

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

多発性硬化症に対するインターフェロン療法の
効果の発現及びその持続性に関する要因等の
解析に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山村 隆

平成 16 年 (2004) 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 多発性硬化症に対するインターフェロン療法の効果の発現及び
その持続性に関する要因等の解析に関する研究 1
国立精神・神経センター神経研究所 山村 隆
- 資料：平成 15 年度班員共同執筆論文 9
Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis
and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis

II. 分担研究報告

- 「MSQOL-54 評価によるインターフェロン治療中の
多発性硬化症患者の生活の質」に関する研究 47
国立精神・神経センター武蔵病院 川井 充
- MS 患者と健常者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロファイルの比較解析：
MS におけるアポトーシス関連遺伝子群の発現異常について 50
国立精神・神経センター神経研究所 佐藤 準一
- 「DNA マイクロアレイによる免疫寛容関連遺伝子解析」に関する研究 ... 58
国立精神・神経センター神経研究所 三宅 幸子
- 「特発性炎症性脱髄疾患（IIDD）の理解における」attack-related
severity の重要性－病変分布／経過／attack-related severity に
よる三次元的理解」 62
- 「視神経脊髄型 MS における Osteopontin, Vitamin D Receptor,
Estrogen Receptor 遺伝子多型の検討」 68
北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野 菊地 誠志

■	多発性硬化症患者髄液とアミノ酸代謝に関する研究		73
	順天堂大学医学部脳神経内科 横山 和正		
■	arundic acid(ONO-2506)の多発性硬化症実験動物 (慢性進行性・再発寛解型 EAE) に対する抑制効果に関する研究		78
	埼玉医科大学神経内科 野村 恭一		
■	「多発性硬化症の診断、McDonald の診断基準をもちいて」		82
	東京理科大学理学部教養科 太田 宏平		
■	IFN β による培養脳毛細血管由来内皮細胞の遺伝子発現変化		87
	東京医科歯科大学大学院脳神経機能病態学分野 神田 隆		
■	多発性硬化症の分子遺伝学的病型分類の試み		91
	国立精神・神経センター神経研究所 山村 隆		
Ⅲ.	平成 15 年度班会議プログラム		96
Ⅳ.	研究成果の刊行に関する一覧表		98
Ⅴ.	研究成果の刊行物・別刷		100

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総括研究報告書

多発性硬化症に対するインターフェロン療法の効果の発現及び
その持続性に関する要因等の解析に関する研究

主任研究者 山村 隆

国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第六部部長

研究要旨

本研究班では多発性硬化症（MS）のインターフェロン・ベータ（IFN-β）療法の有効性を予測する方法の開発と IFN-β療法の最適化をめざしている。これまでに、MS 患者および健常者の T 細胞および非 T 細胞、計 400 サンプル以上について DNA マイクロアレイ解析を行い、あわせて IFN-β治療開始後の個々の MS 患者臨床情報を収集してきた。本年度は、これまでに得られた情報を総合的にコンピュータ解析した。解析の結果、1) MS のリンパ球では細胞死関連蛋白や DNA 修復に関連する分子の発現異常が存在すること、2) クラスタ解析によって MS と健常者が明瞭に区別でき、MS は四つの亜群に分類できること、3) 四つの亜群の中では、グループ A と B は健常者に近いパターンを示し、IFN-β 反応性が良好であること、4) IFN-β のノン・レスポonder に特徴的な遺伝子発現プロファイルがあること、などが明らかになった。その他に、グループ B はもっとも疾患活動性が高いこと、グループ D は罹病期間が長く IFN-β 治療反応性が不良であることなども明らかになった。また、IFN-β 治療の効率的な導入に関する臨床的な研究や IFN-β 治療を受けている患者の QOL 調査なども順調に進歩した。以上の結果を活用すれば、MS の診断および治療法の決定に科学的根拠が与えられ、それゆえ DNA マイクロアレイによる MS 病態解析は今後ますます重要になるものと考えられる。

分担研究者

川井 充（国立精神・神経センター 武蔵病院神経内科 部長）	神経研究所免疫研究部 室長）
佐藤 準一（国立精神・神経センター 神経研究所免疫研究部 室長）	菊地 誠志（北海道大学大学院 医学研究科神経病態学 助教授）
三宅 幸子（国立精神・神経センター	横山 和正（順天堂大学医学部 神経学 助手）

野村 恭一（埼玉医科大学内科学
神経内科 助教授）

太田 宏平（東京理科大学理学部
教授）

神田 隆（東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科・医学部
脳神経機能病態学 助教授）

協力班員

深澤 俊行（北祐会病院 副院長）

大橋 高志（東京女子医科大学附属
脳神経センター神経内科 助手）

A. 研究目的

我が国において多発性硬化症（MS）に対するインターフェロン・ベータ（以下 IFN- β ）治療が導入されてから、既に3年間が経過した。一部の患者は本治療の有効性に満足を覚えているが、治療に反応しないノン・レスポnderでは自己注射の煩雑さと副作用だけが印象づけられ、不満が大きい。もし、あらかじめレスポnderとノン・レスポnderを区別でき、治療に対する反応性や副作用の生じる可能性を予知できれば、IFN- β の有効な患者のみが適切な治療を受けられるようになる。

本研究の目的は、DNA マイクロアレイを応用してレスポnderとノンレスポnderを区別する方法を開発することにある。すなわち、MSの病態研究にDNA マイクロアレイを応用して、遺伝子発現情報を病態解明とテラー・メイド医療

の確立に結び付けようという野心的なものである。本年度の目標は、過去三年間に集積された DNA マイクロアレイの情報と IFN- β 治療開始後二年間の患者臨床情報をコンピュータ解析し、MS の診断や治療法決定におけるマイクロアレイ解析の有用性を評価することにある。あわせて、IFN- β 治療を受けている日本人 MS 患者の満足度（QOL）の調査、テラー・メイド医療につながる情報の収集などの課題を設定した。

B. 研究方法

これまでに再発・寛解型の MS 患者 54 例について IFN- β 治療開始前、開始後 3 ヶ月、6 ヶ月目に T 細胞および非 T 細胞を分離し、個々のサンプルの遺伝子発現プロファイルを 1,263 種類の遺伝子を搭載した cDNA マイクロアレイ（日立製作所）によって決定してきた。また、臨床サイドでは、患者の臨床症状を IFN- β 治療開始後二年間にわたって追跡調査し、ステロイド治療の回数、MRI 脳病変数の変化、EDSS スコアの変化、患者の満足度などをもとに、IFN- β に対するレスポnder、ノンレスポnderおよび境界型症例に分類した（この分類には、佐藤班員が開発した新しいスコアを利用した）。本年度の終了二ヶ月前に全症例について以上の作業が完了したので、ただちに臨床情報とマイクロアレイ情報の関連をコンピュータ解析した（日立製作所担当）。

まず IFN- β 治療開始前の T 細胞および非 T 細胞について、MS と健常者の遺伝子発現プロファイルを比較した (Sato et al. Neurobiol. Dis. 投稿中)。つぎに、IFN- β 治療開始前の T 細胞についてクラスター解析を行い、MS が健常者から区別できるか、また MS がさらに亜分類できるかどうか検討した。MS が四群に亜分類できることを確認した後、それぞれの臨床的特徴を調査した。最後に、レスポナーとノン・レスポナーで発現に差のある遺伝子を同定した。

C. 研究結果

MS のリンパ球におけるアポトーシス制御に関する遺伝子と DNA 修復制御に関する遺伝子の発現異常：

IFN- β 治療を開始前の MS (72 例) と、年齢・性の一致した健常対照者 22 名の遺伝子発現をマイクロアレイで比較した結果、T 細胞ではアレイに搭載された 1263 遺伝子中 134 遺伝子で有意な発現レベルの違いがあり、非 T 細胞では 44 遺伝子で有意な発現レベル差があった。MS で発現上昇している遺伝子もあったが、おもに発現の低下している遺伝子が多く認められた。

T 細胞、非 T 細胞それぞれで発現異常のある遺伝子上位から 30 遺伝子を調べると、その中にはアポトーシスに関連するものが多かった。例として、TRAIL の発現低下、DAXX の発現低下、SODD

の発現亢進、BCL2 の発現低下、BAG1 の発現低下などを上げることができる。MS や他の自己免疫疾患の発症にリンパ球のアポトーシス異常が関与するという論文はあるが、系統的に調べた結果アポトーシス関連遺伝子の変化が上位にランクされたことは意味がある。MS 患者リンパ球では、アポトーシスを促進するような変化と、それを抑制する変化の両方が見られ、おそらく両者が拮抗してバランスを取っているものと推測された。また、DNA 修復に関与する遺伝子の発現変化 (TOP1 の低下、TOP2A の亢進) も見られた。このように、MS のリンパ球異常について、まったく新しい知見が得られた。

以下は MS の T 細胞で発現変化の見られた遺伝子上位 30 である：NR4A2、TCF8、CYP1A2 (以上発現亢進)、RGS14、CHST2、MAPK1、SMARCA3、TPST2、TCF17、HSPA1A、AGTRL2、TRAIL、TOP1、PTPN6、CCR5、CHST4、ERBB4、TCF21、ATP6V1B2、CREB1、ITGB1、COX15、MYC、BAG1、CDC16、SLC35A1、DAXX、TSC22、GABPB1、PARP (以上発現低下)。以下は MS の非 T 細胞で発現変化の見られた遺伝子である：ICAM1、CDC42、RIPK2、IL1R2、MAD、CXCL2、SODD、TOP2A (以上発現亢進)、SMARCA3、RGS14、COX15、AKAP11、TCF17、CDC25B、GZMA、CHST4、BCL2、CR2、RPA1、POLR2H、E2F5、RAB7L1、NFATC3、HSPA1L、

RBBP4、PRKDC、RASSF1、DAXX、EGF、NPR2L（以上発現低下）。

クラスター解析の有用性に関する検討：

72 例の治療開始前 MS と 22 名の健常者の遺伝子情報についてクラスター解析を行った。全情報を解析した結果、MS と健常者由来の T 細胞サンプルが、それぞれ分離する傾向のあることがわかった。その後、さらに解析方法を洗練した結果、健常者と MS のマイクロアレイ情報がほぼ完全に分離できるようになった。この結果は、T 細胞の遺伝子発現を調べれば MS の診断が可能であることを意味するという画期的なものである。

さらに、クラスター解析によって MS 患者が四亜群（A、B、C、D）に分かれることがわかった。クラスター上、A は健常者にもっとも近く、D はもっとも遠くに位置する。それぞれのグループの臨床情報をまとめた結果、いくつかの特徴が明らかになった。1) A 群は全体的に再発回数が少なく、IFN- β に対する反応性は良好である（軽症でレスポナーが多い）。2) B 群は、四群の中でもっとも再発頻度が多く、それを反映して、入院日数やステロイドパルスを受けた日数も、他の群に比べ有意に多い。しかし、IFN- β に対する反応性は比較的良好である（疾患活動性は高いが、レスポナーが多い）。3) A 群と B 群では治療を途中であきらめた症例（ドロップアウト症例）が少ないのに対し、C 群と D 群で多い。

4) C 群には大脳病変のみで他に病変のない西欧型 MS が集中している。5) 他の三群に比べ、D 群は発病か病歴の長い症例が多く EDSS も高い。またレスポナーは少ない。

現在レスポナーとノン・レスポナーを明確に区別する方法の開発を目指し、コンピュータ解析を継続している。その結果、特定の遺伝子の治療前、治療 3 ヶ月後、6 ヶ月後の発現変動パターンが、レスポナーとノン・レスポナーで異なることがわかってきた。例えば ISG-15 については、レスポナーでは治療 3 ヶ月後と 6 ヶ月後の発現レベルに変化がないのに対して、ノン・レスポナーでは 3 ヶ月における値が高いのに、6 ヶ月の時点で明瞭に低下する傾向が見られた。

D. 考察

本プロジェクトは、MS 患者と健常者の末梢血リンパ球から T 細胞と非 T 細胞を分離した上で DNA マイクロアレイ解析を行うという高度なものであるが、目標症例数について、全サンプルの収集に成功した。また、IFN- β 反応性に関する臨床調査についても、すべての情報が集まった。IFN- β 療法のレスポナーとノンレスポナーを同定する方法開発という最終目標については、MS の T 細胞遺伝子発現のクラスター解析という方法で、有用な情報が得られることがわかった。すなわち、患者血液から T 細胞を分離してマイクロアレイで診断することにより、

MS を特徴ある四つの亜群に分類できることがわかった。現時点で確実なことは、A 群と B 群ではインターフェロン治療の効果が十分期待できるということである。これのみでも班の目標の達成を意味する有用な情報であるが、これから遺伝子発現パターンをさらに詳細に解析することによって、決定的な情報が得られるものと確信している。

副次的な産物として、MS を T 細胞の遺伝子発現パターンによって診断できることも明らかになった。現在のアレイは 1263 種類の遺伝子が搭載されているが MS 診断に有用なコンパクトなマイクロアレイが開発されれば、全国いかなる地域においても MS の診断が確実になることは確実である。このようなアレイが開発され、実用性が臨床研究によって評価されれば、厚生労働行政、医療におけるインパクトは大きい。

インターフェロンの治療効果（副作用発現可能性）を予測するアレイの開発が可能なることも、今回の研究でほぼ明らかになったと考えている。MS の診断キットとあわせて、MS の治療法選択に関する診断キットを開発し、班研究で実用性を確認していく必要がある。このようなアプローチは他の疾患にも有効である。

E. 結論

MS 患者のリンパ球の遺伝子発現を DNA マイクロアレイで解析することにより、MS が健常者から明確に分離され

ること、また、MS 患者が四つの特徴あるグループに分類できることがわかった。インターフェロンの効果の現れる患者は、A と B のグループに集中していることがわかった。これらの結果は、DNA マイクロアレイの導入によって、神経難病の診断や治療戦略に新しい時代がやって来ることを意味する。すなわち、MS を血液検査（マイクロアレイ）で診断でき、もっとも相応しい治療法を初診時に決定できるような時代が、5 年後には到来することが推測される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) 国内

論文発表

佐藤 準一、山村 隆：多発性硬化症におけるインターフェロンベータ療法の効果発現機序。医療 57：441-455, 2003

佐藤 準一、山村 隆：多発性硬化症治療への新しい展望。最新医学 58:1926-1938, 2003

山村 隆：近未来の多発性硬化症治療。BIO Clinica 18: 1069-1073, 2003

山本 敏之、藤原 由貴、横田 真知子、中村 治雅、清水 宏、片岸 美帆、尾方 克久、竹嶋 光代、山村 隆、川井

充：多発性硬化症の interferon- β 1b 治療導入におけるクリティカルパスの検討. 神経治療 2004; 21(2) (印刷中)

佐藤 準一、山村 隆：多発性硬化症におけるインターフェロンベータ応答遺伝子. Bio Medical Quick Review Net (印刷中), 2003

学会発表

山村 隆、佐藤 準一、宮本 勝一、三宅 幸子：シンポジウム「神経疾患の克服」神経疾患の免疫療法. 第 26 回日本医学会総会. 福岡国際会議場. 福岡. 2003 年 4 月 5 日

佐藤 準一、古池 史子、中西 恵美、三枝 隆博、山村 隆：多発性硬化症特異的遺伝子発現プロファイル. 第 44 回日本神経学会総会. 横浜. 2003 年 5 月 17 日

朴 千仙、太田 宏平、清水 優子、大原 久仁子、大橋 高志、岩田 誠：多発性硬化症のインターフェロン治療についての MRS での検討. 第 44 回日本神経学会総会 2003.5

佐藤 準一、中西 恵美、尾上 祐行、古池 史子、山村 隆：多発性硬化症患者と健常者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロファイルの比較解析. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会. 福岡, 平成 2003

年 12 月 9 日

2) 海外

論文発表

◎は班の中心課題に対する班員共同執筆論文；○はマイクロアレイを神経疾患の解析に応用した研究論文

Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Tashiro K. Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients.

J Neuroimmunol 136: 125-129, 2003

◎Koike, F., I-i. Satoh, T. Kondo, S. Miyake, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kikuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K. Ota, T. Kanda, T. Fukazawa, and T. Yamamura: Microarray analysis identifies IFN γ -regulated genes in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 139: 109-118, 2003

Kikuchi S, Fukazawa T, Niino M, Yabe I, Miyagishi R, Hamada T, Hashimoto SA, Tashiro K. HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands. *Neurology* 60: 647-651, 2003

Miyagishi R, Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Tashiro K. C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism in Japanese patients

with multiple sclerosis. *J*

Neuroimmunol. 2003 145 :135-8.

Illes, Zs., M. Shimamura, J. Newcombe,
N. Oka, and T. Yamamura:

Accumulation of V α 7.2J α 33 invariant T
cells in autoimmune inflammatory
lesions of the nervous system. *Int.*

Immunol. 16:223-230, 2004

©Satoh, J-i., M. Nakanishi, F. Koike, S.
Miyake, T. Yamamoto, M. Kawai, S.
Kikuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K.
Ota, T. Kanda, T. Fukazawa and T.
Yamamura: Microarray analysis
identifies an aberrant expression of
apoptosis and DNA damage-regulatory
genes in multiple sclerosis. *Neurobiol.*
Dis. (投稿中), 2004

Satoh, J-i., T. Yamamura, and K.
Arima: The 14-3-3 protein epsilon
isoform, expressed in reactive
astrocytes in demyelinating lesions of
multiple sclerosis, binds to vimentin
and glial fibrillary acidic protein in
cultured human astrocytes. *Amer J*
Pathol. (投稿中), 2004

© Satoh, J-i., M. Nakanishi, F. Koike,
S. Miyake, T. Yamamoto, M. Kawai, S.
Kikuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K.
Ota, T. Kanda, T. Fukazawa and T.

Yamamura: Gene cluster analysis
with microarray analysis identifies
distinct subgroups of multiple sclerosis
(執筆中)

学会発表

Yamamura, T.: Immunology of Asian
multiple sclerosis. MS Across
Continents: Insights from Asia
and the Middle East. A programme
organized under the auspices of the MS
Forum. Bangkok, Thailand,
Oct. 10, 2003

©Satoh, J-i., F. Koike, T. Fukazawa, M.
Kawai, and T. Yamamura: Interferon-
b-responsive genes in multiple
sclerosis. 55th Annual Meeting of the
American Academy of Neurology.
Honolulu, Hawaii, USA, April 2, 2003

Satoh, J-i., K. Kurohara, M. Yukitake,
H. Takashima, Y. Kuroda, and T.
Yamamura: Detection of the 14-3-3
protein in the cerebrospinal fluid of
multiple sclerosis. 55th Annual Meeting
of the American Academy of
Neurology, Honolulu, Hawaii, USA,
April 2, 2003

Satoh, J-i., T. Yamamura, M. Kawai,
and K. Arima: The 14-3-3 protein is
expressed in reactive astrocytes in

demyelinating lesions of multiple sclerosis. Xvth International Congress of Neuropathology, Turin, Italy, Sep 16, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：多発性硬化症の診断に有用な遺伝子発現（出願中）
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

資料：平成 15 年度班員共同執筆論文

Full title:

Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis

Jun-ichi Satoh^a, Megumi Nakanishi^a, Fumiko Koike^a, Sachiko Miyake^a, Toshiyuki Yamamoto^b, Mitsuru Kawai^b, Seiji Kikuchi^c, Kyouichi Nomura^d, Kazumasa Yokoyama^e, Kohei Ota^f, Takashi Kanda^g, Toshiyuki Fukazawa^h, Takashi Yamamura^{a,*}

^aDepartment of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan; ^bNational Center Hospital for Mental, Nervous and Muscular Disorders, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan; ^cDepartment of Neurology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Kita-15 Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan; ^dDepartment of Neurology, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyamachou, Saitama 350-0495, Japan; ^eDepartment of Neurology, Juntendo University School of Medicine, Hongo 2-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-841, Japan; ^fDepartment of Neurology, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawadachou, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan; ^gDepartment of Neurology, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan; ^hHokuyukai Neurology Hospital, Niju-Yon-Ken 2-2-4-30, Nishi-ku, Sapporo 063-0802, Japan, Sapporo, Japan

**Corresponding author: Takashi Yamamura, Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan Tel.: +81-42-346-1723; fax: +81-42-346-1753.*

E-mail address: yamamura@ncnp.go.jp (T. Yamamura).

Abstract

To clarify the molecular mechanisms underlying multiple sclerosis (MS)-promoting autoimmune process, we have investigated a comprehensive gene expression profile of T cell and non-T cell fractions of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from 72 MS patients and 22 age- and sex-matched healthy control (CN) subjects, by using a cDNA microarray. Among 1,258 genes examined, 173 genes in T cells and 50 genes in non-T cells were expressed differentially between MS and CN groups. Downregulated genes greatly outnumbered upregulated genes in MS. More than 80% of the top 30 most significant genes were categorized into apoptosis signaling-related genes of both proapoptotic and antiapoptotic classes. They included upregulation in MS of orphan nuclear receptor Nurr1 (NR4A2), receptor-interacting serine/threonine kinase 2 (RIPK2) and silencer of death domains (SODD), and downregulation in MS of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2) and death-associated protein 6 (DAXX). Furthermore, a set of the genes involved in DNA repair, replication and chromatin remodeling was downregulated in MS. Northern blot analysis showed that the expression of the genes upregulated in MS was identified in cultured PBMC following stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate and ionomycin, anti-CD3 monoclonal antibody or interferon-gamma. These results suggest that MS lymphocytes show a complex pattern of gene regulation which represents a counterbalance between promoting and preventing apoptosis and DNA damage of lymphocytes.

Keywords: Apoptosis; Gene expression profile; Microarray; Multiple sclerosis

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) white matter. Although the etiology of MS remains unknown, immunological studies have suggested that MS is an autoimmune disease mediated by T-lymphocytes secreting proinflammatory T helper type 1 (Th1) cytokines, whose development is triggered by a complex interplay of both genetic and environmental factors (Compston, and Coles, 2002). Increasing evidence indicates that the elimination of autoreactive T cells via apoptosis, a common regulatory mechanism for normal development and homeostasis of the immune system, is impaired in MS (Zipp et al., 1999). The mRNA levels of Fas, Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) are elevated in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of relapsing-remitting MS (RRMS) patients, while T cell lines established from these patients show a functional defect in the Fas-signaling pathway (Comi et al., 2000; Huang et al., 2000; Gomes et al., 2003). The expression of B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2) family proteins is dysregulated in lymphocytes of clinically active MS patients in a manner that promotes resistance to apoptosis (Sharief et al., 2003). Apoptosis-regulatory proteins are aberrantly expressed in active MS brain lesions (D'Souza et al., 1996; Bonetti et al., 1999). However, the precise implication of these observations in immunopathogenesis of MS is fairly limited, because most of these studies have focused on a limited range of apoptosis-signaling regulators.

DNA microarray technology is a novel approach that would allow us to systematically and simultaneously monitor the expression of a great number of genes. Application of this technique has begun to give us new insights into the complexity of molecular interactions involved in the MS-promoting autoimmune process (Steinman and Zamvil, 2003). Actually, microarray analysis identified upregulation of a set of genes in active MS brain lesions, whose pathological role has not been previously predicted in MS (Lock et al., 2002). Recently, we have studied the gene expression

profile of T cells and non-T cells derived from RRMS before and after treatment with interferon-beta (IFN β) (Koike et al., 2003). IFN β significantly altered the expression of 21 genes, including 9 with IFN-responsive promoter elements, thereby contributing to the therapeutic effects of IFN β in MS. Supporting our observations, different studies using distinct cDNA microarrays identified IFN β -responsive genes expressed in PBMC of RRMS patients receiving IFN β (Stürzebecher et al., 2003; Weinstock-Guttman et al., 2003). Importantly, a recent microarray analysis showed that a battery of the genes closely associated with development of MS include those encoding apoptosis-regulatory proteins, although this study enrolled only four MS patients (Maas et al., 2002).

Here we investigated a comprehensive gene expression profile of CD3⁺ T cells and CD3⁻ non-T cells isolated from 72 MS patients and 22 healthy subjects by using a cDNA microarray containing 1,258 genes of various functional classes. We found that 173 genes in T cells and 50 genes in non-T cells were differentially expressed between MS and CN groups. Unexpectedly, more than 80% of the top 30 most significant genes were categorized into apoptosis signaling-related genes of both proapoptotic and antiapoptotic classes, suggesting an existence of the counterbalance between resistance and susceptibility of lymphocytes towards apoptosis in MS.

Materials and Methods

The study population

The present study enrolled 72 Japanese MS patients including 65 RRMS and 7 SPMS cases composed of 55 women and 17 men with the mean age of 36.1 ± 10.3 years. It also included 22 healthy control (CN) subjects composed of 16 women and 6 men with the mean age of 38.6 ± 12.3 years. The MS patients were diagnosed according to the established criteria (McDonald et al., 2001). They showed the average Expanded Disability Status Scale (EDSS) score of 2.8 ± 2.0 . No patients had received either corticosteroid or immunosuppressants during at least one month before blood sampling. Written informed consent was obtained from all the subjects.

RNA isolation from T cell and non-T cell fractions

PBMC were isolated from 30 ml of heparinized blood by centrifugation on a Ficoll density gradient. They were then labeled with anti-CD3 antibody-coated magnetic microbeads, and immediately separated by AutoMACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) into a CD3⁺ T cell fraction and a CD3⁻ non-T cell fraction, the latter composed of monocytes, B cells and NK cells. Total RNA was isolated from each fraction by using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Five μ g of purified RNA was *in vitro* amplified within a linear range of the amplification, and the antisense RNA (aRNA) was processed for cDNA microarray analysis as described previously (Koike et al., 2003).

cDNA microarray analysis

The present study utilized a custom microarray containing duplicate spots of cDNA immobilized on a poly-L-lysine-coated slide glass, prepared by PCR of 1,258

sequence-known genes of various functional classes, including cytokines/growth factors and their receptors, apoptosis regulators, oncogenes, transcription factors, cell cycle regulators and housekeeping genes (Hitachi Life Science, Kawagoe, Saitama, Japan). The complete gene list of the microarray is available upon request (express@ls.hitachi.co.jp). Individual aRNA of MS patients and CN subjects was labeled with a fluorescent dye Cy5 by reverse transcriptase reaction. Pooled aRNA of three independent healthy volunteers who were not included in the study was labeled with Cy3 and used as a universal reference to standardize the gene expression levels throughout the experiments as described previously (Koiike et al., 2003). The arrays were hybridized at 62°C for 10 hours in the hybridization buffer containing equal amounts of Cy3- or Cy5-labeled cDNA, and they were then scanned by the ScanArray 5000 scanner (GSI Lumonics, Boston, MA). The data were analyzed by using the QuantArray software (GSI Lumonics). The average of fluorescence intensities (FI) of duplicate spots was obtained after global normalization between Cy3 and Cy5 signals. The impact of inter-experiment variability was verified by analyzing a scatter plot. The genes exhibiting the average FI smaller than the level of 1,000 were omitted to be processed for further analysis. The gene expression level (GEL) was calculated according to the formula: $GEL = FI(Cy5) \text{ of the sample} / FI(Cy3) \text{ of the universal reference}$. The results were also expressed as box and whisker plots.

Statistical analysis

The statistical significance of differences in GEL between MS and CN samples was evaluated by a regularized *t* test (Cyber-T) using the Bayesian inference of variance, where they were considered as significant when the *p* value was smaller than 0.05 (Baldi and Long, 2001).

Northern blot analysis

Unfractionated PBMC of a healthy subject were suspended at 5×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 55 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. The cells were then incubated in a 5%CO₂/95% air incubator at 37°C for 6 hours in the medium with inclusion of both 25 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma, St. Louis, MO) and 1 μ g/ml ionomycin (IOM; Sigma), or incubated for 24 hours in the plate coated with 1 μ g/ml mouse monoclonal antibody (mAb) against human CD3 (OKT3) or in the medium containing 100 ng/ml recombinant human IFN-gamma (IFN γ) (a specific activity of $\geq 2 \times 10^7$ units/mg, PeproTech, London, UK), followed by processing for RNA preparation as described previously (Sato and Kuroda, 2001). Three μ g of total RNA was separated on a 1.5% agarose-6% formaldehyde gel and transferred onto a nylon membrane. After prehybridization, the membranes were hybridized at 54°C overnight with the DIG-labeled DNA probe synthesized by the PCR DIG probe synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using the sense and antisense primer sets listed in Table 1. The specific reaction was visualized on Kodak X-OMAT AR x-ray films by the DIG chemiluminescence detection kit (Roche Diagnostics).