

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立
に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 佐藤 準一

平成19年(2007)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立に関する研究 (研究の総括)	-----	1
明治薬科大学 佐藤 準一		

II. 分担研究報告

遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立に関する研究 (多発性硬化症患者血液検体収集)	-----	16
国立精神・神経センター神経研究所 山村 隆		

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 29

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 31

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

平成 18 年度 総括研究報告書

遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立に関する研究

(研究の総括)

主任研究者 佐藤 準一

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科 バイオインフォマティクス 教授

国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部 客員研究員

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗原反応性 T 細胞により惹起される時間的・空間的再発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が高度で遷延化することにより髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。もし事前に再発を予知出来れば早期治療開始が可能になる。しかしながら現在まで MS 再発予測法は確立されていない。MS の寛解期と再発期では末梢血 T リンパ球遺伝子発現パターンに顕著な差異を認めると考えられる。本研究では MS 患者の末梢血 T リンパ球遺伝子発現プロフィールを経時的に解析し、再発期特異的遺伝子(relapse-specific genes; RSG)発現パターンを同定することを目的とする。再発寛解型 MS 患者(n = 6)で、急性増悪期(at the peak of acute relapse)と完全寛解期(in complete remission)に末梢血 CD3⁺ T 細胞の RNA を精製、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロフィールを比較解析し、43 RSG を同定した。43 RSG を指標とする階層的クラスター解析で、再発期サンプルクラスターと寛解期サンプルクラスターを遺伝子発現プロフィール上、識別することが出来た。すなわち 43 RSG は MS 再発をモニターするバイオマーカーとなり得る。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 KeyMolnet による分子ネットワーク解析で、MS 再発時の NF- κ B 遺伝子発現制御系の異常を発見した。NF- κ B は多彩な炎症性サイトカインの発現をコントロールする中心的な転写因子である。従って NF- κ B 制御適正化分子は MS 再発治療薬・予防薬の創薬ターゲットとなり得る。

分担研究者

山村 隆 (国立精神・神経センター神経研究所
疾病研究第六部 部長)

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗

原反応性 T 細胞により惹起される時間的・空間的再発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が高度で遷延化することにより髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。インターフェロンベータ (IFN β) は MS 前駆病態 clinically isolated syndrome (CIS) から MS への移行を阻止し、MS の再発を顕著に抑制するが、神経保護作用は認められない。MS 病巣では脳微小循環障害を認めるので (Lassmann et al. Brain 126: 1347-1357, 2003), もし事前に再発を予知出来れば、早期に神経保護作用のある脳循環・代謝改善薬や免疫抑制薬を集学的に投与して、炎症を軽減し軽症化出来る可能性が高い (早期治療の重要性)。

しかしながら現在まで MS 再発予測法は確立されていない。再発予測に有効なバイオマーカーは発見されていない。MS では自己反応性活性化 T helper type 1 (Th1) 細胞が、血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を通過し、中枢神経系内に侵入して炎症が惹起される。従って「MS 寛解期と再発期では末梢血 T リンパ球遺伝子発現パターンに顕著な差異を認める」と考えられる。本研究ではこの仮説に基づき、MS 患者の末梢血 T リンパ球遺伝子発現プロファイルを経時的に DNA マイクロアレイで解析、再発期特異的遺伝子 (relapse-specific gene; RSG) の同定を試みた。

B. 研究方法

#1. 患者血液検体収集 (分担研究者山村)

国立精神・神経センター武蔵病院神経内科外来通院中または入院中の再発寛解型 MS (relapsing-remitting MS; RRMS) 患者 (n = 6) で、神経内科専門医 (分担研究者山村) の診断 (McDonald 基準) に基づく急性増悪期 (acute relapse) と完全寛解期 (complete remission) に、未治療の時期に Ficoll-Paque 遠心分離法で末梢血リンパ球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) を採取、MACS で CD3⁺ T 細胞を分離、RNA を精製した (Fig. 1)。

#2. 遺伝子アレイ解析 (主任研究者佐藤)

上記 RNA を増幅して標識、遺伝子アレイ (cDNA microarray, 1,258 genes; Hitachi Life Science) を用いて、既報 (Sato et al. Neurobiol Dis 18: 537-550, 2005) に従い、遺伝子発現プロファイルを解析した。再発期サンプルと寛解期サンプルの 2 群における個々の遺伝子の発現差異を Student's t-test で検定、relapse-specific genes (RSG) を抽出した。さらに生物情報統合プラットフォーム KeyMolnet (医薬分子設計研究所 IMMD) を用いて、43 RSG に関し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データベースで、3 ヶ月ごとにアップデートされている。分子ネットワークについては、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) と発現制御に関与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。本研究では解析する患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かからないようにして取り扱うように配慮した。

C. 研究結果

#1. MS 再発期特異的遺伝子群(relapse-specific genes; RSG)の同定：再発期サンプル(n = 6) vs 寛解期サンプル(n = 6)の群間検定(p < 0.05)で、発現差異を認める 43 遺伝子(再発期に上昇 18 遺伝子; 再発期に低下 25 遺伝子)を同定した(Table 1)。

#2. MS 再発・寛解識別バイオマーカーとしての RSG の有用性の検証：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(Fig. 2)。

#3. MS 再発の分子生物学的機序の解析：KeyMolnet を用いて 43 RSG から関連 88 分子を抽出、分子ネットワークを解析した(Figs. 3-5)。共通上流検索法と周辺検索法の両方で、再発時の NF- κ B 発現制御系異常の関与が、統計学的有意性を呈して示唆された。

D. 考察

遺伝子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。最近神経内科専門医施設にアンケート調査を施行したところ、回答の 80%以上でアレイによる MS 診断法や IFN β 治療効果予測法開発に期待していることが判明した(南里ら. 神経内科 64: 319-320, 2006)。しかしながら一度の遺伝子アレイ解析で得られるデータ量は膨大であり、バイオインフォマティクス手法を駆使した適切な情報処理を行わないと病態生理学的・生物学的意義を発見出来ないことが多い。我々は遺伝子アレイ解析データを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 に入力、疾患・薬効関連分子群のネットワーク解析を行った。

始めに RRMS の CD3⁺T 細胞で再発期と寛解期の比較で発現差異を認める 43 RSG を同定した。43 RSG は階層的クラスター解析により再発期と寛解期のサンプルを識別出来るので、43 RSG は MS 再発をモニターするバイオマーカーとなり得る。次に 43 RSG の分子ネットワーク解析により、MS 再発時の NF- κ B 遺伝子発現制御系異常を発見した。NF- κ B は TNF α , IL-1 など炎症性サイトカイン・ケモカインの発現制御で中心的役割を果たす転写因子である。一方 TNF α , IL-1 は NF- κ B の発現上昇を誘導、positive feedback loop を形成して炎症を慢性化・遷延化

させる(Barnes and Karin. NEJM 336: 1066-1071, 1997)。現在まで 150 種類以上の遺伝子が NF- κ B ターゲットとして同定されている (Pahl. Oncogene 18: 6853-6866, 1999)。NF- κ B selective inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC)の in vivo 投与(Pahan et al. Neurosci Lett 287: 17-20, 2000)や脳特異的 NF- κ B 発現抑制(Van Loo et al. Nature Immunol 7: 954-961, 2006)は MS 動物モデル系である自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を軽症化する。従って NF- κ B 制御適正化分子(Fig. 6)は MS 再発治療薬・予防薬の創薬ターゲットとなり得る。

E. 結論

MS 患者の再発期と寛解期の末梢血 T リンパ球の 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 を同定した(Satoh et al. Submitted for publication)。KeyMolnet による分子ネットワーク解析は創薬ターゲットの探索、バイオマーカーの同定、毒性・安全性の予測など、新しい創薬戦略をサポートする重要な研究手法と成り得る。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 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 DAP12 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. 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.
12. 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
13. 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.
14. 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.

書籍

15. 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).

2. 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 IFNbeta-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, 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：マイクロアレイによるインターフェロン応

- 答遺伝子の網羅的解析. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 免疫性神経疾患に関する調査研究班. 平成 17 年度班会議. 東京、2006.1.25 (抄録集 p.40-41).
2. 佐藤準一: 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. 厚生労働省こころの健康科学研究事業 研究成果発表会. 東京、2006. 2.1. (抄録集 p.50-51).
 3. 佐藤準一: Proteomic approach for identification of 14-3-3 interacting proteins in the human CNS. 科学研究費補助金特定領域研究・感染の成立と宿主応答の分子基盤. 平成 17 年度全体班会議. 東京、2006.2.3. (抄録集 p.156-157).
 4. 佐藤準一、南里悠介、土居芳充、山村隆: IFN β 応答遺伝子群の網羅的解析: 副作用との関連性. 第 18 回日本神経免疫学会学術集会. 名古屋、2006.3.2. (神経免疫学 14: 73, 2006).
 5. 山村隆、佐藤準一、三宅幸子: 多発性硬化症研究の最前線と治療戦略. 第 79 回日本薬理学会年会. シンポジウム S3B1 進行性神経疾患の研究の最前線および治療の現状と創薬への展望. 横浜、2006. 3.10.
 6. 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).
 7. 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).
 8. 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).
 9. 天竺桂弘子、佐藤準一、佐藤令一: カイコによる 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).
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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・バイオフィोरラム. 東京、2006.12.9. (抄録集 p15, 2006).
 15. 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・バイオフィोरラム. 東京、2006.12.9. (抄録集 p16, 2006).
 16. 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).
17. 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).
18. 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.
19. 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.
20. 天竺桂弘子、三澤多真子、佐藤準一: カイコ 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.
21. 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.
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 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.

H. 知的所有権の取得状況

**Table 1. Forty-Three Differentially Expressed Genes in T Cells
between Relapse and Remission of MS (Relapse-Specific Genes; RSG)**

Rank	Symbol	GenBank	P-value	Regulation	22	SULT1B1	NM_014465	0.0279	down
1	PPARG	NM_005037	0.000978	up	23	EP300	NM_001429	0.0286	down
2	RND3	NM_005168	0.00126	down	24	GJA4	NM_002060	0.0287	down
3	IL6	NM_000600	0.00197	down	25	PDGFB	NM_002608	0.0292	up
4	AKT2	NM_001626	0.00273	up	26	ARID4A	NM_002892	0.0305	down
5	DCC	NM_005215	0.0038	up	27	CYP2C19	NM_000769	0.0307	down
6	CREBBP	NM_004380	0.00605	down	28	FGF1	NM_000800	0.0317	down
7	ATF5	NM_012068	0.00699	down	29	MMP2	NM_004530	0.0327	up
8	PLCG1	NM_002660	0.00936	up	30	ARHGAP1	NM_004308	0.0335	down
9	CDK3	NM_001258	0.0101	up	31	TOP3B	NM_003935	0.0397	up
10	RIPK1	NM_003804	0.0115	up	32	SUB1	NM_006713	0.0433	down
11	TNFRSF4	NM_003326	0.0121	down	33	PRKCBP1	NM_183047	0.0434	down
12	ABCC9	NM_005691	0.014	down	34	TGFB2	NM_003238	0.0436	up
13	STAT2	NM_005419	0.0149	up	35	SMAD7	NM_005904	0.0437	down
14	PTEN	NM_000314	0.018	down	36	TCF4	NM_003199	0.044	down
15	AVP	NM_000490	0.0182	up	37	NOS1	NM_000620	0.0442	down
16	FADD	NM_003824	0.0193	up	38	TSC22D1	NM_183422	0.0454	down
17	ELF2	NM_006874	0.021	down	39	GNB1L	NM_053004	0.0457	down
18	NFKB2	NM_002502	0.0211	up	40	IFNA8	NM_002170	0.046	down
19	ERBB4	NM_005235	0.0218	down	41	IL1A	NM_000575	0.0477	up
20	BCL2L1	NM_001191	0.0253	up	42	CD3D	NM_000732	0.0492	up
21	BTRC	NM_003939	0.0265	up	43	IL1R1	NM_000877	0.0495	down

The genes differentially expressed between relapse and remission were identified by comparing two groups of samples evaluated by Student t-test. A *p* value of < 0.05 was considered statistically significant. The gene symbol, GenBank accession number, p value, and regulation in relapse versus remission are shown (Sato et al. Submitted for publication).

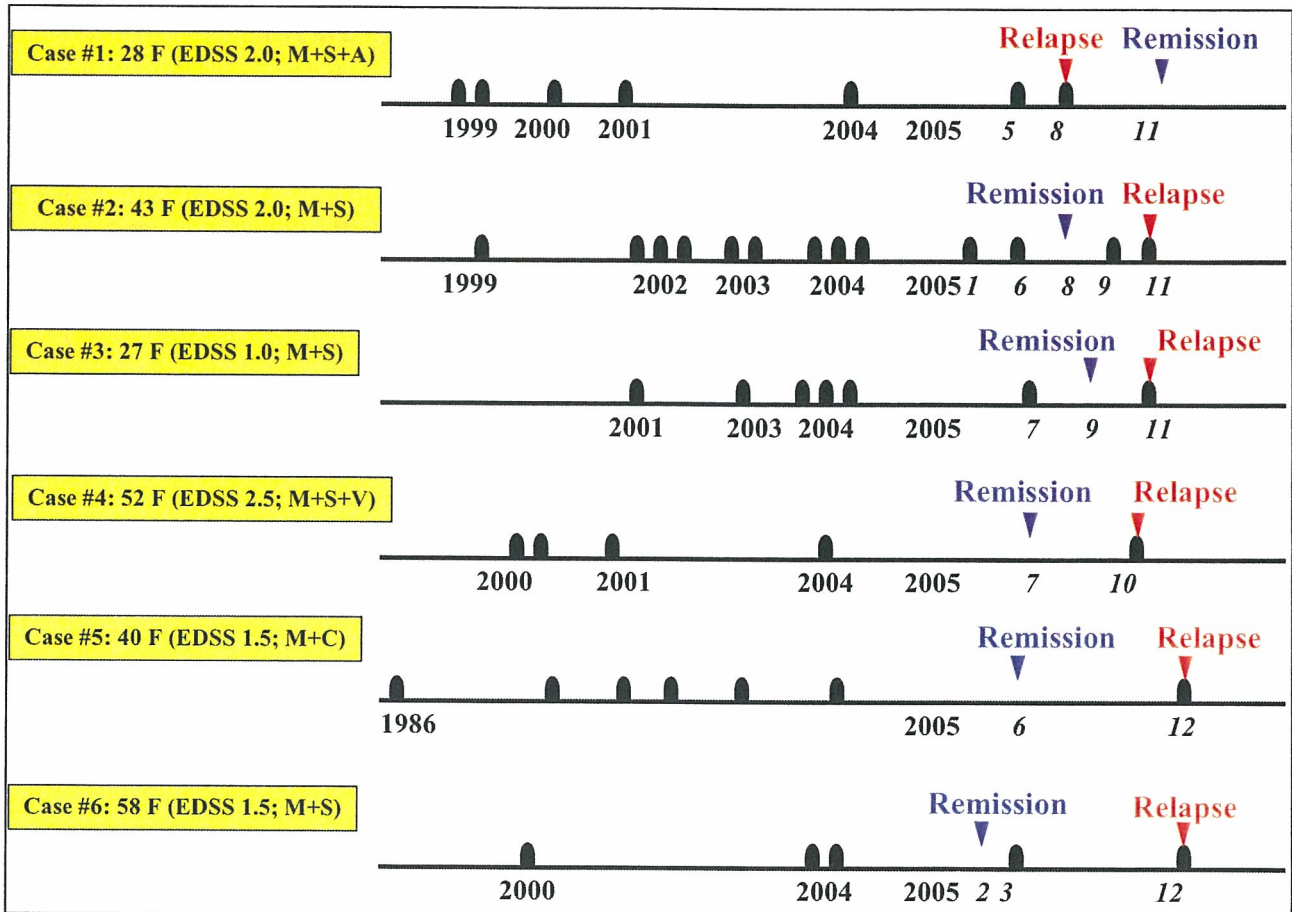


Fig. 1. Blood sampling from six patients with relapsing-remitting MS at the peak of relapse and in remission. Blood samples were taken from six patients with RRMS at the peak of acute relapse (red arrowhead) and in complete remission (blue arrowhead). CD3⁺ T cells were purified and processed for DNA microarray analysis. The relapses of MS (bell shape) specified by year and month (italic), age, sex, Expanded Disability Status Scale (EDSS) score, and cardinal clinical symptoms (M, motor impairment; S, sensory impairment; A, autonomic impairment; C, cognitive impairment; and V, visual impairment) are shown (Sato et al. Submitted for publication).

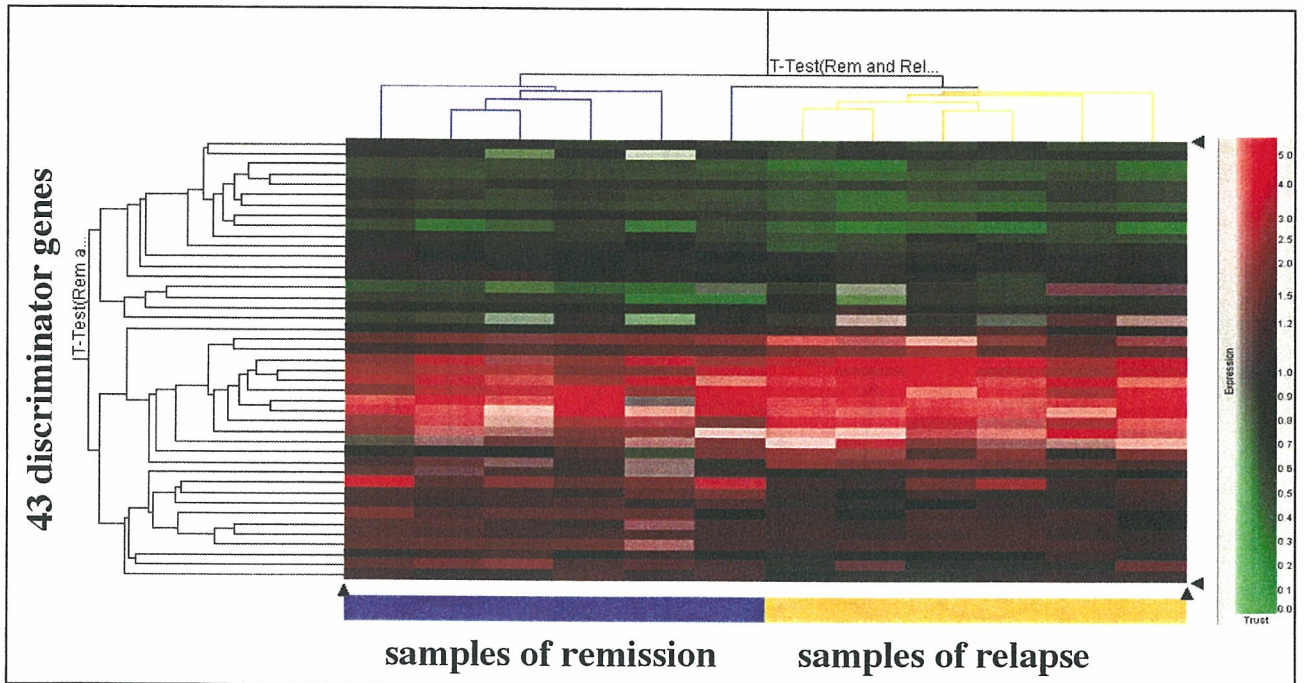


Fig. 2. Hierarchical clustering analysis of 43 genes differentially expressed in T cells between relapse and remission of MS. Hierarchical clustering analysis was performed on total 12 samples, consisting of 6 relapse (orange) and 6 remission (blue) samples, by using the set of 43 differentially expressed genes in T cells between relapse and remission (Table) as a discriminator. This approach separated two clusters, one composed of 5 remission samples and the other composed of 6 relapse samples and one remission sample. The matrix is labeled 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 right (Sato et al. Submitted for publication).

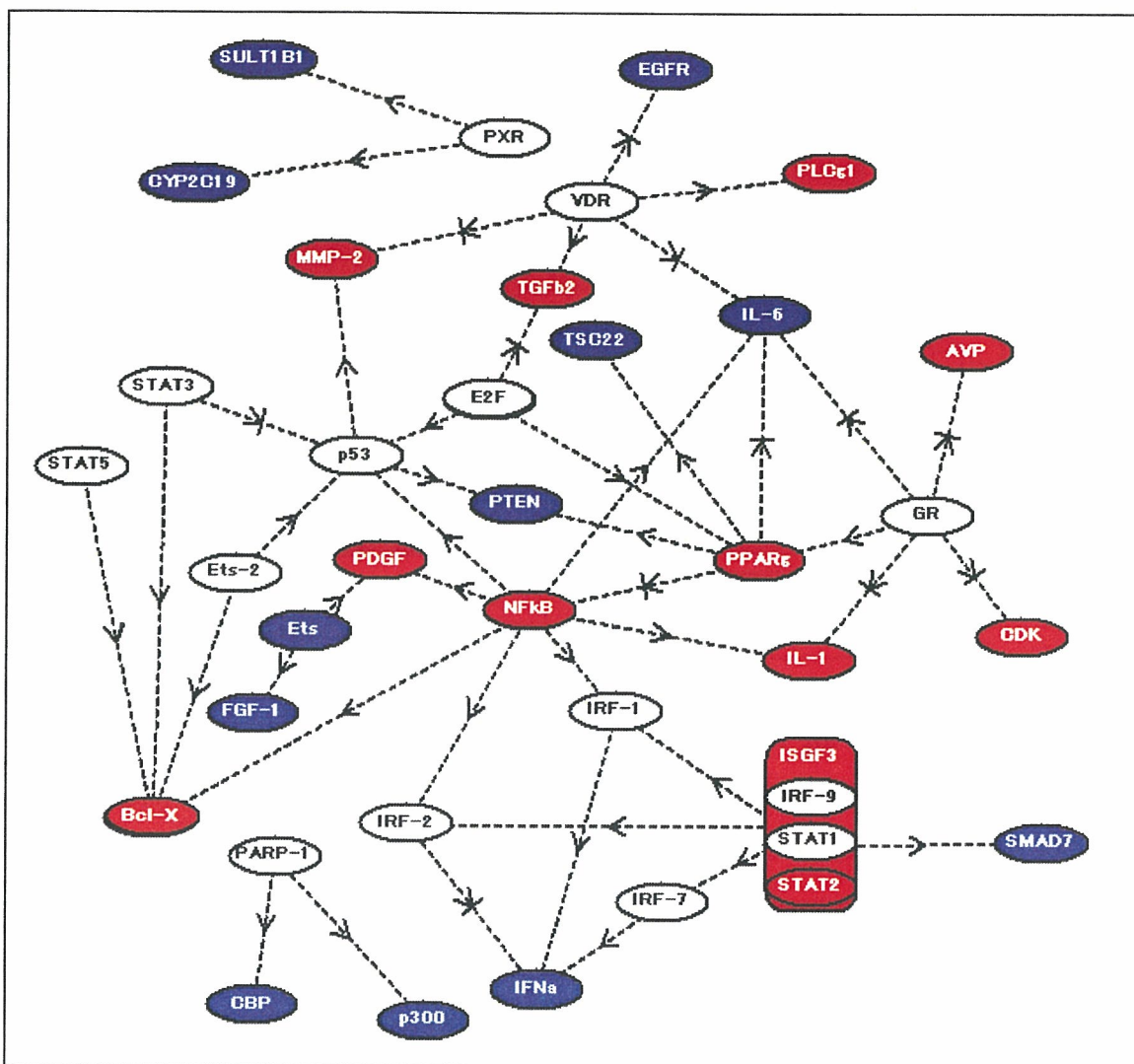


Fig. 3. The common upstream search of differentially expressed genes in T cells between relapse and remission of MS. The microarray data imported into KeyMolnet extracted 88 core contents that were directly linked to 43 genes (Supplementary Table). The “common upstream” search of 88 core contents generated a molecular network composed of 35 fundamental nodes. Red nodes represent upregulated genes in relapse versus remission, whereas blue nodes represent downregulated genes in relapse versus remission. White nodes exhibit additional molecules extracted from all KeyMolnet core contents incorporated in the network to establish molecular connections as many as possible. The direction of molecular relation is indicated by dash line with arrow (transcriptional activation) or dash line with arrow and stop (transcriptional repression). The statistical evaluation of the extracted molecular network indicated the principal relationship with transcriptional regulation by the nuclear factor NF- κ B or with transcriptional regulation by interferon-regulatory factor (IRF) (Sato et al. Submitted for publication).

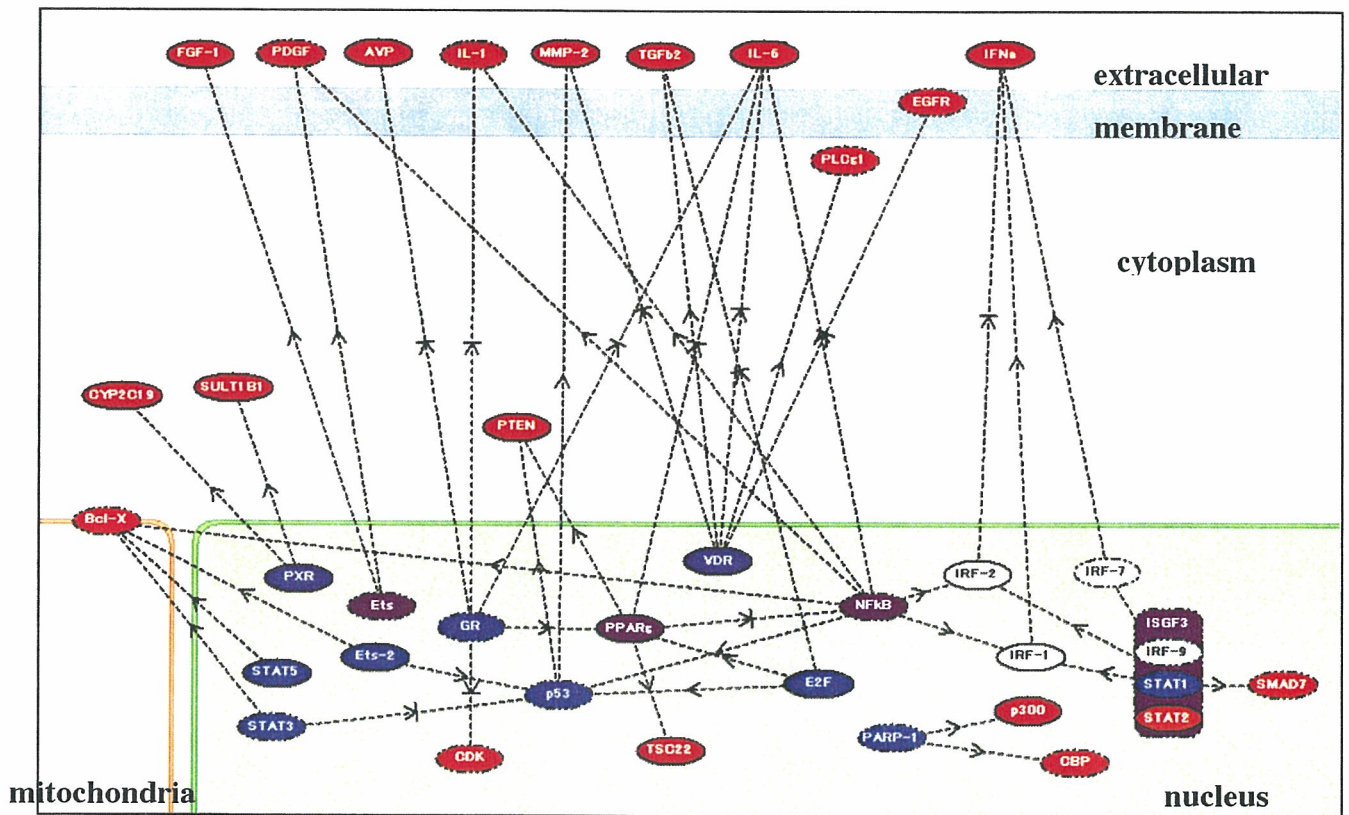


Fig. 4. Subcellular location of the molecules linked to differentially expressed genes in T cells between relapse and remission of MS. The molecular network generated by the “common upstream” search of 43 MS relapse-specific genes (RSGs; Table 1) was arranged by using the editing function of KeyMolnet 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).

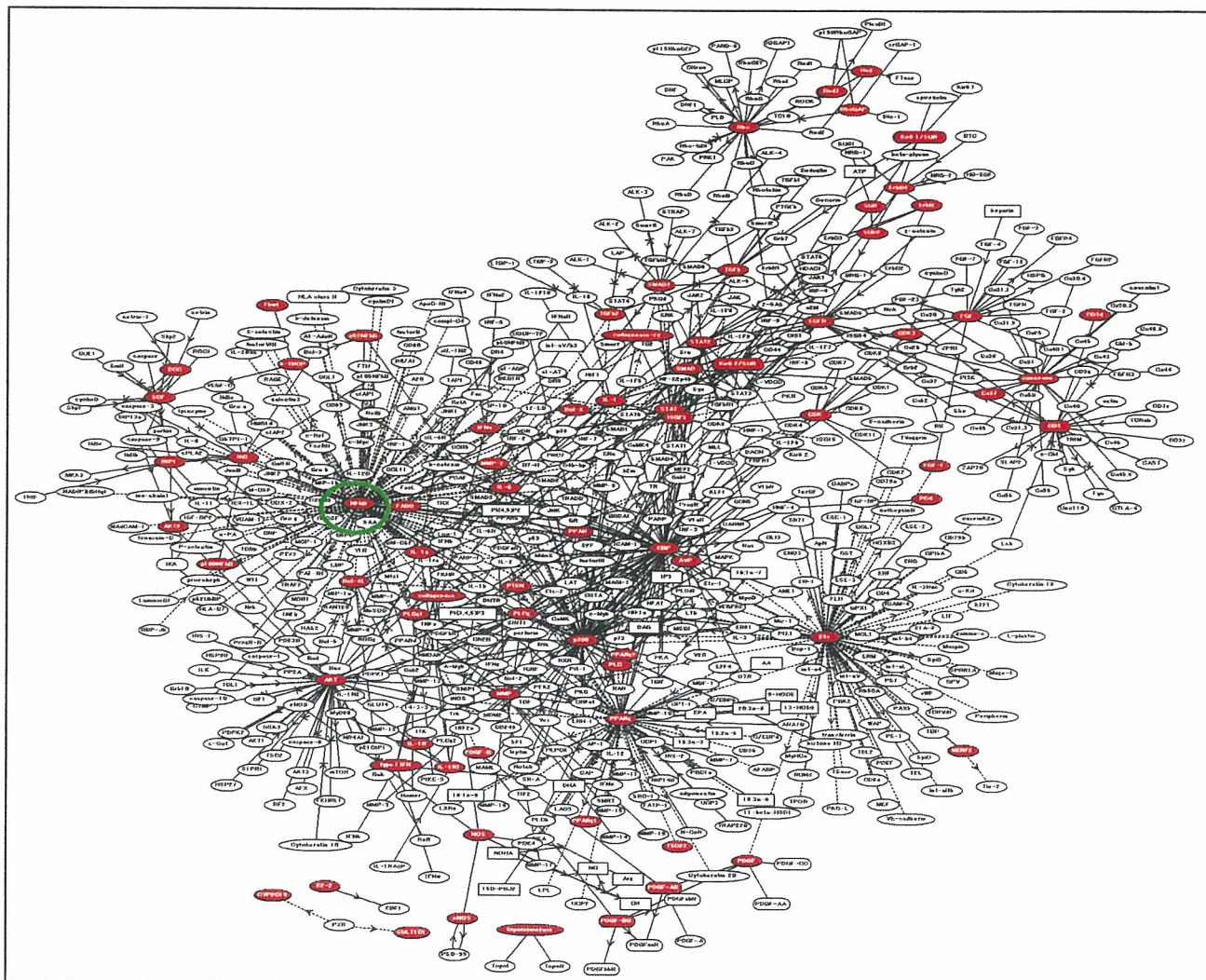


Fig. 5. The neighboring search of differentially expressed genes in T cells between relapse and remission of MS. The microarray data imported into KeyMolnet extracted 88 core contents that were directly linked to 43 genes (Supplementary Table). The “neighboring” search of 88 core contents within the range of adjacent one path generated a molecular network of 701 nodes consisting of proteins (oval) and non-protein small molecules (rectangular). Red nodes represent starting point molecules for the “neighboring” search. The molecular relation is indicated by dash line with arrow (transcriptional activation), dash line with arrow and stop (transcriptional repression), solid line with arrow (direct activation), solid line with arrow and stop (direct inactivation), or solid line without arrow (either complex formation or generic-isoform relationship) The statistical evaluation of the extracted molecular network indicated the principal relationship with transcriptional regulation by NF- κ B enclosed by green circle (Sato et al. Submitted for publication).

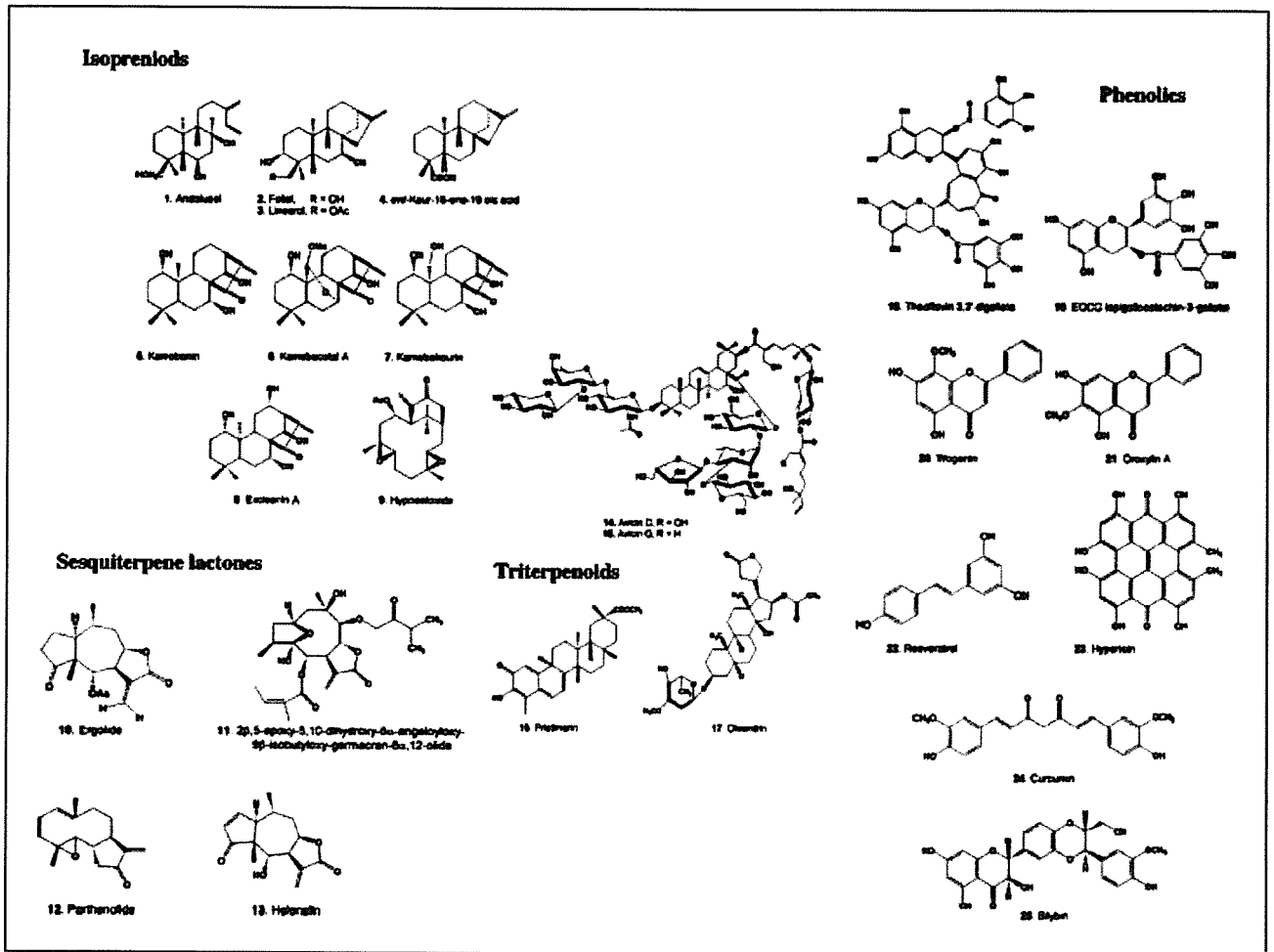


Fig. 6. Plant natural products serve as a candidate for NF- κ B regulators. Plant natural products with a capacity to regulate NF- κ B activity are cited from the literature (Bremner P, Heinrich M. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 54: 453-472, 2002).

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

平成 18 年度 分担研究報告書

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

分担研究者 山村 隆

国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部 部長

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗原反応性 T 細胞により惹起される時間的・空間的再発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が高度で遷延化することにより髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。もし事前に再発を予知出来れば、早期治療が可能になる。しかしながら現在まで MS 再発予測法は確立されていない。MS の寛解期と再発期では末梢血 T リンパ球遺伝子発現パターンに顕著な差異を認めると考えられる。本研究では MS 患者の末梢血 T リンパ球遺伝子発現プロフィールを経時的に解析し、再発期特異的遺伝子(relapse-specific genes; RSG)発現パターンを同定することを主目的とする。分担研究者山村は国立精神・神経センター武蔵病院神経内科で多発性硬化症専門外来を開設、患者から文書による研究参加同意を取得、MS 患者・non-MS 対照神経疾患患者・健常者(Nc)から末梢血 T リンパ球 RNA 154 検体を収集した。また Illes 准教授との共同研究で、Hungary 人 MS 33 検体と Nc 22 検体を収集した。検体は、(1)再発寛解型 MS 患者(n = 6)で、急性増悪期と完全寛解期に CD3⁺ T 細胞の遺伝子発現プロフィールを遺伝子アレイで比較解析、RSG を同定する研究、(2)Hungary monozygotic twin pair (n = 4)で MS/MS twin と MS/Nc twin を比較解析、MS 疾患特異的遺伝子ネットワークを解明する研究、(3)MS classification database(MSCD; 平成 17 年度研究成果)を用いて、階層的クラスター解析とサポートベクターマシン解析に基づく MS 診断法を樹立する研究に使用した。

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は自己抗原反応性 T 細胞により惹起される時間的・空間的再発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾

患である。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が高度で遷延化することにより髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。もし事前に再発を