

- 幌、2013
- 2) 中沢大悟、外丸詩野、西尾妙織、渥美達也、笠原正典、石津明洋：好中球細胞外トラップ (NETs) の異常と MPO-ANCA 関連血管炎の発症 第 102 回日本病理学会総会 札幌、2013
 - 3) 川上 愛、飯沼千景、脇 雅、山口まどか、外丸詩野、笠原正典、吉木敬、石津明洋：自己血管内皮細胞反応性 NKT 細胞による血管炎発症モデル 第 102 回日本病理学会総会 札幌、2013
 - 4) 宮武由甲子、Oliveira Andre L.A.、Jarboui Mohamed Ali、太田秀一、外丸詩野、豊嶋崇徳、Hall William W.、笠原正典：成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATLL)の病態における正常上皮細胞の役割 第 102 回日本病理学会総会 札幌、2013
 - 5) 池下隼司、宮武由甲子、大塚紀幸、外丸詩野、笠原正典：アテローム性動脈硬化症とヒト NKG2D リガンド MICA/B との関わりについての検討 第 102 回日本病理学会総会 札幌、2013
 - 6) 紺野沙織、外丸詩野、岸本葉奈、石津明洋、笠原正典：プロテアソームの発現異常における免疫応答の変化 第 102 回日本病理学会総会 札幌、2013
 - 7) 今本鉄平、中沢大悟、大塚紀幸、外丸詩野、笠原正典、石津明洋：顕微鏡的多発血管炎と血栓症は MPO-ANCA と好中球細胞外トラップを介して関連する 第 102 回日本病理学会総会 札幌、2013
 - 8) 山本 岳、藤井真理子、大塚紀幸、光部兼六郎、櫻井宏治、外丸詩野、石津明洋、笠原正典：HELLP 症候群に合併した hepatic rupture の一例 第 102 回日本病理学会総会 札幌、2013
 - 9) 味藤 静、外丸詩野、大塚紀幸、石津明洋、笠原正典：リツキシマブ投与後に日和見感染症を併発した顕微鏡的多発血管炎の一例 第 102 回日本病理学会総会 札幌、2013
 - 10) 紺野沙織、外丸詩野、石津明洋、笠原正典：プロテアソームの発現異常による免疫応答の変化 第 46 回北海道病理談話会 (病理分科会) 札幌、2013
 - 11) 外丸詩野：プロテアソームの機能異常と病理作用 第 59 回日本病理学会秋期特別総会、甲府、2013
 - 12) Konno S, Tomaru U, Ishizu A, Kasahara M : Aberrant proteasomal expression affects T cell differentiation and functions. 第 42 回日本免疫学会学術集会 千葉、2013
 - 13) Kawakami A, Inura C, Waki M, Yamaguchi M, Tomaru U, Kasahara M, Yoshiki T, Ishizu A : Establishment of invariant NKT cell clone from vasculitis-prone rats, which recognizes autoantigen but not α -galactosylceramide presented by CD1d. 第 42 回日本免疫学会学術集会 千葉、2013
 - 14) 岩崎沙理、藤澤孝志、桑原博昭、外丸詩野、笠原正典、石津明洋、鈴木 昭：鑑別に苦慮した胸腺腫瘍の一例：Type A thyma から胸腺癌へのスペクトラムは存在するか？ 第 33 回日本胸腺研究会 東京、2014

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)
該当なし

網羅的膜プロテオーム解析による HAM 分子標的治療薬の開発

研究分担者

氏名 植田 幸嗣

所属 独立行政法人 理化学研究所

役職 上級研究員

研究協力者

氏名 石原 誠人

所属 独立行政法人 理化学研究所

役職 研究員

研究要旨： HTLV-1 関連脊髄症（HAM）に起因する慢性的脊髄炎症の抑制、および痙性麻痺をはじめとした病態の改善を目的とした分子標的治療薬の開発を目的とし、HTLV-1 感染細胞の膜タンパク質量プロファイリングを行った。非感染健常者 14 例、HTLV-1 感染無症候患者 21 例、HAM 患者 21 例、ATL 患者 14 例の末梢血単核球（PBMC）サンプルから、主な感染細胞集団である CD4⁺ T 細胞を抽出し、精製した細胞膜表面糖タンパク質を LC/MS/MS 質量分析に供した。本定量質量分析からは 946 糖タンパク質（6,791 ペプチド）の同定、定量情報が得られた（False discovery rate < 1%）。

これらの母集団から Welch' s test、または Absent/present search 法に基づき、HAM 患者感染細胞特異的に発現の亢進が観測される細胞表面分子を 4 タンパク質同定することに成功した。これらの分子は HAM に対する有効な分子標的治療薬のターゲットになるだけでなく、HAM 発症メカニズムの解明や病態を正確に把握しうるバイオマーカーになる可能性もある。

特に本研究で同定された 2 種類の HAM 治療標的分子は、別の疾患に対する分子標的治療薬ターゲットとして FDA 認可薬が実用化されている。こうしたターゲットは、HAM の治療にも有効であるという分子生物学的エビデンスが得られれば迅速な臨床実用化が見込める有効なシーズであると考えられる。

A. 研究目的

現在 HAM の治療において、HAM 病因 T 細胞、またはそれに起因する炎症反応を特異的に標的とした分子標的治療薬は存在しない。そこで本研究では、患者由来 HTLV-1 感染末梢血細胞サンプルを用いて、HAM 治療の新たなターゲットとなりうるタンパク質分子を同定することを目的とする。本目的の達成により HAM 病因 T 細胞が特異的に発現する抗原を発見できれば、副作用が少なく、効果の高い HAM 治療薬の開発や、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

69 症例由来の末梢血単核球サンプルから、セルソーターを用いて CD3⁺CD4⁺T 細胞を単離した。得られた細胞を [8M Urea, 50 mM ammonium bicarbonate] に溶解し、Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride による還元、Iodoacetamide によるアルキル化を経てトリプシン消化を行った。得られた消化ペプチドサンプルを ConA レクチンアガロースビーズ (生化学工業) と 96 ウェルフィルタープレートの中でインキュベートし、非糖ペプチドを洗浄操作により除外した。[1 mU PNGaseF (Roche), 100 mM ammonium bicarbonate] で一晩消化を行って N 型糖鎖を還元末端で切り離すことにより、ConA レクチンアガロースビーズに特異的に結合した糖ペプチドのみを選択的に溶出した。

得られたペプチドサンプルを個別に LTQ-Orbitrap-Velos 質量分析計 (Thermo Scientific 社製) で分析した。Nano-flow HPLC には、DIONEX 社 Ultimate3000 HPLC system、0.3 × 5 mm Acclaim PepMap μ-Precolumn (Dionex)、0.075 × 150 mm

C18 チップカラム (日京テクノス) を使用した。流速は 250 nL/min、120 分アセトニトリルグラジエントにて分析を行った。

図 1 に示すワークフローにしたがって解析を進め、測定が完了した LC/MS/MS の raw data を Genedata 社 Expressionist プロテオームサーバーにロードし、定量解析、統計解析を行った。まず Expressionist Refiner MS モジュールを用いてノイズ除去、クロマトグラムアライメントなどのデータプロセッシングと、検出された全ペプチドに対するラベルフリー定量解析を行った。

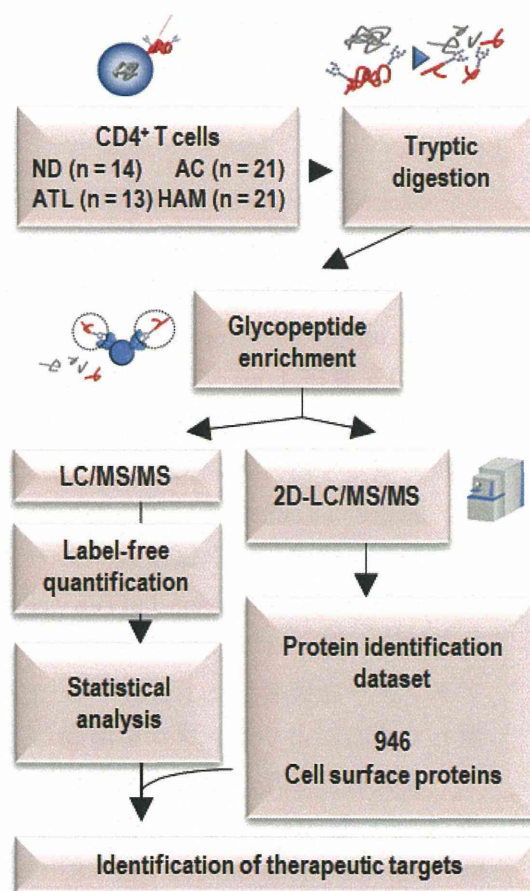


図1 HAM/TSP治療標的分子のスクリーニングのための解析フローチャート。
ND：非感染健常者、AC：感染非症候患者、ATL：成人T細胞白血病患者、HAM：HTLV-1関連脊髄症患者。

次に、Expressionist Analyst モジュールを使用して検出された 56,705 ペプチドデータの標準化を行った後、2 種類の統計解析手法を用いて HAM 患者由来感染細胞特異的に発現の亢進が見られる細胞膜表面分子の選出を行った。(1) Absent/present search 法により、ND および AC 群で 0 または 1 症例でのみ発現し、HAM 患者群では 3 例以上の症例で発現情報が得られたものを治療標的候補とした。(2) ND 群と AC+HAM 群の二群間で Welch's test を実施し、 $p < 0.05$ 、かつ HAM 群で 2 倍以上の発現亢進が見られたペプチドを治療標的候補とした。両手法共に、Transmembrane domain を持つ細胞膜タンパク質と考えられるものを最終候補に選出した。

以上で抽出された治療標的ペプチドのアミノ酸配列を同定するために、2D-LC/MS/MS 分析を実施した。Empore strong anion exchange disk filter (スリーエム) を直径 1 mm にパンチアウトし、これをポリプロピレン製 200 μ l チップ先端に 6 枚充填した陰イオン交換チップを作成した。前述の LC/MS 分析に用いたものと同様に処理した膜タンパク質由来ペプチドサンプルを Britton-Robinson buffer (pH = 11) に溶解し、陰イオン交換チップにロード、アダプターを装着した 1.5 ml チューブに設置して遠心によりサンプルを濾過し、ペプチドを吸着させた。以降、回収チューブを新しいものに取り替えながら Britton-Robinson buffer (pH = 8, 6, 5, 4, or 3) の 5 種類のバッファーを順に濾過していき、最終的に元のペプチドサンプルを 6 フラクションに分画した。分画したサンプルは等量の [4% acetonitrile, 1.2% trifluoroacetic acid] を加えて酸性化した後に、Oasis HLB 96-well filter plate (Waters) にて脱塩精製、減圧乾燥を行った。

これらを前述の LC/MS/MS 分析と同じ条件にて質量分析を行い、以下のようにデータベース検索を行い、タンパク質の同定を行った。

Sequest (Thermo Scientific) データベース検索において、以下のパラメーターを使用した。Taxonomy = Homo Sapiens, Enzyme = Trypsin, Miss cleavage = 2, Database = SwissProt 2014_1 (542,782 sequences), Static modification = Carbamidomethyl (C), Dynamic modifications = Oxidation (M), MS tolerance = 3 ppm, MS/MS tolerance = 0.8 Da, Peptide charge = +2 to +4, Instrument = ESI-TRAP。さらに、Peptide Validator アルゴリズムを使用し、False Discovery Rate $< 1\%$ を同定信頼性の基準とした。

[倫理面への配慮]

聖マリアンナ医科大学から提供を受けた末梢血単核球の収集に関しては、プライバシーに関する遵守事項、同意しない場合でも不利益を受けないこと、同意した場合でも随時これを撤回できること、被験者の人権保護など必要な事項について被験者に十分説明し患者本人からプロジェクトの趣旨や内容に十分な理解を得た上でインフォームドコンセントを文書で取得し、採血の手続きが行われた。

採取、凍結したサンプルは匿名化が行われ、個人情報(氏名、住所、生年月日)は同病院外には一切漏出しないよう管理されている。匿名化された試料は、臨床情報(年齢、性別、治療歴、各種バイオマーカーの値など)

のみ付加された状態で提供され、 -80°C で保管されている。これら臨床検体の提供、本研究への使用に関しては、聖マリアンナ医科大学、理化学研究所、双方の倫理審査委員会による承認を得た上で実施された。

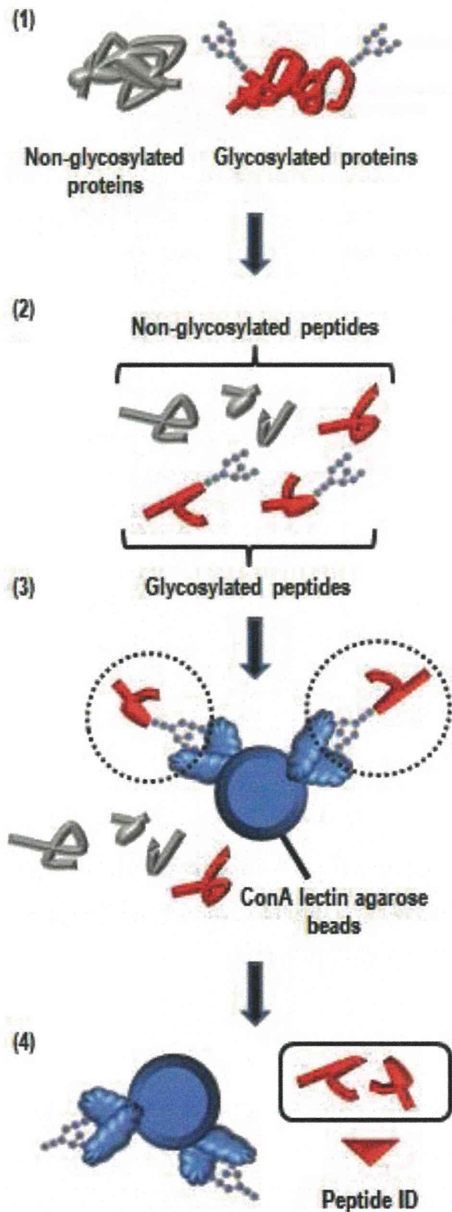


図2 ConAレクチンビーズを用いた糖ペプチド濃縮の原理

C. 研究結果

本研究では抗体医薬品やレセプターアンタゴニストの標的になりやすい細胞膜表面タンパク質にフォーカスしたプロテオーム解析を実施するため、図2に示すような糖ペプチド精製技術を開発、実施した。その結果、LC/MS/MS分析により同定された全6,791ペプチドのうち90%以上が糖ペプチドであったことが分かり、細胞膜表面タンパク質が高度に濃縮できたことを表していた（一部細胞内オルガネラ膜上タンパク質も含む）。

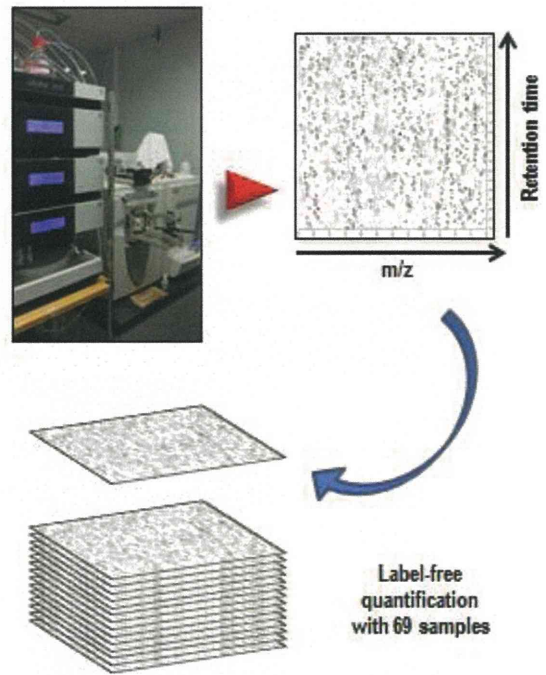


図3 Expressionist プロテオームサーバ上の2次元定量マップの作成および69サンプル間でのラベルフリー定量

計69症例由来のLC/MS/MSスペクトルは、Expressionistサーバ上で図3に示すような質量とHPLC保持時間を軸とした二次元マップに変換され、ここでは69症例間の重複を除いた56,705ペプチドが検出

された。さらに、これら検出シグナル全てについて精密なアライメントを行い、質量分析計でのシグナル強度に基づいた 69 症例間の定量比較値を得た。

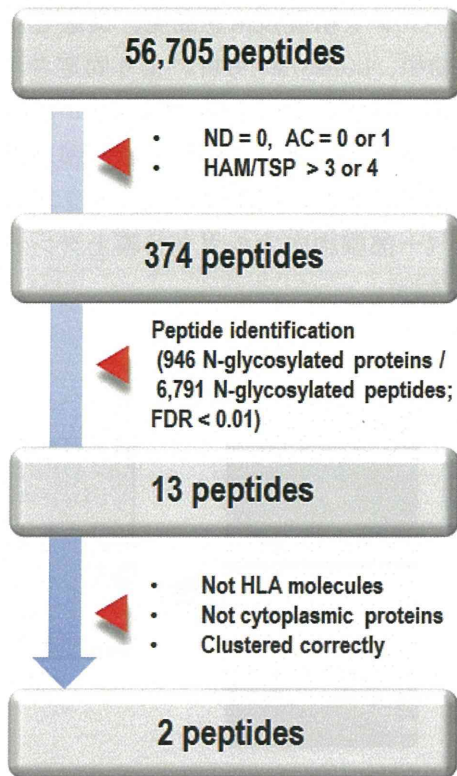


図4 Absent / Present Searchアルゴリズムを使ったHAM/TSP治療標的分子のスクリーニング

ここから得られた定量情報を元に、HAM患者由来感染細胞特異的に発現亢進しているタンパク質を抽出するため、Absent/present search法を用いて図4のような手順に沿って治療標的分子を絞り込んだ。その結果、図5のバーチャートに示される2ペプチドが同定され、これらはともに同一のタンパク質由来のペプチドであることも判明した。さらに、Welch's testでは図6のような手順に沿って候補分子抽出を行い、最終的に図7に挙げる6種類のペプチドが $p < 0.05$, fold change > 2.0

を満たす分子として同定された。以上の統計解析結果を総合すると、4種の細胞膜表面タンパク質に由来する8ペプチドがHAM治療標的候補分子として同定できた。

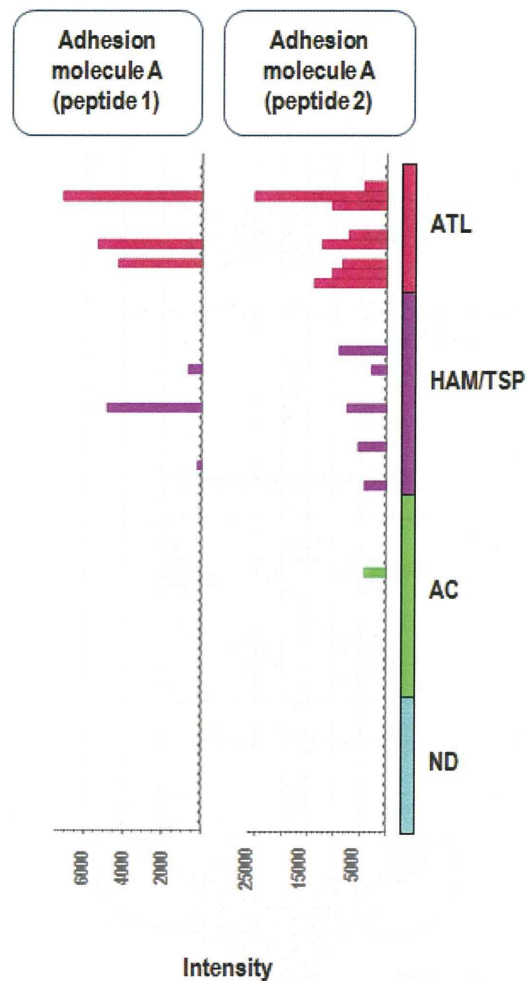


図5 Absent / Present Searchアルゴリズムにより同定されたHAM/TSP治療標的候補分子の定量バーチャート

D. 考案

69症例のHTLV-1感染T細胞を用いた質量分析に基づくラベルフリー定量解析により、HAM病因細胞の膜上で発現量が有意に増加、または減少する分子群の同定に成功した。これまでHTLV-1関連疾患に対する治療や診断を目的とした基礎研究において、細胞膜表面分子を946タンパク質もの網羅

性を持って、かつ多症例でプロファイリングした報告はなく、難病である HAM 発症メカニズムの解明にも大変重要な基盤データベースが得られた。

図 5、7 で同定された HAM 治療標的候補分子の中で特に興味深いのは、このうち 2 タンパク質がすでに異なる疾患に対する分子標的治療薬のターゲットとして証明され、治療薬が FDA に認可されているという事実である。まだ本邦では認可されていない医薬品であるが、これら 2 つの薬剤が HAM についても著効を示す可能性は高いと考えられる。

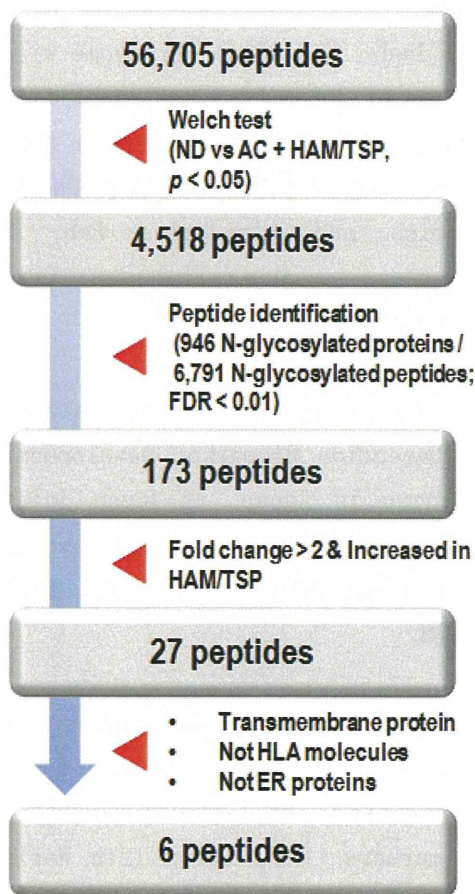


図6 Welch検定を使ったHAM/TSP治療標的分子のスクリーニング

本研究で同定された HAM 病因細胞で発現が上昇するサイトカインレセプターや細胞接着因子を詳細に機能解析することにより、HTLV-1 感染から HAM 発症に至る分子メカニズムの解明に繋がる可能性がある。また、そのような分子を標的にした治療法を開発することにより、HAM の分子標的治療だけではなく、発症の予防までもが可能になると期待できる。

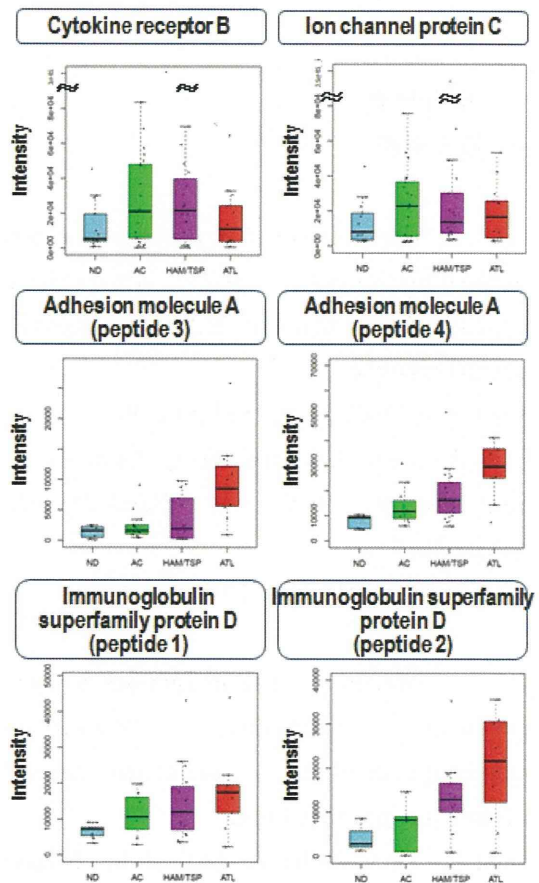


図7 Welch検定により同定されたHAM/TSP治療標的候補分子の定量ボックスプロット

E. 結論

HTLV-1 感染細胞上に発現する HAM 治療標的分子を 4 タンパク質同定することに成功した。このうち 2 種類はすでにこれらをターゲットとした既存薬が臨床応用されて

おり、これらのドラッグリポジショニングをいち早く達成できるよう分子生物学的エビデンスの取得に取りかかる。その他の2分子についてもHAMの特徴的な病態（脊髄での慢性的な炎症）と深く関連が示唆される細胞表面抗原であるため、機能阻害などを用いた治療薬候補としての検証実験のみならず、HAM発症のトリガーとなる分子メカニズムの解明に向けた詳細な機能解析も実施する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. The oncogenic polycomb histone methyltransferase EZH2 methylates lysine 120 on histone H2B and competes ubiquitination.

Kogure M, Takawa M, Saloura V, Sone K, Piao L, Ueda K, Ibrahim R, Tsunoda T, Sugiyama M, Atomi Y, Nakamura Y, Hamamoto R.

Neoplasia. 2013 Nov;15(11):1251-61.

2. Plasma low-molecular-weight proteome profiling identified neuropeptide-γ as a prostate cancer biomarker polypeptide.

Ueda K, Tatsuguchi A, Saichi N, Toyama A, Tamura K, Furihata M, Takata R, Akamatsu S, Igarashi M, Nakayama M, Sato TA, Ogawa O, Fujioka T, Shuin T, Nakamura Y, Nakagawa H.

J Proteome Res. 2013 Oct 4;12(10):4497-506.

3. Glycoproteomic strategies: From discovery to clinical application of cancer carbohydrate biomarkers.

Ueda K.

Proteomics Clin Appl. 2013 May 3;7(9-10):607-617.

4. Preapoptotic protease calpain-2 is frequently suppressed in adult T-cell leukemia.

Ishihara M, Araya N, Sato T, Tatsuguchi A, Saichi N, Utsunomiya A, Nakamura Y, Nakagawa H, Yamano Y, Ueda K.

Blood. 2013 May 23;121(21):4340-7.

2. 学会発表

国際会議

1. Ueda K (2014) Proteome-wide Profiling of Serum Exosomes Identified CD91 as an Exosomal Biomarker For Lung Adenocarcinoma. ISEV Workshop On EV Proteomics and Lipidomics Feb. 3 (Melbourne, Australia): Oral presentation.

2. Ueda K (2014) Current State of Early Detection Biomarker Development for Cancer in Japan. US-Japan Joint Meeting on Biomarkers for Early Cancer Detection Feb. 10 (NIH, Bethesda, MD): 招待講演.

3. Ueda K (2013) Development of glycoproteomic technologies and identification of glycan-targeting tumor markers. HUPO 2013, 12th World Congress Sep. 18 (Yokohama): 受賞講演.

国内会議

1. Ueda K (2014) がんの早期発見に挑む質量分析計. よこはまサイエンスカフェ 2014 Jan. 19 (横浜市立中央図書館): 講演.
2. Ueda K (2013) 癌化に伴う血中エクソソームタンパク質の質的量的変化. 第 36 回日本分子生物学会 Dec. 5 (Yokohama, Japan): ワークショップ講演.
3. Ueda K (2013) 質量分析が明らかにする癌特異的エクソソーム表面抗原. Exosomes as Diagnostic Markers in Cancer (株式会社ダイアログセミナー) Nov. 25 (品川): 招待講演.
4. Ueda K (2013) Erexim 法を用いた抗体医薬品糖鎖構造の高速定量評価. BioJapan 2013 Oct. 11 (Yokohama, Japan): 講演.
5. Ueda K (2013) 大規模サンプル解析のための最先端プロテオーム情報処理基盤. 第 86 回日本生化学会 Sep. 13 (Yokohama, Japan): 特別フォーラム座長・講演.
6. Ueda K (2013) Proteomic Identification of Tumor-derived Exosome Biomarkers. 第 72 回日本癌学会学術総会 Oct. 3 (Yokohama, Japan): シンポジウム.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

特許

1. 前立腺癌の進行度の評価方法、前立腺癌の検出方法、および検査キット
発明者: 植田幸嗣
出願番号: 特願 2013-061094
出願日: 2013/3/22
登録日: 2013/12/13
特許第 5429725 号
出願国: 日本
2. 肺癌の検出方法および検出キット
発明者: 植田幸嗣
出願番号: 特願 2013-251548
出願日: 2013/12/04
出願国: 日本

IV. 資 料

【添付資料 1】

「HAM ネットに関するアンケート」 調査票

添付資料 1 : 「HAM ねっとに関するアンケート」

HAM ねっとに関するアンケート

以下の質問に対して、当てはまる回答を 1つ 選んでレ点を入れてください。

1. 以下の質問にお答えください。

(ア) あなたの性別をお知らせください。

- 男性
- 女性

(イ) あなたの年齢をお知らせください。

- 19 歳以下
- 20～29 歳
- 30～39 歳
- 40～49 歳
- 50～59 歳
- 60～69 歳
- 70～79 歳
- 80～89 歳
- 90 歳以上

(ウ) あなたのお住まいをお知らせください。

- 北海道地方 (北海道)
- 東北地方 (青森県、岩手県、秋田県、宮城県、山形県、福島県)
- 関東地方 (茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都、神奈川県)
- 中部地方 (新潟県、富山県、石川県、福井県、山梨県、長野県、岐阜県、静岡県、愛知県)
- 近畿地方 (三重県、滋賀県、京都府、大阪府、兵庫県、奈良県、和歌山県)
- 中国地方 (鳥取県、島根県、岡山県、広島県、山口県)
- 四国地方 (徳島県、香川県、愛媛県、高知県)
- 九州地方 (福岡県、佐賀県、長崎県、熊本県、大分県、宮崎県、鹿児島県、沖縄県)

1

HAM ねっとに関するアンケート

(エ) 「HAM ねっと」に登録したきっかけをお知らせください。

- 主治医の先生にすすめられて
- 患者会からすすめられて
- インターネットで見
- 友人、知人から聞いて
- 家族にすすめられて
- 病院などで「HAM ねっと」のチラシを見て
- その他 ()

(オ) なぜ「HAM ねっと」に登録しようと思ったのですか (5 つまでお選びください)。

- 病気になる正しい情報がほしかったから
- 治療に関する最新の情報がほしかったから
- 治療に関する情報がほしかったから
- 治療が始まったら参加したいと思ったから
- 病気に関して話を聞いてくれる場所や人がほしかったから
- 同じ病気で苦しんでいる人たちと交流したかったから
- まわりに相談できる人がいないから
- 病気や治療に関する相談が出来ると思ったから
- すずめられたから何となく
- 自分がこれからどうなるか不安だったから
- 病気に対する国の取り組み姿勢が知りたかったから
- 医療費助成などに関する情報がほしかったから
- 研究の推進に役立ちたかったから
- 登録しておけば何か得られかもしれないと思ったから
- 自分の生活をよりよくするための情報がほしかったから
- 講演会などの情報がほしかったから
- 心のよりどころがほしかったから
- その他 ()

2

HAM ねっとに関するアンケート

2. 電話での聞き取り調査について、以下の質問にお答えください。

(ア) 電話での聞き取り調査を受けたことがありますか？

- ある → (イ) 以降の質問へ
- ない → 5 ページ「3. 広報紙「HAM ねっと通信」について」へ

*以下の質問には (ア) で「ある」と答えた方のみお答えください。

(イ) 電話での聞き取り調査を受けたことをどう思いますか？

- とても満足している
- 満足している
- どちらともいえない
- 不満である
- とても不満である

(ウ) 電話での聞き取り調査の担当者の対応はどうか？

- とても満足している
- 満足している
- どちらともいえない
- 不満である
- とても不満である

(エ) 電話での聞き取り調査を行う時間帯はどうか？

- とても満足している
- 満足している
- どちらともいえない
- 不満である
- とても不満である

3

HAM ねっとに関するアンケート

(オ) 電話での聞き取り調査にかかる時間 (所要時間) はどうでしたか？

- 長すぎる
- やや長い気がする
- ちょうどよい
- やや短い気がする
- 短すぎる

(カ) 電話での聞き取り調査では聞かれなかったので答えなかったが、話したかったこと、話せばよかったと思ったことはありますか？

(キ) その他、電話での聞き取り調査について、ご意見・ご要望がありましたらご自由にお書きください。

4

HAM ネットに関するアンケート

3. 広報紙「HAM ネット通信」について、以下の質問にお答えください。

- (ア) 「HAM ネット通信」を読んだことがありますか？
- ある → (イ) 以降の質問へ
 - ない → 8ページ「4.インターネットの「HAM ネット」について」へ
 - 送られてきたことがない → 8ページ「4.インターネットの「HAM ネット」について」へ

*以下の質問には (ア) で「ある」と答えた方のみお答えください。

- (イ) 「HAM ネット通信」の発行回数はどうですか？
- とても満足している
 - 満足している
 - どちらともいえない
 - 不満である
 - とても不満である
- 「HAM ネット通信」の発行回数について、ご意見をお聞かせください。
- a) 発行回数 増やしてほしい 今のままでよい 減らしてほしい

- (ウ) 「HAM ネット通信」の読みやすさはどうですか？
- とても満足している
 - 満足している
 - どちらともいえない
 - 不満である
 - とても不満である
- 「HAM ネット通信」の読みやすさについて、ご意見をお聞かせください。
- a) 文字 大きすぎる ちょうどよい 小さすぎる
- b) 記事の配置 見やすい ちょうどよい 見にくい
- c) 記事の量 多すぎる ちょうどよい 少なすぎる

HAM ネットに関するアンケート

- インターネットの「HAM ネット」の見やすさについて、ご意見をお聞かせください。

- a) 文字 大きすぎる ちょうどよい 小さすぎる
- b) 色使い よい どちらでもない 悪い
- c) イラスト よい どちらでもない 悪い
- d) 記事の配置 見やすい ちょうどよい 見にくい
- e) 記事の量 多すぎる ちょうどよい 少なすぎる

(オ) インターネットの「HAM ネット」の操作のしやすさはどうですか？

- とても満足している
- 満足している
- どちらともいえない
- 不満である
- とても不満である

- インターネットの「HAM ネット」の操作のしやすさについて、ご意見をお聞かせください。

- a) クリックするボタン 大きすぎる ちょうどよい 小さすぎる
- b) ページの移動 分かりやすい どちらでもない 分かりにくい

(カ) インターネットの「HAM ネット」に書かれている内容はわかりやすいですか？

- とてもわかりやすい
- わかりやすい
- どちらともいえない
- わかりにくい
- とてもわかりにくい

HAM ネットに関するアンケート

(キ) 今後「HAM ネット通信」で取り上げてほしい記事がありましたらお聞かせください (複数回答可)。

- HAM に関する最新の研究成果
- 治験の情報
- 国の HTLV-1 に関する会議の内容
- 国の難病対策の動向
- 福祉サービスの情報
- 医療費助成の情報
- リハビリの情報
- 講演会の情報
- 患者さんの投稿コーナー
- その他 (以下の枠の中にお書きください)

Empty box for additional comments.

(ク) その他、「HAM ネット通信」について、ご意見・ご要望がありましたらご自由にお書きください。

Empty box for additional comments.

HAM ネットに関するアンケート

4. インターネットの「HAM ネット」について、以下の質問にお答えください。

(ア) インターネットで「HAM ネット」を見ますか？

- 見ている → (イ) 以降の質問へ
- 見ていない → 12ページ「5.「HAM ネット」について」へ
- 見られない → 12ページ「5.「HAM ネット」について」へ

*以下の質問には (ア) で「見ている」と答えた方のみお答えください。

(イ) インターネットで「HAM ネット」をどれくらいの頻度で見ますか？

- 週に1~2回以上
- 月に1~2回程度
- 年に数回未満

(ウ) インターネットの「HAM ネット」の更新頻度はどうですか？

- とても満足している
- 満足している
- どちらともいえない
- 不満である
- とても不満である

(エ) インターネットの「HAM ネット」の見やすさはどうですか？

- とても満足している
- 満足している
- どちらともいえない
- 不満である
- とても不満である

HAM ねっとに関するアンケート

(キ) インターネットの「HAM ねっと」で提供しているサービス (HAM 手帳のダウンロードページ、HAM 関連のリンク集) はどうですか？

- とても満足している
- 満足している
- どちらともいえない
- 不満である
- とても不満である

(ク) インターネットの「HAM ねっと」に取り上げている項目はどうですか？

- とても満足している
- 満足している
- どちらともいえない
- 不満である
- とても不満である

(ケ) よく見る項目、情報の更新がないかチェックしている項目は何ですか？ (複数回答可)

- HAM の病状や治療に関するお知らせや新着情報
- 講演会などの開催に関するお知らせや新着情報
- 法律の改正など国の支援事業に関するお知らせや新着情報
- iPS 細胞の活用や難病対策改革など研究事業に関するお知らせや新着情報
- 治験や新薬に関する情報の有無
- この研究の経過報告や進捗状況
- アンケートや電話調査などの調査結果
- HAM について (病気に関する説明)
- この研究について (研究の内容)
- HAM ねっと事務局の窓口時間
- HAM 関連のリンク集
- その他 ()

10

HAM ねっとに関するアンケート

(エ) 「HAM ねっと通信」に書かれている記事の内容はわかりやすいですか？

- とてもわかりやすい
- わかりやすい
- どちらともいえない
- わかりにくい
- とてもわかりにくい

(オ) 「HAM ねっと通信」でこれまでに取り上げた記事の内容はどうですか？

- とても満足している
- 満足している
- どちらともいえない
- 不満である
- とても不満である

(カ) 特にどんな記事に興味がありましたか、または印象に残っていますか？ (複数回答可)

- 難病対策や特定疾患等に関する記事
- HAM ねっとの登録者数のお知らせ
- 講演の内容をまとめたチラシ
- 公開講演会やシンポジウムのご案内
- HAM や HTLV-1 に関する小冊子
- HAM ねっと調査の進捗状況
- 同封されていたアンケートの内容
- HAM 手帳
- HAM 手帳 Q&A
- 編集後記 (HAM ねっと事務局や電話調査担当者からの一言)
- HAM ねっと事務局の連絡先
- その他 ()

6

HAM ねっとに関するアンケート

(コ) 今後インターネットの「HAM ねっと」で取り上げてほしい項目がありましたらお聞かせください (複数回答可)。

- HAM に関する最新の研究成果
- 治験の情報
- 国の HTLV-1 に関する会議の内容
- 国の難病対策の動向
- 福祉サービスの情報
- 医療費助成の情報
- リハビリの情報
- 「HAM ねっと」登録者同士の交流 (電子掲示板など)
- メールマガジンなど他の形式での情報発信
- その他 (以下の枠の中にお書きください)

(サ) その他、インターネットの「HAM ねっと」について、ご意見・ご要望がありましたらご自由にお書きください。

11

HAM ねっとに関するアンケート

5. 「HAM ねっと」に関して、以下の質問にお答えください。

(ア) 「HAM ねっと」に登録したことをどのように感じていますか？

- とても満足している
- 満足している
- どちらともいえない
- 不満である
- とても不満である

その理由がございましたら、ご自由にお書きください。

(イ) 「HAM ねっと」に登録したことが研究の推進に役立っていることを実感していますか？

- とても実感している
- 実感している
- どちらともいえない
- 実感していない
- まったく実感していない

その理由がございましたら、ご自由にお書きください。

12

HAM ネットに関するアンケート

(ウ) 今後、講演会などの情報がメールで配信されることを希望しますか？

- はい
- いいえ

質問は以上です。最後までご協力いただき、ありがとうございました。

【添付資料 2】

HAM 患者を対象とした
KW-0761 第 I/II a 相臨床試験
医師主導治験として実施
キックオフミーティング

日 時： 平成 25 年 12 月 5 日(木)

17:00～18:30

場 所： 聖マリアンナ医科大学

難病治療研究センター 4 階会議室

添付資料 2

HAM 患者を対象とした KW-0761 第 I/IIa 相臨床試験 医師主導治験として実施 キックオフミーティング

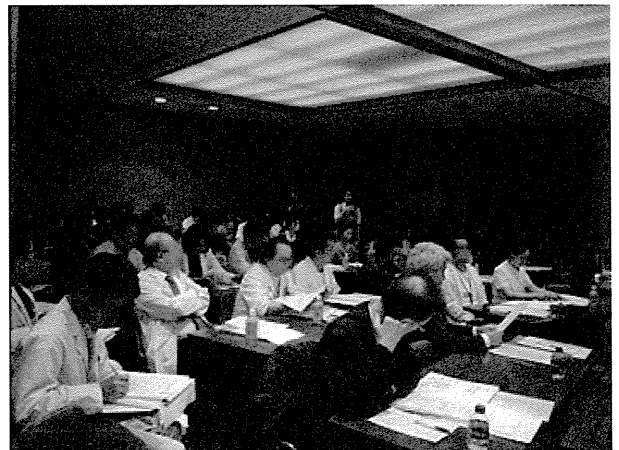
主催：平成 25 年度厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
「HAM の革新的な治療法となる抗 CCR4 抗体療法の実用化に向けた開発」(山野班)

日 時：平成 25 年 12 月 5 日(木) 17:00~18:30

場 所：聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 4 階会議室

— プログラム —

- 16:40~17:00 受付
- 17:00~17:05 ご挨拶 厚生労働省 疾病対策課 田中桜 様
- 17:05~17:10 ご挨拶 聖マリアンナ医科大学病院 病院長 幕内晴朗 教授
- 17:10~17:30 各グループの自己紹介
効果安全性評価委員 (山口一成 先生、宇都宮與 先生)
神経内科学教室 (長谷川泰弘教授)、8 階南病棟、8 階東病棟、内科外来
聖マリアンナ医科大学病院 治験管理室、薬剤部、臨床検査部、
リハビリテーション部、医事課
聖マリアンナ医科大学 研究推進課、薬理学教室 (松本直樹教授)、
北里大学臨床試験コーディネーティング部
アタライフ (株)
協和発酵キリン (株)
SRL メディサーチ (株)、東レリサーチセンター
- 17:30~17:50 HAM に対する KW-0761 医師主導治験の背景・全体像・附随研究について
山野嘉久 発表 20 分
- 17:50~18:05 HAM に対する KW-0761 医師主導治験の実施体制等について
青谷恵利子 発表 15 分
- 18:05~18:15 治験の流れと分担医師の役割について 治験管理室 増原直子 師長
- 18:15~18:25 KW-0761 に関する安全性情報について 協和発酵キリン (株)
- 18:25~18:30 ご挨拶 難病治療研究センター センター長 遊道和雄 教授

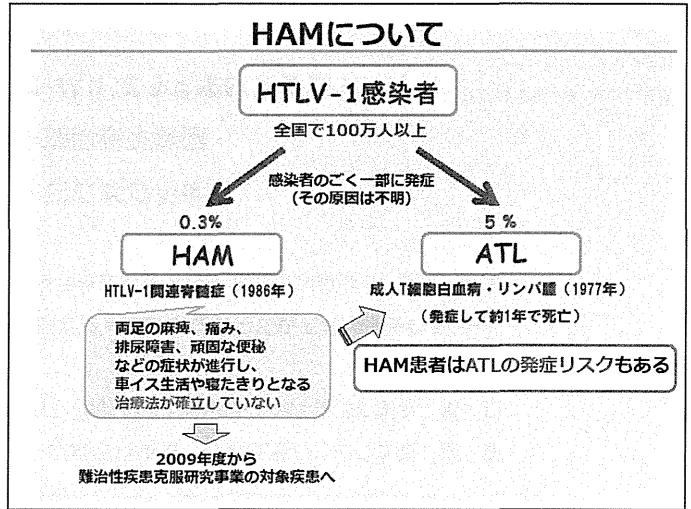


厚生労働科学研究
難治性疾患克服研究事業
(H25-難治等(難) - 一般-023)

**「HAMに対するKW-0761医師主導治験の
背景・全体像・附随研究について」
第1回 キックオフミーティング**

治験責任医師
聖マリアンナ医科大学
難病治療研究センター
山野嘉久

2013年12月5日(木) 神奈川



希少難病HAMの「保険承認される治療薬」を開発するために

<薬事承認を得るためには>

- 公知申請・・・海外での治療エビデンス、あるいはレベルの高い治療エビデンス
- 薬事承認に耐えうる治験の実施・・・企業主導治験、医師主導治験

<そのために必要なこと>

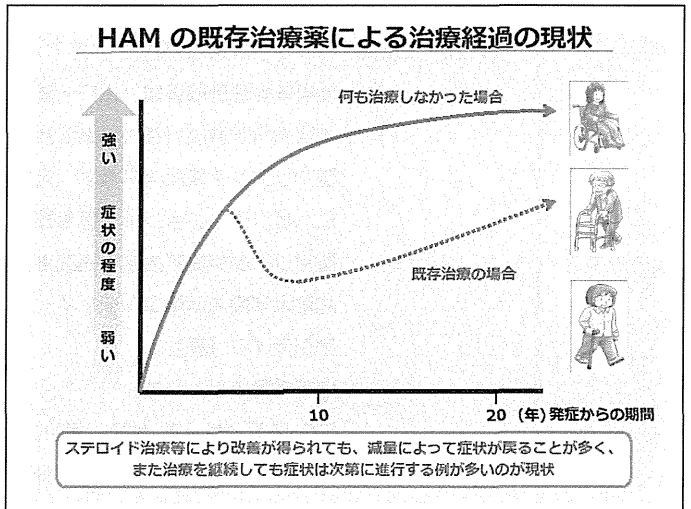
- 多くの患者さんの協力が得られる体制が必要・・・「HAMねっと」を構築
- 医師主導治験(安全性の検証、有効性の探索・検証)の実施が必要
- 検証的試験に重要な「有効性評価指標」の開発が必要
- 次世代の新薬候補の開発研究が必要

第1相臨床試験 → 第2相臨床試験 → 第3相臨床試験

安全性 有効性(数億円) 有効性(数百億円)

↓

希少難病はこの段階で薬事承認可能



背景：HAMの病態を踏まえた治療戦略

HAMはアンメットニーズの高い極めて難治性の希少疾患で、新薬開発の要望が強い

① HTLV-1感染細胞の増加と活性化

↑

抗ウイルス療法
(実現していない)

② 脊髄での慢性炎症

↑

免疫抑制療法
(ステロイド・IFN-α)

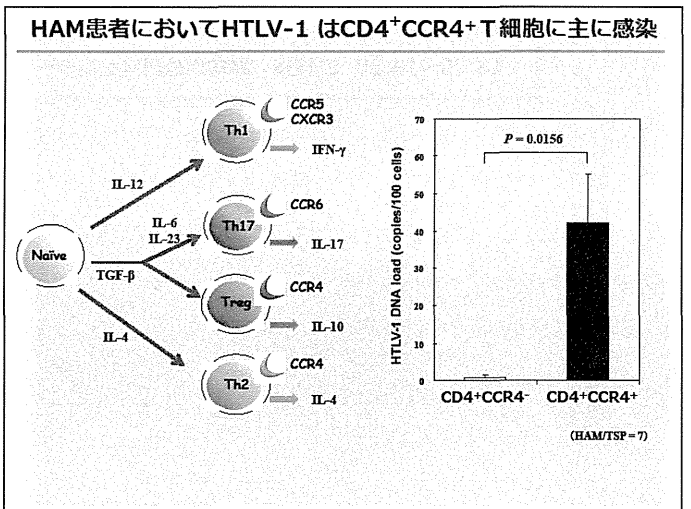
③ 神経組織の破壊と変性

↑

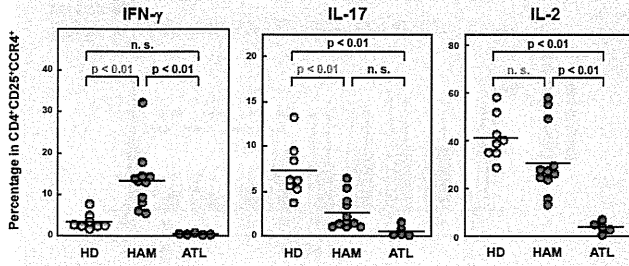
神経再生治療
(実現していない)

- ・既存のステロイド・インターフェロンα治療では患者の予後は不良
- ・HTLV-1感染細胞数がHAM患者の長期予後と相関 (Olindo S et al 2005)
- ・逆転写阻害剤やプロテアーゼ阻害剤は感染細胞制御に無効 (Taylor G 2006)

HTLV-1感染細胞を標的とした治療薬の開発が必要



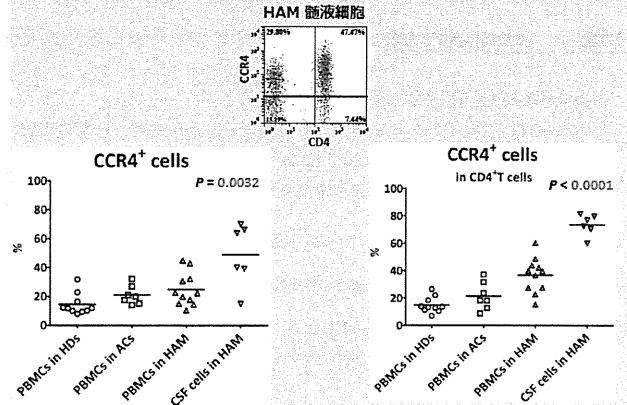
HAM 患者の CD4+CD25+CCR4+ T 細胞における IFN- γ の増加と IL-17 の減少



HD (healthy donor) : n = 8
HAM (HAM/TSP) : n = 11
ATL : n = 5

(Yamano T. et al PLoS One 2009)

HAM 患者の髄液細胞には CCR4+ 細胞が極めて多い



Statistical significance, $P < 0.05$ by Kruskal-Wallis test

(Araya N et al submitted)

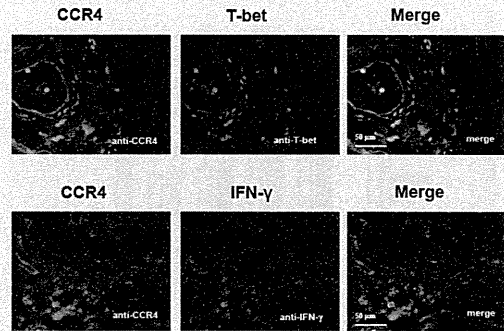
HAM 患者髄液中の CCR4+ 細胞における HTLV-1 感染の証明



緑: CCR4
赤: HTLV-1

(Araya N et al submitted)

HAM 患者の脊髄病変部における CCR4+ 細胞の浸潤と炎症促進因子の共発現



(Araya N et al submitted)

HAM患者における CCR4+ T 細胞の特徴

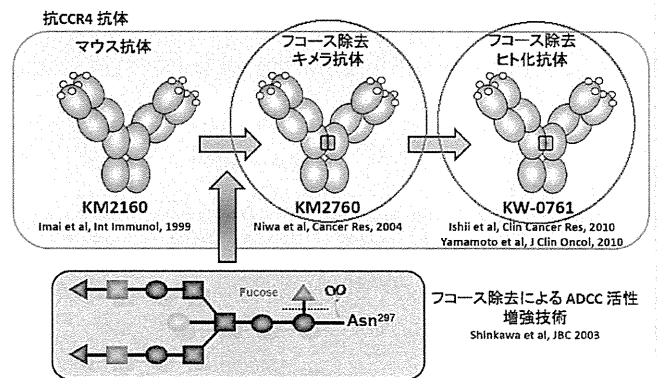
HAM患者で、

- HTLV-1は主にCCR4+ T細胞に感染して増加している
- CCR4+ T細胞は中枢神経系に多数認められる
- CCR4+ T細胞は炎症性サイトカインを産生する細胞へと変化

HAM患者でCCR4を標的とした治療が有効である可能性

ヒト化抗CCR4抗体製剤 (Mogamulizumab) を用いてin vitroで検討

ヒト化抗CCR4抗体 (KW-0761)の開発



(協和発酵キリン(株)から供与)

引用:
第4回 HTLV-1特命チーム会議議事録
名古屋市立大学大学院医学研究科特任教授
名古屋市病院局長 上田隼三