

## C. 研究結果

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

初めに MSH, MSL, HS 間で one-way ANOVA で有意な( $p < 0.05$ )差異を認める 3729 遺伝子を抽出した。しかしながら Bonferroni multiple test correction を通過する遺伝子は存在しなかった。次に MSH/MSL および MSH/HS が 3 倍以上発現上昇している 127 遺伝子と MSH/MSL および MSH/HS が 3 倍以上発現低下している 158 遺伝子を抽出し、このうち annotation が明確な発現上昇 86 遺伝子と発現低下 108 遺伝子を Sema4-related genes(SRG)として抽出した。

2. 血清 Sema4A 高値 MS 患者末梢血リンパ球で発現上昇または低下を示す遺伝子群の分子ネットワーク

KeyMolnet による発現上昇 86 遺伝子の上流・下流 1 パス周辺検索では、1071 分子・1466 分子リレーションからなる複雑なネットワークが描出され、Transcriptional regulation by Ets-domain family ( $p = 2.094E-107$ )との関連が示唆された。発現低下 108 遺伝子の上流・下流 1 パス周辺検索では、1974 分子・3539 分子リレーションからなる複雑なネットワークが描出され、Transcriptional regulation by p53 ( $p = 2.225E-308$ )との関連が示唆された。

IPA による発現上昇 86 遺伝子のネットワーク解析では、Cellular Development, Embryonic Development, Tissue Development ( $p = 1E-56$ )との関連を認めた(図1a)。発現低下 108 遺伝

子のネットワーク解析では、Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair ( $p = 1E-53$ )との関連を認め、p53 が中心分子 hub として位置していた(図 1b)。

3. 血清 Sema4A 高値 MS 患者末梢血リンパ球で発現上昇または低下を示す遺伝子群の階層クラスター解析

Top30 発現上昇遺伝子と発現低下遺伝子(表 1)を指標に施行した階層クラスター解析では、MSH 群(血清 Sema4A 高値群)は MSL, HS 群(血清 Sema4A 低値群)から分離された(図 2)。特に、発現上昇遺伝子の中では NECAB1(14.7-fold), GNA11(11.5-fold), 発現低下遺伝子の中では ADAM19(0.09-fold), MECR(0.14-fold), HSDL2(0.14-fold)が両者の明確な識別に有用と考えられた。

## D. 考察

Sema4A 特異的抗体は MS 動物モデル EAE の発症を抑制し、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。従って MS で血清 Sema4A 高値の患者群は、活動性が高い可能性がある。

本研究では、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)に関して、バイオインフォマティクス手法を駆使して再解析し、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 は標的遺伝子の発現誘導を介して、細胞周期・アポトーシス・DNA 修復を制御するゲノムの守護神(guardian of the genome)である。

MS 末梢血リンパ球では、ataxia telangiectasia mutated (ATM)が恒常的に活性化し、check point kinase-2 (CHK2)による p53 リン酸化亢進を介して、放射線照射によるアポトーシスに抵抗性を示す(Deng X et al. *Ann Neurol* 58: 577-584, 2005)。また MS 末梢血リンパ球では、histone deacetylase 3 (HDAC3)の構成的発現が亢進し、HDAC3 inhibitor trichostatin A (TSA)によるアポトーシスに抵抗性を示す(Zhang F et al. *PLoS One* 6: e16795, 2011)。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。

MSH 群(血清 Sema4A 高値群)と MSL, HS 群(血清 Sema4A 低値群)の明確な識別に有用と考えられた N-terminal EF-hand calcium binding protein 1 (NECAB1)は神経細胞で高発現している Ca<sup>2+</sup>結合タンパクである(Sugita S et al. *Neuroscience* 112: 51-63, 2002)。Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class) (GNA11)は、TCR-CD3 signaling の直下でチロシンキナーゼ活性を制御する G タンパク質の構成要素である(Stanners J et al. *J Biol Chem* 270: 30635-30642, 1995)。ADAM metalloproteinase domain 19 (ADAM19)は、樹状細胞マーカーで細胞間接着に関与しているメタロプロテアーゼである(Ehrnsperger A et al. *Biochem Biophys Res Commun* 332: 456-464, 2005)。Mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase (MECR)は、nuclear receptor binding factor-1 (NRBF1)とも呼ばれ、PPARalpha など様々な核内受容体と結合し得る(Masuda N et al.

*Gene* 221: 225-233, 1998)。Hydroxysteroid dehydrogenase like 2 (HSDL2)はペルオキシゾームに局在し、脂肪酸代謝に関与する酵素である(Kowalik D et al. *J Steroid Biochem Mol Biol* 117: 117-124, 2009)。これらの分子が Sema4A 発現制御に関与しているかどうかは明らかではない。

## E. 結論

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)に関して、バイオインフォマティクス手法を駆使して再解析し、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。

## F.健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tabunoki H, Ode H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Yamamoto K, Sato R, Ishii-Nozawa R, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One* 6(3): e17683, 2011.
2. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Arima K: Immunohistochemical

- characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology* 31(4): 363-375, 2011.
3. Satoh J, Tabunoki H: Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Mining* 4: e17, 2011.
  4. Yoshino T, Tabunoki H, Sugiyama S, Ishii K, Kim SU, Satoh J: Non-phosphorylated FTY720 induces apoptosis of human microglia by activating SREBP2. *Cellular and Molecular Neurobiology* 31(7): 1009-1020, 2011.
  5. Numasawa Y, Yamaura C, Ishihara S, Shintani S, Yamazaki M, Tabunoki H, Satoh J: Nasu-Hakola disease with a splicing mutation of TREM2 in a Japanese family. *European Journal of Neurology* 18(9): 1179-1183, 2011.
  6. Nakamagoe K, Shioya A, Yamaguchi T, Takahashi H, Koide R, Monzen T, Satoh J, Tamaoka A. A Japanese case with Nasu-Hakola disease of DAP12 gene mutation exhibiting precuneus hypoperfusion. *Internal Medicine* 50(22): 2839-2844, 2011.
  7. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K: Immunohistochemical characterization of gamma-secretase activating protein expression in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* in press, 2011.
  8. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Futamura N, Kobayashi M, Toyoshima I, Yoshioka T, Enomoto K, Arai N, Saito Y, Arima K: Phosphorylated Syk expression is enhanced in Nasu-Hakola disease brains. *Neuropathology* in press, 2011.
  9. Satoh J: Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Experimental Neurology* in press, 2011.
  10. Satoh J, Shimamura Y, Tabunoki H: Gene expression profile of THP-1 monocytes following knockdown of DAP12, a causative gene for Nasu-Hakola disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* in press, 2011.
  11. 佐藤 準一: 神経変性と神経炎症の分子ネットワーク解析. 脳内免疫システム: 明らかになる神経疾患との関わり. *細胞工学* 30(10): 1028-1035, 2011.
  12. 佐藤 準一: 分子ネットワークからみた多発性硬化症の創薬標的分子. 特集 I 神経免疫の新展開. *炎症と免疫* 19(6): 543-552, 2011.
- 著書
1. Satoh J: Molecular network analysis of target RNAs and interacting proteins of TDP-43, a causative gene for the neurodegenerative diseases ALS/FTLD. In *Biomedical Engineering and Cognitive*

- Neuroscience for Healthcare: Interdisciplinary Applications, ed by Wu J. IGI Global, Hershey, Pennsylvania, 2011, in press.
2. Satoh J: Human microRNA targetome indicates a specialized role of microRNAs in regulation of oncogenesis. In Systems Biology and Cancer, ed by Azumi AS. Springer, Netherlands, 2011, in press.
  3. 佐藤準一: 2. 網羅的遺伝子発現解析からみた病因・病態. 第1章 多発性硬化症の病態と診断 K. 病因・病態をめぐって. アクチュアル脳・神経疾患の臨床. 最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄炎. 辻省次・吉良潤一編. 中山書店、2011, 印刷中.
- ## 2. 学会発表
- ### 国際学会
1. Satoh J, Tabunoki H, Arima K: Immunohistochemical characterization of microglia in Nasu-Hakola disease brains. 63rd Annual Meeting of American Academy of Neurology. Honolulu, 2011.4.12.
  2. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network analysis of microRNA targets suggests aberrant expression of cell cycle regulators in Alzheimer's disease brains. The 9th International Workshop on Advanced Genomics. Revolution of Genome Science. Tokyo, 2011.7.12.
  3. Tabunoki H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, Bombyx mori. Queenstown Molecular Biology Meetings 2011. Queenstown, New Zealand, 2011.8.30.
  4. Tabunoki H, Shimada T, Mita K, Banno Y, Satoh J: BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, Bombyx mori. 2011 Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, 2011.11.14.
- ### 国内学会
1. 天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、野澤玲子、佐藤準一: カイコ DJ-1 オルソログは NO により酸化される. 日本薬学会第131年会. 静岡、2011.3.28.
  2. 佐藤準一、吉野隆、小口翔、天竺桂弘子: TDP-43 インターラクトームの分子ネットワーク解析. 日本薬学会第131年会. 静岡、2011.3.28.
  3. 天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、野澤玲子、佐藤準一: カイコ DJ-1 オルソログは NO により酸化される. 第52回日本神経学会総会. 名古屋、2011.5.18.
  4. 沼沢祥行、山浦千春、石原正一郎、新谷周三、山崎峰雄、天竺桂弘子、佐藤準一: 本邦初の TREM2 遺伝子変異による

那須ハコラ病の一家系. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011. 5.20.

5. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、柳下三郎、陣内研二、二村直伸、小林道雄、豊島至、吉岡年明、榎本克彦、新井信隆、有馬邦正: 那須ハコラ病の臨床病理遺伝学的研究. 第 52 回日本神経学会総会. 名古屋、2011. 5.20.
6. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、柳下三郎、陣内研二、二村直伸、小林道雄、豊島至、吉岡年明、榎本克彦、新井信隆、有馬邦正: 那須ハコラ病脳ミクログリアの免疫組織化学的解析. 第 52 回日本神経病理学会総会. 京都、2011. 6.4.
7. 佐藤準一: 神経難病の病態解明のための分子ネットワーク解析. *Ingenuity Pathways Analysis ユーザーミーティング*. 招待講演. 東京、2011.9.1.
8. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、有馬邦正: アルツハイマー病脳における GSAP の発現解析. 第 34 回日本神経科学大会. *Neuro2011*. 横浜、2011. 9.15.
9. 佐藤準一、吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim : FTY720 の SREBP2 活性化を介するヒトミクログリア

のアポトーシス誘導. 第 23 回日本神経免疫学会学術集会 東京、2011. 9.17.

10. 天竺桂弘子、嶋田透、伴野豊、三田和英、佐藤令一、佐藤準一: カイコ DJ-1 オルソログは NO により酸化される. 第 84 回日本生化学会大会. 京都、2011.9.22.
11. Satoh J, Tabunoki H: Molecular network analysis of microRNA targets suggests aberrant expression of cell cycle regulators in Alzheimer's disease brain. 日本バイオインフォマティクス学会 2011 年会. 神戸、2011.11.8.
12. 佐藤準一、吉野隆、天竺桂弘子、杉山重夫、石井啓太郎、Seung U. Kim: FTY720 は SREBP2 活性化を介してヒトミクログリアのアポトーシスを誘導する. 第 40 回日本免疫学会学術集会 幕張、2011.11.29.

## H. 知的所有権の取得状況

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

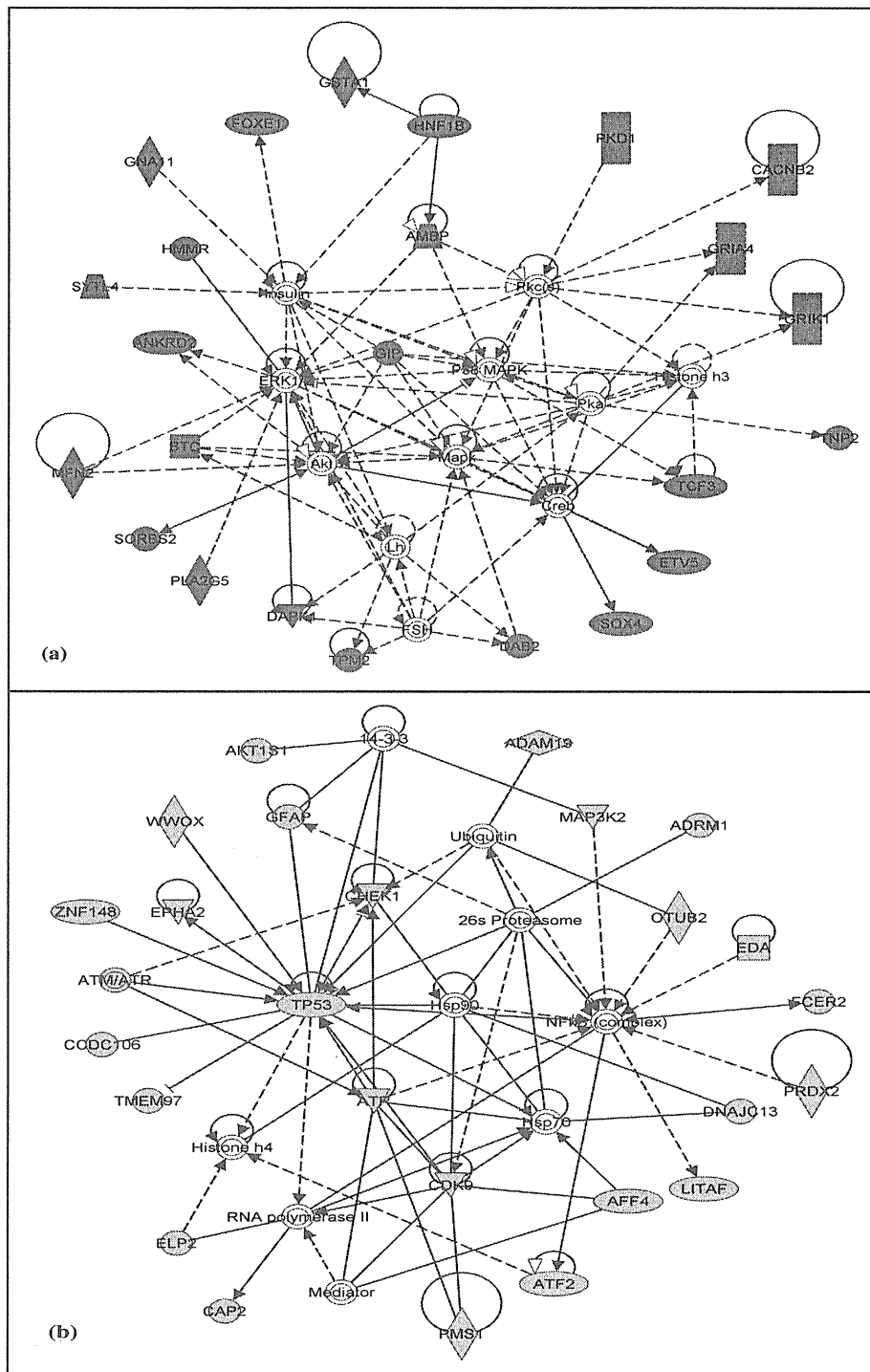


図 1. 分子ネットワーク解析.

血清 Sema4A 高値 MS 患者末梢血リンパ球で発現上昇 86 遺伝子のネットワークは、Cellular Development, Embryonic Development, Tissue Development ( $p = 1E-56$ )との関連を認めた(a)。発現低下 108 遺伝子のネットワークは、Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair( $p = 1E-53$ )との関連を認め、p53 が中心分子 hub として位置していた(b)。

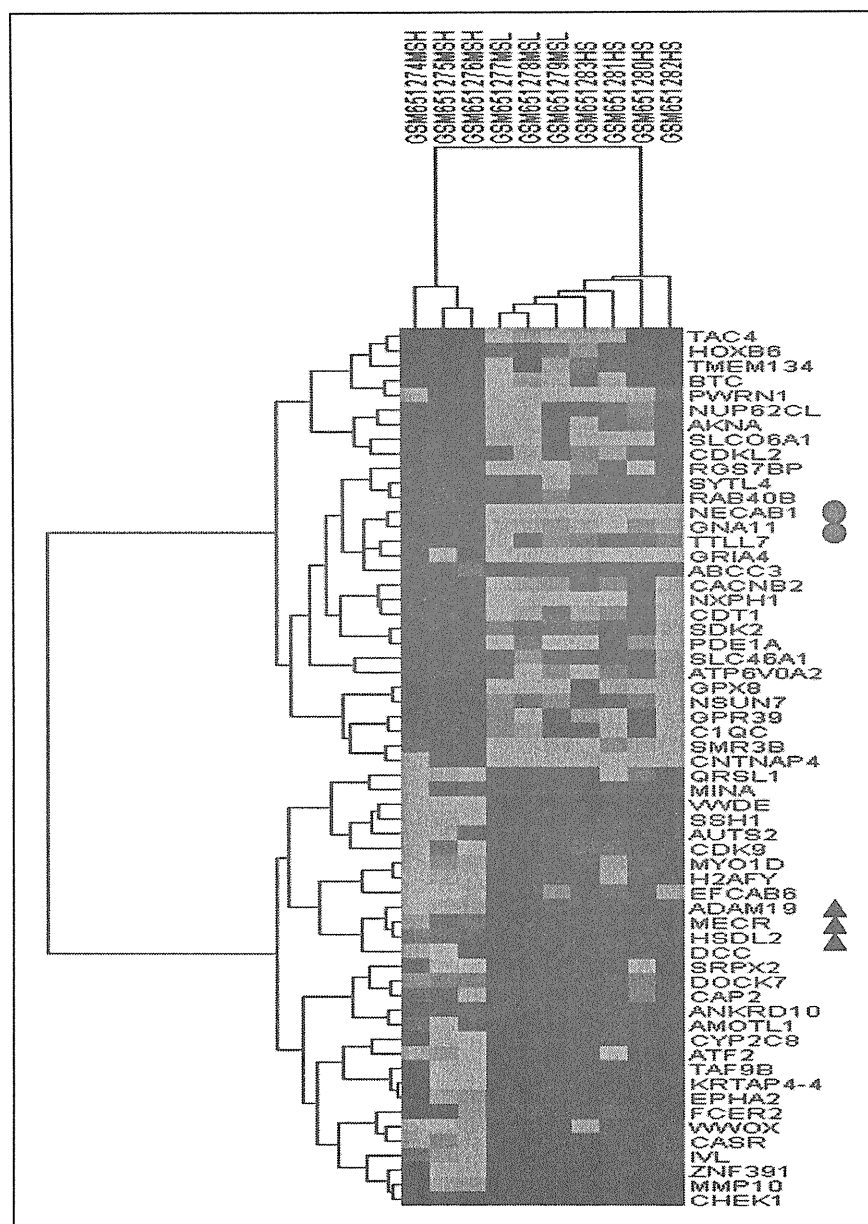


図 2. 階層的クラスター解析.

Top30 発現上昇遺伝子と発現低下遺伝子(表 1)を指標に施行した階層クラスター解析では、MSH 群(血清 Sema4A 高値群)は MSL, HS 群(血清 Sema4A 低値群)から分離された。特に、発現上昇遺伝子の中では NECAB1, GNA11(丸), 発現低下遺伝子の中では ADAM19, MECR, HSDL2(三角)が両者の明確な識別に有用と考えられた。

**Table 1. Top 30 Differentially Expressed Genes in MS Patients With High Serum Sema4A Levels**

Rank	Upregulated Genes			Downregulated Genes		
	Gene Symbol	Gene Name	Fold Change (MSH/MSL)	Gene Symbol	Gene Name	Fold Change (MSH/MSL)
1	RG37BP	regulator of G-protein signaling 7 binding protein	20.03565316	VWDE	von Willebrand factor D and EGF domains	0.053865922
2	NECAB1	N-terminal EF-hand calcium binding protein 1	14.69159064	WVWX	WW domain containing oxidoreductase	0.063762556
3	NXPH1	neurexophilin 1	12.857734	CYP2C8	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	0.073268266
4	BTC	betacellulin	12.59413532	QRSL1	glutamyl-tRNA synthase (glutamine-hydrolyzing)-like 1	0.074637968
5	GNA11	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)	11.53533324	SRPX2	sushi-repeat-containing protein, X-linked 2	0.083897041
6	GPX8	glutathione peroxidase 8 (putative)	10.59190375	ADAM19	ADAM metalloproteinase domain 19 (metrin beta)	0.094450948
7	CACNB2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit	10.0808179	FCER2	Fc fragment of IgE, low affinity II, receptor for (CD23)	0.094722417
8	TAC4	tachykinin 4 (hemokinin)	10.07174011	TAF9B	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 31kDa	0.097143997
9	MSUN7	NOL1/NOP2/Sun domain family, member 7	9.812551576	DOCK7	dedicator of cytokinesis 7	0.100213917
10	NUP62CL	nucleoporin 62kDa C-terminal like	9.255125938	KRTAP4-4	keratin associated protein 4-4	0.101391634
11	GPR39	G protein-coupled receptor 39	8.631334041	MYO1D	myosin ID	0.105173507
12	TMEM134	transmembrane protein 134	8.067395617	H2AFY	H2A histone family, member Y	0.10711715
13	SYTL4	synaptotagmin-like 4	7.717444748	EFCAB6	EF-hand calcium binding domain 6	0.111750527
14	TTLL7	tubulin tyrosine ligase-like family, member 7	7.439690249	ANKRD10	ankyrin repeat domain 10	0.115736463
15	HOXB6	homeobox B6	7.252508718	CDK9	cyclin-dependent kinase 9	0.116558228
16	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	7.150490445	SSH1	shagohol homolog 1 (Drosophila)	0.117798667
17	SLCO6A1	solute carrier organic anion transporter family, member 6A1	6.371237367	AMOTL1	angiomotin like 1	0.117918945
18	RAB40B	RAB40B, member RAS oncogene family	6.959684584	ZNF391	zinc finger protein 391	0.120072272
19	AKNA	AT-hook transcription factor	6.603299345	CASR	calcium-sensing receptor	0.122917094
20	C1QC	complement component 1, q subcomponent, C chain	6.594384054	MINA	MYC induced nuclear antigen	0.123285028
21	CDT1	chromatin licensing and DNA replication factor 1	6.586658316	AUTS2	autism susceptibility candidate 2	0.129023126
22	GRIA4	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 4	6.526292031	IVL	Involucrin	0.133746312
23	SMR3B	submaxillary gland androgen regulated protein 3B	6.507672483	ATF2	activating transcription factor 2	0.135481858
24	CDKL2	cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)	6.436023338	MMP10	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	0.136087587
25	SDIC2	sidekick homolog 2 (chicken)	6.446665391	DCC	deleted in colorectal carcinoma	0.137266391
26	CNTNAP4	contactin associated protein-like 4	6.272332598	MECR	mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase	0.137875539
27	PDE1A	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	6.242070895	HSDL2	hydroxysteroid dehydrogenase like 2	0.138284906
28	PWRN1	Prader-Willi region non-protein coding RNA 1	6.215876365	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	0.138698258
29	SLC46A1	solute carrier family 46 (folate transporter), member 1	6.196389416	EPHA2	EPH receptor A2	0.143891243
30	ATP6V0A2	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal V0 subunit a2	6.010151433	CAP2	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	0.145407135

Gene expression profiles are compared among 3 MS patients with high serum Sema4A levels (MSH), 3 MS patients with low serum Sema4A levels (MSL), and 4 healthy subjects with low serum Sema4A levels (HS) by one-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). The genes greater than 3-fold changes between MSH and MSL and between MSH and HS are selected and processed for annotation. Top 30 genes upregulated in MSH versus MSL are listed.



## 核内転写因子標的医薬の薬効評価研究

研究分担者 氏名 大木 伸司

独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第六部 職名 室長

### 研究要旨

多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)は、自己抗原に対する過剰な免疫応答を原因とする典型的な自己免疫疾患である。MSの病態形成には、Th1細胞、Th17細胞など複数の炎症性免疫細胞が深く関わる。これまでに急性前骨髄急性白血病治療薬として臨床応用されている合成レチノイド Am80 が Th17 細胞分化抑制効果を示し、予防的あるいは治療的経口投与により、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) などの病態を有意に改善できることを示してきた。最近、IL-9 産生性の炎症性 Th9 細胞が EAE を誘導できることが示された。そこで Th9 細胞の IL-9 産生に対する RAR アゴニストの効果を解析することで、RAR アゴニストが有する新たな T 細胞機能制御能を検証し、自己免疫疾患治療薬としての種々の RAR アゴニストの可能性を、さらに詳細に検討した。

### A. 研究目的

近年、多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)などの自己免疫疾患における種々炎症性 T 細胞の機能が注目されている。本研究では、Th17 細胞分化抑制効果を示す RAR アゴニストが、新たな炎症性 T 細胞として同定された Th9 細胞の IL-9 産生に及ぼす効果を検証し、RAR アゴニストの新たな免疫応答制御能を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

C57BL/6J(B6)マウス由来脾臓由来 T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体刺激し、天然型レチノイド all-trans レチノイン酸(ATRA)、合成レチノイド Am80 を含む 7 種類の RAR アゴニストを添加し、培養液中に産生されたサイトカイン (IFN- $\gamma$ 、IL-17、IL-9) を測定した。ナイーブ T 細胞 (CD4+CD44-CD25-CD62Lhigh) を IL-4 と TGF- $\beta$  の共存下(Th9 細胞誘導条件)で抗 CD3/CD28 抗体刺激し、Th9 細胞への分化過程における IL-9 産生と制御性 T(Treg)細胞マーカーである Foxp3 発現の経時変化に対するレチノイドの効果を、フローサイトメーターを用いて測定した。培養後の T 細胞から抽出した RNA を用いた定量 PCR により、Foxp3 と GATA-3 の発現をそれぞれ定量した。In vitro で分化させた Th1 細胞、Th2 細胞および Th9 細胞を、resting 後 Th1 細胞、Th2 細胞および Th9 細胞分化条件で再刺激し、それぞれ IFN- $\gamma$ 、IL-4 および IL-9 の産生を測定した。In vitro で分化させた Th9 細胞および Treg 細胞を、抗 CD3 抗体存在下にナイーブ CD4 陽性 T 細胞および放射線照射脾臓細胞と共培養して、細胞増殖抑制能を比較した。Am80 あるいは RAR アンタゴニスト LE540 を腹腔内投与した B6 マウスの脾臓から CD4 陽性細胞を分離し、抗 CD3/CD28 抗体刺激後の IL-9 産生を比較した。MOG 抗原特異的 T 細胞受容体トランスジェニック (2D2) マウス脾臓から分離したナイーブ CD4 陽性 T 細胞を、IL-4 と TGF- $\beta$  の共存下に抗 CD3/CD28 抗体刺激し、Th9 細胞を分化させ

た。Resting 後再刺激した細胞 ( $5 \times 10^6$  cells/mouse) を、未処理 B6 マウスに経静脈移入し、EAE の発症を誘導した。T 細胞移入時よりマウスに ATRA を腹腔内投与し、臨床スコアを測定した。

### (倫理面への配慮)

すべての動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従って作成した実験計画書の承認を受けて行った。

### C. 研究結果

用いた 7 種類の RAR アゴニスト (100 nM) は、T 細胞の IFN- $\gamma$  産生と IL-17 産生をいずれも強く抑制したが、IL-6 や GM-CSF には影響を与えなかった。T 細胞の IL-9 産生は、同条件下で非常に強く抑制されることが分かった。同様に、Th9 細胞分化誘導条件下で培養したナイーブ T 細胞に対しても、ATRA を含む RAR アゴニストは強力な IL-9 産生抑制効果 (IC50=100pM 前後) を示した。この時分化させた Th9 細胞の細胞増殖は、RAR アゴニストにより同様に強く抑制された。フローサイトメーターを用いた解析から、Th9 細胞誘導条件下で培養したナイーブ T 細胞は、3 日目に Foxp3 を一過性に発現した。4 日目には Foxp3 発現が消失し、高い IL-9 産生を示した後、5 日目に Foxp3 発現・IL-9 産生ともに減少した。ATRA 添加群では、4 日目に Foxp3 発現の消失が見られず、同時に IL-9 産生も起こらなかった。培養後の細胞では、ATRA 濃度依存的 Foxp3 遺伝子と GATA-3 遺伝子の発現誘導が認められた。Th9 細胞は、Treg 細胞よりは弱いものの有意な細胞増殖抑制能を示した。In vitro で分化させた Th1 細胞と Th2 細胞では、IL-4 と TGF- $\beta$  の共存下で再刺激することにより有意な IL-9 産生を認め、これは ATRA の共存によりいずれも抑制された。RAR アンタゴニスト LE540 を腹腔内投与した B6 マウスの脾臓 CD4 陽性細胞を、抗 CD3/CD28 抗体刺激すると、IL-9

産生が対照群に比べて有意に亢進した。一方、Am80 を投与したマウスから分離した脾臓 CD4 陽性細胞では、刺激後の IL-9 産生が有意に抑制された。In vitro で Th9 細胞へと分化させた 2D2 マウス由来 CD4 陽性 T 細胞を移入した B6 マウスは、移入 14 日目頃から EAE を発症した。移入時より ATRA を腹腔内投与した B6 マウスの EAE は、対照群に比べて有意に軽症化した。

## D. 考察

種々の自己免疫疾患モデルあるいはヒト自己免疫疾患において、Th1 細胞や Th17 細胞など病原性 T 細胞の主要な細胞集団であることが示されている。最近、in vitro で IL-4 と TGF- $\beta$  の共存下で分化誘導される Th9 細胞を、未処理マウスに移入することによって EAE が発症することが示され、新たな病原性 T 細胞の一群として注目されている。本研究では、Th1 細胞および Th17 細胞分化を抑制し、EAE 治療効果を有する RAR アゴニストの、IL-9 産生細胞誘導に対する効果を検討した。検証した全ての RAR アゴニストは、脾臓由来 CD4 陽性 T 細胞の IL-9 産生を非常に強く抑制した。Th17 細胞分化に対して、合成 RAR アゴニスト Am80 は天然型アゴニストである ATRA に対して~10 倍程度の強い抑制効果を示したが、IL-9 産生抑制においては、いずれも同程度の抑制効果を示したことから、以下主に ATRA を用いた検討を進めた。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞から Th9 細胞への分化においては、ATRA は強力な細胞増殖抑制を伴って極めて低濃度から効果を示した (IC50=100pM 前後)。他のエフェクター T 細胞分化条件での細胞増殖は、同濃度の ATRA 添加により全く変化しないことから、ATRA は Th9 細胞分化に対して、選択的で極めて強力な抑制効果を有することが明らかとなった。ナイーブ T 細胞から Th9 細胞への分化過程においては、一過性の Foxp3 発現の後に高い IL-9 産生に移行するという挙動が認められ、IL-9 産生過程における Foxp3 発現の意義が興味深いと考えられた。さらに ATRA は Foxp3 の発現を維持し、IL-9 産生を抑えるものと考えられた。さらに ATRA 存在下に Foxp3 発現を維持した細胞は、有意な細胞増殖抑制能を有し、一部 Treg 細胞と機能を共有する細胞群に変化していると考えられる。IL-9 は、IL-4 と TGF- $\beta$  の共存下でナイーブ T 細胞のみならず Th1 細胞や Th2 細胞から産生されたことから、生体内ではより広汎な産生細胞が存在すると考えられる。さらにいずれも ATRA 添加により抑制されたことから、ATRA は極めて有効な IL-9 抑制能を有する。RAR アンタゴニストの投与により脾臓細胞の IL-9 産生が亢進したことから、生理的濃度の ATRA が生体内 IL-9 産生を制御している可能性が示された。2D2 マウス由来の Th9 細胞を移入することで誘導した EAE が、ATRA の腹腔内投与により有意に軽症化したことから、RAR アゴニストは、病原性 T 細胞を形成する Th1 細胞、Th17 細胞に加えて Th9 細胞を介した病態にも有効である可能性が示された。

## E. 結論

ATRA や Am80 を含む RAR アゴニストは、T 細胞の IL-9 産生を極めて有効に抑制し、Treg 細胞様の細胞群へと分化誘導する。生理的濃度の ATRA が生体内の IL-9 産生を制御する可能性が示されたとともに、RAR アゴニストは、病原性 T 細胞を形成すると思われる Th1 細胞、Th17 細胞のみならず Th9 細胞を介した病態にも有効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 なし

### 2. 学会発表

[国際学会]

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura:

NR4A2, a nuclear receptor that controls pathogenic Th17 responses during autoimmune disease, is induced in T cells by target organ antigen presenting cells  
British Society of Immunology Congress 2011, Liverpool, Dec. 5th-8th, 2011

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura:

NR4A2 controls Th17-mediated autoimmunity  
Keystone Symposia 2011: Th17 Cells in Health and Disease (Q2), Keystone, Feb. 5th-10th, 2012

[国内学会]

大木 伸司、ベン・レイバニー、山村 隆: Th17 細胞依存性自己免疫応答に対するオーファン核内受容体 NR4A2 の機能的連関 日本薬学会第 131 年会、Mar. 28th-31th, 2011

野口 真行、大木 伸司、山村 隆: T 細胞の Interleukin-9 産生に対するレチノイドの制御作用 第 22 回日本レチノイド研究会、Nov. 11th-12th, 2011

Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: NR4A2, a nuclear receptor that controls pathogenic Th17 responses during autoimmune disease, is induced in T cells by target organ antigen presenting cells 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会、Nov. 27th-29th, 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

### 多発性硬化症の MRI による定量的経時解析に関する研究

研究分担者 小川 雅文 国立精神・神経医療研究センター病院神経内科医長  
研究協力者 佐藤典子 国立精神・神経医療研究センター病院放射線診療部長

#### 研究要旨

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 Qbrain というソフトを用い当施設にて MS と診断され MRI を経時的に撮影した患者 14 人（男性 4 人、女性 10 人、年齢  $52.0 \pm 14.8$  歳、MRI 撮影間隔は  $17.5 \pm 6.8$  ヶ月）について定量的に検討した。頭蓋内容積は 2 回の測定間で有意差はなく 2 回目の測定値の変動は一回目の測定値の  $1.9 \pm 1.6\%$  だった。脳容積を頭蓋内容積で除した値を用い 2 回の測定での萎縮の変化を検討したところ 5%以上の萎縮をみた例は 4 人だったが EDSS が悪化していたのは 1 例のみだった。T2 高信号病巣容積を頭蓋内容積で除した値を多発性硬化症病巣容積の指標として変化を検討すると増加例、ほぼ不変例、減少例にわかれた。増加例 3 人のうち EDSS が悪化していたのは 2 例であった。Qbrain を用いた MRI の定量的評価は多発性硬化症患者の経時的な病巣容積や脳萎縮の検討に有用であり再発予防を目的とする薬物治療の有効性判定にも使用できると考えた。

#### A. 研究目的

多発性硬化症（MS）の再発予防治療の効果判定には臨床症状とともに MRI 画像が広く使用されている。Qbrain という軸位断の FLAIR と T2 強調画像から自動的に容積を測定できるソフトを用い、当施設にて MS と診断され MRI を経時的に撮影した患者を対象に、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、脳萎縮や多発性硬化症病巣の変化およびそれらと患者の重症度の変化との相関の有無を検討することにより、病状評価に使用できるか考察した。

#### B. 研究方法

対象は当院で多発性硬化症と臨床診断された患者で Qbrain が使用可能な MRI を 6 ヶ月以上の期間をあけて 2 回撮影した症例。視神経脊髄炎、視神経脊髄炎関連疾患は除外し頭部 MRI で多発性硬化症以

外の病変があったものも除外した。MRI は通常診療のため撮影されたものを使用し軸位断像の T2 強調画像と FLAIR 画像から Qbrain にて頭蓋内容積、脳脊髄液、脳容積、T2 高信号病巣容積を自動算出した。測定はそれぞれの部位を自動抽出した後目視で確認し、実際とずれている場合は手動で訂正した。

統計は分散分析を用いすべて危険率は 5%以下を有意とした。なお今回の検討は後ろ向きの調査であり、介入は一切なく、疫学的な調査である。

#### C. 研究結果

検討の対象となったのは 14 人（男性 4 人、女性 10 人）、年齢は  $52.0 \pm 14.8$  歳、MRI 撮影間隔は  $17.5 \pm 6.8$  ヶ月だった。2 回の MRI 撮影期間中に EDSS が悪化したものは 3 人、不変が 11 人だった。

経時変化がないと考えられる頭蓋内容

積は1回目撮影時  $1398.8 \pm 111.8 \text{ ml}$  2回目撮影時  $1417.3 \pm 127.3 \text{ ml}$  で2回の測定間に統計的には有意差なく患者ごとの2回目の測定値の変動は1回目の測定値の  $1.9 \pm 1.6\%$  だった。脳容積を頭蓋内容積で除した値を用い2回の測定での萎縮の変化を検討したところ 5%以上の萎縮をみた例は4人だったがEDSSが悪化していたのは1例のみだった。T2高信号病巣容積を頭蓋内容積で除した値を多発性硬化症病巣容積の指標として変化を検討すると増加例、ほぼ不変例、減少例にわかれた。増加例3人のうちEDSSが悪化していたのは2例であった。

#### D. 考察

Qbrain を用いれば通常の診療で撮影するMRI画像を用いて定量的に脳萎縮やT2高信号病巣容積を算出できる。今回は実際の多発性硬化症患者のMRIを用いて経時的な検討を行った。2回の頭蓋内容積測定間に有意差がなく2%程度の誤差しか生じていないことから複数回の測定による容積変化の検討にもQbrainは十分使用できると考えた。

脳萎縮の検討では14例中4例に5%以上の萎縮をみた。しかしこの4例の中でEDSSが悪化しているものは1例のみで他の3例はEDSS以外にも再発もあまりなく臨床上比較のおちついた経過をしめしていた。

T2高信号病巣の検討では容積増加例以外に不変例と減少例がみられた。多発性硬化症病巣は経過で消退することもあるので減少例はそのような病巣を反映していると思われる。増加例は一回以上の再発による病巣の出現を示唆しているが病巣容積が増加しても必ずしもEDSS等の臨床症状が悪化するわけではなかった。

多発性硬化症の治療は再発をいかに抑制することにより病状進行をとめるかにあるが臨床徴候やEDSSをはじめとするスケール以外に今回のようなMRIを用いた定量的な病巣容積や脳萎縮のフォローは

客観的な評価となるため病気の進行度合いや薬剤をはじめとする様々な介入の効果判定に非常に有用であると思われた。

#### E. 結論

Qbrainを用いたMRIの定量的評価は多発性硬化症患者の経時的な病巣容積や脳萎縮の検討に有用である。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

なし

#### 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

特記すべきことなし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

多発性硬化症のMRによる定量的解析に関する研究

研究分担者 佐藤 典子 国立精神・神経医療研究センター病院放射線診療部 部長  
研究協力者 小川 雅文 国立精神・神経医療研究センター病院神経内科 医長  
研究協力者 岡本 智子 国立精神・神経医療研究センター病院神経内科 医長  
研究協力者 太田 深秀 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第三部  
室長

**研究要旨**

Arterial Spin Labeling (ASL ; 動脈ラベル標識法) という非侵襲的な新しい手法を用いて、MS 患者の脳血流画像を撮影し、対象健常者と比較した。また同時に MRI で脳の容積や白質病変も測定し、評価した。対象は多発性硬化症患者 9 例と年齢、性別をマッチさせた健常者 16 名で行ったところ、右有意にびまん性に皮質領域の血流低下を認めたほか、視床、尾状核、後部帯状回などの領域で血流低下を認めた。右有意びまん性に皮質領域の血流と全脳白質病変容量に関連を認めたほか、視床や後部帯状回などの領域で白質病変と血流との間に負の関連を認めた。多発性硬化症の評価は MRI による白質病巣や脳萎縮の評価が主なものであるが通常撮影方法では大脳皮質病変は描出されにくく問題となっている。脳灌流画像であれば皮質機能も含めた評価が可能であると思われ、今後この手法は有力な客観的な評価手段になると思われる。

**A. 研究目的**

多発性硬化症 (MS) の病変評価には MRI 画像による形態的な検討が重要視されている。昨年度、われわれは多発性硬化症の脳血流を SPECT で検討した。脳血流は MRI では描出されにくい脳皮質病変を含めた変化を反映し有意義と思われるが SPECT 撮影は放射性リガンドを静注しなければならず、また被爆の問題もある。最近 Arterial Spin Labeling (ASL) 法を用い MR で非侵襲的に脳血流画像を撮影することができるようになった。今回はこの ASL 法をもちい多発性硬化症患者と対象健常群の大脳血流を比較検討した。

**B. 研究方法**

対象は当院で多発性硬化症と臨床診断された多発性硬化症患者 9 例 (男性 2 名、女性 7 名。平均年齢=40.4±11.2 歳) と年齢、性別をマッチさせた健常者 16 名 (男性 4 名、女性

12 名。平均年齢=36.4±13.4 歳) で行った。患者で、視神経脊髄炎や視神経脊髄炎関連疾患は除外した。頭部 MRI で多発性硬化症以外の病変があったものも除外した。今回の ASL は Philips 3.0T Achieva MR scanner (Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) を用いて pseudo-continuous arterial spin labeling (PCASL) を施行した。TR/TE of 4000/12 ms、field of view=240 mm、matrix=64×64、スライス厚 8mm、NEX=32、labeling time=1.6 s、post label delay time=1520 ms であった。撮影には約 6 分を要した。撮影されたデータは Matlab で起動する ASL toolbox を用いて解析を行った。またその他に 3DT1WI の volume data や T2WI、FLAIR も同時に撮影し、脳の容積や白質病変も評価した。

**C. 研究結果**

ASL 法では良好な大脳皮質の脳血流画像

を撮影することができ、多発性硬化症の群では健常群と比較し、右有意にびまん性に皮質領域の血流低下を認めたほか、視床、尾状核、後部帯状回などの領域で血流低下を認めた。右有意びまん性に皮質領域の血流と全脳白質病変容量に関連を認めたほか、視床や後部帯状回などの領域で白質病変と血流との間に負の関連を認めた。

#### D. 考察

昨年 の SPECT による検討では多発性硬化症患者の平均脳血流量と有意に相関したものは年齢、MMSE、MRI で測定した脳脊髄液容積のみであった。MMSE と脳血流が有意に相関していることから MS の脳血流は大脳全体の機能のある程度表しているといえる。SPECT 撮影は時間やコスト、被爆の問題もあり通常の MRI 撮影時に比較的短時間で追加できる ASL 法で同様のデータが得られれば大変有用であると思われる。多発性硬化症の評価は MRI による白質病巣や脳萎縮の評価が主なものであるが通常の撮影方法では大脳皮質病変は描出されにくく問題となっている。脳灌流画像であれば皮質機能も含めた評価が可能であると思われる。

#### E. 結論

MRI を用いた ASL 法による脳灌流画像撮影は短時間で可能で侵襲性もなく多発性硬化症患者の脳機能評価に大変有用である。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsuda H, Mizumura S, Nemoto K, Yamashita F, Imabayashi E, Sato N, Asada T: Automatic Voxel-Based Morphometry of Structural MRI by SPM8 plus Diffeomorphic Anatomic

Registration Through Exponentiated Lie Algebra Improves the Diagnosis of Probable Alzheimer Disease. Am J Neuroradiol. 2012 Feb 2. [Epub ahead of print]

- 2) Ota M, Nemoto K, Sato N, Mizukami K, Yamashita F, Asada T: Relationship between white matter T2 hyperintensity and cortical volume changes on magnetic resonance imaging in healthy elders. Int J Geriatr Psychiatry. 26(9): 886-92, Sep, 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

特記すべきことなし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表



## 平成23年度 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	出版社名	出版年
		書籍名	出版地	ページ
佐藤和貴郎, 山村 隆	多発性硬化症とTh17細胞	編集：鈴木則宏, 祖父江元, 荒木信夫, 宇川義一, 川原信隆	中外医学社	2012
		Annual Review 神経2012	東京	253-260
Satoh J	Molecular network analysis of target RNAs and interacting proteins of TDP-43, a causative gene for the neurodegenerative diseases ALS/FTLD.	Wu J	IGI Global	2011
		Biomedical Engineering and Cognitive Neuroscience for Healthcare: Interdisciplinary Applications	Pennsylvania	in press
Satoh J	Human microRNA targetome indicates a specialized role of microRNAs in regulation of oncogenesis.	Azumi AS	Springer	2011
		Systems Biology and Cancer	Netherlands	in press
佐藤 準一	アクアポリン-4 (AQP-4).	山村隆	診断と治療社	2011
		多発性硬化症 (MS) 診療のすべて	東京	in press
佐藤 準一	網羅的遺伝子発現解析からみた病因・病態. 多発性硬化症の病態と診断. 病因・病態をめぐって.	辻省次・吉良潤一	中山書店	2011
		アクチュアル脳・神経疾患の臨床. 最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄炎	東京	in press

平成23年度研究成果に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Miyake S</u>	Mind over cytokines: Crosstalk and regulation between the neuroendocrine and immune systems	Clin Exp Neuroimmunol	3	1-15	2012
Chiba A, Tajima R, Tomi C, Miyazaki Y, <u>Yamamura T</u> , <u>Miyake S</u>	Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis.	Arthritis Rheum	64	153-161	2012
Chiba A, Mizuno M, Tomi C, Tajima R, Alloza I, di Penta A, <u>Yamamura T</u> , Koen Vandenbroeck, <u>Miyake S</u>	A 4-trifluoromethyl analogue of celecoxib inhibits arthritis by suppressing innate immune cell activation.	Arthritis Res Ther	14	R9 (Epub)	2012
Matsuda H, Mizumura S, Nemoto K, Yamashita F, Imabayashi E, <u>Sato N</u> , Asada T	Automatic Voxel-Based Morphometry of Structural MRI by SPM8 plus Diffeomorphic Anatomic Registration Through Exponentiated Lie Algebra Improves the Diagnosis of Probable Alzheimer Disease.	Am J Neuroradiol.	Feb 2.	[Epub ahead of print]	2012
Satoh M, Andoh Y, Clingan CS, Ogura H, Fujii S, Eshima K, Nakayama T, Taniguchi M, Hirata N, Ishimori N, Tsutsui H, Onoe K, <u>Iwabuchi K</u>	Type II NKT cells stimulate diet-induced obesity by mediating adipose tissue inflammation, steatohepatitis and insulin resistance.	PLoS ONE	7(2)	e30568	2012
Tamauchi H, Amoh Y, Ito M, Terashima M, Masuzawa M, Habu S, Katsuoka K, <u>Iwabuchi K</u>	GATA-3 regulates contact hyperresponsiveness in a murine model of allergic dermatitis	Immunobiol			in press
Norio Chihara, <u>Toshimasa Aranami</u> , Wakiro Sato, Yusei Miyazaki, <u>Sachiko Miyake</u> , Tomoko Okamoto, <u>Masafumi Ogawa</u> , Tatsushi Toda and <u>Takashi Yamamura</u> .	Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica	Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	108(9)	3701-6	2011
Sanvito L, Tomita A, Chihara N, Okamoto T, Lin Y, <u>Ogawa M</u> , Gran B, <u>Aranami T</u> , <u>Yamamura T</u>	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
Miyazaki Y, <u>Miyake S</u> , Chiba A, Lantz O, <u>Yamamura T</u>	Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis.	Int Immunol	23	529-535	2011
Ichikawa D, Mizuno M, <u>Yamamura T</u> , <u>Miyake S</u>	GRAIL (Gene related to anergy in lymphocytes) regulates cytoskeletal reorganization through ubiquitination and degradation of Arp2/3 subunit 5 and coronin 1A.	J Biol Chem	286	43465-74	2011

Hirata N, Yanagawa y, Ogura H, Satoh M, Noguchi M, Matsumoto M, Togashi H, Onoe K, <u>Iwabuchi K</u>	The role of tumor necrosis factor- $\alpha$ for interleukin-10 production by murine dendritic cells	Cell Immunol	266 (2)	165-171	2011
Yoshino T, Tabunoki H, Sugiyama S, Ishii K, Kim SU, <u>Satoh J.</u>	Non-phosphorylated FTY720 induces apoptosis of human microglia by activating SREBP2.	Cellular and Molecular Neurobiology	31 (7)	1009-1020	2011
Ota M, Nemoto K, <u>Sato N.</u> Mizukami K, Yamashita F, Asada T	Relationship between white matter T2 hyperintensity and cortical volume changes on magnetic resonance imaging in healthy elders.	Int J Geriatr Psychiatry.	26 (9)	886-92	2011
Adachi Y, <u>Sato N.</u> Okamoto T, Sasaki M, Komaki H, Yamashita F, Kida J, Takahashi T, Matsuda H	Brachial and lumbar plexuses in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: MRI assessment including apparent diffusion coefficient.	Neuroradiology.	53(1)	3-11	2011
Tabunoki H, Ode H, Banno Y, Katsuma S, Shimada T, Mita K, Yamamoto K, Sato R, Ishii-Nozawa R, <u>Satoh J.</u>	BmDJ-1 is a key regulator of oxidative modification in the development of the silkworm, Bombyx mori.	PLoS One	6 (3)	e17683	2011
<u>Satoh J.</u> , Tabunoki H.	Comprehensive analysis of human microRNA target networks.	BioData Mining	4	e17	2011
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	30 (10)	1060-1063	2011
岩濑和也	ナチュラルキラーT細胞の分化と機能	北里医学	41(2)	99-109	2011
<u>佐藤進一</u>	神経変性と神経炎症の分子ネットワーク解析. 脳内免疫システム: 明らかになる神経疾患との関わり.	細胞工学	30 (10)	1028-1035	2011
<u>佐藤進一</u>	分子ネットワークからみた多発性硬化症の創薬標的分子. 特集I 神経免疫の新展開.	炎症と免疫	19 (6)	543-552	2011

## IV. 研究成果の刊行物・別刷