

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/025923

発行日 令和1年6月6日(2019.6.6)

(43) 国際公開日 平成30年2月8日(2018.2.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	4 C 0 8 6
A 6 1 P 31/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/14	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

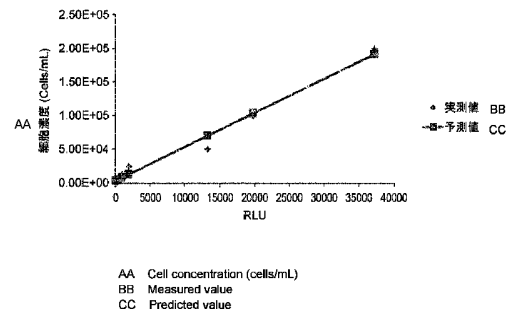
出願番号 特願2018-531956 (P2018-531956)	(71) 出願人 504258527 国立大学法人 鹿児島大学 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/028094	
(22) 国際出願日 平成29年8月2日(2017.8.2)	
(31) 優先権主張番号 特願2016-152871 (P2016-152871)	(74) 代理人 110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
(32) 優先日 平成28年8月3日(2016.8.3)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 兒玉 大介 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内
	(72) 発明者 出雲 周二 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内
	Fターム(参考) 4C086 AA02 BC42 BC50 BC82 GA07 GA08 GA10 GA12 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZB11 ZB33

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗HTLV-1剤、HTLV-1関連脊髄症(HAM/TSP)治療薬

(57) 【要約】

HTLV-1関連脊髄症(HAM/TSP)の新規な治療薬及び新規な抗HTLV-1剤を提供する。ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質を有効成分とする。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質を有効成分とするHTLV-1関連脊髄症（HAM/TSP）治療薬。

【請求項 2】

上記物質は、イマチニブ、ニロチニブ及びダサチニブからなる群から選ばれる少なくとも1つの物質であることを特徴とする請求項1記載のHTLV-1関連脊髄症（HAM/TSP）治療薬。

【請求項 3】

ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質を有効成分とする抗HTLV-1剤。 10

【請求項 4】

上記物質は、イマチニブ、ニロチニブ及びダサチニブからなる群から選ばれる少なくとも1つの物質であることを特徴とする請求項3記載の抗HTLV-1剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトTリンパ球指向性ウイルス1型を減量する抗HTLV-1剤、ヒトTリンパ球指向性ウイルスに起因する疾患であるHTLV-1関連脊髄症に対する治療薬に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトTリンパ球指向性ウイルス1型（以下、HTLV-1）は、CD4陽性Tリンパ球のゲノムDNAに組み込まれ、体内及び個体間で感染伝搬するレトロウイルスである。HTLV-1感染細胞が腫瘍化することで成人T細胞白血病（ATL）を発症し、またHTLV-1感染細胞が脊髄内に浸潤することで痙性脊髄麻痺や排尿障害をきたすHTLV-1関連脊髄症（HAM/TSP：HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis、以下HAMと称する場合もある）を発症する。さらに、HTLV-1感染細胞が眼球内に浸潤することでブドウ膜炎（HU）を発症することもある。

【0003】

上述したHTLV-1に起因する各種疾患のうちHAMについては、HTLV-1感染細胞が脊髄内に浸潤して炎症を起こすことがきっかけとなること以外、発症メカニズムは不明である。現在、HAMに対しては、根治療法は未樹立であり、病気の進行の早さや炎症の強さに応じて、炎症を抑える治療が行われる。炎症が強い場合は症状が進行する可能性が高いので、ステロイド療法、インターフェロン・アルファ注射療法等の治療が選択され、炎症を抑えて脊髄が壊れるのを防止している。具体的には、抗炎症薬として副腎皮質ステロイド（プレドニゾロン：Predonisolone）の経口投与で、ある程度のプロウイルス量が減少し、症状改善効果が確認されている。しかしながら、多くの場合、当該治療方法では、完治することができず投薬中止によるリバウンドなどの問題もある。さらに、当該知慮方法にはステロイド糖尿病、骨粗鬆症及び免疫抑制等の副作用もある。 30

【0004】

以上のように、HTLV-1に起因するHAMには、根治治療を可能とする治療薬が求められていた。例えば、特許文献1には、ヒトCXCL10に特異的に結合する抗ヒトCXCL10抗体または前記抗体の断片を含む、HTLV-1関連脊髄症の治療薬が開示されている。 40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2013-119531号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、HTLV-1関連脊髄症患者での主感染巣である末梢CD4+T細胞でのシグナル伝達を解明し、得られた知見に基づいてHTLV-1関連脊髄症の新規な治療薬を提供すること、更にHTLV-1関連脊髄症の原因となるHTLV-1を減量する抗HTLV-1剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上述した目的を達成するため、本発明者らが鋭意検討した結果、HTLV-1関連脊髄症患者由来のCD4+T細胞を用いたパスウェイ解析等により、HTLV-1関連脊髄症患者由来のCD4+T細胞において特異的に発現するパスウェイに關与するチロシンキナーゼABL1を同定し、ABL1阻害薬がHTLV-1関連脊髄症患者由来のCD4+T細胞を特異的に死滅できることを見いだした。さらに、ABL1阻害薬が無症候性キャリア(Asymptomatic carrier: AC)由来のCD4+T細胞をも特異的に死滅でき、無症候性キャリア等に対してウイルス量の減量を可能とする抗ウイルス剤として利用できることを見いだした。本は発明者らは、これら新たな知見に基づいて、本発明を完成するに至った。

10

【0008】

本発明は以下を包含する。

【0009】

(1) ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質を有効成分とするHTLV-1関連脊髄症(HAM/TSP)治療薬。

【0010】

(2) 上記物質は、イマチニブ、ニロチニブ及びダサチニブからなる群から選ばれる少なくとも1つの物質であることを特徴とする(1)記載のHTLV-1関連脊髄症(HAM/TSP)治療薬。

20

【0011】

(3) ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質を有効成分とする抗HTLV-1剤。

【0012】

(4) 上記物質は、イマチニブ、ニロチニブ及びダサチニブからなる群から選ばれる少なくとも1つの物質であることを特徴とする(3)記載の抗HTLV-1剤。

【0013】

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2016-152871号の開示内容を包含する。

30

【発明の効果】

【0014】

本発明により、従来、有効な治療薬が無かったHTLV-1関連脊髄症に対する有効な治療剤を提供することができる。

【0015】

また、本発明により、HTLV-1関連脊髄症の原因となるHTLV-1を減量する抗HTLV-1剤を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

40

【0016】

【図1】CellTiter-Fluor Cell Viability Assay(Promega)で測定したヒトPBMCの細胞濃度(Y)とRelative live cell signal (RLU) (X)の単回帰分析を行った結果を示す特性図である。

【図2】ABL1阻害薬(イマチニブ及びニロチニブ)による細胞生存率に対する効果を示す特性図である。

【図3】HAM、NC由来CD4+T細胞、非CD4 PBMCのin vitro培養時の細胞濃度の経時的変化を示す特性図である。

【図4】HAM患者由来CD4+T細胞を用いたマイクロアレイデータの3群分割プロトコールによるHAM特異的有意差発現遺伝子の同定方法のフローチャートである。

50

【図5】HAM、AC、NCにおける遺伝子発現パターンとHAM病態における細胞性遺伝子の意義の対応を示す特性図である

【図6】HAMでのみ高発現となっているHAM病態特異的責任遺伝子として同定された遺伝子を列挙した特性図である。

【図7】HAMでのみ高発現となっているHAM病態特異的責任遺伝子として同定された遺伝子を列挙した特性図である。

【図8】HAMでのみ高発現となっているHAM病態特異的責任遺伝子として同定された遺伝子を列挙した特性図である。

【図9】HAMでのみ高発現となっているHAM病態特異的責任遺伝子として同定された遺伝子を列挙した特性図である。

10

【図10】HAMでのみ高発現となっているHAM病態特異的責任遺伝子として同定された遺伝子を列挙した特性図である。

【図11】HAMでのみ高発現となっているHAM病態特異的責任遺伝子として同定された遺伝子を列挙した特性図である。

【図12】パスウェイ解析及びHAM病態特異的パスウェイの同定方法のフローチャートである。

【図13】実験例1で同定したHAM病態特異的パスウェイの一覧を示す特性図である。

【図14】 C_{Drug} とABL1阻害薬処理との関係を示す特性図である。

【図15】 C_{Drug} とイマチニブ濃度との関係を示す特性図である。

【図16】 C_{Drug} とニロチニブ濃度との関係を示す特性図である。

20

【図17】 C_{Drug} とIC50におけるイマチニブ及びニロチニブとの関係を示す特性図である。

【図18】 C_{Drug} とCmaxにおけるイマチニブ及びニロチニブとの関係を示す特性図である。

【図19】生細胞中pXコピー減少率とABL1阻害薬処理との関係を示す特性図である。

【図20】生細胞中pXコピー減少率とイマチニブ濃度との関係を示す特性図である。

【図21】生細胞中pXコピー減少率とニロチニブ濃度との関係を示す特性図である。

【図22】生細胞中pXコピー減少率とIC50におけるイマチニブ及びニロチニブとの関係を示す特性図である。

【図23】生細胞中pXコピー減少率とCmaxにおけるイマチニブ及びニロチニブとの関係を示す特性図である。

30

【図24】PMA viability PCRにおける増幅回数(サイクル数) - 増幅産物量(実数)との関係を示す特性図である。

【図25】PMA viability PCRにおける C と遺伝子相対発現コピー数(log表示)との関係を例示的に示す特性図である。

【図26】PMA-HTLV-1 viability PCRによるHTLV-1感染細胞傷害性薬物のアッセイにおける増幅回数(サイクル数) - 増幅産物量(実数)との関係を示す特性図である。

【図27】PMA-HTLV-1 viability PCRによるHTLV-1感染細胞傷害性薬物のアッセイにおける C と遺伝子相対発現コピー数(log表示)との関係を例示的に示す特性図である。

【図28】NC及びAC由来CD4+T細胞に対するABL1阻害薬(イマチニブ及びニロチニブ)による細胞生存率に対する効果を示す特性図である。図中有、A及びBはCD4+T細胞に関して、C及びDは非CD4-PBMCに関して、ABL1阻害薬処理24時間後の生細胞比を示す。

40

【図29】AC由来CD4+T細胞の生細胞中pXコピー減少率とABL1阻害薬処理時間との関係を示す特性図である。図中、棒グラフ上のアスタリスクはT=0hとの間での有意差を示し、棒グラフ上の横棒は両端が示す棒グラフ間での有意差を示す。

【図30】AC由来CD4+T細胞における生細胞中pXコピー減少率とイマチニブ濃度との関係を示す特性図である。図中、棒グラフ上の横棒は両端が示す棒グラフ間での有意差を示す。

【図31】AC由来CD4+T細胞における生細胞中pXコピー減少率を薬剤間で比較した結果を示す特性図である。図中、AはABL1阻害薬それぞれのIC50濃度、Bは添付文書中のCmax濃度

50

で検討したものである。 図中、棒グラフ上の横棒は両端が示す棒グラフ間での有意差を示す。

【図32】生細胞中pXコピー減少率の効果をHAM由来CD4+T細胞とAC由来CD4+T細胞とで比較した結果を示す特性図である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0018】

本発明では、ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質がHTLV-1に感染したCD4+T細胞を特異的に死滅させる効果を有するとの知見を、HTLV-1関連脊髄症患者由来のCD4+T細胞及び無症候性キャリア(Asymptomatic carrier: AC)由来のCD4+T細胞において見いだしている。すなわち、ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質は、HTLV-1関連脊髄症患者に対してHTLV-1関連脊髄症の治療目的で投与されるHTLV-1関連脊髄症治療薬として利用することができ、また、HTLV-1に関する無症候性キャリアに対してウイルス量減量を目的として投与される抗HTLV-1剤として利用することができる。なお、本発明に係るHTLV-1関連脊髄症治療薬は、HTLV-1関連脊髄症に対する治療効果とともに、HTLV-1に感染したCD4+T細胞を特異的に死滅させることによるウイルス量低減の効果も示す。

10

【0019】

すなわち、本発明に係るHTLV-1関連脊髄症治療薬及び抗HTLV-1剤は、ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質を有効成分として含む。本発明に係るHTLV-1関連脊髄症治療薬及び抗HTLV-1剤は、HTLV-1に感染したCD4+T細胞に対して特異的に死滅させる効果を示すものである。

20

【0020】

ABL1遺伝子は、NCBIデータベースにアクセッション番号：NM_005157(NP_005148.2)及びNM_007313(NP_009297.2)として塩基配列及びアミノ酸配列が登録されている。ただし、ABL1遺伝子は、これらデータベースに登録された具体的な塩基配列及びアミノ酸配列に限定されることなく、公知の一塩基多型等の多型により、データベースに登録された具体的な塩基配列及びアミノ酸配列と異なる場合もある。

【0021】

ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質とは、特に限定されず、例えば、当該チロシンキナーゼの産生及び/又は活性を抑制する薬物や、当該チロシンキナーゼの分解及び/又は不活性化を促進する薬物などが含まれる。当該チロシンキナーゼの産生を抑制する物質としては、特に限定されないが、例えば当該チロシンキナーゼをコードするABL1遺伝子に対するRNAi分子、リボザイム、アンチセンス核酸、DNA/RNAキメラポリヌクレオチド及びこれらを発現するベクター等が挙げられる。

30

【0022】

また、当該チロシンキナーゼを阻害する物質としては、当該チロシンキナーゼに対して作用する化合物を使用することができる。このような化合物としては、有機化合物(アミノ酸、ポリペプチド又はその誘導体、低分子化合物、糖、高分子化合物等)、無機化合物等を使用することができる。また、このような化合物は、天然物質及び非天然物質のいずれであってもよい。ポリペプチドの誘導体としては、修飾基を付加して得られた修飾ポリペプチド、アミノ酸残基を改変することにより得られたバリエーションポリペプチド等が挙げられる。さらに、このような化合物は、単一化合物であってもよいが、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産物、海洋生物抽出物、植物抽出物等であってもよい。

40

【0023】

具体的に、ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質としては、特に限定されないが、イマチニブ、ニロチニブ及びダサチニブ等を挙げることができる。これらイマチニブ、ニロチニブ及びダサチニブについては、チロシンキナーゼ阻害薬(TK

50

1)として公知であり、例えば慢性骨髄性白血病の治療薬として使用されている。ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質としては、これらイマチニブ、ニロチニブ及びダサチニブに限定されず、現在においてTKIとして開発中の物質或いは慢性骨髄性白血病の治療薬として治験中の物質を使用することもできる。

【0024】

所定の物質がABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する機能を有するか否かは、定法に従って判定することができる。例えば、ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを含む溶液に供試化合物を添加し、25℃で30分間プレインキュベートする。ピオチン化標識基質ペプチド (poly Glu-Tyr) とATPをプレインキュベート液に加え、25℃で30分間リン酸化反応行わせる。EDTA添加により反応を停止させ、アビジンでコートされた96ウェルプレートに反応液を加えてピオチン化基質を結合させる。基質のリン酸化レベルを、抗リン酸化チロシン抗体を用いたELISAによって測定する。本評価系では、ポジティブコントロールとしてイマチニブを用いることが好ましい。このELISAの結果により、供試化合物におけるチロシンキナーゼ阻害活性をイマチニブと比較して評価することができる。

10

【0025】

また、これら公知の化合物以外でも、ABL1遺伝子の発現又は当該チロシンキナーゼ活性を抑制する物質、以下の(1)～(3)をHTLV-1関連脊髄症治療薬及び抗HTLV-1剤とすることができる。

20

【0026】

(1) ABL1遺伝子の翻訳を抑制可能な物質

(1-1) 二本鎖RNA

ABL1遺伝子の翻訳を抑制するために、RNA干渉(RNA interference)を利用することが可能である。具体的には、標的とするABL1遺伝子の塩基配列に相補的な二本鎖RNAを細胞内に導入するとABL1遺伝子のmRNAが分解されて、結果としてその細胞での遺伝子発現が特異的に抑制されることとなる。この手法は、哺乳動物細胞などにおいても確認されている(Hannon, G.J., Nature (2002) 418, 244-251 (review); 特表2002-516062号公報; 特表平8-506734号公報)。ABL1遺伝子に対する二本鎖RNA(dsRNA)分子の設計及び作製、その投与方法などの詳細については定法を参照することができる。

30

【0027】

(1-2) アンチセンス法

また、ABL1遺伝子の翻訳を抑制する手段としては、いわゆるアンチセンス核酸を用いる方法が挙げられる。すなわち、ABL1遺伝子のmRNAに対するアンチセンスRNAを転写するDNAを、プラスミドとして導入するか又は被験者のゲノムに組み込み、当該アンチセンスRNAを過剰発現させることで、ABL1遺伝子のmRNAの翻訳が抑制される。アンチセンスRNAに関する技術は、例えば哺乳動物を宿主とした場合でも知られている(Han et al.(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4313-4317; Hackett et al.(2000) Plant Physiol., 124, 1079-86)。

【0028】

(2) ABL1遺伝子の転写を抑制可能な物質

ABL1遺伝子の転写を抑制する物質としては、対象となる被験者における当該遺伝子の転写プロモーター領域を転写抑制型プロモーターと置換するために用いることが可能な発現ベクターが挙げられる。また、ABL1遺伝子の転写を抑制する手段としては、当該遺伝子の転写に関わる領域に転写抑制活性のある塩基配列を挿入するための発現ベクターを用いてもよい。上記のような発現ベクターの設計及び調製は当業者には周知である。

40

【0029】

(3) ABL1遺伝子がコードするチロシンキナーゼに対する抗体

当該チロシンキナーゼに対する抗体は、チロシンキナーゼと特異的に結合することにより、該チロシンキナーゼのキナーゼ活性を抑制することができる。チロシンキナーゼに対する抗体は、当技術分野で公知の抗体作製方法によって作製することができる。簡単に説

50

明すると、チロシンキナーゼの全長タンパク質又はその部分ペプチドを用いて免疫原を調製し、免疫原を適当な動物（マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、トリなど）に適当な回数で投与することにより、該動物においてチロシンキナーゼに対する抗体を誘起することができる。免疫した動物から抗血清を採取することによりポリクローナル抗体を得ることができる。また免疫した動物の脾細胞又は抗体産生細胞を不死化細胞（ミエローム細胞など）と融合してハイブリドーマを作製し、目的の抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、該ハイブリドーマから抗体を採取することによってモノクローナル抗体を得ることができる。その他、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体フラグメントなども用いることができ、それらは全て当技術分野で公知の方法に従って作製することができる。

【0030】

上述したABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質は、HTLV-1関連脊髄症患者由来のCD4+T細胞において有意に発現亢進している遺伝子を含むパスウェイに対して抑制的に作用することで、HTLV-1関連脊髄症を治療することができるものである。

【0031】

本発明の治療剤は、HTLV-1関連脊髄症を罹患している被験体、及びHTLV-1関連脊髄症の罹患が疑われる被験体に投与することができる。被験体は、例えば哺乳動物及び鳥類動物を含む動物でありうる。例えば、哺乳動物としては、ヒト、実験動物（マウス、ラット、サル、ウサギ、チンパンジー等）、ペット動物（ネコ、イヌ等）、家畜動物（ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ等）が挙げられる。

【0032】

また、本発明の治療剤による治療の成果は、投与された被験体に少なくとも健康に良い効果をもたらすことであり、好ましくはHTLV-1関連脊髄症の少なくとも1つの症状を軽減若しくは緩和すること、又はHTLV-1関連脊髄症の進行若しくは再発を阻止することなどである。そのようなHTLV-1関連脊髄症の症状としては、限定されるものではないが、歩行障害；頻尿、排尿困難、尿失禁及び慢性便秘等の排尿排便障害；感覚障害；発汗障害；起立性低血圧によるめまい及びインポテンツ等の自律神経症状；手指振戦；運動失調；軽度の痴呆；両下肢痙性不全麻痺等を挙げることができる。

【0033】

本発明の抗HTLV-1剤は、HTLV-1関連脊髄症を発症していない被験体（すなわち、HTLV-1を保有している無症候性キャリア（Asymptomatic carrier: AC））に投与することができる。なお、本発明の抗HTLV-1剤は、HTLV-1関連脊髄症を罹患している被験体、及びHTLV-1関連脊髄症の罹患が疑われる被験体に投与して、ウイルス量の低減を図っても良い。被験体は、例えば哺乳動物及び鳥類動物を含む動物でありうる。例えば、哺乳動物としては、ヒト、実験動物（マウス、ラット、サル、ウサギ、チンパンジー等）、ペット動物（ネコ、イヌ等）、家畜動物（ウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ等）が挙げられる。

【0034】

また、本発明の抗HTLV-1剤は、無症候性キャリアに投与された場合、HTLV-1プロウイルス量（PVL）、特に生細胞のみにおけるPVLに基づいて評価できる、ウイルス量低減効果を奏する。その結果、HTLV-1に関する無症候性キャリアがHTLV-1関連脊髄症や成人T細胞白血病（ATL）へ進展することを阻止することができる。

【0035】

特に、HTLV-1関連脊髄症では、無症候性キャリアより有意にプロウイルス量が高いこと（Nagai M. J.NeuroVirol 1998.4:586-593.）、高プロウイルス量を呈するがHTLV-1関連脊髄症や成人T細胞白血病（ATL）には至っていない無症候性キャリア症例があることが知られていた。近年、高プロウイルス量の無症候性キャリア症例からHTLV-1関連脊髄症への進展が多く予後因子となりうるという報告（Martins ML. et al. J.NeuroVirol. 2017. 23(1):125-133.）や、疫学調査により高プロウイルス量（4.17-28.58 copies/100 PBMCs）の無症候性キャリア群から成人T細胞白血病（ATL）発症が報告されており（Iwanaga M. et al. Blood 2010. 116(8):1211-9.）、無症候性キャリアであっても何らかの治療的介入

10

20

30

40

50

を行うべき症例があることがコンセンサスになりつつある。

【0036】

抗ウイルス薬がほとんどないHTLV-1関連疾患の現状において、本発明に係る抗HTLV-1剤は有力な抗ウイルス療法の手段となる。

【0037】

本発明の治療剤及び抗HTLV-1剤は、1以上の薬学的に許容される担体又は賦形剤を用いて慣用的に製剤化することができる。例えば、本発明の治療剤及び抗HTLV-1剤は、経鼻投与、経口投与、直腸投与、注射による投与などにより投与するための組成物に製剤化しうる。また、投与は全身性又は局所的のいずれであってもよい。

【0038】

本発明の治療剤及び抗HTLV-1剤は、その投与経路に応じて、液剤、懸濁剤、乳剤、錠剤、丸薬、ペレット、カプセル剤、散剤、徐放性製剤、坐剤、エアロゾル、スプレーなど、使用に適したいかなる他の剤形であってもよい。

【0039】

経鼻投与では、有効成分を、適当な溶媒（生理食塩水、アルコールなど）に溶解し、その溶液を鼻に注入又は点鼻することによって送達することができる。あるいは、経鼻又は吸入による投与では、有効成分を、適切な噴霧剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、又はその他の適切な気体を用いて、加圧バック又はネプライザからエアロゾルスプレーを噴出させる形で都合良く送達することができる。加圧エアロゾルの場合、投薬単位は、計量分が送達されるように弁を設けることにより決定することができる。

【0040】

注射の場合、有効成分は、例えばボラス注射又は連続注入による非経口投与（すなわち静脈内又は筋肉内投与）用に溶剤として処方することができ、好ましくはハンス液やリンガー液、生理食塩水などの、生理学的に適合性のある緩衝液として処方することができる。この溶剤は、懸濁剤や安定剤、及び/又は分散剤などの、処方可可能な薬剤を含有してよい。あるいは有効成分は、使用前に、例えば滅菌した発熱性物質を含まない水などの適切な賦形剤と共に再構成するために、粉末形態にすることができる。注射用製剤は、保存剤を添加して、例えばアンプル又は複数回投与容器中の単位投与剤形として提供することができる。

【0041】

経口投与する場合には、本発明の治療剤及び抗HTLV-1剤は、例えば錠剤、ロゼンジ、水性又は油性懸濁液、顆粒、散剤、乳剤、カプセル、シロップ、又はエリキシルの形態であり得る。錠剤又は丸薬形態の場合は、胃腸管内での分散及び吸収を遅延させ、それにより長時間持続した作用をもたらすために、組成物をコーティングすることができる。

【0042】

その他の投与経路に適した製剤の形態及び製剤化方法は、当技術分野で公知であり、それらの任意の形態及び製剤化方法を用いて本発明の治療剤及び抗HTLV-1剤を製造することができる。

【0043】

薬学的に許容される担体又は賦形剤としては、限定されるものではないが、液体（例えば水、油、生理食塩水、デキストロス水溶液、エタノールなど）、固体（例えばアカシアガム、ゼラチン、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、タルク、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、ケラチン、コロイド状シリカ、乾燥脱脂乳、グリセロールなど）が挙げられる。また、本発明の治療剤は、通常の医薬組成物に配合される補助剤、防腐剤、安定化剤、濃化剤、潤滑剤、着色剤、湿潤剤、乳化剤、及びpH緩衝剤などのうち適当なものを含ってもよい。

【0044】

本発明の治療剤及び抗HTLV-1剤は、ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質を有効量で含有する。有効量とは、治療対象の被験体に健康に良い効果をも

10

20

30

40

50

たらずのに十分な有効成分の量を意味する。

【0045】

本発明の治療剤及び抗HTLV-1剤の毒性及び治療効力は、例えばLD50（集団の50%が致死となる量）及びED50（集団の50%に対して治療上有効な量）を決定するため、標準的な手順により、細胞培養物又は実験動物において決定することができる。毒性作用を示す用量と治療効果を示す用量の比は治療インデックスであり、比LD/EDとして表すことができる。

【0046】

治療インデックスが高い治療剤及び抗HTLV-1剤が好ましく、毒性が高い場合には、治療剤及び抗HTLV-1剤が罹患組織の部位に標的化するような送達系を設計して、非罹患細胞が受ける可能性のある損傷を最小限に抑え、それにより副作用を低減することに注意すべきである。

10

【0047】

細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータを用いて、ヒトにおける使用のための用量範囲を決定しうる。そのような治療剤及び抗HTLV-1剤の投与量は、ほとんど又は全く毒性のないED50を含む循環血漿濃度の範囲内であることが好ましい。投与量は、この範囲内で、使用する投与剤形、及び採用する投与経路に応じて異なる。本発明の治療剤及び抗HTLV-1剤については、まず細胞培養アッセイから有効量を推定しうる。細胞培養で決定したIC50（すなわち、症状の最大半分の抑制を達成する試験治療剤の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するように、動物モデルにおいて決定しうる。このような情報は、ヒトにおける有効量をより詳細に決定するために用いることができる。血漿中のレベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定することができる。

20

【0048】

被験体の症状及び年齢、並びに/又は投与経路に応じて、当業者であれば、本発明の治療剤及び抗HTLV-1剤の適切な用量を選択することができる。例えば、本発明の治療剤及び抗HTLV-1剤にイマチニブを使用する場合、慢性骨髄性白血病に対する治療と同様の投薬量とすることができる。

【実施例】

【0049】

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

30

〔実施例1〕

後述する実験例1に示したように、HTLV-1関連脊髄症（HTLV-1-associated myelopathy：HAM）患者由来のCD4+T細胞を用いたマイクロアレイ解析及びパスウェイ解析により、HAM患者由来のCD4+T細胞では、有意に発現亢進している遺伝子を含むパスウェイとして、ABL1遺伝子を含むパスウェイを同定した。そこで、本実施例では、ABL1遺伝子がコードするチロシンキナーゼの阻害剤であるイマチニブ（グリベック）及びニロチニブ（タシグナ）を使用し、これら薬剤のHAM患者由来CD4+T細胞に対する影響を検討した。

【0050】

< 検討方法 >

40

[1] CellTiter-Fluor Cell Viability Assay (G6080, Promega社製)を用いたヒトPBMCの細胞濃度測定（アッセイ感度決定）（Technical Bulletin (#TB371). CellTiter-Fluor Cell Viability Assay. Instructions for use of Products G6080, G6081 and G6082 (Promega). 本キットは、生細胞プロテアーゼの基質である細胞膜透過性の蛍光ペプチド glycyphenylalanyl-aminofluoro coumarin (GF-AFC, Ex400/Em505nm)を用いて生細胞数に比例する生細胞プロテアーゼによるGF-AFC基質の開裂による蛍光を定量するキットである。）

【0051】

(1) プロトコール

(1-1) 細胞の洗浄：比較的新鮮な陰性対照者（negative controls: NC）由来末梢血

50

単核球 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) 検体 (液体窒素中凍結保存細胞 1×10^7 個) を 37 °C 湯浴で溶解し PBS10mL を入れた 15mL チューブに移し、 $300 \times g$ 、10 分間遠沈し洗浄した。上清を捨て、ペレットのみとしたチューブの底部を金網上で擦過し、PBS10mL を入れて同様にもう 1 回洗浄した。そして、PBS 1mL で懸濁して氷上に置いた。

【 0 0 5 2 】

(1 - 2) 血球計算盤による細胞濃度の決定と細胞検体の濃度の調製 : ビュルカー-チュルク (Burker-Turk) 血球計算盤、Trypan Blue 0.4% 溶液 (T8154, シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社製) とトリパンブルー除外テストを用いて生細胞濃度を決定し、生細胞数の濃度を、10% 非働化 Fetal bovine serum (#10437028, Thermo Fisher Scientific 社製) および 1% penicillin-streptomycin (#15140122, Thermo Fisher Scientific 社製) を添加した RPMI1640 培地 (#189-02025 和光純薬工業社製) 中で 40 万個 (4×10^5 個) cells/mL (培地) となるように希釈した。

10

【 0 0 5 3 】

(1 - 3) 384 ウェルプレートへのプレーティング : Nunc 384-well clear polystyrene plate with non-treated surface (#242765, Thermo Fisher Scientific 社製) のような 384 ウェルプレートを準備し、A 行及び B 行の 1~3 列、7~9 列の合計 6 列の 12 ウェルに細胞濃度 5×10^5 cells/mL (培地) に調製した細胞懸濁液 20 μ L (1×10^4 個) をマルチチャンネルピペッターでピペティングして入れた。

【 0 0 5 4 】

次に B~H 行、1~3 列、7~9 列に前出の培地 25 μ L を入れた。B 行は細胞懸濁液と培地が両方入り 20 μ L になっているが、マルチチャンネルで泡立てないようにピペティングし、B 行から C 行へ各列とも 10 μ L ずつ移した。同様に C 行から D 行、D 行から E 行といった具合に G 行まで 10 μ L を上の行から下の行へ移した。G 行からは 10 μ L 吸って廃棄した。H 行には G 行からの細胞懸濁液は入れずに No cell control とした。

20

【 0 0 5 5 】

以上の操作により A~G 及び H 行の細胞濃度はそれぞれ 10,000 個、5,000 個、2,500 個、1,250 個、625 個、312.5 個、156.25 個、0 個 (No cell control) となり、ウェル内の液量はすべて 10 μ L となる。

【 0 0 5 6 】

(1 - 4) ジギトニンによる細胞の殺処理 : 細胞溶解性の detergent であるジギトニン (digitonin) (Calbiochem # 300410, Merck-Millipore 社製) の 20mg/mL in DMSO (043-07216, 和光純薬工業社製) 溶液を調製し、ストック液とした。これをさらに DMSO で希釈し、300 μ g/mL のジギトニン溶液ワーキング溶液としておく。ジギトニン・ワーキング溶液 2.5 μ L を先述の 384 ウェルプレートの A~H 行の 7~9 列のウェルに各々入れた。これが死細胞の蛍光シグナルとなる。

30

【 0 0 5 7 】

ジギトニン未処理サンプル (対照) として A~H 行の 1~3 列の各々のウェルには液量を標準化するため double distilled water (D2W) 2.5 μ L を入れた。これにより、全ウェル内の液量は 12.5 μ L となる。

【 0 0 5 8 】

(1 - 5) CellTiter-Fluor 2x 試薬の添加 : A~H 行の 1~3 行と 7~9 列の全ウェルに CellTiter-Fluor 2x 試薬 (2x Reagent) (G6080, Promega 社製) を 12.5 μ L ずつ入れた。つまり、ウェル内の容量 12.5 μ L と 2x 試薬の容量比は 1 : 1 で混合した。

40

【 0 0 5 9 】

短時間オービタルシェーカーに載せて混合した後、37 °C インキュベーター中で 30 分間インキュベートした。なお、GF-AFC 基質と Assay Buffer を容量比 1 : 1000 で基質が完全に溶解するまでボルテックスして溶解させたものが 2x Reagent である。

【 0 0 6 0 】

(1 - 6) 蛍光測定 : TECAN Infinite 200M (Tecan Japan 社製) で蛍光 (Ex400/Em505nm) を測定した。

50

【 0 0 6 1 】

(1 - 7) 蛍光シグナルと細胞濃度の回帰分析：上記 (1 - 6) で測定した、生細胞シグナル (未処理サンプル) と死細胞シグナル (処理サンプル) を用いて下記式により希釈度 (細胞濃度) 毎に生細胞シグナル比を算出した。

Relative Live cell signal (RLU)=[生細胞シグナル - 死細胞シグナル]/(No cell control signalの平均)

【 0 0 6 2 】

そして、細胞濃度を説明変数、生細胞シグナル比を目的変数として単回帰分析により回帰式を作製した。作成した回帰式を用いて、同じ細胞のCellTiter Fluorのシグナルから元の細胞の細胞濃度を算出した。

10

【 0 0 6 3 】

(1 - 8) 感度の算出：各々の細胞希釈度毎に (1万cells/well; 5,000 cells/well; 2,500 cells/well, etc.) シグナル-to-ノイズ (S/N比) の計算をすることにより感度を算出した。なお、アッセイ感度の実際のレベルはS/N比が3 SDよりも大きいとされる (Niles, A.L. et al. (2007) A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. Anal. Biochem. 366, 197-206) 。

Viability S:N = [未処理サンプルの平均-処理サンプルの平均] / (H-1 ~ H-3までの標準偏差)

【 0 0 6 4 】

20

(2) 結果

測定したRLUと細胞濃度との関係を表 1 に示した。

【 表 1 】

RLU	細胞濃度 (cells/mL)
37154.33	2.00E+05
19791.67	1.00E+05
13279	5.00E+04
1968	2.50E+04
998.67	1.25E+04
487	6.26E+03
163.33	3.12E+02

30

【 0 0 6 5 】

また、この結果を用いてRLUを説明変数 (X) 、細胞濃度を目的変数 (Y) として単回帰分析を行った結果、回帰式： $Y=5.092279X+2578.274$ 、 $P=2.369E-05$ 、 $R^2=0.9890997$ となった。RLU (X) と細胞濃度 (Y) の回帰式のグラフを図 1 に示した。本実施例においてPBMCの細胞濃度については、この回帰式を用いて蛍光シグナルデータから算出するものとした。

40

【 0 0 6 6 】

[2] ABL1阻害薬処理によるHAM由来CD4+T細胞の細胞死誘導効果の測定

本項では、ABL1阻害薬：イマチニブ (Imatinib、グリベックTM) 及びニロチニブ (Nilotinib) を用いてHAM患者由来PBMCを処理することで細胞死がNC由来PBMCよりも優先的に起こるかどうかを検討した。なお、本項においてイマチニブ及びニロチニブは、イマチニブの添付文書にあるCmax濃度をもとに高濃度 (5 μ M) で検討することにした。

【 0 0 6 7 】

(2 - 1) プロトコール

[検体]

50

HAM患者、陰性対照 (NC) 由来のPBMCを各6例、 5×10^6 個の液体窒素中凍結保存PBMCを準備した。

【0068】

[細胞の準備]

37 湯浴で融解したPBMCを、PBS10mLを入れた15mLチューブに移し、 $300 \times g$ 、10分間遠沈し洗浄した。上清を捨て、ペレットのみとしたチューブの底部を金網上で擦過し、PBS10mLを入れて同様に更に1回洗浄した。

【0069】

マイクロビーズと抗体カクテルを用いたCD4+T cell アイソレーションキット、ヒト (#130-096-533, Myltenyi Biotec社製) のプロトコールによりPBMCをCD4+T cell、非CD4-PBMCに分離した。分離した細胞はPBS 6.5mLに再懸濁し、チューブを氷上に置いた。 10

【0070】

[薬剤処理]

ABL1阻害薬：イマチニブ及びニロチニブによる細胞死誘導効果を、CellTiter-Fluor Cell Viability Assay(G6080, Promega社製)を用いた細胞濃度測定によって検証した。

【0071】

まず、各検体由来のCD4+T cell、非CD4-PBMCのPBS懸濁液をボルテックスしながらよく混合し、Falcon 6-well clear flat-bottom TC-treated multiwell cell culture plate with-lid (#353046, Corning Japan社製)の3 ウェルに各ウェル2,000 μ Lずつ入れた。ただし薬剤未処理、イマチニブ(終濃度5 μ M)、ニロチニブ(終濃度5 μ M)を各1ウェルずつ準備するものとする。イマチニブ及びニロチニブのストック液(DMSO溶液)は十分高濃度のものを用意し、1/1000で終濃度となるようにし、インキュベート開始時の3ウェルの細胞濃度は同一とみなした。 20

【0072】

次に37、5%CO₂下で24時間インキュベートし、24時間後に各ウェルの細胞懸濁液を全量ハーベストした。CD4+T cellの薬剤未処理ウェルの細胞懸濁液を入れたチューブをボルテックスしながらよく混合し、Nunc 384-well clear polystyrene plate with non-treated surface (#242765, Thermo Fisher Scientific社製)にHAM検体1由来CD4+T細胞懸濁液を1列A~C行に25 μ Lずつ3つ組で入れた。同様にHAM検体2由来CD4+T細胞懸濁液を2列A~C行、HAM検体3由来を3列A~C行といった順序で、最後のHAM検体6由来を6列A~C行に入れた。また、NC検体1由来を7列A~C行に入れ、同様に順に検体を入れ、最後のNC検体6由来を12列A~C行に入れた。 30

【0073】

同様に非CD4-PBMCについてもHAM検体1~6、NC検体1~6由来の細胞懸濁液を1~12列D~F行に入れた。なお、1~12列G行にはPBS25 μ LをNo cell controlとして入れた。

【0074】

その後、全ウェルにCellTiter-Fluor Reagentを25 μ L加え、短時間オービタルシェーカーに載せて混合した後、37 インキュベーターに少なくとも30分間入れて遮光下でインキュベートした。その後、TECAN Infinite 200M (Tecan Japan社製)で蛍光(Ex400/Em505nm)を測定した。 40

【0075】

一方、別なプレートを用意し、イマチニブ処理(終濃度5 μ M)したCD4+Tcell/非CD4-PBMC、さらに別なプレートでニロチニブ処理(終濃度5 μ M)したCD4+Tcell/非CD4-PBMCについてもHAM検体1~6及びNC検体1~6に関して同様に蛍光を測定した。

【0076】

そして、生細胞数(絶対値)を算出し、曝露前を100%、曝露なしの場合は24時間後(曝露ありの場合は曝露24時間後)をX%として、細胞数の%低下(%REGRESSION)を非曝露の場合、イマチニブ曝露の場合、ニロチニブ曝露の場合で比較した。

【0077】

(2-2)コントロール実験

対比するため、HAM由来CD4+T細胞、NC由来CD4+T細胞、非CD4-PBMCのin vitro培養時の細胞濃度の経時的变化を確認した。具体的にはHAM3例及びNC2例についてPBMCをCD4+T細胞、非CD4-PBMCに分離した後、各細胞を約 8×10^4 個としてRPMI1640培地2mL中（薬剤無し）で6ウェルプレートを用いて経時的に観察した。

【0078】

観察開始時（0h）、24時間後（24h）、48時間後（48h）にトリパンブルー排除法で細胞濃度を観察した。0hの濃度を100%とし、それぞれのサンプルの相対濃度で示した。

【0079】

（2-3）結果

ABL1阻害薬（イマチニブ $5 \mu\text{M}$ 又はニロチニブ $5 \mu\text{M}$ ）24時間処理による細胞生存率に対する効果を図2に示した。図2のAはCD4+T細胞におけるイマチニブ $5 \mu\text{M}$ 、24時間処理による細胞生存率に対する効果を示している。図2のBはCD4+T細胞におけるニロチニブ $5 \mu\text{M}$ 、24時間処理による細胞生存率に対する効果を示している。図2のCは非CD4-PBMCにおけるイマチニブ $5 \mu\text{M}$ 、24時間処理による細胞生存率に対する効果を示している。図2のDは非CD4-PBMCにおけるニロチニブ $5 \mu\text{M}$ 、24時間処理による細胞生存率に対する効果を示している。

【0080】

図2のA及びBで示すように、CD4+T細胞ではイマチニブ及びニロチニブともにHAM由来で有意に細胞死に陥り、一方NC由来CD4+T細胞では細胞死には陥らないことが理解できる。一方、非CD4-PBMCでは、図2C及びDに示すように、イマチニブはHAMで、ニロチニブはHAM及びNCとも細胞死が有意にみられた。

【0081】

一方、上記（2-2）で説明したコントロール実験の結果を図3に示した。図3に示すように、HAM由来の非CD4-PBMC、NC由来のCD4+T細胞及び非CD4-PBMCの細胞数は24時間後にかけて減少し、その後48時間後まで著変なかった。しかしHAM由来のCD4+T細胞は24時間後から48時間後にかけて増加する傾向があることが判る。

【0082】

（3）考察

以上から、イマチニブ及びニロチニブとも、HAM患者由来のCD4+T細胞を優先的に殺す効果を有することが明らかになった。HTLV-1感染CD4+T細胞を含むHAM患者のCD4+T細胞に対するABL1阻害薬の優先的殺傷効果は今までに報告はなく、世界初の知見である。詳細を後述するアレイデータからHAM治療標的としてのABL1遺伝子を抽出したが、この結論の正しさを裏付ける結果を示唆している。

【0083】

コントロール実験において、薬物処理なしで経時的観察をするとHAM患者由来のCD4+T細胞は薬物なしでは24時間後～48時間後には増加傾向があることを考慮すると、ABL1阻害薬による処理でHAM患者由来のCD4+T細胞が減少することは、より長い時間経時的観察をするとさらに減少効果は明らかとなる可能性がある。

【0084】

一方、非CD4-PBMCの細胞死効果については、臨床的には使わない高濃度（ $5 \mu\text{M}$ ）による副作用が疑われる。通常の臨床的に使用する濃度での細胞傷害の副作用のデータはイマチニブ及び/又はニロチニブに関する既知のデータが使用できると考えられる。

【0085】

〔実験例1〕

本実験例1では、HTLV-1関連脊髄症患者由来のCD4+T細胞を用いたマイクロアレイ解析及びパスウェイ解析により、HTLV-1関連脊髄症患者由来のCD4+T細胞において、有意に発現亢進している遺伝子を含むパスウェイを同定した。本実験の解析方法のフローチャートを図4に示した。

【0086】

<対象>

WHO診断基準により臨床診断したHTLV-1関連脊髄症患者4例、無症候性HTLV-1キャリア（

AC) 4例及びHTLV-1陰性健康者対照(NC) 4例を無作為に選んだ(表2)。なお、倫理面へ配慮し、採血及び検体保存は十分な説明と文書での同意を得て行った。本研究では患者と検体は非連結匿名化し、鹿児島大学倫理委員会の承諾を得て取得した検体を用いた。

【表2】

	HAM	AC	NC
検体数	4	4	4
性(男:女)	2:2	1:3	2:2
年齢(平均±SE)(歳)	60.0±7.4	52.3±4.9	52±13.9
プロウイルス量(copies/10 ⁴ PBMC)	2066±403.0	←*→ 325.8±155.3	-
保存期間(平均±SE)(年)	4.3±0.0	2.2±0.2**	5.1±1.1

*P=0.021(Mann-Whitney); **P=0.030(Kruskal-Wallis)

【0087】

<凍結PBMC検体からのCD4+T細胞セレクションとマイクロアレイ>

約2×10⁷個のPBMCを含む凍結検体を用い、CD4+T細胞を回収、さらにtotalRNA抽出、cDNAの合成、Cy3標識cRNAの合成と標識(Cy3-CTP, 633nm励起)、Cy3標識cRNA精製、DNAマイクロアレイ(1-color Whole Human Genome44k×4plex DNA microarray, 41,000 genes (Agilent Technologies))を用い、ハイブリダイズと洗浄を行った。その後、Agilent Microarray scannerで画像取得後、Feature Extraction Software Ver.10.5で蛍光シグナル強度を数値化したRaw dataを取得した。さらにGeneSpring GX softwareで数値データ対数変換、正規化した。

【0088】

<アレイデータの解析方法>

(1) パスウェイ解析による有意差発現遺伝子、有意なパスウェイの抽出

(1-1) 有意差発現遺伝子の基準(3群間One-way ANOVA)

NCに比べ2 fold change(up/down)以上の変動がありかつ3群間One-way ANOVA(一元配置分散分析)でp<0.01を満たす遺伝子を有意差発現遺伝子として絞り込んだ。有意差発現遺伝子をHAMのみ、ACのみ、HAM及びAC両方でそれぞれ探索した。

【0089】

(1-2) クラスタリングとHeatmap作成

HAM、AC、NCにおける遺伝子発現パターンとHAM病態における細胞性遺伝子の意義の対応を検討すると図5のようになる。図5における1)は、3群(HAM・AC・NC)×2群(発現亢進/低下)分割Venn図は、NC(陰性対照)の遺伝子発現強度を基準とするため、実際は2×2で4群に大別される。HAM_{up}、HAM_{down}、AC_{up}、AC_{down}はそれぞれ順にHAMで高発現の遺伝子、HAMで低発現の遺伝子、ACで高発現の遺伝子、ACで低発現の遺伝子の集合を示す。添字のup(高発現)、down(低発現)で示す集合を図4のVenn図では下線付き、下線無しで示している。なお、アレイデータをクラスタリング(クラスター解析)しHeatmapを作成した。

【0090】

(1-3) 3群(HAM・AC・NC)×2群(高/低発現)分割Venn図とHeatmapを対応させた新規3群分割プロトコル(Trichotomy protocol)

さらに、ウイルス感染のような3群間比較による発現変動遺伝子をVenn図で表示するために新規に考案した3群(HAM・AC・NC)×2群(高/低発現)分割Venn図をさらに作成した。

【0091】

HAM、AC、NCでの遺伝子発現パターンとHAM病態における細胞性遺伝子の意義の対応を、Heatmapと3群(HAM・AC・NC)×2群(高/低発現)分割Venn図へのマッピングへの手順に置き換えることにより、HAMでのみ高発現となっている遺伝子をHAM病態特異的責任遺伝子として、Venn図における

10

20

30

40

50

【数1】

$$\text{HAM}_{\text{up}} \cap \overline{\text{AC}_{\text{up}}} \cap \overline{\text{AC}_{\text{down}}}$$

の部分として177遺伝子を同定した。同定した遺伝子を図6~11に示した。

【0092】

なお、本項で採用した3群間比較による一連の病態特異的責任遺伝子の抽出方法は、2群間のt検定による比較とは異なる新しい方法であり、3群間分割プロトコール(Trichotomy protocol)と呼称する。

【0093】

(1-4) パスウェイ解析

パスウェイ解析のワークフローを図12に示した。有意差発現遺伝子をパスウェイ解析ソフトウェアExPlainと文献情報からキュレーター(curator)により整備されたパスウェイデータベースTRANSPATH(いずれもBIOBASE GmbH社製)を用いて少なくとも2つ以上の遺伝子が含まれる(#Hits in groupが2個以上)パスウェイを有意($P < 0.05$)とした。

【0094】

(2) 上流解析

(2-1) 転写因子結合サイト検索

転写因子結合サイト(エレメント)のデータベースTRANSPROを用い、有意差変動遺伝子のプロモーターウィンドウ(-1000~+100)を比較・検索し、重み付きのコンセンサス配列を算出し、上流の転写因子を予想した。変化のある遺伝子群(Yes-set):fold change ≥ 2.0 とし、変化のない遺伝子群(No-set):fold change < 1.1 であり、かつHAM、AC及びNC群で共通して変動がない遺伝子群を探索するため、変動係数(Coefficient of variation (C.V.))、標準偏差を算術平均で割り(下記式)、相対的なばらつきを表す単位の無い数)が下位300個の遺伝子を採用した。

【数2】

$$\text{C.V.} = \frac{\sqrt{\sigma^2}}{\bar{x}}$$

【0095】

また、Yes/Noサイト頻度比 > 1.5 、Yes-set中の結合サイト存在数に対する偶然の確率($P < 0.05$)、Yes-set中のプロモーター数に対する偶然の確率($p < 0.05$)を満たすものを転写因子結合サイトとした。

【0096】

(2-2) キーノード(Key node)解析

Yes-setで発現/制御応答を含むエッジを最大6つまで遡るキーノードをFDR(False Discovery Rate) < 0.05 で検索した。

【0097】

(2-3) キーノード遺伝子によるパスウェイ解析

2つ以上のキーノードを持つ(#Hits in groupが2個以上)パスウェイをTRANSPATHデータベースから抽出した($p < 0.05$)。

【0098】

(3) 研究結果

(3-1) 有意差発現変動遺伝子

HAMのみ、ACのみ、HAM及びAC両方で、特異的な有意差発現変動遺伝子をそれぞれ181個(うち高発現遺伝子177;低発現遺伝子4)、65個(うち高発現遺伝子19;低発現遺伝子46)及び56個(うち高発現遺伝子56;低発現遺伝子0)見出した。

【0099】

(3-2) 有意差発現遺伝子によるパスウェイの特徴

HAMでは有意な($p < 0.05$)パスウェイは12個みられたが、TGF- β /SMADに關与する1つを除

10

20

30

40

50

いた11個すべてCaspaseによるアポトーシス制御に関与するものであった。これら11個の経路すべてに同一遺伝子であるABL1(ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase, Gene ID:25) が関与していた(図13)。なお、図13において、項目「Pathway ID of TRANSPATH database」は、文献報告の存在するものを人手による判断(curate)を経て作成されたシグナル伝達経路(パスウェイ)のデータベースであるTRANSPATHデータベース(BIOBASE GmbH社製)のIDである。図13において、分子名の略語は以下を意味している。

ABL-1a: c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase isoform a;

ABL-1b: isoform b;

TOPBP1: DNA topoisomerase II binding protein 1;

RAD52: DNA repair protein RAD52 homolog (S. cerevisiae) ;

p73 : tumor protein p73 isoform ;

Ubc9: UBE21 (ubiquitin-conjugating enzyme E21) ;

Ran: GTP-binding Ran (ras-related nuclear protein);

Smurf-1: E3 ubiquitin-protein ligase SMURF1;

clAP-2: BIRC3 (a member of IAP family that inhibit apoptosis by binding TRAF1 and 2)

【0100】

また、図13において、項目「#Hits in group」は、パスウェイ内に存在する遺伝子リスト中の遺伝子数を意味している。図13において項目「Group size」はパスウェイ内に存在する遺伝子、タンパク質、代謝物質などの全体の数を意味している。図13において項目「#Hits expected」は遺伝子リストに偶然含まれる可能性のある遺伝子数を意味している。図13において項目「P-value」は、パスウェイ内に存在する遺伝子リスト中の遺伝子が偶然含まれる可能性を含まれる場合、含まれない場合の2×2分割表について行・列要因の独立性をFisher正確性両側検定(Two-tailed Fisher's exact test) で検定した値を意味している。なお、図13には、 $P < 0.05$ の有意のパスウェイをP値が小さい順にHAM病態特異的パスウェイとして示している。

【0101】

ACではCaspaseよりも上流にある細胞性ストレス関連のMAPK経路の遺伝子を含む2個の有意なパスウェイが抽出された(詳細は省略)。また、HAM・ACで共通した有意な(2個以上の遺伝子がヒットする)パスウェイは認められなかった。

【0102】

(3-3) 上流解析

(3-3-1) 転写因子結合サイト検索

HAM特異的遺伝子プロモーター領域、AC特異的遺伝子プロモーター領域からコンセンサス配列を作成し、転写因子結合サイトのデータベースと照合したところ、HAMでは56個、ACでは21個の転写因子が変動発現遺伝子上流に予想された。HTLV-1との関連をデータベースで検索すると、HAMではHTLV-1との関連が既知のもの(C/EBP, ATF2(CREB2), GATA1, 3など)を除くとほとんど関連が知られていない転写因子であり、HAM及びACに共通したものが散見された(詳細は省略)。

【0103】

(3-3-2) キーノード解析

HAM特異的遺伝子群から予想したキーノード解析では、CREBのリン酸化キナーゼのひとつCaMKII、アポトーシス関連遺伝子(Fas, Daxx)、TGF- β R、Jak1・2、p38MAPK、HTLV-1との関連が知られているアダプター分子Crk、またインスリン受容体(InsR)など23個が抽出された。

【0104】

ACのキーノード解析では、IFN- γ 1、IL-4R、IL-10R、IL-22Rなどサイトカインと受容体、Jak3、TykなどJak/Tykキナーゼなど47個が抽出された。

【0105】

10

20

30

40

50

(3-3-3) キーノード遺伝子によるパスウェイ解析

キーノード分子を含む有意なパスウェイがHAMでは66個、ACでは65個抽出された。HAMではインスリン受容体からリン酸化シグナルに関するパスウェイ、Jak-STAT系、p38MAPKのパスウェイが、ACではインスリン受容体からリン酸化シグナルに関するパスウェイの他、Jak3、Tyk2、SHP-1、SHP-2、CAS、CrkLなど比較的細胞膜近くの分子に関するパスウェイが有意だった(詳細は省略)。

【0106】

(4) 考察

Tattermusch S, Skinner JA, Bangham CR. et al. PLoS Pathog. 2012 Jan;8(1):e1002480. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy (以下、参考文献)には、HAMにおけるアレイデータが報告されている。参考文献によれば、HAMでは末梢血白血球でIFN誘導性遺伝子(STAT1及び2、TAP1、CXCL10(IP-10)、IFI35など)の過剰発現が特徴であり単球、好中球でも同様に報告されている。また、参考文献では、パスウェイ解析の事実上の標準的ソフトウェアであるIngenuity(Ingenuity Systems社製)を用いているが、これでは上流解析はできない。本実験例で使用したExplain(TRANSPATH, TRANSFACデータベース含む)は上流解析が可能である(Kel A., Voss N., Wingender E., et al. BMC Bioinformatics. 2006, 7(Suppl 2):S13. Beyond microarrays: Finding key transcription factors controlling signal transduction pathways)。また、本実験例では、末梢白血球全体でなくHTLV-1の主な感染源であるCD4+T細胞を濃縮し検討するなど方法が異なり、その結果、結論も違いがみられた。

【0107】

HAM特異的変動遺伝子によるパスウェイでは、ABL1の関与したCaspase関連のアポトーシス及び上流のストレス応答関連パスウェイが特徴的である。実際のHAM脊髄の病理でCaspaseが観察されることと矛盾しない結果と考えられた。

【0108】

これに対しACではMAPKシグナル経路上流のMEKK2 (MAPK kinase kinase 2)などストレス応答のパスウェイが特徴的でHAMと異なりアポトーシスに陥っていないことが示唆された。

【0109】

上流解析のうち転写因子結合サイト検索では、HAM、ACともHTLV-1との関連が文献的に知られていない転写因子が多く、HTLV-1の病的なシグナル伝達経路が十分検討されていないと考えられた。

【0110】

HAMのキーノード解析では、HAM・ACのキーノードから4ノード以内の接続する遺伝子(connecting gene)中に、転写因子CREBは含まれたが、ATLのシグナル伝達で重要なNF- κ Bは含まれておらず、HAMは炎症やサイトカインの下流であるJAK-STAT系に参与するCREBとの関係が、ATLは細胞増殖に関連するNF- κ Bとの関係がそれぞれシグナル伝達上で深いことを反映していると考えられる。これは特異的変動遺伝子による特異的パスウェイでも同様だった。

【0111】

キーノード分子を用いた上流のパスウェイでinsulin受容体からのシグナルがHAM及びAC共に抽出されたが、これは一般的にリン酸化シグナルのかなり上流にありエネルギーを供与するとされている。

【0112】

要約すると、本実験例では末梢血CD4+T細胞でHAM病態特異的責任遺伝子として抽出された177遺伝子中のABL1は、HAM病態特異的パスウェイとして抽出されたものである。上流解析では少数の遺伝子には収束せず、HAMの遺伝子あるいは分子標的治療法として有望な遺伝子は他に見つからなかった。

【0113】

10

20

30

40

50

またABL1は、HAM脊髄と同様なCaspaseなどのアポトーシス経路のパスウェイに関する遺伝子であり、従来のHAM脊髄での病理学的知見とも矛盾しないことから、ABL1を阻害標的とするABL1阻害薬はHAMの遺伝子あるいは分子標的治療法となる可能性が考えられた。

【0114】

(5) 結論

HAM末梢血CD4+T細胞を用いたアレイデータを用いて抽出したHAM病態特異的責任遺伝子、またHAM病態特異的パスウェイから、HAM治療の有望な標的としてABL1チロシンキナーゼを同定した。

【0115】

〔実施例2〕

本実施例では、生細胞のみにおけるHTLV-1プロウイルス量(PVL)を定量できる新規定量法 PMA(propidium monoazide)-HTLV-1 viability PCRを開発し、この手法を用いることでABL1阻害薬が生細胞中HTLV-1プロウイルス量減少効果を有するか検討した。通常のPVL測定法では、死細胞と生細胞のPVLをそれぞれ区別して測定することができず、両者について一括してPVLを測定することとなる。

【0116】

新規定量法 PMA-HTLV-1 viability PCRは、詳細を後述の実験例2にて説明するが、従前公知であったPMA Viability PCR(Nocker A. et al. J Microbiol Methods 2006. 67: 310-320)に基づいている。

【0117】

(1) PMA-HTLV-1 Viability PCR によるABL1阻害薬のアッセイ

(1-1) 実験の準備

(1-1-1) 対象・細胞

液体窒素中冷凍保存されているHAM由来16例のPBMCを用いた。

【0118】

(1-1-2) PMA処理・光クロスリンキング

PMA処理の方法は、詳細を後述するPMA-HTLV-1 viability PCRと同様である。PMAストック液(20mM、-20℃遮光冷凍保存)を最終濃度50µMとなるように細胞サンプルに添加し、室温、5分間、暗所で(アルミホイルで包んで)チューブをインキュベートした(時々チューブを混合するため指ではじく)。

【0119】

光クロスリンキングはすべてハロゲンランプ光クロスリンカーを用いて家庭用交流電源100Vで行った。細胞検体の容量はPBSを適宜加えて調製し200µLとし、暗所にてハロゲンランプから20cm離れた位置で5分間照射した。サンプルの温度が37℃以上に上昇しないように照射中は空冷した。時々サンプルチューブを指ではじいた。

【0120】

(1-1-3) 薬物(イマチニブ及びニロチニブ)

イマチニブ及びニロチニブの製品添付文書にあるABL1 50%阻害濃度(IC50)、体内動態検討データでのCmax濃度のデータと分子量から、IC50としてイマチニブ600nM、ニロチニブ30nM、Cmaxとしてイマチニブ5µM、ニロチニブ3µMを検討した。

【0121】

(1-2) 実験プロトコール

(1-2-1) 細胞検体の洗浄と細胞濃度カウント

凍結PBMC検体を37℃湯浴で融解した後、PBSで2回、300×gで洗浄し、ペレットをPBS 1mL中に懸濁し氷上に置いた。Trypan Blue排除法とヘモサイトメーターで細胞濃度をカウントした。

【0122】

(1-2-2) 薬物未処理DNAサンプルの処理(T=0h)

5×10⁵~1×10⁶個程度の細胞をエッペンドルフチューブに2本取り分け、溶液量をPBSを適宜加え、容量200µLとした。一方はPMA処理・光クロスリンキングを行い、もう一方は

10

20

30

40

50

この処理を行わず、両者ともDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)でDNAを抽出した。

【0123】

PMA未処理の方はSample No-D(Drug)-P-、PMA処理した方のDNAはSample No-D+P+と命名した。

【0124】

(1-2-3) 薬物処理 (イマチニブ及びニロチニブ)

各細胞検体の細胞懸濁液の残った液に細胞培地RPMI1640 (Fetal calf serum 10%、Penicillin-streptomycin 1%添加したもの)を約7.5mL加え合計8.0mL+ としておき、ポリスチレン製6ウェルプレートに1細胞検体当たり4ウェルを使って約2000 μ Lプレティングした。1細胞検体当たりウェル内最終濃度がイマチニブ 600nM或いは5 μ M、ニロチニブ30nM或いは3 μ Mとなるように添加した。

10

【0125】

(1-2-4) インキュベート

薬物を添加したらシェーカーで軽く振盪してから37 $^{\circ}$ C、5%CO₂インキュベーター内でインキュベート開始した。

【0126】

(1-2-5) T=6hでのハーベストとPMA処理、DNA抽出

T=6hで各ウェルの細胞懸濁液を半分程度ハーベストし、エッペンドルフチューブに取り、3,500rpm \times 10分間で遠沈し、上清を捨て、ペレットをPBS1mLで再懸濁させ、もう1回3,500rpm \times 10分間で遠沈し、上清を捨てて洗浄した。PBSを加え200 μ Lの容量とし、全部の検体をPMA処理及び光クロスリンクを行った後、再度PBSで洗浄し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)でDNAを抽出した。

20

【0127】

DNAサンプル名は、Sample No-Imatinib600nM-6hなどと命名した。

【0128】

(1-2-6) T=12hでのハーベストとPMA処理、DNA抽出

上記(1-2-5)で説明したT=6hのときと同様に行い、DNAサンプル名は、Sample No-Imatinib600nM-12hなどと命名した。

【0129】

(1-2-7) DNA濃度測定とWorking solutionの調製

DNA濃度はND-1000 (Thermo Fisher Scientific社製)により測定し、リアルタイムPCRをTriplicateで行うのに十分な量(10ng/ μ L \times Triplicate以上)を調製した。使用するまで-20 $^{\circ}$ Cに凍結保存した。

30

【0130】

(1-2-8) TaqMan プローブを用いたReal-Time PCRによる測定 (Triplicate)

TaqMan Universal Master Mix II (#4440044, Thermo Fisher Scientific社製)のプロトコール(合計25 μ LのPCRの系)に従い、20 μ M Forward Primer、Reverse Primer、8 μ M TaqMan Probe、2 \times Universal Master Mix II、D2Wを混合し、MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate (0.1mL) (REF 4346907, Applied Biosystems社製)、MicroAmp Optical Adhesive Film (P/N 4311971, Applied Biosystems社製)を用いてTriplicateの各ウェルに25 μ Lずつピペティングした。

40

【0131】

スタンダード曲線作成のためのスタンダード希釈系列は、pXについてNTC(No Template Control)、2 copies/ μ L(5 μ Lで10 copies)、20 copies/ μ L(同100 copies)、200 copies/ μ L(同1000 copies)、2000 μ L(同10000 copies)の各5点から作成した。

【0132】

サーマル・サイクルプログラムは、StepOne PlusリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems社製)とStepOne software ver.2.3を用いて、Hold stage 1 cycle: 50 $^{\circ}$ C \times 2分、95 $^{\circ}$ C \times 10分、Amplification 45 cycles: 95 $^{\circ}$ C \times 15秒、60 $^{\circ}$ C \times 1分で行った。

【0133】

50

(1 - 2 - 9) PMA-HTLV-1 viability PCRの指標の計算方法

ABL1阻害薬処理によるC 延長効果の指標

【数 3】

$$\Delta C\tau_{Drug} = C\tau_{D-P+} - C\tau_{D+P+}$$

及びABL1阻害薬処理によるHTLV-1ウイルス量減少効果の指標

【数 4】

$$\text{生細胞中 pX コピー減少率(pX decrease rate)}(\%) = (1 - 10^{\frac{-\Delta C\tau_{Drug}}{\text{slope}}}) \times 100 \quad 10$$

を算出するため、T=0でのDNAサンプルのD - P+サンプル群とT=6h及びT=12hでの各薬物・濃度で割り振られた細胞由来のDNAサンプル(D+P+群)とから上記指標を算出した。

【 0 1 3 4 】

(1 - 2 - 1 0) 検定

各薬物及び濃度でまとめ、上記指標を時系列(T=0h、6h及び12h)、薬物毎の濃度間、濃度(IC50及びCmax)毎の薬物間などで対応のあるt検定(Paired t-test)で検定を行った。すべてサンプルはN=16で検討した。

【 0 1 3 5 】

(2) アッセイ結果

20

(2 - 1) PMA-HTLV-1 viability PCRによるABL1阻害薬のアッセイの結果

ABL1阻害薬処理によるC 延長効果の指標 C_{Drug} 及び生細胞中pXコピー減少率(pX decrease rate)(%)を算出し、算出結果を表3にまとめた。

【表 3】

薬剤処理	Imatinib 600nM			Imatinib 5μM			Nilotinib 30nM			Nilotinib 3μM		
	0h	6h	12h	0h	6h	12h	0h	6h	12h	0h	6h	12h
ΔCr Drug												
平均	0	-1.30	-1.96	0	-0.99	-1.49	0	-2.03	-2.63	0	-0.86	-1.46
標準偏差(SD)	0	0.97	1.22	0	0.66	0.94	0	0.85	0.95	0	0.58	1.05
標準誤差(SE)	0	0.24	0.30	0	0.16	0.24	0	0.21	0.24	0	0.15	0.26
生細胞中 pX コピー数減少率(%)												
平均	0	50.35	66.37	0	43.37	44.99	0	69.51	78.00	0	53.82	36.19
標準偏差(SD)	0	22.38	17.54	0	19.31	39.71	0	13.70	10.39	0	15.61	37.20
標準誤差(SE)	0	5.60	4.38	0	4.83	9.93	0	3.43	2.60	0	3.90	9.30

30

【 0 1 3 6 】

(2 - 2) C_{Drug} によるABL1阻害薬の検討

(2 - 2 - 1) 時系列での検討(図14)

結果を図14に示した。図14においては、T=0hとの差を*P<0.05, **P<0.01で有意; T=12hについては6hとの差も † P<0.05, ‡ P<0.01で有意として示した。有意であることを示す*, **, †, ‡ の記号に続く番号はそれぞれ以下に示す危険率である: 1) 7.88E-05; 2) 2.01E-07; 3) 2.56E-12; 4) 6.30E-10; 5) 1.71E-10; 6) 0.0027; 7) 0.0014; 8) 0.85; 9) 8.17E-15; 10) 0.0071; 11) 0.0014; 12) 0.069。記号が前にない番号は有意ではない(N=16, Paired t-test)。

40

【 0 1 3 7 】

図14に示すように、イマチニブ(600nM或いは5μM)、ニロチニブ(30nM或いは3μM)のいずれもT=0に比べてT=6hでもT=12hの時点でも危険率1%以下で有意にC 延長効果がみられた。T=12hの時点ではT=6hの時点とも比較し、イマチニブ600nM、ニロチニブ30nMという低濃度(IC50)の方が有意にT=6hよりもC 延長効果がみられ、高濃度(Cmax)では両者とも有意ではなかった。

【 0 1 3 8 】

50

(2-2-2) 濃度間比較 (図15、図16)

イマチニブを使用したときの結果を図15に示した。図15に示すように、イマチニブ600nM vs 5 μ Mでは有意差はみられないもののT=6hでもT=12hでも低濃度(600nM)の方が高濃度(5 μ M)よりもC 延長効果がやや大きい傾向がみられた。

【0139】

ニロチニブを使用したときの結果を図16に示した。図16に示すように、ニロチニブ30nM vs 3 μ MではT=6hでもT=12hでも低濃度(30nM)の方が高濃度(3 μ M)よりもC 延長効果が危険率1%以下で有意に大きかった。

【0140】

(2-2-3) 薬剤間比較 (図17、図18)

IC50同士(イマチニブ600nM vs ニロチニブ30nM)で比較した結果を図17に示す。図17に示すように、T=6hでもT=12hでもイマチニブ600nMよりもニロチニブ30nMの方がC 延長効果が危険率1%以下で有意に大きかった。

【0141】

高濃度Cmax同士(イマチニブ5 μ M vs ニロチニブ3 μ M)で比較した結果を図18に示す。図18に示すように、T=6hでもT=12hでも有意差はなかった。

【0142】

(2-3) 生細胞中pXコピー減少率(pX decrease rate)(%)によるABL1阻害薬の検討

(2-3-1) 時系列での検討 (図19)

結果を図19に示した。図19においては、T=0hとの差を*P<0.05, **P<0.01で有意; T=12hについては6hとの差も† P<0.05, ‡P<0.01で有意として示した。有意であることを示す*, **, †, ‡の記号に続く番号はそれぞれ以下に示す危険率である: 1) 1.97E-07; 2) 1.71E-10; 3) 0.0027; 4) 2.01E-07; 5) 0.0014; 6) 0.846; 7) 2.56E-12; 8) 8.17E-15; 9) 0.0071; 10) 6.30E-10; 11) 0.0014; 12) 0.069。記号が前にない番号は有意ではない(N=16, Paired t-test)。

【0143】

図19に示すように、イマチニブ(600nM或いは5 μ M)、ニロチニブ(30nM或いは3 μ M)のいずれもT=0に比べてT=6hでもT=12hの時点でも危険率1%以下で有意に生細胞中pXコピー減少効果がみられた。T=12hの時点ではT=6hの時点とも比較し、イマチニブ600nM、ニロチニブ30nMという低濃度(IC50)の方が有意にT=6hよりも細胞中pXコピー減少効果がみられ、高濃度(Cmax)では両者とも有意ではなかった。

【0144】

低濃度(IC50)での各薬物での生細胞中pXコピー数減少率は、T=6h、12hの順に、イマチニブ600nMでは50.35%、66.37%、ニロチニブ30nMでは69.51%、78.00%と顕著にプロウイルス量を減少させることが明らかとなった。

【0145】

(2-3-2) 濃度間比較 (図20、図21)

イマチニブを使用したときの結果を図20に示した。図20に示すように、イマチニブ600nM vs 5 μ Mにおいて、T=6hでは有意差はみられないものの低濃度(600nM)の方が高濃度(5 μ M)よりも生細胞中pXコピー数減少率がやや大きい傾向がみられた。T=12hでは有意に低濃度(600nM)の方が高濃度(5 μ M)よりも生細胞中pXコピー数減少率が大きかった。

【0146】

ニロチニブを使用したときの結果を図21に示した。図21に示すように、ニロチニブ30nM vs 3 μ Mにおいては、T=6hでもT=12hでも低濃度(30nM)の方が高濃度(3 μ M)よりも生細胞中pXコピー数減少率が危険率1%以下で有意に大きかった。

【0147】

(2-3-3) 薬剤間比較 (図22、図23)

IC50同士(イマチニブ600nM vs ニロチニブ30nM)で比較した結果を図22に示す。図22に示すように、T=6hでもT=12hでもイマチニブ600nMよりもニロチニブ30nMの方が生細胞

10

20

30

40

50

胞中pXコピー数減少率が危険率1%以下で有意に大きかった。

【0148】

高濃度Cmax同士(イマチニブ5 μ M vs ニロチニブ3 μ M)で比較した結果を図23に示す。図23に示すように、T=6hでは、ニロチニブ3 μ Mの方がイマチニブ5 μ Mよりも有意に生細胞中pXコピー数減少率が大きかった。T=12hでは有意差はなかった。

【0149】

(3) 考察

上記(2)で示したように、PMA-HTLV-1 viability PCRによるABL1阻害薬のアッセイにより、C延長効果の指標であるC_{Drug}及び生細胞中pXコピー減少率(pX decrease rate)(%)ともに、薬物未処理に比べてABL1阻害薬で処理すると、生細胞中のHTLV-1プロウイルス量が減少することを明らかにすることができた。

10

【0150】

これらABL1阻害薬の効果は、T=6h、12hと時系列的にも減少効果は有意に継続することがわかった。実施例1の図3でHAM、NC由来CD4+T細胞、非CD4-PBMCの薬物未処理の状態におけるin vitro培養時の細胞濃度の経時的变化を示したが、これでもたようにin vitroでは、すなわち中和抗体などが無い体外ではHAM由来CD4+T細胞はT=24h~48hでSpontaneous proliferationを起こして自然に増殖すること、すなわちプロウイルス量が拡大するという性質があることを考えると、ウイルス減少効果が比較的長時間継続するとHAM治療には大きな長所となることが期待できる。

【0151】

またイマチニブよりもニロチニブの方が、濃度が同程度(IC50同士)では有意に効果が高かった。これは、ニロチニブがより特異的な第2世代の薬物であることと合致していると考えられる。

20

【0152】

同一薬物ではイマチニブ及びニロチニブともに低濃度(IC50)の方が高濃度(Cmax)よりも有意に生細胞中ウイルス減少効果が高いと考えられる結果だった。ABL1チロシンキナーゼがHAMでの病態特異的責任遺伝子として、またHAM病態特異的パスウェイに關与する遺伝子として抽出され、さらにHAMのCD4+T細胞におけるアポトーシス/サバイバルに關与する遺伝子として見つかったこと、ABL1は細胞内でさまざまなイベントに關与する多機能な分子であることなどを考慮すると、これまでの実験結果が示すようにABL1阻害薬を低濃度

30

【0153】

生体内では細胞膜が壊れたCD4+T細胞はただちにマクロファージが認識して貪食するが、in vitroの培養系ではマクロファージはほとんどいないことを考慮すると、ABL1阻害薬を体内投与した場合には、本実施例で示したin vitroにおける生細胞中ウイルス量減少効果がそのまま反映されるような臨床的検査結果が得られる可能性が期待できる。

【0154】

ABL1阻害薬は既に述べたように慢性骨髄性白血病(CML)の臨床応用されている分子標的薬である。HAMに対しHTLV-1プロウイルス量減少目的で新たな適応追加が期待される。

【0155】

〔実験例2〕

本実験例2では、生細胞中のみでのPVL新規定量法 PMA-HTLV-1 viability PCRを説明する。

40

【0156】

[PMA viability PCR]

まず、基礎となるPMA viability PCRの概略を説明する。PMA(propidium monoazide)とは、膜非透過性、核酸(DNA/RNA)結合性蛍光色素で、azide基に光反応性がある。PMA Viability PCRとは2006年に環境学的検体、食品などの検体における微生物が生きているかどうかを判定する目的でNockerらにより考案された(Nocker A. et al. J Microbiol Methods 2006. 67: 310-320)。

50

【 0 1 5 7 】

PMAは、膜統合性（非対称性）が喪失した、死にかけている細胞又は死んだ細胞（併せて死細胞）に入り、二重鎖DNAに優先的に結合する。一方、PMAは、膜統合性を有する生細胞内には入り込まない。

【 0 1 5 8 】

二重鎖DNAに結合したPMAは、吸収波長464nm(ほぼ470nm)を照射することで、で光クロスリンク(Photo-crosslinking)によりDNA鎖に不可逆的に結合する。一方、結合しなかったPMAは光分解(photolysis)する。そして、抽出したDNAを鋳型に定量PCR(qPCR)を行うと、PMAが結合したDNAを鋳型とするPCRは阻害され、PMAと結合していない生細胞由来のDNAのみ鋳型としてPCRが進行する。このように、鋳型となるDNAのなかにPMAが結合したDNAが含まれると、定量PCRにおける閾値に到達するサイクル数(C 値)は大きくなる(延長する)。よって、生菌(生細胞)が多いとPMAが結合していないDNAが多いのでPCRがかかりC 値は小さく、生菌(生細胞)が少ないとC 値は大きくなる(延長する)。

10

【 0 1 5 9 】

PMAのPCR阻害効果を検討するための指標として、Nockerらの原著(Nocker A. et al. J Microbiol Methods 2006. 67: 310-320)では、PMA未処理検体のC から同一検体のPMA処理検体のC を差し引いた値(負になる)を C として下向きに表示して用いている(下記式)。

【 数 5 】

20

$$\Delta C_{\tau} = C_{\tau w/o PMA} - C_{\tau with PMA}$$

C w/o PMA : PMA未処理後抽出DNAのPCRで測定したC 値

C with PMA : 同一細胞サンプルのPMA処理後DNAのPCRで測定したC 値

【 0 1 6 0 】

[PMA-HTLV-1 viability PCR]

本実験例では、生細胞中のみでのPVL新規定量法(PMA-HTLV-1 viability PCRと呼称する)を提案する。PMA viability PCRのプロトコールと計算理論を拡張した後にPMA-HTLV-1 viability PCRを導入する。

【 0 1 6 1 】

30

(1) PMA viability PCRのプロトコールと計算理論の拡張

(1 - 1) PMA viability PCRのプロトコールの拡張

PMA viability PCRのプロトコールでは、通常のリアルタイムPCR絶対法と異なり、標的核酸の標準品希釈系列を用いた標準曲線を作成しない。本実験例では、ここで標的核酸の標準品とその希釈系列、標的核酸に対するプライマーセット及びTaqManプローブを用いてリアルタイムPCR絶対法に準じたプロトコールを行う場合を考える。

【 0 1 6 2 】

測定対象となる細胞を2分割し、PMA処理しないもの(w/o (without) PMA)、PMA処理したもの(with PMA)とし、DNA抽出し、リアルタイムPCR絶対法に準じたプロトコールに従い標的核酸のスタンダードと、測定対象DNA検体の標的核酸コピー数を三重測定(Triplicate)で測定するものとする。

40

【 0 1 6 3 】

(1 - 2) PMA viability PCRの計算理論の拡張

リアルタイムPCRでは一般に増幅産物を意味する蛍光強度は最初の1~最大10サイクルまではノイズレベルでサンプルブランクとみなし、それらの標準偏差(Standard deviation: SD)を算出し、10SDを閾値(Threshold)とする。閾値を初めて最初に上回るサイクル数をCycle threshold (C)値とする。リアルタイムPCRのプロトコールでアプライするDNA量は一定量であるが、その中の標的初期鋳型DNA量がPCR開始時に多いとC 値は小さく、標的初期鋳型DNA量が少ないとC 値は大きくなる。

【 0 1 6 4 】

50

これらの関係と細胞検体のPMA処理の有無を含め、PCRの増幅回数-増幅産物量(実数)プロット、C_t-遺伝子相対発現コピー数(log表示)プロット中にそれぞれ図示すると、図24及び図25のようになる。

【0165】

(1-2-1) PMA viability PCRにおける増幅回数(サイクル数)-増幅産物量(実数)プロット(図24)

Nocker AらによるPMA viability PCRの原著(Nocker A. et al. J Microbiol Methods 2006. 67: 310-320)ではPMAのPCR阻害効果を検討するための指標として、PMA未処理検体のC_tから同一検体のPMA処理検体のC_tを差し引いた値(負になる)をC_tとして下向きのグラフに表示して用いている。

10

【0166】

ここで、リアルタイムPCRにおける増幅回数(サイクル数)-増幅産物量(実数)プロット上でさらにC_tの表示を試みると図24のように表示できる。PMA処理(-)ではC_t値は小さいがPMA処理(+)では生細胞DNAのみにより増幅産物量曲線が立ち上がりC_t値は遅延し(大きくなり)、死細胞数に依拠するC_tは小さい方のPMA処理(-)C_t w/o PMA値から大きい方のC_t with PMA値を引いて拡大した負の値になる。

【0167】

(1-2-2) PMA viability PCRにおけるC_t-遺伝子相対発現コピー数(log表示)プロット(図25)

図24のC_tは、PMA VIABILITY PCRに加えてさらに同時に標的核酸配列の標準品とそれに対するTAQMANプローブを用いた絶対法で標準曲線(検量線回帰式)を得たとする。この標準曲線を用いてY軸(C_t)上に図25のようにC_tをプロットできる。

20

【0168】

さらにX軸上の遺伝子相対発現コピー数(log表示)の軸上でPCR時にアプライした初期鋳型コピー数を

$I_{w/o PMA}$: PMA処理(-)検体でPCRによりC_t w/o PMA値だった時の初期鋳型量(コピー数)(log表示)

$I_{with PMA}$: PMA処理(+)検体でPCRによりC_t with PMA値だった時の初期鋳型量(コピー数)(log表示)

とすると、C_tと同様に負の値として初期鋳型量(コピー数)減少分: $I = I_{w/o PMA} - I_{with PMA}$ を新たに定義し図示できる。

30

【0169】

なお、標準曲線から算出した次式を用いてIを計算することもできる。

【数6】

$$I_{w/o PMA} = 10^{\frac{C_{t_{with PMA}} - Y - \text{int}}{\text{slope}}}, I_{with PMA} = 10^{\frac{C_{t_{w/o PMA}} - Y - \text{int}}{\text{slope}}}$$

【0170】

(2) 生細胞のみにおけるHTLV-1プロウイルス量(PVL)新規定量法 PMA-HTLV-1 viability PCR

40

通常のTaqMan法によるPVL測定法(Nagai M. J Neurovirol. 1998 Dec;4(6):586-93.)は、生細胞、死細胞を含むPBMCからDNA抽出キットにより精製したDNAを鋳型に、標的遺伝子pX、内部対照遺伝子-actinに対するTaqManプローブ、プライマーセットによりリアルタイムPCRを行う。この方法では生細胞、死細胞由来のHTLV-1プロウイルス量(PVL)は原理的に区別できない。

【0171】

そこで生細胞のみのPVLを測定する方法があれば、抗HTLV-1候補薬処理の有無により生細胞PVL量を比べることで抗HTLV-1候補薬の効果を検討することが可能となる。生細胞でのPVLの減少を示すために、Dead cell removal kit (Miltenyi Biotec 130-090-101)の

50

ようなAnnexin V (膜GPIアンカー構造であるPhosphatidyl serineやCa²⁺と結合する抗凝固蛋白)をコンジュゲートしたビーズを詰めたカラムで死細胞を除去する方法では、細胞単位で死細胞が除去され、ハーベストできるDNA量が顕著に減少してしまい、PVL測定に必要なゲノムDNAの量と質を確保することは非常に困難となる。このためこの方法では、抗HTLV-1候補薬処理をする際に低い薬剤濃度で処理せざるを得ず、抗HTLV-1候補薬の効果の検討で有意差をみいだすことが困難になってしまうという二律背反に陥ってしまう。

【0172】

そこで細胞レベルではなく、DNAレベルで、即ちReal-Time PCRの段階で生細胞・死細胞由来のDNAを区別する方法として、PMA-HTLV-1 viability PCRを提案する。

【0173】

(2-1) PMA viability PCRを拡張したPMA-HTLV-1 viability PCR

PMA Viability PCRを細菌その他の微生物ではなく、哺乳類であるヒト細胞に応用し、ヒトゲノムDNAに組み込まれたHTLV-1ウイルスpX領域を標的遺伝子(核酸)としてプライマーセット、TaqManプローブ、pX標準品希釈系列を用いたスタンダードをConventionalなHTLV-1 PVL定量法と同様に使い、PMA処理、DNA抽出、C_t値測定およびC_t値算出といったステップを含む方法をPMA-HTLV-1 viability PCRと呼称することにする。

【0174】

(2-2) PMA-HTLV-1 viability PCRは生細胞のみにおけるHTLV-1を測定する

PMA-HTLV-1 viability PCRは、PMA viability PCRをHTLV-1 pXに対して測定するものなので、増幅回数(サイクル数) - 増幅産物量(実数)プロット、C_t - 遺伝子相対発現コピー数(log表示)プロット(図24及び図25)はそのまま使用できる。

【0175】

PMA viability PCRの基本的事項はそのままPMA-HTLV-1 viability PCRについても成り立つことをHAM患者由来PBMCおよびHTLV-1感染細胞株Hut102を用いて後に示す。

【0176】

基本的事項を再確認すると、生・死菌混合物由来DNAの場合、PMA処理(-)でのDNAを用いた通常のPCRでは生・死細胞比率に無関係に産物量は一定(C_t値一定)だが、PMA処理(+)でのDNAを用いた、すなわちPMA viability PCRでは生細胞比率が高いと産物量が増えPCR立ち上がり早く(C_t値小さい)、生細胞比率が低いとPCR立ち上がり遅い(C_t値大きい)。つまり産物量とC_t値は負の相関関係にある。

【0177】

PMA処理(-)のDNAを用いたPCRすなわち通常のPCRでは早い立ち上がり(あるいは大きいC_t値)は生・死細胞両方から抽出されたDNAに由来するが、PMA処理(+)のDNAを用いたPCRすなわちPMA viability PCRでの遅い立ち上がり(C_t値遅延あるいは大きいC_t値)は生細胞のみに由来する。これにより生細胞のみでのHTLV-1 PVL定量が可能となる。

【0178】

同様に、C_tは死細胞のみに由来する。これを用いて抗HTLV-1薬の効果が判定可能となる。

【0179】

(3) PMA-HTLV-1 viability PCRによるHTLV-1感染細胞傷害性薬物のアッセイ

次に、PMA-HTLV-1 viability PCRを用いて、HTLV-1感染細胞を標的として殺傷する薬物(すなわち、実施例2で使用したようなABL1阻害薬)をアッセイする場合を考える。

【0180】

(3-1) PMA-HTLV-1 viability PCRによるHTLV-1感染細胞傷害性薬物のアッセイにおける増幅回数(サイクル数) - 増幅産物量(実数)プロット(図26)

(3-1-1) PMA処理によるC_t値延長 C_t PMA、薬物処理によるC_t値延長 C_t Drug
候補薬物処理(Drug処理)で標的細胞が死ぬと、その後PMA処理し、標的細胞の特異的核酸(遺伝子)を増幅するPCRは阻害されC_t値(C_t D+ P+)は候補薬物処理なしの時(C_t D. P+)よりも大きくなる。前述したPMA処理によるC_t値延長 C_tをC_t PMAとし、候補薬物処理によるC_t値延長をC_t Drugとして新たに定義する。すなわち、

10

20

30

40

50

$C_{PMA} = C_{D-P-} - C_{D-P+}$ (Nocker A. 原著の式に相当する)

$C_{Drug} = C_{D-P+} - C_{D+P+}$

C_{D-P-} : Drug処理(-)、PMA処理(-)のDNAを用いたときのC値であり、薬物未処理検体の生細胞及び死細胞由来DNA量を反映する。

C_{D-P+} : Drug処理(-)、PMA処理(+)のDNAを用いたときのC値であり、薬物未処理検体の生細胞由来DNA量を反映する。

C_{D+P+} : Drug処理(+)、PMA処理(+)のDNAを用いたときのC値であり、薬物処理検体の生細胞由来DNA量を反映する。

【0181】

そして、 C_{PMA} は、細胞サンプル毎に異なる生細胞及び死細胞比率を反映するPMA処理による生細胞のみのDNA量の指標である。 C_{Drug} は、生細胞のみに由来するDNA量の薬物による減少を反映する。よって薬物の標的細胞傷害効果を判定する指標として使用できる。

10

【0182】

(3-2) PMA-HTLV-1 viability PCRによるHTLV-1感染細胞傷害性薬物のアッセイにおけるC - 遺伝子相対発現コピー数(log表示)プロット(図27)

PMA viability PCRに加えて同時に標的核酸配列の標準品とそれに対するTaqManプローブを用いた絶対法でpXの標準曲線(検量線回帰式)を得たとする。この標準曲線を用いてY軸(C)上に図のようにCをプロットできる。

【0183】

20

(3-2-1) PMA処理による初期鋳型減少 I_{PMA} 、薬物処理による初期鋳型コピー数減少 I_{Drug}

同様にC - 遺伝子相対発現コピー数(log表示)プロット上ではPCRにアプライした初期鋳型コピー数の減少を前に定義したIを I_{PMA} とし、候補薬剤処理(Drug処理)による減少を I_{Drug} として新たに定義する。すなわち、

$$I_{PMA} = I_{D-P-} - I_{D-P+}$$

$$I_{Drug} = I_{D-P+} - I_{D+P+}$$

I_{D-P-} : Drug処理なし、PMA処理なしのDNAを用いたときの初期鋳型コピー数であり、薬物未処理検体中の生細胞及び死細胞由来DNA中初期鋳型コピー数である。

I_{D-P+} : Drug処理なし、PMA処理ありのDNAを用いたときの初期鋳型コピー数であり、薬物未処理検体中の生細胞由来DNA中初期鋳型コピー数である。

30

I_{D+P+} : Drug処理あり、PMA処理ありのDNAを用いたときの初期鋳型コピー数であり、薬物処理検体中の生細胞由来DNA中初期鋳型コピー数である。

【0184】

I_{D-P-} が生細胞及び死細胞全体の中の初期鋳型コピー数なのに対し、 I_{D-P+} 及び I_{D+P+} は生細胞中のみの初期鋳型コピー数である。

【0185】

I_{PMA} は細胞サンプル毎に異なる生細胞及び死細胞比率を反映するPMA処理による生細胞のみの初期鋳型コピー数の指標である。 I_{Drug} は生細胞のみに由来する初期鋳型コピー数の薬物による減少を反映する。よって薬物の標的細胞傷害効果を判定する指標として使用できる。なお、標準曲線から算出した次式を用いて I_{PMA} を計算することもできる。

40

【数7】

$$I_{D-P-} = 10^{\frac{C_{D-P-} - Y - \text{int}}{\text{slope}}}, I_{D-P+} = 10^{\frac{C_{D-P+} - Y - \text{int}}{\text{slope}}}, I_{D+P+} = 10^{\frac{C_{D+P+} - Y - \text{int}}{\text{slope}}}$$

【0186】

(3-2-2) 生細胞中標的遺伝子コピー数減少率(Target gene decrease rate in live cells) (%) と生細胞中標的遺伝子コピー数残存率(Target gene survival rate in live cells) (%)

50

PMA-HTLV-1 viability PCRによるHTLV-1感染細胞傷害性薬物のアッセイでは、候補薬物処理（Drug処理）により減少した生細胞中の標的核酸（ここではHTLV-1 pX遺伝子すなわちウイルス量）コピー数の減少率(%)を元来あった生細胞のみにおける初期鋳型コピー数 I_{D-P+} に対する比率として、生細胞中標的遺伝子コピー数減少率(Target gene decrease rate in live cells) (%)を定義し計算できる。これによりアッセイしたい薬物の標的核酸（ここではHTLV-1ウイルス量）減少効果の指標となり効果が判定できる。

【数8】

$$\begin{aligned} \text{Target gene decrease rate in live cells (\%)} &= \frac{\Delta I_{Drug}}{I_{D-P+}} \times 100 \\ &= \frac{I_{D-P+} - I_{D+P+}}{I_{D-P+}} \times 100 \\ &= \left(1 - 10^{\frac{C\tau_{D+P+} - C\tau_{D-P+}}{\text{slope}}}\right) \times 100 \\ &= \left(1 - 10^{\frac{-\Delta C\tau_{Drug}}{\text{slope}}}\right) \times 100 \end{aligned}$$

10

【0187】

上記式から判るように、100 - Target gene survival rate in live cells (%)で求まる値は、生細胞中標的遺伝子コピー数残存率である。

20

【0188】

〔実施例3〕

本実施例1では、ABL1阻害薬（イマチニブ、ニロチニブ）がHAM由来のCD4+T細胞に対して特異的に殺傷する結果を示した。本実施例では、ABL1阻害薬（イマチニブ及びニロチニブ）が無症候性キャリア（AC）由来のCD4+T細胞に対しても特異的な殺傷効果を持つか検証した。

【0189】

（3-1）プロトコール

本実施例では、検体として、無症候性HTLV-1キャリア(AC)、陰性対照(NC)由来のPBMCを各4例、 5×10^6 個の液体窒素凍結保存PBMCを準備した。そして、実施例1に記載した〔細胞の準備〕と同じ方法により細胞を処理し、実施例1に記載した〔薬剤処理〕と同様な方法により薬剤処理を行った。但し、本実施例では、AC検体#1由来CD4+T細胞についてA行1~3列に薬剤未処理ウェル懸濁液、A行4~6列にイマチニブ $5 \mu\text{M}$ 処理ウェル懸濁液、A行7~9列にニロチニブ $5 \mu\text{M}$ 処理ウェル懸濁液をそれぞれ $25 \mu\text{L}$ ずつ3つ組で入れた。同様に、AC検体#2由来CD4+T細胞についてB行1~9列に、AC検体#3由来CD4+T細胞についてC行1~9列、AC検体#4由来CD4+T細胞についてD行1~9列に入れた。また、NC検体#1由来CD4+T細胞について同様にE行1~9列に、NC検体#2由来CD4+T細胞についてF行1~9列に、NC検体#3由来CD4+T細胞について同様にG行1~9列に、NC由来#4由来CD4+T細胞をH行1~9列に入れた。

30

【0190】

同様にこれらのCD4+T細胞懸濁液を同じ手順でもう一組、10列はブランクとし、A~H行1~19列に入れた。後者の検体の領域の各ウェルには細胞毒ジゴトニン $300 \mu\text{M}$ 溶液 $2.5 \mu\text{L}$ を入れて死細胞蛍光強度測定用とし、前者の生細胞領域のウェルには等量とするためPBS(-) $2.5 \mu\text{L}$ を入れた。

40

【0191】

さらに、同様に非CD4-PBMC細胞についても、異なるNunc384-well clear polystyrene plate with non-treated surfaceプレートを準備し、AC検体#1~4、NC検体#1~4由来の細胞懸濁液を1~16列D~F行に入れ、同様にジゴトニン溶液及びPBS(-)も加えた。なお、1~12列G行にはPBS $25 \mu\text{L}$ をNo cell controlとして入れた。

【0192】

そして、実施例1と同様にして、CellTiter-Fluor Reagent及びTECAN Infinite 200M (

50

Tecan Japan社製)で蛍光(Ex400/Em505nm)を測定した。得られた蛍光強度は、実施例1と同様に、Relative live cell signal (RLU)を検量線回帰式に代入して細胞濃度(cells/mL)を算出した。

【0193】

(3-2)結果

薬剤未処理ウェルの細胞濃度を100とし、イマチニブ5 μ M処理ウェル、ニロチニブ5 μ M処理ウェルのそれぞれの相対濃度(%)を算出した。結果を表4に示した。なお、表4に示した数値は、生細胞濃度(cells/mL)の薬剤未処理に対する相対%を示している(相対% \pm 標準誤差)。

【表4】

10

細胞種別と検体由来		ABL1 阻害薬処理		
		薬剤未処理	Imatinib 5 μ M24h	Nilotinib 5 μ M24h
CD4+T 細胞	AC	100	35.47 \pm 6.77	34.26 \pm 5.72
	NC	100	77.99 \pm 11.91	56.66 \pm 19.30
非 CD4-PBMC	AC	100	85.16 \pm 22.26	76.78 \pm 41.21
	NC	100	109.64 \pm 21.88	79.78 \pm 16.96

【0194】

20

また、表4に示した結果のグラフと統計解析結果を図28に示した。図28において、A及びBはCD4+T細胞に関する結果であり、C及びDは非CD4-PBMC細胞に関する結果である。また、図28においてA及びCはイマチニブ5 μ M処理の結果であり、B及びDはニロチニブ5 μ M処理の結果を示している。図28のA~Dにおいて、それぞれ左側にNCの結果、右側にACの結果を示している。また、A~Dにおいてにおいて黒い棒グラフは薬剤未処理の細胞濃度(cells/mL)で100%とし、イマチニブ5 μ M処理の相対的細胞濃度(% cell viability)を白い棒グラフで、ニロチニブ5 μ M処理の相対的細胞濃度(% cell viability)を灰色の棒グラフで示した。

【0195】

(3-3)考察

30

関連のあるt検定で統計解析すると、AC検体由来CD4+T細胞をイマチニブ5 μ M処理、ニロチニブ5 μ M処理すると、NCに比べて有意に細胞濃度を減少させる(それぞれP=0.011; P=0.007)ことがわかった。このような効果は非CD4-PBMC細胞ではみられず、ABL1阻害薬のHTLV-1感染細胞特異的な細胞死誘導効果であることが示唆された。

【0196】

本実施例及び実施例1で示したように、ABL1阻害薬がHAM由来のCD4+T細胞及びAC由来のCD4+T細胞、すなわちHTLV-1感染CD4+T細胞に対して優先的に細胞死を誘導する効果を発見した。特に、本実施例において、ABL1阻害薬は無症候性キャリア(AC)由来のCD4+T細胞に対しても優先的細胞死誘導効果を持つことを世界で初めて発見したと言える。

【0197】

40

〔実施例4〕

本実施例2では、死細胞を除き、生細胞のみのHTLV-1プロウイルスを定量する技術を用いて、ABL1阻害薬(イマチニブ、ニロチニブ)がHAM由来のCD4+T細胞の生細胞におけるプロウイルス量を減少させる効果を持つことが実証された。本実施例では、同ABL1阻害薬が無症候性キャリア(AC)由来のCD4+T細胞に対しても、同様にプロウイルス量減少効果を持つか検証した。

【0198】

(4-1)プロトコール

(4-1-1)対象・細胞

液体窒素中冷凍保存されているAC由来14例の各例 1×10^7 個のPBMCを用いた。

50

【 0 1 9 9 】

(4 - 1 - 2) T=0hでのハーベスト (ABL1阻害薬未処理検体)

液体窒素中冷凍保存されている検体を37℃湯浴で融解後、約10mLのPBSで300 × g、10分間遠沈にて2回洗浄し、PBS中1mL中に再懸濁し、細胞濃度をトリパンブルー排除法でカウントした。そして、各検体について約10万個のPBMCとなるように2組に取り分けた。これらのうち一方はPMA処理しないもの、他方はPMA処理するものとした。各々Sample No-Drug-P-及びSample No-Drug-P+と命名しておく。

【 0 2 0 0 】

Sample No-Drug-P+と命名された検体には、実施例2に記載した方法と同様に、まずPMAストック液を終濃度50 μMとなるよう加え、遮光下に室温、5分間、時々振盪しながらPMA処理し、ハロゲンランプ光クロスリンカーで5分間空冷しながらクロスリンキングした。PMA処理しない前者と合わせ両者ともDNeasy Blood & Tissue Kit (Cat No 69504、QIAGEN社製) を用いてゲノムDNAを抽出した。

10

【 0 2 0 1 】

(4 - 1 - 3) 薬物処理

上記 (4 - 1 - 2) にて2組の検体を取り分けた後の残りの細胞懸濁液に、約7mL+ の容量のRPMI1640 (10% ウシ胎児血清、1% Penicilin、Streptomycin添加) を加え、ボルテックスしたのち、6-well平底ポリスチレンプレートに約2mL分注し、実施例1の濃度と同様に、イマチニブ600nM (IC50)、同5 μM (Cmax)、ニロチニブ30nM (IC50)、同3 μM (Cmax) となるようにイマチニブ或いはニロチニブを加えた。短時間シェーカーで混合した後、5%CO₂インキュベーター内で培養した。

20

【 0 2 0 2 】

(4 - 1 - 4) T=6hでのハーベストとPMA処理、DNA抽出

実施例2に記載した方法により、T=6h以降は全検体をPMA処理及びクロスリンキングし、その後ゲノムDNAを抽出した。

【 0 2 0 3 】

(4 - 1 - 5) T=12hでのハーベストとPMA処理、DNA抽出

実施例2に記載した方法によりPMA処理、DNA抽出を行った。これにより、供試したAC1検体につきゲノムDNAが10サンプル、すなわち14検体から140サンプル調製された。

30

【 0 2 0 4 】

(4 - 1 - 6) DNA濃度測定、Working solutionの調製、リアルタイムPCR法及びPMA-HTLV-1 viability PCRの指標の計算方法

本実施例において、DNA濃度測定、Working solutionの調製、リアルタイムPCR法及びPMA-HTLV-1 viability PCRの指標の計算方法については、実施例2に記載した方法を適用した。

【 0 2 0 5 】

(4 - 1 - 7) 検定

各薬物及び濃度でまとめ、上記指標を時系列 (T=0h、6h及び12h)、薬物毎の濃度間、濃度 (IC50及びCrmax) 毎の薬物間などで対応のあるt検定 (Paired t-test) で検定を行った。すべてサンプルはN=14で検討した。

40

【 0 2 0 6 】

(4 - 2) アッセイ結果

PMA-HTLV-1 viability PCRによるABL1阻害薬のアッセイの結果として、ABL1阻害薬処理による生細胞中pXコピー減少率 (pXdecrease rate (%)) を算出し、結果を表5にまとめた。

【表 5】

薬剤処理	Imatinib 600 nM			Imatinib 5 μ M			Nilotinib 30 nM			Nilotinib 3 μ M		
	0h	6h	12h	0h	6h	12h	0h	6h	12h	0h	6h	12h
Δ CT _{Drug}												
平均	0	-0.28	-0.98	0	-1.45	-1.25	0	-1.26	-1.56	0	-1.05	-1.36
標準偏差	0	0.70	0.90	0	1.03	1.38	0	1.02	1.48	0	0.72	1.36
標準誤差	0	0.19	0.24	0	0.28	0.37	0	0.27	0.40	0	0.19	0.36
生細胞中 pX コピー数減少率(%)												
平均	0	23.83	45.46	0	51.65	58.25	0	53.23	71.38	0	50.50	58.56
標準偏差	0	17.23	20.22	0	21.69	27.49	0	21.65	17.74	0	13.98	25.26
標準誤差	0	4.97	6.10	0	5.80	8.69	0	6.25	5.61	0	4.04	7.61

10

【0207】

表 5 に示したように、実施例 2 に示したHAM由来CD4+T細胞-PBMCの場合に比べるとやや成績は劣るものの、AC由来CD4+T細胞-PBMCでも、イマチニブ及びニロチニブともIC50濃度12h処理でそれぞれ約45%及び71%と未処理時に比べ大幅に生細胞中ウイルスコピー数を減少させる効果があることが証明できた。

【0208】

20

(4-3) 考察

以下、 C_{Drug} による検討、生細胞中pXコピー数減少率(%)による検討は、同等なので、簡単のため後者の生細胞中pXコピー数減少率(%)のみ用いて考察した。統計学的検討は時系列での比較はPaired t-test、濃度間及び薬剤間比較はMann-Whitney U testを用い、†: P<0.05、*: P<0.01で有意を示した。

【0209】

(4-3-1) 時系列での検討(図29)

結果を図29に示した。図29においてAはイマチニブ(600nM、5 μ M)、Bはニロチニブ(30nM、3 μ M)について経時的变化を検討した結果を示している。図29に示すように、イマチニブ及びニロチニブとも、T=0hと6h及び12hとの間でいずれも危険率1%未満で有意差を認めた。イマチニブ600nM(IC50)では6hと12hとの間でも危険率1%未満で有意差を認めた。イマチニブの効果による生細胞中ウイルス減少効果の出現が6h時点でやや低いためと考えられるが、この現象がAC由来検体に特異的かどうかは更なる解析が必要である。なお、AC由来検体であっても12h後には十分な効果が出現している。

30

【0210】

(4-3-2) 濃度間での検討(図30)

同一薬剤及び同時点で濃度による効果の差があるかどうかを検討した。結果を図30に示した。図30はイマチニブを600nMと5 μ Mで使用したときの結果である。図30に示したように、イマチニブの600nMと5 μ Mの間では6hの時点において危険率1%未満で有意差を認め、5 μ Mで使用した場合の方が600nMで使用した場合と比べて、生細胞中ウイルス減少率が高かった。ただし、図30に示したように、12hの時点では濃度間の有意差なかった。データを示さないが、ニロチニブでは濃度間の差は6h及び12hともなかった。

40

【0211】

(4-3-3) 薬剤間での検討(図31)

結果を図31に示した。図31においてAはIC50濃度でのイマチニブ(600nM)及びニロチニブ(30nM)間を比較した結果を示し、BはCmax濃度でのイマチニブ(5 μ M)及びニロチニブ(3 μ M)間を比較した結果を示している。図31に示すように、イマチニブ600nM及びニロチニブ30nMは、6hの時点では危険率1%未満で有意差がみられ、12hの時点でもP値0.059といずれの時点でも、イマチニブと比べてABL特異性がより高いニロチニブを使用したほうが生細胞中ウイルス減少率が高かった。この傾向はHAM由来CD4+T細胞を使用した場

50

合と同様であった。なお、Cmax濃度での両者はBに示したように有意差はなかった。

【0212】

(4-3-4) HAM由来CD4+T細胞への効果とAC由来CD4+T細胞への効果の比較(図32)

実施例2で行ったHAM由来CD4+T細胞-PBMCに対するPMA-HTLV-1 Viability PCRによるABL1阻害薬のアッセイの結果と、本実施例で行ったAC由来CD4+T細胞-PBMCに対する同アッセイの結果とを比較した結果を図32に示した。図32に示すグラフにおいて、6h及び12hの各区には、左から順にイマチニブ600nMの結果、イマチニブ5 μ Mの結果、ニロチニブ30nMの結果及びニロチニブ3 μ Mの結果を棒グラフとして示している。

【0213】

図32に示すように、同一時点、同一薬、同一濃度では、HAM由来CD4+T細胞に対する生細胞中HTLV-1 pXコピー数減少率が、AC由来CD4+T細胞に対する同減少率と比較して大きい傾向であった。HAMの病態機序でABL1発現亢進に基礎をおく治療薬なので、ACではHAMほど高発現ではないこととHAMほど減少率が得られないことが関連していると推測される。しかし6hと12hとで有意に低下するなど観察した12h後まで有意な減少が継続した。ACでは12h後は未処理時(T=0h)とは有意差があり6hとは有意差がなかったが、減少傾向は継続し、ニロチニブ30nMで最大71.38%とHAMに匹敵する減少率がみられた。

10

【0214】

以上のように本実施例の結果と上述した実施例3の結果を併せて考えると、イマチニブやニロチニブ等のABL1阻害薬は、AC由来CD4+T細胞における生細胞中HTLV-1ウイルスのコピー数を減少させる効果があることが証明された。

20

【0215】

〔実施例5〕

〔ヒトにおける投与例〕

HTLV-1感染動物モデルは、成人T細胞白血病(ATL)様動物腫瘍モデルに比べて、これまでのところ良いモデルが樹立されていない。HAM動物モデルはさらに困難な状況である。したがって、in vivoの系において、ABL1阻害薬によるHAM改善効果や抗ウイルス効果を検証することが困難である。

【0216】

一方、ABL1阻害薬は、慢性骨髄性白血病(Chronic myelogenous leukemia: CML)慢性期に対する臨床応用が確立した薬剤である。現在、ABL1阻害薬は、日本において当該臨床応用について保険適応となっている医薬品である。CMLは人口10万人当たり有病率1人とされる比較的まれな疾患であり、日本の抗HTLV-1抗体陽性率0.1%を考慮すると、抗体陽性CMLの症例は年間10症例程度が出現するはずである。

30

【0217】

そこで、ヒトのCML患者で抗HTLV-1抗体陽性が判明し、且つ、ABL1阻害薬投与前後でPVL測定を行った症例を検索し、ABL1阻害薬投与の後にPVLの低下がみられたかどうかを検索した。その結果、1例の抗HTLV-1抗体陽性であるCML患者を発見した。当該症例は、52歳時にHAMを発症し杖歩行していた。ステロイド、IFN- γ などHAMに対する治療は行われていなかった。当該症例は、8年後、60歳時にさらにCMLを発症した。このとき、白血球27,430/ μ Lと増多、NAPスコア低値、フィラデルフィア染色体陽性にてCMLを確定診断された。イマチニブ400mg/日内服開始し、1か月後に白血球減少のため300mg/日に減量したが現在(2017年7月)も内服継続し、CMLは分子遺伝学的寛解となっている。

40

【0218】

イマチニブ400mg/日で運動機能障害度5が4となり、300mg/日へ減量後も5のままで維持され、それ以上の悪化を認めていない。当該症例について、末梢血PVLは、投薬前において2844コピーであり、投薬5か月後1138コピーに減少し、投薬1年5か月後448コピー/ 10^4 PBMCと明らかなPVL低下が認められた。

【0219】

本実施例では、抗HTLV-1抗体陽性であるCML患者で、ABL1阻害薬投与のHTLV-1に対する臨床応用例を示すことができた。ABL1阻害薬の効果と考えられる明らかなPVL低下効果を

50

実際の臨床において示すことができ、また、ABL1阻害薬による重篤な副作用や予期せぬ神経学的増悪は出現せず、内服継続可能であったという貴重な知見が得られた。

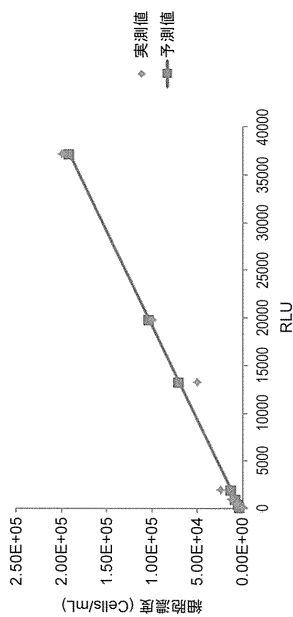
【0220】

以上、本実施例で示したように、現状では利用が困難なHTLV-1感染動物モデルの代わりに、ABL1阻害薬の臨床応用例として抗HTLV-1抗体陽性のCML患者を挙げることで、ABL1阻害薬のHTLV-1に対する治療効果を臨床的にも示唆することができた。

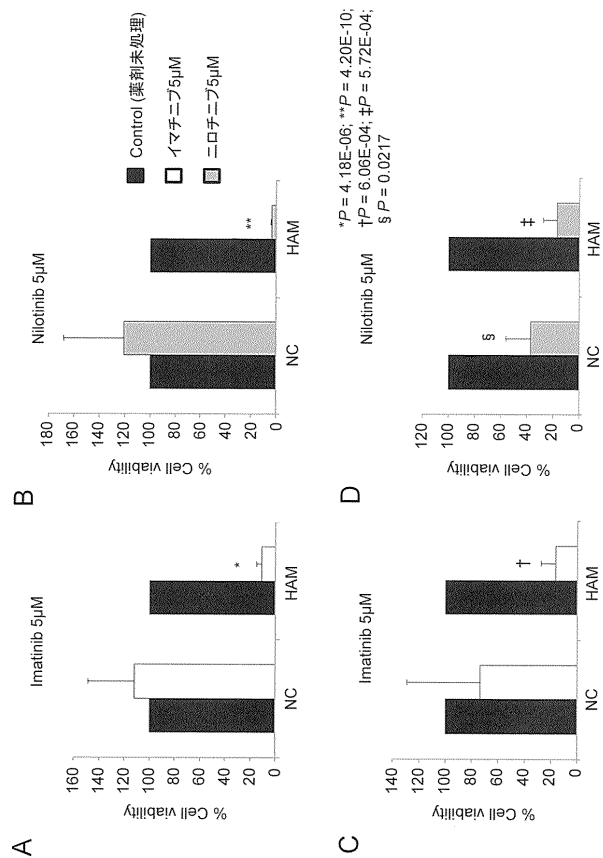
【0221】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

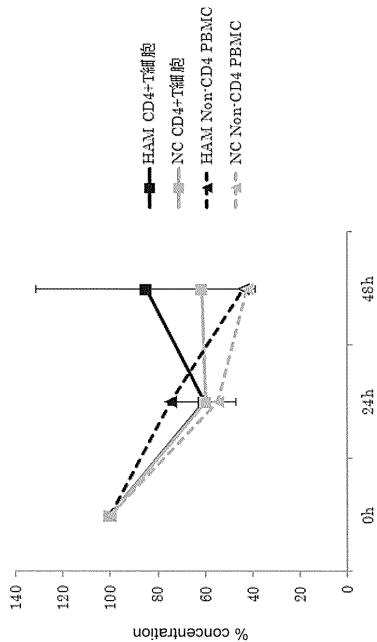
【図1】



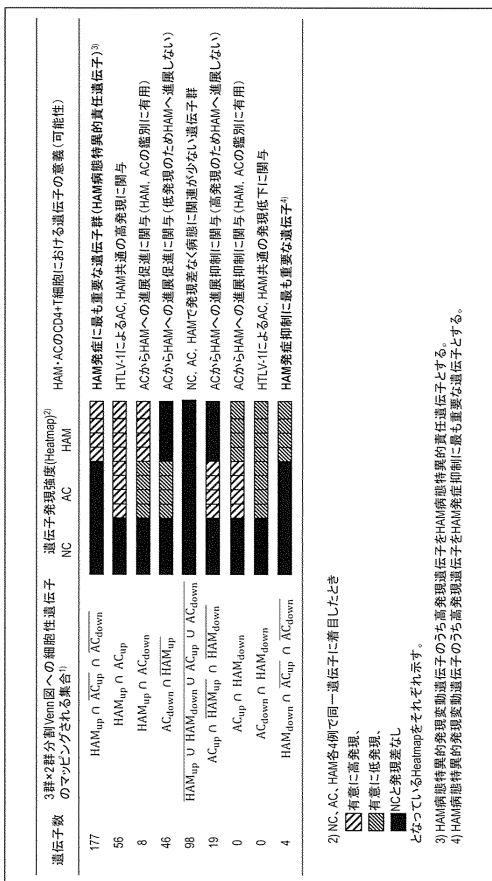
【図2】



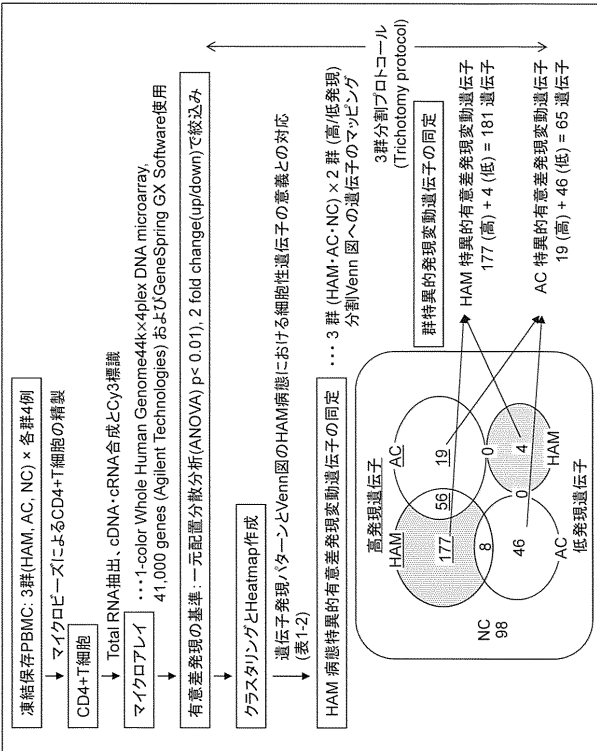
【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】

Gene symbol	Product	Accession number	Gene location	Relative expression (fold change, ± 2SD)	Function and localization
C14orf72	Chromosome 14 open reading frame	NM_098733	14q32.31	9.73± 4.40	hypothetical
CK2S	CK2δ protein kinase regulatory subunit 2	NM_001827	11q22	9.13± 5.22	Cell cycle, cell proliferation, spindle organization
NAF1	nuclear assembly factor 1 homolog (S. cerevisiae)	NM_138366	92q35	7.38± 5.02	ATP, nucleotide, protein binding, cell cycle, division
ZC3H12D	Zinc finger CCHC-type containing 12D	NM_207360	3q01q32	11.34± 7.00	Endonuclease activity, regulates Mφ
POFUT2	Protein O-GlcNAcyltransferase 2 isoform A	NM_015227	21q22.3	10.71± 3.10	O-glycosylation in SF residues in EGF or thrombospondin motifs
RAB11	RAB GTPase activating protein 1-like isoform A	NM_014851	9p38.31	8.81± 5.44	Protein binding
WDR41	WD repeat domain 41	NM_001877	4q24	6.71± 4.32	GTPase activator activity, intracellular
TDP1	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1	NM_018268	5q13.3	6.68± 3.1	K ion binding, plasma membrane protein
BCL2L13	BCL2-like protein 13 (apoptosis facilitator)	NM_018519	5q72	6.49± 3.82	DNA repair, binding
RPS8KAS	ribosomal protein S8 kinase, 90kDa, polypeptide 5	NM_015367	22q11.1	6.39± 4.20	Caspase activator activity
MAML1	Mastomimetic-like domain containing 1	NM_004755	14q31-q32.1	6.30± 4.14	ATP binding, cytoplasm, nucleus
RABEP1	rabep1, RAB GTPase binding effector protein 1 isoform 1	NM_005491	9q35	6.27± 3.88	Regulation of transcription, nucleus
IL6ST	IL-6 signal transducer isoform 1 precursor (gp130, oncostatin M receptor)	NM_004703	17p13.2	5.95± 0.62	membrane fusion, GTPase activator activity, cytoplasm, endosome
TMEM38A	Transmembrane protein 38A	NM_002184	5q11	5.54± 2.42	IL-6, -11, -27 receptor activity, positive regulation of T cell proliferation, plasma membrane
S100P	S100 calcium binding protein P	NM_018266	3q13.33	5.32± 2.30	T cell proliferation, plasma membrane
AF4A	AF4/FMR2 family, member 4	NM_005980	6q26	5.20± 1.88	plasma membrane, transmembrane protein
SIFN5	scleritin family, member 5	NM_014423	27125	5.06± 3.24	Calcium and magnesium ion binding, cytoplasm, nucleus
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	NM_144875	17q12	4.86± 4.94	Regulation of transcription, nucleus
RILPL2	Rab interacting lysosomal protein-like 2	BC018924	6q25.3	4.83± 1.06	ATP, nucleotide binding, cell differentiation, nucleus
PMFBP1	Poyamine modulated factor 1 (PMF-1) binding protein 1	NM_145058	19q38.3	4.83± 1.92	Magnesium ion binding, nucleus
RAN	Ras related nuclear protein	NM_031293	8q44.9	4.76± 3.08	identical protein binding, cytoplasm, cytosol
PMP1	PMP1 homolog (S. cerevisiae)	NM_005225	5801	4.50± 0.98	GTP binding, GTPase activity, mitotic spindle organization, cytosol, nucleus
ME28	Mediator complex subunit 28	CR621244	11137	4.32± 3.90	Transcription, nucleus
		NM_025255	80306	4.28± 1.58	actin binding, protein binding, regulation of transcription, cytoplasm, membrane, nucleus

【 7 】

Gene symbol	Accession number	Gene ID	Gene location	Relative expression (fold change ± 2SD)	Function and localization
HES2	BC012091	54626	106331-108111	4.17E-2.78	DNA binding, transcription regulator activity, nucleus
FAM133B	NM_152789	257415	7421.2	4.14E-1.90	Unknown
RRN3	NM_018427	54700	16912	4.05E-2.14	Regulation of transcription, nucleoplasm, nucleus
HERPUD1	NM_014665	9799	16912.2-q13	4.04E2.58	protein binding, response to unfolded protein; ER stress-nucleole, tubulin-like domain member 1
PRPS1L1	NM_175866	221823	7421.1	3.85E2.14	ATP, magnesium ion binding, kinase activity, cellular component
FRXQ3	NM_012176	28273	11413	3.81E2.04	leucyl-protein ligase activity, proteolysis
POCD2	NM_022658	5134	64227	3.75E1.08	DNA, protein, zinc ion binding, apoptosis, cytoplasm, nucleus
SNAPC5	BC014315	10392	13622.31	3.75E1.66	Regulation of transcription, nucleus
BIRC3	NM_001165	330	11922	3.74E1.90	ubiquitin-protein ligase activity, zinc ion binding, anti-apoptosis, signal transduction, cytoplasm, nucleus
ELIN1	BC085586	2006	7011.23	3.71E2.26	acetylcholinesterase activity, chitinase activity, protein binding, chitinase, extracellular matrix
KRT1	NM_006121	3848	12412-q13	3.70E1.04	Protein, sugar binding, receptor activity, cytoskeleton; plasma membrane
GALNT11	NM_022087	63917	7434-36	3.69E1.46	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity, Golgi
IKZF5	NM_022466	64376	10626	3.65E1.10	DNA, zinc ion binding; intracellular, nucleus or NOT nucleus
TSC1D2	NM_018309	55773	3012.1-122	3.57E2.18	Rob GTPase activator activity, intracellular
MRR141	NM_032477	69575	9434.3	3.52E1.56	structural constituent of ribosome, apoptosis, cell cycle, translation; mitochondria, ribosome
NEFLRQ	NM_020899	60674	10621.3	3.49E2.26	Nervous system development, positive regulation of transcription from RNA polymerase I promoter, nucleus
CRH1A	NM_032630	84916	16622.1	3.49E0.48	Molecular function: nuclear, nucleus
NDFP3	NM_002481	4789	2431.3	3.39E1.18	NADH dehydrogenase (ubiquinone) beta1, mitochondrial electron transport, mitochondria
PLA2G4D	NM_178934	283748	15161.1	3.37E1.20	calcium ion binding, hydrolase activity, phospholipase A2 activity, cytosol, cytoplasm
PTBP1	NM_002819	5725	15161.1	3.36E1.30	RNA splicing; nucleolus, nucleoplasm, nucleus

【 8 】

Gene symbol	Accession number	Gene ID	Gene location	Relative expression (fold change ± 2SD)	Function and localization
HAND1	NM_004821	9421	5433	3.34E-1.82	protein heterodimerization activity, transcription, nucleus
GMCL1	NM_178439	64395	2013.3	3.34E2.76	protein binding, cell differentiation; nucleus
FAT2	NM_001447	2168	5632-33	3.29E0.18	calcium ion, protein binding, cell adhesion; plasma membrane
WR52	NM_01263	10832	1013.3-13.1	3.28E2.74	ATP, nucleotide binding, hypophan-RNA-ligase activity, cytoplasm, mitochondria
CDX4	NM_005193	1048	Xq13.2	3.29E2.02	Sequence-specific DNA binding, transcription factor, nucleus
TG	NM_003211	6896	12424.1	3.27E1.26	DNA N-glycosylase activity, damaged DNA, mismatched DNA binding, nucleus
CCDC85C	BC019600	317762	14632.31	3.27E1.36	Ubiquitin, nucleus
ABL1	M14755	25	9434.1	3.26E2.06	Apoptosis, cell cycle, cell adhesion, actin cytoskeleton organization, peptidyl-tyrosine phosphorylation, transcription, signal transduction, intracellular
PRLH	NM_015893	51052	2637.3	3.25E1.54	Hormone activity, cytoplasm, extracellular
ONSL	NM_003733	8638	12424.2	3.24E2.38	ATP, DNA, double-stranded RNA binding, thyroid hormone receptor binding, transcription activity, cytoplasm, nucleus
HCP5	NM_006574	10866	6921.3	3.23E1.58	Defense response; plasma membrane
CTCFA	NM_001792	908	7911.2	3.22E1.20	ATP, nucleotide, unfolded protein binding, cytoplasm isomerase
SNAD4	NM_005389	4089	18421.1	3.16E0.90	R-SMAD, collagen binding, BMP signaling, cytosol, cytoplasm, nucleoplasm, nucleus
SNM2	NM_022677	6807	5913	3.15E1.02	RNA, protein binding, RNA, mRNA splicing, cell death, cytosol, nucleus
COL13	NM_005408	6357	17411.2	3.14E1.44	chemokine activity, signal transducer activity, cell-cell signaling, inflammatory response; plasma membrane
TRIM23	NM_001696	373	5912.3	3.14E0.92	GDP, GTP, nucleotide binding; Golgi, cytoplasm
PFKEB2	NM_006212	5208	1031	3.13E1.32	ATP, nucleotide binding, 6-phosphotriphospho-2-kinase hydrolyase, kinase, transferase activity, cytosol
ERN1	NM_152461	2081	17424.2	3.08E0.74	Endonuclease activity, cell cycle arrest, mRNA processing, regulation of transcription; ER, nuclear inner membrane
GABPB2	NM_005254	126626	1021.3	3.07E1.86	protein binding, transcription factor activity, nucleus
RAPGEF1	NM_198879	2889	9434.3	3.05E2.20	SH3 domain binding, guanylnucleotide exchange factor activity, protein binding; cytosol, endosome, intracellular factor 2 isomerase

【 9 】

Gene symbol	Accession number	Gene ID	Gene location	Relative expression (fold change ± 2SD)	Function and localization
YTHDC1	NM_133370	91746	4q13.2	3.04E0.96	RNA splicing, mRNA processing; nucleus
MORF4L1	NM_026839	10933	15424	3.03E1.82	DNA repair, chromatin modification, histone H2A acetylation, histone H4 acetylation, histone deacetylase activity
SOX3	NM_006534	6658	Xq27.1	3.02E1.54	DNA binding, nucleus
SNRRP	NM_003096	6637	2p13.3	2.99E1.46	DNA binding, RNA splicing, protein binding; cytosol, nucleus
POLR2K	NM_005034	5440	8q22.2	2.98E1.14	DNA binding, DNA-directed RNA polymerase activity, zinc ion binding; nucleoplasm, nucleus
ZMAT2	NM_144723	153527	5q31.3	2.97E1.46	DNA binding, zinc ion binding; intracellular, nucleus
AATK	AK131529	9625	17q25.3	2.95E1.94	ATP, nucleotide binding, transferase; cytoplasm, mitochondria
TSPAN13	NM_014399	27075	7q21.1	2.94E1.16	Plasma membrane
TSAR5	NM_003967	9038	6q23	2.89E1.22	C-protein coupled receptor activity; plasma membrane
TMEM126A	NM_032273	84233	10141.1	2.87E0.72	Molecular function: plasma membrane, mitochondria
COMP	NM_000095	1311	19p13.1	2.85E2.16	calcium ion binding, ECM structure, cell adhesion; extracellular
LILBP2	NM_029217	80328	6q25	2.80E1.54	MHC class I receptor, NK cell activation; plasma membrane
ADAM7	NM_003817	8756	8q21.2	2.76E1.10	metalloproteinase activity, zinc ion binding, proteolysis; plasma membrane
HUS1	NM_004507	3364	7q13-12	2.75E1.54	protein binding, protein serine/threonine kinase activity, DNA repair, cell cycle; cytoplasm, nucleus
SH3BP1	AY423734	30011	Xp22.1-q13.1	2.74E1.54	SH3 domain binding, protein binding, apoptosis, cell-cell signaling, endocytosis, focal adhesion; plasma membrane
PPM1B	NM_002706	5495	2q21	2.70E0.74	hydrolase activity, magnesium ion binding, protein binding, protein serine/threonine phosphatase activity
SHUREF1	NM_020429	57154	7q22.1	2.69E1.02	ubiquitin-protein ligase activity; cytoplasm, plasma membrane
SNPY	NM_014332	28676	Xq22.1	2.65E0.94	striated muscle contraction; cytoplasm, nucleus
ADAM21	NM_003813	8747	14q24.1	2.63E1.08	zinc ion binding, metalloproteinase activity, proteolysis, single fertilization; membrane
IGFALS	NM_004970	3483	16p13.3	2.62E0.68	IGF binding, protein C-terminus binding, cell adhesion; extracellular matrix
NPM1	NM_199185	4869	5q35	2.62E0.60	NR4A2BP1, 'a1' protein, RNA, histone binding; protein hetero- or homo-dimerization, anti-apoptosis, cell-signaling
ZNF407	AB051460	55628	18q23	2.61E0.68	DNA, zinc ion binding, transcription; intracellular, nucleus

【 10 】

Gene symbol	Accession number	Gene ID	Gene location	Relative expression (fold change ± 2SD)	Function and localization
HLA-E	NM_005516	3133	6p21.3	2.61E0.56	MHC class I receptor activity, antigen processing and presentation; plasma membrane
MOBK3	NM_015387	25943	2q33.1	2.59E1.02	zinc ion, protein binding; Golgi, cytoplasm, membrane
BBD2	NM_030578	80776	19q13.2	2.57E0.52	cell projection organization; cilium, microtubule basal body, nucleus
PEX8	NM_000287	5190	6p21.1	2.54E0.94	ATPase activity, ATP, nucleotide, protein C-terminus binding; cytoplasm, cytosol, peroxisome
YWHAZ	NM_145680	7534	8q23.1	2.52E0.86	protein domain specific binding, transcription factor binding, anti-apoptosis; cytoplasm, mitochondria, nucleus
SUP3D1	NM_003171	6832	10q22.1	2.49E0.40	ATP, DNA, RNA, nucleotide binding, DNA helicase activity, hydrolyase activity, DNA duplex unwinding; nucleus, mitochondria
EIF2S1	NM_004094	1965	14q23.3	2.48E1.22	RNA, protein binding, translation initiation factor activity; cytoplasm, cytosol, nucleus
TUBA1B	A1608782	10376	12q13.12	2.48E0.94	GTP, protein binding, GTPase activity, microtubule cytoskeleton organization; microtubule
HNRPCL1	NM_0010136	343669	1p36.21	2.48E0.80	RNA binding, nucleotide binding; nucleus
POLB	NM_002690	5423	8p11.2	2.45E1.12	DNA-directed DNA polymerase activity, damaged DNA binding, enzyme binding, base activity; cytoplasm, nucleoplasm, nucleus, spicule, microtubule
SRPK3	NM_014370	26576	Xq28	2.45E0.38	ATP, nucleotide, protein binding, protein serine/threonine kinase activity, transferase; intracellular, nucleus, cytosol
TSPYL1	NM_00309	7259	6q22.23	2.44E0.88	Molecular function: intracellular, nucleus, cytosol, cytoplasm
RAI2	NM_021785	10742	Xq22	2.44E1.18	Molecular function, embryonic development; cellular component
UCR11	NM_006830	10975	19p13.3	2.44E0.32	electron transfer activity, ubiquitin-cytosome-c reduction activity; mitochondria
POLDIP3	NM_032311	84271	22q13.2	2.41E0.44	RNA binding, nucleotide binding, protein binding; nucleus
RPS14	NM_005617	6208	5q31-33	2.39E0.60	RNA, mRNA 5'-UTR, protein binding, constituent of ribosome, translation regulator activity; cytosol, nucleolus, ribosome

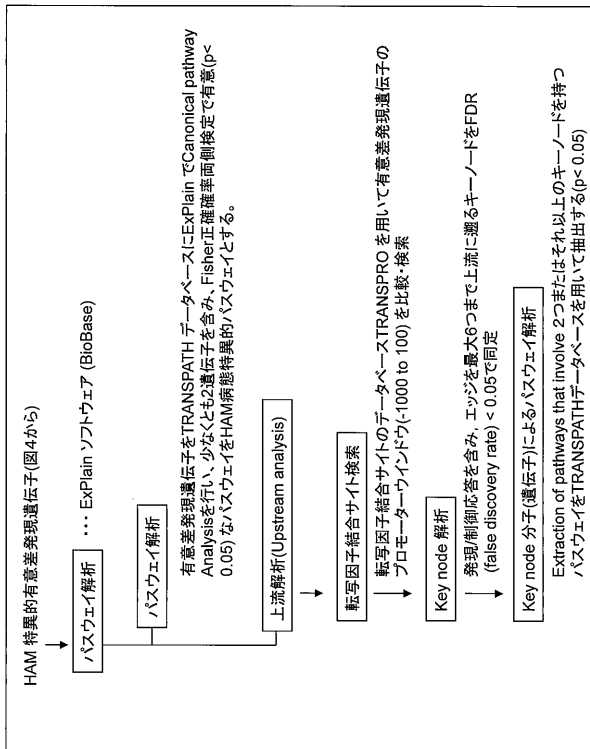
【 ☒ 1 1 】

Gene symbol	Accession number	Gene location	Relative expression (fold change ± SD)	Function and localization
SMCHD1	AK12624	23347	1811.32	2.362040 ATP, protein binding, chromosome
HBS1L	A145987	10787	6232.24	GTP, nucleotide binding, GTPase activity, translation elongation factor activity
SLC4A3	U05597	658	2.224060	anion transmembrane transporter activity, inorganic anion exchanger activity, transporter activity, plasma membrane member 3

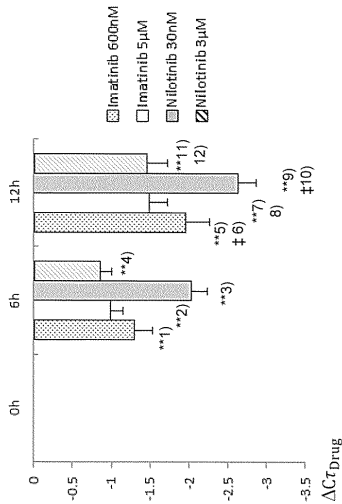
【 ☒ 1 3 】

Pathway ID of TRANSPATH database	Molecular name	Pathway name	#Hits in group	Group size	#Hits expected	P-value
CH000003804	ABL-1a, ABL-1b	Abi → TOPBP1	2	3	1	0.000213782
CH000003870	ABL-1a, ABL-1b	Abi → Rad52	2	4	1	0.000425383
CH000000872	ABL-1a, ABL-1b	Abi →/ Bcl-xL	2	4	1	0.000425383
CH000003546	ABL-1a, ABL-1b	Abi →/ Caspase-9	2	4	1	0.000425383
CH000000867	ABL-1a, ABL-1b	Abi →/ p73α	2	5	1	0.000705355
CH000000908	ABL-1a, ABL-1b	Caspase-8 →/ Abi	2	6	1	0.00105284
CH000000997	ABL-1a, ABL-1b	Ubc9 →/ p73α	2	7	1	0.00146618
CH000000895	ABL-1a, ABL-1b	Fas →/ Abi	2	10	1	0.00309403
CH000000877	ABL-1a, ABL-1b	Abi →/ p53	2	11	1	0.00378233
CH000000669	ABL-1a, ABL-1b	p73 pathway	2	24	1	0.0176695
CH000000711	SMAD4, Ran, Smur1	TGFβ pathway	3	76	1	0.0260633
CH000000879	ABL-1a, ABL-1b, cIAP-2	Caspase network	3	93	1	0.0439147

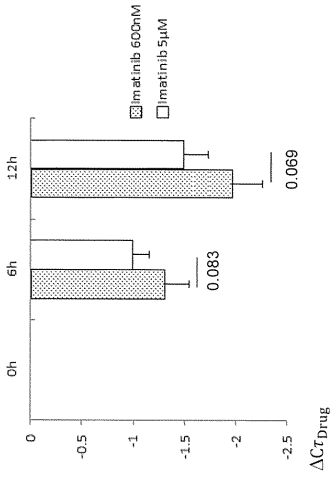
【 ☒ 1 2 】



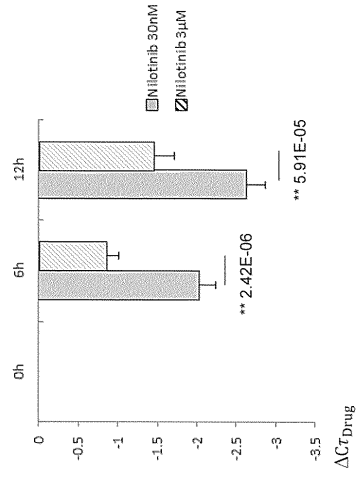
【 ☒ 1 4 】



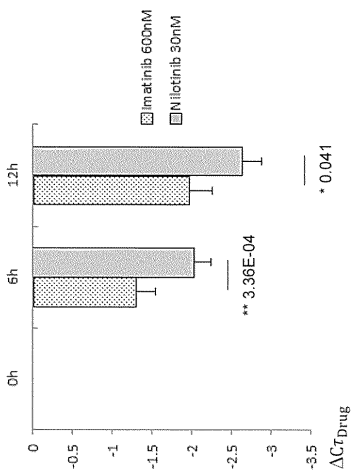
【 15 】



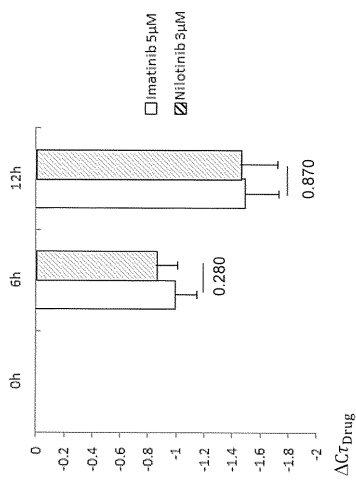
【 16 】



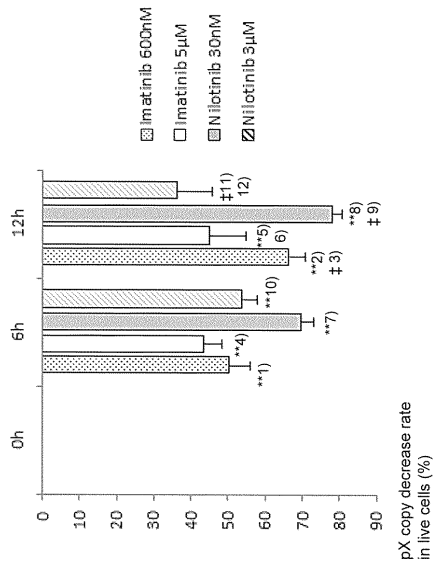
【 17 】



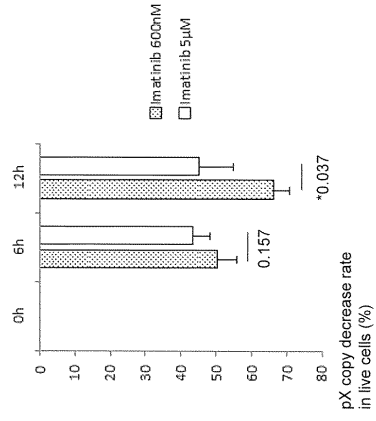
【 18 】



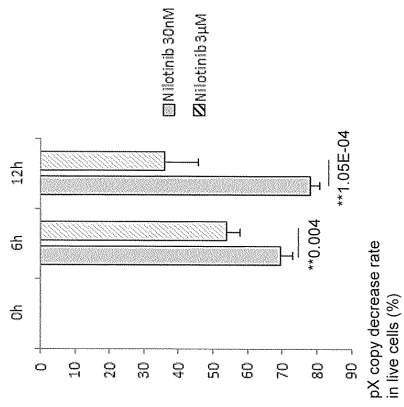
【 19 】



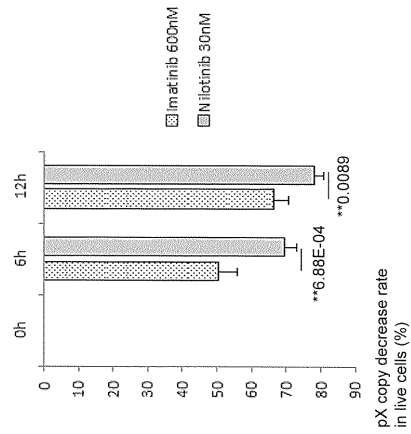
【 20 】



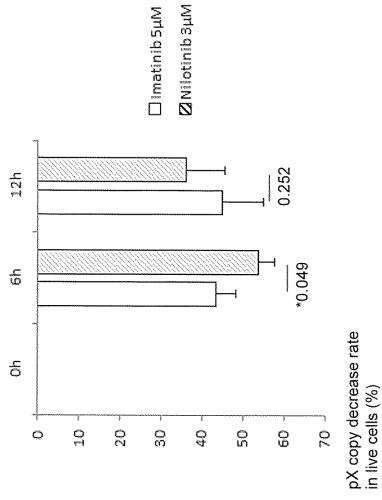
【 21 】



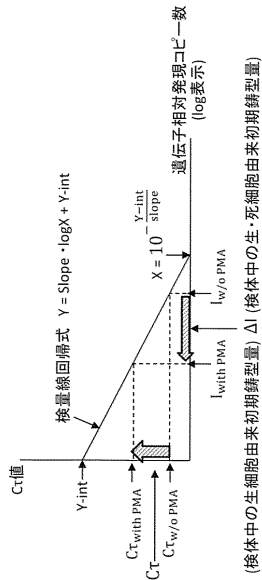
【 22 】



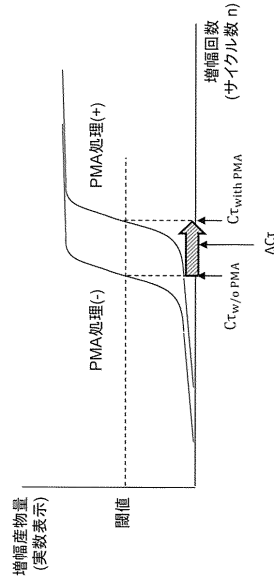
【 図 2 3 】



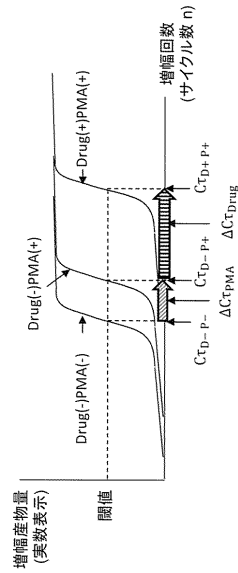
【 図 2 5 】



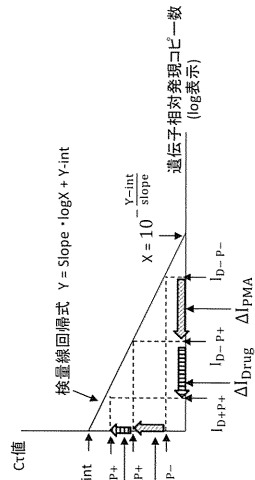
【 図 2 4 】



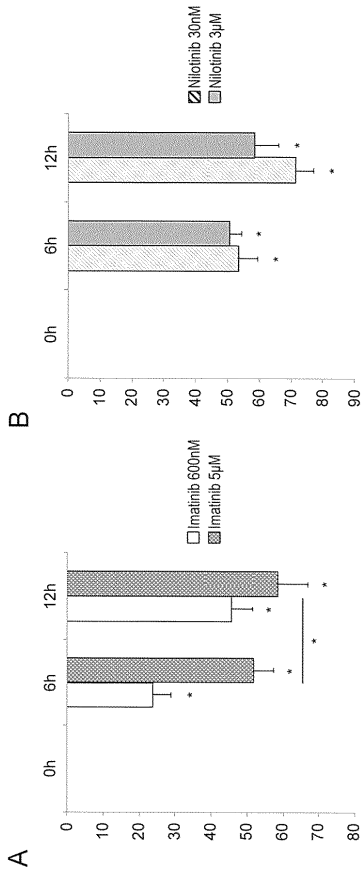
【 図 2 6 】



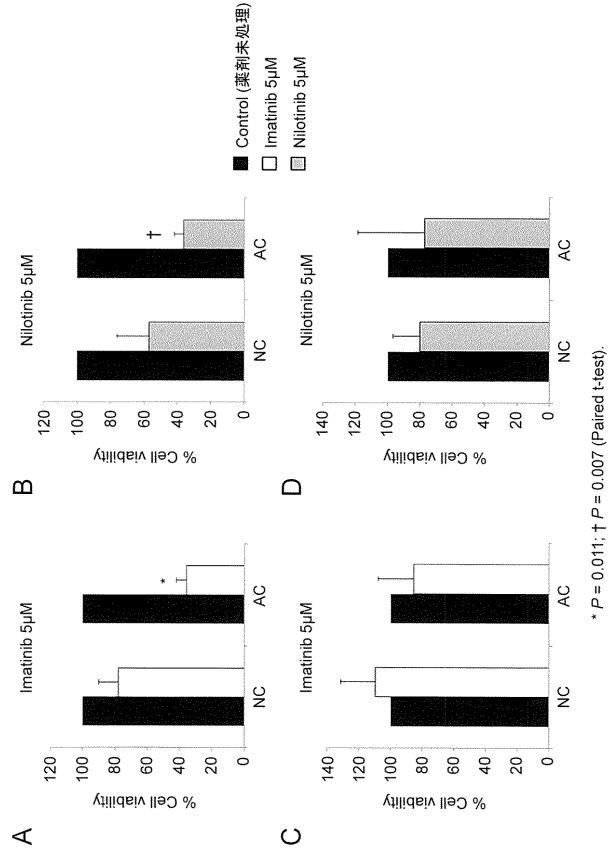
【 図 2 7 】



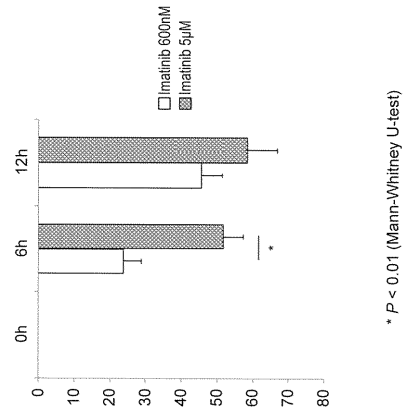
【 図 2 9 】



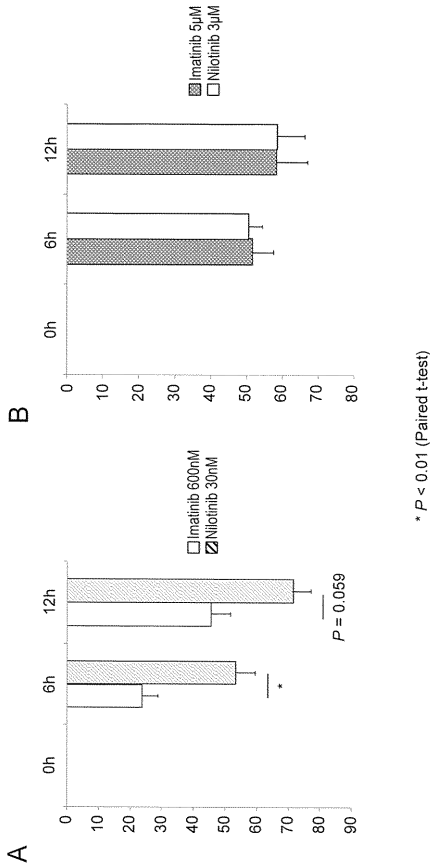
【 図 2 8 】



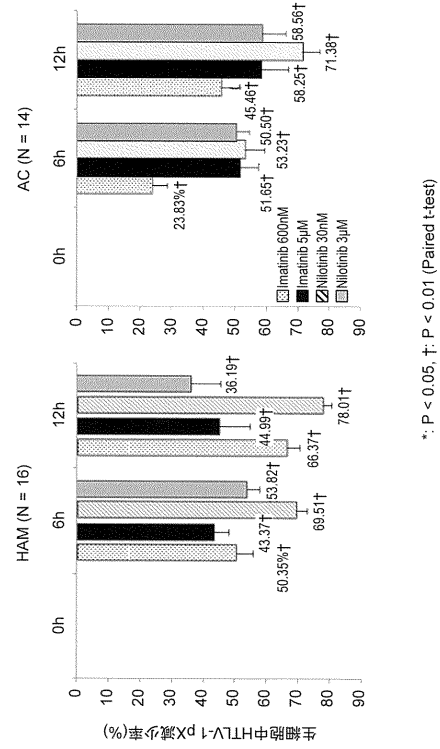
【 図 3 0 】



【 図 3 1 】



【 図 3 2 】



【 手続 補正書 】

【 提出日 】 平成29年12月25日 (2017.12.25)

【 手続 補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

イマチニブ、ニロチニブ及びダサチニブからなる群から選ばれる少なくとも1つの物質を有効成分とするHTLV-1関連脊髄症(HAM/TSP)治療薬。

【 請求項 2 】

(削除)

【 請求項 3 】

イマチニブ、ニロチニブ及びダサチニブからなる群から選ばれる少なくとも1つの物質を有効成分とする抗HTLV-1剤。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/028094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K45/00(2006.01)i, A61K31/506(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K45/00, A61K31/506, A61P19/00, A61P25/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PINTO M.T. et al., T cell receptor signaling pathway is overexpressed in CD4(+) T cells from HAM/TSP individuals., Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2015, Vol.16, No.6, pages 578 to 584, ISSN: 1413-8670 Abstract, page 579, left column, lines 37 to 48, page 582, left column, line 7 to page 582, right column, line 5, page 582, right column, lines 27 to 33	1-4
Y	LEE K.C. et al., Lck is a key target of imatinib and dasatinib in T-cell activation., Leukemia, 2010, Vol.24, No.4, pages 896 to 900, ISSN: 0887-6924 page 897, left column, lines 12 to 26, page 898, right column, lines 21 to 24, page 899, left column, lines 23 to 33, page 899, left column, lines 52 to 64	1-4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 21 September 2017 (21.09.17)		Date of mailing of the international search report 03 October 2017 (03.10.17)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/028094

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STEPHEN T.L. et al., Subcellular distribution of Lck during CD4 T-cell maturation in the thymic medulla regulates the T-cell activation threshold., Proc Natl Acad Sci USA, 2012, Vol.109, No.19, pages 7415 to 7420, ISSN:0027-8424 page 7415, right column, line 44 to page 7416, left column, line 15, page 7417, right column, lines 25 to 32	1-4
A	DUMAIS N. et al, T-cell receptor/CD28 engagement when combined with prostaglandin E2 treatment leads to potent activation of human T-cell leukemia virus type 1., Journal of Virology, 2003, Vol.77, No.20, pages 11170 to 11179, ISSN:0022-538X	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/028094

Object to be covered by this search:

Claims 1 and 3 relate to a therapeutic agent for HAM/TSP or an anti-HTLV-1 drug comprising, as an active ingredient, a substance that is defined by a desired property, i.e., "a substance capable of inhibiting tyrosine kinase encoded by ABL1 gene".

Although claims 1 and 3 involve all materials having such a property, disclosed within the meaning of PCT Article 5 is merely a slight portion of the claimed material, and consequently, it is considered that said claims lack the support by the disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6.

With regard to "a substance capable of inhibiting tyrosine kinase encoded by ABL1 gene", even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it cannot be recognized that the scope of compounds having the above property could be specified. Thus, claims 1 and 3 also fail to satisfy the requirement of clearness as defined in Article 6 of the PCT.

Such being the case, the search was practiced on the relationship between tyrosine kinase encoded by ABL1 gene and HAM/TSP or HTLV-1 and therapeutic agents for HAM/TSP or anti-HTLV-1 drugs comprising, as an active ingredient, the substances that are disclosed in the description and specified in claims 2 and 4.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2017/028094									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/506(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K45/00, A61K31/506, A61P19/00, A61P25/00											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr><td>日本国実用新案公報</td><td>1922-1996年</td></tr> <tr><td>日本国公開実用新案公報</td><td>1971-2017年</td></tr> <tr><td>日本国実用新案登録公報</td><td>1996-2017年</td></tr> <tr><td>日本国登録実用新案公報</td><td>1994-2017年</td></tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2017年	日本国実用新案登録公報	1996-2017年	日本国登録実用新案公報	1994-2017年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2017年										
日本国実用新案登録公報	1996-2017年										
日本国登録実用新案公報	1994-2017年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
Y	PINTO M.T. et al., T cell receptor signaling pathway is overexpressed in CD4(+) T cells from HAM/TSP individuals., Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2015, Vol.16, No.6, pages 578 to 584, ISSN: 1413-8670 Abstract、579 ページ左欄 37~48 行目、582 ページ左欄 7 行目~582 ページ右欄 5 行目、582 ページ右欄 27~33 行目	1-4									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 21.09.2017		国際調査報告の発送日 03.10.2017									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小森 潔	4U 3762								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3439								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2017/028094
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	LEE K.C. et al., Lck is a key target of imatinib and dasatinib in T-cell activation., Leukemia, 2010, Vol.24, No.4, pages 896 to 900, ISSN: 0887-6924 897 ページ左欄 12~26 行目、898 ページ右欄 21~24 行目、899 ページ左欄 23~33 行目、899 ページ左欄 52~64 行目	1-4
Y	STEPHEN T.L. et al., Subcellular distribution of Lck during CD4 T-cell maturation in the thymic medulla regulates the T-cell activation threshold., Proc Natl Acad Sci USA, 2012, Vol.109, No.19, pages 7415 to 7420, ISSN:0027-8424 7415 ページ右欄 44 行目~7416 ページ左欄 15 行目、7417 ページ右欄 25~32 行目	1-4
A	DUMAIS N. et al, T-cell receptor/CD28 engagement when combined with prostaglandin E2 treatment leads to potent activation of human T-cell leukemia virus type 1., Journal of Virology, 2003, Vol.77, No.20, pages 11170 to 11179, ISSN:0022-538X	1-4

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2017/028094

<調査の対象について>

請求項1, 3は、「ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質」という所望の性質により定義された物質を有効成分とするHAM/TSP治療薬、あるいは、抗HTLV-1剤に関するものである。

そして、請求項1, 3は、そのような性質を有するあらゆる物質を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた物質のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼを阻害する物質」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求項1, 3は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、ABL1遺伝子によりコードされるチロシンキナーゼとHAM/TSPあるいはHTLV-1との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求項2, 4に特定されている物質を有効成分として含有するHAM/TSP治療薬、あるいは、抗HTLV-1剤について行った。

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。