(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116850291 A
(43)申请公布日 2023.10.10

(21)申请号 202310983521.2
(22)申请日 2019.07.19
(30)优先权数据
2018-135925 2018.07.19 JP
(62)分案原申请数据
201980048012.2 2019.07.19
(71)申请人 国立大学法人东京大学
地址 日本东京都
申请人 学校法人圣玛丽安娜医科大学
(72)发明人 内丸薰 山岸诚 石崎伊纯 山野嘉久
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 周莎
(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/22(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)

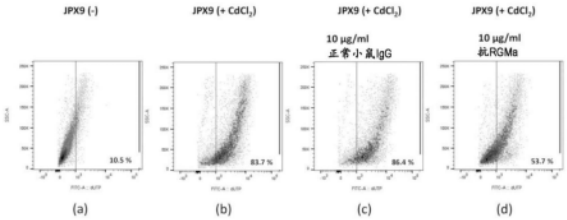
权利要求书1页 说明书16页
序列表（电子公布） 附图6页

(54)发明名称

HTLV-1相关性脊髓病(HAM)治疗或预防剂、及HAM的治疗方法

(57)摘要

本申请涉及HTLV-1相关性脊髓病(HAM)治疗或预防剂、及HAM的治疗方法。本发明提供含有RGMa阻遏物质的HTLV-1相关性脊髓病(HAM)的治疗或预防剂、及包括向需要其的HTLV-1相关性脊髓病(HAM)患者施予药理学有效量的RGMa阻遏物质的、HAM的治疗方法。



CN 116850291 A

1.RGMa阻遏物质在HTLV-1相关性脊髓病(HAM)的治疗或预防剂的制造中的用途。

2.RGMa阻遏物质在HAM的炎症病况诱导的抑制剂的制造中的用途。

3.如权利要求2所述的用途,其中,所述HAM的炎症病况诱导的抑制剂为CXCL10产生抑制剂。

4.RGMa阻遏物质在HAM的炎症的抑制剂的制造中的用途。

5.如权利要求4所述的HAM的用途,其中,所述HAM的炎症的抑制剂为IL-10产生增加剂。

6.RGMa阻遏物质在HTLV-1-tax表达细胞导致的神经细胞死亡的抑制剂的制造中的用途。

7.如权利要求1、2、4或6所述的用途,其中,所述RGMa阻遏物质为识别RGMa的抗体或其抗原结合片段。

8.如权利要求7所述的用途,其中,所述抗体或其抗原结合片段为轻链的互补性决定区1(LCDR1)、轻链的互补性决定区2(LCDR2)、轻链的互补性决定区3(LCDR3)、重链的互补性决定区1(HCDR1)、重链的互补性决定区2(HCDR2)及重链的互补性决定区3(HCDR3)各自的氨基酸序列包含在下述序列中取代、缺失、及/或添加1个或2个氨基酸而得的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段:

LCDR1:RASQDISSYLN(序列号58)

LCDR2:YTSRLHS(序列号59)

LCDR3:QQLNTLP(序列号60)

HCDR1:DAWMD(序列号61)

HCDR2:EIRSKANNHATYYAESVKG(序列号62)及

HCDR3:RDGAY(序列号63);

或者

LCDR1:RSSQSLVHSNGNTYLH(序列号64)

LCDR2:KVSNRFS(序列号65)

LCDR3:SQSTHVP(序列号66)

HCDR1:TSYYWN(序列号67)

HCDR2:YISYDGTNNYNPSLKN(序列号68)及

HCDR3:SFG。

9.如权利要求7所述的用途,其中,所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区(VH)包含与序列号95的氨基酸序列的同一性为至少90%的氨基酸序列,轻链可变区(VL)包含与序列号96的氨基酸序列的同一性为至少90%的氨基酸序列。

HTLV-1相关性脊髓病(HAM)治疗或预防剂、及HAM的治疗方法

[0001] 本申请是申请日为2019年7月19日、发明名称为“HTLV-1相关性脊髓病(HAM)治疗或预防剂、及HAM的治疗方法”的中国发明专利申请No.201980048012.2(PCT申请号为PCT/JP2019/028431)的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及HTLV-1相关性脊髓病(HAM)治疗或预防剂。另外,本发明也涉及HAM的治疗方法。

背景技术

[0003] HTLV-1(人T细胞白血病病毒1型,Human T-cell Lukemia Virus Type 1;人T细胞白血病病毒)是会感染作为血液中白细胞之一的T细胞等(主要是CD4阳性T细胞)的病毒。

[0004] 感染了HTLV-1的T细胞在脊髓中形成慢性的炎症,结果引起脊髓神经细胞的障碍及变性,引发脊髓痉挛性麻痹。因感染了HTLV-1的细胞而引起的脊髓痉挛性麻痹被称为HTLV-1相关性脊髓病(也简记为HAM)。

[0005] 作为HAM的症状,可举出因神经组织障碍导致的双腿(脚)麻痹、疼痛、排尿障碍、顽固性便秘等症状等。这些症状的进展会导致轮椅生活、卧床不起的生活。HAM是被指定为日本的指定性疑难病的疾病之一。目前,尚未确立有效的HAM的治疗方法,主要实施对症治疗。

[0006] 作为治疗方法之一,使用抗CCR4抗体的治疗方法已被证明使HTLV-1感染细胞减少,减轻HAM的脊髓炎症,起到改善症状的效果(非专利文献1、专利文献5)。

[0007] RGMa蛋白是与视网膜、海马体的神经细胞的轴突诱导、神经管的闭合等相关的蛋白质RGM(排斥性导向分子,Repulsive guidance molecule)家族中的一种。RGM的作用不限于上述,已知其具有各种功能。

[0008] 例如,专利文献1中公开了RGM在来源于骨髓的树突细胞(BMDCs)中表达,RGM受体在$CD4^+$T细胞及$CD11b^+$巨噬细胞中表达,RGM与该RGM受体结合从而使得$CD4^+$T细胞及$CD11b^+$巨噬细胞的细胞粘附活性增强。另外,专利文献1中公开了利用抗RGM中和抗体能够减轻多发性硬化症模型小鼠的临床症状及组织病变这两者,从该小鼠获得的脾细胞中,抗原特异性及非特异性的T细胞活化减弱。

[0009] 专利文献2及3中公开了选择性地阻遏RGMa与RGMa的受体再生蛋白(neogenin)以及骨形态发生蛋白2及骨形态发生蛋白4(BMP-2、BMP-4)的结合的、针对RGMa的中和单克隆抗体。认为利用该中和单克隆抗体有可能促进在受到损伤、引起了炎症的人中枢神经系统中、具体而言在多发性硬化症、急性脊髓损伤、脑外伤后遗症、亨廷顿氏舞蹈症(Huntington's disease)、帕金森病、阿尔茨海默病等神经退行性疾病中被破坏的神经元耦合的神经再生及再生长。

[0010] 专利文献4中公开了RGMa局部集中于患有创伤性脑损伤或缺血性中风的人的中枢神经系统髓鞘质、新生病灶及成熟瘢痕组织中,公开了以诊断上述神经退行性疾病为目的而对RGMa片段进行检测、定量的方法。另外,专利文献4中,作为RGMa片段检测所针对的对象

的神经退行性疾病及障碍,举出了多发性硬化症、帕金森病、阿尔茨海默病、泰伊-萨克斯二氏病(Tay-Sachs disease)、尼-皮二氏病(Niemann-Pick disease)、高雪氏病(Gaucher's disease)、赫尔勒综合征(Hurler's syndrome)、亨廷顿病、肌萎缩性侧束硬化症、特发性炎性脱髓鞘病、维生素B12缺乏症、脑桥中央髓鞘溶解症(central pontine myelinolysis)、脊髓痨(locomotor ataxia)、横贯性脊髓炎、德维克氏病(Devic's disease)、进行性多病灶脑白质病、视神经炎、脊髓损伤、创伤性脑损伤、中风、青光眼、糖尿病性视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、脑白质营养不良(leukodystrophy)。

[0011] 现有技术文献

[0012] 专利文献

[0013] 专利文献1:国际公开2011/071059号

[0014] 专利文献2:日本特开2014-138599号

[0015] 专利文献3:日本特开2016-175897号

[0016] 专利文献4:日本特表2017-526930号

[0017] 专利文献5:日本特开2010-100578号

[0018] 非专利文献

[0019] 非专利文献1:N Engl J Med,2018,378,529-538.

发明内容

[0020] 发明所要解决的课题

[0021] 虽然利用非专利文献1、专利文献5中公开的使用抗CCR4抗体的方法能够改善HAM的症状,但对于神经破坏已经进展的HAM患者而言,抗CCR4抗体的效果是有限的。因此,需求能够治疗HAM的更优异的方法。

[0022] 本发明是鉴于上述问题而完成的,其目的为提供能够治疗HAM的治疗剂及治疗方法。

[0023] 用于解决课题的手段

[0024] 本申请的发明人为了解决上述课题而反复进行了深入研究,结果发现,阻遏RGMa的物质对于HAM的治疗有效,从而完成了本发明。

[0025] 即,本发明如下所述。

[0026] [1]

[0027] HTLV-1相关性脊髓病(HAM)的治疗或预防剂,其含有RGMa阻遏物质。

[0028] [2]

[0029] 如[1]所述的HAM的治疗或预防剂,其中,所述RGMa阻遏物质为识别RGMa的抗体。

[0030] [3]

[0031] HAM的治疗方法,其包括向需要其的HTLV-1相关性脊髓病(HAM)患者施予药理学有效量的RGMa阻遏物质。

[0032] [4]

[0033] 如[3]所述的HAM的治疗方法,其中,所述RGMa阻遏物质为识别RGMa的抗体。

[0034] 发明效果

[0035] 根据本发明,能够治疗作为难治性疾病的HAM。

附图说明

[0036] [图1]为示出CD4阳性T细胞中、基于作为HTLV-1感染细胞的指标的CADM1、和CD7分类而得到的组P、D、N的图。

[0037] [图2]为示出正常T细胞(正常.CD4)、来源于HAM患者的CD4阳性T细胞(HAM.CD4)、来源于健康人的CD4阳性/CADM1阴性/CD7阳性T细胞(正常.P)、HTLV-1感染者CD4阳性/CADM1阴性/CD7阳性T细胞(P组)、HTLV-1感染者CD4阳性/CADM1阳性/CD7阳性T细胞(D组)、HTLV-1感染者CD4阳性/CADM1阳性/CD7阴性T细胞(N组)、急性型ATL患者CD4阳性/CADM1阳性/CD7阴性T细胞(急性.N)、健康人CD4阳性T细胞(正常.CD4.1)、来源于郁积型ATL患者的PBMC(郁积(Smoldering))、来源于慢性型ATL患者的PBMC(慢性(Chronic))、来源于急性型ATL患者的PBMC(急性(Acute))中的、RGMa基因的表达水平的图。

[0038] [图3]为示出HAM患者CD4阳性T细胞及健康者CD4阳性T细胞中的RGMa的表达量的图。

[0039] [图4]为示出对HAM患者PBMC中的细胞种类间的RGMa的表达量进行分析而得的结果的图。

[0040] [图5]为示出HAM患者PBMC的培养中的、伴随HTLV-1病毒表达的RGMa的表达变化的图。

[0041] [图6]为示出自RGMa基因的转录起始位点起-2,916bp上游附近的H3K27me3水平的图。

[0042] [图7]为示出针对人CD4阳性T细胞白血病细胞株Jurkat导入了插入编码HTLV-1Tax的cDNA的慢病毒载体时的、RGMa基因mRNA的水平的图。

[0043] [图8]为示出HTLV-1-tax表达诱导细胞株JPX-9中的Tax及RGMa的蛋白表达的分析结果的图。

[0044] [图9]为关于RGMa抗体针对HAM患者PBMC的作用,示出RGMa抗体对于自主增殖活性的作用的结果的图。

[0045] [图10]为关于RGMa抗体针对HAM患者PBMC的作用,示出RGMa抗体对于HTLV-1前病毒量变化的作用的结果的图。

[0046] [图11]为关于RGMa抗体针对HAM患者PBMC的作用,示出RGMa抗体对于CXCL10产生的作用的结果的图。

[0047] [图12]为关于RGMa抗体针对HAM患者PBMC的作用,示出RGMa抗体针对HAM患者PBMC的细胞因子产生的作用的结果的图。

[0048] [图13]为表示HAM-PBMC引起了神经细胞株的凋亡诱导的图。

[0049] [图14]为示出RGMa抗体的、针对基于HTLV-1-tax诱导细胞株的神经细胞株凋亡诱导的抑制作用的结果的图。(a)为对NB-1细胞和JPX-9细胞(未刺激)进行共培养时的FACS绘图(plot)。(b)为对NB-1细胞和$CdCl_2$刺激JPX-9细胞(HTLV-1-tax表达细胞)进行共培养时的FACS绘图。(c)为在(b)的条件中添加了对照抗体时的FACS绘图。(d)为在(b)的条件中添加了抗RGMa抗体时的FACS绘图。

具体实施方式

[0050] 以下,对本发明的实施方式进行详细说明。需要说明的是,本发明不限于以下的本

实施方式,可以在其主旨的范围内进行各种变型而实施。

[0051] 本发明是含有RGMa阻遏物质的、HTLV-1相关性脊髓病(HAM)的治疗或预防剂。RGMa阻遏物质可以是作用于RGMa自身来阻遏RGMa的活性的物质,也可以是抑制RGMa的表达的物质。

[0052] 作为RGMa阻遏物质,例如,可举出具有阻遏RGMa的活性的化合物、及识别RGMa的抗体等。

[0053] 另外,作为RGMa阻遏物质,例如,可举出表达RGMa的基因的siRNA(短干扰RNA,short interfering RNA)、shRNA(短发夹RNA,short hairpin RNA)、及反义寡核苷酸等抑制RGMa的表达的物质。

[0054] 作为RGMa基因,可举出例如包含序列号1所示的碱基序列的人RGMa基因、包含序列号2所示的碱基序列的RGMa基因等,但不限于这些。来自各种生物的RGMa基因的碱基序列的信息可从GenBank等数据库中获得。

[0055] siRNA是能够抑制作为靶标的RGMa基因的表达的双链RNA。siRNA中的碱基序列的长度(碱基长度)没有特别限定,优选为约小于30个碱基,更优选为约19～27个碱基,进一步优选为约21～25个碱基。

[0056] shRNA是指由通过在单链RNA中局部地包含回文状的碱基序列从而在分子内具有双链结构、在3'末端具有突出部的短发夹结构形成的约20个碱基对以上的分子。shRNA在被导入细胞内后,在细胞内被分解成约20个碱基的长度,能够与siRNA同样地抑制作为靶标的RGMa基因的表达。

[0057] siRNA及shRNA可进行人工化学合成。另外,siRNA及shRNA可使用例如T7RNA聚合酶及T7启动子,在体外从模板DNA合成反义RNA及有义RNA。

[0058] 反义寡核苷酸只要是与RGMa基因的DNA序列中少于连续的约30个碱基的碱基序列互补的、或可与其进行杂交的核苷酸即可,可以是DNA或RNA中的任一者。另外,只要对功能没有妨碍,则可以是经修饰的核苷酸。反义寡核苷酸可利用常规方法进行合成,例如,可利用市售的DNA合成装置容易地合成。

[0059] 作为本发明的HAM的治疗或预防剂所含的RGMa阻遏物质,优选识别RGMa的抗体。以下,也将识别RGMa的抗体称为RGMa抗体。本发明中的RGMa抗体只要是与RGMa结合并阻遏其活性的抗体即可,例如,可举出通过结合至RGMa从而使RGMa无法与RGMa受体结合的抗体等。

[0060] 本发明中的RGMa抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。另外,本发明中的抗体可以是IgG、IgM、IgA、IgD及IgE中的任一同种型(isotype)。

[0061] 本发明中的RGMa抗体可以是例如小鼠抗体、人型CDR移植抗体、人型嵌合抗体、人源化抗体、或全人源化抗体,也可以是小分子抗体。这些抗体可以单独使用1种,也可以组合2种以上使用

[0062] 人型CDR移植抗体是将人以外的动物的抗体的CDR用人抗体的CDR进行置换而得的抗体。人型嵌合抗体是包含来自人以外的动物的抗体的可变区、和来自人抗体的恒定区的抗体。另外,人源化抗体是指在人以外的动物的抗体中保留安全性高的一部分区域、组入来自人的抗体的部分而得的抗体,是包括人型嵌合抗体、及人型CDR移植抗体在内的概念。

[0063] 本说明书中"小分子抗体"是指抗体的片段或使任意的分子与抗体的片段结合而得的物质,且识别与原本的抗体相同的表位。具体而言,可举出由VL、VH、CL及CH1区组成的

Fab;2个Fab在铰链区介由二硫键连结而成的F(ab')2;由VL及VH组成的Fv;将VL及VH用人造多肽接头连结而成的单链抗体scFv;以及sdFv、Diabody、sc(Fv)2,但不限于这些。

[0064] 本发明中使用的RGMa抗体可使用RGMa或其片段作为免疫原,通过已知的方法制备。

[0065] 可将RGMa活性作为指标来确认得到的抗体为RGMa抗体。

[0066] 作为RGMa,可举出例如包含序列号3所示的氨基酸序列的人RGMa、包含序列号4所示的氨基酸序列的RGMa等。可使用来自各种生物的RGMa作为免疫原。RGMa的氨基酸序列可从作为已知数据库的Protein Data Bank等中获得。

[0067] 本发明中使用的RGMa抗体为多克隆抗体时,可通过例如以下的方式进行制备。首先,作为抗原,将RGMa或其片段溶解于磷酸缓冲生理盐水(也记载为PBS)中,根据需要而适量混合通常的佐剂、例如弗氏完全佐剂,制成免疫原,对小鼠、大鼠、兔、山羊、及马等哺乳动物进行免疫。免疫方法没有特别限定,例如,可举出施以皮下注射或腹腔内注射1次、或按合适的间隔施以2次以上的方法。然后,按照常规方法,从经免疫的动物中采集血液并分离血清,纯化多克隆抗体组分,从而获得多克隆抗体。

[0068] 本发明中使用的RGMa抗体为单克隆抗体时,该单克隆抗体可通过下述方法得到:使从上述经免疫的哺乳动物中得到的免疫细胞、例如脾细胞与骨髓瘤细胞融合而得到杂交瘤,从该杂交瘤的培养物中采集抗体。另外,对于上述单克隆抗体而言,也可从杂交瘤克隆抗体基因,组入合适的载体,将其导入宿主细胞中,使用基因重组技术从而产生重组型的单克隆抗体。此外,上述单克隆抗体也可使用噬菌体展示法进行制备。

[0069] 作为本发明中使用的RGMa抗体,例如,可使用Yamashita,T.,Mueller,B.K.&Hata,K.Neogenin and repulsive guidance molecule signaling in the central nervous system.Curr.Opin.Neurobiol.17,29-34(2007);日本特开2014-138599号公报;日本特开2016-175897号公报;日本特表2017-526930号公报;国际公开2016/175236号;日本特表2015-508061号公报等中公开的抗体。

[0070] 另外,作为本发明中使用的RGMa抗体,例如,可以以株式会社免疫生物研究所(IBL)制、R&D Systems公司制等的市售品的形式获得。

[0071] RGMa抗体优选包含至少1个包含选自由下述序列组成的组中的氨基酸序列的CDR作为抗原结合结构域:

[0072] GTTPDY(序列号7);

[0073] FQATHDPLT(序列号10);

[0074] ARRNEYYGSSFFDY(序列号13);

[0075] LQGYIPPRT(序列号16);及

[0076] 与上述序列中的一者具有至少50%的序列同一性的修饰CDR氨基酸序列。

[0077] 上述的序列同一性优选为80%以上,更优选为90%以上。需要说明的是,本说明书中氨基酸有时以惯用的单字母记载或三字母记载示出。

[0078] 互补性决定区(CDR)是指免疫球蛋白分子的可变区中形成抗原结合位点的区域,也被称为超变区,指每个免疫球蛋白分子中氨基酸序列的变化特别大的部分。对于CDR而言,在轻链及重链中各自具有3个CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、及CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)。本申请中,免疫球蛋白分子的CDR基于卡巴特(Kabat)的编号系统(Kabat等,1987,

Sequences of Proteins of Immunological Interest,USDepartment of Health and Human Services,NIH USA)决定。

[0079] 另外,在本发明中的、以轻链及重链的氨基酸序列规定的抗体中,可以CDR的氨基酸序列与规定的序列相比没有变化,而CDR以外由于突变等发生变化。在CDR以外存在突变等时,优选同源性为90%以上。

[0080] 另外,RGMa抗体优选还包含至少1个包含选自由序列号5、6、8、9、11、12、14、15及与这些序列中的一者具有至少50%的序列同一性的修饰CDR氨基酸序列组成的组中的氨基酸序列的CDR。上述的序列同一性优选为80%以上,更优选为90%以上。

[0081] 更优选地,RGMa抗体包含选自表1所示的可变结构域CDR组的至少3个CDR、或其中该3个CDR中的至少1个为与亲本序列具有至少50%、优选80%、更优选90%的序列同一性的修饰CDR氨基酸序列的可变结构域组中的至少3个CDR。另外,RGMa抗体进一步优选包含至少2个表1所示的可变结构域CDR组。此外,至少2个可变结构域CDR组优选为VH5F9组及VL5F9组的组合、或VH8D1组及VL8D1组的组合。

[0082] [表1]

[0083]

VH5F9组		
VH5F9 CDR-H1	序列号17的残基31－35	序列号5
VH5F9 CDR-H2	序列号17的残基50－66	序列号6
VH5F9 CDR-H3	序列号17的残基99－104	序列号7
VL5F9组		
VL5F9 CDR-L1	序列号18的残基24－39	序列号8
VL5F9 CDR-L2	序列号18的残基55－61	序列号9
VL5F9 CDR-L3	序列号18的残基94－102	序列号10
VH8D1组		
VH8D1 CDR-H1	序列号19的残基31－35	序列号11
VH8D1 CDR-H2	序列号19的残基50－66	序列号12
VH8D1 CDR-H3	序列号19的残基97－110	序列号13
VL8D1组		
VL8D1 CDR-L1	序列号20的残基24－34	序列号14
VL8D1 CDR-L2	序列号20的残基50－56	序列号15
VL8D1 CDR-L3	序列号20的残基89－97	序列号16

[0084] RGMa抗体可包含框架区。作为框架区所包含的氨基酸序列,可举出序列号22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39及40。这些氨基酸序列可以是单独1种,也可以是2种以上的组合。

[0085] 另外,RGMa抗体中,作为重链可变结构域及轻链可变结构域优选包含:选自序列号41、42、43、44、45、46、47、48及49中的至少1个重链可变结构域;及/或选自序列号50、51及52中的至少1个轻链可变结构域。

[0086] 另外,对于RGMa抗体而言,与RGMa结合时的结合部位只要是可引起RGMa阻遏的部位即可,没有特别限定,例如,为人RGMa时,优选与具有由下述序列表示的氨基酸序列的一个以上的肽结合:

[0087] EEVVNAVEDWDSQG(序列号53)

[0088] NQQIDFQAFHTNAE(序列号54)

[0089] PTAPETFPYET(序列号55)

[0090] KLPVEDLYYQA(序列号56)

[0091] LYERTRDLPGRAAAGL(序列号57)。

[0092] RGMa抗体更优选与具有由序列号53及/或序列号54表示的氨基酸序列的肽结合，更优选与具有由序列号53及/或序列号54表示的氨基酸序列的肽、和具有由序列号55及/或序列号56表示的氨基酸序列的肽结合。

[0093] RGMa抗体优选为在人RGMa的氨基酸序列中的第250位之后进行结合的抗体。

[0094] 对于RGMa抗体而言，与具有由序列号53和序列号54表示的氨基酸序列、且具有由序列号55或序列号56表示的氨基酸序列的肽结合是更优选的。

[0095] RGMa抗体也可以是将RGMa蛋白或其部分片段(例如，包含序列号53～57中的一者以上的片段)作为抗原、用该抗原对小鼠等哺乳动物进行免疫而得到的多克隆抗体及单克隆抗体、使用基因重组技术制造的嵌合抗体及人源化抗体、以及使用产生人抗体的转基因动物等制造的人抗体等。

[0096] 本发明中，RGMa抗体以医药形式施予至人的情况下，从副作用的观点考虑，期望人源化抗体或人抗体。

[0097] RGMa抗体可以以将RGMa蛋白或其部分片段(例如，包含序列号53～57中的一者以上的片段)作为抗原进行识别的多克隆抗体及/或单克隆抗体的部分片段的形式进行使用，也可以是小分子抗体。

[0098] 作为RGMa抗体，除了表1所示的以外，还可以是轻链的互补性决定区1(LCDR1)、轻链的互补性决定区2(LCDR2)、轻链的互补性决定区3(LCDR3)、重链的互补性决定区1(HCDR1)、重链的互补性决定区2(HCDR2)及重链的互补性决定区3(HCDR3)各自的氨基酸序列包含下述序列的经分离的RGMa抗体、或其抗原结合片段：

[0099] LCDR1:RASQDISSYLN(序列号58)

[0100] LCDR2:YTSRLHS(序列号59)

[0101] LCDR3:QQLNTLP(序列号60)

[0102] HCDR1:DAWMD(序列号61)

[0103] HCDR2:EIRSKANNHATYYAESVKG(序列号62)及

[0104] HCDR3:RDGAY(序列号63)；

[0105] 或者

[0106] LCDR1:RSSQSLVHSNGNTYLH(序列号64)

[0107] LCDR2:KVSNRFS(序列号65)

[0108] LCDR3:SQSTHVP(序列号66)

[0109] HCDR1:TSYYWN(序列号67)

[0110] HCDR2:YISYDGTNNYNPSLKN(序列号68)及

[0111] HCDR3:SFG。

[0112] 可在各CDR序列中取代、缺失、及/或添加1个或多个氨基酸，例如，可取代、缺失、及/或添加1个或2个氨基酸。

[0113] 作为RGMa抗体，可示例在轻链中具有序列号73的氨基酸序列、在重链中具有序列

号74的氨基酸序列的抗体。可在由这些序列号表示的氨基酸序列中取代、缺失、添加或插入1个或多个氨基酸(1～20个、1～10个或1～5个)。可将这样的取代、缺失、添加导入CDR中,但优选导入CDR以外的区域中。

[0114] 可以是使恒定区为人源的小鼠/人嵌合抗体,作为小鼠/人嵌合抗体,可示例在轻链中具有序列号77的氨基酸序列(可变区为1～107)、在重链中具有序列号78的氨基酸序列(可变区为1～116)的抗体。可在由这些序列号表示的氨基酸序列中取代、缺失、添加或插入1个或多个氨基酸(1～20个、1～10个或1～5个)。可将这样的取代、缺失、添加导入CDR中,但优选导入CDR以外的区域中。

[0115] 可以是使CDR以外为人源的人源化抗体。作为人源化抗体,可示例在重链中具有序列号70～87(可变区为N末端侧第116个残基为止)中任一者的氨基酸序列、在轻链中具有序列号88～94(可变区为N末端侧第1～107个残基为止)中任一者的氨基酸序列的抗体。由这些序列号表示的氨基酸序列可取代、缺失、添加或插入1个或多个氨基酸(1～20个、1～10个或1～5个)。可将这样的取代、缺失、添加导入CDR中,但优选导入CDR以外的区域中。

[0116] 重链氨基酸序列和轻链氨基酸序列可以是上述中的任意的组合,优选在重链中具有序列号84的氨基酸序列、在轻链中具有序列号88的氨基酸序列的抗体。序列号84的氨基酸序列之中,相当于重链可变区的氨基酸序列由序列号95表示,相当于轻链可变区的氨基酸序列由序列号96表示。

[0117] 作为RGMa抗体,优选下述经分离的RGMa抗体、或其抗原结合片段,其中,重链可变区(VH)包含下述氨基酸序列、或与该氨基酸序列具有至少90％的同一性的氨基酸序列:

[0118] EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFSDAWMDWVRQAPGKGLEWVAEIRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSIVYLQMNSLRTEDTALYYCTRRDGAYWGKGTTVTVSS(序列号95),

[0119] 轻链可变区(VL)包含下述氨基酸序列、或与该氨基酸序列具有至少90％的同一性的氨基酸序列:

[0120] DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFASYFCQQLNTLPWTFGGGTKVEME(序列号96)。

[0121] 作为RGMa抗体,可示例在轻链中具有序列号75的氨基酸序列、在重链中具有序列号76的氨基酸序列的抗体。可在由这些序列号表示的氨基酸序列中取代、缺失、添加或插入1个或多个氨基酸(1～20个、1～10个或1～5个)。可将这样的取代、缺失、添加导入CDR中,但优选导入CDR以外的区域中。

[0122] 可以是使恒定区为人源的小鼠/人嵌合抗体,也可以是使CDR以外为人源的人源化抗体。

[0123] 另外,作为抗RGMa抗体,可以是选自下述(a1)～(h1)中的经分离的RGMa抗体、或其抗原结合片段。

[0124] (a1)抗RGMa抗体、或其抗原结合片段,其包含下述轻链可变区及重链可变区,所述轻链可变区包含:包含序列号97中记载的氨基酸序列的LCDR1、包含序列号98中记载的氨基酸序列的LCDR2及包含序列号99中记载的氨基酸序列的LCDR3,所述重链可变区包含:包含序列号100中记载的氨基酸序列的HCDR1、包含序列号101中记载的氨基酸序列的HCDR2及包含序列号102中记载的氨基酸序列的HCDR3;

[0125] (b1)抗RGMa抗体、或其抗原结合片段,其包含下述轻链可变区及重链可变区,所述

轻链可变区包含:包含序列号97中记载的氨基酸序列的LCDR1、包含序列号98中记载的氨基酸序列的LCDR2及包含序列号103中记载的氨基酸序列的LCDR3,所述重链可变区包含:包含序列号100中记载的氨基酸序列的HCDR1、包含序列号101中记载的氨基酸序列的HCDR2及包含序列号102中记载的氨基酸序列的HCDR3;

[0126] (c1)抗RGMa抗体、或其抗原结合片段,其包含下述轻链可变区及重链可变区,所述轻链可变区包含:包含序列号97中记载的氨基酸序列的LCDR1、包含序列号98中记载的氨基酸序列的LCDR2及包含序列号104中记载的氨基酸序列的LCDR3,所述重链可变区包含:包含序列号100中记载的氨基酸序列的HCDR1、包含序列号101中记载的氨基酸序列的HCDR2及包含序列号102中记载的氨基酸序列的HCDR3;

[0127] (d1)抗RGMa抗体、或其抗原结合片段,其包含下述轻链可变区及重链可变区,所述轻链可变区包含:包含序列号97中记载的氨基酸序列的LCDR1、包含序列号98中记载的氨基酸序列的LCDR2及包含序列号105中记载的氨基酸序列的LCDR3,所述重链可变区包含:包含序列号100中记载的氨基酸序列的HCDR1、包含序列号101中记载的氨基酸序列的HCDR2及包含序列号102中记载的氨基酸序列的HCDR3;

[0128] (e1)抗RGMa抗体、或其抗原结合片段,其包含下述轻链可变区及重链可变区,所述轻链可变区包含:包含序列号97中记载的氨基酸序列的LCDR1、包含序列号98中记载的氨基酸序列的LCDR2及包含序列号106中记载的氨基酸序列的LCDR3,所述重链可变区包含:包含序列号100中记载的氨基酸序列的HCDR1、包含序列号101中记载的氨基酸序列的HCDR2及包含序列号102中记载的氨基酸序列的HCDR3;

[0129] (f1)抗RGMa抗体、或其抗原结合片段,其包含下述轻链可变区及重链可变区,所述轻链可变区包含:包含序列号97中记载的氨基酸序列的LCDR1、包含序列号98中记载的氨基酸序列的LCDR2及包含序列号107中记载的氨基酸序列的LCDR3,所述重链可变区包含:包含序列号100中记载的氨基酸序列的HCDR1、包含序列号101中记载的氨基酸序列的HCDR2及包含序列号102中记载的氨基酸序列的HCDR3;

[0130] (g1)抗RGMa抗体、或其抗原结合片段,其包含下述轻链可变区及重链可变区,所述轻链可变区包含:包含序列号97中记载的氨基酸序列的LCDR1、包含序列号98中记载的氨基酸序列的LCDR2及包含序列号108中记载的氨基酸序列的LCDR3,所述重链可变区包含:包含序列号100中记载的氨基酸序列的HCDR1、包含序列号101中记载的氨基酸序列的HCDR2及包含序列号102中记载的氨基酸序列的HCDR3;及

[0131] (h1)抗RGMa抗体、或其抗原结合片段,其包含下述轻链可变区及重链可变区,所述轻链可变区包含:包含序列号97中记载的氨基酸序列的LCDR1、包含序列号98中记载的氨基酸序列的LCDR2及包含序列号109中记载的氨基酸序列的LCDR3,所述重链可变区包含:包含序列号100中记载的氨基酸序列的HCDR1、包含序列号101中记载的氨基酸序列的HCDR2及包含序列号102中记载的氨基酸序列的HCDR3。

[0132] RGMa抗体优选为具有上述的氨基酸序列、且是人源化抗体的抗体,另外,优选具有人IgG的恒定区。

[0133] 利用本发明中的RGMa阻遏物质,能够治疗或预防HAM。

[0134] 如后述的实施例及图13所示,HAM患者中由来源于HAM患者的细胞引起了神经细胞死亡、即脊髓组织的损伤及变性的诱导。

[0135] 本申请的发明人进行了研究，结果，如后述的实施例中所示的那样，RGMa在作为HAM患者的主要HTLV-1感染细胞的CD4阳性T细胞中显著地表达，可知RGMa的表达与HAM相关。另外，使用RGMa抗体进行RGMa的阻遏的试验，结果发现RGMa与CXCL10、IL-2、及IL-10的产生相关。

[0136] 已知CXCL10是应答于IFN-γ而从HAM病原性的HTLV-1感染T细胞中产生的蛋白质，其诱导HAM的病况(Brain 2013)，另外已知CXCL10与HAM的症状的进展速度呈强相关(PLoS Negl Trop Dis 2013)。使RGMa抗体作用于HAM患者的细胞时，该CXCL10的产生被抑制。另外，IL-10为细胞因子之一，以抑制炎症的方式发挥作用。使RGMa抗体作用于HAM患者的细胞时，IL-10的产生显著地增加。

[0137] 为了给HAM带来真正的治疗效果，要求抑制神经细胞的损伤。HAM患者的HTLV-1感染细胞中HTLV-1-tax以高水平表达(Blood2002)，表明HTLV-1-tax对于病况形成而言是重要的(J Clin Invest2014)。本发明中显示出HTLV-1-tax诱导RGMa的表达，来源于RGMa表达水平高的HAM患者的细胞诱导神经细胞死亡，重要的是，显示出HTLV-1-tax表达细胞导致的神经细胞死亡能被RGMa阻遏物质抑制。

[0138] 如上所述，RGMa阻遏物质能够抑制HAM的炎症病况的诱导，并且抑制基于HAM患者细胞的炎症反应，因此，能够治疗或预防HAM。此外，RGMa阻遏物质不仅抑制HAM特有的炎症反应，还能够抑制HAM患者的病原性细胞即HTLV-1-tax表达细胞所导致的神经细胞死亡，因此，能够治疗或预防HAM。

[0139] 如上所述，RGMa阻遏物质能够治疗或预防HAM，本发明提供：用于在HAM的治疗中使用的RGMa阻遏物质；用于在HAM的治疗中使用的医药组合物；RGMa阻遏物质的用于治疗HAM的用途；RGMa阻遏物质在HAM的治疗用医药的制造中的用途；用于在HAM的治疗用医药的制造中使用的RGMa阻遏物质；包括将有效量的RGMa阻遏物质施予至需要其的对象的、HAM的治疗或预防方法。

[0140] 本发明的HAM的治疗或预防剂含有RGMa阻遏物质，可进一步适宜配合药学上允许的担载体及/或添加剂进行制剂化。

[0141] 作为制剂化的形态，例如，可举出片剂、包衣片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、液体制剂、悬浮剂、乳剂等经口剂；注射剂、输液、栓剂、软膏、贴片剂等非经口剂。

[0142] 对于担载体或添加剂的配合比例而言，基于在医药品领域中通常采用的范围适宜设定即可。

[0143] 作为上述担载体，没有特别限定，例如，可举出水、生理盐水、其他的水性溶剂、及水性或油性基剂等。作为上述添加剂，没有特别限定，可举出赋形剂、粘结剂、pH调节剂、崩解剂、吸收促进剂、润滑剂、着色剂、矫味剂、及香料等。

[0144] 本发明中的RGMa阻遏物质为识别RGMa的抗体时，优选将该抗体以与药学上允许的担载体一同制剂化而得的注射剂或输液的形式，施予至非经口施予途径、例如静脉内、肌肉内、皮肤内、腹腔内、皮下或局部。

[0145] 含有RGMa抗体的注射剂或输液可以以溶液、混悬液或乳浊液的形式进行使用。作为其溶剂，例如，可使用注射用蒸馏水、生理盐水、葡萄糖溶液、及等渗液(例如，氯化钠、氯化钾、甘油、甘露糖醇、山梨糖醇、硼酸、硼砂、丙二醇等的溶液)等。这些溶剂可以单独使用1种，也可组合2种以上进行使用。

[0146] 此外，上述注射剂或输液可含有稳定剂、助溶剂、混悬剂、乳化剂、镇痛剂、缓冲剂、保存剂、防腐剂、pH调节剂等添加剂。

[0147] 作为稳定剂，例如，可使用白蛋白、球蛋白、明胶、甘露糖醇、葡萄糖、葡聚糖、乙二醇、丙二醇、抗坏血酸、亚硫酸氢钠、硫代硫酸钠、EDTA钠、柠檬酸钠、二丁基羟基甲苯等。

[0148] 作为助溶剂，例如，可使用醇(例如，乙醇等)、多元醇(例如，丙二醇、聚乙二醇等)、非离子性表面活性剂(例如，聚山梨酯80(注册商标)、HCO-50等)等。

[0149] 作为混悬剂，例如，可使用单硬脂酸甘油酯、单硬脂酸铝、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羟甲基纤维素、月桂基硫酸钠等。

[0150] 作为乳化剂，例如，可使用阿拉伯胶、海藻酸钠、黄蓍胶等。

[0151] 作为镇痛剂，例如，可使用苯甲醇、氯丁醇、山梨糖醇等。

[0152] 作为缓冲剂，例如，可使用磷酸缓冲液、乙酸缓冲液、硼酸缓冲液、碳酸缓冲液、柠檬酸缓冲液、Tris缓冲液等。

[0153] 作为保存剂，例如，可使用对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯、氯丁醇、苯甲醇、苯扎氯铵、脱氢乙酸钠、乙二胺四乙酸钠、硼酸、硼砂等。

[0154] 作为防腐剂，例如，可使用苯扎氯铵、对羟基苯甲酸、氯丁醇等。

[0155] 作为pH调节剂，例如，可使用盐酸、氢氧化钠、磷酸、乙酸等。

[0156] 本发明中的RGMa阻遏物质为表达RGMa的基因的siRNA(short interfering RNA)、shRNA(short hairpin RNA)、及反义寡核苷酸等抑制RGMa的表达的物质时，可以以非病毒载体或病毒载体的形态进行施予。

[0157] RGMa阻遏物质为非病毒载体形态时，作为施予的方法，可举出使用脂质体导入核酸分子的方法(脂质体法、HVJ-脂质体法、阳离子脂质体(cationic liposome)法、脂质体转染法、Lipofectamine法等)、微注射法、使用基因枪(Gene Gun)将核酸分子与担载体(金属粒子)一同转移至细胞中的方法等。

[0158] 将siRNA或shRNA使用病毒载体施予至生物体的情况下，可利用重组腺病毒、逆转录病毒等病毒载体。可向去毒化的逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、痘病毒、脊髓灰质炎病毒、辛德毕斯病毒、仙台病毒、SV40等DNA病毒或RNA病毒中导入表达siRNA或shRNA的DNA，使该重组病毒感染细胞或组织。由此向细胞或组织内导入基因。

[0159] 如此得到的制剂可通过以其有效量施予至例如人、以及大鼠、小鼠、兔、绵羊、猪、牛、猫、狗、及猴等其他哺乳动物来预防或治疗HAM。

[0160] 施予量可考虑目的、疾病的严重程度、患者的年龄、体重、性别、既往病史、有效成分的种类等而适宜设定。

[0161] 实施例

[0162] [实施例1：用于阐明HAM及成人T细胞白血病淋巴瘤(ALT；adult T-cell leukemia/lymphoma)的发病机制以及病况的综合性比较分析]

[0163] 如图1所示，针对HTLV-1感染未发病者的检体，对以CD4阳性细胞之中、基于作为HTLV-1感染细胞的指标的CADM1、和CD7分类而得到的组P、D、N进行了mRNA的表达分析。

[0164] 另外，对于HAM，也对从HAM患者末梢血单核细胞中使用磁珠浓缩而得的CD4阳性细胞和CD4阴性细胞各4例进行了分析。对HTLV-1非感染健康者(正常(Normal))也同样地进行

了分离。末梢血单核细胞也记载为PBMC。ATL(郁积、慢性、急性的各病型)使用了主要由CD4阳性细胞组成的PBMC。

[0165] 实施了Agilent Technologies,Ltd.制的单色微阵列基因表达分析法。

[0166] 对与神经相关的分子综合性地进行了比较分析,结果发现,RGMa在HAM患者的CD4阳性细胞中显著表达。

[0167] 针对正常T细胞4例(正常.CD4)、来源于HAM患者的CD4阳性T细胞4例(HAM.CD4)、来源于健康人的CD4阳性/CADM1阴性/CD7阳性T细胞3例(正常.P)、HTLV-1感染者CD4阳性/CADM1阴性/CD7阳性T细胞5例(P组)、HTLV-1感染者CD4阳性/CADM1阳性/CD7阳性T细胞5例(D组)、HTLV-1感染者CD4阳性/CADM1阳性/CD7阴性T细胞5例(N组)、急性型ATL患者CD4阳性/CADM1阳性/CD7阴性T细胞3例(急性.N)、健康人CD4阳性T细胞21例(正常.CD4.1)、来源于郁积型ATL患者的PBMC 3例(郁积)、来源于慢性型ATL患者的PBMC 20例(慢性)、来源于急性型ATL患者的PBMC 26例(急性),使用Agilent Technologies,Ltd.的Human Gene Expression 4×44KMicroarray获得全基因表达数据,使用中值标准化后,针对RGMa基因水平制作图表。

[0168] 图表中,针对阵列的荧光强度的Log_2值绘图。来源于HAM患者的CD4阳性T细胞组以与其他所有组具有显著性差异的方式上升($P<0.05$)。图表示于图2。

[0169] [实施例2:CD4阳性HAM患者中的基因表达分析]

[0170] 使用人CD4+分离试剂盒(Miltenyi Biotec),由从5名HAM患者的末梢血中分离的PBMC,分离CD4阳性T细胞,作为包含大量HTLV-1感染细胞的细胞群。同样地从4名健康者的PBMC中分离CD4阳性T细胞,作为对照组。

[0171] 从分离的CD4阳性T细胞中回收总RNA,使用ReverTra Ace(东洋纺公司)制备cDNA。使用制备的cDNA通过实时PCR分析HAM患者CD4阳性T细胞与健康者CD4阳性T细胞之间的RGMa的表达量差异。内部参照使用了18srRNA。

[0172] 分析的结果的图表示于图3。图表中的HD-CD4+指对照组,HAM-CD4+指HAM患者的组。

[0173] [实施例3:PBMC中的RGMa表达细胞的分析]

[0174] 使用Clear Back(MBL)进行Fc阻断处理后,向HAM患者PBMC中加入抗CD3-PECy7(TONBO)、CD4-FITC(eBioscience)、CD14-PE(eBioscience)抗体,于4℃染色30分钟。

[0175] 将经抗体染色的PBMC洗涤后使用AriaIIIu(BD)进行FACS分选,实施CD3阳性CD4阴性细胞(CD3+CD4-)、CD3阳性CD4阳性细胞(CD3+CD4+)、CD3阴性CD14阴性细胞(CD3-CD14-)及CD3阴性CD14阳性细胞(CD3-CD14+)的分离回收。

[0176] 从回收的各细胞中回收总RNA,使用ReverTra Ace(东洋纺公司)制备cDNA。使用制备的cDNA通过实时PCR分析细胞种类间的RGMa的表达量差异。内部参照使用了18s rRNA。分析的结果的图表示于图4。

[0177] 可知HAM-PBMC中,RGMa的表达在存在大量感染细胞的CD3阳性CD4阳性细胞(CD3+CD4+)中最高。

[0178] [实施例4:伴随HAM患者PBMC的培养的RGMa表达变化]

[0179] 将2名HAM患者的PBMC悬浮于培养基(含有10% FBS(GIBCO)的RPMI1640培养基(wako))中,以各孔1e5个细胞将10孔分量接种至96孔圆底板中后,培养1、3、5、7天。

[0180] 从没有进行培养的第0天的PBMC、以及经各时间培养的PBMC提取总RNA，使用ReverTra Ace(东洋纺公司)制备cDNA。已知HAM患者PBMC进行培养时HTLV-1病毒过量表达，使用制备的cDNA，通过实时PCR对与HAM患者PBMC的培养相伴的、即与病毒表达相伴的RGMa的表达变化进行分析。内部参照使用了18srRNA。在图5中示出表示分析结果的图表。

[0181] [实施例5:全启动子上的H3K27me3水平的分析]

[0182] 针对正常T细胞3例(正常T细胞)、来源于HAM患者的CD4阳性T细胞4例(HAM)、来源于急性型ATL患者的PBMC 3例(ATL)，使用Agilent Technologies公司的SurePrint G3 Human Promoter 2×400K Microarray获得全启动子上的H3K27me3水平，进行标准化后，将自RGMa基因的转录起始位点起-2,916bp上游附近的H3K27me3水平进行图表化。

[0183] 图表示于图6中。图表中将阵列的荧光强度的Log_2值绘图。需要说明的是，图中的HAM50及HAM123分别指得到CD4阳性T细胞的HAM患者。意味着来源于HAM患者的CD4阳性T细胞中，RGMa的基因表达抑制被解除。

[0184] [实施例6:RGMa基因mRNA水平的定量]

[0185] 针对人CD4阳性T细胞白血病细胞株Jurkat，导入插入编码HTLV-1Tax的cDNA慢病毒载体，通过定量RT-PCR测定导入后3天的经时性的RGMa基因mRNA水平。也测定了RPL19基因mRNA，作为内参标准使用。

[0186] 表示定量的结果的图表示于图7。意味着由HTLV-1病毒引起RGMa表达。

[0187] [实施例7:HTLV-1-tax表达诱导细胞株JPX-9细胞中的Tax依赖性的RGMa的表达诱导]

[0188] 将JPX9细胞在培养基(含有10％ FBS的RPMI1640培养基)中培养24小时，以最终浓度成为20μM的方式添加诱导HTLV-1-tax表达的氯化镉($CdCl_2$;Nacalai Tesque)，然后培养1、2、及3天。对于经氯化镉处理及未处理的JPX9细胞，针对Tax及RGMa的蛋白表达进行FACS分析。

[0189] 将经氯化镉处理及未处理的JPX9细胞分别洗涤，使用Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit(eBioscience)进行细胞通透处理。然后，添加抗Tax-FITC抗体(Lt-4:由琉球大学田中教授出让)，于4℃处理1小时，由此对在细胞内表达的Tax蛋白染色。被染色的Tax蛋白通过使用了CantoII的FACS分析进行检测。

[0190] 将经氯化镉处理及未处理的JPX9细胞分别洗涤，添加抗RGMa抗体(株式会社免疫生物研究所(IBL)制)，于4℃处理30分钟。然后，洗涤细胞，添加抗小鼠IgG-PE抗体(BioLegend)，使其于4℃反应30分钟，对在JPX9中表达的RGMa蛋白染色。被染色的RGMa蛋白通过使用了CantoII的FACS分析进行检测。

[0191] 图8示出Tax及RGMa的蛋白表达的分析结果。

[0192] [实施例8:RGMa抗体针对HAM患者PBMC的作用研究]

[0193] (RGMa抗体对于自主增殖活性的作用)

[0194] 将4例HAM患者PBMC悬浮于培养基(含有10％ FBS的RPMI1640培养基)中，以各孔1e5个细胞接种至96孔圆底板中，以最终浓度成为10μg/ml的方式加入RGMa抗体(R&D Systems制)，在合计0.1ml的培养液中于37℃、5％ CO_2条件下培养7天。

[0195] 将未进行任何添加的组(培养基(Medium))、添加相同浓度的正常山羊IgG(Santa Cruz Biotechnology)的组(正常IgG)、及添加1μg/ml泼尼松龙(PSL)(Funakoshi Co.,

Ltd.)的组作为对照。

[0196] 自培养开始起6天后,向各孔中添加1μCi^{3}H-胸苷,于37℃、5%CO_2条件下培养16小时。然后,使用细胞采集器(cell harvester)(Tomtec MH3 PerkinElmer)使培养细胞吸附于玻璃过滤器(Printed Filtermat A PerkinElmer),使其干燥后,浸染固体闪烁体Meltilex-A(PerkinElmer),使用MicroBeta(WALLAC MicroBeta TriLux 1450-021)测定被细胞摄入的^{3}H-胸苷量。将各HAM患者PBMC的培养基组中的^{3}H-胸苷的读数(count)的平均值作为100%,算出各组的相对值,求出4例HAM患者的^{3}H-胸苷摄入率的平均值。结果示于图9。

[0197] (RGMa抗体对于HTLV-1前病毒量变化的作用)

[0198] 将4例HAM患者PBMC悬浮于培养基(含有10% FBS的RPMI1640培养基)中,以各孔1e5个细胞接种至96孔圆底板中,以最终浓度成为10μg/ml的形式添加RGMa抗体(R&D Systems制),在合计0.1ml的培养液中于37℃、5% CO_2条件下培养7天。

[0199] 将未进行任何添加的组(培养基(Medium))、添加相同浓度的正常山羊IgG(Santa Cruz Biotechnology)的组(正常IgG)、添加1μg/ml泼尼松龙(PSL)(Funakoshi Co.,Ltd.)的组作为对照。

[0200] 自培养开始起7日天后,进行离心并除去上清液,从所得细胞块中提取基因组DNA。使用提取的基因组DNA,通过实时PCR测定HTLV-1前病毒量(感染细胞率)。

[0201] 将各HAM患者PBMC的培养基组中的HTLV-1前病毒量作为100%,算出各组中的HTLV-1前病毒量的相对值,求出4例HAM患者的HTLV-1前病毒量的平均值。结果示于图10。

[0202] (RGMa抗体对于CXCL10产生的作用)

[0203] 为了对RGMa抗体对于来自HAM患者PBMC的CXCL10产生的作用进行分析,将4例HAM患者PBMC悬浮于培养基(含有10%FBS的RPMI1640培养基)中,以各孔1e5个细胞接种至96孔圆底板中,以最终浓度成为10μg/ml的方式加入RGMa抗体(R&DSystems制),在合计0.1ml的培养液中于37℃、5% CO_2条件下培养7天。

[0204] 将未进行任何添加的组(培养基(Medium))、添加相同浓度的正常山羊IgG(Santa Cruz Biotechnology)的组(正常IgG)、添加1μg/ml泼尼松龙(PSL)(Funakoshi Co.,Ltd.)的组作为对照。

[0205] 自培养开始起7天后,将培养液离心分离,仅回收培养上清液。培养上清液中的CXCL10浓度使用Cytokine Beads Array kit(BD Biosciences)利用流式细胞仪FACSCantoII(BD Biosciences)测定。

[0206] 将培养基组的培养液中的CXCL10浓度作为100%,算出各组中的各组的培养液中CXCL10浓度的相对值,求出4例HAM患者的CXCL10浓度的平均值。结果示于图11。

[0207] (RGMa抗体对于HAM患者PBMC的细胞因子产生的作用)

[0208] 为了对RGMa抗体对于HAM患者PBMC中的各种细胞因子的产生的作用进行分析,将4例HAM患者PBMC悬浮于培养基(含有10% FBS的RPMI1640培养基)中,以各孔1e5个细胞接种至96孔圆底板中,以最终浓度成为10μg/ml的方式加入RGMa抗体(R&D Systems制),在合计0.1ml的培养液中于37℃、5% CO_2条件下培养7天。

[0209] 将未进行任何添加的组(培养基(Medium))、添加相同浓度的正常山羊IgG(Santa Cruz Biotechnology)的组(正常IgG)、添加1μg/ml泼尼松龙(PSL)(Funakoshi Co.,Ltd.)的组作为对照。

[0210] 自培养开始起7天后,将培养液离心分离,仅回收培养上清液。培养上清液中的IFNγ、TNF、IL-2、IL-10浓度使用Cytokine Beads Array kit(BD Biosciences)利用流式细胞仪FACSCantoII(BD Biosciences)测定。

[0211] 将培养基组的培养液中的各细胞因子浓度作为100%,算出各培养条件下的细胞因子浓度的相对值,求出4例HAM患者的平均值。

[0212] [实施例9:基于HAM-PBMC的神经细胞株的凋亡诱导]

[0213] 将神经细胞株NB-1或SK-N-AS接种至6孔板中,培养24小时后,添加健康者(HD)或HAM患者的PBMC进行共培养。自共培养开始起48小时后将培养基与添加的PBMC一同除去,用PBS洗涤后,回收神经细胞株。

[0214] 针对回收的各神经细胞株,利用特异性地检测由凋亡引起DNA片段化的细胞的TUNEL法(MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct(MBL))进行分析。图13示出分析结果。直方图中的X轴示出DNA片段化阳性的强度。来源于HAM的细胞较之来源于HD的细胞而言更强力地在神经细胞株中诱导凋亡。

[0215] 具体而言,按照以下的<实验步骤>进行细胞死亡的分析。

[0216] <实验步骤>

[0217] 将神经细胞株NB-1、SK-N-AS分别接种至6孔板中,培养24小时。

[0218] 然后,添加HD或HAM-PBMC(神经细胞株的接种数量的2倍量),培养48小时。

[0219] 然后,使用4%低聚甲醛固定细胞,利用70%乙醇进行细胞通透处理。

[0220] 为了实施DNA缺口末端标记,将细胞悬浮于MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct(MBL)的TdT溶液20uL(TdT缓冲液II:TdT:FITC-dUTP=18:1:1)中,使其于37℃反应60分钟后,实施FACS分析。

[0221] [实施例10:RGMa抗体对于由HTLV-1Tax表达T细胞株诱导的神经细胞株的凋亡的抑制作用]

[0222] 将神经细胞株NB-1接种至6孔板中,培养24小时,然后加入未刺激JPX9(JPX9(-))、或添加20μM氯化镉24小时从而诱导了Tax表达的JPX9(JPX9(+$CdCl_2$)),进行共培养。另外,在NB-1细胞和(JPX9(+$CdCl_2$)的共培养中以最终浓度成为10μg/ml的方式加入正常小鼠IgG2b(MBL)或RGMa抗体(IBL)。自共培养开始起48小时后,将培养基与添加的JPX9一同除去,使用PBS洗涤后,回收神经细胞株。针对回收的各神经细胞株,利用特异性地检测由凋亡引起DNA片段化的细胞的TUNEL法(MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct(MBL))进行分析。图14示出分析结果。直方图中的X轴示出DNA片段化阳性的强度。

[0223] 具体而言,按照以下的<实验步骤>进行细胞死亡的分析。

[0224] <实验步骤>

[0225] 将神经细胞株(NB-1)接种至6孔板中,培养24小时。

[0226] 然后,向NB-1细胞添加JPX9(-)或JPX9(+$CdCl_2$)进行共培养。需要说明的是,JPX9(-)或JPX9(+$CdCl_2$)的细胞数量为NB-1细胞的接种数量的2倍量。对于JPX9(+$CdCl_2$),为了除去氯化镉,用培养基10ml洗涤3次,加入NB-1细胞中。

[0227] 然后,在NB-1细胞和(JPX9(+$CdCl_2$)的共培养中以最终浓度成为10μg/ml的方式加入正常小鼠IgG2b(MBL)或抗RGMa抗体(IBL),培养48小时。

[0228] 然后,使用4%低聚甲醛固定细胞,利用70%乙醇进行细胞通透处理,加入抗CD45-

V450抗体进行染色。

[0229] 为了实施DNA缺口末端标记,将细胞悬浮于MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct(MBL)的TdT溶液20uL(TdT缓冲液II:TdT:FITC-dUTP＝18:1:1)中,使其于37℃反应60分钟后,实施FACS分析。

[0230] 本说明书中引用并记载的出版物、专利文献及非专利文献中记载的全部内容均作为参考而直接并入本说明书中。

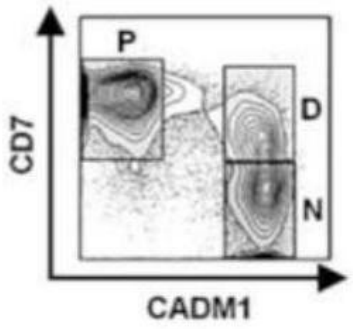

P
D
N
CD7
CADM1

图1

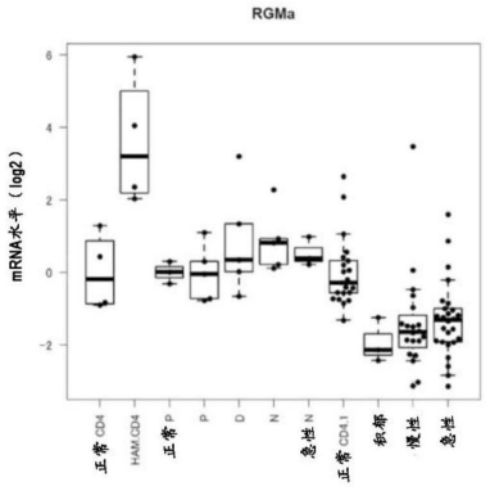

RGMa
mRNA水平（log2）
6
4
2
0
-2
正常 CD4
HAM CD4
正常 P
P
D
N
急性 N
正常 CD4.1
积聚
慢性
急性

图2

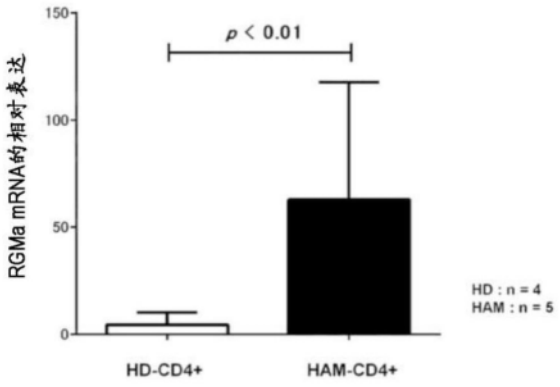

p < 0.01
RGMa mRNA的相对表达
150
100
50
0
HD : n = 4
HAM : n = 5
HD-CD4+
HAM-CD4+

图3

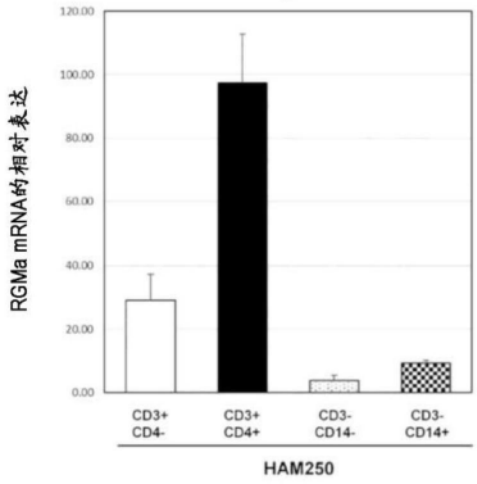

RGMa mRNA的相对表达
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
CD3+ CD4-
CD3+ CD4+
CD3- CD14-
CD3- CD14+
HAM250

图4

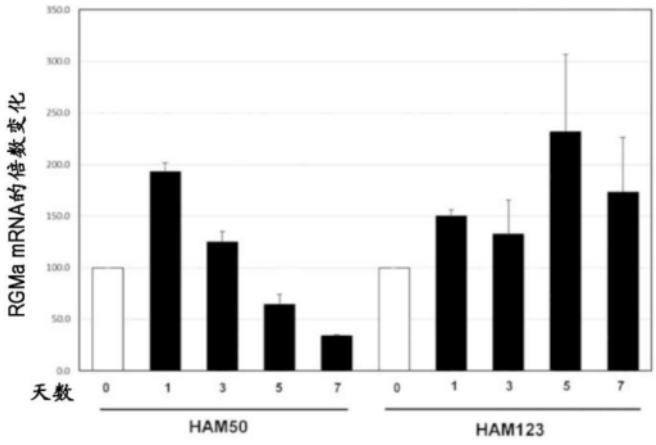

RGMa mRNA的倍数变化
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
天数
0 1 3 5 7
0 1 3 5 7
HAM50
HAM123

图5

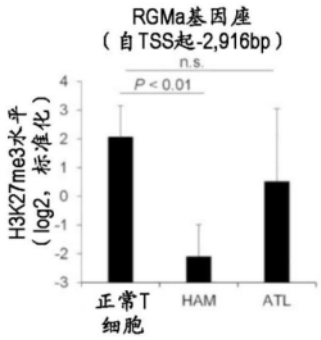

RGMa基因座
（自TSS起-2,916bp）
n.s.
P < 0.01
H3K27me3水平
（log2，标准化）
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
正常T细胞
HAM
ATL

图6

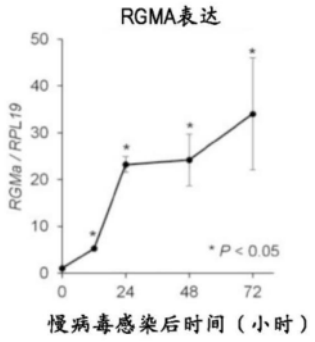

RGMA表达
RGMa / RPL19
50
40
30
20
10
0
* P < 0.05
0
24
48
72
慢病毒感染后时间（小时）

图7

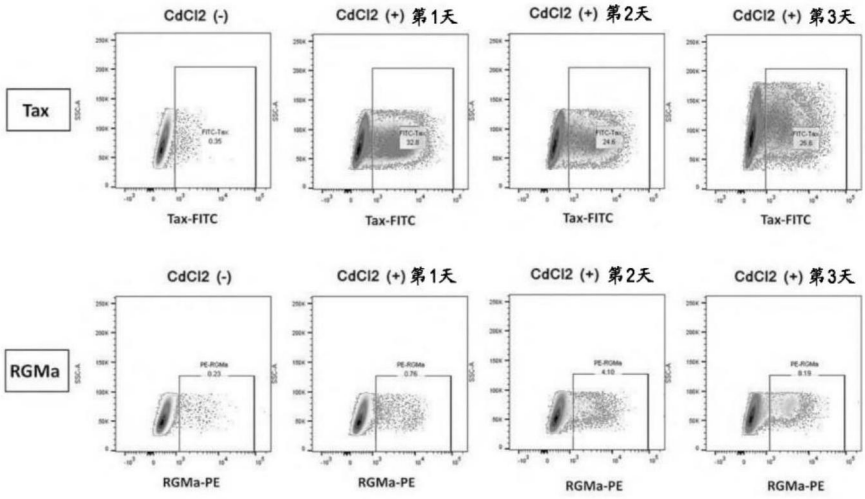

CdCl2 (-)
CdCl2 (+) 第1天
CdCl2 (+) 第2天
CdCl2 (+) 第3天
Tax
Tax-FITC
RGMa
RGMa-PE

图8

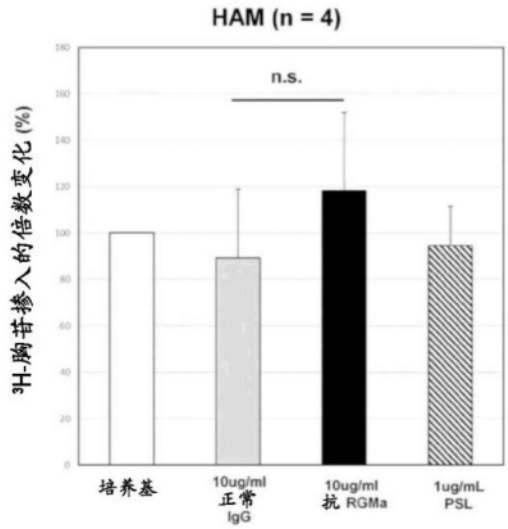

HAM (n = 4)
n.s.
3H-胸苷掺入的倍数变化 (%)
培养基
10ug/ml 正常 IgG
10ug/ml 抗 RGMa
1ug/mL PSL

图9

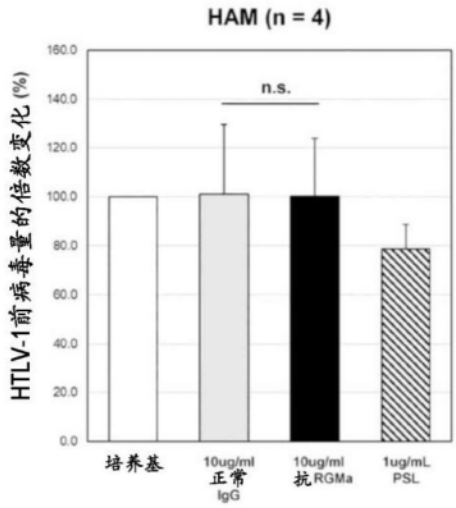

HAM (n = 4)
HTLV-1前病毒量的倍数变化 (%)
160.0
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
n.s.
培养基
10ug/ml 正常 IgG
10ug/ml 抗RGMa
1ug/mL PSL

图10

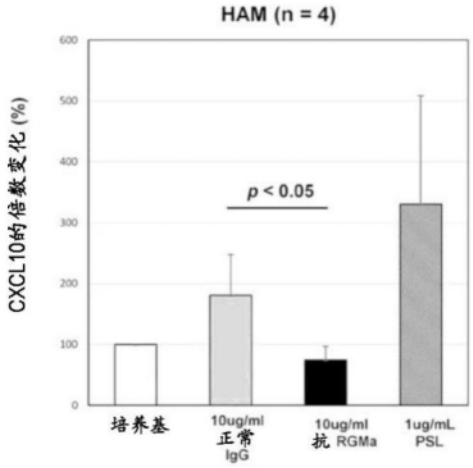

HAM (n = 4)
CXCL10的倍数变化 (%)
600
500
400
300
200
100
0
p < 0.05
培养基
10ug/ml 正常 IgG
10ug/ml 抗 RGMa
1ug/mL PSL

图11

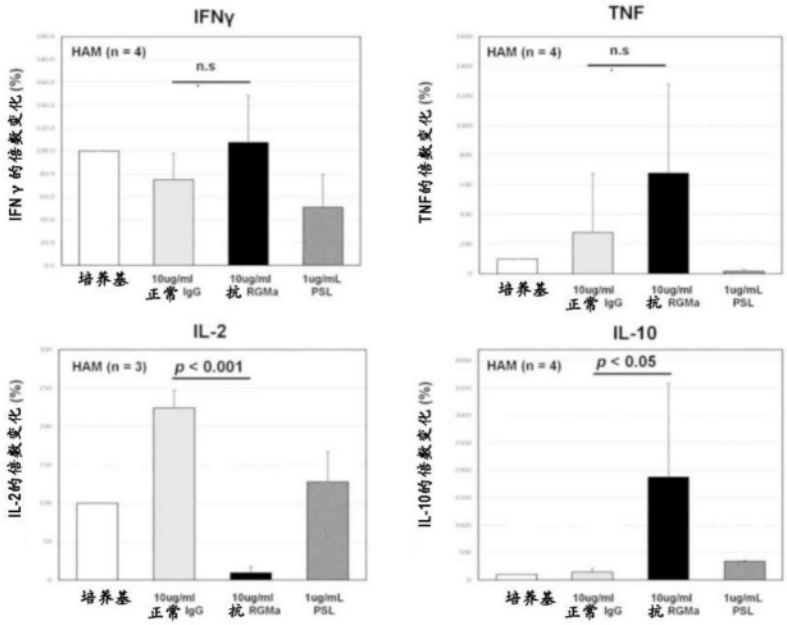

IFNγ
HAM (n = 4)
n.s
IFN γ 的倍数变化 (%)
TNF
HAM (n = 4)
n.s
TNF的倍数变化 (%)
IL-2
HAM (n = 3)
p < 0.001
IL-2的倍数变化 (%)
IL-10
HAM (n = 4)
p < 0.05
IL-10的倍数变化 (%)
培养基
10ug/ml 正常 IgG
10ug/ml 抗 RGMa
1ug/mL PSL

图12

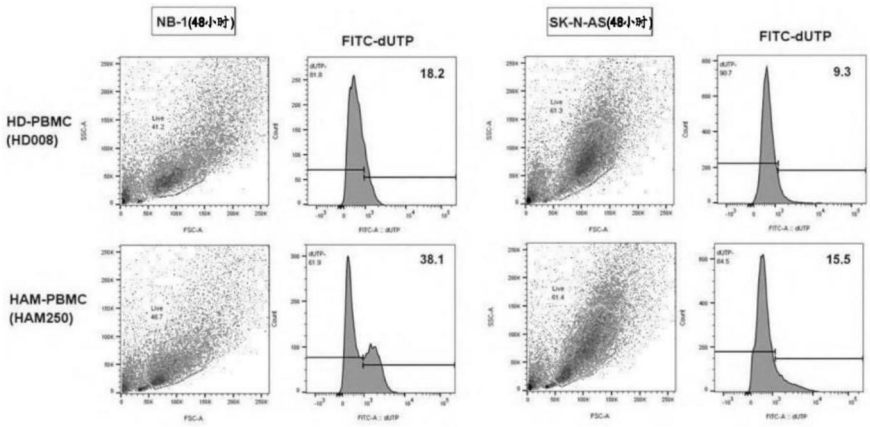

NB-1(48小时)
SK-N-AS(48小时)
FITC-dUTP
HD-PBMC (HD008)
HAM-PBMC (HAM250)
18.2
9.3
38.1
15.5

图13

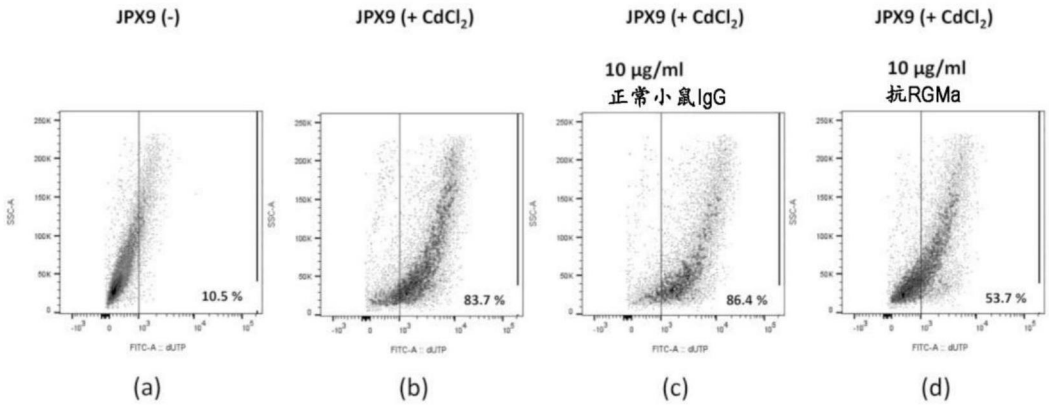

JPX9 (-)
JPX9 (+ CdCl2)
JPX9 (+ CdCl2)
10 μg/ml
正常小鼠IgG
JPX9 (+ CdCl2)
10 μg/ml
抗RGMa
10.5 %
83.7 %
86.4 %
53.7 %
SSC-A
FITC-A :: dUTP
(a)
(b)
(c)
(d)

图14