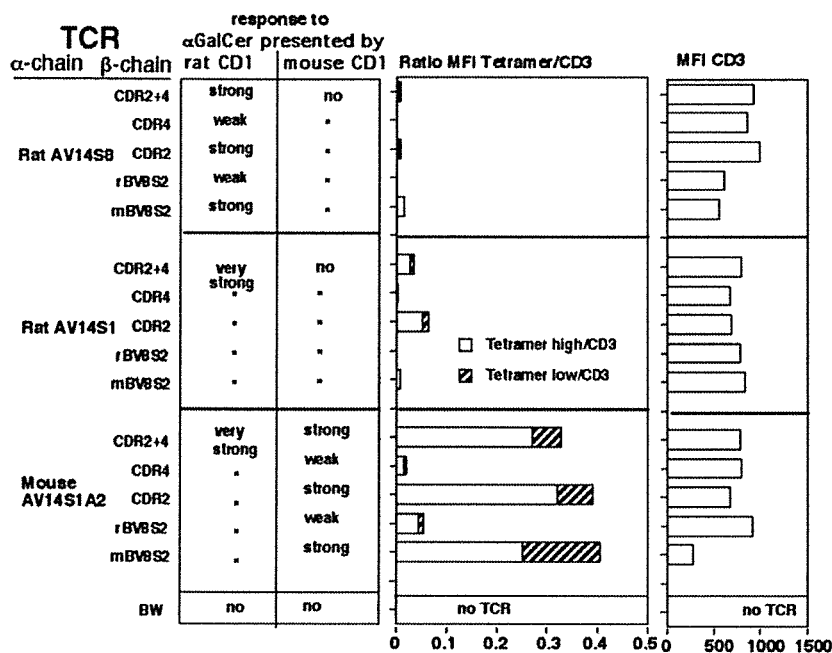


FIGURE 6. Survey of α -GalCer responsiveness of TCR-transduced cell lines, their CD1d tetramer binding, and TCR expression. The left part of the figure summarizes functional data of three to five experiments on the response to α -GalCer presented by rat or mouse CD1d by cell lines expressing the indicated iNKT TCR combinations (see also Figs. 3–5). The central part gives an estimate on CD1d tetramer binding for different cell lines. The stacked bars depict the ratio of MFIs obtained by staining with 350 ng (tetramer high) or 35 ng (tetramer low) of CD1d tetramer divided by the MFI of anti-CD3 staining. Numbers on the abscissa indicate this ratio. Examples for the staining are given in Fig. 3. The right part gives the MFI of CD3 staining of the cell lines used to generate of the data depicted in the central part of the graph.



somewhat lower IL-2 production of the line coexpressing rat AV14S1 α -chain and the CDR4 mutant β -chain probably reflects a generally weaker capacity in TCR-triggered IL-2 production, because anti-CD3 induced IL-2 secretion (not shown) was only about one-half of that found for the other lines. Less clear were the results for cell lines expressing rat AV14S8 α -chain. In two of four experiments, β -chain composition affected the response to rat CD1d- α -GalCer complexes of the lines. An example for such a differential response is given in Fig. 4, where the lines expressing the CDR2 or CDR2+4 mutant β -chains reacted far better than those lines expressing the wild-type BV8S2 or the CDR4 mutant.

Finally, effects of the α -chain composition were also seen for the three mouse β -chain-expressing lines. The rat AV14S8 α -chain/mouse β -chain-expressing line completely lacked α -GalCer reactivity (Fig. 4), whereas the rat AV14S1 α -chain/mouse β -chain expressing line responded to α -GalCer if it was presented by rat CD1d-transduced P80rCD80 cells (Fig. 4), implicating rat V α interactions with CD1d in imparting the observed species specificity. Only the mouse AV14S1A2 α -chain/mouse β -chain expressing line responded irrespective of the types of APC or origin of CD1d used to present the α -GalCer (Fig. 4).

Differential binding of α -GalCer-loaded mouse CD1d tetramers to iNKT-TCR-transduced lines

All cell lines were also tested for TCR expression and binding of α -GalCer-loaded tetramers at two different concentrations. In all cases, binding of unloaded tetramer control was negligible. Fig. 6 summarizes data from such an experiment and gives an overview of the results obtained in the functional assays. The capacity to bind α -GalCer-loaded mouse CD1d tetramers is presented by the ratio of MFI of tetramer binding and MFI of anti-CD3 binding. The best binding was found for the TCR comprising mouse AV14S1 α -chain paired with the CDR2, CDR2+4 mutants of rat BV8S2 β -chains or the mouse BV8S2 β -chain (Figs. 3 and 6), which is consistent with their exclusive capacity to respond to α -GalCer presented by mouse CD1d. At least 8 times weaker was the tetramer binding of lines coexpressing mouse α -chains and rat BV8S2 and CDR4 mutants.

Interestingly, the tetramer binding varied also between the rat α -chain-expressing lines. The poorly responding rat AV14S8 α -chain-expressing lines showed essentially no binding, whereas at least some tetramer binding was found for the more reactive lines coexpressing rat AV14S1 α -chain and the suitable CDR2 or CDR2+4 mutated β -chains. Finally, and again consistent with the functional assays, the rat α -chains paired with mouse β -chain bound no tetramer, whereas the original mouse iNKT TCR bound it very well. Indeed, the efficient binding of this TCR at the lower tetramer concentration suggests a rather high avidity of the original mouse iNKT TCR for α -GalCer-mouse CD1d complexes, consistent with measurements conducted with other mouse iNKT cell hybridomas and T cell populations.

Fig. 6 summarizes our results on the CD1d-restricted α -GalCer response and binding of α -GalCer-loaded mouse CD1d tetramers to iNKT TCR-transduced cell lines. It appears that the lack of reactivity to α -GalCer presented by mouse CD1d results from an impaired binding of the rat iNKT TCR α - rather than β -chain to mouse CD1d. Furthermore, comparison of iNKT TCR sharing the same α -chain but comprising different β -chains revealed that the amino acid composition of CDR2 of the β -chain strongly affects the CD1d-restricted glycolipid reactivity.

Discussion

This study was initiated to characterize the phenotype and the α -GalCer response of rat iNKT cells in a side by side comparison of mouse and rat IHL. As previously described (1, 6, 28), ~30% of mouse IHL coexpressed NK1.1 and TCR and were either CD4⁺ or CD4⁻CD8⁻, whereas rat IHL comprised rather low numbers of NKR-P1a (rat homolog of NK1.1) and TCR⁺ cells, most of them being CD8 $\alpha\beta$ ⁺. Our attempts to directly detect rat iNKT cells by staining with α -GalCer-loaded mouse CD1d tetramers failed, although the capacity of rat IHL to produce IFN- γ and IL-4 production after stimulation with α -GalCer suggested that there is indeed a functional iNKT cell population in F344/Crl rats. Analysis of newly generated cell lines expressing CD1d and iNKT TCR of both species allowed us to directly demonstrate the functionality of the rat elements of cognate Ag recognition by iNKT cells. In

addition, this analysis revealed that Ag recognition by rat iNKT TCR required its presentation by syngeneic CD1d, which was unexpected, given that mouse and human CD1d tetramers and dimers (18–20) bind to iNKT cells of the opposite species. Nevertheless, despite this cross-species reactivity, mouse iNKT TCRs bind mouse CD1d better than human CD1d, as was shown with α -GalCer-loaded mouse CD1d dimers (4). In addition, the weakly binding human dimers showed a stronger preference for mouse BV8S2 iNKT TCR than for mouse dimers, a result that underlines the substantial contribution of the β -chain to binding of α -GalCer CD1d complexes (4).

Interestingly, mouse iNKT TCR-transduced lines responded quite well to α -GalCer presented by rat and by mouse CD1d, whereas the rat iNKT TCR-expressing lines responded only when Ag was presented by rat CD1d. What could be the reason for the need of syngenicity between iNKT TCR and CD1d only in one direction? One possibility could be that higher numbers of α -GalCer complexes on rat CD1d⁺ APCs could have compensated for the generally low avidity of rat iNKT TCR for CD1d, in particular for mouse CD1d. This possibility cannot be formally excluded but seems to be rather unlikely because homologous types of APC were used for presentation. Alternatively, we suggest a higher degree of promiscuity either in Ag recognition by mouse vs rat iNKT TCR or in Ag presentation by rat vs mouse CD1d.

With the help of chimeric and mutated iNKT TCR, we could identify TCR regions, which contribute to binding of α -GalCer and (mouse) CD1d. Cell lines expressing TCR comprising a mouse iNKT TCR α -chain and a suitable β -chain transgressed the threshold for the induction of a response to Ags presented by mouse CD1d, and these cells efficiently bound mouse CD1d tetramers. The differential reactivity of the rat BV8S2 β -chain mutants allowed us for the first time to demonstrate the important role of BV-encoded parts in the α -GalCer response, without a possible interference by CDR3 diversity. In addition, analysis of mutants swapping the CDR2 of BV8S2 with that of BV8S4 provided evidence for an involvement of the CDR2 of the β -chain in recognition of the α -GalCer-CD1d complex. In this context, it is of interest that the CDR2 of rat BV8S4, which in the combination with the mouse iNKT TCR α -chain permitted binding of α -GalCer-mouse CD1d complexes, and the CDR2 of mouse BV8S differ from each other by only one amino acid (Fig. 2). In contrast, the CDR2 of rat BV8S2, which in the interspecies comparison was nonpermissive, differed from that of mouse BV8S2 by 3 aa.

Rat *Tcrb* haplotypes vary in expression of functional BV8S2 and BV8S4 genes. The *Tcrb*^a haplotype, which is found in F344/Crl and DA rats, expresses BV8S2 and BV8S4, whereas the *Tcrb*^b haplotype of LEW/Cr, BN, and PVG rats expresses only BV8S2 (24, 31, 41, 42). These rat strains are widely used as models for autoimmune diseases; therefore, it is of special interest to investigate whether differences in reactivity to natural iNKT TCR ligands based on differences in the CDR2s of BV8S2 vs BV8S4 could lead to a rat strain-specific variation in iNKT T cell development or Ag reactivity.

The three α -chains tested contributed not only to restricted recognition of syngeneic CD1d, but also to the overall magnitude of the α -GalCer response. The lines expressing TCR with rat AV14S1 chains and mouse AV14S1A2 α -chains showed a much better response than the rat AV14S8-expressing lines. By analogy to what is known from MHC-restricted recognition of peptide Ags, the differences in α -GalCer reactivity of the two rat α -chains could have been explained by the K50T substitution in the CDR2 α and by the A93V difference in the CDR3 α (43). Two reasons lead us to assume that the CDR2 α difference is of minor importance. In a comprehensive study on a mouse AV14S1 polymorphism, Sim et

al. (44) demonstrated that a pronounced CDR2 α difference between mouse AV14S1A1 and AV14S1A2 (see also Fig. 2) had little if any effect on TCR-binding to α -GalCer-CD1d complexes (44). Also, our own preliminary results (E. Pyz, I. Müller, and T. Herrmann, unpublished observations) obtained with rat AV14S1 and AV14S8 chain mutants showed little effect of the K50T substitution on the α -GalCer response, whereas a pronounced effect was found for the V93A substitution.

To sum up, we showed that efficient activation of rat iNKT TCR-expressing lines requires presentation of α -GalCer by syngeneic CD1d, and that reactivity to complexes of α -GalCer and mouse CD1d can be obtained by replacing the rat α -chain against that of the mouse and by using a β -chain comprising the CDR2 of rat BV8S4.

This finding thus provides the first description of a germline-encoded CDR involved in ligand recognition by iNKT TCR. The generation and functional analysis of further chimeric rat/mouse iNKT TCR and of chimeric rat/mouse CD1d molecules should strongly facilitate the characterization of the TCR/CD1d/Ag complex. At a certain point of chimerism of TCR or CD1d, cells expressing iNKT TCR comprising rat/mouse α -chain chimeras would be expected to gain specificity for α -GalCer presented by mouse CD1d and mouse/rat CD1d chimeras should gain the capacity to efficiently present Ag to rat iNKT TCR. Finally, combined functional assays with cells expressing such chimeric or mutated receptors and ligands, at best together with binding studies of recombinant molecules, may even allow definition of direct contacts in the ternary complex comprising iNKT TCR/Ag and CD1d.

Acknowledgments

We thank Kathrin Krejci and Ingrid Müller for excellent technical assistance and Niklas Beyersdorf and Barbara Sullivan for critical reading of the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth, and L. Van Kaer. 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* 4: 231–237.
- Lantz, O., and A. Bendelac. 1994. An invariant T cell receptor α chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4⁺ and CD4–8[–] T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* 180: 1097–1106.
- Matsuda, J. L., L. Gapin, N. Fazilleau, K. Warren, O. V. Naidenko, and M. Kronenberg. 2001. Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor β repertoire and small clone size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12636–12641.
- Schumann, J., R. B. Voyle, B. Y. Wei, and H. R. MacDonald. 2003. Cutting edge: influence of the TCR V β domain on the avidity of CD1d: α -galactosylceramide binding by invariant V α 14 NKT cells. *J. Immunol.* 170: 5815–5819.
- Dellabona, P., E. Padovan, G. Casorati, M. Brockhaus, and A. Lanzavecchia. 1994. An invariant V α 24-J α Q/V β 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4–8[–] T cells. *J. Exp. Med.* 180: 1171–1176.
- Matsuura, A., M. Kinebuchi, H. Z. Chen, S. Katabami, T. Shimizu, Y. Hashimoto, K. Kikuchi, and N. Sato. 2000. NKT cells in the rat: organ-specific distribution of NKT cells expressing distinct V α 14 chains. *J. Immunol.* 164: 3140–3148.
- Swann, J., N. Y. Crowe, Y. Hayakawa, D. I. Godfrey, and M. J. Smyth. 2004. Regulation of antitumor immunity by CD1d-restricted NKT cells. *Immunol. Cell Biol.* 82: 323–331.
- Skold, M., and S. M. Behar. 2003. Role of CD1d-restricted NKT cells in microbial immunity. *Infect. Immun.* 71: 5447–5455.
- Taniguchi, M., M. Harada, S. Kojo, T. Nakayama, and H. Wakao. 2003. The regulatory role of V α 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 483–513.
- Giabbai, B., S. Sidobre, M. D. Crispin, Y. Sanchez-Ruiz, A. Bachi, M. Kronenberg, I. A. Wilson, and M. Degano. 2005. Crystal structure of mouse CD1d bound to the self ligand phosphatidylethanolamine: a molecular basis for NKT cell activation. *J. Immunol.* 175: 977–984.
- Koch, M., V. S. Stronge, D. Shepherd, S. D. Gadola, B. Mathew, G. Ritter, A. R. Fersht, G. S. Besra, R. R. Schmidt, E. Y. Jones, and V. Cerundolo. 2005. The crystal structure of human CD1d with and without α -galactosylceramide. *Nat. Immunol.* 6: 819–826.

12. Zajonc, D. M., C. Cantu, 3rd, J. Mattner, D. Zhou, P. B. Savage, A. Bendelac, I. A. Wilson, and L. Teyton. 2005. Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor. *Nat. Immunol.* 6: 810–818.
13. Zhou, D., J. Mattner, C. Cantu III, N. Schrantz, N. Yin, Y. Gao, Y. Sagiv, K. Hudspeth, Y. Wu, T. Yamashita, et al. 2004. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306: 1786–1789.
14. Kinjo, Y., D. Wu, G. Kim, G. W. Xing, M. A. Poles, D. D. Ho, M. Tsuji, K. Kawahara, C. H. Wong, and M. Kronenberg. 2005. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434: 520–525.
15. Mattner, J., K. L. Debord, N. Ismail, R. D. Goff, C. Cantu, 3rd, D. Zhou, P. Saint-Mezard, V. Wang, Y. Gao, N. Yin, et al. 2005. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434: 525–529.
16. Sandberg, J. K., and H. G. Ljunggren. 2005. Development and function of CD1d-restricted NKT cells: influence of sphingolipids, SAP and sex. *Trends Immunol.* 26: 347–349.
17. MacDonald, H. R. 2000. CD1d-glycolipid tetramers: A new tool to monitor natural killer T cells in health and disease. *J. Exp. Med.* 192: F15–F20.
18. Matsuda, J. L., O. V. Naidenko, L. Gapin, T. Nakayama, M. Taniguchi, C. R. Wang, Y. Koezuka, and M. Kronenberg. 2000. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* 192: 741–754.
19. Karadimitris, A., S. Gadola, M. Altamirano, D. Brown, A. Woolfson, P. Klenerman, J. L. Chen, Y. Koezuka, I. A. Roberts, D. A. Price, et al. 2001. Human CD1d-glycolipid tetramers generated by in vitro oxidative refolding chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 3294–3298.
20. Benlagha, K., A. Weiss, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac. 2000. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* 191: 1895–1903.
21. Naidenko, O. V., J. K. Maher, W. A. Ernst, T. Sakai, R. L. Modlin, and M. Kronenberg. 1999. Binding and antigen presentation of ceramide-containing glycolipids by soluble mouse and human CD1d molecules. *J. Exp. Med.* 190: 1069–1080.
22. Ichimiya, S., K. Kikuchi, and A. Matsuura. 1994. Structural analysis of the rat homologue of CD1: evidence for evolutionary conservation of the CD1D class and widespread transcription by rat cells. *J. Immunol.* 153: 1112–1123.
23. Katabami, S., A. Matsuura, H. Z. Chen, K. Imai, and K. Kikuchi. 1998. Structural organization of rat CD1 typifies evolutionarily conserved CD1D class genes. *Immunogenetics* 48: 22–31.
24. Asmuss, A., K. Hofmann, T. Hochgrebe, G. Giegerich, T. Hunig, and T. Herrmann. 1996. Alleles of highly homologous rat T cell receptor β -chain variable segments 8.2 and 8.4: strain-specific expression, reactivity to superantigens, and binding of the mAb R78. *J. Immunol.* 157: 4436–4441.
25. Kinebuchi, M., and A. Matsuura. 2004. Rat T-cell receptor TRAV11 ($V\alpha 14$) genes: further evidence of extensive multiplicity with homogeneous CDR1 and diversified CDR2 by genomic contig and cDNA analysis. *Immunogenetics* 55: 756–762.
26. Shimamura, M., J. Miura-Ohnuma, and Y. Y. Huang. 2001. Major sites for the differentiation of $V\alpha 14^+$ NKT cells inferred from the V-J junctional sequences of the invariant T-cell receptor α chain. *Eur. J. Biochem.* 268: 56–61.
27. Brissette-Storkus, C., C. L. Kaufman, L. Pasewicz, H. M. Worsley, R. Lakomy, S. T. Ildstad, and W. H. Chambers. 1994. Characterization and function of the NKR-P1dim/T cell receptor- $\alpha\beta^+$ subset of rat T cells. *J. Immunol.* 152: 388–396.
28. Badovinac, V., C. Boggiano, V. Trajkovic, A. B. Frey, N. L. Vujanovic, D. P. Gold, M. Mostarica-Stojkovic, and S. Vukmanovic. 1998. Rat NKR-P1 $^+$ CD3 $^+$ T cells: selective proliferation in interleukin-2, diverse T-cell-receptor- $V\beta$ repertoire and polarized interferon- γ expression. *Immunology* 95: 117–125.
29. Kinebuchi, M., A. Matsuura, K. Ohya, W. Abo, and J. Kitazawa. 2005. Contribution of $V\alpha 24V\beta 11$ natural killer T cells in Wilsonian hepatitis. *Clin. Exp. Immunol.* 139: 144–151.
30. Knudsen, E., T. Seierstad, J. T. Vaage, C. Naper, H. B. Benestad, B. Rolstad, and A. A. Maghazachi. 1997. Cloning, functional activities and in vivo tissue distribution of rat NKR-P1 $^+$ TCR $\alpha\beta^+$ cells. *Int. Immunol.* 9: 1043–1051.
31. Herrmann, T., K. Hofmann, N. E. Nagel, A. Asmuss, T. Hunig, and K. Wönigeit. 1999. Differential CD4/CD8 subset-specific expression of highly homologous rat Trb-V8 family members suggests a role of CDR2 and/or CDR4 (HV4) in MHC class-specific thymic selection. *Int. Immunol.* 11: 435–444.
32. Emoto, M., Y. Emoto, and S. H. Kaufmann. 1995. IL-4 producing CD4 $^+$ TCR $\alpha\beta$ in liver lymphocytes: influence of thymus, β_2 -microglobulin and NK1.1 expression. *Int. Immunol.* 7: 1729–1739.
33. Kreiss, M., A. Asmuss, K. Krejci, D. Lindemann, T. Miyoshi-Akiyama, T. Uchiyama, L. Rink, C. P. Broeren, and T. Herrmann. 2004. Contrasting contributions of complementarity-determining region 2 and hypervariable region 4 of rat BV8S2 $^+$ ($V\beta 8.2$) TCR to the recognition of myelin basic protein and different types of bacterial superantigens. *Int. Immunol.* 16: 655–663.
34. Makowska, A., T. Kawano, M. Taniguchi, and S. Cardell. 2000. Differences in the ligand specificity between CD1d-restricted T cells with limited and diverse T-cell receptor repertoire. *Scand. J. Immunol.* 52: 71–79.
35. Kuss, A. W., M. Knodel, F. Berberich-Siebelt, D. Lindemann, A. Schimpl, and I. Berberich. 1999. A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death. *Eur. J. Immunol.* 29: 3077–3088.
36. Luhder, F., Y. Huang, K. M. Dennehy, C. Guntermann, I. Müller, E. Winkler, T. Kerkau, S. Ikemizu, S. J. Davis, T. Hanke, and T. Hunig. 2003. Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J. Exp. Med.* 197: 955–966.
37. Maeda, K., T. Sato, M. Azuma, H. Yagita, and K. Okumura. 1997. Characterization of rat CD80 and CD86 by molecular cloning and mAb. *Int. Immunol.* 9: 993–1000.
38. Teitell, M., H. R. Holcombe, L. Brossay, A. Hagenbaugh, M. J. Jackson, L. Pond, S. P. Balk, C. Terhorst, P. A. Peterson, and M. Kronenberg. 1997. Nonclassical behavior of the mouse CD1 class I-like molecule. *J. Immunol.* 158: 2143–2149.
39. Bradbury, A., K. T. Belt, T. M. Neri, C. Milstein, and F. Calabi. 1988. Mouse CD1 is distinct from and co-exists with TL in the same thymus. *EMBO J.* 7: 3081–3086.
40. Morita, M., K. Motoki, K. Akimoto, T. Natori, T. Sakai, E. Sawa, K. Yamaji, Y. Koezuka, E. Kobayashi, and H. Fukushima. 1995. Structure-activity relationship of α -galactosylceramides against B16-bearing mice. *J. Med. Chem.* 38: 2176–2187.
41. Torres-Nagel, N. E., T. Herrmann, G. Giegerich, K. Wönigeit, and T. Hunig. 1994. Preferential TCR V usage in rat repertoire selection: $V\alpha 8$ imparts both positive thymic selection by and alloreactivity to RT1f. *Int. Immunol.* 6: 1367–1373.
42. Stienekemeier, M., K. Hofmann, R. Gold, and T. Herrmann. 2000. A polymorphism of the rat T-cell receptor β -chain variable gene 13 (BV13S1) correlates with the frequency of BV13S1-positive CD4 cells. *Immunogenetics* 51: 296–305.
43. Rudolph, M. G., and I. A. Wilson. 2002. The specificity of TCR/pMHC interaction. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 52–65.
44. Sim, B. C., K. Holmberg, S. Sidobre, O. Naidenko, N. Niederberger, S. D. Marine, M. Kronenberg, and N. R. Gascoigne. 2003. Surprisingly minor influence of TRAV11 ($V\alpha 14$) polymorphism on NKT-receptor mCD1 α -galactosylceramide binding kinetics. *Immunogenetics* 54: 874–883.

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ィールにもとづき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
遺伝子発現プロフィール
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をスポッター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(Cy3, Cy5)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、免疫グロブリン 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 活動性病巣での免疫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 et al ⁶⁾	1999	PPMS (n=1)	acute lesion vs NAWM	Original cDNA Array	1,344 or 5,000	Upregulation of IRF-2 and TNFRp75 in acute lesions
Ramanathan et al 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 et al 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 et al 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 Array	2,798	Upregulation of 5-lipoxygenase in MS and EAE lesions
Lock et al 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 et al 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 et al 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 et al 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 et al 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 et al 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 et al ⁽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 <i>in vitro</i>	Mini-Lymphochip cDNA Array	6,432 or 12,672	Downregulation of IL-8 in responders after IFN- β treatment
Tajouri et al ⁽¹³⁾	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 et al ⁽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 (Res-arch Genetics)	5,184	Time-dependent upregulation of IFN-responsive genes
Achiron et al ⁽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 et al ⁽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 et al ⁽¹⁵⁾	2004	RRMS (n=6) before and after IVMP	PBMC	Atlas Human Hematology/Immunology Membrane Array (Clontech)	448	Downregulation of LCK, TCF7, CD5, and ISGF3 by IVMP
Hong et al ⁽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 et al ⁽²⁵⁾	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 et al ⁽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 et al ⁽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 et al ⁽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 et al ⁽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, IVMP : 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ィール (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。Wandinger 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 Th 1 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 Th 2 シフトを誘導しないという見解²⁶⁾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ダーと定義した。ノンレスポンダー群を当初から効果のみられない nonresponder 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。レスポンダーで治療後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ダ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, レスポンダー, ノンレスポンダ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例のレスポンダーでは治療前に約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

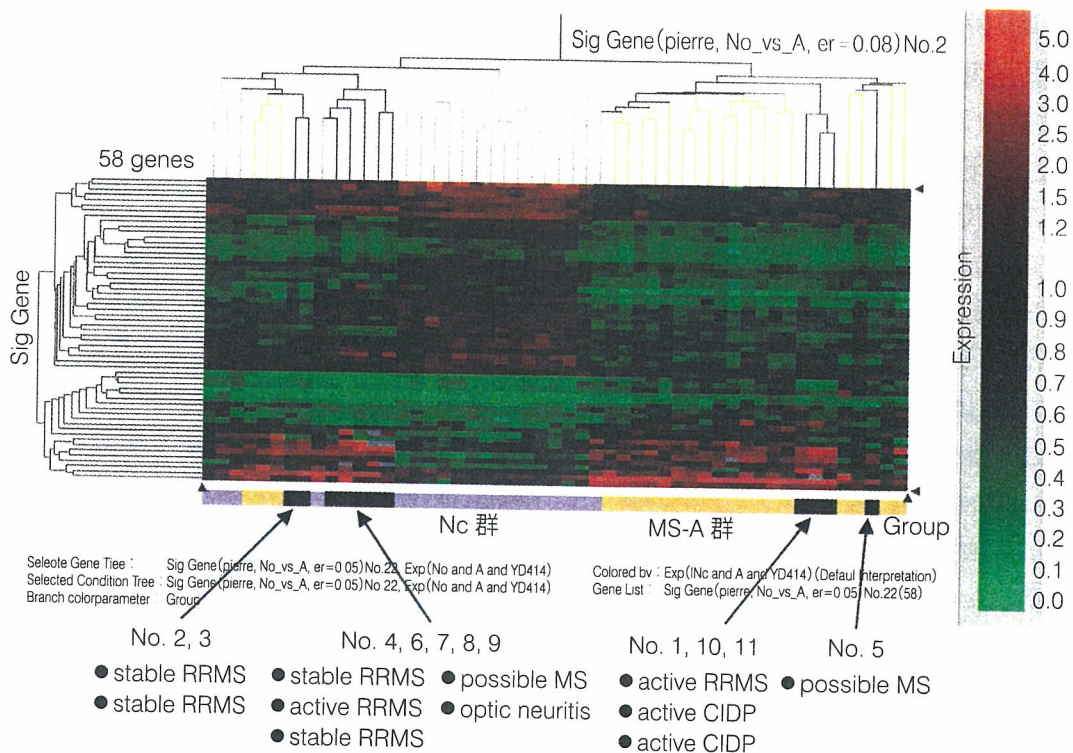


図 1. 階層的クラスター解析

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ィールが最も 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

SVM No.	Gene Set	Gene Selection Method	No. of Predictor Genes	Kernel Function	Clustering by 58 genes												
					1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
					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	
						A	Nc	Nc	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A
1	58	All genes	—	PDP(Order 1)	A	Nc	A	A	A	Nc	A	Nc	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	A	
28	286	Fisher's Exact Test	10	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A	
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	Nc	Nc	Nc	A	Nc	
32	286	Golub Method	10	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	Nc	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	Nc	
33	1259	All genes	—	PDP(Order 1)	A	A	A	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	A	A	
34	1259	All genes	—	PDP(Order 2)	A	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A	A	
35	1259	All genes	—	PDP(Order 3)	A	A	A	A	A	Nc	Nc	A	A	A	A	A	
36	1259	All genes	—	Radial basis(Gaussian)	A	A	A	A	A	Nc	Nc	Nc	A	A	A	A	
37	1259	Fisher's Exact Test	50	PDP(Order 1)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A	
38	1259	Fisher's Exact Test	50	PDP(Order 2)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A	
39	1259	Fisher's Exact Test	50	PDP(Order 3)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A	
40	1259	Fisher's Exact Test	50	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	A	A	Nc	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	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A	
44	1259	Golub Method	50	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A	
45	1259	Fisher's Exact Test	30	PDP(Order 1)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A	
46	1259	Fisher's Exact Test	30	PDP(Order 2)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A	
47	1259	Fisher's Exact Test	30	PDP(Order 3)	A	Nc	A	A	A	Nc	Nc	Nc	Nc	Nc	A	A	
48	1259	Fisher's Exact Test	30	Radial basis(Gaussian)	A	Nc	A	A	A	Nc	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ィールが最も 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。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

ポンダーと定義し、両者は3遺伝子 [caspase 2, caspase 10, FLICE inhibitory protein (FLIP)] の発現レベルの三次元マッピングで86%区別可能と報告した。

最近、われわれ¹⁸⁾は72例のIFN- β 未治療活動性MS(46例は初回採血後2年間IFN- β 治療開始)と22名の健常人の末梢血CD3⁺T細胞を1,259遺伝子cDNAマイクロアレイ(Hitachi)で解析したデータに関して、両群間で発現差異を示す286遺伝子を指標遺伝子(discriminator genes)にして階層的クラスター解析を施行した[MS classification database(MSCD), Satoh *et al*, Manuscript in preparation]. 286遺伝子は5クラス(クラス#1~#5)に分類され、MS群は健常人群から分離され、さらに4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健常人に類似し、B群は最も臨床的活動性が高く、ケモカイン遺伝子の多いクラス#5の発現レベルが高く、C群は脳限局病変を呈する患者が多く、D群は最もEDSSスコアが高値であった。さらに群間検定で健常人とMS A群を識別する58遺伝子を抽出した。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強調画像病巣数と患者満足度から治療評価スコアを算出すると、レスポナーはA群とB群に集積していた。レスポナーではノンレスポナーに比較して、治療開始後6ヵ月のIRG (ISG 15, IFI 27, MCP-1, TNFRp 75)発現レベルが高く維持されていた。

このMSCDに新規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、286遺伝子, 58遺伝子を指標遺伝子とする階層的クラスター解析により、非活動性MSは全例健常者群に分類された(図1)。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。MSCDを

training setとして施行したSVM解析でも同様のグループ分類が支持された(表2)。症例数は少ないがわれわれの結果は末梢神経抗原に対する自己免疫機序が関与するCIDPと中枢神経抗原に対する自己免疫機序が関与するMSではT細胞遺伝子発現レベルで類似性があり、CIDPはDNAマイクロアレイ解析だけではMSと鑑別できないことを示唆する。

おわりに

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、薬物反応性や副作用の予測、治療効果の判定など幅広い臨床応用が期待されている。われわれはDNAマイクロアレイ解析でMSがT細胞遺伝子発現プロフィールにもとづき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報告した(MS classification database : MSCD)。今後MSCDを礎にしてテーラメイド医療樹立に向けて研究を進める予定である。

謝辞：本稿で紹介した研究は、国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部山村 隆部長、古池史子先生、中西恵美先生、尾上祐行先生、土居芳充先生、南里悠介先生、佐藤和気郎先生、荒浪利昌先生、および難治性疾患の画期的診断・治療法などに関する研究班の班員諸氏との共同研究でなされ、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年度創業など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)の補助を受けた。

文献

- 1) Sospedra M *et al* : Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* **23** : 683-747, 2005
- 2) Waubant E *et al* : Clinical characteristics of

- responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* **61** : 184-189, 2003
- 3) Lucchinetti C *et al* : Heterogeneity of multiple sclerosis lesions : implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* **47** : 707-717, 2000
 - 4) Steinman L *et al* : Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* **3** : 483-492, 2003
 - 5) Whitney AR *et al* : Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 1896-1901, 2003
 - 6) Whitney LW *et al* : Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* **46** : 425-428, 1999
 - 7) Whitney LW *et al* : 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
 - 8) Chabas D *et al* : The influence of the proinflammatory cytokine osteopontin on autoimmune demyelinating disease. *Science* **294** : 1731-1735, 2001
 - 9) Lock C *et al* : Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* **8** : 500-508, 2002
 - 10) Mycko MP *et al* : cDNA microarray analysis in multiple sclerosis lesions : detection of genes associated with disease activity. *Brain* **126** : 1048-1057, 2003
 - 11) Graumann U *et al* : Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. *Brain Pathol* **13** : 554-573, 2003
 - 12) Lindberg RL *et al* : 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
 - 13) Tajouri L *et al* : Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Mol Brain Res* **119** : 170-183, 2003
 - 14) Ramanathan M *et al* : *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
 - 15) Airla N *et al* : Suppression of immune system genes by methylprednisolone in exacerbations of multiple sclerosis. Preliminary results. *J Neurol* **251** : 1215-1219, 2004
 - 16) Bomprezzi R *et al* : Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls : identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet* **12** : 2191-2199, 2003
 - 17) Mayne M *et al* : CYFIP 2 is highly abundant in CD 4⁺ cells from multiple sclerosis patients and is involved in T cell adhesion. *Eur J Immunol* **34** : 1217-1227, 2004
 - 18) Satoh J *et al* : Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* **18** : 537-550, 2005
 - 19) Achiron A *et al* : Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis : unique gene expression of disease activity. *Ann Neurol* **55** : 410-417, 2004
 - 20) Achiron A *et al* : Understanding autoimmune mechanisms in multiple sclerosis using gene expression microarrays : treatment effect and cytokine-related pathways. *Clin Dev Immunol* **11** : 299-305, 2004
 - 21) Mandel M *et al* : Autoimmunity gene expression portrait : specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* **138** : 164-170, 2004
 - 22) Maas K *et al* : Cutting edge : molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol* **169** : 5-9, 2002
 - 23) Iglesias AH *et al* : Microarray detection of E 2 F pathway activation and other targets in multiple sclerosis peripheral blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* **150** : 163-177, 2004
 - 24) Satoh J *et al* : Differing effects of IFN β vs IFN γ in MS. Gene expression in cultured astrocytes. *Neurology* **57** : 681-685, 2001
 - 25) Wandinger KP *et al* : Complex im-

- munomodulatory effects of interferon- β in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurol* **50** : 349-357, 2001
- 26) Koike F *et al* : Microarray analysis identifies interferon β -regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **139** : 109-118, 2003
- 27) Taniguchi T *et al* : 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
- 28) Maric M *et al* : Defective antigen processing on GILT-free mice. *Science* **294** : 1361-1365, 2001
- 29) Behar SM *et al* : Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* **189** : 1973-1980, 1999
- 30) Bárdos T *et al* : 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
- 31) Baechler EC *et al* : Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 2610-2615, 2003
- 32) Weinstock-Guttman B *et al* : Genomic effects of IFN- β in multiple sclerosis patients. *J Immunol* **171** : 2694-2702, 2003
- 33) Liang Y *et al* : Differential and trajectory methods for time course gene expression data. *Bioinformatics* **21** : 3009-3016, 2005
- 34) Stürzebecher S *et al* : Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon- β in multiple sclerosis. *Brain* **126** : 1419-1429, 2003
- 35) Hong J *et al* : Gene expression profiling of relevant biomarkers for treatment evaluation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **152** : 126-139, 2004
- 36) van Boxel-Dezaire AH *et al* : Contrasting response to interferon β -1 b treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis : does baseline interleukin-12 p35 messenger RNA predict the efficacy of treatment? *Ann Neurol* **48** : 313-322, 2000
- 37) Wandinger KP *et al* : TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* **361** : 2036-2043, 2003
- 38) Lamhamedi-Cherradi SE *et al* : Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL^{-/-} mice. *Nat Immunol* **4** : 256-260, 2003
- 39) Baranzini SE *et al* : Transcription-based prediction of response to IFN β using supervised computational methods. *PLoS Biol* **3** : e2, 2005

LETTERS TO THE EDITOR

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

[Questionnaires on the expediency of DNA microarray analysis for diagnosis
of multiple sclerosis and prediction of therapeutic response to interferon-beta.]

南里悠介 佐藤準一
佐藤和貴郎 山村隆

[Yusuke NANRI, M.D., Jun-ichi SATOH, M.D., Ph.D., Wakiro SATO, M.D. & Takashi YAMAMURA, M.D., Ph.D.: 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部(〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1); Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan]

2006年1月17日

拝啓

最近、多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)前駆病態と考えられるclinically isolated syndrome (CIS)で、早期にインターフェロンベータ(interferon-beta: IFNB)治療を開始するとdefinite MSへの移行を抑制可能と報告されています¹⁾。しかし、本邦では視神経脊髄型MS(opticospinal MS: OSMS)が比較的多いので、早期診断はMcDonald診断基準では困難であり、有効な補助診断法の樹立が必要です。また、IFNBが無効な症例や副作用で使用できない症例も存在し、治療反応性予知法の確立が重要な課題です。現在ゲノムプロジェクト完了によりヒト全遺伝子塩基配列が解明され、遺伝子アレイ(DNAマイクロアレイまたはGene Chipと呼ばれる)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・系統的に解析可能になっております。このような網羅的発現解析により従来の研究方法では予期しなかった遺伝子のMS病態における役割が次々明らかにされ、薬物反応性の個人差が予測可能になりつつあります²⁾。最近私どもは、末梢血T細胞マイクロアレイ解析によりMSにおけるアポトーシス制御遺伝子群の発現異常を報告しています³⁾。

私どもは、神経内科専門医常勤1,709施設を対象に、DNAマイクロアレイによるMS診断法開発

に対する期待感およびIFNB治療に関する現況を把握するためにアンケート調査を行い、319施設から回答を得ました。調査は以下の18項目(質問に対するyes/noとコメント記入)を含みます。[Q1] MSと腫瘍の鑑別が問題になった症例の経験がある。[Q2] その場合の診断法。[Q3] MSと脳血管障害の鑑別が問題になった症例の経験がある。[Q4] その場合の診断法。[Q5] MSが否か鑑別に苦慮する症例を診療している。[Q6] 鑑別診断困難な理由。[Q7] T細胞マイクロアレイ解析によるMS補助診断法に興味がある。[Q8] 外来診療MS患者数。[Q9] IFNB投与通算患者数。[Q10] 治療結果に満足している患者数。[Q11] IFNB治療中に副作用などで中止となった経験がある。[Q12] その内容。[Q13] IFNBを積極的に治療に導入する。[Q14] 消極的な理由。[Q15] IFNB有効性・副作用予測法開発を期待する。[Q16] 患者からIFNB治療導入の相談を受け保留している例がある。[Q17] その理由。[Q18] T細胞マイクロアレイ解析によるIFNB治療効果・副作用予測法に興味がある。

その結果、171施設で腫瘍との鑑別が問題となり、70施設では生検が施行されていました。また、180施設で脳血管障害との鑑別が問題となり、4施設で生検が施行されていました。102施設で鑑別診断困難症例を経験しており、9施設がSjogren症候群との鑑別に言及していました。IFNB

投与患者数総計1,052人中46%が治療に満足し、25%は皮膚反応・肝機能障害・うつ症状・白血球減少などで治療中止しておりました。IFNB治療導入に消極的な理由や使用保留の理由に関しては、治療効果不十分・副作用高頻度・使用法煩雑などがあげられ、310施設で薬効・副作用予測法開発に期待していました。末梢血T細胞マイクロアレイ解析によるMS補助診断法樹立は254施設(80%)、IFNB有効性・副作用予測法樹立は275施設(86%)が期待していました。今回の調査により専門医レベルでも、腫瘍や脳血管障害との鑑別が困難な症例が多数存在し、IFNB治療に対する患者満足度が低く、大多数の施設でDNAマイクロアレイによるMS診断法やIFNB治療効果・副作用予測法開発に期待感を持っていることが明らかになりました。今後、皆様のご期待に添えるようにMSのマイクロアレイ研究を進め

ていこうと思います。

敬 具

文 献

- 1) Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. N Engl J Med 2000 ; 343 : 898-904.
- 2) Steinman L, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. Nature Rev Immunol 2003 ; 3 : 483-92.
- 3) Satoh J, Nakanishi M, Koike F, et al. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. Neurobiol Dis 2005 ; 18 : 537-50.

* * *

次号特集予告

第64巻第4号(2006年4月)

特集 I / 筋硬直, 筋痙攣と周辺疾患

・筋硬直と筋痙攣	徳島大学神経内科	梶	龍兒
・ミオキミア	和歌山県立医科大学神経内科	三輪	英人
・こむら返り	慶應義塾大学神経内科	高尾	昌樹
・Isaacs症候群の病因	鹿児島大学第三内科	有村	公良
・Isaacs症候群の臨床	名古屋市立大学神経内科	山脇	健盛
・Stiff person症候群の病因	筑波大学神経内科	大越	教夫
・Stiff person症候群の臨床	順天堂大学脳神経内科	林	明人
・里吉病	福島県立医科大学神経内科	遠藤	一博

特集 II / ALSの非侵襲呼吸(NIPPV)ケアをめぐる

・非侵襲呼吸(NIPPV)の理論と実践	国立病院機構八雲病院小児科	石川	悠加
・ALSにおける呼吸療法—総論—	国立病院機構新潟病院神経内科	中島	孝
・ALSにおけるNIPPVの意義と実践	東京都立神経病院神経内科	小森	哲夫
・ALS患者に対するNIPPV療法の 導入の背景とその転帰	国立病院機構熊本南病院神経内科	栗崎	玲一
・ALS診療におけるNIPPVの長所と問題点	北里大学東病院神経内科	萩野	美恵子
・ALS診療におけるNIPPV—日本と欧米の比較—	北里大学医療衛生学部	斎藤	豊和

特集 多発性硬化症研究・治療の現状2006

多発性硬化症のマイクロアレイ診断*

佐藤 準 —1,2)

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は再発を繰り返す中枢神経系炎症性脱髄疾患である。MS の病因は未だ明らかではないが、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。再発予防のため、インターフェロンベータ (IFN β) が投与されるが無効例 (nonresponder) も多い。MS は臨床経過・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 (clinicopathological 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固定されているチップである。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 免疫病態多様性の解明に威力を発揮する。すなわち従来の研究方法では予期しなかった遺伝子群の、MS 病態形成における重要な役割が次々解明され、治療の新しい分子標的 (molecular target) となる可能性が示唆されている。また薬物応答遺伝子を系統的に解析することにより、個々人の遺伝的背景 (genetic background) に応じた治療反応性や副作用を事前に予測することも可能になりつつある。最近筆者らは遺伝子アレイを用いて、MS が末梢血 T 細胞の遺伝子発現プロファイルの階層的クラスター解析 (hierarchical clustering analysis) により 4 サブグループに分類され、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 (personalized medicine) 樹立に役立つと思われる。

キーワード：DNA マイクロアレイ、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

はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、様々な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。MS では遺伝的要因と環境因子の相互作用を背景に、髄鞘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脳・脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化して、炎症増強因子 (TNF α) など

の産生を誘導し、脱髄 (demyelination) が惹起される (自己免疫機序)³²⁾。回復期には髄鞘再生 (remyelination) を認めるが、炎症が高度で遷延化すると軸索傷害 (axonal degeneration) を来して不可逆的機能障害を残す。近年、欧米・本邦での大規模臨床試験により、インターフェロンベータ (interferon-beta : IFN β) の MS 再発抑制効果が class I evidence で立証され^{29,37)}、現在では急性増悪期 (acute relapse) に副腎皮質ステロイド短期間大量静脈内投与 (intravenous methylprednisolone pulse : IVMP)

2005年11月21日受稿

* Microarray analysis classifies multiple sclerosis subgroups.

1) 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 (〒187-8502 東京都小平市小川東町 4-1-1) Jun-ichi SATOH : Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.

2) 明治薬科大学薬学部生命創薬科学科生命情報解析学 (〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1) Jun-ichi SATOH : Department of Bioinformatics and Neuroinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.

0001-8724/06/ ¥ 500/論文/JCLS

を行い、回復寛解期 (remission) に IFN β の継続的皮内・筋肉内投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。しかし IFN β が十分治療効果を示さない症例 (nonresponder) や副作用で使用出来ない症例も多い^{28,40,43})。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。事実 MS は臨床経過から再発寛解型 (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 治療反応性から反応型 (responder MS : RMS), 不応型 (nonresponder MS : NRMS) に分類される。また病理学的には T 細胞浸潤, 抗体沈着, オリゴデンドロサイトアポトーシス (apoptosis) 所見により 4 型に分類され²⁰, 早期からの軸索傷害進行も注目されている³⁸)。

近年, MS の免疫病態多様性 (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。ゲノムプロジェクト完了によりヒト全遺伝子塩基配列が解読され, 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・系統的に解析可能になった。RNA レベルの発現解析をトランスクリプトーム (transcriptome) 解析, タンパク質レベルの発現解析をプロテオーム (proteome) 解析と呼ぶ。このような網羅的発現解析 (global expression analysis) の手法により, 従来の研究方法では予期しなかった遺伝子群の MS 病態形成における役割が, 次々明らかにされた³³)。さらに薬物反応性遺伝子の変動を経時的に解析し, 遺伝学的個人差に応じた薬物反応性や副作用を予知することが可能になり, 薬理ゲノミクス (pharmacogenomics) の分野は急成長を遂げた。本稿では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。

I. 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・支持体上に, 数千・万の cDNA やオリゴヌクレオチド (oligonucleotide) が固定されているチップである。cDNA をスポットで基盤上にスポットする DNA マイクロアレイ (microarray) と, 基盤上で直接高密度 oligonucleotide をフォトリソグラフ合成する GeneChip (Affymetrix) に大別される。スライドガラスをマイクロアレイ (microarray), ナイロン膜をマクロアレイ (macroarray) と総称する。遺伝子アレイ解析は発現解析アレイ・タイピングアレイ (SNP, CGH な

ど)・タイピングアレイ (ChIP-chip など) に分類されるが, 本稿では発現解析アレイに焦点を絞って言及する。

まず, 遺伝子発現レベルが異なる 2 種類以上の細胞・組織, 例えば IFN β 投与前後の細胞から mRNA (total RNA でも可能) を抽出し増幅する (図 1)。DNA マイクロアレイでは別々の蛍光色素 (Cy3 赤, Cy5 緑) 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行う (2 色法)。GeneChip では *in vitro* transcription 法で cDNA から biotin 標識 cRNA を作成, fragment に切断してハイブリダイゼーションを行い, streptavidin-phycoerythrin (SAPE) を添加して蛍光標識する (1 色法)。GeneChip は 1 サンプルに 1 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) を行い, サンプル間の遺伝子発現プロフィール (gene expression profile) を比較する。したがって出発点の 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に関しては real-time RT-PCR 解析を行い, 定量的に検証 (validation) することが重要である。同定した遺伝子の機能や構造に関する情報 (annotation) に関しては, Web 上でデータベース (NCBI の Entrez など) を検索する (表 1)。すでに様々な遺伝子発現データが MIAME (minimum information about a microarray experiment) 形式に従い, 公共データベース Gene Expression Omnibus (GEO) に登録されており, 自由にダウンロード出来る。末梢血リンパ球 (peripheral blood mononuclear cells : PBMC) の解析の問題点としては, 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)⁴⁵)。脳組織の解析では, 死後脳凍結までに要する時間 (RNA degradation time) が問題であるが, 組織の pH が参考になる。

サンプルが多数の場合はデータセットの要素特性を分類するため, 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) を行う⁴⁾。すなわちサンプルに関する事前情報なしに (教師なし法 unsupervised method と呼ぶ), 同じ遺伝子発現制御を受けていると考えられる類似発現パターン遺伝子やサンプルを, クラスター (グループ・クラスとも言う) に分類し, 系統樹・樹状図 (dendrogram) および発現レベルの二次元マトリックスを用いて表示する⁴⁾。非階層的クラスター解析には k-means (KM) clustering や self-

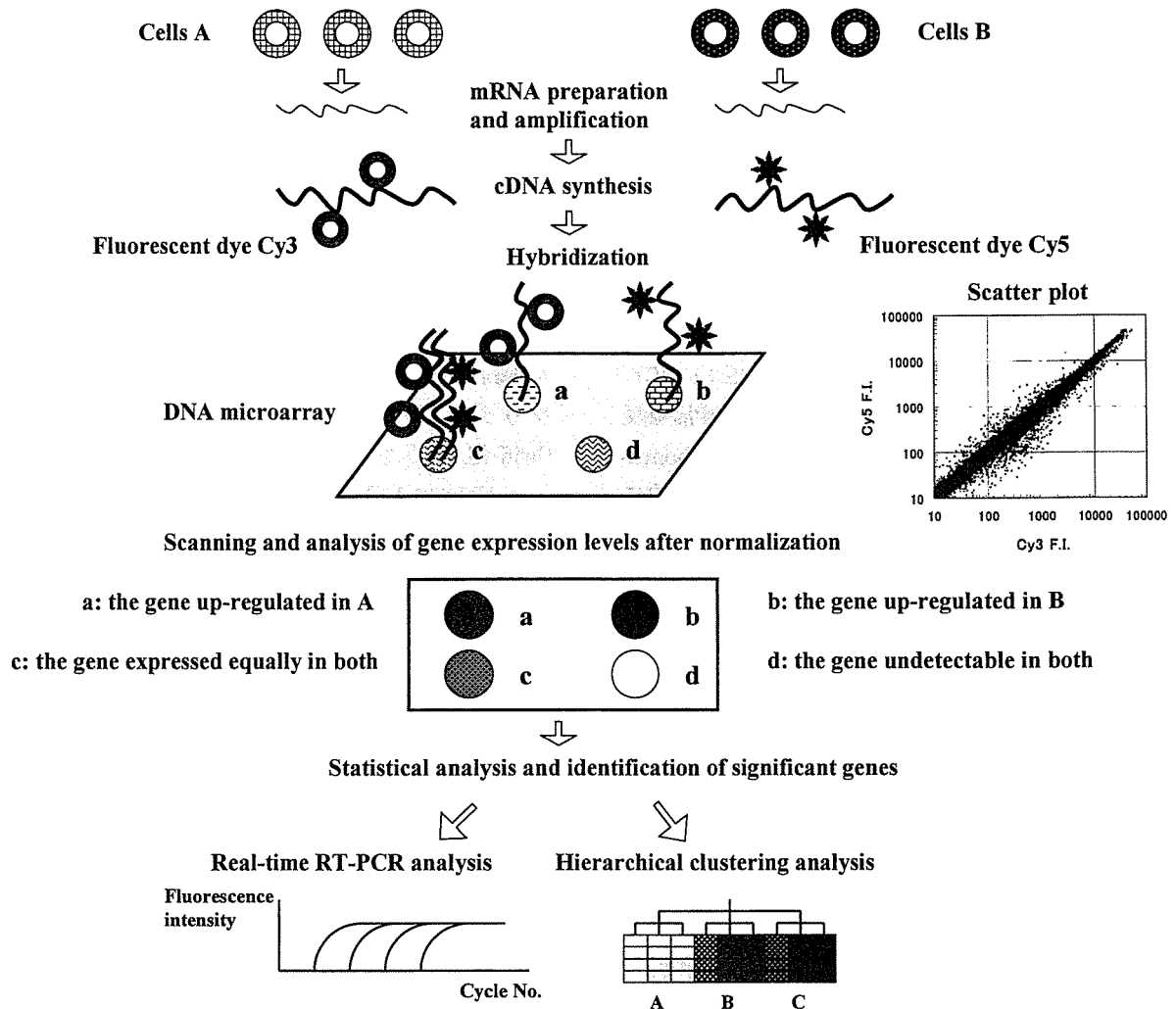


図1 マイクロアレイ解析の概要

2種類の細胞(A, B)からmRNAを抽出増幅し、別々の蛍光色素(Cy3, Cy5)でラベルしたcDNA probeを作成して、多数のcDNA(またはoligonucleotide)がスポットされたスライドガラス(DNA microarray)上で競合的ハイブリダイゼーションを行う(2色法)。スキャナーで蛍光シグナルを検出し、データを正規化して統計学的検定を行い、サンプル間の遺伝子発現プロファイル(gene expression profile)を比較する。A, Bの遺伝子発現パターンが類似している場合には、蛍光シグナルがスキャタープロット(Cy3 vs Cy5 scatter plot)で直線上に分布する。マイクロアレイ解析で有意な発現差異を呈すると判定された遺伝子に関しては、real-time RT-PCR法でmRNAを定量し検証する必要がある。サンプル数が多数の場合は階層的クラスター(hierarchical clustering)解析を行い、類似発現パターンを示す遺伝子やサンプルをグループ・クラスに分類する。

organization map (SOM) 法がある。またクラスターを特徴づける指標遺伝子(discriminator genes)を抽出し、その要素を圧縮して三次元に投射する主成分解析(principal component analysis: PCA)を行う²⁶⁾。さらに指標遺伝子の抽出に用いたデータをtraining setとして機械学習することにより(教師あり法 supervised method と呼ぶ)、新規のデータセットにおけるクラスターを識別する超平面(hyperplane)を同定する方法であるサポートベクターマシン(support vector machine: SVM)解析を行う¹⁰⁾。

II. DNA マイクロアレイによる多発性硬化症免疫病態の解析(表2)

1. MS 脳組織の遺伝子発現解析

Whitney らは初めて cDNA microarray 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、前者における interferon-regulatory factor IRF-2 と 5-lipoxygenase の発現上昇を報告した^{46,47)}。Chabas らは cDNA ライブラリー網羅的シークエンス解析により、MS 脳における