

Figure 1. Miniarray of Nogo and NgR fragments. A panel of six different recombinant proteins, all of which have an N-terminal Xpress tag, were purified from *E. coli* transformed by PCR-based cloning strategy using primer sets listed in Table 1. The recombinant proteins, whose amounts range from 60 ng to 11.6 µg per lane, were separated on a single 12% SDS-PAGE gel and transblotted onto the identical nitrocellulose membrane, designated the miniarray. (A) The miniarray immunolabeled with anti-Xpress antibody. The lanes (1–6) represent (1) NAS (187 kDa), (2) NgR (50 kDa), (3) LacZ (40 kDa), (4) NAB (36 kDa), (5) MOG (29 kDa), and (6) N66 (11 kDa). The panels of the miniarray (B–D) represent the serum of (B) SPMS exhibiting both anti-non-glycosylated NgR IgG (lane 2, extremely strong; +++) and anti-MOG IgG (lane 5, weak; +), (C) RRMS in remission exhibiting anti-MOG IgG (lane 5, extremely strong; +++) and (D) HC subject presenting with anti-N66 IgG (lane 6, extremely strong; + + +). The specific bands are indicated by arrows, while non-specific reactions, possibly derived from the cross-reaction with contaminating *E. coli* proteins, are indicated by asterisks.

the identical nitrocellulose membrane, designated the miniarray. Then, the array was immunolabeled with anti-Xpress antibody (Fig. 1A). To verify whether the same amount of recombinant proteins was blotted on each array, the signal intensity of Xpress-immunoreactive bands was normalized between individual arrays onto which different serum samples were exposed. The profile of serum IgG autoantibodies varied from case to case, eliminating the possible cross-reactivity of secondary antibodies with recombinant proteins (Fig. 1B–D). This is further confirmed by the observation that negative controls including all the steps except for incubation with the serum detected no immunoreactive bands (data not shown).

Detection of autoantibodies against MOG, N66, and NgR in the serum of MS and controls

None of the subjects examined showed IgG autoantibodies against NAS or NAB (Table 2). In contrast, 30% of MS patients, 23% of OND patients, and 32% of HC subjects exhibited anti-N66 IgG expressing a specific band with varying intensities (Table 2 and Fig. 2A, lanes 1–7). Furthermore, 27% of MS patients, 27% of OND patients, and 18% of HC subjects showed anti-MOG IgG (Table 2 and Fig. 2B, lanes 1–7). IgG antibody against non-glycosylated NgR was identified in 33% of MS patients and 14% of OND patients, whereas it was undetected in any HC subject (Table 2 and Fig. 3A, lanes 1–7). In several cases, minor bands with lower molecular weights were detected in the blots, which possibly represent immunoreactivity against a small amount of degraded NgR proteins (Fig. 3A). No subjects showed IgG antibody against LacZ fragment tagged with Xpress (Table 2), excluding the possibility that the serum IgG autoantibodies against N66, MOG, and NgR were directed to a potentially immunogenic epitope of the tag. In contrast to the frequent detection of anti-NgR IgG, only two OND patients showed IgM antibody against non-glycosylated NgR (Table 2 and Fig. 3B, lanes 1, 2).

A larger proportion (60%) of MS patients, 18% of OND patients, and 14% of HC subjects showed IgG antibody against glycosylated NgR-Fc (Table 2 and Fig. 3C, lanes 1–7). All progressive MS patients ($n = 4$, Table 2) expressed anti-NgR-Fc IgG. In contrast, no subjects showed anti-NgR-Fc IgM (Table 2). Among RRMS patients positive for anti-NgR-Fc IgG, the patients in remission (12/17) greatly outnumbered those in acute relapse (2/9), while among RRMS patients with anti-MOG IgG, the patients in acute relapse (4/9) outnumbered those during remission (3/17) (Table 2), raising the possibility that anti-NgR-Fc IgG is overexpressed in RRMS patients in remission. However, no significant differences were found between MS patients positive or negative for anti-NgR-Fc IgG in age, sex, disease duration, EDSS score, the number of recent relapses, the number of patients with spinal cord involvement, and the treatment given at blood sampling (Table 3).

Discussion

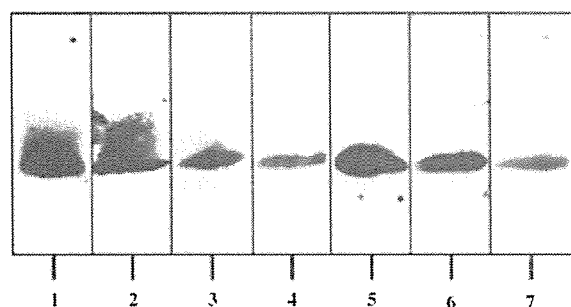
The present study using recombinant human proteins as target antigens on Western blot showed that a substantial proportion of MS patients, OND patients, and HC subjects exhibited the serum IgG

Table 2 Detection of autoantibodies against Nogo and NgR fragments in the serum of MS and controls

	MS subtypes						
	MS (n = 30)	RRMS (total) (n = 26)	RRMS (in remission) (n = 17)	RRMS (in relapse) (n = 9)	SP/PPMS (n = 4)	OND (n = 22)	HC (n = 22)
NAS IgG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
NAB IgG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
N66 IgG	9 (30)	7 (27)	4 (24)	3 (33)	2 (50)	5 (23)	7 (32)
NgR IgG	10 (33)	8 (31)	7 (41)	1 (11)	2 (50)	3 (14)	0 (0)
NgR IgM	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (9)	0 (0)
NgR-Fc IgG	18 (60)	14 (54)	12 (71)	2 (22)	4 (100)	4 (18)	3 (14)
NgR-Fc IgM	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MOG IgG	8 (27)	7 (27)	3 (18)	4 (44)	1 (25)	6 (27)	4 (18)
LacZ IgG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

The number of subjects with immunoreactive bands is shown with the percentage in parenthesis. RRMS, relapsing–remitting MS; SPMS, secondary progressive MS; PPMS, primary progressive MS; OND, non-MS other neurological diseases; HC, healthy controls; NAS, Nogo-A-specific fragment; NAB, Nogo-A and Nogo-B-shared fragment; N66, Nogo-66 fragment; NgR, non-glycosylated Nogo receptor fragment; NgR-Fc, glycosylated Nogo receptor-IgG Fc fusion protein; MOG, myelin-oligodendrocyte glycoprotein.

A



B

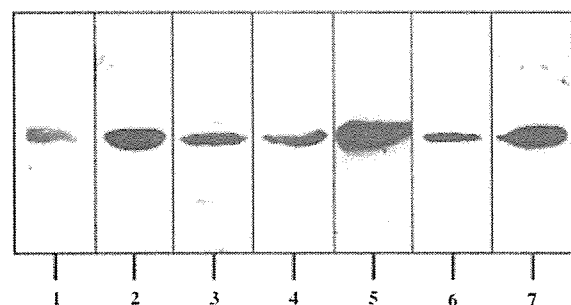


Figure 2. Detection of IgG autoantibodies against N66 and MOG in the serum of MS and controls. The miniarray was incubated with the serum of MS patients, the patients with non-MS neurological diseases (OND) or healthy control (HC) subjects. It was followed by incubation with HRP-conjugated anti-human IgG. (Panel A) Anti-N66 IgG. The lanes (1–7) represent the serum of (1) RRMS in acute relapse, (2) SPMS, (3) Parkinson's disease, (4) adrenoleukodystrophy, (5) HC, (6) HC, and (7) HC. (Panel B) Anti-MOG IgG. The lanes (1–7) represent the serum of (1) RRMS in remission, (2) RRMS in remission, (3) Parkinson's disease, (4) spinocerebellar degeneration, (5) spinocerebellar degeneration, (6) HC, and (7) HC.

autoantibodies against N66, MOG, and NgR. These results agree with a previous study reporting the substantial prevalence of the serum anti-MOG IgG in MS (20). In contrast, no subjects showed

IgG antibodies against NAS or NAB, excluding the possibility that the detection of anti-N66, anti-MOG, and anti-NgR antibodies in our study is simply attributable to non-specific binding. However, our observations do not support a recent study showing that both IgG and IgM autoantibodies against the Nogo-A 1–979 fragment, corresponding to a segment overlapping NAS and NAB in the present study, is often found in the serum of RRMS and OND patients (22). This discrepancy might be derived from following differences between the previous study and our own. First, the study populations were different between both of them. The previous study enrolled 55 patients with RRMS and 38 patients with chronic progressive (CP) MS (22). Ten of them were under treatment with intravenous immunoglobulins (IVIG), which potentially affects the autoantibody profile. In contrast, our study included 26 patients with RRMS, three with SPMS and one with PPMS. None of them received IVIG treatment. Second, the previous study focused on the ELISA-based immunoassay (22), which has more chance of detecting non-specific binding as positive. In contrast, we utilized Western blot throughout the study. Third, the previous study did not include in their assay irrelevant recombinant proteins having the same epitope tag that target fusion proteins have (22), whereas our miniarray included Xpress-tagged LacZ as a negative control.

The present study for the first time showed that 60% of MS patients, 18% of OND patients, and 14% of HC subjects have IgG antibody against glycosylated NgR-Fc. The DNAQLR motif located in the third leucine-rich repeat domain of NgR is the principal epitope recognized by a monoclonal anti-NgR antibody with a capacity to block binding of all NgR ligands (27). The

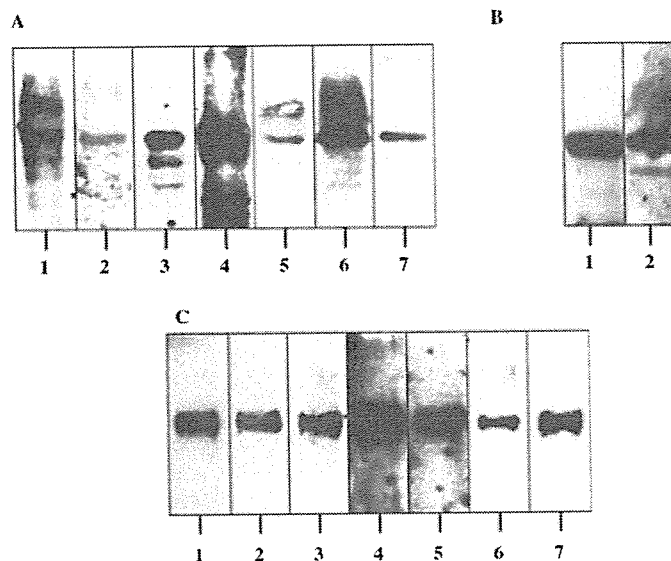


Figure 3. Detection of IgG and IgM autoantibodies against NgR and NgR-Fc in the serum of MS and controls. The miniarray and the NgR-Fc blot were incubated with the serum of MS patients, OND patients or HC subjects. It was followed by incubation with HRP-conjugated anti-human IgG (panel A), IgM Fc_{sμ} (panel B), or IgG F(ab')₂ (panel C). (Panel A) IgG antibody against non-glycosylated NgR. The lanes (1–7) represent the serum of (1) RRMS in remission, (2) RRMS in remission, (3) RRMS in remission, (4) SPMS, (5) Parkinson's disease, (6) spinocerebellar degeneration, and (7) Charcot-Marie-Tooth disease CMT1A. (Panel B) IgM antibody against non-glycosylated NgR. The lanes (1,2) represent the serum of (1) spastic paraplegia of unknown etiology and (2) Fisher syndrome. (Panel C) IgG antibody against glycosylated NgR-Fc. The lanes (1–7) represent the serum of (1) RRMS in remission, (2) RRMS in remission, (3) RRMS in remission, (4) spastic paraplegia of unknown etiology, (5) mitochondrial encephalomyopathy, (6) HC, and (7) HC.

Table 3 Clinical characteristics of MS patients positive or negative for IgG antibodies against NgR-Fc in the serum

Clinical characteristics	NgR-Fc IgG-positive MS (n = 18)	NgR-Fc IgG-negative MS (n = 12)
Age (years) ^a	42.2 ± 10.6	40.4 ± 14.8
Male vs female (number)	8 vs 10	2 vs 10
Disease duration (years) ^a	6.6 ± 5.7	7.9 ± 7.2
EDSS score ^a	3.7 ± 2.2	3.5 ± 1.8
Relapses during the recent one year (number) ^a	0.7 ± 0.9	1.0 ± 1.0
Patients with spinal cord involvement (number and %)	8 (44%)	5 (42%)
Patients in remission, in relapse, and in progression (number)	12 vs 2 vs 4	5 vs 7 vs 0
Patients receiving IFNβ, corticosteroids, and azathioprine at blood sampling (number)	5 vs 7 vs 2	4 vs 4 vs 0

^aNo significant differences are found by Mann-Whitney's *U*-test between the two groups of MS in age, disease duration, EDSS score, and relapses during the recent one year. NgR-Fc, glycosylated Nogo receptor-IgG Fc fusion protein; EDSS, Expanded Disability Status Scale.

Nogo-66 region contains several immunogenic epitopes for mouse T and B cells (28). Although immunogenic epitopes of NgR and Nogo-A in the human immune system remain to be clarified, our observations suggest that both NgR and Nogo-66 are more immunogenic than NAS and NAB for activation of human B cells. Among RRMS patients with anti-NgR-Fc IgG, the patients in remission (*n* = 12) outnumbered those in acute relapse (*n* = 2). Therefore, the possibility exists that this antibody might play a role in the maintenance of remission or the protection against relapse in RRMS, by blocking the interaction between Nogo-66 on oligodendrocytes/myelin and

NgR on neurons/axons. This hypothesis should be evaluated by future studies including the larger cohort of MS patients and controls.

Stress-inducing stimuli greatly affect the levels of Nogo-A expression in distinct cell types. Global ischemia enhances Nogo-A expression on the myelin sheath in the adult rat brain (29). Nogo-A expression is enhanced around the lesion site, whereas NgR is maintained at constant levels in the adult mouse and rat spinal cord following injury (7, 11, 30, 31). Kainate-induced seizure elevates Nogo-A mRNA levels in the adult rat hippocampal neurons (32). Nogo-A is induced in hippocampal neurons of the patients with

temporal lobe epilepsy (33). Unexpectedly, we identified the serum IgG autoantibodies against N66, MOG, and NgR-Fc not only in MS but also in non-MS and HC subjects. Our observations indicate that both Nogo-66 and NgR in addition to MOG serve as an autoantigen in the human immune system. Supporting this, a recent study identified anti-MOG IgG in the serum of both RRMS patients and HC subjects at the similar frequency (34). Increasing evidence indicates that Nogo-A, Nogo-B, Nogo-C and NgR are widely distributed in the cells and tissues outside the CNS (35–37). Nogo-A expression is elevated in postmortem and biopsied muscles of amyotrophic lateral sclerosis patients (38, 39). These observations suggest that the Nogo-66/NgR interaction plays an as yet undefined extraneural role, associated with an increased probability of antibody production under pathological conditions, when they are exposed and recognized by the human immune system.

In conclusion, IgG antibodies against N66, NgR, and MOG are frequently detected in the serum of both MS patients and controls. Although the study population is small and heterogeneous, we could definitely conclude that these autoantibodies do not serve as a disease-specific marker for MS.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H17-kokoro-020), Research on Health Sciences Focusing on Drug Innovation, the Japan Health Sciences Foundation (KH21101), and the Grant-in-Aid for Scientific Research, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (B18300118), Japan.

References

- FERGUSON B, MATYSZAK MK, ESIRI MM, PERRY VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997;120:393–99.
- TRAPP BD, PETERSON J, RANSOHO RM, RUDICK R, MÖRK S, BÖ L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:278–85.
- LASSMANN H. Axonal injury in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:695–97.
- SCHWAB ME, BARTHOLDI D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 1996;76:319–70.
- CHEN MS, HUBER AB, VAN DER HAAR ME, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 2000;403:434–39.
- GRANDPRÉ T, NAKAMURA F, VARTANIAN T, STRITTMATTER SM. Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein. *Nature* 2000;403:439–44.
- JOSEPHSON A, WIDENFALK J, WIDMER HW, OLSON L, SPENGER C. NOGO mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Exp Neurol* 2001;169:319–28.
- WANG X, CHUN S-J, TRELOAR H, VARTANIAN T, GREER CA, STRITTMATTER SM. Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *J Neurosci* 2002;22:5505–15.
- OERTLE T, VAN DER HAAR ME, BANDTLOW CE et al. Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions. *J Neurosci* 2003;23:5393–406.
- FOURNIER AE, GRANDPRÉ T, STRITTMATTER SM. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 2001;409:341–46.
- JOSEPHSON A, TRIFUNOVSKI A, WIDMER HR, WIDENFALK J, OLSON L, SPENGER C. Nogo-receptor gene activity: cellular localization and developmental regulation of mRNA in mice and humans. *J Comp Neurol* 2002;453:292–304.
- WANG KC, KIM JA, SIVASANKARAN R, SEGAL R, HE Z. p75 interacts with the Nogo receptor as a co-receptor for Nogo, MAG and OMgp. *Nature* 2002;420:74–8.
- MI S, LEE X, SHAO Z, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. *Nat Neurosci* 2004;7:221–28.
- PARK JB, YIU G, KANEKO S, WANG J, CHANG J, HE Z. A TNF receptor member, TROY, is a coreceptor with Nogo receptor in mediating the inhibitory activity of myelin inhibitors. *Neuron* 2005;45:345–51.
- NIEDERÖST B, OERTLE T, FRITSCH J, MCKINNEY RA, BANDTLOW CE. Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. *J Neurosci* 2002;22:10368–76.
- BAREYRE FM, HAUDENSCHILD B, SCHWAB ME. Long-lasting sprouting and gene expression changes induced by the monoclonal antibody IN-1 in the adult spinal cord. *J Neurosci* 2002;22:7097–110.
- FOURNIER AE, GOULD GC, LIU BP, STRITTMATTER SM. Truncated soluble Nogo receptor binds to Nogo-66 and blocks inhibition of axonal growth by myelin. *J Neurosci* 2002;22:8876–83.
- GRANDPRÉ T, LI S, STRITTMATTER SM. Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* 2002;417:547–51.
- LEE J-K, KIM J-E, SIVULA M, STRITTMATTER SM. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J Neurosci* 2004;24:6209–17.
- BERGER T, RUBNER P, SCHAUTZER F et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 2003;349:139–45.
- LENNON VA, KRYZER TJ, PITTOCK SJ, VERKMAN AS, HINSON SR. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 2005;202:473–77.
- REINDL M, KHANTANE S, EHLING R, et al. Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders. *J Neuroimmunol* 2003;145:139–47.
- SATOH J-I, ONOUE H, ARIMA K, YAMAMURA T. Nogo-A and Nogo receptor expression in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:129–38.
- KARNEZIS T, MANDEMAKERS W, McQUALTER JL, et al. The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in auto-immune-mediated demyelination. *Nat Neurosci* 2004;7:736–44.

25. McDONALD WI, COMPSTON A, EDAN G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121–27.
26. SATOH J-I, KURODA Y. Differential gene expression between human neurons and neuronal progenitor cells in culture: an analysis of arrayed cDNA clones in Ntera2 human embryonal carcinoma cell line as a model system. *J Neurosci Methods* 2000;94:155–64.
27. LI W, WALUS L, RABACCHI SA, et al. A neutralizing anti-Nogo66 receptor monoclonal antibody reverses inhibition of neurite outgrowth by central nervous system myelin. *J Biol Chem* 2004;279:43780–88.
28. FONTOURA P, HO PP, DeVoss J, et al. Immunity to the extracellular domain of Nogo-A modulates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004;173:6981–92.
29. ZHOU C, LI Y, NANDA A, ZHANG JH. HBO suppresses Nogo-A, NgR, or RhoA expression in the cerebral cortex after global ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:368–76.
30. HUNT D, MASON MRJ, CAMPBELL G, CON R, ANDERSON PN. Nogo receptor mRNA expression in intact and regenerating CNS neurons. *Mol Cell Neurosci* 2002;20:537–52.
31. HUNT D, CON RS, PRINJHA RK, CAMPBELL G, ANDERSON PN. Nogo-A expression in the intact and injured nervous system. *Mol Cell Neurosci* 2003;24:1083–102.
32. MEIER S, BRÄUER AU, HEIMRICH B, SCHWAB ME, NITSCH R, SAVASKAN NE. Molecular analysis of Nogo expression in the hippocampus during development and following lesion and seizure. *FASEB J* 2003;17:1153–55.
33. BANDTLOW CE, DLASKA M, PIRKER S, CZECH T, BAUMGARTNER C, SPERK G. Increased expression of Nogo-A in hippocampal neurons of patients with temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2004;20:195–206.
34. LAMPASONA V, FRANCIOTTA D, FURLAN R et al. Similar frequency of anti-MOG IgG and IgM in MS patients and healthy subjects. *Neurology* 2004;62:2092–94.
35. SATOH J-I, KURODA Y. Cytokines and neurotrophic factors fail to affect Nogo-A mRNA expression in differentiated human neurones: implications for inflammation-related axonal regeneration in the central nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002;28:95–106.
36. OERTLE T, HUBER C, VAN DER PUTTEN H, SCHWAB ME. Genomic structure and functional characterisation of the promoters of human and mouse nogo/rtn4. *J Mol Biol* 2003;325:299–323.
37. DODD DA, NIEDERÖST B, BLOECHLINGER S, DUPUIS L, LOEER JP, SCHWAB ME. Nogo-A, -B, and -C are found on the cell surface and interact together in many different cell types. *J Biol Chem* 2005;280:12494–502.
38. DUPUIS L, GONZALEZ DE AGUILAR JL, DI SCALA F, et al. Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 2002;10:358–65.
39. JOKIC N, DE AGUILAR J-LG, PRADAT P-F, et al. Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* 2005;57:553–56.

多発性硬化症における調節性 T 細胞と FOXP3mRNA 発現の検討 (第2報)

清水優子¹、太田宏平²、川畑仁人³、大原久仁子¹、大橋高志¹、岩田 誠¹
¹ 東京女子医大 神経内科、² 東京理科大 理学部、³ 東大・大学院アレルギーリウマチ科

目的

近年、CD4+CD25^{hi}調節性T細胞 (CD4+CD25^{hi}Tr細胞) は自己反応性T細胞を抑制する機能があり、種々の疾患で注目されている。またFoxp3 遺伝子は内在性制御性T細胞の特異性の高いマーカーと考えられており、多発性硬化症 (multiple sclerosis :MS) における検討も散見されるようになった。今回我々は、MSの免疫調整治療薬であるInterferon-β1b (IFN-β1b) を投与した患者数を前回発表時よりも増やし、さらにIFN-β1b投与中に再発した患者群において、検討を加えたので報告する。

方法

対象はIFN-β1b投与を行ったMS患者 17名 (男性:女性=5:12。平均年齢36.3±8.6歳) と健常者 10名 (男性:女性=2:8、平均年齢30.9±6.8歳)。①健常者②IFN-β投与前、投与後3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、24ヶ月のMS患者、および③IFN-β1b投与中に再発したMS患者 (n=5) 末梢血を採取し、PBMCを分離、フローサイトメーターを用いCD4+CD25^{hi}Treg細胞を測定した。同様のPBMCよりRNAを抽出、cDNA合成後、real-time PCRを用いG3PDHを内在コントロールとして標準化し、Foxp3 遺伝子の発現量はABI 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用い測定した。IFN-β1b投与前を基準とし、比較定量法により検討した。なお統計解析はFriedman検定をおこない、p値0.05未満を有意水準とした。IFN-β1b投与前と各治療期間の比較はWilcoxon符号付順位検定を行った。

結果

1: 末梢血のCD4+CD25^{hi}Treg細胞の割合は、健常者は2.00±1.30%で、IFN-β1b投与前の患者では2.44±1.92%であり有意差はなかった。またIFN-β1b投与後3ヶ月～投与後24ヶ月で2.55±2.00%～4.10±

2.11%と軽度増加した。再発群では2.85±2.44%で、投与前と投与後、また再発群において有意差はなかった。2: FOXP3mRNA の発現量。IFN-β投与前を基準1.0とすると、健常者では0.71±0.54、投与後は1.41±1.64～3.22±3.94とやや増加した。特に投与後3ヶ月においてFOXP3mRNAの発現が有意に増加した。再発群では1.26±0.73と投与中と比較し、若干低下していた。(表1)。

考察

これまで、CD4+CD25^{hi}Treg細胞についての検討では、寛解期MSと健常者では差はなく、FOXP3mRNAの発現はMSでは健常者と比較し、減少していると報告されている。しかしIFN-β治療についての検討はない。我々の結果では、両者ともIFN-β1b投与後に増加していた。特に、FOXP3mRNA発現は治療3ヶ月後有意に増加、また投与中の再発群では(症例数は少ないが)、非再発群と比べ、有意差はなかったが減少していた。以上から、IFN-βは調節性T細胞の増加を介し、自己反応性T細胞を抑制している可能性が示唆された。

表1. IFN-β1b投与によるFOXP3mRNA発現の変化

	FOXP3mRNA Expression	p value
IFN-β1b投与前 (n=17)	1.0	—
投与後3M	3.22±3.93	P=0.036
投与後6M	1.41±1.64	NS
投与後12M	2.62±3.94	NS
投与後24M	3.01±3.97	NS
投与中再発 (n=5)	1.26±0.72	NS
健常者 (n=10)	0.71±0.54	NS

多発性硬化症における免疫吸着療法の実際

大橋 高志¹、太田 宏平²、清水 優子¹、大原 久仁子¹、竹内 千仙¹、岩田 誠¹

¹東京女子医科大学神経内科、²東京理科大学理学部

目的

多発性硬化症 (MS) の急性期の治療としては、ステロイドパルス療法 (IVMP) が行われるが、治療抵抗性と考えられる症例も少なからずみられる。血漿交換療法 (PE) や免疫吸着療法 (IAPP) などの血液浄化療法の効果については評価が定まっておらず、症例の蓄積が重要である。さらに、IAPP の再発予防効果を示唆する報告もあり、治療法の確立が望まれる。

対象および方法

IVMPおよび免疫グロブリン静注療法 (IVIg) が無効であった症例2例を含む急性～亜急性期MS 4例に対し、IAPPを施行した。トリプトファンカラム (イソムーバ TR-350[®]) を用い、処理量は2000～2500 mlとした。さらに、インターフェロン (IFN) β -1b療法の導入後も再発を繰り返すMS症例3例 (重複例を含む) に対して、予防的にIAPPを施行し、その有効性を評価した。

結果

急性～亜急性期の MS 症例4例では、いずれも中等度以上の症状改善が得られた。とりわけ視神経炎では治療開始早期から自覚症状の改善がみられた。1例では妊娠中の再発に対して用いたが、特に問題は生じなかった。再発予防目的で定期的に IAPP を施行している間は最長1年間にわたって再発がみられなくなり、有効性を示唆する良好な結果が得られた。合併症として、深部静脈血栓症、カテーテル感染症、アナフィラキシー様症状が各々1例でみられた。

考察

MS は中枢神経系の炎症性脱髄性疾患であり、T細胞性免疫による自己免疫疾患と考えられている。しかし、オリゴクローナル IgG バンドが存在することや、抗 MOG 抗体によって実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) が誘導・増強されるなど、液性因子が少なからず関与しているこ

とも明らかである。

近年、MS に対して PE や IAPP などの血液浄化療法が施行され、その有用性が報告されるようになった。Weinshenker らは、重症 MS を含む中枢神経系の炎症性脱髄疾患に対して PE 群と sham PE 群との二重盲検 RCT を行い、PE 施行群の 44.1% で中等度以上の改善がみられたことを報告した。Lucchinetti らは、MS が病理学的に 4 型に分類できることを示し、第 2 型では脱髄巣における抗体、補体の沈着が特徴的であることを示した。さらに、彼らは第 2 型の患者における劇症型の再発に PE が有効であることを報告し、病的な液性因子を除去することによって改善が期待できることを示した。

MS に対する IAPP の少数例での有効例の報告も多数あり、PE と同等の効果を示すとされている。置換液を用いず副作用も少ないことから、本邦では急性期の治療法として IAPP が好んで用いられている。とりわけ視神経脊髄型 MS には IAPP が有効である可能性があり、IVMP が無効な治療抵抗例には IAPP を考慮するべきであると考えられる。また、妊娠中にも比較的安全に用いることができ、再発予防としての効果も期待できる。

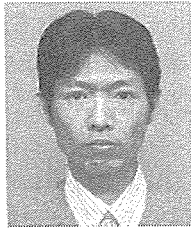
結論

IAPP は、細胞性免疫に影響を及ぼすことによって、MS に対しても有効性を示すと考えられる。MS の中にも液性免疫が強く関与する一群があり、IAPP が特に有効である可能性がある。とりわけ劇症型の再発や視神経脊髄型 MS の劇症型の再発や、IVMP や IVIg が無効ないし効果不十分な治療抵抗例には積極的に IAPP を考慮するべきであると考えられる。また、妊娠中にも比較的安全に用いることができ、再発時の治療法としても有用である。さらに、MS の慢性期の予防的治療の選択肢としても今後検討すべきものである。

多発性硬化症の病態

——免疫調節機構の破綻

The pathology of multiple sclerosis——Breakdown of immune regulatory mechanisms



荒浪利昌(写真) 山村 隆

Toshimasa ARANAMI and Takashi YAMAMURA

国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部

◎多発性硬化症(MS)は中枢神経系の慢性炎症性脱髄性疾患であるが、その病態は中枢神経のミエリン蛋白に対するTh1細胞による自己免疫反応であると考えられている。これに対して自己反応性T細胞に対して抑制的に働く免疫系細胞が存在し、免疫調節細胞とよばれる。MSへの関与が示唆されている免疫調節細胞としては、CD25陽性CD4陽性T細胞、NK細胞、NKT細胞などがあるが、MSの病態は自己反応性T細胞とこれら免疫調節細胞のバランスによって決定されると考えられる。本稿では、MSの病因・病態と治療を考えるうえで重要な免疫調節細胞に関する最近の知見を概説するとともに、これら拮抗する免疫系細胞のバランスという観点からMSの病態を論じる。

Key word : 多発性硬化症(MS), 免疫調節細胞, 自己反応性T細胞, CD25陽性CD4陽性T細胞, NK細胞, NKT細胞

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は中枢神経系に炎症性脱髄性病巣が時間的・空間的に多発する疾患で、若年成人に好発する。多彩な神経症状を示し、多くの例で再発と寛解を繰り返すが、その病因は中枢神経のミエリン蛋白に対する自己免疫反応であると考えられている。自己免疫反応は、CD4陽性ヘルパーT細胞、CD8陽性キラーT細胞、B細胞、樹状細胞、マクロファージなどの免疫系細胞によって惹起されるが、中心的役割を果たしているのがCD4陽性ヘルパーT細胞である。末梢リンパ組織において活性化された自己反応性CD4陽性T細胞は中枢神経系に浸潤し、ミエリン塩基性蛋白(MBP)などのミエリン蛋白に特異的に反応して活性化され、IFN- γ 、TNF- α などさまざまな炎症性サイトカインやケモカインを産生する。炎症性ケモカインによって樹状細胞、マクロファージなどが末梢血より動員され、さらに炎症が持続、拡大する¹⁾。

これに対して、自己反応性T細胞や病的な免疫

系の活性化に対して抑制的に働く免疫系細胞の存在が知られており、免疫調節細胞とよばれる。免疫調節細胞は炎症性サイトカインに拮抗的に働く、IL-4、IL-10、TGF- β 1などの調節性サイトカインを産生し、直接的に、あるいは樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞の抑制を介して間接的に、自己反応性CD4陽性T細胞の反応を抑制すると考えられる。したがって、MSの病態は自己反応性T細胞と免疫調節細胞のバランスによって決定されると考えられる。

本稿では、MSに関与する病原性自己反応性T細胞と免疫調節細胞に関する最近の知見を紹介するとともに、再発と寛解という臨床経過がこれら拮抗する免疫系細胞のバランスという観点から理解できることを論じる。

自己反応性T細胞——Th1細胞とTh17細胞

免疫反応を統括するCD4陽性T細胞のもっとも重要な機能のひとつはサイトカイン産生能であ

る。CD4 陽性 T 細胞は産生するサイトカインの種類によって、IFN- γ 、TNF- α などを産生する Th1 細胞と、IL-4、IL-5、IL-13などを産生する Th2 細胞に大別される。Th1 と Th2 細胞はそれぞれが産生するサイトカイン自体によりたがいに拮抗的に働くという制御機構をもつ。MS およびそのマウス実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) においてはこれまで、Th1 細胞が病原性 T 細胞であると考えられてきた。しかし最近、あらたな系列の T 細胞として、IL-17 を産生する Th17 細胞が同定された。この T 細胞は EAE においては Th1 細胞よりも強力な自己免疫惹起能をもつと報告されており、また視神経脊髄型 MS 患者脳脊髄液中での IL-17 濃度上昇が報告され²⁾、MS においても Th17 細胞が病原性 T 細胞のひとつとして注目されつつある。

さまざまな免疫調節細胞

これまで EAE あるいは MS においてさまざまな免疫調節細胞が報告されている。CD4 陽性 CD25 陽性 T 細胞、IL-10 産生性 T regulatory type 1 (Tr1) 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、NKT 細胞、B 細胞などである。EAE、MS に関するさまざまな免疫調節細胞について概説する。

1. CD25陽性CD4陽性T細胞

ヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞の数~10%を占め、末梢性免疫寛容における重要な役割を果たしている。マウスにおいては抗 CD25 抗体によりこの細胞を除去すると、さまざまな臓器特異的自己免疫疾患を発症する³⁾。さらに、この細胞の生成および機能に必須である Foxp3 蛋白の遺伝子に変異を持つヒトおよびマウスでは、自己免疫疾患を自然発症する。すなわち、この調節細胞はつねにさまざまな臓器に対する自己反応性 T 細胞を抑制していると考えられる。EAE においてもこの細胞の除去により EAE が重症化することから⁴⁾、免疫調節細胞として重要な役割を果たしていることが示唆される。さらに MS においては、CD25 陽性 CD4 陽性 T 細胞の機能異常⁵⁾、および Foxp3 発現の減少⁶⁾が報告されており、MS の病因のひとつとしての可能性も示唆されている。

2. NK細胞

NK 細胞はウイルス感染細胞、腫瘍細胞などを殺す免疫細胞として知られているが、そのほかサイトカイン産生を介してさまざまな免疫反応に関与している。T 細胞の分化と同様に NK 細胞においても、NK1 および NK2 細胞という分化経路が知られている⁷⁾。NK1 細胞は IFN- γ 、IL-10 など、NK2 細胞は IL-5、IL-13などを産生する。著者らは、NK 細胞除去により EAE が重症化すること⁸⁾、MS 寛解期の NK 細胞が高い IL-5 産生能をもち (NK2 偏倚)、自己反応性 Th1 細胞に対して抑制的に働きうることから^{9,10)}、NK 細胞が免疫調節細胞として機能していることを提唱している。

3. NKT細胞

マウスにおいて、NK 細胞表面マーカーと T 細胞抗原受容体 (TCR) を共に発現するユニークな細胞群として同定され、TCR α 鎖に多様性のほとんどないインバリアント鎖をもつことから、NKT 細胞、とくに invariant NKT 細胞 (iNKT 細胞) とよばれる。iNKT 細胞はペプチド抗原ではなく、糖脂質抗原により活性化され、迅速に IFN- γ と IL-4 を産生する。当研究室では OCH という糖脂質を合成し、この新規合成糖脂質が iNKT 細胞を活性化させ、選択的に IL-4 のみを産生させることを報告した。EAE においては OCH の投与により生体内で iNKT 細胞より選択的に IL-4 が産生され、症状が改善されることを示した¹¹⁾。ヒト末梢血中にも iNKT 細胞は存在し、MS 寛解期においては、この細胞は IL-4 を優位に産生する¹²⁾。このことは iNKT 細胞が IL-4 産生を介して寛解期の維持に関与している可能性を示唆する。

4. V α 19i T細胞

第 2 のインバリアント鎖を発現する NKT 細胞であり、ヒトおよびマウスの腸管粘膜固有層に存在することから、mucosal-associated invariant T (MAIT) cells とよばれる¹³⁾。当研究室では V α 19i TCR トランスジェニックマウスでは、V α 19i T 細胞が多量の IL-10 産生誘導を介して、EAE を抑制し、逆に V α 19i T 細胞を欠損するマウスにおいては EAE が増悪することを示し、この細胞が EAE における重要な免疫調節細胞であることを証明した¹⁴⁾。

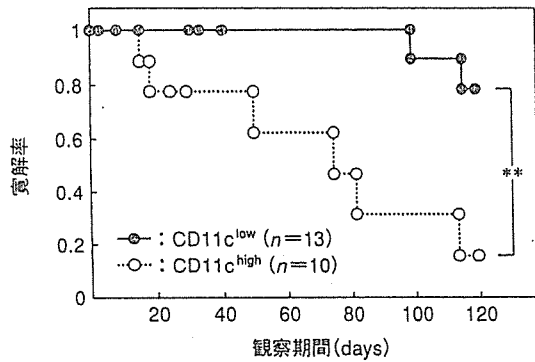


図1 調節性NK細胞の表現型とMSの疾患活動性の相関

免疫抑制剤未投与寛解期MS患者23名の末梢血NK細胞上のCD11cの発現量をフローサイトメトリーで解析した。個々の患者はCD11cの発現量に従い、CD11c^{high}MSとCD11c^{low}MSに分けられる。末梢血サンプリング後120日間の再発の有無を追跡し、Kaplan-Mayerの生存分析に従い、寛解率を算出した。また、寛解率の有意差検定にはログランクテストを用いた。その結果、本図に示すとおり、CD11c^{high}MS群は、CD11c^{low}MS群に比べ有意に寛解率が低いことが分かった。*** $p < 0.01$ 。

免疫調節細胞と自己反応性T細胞のバランスの破綻

MBPなどミエリン蛋白に対する試験管内でのT細胞の反応性は健常人においても認められる。しかし、これがMSを惹起しないのは、生体内では免疫調節細胞によって抑制されているからであると考えられる。つまりMSの生体内では自己反応性T細胞とさまざまな免疫調節細胞がつねに拮抗しており、それぞれの細胞群がさまざまな外的要因による影響を受け、その機能が変化するために、再発と寛解という病態が形成されることが考えられる。自己反応性T細胞の増強、あるいは免疫調節細胞の減弱のいずれもがバランス破綻(再発)の契機となりうる。外傷、過労、感染、精神的ストレスなどがMSの増悪因子となりうると思われているが、感染などを契機に産生されるIFN- γ などのTh1サイトカインが、NK2細胞、Th2細胞などの免疫調節細胞の生成に抑制的に働くことが考えられる。また、精神的ストレスなどは免疫系細胞に対して抑制的に働くことが報告されており、免疫調節細胞の機能低下の引き金になる可能性がある。MS患者におけるCD25陽性CD4陽性T細胞の機能低下は容易なバランス破綻の一因となりうる。

る。このような免疫調節細胞の機能的変化と再発の関連を示すデータとして著者らは最近、MSのNK細胞表面分子のひとつであるCD11c発現がMSのNK細胞の調節能低下と相関し、早期の再発率の上昇と関連することを見出した¹⁵⁾。MS患者は末梢血NK細胞上のCD11cの発現に従い、CD11c^{high}MSとCD11c^{low}MSに分けられる(図1)。CD11c^{high}MSにおいては、MSの調節性NK細胞の特徴であるNK2偏倚が消失していた。重要なことに、CD11c^{high}MSはCD11c^{low}MSに比べ、その後の4カ月間での有意な再発率の上昇が認められた。このことは、調節性NK細胞をはじめとする、免疫調節細胞の機能減弱が再発の誘因となることを示唆すると考えている。

おわりに

MSは自己反応性T細胞によって惹起される自己免疫疾患であるが、生体内には免疫調節細胞も存在し、この両者がバランスを保ちつつ、つねに拮抗していると考えられる。このバランスは自己反応性T細胞の増強あるいは免疫調節細胞の減弱によって破綻すると考えられ、ストレス、感染などがその契機となりうると思われるが、そのメカニズムの詳細はいまだ不明である。このメカニズムの解明と、免疫調節細胞の機能を強化する治療法の開発が重要であると考えられる。

文献

- 1) Sospedra, M. and Martin, R. : Immunology of multiple sclerosis. *Ann. Rev. Immunol.*, 23 : 683-747, 2005.
- 2) Ishizu, T. et al. : Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. *Brain*, 128 : 988-1002, 2005.
- 3) Sakaguchi, S. : Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.*, 6 : 345-352, 2005.
- 4) Montero, E. et al. : Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4⁺, CD25⁺ and CD8⁺ T cells: analysis using depleting antibodies. *J. Autoimmun.*, 23 : 1-7, 2004.
- 5) Vigiotta, V. et al. : Loss of functional suppression by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.*, 199 : 971-979, 2004.
- 6) Huan, J. et al. : Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J. Neurosci. Res.*, 81 : 45-52,

- 2005.
- 7) Peritt, D. et al. : Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J. Immunol.*, 161 : 5821-5824, 1998.
 - 8) Zhang, B. et al. : Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer(NK) cells. *J. Exp. Med.*, 186 : 1677-1687, 1997.
 - 9) Takahashi, K. et al. : The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain*, 127 : 1917-1927, 2004.
 - 10) Takahashi, K. et al. : Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.*, 107 : R23-R29, 2001.
 - 11) Miyamoto, K. et al. : A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature*, 413 : 531-534, 2001.
 - 12) Araki, M. et al. : Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.*, 15 : 279-288, 2003.
 - 13) Treiner, E. et al. : Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature*, 422 : 164-169, 2003.
 - 14) Croxford, J.L. et al. : Invariant V(α)19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.*, 7 : 987-994, 2006.
 - 15) Aranami, T. et al. : Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal disease activity of multiple sclerosis. *J. Immunol.*, 2006. (in press)

● お知らせ ●

真菌症フォーラム第8回学術集会

日時：2007年2月10日(土曜日)11:00~18:00
 場所：ニューオータニ神戸ハーバーランド
 〒650-0044 神戸市中央区東川崎町 1-3-5
 TEL. 078-360-1111

会長：竹末芳生(兵庫医科大学感染制御学)

テーマ：改訂 深在性真菌症ガイドライン

内容：

1. 招待講演

「Fungal Infections : Pre-emptive Therapy and Prophylaxis in Surgical Patients」

座長：竹末芳生(兵庫医科大学感染制御学)

演者：Pamela, A. Lipsett, MD, FACS, FCCM (Johns Hopkins University)

2. シンポジウム「深在性真菌症改訂ガイドライン」

座長：河野 茂(長崎大学大学院感染免疫学)

山口英世(帝京大学医真菌研究センター)

① 「血液系の立場から」

田村和夫(福岡大学医学部内科学第一)

② 「外科系の立場から」

木内哲也(名古屋大学医学部移植外科)

③ 「内科系の立場から」

宮崎義継(長崎大学医学部・歯学部附属病院第二内科)

④ 「基礎の立場から」

渋谷和俊(東邦大学医学部病院病理学講座)

3. ランチョンセミナー「ICDが知りたい真菌感染症の画像診断」

座長：二木芳人(倉敷第一病院呼吸器センター)

演者：酒井文和(東京都立駒込病院放射線科)

4. 一般演題(口演発表・ポスター発表)

※講演会終了後、情報交換会を予定しております。

事務局：真菌症フォーラム第8回学術集会事務局 株式会社協和企画 コンベンション事務局内(〒105-0004

東京都港区新橋 2-20 新橋駅前ビル1号館5階, TEL.

03-3573-2060, FAX. 03-3573-2064, E-mail : t_tanabe

@kk-kyowa.co.jp)

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 methylprednisolone 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onder (応答) (responder MS : RMS), ノンレスポonder (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ますます明らかにされた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 (Cy 3, Cy 5) で標識した cDNA または cRNA を作成して同一チップ上で競合的ハイブリダイゼーションをおこなう (2 色法)。GeneChip では *in vitro* transcription により cDNA から biotin 標識 cRNA を作成, 断片的に切断してハイブリダイゼーションをおこない, streptavidin-phycoerythrin (SAPE) を添加して蛍光標識する (1 色法)。GeneChip は 1 サンプルに 1 枚のアレイが必要でアレイ間の比較になる。どちらの場合もスキャナーで蛍光シグナルを検出, 得られたデータを正規化 (normalization) し, 統計学的解析 (R 解析: www.cran.r-project.org など) をおこない, サンプル間の遺伝子発現プロフィール (gene expression profile) を比較する。したがって RNA の質 (quality) が結果に非常に影響する。有意な発現差異を示す遺伝子はリアルタイム RT-PCR で定量・検証することが重要である (validation)。同定した遺伝子の機能・構造に関する情報 (annotation) は, Web 上でデータベース (NCBI Entrez: www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.htm など) を検索する。すでにさまざまな遺伝子発現データが Gene Expression Omnibus (GEO: www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) に登録されておりダウンロードできる。末梢血リンパ球 (peripheral blood mononuclear cells : PBMC) の遺伝子アレイ解析の問題点は, 遺伝子発現レベルが年齢・性・喫煙・飲酒・常用薬・嗜好品・精神的ストレスなどの個人差や採血時刻 (日内変動) の影響を受けることである (interindividual and intraindividual variation)⁵⁾。また脳組織の解析では死後脳凍結までに要する時間 (RNA degradation time) が問題であり, 組織 pH が参考になる。

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

2. DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の免疫病態の解析(表1)

1) MS 脳組織の網羅的遺伝子発現解析

Whitney ら⁹⁷⁾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⁹⁸⁾は MS 脳 cDNA ライブラリーの網羅的シークエンス解析により 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⁹⁹⁾。Lock ら⁹⁹⁾は GeneChip を用いて MS 急性炎症性病巣と慢性非活動性病巣を比較し、

前者の G-CSF 上昇と後者の IgG Fc レセプター、IgE レセプター、ヒスタミンレセプタータイプ1 上昇を報告した。また G-CSF 投与で EAE 軽症化を認め、イムノグロブリン FcR γ 鎖遺伝子欠損マウスでは EAE 慢性化が抑制されることを報告した⁹⁹⁾。

Mycko ら¹⁰⁰⁾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¹⁰¹⁾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¹⁰²⁾は GeneChip を用いて SPMS 活動性病巣でのイムノグロブリン産生亢進を見出した。Tajouri ら¹⁰³⁾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¹⁰³⁾。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¹⁰⁴⁾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¹⁰⁵⁾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¹⁰⁶⁾は独自の cDNA マイクロアレイを用いて、RRMS と健常人の PBMC で発現差異を呈する 53 遺伝子を同定した。MS では T 細胞活性化関連遺伝子群 IL-7 R, ZAP 70, TNFRSF 7(CD 27)の上昇およびサイトカイン

表 1. MS の免疫病態のマイクロアレイ解析

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

Stürzbecher 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 (Research 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. ⁽²³⁾	2004	RRMS (n=17) vs HC (n=7)	PBMC	HuGene FL Oligonucleotide Array (Affymetrix)	6,800	Upregulation of E2F transcription factor pathway genes in MS
Lindberg 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, 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 : glatramer 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²⁵⁾を支持する. 上記の9遺伝子(IRF-7, ISG 15, IFI 56, IFI 6-16, IFI 60, IFI 17, TAP 1, TNFAIP 6, MIG)はプロモータ領域に IFN-stimulated response element (ISRE)や IRF element (IRF-E)が同定されている既知 IRG であり, 治療に直接反応し治療効果に深く関与していると考えられる. IRF-7はウイルス感染時に IFN- α/β 産生を増幅する正の制御因子である²⁷⁾. IFI 30はクラス II MHC 拘束性抗原提示の際, はたらくチオール還元酵素で, IFI 30 遺伝子欠損マウスでは抗原呈示能低下をきたす²⁸⁾. TAP 1はクラス I MHC 拘束性抗原提示の際, はたらくペプチド輸送因子で, TAP 1 遺伝子欠損マウスでは CD 8⁺ T細胞を介する結核菌抵抗力が減弱する²⁹⁾. TNFAIP 6は TNF- α , IL-1 β により誘導される分泌蛋白質で抗炎症作用を呈する³⁰⁾. 以上のように MS で IFN- β は antiviral and antiinflammatory mediators の発現を誘導することが明らかになった. 興味深いことに SLE では治療の種類にかかわらず PBMC における IRG の発現レベルが高い³¹⁾.

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

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

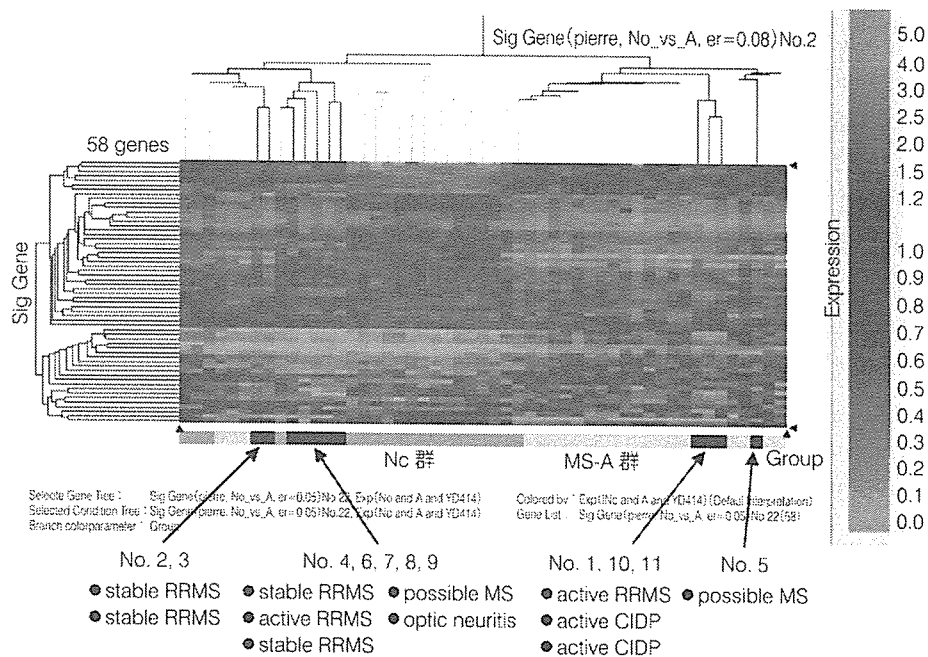


図 1. 階層的クラスター解析

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

MMP-9 は IFN- β により低下, GA では上昇した。

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

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

表 2. SVM 解析によるグループ分類

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

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解析 (hierarchical clustering analysis) で、MS 群は Nc 群と分離され A、B、C、D の 4 群に分類された。A 群は遺伝子発現プロファイルが最も Nc 群に類似し、群間検定で両者を識別する 58 遺伝子を抽出した。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