

201128006A

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

免疫修飾薬による多発性硬化症の  
治療成績向上を実現する探索的研究  
(H21-難治-一般-217)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成24年（2012年）3月

厚生労働科学研究費補助金  
難治性疾患克服研究事業

免疫修飾薬による多発性硬化症の  
治療成績向上を実現する探索的研究  
(H21-難治-一般-217)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成24年（2012年）3月

# 目 次

## I. 総括研究報告

- 免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的研究 P1  
独) 国立精神・神経医療研究センター 山村 隆

## II. 分担研究報告

- OCH 投与によるカニクイザルの免疫応答への影響についての検討 P5  
独) 国立精神・神経医療研究センター 三宅 幸子
- OCH 治療効果判定に有用なヒト末梢血バイオマーカー探索に関する研究 P8  
独) 国立精神・神経医療研究センター 荒浪 利昌
- 『免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的研究』  
NKT 細胞亜群間の炎症に対する機能について：食餌誘導性肥満をモデルとして  
北里大学 岩渕 和也 P10
- 自己免疫制御分子 Semaphorin 4A 高値 MS 末梢血リンパ球の  
遺伝子発現プロファイル解析 P14  
明治薬科大学 佐藤 準一
- 核内転写因子標的医薬の薬効評価研究 P24  
独) 国立精神・神経医療研究センター 大木 伸司
- 多発性硬化症の MRI による定量的経時解析に関する研究 P27  
独) 国立精神・神経医療研究センター 小川 雅文
- 多発性硬化症のMRによる定量的解析に関する研究 P29  
独) 国立精神・神経医療研究センター 佐藤 典子

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P31

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 P35

# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的研究

研究代表者：山村 隆 （独）国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部・部長

多発性硬化症（MS）患者を対象にした早期探索的臨床試験を実施することを目的とする研究である。本研究で扱う新薬OCHは、NCNPで開発された糖脂質医薬である。平成21年度より非臨床試験、GMP原薬合成、OCH製剤化、MSのバイオマーカー探索、臨床試験実施体制の整備等を進めた結果、平成24年2月にはPMDAとの対面助言を終了し、医師主導でFirst in Human試験を実施する準備をほぼ完了した。OCHはNCNPの保有する物質特許が内外で成立し、コンプライアンスに優れる経口薬で、自己免疫疾患動物モデルで顕著な有効性が確認されている。最終年度には霊長類（カニクイザル）におけるOCH経口投与の細胞性免疫抑制効果を確認した他、新しく導入したフローサイトメーター解析システムによる患者病態評価法を確立した。

研究分担者

小川雅文 （独）国立精神・神経医療研究センター・医長  
佐藤典子 （独）国立精神・神経医療研究センター・部長  
中林哲夫 （独）国立精神・神経医療研究センター・室長（H23.9.30まで）  
立石智則 （独）国立精神・神経医療研究センター・室長（H23.10.1より）  
三宅幸子 （独）国立精神・神経医療研究センター・室長  
岩淵和也 北里大学・教授  
大木伸司 （独）国立精神・神経医療研究センター・室長  
荒浪利昌 （独）国立精神・神経医療研究センター・室長  
佐藤準一 明治薬科・教授  
案浦洋一 アスビオファーマ株式会社・化学ファカルティ長

されている。企業が開発中の薬剤は主に分子標的医薬または免疫抑制剤に属し、重症感染（PMLなど）や癌を発症するリスクがある。また最近フィンゴリモードと $\beta$ 遮断薬およびCa拮抗薬の併用による死亡例が報告され、高リスクのある薬剤であることが懸念されている。本研究の目的は、医療スーパー特区を活用することによって国産のMS治療薬OCHをMSの新規経口薬として開発することである。本開発研究の中核となる薬剤OCHは、申請者らが発見した糖脂質医薬で、NKT細胞の免疫修飾効果を誘導する機序をもった経口薬である（Nature 413:531, 2001; JCI 113:1631, 2004; Curr Med Chem 15:2337, 2008）。

B. 研究方法

カニクイザルにおけるOCH薬効確認：雄カニクイザル（4匹/群）に破傷風トキソイド（Tetanus toxoid:TTx）を感作し、21日後に遅延型過敏症（Delayed-type hypersensitivity response: DTH）を誘導した。OCH（100 mg/kg）を連日経口投与し、一般状態、体重への影響について調べた。DTHについては、24時間後、48時間後、72時間後に発赤面積の測定をおこなった。末梢血単核球細胞をTTx存在下に培養し、増殖反応、サイトカイン（IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ）をELISA法にて測定した。

フローサイトメーター解析：ヒトおよびカニクイザルのリンパ球亜分画変化を、末梢血リンパ球の6色フローサイトメーター解析によって実施

A. 研究目的

アカデミア発の多発性硬化症（MS）医薬を、医師主導治験によって実用化するための、研究を進めることが本研究の目的である。MSは若年で発症する慢性難治疾患であり、数10年以上に及ぶ長期治療が必要になる。現時点では治療の選択肢は少なく、インターフェロン・ノンレスポnderではステロイドや免疫抑制剤の長期投与を余儀なく

した。Th1 細胞、Th2 細胞、Th17 細胞、NK1 細胞、NK2 細胞の頻度を測定するために、回収した細胞を PMA と Ionomycin でモノニンシン存在下 4 時間刺激し、定法によって IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5、IL-17 産生細胞を細胞内サイトカイン染色により測定した。

MRI 解析：軸位断の FLAIR と T2 強調画像から自動的に容積を測定できるソフト Qbrain を用い、当施設の MS 患者を対象に、脳容積、脳脊髄液の容積、T2 高信号域の容積を定量的に求めた。

(倫理面への配慮)

動物実験は施設の動物実験指針に基づき倫理審査委員会の承認を受けた上で行った。ヒト血液、髄液検体を用いた解析については、国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認を受けて行い、書面による説明と同意を得た上で、採血を行った。

### C. 研究結果

#### 1) GMP 原薬合成:

OCH の GMP 原薬として、1.5 kg の製造を実施し、分析の結果から規格値に適合していることを確認した。分担研究者案浦博士 (アスピオファーマ) が中心となって、合成実施を可能にする製法関連情報の開示を進め、合成は (株) ナードケミカルズにおいて実施した。

#### 2) OCH 製剤化:

OCH 製剤化の検討を北海道医療短期大学に委託した。溶解度および吸収効率に優れる顆粒製剤の製造法を確立した。

#### 3) 臨床試験体制整備:

NCNP のトランスレーショナル・メディカル・センター (TMC) の体制整備が進み、プロジェクトマネージャー (PM)、治験関連業務 (プロトコール作成、生物統計など) の担当が決定した。また治験担当専門医師の人事も発令した。

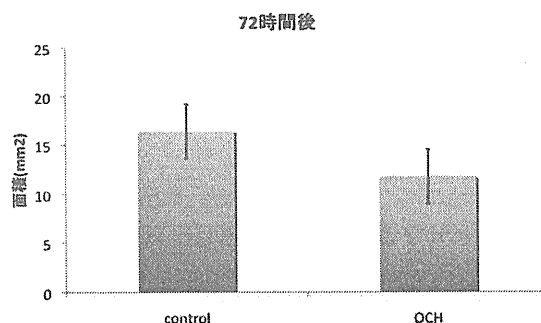
#### 4) 非臨床試験：理化学試験、安全性薬理試験、毒性試験、薬効薬理試験、薬物動態試験、バリデーション試験など、臨床治験実施に必要な試験を (株) 新日本科学に委託した。

#### 5) 霊長類モデルにおける薬効試験:

OCH 投与量、投与プロトコールと、免疫パラメーターの関連について、カニクイザルを用いた検討を実施した。OCH 連日投与により、一般状態は良好、体重については大きな変化はなかった。DTH については、72 時間後における発赤面積において、OCH 投与群で有意な低下が確認された。カニクイザル末梢血単核球細胞を TTx

存在下に培養し、増殖反応を測定したが、OCH 投与群とコントロール群で有意差はみられなかった。また、サイトカイン (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) についても、OCH 投与群とコントロール群で有意差はみられなかった。

カニクイザル細胞性免疫応答 (DTH) の OCH 経口投与による抑制

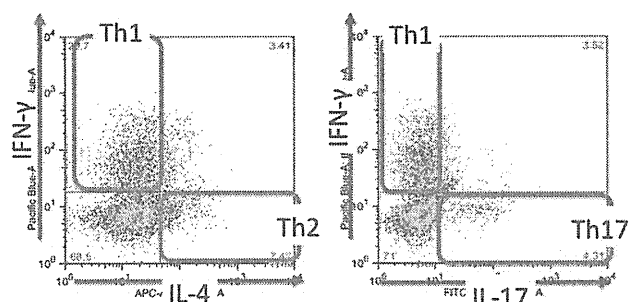


#### 6) OCH 臨床試験に有用なバイオマーカー探索:

患者末梢血 T 細胞の発現する転写因子 NR4A2 が MS の活動性の指標になる可能性を明らかにした (論文準備中)。

T 細胞、NKT 細胞、NK 細胞の末梢血における変動を明らかにするために、高速フローサイトメーターを導入し解析方法を確立した。マルチカラー解析によって 4 種類のケモカイン受容体の発現プロファイルによってリンパ球亜分画の変化を評価する方法、および細胞内サイトカイン染色によって、Th1/Th2/Th17 細胞それぞれの頻度を測定する方法 (下図)、および NK1/NK2 細胞頻度を測定する方法を確立した。

#### Th1/Th2/Th17 細胞頻度の測定



#### 7) 多発性硬化症病態の神経放射線学的アプローチによる評価法研究:

医師主導治験において患者病態評価に貢献する方法論の確立に向けた研究を進めた。NCNP 病

院のMS症例におけるSPECTによる脳血流測定、MRI画像との対比研究、MSの脳容積等の変化の定量的解析手法の検討を進めた。

#### 8) First in Human のプロトコール作成等

平成24年度にはMS患者を対象とするFirst in Human 試験をNCNPで実施するために、OCH治験薬概要書作成、治験プロトコール(原案)作成、プロトコール検討委員会設立などの準備を進め、医薬品機構(PMDA)の薬事戦略相談(対面助言)で患者を対象とする早期探索的臨床試験(以下、早期探索試験)の試験計画概要について合意を得る手続きを進めた、事前面談は平成23年10月に終了し、対面助言は24年2月28日に終了し、プロトコール案が大枠で承認されたところである。

#### D. 考察

早期にPOCを確立するために必要な解析機器の基盤整備、GMP原薬大量合成、製剤安定性試験、医師主導治験推進体制の確立を果たした他、非臨床試験を予定通り完了した。PMDAの薬事戦略相談も順調に進み、最速で平成24年6月にOCHのヒト投与が可能な状態まで研究が進んだ。First in Human 試験の実現可能な段階にまで準備が進んだことから、達成度は95%以上と考えている。

最終年度に得られた大きな成果の一つは、霊長類(カニクイザル)に対するOCH経口投与によって、細胞性免疫(DTH)が有意に抑制されることを証明できたことにある。従来、マウスでの薬効を自己免疫動物モデルで明らかにして来たが、免疫系の種差や系統差の観点から、マウス実験の結果のみではヒトに対するOCHの有効性を確信できる状況にはなかった。しかしカニクイザルに対するOCH3週間経口投与がDTHを有意に抑制した実験結果は、MS患者に対するOCH経口投与が細胞性免疫の関わる疾患MSを抑制する可能性を強く支持する。

今後OCHを国内発のオーファンドラッグとして実用化する道筋としては、早期探索的臨床試験として患者を対象とする医師主導治験を行う、あるいは従来型のフェーズ1試験から開始する、のいずれかが考えられる。主任研究者は早期探索的臨床試験の実施によって、成功の可能性が高まると考えているが、PMDAとの意見交換によって、OCH開発に相応しいプロトコールの最終案が決定されるものと考えている。

#### E. 結論

経口薬OCHは霊長類の細胞性免疫を抑制する薬効があり、MSの新規経口薬として有望な薬剤であることが確認された。3年間の本研究事業の結果、OCHのヒトへの投与を平成24年度中に実施する準備が完了した。

#### F.健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

英文原著

1. Ichikawa, D., T. Yamamura and S. Miyake: Gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) regulates cytoskeletal reorganization through ubiquitination and degradation of Arp2/3-5 and coronin 1A. *J. Biol. Chem.* 2011 Oct Epub ahead of print
2. Chiba, A., R. Tajima, C. Tomi, Y. Miyazaki, T. Yamamura, and S. Miyake: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease of murine models of arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011 Sep 8
3. Miyazaki, Y., S. Miyake, A. Chiba, O. Lantz, and T. Yamamura: Mucosal-associated invariant T cells regulate T helper type 1 response in multiple sclerosis. *Int. Immunol.* 23:332-337, 2011
4. Sanvito, L., A. Tomita, N. Chihara, T. Okamoto, M. Ogawa, B. Gran, T. Aranami, and T. Yamamura: Increase of Ki-67+ natural killer cells in multiple sclerosis patients treated with interferon- $\beta$  and interferon- $\beta$  combined with low-dose oral steroids. *J. Neuroimmunol.* 236: 111-117, 2011
5. Chihara, N., T. Aranami, W. Sato, Y. Miyazaki, S. Miyake, T. Okamoto, M. Ogawa, T. Toda, and T. Yamamura: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in

neuromyelitis optica. *PNAS* 108 : 3701-3706, 2011

6. Chang, Y-J., H. Y. Kim, L. A. Albacker, H.-H. Lee, N. Baumgarth, S. Akira, P. Savage, S. Endo, T. Yamamura, J. Maaskant, N. Kitano, A. Singh, A. Bhatt, G. Besra, P. van den Elzen, B. Appelmelk, R. W. Franck, G. Chen, R. DeKruyff, M. Shimamura, P. Illarionov, and D. Umetsu. Influenza A infection in suckling mice expands a population of NKT cells that protects mice as adults from airway hyperreactivity. *J. Clin. Invest.* 121: 57-69, 2011

7. 三宅幸子, 山村 隆 : 多発性硬化症. 慢性炎症と神経疾患. 実験医学 増刊 慢性炎症-多様な疾患の基盤病態. 29:1658-1664, 2011

## 2. 学会発表 (招待講演のみ)

1. 山村 隆 : 多発性硬化症と消化管免疫. ホットトピックス 2-2. 多発性硬化症の最新の病態と治療. 第52回日本神経学会学術大会. 名古屋, 5.18, 2011
2. 山村 隆 : 中枢神経系自己免疫病態の多様性. 第35回阿蘇シンポジウム “自己免疫疾患 – その病態解明と治療の進歩 – “. 阿蘇リゾートグランヴィリオホテル, 7.30, 2011
3. 山村 隆, 荒浪利昌, 太木伸司, 三宅幸子 : 多発性硬化症 : 自己免疫病仮説の再検証. 6学会合同特別シンポジウム. 免疫疾患のトピックスと将来展望. 東京, 京王プラザホテル, 9.16, 2011

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

発明の名称 : 新規な糖脂質及びこれを有効成分とする自己免疫疾患治療薬 (OCH 物質特許)

発明者 : 山村 隆, 三宅幸子

取得状況 :

ヨーロッパ EP (欧州特許) 査定, 特許証受領  
日本 特許査定, 特許証受領

オーストラリア 特許査定, 特許証受領

韓国 特許査定, 特許証受領

中国 特許査定, 特許証受領

ノルウエー 特許査定, 特許証受領

カナダ特許査定, 特許許可通知受領

アメリカ審査請求中, 公開通知

ブラジル 審査請求中

ブラジル 審査請求中

発明の名称 : 糖脂質誘導体及びその製造法並びに  
それらの合成中間体及びその製造法

発明者 : 案浦洋一, 村田健司, 山村 隆

取得状況 :

中国特許査定, 特許証受領

日本 特許査定, 特許証受領

アメリカ特許査定, 特許証受領

欧州審査請求中

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

○CH投与によるカニクイザルの免疫応答への影響についての検討

研究分担者 三宅 幸子 独) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 室長

**研究要旨**

マウスを中心とした研究で OCH の開発を行ってきたが、OCH の標的である NKT 細胞は、種によってその頻度が著しく異なる。そこで OCH の臨床応用に際し、NKT 細胞数がヒトに近く、霊長類であるカニクイザルを用いて、安全性の確認を行うとともに免疫応答における影響を検討した。単回投与毒性試験における無毒性量は、ICR 系マウスにおいては 0.05mg/kg 未満であったのに対して、ラット及びカニクイザルにおいては 1000mg/kg であった。また、反復投与毒性試験での無毒性量は、マウスにおける 2 週間投与の場合は 0.5mg/kg であったのに対して、カニクイザルの 4 週間投与では 100mg/kg であった。また、カニクイザルにおいて破傷風トキソイドによる遅延型過敏症を検討したところ、OCH 連日投与により 72 時間後における発赤面積において有意に低下しており、霊長類においても OCH が免疫修飾作用を有することが示された。

**A. 研究目的**

OCH の標的である NKT 細胞は、種によってその頻度が著しく異なる。OCH の臨床応用に際し、NKT 細胞数がヒトに近く、霊長類であるカニクイザルを用いて、安全性の確認を行うとともに、免疫応答における影響を検討した。

**B. 研究方法**

ICR 系マウス、ラット及びカニクイザルにおいて単回投与毒性試験ならびに反復投与毒性試験を行った。

雄カニクイザル (4 匹/群) に破傷風トキソイド (Tetanus toxoid:TTx) を感作し、21 日後に遅延型過敏症 (Delayed-type

hypersensitivity response: DTH) を誘導した。OCH (100 mg/kg) を連日経口投与し、一般状態、体重への影響について調べた。DTH については、24 時間後、48 時間後、72 時間後に発赤面積の測定をおこなった。末梢血単核球細胞を TTx 存在下に培養し、増殖反応、サイトカイン (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) を ELISA 法にて測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

**C. 研究結果**

単回投与毒性試験における無毒性量は、ICR

系マウスにおいては0.05mg/kg未満であったのに対して、ラット及びカニクイザルにおいては1000mg/kgであった。また、反復投与毒性試験での無毒性量は、マウスにおける2週間投与の場合は0.5mg/kgであったのに対して、カニクイザルの4週間投与では100mg/kgであった。OCH連日投与により、一般状態は良好、体重については大きな変化はなかった。DTHについては、72時間後における発赤面積において、OCH投与群で有意に低下していた。末梢血単核球細胞をTTx存在下に培養し、増殖反応を測定したが、OCH投与群とコントロール群で有意差はみられなかった。また、サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ )については、OCH投与群とコントロール群で有意差はみられなかった。

#### D. 考察

マウスと比較し、カニクイザルにおける無毒生量は単回投与、反復投与共に著しく高い。これは、カニクイザルにおける自験データでは末梢血におけるNKT細胞の頻度が $0.151 \pm 0.202\%$  (n=15)と、よりヒトに類似していることによると考えられた。

サルとヒト、マウス、ラットのCD1d分子のアミノ酸配列には高い相同性が認められ、マウス及びヒトCD1d分子の結晶解析の結果からこれらCD1d分子の種を超えた3次元構造および糖脂質との結合特性の類似性が示唆されており、OCHは霊長類においてもその作用を発揮しうることが期待されている。OCH連続投与によりDTHが抑制されたことは、霊長類においてもOCHが免疫修飾作用を有することを示しており、意義が大きい。また、連続投与により効果があることが明らかとなり、臨床治験プロトコル作製上有意義な結果が得ら

れた。

#### E. 結論

OCH連続投与によりカニクイザルにおいてDTHが抑制された。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T: Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(9):3701-3706, 2011
- 2) Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, Lantz O, Yamamura T: Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol* 23(9):529-535, 2011
- 3) Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, Yamamura T, Miyake S: Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* 64(1):153-61, 2011
- 4) Ichikawa D, Mizuno M, Yamamura T, Miyake S: Gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) regulates cytoskeletal reorganization through ubiquitination and degradation of Arp2/3-5 and coronin A. *J Biol Chem* 286(50):43465-74, 2011

5) Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, Yamamura T, Koen Vandebroek, Miyake S: A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation. *Arthritis Res Ther* 14(1):R9, 2012

## 2. 学会発表

1) Miyake S. Innate lymphocytes in autoimmune diseases. Autoimmunity Congress Asia. Singapore, 18 November, 2011

2) 三宅幸子 : 自己免疫疾患における MAIT 細胞. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会 6 学会合同特別シンポジウム、東京、9 月 16 日、2011

3) 三宅幸子 : 腸管免疫の視点から: 腸管リンパ球と多発性硬化症. 第 23 回日本神経免疫学会総会、東京、9 月 17 日、2011

4) 千葉麻子、三宅幸子 : マスト細胞の活性阻害を介した関節炎の抑制. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、7. 19, 2011

5) 千葉麻子、田村直人、松平欄、頭山尚子、高崎芳成、山村隆、三宅幸子 : 膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、9. 17, 2011

6) 山村隆、荒浪利昌、大木伸司、三宅幸子、 : 多発性硬化症: 自己免疫病仮説の再検証. 第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会 6 学会合

同特別シンポジウム、東京、9. 16, 2011

7) 林幼偉、三宅幸子、山村隆 : EAE の寛解維持機構: 'armoured' Treg の誘導. 第 23 回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9. 15, 2011

8) 能登大介、三宅幸子、高橋和也、山村隆、山田正仁 : マウス及びヒトにおける末梢血単球からミクログリアへの分化誘導. 第 23 回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9. 17, 2011

9) 富田敦子、佐藤和貴郎、市川大樹、林幼偉、岸田日帯、三宅幸子、小川雅文、岡本智子、村田美穂、黒岩義之、荒浪利昌、山村隆 : メタロプロテイナーゼとオステオポンチンを高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の MS 病態への関与. 第 23 回日本神経免疫学会総会・学術集会、東京、9. 17, 2011

10) 千葉麻子、田村直人、松平欄、高崎芳成、山村隆、三宅幸子 : 膠原病における Mucosal-associated invariant T 細胞の解析. 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、千葉、11. 27, 2011

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- |           |     |
|-----------|-----|
| 1. 特許取得   | なし. |
| 2. 実用新案登録 | なし. |
| 3. その他    | なし. |

## OCH 治療効果判定に有用なヒト末梢血バイオマーカー探索に関する研究

研究分担者 荒浪 利昌 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 室長

### 研究要旨

多発性硬化症（MS）は若年成人に好発し、運動障害や視力障害などの神経症状が再発と寛解を繰り返す慢性疾患である。本研究の目的は、OCH の治療効果判定に有用なバイオマーカーを探索することである。MS 患者或いは健常者から分離した末梢血単核細胞（PBMC）を  $\alpha$ -GalCer ( $\alpha$ -GC) や OCH の存在下および非存在下で培養し、CD4 陽性 T 細胞あるいは NK 細胞に占める IFN- $\gamma$ 、IL-17、IL-4、IL-5、IL-10 産生性細胞の頻度を細胞内サイトカイン染色により測定した。その結果、OCH 存在下で培養することにより、IFN- $\gamma$  産生性 T 細胞の頻度の減少が認められた。一方、 $\alpha$ -GC 存在下ではこのような変化は見られなかった。また、NK 細胞のサイトカイン産生には影響は見られなかった。しかし、健常者と MS で比較すると、MS の NK 細胞は、IFN- $\gamma$  産生性細胞の割合が有意に低く、IL-4 あるいは IL-5 産生性細胞の割合が有意に高いことが判明した。以上より、Th1/Th2/Th17 および NK1/NK2 細胞の頻度の測定は、OCH 治療効果判定のバイオマーカーとして有用であると考えられる。

### A. 研究目的

多発性硬化症（MS）は若年成人に好発し、運動障害や視力障害などの神経症状が再発と寛解を繰り返し、その病態形成には、Th1 細胞や Th17 細胞の関与が想定される自己免疫疾患である。我々はこれまでに、MS 寛解期の末梢血 NK 細胞が IL-5 産生性の type II 偏倚を示し、寛解の維持に関与することを提唱している。そこで、本研究の目的は、T 細胞あるいは NK 細胞のサイトカイン産生細胞の割合の、OCH の治療効果判定に有用なバイオマーカーとしての有用性を評価することである。

### B. 研究方法

対象：健常者 9 名と再発寛解型 MS 患者 10 名である。  
細胞培養：NK 細胞の刺激には、末梢血単核細胞（PBMC）を IL-2 100U/ml 存在下で 7 日間培養した。また、T 細胞の抗原特異的刺激では、PBMC をサイトメガロウイルス抗原タンパク pp65 で 7 日間刺激した。いずれの場合も、コントロール solvent（DMSO）、OCH 或いは  $\alpha$ -galactosyl ceramide ( $\alpha$ GalCer) を同時に加えて培養した。  
フローサイトメトリー：培養 7 日目に細胞を回収し、PMA と Ionomycin で 4 時間刺激して、

細胞内 IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-5、IL-17 を同時に染色した。

### （倫理面への配慮）

本研究においては、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た上で採血を行った。また、患者から得られた情報は、連結可能匿名化の後、国立精神神経センター病院にて厳重に保管されている。以上から、本研究は、倫理面への十分な配慮がなされている研究であると考えられる。

### C. 研究結果

- 1) 試験管内での PBMC における抗原特異的な IFN- $\gamma$  産生性 T 細胞の頻度は、OCH を添加することによって有意に減少することが分かった。一方、 $\alpha$ GalCer 存在下ではその頻度に変化は認められなかった。
- 2) OCH 或いは  $\alpha$ GalCer 存在下で、IFN- $\gamma$ 、IL-4 或いは IL-5 産生性 NK 細胞の頻度に変化は認められなかった。
- 3) MS の NK 細胞では健常者と比較し、IFN- $\gamma$  産生細胞の頻度が低く、特に IL-4、および IL-5 産生細胞の頻度が有意に高いことが分かった。

## D. 考察

当研究部の以前の報告でも、MS の NK 細胞における IL-5 産生の亢進を報告しているが、今回はそれに加えて、IL-4 産生性 NK 細胞の頻度も有意に高く、IFN- $\gamma$  産生 NK 細胞の頻度が有意に低いことが判明した。このことは、MS の NK 細胞における type II 偏倚と考えられる。

## E. 結論

Th1/Th2/Th17 および NK1/NK2 細胞の頻度の測定は、OCH 治療効果判定のバイオマーカーとして有用であると考えられる。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Norio Chihara, Toshimasa Aranami, Wakiro Sato, Yusei Miyazaki, Sachiko Miyake, Tomoko Okamoto, Masafumi Ogawa, Tatsushi Toda and Takashi Yamamura. 2011. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011; 108(9):3701-6.

2) Increase of Ki-67+ natural killer cells in multiple sclerosis patients treated with interferon- $\beta$  and interferon- $\beta$  combined with low-dose oral steroids.

Sanvito L, Tomita A, Chihara N, Okamoto T, Lin Y, Ogawa M, Gran B, Aranami T, Yamamura T.

J Neuroimmunol. 2011 Jul;236(1-2):111-7.

3) 荒浪利昌、「多発性硬化症・視神経脊髄炎に対する免疫療法」細胞工学 Vol. 30, No. 10, p1060-1063, 2011 年 10 月号

### 2. 学会発表

1) Interleukin 6 Signaling Enhances Anti-aquaporin 4 Autoantibody Production

from Plasmablasts in Neuromyelitis Optica. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T, Annual Meeting of Federation of Clinical Immunology Societies, June 24, 2011, Washington DC, USA

2) T Cells Expressing Matrix Metalloproteinase-9 and Osteopontin in Multiple Sclerosis. Wakiro Sato, Atsuko Tomita, Daiju Ichikawa, Youei Lin, Hitaru Kishida, Sachiko Miyake, Masafumi Ogawa, Tomoko Okamoto, Miho Murata, Yoshiyuki Kuroiwa, Toshimasa Aranami, Takashi Yamamura, Annual Meeting of Federation of Clinical Immunology Societies, June 24, 2011, Washington DC, USA

3) メタロプロテイナーゼ 9 とオステオポンチンを高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性 T 細胞の MS 病態への関与、富田敦子、佐藤和貴郎、市川大樹、林幼偉、岸田日帯、三宅幸子、小川雅文、岡本智子、村田美穂、黒岩義之、荒浪利昌、山村隆、第 23 回日本神経免疫学会学術集会、平成 23 年 9 月 17 日、東京京王プラザホテル

4) 視神経脊髄炎 (NMO) における plasmablasts の関与、千原 典夫、荒浪 利昌、林 幼偉、岡本 智子、小川 雅文、戸田 達史、山村 隆、第 23 回日本神経免疫学会学術集会、平成 23 年 9 月 17 日、東京京王プラザホテル

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

『免疫修飾薬による多発性硬化症の治療成績向上を実現する探索的研究』  
NKT 細胞亜群間の炎症に対する機能について：食餌誘導性肥満をモデルとして

研究分担者 岩瀬 和也 北里大学医学部免疫学 教授  
研究協力者 佐藤 雅 北里大学医学部免疫学 助教

### 研究要旨

選択的 NKT 細胞リガンド（OCH など）によるナチュラルキラー T（NKT）細胞の活性化は自己免疫性神経炎症の進展抑制に重要な役割を果たすことが示されている。一方、NKT 細胞は内因性・食餌性脂質に対する応答により、生体内での脂質関連炎症にも深く関わっている。本年度は NKT 細胞亜群の食餌誘導性肥満の進展に対する関与について解析した。本研究で、CD1d 拘束性 type II NKT 細胞が肝・脂肪組織において炎症の増強方向に作用し、脂肪肝（炎）や内臓脂肪肥大に関与にしている可能性が示された。

### A. 研究目的

炎症の発生と進展は、起炎機転や関与する自然・獲得免疫担当細胞、それらの細胞から産生される種々の液性因子の作用によって多様な修飾を受ける<sup>1</sup>。さらに、免疫系だけではなく、ホストの体内環境を規定している内分泌・代謝系も、炎症の進展やアウトカムに大きく影響を与え得る。一つには、免疫系細胞も内分泌・代謝系の液性因子の受容体を発現し、その作用を受けることで機能修飾されるということによる<sup>2</sup>。脂肪細胞から産生され、摂食などをコントロールするレプチンは免疫応答を増強する方向に働き、一方その中和によって実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）など抗原誘発性の自己免疫疾患モデルでは軽症化が誘導される<sup>3</sup>。また同じく摂食やエネルギー収支を調節する消化管ホルモンであるグレリンは抗炎症機能を有し、皮下投与によって EAE の進展を抑制することが報告されている<sup>4</sup>。

他方では、免疫担当細胞自体の代謝特性によって、炎症・免疫反応が影響を受けるという場合もある。最近、エフェクター T 細胞機能にはグルコース代謝が、制御性 T 細胞には脂質の酸化が重要であることが、エストロゲン関連受容体  $\alpha$ （ERR $\alpha$ ）に関する研究から明らかにされた<sup>5</sup>。一方、糖尿病（マウス・ヒトともに）で、マクロファージ（M $\phi$ ）が M<sub>1</sub> タイプへ偏倚するのは、M $\phi$  でアラキドニル CoA を合成する ACSL<sub>1</sub> という酵素が発現上昇し、PGE<sub>2</sub> 産生が増強するためである<sup>6</sup>と報告されるなど、メタボライトレベルで代謝と免疫応答の関連が注目され始めている。

糖尿病やメタボリック症候群では、炎症の易発症状態に在ることになるが、肥満自体が白色脂肪組織（WAT）への M $\phi$  や T 細胞の浸潤で生じた、炎症の産物であるともいえる。食餌誘導性肥満（DIO）の系で CD8<sup>+</sup> T 細胞や T<sub>reg</sub> が、それぞれ脂肪組織における慢性炎症の進展や抑制に関わっていることが報告されている<sup>7-9</sup>。一方、脂質をリガンドとする NKT 細胞でありながら、DIO への関与について、これまで明らかに

されていなかったため、本研究で明らかにし、また亜群間での機能差についても併せて検討したいと考えた。

### B. 研究方法

#### 1. 体重経時変化と臓器体重

C57BL/6(WT), NKT 細胞欠損マウス (Ja18<sup>-/-</sup>, CD1d<sup>-/-</sup>) の各系統のマウスに高脂肪食 (High fat diet; HFD: 脂肪含量 32%) または対照群として普通餌 (Standard fat diet; SFD: 脂肪含量 4.3%) を 18 週間給餌し、体重を毎週測定した<sup>10</sup>。

#### 2. 肝・内臓脂肪組織の重量比較及び胆汁生化学検査

肝臓と内臓脂肪については臓器採取時に秤量し、凍結・パラフィン切片を作製した。それぞれ、HE 染色、Oil-red-O 染色を行い、脂肪沈着量や細胞サイズの定量化を行なった。また、血清について血液生化学的検査を行った。

#### 3. 経腹腔耐糖能試験およびインスリン抵抗性試験

肥満マウスの耐糖能・インスリン抵抗性の評価のために、経腹腔耐糖能試験 (IPGTT) やインスリン耐性試験 (ITT) を行った<sup>10</sup>。IPGTT は 0, 30, 60, 120 分と経時的に尾静脈より血液を採取、血糖値を測定した。ITT は 3 時間半前より絶食させ、同時間で血液を採取、血糖値を測定した (インスリン 7.5  $\mu$ L/生理食塩水 10 mL を 0.01 mL/g 体重で腹腔注射後に)。各実験は  $\delta$ ・ $\eta$  両方で、各 n = 3~5 匹で複数回行ない、統計解析は Tukey-Kramer test により  $p < 0.05$  を有意とした。

#### 4. MR1 拘束性 NKT 細胞亜群の DIO における機能解析

WT マウス (あるいは Ja18<sup>-/-</sup>) と MR1 拘束性 NKT 細胞亜群欠損の MR1<sup>-/-</sup> マウスに HFD を、対照群として SFD を、29~33 週間給餌し、1 と同様に体重、組織像を解析した。統計解析は Student's-t test により  $p <$

0.05を有意とした。

(倫理面への配慮)

動物実験は北里大学動物実験委員会で審議を経たのち、許可を得てから実施した (#2011-105)。

### C. 研究結果

#### 1. 体重の経時変化

HFD 給餌群において CD1d<sup>-/-</sup>マウスで、WT, Jα18<sup>-/-</sup>マウスに比して、体重が有意に少ないことが判明した (図 1 A, B)。これは体重増加分の比較として表しても同様であった (同 C, D)。また、♀ (同 A, C)、♂ (同 B, D) ともに同様の傾向を示した。

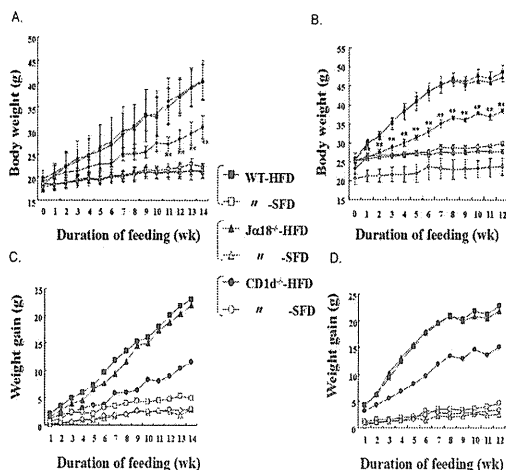


図 1. 体重経時変化

A. 体重 (♀), B. 体重 (♂), C. 体重増加分 (♀), D. 体重増加分 (♂) \**p* < 0.05; \*\* *p* < 0.01

#### 2. 肝・内臓脂肪の重量比較

HFD 給餌群の臓器重量は CD1d<sup>-/-</sup>マウスにおいて、肝重量・内臓脂肪・褐色脂肪重量いずれも有意に少なかった (図 2 B ~ E)。一方、SFD 給餌群においては、各群間に有意差は認められなかった (同)。

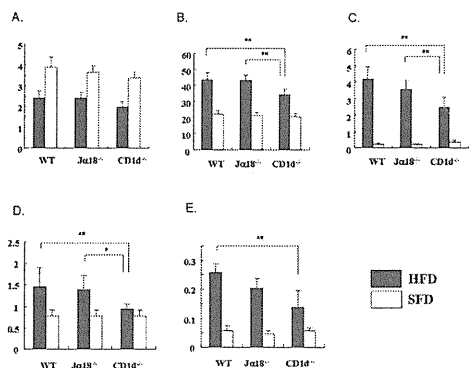


図 2. 各系統の体重・臓器重量の比較

A. 餌摂取量, B. 体重 (臓器採取時), C. 内臓脂肪量, D. 肝重量, E. 褐色脂肪量

#### 3. 各系統マウスの肝・脂肪の病理組織解析

HFD 給餌 CD1d<sup>-/-</sup>マウスでは、内臓脂肪細胞のサイズ (図 3 A, B)、肝臓の Oil- red-O 陽性領域 (脂肪滴; 図 3 C) とも最も小さく、臓器重量比較の結果 (図 2) と一致していた。一方血清レプチン濃度は、脂肪量に比例して、また血清 ALT は脂肪肝の程度に比例して、CD1d<sup>-/-</sup>マウスにおいて最も低値であった (図 3 D, E)。さらに肝単核球をリポ多糖で刺激した場合の IL-6, TNF-α も CD1d<sup>-/-</sup>で最も低値であった (図 3 F)。

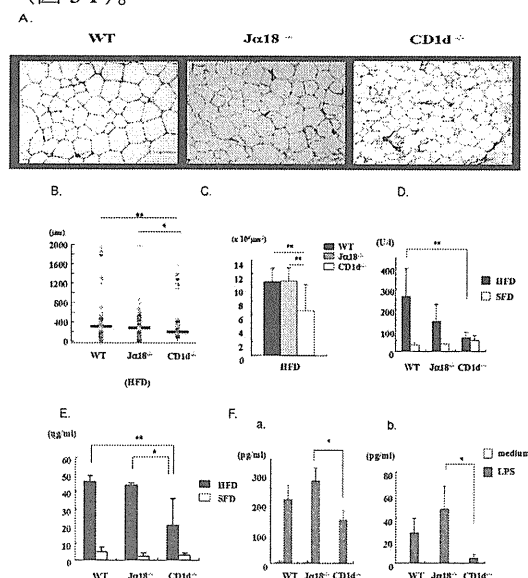


図 3. 組織解析

A. 脂肪細胞の組織像 (HFD 給餌、HE 染色), B. 周囲径, C. オイルレッド O 染色領域, D. ALT, E. レプチン, F. サイトカイン (a. IL-6; b. TNF-α)

#### 4. 各系統マウスの耐糖能・インスリン抵抗性比較

耐糖能試験は、SFD 給餌群では各系統で差を認めなかったが (図 4 A), HFD 給餌群では CD1d<sup>-/-</sup>マウスが WT, Jα18<sup>-/-</sup>マウスに比べ、糖負荷試験後の血糖上昇について最も低い血糖上昇を示し (図 4 B), インスリン基礎値・2 時間値も WT = Jα18<sup>-/-</sup> > CD1d<sup>-/-</sup>であった (図 4 C)。逆に、ITT では CD1d<sup>-/-</sup>が最も良好な血糖降下応答を示した (図 4 D)。



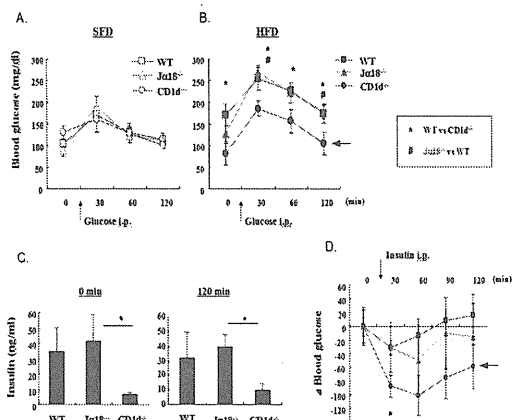


図4. 耐糖能試験、インスリン耐性試験の結果  
A. IPGTT(SFD), B. IPGTT(HFD), C.インスリン値, D.ITT

### 5. MR1 拘束性 NKT 細胞のマウスにおける DIO

同様に SFD で有意な差はなかったが、HFD 給餌群で有意に体重増加が多い結果であった (図 5 A a)。Jα18<sup>-/-</sup>マウスと MR1<sup>-/-</sup>マウスの 2 群間では統計学的有意差はなかったが、やはり MR1<sup>-/-</sup>マウスの平均体重が重い傾向が認められた (図 5 A b)。

組織像の解析では、HFD 給餌群において、HE 染色での肝細胞の空胞面積(脂肪滴)は、有意差はないが WT マウスの方が MR1<sup>-/-</sup>マウスに比して大きい傾向であった (図 5 B)。一方、内臓脂肪細胞面積は MR1<sup>-/-</sup>マウスが WT マウスに比して、有意に大きい結果であり、体重の結果に合致していた(図 5 C)。

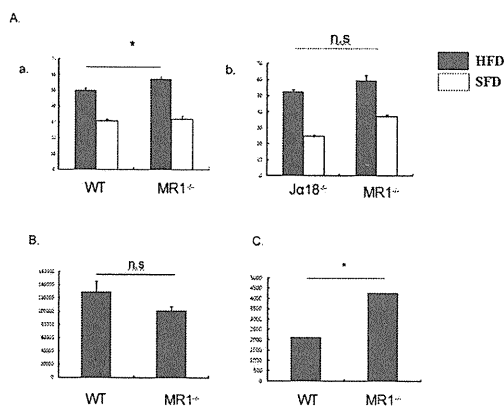


図5. 体重比較と組織解析  
A.体重(a. WT vs MR1<sup>-/-</sup>; b. Jα18<sup>-/-</sup> vs MR1<sup>-/-</sup>) B.肝空胞(脂肪滴)の面積, C.脂肪細胞面積 \*p < 0.05

### D. 考察

本研究においてNKT細胞欠損マウスではあるが、type I NKT 細胞のみを欠損する Jα18<sup>-/-</sup>では WT マウスと同様の体重増加を示し、type I と II NKT 細胞の

両亜群を欠損する CD1d<sup>-/-</sup>マウスでは WT マウスに比して有意に低い体重増加しか示さなかった。このことは、type II NKT 細胞が DIO で主たる役割を果たしているか、type I NKT 細胞の機能を完全に代替出来る、などの可能性が考えられた。HFD 摂食下では、過剰な脂質抗原そのもの、あるいは代謝産物により直接経路で、β-GlcCer などの自己糖脂質抗原を介した間接経路により、NKT 細胞が活性化されていることが推測される<sup>11</sup>。WT や Jα18<sup>-/-</sup>マウスでの脂肪肝や脂肪細胞の肥大の状態から、NKT 細胞が肝における非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) や脂肪組織での慢性炎症を増強させている可能性が考えられた。その結果、WT や Jα18<sup>-/-</sup>マウスでは、耐糖能異常やインスリン抵抗性がより顕症化しているものと考えられた。

一方、MR1 拘束性 NKT 細胞の DIO に対する役割も予備的に解析した結果、同亜群は DIO に対して抑制的に作用している可能性が判明した。同亜群は神経炎症を抑制することが既に報告されている<sup>12</sup>。CD1d 拘束性 NKT 細胞(特に type II)を直接的あるいは間接的に抑制する、脂肪組織へ浸潤した Mφ に対して抑制的に働いているなど、いくつかの可能性が考えられ、今後、抑制メカニズムの詳細な解明が必要である。

### E. 結論

NKT 細胞も亜群により、CD1d 拘束性亜群 (特に type II NKT 細胞が関連すると思われる) で促進的に、MR1 拘束性亜群で抑制的にという、動脈硬化症で認められたような機能極性を有していた。

### 参考文献

1. Nature insight -Inflammation. 420 (6917): 845-891, 2002.
2. Conde J, et al. Expert Rev Clin Immunol. 6 (5): 801-8, 2010.
3. De Rosa V, et al. J Clin Invest 176 (1): 447-55, 2006.
4. Theil MM, et al. J Immunol 183: 2859-66, 2009.
5. Michalek RD, et al. Proc Natl Acad Sci USA 108 (45): 18348-53, 2011.
6. Kanter J, et al. Proc Natl Acad Sci USA Early Edition. pnas 1111600109.
7. Nishimura S, et al. Nat Med 15: 914-20, 2009.
8. Winer S, et al. *ibid.* 921-9, 2009.
9. Feuerer M, et al. *ibid.* 930-9, 2009.
10. Satoh M, et al. PLoS ONE (in press)
11. Kronenberg M, Kinjo Y. Immunity 22: 657-9, 2005.
12. Croxford JL, et al. Nat Immunol 7:987-94, 2006.

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Hirata N, Ogura H, Satoh M, Noguchi M, Matsumoto M, Togashi H, Onoe K, Iwabuchi K. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  for interleukin-10 production by murine dendritic cells. *Cell Immunol* 2011; 266 (2): 165-71.
2. Kurotaki D, Kon S, Bae K, Ito K, Matsui Y, Nakayama Y, Kanayama M, Kimura C, Narita Y, Nishimura T, Iwabuchi K, Mack M, van Rooijen N, Sakaguchi S, Uede T, Morimoto J. CSF-1-dependent red pulp macrophages regulate CD4 T cell responses. *J Immunol* 2011; 186 (4): 2229-2237.
3. 岩瀬和也. NKT細胞の分化と機能. 北里医学 2011; 41(2): 99-109.
4. Tamauchi H, Amoh Y, Ito M, Terashima M, Masuzawa M, Habu S, Katsuoka K, Iwabuchi K. GATA-3 regulates contact hyperresponsiveness in a murine model of allergic dermatitis. *Immunobiol* (in press)
5. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Eshima K, Nakayama T, Taniguchi M, Hirata N, Ishimori N, Tsutsui H, Onoe K, Iwabuchi K. Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. *PLoS ONE* (in press)

## 2. 学会発表

1. 佐藤雅, 江島耕二, 岩瀬和也. 食餌誘導性肥満における type II NKT 細胞の役割. 第 21 回京都 T セルカンファレンス. 2011.6.11 (京都)
2. Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Nakayama T, Taniguchi M, Ishimori N, Tsutsui H, Van Kaer L, Onoé K, Iwabuchi K. Type II NKT cells operate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance. The 6<sup>th</sup> Intl. Symposium on CD1/NKT cells 2011. 9. 23 (Chicago, USA)
3. Hirata N, Yanagawa Y, Iwabuchi K, Satoh M, Ogura H, Onoe K, Noguchi M. TNF- $\alpha$  drives IL-10 production in murine dendritic cells. 第 40 回

- 日本免疫学会学術集会 2011. 11. 27 (Chiba)
4. Satoh M, Eshima K, Fujii S, Nakayama T, Taniguchi M, Ishimori N, Iwabuchi K. Type II NKT cells operate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation and steatohepatitis. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011. 11. 27 (Chiba)
  5. Eshima K, Satoh M, Shinohara N, Iwabuchi K. On the role of T-box family molecules in the activation of two cytolytic pathways. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011. 11. 27 (Chiba)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
研究分担報告書

自己免疫制御分子 Semaphorin 4A 高値 MS 末梢血リンパ球の遺伝子発現プロフィール解析

研究分担者 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

**研究要旨** 中枢神経系炎症性脱髄疾患である多発性硬化症(multiple sclerosis; MS)では、自己反応性 Th17 細胞や Th1 細胞が血液脳関門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、脱髄と軸索傷害を惹起する。現在 MS の臨床においては、インターフェロンベータなどの免疫調節薬が投与されているが難治例も多く、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。近年、ヒトゲノムの解読が完了し、個々の細胞における遺伝子やタンパク質の発現情報を網羅的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。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固有の防御機構であるロバストネスの破綻に起因する。本研究では、公共データベース GEO に登録されている血清 Semaphorin 4A 高値の MS 患者末梢血リンパ球の網羅的遺伝子発現プロフィールデータ(GSE26484)に関して、バイオインフォマティクスの手法を駆使して再解析した。自己免疫制御分子 Semaphorin4A 高値 MS 特異的分子ネットワークを解析し、転写因子 p53 を中心とするネットワークの発現低下を認めた。p53 の機能的な異常は、MS における自己反応性 T 細胞排除の障害につながる可能性がある。このようにゲノムワイドの分子ネットワーク解析は、MS の病態解明・治療薬開発のために重要な研究手段となると思われる。

**A. 研究目的**

MS は、自己抗原反応性 Th17, Th1 細胞により惹起され、時間的空間的多発を特徴とする中枢神経系炎症性脱髄疾患である。回復期には髄鞘再生を認めるが、再発を反復して炎症が遷延化すると、軸索傷害や神経変性を来して不可逆的な機能障害を残す。治療としては、急性期に炎症抑制目的で副腎皮質ステロイドパルス(IVMP)、寛解期に再発抑制目的でインターフェロンベータ(IFNB)の継続的投与がなされるが完治には

ほど遠く、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。

近年、ヒトゲノムの解読が完了し、個々の細胞における遺伝子やタンパク質の発現情報を網羅的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。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固有の防御機構であるロバストネスの破綻に起因する。

当初、神経細胞軸索伸長阻害分子(axonal

guidance molecules)として発見された Semaphorins は、共通の Semaドメインを有する膜タンパク・分泌性タンパクファミリーで、近年免疫細胞にも発現していることが明らかになり、immune semaphorins と呼ばれている (Takegahara and Kumanogoh. Clin Exp Neuroimmunol 1:33-45, 2010)。多くの Semaphorins は受容体膜タンパク Plexins(Plexin-A1, A4, B1, B2, D1)に結合する。Semaphorins は8種類の subclass に分類され、Sema 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F, 4G は class IV に属する。Semaphorin-4A(Sema4A)は脳・肺・脾などに発現し、樹状細胞(dendritic cells; DC)では構成的発現を認め、T 細胞抗原特異的活性化、Th1 細胞分化促進、Th2 細胞分化抑制に働く分子で、受容体 T cell, Ig domain, mucin domain-2(Tim-2), Plexin-D1, Plexin-B2 に結合する。Sema4A 特異的抗体は MOG 特異的 T 細胞による EAE の誘導を抑制し、Sema4A は自己免疫増強分子(Kumanogoh et al. Nature 419: 629-633, 2002)と考えられている。

最近、National Center for Biotechnology Information(NCBI)の遺伝子発現データベース Gene Expression Omnibus(GEO)に、血清 Sema4A 高値 MS 患者末梢血リンパ球のトランスクリプトームデータ(GSE26484)が登録・公開された。本研究では、GSE26484 に関して、バイオインフォマティクスの手法を駆使して再解析し、Semaphorin4A 高値 MS 特異的分子ネットワークの解明を試みた。本研究の成果は、MS における新規治療薬開発に貢献し、厚生労働行政を主導とする患者の QOL 向上につ

ながる。

## B. 研究方法

### 1. 血清 Sema4A 高値 MS 患者末梢血リンパ球のトランスクリプトームデータセット(GSE26484)の再解析

GSE26484 は、大阪大学医学部神経内科中辻らの研究グループが解析し、NCBI GEO に登録・公開したマイクロアレイデータである。3名の血清 Sema4A 高値 MS 患者(MSH)、3名の血清 Sema4A 低値 MS 患者(MSL)、4名の血清 Sema4A 低値健常者(HS)の末梢血リンパ球から、QIAamp RNA blood Mini Kit(Qiagen)を用いて、total RNA を抽出し、Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array(38,500genes)で、網羅的な遺伝子発現解析を行い、MAS5.0 で正規化したデータである。本研究では MSH, MSL, HS 間で one-way ANOVA で有意な差異を認め( $p < 0.05$ )、かつ MSH/MSL および MSH/HS が3倍以上発現差異を呈する遺伝子群を抽出し、Sema4-related genes(SRG)と定義した。

MSH/MSL の fold change の上位 30 位の SRG を指標として、Cluster 3.0, TreeView を用いて、階層的クラスタ解析を行った。

### 2. 分子ネットワーク解析

生物情報統合プラットフォーム KeyMolnet(医薬分子設計研究所)、Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems)を用いて、SRG の分子ネットワークを解析した。

(倫理面への配慮)

GSE26464 は公開された公共データであり、使用に当たり倫理的な問題はない。