

## HAM 病態モデルの樹立を目指した基礎的検討

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。効果的な新規治療法の開発にはヒト HAM 病態を模倣するより有用な病態モデルの樹立が不可欠である。

本研究では HAM モデルの樹立を目指し、ATL 発症マウスモデルを用いた基礎的な検討を行った。その結果、ATL 発症マウスでは野生型マウスに比して CXCR3 陽性 CD8 T 細胞の増加を認めることが明らかとなり、中枢神経系における IP-10 発現誘導により HAM 様の脳脊髄炎を誘導でき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) の効果的な新規治療法の開発にはヒト HAM 病態を模倣するより有用な病態モデルの樹立が不可欠である。本研究課題では、ヒト HAM 病態を模倣するより有用な病態モデルの樹立を目指した基礎的検討を推進した。

### B. 研究方法

#### 1. マウス

国立感染症研究所より ATL を発症する Tax トランスジェニックマウス (Tax-Tg) の供与を受けた。コントロールには野生型 B6 マウスを用いた。

#### 2. 脾細胞分離

Tax-Tg および WT マウスを犠牲死させ、脾臓を摘出し、セルスクレーパー (BD Falcon) と 100  $\mu$ m のセルストレイナー (BD Falcon) を用いて細胞を分離し、PBS に浮遊させた。

#### 3. フローサイトメトリー

PBS 浮遊細胞を溶血後、一次抗体を添加し、4°C で 30 分染色し、洗浄した後にフローサイトメトリーによる解析を行った。フローサイトメトリーは FACS Calibur (BD Bioscience) を使い、Cell Quest software (BD Bioscience) でデータを解析した。抗体は PE-conjugated anti-mouse CD4、FITC-conjugated anti-mouse CD8、PerCP-conjugated anti-mouse CD3、PE-Cy5-conjugated anti-mouse CXCR3 (いずれも BD Bioscience) とそれに対応するアイソタイプコントロールを用いた。

(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

Tax-Tg の脾細胞では WT に比して、CXCR3 陽性 CD8 陽性 T 細胞が多数認められ

た。CD4 陽性 T 細胞には CXCR3 発現の変化は認めなかった。

#### 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 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、Tax-Tg マウスの CD8 T 細胞に CXCR3 の強発現を認めたことから、実験的脳脊髄炎など、中枢神経系における脳局所での IP-10 の発現により、Tax 発現性 CXCR3 陽性 CD8 T 細胞を脳内に誘導できる可能性が考えられた。現在、ATL マウスに実験的脳脊髄炎を誘導し、炎症の遷延等の病態に関して解析を行っている。

#### E. 結論

新たな HAM モデルの誘導に ATL マウスが応用できる可能性が示された。

#### F. 健康危惧情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Imamoto T, Nakazawa D, Shida H, Suzuki A, Otsuka N, Tomaru U, Ishizu A. Possible linkage between microscopic polyangiitis and thrombosis via neutrophil extracellular traps. *Clin Exp Rheumatol*. 32(1):149-150, 2014
- 2) Matsui Y, Tomaru U, Miyoshi A, Ito T, Fukaya S, Miyoshi H, Atsumi T, Ishizu A. Overexpression of TNF- $\alpha$  converting enzyme promotes adipose tissue inflammation and fibrosis induced by high fat diet. *Exp Mol Pathol*. 2014, 97(3):354-8.
- 3) Ando R, Noda K, Tomaru U, Kamoshita M, Ozawa Y, Notomi S, Hisatomi T, Noda M, Kanda A, Ishibashi T, Kasahara M, Ishida S. Decreased proteasomal activity causes photoreceptor degeneration in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 3;55(7):4682-90.
- 4) Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y, Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, Yamano Y. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest*. 2014 124(8):3431-42.
- 5) Inuma C, Waki M, Kawakami A, Yamaguchi M, Tomaru U, Sasaki N, Masuda S, Matsui Y, Iwasaki S, Baba T, Kasahara M, Yoshiki T, Paletta D, Herrmann T, Ishizu A. Establishment of a vascular endothelial cell-reactive type II NKT cell clone from a rat model of autoimmune vasculitis. *Int Immunol*. 2014, 27(2):105-14.
- 6) Tomaru U, Tsuji T, Kiuchi S, Ishizu A, Suzuki A, Otsuka N, Ito T, Ikeda H, Fukasawa Y, Kasahara M. Decreased expression of a thymus-specific proteasome subunit b5t in Down syndrome patients. *Histopathology*. 2015, in press.
- 7) Tsuchisaka A, Kaneko S, Imaoka K, Ota M, Kishimoto K, Tomaru U, Kasahara M, Ohata C, Furumura M, Takamori S, Morita E, Hashimoto T. Presence of autoimmune regulator and absence of desmoglein 1 in thymoma associated with a pemphigus foliaceus patient. *Br J Dermatology* 2015, in press.
- 8) Honma R, Kinoshita I, Miyoshi E, Tomaru U, Matsuno Y, Shimizu Y, Takeuchi S,

Kobayashi Y, Kaga K, Taniguchi N, Dosaka-Akita H. Expression of Fucosyltransferase 8 Is Associated with an Unfavorable Clinical Outcome in Non-Small Cell Lung Cancers. *Oncology*. 2015, in press.

## 2. 学会等での講演、発表

### 国内会議

- 1) 木内静香、外丸詩野、紺野沙織、石津明洋、宮島祥太、平川彩香、笠原正典：胸腺におけるプロテアソームキモトリプシン様活性サブユニットの発現とT細胞選択 第103回日本病理学会総会、2014
- 2) 伊藤智樹、外丸詩野、大村優、石津明洋、笠原正典：プロテアソーム機能異常と脳機能の低下 第103回日本病理学会総会 広島国際会議場・ANAクラウンプラザ（広島）、2014
- 3) 竹中淳規、大塚紀幸、藤田裕美、中馬誠、外丸詩野、石津明洋、笠原正典：高齢男性でみられたEBV陽性肝脾 $\gamma$  $\delta$ T細胞リンパ腫の一例 第103回日本病理学会総会 広島国際会議場・ANAクラウンプラザ（広島）、2014
- 4) 三次有奈、山田真衣、舘山ゆう、楠由

宏、志田玄貴、中沢大悟、外丸詩野、三好秀明、渥美達也、石津明洋：高血糖による好中球細胞トラップ（neutrophil extracellular traps : NETs）の形成亢進 第47回北海道病理談話会（病理分科会）、2014

- 5) 志田玄貴、中沢大悟、舘山ゆう、山田真衣、楠由宏、三次有奈、外丸詩野、渥美達也、石津明洋：抗ラクトフェリン抗体の病原性 第47回北海道病理談話会（病理分科会）、2014
- 6) 伊藤智樹、外丸詩野、大村優、戸松留花、石津明洋、笠原正典：プロテアソーム機能低下モデルマウスにおける脳機能障害の解析 第47回北海道病理談話会（病理分科会）、2014
- 7) Shizuka Kiuchi, Utano Tomaru, Saori Konno, Shota Miyajima, Akihiro Ishizu, Masanori Kasahara : Aberrant expression of proteasomal  $\beta$ 5 subunit affects T cell repertoires in the thymus. 第43回日本免疫学会総会・学術集会、2014

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)  
該当なし

## IV. 資 料

## 【添付資料 1】

HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の有効性評価  
指標に関する前向き多施設共同臨床研究

実施計画書 Ver1.01

同意説明文書 Ver1.01

# HTLV-1 関連脊髄症（HAM）の有効性評価指標に関する

## 前向き多施設共同臨床研究

(UMIN 試験 ID: UMIN000012874)

### 実施計画書

研究代表者： 山野嘉久

聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター

〒216-8512 川崎市宮前区菅生 2-16-1

TEL: 044-977-8111 (内線 4021)

FAX: 044-977-9772

E-mail: [yyamano@marianna-u.ac.jp](mailto:yyamano@marianna-u.ac.jp)

作成日・改訂日：

Ver 1.01 (2014年9月10日)

## 目次

1. 背景	3
2. 目的	4
3. 対象	5
3.1. 予定被験者数	
3.2. 選択基準	
3.3. 除外基準	
3.4. 中止・脱落基準	
4. 被験者の同意取得方法	5
5. 研究方法	6
5.1. 患者検体と個人情報取り扱い	
5.2. 研究のタイムライン	
5.3. 被験者の試験参加予定期間	
5.4. 併用薬剤、併用療法	
5.5. 症例登録の方法	
6. 評価項目	9
6.1. 検体の測定項目と処理方法	
6.1.1. 測定項目	
6.1.2. 検体の処理方法	
6.2. 臨床情報の収集	
6.2.1. 試験担当医師による調査	
6.2.2. HAM ねっと登録センターによる調査	
6.2.3. 歩行評価尺度の測定方法	
6.3. 観察及び検査スケジュール	
7. 解析方法	13
7.1. 歩行評価尺度の解析	
7.2. prognostic marker の解析	
7.3. 治療効果判定因子、治療効果予測因子の解析	
8. 研究の中止基準	13
9. 研究実施期間	14
10. 倫理的事項	14
10.1. 遵守すべき諸規則	
10.2. 被験者の人権及び安全性・不利益に対する配慮	
11. 研究に関わる費用・義務・権利及び検体・記録の保存、結果の公表	14
11.1. 研究に関わる費用・義務・権利など	
11.2. 検体・記録の保存	
11.3. 結果の開示・公表	
11.4. 遺伝情報の安全管理の方法	
11.5. 遺伝カウンセリングの必要性およびその体制	
12. 研究組織	15
13. 参考文献	18

## 1. 背景

ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) の感染者は全国で約 100 万人以上存在し、感染者の約 0.3% に難治性疾患である HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM)、約 5.0% に致死的な成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATL) を発症することから、その対策は我が国の厚生行政の上でも重要課題として認識されており、平成 22 年度から「HTLV-1 総合対策」が開始され、その解決に向け国レベルで取り組まれている。

HAM は、進行性の痙性脊髄麻痺を特徴とする疾病で、有効な治療法がなく患者の生活の質 (QOL) は大きく損なわれており、アンメットニーズの高い、極めて深刻な難治性希少疾患である。このため HAM は、国の難治性疾患克服研究事業の対象疾患 (難病) に認定されている。現在、HAM の治療はステロイドやインターフェロン- $\alpha$  が主に使用されているが、これら薬剤は効果が不十分で、また副作用の問題もあり継続が困難である場合が多く、HAM 患者の機能予後は極めて不良であるのが現状で、より効果や長期忍容性に優れ、患者の長期予後の改善に結びつく画期的な新規治療薬開発の要望が強い。

HAM に対して有効な新薬の開発を進めるためには、その有効性を証明する検証的臨床試験の実施 (治験による) が必要であるが、HAM は希少疾患であり (全国での患者数約 3000 名)、また欧米の先進国では患者数が少ないことから、薬効を評価するための「有効性評価指標」が確立しておらず、新薬開発が進展しない大きな要因となっている。そこで本研究では、HAM に関する質の高い有効性評価指標 (バイオマーカーを含む) を開発するために、前向き多施設共同臨床研究を計画した。

有効性評価指標には、一般的に①臨床的指標と②薬理的指標 (バイオマーカー) があるが、まず、HAM の臨床試験における①臨床的評価指標としては、臨床的な適切さ、客観性、定量性、数値の連続性、感度、再現性などが重要と考えられる。HAM の主な症状として、歩行障害、排尿・排便障害、感覚障害などがあるが、歩行障害はほぼ全例に認められるのに対して、排尿・排便障害は 8~9 割程度、感覚障害は 6 割程度と全例に認められないため、HAM の ADL 障害の主要な要因となっている歩行障害のレベルについては、これまでも HAM の臨床試験における重要な評価項目として使用されてきた。このように、臨床的な適切さという意味で、HAM の臨床試験における臨床的評価指標として、歩行障害の評価尺度を選択することは優先度が高いと考えられる。

HAM の歩行障害レベルの評価尺度としては、これまで納の運動障害重症度 (OMDS)、Expanded Disability Status Scale (EDSS)、IPEC、10m 歩行時間 (10mWT) が使用されている。いずれも客観的で定量的であるが、OMDS、EDSS、IPEC は重症度が段階的に分割されているので、これらの尺度では重症度の小さな変化が見落とされることがあり、すなわち感度が低いという欠点がある (OMDS ではグレードが 1 段階悪化するのに約 5 年を要する)。その為、HAM 患者の歩行状態を感度良く連続変数として定量的に反映することができる評価指標が臨床試験においてはより



好ましく、10mWT の有用性が期待される。しかし、一般的には歩行障害を主徴とする疾患において 10mWT でも感度が低い場合があり、さらに感度の良い尺度として 2 分間(あるいは 6 分間)歩行距離 (2minWT or 6minWT) が用いられることがある。従って、10mWT、2minWT は HAM の臨床試験における臨床的評価指標の有望な候補と期待されるが、HAM 患者における 10mWT、2minWT のデータを (多施設において) 前向きに長期間収集したデータが不足しているため、これら指標の「臨床試験における有用性や位置づけ」が確立していないのが現状であり、出来るだけ多くのデータ収集とその生物統計学的解析の実施が強く求められる。

さらに HAM は、一般的に歩行障害が数十年かけて緩徐に進行する疾患であるため、臨床試験の有効性評価期間中にその変動を検出できないリスクがあり、②薬理的指標 (バイオマーカー) に関する開発の必要性が極めて高い。HAM の治療の最終目標 (true end point) は、長期予後の改善である。しかし、HAM の経過は数十年と長いため、true end point を対象に臨床試験を実施することは非現実的であり、true end point と統計学的に相関し、かつ定量性の高い surrogate marker (代替 marker) を決定し、その改善をエンドポイントとした臨床試験の実施が望まれる。しかしながら、HAM において surrogate marker は確立しておらず、その開発に向けた研究推進の必要性が高い。Surrogate marker の候補は、まず病気の進行度と相関する marker (prognostic marker) として証明される必要がある<sup>1)</sup>。これまで HAM において進行度や長期予後との相関性が報告されたバイオマーカーとして、末梢血 HTLV-1 プロウイルス量<sup>2)</sup>、髄液/血液 HTLV-1 プロウイルス量比<sup>3)</sup>があり、さらに最近我々は、髄液の CXCL10, CXCL9, ネオプテリン濃度の有用性を報告した<sup>4)</sup>。これらマーカーは HAM の prognostic marker 候補と考えられるが、全て後ろ向き・単施設での検討であり、これまで前向きに検討された研究はなく、よりエビデンスレベルの高い prognostic marker を開発していくためには、前向きの多施設共同による、オミックス解析も含めた研究の実施が望まれる。そこで本研究では、前向きに臨床的評価指標やバイオマーカーに関する情報収集・解析を実施する研究を計画した。

## 2. 目的

HAM の有効性評価指標を開発するために、臨床的評価指標の候補に関するデータを多施設共同で前向きに収集して生物統計学的解析を加え、臨床的評価指標としての適切さについて検討する。また、HAM 患者由来のバイオリソースを治療介入前後で前向きに収集し、これまで報告された prognostic marker 候補の測定ならびにオミックス解析を行い、臨床経過との相関性を調べることにより、prognostic marker を同定する。さらに同定されたマーカーの治療による変動について解析し、治療効果判定指標・治療効果予測因子としての有用性について検討する。

### 3. 対象

#### 3.1. 予定被験者数

- (1) 以下の選択・除外基準を満たす HAM 患者 150 例

#### 3.2. 選択基準

- (1) HAM/TSP 診断指針 (1988 年鹿児島 WHO 学術会議による)を満たす
- (2) 同意取得時に歩行補助具の要否に関係なく 10メートル以上歩行可能な患者
- (3) 本研究への参加について本人から自由意思による文書同意が得られている患者  
(未成年者の場合、法定保護者の同意が必要)

#### 3.3. 除外基準

- (1) 頸椎疾患、椎間板ヘルニア、黄色靭帯骨化症など、歩行評価に影響する脊髄圧迫病変を合併している患者
- (2) 変形性膝関節症、変形性股関節症、コントロール不良の関節リウマチなど、歩行評価に影響する運動器疾患を合併している患者
- (3) パーキンソン病、脳梗塞後遺症、脳出血後遺症、くも膜下出血後遺症など、歩行評価に影響する神経疾患やその後遺症を合併している患者
- (4) 歩行評価に影響する重篤な合併症 (心不全、呼吸不全、腎不全、肝不全等)に罹患している患者
- (5) 精神障害、認知症など、聞き取り調査に影響する精神神経系疾患を合併している患者
- (6) ステロイド (外用薬は除く) もしくはインターフェロン、免疫抑制剤、抗がん剤を投与する可能性のある、HAM 以外の合併症を有している患者
- (7) 重度の貧血 (ヘモグロビン 9.0 g/dl 未満) ならびに低髄液圧症候群を合併しており、血液や髄液の採取において、被験者の安全性の観点から不適切と判断される患者
- (8) その他、試験責任医師または分担医師により本研究への参加が不適切と判断された患者

#### 3.4. 中止・脱落基準

被験者から研究参加の辞退の申し出や同意の撤回があった場合。及び、その他の理由により医師が試験を中止することが適当と判断した場合。

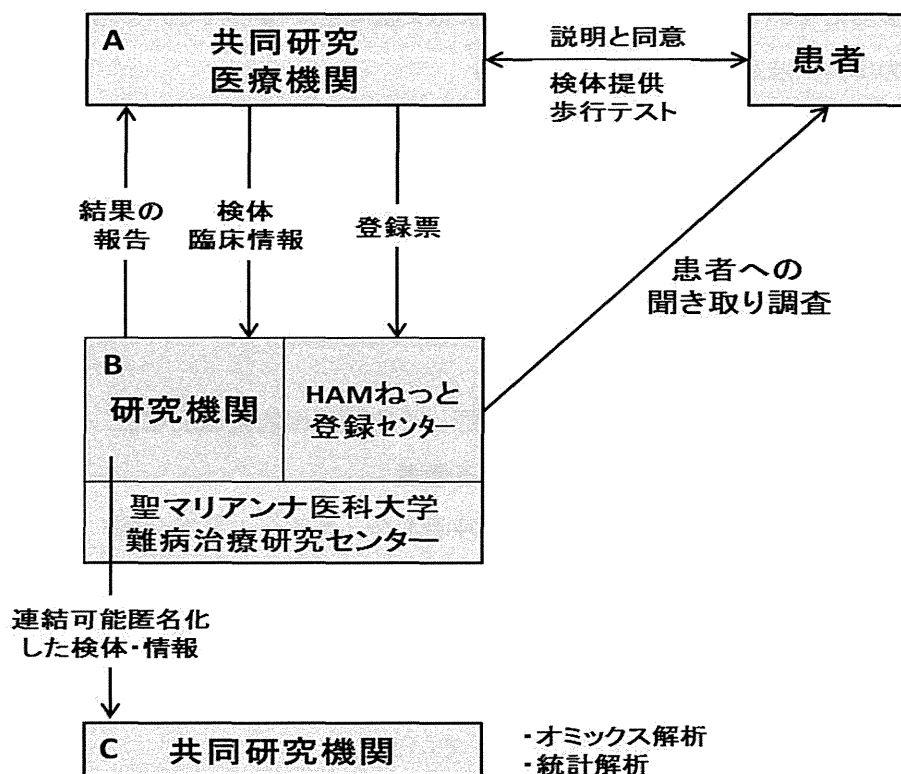
### 4. 被験者の同意取得方法

本研究の開始前に担当医師は、被験者 (あるいは法定代理人) から文書による同意を取得する。同意取得に当たっては、倫理委員会の承認を受けた同意説明文書を用いて、担当医師から研究の目的、方法、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（あるいは法定代理人）に十分説明し、被験者の自由意思による同意を文書で得る。被験者が未成年者である場合、法定保護者からの同意を得るばかりでなく、たとえ未成年者であっても本人から同意が得られる状況においては、未成年者本人からも文書で同意を得る。

## 5. 研究方法

### 5.1. 患者検体と個人情報の取り扱い



#### A : 共同研究医療機関 :

- ① 担当医師は、患者に試験の内容を説明し、文書による同意を取得する。
- ② 歩行の評価（OMDS 判定、10m 歩行時間、2 分間歩行距離）を実施する。
- ③ 血液（ヘパリン加 10ml 採血管 2 本、血清 10ml 採血管 1 本、EDTA-2 Na 加 7ml 採血管 1 本、PAXgene 採血管 2.5ml 1 本：通常 39.5ml、状況に応じて減量）と髄液（3ml）を採取する（任意）。
- ④ 検体と臨床情報、登録票を「研究機関」へ郵送する。

#### B : 研究機関 : 聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター

##### <患者検体の取り扱い>

- ① 検体を受け取り、個人情報管理者により連結可能匿名化法によって本研究専用の登録番号

(患者コード) が付与される。

- ② 研究機関では、番号化された検体を用いて研究を施行する。
- ③ 実験は、難病治療研究センターP2 実験室にて行う。
- ④ 末梢血と髄液のウイルス量定量値、髄液のネオプテリン濃度、CXCL10 濃度、抗体価の結果を担当医師へ報告する。
- ⑤ 番号化された検体の一部を、連結可能匿名化な状態で、「**共同研究機関**」(東京大学大学院新領域創成科学研究科ファンクショナルプロテオミクスセンター、京都大学医学部ゲノム医学センター) に提供する。

#### <臨床情報の取り扱いと、HAM ねっと登録センターによる聞き取り調査>

- ① HAM ねっと登録センター (聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター、責任者：山野嘉久) は、担当医師から送付された臨床情報、登録票を受領し、登録票の内容を確認して、登録完了票を担当医師へ FAX する。
- ② HAM ねっと登録センターは、登録患者へ電話による聞き取り調査を1年毎に実施する。
- ③ 臨床情報と聞き取り調査の結果は、HAM ねっと登録センターで患者毎にファイルで整理し、鍵付きの棚に保管する。
- ④ 臨床データに関しては、個人情報管理者により連結可能匿名化法によって本研究専用の登録番号 (患者コード) が付与され、情報は患者コードを用いて管理し、本研究専用のコンピュータと記憶媒体に保存する。解析する際は患者コードを用いて実施する。
- ⑤ 匿名化された臨床データを、北里大学薬学部臨床医学 (臨床統計学)、聖マリアンナ医科大学予防医学 (疫学解析) に提供する。

#### **C : 共同研究機関 :**

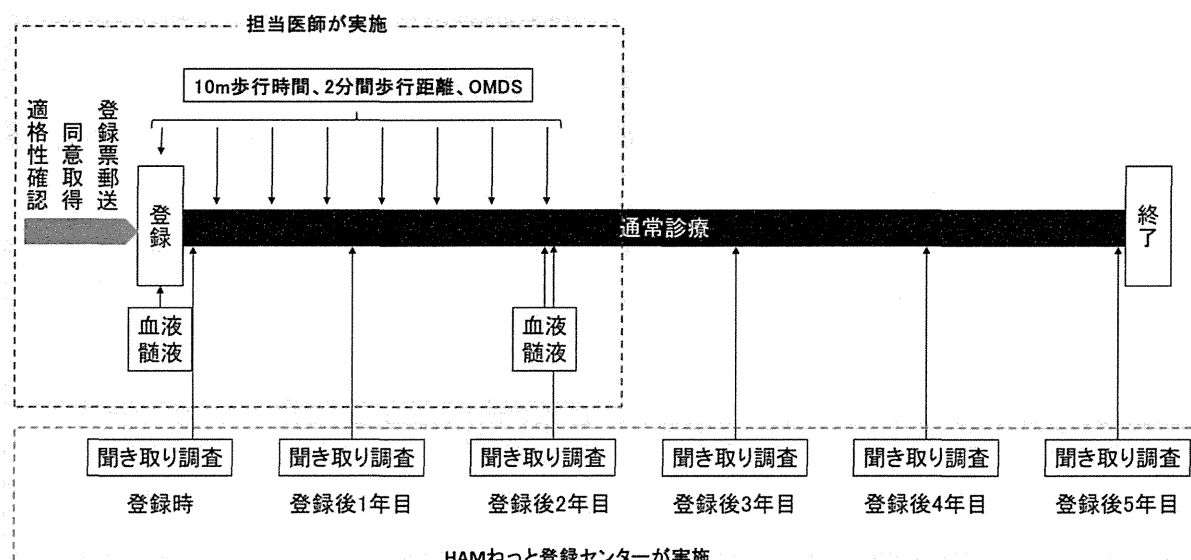
<患者検体の受け取りと解析> : 東京大学大学院新領域創成科学研究科ファンクショナルプロテオミクスセンター、京都大学医学部ゲノム医学センター

- ① 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターで匿名化された検体を受け取り、解析を実施する。
- ② 必要な臨床情報に関しては、匿名化された番号で聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターへ問合せ、臨床情報も匿名化された番号でのみ受け取る。

<臨床情報の受け取りと生物統計学的解析> : 北里大学薬学部臨床医学 (臨床統計学)、聖マリアンナ医科大学予防医学

- ① 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターで匿名化された臨床情報を受け取り、生物統計学的解析、疫学的解析を実施する。

## 5.2. 研究のタイムライン



試験担当医師は、適格性が確認できた患者より文書による同意が得られたら、登録センター（聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター「HAM ねっと」登録センター）に登録票を郵送する。また試験担当医師は、血液および髄液サンプルの採取<sup>a)</sup>、納の運動障害重症度 (OMDS) 判定、10m 歩行時間、2 分間歩行距離の測定を実施する（上図参照）。以後、定期受診毎に 10m 歩行時間、2 分間歩行距離の測定を 2 年間実施する<sup>b)</sup>。登録後 2 年目に、血液および髄液サンプルの採取と OMDS 判定を実施する<sup>c)</sup>。

HAM ねっと登録センターは、登録書類を受領後、登録完了票を担当医師宛に FAX、初回は受領後速やかに電話による聞き取り調査を実施し、以降 1 年毎に同様の調査を実施する。

- a) 血液及び髄液サンプルの採取は原則任意とするが、過去 6 ヶ月以上 HAM に対するステロイドまたはインターフェロンの治療歴のない患者については可能な限り実施する。
- b) 被験者の来院のタイミングに応じて実施時期は変更可能とするが、可能な限り、定期的な来院は 1~3 か月に 1 回実施する。
- c) 登録後 2 年目の検査のタイミングは前後 1 ヶ月の範囲内で実施とする。

注) 本試験期間中の治療内容は特に制限せず、治療内容の変更も可とする。

## 5.3. 被験者の試験参加予定期間

参加予定期間：登録から終了まで約 5 年間

ただし、5 年目の被験者の来院が遅延した場合にはその日までの延長を可とする。

## 5.4. 併用薬剤、併用療法

試験担当医師の判断による一般的な治療とし、内容を制限しない。

## 5.5. 症例登録の方法

試験担当医師は同意取得後に登録票を記載し、登録センター（聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター内「HAM ネット登録センター」）に必要書類を郵送する。登録センターは書類受領後、実施施設宛に登録完了票を FAX する。

## 6. 評価項目

### 6.1. 検体の測定項目と処理方法

#### 6.1.1. 測定項目

- 1) 血液・髄液（聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センターで実施）

<血液>

血清 sIL-2R、CXCL10、CXCL9 濃度、末梢血 PBMC の HTLV-1 プロウイルス量、

<髄液>

細胞数、抗 HTLV-1 抗体価（PA 法）、ネオプテリン、CXCL9、CXCL10、CXCL13、  
髄液細胞の HTLV-1 プロウイルス量

- 2) 血漿、髄液のプロテオーム解析

（東京大学大学院新領域創成科学研究科ファンクショナルプロテオミクスセンターでプロテオーム解析、京都大学医学部ゲノム医学センターで MS を用いた水溶性低分子化合物、脂質、ペプチド解析を実施）

- 3) 末梢血 PBMC 由来 DNA の whole ゲノム解析、Copy number variation (CNV)解析、末梢血 RNA 発現解析

（京都大学医学部 ゲノム医学センターで実施）

#### 6.1.2. 検体の処理方法

##### 1) 末梢血単核球細胞（PBMC）

ヘパリン加採血管（10ml）2 本に採血し、聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センターへ室温の状態<sup>1</sup>で郵送する。難病治療研究センターで、比重法により PBMC を分離し、 $3 \times 10^6$  PBMC から DNA を抽出、その一部を HTLV-1 プロウイルス量定量測定に使用し、一部をゲノム解析へ送付、残存 DNA については $-20^{\circ}\text{C}$ で保存。残存 PBMC は、 $1 \times 10^7$ /tube ずつセルバンカーに入れ、液体窒素タンク内で保存。

##### 2) 血清

血清採血管（10ml）1 本に採血し、遠心（ $3000\text{rpm} \times 10\text{min}$ ）した後、ただちに $4^{\circ}\text{C}$ で保管する。保冷剤を入れた宅急便（冷蔵便）で聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センターへ郵送。500ul/tube ずつ 6 本に分注し、液体窒素で瞬間凍結後に $-80^{\circ}\text{C}$ に保存。1 本を sIL-2R、CXCL10、CXCL9 濃度測定に使用。1 本をプロテオーム解析（東京大学）へ

送付、残り 4 本を将来の解析 (validation) 用に-80℃冷凍庫に保存。

### 3) 血漿

EDTA- 2 Na 加採血管 (7ml) 1 本に採血し、速やかに転倒混和を行う。4℃で遠心 (1500-2000 rpm x 10min) した後、得られた血漿を別のスピッツに移し、ただちに4℃で保管する。保冷剤を入れた宅急便 (冷蔵便) で聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センターへ郵送。250ul/tube ずつ 4 本に分注し、液体窒素で瞬間凍結後に-80℃に保存。1 本をプロテオーム解析 (東京大学) へ送付、1 本をペプチド・脂質解析 (京都大学) へ送付。残り 2 本を将来の解析 (validation) 用に-80℃冷凍庫に保存。

### 4) RNA

PAXgene RNA 採血管 (BD : 2.5ml) 1 本に翼状針で採血し、静かに 8~10 回転倒混和する。採血管をまっすぐに立て、室温 (18~25℃) で最低 2 時間放置する (RNA 安定化目的)。採取当日に検体を聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターへ、保冷剤を入れた宅急便 (冷蔵便) にて郵送する。聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターで、-20℃の冷凍庫に 24 時間置いてから、-80℃冷凍庫に保存し、RNA 解析へ (京都大学) へ冷凍で送付する。

### 5) 髄液

髄液採取用のスピッツに髄液を 3ml (約 100 滴) 採取して、氷上または4℃におく。4℃で遠心 (1500rpm x 10min) して、上清を採って別のスピッツに移し、採取当日に検体を聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターへ、保冷剤を入れた宅急便 (冷蔵便) にて送付する。(ただし、各医療機関で凍結保存した場合は、ドライアイスを入れた宅急便 (冷凍便) にて送付する)。難病治療研究センターで 500ul/tube ずつ 6 本に分注し、液体窒素で瞬間凍結後に-80℃に保存。1 本を抗 HTLV-1 抗体価 (PA 法)、ネオプテリン、CXCL9、CXCL10、CXCL13 濃度測定に使用。1 本をプロテオーム解析へ送付。残りの 4 本を将来の解析 (validation) 用として-80℃冷凍庫に保存。

また、遠心後に上清を回収したスピッツの底に残っている細胞成分は、採取当日に検体を聖マリアンナ医科大学難病治療研究センターへ、保冷剤を入れた宅急便 (冷蔵便) にて送付する。(ただし、各医療機関で凍結保存した場合は、ドライアイスを入れた宅急便 (冷凍便) にて送付する。難病治療研究センターで DNA を抽出し、HTLV-1 プロウイルス量を定量測定する。

## 6.2.臨床情報の収集

### 6.2.1. 試験担当医師による調査

#### 1) 被験者背景

氏名、性別、生年月日、郵便番号、住所、連絡先 (TEL、FAX、メールアドレス)、治

療歴、合併症の有無、登録時の血液・髄液一般検査所見

- 2) 納の運動障害重症度 (OMDS)、10m 歩行時間、2 分間歩行距離
- 3) ステロイド、インターフェロン、及び抗癌縮薬の治療状況

### 6.2.2. HAM ねっと登録センターによる調査 (聞き取り)

- 1) 被験者背景 (登録時)  
既往歴、HAM と診断された時期及び診断された医療機関、
- 2) 登録以前の歩行障害の経過 (登録時)  
歩行障害の出現時期、納の運動障害重症度 (OMDS) の各グレードに変化のあった時期
- 3) 家庭環境及び生活状況 (登録時)  
職業、雇用形態、収入の有無、家族構成、同居家族、公的支援受給状況、各種制度への加入状況、障害者手帳の受領の有無とその程度
- 4) QOL 調査 (登録時ならびに 1 年毎)  
OMDS、IPEC (HAM 障害度スコア)、OABSS (過活動膀胱症状スコア)、I-PSS (国際前立腺症状スコア)、ICIQ-SF (尿失禁 QOL 質問票)、N-QOL (夜間頻尿 QOL 質問票)

### 6.2.3. 歩行評価尺度の測定方法

#### 1) 納の運動障害重症度 (OMDS)

試験担当医師が、診察時に下記 scale から該当する scale を確認する。

scale	評価指標
0	歩行、走行ともに異常を認めない
1	歩くスピードが遅い
2	歩行異常 (つまずき、膝のこわばり)
3	かけ足不能
4	階段昇降に手すりが必要
5	片手によるつたい歩き
6	片手によるつたい歩き不能：両手なら 10 メートル以上可能
7	両手によるつたい歩き 5 メートル以上、10 メートル以内可
8	両手によるつたい歩き 5 メートル以内可
9	両手によるつたい歩き不能、四つばい移動可
10	四つばい移動不能、両手による移動可
11	自力では移動不能、寝返り可
12	返り不可能
13	足の指も動かさない

(注：現時点で最も可能な scale を決定する)



## 2) 10m 歩行時間

直線 10 メートルの始点と終点の床にテープ等で印をつけ、歩行に要する時間をストップウォッチで測定する。測定方法は下記とする。尚、歩行できない場合には測定できない理由を記録する。

- ① 歩行テストの前にストレッチ等をして痙縮をほぐしてから実施する。
- ② 始点の 2 メートル前から歩行開始し、始点を通過した時点から、終点を通過した時点までに要した歩数と秒数を測定する。
- ③ 必ず 2 回測定し、それぞれの測定値を記録する。

※歩行に歩行補助具（片手杖や両手杖など）を用いる場合は、使用した補助具を記録する。

※本試験期間中は、測定方法を変更しないことが望ましい（同じ歩行補助具と使用方法）。

## 3) 2 分間歩行距離

直線 10 メートルの始点と終点の床にテープ等で印をつけ、始点-終点間を往復してもらい、2 分間の間に歩行できた距離を計測する。測定方法は下記とする。尚、歩行できない場合には測定できない理由を記録する。

- ① 歩行テストの前にストレッチ等をして痙縮をほぐしてから実施する。
- ② 始点の 2 メートル前から歩行開始し始点を通過した時点から、2 分間の計測を始める。

※歩行に歩行補助具（片手杖や両手杖など）を用いる場合は、使用した補助具を記録する。

※2 分間の途中で歩行が困難になった場合は、実際に歩行した距離と時間を記録する。

※本試験期間中は、測定方法を変更しないことが望ましい（同じ歩行補助具と使用方法）。

## 6.3 観察及び検査スケジュール

	観察及び評価項目	登録時	外来時 (登録～2年)	1年後	2年後	3年目以降1年毎
担当医師による調査	同意取得	○				
	治療内容の確認	○	○	○	○	○
	血液及び髄液検査※	○			○	
	納の運動障害重症度 10m 歩行時間 2 分間歩行距離	○	○	○	○	
	登録センターによる調査	○		○	○	○

※任意とする。

## 7. 解析方法

### 7.1. 歩行評価尺度の解析

10m 歩行時間・2分間歩行距離に関して対数変換を施し、登録時と1年後および2年後の間で Pearson の相関係数とその 95%信頼区間を求める。加えて、すべての時点のデータを用いて、個体内変動と個体間変動を混合効果線形モデルで算出する。この解析からは経時的推移のデータも得られるため、各時点の平均値およびその 95%信頼区間も算出する。個体間変動と個体内変動の値は臨床試験を行うときのサンプルサイズ設計に用いることを想定し、様々なモデル条件のもとで算出する。さらに、納の運動障害重症度と 10m 歩行時間・2分間歩行距離の関係を Spearman の相関係数とその 95%信頼区間を用いて表現する。

### 7.2. prognostic marker の解析

進行度に関連するバイオマーカーを探索するために、進行度のサブグループ（進行群 vs 非進行群）それぞれにおいてバイオマーカーの記述統計量を算出し、ノンパラメトリック検定を行って比較する。進行度を予測するバイオマーカーを探索するために、ベースラインのバイオマーカーと背景情報を説明変数、進行度のサブグループを目的変数としたロジスティック回帰を実施し、c 統計量(ROC-AUC)が最大となるバイオマーカーおよびその組み合わせを探索する。評価はクロスバリデーションに基づき行う。検定を行うときの有意水準は 0.05 とする。

### 7.3. 治療効果判定因子、治療効果予測因子の解析

治療効果判定因子を探索するために、治療前後の各マーカー測定値の変化量を要約し、変化量が 0 かどうかの検定を行う。マーカーに対する治療効果が臨床的な治療効果と相関することを解析するために、マーカーおよび臨床的治療効果尺度の変化量を治療前後で算出し、Pearson の相関係数と 95%信頼区間を算出する。検定を行うときの有意水準は 0.05 とする。

治療効果予測因子を探索するために、ベースラインの治療効果尺度、ベースラインのマーカーと治療の交互作用項を説明変数、1年後および2年後の治療効果尺度の変化量を目的変数とした重回帰を実施する。副次的に、マーカーのベースライン値で 4 サブグループを構成し、そのそれぞれで治療効果を推測する。検定を行うときの有意水準は 0.05 とする。

## 8. 研究の中止基準

以下のような場合は、試験継続は不可能と判断し、本試験を中止する。

- 1) 被験者から研究参加の辞退の申し出や同意の撤回があった場合
- 2) 同意後に適格性を満足しないことが判明した場合
- 3) 研究全体が中止となった場合
- 4) その他、本研究責任者により継続が困難と判断された場合

## 9. 研究実施期間

2013年承認日から2024年3月31日（登録締切：2016年3月31日）

## 10. 倫理的事項

### 10.1. 遵守すべき諸規則

本研究は、ヘルシンキ宣言、「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年7月31日改正）、「疫学研究に関する倫理指針」（平成20年12月改正）、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」（平成25年2月8日改正）に基づいた倫理原則を遵守し実施する。

### 10.2. 被験者の人権及び安全性・不利益に対する配慮

#### 1) 人権への配慮（プライバシーの保護）

個人情報および診療情報等のプライバシーに関する情報は、個人の人格尊重の理念の下、厳重に保護され慎重に取り扱われるべきものと認識し、万全な管理対策を講じ、プライバシーの保護に努める。個人情報の保護に関する法律（平成15年5月30日法律第57号、最終改正：平成21年6月5日法律第49号）に従う。

年齢、性別、病名、重症度等の臨床情報と「研究機関」に送付された検体は、本研究とは直接関係のない組織に属する個人情報管理者（聖マリアンナ医科大学、薬理学講座 松本直樹）により、連結可能匿名化の方法によって本研究専用の登録番号（患者コード）が付与される。その後、研究実施者は番号化された検体・情報のみを受け取るため、提供者を特定できない。また、共同研究機関に提供する場合は、連結可能匿名化で番号化された検体・情報が提供されるため、プライバシーの保護は厳重に守られる体制にある。

データを解析する際の患者識別は、症例登録時に付与した本研究専用の登録番号（患者コード）と施設患者IDを併記した、対応表でのみ可能である。対応表は個人情報管理者が適切に管理する。患者データのやりとりにおいては、最大限プライバシーを保護する。また、本研究結果の発表・報告に際して、被験者の氏名をはじめとする個人を特定されるような情報は一切公表されない。

#### 2) 被験者の安全性に対する配慮

提供される血液は、1回あたり必要最小限の量（通常39.5ml以下）にとどめられ、また髄液は、1回あたり必要最小限の量（通常3ml以下）にとどめられ、重度の貧血ならびに低髄液圧症候群を有する患者は原則禁止とし（p5, 除外基準参照）、被験者の安全性には十分配慮する。

## 11. 研究に関わる費用・義務・権利及び検体・記録の保存、結果の公表

### 11.1. 研究に関わる費用・義務・権利など

本研究の実施に伴う諸費用は、平成26年度厚生労働科学研究費補助金（H26-委託（難）

－一般－033)「HAM の革新的な医薬品等の開発促進に関する研究」班(研究代表者:山野嘉久)により負担する。また遺伝子解析は、平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金(H26-委託(難)-一般-085)「集約的オミックス解析による難病の原因究明と疾患別遺伝子診断ネットワークの構築」研究班(研究代表者:松田文彦)により負担する。この他に、特定の団体からの資金提供や無償提供などは受けないため、研究組織全体に関して起こりうる利益相反は存在しない。よって、患者および研究参加施設への経済的負担は発生しない。

また本研究は、研究責任者の管轄する研究費で行い、通常の診療の範囲内で行われるため、通常の保険診療の負担以外には、被験者自身が負担する費用はない。また、健康被害が生じた場合の補償は医療の提供のみ行われ、一般診療での対処に準ずる。また、被験者への電話での聞き取りについては、登録センターからの電話もしくはフリーダイヤルが設置されている為、被験者負担は発生しない。

### 11.2. 検体・記録の保存

保管期間については、大変貴重な検体・データとなる為、研究責任者が半永久的に保管する。途中での同意撤回症例の検体・データに関しては、研究責任者の責任により速やかに破棄する。また、研究責任者は、本研究の実施に関わる必須文書を研究終了後も最低 5 年間は難病治療研究センターに保存する。

### 11.3. 結果の開示・公表

解析結果のうち末梢血・髄液の HTLV-1 プロウイルス量、髄液のネオプテリン濃度、CXCL10 濃度、抗体価のデータに関しては試験担当医師にフィードバックするが、本研究は探索的な研究でありデータの意義付けは未確定であるため、研究目的での使用に限定する。

本研究での遺伝子解析により得られる情報は探索的なものであり、進行度や治療効果等との関連性は明確ではない。このため、本研究に参加する被験者に遺伝子解析結果を開示することは原則としてない。ただし、研究の途中で遺伝子解析結果が被験者の診療において重要と考えられる関連性が明確となった場合、本人が情報開示を希望する被験者に限り、担当医から本研究における検査方法や結果の限界などを十分に説明した上で、遺伝子解析結果を被験者本人にのみ開示することは可能である。開示した内容については診療録(カルテ)に詳細に記載する。

また、本研究により得られた成果は研究報告書、学術雑誌あるいは学会などで公表されるが、個人が特定されないように配慮される。その他、プライバシーを守ることにに関して、十分な配慮をおこなう。

### 11.4. 遺伝情報の安全管理の方法

遺伝子解析に関しては、遺伝子解析を実施する共同研究機関に検体を提供する場合は、連結可能匿名化で番号化された検体・情報が提供されるため、プライバシーの保護は厳重に守られ