

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

333 ACAACGCACAGAATCTAACGC-3'. Purified recombinant virus was titrated by plaque assay,
334 and high titer stocks (2×10^7 pfu/ml) were used for infecting larvae.

335
336 **Determination of LD50 of day 4 fifth instar larvae by ROT stimulation-** To determine the
337 LD50 of day 3 fifth instar larvae by ROT (Sigma) stimulation, we injected ROT
338 intrahemocoelically to larvae weighing 3.5 to 4.0 g using a disposable syringe (Terumo, Tokyo,
339 Japan) with a 30G needle. ROT was dissolved in DMSO (prepared immediately before use and
340 stored in the dark) at 0, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 20, 40, and 80 $\mu\text{g/g}$ and injected into larvae in a volume
341 of 10 $\mu\text{l/g}$ body weight. The number of dead silkworms after 24 h was counted and the mortality
342 rate (%) = $(X/Y) \times 100$ was calculated, where X = dead larvae in the group and Y = total larvae in
343 the group. The mortality rates were analyzed with Probit analyses (29) using the Probit Analysis
344 option in the SAS 8.2 software package (SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan) to calculate the
345 LD50.

346
347 **Overexpression of BmDJ-1 to larvae and exposure to ROT oxidative stimuli-** A 50- μl
348 aliquot of BmNPV-BmDJ-1 or BmNPV- blank-vector (1×10^5 pfu/larva) was injected
349 intrahemocoelically into day 0 fifth instar larvae using a disposable syringe (Terumo) with a 30G
350 needle. Blank-vector recombinant virus was injected as a control. After rearing for 4 days on an
351 artificial diet, larvae were examined for overexpression of BmDJ-1 to assess protection from
352 oxidative stress due to ROT.

353 Virus-derived BmDJ-1 expression level was measured in the dissected fatbodies of several
354 insects after 1 day (24 h) and 4 days (day 3 fifth instar) by RT-PCR with the primers 5'-
355 ACTGTCGACAAGCTCTGTCC-3' and 5'-ACAACGCACAGAATCTAACGC-3'.

356 Virus-derived BmDJ-1 expression level was measured in the dissected fatbodies of several
357 insects after 4 days (day 3 fifth instar) by immunoblotting.

358 We surmised the ROT dose that would be most effective in the experimental model with
359 exogenous BmDJ-1 based on a report of the administration of exogenous DJ-1 (30).

360 ROT, prepared at 20 $\mu\text{g/g}$ (LD70), was injected to three groups of 10 to 20 larvae in a volume of
361 10 $\mu\text{l/g}$ body weight. The number of dead silkworms after 24 h was counted and the mortality rate
362 (%) was calculated.

363 Data were analyzed with the multiple comparison test followed by the Cochran-Armitage test
364 for dose-response relationship and Steel's (non-parametric) multiple comparison test. $P < 0.05$
365 was considered significant. All statistical analyses were carried out using SAS system 8.2
366 software. Three trials were performed in each experiment.

367
368 **BmN4 cells treated with ROT, two-dimensional (2D) gel electrophoresis, and detection of**
369 **BmDJ-1-** BmN4 cells (2×10^6) were grown on 6-well Falcon plates (BD Biosciences, Franklin
370 Lakes, NJ, USA) and washed twice with PBS followed by 3 h of treatment with TC-100 medium
371 containing ROT (50 μM) dissolved in 0.1% DMSO or 0.1% DMSO as a control in the dark. To
372 prepare total protein extracts for two-dimensional (2D) gel electrophoretic analysis, the cells were
373 sonicated in rehydration buffer comprising 8 M urea, 2% CHAPS, 0.5% carrier ampholytes at pH
374 3-10, 20 mM dithiothreitol, 0.002% bromophenol blue, and a cocktail of protease inhibitors.

375 Urea-soluble proteins were separated by isoelectric focusing (IEF) using the ZOOM IPGRunner
376 system loaded with an immobilized pH 3-10 gradient strip (Invitrogen), as described previously
377 (16). After the first dimension of IEF, the protein was separated in the second dimension on a 4-
378 12% NuPAGE polyacrylamide gel (Invitrogen). For detection of BmDJ-1, the gel was transferred
379 to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane for immunoblotting.

380 All incubation steps were carried out at 25°C in the dark. Three trials were performed for each
381 experiment.

382

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

383 Collection of samples and measurement of NO levels- Hemolymph (250 μ l) was collected
384 from day 0 fifth instar larvae, adults, or from medium to measure the concentration of NO. To
385 remove proteins, samples were mixed with methanol (2:1 by volume), followed by centrifugation
386 at 10,000 \times g for 20 min, and NO levels in the supernatants were measured using an NOx
387 analyzer (ENO-20; Eicom, Kyoto, Japan), according to the manual.
388

389 BmN4 cell treatment with ISDN and detection of BmDJ-1- BmN4 cells (2×10^6) were grown
390 on 6-well Falcon plates (BD Biosciences) and washed twice with PBS followed by 16 h of
391 treatment with TC-100 medium containing 100 μ M of isosorbide dinitrate (ISDN; prepared
392 immediately prior to use and kept in the dark) dissolved in 0.1% ethanol or with 0.1% ethanol
393 alone as a control. Total protein extracts were prepared for immunoblotting and culture medium
394 was prepared for NO analysis. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. A *P* <
395 0.05 was considered significant. All statistical analyses were carried out using SAS system 8.2
396 software. Three trials were performed for each experiment.
397

398 Footnotes

399
400 The cDNA clone, NRPG1136, was provided by the National Bioresource Project (MEXT,
401 Japan).

402
403 The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to GeneBank /DDBJ
404 SAKURA Data bank Accession No. AB281053.
405

406 Acknowledgments

407 We are indebted to Dr. Taro Tamaki for critical reading of the manuscript, Dr. Yuki Ogasawara
408 for advice on the oxidative stress experiment, Dr. Kikuo Iwabuchi for advice on cell culture, and
409 Ms. Mai Ikeda, and Ms. Yukiko Senoo for technical assistance.
410

411 References

- 412
413 1. Bandyopadhyay, S., Cookson, M. R. (2004) Evolutionary and functional relationships
414 within the DJ1 superfamily. *BMC Evol Biol* 4: 1–9.
415 2. Costa C. A. (2007) DJ-1: a newcomer in Parkinson's disease pathology. *Curr Mol Med*
416 7: 650–657.
417 3. Kinumi, T., Kimata, J., Taira, T., Ariga, H., Nikia, E. (2004) Cysteine-106 of DJ-1 is
418 the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation *in vivo* in
419 human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 722–728.
420 4. Bové, J., Prou, D., Perier, C., Przedborski, S. (2005) Toxin-induced models of
421 Parkinson's disease. *NeuroRx* 2: 484–494.
422 5. Terzioglu, M., Galter, D. (2008) Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced
423 rodent models. *FEBS J* 275: 1384–1391.
424 6. Panov, A., Dikalov, S., Shalbuyeva, N., Taylor, G., Sherer, T., et al. (2005) Rotenone
425 model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term
426 systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem* 280: 42026–42035.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

427 7. Menzies, F. M., Yeniseti, S. C., Min, K.T. (2005) Roles of Drosophila DJ-1 in
428 survival of dopaminergic neurons and oxidative stress. *Curr Biol* 15: 1578–1582.
429 8. Olzmann, J. A., Brown, K., Wilkinson, K. D., Rees, H. D., Huai, Q., et al. (2004)
430 Familial Parkinson's disease-associated L166P mutation disrupts DJ-1 protein folding and
431 function. *J Biol Chem* 279: 8506–8515.
432 9. Tao, X., Tong, L. (2003) Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with
433 early onset Parkinson's disease. *J Biol Chem* 278: 31372–31379.
434 10. Anderson, P. C., Daggett, V. (2008) Molecular basis for the structural instability of
435 human DJ-1 induced by the L166P mutation associated with Parkinson's disease.
436 *Biochemistry* 47: 9380–9393.
437 11. Blackinton, J., Lakshminarasimhan, M., Thomas, K. J., Ahmad, R., Greggio, E., et al.
438 (2009) Formation of a stabilized cysteine sulfinic acid is critical for the mitochondrial
439 function of the parkinsonism protein DJ-1. *J Biol Chem* 284: 6476–6485.
440 12. Meulener, M. C., Xu, K., Thomson, L., Ischiropoulos, H., Bonini, N. M. (2004)
441 Mutational analysis of DJ-1 in Drosophila implicates functional inactivation by oxidative
442 damage and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 12517–12522.
443 13. Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., et al. (2004) The
444 genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res* 11: 27–35
445 14. Ohnishi, A., Hull, J. J., Matsumoto, S. (2006) Targeted disruption of genes in the
446 *Bombyx mori* sex pheromone biosynthetic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4398–
447 4403.
448 15. Tomita, M., Munetsuna, H., Sato, T., Adachi, T., Hino, R., et al. (2003) Transgenic
449 silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol*
450 21: 52–56.
451 16. Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C., Cheng, D., Dai, F., et al. (2004) A draft sequence for the
452 genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* 306: 1937–1940
453 17. Xia, Q., Cheng, D., Duan, J., Wang, G., Cheng, T., et al. (2007) Microarray-based
454 gene expression profiles in multiple tissues of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*.
455 *Genome Biol* 8: R162.
456 18. Kozak, M., (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the
457 translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 12: 857–872.
458 19. Pedersen, A. G., Nielsen, H. (1997) Neural network prediction of translation initiation
459 sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. *Proc Int Conf Intell Syst*
460 5: 226–233.
461 20. Yamamoto, K., Narukawa, J., Kadono-Okuda, K., Nohata, J., Sasanuma, M., et al.
462 (2006) Construction of a single nucleotide polymorphism linkage map for the silkworm,
463 *Bombyx mori*, based on bacterial artificial chromosome end sequences. *Genetics* 173:
464 151–161.
465 21. Tabunoki, H., Sugiyama, H., Tanaka, Y., Fujii, H., Banno Y., et al. (2002) Isolation,
466 characterization, and cDNA sequence of a carotenoid binding protein from the silk gland
467 of *Bombyx mori* larvae. *J Biol Chem* 277: 32133–32140.
468 22. Meulener, M., Whitworth, A. J., Armstrong-Gold, C. E., Rizzu, P., Heutink, P., et al.
469 (2007) Drosophila DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins
470 associated with Parkinson's disease. *Curr Biol* 15: 1572–1577.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 471 23. Maeda, S., Kawai, T., Obinata, M., Fujiwara, H., Horiuchi, T., et al. (1985)
472 Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature*
473 315: 592–594.
474 24. Choi, S. K., Choi, H. K., Kadono-Okuda, K., Taniai, K., Kato, Y., et al. (1995)
475 Occurrence of novel types of nitric oxide synthase in the silkworm, *Bombyx mori*.
476 *Biochem Biophys Res Commun* 207: 452–459.
477 25. Inoue, M., Sato, E. F., Nishikawa, M., Hiramoto, K., Kashiwagi, A., et al. (2004) Free
478 radical theory of apoptosis and metamorphosis. *Redox Rep* 9: 237–247. Review
479 26. Fan, J., Ren, H., Jia, N., Fei, E., Zhou, T., et al. (2008) DJ-1 decreases Bax expression
480 through repressing p53 transcriptional activity. *J Biol Chem* 283:4022–4030.
481 27. Tabunoki, H., Shimada, T., Banno, Y., Sato, R., Kajiwara, H., et al. (2008)
482 Identification of *Bombyx mori* 14-3-3 orthologs and the interactor Hsp60. *Neurosci Res*
483 61: 271–280.
484 28. Towbin, H., Staehelin, J., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from
485 polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl*
486 *Acad Sci USA* 76: 4350–4354.
487 29. Finny, D. J. (1947) *Probit Analysis, A Statistical Treatment of the Sigmoid Response*
488 *Curve*, Cambridge, NY: Cambridge University Press, 20 p.
489 30. Inden, M., Taira, T., Kitamura, Y., Yanagida, T., Tsuchiya, D., et al. (2006) PARK7
490 DJ-1 protects against degeneration of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease
491 rat model. *Neurobiol Dis* 24: 144–158.

492 **Figure Legends**

493
494 **Figure 1. Alignment and Phylogenic tree of *B. mori* DJ-1 with other DJ-1 proteins.**
495 A. Conserved amino acid sequences C at position 106 and L at position 166 of human DJ-1 are
496 marked by asterisks (*). The level of conserved amino acid residues among the various species
497 are graphically shown below the sequences. B. The unrooted bootstrap tree of *B. mori* DJ-1 and
498 DJ-1 protein of other species. Sequences are *Homo sapiens*, *Bos Taurus*, *Mus musculus*, *Gallus*
499 *gallus*, *Danio rerio*, *Xenopus tropicalis*, *Drosophila melanogaster*- α and - β , *Caenorhabditis*
500 *elegans*, and *Bombyx mori* DJ-1.

501
502 **Figure 2. Northern blot analysis and RT-PCR of BmDJ-1.** A. Total RNA isolated from *B.*
503 *mori* ovary was analyzed by northern blot analysis using a BmDJ-1 probe. A band at about 756
504 kb was identified as the BmDJ-1 transcript. The amount of total RNA is 12 μ g per lane. 18S
505 rRNA was used as a control for monitoring RNA loading. B. RT-PCR for BmDJ-1 from cDNA
506 samples synthesized from diverse larval tissues. RT-PCR for actin was used as a positive loading
507 control and RT-PCR reaction, without reverse transcriptase, was used as a negative control. Lane
508 1, brain (RT-); lane 2, brain; lane 3, midgut; lane 4, silk gland; lane 5, fat body; lane 6,
509 Malpighian tubule; lane 7, ovary; lane 8, testis; lane 9, hemocyte.

510
511 **Figure 3. Specificity of anti-BmDJ-1 antibody.** The recombinant protein, cell or tissue lysate
512 were separated on a 12% SDS-PAGE gel, transferred onto a nitrocellulose membrane, and
513 processed for immunoblotting with anti-BmDJ-1 antibody. The following samples were loaded in
514 each lane: 1, 1 μ g recombinant CBP as a negative control; 2, 0.25 μ g recombinant BmDJ-1
515 protein; 3, 0.5 μ g recombinant BmDJ-1 protein; 4, HEK 293 cells; 5, BmN4 cells; 6, larvae brain.
516

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

517 **Figure 4. Developmental and tissue distribution of BmDJ-1 in *B. mori*.** A. Aliquots (5 µg)
518 of whole body homogenates from day 0 larvae of the first (lane 1), second (lane 2), third (lane 3),
519 fourth (lane 4), and fifth (lane 5) instars, the pupae (lane 6), and the adult (lane 7) were separated
520 by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with anti-BmDJ-1 antibody. B, Aliquots
521 (5 µg) of brain of the fifth instar larvae (lane 8), pupae (lane 9), and adults (lane 10). C. Aliquots
522 (5 µg) of protein of various tissues were subjected to SDS-PAGE and examined for BmDJ-1
523 expression. Tissues shown in lanes 1, midgut; 2, fatbody; 3, Malpighian tubule; 4, testis; and 5,
524 ovary were isolated from day 0 to 12 fifth instar larvae (panels a to m), from day 0 to 8 pupae
525 (panels n to s), and from day 0 adults (panel t). Wells m5, p3, q1, q4, r1, s1, and t1 did not have
526 samples.

527
528 **Figure 5. Effect of BmDJ-1 on ROT-induced oxidative stress in BmN4 cells.** A. BmN4
529 cells exposed to ROT for 3 h were examined for BmDJ-1 content by 2D-PAGE and
530 immunoblotting. A is control, B is ROT treatment.

531
532 **Figure 6. Dose mortality curve of rotenone in the silkworm.** ROT (0, 1.25, 2.5, 5.0, 10, 20,
533 40, and 80 µg/g) was injected in day 3 fifth instar larvae, and the mortality rate within 24 h was
534 examined. Filled circles were observational data.

535
536 **Figure 7. Expression of BmDJ-1 in silkworms infected by recombinant BmNPV.** The
537 fatbodies of several insects were dissected after 1 day (24 h) and 5 days (day 4 fifth instar) and
538 subjected to RT-PCR with BmNPV specific primers. 1, 2: blank virus; 3,4: recombinant virus; 1,
539 3: 1 day after infection; 2,4: 5 days after infection.

540
541 **Figure 8. Change of NO concentration in hemolymph and expression of BmDJ-1 treated**
542 **with ISDN.** A. The hemolymph of several insects was collected from day 0 fifth instar larvae to
543 adults and measured for NO concentration. 1-13: fifth instar larval stage (day 0 to 12); 13-25:
544 pupal stage (day 0 to 11); 26: adult. B. NO concentration in the medium. C. Aliquots (5 µg) of
545 protein samples from BmN4 cells, experiment 1 of control (lane 1), experiment 2 of control (lane
546 2), experiment 3 of control (lane 3), experiment 1 of ISDN treatment (lane 4), experiment 2 of
547 ISDN treatment (lane 5), and experiment 3 of ISDN treatment (lane 6) were separated by SDS-
548 PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with anti-BmDJ-1 antibody. Protein level was
549 measured by Image J ver 1.37 c and plotted to a graph. *P<0.05, **P<0.01 compared with control
550 values.

551
552 **Tables**

553
554 **TABLE 1. Mortality rate of BmDJ-1 overexpressing (rBmNPV-infected) silkworm exposed**
555 **to ROT oxidative stress.**

Experiment	Silkworm mortality ^a (%)	
	Control	BmDJ-1
1	17/20 (85)	8/21 (38)**
2	14/15 (93)	4/15 (27)***
3	18/20 (90)	3/20 (15)***

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

564 ^aRotenone (20 µg/g) was injected into BmDJ-1 overexpressing day 4 fifth instar larvae as shown
565 in Fig. 7, and the mortality rate (dead silkworms / total silkworms; mortality rate, % in
566 parentheses) within 24 h was examined.
567 ^{**}P<0.01, ^{***}P<0.001 compared with control values.

Figure
[Click here to download high resolution image](#)

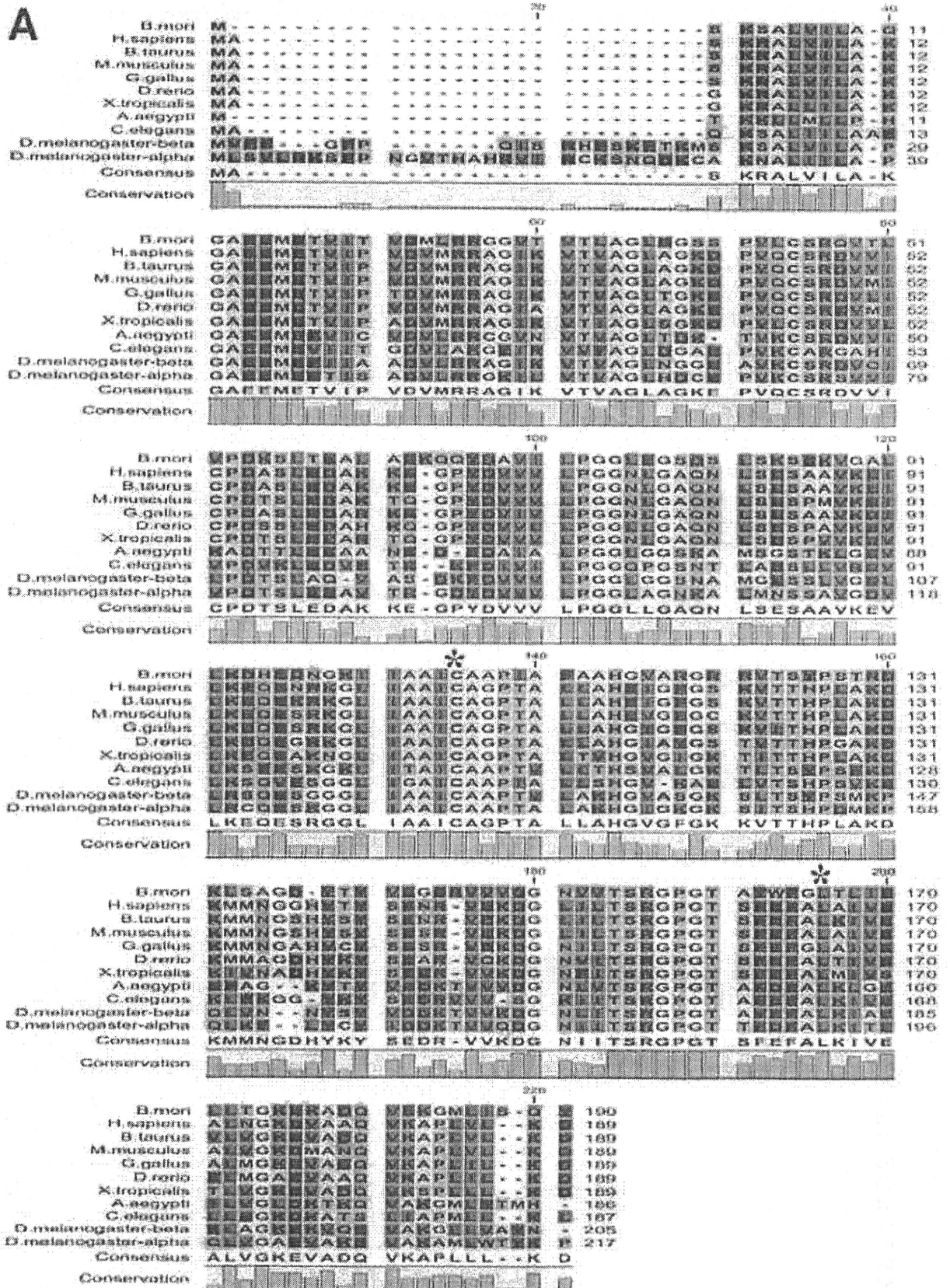
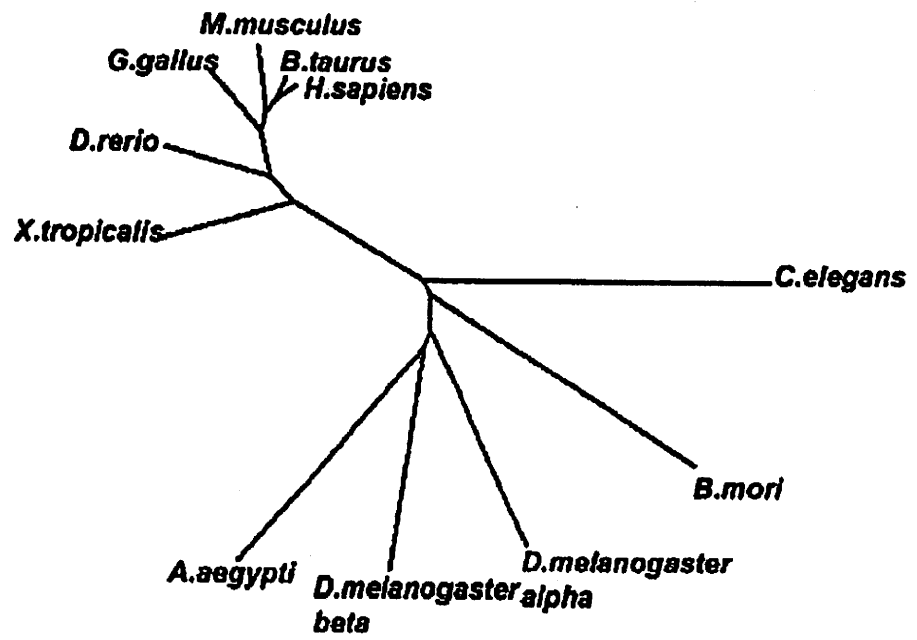


Figure
Click here to download high resolution image

Figure 1

B



0.1

Figure
Click here to download high resolution image

Figure 2

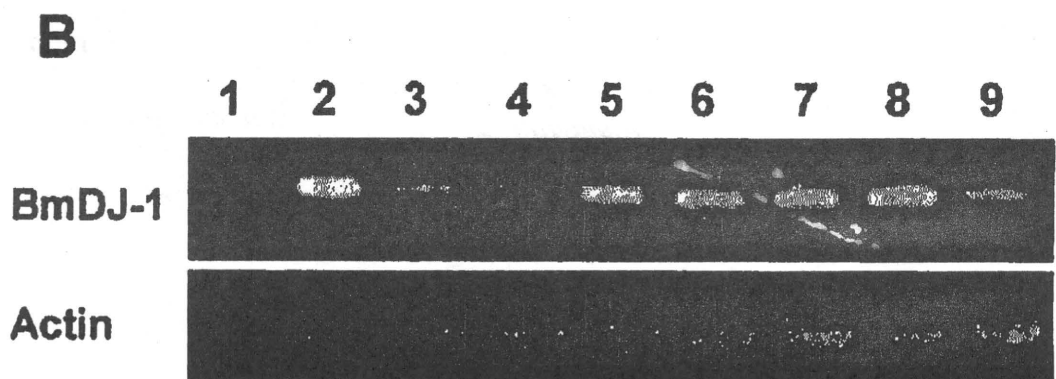
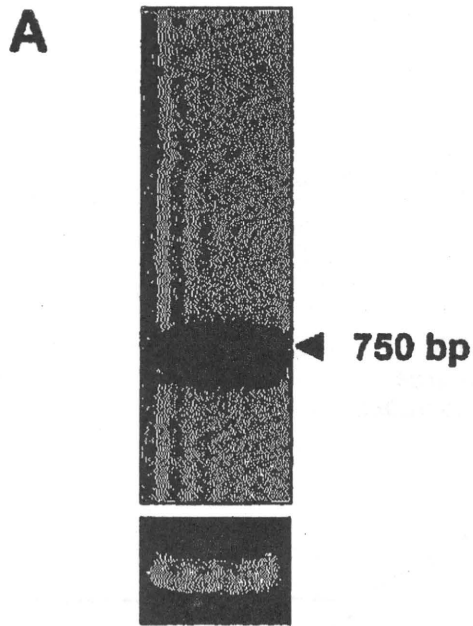


Figure
Click here to download high resolution image

Figure 3

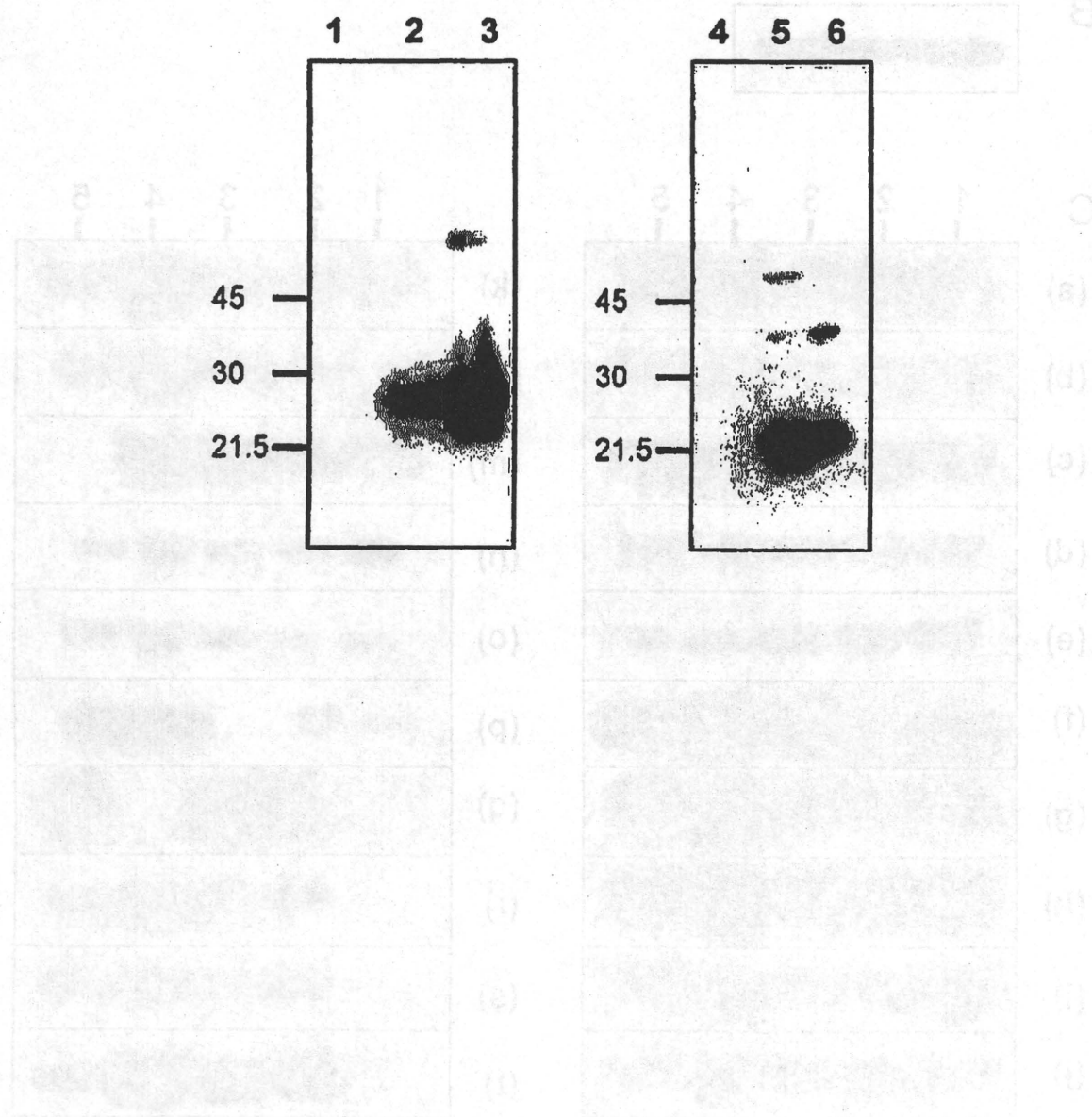


Figure
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 4

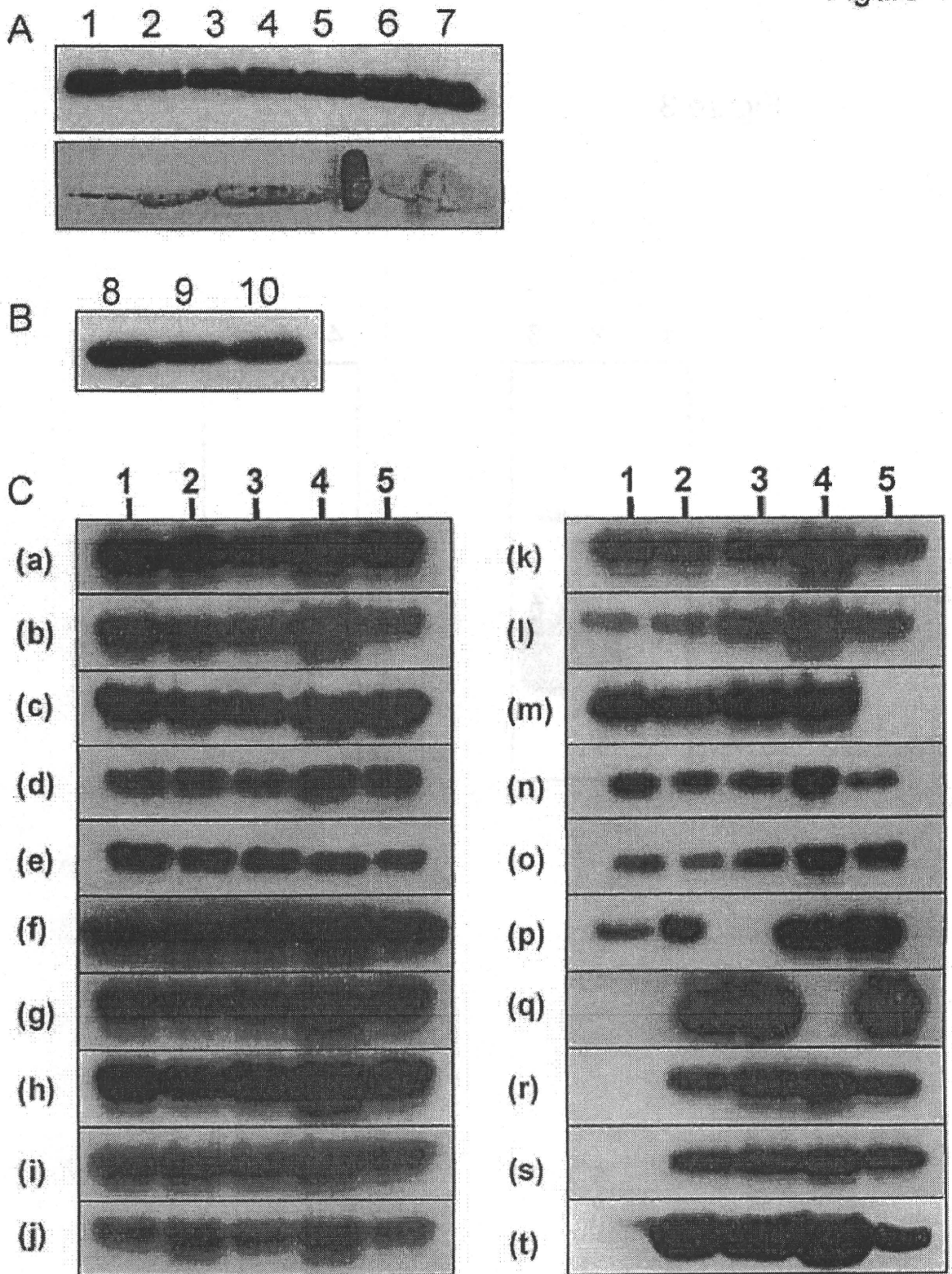


Figure
Click here to download high resolution image

Figure
Click here to download high resolution image

Figure 5

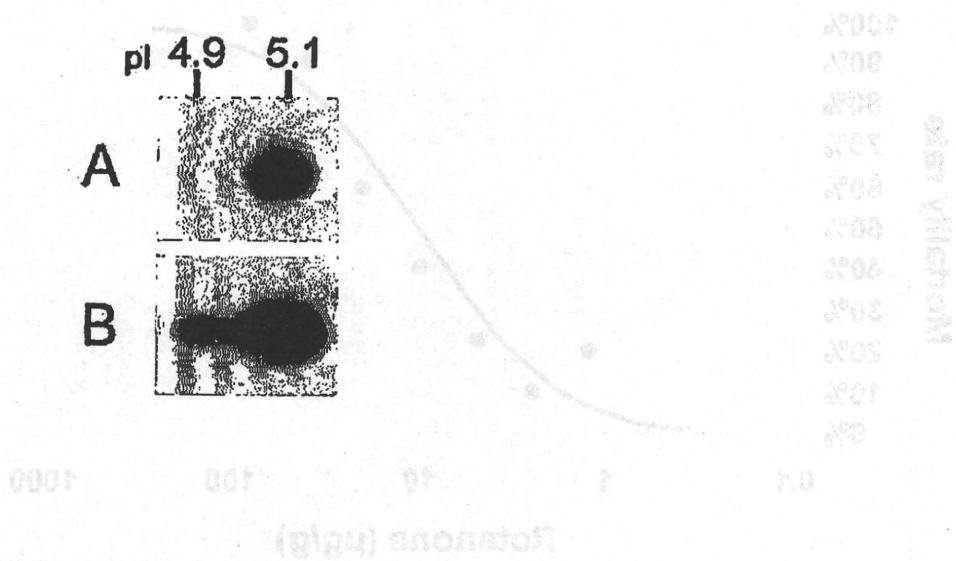


Figure 5

Figure
Click here to download high resolution image

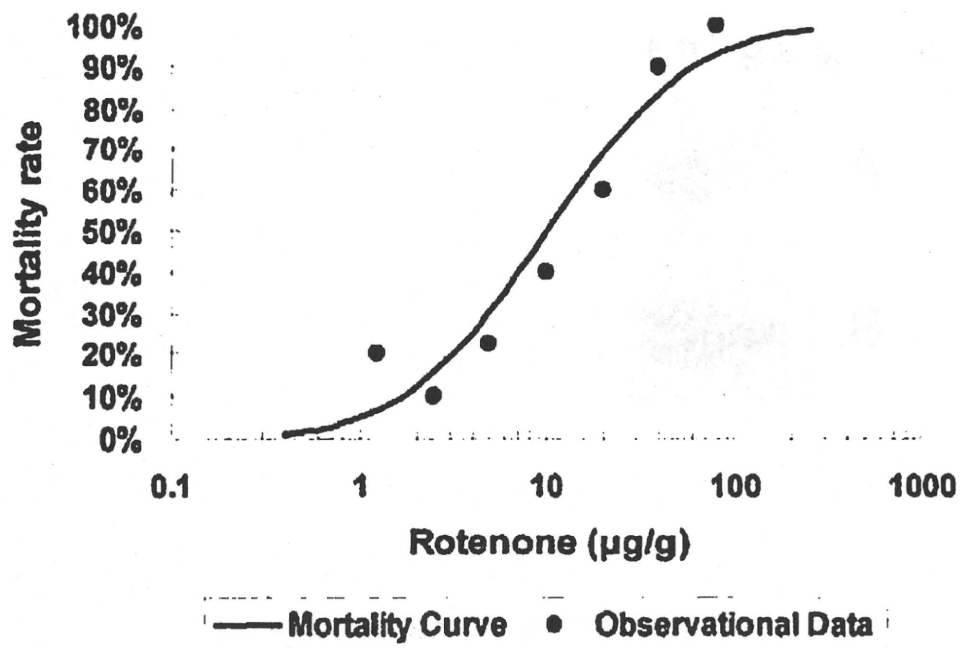


Figure 6

Figure 7

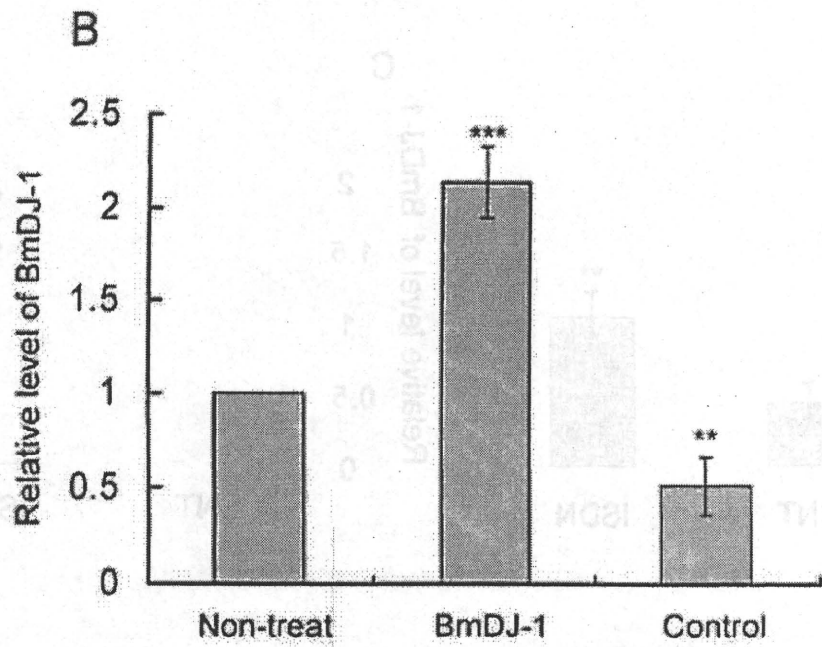
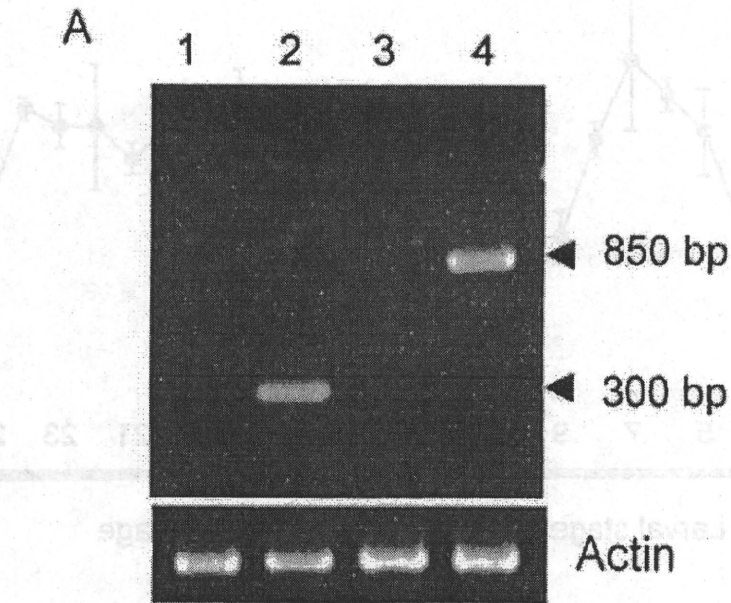
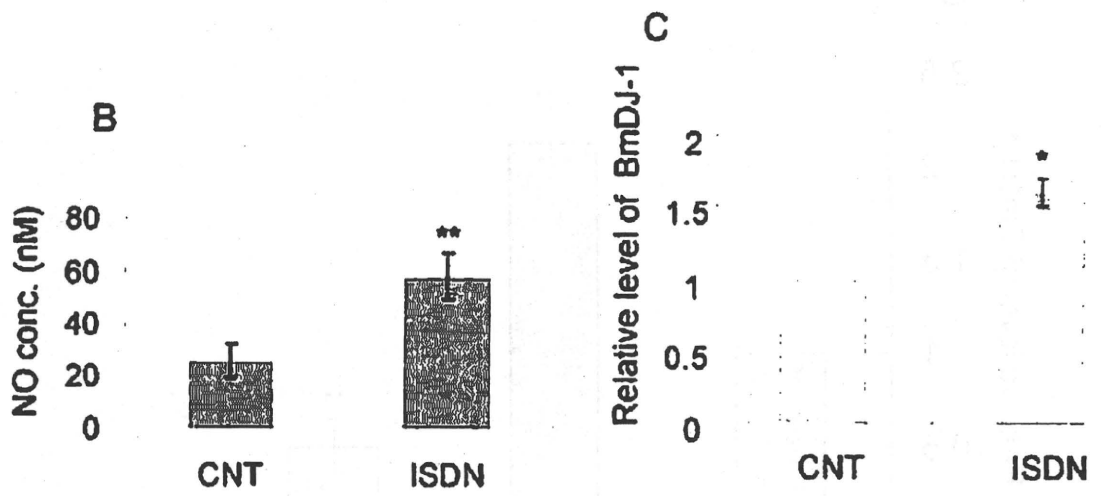
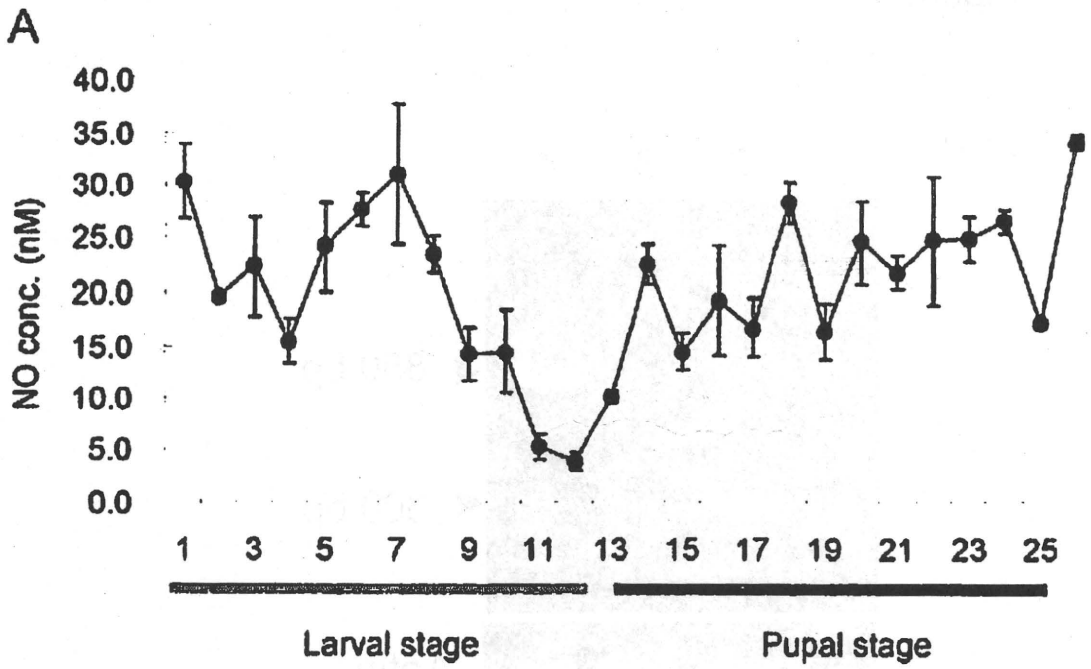


Figure 8



5

ゲノムワイド解析により同定された多発性硬化症のリスクアレル

Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study

多発性硬化症(MS)では臨床上に明らかな遺伝的要因の関与を認める。本研究ではDNAマイクロアレイによるゲノムワイド関連(GWA)解析で、MSリスクアレルを同定した。931家系トリオのSNPをスクリーニングし、別の609家系トリオ、2,322孤発例MS、789コントロールと2種類の外部データベースコントロールで再現性を検証した。全12,360データを統合し、MSリスクの統計学的有意性を算出した。その結果、931家系トリオの334,923 SNPsにお

けるTDTで、49 SNPsとMSの連関が示唆され、38 SNPsで検証した。931家系トリオ患者と2,431健常者間で差異を呈する32 SNPsを同定、110 SNPsで検証した。最終的に、IL-2受容体 α 鎖遺伝子(IL2RA) ($p=2.96 \times 10^{-8}$)、IL-7受容体 α 鎖遺伝子(IL7RA) ($p=2.94 \times 10^{-7}$)、HLA-DRA遺伝子座 ($p=8.94 \times 10^{-81}$)のSNPsのアレルがMSと強く連関し、MSリスク遺伝因子と考えられた。

GWA解析の対象

MSは若年成人では最も多い中枢神経系炎症性自己免疫疾患である。MS双生児・兄弟例の解析から、何らかの遺伝因子がMS疾患感受性に影響していることが分かった。候補遺伝子解析で、主要適合性複合体(MHC)遺伝子座の多型とMSの連関が示唆された。730家系2,692サンプル4,506 SNPsの連鎖解析で、MHC遺伝子座との強い連鎖(LODスコア11.66)が証明された。しかし過去の研究では、統計学的検出力が不十分で、MSと連鎖するnon-MHC遺伝子を同定できなかった。

本研究では、バイアスや仮説の影響を受けないゲノムワイド関連(genome-wide association; GWA)解析により、MSリスクnon-MHC SNPアレルの同定を試みた。International MS Genetics Consortium (IMSGC)を立ち上げ、MS家系トリオと孤発例MSの血液サンプルはUK(全土)とUS(UCSF MS Center,

San FranciscoとBWH MS Center, Bostonを中心)の研究グループが収集、ジェノタイピングにはAffymetrix社GeneChip Human Mapping 500K arrays (500,000 SNPs)を用いた。MSはMcDonald基準で診断したが、clinically isolated syndrome (CIS) (臨床的 attack 1回)が4% (86症例)含まれている。コントロールサンプルは、BWH、UCSFで慢性炎症性疾患既往歴のない非ヒスパニック系白人より収集した。また外部データベース Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC), National Institute of Mental Health (NIMH)の双極性障害GWA研究のAffymetrix 400K SNPデータをコントロールとして取り込んだ。GWA解析は、I型・II型糖尿病、炎症性腸疾患、関節リウマチ、全身性エリテマトーデスのリスクnon-MHC SNPsの同定に成功している。

GWA解析のステージ化

本研究ではジェノタイピング効率化のため、解析をステージ化した。品質管理(QC)ステージでは、1,003家系トリオをタイピングし、ジェノタイピング率、Hardy-Weinberg平衡、Mendelianエラーの基準を満たすヨーロッパ系家系のサンプルを選択、対象を931家系トリオの334,923 SNPsに絞り込んだ。スクリーニングステージでは、931家系トリオの患者と両親を伝達不平衡テスト(TDT)で比較し、MSに連関する78 SNPs ($p < 1 \times 10^{-4}$)を同定した。931家系トリオの患者と2,431コントロール(WTCCC 1,475, NIH 956)をCochran-Mantel-Haenszelテストで解析し、MSに連関する63 SNPs

($p < 0.001$)を同定した。自己免疫疾患感受性遺伝子座近傍の24 SNPs ($p < 0.01$)を追加解析した。再現性検証ステージでは、QC基準を満たす110 SNPsに関して、スクリーニングとは別の609家系トリオ、2,322孤発例MS(UK 928, US 1,394), 2,987コントロール(IMSGC 789, WTCCC 1,475, NIH 723)を追加、Sequenom社iPLEX Gold MassArrayを用いて解析した。最後に全ステージ12,360サンプル(1,540家系トリオ、2,322孤発例MS、5,418コントロール)のデータを統合、UNPHASEDソフトで解析した。

MSリスクに関連する non-MHC SNPs の意義

MHC遺伝子座HLA-DRB1*1501のSNP rs3135388 Aアレル ($p=8.94 \times 10^{-81}$)が最も有意にMSリスクに関連していたが、他に比較的有意と判断された16 non-MHC SNPs: IL2RA

(CD25)第1イントロンrs12722489 Cアレル ($p=2.96 \times 10^{-8}$)とrs2104286 Tアレル ($p=2.16 \times 10^{-7}$)、IL7RA (CD127)第6エクソンのアミノ酸置換(T244I)を伴うrs6897932 Cアレル

($p=2.94 \times 10^{-7}$), KIAA0350 (CLEC16A) rs6498169 Gアレル ($p=3.83 \times 10^{-6}$), CD58 rs12044852 Cアレル ($p=1.90 \times 10^{-5}$)などを検出した(表)。IL2RAはI型糖尿病やバセドウ病との連関が報告されている。種々の自己免疫疾患でCD4⁺CD25^{high}制御性T細胞の機能不全を認める。抗IL2RA抗体(rituximab)はMSで臨床試験中である。3つの候補遺伝子解析研究でも、IL7RAとMSの連関が報告されている。IL-7はメ

モリーT細胞プールの維持や $\gamma\delta$ T細胞の分化に重要なサイトカインである。IL7RA T244Iバリエントは可溶型と膜型受容体の構成比に関与し、I型糖尿病発症との連関が報告されている。本研究では、初めてnon-MHC SNPsとMSリスクとの連関を証明できた点に意義がある。

佐藤 準一(明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス教授)

表 ● GWA解析で同定したMSリスクSNPとアレル

No.	染色体	遺伝子	一塩基多型 (SNP)	リスクアレル	リスクアレル頻度	スクリーニング試験				確認試験		統合データ		アレル層別解析	
						931家系トリオの患者と両親の比較		931家系トリオ患者と2,431コントロールの比較		2,322患者・609家系トリオと2,987コントロールの比較		全サンプル		DRB1*1501 陽性者(n=531)	DRB1*1501 陰性者(n=400)
						p値	オッズ比 (95%信頼区間)	p値	オッズ比 (95%信頼区間)	p値	オッズ比 (95%信頼区間)	p値	オッズ比 (95%信頼区間)		
1	6p21	HLA-DRA	rs3135388	A	0.23							8.94×10 ⁻⁸¹	1.99 (1.84,2.15)		
2	10p15	IL2RA	rs12722489	C	0.85	1.28×10 ⁻³	1.35 (1.13-1.62)	9.61×10 ⁻⁴	1.30 (1.11-1.52)	4.56×10 ⁻⁴	1.19 (1.08-1.31)	2.96×10 ⁻⁸	1.25 (1.16-1.36)	8.50×10 ⁻³	6.19×10 ⁻²
3	10p15	IL2RA	rs2104286	T	0.75	3.25×10 ⁻³	1.26 (1.08-1.47)	2.85×10 ⁻⁴	1.26 (1.11-1.43)	1.49×10 ⁻⁴	1.16 (1.08-1.25)	2.16×10 ⁻⁷	1.19 (1.11-1.26)	3.19×10 ⁻²	4.44×10 ⁻²
4	5p13	IL7RA	rs6897932	C	0.75	5.78×10 ⁻³	1.24 (1.07-1.44)	1.65×10 ⁻²	1.17 (1.03-1.32)	2.75×10 ⁻⁵	1.18 (1.09-1.27)	2.94×10 ⁻⁷	1.18 (1.11-1.26)	1.17×10 ⁻¹	1.53×10 ⁻²
5	16p13	CLEC16A	rs6498169	G	0.37	2.90×10 ⁻²	1.16 (1.02-1.33)	6.51×10 ⁻³	1.17 (1.04-1.31)	1.89×10 ⁻⁵	1.16 (1.09-1.24)	3.83×10 ⁻⁶	1.14 (1.08-1.21)	9.50×10 ⁻²	1.60×10 ⁻¹
6	1p22	RPL5	rs6604026	C	0.29	4.45×10 ⁻⁴	1.29 (1.11-1.50)	2.34×10 ⁻⁴	1.25 (1.11-1.40)	9.59×10 ⁻⁴	1.13 (1.05-1.22)	7.94×10 ⁻⁶	1.15 (1.08-1.22)	2.06×10 ⁻²	7.42×10 ⁻³
7	9q33	DBCF1	rs10984447	A	0.77	1.18×10 ⁻⁴	1.36 (1.16-1.59)	2.13×10 ⁻¹	1.09 (0.95-1.24)	1.27×10 ⁻³	1.14 (1.05-1.24)	8.46×10 ⁻⁶	1.17 (1.09-1.25)	2.07×10 ⁻⁴	1.23×10 ⁻¹
8	1p13	CD58	rs12044852	C	0.92	9.71×10 ⁻⁴	1.48 (1.17-1.87)	3.01×10 ⁻⁵	1.54 (1.26-1.89)	2.06×10 ⁻³	1.20 (1.07-1.35)	1.90×10 ⁻⁶	1.24 (1.12-1.37)	4.52×10 ⁻⁴	3.57×10 ⁻¹
9	2q23	ALK	rs7577363	A	0.03	1.14×10 ⁻⁴	2.14 (1.43-3.20)	1.21×10 ⁻²	1.44 (1.08-1.92)	3.15×10 ⁻³	1.34 (1.11-1.62)	7.37×10 ⁻⁶	1.37 (1.17-1.61)	9.22×10 ⁻⁴	1.38×10 ⁻¹
10	1p22	FAM69A	rs7536563	A	0.38	2.53×10 ⁻⁵	1.34 (1.16-1.55)	2.48×10 ⁻²	1.14 (1.02-1.27)	2.17×10 ⁻³	1.08 (1.01-1.16)	9.12×10 ⁻⁵	1.12 (1.06-1.18)	5.09×10 ⁻⁴	1.39×10 ⁻¹
11	1p22	FAM69A	rs11164838	C	0.57	6.01×10 ⁻⁵	1.32 (1.15-1.52)	3.28×10 ⁻³	1.18 (1.06-1.32)	1.30×10 ⁻²	1.09 (1.02-1.16)	1.91×10 ⁻⁴	1.11 (1.05-1.18)	3.56×10 ⁻⁴	4.23×10 ⁻²
12	9p24	ANKRD15	rs10975200	G	0.18	8.05×10 ⁻³	1.26 (1.06-1.50)	9.95×10 ⁻⁶	1.37 (1.19-1.58)	2.12×10 ⁻²	1.11 (1.02-1.21)	3.23×10 ⁻⁴	1.14 (1.06-1.23)	1.62×10 ⁻¹	1.62×10 ⁻²
13	1p22	EV15	rs10735781	G	0.38	2.21×10 ⁻⁴	1.29 (1.12-1.50)	6.05×10 ⁻³	1.17 (1.05-1.30)	2.01×10 ⁻³	1.08 (1.01-1.16)	3.35×10 ⁻⁴	1.11 (1.05-1.18)	1.93×10 ⁻²	3.33×10 ⁻³
14	1p22	EV15	rs6680578	T	0.38	3.46×10 ⁻⁴	1.29 (1.11-1.49)	4.88×10 ⁻³	1.17 (1.05-1.31)	1.66×10 ⁻³	1.09 (1.01-1.16)	5.00×10 ⁻⁴	1.11 (1.04-1.17)	2.19×10 ⁻²	4.21×10 ⁻³
15	12p13	KLRB1	rs4763855	A	0.38	4.55×10 ⁻³	1.15 (1.00-1.32)	2.16×10 ⁻³	1.19 (1.07-1.33)	1.83×10 ⁻²	1.09 (1.01-1.16)	6.85×10 ⁻⁴	1.10 (1.04-1.17)	2.61×10 ⁻¹	7.65×10 ⁻²
16	3q13	CBLB	rs12487066	T	0.73	7.65×10 ⁻³	1.22 (1.05-1.41)	4.09×10 ⁻⁵	1.29 (1.14-1.46)	3.53×10 ⁻²	1.08 (1.00-1.16)	5.43×10 ⁻³	1.09 (1.03-1.16)	1.14×10 ⁻¹	2.32×10 ⁻²
17	1p31	PDE4B	rs1321172	C	0.49	8.77×10 ⁻²	1.12 (0.98-1.27)	9.57×10 ⁻³	1.15 (1.04-1.28)	3.95×10 ⁻²	1.07 (1.01-1.14)	6.06×10 ⁻³	1.08 (1.02-1.14)	2.36×10 ⁻¹	2.16×10 ⁻¹

Remark

日本人MSには適応が難しい

佐藤 準一

多因子疾患は、複数の遺伝子変異と環境因子の相互作用により発症が規定される。個々の疾患関連遺伝子多型(SNP)は単独では浸透率が低く、発症を誘導しない。しかしこのようなSNPsと環境因子が複数共存すると、疾患としての表現型(phenotype)が誘導される。従来の研究では、罹患者を2人以上有する家系(罹患同胞対など)を多数収集し、マイクロサテライトマーカー(全ゲノムで数万個)を指標に候補遺伝子座(ロッドスコア>3.0)を同定する連鎖解析(linkage analysis)が主流であったが、多数の家系が必要で検出感度が低かった。SNP(対立遺伝子の頻度の低いアレルの頻度が1%以上)はゲノム上に高密度に存在(全ゲノムで数百万個)し、マイクロアレイが普及してハイスループットスクリーニングが可能となり、ゲノムワイ

ドの関連解析が容易となった。本研究ではヨーロッパ系非ヒスパニック白人MSと健常者の膨大なサンプルで統計学的検出力を高めてGWA解析を行い、IL2RA, IL7RAのSNPとMSの連関を見いだした。しかし同定された個々のnon-MHC SNPsはp値が高く、関与は軽微と判断された。

MSは再発を反復し、多巣性病巣を認める中枢神経系炎症性脱髄疾患と定義されるが、不均一な病因に起因する疾患群と考えられる。本研究ではRRMS, SPMS, PPMS, CIS(MRIで視神経・脊髄・脳幹・小脳に2病巣以上)を一括してMSとしたが、これらが同一のgenetic backgroundを有するというエビデンスはない。また抗AQP4抗体を測定していないため、neuromyelitis optica(NMO)混入の可能性を否定できない。したがってサブグループ別のGWA解析が必要となる。またSNPアレル頻度の人種差(ethnic differences)を考慮すると、本研究の結果は日本人MSには適応困難と思われる。

総説

特集：ヒト免疫疾患研究の新展開—From clinic to bench

多発性硬化症病変分子のネットワーク解析

佐藤 準一

Molecular Network Analysis of Multiple Sclerosis Brain Lesion Proteome

Jun-ichi SATOH

Department of Bioinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan

(Received April 4, 2010)

summary

A recent proteomics study of multiple sclerosis (MS) brain lesion-specific proteome profiling clearly revealed a pivotal role of coagulation cascade proteins in chronic active demyelination (Han MH et al. *Nature* 451 : 1076-1081, 2008). However, among thousands of proteins identified, nearly all of remaining proteins were left behind to be characterized in terms of their implications in MS brain lesion development. By the systems biology approach using four different pathway analysis tools of bioinformatics, we studied molecular networks and pathways of the proteome dataset of acute plaque (AP), chronic active plaque (CAP), and chronic plaque (CP). The database search on KEGG and PANTHER indicated the relevance of extracellular matrix (ECM)-mediated focal adhesion and integrin signaling to CAP and CP proteome. IPA identified the network constructed with a wide range of ECM components as one of the networks highly relevant to CAP proteome. KeyMolnet disclosed a central role of the complex interaction among diverse cytokine signaling pathways in brain lesion development at all disease stages, as well as a role of integrin signaling in CAP and CP. Although four distinct platforms produced diverse results, they commonly suggested a role of ECM and integrin signaling in development of chronic lesions of MS. These observations indicate that the selective blockade of the interaction between ECM and integrins would be a rational approach for designing inhibitors of chronic inflammatory demyelination in MS brain lesions.

Key words—KeyMolnet; molecular network; multiple sclerosis; proteome; systems biology

抄録

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す難病である。MS では、自己反応性 Th1 細胞や Th17 細胞が血液脳関門を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクローファージやミクログリアを活性化して、脱髄を惹起する。炎症が遷延化すると軸索傷害を来して不可逆的機能障害が残存する。現在まで、髄鞘や軸索の再生に有効な治療薬は開発されていない。最近、MS 脳病巣の網羅的プロテオーム解析データが報告された (Han MH et al. *Nature* 451 : 1076-1081, 2008)。Han らはステージを確認した病巣から laser microdissection で分離したサンプルを質量分析で解析して、4324 種類のタンパク質を同定した。彼らは慢性活動性脱髄巣 (chronic active plaque ; CAP) における血液凝固系の亢進を見出し、抗凝固薬を用いて MS 動物モデル自己免疫性脳脊髄炎の治療に成功した。しかしながら、凝固系以外の多くのタンパク質に関しては、MS 脳分子病態における意義は明らかではない。われわれは、Han らのデータセットを分子ネットワーク解析ツール KEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnet を用いて再解析し、MS 脳病巣プロテオームの主要分子ネットワークを調べた。その結果、CAP における extracellular matrix (ECM)-integrin ネットワークの中心的役割を発見した。すなわちシステム生物学の観点からは、ECM-integrin シグナル伝達系は、MS における炎症性脱髄遷延化抑制のための創薬標的のパスウェイとなる可能性がある。

1. はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis ; MS) は、中枢

神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、様々な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。MS では、遺伝的要因と環境因子の複雑な相互作用を背景に出現した活性化自己反応性 Th1 細胞や Th17 細胞が、血液脳関門 (blood-brain barrier ; BBB) を

通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化して、TNF α などの proinflammatory mediator の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている¹⁾。回復期には髄鞘再生を認めるが、炎症が遷延化すると軸索傷害を来して不可逆的機能障害が残存する。MS では、急性増悪期に 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。しかし IFN β に対する nonresponder や副作用のため投与出来ない症例も存在する。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) に分類され、病理学的には T 細胞浸潤、抗体沈着、オリゴデンドロサイトアポトーシスの所見により 4 型に分類されており、このような不均一性 (heterogeneity) の存在も治療難航の一因となっている²⁾。現在まで、髄鞘や軸索の再生を促進する治療薬はなく、新規の標的分子に対する画期的な創薬が待望されている。

2003 年に全ヒトゲノムの解読が完了し、個々の細胞における全遺伝子やタンパク質の発現情報をルーチンに解析可能なポストゲノム時代が到来し、創薬研究の中心はゲノム創薬へとパラダイムシフトした。このようなオミックス研究により、癌や神経難病の診断バイオマーカーや治療標的分子が次々明らかにされた。さらに薬理ゲノミクスの分野は急成長を遂げ、薬物応答性個人差をある程度予測可能となり、テーラメド医療 (personalized medicine) の樹立に道が開かれた。またシステム生物学 (systems biology) の観点からは、ヒトは大規模な分子ネットワークで精密に構築された複雑系であり、多くの難病がシステムの持つロバストネスの破綻に起因すると考えられている³⁾。従って難病の病態解明のためには、オミックス解析に直結したゲノムワイドの分子ネットワーク解析が必須の研究手段となりつつある⁴⁾。

最近、MS 脳病巣の網羅的プロテオーム解析データが報告された⁵⁾。この研究では、種々のステージの MS 脳病巣から 4324 種類のタンパク質を同定した。彼らはその中から慢性活動性脱髄巣における血液凝固系の亢進を見出した。その所見に基づき、抗凝固薬を用いて、MS 動物モデルである自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomye-

litis ; EAE) の治療に成功し、膨大なプロテオミクスデータから新規創薬標的候補を同定出来た。しかしながら、大多数を占める凝固系以外のタンパク質に関しては、MS 脳分子病態における意義は明らかされていない。われわれは彼らのデータセットを利用して、分子ネットワーク解析ツール KEGG, Panther, KeyMolnet, IPA を用いて再解析し、MS 脳病巣プロテオームの主要分子ネットワークを調べ、システム生物学の観点から創薬標的の探索を試みた⁶⁾。

II. MS 脳病巣の網羅的プロテオーム解析

2008 年、Han らは 6 例の MS 凍結脳を用いて、病理学的にステージを確認した脳病巣から laser microdissection で採取したサンプルを SDS-PAGE で分離後に、タンパク質を抽出し、トリプシン消化ペプチド断片を質量分析で解析した⁵⁾。ステージは、炎症性細胞浸潤と浮腫を主徴とする急性脱髄巣 (active plaque ; AP), 脱髄巣辺縁部に炎症が局限している慢性活動性脱髄巣 (chronic active plaque ; CAP), 炎症所見に乏しくアストログリアの瘢痕形成を主徴とする慢性非活動性脱髄巣 (chronic plaque ; CP) に分類した。同時に 2 例の健常脳に関しても質量分析で解析した。その結果、AP から 1082, CAP から 1728, CP から 1514, 合計 4324 種類のタンパク質を同定した。さらに INTERSECT プログラムを用いて、健常脳では検出されずかつステージ特異的なタンパク質を選び出し、AP 158, CAP 416, CP 236 種類のタンパク質データを公開した。彼らは PROTEOME-3D を用いてアノテーションを調べた結果、CAP において血液凝固系タンパク質 protein C inhibitor, tissue factor, thrombospondin 1, fibronectin 1, vitronectin の発現を認めた。この所見に基づいて、抗凝固薬である thrombin inhibitor hirudin および activated protein C を用いて、MS 動物モデルである PLP139-151 ペプチド誘導性 SJL/J マウス EAE を治療した。どちらの抗凝固薬も、脾細胞やリンパ節細胞の増殖と IL-17, TNF α 産生を抑制した。以上の結果より、血液凝固系タンパク質は新規創薬標的分子となることが明らかになった。しかしながらどのような経緯で、膨大なプロテオミクスデータから上記 5 種類のタンパク質を選出し、焦点を絞ったのかに関しては記載がない。また大多数を占める凝固系以外のタンパク質に関しては、MS 脳分子病態における意義は明らかされていない。

III. MS 脳病巣プロテオームデータの分子ネットワーク解析

生体では、タンパク質は複雑なシステムを構築しているため、病態の解明には個々のタンパク質の機能解析のみならず、タンパク質が構築する分子ネットワークやパスウェイの同定も重要である。タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction; PPI) には、単純な直接的結合関係のみならず、活性化、抑制、運搬、酵素反応、複合体形成など多彩な相互作用様式が存在する。複雑多岐のオミックスデータに関連している分子ネットワークを解析するためには、精査された文献情報に裏付けられた専用の解析ツールを使う必要がある。すなわち、膨大な文献情報から様々な分子間相互作用を抽出し、信頼性の高い知識を整理してコンテンツとして収録したデータベース (knowledgebase) を利用して、既知のどのネットワークやパスウェイに最も高い類似性を呈しているかについて調べる方法である。Web 上でフリーに利用出来る代表的な knowledgebase としては、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (www.kegg.jp)⁷⁾, the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) classification system (www.pantherdb.org)⁸⁾, Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) (string.embl.de)⁹⁾ などがある。特に KEGG と PANTHER は、curator と呼ばれる専門家によって精査された遺伝子や代謝物などの情報を統合しており、2010年4月現在、KEGG PATHWAY には 352 reference pathways から構成される 104,520 パスウェイが登録されており、search objects in pathways ボックスに目的分子の KEGG ID を入力することにより、該当するパスウェイを検索出来る。PANTHER では reference set との比較により、類似性に関する統計学的有意差を多重検定で評価出来る。STRING では KEGG, HPRD, BIND, IntAct の情報も統合して収録しており、PubMed アブストラクトからは自然言語処理 (natural language processing) によるテキストマイニングを介して、分子間相互作用に関する情報を収集している。有償ツールとしては、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA) (www.ingenuity.com) や KeyMolnet (Institute of Medicinal Molecular Design, Tokyo) (www.immd.co.jp) などがある。どちらも専門家

が精選された文献を精読して、信頼性の高い分子間相互作用に関する情報を収集しており、定期的にアップデートされている。KeyMolnet は日本語入力にも対応しており、結合・発現制御・複合体形成を包括的に調べる周辺検索 (neighboring search), 発現制御に関与する転写因子群を調べる共通上流検索 (common upstream search), 始点と終点間のネットワークを調べる始点終点検索 (N-points to N-points search), 複数の端点を始点として、最多数の始点を含む最小の分子ネットワークを調べる相互関係検索 (interrelation search) を、検索法として選択出来る¹⁰⁾。

著者らは、Han らの MS 脳病巣 AP 158, CAP 416, CP 236 プロテオームデータ⁵⁾ に該当する UniProt ID を、Entrez Gene ID および KEGG ID に変換して、KEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnet に入力し、それぞれのステージ特異的プロテオームデータを最も良く反映している分子ネットワークを同定した⁶⁾。ID 変換には UniProt (www.uniprot.org) と KEGG Identifiers を用いたが、DAVID Bioinformatics Resources (david.abcc.ncifcrf.gov)¹¹⁾ の Gene ID conversion ツールを利用しても、Entrez Gene ID への一括変換は容易に行える。なお DAVID はプロテオミクスデータのアノテーション解析の際にも非常に有用なツールである¹²⁾。

KEGG による解析では、CAP プロテオームと focal adhesion (hsa04510), cell communication (hsa01430), ECM-receptor interaction (hsa04512), CP プロテオームと focal adhesion (hsa04510) との関連性が示唆された。CAP プロテオームの focal adhesion (hsa04510) は、COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, LAMA1, MYLK, SHC3, PPP1CA, PARVA, PRKCB1, MYL7, RAC3, SPP1, SRC, THBS1, VTN から構成され、CP プロテオームの focal adhesion (hsa04510) は、COL4A2, COL6A1, CRK, FYN, ITGA6, LAMB2, LAMC1, PIK3CA, ZYX から構成されていた。PANTHER による解析では、CAP プロテオームと inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway ($p=2.63E-03$), integrin signaling pathway ($p=3.55E-03$) (図 1), CP プロテオームと integrin signaling pathway ($p=4.33E-02$) との関連性が検出された。すなわち KEGG と PANTHER の解析から、MS 慢性病巣における ECM-integrin シグナル伝達系の中心的役割