

Table 2  
Twenty 14-3-3-binding proteins identified by protein microarray analysis

No.	Symbol	Database ID	Protein name	Putative biological function	14-3-3-binding consensus motif mode I	Stringency level of the binding motif	Subarray	Row	Column	Z-score	
1	EAP30	NM_007241	EAP30 subunit of ELL complex	a 30-kDa component of the ELL complex that confers derepression of transcription by RNA polymerase II	No sites	NA	1	7	11	22.8593	
2	FLJ10415	NM_018089	Hypothetical protein, cDNA clone MGC:969	Unknown	S258: ARGGSHSAGANLRR	Low	5	4	11	24.60829	
3	LOC57228	NM_020467	Hypothetical protein	Unknown	S405: SPKQSGSEGEDGFQ S525: PADPRVLSLLSAPLG S690: VNTRRCWSCGASLQG	Low Low Low	5	4	11	4.16265	
4	MGC17403	NM_152634	Hypothetical protein	Unknown	S28: AARKNISSNDSQAP	Low	5	6	9	16.84741	
5	LCP2	NM_005565	Lymphocyte cytosolic protein 2	A 72-kDa protein (SLP76) that associates with the Grb2 adaptor protein, provides a substrate of the ZAP-70 protein tyrosine kinase, and plays a role in promoting T cell development and activation	T274: KQLRASYTESCIQEH S297: TTERHERSSPLPGKK	Low Low	11 13	3 5	1 11	17.1519 4.04754 4.08838 4.47457	
6	METAP2	NM_006838	Methionine aminopeptidase 2	A 67-kDa protein that interacts with eukaryotic initiation factor-2 (eIF-2) and regulates protein synthesis	S376: SSFPQASLPPYFSQ T456: DSSKKTINPYVLMV T113: KRGPKVQIDPPSVPI	Low Low Low	15	6	11	4.46343 3.54252	
7	MAGEB4	NM_002367	Melanoma antigen family B, 4	A member of the MAGEB family expressed in testis whose function remains unknown	S152: TAAWRITSEKKKALD T18: AREKRQRIRGQTQDL	Low Medium	18	3	7	3.31601 9.50614	
8	CHST11	NM_018413	Chondroitin 4 sulfotransferase II	A member of HNK-1ST family GalNAc 4-O-sulfotransferase that plays a role in chondroitin sulfate and dermatan sulfate biosynthesis	T194: GNOSSAWILPRNGLL S339: SAYSRATSSSSQPM S93: IDTCRANSATSRKRR	Low Low Medium	20	5	3	9.30562 3.97327	
9	ZC3HC1	NM_016478	Nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (ALK)	A 60-kDa protein that interacts with ALK and plays an antiapoptotic role in nucleophosmitin-ALK signaling events	S56: DICCRKGSRSPLQEL S194: EPFERLVSAYRNKFT	Low Low	23	3	3	3.92871 3.33458	
					No sites	NA				4	3.55366

10	MCM10	NM_018518	Mitochondromosome maintenance deficient 10	A key component of the pre-replication complex (pre-RC) that is essential for the initiation of DNA replication	S90: AQPPRTGSEPRLEG S35: KPAIKSISASALLKQ S55: LEMRRRKSEIQKRF S302: PCGNRSISLDRLPNK T329: DGMLKEKIGPKIGGE T95: EDKKKIKTESGRYIS	Medium Low Low Low Low	25 14 14 14 3	3 13 14 15	4.26291 4.12552 9.2425
11	DDX54	NM_024072	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 54	A 97-kDa RNA helicase (DP97) that interacts with estrogen receptor (ER) and represses the transcription of ER-regulated genes	S102: TESGRYISSYKRDL S125: DYYDRMYSPARVPP	Low High	28	6 9	9.10882 4.81248
12	HNPRC	NM_004500	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	A member of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) involved in pre-mRNA processing, miRNA metabolism and transport	S158: NTSRRGKSGFNKSG S170: KSGQRGSSKSGKLG S240: ETNVKMESEGADDS	Low Low Low	30	5 11	3.56109 5.18382
13	LOC137781	BC032347	Hypothetical gene, cDNA clone MGC:40429	Unknown	No sites	NA	30	5 11	3.56109
14	LOC92345	NM_138386	Hypothetical protein	Unknown	S339: QGRKKLKSENEPGE T374: GYRNREFIRGFSRAR S467: PLLNLPYSLPPPPP	Low Low Low	32	5 13 14	3.47568 3.55366 3.73933
15	FGF12	NM_004113	Fibroblast growth factor 12, transcript variant 2	A member of the FGF family that plays a role in nervous system development and function	S150: VCMYREQSLHEIGEK	Low	34	6 5	5.73339
16	GSTM3	NM_000849	Glutathione S-transferase (brain)	A cytoplasmic glutathione S-transferase of the mu class that plays a role in detoxification of carcinogens, therapeutic drugs, environmental toxins, and products of oxidative stress	S165: QGRSRKSSGPTMNG S64: GIKLRSFSV	Low Low	38	5 15	5.75567 7.82029
17	STAC	NM_003149	src homology three (SH3) and cysteine rich domain	A 47-kDa protein with a SH3 and a cysteine-rich domain that plays a role in the neuron-specific signal transduction pathway	S172: KGFRRYSSPLLHE S56: TKSLRKSADNFFQR S255: DLRRKNSVFTYPEN S46: QKLKRSLSFKTKSLR S51: SLSFKTKSLRKSAD S66: NFFQRTNSEDMLQA S253: GYDLRKRNSVFTYP	High Medium Medium Low Low Low	39	5 1 2	7.70889 16.63575 16.64318

Table 2 (Continued)

No.	Symbol	Database ID	Protein name	Putative biological function	14-3-3-binding consensus motif mode I	Stringency level of the binding motif	Subarray	Row	Column	Z-score
18	FLJ10156	NM_019013	Hypothetical protein, cDNA clone MGC:961	Unknown	S16: GTSVRRRSLQHQL	Low	41	3	7	7.31156
19	ATP6V0B	NM_004047	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal, 21 kD, V0 subunit C"	A 23-kDa component of vacuolar ATPase that mediates acidification of intracellular organelles	T190: FRSPYSSTEPLCSFS No sites	Low NA	43	7	3	6.94023 3.3123
20	FLJ25758	NM_001011541	Hypothetical protein, clone MGC:33355	Unknown	No sites	NA	48	7	7	3.60565 4.18864 4.18122

Among 1752 proteins on the microarray, 20 were identified as showing a significant interaction, based on the signal intensity value exceeding the median plus three standard deviations of all the fluorescence intensities by analyzing with ProtoArray Prospector software. They are listed with the 14-3-3-binding consensus motif (putative phosphoserine and phosphothreonine indicated by underline) and its stringency level by the Scansite Motif Scanner, the position on the array, and the Z-score calculated as described in Section 2. Abbreviations: FLJ, the full-length long Japanese MCG, mammalian gene collection; NA, not available.

3-3-interacting domain is located in the N-terminal segment spanning amino acid residues 2-105 of STAC, and the interaction is independent of serine/threonine-phosphorylation of the binding domain of STAC.

#### 4. Discussion

The present study was designed to rapidly and systematically identify 14-3-3-binding proteins by analyzing a high-density protein microarray. The array included 1752 proteins derived from multiple gene families of biological importance, including cell-signaling proteins, kinases, membrane-associated proteins, and metabolic proteins. In general, protein microarray has its own limitations associated with the expression and purification of a wide variety of target proteins. In the microarray we utilized, the target proteins were expressed in a baculovirus expression system, purified under native conditions, and spotted on the slides to ensure the preservation of native structure, posttranslational modifications, including glycosylation and serine phosphorylation (Culleré et al., 1998; Tennagels et al., 1999), and proper functionality. Immunolabeling of the array with anti-phosphotyrosine (pTyr) antibody indicated that approximately 10–20% of the proteins on the array are phosphorylated (the unpublished data of Invitrogen Technical Service). When this microarray was utilized for kinase substrate identification, most of known kinases immobilized on the array are enzymatically active with the capacity of some degree of autophosphorylation, suggesting that they are certainly phosphorylated on tyrosine, serine, and threonine residues (see the Protoarray application note on <http://www.invitrogen.com/protoarray>). However, we could not currently validate the precise levels of phosphorylation of individual proteins, because of a lack of anti-phosphoserine (pSer) and anti-phosphothreonine (pThr) antibodies suitable for detection of pSer and pThr residues of the proteins on glass slide.

The protein microarray utilized in the present study includes 11 known 14-3-3-binding proteins, such as PCTAIRE protein kinase 1 (PCTK1) (Graeser et al., 2002), protein kinase C zeta (PRKCZ) (van der Hoeven et al., 2000), keratin 18 (KRT18) (Ku et al., 1998), myosin light polypeptide kinase (MYLK) (Haydon et al., 2002), v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (ABL1) (Yoshida et al., 2005), v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1) (Powell et al., 2002), epidermal growth factor receptor (EGFR) (Oksvold et al., 2004), cell division cycle 2 (CDC2) (Chan et al., 1999), mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP3K1) (Fanger et al., 1998), mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2) (Powell et al., 2003), and stratifin (SFN) (Benzinger et al., 2005) (Table 3). All of these were not identified as a 14-3-3-binding protein in the present study. Therefore, the possibility could not be excluded that some 14-3-3 binding partners were not detected due to imperfect phosphorylation of the proteins on the array or due to 14-3-3 isoform-specific binding. Calmodulin, another known 14-3-3 interactor (Luk et al., 1999), was included as a negative control on the array and identified as negative in the present study, because the calcium-dependent interaction between 14-3-3 and calmodulin could not be detected under the calcium-free conditions we employed.

Table 3  
Eleven known 14-3-3-binding proteins immobilized on the protein microarray utilized in the present study

Gene name	Database ID	Reference
PCTAIRE protein kinase 1 (PCTK1), transcript variant 3	NM_033019	Graeser et al. (2002)
Protein kinase C, zeta (PRKCZ)	NM_002744	van der Hoeven et al. (2000)
Keratin 18 (KRT18), transcript variant 1	NM_000224	Ku et al. (1998)
Myosin, light polypeptide kinase (MYLK), transcript variant 6	NM_005965	Haydon et al. (2002)
V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (ABL1), transcript variant a	NM_005157	Yoshida et al. (2005)
V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1), transcript variant 1	NM_005163	Powell et al. (2002)
Epidermal growth factor receptor (EGFR), transcript variant 1	NM_005228	Oksvold et al. (2004)
Cell division cycle 2 (CDC2), transcript variant 1	NM_001786	Chan et al. (1999)
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MAP3K1)	XM_042066	Fanger et al. (1998)
Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK2), transcript variant 1	NM_004759	Powell et al. (2003)
14-3-3 Sigma, stratifin (SFN)	NM_006142	Benzing et al. (2005)

The known 14-3-3-binding proteins, which were spotted on the protein microarray but were not detected in the present study are listed. The 14-3-3-binding proteins validated by definitive evidence are selected and shown with references.

363 Increasing studies indicate that 14-3-3-binding phosphorylation  
364 sites do not exactly fit the consensus motif (Aitken et al., 2002;  
365 Ku et al., 1998) and a second site is required to enhance a  
366 stable 14-3-3-target interaction (MacKintosh, 2004), and show  
367 that the 14-3-3 protein interacts with a set of target proteins  
368 in a phosphorylation-independent manner (Dai and Murakami,  
369 2003; Henriksson et al., 2002; Zhai et al., 2001). Supporting  
370 the latter possibility, the present observations showed that the  
371 interaction of 14-3-3 with target proteins is independent of  
372 serine/threonine-phosphorylation of the binding sites of EAP30,  
373 DDX54, and STAC. This suggests that substantial numbers of  
374 14-3-3 binding partners identified by protein microarray analysis,  
375 if not all, employ phosphorylation-independent binding  
376 domains.

377 All the procedure required for microarray analysis takes  
378 approximately 5 h. This analysis identified a set of 20 human  
379 proteins as 14-3-3 interactors, most of which were previously  
380 unreported except for glutathione *S*-transferase M3 (GSTM3)  
381 that was found as one of binding partners by 14-3-3 affinity  
382 purification of HeLa cell protein extracts (Pozuelo Rubio et al.,  
383 2004). Unexpectedly, the highly stringent 14-3-3-binding consensus  
384 motif was identified only in two, such as STAC and  
385 HNPRC, by the Scansite Motif Scanner search, while 15 of  
386 20 proteins have one or several motifs when a query with the  
387 medium or low stringency was performed (Table 2). The specific  
388 binding to 14-3-3 of EAP30, DDX54, and STAC was verified  
389 by immunoprecipitation analysis of the recombinant proteins  
390 expressed in HEK293 cells. These results indicate that protein  
391 microarray is a powerful tool for rapid identification of  
392 protein–protein interactions, including those unpredicted by the  
393 Database search.

394 Among the 14-3-3-binding partners we identified, several  
395 proteins could be categorized as a component of multimolec-  
396 ular complexes involved in transcriptional regulation. ELL is a  
397 human oncogene encoding a RNA polymerase II (Pol II) tran-  
398 scription factor that promotes transcription elongation (Schmidt  
399 et al., 1999). EAP30 is a 30-kDa component of the ELL com-  
400 plex where EAP30 confers derepression of transcription by Pol  
401 II (Schmidt et al., 1999). A recent study showed that EAP30  
402 could interact with the tumor susceptibility gene TSG101 prod-  
403 uct, a cellular factor that plays a key role in packaging of HIV

404 virions (von Schwedler et al., 2003). DDX54 is a 97-kDa RNA  
405 helicase (DP97) that interacts with estrogen receptor (ER) and  
406 represses the transcription of ER-regulated genes (Rajendran et  
407 al., 2003). A recent study by using chromatin immunoprecipita-  
408 tion (ChIP) assay combined with promoter microarray analysis  
409 showed that hepatocyte nuclear factor 4- $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), a mas-  
410 ter regulator of hepatocyte gene expression, interacts with the  
411 DDX54 gene promoter, together with Pol II (Odom et al., 2004).  
412 HNPRC is a member of heterogeneous nuclear ribonucleo-  
413 proteins (hnRNPs) involved in pre-mRNA processing, mRNA  
414 metabolism and transport (Nakagawa et al., 1986). Increasing  
415 evidence indicates that the 14-3-3 protein and its targets are  
416 widely distributed in various subcellular compartments, includ-  
417 ing the nucleus (Dougherty and Morrison, 2004; Meek et al.,  
418 2004).

419 STAC is a 47-kDa cytosolic protein that has a cysteine-rich  
420 domain (CRD) of the protein kinase C family in the N-terminal  
421 half (NTF), and a src homology three (SH3) domain in the  
422 C-terminal half (CTF), suggesting its function as an adapter  
423 on which divergent signaling pathways converge (Hardy et al.,  
424 2005; Suzuki et al., 1996). STAC is expressed predominantly  
425 in the brain with the distribution in a defined population of  
426 neurons (Suzuki et al., 1996). IP analysis of mutant and trun-  
427 cated forms argued against an active involvement of the most  
428 stringent motif RYYSSP (*pS172*) of STAC in its binding to  
429 14-3-3. The present observations indicated that the 14-3-3-  
430 interacting domain is located in the N-terminal segment span-  
431 ning amino acid residues 2-105 of STAC and the interaction is  
432 serine/threonine phosphorylation-independent.

433 In conclusion, protein microarray is a useful tool for rapid and  
434 comprehensive profiling of 14-3-3-binding proteins, although  
435 the validation of the results by different methods is highly impor-  
436 tant.

#### Acknowledgements

437 This work was supported by grants from Research on Psychi-  
438 atric and Neurological Diseases and Mental Health, the Ministry  
439 of Health, Labour and Welfare of Japan (H17-020), Research on  
440 Health Sciences Focusing on Drug Innovation, the Japan Health  
441 Sciences Foundation (KH21101), the Grant-in-Aid for Scien-  
442

443 tific Research, the Ministry of Education, Science, Sports and  
444 Culture (B2-15390280 and PA007-16017320), and the Program  
445 for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the  
446 National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), Japan.

#### 447 Appendix A. Supplementary data

448 Supplementary data associated with this article can be found,  
449 in the online version, at 10.1016/j.jneumeth.2005.09.015.

#### 450 References

- 451 Aitken A, Baxter H, Dubois T, Clokic S, Mackie S, Mitchell K, Peden A,  
452 Zemlickova E. 14-3-3 proteins in cell regulation. *Biochem Soc Trans*  
453 2002;30:351–60.
- 454 Benzinger A, Muster N, Koch HB, Yates 3rd JR, Hermeking H. Targeted  
455 proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced  
456 in cancer. *Mol Cell Proteomics* 2005;4:785–95.
- 457 Berg D, Holzmann C, Riess O. 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nat*  
458 *Rev Neurosci* 2002;4:752–62.
- 459 Chan SM, Ermann J, Su L, Fathman CG, Utz PJ. Protein microarrays for mul-  
460 ti-plex analysis of signal transduction pathways. *Nat Med* 2004;10:1390–6.
- 461 Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3 $\sigma$   
462 is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*  
463 1999;401:616–20.
- 464 Chen H-K, Fernandez-Funez P, Acevedo SF, Lam YC, Kaytor MD, Fernandez  
465 MH, Aitken A, Skoulakis EM, Orr HT, Botas J, Zoghbi HY. Interaction  
466 of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration  
467 in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* 2003;113:457–68.
- 468 Culleré X, Rose P, Thathamangalam U, Chatterjee A, Mullane KP, Pallas DC,  
469 Benjamin TL, Roberts TM, Schaffhausen BS. Serine 257 phosphoryla-  
470 tion regulates association of polyomavirus middle T antigen with 14-3-3  
471 proteins. *J Virol* 1998;72:558–63.
- 472 Dai J-G, Murakami K. Constitutively and autonomously active protein  
473 kinase C associated with 14-3-3  $\zeta$  in the rodent brain. *J Neurochem*  
474 2003;84:23–34.
- 475 Dougherty MK, Morrison DK. Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci*  
476 2004;117:1875–84.
- 477 Fanger GR, Widmann C, Porter AC, Sather S, Johnson GL, Vaillancourt  
478 RR. 14-3-3 proteins interact with specific MEK kinases. *J Biol Chem*  
479 1998;273:3476–83.
- 480 Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and  
481 regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:617–47.
- 482 Graeser R, Gannon J, Poon RYC, Dubois T, Aitken A, Hunt T. Regulation  
483 of the CDK-related protein kinase PCTAIRE-1 and its possible role in  
484 neurite outgrowth in Neuro-2A cells. *J Cell Sci* 2002;115:3479–90.
- 485 Hardy K, Mansfield L, Mackay A, Benvenuti S, Ismail S, Arora P, O'Hare  
486 MJ, Jat PS. Transcriptional networks and cellular senescence in human  
487 mammary fibroblasts. *Mol Biol Cell* 2005;16:943–53.
- 488 Haydon CE, Watt PW, Morrice N, Knebel A, Gaestel M, Cohen P. Identifica-  
489 tion of a phosphorylation site on skeletal muscle myosin light chain kinase  
490 that becomes phosphorylated during muscle contraction. *Arch Biochem*  
491 *Biophys* 2002;397:224–31.
- 492 Henriksson ML, Francis MS, Peden A, Aili M, Stefansson K, Palmer R,  
493 Aitken A, Hallberg B. A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on  
494 exoenzyme S that is functional in vivo. *Eur J Biochem* 2002;269:4921–9.
- 495 Ichimura T, Yamamura H, Sasamoto K, Tominaga Y, Taoka M, Kakiuchi  
496 K, Shinkawa T, Takahashi N, Shimada S, Isobe T. 14-3-3 proteins  
497 modulate the expression of epithelial Na<sup>+</sup> channels by phosphorylation-  
498 dependent interaction with Nedd4-2 ubiquitin ligase. *J Biol Chem*  
499 2005;280:13187–94.
- 500 Jin J, Smith FD, Stark C, Wells CD, Fawcett JP, Kulkarni S, Metanikov P,  
501 O'Donnell P, Taylor P, Taylor L, Zougman A, Woodgett JR, Langeberg  
502 LK, Scott JD, Pawson T. Proteomic, functional, and domain-based analy-  
503 sis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation  
504 and cellular organization. *Curr Biol* 2004;14:1436–50.

- Kawamoto Y, Akiguchi I, Nakamura S, Honjyo Y, Shibasaki H, Budka H. 14-3-3 proteins in Lewy bodies in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:245–53.
- Ku N-O, Liao J, Omary MB. Phosphorylation of human keratin 18 serine 33 regulates binding to 14-3-3 proteins. *EMBO J* 1998;17:1892–906.
- Layfield R, Fergusson J, Aitken A, Lowe J, Landon M, Mayer RJ. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease brains contain 14-3-3 proteins. *Neurosci Lett* 1996;209:57–60.
- Luk SCW, Ngai S-M, Tsui SKW, Fung K-P, Lee C-Y, Waye MMY. In vivo and in vitro association of 14-3-3 epsilon isoform with calmodulin: implication for signal transduction and cell proliferation. *J Cell Biochem* 1999;73:31–5.
- MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 2000;289:1760–3.
- MacKintosh C. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phospho-proteins regulate diverse cellular processes. *Biochem J* 2004;381:329–42.
- Malaspina A, Kaushik N, de Belleruche J. A 14-3-3 mRNA is up-regulated in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *J Neurochem* 2000;75:2511–20.
- Meek SEM, Lane WS, Piwnica-Worms H. Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J Biol Chem* 2004;279:32046–54.
- Michaud GA, Salcius M, Zhou F, Bangham R, Bonin J, Guo H, Snyder M, Predki PF, Schweitzer BI. Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol* 2003;21:1509–12.
- Nakagawa TY, Swanson MS, Wold BJ, Dreyfuss G. Molecular cloning of cDNA for the nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: a conserved gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2007–11.
- Obenaus JC, Cantley LC, Yaffe MB. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucl Acids Res* 2003;31:3635–41.
- Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, Fraenkel E, Bell GI, Young RA. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 2004;303:1378–81.
- Oksvold MP, Huitfeldt HS, Langdon WY. Identification of 14-3-3 $\zeta$  as an EGF receptor interacting protein. *FEBS Lett* 2004;569:207–10.
- Pozuelo Rubio M, Geraghty KM, Wong BH, Wood NT, Campbell DG, Morrice N, Mackintosh C. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J* 2004;379:395–408.
- Powell DW, Rane MJ, Chen Q, Singh S, McLeish KR. Identification of 14-3-3 $\zeta$  as a protein kinase B/Akt substrate. *J Biol Chem* 2002;277:21639–42.
- Powell DW, Rane MJ, Joughin BA, Kalmukova R, Hong J-H, Tidor B, Dean WL, Pierce WM, Klein JB, Yaffe MB, McLeish KR. Proteomic identification of 14-3-3 $\zeta$  as a mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 substrate: role in dimmer formation and ligand binding. *Mol Cell Biol* 2003;23:5376–87.
- Rajendran RR, Nye AC, Frasor J, Balsara RD, Martini PG, Katzenellenbogen BS. Regulation of nuclear receptor transcriptional activity by a novel DEAD box RNA helicase (DP97). *J Biol Chem* 2003;278:4628–38.
- Satoh J, Kuroda Y. Differential gene expression between human neurons and neuronal progenitor cells in culture: an analysis of arrayed cDNA clones in NTER2 human embryonal carcinoma cell line as a model system. *J Neurosci Meth* 2000;94:155–64.
- Satoh J, Yamamura T. Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein. *Cell Mol Neurobiol* 2004;24:793–814.
- Satoh J, Yamamura T, Arima K. The 14-3-3 protein  $\epsilon$  isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. *Am J Pathol* 2004;165:577–92.
- Schmidt AE, Miller T, Schmidt SL, Shiekhattar R, Shilatifard A. Cloning and characterization of the EAP30 subunit of the ELL complex that confers derepression of transcription by RNA polymerase II. *J Biol Chem* 1999;274:21981–5.
- Suzuki H, Kawai J, Taga C, Yaoi T, Hara A, Hirose K, Hayashizaki Y, Watanabe S. Stac, a novel neuron-specific protein with cysteine-rich and SH3 domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:902–9.

- 573 Tennagels N, Hube-Magg C, Wirth A, Noelle V, Klein HW. Expression, 580  
574 purification, and characterization of the cytoplasmic domain of the human 581  
575 IGF-1 receptor using a baculovirus expression system. *Biochem Biophys* 582  
576 *Res Commun* 1999;260:724–8. 583
- 577 van der Hoeven PCJ, van der Wal JCM, Ruurs P, van Blitterswijk WJ. Pro- 584  
578 tein kinase C activation by acidic proteins including 14-3-3. *Biochem J* 585  
579 2000;347:781–5. 586
- 580 van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GPH. 14-3-3 proteins: key regu- 587  
581 lators of cell division, signaling and apoptosis. *Bioessays* 2001;23:936–47. 588
- 582 Vidalain PO, Boxem M, Ge H, Li S, Vidal M. Increasing specificity in high- 589  
583 throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods* 2004;32:363–70. 600
- 584 von Mering C, Krause R, Snel B, Cornell M, Oliver SG, Fields S, Bork P. 601  
585 Comparative assessment of large-scale data sets of protein-protein inter- 602  
586 actions. *Nature* 2002;417:399–403. 603
- 587 von Schwedler UK, Stuchell M, Müller B, Ward DM, Chung HY, Morita E, 604  
588 Wang HE, Davis T, He GP, Cimborra DM, Scott A, Kräusslich HG, Kaplan 605  
589 J, Morham SG, Sundquist WI. The protein network of HIV budding. *Cell* 606  
2003;114:701–13. 607
- Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y. JNK phospho- 580  
rylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in 581  
the apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2005;7:278– 582  
85. 583
- Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M, Poser S, Wiltfang J, Windl O, Kret- 584  
zschmar HA, Weber T. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal 585  
fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt–Jakob disease. *Ann Neurol* 586  
1998;43:32–40. 587
- Zhai J, Lin H, Shamim M, Schlaepfer WW, Cañete-Soler R. Identifica- 588  
tion of a novel interaction of 14-3-3 with p190RhoGEF. *J Biol Chem* 589  
2001;276:41318–24. 600
- Zhang LV, Wong SL, King OD, Roth FP. Predicting co-complexed protein 601  
pairs using genomic and proteomic data integration. *BMC Bioinformat* 602  
2004;5:38–52. 603
- Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, 604  
Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Ger- 605  
stein M, Snyder M. Global analysis of protein activities using proteome 606  
chips. *Science* 2001;293:2101–5. 607

## 多発性硬化症と免疫調節細胞

Multiple sclerosis and regulatory cells

山村 隆 高橋和也 荒木 学

Key words : 多発性硬化症, 免疫調節細胞, NK細胞, NKT細胞

## はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は, 中枢神経系内に炎症性病変が多発し (数個~数10個以上), 視力低下, 脱力, 筋力低下, 感覚障害など様々な症状が繰り返して現れる難病である. 過去20年に及ぶ研究により, ミエリン塩基性蛋白などの自己抗原に反応する Th1 細胞 (自己反応性 T 細胞) が MS に関与することを示す実験結果が蓄積され<sup>1,2)</sup>, MS が自己免疫疾患であることは定説となった. MS は一般に寛解 (remission) と再発 (relapse) を繰り返す疾患であるが, その経過は症例ごとに大きく異なる. ステロイドや免疫抑制剤などの投薬なしで, 数年以上にわたる寛解を享受する場合があるのに対し, 毎月のように再発を繰り返し, 治療に苦慮する例もある.

感冒や膀胱炎に引き続いて再発が起こる場合は, 感染因子による自己反応性 T 細胞の活性化による再発と推察される. T 細胞の活性化には, 自己抗原と配列や構造の類似したペプチドが関与する可能性 (分子相同性仮説) と, Toll-like receptor を介した自然免疫系の活性化が関与する可能性がある<sup>3)</sup>. しかし, 先行感染がなく精神的なストレスなどで悪化する症例も多く, MS の寛解がどのように維持され, それがどのようにして破綻するのか, まだ不明な点が多い.

近年, 自己免疫疾患の病態を, 自己反応性 T 細胞と免疫調節細胞 (regulatory cell) のバランスで理解する研究者が増えてきた. 著者らの研究室では, MS の寛解期には, NK 細胞が Th2 サイトカイン IL-5 を過剰産生することを示し<sup>4)</sup>, 寛解の維持に免疫調節細胞が重要な貢献をする可能性を示した. しかし, まだ免疫制御機構の全体像が理解されているとはいえない. 本稿では, MS の病態制御に関連する免疫調節細胞のうち, NK 細胞, NKT 細胞, CD25<sup>+</sup>調節 T 細胞に焦点を絞り, MS 病態における免疫制御機構の役割を考察する.

## 1. NK 細胞

## a. NK2 細胞と MS

ヘルパー T 細胞が, その産生するサイトカインによって Th1 細胞と Th2 細胞に大別されるように, NK 細胞も NK1 細胞と NK2 細胞に分かれることが最近明らかにされた<sup>4-6)</sup>. NK1 細胞は IFN- $\gamma$  と IL-10 を産生し, NK2 細胞は IL-5 や IL-13 を産生する. また NK1 は CD95 分子を細胞表面に強く発現するのに対し, NK2 は弱く発現するという違いがある. 著者らは MS 患者の末梢血 NK 細胞が NK1 または NK2 に偏倚している可能性を検討した結果, 寛解期に限って NK 細胞が NK2 様の変化を呈していることを明らかにした<sup>4)</sup>. すなわち, MS 寛解期の NK 細胞は,

Takashi Yamamura, Kazuya Takahashi, Manabu Araki: Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

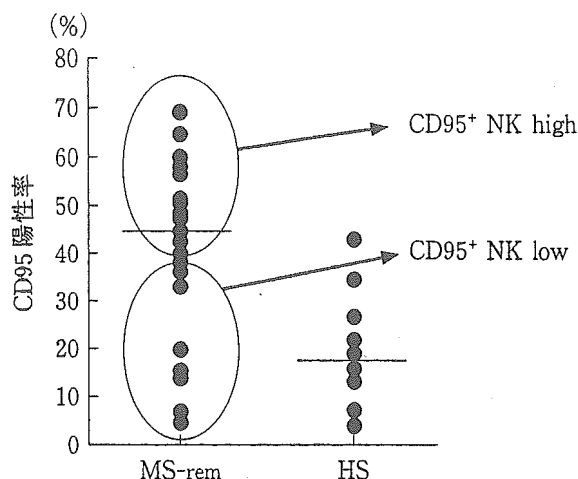


図1 NK細胞中のCD95<sup>+</sup>細胞の比率(%)  
—MS寛解期と健常者の比較—

健常者(HS)に比べると、MS寛解期(MS-rem)ではCD95<sup>+</sup>NK細胞の比率が高い(横線は平均値)。しかし、よく見ると、健常者と変わらないレベルの患者(CD95<sup>+</sup>NK low)と、明らかに高い患者(CD95<sup>+</sup>NK high)に分かれる。

IL-5のmRNA発現が亢進し、PMA/ionomycinで刺激すると大量のIL-5を産生した。しかし、IFN- $\gamma$ 産生については亢進も低下もみられなかった。また、MS寛解期のNK細胞は表面にCD95を弱く発現する傾向がみられた。更に培養NK2細胞は、Th1細胞の誘導を抑制することもわかった。以上から、MSの寛解期のNK細胞の変化(NK2細胞様変化)は、自己反応性Th1細胞の抑制に有利な変化であり、MSの再発防止に貢献するものと考えられる<sup>4)</sup>。

#### b. MS寛解はCD95<sup>+</sup>NK細胞の頻度によって2群に分かれる

末梢血NK細胞の中でCD95を弱く発現する細胞の比率を調べると、寛解期のMS患者は、CD95<sup>+</sup>NK細胞の多いグループ(CD95<sup>+</sup>NK high: 以下highと略)と少ないグループ(CD95<sup>+</sup>NK low: 以下lowと略)に分かれる(図1)<sup>2)</sup>。一方、健常者とMS再発は、すべてlowに分類される。

high群ではNK細胞がNK2に偏倚し、特に活発に自己反応性T細胞を抑制していることが推測される。このグループでは自己反応性T細胞の数が多いが、NK細胞の働きによって寛解が辛うじて維持されているのではないかと仮

説をたてた<sup>2)</sup>。これを検証するために、患者末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cells: PBMC)をミエリン塩基性蛋白(myelin basic protein: MBP)で8時間刺激し、IFN- $\gamma$ 産生細胞数をフローサイトメーターで測定する方法を開発した。この方法で検出できるIFN- $\gamma$ 産生細胞は、MSの標的自己抗原であるMBPに迅速に反応するメモリーT細胞である。

健常者あるいはMS患者のPBMCでは、このアッセイでIFN- $\gamma$ 産生細胞はほとんど検出されなかった。つぎにPBMCからあらかじめNK細胞を除いておいてから実験を行ったところ、high群のMS患者ではIFN- $\gamma$ 産生細胞が明瞭に検出されたが、low群では検出されなかった(図2)。この結果は、high群ではMBPに反応するメモリーT細胞の頻度が高いが、NK細胞によって抑制されていることを意味し、著者らの仮説の妥当性を支持する。また、MBP特異的なT細胞株を使った実験結果も、high群のNK細胞は、Th1細胞誘導を強く制御することを示した。

#### c. 結果の解釈と臨床的な意義

以上の結果は、high群では、脳の中で暴れるテロリスト(自己反応性Th1メモリー細胞)の数が多いが、それを取り締まる武装警察官(CD95<sup>+</sup>NK細胞)の数も多いので、何とか社会の平安が維持されている状態に喩えられる。しかし、high群では、何らかの理由で警察官の士気が低下すると、あっという間に事件(すなわち再発)が起こる。このような不安定な状態を、高橋はsmoldering remissionと呼ぶことを提唱した<sup>2)</sup>。一方、low群におけるMSの寛解は、犯罪者の数が少ないので、警察官も少なくてよいという非常に安定した状態である。また症例数は少ないが、長期間経過を観察した患者では、highからlow、あるいはlowからhighにスイッチすることがある。これは、MS病態が時間を追って変化することを示すものと考えている。

MSの再発は精神的なストレスの強くかかった状態で多くみられる。また、発病の前に強いストレスに曝されていたという患者は多い。ストレスによってNK細胞の数や活性が低下することが報告されているので、精神的ストレスに



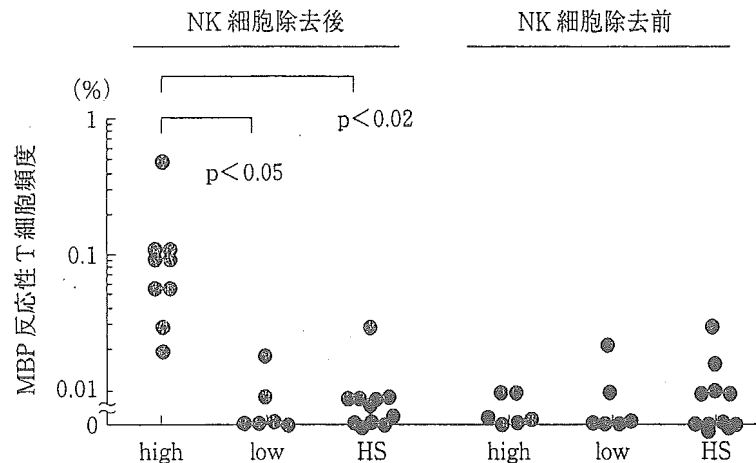


図2 NK細胞除去前後のMBP反応性T細胞の検出頻度(%)

—健常者, CD95<sup>+</sup> NK low, CD95<sup>+</sup> NK highの比較—

健常者(HS)またはCD95<sup>+</sup> NK low(low), CD95<sup>+</sup> NK high(high), それぞれのPBMCをMBPで8時間刺激し, インターフェロン $\gamma$ 産生細胞数をフローサイトメーターで評価した(CD4<sup>+</sup>T細胞中のインターフェロン $\gamma$ 陽性細胞の頻度). NK細胞除去前には, MBPに迅速に反応するメモリーT細胞の検出頻度は, HS, low, highいずれにおいても極めて低い. しかし, NK細胞を除去したサンプルでは, high群で有意に高頻度の陽性細胞が検出できた.

よるNK細胞の変化(警察官の士気低下)で再発の起こることがあるかもしれない. 免疫疾患においても心のケアが重要なゆえである. MSの予後を良くするには, 寛解をできるだけ長期間維持することが重要である. もし寛解が生涯維持できれば, それは治癒ということである. 著者らはNK細胞の性質を詳しく研究すれば, 良い治療法が開発できるかもしれないと考えている.

## 2. NKT細胞

### a. NKT細胞の性質

NKT細胞はヒトではVa24-J $\alpha$ QインバリアントTCR鎖を発現し, ペプチドでなく糖脂質を認識するユニークなT細胞である. 糖脂質は多様性のないMHC様分子であるCD1dに結合し, NKT細胞に提示される<sup>7,8)</sup>. NKT細胞は, 免疫制御性サイトカインを迅速に, かつ大量に産生する重要な細胞である. 近年CD4を表面に発現するNKT細胞と発現しないNKT細胞では, 機能に大きな差のあることが明らかになった. CD4<sup>-</sup>NKT細胞は, 主に炎症性サイトカインを産生し, 機能的にはNK細胞に近いのに対し,

CD4<sup>+</sup>NKT細胞はTh1とTh2サイトカインの両方を産生する. したがって, 免疫調節において重要な役割を果たすのは, 主にCD4<sup>+</sup>NKT細胞であると考えてもよい<sup>9)</sup>.

### b. MSにおけるNKT細胞の変化

自己免疫疾患の多くでNKT細胞数の減少が報告されている. MSにおいてもNKT細胞は全体として減少する傾向にある<sup>10,11)</sup>. 特に寛解期において減少が著しい. しかし, CD4<sup>-</sup>NKT細胞での減少が著しいのに対し, CD4<sup>+</sup>NKT細胞は相対的に保存されている<sup>11)</sup>. また, 機能的には, CD4<sup>+</sup>NKT細胞のIL-4産生能が, MS寛解期には著明に亢進していることがわかっている. 再発時には, 細胞数の減少は目立たなくなり, CD4<sup>+</sup>NKT細胞のIL-4産生亢進も抑制される.

### c. 結果の解釈と臨床的な意義

上述したようにMSの寛解期で主に減少するCD4<sup>-</sup>NKT細胞は, 主にTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインを産生する. したがって, その数の減少は, MSの寛解維持にとっては都合のよい変化ととらえられる. またCD4<sup>+</sup>NKT細胞がIL-4を活発に産生することは, やはり寛解の維持にとって有利な変化である. したがって,

NKT細胞もNK細胞と同様に、MSの寛解期には、その維持に有利なように変化していると考えられる。

### 3. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>調節性T細胞

#### a. ヒトCD25<sup>high</sup>T細胞

CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>調節性T細胞が自己寛容(self-tolerance)において重要な役割を果たし、その数や機能の異常によって様々な自己免疫現象が観察されることは一般の常識になった<sup>12)</sup>。近年では、この細胞のマーカー分子としてFoxp-3が同定され、更に新しい知見が集積されている。MSの動物モデルにおいても、この細胞が病気の抑制にかかわることが証明されている。しかし、これまで発表された知見の多くが、マウスの実験によるものであり、ヒトにおいてこの細胞がどの程度重要であるか、まだ不明な点が多い。

様々な抗原に曝露されているヒトでは、マウスと異なり、CD25<sup>+</sup>T細胞の多くは免疫制御活性をもたない活性化細胞である。HaflerらはCD25<sup>+</sup>T細胞の中でも、特にCD25の発現レベルの高い細胞(CD25<sup>high</sup>T細胞)のみが免疫制御活性をもつことを示した<sup>13)</sup>。マウスのCD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞に相当するのはヒトではCD25<sup>high</sup>T細胞であることを意味し、ヒトでの研究を容易にする貢献と考えられる。

#### b. MSにおけるCD25<sup>high</sup>T細胞の変化

現在のところHaflerのラボの結果しか発表されていないが、MSでは健常人と比べてCD25<sup>high</sup>T細胞の免疫抑制活性が低下しているようである<sup>14)</sup>。また彼らはsingle cell sortingで評価したところ、MSではCD25<sup>high</sup>T細胞クローンの頻度が少ないと報告している。しかし、新鮮な

PBMCを解析した結果は、MSでもCD25<sup>high</sup>T細胞の数が減っておらず、複数の施設における追試確認が必要と思われる。

#### c. 結果の解釈と臨床的な意義

NK細胞とNKT細胞についてはMSの寛解を維持するような変化がみられたが、CD25<sup>high</sup>T細胞の機能低下は明らかにMS病態を悪化させるものである。このような変化がいつ頃からみられるのか、これを矯正する方法はあるのかなど、臨床免疫学において興味ある問題が数多く残されている。細胞治療やCD25<sup>high</sup>T細胞を刺激するペプチド療法などの検討が進んでいる。

### おわりに

一昔前には、自己免疫疾患では免疫調節機能の多くが低下し、これが発病に関与しているとされていた。しかし、著者らの研究結果が示すように、MSが安定しているときには、NK細胞やNKT細胞の免疫調節機能はむしろ亢進している。一方、CD25<sup>high</sup>T細胞の機能低下は、病気が安定しているかどうかには関係ないようである。そうだとすれば、CD25<sup>high</sup>T細胞の変化はMSの発症に本質的なものであり、NK細胞とNKT細胞の変化は、自己免疫疾患の発症に抵抗する生体のホメオスターシスの現れと理解することも可能である。確かに免疫調節機構は多層性構造をなし、一部が破綻しても、他のシステムがそれを補うように働くと考えるのは合理的であろう。現在与えられた情報は限られているが、ヒトの自己免疫疾患MSにおいて、自己反応性T細胞と免疫制御細胞が激しい戦いをやっていることは確かであり、新しい治療戦略を考えるうえにおいて、この事実を忘れることはできない。

### ■ 文 献

- 1) Bielekova B, et al: Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 6: 1167-1175, 2000.
- 2) Takahashi K, et al: The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 127: 1917-1927, 2004.
- 3) Tejada-Simon MV, et al: Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53: 189-197, 2003.
- 4) Takahashi K, et al: Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 107:

- R23–R29, 2001.
- 5) Peritt D, et al: Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* **161**: 5821–5824, 1998.
  - 6) Katsumoto T, et al: STAT6–dependent differentiation and production of IL–5 and IL–13 in murine NK2 cells. *J Immunol* **173**: 4967–4975, 2004.
  - 7) Godfrey DI, et al: NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* **21**: 573–583, 2000.
  - 8) Brigl M, Brenner MB: CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* **22**: 817–890, 2004.
  - 9) 山村 隆 : NKT 細胞と自己免疫. 調節性 CD4<sup>+</sup> NKT 細胞の役割. *Molecular Medicine* **40**: 562–568, 2003.
  - 10) Illés Z, et al: Differential expression of NK T cell V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol* **164**: 4375–4381, 2000.
  - 11) Araki M, et al: Th2 bias of CD4<sup>+</sup> NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* **15**: 279–288, 2003.
  - 12) Fehervari Z, Sakaguchi S: CD4<sup>+</sup> Tregs and immune control. *J Clin Invest* **114**: 1209–1217, 2004.
  - 13) Baecher–Allen C, et al: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* **167**: 1245–1253, 2001.
  - 14) Vaglietta V, et al: Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* **199**: 971–979, 2004.

## 多発性硬化症における免疫抑制薬の使い方

山 村 隆\*

### 要 旨

多発性硬化症 (MS) は代表的な自己免疫性神経疾患であり, さまざまな中枢神経症状を呈し慢性の経過をとる. MS の長期的な予後を改善するためには, 積極的な治療的介入が必要である. 国によって状況は異なるが, 先進諸国では IFN $\beta$  やコパキソン (copaxon) の長期投与が普及している. 免疫抑制薬の投与を考慮するのは IFN $\beta$  の効果が認められない症例であり, 特に比較的短期間で神経症状が進行する症例が対象となる. 最近欧米では MS の重症例に対するミトキサントロンの有効性が強調されている.

### はじめに

多発性硬化症 (MS) は, 中枢神経系に炎症性脱髄病変が多発する難病であり, 今日では臓器特異的自己免疫疾患に分類されている. 脱髄病変のできる場所によって, 視力低下, 感覚障害, 記憶力低下などのさまざまな症状が現れる. 主に若年者を冒す疾患であるが, 最近では小児や 60 歳以上の MS を診療する機会も決して少なくない. 欧米に比較してアジアやアフリカでは少ないが, 最近の調査では日本国内の患者数は増加の一途をたどっている. 診断能力の進歩も関係するが, 環境要因の変化が患者数の増加をもたらしている可能性が推測される. 古い調査では有病率は 3~5 人/10 万人と報告されているが, 現在では 10 人/10 万人以上の患者が登録さ

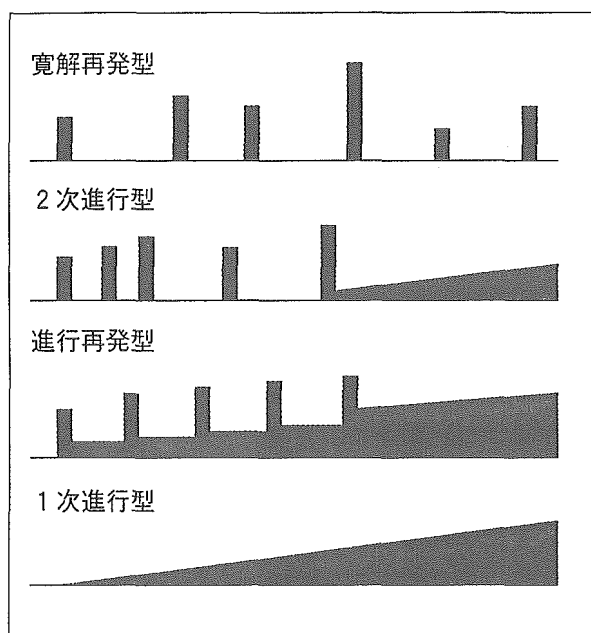
れている.

MS の典型例では, 再発と寛解を繰り返す (再発寛解型 MS: remitting-relapsing MS) (図 1). 再発回数は年に 1~2 回の例が多いが, 6~12 回に及ぶ症例もある. 再発と寛解を 5 年から 10 年ほど繰り返し, ある時点から明瞭な再発はなく症状がどんどん進行していく病型を, 2 次進行型 MS (secondary progressive MS) と呼ぶ. このタイプの MS では, 慢性期には炎症反応の関与は少なく, 神経細胞に長年蓄積した障害の結果として生じる神経変性が重要であると言われている<sup>1)</sup>. また, 再発を繰り返すごとに神経学的な後遺症を残し, 比較的急速に ADL が悪化していく症例がある. このような患者を進行再発型 MS (progressive-relapsing MS) と呼ぶ<sup>2)</sup>. 発症当初から明確な再発を認めず進行する病型は, 1 次進行型 MS (primary progressive MS) である. 1 次進行型は我が国では MS 全体の 5%程度と言われるが, 欧米では

\* 国立精神・神経センター神経研究所 部長

キーワード: 多発性硬化症, 免疫抑制薬,  
ミトキサントロン

図1 多発性硬化症の各種病型



横軸は時間経過を示す。発病してから最初の4年程度の代表例の経過を示す。実際には分類が困難な症例も多い。

表1 ステロイドパルス療法

処方例	
メチルプレドニゾロン (ソル・メドロール®)	1,000mg
ガスター®	1A
生理食塩液	100ml

約1時間で点滴静注する。同じ点滴を3日間連日で行う(1クール)。

(参考)

- ・症状の改善が十分でない場合には、4～7日の間隔を置いて、2クール目を追加する。それでも効果が見られない場合は、3クール目を追加するか、血液浄化療法を考慮する。
- ・ステロイドパルス終了後は、経口ステロイド療法を開始し、数週間程度で漸減することが多い。
- ・比較的軽い再発では、ステロイド量を半量(500mg)に減らしても良い。
- ・重症例では、1クール5日間とすることがある。

10%程度に達する。

MSは病変の分布状態によって、視神経脊髄型(opticospinal MS)、大脳型(conventional MS)などにも分類できる。視神経脊髄型はアジア人や黒人に比較的多い。しかし、

日本では過去30年で視神経脊髄型の頻度がかなり減少している(現在は20%程度)。その原因は、おそらく環境要因に求められるべきであろう。

### 多発性硬化症(MS)治療の動向

再発時(急性増悪時)の水溶性ステロイド薬のパルス療法は、広く世界中で普及している(表1)。病変部位の炎症反応を抑制するとともに、活性化T細胞のアポトーシスを誘導する効果もある。症状が安定している慢性期については、以前は治療の必要がないという考えもあったが、最近ではIFN $\beta$ やコパキソン(copaxon, 日本では未発売)の継続的な自己注射が推奨されている。IFN $\beta$ は再発寛解型MSと2次進行型MSで認可されており、再発頻度を減少させ、長期的な予後を改善させる効果がある。治療薬ではなく、病気を修飾する薬(disease modifying agent)と位置づけられている。重症例の多い欧米では普及率は50%程度であり、発病後できるだけ早期に使用する傾向がうかがえる。一方、国内におけるIFN $\beta$ の普及率は約20%程度である。IFN $\beta$ 治療の初期には、発熱、皮膚潰瘍などの副作用が見られることが多い(表2)。治療開始に当たっては専門医によるきめ細かい指導が必要である。治療開始時に副作用を適切にコントロールできない場合には治療継続が困難になることが多い。実際、10～30%のドロップアウトが見られる。中には、肝障害、高度の白血球減少、高度のうつ病などにより治療中止がやむをえない場合もあるが、鎮痛薬、解熱薬の処方や十分な説明で対処できることのほうが多い。IFN $\beta$ の有効な例(効果が実感できる例)は30～40%程度であり、約50%では治療効果が認められない(ノンレスポナー)。このようなノンレスポナーを早期に見分けられる方法が開発されると良いが、まだ研究の途上である。

表2 IFN $\beta$ の副作用

発熱
頭痛
注射部位反応（発赤、潰瘍など）
抑うつ
肝障害
白血球減少
無月経

（注意事項）

- ・流産を誘発する可能性がある。
- ・漢方薬との併用で肺線維症の可能性

日本で現在利用できる IFN は糖鎖修飾のない IFN $\beta$ -1b（商品名 ベタフェロン）であり、隔日に皮下投与する必要がある。糖鎖のある IFN $\beta$ -1a は週に1回の筋肉注射で、海外では普及しているが日本では承認が遅れている。コパキソンは連日皮下注射が必要であるが、副作用が少ない。

T細胞の接着分子（VLA-4）を認識するヒト型抗体 natalizumab は、月1回の投与で優れた効果が得られるので<sup>3)</sup>、MS 診療において画期的な薬剤となる可能性が高い。米国食品医薬品局（FDA）で最近認可されたところであり、日本で利用できるまでには時間がかかりそうである。

### MS に対する免疫抑制薬の使用状況

disease modifying agent が経済的な理由などで利用できない環境（低開発国など）では、疾患の予後を改善する目的で免疫抑制薬がしばしば処方されている。特にミトキサントロンが世界各国で最近かなり普及している。日本では IFN $\beta$ -1b が利用できるため、免疫抑制薬の使用頻度は減少している。しかし、IFN $\beta$  の有効性のもとと期待できない症例（進行再発型 MS、1次進行型 MS）、IFN $\beta$  の投与にもかかわらず再発を繰り返す寛解再発型 MS や、IFN $\beta$  が副作用などのために使用できない症例などに対して処方されている。

活動性の高い進行再発型 MS（再発回数が多く、神経症状が季節単位で悪化）に対して、免疫抑制薬とステロイド薬、免疫抑制薬と IFN $\beta$  の組み合わせなども検討されている<sup>4)</sup>。

### 免疫抑制薬の適応

MS 治療における選択肢が増えた今日では、最初から免疫抑制薬を投与することはまれである。すなわち劇症型 MS を除いて、急性期はステロイドパルス療法で対応し、病態が安定すれば IFN $\beta$  の投与を考慮するというやり方が標準的である。欧米では IFN $\beta$  投与をできるだけ早期に開始すべきだと主張する専門家が多いが、日本人の MS では再発回数の少ない症例も多いので、専門医が総合的に判断を下す必要がある。

ステロイドパルス療法を3クールまで行っても急性期の神経症状が完全には回復しない場合には、血液浄化療法を追加したほうが良い場合がある<sup>4)</sup>。以上のような方針をとっても数ヶ月から半年間経過の間に何度も再発を繰り返すか、再発がなくとも ADL が数ヶ月ごとに悪化していく場合には、免疫抑制薬への切り替え、あるいはその併用を考える。白血球減少症や不妊などの重篤な副作用があるが、MS 発病後数年間のコントロールが悪いと早期に車椅子生活になる。この事実を重視すべきであり、いたずらに治療を遅らせるべきではない。

### MS 治療に使用される免疫抑制薬

MS 患者の多い欧米では、多くの免疫抑制薬について MS 治療薬としての有効性が評価されてきた。副作用と効果のバランスの観点からある程度の評価を得た薬剤として、アザチオプリン、シクロホスファミド、メトトレキサート、ミトキサントロンなどがある<sup>5)</sup>。なお、国、施設によって使用される薬剤はかなり異なり、例えば米国東海岸ではシクロホ

表3 ミトキサントロン療法

<p>I. 治療の前提</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・治療に当たっては経験のあるセンターと協力関係を確立することが望ましい。</li> <li>・胸部X線などで感染症の有無を確認する。</li> <li>・心エコーによる心機能評価。</li> <li>・起こりうる副作用（心機能低下、不妊、無月経、悪性腫瘍など）を説明する。</li> </ul> <p>II. 投与方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・経静脈カテーテルを留置する。</li> <li>・制吐薬をワンショットで投与する（必要に応じてセロトニン受容体 5-HT<sub>3</sub> 拮抗薬などを使う）。</li> <li>・白血球数が 4,000&lt;を確認。</li> <li>・ミトキサントロンを 30～90 分かけて投与する。</li> </ul> <p>III. 投与計画</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・標準量（12mg/m<sup>2</sup>）の投与を 3 ヶ月ごとに繰り返す（必要があればステロイドパルスを併用する）。</li> <li>・劇症型 MS では、最初の 3 回は 1 回投与量 12 mg/m<sup>2</sup> で、4 週ごとの投与とする。</li> <li>・白血球数は投与開始 2 週間後に 2,000～3,000 の範囲になるように配慮する。</li> </ul> <p>IV. 参考事項</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・感染症のある患者には禁忌。</li> <li>・吐き気の強い場合には、5-HT<sub>3</sub> 拮抗薬とステロイドを併用する。</li> <li>・1 年以上治療を継続する場合には、1 回の投与量を減量することを考慮する。生涯の投与量は 140mg/m<sup>2</sup> を超えないこと。</li> <li>・心エコーで年に 1 回心臓の機能を評価すること。</li> </ul>
--

スファミドの処方例が多いようである。シクロホスファミドのパルス療法（ステロイドパルスと併用）は Th2 偏倚を誘導する効果があり、重症例では試みる価値があるが、脱毛、膀胱炎や白血球減少などの強い副作用が現れる<sup>6)</sup>。IFN $\beta$  の普及につれてアザチオプリンが処方される機会は減少しているが、副作用のために IFN $\beta$  が処方できない例では今日でも有用である。なお、免疫抑制薬は炎症反応の制御法として位置づけられる。MRI でガドリニウム造影病変が確認できる患者に処方することが望ましい。

#### ミトキサントロン

ミトキサントロンは元来抗癌剤として開発されたものであるが、強い免疫抑制作用を有する。動物モデルの研究により MS への有効性が示唆され、ヨーロッパにおける第Ⅲ相

臨床試験などの結果<sup>7)</sup>に基づき、2000 年 10 月には米国 FDA により MS の治療薬として正式に認可された。本薬剤は T 細胞と B 細胞の両方に効果を示し、TNF $\alpha$ 、IL-2、IFN $\gamma$  などのサイトカインを強く抑制する。心臓に対する毒性などのため、生涯の総投与量は 140mg/m<sup>2</sup> 以内にとどめる。ドイツ人による第Ⅲ相臨床試験で用いられた投与方法は<sup>7)</sup>、12mg/m<sup>2</sup> または 5 mg/m<sup>2</sup> の 3 ヶ月ごとの投与を 2 年間継続するというもので、いずれの用量についてもプラセボに対して有意な疾患抑制効果が確認された（12mg/m<sup>2</sup> で p<0.0001；5 mg/m<sup>2</sup> では p<0.005）。また別の第Ⅱ相臨床試験では、ステロイド薬（1 g のメチルプレドニゾン）と 20mg のミトキサントロンが月 1 回、計 6 回投与され、顕著な効果が見られた（p<0.001）。欧米や一部のアジア地域では、治療に反応せず増悪を続

ける症例の治療法として普及しつつある。しかし心毒性などのため、治療を開始するに当たってはさまざまな配慮が必要である。ドイツの神経内科医を対象としたプロトコルを表3に紹介した。

### 多剤併用療法

単剤で病態の十分なコントロールができない場合に、免疫抑制薬を組み合わせた多剤併用療法を行う。IFN $\beta$  とメトトレキサートの併用、IFN $\beta$  とアザチオプリンの併用、ミトキサントロンと定期的ステロイドパルス療法の併用などについて、その有効性が検討されているところである<sup>8)</sup>。

### おわりに

日本人 MS の予後は比較的良好であるため、免疫抑制療法の重要性が十分認識されていないきらいがある。しかし、IFN $\beta$  でコントロールできない症例や、進行の速い重症例では免疫抑制薬の投与が必要になる。本稿が MS 診療の参考になれば幸いである。

### 文 献

- 1) Zamvil SS, et al: Diverse targets for interven-
- tion during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* 38: 685-688, 2003.
- 2) Tullman MJ, et al: Clinical characteristics of progressive relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler* 10: 451-454, 2004.
- 3) Miller DH, et al: A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 348: 15-23, 2003.
- 4) Ruprecht K, et al: Plasma exchange for severe optic neuritis: treatment of 10 patients. *Neurology* 63: 1081-1083, 2004.
- 5) Hommes OR, et al: Clinical practice of immunosuppressive treatments in multiple sclerosis: results of a second international questionnaire. *J Neurol Sci* 223 (1): 65-67, 2004.
- 6) Weiner HL, et al: Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects. *Mult Scler* 8: 142-154, 2002.
- 7) Hartung HP, et al: Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360: 2018-2025, 2002.
- 8) Jeffery DR: Use of combination therapy with immunomodulators and immunosuppressants in treating multiple sclerosis. *Neurology* 63 (Suppl 6): S41-46, 2004.

---

## Treatment of Progressive Multiple Sclerosis with Immunosuppressants

Takashi Yamamura

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry



# 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

佐藤 準一

日本神経免疫学会機関誌 神経免疫学 Vol.13 No.2

2005

## <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>

### 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

佐藤 準<sup>1,2)</sup>

### DNA Microarray Analysis Clarifies Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis

Jun-ichi Satoh<sup>1,2)</sup>

#### Abstract

Multiple sclerosis (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. MS shows a great range of phenotypic variability in terms of the disease course, lesion distribution, therapeutic response to IFN $\beta$ , and pathological aspects, suggesting that MS is a kind of neurological syndrome caused by different immunopathological mechanisms leading to the final common pathway that provokes inflammatory demyelination. DNA microarray technology is a novel approach to systematically monitoring the expression of a large number of genes. It gives us new insights into the complexity of molecular interactions promoting the autoimmune process in MS. By microarray analysis followed by hierarchical clustering analysis, we found that T cell gene expression profiling is valuable to identify distinct subgroups of MS associated with differential disease activity and therapeutic response to IFN $\beta$ . These observations suggest that microarray analysis is highly valuable for designing personalized treatment for heterogeneous populations of MS.

**Key words :** DNA microarray, gene expression profile, multiple sclerosis, personalized medicine

#### はじめに

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、様々な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。MS 発症機序は十分解明されていないが、多数の遺伝的要因と環境因子の存在下で、脳炎惹起性髄鞘抗原に分子相同性を示すウイルスなどの外来抗原を認識し活性化した自己反応性 CD4<sup>+</sup> 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、マクロファージ・ミクログリアを活性化して TNF $\alpha$  などの炎症増強因子の産生を誘導し、脱髄が惹起されると考えられている (自己免疫機序)<sup>1)</sup>。回復期には髄鞘再生を認めるが、炎症が高度で遷延化すると髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。

近年欧米・本邦で実施された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 MS 再発抑制効果が立証され、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 $\beta$  が全く効果を示さない症例も多い<sup>2,3)</sup>。すなわち MS は均一な疾患ではなく多様な病態 (phenotypic heterogeneity) を呈する疾患群である可能性が高い。実際 MS は臨床経過から再発寛解型 (relapsing-remitting MS; RRMS), 2 次進行型 (secondary-progressive MS; SPMS), 1 次進行型 (primary-progressive MS; PPMS), 病巣分布から脳型 (conventional MS; CMS) と視神経脊髄型 (opticospinal MS; OSMS),

1) 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部  
2) 明治薬科大学薬学部生命創薬科学科生命情報解析学

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP  
Department of Bioinformatics and Neuroinformatics, Meiji Pharmaceutical University

IFN $\beta$  治療反応性から responder (RMS), nonresponder (NRMS) に分類される。病理学的にも T 細胞浸潤, 抗体沈着, oligodendrocyte apoptosis の観点から 4 型に分類される<sup>4)</sup>。近年 MS の免疫病態の多様性を解析する手法として遺伝子アレイが用いられている。ヒトゲノムプロジェクトの完結によりヒト全遺伝子の塩基配列が解明された結果, 遺伝子アレイ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・網羅的・系統的に解析可能になった。RNA 発現解析を transcriptome 解析, タンパク質発現解析を proteome 解析と呼ぶ。網羅的発現解析 (global expression analysis) により, 従来の少数分子に焦点を向けた研究 (pinpoint study) では予期しなかった遺伝子群の MS 発症機序における役割が次々明らかになった<sup>5)</sup>。また治療による遺伝子発現変化を経時的に解析することにより薬物反応性遺伝子を同定し (薬理ゲノミクス pharmacogenomics), 有効性や副作用を治療開始前に予知することにより, テーラーメイド医療 (personalized medicine) に道が開かれた。本稿では DNA マイクロアレイ解析の基本原則と MS の免疫病態解析における応用に関して最近の知見を概説する。

### 1. DNA マイクロアレイ解析の基本原則

遺伝子アレイはスライドガラスやナイロン膜などの基盤上に, 機能既知または未知の数千・万の cDNA または oligonucleotide が貼付けてあるチップである。主として

cDNA をスポッターで基盤上にスポットしてある DNA マイクロアレイ (DNA microarray) と光オリゴヌクレオチド合成により基盤上で直接高密度の oligonucleotide を伸長合成している GeneChip (Affymetrix) に分類される (表 1)<sup>6)</sup>。スライドガラスを DNA microarray, ナイロン膜を DNA macroarray と総称することもある。最近では約 3,000 種類のタンパク質をスライドガラスに固定してあるプロテインチップ (protein microarray) も普及しており, タンパク質間相互作用 (interactome) やシグナル伝達系の網羅的解析に用いられている<sup>7)</sup>。遺伝子アレイは遺伝子多型・変異解析にも応用可能であるが本稿では割愛する。

遺伝子アレイ解析ではまず遺伝子発現レベルの異なる 2 種類以上の細胞・組織, 例えば IFN $\beta$  投与前後の細胞などから mRNA を抽出し増幅する (図 1)。DNA マイクロアレイでは一般的に別々の蛍光色素 (Cy3, Cy5) でラベルした cDNA または cRNA を作成して同一チップ上で競合的ハイブリダイゼーションを行い, 2 色法と呼ばれる。GeneChip では in vitro transcription (IVT) により cDNA から biotin 標識 cRNA を作成, fragment に切断してハイブリダイゼーションを行い, streptavidin-phycoerythrin (SAPE) を添加して蛍光標識する。GeneChip では 1 サンプルに 1 枚のアレイが必要で, アレイ間の比較になる。どちらの場合もスキャナーで蛍光シグナルを検出し, 得られたデータ (dataset) を正規化 (normalization) して統計学的検定を行い, サンプル間の遺伝子発現プロファイル (gene expression profile) を比較解析する。同

表 1 cDNA microarray と GeneChip の比較

	cDNA/Oligonucleotide Microarray	GeneChip
基盤	スライドガラス (microarray) またはナイロン膜 (macroarray)	半導体チップ
固定化法	スポッティングまたは化学合成	オンチップフォトリソグラフ合成
遺伝子	300–1000 bp cDNA or 30–80 mer oligonucleotide	25 mer oligonucleotides of perfect match (PM) and mismatch (MM)
集積度	40,000/slide 程度	>500,000/chip
Tm	不均一	一定
蛍光標識	2 色法 (Cy3, Cy5)	単色法
定量原理	競合的ハイブリダイゼーションによる比較	個々のチップのデータを正規化して比較
代表的なヒト遺伝子発現解析用アレイ (遺伝子数; Commercial Supplier)	Whole Human Genome G4112A Array (41,000; Agilent), Human Whole Genome Bioarray (55,000; Amersham)	Human Genome U133 Plus 2.0 Array (47,000; Affymetrix)
カスタム性	高い 汎用マイクロアレイスキャナーが使用可能	低い 専用のハイブリダイゼーションオープンや洗浄装置とスキャナーが必要

文献 6 より引用改変。

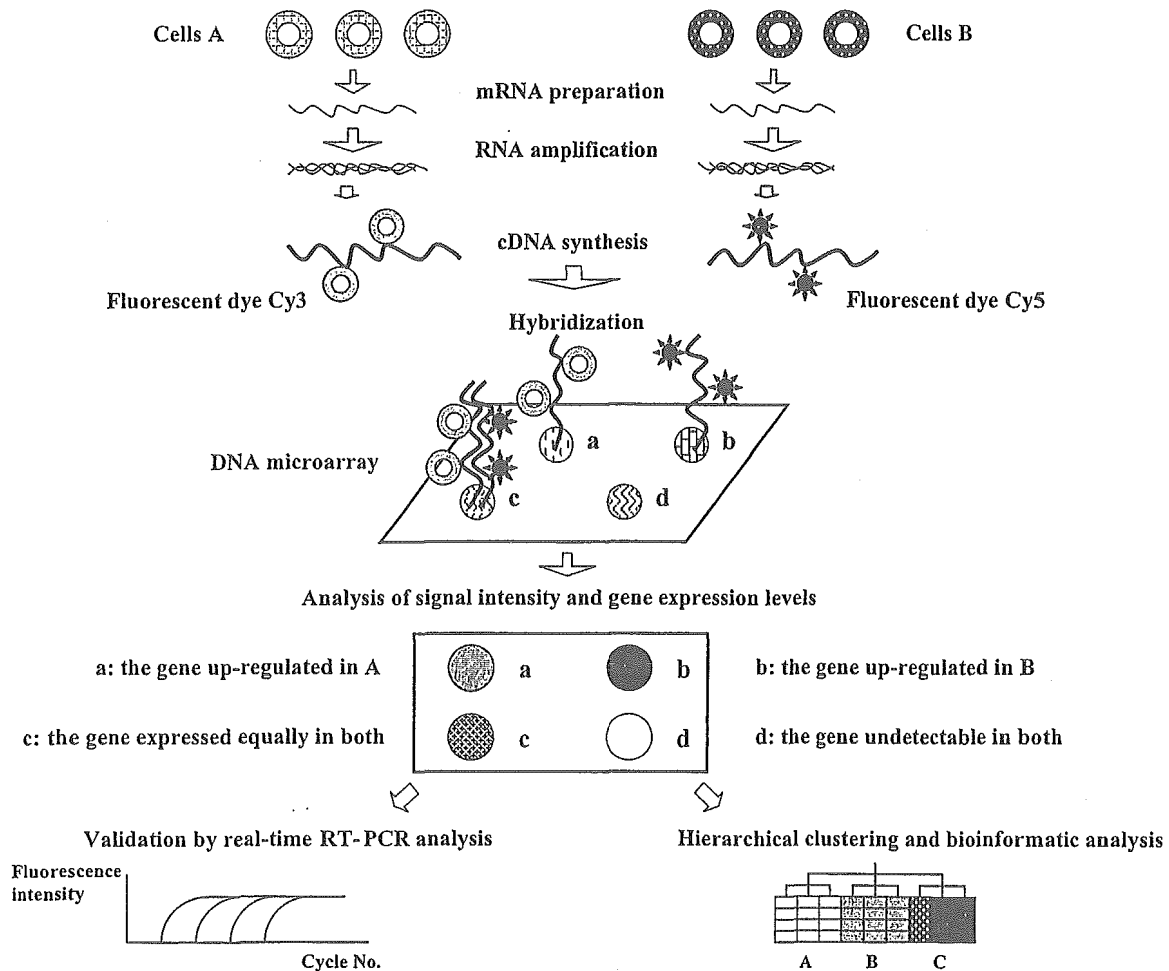


図1 DNA マイクロアレイ解析の概要。

2種類の細胞から mRNA を抽出増幅し、別々の蛍光色素 (Cy3, Cy5) でラベルした cDNA probe を作成して、cDNA がスポットされたチップ上で競合的ハイブリダイゼーションを行う。スキャナーで蛍光シグナルを検出し、データを正規化して統計学的検定を行い、サンプル間の遺伝子発現プロファイル (gene expression profile) を比較解析する。さらに階層的クラスタ解析 (hierarchical clustering analysis) を行って、類似した発現パターンを呈する遺伝子やサンプルをグループに分類する。有意な発現差異を呈する遺伝子は real-time RT-PCR で mRNA を定量して検証する。

定した遺伝子の機能・構造の注釈情報 (annotation) は遺伝子リストの ID から Web 上で database を検索可能である (表2)。既に様々な細胞・組織の遺伝子発現データが Gene Expression Omnibus (GEO; [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)) に登録されているが、実験に用いたチップの format が異なるとデータ間の互換性がなくなると考えられ、大規模な meta-analysis を実施する場合に支障となる<sup>9)</sup>。サンプル数が多い場合はデータセットの要素の特性を抽出するため、階層的クラスタ解析 (hierarchical clustering analysis) を行う<sup>9)</sup>。すなわちサンプルに関する事前情報なしに (教師なし法 unsupervised method), 類似した発

現パターンを呈する遺伝子やサンプルをグループに分類して、樹状図 (dendrogram) と発現レベルの2次元マトリックスで表示する。またサンプルをいくつかのグループに分類する代表な遺伝子 (discriminator genes) を抽出し、これらを3次元に圧縮投射する主成分解析 (principal component analysis) を行う<sup>9)</sup>。

我々は薬物応答遺伝子アレイ 1,258 cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて、MS 患者末梢血 T 細胞の遺伝子発現プロファイルを解析している。健常者3名の RNA mixture を universal reference として Cy3 で標識し、患者や健常者のサンプルを全て Cy5 で標識し、各サ