

1.08%、処理群 $1.32 \pm 1.80\%$ と減少傾向 ($P=0.080$) を認め、一方 Tax 陰性細胞 (非感染細胞) での LacNAc 陽性率は非処理群 $4.90 \pm 1.43\%$ 、処理群 $6.78 \pm 3.04\%$ と有意な増加 ($P=0.008$) を認めた (図 5)。

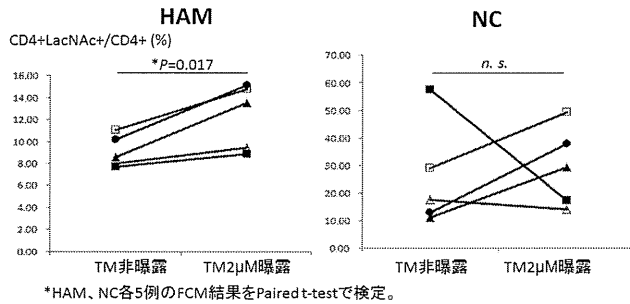


図 4. TM2μM 処理+/-での HAM・NC の CD4+T 細胞の LacNAc 発現率

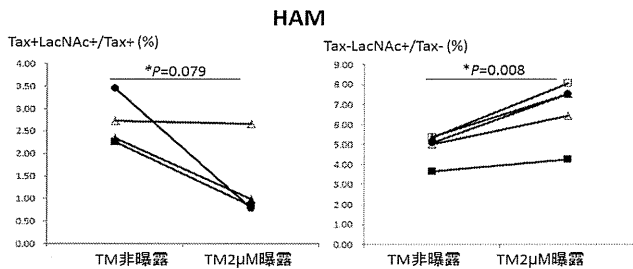


図 5. TM2μM 処理+/-での HAM の感染・非感染 CD4+T 細胞の LacNAc 発現率

4) CD4+T 細胞に HTLV-1 感染すると小胞体ストレス (GRP94 低下) をきたす

TM は N-グリカン合成阻害剤であると同時に小胞体ストレス性アポトーシス誘導剤であることから小胞体ストレス系の主なエフェクター分子である GRP78(HSPA5, BiP)、GRP94(HSP90B1)、XBP1s (spliced variant) の発現を TM 非処理群 CD4+T 細胞で見たところ、HAM、AC では GRP78、XBP1s が NC に比べ低い傾向 (各々 $P=0.34$ 、 0.25 、ANOVA) があったが、GRP94 では HAM、AC では NC に比べ有意に低値 ($P=0.022$) だった (図 6)。

GRP94 の発現量を tax mRNA、HBZ mRNA 発現量で説明可能かどうか回帰分析したところ負の相関の傾向がみられたが有意ではなかった (データは示していない)。

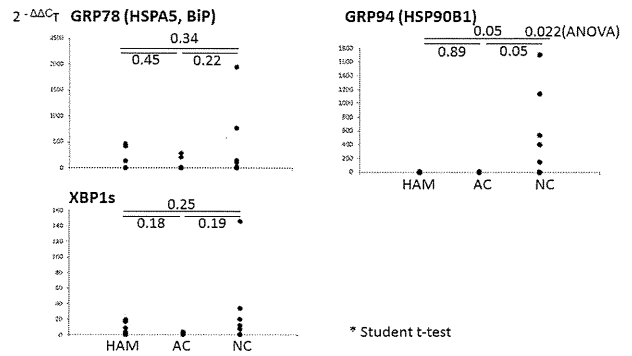


図 6. HAM の CD4+T 細胞における小胞体ストレス遺伝子発現の検討

D. 考察

HAM の CD4+T 細胞の膜蛋白では LacNAc が高発現していることを Lectin array と Lectin ELISA で確認した。LacNAc の特異的リガンドであるセイヨウイラクサレクチン UDA 1μM で HTLV-1 感染細胞株をビトロで処理すると cell-to-cell 感染を完全に阻止することが知られており (Balestrieri E.

Antimicrob Agents Chemother 2008)、感染細胞上の LacNAc と非感染細胞膜上の特異的リガンド Galectin-3 との結合が関与しているのかもしれない。

また HAM 患者 HTLV-1 感染細胞膜外の Extra-cellular virus assembly に ex vivo で O-グリカン、Tax 誘導性 Galectin-3、ウイルス粒子が共局在していることが知られている (Pais-Correia A. Nat Med 2010) が、我々の結果は N-グリカンも HTLV-1 感染に関与することを示唆している。

LacNAc は主に糖鎖転移酵素 B3GnT2 により合成され、CD19、CD28 を修飾し免疫応答時のリンパ球、マクロファージ活性化基礎レベル抑制に関与するとされる (Togayachi A. PNAS 2007)。膜蛋白は細胞膜、小胞体に存在するが、糖鎖修飾は小胞体で行われるので TM で N-グリカン合成を抑制すると蛋白の正常な糖鎖修飾・成熟が阻害され、非折り畳み型蛋白過剰産生により、近年提唱されている小胞体ストレス (Mori K.; Walter P., いずれも Cell 1993) をきたし TM 誘導性アポトーシスを惹起する (Miyake H. J Cell Biochem 2000) と考えられる。

HTLV-1 感染細胞での小胞体ストレスはほとんど知られていない。今回我々は HAM の PBMC を TM 処理すると CD4+LacNAc 陰性 T 細胞は減少し、これは非感染 LacNAc 陽性 T 細胞が生き残るためという結果を得た。これは感染細胞に TM 誘導性小胞体ストレスによるアポトーシスが惹起され、非感染細胞にはこの機序は比較的起こりにくいことを示唆する。

その原因として小胞体ストレス系エフェクターの

遺伝子発現を TM 非処理の状態で検討し、HAM、AC の HTLV-1 感染細胞では正常に比べ GRP94 が低発現という結果を得た。GRP94 は最も豊富なエフェクター分子であるが、感染細胞ではこれが何らかの機序により低いため TM 誘導性アポトーシスに高感受性となっており、TM 処理で減少することが示唆される。GRP94 は ATL で治療薬として検討されている HSP90 阻害剤の標的遺伝子 HSP90 と同じ HSP90 ファミリーに属し興味深い。

E. 結論

1) HAM 患者の HTLV-1 感染 CD4+T 細胞の膜蛋白では LacNAc が高発現しており、何らかの機序で生合成酵素 B3GnT2 が高発現であることに起因している。

2) HAM、AC の HTLV-1 感染 CD4+T 細胞では小胞体ストレス系遺伝子 GRP94 が低発現であり、TM による小胞体ストレス誘導性アポトーシスに高感受性であることが示唆され、治療標的となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 児玉 大介、久保田 龍二、松崎 敏男、高嶋 博、出雲 周二：HAM 患者 CD4+T 細胞表面の N-アセチルラクトサミン-ガレクチン-3 格子は細胞外ウイルス会合体かもしれない。第 19 回日本神経感染症学会総会学術集会・第 26 回日本神経免疫学会学術集会合同学術集会，2014 年 9 月 4 日，金沢市

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定含）

1. 特許取得

HTLV-1 感染 CD4+T 細胞上の N 型糖鎖 N-アセチルラクトサミンを標的とした新規治療法（申請予定）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）

未同定の遺伝性白質脳症に関する研究

担当責任者 中川 正法 京都府立医科大学附属北部医療センター

研究要旨

既知の遺伝子診断依頼症例の中から異常を認めなかった2群の未同定の成人発症遺伝性白質脳症を認めた。1群は橋を主体とする脳小血管病で、もう1群は痙性麻痺、前頭葉機能障害と広範囲の皮質下白質病変を侵す白質脳症であり、独立した疾患単位と考えられた。

研究協力者

水野 敏樹、吉田 誠克、水田 依久子
（京都府立医科大学神経内科学）

床所見、画像上が類似していた2群を抽出して、その臨床画像所見を検討した。
（倫理面への配慮）

京都府立医科大学倫理委員会の承認を得た遺伝性神経疾患に対する遺伝子解析の方法に従って説明し、文書同意を得た上で行った。

A. 研究目的

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、アレク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。

C. 研究結果

臨床的に比較的均一と思われる2群の白質脳症を認めた。一つは Notch3、HTRA1 遺伝子異常が否定され、CADASIL/CARASIL では稀にしか病変を認めない橋に病変を有する15症例を同定した。また血管病変を認めず進行性の痙性麻痺、前頭葉機能低下と MRI でびまん性に T2 高信号を U 線維を含む広範囲な皮質下白質まで認める成人型白質脳症の2家系を見出した。

B. 研究方法

京都府立医科大学神経内科へ遺伝子診断があり既知の遺伝子異常を認めなかった95例を対象として、これらの症例中臨

D. 考察

橋を主体とする遺伝性脳小血管病とし pontine autosomal dominant microangiopathy and

leukoencephalopathy (PADMAL)が報告されており、当科の解析した 15 症例も類似しており、同一の疾患単位の可能性がある。

2 群目は自律神経症状を伴っていた点は adult onset diffuse

leukodystrophy(ADLD)と類似していたが、ADLD の原因遺伝子とされる

LaminB1 遺伝子重複が報告されているが、本症例では認めておらず、新規の独立した疾患単位と考えられる。

E. 結論

未同定の遺伝性白質脳症の 2 群を認め、今後次世代シーケンサーを用いて原因遺伝子同定を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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, Nguyen 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. 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 α -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.* Epub ahead of print.
- 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）

当科における神経変性疾患患者の現況と治療薬開発

担当責任者 永井将弘 愛媛大学医学部附属病院臨床薬理センター

研究要旨

平成 23 年から約 3 年間で愛媛大学医学部附属病院薬物療法・神経内科を受診した神経変性疾患患者を症例データベースから抽出した。その多くはパーキンソン病患者であった。これらの患者を対象としてイノシンをはじめ多くの抗パーキンソン病薬臨床開発にたずさわった。

A. 研究目的

神経変性疾患に対する薬物治療は現況では満足いくものではなく、unmet medical needs に関する調査結果でも該当疾患に対する医薬品の貢献度は低く、その解決が望まれている。今回、当科における神経変性疾患患者の現況と治療薬開発の状況を報告する。

B. 研究方法

効率的な疾患データの解析、検体収集を目的として平成 23 年に症例データベースを構築した。このデータベースを用い、平成 23 年 9 月から平成 26 年 11 月までに愛媛大学医学部附属病院薬物療法・神経内科を受診した神経変性疾患患者を抽出した（今回は認知症、遺伝性末梢神経障害、筋ジストロフィーなどは抽出対象に含めなかった）。

（倫理面への配慮）

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ている。発表の際は個人が特定されないよう配慮する。

C. 研究結果

抽出された神経変性疾患の内訳はパーキンソン病 524 名（女性 308 名、男性 216 名、平均年齢 71.6 才）、多系統萎縮症 23 名（女性 12 名、男性 11 名、平均年齢 68.9 才）、進行性核上性麻痺 14 名（女性 3 名、男性 11 名、平均年齢 70.2 才）、大脳皮質基底核症候群 7 名（女性 4 名、男性 3 名、平均年齢 71.9 才）、脊髄小脳変性症 30 名（女性 12 名、男性 18 名、平均年齢 64.8 才）、筋萎縮性側索硬化症 36 名（女性 16 名、男性 20 名、平均年齢 68.9 才）であった

治療薬開発に関しては、上記疾患のうち、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症患者を被験者とした治験を実施した。特にパーキンソン病治療薬の治験においては当院 Phase I unit を使用して First in human 試験、病態時

薬物動態試験、POC 試験等を実施した。また、自主臨床試験としてパーキンソン病に対するイノシン長期投与の安全性確認試験を行った。

D. 考察

疾患データベース解析の結果、当科を受診している神経変性疾患患者の多くはパーキンソン病患者であった。パーキンソン病薬物治療に関しては、レボドパ製剤をはじめとしたドパミン療法や非ドパミン療法など症候改善効果を目的とした多くの薬剤が開発され、上市されている。しかし、パーキンソン病治療薬においても神経細胞変性を抑制する disease modifying therapy は未だ確立されていない。その他多くの神経変性疾患においては有効な治療薬の開発が進んでいないのが現状である。今後、当科を受診した神経変性疾患患者検体を用い病態解明に取り組み、シーズの開発または既使用薬剤、サプリメントの新しい薬理活性の発見による創薬を推進していきたい。また、治療薬開発を目的とした臨床試験実施の際にも、当院 Phase I unit も活用し、少しでも被験薬の上市につなげたい。

E. 結論

当科受診の神経変性疾患患者の多くはパーキンソン病であった。これらの患者を対象としてイノシンをはじめ多くの抗パーキンソン病薬臨床開発にたずさわった。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Pharmacokinetics of levodopa/benserazide versus levodopa/carbidopa in healthy subjects and patients with Parkinson's disease
H Iwaki, N Nishikawa, M Nagai, T Tsujii, H Yabe, M Kubo, I Ieiri, M Nomoto
Neurology and Clinical Neuroscience 1-6, 2014

2. 学会発表

H Iwaki, M. Kannou, R Andou, H Yabe, T Tsujii, N Nishikawa, M Nagai, M Nomoto.
Serum urate level correlated with the severity of Parkinson's disease
18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders, June.8, 2014. STOCKHOLM

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）

神経変性抑制薬に関する実験的研究

担当責任者 野元正弘 愛媛大学大学院薬物療法・神経内科

研究要旨

体内で最大の活性化酸素スカベンジャーである尿酸を増加させることにより神経変性を抑制させることを目標として、実験的治療を計画した。本年度は尿酸の前駆物質であるアミノ酸のイノシンを投与して、脳内尿酸の増加することを明らかにした。

A. 研究目的

これまでの検討で、血中尿酸値の低いグループではパーキンソン病の有病率が高いことを確認した(Fig 1)。尿酸は細胞死を誘発する活性化酸素に対して、体内での最大のスカベンジャーであり、細胞死を抑制することにより神経変性を予防する可能性が考えられる。このことから動物を用いて尿酸値を上昇させることにより、神経細胞死の抑制を研究する。

B. 研究方法

Wistar rat (n=10) を用いた。脳内の uric acid を上昇させるため、inosine 300mg/kg を経口投与した。脳内動態を検討するため、投与前、投与後、30min, 60min, 90min, 120min, 180min に脳を摘出し、inosine と uric acid の濃度を測定した。Inosine の測定には LC/MS/MS を、uric acid では HPLC を用いた。

(倫理面への配慮)

今回の検討は動物を用いるものであり、愛媛大学医学部動物実験委員会に申請して承認を得て行った。

C. 研究結果

Wistar rat の inosine と uric acid の脳内濃度は、それぞれ、300-500 nmol/g tissue、2-4 μ mol/g tissue であった。Inosine、uric acid とともに投与後 120 min でピークとなり、180 min 後では低下していた(Fig 2)。Inosine も 120min でピークとなった。このことから、inosine の投与で、脳内の uric acid が上昇することが確認された。

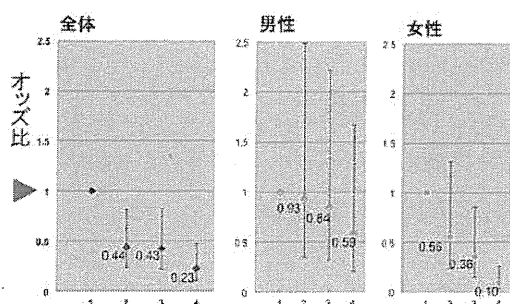


図1. 尿酸値4分位における、全体及び各性別でのオッズ比の変化
男女全体における尿酸4分位(左)及び、女性(中央)、男性(右)それぞれにおける尿酸4分位について、最も血清尿酸値の低い群のPDオッズを1とした時の、各群のオッズ比を示した。中心の点がオッズ比であり、上下の線分の範囲で、95%信頼区間を表した。

Fig 1) 血清尿酸値とパーキンソン病の発症頻度

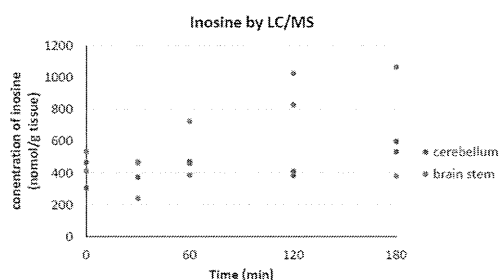


Fig 2 a. Inosine の脳内濃度

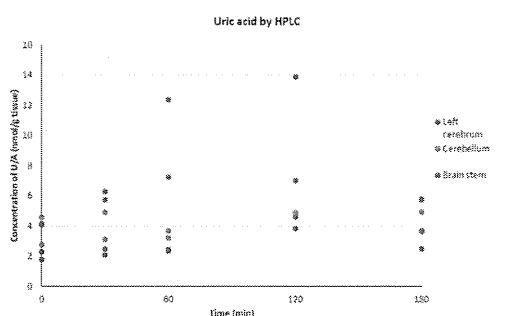


Fig 2 b. Uric Acid の脳内濃度

D. 考察

これまでの研究から血清尿酸の高いグループでは脳神経疾患の頻度は少ない。このことから脳内の尿酸値を上昇させるため、ラットを用いてイノシンの経口投与を行ったところ脳内の尿酸値を上昇させることができた。このことは神経の変性においてもイノシンの服用により、神経変性を抑制できる可能性を示唆する。

E. 結論

Uric acid の神経保護作用を検討するため、前駆物質であるアミノ酸の inosine を rat に投与し、脳内への移行と、脳内 uric acid 濃度の上昇を確認できた。この結果から、inosine 投与によりイノシンを用いて神経変性に対する uric acid の神経保護作用の検討を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Tomoaki Tujii, Win Thiri Kyaw, Hirotaka Iwaki, Noriko Nishikawa, Masahiro Nagai, Madoka Kubo, Masahiro Nomoto : Evaluation of the effect of pregabalin on simulated driving ability using driving simulators. International Journal of General Medicine 7:103-108, 2014..

2) Masahiro Nomoto, Yoshikuni Mizuno, Tomoyoshi Kondo, Kazuko Hasegawa, Miho Murata, Masahiro Takeuchi, Junji Ikeda, Takayuki Tomida, Nobutaka Hattori. Ransdermal rotigotine in advanced Parkinson's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial. J Neurol 261:1887-1893, 2014.

2. 学会発表

1) 辻井智明, 岩城寛尚, 西川典子, 永井将弘, 菅能麻梨子, 久保円, 野元正弘 : パーキンソン病患者における血中ビタミン濃度について. 第 55 回日本神経学会学術大会, 5月 21-24 日, 2014, 福岡.

2) H. Iwaki, M. Kannou, R. Andou, H. Yabe, T. Tsujii, N. Nishikawa, M. Nagai and M. Nomoto. Serum urate level correlated with the severity of Parkinson's disease. 18th International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. June. 8-12, 2014, Stockholm.

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）

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

担当責任者 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 では HTLV-1 プロウイルス量が大きく、その治療法確立には HTLV-1 感染細胞の除去が重要と考えられるが、流血中の感染細胞はウイルス蛋白をほとんど産生しないため感染細胞の同定は困難である。本研究では、末梢血リンパ球を数時間培養し抗 Env 抗体を用いて細胞表面を染色することで、感染細胞を生きた状態で同定することを目的とした。各種抗 Env 抗体をカクテルとし、細胞濃度を $1 \times 10^6/4\text{ml}$ にすることで検出感度が上昇し 18 時間で HTLV-1 感染細胞の検出ピークを認めた。今回の Env 蛋白検出による方法で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。

A. 研究目的

HAM では HTLV-1 プロウイルス量が大きく、その治療法確立には HTLV-1 感染細胞の除去が重要と考えられる。流血中の感染細胞はウイルス蛋白をほとんど産生しないため感染細胞の同定は困難である。末梢血リンパ球を数時間培養し抗 Env 抗体を用いて細胞表面を染色することで、感染細胞を生きた状態で同定できるような実験系を樹立し、感染細胞特異的分子同定の基礎となることを目的とした。

B. 研究方法

各種抗 Env 抗体を用い、HTLV-1 感染細胞株 MT-2 を用いて感度よく Env 蛋白を検出する抗体を選択した。次にこれ

らの抗体を用い、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。次に細胞濃度を変えて Env 蛋白の発現を検討した。

（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

各種抗 Env 抗体の HTLV-1 感染細胞の検出は弱かったが、カクテルにて使用することで検出感度の上昇を認めた。 $1 \times 10^6/200\text{ul}$ の培養では 6-8 時間で Env 蛋白検出のピークを認めた。ウイルス蛋白

白を発現した細胞は CTL に killing される可能性があるため細胞希釈を行ったところ、 $1 \times 10^6/4\text{ml}$ ($0.25 \times 10^5/\text{ml}$) で検出感度が上昇した。さらにこの細胞濃度での時間経過では 18 時間で検出ピークを認めた。

D. 考察

Env 蛋白の発現は 18 時間にピークを認め、Tax 蛋白の発現のピークである 8 時間より発現が遅延しており、HTLV-1 感染細胞内でのウイルス蛋白の発現順序には違いがあることが示唆された。細胞培養で細胞濃度を $0.25 \times 10^5/\text{ml}$ として細胞が接触しない程度の濃度にするると、感染細胞の検出感度が上昇した。このことは、数時間の培養でも HTLV-1 感染細胞がウイルス抗原を産生すると、PBMC 中の CTL によって排除されることが示唆された。今までの Tax 蛋白の染色による HTLV-1 感染細胞の同定では、Tax は細胞内蛋白であるため、染色過程で細胞膜の固定が必要で死んだ細胞でしか感染細胞を検出できなかったが、今回の Env 蛋白の染色法では生きた状態で検出することが可能となった。今後 DNA マイクロアレイ解析などを行いた感染細胞に特異的な分子の同定や、機能分子の解析などに有用であると考えられた。

E. 結論

末梢血中 HTLV-1 感染細胞を短時間培養することで、細胞内 Tax 蛋白と別に、表面の Env 蛋白を抗体で検出できるようになった。Tax 蛋白検出では HTLV-1 感染非生存細胞の検出となるが、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。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 9(5):e86144, 2014

2) 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

2. 学会発表

1) 久保田龍二、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二：HAM における HTLV-1 HBZ 特異的 CTL の検出。第 55 回日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 福岡

2) 児玉大介、出雲公子、久保田龍二、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二：HTLV-1 感染細胞のウイルスアセンブリは N-アセチルラクタサミンとガレクチン-3 である。第 55 回日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 福岡

3) 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: HAM 患者の筋力低下パターンの検討。第 55 回日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 福岡

4) 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: エクソーム解析による HAM 疾患感受性遺伝子の探索。第 55 回日本神経学会学術大会。2014 年 5 月 福岡

5) 久保田龍二、齊藤峰輝、高嶋 博、出雲周二: HAM における HTLV-1 抗原遺伝子変異と CTL 認識。第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会。2014 年 8 月、東京。

6) 久保田龍二、松崎敏男、高嶋 博、出雲周二: HTLV-1 HBZ 特異的 CTL のエピトープ同定と HAM における検出。第 19 回日本神経感染症学会学術集会。2014 年 9 月、金沢

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
特記事項なし。

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）

遺伝性神経疾患の遺伝子解析に基づく病態解明

担当責任者 祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科

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た結果、近年生前に NIID と診断される症例が顕著に増加してきている。NIID の原因を究明し有効な治療法を確立すべく、臨床像の確立および原因遺伝子探索を進めている。

A. 研究目的

我々は Neuronal intranuclear inclusion disease (NIID:エオジン好性核内封入体病)の大家系について、臨床・病理所見を報告し、皮膚生検により診断が可能である事を報告している。その後、認知症を呈し、頭部 MRI 画像で特徴的な像を呈する NIID 例の報告が相次いでいる。皮膚生検により NIID と診断した症例を蓄積し、NIID の臨床病理像を明らかにするとともに、連鎖解析および次世代シーケンサーを用いた遺伝子配列により、原因遺伝子の同定、病態の解明を目指す。

B. 研究方法

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。

(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

病理学的に NIID と診断した 23 例に関して、臨床像を検討した。家族性 NIID では、筋力低下、自律神経症状を示す例が多く、高次脳機能、失調などは認められなかったのに対し、孤発性 NIID では、失調を約 60%、膀胱直腸障害、感覚障害を約 35%に認めた。異常行動は約 20%で認められた。検査結果では、髄液蛋白の上昇が家族性、孤発性双方で認められ、頭部 MRI での T2 高信号についても、双方で認めた。また、四肢に異常を訴えない孤発性 NIID 9 例中 8 例で、神経伝導速度検査異常を認めた。核内封入体の光顕、電顕所見についても NIID の神経細胞で認められるものと同様であった。また、遺伝子解析については、これまでに次世代シーケンサーを用いて解析した Lod score 4 前後を示す領域について、引き続き解析を進めているところである。

D. 考察

今日までに、NIID の報告例を検討すると、家族例においては末梢神経障害家系が報告されており、一方孤発例では、白質脳症を呈する認知症例が報告されてきているが、今回の検討で、家系例にも白質脳症が存在し、孤発例でも末梢神経障害がみられることが明らかとなった。背景の病理像は共通していることから、大きな一つの疾患スペクトラムとして今後

検討する必要があると考えられる。

E. 結論

NIID は、皮膚生検により診断が可能であり、家族性および孤発性 NIID に共通した臨床像、検査所見を呈することが明らかとなった今後、さらに症例を蓄積し、原因遺伝子の同定を目指していく。

F. 健康危険情報

特記すべきもの無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2. 学会発表

1) 曾根淳：皮膚生検により診断した Neuronal intranuclear inclusion disease 18 例の臨床学的特徴. 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014.5.24, 福岡

2) Jun Sone: Clinical feature of 19 cases of Neuronal intranuclear inclusion disease diagnosed by skin biopsy. XVIII International Congress Of Neuropathology, 2014.9.15, Rio De Janeiro.

3) Jun Sone: Antemortem diagnosis of Neuronal intranuclear inclusion disease. XVIII International Congress Of Neuropathology, 2014.11.19, Washington.

4) 曾根淳：皮膚生検による Neuronal intranuclear inclusion disease の診断に

ついて. 第 32 回日本神経治療学会総会,
2014.11.22, 東京

5) 曾根淳: 皮膚生検により診断した
Neuronal intranuclear inclusion
disease 10 例の検討. 第 33 回日本認知症
学会学術集会, 2014.12.1, 横浜

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）

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

担当責任者 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

HAM の主病態は HTLV-1 感染細胞に起因する脊髄の慢性炎症による神経組織障害と考えられている。現在、HAM に対する有効な治療法は確立されておらず、一刻も早い治療法の開発が切望されている。本研究では、HAM 診断・治療標的分子の探索を目的とし、臨床検体 8 症例（HTLV-1 感染無症候患者 2 例、HAM 患者 4 例、ATL 患者 2 例）から高率な HTLV-1 感染細胞群として CD4⁺CCR4⁺TSLC1⁺細胞を単離し DNA マイクロアレイ解析を実施し、HAM の HTLV-1 感染細胞において発現変動がみられる遺伝子の同定を行った。さらに、同定された HAM の HTLV-1 感染細胞特異的発現亢進遺伝子群より膜タンパク質コード遺伝子をスクリーニングし、有望な新規抗体治療薬の標的候補分子として抽出した。

A. 研究目的

HTLV-1 は感染者に脊髄の慢性炎症を特徴とする HTLV-1 関連脊髄症（HAM）を引き起こす。その病態の特徴は、HTLV-1 感染細胞に起因した過剰な免疫応答による脊髄炎症と考えられている。従って、感染細胞に着目した解析が HAM 病態の制御に必須となる。HTLV-1 は CD4⁺T 細胞に持続感染することが知られているが、近年では、先行研究および我々の解析から、HTLV-1 は CD4⁺T 細胞中でも特に CCR4 を発現す細胞群に優位に感染しており、HAM においてはその細胞の機能が異常変化しており、HAM の病態形成に重要な役割を果たす HAM 病因 T 細胞として重要な役割を担っていることが予想される知見が得られている。しかしながら、現在までに HAM の治療において、HAM 病因 T 細胞を特異的に標的とした分子標的治療薬は存在しない。

そこで、HAM 治療の新たなターゲットとなりうる因子を同定することを目的とし、本研究では、HTLV-1 感染無症候患者（AC）、HAM 患者および ATL 患者由来末梢血細胞より高率に HTLV-1 感染細胞を単離するため、CCR4 とともに HTLV-1 感染細胞特異的な発現が知られている TSLC1 を感染細胞のマーカーとして用い CD4⁺CCR4⁺TSLC1⁺細胞を HTLV-1 感染細胞が集積する細胞群として分離し、マイクロアレイ解析を実施し、HAM 感染細胞特異的発現変動遺伝子の探索を行った。

本研究目的の達成により HAM 病因 T 細胞特異的な抗原が発見されれば、副作用が少なく、効果の高い画期的な HAM 治療薬開発、さらには発症予防法の開発に繋がると期待できる。

B. 研究方法

(1) 対象細胞の分離

AC 2 例、HAM 患者 4 例、ATL 患者 2 例の計 8 症例由来の PBMC より磁気ビーズ (CD4⁺T Cell アイソレーションキット: MACS) を用いて CD4⁺T 細胞を分離し、その後、フローサイトメトリーを用いてにより CD4⁺CCR4⁺TSLC1⁺細胞および CD4⁺CCR4⁻TSLC1⁻細胞を分離精製した。分離された各細胞群の一部を用いて分離細胞の純度を確保するため FACS 解析を行った。また、プロウイルス量の測定を行った。

(2) マイクロアレイ法による遺伝発現解析

単離した各細胞群から抽出した total RNA を用いて、Agilent Technologies 社 SurePrint G3 Human GE 8x60K による 1 色法マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行い、AC、HAM、ATL における HTLV-1 感染細胞間で発現変動する細胞遺伝子の同定を試みた。2 群間 (AC vs HAM、HAM vs ATL、AC vs ATL) における発現変動遺伝子の抽出は、Welch's t 検定を行い、P=0.05、Fold change 2.0 以上の条件で発現亢進または低下している遺伝子を抽出した。また、変動遺伝子についての生物学的な特徴づけを行うために Gene Ontology (GO) Consortium が提供している遺伝子機能情報をもとに GO 解析を実施した。

(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、患者の人権擁護に努めた。

C. 研究結果

(1) HTLV-1 感染細胞の分離

AC 2 例、HAM 患者 4 例、ATL 患者 2 例の計 8 症例由来の PBMC より CD4⁺CCR4⁺TSLC1⁺細胞および CD4⁺CCR4⁻TSLC1⁻細胞を分離した (図 1)。分離された各細胞群の細胞純度を FACS で解析した結果、全検体より単離した CD4⁺CCR4⁺TSLC1⁺細胞および CD4⁺CCR4⁻TSLC1⁻細胞 の平均純度は 94.13% と 97.44% であり各細胞群が高純度に単離されていることを確認した。また、ウイルス感染率測定から CD4⁺CCR4⁺TSLC1⁺細胞は平均 59.36 copies/100cells、CD4⁺CCR4⁻TSLC1⁻細胞は平均 5.70 copies/100cells を示し CD4⁺CCR4⁺TSLC1⁺細胞群には高率で HTLV-1 感染細胞を濃縮、精製できていることが確認された。AC、HAM および ATL 別の分離純度とプロウイルス量の平均は表 1 に示す。

HTLV-1感染者CD4⁺T細胞

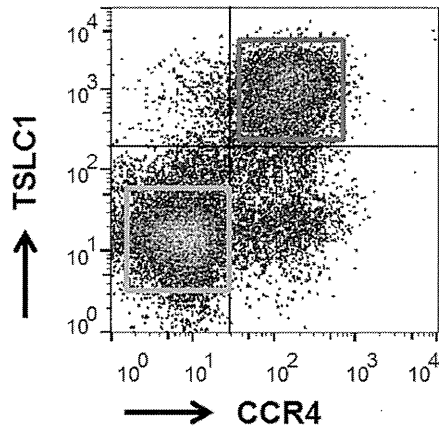


図 1 セルソーターによる CD4⁺CCR4⁺TSLC1⁺細胞と CD4⁺CCR4⁻TSLC1⁻細胞の単離

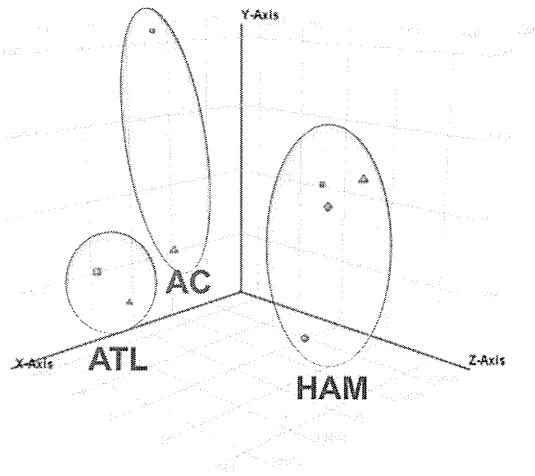


図 2 全遺伝子発現量データを用いた主成分分析。x、y、z 軸: 第一、第二、第三主成分量。

		AC	HAM	ATL
検体数		2	4	2
分離純度(%)	CCR4 ⁺ TSLC1 ⁺	92.05	94.15	96.20
	CCR4 ⁻ TSLC1 ⁻	99.35	98.63	94.35
プロウイルス量	CCR4 ⁺ TSLC1 ⁺	65.29	55.88	60.39
	CCR4 ⁻ TSLC1 ⁻	0.36	5.29	11.87

表 1 各分離細胞群の純度およびプロウイルス量

(2) cDNA マイクロアレイによる HAM 病因細胞特異的発現遺伝子の同定

8 症例(AC: 2 例、HAM: 4 例、ATL: 2 例)由来 CD4⁺CCR4⁺TSLC1⁺細胞より抽出した mRNA を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行った。得られた全遺伝子発現量データを主成分分析により評価した結果、上記 3 病理群を明確に識別できる遺伝子セットを抽出可能であることが分かった(図 2)。特に AC 患者群と比較して、第一主成分は ATL 患者病因細胞特異的な発現を示す遺伝子群の存在を示唆し、第三主成分は HAM 患者病因細胞特異的遺伝子群の存在を示していた。

HAM 患者由来 HTLV-1 感染細胞において特異的に発現亢進している遺伝子を同定するため、AC、HAM、ATL 各病理群間に対する t 検定を実施した。本検定において $p < 0.05$ かつ $|\text{fold change}| > 2.0$ を満たした遺伝子をリストアップし、ベン図に示した(図 3)。その結果、AC 患者群と比較して HAM 患者群において発現上昇している遺伝子は 698、また ATL 患者群で有意な発現亢進が検出されたものは 296 種同定された(図 3)。一方、AC 患者群に比べ HAM 患者群、ATL 患者群において有意に発現低下している遺伝子は 735、177 種同定された(図 3)。これら遺伝子群の転写産物(タンパク質)は HAM、ATL 病因細胞に対する特異的な治療標的分子になりうると期待できる。