

## ＜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＞

### 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

佐藤 準一<sup>1,2)</sup>

### DNA Microarray Analysis Clarifies Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis

Jun-ichi Satoh<sup>1,2)</sup>

#### Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) white matter mediated by an autoimmune process whose development is triggered by a complex interplay of both genetic and environmental factors. MS shows a great range of phenotypic variability in terms of the disease course, lesion distribution, therapeutic response to IFN $\beta$ , and pathological aspects, suggesting that MS is a kind of neurological syndrome caused by different immunopathological mechanisms leading to the final common pathway that provokes inflammatory demyelination. DNA microarray technology is a novel approach to systematically monitoring the expression of a large number of genes. It gives us new insights into the complexity of molecular interactions promoting the autoimmune process in MS. By microarray analysis followed by hierarchical clustering analysis, we found that T cell gene expression profiling is valuable to identify distinct subgroups of MS associated with differential disease activity and therapeutic response to IFN $\beta$ . These observations suggest that microarray analysis is highly valuable for designing personalized treatment for heterogeneous populations of MS.

**Key words :** DNA microarray, gene expression profile, multiple sclerosis, personalized medicine

#### はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、様々な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。MS 発症機序は十分解明されていないが、多数の遺伝的要因と環境因子の存在下で、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<sup>+</sup> 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 TNF $\alpha$  などの炎症増強因子の産生を誘導し、脱髄が惹起されると考えられている (自己免疫機序)<sup>1)</sup>。回復期には髄鞘再生を認めるが、炎症が高度で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。

近年欧米・本邦で実施された大規模臨床試験により、インターフェロンベータ (interferon-beta; IFN $\beta$ ) 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を行い、回復期に IFN $\beta$  の継続的皮内・筋肉内投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。しかし IFN $\beta$  が全く効果を示さない症例も多い<sup>2,3)</sup>。すなわち MS は均一な疾患ではなく多様な病態 (phenotypic heterogeneity) 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型 (relapsing-remitting MS; RRMS), 2 次進行型 (secondary-progressive MS; SPMS), 1 次進行型 (primary-progressive MS; PPMS), 病巣分布から脳型 (conventional MS; CMS) と視神経脊髄型 (opticospinal MS; OSMS),

1) 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部  
2) 明治薬科大学薬学部生命創薬科学科生命情報解析学

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP  
Department of Bioinformatics and Neuroinformatics, Meiji Pharmaceutical University

IFN $\beta$  治療反応性から responder (RMS), nonresponder (NRMS) に分類される。病理学的にも T 細胞浸潤, 抗体沈着, oligodendrocyte apoptosis の観点から 4 型に分類される<sup>4)</sup>。近年 MS の免疫病態の多様性を解析する手法として遺伝子アレイが用いられている。ヒトゲノムプロジェクトの完結によりヒト全遺伝子の塩基配列が解明された結果, 遺伝子アレイを用いて個々の細胞における数万遺伝子 (ヒト全遺伝子約 30,000) の発現情報を包括的・網羅的・系統的に解析可能になった。RNA 発現解析を transcriptome 解析, タンパク質発現解析を proteome 解析と呼ぶ。網羅的発現解析 (global expression analysis) により, 従来の少数分子に焦点を向けた研究 (pinpoint study) では予期しなかった遺伝子群の MS 発症機序における役割が次々明らかになった<sup>5)</sup>。また治療による遺伝子発現変化を経時的に解析することにより薬物反応性遺伝子を同定し (薬理ゲノミクス pharmacogenomics), 有効性や副作用を治療開始前に予知することにより, テーラーメイド医療 (personalized medicine) に道が開かれた。本稿では DNA マイクロアレイ解析の基本原則と MS の免疫病態解析における応用に関して最近の知見を概説する。

### 1. DNA 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, 機能既知または未知の数千・万の cDNA または oligonucleotide が貼付けてあるチップである。主として

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 (DNA microarray) と光オリゴヌクレオチド合成により基盤上で直接高密度の oligonucleotide を伸長合成している GeneChip (Affymetrix) に分類される (表 1)<sup>6)</sup>。スライドガラスを DNA microarray, ナイロン膜を DNA macroarray と総称することもある。最近では約 3,000 種類のタンパク質をスライドガラスに固定してあるプロテインチップ (protein microarray) も普及しており, タンパク質間相互作用 (interactome) やシグナル伝達系の網羅的解析に用いられている<sup>7)</sup>。遺伝子アレイは遺伝子多型・変異解析にも応用可能であるが本稿では割愛する。

遺伝子アレイ解析ではまず遺伝子発現レベルの異なる 2 種類以上の細胞・組織, 例えば IFN $\beta$  投与前後の細胞などから mRNA を抽出し増幅する (図 1)。DNA マイクロアレイでは一般的に別々の蛍光色素 (Cy3, Cy5) でラベルした cDNA または cRNA を作成して同一チップ上で競合的ハイブリダイゼーションを行い, 2 色法と呼ばれる。GeneChip では in vitro transcription (IVT) により cDNA から biotin 標識 cRNA を作成, fragment に切断してハイブリダイゼーションを行い, streptavidin-phycoerythrin (SAPE) を添加して蛍光標識する。GeneChip では 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し, 得られたデータ (dataset) を正規化 (normalization) して統計学的検定を行い, サンプル間の遺伝子発現プロフィール (gene expression profile) を比較解析する。同

表 1 cDNA microarray と GeneChip の比較

	cDNA/Oligonucleotide Microarray	GeneChip
基盤	スライドガラス (microarray) またはナイロン膜 (macroarray)	半導体チップ
固定化法	スポッティングまたは化学合成	オンチップフォトリソグラフ合成
遺伝子	300-1000 bp cDNA or 30-80 mer oligonucleotide	25 mer oligonucleotides of perfect match (PM) and mismatch (MM)
集積度	40,000/slide 程度	>500,000/chip
Tm	不均一	一定
蛍光標識	2 色法 (Cy3, Cy5)	単色法
定量原理	競合的ハイブリダイゼーションによる比較	個々のチップのデータを正規化して比較
代表的なヒト遺伝子発現解析用アレイ (遺伝子数; Commercial Supplier)	Whole Human Genome G4112A Array (41,000; Agilent), Human Whole Genome Bioarray (55,000; Amersham)	Human Genome U133 Plus 2.0 Array (47,000; Affymetrix)
カスタム性	高い 汎用マイクロアレイスキャナーが使用可能	低い 専用のハイブリダイゼーションオープンや洗浄装置とスキャナーが必要

文献 6 より引用改変。

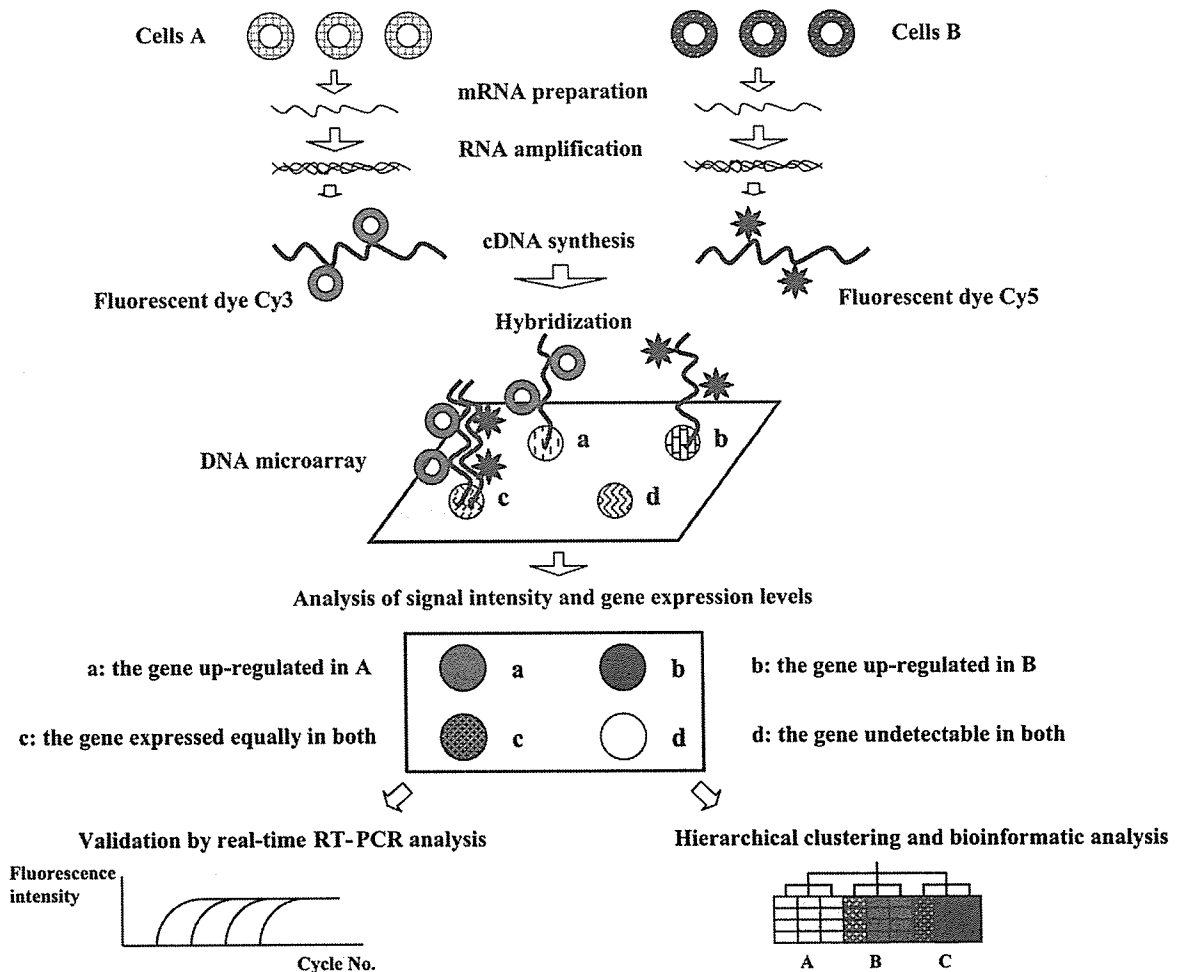


図1 DNA マイクロアレイ解析の概要。

2種類の細胞から mRNA を抽出増幅し、別々の蛍光色素 (Cy3, Cy5) でラベルした cDNA probe を作成して、cDNA がスポットされたチップ上で競合的ハイブリダイゼーションを行う。スキャナーで蛍光シグナルを検出し、データを正規化して統計学的検定を行い、サンプル間の遺伝子発現プロファイル (gene expression profile) を比較解析する。さらに階層的クラスタ解析 (hierarchical clustering analysis) を行って、類似した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する。有意な発現差異を呈する遺伝子は real-time RT-PCR で mRNA を定量して検証する。

定した遺伝子の機能・構造の注釈情報 (annotation) は遺伝子リストの ID から Web 上で database を検索可能である (表2)。既に様々な細胞・組織の遺伝子発現データが Gene Expression Omnibus (GEO; [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)) に登録されているが、実験に用いたチップの format が異なるとデータ間の互換性がなくなると考えられ、大規模な meta-analysis を実施する場合に支障となる<sup>8)</sup>。サンプル数が多い場合はデータセットの要素の特性を抽出するため、階層的クラスタ解析 (hierarchical clustering analysis) を行う<sup>9)</sup>。すなわちサンプルに関する事前情報なしに (教師なし法 unsupervised method), 類似した発

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て、樹状図 (dendrogram) と発現レベルの2次元マトリックスで表示する。またサンプルをいくつかのグループに分類する代表的な遺伝子 (discriminator genes) を抽出し、これらを3次元に圧縮投射する主成分解析 (principal component analysis) を行う<sup>9)</sup>。

我々は薬物応答遺伝子アレイ 1,258 cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて、MS 患者末梢血 T 細胞の遺伝子発現プロファイルを解析している。健康者3名の RNA mixture を universal reference として Cy3 で標識し、患者や健康者のサンプルを全て Cy5 で標識し、各サ

表2 Transcriptome・proteome 解析に有用な database

Name	Website	Contents
★統合 Database 検索システム		
Entrez	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html">www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html</a>	The Life Sciences Search Engine
Gene	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&amp;DB=gene">www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&amp;DB=gene</a>	A Searchable Database of Genes
OMIM	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&amp;DB=omim">www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&amp;DB=omim</a>	Online Mendelian Inheritance in Man
DBGET	<a href="http://www.genome.ad.jp/dbget/dbget.links.html">www.genome.ad.jp/dbget/dbget.links.html</a>	Web of Molecular Biology Databases
KEGG	<a href="http://www.genome.ad.jp/kegg">www.genome.ad.jp/kegg</a>	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
SRS	<a href="http://srs6.ebi.ac.uk">srs6.ebi.ac.uk</a>	European Bioinformatics Institute Database
HGMD	<a href="http://www.hgmd.cf.ac.uk/hgmd0.html">www.hgmd.cf.ac.uk/hgmd0.html</a>	Human Gene Mutation Database
★配列解析		
UniProt	<a href="http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?uniprot">www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?uniprot</a>	SWISS-PROT Protein Sequence Database
PIR	<a href="http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?pir">www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?pir</a>	PIR Protein Sequence Database
BLAST	<a href="http://blast.genome.jp">blast.genome.jp</a>	Sequence Similarity Search
dbSNP	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&amp;DB=snp">www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&amp;DB=snp</a>	Single Nucleotide Polymorphism Database
CLUSTALW	<a href="http://align.genome.jp">align.genome.jp</a>	Multiple Sequence Alignment
TraceSuite II	<a href="http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~jiye/evoltrace/evoltrace.html">www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~jiye/evoltrace/evoltrace.html</a>	Evolutionary Trace Server
ORF Finder	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html">www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html</a>	Open Reading Frame Finder
PROSCAN	<a href="http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan">thr.cit.nih.gov/molbio/proscan</a>	Web Promoter Scan
★タンパク質立体構造解析		
PDB	<a href="http://www.rcsb.org/pdb">www.rcsb.org/pdb</a>	The RCSB Protein Data Bank
RasMol	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/help-graphics.html#rasmol_download">www.rcsb.org/pdb/help-graphics.html#rasmol_download</a>	Molecular Graphics
GRASS	<a href="http://honiglab.cpmc.columbia.edu/cgi-bin/GRASS/surfserv_enter.cgi">honiglab.cpmc.columbia.edu/cgi-bin/GRASS/surfserv_enter.cgi</a>	Graphical Representation and Analysis of Structure Server
SWISS-MODEL	<a href="http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html">swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html</a>	An Automated Comparative Protein Modelling Server
ERRAT	<a href="http://nihserver.mbi.ucla.edu/ERRAT">nihserver.mbi.ucla.edu/ERRAT</a>	A Protein Structure Verification Algorithm
Verify3D	<a href="http://nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D">nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D</a>	A Crystal Structure Evaluation Server
SCOP	<a href="http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html">scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html</a>	Structural Classification of Proteins
DBAli	<a href="http://salilab.org/DBAli">salilab.org/DBAli</a>	A Database of Structure Alignments
★タンパク質機能予測		
SOSUI	<a href="http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html">sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html</a>	Classification and Secondary Structure Prediction of Membrane Proteins
PSORT II	<a href="http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp">psort.ims.u-tokyo.ac.jp</a>	Prediction of Protein Sorting Signals and Localization Sites in Amino Acid Sequences
SignalP 3.0	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP">www.cbs.dtu.dk/services/SignalP</a>	Prediction of Signal Peptide Cleavage Sites in Amino Acid Sequences
InterPro	<a href="http://www.ebi.ac.uk/interpro">www.ebi.ac.uk/interpro</a>	A Database of Protein Families, Domains and Functional Sites
PredictProtein	<a href="http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html">www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html</a>	Structure Prediction and Sequence Analysis
BIND	<a href="http://www.bind.ca">www.bind.ca</a>	The Biomolecular Interaction Network
DIP	<a href="http://dip.doe-mbi.ucla.edu">dip.doe-mbi.ucla.edu</a>	Databases of Interacting Proteins
MINT	<a href="http://160.80.34.4/mint/index.php">160.80.34.4/mint/index.php</a>	A Molecular Interaction Database
PPID	<a href="http://www.anc.ed.ac.uk/mscs/PPID/cgi-bin/ppid_search.pl">www.anc.ed.ac.uk/mscs/PPID/cgi-bin/ppid_search.pl</a>	Protein-Protein Interaction Database
PROCAT	<a href="http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PROCAT/PROCAT.html">www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PROCAT/PROCAT.html</a>	A Database of 3D Enzyme Active Site Templates
Scansite	<a href="http://scansite.mit.edu">scansite.mit.edu</a>	A Motif Scan
PhosphoSite	<a href="http://www.phosphosite.org/Login.jsp">www.phosphosite.org/Login.jsp</a>	An In Vivo Phosphorylation Site Database
ExPASy	<a href="http://au.expasy.org">au.expasy.org</a>	Expert Protein Analysis System Proteomics Server

2005年8月の時点でのサイト。

ンプルで遺伝子ごとに Cy5/Cy3 signal intensity ratio を測定している。比較する 2 群間 (MS vs 健常者など) で有意な発現差異を呈する遺伝子は、Bayesian t test または R

解析 ([www.cran.r-project.org](http://www.cran.r-project.org)) と Bonferroni 補正で統計学的有意性を検定することにより同定している。さらに有意な遺伝子に関しては、LightCycler (Roche) による

real-time RT-PCRで定量してアレイ解析の結果を検証 (validation) している。階層クラスター解析と主成分解析は GeneSpring (Silicon Genetics-Agilent) で行っている。末梢血リンパ球の遺伝子アレイ解析の問題点は、特定の遺伝子の発現レベルが年齢・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)<sup>10)</sup>。また脳組織の遺伝子アレイ解析の問題点は死後脳凍結までに要する時間 (RNA degradation time) で、組織の pH がある程度参考になる。

## 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

### 2.1. MS 脳組織の網羅的遺伝子発現解析

DNA マイクロアレイによる MS の病態解析の最初の報告は Whitney らによる研究である<sup>11)</sup>。彼らは独自の cDNA microarray を用いて MS 急性期炎症性病巣と正常白質 (normal-appearing white matter; NAWM) を比較し、MS 病巣における interferon-regulatory factor IRF-2, 5-lipoxygenase 発現上昇を報告した (表 3)<sup>11,12)</sup>。Chabas らは MS brain cDNA ライブラリーの網羅的シークエンス解析で osteopontin (OPN) 発現レベルの上昇を認めた<sup>13)</sup>。さらにラット EAE 脊髄のカスタム oligonucleotide microarray 解析で OPN の発現上昇を確認した。OPN は主として T 細胞が産生し macrophages による IL-12 産生を促進して IL-10 産生を抑制する Th1 cytokine で、活動性 RRMS 患者血清で上昇している<sup>14)</sup>。OPN 遺伝子欠損マウスは EAE 惹起に対して抵抗性を示す<sup>13)</sup>。Lock らは 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、活動性病巣での granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) 発現上昇と非活動性病巣での IgG Fc receptor, IgE receptor, histamine receptor type 1 の発現上昇を認めた<sup>15)</sup>。さらに彼らは G-CSF 投与で EAE を軽症化出来ること、immunoglobulin FcR  $\gamma$ -chain 遺伝子欠損マウスでは EAE 慢性化が抑制されることを証明し、アレイ解析の結果を裏付けた。Chabas らや Lock らの報告により、MS, EAE の病巣形成における allergic response mediators の役割が認識されるようになった<sup>16)</sup>。

Mycko らは cDNA microarray (Clontech) を用いて SPMS の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炎症・免疫応答遺伝子群 (TNF $\alpha$  など) の発現上昇を認めた<sup>17)</sup>。Graumann

らは cDNA macroarray (Clontech) を用いて MS の NAWM と非神経疾患のコントロール白質を比較し、NAWM における脳虚血関連遺伝子 (hypoxia-inducible factor 1 alpha; HIF-1 $\alpha$  など) の発現上昇を認めた<sup>18)</sup>。Lindberg らは GeneChip で SPMS の活動性病巣と NAWM を比較し、活動性病巣での immunoglobulin 産生亢進の所見を見出した<sup>19)</sup>。Tajouri らは独自の cDNA microarray を用いて SPMS の急性・慢性活動性病巣を non-MS コントロール白質と比較し、活動性病巣における  $\alpha$ B-crystallin, superoxide dismutase SOD1 の発現上昇を報告した<sup>20)</sup>。上述の MS 脳組織のマイクロアレイ解析は各々症例数が少なく、RNA 抽出部位が必ずしも全体像を反映していない可能性は否定出来ない。EAE 脳・脊髄の網羅的遺伝子発現解析に関しては割愛する<sup>21-23)</sup>。

### 2.2. 末梢血リンパ球を用いた MS と健常コントロールの比較解析

Ramanathan らは Research Genetics (Invitrogen) の Gene-Filter membrane array を用いて、MS と健常者の monocyte-depleted peripheral blood lymphocytes (PBL) を比較し、MS における lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK), IL-7R の発現上昇を報告した<sup>24)</sup>。LCK は Airla らによる RRMS の PBMC の cDNA macroarray (Clontech) 解析で、intravenous methylprednisolone pulse (IVMP) で発現低下する遺伝子として報告されている<sup>25)</sup>。Bomprezzi らは独自の cDNA microarray を用いて、24 例の RRMS と 21 名の健常者の peripheral blood mononuclear cells (PBMC) を比較し、発現差異を示した 53 遺伝子を同定した<sup>26)</sup>。MS では自己反応性 T 細胞活性化に関連する IL-7R, ZAP70, TNFRSF7 (CD27) の発現上昇およびサイトカイン mRNA の ubiquitin-proteasome 系による分解を制御する HSPA1A (HSP70) の発現低下を認めた。Mayne らは RRMS と健常者の CD4 陽性 T 細胞を negative selection で分離し、cDNA membrane array (NIA) を用いて解析し、MS における cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (CYFIP2) の発現上昇を認めた<sup>27)</sup>。

我々は cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて、72 例の MS (65 RRMS, 7 SPMS) と 22 名の健常者の末梢血 CD3 陽性 T 細胞、CD3 陰性 non-T 細胞の遺伝子発現プロフィールを解析した (表 3)<sup>28)</sup>。その結果 T 細胞で 173 遺伝子、non-T 細胞で 50 遺伝子の発現差異を認め、上位 30 遺伝子 (the most significant genes) を抽出すると、T 細胞で 25 遺伝子 (NR4A2, TCF8 の上昇と

表3 Microarray による MS の免疫病態の解析

Authors (Reference No.)	Year	No of MS Patients and Controls	RNA Samples
Whitney et al. (11)	1999	PPMS (n=1)	acute lesion vs NAWM
Ramanathan et al. (24)	2001	RRMS (n=15) vs HC (n=15)	monocyte-depleted PBL
Wandinger et al. (35)	2001	RRMS (n=1) plus HC (n=2)	PBMC incubated with IFN $\beta$ in vitro
Whitney et al. (12)	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
Lock et al. (15)	2002	CPMS and SPMS (n=4)	acute or chronic active lesions vs chronic silent lesions
Mass et al. (32)	2002	RA (n=20), SLE (n=24), IDDM (n=5), and MS (n=5) vs HC before and after influenza vaccination (n=9)	PBMC
Bomprezzi et al. (26)	2003	RRMS (n=18), SPMS (n=6) vs HC (n=21)	PBMC (fresh or frozen)
Graumann et al. (18)	2003	SP/PP/RRMS (n=10) vs non-neurological controls (n=7)	NAWM vs control white matter
Koike et al. (36)	2003	RRMS (n=13) before and at 3 and 6 months after IFN $\beta$ treatment	T and non-T cells separated from PBMC
Mycko et al. (17)	2003	SPMS (n=4)	chronic active vs silent lesions and the lesion margin vs center
Stürzebecher et al. (46)	2003	RRMS before and after IFN $\beta$ treatment for 6 months (n=10; 6 responders vs 4 non-responders)	frozen PBMC ex vivo or incubated with IFN $\beta$ in vitro
Tajouri et al. (20)	2003	SPMS (n=5) vs non-MS	acute and chronic active lesions
Weinstock-Guttman et al. (44)	2003	RRMS before and at 1, 2, 4, 8, 24, 120, and 160 h after IFN $\beta$ treatment (n=8)	monocyte-depleted PBL
Achiron et al. (29)	2004	RRMS (n=26; 14 with treatment) vs HC (n=18)	PBMC
Achiron et al. (30)	2004	RRMS treated (n=13) vs untreated (n=13)	PBMC
Airla et al. (25)	2004	RRMS (n=6) before and after IVMP	PBMC
Hong et al. (47)	2004	RRMS/SPMS treated with IFN $\beta$ (n=18), GA (n=12) or untreated (n=15)	PBMC
Iglesias et al. (33)	2004	RRMS (n=17) vs HC (n=7)	PBMC
Lindberg et al. (19)	2004	SPMS (n=6) vs non-neurological controls (n=12)	active lesions vs NAWM
Mandel et al. (31)	2004	RRMS (n=13) vs SLE (n=5) vs HC (n=18)	PBMC
Mayne et al. (27)	2004	RRMS (n=21) vs HC (n=19)	CD4 <sup>+</sup> T cells
Satoh et al. (28)	2005	RRMS (n=65) plus SPMS (n=7) vs HC (n=22)	T and non-T cells separated from PBMC

Abbreviations: RRMS, relapsing-remitting MS; SPMS, secondary progressive MS; PPMS, primary progressive MS; CPMS, chronic progressive MS; HC, healthy controls; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; NAWM, normal appearing white matter; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBL, peripheral blood lymphocytes; IFN, interferon; GA, glatiramer acetate; IVMP, intravenous methylprednisolone pulse.

MAPK1, SMARCA3, HSPA1A, TRAIL, TOP1, CCR5, BAG1, DAXX, TSC22, PARP の低下など), non-T 細胞で 27 遺伝子 (ICAM1, CDC42, RIPK2, SODD, TOP2A の上昇と BCL2, RPA1, NFATC3, HSPA1L, RBBP4, PRKDC の低下など) が apoptosis 制御遺伝子に属していた。すなわち apoptosis 促進遺伝子 (proapoptotic genes)

と抑制遺伝子 (antiapoptotic genes) の発現上昇・低下の拮抗的バランス (counterbalance) を認め、MS 免疫病態における apoptosis 制御機構の異常が示唆された。Achiron らは GeneChip を用いて、26 例の RRMS と 18 名の健常者の PBMC を比較解析した<sup>29)</sup>。両群間で 1,109 遺伝子の発現差異を認め、MS における T 細胞活性化関連遺伝子

Type of Microarray	No of Genes on Microarray	Key Findings
Original cDNA Glass Array	1,344 or 5,000	Upregulation of IRF-2 and TNFRp75 in acute lesions
GeneFilters GF211 Membrane Array (Research Genetics)	5,184	Upregulation of LCK, IL-7R and MMP-19 and downregulation of CCR6 and DFFA in MS
Mini-Lymphochip cDNA Array	6,432	Upregulation of proinflammatory genes such as CCR5, IP-10, and IL-15RA by IFN $\beta$ treatment
Original cDNA Glass Array	2,798	Upregulation of 5-lipoxygenase in MS and EAE lesions
HuGene FL Oligonucleotide Array (Affymetrix)	7,026	Upregulation of G-CSF in active lesions and upregulation of IgG FcR in silent lesions, and amelioration of EAE in FcR $\gamma$ -chain-KO mice and by treatment with G-CSF
GeneFilters GF211 Membrane Array (Research Genetics)	4,329	Indistinguishable profiles between MS and IDDM and downregulation of apoptosis-regulatory genes in autoimmune diseases
Original cDNA Array (Modified Lymphochip)	6,500 or 7,500	Upregulation of PAFAH1B1, IL-7R, ZAP70, and TNFRSF7(CD27) and downregulation of HSPA1A (HSP70) and CKS2 in MS
Atlas Human cDNA Membrane Array 1.2 (Clontech)	3,528	Upregulation of ischemic preconditioning genes such as HIF-1 $\alpha$ in NAWM of MS
Human cDNA Array (Hitachi Life Science)	1,258	Upregulation of 15 IFN-responsive genes in MS after IFN $\beta$ treatment
Atlas Human 1.0 Glass Microarray (Clontech)	588	Upregulation of inflammation/immune-related genes in the margin of active lesions
Mini-Lymphochip cDNA Array	6,432 or 12,672	Downregulation of IL-8 in responders after IFN $\beta$ treatment
Custom-made cDNA Glass Array	5,000	Upregulation of $\alpha$ B-crystallin and SOD in acute lesions
GeneFilters GF211 Membrane Array (Research Genetics)	5,184	Time-dependent upregulation of IFN-responsive genes
Human U95Av2 Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,000	Upregulation of T cell activation genes and downregulation of IL-1 and TNF signaling genes in MS
Human U95Av2 Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,000	Identification of SCYA4, IL2RG, and TNFRSF6(Fas) as immunomodulatory treatment-associated genes
Atlas Human Hematology/Immunology Membrane Array (Clontech)	448	Downregulation of LCK, TCF7, CD5, and ISGF3 by IVMP
Original Membrane Array	36	Distinct gene expression profile between MS patients treated with IFN $\beta$ and GA
HuGene FL Oligonucleotide Array (Affymetrix)	6,800	Upregulation of E2F transcription factor pathway genes in MS
Human U95A Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,633	Upregulation of genes related to Ig synthesis in active lesions of MS
Human U95Av2 Oligonucleotide Array (Affymetrix)	12,000	Downregulation of NR4A1 and NR4A3 as the autoimmunity-specific signature
Immune Membrane Array (National Institute on Aging)	1,152	Upregulation of CYFIP2 in MS
Human cDNA Array (Hitachi Life Science)	1,258	Aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in MS

(LEF1, TCF3, SLAM, ITGB2, CTSB) の発現上昇および IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  シグナル伝達系遺伝子の発現低下を認めた。我々の結果<sup>28)</sup>に反し, MS における orphan nuclear receptor NR4A2 の発現低下を報告した。彼らの研究では MS 14 例は採血時に IFN $\beta$ , glatiramer acetate (GA), IVIg 治療中である点が問題である。彼らは同じ症例の治療中

13 例と未治療 13 例の PBMC の比較解析を行い, 治療関連 7 遺伝子 (TNFRSF6; Fas など) を同定した<sup>30)</sup>。さらに 13 例の RRMS と 5 例の SLE を 18 名の健常者と比較して, 自己免疫疾患共通遺伝子 (autoimmunity-specific signature) を探索し, 自己免疫疾患における apoptosis, matrix metalloproteinase (MMP) 制御系遺伝子の発現異

常を発見した<sup>31)</sup>。Maas らも 20 例の RA, 24 例の SLE, 5 例の IDDM, 5 例の MS と 9 名の健常者 (influenza ワクチン接種前後) の PBMC を比較解析した<sup>32)</sup>。ワクチンに対する免疫応答と自己免疫疾患の遺伝子発現プロファイルは全く異なるが, RA と SLE, MS と IDDM は極めて類似し, 自己免疫疾患では共通して apoptosis 制御遺伝子群の発現低下を認めることを報告した。Iglesias らは GeneChip を用いて 17 例の RRMS と 10 名の健常者の PBMC を比較し, MS における E2F transcription factor pathway 遺伝子群の発現上昇を見出し, E2F1 遺伝子欠損マウスでは EAE が軽症化することを報告した<sup>33)</sup>。

### 2.3. MS におけるインターフェロンベータ治療反応性の解析

我々は cDNA macroarray (Invitrogen) を用いて, ヒト胎児脳より樹立したアストロサイト (astrocytes) 純培養で IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  により発現変動する遺伝子群を解析した<sup>34)</sup>。IFN $\beta$  による interferon-regulatory factor IRF-7 と pleiotrophin の発現上昇, IFN $\gamma$  による IRF-1 と ICAM-1 の発現上昇を発見した。Wandering らは RRMS と健常者の PBMC を IFN $\beta$  で刺激して cDNA microarray (Mini-Lymphochip) を用いて解析した<sup>35)</sup>。彼らは proinflammatory molecules である CC chemokine receptor 5 (CCR5), interferon-inducible cytokine IP-10 (CXCL10), IL15 receptor alpha (IL-15RA) の発現上昇を認めた。我々は cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて, 13 例の RRMS の末梢血 CD3 陽性 T 細胞と CD3 陰性 non-T 細胞で, IFN $\beta$ 1b 治療開始後に発現変動したインターフェロン応答遺伝子群 (IFN-responsive genes; IRG) を同定した<sup>36)</sup>。21 遺伝子が有意な変動を呈し, T 細胞で 8 IRG (IRF-7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI30, ATF3, TLR5) の発現上昇, IL-3, monokine induced by IFN $\gamma$  (MIG) などの発現低下を認め, non-T 細胞では 12 IRG (IRF-7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, IFI17, TAP1, TNFAIP6, TSC22, SUL1C1, RPC39, RAB11A) の発現上昇, IL-3 の発現低下を認めた。ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, TSC22, SUL1C1 に関しては, 治療開始後 3-6 ヶ月の持続的な上昇を認めた。一方統計学的有意差は見られなかったが, 治療後に Th1 関連遺伝子 CCR5 (T), IFN $\gamma$  (T), TNF $\alpha$  (non-T) の発現上昇傾向を認めた。このことは MS において IFN $\beta$  治療は必ずしも明確な Th2 shift を誘導しないという見解<sup>35)</sup> に一致する。上記のうち 9 遺伝子 (IRF7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI17, TAP1, TNFAIP6,

MIG) はプロモーター領域に IFN-stimulated response element (ISRE) や IRF element (IRF-E) が同定されている既知の IRG であり, IFN $\beta$  治療に直接反応して上昇し治療効果発現に深く関与していると考えられる。興味深いことに培養系では多くの IRG は IFN $\gamma$  によっても発現が誘導される<sup>36,37)</sup>。IRF-7 はウイルス感染時に IFN $\alpha/\beta$  産生を増幅する正の制御因子である<sup>38)</sup>。IFI30 は class II MHC 拘束性抗原提示に働くチオール還元酵素であり, IFI30 遺伝子欠損マウスでは抗原呈示能低下を来す<sup>39)</sup>。TAP1 は class I MHC 拘束性抗原提示を司るペプチド輸送因子で, TAP1 遺伝子欠損マウスでは CD8<sup>+</sup>T 細胞を介する結核菌への抵抗力が減弱する<sup>40)</sup>。TNFAIP6 は TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  により発現誘導される分泌蛋白質で, マウス関節炎に投与すると抗炎症作用を呈する<sup>41)</sup>。以上より MS において IFN $\beta$  は antiviral and antiinflammatory mediator 遺伝子群の発現上昇を誘導することが明らかになった。非常に興味深いことに SLE では治療に関わらず PBMC における IRG の発現レベルが高い<sup>42,43)</sup>。

Weinstock-Guttman らは GeneFilter membrane array を用いて, 8 例の RRMS で IFN $\beta$ 1a 投与後経時的に monocyte-depleted PBL を解析して IRG を同定したが, その多くは我々の結果とオーバーラップしている<sup>44)</sup>。また Liang らは Weinstock-Guttman らのデータを再解析し, IFN $\beta$  により発現誘導される IRG は early-onset (within 8 hours), intermediate-onset (24 hours), late-onset (48 hours) の 3 群に分類されることを報告した<sup>45)</sup>。Stürzebecher らは cDNA microarray (Mini-Lymphochip) を用いて, 10 例の RRMS で IFN $\beta$ 1b 治療前後の PBMC を解析した<sup>46)</sup>。治療開始前 6 ヶ月から開始 12 ヶ月後まで毎月 Gd 造影 MRI で活動性病巣数を算出し, 治療後に病巣数が 60% 以上減少した症例を responder と定義した。また nonresponder を治療開始後から効果のない nonresponder from initiation of therapy (INR) と, 治療開始後一定期間は効果があり neutralizing antibody (NAb) 出現とともに効果が減弱した nonresponder with development of NAb (NAbNR) の 2 群に分類した。さらに ex vivo 解析と同時に IFN $\beta$  で刺激した in vitro 解析も行った。Responder で治療後 2 倍以上変動した遺伝子は ex vivo では 25 遺伝子 (IFI17, OAS, Stat1 の上昇と IL-8, CD69, c-fos, TSC22 の低下など) で, そのうち IL-8 発現低下は responder 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, responder と nonresponder の間で発現レベルに差異を認めなかつ



た。彼らの結果に反して、我々は IFN $\beta$  治療後に non-T 細胞で TGF $\beta$ -stimulated protein TSC22 の発現上昇を認めている<sup>36)</sup>。彼らの研究の問題点は responder 6 例・INR 2 例・NAbNR 2 例と症例数が少なく、PBMC を凍結保存後に解凍して刺激しており、実験操作で遺伝子発現が変化し得ることである<sup>46)</sup>。さらに 1 例の responder 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 では極めて異例である。Hong らは免疫応答に極めて重要な 36 遺伝子に絞った cDNA macroarray を作成し、未治療 MS と IFN $\beta$ 1a または GA 治療症例の PBMC を解析し、治療反応性遺伝子群の相違を明らかにした<sup>47)</sup>。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 MMP-9 の発現は IFN $\beta$  より低下したが GA では上昇した。

van Boxel-Dezire らは 26 例の IFN $\beta$ 1b 治療中の RRMS で PBMC の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<sup>48)</sup>。治療前後 2 年間の再発回数・IVMP 回数・Extended Disability Status Scale (EDSS) スコアから 16 例の responder と 10 例の nonresponder に分けて比較すると、responder は治療前に IL-12p35 発現レベルが低い傾向を呈した。Wandinger らは RRMS で IFN $\beta$ 1a 治療後 1 年間一度も再発がなく、EDSS スコア悪化の見られない症例を responder、一度以上再発が見られた症例を nonresponder と定義し、20 例の responder と 19 例の nonresponder の PBMC を比較し、responder では TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL; TNFSF10) が持続的高値を呈することを報告した<sup>49)</sup>。TRAIL は IRG の 1 つで我々は MS の T 細胞における発現低下を認めている<sup>28)</sup>。TRAIL 遺伝子欠損マウスは胸腺細胞の apoptosis に異常を来とし、コラーゲン関節炎などに高感受性になることが報告されている<sup>50)</sup>。Baranzini らは 52 例の IFN $\beta$  治療中の RRMS で経時的に PBMC の 70 遺伝子の発現レベルを RT-PCR で定量的に解析した。彼らは治療後 2 年間一度も再発がなく、EDSS スコア悪化の見られない症例を responder、2 回以上再発が見られた症例を nonresponder と定義し、両者は 3 遺伝子 (caspase2, caspase10, FLICE inhibitory protein; FLIP) の発現レベルの 3 次元解析で 86% 区別可能と報告している<sup>51)</sup>。

最近我々は前述<sup>28)</sup>の 72 例の IFN $\beta$  未治療 MS (46 例は初回採血後 2 年間 IFN $\beta$  治療開始) と 22 名の健常者の末梢血 CD3 陽性 T 細胞を cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて解析したデータを、両群間で発現差異

を示す 286 遺伝子を指標にして階層的クラスター解析で再解析した (Sato et al. Manuscript in preparation)。この解析により 286 遺伝子は class #1-#5 に分類され、MS は健常者から分離されてさらに 4 つのサブグループに分類された。すなわち遺伝子発現プロファイルが健常者に近似した A 群、治療導入前後 2 年間の再発回数・IVMP 日数・入院日数の点で最も活動性が高い B 群、大脳限局病変が多い C 群、最も EDSS スコアが高値の D 群に分類された。B 群は chemokine 遺伝子を多く含む class #5 の発現レベルが高かった。また IFN $\beta$  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 強調画像病巣数の比較と患者満足度から算出した IFN $\beta$  治療反応スコアで評価すると、responder は A 群と B 群に集積していた。また responder では nonresponder に比較して治療開始後 6 ヶ月の時点でも IRG (ISG15, IFI27, MCP-1, TNFRp75) の発現レベルが高く保持される傾向を示した。

### 3. 結 語

我々は DNA マイクロアレイ解析を用いて MS が T 細胞の遺伝子発現プロファイルに基づき 4 群に分類され、各群は疾患活動性・病変分布・IFN $\beta$  治療反応性との対応を認めることを報告した。現在、欧米人 MS にも同様の結果が当てはまるかどうか症例数を増加して解析中である。このような研究成果を積み重ねることにより MS のテーラメイド医療樹立に貢献出来ると思われる。

### 謝 辞

本稿で紹介した我々研究の一部は、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金こころの健康科学 (遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立に関する研究: H17-こころ-020) および平成 17 年度創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業 (DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究: KH21101) の補助により実施された。

### 参考文献

- 1) Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23: 683-747, 2005.
- 2) Waubant E, Vukusic S, Gignoux L, Dubief FD, Achiti I, Blanc S, Renoux C, Confavreux C. Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 61: 184-189, 2003.

- 3) Rudick RA, Lee J-C, Simon J, Ransohoff RM, Fisher E. Defining interferon  $\beta$  response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 56: 548–555, 2004.
- 4) Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47: 707–717, 2000.
- 5) Steinman L, Zamvil S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nature Rev Immunol* 3: 483–492, 2003.
- 6) 野村 仁. ゲノム創薬. 個別化医療とゲノムデータマイニング. 新・生命科学ライブラリ-バイオと技術 5. 第4章ゲノム創薬各論. サイエンス社. pp. 55–129, 2005.
- 7) Chan SM, Ermann J, Su L, Fathman CD, Utz PJ. Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways. *Nature Med* 10: 1390–1396, 2004.
- 8) Stevens JR, Doerge RW. Combining Affymetrix microarray results. *BMC Bioinformatics* 6: 57–75, 2005.
- 9) 戸塚裕彦. データのコンピュータ解析. データの標準化と解析ソフト. 実験医学別冊 DNA チップ実験まるわかり. 佐々木博巳・青柳一彦編. 羊土社. pp. 80–90, 2004.
- 10) Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, Brown PO. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1896–1901, 2003.
- 11) Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munson PJ, Prabhu VV, Trent JM, McFarland HF, Biddison WE. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* 46: 425–428, 1999.
- 12) Whitney LW, Ludwin SK, McFarland HF, Biddison WE. Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions. *J Neuroimmunol* 121: 40–48, 2001.
- 13) Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuj M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L. The influence of the proinflammatory cytokine osteopontin on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294: 1731–1735, 2001.
- 14) Vogt MH, Lopatinskaya L, Smits M, Polman CH, Nagelkerken L. Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 53: 819–822, 2003.
- 15) Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Med* 8: 500–508, 2002.
- 16) Pedotti R, DeVoss JJ, Youssef S, Mitchell D, Wedemeyer J, Madanat R, Garren H, Fontoura P, Tsai M, Galli SJ, Sobel RA, Steinman L. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1867–1872, 2003.
- 17) Mycko MP, Papoian R, Boschert U, Raine CS, Selmaj KW. cDNA microarray analysis in multiple sclerosis lesions: detection of genes associated with disease activity. *Brain* 126: 1048–1057, 2003.
- 18) Graumann U, Reynolds R, Steck AJ, Schaeren-Wiemers N. Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. *Brain Pathol* 13: 554–573, 2003.
- 19) Lindberg RLP, De Groot CJA, Certa U, Ravid R, Hoffmann F, Kappos L, Leppert D. Multiple sclerosis as a generalized CNS disease-comparative microarray analysis of normal appearing white matter and lesions in secondary progressive MS. *J Neuroimmunol* 152: 154–167, 2004.
- 20) Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenber AEG, Nagra RM, Tourtellotte WW, Griffiths LR. Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Mol Brain Res* 119: 170–183, 2003.
- 21) Ibrahim SM, Mix E, Böttcher T, Koczan D, Gold R, Rolfs A, Thiesen H-J. Gene expression profiling of the nervous system in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 124: 1927–1938, 2001.
- 22) Carmody RJ, Hilliard B, Maguschak K, Chodosh LA, Chen YH. Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation. *J Neuroimmunol* 133: 95–107, 2002.
- 23) Baranzini SE, Bernard CCA, Oksenberg JR. Modular transcriptional activity characterizes the initiation and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 174: 7412–7422, 2005.
- 24) Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Nguyen LT, Badgett D, Miller C, Patrick K, Brownscheidle C, Jacobs L. In vivo gene expression revealed by cDNA arrays: the pattern in relapsing-remitting multiple sclerosis patients compared with normal subjects. *J Neuroimmunol* 116: 213–219, 2001.
- 25) Airla N, Luomala M, Elovaara I, Kettunen E, Knuutila S, Lehtimäki T. Suppression of immune system genes by methylprednisolone in exacerbations of multiple sclerosis. Preliminary results. *J Neurol* 251: 1215–1219, 2004.
- 26) Bomprezzi R, Ringnér M, Kim S, Bittner ML, Khan J, Chen Y, Elkahoul A, Yu A, Bielekova B, Meltzer PS, Martin R, McFarland HF, Trent JF. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet* 12: 2191–2199, 2003.
- 27) Mayne M, Moffatt T, Kong H, McLaren PJ, Fowke KR, Becker

- KG, Namaka M, Schenck A, Barrdoni B, Bernstein CN, Melanson M. CYFIP2 is highly abundant in CD4<sup>+</sup> cells from multiple sclerosis patients and is involved in T cell adhesion. *Eur J Immunol* 34: 1217–1227, 2004.
- 28) 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. *Neurobiol Dis* 18: 537–550, 2005.
- 29) Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Ann Neurol* 55: 410–417, 2004.
- 30) Achiron A, Gurevich M, Magalashvili D, Kishner I, Dolev M, Mandel M. Understanding autoimmune mechanisms in multiple sclerosis using gene expression microarrays: treatment effect and cytokine-related pathways. *Clin Dev Immunol* 11: 299–305, 2004.
- 31) Mandel M, Gurevich M, Pauzner R, Kaminski N, Achiron A. Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 138: 164–170, 2004.
- 32) Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, Aune TM. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol* 169: 5–9, 2002.
- 33) Iglesias AH, Camelo S, Hwang D, Villanueva R, Stephanopoulos G, Dangond F. Microarray detection of E2F pathway activation and other targets in multiple sclerosis peripheral blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 150: 163–177, 2004.
- 34) Satoh J, Kuroda Y. Differing effects of IFN $\beta$  vs IFN $\gamma$  in MS. Gene expression in cultured astrocytes. *Neurology* 57: 681–685, 2001.
- 35) Wandinger K-P, Strüzebecher C-S, Bielekova B, Detore G, Rosenwald A, Staudt LM, McFarland HF, Martin R. Complex immunomodulatory effects of interferon- $\beta$  in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurol* 50: 349–357, 2001.
- 36) Koike F, Satoh J, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies interferon  $\beta$ -regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 139: 109–118, 2003.
- 37) Der SD, Zhou A, Williams BRG, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15623–15628, 1998.
- 38) Taniguchi T, Takaoka A. The interferon- $\alpha/\beta$  system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 14: 111–116, 2002.
- 39) Maric M, Arunachalam B, Phan UT, Dong C, Garrett WS, Cannon KS, Alfonso C, Karlsson L, Flavell RA, Cresswell P. Defective antigen processing on GILT-free mice. *Science* 294: 1361–1365, 2001.
- 40) Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 189: 1973–1980, 1999.
- 41) Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT. Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. *Am J Pathol* 159: 1711–1721, 2001.
- 42) Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2610–2615, 2003.
- 43) Bennett L, Plaucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197: 711–723, 2003.
- 44) Weinstock-Guttman B, Badgett D, Patrick K, Hartrich L, Santos R, Hall D, Baier M, Feichter J, Ramanathan M. Genomic effects of IFN- $\beta$  in multiple sclerosis patients. *J Immunol* 171: 2694–2702, 2003.
- 45) Liang Y, Tayo B, Cai X, Kelemen A. Differential and trajectory methods for time course gene expression data. *Bioinformatics* 21: 3009–3016, 2005.
- 46) Strüzebecher S, Wandinger KP, Rosenwald A, Sathyamoorthy M, Tzou A, Mattar P, Frank JA, Staudt L, Martin R, McFarland HF. Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon- $\beta$  in multiple sclerosis. *Brain* 126: 1419–1429, 2003.
- 47) Hong J, Zang YCQ, Hutton G, Rivera VM, Zhang JZ. Gene expression profiling of relevant biomarkers for treatment evaluation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 152: 126–139, 2004.
- 48) van Boxel-Dezaire AHH, van Trigt-hoff SCJ, Killestein J, Schrijver HM, van Houwelingen JC, Polman CH, Nagelkerken L. Contrasting response to interferon  $\beta$ -1b treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: does baseline interleukin-12p35 messenger RNA predict the efficacy of treatment? *Ann Neurol* 48: 313–322, 2000.
- 49) Wandinger K-P, Lünemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A, Grundström E, Ehrlich S, Wernecke K-D, Volk H-D, Zipp F. TNF-related apoptosis inducing ligand

- (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 361: 2036–2043, 2003.
- 50) Lamhamedi-Cherradi S-E, Zheng S-J, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL<sup>-/-</sup> mice. *Nature Immunol* 4: 256–260, 2003.
- 51) Baranzini SE, Mousavi P, Rio J, Caillier SJ, Stillman A, Villoslada P, Wyatt MM, Comabella M, Greller LD, Somogyi R, Montalban X, Oksenberg JR. Transcription-based prediction of response to IFN $\beta$  using supervised computational methods. *PLoS Biol* 3: e2, 2005.

### 要 旨

多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) 発症は多数の遺伝因子と環境因子の複雑な相互作用により規定されている。そのため MS は臨床経過・病巣分布・治療反応性・病理学的所見の点から多様な病態 (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付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や脳組織の網羅的遺伝子発現解析は、MS の分子遺伝学的発症機序解明に威力を発揮する。特に遺伝子アレイ解析により従来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 gene; IRG) を同定することにより治療有効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。最近我々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ァイルに基づき 4 群に分類され、各群は疾患活動性・病変分布・インターフェロン (IFN $\beta$ ) 治療反応性と密接な対応を認めることを発見した。遺伝子アレイ解析は MS のテーラーメイド医療 (personalized medicine) 樹立に道を開くと思われる。

キーワード：遺伝子発現プロファイル, DNA マイクロアレイ, 多発性硬化症, テーラーメイド医療

## ● 自己免疫疾患の概念と知見

## 多発性硬化症

\* 国立精神・神経センター神経研究所 免疫研究部

三宅幸子\*

## || 要 旨 ||

多発性硬化症は、中枢神経の髄鞘タンパク質を標的とする自己免疫性脱髄性疾患である。再発と寛解を繰り返し、進行期には神経変性にいたるため、早期の自己免疫抑制が重要である。自己免疫病態形成には、Th1 サイトカインを産生する CD4<sup>+</sup>T細胞が重要であるが、その抑制にはさまざまな免疫調節性細胞が関与している。現在再発予防に I 型 IFN など限られた薬剤しかなく、副作用や無効例もあることから、新しい薬剤の開発導入が望まれる。

## はじめに

多発性硬化症 (MS) は、中枢神経の髄鞘タンパク質を標的とする自己免疫性の脱髄疾患と考えられている<sup>1)2)</sup>。MS は欧米では多い疾患であり、若年者に発症するため社会的、経済的に大きな問題であり、新薬開発も盛んに行われている。本稿では、MS の病態機構についての基礎的な知見と、治療戦略について概説する。

## 多発性硬化症 (MS) の臨床像

MS は、日本では人口 10 万人に 5～10 人程度と推定されているが、世界全体では欧米の白人を中心に 300 万人以上の患者がいると

---

キーワード：多発性硬化症、実験的自己免疫性脳脊髄炎、脳炎惹起性 T 細胞、Th1 / Th2、免疫調節細胞

推定されている。女性にやや多く、主に20～40代の若年成人に好発する。症状は、脱髄病変のできる場所やその程度によって異なるため多彩であり、空間的・時間的多発性が特徴である。視神経炎による失明、脊髄炎による対麻痺、小脳症状による運動失調、大脳病変による運動障害、高次脳機能障害などが代表的な症状である。それぞれの症状は、完全に回復する場合もあるが、再発を繰り返しながら少しずつ進行し、一部は明らかな回復傾向がなく、慢性に進行する。MSの臨床経過は多様性があり、再発のパターンと障害進行の持続性によって分類される<sup>3)</sup>。急性増悪と寛解を繰り返す再発寛解型MS (relapsing-remitting MS: RRMS)、慢性進行型として再発寛解型から移行する2次進行型MS (secondary progressive MS: SPMS)、発症時から進行する1次進行型MS (primary progressive MS: PPMS)に分類される。欧米でも、本邦でもRRMSが最も多くMSの70～80%を占める。日本では進行型MSは欧米に比較して少ない。また本邦では、視神経炎と脊髄炎のみを繰り返し、脳に病変の見られない病型を視神経脊髄型MS (optic spinal MS: OSMS)として、通常型MS (conventional MS: OMS)と区別する考え方もある。MSの診断には、髄液のオリゴクローナルバンド、IgG indexの上昇などが参考になるが、MRIが最も重要となる。MSの脱髄病巣は、脳室周囲の白質、脳幹、小脳半球、中小脳脚、皮質下、脳梁などに出現する。急性期、慢性期いずれの場合もT<sub>2</sub>強調画像で高信号を呈し、急性病変ではガドリニウムによる増強効果が見られることが多い。慢性期のT<sub>1</sub>強調画像での低信号病巣や、脳萎縮などは認知機能障害や長期的機能障害の進行に相関が注目されている。

#### 多発性硬化症 (MS) の病因

MSは、多因子疾患であり、遺伝的要因、環境的要因がともに関与する。遺伝的要因の中で、最も相関が高いと考えられているのは、HLA分子 (HLA-DR2)である。HLA-DRは、抗原提示にかかわる分子であり、脳炎を誘発するペプチドを結合することが知られているが、HLA分子の近傍の遺伝子が疾患感受性に関与している可能性もある。近年のゲノム解析の結果、副刺激分子 (CTLA-4)、サイト

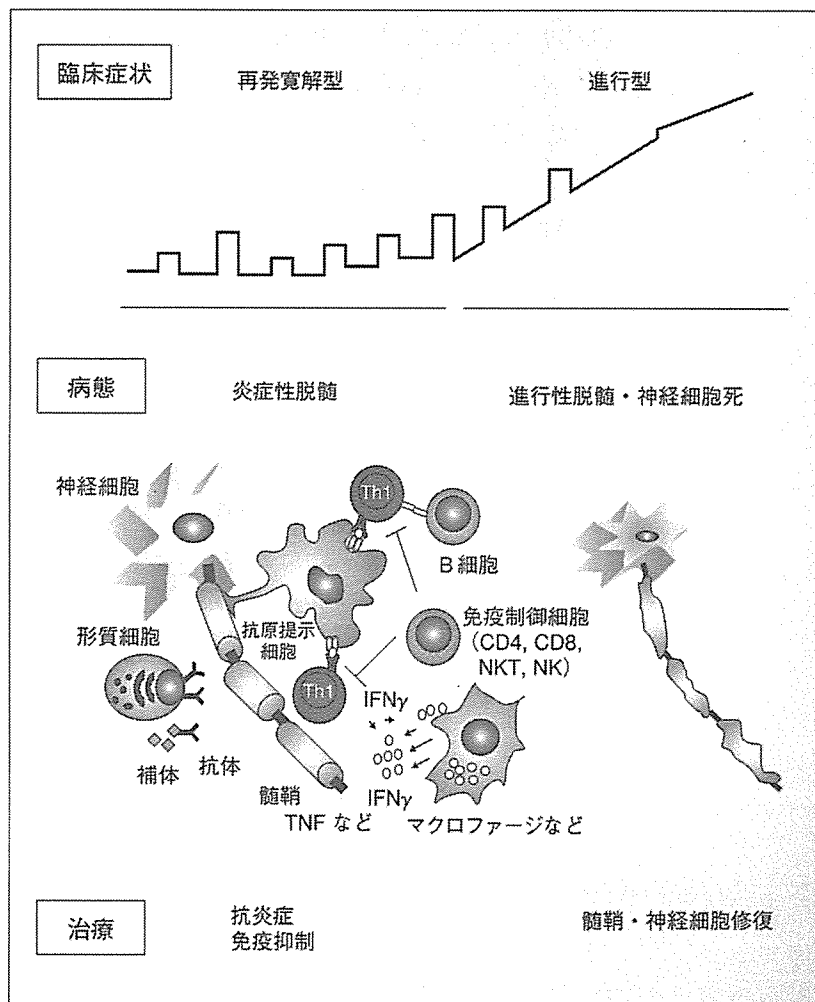
カイン (TNF $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$ ), サイトカイン受容体 (IL-4/IL-10/IL-2), ケモカイン受容体 (CCR2/5), ビタミンD受容体, エストロゲン受容体, アポ E4 などさまざまな遺伝子の関与が報告されているが, 報告間で差があり今後の解析が待たれる. 一方, MS の一卵性双生児における同胞の発症率は 20~35% であることから, 環境的要因が MS 発症に重要と考えられる.

環境的要因としては, 感染性因子の関与, 有害物質の関与などが検討されてきた. 感染因子が発症の契機になることは, 疫学研究から示唆されてきた. 最近では, human herpes virus 6 (HHV-6) や *Chlamydia pneumoniae* などの感染と MS との関連が報告されているが, 一般的には感染因子は自己免疫性 T 細胞の活性化に関与すると考えられている. 感染症が病態の本態ではなく, 自己免疫誘発の原因となる場合の機序については, 分子相同性仮説と抗原非依存性活性化が考えられている. 分子相同性は, 自己抗原と配列の類似した外来抗原 (ウイルスや細菌の抗原) が中枢神経髄鞘タンパク質特異的 T 細胞を刺激して自己免疫を起こすという仮説である. T 細胞による抗原認識は, 従来考えられていたほど厳密ではなく, アミノ酸配列が保存されていなくとも, 髄鞘タンパク質特異的 T 細胞を刺激できることが報告されており, 交差反応による自己免疫性 T 細胞の活性化が起こる機会は少なくないと考えられる. 抗原非特異的活性化としては, 感染に伴って産生される炎症性サイトカインや, 抗原提示細胞の活性化などが, MS の発症や再発の誘因になることが推定されている.

#### 多発性硬化症 (MS) の病態

MS の病態は, 中枢神経髄鞘タンパク質を認識する自己免疫性 T 細胞が何らかの刺激で活性化され, 炎症性の脱髄を起こす引き金を引くと考えられている. このような炎症を繰り返していくうちに (RRMS), 脱髄の修復の遅延, 神経細胞の障害などが進行するのが 1 つの典型的な経過と考えられている (図 1). 病理学的には, Lassmann らが, PPMS の一部では, オリゴデンドロサイトの 1 次的な障害が原因である可能性があることも報告しており, 病態にも多様性があることが示唆されている<sup>9)</sup>. 自己抗原としては, ミエリン塩基性タンパク質

図1 多発性硬化症の代表的な臨床経過とその病態



多発性硬化症の最も典型的な経過は、再発と寛解を繰り返し、やがて進行型に移行する。病態としては、中枢神経の髄鞘蛋白を抗原とする自己免疫性の炎症性脱髄を繰り返し、やがて進行性脱髄・神経細胞死に至ると考えられている。治療法としては、自己免疫性の炎症を抑制することが重要であるが、進行期にはオリゴデンドロサイトや神経細胞の保護や再生を促進する治療についても検討されている。

(MBP) やプロテオリピッドタンパク質 (PLP), ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG), ミエリン内接着糖タンパク質 (MAG) などが抗原として注目されてきた。これらは感受性のある系統の動物に免疫することにより実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を惹起できる。そのほか、S-100 タンパク質, 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase), アルファBクリスタリン, ミエリ



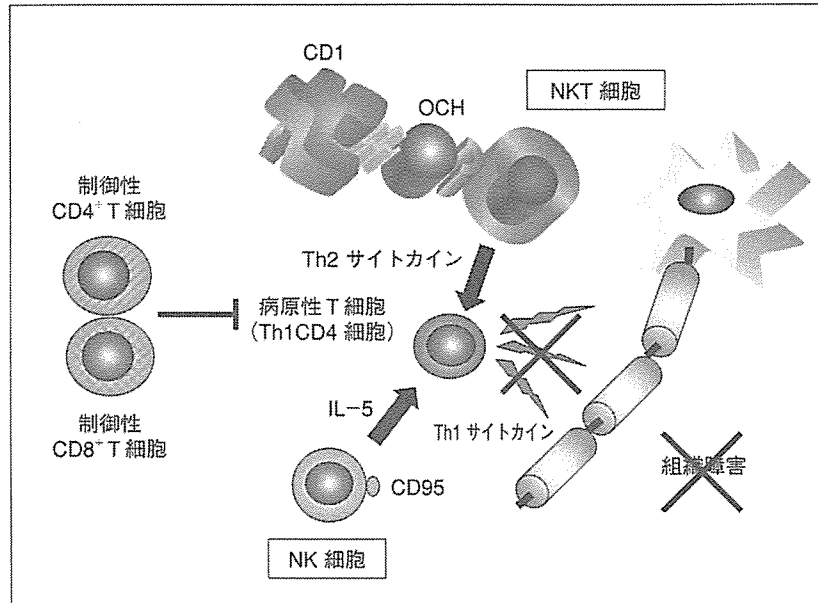
ンオリゴデンドロサイト塩基性タンパク質 (MOBP) なども抗原として報告されているが、どの抗原がどの程度 MS の発症や病態形成に関与するかについては分かっていない。

MS では、抗体や CD8<sup>+</sup>T細胞の関与についても研究が進みつつあるが、特に CD4<sup>+</sup>T細胞が重要と考えられている。末梢で活性化され中枢神経系に侵入し、さらにそこで樹状細胞やミクログリアによる抗原提示をうけて活性化されて、炎症を引き起こすと考えられている。マウスやラットに髄鞘タンパク質を免疫すると、MS と類似した病態である EAE が起こるので、MS の動物モデルとして病態解析や治療法の開発研究に汎用されている<sup>9)</sup>。CD4<sup>+</sup>T細胞の重要性は、EAE が髄鞘タンパク質反応性の CD4<sup>+</sup>T細胞の移入によって起こるが、抗体の移入では起こらないことから推定された。また MS では、CD4<sup>+</sup>T細胞に抗原を提示する分子である HLA-DR と相関あること、ヒトの HLA-DR2 遺伝子を発現させたマウスを使った研究も CD4<sup>+</sup>T細胞の重要性を支持するものであった。

CD4<sup>+</sup>T細胞は、IL-2, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ などを産生し、細胞内感染病原体の排除や自己免疫性組織障害に関与する Th1 細胞と、IL-4, IL-5, IL-13, IL-10などを産生して寄生虫排除やアレルギー疾患に関与する Th2 細胞に分類される。Th1 細胞の誘導には、IL-12 が必須であり、Th2 細胞の分化には IL-4 が重要である。Th1 細胞と Th2 細胞はそれぞれ産生するサイトカインを介して拮抗してバランスをとっている。EAE を起こす脳炎惹起性 T細胞が Th1 細胞であることや、ヒトの髄鞘タンパク質特異的 T細胞の多くが Th1 細胞であることから、MS は Th1 細胞が病態形成に重要であると考えられてきた。実際に、MS では IFN $\gamma$  の投与によって再発回数の増加が見られ、MS の抗原提示細胞では IL-12 の産生が亢進していることが報告されている。また、IFN $\beta$  やコポリマー I といった再発予防薬が生体内では結果的に Th2 反応を促進する作用があることも、MS の病態悪化に Th1 反応が関与していることを支持している。

T細胞は、これら病態悪化につながる細胞のみではなく、自己免疫を抑制する免疫制御細胞が存在することが動物実験から想定されている (図 2)。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>細胞は免疫抑制細胞として知られ、また

図2 免疫制御性細胞による自己免疫抑制



自己免疫を抑制する細胞として、制御性 CD4<sup>+</sup> T 細胞、制御性 CD8<sup>+</sup> T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞などが知られている。NK 細胞、NKT 細胞は Th2 サイトカインを産生して、Th1 細胞を抑制することによって寛解維持に貢献していると考えられる。制御性 CD4、CD8 細胞の抑制機序については、詳細は不明である。

CD8<sup>+</sup> 細胞にも免疫抑制的に働く細胞群があることが報告されているが、これらの細胞が MS でどのような働きをしているかについては現在研究段階である。また、NK 細胞や NK 細胞マーカーを発現する T 細胞である NKT 細胞は、免疫調節細胞として注目されている(図 2)。NKT 細胞は、多型性のない CD1d 分子に提示される糖脂質を抗原として認識し、刺激によって大量のサイトカインを速やかに産生するユニークな細胞である。抗原の性質や、サイトカインなどの周りの環境によって、Th1 サイトカインも Th2 サイトカインも産生することができる。MS の寛解期では、NKT 細胞の中でも、Th1 サイトカイン産生や細胞障害活性を持つ CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> の DN-NKT 細胞は減少しているが、Th2 サイトカインを産生する CD4<sup>-</sup>NKT 細胞は比較的保たれていて、Th2 サイトカインをより産生する傾向がある。このことから、NKT 細胞は MS の寛解期には、Th1 細胞を抑制していると考えられる<sup>9)</sup>。動物実験では、NKT 細胞を刺激して、Th2

サイトカインを選択的に出させるような合成糖脂質リガンド (OCH) を投与すると, MS のモデルである EAE が抑制され<sup>7)</sup>, NKT 細胞は新しい治療薬開発の標的の1つとして注目されている. NK 細胞は, 寛解期には CD95 の発現の高い症例が見られ, これらの症例の NK 細胞では IL-5 の産生が亢進していること, 末梢血から NK 細胞を除去して MBP で刺激をすると, IFN $\gamma$  産生細胞が増加することが報告されていることから, NK 細胞も MS の寛解の維持に積極的に関与している可能性がある<sup>8)9)</sup>.

#### 進行型の病態

RRMS が SPMS にいたる機序については, 詳細は分かっていないが, SPMS では炎症はむしろ弱く, 脱髄や神経細胞壊死が進行すると考えられている. MS では, 脱髄後の髄鞘の再生が遅いと言われているが, これは度重なる脱髄刺激によりオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) の絶対数が不足してしまう可能性, ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) のような OPC の膜抗原に対する抗体により OPC が傷害される可能性, 慢性期の病変部位でおこるグリオシスが髄鞘再生を阻害するなどの可能性が考えられている.

#### 治療戦略と病態

MS では, 新規治療が積極的に試みられ, その経過を通して病態に関する多くの知見を残してきた. 急性期の治療としては副腎皮質ステロイドのバルス療法が主体である. 寛解期の治療としては, ステロイドや免疫抑制剤の長期投与による再発予防効果には論議があり, 近年では I 型 IFN や glatiramer acetate (コポリマー I) が欧米で使用されている<sup>10)</sup>. IFN は, ウイルス感染などによって誘導されるサイトカインで, I 型 (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ ) と II 型 (IFN $\gamma$ ) に大別される. MS がウイルス性疾患ではないかと考えられ, 1980 年代前半には抗ウイルス療法として, IFN が投与された. IFN $\gamma$  投与では再発が増加したが, I 型 IFN の投与では MS の抑制効果が見られたことから, IFN $\beta$  が治療薬として使われるようになった. この結果は, IFN の効果は, 抗ウイルス作用ではなく, 免疫調節作用によること, MS では Th1

サイトカインが増悪因子となりうることを示唆した。I型IFNの作用機序としては、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞のIL-12産生の抑制と、それを介したT細胞によるIFN $\gamma$ の産生抑制、メタロプロテナーゼ2, 9の抑制によるリンパ球の中樞神経系への浸潤阻害などが報告されている。IFN $\beta$ は、RRMSにおける再発回数を約30%減少させ、神経症状の進行を抑制することが報告されている。しかし、自己注射が必要で、発熱などの副作用も少なくなく、無効例もあることから、新たな薬剤の登場が待たれていることも事実である。

Glatiramer acetate（コポリマーI）は、アラニン、チロシン、グルタミン酸、リジンからなるさまざまな配列を含んだオリゴペプチドの集合体である。MBPで良く使用されているアミノ酸をもとに、はじめはEAEを惹起するペプチドとしてデザインされたが、実際にはEAEを抑制することが分かり、MSの治療薬として欧米で使用されるようになった。作用機序として当初はMBPのMHC結合に競合すると考えられたが、コポリマーIで治療を受けた患者では、glatiramer acetateとMBPにも交差反応するTh2細胞が誘導されており、病態抑制機序としてはTh1/Th2のバランス調節が重要なのではないかと考えられている。コポリマーIはIFNよりも副作用が少なく、経口剤もあるが、日本では承認されていない。これら再発予防に効果のある2種の薬剤は、いずれも自己抗原反応性T細胞の反応をTh2に偏倚させていることから、Th1/Th2バランスをTh2に傾けることは、治療戦略の1つとして有効であることが確認された。

これらの治療は、繰り返す炎症を抑制することによって、SPMSへの移行を抑制しようとするものである。では、進行型についての治療はどうであろうか。現在、mitoxantroneが有効であることが注目され、欧米で使用されている。mitoxantroneは、anthraquinone系抗癌薬であり、DNA複製を阻害する。総投与量に制限があることなどから、主に進行型に用いられている。欧米では、自己幹細胞移植も試みられ、有効性が報告されている。その抑制機序としては、移植後にT細胞のレパトアが変化し、病態が抑制されることを示唆する結果が報告されている<sup>11)</sup>。これらの治療法は、リンパ球を標的としていることから、進行期に炎症細胞浸潤が減少している状態でもリンパ球が病