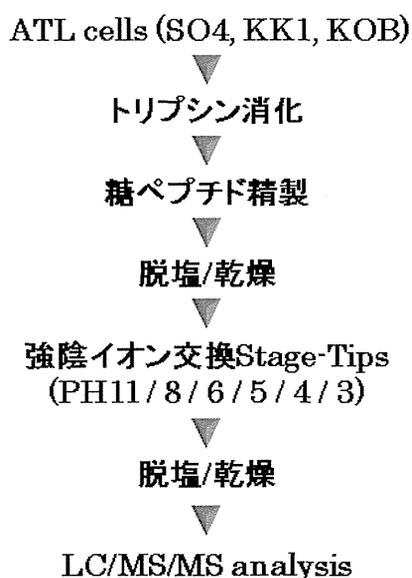


逆相精製によって脱塩され、CL4B ビーズ (Sigma-Aldrich) を用いた親水性相互作用クロマトグラフィによって糖ペプチドを粗精製し、凍結乾燥を行った。さらに 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MnCl<sub>2</sub>, 5% アセトニトリル及び 50 mM ammonium bicarbonate を含む Buffer に再懸濁後、ConA レクチンビーズ (J-オイルミルズ) に糖ペプチドを結合させ、非糖ペプチドを wash により洗い流した後に PNGase (Roche) によって N 型糖鎖の根元を切断し、溶出物を回収する事で糖鎖修飾を受けていたコアペプチドのみを回収した。凍結乾燥した糖ペプチド精製品は Britton-Robinson buffer に再懸濁され、1 次元目の分離として Stage tips を用いた強陰イオン交換による分画 (pH11, 8, 6, 5, 4, 3) を施された。続く 2 次元目にはスクリーニング時と同様の逆相分離を採用し、サンプルを流速 250 nL/min、120 分間 C18 逆相カラム (日京テクノス) を用いて分離を行いながらイオン化し、質量分析計である LTQ-Orbitrap Velos によって解析した (図 1)。取得されたデータは MASCOT 検索による同定検索に供された。MASCOT 検索には以下のパ

ラメータを使用した。Taxonomy = Homo Sapiens, Enzyme = semiTrypsin, Miss cleavage = 2, Database = SwissProt\_2015\_01 (547,357 sequences), Fixed modifications = Carbamidomethyl (C), Variable modifications = Oxidation (M) + IGL' (N), MS tolerance = 3 ppm MS/MS tolerance = 0.8 Da, Instrument = ESI-TRAP。さらに Peptide Validator アルゴリズムを使用し、False Discovery Rate < 0.01 を同定信頼性の基準とした。

得られた同定情報を m/z 及び RT に関連付けさせ、治療標的候補分子の同定を行った。ペプチド同定は m/z 方向に ±3 ppm、RT 方向に ±5 分の範囲を許容する基準で行った。

同定された治療標的候補のバリデーションには Flow cytometry を用いた。採取後に Cell Banker を用いて凍結保存していた独立な末梢血検体 (健常者 (ND, n = 4), 無症候キヤリア (AC, n = 6), HAM 患者 (HAM, n = 6)) を解凍し、PBS で 2 回洗浄した後に α-Adhesion molecule A Alexa647 (Biolegend) を用いて染色後、FACS Aria (BD) を用いて解析した。取得されたデータの解析は FlowJo (Tree Star Inc.) を用いて実施した。



(図 1) 2D-LC/MS/MS の概要

(倫理面への配慮)

血球試料の収集に関しては、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取得し、採血の手続きを行った。採血され、血球を分離、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) は聖マリアンナ医科大学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 (疾患の状況、治療歴、各種バイオマーカーの値など) のみ付加されて研究分担者の所属する研究室へと移動、保管した。こ

れら血球試料の提供、本研究への使用に関しては、聖マリアンナ医科大学病院、東京大学双方の倫理審査委員会による承認を得た上で実施した。

### C. 研究結果

前年度までに未同定であった治療標的候補ペプチドの同定にあたり、同定データベースの作成を行った。逆相クロマトグラフィにおけるペプチドの RT は独立な解析間でも再現性が極めて高く、未同定のペプチドを異なる解析で作成した同定データセットと照合する事によって同定を行う事が可能である。この同定データセットを作成するため ATL 細胞株を用いた糖ペプチド精製物に対する 2D-LC/MS/MS 解析を行った。ATL 細胞株より回収した糖ペプチド回収物を Stage Tips による陰イオン交換で分離し、各細胞 6 フラクシオン、計 18 フラクシオンを作成した。これらの各フラクシオンに対し LC-MS/MS 解析を行った結果、915 糖タンパク質由来 6,791 糖ペプチドの同定に至り、uniprot データベースの subcellular localization におけるタームを基に解析を行った結果、69.5%が膜表面タンパク質であることが明らかとなった (図 2)。このデータセットを用いて未同定の標的治療候補分子を同定した結果、27 ペプチドを同定した。ここから膜表面タンパク質である事、非 HLA 分子である事を条件に候補ペプチドを絞り込んだところ 3 ペプチドの抽出に至った。この内 2 ペプチドはこれまでに HAM 患者末梢血での発現上昇が報告されている  $\beta$ 1-integrin 由来のペプチド断片であった (図 3)。また、現在までに HAM 病態において未報告の新規治療標的候補膜タンパク質として Adhesion molecule A を同定した (図 3)。

Adhesion molecule A に対する Flow cytometry を用いた定量的バリデーションを

行うにあたってサンプルサイズを決定する必要があり、少数末梢血サンプル (ND (n = 4), AC (n = 6), HAM (n = 6)) を用いて蛍光強度の標準偏差及び平均値を算出し、検出力 0.8 に設定した時の必要なサンプルサイズの算出を行った。その結果バリデーションに必要な最低サンプル数が 20 サンプルであることが明らかとなり、現在引き続きサンプルの収集にあっている。なおこのデータからはスクリーニング時に得られた定量結果と同様、HAM における発現の増加傾向が観察されており (図 4)、Adhesion molecule A が HAM における感染細胞で発現が増加している可能性が高い。

### D. 考案

HTLV-1 感染細胞を対象とした膜プロテオーム解析を行う事により、HAM 病態で CD4 陽性 T 細胞における発現が上昇するタンパク質を 2 タンパク質同定する事に成功した。うち 1 タンパク質に関しては HAM 患者 CD4 陽性 T 細胞において発現が上昇している事がすでに報告されており、本研究における膜プロテオーム解析が目的に則して正しく機能していたことを示している。今後 Adhesion molecule A に関する定量バリデーション及び機能解析を進めることにより、HAM 病態における新規発症機序の解明や Adhesion molecule A を標的とした治療法の開発につなげていく予定である。

Adhesion molecule A は T 細胞活性化において T 細胞受容体を介したシグナル経路に関与する事が報告されている。HAM 病態においては、病態進行時に血中のプロウイルス量が増加することが知られており、HAM において感染細胞の増殖・活性化などに Adhesion molecule A が関与している可能性が考えられる。

近年 HTLV-1 関連疾患である ATL 病態では HAS-flow 法に代表されるように Flow cytometry を用いた病態分類の実用化に向けた研究が進んでおり、本研究の発見は HAM 病態において同様の診断アルゴリズムの作成に応用できる可能性が期待される。Adhesion molecule A は治療標的としてだけでなく客観的な HAM 病態の診断が難しい現状を打開できる新規の診断法の開発に応用できる可能性があり、本研究成果は治療、診断の両面から HAM 治療に貢献できる可能性が高い。

## E. 結論

高感度質量分析を用いた膜プロテオーム解析は病態に依存的に変化し、治療標的となり得る膜タンパク質の同定において強力な手段である。今後 Adhesion molecule A の HAM 病態での役割を解明し、HAM の新規治療法の確立に結び付けていく。

## F. 健康危惧情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1) A plasma diagnostic model of human T cell leukemia virus-1 associated myelopathy.  
Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Yamano Y, and Ueda K.  
Annals of Clinical and Translational Neurology, in press, 2014.

2) Antibody-coupled monolithic silica microtips for highthroughput molecular profiling of circulating exosomes.

Ueda K, Ishikawa N, Tatsuguchi A, Saichi N, Fujii R, and Nakagawa H.  
Scientific reports, 4, 6232, 2014.

3) Critical role of lysine 134 methylation on histone H2AX for gamma-H2AX production and DNA repair.

Sone K, Piao L, Nakakido M, Ueda K, Jenuwein T, Nakamura Y, and Hamamoto R.  
Nature communications, 5, 5691, 2014.

4) SMYD2-dependent HSP90 methylation promotes cancer cell proliferation by regulating the chaperone complex formation.

Hamamoto R, Toyokawa G, Nakakido M, Ueda K, and Nakamura Y.  
Cancer letters, 351 (1), 126-133, 2014.

5) Identification of a nuclear protein, LRRC42, involved in lung carcinogenesis.  
Fujitomo T, Daigo Y, Matsuda K, Ueda K, and Nakamura Y.

International journal of oncology, 45 (1), 147-156, 2014

### 2. 学会発表

1) Membrane proteome analysis to discover therapeutic targets for adult T-cell leukemia (ATL).

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Tatsuguchi A, Utsunomiya A, Yamano Y, Sugano S, and Ueda K.  
第76回日本血液学会学術集会 口頭

2014年11月1日

2) Comprehensive membrane-proteomic analysis for discovery of novel therapeutic targets against adult T-cell leukemia.

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Tatsuguchi A, Utsunomiya A, Yamano Y, Sugano S, and Ueda K.

第73回日本癌学会学術総会 口頭

2014年9月27日

3) Quantitative membrane proteome profiling to discover therapeutic targets for HTLV-I associated diseases.

Ishihara M, Araya N, Sato T, Saichi N, Fujii R, Tatsuguchi A, Yamano Y, and Ueda K.

13th Annual World Congress of the Human Proteome Organization. Oral Presentation  
2014年10月8日

4) CD4陽性T細胞を用いた膜プロテオーム解析によるHTLV-1関連脊髄症に対する新規治療標的分子の探索

石原 誠人、新谷 奈津美、佐藤 知雄、藤井 理沙、最知 直美、宇都宮 與、山野 嘉久、菅野 純夫、植田 幸嗣

第1回日本HTLV-1学会学術集会 口頭

2014年8月24日

5) 膜プロテオーム解析によるヒトT細胞白血病ウイルス-I型 (HTLV-1) 関連疾患に対する新規治療標的分子の探索

石原 誠人、新谷 奈津美、佐藤 知雄、龍口 文子、最知直美、宇都宮與、山野 嘉久、菅野 純夫、植田 幸嗣

日本プロテオーム学会2014年会 ポスター  
2014年7月17日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

ヒト T リンパ好性ウイルス-1 (HTLV-1) 関連脊髄症 (HAM/TSP) の検査方法、及び検査用キット

日本出願番号: 特願 2014-226719

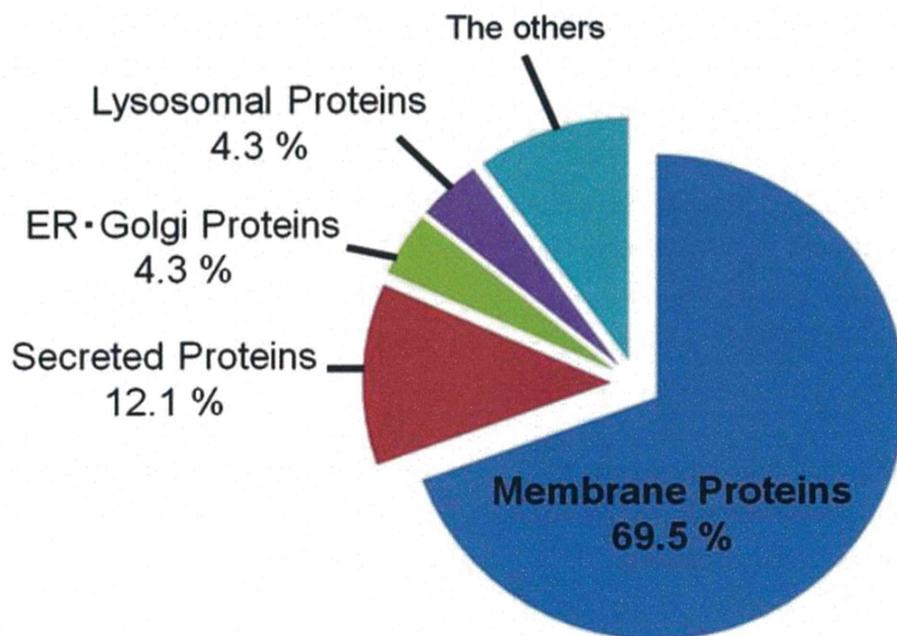
日本出願日: 2014 年 11 月 7 日

発明者: 植田幸嗣、石原誠人、山野嘉久

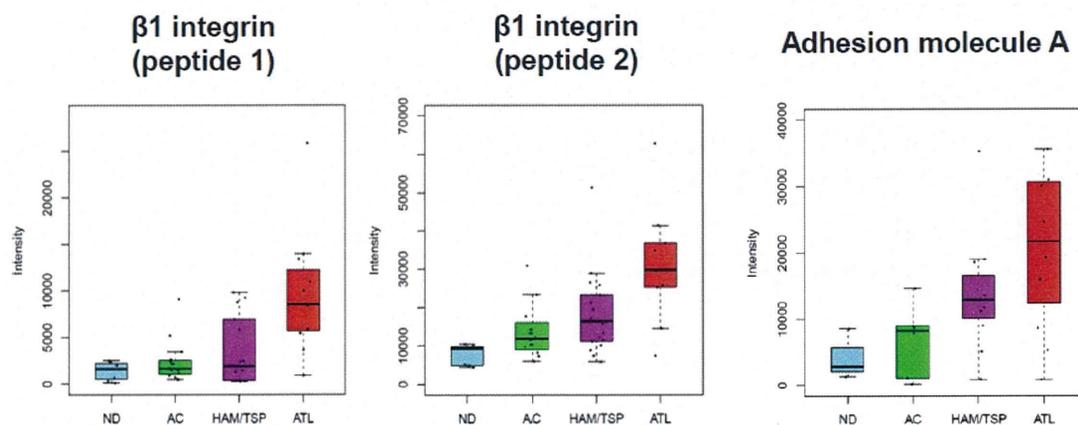
出願国: 日本

2. 実用新案登録

該当なし



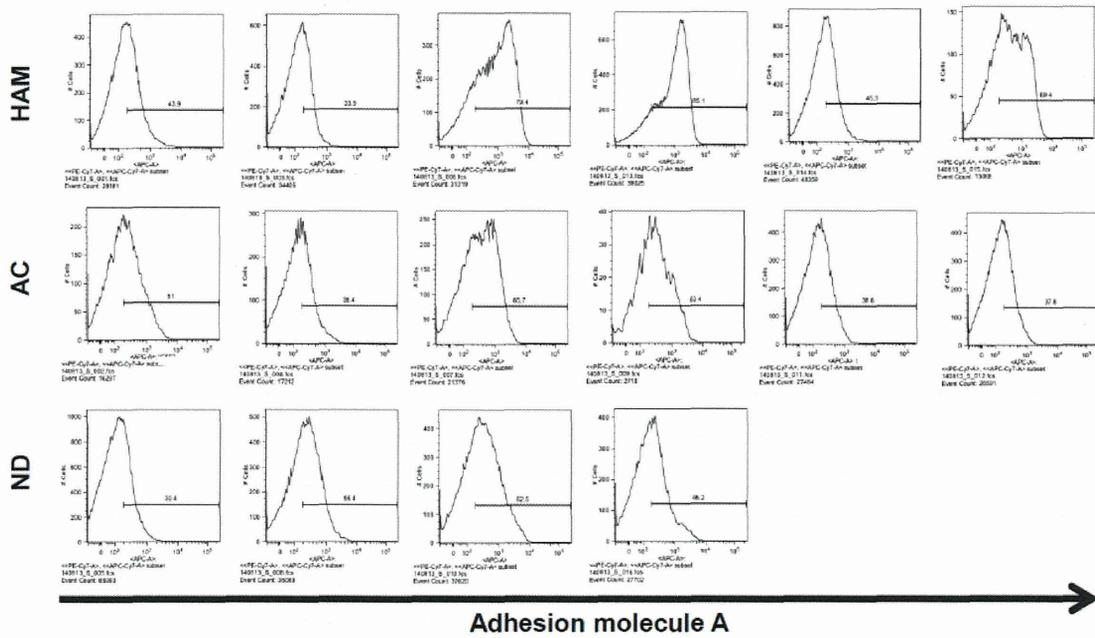
**図2 2D-LC/MS/MSで同定された細胞ライセート由来糖ペプチドの内訳**  
 同定された915糖タンパク質に関してUniprotデータベースのSubcellular localizationを基に局在を解析した所、同定された糖ペプチドの70%近くが膜タンパク質であることが分かった。



**図3 HAM治療標的候補分子の定量ボックスプロット**  
 β1-Integrin 及び Adhesion molecule A のLC-MS/MS解析での検出強度はHAM, ATLで上昇している事が明らかとなった。

(A)

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T-cells (HAM (6), AC (6) and ND (4))



(B)

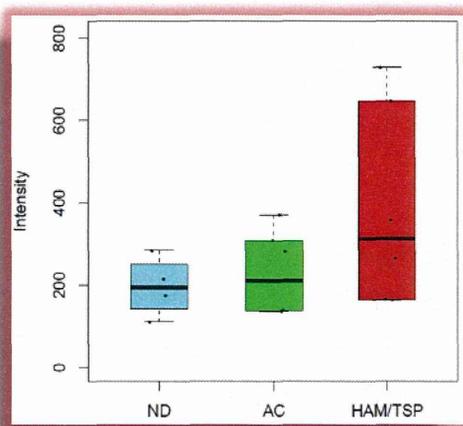


図4 Adhesion molecule Aの臨床検体における発現

(A) Adhesion molecule Aに対するAlexa647標識抗体を用いてFACSaria (BD)による発現解析を行った。その結果HAM患者末梢血CD4陽性T細胞でAdhesion molecule Aの発現の増加傾向が観察された。  
(B) FACSariaによる解析結果におけるAdhesion molecule Aのピーク平均値のボックスプロット。

## HTLV-1 感染細胞クローンの解析

研究分担者 氏名 : 松岡雅雄  
所属機関 : 京都大学ウイルス研究所  
職名 : 教授

研究要旨：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は生体内では新規感染ではなく、感染細胞の増殖によって、自身のコピー数を増加させる。これは HTLV-1 が感染細胞を介してのみ感染できるため合目的な戦略であると考えられている。HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位を網羅的に解析することによって感染細胞クローンを同定、定量化できる。抗 CCR4 抗体投与前後の感染細胞クローンを解析して、その動態を検討した。

### A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は感染細胞を介してのみ感染できるため、感染後、生体内で感染細胞を増やすという戦略を取っている。HTLV-1 はプロウイルスとして宿主ゲノムに組み込まれており、細胞分裂により増加する。このため、プロウイルスの組み込み部位を同定することにより、感染細胞クローンを定量化することが可能である。本研究では、プロウイルス組み込み部位を次世代シーケンサーにより網羅的に解析して、HTLV-1 感染細胞クローンの動態を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

プロウイルス組み込み部位の解析は、DNA を抽出の後、超音波にて DNA の断片化を行ってリンカーを断片化 DNA へ連結した。その後、ウイルスの 3' 側の配列と、リンカーの配列を使用し PCR 反応を行い、ウイルスの組み込み部位を特異的に増幅する。さらに次世代シーケンサー特異的な配列をもつリンカーを連結させ、シーケンス解析を行う。この際に各サンプル毎に Tag 配列を使用するこ

とで、同時に解析を行うことが可能である。得られたデータを Tag 配列によってわけ、ウイルスの組み込み部位から断片端までの配列で clone を計算することが可能である。同じ断片端をもつものは PCR による増幅として計算し、異なる断片端の同じ組み込み部位をもつものは姉妹細胞として計算した。

### (倫理面への配慮)

HAM 患者検体の次世代シーケンサーでのゲノム解析に関して、京都大学大学院医学研究科、医の倫理委員会にて承認が得られている (承認番号 : G204)。

### C. 研究結果

1. HTLV-1 組み込み部位の網羅的解析による HTLV-1 感染細胞クローンの同定 : 末梢血単核球から分離したゲノム DNA を使い、HTLV-1 プロウイルス組み込み部位を網羅的に同定した。次に組み込み部位の塩基配列に基づき、HTLV-1 感染クローンの同定を行った。
2. 抗 CCR4 抗体前後でのクローンの変化 : 抗 CCR4 抗体使用前後のクローンの動態を

解析して、前後で異なるクローンが認められた。また、治療前に存在したクローンが検出できなくなり、逆に存在しなかったクローンが出現することが認められた。

#### D. 考案

次世代シーケンサーによる HTLV-1 感染クローンの同定は有効な解析方法であり、これまで HTLV-1 感染症に関して新たな結果が得られている。例えば HAM 患者ではプロウイルス量が高いことから、大きな感染細胞クローンが増加していると予想されていたが、実は感染細胞クローン数が多いことが明らかになった。我々はサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (STLV-1) 感染ニホンザルが HTLV-1 感染のモデルとして有用であることを報告し、抗 CCR4 抗体投与によって感染細胞数が強く抑制されることを報告してきた。抗 CCR4 抗体投与前後で解析すると STLV-1 感染クローンの中で、投与前にあったクローンが投与後に回復するものとしらないものが観察され、抗 CCR4 抗体が HTLV-1 感染細胞を一様に抑制するのではなく、その反応には多様性が認められることが示唆された。HAM 患者でも同様の傾向が認められた。

#### E. 結論

次世代シーケンサーを使った解析により HTLV-1 感染クローンの詳細な解析が可能となった。

#### F. 健康危惧情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ma G, Yasunaga J-I, Akari H, and Matsuoka M. TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, (in press).
2. Takachi T, Takahashi M, Takahashi-Yoshita

M, Higuchi M, Obata M, Mishima Y, Okuda S, Tanaka Y, Matsuoka M, Saitoh A, Green P, Fujii M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein represses the expression of the BCL11B tumor suppressor in T-cells. **Cancer Sci**, (in press).

3. Kinpara S, Ito S, Takahata T, Saitoh Y, Hasegawa A, Kijiyama M, Utsunomiya A, Masuda M, Miyazaki Y, Matsuoka M, Nakamura M, Yamaoka S, Masuda T, Kannagi M. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and anti-sense viral RNA in the constitutive NF $\kappa$ B activation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. **Leukemia** (in press).
4. Suehiro Y, Atsuhiko Hasegawa A, Tadafumi Iino T, Amane Sasada A, Nobukazu Watanabe N, Masao Matsuoka M, Ayako Takamori A, Ryuji Tanosaki R, Atae Utsunomiya A, Ilseung Choi I, Tetsuya Fukuda T, Osamu Miura O, Shigeo Takaishi S, Takanori Teshima T, Koichi Akashi K, Mari Kannagi M, Naokuni Uike N, Jun Okamura J. Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T-cell leukemia/lymphoma in a pilot study. **Br J Haematol** (in press).
5. Niederer HA, Laydon DJ, Melamed A, Elemans M, Asquith B, Matsuoka M, Bangham CR. HTLV-1 proviral integration sites differ between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. **Virology J**. 11: 172, 2014.
6. Lavorgna A, Matsuoka M, Harhaj EW. A critical role for IL-17RB signaling in HTLV-1 Tax-induced NF- $\kappa$ B activation and T-cell transformation. **PLoS Pathogens** (in press).
7. Cook LB, Melamed A, Niederer H, Valganon M, Laydon D, Foroni L, Taylor GP, Matsuoka M, Bangham CR. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure and genomic integration site in adult T cell leukemia/lymphoma. **Blood**, 123: 3925-3931, 2014.
8. Furuta RA, Ma G, Matsuoka M, Otani S, Matsukura H, Hirayama F. Re-evaluation of screening of plasma positive for human T-cell leukemia virus type 1 using a luciferase immunoprecipitation system in blood donors. **Transfusion**, (in press).
9. Zhao, T, Satou Y and Matsuoka M.

- Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice. Arch Virol, 159: 1849-1856, 2014.
10. Azuma Y, Kükenshöner T, Ma G, Yasunaga JI, Imanishi M, Arndt KM, Matsuoka M, and Futaki S. Controlling leucine-zipper partner recognition in cells through modifications of a-g interactions. Chem. Commun. 50: 6364-6367, 2014.
  11. Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J-I, Takai K and Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. Cancer Res, 74:188-200, 2014.
2. 学会発表
1. Masao Matsuoka. How Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Causes Diseases: The 4<sup>th</sup> International Symposium on Carcinogenic Spiral Infection, Immunity, and Cancer, Keio Plaza Hotel Sapporo, Japan, February 10-11, 2014.
  2. 松岡雅雄: HTLV-1 感染が仕掛ける巧妙な罠: HBZ タンパク質: 成人 T 細胞白血病 (ATL) と原因ウイルス (HTLV-1) 「ATL 細胞の培養から始まった HTLV-1 研究: ATL シンポジウム、高新文化ホール(高知)、2014 年 5 月 24 日
  3. Masao Matsuoka. Mechanism of leukemogenesis by human T-cell leukemia virus type 1: The 12<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology. Fukuoka Sunpalace, Japan, July 17-19, 2014.
  4. 安永純一郎、園直希、馬広勇、萩谷啓太、松岡雅雄: 宿主 F-box タンパク質 FBXL11 は Tax と HBZ のユビキチン化を誘導し機能を活性化する: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京)、2014 年 8 月 22 日-24 日
  5. 栗林和華子、水上拓郎、滝澤和也、倉光球、浅田善久、岩間厚志、松岡雅雄、濱口功: HTLV-1 モデルマウスである HBZ-Tg マウスにおける癌幹細胞の同定と機能解析: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京)、2014 年 8 月 22 日-24 日
  6. 三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症には IFN $\gamma$  が重要な役割を果たす: 第 1 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京大学医科学研究所 1 号館講堂 (東京)、2014 年 8 月 22 日-24 日
  7. Guangyong Ma, Jun-ichiro Yasunaga, Masao Matsuoka. TCF1/LEF1 are T-cell natural HTLV-1 Tax antagonists that restrict viral expansion in thymus. The 1<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of HTLV-1 and Associated Diseases. The Institute of Medical Science, Tokyo University, Japan, August 22<sup>th</sup>-24<sup>th</sup>, 2014.
  8. 松岡雅雄: HTLV-1 による発がん機構: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014 年 9 月 25 日-27 日
  9. 川月章弘、安永純一郎、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor (HBZ) は Rb タンパクと相互作用し、E2F-1/Rb 経路を改変する: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014 年 9 月 25 日-27 日
  10. 安永純一郎、松岡雅雄: 転写因子 TCF1、LEF1 は HTLV-1 Tax を阻害し末梢 T リンパ球への感染指向性に関与する: 第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014 年 9 月 25 日-27 日
  11. 三田上侑生、安永純一郎、大島孝一、松岡雅雄: HTLV-1 bZIP factor が惹起する炎症における IFN $\gamma$  の役割: 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014 年 11 月 10 日-11 月 12 日
  12. 菅田謙治、安永純一郎、三浦未知、明里宏文、小柳義夫、小原道法、松岡雅雄: Anti-CCR4 抗体は Treg と感染細胞を同時に標的にする事で、STLV-1 自然感染ニホンザルでのウイルス特異的免疫反応を活性化させる: 第 62 回日本ウイルス学会学術集会、パシフィコ横浜 (神奈川)、2014 年 11 月 10 日-11 月 12 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他

## 末梢血中 ATL 前駆細胞の解析

研究分担者 氏名 : 内丸 薫  
所属機関 : 東京大学医科学研究所附属病院  
職名 : 准教授

研究要旨：HTLV-1 感染細胞の腫瘍化過程を解析する HAS-2G 法を用いて HTLV-1 キャリア、indolent ATL 患者 60 例の CD7/CADM1 の発現の解析を行った。HAS-2G 法による解析は HTLV-1 感染者末梢血の病態を非常によく反映していると考えられ、末梢血中の ATL 前駆細胞の状態を評価することが可能であった。本治験で抗 CCR4 抗体の投与を受けた HAM 患者の末梢血を HAS-2G で解析することにより HTLV-1 キャリアに抗 CCR4 抗体を投与した時の末血中 ATL 前駆細胞への影響を評価することが可能であり、HTLV-1 ハイリスクキャリアへの ATL 発症予防のための抗 CCR4 抗体投与の可能性を検討できると考えられる。

### A. 研究目的

我々の開発した HTLV-1 感染者末梢血 CD4 陽性細胞における CD7/CADM1 の発現を検討する multi-color FACS system (HAS-2G 法)によって、HTLV-1 キャリア、ATL 患者末梢血において CD7<sup>+</sup>/CADM1<sup>-</sup>(P)、CD7<sup>dim</sup>/CADM1<sup>+</sup>(D)、CD7<sup>-</sup>/CADM1<sup>+</sup>(N)の 3つの集団が検出され、これらはこの順に ATL へ向けての腫瘍化過程が進行した細胞集団であることを我々は報告してきた。本研究では多数例の HTLV-1 キャリアと indolent ATL を HAS-2G を用いて解析し、HAS-2G の解析パターンと病態との関連をより詳細に明らかにするとともに、本研究において抗 CCR4 抗体が投与された患者の末梢血への影響の評価の可能性を検討する。

### B. 研究方法

東大医科研血液腫瘍内科を受診した HTLV-1 キャリア 41 例、くすぶり型 ATL9

例、慢性型 ATL10 例の合計 60 例を解析対象とした。末梢血単核球を分離後、既報のとおり HAS-2G 法により、CD14 陽性単球を gate out した後、CD3/4 陽性 T 細胞に gate をかけ、CD7/CADM1 の発現を解析した。これらの集団の clonality について inverse PCR で解析を行った。対象症例の末梢血異常リンパ球数などの臨床情報、プロウイルス量などのデータと HAS-2G パターンとの関連について解析を行った。また、各集団の CCR4 の発現について検討した。

### (倫理面への配慮)

本研究は臨床研究に関する倫理指針に則り東京大学医科学研究所ヒトゲノム倫理委員会の審査承認（承認番号 24-34-1004）のもとに被験者から文書による説明と同意を得て遂行された。

### C. 研究結果

末梢血中プロウイルス量 (PVL) >4%は

ATL 発症のリスクファクターであることが報告されているが、HAS-2G による解析により PVL<4% の症例はほぼ全例 D+N<10%、PVL>4%の症例は同様に D+N>10%と明瞭に分離された (図 1)。

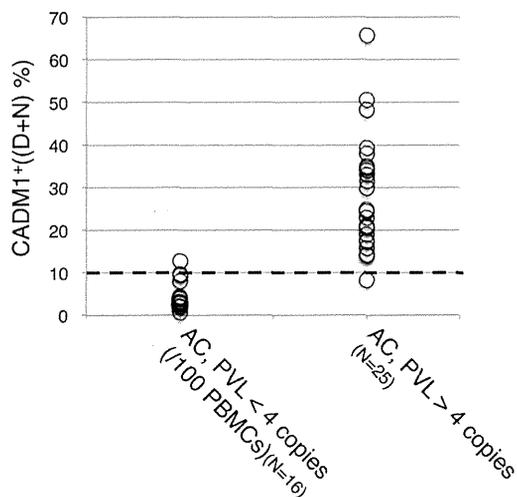


図 1 D+N(%)と PVL の関係

D+N の%により、解析した全 60 例のキャリア、indolent ATL をプロットした結果を図 2 に示す。各症例の clonality を inverse PCR で解析した結果 (図 3)、PVL<4%である D+N<10% の症例では全例 HTLV-1 感染細胞は polyclonal であり、10%~25% ではほとんどの症例が oligoclonal、ないし major clone の増殖を認める症例であったが、下山分類上はキャリアであった。D+N 25%~50% の症例では全例で oligoclonal band ないし

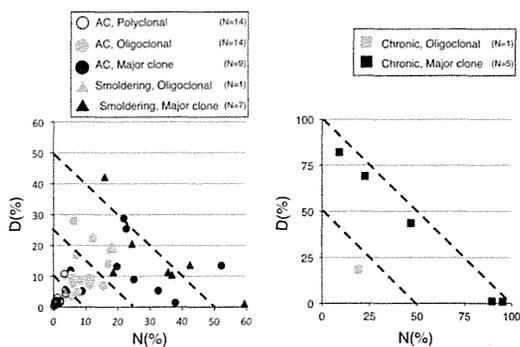


図 2 D+N(%)による 4 集団への分画

major clone を認め、くすぶり型 ATL とキャリアが混在していた。慢性型症例は全例 D+N>50%であった。

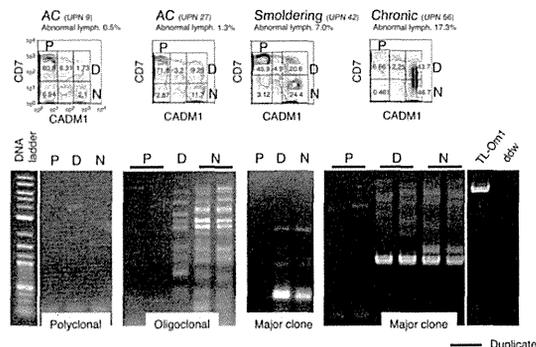


図 3 各分画の clonality 解析

これら D+N 0~10%、10~25%、25~50%、50%<の 4 つの集団における末梢血中異常リンパ球数を図 4 に示す。

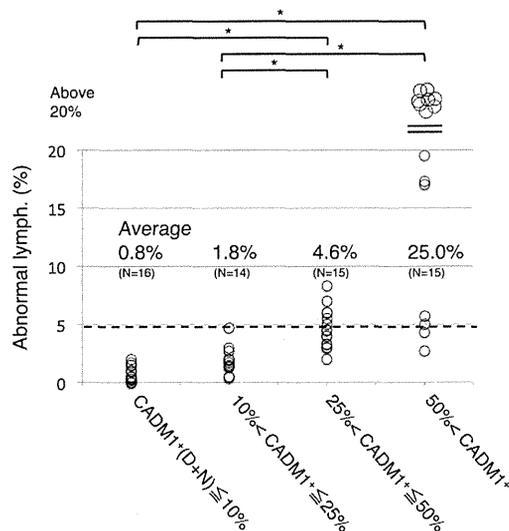


図 4 4 集団の末梢血異常リンパ球数

D+N<10% では全例末梢血中異常リンパ球は 1%前後ないしそれ以下であった。10%~25% ではほとんどの症例が異常リンパ球は 2~3%程度で全例診断はキャリアであった。25%~50% では異常リンパ球は 5%前後で、継時的に 5%前後で推移しており、診断はくすぶり型 ATL とキャリアが混在していた。これらのくすぶり型 ATL とキャリア

アとは HAS-2G および clonality 解析上は区別が困難であった。慢性型症例は全例 D+N>50%であったが、一部のくすぶり型症例、またキャリアの中にもここに分布する症例があった。これらの症例は全例 major clone を認める症例であった(図 2)。

HAS-2G における P、D、N の各集団における CCR4 の発現の解析結果を図 5 に示す。

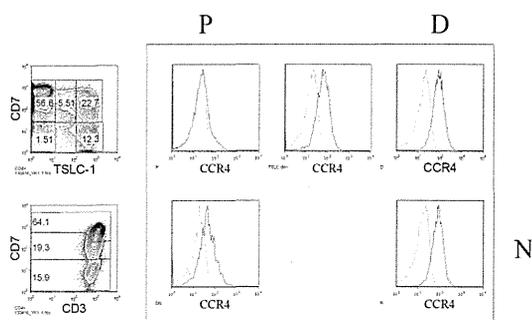


図 5 P、D、N 各集団の CCR4 の発現

D、N の集団はすでに CCR4 を発現していることがわかる。

#### D. 考案

本研究の結果、HAS-2G のパターンは末梢血中の異常リンパ球数や PVL、HTLV-1 感染細胞の clonality などとよく相関していた。PVL 測定と比較して簡便かつ短時間に結果が得られ、また視覚的にも優れているだけでなく、腫瘍化過程の各段階の細胞を分画して解析することも可能であることから、HTLV-1 感染者の腫瘍化過程の評価を行う上で優れた方法と考えられた。くすぶり型とキャリアの一部の症例はこれらの解析によっては区別できず、これらを一つの集団と見なす新たな概念、病型分類が必要であろうと考えられる。HAS-2G による解析は下山分類による病型分類以上に各症例の病態をよく反映していると考えられ、HAS-2G により解析することで、HTLV-1 感染細胞の clonality が推定でき、ATL 前駆細胞を捉え、腫瘍化の過程のどの段階にいるのかを推定するこ

とが可能と考えられる。

HAS-2G により D、N の集団として検出される ATL 前駆細胞は CCR4 を発現している。したがって抗 CCR4 抗体を投与することにより CCR4 陽性 aggressive ATL 患者に投与した時に ATL 細胞が減少するように D、N の集団が減少することが期待される。本研究班による治験により抗 CCR4 抗体を投与された HAM 患者の末梢血の HAS-2G による解析パターンの変化を検討することにより、ATL を発症していない HTLV-1 感染者末梢血の D、N の集団への抗 CCR4 抗体の影響を検討することが可能になる。抗 CCR4 抗体の投与によりこれらの症例で D、N の集団が減少ないし消失し、HAS-2G のパターンが改善するようであれば ATL の発症予防への応用の可能性が考えられる。また、本治験における抗 CCR4 抗体の投与量が、ATL 症例における投与量の 1/10 程度の投与量であり、その副作用プロフィールも注目される。投与量の減量により副作用も軽減されるならば、ハイリスクキャリアへの ATL 発症予防のための抗 CCR4 抗体の投与への道を開くものとなる。

#### E. 結論

HTLV-1 感染細胞の CD7/CADM1 の発現レベルを Flow cytometry で検討する HAS-2G 法により、HTLV-1 キャリア、ATL 患者の病態解析が可能であり、末梢血中の ATL 前駆細胞の状態を評価することができる。本治験で抗 CCR4 抗体の投与を受けた HAM 患者の末梢血を HAS-2G で解析することにより HTLV-1 キャリアに抗 CCR4 抗体を投与した時の末血中 ATL 前駆細胞への影響を評価することが可能であり、HTLV-1 ハイリスクキャリアへの ATL 発症予防のための抗 CCR4 抗体投与の可能性が検討できると考えられる。

F. 健康危惧情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. Kawamata T, Ohno N, Sato K, Kobayashi M, Jo N, Yuji K, Tanosaki R, Yamano Y, Tojo A, Uchimaru K. A case of post-transplant adult T-cell leukemia/lymphoma presenting myelopathy similar to but distinct from human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy. Springerplus. 2014 Oct 4;3:581. doi: 10.1186/2193-1801-3-581. eCollection 2014
2. Ishigaki T, Zaike Y, Nojima M, Kobayashi S, Ohno N, Uchimaru K, Tojo A, Nakauchi H, Watanabe N. Quantification of adult T-cell leukemia/lymphoma cells using simple four-color flow cytometry. Clin Chem Lab Med. 2015 Jan 1;53(1):85-93. doi: 10.1515/cclm-2014-0183.
3. Takahashi R, Yamagishi M, Nakano K, Yamochi T, Yamochi T, Fujikawa D, Nakashima M, Tanaka Y, Uchimaru K, Utsunomiya A, Watanabe T. Epigenetic deregulation of Ellis Van Creveld confers robust Hedgehog signaling in adult T-cell leukemia. Cancer Sci. 2014 Sep;105(9):1160-9. doi: 10.1111/cas.12480. Epub 2014 Sep 8.
4. Kobayashi S, Nakano K, Watanabe E, Ishigaki T, Ohno N, Yuji K, Oyaizu N, Asanuma S, Yamagishi M, Yamochi T, Watanabe N, Tojo A, Watanabe T,

Uchimaru K. CADM1 expression and stepwise downregulation of CD7 are closely associated with clonal expansion of HTLV-I-infected cells in adult t-cell leukemia/lymphoma. Clin Cancer Res. 2014 Jun 1;20(11):2851-61. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3169. Epub 2014 Apr 11.

5. Kobayashi Seiichiro, Watanabe Eri, Ishigaki Tomohiro, Ohno Nobuhiro, Yuji Koichiro, Nakano Kazumi, Yamochi Tadanori, Watanabe Nobukazu, Tojo Arinobu, Watanabe Toshiki, Uchimaru Kaoru. Advanced HTLV-1 carriers and early-stage indolent ATLs are indistinguishable based on CADM1 positivity in flow cytometry. Cancer Science. in press. 2015
6. 内丸 薫 わが国における HTLV-1 キャリアと ATL 患者に対する相談機能と知識の普及 血液内科 68(1); 58-64, 2014
7. 内丸 薫 成人 T 細胞白血病 (ATL) 検査と技術 42 ; 1370-1375, 2014
8. 内丸 薫 成人 T 細胞白血病 medicina 52(4) in press

2. 学会発表

1. 間質依存性増殖を示す新規急性型 ATL 細胞株の樹立と in vivo 増殖モデルの解析 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、大田泰徳、渡辺信和、東條有伸、中内啓光、内丸 薫 第 76 回日本血液学会学術集会 大阪 2014
2. Tumor-specific gene expression leads to p38 and Hedgehog activation

- in adult T-cell leukemia. Yamagishi M, Takahashi R, Sakai N, Fujiwara D, Nakagawa S, Yamochi T, Yamachi T, Nakano K, Uchimaru K, Utsunomiya A and Watanabe T 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
3. A nationwide study of patients with adult T-cell leukemia/lymphoma(ATL) in Japan:2010-2011. Noasaka K, Iwanaga M, Ishizawa K, Ishida Y, Uchimaru K, Ishitsuka K, Amano M, Ishida T, Imaizumi Y, Uike N, Utsunomiya A, Oshima K, Kawai K, Tanaka J, Tokura Y, Tobinai K, Watanabe T, Tsukasaki K. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
  4. ESHAP regimen as salvage therapy for patients with relapsed or refractory adult T cell leukemia. JO N, Ohno N, Takeda R, Nakamura S, Hirano M, Takei S, Kawamata T, Yokoyama K, Fukuyama T, Yuji K, Uchimaru K and Tojo A 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
  5. Differential diagnosis of by flowcytometric analysis of post allo-SCT myelopathy; a case report/ Kawamata T, Ohno N, Sato K, Kobayashi M, Jo N, Yuji K, Tanosaki R, Yamano Y, Uchimaru K and Tojo A. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014
  6. 急性型 ATL と HTLV-1 ぶどう膜炎の同時発症の1例. 平野光人、大野伸広、小林誠一郎、石垣知寛、田野崎隆二、鴨居功樹、内丸 薫、東條有伸. 第1回日本 HTLV-1 学会学術集会 東京 2014
  7. 急性型 ATL における細胞表面抗原のクラスタリング解析と ATL 幹細胞マーカーの探索. 石垣知寛、小林誠一郎、大野伸広、中野伸亮、宇都宮與、山崎 聡、渡辺信和、東條有伸、中内啓光、内丸 薫. 第1回日本 HTLV-1 学会学術集会 東京 2014
  8. Hierarchical clustering analysis of surface antigens on ATL cells and search for AT-initiating cell marker. Ishigaki T, Kobayashi S, Nakano N, Utsunomiya A, Uchimaru K and Tojo A. 第73回日本癌学会学術総会 横浜 2014.
  9. Comprehensive Analysis of Surface Antigens on Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATL) Cells and Search for ATL-Initiating Cell Markers. Ishigaki T, Uchimaru K et al. The 56th ASH Annual Meeting and Exposition. San Francisco, CA, 2014.
- H.** 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得
  2. 実用新案登録
  3. その他
- 今年度はいずれも該当なし

## IV. 資 料

## 【添付資料 1】

HAM ネット  
HAM 患者登録サイト

[トップページ](#)[HAMねっとについて](#)[HAMについて](#)[お知らせ・新着情報](#)[HAM関連のリンク集](#)

## みなさまの協力でよりよい治療に HAM患者さんのための登録サイト

会員に登録することで皆さまにHAMについての情報をより早くお知らせすることができます。



### ▶ お知らせ・新着情報

- 2015/03/18 HAMねっと登録患者さんに向けて「HAMねっと通信」Vol.6を発行しました

---

- 2015/03/16 成果報告会「難病制圧に向けて -アカデミアにおけるイノベーション創出の現状と展望-」が開催されました。

---

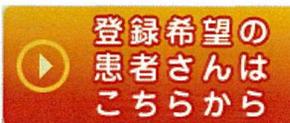
- 2015/02/06 「RDD世界希少・難治性疾患の日」(2015年2月28日)開催のお知らせ

---

- 2015/01/28 成果報告会「難病制圧に向けて-アカデミアにおけるイノベーション創出の現状と展望-」(2015年3月13日)開催のお知らせ

---

- 2015/01/14 「第8回ナースのための臨床試験セミナー」(2015年2月27日)開催のお知らせ



▶ [お知らせ・新着情報の一覧へ](#)

### ▶ HAMねっとについて



#### HAMねっとに対する研究について みなさまにご紹介します

HAMは患者数が少ない稀な神経難病で、患者さんがさまざまな医療機関に点在しているため情報がなかなか集まらず、病態・治療研究が進まない大きな原因となっています。そこでこの研究では、患者さんの登録を進めて、経過や実態などを調査することによって、HAMの病態解明や治療法開発に必要な情報を効率的に集めて蓄積します。また、治療法を確立していくためには様々な治療薬を用いた臨床試験/治験の実施が必要です。それを円滑に進めるためには多くの患者さんのご協力が必要ですが、この登録によって臨床試験/治験の情報を皆様にお届けすることが可能となり、治療法の研究をより円滑に進める効果も期待されます。このような研究を進めていくためには患者さんのご協力がとても大切です。一人でも多くの皆様のご協力をお待ちしております。

▶ [登録はこちら](#)

▶ [詳細はこちら](#)

### ▶ HAMの治験について



新規治療薬の開発に向け、研究班では様々な研究を行ってきましたが、その研究が国に認められ、国の助成を受け本年9月13日より厚生労働省科学研究費補助金 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)「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」研究班(通称 山野研究班)が発足し、治験の第一歩がスタートしました。治験についての正しい知識を持って頂くため、また患者さんからの疑問に少しでもお答えできるよう情報を公開しております。

▶ [詳細はこちら](#)

▶ [治験に関するお問い合わせはこちら](#)

### ▶ HAMねっとの進捗状況について



HAMねっとの研究の内容や結果の一部につきまして随時報告しています。これらの結果は、病気の研究の進歩や医療・福祉の充実にとても重要な情報となります。



「HAMねっと」のトップページ > HAMの治験について

## ○ HAMの治験について

▶ 「HAM患者さんを対象とした治験Q&A」は[こちら](#)

## HAM患者さんを対象とした治験開始のお知らせ

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター 病因・病態解析部門長 山野嘉久先生のグループの研究成果により「抗CCR4抗体」がHAMの有効な治療薬となる可能性が示されました。

この研究成果は厚生労働省により評価され、平成23年度から平成24年度の2年間、厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服事業「HTLV-1関連脊髄症 (HAM) の新規医薬品開発に関する研究」が助成されました。この助成により医師主導治験のプロトコルを作成する研究が始まり、また患者登録システム「HAMねっと」もここで生まれました。

この2年前からスタートした治験開始に向けた取り組みが実を結び、厚生労働省は抗CCR4抗体療法がHAMの有効な治療法になる可能性が極めて高いと判断し、さらに平成25年度から大型の研究費を助成することを決めました。これにより平成25年9月13日より厚生労働省科学研究費補助金 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）「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」研究班（通称 山野研究班）が発足し、治験の第一歩がスタートしました。

### 新しい薬ができるまで

新しい薬を患者さんに使用できるようにするため、患者さんでの効き目（有効性）と副作用（安全性）を調べる試験のことを「臨床試験」といいます。そのなかでも厚生労働省から新薬として認めてもらうために行われる臨床試験のことを「治験（ちけん）」といっています。通常「治験」は3つの段階（第Ⅰ相、第Ⅱ相、第Ⅲ相）に分けて慎重に進められます。

第Ⅰ相では、主に健康な成人を対象に、ごく少量の「薬の候補」から使い始め、徐々に量を増やしていき、副作用について注意深く調べます。第Ⅱ相では、少数の患者さんを対象に「くすりの候補」の有効性、安全性とともに、効果的な使い方（量・間隔・期間）について調べます。最後に第Ⅲ相では、これまでに得られた結果でみられた「薬の候補」の有効性、安全性が多数の患者さんにも当てはまるかどうかを最終確認します。治験は「薬事法」という薬に関するルールや厚生労働省が定める「医薬品の臨床試験の実施の基準（GCP: Good Clinical Practice）」という治験のルールにより厳格に規定されていて、治験に参加する方の人権や安全性、プライバシーが守られるようになっています。

このようにして有効性や安全性を調べた治験の結果は、厚生労働省に提出され薬として役立つかどうか審査されます。ここで承認されて初めて新しい薬の誕生となります。

さらに薬が販売された後は、実際に多くの患者さんに使われた場合の効果や安全性、今まで得られなかった副作用などが調査されます。

### HAM患者さんを対象とした治験

今回のHAM患者さんを対象とした治験は、「第Ⅰ相試験」と「第Ⅱ相試験」を一緒に組み合わせた「第Ⅰ/Ⅱa相試験」と呼ばれる治験が行われます。通常は第Ⅰ相で健康な成人を対象として試験した後に、第Ⅱ相で少数の患者さんを対象として試験を進めますが、「第Ⅰ/Ⅱa相試験」の場合は、始めから少数の患者さんを対象として試験が進みます。このように2つの試験を1つにすることで、新薬をより早く患者さんに届けることができるという大きなメリットがあります。

従来治験は医薬品を開発・製造する製薬企業が行ってきましたが、2003年より医師自らが治験を計画し、実施することができるようになりました。このように製薬企業が製造した薬の候補を用いて医師が治験を計画・実施することを「医師主導治験」と呼びます。つまり医師主導治験は、医療の現場で必要性が高いにもかかわらず、何らかの理由により製薬企業によって治験が行われない場合に、医師自らが指揮をとって厚生労働省への承認申請を行うことが可能となった画期的な制度です。

治験には膨大な費用がかかります。しかし、みなさまや医療者の「一日も早いHAM治療の薬を」という切実な願いと幾多にもわたる訴え、さらにこれまでの研究成果がここに合い重なることで厚生労働省もその必要性を認め、治験のための研究費の助成が決まりました。皆が一丸となって歩み続けてきたことで、この度のHAM患者さんを対象とした治験の開始が実現したのです。今回の医師主導治験は、およそ5年後の薬事承認を目指して、聖マリアンナ医科大学にて年明け早々に第1回目の投与が始まります。

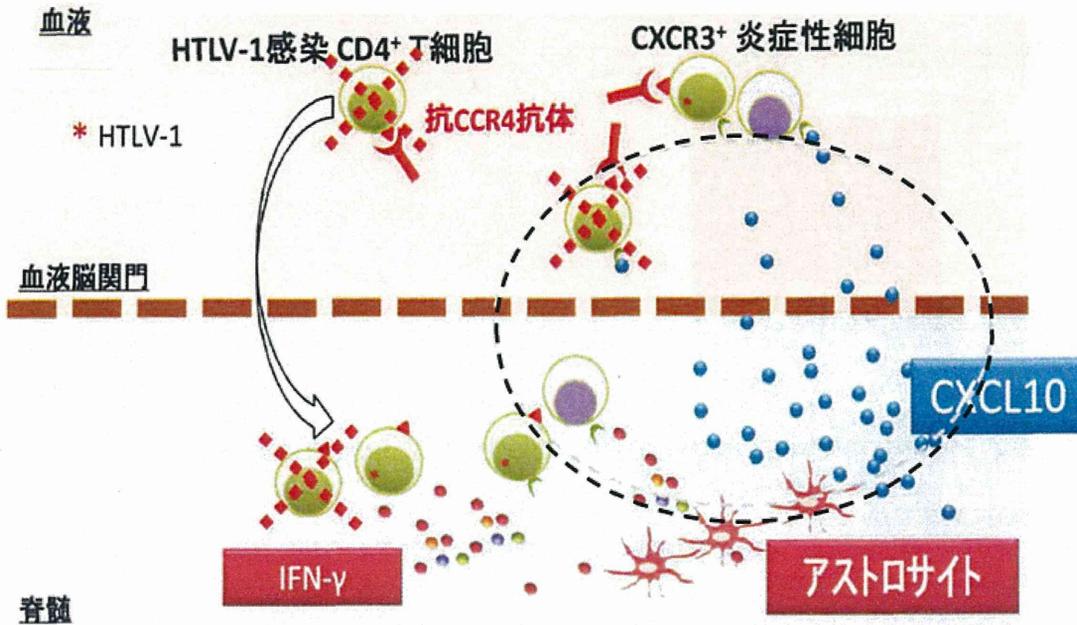
### 治験に使用されるお薬

今回使用されるお薬は協和発酵キリン株式会社により開発された「抗CCR4抗体（KW-0761）」（商品名：ポテリジオ点滴静注

®)」です。このお薬はHAMと同じくHTLV-1が原因となる成人性T細胞白血病・リンパ腫(ATL)の治療薬として2012年5月より市販されているものです。今回の治験では、ATL治療に使用する量の1000分の3程度という少ない量から投与が始まります。治験に使用するためのお薬は協和発酵キリン株式会社より無償で提供されます。

## 治験に使用するお薬の働き

CCR4 (CCケモカイン受容体4) とは、アレルギーに関係するタンパク質です。HAMの患者さんではCCR4をもった細胞がHTLV-1に多く感染していることから、抗CCR4抗体 (KW-0761) がCCR4を持った細胞に結合することで、CCR4を持った細胞すなわちHTLV-1に感染した細胞を選択的に破壊し、HAMの患者さんで起こっている炎症反応を抑えることが期待されます。



「HAMねっと」のトップページ > HAMの治験について > HAM患者さんを対象とした治験Q&A

## ○ HAMの治験について

### HAM患者さんを対象とした治験Q&A

[Q1：治験はどこで実施していますか。](#)

[Q2：関東以外の地域からも参加できますか。](#)

[Q3：年齢制限はありますか。](#)

[Q4：薬の副作用はどのようなものがありますか。](#)

[Q5：薬は内服ですか。](#)

[Q6：薬の投与は何回ありますか。](#)

[Q7：HAMと診断されていますが、参加できますか。](#)

[Q8：参加する方法を教えてください。](#)

#### Q1：治験はどこで実施していますか。

A1：神奈川県川崎市にある聖マリアンナ医科大学病院で実施しており、その他の病院では実施していません。

#### Q2：関東以外の地域からも参加できますか。

A2：参加頂く方の地域は特に決まっておられません。治験に参加頂く為の検査来院、またこちらから指定した日に入院や通院が可能でなければ参加可能です。

#### Q3：年齢制限はありますか。

A3：今回20歳以上の方を対象としております。年齢の上限はありません。

ただし、新しいお薬の投与となりますので、HAM以外の病気で治療中の方、また心臓や肺、腎臓の機能が低下している方についてはご参加頂けない場合があります。

#### Q4：薬の副作用はどのようなものがありますか。

A4：主にリンパ球や好中球の減少、アレルギー症状、皮膚症状（湿疹や赤み、かゆみなど）などが報告されています。このような副作用はすべての方に現れるというわけではありません。また、一度に出現するわけではなく、その方により副作用の種類や程度、発現の頻度は異なります。

#### Q5：薬は内服ですか。

A5：注射剤です。治験に参加した方は入院して投与を受けて頂きます。入院期間は最初の投与の際のみ1週間、その後の投与の際は1泊2日の予定です。

#### Q6：薬の投与は何回ありますか。

A6：今回の治験は2つの種類の研究の組み合わせになっています。最初の研究は1回投与し、12週間の経過観察の後、安全性を主に確認します。その後は検査結果を確認の上、感染細胞が増えた段階で2～3ヵ月毎に再度投与し、その効果について確認します。全ての患者さんの参加終了時期は2015年10月です。

#### Q7：HAMと診断されていますが、参加できますか。

A7：HAMと診断されている方全てが参加できる訳ではありません。治験では安全にお薬を投与し、効果や副作用を確認することが大切です。下記が参加条件で、その他、髄液検査や血液検査の結果によりご参加頂けるかが決定します。まずは診察を受けて頂き、医師により状態を確認させていただきます。

- 20歳以上の方
- 治験期間中聖マリアンナ医科大学病院に通院が可能な方（約2年間：治験開始時に1週間の入院があります）。治験で決められている通院日は、最初の投与から2週間後、4週間後、8週間後、12週間後ですが、その他にも来院をお願いすることがあります。13週目以降は、最低月1回通院いただきます。1回の診察時間は、通常よりも長くなります。
- ステロイドを内服中の方
- 杖や歩行器の使用に関係なく10m以上歩行可能な方

#### Q8：参加する方法を教えてください。

A8：今回ご参加頂ける方の人数は18～33名で、開始できる日程が全ての症例で決められております。参加日程のご希望はお