

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

遺伝子アレイによる多発性硬化症再発
予測法樹立に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐藤 準一

平成18年（2006）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

- 遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立
に関する研究 ----- 1

国立精神・神経センター神経研究所 佐藤 準 一

II. 分担研究報告

- 遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立
に関する研究
(多発性硬化症患者血液検体収集) ----- 8

国立精神・神経センター神経研究所 山 村 隆

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----16

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----18

I. 総括研究報告

遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立に関する研究

主任研究者 佐藤 準一

国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 組織培養研究室長

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、多彩な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。MSでは髄鞘抗原を認識し活性化した自己反応性CD4⁺ Th1 T細胞が、血液脳関門を通過して中枢神経系組織内に浸潤し炎症性脱髄を惹起する。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が遷延化すると軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。MSは働き盛りの若年成人に好発し、恒久的後遺症(視力障害・対麻痺)の残存が社会復帰を困難にする。近年大規模臨床試験により、インターフェロンベータ(IFNβ)のMS再発抑制効果が立証された。現在では急性増悪期には副腎皮質ステロイド短期間大量静脈内投与を行い、寛解期には再発予防のためIFNβの継続的皮内投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。しかし現在までMS再発予測法は確立されていない。もし再発を事前に予知出来れば、早期に十分量の免疫調節薬を集学的に投与して炎症を軽減し回復を促進し、後遺症を軽減出来る可能性が高い。本研究(予定期間2年)は遺伝子アレイを用いたMS再発予測法樹立を主目的とする。平成17年度(初年度)は多数例の再発寛解型MS患者の再発期・寛解期に末梢血Tリンパ球を採取しRNAを精製・保存する。平成18年度(第2年度)はHuman cDNA microarrayを用いて遺伝子発現プロファイルを包括的に解析し、階層的クラスター解析・サポートベクターマシン解析を施行して再発特異的遺伝子(relapse-specific genes; RSG)を同定する。RSGを同定出来れば、定量的real-time RT-PCR法による再発予測キットを作成する。遺伝子アレイによるMS再発予測法が樹立されれば早期治療を可能にし、患者の後遺症を減らして社会復帰を促進する手助けとなる。

分担研究者 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

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗原反応性 T 細胞により惹起される時間的・空間的再

発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。再発を反復し炎症が遷延化すると軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。MS では感染症やストレスが再発を惹起すると報告されているが、未だ再発予測法は確立されていない。もし再発を事前に予知出来れば、早期から副腎皮質ステロイド、インターフェロンベータ

(IFN β), 免疫抑制剤を集学的に投与して、炎症を抑制し後遺症を軽減出来る可能性が高い。

近年ゲノムプロジェクト完了によりヒト全遺伝子塩基配列が解明され、遺伝子アレイ(DNA マイクロアレイまたは Gene Chip と呼ばれる)を用いて個々の細胞における数万遺伝子(ヒト全遺伝子約 30,000)の発現情報を包括的・系統的に解析可能になった。このような網羅的発現解析により、従来の研究方法では予期しなかった遺伝子の MS 病態における役割が次々明らかにされた(Steinman L, Zamvil S. Nature Rev Immunol 3: 483-492, 2003)。最近我々は MS 患者末梢血リンパ球の遺伝子アレイ解析により、IFN 応答遺伝子(IFN-responsive genes; IRG)を網羅的に同定した(Koike F et al. J Neuroimmunol 139: 109-118, 2003)。MS 寛解期(非活動期)と再発期(活動期)では末梢血リンパ球遺伝子発現パターンに顕著な差異を認めると考えられる。この仮説に基づき、本研究(予定期間 2 年)では遺伝子アレイを用いて多数の MS 患者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロフィールを経時的に解析し、臨床的再発に一致する遺伝子発現パターンを同定する。これらの情報を基に遺伝子アレイを用いた MS 再発予測法樹立を目指す。

B. 研究方法

平成 17 年度(初年度)は文書で同意を得た国立精神・神経センター武蔵病院神経内科通院・入院中の多数の再発寛解型 MS 患者の寛解期・再発期に末梢血 T リンパ球を採取し RNA を精製・凍結保存する。対照神経疾患(non-MS neurological diseases)や健常者(normal control subjects; Nc)の検

体の収集し凍結保存する。平成 18 年度(第 2 年度)は Human cDNA microarray (1,259 genes; Hitachi)を用いて遺伝子発現プロフィールを包括的に解析する。得られたデータセットに関して階層的クラスタ解析(hierarchical clustering analysis; HCA)とサポートベクターマシン(support vector machine; SVM)解析を施行し、再発特異的遺伝子(relapse-specific genes; RSG)を同定する。RSG を同定出来れば、臨床実用化に向けて、定量的 real-time RT-PCR 法で検出可能な再発予測キットを作成する。

(倫理面への配慮)

「多発性硬化症患者および対照リンパ球遺伝子発現解析研究(申請者山村隆)」は、既に国立精神・神経センター倫理委員会で承認済みである。本研究で解析する対象者全員から研究参加に関して文書で同意を取得する。また全サンプルは第 3 者により暗号化し、検査者には個人情報からわからないようにして取り扱う。

C. 研究結果

#1. MS 病型分類データベース作成(主任研究者佐藤・分担研究者山村):平成 16 年度までに収集した MS 72 検体と健常者(Nc) 22 検体の遺伝子発現プロフィールを比較解析した。MS と Nc で発現差異を認める 286 遺伝子を指標遺伝子(discriminator genes)として HCA を施行し、MS 病型分類データベース(MS classification database; MSCD)を樹立した。286 遺伝子は 5 クラス(class #1-#5)に分類された。MS 群は Nc 群から識別され、さらに 4 サブグループ(A, B, C, D)に分類された。

A 群は遺伝子発現プロフィールが最も Nc 群に類似し、B 群は臨床的活動性が最も高く、chemokine 遺伝子が集積した class #5 の発現レベルが最も高く、C 群は脳限局病変を呈する患者が多く、D 群は EDSS スコアが最も高値であった。また Nc 群と MS-A 群を識別し得る 58 遺伝子を絞り込んだ。IFN β 治療例では、治療前後 2 年間の再発回数・IVMP 日数・入院日数・EDSS スコア・MRI T2 強調画像病巣数と治療満足度の集計から responder と nonresponder に分類すると、IFN β responder は A 群と B 群に集積していた。Responder は nonresponder に比較して、治療開始後 6 ヶ月の時点の IRG (ISG15, IFI27, MCP-1, TNFRp75) の発現レベルが高値に維持されていた。

#2. 検体収集(分担研究者山村・主任研究者佐藤): 平成 17 年度は MS, non-MS, Nc より合計 100 RNA 検体を精製し-80°C で凍結保存した。43 検体は active relapsing-remitting (RR)MS, 10 検体は stable RRMS, 6 セット(12 検体)は同一患者の再発期・寛解期ペアである。既に 69 検体は Human cDNA microarray で解析終了し、HCA, SVM を施行した。また Pecs 大学(Hungary) Illes 準教授との共同研究で、Hungary 人 MS 33 検体と Nc 22 検体を入手した。新規 11 症例(2 active RRMS, 4 stable RRMS, 2 possible MS, 1 optic neuritis, 2 chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; CIDP) を MSCD に適合解析すると、HCA, SVM で stable RRMS は全例が Nc 群、CIDP は MS-A 群に分類された。

#3. 再発期・寛解期比較解析(主任研究者佐藤・分担研究者山村): 上記同一患者再発・寛解セット

のうち解析終了した 4 ペアで予備的解析を行った。再発群と寛解群の群間検定で発現差異を認める 41 遺伝子中、6 遺伝子が炎症誘導遺伝子であった。この 41 遺伝子を指標とする HCA は再発群と寛解群のサンプルを識別した(図 1)。再発期上昇上位 20 遺伝子を個々の症例で比較すると、TAF2A と NFKB1 は 4 例中 3 例で共通、一方再発期低下上位 20 遺伝子では、TCF8 と CD163 が 4 例中 3 例で共通に抽出された。

D. 考察

遺伝子アレイによる T 細胞遺伝子発現プロフィール解析により MS 病型分類データベース(MSCD)を樹立した。MSCD は多様な病態を呈する MS を 4 群に分類し、各群は疾患活動性・病巣分布・IFN β 治療反応性との密接な関連を認めた。また MS 再発期・寛解期で発現差異を認めた遺伝子のうち、TAF2A は cell cycle, NFKB1 は炎症・アポトーシス、TCF8 は T リンパ球増殖因子産生抑制、CD163 は抗炎症の制御遺伝子である。これらは MS 再発特異的遺伝子(relapse-specific genes; RSG)候補となる可能性がある。

E. 結論

現時点で症例数は少ないが、MS では病期(再発期・寛解期)依存的に、末梢血 T 細胞遺伝子発現プロフィールが大きく変動することが判明した。今後症例数を増加して RSG を同定し、その情報に基づいて遺伝子アレイによる再発予測法を樹立する予定である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, 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. *Neurobiology of Disease* 18: 537-550, 2005.
 2. Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T: Nogo-A and Nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 129-138, 2005.
 3. Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T: The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 858-868, 2005.
 4. Satoh J, Nanri Y, Yamamura T: Rapid identification of 14-3-3-binding proteins by protein microarray analysis. *Journal of Neuroscience Methods* in press, 2005.
 5. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Onoue H, Aranami T, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Saito T, Ohta M, Miyake S, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* in press, 2006.
 6. 佐藤準一: DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の免疫病態の解析. 特集 I サイトカイン・ケモカインからみた多発性硬化症の病型と病態. *Neuroimmunology* 13: 167-178, 2005.
 7. 佐藤準一: 網羅的遺伝子発現解析による多発性硬化症の病態・薬物反応性. 特集 II 遺伝子チップ解析の現状とその将来に期待される展開. *炎症と免疫*, 14(2): 205-216, 2005.
 8. 佐藤準一: 多発性硬化症のマイクロアレイ診断. 特集 II 多発性硬化症研究・治療の現状 2006. *神経進歩*, 2006, 印刷中.
 9. 佐藤準一: 多発性硬化症. インターフェロン治療学. 最新の基礎・臨床. *日本臨床*, 2006, 印刷中.
- (書籍)
10. Satoh J. Protein Microarray Analysis for Rapid Identification of 14-3-3 Protein Binding Partners. In *Functional Protein Microarrays in Drug Discovery*. Edited by Predki PF. CRC Press, Boca Raton, FL, in press, 2006.
- (投稿中)
11. Onoue H, Satoh J, Ogawa M, Yamamura T: Detection of anti-Nogo receptor autoantibody in

the serum of multiple sclerosis and controls. Multiple Sclerosis, Submitted for publication.

12. Satoh J, Yamamura T: Microarray analysis identifies CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early interferon-beta-responsive genes in lymphocytes. Multiple Sclerosis, Submitted for publication.
13. Satoh J, Arima K, Yamamura T: Human Astrocytes Express 14-3-3sigma in Response to Oxidative and DNA-Damaging Stresses. Journal of Neuroscience Research, Submitted for publication.
14. 南里悠介、佐藤準一、土居芳充、山村隆: DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の診断とインターフェロンベータ治療反応性予測に関するアンケート調査. 神経内科 投稿中.

2. 学会発表

国際学会

1. Satoh J, Onoue H, Arimaki K, Yamamura T: Nogo-A and Nogo receptor expression is enhanced in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 57th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Miami Beach, 2005. 4.12. (Neurology 64, Suppl 1: A138, 2005).
2. Satoh J, Onoue H, Nanri Y, Arima K, Yamamura T: The 14-3-3 Protein Forms a Molecular Complex with Heat Shock Protein Hsp60 and Cellular Prion Protein: A Possible Implication for

Detection of 14-3-3 in the CSF of Prion Diseases. The Fifth Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, 2005. 9.7. (Abstract P-084, p. 102, 2005).

3. Satoh J, Doi Y, Aranami T, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies four distinct subgroups of multiple sclerosis. International Symposium on Autoimmunity in Intractable Diseases-Novel Molecules and Emerging Paradigms. Hakone, 2005. 10.27. (Abstract 27S-2, 2005).
4. Doi Y, Satoh J, Aranami T, Yamamura T: NR4A2 (Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. International Symposium on Autoimmunity in Intractable Diseases-Novel Molecules and Emerging Paradigms. Hakone, 2005. 10.27. (Abstract PV-17, 2005).

国内学会

1. 佐藤準一: The 14-3-3 zeta isoform binds to heat shock protein HSP60 in human neural cells: a possible implication in prion diseases. 科学研究費補助金特定領域研究・感染の成立と宿主応答の分子基盤. 平成 16 年度 2 回全体班会議. 東京、2005. 1. 8 (抄録集 p.156-157).
2. 佐藤準一、山村隆、尾上祐行、有馬邦正: 多発性硬化症脱髄巣反応性アストロサイトにおける Nogo 受容体の発現. 厚生労働省特定

- 疾患対策研究事業 免疫性神経疾患に関する調査研究班. 平成 16 年度班会議. 東京、2005. 1.26 (抄録集 p.20-21).
3. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆 : T 細胞の DNA microarray 解析による多発性硬化症の病型分類. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005. 3.3. (神経免疫学 13: 44, 2005). 第 17 回日本神経免疫学会会長賞受賞.
 4. 尾上祐行、佐藤準一、山村隆 : 多発性硬化症患者血清中の抗 Nogo Receptor 抗体の検出. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005. 3.3. (神経免疫学 13: 72, 2005). 第 17 回日本神経免疫学会奨励賞受賞.
 5. 土居芳充、佐藤準一、山村隆 : 多発性硬化症の末梢血 T 細胞における NR4A2 発現上昇. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005. 3.4. (神経免疫学 13: 104, 2005).
 6. 佐藤準一、尾上祐行、有馬邦正、山村隆 : 多発性硬化症脱髄巣における Nogo-A・Nogo 受容体の発現. 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会. 宇都宮、2005. 5.13. (Neuropathology 25: A32, 2005).
 7. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、土居芳充、古池史子、山村隆 : DNA microarray 解析による多発性硬化症の病型分類. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005. 5.25. (抄録集 102, 2005).
 8. 土居芳充、佐藤準一、山村隆 : 多発性硬化症 (MS)末梢血 T 細胞における NR4A2 発現上昇. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005. 5.27. (抄録集 272, 2005).
 9. 尾上祐行、佐藤準一、山村隆 : 多発性硬化症 (MS)患者血清中の抗 Nogo 抗体の検出. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005. 5.27. (抄録集 272, 2005).
 10. 山村隆、佐藤準一 : cDNA マイクロアレイを用いた多発性硬化症の病態解析. 第 26 回日本炎症・再生医学会. ワークショップ 3. 網羅的遺伝子発現解析による炎症性疾患の病態解析と治療効果の予測. 東京、2005. 7.13. (炎症・再生 25: 289, 2005).
 11. 佐藤準一、野村恭一、山村隆 : CIDP 診断における DNA マイクロアレイ有用性に関する研究. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 難治性ニューロパチーの病態に基づく新規治療法の開発班. 平成 17 年度班会議. 東京、2005. 12.7.
 12. 佐藤準一、南里悠介、土居芳充、山村隆 : 末梢血リンパ球におけるインターフェロン応答遺伝子の網羅的解析. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患の画期的診断・治療法に関する研究事業. 平成 17 年度班会議. 東京、2005.12.9.
 13. 南里悠介、佐藤準一、土居芳充、山村隆 : MS のマイクロアレイ診断およびインターフェロンベータ治療に関するアンケート調査の集計. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患の画期的診断・治療法に関する研究事業. 平成 17 年度班会議. 東京、2005.12.9.
 14. Satoh J, Onoue H, Doi Y, Yamamura T : Detection of anti-Nogo-66 and anti-Nogo receptor

autoantibodies in the serum of multiple sclerosis.
 第 35 回日本免疫学会総会学術集会 横浜、
 2005. 12.13. (Proceedings of the Japanese
 Society for Immunology 35: 37, 2005).

2) 多発性硬化症に関連する遺伝子の発現測定方
 法、多発性硬化症関連遺伝子の発現を測定するた
 めのチップ、多発性硬化症の罹患を判断するた
 めの遺伝子群、多発性硬化症の評価方法。
 (特開 2005-160440).

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 多発性硬化症に対するインターフェロン・ペー
 タ薬物治療の有効性予測法(特開 2004-28926).

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

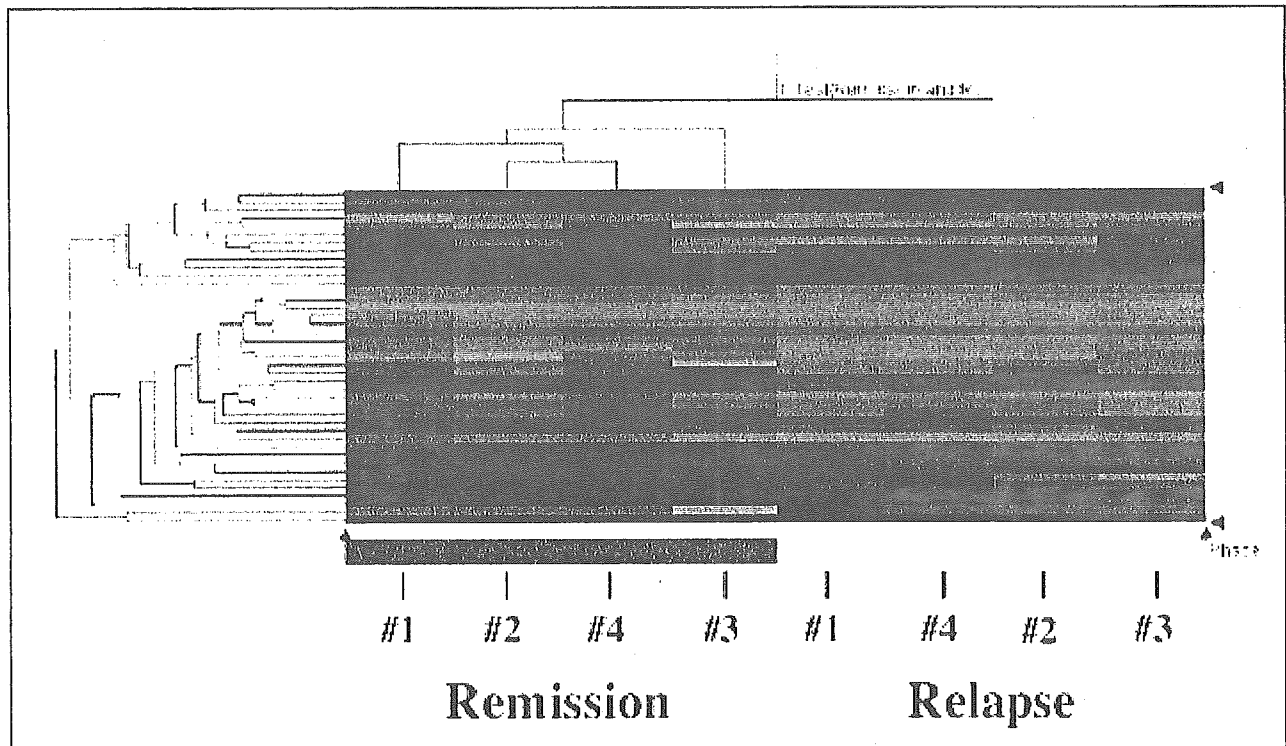


図 1. MS 寛解期(remission)と再発期(relapse)で発現差異を認める 41 遺伝子を指標とする階層的クラスタ
 ー解析(hierarchical clustering analysis; HCA). #1-#4 は患者を示す。

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

分担研究報告書

遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立に関する研究 (多発性硬化症患者血液検体収集)

分担研究者 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 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、多彩な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。MSでは髄鞘抗原を認識し活性化した自己反応性CD4⁺Th1 T細胞が中枢神経系組織内に浸潤し炎症性脱髄を惹起する。近年インターフェロンベータ(IFNβ)のMS再発抑制効果が立証された。現在では急性増悪期には副腎皮質ステロイド短期間大量静脈内投与を行い、寛解期には再発予防のためIFNβの継続的皮内投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。治療が遅れると恒久的後遺症を残す。現在までMS再発予測法は確立されていない。再発を事前に予知出来れば、早期に免疫調節薬を十分量投与し回復を促進し、後遺症を軽減出来る可能性が高い。本研究(予定期間2年)は遺伝子アレイを用いたMS再発予測法樹立を主目的とする。平成17年度(初年度)は文書で同意を取得した国立精神・神経センター武蔵病院の多数例の再発寛解型MS患者の再発期・寛解期に末梢血Tリンパ球を採取しRNAを精製・保存する。平成18年度(第2年度)はHuman cDNA microarrayを用いて遺伝子発現プロファイルを包括的に解析し、階層的クラスター解析・サポートベクターマシン解析を施行して再発特異的遺伝子(relapse-specific genes; RSG)を同定する。

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗原反応性T細胞により惹起される時間的・空間的再発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。再発を反復し炎症が遷延化すると軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。未だMS再発予測法は確立されていない。再発を事前に予知出来れば、早期から副腎皮質ステロイド、インターフェロンベータ(IFNβ)、免疫抑制剤を集中的に投与して、炎症を抑制し後遺症を軽減出来

る可能性が高い。MS寛解期(非活動期)と再発期(活動期)では末梢血リンパ球遺伝子発現パターンに顕著な差異を認めると考えられる。本研究(予定期間2年)では遺伝子アレイを用いて多数のMS患者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロファイルを経時的に解析し、臨床的再発に一致する遺伝子発現パターンを同定する。これらの情報を基に遺伝子アレイを用いたMS再発予測法樹立を目指す。主として分担研究者山村は検体収集を担当した。

B. 研究方法

平成17年度(初年度)は文書で同意を得た国立精神・神経センター武蔵病院神経内科通院・入院中の多数の再発寛解型 MS 患者の寛解期・再発期に末梢血 T リンパ球を採取し RNA を精製・凍結保存する。新規神経学的所見出現または・および MRI-T1 強調画像造影病巣出現を再発とした。対照神経疾患(non-MS neurological diseases)や健常者(normal control subjects; Nc)の検体の収集し凍結保存する。平成 18 年度(第 2 年度)は Human cDNA microarray (1,259 genes; Hitachi)を用いて遺伝子発現プロファイルを包括的に解析する。得られたデータセットに関して階層的クラスター解析(hierarchical clustering analysis; HCA)とサポートベクターマシン(support vector machine; SVM)解析を施行し、再発特異的遺伝子(relapse-specific genes; RSG)を同定する。RSG を同定出来れば、臨床実用化に向けて、定量的 real-time RT-PCR 法で検出可能な再発予測キットを作成する。

(倫理面への配慮)

「多発性硬化症患者および対照リンパ球遺伝子発現解析研究(申請者山村隆)」は、既に国立精神・神経センター倫理委員会で承認済みである。本研究で解析する対象者全員から研究参加に関して文書で同意を取得する。また全サンプルは第 3 者により暗号化し、検査者には個人情報が見えないようにして取り扱う。

C. 研究結果

#1. MS 病型分類データベース作成(主任研究者佐藤・分担研究者山村):平成 16 年度までに収

集した MS 72 検体と健常者(Nc) 22 検体の遺伝子発現プロファイルを比較解析した。MS と Nc で発現差異を認める 286 遺伝子を指標遺伝子(discriminator genes)として HCA を施行し、MS 病型分類データベース(MS classification database; MSCD)を樹立した。286 遺伝子は 5 クラス(class #1-#5)に分類された。MS 群は Nc 群から識別され、さらに 4 サブグループ(A, B, C, D)に分類された。A 群は遺伝子発現プロファイルが最も Nc 群に類似し、B 群は臨床的活動性が最も高く、chemokine 遺伝子が集積した class #5 の発現レベルが最も高く、C 群は脳限局病変を呈する患者が多く、D 群は EDSS スコアが最も高値であった。また Nc 群と MS-A 群を識別し得る 58 遺伝子を絞り込んだ。IFN β 治療例では、治療前後 2 年間の再発回数・IVMP 日数・入院日数・EDSS スコア・MRI T2 強調画像病巣数と治療満足度の集計から responder と nonresponder に分類すると、IFN β responder は A 群と B 群に集積していた。Responder は nonresponder に比較して、治療開始後 6 ヶ月の時点の IRG (ISG15, IFI27, MCP-1, TNFRp75)の発現レベルが高値に維持されていた。

#2. 検体収集(分担研究者山村・主任研究者佐藤):平成 17 年度は MS, non-MS, Nc より合計 100 RNA 検体を精製し-80°Cで凍結保存した。43 検体は active relapsing-remitting (RR)MS, 10 検体は stable RRMS, 6 セット(12 検体)は同一患者の再発期・寛解期ペアである。既に 69 検体は Human cDNA microarray で解析終了し、HCA, SVM を施行した。また Pecs 大学(Hungary) Illes 準教授との

共同研究で、Hungary 人 MS 33 検体と Nc 22 検体を入手した。新規 11 症例(2 active RRMS, 4 stable RRMS, 2 possible MS, 1 optic neuritis, 2 chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; CIDP) を MSCD に適合解析すると、HCA, SVM で stable RRMS は全例が Nc 群、CIDP は MS-A 群に分類された。

#3. 再発期・寛解期比較解析(主任研究者佐藤・分担研究者山村): 上記同一患者再発・寛解セットのうち解析終了した 4 ペアで予備的解析を行った。再発群と寛解群の群間検定で発現差異を認める 41 遺伝子中、6 遺伝子が炎症誘導遺伝子であった(表 1)。この 41 遺伝子を指標とする HCA は再発群と寛解群のサンプルを識別した。再発期上昇上位 20 遺伝子を個々の症例で比較すると、TAF2A と NFKB1 は 4 例中 3 例で共通、一方再発期低下上位 20 遺伝子では、TCF8 と CD163 が 4 例中 3 例で共通に抽出された。

D. 考察

遺伝子アレイによる T 細胞遺伝子発現プロファイル解析により MS 病型分類データベース(MSCD)を樹立した。MSCD は多様な病態を呈する MS を 4 群に分類し、各群は疾患活動性・病巣分布・IFN β 治療反応性との密接な関連を認めた。また同一 MS 患者の再発期・寛解期で顕著な発現差異を認める遺伝子群を同定した。

E. 結論

MS では病期(再発期・寛解期)依存的に、末梢血 T 細胞遺伝子発現プロファイルが大きく変動することが判明した。今後患者の臨床経過を注意深く観察し、再発時の検体を増加させる予定である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, 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. *Neurobiology of Disease* 18: 537-550, 2005.
2. Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T: Nogo-A and Nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 129-138, 2005.
3. Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T: The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 858-868, 2005.
4. Oki S, Tomi C, Yamamura T, Miyake S. Preferential Th2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production of inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. *International Immunology* 17: 1619-1629, 2005.

5. Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, Van Kaer L, Liu C, Tanimoto M, Teshima T. Stimulation of host NKT cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *Journal of Immunology* 174: 551-556, 2005.
 6. Ronet C, Darche S, Leite de Moraes M, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, Buzoni-Gatel D. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology* 175: 899-908, 2005.
 7. Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumura K. IFN-gamma-mediated negative feedback regulation of NKT-cell function by CD94/NKG2. *Blood* 106: 184-192, 2005.
 8. Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fujiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamura T, Chang YT, Besra GS, Porcelli SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 102: 3383-3388, 2005.
 9. Satoh J, Nanri Y, Yamamura T: Rapid identification of 14-3-3-binding proteins by protein microarray analysis. *Journal of Neuroscience Methods* in press, 2005.
 10. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Onoue H, Aranami T, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Saito T, Ohta M, Miyake S, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* in press, 2006.
2. 学会発表
- 国際学会
1. Satoh J, Onoue H, Arimaki K, Yamamura T: Nogo-A and Nogo receptor expression is enhanced in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 57th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Miami Beach, 2005. 4.12. (*Neurology* 64, Suppl 1: A138, 2005).
 2. Satoh J, Onoue H, Nanri Y, Arima K, Yamamura T: The 14-3-3 Protein Forms a Molecular Complex with Heat Shock Protein Hsp60 and Cellular Prion Protein: A Possible Implication for Detection of 14-3-3 in the CSF of Prion Diseases. The Fifth Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, 2005. 9.7. (Abstract P-084, p. 102, 2005).
 3. Satoh J, Doi Y, Aranami T, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies four distinct subgroups of multiple sclerosis. International Symposium on Autoimmunity in Intractable

Diseases-Novel Molecules and Emerging Paradigms. Hakone, 2005. 10.27. (Abstract 27S-2, 2005).

4. Doi Y, Satoh J, Aranami T, Yamamura T: NR4A2 (Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. International Symposium on Autoimmunity in Intractable Diseases-Novel Molecules and Emerging Paradigms. Hakone, 2005. 10.27. (Abstract PV-17, 2005).

国内学会

1. 佐藤準一、山村隆、尾上祐行、有馬邦正：多発性硬化症脱髄巢反応性アストロサイトにおける Nogo 受容体の発現. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 免疫性神経疾患に関する調査研究班. 平成 16 年度班会議. 東京、2005. 1.26 (抄録集 p.20-21).
2. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：T 細胞の DNA microarray 解析による多発性硬化症の病型分類. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005. 3.3. (神経免疫学 13: 44, 2005). 第 17 回日本神経免疫学会会長賞受賞.
3. 尾上祐行、佐藤準一、山村隆：多発性硬化症患者血清中の抗 Nogo Receptor 抗体の検出. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005. 3.3. (神経免疫学 13: 72, 2005). 第 17 回日本神経免疫学会奨励賞受賞.
4. 土居芳充、佐藤準一、山村隆：多発性硬化症の末梢血 T 細胞における NR4A2 発現上昇. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005. 3.4. (神経免疫学 13: 104, 2005).
5. 佐藤準一、尾上祐行、有馬邦正、山村隆：多発性硬化症脱髄巢における Nogo-A・Nogo 受容体の発現. 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会：宇都宮、2005. 5.13. (Neuropathology 25: A32, 2005).
6. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、土居芳充、古池史子、山村隆：DNA microarray 解析による多発性硬化症の病型分類. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005. 5.25. (抄録集 102, 2005).
7. 土居芳充、佐藤準一、山村隆：多発性硬化症 (MS)末梢血 T 細胞における NR4A2 発現上昇. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005. 5.27. (抄録集 272, 2005).
8. 尾上祐行、佐藤準一、山村隆：多発性硬化症 (MS)患者血清中の抗 Nogo 抗体の検出. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005. 5.27. (抄録集 272, 2005).
9. 山村隆、佐藤準一：cDNA マイクロアレイを用いた多発性硬化症の病態解析. 第 26 回日本炎症・再生医学会. ワークショップ 3. 網羅的遺伝子発現解析による炎症性疾患の病態解析と治療効果の予測. 東京、2005. 7.13. (炎症・再生 25: 289, 2005).
10. 佐藤準一、野村恭一、山村隆：CIDP 診断における DNA マイクロアレイ有用性に関する研究. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託

費 難治性ニューロパチーの病態に基づく
新規治療法の開発班. 平成 17 年度班会議. 東
京、2005. 12.7.

11. 佐藤準一、南里悠介、土居芳充、山村隆: 末
梢血リンパ球におけるインターフェロン応
答遺伝子の網羅的解析. 厚生労働科学研究費
補助金 難治性疾患の画期的診断・治療法に
関する研究事業. 平成 17 年度班会議. 東京、
2005.12.9.
12. 南里悠介、佐藤準一、土居芳充、山村隆: MS
のマイクロアレイ診断およびインターフェ
ロンベータ治療に関するアンケート調査の
集計. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾
患の画期的診断・治療法に関する研究事業.
平成 17 年度班会議. 東京、2005.12.9.
13. Satoh J, Onoue H, Doi Y, Yamamura T :
Detection of anti-Nogo-66 and anti-Nogo
receptor autoantibodies in the serum of multiple
sclerosis. 第 35 回日本免疫学会総会学術集会

横浜、2005. 12.13. (Proceedings of the Japanese
Society for Immunology 35: 37, 2005).

Ⅲ. 知的所有権の取得状況

1. 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) 多発性硬化症に関連する遺伝子の発現測定方
法、多発性硬化症関連遺伝子の発現を測定するた
めのチップ、多発性硬化症の罹患を判断するた
めの遺伝子群、多発性硬化症の評価方法.
(特開 2005-160440).

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Rank	Symbol	p-value	GenBank	Name	Unigene	LocusID	Category
1	<259>IL6	0.00362	M14584	Human interleukin 6 mRNA, complete cds	93913	3569	Cytokine, Signal
2	<1240>FGF1	0.00617	X51943	acidic fibroblast growth factor (AFGF) + heparin-binding growth factor 1 precursor (HBCF-1);	75297	2246	GF
3	<1226>PPARG	0.00769	L40904	H. sapiens peroxisome proliferator activated receptor gamma, complete cds	100724	5468	PPAR, TF
4	<291>CREBBP	0.0131	U47741	Human CREB-binding protein (CBP) mRNA, complete cds	23598	1387	ATF/CREB
5	<1167>IL15RA	0.0132	U31628	Human interleukin-15 receptor alpha chain precursor (IL15RA) mRNA, complete cds	12503	3601	Cytokine
6	<962>SYK	0.0132	L28824	Homo sapiens protein tyrosine kinase (Syk) mRNA; Spleen tyrosine kinase	74101	6850	Signal
7	<492>DCC	0.0133	X76132	Human tumor suppressor protein DCC precursor; colorectal cancer suppressor	211567	1630	Suppressor
8	<574>TLR5	0.0154	U88881	Homo sapiens Toll-like receptor 5 (TLR5) mRNA, partial cds.	114408	7100	Signal
9	<476>PRKCA	0.0166	X52479	Human PKC alpha mRNA for protein kinase C alpha; Protein kinase C, alpha	169449	5578	Signal
10	<327>PRKCB1	0.017	X06318	Human mRNA for protein kinase C (PKC) type beta I.; Protein kinase C, beta 1	77202	5579	Signal
11	<316>TGFB2	0.0177	M19154	Human transforming growth factor-beta-2 mRNA; glioblastoma -derived T-cell suppressor factor (G-TSF); hsc-1 cell growth inhibitor; polyarginin; cetermin	169300	7042	GF
12	<76>AXIN1	0.0193	AF009674	Homo sapiens axin (AXIN1), partial cds	184434	8312	Signal
13	<742>FCER1G	0.0215	M33195	Human Fc-epsilon-receptor gamma-chain mRNA; Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; gamma polypeptide	743	2207	Signal
14	<957>TNFRSF4	0.0239	X75962	H. sapiens mRNA for OX40 homologue	129780	7293	Cytokine
15	<128>JAK2	0.0255	AF005216	Homo sapiens receptor-associated tyrosine kinase (JAK2) mRNA, Janus kinase 2	115541	3717	Signal
16	<125>CHEK1	0.0274	AF016582	checkpoint kinase 1 (CHK1)	20295	1111	Signal
17	<234>IL8	0.0285	M17017	Human beta-thromboglobulin-like protein mRNA, complete cds	624	3576	Cytokine, Signal
18	<267>NFKBIA	0.0289	M69043	Homo sapiens MAD-3 mRNA encoding Ikb-like activity, complete cds, IkbAlpha	81328	4792	Signal
19	<1119>CDK3	0.0313	X66357	H. sapiens mRNA cdk3 for serine/threonine protein kinase	100009	51	CellCycle
20	<279>PTEN	0.0314	U92436	Human mutated in multiple advanced cancers protein (MMAC1) mRNA; putative protein-tyrosine phosphatase PTEN	10712	5728	Suppressor
21	<1208>ABCA8	0.0314	AB020629	Homo sapiens mRNA for KIAA0822 protein, complete cds	38095	10351	ABC transporter
22	<1362>CD9	0.0325	NM_001769	Homo sapiens CD9 antigen (p24)	1244	928	hyperosmotic stress
23	<903>PTPN6	0.0326	X62055	H.sapiens PTPIC mRNA for protein-tyrosine phosphatase 1C.; Protein tyrosine phosphatase, non-receptor	63489	5777	Signal

						type 6; SHP-1					
24	<348>CD86	0.0328	U04343			Human CD86 antigen mRNA, complete cds	27954	942			Signal
25	<62>MAD	0.0332	L06895			Homo sapiens antagonist of myc transcriptional activity (Mad) mRNA, complete cds	281791	-			TF
26	<550>FCGR2B	0.0334	M28696			Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor for (CD32)	278443	2213			Signal
27	<407>IGFBP7	0.0338	S75725			prostaglandin-stimulating factor [human, cultured diploid fibroblast cells, mRNA, 1124 nt].	119206	3490			GF
28	<1273>AKAP1	0.0366	NM_003488			Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 1 (AKAP1)	78921	8165			Signal
29	<417>ARHE	0.0389	X95282			H.sapiens mRNA for Rho8 protein; Ras homolog gene family, member E	6838	390			Signal
30	<1217>SULT1A1	0.0405	NM_001055			Homo sapiens sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1 (SULT1A1)	142	6817			sulfotransferase
31	<1199>CHRAC17	0.0407	AF070640			histone fold protein CHRAC17; DNA polymerase epsilon p17 subunit	108112	54107			polymerase
32	<783>ATP6C	0.041	M62762			ATPase, H+ transporting, lysosomal (vacuolar proton pump) 16kD	76159	527			ATPase
33	<561>IL12A	0.0412	M65291			Human natural killer cell stimulatory factor (NKSF) mRNA, complete cds, clone p35	673	3592			Cytokine, Signal
34	<383>SMARCA3	0.0413	Z46606			SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 3	3068	6596			ATPase
35	<895>IFI27	0.0442	X67325			H.sapiens p27 mRNA (interferon, alpha-inducible protein 27)	278613	3429			Cytokine
36	<749>GSTM2	0.0443	M63509			Human glutathione transferase M2 (GSTM2) mRNA	279837	2946			GSTM
37	<785>PLCG1	0.0476	M34667			Human phospholipase C-gamma mRNA, complete cds	268177	5335			Signal
38	<1316>AKAP10	0.0476	NM_007202			Homo sapiens A kinase (PRKA) anchor protein 10 (AKAP10)	288692	-			Signal
39	<214>ELF2	0.049	U43188			Human Ets transcription factor (NERF-2) mRNA, complete cds	82143	1998			TF
40	<265>ALDH10	0.0492	U46689			Human microsomal aldehyde dehydrogenase (ALDH10) mRNA	159608	224			ALDH
41	<519>STK4	0.0496	U60207			Human stress responsive serine/threonine protein kinase Krs-2 mRNA, Serine/threonine kinase 4	35140	6789			Stress

表 1. 再発群と寛解群の群間検定で発現差異を認める 41 遺伝子。

IL6, IL15RA, IL8, NFKBIA, CD86, IL12A は proinflammatory genes である。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表