

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究

(難治性神経疾患の画期的診断・治療法等に関する研究班－1)

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山村 隆

平成17年(2005)3月

目 次

I. 総括研究報告

- 難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究 1
国立精神・神経センター神経研究所 山村 隆

- 資料：平成 16 年度班員共同執筆論文 10
T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of
multiple sclerosis.

II. 分担研究報告

- 末梢血 T 細胞の DNA microarray 解析による
多発性硬化症の病型分類とインターフェロンベータ治療反応性 67
国立精神・神経センター神経研究所 佐藤 準一

- 「対照疾患のマイクロアレイ解析」に関する研究 74
国立精神・神経センター神経研究所 三宅 幸子

- IFN β による培養脳毛細血管由来内皮細胞の
MMPs 及び MMP 関連遺伝子発現変化の検討 79
山口大学医学部脳神経病態学神経内科 神田 隆

- 多発性硬化症インターフェロン・ベータ療法
ドロップアウト例に関する研究 83
独立行政法人国立病院機構東埼玉病院 川井 充

- アジアにおける多発性硬化症の特徴と疾患分類・診断の問題点
—新たな診断基準 (McDonald 2001) における「除外基準」の妥当性を
中心に— 85
北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野 菊地 誠志

- インターフェロン β -1b 療法の外来導入に関する検討 88
東京理科大学理学部教養 太田 宏平

■ 「多発性硬化症患者における TRAIL およびに TRAIL レセプター遺伝子多型」に関する研究 北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野 菊地 誠志	92
■ 多発性硬化症の非活動期における末梢血リンパ球サブセット およびケモカインレセプターと神経症候 埼玉医科大学総合医療センター神経内科 野村 恭一	94
■ インターフェロン使用による多発性硬化症患者髄液組成、 アミノ酸変化の検討続報 順天堂大学医学部脳神経内科 横山 和正	100
■ 「多発性硬化症の血清及び髄液中の神経髄鞘成分に対する抗体」 に関する研究 近畿大学医学部神経内科 楠 進	105
III. 平成 16 年度班会議プログラム	107
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	125
V. 研究成果の刊行物・別刷	129
VI. 班員名簿	283

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

難治性神経疾患の画期的診断・治療法等に関する研究班-1
(研究課題名：難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究)

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 DNA マイクロアレイを用いて、多発性硬化症 (MS) の血液診断法を確立し、MS のテイラーメイド医療に有用な診断システムを開発することを目標にしている。インターフェロンベータ (IFN- β) が MS の予後を改善する薬剤として利用できるようになっているが、治療効果が得られない症例や副作用の強く現れる症例が存在するために、経験の少ない医師には処方しにくい薬剤である。あらかじめ薬効を推測する方法の確立が求められている。これまでに IFN- β 治療開始前の MS 患者、および健常者の末梢血 T 細胞および非 T 細胞、計 4 0 0 サンプル以上について DNA マイクロアレイ解析とクラスタ解析を行い、同時に 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。本年は、これまでのデータを詳細に解析し、今後検討すべき問題点を洗い出した。その結果、1) T 細胞発現遺伝子のクラスタ解析によって MS と健常者が区別できること、2) MS は四つの亜群に分類できること、3) 四つの亜群の中で、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) グループ B は疾患活動性ももっとも高いことなどを示すことに成功した。また、平行して調べた関節リウマチ患者の血液では、MS と異なる遺伝子発現パターンが見られた。以上の結果は、経験の浅い医師でも、血液を調べるだけで MS の診断が可能になり、最適の治療法を選択できる時代が目前に迫っていることを意味する。この班の 3 年間の到達目標は、DNA マイクロアレイによる MS 診断の有用性を多数例で確認し実用化することにある。既に解析システムは整っており、対照疾患も含めて、多数例での確認が済めば実用化できる。本年度は、MS の診断が困難な症例を DNA マイクロアレイで検討した結果、きわめて興味ある結果を得ることができた。また、日本人に対する IFN- β 療法の導入における問題点の検討、導入方法の工夫などに関する研究もあわせて行い、重要な知見が得られた。

分担研究者

川井 充（独立行政法人国立病院機構東
埼玉病院 副院長）

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）

三宅 幸子（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
究科神経内科学分野 助教授）

横山 和正（順天堂大学医学部脳神経内
科 助手）

野村 恭一（埼玉医科大学総合医療セン
ター神経内科 教授）

太田 宏平（東京理科大学理学部 教授）

神田 隆（山口大学医学部脳神経病態
学神経内科 教授）

楠 進（近畿大学医学部神経内科 教授）

協力班員

深澤 俊行（北祐会神経内科病院 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

近年の分子、免疫、病理学的な研究結
果は、多発性硬化症（MS）が単一疾患
ではなく、きわめて多彩な病像を示す症
候群であることを示唆している。MS 病
態の多様性は、臨床経過、病変分布（症
候）、病理像、治療薬に対する反応性、
などに現れる。典型的な症例は、経験の
ある医師であれば MRI や神経学的所見

に基づいて診断できる。しかし、非典型
的な MRI 像を示す症例では、脳腫瘍や
脊髄腫瘍と誤って手術を受ける場合があ
る。さらに、MS が疑われても、高血圧
や糖尿病の合併のある中年以上の患者で
は、多発性脳梗塞の鑑別が大きな問題に
なる。いずれのケースでも、専門医であ
っても診断確定には数カ月以上を要する。

MS の治療薬として海外で実用化さ
れているものには、インターフェロン・
ベータ 1b（以下 IFN- β ）、インターフェ
ロン・ベータ 1a、glatiramer acetate
（Copaxon）、抗 VLA-4 抗体などがあり、
今後その種類はさらに増加することが予
想されている。日本では IFN- β のみが利
用可能である。

IFN- β の治療効果については、3—4 割
の症例は、治療の有効性に十分な満足を
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。
また、IFN- β を開始してから激しい再発
を来す症例もあるようである。

これらの事実から、我々は、今後の MS
の臨床研究に求められるものは、客観性
のある早期診断法の確立と、治療に対す
る反応性や副作用の生じる可能性を予知
する方法の確立に向けられるべきであると
考えている。

本研究の目的は、患者末梢血リンパ
球の DNA マイクロアレイ解析による MS
診断法および治療反応性予測法を実用化
することにある。この研究班の前身であ

る「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」班（主任研究者 山村）では、IFN- β 治療開始前の MS 患者、および健常者の末梢血 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とクラスタ解析を行い、同時に 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。その結果、T 細胞の遺伝子発現解析により、MS の診断が可能であり、IFN- β 治療反応性もある程度予測できることがわかった。日立製作所ライフサイエンス事業部と共同研究を進めた結果、実用化されるべき技術であるという認識に至った。今後、3年間で多数例において信頼性を検証し、あわせて将来のテラーメイド医療につながる情報の収集、および MS 医療の向上につながる臨床研究を進める。

B. 研究方法

T 細胞は抗 CD3 抗体結合磁気ビーズを用いて、患者および健常者の末梢血から分離する。RNA を精製した後、個々のサンプルの遺伝子発現プロフィールを 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）によって決定する。

対象とする症例は、診断が確定し免疫制御性薬剤の投与を受けていない MS 60 例（うち 30 例は併用薬剤なし）、診断の確定した対照神経疾患 200 例、MS

との鑑別が問題になり、まだ診断の確定していない症例 50 例である。診断の確定していない症例については、班員が診断の確定するまで追跡調査を行う。

これまでに MS と健常者で発現レベルの異なる 286 遺伝子を同定している（Sato J-i. et al. Neurobiol. Dis. 印刷中）。これを識別遺伝子（discriminator genes）として GeneSpring を用いて standard x standard algorithm に従い、階層クラスタ解析（hierarchical clustering analysis; HCA）と主成分解析（principal component analysis; PCA）を行う。

C. 研究結果

階層クラスタ解析（HCA）と主成分解析（PCA）による MS 亜分類：

国立精神・神経センターは日立製作所との共同で、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 HCA と PCA を行い、これまでに得られた全情報を解析した（佐藤班員）。その結果は、班員共同執筆論文“T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of multiple sclerosis”に詳述した（添付；投稿中）。

要約すると、MS と健常者由来の T 細胞サンプルが分離し、MS は A、B、C、D の四群に分類された。また、解析に用いた 286 遺伝子は 5 種類のグループに分類された。MS subgroups のうち A 群は

健常者にもっとも近いパターンを示し、D 群はもっとも高い EDSS 値を示した。また、C 群には病変が脳に局限する症例が集積しているという興味ある結果が得られた。また B 群では、CCL3、CXCL9 など chemokine 遺伝子が集積していた。IFN β responder は A 群で 57.1%、B 群で 57.1%、C 群で 18.2%、D 群では 0% であり、A 群と B 群では IFN β 治療の有効性の高いことが示唆された。以上の結果は、T 細胞の遺伝子発現を調べれば MS の診断が可能であり、IFN β 治療の有効性も、ある程度推測できることを意味するという画期的なものである。今後、鑑別困難な症例や対照疾患の解析経験を増やし、併用薬剤（降圧剤や抗コレステロール剤、ビタミン剤等）の影響なども検討しながら、診断法の信頼性を高めていく必要がある。

IFN β responsive genes の発現変動解析による IFN β responder の同定：

Responder あるいは non-responder であることが確定した症例の、治療前、IFN β 治療開始後 3 か月、6 か月の血液サンプルを用いて、両群の遺伝子発現パターンの違いを比較した。その結果、responder では治療 3 か月および 6 か月の時点で ISG15、IFI27、MCP-1、TNFRp75 の高発現が保持されていたが（persistent induction）、non-responder では 3 か月で上昇するも、6 か月で低下していた。

診断困難症例のマイクロアレイ解析：

大学病院の神経内科において診断に苦慮した MS 疑い例 2 例を、T 細胞 DNA マイクロアレイによって解析した。

第一例は、39 歳女性で、若年性高血圧があり、四肢のしびれなどの軽い神経症状が数回繰り返した症例である。MRI では大脳半球に 10 個程度の T2 high 病変を認め、多発性脳梗塞または多発性硬化症が疑われた。マイクロアレイの結果では、健常者のグループに入った。また MRI 所見も基底核の病変が目立ち、多発性脳梗塞が支持されている。

第二例は、60 歳男性で、糖尿病と高血圧があり、半年前より半身のしびれ、物忘れ、言語障害などを繰り返して症状が悪化。MRI では lymphoma を疑わせる大病変が多発し、生検を行ったが、診断が確定できなかった（梗塞と脱髄が併存？）。T 細胞 DNA マイクロアレイの結果は、MS の A 群に一致する結果であり、MS と考えて現在経過を観察している。症状は現在安定している。このような症例を多数経験し、追跡調査を行うことがアレイの実用化に重要である。

D. 考察

本プロジェクトでは、MS の診断と治療法決定に有用な DNA マイクロアレイ解析システムを確立することを意図している。本班の前身である「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」班で集積した情報から、MS と健常者を区別できることが明らかになった。また、MS が特徴のある 4 群に分類されることもわかった。それぞれのグループは、治療反応性が異なることから、患者および担当医にとって、患者が属するグループを知ることは重要である。したがって、広く全国的に利用できるようなシステムの構築が必要である。

その実現に向けて、今後必要なことは、対照疾患で false positive の結果が出ることがないか、併用薬剤によって MS が false negative になることはないか、MS の解析結果は、採血の時期によって変化することがないか（月経周期など）、などの検討を進めることである。

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。全国的に公知するには、研究班による、より詳細な検討と症例の積み重ねが必要であるが、本班の終了時点までには実現可能と考えている。

F. 健康危険情報

川井班員から報告されたように、IFN- β の使用後に MS の症状が悪化する例や病変の分布が大きく変化する例がある。IFN- β 使用による初期症状の悪化は、既に指摘されているところであるが、そのような悪化が見られた場合の明瞭な治療指針がないために、治療を継続する医師が多いようである。しかし、川井班員および山村は、国立精神・神経センター武蔵病院において、IFN- β 使用後3か月間に毎月1回、視神経炎による高度の視力低下を来したが、IFN- β 使用中止によって、ただちに安定化した症例を経験している。このような症例で、もし IFN- β を中止することが決断されなかった場合の転帰は不明であるが、おそらく重大な後遺症が残った可能性がある。学会レベルでも、類似症例の報告がある。欧米の症例と日本の症例では、IFN- β の効果は異なる可能性は否定できず、早い時点で全国的な実態調査を行い、対策を決定しておく必要がある。本班でも対応可能であるが、組織を拡大する必要がある。IFN- β 治療に関する現場の情報を入手している専門家集団として、以上の情報を健康危険情報として報告する。

G. 研究発表

1) 国内

論文発表

荒木 学、三宅幸子、山村 隆：多発性硬化症における NKT 細胞減少は長期ステロイド治療により補正される。神経免疫学 12:175-179, 2004

山村 隆：NKT 細胞のリガンドと Th1/Th2 バランス。臨床免疫 41: 14-17, 2004

宮本 勝一、山村 隆：多発性硬化症の新しい治療薬の開発。Clinical Neuroscience 22: 847-850, 2004

山村 隆：MS FRONTIER. 多発性硬化症の DNA マイクロアレイ解析。Current Insights in Neurological Science. Vol 12, No. 3, pp 10-11, 2004

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

佐藤 準一：特集 II: 疾患モデルにおける最新の知見「自己免疫性脳脊髄炎」Neuroimmunology 12: 151-161, 2004

山本 敏之、尾方 克久、片岸 美帆、清水 宏、小川 雅文、山村 隆、川井 充：日本語版 Multiple Sclerosis Quality of Life-54 の信頼性の検討。臨床神経 44 (7): 417-421, 2004

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 21(2): 175-182, 2004

太田 宏平：多発性硬化症の免疫学・免疫遺伝学。Molecular Physician 24: 1824-1828, 2004

野村 恭一：多発性硬化症とアフェレシス。日本アフェレシス学会雑誌 23 (3): 227-233, 2004

学会発表

佐藤 準一、中西 恵美、尾上 祐行、古池 史子、山村 隆：MS におけるアポトーシス関連遺伝子群の発現異常。第 45 回日本神経学会総会。東京、平成 16 年 5 月 12 日

荒浪 利昌、高橋 和也、三宅幸子、山村 隆：多発性硬化症寛解期における NK 細胞の CD11c 発現亢進。第 32 回日本臨床免疫学会総会。東京、平成 16 年 10 月 8 日

**佐藤 準一、中西 恵美、尾上 祐行、古池 史子、山村 隆：末梢血 T 細胞の DNA マイクロアレイ解析による多発性硬化症の病型分類。第 32 回日本臨床免疫学会総会。東京、平成 16 年 10 月 8 日

**学会優秀ポスター賞受賞

佐藤 準一、中西 恵美、尾上 祐行、古池 史子、山村 隆：末梢血 T 細胞遺伝子発現プロフィールに基づく多発性硬化症病型分類。第 34 回日本免疫学会総会、札幌、平成 16 年 12 月 1 日

荒浪 利昌、三宅 幸子、山村 隆：多発性硬化症寛解期における NK 細胞 CD11c 発現上昇。第 34 回日本免疫学会総会、札幌、平成 16 年 12 月 1 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

◎Satoh, J-i., M. Nakanishi, F. Koike, S. Mivake, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kukuchi, 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.** (印刷中), 2004

◎ Satoh, J-i., M. Nakanishi, F. Koike, H. Onoue, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kukuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, T. Ohashi, K. Ota, T. Saito, M. Ohta, S. Mivake, T. Kanda, T. Fukazawa and T. Yamamura: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of multiple sclerosis. **Annals of Neurology** (投稿中)

Satoh, J-i., T. Yamamura, and K. Arima: The 14-3-3 protein ϵ isoform, expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis, binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. **Am. J. Pathol.** 165: 577-592, 2004

Takahashi, K., T. Aranami, M. Endoh, S. Mivake, and T. Yamamura: The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. **Brain** 127: 1917-1927, 2004

Satoh, J-i., and T. Yamamura: Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein. **Cell. Mol. Neurobiol.** 24:793-814, 2004

Satoh, J-i., H. Onoue, K. Arima, and T. Yamamura: Nogo-A and Nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** (in press) 2005

Kanda, T., Y. Numata, and H. Mizusawa: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry** 75: 765-769, 2004

Kanda, T., T. Ariga, H. Kubodera, H.L. Jin, K. Owada, T. Kasama, M. Yamawaki, and H. Mizusawa: Glycosphingolipid composition of primary cultured human brain microvascular endothelial cells. **J. Neurosci. Res.** 78: 141-150, 2004

Hori, S., S. Ohtsuki, M. Ichinowatari, T. Yokota, T. Kanda, and T. Terasaki: Selective gene silencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an in vitro blood-brain barrier model by short interfering RNA. **J. Neurochem.** (in press) 2005

Yakushiji, Y., J. Satoh, M. Yukiitake, K.

Yamamuchi, I. Nakamura, I. Nishino, and Y. Kuroda: interferon β -responsive inclusion body myositis in a hepatitis C virus carrier. *Neurology* 63: 587-588, 2004

Fukazawa T, Kikuchi S, Niino M, Yabe I, Miyagishi R, Fukaura H, Hamada T, Tashiro K, and Sasaki H: Attack-related severity: A key factor in understanding the spectrum of idiopathic inflammatory demyelinating disorders. *J. Neurol. Sci.* 225: 71-78, 2004

Fukazawa T, Kikuchi S, Miyagishi R, Niino M, Yabe I, Hamada T, and Sasaki H: CTLA-4 gene polymorphism is not associated with conventional multiple sclerosis in Japanese. *J. Neuroimmunol.* 159: 225-229, 2005

学会発表

Satoh, J-i., M. Nakanishi, and T. Yamamura: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. American Academy of Neurology meeting, San Francisco, April 27, 2004

Satoh, J-i., M. Nakanishi and T. Yamamura: Dysregulation of apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Montreal, Quebec, Canada, July 18-23, 2004

Satoh, J-i., M. Nakanishi, H. Onoue, T. Aranami, and T. Yamamura: T cell gene expression profiling identifies molecularly and clinically distinct subgroups of multiple sclerosis. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 29, 2004

Bedoui, S., S. Mivake, Y. Lin, K. Miyamoto, S. Oki, N. Kawamura, A. Beck-Sickinger, S. von Hoersten, and T. Yamamura: Activation of the neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor suppresses EAE via the inhibition of autoreactive Th1 responses in vivo. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 29, 2004

Lin, Y., S. Mivake and T. Yamamura: An encephalogenic proteolipid protein (PLP) peptide PLP136-150 induces regulatory cells in the lymph node and thus inhibits re-induction of EAE. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 29, 2004

Nakanishi, M., J-I. Satoh, T. Aranami, G. Hirose, and T. Yamamura: lack of apolipoprotein E (Apo E) exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 30, 2004

Croxford, J.L. and T. Yamamura: Immunoregulation of a model of

multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R(+) WIN55,212. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy, September 30, 2004

September 30, 2004

Theil, M.M., S. Miyake, H. Hosoda, J. Schween, J.L. Croxford, A. Chiba, S. Oki, S. von Horsten, T. Akamizu, K. Kangawa, and T. Yamamura: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by gastric hormone Ghrelin. The VIIth International Congress of Neuroimmunology. Venice, Italy,

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許取得：

- 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 (特開 2004-28926)
- 2) 多発性硬化症特異的遺伝子発現プロファイルの解析 (出願中)

実用新案登録：なし
その他：なし

資料：平成16年度班員共同執筆論文

Title:

T Cell Gene Expression Profiling Identifies Distinct Subgroups of Multiple Sclerosis

Jun-ichi Satoh, MD,¹ Megumi Nakanishi, MD,¹ Fumiko Koike, MD,¹ Hiroyuki Onoue, MD,¹ Toshiyuki Yamamoto, MD,² Mitsuru Kawai, MD,² Seiji Kikuchi, MD,³ Kyouichi Nomura, MD,⁴ Kazumasa Yokoyama, MD,⁵ Takashi Ohashi, MD,⁶ Kohei Ota, MD,⁶ Toshiro Saito, PhD,⁷ Masayuki Ohta,⁷ Sachiko Miyake, MD,¹ Takashi Kanda, MD,⁸ Toshiyuki Fukazawa, MD,⁹ and Takashi Yamamura MD¹

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, Tokyo 187-8502, Japan¹, National Center Hospital for Mental, Nervous and Muscular Disorders, NCNP, Tokyo, Japan², Department of Neurology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan³, Department of Neurology, Saitama Medical School, Saitama, Japan⁴, Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan⁵, Department of Neurology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan⁶, Life Science Group, Hitachi Ltd., Saitama, Japan⁷, Department of Neurology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan⁸, and Hokuyukai Neurology Hospital, Sapporo, Japan.⁹

Address correspondence to Dr. 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: yamamura@ncnp.go.jp

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a T helper type 1 (Th1) lymphocyte-mediated demyelinating disease presenting with remarkable variability in clinical and pathological manifestations. To explore the molecular mechanism underlying heterogeneity of MS, we characterized the gene expression profile of peripheral blood CD3⁺ T cells isolated from MS and healthy control (CN) subjects by using a cDNA microarray. Among 1,258 cDNAs on the array, 286 genes were expressed differentially between 72 untreated MS patients and 22 age- and sex-matched CN subjects. When this set was used as a discriminator for hierarchical clustering analysis, it identified four distinct subgroups of MS patients and five gene clusters differentially expressed among the four subgroups. The expression of one of these gene clusters was upregulated in MS versus CN and enhanced in the clinically most active subgroup of MS. After 46 of the MS patients were treated with IFN β -1b for two years, we found that IFN β responders had been clustered in two of the four MS subgroups. Furthermore, the kinetics of IFN-responsive genes in T cells at 3 and 6 months after starting IFN β treatment showed substantial differences between IFN β responders and nonresponders in MS. These results suggest that T cell gene expression profiling is highly valuable to identify molecularly distinct subgroups of MS associated with differential disease activity and therapeutic response to IFN β .

Introduction

MS is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) white matter mediated by an autoimmune process whose development is triggered by a complex interplay of both genetic and environmental factors.¹ Intravenous administration of interferon-gamma (IFN γ) to MS patients in prior clinical trials provoked acute relapses accompanied by activation of the systemic immune response, indicating a central role of proinflammatory T helper type 1 (Th1) lymphocytes in the immunopathogenesis of MS.² In contrast, treatment with interferon-beta (IFN β) produced a beneficial effect on approximately 30% of MS patients.^{3,4} More recent studies indicated that an early initiation of IFN β delays the conversion to clinically definite MS in the patients who experienced a first demyelinating event.⁵

MS patients exhibit a great range of variability in the disease course, lesion distribution, and response to therapeutics. It is classified into the relapsing-remitting MS (RRMS), secondary progressive MS (SPMS), or primary progressive MS (PPMS) with respect to the disease course, conventional MS (CMS) or opticospinal MS (OSMS) in terms of the lesion distribution, and IFN β responder or nonresponder based on the therapeutic response to IFN β .^{1,6,7} Pathologically, MS lesions show a remarkable heterogeneity in the degree of inflammation, complement activation, antibody deposition, demyelination and remyelination, oligodendrocyte apoptosis, and axonal degeneration.⁸ These observations suggest that MS is a kind of neurological syndrome caused by different immunopathological mechanisms leading to the final common pathway provoking inflammatory demyelination. Therefore, it is not surprising to find that individual MS patients show highly variable responses to IFN β treatment. However, very little is currently known about the molecular background underlying clinical and pathological heterogeneity of MS.

DNA microarray technology is a novel approach that allows us to systematically monitor the expression of a large number of genes and to delineate molecular portrait of

a given sample derived from disease-affected tissues.⁹ This approach has discovered therapeutically relevant targets and prognostic markers for cancers,^{10,11} and has given new insights into the complexity of molecular interactions promoting the autoimmune process in MS.^{12,13} Importantly, comprehensive gene expression profiling has succeeded in identifying a battery of genes upregulated in MS brain lesions, whose role in its pathogenesis has not been previously predicted.¹⁴⁻¹⁷ These results suggest that microarray analysis is highly valuable to discover molecular markers and therapeutic targets that were previously unrecognized in MS.¹⁸⁻²⁰ However, most of previous studies have focused on gene expression in a heterogeneous population of brain cells and unfractionated lymphocytes.¹⁴⁻²⁰ Recently, we studied the gene expression profile of highly purified peripheral blood CD3⁺ T cells and CD3⁻ non-T cells isolated from 13 Japanese MS patients before and after IFN β treatment, and found that IFN β treatment upregulates the expression of 7 IFN-responsive genes in CD3⁺ T cells.²¹ More recently, we compared the gene expression profile of purified CD3⁺ T cells between 72 untreated MS patients and 22 healthy control (CN) subjects, and found that the vast majority of top 30 differentially expressed genes between MS and CN were categorized into apoptosis signaling-related genes.²²

To extend our previous studies,^{21,22} we have conducted hierarchical clustering analysis for 286 genes that were differentially expressed between MS and CN in the purified peripheral blood CD3⁺ T cells. Here we report that MS could be distinguished from CN by clustering analysis and that MS could be further classified into four subgroups. Most importantly, these subgroups differed in the disease activity and therapeutic response to IFN β . We also studied the kinetics of IFN-responsive genes in MS T cells during IFN β treatment, and found appreciable differences between IFN β responders and nonresponders. These observations indicate that T cell gene expression profiling is highly valuable to identify molecularly distinct subgroups of MS and could be applied for designing tailor-made treatment for MS in the near future.

Subjects and Methods

The Study Population

The Research Group for IFN β treatment of MS, sponsored by the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan, conducted the present study. It enrolled 72 Japanese clinically active 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, and 22 healthy control (CN) subjects composed of 16 women and 6 men with the mean age of 38.6 ± 12.3 years. The members of this research group (SK, KN, KY, KO, TK, TF, and TY), all of who are certified neurologists, have diagnosed individual cases according to the established criteria²³ and followed up the patients for at least two years after entry. The patients showed the mean Expanded Disability Status Scale (EDSS) score of 2.8 ± 2.0 upon entry. No patients had a history of treatment with interferons, glatiramer acetate or mitoxantrone before enrollment, or had received corticosteroids and other immunosuppressants during at least one month before blood sampling. Upon entry, MS patients were divided into two groups by the patient's own determination: one treated with IFN β and the other without IFN β (see Supplementary Table 2 online). The IFN β -treated group included 46 patients who started to receive an administration of 8 million units of IFN β -1b (Betaferon, Schering, Osaka, Japan) for two years given subcutaneously on alternate days, while the IFN β -untreated group included 26 patients who were followed up without IFN β treatment for successive two years. From the IFN β -treated group, blood samples were taken three times: before starting IFN β treatment (designated Pre) and at 3 and 6 months after starting the treatment. In the IFN β -untreated group, they were collected twice: at enrollment and at 6 months after the enrollment. In case of acute relapse, the patients were given intravenous methylprednisolone pulse (IVMP) following the standard protocol. Written informed consent was obtained from all the subjects. The present study was approved by the Ethics Committee of National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP).

IFN β Responder/Nonresponder Score

To evaluate the therapeutic effect of IFN β , we investigated the following six parameters during four years (two years before and two after initiation of IFN β treatment); the number of clinical relapse, the day of IVMP treatment, the day of hospitalization, EDSS score, the number of lesions on T2-weighted MRI, and the patient's satisfaction on the treatment (Table 1). When compared before and after IFN β treatment, these parameters have given three ranks and scores; good (+1), intermediate (0), and poor (-1). The total score was calculated for each patient, ranging from the maximum value of +6 to the minimum value of -6. The patients with the total score equal to or greater than +3 were considered as being the responder (R), the score from 0 to +2 as one with the undetermined response (UD), and the score equal to or smaller than -1 as the nonresponder (NR) (Table 1).

cDNA Microarray Analysis

The present study utilized a custom microarray containing duplicate spots of cDNA immobilized on a poly-L-lysine-coated slide glass. The cDNA were amplified by PCR for 1,258 sequence-known genes of various functional classes, including cytokines/growth factors and their receptors, apoptosis regulators, oncogenes, transcription factors, signal transducers, cell cycle regulators and housekeeping genes (Hitachi Life Science, Kawagoe, Saitama, Japan; <http://www.hitachi.co.jp/LS>). To investigate gene expression profile of T cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 30 ml of heparinized blood by centrifugation on a Ficoll density gradient. They were labeled with anti-CD3 antibody-coated magnetic microbeads (#130-050-101, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). After separating CD3⁺ T cells by AutoMACS (Miltenyi Biotec), total RNA was isolated from the cells by using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). The remaining cells after the positive selection of CD3⁺ T cells were harvested as CD3⁻ non-T cell fraction as described previously.^{21,22} Five μ g of purified RNA was *in vitro* amplified within a linear range of