

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書（I）

目 次

| 課題番号 | | |
|---------|---|--------------|
| KH11001 | バイオフィotonicsを利用した細胞組織障害を視る、測る、解析する技術の開発 | 川西 徹 …… 1 |
| KH11002 | 成長制御機構の解明と成長障害治療法の開発 | 緒方 勤 …… 16 |
| KH12072 | 変異を克服した画期的抗ウイルス薬の開発 | 野口博司 …… 21 |
| KH21004 | 動脈硬化症と血栓症にかかわるスフィンゴシン1-リン酸 (S1P) 受容体 (S1P3) の拮抗薬の開発 | 望月直樹 …… 30 |
| KH21005 | 遺伝子改変動物を用いた病態関連因子の解明と創薬への応用に関する研究 | 田上昭人 …… 40 |
| KH21006 | 病態時の侵害情報伝達に関与するプリン受容体の機能解明 | 井上和秀 …… 100 |
| KH21007 | 蛋白立体構造異常を原因とするコンフォメーション病に対する病態解明と創薬探索システムの確立 | 桃井 隆 …… 126 |
| KH21008 | 高密度CGHアレイを用いた新規白血病・リンパ腫治療薬の標的分子の探索 | 小川誠司 …… 144 |
| KH21009 | 脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用 | 花田賢太郎 …… 154 |
| KH21010 | 繊維芽細胞の放出するmacrophage活性化因子とJAG1蛋白の関連と臓器繊維化の機序解明 | 香坂隆夫 …… 168 |
| KH21011 | 血管におけるレクチンを介する生体防御システムの解明と創薬への応用 | 若宮伸隆 …… 181 |
| KH21012 | コネキシン遺伝子の癌抑制機能の網羅的解析；癌予防および治療への応用 | 矢野友啓 …… 196 |
| KH21013 | 免疫グロブリン大量静注療法的作用機序解明と新しい治療標的分子の探索 | 阿部 淳 …… 208 |
| KH21014 | 受精および初期胚発生における糖鎖の役割解析とその応用に関する研究 | 藤本純一郎 …… 221 |
| KH21015 | 細胞内エネルギー代謝制御分子の機能発現機構の解明と新規治療薬への応用 | 江崎 治 …… 235 |
| KH21018 | アルツハイマー病における新規創薬ターゲット検索のための、APP細胞内ドメインの機能解析 | 中山耕造 …… 247 |
| KH21019 | 創薬への応用を目標としたB細胞の分化・増殖・細胞死の制御機構解明に関する研究 | 上出利光 …… 262 |
| KH21021 | エンドトキシン認識・刺激伝達機構の解明と医療への応用に関する研究 | 西島正弘 …… 286 |
| KH21022 | ウイルスRNA結合ペプチドを用いたC型肝炎治療薬の開発 | 鈴木哲朗 …… 300 |
| KH21023 | 末梢血幹細胞の分化増殖機構の解明と創薬への応用に関する研究 | 葛西正孝 …… 310 |
| KH21101 | 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 | 佐藤準一 …… 318 |

| | | | |
|---------|---|--------|--------|
| KH22073 | 機能性精神疾患のハイスループットSNPs解析と機能解析による創薬標的分子の解明 | 功刀 浩 | …… 344 |
| KH31024 | 超難溶性薬物の効率的製剤化に非晶質の特異性を活用する技術とその評価法の確立 | 吉岡 澄江 | …… 358 |
| KH31025 | 生薬及び漢方処方 of 科学的品質保証に関する研究 | 合田 幸広 | …… 373 |
| KH31026 | 食中毒細菌の新規迅速検査法の開発とその評価法に関する研究 | 工藤由起子 | …… 390 |
| KH31027 | ハイスループット・ヒト型遺伝毒性試験系の構築 | 能美 健彦 | …… 402 |
| KH31028 | ヒト肝細胞で置換された肝臓を持つマウスの医薬品開発への利用ー非拘束マウスの胆汁採取分析技術の確立ー | 吉里 勝利 | …… 417 |
| KH31029 | 高度分析評価技術を応用した医薬品製剤開発および製造工程管理手法の研究 | 檜山 行雄 | …… 435 |
| KH31030 | 患者個別化薬物治療のための遺伝子タイピング法及びメタボロミクス的手法の開発に関する研究 | 斎藤 嘉朗 | …… 449 |
| KH31031 | 細胞医療に用いられる細胞組織利用医薬品の品質・安全性評価技術の開発 | 山口 照英 | …… 466 |
| KH31032 | 医薬品等の有効性・安全性を保証するための分析・解析技術の評価と標準化に関する研究 | 林 讓 | …… 481 |
| KH31034 | プロテオミクス及び構造生物学的アプローチ等を用いたバイオ医薬品の特性解析・品質評価技術の開発 | 川崎 ナナ | …… 494 |
| KH31035 | 生物由来製品のウイルス安全性に関する基盤研究 | 内田 恵理子 | …… 509 |
| KH31036 | 臨床薬理学的視点による薬効ゲノム情報活用のための基盤研究 | 東 純一 | …… 525 |
| KH32074 | IT技術を用いた低コストかつ高品質な大規模臨床試験実施基盤の構築 | 永井 洋士 | …… 537 |
| KH41037 | 抗フリーラジカル療法を目指した基盤研究と創薬への応用 | 綱脇 祥子 | …… 551 |
| KH41038 | ボツリヌス神経毒素有効成分を利用したジストニア・痙縮等の治療法の確立と筋萎縮性側索硬化症に対するdrug delivery systemの開発 | 梶 龍兒 | …… 566 |
| KH42075 | 熱帯病・寄生虫症に対する稀少疾病治療薬の輸入・保管・治療体制の開発研究 | 名 和 行文 | …… 576 |

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

所属 明治薬科大学 薬学部

研究者 佐藤 準一

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、再発を繰り返して進行する難病である。炎症が遷延化すると軸索傷害を来して不可逆的な機能障害を残す。MSは通常の血液検査では異常を認めず、診断は臨床症状・経過・神経学的所見・脳脊髄液所見・MRI画像に基づいてなされるが、鑑別疾患が多く必ずしも容易ではない。近年、インターフェロンベータ(IFN β)のMS再発抑制効果が立証された。MSの前駆病態であるclinically isolated syndrome(CIS)では、早期にIFN β 治療を開始するとMSへの移行を抑制可能である。早期治療開始のためにはMSの高精度診断法の樹立が望まれる。MSでは髄鞘抗原を認識する活性化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、マクロファージ・ミクログリアを活性化して炎症増強因子産生を誘導し脱髄が惹起される。従って自己反応性活性化T細胞を含む末梢血リンパ球の遺伝子発現プロファイルの解析がMSの鑑別診断に役立つと推測される。本研究(2年間)ではDNAマイクロアレイによるMS迅速診断法の確立を主目的とする。平成17年度(初年度)は国立精神・神経センター武蔵病院の多数のMS, non-MS対照神経疾患、健常者(normal control; Nc)の末梢血T細胞のRNAを精製した。DNAマイクロアレイ解析により、MS(n = 72)とNc(n = 22)で発現差異を認める遺伝子群を指標にしてMS病型分類データベース(MS classification database; MSCD)を樹立した。平成18年度(第2年度)は検体収集数をさらに増加し(新規129検体)、58遺伝子(MS diagnostic genes; MDG)を指標とする階層的クラスター解析(hierarchical clustering analysis; HCA)とサポートベクターマシン(support vector machine; SVM)解析に基づくMS診断法を開発し、精度を検証した。

分担研究者

- (1) 国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第六部 山村 隆
- (2) 日立製作所ライフサイエンス推進事業部
遺伝子診断事業推進センター 斎藤俊郎
- (3) 国立精神・神経センター神経研究所
免疫研究部 荒浪 利昌

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は視神経・大脳・脊髄など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。炎症が遷延化すると軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。MSの診断は臨床症状・経過・神経学的所見・脳脊髄液所見・MRI画像に基づい

てなされるが、神経内科専門医でも必ずしも容易ではない。ヘルペスウイルス性脊髄炎・HTLV-I関連性脊髄症・神経ペーチェット病・シェーグレン症候群・脳血管炎・悪性リンパ腫・多発性脳梗塞はMSと誤診されることが多い。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(IFN β)のMS再発抑制効果が立証された。IFN β は初回症状first attack(clinically isolated syndrome; CISとも呼ばれる)出現直後に開始するとMSへの移行を抑制可能であり(Jacobs et al. N Engl J Med 343: 898-904, 2000), 早期治療開始のためにもMSの高精度診断法の樹立が望まれる。MSでは髄鞘抗原反応性活性化CD4⁺ Th1 T細胞が、血液脳関門を通過して中枢神経系組織内に浸潤し、炎症性脱髄を惹起する(自己免疫学的機序)。従って自己反応性活性化T細胞を含む末梢血リンパ球の遺伝子発現プロフィールの解析がMSの鑑別診断に役立つと考えられる。

本研究(2年間)ではDNAマイクロアレイによるMS迅速診断法の確立を主目的とする。平成17年度(初年度)は国立精神・神経センター武蔵病院の多数のMS, non-MS 対照神経疾患(other neurological diseases; OND), 健常者(normal control; Nc)の末梢血T細胞RNAを精製、遺伝子発現プロフィールをDNAマイクロアレイで解析、MS(n = 72)とNc(n = 22)で発現差異を認める286遺伝子を指標にしてMS分類データベース(MS classification database; MSCD)を樹立した。平成18年度(第2年度)は検体収集数をさらに増加して、階層的クラスター解析(hierarchical clustering analysis; HCA)とサポートベクターマシン(support vector machine; SVM)解析に基づくMS診断法を開発し、精度を検証した。末梢血によるMS診断法が確立されれば、早期治療や創薬に貢献し、患者の後遺症を減ら

して社会復帰を促進出来ると思われる。

B. 研究方法

#1. 検体の収集(分担研究者山村・荒浪): 平成17年度(初年度)はMS診断基準(McDonald et al. Ann Neurol 50: 121-127, 2001; Poser et al. Ann Neurol 13: 227-231, 1983)を満たす、文書で同意を取得した国立精神・神経センター武蔵病院神経内科通院・入院中の多数の再発寛解型MS患者とnon-MS神経疾患患者(臨床的にMSと鑑別困難な神経疾患を含む)、および健常者(normal control subjects; Nc)ボランティアから末梢血リンパ球を分離、CD3抗体マイクロビーズでラベルし、autoMACS (Miltenyi Biotec)を用いてCD3⁺ T細胞分画を精製、RNAeasy mini kit (Qiagen)でRNAを抽出、-80°Cで凍結保存した。

#2. DNAマイクロアレイ解析(主任研究者佐藤・分担研究者斎藤・荒浪): 各々のRNAサンプルをMessengeAmp aRNA kit (Ambion)を用いて増幅、逆転写反応により蛍光色素標識cDNAを作成、DNAマイクロアレイ(Human cDNA Microarray, 1,258 genes; Hitachi Life Science)と反応させ、特異的シグナルをMicroarray Scannerで検出、signal intensity (SI)をQuantArray software (GSI Lumonics)を用いて定量した。データセットに関してGeneSpring 7.2(Agilent)を用いて階層的クラスター解析(HCA)・主成分解析(principal component analysis; PCA)を施行した。すなわちMS(n = 72)と健常者(n = 22)の群間比較(多重検定Bonferroni補正後error rate < 0.25)で発現差異を認める286遺伝子を抽出、指標としてHCAを施行、MSをT細胞遺伝子発現プロフィールからA, B, C, Dの4サブグループに分類出来るMS病型分類データベース(MS classification database; MSCD)を作成した。

平成 18 年(第 2 年度)は MS-A(MSCD 上 Nc)に最も類似した T 細胞遺伝子発現プロファイルを呈する MS サブグループ)と Nc の群間比較(多重検定 Bonferroni 補正後 error rate < 0.25)で発現差異を呈する 58 遺伝子を絞り込んだ。

平成 18 年(第 2 年度)は検体数を増加し(新規 129 RNA 検体を追加)、MS-A と Nc のデータセットを training set として機械学習した SVM 解析と 58 遺伝子を指標とする HCA 解析に基づく MS 診断法を開発し、臨床診断と対比させて精度を検証した。SVM では MS と Nc の識別関数(Kernel function)として、polynomial dot product (PDP)- 1, 2, 3 と radial basis (Gaussian)を用いた。

また再発寛解型 MS 患者(n = 6)では経時的に追跡、急性増悪期(acute relapse)と完全寛解期(complete remission)の未治療の時期に採血、DNA マイクロアレイで CD3 陽性 T 細胞の遺伝子発現プロファイルを解析し、再発期と寛解期で発現差異(群間検定 Student's t-test, $p < 0.05$)を認める 43 遺伝子を同定した。さらに Illes 准教授(Hungary Pecs 大学)との共同研究で、DNA マイクロアレイで Hungarian monozygotic (MZ) twin 4 pairs の末梢血 CD3 陽性 T 細胞の遺伝子発現プロファイルを比較解析し、MS 特異的 20 遺伝子を同定した。

DNA マイクロアレイで同定した遺伝子群の MS における病態生理学的意義を調べるため、バイオインフォマティクスの新しいデータマイニングツールである KeyMolnet(医薬分子設計研究所 IMMD)を用いて、分子ネットワークを解析した。KeyMolnet は生体分子・医薬・疾患・生命現象・分子ネットワークに関して、IMMD 専属バイオロジストが厳選したレビュー誌から情報を収集し体系化した core コン

テンツと PubMed アブストラクトから構築した secondary コンテンツを電子化した生物情報統合プラットフォームで、3 ヶ月ごとにアップデートされている。結合・発現制御・複合体形成を包括的に調べる周辺検索法(neighboring search)と発現制御に関する転写因子群を調べる共通上流検索法(common upstream search)に従って、分子ネットワークを解析した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

#1. 検体の収集(分担研究者山村・荒浪)：平成 17 年度に解析した MS(n = 72), Nc(n = 22)に加えて、平成 18 年度は新規に MS, non-MS OND および Nc より合計 129 RNA 検体を精製し、-80°C で凍結保存した。内訳は MS(n = 114), Nc(n = 7), non-MS OND(n = 8; CIDP, HSP, ALS, OPCA, OYL, psychogenic reaction, sarcoidosis)である。病歴調査より MS 群は McDonald 診断基準を満たす relapsing-remitting MS(RRMS, n = 89; the patients in acute relapse, n = 16), secondary progressive MS(SPMS, n = 3), primary progressive MS(PPMS, n = 3)と、Poser 診断基準に適合する possible MS(n = 16; the patients with CIS, n = 6), neuromyelitis optica (NMO, n = 3)に該当した。またこ

の他に Hungary 人 MS 33 検体と Nc 22 検体を収集した。

#2. MS 病型分類データベースの作成(主任研究者佐藤・分担研究者山村・斎藤・荒浪): MS(n = 72) と健常者(Nc)(n = 22)の末梢血 CD3 陽性 T 細胞の遺伝子発現プロフィールを比較解析した。MS と Nc で発現差異を認める 286 遺伝子を指標として HCA を施行、MSCD を樹立した(Fig. 1)。286 遺伝子は 5 クラス(class #1-#5)に分類された。MS 群は Nc 群から識別され、さらに 4 サブグループ(A, B, C, D)に分類された。A 群は遺伝子発現プロフィールが最も Nc 群に類似、B 群は臨床的活動性が最も高く、chemokine 遺伝子が集積した class #5 の発現レベルが最も高く、C 群は大脳限局病変を呈する患者が多く、D 群は EDSS スコアが最も高値であった。IFN β 治療症例(n = 46)では、治療前後 2 年間の再発回数・IVMP 日数・入院日数・EDSS スコア・MRI T2 強調画像病巣数と治療満足度スコアを集計、治療反応性良好群(responder)と不良群(nonresponder)に分類すると、IFN β responder は A 群と B 群に集積していた。Responder では nonresponder に比較し、治療開始後 6 ヶ月の時点の IFN-responsive genes(ISG15, IFI27, MCP-1, TNFRp75)の発現レベルが高値に維持されることがわかった(Sato et al. J Neuroimmunol 174: 108-118, 2006)。

#3. HCA, SVM に基づく MS 診断法の開発と精度の検証(主任研究者佐藤・分担研究者山村・斎藤・荒浪): MSCD 上、MS-A と Nc で発現差異を認める 58 遺伝子(MS diagnostic genes; MDG)を抽出した。KeyMolnet で 58 MDG に関連する 95 遺伝子を抽出、共通上流検索法で分子ネットワークを解析した。その結果、MS と Nc を識別する遺伝子群の発現におけ

る Myc/Mad および p63 を介する制御系の関与が示唆された(Fig. 2)(Manuscript in preparation)。

次に新規 129 例のうち McDonald 診断基準を満たす MS 95 例(RRMS, n = 89; SPMS, n = 3; PPMS, n = 3) と non-MS 15 例(Nc, n = 7; non-MS OND, n = 8)に関して、58 MDG を指標とする HCA 解析および MSCD を training set として機械学習した SVM 解析を施行、臨床診断と照らし MS 診断正答率を調べた。この方法では採血から最短で 3 日以内に診断結果を得ることが出来た。HCA と SVM の一致率は 74.5%(82/110)で、正答率(MS を MS と診断、Nc/non-MS OND を Nc と診断)は HCA 30.9%(34/110), SVM 32.7%(36/110)であった。偽陰性率(MS を Nc と誤診断)は HCA 70.5%(67/95), SVM 71.6%(68/95)で、偽陽性率(Nc/non-MS OND を MS と誤診断)は HCA 60.0%(9/15), SVM 40.0%(6/15)であった。すなわち McDonald 診断基準を満たす MS で、58 MDG を指標とする HCA 単独または SVM 識別法単独では診断正答率が低く、誤診率が高いことが判明した(Table 1)。

さらに Poser 診断基準を満たす MS 114 例(RRMS, n = 89; SPMS, n = 3; PPMS, n = 3; possible MS, n = 16; NMO, n = 3)と non-MS 15 例(Nc, n = 7; non-MS OND, n = 8)に関して、58 MDG を指標とする HCA 解析および MSCD を training set として機械学習した SVM 解析を施行、臨床診断と照らし MS 診断正答率を調べた。HCA と SVM の一致率は 69.8%(90/129)で、正答率(MS を MS と診断、Nc/non-MS OND を Nc と診断)は HCA 29.5%(38/129), SVM 34.1%(44/129)であった。偽陰性率(MS を Nc と誤診断)は HCA 71.9%(82/114), SVM 69.3%(79/114)で、偽陽性率(Nc/non-MS OND を MS と誤診断)は HCA 60.0%(9/15), SVM 40.0%(6/15)であった。すなわち

Poser 診断基準を満たす MS でも、58 MDG を指標とする HCA 単独または SVM 識別法単独では診断正答率が低く、誤診率が高いことが判明した。

#4. MS 再発期特異的遺伝子群 (relapse-specific genes; RSG) の同定 (主任研究者佐藤・分担研究者山村) : 再発期と寛解期で発現差異を認める 43 遺伝子 (再発期に上昇 18 と低下 25) を同定した。43 RSG を指標とする階層的クラスター解析で、再発期と寛解期のサンプルを独立したクラスターに識別出来た。MS 再発の分子機序を解明するため、KeyMolnet を用いて 43 RSG に関連する 88 分子を抽出、分子ネットワークを解析した。共通上流検索法と周辺検索法の両方で、MS 再発時の NF- κ B 発現制御系異常が、統計学的有意性をもって示唆された (Fig. 3) (Sato et al. Submitted for publication)。

#5. Hungarian MZ twin 解析による MS 特異的遺伝子群の探索 (主任研究者佐藤・分担研究者山村) : Hungarian MZ twin 4 pairs (concordant pairs; #1. MS/MS; #2. MS/MS; #3. MS/MS; discordant pair: #4. MS/Nc) の末梢血 CD3 陽性 T 細胞を遺伝子アレイで解析、concordant pairs (#1-3) で各々発現差異を認める上位 100 遺伝子 (100 DEG) を抽出した。次に discordant pair (#4) で発現差異を認める上位 50 遺伝子 (50 DEG) を抽出した。最終的に 50 DEG 中で 100 DEG に含まれない 34 遺伝子から、Nc に比較し MS で 2 倍以上の発現差異を呈する 20 遺伝子 (20 DEG) を抽出した。KeyMolnet で 20 DEG に関連する 43 遺伝子を抽出、共通上流検索法で分子ネットワークを解析した。その結果、MS 特異的遺伝子発現プロファイルの特徴として、Ets 転写因子ファミリーおよび NF- κ B を介する発現制御系の関与が示唆された (Sato et al. Submitted for publication)。

D. 考察

2003 年にヒトゲノム解読が完了し、全ヒト遺伝子 (約 22,000 個) が同定された。DNA マイクロアレイはスライドガラス上に数万遺伝子を固定したチップで、細胞の遺伝子発現を網羅的かつ迅速に解析出来る。DNA マイクロアレイ解析は臨床所見や画像のみでは鑑別困難な疾患の補助診断のツール、腫瘍悪性度や予後の予測、薬物応答や副作用の予測、治療効果の判定など幅広い臨床応用が可能で、ポストゲノム創薬において必須の研究手法となっている。DNA マイクロアレイ解析では多数のデータセットの要素特性を階層的クラスター解析 (HCA) で分類する。教師なし法 (unsupervised method) では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サンプルをクラスター (グループ) に分類し、クラスターを識別し得る指標遺伝子 (discriminator genes) を抽出する。サポートベクターマシン (SVM) 解析は、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クラスターを識別可能な超平面 (hyperplane) を同定する方法 (教師あり法 supervised method) である。

本研究では平成 17 年度 (初年度) に T 細胞の DNA マイクロアレイ解析により MS 病型分類データベース (MSCD) を樹立した。MSCD では多様な病態を呈する MS を 4 群に分類し、各群は疾患活動性・病巣分布・IFN β 治療反応性との密接な関連を認めた。平成 18 年度 (第 2 年度) は HCA, SVM に基づく MS 診断法を開発し、採血から 3 日以内に診断結果を得ることが出来た。しかしながら非常に残念なことに、新規 129 検体で指標遺伝子 58 MDG による HCA 単独もしくは SVM 単独では偽陰性率 (false negative rate) が極めて高く (約 70%)、MS と Nc/non-MS OND を識

別困難であることが判明した。指標遺伝子の選定を変更し、SVM 解析のパラメーター(Kernel function)を変化させ、臨床情報(時間的・空間的多発性)との組み合わせにより診断精度を向上出来るか、今後再解析する予定である。一方 MS 患者の再発期と寛解期の T 細胞の DNA マイクロアレイ解析により、NF- κ B を介する遺伝子発現制御系に密接に関連し、再発予測バイオマーカーになり得る 43 RSG を同定することが出来た。また Hungarian MZ twin 解析により、MS 免疫病態機序で中心的役割を果たす転写因子ネットワークを解明出来た(Satoh et al. Submitted for publication)。

E. 結論

末梢血 T 細胞の DNA マイクロアレイ解析により MS 病型分類データベース(MSCD)を樹立し、HCA, SVMに基づく MS 迅速診断法を開発したが、この方法単独では偽陰性率(false negative rate)が高く、MS と Nc/non-MS OND を識別困難であることが判明した。今後解析方法に改良を加える予定である。

F. 研究発表

論文発表

1. Satoh J, Nanri Y, Yamamura T: Rapid identification of 14-3-3-binding proteins by protein microarray analysis. *Journal of Neuroscience Methods* 152: 278-288, 2006.
2. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Onoue H, Aranami T, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Saito T, Ohta M, Miyake S, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology* 174: 108-118, 2006.
3. Satoh J, Nanri Y, Tabunoki H, Yamamura T: Microarray analysis identifies a set of CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early IFN β -responsive genes in peripheral blood lymphocytes: an implication for IFN β -related adverse effects in multiple sclerosis. *BMC Neurology* 6: 18-34, 2006.
4. Satoh J, Tabunoki H, Nanri Y, Arima K, Yamamura T: Human astrocytes express 14-3-3 sigma in response to oxidative and DNA-damaging stresses. *Neuroscience Research* 56: 61-72, 2006.
5. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H: TROY and LINGO-1 expression in astrocytes and macrophages/microglia in multiple sclerosis lesions. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 33: 99-107, 2007.
6. Kuroda R, Satoh J, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K: A novel compound heterozygous mutation in the DAPI2 gene in a patient with Nasu-Hakola disease. *Journal of the Neurological Sciences* 252: 88-91, 2007.
7. Onoue H, Satoh J, Ogawa M, Tabunoki H, Yamamura T: Detection of anti-Nogo receptor autoantibody in the serum of multiple sclerosis and controls. *Acta Neurologica Scandinavica* 115: 153-160, 2007.
8. Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T, Arima K, Konno H: Human astrocytes express aquaporin-1 and aquaporin-4 in vitro and in vivo.

Neuropathology in press, 2007.

9. Satoh J, Misawa T, Tabunoki H, Yamamura T: T-cell transcriptome analysis indicates a crucial role of the nuclear factor NF- κ B in relapse of multiple sclerosis. Submitted for publication.
10. Satoh J, Illes Z, Peterfalvi A, Tabunoki H, Rozsa C, Yamamura T: T-cell transcriptome of monozygotic twins suggests a key molecular network involved in MS. Submitted for publication.
11. 佐藤準一: DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の免疫病態の解析. 特集 I サイトカイン・ケモカインからみた多発性硬化症の病型と病態. *Neuroimmunology* 13: 167-178, 2005.
12. 南里悠介、佐藤準一、佐藤和貴郎、山村隆: DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の診断とインターフェロンベータ治療反応性予測に関するアンケート調査. *神経内科* 64: 319-320, 2006.
13. 佐藤準一: 網羅的遺伝子発現解析による多発性硬化症の病態・薬物反応性. 特集 II 遺伝子チップ解析の現状とその将来に期待される展開. *炎症と免疫* 14: 205-216, 2006
14. 佐藤準一: 多発性硬化症のマイクロアレイ診断. 特集 II 多発性硬化症研究・治療の現状 2006. *神経研究の進歩* 50: 582-599, 2006.
15. 佐藤準一: 多発性硬化症. インターフェロン治療学. 最新の基礎・臨床. *日本臨床* 64: 1297-1309, 2006.
16. Satoh J: Protein Microarray Analysis for Rapid Identification of 14-3-3 Protein Binding Partners. In *Functional Protein Microarrays in Drug Discovery*. Edited by Predki PF. CRC Press, Boca

Raton, FL, 2007 (ISBN: 0849398096).

学会発表

国際学会

1. Satoh J, Nanri Y, Doi Y, Yamamura T: Microarray analysis identifies CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as immediate early IFN β -responsive genes in peripheral blood lymphocytes. 58th Annual Meeting of American Academy of Neurology. San Diego, 2006. 4.5. (*Neurology* 66, Suppl 2: A175, 2006).
2. Satoh J, Nanri Y, Yamamura T: Protein microarray analysis for rapid and systematic identification of 14-3-3 protein binding partners. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, 2006. 6.23. (Abstract 5P-B-224, 2006).
3. Satoh J: Human astrocytes express 14-3-3 sigma in response to oxidative and DNA-damaging stresses. Gordon Research Conference. Biology of 14-3-3 Proteins. Oxford, 2006. 8.28.
4. Satoh J, Tabunoki H: Microarray Analysis Characterizes Gene Regulation in Human Astrocytes Following DNA Damage. 7th International Conference on Systems Biology. Yokohama, 2006. 10.9. (MI03).
5. Satoh J: Nogo, Nogo receptor, and TROY expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 8th International Congress of Neuroimmunology. International Symposium: Alzheimer's disease, neurodegeneration and immunity. Nagoya, 2006.10.17. (*Journal of*

Neuroimmunology 178: 21 IS03-05, 2006).

6. Satoh J: Microarray analysis clarifies the immunopathogenesis and therapeutic rationale for IFNB in MS. 8th International Congress of Neuroimmunology. Concurrent Symposium: Proteomics, transcriptomes and disease markers in MS. Nagoya, 2006.10.17.
7. Doi Y, Oki S, Satoh J, Aranami T, Miyake S, Yamamura T: NR4A2 (Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. 8th International Congress of Neuroimmunology. Workshop 14: Pathogenesis of MS. Nagoya, 2006.10.18. (Journal of Neuroimmunology 178: 78 WS14-02, 2006).
8. Satoh J, Tabunoki H, Nanri Y, Yamamura T, Arima K, Konno H: Both aquaporin-1 (AQP1) and aquaporin-4 (AQP4) are expressed in cultured human astrocytes and non-hypertrophic astrocytes in brains of multiple sclerosis. 8th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session 11: MS- pathology and experimental models. Nagoya, 2006.10.16. (Journal of Neuroimmunology 178: 188 PP11-03, 2006).
9. Onoue H, Satoh J, Ogawa M, Yamamura T: Anti-Nogo receptor autoantibody in the serum of multiple sclerosis. 8th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session 12: MS-immunological studies. Nagoya, 2006.10.16. (Journal of Neuroimmunology 178: 199 PP12-23, 2006).
10. Satoh J, Nanri Y, Sato W, Yamamura T: DNA microarray analysis identifies CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early IFN-responsive genes in peripheral blood lymphocytes. 8th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session 14: MS-therapy. Nagoya, 2006.10.16. (Journal of Neuroimmunology 178: 205 PP14-01, 2006).
11. Nanri Y, Satoh J, Sato W, Yamamura T: Questionnaire on the expediency of DNA microarray analysis for differential diagnosis of multiple sclerosis and prediction of therapeutic response to interferon-beta. 8th International Congress of Neuroimmunology. Poster Session 15: MS-clinical studies. Nagoya, 2006.10.16. (Journal of Neuroimmunology 178: 215 PP15-03, 2006).
12. Satoh J: Microarray analysis clarifies immunopathogenesis and rationale for interferon-beta therapy in multiple sclerosis. The 1st International Seminar of Meiji Pharmaceutical University Asia/Africa Center for Drug Discovery. Special Lecture. Tokyo, 2007.3.9.
13. Satoh J, Tabunoki H: Human astrocytes express aquaporin-1 and aquaporin-4 in vitro and in vivo. 59th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Boston, 2007. 5.3.

国内学会

1. 佐藤準一、南里悠介、土居芳充、山村隆: Protein microarray による 14-3-3 結合タンパク質の網羅的解析. 第 47 回日本神経学会総会. 東京、2006. 5.12. (抄録集 199, 2006).
2. 南里悠介、佐藤準一、土居芳充、山村隆: DNA microarray による MS 診断法・IFN β 治療効果予測法開発に関するアンケート調査. 第 47 回日

- 本神経学会総会. 東京、2006.5.13. (抄録集 285, 2006).
3. 佐藤準一、南里悠介、山村隆、有馬邦正：ヒト中枢神経系における 14-3-3, Hsp60, PrPC 複合体形成. 第 47 回日本神経病理学会総会学術研究会. 岡山、2006.5.26. (Neuropathology 26: A43, 2006).
 4. 天竺桂弘子、佐藤準一、佐藤令一：カイクによる RNA 医薬の評価系の確立. 第 7 回 Pharmacology-Hematology Symposium. 東京、2006.6.30. (抄録集 23, 2006).
 5. 佐藤準一：T 細胞の DNA マイクロアレイ解析による多発性硬化症の病型分類とインターフェロンベータ治療反応性. 第 15 回明治薬科大学オープンリサーチセンターセミナー. 東京、2006.7.13.
 6. 佐藤準一：プリオン：その不思議な世界. 明治薬科大学オープンキャンパス 2006. 薬学ミニ講義. 東京、2006.7.29.
 7. 佐藤準一：ヒトアストロサイトの DNA 傷害に対する応答. 第 4 回明治薬科大学オープンカレッジ. 網羅的解析で得られた生体情報を読みこなす. 東京、2006.8.7.
 8. 佐藤準一：神経疾患病態形成における 14-3-3 の役割：多発性硬化症とプリオン病. 東京大学老年病科抗加齢医学教室第 5 回がんと神経セミナー. 東京、2006.11.14.
 9. 天竺桂弘子、陸玲玲、三澤多真子、佐藤準一：DNA マイクロアレイによる培養ヒトミクログリアにおけるインターフェロン応答遺伝子群の網羅的解析. 第 5 回ファーマ・バイオフィォーラム. 東京、2006.12.9. (抄録集 p15, 2006).
 10. 三澤多真子、陸玲玲、庄司麻衣子、天竺桂弘子、佐藤準一：神経幹細胞でオーファン核内受容体 Nurr1 により発現誘導される遺伝子群のネットワーク解析. 第 5 回ファーマ・バイオフィォーラム. 東京、2006.12.9. (抄録集 p16, 2006).
 11. 工藤晃太、三澤多真子、陸玲玲、天竺桂弘子、佐藤準一：KeyMolnet による統合失調症とうつ病の分子機序の比較解析. 第 5 回ファーマ・バイオフィォーラム. 東京、2006. 12.9. (抄録集 p16, 2006).
 12. Satoh J, Kawai M, Tabunoki H, Kanda T, Yamamura T：Microarray analysis identifies CXCR3 ligand chemokines as immediate early IFN-responsive genes in peripheral blood lymphocytes in vitro and in vivo. 第 36 回日本免疫学会総会学術集会. 大阪、2006.12.11. (Proceedings of the Japanese Society for Immunology 36: 188, 2006).
 13. 佐藤準一、天竺桂弘子、三澤多真子：MS 再発寛解期の末梢血 T リンパ球で発現差異を呈する遺伝子群の分子ネットワーク解析. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患の画期的診断・治療法に関する研究事業. 平成 18 年度班会議. 東京、2006.12.15.
 14. 佐藤準一：DNA マイクロアレイ診断. 厚生労働科学こころの健康科学研究推進事業. 第 3 回多発性硬化症フォーラム. 医療講演会・研究成果発表会. 東京、2006.12.16.
 15. 天竺桂弘子、三澤多真子、佐藤準一：カイク 14-3-3 オルソログのクローニング. 日本薬学会第 127 年会. 富山、2007.3.28.
 16. 佐藤準一、天竺桂弘子、三澤多真子、陸玲玲：多

発性硬化症再発治療薬創薬ターゲットとしての NF- κ B シグナル伝達系. 日本薬学会第 127 年会. 富山、2007.3.30.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

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

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

3) 多発性硬化症再発予測法(特許申請中).

2. 実用新案登録 該当なし

3. その他 : GenBank 登録 2 件.

1) [Satoh J](#), Kuroda R, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K: Homo sapiens TYROBP gene for TYRO protein tyrosine kinase binding protein, exon 3, partial sequence, DNA Data Bank of Japan, AB280796, 2006.

2) [Satoh J](#), Kuroda R, Yamamura T, Anezaki T, Terada T, Yamazaki K, Obi T, Mizoguchi K: Homo sapiens TYROBP gene for TYRO protein tyrosine kinase binding protein, exon 4, partial sequence, DNA Data Bank of Japan, AB280795, 2006.

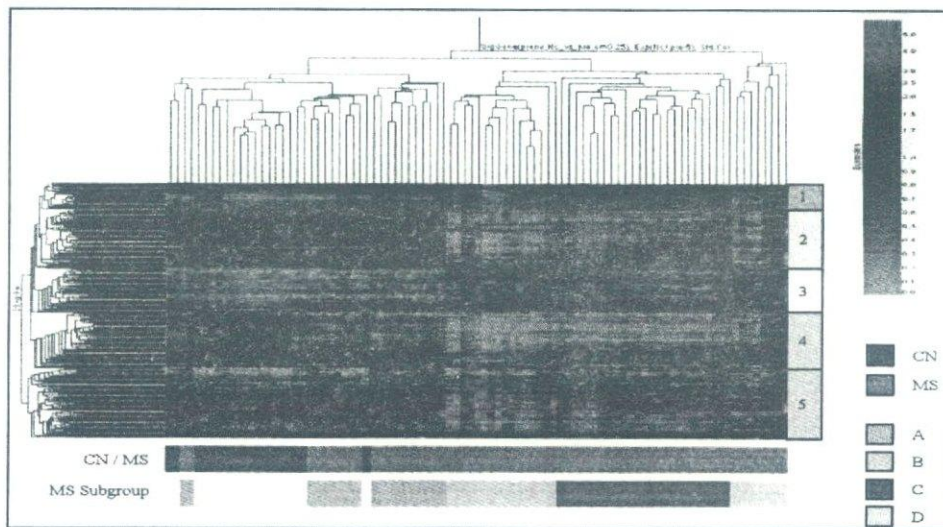


Fig. 1. Hierarchical clustering analysis of 286 genes differentially expressed between 72 untreated MS patients and 22 normal control (CN) subjects. The gene expression profile of peripheral blood CD3⁺ T cells was studied in 72 untreated MS patients and 22 age- and sex-matched healthy control (CN) subjects, by using a 1,258 cDNA microarray. Hierarchical clustering analysis was performed by selecting a set of 286 genes differentially expressed between MS and CN as a discriminator. The results are expressed in a matrix format, with each row representing the gene expression level (GEL) of a single gene in all the subjects and each column representing GEL of 286 genes in an individual subject. The matrix is shown by a pseudo-color, with red expressing upregulation, green expressing downregulation, and the color intensity representing the magnitude of the deviation from GEL 1.0 as shown on the upper right. Hierarchical clustering analysis separated MS (purple) from CN (dark blue), and classified the former into four subgroups named A (green), B (light blue), C (red) and D (yellow). The 286 genes were categorized into five classes numbered #1 (pink) to #5 (light blue) ([Satoh et al. J Neuroimmunol 174: 108-118, 2006](#)).

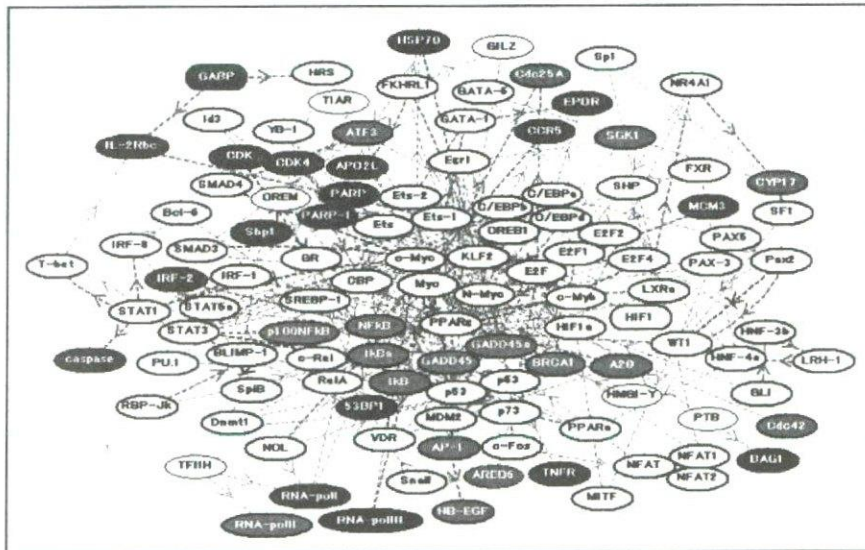


Fig. 2. The common upstream search of 58 differentially expressed genes in T cells between MS subgroup A (MS-A) and normal controls (Nc). The microarray data of 58 differentially expressed genes (MDG) in T cells between MS subgroup A (MS-A) and normal controls (Nc) imported into KeyMolnet extracted 95 genes directly linked to 58 genes. The “common upstream” search of 98 genes generated a molecular network composed of 117 nodes. Red nodes represent upregulated genes in MS-A, whereas purple nodes represent downregulated genes in Nc. White nodes exhibit the genes extracted by KeyMolnet to establish molecular connections. The direction of molecular relation is indicated by dash line with arrow (transcriptional activation) or dash line with arrow and stop (transcriptional repression). Thick lines indicate the core contents, while thin lines indicate the secondary contents of KeyMolnet (Sato et al. Manuscript in preparation).

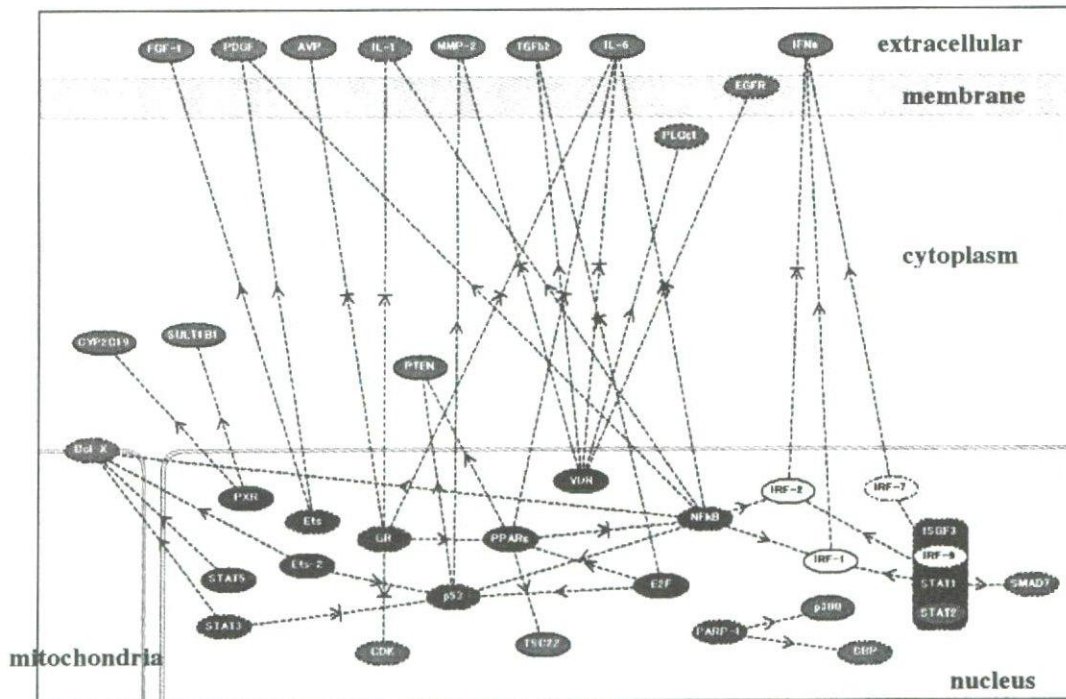


Fig. 3. Subcellular location of the molecules linked to differentially expressed genes in T cells between relapse and remission of MS. The molecular network generated by the “common upstream” search of 43 MS relapse-specific genes (RSG) was arranged by using the editing function of KeyMolnet with respect to subcellular location of molecules. Red nodes represent starting point molecules, whereas blue nodes represent common upstream molecules. Purple nodes express characteristics of both starting point and common upstream molecules. The direction of molecular relation is indicated by dash line with arrow (transcriptional activation) or dash line with arrow and stop (transcriptional repression) (Sato et al. Submitted for publication).

Table 1. MS-Diagnostic Capability of Hierarchical Clustering Analysis (HCA) and Support Vector Machine (SVM) Analysis

| No. | Disease duration (year) | HCA | SVM | Clinical diagnosis | No. | Disease duration (year) | HCA | SVM | Clinical diagnosis |
|-----|-------------------------|-----|-----|--------------------|-----|-------------------------|-----|-----|--------------------|
| 1 | 3.5 | MS | MS | MS | 56 | 7 | MS | MS | MS |
| 2 | 4.7 | Nc | Nc | MS | 57 | 4 | Nc | Nc | MS |
| 3 | 4.8 | Nc | MS | MS | 58 | 0.6 | Nc | Nc | MS |
| 4 | 6 | Nc | MS | MS | 59 | 4.5 | Nc | MS | MS |
| 5 | 0.8 | Nc | Nc | MS | 60 | | Nc | Nc | non-MS (Nc) |
| 6 | 46 | Nc | Nc | MS | 61 | 6.5 | Nc | Nc | MS |
| 7 | | MS | MS | non-MS (CIDP) | 62 | 3 | Nc | Nc | MS |
| 8 | | MS | MS | non-MS (CIDP) | 63 | 20 | Nc | Nc | MS |
| 9 | 1.8 | Nc | Nc | MS | 64 | 20 | Nc | Nc | MS |
| 10 | | Nc | Nc | non-MS (HSP) | 65 | 4 | Nc | MS | MS |
| 11 | 21 | Nc | Nc | MS | 66 | 0.8 | Nc | Nc | MS |
| 12 | 7 | Nc | MS | MS | 67 | 2.3 | Nc | Nc | MS |
| 13 | 4.8 | Nc | Nc | MS | 68 | 5.5 | Nc | Nc | MS |
| 14 | 10 | Nc | Nc | MS | 69 | 21 | Nc | MS | MS |
| 15 | 3 | Nc | MS | MS | 70 | 5 | Nc | Nc | MS |
| 16 | 5.3 | Nc | Nc | MS | 71 | 3 | Nc | Nc | MS |
| 17 | 40 | Nc | Nc | MS | 72 | 6 | Nc | Nc | MS (SPMS) |
| 18 | 25 | Nc | Nc | non-MS (PR) | 73 | 4 | Nc | Nc | MS |
| 19 | 3.3 | Nc | Nc | MS | 74 | 8 | Nc | Nc | MS |
| 20 | 2.5 | MS | Nc | MS | 75 | 3.3 | Nc | Nc | MS |
| 21 | 4.8 | MS | Nc | MS | 76 | 0.3 | Nc | Nc | MS |
| 22 | 3 | MS | Nc | MS | 77 | 22 | Nc | Nc | MS (PPMS) |
| 23 | 5.8 | MS | Nc | MS | 78 | 7 | Nc | Nc | MS |
| 24 | | MS | Nc | MS | 79 | 4.7 | Nc | Nc | MS |
| 25 | 15 | MS | Nc | MS | 80 | 8 | MS | MS | MS |
| 26 | | MS | Nc | non-MS (Nc) | 81 | | Nc | Nc | MS |
| 27 | | MS | Nc | non-MS (Nc) | 82 | 5 | Nc | MS | MS |
| 28 | | MS | MS | non-MS (Nc) | 83 | | Nc | Nc | non-MS (Nc) |
| 29 | | MS | Nc | non-MS (Nc) | 84 | 3.1 | Nc | Nc | MS |
| 30 | | MS | Nc | non-MS (Nc) | 85 | | Nc | Nc | MS |
| 31 | 6.3 | Nc | Nc | MS | 86 | 0.4 | Nc | MS | MS |
| 32 | 11 | Nc | Nc | MS | 87 | 1 | Nc | Nc | MS |
| 33 | | MS | MS | MS | 88 | 0.6 | MS | MS | MS |
| 34 | | MS | MS | MS | 89 | 7 | MS | Nc | MS |
| 35 | 2.1 | Nc | Nc | MS | 90 | 5 | MS | Nc | MS |
| 36 | 4 | Nc | Nc | MS | 91 | 9 | MS | Nc | MS |
| 37 | | MS | MS | MS | 92 | 5 | MS | Nc | MS |
| 38 | 9.8 | Nc | Nc | MS | 93 | 4 | MS | MS | MS |
| 39 | 0.3 | Nc | Nc | MS | 94 | | MS | Nc | MS |
| 40 | 0.7 | MS | MS | non-MS (ALS) | 95 | 7 | MS | Nc | MS |
| 41 | | Nc | MS | non-MS (sarcoid) | 96 | 9 | Nc | Nc | MS (PPMS) |
| 42 | 6 | Nc | MS | MS | 97 | 13 | Nc | Nc | MS |
| 43 | | MS | MS | non-MS (OPCA) | 98 | 6.3 | Nc | Nc | MS |
| 44 | 1.6 | Nc | Nc | non-MS (OYL) | 99 | 4 | Nc | Nc | MS |
| 45 | 5.9 | Nc | Nc | MS | 100 | 8.5 | Nc | Nc | MS |
| 46 | 12 | Nc | Nc | MS | 101 | 3.5 | Nc | Nc | MS |
| 47 | 11 | Nc | Nc | MS | 102 | 6.3 | Nc | Nc | MS |
| 48 | 5 | Nc | MS | MS | 103 | 13 | Nc | MS | MS |
| 49 | | MS | MS | MS | 104 | 9 | Nc | Nc | MS |
| 50 | 0.6 | Nc | Nc | MS | 105 | 9 | Nc | Nc | MS (SPMS) |
| 51 | 0.1 | Nc | MS | MS | 106 | 0.1 | MS | MS | MS |
| 52 | 7 | Nc | Nc | MS | 107 | 3.5 | MS | Nc | MS |
| 53 | 6.4 | Nc | Nc | MS | 108 | 0.5 | MS | MS | MS |
| 54 | 7 | MS | MS | MS (SPMS) | 109 | 13 | MS | MS | MS |
| 55 | 7 | MS | MS | MS | 110 | 14 | Nc | Nc | MS (PPMS) |

MS population, clinically diagnosed following McDonald's criteria, includes 89 RRMS (16 in acute relapse indicated by red), 3 SPMS, and 3 PPMS patients. Non-MS population includes 7 Nc subjects indicated by yellow, 2 CIDP, 1 HSP, 1 PR, 1 ALS, 1 OPCA, 1 sarcoidosis, and 1 OYL patients indicated by blue. Abbreviations; Nc, healthy normal control; CIDP, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; HSP, hereditary spastic paraplegia; PR, phycogenic reaction; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; OPCA, olivopontocerebellar atrophy; and OYL, ossification of yellow ligament (Sato et al. Manuscript in preparation).

平成18年度

政策創薬総合研究
重点研究報告書(Ⅰ)

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル(小伝馬町駅前)4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社