

Ⅱ. 分担総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

総合研究報告書

DNAマイクロアレイによる多発性硬化症患者末梢血 T リンパ球
遺伝子発現の網羅的解析

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

研究要旨 多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は時間的・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。MS では何らかの遺伝的素因を有する個体において、脳炎惹起性自己抗原に分子相同性を示す外来抗原を認識して活性化した自己反応性 CD4⁺ Th1 T 細胞が誘導され、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を通過して中枢神経系組織内に侵入する。MS は臨床経過から RRMS, SPMS, PPMS, 病巣分布から conventional MS, opticospinal OSMS, 治療反応性からインターフェロン interferon-beta (IFN β) responder, nonresponder に分類され、病理学的には T 細胞浸潤、抗体・補体沈着、oligodendrocyte apoptosis, axonal degeneration など多様な所見を呈する。多彩な免疫病態の全貌を Th1 bias だけで説明するのは困難である。現在 MS 再発抑制のため IFN β が投与されているが、著効率は 30%であり副作用の発現頻度も高いが、IFN β 治療効果・副作用出現を予測するバイオマーカーは同定されていない。MS 回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が遷延化すると髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。事前に再発を予知出来れば、早期治療が可能になり軽症化出来る可能性が高いが、現在まで再発予測法は確立されていない。本研究では(1)MS 多様性(heterogeneity)の分子遺伝学的基盤を解明するため、患者末梢血 T 細胞遺伝子発現プロフィールを DNA マイクロアレイで網羅的に解析、(2)IFN β 応答遺伝子(IFN β -responsive genes; IRG)を網羅的に解析、(3) T 細胞遺伝子発現プロフィールを経時的に解析、再発期特異的遺伝子(relapse-specific genes; RSG)を同定することを目的とした。結果として(1)T 細胞遺伝子発現プロフィールから、MS は疾患活動性・病巣分布・IFN β 治療反応性と密接に関連した 4 群に分類されること、(2) IRG としての CXCR3 ligand chemokines や CCR2 ligand chemokines が IFN β 治療早期副作用発現に関与していること、(3)再発バイオマーカーとなり得る 43 RSG を同定し、NF- κ B 遺伝子発現制御系異常による再発惹起の概念を提唱し、NF- κ B 制御適正化分子の MS 再発予防薬創薬ターゲットとしての意義を見出した。

A. 研究目的

多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)は時間的・空間的再発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患で、働き盛りの若年成人に好発し視力障害や運動麻痺を来す原因不明の難病である。MS では何らかの遺伝的素因を有する個体において、脳炎惹起性自己抗原に分子相同性を示す外来抗原を認識して活性化した自己反応性 CD4⁺ Th1 T 細胞が誘導され、血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)を通過して中枢神経系組織内に侵入する。自己反応性 T 細胞はミクログリアにより抗原提示を受けて再活性化し、炎症を増幅して脱髄を誘導する。MS は臨床経過から再発寛解型 relapsing-remitting (RRMS), 2次進行型 secondary progressive (SPMS), 1次進行型 primary progressive (PPMS), 病巣分布から脳型 conventional (CMS), 視神経脊髄型 opticospinal (OSMS), 治療反応性からインターフェロン interferon-beta (IFN β) responder (R-MS), nonresponder(NR-MS)に分類され、病理学的には T 細胞浸潤、抗体・補体沈着、oligodendrocyte apoptosis, axonal degeneration など多様な所見を呈する。多彩な MS 免疫病態の全貌を Th1 bias だけで説明するのは困難である。現在 MS 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)を行い、寛解期に IFN β の継続的投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。IFN β 著効率は約 30%程度であり、発熱・皮膚潰瘍・肝機能障害・抑うつなどの副作

用発現頻度も高いが、現在まで IFN β 治療効果・副作用出現を予測するバイオマーカーは同定されていない。MS 回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復し炎症が遷延化すると髄鞘再生不全・軸索傷害・神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。事前に再発を予知出来れば、早期治療が可能になり軽症化出来る可能性が高いが、現在まで再発予測法は確立されていない。

本研究では、平成 16 年度に(1)MS 病態多様性(heterogeneity)の分子遺伝学的基盤を解明するため、患者末梢血 T 細胞の遺伝子発現プロフィールを DNA マイクロアレイで網羅的に解析して健常者と比較し、平成 17 年度に(2)IFN β 応答遺伝子(IFN β -responsive genes; IRG)を網羅的に解析し、副作用発現関連遺伝子を同定し、平成 18 年度に(3) T 細胞遺伝子発現プロフィールを再発期と寛解期に経時的に比較解析し、再発期特異的遺伝子(relapse-specific genes; RSG)を同定することを目標とした。

B. 研究方法

#1. 対象:上記(1)では文書同意を取得した IFN β 未治療 clinically active MS 72 名(65 RRMS, 7 SPMS; 55 women, 17 men; the mean age 36.1 \pm 10.3)と健常者 22 名 (healthy controls; CN, 16 women, 6 men; the mean age 38.6 \pm 12.3) の末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells; PBMC)をから、MACS で CD3⁺ T 細胞を分離、(2)では健常者 PBMC を recombinant human IFN β ,

IFN γ , TNF α or IL-1 β (50 ng/ml each)存在下で3時間または24時間培養、(3)では国立精神・神経センター武蔵病院神経内科通院中 RRMS 患者6名で、神経内科専門医診断に基づく急性増悪期(acute relapse)と完全寛解期(remission)に採取したPBMCからMACSでCD3⁺T細胞を分離。
#2. RNAの精製とDNA microarray解析：RNAeasy Mini KitでRNAを抽出、増幅後にcDNA作成、Cy5で標識した。別の健常者3名のpooled cDNAをCy3で標識しuniversal referenceとし、1,258 cDNA microarray (Hitachi Life Science)上で競合的hybridizationを行い、蛍光強度をglobal normalizationで補正した。

上記(1)ではR (Bayesian t test)によりMS versus CNで有意な発現差異を認めた遺伝子群を抽出し、これを識別遺伝子(discriminator)としてGeneSpring 7.2を用いて階層的クラスタ解析(hierarchical clustering analysis; HCA)と主成分解析(principal component analysis; PCA)を行った。(2)では2-fold changeをcut-offとしてIFN β -induced (upregulated) or repressed (downregulated) genesを同定、LightCycler ST300によるreal-time RT-PCRで検証(validation)した。(3)では生物情報統合プラットフォームKeyMolnetを用いて43 RSGの分子ネットワークを解析した。

(倫理面への配慮)

「多発性硬化症患者および対照リンパ球遺伝子発現解析研究(申請者山村隆)」は、既に国立精神・神経センター倫理委員会で承認済みである。本研究で解析する患者全員から研究参

加に関して文書で同意を取得した。

C. 研究結果

#1. 上記(1)では、IFN β 未治療MS 72名とCN 22名のCD3⁺T細胞間で発現差異を呈した286遺伝子を指標とする階層的クラスタ解析と主成分解析で、MSはCNから独立したA, B, C, D 4群に分類され、286遺伝子は1-5群(class #1-#5)に分類された(Fig. 1)。A群が最もCNに近い遺伝子発現プロフィールを呈し、D群が最もExpanded Disability Status Scale (EDSS) scoreが高値、C群には大脳限局病変を示す患者(cerebrum only)が集積、B群はchemokine遺伝子を多く含むclass #5遺伝子の発現レベルが最高で、最も活動性が高い患者が集積していた。IFN β responderはA, B群に集積していた。

#2.(2)では、IRG(主要カテゴリーをTable 1に示す)としてCXCR3 ligand chemokines (SCYB11, SCYB10, SCYB9), CCR2 ligand chemokines (SCYA10, SCYA2)がtop 20発現上昇遺伝子に含まれており、IFN β はPBMCにおいて迅速にchemokine burstを誘導することが明らかになった。

#3.(3)では、再発期特異的43 RSG(Table 2)を同定し、階層的クラスタ解析で、再発期サンプルと寛解期サンプルを独立したクラスタに分離することが出来た。KeyMolnetによる分子ネットワーク解析でMS再発における最重要なネットワークとしてNF- κ B発現制御系の関与を見出した(Fig. 2)。

D. 考察

DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析は臨床所見や画像所見のみでは鑑別困難な疾患の補助診断ツールとして、腫瘍の悪性度・予後予測、種々の疾患の薬物反応性予測、治療効果判定、副作用予測など、幅広い臨床応用が可能である。本研究ではMS 特異的 286 遺伝子を指標とする階層的クラスター解析で、MS を疾患活動性・病巣分布・IFN β 治療反応性と密接に関連した 4 亜群に分類出来た(Satoh et al. *J Neuroimmunol* 174: 108-118, 2006)。

IFN β は effector Th1 cells に働く CXCR3 ligand chemokines, monocytes に働く CCR2 ligand chemokines, 炎症増強に働く proinflammatory cytokines (IL-6, IL-15, osteopontin, TNF α , IFN γ) の発現を迅速に誘導することがわかった。これらは副作用の発現と密接に関連していると考えられる(Satoh et al. *BMC Neurology* 6: 18-34, 2006)。

再発期特異的遺伝子群 43 RSG は MS 再発をモニターするためのバイオマーカーとなり得る。43 RSG の分子ネットワーク解析により、NF- κ B 遺伝子発現制御系異常の MS 再発への関与が示唆された。NF- κ B は TNF α , IL-1 などの proinflammatory cytokines 発現制御で中心的な役割を果たす転写因子である。一方 TNF α , IL-1 は NF- κ B の発現上昇を誘導し、positive feedback loop を形成して炎症を遷延化させる。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(Satoh et al. *Neuroscience Research*, submitted)。

E. 結論

MS・健常者の T リンパ球・PBMC の DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、病態・治療反応性に基づく MS subgroups の分類法の確立、副作用バイオマーカーとしての IRG と再発予測バイオマーカーとしての RSG の同定に成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, Yamamura T, Arima K: The 14-3-3 protein epsilon isoform expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis binds to vimentin and glial fibrillary acidic protein in cultured human astrocytes. *American Journal of Pathology* 165: 577-592, 2004.
2. Maraganore DM, Lesnick TG, Elbaz A, Chartier-Harlin M-C, Gasser T, Krüger R, Hattori N, Mellick GD, Quattrone A, Satoh J, Toda T, Wang J, Ioannidis JPA, de Andrade M, Rocca WA, the UCHL1 Global Genetics Consortium: UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene. *Annals of Neurology* 55: 512-521, 2004.
3. Yakushiji Y, Satoh J, Yukitake M, Yamamuchi

- K, Nakamura I, Nishino I, Kuroda Y: Interferon β -responsive inclusion body myositis in a hepatitis C virus carrier. *Neurology* 63: 587-588, 2004.
4. Satoh J, Nakanishi M, Yamamura T: Dysregulation of apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. *Immunology* 2004 1: 501-504, 2004.
 5. Satoh J, Yamamura T: Gene expression profile following stable expression of the cellular prion protein. *Cellular and Molecular Neurobiology* 24: 793-814, 2004.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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*

in press, 2007.

16. 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.
17. 佐藤準一、山村隆：多発性硬化症におけるインターフェロンベータ応答遺伝子. *Bio Medical Quick Review Net* 2004.
18. 佐藤準一、山村隆：神経系 1. オーバービュー. 別冊・医学のあゆみ サイトカイン state of arts 119-122, 2004.
19. 佐藤準一：特集 II: 疾患モデルにおける最新の知見「自己免疫性脳脊髄炎」. *Neuroimmunology* 12: 151-161, 2004.
20. 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.
21. 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.
22. 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
23. 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.
24. 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

25. 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, Yamamura T: Microarray analysis identifies an aberrant expression of DNA damage and apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. *The First International Symposium. Cellular Responses to Genome Damage and Chromatin Dynamics*. Hiroshima, 2004. 2. 13.
2. Satoh J, Yamamura T, Kawai M, Arima K: The 14-3-3 protein epsilon isoform is expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis. *Gordon Research Conference. Biology of 14-3-3 Proteins*. Ventura, 2004. 2.25.
3. Satoh J: The 14-3-3 protein epsilon isoform is expressed in reactive astrocytes in demyelinating lesions of multiple sclerosis: Its binding to vimentin and GFAP in cultured human astrocytes. *Special Symposium. Recent*

- Progress in Neuroimmunology and NKT Cell Research. Tokyo, 2004. 3. 9.
4. Satoh J, Nakanishi M, Yamamura T: Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. 56th Annual Meeting of American Academy of Neurology. San Francisco, 2004. 4.27.
 5. Nakanishi M, Satoh J, Aranami T, Yamamura T: Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in apolipoprotein-E knockout mice. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Montréal, 2004. 7.21.
 6. Satoh J, Nakanishi M, Yamamura T: Dysregulation of apoptosis-regulatory genes in multiple sclerosis. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Montréal, 2004. 7.21.
 7. Satoh J, Onoue H, Yamamura T: Gene expression profile of human cells following stable expression of the cellular prion protein. The Awaji international forum on Infection and Immunity. Awaji, 2004. 9.1
 8. Satoh J, Nakanishi M, Onoue H, Aranami T, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies molecularly and clinically distinct subgroups of multiple sclerosis. 7th International Congress of Neuroimmunology. Workshop I. Genetics of neuroinflammatory diseases. Venice, 2004. 9.29.
 9. Nakanishi M, Satoh J, Aranami T, Hirose G, Yamamura T: Lack of apolipoprotein E (ApoE) exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. 7th International Congress of Neuroimmunology. Venice, 2004. 9.30.
 10. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Onoue H, Yamamura T: T cell gene expression profiling identifies molecularly and clinically distinct subgroups of multiple sclerosis. The 13th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience. Genome Analysis and Medicine. Tokyo, 2004. 12.7.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.

14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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. Workshop 14: Pathogenesis of MS. Nagoya, 2006.10.18.
22. 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, 2006.10.17.
23. 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, 2006.10.17.
24. 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, 2006.10.17.
25. 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, 2006.10.17.

国内学会

1. 佐藤準一、川井充、有馬邦正、山村隆：多発性硬化症脱髄巢反応性アストロサイトにおける 14-3-3 蛋白質各アイソフォームの発現. 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 15 年度班会議. 東京、2004. 1.28.
2. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：MS 患者と健常者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロファイルの差異：MS におけるアポトーシス関連遺伝子群の発現異常. 第 16 回日本神経免疫学会学術集会. 東京、2004. 1.30.
3. 中西恵美、佐藤準一、荒浪利昌、広瀬源二郎、山村隆：MS 患者と健常者の末梢血リンパ球遺伝子発現プロファイルの差異：ApoE 欠損マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の重症化. 第 16 回日本神経免疫学会学術集会. 東京、2004. 1.31.
4. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：MS におけるアポトーシス関連遺伝子群の発現異常. 第 45 回日本神経学会総会. 東京、2004. 5.12.
5. 中西恵美、佐藤準一、荒浪利昌、広瀬源二郎、山村隆：ApoE 欠損マウスにおける EAE の重症化. 第 45 回日本神経免疫学会学術集会. 東京、2004. 5.12
6. 佐藤準一、尾上祐行、山村隆：培養ヒトアストロサイトにおいて 14-3-3 蛋白質は vimentin および GFAP と結合する. 第 45 回日本神経病理学会総会学術研究会. 前橋、2004. 5.26
7. 佐藤準一、山村隆、有馬邦正：多発性硬化症脱髄巢反応性アストロサイトに発現する 14-3-3 蛋白質のアストログリオーシスにおける役割. 第 21 回神経組織培養研究会 東京、2004. 9.11.
8. Satoh J, Onoue H, Yamamura T: Upregulation of cerebellar degeneration-related genes in HEK293 cells following stable expression of the cellular prion protein. 第 47 回日本神経学会大会(第 27 回日本神経科学大会合同大会). Neuro2004. 大阪、2004. 9.22.
9. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：末梢血 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. 第 32 回日本臨床免疫学会総会 東京、2004. 10.8.
10. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：末梢血 T 細胞遺伝子発現プロファイルに基づく多発性硬化症病型分類. 第 34 回日本免疫学会総会学術集会 札幌、2004. 12.1.
11. 佐藤準一、中西恵美、尾上祐行、古池史子、山村隆：末梢血 T 細胞の DNA microarray 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. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究班. 平成 16 年度班会議. 東京、2004. 12.13.
12. 佐藤準一：多発性硬化症テラーメイド医療に向けて. DNA マイクロアレイの可能性. こころの健康科学研究推進事業. 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、2004. 12.25.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. 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.
 34. 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.
 35. 天竺桂弘子、佐藤準一、佐藤令一 : カイコによる RNA 医薬の評価系の確立. 第 7 回 Pharmacology-Hematology Symposium. 東京、2006. 6.30.
 36. 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.
 37. 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.
 38. 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.
 39. 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.

40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 多発性硬化症に対するインターフェロン・ベータ薬物治療の有効性予測法(特開2004-28926).
- 2) 多発性硬化症に関連する遺伝子の発現測定方法、多発性硬化症関連遺伝子の発現を測定するためのチップ、多発性硬化症の罹患を判断するための遺伝子群、多発性硬化症の評価方法.(特開2005-160440).
- 3) 多発性硬化症再発予測法(特許申請中).

2. 実用新案登録

なし

3. その他：GenBank 登録

- 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.

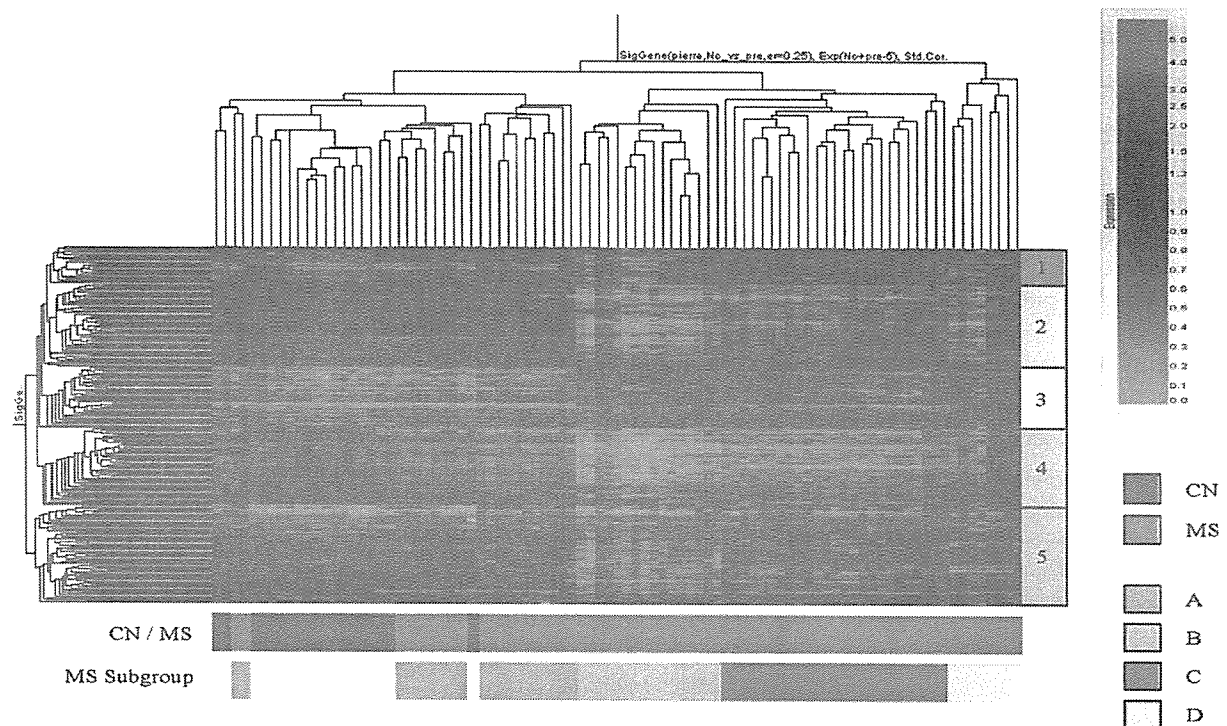


Fig. 1. Hierarchical clustering analysis of 286 genes differentially expressed between 72 untreated MS patients and 22 control subjects. The gene expression profile of peripheral blood CD3⁺ T cells was studied in 72 untreated MS patients and 22 age- and sex-matched healthy control (CN) subjects, by using 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).

Table 1. Functional Classification of IRGs in PBMC.

Categories	Number of genes	Gene symbols (alternative symbols or names)
1 Conventional IFN-response markers	12	IFIT1 (IFI56), ISG15 (G1P2), IFIT4 (IFI60), MX1 (MXA), MX2 (MXB), IFI27, G1P3 (IFI6-16), ISG20, IFI16, IFITM1 (IFI17), IFITM3 (1-8U), ABCB2 (TAP1)
2 Components of IFN-signaling pathways	12	STAT1, IRF7, STAT2, JAK2, IRF2, ISGF3G (IRF9), MYD88, IRF8, STAT3, JAK3, IRF1, TLR3
3 Chemokines and receptors	11	SCYB11 (CXCL11, I-TAC), SCYB10 (CXCL10, IP-10), SCYA8 (CCL8, MCP2), SCYB9 (CXCL9, MIG), SCYA2 (CCL2, MCP1), CCR5, SCYA4 (CCL4, MIP1B), IL8RB (CXCR2), SCYA3 (CCL3, MIP1A), SCYA19 (CCL19, MIP3B), SCYA13 (CCL13, MCP4)
4 Cytokines, growth factors, and receptors	17	IL6, ILRN (IL-1 receptor antagonist), IL1R2, IL15RA, IL15, SPP1 (osteopontin), CSF1, IL12RB2, TNF (TNFA), IL2RB, IFNG, NTRK1 (TRKA), PDGFRL, TNFAIP6, KITLG (SCF), IL10, IL3RA
5 Apoptosis, DNA damage, and cell cycle regulators	29	TNFSF10 (TRAIL), CASP10, BAG1, TNFRSF6 (FAS), CASP4, TRADD, GZMA, CASP7, RIPK2, MAD, RIPK1, CFLAR (FLIP), RELA, STK3, CASP1, TNFSF6 (FASL), PARP4, TANK (I-TRAF), POLE2, LMNB1, E2F2, CCNA1 (cyclin A1), CDKN1A (p21), PPP1R15A (GADD34), CASP3, CDKN1C (p57), CDK5R2 (p39), TERF1, NBS1 (nibrin)
6 Heat shock proteins	9	HSPA6 (HSP70B'), HSJ2 (HSPF4), HSPA1A (HSP70-1), HSPA1B (HSP70-2), HSPCA (HSP90A), HSPA5 (GRP78), HSPA1L (HSP70-HOM), HSPA8 (HSC70), HSPB1 (HSP27)
7 Costimulatory and adhesion molecules	7	CD80 (B7-1), SELL (selectin L), TNFRSF5 (CD40), CD163, CD86 (B7-2), HLA-DRA, FCER1G

**Table 2. Fourty-Three Differentially Expressed Genes in T Cells
between Relapse and Remission of MS.**

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

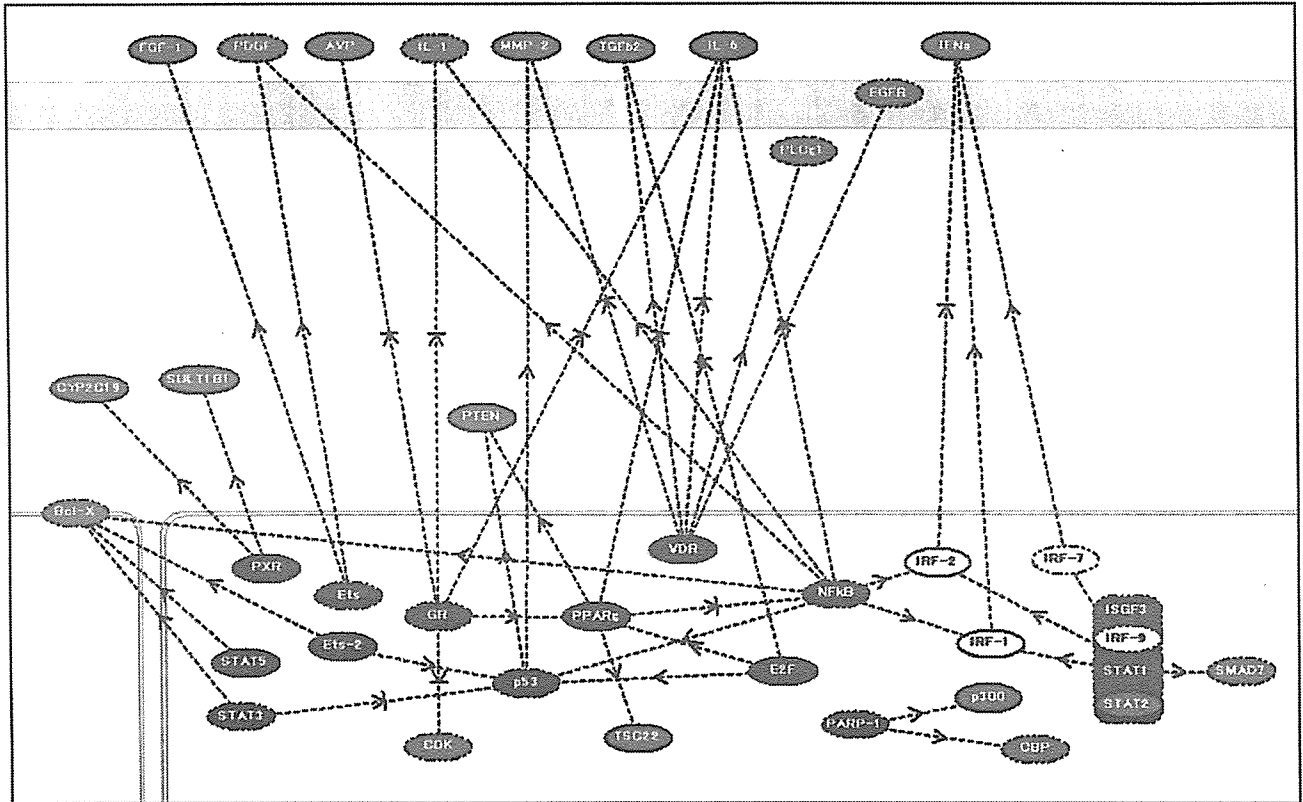


Fig. 2. Subcellular location of the molecules linked to differentially expressed genes in T cells between relapse and remission of MS. The molecular network generated by the “common upstream” search of 43 MS relapse-specific genes (RSGs; Table 2) was arranged by using the editing function of KeyMolnet with respect to subcellular location of molecules. Red nodes represent starting point molecules, whereas blue nodes represent common upstream molecules. Purple nodes express characteristics of both starting point and common upstream molecules. The direction of molecular relation is indicated by dash line with arrow (transcriptional activation) or dash line with arrow and stop (transcriptional repression).

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
（総合）研究報告書

「DNA マイクロアレイを用いて検討した多発性硬化症関連遺伝子」に関する研究

分担研究者 三宅 幸子 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨

これまで、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)患者末梢血中の T 細胞において健常人と比較して上昇している分子群を DNA マイクロアレイを用いて同定し報告してきた。その中で健常人との差における p 値が最も低い分子 Nurr1 に注目し、その機能を解析した。MS 患者末梢血での上昇がみられた Nurr1 は、EAE においては CNS 浸潤 T 細胞に特異的に発現が誘導されていた。T 細胞株を用いてリポーターアッセイを行うと、Nurr1 を過剰発現させると IL-17,IFN- γ ,IL-2 いずれのサイトカインの産生も増強した。ヒト CD4 T 細胞に、Nurr1 の siRNA を導入してその機能を抑制すると、抗 CD3 抗体刺激により産生される IL-17,IFN- γ ,IL-2 いずれのサイトカインの産生も低下した。

A. 研究目的

これまで、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)患者末梢血中の T 細胞において健常人と比較して上昇している分子群を DNA マイクロアレイを用いて同定し、報告してきた。今回は、その中で健常人との差における p 値が最も低い分子 Nurr1 に注目した。Nurr1 は、Steroid thyroid receptor superfamily に属するオーファンリセプターで、T 細胞受容体刺激や炎症性サイトカインなどによって発現が誘導される。今回我々は、T細胞における Nurr1 の機能解析を行った。

B. 研究方法

DNA マイクロアレイの結果を検証するため、MS 末梢血 T細胞と健常人末梢血 T 細胞における Nurr1 の発現を real-time PCR 法を用いて検討した。実験的 自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental

Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) は、C57/BL6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを用いてを誘導した。脳脊髄(CNS)浸潤細胞、リンパ節細胞、脾臓細胞を採取し、それぞれから T 細胞を分離し real-time PCR を用いて Nurr1 の発現レベルを比較した。CNS 浸潤T細胞からのサイトカイン産生をELISA 法ならびに細胞内 IL-17 染色法を用いて調べた。Nurr1 を過剰発現させ、T 細胞株を用いて IL-17,IFN- γ ,IL-2 のリポーターアッセイを行った。ヒト CD4 T 細胞に、Nurr1 の siRNA を導入し、抗 CD3 抗体刺激により産生されるサイトカインを ELISA 法にて測定した。

C. 研究結果

まず、DNA マイクロアレイの結果を検証するため、MS 末梢血 T細胞と健常人末梢血 T 細胞における Nurr1 の発現を real-time PCR 法を用いて検討し、MS で有意に上昇していることを確認した。

次に、C57/BL6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを用いて EAE を誘導し、脳脊髄(CNS)浸潤細胞、リンパ節細胞、脾臓細胞を採取し、それぞれから T 細胞を分離し real-time PCR を用いて Nurr1 の発現レベルを比較すると、CNS 浸潤 T 細胞において特異的に上昇していた。CNS 浸潤 T 細胞からのサイトカイン産生を調べると、細胞内染色法による検討では、IL-17 産生細胞が優位であった。IL-17 は EAE 発症に重要なサイトカインであることから、Nurr1 の IL-17 産生に与える影響について検討した。T 細胞株を用いてリポーターアッセイを行うと、Nurr1 を過剰発現させると IL-17,IFN- γ ,IL-2 いずれのサイトカインの産生も増強した。マウス CD4 T 細胞に、Nurr1 の siRNA を導入してその機能を抑制すると、抗 CD3 抗体刺激により産生される IL-17,IFN- γ ,IL-2 いずれのサイトカインの産生も低下した。TNF- α の産生は影響を受けなかった。

D. 考察

MS 患者末梢血での上昇がみられた Nurr1 は、EAE においては CNS 浸潤 T 細胞に特異的に発現が誘導されていた。Nurr1 発現細胞が CNS に特異的に浸潤するのか、CNS 局所において Nurr1 の発現が誘導されるかについては、今後の検討が必要である。また、Nurr1 の EAE への病態に与える影響は、今後 siRNA などを用いて検討していく予定である。

E. 結論

SLE 末梢血単核球で上昇のみられた遺伝子群は、多発性硬化症で上昇がみられた遺伝子群と異なっていた。今後、本研究は多発性硬化症に特異的な DNA チップの開発につながると考えられた。

F. 研究発表

I 論文発表

原著

- 1) Chiba A, Oki S, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T and Miyake S. Suppression of collagen-induced arthritis by natural killer T cell activation with OCH, a sphingosine-truncated analog of alpha-galactosylceramide. **Arthritis Rheum.** 50(1): 305-13, 2004
- 2) Oki S, Chiba A, Yamamura T and Miyake S. The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. **J.Clin.Invest.** 113(11): 1631-40, 2004
- 3) Takahashi T, Miyake S, Endoh M and Yamamura T. The regulatory role for natural killer cells in the “smoldering” state of multiple sclerosis. **Brain** 127, 1917-27, 2004
- 4) Mizuno M, Masumura M, Tomi C, Chiba S, Oki S, Yamamura T and Miyake S. Synthetic glycolipid OCH prevents insulinitis and diabetes in NOD mice. **J.Autoimmun.** 23, 293-300, 2004
- 5) Nakai Y, Iwabuchi K, Fujii S, Ishimori N, Dashtsoodol N, Watano K, Mishima T, Iwabuchi C, Kato K, Tanaka S, Bezbradica JS, Nakayama T, Taniguchi M, Miyake S, Yamamura T, Kitabatake A, Joyce S, Van Kaer L and Onoe K. Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. **Blood** 104(7): 2051-9, 2004
- 6) Satoh J-i, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T and Yamamura T. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA

- damage-regulatory genes in multiple sclerosis. **Neurobiol.Dis.** 18(3):537-50, 2005
- 7) Ueno Y, Tanaka S, Sumii M, Miyake S, Tazuma S, Taniguchi M, Yamamura T, Chayama K. Single dose of OCH improves mucosal Th1/Th2 cytokine balance and prevents experimental colitis in the presence of V α 14 NKT cells in mice. **Inflamm.Bowel Disease** 11(1): 35-41, 2005
 - 8) Hashimoto D, Asakura S, Miyake S, Yamamura T, van Kaer L, Liu C, Tanimoto M and Teshima T. Stimulation of host natural killer T cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducint Th2 polarization of donor T cells. **J.Immunol.** 174(1): 551-6, 2005
 - 9) Murata K, Toba T, Nakanishi K, Takahashi B, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. Total synthesis of an immunosuppressive glycolipid, (2S,3S,4R)-1-O- (alpha-d-galactosyl)-2-tetracosanoylamino-1,3,4-nonanetriol. **J.Org.Chem.** 70(6): 2398-401, 2005
 - 10) Yu KO, Im JS, Molano A, Dutronc Y, Illarionov PA, Forestier C, Fjiwara N, Arias I, Miyake S, Yamamur T, Chang YT, Besra GS, and Porcellli SA. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acylvariants of α -galactosylceramides. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 102(9): 3383-8, 2005
 - 11) Ota T, Takeda K, Akiba H, Hayakawa Y, Ogasawara K, Ikarashi Y, Miyake S, Wakasugi H, Yamamura T, Kronenberg M, Raulet DH, Kinoshita K, Yagita H, Smyth MJ, Okumra K. IFN- γ -mediated negative feedback regulation of NKT cell function by CD94/NKG2. **Blood** 106(1): 184-92, 2005
 - 12) Chiba A, Kaieda S, Oki S, Yamamura T and Miyake S. The involvement of V α 14 NKT cells in the pathogenesis of murine models of arthritis. **Arthritis Rheum.** 52:1941-8, 2005
 - 13) Toba T, Murata K, Yamamura T, Miyake S and Annoura H. A concise synthesis of (3S,4S,5R)-1-(α -D-galactopyranosyl)-3-tetracosanoylamino-4,5-decanediol, a C-glycoside analogue of immunomodulating α -galactosylceramide OCH. **Tetrahedron Letters** 46: 5043-7, 2005
 - 14) Ronet C, Darche S, de Moraes ML, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, Buzoni-Gatel D. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. **J.Immunol.** 175(2): 899-908, 2005
 - 15) Oki S, Tomi C, Yamamura T and Miyake S. Preferential Th2 polarization by OCH is supported by incompetent NKT cell induction of CD40L and following production inflammatory cytokines by bystander cells in vivo. **Int.Immunol.** 17(12):1619-29, 2005
 - 16) Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Berberich I, Cardell S, Kronenberg M, Herrmann T. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. **J.Immunol.** 176(12): 7447-55, 2006
 - 17) Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S and Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. **Brain** 129: 1984-92, 2006
 - 18) Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant V α 19J α 33 T cells inhibit autoimmune inflammation. **Nat.Immunol.** 7(9):987-94, 2006
 - 19) Aranami T, Miyake S and Yamamura T. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. **J.Immunol.** 177(8): 5659-67, 2006