早く、発症後も進行が遅い傾向が明らかとなった。すべての HAM において年齢が高ければ高いほど急速に進行する例の割合が増えることが明らかとなった。また、急速に進行する例が発症後およそ 1.5 年で車いすが必要となるのに対して、緩徐に進行する例は 15 年と 10 倍の開きがあることが判明した。遺伝子のエクソーム解析では、いくつかの候補遺伝子を明らかにしたが、オッズ比を孤発性 HAM200 例、キャリア 200 例で検証したところ、そのなかの 1 つ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】家族例というグルーピングを用い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の同定に成功した。今回明らかとなった臨床的特徴別にグルーピングすることで新しい因子が明らかとなると考えられた。なによりも今後のエクソーム解析症例が増える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なろう。

A. 研究目的

HAM 患者の末梢血中の HTLV-1 プロウイルス量は HTLV-1 無症候性キャリアに比して優位に高いが、興味深いことに HAM 患者の家族においてもプロウイルス量が優位に高い。また、いくつかの HLA の違いや遺伝子多型が HAM の発症因子や抑制因子として知られている。これらの事実は HAM の発症に遺伝的背景があることを示唆している。しかし、このように HAM を発症しやすい遺伝的背景を持つ家系の存在が推定されてきたにも関わらず、現在まで家族性に発症した HAM 症例（家族性 HAM）のみを集めて解析した報告はない。

我々はいままで、家族内に複数の HAM を発症した家系を経験してきた。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。

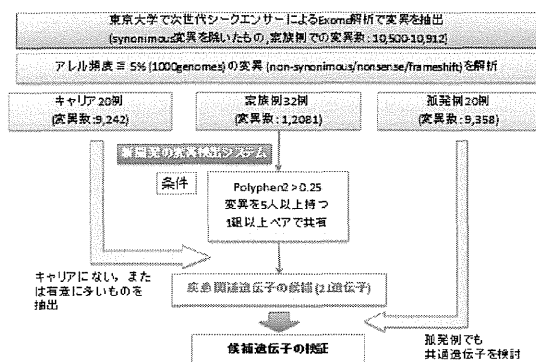
B. 研究方法

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

家族性 HAM の特徴を明らかにするために、2002 年から 2012 年まで鹿児島大学病院に入院した包括的同意の得られている連続孤発例 124 例の特徴を臨床記録を用いて検討比較した。

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

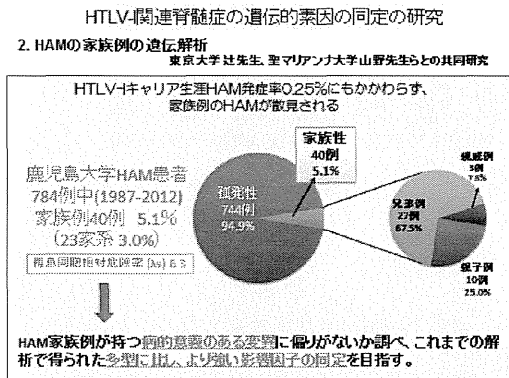
なお、本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・

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

C. 研究結果

家族性 HAM の割合

データベースを解析した結果、鹿児島大学に登録されている HAM 症例 784 人のうち、家族内に HAM を複数人発症している家系は 23 家系存在し、その家系内 HAM は 40 人 (5.1%) であった。



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

遺伝子解析 (対象患者)

解析対象	症例数
家族例	24家系34例
親子例	8家系11例
兄弟例	14家系20例
親戚例	2家系3例
孤発例	20例
HTLV-1キャリア	20例

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

また同時に進められた、家族性 HAM の臨床

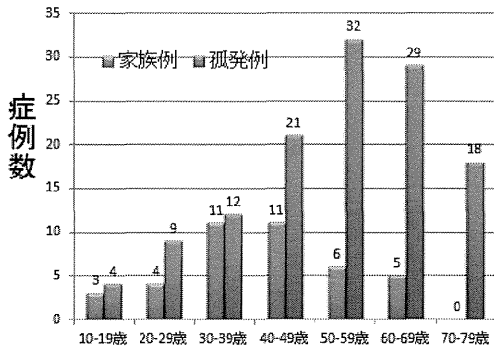
的特徴として、対象とした HAM124 例と比較した結果、家族性 HAM は孤発性 HAM と比べて、平均年齢が低く、発症年齢も低いことが明らかとなった。

家族例を孤発例と比較する

	家族性 (N=40)	孤発性 (N=124)	P
性別男性/女性	7/33 (1:4.5)	31/93 (1:3) どちらも女性が多い	NS
年齢 (mean ± s.d., range)	55.6 ± 13.0 (23-79)	61.8 ± 12.5 (15-83)	0.006
発症年齢 (mean ± s.d., range)	41.3 ± 13.9 (14-65)	51.5 ± 15.9 (13-78)	<0.001
観察期間 (mean ± s.d., range)	14.0 ± 11.4 (1-49)	10.2 ± 9.6 (0-45)	0.026

PLoS ONE 2014 in press

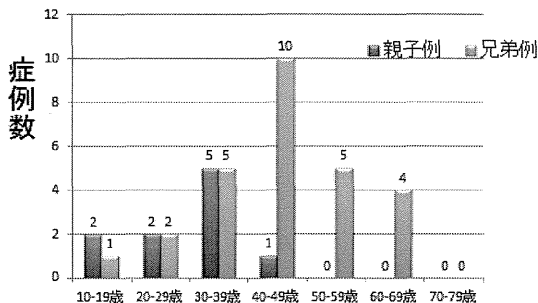
家族性HAMは発症年齢が早い



また、下図のように家族性 HAM の中でも親子例の発症年齢がと兄弟例のそれよりも若いことも明らかとなった。

家族性HAMは発症年齢が早い

親子例は兄弟例よりさらに発症年齢が早い

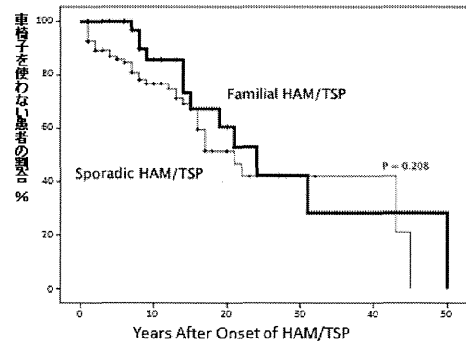


次におこなった、初発症状の検討では、家族例 HAM、孤発例 HAM どちらの群も歩行障害で発症しており、次いで排尿障害、感覚障害が続き、両群に大きな違いはなかった。

家族性 HAM と孤発例 HAM の車いすになる割合を見たところ、全体におよそ 20 年で 50% の患者が車いすになることが分かった。家族性

の HAM では病中期に急速に進行する傾向が見て取られた。

Kaplan-Meier曲線 (発症から車いすまで)



家族性 HAM のそのほかの特徴として、発症年齢が低い一方、急速に進行する率が 10% と低く (10% vs 28.8% p=0.019)、車いすになるまでの期間も孤発性の HAM に比して長期であった。

そこで孤発例 HAM124 例を急速進行例とそれ以外の緩徐進行例に分けて臨床症状を解析したところ、急速進行例は発症年齢が 15 歳も高く、わずか 1.5 年で車いす生活となる事が判明した。興味深いことに、急速進行例は髄液抗体価が高いにも拘わらず、末梢血 PBMC 中のプロウイルス量がむしろ少ないことが判明した。

	急速進行群 (N=35)	緩徐進行群 (N=89)	P
性別男性/女性	10/25	21/68	NS
発症年齢 (mean ± s.d., range)	62.3 ± 9.6	47.4 ± 15.9	<0.001
観察期間 (mean ± s.d., range)	3.0 ± 4.6	13.0 ± 9.6	<0.001
発症から車いすまで (mean ± s.d., range)	1.5 ± 0.9 (N=13)	14.4 ± 10.4 (N=25)	<0.001
Provirus量 (copies/10 ³ PBMC) (mean ± s.d., range)	370 ± 327 (N=32)	1,245 ± 2,046 (N=69)	<0.001
髄液HTLV-1抗体価 (mean ± s.d., range)	1,251 ± 1,800 (N=34)	416 ± 852 (N=77)	0.014

急速進行例と緩徐進行例が免疫学的反応においても異なることが明らかとなった。

一方、家族性 HAM およびコントロールエクソーム解析の終わったサンプルについて遺伝子変異の抽出を独自に開発中の解析ソフトを用いて行った。今回はアミノ酸変位を伴うもの、ナンセンス、フレームシフトについて遺伝子ごとに解析を行った。

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、mtv-キャリア20例に認められなかったものを抽出した

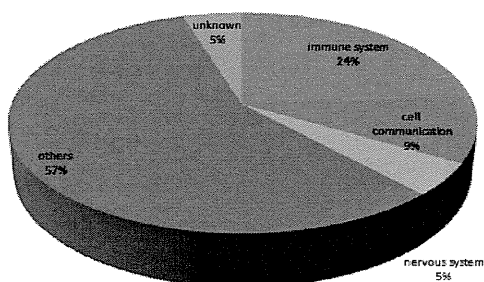
上記の変異遺伝子のうち、32 例中 7 人、あるいは 6 人に共通した遺伝子の機能を調べた。下記に記す。

候補遺伝子

Gene	Category	Count	Frequency	Function	
MT1	non-synonymous	11	0	cell migration	
SNF19B	non-synonymous	8	1	cystolic activity of lymphocyte	
Gene X	non-synonymous	8	2	immune system	
CCDC158	non-synonymous	6	0		
NCK5	non-synonymous	6	2	expressed in lymph nodes	
Gene Y	non-synonymous	6	0	transporter	
TRM11	non-synonymous	6	2	ubiquitin-protein ligase	
ABT2	non-synonymous	5	1	hepatocyte growth	
CACNA1B	non-synonymous	5	0	Ca Channel, neurotransmitter	
DEP50	non-synonymous	5	3	GAP-Gly domain	
DUG5	non-synonymous	5	0	cell-cell contact	
PLD3	non-synonymous	5	0	drug-metabolizing enzymes	
HIST1H1C	non-synonymous	5	1	histone H1 family	
LEF3	non-synonymous	5	0	TGF- α enhancer	
MUC6	non-synonymous	5	0	gastric mucus	
PLED1	non-synonymous	5	1	Phospholipase	
SP11	non-synonymous	5	1	retinal-specific protein	
ULBP3	non-sense	5	2	signal pathways in NK cells	
PRKCSH	frameshift	17	8	5	beta-subunit of glucosylase
NAD2	frameshift	7	2	0	Wnt receptor signaling
MGB1	frameshift	5	0	0	hydroxylases reduction

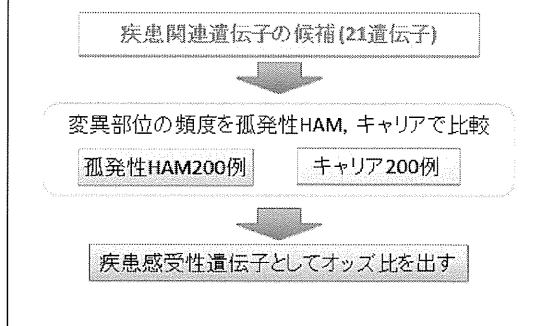
最も多くの7人に共通した遺伝子は3つあり、細胞増殖や細胞接着因子、細胞浸潤に関わる遺伝子であった。

候補遺伝子の機能別分類



少なくとも家族性 HAM の中で 5 人以上共通を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 個は神経系に関係するものであった。

候補遺伝子の検証



上記のフローのように候補遺伝子を検証するために、新たに用意した孤発性 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。

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

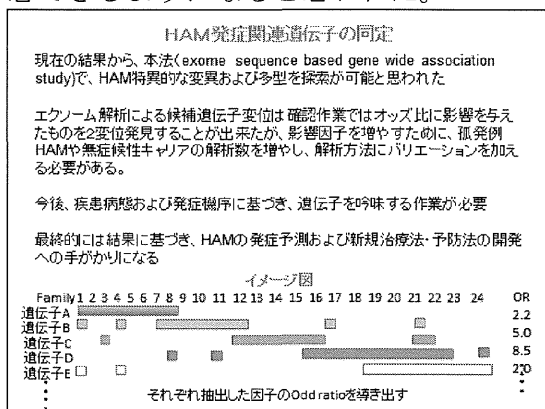
Gene	Spadic HAM (n=200)	Spadic HAM (%)	Carrier (n=200)	Carrier (%)	Odds Ratio	P-value
MT1	48	12.0%	40	10.0%		
SNF19B	27		22	5.5%		
Gene X	20	5.0%	9	2.5%	2.3	0.09855
CCDC158	2	0.5%	1	0.5%		
NCK5	27	6.8%	20	5.0%		
Gene Y	15	3.8%	4	1.0%	3.3	0.04715
TRM11	6	1.5%	12	3.0%		
ABT2	7	1.8%	8	2.0%		
CACNA1B	12	3.0%	10	2.5%		
DEP50	15	3.8%	12	3.0%		
DUG5	5	1.3%	11	2.8%		
PLD3	15	3.8%	8	2.0%		
HIST1H1C	11	2.8%	13	3.3%		
LEF3	7	1.8%	12	3.0%		
MUC6	5	1.3%	13	3.3%		
PLED1	149	37.3%	159	39.8%		
SP11	45	10.8%	51	12.8%		
ULBP3	6	1.5%	23	6.3%		
PRKCSH	76	19.0%	75	18.8%		
NAD2	28	7.0%	23	5.8%		
MGB1	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

1. Brian Yao, Francesca Bagnato, **Eiji Matsuura**, Hellmut Merkle, Peter van Gelderen, Frederic K. Cantor, Jeff H. Duyn: Chronic Multiple Sclerosis Lesions: Characterization with High-Field-Strength MR imaging. *Radiology*, 262(1):206-15, 2012
2. Yoshimi Enose-Akahata, **Eiji Matsuura**, Yuetsu Tanaka, Unsong Oh, Steven Jacobson: Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease, *Retrovirology*, 9(16) 2012.

3. 松浦英治、久保田龍二、樋口逸郎. HTLV-1 と筋炎 *Clinical neuroscience*. 30(3):322-333, 2012
4. 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.
5. 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
6. 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. 松浦英治、久保田龍二、高嶋博. HTLV-1 キャリアの脊髄に HTLV-I 特異的細胞障害性 T 細胞は浸潤している. 第 53 回日本神経学会 2012 年 5 月 東京
2. 松浦英治、高嶋博、久保田龍二、出雲周二. HTLV-I 関連脊髄症 (HAM/TSP) 患者大脳、及び、HTLV-1 キャリア脊髄への HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞の浸潤. 第 53 回日本神経病理学会総会学術研究会 2012 年 6 月 新潟
3. 松浦英治、久保田龍二、出雲周二、高嶋博. HAM および HTLV-1 キャリアの中樞神経における HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞の分布. 第 5 回 HTLV-1 研究会 2012 年 8 月 東京
4. 松浦英治、久保田龍二、高嶋博. HTLV-1 特異的細胞障害性 T 細胞が関与する病態に関する検討 (HAM 患者の大脳・HTLV-1 carrier の脊髄の検討). 第 24 回日本神経免疫学会学術集会 2012 年 9 月 軽井沢
5. 松浦英治、久保田龍二、出雲周二、高嶋博. HAM/TSP 患者脊髄・大脳および HTLV-1

キャリア脊髄における HTLV-1 ウイルス特異的細胞障害性 T 細胞の検出. 第 17 回日本神経感染症学会 2012 年 10 月 京都

6. 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
7. 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
8. 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-1 研究会 2013 年 8 月 24 日東京

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

国際学会

1. HTLV-1 specific cytotoxic T cell migration in the cerebrum of the patient with HAM/TSP. **Eiji Matsuura** Ryuji Kubota, Hiroshi Takashima, The 13th Asian Oceanian Congress of Neurology, 2012 年 6 月 7 日, Melbourne
2. 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
3. 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 Matsuura**, Satoshi Nozuma, 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
4. 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,

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者名	論文題名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yuan J, Higuchi Y, Nagado T, Nozuma S, Nakamura T, Matsuura E, Hashiguchi A, Sakiyama Y, Yoshimura A, <u>Takashima H.</u>	Novel mutation in the replication focus targeting sequence domain of DNMT1 causes hereditary sensory and autonomic neuropathy IE.	J Peripher Nerv Syst.	18(1)	89-93	2013
Yuan J, Matsuura E, Higuchi Y, Hashiguchi A, Nakamura T, Nozuma S, Sakiyama Y, Yoshimura A, Izumo S, <u>Takashima H.</u>	Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type IID caused by an SCN9A Mutation.	Neurology	80(18)	1641-9	2013
Yuan JH, Sakiyama Y, Higuchi I, Inamori Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, Higashi K, Yoshimura A, <u>Takashima H</u>	Mitochondrial myopathy with autophagic vacuoles in patients with the m.8344A>G mutation.	J Clin Pathol.	66(8)	659-64	2013
Nakamura T, Hashiguchi A, Suzuki S, Uozumi K, Tokunaga S, <u>Takashima H.</u>	Vincristine exacerbates asymptomatic Charcot-Marie-Tooth disease with a novel EGR2 mutation.	Neurogenetics	13 (1):	77- 81	2012
Zhao Z, Hashiguchi A, Hu J, Sakiyama Y, Okamoto Y, Tokunaga S, Zhu L, Shen H, <u>Takashima H.</u>	Alanyl-tRNA synthetase mutation in a family with dominant distal hereditary motor neuropathy.	Neurology	78(21)	1644-9	2012
Yoshida T, Sasaki M, Yoshida M, Namekawa M, Okamoto Y, Tsujino S, Sasayama H, Mizuta I, <u>Nakagawa M.</u> 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

Ishiura H, Sako W, Yoshida M, <u>Nakagawa M.</u> 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
Shiga K, Noto Y, Mizuta I, Hashiguchi A, Takashima H, <u>Nakagawa M.</u>	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
Noto Y, <u>Nakagawa M.</u> , 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
Noto Y, Shiga K, Tsuji Y, Kondo M, Tokuda T, Mizuno T, <u>Nakagawa M.</u>	Contrasting echogenicity in FDP-FCU: A diagnostic ultrasound pattern in sporadic inclusion body myositis.	Muscle Nerve	49(5)	745-8	2014
Noriko Nishikawa, <u>Masahiro Nagai,</u> Tomoaki Tsujii, Nachi Tanabe, Hiroshi Takashima and <u>Masahiro Nomoto</u>	Three Spinocerebellar Ataxia Type 2 Siblings with Ataxia, Parkinsonism, and Motor Neuronopathy	INTERNAL MEDICINE	50	1429-1432	2011
<u>Masahiro Nagai,</u> Tomoaki Tsujii, Hirotaka Iwaki, Noriko Nishikawa and <u>Masahiro Nomoto.</u>	Cerebrospinal Fluid Neopterin, but not Osteopontin, is a Valuable Biomarker for the Treatment Response in Patients with HTLV-I-associated Myelopathy.	INTERNAL MEDICINE	52	2203-2208	2013
Abdullah HM, Higuchi I, <u>Kubota R.</u> Matsuura E, Hashiguchi A, Abdelbary NH, Inamori Y, Takashima H, <u>Izumo S.</u>	Histopathologic differences between human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-positive and HTLV-1-negative polymyositis.	Clin Exp Neuroimmunol.	2	12-17	2011