

- J.D., 1996. Inhibition of Nur77/Nurr1 leads to inefficient clonal deletion of self-reactive T cells. *J. Exp. Med.* 183, 1879-1892.
73. Zhou, Z.-Q., Hurlin, P.J., 2001. The interplay between Mad and Myc in proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol.* 11, S10-S14.
74. Zipp, F., Krammer, P.H., Weller, M., 1999. Immune (dys)regulation in multiple sclerosis: role of the CD95-CD95 ligand system. *Immunol. Today* 20, 550-554.

Figure Legends

Fig. 1. Top 30 differentially expressed genes in T cell fraction between MS and CN groups. The gene expression profile was studied in CD3⁺ T cell fraction isolated from 72 MS patients and 22 healthy control (CN) subjects by analyzing a cDNA microarray containing 1,258 genes. RNA of MS and CN samples was labeled with Cy5, while RNA of a universal reference was labeled with Cy3. Top 30 genes were identified by Cyber-T test, based on the *p* value of log gene expression level (GEL) as listed in Table 2. The results were expressed as box and whisker plots where the longitudinal axis indicates log GEL, and were arranged in order of the significance. The plots represent the following genes: (1) regulator of G protein signaling 14 (RGS14), (2) carbohydrate sulfotransferase 2 (CHST2), (3) nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (NR4A2), (4) mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), (5) SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3 (SMARCA3), (6) tyrosylprotein sulfotransferase 2 (TPST2), (7) transcription factor 17 (TCF17), (8) heat shock 70kD protein 1A (HSPA1A), (9) angiotensin receptor-like 2 (AGTRL2), (10) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), (11) topoisomerase 1 (TOP1), (12) protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6 (PTPN6), (13) chemokine, CC motif, receptor 5 (CCR5), (14) transcription factor 8 (TCF8), (15) carbohydrate sulfotransferase 4 (CHST4), (16) v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (ERBB4), (17) transcription factor 21 (TCF21), (18) ATPase, hydrogen-transporting, lysosomal, 56/58kD, V1 subunit B, isoform 2 (ATP6V1B2), (19) cAMP responsive element-binding protein 1 (CREB1), (20) integrin, beta-1 (ITGB1), (21) cytochrome c oxidase assembly protein (COX15), (22) Myc protooncogene (MYC), (23) BCL2-associated athanogene 1 (BAG1), (24) cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2 (CYP1A2), (25) cell division cycle 16 (CDC16), (26) solute carrier family 35, member A1 (SLC35A1), (27) death-associated protein 6 (DAXX), (28) TGF β -stimulated gene 22 (TSC22), (29) GA-binding protein transcription factor,

beta subunit 1 (GABPB1), and (30) poly(ADP-ribose) polymerase (PARP).

Fig. 2. Top 30 differentially expressed genes in non-T cell fraction between MS and CN groups. The gene expression profile was studied in CD3⁺ non-T cell fraction isolated from 72 MS patients and 22 healthy control (CN) subjects by analyzing a cDNA microarray containing 1,258 genes. See the footnote of figure 1. The top 30 genes were arranged in order of the significance as listed in Table 3. The plots represent the following genes: (1) intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), (2) cell division cycle 42 (CDC42), (3) SMARCA3, (4) RGS14, (5) COX15, (6) A-kinase anchor protein 11 (AKAP11), (7) receptor-interacting serine/threonine kinase 2 (RIPK2), (8) TCF11, (9) cell division cycle 25B (CDC25B), (10) granzyme A (GZMA), (11) CHST4, (12) IL-1 receptor, type II (IL1R2), (13) B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2), (14) complement component receptor 2 (CR2), (15) replication protein A1 (RPA1), (16) RNA Polymerase II, subunit H (POLR2H), (17) E2F transcription factor 5 (E2F5), (18) Max dimerization protein (MAD), (19) Ras-associated protein RAB7-like 1 (RAB7L1), (20) nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3 (NFATC3), (21) heat shock 70-kD protein-like 1 (HSPA1L), (22) chemokine, CXC motif, ligand 2 (CXCL2), (23) silencer of death domains (SODD), (24) retinoblastoma-binding protein 4 (RBBP4), (25) protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit (PRKDC), (26) Ras association domain family 1 (RASSF1), (27) topoisomerase 2 alpha (TOP2A), (28) DAXX, (29) epidermal growth factor (EGF), and (30) nitrogen permease regulator 2-like (NPR2L).

Fig. 3. The genes upregulated in MS were expressed in cultured PBMC in an activation-dependent manner. Unfractionated PBMC of a healthy subject were incubated for 6 hours in the medium without (lane 1) or with inclusion of 25 ng/ml PMA and 1 µg/ml IOM (lane 2), or for 24 hours in the plate coated with 1 µg/ml anti-CD3 mAb (lane 3) or in the medium containing 100 ng/ml IFNγ (lane 4), followed by processing for RNA preparation. Three µg of total RNA was separated on a 1.5%

agarose-6% formaldehyde gel and transferred onto a nylon membrane. The membranes were hybridized with the DIG-labeled DNA probe specific for CD69 (panel a), IFN regulatory factor 1 (IRF-1; panel b), IFN-induced 15kDa protein (ISG15; panel c), NR4A2 (panel e), TCF8 (panel f), ICAM1 (panel g), CDC42 (panel h), RIPK2 (panel i), IL1R2 (panel j), MAD (panel k), CXCL2 (panel l), SODD (panel m), and TOP2A (panel n). The ethidium bromide staining of the representative gel is shown in the panel d.

Fig. 4. Aberrant expression of apoptosis signaling-related genes in MS lymphocytes.

More than 80% of the top 30 differentially expressed genes between MS and CN groups were categorized into apoptosis signaling-related genes of both proapoptotic and antiapoptotic classes, whose expression was either upregulated ($\uparrow$, red) or downregulated ($\downarrow$, blue) in MS. The expression of a subset of the genes involved in DNA repair, replication and chromatin remodeling was dysregulated in MS. The figure represents an integrated picture of the observations on both T cell and non-T cell fractions. Abbreviations: DR, death receptor; TNFR, TNF receptor; D, the DR/Fas/TNFR-mediated apoptosis-signaling pathway; M, the mitochondria-mediated apoptosis-signaling pathway.

Table 1. Primer Sequences Used for PCR

Genes	Sense	Antisense	Product size (bp)	mRNA size (kb)
CD69	5'CCAGTCCCCATTCTCAACACGTC3'	5'GTGTTCTCTCTACCTGCGTATCG3'	350	1.7
IRF-1	5'TCTCTGATGGACTCAGCAGCTCCA3'	5'TATCCACCATGATGCCAGGTCCTG3'	596	2.6, 2.0
ISG15	5'CAACGAATTCCAGGTGTCCCTGAG3'	5'CGCAGATTCATGAACACGGTGCTC3'	423	0.7
NR4A2	5'CGGACAGCAGTCCTCCATTAAGGT3'	5'CTGAAATCGGCAGTACTGACAGCG3'	712	3.4
TCF8	5'CCAGTGGGATCAACCACCAATGGT3'	5'TGCAGGGCTGACCGTAGTTGAGTA3'	489	6
CYP1A2	5'ACAGCACTTCCCTGAGAGTAGCGA3'	5'GGTTGACCTGCCACTGGTTTACGA3'	629	3.5
ICAM1	5'CCATCGTGAAGAGTGGTCTC3'	5'GGTGACATTGGCCAGGGTCA3'	476	3
CDC42	5'TTGTTGTGGGCGATGGTGCTGTTG3'	5'GCAGTCTCTGGAGTGATAGGCTTC3'	406	2.2, 1.7
RIPK2	5'CAAGACCACTCCATGCTCTTCAGC3'	5'TTCCGGGTAAGGCTGAAGACCCAT3'	340	2.8, 1.4
IL1R2	5'TACACGATGTGGCCCTGGAAGATG3'	5'GTGTTTGACCGTCTGTGCATCCA3'	545	1.6
MAD	5'ACCAAATCGACCAGCTTCAGCGAG3'	5'GAGACCAAGACACGCCTTGTGACT3'	314	5.0, 3.5
CXCL2	5'TTGACAGACCCTGCAGGGAATTCAC3'	5'TCAGCCTCTATCACAGTGGGTGAC3'	588	1.2
SODD	5'AACAGCCCAACTCCAGTCTCTCGT3'	5'CTGAGGCTCAGCACTATACTGGAC3'	507	4.5
TOP2A	5'GGAAGCCCTCAAGAAGATGGTGTG3'	5'GGTAGTGAGGTGGAAGACTGACT3'	555	5.7

Abbreviations: IRF-1, IFN regulatory factor-1; ISG15, IFN-induced 15-kDa protein; NR4A2, nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2; TCF8, transcription factor 8; CYP1A2, cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2; ICAM1, intercellular adhesion molecule-1; CDC42, cell division cycle 42; RIPK2, receptor-interacting serine/threonine kinase 2; IL1R2, IL-1 receptor, type II; MAD, Max dimerization protein; CXCL2, chemokine, CXC motif, ligand 2; SODD, silencer of death domains; TOP2A, topoisomerase II alpha.

Table 2. The genes expressed differentially in T cells between MS and controls

No.	Symbol	Genbank accession number	Description	Presumed function	Possible involvement in apoptosis regulation	Significance (p-log)
<i>The upregulated genes</i>						
1	NR4A2	NM_006186	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	an orphan nuclear receptor of the steroid-thyroid hormone receptor superfamily designated Nurrl	(+)	2.55E-12
2	TCF8	NM_030751	Transcription factor 8	a transcription repressor for IL-2 expression in T cells designated ZEB	(+)	1.17E-09
3	CYP1A2	NM_000761	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	a monooxygenase involved in the metabolism of drugs, toxic chemicals, and carcinogens	(+)	1.64E-08
<i>The downregulated genes</i>						
4	RGS14	NM_006480	Regulator of G protein signaling 14	a downregulator of signaling through G protein-coupled receptors	(+)	1.51E-13
5	CHST2	NM_004267	Carbohydrate sulfotransferase 2	an N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase	unknown	6.43E-13
6	MAPK1	NM_002745	Mitogen-activated protein kinase 1	a protein kinase designated ERK2 (p42) that regulates diverse cellular functions	(+)	6.02E-12
7	SMARCA3	NM_003071	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3	a DNA helicase-like chromatin remodeling enzyme	(+)	1.70E-11
8	TPST2	NM_003595	Tyrosylprotein sulfotransferase 2	a tyrosylprotein sulfotransferase	unknown	2.31E-11
9	TCF17	NM_005649	Transcription factor 17 designated KId-1	a transcriptional repressor of renal genes	(+)	3.14E-11
10	HSPA1A	NM_005345	Heat shock 70kD protein 1A	an inducible member of the HSP70 family	(+)	4.67E-11
11	AGTRL2	NM_005162	Angiotensin receptor-like 2	a protein homologous to the angiotensin II receptor type 1	unknown	3.51E-10
12	TRAIL	NM_003810	TNF-related apoptosis-inducing ligand	an apoptosis-inducing ligand of the TNF family for DR4 and DR5	(+)	5.19E-10
13	TOP1	NM_003286	Topoisomerase 1	a DNA topoisomerase	(+)	7.03E-10
14	PTPN6	NM_080549	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	a protein tyrosine phosphatase with SH2 domains designated SHP-1	(+)	7.77E-10
15	CCR5	NM_000579	Chemokine, CC motif, receptor 5	a chemokine receptor for RANTES, MIP1 α , MIP1 β and MCP2	(+)	1.10E-09
16	CHST4	NM_005769	Carbohydrate sulfotransferase 4	an N-acetylglucosamine 6-O sulfotransferase	unknown	1.84E-09
17	ERBB4	NM_005235	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4	an EGF receptor-related receptor tyrosine kinase interacting with neuregulins	(+)	2.22E-09
18	TCF21	NM_003206	Transcription factor 21	a transcription factor designated Capsulin	(+)	4.99E-09
19	ATP6V1B2	NM_001693	ATPase, hydrogen-transporting, lysosomal, 56/58kD, V1 subunit B, isoform 2	a vacuolar ATPase that mediates acidification of intracellular organelles	(+)	5.10E-09
20	CREB1	NM_134442	Cyclic AMP responsive element-binding protein 1	a CRE-binding transcription factor for cAMP-responsive genes	(+)	6.58E-09
21	ITGB1	NM_002211	Integrin, beta-1	a common beta chain of the VLA protein family	(+)	7.16E-09
22	COX15	NM_078470	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15	a protein essential for assembly of COX	(+)	1.13E-08
23	MYC	NM_002467	Myc protooncogene	a transcription factor that regulates diverse cellular functions	(+)	1.18E-08
24	BAG1	NM_004323	BCL2-associated athanogene 1	an enhancer of the anti-apoptotic effects of BCL2	(+)	1.51E-08
25	CDC16	NM_003903	Cell division cycle 16	a component of the anaphase-promoting complex essential for mitosis	(+)	1.99E-08
26	SLC35A1	NM_006416	Solute carrier family 35, member A1	a CMP-sialic acid transporter	unknown	2.06E-08
27	DAXX	NM_001350	Death-associated protein 6	a protein that interacts with the death domain of Fas	(+)	2.23E-08
28	TSC22	NM_006022	TGF β -stimulated gene 22	a transcription factor induced by TGF β	(+)	2.34E-08
29	GABPB1	NM_005254	GA-binding protein transcription factor, beta subunit 1	a nuclear transcription factor for cytochrome c oxidase	(+)	6.16E-08
30	PARP	NM_001618	Poly(ADP-ribose) polymerase	a chromatin-associated enzyme that catalyzes polyADP-ribosylation of nuclear proteins	(+)	6.72E-08

Table 3. The genes expressed differentially in non-T cells between MS and controls

No.	Symbol	Genbank accession number	Description	Presumed function	Possible involvement in apoptosis regulation	Significance (p-log)
<i>The upregulated genes</i>						
1	ICAM1	NM_000201	Intercellular adhesion molecule-1	a cell surface glycoprotein ligand (CD54) for LFA-1 and Mac-1	(+)	1.11E-09
2	CDC42	NM_001791	Cell division cycle 42	a small GTPase that regulates diverse cellular functions	(+)	1.49E-08
3	RIPK2	NM_003821	Receptor-interacting serine/threonine kinase 2	a protein kinase interacting with CLARP in the Fas-signaling pathway	(+)	1.88E-07
4	IL1R2	NM_004633	IL-1 receptor, type II	a decoy receptor for IL-1 that inhibits IL-1 activity	unknown	4.56E-07
5	MAD	NM_002357	Max dimerization protein	a transcriptional repressor that competes with MYC for binding to MAX	(+)	1.00E-06
6	CXCL2	NM_002089	Chemokine, CXC motif, ligand 2	a chemokine designated MIP2 binding to CXCR2	(+)	1.91E-06
7	SODD	NM_004874	Silencer of death domains	an adaptor protein designated BAG4 associated with HSP70 and the death domain of TNFR1 and DR3	(+)	3.13E-06
8	TOP2A	NM_001067	Topoisomerase 2 alpha	a DNA topoisomerase	(+)	4.82E-06
<i>The downregulated genes</i>						
9	SMARCA3	NM_003071	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3	a DNA helicase-like chromatin remodeling enzyme	(+)	3.95E-08
10	RGS14	NM_006480	Regulator of G protein signaling 14	a downregulator of signaling through G protein-coupled receptors	(+)	5.44E-08
11	COX15	NM_078470	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15	a protein essential for assembly of COX	(+)	6.43E-08
12	AKAP11	NM_016248	A-kinase anchor protein 11	a protein anchoring the regulatory subunit of protein kinase A	(+)	1.68E-07
13	TCF17	NM_005649	Transcription factor 17	a transcriptional repressor of renal genes designated Kld-1	(+)	1.92E-07
14	CDC25B	NM_021874	Cell division cycle 25B	a tyrosine phosphatase that activates the cyclin dependent kinase CDC2	(+)	2.40E-07
15	GZMA	NM_006144	Granzyme A	a cytotoxic T cell- and NK cell-specific serine protease	(+)	2.49E-07
16	CHST4	NM_005769	Carbohydrate sulfotransferase 4	an N-acetylglucosamine 6-O sulfotransferase	unknown	3.46E-06
17	BCL2	NM_000633	B-cell CLL/lymphoma 2	a mitochondrial membrane protein that blocks the apoptotic death	(+)	4.81E-07
18	CR2	NM_001877	Complement component receptor 2	a membrane receptor (CD21) for C3d	(+)	5.88E-07
19	RPA1	NM_002945	Replication protein A1	a single-stranded DNA-binding protein that regulates DNA replication	(+)	6.72E-07
20	POLR2H	NM_006232	RNA polymerase II, subunit H	a subunit of RNA polymerase II	(+)	7.28E-07
21	E2F5	NM_001951	E2F transcription factor 5	a transcription factor of the E2F family	(+)	1.00E-06
22	RAB7L1	NM_003929	Ras associated protein RAB7-like 1	a RAS-related small GTP-binding protein	(+)	1.49E-06
23	NFATC3	NM_173165	Nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 3	a component of DNA-binding transcription complex that regulates the gene expression in T cells	(+)	1.66E-06
24	HSPA1L	NM_005527	Heat shock 70-kD protein-like 1	a constitutive member of the HSP70 family	(+)	1.87E-06
25	RBBP4	NM_005610	Retinoblastoma-binding protein 4	a nuclear protein binding to RB1	(+)	3.13E-06
26	PRKDC	NM_006904	Protein kinase, DNA-activated, catalytic subunit	a nuclear serine/threonine protein kinase	(+)	3.36E-06
27	RASSF1	NM_170714	Ras association domain family 1	a lung tumor suppressor gene having a Ras-association domain	(+)	3.49E-06
28	DAXX	NM_001350	Death-associated protein 6	a protein that interacts with the death domain of Fas	(+)	5.16E-06
29	EGF	NM_001963	Epidermal growth factor	a potent mitogenic factor for the cells of both ectodermal and mesodermal origin	(+)	5.74E-06
30	NPR2L	NM_006545	Nitrogen permease regulator 2-like	a possible tumor suppressor gene	unknown	1.13E-05

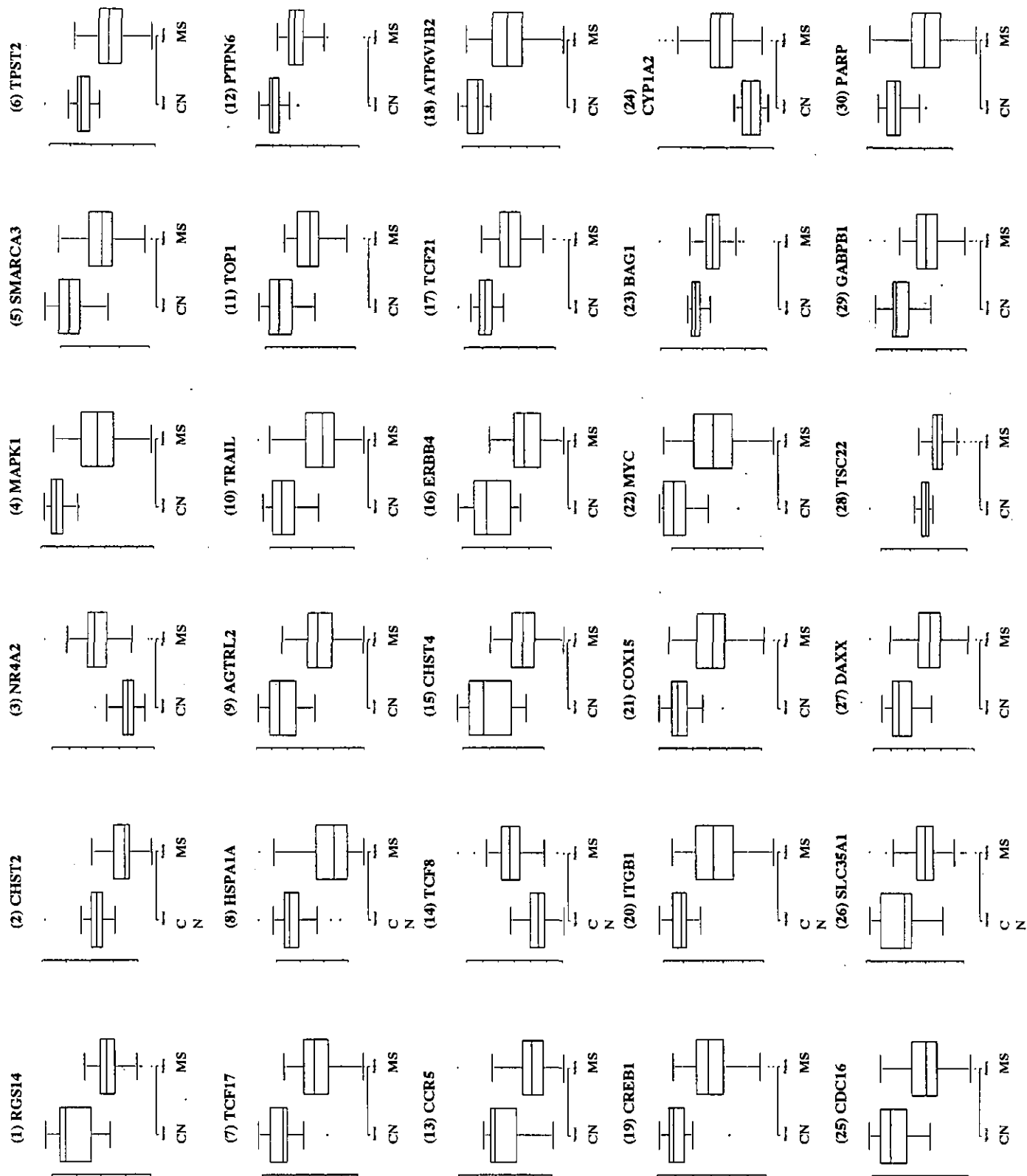


Fig. 1 Satoh et al

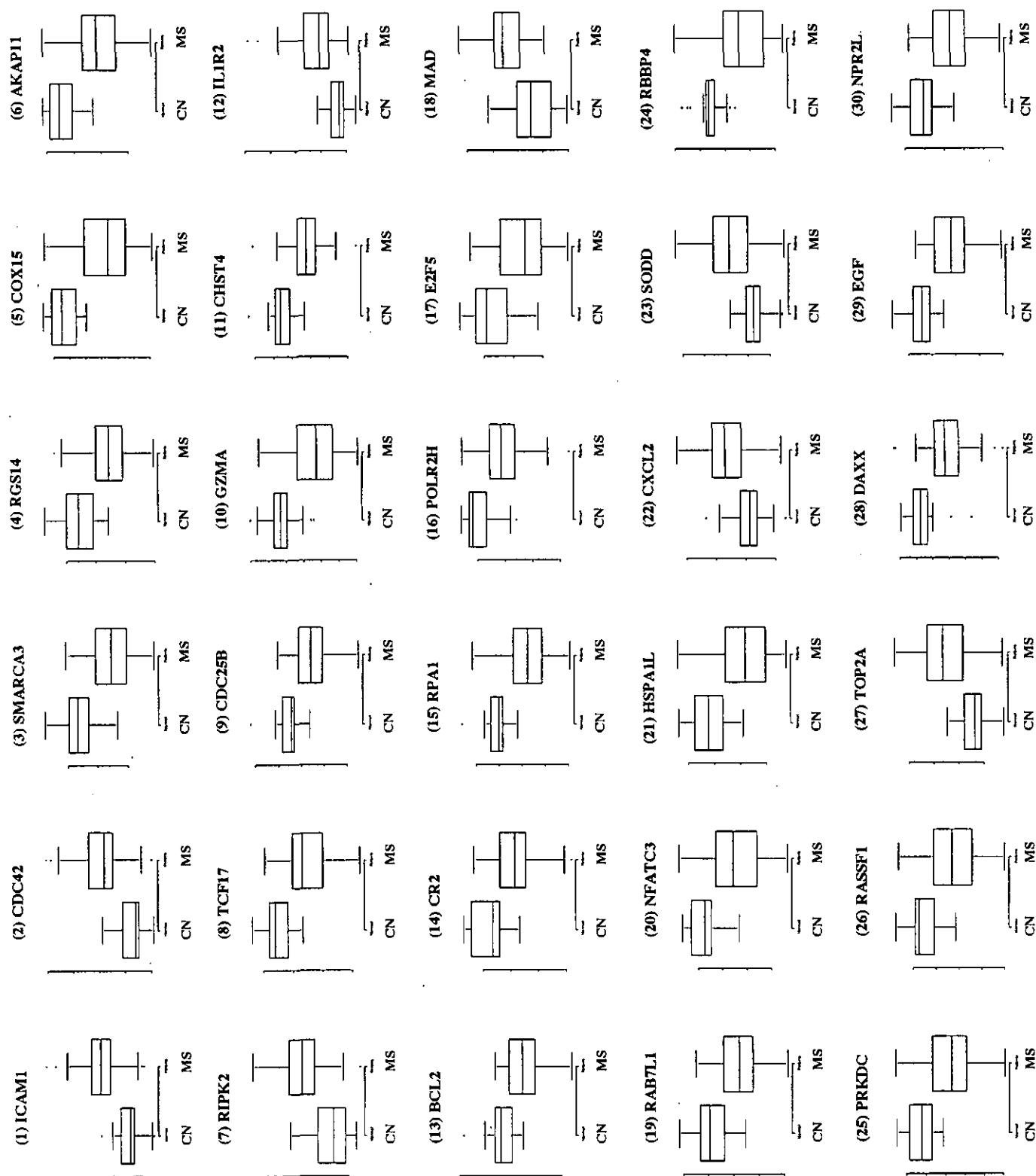


Fig. 2 Satoh et al

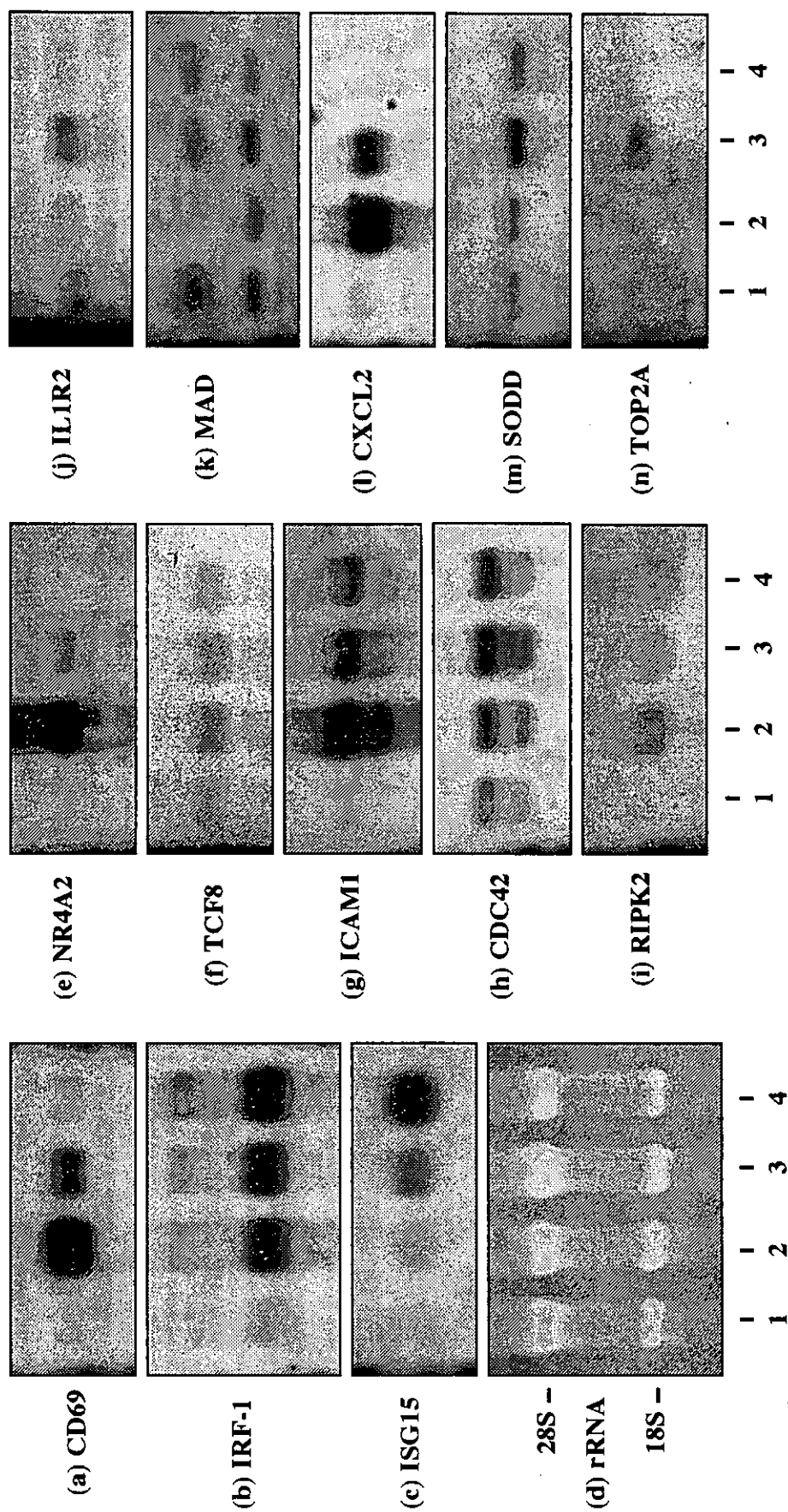


Fig. 3 Satoh et al

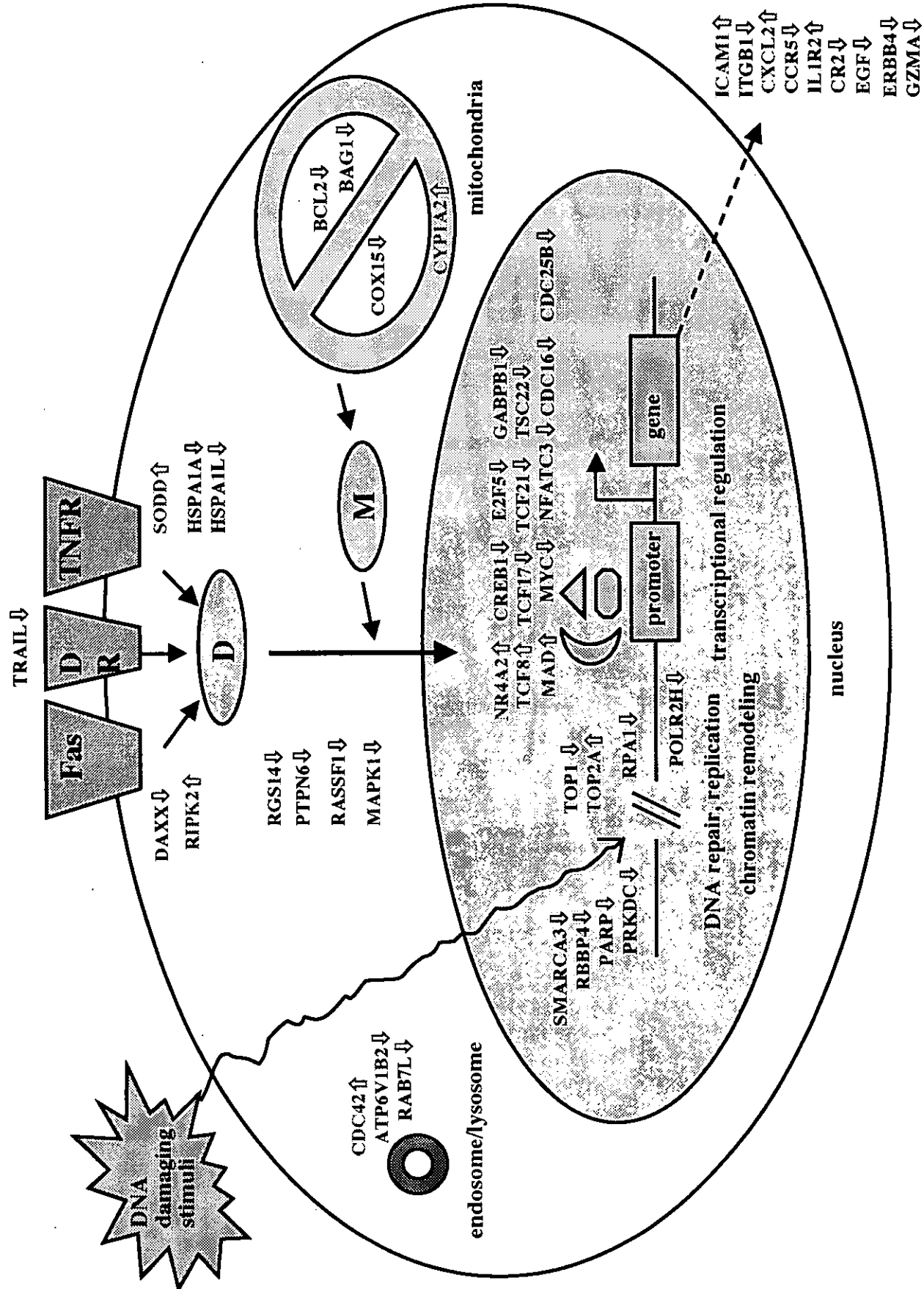


Fig. 4 Satoh et al

Ⅱ. 分 担 研 究 報 告

厚生労働省科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

「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

分担研究者	川井 充	国立精神・神経センター武蔵病院	第二病棟部長
研究協力者	山本敏之	国立精神・神経センター武蔵病院	神経内科
	尾方克久	同上	
	大矢寧	同上	
	小川雅文	同上	

研究要旨

日本人の多発性硬化症 (MS) 患者 60 人を対象に, expanded disability status scale (EDSS) を用いて身体障害度を評価し, 生活の質 (QOL) を日本語版 Multiple Sclerosis Quality of Life-54 Instrument-54 (MSQOL-54J) で評価した. インターフェロン β 1b (INF β) で治療している 20 人と INF β で治療していない 40 人を比較し, EDSS, MSQOL-54J の評価点とも, 有意差はなかった. また, EDSS と MSQOL-54J の身体複合健康度, 精神複合健康度は, 相関が低かった. MS に特異的な MSQOL-54J は, EDSS では評価できない MS 患者の自覚的な QOL 評価尺度として有用であると考えた.

A. 研究目的

インターフェロン β 1b (INF β) 治療中の多発性硬化症 (MS) 患者と INF β 治療をしていない MS 患者について, expanded disability status scale (EDSS) を用いた身体障害度と, 日本語版 Multiple Sclerosis Quality of Life-54 Instrument (MSQOL-54J) を用いた生活の質 (QOL) を比較検討する.

B. 研究方法

国立精神・神経センター武蔵病院 神経内科で治療中の MS 患者 60 人を対象とした. INF β 治療をしている MS 患者 (INF β 治療群) は 20 人 (男性 7 人, 女性 13 人, 平均年齢 36.4 ± 10.6 才), INF β 治療をしていない MS 患者 (INF β 未治療群) は 40 人 (男性 9 人, 女性

31 人, 平均年齢 45.9 ± 12.0 才) であった.

すべての MS 患者の総合障害度は, EDSS を用いて評価し, INF β 治療群と INF β 未治療群の 2 群の EDSS の比較は Mann-Whitney 検定を使った.

QOL の評価は, MSQOL-54 を日本語に翻訳した MSQOL-54J を用いて記名自己記入調査した. MSQOL-54J は複数の質問から構成される 12 の項目と単一の質問からなる 2 つの項目の計 14 項目で構成される. それぞれの項目の最終評価点は, 英語版 MSQOL-54 に準拠して計算し, 項目ごとに比重をかけた. いずれの項目も最終評価点は 0 点から 100 点で, 点数が高いほど QOL は良好であると評価される. 複数の項目を集計し, 身体複合健康度と精神複合健康度を算出した. また, 解析では,

それぞれの項目を構成する質問の回答が半数以上欠損した例は対象外とした。また、個々の項目を構成する質問の内的整合性を Cronbach α 係数で使って調べた。INF β 治療群と INF β 未治療群の MSQOL-54J の結果を比較し、Mann-Whitney 検定で解析した。MS 患者全体の EDSS と MSQOL-54J の相関を、Spearman の順位相関を使って解析した。いずれも、 $p < 0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

・総合障害度 (EDSS) の比較。

INF β 治療群:

中央値 3.25, 四分位範囲 3.5.

INF β 未治療群:

中央値 3.0, 四分位範囲 2.0.

2 群に有意差はなかった。

・MS 患者全体の MSQOL-54J の項目別回答率。

回答率が低かった項目:

「性機能」 73.3%.

「性機能の満足度」 76.7%.

回答率が高かった項目:

「身体健康度」, 「心の健康」, 「活力」,

「健康の認識」, 「認知機能」, 「健康

の悩み」, それぞれ 100%

・MS 患者全体の MSQOL-54J の項目別内的整合性 (Cronbach α 係数)。

もっとも整合性の低かった項目:

「社会的役割」 0.66

もっとも整合性の高かった項目:

「身体健康度」 0.93

・INF β 治療群と INF β 未治療群の MSQOL-54 の項目別の最終評価点の比較 (Fig. 1)。

INF β 治療群と INF β 未治療群はほぼ同じ傾向であった。

・EDSS と PHCS と MHCS の比較

身体複合健康度:

Spearman の $\rho = -0.48$, $P < 0.001$

精神複合健康度:

Spearman の $\rho = -0.15$, $P = 0.24$.

いずれの項目も相関が低かった。

D. 考察

MS の総合障害度の評価には神経学的な重症度から評価する EDSS が広く使われるが、EDSS では四肢の障害や歩行の障害がある場合に重症度が上がりやすく、MS で起こりうる易疲労、抑うつ、性機能、認知機能などを評価しきれないことが知られている。MSQOL-54 は MS 患者の QOL を評価するために作られた評価スケールで、一般に QOL スコアとして用いられている Short Form 36-Item Health Survey (SF-36) の 34 の質問に MS 患者に特異的な 18 の質問を加えたものである。MSQOL-54 を使った米国の研究では、MS 患者の総合障害度が悪いほど QOL は悪く、また、二次進行型 MS は再発寛解型 MS よりも QOL が悪いことが報告されている。

本研究は日本人 MS 患者において、EDSS から身体的な障害度を評価し、MSQOL-54 から QOL を評価した。これまでに本邦では MS 患者の QOL の研究はなく、われわれが日本語に翻訳した MSQOL-54 が日本人 MS 患者にたいして妥当であるかは検討の余地があるが、回答率、内的整合性とも臨床研究として良好な結果であると考えた。本研究の INF β 治療群と INF β 未治療群は、EDSS の結果も、MSQOL-54J の結果も有意差がないことから、隔日で自己注射が必要な INF β 治療でも、社会的な活動を損なわず、QOL を悪化させない可能性が示唆された。また、MSQOL-54J で算出した複合障害度と EDSS の相関は低く、EDSS で評価できない項目を MSQOL-54J は評価できる可能性が示唆された。

E. 結論

1) INF β 治療の導入が, MS 患者の QOL を悪化させていない可能性が示唆された.

2) MSQOL-54J は新たな治療効果判定スケールとして有用であり, EDSS では評価できない MS 患者の改善度を評価できる可能性があった.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

山本敏之, 藤原由貴, 横田真知子ら: 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 (in press)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

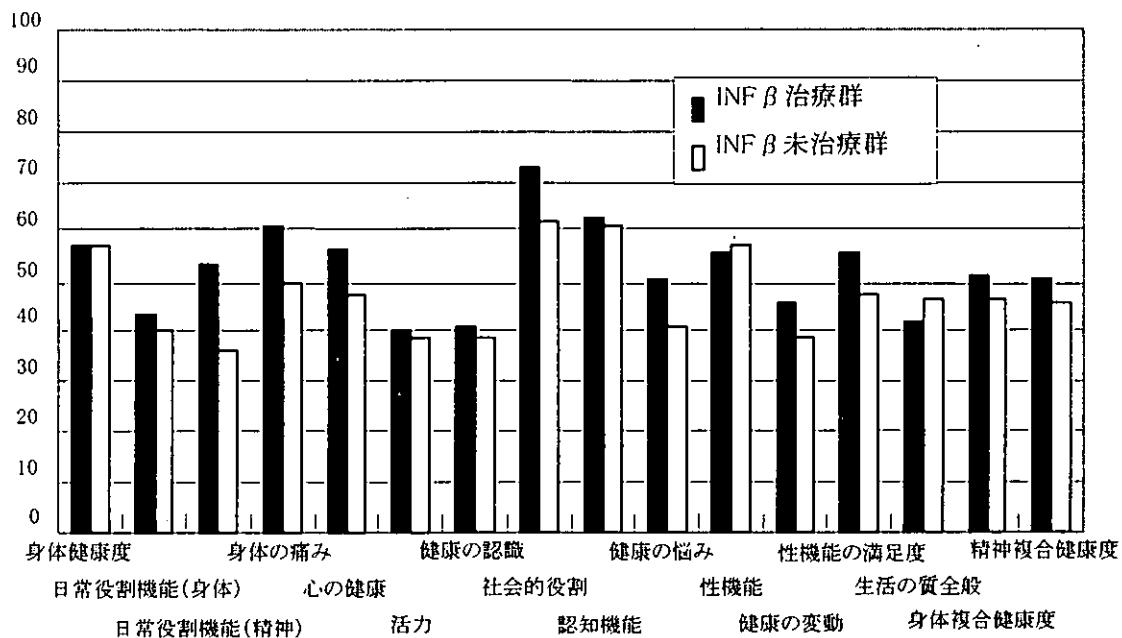


Fig. 1 MSQOL-54J の INF β 治療群, INF β 未治療群の項目別平均最終評価点. 点数が高いほど QOL は良好である. INF β 治療群, INF β 未治療群の傾向はほぼ同じであった.

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

佐藤 準一、中西 恵美、尾上 祐行、古池 史子、山村 隆
国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は何らかの遺伝的素因を有する個体において、脳炎惹起性自己抗原に分子相同性を示す外来抗原を認識して活性化した自己反応性 CD4⁺ Th1 T 細胞が誘導されることにより発症が規定される。しかし MS の病態は臨床経過・病変分布・IFN β 治療反応性の観点からは多彩であり、Th1 bias を主体とする自己免疫機序のみで MS の全体像を説明するのは困難であり、細胞普遍的分子機構すなわち増殖分化・死を制御する遺伝子群の発現制御異常にも注目する必要がある。本研究では MS 患者 72 例の末梢血 T 細胞、non-T 細胞各分画における遺伝子発現パターンを 1,258 cDNA microarray を用いて解析し、健常者(control subjects; CN)22 名と比較した。その結果、MS と CN 間で T 細胞で 173 遺伝子、non-T 細胞で 50 遺伝子の発現差異を認め、各分画の上位 30 遺伝子(the most significant genes)の大多数(80%以上)はアポトーシス関連遺伝子に属していた。またアポトーシス促進遺伝子(proapoptotic genes)とアポトーシス抑制遺伝子(antiapoptotic genes)の発現上昇および低下を認め、両者の拮抗的バランス(counterbalance)を示す遺伝子発現プロファイルを呈していた。本研究の結果は、MS 発症におけるアポトーシス制御機構異常の関与を示唆する。

A. 研究目的

アポトーシス(apoptosis)は自己反応性 T 細胞を除去して免疫系の恒常性を維持するために必須なメカニズムである。従ってアポトーシス制御機構の破綻は自己免疫疾患や癌の発症に直結する。近年、多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)におけるアポトーシス制御機構の異常に関する報告が散見されるが、大多数の研究は Fas, FasL, BCL2 など数種類の限られたアポトーシス制御因子(apoptosis signaling regulators)の発現に焦点が向けられている。遺

伝子アレイ(gene expression array)は細胞における数千・数万種類の遺伝子の発現パターンを一回の実験で短時間に包括的・網羅的・系統的に解析可能というメリットを有する。本研究では MS の免疫学的・分子細胞生物学的全体像を把握するために、DNA microarray を用いて MS 末梢血 T 細胞、non-T 細胞特異的遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、驚くべきことに健常者に比較して MS リンパ球で発現異常を認めた多くの遺伝子が、MS における過去の報告には見られない apoptosis

signaling regulators に分類された。本研究の結果は、MS 発症におけるアポトーシス制御機構の異常の関与を強く示唆する。

B. 研究方法

Informed consent を得た McDonald 診断基準を満たす 72 例の IFN β 未治療 active MS (65 例の relapsing-remitting MS (RRMS) と 7 例の secondary progressive MS (SPMS); 55 women, 17 men; the mean age 36.1 ± 10.3 ; the mean EDSS 2.8 ± 2.0) と 22 名の健常者(control subjects; CN, 16 women, 6 men; the mean age 38.6 ± 12.3) の末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を、AutoMACS を用いて CD3⁺ T 細胞と CD3⁺ non-T 細胞に分画した。各分画より RNA を抽出・増幅して cDNA 作成時に Cy5 でラベルした。また別の健常者 3 名の RNA から Cy3 ラベル cDNA を作成し universal reference とし、1,258 cDNA microarray (Hitachi Life Science) 上で競合的 hybridization を行って蛍光強度を測定し、規 準 化 (global normalization) 後 に Cyber-T (regularized t) test で MS 群 versus CN 群間で有意な発現差異を認めた遺伝子を同定した。また MS 群で発現上昇を認めた遺伝子に関して、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/ionomycin (IOM), anti-CD3 monoclonal antibody (mAb) or interferon-gamma (IFN γ) で刺激した培養 PBMC の RNA を用いて Northern blot 解析でその発現を検証した。

C. 研究結果

#1. 両群間で T 細胞 173 遺伝子、non-T 細胞 50 遺伝子が有意な発現差異を呈した。MS では T 細胞で 25 遺伝子が発現上昇、148 遺伝子

が発現低下、non-T 細胞で 11 遺伝子が発現上昇、39 遺伝子が発現低下していた。

#2. 両群間で発現差異を認めた遺伝子のうち、統計学的有意差 p value 上位 30 遺伝子を抽出すると、T 細胞では 25 遺伝子、non-T 細胞では 27 遺伝子が apoptosis 関連遺伝子に分類された (Table 1, Table 2)。T 細胞では proapoptotic genes (TRAIL, DAXX) と antiapoptotic gene (BAG1) の両者の発現低下、non-T 細胞では proapoptotic gene (RIPK2) と antiapoptotic genes (MAD, SODD) の両者の発現上昇を認めた (Table 1, Table 2)。また T 細胞で 4 遺伝子、non-T 細胞で 7 遺伝子が DNA 構築維持 (DNA integrity) すなわち DNA repair, replication, recombination, chromatin remodeling 制御関連遺伝子であった (Table 1, Table 2 の下線の遺伝子)。

#3. MS で発現上昇を認めた遺伝子の培養 PBMC における発現を Northern blot 解析で検証したところ PMA/ionomycin により NR4A2, RIPK2, ICAM1, CXCL2 の発現上昇と IL1R2, MAD の発現低下、anti-CD3 mAb で CDC42, SODD, TOP2A の発現上昇、IFN γ で CDC42, ICAM1 の発現上昇と IL1R2 の発現低下を認めた (activation-dependent regulation) (Fig. 1)。

D. 考察

本研究では DNA microarray を用いて、MS 72 例と CN 22 名の PBMC の遺伝子発現プロフィールを比較解析し、両群で有意な発現差異を認めた遺伝子群を同定したところ、大多数はアポトーシス関連遺伝子であった。MS で発現上昇を認めた receptor-interacting serine/threonine kinase-2 (RIPK2) は Fas-mediated

apoptosis を増強し(Inohara N et al. J Biol Chem 273: 12296-12300, 1998)、RIPK2-KO mice では Th1 differentiation が抑制され(Kobayashi K et al. Nature 416: 194-199, 2002)、silencer of death domains (SODD) は TNFR1 や DR3 の death domain (DD) と結合し death signal を抑制する(Jiang Y et al. Science 283: 543-546, 1999)。MS で発現低下していた death-associated protein 6 (DAXX) は Fas の DD と結合し Fas-mediated apoptosis を増強し(Yang X et al. Cell 89: 1067-1076, 1997)、BCL2-associated athanogene 1 (BAG1) は BCL2 と結合し BCL2 の antiapoptotic activity を増強する(Takayama S et al. Cell 80: 279-284, 1995)。また DAXX は chromatin-associated proteins とともに結合し、transcriptional co-repressor としても働く(Hollenbach AD et al. J Cell Sci 115: 3319-3330, 2002)。さらに MS で発現低下していた TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は type I IFN で発現誘導され、その発現上昇は MS における IFN β responder の指標となる可能性が示唆されている(Wandinger K-P et al. Lancet 361: 2036-2041, 2003)。

E. 結論

MS の PBMC では proapoptotic genes と antiapoptotic genes の発現上昇および低下を認め、外界からの apoptosis-inducing or DNA-damaging stimuli and stresses に対して homeostasis を保つために、両者の counterbalance が成立していると思われる(Fig. 2)。MS 発症にはアポトーシス制御機構異常の関与が示唆され、apoptosis-regulatory agents は MS の新規治療薬になる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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: 130-142, 2003.
- 3) 佐藤 準一：脳の炎症とグリア細胞の役割. BRAIN MEDICAL 15: 15-20, 2003.
- 4) 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 2004 (印刷中).
- 5) Koike F, Satoh J-I, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies interferon β -regulated genes in multiple sclerosis. J Neuroimmunol 139: 109-118, 2003.
- 6) Satoh J-I, M. Yuki take, K. Kurohara, H. Takashima, and Y. Kuroda: Detection of the 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid of Japanese multiple sclerosis patients presenting with severe myelitis. J Neurol Sci 212: 11-20, 2003.
- 7) Satoh J-I, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-

regulatory genes in multiple sclerosis. Neurobiol Dis 2004, submitted for publication.

2. 学会発表

国際学会

1) Satoh J-I, Koike F, Fukazawa T, Kawai M, Yamamura T: Interferon- β -responsive genes in multiple sclerosis. 55th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Honolulu, Hawaii, April 2, 2003.

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

3) Satoh J-I, Yamamura T, Kawai M, Arima K: The 14-3-3 protein is expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 15th International Congress of Neuropathology. Torino, September 16, 2003.

国内学会

1) 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. 東京、2003 年 5 月 17 日.

2) 佐藤 準一、三枝 隆博、山村 隆、小川 雅文、川井 充、：多発性硬化症脱髄巣における 14-3-3 蛋白質の発現. 第 44 回日本神経病理学会総会学術研究会. 名古屋、2003 年 5 月 29 日.

3) 佐藤 準一：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 2 回東京 MS 研究会. 東京、2003 年 9 月 5 日.

4) 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、2003 年 12 月 9 日.

5) 中西 恵美、佐藤 準一、荒浪 利昌、山村 隆：ApoE 欠損マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の重症化. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会. 福岡、2003 年 12 月 9 日.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得(出願中)

1) 多発性硬化症に対するインターフェロン・ベータ薬物治療の有効性予測法

2) 多発性硬化症特異的遺伝子発現プロファイルの解析

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Table 1. The genes expressed differentially in T cells between MS and controls

No.	Symbol	Genbank accession number	Description	Presumed function	Possible involvement in apoptosis regulation	Significance (p-log)
<i>The upregulated genes</i>						
1	NR4A2	NM_006186	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	an orphan nuclear receptor of the steroid-thyroid hormone receptor superfamily designated Nurrl	(+)	2.55E-12
2	TCF8	NM_030751	Transcription factor 8	a transcription repressor for IL-2 expression in T cells designated ZEB	(+)	1.17E-09
3	CYP1A2	NM_000761	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	a monooxygenase involved in the metabolism of drugs, toxic chemicals, and carcinogens	(+)	1.64E-08
<i>The downregulated genes</i>						
4	RGS14	NM_006480	Regulator of G protein signaling 14	a downregulator of signaling through G protein-coupled receptors	(+)	1.51E-13
5	CHST2	NM_004267	Carbohydrate sulfotransferase 2	an N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase	unknown	6.43E-13
6	MAPK1	NM_002745	Mitogen-activated protein kinase 1	a protein kinase designated ERK2 (p42) that regulates diverse cellular functions	(+)	6.02E-12
7	<u>SMARCA3</u>	NM_003071	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3	a DNA helicase-like chromatin remodeling enzyme	(+)	1.70E-11
8	TPST2	NM_003595	Tyrosylprotein sulfotransferase 2	a tyrosylprotein sulfotransferase	unknown	2.31E-11
9	TCF17	NM_005649	Transcription factor 17 designated Kid-1	a transcriptional repressor of renal genes	(+)	3.14E-11
10	HSPA1A	NM_005345	Heat shock 70kD protein 1A	an inducible member of the HSP70 family	(+)	4.67E-11
11	AGTRL2	NM_005162	Angiotensin receptor-like 2	a protein homologous to the angiotensin II receptor type 1	unknown	3.51E-10
12	TRAIL	NM_003810	TNF-related apoptosis-inducing ligand	an apoptosis-inducing ligand of the TNF family for DR4 and DR5	(+)	5.19E-10
13	<u>TOP1</u>	NM_003286	Topoisomerase 1	a DNA topoisomerase	(+)	7.03E-10
14	PTPN6	NM_080549	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	a protein tyrosine phosphatase with SH2 domains designated SHP-1	(+)	7.77E-10
15	CCR5	NM_000579	Chemokine, CC motif, receptor 5	a chemokine receptor for RANTES, MIP1 α , MIP1 β and MCP2	(+)	1.10E-09
16	CHST4	NM_005769	Carbohydrate sulfotransferase 4	an N-acetylglucosamine 6-O sulfotransferase	unknown	1.84E-09
17	ERBB4	NM_005235	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4	an EGF receptor-related receptor tyrosine kinase interacting with neuregulins	(+)	2.22E-09
18	TCF21	NM_003206	Transcription factor 21	a transcription factor designated Capsulin	(+)	4.99E-09
19	ATP6V1B2	NM_001693	ATPase, hydrogen-transporting, lysosomal, 56/58kD, V1 subunit B, isoform 2	a vacuolar ATPase that mediates acidification of intracellular organelles	(+)	5.10E-09
20	CREB1	NM_134442	Cyclic AMP responsive element-binding protein 1	a CRE-binding transcription factor for cAMP-responsive genes	(+)	6.58E-09
21	ITGB1	NM_002211	Integrin, beta-1	a common beta chain of the VLA protein family	(+)	7.16E-09
22	COX15	NM_078470	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15	a protein essential for assembly of COX	(+)	1.13E-08
23	MYC	NM_002467	Myc protooncogene	a transcription factor that regulates diverse cellular functions	(+)	1.18E-08
24	BAG1	NM_004323	BCL2-associated athanogene 1	an enhancer of the anti-apoptotic effects of BCL2	(+)	1.51E-08
25	CDC16	NM_003903	Cell division cycle 16	a component of the anaphase-promoting complex essential for mitosis	(+)	1.99E-08
26	SLC35A1	NM_006416	Solute carrier family 35, member A1	a CMP-stable acid transporter	unknown	2.06E-08
27	<u>DAXX</u>	NM_001350	Death-associated protein 6	a protein that interacts with the death domain of Fas	(+)	2.23E-08
28	TSC22	NM_006022	TGF β -stimulated gene 22	a transcription factor induced by TGF β	(+)	2.34E-08
29	GABPB1	NM_005254	GA-binding protein transcription factor, beta subunit 1	a nuclear transcription factor for cytochrome c oxidase	(+)	6.16E-08
30	<u>PARP</u>	NM_001618	Poly(ADP-ribose) polymerase	a chromatin-associated enzyme that catalyzes polyADP-ribosylation of nuclear proteins	(+)	6.72E-08