

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17年度～18年度 総合研究報告書

主任研究者 佐藤 準一

平成19年(2007)年 3月

目 次

I. 総合研究報告

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) ----- 24

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 ----- 44

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 47

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(こころの健康科学研究事業)

総合研究報告書

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 は通常の血液検査では異常を認めず、神経学的所見・経過・脳脊髄液所見・MRI 画像に基づいて診断されるが、鑑別疾患が多く、神経内科専門医でも正確な診断は容易ではない。MS と健常者、および 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(平成 17 年度ー平成 18 年度の 2 年間)では MS 患者および健常者の末梢血 T リンパ球遺伝子発現プロフィールを解析し、(1)MS 特異的遺伝子(MS-specific genes; MSG), (2)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。研究成果として(1) MS 患者(n = 72)と健常者(n = 22)で発現差異を呈する 286 遺伝子を同定、階層的クラスター解析で MS を活動性・病変分布・治療反応性と密接に関連する 4 サブグループに分類する方法 MS classification database(MSCD)を樹立し、(2)再発寛解型 MS 患者(n = 6)について、急性増悪期(at the peak of acute relapse)と完全寛解期(in complete remission)で発現差異を呈する 43 遺伝子を同定、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識別する方法を樹立した。さらに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により、MS 再発時の NF- κ B 遺伝子発現制御系の異常を見出し、MS 再発治療薬・予防薬の創薬ターゲットとなる可能性を示唆した。

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(Jacobs et al. N Engl J Med 343: 898-904, 2000), 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)。MS では感染症やストレスが再発を惹起すると報告されているが、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。

近年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 22,000)の発現情報を包括的・

系統的に解析可能になった。このような網羅的発現解析により、従来の研究方法では解明出来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(Steinman et al. Nature Rev Immunol 3: 483-492, 2003)。最近我々は MS 患者末梢血リンパ球を遺伝子アレイで解析し、IFN β 応答遺伝子(IFN-responsive genes; IRG)を同定した(Koike et al. J Neuroimmunol 139: 109-118, 2003)。

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 と健常者、および 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(平成 17 年度ー平成 18 年度の 2 年間)ではこの仮説に基づき、MS 患者と健常者の末梢血 T リンパ球遺伝子発現プロフィールを遺伝子アレイで解析、MS 特異的遺伝子(MS-specific genes; MSG)および再発期特異的遺伝子(relapse-specific gene; RSG)の同定を試みた。また MS の IFN β 治療関連副作用の発現機序を調べるため、末梢血リンパ球の培養系で IRG を網羅的に解析した。

B. 研究方法

#1. 患者血液検体収集(分担研究者山村)

平成 17 年度ー平成 18 年度に、文書で研究参加への同意を取得した(同意書書式は分担研究報告書 p. 40-43 を参照)国立精神・神経センター武蔵病院神経内科外来通院中・入院中の MS 患

者、対照神経疾患(non-MS neurological diseases)患者や健常者ボランティア(normal control subjects; Nc)の154検体を収集し、凍結保存した。また6名の再発寛解型MS患者では経時的に追跡、急性増悪期(acute relapse)と完全寛解期(complete remission)に未治療の時期に採取した。末梢血全血からFicoll-Paque遠心分離法でリンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)を採取、MACSでCD3⁺T細胞を分離(positive selection), RNAを精製した(Fig. 3)。またIlles准教授(Hungary Pecs 大学)との共同研究で、Hungary人MS 33検体(4 MS twin pairsを含む)とNc 22検体を収集した。

#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(Satoh et al. Neurobiol Dis 18: 537-550, 2005)に従い、遺伝子発現プロフィールを解析した。平成17年度はMS(n=72)と健常者Nc(n=22)の比較を行い、両群間で発現差異(多重検定Bonferroni補正後error rate <0.25)を認める286遺伝子(MSG候補)を同定、階層的クラスター解析(hierarchical clustering analysis; HCA)によりMS病型分類データベース(MS classification database; MSCD)を樹立した。平成18年度はRRMS(n=6)の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(RSG候補)を同定した。またHungarian monozygotic (MZ) twin 4 pairsを比較解析、MS特異的20遺伝子(MSG候補)を同定した。さらにPBMC培養系をIFN β (50 ng/ml)で3, 24時間刺

激し、上記のアレイを用いてIFN-responsive genes (IRG)を網羅的に解析、LightCycler ST300 (Roche)でreal-time RT-PCRを行い、遺伝子アレイの結果を検証(validation)した。

遺伝子アレイ解析で同定した遺伝子群の病態生理学的意義を調べるため、新しいバイオインフォマティクスデータマイニングツール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。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三者により暗号化し、検査者には個人情報が出ないようにし取り扱うように配慮した。

C. 研究結果

#1. MS 病型分類データベース作成(主任研究者佐藤・分担研究者山村) : DNA マイクロアレイで MS (n = 72) と健常者(Nc または CN と表記) (n = 22) 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 遺伝子を指標遺伝子(discriminator genes)として階層的クラスター解析を施行、MS 病型分類データベース(MS classification database; MSCD)を樹立した。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 群に類似し、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(Fig. 1)。さらに Nc 群と MS-A 群を識別する 58 遺伝子を絞り込んだ。IFN β 治療例では、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の集計から治療効果良好(responder)と不良(nonresponder)に分類すると、IFN β responder は A 群と B 群に集積することがわかった。Responder は nonresponder に比較し、治療開始後 6 ヶ月の時点の IRG (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(Fig. 2)(Sato et al. J Neuroimmunol 174: 108-118, 2006)。

#2. MS 再発期特異的遺伝子群(relapse-specific

genes; RSG)の同定(佐藤・山村) : 再発期サンプル(n = 6)と寛解期サンプル(n = 6)間で、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)。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. 4)。

さらに MS 再発の分子生物学的機序を解明するために 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. 5-7)。共通上流検索法と周辺検索法の両方で、再発時の NF- κ B 発現制御系異常が、統計学的有意性をもって示唆された(Sato et al. Submitted for publication)。

#3. Hungarian MZ twin 解析による MS 特異的遺伝子群の探索(佐藤・山村) : Hungarian MZ twin 4 pairs(concordant pairs; #1. MS/MS; #2. MS/MS; #3. MS/MS; discordant pair: #4. MS/Nc)の CD3⁺ 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。20 DEG について、KeyMolnet で関連 44 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ィールの特徴として、NF- κ B および Ets 転写因子ファミリーを介する発現制御系の関与が示唆された(Fig. 8)(Sato et al.

Submitted for publication).

#4. IFN-responsive genes (IRG) の網羅的解析 (佐藤・山村) : PBMC を IFN β で刺激して、発現上昇したのは 3 時間で 107 遺伝子、24 時間で 87 遺伝子であり、69 遺伝子は両時間でオーバーラップし、既報 (Koike et al. J Neuroimmunol 2003; 139: 109-118) の RRMS 患者における *in vivo* IRG 11 遺伝子 (IFI56, ISG15, IFI60, IFI27, IFI6-16, IRF7, TAP1, ATF3, IFI17, SULT1C1, TNFAIP6) が含まれていた。CXCR3 ligand chemokine (SCYB11, SCYB10, SCYB9) と CCR2 ligand chemokine (SCYA10, SCYA2) は、両時間の top 20 発現上昇遺伝子に含まれていた。IFN β 刺激で発現低下したのは 3 時間で 22 遺伝子、24 時間で 23 遺伝子であり、2 遺伝子 (FOS, IL1A) は両時間でオーバーラップし、CXCR2 ligand chemokine (SCYB2, SCYB1, SCYB8) および RGS14 は 3 時間における IFN β -repressed genes に含まれていた。IRG は主要 7 カテゴリー: (i) conventional IFN-response markers (n = 12), (ii) components of classical and Toll-like receptor (TLR)-dependent IFN-signaling pathways (n = 12), (iii) chemokines and their receptors (n = 11), (iv) cytokines, growth factors and their receptors (n = 17), (v) apoptosis, DNA damage, and cell cycle regulators (n = 29), (vi) heat shock proteins (n = 9), (vii) costimulatory and adhesion molecules (n = 7) (Table 2) に分類された (Satoh et al. BMC Neurol 6: 18-34, 2006)。

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。本研究では DNA マイクロアレイを用いた T 細胞遺伝子発現プロファイル解析により MS 病型分類データベース (MSCD) を樹立した。MSCD 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。MSCD を利用すると、任意の未治療患者で末梢血 T 細胞の遺伝子アレイ解析を施行すれば、病態が (1) MS に近いのか、健常者に近いのか、(2) MS の場合は活動性が高いのか、低いのか、(3) IFN β 治療反応性が良好か、不良かを予測出来る。すなわち MS 診断補助・治療反応性予測のツールとして活用出来る。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)。

また本研究では RRMS の CD3⁺ T 細胞において再発期と寛解期で発現差異を認める 43 RSG を同定した。43 RSG を指標遺伝子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して利用出来る。すなわち任意の未治療 RRMS 患者で末梢血 T 細胞の遺伝子アレイ解析を施行すれば、病態が再発期に近いのか、寛解期に近いかを予測出来る。

本研究では非常に貴重なハンガリー人一卵性双生児4ペアの末梢血 CD3⁺ T細胞をDNAマイクロアレイで比較解析し、MS 特異的遺伝子(20 DEG)の発現プロフィールを明らかにした。一般に、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。

KeyMolnet による 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 制御適正化分子は MS 再発治療薬・予防薬の創薬ターゲットとなり得る。また KeyMolnet で解析した 20 DEG の分子ネッ

トワークの特徴として NF- κ B および Ets 転写因子ファミリーを介する発現制御系を同定した。Ets は T 細胞分化を制御し、自己免疫の発症に関与する重要な転写因子である。

最後に MS 治療薬 IFN β の副作用関連遺伝子を遺伝子アレイで解析した。IFN β は IFN response/signaling 関連遺伝子群の他に、apoptosis regulators, heat shock proteins など多彩な遺伝子群を迅速(3-24 時間)に誘導することがわかった。特に effector Th1 cells に働く CXCR3 ligand chemokine と monocytes に働く CCR2 ligand chemokine の顕著な発現上昇、chemokine receptor GPCR 系 signaling 抑制因子 RGS14 の発現低下、proinflammatory cytokine (IL-6, IL-15, osteopontin, TNF α , IFN γ)の発現誘導を認めた。これらのサイトカイン・ケモカインは MS における IFN β 治療関連早期副作用 (skin reaction, flu-like symptoms, liver dysfunction)の発現で中心的役割を果たしている可能性がある。

E. 結論

MS 患者の再発期と寛解期の末梢血 T リンパ球の遺伝子アレイ解析により、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, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiology of Disease* 18: 537-550, 2005.
2. Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T: Nogo-A and Nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 129-138, 2005.
3. Satoh J, Onoue H, Arima K, Yamamura T: The 14-3-3 protein forms a molecular complex with heat shock protein Hsp60 and cellular prion protein. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64: 858-868, 2005.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.

12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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
17. 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.
18. 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

19. 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, Onoue H, Arimak K, Yamamura T: Nogo-A and Nogo receptor expression is enhanced in demyelinating lesions of multiple sclerosis. 57th Annual Meeting of American Academy of Neurology. Miami Beach, 2005. 4.12. (Neurology 64, Suppl 1: A138, 2005).
2. Satoh J, Onoue H, Nanri Y, Arima K, Yamamura T: The 14-3-3 Protein Forms a Molecular Complex with Heat Shock Protein Hsp60 and Cellular Prion Protein: A Possible Implication for Detection of 14-3-3 in the CSF of Prion Diseases. The Fifth Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, 2005. 9.7. (Abstract P-084, p. 102, 2005).
3. Satoh J, Doi Y, Aranami T, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies four distinct subgroups of multiple sclerosis.

- International Symposium on Autoimmunity in Intractable Diseases-Novel Molecules and Emerging Paradigms. Hakone, 2005. 10.27. (Abstract 27S-2, 2005).
4. Doi Y, Satoh J, Aranami T, Yamamura T: NR4A2 (Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. International Symposium on Autoimmunity in Intractable Diseases-Novel Molecules and Emerging Paradigms. Hakone, 2005. 10.27. (Abstract PV-17, 2005).
 5. 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).
 6. 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).
 7. 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.
 8. 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).
 9. 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).
 10. 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.
 11. 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).
 12. 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).
 13. 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).

14. 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).
15. 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).
16. 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 : The 14-3-3 zeta isoform binds to heat shock protein HSP60 in human neural cells: a possible implication in prion diseases. 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 16 年度 2 回

全体班会議. 東京、2005.1.8. (抄録集 p.156-157).

2. 佐藤準一、山村隆、尾上祐行、有馬邦正 : 多発性硬化症脱髄巣反応性アストロサイトにおける Nogo 受容体の発現. 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 16 年度班会議. 東京、2005.1.26. (抄録集 p.20-21).
3. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆 : T 細胞の DNA microarray 解析による多発性硬化症の病型分類. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005.3.3. (神経免疫学 13: 44, 2005). 第 17 回日本神経免疫学会会長賞受賞.
4. 尾上祐行、佐藤準一、山村隆 : 多発性硬化症患者血清中の抗 Nogo Receptor 抗体の検出. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005.3.3. (神経免疫学 13: 72, 2005). 第 17 回日本神経免疫学会奨励賞受賞.
5. 土居芳充、佐藤準一、山村隆 : 多発性硬化症の末梢血 T 細胞における NR4A2 発現上昇. 第 17 回日本神経免疫学会学術集会. 福岡、2005. 3.4. (神経免疫学 13: 104, 2005).
6. 佐藤準一、尾上祐行、有馬邦正、山村隆 : 多発性硬化症脱髄巣における Nogo-A・Nogo 受容体の発現. 第 46 回日本神経病理学会総会学術研究会. 宇都宮、2005.5.13. (Neuropathology 25: A32, 2005).
7. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、土居芳充、古池史子、山村隆 : DNA microarray 解析による多発性硬化症の病型分類. 第 46 回日本

- 神経学会総会. 鹿児島、2005.5.25. (抄録集 102, 2005).
8. 土居芳充、佐藤準一、山村隆：多発性硬化症(MS)末梢血 T 細胞における NR4A2 発現上昇. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005.5.27. (抄録集 272, 2005).
 9. 尾上祐行、佐藤準一、山村隆：多発性硬化症(MS)患者血清中の抗 Nogo 抗体の検出. 第 46 回日本神経学会総会. 鹿児島、2005.5.27. (抄録集 272, 2005).
 10. 山村隆、佐藤準一：cDNA マイクロアレイを用いた多発性硬化症の病態解析. 第 26 回日本炎症・再生医学会. ワークショップ 3. 網羅的遺伝子発現解析による炎症性疾患の病態解析と治療効果の予測. 東京、2005.7.13. (炎症・再生 25: 289, 2005).
 11. 佐藤準一、野村恭一、山村隆：CIDP 診断における DNA マイクロアレイ有用性に関する研究. 厚生労働省精神・神経疾患研究委託費 難治性ニューロパチーの病態に基づく新規治療法の開発班. 平成 17 年度班会議. 東京、2005.12.7.
 12. 佐藤準一、南里悠介、土居芳充、山村隆：末梢血リンパ球におけるインターフェロン応答遺伝子の網羅的解析. 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 17 年度班会議. 東京、2005.12.9.
 13. 南里悠介、佐藤準一、土居芳充、山村隆：MS のマイクロアレイ診断およびインターフェロンベータ治療に関するアンケート調査の集計. 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 17 年度班会議. 東京、2005.12.9.
 14. Satoh J, Onoue H, Doi Y, Yamamura T : Detection of anti-Nogo-66 and anti-Nogo receptor autoantibodies in the serum of multiple sclerosis. 第 35 回日本免疫学会総会学術集会 横浜、2005.12.13. (Proceedings of the Japanese Society for Immunology 35: 37, 2005).
 15. 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).
 16. 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).
 17. 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).
 18. 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).
 19. 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.
20. 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).
21. 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).
22. 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).
23. 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).
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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).
29. 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).
30. 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).
31. 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).
32. 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.
33. 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.

34. 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.
35. 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.

H. 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 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.

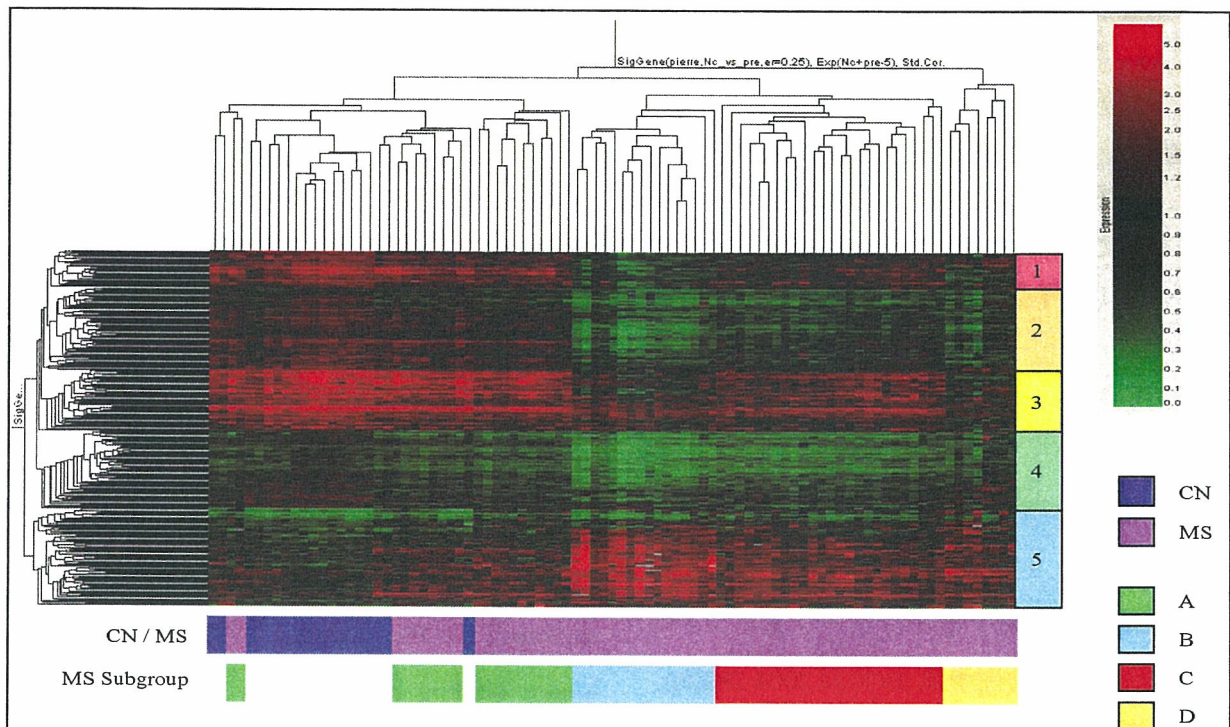


Fig. 1. Hierarchical clustering analysis of 286 genes differentially expressed between 72 untreated MS patients and 22 normal control (CN) subjects. The gene expression profile of peripheral blood CD3⁺ T cells was studied in 72 untreated MS patients and 22 age- and sex-matched healthy control (CN) subjects, 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) (Sato et al. *J Neuroimmunol* 174: 108-118, 2006).

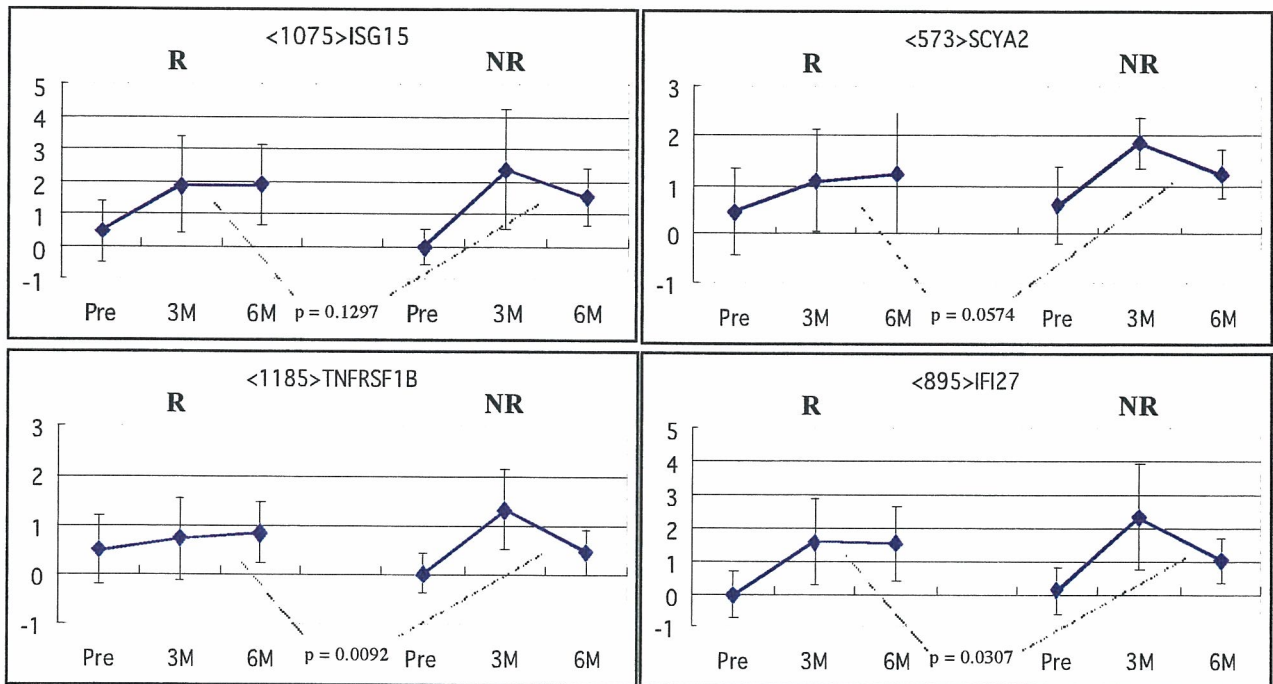


Fig. 2. The temporal profile of induction of IFN-responsive genes in IFN β responders (R) and nonresponders (NR) during IFN β treatment. T-cell gene expression profiling was examined in 46 IFN β -treated MS patients at three time points: before starting IFN β treatment (Pre), and at 3 months (3M) and 6 months (6M) after starting the treatment. Based on the IFN β responder/nonresponder score, they were separated into 19 IFN β responders (R: the left) and 7 nonresponders (L: the right) as shown in Table 2. The temporal expression profile of IFN-responsive genes (IRGs), such as IFN-stimulated protein 15 (ISG15), small inducible cytokine A2 (SCYA2), TNF receptor subfamily member 1B (TNFRSF1B), and IFN α -inducible protein 27 (IFI27), is shown with the statistical differences in the kinetics during 3 to 6 months between R and NR. The vertical axis represents the gene expression level (GEL), while the horizontal axis indicates the time course (Satoh et al. *J Neuroimmunol* 174: 108-118, 2006).

**Table 1. Fourty-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).

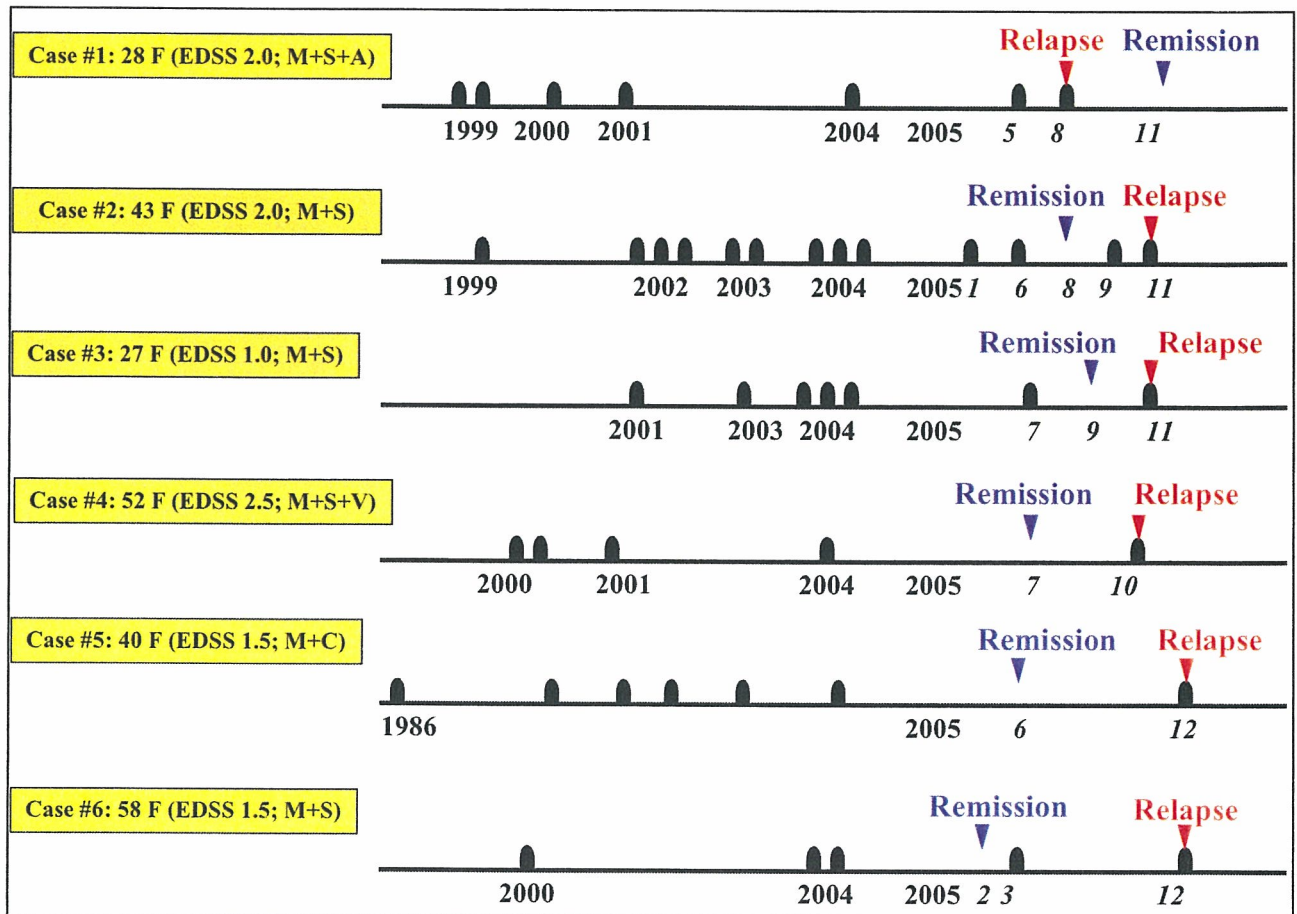


Fig. 3. Blood sampling from six patients with relapsing-remitting MS at the peak of relapse and in remission. Blood samples were taken from six patients with RRMS at the peak of acute relapse (red arrowhead) and in complete remission (blue arrowhead). CD3⁺ T cells were purified and processed for DNA 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).