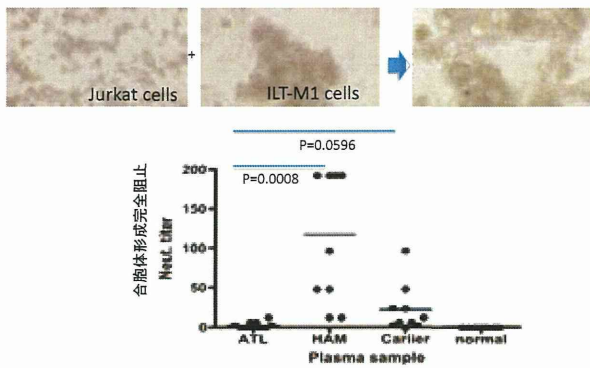
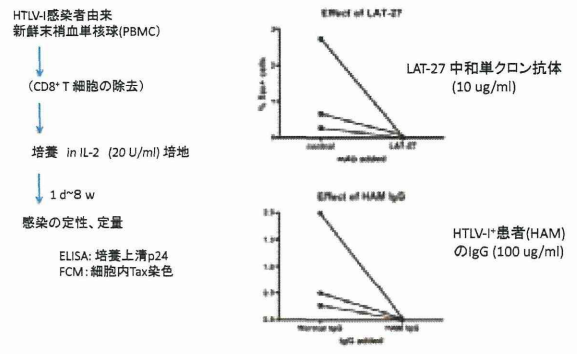


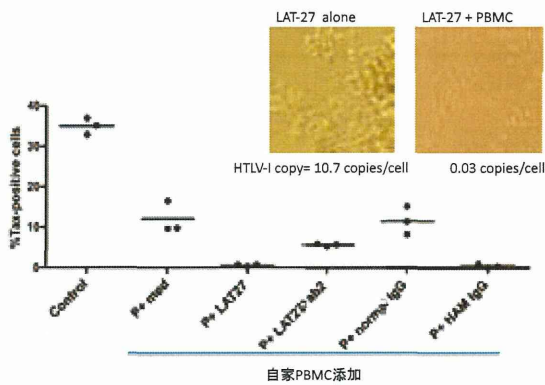
患者抗体の中和能: HTLV-I 合胞体形成阻止



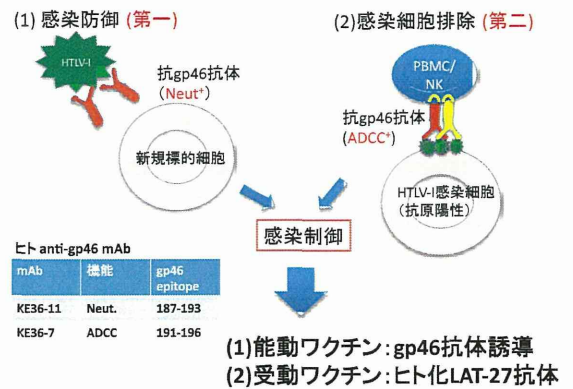
LAT-27抗体とHTLV-I⁺患者のIgGは、HTLV-Iが生体内で感染したT細胞の不死化/増殖を阻止する



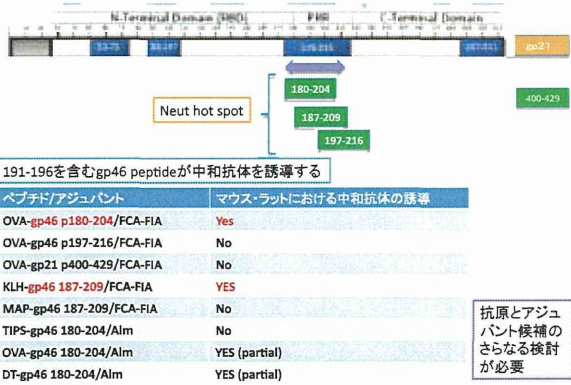
抗HTLV-I gp46中和抗体は新鮮自家PBMC存在下、Fc依存性にHTLV-I感染細胞株の増殖を阻止する



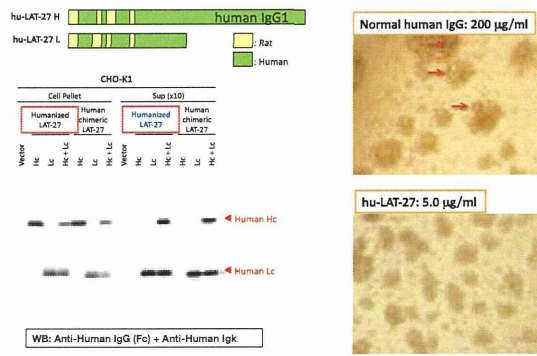
単一/複数の抗体を介するHTLV-I感染制御



HTLV-I エンベロープgp46 peptideの中和抗体誘導能

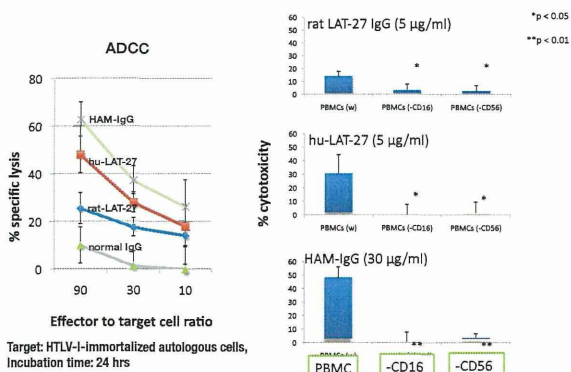


LAT-27単クロン抗体のヒト型化

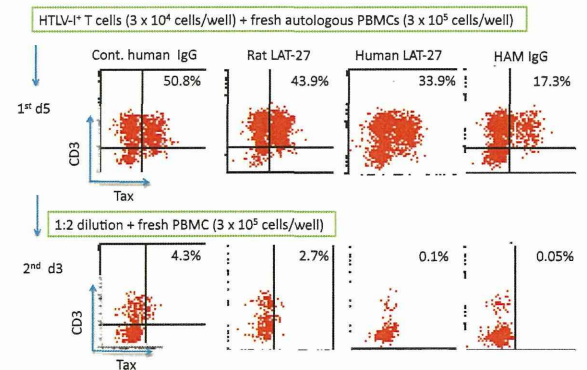


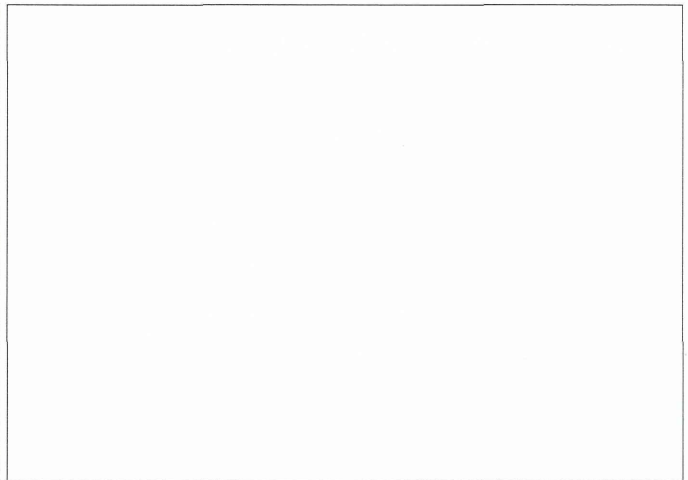
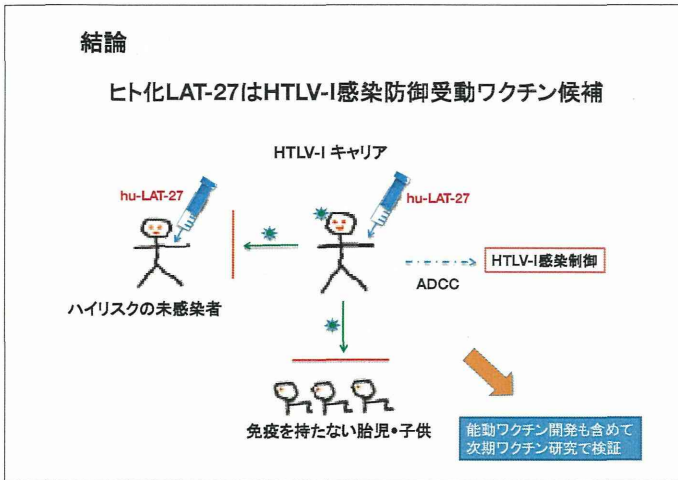
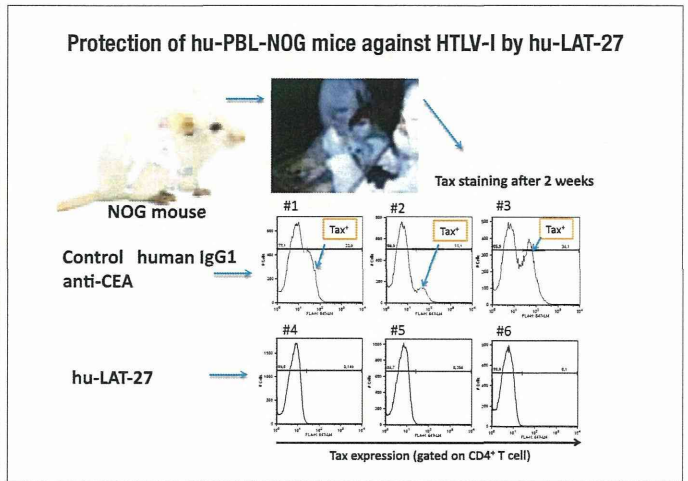
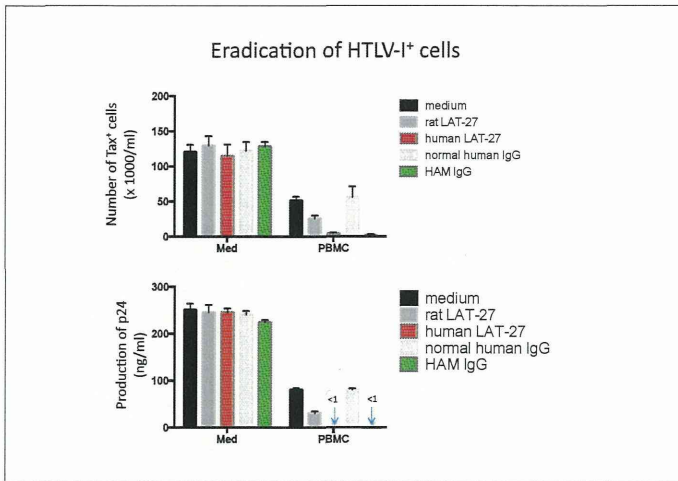
(IBL:特許申請中)

hu-LAT-27 mediates ADCC with NK cells



Eradication of Tax⁺ cells by hu-LAT-27 with autologous PBMCs

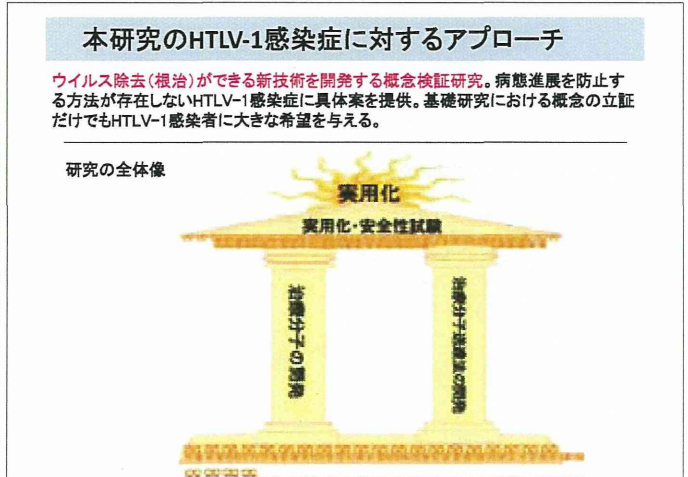
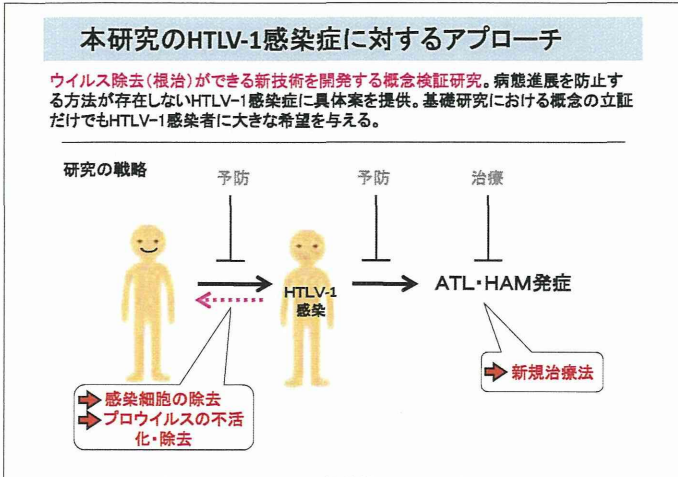
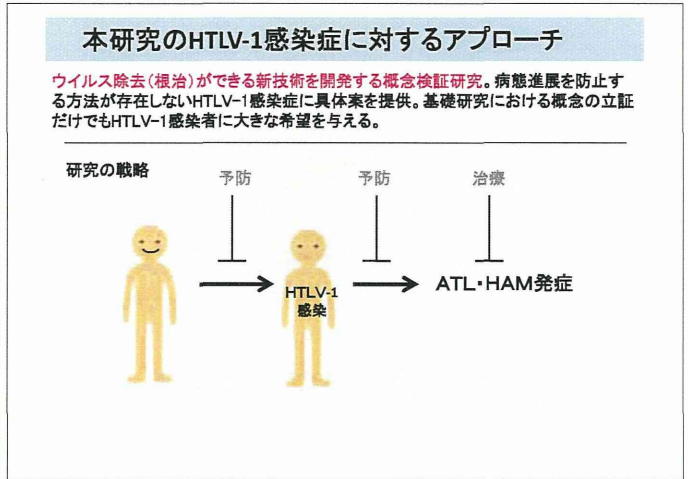




プロウイルスゲノム破壊による革新的 HTLV-1 関連疾患発症遅延法の開発

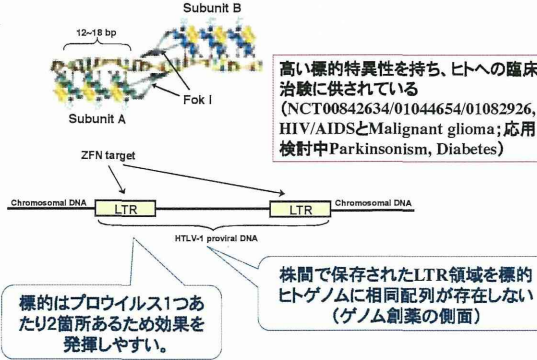
厚生労働省科学研究費補助金
 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業
 (H23-新興一般-028)

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	熊本大学エイズ学研究センター
	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



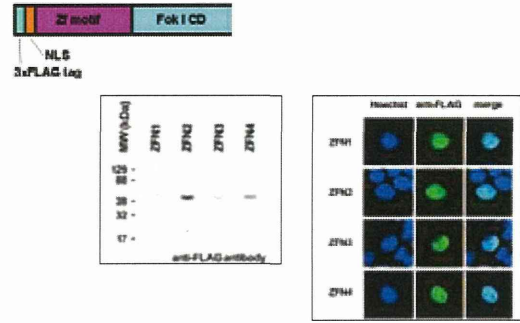
柱1:治療分子の開発

人工酵素Zinc Finger Nuclease (ZFN)を利用

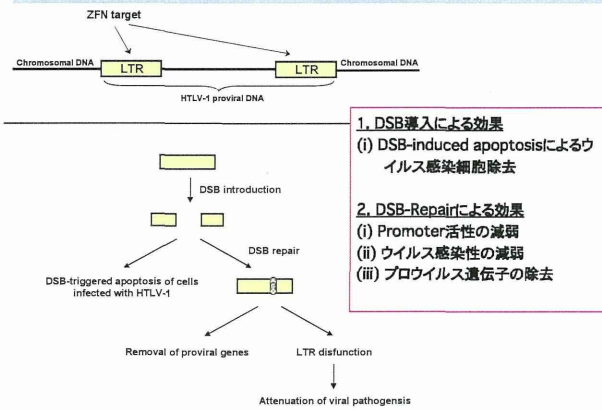


治療分子の標的と発現確認

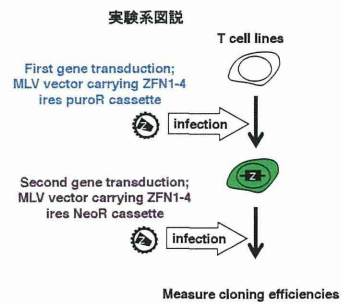
ZFN genetic structure



期待されるHTLV-1 LTRを標的としたZFNの活性



ZFNによるHTLV-1感染細胞の増殖抑制効果



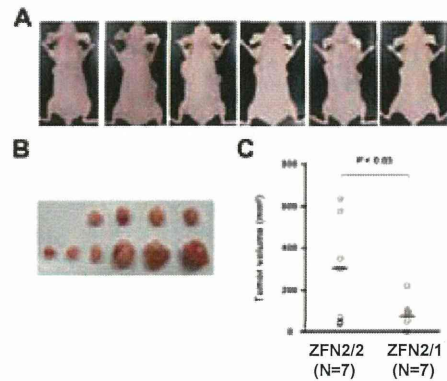
ZFNによるHTLV-1感染細胞の増殖抑制効果

Cell	ZFN	Cloning efficiency (Mean ± SD)	Statistical significance
MDM4	ZFN1+ZFN2	0.00 ± 0.00 (N=4)	P = 0.0019
	ZFN2+ZFN1	0.00 ± 0.00 (N=4)	
	ZFN1+ZFN1	1.16 ± 0.16 (N=2)	
	ZFN2+ZFN2	3.74 ± 0.88 (N=2)	
SP7	ZFN1+ZFN2	0.00 ± 0.00 (N=2)	P < 0.0001
	ZFN2+ZFN1	0.64 ± 0.91 (N=2)	
	ZFN1+ZFN1	0.04 ± 0.13 (N=2)	
	ZFN2+ZFN2	0.04 ± 0.13 (N=2)	

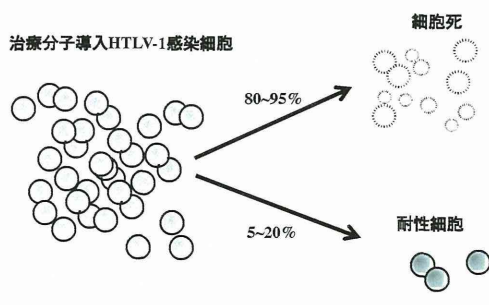
* The order of transduction into cells is indicated.

2種類のHTLV-1感染細胞モデルで活性を実証
HTLV-1陰性の細胞では活性を認めず

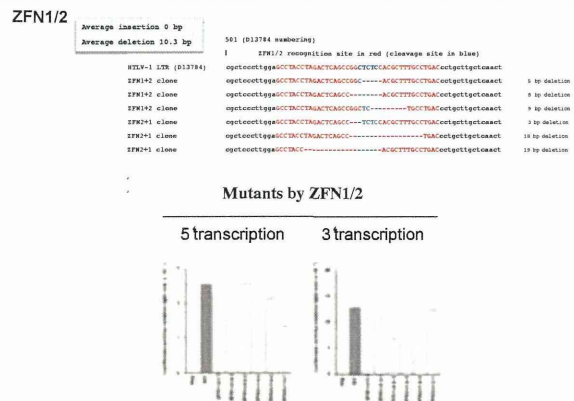
生体内におけるZFNのATL細胞に対する治療効果



ZFNによる治療効果に対する耐性



ZFNによるLTRへの部位特異的変異導入(2)



ZFNによる標的配列除去活性の検出(1)

実験系図説

Deletion reporters
Transfection
293T cells
48 hr
Luciferase assay

Deletion reporter A

Rluc activity

deletion

結果

HTLV-1のプロウウイルスの除去活性を持つ分子は世界初

本研究のHTLV-1感染症に対するアプローチ

ウイルス除去(根治)ができる新技術を開発する概念検証研究。病態進展を防止する方法が存在しないHTLV-1感染症に具体案を提供。基礎研究における概念の立証だけでもHTLV-1感染者に大きな希望を与える。

研究の全体像

- 開発に成功
- 治療効果を実証
- 作用機序解明
- 耐性機序解析

治療分子デリバリーの基盤技術構築

治療分子送達法の開発

- 治療分子導入法
 - レトロウイルスベクター
 - レンチウイルスベクター(特許)
 - タンパク質導入法(独自技術)
 - アデノウイルスベクター

ベクターの抗体被覆による標的細胞特異性治療分子送達法の開発(世界初)

- 健康人由来CD4反応性抗体 Clone ID: HO538-213の利用(特許)
- Fusion-competent Binding-deficient membrane fusogenic protein (HAfd)の利用(Amy H. Lin, et al. Human Gene Ther 2004)

ベクターを抗体被覆

HTLV-1感染細胞 (CD4陽性T細胞)

治療分子の導入

プロウイルス

治療分子デリバリーの基盤技術構築

抗体工学に基づく抗体遺伝子の改変

健康人由来抗体の利用
CD4反応性抗体(特許) Clone ID: HO538-213

ベクター被覆抗体

Fab → scFv → mscFv

大腸菌 哺乳類細胞

抗体改変の鍵
遺伝子発現効率の維持
CD4への反応性維持

治療分子デリバリーの基盤技術構築

ヒト抗体をscFv化して細胞膜に発現局在させる技術開発に成功(世界初)

コントロール

CHO cells

ベクター被覆抗体

CHO cells

治療分子デリバリーの基盤技術構築

健康人由来CD4反応性抗体 HO538-213のエピトープ同定

CD4.D2 CD4.D1 MHC class 2

light chain heavy chain antiCD4 single chain Fv

抗体はCD4-MHC複合体形成を阻害しない。本抗体のエピトープ近傍を認識するIbalizumabはヒトでの安全性が実証された(Jacobson JM AAC 2009; Kuritzkes DR JID 2004)。

進捗状況まとめ

ウイルス除去(根治)ができる新技術を開発する概念検証研究。病態進展を防止する方法が存在しないHTLV-1感染症に具体案を提供。基礎研究における概念の立証だけでもHTLV-1感染者に大きな希望を与える。

研究の全体像

- 開発に成功
- 治療効果を実証
- 作用機序解明
- 耐性機序解析
- 送達分子の構築に成功
- 安全性に関する知見

進捗状況まとめ

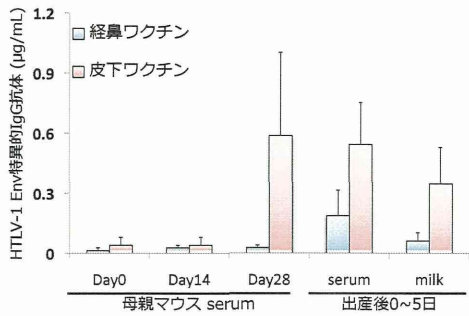
ウイルス除去(根治)ができる新技術を開発する概念検証研究。病態進展を防止する方法が存在しないHTLV-1感染症に具体案を提供。基礎研究における概念の立証だけでもHTLV-1感染者に大きな希望を与える。

研究の全体像

- 開発に成功
- 治療効果を実証
- 作用機序解明
- 耐性機序解析
- 治療分子の改良
- 治療法の改良
- 送達分子の構築に成功
- 安全性に関する知見
- ベクター指向性の検証
- in vivo安全性試験
- 抗体の改良(特許技術)

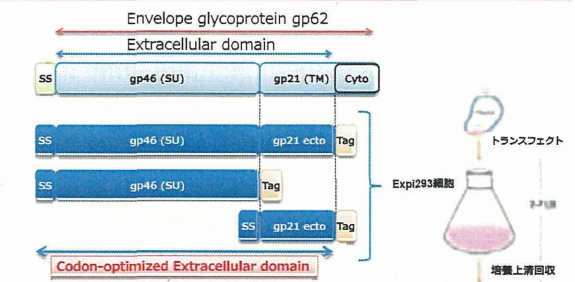
研究の課題

ワクチン接種後の血清、および母乳の抗体



抗体誘導は確認できたが、抗原量10µg、3回免疫が必要であり、免疫原性が低い
インフルエンザHAワクチン（スプリットワクチン）では、抗原量0.1~1µg、2回免疫で十分

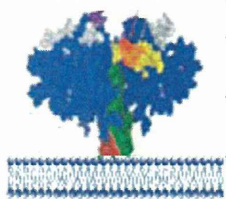
哺乳類培養細胞タンパク質合成系による可溶性HTLV-1 Envの合成



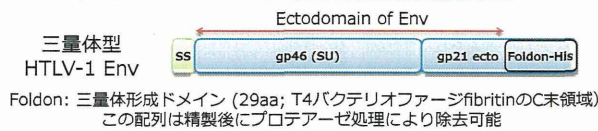
Env細胞外領域のみの発現
→精製工程の簡略化（界面活性剤による可溶化が必要ない）
WBレベルでも発現を確認できない
（野生型コドンのコンストラクトも発現せず）

哺乳類培養細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型HTLV-1 Envの合成

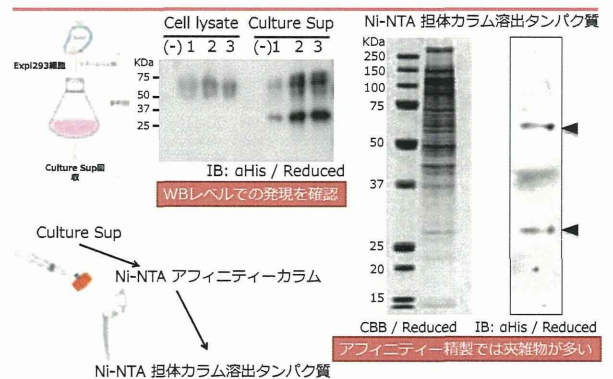
HIV ENV = 三量体



- ✓ HTLV-1 Envも三量体を形成
- ✓ 膜貫通領域を除いたENVは、三量体を形成できない？
- ✓ 三量体を形成できない単量体型ENVでは正しいフォールディングが出来ず分解されている？
- ✓ 三量体型ENVの方がNativeの構造を維持しており、中和エピトープが保持されている
→ **ワクチン抗原として好ましい。**

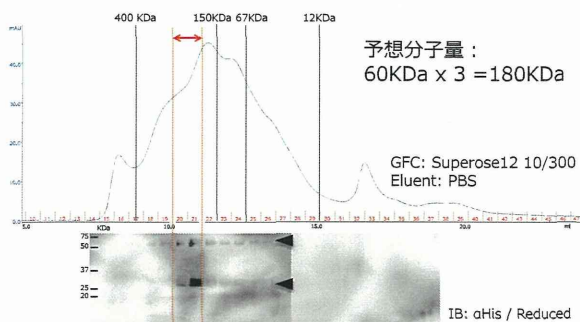


哺乳類培養細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型HTLV-1 Envの発現と精製



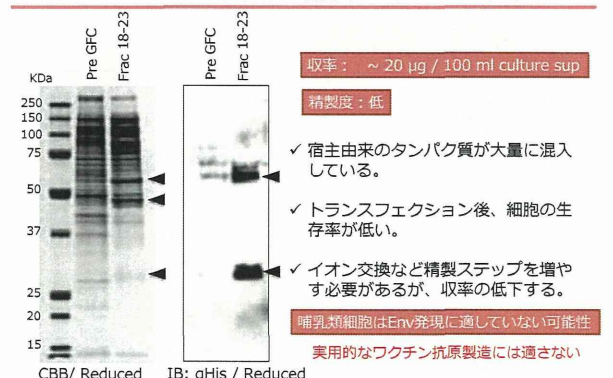
アフィニティー精製では夾雑物が多い

ゲル濾過による可溶性Env三量体化の確認



Envは、150kDa以上の分画に溶出されており、三量体を形成。

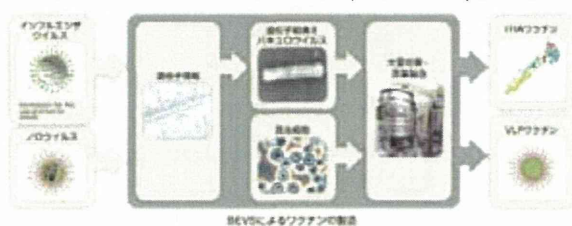
哺乳類培養細胞タンパク質合成系によるHTLV-1 Env合成・精製における問題点



- 採取率： ~ 20 µg / 100 ml culture sup
- 精製度： 低
- ✓ 宿主由来のタンパク質が大量に混入している。
- ✓ トランスフェクション後、細胞の生存率が低い。
- ✓ イオン交換など精製ステップを増やす必要があるが、収率の低下する。
- 哺乳類細胞はEnv発現に適していない可能性
- 実用的なワクチン抗原製造には適さない

昆虫細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型HTLV-1 Envの合成

昆虫細胞系を用いたタンパク質発現技術（Baculovirus Expression Vector System: BEVS）



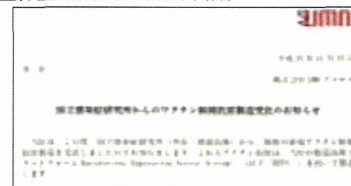
BEVSによるワクチンの製造

- ◇ ヒトパピロウイルスワクチン「サーバリックス」(GSK)
- ◇ 組換えインフルエンザHAワクチン（UMNファーマ、臨床第三相）

既にヒトにおいて広く使用されているワクチン抗原製造系

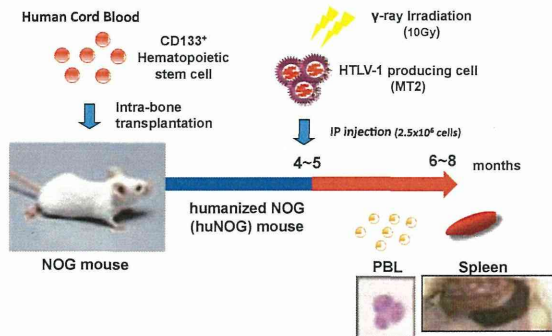
GMPグレード昆虫細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型HTLV-1 Envの合成

実用的なワクチン抗原製造系確立を目指し、日本国内でGMPグレードの昆虫細胞タンパク質合成系を有する（株）UMNファーマによる三量体型HTLV-1 Envの合成

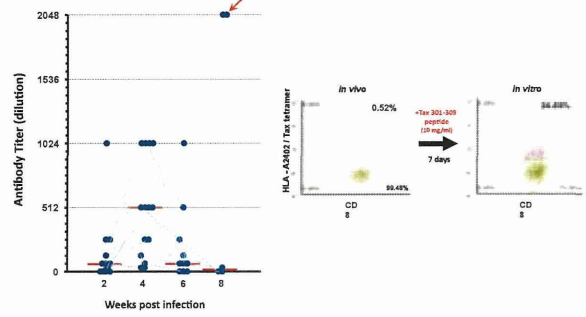


平成25年度内に合成系の構築を行い、数L単位で試験製造の予定。感染研にて精製系の初期検討および合成物の抗原性を検討する。また、より良い抗原設計やエピトープ解析のための基礎情報となるHTLV-1 Env立体構造の解明をX線結晶構造解析により試みる。

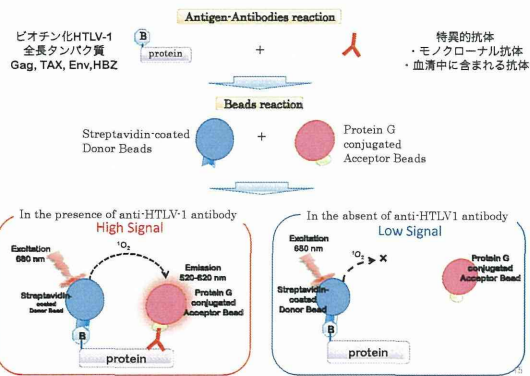
HTLV-1 感染ヒト化マウスにおけるATL様病態と抗HTLV-1免疫 (田中正和・関西医科大学)



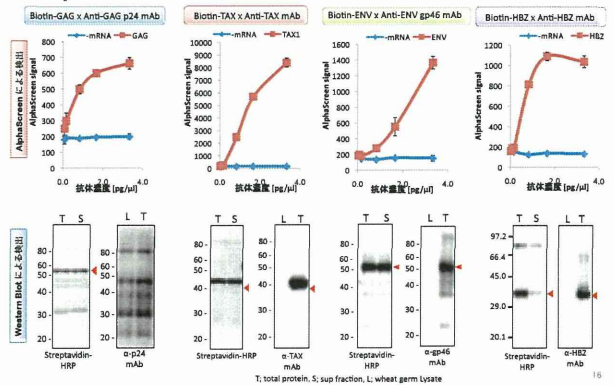
HTLV-1特異的ヒトIgG及びCTL誘導



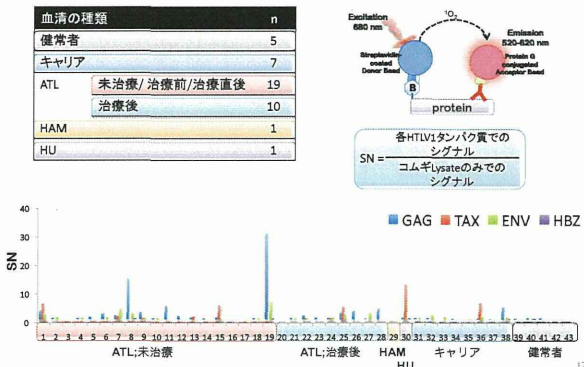
AlphaScreen法を用いた抗体検出



HTLV-1モノクローナル抗体を用いた AlphaScreen法による抗体検出系の条件検討

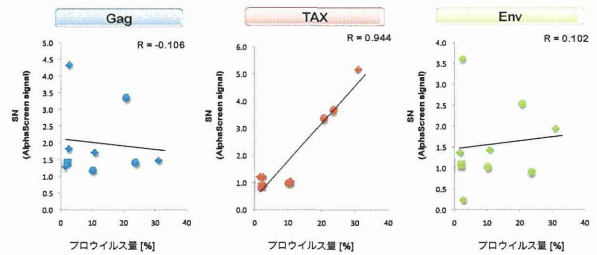


HTLV-1感染患者血清およびATL患者血清中の微量抗HTLV-1抗体を検出

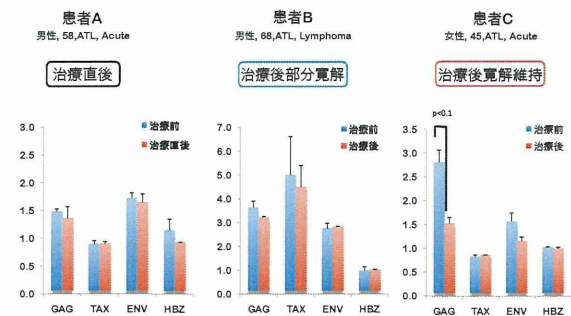


プロウイルス量と抗体の関係

プロウイルス量(%) (コピー/10ng)がわかっている 9 sample に関して、プロウイルス量とAlphaScreenアッセイの結果における関係性。
ATL: 4 samples (●治療前, ■寛解状態)
キャリア: 5 sample (◆)



同一患者における治療前後の抗体量の変化



まとめ

コムギ無細胞タンパク質合成系でHTLV-1がコードする全てのタンパクの合成と可溶性に成功。

哺乳類培養細胞タンパク質合成系を用いて三量体化可溶性三量体型Env抗原の合成に成功した。

AlphaScreen法による抗体検出のアッセイ系の検討を行なった結果、患者血清の微量抗体測定が可能となった。

動物モデルとしてヒト化マウスによるヒト抗体誘導、CTL誘導が可能となりワクチン評価に期待される。

今後、実用的なワクチン抗原を作製するために昆虫細胞タンパク質合成系による可溶性三量体型Env抗原の作製を(株)UMNファーマと共同で進めていく。

平成25年度厚生労働科学研究補助金
 新型インフルエンザ等対策・病原体感染研究事業
 [石字24-26]

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 室長

成人T細胞白血病(ATL)

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

定義

- 疫学：西南日本に多い
- 発症：若狭内発症 平均発症年齢60歳
- 感染：母乳感染・性感染・輸血
- 予後に極めて不良

臨床疫学的特徴

リンパ節腫大 皮膚の発疹 骨への浸潤

感染症 腎臓病 肝への浸潤

HTLV-1総合対策 [2011年度]

感染予防 キャリア全員がATLにならない(5%前後が発症)なので、ATL発症
 高危険層を特定し、発症介入を行う(HTLV-1総合対策2011)

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

感染防止

- 献血感染 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 全国一律経母乳抗体検査(2010年11月より)
 - 感染率は20% 100% 100%
 - しかし母乳しても3%感染する!

新しい革新的感染予防法の開発が必要!

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

抗体陽性血漿より抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンの製造

高力価HTLV-IG | HTLV-IG
 佐竹正博先生(高東研日本赤十字血液センター)
 田所泰治先生(日本赤十字血液センター)
 *ロット差があるので複数のロットを作成

高力価HTLV-IGを用いたin vitroを用いた感染防止実験

ATL細胞株 HTLVキャリア ATL細胞 + 培養細胞やPBMC + 高力価IG 通常IG 5%, 10%, 20%

FACS解析 核陽性細胞数
 Western Blotting

培養細胞を用いたin vitro 感染モデルの作成

Mitomycin C処理 (50ug/ml) 37℃ 1hrs → 核陽性細胞試験

ATL細胞株: HUT102, MT2, SLB-1, TLOM1
 培養細胞: Jurkat, Mol4

感染抑制の抗体温度依存性 (for 10days)

各種パラメーターとの相関関係

抗体陽性献血検体のin vitro感染抑制効果の検討

PVL% in Jurkat
 pep180

抗体によるSyncytiumの抑制

Jurkat SLB1 Jurkat + SLB1

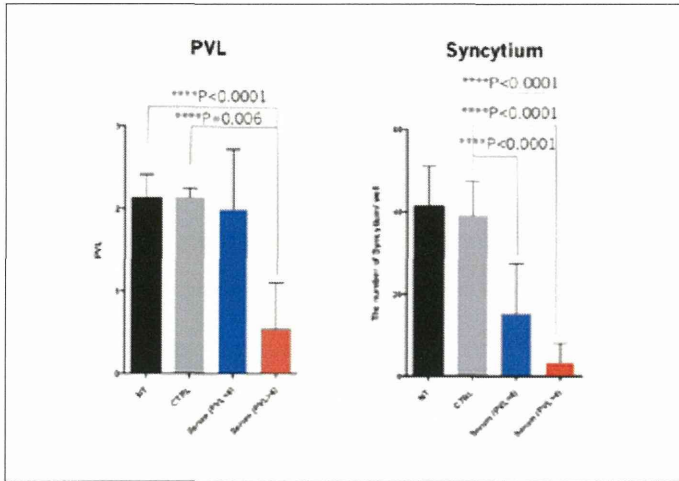
Jurkat + SLB1 + 抗体陽性血漿
 Jurkat + SLB1 + 抗体陽性血漿(T65, 1%)

シンシチウム形成抑制効果における抗体温度依存性(T23)

PVL% in Jurkat
 syncytium formation

抗体陽性献血検体のシンシチウム形成抑制効果

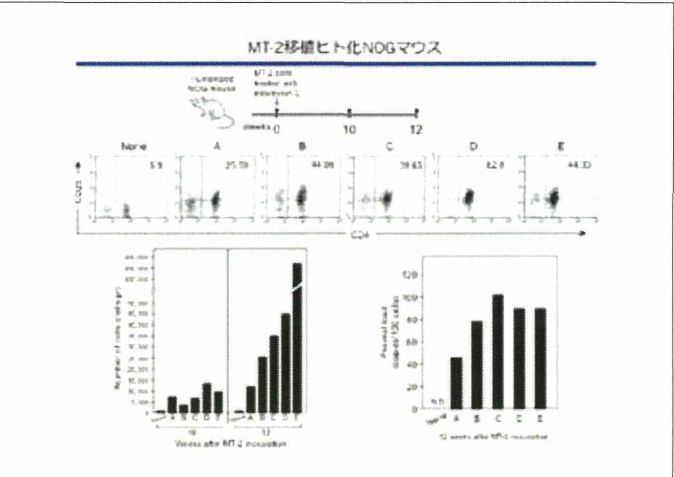
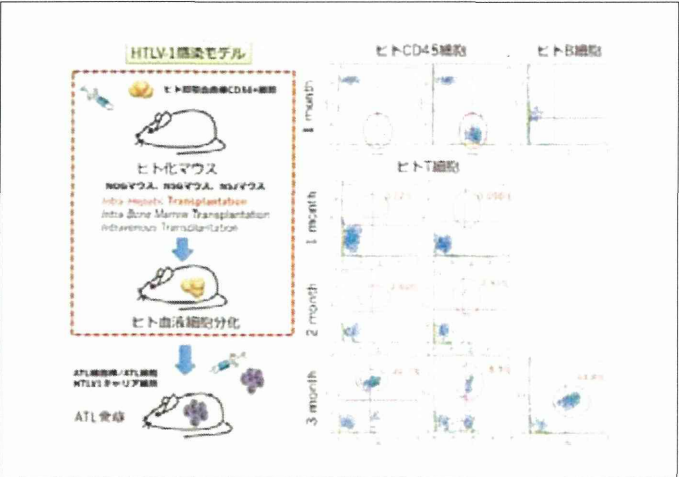
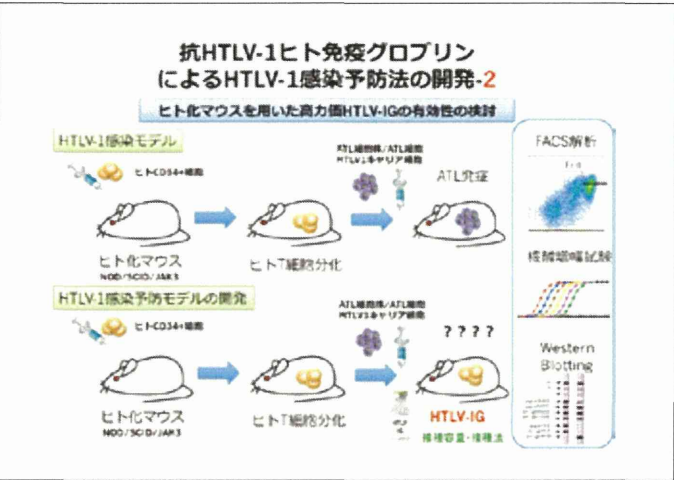
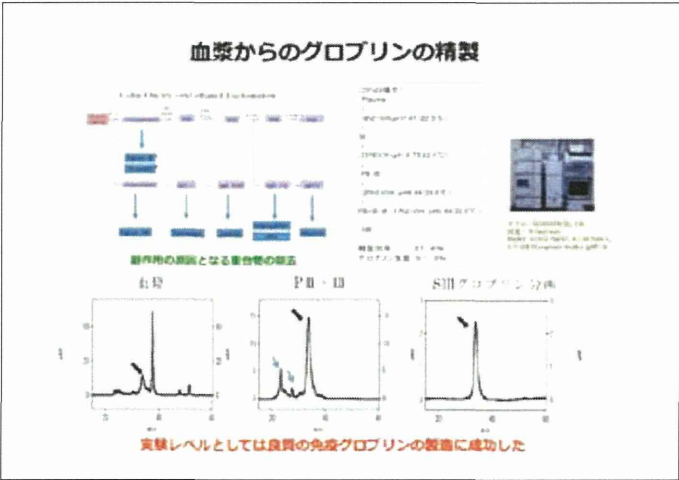
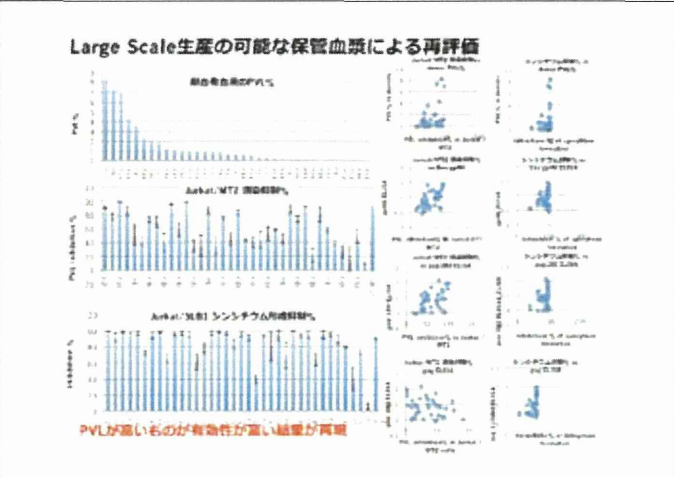
pep180
 syncytium formation

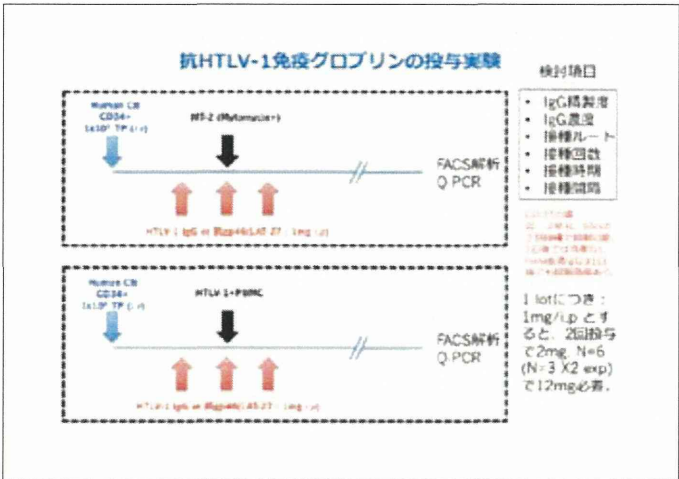
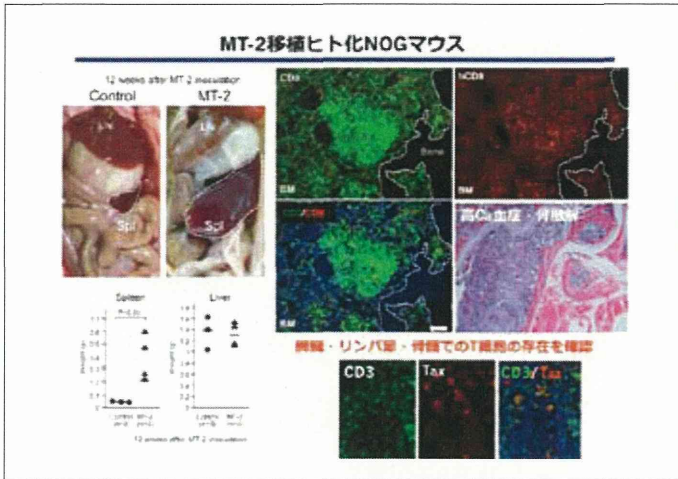


- ### 小括
- HTLV-1感染細胞株を用いてHTLV-1感染系を構築した。
 - 日赤献血由来、HTLV-1抗体陽性血清でスクリーニングを行った。抗体陽性献血者のPVL%が高く、env, gagの力値が高い抗体が感染抑制効果が高かった。中にはPVL%が低い感染抑制が認められる株体もあった。Pep180力値との相関は認められなかった。
 - シンシチウム形成を抑制する系を立ち上げた。30種類のHTLV-1陽性血漿を用いてスクリーニングを行った結果、PVL%が高く、env, gagの力値が高い抗体がシンシチウム形成抑制効果が高かった。中には、献血者のPVL%が低くても、シンシチウム形成抑制能が強い株体が認められた。Pep180力値との相関は認められなかった。
 - 高力価グロブリン製剤作製の候補株体は、無症候性キャリアのうち、PVL%が高い株体を候補とするのがよい。
 - その他に注目する群が存在した。

Large Scale生産の可能な保管血漿

品名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
品名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50





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は入手できないため、高品質のHTLV-IGは日本国内で開発・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 厚生労働科学研究費 長谷川秀徳主任研究者）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が実現可能となり、新規感染は抑制可能となる。

学産の有効利用 貴重な献血血液の有効利用に繋がる

代表	村上 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	須口 功	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	部長
	大塚 聡	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	第3室室長
	山口 一哉	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	奈良県立医科大学	血液学センター	
	田所 晋吉	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 千穂子	日本赤十字中央血液研究所		

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-3 (H26年度)

ヒト化マウスを用いた高品質HTLV-IGの有効性の検討

HTLV-1母乳感染モデルの確立

HTLV-IG製剤開発へ向けた研究

- HTLV-IGの性状・用法・容量の設定
- 抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンの認識抗原の同定
- 製造工程中のウイルス混入リスク解析（核酸増幅試験）
- 製造工程中のウイルススクリアランス
- 国家検定に準じた品質管理試験（安全性・物理化学試験）の実施

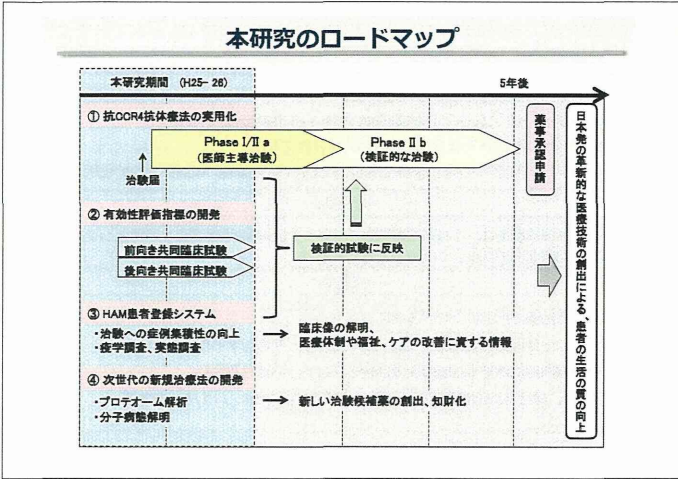
厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患実用化研究事業
(H25-難治等(難)-一般-023)

HAMの革新的な治療法となる 抗CCR4抗体療法の実用化に向けた開発

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

これまで有効な治療法のなかったHAM患者の生活の質を大きく向上させるためにHAMの画期的な治療となりうる医薬品の治験を実施し実用化に向けた開発研究を推進する



- ### HAMの新薬実用化を推進するための本研究活動内容
- ① 抗CCR4抗体療法の実用化
医師主導治験の実施 (山野、長谷川、松本、佐藤)
 - ② 有効性評価指標の開発
臨床的評価指標とバイオマーカーに関する前向き臨床研究
予後因子・治療に関する後ろ向き調査研究 (菊池、新野、藤原、三須、長谷川、中川、竹之内、砂田、永井、吉良、中村、法化園、高嶋、松浦 出雲、松崎、渡嘉敷、中島、山海、植田、松田、井上、高田、松本、山野)
 - ③ HAM患者登録システムの推進と疫学調査
満足度調査、治療の有効性調査
コホート調査の継続 (高田、八木下、山野)
 - ④ 次世代の新規治療法の開発
分子レベルでの疾患特性の解明による新規治療標的分子の同定 (斎藤、外丸、植田、山野)