

- 域連携・リハビリテーションのために  
～ロボットスーツHAL治験から見えて  
きた可能性と役割」(長岡西病院 2014  
年10月4日)
42. 患者主体のQOL評価法「SEIQoL-DW」を  
学び、活かす実習セミナー、「主観的評  
価が医療を変える QOLの新しい実践」  
(北海道医療大学サテライトキャンパ  
ス 2014年11月2日)
43. 第30回東海北陸理学療法学会、「サイ  
バニクスによる新たな随意運動改善  
方法ーロボットスーツHALの臨床利用  
の考え方ー」(静岡市民文化会館 2014  
年11月15日)
44. ロボットスーツHAL第22回地区別HAL勉  
強会 第3回Mie LIP鈴鹿ロボット研究  
会、「ロボットスーツHALの医師主導治  
験から見えるもの」(鈴鹿医療科学大学  
千代崎キャンパス 2014年11月29日)
45. 第6回三重緩和医療研究会、「治らない  
病を持つ患者のQOL評価と向上とは何  
か?～緩和ケアにおけるQOLの誤解を  
解くために～」(アスト津 2014年11月  
30日)
46. 第18回新潟神経内科シンポジウム、「生  
体電位駆動装置型ロボットスーツ、医  
療モデルHAL-HN01による随意運動改善  
治療について」(ホテルディアumont新  
潟 2014年12月13日)
47. 第3回日本脳神経HAL研究会、「神経難  
病とHAL研究」(福大メディカルホール  
2014年12月27日)
48. 神経疾患懇話会、「ロボットスーツHAL  
の医療応用ー神経・筋疾患からパーキ  
ンソン病までー」(長岡中央総合病院  
2015年1月27日)
49. H26年度厚生労働科学研究費 HTLV-1関  
連疾患研究領域研究班合同発表会、「希  
少性難治性疾患ー神経・筋難病疾患の  
進行抑制治療効果を得るための新たな  
医療機器、生体電位等で随意コントロ  
ールされた下肢装着型補助ロボット (H  
AL-HN01) に関する医師主導治験の実施  
研究」(東京大学医科学研究所1号館  
2015年2月7日)
50. 患者主体のQOL評価法「SEIQoL-DW」を  
学び、活かす実習セミナー、「主観的評  
価が医療を変える QOLの新しい実践」  
(帝京平成大学 2015年2月7日)
51. 重症心身障害児(者)療育研修、「治ら  
ない疾患のQOLの向上とは何か」(国立  
病院機構本部研修センター 2015年2  
月18日)
52. H26年度 神経難病医療従事研修会(群  
馬県)、「ALSなど神経難病ケアアプロ  
ーチのポイントとQOL評価」(群馬県庁ビ  
ジターセンター  
2015年2月27日)
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含  
む)**
1. 特許取得  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

## HAM の革新的な治療法となる抗 CCR 4 抗体療法の実用化に向けた開発

研究分担者 氏名 : 山海 嘉之  
所属機関 : 筑波大学大学院 システム情報工学研究科  
職名 : 教授

### 研究要旨 :

本研究は、我が国で開発された医薬品を用い、世界初のHAMの感染細胞を標的とした根本的治療となりうる医薬品の治験に関し、実用化に向けた開発推進を目的とするものである。

ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-1）の感染者は全国で約108万人存在し、感染者の一部に難治性のHTLV-1関連脊髄症（HAM）あるいは成人T細胞白血病（ATL）を発症することから、その対策は厚生行政の上でも重要課題である。HAMは進行性の痙性脊髄麻痺を特徴とし、有効な治療法がなく極めて深刻な難治性疾患であり、新たな治療法の実用化が急務である。そこで本研究では、HAMに対する有効性が期待される新規医薬品の医師主導治験に関し、その実用化を推進する。

### A. 研究目的

HAM において感染細胞量は長期予後と関連することが報告されており、感染細胞を標的とした薬剤開発は、根本的治療薬となることが期待されてきたが、これまで実現されなかった。そこで本研究では、HAM に対する有効性が期待される新規医薬品の医師主導治験に関し、その実用化に向けて推進する。本研究で実施する治験計画は、世界で初めてその開発を進めるものであり、そのこれまで有効な治療法が確立していない神経難病である HAM の長期予後改善に結びつく画期的な治療薬となり、HAM の治療にパラダイムシフトをもたらすことが期待される。

### B. 研究方法

HAM に対する新規医薬品の実用化を推進するためには、将来の検証的試験に備え、生物統計学的解析に耐えうる HAM の有効

性評価指標に関するデータをできるだけ収集し、そのエビデンスレベルを高めていく取り組みが必須であり、その実施を PMDA から強く推奨されている。したがって、予後因子と治療成績に関する共同試験に関する HAM の有効性評価指標の開発を進めるための議論に参加する。

#### （倫理面への配慮）

人支援技術の研究開発の推進には、被験者に対する適切な対応が求められるため、当該研究では、厚生労働省の臨床研究に関する倫理指針や ICH-GCP 等を遵守した。

### C. 研究結果

当該治験に関して、下記の会議に参画し、HAM の有効性指標開発のための様々な方策について検討・議論した。また、指標開発推進に寄与するとともに、安全な当該治験の遂行に貢献した。

- ・ 2013 年 11 月 24 日 聖マリアンナ大学山野班第 1 回会議

- ・ 2014年7月30日 HAM 治験 平成26年度第1回 山野班/前向き・病態研究班合同班会議
- ・ 2014年8月10日 NCY-2001 試験他施設共同治験、実施施設打ち合わせ会議
- ・ 2015年1月31日 公開合同研究報告会（中島班・橋本班）

#### D. 考案

HAM の有効性評価指標に関するデータをできるだけ収集し、そのエビデンスレベルを今後も高めていく必要性が示唆された。

#### E. 結論

本研究では、HAM に対する有効性が期待される新規医薬品の医師主導治験に関し、その実用化に向けて推進した。この研究成果は日本のみならず、感染者や患者の多い発展途上国などの地域にも恩恵をもたらし、国際的な貢献が期待される。

#### F. 健康危惧情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

（これまでの関連研究の成果も含む）

- 1) Aach M, Cruciger O, Sczesny-Kaiser M, Hoffken O, Meindl RCh, Tegenthoff M, Schwenkreis, Sankai Y, Schildhauer TA, Voluntary driven exoskeleton as a new tool for rehabilitation in chronic spinal cord injury: a pilot study, The Spine Journal, Vol.14, No.12, pp.2847-2853, 2014.
- 2) Koichi Murata, Akira Matsushita, Kousaku Saotome, Hiroaki Kawamoto, Yoshiyuki Sankai,

Development of an MR-compatible configurable brush stimulation device, Proc. of 36th Annual International Conference of the IEEE EMBS, pp.2101-2106, Chicago, Illinois, USA, 26 Aug.- 30 Aug.,2014

- 3) 鍋島厚太, 新宮正弘, 河本浩明, 山海嘉之, 装着型歩行補助ロボットのリスク管理方法: ロボットスーツ HAL®福祉用の事例, 日本ロボット学会誌, Vol.32, No.4, pp.380-385, 2014.
- 4) Ai Kaneko, Yoshiyuki Sankai, "Long-term culture of rat hippocampal neurons at low density in serum-free medium: combination of the sandwich culture technique with the three-dimensional nanofibrous hydrogel PuraMatrix", PloS One 9(7), e102703. doi: 10.1371/journal.pone.0102703, 2014
- 5) 村田耕一, 松下明, 五月女康作, 河本浩明, 山海嘉之, "ピン刺激と擦過刺激が可能な MRI 対応感覚刺激装置の開発", 日本機械学会論文集, Vol. 80 (2014) No. 810 p. DR0028.
- 6) Modar Hassan, Hideki Kadone, Kenji Suzuki and Yoshiyuki Sankai, "Wearable Gait Measurement System with an Instrumented Cane for Exoskeleton Control", Sensors, Vol.14, pp.1705-1722, 2014.
- 7) AKIHIRO KITAMURA, TAKASHI NAMEKAWA, KOUSUKE HIRAMATSU, and YOSHIYUKI SANKAI, OPERATING MANIPULATOR ARM BY ROBOT SUIT HAL FOR REMOTE IN-CELL EQUIPMENT MAINTENANCE, NUCLEAR

- TECHNOLPGY Vol.184, pp.310-319, 2013
- 8) Shinichi Tsujimura and Yoshiyuki Sankai, "Attachment Design of an Automatic Thrombus Monitoring System Using Multiple Optical Emitters and Detectors for an Extracorporeal Pulsatile Artificial Heart," Proc of The 15th International Conference on Biomedical Engineering(ICBME 2013), Singapore, Dec. 4-7, 2013, pp.876-879.
  - 9) Harutoshi Sakakima, Kosei Ijiri, Fumiyo Matsuda, Hiroyuki Tominaga, Takanori Biwa, Kazunori Yone, and Yoshiyuki Sankai, A Newly Developed Robot Suit Hybrid Assistive Limb Facilitated Walking Rehabilitation after Spinal Surgery for Thoracic Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament: A Case Report, Case Reports in Orthopedics, Volume 2013 (2013), Article ID 621405
  - 10) Aleksandr Igorevitch Ianov. Hiroaki Kawamoto and Yoshiyuki Sankai, "Development of Noise Resistant Hybrid Capacitive-Resistive Electrodes for Wearable Robotics, Computing and Welfare," IROS 2013: IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, pp.4249-4254, 2013
  - 11) 白石直人, 山海嘉之, " 簡便な下肢の動脈硬化スクリーニング指標計測装置の開発" , 日本機械学会論文集(C編), Vol. 79 (2013) No. 804 p. 2694-2703.
  - 12) Naoto Shiraishi, Yoshiyuki Sankai, "Pulse Transit Time Measurement Method with Artifact Tolerance for Home Healthcare", proceedings of International Conference on Mechatronics and Automation (IEEE ICMA2013), pp.908-913, Takamatsu, Japan, Aug.4-7, 2013
  - 13) Junji Takahashi, Noel Segura Meraz, Yasuhisa Hasegawa, and Yoshiyuki Sankai, "The Discriminant Criteria Detecting Operational Intention from Myoelectricity for Alternative Interface System", Transaction on control and mechanical systems, Vol.2, No.1, 2013
  - 14) Shigeki Kubota, Yoshio Nakata, Kiyoshi Eguchi, Hiroaki Kawamoto, Kiyotaka Kamibayashi, Masataka Sakane, Yoshiyuki Sankai, Naoyuki Ochiai, "Feasibility of Rehabilitation Training With a Newly Developed Wearable Robot for Patients With Limited Mobility", Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, Volume 94, No 6, June 2013. (pp1080-1087)
  - 15) Tetsuya Ueba, Omi Hamada, Toshiyasu Ogata, Tooru Inoue, Etsuji Shiota, and Yoshiyuki Sankai, Feasibility and Safety of Acute Phase Rehabilitation After Stroke Using the Hybrid Assistive Limb Robot Suit, Neural Med Chir (Tokyo) 53, pp287-290, 2013
  - 16) Minh Tuan Nguyen and Yoshiyuki Sankai, Measurement method of interaction force between human and wearable assistive robot based on strain of contact part, SICE Annual Conference 2013

- 17) Mirko Aach, Renate Meindl, Tomohiro Hayashi, Irene Lange, Jan Geßmann, Andre Sander, Volkmar Nicolas, Peter Schwenkreis, Martin Tegenthoff, Yoshiyuki Sankai, Thomas A. Schildhauer, Exoskeletal Neuro-Rehabilitation in Chronic Paraplegic Patients – Initial Results, Converging Clinical and Engineering Research on Neurorehabilitation Biosystems & Biorobotics Vol 1, 2013, pp 233-236
- 18) Matthias Sczesny-Kaiser, Oliver Höffken, Silke Lissek, Melanie Lenz, Lara Schlawffke, Volkmar Nicolas, Renate Meindl, Mirko Aach, Yoshiyuki Sankai, Thomas A. Schildhauer, Martin Tegenthoff, Peter Schwenkreis, Neurorehabilitation in Chronic Paraplegic Patients with the HAL® Exoskeleton – Preliminary Electrophysiological and fMRI Data of a Pilot Study, Converging Clinical and Engineering Research on Neurorehabilitation Biosystems & Biorobotics Vol 1, 2013, pp 611-615
- 4) 山海 嘉之:” サイバニクスが創る医療の未来”, 第9回敬和会合同学会, 大分, 2014年6月1日
- 5) 山海 嘉之:” 生体電位駆動型 HAL と身体とのインタラクティブバイオフィードバックによる機能改善治療への挑戦”, 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014年5月23日
- 6) 中西 大輔, 末岡 裕一郎, 杉本 靖博, 大須賀 公一, 山海 嘉之:”空気圧人工筋を用いた脚ロボットの関節剛性と立位安定性条件の関係について”, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 (ROBOMECH2014), 2A1-Q06, 2014.05.27, 富山
- 7) 本多 宏章, 中西 大輔, 末岡 裕一郎, 杉本 靖博, 大須賀 公一, 山海 嘉之:”McKibben 型空気圧アクチュエータの動的特性に関する実験的検証”, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 (ROBOMECH2014), 2A2-O01, 2014.05.27, 富山
- 8) K.Iwatsuki, T. Yoshimine, Y.Sankai, F. Tajima, M. Umegaki, Y-I. Ohnishi, M. Ishihara, K.Ninomiya, T. Moriwaki, “Involuntary muscle spasm expressed as motor evoked potential after olfactory mucosa autograft in patients with chronic spinal cord injury and complete paraplegia”, ASTNR2014(American society for neural therapy and repair) 21th annual meeting 2014 April 24-26 Sheraton sand key resort Clearwater beach, Florida
- 9) ハサンモデル, 門根秀樹, 鈴木健嗣, 山海嘉之, “歩行補助杖と装着型センサを利用した歩行計測に基づく外骨格ロボット制御”, 日本機械学会ロボティク

## 2. 学会発表

(これまでの関連研究の成果も含む)

- 1) 山海 嘉之:” 高齢社会を支える生活介護支援ロボットの開発の現状”, 第56回日本老年医学会学術集会, 福岡, 2014年6月13日
- 2) 山海 嘉之:” 未来のリハビリとロボット工学との融合”, 第16回世界作業療法士連盟大会, 横浜, 2014年6月21日
- 3) 山海 嘉之:” 医療・介護用ロボットの近未来 ～ロボットスーツ HAL 最前線～”, 第14回日本抗加齢医学会総会, 大阪, 2014年6月6日

- スメカトロニクス講演会予稿集,  
3P2-H03, 富山, 5月25-28日, 2014.
- 10) 河本浩明, 門根秀樹, 桜井尊, 有安諒平, 上野有希子, 江口清, 山海嘉之: “片麻痺を有する人のための非麻痺側の歩容を活用したロボットスーツHALの歩行支援と臨床応用”, 日本機械学会ロボティクスメカトロニクス講演会予稿集, 1P1-F01, 富山, 5月25-28日, 2014.
- 11) 上野有希子, 江口清, 門根秀樹, 有安諒平, 久保田茂希, 入江駿, 河本浩明, 中田由夫, 松下明, 坂根正孝, 山海嘉之, “脳卒中患者1例に対するロボットスーツHALを用いた歩行プログラム前後の歩容評価”, 第49回日本理学療法学会大会, 横浜, 5月30-6月1日, 2014.
- 12) 江口清, 久保田茂希, 有安諒平, 上野有希子, 中田由夫, 門根秀樹, 松下明, 五月女康作, 坂根正孝, 山海嘉之, “脊髄損傷患者のリハビリテーションにおける装着型ロボットの応用”, 第51回日本リハビリテーション医学会学術集会, 名古屋, 6月5日-7日, 2014.
- 13) Modar Hassan, Hideki Kadone, Kenji Suzuki and Yoshiyuki Sankai, "Body synergy based exoskeleton control designed for hemiplegia", Proceedings of the International Society for Gait and Posture Research (ISPGR2014), P1-N74, Vancouver, June 29-July 3, 2014.
- 14) Hideki Kadone, Yukiko Ueno, Kiyoshi Eguchi, Ryohei Ariyasu, Shigeki Kubota, Shun Irie, Hiroaki Kawamoto, Yoshio Nakata, Akira Matsushita, Masataka Sakane and Yoshiyuki Sankai, "A Case Study on Gait Improvement after Clinical Program using Robot Suit HAL in a Stroke Patient", Proceedings of the International Society for Gait and Posture Research (ISPGR2014), P2-N69, Vancouver, June 29-July 3, 2014.
- 15) Kubota S, Eguchi K, Nakata Y, Kamibayashi K, Ariyasu R, Ueno Y, Kawamoto H, Sakane M, Yamazaki M, Sankai Y. A new rehabilitation technique using the robot suit HAL in chronic incomplete spinal cord injury. The 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, USA, 2014.5.15-18.
- 16) Kousaku, Saotome; Matsushita, Akira; Kadone, Hideki; Sankai, Yoshiyuki; Nakai, Kei; Matsumura, Akira. A Head Fixation Method for fMRI During Bending and Stretching of Feet. SMRT 23rd Annual Meeting, 10-11 May, 2014
- 17) Matsushita, Akira; Saotome, Kousaku; Nakai, Kei; Eguchi, Kiyoshi; Sankai, Yoshiyuki; Matsumura, Akira. Functional connectivity related to recovery in gait performance through robot-assistive rehabilitation of chronic gait. Joint Annual Meeting ISMRM-ESMRMB 7859, Milano, 10-16 May, 2014
- 18) Leading Edge of HAL and Medical Challenges HAL 最前線・医療への挑戦, 山海嘉之, TRI (Translational Research Informatics Center) 10周年記念シンポジウム, JA 共済ビルカンファレンスホール, 2014. 1. 19
- 19) ロボットスーツHALの世界展開, 山海嘉之, 第2回日本脳神経HAL研究会, 福大メディアホール, 2013. 12. 21
- 20) サイバニクスが拓く障害者向け支援技術の可能性, 山海嘉之, 第三回筑波障害学

- 生支援研究会, つくば国際会議場, 2013. 12. 17
- 21) 脳・神経・筋系の機能再生のための新たな医療機器「ロボットスーツHAL医療用」, 山海嘉之, PMDA薬事戦略フォーラム, 全社協・灘尾ホール, 2013. 11. 19
- 22) 小児神経とロボットスーツ, 山海嘉之, 第6回北海道小児神経研究会, KKRホテル札幌, 2013. 11. 16
- 23) HALによる機能改善・治療最前線, 山海嘉之, 第2回函館リハビリテーション講演会, 函館国際ホテル, 2013. 11. 15
- 24) 生活支援ロボットの实用化, 山海嘉之, 筑波研究学園都市50周年記念式典, 2013. 11. 12
- 25) 「革新的ロボットHALの開発と未来開拓への挑戦」～課題解決, 新産業創出, 人材育成の同時展開～, 山海嘉之, 平成25年度 関東地区高等学校教頭・副校長回研究協議会, ホテルレイクビュー, 2013. 11. 8
- 26) Robot Suit for Nuclear Facilities in Radioactive Environments, Yoshiyuki Sankai, IEEE IROS2013, 東京ビッグサイト, 2013. 11. 3
- 27) Case Study 8 for future collaboration, Yoshiyuki Sankai, 日本・スイスクラスタースイスイ・シュピーツ), Hotel Belvedere Spiez (スイス・シュピーツ), 2013. 10. 29
- 28) 医療と介護へのHALのこれからの展開, 第29回日本義肢装具学会学術大会, 佐賀市文化会館, 2013. 10. 26
- 29) Public Health / Nursing “Global Challenges in Public Health & Nursing”, 山海嘉之, Tsukuba Global Science Week 2013, つくば国際会議場, 2013. 10. 3
- 30) 少年のころからの夢とロボットスーツHALの開発, 最先端技術の重度障害児者への応用, 山海嘉之, 第39回重症心身障害学会学術集会, 宇都宮総合文化センター, 2013, 9. 26
- 31) ロボットスーツ最前線, 山海嘉之, 第51回全国自治体病院協議会精神科特別部会総会・研修会, 水戸プラザホテル, 2013. 8. 29
- 32) Cybernetics : fusion of human, machine and information systems ~ Challenges for the future~, 山海嘉之, International Conference of International Association of Societies of Design Research 2013, 芝浦工業大学, 2013.8.27
- 33) 日本再生に向けた国際戦略: 高齢化対策と新産業創出の同時解決, 山海嘉之, 国際標準化推進戦略シンポジウム, イイノホール (東京), 2013.7.3
- 34) Robot Suit HAL and Clinical Applications for Locomotor Disorder, 山海嘉之, 2nd joint world congresso of ISPGR and Gait & Mental Function, 秋田ビューホテル, 2013.6.26
- 35) サイバニクスを駆使したロボットスーツHAL最前線, 山海嘉之, 医療法人林病院創立百周年記念, 福井県民ホール, 2013. 5. 25
- 36) 医療機器産業と日本経済, 山海嘉之, 中部医療機器工業協会 平成25年度通常総会 特別講演会, アイリス愛知, 2013.5.24
- 37) The Future of Japanese Robots, Yoshiyuki Sankai, Harvard Asia Business Conference 2013, Harvard Business School, Spangler Auditorium, 2013.4.13
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(これまでの関連研究の成果も含む)
1. 特許取得

該当無し。

2. 実用新案登録  
該当無し。

3. その他  
該当無し。



## HAM の新規診断法・治療薬開発につながるシーズ探索と臨床応用への研究基盤構築

研究分担者 齊藤 峰輝 川崎医科大学微生物学教室 教授

### 研究要旨：

新規抗体医薬の候補となりうる HAM の新たな治療標的分子を網羅的に探索するため、マイクロアレイ解析を行った結果、未報告のものを含め、多数の Tax 発現誘導に伴って発現誘導・抑制される遺伝子、HAM 患者の末梢血単核球 (PBMC) に強発現する遺伝子、発現が低下する遺伝子を同定した。一方、HTLV-1 感染によるがん化、炎症形成の原因遺伝子である HBZ に対する多数の単クローン抗体を世界に先駆けて作製し、FACS、免疫染色、Western Blot、ELISA により HBZ 蛋白を検出する系を確立した。特に、HBZ 蛋白質を定量可能な新規サンドイッチ ELISA 系の開発により、ATL 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白質を定量することに世界で初めて成功した。今後は、臨床検体を用いてバリデーションを行い、HAM の新規診断法や治療薬開発に資するシーズの同定と臨床応用に向けた研究基盤の確立を目指す。

### A. 研究目的

ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1 :HTLV-1) は、世界ではじめてヒトの疾患との関連が見いだされたレトロウイルスであり、感染者の一部に HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM) および成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia : ATL) を発症させる。ほとんどの HTLV-1 感染者が生涯にわたって未発症の無症候性キャリアーとして経過するとはいえ、現在わが国には 100 万人を超える多数の HTLV-1 感染者が存在するため、一刻も早い HTLV-1 関連疾患の病態解明と発症予防法・新規治療法の開発が待たれている。

本研究の目的は、① HAM の治療標的分子を同定し、その分子に対する単クローン抗体を作製して新規抗体医薬の候補とすること、および ② HTLV-1 関連疾患の発症病態との密接な関連が報告されたにもかかわらず、*in vivo* における発現量が低いこと、優れた抗体がないことから臨床研究が進展していな

いウイルス因子である HBZ の鋭敏な検出・定量系を開発し、HAM の病態解明に資することである。

### B. 研究方法

#### ① HAM 治療標的候補分子の網羅的探索

まず、TNF 受容体型分子群に属する T 細胞活性化に必要な副シグナル分子であり、HTLV-1 の転写制御因子 Tax によって発現誘導されるとの報告がある OX40 に着目し、HAM の病態形成における意義を解析した。HTLV-1 感染・非感染 T 細胞株、HAM 患者 PBMC および剖検脊髄標本を用いて OX40 陽性 T 細胞の発現を検討した。すなわち、(1) HTLV-1 感染、非感染 T 細胞株における OX40 蛋白の発現量をフローサイトメトリーで比較した。

(2) HTLV-1 プロウイルス量を Real Time PCR 法で定量した。(3) HAM 患者剖検脊髄組織を自家製抗 OX40 単クローン抗体で免疫染色した。(4) HAM 患者の PBMC を短時間培養して Tax および OX40 を発現誘導し、自家製抗 OX40 単クローン抗体を培養系に添加して HTLV-1

感染細胞に対する効果を解析した。

さらに、HTLV-1 の転写活性化因子 Tax に着目して、未報告の Tax 標的遺伝子の同定を試みた。Tax が発現制御する標的遺伝子群を網羅的に解析するため、テトラサイクリン応答プロモーターの下流に Tax 遺伝子を組み込んだコンストラクトをヒト細胞株に遺伝子導入した (Tet-On システム)。テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリンを投与することで、細胞において可逆的に Tax を細胞内に発現誘導させ、その前後で変動する遺伝子群をマイクロアレイ (SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray 8×60K Ver. 2.0 チップ Agilent Technologies® を使用) で網羅的に解析した。一方、HAM 患者の PBMC から RNA を抽出し、非感染正常 PBMC と比較して強発現もしくは発現が低下する遺伝子群を同様にマイクロアレイで網羅的に解析し、Tet-On システムの結果と比較した。

#### ② HBZ 蛋白の鋭敏な検出・定量系の開発

2 種類の HBZ ペプチド (Peptide #1: LRRGPPGEKAPPRGETHRD, Peptide #2: KAKQHSARKEKMQELGIDG) およびコムギ無細胞蛋白発現系により作製した組換え HBZ 蛋白質を C57BL/6 マウスに 3 回免疫した後、脾細胞とミエローマ細胞 (SP2/0) をポリエチレングリコールで融合した。HAT 選択後にハイブリドーマの培養上清を用いてスクリーニングを行った。陽性コロニーは限界希釈法によりクローニングした。陽性ハイブリドーマ細胞をマウス腹腔に接種して腹水化させ、ゲル濾過法で IgG を精製した。これらのマウス抗 HBZ 単クローン抗体を用いて、(1) フローサイトメトリー (2) 蛍光免疫染色 (間接法) (3) ウェスタンブロッティングによる HBZ 蛋白質の検出を試みた。さらに、HBZ 蛋白質 C 末ペプチド (Peptide #3: KEDLMGEVNYWQGRLEAMW) を WKAH ラットに免疫した後、同様にハイブリドーマ法で 2 クローンのラット抗 HBZ 単クローン抗体を取得した。これらの抗体の中か

ら最もバックグラウンドが低く、かつ感度が高い抗体の組み合わせを検討し、HTLV-1 感染細胞中の HBZ 蛋白質を検出・定量するサンドイッチ ELISA 系を構築した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、検体を提供して頂く各施設の倫理委員会の承諾を得た後に施行した。十分な説明と同意のもと、書面による研究協力承諾書が得られた被験者から採取した検体のみを用い、完全に匿名化した後に行った。動物実験は、無駄な苦痛を与えず、与えざるを得ない苦痛であっても最低限とし、必要最低限の匹数で実験を行うべく実験計画を作成し、動物実験委員会の承認を得た上で行った。

### C. 研究結果

#### ① HAM 治療標的候補分子の網羅的探索

まず、OX40 は既報の通り Tax を発現する HTLV-1 感染 T 細胞株に高発現していた (図 1)。HAM 患者 PBMC に OX40 の発現は認められなかったが、剖検脊髄の病変局所浸潤細胞に強発現していた (図 2)。HAM 患者の PBMC を 16 時間培養して Tax 蛋白を発現誘導すると、OX40 は Tax 陽性細胞特異的に発現した (図 3)。この培養系に自家製抗 OX40 単クローン抗体を添加すると、コントロール抗体を添加した場合と比較して Tax 陽性細胞が半減した (図 4)。培養前後で CD4 陽性 T 細胞を分離してゲノム DNA を抽出し HTLV-1 プロウイルス量を測定したところ培養後に有意な低下が認められた。 (図 5)。

一方、マイクロアレイ解析により、Tax により発現誘導・抑制される多数の新規標的遺伝子を同定した。そのうち、感染制御・炎症・免疫応答に関わる遺伝子群、すなわち、(1) ウイルス感染の初期段階に関与する遺伝子群、特に Toll 様受容体 (TLR) 及びインターフェロン調節因子 (IRF)、(2) 炎症性サイトカイン・ケモカイン遺伝子群、(3) 免疫応答に関与する遺伝子群についてさらなる解析

を進めている。さらに、HAM 患者 PBMC に特異的に発現する細胞因子を探索するため、HAM 患者 PBMC および非感染健康成人 PBMC (対照) から RNA を抽出し、HAM 患者 PBMC で強発現もしくは発現が低下する遺伝子群をマイクロアレイで網羅的に解析した。その結果、HAM 患者の PBMC に強発現する遺伝子、発現が低下する遺伝子を多数同定した。これらの遺伝子群の中には、従来 HAM 患者 PBMC における強発現、発現低下が報告されている既知の遺伝子のみならず、未報告の遺伝子も多数含まれており、将来の抗体医薬の候補分子となりうる「治療標的分子」が含まれる可能性が高いと考えられる。今後、臨床検体を用いて FACS 解析を行い、実際に HAM 患者 PBMC 表面に蛋白レベルで強発現または発現低下していることを確認する予定である (特許の関係でデータは示さない)。

#### ② HBZ 蛋白の鋭敏な検出・定量系の開発

以下に示す合計 14 クローン of マウス抗 HBZ 単クローン抗体を取得した。

A. peptide #1 配列 (LRRGPPGEEKAPPRGETHRD) を認識するマウス抗体

- pep#1 P6-A7 (Mouse, IgG2b)
- pep#1 P4-E12 (Mouse, IgG2b)

B. peptide #2 配列 (KAKQHSARKEKMQELGIDG) を認識するマウス抗体

- pep#2 #20-H12 (Mouse, IgG1)
- pep#2 #62-B9 (Mouse, IgG2b)
- pep#2 #39-F2 (Mouse, IgG1)

C. 組換え HBZ 蛋白質を認識するマウス抗体

- α コムギ HBZ #1-1 (Mouse, IgG2a)
- α コムギ HBZ #2-1 (Mouse, IgM)
- α コムギ HBZ #5-1 (Mouse, IgM)
- α コムギ HBZ #6-1 (Mouse, IgG1)
- α コムギ HBZ #7-1 (Mouse, IgG2b)
- α コムギ HBZ #8-1 (Mouse, IgM)
- α コムギ HBZ #10-1 (Mouse, IgM)
- α コムギ HBZ #12-1 (Mouse, IgM)
- α コムギ HBZ #14-1 (Mouse, IgM)

これら計 14 クローンのマウス抗 HBZ 単クローン抗体に加え、HBZ 蛋白質 C 末端のペプチドに対する 2 つのラット抗 HBZ 単クローン抗体を得た。

- pep#3 #21-1 (Rat, IgG2a)
- pep#3 #91-1 (Rat, IgG1)

これらの抗体を用いて、(1) フローサイトメトリー (2) 蛍光免疫染色 (間接法) (3) ウエスタンブロッティングによる HBZ 蛋白質の検出系を確立した (図 6)。また、ラット抗 HBZ 単クローン抗体のうち、HBZ に対する結合能が高い抗体を捕獲抗体として、HTLV-1 感染細胞内の HBZ 蛋白質を定量するサンドイッチ ELISA 系を構築した。このサンドイッチ ELISA 系では、HBZ 強制発現細胞 (293T/HBZ-SI) や各種 HTLV-1 感染細胞株 (SLB1、MT-2、ILT-M1 など) に発現する HBZ 蛋白質のみならず、ATL 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白質を再現性よく定量的に検出可能であった (図 7)。一方、HAM 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白質は測定系の感度以下で検出できなかった。今後、さらなる改良が必要である。

#### D. 考案

HTLV-1 Tax はウイルス遺伝子にコードされた強力な転写因子であり、LTR を活性化してウイルス遺伝子の発現を誘導するとともに、炎症形成に関与するサイトカイン、ケモカインを含む様々な宿主遺伝子の発現を誘導あるいは抑制し、宿主 T 細胞の増殖を強力に促進する。HAM 患者においても、HTLV-1 感染 CD4 陽性 T 細胞と Tax 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が末梢血中より高い割合で脊髄内に存在し、炎症に関与する可能性が指摘されている。Tax により誘導される細胞性因子は、HTLV-1 感染細胞表面に誘導される可能性が高いことから、それらを標的に単クローン抗体を作製することで、HTLV-1 感染細胞を排除する新規抗体医薬としての応用が期待できる。OX40 が HTLV-1 Tax により感染細胞に

選択的に発現誘導されること、HAM 脊髄病変局所浸潤細胞に高発現していたことから、OX40 は HAM の病態形成に重要な役割を果たす治療標的分子である可能性が高い。また、抗 OX40 単クローン抗体が HAM 患者の HTLV-1 感染細胞を *in vitro* で特異的に減少させることから、我々の自家製抗 OX40 単クローン抗体は、HAM に対する新規抗体医薬の有望な候補となる可能性がある。一方、本研究により、Tax により発現誘導・抑制される多数の新規標的遺伝子を同定することができた。今後、これらの新規 Tax 標的遺伝子群について、もとの Tax 遺伝子安定導入株、HTLV-1 感染 T 細胞株、HAM 患者 PBMC における動態を比較解析し、病態との関連を明らかにすることにより、新規治療標的分子あるいはバイオマーカーとしての可能性を追求したい。

HTLV-1 のマイナス鎖にコードされる HBZ は、HTLV-1 感染症における発がん (ATL)・慢性炎症形成 (HAM) 双方の原因遺伝子であり、これも HAM の治療法・発症予防法開発の有効な標的と考えられる。本研究により、HBZ 蛋白質を特異的に検出可能な複数の新規抗 HBZ 単クローン抗体を取得して、HBZ 蛋白質の鋭敏な検出・定量系を構築した。特に、サンドイッチ ELISA 系により、世界で初めて ATL 患者 PBMC 中の HBZ 蛋白質の定量に成功した。今のところ、HAM 患者 PBMC 中 HBZ の検出には成功していないが、今後改良を重ね感度を上げることで、HAM 患者およびキャリアー PBMC 中の HBZ 蛋白質を検出可能な系を確立したい。さらに、HAM の臨床病態と HBZ mRNA、蛋白質発現動態との関連を詳細に解析することで、HAM の慢性持続性炎症形成メカニズムに対する HBZ 蛋白質の病因的意義を解明したい。

## E. 結論

HAM の新規治療標的分子あるいはバイオマーカー候補となりうる多数の Tax 標的遺伝子

を同定した。また、HBZ 蛋白質を定量するサンドイッチ ELISA 系の作製に成功した。本研究により、HAM の病態を反映する新規バイオマーカー、抗体医薬等の開発に資するシーズを同定するための研究基盤が構築できた。

## F. 健康危惧情報

該当なし

## G. 研究発表

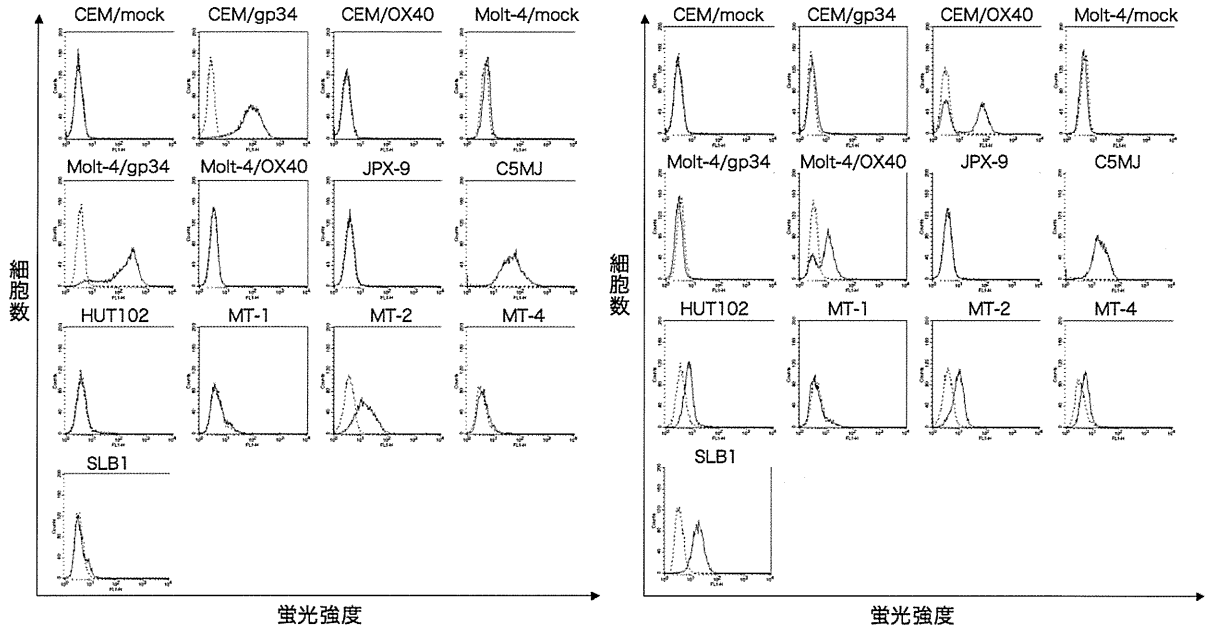
### 1. 論文発表

- 1) Saito M. (textbook) HTLV-1. *Encyclopedia of Genetics 2nd Edition*. Stanley Maloy, Kelly Hughes ed. Elsevier, Oxford, UK, 543-545, 2013.
- 2) Saito M., Tanaka R, Arishima S, Matsuzaki T, Ishihara S, Tokashiki T, Ohya Y, Takashima H, Umehara F, Izumo S, Tanaka Y. Increased expression of OX40 is associated with progressive disease in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology*. 10:51, 2013.
- 3) Kodama A, Tanaka R, Saito M., Ansari AA, Tanaka Y. A novel and simple method for generation of human dendritic cells from unfractionated peripheral blood mononuclear cells within 2 days: its application for induction of HIV-1-reactive CD4(+) T cells in the hu-PBL SCID mice. *Front Microbiol*. 4:292, 2013.
- 4) Saito M. (Review) Neuroimmunological aspects of human T cell leukemia virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol*. 20:164-174, 2014.
- 5) Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Kodama A, Fujii H, Hasegawa A, Kannagi M, Ansari AA, Saito M. Elimination of human T cell leukemia virus type-1-infected cells by neutralizing and antibody-dependent cellular

- cytotoxicity-inducing antibodies against human T cell leukemia virus type-1 envelope gp46. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 30(6):542-552, 2014.
- 6) Saito M. Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into Th17 cells: is this also the case for multiple sclerosis? *Clin Exp Neuroimmunol*. 5(2):112-113, 2014.
- 7) Saito M, Tanaka R, Fujii H, Kodama A, Takahashi Y, Matsuzaki T, Takashima H, Tanaka Y. The neutralizing function of the anti-HTLV-1 antibody is essential in preventing in vivo transmission of HTLV-1 to human T cells in NOD-SCID/ $\gamma$  cnull (NOG) mice. *Retrovirology*. 11(1):74, 2014.
2. 学会発表
- 1) 齊藤峰輝、安間恵子、後川 潤、松崎敏男、高嶋 博、松岡雅雄：HTLV-1 関連脊髄症発症関連因子としての HTLV-1 ウイルス型の解析. 第 54 回日本神経学会学術大会, 2013 年 5 月 30 日, 東京  
第 54 回日本神経学会学術大会プログラム p113, 2013.
- 2) 齊藤峰輝、塩浜 康雄、後川 潤、高嶋 博、大原 義朗：HTLV-1 標的遺伝子 CCL1 の HAM 発症における病因的意義. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会, 2013 年 11 月 29 日, 下関  
第 25 回日本神経免疫学会学術集会抄録集 p119, 2013.
- 3) Saito M, Tanaka R, Kodama A, Tanaka Y : Complete prevention of HTLV-1 infection in humanized mice (hu-PBL SCID) by a neutralizing monoclonal antibody to envelope gp46. 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. June 27, 2013, Montréal, Canada. *Retrovirology* 11(Suppl 1):09, 2014. doi:10.1186/1742-4690-11-S1-09
- 4) 齊藤峰輝、塩浜康雄、後川 潤：HTLV-1 遺伝子およびサイトカイン発現抑制効果を指標とした HAM 治療薬・抗体医薬の検討. 第 55 回 日本神経学会学術大会, 2014 年 5 月 23 日, 福岡
- 5) 齊藤峰輝、安間恵子、松崎敏男、高嶋 博、松岡雅雄：HAM 発症関連ウイルス多型が宿主・ウイルス遺伝子発現および臨床経過に及ぼす影響の解析. 第 1 回 日本 HTLV-1 学会学術集会, 2014 年 8 月 23 日, 東京
- 6) 齊藤峰輝、塩浜康雄、後川 潤、田中勇悦：ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) 感染予防法と新規 HAM 治療薬の検討. 第 26 回神経免疫・第 19 回神経感染症合同学術集会, 2014 年 9 月 6 日, 金沢
- 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 細胞白血病ウイルス HBZ 蛋白質の検出方法 (出願中)
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

図 1 : HTLV-1 感染 T 細胞株における OX40 および OX40L (=gp34) の高発現

A. 蛍光標識抗 OX40L 単クローン抗体で染色 B. 蛍光標識抗 OX40 単クローン抗体で染色

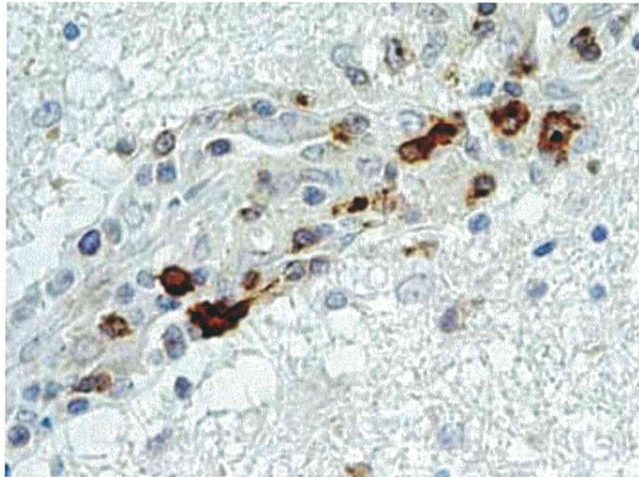


CEM/gp34, CEM/OX40, Molt-4/gp34, Molt-4/OX40 : CEM または Molt-4 を親株とした gp34 または OX40 の安定発現細胞株 (stable transformant) →陽性コントロールとして使用。

破線 : Control 抗体 実線 : 抗 OX40 or OX40L 抗体

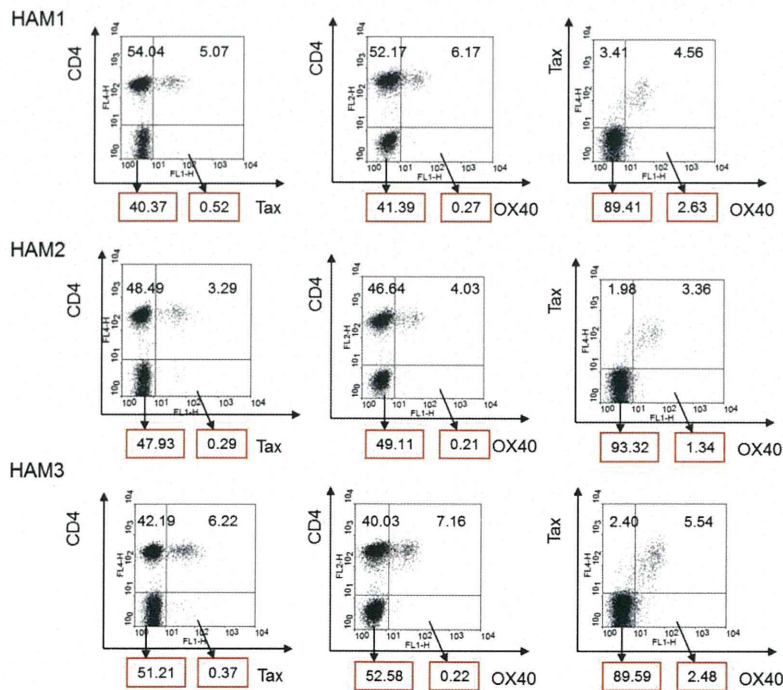
OX40 は HTLV-1 感染細胞株のうち C5MJ, HUT102, MT-2, MT-4, SLB1 に、OX40L は C5MJ, MT-2 に高発現していた。

図 2 : HAM 患者脊髄病変・血管周囲の浸潤細胞における OX40 の強発現



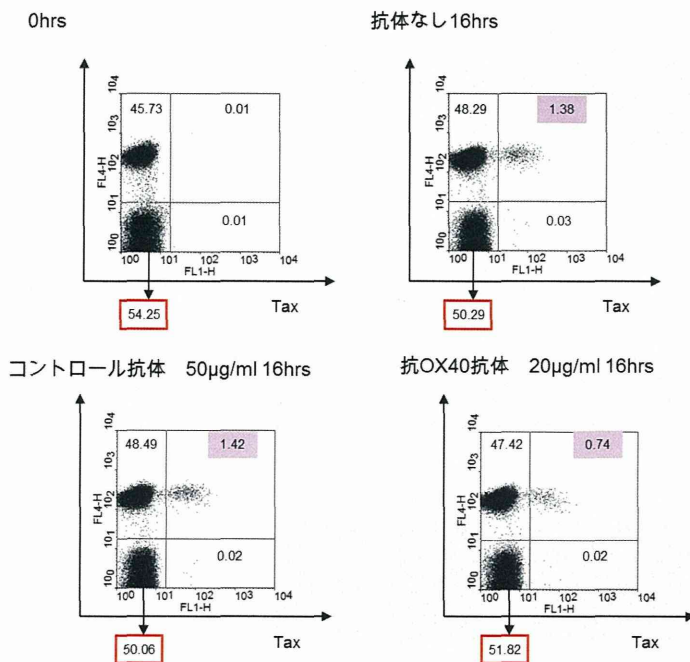
OX40 は未培養の HAM 患者 PBMC には発現が認められなかった (data not shown) が、HAM 患者剖検脊髄標本の免疫組織染色では病変局所浸潤細胞に強発現していた。

図 3 : HTLV-1 感染 CD4 陽性 T 細胞における OX40 の発現誘導



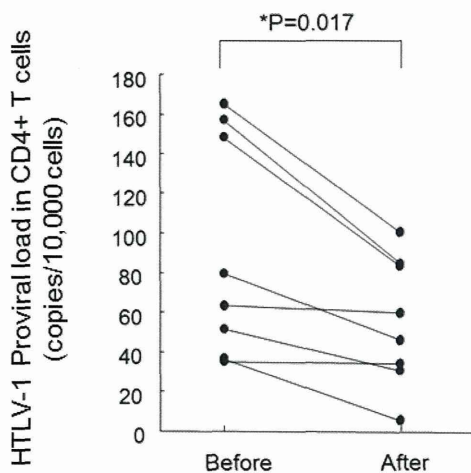
HAM 患者の新鮮 PBMC に OX40 および OX40L の発現は認められなかったが、in vitro で 16 時間培養して Tax 蛋白を発現誘導すると、OX40 は HAM 患者 PBMC の Tax 陽性細胞特異的に発現誘導された。

図 4： HAM 患者 PBMC 培養系における抗 OX40 抗体による Tax 発現細胞の減少



HAM 患者の PBMC を 16 時間培養すると、主に CD4 陽性 TPBMC に Tax 蛋白発現が誘導される。この系に抗 OX40 単クローン抗体を添加すると、コントロール抗体（抗 HIV-1 p24 抗体）と比較して CD4+Tax+細胞（HTLV-1 感染細胞）が半減した。

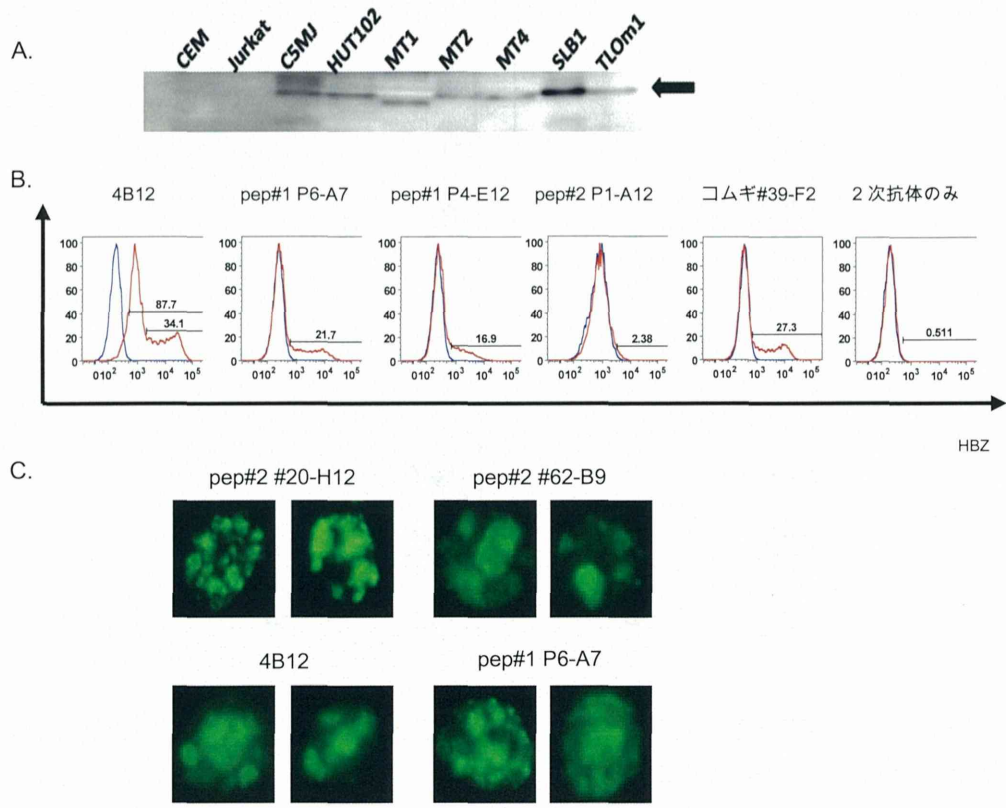
図 5： HAM 患者 PBMC 短時間培養系における抗 OX40 抗体による感染細胞数の有意な減少



HAM 患者 PBMC を 16 時間培養し、その前後で CD4+T 細胞を分離して HTLV-1 プロウイルス量を Real Time PCR 法で定量した。\*: Wilcoxon signed-ranks test で検定。

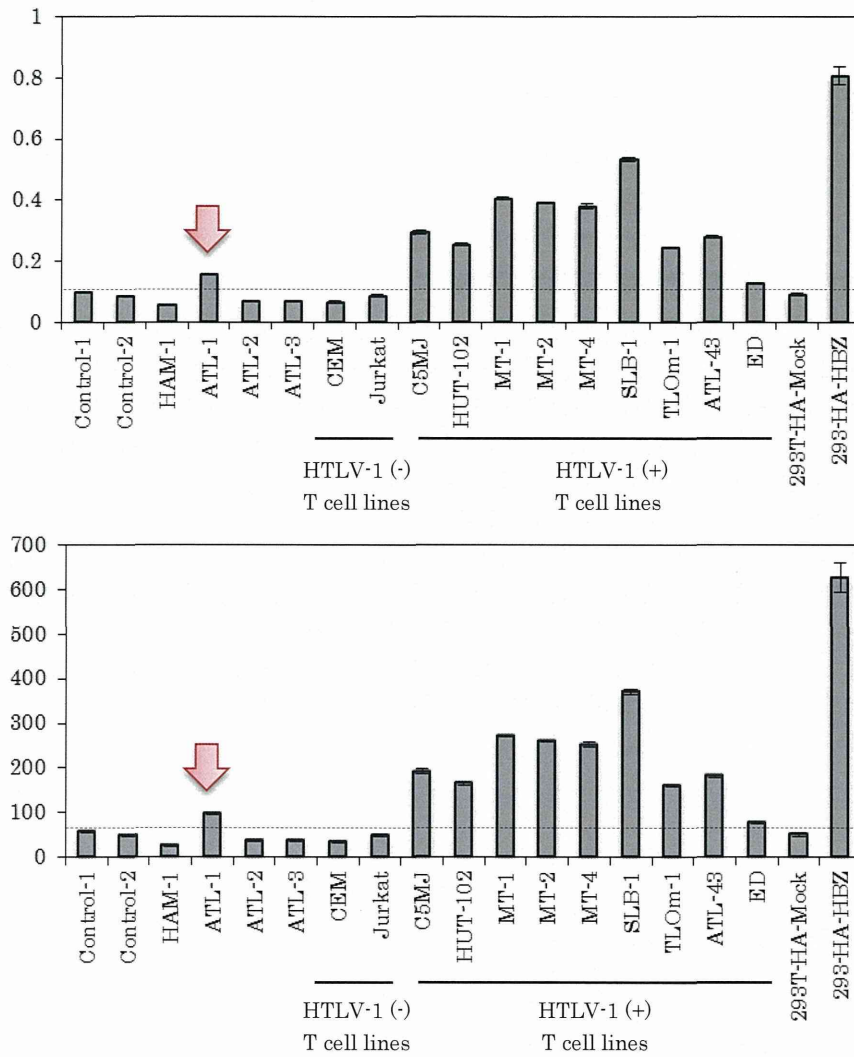


図6：新規抗HBZ単クローン抗体による細胞内HBZ蛋白質の検出



A. ウェスタンブロッティング B. フローサイトメトリー C. 蛍光免疫染色 (間接法)

図 7：新規サンドイッチ ELISA 系による HTLV-1 感染細胞中の HBZ 蛋白質の定量



検討した ATL 患者検体 3 検体中 1 検体において HBZ 蛋白質が検出・定量された(矢印)。

## HAM 患者における疾患惹起性 T 細胞の分布

研究分担者 氏名 : 外丸 詩野

所属機関 : 北海道大学大学院医学研究科 分子病理学分野

職名 : 准教授

研究要旨 : HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy: HAM) は長い潜伏期の後に、HTLV-I 感染キャリアーの一部に慢性の痙性脊髄麻痺を発症する疾患で、病態には脊髄に浸潤する T 細胞による過剰な細胞傷害やサイトカインの産生等が関わっていると推定されている。本研究課題は、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研究を推進しているが、効果的な新規治療法の開発には HAM 病態において重要な役割を有するターゲット細胞の検討が重要である。

本研究では HAM の病態において、特に IP-10 産生細胞を同定する目的で、患者脊髄サンプルを用いて蛍光染色による検討を行った。その結果、HAM 患者脊髄で増加している IP-10 発現細胞の多くはアストロサイトであることが判明し、ウイルス感染を背景としてアストロサイトが IP-10 を産生し、CXCR3 陽性 T 細胞の脊髄への浸潤を惹起していることが明らかとなった。また、HAM 患者では脾臓が CXCR3 陽性 T 細胞の pooling や増殖に関与している可能性が考えられた。

### A. 研究目的

HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1 associated myelopathy: HAM) の新規治療法を開発することを目的に、HAM の病態に重要な役割を果たしている疾患惹起性 T 細胞に関する病理組織学的な検討を行った。

### B. 研究方法

#### 1. サンプル

HAM 患者の剖検により採取された脊髄標本 4 例、脾臓標本 2 例、および他疾患により病理解剖され、脊髄や脾臓には異常を認めない標本 6 例を正常コントロールとして用いた。

#### 2. 抗体

Anti-IP-10 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、Anti-GFAP 抗体 (DAKO)、Anti-CXCR3 抗体 (Abcam)、Anti-CD3 抗体 (DAKO)、Anti-CD4 抗体 (DAKO)、および

対応するアイソタイプコントロールを用いた。二次抗体は Alexa 488-conjugated、Alexa 594-conjugated の anti-rabbit あるいは mouse IgG (Invitrogen) を用いた。

#### 3. 蛍光染色

脊髄のパラフィンブロックより作製した 4 $\mu$ m 切片を、脱パラの後に serum-free blocking medium (DAKO) で 15 分ブロッキングし、1 次抗体を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。1 次抗体の反応後、標本を PBS で 10 分 2 回洗浄したのち、二次抗体 (300 倍希釈) に 30 分反応させた。反応後標本を PBS で 10 分 2 回洗浄し、mounting medium (DAKO) で封入後、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 4. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色については、定法の DAB 染色を用いた。

(倫理面への配慮)

実験は北海道大学の倫理委員会承認に基づいて行った。

### C. 研究結果

HAM 患者脊髄で増加している IP-10 発現細胞の多くはアストロサイトであることが判明し (図)、ウイルス感染を背景としてアストロサイトが IP-10 を産生し、CXCR3 陽性 T 細胞の脊髄への浸潤を惹起していることが明らかとなった。また、HAM 患者では、脾臓内に分布する CXCR3 陽性 CD4 陽性 T 細胞が多数認められ、脾臓が CXCR3 陽性 T 細胞の pooling や増殖に関与している可能性が考えられた。

### D. 考察

HAM の病態には脊髄に浸潤する T 細胞による過剰な細胞傷害やサイトカインの産生等が関わっていると推定されている。

これまでの検討では、HAM の病態解明を進める目的で、患者脊髄サンプルおよび健常コントロールを用いて、ケモカインやケモカインレセプター、サイトカインの発現解析を行ってきた。その結果、HAM 患者脊髄には CXCR3 陽性 T 細胞が浸潤し

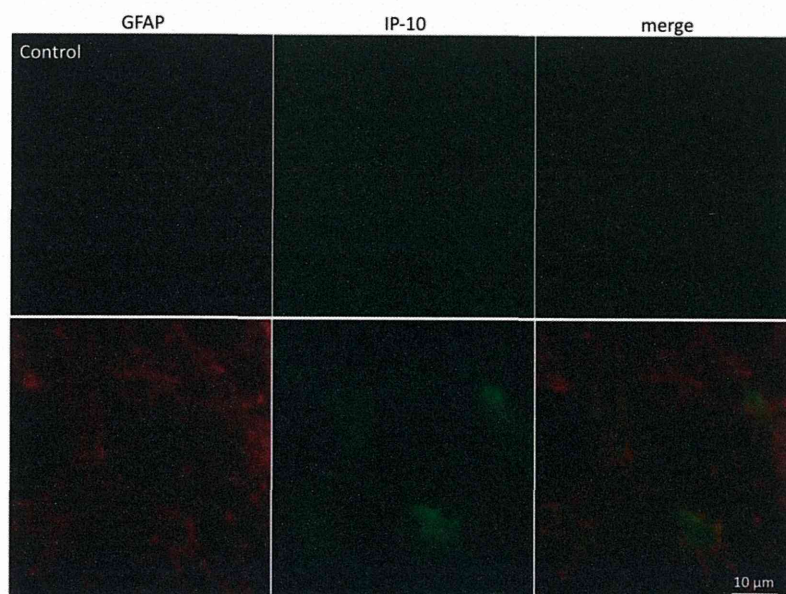
ていること、また HAM 患者脊髄では IP-10 発現グリア細胞が増加していることが明らかとなり、CXCR3/IP-10 を介する脊髄への炎症細胞浸潤が病態に関連している可能性が考えられた。本研究により IP-10 産生細胞が主としてアストロサイトであることが明らかとなり、今後はアストロサイトのケモカイン過剰産生をブロックする治療戦略を考えることで、より効果的な治療法を構築することが有用であると考えられた。また、脾臓が CXCR3 陽性 T 細胞の pooling や増殖に関与している可能性が考えられ、今後は抗 CCR4 抗体療法の効果を判定する上で、体内に pool される炎症惹起性 T 細胞の動態をモニタリングすることも重要であると考えられた。

### E. 結論

HAM 患者では CXCR3/IP-10 を介する脊髄への炎症細胞浸潤が病態に関連していると考えられ、CXCR3 陽性 T 細胞の pooling や増殖には脾臓が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

### F. 健康危惧情報

該当なし



(図) HAM 患者脊髄における IP-10/GFAP 陽性細胞の分布