

201442014A

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等克服研究事業  
（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）））

神経筋疾患の原因究明および  
革新的治療法開発に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 高嶋 博

平成 27 年（2015）年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業による委託業務として、国立大学法人鹿児島大学が実施した平成26年度「神経筋疾患の原因究明および革新的治療法開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

|  |      |
|--|------|
| I. 委託業務成果報告（総括）                                    |      |
| 神経筋疾患の原因究明および革新的治療法開発に関する研究                        | 3 頁  |
| 高嶋 博   |      |
| II. 委託業務成果報告（業務項目）                                 |      |
| 1. Charcot-Marie-Tooth 病の網羅的遺伝子解析と新規原因遺伝子の同定       | 13 頁 |
| 高嶋 博   |      |
| 2. HAM 患者 CD4+T 細胞の小胞体ストレスを介したツニカマイシン誘導性アポトーシス     | 18 頁 |
| 出雲 周二  |      |
| 3. 未同定の遺伝性白質脳症に関する研究                               | 22 頁 |
| 中川 正法  |      |
| 4. 当科における神経変性疾患患者の現況と治療薬開発                         | 26 頁 |
| 永井 将弘  |      |
| 5. 神経変性抑制薬に関する実験的研究                                | 28 頁 |
| 野元 正弘  |      |
| 6. 短時間培養による末梢血中 HTLV-1 感染細胞の同定に関する研究               | 31 頁 |
| 久保田 龍二   |      |
| 7. 遺伝性神経疾患の遺伝子解析に基づく病態解明                           | 34 頁 |
| 祖父江 元  |      |
| 8. HTLV-1 感染細胞特異的発現分子に基づいた HAM の診断・治療標的分子の探索に関する研究 | 37 頁 |
| 山野 嘉久  |      |
| 9. HTLV-1 関連脊髄症の発症年齢に関する研究                         | 44 頁 |
| 松浦 英治  |      |
| 10. HTLV-1 の炎症原因遺伝子 HBZ による HAM 発症機構の解明とその制御       | 50 頁 |
| 齊藤 峰輝  |      |
| III. 学会等発表実績                                       | 57 頁 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷                                    | 71 頁 |

## I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等克服研究事業  
（難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)））

委託業務成果報告（総括）

神経筋疾患の原因究明および革新的治療法開発に関する研究

業務主任者 高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学

研究要旨：本研究の目的は、本邦における希少難治性神経疾患の遺伝的原因の決定を行い、最新のゲノム解析技術を用いて遺伝子診断法を開発、実践し、診断を明確にする。さらに未同定患者の遺伝的原因を発見し、さらに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。

我々は、希少性の遺伝性神経疾患患者検体について、次世代ゲノムシーケンサーによる大規模シーケンス配列の決定をおこなった。専用の解析ソフトウェアを開発し、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を行った。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）および鹿児島大学におけるエクソーム解析データによる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。

CMT 病については、8つの原因候補遺伝子を見出し、特に3遺伝子については、新規の劣性遺伝性小脳失調症の原因と確定しうる。それらについて原因遺伝子について、2014年5月遺伝性疾患の検出方法として出願（特願 2014-093044）した。優性遺伝性 CMT 病も、ほぼ疾患原因と思われる2つの遺伝子が見つかっており、病態解析とともに特許出願準備中である。これにより、さらなる CMT の診断率の向上が期待される。治療面では発見した AR-CMT 原因遺伝子の中で、機能欠失変異であり、遺伝子治療のターゲットとしても重要で、メカニズム的にも治療へのヒントが得られた。希少性遺伝性疾患については、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た。

HAM については、HAM 家族例 40 例、HTLV-I キャリア 90 例、HAM（孤発例）90 例、計 220 例のエクソーム解析終了した。関連因子抽出プログラムで疾患感受性因子を同定し得たが、その確認のためセカンドサンプルでオズブレシオなども含めて様々な手法で解析中である。エクソーム解析を用いた感受性因子の同定は、これまで行われたことがなく、解析手法を試行錯誤しながら一つの感受性遺伝子を同定し、結果が出た。さらに多くの感受性遺伝子、防御因子の同定を行い、感受性遺伝子ごとに病態解析を予定している。

業務項目担当責任者

出雲周二 (鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター分子病理病態研・教授)

中川正法 (京都府立医科大学大学院神経内科学・教授)

野元正弘 (愛媛大学大学院病態治療内科学・教授)

永井将弘 (愛媛大学医学部附属病院臨床薬理センター・准教授)

久保田龍二 (鹿児島大学難治ウイルス病態制御研究センター分子病理病態研・准教授)

祖父江元 (名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学・教授)

山野嘉久 (聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター・准教授)

松浦英治 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学講座・講師)

齊藤峰輝 (川崎医科大学微生物学・教授)

## A. 研究目的

本邦における希少難治性神経疾患の遺伝的原因を決定する。最新のゲノム解析技術を用い、遺伝子診断法を開発、実践し、診断を明確にする。未同定患者の遺伝的原因を発見し、本邦の分子疫学および疾患原因別に病態を明らかにする。見つかった原因とその病態機序に基づいた、治療への道筋を立案する。HTLV-I 関連脊髄症(HAM)については、発症関連因子を同定し、発症促進因子、抑制因子などを同定し、治療法、予防法を開発する。

## 1. 研究施設

業務項目担当施設

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

協力研究施設

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

本邦にみられる神経・筋疾患・難病

a. **単一遺伝子病:** Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT)、ミトコンドリア病、脊髄小脳変性症、周期性四肢麻痺、先天性ミオトニア、遺伝性感覚性ニューロパチー、遺伝性運動性ニューロパチー、家族性 ALS、細胞内封入体病、HDLS、CADASIL、NIID、Ullrich 型筋ジストロフィー、遺伝性脳小血管病、遺伝性成人型白質ジストロフィー等

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

c. **原因未解明の地域性の疾患:** 沖縄型筋萎縮症 (HMSN-P)、SCA36、地域性脳炎

## 3. 検体収集

全施設にて 10000 検体以上収集している。

さらに検体収集について、他の研究班との連携し、特に CMT、HAM では患者会と連携して行っている。ホームページの開設、市民公開講座など様々な場で広報を行っている。

## 4. 遺伝子診断・解析

包括的に既知の遺伝子診断を行うため、次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析システムを構築した。配列決定プロセスの最適化、効率的な遺伝子異常の検出ソフトウェアの構築の開発もおこなった。診断陰性の検体を拠点研究機関(東京大学神経内科)において、大規模エクソーム解析を行い、DNA 配列情報をもとに既知および新規の原因の同定を行った。また、ミトコンドリア病など希少性神経疾患に対して鹿児島大学でエクソーム解析を行った。また、多因子遺伝病や HAM などの非遺伝性疾患の感受性遺伝子の同定を行った。

## 5. 単一遺伝子病の新規遺伝的原因の同定

遺伝子診断の陰性例については、次世代ゲノムシーケンサーを用いた包括的ゲノム解析、主としてエクソーム解析により行った。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 ESVD (Exome-based Shared Variants Detection) システムを開発し、抽出を容易にした。

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

遺伝性白質脳症には遺伝性脳小血管病を基盤とする CADASIL、CARASIL、ファブリー病、白質変性を基盤とする Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids、那須ハコラ病、アレキサンダー病等があるが、画像的には類似するにも関わらず、小血管病変、白質変性と別個の観点から検討されている。我々は CADASIL、アレキサンダー病の遺伝診断依頼例の中に白質脳症の家族歴があるにもかかわらず既知の遺伝子異常を認めなかった多数の症例を認めたことから、これらの未同定の白質脳症の検討を行った。

遺伝性白質脳症には遺伝性脳小血管病を基盤とする CADASIL、CARASIL、ファブリー病、白質変性を基盤とする Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids、那須ハコラ病、アレキサンダー病等があるが、画像的には類似するにも関わらず、小血管病変、白質変性と別個の観点から検討されている。我々は CADASIL、アレキサンダー病の遺伝診断依頼例の中に白質脳症の家族歴があるにもかかわらず既知の遺伝子異常を認めなかった多数の症例を認めたことから、これらの未同定の白質脳症の検討を行った。細胞内封入体病など家族性の疾患についてマイクロアレイでマッピングし、候補領域の全ゲノムの塩基配列を次世代ゲノムシーケンシング法で決定し、その遺伝情報に基づいて遺伝的原因を同定する。また、その他の遺伝子学的手法も幅広く用いる。

## 7. CMT 患者 iPS 細胞作成と病態解明

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

## 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。

### HAM の病態解析

HTLV-I 感染細胞を生きた状態で同定するため、実験系を樹立し各種抗 Env 抗体を用い、HAM 患者の末梢血リンパ球を用いて時間経過による Env 蛋白の発現を検討した。

HAM 由来の検体を用いて感染細胞外側に O 型糖鎖や、糖鎖と結合するレクチンの一種で HTLV-1 Tax 誘導性の高発現分子 galectin-3 と HTLV-1 p19Gag との共局を解析した。また、TaxA を持つ感染者は TaxB を持つ感染者と比較して、HAM 発症の Odds が約 2 倍高いことが報告されているが、本研究では、ウイルス型を決定した合計 77 例の HAM 患者について各症例の PBMC 1 個あたりの HBZ、Tax および FoxP3 mRNA 発現を定量し、ウイルス型、HTLV-1 PVL との関連を解析した。

Lectin array により、HAM、AC、NC 各 4 例由来の CD4+T 細胞の膜蛋白を CD4+T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec)、TM-PEK ProteoExtract Transmembrane Extraction Kit (Novagen) で精製し、LecChip ver1.0 (GP Bioscience) のプロトコールに従い糖鎖のシグナルを決定した。

### (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。CMT1084 例の解析で 275 名の原因遺伝子を同定した。臨床的に Hereditary Motor and Sensory Neuropathy - proximal (HMSN-P) と考えられ、包括的遺伝子検査は施行せず TFG 遺伝子変異のみを検査して変異を確定した症例が 47 例あった。CMT1A を除いた CMT 及び遺伝性ニューロパチーの原因遺伝子頻度を明らかにした。

## 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 700 検体のエクソーム解析の結果を得た。CMT については、544 例全例にマイクロアレイ DNA チップを用い、28 個の既知の遺伝性ニューロパチーの原因遺伝子の変異スクリーニングを行い、68 例 (12%) に病的変異を同定した。さらに原因未同定 304 例のエクソーム解析にて 88 例 (16%) に既知の遺伝性ニューロパチー関連遺伝子に病的変異を同定した。次に、原因未同定の症例の中から、AR もしくは孤発例の 161 例を選出し、エクソーム解析の変異データから、ESVD システムを用いて 2 症例以上で共有する 9 の新規ホモ接合性変異/3 つの遺伝子を抽出した。この 3 つの新規遺伝子 A、B、C はそれぞれ 5 家系、2 家系、2 家系ずつ遺伝子異常を共有していた。さらに驚くべきことに、3 つの遺伝子異常を有する症例は、それぞれ共通の特徴的な表現型をもつことから AR-CMT の新規原因遺伝子と考えられた。劣性遺伝性 CMT の全くの新規の原因を同時に 8 遺伝子 (特に確認可能な 3 遺伝子) について確認し得た。(特許出願中)。優性遺伝性 CMT についても、新手法で 2 つの新規の原因を同定しつつある。

## CMT 患者 iPS 細胞作成と病態解明

京都府立医科大学と京都大学 iPS 研究所の共同研究で 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

臨床症候及び頭部 MRI 画像などから NIID が疑われた患者に対し、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を行い、核内封入体の有無により NIID を診断した。また、我々は既に NIID の原因遺伝子が存在する候補領域を、染色体 A 上に見いだし、Lod Score 4.96 を示す領域を特定し、その領域を次世代シーケンサー HiSeq 2000、および Agilent 社製の SureSelect キットを用いて全ゲノムおよび全エクソンシーケンスにより解析した。原因解明も近いと考えている。

## HAM のゲノム解析による感受性遺伝子の探索

HTLV-I は、発症感受性素因を調べるため、40 例の家族歴のある HAM 検体 40 例、HAM90 例、HTLV-I キャリア 90 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 220 例になった。関連因子抽出プログラムで疾患感受性因子を同定し得たが、その確認のためセカンドサンプルでオッズレシオなども含めて様々な手法で解析中である。エクソーム解析を用いた感受性因子の同定は、これまで行われたことがなく、解析手法を試行錯誤しながら一つの感受性遺伝子を同定し、結果が出た。さらに多くの感受性遺伝子、防御因子の同定を行い、感受性遺伝子ごとに病態解析を予定している。

今回の Env 蛋白検出による方法では生きた状態で感染細胞を検出することが可能となった。今後の生体内 HTLV-1 感染細胞の解析に有用と考えられた。

レクチンアレイ解析により HAM 患者末血 CD4+T 細胞膜蛋白上には N 型糖鎖 N-アセチルラクトサミン (LacNAc) の高発現が示唆された。新たに樹立した Lectin ELISA で確認し、LacNAc 修飾責任遺伝子 B3GnT2 の高発現が原因であることが qRT-PCR で示唆された。

LacNAc 阻害剤かつ小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン(TM) 処理を加えた FCM と qRT-PCR で HTLV-1 感染 CD4+T 細胞は TM 誘導性アポトーシスに感受性であることが推測された。

## D 考察

累計 544 例の CMT もしくは疑い症例を対象にマイクロアレイ DNA チップを用いて網羅的遺伝子解析を実施してきたが、原因を同定できた症例は 68

例で同定率が 12%と低いことが問題となっていた。今回、原因未同定例を対象にエクソーム解析を行い、新たに 88 例で原因を同定することができ、全体の同定率は 27% (1084 例中 275 例) となり、診断率が向上した。個々の症例の遺伝子診断は、遺伝性疾患解明の第一歩であり、今回我々が行ったエクソーム解析による網羅的遺伝子診断の結果は、今後の遺伝子診断の方向性や治療対策などを検討する基礎データになると思われる。

一方、原因未同定の症例も未だ多くを占めるが、新規候補遺伝子を効率よく同定するために開発した ESVD システムは、同時に 3 つの AR-CMT 新規原因遺伝子 (遺伝子 A, B, C [論文投稿中のため遺伝子名は未記載]) を同定に貢献した (その他 4 遺伝子を含む合計 7 遺伝子を同定し、特許取得)。このシステムは、多数例を解析して初めて行いうる手法であるが、他疾患にも応用も可能性であり、今後、CMT 以外の複数の遺伝性疾患の新規原因遺伝子の同定に用いることが出来る。

この 3 遺伝子の機能については既知の報告で明らかになっている。遺伝子 A は Misfolding した異常タンパク質凝集体の処理に関与する蛋白分解酵素であることが分かっており、神経細胞の代謝・処理に関与すると考えられている。遺伝子 B は細胞接着分子であるカドヘリンスーパーファミリーに属する蛋白で、胚発生期において細胞外マトリックスの軸索束形成と調整に重要な役割をもち、神経細胞の分化・維持に関与すると考えられている。遺伝子 C はミトコンドリア膜に存在する蛋白で、膜蛋白のアセンブリや呼吸鎖複合体の酵素活性に関与し、ミトコンドリア機能に関連する遺伝子であることが分かっている。遺伝子診断法の特許を申請中で、JST の海外特許申請の援助が受けられることとなった。

遺伝子診断を年間 700 検体以上行う中で、患者・主治医に結果を返しながら、研究に参加してもらうことで良好な関係を築いた。年々、主治医および患者に、極力迅速に結果が返せるようになっている。

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。

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。

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。

## E. 結論

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

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 CMT の原因を発見した。

④HAM の家系列の集積と臨床像の解析を報告し、HAM 発症関連遺伝子の解析を行った。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 論文発表

(高嶋、松浦、久保田、出雲)

Yoshinaga H, Sakoda S, Shibata T, Akiyama T, Oka M, Yuan JH, **Takashima H**, Takahashi MP, Kitamura T, Murakami N, Kobayashi K Phenotypic Variability in Childhood of Skeletal Muscle Sodium Channelopathies. **Pediatr Neurol**. 2015 Jan 29. pii: S0887-8994

Hashiguchi A, Higuchi Y, Nomura M, Nakamura T, Arata H, Yuan J, Yoshimura A, Okamoto Y, Matsuura E, Takashima H. Neurofilament light mutation causes hereditary motor and sensory neuropathy with pyramidal signs **J Peripher Nerv Syst**. 2014 Dec;19(4):311-6

Nagamine S, Sakoda S, Koide R, Kawata A, Yuan J, **Takashima H**, Nakano I. A case of Andersen-Tawil syndrome presenting periodic paralysis exacerbated by acetazolamide. **J Neurol Sci**. 2014 Dec15;347(1-2):385-6

**Matsuura E, Kubota R**, Tanaka Y, **Takashima H, Izumo S**: Visualization of HTLV-1-specific cytotoxic T lymphocytes in the spinal cords of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neuropath Exp Neurol**. 74(1): 2-14, 2015

Maeda K, Idehara R, Hashiguchi A, **Takashima H**. A family with distal hereditary motor neuropathy and a K141Q mutation of small heat shock protein HSPB1. **Intern Med**. 2014;53(15):1655-8. Epub 2014 Aug 1.

Yuan J, Ando M, Higuchi I, Sakiyama Y, **Matsuura E**, Michizono K, Watanabe O, Nagano S, Inamori Y, Hashiguchi A, Higuchi Y, Yoshimura A, **Takashima H**. Partial deficiency of emerin caused by a splice site mutation in EMD. **Intern Med**. 2014;53(14):1563-8. Epub 2014 Jul 15.

Yonekawa T, Oya Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, **Takashima H**, Sugai K, Sasaki M. Extremely Severe Complicated Spastic Paraplegia 3A With Neonatal Onset **Pediatr Neurol**. 2014 Jul 24. pii: S0887-8994(14)00456-1.

Nozuma S, **Matsuura E**, Matsuzaki T, Watanabe O, **Kubota R, Izumo S, Takashima H**. Familial clusters of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **PLoS One**. 2014 May 6;9(5):e86144. doi: 10.1371/journal.pone.0086144. eCollection 2014

Furukawa Y, Hashiguchi T, Minami R, Yamamoto M, **Takashima H**. Exacerbation of microcytic anemia associated with cessation of anti-retroviral therapy in an HIV-1-infected patient with beta thalassemia. **J Infect Chemother**. 2014 Jun;20(6):387-9

(中川)

中川正法. Charcot-Marie-Tooth 病の診療ポイント. **臨床神経**54 : 950-952, 2014

Sekiguchi T, Kanouchi T, Shibuya K, Noto Y, Yagi Y, Inaba A, Abe K, Misawa S, Orimo S, Kobayashi T, Kamata T, **Nakagawa M**, Kuwabara S, Mizusawa H, Yokota T. Spreading of amyotrophic lateral sclerosis lesions—multifocal hits and local propagation? **J Neurol Neurosurg Psychiatry**85.; 85-91, 2014.

Tamura A, Kasai T, Akazawa K, Nagakane Y, Yoshida T, Fujiwara Y, Kuriyama N, Yamada K, Mizuno T, **Nakagawa M**. Long insular artery infarction: characteristics of a previously unrecognized entity. **Am J Neuroradiol** 35:466-471, 2014

Kuriyama N, Mizuno T, Kita M, Yamada K, Ozaki E, Matsumoto S, Takada A, Watanabe A, Kasai T, Nagakane Y, Mitani S, Matsui D, Watanabe I, Takeda K, **Nakagawa M**, Watanabe Y. TGF-beta1 is associated with the progression of intracranial deep white matter lesions: a pilot study with 5 years of magnetic resonance imaging follow-up. **Neurological Research**. 36, 47-52, 2014.

Azuma Y, Tokuda T, Shimamura M, Kyotani A, Sasayama H, Yoshida T, Mizuta I, **Mizuno T, Nakagawa M**, Fujikake N, Ueyama M, Nagai Y, Yamaguchi M. Identification of ter94, Drosophila VCP, as a strong modulator of motor neuron degeneration induced by knockdown of Caz, Drosophila FUS. **Human Molecular Genetics**. 23(13) 3467-3480, 2014.

Itoh K, Kasai T, Tsuji Y, Saito K, Mizuta I, Harada Y, Sudoh S, **Mizuno T, Nakagawa M**, Fushiki D. Definite familial multiple system atrophy with unknown genetics. **Neuropathology** 2014; 34, 309–313.

Taguchi K, Watanabe Y, Tsujimura A, Tatebe H, Miyata S, Tokuda T, **Mizuno T**, Tanaka M. Differential expression of alpha-synuclein in hippocampal neurons. **PLoS ONE** 01/2014; 9(2):e89327.

Shimamura M, Kyotania A, Azuma Y, Yoshida H, Nguyena TB, Mizuta I, Yoshida T, **Mizuno T, Nakagawa M**, Tokuda T, Yamaguchi M. Genetic link between Cabeza, a Drosophila homologue of Fused in Sarcoma (FUS), and the EGFR signaling pathway. **EXPERIMENTAL CELL RESEARCH** 326 (2014) 36 – 45

Kitani-Morii F, Kasai T, Tomonaga K, Saito K, Mizuta I, Yoshioka A, Nakagawa M, **Mizuno T**. Hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids characterized by spastic hemiplegia preceding mental impairment. **Intern Med.** 2014;53(12):1377-80.

Isayama R, Shiga K, Seo K, Azuma Y, Araki Y, Hamano A, Takezawa H, Kuriyama N, Takezawa N, **Mizuno T, Nakagawa M**. Sixty six-month follow-up of muscle power and respiratory function in a case with adult-type Pompe disease treated with enzyme replacement therapy. **J Clin Neuromuscul Dis.** 2014 Jun;15(4):152-6.

Kasai T, Tokuda T, Ishii R, Ishigami N, Tsuboi Y, **Nakagawa M, Mizuno T**, El-Agnaf OM. Increased  $\alpha$ -synuclein levels in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. **J Neurol.** 2014 Jun;261(6):1203-9.

Yamada T, Itoh K, Matsuo K, Yamamoto Y, Hosokawa Y, Koizumi T, Shiga K, **Mizuno T, Nakagawa M**, Fushiki S. Concomitant alpha-synuclein pathology in an autopsy case of amyotrophic lateral sclerosis presenting with orthostatic hypotension and cardiac arrests. **Neuropathology.** 2014 Apr;34(2):164-9.

Noto Y, Shiga K, Tsuji Y, Kondo M, Tokuda T, **Mizuno T, Nakagawa M**. Contrasting echogenicity in flexor digitorum profundus-flexor carpi ulnaris: a diagnostic ultrasound pattern in sporadic inclusion body myositis. **Muscle Nerve.** 2014 May;49(5):745-8.

Noto YI, Shiga K, Tsuji Y, Mizuta I, Higuchi Y, Hashiguchi A, **Takashima H, Nakagawa M, Mizuno T**. Nerve ultrasound depicts peripheral nerve enlargement in patients with genetically distinct Charcot-Marie-Tooth disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2014.

(野元、永井)

Iwaki H, Nishikawa N, **Nagai M**, Tsujii T, Yabe H, Kubo M, Ieiri I, **Nomoto M**. Pharmacokinetics of levodopa/benserazide versus levodopa/carbidopa in healthy subjects and patients with Parkinson's disease **Neurology and Clinical Neuroscience**, 1–6

(山野)

Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, **Yamano Y**. HLV-1 induces a Th1-like

state in CD4+CCR4+ T cells. **J Clin Invest.** 124(8):3431-3442, 2014.

Yamauchi J, Coler-Reilly A, Sato T, Araya N, Yagishita N, Ando H, Kunitomo Y, Takahashi K, Tanaka Y, Shibagaki Y, Nishioka K, Nakajima T, Hasegawa Y, Utsunomiya A, Kimura K, **Yamano Y**. Mogamulizumab, an anti-CCR4 antibody, targets human T-lymphotropic virus type 1-infected CD8+ and CD4+ T cells to treat associated myelopathy. **J Infect Dis.** 2015 .

Coler-Reilly A, Ando H, **Yamano Y**. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in human T lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Clinical and Experimental Neuroimmunology**, 5(108-109), 2014.

(祖父江)

Kitagawa N, Sone J, **Sobue G**, Kuroda M, Sakurai M: Neuronal intranuclear inclusion disease presenting with resting tremor. **Case Reports in Neurology**, 6(2) :176-180, 2014.

(齊藤)

**Saito M**. Neuroimmunological aspects of human T cell leukemia virus type 1- associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neurovirol.** 20(2):164-174, 2014.

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.** 30(6):542-552, 2014.

**Saito M**. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into Th17 cells: is this also the case for multiple sclerosis? **Clin Exp Neuroimmunol.** 5(2):112–113, 2014.

**Saito M**, Tanaka R, Fujii H, Kodama A, Takahashi Y, Matsuzaki T, **Takashima H**, Tanaka Y. The neutralizing function of the anti-HTLV-1 antibody is essential in preventing in vivo transmission of HTLV-1 to human T cells in NOD-SCID/ $\gamma$ cnnull (NOG) mice. **Retrovirology.** 11(1):74, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(国内特許出願中)

知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

特許出願中 斎藤峰輝

【発明の名称】 ヒトT細胞白血病ウイルスHBZ蛋白質の検出方法

1 特許取得

特願 2014-250359 (2014年12月10日受付)

特許出願中 高嶋 博

2014年5月遺伝性疾患の検出方法として出願  
(特願 2014-093044) (国内特許出願中、JST 国際  
特許申請採択)

2 実用新案登録 特になし

認知症 (新規感染性脳炎) の新規治療薬

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等克服研究事業  
（難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)））

委託業務成果報告（業務項目）

Charcot-Marie-Tooth 病の網羅的遺伝子解析と新規原因遺伝子の同定

担当責任者 高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 神経内科・老年病学

研究要旨

大規模な数の Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) 患者を対象にマイクロアレイ解析およびエクソーム解析を実施し、本邦の遺伝性ニューロパチーの分子疫学および疾患原因別頻度を明らかにした。また、原因未同定の症例から複数の症例間で共有する新規のホモ接合性変異を抽出することで常染色体劣性遺伝型 CMT の新規原因遺伝子を 3 つ同定した。

A. 研究目的

Charcot-Marie-Tooth 病 (CMT) は臨床的にも遺伝的にも多様な疾患であり、これまで 40 以上の原因遺伝子が同定されているが、これらの変異陽性率は半数以下であり、未知の原因遺伝子が多数存在すると考えられている。本研究の目的は、大規模な数の CMT 患者を対象にマイクロアレイ解析およびエクソーム解析による網羅的な遺伝子解析を行い、本邦の遺伝性ニューロパチーの分子疫学および疾患原因別頻度を明らかにすることである。また、さらに原因未同定患者から常染色体劣性遺伝型 CMT (AR-CMT) の新規遺伝子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

2007 年 4 月から 2012 年 4 月まで、当院および全国の医療機関から、臨床症状や電気生理学的検査所見、末梢神経組織像などから、CMT と臨床診断された症例

もしくはその疑い例、累計 544 例を対象にマイクロアレイ法で 28 個の CMT 既知原因遺伝子の変異解析を実施し病的変異を検出した。次に陰性であった原因未同定の症例 304 例にエクソーム解析を行い、既知の遺伝性ニューロパチー関連遺伝子 (165 遺伝子) の変異解析を実施し病的変異を検出した。エクソーム解析は、HiSeq2000 (Illumina, San Diego, California) でシーケンシングを行い、二次解析ツールには BWA、Samtools を利用した。さらに我々は 304 例の中から、家族歴をもとに AR もしくは孤発例の症例 161 例を選出し、複数の症例間で共有し、病的性が強いと考えられるホモ接合性変異 (ナンセンス変異、スプライス部位変異、ミスセンス変異) を抽出することで AR-CMT の候補遺伝子を絞り込んだ。その過程で、我々は候補遺伝子を効率的に絞り込むための解析ツール ESVD (Exome-based Shared Variants

Detection)システムを開発した。

(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、鹿児島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、使用目的（遺伝性神経疾患の遺伝子診断検査、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全員に十分に説明し、文書で遺伝子検査に関する同意書を得ている。

### C. 研究結果

544 例全例にマイクロアレイ DNA チップを用い、28 個の既知の遺伝性ニューロパチーの原因遺伝子の変異スクリーニングを行い、68 例 (12%)に病的変異を同定した。さらに原因未同定 304 例のエクソーム解析にて 88 例 (16%)に既知の遺伝性ニューロパチー関連遺伝子に病的変異を同定した。次に、原因未同定の症例の中から、AR もしくは孤発例の 161 例を選出し、エクソーム解析の変異データから、ESVD システムを用いて 2 症例以上で共有する 9 の新規ホモ接合性変異/3 つの遺伝子を抽出した。この 3 つの新規遺伝子 A、B、C はそれぞれ 5 家系、2 家系、2 家系ずつ遺伝子異常を共有していた。さらに驚くべきことに、3 つの遺伝子異常を有する症例は、それぞれ共通の特徴的な表現型をもつことから AR-CMT の新規原因遺伝子と考えられた。

### D. 考察

当教室では累計 544 例の CMT もしくは疑い症例を対象にマイクロアレイ DNA

チップを用いて網羅的遺伝子解析を実施してきたが、原因を同定できた症例は 68 例で同定率が 12%と低いことが問題となっていた。今回、原因未同定例を対象にエクソーム解析を行い、新たに 88 例で原因を同定することができ、全体の同定率は 28% (544 例中 151 例) となり、診断率が向上した。個々の症例の遺伝子診断は、遺伝性疾患解明の第一歩であり、今回我々が行ったエクソーム解析による網羅的遺伝子診断の結果は、今後の遺伝子診断の方向性や治療対策などを検討する基礎データになると思われる。

一方、原因未同定の症例も未だ多くを占めるが、新規候補遺伝子を効率よく同定するために開発した ESVD システムは、同時に 3 つの AR-CMT 新規原因遺伝子 (遺伝子 A, B, C [論文投稿中のため遺伝子名は未記載]) を同定に貢献した (その他 4 遺伝子を含む合計 7 遺伝子を同定し、特許取得)。このシステムは、多数例を解析して初めて行いうる手法であるが、他疾患にも応用も可能性であり、今後、CMT 以外の複数の遺伝性疾患の新規原因遺伝子の同定に用いることが出来る。

この 3 遺伝子の機能については既知の報告で明らかになっている。遺伝子 A は Misfolding した異常タンパク質凝集体の処理に関与する蛋白分解酵素であることが分かっており、神経細胞の代謝・処理に関与すると考えられている。遺伝子 B は細胞接着分子であるカドヘリンスーパーファミリーに属する蛋白で、胚発生期において細胞外マトリックスの軸索束形成と調整に重要な役割をもち、神経細胞の分化・維持に関与すると考えられてい

る。遺伝子 C はミトコンドリア膜に存在する蛋白で、膜蛋白のアセンブリや呼吸鎖複合体の酵素活性に関与し、ミトコンドリア機能に関連する遺伝子であることが分かっている。

#### E. 結論

大規模な数のエクソーム解析から、本邦の遺伝性ニューロパチーの分子疫学を明らかにし、3つのAR-CMTの新規原因遺伝子を同定した。これらの遺伝子の機能はそれぞれ、異常タンパク質の処理、軸索形成・神経突起の伸長、ミトコンドリア機能に関与していることが分かっている。本研究の結果はCMTの分子病態のさらなる理解や新しい治療法の開発に寄与すると考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 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 Feb;13(1):77-82.
2. Saiga T, Tateishi T, Torii T, Kawamura N, Nagara Y, Shigeto H, Hashiguchi A, Takashima H, Honda H, Ohyagi Y, Kira J. Inflammatory radiculoneuropathy in an ALS4 patient with a novel SETX mutation. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2012 Jul;83(7):763-4.
3. 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 dominant distal hereditary motor neuropathy. **Neurology**. 2012 May 22;78(21):1644-9.
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 30;80(18):1641-9.
6. Mitsui J, Ishiura H, Takashima H, Tsuji S, et al (73人中3番, 23番 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. 2013 Jun 12.
7. Yuan J, Ando M, Higuchi I, Sakiyama Y, Matsuura E, Michizono K, Watanabe O, Nagano S, Inamori Y, Hashiguchi A, Higuchi Y, Yoshimura A, Takashima H. Partial deficiency of emerin caused by a splice site mutation in EMD. **Intern Med**. 53(14):1563-8. 2014
8. Maeda K, Idehara R, Hashiguchi A, Takashima H. A family with distal hereditary motor neuropathy and a K141Q mutation of small heat shock protein HSPB1. **Intern Med**. 53(15):1655-8. 2014
9. Noto YI, Shiga K, Tsuji Y, Mizuta I, Higuchi Y, Hashiguchi A, Takashima H, Nakagawa M, Mizuno T. Nerve ultrasound depicts peripheral nerve enlargement in patients with genetically distinct Charcot-Marie-Tooth disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2014 Aug 4. [Epub ahead of print]
10. Yamashita S, Mori A, Nishida Y, Kurisaki R, Tawara N, Nishikami T,

- Misumi Y, Ueyama H, Imamura S, Higuchi Y, Hashiguchi A, Higuchi I, Morishita S, Yoshimura J, Uchino M, Takashima H, Tsuji S, Ando Y. Clinicopathological features of the first Asian family having vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy due to a MATR3 mutation. **Neuropathol Appl Neurobiol.** 2014 Sep 4. [Epub ahead of print]
11. Yonekawa T, Oya Y, Higuchi Y, Hashiguchi A, Takashima H, Sugai K, Sasaki M. Extremely severe complicated spastic paraplegia 3A with neonatal onset. **Pediatr Neurol.** 51(5):726-9. 2014
  12. Kawakami N, Komatsu K, Yamashita H, Uemura K, Oka N, Takashima H, Takahashi R. A novel mutation in glycyl-tRNA synthetase caused Charcot-Marie-Tooth disease type 2D with facial and respiratory muscle involvement. **Rinsho Shinkeigaku.** 54(11):911-5. 2014
  13. Horinouchi S, Deguchi T, Arimura K, Arimura A, Dochi Y, Uto T, Nakamura T, Arimura Y, Nishio Y, Takashima H. Median neuropathy at the wrist as an early manifestation of diabetic neuropathy. **J Diabetes Investig.** 5(6):709-13, 2014
  14. Higuchi Y, Hashiguchi A, Yuan J, Yoshimura A, Nakamura T, Okamoto Y, Mitsui J, Tsuji S, Takashima H. 臨床的に Charcot-Marie-Tooth 病が疑われた 304 例のエクソーム解析による網羅的遺伝子診断 **Peripheral Nerve** 25(1), 93-99, 2014
  15. Hashiguchi A, Higuchi Y, Nomura M, Nakamura T, Arata H, Yuan J, Yoshimura A, Okamoto Y, Matsuura E, Takashima H. Neurofilament light mutation causes hereditary motor and sensory neuropathy with pyramidal signs. **J Peripher Nerv Syst.** [Epub ahead of print] 2015.
2. 学会発表
1. 高嶋 博 遺伝性運動性・感覚性・自律神経性ニューロパチーの臨床 第 55 回日本神経学会学術大会、2014、福岡
  2. 橋口昭大、吉村明子、樋口雄二郎、中村友紀、岡本裕嗣、松浦英治、高嶋 博 次世代シーケンサーを用いた Charcot-Marie-Tooth 病の包括的遺伝子診断 第 55 回日本神経学会学術大会(2014)、福岡
  3. 石原 聡、田邊 肇、吉村明子、袁 軍輝、樋口雄二郎、橋口昭大、岡本裕嗣、石浦浩之、三井 純、辻 省次、高嶋 博 Charcot-Marie-Tooth 病におけるニューロフィラメント関連の新規原因遺伝子同定の試み 第 55 回日本神経学会学術大会(2014)、福岡
  4. 田邊 肇、石原 聡、吉村明子、袁 軍輝、樋口雄二郎、橋口昭大、岡本裕嗣、石浦浩之、三井 純、辻 省次、高嶋 博 Charcot-Marie-Tooth 病におけるミエリン関連蛋白由来の新規原因遺伝子の探索 第 55 回日本神経学会学術大会(2014)、福岡
  5. 橋口昭大、吉村明子、樋口雄二郎、中村友紀、岡本裕嗣、松浦英治、高嶋 博 次世代シーケンサーを利用した Charcot-Marie-Tooth 病の包括的遺伝子診断 日本人類遺伝学会第 59 回大会 日本遺伝子診療学会第 21 回大会(2014)、東京
  6. 吉村明子、橋口昭大、樋口雄二郎、袁 軍輝、中村友紀、岡本裕嗣、高嶋 博 シャルコー・マリー・トゥース病の網羅的遺伝子診断 日本人類遺伝学会第 59 回大会 日本遺伝子診療学会第 21 回大会(2014)、東京

7. 樋口雄二郎, 橋口昭大, 袁軍輝, 石原聡, 田邊肇, 吉村明子, 中村友紀, 岡本裕嗣, 吉村淳, 土井晃一郎, 森下真一, 石浦浩之, 三井純, 辻省次, 高嶋博 臨床的に Charcot-Marie-Tooth 病が疑われた 304 例のエクソーム解析による網羅的遺伝子診断 日本人類遺伝学会第 59 回大会 日本遺伝子診療学会第 21 回大会(2014)、東京
  8. 田邊 肇、石原 聡、吉村明子、袁 軍輝、樋口雄二郎、橋口昭大、岡本裕嗣、石浦浩之、三井 純、辻 省次、高嶋 博 Charcot-Marie-Tooth 病におけるミエリン関連蛋白を中心とした新規遺伝子探索の試み 日本人類遺伝学会第 59 回大会 日本遺伝子診療学会第 21 回大会(2014)、東京
  9. 石原 聡、田邊 肇、吉村明子、袁 軍輝、樋口雄二郎、橋口昭大、岡本裕嗣、石浦浩之、三井 純、辻 省次、高嶋 博 ニューロフィラメントに関連した Charcot-Marie-Tooth 病の新規原因遺伝子同定の試み 日本人類遺伝学会第 59 回大会 日本遺伝子診療学会第 21 回大会(2014)、東京
  10. 岡本 裕嗣 遺伝性ニューロパチーの治療とその分子メカニズムシンポジウム2 「末梢神経障害の分子病態」 第 25 回日本末梢神経学会学術集会(2014)、京都
  11. 橋口昭大、吉村明子 樋口雄二郎、中村友紀、岡本裕嗣、松浦英治、高嶋 博 軸索型 Charcot-Marie-Tooth 病の包括的遺伝子診断 第 25 回日本末梢神経学会学術集会(2014)、京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定含)
1. 特許取得  
7つの CMT 新規原因遺伝子の同定および遺伝子診断への応用  
(国内特許取得、 国際特許準備中)
  2. 実用新案登録 特になし
  3. その他 特になし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等克服研究事業  
（難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)））  
委託業務成果報告（業務項目）

HAM 患者 CD4+T 細胞の小胞体ストレスを介したツニカマイシン誘導性アポトーシス

担当責任者 出雲 周二 鹿児島大学大学院医歯学総合科難治ウイルス病態制御研分子病理  
共同研究者 児玉 大介 久保田 龍二 所属 同上  
松崎 敏男 医療法人三州会大勝病院神経内科  
高嶋 博 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学

研究要旨： HAM 患者末血 CD4+T 細胞膜蛋白上には N 型糖鎖 N-アセチルラクトサミン (LacNAc) の高発現がレクチンアレイで示唆された。新たに樹立した Lectin ELISA で確認し、LacNAc 修飾責任遺伝子 B3GnT2 の高発現が原因であることが qRT-PCR で示唆された。さらに LacNAc 阻害剤かつ小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン(TM)処理を加えた FCM と qRT-PCR で HTLV-1 感染 CD4+T 細胞は TM 誘導性アポトーシスに感受性であることが推測された。HAM の新たな治療法となる可能性が考えられる。

A. 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症(HAM)にはウイルス量や感染細胞数を減らす有効な治療法が確立されておらず、患者は日常生活に介護が必要となるなど社会的経済的に損失が大きい。このため HTLV-1 のウイルス生活環の様々な標的に対し抗ウイルス薬探索の試みが続けられている。我々は翻訳後修飾関連遺伝子探索のため HAM 患者末血 CD4+T 細胞膜蛋白上の糖鎖を Lectin array で解析し、UDA・STL (N-グリカン) のリガンド、N-acetyllactosamine(LacNAc) が有意に高発現していることを少数例で見出した。そこで Lectin ELISA を樹立し多数例での確認、LacNAc 修飾責任遺伝子  $\beta$ 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 (B3GnT2)の発現解析を行った。さらに LacNAc の病的意義の検討のため、LacNAc を含む N-グリカン生合成阻害剤 かつ小胞体(ER)ストレス性アポトーシス誘導剤である Tunicamycin (TM) 曝露下に HAM 患者 CD4+T 細胞を培養し、Flow-cytometry(FCM) 解析を行った。近年ウイルス感染による小胞体ストレスが知られるようになったが HTLV-1 と小胞体ストレスの関連はまだ知られていない。そこで HAM 患者 CD4+T 細胞での小胞体ストレスも検討した。

B. 研究方法

1) 研究対象：鹿児島大学病院、医療法人三州会大勝病院神経内科で HAM の WHO 診断基準に基づき診断された HAM、無症候性キャリア(AC)、陰性対照者(NC) 各 14 例の書面にて説明と同意下に採

取・凍結保存した末梢血単核球(PBMC)を用いた。

2) Lectin array : HAM、AC、NC 各 4 例由来の CD4+T 細胞の膜蛋白を CD4+T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec)、TM-PEK ProteoExtract Transmembrane Extraction Kit(Novagen) で精製し LecChip ver1.0 (GP Bioscience)のプロトコールに従い糖鎖のシグナルを決定した。

3) Lectin ELISA : HAM、AC、NC 各 10 例由来の膜蛋白を Lectin (STL) coated Microwell Strips (ALerCHEK)にアプライし、検出系としてビオチン化 UDA(EY Labs)、Alexa Fluor488 Streptavidin conjugate (Life Technologies) を用いて最適化し蛍光法で測定した。

4) FCM 解析 : HAM、NC 各 5 例の PBMC を TM2  $\mu$ M 処理+/-で 24 時間培養し、LacNAc を標的として DyLight488 Conjugate Solanum tuberosum (potato)-STA (EY Labs)、CD4、Tax に対しては各々 CD4-PC5 (Beckman -Colter)、Lt-4 抗体および二次抗体として Gt-F(ab')<sub>2</sub>-anti-mouse IgG3-RPE (Southern Biotech) で染色し FCM を行った。

5) qRT-PCR(real-time RT-PCR) : HAM、AC、NC 各 10 例由来の total RNA を逆転写し cDNA とし、LacNAc 修飾責任遺伝子 B3GnT2、小胞体ストレス系遺伝子の主要なエフェクターあるいは HTLV-1 との関連が示唆されているものとして

GRP78(HSPA5, BiP)、GRP94(HSP90B1)、XBP1s を標的にプライマーを設計し(表 1)、qRT-PCR を行い、内部対象遺伝子 GAPDH を用いて比較 Ct 法で検討した。

| 標的mRNA |         | プライマー配列(5'→3')           | 参照配列           | Position  |
|--------|---------|--------------------------|----------------|-----------|
| B3GnT2 | Forward | CACCTGGATGAGACATTTC      | 006577.5       | 568-587   |
|        | Reverse | TTCACAGCCATGAGCACCTA     |                |           |
| GRP78  | Forward | AGCTGTAGCGTATGGTGCTG     | NM_005347.4    | 1437-1456 |
|        | Reverse | AAGGGGACATACATCAAGCAGT   |                |           |
| GRP94  | Forward | TCCTATTATGTAATGGAGCAGCAA | NM_003299.1    | 936-959   |
|        | Reverse | GCAGCTTCATCATCAGATCTTC   |                |           |
| XBP1s  | Forward | GCGTAGTCTGGAGCTATGGTA    | NM_001079539.1 | 34-54     |
|        | Reverse | CGACAGAAGCAGAACTTAGGG    |                |           |
| GAPDH  | Forward | GACTAACCCCTGCGCTCTG      | NM_001256799.1 | 109-127   |
|        | Reverse | GCCCAATACGACCAATCAG      |                |           |

表 1. qRT-PCR に用いたプライマー配列

(倫理面への配慮)

臨床検体採取はインフォームドコンセント下に行い、検体は匿名化非連結下で検討した。本研究での検体、遺伝子の検討は鹿児島大学倫理委員会承認下に行われた。

### C. 研究結果

#### 1) HAM の CD4+T 細胞膜蛋白では Galβ1-4 GlcNAc (N-acetyllactosamine, LacNAc) が高発現している

HAM、AC、NC 各群 4 例での Lectin array で LacNAc を特異的に認識するレクチン STL (Solanum tuberosum (potato) lectin)、UDA (Urtica dioica (Stinging nettle) agglutinin) が各々 2 群間/3 群間比較両方で HAM で有意に高信号で (3 群間では各々 P=0.001、0.006)、LacNAc の高発現が示唆された (図 1)。各群 10 例に増やし Lectin ELISA 蛍光法を樹立し検討したところ、3 群間比較で HAM でやはり有意な高発現 (P=0.046) を認めた (図 2)。

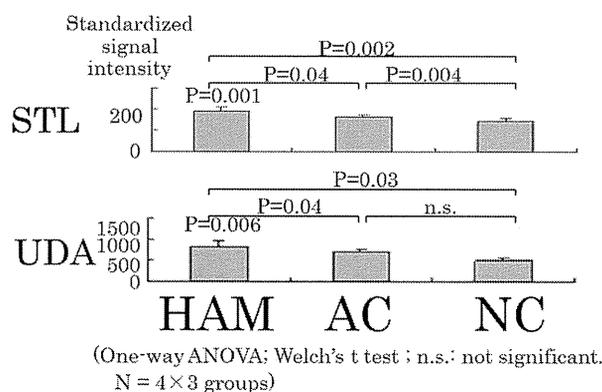


図 1. CD4+T 細胞膜蛋白の糖鎖 (Lectin array)

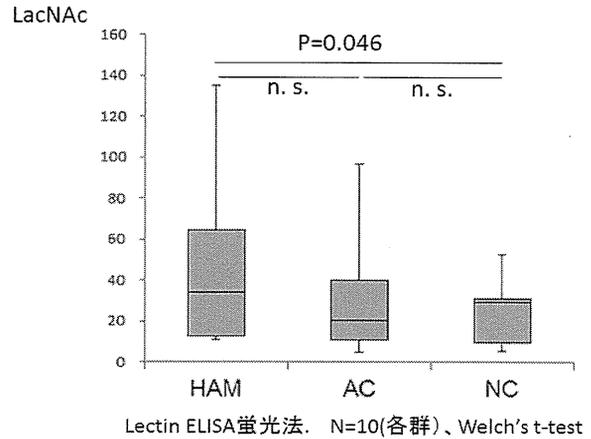
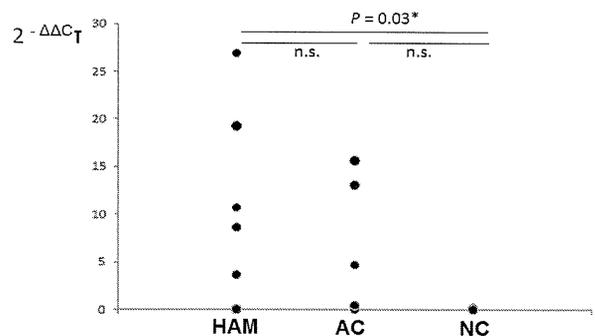


図 2. CD4+T 細胞膜蛋白の LacNAc (Lectin ELISA)

#### 2) HAM の CD4+T 細胞では LacNAc 生合成酵素 B3GnT2 が高発現している

LacNAc 生合成に主に B3GnT2 が関与するとされる。各群 10 例で CD4+T 細胞由来の cDNA を用いて qRT-PCR を行い、HAM で有意に高発現だった (P=0.03 Student t-test)。LacNAc の HAM での高発現は B3GnT2 高発現による (図 3)。



ΔΔC<sub>T</sub> 法による各群 10 例の検討 (内部対照遺伝子 GAPDH)。\* Student t-test. B3GnT2: β1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2

#### 3) HAM で TM2μM 処理すると CD4+T 細胞で LacNAc 陰性細胞は減少し、非感染 Tax 陰性 LacNAc 陽性細胞は生き残る

#### 3) HAM で TM2μM 処理すると CD4+T 細胞で LacNAc 陰性細胞は減少し、非感染 Tax 陰性 LacNAc 陽性細胞は生き残る

HAM の CD4+T 細胞での LacNAc 陽性率は TM2 μM 非処理群に比べ処理群では 9.10 ± 2.88% から 12.36 ± 6.00% と有意な増加 (P=0.017) (mean ± 2SD, Paired t-test)、換言すれば LacNAc 陰性率は TM で有意に減少した。NC では差や傾向はなかった (図 4)。

HAM でさらに Tax 陽性細胞 (感染細胞) での LacNAc 陽性率を検討すると、TM 非処理群 2.70 ±