

平成24年度厚生労働科学研究費
「HTLV-I関連疾患研究領域研究班合同発表会」

HAMに対する治療戦略

難治性疾患等克服研究事業(難治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」
研究代表者: 楠 進(近畿大学医学部 神経内科)

発表者: 中村龍文
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
感染免疫学講座・先進感染制御学分野

HAM (HTLV-I関連脊髄症)

- 免疫性神経疾患班会議 (班長)
- 1986年、鹿児島大学の納光弘 発見命名され、世界に発信された

HAM発見のインパクト:

- はじめてのヒトの腫瘍ウイルス慢性炎症性神経疾患をも引き起こす一病原
- 慢性進行性で不治の神経変性可能なウイルス性疾患として

HTLV-I ASSOCIATED MYELOPATHY, A NEW CLINICAL ENTITY

Six, Gessain and colleagues¹ have reported that about 60% of patients with tropical spastic paraparesis (TSP) had antibodies to human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in their serum. We have seen patients with similar myelopathies with high titres of HTLV-I antibody in serum and even in the CSF, and think this myelopathy is the same as that described in HTLV-I antibody positive TSP by Gessain et al. However, our patients live, not in the tropics, but in a temperate zone, Kagoshima prefecture, where adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATLL) is endemic and where about 16% of the population have HTLV-I antibody.² For our patients, therefore, we propose the diagnostic term HTLV-I associated myelopathy (HAM).

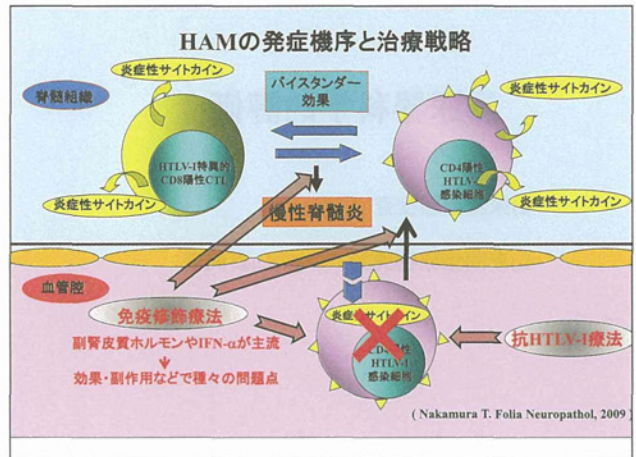
MITSUHIRO OSAME
KOICHIRO UBUKI
SEIJI IZUMO
NAOHI ICHII
HIROYUKI ASHITANI
AKIHIRO ISATA
MARTO MATSUMOTO
MITSUHIKO TARA

Third Department of General Medicine,
Faculty of Medicine,
Kagoshima University,
Kagoshima, Japan
Institute of Cancer Research,
Faculty of Medicine, Kagoshima
Kagoshima City Hospital

(Osame M., et al., Lancet 1986)

「免疫性神経疾患に関する調査研究班」
でのHAM関連の研究を行っている班員

- 出雲周二 先生 (鹿児島大学)
- 大原義朗 先生 (金沢医科大学)
齊藤峰輝 先生 (川崎医科大学)
- 山野嘉久 先生 (聖マリアンナ医科大学)
- 中村龍文 (長崎大学)

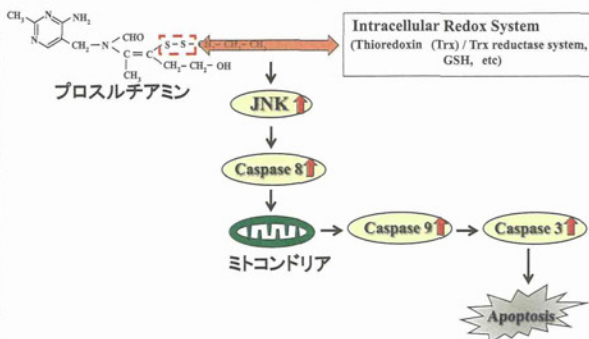


HAMに対する治療薬としての必要条件

- 1) HTLV-I感染症 → 抗HTLV-I効果
- 2) 下肢運動・膀胱機能障害 → ADL・QOLを改善
その後の進行阻止
- 3) 慢性疾患 → 十分な安全性を持ち
長期使用可能
- 4) 即戦力 → まずは既存薬剤

プロスルチアミン (アリナミン®) 療法

プロスルチアミンによるHTLV-I感染細胞傷害性のメカニズム



プロスルチアミン臨床試験 (UMIN試験ID: UMIN00005969)

- 厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業) (出雲班)
- 本試験は本院倫理委員会の承認を得、臨床研究保険に加入し、文書によるインフォームド・コンセントを取得後、施行された。

投与薬剤と方法

- 薬剤:
プロスルチアミン (原末は韓国より輸入) 経口薬カプセル化剤
- 投与方法:
外来にて、1日1回300 mgを朝食前、12週間連日、経口投与

神経内科学的評価

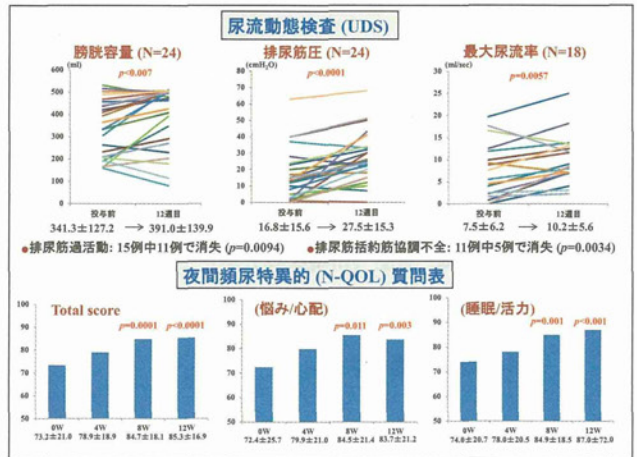
運動機能障害度と痙縮の改善

症例	性	年齢(歳)	罹病期間(年)	運動機能障害度		痙縮(Modified Ashworth Scale)	
				投与前	12週目	投与前	改善
1)	女性	80	23	6	6	(+)	(+)
2)	女性	64	16	6	6	(+)	(+)
3)	男性	57	51	6	6	(+)	(+)
4)	女性	51	36	9	9	(+)	(+)
5)	女性	67	3	3	3	(-)	(-)
6)	女性	61	30	5	5	(+)	(+)
7)	女性	68	12	4	4	(+)	(+)
8)	男性	64	11	5	5	(+)	(-)
9)	男性	66	23	9	9	(+)	(+)
10)	男性	76	23	6	6	(+)	(+)
11)	女性	53	7	6	6	(+)	(-)
12)	女性	62	12	4	4	(-)	(-)
13)	女性	44	22	6	6	(+)	(-)
14)	男性	56	10	5	5	(+)	(+)
15)	女性	71	45	9	9	(-)	(-)
16)	女性	78	18	5	5	(+)	(+)
17)	女性	50	19	5	5	(+)	(+)
18)	女性	63	29	8	8	(+)	(-)
19)	女性	62	9	8	8	(+)	(+)
20)	女性	60	34	2	1	(-)	(-)
21)	女性	46	26	2	1	(+)	(+)
22)	女性	31	-	4	3	(+)	(+)
23)	男性	57	-	10	10	(-)	(-)
24)	男性	56	-	2	2	(+)	(+)

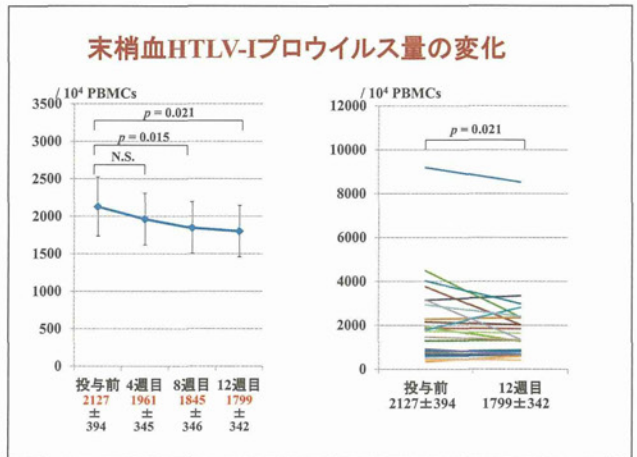
平均罹病期間: 約21年

泌尿器科学的評価

- a) 尿流動態検査 (UDS)
- b) 夜間頻尿特異的 (N-QOL) 質問表

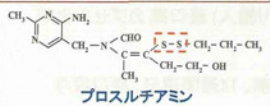


ウイルス学的評価



考察

- 末梢血HTLV-Iプロウイルス量をより減少させるためには、今後プロトコール作成の工夫が必要 (プロスルチアミンの投与量、投与期間、etc.)。
- ただ、今回のプロトコールにおいても、臨床症状の改善は明らか。
元来、プロスルチアミンはVit B1としての組織移行がよくなるように創薬されたもので、組織に移行した後、HTLV-I感染細胞内においてSS結合が還元される際に効果を発揮している可能性がある。



↓
神経組織内の情報を得ることが必要。
(Ex. 髄液検査)

ポリサルフェート療法

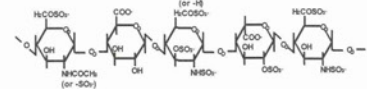
HAM 患者に対するヘパリン治療の臨床効果

症例	年齢性	罹病期間 (年)	ヘパリン投与		30m歩行時間の減少率 (%)	運動機能障害の変化	臨床効果
			単位/日 (x 10 ³)	期間 (日数)			
1	34/F	4	5	9	30.8	3 → 2	(++)
2	63/F	1	10	32	55.2	3 → 2	(++)
3	66/F	15	10	93	—	7 → 6	(++)
4	50/F	11	5	18	18.2	5 → 5	(+)
5	58/F	10	10	30	70.7	5 → 5	(+)
6	60/F	31	10	28	—	7 → 7	(+)
7	64/F	45	10	27	—	7 → 7	(+)
8	29/F	13	10	14	0	4 → 4	(-)
9	53/M	10	10	17	16.7	5 → 5	(-)
10	60/F	3	10	28	25.0	5 → 5	(-)

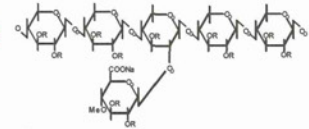
(Nagasaki K., et al., 1993)

ポリサルフェート

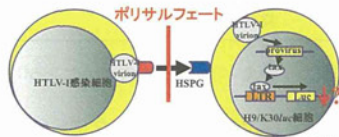
ヘパリン



ペントサン多硫酸ナトリウム

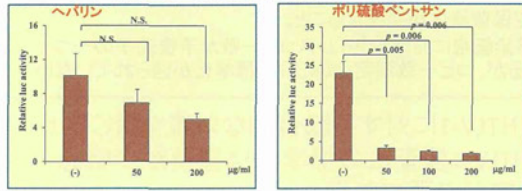


- ヨーロッパ・ブナ等の植物から抽出された多糖骨格であるキシランを硫化後に水酸化ナトリウムで処理されたナトリウム塩。
- 50年以上にわたり主に欧州において抗血栓薬および抗高脂血症薬として販売。米国とカナダでは、関節性膀胱炎による疼痛や不快感の緩和を適応として販売。



(徳島大学 足立昭夫教授より供与)

ポリサルフェート処理によるHTLV-1感染阻止効果



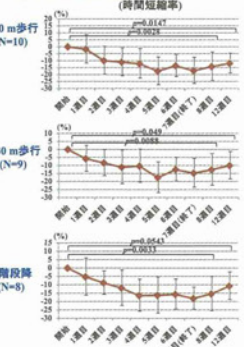
ポリ硫酸ペントサンによる臨床試験 (UMIN試験ID: UMIN000004492)

対象症例および結果①

1) 運動機能障害及び疼痛の改善

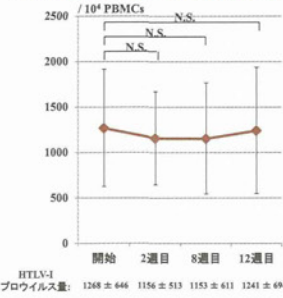
症例	性別	年齢	罹病期間 (年)	歩行時間 (分)	疼痛 (VAS)	治療前	治療後
1	男	53	10	30	7	30	20
2	女	63	1	32	5	30	20
3	女	66	15	93	7	30	20
4	女	50	11	18	5	30	20
5	女	58	10	30	7	30	20
6	女	60	31	28	7	30	20
7	女	64	45	27	7	30	20
8	女	29	13	14	4	30	20
9	男	53	10	17	5	30	20
10	女	60	3	28	5	30	20

2) 歩行機能の改善 (時間短縮率)

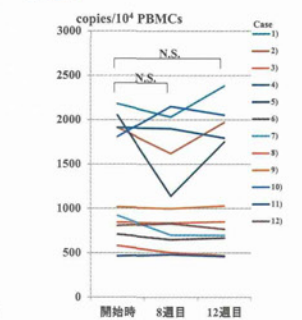


結果②

A) 末梢血HTLV-1プロウイルス量の変化



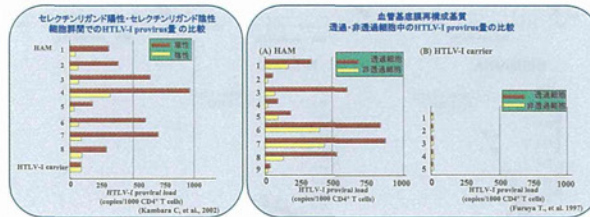
B) 各症例での末梢血HTLV-1プロウイルス量の変化



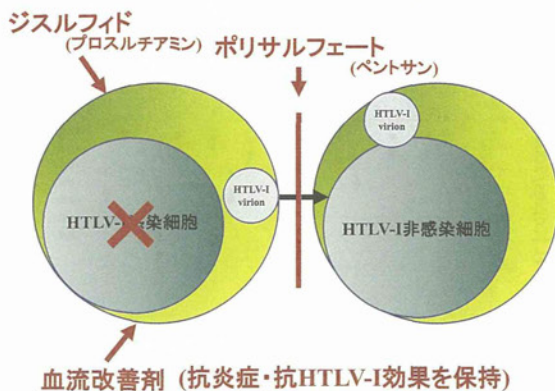
考察

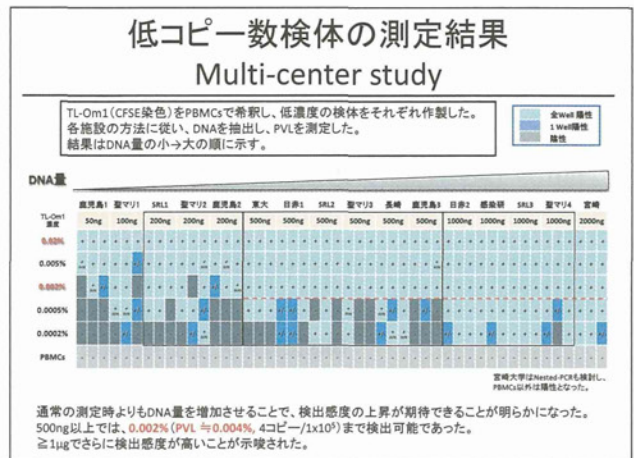
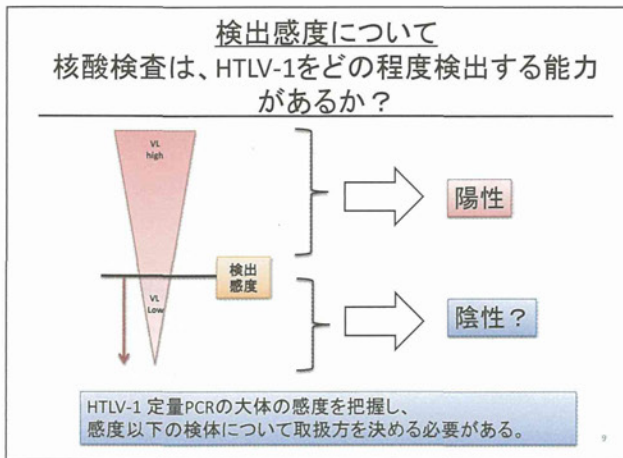
今回の薬剤投与プロトコールでは末梢血HTLV-1プロウイルス量の有意な減少は得られなかったものの、下肢運動機能は明らかに改善

↓
ポリサルフェートが元来持っている血流改善作用に起因してHTLV-1感染細胞の骨髄内への浸潤を抑制している可能性

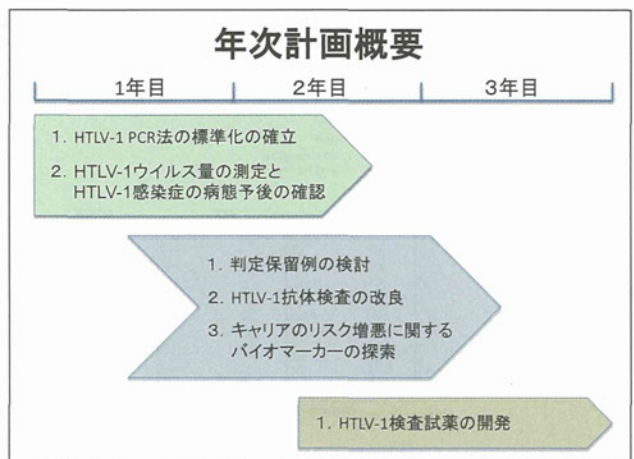
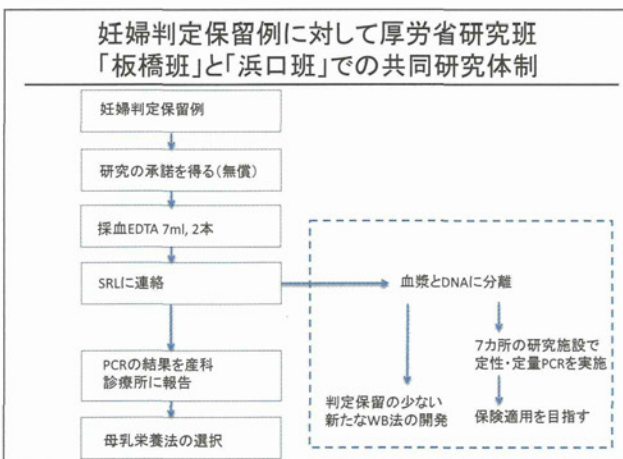
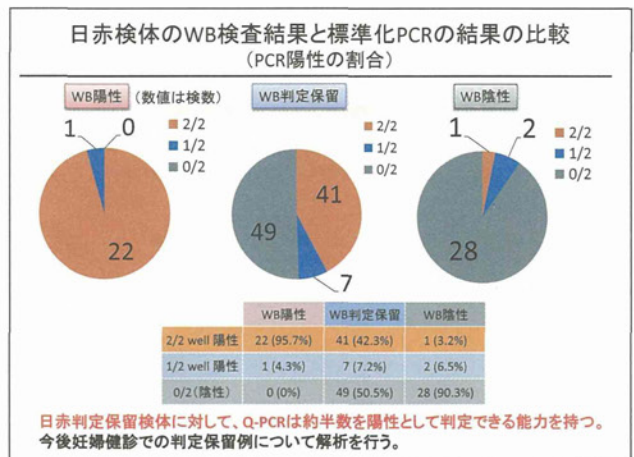


HAMに対する治療戦略





- ### 標準化作業の進捗
- TL-Om1細胞株を用い核酸検査の標準品の作成を行った。
 - 標準品を用いた測定により各施設の補正係数を算出し利用することにより、測定値の施設間差が縮小し、HTLV-1コピー数測定の標準化を達成した。
 - 測定に用いる試料が500ng以上のDNA量ではPVL値約0.004% (4コピー/1x10⁵個)まで全施設が検出することが出来た。また1μg以上では、さらに高感度に測定できると考えられ、定性的測定を行う際は1μgをもちいることとした。



- ### 保険適用への道筋
- 平成24年より、試薬メーカーの協和メディックスおよびキアゲンジャパンの共同事業としてHTLV-1核酸検査の検査試薬の開発が始まった。(両社とも浜口班の協力研究者として活動中であり、情報の共有および検体の提供を行う)
 - 平成24年より、当該研究班で進めてきたHTLV-1核酸検査を先進医療として熊本大学付属病院が医療施設内で検査を実施するための技術移転を始めた。

HTLV-1感染モデルを用いた 抗HTLV-1薬の探索および作用機序の解析

関西医科大学 微生物学講座
上野 孝治

HTLV-1感染モデルの構築

HTLV-1感染モデルの病態

① 血中プロウイルス量 (copies / 100 PBMCs)

② ヒトリンパ球の異常増殖 (CD3, CD4, CD25)

③ 脾臓の腫大 (脾臓の重量)

④ Tax特異的CTL

⑤ 抗HTLV-1抗体 (IgG depletion, CTL, anti IgG depletion)

⑥ 感染細胞のクローナル増殖 (sample 1, sample 2)

抗HTLV-1薬による発症予防

① 血中プロウイルス量 (copies / 100 PBMCs)

② ヒトリンパ球の異常増殖 (CD3, CD4, CD25)

③ 脾臓の腫大 (脾臓の重量)

④ Tax特異的CTL

⑤ 抗HTLV-1抗体 (IgG depletion, CTL, anti IgG depletion)

⑥ 感染細胞のクローナル増殖 (sample 1, sample 2)

AZT/IFN投与に依る血中プロウイルス量の抑制

① 非感染細胞数 (Cells in PB / μ l)

② 感染細胞数 (Cells in PB / μ l)

AZT/IFNの感染・非感染細胞に対する影響

AZT/IFN投与に依る血中プロウイルス量の抑制

AZT/IFN再投与による血中プロウイルス量の抑制

17-DMAGとは？

17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin

- Hsp90阻害剤である Geldanamycin 類縁体
- Tax タンパクの分解を誘導、ATL 細胞に対する増殖抑制効果を有する

17-DMAGによるTaxの減少

17-DMAG (μM)	0	0.1	0.5	2.5	5
Lysate!	[Western blot bands showing decreasing Tax intensity]				
IB: Tax!	[Western blot bands showing decreasing Tax intensity]				

(BMC in revision)

17-DMAG投与に依る血中プロウイルス量の抑制

HTLV-1 感染 Jurkat細胞 → HTLV-1 感染 IMI-huNOG

17-DMAG treatment: 17-DMAG 300 μg /body /weekday or PBS 100 μl /body /weekday

Weeks post infection: 2, 4, 6, 8

proviral load (copies / 100 PBMCs)

Weeks post infection

17-DMAG投与に依る感染細胞数の抑制

感染細胞数 (Cells in PB / μl)

CD25⁺ T細胞 占有率 (% in CD3⁺ T-cells)

Kaplan-Meier 生存曲線

Weeks post infection

まとめ

1. AZT/IFNの併用投与は、血中プロウイルス量を抑制した。
1. AZT投与中止後に血中プロウイルス量が増殖した個体に対して、AZT/IFNを追加投与することにより、感染細胞数が減少した。
2. 17-DMAG投与により、血中プロウイルス量・感染細胞数・CD25陽性細胞の占有率を低下させ、生存率が上昇した。

HTLV-I感染拡大を阻止するワクチンならびに抗体医薬等の開発基盤の確立

- ・現在、我が国のHTLV-I感染者数は未だ100万人を超えると推定され、特に大都市部では感染者の増加が問題となっている。
- ・これまでHTLV-I感染拡大を阻止するワクチン等の方法は開発されていない。

HTLV-I感染拡大を阻止するワクチンならびに抗体医薬等の開発基盤の確立(2年目成果概要)

1~2年目: 実験基盤の確立

2~3年目: 展開と検証

3年目: 検証と次のステージへの準備

HTLV-I抗原の検出・定量法の確立と応用(田中)

In vitro HTLV-I感染系の確立と応用(田中、上里、高橋)

ラットのHTLV-I経口/血液感染実験系の確立と応用(長谷川)

ヒト北マウスのHTLV-I感染系の開発と応用(伊藤、高橋)

HTLV-Iワクチンのデザインと動物免疫実験(松崎、新川、前田)

HTLV-I感染を細胞内で制御する宿主因子の研究(樋口)

HTLV-Iワクチン候補および抗体医薬候補等による感染阻止効果の検証と新規成果へ向けた展開

HTLV-I感染阻止ワクチンならびに抗体医薬等の開発基盤の確立

臨床応用に向けた新たな展開: HTLV-I感染拡大阻止への貢献

平成24年度の研究では、これまでに確立した試験管内および動物を用いた抗体やワクチンのHTLV-I感染抑制活性の定量法を駆使し、抗HTLV-Igp46中和単クローン抗体(LAT-27)がHTLV-Iの新規感染のみならず、すでに感染した細胞の監視を行うことを見いだした。

HTLV-I やATL細胞に対する特異的抗体ライブラリー

使用目的	HTLV-Iウイルス抗原	HTLV-I 感染細胞 ATL細胞
蛍光抗体法 (直接法・間接法)	p19, p24, gp21, gp46, Tax, HBZ	CD25, OX40, OX40L
抗原定量ELISA	p19, p24, gp46, Tax	CD25, OX40, OX40L
Western Blot	p19, p24, gp46, Tax, p27rex, HBZ	CD25, OX40, OX40L
HTLV-I感染中和	gp46 (LAT-27, Tanaka 1991)	

HTLV-I感染細胞の可視化

HTLV-I-抗原の定量

(1) ELISA直接法

Detection mAb, Antigen, Capture mAb, HRP, H₂O₂, TMB

HTLV-I p24

Recombinant HTLV-I p24 (ng/ml)

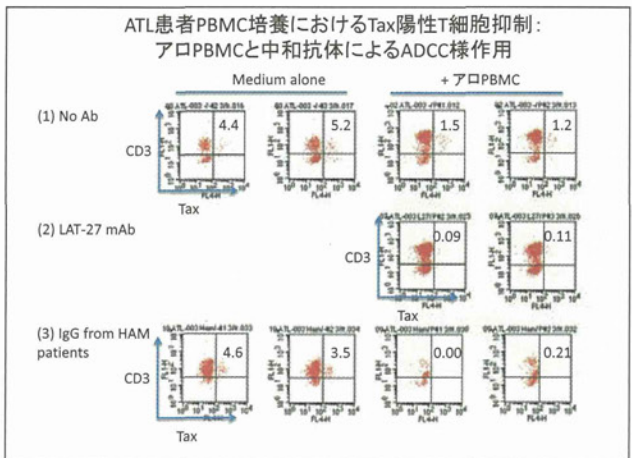
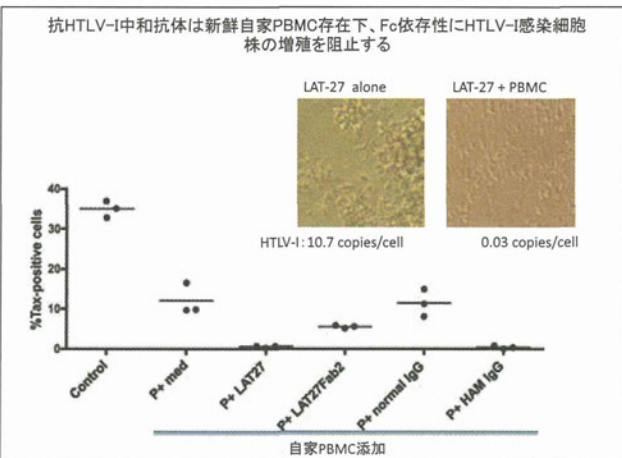
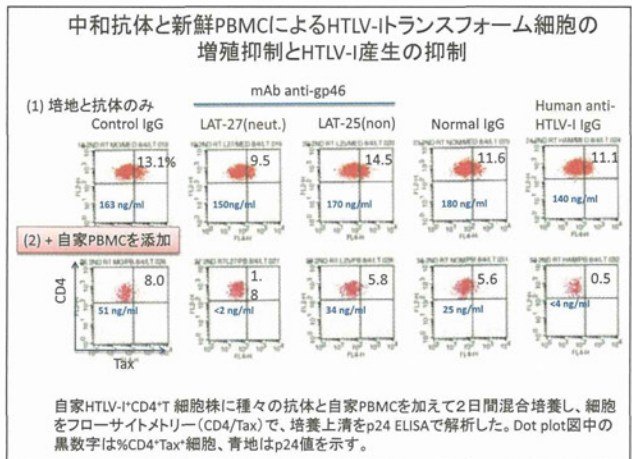
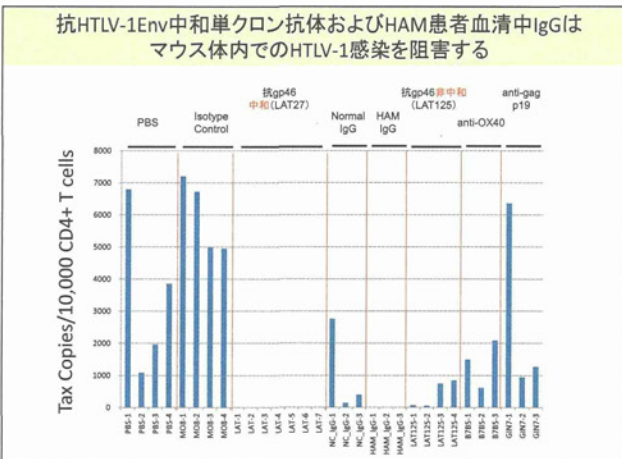
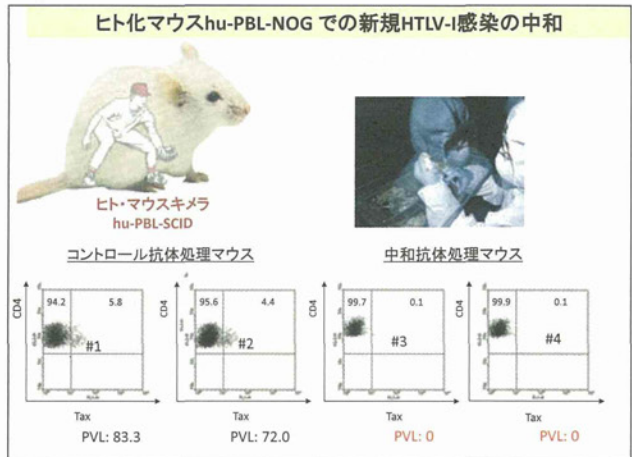
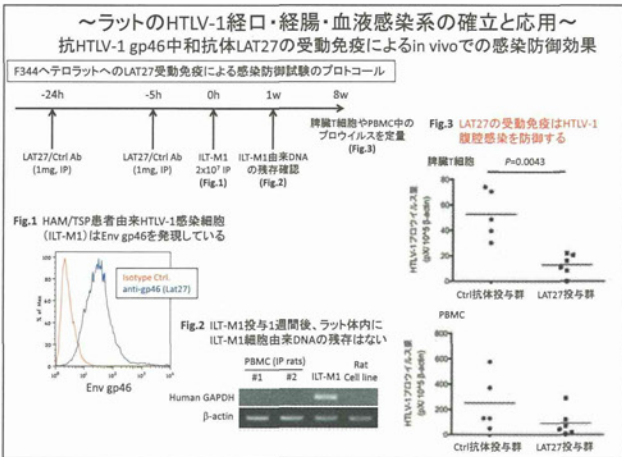
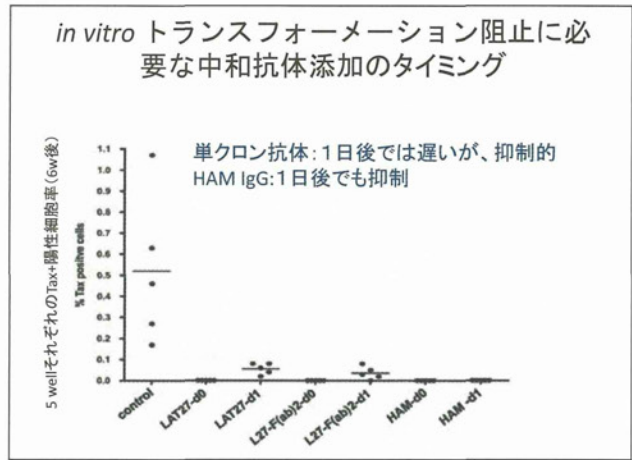
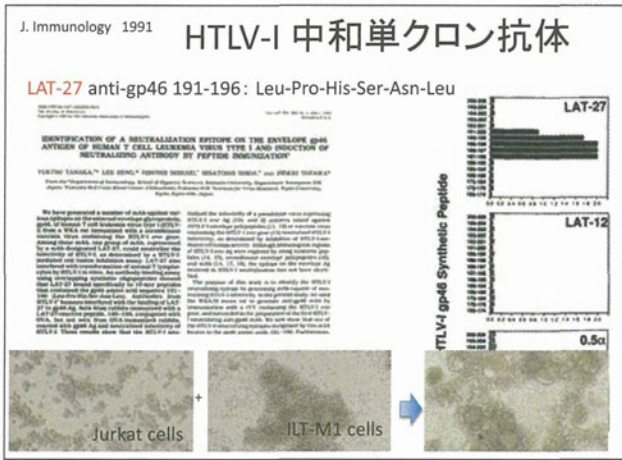
(2) Flow cytometry

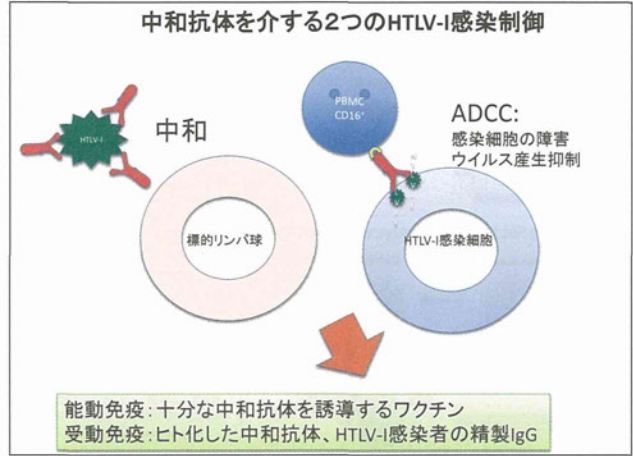
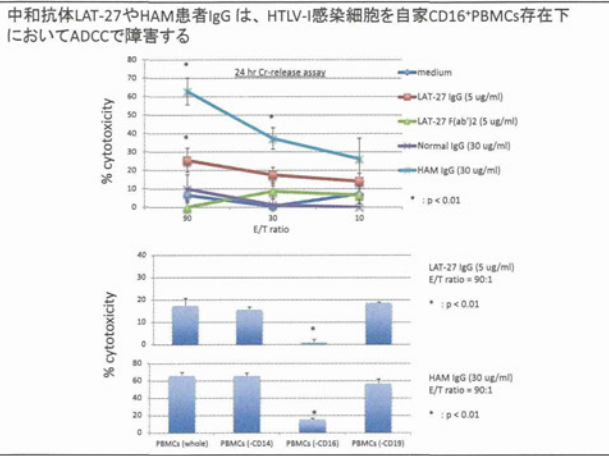
HTLV-I⁺ patients' PBMC cultured for 1 day

Anti-CD4

Anti-Tax

#1: 1.48, #2: 21.9, #3: 1.52





HAM 患者のIgG抗体は自己および他のドナー由来のHTLV-I感染を阻止する: HTLV-Iのエスケープはない

p24 産生 (ng/ml) (3週間培養後)

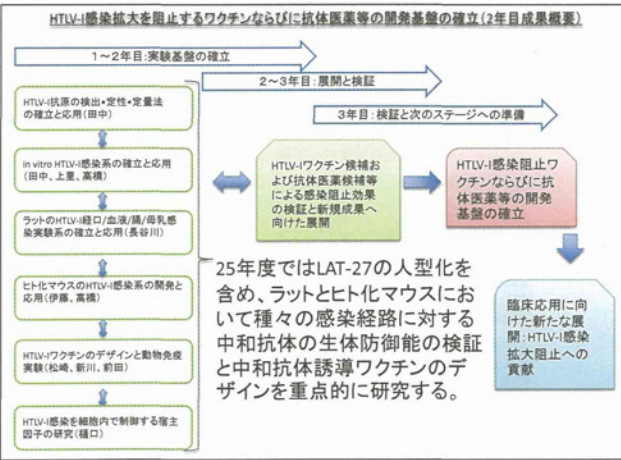
細胞のドナー	IgG 抗体のドナー					
	Normal	HAM-1	HAM-2	HAM-3	HAM-4	HAM-5
HAM-1	4.1	<1	<1	<1	<1	<1
HAM-2	22.5	<1	<1	<1	<1	<1
HAM-3	28.7	<1	<1	<1	<1	<1
HAM-4	44.7	<1	<1	<1	<1	<1
HAM-5	23.6	<1	<1	<1	<1	<1

HAM patient-PBMC's depleted of CD8⁺T cells were cocultured with allogeneic activated PBMCs in the presence of 100 ug/ml IgG from each of various HAM patients or normal donors. p24 in the culture supernatants was determined by ELISA (ng/ml).

ペプチド免疫によるHTLV-I中和抗体の誘導

ペプチド	B6マウス血清の合胞体抑制能(n=5)	中和単クローン抗体産生ハイブリドーマの樹立
gp46 P180-204	2~4 x	Yes
gp46 P197-216	1>	No
gp21 P400-429	1>	No

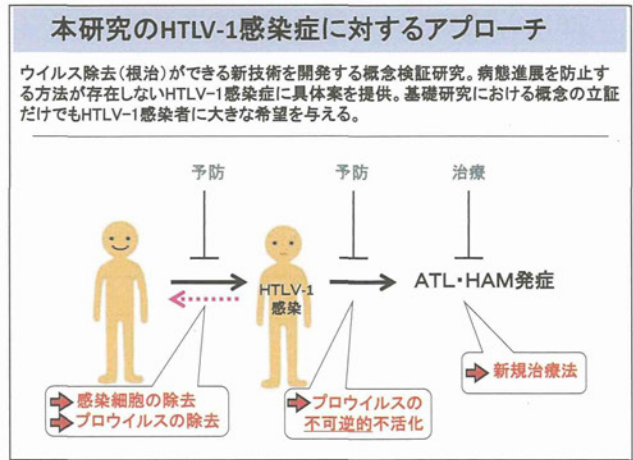
OVA-peptide conjugate(10 ug) をTiter Max混合し、皮下に2週間おきに2回免疫した。最終免疫から2週間後にpeptideのみ(10ug)をi.p. 接種し、その3日後に採血した。免疫マウスの脾臓をプールしてSP2/0と細胞融合し、ハイブリドーマより単クローン抗体を産製した。

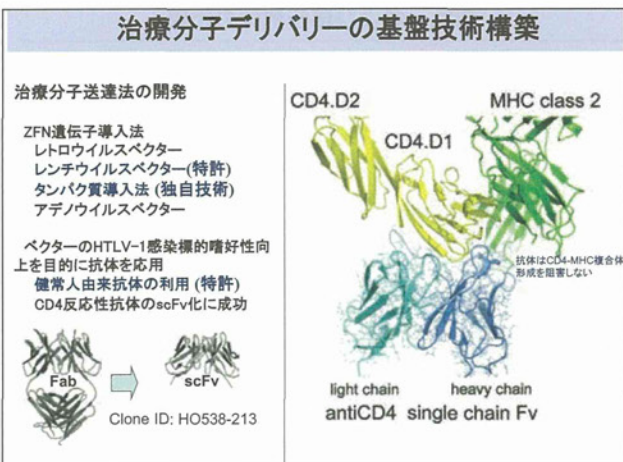
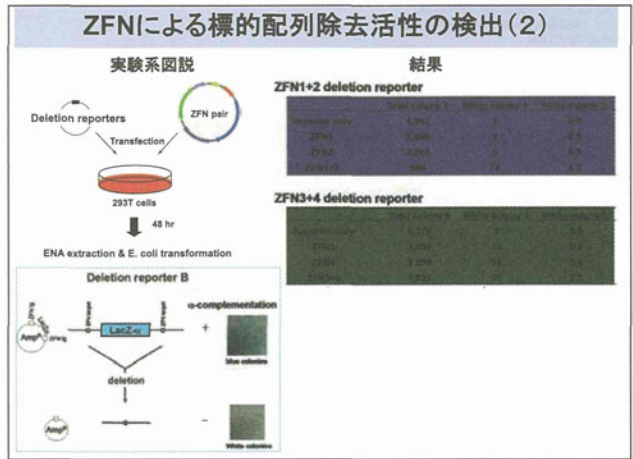
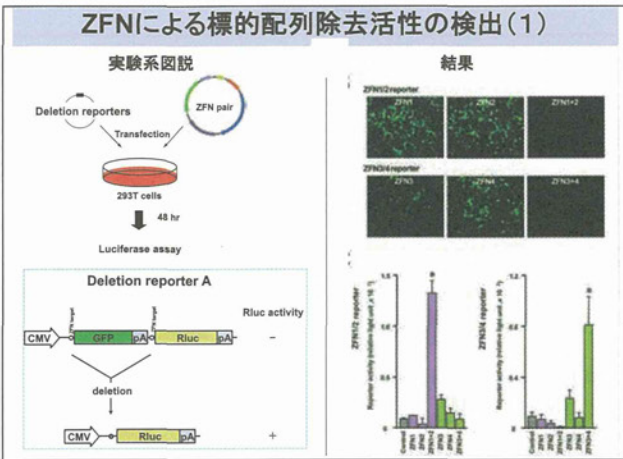
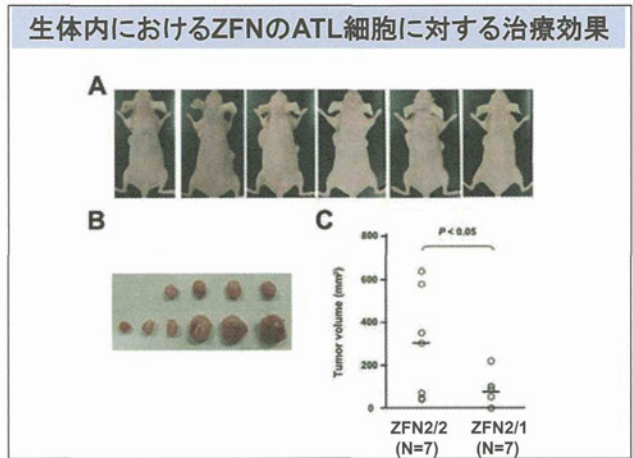
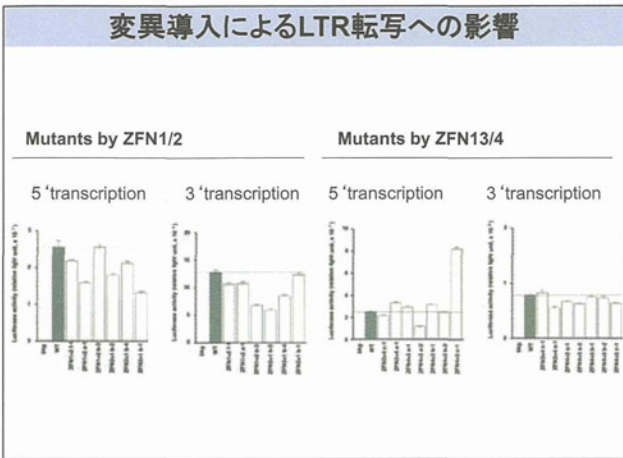


プロウイルスゲノム破壊による革新的HTLV-1関連疾患発症遅延法の開発

厚生労働省科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
(H23-新興一般-028)

研究代表者 駒野 淳 大阪府立公衆衛生研究所
研究分担者 竹腰 正隆 東海大学医学部
岡田 誠治 熊本大学エイズ学センター
星野 忠治 千葉大薬学部
武田 哲 国立感染症研究所
田中 淳 大阪大学医学部



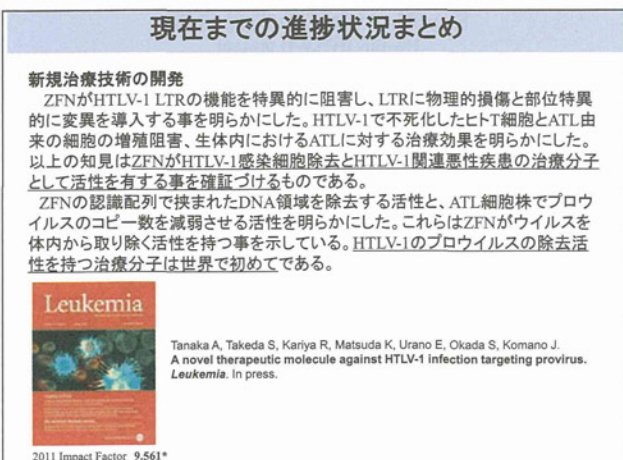


現在までの進捗状況まとめ

新規治療技術の開発

ZFNがHTLV-1 LTRの機能を特異的に阻害し、LTRに物理的損傷と部位特異的に変異を導入する事を明らかにした。HTLV-1で不活化したヒトT細胞とATL由来の細胞の増殖阻害、生体内におけるATLに対する治療効果を明らかにした。以上の知見はZFNがHTLV-1感染細胞除去とHTLV-1関連悪性疾患の治療分子として活性を有する事を確認づけるものである。

ZFNの認識配列で挟まれたDNA領域を除去する活性と、ATL細胞株でプロウイルスのコピー数を減弱させる活性を明らかにした。これらはZFNがウイルスを体内から取り除く活性を持つ事を示している。HTLV-1のプロウイルスの除去活性を持つ治療分子は世界で初めてである。



現在までの進捗状況まとめ

新規治療技術の開発

ZFNがHTLV-1 LTRの機能を特異的に阻害し、LTRに物理的損傷と部位特異的に変異を導入する事を明らかにした。HTLV-1で不活化したヒトT細胞とATL由来の細胞の増殖阻害、生体内におけるATLに対する治療効果を明らかにした。以上の知見はZFNがHTLV-1感染細胞除去とHTLV-1関連悪性疾患の治療分子として活性を有する事を確認づけるものである。

ZFNの認識配列で挟まれたDNA領域を除去する活性と、ATL細胞株でプロウイルスのコピー数を減弱させる活性を明らかにした。これらはZFNがウイルスを体内から取り除く活性を持つ事を示している。HTLV-1のプロウイルスの除去活性を持つ治療分子は世界で初めてである。

治療分子デリバリー技術の開発

HTLV-1感染標的であるCD4陽性T細胞への特異的かつ安全な治療分子導入を目指し、健康人由来CD4反応性モノクローナル抗体HO538-213を基盤とした技術を構築中。scFv化抗体が認識するエピトープがMHC-CD4相互作用に影響しないD1ドメインのC末端部分に同定された。これは生体への投与における抗体の安全性を強く示唆し、治療分子送達法への応用を支持する知見である。

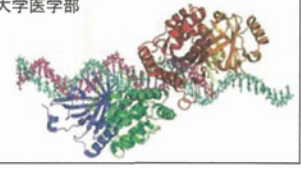
将来展望と課題

- (1) 治療より発症防止の方が感染者の身体的負担は小さいうえ、社会経済的観点からもメリットがある。本研究でプロウイルス除去やLTR不可逆的破壊が可能であることが証明されたら、HTLV-1感染症根治の現実を念頭においた**新たな厚生研究の方向性**を示す事ができる。
- (2) 本技術とiPS技術、末梢血幹細胞移植、遺伝子治療を組み合わせることにより、治療抵抗性として知られるATLに対し、新たな治療法を提供することもできる。この技術は他のウイルス感染症に対する治療にも応用可能である(HBV, EBV, HIV-1, KSHV, etc.)。
- (3) 治療分子送達技術や抗体工学は、HTLV-1感染症領域を超えて遺伝子治療や抗体医薬の領域にも多大な貢献が期待できる。
- (4) HTLV-1プロウイルスを感染細胞から**全て**除去する方法の基盤技術を確立する。ゲノム完全性と遺伝子発現・細胞生理攪乱の角度から治療分子の安全性を評価する。

プロウイルスゲノム破壊による革新的 HTLV-1 関連疾患発症遅延法の開発

厚生労働省科学研究費補助金
 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
 (H23-新興一般-028)

研究代表者 駒野 淳 大阪府立公衆衛生研究所
 研究分担者 竹腰 正隆 東海大学医学部
 岡田 誠治 熊本大学エイズ学術センター
 星野 忠治 千葉大薬学部
 武田 哲 国立感染症研究所
 田中 淳 大阪大学医学部



平成24年度厚生労働科学研究費補助金
 HTLV-1関連疾患研究領域研究班合同発表会
 平成25年2月16日

HTLV-1 感染症予防ワクチンの開発に関する研究

研究代表者: 長谷川 秀樹・国立感染症研究所感染病理部
 研究分担者:
 俣野哲朗・国立感染症研究所・エイズセンター
 梁 明秀・横浜市立大学大学院医学研究科・分子生体防御学
 外丸詩野・北海道大学大学院医学研究科・分子病理学
 田中正和・関西医科大学・微生物学講座

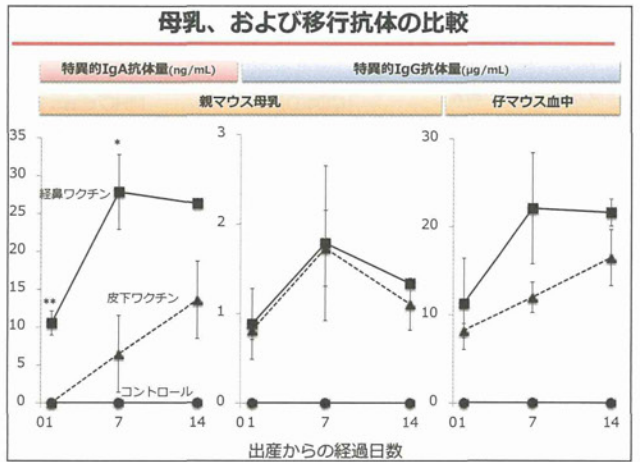
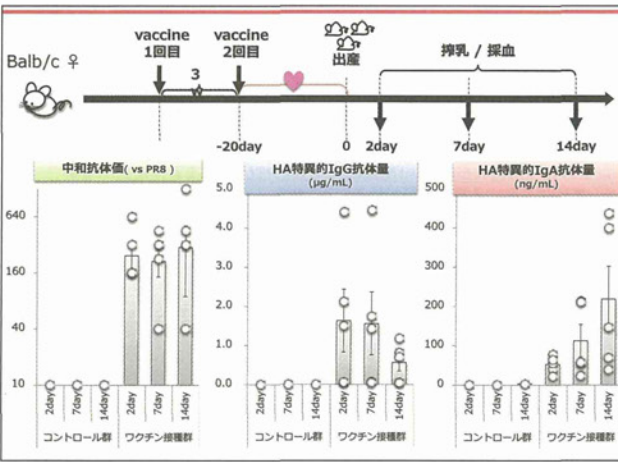
目的と背景

HTLV-1感染症を我が国をはじめとする流行地域から減少させる目的で感染阻止、HTLV-1関連疾患の発症阻止を目指したワクチン開発を目的とする。

- ✓ HTLV-1の主な感染経路は母乳を介した母子感染である。感染防御を目的として新生児の免疫獲得には工夫が必要である。粘膜を介して感染する感染症においては粘膜上で働く特異的IgA抗体に代表される粘膜免疫が重要な働きをする。IgA抗体は母乳中にも積極的に分泌される事が知られている。血中IgG抗体に加えてIgA抗体が誘導される事により感染防御効果が高まる事が期待できる。
- ✓ また感染細胞を標的とした細胞障害性T細胞の誘導も発症予防の観点から重要である。
- ✓ 新生児へのワクチン接種は、免疫機構が未成熟であるため、有効な効果が期待できない。しかし、新生児の時こそHTLV-1に対する免疫が必要である。



HTLV-1の感染防御免疫の標的抗原の同定、
 有効な免疫の検討、ワクチン投与ルート、
 免疫方法の検討、アジュバントの検討、評価モデル動物の検討



コムギ無細胞タンパク質合成系を用いた HTLV1Aタンパク質の合成

(梁秀明・横浜市立大学医学部)

Name	bp	aa	kDa	isoform
1 HTLV1A_gag	1302	429	47.5	
2 HTLV1A_gag-pro	1970	651	71.6	
3 HTLV1A_gag-pro-pol	4401	1462	162.5	
4 HTLV1A_env	1481	495	53.9	
5 HTLV1A_TAX-1	1076	353	39.5	
6 HTLV1A_HBZ	844	299	24.89	
7 HTLV1A_p27REX	584	189	20.5p21REX_missing in p27REX 1-78	
8 HTLV1A_p27I	470	151	17.2p21I_missing in p27I 1-53	
9 HTLV1A_p30II	740	241	26.7p13II_missing in p30II 1-154	

DNAMER1: Human T-cell leukemia virus 1 (strain Japan ATK-1 subtype A)

HTLV1A_gag, env, TAX-1, HBZ, p27REX, p27I, p30II

pEU-E01-bls-S1-MCS vectorへ乗せ換え

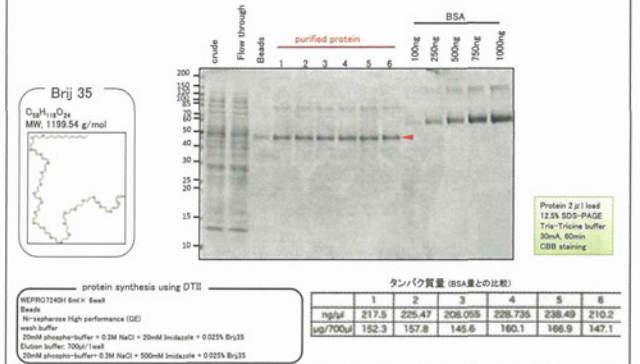


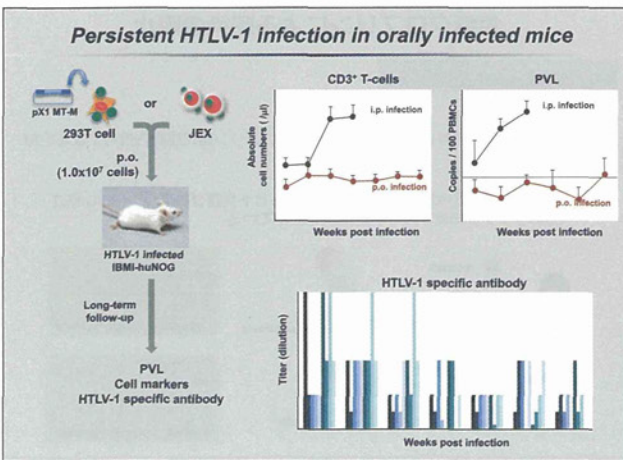
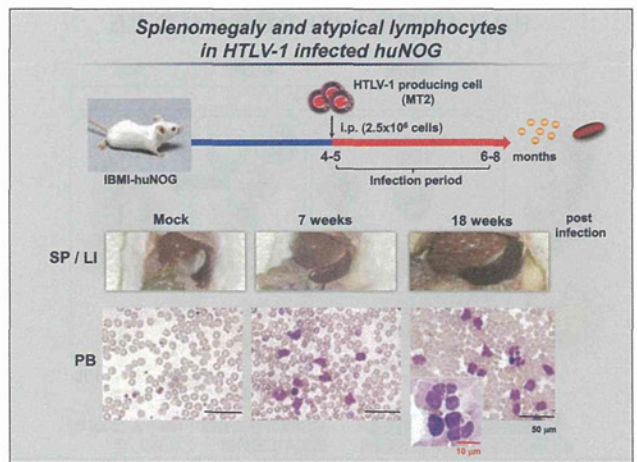
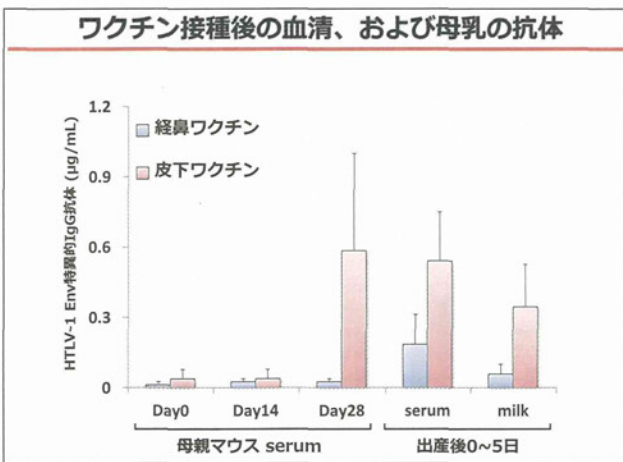
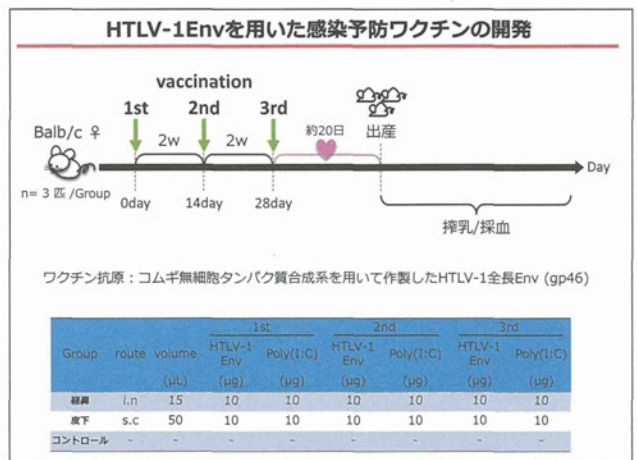
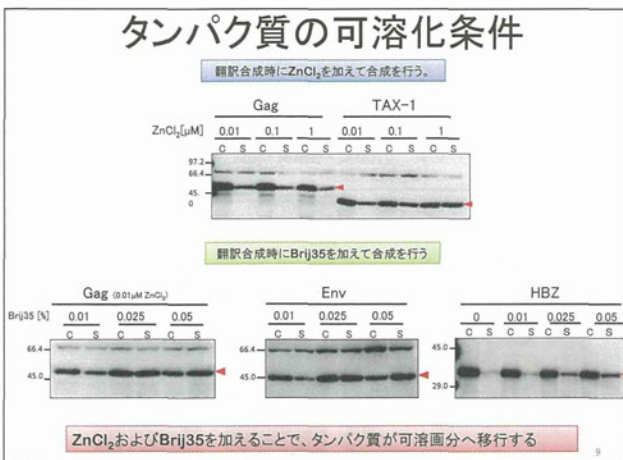
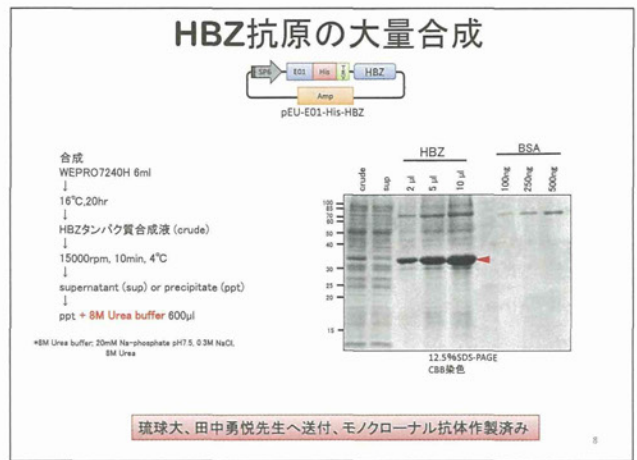
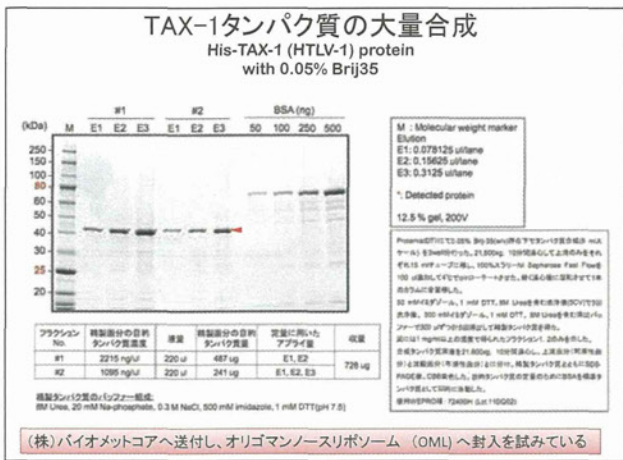
bls配列: Biotin ligation site (GLNDIFEAGIKSEWHE)

S1配列: CCACCGACACGACCA (LHPHPPRRS)

Envタンパク質の大量合成

His-Env (HTLV-1) protein with 0.025% Brij35

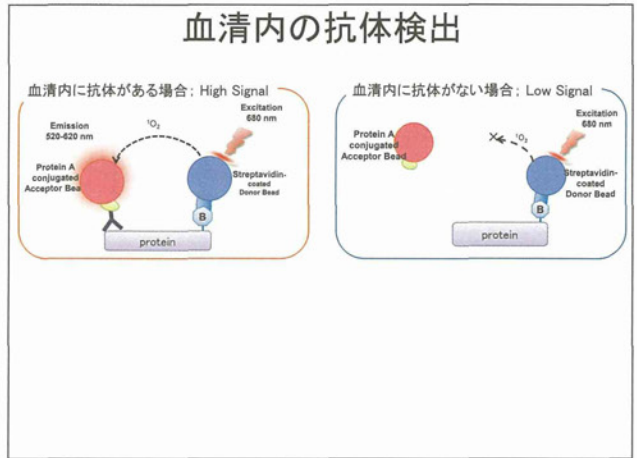
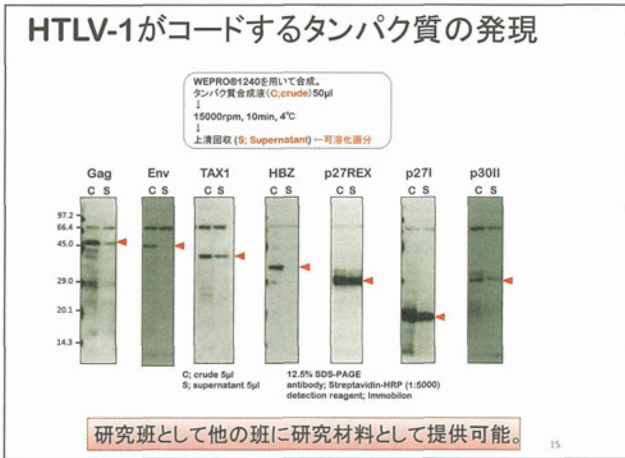




次年度以降の計画

感染阻止、発症阻止の為のワクチン開発

- ・作成された種々の抗原による防御能の検討
- ・アジュバント、投与ルートの検討
 - 1) 感染源となる細胞の破壊
 - 2) 粘膜上での感染の防御
 - 3) 感染細胞を標的とした細胞障害性T細胞の誘導
- ・感染モデル、発症モデルを用いたワクチン効果の検討



平成24年度厚生労働科学研究費補助金
新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンによる HTLV-1の革新的感染予防モデルの開発 とその有効性の検討

水上 拓郎
国立感染症研究所
血液・安全性研究部 第4室

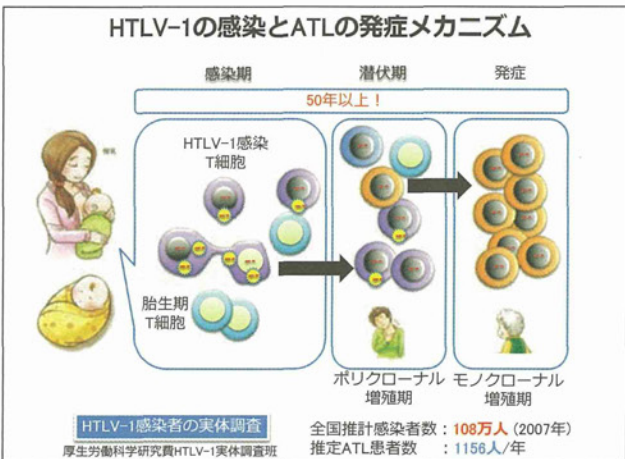
成人T細胞白血病(ATL)

定義
HTLV-1感染Tリンパ球が腫瘍化し、クローン性に増殖した事によって発症する疾患

臨床疫学的特徴

- 疫学: 西南日本に多い
- 発症: 家族内発症
平均発症年齢60歳
- 感染: 母乳感染・性感染・輸血
- 予後は極めて不良

リンパ節腫大 皮膚の発疹 胃への浸潤
感染初症 骨転移 脳への浸潤



HTLV-1対策 [1988年]

平成2年度厚生労働科学研究費研究課題 (3年間: 1988年 - 1990年)
成人T細胞白血病(ATL)の母子感染防止に関する研究

1. 育児方法の変化により、放置しても感染者は自然に減少し、将来消滅する。
2. キャリア率の高い地域以外では、対策不要であろう。
3. 全国的な一律の検査や対策は必要ない。九州地区を中心に実施された

HTLV-1キャリア数の変化と地域分布 [2007]

厚生労働科学研究費HTLV-1実体調査班報告書より

1988年: 130万人 → 2007年: 108万人

西南日本 → 都市部へ

107万9千人 (2007)

地域	キャリア率 (%)
北海道	2.6%
東北	4.5%
関東	17.7%
中部	7.6%
近畿	15.9%
中国	6.2%
九州	45.7%

総数は九州地区の減少により減少したが、都市部で増加傾向にあり、全国化した

HTLV-1総合対策 [2011年度]

発症予防 キャリア全員がATLにはならない (5%前後が発症) なので、ATL発症高危険群を同定し、発症介入を行う (HTLV-1総合対策2011)

治療 ATL治療法の開発 (IFN/AZT治療等)、同種造血幹細胞治療、新規治療法 (CCR4抗体)、ワクチン

感染防止

- 輸血感染: 献血者スクリーニング (抗体検査) の導入により完全防止
- 性感染: 水平感染の可能性が高いが、詳細は不明 (避妊具)
- 母子感染の防止:
 - 母乳から人工乳へ
 - 全国一律妊婦抗体検査 (2010年11月より)
 - 感染率は20% しかし断乳しても3%感染する!

新しい革新的感染予防法の開発が必要!

免疫グロブリンによる感染の阻止

免疫グロブリンを使った成功例

感染胎児の治療
CMV胎内感染に対し、CMV高力価免疫グロブリン胎児腹腔内投与による治療

新生児の感染予防
母体がHBs抗原(+)の場合、新生児に抗HBsヒト免疫グロブリン(HBIG)筋注とHBワクチンの皮下注で予防効果を上げている

抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンによるHTLV-1感染予防法の開発-1 (H24年度)

抗体陽性血漿より抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンの製造へ向けた予備的スクリーニング

候補血漿の選定 高力価HTLV-Ig

佐竹正博先生 (西東京日本赤十字血液センター)
 田所憲治先生 (日本赤十字中央血液研究所)
 松本千恵子先生 (日本赤十字中央血液研究所)

NIID 抗体陽性血漿を用いたin vitro感染抑制実験

感染モデルの標準化が必要

HTLV-1感染細胞株 + 培養細胞 ± HTLV-Ig

HTLV-1感染細胞株 (HTLVキャリア ATL細胞) + 培養細胞 (hPBMC) + 候補血漿のスクリーニング

FACS解析 核酸増幅試験 Western Blotting

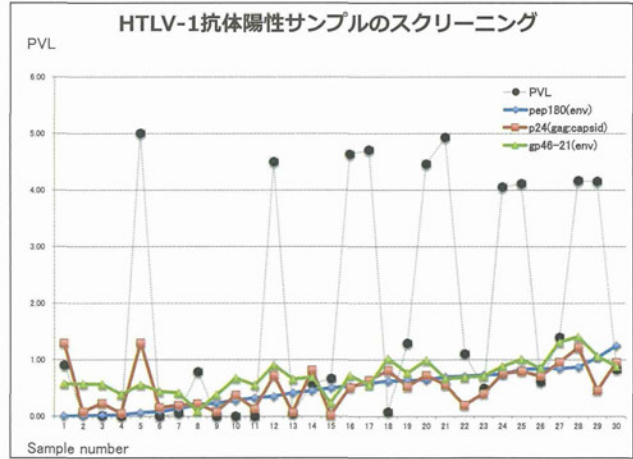
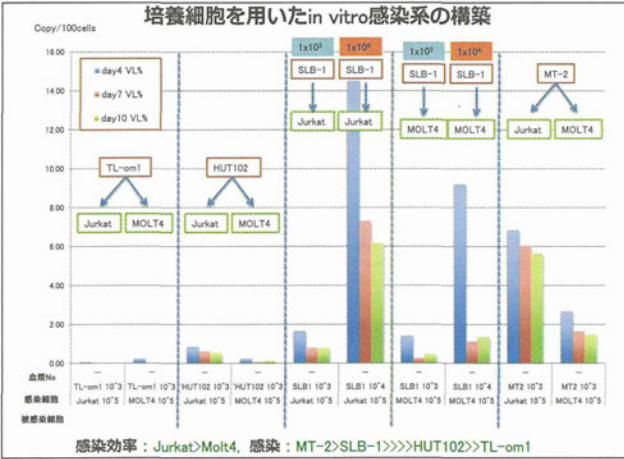
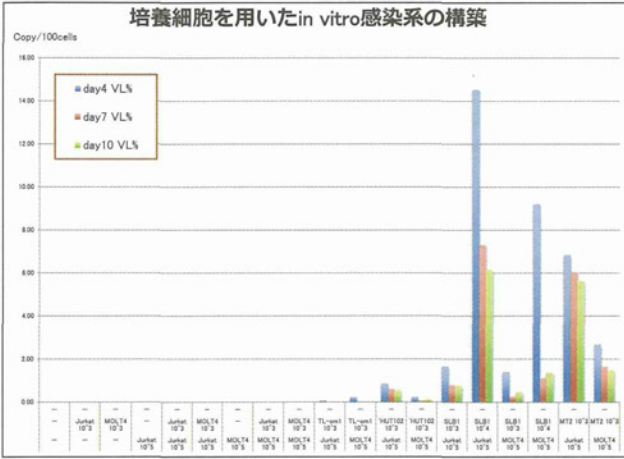
培養細胞を用いたin vitro感染系の構築

Mitomycin C処理 (50ug/ml) 37°C1hrs

HTLV-1感染細胞株 → 培養細胞 → 核酸増幅試験 (Day 4, 7, 10)

HTLV-1感染細胞株: HUT102, MT2, SLB-1, TL-OM1
 培養細胞: Jurkat, Molt4

Test	Day 4	Day 7	Day 10
Jurkat 10 ³	~1	~1	~1
Jurkat 10 ⁵	~1	~1	~1
TL-OM1 10 ³	~1	~1	~1
TL-OM1 10 ⁵	~1	~1	~1
HUT102 10 ³	~1	~1	~1
HUT102 10 ⁵	~1	~1	~1
SLB1 10 ³	~1	~1	~1
SLB1 10 ⁵	~1	~1	~1
P.C.	~1	~1	~1

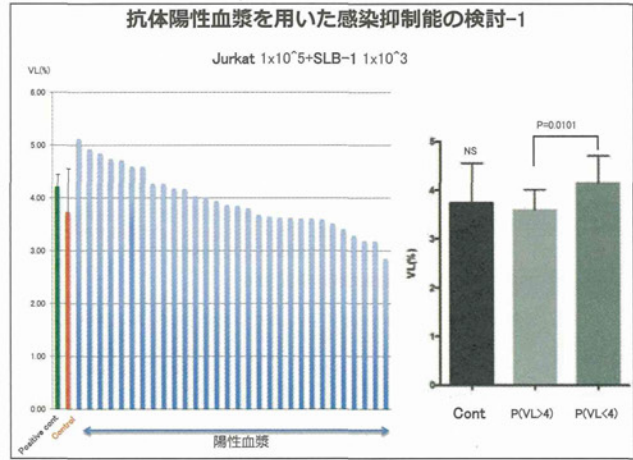


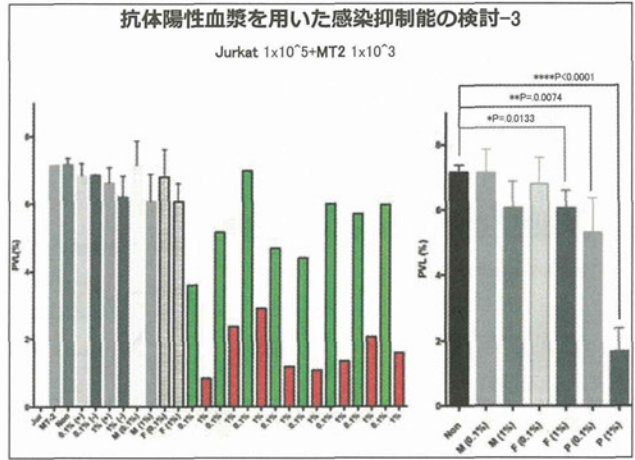
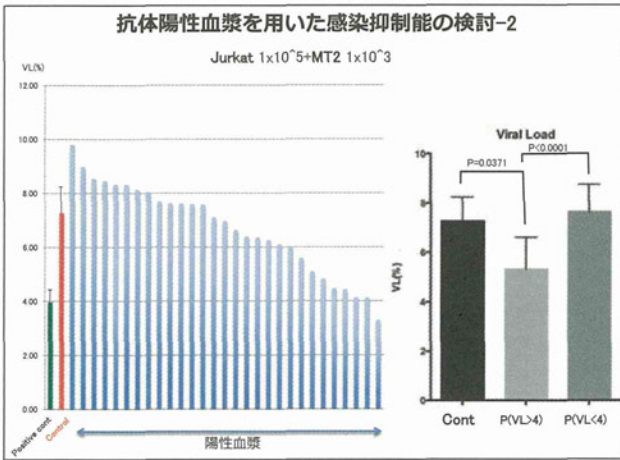
抗体陽性血漿を用いた感染抑制能の検討

Post-Incubation: HTLV-1感染細胞株 + 培養細胞 + 陽性血漿 → 核酸増幅試験

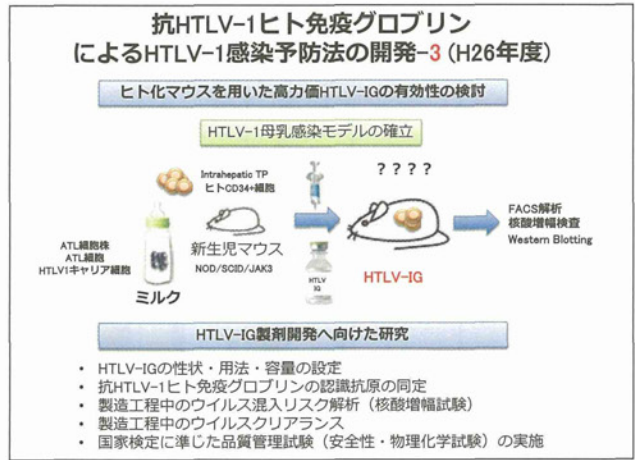
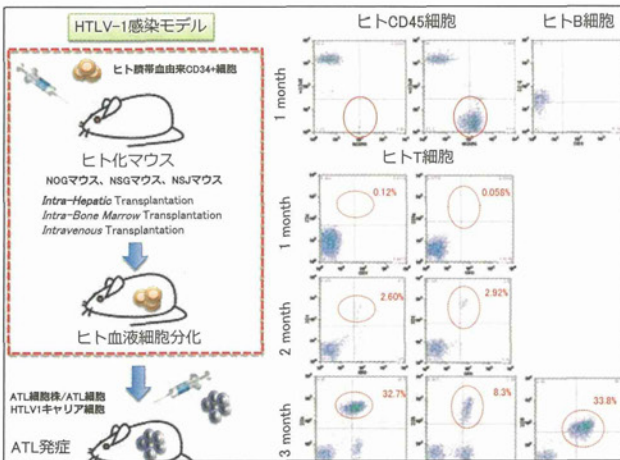
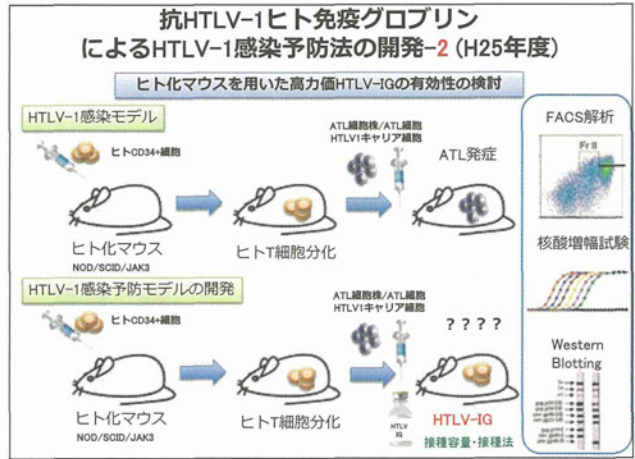
Pre-Incubation: HTLV-1感染細胞株 + 陽性血漿 → 培養細胞 → 核酸増幅試験

HTLV-1感染細胞株: MT2, SLB-1
 培養細胞: Jurkat, Molt4





- ### 小 括
- HTLV-1感染細胞株を用いてHTLV-1感染系を構築した。
 - HUT102, TL-om1, SLB-1, MT2を用いて実験を行った結果、**SLB-1, MT-2**が**高効率に感染**をすることが明らかとなった。また、被感染細胞としてMolt4, Jurkatなどを検討したが、**Jurkatへの感染効率がより良い**事が明らかとなり、SLB-1/MT2-Jurkat系の感染システムが感染抑制効果の検証に有効であることが明らかとなった。
 - 30種類のHTLV-1陽性血漿を用いて予備的スクリーニングを行った結果、**MT-2+Jurkat系ではPVL4以上の陽性血漿で有意な感染阻害が認められた**一方、SLB-1-Jurkatでは感染阻害の程度が弱かった。
 - 陽性血漿をさらに非動化処理の有無・性別・遠心処理の有無・添加量などに分類し、条件検討を行った結果、**いずれも1%の濃度では有意に感染抑制効果が認められた**。
 - 現在、高価グロブリンの精製を視野に入れてより効率の良い感染阻害実験系の確立を目指している。また、PBMCでの同様の試験法の標準化を検討中である。



本研究の意義と期待される成果・厚生行政への貢献

- 新規感染予防法** HTLV1感染について、**HTLV-IGの感染阻止に関する有効性**を示す
- ヒト臨床へのTRS** ヒト化マウスを用いる事で、ヒト細胞の実際の生体内での感染予防を確認でき、**ヒトへの外挿**が可能となる
- 新薬開発/国際貢献** HTLV-1抗体陽性血漿は**日本でしか入手できないため、高品質のHTLV-IGは日本発で開発・製造可能**。世界的には数千万人のキャリアがあり、**世界的な規模での利用**が期待されている。
- 厚生行政** HTLVワクチン (H23年度 厚生労働省科学研究費 長谷川秀樹主任研究者) が成功すれば、**HTLV-IG+Vaccineとの組み合わせ**でHBVの母子感染予防のような感染予防策が期待される。
- 献血の有効利用** 貴重な**献血血液の有効利用**に繋がる

代表	水上 拓郎	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第4室室長
分担	浜口 功	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	部長
	大隈 和	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第3室室長
	山口 一成	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	客員研究員
	佐竹 正博	西東京日本赤十字血液センター		
	田所 憲治	日本赤十字中央血液研究所		
協力	野島 清子	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	研究員
	松本 千恵子	日本赤十字中央血液研究所		

厚生労働科学研究
難治性疾患克服研究事業
(H23-難治-一般-126)

「HAMの新規医薬品の開発に関する研究」

研究代表者
聖マリアンナ医科大学
難病治療研究センター
山野嘉久

本研究班の目的

HAM患者の診療レベルを改善し
生活の質を大きく向上させるために
画期的な新規医薬品の開発と
治療法の確立に向けた研究を推進する

研究組織

研究の総括
研究代表者 山野嘉久 (聖マリアンナ医大)

臨床的解析チーム	基礎的解析チーム
分担研究者 菊池誠志 (北海道医療センター 臨床研究部) 藤原一男 (東北大学 多発性硬化症治療学) 長谷川泰弘 (聖マリアンナ医大 神経内科) 中川正法 (京都府立医大 神経内科) 竹之内徳博 (関西医大 微生物・神経内科) 永井将弘 (愛媛大学 臨床薬理・神経内科) 吉良樹一 (九州大学 神経内科) 中村龍文 (長崎大学 神経内科) 高橋博 (鹿児島大学 神経内科) 渡藤敦崇 (琉球大学 神経内科) 齊藤峰輝 (琉球大学 免疫学・神経内科) 上野隆彦 (聖マリアンナ医大 生物統計) 松本直樹 (聖マリアンナ医大 臨床薬理) 青谷恵利子 (北里大学 臨床試験・データインテグ) 高田礼子 (聖マリアンナ医大 予防医学)	分担研究者 樋田幸嗣 (理化学研究所 プロテオミクス) 外丸祐野 (北海道大学 病理学)
研究協力者 佐藤知雄 (聖マリアンナ医大 難治研) 八木下尚子 (聖マリアンナ医大 難治研) 新谷奈津美 (聖マリアンナ医大 難治研) 橋本充代 (聖マリアンナ医大 予防医学) 井上永介 (北里大学薬学部 臨床統計学)	



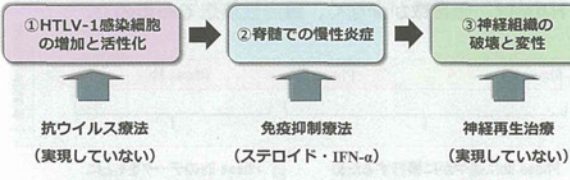
研究方法

- (1) 医師主導治験プロトコル作成とPMDAの対面助言
- (2) プロトコル作成に資する臨床的・薬力学的評価指標のデータ収集と解析
- (3) HAM患者登録システムの構築と疫学調査
- (4) 次世代の新規医薬品候補のシーズ探索

研究方法

- (1) 医師主導治験プロトコル作成とPMDAの対面助言
- (2) プロトコル作成に資する臨床的・薬力学的評価指標のデータ収集と解析
- (3) HAM患者登録システムの構築と疫学調査
- (4) 次世代の新規医薬品候補のシーズ探索

HAMの病態からみた治療薬開発の展望



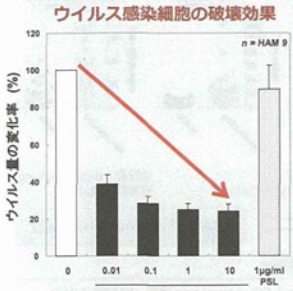
抗ウイルス療法 (実現していない) 免疫抑制療法 (ステロイド・IFN-α) 神経再生治療 (実現していない)

- 現状のステロイド・インターフェロンα治療では患者の予後は不良
- 現状では病気の根本である感染細胞を標的とした治療薬がない

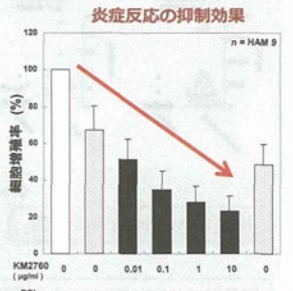
感染細胞を標的とした薬はHAMの根本的な治療薬となることが期待される
HAM患者の機能予後改善のみでなくATLの発症予防にもつながる可能性あり

HAM患者における抗CCR4抗体の有用性を証明

ウイルス感染細胞の破壊効果

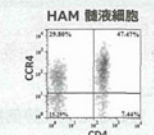


炎症反応の抑制効果

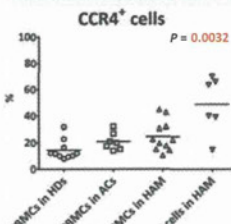


HAM患者における感染細胞の表面マーカーとしてCCR4が有用であり、それを標的とした治療薬の有効性を証明し特許出願 (2008年, 2012年)

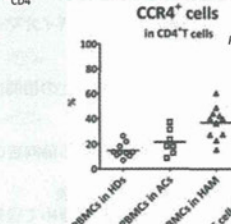
HAM患者の髄液細胞にはCCR4+細胞が極めて多く含まれている



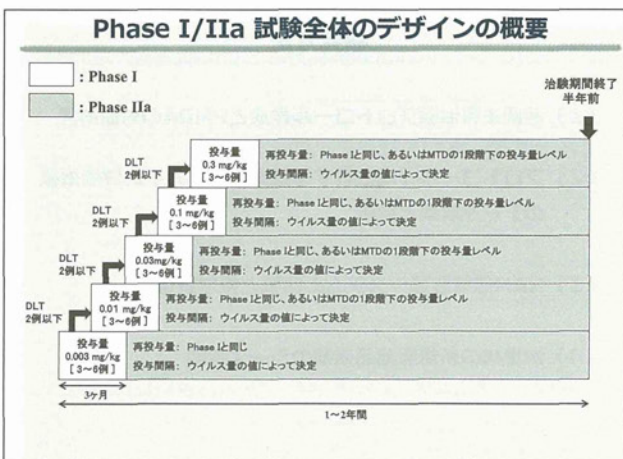
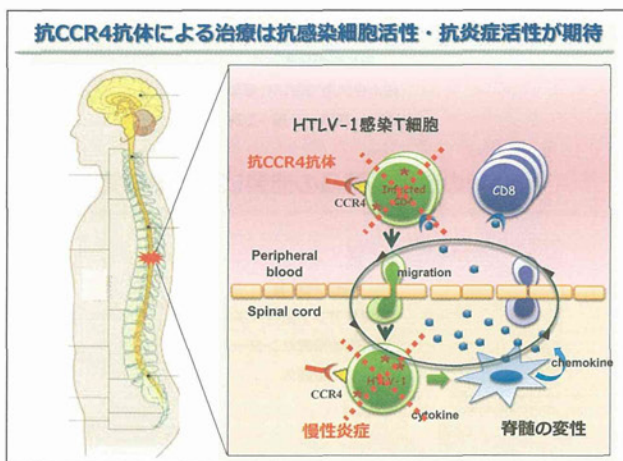
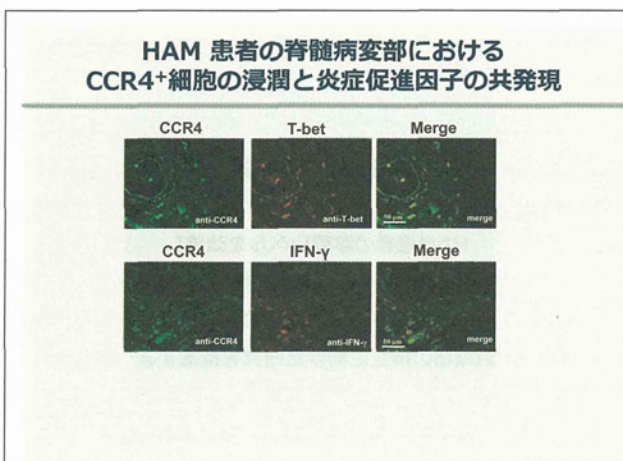
CCR4+ cells



CCR4+ cells in CD4+ T cells



Statistical significance, P < 0.05 by Kruskal-Wallis test

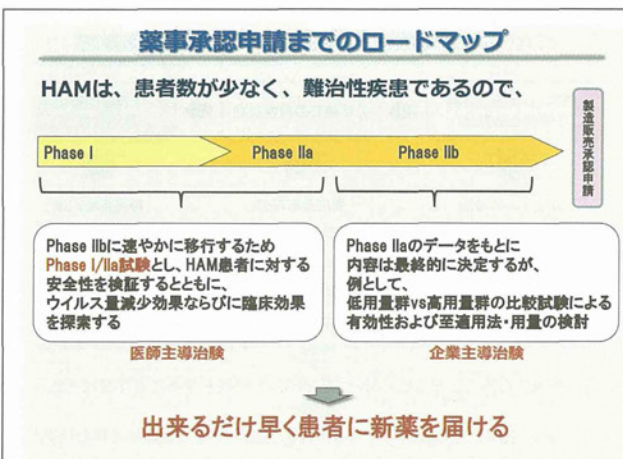


HAMの医師主導治験に向けて準備を進めた

- 特許出願完了
- プロトコル作成に必要な臨床ならびに基礎情報の蓄積

国内製薬企業の協力を得ながら、安全性に十分配慮した至適投与量・投与回数などを検討するための薬事承認申請に耐える医師主導治験のプロトコルを作成し、PMDA (医薬品医療機器総合機構) の対面助言 (2012/11/6) を終了

医師主導治験を実施し
日本発のHAMの革新的な新薬の創出につなげる



- ### 研究方法
- (1) 医師主導治験プロトコル作成とPMDAの対面助言
 - (2) プロトコル作成に資する臨床的・薬学的評価指標のデータ収集と解析
 - (3) HAM患者登録システムの構築と疫学調査
 - (4) 次世代の新規医薬品候補のシーズ探索

HAMの質の高い臨床試験を実現していくために

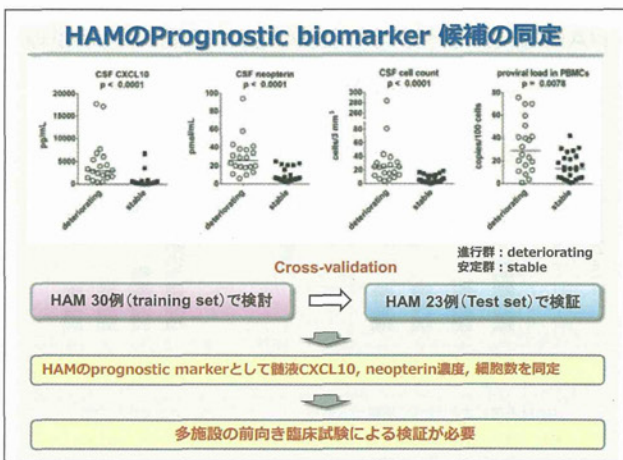
- **エンドポイントの質を高めるために、生物統計学的解析に基づいた有効性評価指標を確立する必要がある**
- ★ 臨床経過に関する詳細なデータが必要 (特に10m歩行時間など、定量性の高い評価指標のデータ蓄積が必要)
- ★ 臨床経過や予後と相関するバイオマーカーの同定と検証が必要

臨床経過とバイオマーカーとの相関に関する解析が必要

その意味で、

- ・ 予後因子・治療に関する前向き臨床試験
- ・ 後ろ向き研究
- ・ 今回のPhase I/IIa試験等によるデータ収集が極めて重要で、

将来のHAMの有効性検証試験 (Phase IIbなど) に必須



前向き国際共同臨床試験のプロトコル作成

Why international?

- 症例集積性の向上
- 高いエビデンスレベル
- 国際的な合意形成
- HAM臨床研究グループの促進
- 国際貢献

<世界の背景>

- HAMの治療エビデンスが少ない
- 国際標準の「評価項目」が確立していない
- 国際的な連携がとれていない

前向き臨床試験による

- バイオマーカーの検証
- 緩徐進行群へのステロイド有効性の検証
- 国際標準の outcome 評価法の決定

世界のHAM研究者らでHAMの臨床試験を推進するHAM clinical trial study group (HAM-CTSG)を結成

日本	慶応義塾大学 (山野嘉久)
英国	York大学 (Dr. F. Martin)
英国	Imperial大学 (Dr. G. Taylor)
米国	NIH (Dr. S. Jacobson)
ブラジル	Bahiana大学 (Dr. B.G. Castro)

日本の研究施設も多数参加

HAMのバイオマーカーを検証し、また臨床の現場に還元できる治療エビデンスを創出できる

HAMの前向き国際共同臨床試験のプロトコル骨子

Study Design

急速進行 (ステロイド・オープンラベル試験 (パルス療法→内服、治療24週、観察24週、n=12))

緩徐進行 (ランダム化二重盲検プラセボ対照比較試験 (ステロイド少量内服、治療24週、観察24週、n=66))

非進行 (観察(ベストスタンダードケア、48週、n=12))

主要評価項目 (国際標準)

10m歩行時間 → Log 10m歩行時間

必要症例数の生物統計学的解析

$$n = 2 \left(\frac{t_{\alpha/2}(2n-2) + t_{\beta}(2n-2)}{\delta/\sigma} \right)^2$$

検出力80%で、20%の変化量を検出するために必要な症例数は1群あたり33例

HAMの臨床試験・治験を実施する上で重要な基盤情報を創出

研究方法

- (1) 医師主導治験プロトコル作成とPMDAの対面助言
- (2) プロトコル作成に資する臨床的・薬力学的評価指標のデータ収集と解析
- (3) HAM患者登録システムの構築と疫学調査
- (4) 次世代の新規医薬品候補のシーズ探索

HAM患者登録システム (HAMねっと) の開設 (H24,3月~)

HAM患者登録システム、患者会と連携して登録を進め、383例の申込み、313例の登録完了

- 患者情報の効率的な集約が可能
- 全国規模で様々な背景の患者登録に成功
- 臨床試験の症例集積性の向上につながる
- 患者への最新情報の発信を可能とする

疫学研究

- 継続的な調査(患者背景、生活・障害支援状況 QOL、治療内容、検査データ等)
- 横断的な調査(発症リスク、予後因子など)

HAMの自然経過、治療経過、予後因子、重症度評価法など、治療研究や行政施策に必要な基盤情報が明らかとなり、その推進に貢献

研究方法

- (1) 医師主導治験プロトコル作成とPMDAの対面助言
- (2) プロトコル作成に資する臨床的・薬力学的評価指標のデータ収集と解析
- (3) HAM患者登録システムの構築と疫学調査
- (4) 次世代の新規医薬品候補のシーズ探索

新規医薬品候補のシーズ探索

HAM臨床研究ネットワーク
高い症例集積性 (現在の患者数: 316例) (過去の患者数: 1151例)

臨床試験・治験検討委員会
臨床試験マネジメント
サンプルセンター

新薬開発研究 (基礎解析チーム)

- 新薬候補の有効性の検証
- リード化合物ライブラリーを用いた新規治療薬候補化合物のスクリーニング
- プロテオミクスによる治療標的分子の探索

2種類の新薬を同定し 特許出願

新薬研究と治験実施体制をリンクさせ、一連の流れを加速させる

早期臨床試験の実施

今後の展望

本研究期間 (H23-24) → 5年後 → 10年後

- ①抗CCR4抗体療法の治験
 - 治験プロトコル完成 (PMDA対面助言終了)
 - Phase I/IIa (医師主導治験)
 - Phase IIb (企業主導治験)
 - 製造販売承認申請
- ②臨床的・薬力学的データ収集
 - 臨床的・薬力学的データの生物統計学的解析
 - 予後因子の解析
 - 後向き国内共同試験の立案と開始
 - 後向き臨床試験
 - 前向き国際共同試験プロトコル完成
 - 前向き臨床試験
- ③HAM患者登録システム (HAMねっと)
 - 症例集積性向上
 - 疫学調査
 - 疫学情報の解析
- ④次世代の新規医薬品候補のシーズ探索 → 新しい治験候補薬

エビデンスレベルの高い有効性評価指標の確立、症例集積性向上に貢献

日本の革新的な新薬の創出

治療エビデンスの蓄積

患者の診療レベルを改善し生活の質を大きく向上

HAMの治療研究を発展させていくために

● 抗CCR4抗体製剤の治験

Phase I → Phase IIa → Phase IIb

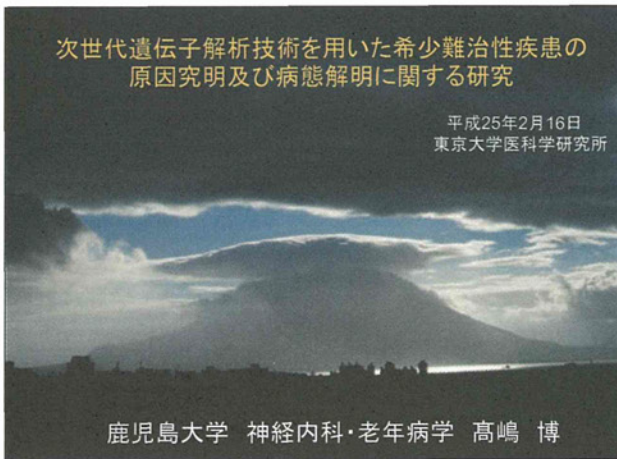
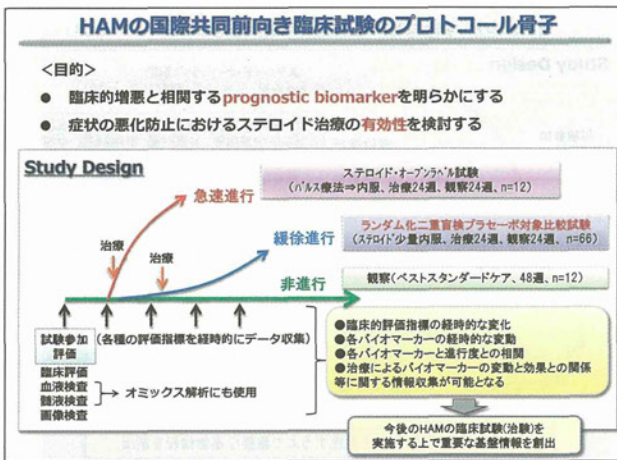
Phase I/IIa試験 (医師主導治験) → Phase IIb試験 (企業主導治験)

- HAM国際共同臨床試験
- 後ろ向き研究
- その他、臨床データの蓄積
- HAM患者登録システムの充実

これらのデータは、適切な治験の実施へ役立つ

HAMの適切な治療効果判定方法の確立へ

製造販売承認申請



厚生労働省 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

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

次世代シーケンサーを用いた家族性HAMの遺伝子解析によるHAM発症因子の探索

○高嶋 博¹ 松浦英治¹ 野妻智嗣¹ 松崎敏男² 渡邊 修¹
久保田龍二² 出雲周二²
三井 純³ 高橋祐二³ 辻省次³ 山野嘉久⁴

¹鹿児島大学神経内科・老年病学
²鹿児島大学難治ウイルス研
³東京大学神経内科
⁴聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター

厚生労働省 難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

研究班メンバー

研究班メンバー		担当	
鹿児島大学 神経内科学	高嶋 博	代表研究者	
鹿児島大学 神経病理学	出雲 周二	HAM	出雲班
京都府立医科大学、神経内科学	中川 正法	遺伝性神経疾患	中川班
愛媛大学 神経内科学 薬物治療学	野元 正弘	遺伝性神経疾患	
愛媛大学 神経内科学 臨床薬理学	永井 将弘	遺伝性神経疾患	HAM
東京大学 神経内科学	高橋 祐二	ゲノム解析拠点	
鹿児島大学 神経免疫学	久保田龍二	HAM	
名古屋大学 神経内科学	田中 章景	遺伝性神経疾患	
聖マリアンナ医科大学 神経免疫学	山野 嘉久	HAM	山野班
鹿児島大学 神経内科学	松浦 英治	HAM	

東大病院 ゲノム医学センター 2011年5月発足

多数の高性能ゲノムシーケンサーを所有(5台)

- HiSeq2000: 2台
- MiSeq: 1台
- PacBio: 1台
- 5500XL: 1台

1500Gb/2 weeks

- ヒトゲノム約30億(=3G)塩基対
- ヒト全ゲノム一人解読するのに必要な容量=3G×50(depth)=150G

2週間で10人のヒト全ゲノム解析が可能

鹿児島大学神経内科・老年病学

7G/day 2G/day 60-100G/day

研究班の目的

全国的な枠組みで10000例を超える多数のDNA検体を収集
次世代シーケンサーを用いて

1. 希少難治性疾患の遺伝的原因を決定
2. 安価で持続可能な遺伝子診断法を開発
3. 遺伝性神経難病の本邦の分子疫学
4. 疾患原因別頻度を明らかにし、治療への道筋を立案する
5. 孤発性疾患の疾患発症原因の同定

単一遺伝子疾患	多因子遺伝性疾患
Charcot-Marie-Tooth 病、(CMT)	HTLV-1関連脊髄症
Hereditary Motor Neuropathy (HMN)	(HAM)
HSAN	MSA
遺伝性脊髄小脳変性症	ALS
ミトコンドリア病 (MIMECK etc)	PSP
周期性四肢麻痺	CBD
筋疾患	

