

# 論文要旨

## Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I associated neurological disease

細胞外マトリックス蛋白の遺伝子多様性は  
HTLV-I 関連神経疾患の発症リスク因子である

延原康幸

### 【序論および目的】

HTLV-I関連脊髄症 (HAM) はHTLV-Iが発症に関わる慢性難治性神経疾患であるが、その発症はHTLV-I感染者の1-2%に見られるのみで、大多数の感染者は生涯にわたっていわゆる無症候性キャリアー (HC) として経過する。我々のこれまでの研究から、鹿児島HAM患者ではHCに比べプロウイルス量が10倍以上に増加し最大の発症危険因子であること、HAMを発症しやすい特定のHTLV-Iのサブタイプが存在すること、HAM発症に関連する複数の宿主遺伝子が存在することが明らかになった。また、これら危険因子の有無を多変量解析することにより、HAM発症の危険度をある程度推測することも可能となっている。このように、HAM発症に関与する因子は明らかになってきたものの、どのような機序で発症にいたるのかについての詳細は未だ解明の途上である。2002年になって、ヒトの核内RNA 結合タンパク質であるhnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoprotein)-A1に対する自己抗体がHAM患者の血清内に高頻度で見いだされ、かつHTLV-I Tax 蛋白と交叉反応を示すとの報告がなされた。このことはHTLV-Iの構成蛋白と類似の自己分子への認識反応がHAMにおける組織障害に関わっている可能性を示唆している。実際に、関節症状の合併が17%のHAM患者に認められており、我々はHAMの病態について脊髄障害と関節障害との関わりに着目した。つまり、関節症状をもつHAM患者においてHTLV-I構成蛋白と交叉反応する自己抗体が組織障害に関与する可能性である。この場合、脊髄と関節の両方に存在する蛋白に対する免疫応答は自己抗原の候補蛋白となりうる。そこで、関節軟骨内と脊髄組織のいずれにも存在する細胞外マトリックス蛋白であるAggrecanに着目した。Aggrecanの機能は、関節軟骨の保水のみならず、中枢における細胞浸潤に対してのバリアー機能や、軸索伸長の際のガイド機能と多岐にわたる。さらにAggrecan 蛋白の一部をepitopeとして持つT細胞、B細胞の存在がin vivoで確認されている。また、Aggrecan 蛋白の側鎖として存在するchondroitin sulfate(CS)量の減少はT細胞の、keratan sulfate(KS)量の減少はB細胞の免疫反応を誘導すると報告されており、aggrecanの構造変化・変性は何らかの免疫反応を励起することが考えられる。

今回我々は、HAM患者とHC、健常人コントロールのゲノムDNAを用いて、CSをコードする部位に存在するvariable number of tandem repeat (VNTR)の遺伝子多型を比較検討した。さらに、HAM患者の血清及び髄液中のAggrecan蛋白量を定量し、HAMの発症リスクおよび臨床症状への関与について検討した。

### 【材料および方法】

材料: (1) ゲノム DNA : 第 1 群として HAM 患者 227 例、HTLV-I キャリア (HC) 217 例、健常人コントロール 85 例。第 2 群として HAM 患者 58 例、HC 70 例を準備した。

(2) 血清 : HAM 患者 33 例、HC 11 例。髄液 : HAM 患者 52 例、HTLV-I 陽性非炎症性疾患 (OND) 18 例。

方法: (1) Aggrecan 遺伝子多型の検討: exon 10 (2888-2911) に存在する VNTR の遺伝子多型をゲノム DNA を用いた PCR 法で増幅後に 1% アガロースゲル上に展開した。各 allele の同定にはマーカー DNA の使用と、2 人の判読者による独立した判定の後に結果を照合して決定した。

(2): 血清、髄液中の Aggrecan 濃度の測定: ELISA kit を用い、450nm 吸光度測定器を使用して測定した。

(3): 発症後 3 年以内で歩行不能に至った HAM 患者を急速進行例、それ以外を慢性進行例と区分した。

### 【結果】

Aggrecan VNTR 9 allele の中で HAM 患者では allele 28 (1630bp) の出現頻度 (25.3%) が、HC (15.9%)、control 群 (11.8%) と比して有意に高値であった。HC と control 間では allele 28 の出現頻度に有意差はなかった。他の allele の頻度は既報告とほぼ一致していた。第 2 群の結果においても allele 28 の出現頻度は HAM (26.8%) で HC (10.8%) より有意に高頻度となり、第 1 群と同様であった。Allele 28 を有する症例と有さない症例の HTLV-I プロウイルス量に有意な差は認められなかった。

血清中 Aggrecan 濃度は急速進行 HAM 患者と、慢性進行 HAM 患者及び HC の間で有意差を認めなかったが、髄液中 Aggrecan 濃度は、急速進行 HAM 患者において慢性進行 HAM 患者及び HC よりも有意に高値であった。

### 【結論及び考察】

HAM 患者では Aggrecan VNTR の allele 28 を高頻度に有することが明らかになった。Aggrecan VNTR 多型と疾患との関連については、過去に変形性手関節症や多発性椎間板変性について検討されているが、慢性炎症性、神経免疫性の中樞神経疾患での検討は本研究がはじめてである。またアジア人における Aggrecan VNTR の検討は我々の報告が 2 報目となる。コントロール及び HC の allele 分布は既報告の結果と差異はなく、HAM 患者で allele 28 を有する例が高率であることから、この遺伝子の疾患への何らかの関与が推測される。Aggrecan 構成成分は加齢、機械的刺激、蛋白分解酵素 (aggrecanase) により切断、分解されるが、切断断片は T 細胞の活性化に関与し、活性化した T 細胞が血液脳関門を通過して中枢での炎症性疾患を引き起こすことが報告されている。また、その際に Aggrecan の側鎖中の CS, KS の量が病勢と関連すると報告されている。これらの報告から、VNTR の差により規定された CS 量の差異が HAM 患者における免疫応答に影響を与え、発症に関与する可能性も推察され、今後の検討課題である。

HAM 患者においては、一般に HTLV-I プロウイルス量が高値であり、その変動と病勢の相関も知られているが、一方でプロウイルス量が非常に低いにもかかわらず典型的な HAM を発症する症例も存在する。今回見いだされた、Aggrecan という脊髄構成蛋白の多型が HAM 発症リスクに関連するという知見は、炎症の強弱のみでなく、炎症の場となる脊髄組織の強度も発症にかかわる要素となりうるという可能性を示唆しており、画期的なものである。

また、本研究では、今までに報告がなかった髄液中での Aggrecan 量の測定をはじめて行い、HAM 急速進行例では慢性進行例よりも髄液中の Aggrecan 濃度が高値であることを明らかにした。脊髄組織の障害の結果、髄液中へ漏出したと考えられる Aggrecan を測定することは、脊髄障害の指標や臨床経過の評価に有用であると考えられた。

( Immunogenetics. 2005; December 受理)

# 論文審査の要旨

報告番号	医論第1418号	氏名	延原康幸
審査委員	主査	有馬直道	
	副査	馬場昌範	熊本一朗

## Genetic variability in the extracellular matrix protein as a determinant of risk for developing HTLV-I associated neurological disease

(細胞外マトリックス蛋白の遺伝子多様性はHTLV-I関連神経疾患の発症リスク因子である)

HTLV-I関連脊髄症 (HAM) はHTLV-Iが発症に関わる慢性難治性神経疾患であるが、その発症はHTLV-I感染者の1-2%に見られるのみで、大多数の感染者は生涯にわたっていわゆる無症候性キャリアー (HC) として経過する。これまでの研究から、鹿児島島のHAM患者ではHCに比べプロウイルス量が10倍以上に増加し、最大の発症危険因子であること、HAMを発症しやすい特定のHTLV-Iサブタイプが存在すること、HAM発症に関連する複数の宿主遺伝子が存在することが明らかになっている。しかし、どのような機序でHAM発症に至るかについての詳細は未だ明らかでない。2002年になって、ヒトの核内RNA結合タンパク質であるhnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoprotein)-A1に対する自己抗体がHAM患者の血清内に高頻度で見いだされ、かつHTLV-I Tax 蛋白と交叉反応を示すとの報告がなされ、HTLV-Iの構成蛋白と類似の自己分子への認識反応がHAMにおける組織障害に関わっている可能性が示唆された。我々は、17%のHAM患者に関節症状の合併があることから、関節症状をもつHAM患者においてHTLV-I構成蛋白と交叉反応する自己抗体が組織障害に関与する可能性を想定し、自己抗原の候補として細胞外マトリックス蛋白アグリカンに着目した。これは、関節軟骨と脊髄組織のいずれにも存在し、その分解産物がT細胞の活性化と中枢での炎症形成に関与し、さらに側鎖の量が病勢と関連すると報告されている分子である。そこで、本研究ではHAM患者とHC、健常人コントロールのゲノムDNAを用いて、chondroitin sulfate(CS)が結合するコア蛋白をコードする部位に存在するvariable number of tandem repeat (VNTR)の遺伝子多型を比較検討し、さらに、HAM患者の血清及び髄液中のアグリカン蛋白量を定量し、HAM発症リスクおよび臨床症状との関与について検討した。

本研究で得られた新しい知見は以下の3つである。

1. アグリカン VNTR のアレル分布に HAM 患者群と HC 群で統計学的有意差が認められ、特に HAM 患者では allele28 を高頻度に有しており、アグリカン遺伝子が HAM 発症に関連する疾患関連遺伝子であることを明らかにした。
2. アグリカン遺伝子 VNTR の allele28 と HTLV-I provirus 量との間に相関は見られなかった。
3. 血清中アグリカン濃度は急速に進行する HAM 患者と、慢性に経過する HAM 患者及び HC の間で有意差を認めなかったが、髄液中アグリカン濃度は、急速に進行する HAM 患者において慢性に経過する HAM 患者及び HC よりも有意に高値であった。

以上より、脊髄構成蛋白であるアグリカンの多型が HAM 発症リスクに関連していること、髄液中アグリカン値が HAM の病勢を反映していることを明らかにした。

今回の知見は、炎症の場となる脊髄組織の強度も発症にかかわる要素となりうる可能性を示唆しており、きわめて重要なものである。また、髄液中アグリカンの測定が、脊髄障害の指標や臨床経過の評価に有用であることを示した初めての報告であり、HAM の病態および病状の解明に大いに寄与すると思われる。

よって、本研究は博士 (医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1418 号	氏名	延原 康幸
審査委員	主査	有馬直道	
	副査	馬場昌範	熊本一朗

主査および副査の3名は、平成18年2月27日、学位請求者 延原 康幸 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 軟骨組織内でアグリカンはコラーゲンネット内に存在しているとのことであるが、脊髄内でも同様に存在しているのか、異なった存在様式があるのか。  
 (回答) 軟骨組織と同様に脊髄組織内でもコラーゲンネット内で細胞間隙を埋めるように存在している。

質問2) アグリカンの G1 ドメインが T 細胞のエピトープとして存在するというのはどういう意味か。  
 (回答) G1 ドメイン部位でアグリカン分子が断裂、分解され露出することで T 細胞に対して抗原提示されやすくなり、ここがエピトープとなって、自己反応性の T 細胞が誘導されるという意味であり、in vitro の実験で報告されている。

質問3) 今回の HAM 症例で関節症状を有する例は何%いたか。Allele28 保有の有無、関節症状の有無が血清、髄液中のアグリカンの濃度と関連することがあったか。  
 (回答) 今回解析した症例で関節症状を有する HAM 症例は約 20%であった。関節症状の有無、allele28 保有の有無と血清・髄液中のアグリカン濃度にはとくに関連は認めなかった。

質問4) 髄液採取中の血清成分の混入の可能性はあるか。  
 (回答) 髄液採取時の肉眼的観察と、鏡検時に赤血球の混入がない検体のみを使用しており、データに影響する程の血清成分が混入している可能性はきわめて低いと判断している。

質問5) 髄液採取は統一した方法で行われたのか。  
 (回答) 一般的な腰椎穿刺の方法で髄液採取を行い、採取から保存までもほぼ同一の条件で行われた。

質問6) DNA サンプルの第一群と第二群の区分方法は。また、髄液中アグリカン値の検討はどちらの群でおこなったのか。  
 (回答) HAM 群、キャリアー群ともランダムにサンプリングして、第一群と第二群に分けた。髄液中アグリカン値の測定は第一群の患者検体を用いておこなった。

質問7) アグリカンがその機能を発揮する上で適切な長さというものはあるのか。  
 (回答) アグリカン VNTR リピートが短いと椎間板変性の誘因となり、長いと構造的に不安定になるとの報告がある。適当な長さがどのくらいかをモデル動物の実験などで示した報告は存在しないが、今までの報告ではヒトにおいて一番頻度の高いリピート数は 27 とされており、これが最も適切な長さであるかもしれない。

質問 8) アグリカン VNTR リピートで 18 リピートと 32 リピートの homozygote が存在しないのは、この組み合わせでは、発生時に不都合があるなどの問題に関与しているためか。

(回答) リピート数の短いホモのマウスを作成すると胎生致死であり、生存し得ないという報告があり、ご指摘のように、リピートが長すぎても短かすぎても発生時に何らかの障害が起きる可能性があると考えます。

質問 9) 側鎖にケラタン硫酸/コンドロイチン硫酸が付着していることでアグリカンに対する自己免疫応答が抑制される機序はどのようなものか。

(回答) ケラタン硫酸/コンドロイチン硫酸により構成される側鎖の存在により、樹状細胞などの抗原提示細胞が、抗原性の高いアグリカンの細胞骨格部位にアプローチしにくくなることで、抗原認識が起りにくくなるのが可能性として考えられる。

質問 10) 川口らの報告では allele28 は 9.4%であるが、今回は HTLV-I 感染健常者は 15.9%、コントロール 11.8%であるが、この頻度に差はあると考えるのか。

(回答) 川口らの報告は、椎間板変性症の発症者についての検討で、正常者のデータではないが、我々の正常コントロールと比較して有意な allele 分布の相違は認められなかった。

質問 11) 髄液中アグリカン値の検討で、急速進行例、慢性進行例とされている HAM 患者群について、選択された治療の種類や効果の違いが症状の進行に影響を与えた可能性はないか。

(回答) 今回使用した検体はすべて治療前に採取された検体である。急速進行/慢性進行の区分は検体採取時点までの臨床経過から分けた。

質問 12) Glant らの報告では VNTR リピートの短いほど T 細胞の活性化が起きやすく、炎症が引き起こされやすくなるとなっているが、今回 HAM 患者で比較的長い allele28 を持つ患者の頻度が多いという結果との解離はどう説明するか。

(回答) VNTR リピートが短い方が免疫応答が引き起こしやすい点をご指摘の通りであるが、この報告はマウスを用いた検討であり、ヒトにおいては効果が異なる可能性もある。今後、HAM 患者、キャリアーの検体を用いて、VNTR リピートの長さの違いがたとえば HTLV-I 抗原に対する T 細胞の反応性に影響するかなどの検討をしていく必要があると思われる。

質問 13) Table 2 で HTLV-I プロウイルス量を区分けした理由は。

(回答) HTLV-I プロウイルス量は HAM 発症の最も大きな危険因子である。末梢血単核球 10,000 個あたり 500 コピー以上では HAM 発症の危険度が非常に大きくなる事から、まず 600 以下で区切っている。また、プロウイルス量は、病勢や免疫担当細胞の活性化の状態と密接に関与するため、table に示したように細かく段階的に区分をした。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。