

図1 PANTHERによるMS脳病巣CAPプロテオームの分子ネットワーク解析

MS脳病巣CAPプロテオームのPANTHERによる解析では、integrin signaling pathwayとの関連性が示唆された ( $p=3.55E-03$ )。Reference pathway上の分子とヒットしたタンパク質を濃いシャドウで示す。Focal adhesion kinase (FAK)が、ネットワークのハブ(矢印)となることがわかる。文献6)より改変。

が示唆された。KEGGとPANTHERの解析では、APプロテオームと密接に関連するパスウェイは検出されなかった。

一方IPA core analysisによる解析では、APプロテオームはcellular assembly and organization, cancer, and cellular movement ( $p=1.00E-49$ )、CAPプロテオームはdermatological diseases and conditions, connective tissue disorders, and inflammatory disease ( $p=1.00E-47$ )、lipid metabolism, molecular transport, and small molecule biochemistry ( $p=1.00E-47$ )、CPプロテオームはcell cycle, cell morphology, and cell-to-cell signaling and interaction ( $p=1.00E-50$ )との関連性を認めた。CAPプロテオームのdermatological diseases and conditions, connective tissue disorders, and inflammatory diseaseネットワークは、BGN, CHI3L1, CNN2, COL1A1, COL1A2, COL6A2, COL6A3, CXCL11, ENTPD1, ERK, FBLN2, FERMT2, FN1, GBP1, HSPG2, Ifn gamma, INPP5D, Integrin, LAMA1, LUM, Mlc, MYL7, MYL6B, NES, P4HA1, Pak, PARVA, POSTN, PRELP, SERPINA5, SERPINH1, Tgf beta, TGFBR3, THBS1, VTNから構成されており、ECM-integrin相互作用の関与を強く示唆している。最後にKeyMolnetに収録されているMS関連

75分子を始点、ステージ特異的プロテオームの各分子を終点として、最短経路で始点終点検索を施行したところ、非常に複雑な分子ネットワークが抽出された<sup>6)</sup>。APプロテオームはIL-4 signaling pathway ( $p=1.79E-13$ )、CAPプロテオームはPI3K signaling pathway ( $p=7.25E-18$ )、CPプロテオームはIL-4 signaling pathway ( $p=1.04E-16$ )と最も密接に関連していた。またCAPとCPはintegrin signaling pathwayとの関連性も認め ( $p=2.13E-12$  および  $p=2.57E-12$ )、他にも様々なサイトカインシグナル伝達系との関連性も見られた。

#### IV. MS脳病巣プロテオームネットワークの創薬標的分子

上述のように、MS脳病巣網羅的プロテオームデータセット<sup>9)</sup>に関して、4種類の異なる分子ネットワーク解析ツールKEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnetは、様々な独自の分子ネットワークを抽出したが、共通してCAP, CPにおけるECM-integrinシグナル伝達系の中心的役割が示唆された<sup>6)</sup>。さらにCAPプロテオームデータをSTRINGで解析したところ、描画された複雑な分子ネットワーク中に、ECMのクラスターを同定することが出来た(図2)。

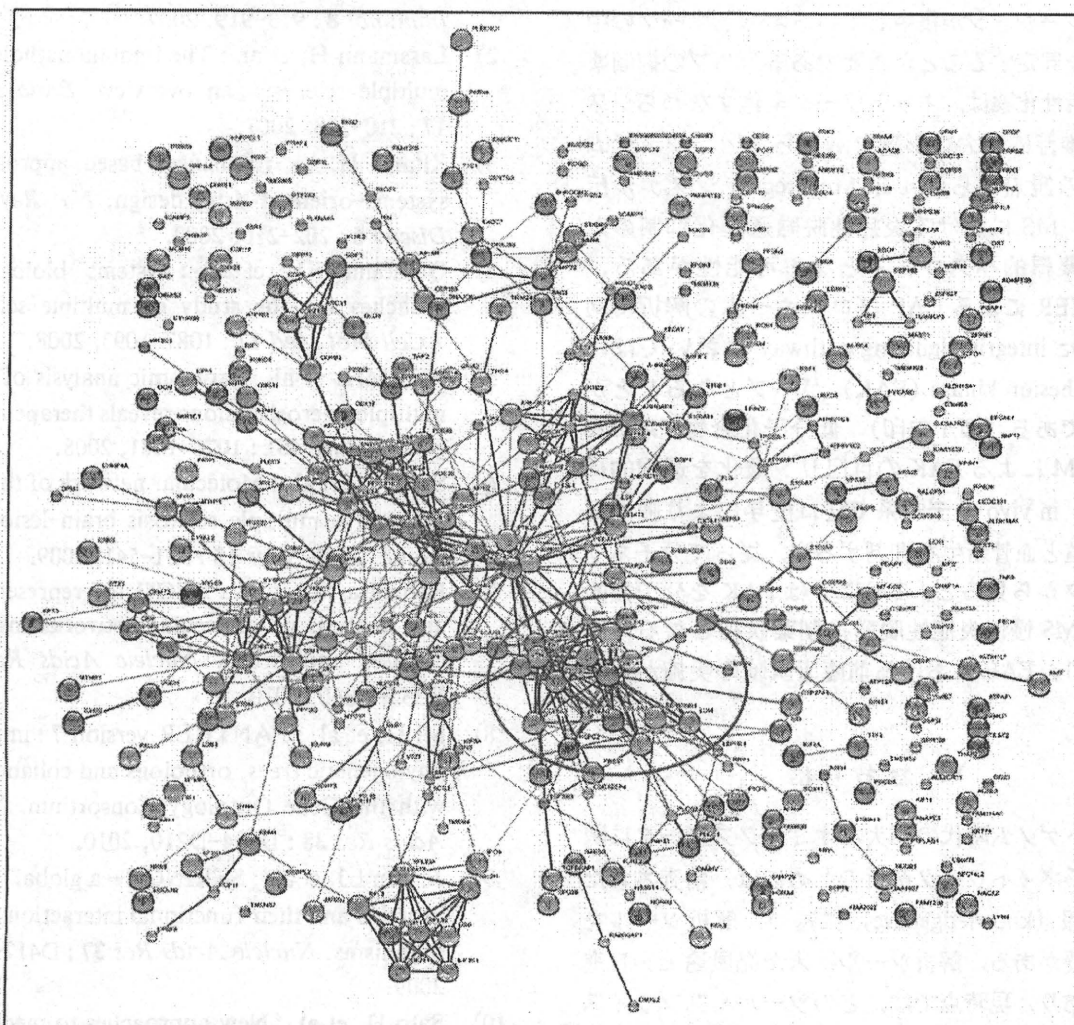


図2 STRINGによるMS脳病巣CAPプロテオームの分子ネットワーク解析

MS脳病巣CAPプロテオームのSTRINGによる解析では、複雑な分子ネットワーク中にECMのクラスター(赤楕円)が存在するのがわかる。

Integrinは複数の $\alpha$ ,  $\beta$ サブユニットから構成される24種類のヘテロダイマータンパク質であり、細胞外基質ECMのリガンドである。例えば $\beta 1$  integrinファミリーはcollagen, fibronectin, lamininと結合し、 $\alpha v$  integrinファミリーはvitronectinと結合する。細胞骨格動態制御を介する細胞の接着、遊走、分化、増殖には、ECM-integrin間の相互作用を介するoutside-in, inside-outシグナルが必須である<sup>13)</sup>。MS脳病巣に集積を認めたfibronectinやvitronectinは、主として破綻したBBBを通過して脳実質に浸透した血漿成分に由来する。ECM, integrinが著増している慢性病巣において髄鞘や軸索の再生が乏しい理由として、グリア瘢痕に含まれているECMタンパク質が再生阻害因子として働く可能性や、活性化マクロファージやミクログリアが産生

する種々のタンパク質分解酵素がECMに結合して長期に保持され、髄鞘崩壊が遷延化している可能性が挙げられている<sup>14,15)</sup>。またECM-integrin間の相互作用は、リンパ球のホーミングや血管外遊出、アストログリア・ミクログリアの活性化、オリゴデンドログリア前駆細胞の分化の抑制を介して、脱髄と軸索傷害を増強する<sup>16,17)</sup>。

MSにおける臨床試験では、 $\alpha 4 \beta 1$  integrin (VLA4)に対するヒト化モノクローナル抗体natalizumabが再発抑制に著効を呈した。しかしながら、natalizumabは進行性多巣性白質脳症(progressive multifocal leukoencephalopathy; PML)を惹起するので、より安全な治療薬の登場が待望されている<sup>18)</sup>。分子ネットワークから創薬標的分子を探索する場合は、ハブ(hub)と呼ばれる、多くの分子が

らのリレーションが集中しているネットワークの中心分子を同定することが重要である。ハブの抑制薬または活性化薬は、ネットワーク全体すなわちシステムの維持に多大な影響をもたらす<sup>19)</sup>。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パスウェイとなる可能性がある。PANTHER による CAP プロテオームの解析で同定された integrin signaling pathway においては、focal adhesion kinase (FAK) がハブとなることが明らかである (図 1 矢印)。低分子化合物 TAE226 は、ECM による FAK の自己リン酸化を選択的に抑制し、in vivo モデル系で経口投与により腫瘍細胞の増殖と血管新生を抑制する<sup>20)</sup>。従って分子ネットワークから見ると、TAE226 は FAK を分子標的とする MS 慢性炎症性脱髄抑制薬候補となる可能性があり、EAE における前臨床試験の実施が待たれる。

## V. おわりに

ポストゲノム時代の膨大なオミックスデータに関する分子ネットワーク解析のためには、精査された文献情報 (knowledgebase) に基づく解析ツールを使う必要がある。解析ツールは未だ発展途上・日進日歩であり、現時点では、どのツールもスプライスバリエーションや翻訳後修飾、細胞・組織特異的発現、細胞内局在化、動的な特性に関しては十分対応出来ていない。しかしながら生体をシステムとして捉える見方から、分子ネットワークを解析することにより、初めて論理的な仮説に裏付けられた創薬標的分子・分子ネットワークを効率的に同定することが出来る。

謝 辞：本稿で紹介した研究は、国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部山村隆部長、明治薬科大学バイオインフォマティクス天竺桂弘子助教との共同研究でなされ、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業明治薬科大学ハイテクリサーチセンター研究事業 (S0801043) と厚生労働科学難治性疾患克服研究事業 (H21-難治一般-201) の補助を受けた。

## 文 献

- 1) McFarland HF, Martin R. : Multiple sclerosis : a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 8 : 913-919, 2007.
- 2) Lassmann H, et al. : The immunopathology of multiple sclerosis : an overview. *Brain Pathol* 17 : 210-218, 2007.
- 3) Kitano H. : A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nat Rev Drug Discov* 6 : 202-210, 2007.
- 4) Quintana FJ, et al. : Systems biology approaches for the study of multiple sclerosis. *J Cell Mol Med* 12 : 1087-1093, 2008.
- 5) Han MH, et al. : Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 451 : 1076-1081, 2008.
- 6) Satoh JI, et al. : Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain-lesion proteome. *Mult Scler* 15 : 531-541, 2009.
- 7) Kanehisa M, et al. : KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* 38 : D355-D360, 2010.
- 8) Mi H, et al. : PANTHER version 7 : improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res* 38 : D204-D210, 2010.
- 9) Jensen LJ, et al. : STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* 37 : D412-D416, 2009.
- 10) Sato H, et al. : New approaches to mechanism analysis for drug discovery using DNA microarray data combined with KeyMolnet. *Curr Drug Discov Technol* 2 : 89-98, 2005.
- 11) Huang da W, et al. : Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4 : 44-57, 2009.
- 12) Satoh J, et al. : Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35 : 16-35, 2009.
- 13) Luo BH, et al. : Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 25 : 619-647, 2007.
- 14) Sobel RA. : The extracellular matrix in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 57 : 205-217, 1998.
- 15) van Horssen J, et al. : The extracellular matrix in multiple sclerosis pathology. *J Neurochem* 103 : 1293-1301, 2007.
- 16) Sisková Z, et al. : Fibronectin impedes "myelin" sheet-directed flow in oligodendrocytes : a

- role for a beta 1 integrin-mediated PKC signaling pathway in vesicular trafficking. *Mol Cell Neurosci* 33 : 150-159, 2006.
- 17) Milner R, et al. : Fibronectin- and vitronectin-induced microglial activation and matrix metalloproteinase-9 expression is mediated by integrins  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$ . *J Immunol* 178 : 8158-67, 2007.
- 18) Clifford DB, et al. : Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis : lessons from 28 cases. *Lancet Neurol* 9 : 438-446, 2010.
- 19) Albert R, et al. : Error and attack tolerance of complex networks. *Nature* 406 : 378-382, 2000.
- 20) Liu TJ, et al. : Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 6 : 1357-1367, 2007.

