

表 2 Transcriptome・proteome 解析に有用な database

Name	Website	Contents
★統合 Database 検索システム		
Entrez	www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html	The Life Sciences Search Engine
Gene	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene	A Searchable Database of Genes
OMIM	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim	Online Mendelian Inheritance in Man
DBGET	www.genome.ad.jp/dbget/dbget.links.html	Web of Molecular Biology Databases
KEGG	www.genome.ad.jp/kegg	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
SRS	srs6.ebi.ac.uk	European Bioinformatics Institute Database
HGMD	www.hgmd.cf.ac.uk/hgmd0.html	Human Gene Mutation Database
★配列解析		
UniProt	www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?uniprot	SWISS-PROT Protein Sequence Database
PIR	www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?pir	PIR Protein Sequence Database
BLAST	blast.genome.jp	Sequence Similarity Search
dbSNP	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=snp	Single Nucleotide Polymorphism Database
CLUSTALW	align.genome.jp	Multiple Sequence Alignment
TraceSuite II	www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~jiye/evoltrace/evoltrace.html	Evolutionary Trace Server
ORF Finder	www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html	Open Reading Frame Finder
PROSCAN	thr.cit.nih.gov/molbio/proscan	Web Promoter Scan
★タンパク質立体構造解析		
PDB	www.rcsb.org/pdb	The RCSB Protein Data Bank
RasMol	www.rcsb.org/pdb/help-graphics.html#rasmol_download	Molecular Graphics
GRASS	honiglab.cpmc.columbia.edu/cgi-bin/GRASS/surfserv_enter.cgi	Graphical Representation and Analysis of Structure Server
SWISS-MODEL	swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html	An Automated Comparative Protein Modelling Server
ERRAT	nihserver.mbi.ucla.edu/ERRAT	A Protein Structure Verification Algorithm
Verify3D	nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D	A Crystal Structure Evaluation Server
SCOP	scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html	Structural Classification of Proteins
DBAli	salilab.org/DBAli	A Database of Structure Alignments
★タンパク質機能予測		
SOSUI	sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html	Classification and Secondary Structure Prediction of Membrane Proteins
PSORT II	psort.ims.u-tokyo.ac.jp	Prediction of Protein Sorting Signals and Localization Sites in Amino Acid Sequences
SignalP 3.0	www.cbs.dtu.dk/services/SignalP	Prediction of Signal Peptide Cleavage Sites in Amino Acid Sequences
InterPro	www.ebi.ac.uk/interpro	A Database of Protein Families, Domains and Functional Sites
PredictProtein	www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html	Structure Prediction and Sequence Analysis
BIND	www.bind.ca	The Biomolecular Interaction Network
DIP	dip.doe-mbi.ucla.edu	Databases of Interacting Proteins
MINT	160.80.34.4/mint/index.php	A Molecular Interaction Database
PPID	www.anc.ed.ac.uk/mscs/PPID/cgi-bin/ppid_search.pl	Protein-Protein Interaction Database
PROCAT	www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PROCAT/PROCAT.html	A Database of 3D Enzyme Active Site Templates
Scansite	scansite.mit.edu	A Motif Scan
PhosphoSite	www.phosphosite.org/Login.jsp	An In Vivo Phosphorylation Site Database
ExpASy	au.expasy.org	Expert Protein Analysis System Proteomics Server

2005年8月の時点でのサイト。

ンプルで遺伝子ごとに Cy5/Cy3 signal intensity ratio を測定している。比較する 2 群間 (MS vs 健常者など) で有意な発現差異を呈する遺伝子は, Bayesian t test または R

解析 (www.cran.r-project.org) と Bonferroni 補正で統計学的有意性を検定することにより同定している。さらに有意な遺伝子に関しては, LightCycler (Roche) による

real-time RT-PCRで定量してアレイ解析の結果を検証 (validation) している。階層クラスター解析と主成分解析は GeneSpring (Silicon Genetics-Agilent) で行っている。末梢血リンパ球の遺伝子アレイ解析の問題点は、特定の遺伝子の発現レベルが年齢・性・喫煙・飲酒・常用薬・嗜好品・精神的ストレスなどの個人差や採血時刻 (日内変動) の影響を受けることである (interindividual and intraindividual variation)¹⁰⁾。また脳組織の遺伝子アレイ解析の問題点は死後脳凍結までに要する時間 (RNA degradation time) で、組織の pH がある程度参考になる。

2. 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

2.1. MS 脳組織の網羅的遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイによる MS の病態解析の最初の報告は Whitney らによる研究である¹¹⁾。彼らは独自の cDNA microarray を用いて MS 急性期炎症性病巣と正常白質 (normal-appearing white matter; NAWM) を比較し、MS 病巣における interferon-regulatory factor IRF-2, 5-lipoxygenase 発現上昇を報告した (表 3)^{11,12)}。Chabas らは MS brain cDNA ライブラリーの網羅的シークエンス解析で osteopontin (OPN) 発現レベルの上昇を認めた¹³⁾。さらにラット EAE 脊髄のカスタム oligonucleotide microarray 解析で OPN の発現上昇を確認した。OPN は主として T 細胞が産生し macrophages による IL-12 産生を促進して IL-10 産生を抑制する Th1 cytokine で、活動性 RRMS 患者血清で上昇している¹⁴⁾。OPN 遺伝子欠損マウスは EAE 惹起に対して抵抗性を示す¹³⁾。Lock らは GeneChip を用いて MS 急性炎症性病巣と慢性非活動性病巣を比較し、活動性病巣での granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 発現上昇と非活動性病巣での IgG Fc receptor, IgE receptor, histamine receptor type 1 の発現上昇を認めた¹⁵⁾。さらに彼らは G-CSF 投与で EAE を軽症化出来ること、immunoglobulin FcR γ -chain 遺伝子欠損マウスでは EAE 慢性化が抑制されることを証明し、アレイ解析の結果を裏付けた。Chabas らや Lock らの報告により、MS, EAE の病巣形成における allergic response mediators の役割が認識されるようになった¹⁶⁾。

Mycko らは cDNA microarray (Clontech) を用いて SPMS の慢性活動性病巣と非活動性病巣、脱髄巣辺縁部と中心部を比較し、活動性病巣辺縁部における炎症・免疫応答遺伝子群 (TNF α など) の発現上昇を認めた¹⁷⁾。Graumann

らは cDNA macroarray (Clontech) を用いて MS の NAWM と非神経疾患のコントロール白質を比較し、NAWM における脳虚血関連遺伝子 (hypoxia-inducible factor 1 alpha; HIF-1 α など) の発現上昇を認めた¹⁸⁾。Lindberg らは GeneChip で SPMS の活動性病巣と NAWM を比較し、活動性病巣での immunoglobulin 産生亢進の所見を見出した¹⁹⁾。Tajouri らは独自の cDNA microarray を用いて SPMS の急性・慢性活動性病巣を non-MS コントロール白質と比較し、活動性病巣における α B-crystallin, superoxide dismutase SOD1 の発現上昇を報告した²⁰⁾。上述の MS 脳組織のマイクロアレイ解析は各々症例数が少なく、RNA 抽出部位が必ずしも全体像を反映していない可能性は否定出来ない。EAE 脳・脊髄の網羅的遺伝子発現解析に関しては割愛する²¹⁻²³⁾。

2.2. 末梢血リンパ球を用いた MS と健常コントロールの比較解析

Ramanathan らは Research Genetics (Invitrogen) の Gene-Filter membrane array を用いて、MS と健常者の monocyte-depleted peripheral blood lymphocytes (PBL) を比較し、MS における lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK), IL-7R の発現上昇を報告した²⁴⁾。LCK は Airla らによる RRMS の PBMC の cDNA macroarray (Clontech) 解析で、intravenous methylprednisolone pulse (IVMP) で発現低下する遺伝子として報告されている²⁵⁾。Bomprezzi らは独自の cDNA microarray を用いて、24 例の RRMS と 21 名の健常者の peripheral blood mononuclear cells (PBMC) を比較し、発現差異を示した 53 遺伝子を同定した²⁶⁾。MS では自己反応性 T 細胞活性化に関連する IL-7R, ZAP70, TNFRSF7 (CD27) の発現上昇およびサイトカイン mRNA の ubiquitin-proteasome 系による分解を制御する HSPA1A (HSP70) の発現低下を認めた。Mayne らは RRMS と健常者の CD4 陽性 T 細胞を negative selection で分離し、cDNA membrane array (NIA) を用いて解析し、MS における cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (CYFIP2) の発現上昇を認めた²⁷⁾。

我々は cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて、72 例の MS (65 RRMS, 7 SPMS) と 22 名の健常者の末梢血 CD3 陽性 T 細胞, CD3 陰性 non-T 細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した (表 3)²⁸⁾。その結果 T 細胞で 173 遺伝子, non-T 細胞で 50 遺伝子の発現差異を認め、上位 30 遺伝子 (the most significant genes) を抽出すると、T 細胞で 25 遺伝子 (NR4A2, TCF8 の上昇と

表3 Microarray による MS の免疫病態の解析

Authors (Reference No.)	Year	No of MS Patients and Controls	RNA Samples
Whitney et al. (11)	1999	PPMS (n=1)	acute lesion vs NAWM
Ramanathan et al. (24)	2001	RRMS (n=15) vs HC (n=15)	monocyte-depleted PBL
Wandinger et al. (35)	2001	RRMS (n=1) plus HC (n=2)	PBMC incubated with IFN β in vitro
Whitney et al. (12)	2001	PPMS (n=1), RRMS (n=1), EAE vs HC (n=3)	acute or chronic lesions of MS and EAE vs white matter of non-MS controls
Lock et al. (15)	2002	CPMS and SPMS (n=4)	acute or chronic active lesions vs chronic silent lesions
Mass et al. (32)	2002	RA (n=20), SLE (n=24), IDDM (n=5), and MS (n=5) vs HC before and after influenza vaccination (n=9)	PBMC
Bomprezzi et al. (26)	2003	RRMS (n=18), SPMS (n=6) vs HC (n=21)	PBMC (fresh or frozen)
Graumann et al. (18)	2003	SP/PP/RRMS (n=10) vs non-neurological controls (n=7)	NAWM vs control white matter
Koike et al. (36)	2003	RRMS (n=13) before and at 3 and 6 months after IFN β treatment	T and non-T cells separated from PBMC
Mycko et al. (17)	2003	SPMS (n=4)	chronic active vs silent lesions and the lesion margin vs center
Stürzebecher et al. (46)	2003	RRMS before and after IFN β treatment for 6 months (n=10; 6 responders vs 4 non-responders)	frozen PBMC ex vivo or incubated with IFN β in vitro
Tajouri et al. (20)	2003	SPMS (n=5) vs non-MS	acute and chronic active lesions
Weinstock-Guttman et al. (44)	2003	RRMS before and at 1, 2, 4, 8, 24, 120, and 160 h after IFN β treatment (n=8)	monocyte-depleted PBL
Achiron et al. (29)	2004	RRMS (n=26; 14 with treatment) vs HC (n=18)	PBMC
Achiron et al. (30)	2004	RRMS treated (n=13) vs untreated (n=13)	PBMC
Airla et al. (25)	2004	RRMS (n=6) before and after IVMP	PBMC
Hong et al. (47)	2004	RRMS/SPMS treated with IFN β (n=18), GA (n=12) or untreated (n=15)	PBMC
Iglesias et al. (33)	2004	RRMS (n=17) vs HC (n=7)	PBMC
Lindberg et al. (19)	2004	SPMS (n=6) vs non-neurological controls (n=12)	active lesions vs NAWM
Mandel et al. (31)	2004	RRMS (n=13) vs SLE (n=5) vs HC (n=18)	PBMC
Mayne et al. (27)	2004	RRMS (n=21) vs HC (n=19)	CD4 ⁺ T cells
Satoh et al. (28)	2005	RRMS (n=65) plus SPMS (n=7) vs HC (n=22)	T and non-T cells separated from PBMC

Abbreviations: RRMS, relapsing-remitting MS; SPMS, secondary progressive MS; PPMS, primary progressive MS; CPMS, chronic progressive MS; HC, healthy controls; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; NAWM, normal appearing white matter; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBL, peripheral blood lymphocytes; IFN, interferon; GA, glatiramer acetate; IVMP, intravenous methylprednisolone pulse.

MAPK1, SMARCA3, HSPA1A, TRAIL, TOP1, CCR5, BAG1, DAXX, TSC22, PARP の低下など), non-T 細胞で 27 遺伝子 (ICAM1, CDC42, RIPK2, SODD, TOP2A の上昇と BCL2, RPA1, NFATC3, HSPA1L, RBBP4, PRKDC の低下など) が apoptosis 制御遺伝子に属していた。すなわち apoptosis 促進遺伝子 (proapoptotic genes)

と抑制遺伝子 (antiapoptotic genes) の発現上昇・低下の拮抗的バランス (counterbalance) を認め、MS 免疫病態における apoptosis 制御機構の異常が示唆された。Achiron らは GeneChip を用いて、26 例の RRMS と 18 名の健常者の PBMC を比較解析した²⁹⁾。両群間で 1,109 遺伝子の発現差異を認め、MS における T 細胞活性化関連遺伝子

Type of Microarray	No of Genes on Microarray	Key Findings
Original cDNA Glass Array	1,344 or 5,000	Upregulation of IRF-2 and TNFRp75 in acute lesions
GeneFilters GF211 Membrane Array (Research Genetics)	5,184	Upregulation of LCK, IL-7R and MMP-19 and downregulation of CCR6 and DFFA in MS
Mini-Lymphochip cDNA Array	6,432	Upregulation of proinflammatory genes such as CCR5, IP-10, and IL-15RA by IFN β treatment
Original cDNA Glass Array	2,798	Upregulation of 5-lipoxygenase in MS and EAE lesions
HuGene FL Oligonucleotide Array (Affymetrix)	7,026	Upregulation of G-CSF in active lesions and upregulation of IgG FcR in silent lesions, and amelioration of EAE in FcR γ -chain-KO mice and by treatment with G-CSF
GeneFilters GF211 Membrane Array (Research Genetics)	4,329	Indistinguishable profiles between MS and IDDM and downregulation of apoptosis-regulatory genes in autoimmune diseases
Original cDNA Array (Modified Lymphochip)	6,500 or 7,500	Upregulation of PAFAH1B1, IL-7R, ZAP70, and TNFRSF7(CD27) and downregulation of HSPA1A (HSP70) and CKS2 in MS
Atlas Human cDNA Membrane Array 1.2 (Clontech)	3,528	Upregulation of ischemic preconditioning genes such as HIF-1 α in NAWM of MS
Human cDNA Array (Hitachi Life Science)	1,258	Upregulation of 15 IFN-responsive genes in MS after IFN β treatment
Atlas Human 1.0 Glass Microarray (Clontech)	588	Upregulation of inflammation/immune-related genes in the margin of active lesions
Mini-Lymphochip cDNA Array	6,432 or 12,672	Downregulation of IL-8 in responders after IFN β treatment
Custom-made cDNA Glass Array	5,000	Upregulation of α B-crystallin and SOD in acute lesions
GeneFilters GF211 Membrane Array (Research Genetics)	5,184	Time-dependent upregulation of IFN-responsive genes
Human U95Av2 Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,000	Upregulation of T cell activation genes and downregulation of IL-1 and TNF signaling genes in MS
Human U95Av2 Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,000	Identification of SCYA4, IL2RG, and TNFRSF6(Fas) as immunomodulatory treatment-associated genes
Atlas Human Hematology/Immunology Membrane Array (Clontech)	448	Downregulation of LCK, TCF7, CD5, and ISGF3 by IVMP
Original Membrane Array	36	Distinct gene expression profile between MS patients treated with IFN β and GA
HuGene FL Oligonucleotide Array (Affymetrix)	6,800	Upregulation of E2F transcription factor pathway genes in MS
Human U95A Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,633	Upregulation of genes related to Ig synthesis in active lesions of MS
Human U95Av2 Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,000	Downregulation of NR4A1 and NR4A3 as the autoimmunity-specific signature
Immune Membrane Array (National Institute on Aging)	1,152	Upregulation of CYFIP2 in MS
Human cDNA Array (Hitachi Life Science)	1,258	Aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in MS

(LEF1, TCF3, SLAM, ITGB2, CTSB) の発現上昇および IL-1 β , TNF α シグナル伝達系遺伝子の発現低下を認めた。我々の結果²⁸⁾に反し, MSにおける orphan nuclear receptor NR4A2 の発現低下を報告した。彼らの研究では MS 14 例は採血時に IFN β , glatiramer acetate (GA), IVIg 治療中である点が問題である。彼らは同じ症例の治療中

13 例と未治療 13 例の PBMC の比較解析を行い, 治療関連 7 遺伝子 (TNFRSF6; Fas など) を同定した³⁰⁾。さらに 13 例の RRMS と 5 例の SLE を 18 名の健常者と比較して, 自己免疫疾患共通遺伝子 (autoimmunity-specific signature) を探索し, 自己免疫疾患における apoptosis, matrix metalloproteinase (MMP) 制御系遺伝子の発現異

常を発見した³¹⁾。Maas らも 20 例の RA, 24 例の SLE, 5 例の IDDM, 5 例の MS と 9 名の健常者 (influenza ワクチン接種前後) の PBMC を比較解析した³²⁾。ワクチンに対する免疫応答と自己免疫疾患の遺伝子発現プロフィールは全く異なるが, RA と SLE, MS と IDDM は極めて類似し, 自己免疫疾患では共通して apoptosis 制御遺伝子群の発現低下を認めることを報告した。Iglesias らは GeneChip を用いて 17 例の RRMS と 10 名の健常者の PBMC を比較し, MS における E2F transcription factor pathway 遺伝子群の発現上昇を見出し, E2F1 遺伝子欠損マウスでは EAE が軽症化することを報告した³³⁾。

2.3. MS におけるインターフェロンベータ治療反応性の解析

我々は cDNA macroarray (Invitrogen) を用いて, ヒト胎児脳より樹立したアストロサイト (astrocytes) 純培養で IFN β , IFN γ により発現変動する遺伝子群を解析した³⁴⁾。IFN β による interferon-regulatory factor IRF-7 と pleiotrophin の発現上昇, IFN γ による IRF-1 と ICAM-1 の発現上昇を発見した。Wandinger らは RRMS と健常者の PBMC を IFN β で刺激して cDNA microarray (Mini-Lymphochip) を用いて解析した³⁵⁾。彼らは proinflammatory molecules である CC chemokine receptor 5 (CCR5), interferon-inducible cytokine IP-10 (CXCL10), IL15 receptor alpha (IL-15RA) の発現上昇を認めた。我々は cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて, 13 例の RRMS の末梢血 CD3 陽性 T 細胞と CD3 陰性 non-T 細胞で, IFN β 1b 治療開始後に発現変動したインターフェロン応答遺伝子群 (IFN-responsive genes; IRG) を同定した³⁶⁾。21 遺伝子が有意な変動を呈し, T 細胞で 8 IRG (IRF-7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI30, ATF3, TLR5) の発現上昇, IL-3, monokine induced by IFN γ (MIG) などの発現低下を認め, non-T 細胞では 12 IRG (IRF-7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, IFI17, TAP1, TNFAIP6, TSC22, SULT1C1, RPC39, RAB11A) の発現上昇, IL-3 の発現低下を認めた。ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, TSC22, SULT1C1 に関しては, 治療開始後 3-6 ヶ月の持続的な上昇を認めた。一方統計学的有意差は見られなかったが, 治療後に Th1 関連遺伝子 CCR5 (T), IFN γ (T), TNF α (non-T) の発現上昇傾向を認めた。このことは MS において IFN β 治療は必ずしも明確な Th2 shift を誘導しないという見解³⁵⁾ に一致する。上記のうち 9 遺伝子 (IRF7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI17, TAP1, TNFAIP6,

MIG) はプロモーター領域に IFN-stimulated response element (ISRE) や IRF element (IRF-E) が同定されている既知の IRG であり, IFN β 治療に直接反応して上昇し治療効果発現に深く関与していると考えられる。興味深いことに培養系では多くの IRG は IFN γ によっても発現が誘導される^{36,37)}。IRF-7 はウイルス感染時に IFN α/β 産生を増幅する正の制御因子である³⁸⁾。IFI30 は class II MHC 拘束性抗原提示に働くチオール還元酵素であり, IFI30 遺伝子欠損マウスでは抗原呈示能低下を来す³⁹⁾。TAP1 は class I MHC 拘束性抗原提示を司るペプチド輸送因子で, TAP1 遺伝子欠損マウスでは CD8⁺T 細胞を介する結核菌への抵抗力が減弱する⁴⁰⁾。TNFAIP6 は TNF α , IL-1 β により発現誘導される分泌蛋白質で, マウス関節炎に投与すると抗炎症作用を呈する⁴¹⁾。以上より MS において IFN β は antiviral and antiinflammatory mediator 遺伝子群の発現上昇を誘導することが明らかになった。非常に興味深いことに SLE では治療に関わらず PBMC における IRG の発現レベルが高い^{42,43)}。

Weinstock-Guttman らは GeneFilter membrane array を用いて, 8 例の RRMS で IFN β 1a 投与後経時的に monocyte-depleted PBL を解析して IRG を同定したが, その多くは我々の結果とオーバーラップしている⁴⁴⁾。また Liang らは Weinstock-Guttman らのデータを再解析し, IFN β により発現誘導される IRG は early-onset (within 8 hours), intermediate-onset (24 hours), late-onset (48 hours) の 3 群に分類されることを報告した⁴⁵⁾。Stürzebecher らは cDNA microarray (Mini-Lymphochip) を用いて, 10 例の RRMS で IFN β 1b 治療前後の PBMC を解析した⁴⁶⁾。治療開始前 6 ヶ月から開始 12 ヶ月後まで毎月 Gd 造影 MRI で活動性病巣数を算出し, 治療後に病巣数が 60% 以上減少した症例を responder と定義した。また nonresponder を治療開始後から効果のない nonresponder from initiation of therapy (INR) と, 治療開始後一定期間は効果があり neutralizing antibody (NAb) 出現とともに効果が減弱した nonresponder with development of NAb (NAbNR) の 2 群に分類した。さらに ex vivo 解析と同時に IFN β で刺激した in vitro 解析も行った。Responder で治療後 2 倍以上変動した遺伝子は ex vivo では 25 遺伝子 (IFI17, OAS, Stat1 の上昇と IL-8, CD69, c-fos, TSC22 の低下など) で, そのうち IL-8 発現低下は responder の指標となる可能性が示唆された。一方 in vitro IRG は 87 遺伝子で, responder と nonresponder の間で発現レベルに差異を認めなかつ

た。彼らの結果に反して、我々は IFN β 治療後に non-T 細胞で TGF β -stimulated protein TSC22 の発現上昇を認めている³⁶⁾。彼らの研究の問題点は responder 6 例・INR 2 例・NAbNR 2 例と症例数が少なく、PBMC を凍結保存後に解凍して刺激しており、実験操作で遺伝子発現が変化し得ることである⁴⁶⁾。さらに 1 例の responder では治療前に約 90 個の Gd 造影病巣を呈しているが、これほど多数の造影病巣を示す症例は日本人 MS では極めて異例である。Hong らは免疫応答に極めて重要な 36 遺伝子に絞った cDNA macroarray を作成し、未治療 MS と IFN β 1a または GA 治療症例の PBMC を解析し、治療反応性遺伝子群の相違を明らかにした⁴⁷⁾。興味深いことに活性化 T 細胞の血液脳関門通過に重要な MMP-9 の発現は IFN β により低下したが GA では上昇した。

van Boxel-Dezire らは 26 例の IFN β 1b 治療中の RRMS で PBMC のサイトカイン遺伝子発現レベルを半定量的 RT-PCR で経時的に解析した⁴⁸⁾。治療前後 2 年間の再発回数・IVMP 回数・Extended Disability Status Scale (EDSS) スコアから 16 例の responder と 10 例の nonresponder に分けて比較すると、responder は治療前に IL-12p35 発現レベルが低い傾向を呈した。Wandinger らは RRMS で IFN β 1a 治療後 1 年間一度も再発がなく、EDSS スコア悪化の見られない症例を responder、一度以上再発が見られた症例を nonresponder と定義し、20 例の responder と 19 例の nonresponder の PBMC を比較し、responder では TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL; TNFSF10) が持続的高値を呈することを報告した⁴⁹⁾。TRAIL は IRG の 1 つで我々は MS の T 細胞における発現低下を認めている²⁸⁾。TRAIL 遺伝子欠損マウスは胸腺細胞の apoptosis に異常を来し、コラーゲン関節炎などに高感受性になることが報告されている⁵⁰⁾。Baranzini らは 52 例の IFN β 治療中の RRMS で経時的に PBMC の 70 遺伝子の発現レベルを RT-PCR で定量的に解析した。彼らは治療後 2 年間一度も再発がなく、EDSS スコア悪化の見られない症例を responder、2 回以上再発が見られた症例を nonresponder と定義し、両者は 3 遺伝子 (caspase2, caspase10, FLICE inhibitory protein; FLIP) の発現レベルの 3 次元解析で 86% 区別可能と報告している⁵¹⁾。

最近我々は前述²⁸⁾の 72 例の IFN β 未治療 MS (46 例は初回採血後 2 年間 IFN β 治療開始) と 22 名の健常者の末梢血 CD3 陽性 T 細胞を cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて解析したデータを、両群間で発現差異

を示す 286 遺伝子を指標にして階層的クラスター解析で再解析した (Sato et al. Manuscript in preparation)。この解析により 286 遺伝子は class #1-#5 に分類され、MS は健常者から分離されてさらに 4 つのサブグループに分類された。すなわち遺伝子発現プロフィールが健常者に近似した A 群、治療導入前後 2 年間の再発回数・IVMP 日数・入院日数の点で最も活動性が高い B 群、大脳限局病変が多い C 群、最も EDSS スコアが高値の D 群に分類された。B 群は chemokine 遺伝子を多く含む class #5 の発現レベルが高かった。また IFN β 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 強調画像病巣数の比較と患者満足度から算出した IFN β 治療反応スコアで評価すると、responder は A 群と B 群に集積していた。また responder では nonresponder に比較して治療開始後 6 ヶ月の時点でも IRG (ISG15, IFI27, MCP-1, TNFRp75) の発現レベルが高く保持される傾向を示した。

3. 結 語

我々は DNA マイクロアレイ解析を用いて MS が T 細胞の遺伝子発現プロフィールに基づき 4 群に分類され、各群は疾患活動性・病変分布・IFN β 治療反応性との対応を認めることを報告した。現在、欧米人 MS にも同様の結果が当てはまるかどうか症例数を増加して解析中である。このような研究成果を積み重ねることにより MS のテーラメイド医療樹立に貢献出来ると思われる。

謝 辞

本稿で紹介した我々研究の一部は、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金こころの健康科学 (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: H17-こころ-020) および平成 17 年度創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業 (DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究: KH21101) の補助により実施された。

参考文献

- 1) Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23: 683-747, 2005.
- 2) Waubant E, Vukusic S, Gignoux L, Dubief FD, Achiti I, Blanc S, Renoux C, Confavreux C. Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 61: 184-189, 2003.

- 3) Rudick RA, Lee J-C, Simon J, Ransohoff RM, Fisher E. Defining interferon β response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 56: 548–555, 2004.
- 4) Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47: 707–717, 2000.
- 5) Steinman L, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nature Rev Immunol* 3: 483–492, 2003.
- 6) 野村 仁. ゲノム創薬. 個別化医療とゲノムデータマイニング. 新・生命科学ライブラリ-バイオと技術 5. 第4章ゲノム創薬各論. サイエンス社. pp. 55–129, 2005.
- 7) Chan SM, Ermann J, Su L, Fathman CD, Utz PJ. Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways. *Nature Med* 10: 1390–1396, 2004.
- 8) Stevens JR, Doerge RW. Combining Affymetrix microarray results. *BMC Bioinformatics* 6: 57–75, 2005.
- 9) 戸塚裕彦. データのコンピュータ解析. データの標準化と解析ソフト. 実験医学別冊 DNA チップ実験まるわかり. 佐々木博巳・青柳一彦編. 羊土社. pp. 80–90, 2004.
- 10) Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, Brown PO. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1896–1901, 2003.
- 11) Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munson PJ, Prabhu VV, Trent JM, McFarland HF, Biddison WE. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* 46: 425–428, 1999.
- 12) Whitney LW, Ludwin SK, McFarland HF, Biddison WE. Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions. *J Neuroimmunol* 121: 40–48, 2001.
- 13) Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuj M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L. The influence of the proinflammatory cytokine osteopontin on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294: 1731–1735, 2001.
- 14) Vogt MH, Lopatinskaya L, Smits M, Polman CH, Nagelkerken L. Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53: 819–822, 2003.
- 15) Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Med* 8: 500–508, 2002.
- 16) Pedotti R, DeVoss JJ, Youssef S, Mitchell D, Wedemeyer J, Madanat R, Garren H, Fontoura P, Tsai M, Galli SJ, Sobel RA, Steinman L. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1867–1872, 2003.
- 17) Mycko MP, Papoian R, Boschert U, Raine CS, Selmaj KW. cDNA microarray analysis in multiple sclerosis lesions: detection of genes associated with disease activity. *Brain* 126: 1048–1057, 2003.
- 18) Graumann U, Reynolds R, Steck AJ, Schaeren-Wiemers N. Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. *Brain Pathol* 13: 554–573, 2003.
- 19) Lindberg RLP, De Groot CJA, Certa U, Ravid R, Hoffmann F, Kappos L, Leppert D. Multiple sclerosis as a generalized CNS disease-comparative microarray analysis of normal appearing white matter and lesions in secondary progressive MS. *J Neuroimmunol* 152: 154–167, 2004.
- 20) Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenber AEG, Nagra RM, Tourtellotte WW, Griffiths LR. Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Mol Brain Res* 119: 170–183, 2003.
- 21) Ibrahim SM, Mix E, Böttcher T, Koczan D, Gold R, Rolfs A, Thiesen H-J. Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 124: 1927–1938, 2001.
- 22) Carmody RJ, Hilliard B, Maguschak K, Chodosh LA, Chen YH. Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation. *J Neuroimmunol* 133: 95–107, 2002.
- 23) Baranzini SE, Bernard CCA, Oksenberg JR. Modular transcriptional activity characterizes the initiation and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 174: 7412–7422, 2005.
- 24) Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Nguyen LT, Badgett D, Miller C, Patrick K, Brownschidle C, Jacobs L. In vivo gene expression revealed by cDNA arrays: the pattern in relapsing-remitting multiple sclerosis patients compared with normal subjects. *J Neuroimmunol* 116: 213–219, 2001.
- 25) Airla N, Luomala M, Elovaara I, Kettunen E, Knuutila S, Lehtimäki T. Suppression of immune system genes by methylprednisolone in exacerbations of multiple sclerosis. Preliminary results. *J Neurol* 251: 1215–1219, 2004.
- 26) Bompreszi R, Ringnér M, Kim S, Bittner ML, Khan J, Chen Y, Elkhoulou A, Yu A, Bielekova B, Meltzer PS, Martin R, McFarland HF, Trent JF. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet* 12: 2191–2199, 2003.
- 27) Mayne M, Moffatt T, Kong H, McLaren PJ, Fowlke KR, Becker

- KG, Namaka M, Schenck A, Barndoni B, Bernstein CN, Melanson M. CYFIP2 is highly abundant in CD4⁺ cells from multiple sclerosis patients and is involved in T cell adhesion. *Eur J Immunol* 34: 1217–1227, 2004.
- 28) 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. *Neurobiol Dis* 18: 537–550, 2005.
- 29) Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Ann Neurol* 55: 410–417, 2004.
- 30) Achiron A, Gurevich M, Magalashvili D, Kishner I, Dolev M, Mandel M. Understanding autoimmune mechanisms in multiple sclerosis using gene expression microarrays: treatment effect and cytokine-related pathways. *Clin Dev Immunol* 11: 299–305, 2004.
- 31) Mandel M, Gurevich M, Pauzner R, Kaminski N, Achiron A. Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 138: 164–170, 2004.
- 32) Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, Aune TM. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol* 169: 5–9, 2002.
- 33) Iglesias AH, Camelo S, Hwang D, Villanueva R, Stephanopoulos G, Dangond F. Microarray detection of E2F pathway activation and other targets in multiple sclerosis peripheral blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 150: 163–177, 2004.
- 34) Satoh J, Kuroda Y. Differing effects of IFN β vs IFN γ in MS. Gene expression in cultured astrocytes. *Neurology* 57: 681–685, 2001.
- 35) Wandinger K-P, Strüzebecher C-S, Bielekova B, Detore G, Rosenwald A, Staudt LM, McFarland HF, Martin R. Complex immunomodulatory effects of interferon- β in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurol* 50: 349–357, 2001.
- 36) Koike F, Satoh J, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies interferon β -regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 139: 109–118, 2003.
- 37) Der SD, Zhou A, Williams BRG, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15623–15628, 1998.
- 38) Taniguchi T, Takaoka A. The interferon- α/β system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 14: 111–116, 2002.
- 39) Maric M, Arunachalam B, Phan UT, Dong C, Garrett WS, Cannon KS, Alfonso C, Karlsson L, Flavell RA, Cresswell P. Defective antigen processing on GILT-free mice. *Science* 294: 1361–1365, 2001.
- 40) Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 189: 1973–1980, 1999.
- 41) Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor- α -stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. *Am J Pathol* 159: 1711–1721, 2001.
- 42) Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2610–2615, 2003.
- 43) Bennett L, Plaucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197: 711–723, 2003.
- 44) Weinstock-Guttman B, Badgett D, Patrick K, Hartrich L, Santos R, Hall D, Baier M, Feichter J, Ramanathan M. Genomic effects of IFN- β in multiple sclerosis patients. *J Immunol* 171: 2694–2702, 2003.
- 45) Liang Y, Tayo B, Cai X, Kelemen A. Differential and trajectory methods for time course gene expression data. *Bioinformatics* 21: 3009–3016, 2005.
- 46) Strüzebecher S, Wandinger KP, Rosenwald A, Sathyamoorthy M, Tzou A, Mattar P, Frank JA, Staudt L, Martin R, McFarland HF. Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon- β in multiple sclerosis. *Brain* 126: 1419–1429, 2003.
- 47) Hong J, Zang YCQ, Hutton G, Rivera VM, Zhang JZ. Gene expression profiling of relevant biomarkers for treatment evaluation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 152: 126–139, 2004.
- 48) van Boxel-Dezaire AHH, van Trigt-hoff SCJ, Killestein J, Schrijver HM, van Houwelingen JC, Polman CH, Nagelkerken L. Contrasting response to interferon β -1b treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: does baseline interleukin-12p35 messenger RNA predict the efficacy of treatment? *Ann Neurol* 48: 313–322, 2000.
- 49) Wandinger K-P, Lünemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A, Grundström E, Ehrlich S, Wernecke K-D, Volk H-D, Zipp F. TNF-related apoptosis inducing ligand

- (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 361: 2036–2043, 2003.
- 50) Lamhamedi-Cherradi S-E, Zheng S-J, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL^{-/-} mice. *Nature Immunol* 4: 256–260, 2003.
- 51) Baranzini SE, Mousavi P, Rio J, Caillier SJ, Stillman A, Villoslada P, Wyatt MM, Comabella M, Greller LD, Somogyi R, Montalban X, Oksenberg JR. Transcription-based prediction of response to IFN β using supervised computational methods. *PLoS Biol* 3: e2, 2005.

要 旨

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) 発症は多数の遺伝因子と環境因子の複雑な相互作用により規定されている。そのため MS は臨床経過・病巣分布・治療反応性・病理学的所見の点から多様な病態 (clinical heterogeneity) を呈する。遺伝子アレイ (DNA microarray, GeneChip) は基盤上に数万遺伝子が貼付けてあるチップである。遺伝子アレイによる MS 患者末梢血リンパ球や脳組織の網羅的遺伝子発現解析は、MS の分子遺伝学的発症機序解明に威力を発揮する。特に遺伝子アレイ解析により従来の研究方法では予期しなかった遺伝子群の MS 病態における重要な役割を発見したり、インターフェロン応答遺伝子群 (IFN-responsive gene; IRG) を同定することにより治療有効性や副作用を事前に予知することが可能になりつつある。最近我々は階層的クラスター解析 (hierarchical clustering analysis) により、MS が T 細胞の遺伝子発現プロファイルに基づき 4 群に分類され、各群は疾患活動性・病変分布・インターフェロン (IFN β) 治療反応性と密接な対応を認めることを発見した。遺伝子アレイ解析は MS のテーラーメイド医療 (personalized medicine) 樹立に道を開くと思われる。

キーワード：遺伝子発現プロファイル, DNA マイクロアレイ, 多発性硬化症, テーラーメイド医療

MS の臨床・臨床免疫

インターフェロン β -1b 療法の導入法と副作用の対応に関する検討大橋高志¹、太田宏平²、清水優子¹、大原久仁子¹、竹内千仙¹、岩田 誠¹¹東京女子医科大学神経内科、²東京理科大学理学部

目的

インターフェロン (IFN) β -1b は国内外の多くの臨床試験によるエビデンスを持ち、本邦においては多発性硬化症 (MS) の再発予防・進行抑制を適応に持つ唯一の薬剤である。しかし、とりわけ導入初期に副作用が起こりやすく、この時期に治療が中断される例が多い。

なかでも皮膚症状が強く起こる場合には IFN β -1b 療法の継続が困難となることが多いが、注射手技を正確に行い、自己注射用補助器具を使用することで注射部位反応はかなり軽減できることが報告されている。

さらに、IFN β -1b 療法の導入時に IFN β -1b を少量より漸増することで導入初期の副作用の発現を抑えられる可能性がある。

そこで、IFN β -1b の導入法と副作用の対応に関する検討を行い、IFN β -1b 療法を安全に導入、継続するためのシステムを構築することが重要である。

方法

当科に通院中の MS 患者のうち、IFN β -1b 療法を施行中の患者 27 例、および導入後に中止となった患 4 例について、経過中に認められた副作用とその対応について調査した。

IFN β -1b 療法を施行中の患者 10 名 (男性 4 名、女性 4 名、薬剤使用期間平均 16 ヶ月) にアンケート調査を行い、自己注射用補助器具の効果について検討した。

平成 15 年 12 月以降の IFN β -1b 療法の導入時に IFN β -1b を 200 万単位から漸増する方法をとり、副作用の発現頻度とその程度を評価した。

結果

IFN β -1b 療法が中止となった 4 例のうち、副作用が理由となったのは 2 例であり、いずれも全身性の皮膚症状のためであった。その他に、問題となる皮膚症状がみられたのは 1 例であったが、IFN β -1b を一時中断後に漸増し、注射補助器具を使用することによって皮膚症状は低減し、IFN β -1b 療法は継続可能となった。

アンケート調査の結果からは、注射用補助器具の使用により、注射針に対する恐怖感が払拭され、自己注射が困難な部位への投与が可能になることが示された。

IFN β -1b 療法を漸増法によって導入した症例では、発熱、

注射部位の発赤、白血球減少などの副作用がみられたが、全例とも症状は軽微であり、IFN β -1b 療法は問題なく継続できた。

考察

IFN β -1b による注射部位反応は、皮膚および皮下組織への薬液の接触を減らすことで低減できるとされている。皮下注射時に新しい針を使い、さらに注射用補助器具を用いることで、従来の方法に比べて注射部位反応が 59.8% 減少することが報告されている。

実際に注射手技に特に問題のないようにみえる患者でも、注射用補助器具の使用により注射部位反応が低減することが確認された。また、アンケート調査の結果からも、注射用補助器具を使用することで、注射針に対する恐怖感が払拭されるのみではなく、確実に皮下に注射をすることができるようになること、自己注射が困難な部位への投与が可能になることで注射部位反応の低減が期待できることがわかった。しかし、薬液が 1 ml 未満の状態での注射用補助器具の使用は注射器の破損を招く恐れがあるため、導入初期には用いることができない。今後の改良が期待される。

また、IFN β -1b 療法の導入時には、本邦では最初から常用量である 800 万単位もしくは最初の数回のみ 400 万単位を投与することが一般的であるが、欧米では 1/4 量、200 万単位から開始し、2週間毎に漸増することが推奨されている。当院でもこの方法をとっており、良好な結果を得ている。IFN β -1b を漸増法によって導入した症例は全例とも副作用が軽微なものに留まっており、IFN β -1b 導入初期にみられる副作用の発現を抑えられる可能性があると考えられた。

結論

IFN β -1b 使用時には、注射用補助器具を用いることで、注射部位反応の低減が期待できる。

さらに IFN β -1b 療法を導入する際に IFN β -1b を 1/4 量からの 2週間毎に漸増する方法をとることで、導入初期にみられる副作用の発現が抑えられる可能性がある。

MS の臨床・臨床免疫

IFN-β 1bを投与した多発性硬化症患者末梢血の CD4+CD25^{high} 制御性 T 細胞と Foxp3 遺伝子発現の検討

清水優子¹、太田宏平²、川畑仁人³、大原久仁子¹、大橋高志¹、竹内千仙¹、岩田 誠¹

¹東京女子医大脳神経センター神経内科、²東京理科大学理学部

³東京大学大学院アレルギーリウマチ科

目的

近年、免疫調節性 T 細胞のひとつである、CD4+CD25^{high} 制御性 T 細胞 (CD4+CD25^{high}Treg 細胞) は自己反応性 T 細胞の活性化と増殖を抑制する機能を持つことで注目されている。また自己免疫性腸炎、糖尿病、甲状腺炎をきたす PEX 症候群では、Foxp3 遺伝子異常による Treg の欠損が発症の原因であることから、CD4+CD25+ 細胞特異的に発現している Foxp3 遺伝子は、T 細胞の活性化、増殖を抑制する重要な遺伝子であると考えられている。多発性硬化症 (MS) における CD4+CD25^{high}Treg 細胞については、effector function の低下が指摘されたが¹⁾、Foxp3 遺伝子発現の検討はごくわずかである²⁾。今回、我々は IFN-β 1b を投与した MS 患者において、これらの免疫調節性因子が変動するの否か、検討を行ったので報告する。

対象と方法

対象は IFN-β 1b 投与を行った MS 患者 10 名 (男性: 女性=3:7。平均年齢 38.8±9.2 歳) と健常者 10 名 (男性: 女性=2:8、平均年齢 30.9±6.8 歳)。健常者および、IFN-β 投与前、投与後 3ヶ月、6ヶ月、1年、2年後の患者末梢血を採取し、PBMC を分離、フローサイトメーターを用い CD4+CD25^{high}Treg 細胞を測定した。同様の PBMC より RNA を抽出、cDNA 合成後、real-time PCR を用い G3PDH を内在コントロールとして標準化し、Foxp3 遺伝子の発現量は ABI 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い、IFN-β 1b 投与前を基準とし、比較定量法により検討した。なお統計解析は Friedman 検定をおこない、p 値 0.05 未満を有意水準とした。IFN-β 1b 投与前と各治療期間の比較は Wilcoxon 符号付順位検定を行った。

結果

1. 末梢血の CD4+CD25^{high}Treg 細胞の割合は、健常者は 0.85±0.58%。IFN-β 1b 投与前 MS では 0.68±0.6% と有意差はなかった。また IFN-β 1b 投与前～投与後 2 年間で 1.05±0.74%～1.39±1.26% であり、増加を示したが、有意差は

無かった。

2. Foxp3 遺伝子の発現量について、IFN-β 投与前を基準 1.0 とすると、投与後は 1.37±1.26～3.39±4.13 とやや増加したが、有意差はなかった (表 1)。

表 1. IFN-β 1 投与による CD4+CD25^{high}Treg 細胞と Foxp3 遺伝子発現の変化

	CD4+CD25 ^{high} Treg 細胞 (%)	Foxp3 遺伝子発現
投与前	0.66±0.60	1.0
投与後 3M	1.15±1.00	3.39±4.13
投与後 6M	1.17±0.62	1.37±1.26
投与後 12M	1.05±0.74	3.21±5.07
投与後 24M	1.39±1.26	3.33±4.17

考察と結語

これまでの報告では、MS 患者末梢血中の CD4+CD25^{high}Treg 細胞の頻度は、健常者と差はないといわれている¹⁾。また、Foxp3 遺伝子発現は MS で健常人と差はなかったものの、視神経炎患者では発症時に、Foxp3 遺伝子発現が低下していることが報告された²⁾。今回の結果では CD4+CD25^{high}Treg 細胞の頻度は、これまでの報告と同様であった。IFN-β 1b による CD4+CD25^{high}Treg 細胞の頻度と Foxp3 遺伝子発現は、有意差はなかったものの、治療によって若干増加していた。今後、CD4+CD25^{high}Treg 細胞が、IFN-β 1b の免疫状態の是正に関与しているのか、細胞内サイトカインなどの詳細な検討が必要である。

参考文献

1. Viglietta V, et al. Loss of functional suppression by CD4+CD25+regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971-979; 2004
2. 筒井広美ら. 視神経炎、多発性硬化症患者における Foxp3 遺伝子の発現. *神経眼科* 21 増補, 80; 2004

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

佐藤準一^{*,**}

MSの発症は多数の遺伝因子と環境因子の複雑な相互作用により規定されており、臨床経過・病巣分布・治療反応性・病理学的所見の観点から多様な病態 (clinical heterogeneity) を呈する。遺伝子アレイ (DNA microarray/GeneChip) は基盤上に数万遺伝子が貼りつけてあるチップである。遺伝子アレイによるMS患者末梢血リンパ球・脳組織の網羅的遺伝子発現解析は、MS分子遺伝学的発症機序の解明に威力を発揮する。従来の研究方法では予期しなかった遺伝子群のMS病態における重要な役割を発見したり、インターフェロン応答遺伝子群 (IFN-responsive genes : IRG) を同定して治療反応性や副作用を事前に予知することが可能になりつつある。最近われわれは階層的クラスター解析 (hierarchical clustering analysis) により、MSがT細胞の遺伝子発現プロファイルにもとづき4群に分類され、各群は疾患活動性・病変分布・IFN- β 治療反応性と密接な対応を認めることを見出した。遺伝子アレイ解析はMSのテーラーメイド医療の樹立に役立つと思われる。

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、さまざまな神経症状が再発をく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、遺伝的要因と環境因子の相互作用を背景に、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⁺ 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腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α) などの炎症増強因子の産生を誘導し脱髄 (demyelination) が惹起されると考えられている (自己免疫機序)¹⁾。回復期には髄鞘再生を認めるが、炎症が遷延化すると髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性をきたして不可逆的機能障害を残す。近年欧米およびわが国における大規模臨床試験により、インターフェロン (IFN)- β 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 (intravenous methylpredonisolone pulse : IVMP) をおこない、回復期に IFN- β の継続的皮内・筋肉内投与をおこなう方法が、最も一般的な治療法として選択されている。しかし IFN- β がまったく効果を示さない症例も多い²⁾。すなわちMSは均一な疾患ではなく多様な病態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

〔キーワード〕

DNA マイクロアレイ
遺伝子発現プロファイル
階層的クラスター解析
多発性硬化症
テーラーメイド医療

* SATOH Jun-ichi/国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

** 明治薬科大学薬学部生命創薬科学科生命情報解析学

型 (relapsing-remitting MS : RRMS), 二次進行型 (secondary-progressive MS : SPMS), 一次進行型 (primary-progressive MS : PPMS), 病巣分布から脳型 (conventional MS : CMS), 視神経脊髄型 (opticospinal MS : OSMS), IFN- β 治療反応性からレスポンドー (応答) (responder MS : RMS), ノンレスポンドー (非応答) (nonresponder MS : NRMS) に分類される。病理学的には T 細胞浸潤, 抗体沈着, オリゴデンドログリアのアポトーシス (apoptosis) の所見により 4 型に分類される³⁾。

近年 MS の免疫病態の多様性 (heterogeneity) を解析する手段として遺伝子アレイ (DNA microarray/GeneChip) が用いられている。ヒトゲノムプロジェクトによりヒト全遺伝子塩基配列が解明され, 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・系統的に解析することが可能になった。RNA 発現解析をトランスクリプトーム解析, 蛋白質発現解析をプロテオーム解析とよぶ。このような網羅的発現解析 (global expression analysis) により, 従来の研究方法では予期し得なかった遺伝子群の MS 病態における役割がつつぎつつ明らかにされた⁴⁾。また治療に反応する遺伝子群の変動を経時的に解析することにより, 薬物反応性や副作用を予知することが可能になりつつある (薬理ゲノミクス, pharmacogenomics)。本稿では DNA マイクロアレイによる MS の免疫病態・薬物反応性の解析に関する最近の知見を概説する。

1. 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, 数千~一万の cDNA またはオリゴヌクレオチドが貼りつけてあるチップである。cDNA をスポットで基盤上にスポットしてある DNA マイクロアレイと, 基盤上で直接高密度オリゴヌクレオチドをフォトリソグラフ合成して

いる GeneChip (Affymetrix) に分類される。スライドガラスをマイクロアレイ, ナイロン膜をマイクロアレイと総称する。まず遺伝子発現レベルが異なる 2 種類以上の細胞・組織, たとえば IFN- β 投与前後の細胞などから mRNA を抽出し増幅する。DNA マイクロアレイでは別々の蛍光色素 (Cy 3, Cy 5) で標識した 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おこなう (2 色法)。GeneChip では *in vitro* transcription により cDNA から biotin 標識 cRNA を作成, 断片的に切断してハイブリダイゼーションをおこない, streptavidin-phycoerythrin (SAPE) を添加して蛍光標識する (1 色法)。GeneChip 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, 得られたデータを正規化 (normalization) し, 統計学的解析 (R 解析: www.cran.r-project.org など) をおこない, サンプル間の遺伝子発現プロファイル (gene expression profile) を比較する。したがって RNA の質 (quality) が結果に非常に影響する。有意な発現差異を示す遺伝子はリアルタイム RT-PCR で定量・検証することが重要である (validation)。同定した遺伝子の機能・構造に関する情報 (annotation) は, Web 上でデータベース (NCBI Entrez: www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.htm など) を検索する。すでにさまざまな遺伝子発現データが Gene Expression Omnibus (GEO: www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) に登録されておりダウンロードできる。末梢血リンパ球 (peripheral blood mononuclear cells : PBMC) の遺伝子アレイ解析の問題点は, 遺伝子発現レベルが年齢・性・喫煙・飲酒・常用薬・嗜好品・精神的ストレスなどの個人差や採血時刻 (日内変動) の影響を受けることである (interindividual and intraindividual variation)⁵⁾。また脳組織の解析では死後脳凍結までに要する時間 (RNA degradation time) が問題であり, 組織 pH が参考になる。

複数サンプルの場合はデータセットの要素特性を抽出し分類するため、解析ソフト(GeneSpring: Silicon Genetics-Agilent など)を用いて、階層的クラスター解析(hierarchical clustering analysis)をおこなう。すなわちサンプルに関する事前情報なしに、類似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、樹状図(dendrogram)と発現レベルの二次元マトリックスで表示する(教師なし法: unsupervised method)。またグループを特徴づける指標遺伝子(discriminator genes)を抽出して三次元に投射する主成分解析(principal component analysis: PCA)をおこなう。さらに指標遺伝子抽出に用いたデータを training set として機械学習し、新規データセットにおけるサブグループを高次元空間上で線形判別可能な超平面(hyperplane)を同定するサポートベクターマシン(support vector machine: SVM)解析をおこなう(教師あり法: supervised method)。

2. 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(表1)

1) MS 脳組織の網羅的遺伝子発現解析

Whitney ら⁶⁷⁾は独自の cDNA マイクロアレイを用いて MS 急性期炎症性病巣と正常様白質(normal-appearing white matter: NAWM)を比較し、MS 病巣におけるインターフェロン制御転写因子(interferon-regulatory factor: IRF)-2, 5-lipoxygenase 発現上昇を報告した。Chabas ら⁸⁾は MS 脳 cDNA ライブラリーの網羅的シーケンス解析により osteopontin(OPN)発現上昇を認め、ラット実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)モデルの脊髄を用いたカスタムオリゴヌクレオチドマイクロアレイ解析で OPN 上昇を確認した。OPN 遺伝子欠損マウスは EAE 惹起に対して抵抗性を示す⁸⁾。Lock ら⁹⁾は GeneChip を用いて MS 急性炎症性病巣と慢性非活動性病巣を比較し、

前者の G-CSF 上昇と後者の IgG Fc レセプター、IgE レセプター、ヒスタミンレセプタータイプ1 上昇を報告した。また G-CSF 投与で EAE 軽症化を認め、イムノグロブリン FcR γ 鎖遺伝子欠損マウスでは EAE 慢性化が抑制されることを報告した⁹⁾。

Mycko ら¹⁰⁾は cDNA マイクロアレイ(Clontech)を用いて SPMS 慢性活動性病巣と非活動性病巣、脱髄巣辺縁部と中心部を比較し、活動性病巣辺縁部における免疫応答関連遺伝子群(TNF- α など)の上昇を報告した。Graumann ら¹¹⁾は cDNA マクロアレイ(Clontech)を用いて MS の NAWM における脳虚血関連遺伝子群(HIF-1 α など)の上昇を見出した。Lindberg ら¹²⁾は GeneChip を用いて SPMS 活動性病巣でのイムノグロブリン産生亢進を見出した。Tajouri ら¹³⁾は独自の cDNA マイクロアレイを用いて SPMS 急性・慢性活動性病巣における α B-crystallin, SOD 1 の上昇を報告した¹³⁾。これら一連のマイクロアレイによる MS 脳組織の解析は症例数・サンプル数が少なく、RNA 抽出部位が全体像を反映していない可能性が残る。

2) MS とコントロールの末梢血リンパ球の比較解析

Ramanathan ら¹⁴⁾は GeneFilter membrane array(Research Genetics)を用いて、MS と健常人の monocyte-depleted PBMC を比較し、MS における lymphocyte-specific protein tyrosine kinase(LCK), IL-7 R の発現上昇を報告した。LCK は Airla ら¹⁵⁾の cDNA マクロアレイ(Clontech)解析で、RRMS の PBMC において IVMP 治療により低下する遺伝子として報告されている。Bomprezzi ら¹⁶⁾は独自の cDNA マイクロアレイを用いて、RRMS と健常人の PBMC で発現差異を呈する 53 遺伝子を同定した。MS では T 細胞活性化関連遺伝子群 IL-7 R, ZAP 70, TNFRSF 7(CD 27)の上昇およびサイトカイン

表 1. MS の免疫病態のマイクロアレイ解析

Authors (Reference No.)	Year	No of MS Patients and Controls	RNA Samples	Type of Microarray	No of Genes on Microarray	Key Findings
Whitney <i>et al</i> ⁽⁶⁾	1999	PPMS (n=1)	acute lesion vs NAWM	Original cDNA Glass Array	1,344 or 5,000	Upregulation of IRF-2 and TNFRp75 in acute lesions
Ramanathan <i>et al</i> ⁽¹⁴⁾	2001	RRMS (n=15) vs HC (n=15)	monocyte-depleted PBMC	GeneFilters GF211 Membrane Array (Research Genetics)	5,184	Upregulation of LCK, IL-7R and MMP-19 and downregulation of CCR6 and DFFA in MS
Wandinger <i>et al</i> ⁽²⁵⁾	2001	RRMS (n=1) plus HC (n=2)	PBMC incubated with IFN β <i>in vitro</i>	Mini-Lymphochip cDNA Array	6,432	Upregulation of proinflammatory genes such as CCR5, IP-10, and IL-15RA by IFN- β treatment
Whitney <i>et al</i> ⁽⁷⁾	2001	PPMS (n=1), RRMS (n=1), EAE vs HC (n=3)	acute or chronic lesions of MS and EAE vs white matter of non-MS controls	Original cDNA Glass Array	2,798	Upregulation of 5-lipoxygenase in MS and EAE lesions
Lock <i>et al</i> ⁽⁹⁾	2002	CPMS and SPMS (n=4)	acute or chronic active lesions vs chronic silent lesions	HuGene FL Oligonucleotide Array (Affymetrix)	7,026	Upregulation of G-CSF in active lesions and upregulation of IgG FcR in silent lesions, and amelioration of EAE in FcR γ -KO mice and by treatment with G-CSF
Mass <i>et al</i> ⁽²²⁾	2002	RA (n=20), SLE (n=24), IDDM (n=5), and MS (n=5) vs HC before and after influenza vaccination (n=9)	PBMC	GeneFilters GF211 Membrane Array (Research Genetics)	4,329	Indistinguishable profiles between MS and IDDM and downregulation of apoptosis-regulatory genes in autoimmune diseases
Bomprezzi <i>et al</i> ⁽¹⁶⁾	2003	RRMS (n=18), SPMS (n=6) vs HC (n=21)	PBMC (fresh or frozen)	Original cDNA Array (Modified Lymphochip)	6,500 or 7,500	Upregulation of PAFAH1B1, IL-7R, ZAP70, and TNFRSF7 (CD27) and downregulation of HSPA1A (HSP70) and CKS2 in MS
Graumann <i>et al</i> ⁽¹¹⁾	2003	SP/PP/RRMS (n=10) vs non-neurological controls (n=7)	NAWM vs control white matter	Atlas Human cDNA Membrane Array 1.2 (Clontech)	3,528	Upregulation of ischemic preconditioning genes such as HIF-1 α in NAWM of MS
Koike <i>et al</i> ⁽²⁶⁾	2003	RRMS (n=13) before and at 3 and 6 months after IFN- β treatment	T and non-T cells separated from PBMC	Human cDNA Array (Hitachi Life Science)	1,258	Upregulation of 15 IFN-responsive genes in MS after IFN- β treatment
Mycko <i>et al</i> ⁽¹⁰⁾	2003	SPMS (n=4)	chronic active vs silent lesions and the lesion margin vs center	Atlas Human 1.0 Glass Microarray (Clontech)	588	Upregulation of inflammation/immune-related genes in the margin of active lesions

Stürzbecher <i>et al</i> ⁽³⁴⁾	2003	RRMS before and after IFN- β treatment for 6 months (n=10, 6 responders vs 4 non-responders)	frozen PBMC <i>ex vivo</i> or incubated with IFN- β	Mini-Lymphochip cDNA Array	6,432 or 12,672	Downregulation of IL-8 in responders after IFN- β treatment
Tajouri <i>et al</i> ⁽¹⁹⁾	2003	SPMS (n=5) vs non-MS	acute and chronic active lesions	Custom-made cDNA Glass Array	5,000	Upregulation of α B-crystallin and SOD in acute lesions
Weinstock-Guttman <i>et al</i> ⁽³²⁾	2003	RRMS before and at 1, 2, 4, 8, 24, 120, and 160h after IFN- β treatment (n=8)	monocyte-depleted PBMC	GeneFilters GF211 Membrane Array (Research Genetics)	5,184	Time-dependent upregulation of IFN-responsive genes
Achiron <i>et al</i> ⁽¹⁹⁾	2004	RRMS (n=26, 14 with treatment) vs HC (n=18)	PBMC	Human U95A v2 Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,000	Upregulation of T cell activation genes and downregulation of IL-1 and TNF signaling genes in MS
Achiron <i>et al</i> ⁽²⁰⁾	2004	RRMS treated (n=13) vs untreated (n=13)	PBMC	Human U95A v2 Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,000	Identification of SCYA4, IL2RG, and TNFRSF6 (Fas) as immunomodulatory treatment-associated genes
Airla <i>et al</i> ⁽¹⁵⁾	2004	RRMS (n=6) before and after IVIMP	PBMC	Atlas Human Hematology/Immunology Membrane Array (Clontech)	448	Downregulation of LCK, TCF7, CD5, and ISGF3 by IVIMP
Hong <i>et al</i> ⁽³⁵⁾	2004	RRMS/SPMS treated with IFN- β (n=18), GA (n=12) or untreated (n=15)	PBMC	Original Membrane Array	36	Distinct gene expression profile between MS patients treated with IFN- β and GA
Iglesias <i>et al</i> ⁽²³⁾	2004	RRMS (n=17) vs HC (n=7)	PBMC	HuGene FL Oligonucleotide Array (Affymetrix)	6,800	Upregulation of E2F transcription factor pathway genes in MS
Lindberg <i>et al</i> ⁽¹²⁾	2004	SPMS (n=6) vs non-neurological controls (n=12)	active lesions vs NAWM	Human U95A Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,633	Upregulation of genes related to Ig synthesis in active lesions of MS
Mandel <i>et al</i> ⁽²¹⁾	2004	RRMS (n=13) vs SLE (n=5) vs HC (n=18)	PBMC	Human U95A v2 Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,000	Downregulation of NR4A1 and NR4A3 as the autoimmunity-specific signature
Mayne <i>et al</i> ⁽¹⁷⁾	2004	RRMS (n=21) vs HC (n=19)	CD4 ⁺ T cells	Immune Membrane Array (National Institute on Aging)	1,152	Upregulation of CYFIP2 in MS
Satoh <i>et al</i> ⁽¹⁸⁾	2005	RRMS (n=65) plus SPMS (n=7) vs HC (n=22)	T and non-T cells separated from PBMC	Human cDNA Array (Hitachi Life Science)	1,258	Aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in MS

Abbreviations : RRMS : relapsing-remitting MS, SPMS : secondary progressive MS, PPMS : primary progressive MS, CPMS : chronic progressive MS, HC : healthy controls, IDDM : insulin-dependent diabetes mellitus, NAWM : normal appearing white matter, PBMC : peripheral blood mononuclear cells, IFN : interferon, GA : glatiramer acetate, IVIMP : intravenous methylprednisolone pulse

mRNA の分解制御因子 HSPA 1 A (HSP 70) の低下を認めた。Mayne ら¹⁷⁾は RRMS と健常人の末梢血から CD 4⁺ T 細胞を negative selection で分離, cDNA membrane array (NIA) を用いて解析し, MS における cytoplasmic FMR 1 interacting protein 2 (CYFIP 2) の上昇を報告した。

われわれ¹⁸⁾は明確な annotation つき 1,259 遺伝子を掲載した cDNA マイクロアレイ (Hitachi Life Science) を用いて, 72 例の IFN- β 未治療活動性 MS (65 RRMS, 7 SPMS) と 22 名の健常人の末梢血から AutoMACS (Miltenyi Biotec) で分離した CD 3⁺ T 細胞, CD 3⁻ non-T 細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した。両群間で T 細胞 173 遺伝子, non-T 細胞 50 遺伝子の発現差異を認めた。上位 30 遺伝子では T 細胞 25 遺伝子 (NR 4 A 2, TCF 8 上昇と MAPK 1, SMARCA 3, HSPA 1 A, TRAIL, TOP 1, CCR 5, BAG 1, DAXX, TSC 22, PARP 低下など), non-T 細胞 27 遺伝子 (ICAM 1, CDC 42, RIPK 2, SODD, TOP 2 A 上昇と BCL 2, RPA 1, NFATC 3, HSPA 1 L, RBBP 4, PRKDC 低下など) がアポトーシス制御遺伝子の範疇に属していた。MS でアポトーシス促進遺伝子 (proapoptotic genes) と抑制遺伝子 (antiapoptotic genes) の発現上昇・低下 (拮抗的バランス counterbalance) を認め, MS におけるアポトーシス制御異常の存在が示唆された。

Achiron ら¹⁹⁾は GeneChip を用いて 26 例の RRMS と 18 名の健常人で PBMC の遺伝子発現プロファイルを比較解析した。両群間で 1,109 遺伝子の発現差異を認め, MS で T 細胞活性化関連遺伝子群 (LEF 1, TCF 3, SLAM, ITGB 2, CTSB) 上昇と IL-1 β /TNF- α シグナル伝達系遺伝子群の低下を認めた。われわれの結果¹⁸⁾に反して MS における orphan nuclear receptor NR 4 A 2 の低下を報告した。しかし彼らの研究では MS 14 例は採血時に治療薬 IFN- β , glatiramer acetate (GA), intravenous immunog-

lobulins (IVIg) を投与中で, 遺伝子発現に影響した可能性がある。Achiron ら²⁰⁾は上記の症例を治療群 13 例と未治療群 13 例に分けて比較し, 治療関連 7 遺伝子群 (TNFRSF 6, Fas など) を同定した。また 13 例の RRMS と 5 例の SLE を 18 名の健常人と比較し, 自己免疫特異的プロファイル (autoimmunity-specific signature) としてアポトーシス制御遺伝子群の発現異常を報告した²¹⁾。Maas ら²²⁾は 20 例の RA, 24 例の SLE, 5 例の IDDM, 5 例の MS, 9 名のインフルエンザワクチン接種前後の健常人の PBMC を解析した。ワクチン免疫応答と自己免疫疾患の遺伝子発現パターンはまったく異なるが, RA と SLE 間, MS と IDDM 間はきわめて類似していた。彼らも自己免疫疾患に共通してアポトーシス制御遺伝子群の発現低下を認めた。Iglesias ら²³⁾は GeneChip で RRMS と健常人の PBMC を比較解析し, MS における E 2 F transcription factor pathway 遺伝子上昇を認め, E 2 F 1 遺伝子欠損マウスでは EAE が軽症化することを報告した。

3) MS における IFN- β 治療反応性の解析

われわれ²⁴⁾は cDNA マクロアレイ (Clontech) を用いて, ヒト胎児脳アストロサイト純培養で IFN により変動する遺伝子を解析し, IFN- β による IRF-7 と pleiotrophin の上昇, IFN- γ による IRF-1 と ICAM-1 の上昇を報告した。Wandering ら²⁵⁾は RRMS と健常人の PBMC を *in vitro* で IFN- β により刺激して cDNA マイクロアレイ (Mini-Lymphochip) で解析し, CC chemokine receptor 5 (CCR 5) と interferon-inducible cytokine IP-10 (CXCL 10) の上昇を認めた。われわれ²⁶⁾は 1,259 遺伝子 cDNA マイクロアレイ (Hitachi) を用いて, 13 例の RRMS で IFN- β 治療開始前後に採血し, 末梢血 CD 3⁺ T 細胞と CD 3⁻ non-T 細胞で発現変動した遺伝子群 (IFN-responsive genes : IRG) を同定した。T 細胞で 8 遺伝子 (IRF-7, ISG 15, IFI 56, IFI 6-

16, IFI 60, IFI 30, ATF 3, TLR 5)の上昇と IL-3, monokine induced by IFN- γ (MIG)の低下, non-T細胞で12遺伝子(IRF-7, ISG 15, IFI 56, IFI 6-16, IFI 27, IFI 17, TAP 1, TNFAIP 6, TSC 22, SULT 1 C 1, RPC 39, RAB 11 A)の上昇, IL-3の低下を認めた。ISG 15, IFI 56, IFI 6-16, IFI 27, TSC 22, SULT 1 C 1は治療開始後3~6ヵ月において持続的上昇を認めた。一方統計学的有意差はなかったが、治療後にTh1関連遺伝子CCR 5(T), IFN- γ (T), TNF- α (non-T)の上昇傾向を認めた。この所見はIFN- β 治療はMSでは必ずしも明確なTh2シフトを誘導しないという見解²⁵⁾を支持する。上記の9遺伝子(IRF-7, ISG 15, IFI 56, IFI 6-16, IFI 60, IFI 17, TAP 1, TNFAIP 6, MIG)はプロモータ領域にIFN-stimulated response element (ISRE)やIRF element (IRF-E)が同定されている既知IRGであり、治療に直接反応し治療効果に深く関与していると考えられる。IRF-7はウイルス感染時にIFN- α/β 産生を増幅する正の制御因子である²⁷⁾。IFI 30はクラスII MHC拘束性抗原提示の際、はたらくチオール還元酵素で、IFI 30遺伝子欠損マウスでは抗原呈示能低下をきたす²⁸⁾。TAP 1はクラスI MHC拘束性抗原提示の際、はたらくペプチド輸送因子で、TAP 1遺伝子欠損マウスではCD 8⁺ T細胞を介する結核菌抵抗力が減弱する²⁹⁾。TNFAIP 6はTNF- α , IL-1 β により誘導される分泌蛋白質で抗炎症作用を呈する³⁰⁾。以上のようにMSでIFN- β はantiviral and antiinflammatory mediatorsの発現を誘導することが明らかになった。興味深いことにSLEでは治療の種類にかかわらずPBMCにおけるIRGの発現レベルが高い³¹⁾。

Weinstock-Guttmanら³²⁾はGeneFilter membrane arrayを用いて、IFN- β 治療前後の8例のRRMSでmonocyte-depleted PBMCを経時的に解析してIRGを同定した。多くはわれわれの同定したIRG²⁶⁾とオーバーラップしている。

Liangら³³⁾はWeinstock-Guttmanらのデータ³²⁾を再解析し、IRGはearly-onset(8時間以内), intermediate-onset(24時間), late-onset(48時間)の3群に分類されることを見出した。Stürzebecherら³⁴⁾はcDNAマイクロアレイ(Mini-Lymphochip)を用いてIFN- β 治療前後の10例のRRMSでPBMCの遺伝子発現プロフィールを解析した(*ex vivo*解析)。治療前6ヵ月から開始12ヵ月後まで毎月Gd造影MRIを撮影して活動性病巣数を算出、治療により病巣数が60%以上減少した症例をレスポンドーと定義した。ノンレスポンドー群を当初から効果のみられないnon-responder from initiation of therapy(INR)と、開始後一定期間は効果を認めたが中和抗体(neutralizing antibody : NAb)の出現に伴い効果が減弱したnonresponder with development of NAb(NAbNR)の2群に分類した。また培養PBMCをIFN- β 刺激して*in vitro*解析もおこなった。レスポンドーで治療後2倍以上変動した遺伝子は*ex vivo* 25遺伝子(IFI 17, OAS, Stat 1上昇とIL-8, CD 69, c-fos, TSC 22低下など)で、このうちIL-8発現低下はレスポンドーの指標となる可能性が示唆された。一方*in vitro* IRGは87遺伝子で、レスポンドー、ノンレスポンドー間で発現差異を認めなかった。彼らの結果と反して、われわれ²⁶⁾はIFN- β 治療後のnon-T細胞におけるTGF- β -stimulated protein TSC 22上昇を報告している。彼らの研究は症例数が少なく、凍結保存したPBMCを解凍して用いており、実験操作で遺伝子発現が変化する点が問題である。また1例のレスポンドーでは治療前に約90個のGd造影病巣を呈しているが、これほど多数の造影病巣を示す症例は日本人MSでは異例である。Hongら³⁵⁾は主要免疫応答36遺伝子を掲載したcDNAマイクロアレイを用いて、未治療MSとIFN- β , GA治療MSのPBMCを解析し、治療反応性遺伝子群の相違を明らかにした。興味深いことに活性化T細胞の血液脳関門通過に重要な

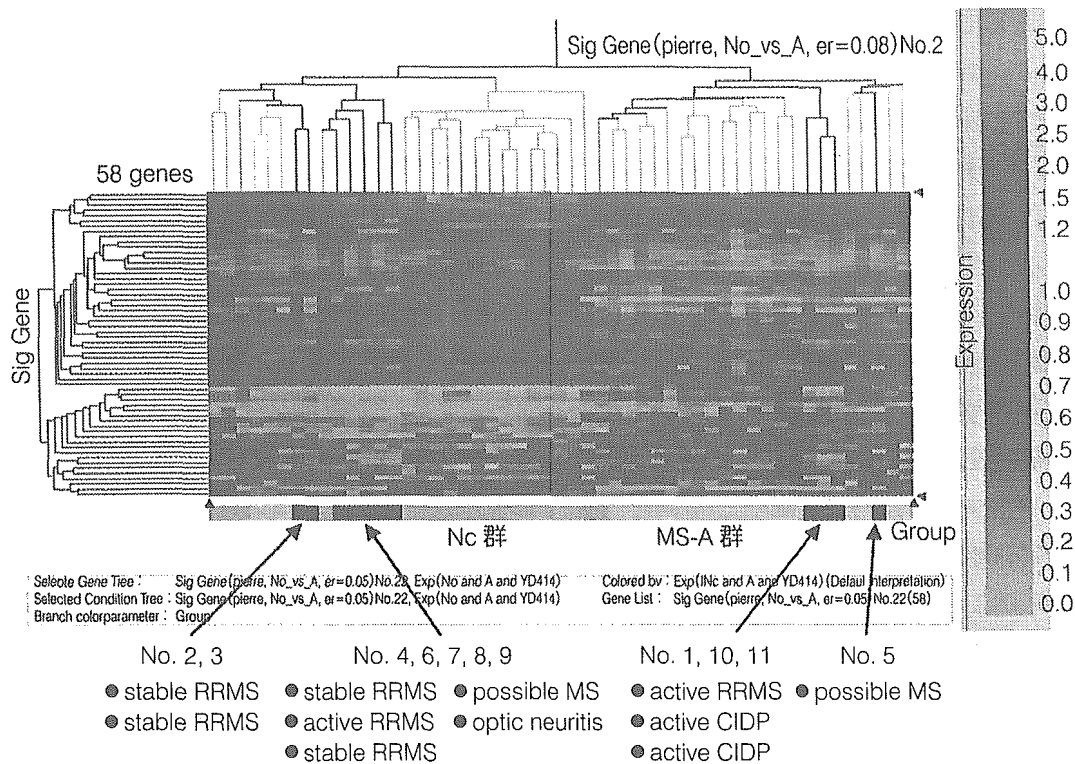


図 1. 階層的クラスター解析

未治療 MS (n=72) と健常人 Nc (n=22) の T 細胞の cDNA マイクロアレイ (1,259 遺伝子) 解析で発現差異を認める 286 遺伝子を指標遺伝子 (discriminator genes) とする階層的クラスター解析 (hierarchical clustering analysis) で、MS 群は Nc 群と分離され A, B, C, D の 4 群に分類された。A 群は遺伝子発現プロファイルが最も Nc 群に類似し、群間検定で両者を識別する 58 遺伝子を抽出した。新規 11 症例 (2 例の活動性 MS, 4 例の非活動性 MS, 2 例の possible MS, 1 例の視神経炎, 2 例の活動性慢性炎症性脱髄性多発神経炎) を適合させると、非活動性 MS は全例健常人群に分類され、一方慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: CIDP) は MS-A 群に分類された。

MMP-9 は IFN- β により低下, GA では上昇した。
van Boxel-Dezire ら³⁶⁾ は IFN- β 治療を受けた 26 例の RRMS の PBMC におけるサイトカイン遺伝子発現レベルを半定量的 RT-PCR で経時的に解析した。治療前後 2 年間の再発回数・IVMP 回数・Extended Disability Status Scale (EDSS) スコアを集計し比較して 16 例のレスポンドーと 10 例のノンレスポンドーに分けると、レスポンドーは治療前に IL-12 p 35 発現レベルが低い傾向を呈した。Wandinger ら³⁷⁾ は IFN- β 治療を受けた RRMS で治療後 1 年間再発がなく EDSS スコア悪化のみられない症例をレスポンドー、再発した症例をノンレスポンドーと定義した。20 例の

レスポンドーと 19 例のノンレスポンドーを比較すると、レスポンドーでは TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL, TNFSF 10) が持続的高値を示すことを見出した。TRAIL は IRG の 1 つで、われわれ¹⁸⁾ は MS T 細胞における発現低下を報告している。TRAIL 遺伝子欠損マウスは胸腺細胞アポトーシスに異常をきたし、コラーゲン関節炎に高感受性になる³⁸⁾。Baranzini ら³⁹⁾ は IFN- β 治療を受けた 52 例の RRMS で PBMC における 70 遺伝子の発現レベルを経時的に定量的 RT-PCR で解析した。治療後 2 年間 1 度も再発がなく EDSS スコア悪化のない症例をレスポンドー、2 回以上再発した症例をノンレス

表 2. SVM 解析によるグループ分類

					Case No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
					Age/Sex	40 F	57 F	30 M	37 M	36 F	48 F	61 F	37 F	22 F	16 M	18 M
					Clinical Diagnosis	Active RRMS	Stable RRMS	Stable RRMS	Stable RRMS	Possible MS	Active RRMS	Stable RRMS	Possible MS	Optic Neuritis	CIDP	CIDP
					Clustering by 58 genes	A	Nc	Nc	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
SVM No.	Gene Set	Gene Selection Method	No. of Predictor Genes	Kernel Function	SVM Classification											
1	58	All genes	—	PDP(Order 1)	A	Nc	A	A	A	Nc	A	Nc	Nc	A	A	
2	58	All genes	—	PDP(Order 2)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
3	58	All genes	—	PDP(Order 3)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
4	58	All genes	—	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
5	286	All genes	—	PDP(Order 1)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
6	286	All genes	—	PDP(Order 2)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
7	286	All genes	—	PDP(Order 3)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
8	286	All genes	—	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
9	286	Fisher's Exact Test	50	PDP(Order 1)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
10	286	Fisher's Exact Test	50	PDP(Order 2)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
11	286	Fisher's Exact Test	50	PDP(Order 3)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
12	286	Fisher's Exact Test	50	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
13	286	Golub Method	50	PDP(Order 1)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
14	286	Golub Method	50	PDP(Order 2)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
15	286	Golub Method	50	PDP(Order 3)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
16	286	Golub Method	50	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
17	286	Fisher's Exact Test	30	PDP(Order 1)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
18	286	Fisher's Exact Test	30	PDP(Order 2)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
19	286	Fisher's Exact Test	30	PDP(Order 3)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
20	286	Fisher's Exact Test	30	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
21	286	Golub Method	30	PDP(Order 1)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	Nc
22	286	Golub Method	30	PDP(Order 2)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	Nc
23	286	Golub Method	30	PDP(Order 3)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	Nc
24	286	Golub Method	30	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	Nc
25	286	Fisher's Exact Test	10	PDP(Order 1)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
26	286	Fisher's Exact Test	10	PDP(Order 2)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
27	286	Fisher's Exact Test	10	PDP(Order 3)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	Nc
28	286	Fisher's Exact Test	10	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	Nc
29	286	Golub Method	10	PDP(Order 1)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc
30	286	Golub Method	10	PDP(Order 2)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc
31	286	Golub Method	10	PDP(Order 3)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc
32	286	Golub Method	10	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc
33	1259	All genes	—	PDP(Order 1)	A	A	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
34	1259	All genes	—	PDP(Order 2)	A	A	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
35	1259	All genes	—	PDP(Order 3)	A	A	A	A	A	A	Nc	Nc	A	A	A	A
36	1259	All genes	—	Radial basis(Gaussian)	A	A	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	A	A	A
37	1259	Fisher's Exact Test	50	PDP(Order 1)	A	Nc	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
38	1259	Fisher's Exact Test	50	PDP(Order 2)	A	Nc	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
39	1259	Fisher's Exact Test	50	PDP(Order 3)	A	Nc	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
40	1259	Fisher's Exact Test	50	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
41	1259	Golub Method	50	PDP(Order 1)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
42	1259	Golub Method	50	PDP(Order 2)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
43	1259	Golub Method	50	PDP(Order 3)	A	Nc	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
44	1259	Golub Method	50	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
45	1259	Fisher's Exact Test	30	PDP(Order 1)	A	Nc	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
46	1259	Fisher's Exact Test	30	PDP(Order 2)	A	Nc	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
47	1259	Fisher's Exact Test	30	PDP(Order 3)	A	Nc	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
48	1259	Fisher's Exact Test	30	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
49	1259	Golub Method	30	PDP(Order 1)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
50	1259	Golub Method	30	PDP(Order 2)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
51	1259	Golub Method	30	PDP(Order 3)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
52	1259	Golub Method	30	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
53	1259	Fisher's Exact Test	10	PDP(Order 1)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
54	1259	Fisher's Exact Test	10	PDP(Order 2)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
55	1259	Fisher's Exact Test	10	PDP(Order 3)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
56	1259	Fisher's Exact Test	10	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
57	1259	Golub Method	10	PDP(Order 1)	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	Nc
58	1259	Golub Method	10	PDP(Order 2)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	Nc
59	1259	Golub Method	10	PDP(Order 3)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	Nc
60	1259	Golub Method	10	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A

未治療 MS(n=72)と健康人 Nc(n=22)の T細胞の cDNA マイクロアレイ(1,259 遺伝子)解析で発現差異を認める 286 遺伝子を指標遺伝子(discriminator genes)とする階層的クラスター解析(hierarchical clustering analysis)で、MS 群は Nc 群と分離され A, B, C, D の 4 群に分類された。A 群は遺伝子発現プロファイルが最も Nc 群に類似し、群間検定で両者を識別する 58 遺伝子抽出した。Gene Set : SVM 実行に使用された遺伝子セット、Gene Selection Method : predictor genes を選定した検定法、Kernel Function : グループ・クラス判別に使用された Kernel 関数の種類