

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山村 隆

平成18年（2006）年 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

## II. 分担研究報告

- 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 ----- 9  
国立精神・神経センター神経研究所 佐 藤 準 一
- 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 ----- 18  
に関するアンケート調査の集計  
国立精神・神経センター神経研究所 佐 藤 準 一
- 多発性硬化症インターフェロン・ベータ療法中止例の予後の検討 ----- 24  
国立精神・神経センター武蔵病院神経内科 小 川 雅 文
- 日本における Late onset MS の特徴及びインターフェロンの効果に関する研究 ----- 26  
順天堂大学医学部脳神経内科 横 山 和 正
- 温度感受性 SV40 ラージ T 抗原トランスジェニックラット脳微小血管由来  
内皮細胞株を用いた IFN- $\beta$  によるトランスポーター発現に関する検討 ----- 28  
山口大学医学部脳神経病態学神経内科 神 田 隆

■ I 型 IFN の標的細胞としての肥満細胞の検討	-----	34
京都大学大学院医学研究科	堀 利 行	
■ CECAM-1 分子を介した実験的自己免疫性脳脊髄炎病態の調節に関する研究	--	38
国立精神・神経センター神経研究所	三 宅 幸 子	
■ ウニ小腸由来 sulfonoquinovosyl diacylglycerol による実験的自己免疫性 脳脊髄炎の治療	-----	42
北海道大学大学院医学研究科神経内科学分野	菊 地 誠 志	
■ Crow-Fukase 症候群における血液浄化療法 ～血清 VEGF 値、サイトカイン値の変動と臨床症候～	-----	44
埼玉医科大学総合医療センター神経内科	野 村 恭 一	
■ 多発性硬化症の免疫吸着療法	-----	48
東京理科大学理学部	太 田 宏 平	
■ 「COX-2阻害剤を用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎への治療」 に関する研究	-----	52
近畿大学医学部神経内科	楠 進	
Ⅲ. 平成 17 年度班会議プログラム	-----	54
Ⅳ. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	77
Ⅴ. 研究成果の刊行物・別刷	-----	80

# I. 總括研究報告

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**

多発性硬化症 (MS) のインターフェロンベータ (IFN-β) 療法は慢性期 MS の国際標準治療となっているが、有効性や副作用の出方の個人差は大きい。本研究班では、DNA マイクロアレイ技術を用いて、IFN-β療法の適応決定や MS の鑑別診断に有用な血液診断法の開発を進めている。また、DNA マイクロアレイ解析結果をもとに、臨床現場に還元できるような情報を集積することを目指している。本年度の主要な研究内容は、以下の通りである。

- 1) 研究の必要性を確認するため全国の神経内科専門医施設にアンケート調査を行った。その結果、現在 MS か否かの鑑別が困難な症例を経験している施設が 32%、DNA マイクロアレイによる IFN-β作用効果予測法の開発に期待する施設が97%あることがわかった。
- 2) IFN-β療法を副作用などのために継続できなかった症例は、全国調査で約 25%、国立精神・神経センター内で 20%あった。神経症状の増悪のためにドロップアウトした例も多く、漸増法の普及やステロイド併用療法などの対応策が求められる。
- 3) IFNβの生物反応に関連するマーカー分子を同定するために、末梢血リンパ球における IFNβ反応性遺伝子を網羅的に解析した。その結果 IFNβはインターフェロンのシグナル伝達に関連する遺伝子群の他に、細胞死制御分子、熱ショック蛋白など、多彩な分子を迅速に誘導することが判明した。特に MS 病態を介在する Th1 細胞活性を増強させる CXCR3 リガンドケモカイン (SCYB11, SCYB10, SCYB9)や単球に働く CCR2 リガンドケモカイン(SCYA8, SCYA2)の顕著な上昇、好中球に働く CXCR2 リガンドケモカイン(SCYB2, SCYB1, IL8)の低下、好炎症性サイトカイン (IL-6, IL-15, osteopontin, TNFα, IFNγ)の上昇などは、IFNβの副作用に関連するものと考えられた。IFN-βの導入に際しては、海外で一般的になっているが日本では行われていない漸増法、あるいはステロイド併用療法などが必要なことを意味しており、これから全国的に注意を喚起する必要がある。

## 分担研究者

佐藤 準一（国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 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）

小川 雅文（国立精神・神経センター武蔵病院神経内科 医長）

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養 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）

堀 利行（京都大学大学院医学研究科 講師）

## 協力班員

深澤 俊行（西円山病院神経内科 主任診療部長）

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）

山脇 正永（東京医科歯科大学医学部臨床教育研修センター神経内科 助教授）

野原 千洋子（都立荏原病院神経内科 医員）

## A. 研究目的

近年欧米・本邦における大規模臨床試験により、インターフェロンベータ (IFN $\beta$ ) の多発性硬化症 (MS) に対する再発抑制効果が class I

evidenceで立証された。わが国でも、患者の長期的予後の改善を目指して、IFN $\beta$ の継続的皮内投与治療が全国の神経内科医によって広く選択されるようになった。しかしIFN $\beta$ が十分効果を示さない症例や副作用で治療継続を断念せざるを得ない症例も多く、臨床の現場ではIFN $\beta$ の適応に関する混乱も見られる。本研究ではMSにおけるIFN $\beta$ 治療効果・副作用を予知するbiomarkerの同定を目標として、DNA microarrayを用いた末梢血リンパ球の遺伝子発現解析を行う。そのゴールはMS診療のレベルを向上させる画期的な血液検査方法を開発することであり、MSの診断、MSの治療方針の決定に有用な血液検査方法の開発を目指している。

国際的に見ても、MS血液診断法の開発はMS研究の主流になっている。正しい方向を定めた研究は実用的な知見を産み、それは今後10年間の神経内科診療の向上に直結すると考えられる。

本年度の主要な研究課題は、以下の通りである。

- 1) MS医療における血液診断法の重要性を明らかにするために、全国神経内科医施設に対してアンケート調査を行う。
- 2) IFN $\beta$ の実態を症例調査などによって明らかにする。
- 3) IFN $\beta$ 治療開始時の副反応のメカニズムを解析するため、IFN $\beta$ 添加により末梢血リンパ球に誘導される遺伝子発現変化を解析する。
- 4) MSの治療法選定や開発に貢献することが期待される基盤研究を進める。

## B. 研究方法

### (アンケート調査)

神経内科専門医の勤務する 1709 施設に 18 項目から構成される質問表(Yes/No 形式とコメント記入)を郵送し FAX で回答を受信した(南里、佐藤、土居、山村の分担報告を参照)。

### (IFN $\beta$ 療法の実態調査)

国立精神・神経センター武蔵病院で経験した連続 51 症例の治療成績、副作用、ドロップアウト例の検討などを行った(小川の分担報告)。

### (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)

末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を recombinant human IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  または IL-1 $\beta$  (50 ng/ml each)存在下で 3 時間または 24 時間培養し RNA を抽出・増幅。1,259 cDNA microarray (Hitachi Life Science)を用いて遺伝子発現プロファイルを解析し、2-fold change を cut-off として IFN $\beta$ -induced (upregulated) or repressed (downregulated) genes を同定した。また LightCycler ST300 (Roche)で real-time RT-PCR を行い、遺伝子アレイの発現レベルを検証(validation)した(佐藤の分担報告)。

### (倫理面への配慮)

本研究課題は国立精神・神経センター倫理委員会の承認を受け、採血に当たっては十分な説明の

上、文書で同意を取ることを徹底した。また、分担研究者の研究については、各施設の倫理規定を遵守し、説明と同意取得については国立精神・神経センターで行っている方法に準じた。

## C. 研究結果

アンケート調査票を送付した全国 1709 施設中 319 施設より回答が寄せられた(回答率 19%)。アンケート回答施設で診療を行っている IFN $\beta$ 使用患者数は 1052 人であり、被治療患者の 30-40%程度をカバーすることがわかった。IFN $\beta$ 治療に満足している患者は、そのうち 46%であり、IFN $\beta$ 治療中止に至ったのは 25%であった。国立精神・神経センター武蔵病院における治療中止例も 51 例中 10 例(19.6%)であり、同療法の compliance に関する現在の状況が明らかになった。これまで一般に皮膚反応や肝障害が副作用として広く認識されているが、武蔵病院例では、MS に関連する神経症状の増悪による治療中止例が、むしろ多かった(10 例中 6 例)。

MS の診断は比較的容易になったと言われるが、現在 MS か否かの鑑別が困難な症例を経験している施設が 32%もあり、DNA マイクロアレイによる診断法に対する期待が大きいことがわかった。これまでに脳腫瘍との鑑別が問題になった症例を経験している施設は 54%を占め、脳生検で診断を確定したと回答した施設が 70 施設あった。その他の項目についても、現代の日本における MS 診療の問題点を示すような調

査結果が得られた (南里の項参照)。

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では、IFN $\beta$ で発現上昇するのは3時間後では107遺伝子、24時間後では87遺伝子で、そのうち69遺伝子は両時間でオーバーラップした。我々はこれまでにIFN $\beta$ 治療開始前と開始後の再発寛解型MSの末梢血T細胞遺伝子発現変化を解析している(Koike F et al. J Neuroimmunol 2003; 139: 109-118)。今回は *in vitro* の解析を行ったわけであるが、*in vitro* と *in vivo* で一致する変化が11種類のIRGで見られた。その内訳は、IFIT1 (IFI56), ISG15 (G1P2), IFIT4 (IFI60), IFI27, G1P3 (IFI6-16), IRF7, ABCB2 (TAP1), ATF3, IFITM1 (IFI17), SULT1C1, TNFAIP6 である。IFN $\beta$ で発現低下は3時間22遺伝子、24時間23遺伝子で、2遺伝子(FOS, IL1A)は両時間でオーバーラップしていた。

今回明らかになったIRGを分類すると、: (i) インターフェロン反応マーカー(n = 12), (ii) 古典的または Toll-like receptor 依存性インターフェロングナル関連分子 (n = 12), (iii) ケモカインとその受容体 (n = 11), (iv) サイトカイン、増殖因子とその受容体 (n = 17), (v) 細胞死、DNA 障害と細胞サイクルの制御因子 (n = 29), (vi) 熱ショック蛋白(n = 9), (vii) 細胞接着分子 (n = 7)とその他に分類された。

Chemokine 関連 IRG には SCYB11 (CXCL11, I-TAC), SCYB10 (CXCL10, IP-10), SCYA8 (CCL8, MCP2), SCYB9 (CXCL9, MIG), SCYA2 (CCL2, MCP1), CCR5, SCYA4 (CCL4, MIP1B), IL8RB (CXCR2), SCYA3 (CCL3, MIP1A), SCYA19

(CCL19, MIP3B), SCYA13 (CCL13, MCP4)が含まれ、特に CXCR3 ligand chemokines (SCYB11, SCYB10, SCYB9), CCR2 ligand chemokines (SCYA10, SCYA2)は両時間 top 20 遺伝子に含まれていた。

CXCR2 ligand chemokines SCYB2 (CXCL2, GRO2), SCYB1 (CXCL1, GRO1), IL8 (SCYB8, CXCL8)および RGS14 は3時間 IFN $\beta$ -repressed genes に含まれていた。

Real-time RT-PCR で IFN $\beta$  による ISG15, SCYB10, SCYA8, SCYA2 の発現亢進, FOS, RGS14, SCYB2 の発現低下を確認した。IFN $\gamma$ は SCYB10, SCYA2, ISG15, SCYA8 の発現亢進, SCYB2 の発現低下を誘導したが、TNF $\alpha$ と IL-1 $\beta$  は SCYB10, ISG15, SCYA8 発現に影響せず、SCYB2 の発現亢進を誘導した。

#### D. 考察

全国アンケート調査および武蔵病院における調査により、IFN $\beta$ 治療に耐えられない症例は20-25%に達することが明らかになった。また、皮膚反応や肝障害などのマイナーな副作用に限らず、MS病態の変化や悪化の見られる例が存在することもわかった。

一方、マイクロアレイ研究により、IFN $\beta$ 治療による副作用のメカニズムに対する理解が進んだ。すなわち、IFN $\beta$ はきわめて広範囲な遺伝子群を迅速(3-24時間)に誘導するが、その中には、MS活動性病巣やCSFでの検出が報告されている炎症性ケモカインが含まれていたのである。特に effector Th1 細胞に働く CXCR3

リガンドケモカイン(SCYB11, SCYB10, SCYB9)や単球に働くCCR2リガンドケモカイン(SCYA8, SCYA2)の顕著 (top 20) な発現上昇、さらには炎症性サイトカイン(IL-6, IL-15, osteopontin, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )の上昇は、IFN $\beta$ 治療開始時に見られる病態の変化や悪化を合理的に説明する。海外でも、SCYB10, IL-6 と flu-like symptoms との関連、SCYB10, SCYA2 と injection-site reactions の関連が指摘されている(Martínez-Cáceres EM et al. *Ann Neurol* 1998; 44: 682-685; Buttman M et al. *J Neuroimmunol* 2005; 168: 175-182)。

欧米の IFN $\beta$ の添付文書には、まず4分の1量から開始して、一週間毎に漸増する使用法が記載されている。これは IFN $\beta$ 治療初期に誘導される炎症性サイトカインやケモカインの影響を小さくするために意味がある。翻ってわが国では、このような使用法(漸増法)が、一部の専門家では推奨されているものの、一般には普及していない。この点は行政の速やかな対応が求められるものと考え、ここに報告する。また、IFN $\beta$ 治療開始初期にはステロイド併用を奨める海外文献もあるが、そのような方法も初期の炎症反応を抑制する意味で合理的であると考えられる。

## E. 結論

DNA マイクロアレイ解析の結果から、IFN $\beta$ は炎症性サイトカイン/ケモカインを早期に誘導することが明確になった。この事実は、IFN $\beta$ 初期の副作用や、病態の変化、再発などを科学的に説明するものである。

## F. 健康危険情報

欧米の IFN $\beta$ の添付文書には、まず4分の1量から開始して、一週間毎に漸増する使用法が記載されている。しかし、わが国では、このような使用法(漸増法)が、添付文書に記載もなく、ほとんど知られていない。DNA マイクロアレイ解析の結果から明らかなように、IFN $\beta$ 治療開始初期には炎症を悪化させるような反応が起こる。それによる影響を最小限にとどめるために、漸増法を速やかに普及しなければならないと考え、健康危険情報として報告する。

## G. 研究発表 (本報告書と関係が特に深いものに限る)

### 1. 論文発表

Satoh, Ji., M. Nakanishi, F. Koike, H. Onoue, T. Aranami, T. Yamamoto, M. Kawai, S. Kikuchi, K. Nomura, K. Yokoyama, K. Ota, T. Saito, M. Ohta, S. Miyake, T. Kanda, T. Fukazawa and T. Yamamura: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* (in press) 2006

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.

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(2): 129-138, 2005.

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(10): 858-868, 2005.

Satoh J, Nanri Y, Yamamura T: Rapid identification of 14-3-3-binding proteins by protein microarray analysis. *Journal of Neuroscience Methods* Epub ahead of print 27-Oct., 2005.

山村 隆、高橋 和也、荒木 学：多発性硬化症と免疫調節細胞。日本臨床 2005 年増刊。臨床免疫学(下)-基礎研究の進歩と最新の臨床- 日本臨床 63 suppl 5 : 422-426, 2005

山村 隆：多発性硬化症における免疫抑制薬の使い方:神経免疫疾患。最新医学 60(3):426-430, 2005

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(2): 167-178, 2005.

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 マイクロアレイ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, 2006

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。神経研究の進歩, 2006, 印刷中。

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

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, 2006, In press.

#### 2. 学会発表

#### 国際学会

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).

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).

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).

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

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).

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.

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.

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).

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).

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).

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).

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).

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).

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.

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.

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.

Satoh I, 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

## II. 分担研究報告

## 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

佐藤 準一、南里 悠介、土居 芳充、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** 近年欧米・本邦における大規模臨床試験により、インターフェロンベータ(interferon-beta; IFN $\beta$ )の多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)再発抑制効果が class I evidence で立証され、現在では急性増悪期に副腎皮質ステロイド短期間大量静脈内投与(intravenous methylprednisolone pulse; IVMP)を行い、寛解・回復期に IFN $\beta$ の継続的皮内・筋肉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 IFN $\beta$ が十分効果を示さない症例や副作用で治療継続を断念せざるを得ない症例も多い。現在まで MS における IFN $\beta$ 治療効果・副作用を予知する biomarker は同定されていない。本研究では IFN $\beta$  biological effect-related molecular markers を同定するため、DNA microarray を用いて末梢血リンパ球における IFN $\beta$ 反応性遺伝子(IFN $\beta$ -responsive genes; IRG)を網羅的に解析した。その結果 IFN $\beta$ は IFN response/signaling 関連遺伝子群の他に、apoptosis regulators, heat shock proteins など多彩な遺伝子を迅速に誘導することが判明した。すなわち effector Th1 cells に働く CXCR3 ligand chemokines (SCYB11, SCYB10, SCYB9)や monocytes に働く CCR2 ligand chemokines (SCYA8, SCYA2)の顕著な上昇、neutrophils に働く CXCR2 ligand chemokines (SCYB2, SCYB1, IL8)の低下、proinflammatory cytokines (IL-6, IL-15, osteopontin, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )の上昇を認めた。DNA microarray 解析の結果から IRG としての proinflammatory chemokines/cytokines が MS における IFN $\beta$ -related early adverse effects の中心的役割を果たしている可能性が示唆された。

### A. 研究目的

近年欧米・本邦における大規模臨床試験により、インターフェロンベータ(interferon-beta; IFN $\beta$ )の多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)再発抑制効果が class I evidence で立証され、現在では急性増悪期に副腎皮質ステロイド短期間

大量静脈内投与(intravenous methylprednisolone pulse; IVMP)を行い、回復期に IFN $\beta$ の継続的皮内・筋肉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 IFN $\beta$ が十分効果を示さない症例や副作用で治療継続を断念せざるを得ない症例も多い(Walther EU

and Hohlfeld R. *Neurology* 1999; 53: 1622-1627; Waubant E et al. *Neurology* 2003; 61: 184-89; Rudick RA et al. *Ann Neurol* 2004; 56: 548-55)。現在まで MS における IFN $\beta$ 治療効果・副作用を予知する biomarker は同定されていない。本研究では IFN $\beta$  biological effect-related molecular markers を同定するため、DNA microarray を用いて末梢血リンパ球における IFN $\beta$ 反応性遺伝子(IFN $\beta$ -responsive genes; IRG)を網羅的に解析することを目的とする。

## B. 研究方法

末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を recombinant human IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  or IL-1 $\beta$  (50 ng/ml each)存在下で3時間または24時間培養し RNA を抽出・増幅、1,259 cDNA microarray (Hitachi Life Science)を用いて遺伝子発現プロフィールを解析し、2-fold change を cut-off として IFN $\beta$ -induced (upregulated) or repressed (downregulated) genes を同定した。また LightCycler ST300 (Roche)で real-time RT-PCR を行い、遺伝子アレイの発現レベルを検証(validation)した。

(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。

## C. 研究結果

#1. IFN $\beta$ で発現上昇は3時間 107 遺伝子、24

時間 87 遺伝子で、69 遺伝子は両時間でオーバーラップし、この中には既報(Koike F et al. *J Neuroimmunol* 2003; 139: 109-118)の RRMS *in vivo* 11 IRG [IFIT1 (IFI56), ISG15 (G1P2), IFIT4 (IFI60), IFI27, G1P3 (IFI6-16), IRF7, ABCB2 (TAP1), ATF3, IFITM1 (IFI17), SULT1C1, TNFAIP6]が含まれていた。IFN $\beta$ で発現低下は3時間 22 遺伝子、24時間 23 遺伝子で、2 遺伝子(FOS, IL1A)は両時間でオーバーラップしていた。

#2. IRG は主要カテゴリー: (i) conventional IFN-response markers (n = 12), (ii) components of classical and Toll-like receptor (TLR)-dependent IFN-signaling pathways (n = 12), (iii) chemokines and their receptors (n = 11), (iv) cytokines, growth factors and their receptors (n = 17), (v) apoptosis, DNA damage, and cell cycle regulators (n = 29), (vi) heat shock proteins (n = 9), (vii) costimulatory and adhesion molecules (n = 7)(表 1)とその他に分類された。

#3. Chemokine 関連 IRG には SCYB11 (CXCL11, I-TAC), SCYB10 (CXCL10, IP-10), SCYA8 (CCL8, MCP2), SCYB9 (CXCL9, MIG), SCYA2 (CCL2, MCP1), CCR5, SCYA4 (CCL4, MIP1B), IL8RB (CXCR2), SCYA3 (CCL3, MIP1A), SCYA19 (CCL19, MIP3B), SCYA13 (CCL13, MCP4)が含まれ、特に CXCR3 ligand chemokines (SCYB11, SCYB10, SCYB9), CCR2 ligand chemokines (SCYA10, SCYA2)は両時間 top 20 遺伝子に含まれていた。

#4. CXCR2 ligand chemokines SCYB2 (CXCL2,

GRO2), SCYB1 (CXCL1, GRO1), IL8 (SCYB8, CXCL8)および RGS14 は 3 時間 IFN $\beta$ -repressed genes に含まれていた。

#5. Real-time RT-PCR で IFN $\beta$ による ISG15, SCYB10, SCYA8, SCYA2 upregulation, FOS, RGS14, SCYB2 downregulation を確認した(図 1,2)。IFN $\gamma$ は SCYB10, SCYA2, ISG15, SCYA8 upregulation, SCYB2 downregulation を誘導したが、TNF $\alpha$ と IL-1 $\beta$ は SCYB10, ISG15, SCYA8 発現に影響せず、SCYB2 upregulation を誘導した。

#### D. 考察

IFN $\beta$ は IFN response/signaling 関連遺伝子群の他に、apoptosis regulators, heat shock proteins など広範囲な遺伝子を迅速(3-24 時間)に誘導することが判明した。また MS 活動性病巣や CSF での検出が報告されている proinflammatory chemokines で、主として effector Th1 cells に働く CXCR3 ligand chemokines (SCYB11, SCYB10, SCYB9) や monocytes に働く CCR2 ligand chemokines (SCYA8, SCYA2)の顕著 (top 20) な upregulation を認め、neutrophils に働く CXCR2 ligand chemokines (SCYB2, SCYB1, IL8) の downregulation を認めた。RGS14 は regulator of G-protein signaling family member で、GPCR である chemokine receptor の signaling を抑制する。また IFN $\beta$ は proinflammatory cytokines (IL-6, IL-15, osteopontin, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )の発現も誘導した。SCYB10, IL-6 は flu-like symptoms との関連が、SCYB10, SCYA2 は injection-site reactions との関連が指摘されている(Martínez-Cáceres EM et

al. Ann Neurol 1998; 44: 682-685; Buttmann M et al. J Neuroimmunol 2005; 168: 175-182)。

#### E. 結論

DNA microarray 解析の結果から IRG としての proinflammatory chemokines/cytokines が MS における IFN $\beta$ -related early adverse effects の中心的役割を果たしている可能性が示唆された。

#### 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(2): 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(10): 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*. 27-Oct. Epub ahead of print 2005.
5. 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(2): 167-178, 2005.
6. 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, 2006.
7. 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. *神経研究の進歩*, 2006, 印刷中.
8. 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

9. Satoh J. Protein Microarray Analysis for Rapid Identification of 14-3-3 Protein Binding Partners. *Functional Protein Microarrays in Drug Discovery*. Edited by Predki PF. CRC Press, Boca Raton, FL, 2006, In press.

#### 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).
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).
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).

## 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

**表 1. Functional Classification of IRGs in PBMC.**

Categories	Number of genes	Gene symbols (alternative symbols or names)
1 Conventional IFN-response markers	12	IFIT1 (IFI56), ISG15 (G1P2), IFIT4 (IFI60), MX1 (MXA), MX2 (MXB), IFI27, G1P3 (IFI6-16), ISG20, IFI16, IFITM1 (IFI17), IFITM3 (1-8U), ABCB2 (TAP1)
2 Components of IFN-signaling pathways	12	STAT1, IRF7, STAT2, JAK2, IRF2, ISGF3G (IRF9), MYD88, IRF8, STAT3, JAK3, IRF1, TLR3
3 Chemokines and receptors	11	SCYB11 (CXCL11, I-TAC), SCYB10 (CXCL10, IP-10), SCYA8 (CCL8, MCP2), SCYB9 (CXCL9, MIG), SCYA2 (CCL2, MCP1), CCR5, SCYA4 (CCL4, MIP1B), IL8RB (CXCR2), SCYA3 (CCL3, MIP1A), SCYA19 (CCL19, MIP3B), SCYA13 (CCL13, MCP4)
4 Cytokines, growth factors, and receptors	17	IL6, ILRN (IL-1 receptor antagonist), IL1R2, IL15RA, IL15, SPP1 (osteopontin), CSF1, IL12RB2, TNF (TNFA), IL2RB, IFNG, NTRK1 (TRKA), PDGFRL, TNFAIP6, KITLG (SCF), IL10, IL3RA
5 Apoptosis, DNA damage, and cell cycle regulators	29	TNFSF10 (TRAIL), CASP10, BAG1, TNFRSF6 (FAS), CASP4, TRADD, GZMA, CASP7, RIPK2, MAD, RIPK1, CFLAR (FLIP), RELA, STK3, CASP1, TNFSF6 (FASL), PARP4, TANK (I-TRAF), POLE2, LMNB1, E2F2, CCNA1 (cyclin A1), CDKN1A (p21), PPP1R15A (GADD34), CASP3, CDKN1C (p57), CDK5R2 (p39), TERF1, NBS1 (nibrin)
6 Heat shock proteins	9	HSPA6 (HSP70B'), HSJ2 (HSPF4), HSPA1A (HSP70-1), HSPA1B (HSP70-2), HSPCA (HSP90A), HSPA5 (GRP78), HSPA1L (HSP70-HOM), HSPA8 (HSC70), HSPB1 (HSP27)
7 Costimulatory and adhesion molecules	7	CD80 (B7-1), SELL (selectin L), TNFRSF5 (CD40), CD163, CD86 (B7-2), HLA-DRA, FCER1G