

型偏倚リガンド)<sup>27</sup>など様々な生物活性を有するものが合成されており、現在でも新たなリガンド(例えば、ヒトのTh1型偏倚リガンドとして、NU- $\alpha$ -GalCer<sup>28</sup>)の合成と探索は続いている。ちなみに前述のCD1ファミリーの各分子のリガンドについても明らかになっている (Figure 3B)。CD1aには、dideoxymycobactin (DDM)<sup>29</sup>、CD1bにはglucose monomycolate (GMM)<sup>30</sup>、CD1cにはmannosylphosphomycoketide<sup>31</sup>など、いずれも結核菌由来の非リポソーム性リポペプチドや複合脂質が結合するのが特徴で、CD1は、結核菌に対する生体防御を担うために存在する分子と推定される。

NKT細胞のセクターリガンド探索の話題に戻る。リガンドとして初めてスフィンゴ糖脂質が明らかにされたこともあり、関連代謝経路の変異マウスや新たに作製したノックアウトマウスで、NKT細胞分化に障害が生じるか否かを評価し、リガンド候補の探索が行われている。その結果、NKT細胞のはっきりした分化障害を示すものは $\beta$ -glucosylceramide ( $\beta$ -GlcCer) 合成酵素<sup>32</sup>のみで、sulfatideやganglioside方面にはないことが

推測された。別のアプローチとして、NKT細胞ハイブリドーマに様々な脂質リガンドを共培養し、IL-2産生でスクリーニングすると、スフィンゴ脂質やリン脂質など生体に通常存在する脂質の多くがリガンドになり得ることが判明した<sup>33</sup>。リガンドの遍在により、NKT細胞はベースラインとして前活性化段階にあると考えることも可能である。2004年には、Sandhoff病のモデルとして作製されていた $\beta$ -hexosaminidase (Hexb) KOマウス<sup>34</sup>で、NKT細胞の分化障害があることが見出された。そこで、isoglobotriaosylceramide (iGb<sub>3</sub>)がNKT細胞リガンドとしても機能することから、iGb<sub>3</sub>が胸腺内セクター・内因性リガンドの最有力候補となった(確かに $\beta$ -GlcCerの先の産物)<sup>35</sup>。iGb<sub>3</sub>はiGb<sub>4</sub>からHexbにより水解して生成すると予測され、Hexbの欠損で減少するとされた (Figure 5)。しかし、iGb<sub>3</sub>は胸腺には存在しないという生化学的事実のもと(マウスでは脊髄後根神経節にのみ存在)<sup>36</sup>、ドイツのグループによりiGb<sub>3</sub>合成酵素のKOマウスが作製され、同マウスではNKT細胞生成に障害が認められないことからiGb<sub>3</sub>セクター説は

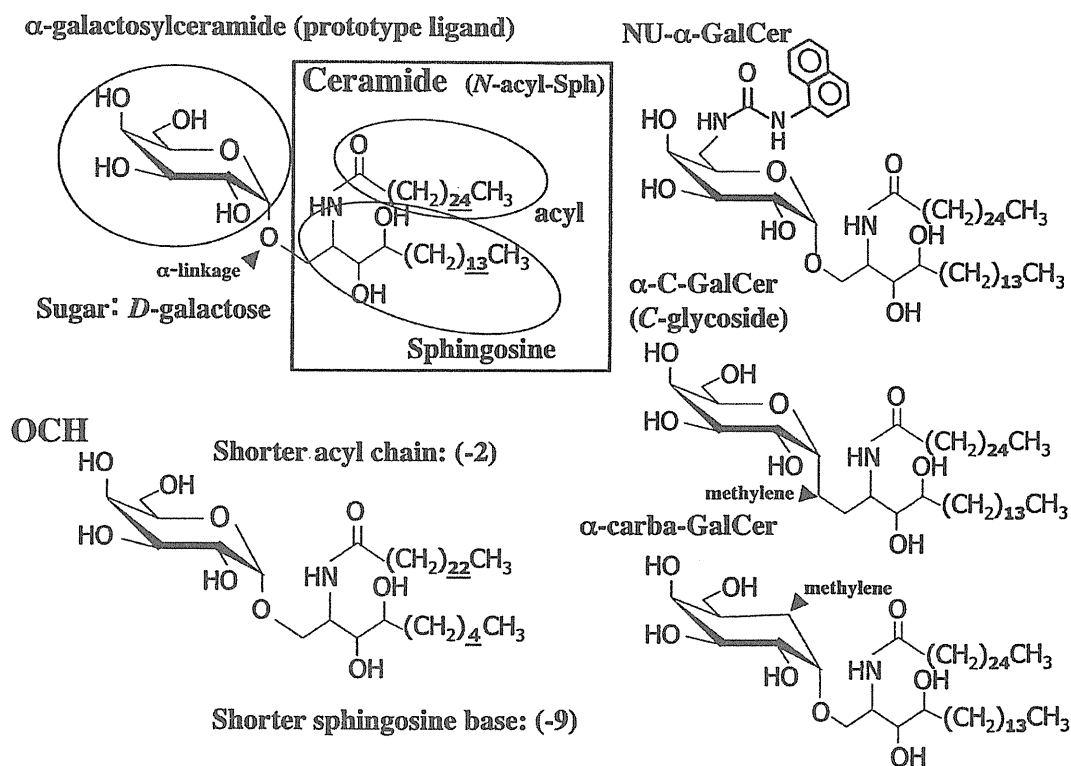


Figure 4. iNKT cell ligands

Representative ligands for iNKT cells presented by CD1d molecules are shown. A prototype ligand,  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer): (2*S*, 3*S*, 4*R*)-1-*O*-( $\alpha$ -*D*-galactopyranosyl)-2-(*N*-hexacosanoylamino)-1, 3, 4-octadecanetriol. Sugar moiety, acyl chain and sphingosine parts are marked as ellipsoids, and the ceramide part as square. Th2-biased ligand, OCH: (2*S*, 3*S*, 4*R*)-1-*O*-( $\alpha$ -*D*-galactopyranosyl)-2-(*N*-tetracosanoylamino)-1, 3, 4-nonanetriol. Th1-biased ligand in mice,  $\alpha$ -*C*-GalCer (*C*-glycoside) does not have oxygen between the sugar ring and ceramide, thus being resistant to hydrolytic cleavage.  $\alpha$ -carba-GalCer, known as RCAI-56, is Th1-biased ligand and has a cyclohexane ring instead of a pyran ring. NU (naphthylurea)- $\alpha$ -GalCer is a Th1-inducing analogue for human iNKT cells for *C*-glycoside in mice. The naphthol-ring is supposed to stick into human CD1d groove to stabilize binding.

覆された<sup>37</sup>。Hexb KOでNKT細胞の減少が認められたのは、酵素欠損によりCD1dをnon-selectorが占拠することで分化が妨害されたためであると考えられる。ただし、リガンドとしてのiGb<sub>3</sub>は不動である。また、後述するが、感染をモニターすることでiGb<sub>3</sub>の量を増加させて、NKT細胞を活性化し、感染に対抗するメカニズムがあることが報告され<sup>38</sup>、内因性リガンドとしてのiGb<sub>3</sub>の意義も再発見されている。同じく、感染により toll-like receptor (TLR) の下流でlactosylceramide (LacCer) 合成酵素の阻害が起きるために、LacCerの前段階にあるβ-GlcCerの濃度上昇によってNKT細胞が活性化するというメカニズムも提唱されている<sup>39</sup>。前述した、β-GlcCer合成酵素の遺伝子破壊でNKT細胞の分化障害が認められるということ<sup>32</sup>と併せて考えると、β-GlcCer自体がセレクターリガンドである可能性もあり、今後の検証が必要である。

(4) 正の選択の第2シグナル

iTCRが [CD1d + x] と結合し、入力される第1シグナル (TCRシグナル) の他にNKT細胞の分化には、もう一つのシグナルがさらに必須である。T細胞では目立った異常が認められないFyn KOでNKT細胞分化が大きく障害されることが知られていたが<sup>40</sup>、Fynにより伝達されるシグナルが実はこの第2のシグナルで、それは signaling lymphocytic activation molecules (SLAM) から入力されるものである<sup>41</sup>。SLAMは、immunoglobulin superfamily (IgSF) に属し、自身もSlamファミリーを形

成する。Slamファミリーは染色体 (ヒト・マウスとも第1染色体) 上に近接して存在し、それらはSLAM (CD150: Slamf1) の他、CD48 (f2) Ly9 (f3) 2B4 (f4) CD84 (f5) Ly-108 (natural killer, T and B cell antigen: NTB-A) (f6) CD2-like receptor activating cytotoxic cells (CRACC: f7) が、クラスターを形成している<sup>42</sup>。これらは、NK細胞やT細胞機能などに関与する分子であり、免疫機能に重要な役割を果たしている。セレクターとしてのDP胸腺細胞上にはCD1dの他にSlamf1が発現し、一方のNKT前駆細胞上のSlamf6と相互作用する。Slamf6がSLAM-associated protein (SAP) を介して、Fynと会合し、おそらく第1シグナルと同時に、余り時を措かずにFynの活性化を生じ、様々な下流分子がチロシンリン酸化されて行くことが予想されている (Figure 6)<sup>43</sup>。これらのうち、protein kinase C theta (PKCθ) を介しBcl10-CARMA1-MALT1 (BCM) 複合体からNF-κB系へ連繋する一方、他方はSlamf6自身やSH2-containing inositol phosphatase (SHIP) やDok docking protein (Dok) 1/Dok2/Ras GTPase-activating protein (RasGAP) などのリン酸化によりTCRシグナルの減殺の方向に働く と推定される。骨髄由来細胞によるアゴニストセレクションを経て生存する為には、シグナルを若干減弱することが必要なのかもしれない。

CD4<sup>+</sup> T細胞を、class II MHCが皮質胸腺上皮細胞ではなく、CD4<sup>+</sup>胸腺細胞にしか発現されない人工的な条件下で分化させると、生成したCD4<sup>+</sup> T細胞 (T-CD4 T)

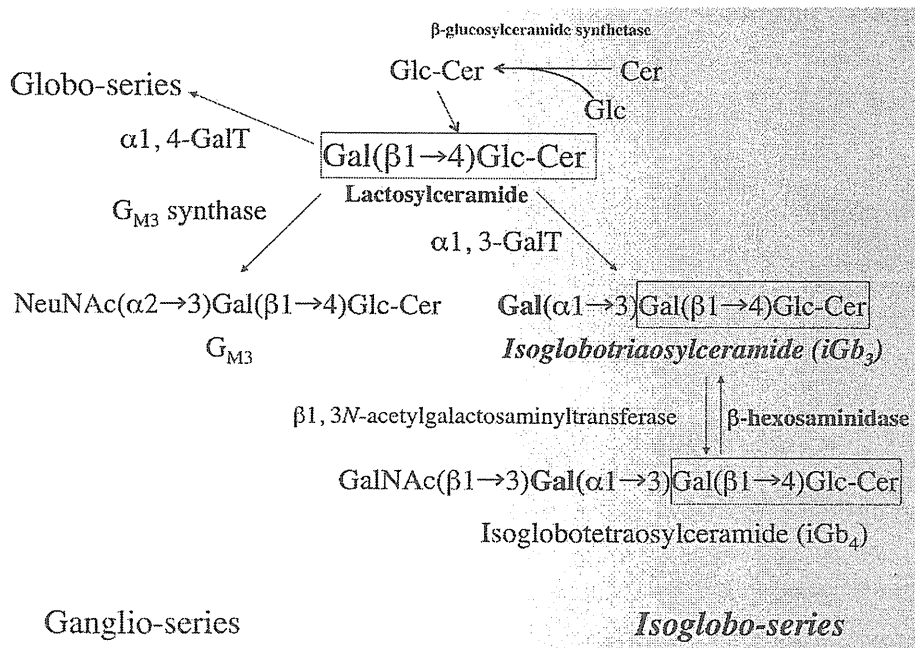


Figure 5. Biosynthetic pathway of glycosphingolipids in mammals

Endogenous ligand iGb<sub>3</sub> is synthesized from lactosylceramide by transferring galactose with α1, 3-galactosyltransferase (α1, 3-GalT) and then N-acetylgalactosamine with β1, 3N-acetylgalactosaminyltransferase to give rise iGb<sub>4</sub>. iGb<sub>4</sub> had been regarded as an important source of iGb<sub>3</sub> but currently is not.

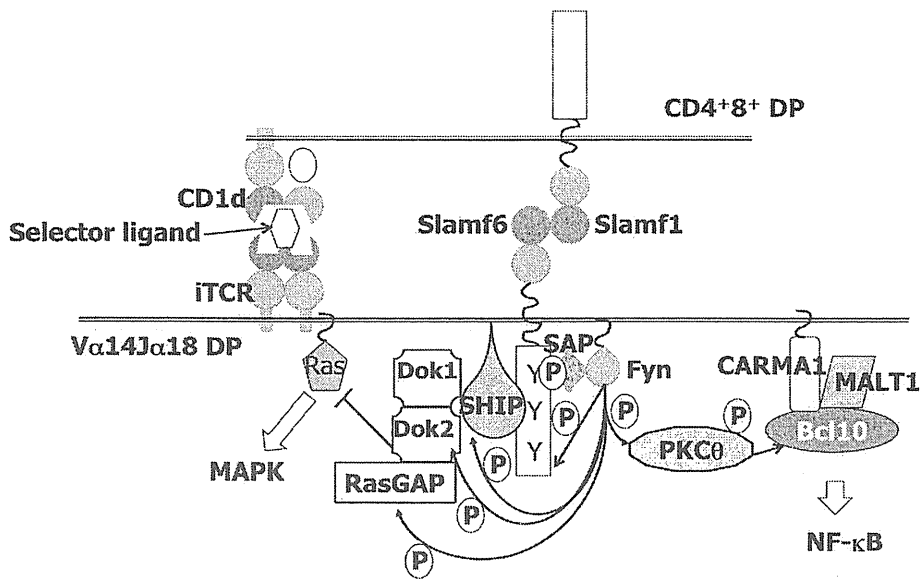


Figure 6. Downstream signals of SLAM-SLAM interactions

SLAM (signaling lymphocytic activation molecule) signal is transmitted through SLAM-associated protein (SAP) to Fyn PTK (protein tyrosine kinase). Fyn then phosphorylates multiple targets and spread the unique information through NF- $\kappa$ B via PLC $\theta$  and may reduce or dampen strong signals through activating RasGAP that inhibits the Ras/MAPK pathway.<sup>43</sup>

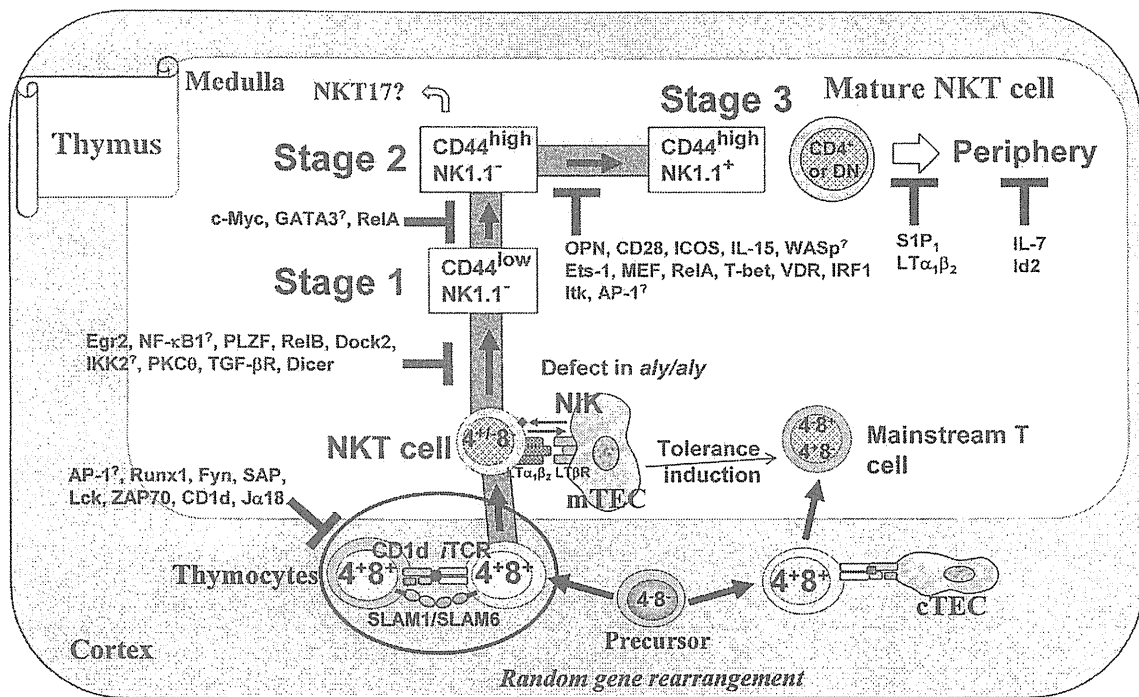


Figure 7. Intrathymic development and maturation of NKT cells in mice

NKT cells that receive the positive-selecting signals and SLAM signal (and the 3rd signal from mTEC) must follow maturation step from stage 0 (CD24<sup>+</sup>CD44<sup>lo</sup>NK1.1<sup>-</sup>)→stage 1 (CD24<sup>+</sup>CD44<sup>lo</sup>NK1.1<sup>-</sup>)→stage 2 (CD24<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>NK1.1<sup>-</sup>)→stage 3 (CD24<sup>+</sup>CD44<sup>hi</sup>NK1.1<sup>+</sup>) before emigration from thymus. Some NKT cells (NKT17) may exit from stage 2, which may imply that heterogenous subsets are included on this maturation cascade and that not all cells follow 0→3 stages. Various gene products are listed that have been shown to affect NKT cell development and maturation next to the blockade marks.<sup>45</sup>

は、刺激後短時間でIL-4やIFN- $\gamma$ を産生し、IL-4なしでもIL-5、IL-13を産生するというNKT細胞様(自然リンパ球的)の反応パターンを示す<sup>44</sup>。このような特性を誘導することにSLAMが関与するのではないかと推測されるが、T-CD4 Tの分化にとってSLAMの変異は、NKT細胞分化に与えるほど重大ではなかった。一方、SAP-Fyn-PKC $\theta$ 系のシグナルはT-CD4 Tの「自然リンパ球らしさ (innateness)」の獲得に重要であることから、この系ではSLAMに代わる類似分子がこの役割を担っているのかもしれない。

(5) 選択後の成熟過程

NKT細胞はDP胸腺細胞から重要なシグナルを受けるが、その後4つのstage (0~3) を経て成熟し末梢へ散布される。成熟過程は、CD24<sup>+</sup>CD44<sup>lo</sup>NK1.1<sup>-</sup>のstage 0から、以降CD24<sup>-</sup>となった細胞をCD44とNK1.1(あるいはNK1.1非発現系統ではLy49など)の発現によりstage 1 (CD44<sup>lo</sup>NK1.1<sup>-</sup>)→stage 2 (CD44<sup>hi</sup>NK1.1<sup>-</sup>)→stage 3 (CD44<sup>hi</sup>NK1.1<sup>+</sup>)と進行するように考えられている<sup>45</sup> (Figure 7)。stage 1に入る前の段階で、まず放射線抵抗性の上皮細胞成分の機能が成熟過程のスタートには必要である。我々は、以前NF- $\kappa$ B inducing kinase (NIK)の点突然変異 (855GがRに変異)によって、NKT細胞の特に胸腺における細胞数が激減することを見出し、第1、第2シグナルの他にNKT細胞上のlymphotoxin (LT)  $\alpha_1\beta_2$ 、髄質胸腺上皮に発現するlymphotoxin  $\beta$  receptor (LT $\beta$ R), その下流のNIK→IKK $\alpha$ →RelB/p100→RelB/p52というalternative NF- $\kappa$ B経路から誘導される何らかの産

物が、第3のシグナルとしてNKT細胞の分化に必要であることを明らかにした<sup>46</sup>。このステップは成熟過程のかなり早い段階と考えられるが、一旦このブロックを越えられた細胞はstage 3まで進むことが可能であり、代替経路があるのかもしれない。また、osteopontin (OPN) KOではstage 2→3のブロックがあることを見出したが<sup>47</sup>、詳細なメカニズムは不明である。末梢におけるサイトカイン産生のへの影響から考えるとGATA3を介する可能性があるが、GATA3 KOではstage 2↓ (stage 1→2のブロックあるいはstage 2の減少)である。その他、NKT細胞分化に影響を与え得る分子 (ZAP-70<sup>48</sup>他)は、特定のstageが減少する場合に、その直前のステップをブロックする因子として記したが (Figure 7)、詳しくは文献45を参照されたい。

NKT細胞特異的に発現している重要な転写因子として、promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF:あるいはzinc finger and BTB-domain containing 16: Zbtb16)が明らかにされている<sup>49</sup>。PLZF KOでは、やはりNKT細胞が著減、stage 2→3のステップが阻止され、NKT細胞の局在が大きく変わっている。通常分布しないリンパ節にNKT細胞が認められるのが特徴である。さらにサイトカイン産生が著減し、産生の即時性も認められなくなる等、分化だけでなく機能の面でもinnatenessが失われていた。PLZFはまたMAITにも発現し<sup>50</sup>、このことはNKTとMAITが同じカテゴリーに属する細胞群であることを示唆している。

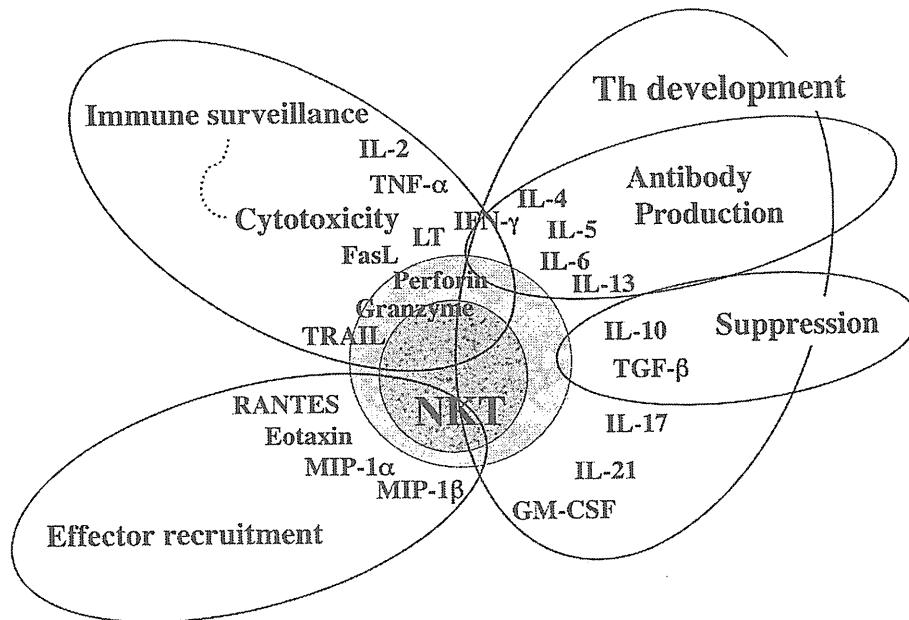


Figure 8. Cytokines/chemokines/effector molecules produced by activating NKT cells  
NKT cells could exhibit various functions with wide varieties and copious amounts of soluble factors.

## 2. NKT細胞の機能

### (1) Type I vs Type II NKT細胞

NKT細胞は、先に述べたiTCRを用いるtype I NKT (iNKT) 細胞と、CD1dには拘束されるが、その他のTCRを使用するtype II NKT細胞に分類されている<sup>1</sup>。大雑把に言うとな型I NKT細胞は、 $\alpha$ -GalCerをリガンドとして、Th1 (Th2) エフェクター機能を、type II NKT細胞は、sulfatideなどをリガンドとして調節性機能を呈する亜群と捉えられる。type II NKT細胞の中ではsulfatide/CD1dと結合する亜群が比較的メジャーな亜群と考えられているが、type II亜群をsulfatide-CD1dマルチマーで明瞭に検出出来る研究者は限定されており、特別な方法が必要なのではないかと考えられる。最近、 $J\alpha 18$  KOマウスにマイナーな $\alpha$ -GalCer-CD1d<sup>+</sup>亜群が検出され $V\alpha 10J\alpha 50$ 亜群であることが報告された<sup>51</sup>。したがって $J\alpha 18$  KOであっても、iNKT細胞様亜群が残存していたことになる(ただし、 $\alpha$ -GalCerよりも $\alpha$ -GlcCerにaffinityが高かった)。またtype Iとtype II NKT細胞間でreciprocalな制御ループが明らかにされており<sup>52</sup>、NKT細胞の機能制御は制御性T細胞 (regulatory T cell: Treg) なども含め複数の機能制御機構が働いている可能性がある。

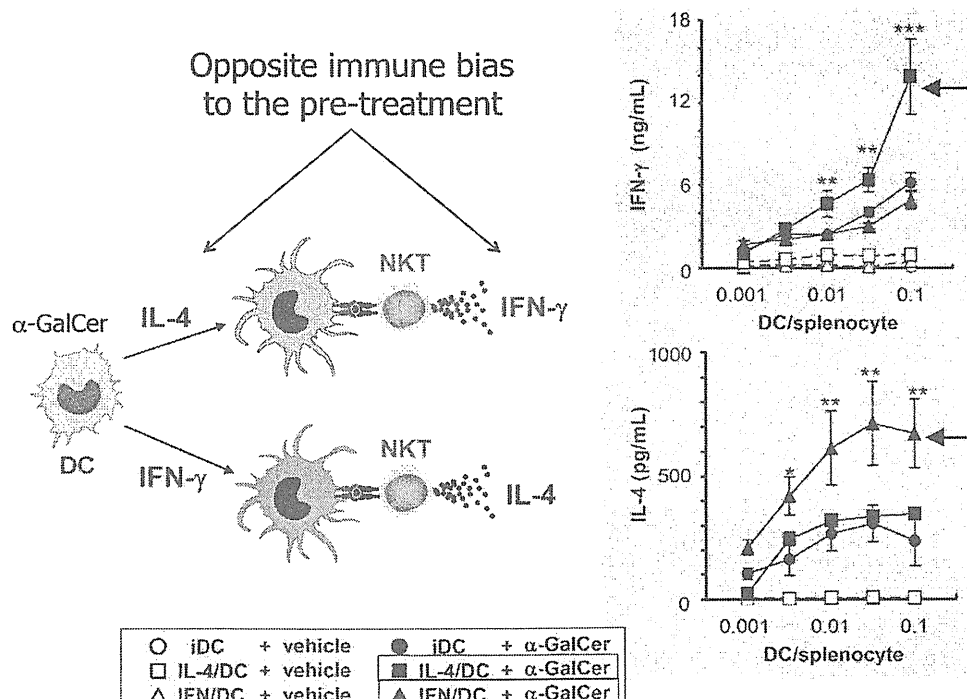
### (2) サイトカイン・ケモカイン・その他のエフェクター分子の産生

NKT細胞は、「免疫界のスイスアーミーナイフ」<sup>53</sup>と呼ばれるほど、サイトカインとしてIL-2, 4, 5, 6,

10, 13, 17, 21, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LT, GM-CSFなどを、ケモカインとしてRANTES, eotaxin, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2などを、効果分子としてFas ligand (FasL), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), perforin, granzymeなど、様々な産物を産生し得る。これらの産物により、単一のサブセットが全てをカバーしないまでも、T細胞機能分化促進、抗体産生増強、免疫抑制、免疫監視、細胞傷害、細胞動員など多彩な機能を果たすことが出来る (Figure 8)。VEGFの産生も報告されており<sup>54</sup>、NKT細胞が未だ報告されていないタンパク・ペプチド・低分子代謝産物を分泌、あるいはそれらの物質に対する受容体を持つことにより、予想外の生体応答を示す可能性がある。一例として、NKT細胞はノルアドレナリン (NA) 受容体を発現している<sup>55</sup>が、マウスの中大脳動脈 (MCA) 結紮による脳梗塞モデルで、梗塞後のNAシグナルによって肝NKT細胞から多量のIL-10が産生される。このIL-10による強い免疫抑制が梗塞後に非常に問題となる易感染性を引き起こしていることが示された<sup>56</sup>。この系では、 $\alpha$ -GalCerによる活性化や $\alpha$ -adrenergic受容体アンタゴニスト投与などのNKT細胞機能修飾に生命予後に対する有益な効果が認められている。

### (3) NKT細胞のネガティブフィードバック制御

ナイーブCD4<sup>+</sup> T細胞のヘルパーT細胞の*in vitro*分化系では、Th1への分化にはIL-12が、Th2への分化にはIL-4が、培養液中に必要である。このように、最終的



**Figure 9.** Reciprocal enhancements of cytokine production by NKT cells with dendritic cells pre-conditioned with cytokines. NKT cells produced cytokines opposite (such as Th1) to those that had been used for pre-conditioning (such as Th2).

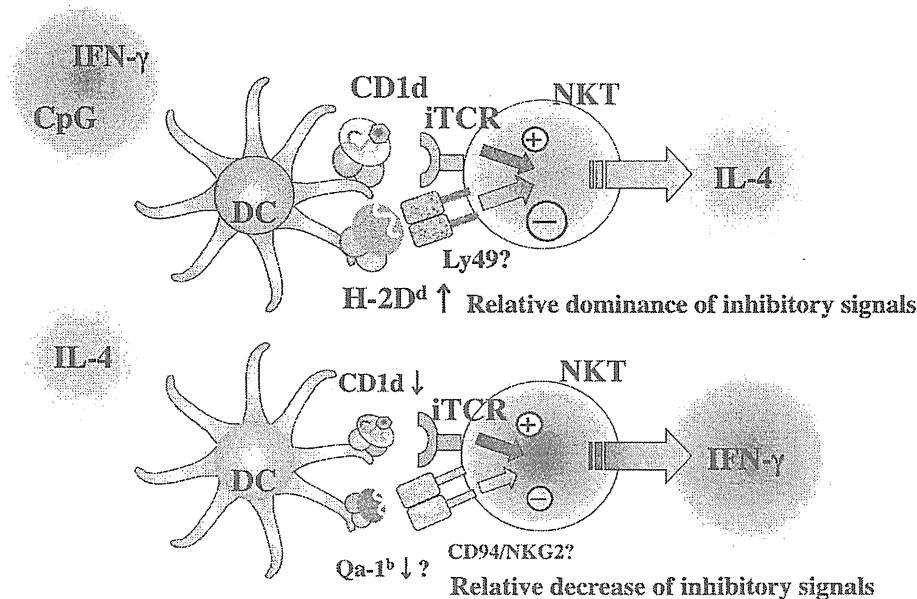
に分化する方向と同じサイトカインが環境にあると、その方向に免疫偏倚を生じるので、分化はポジティブフィードバックで制御されていると考えられる。一方、NKT細胞のサイトカイン産生や免疫偏倚に対して、環境中のサイトカインはどのようなpre-conditioning効果を示すのであろうか。このような関心から、樹状細胞 (DC) に  $\alpha$ -GalCer をパルスし、その後IL-4あるいはIFN- $\gamma$  で前処置、NKT細胞と共培養し、NKT細胞からのサイトカイン産生プロファイルを解析した。その結果、IL-4で前処置した場合IFN- $\gamma$  が、IFN- $\gamma$  で前処置した場合はIL-4がより優先的に誘導されることを見出した (Figure 9)<sup>57</sup>。すなわち、NKT細胞の場合には機能分化はネガティブフィードバックで制御されているように考えられた。また、IL-4と同じファミリーに属するIL-21の場合もコントロールに比して、IFN- $\gamma$  産生が強く誘導された<sup>58</sup>。また、サイトカインだけでなく、CpG (Th1系の応答誘起) の場合も、IL-4の産生増強に繋がった。IFN- $\gamma$ 、CpGなどを処置してDCに誘導された細胞膜表面分子を解析すると、CD1d・クラスII MHC・共刺激分子の発現の上昇が認められた。CpGでDCを前処理した実験系では、特にDC上のH-2D<sup>d</sup>分子の発現上昇が認められた。H-2D<sup>d</sup>の欠損は、NKT細胞からのIFN- $\gamma$ 産生を増強することから<sup>59</sup>、H-2D<sup>d</sup>分子の発現増強がIL-4産生増強に関連している可能性が考えられた。そこで  $\alpha$ -GalCerパルスDCをCpGで処理し、NKT細胞と共培養する系に抗D<sup>d</sup>抗体を添加して、D<sup>d</sup> (と、おそらくは

NKT細胞上の抑制性受容体Ly49の相互作用) をブロックした場合にはCpG前処置で増強したIL-4産生が確かに認められなくなった<sup>60</sup>。一方、IL-4の前処置でIFN- $\gamma$ 産生が増強した場合に、DC上の抑制性分子のQa-1<sup>b</sup>発現の低下を認めた<sup>57</sup>。抗体によるブロックで確認はされていないが、Qa-1<sup>b</sup>//CD94/NKG2Aシグナルの遮断は強力なIFN- $\gamma$ の誘導に繋がるため<sup>61</sup>、こちらも抑制性リガンド/受容体の発現修飾によりサイトカイン産生に変化を生じたものと考えられた。NKT細胞の応答は、基本的にはTCR/リガンド-CD1dからのシグナルに加えて、抑制性リガンド・受容体のシグナルによっても調節されていることがわかる (Figure 10)。このようなメカニズムにより、入力からみるとその逆方向へ舵を切るような出力をすることにより、免疫応答を過剰にTh1あるいはTh2方向に偏倚しないように制御しているように思われる。この基本的な性質が、さまざまな疾患の制御や治療に対して大きな影響を与えるであろうことは想像に難くない。

後編では各種疾患の発症・進展に対するNKT細胞の役割とNKT細胞を標的とした治療を中心に述べたい。

## 文 献

1. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of the NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 297-336.



**Figure 10.** Th1/Th2 balance is regulated through modulation of the expression of inhibitory receptors between dendritic cells (DC) and NKT cells in negative feedback fashion. Pre-treatment of  $\alpha$ -GalCer-pulsed DC with Th1-biased stimuli, CpG, induced enhanced expression of D<sup>d</sup> molecules on DC and resulted in enhanced production of IL-4 by NKT cells. Ab blockade of D<sup>d</sup> in co-culture of NKT cells with CpG-treated DC reduced the production of IL-4 to the level of non-preconditioned DC stimulation.

2. Treiner E, Duban L, Bahram S, et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 2003; 422: 164-9.
3. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, et al. A novel population of T-cell receptor  $\alpha\beta$ -bearing thymocytes which predominantly expresses a single  $V\beta$  gene family. *Nature* 1987; 329: 251-4.
4. Arase H, Arase N, Ogasawara K, et al. An NK1.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> single-positive thymocytes subpopulation that expresses highly skewed T-cell antigen receptor  $V\beta$  family. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 6506-10.
5. Bendelac A, Schwartz RH. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature* 1991; 353: 68-71.
6. Arase H, Arase N, Nakagawa K, et al. NK1.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur J Immunol* 1993; 23: 307-10.
7. Yoshimoto T, Paul WE. CD4<sup>pos</sup>, NK1.1<sup>pos</sup> T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 1994; 179: 1285-95.
8. Seki S, Abo T, Ohteki T, et al. Unusual  $\alpha\beta$ -T cells expanded in autoimmune lpr mice are probably a counterpart of normal T cells in the liver. *J Immunol* 1991; 147: 1214-21.
9. Koseki H, Imai K, Ichikawa T, et al. Predominant use of a particular alpha-chain in suppressor T cell hybridomas specific for keyhole limpet hemocyanin. *Int Immunol* 1989; 1: 557-64.
10. Makino Y, Kanno R, Ito T, et al. Predominant expression of invariant  $V\alpha 14$  TCR  $\alpha$  chain in NK1.1<sup>+</sup> T cell population. *Int Immunol* 1995; 7: 1157-61.
11. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor  $\alpha$  chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> T cells in mice and humans. *J Exp Med* 1994; 180: 1097-106.
12. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007; 25: 354-64.
13. Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, et al. Genetic evidence supporting selection of the  $V\alpha 14i$  NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity* 2005; 22: 705-16.
14. Dashtsoodol N, Watarai H, Sakata S, et al. Identification of CD4(-)CD8(-) double-negative natural killer T cell precursors in the thymus. *PLoS One* 2008; 3: e3688.
15. Tillroy F, Di Santo JP, Bendelac A, et al. Thymic dependence of invariant  $V\alpha^+$  natural killer-T cell development. *E J Immunol* 1999; 29: 3313-18.
16. Cardell S, Tangri S, Chan S, et al. CD1-restricted CD4<sup>+</sup> T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *J Exp Med* 1995; 182: 993-1004.
17. Bendelac A, Killeen N, Littman DR, et al. A subset of CD4<sup>+</sup> thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 1994; 263: 1774-8.
18. Bix M, Coles M, Raulet D. Positive selection of  $V\beta 8^+$  CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> thymocytes by class I molecules expressed by hematopoietic cells. *J Exp Med* 1993; 178: 901-8.
19. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, et al. CD1 recognition by mouse NK1<sup>+</sup> T lymphocytes. *Science* 1995; 268: 863-5.
20. Porcelli SA. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv Immunol* 1995; 59: 1-98.
21. Bendelac A. Positive selection of mouse NK1<sup>+</sup> T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* 1995; 182: 2091-6.
22. Dougan SK, Rava P, Hussain MM, et al. MTP regulated by an alternate promoter is essential for NKT cell development. *J Exp Med* 2007; 204: 533-45.
23. Honey K, Benlagha K, Beers C, et al. Thymocyte expression of cathepsin L is essential for NKT cell development. *Nat Immunol* 2002; 3: 1069-74.
24. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of  $V\alpha 14$  NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997; 278: 1626-9.
25. Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001; 413: 531-4.
26. Schmiege J, Yang G, Franck RW, et al. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide. *J Exp Med* 2003; 198: 1631-41.
27. Tashiro T, Sekine-Kondo E, Shigeura T, et al. Induction of Th1-biased cytokine production by  $\alpha$ -carba-GalCer, a neoglycolipid ligand for NKT cells. *Int Immunol* 2010; 22: 319-28.
28. Pauwels N, Aspeslagh S, Vanhoenacker G, et al. Divergent synthetic approach to 6''-modified  $\alpha$ -GalCer analogues. *Org Biomol Chem* 2011; 9: 8413-21.
29. Moody DB, Young DC, Cheng TY, et al. T cell activation by lipopeptide antigens. *Science* 2004; 303: 527-31.
30. Moody DB, Reinhold BB, Guy MR, et al. Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. *Science* 1997; 278: 283-6.
31. Scharf L, Li NS, Hawk AJ, et al. The 2.5 Å structure of CD1c in complex with a mycobacterial lipid reveals an open groove ideally suited for diverse antigen presentation. *Immunity* 2010; 33: 853-62.
32. Stanic AK, De Silva AD, Park JJ, et al. Defective presentation of the CD1d1-restricted natural  $V\alpha 14J\alpha 18$  NKT lymphocyte antigen caused by  $\beta$ -D-glucosylceramide synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1849-54.
33. Gumperz JE, Roy C, Makowska A, et al. Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* 2000; 12: 211-21.
34. Sango K, McDonald MP, Crawley JN, et al. Mice lacking both subunits of lysosomal  $\beta$ -hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. *Nat Genet* 1996; 14: 348-52.
35. Zhou D, Mattner J, Cantu C 3rd, et al. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 2004; 306: 1786-9.
36. Speak AO, Salio M, Neville DC, et al. Implications for invariant natural killer T cell ligands due to the restricted presence of isoglobotrihexosylceramide in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5971-6.
37. Porubsky S, Speak AO, Luckow B, et al. Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5977-82.
38. Darmoise A, Teneberg S, Bouzonville L, et al. Lysosomal  $\alpha$ -galactosidase controls the generation of self lipid antigens for natural killer T cells. *Immunity* 2010; 33: 216-28.
39. Brennan PJ, Tatituri RVV, Brigl M, et al. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol* 2011; 12: 1202-11.
40. Gadue P, Morton N, Stein PL. The Src family tyrosine kinase Fyn regulates natural killer T cell development. *J Exp Med* 1999; 190: 1189-96.
41. Griewank K, Borowski C, Rietdijk S, et al. Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* 2007; 27: 751-62.
42. Schwartzberg PL, Mueller KL, Oi H, et al. SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 39-46.

43. Borowski C, Bendelac A. Signaling for NKT cell development: the SAP-FynT connection. *J Exp Med* 2005; 201: 833-6.
44. Li W, Sofi MH, Rietdijk S, et al. The SLAM-associated protein signaling pathway is required for development of CD4<sup>+</sup> T cells selected by homotypic thymocyte interaction. *Immunity* 2007; 27: 763-74.
45. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Rev Immunol* 2010; 11: 197-206.
46. Nakagawa K, Iwabuchi K, Iwabuchi C, et al. Generation of NK1.1<sup>+</sup> T cell antigen receptor  $\alpha/\beta$ <sup>+</sup> thymocytes associated with intact thymic structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2472-5.
47. Diao H, Iwabuchi K, Kon S, et al. Osteopontin regulates development and function of invariant natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 15884-9.
48. Iwabuchi K, Iwabuchi C, Tone S, et al. Defective development of NK1.1<sup>+</sup> T-cell antigen receptor  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> cells in zeta-associated protein 70 null mice with an accumulation of NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK-like cells in the thymus. *Blood* 2001; 97: 1765-75.
49. Kovalovsky D, Uche OU, Eladad S, et al. The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol* 2008; 9: 1055-64.
50. Savage AK, Constantinides MG, Han J, et al. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* 2008; 29: 391-403.
51. Uldrich AP, Patel O, Cameron G, et al. A semi-invariant V $\alpha$ 10<sup>+</sup> T cell antigen receptor defines a population of natural killer T cells with distinct glycolipid antigen-recognition properties. *Nat Immunol* 2011; 12: 616-23.
52. Terabe M, Berzofsky JA. NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: cross-regulation between two subsets. *Trends Immunol* 2007; 28: 491-6.
53. Matsuda JL, Mallewaey T, Scott-Browne J, et al. CD1d-restricted iNKT cells, the "Swiss-Army knife" of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 358-68.
54. Hijioka K, Sonoda KH, Tsutsumi-Miyahara C, et al. Investigation of the role of CD1d-restricted invariant NKT cells in experimental choroidal neovascularization. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374: 38-43.
55. Minagawa M, Oya H, Yamamoto S, et al. Intensive expansion of natural killer T cells in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice and its association with sympathetic nerve activation. *Hepatology* 2000; 31: 907-15.
56. Wong CH, Jenne CN, Lee W-Y, et al. Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke. *Science* 2011; 334: 101-5.
57. Minami K, Yanagawa Y, Iwabuchi K, et al. Negative feedback regulation of T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine balance via dendritic cell and natural killer T cell interactions. *Blood* 2005; 106: 1685-93.
58. Maeda M, Yanagawa Y, Iwabuchi K, et al. IL-21 enhances dendritic cell ability to induce interferon- $\gamma$  production by natural killer T cells. *Immunobiol* 2007; 212: 537-47.
59. Ikarashi Y, Mikami R, Bendelac A, et al. Dendritic cell maturation overrules H-2D-mediated natural killer T (NKT) cell inhibition: critical role for B7 in CD1d-dependent NKT cell interferon  $\gamma$  production. *J Exp Med* 2001; 194: 1179-86.
60. Mizuuchi K, Yanagawa Y, Iwabuchi K, et al. H-2D<sup>d</sup>-mediated upregulation of interleukin-4 production by natural killer T cell and dendritic cell interaction. *Immunology* 2008; 124: 102-11.
61. Ota T, Takeda K, Akiba H, et al. IFN- $\gamma$  mediated negative feedback regulation of NKT-cell function by CD94/NKG2. *Blood* 2005; 106: 184-92.

## Development and function of natural killer T (NKT) cells

Kazuya Iwabuchi

Department of Immunology, Kitasato University School of Medicine

NKT cells constitute a unique subset of T cells that recognize lipid antigens (Ag) in the context of CD1d molecules. NKT cells simultaneously express NK markers with T-cell signature, thus include natural killer (NK) in the name. NKT cells are positively selected with CD1d + endogenous lipid Ag on CD4<sup>+</sup>8<sup>+</sup> thymocytes, whereas conventional T cells are selected with MHC + endogenous peptide Ag on cortical epithelial cells in the thymus. NKT cells exhibit an innate-like effector function and could promptly produce a large amount of varieties of cytokines and chemokines upon stimulation. Therefore, NKT cells could modulate the development of inflammatory and autoimmune diseases through the various functions, suggesting that NKT cells may serve as a reasonable target for disease intervention.

**Key words:** innate lymphocytes, NKT cells, CD1, intrathymic development, lipid ligand



# 神経変性と神経炎症の分子ネットワーク解析

Molecular Network Analysis of Neurodegenerative and Neuroinflammatory Diseases

佐藤 準一

Jun-ichi Satoh

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た。創薬研究の中心は網羅的発現解析を統合したオミックス研究に基盤を置く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。いまだ特効薬がない神経変性疾患 アルツハイマー病や炎症性脱髄疾患 多発性硬化症では、分子機序の解明および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。最近、筆者らは神経疾患のオミックスデータに関して、分子ネットワークを詳細に解析して、創薬標的分子を同定した。今後はゲノムワイドの分子ネットワーク解析が、神経難病の病態解明や治療薬開発のためにますます重要な研究戦略となると思われる。



key words

KeyMolnet, 分子ネットワーク, 創薬標的分子, システムバイオロジー

## はじめに

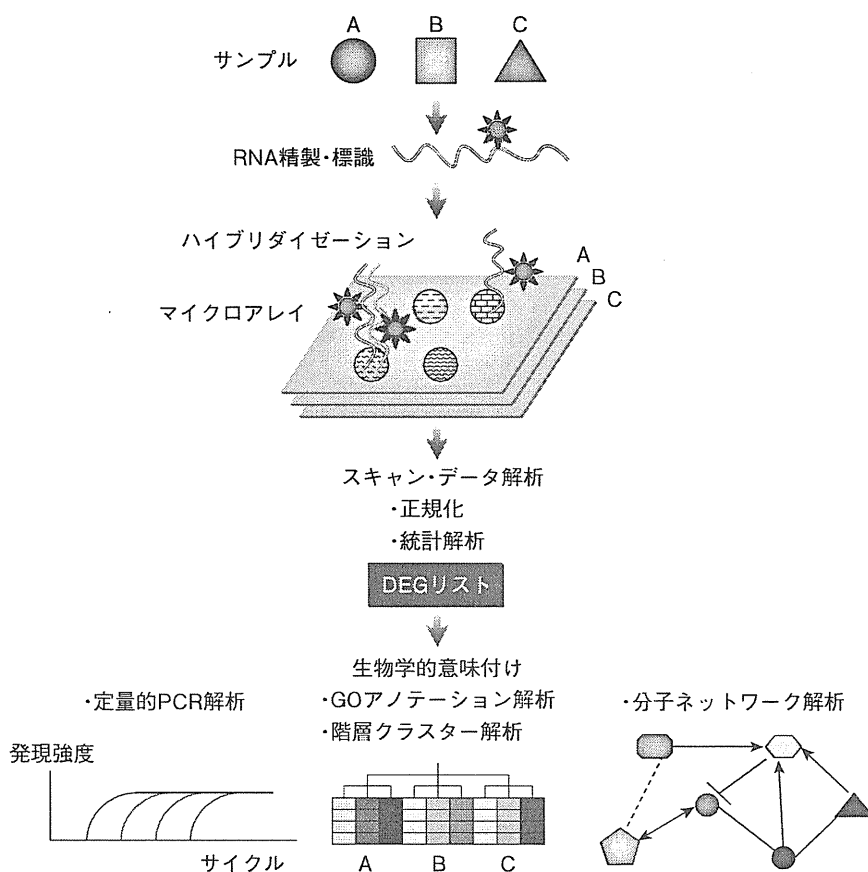
アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) は、中高年期に発症し、進行性の認知機能障害を呈する神経変性疾患で、いまだ特効薬がない難病である。病理学的には、海馬や大脳皮質を中心に A $\beta$  (amyloid beta) の蓄積と異常リン酸化タウを含む神経原線維変化の出現を主徴とし、広汎な神経細胞死を認める。若年発症家族性 AD では、プレセニン (PSEN1, PSEN2) やアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の遺伝子変異を認める。一方、大多数の AD は遺伝子変異がなく孤発性であり、いまだ不明の機序により A $\beta$  産生増大、分解低下、凝集促進を来して、脳に大量の A $\beta$  が蓄積し、タウの異常リン酸化と神経細胞死が誘導されると考えられている。特に早期から蓄積する A $\beta$  オリゴマーは神経毒性が強い。一方、多発性硬化症 (multiple sclerosis ; MS) は、若年期に好発し、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 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サイトカインや活性酸素の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている。MS では、IFN- $\beta$  などの免疫調節薬が投与されているが、ノンレスポンド (無効例) も多い。現在まで、神経細胞や軸索・髄鞘の再生促進

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年にヒトゲノムの解読が完了し、マイクロアレイ、質量分析装置、次世代シーケンサーを用いて、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た。近年、創薬研究の中心は網羅的発現解析を統合したオミックス研究に基盤を置くゲノム創薬へとパラダイムシフトした。同時に薬理ゲノミクスの分野は急成長を遂げ、薬物応答性の個人差をある程度予測可能となり、テーラーメイド医療 (personalized medicine) の樹立に道が開かれた。システムバイオロジー (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固有の防御機構であるロバストネス (robustness) の破綻に起因すると考えられている<sup>1)</sup>。したがって神経難病の病態解明のためには、オミックス研究に直結したゲノムワイドの分子ネットワーク解析が重要な研究手段となりうる。最近、筆者らは神経疾患のオミックスデータに関して、分子ネットワークを詳細に解析することにより、創薬標的分子を同定した<sup>2)</sup>。以下に筆者らの研究を中心に分子ネットワーク解析の意義について概説する。

## I 網羅的発現解析から分子ネットワーク解析へ

2003年にヒト全遺伝子塩基配列が解読され、DNAマイク



■図1 網羅的発現解析から分子ネットワーク解析への流れ

比較対象となる遺伝子発現レベルが異なる数種類以上の細胞や組織からRNAを精製し、蛍光標識して、アレイとハイブリダイゼーションを行う。スキャン後に、シグナル強度を正規化し、サンプル間の遺伝子発現プロファイルを統計学的に比較解析し、有意な発現差異を呈する遺伝子群 (DEG) を抽出し、定量的PCRで検証する。生物学的意味付けのため、GO (Gene Ontology) のアノテーション (annotation) を調べ、階層クラスター解析を行い、KEGG, PANTHER, STRING, IPA, KeyMolnetを利用して分子ネットワークを解析する。

マイクロアレイを用いて、個々の細胞における数万遺伝子の発現情報を包括的に解析することが可能になった。最近では、高速次世代シーケンサーを用いて、発現量の低い遺伝子も含めて、一度に全遺伝子の発現解析が可能になっている。ヒト以外では、マウス・ラット・アカゲザル・イヌ・ウシ・イネ・ゼブラフィッシュ・ショウジョウバエ・酵母・線虫・大腸菌でも、マイクロアレイ解析が可能である。DNAマイクロアレイは、cDNAを基盤上にスポッターで固定するスタンフォード方式と、直接基盤上でオリゴヌクレオチドを合成・伸長するフォトリングラフ方式のGeneChip® (Affymetrix社) に大別される。さらに、スプライスバリエントの網羅的解析が可能エクソンアレイ、遺伝子多型マッピングや染色体コピー数を解析できるジェノタイピングアレイ、ChIP

(chromatin immunoprecipitation) on Chip解析に用いるゲノムタイピングアレイが市販されている。一方、プロテインマイクロアレイは、基盤上にリコンビナントタンパク質を高密度に固定してあり、タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction; PPI) を網羅的に解析可能なチップである。この解析手法は、酵母two-hybrid法に比較して偽陽性率が低く、翻訳後修飾を受けたタンパク質との結合に関しても、鋭敏に検出できる利点がある。

マイクロアレイでは、比較対象となる遺伝子発現レベルが異なる2種類以上の細胞や組織 (例えば、正常細胞と癌細胞、治療前後の細胞など) からtotal RNAまたはmRNAを抽出し、cDNAやcRNAに変換して蛍光色素で標識後、フラグメントに切断してハイブリダイゼーションを行う (図1)。1色法では1サンプルに1アレイを使用し、アレイ間の発現レベルを比較解析する。一般に、同じ実験条件のサンプルに対して、アレイを2~3枚 (レプリケート) 使用する。プロテインマイクロアレイでは、タグを付加したプローブタンパク質をアレイ上のターゲットタンパク質と反応させ、蛍光標識した抗タグ抗体で検出する。アレイを専用の

スキャナーでスキャン後に、シグナル強度を正規化 (normalization) して、サンプル間の遺伝子発現プロファイルを統計学的に比較解析する。マイクロアレイ解析では、一度に非常に多くの遺伝子の発現レベルを解析するため、遺伝子ごとにt検定などで評価すると、偽陽性遺伝子を多数拾ってしまう。通常は多重検定を行いBonferroniの補正を付加するか、または偽陽性率 (false discovery rate; FDR) を評価する。最終的に、サンプル間で有意な発現差異を呈する遺伝子群 (differentially expressed genes; DEG) を抽出し、発現レベルを定量的PCRで検証する。

次に、DEGに関して生物学的意味付けを行う。初めに個々の遺伝子のアノテーション (annotation) を調べる。NCBI (National Center for Biotechnology Information) のデータベースEntrez Geneを利用して、1つずつGO

(Gene Ontology)のCellular Function, Cellular Process, Cellular Componentを調べることも可能だが, DAVID Bioinformatics Resources (david.abcc.ncifcrf.gov)のFunctional Annotationツールを用いると, 膨大な遺伝子セットのアノテーションを一括して解析できる<sup>3)</sup>. 多数のサンプルを比較解析する場合は, データセットの要素特性を分類するために, GeneSpring<sup>®</sup> (Agilent社)やCluster 3.0 (bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster)などのツールを用いて, DEGを指標に階層クラスター解析 (hierarchical clustering analysis)を行うと, 発現プロフィールのビジュアルな比較ができる.

さらに, DEGが構成する分子ネットワークを解析すると, 生物学的意味をより明確に把握することができる (図1). 生体内では, 遺伝子でコードされたタンパク質は複雑なネットワークから成るシステムを構築している<sup>1)</sup>. PPIには, 直接的結合関係のみならず, 活性化, 不活性化, 酵素反応, 運搬, 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同定するためには, 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, 信頼性が高い知識を整理して, コンテンツとして収録した知識データベース (knowledgebase)を用いて, 既知のどのネットワークやパスウェイ (canonical network/pathway)に最も高い類似性を呈しているかについて, 統計学的手法で解析する方法である. 無償で利用できる代表的なデータベースには, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (www.kegg.jp)<sup>4)</sup>, PANTHER (the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) classification system (www.pantherdb.org)<sup>5)</sup>, STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (string.embl.de)<sup>6)</sup>がある. KEGGとPANTHERは, キュレーターと呼ばれる専門家により精査された遺伝子や代謝物に関する情報を収録している. 2011年4月現在, KEGG PATHWAYには392 reference pathwaysから構成される134,607種類のパスウェイが収録されている. 目的とする遺伝子やタンパク質のセットを, DAVID Functional Annotationツールに入力すると, 統計学的検定を行い, 最も密接に関連しているKEGGパスウェイを同定できる. PANTHERでも同様にリファレンスセットとの比較により, 類似性の統計学的有意差を多重検定で評価することができる. STRINGはKEGG, HPRD (Human Protein Reference Database), BIND (Biomolecular Interaction Network

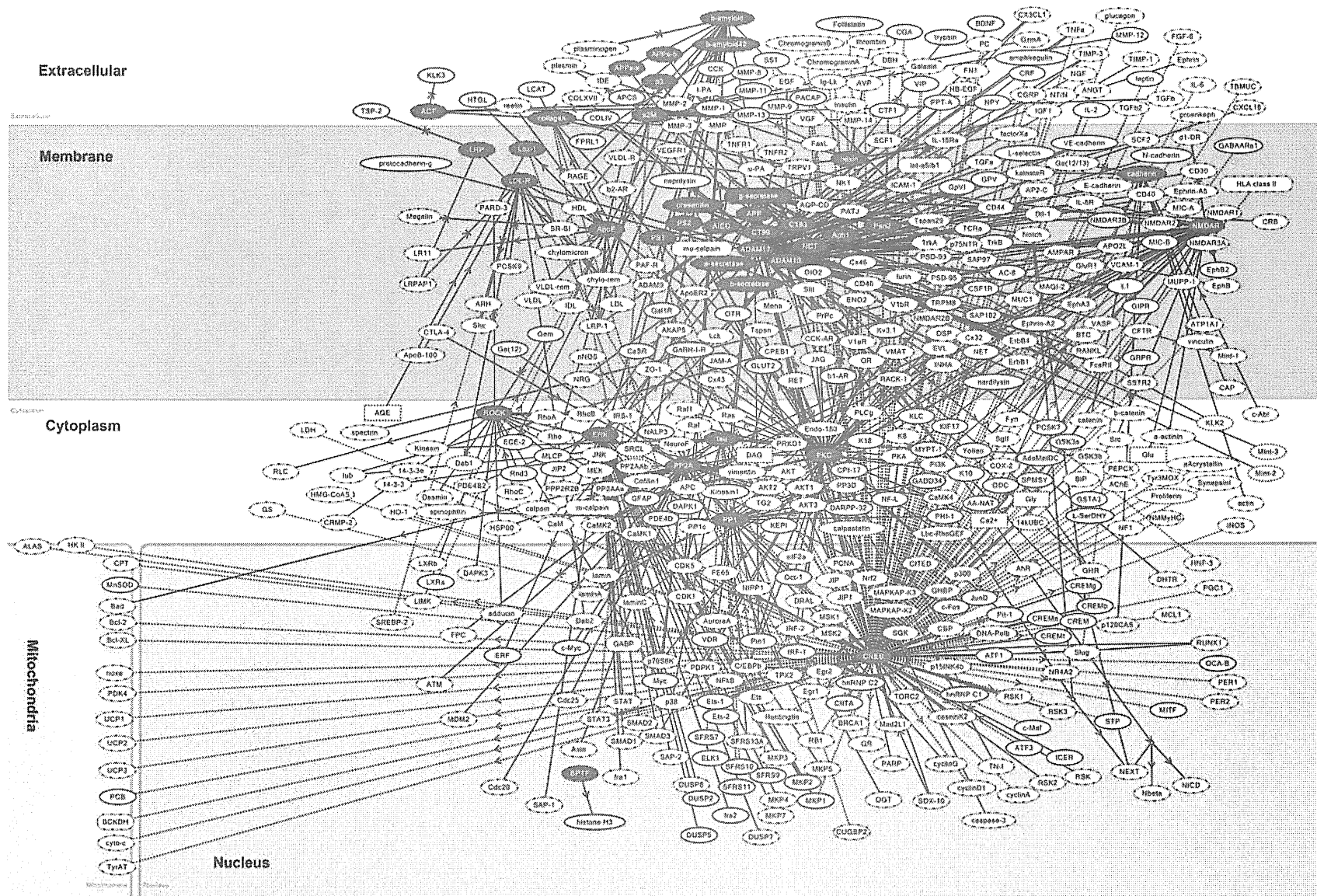
Database), IntAct Molecular Interaction Databaseに登録されている情報も統合して収録している.

また, 有償ツールとしては, IPA (Ingenuity Pathways Analysis)<sup>®</sup> (Ingenuity Systems, Redwood City, CA)やKeyMolnet<sup>®</sup> (Institute of Medicinal Molecular Design, Tokyo)などがある. これらは精選された文献を専門家が精読して, 分子間相互作用に関する信頼性の高い情報を選択して収集しており, 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, 種々の疾患のメディエート分子を整理して収録している. また, 臨床試験中を含む既存の医薬品の標的分子も明示されている. 検索法として, 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)を選択できる<sup>2)</sup>.

解析ツールで描画した分子ネットワークから, 創薬標的分子を探索する場合は, 多数の分子からのリレーションが集中しているハブ (hub)と呼ばれる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, ネットワークのロバストネス維持に重大な影響 (治療効果や毒性・副作用)を及ぼす<sup>2)</sup>.

## II 分子ネットワーク解析から見たADの創薬標的分子

2004年にBlalockらは, 年齢を一致させた31例の高齢者の剖検海馬CA1脳組織から抽出したRNAを用いて, GeneChip<sup>®</sup>HG-U133Aで遺伝子発現を網羅的に解析した<sup>7)</sup>. 生前に施行した知能検査MMSE (mini-mental state examination)のスコアに従って, 正常9例, 早期AD7例, 中等症AD8例, 重症AD7例にグループを分類した. 彼らは3,413種類の全AD関連遺伝子 (発現上昇1,977, 発現低下1,436)と609種類の早期AD関連遺伝子 (発現上昇431, 発現低下178)を同定し, 公開した. 早期AD関連遺伝子には癌抑制遺伝子やオリゴデンドロサイト成長因子が集積していたが, これらの分子が構成するネットワークは解析されなかった. 筆者らは彼らのデータセットを用いて, KeyMolnetの共通上流検索法でAD脳における病態形成に関与してい



■図2 アルツハイマー病の分子ネットワーク解析

KeyMolnetに収録されている42種類のアルツハイマー病疾患メチエート分子(●)を入力して、上下流1パス周辺検索法で、分子ネットワークを解析した。CREB(○)による発現調節との関連性が最も強く示唆された。矢印付き実線は直接結合および活性化、ストップ矢印付き実線は不活性化、矢印付き点線は転写活性化、ストップ矢印付き点線は転写抑制化を示す。

る分子ネットワークを解析した<sup>8)</sup>。その結果、全ADおよび早期ADの関連遺伝子群が構成する分子ネットワークは、両者とも転写因子CREB (cAMP-response element-binding protein)による発現調節と密接に関連していることがわかった。CREBは、成長因子やホルモンの刺激で133位のセリン残基 (Ser133) がプロテインキナーゼA (PKA) によりリン酸化されて活性化し、標的遺伝子プロモーターのCRE (cAMP response element) に結合し、標的遺伝子の転写を活性化する。筆者らは、AD海馬脳組織の抗pCREB抗体による免疫組織染色からpCREBが顆粒空胞変性 (granulovacuolar degeneration ; GVD) に集積していることを見いだした。GVDはオートファゴソームとして働いている可能性があり、筆者らの知見は、ADにおけるオートファジーによるタンパク質代謝制御系の異常を示唆している。

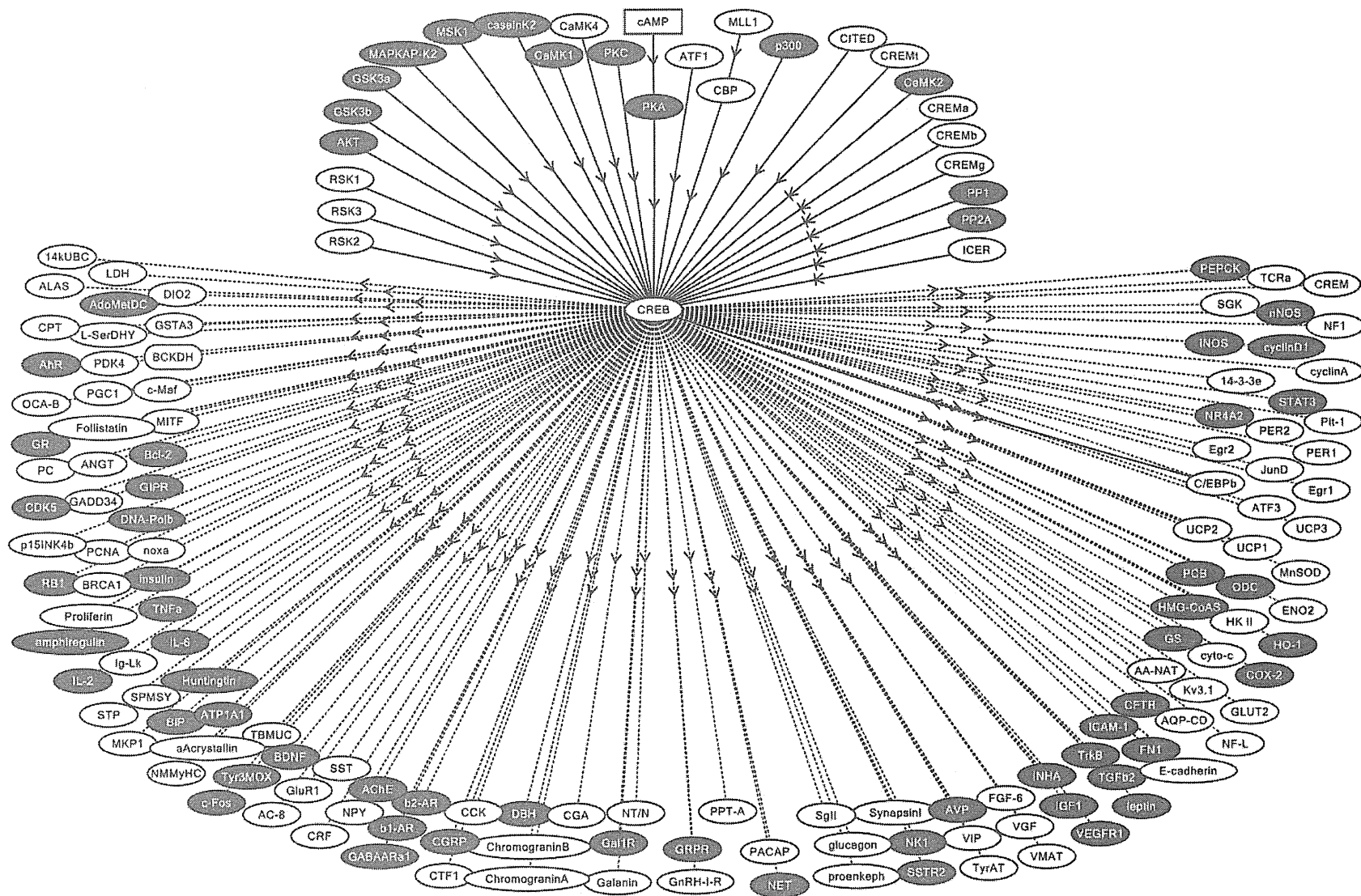
また、KeyMolnetには、精選された文献から専門家により収集された42種類のAD疾患メディエート分子が収録されている。KeyMolnetの上下流1パス周辺検索法で、これら42分子が構成するネットワークを解析したところ、再びCREBによる発現調節との関連性が最も強く示唆された ( $p = 2.225E-308$ ) (図2)。以上の結果は、CREBがAD病態ネットワークのハブとして働くことを示している。KeyMolnetライブラリーのCREBによる発現調節 canonical pathwayは、162分子 (CREBおよび入力27分子と出力134分子) で構成されている (図3)。このうち65分子 (図3●) は、現在市販薬や開発薬が存在している薬の標的分子である。cAMP/PKA/CREBシグナル系活性化を促進するホスフォジエステラーゼ4 (PDE4) 抑制薬であるロリプラム (Rolipram) をAD動物モデルAPP/PS1トランスジェニックマウスに投与すると、認知機能を改善した<sup>9)</sup>。

### III 分子ネットワーク解析から見たMSの創薬標的分子

2008年にHanらは、6例のMS凍結脳を用いて、病理学的ステージを確認した脳病巣からレーザーマイクロダイセクション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網羅的に解析した<sup>10)</sup>。病理学的ステージに関しては、炎症性細胞浸潤と浮腫を主徴とする急性脱髄巣 (active plaque ; AP)、炎症が脱髄巣辺縁部に局限している慢性活動性脱髄巣 (chronic active plaque ; CAP)、炎症所見に乏しくグリア瘢痕を主徴とする慢性非活動性脱髄巣 (chronic plaque ; CP)

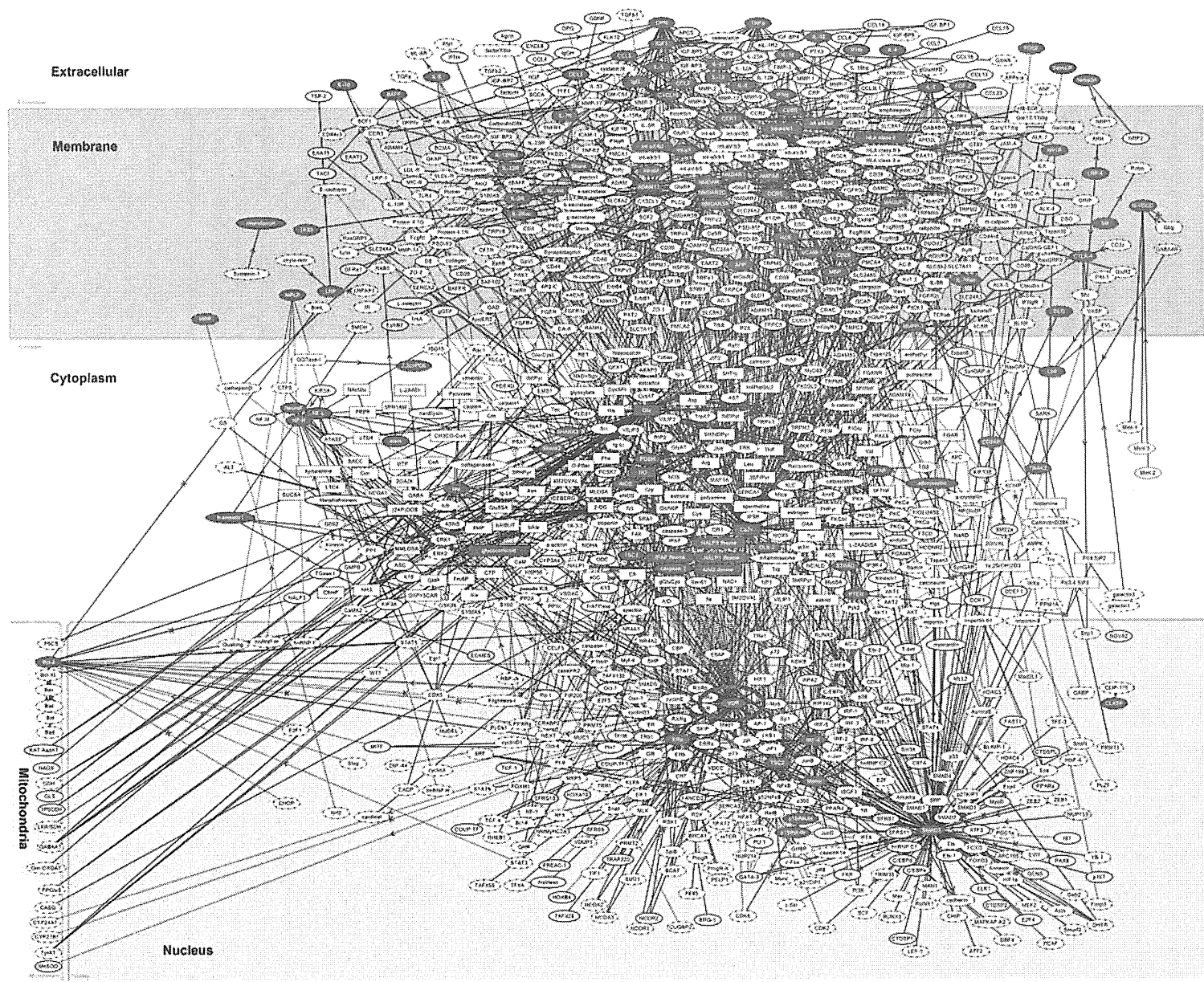
に分類した。同時に2例の健常脳のプロテオームも解析した。健常脳では検出されず、かつ各ステージ特異的なタンパク質を選出し、AP 158, CAP 416, CP 236種類のプロテオームデータを公開した<sup>10)</sup>。彼らはCAPにおいて5種類の血液凝固系タンパク質の発現を認めた。この所見に基づいて、抗凝固薬であるトロンビン阻害剤Hirudinおよび活性化プロテインCを用いて、MS動物モデルであるマウス自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis ; EAE) を治療した。どちらの抗凝固薬も、抗原特異的リンパ球の増殖とIL-17, TNF- $\alpha$ 産生を抑制した。以上の結果より、血液凝固系タンパク質が新規MS創薬標的分子となることが示唆された。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なかった。

筆者らは、HanらのプロテオームデータをKEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnetに入力し、ステージ特異のプロテオームを最もよく反映している分子ネットワークを同定した<sup>11)</sup>。4種類の異なるツール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プロテオームにおける細胞外基質 (extracellular matrix ; ECM) -インテグリンシグナル伝達系の中心的役割を示唆した<sup>11)</sup>。インテグリンは複数の $\alpha$ ,  $\beta$ サブユニットから構成される24種類のヘテロダイマー分子で、ECMリガンドとして働く。 $\beta 1$ インテグリンファミリーはコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンと結合し、 $\alpha_v$ インテグリンファミリーはビトロネクチンと結合する。ECM-インテグリン系は細胞接着、遊走、分化、増殖に必須なシグナルを伝達する。MS慢性病巣においては、髄鞘や軸索の再生が著しく乏しい。その理由として、グリア瘢痕に含まれているECM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タンパク質分解酵素がECMに結合して長期に保持され、その結果、髄鞘崩壊が遅延化している可能性がある<sup>12)</sup>。現在欧米においてMS再発抑制のために、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン (VLA4) に対するヒト化モノクローナル抗体ナタリズマブ (Natalizumab) が臨床で用いられている。しかしながら、ナタリズマブは致死的な進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalo pathy ; PML) を惹起する危険性があり、安全な薬の開発が必要である。ECM-インテグリンシグナル伝達系では、FAK (focal adhesion kinase) がハブとして働く。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*モデル系では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>13)</sup>。



■図3 CREBによる発現調節系

KeyMolnetライブラリーのCREBによる発現調節canonical pathwayは、162分子(CREBおよび入力27分子と出力134分子)で構成されている。65分子(●)は、現在市販薬や開発薬が存在している薬の標的分子である。



■ 図4 多発性硬化症の分子ネットワーク解析

KeyMolnetに収録されている91種類の多発性硬化症疾患メディエート分子(●)を入力して、上下流1パス周辺検索法で、分子ネットワークを解析した。VDR(○)による発現調節との関連性が最も強く示唆された。

したがってMSにおいて、TAE226はFAKを標的分子とする慢性炎症性脱髄抑制薬の候補となる可能性がある。

また、KeyMolnetには、精選された文献から専門家により収集された91種類のMS疾患メディエート分子が収録されている。KeyMolnetの上下流1パス周辺検索法で、これら91分子が構成するネットワークを解析したところ、転写因子であるビタミンD受容体(vitamin D receptor; VDR)による発現調節との関連性が最も強く示唆された( $p = 5.793E-237$ ) (図4)。以上の結果は、VDRがMS病態ネットワークのハブとして働くことを示している。日照時間が短い高緯度地域ではMSの発症頻度が高いという疫学的所見より、ビタミンDはMS発症抑制因子として働くと考えられている<sup>14)</sup>。VDRは活性型ビタミンD(1,25-ジヒドロキシビタミンD)と結合すると、レチノイドX受容体(retinoid X receptor; RXR)とヘテロダイマーを形成して、標的遺伝子プロモーターのVDRE(vitamin D response element)に結合し、標的遺伝子の転写を活性化し、免疫調節作用など多様な生理活性を呈する。しかしながら現在まで、MSにおいて、ビタミンDの有効性が明示された臨床試験は見当たらない。

## おわりに

膨大なオミックスデータに関与する分子ネットワークを手際よく解析するためには、精査された文献情報に基づく解析

ツールを使う必要がある。しかしながら解析ツールはまだまだ発展途上かつ日進日歩であり、現時点では、どのツールもスプライスバリエーション、翻訳後修飾、細胞特異的発現、細胞内局在化、動的特性に関しては十分対応できていない。生命現象を複雑なシステムとして捉えるシステムバイオロジーの観点からすると、神経難病では分子ネットワークを詳細に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を効率的に同定できると思われる。

**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、文部科学省基盤研究(C22500322)と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)および厚生労働科学難治性疾患克服研究事業(H21-難治-一般-201; H22-難治-一般-136)の補助を受けた。

## PROFILE 佐藤 準一

■ 明治薬科大学薬学部 生命創薬科学科 バイオインフォマティクス 教授  
 ■ E-mail: satoj@my-pharm.ac.jp  
 ■ 趣味: 海釣りと化石発掘

1988年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了、医学博士。日本神経学会専門医。現在の研究テーマ: 神経疾患病態関連遺伝子群の網羅的解析。

## 文献

- 1) Kitano H: Nat Rev Drug Discov (2007) 6: 202-210
- 2) Satoh J: Clin Exp Neuroimmunol (2010) 1: 127-140
- 3) Huang da W, et al: Nat Protoc (2009) 4: 44-57
- 4) Kanehisa M, et al: Nucleic Acids Res (2010) 38: D355-D360
- 5) Mi H, et al: Nucleic Acids Res (2010) 38: D204-D210
- 6) Szklarczyk D, et al: Nucleic Acids Res (2011) 39: D561-D568
- 7) Blalock EM, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2004) 101: 2173-2178
- 8) Satoh J, et al: Dis Markers (2009) 27: 239-252
- 9) Gong B, et al: J Clin Invest (2004) 114: 1624-1634
- 10) Han MH, et al: Nature (2008) 451: 1076-1081
- 11) Satoh JI, et al: Mult Scler (2009) 15: 531-541
- 12) van Horssen J, et al: J Neurochem (2007) 103: 1293-1301
- 13) Liu TJ, et al: Mol Cancer Ther (2007) 6: 1357-1367
- 14) Ascherio A, et al: Lancet Neurol (2010) 9: 599-612

## for beginners

- ・「マイクロアレイデータ統計解析プロトコール」藤淵 航・堀本勝久 編, 羊土社 (2008) (マイクロアレイデータ解析入門書)
- ・「創薬・タンパク質研究のためのプロテオミクス解析」小田吉哉・長野光司 編, 羊土社 (2010) (プロテオーム解析入門書)



## 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

佐藤準一\*

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(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、脱髄と軸索傷害を惹起する。現在 MS の臨床では、インターフェロン(IFN)- $\beta$ 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蛋白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。最近、われわれは公共の MS データをバイオインフォマティクスの分子ネットワーク解析ツールで再解析し、創薬標的分子を同定した。今後はゲノムワイドの分子ネットワーク解析が、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。

### 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、さまざまな神経症状が再発をく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 Th17 細胞や Th1 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、腫瘍壊死

因子(tumor necrosis factor : TNF)- $\alpha$ 、一酸化窒素(nitric oxide : NO)などの炎症増強因子(proinflammatory mediators)の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている。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きたして不可逆的機能障害が残存する。臨床では急性増悪期にステロイドパルス(intravenous methylprednisolone pulse : IVMP)をおこない、寛解期にインターフェロン(IFN)- $\beta$ の継続的投与をおこなう方法が最も一般的な治療法として選択されているが、IFN- $\beta$ ノンレスポnderも多い。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

[キーワード]  
分子ネットワーク  
創薬標的分子  
システム生物学  
多発性硬化症  
Th17 細胞

\* SATOH Jun-ichi/明治薬科大学薬学部生命創薬科学科 バイオインフォマティクス研究室

うな病態の不均一性 (heterogeneity) が治療難航の一因となっている。現在まで、髄鞘や軸索の再生促進薬はなく、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蛋白質の発現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。網羅的発現解析を統合したオミックス研究により、がんや神経難病の診断バイオマーカーや治療標的分子が、つぎつぎ明らかにされた。同時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、テーラメード医療 (personalized medicine) の樹立に道が開かれた。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固有の防御機構であるロバストネス (robustness) の破綻に起因すると考えられている。したがって難病の病態解明のためには、オミックス研究に直結したゲノムワイドの分子ネットワーク解析が重要な研究手段となる。

最近、われわれは公共のデータをバイオインフォマティクスの分子ネットワーク解析ツールで再解析し、MSの創薬標的分子を同定することができた<sup>1)</sup>。以下にわれわれの研究を中心に、MSの病態解明や治療標的探索を目的とした分子ネットワーク解析について概説する。

## 1. 分子ネットワークの解析方法

生体内では蛋白質は複雑なネットワークから成るシステムを構築している。したがって難病の病態解明のためには、個々の蛋白質の機能解析のみならず、蛋白質が構築している分子ネットワークやネットワークの構成要素であるパスウェイの同定が重要となる。一般的に蛋白質間相互作用 (protein-protein interaction : PPI) には、単純な直接的結合関係のみならず、活性化、活性抑制、

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づ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さまざま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知識データベース (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、統計学的解析手法を用いて調べる方法である<sup>1)</sup>。Web上で自由に利用できる代表的な knowledgebase には、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) ([www.kegg.jp](http://www.kegg.jp))、the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) classification system ([www.pantherdb.org](http://www.pantherdb.org))、Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) ([string.embl.de](http://string.embl.de)) などがある。とくに KEGG と PANTHER は、キュレーターとよばれる専門家によって精査された遺伝子や代謝物の情報を収録している。2011年4月現在、KEGG PATHWAY には 392 reference pathways から構成される 134,607 パスウェイが収録されている。また利用価値の高いデータベースとして、DAVID Bioinformatics Resources ([david.abcc.ncifcrf.gov](http://david.abcc.ncifcrf.gov)) は、網羅的解析で同定した膨大な遺伝子セットのアノテーションを一括しておこなうために開発されたツールである。Functional Annotation ツールに目的の遺伝子セットを入力すると、統計学的な検定をおこなって、最も密接に関連している KEGG pathway を同定できる。PANTHER でも同様に reference set との比較により、類似性の統計学的有意差を多重検定で評価できる。STRING は KEGG、HPRD、BIND、IntAct などの網羅的 PPI 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

膨大な情報を収集している。

また分子ネットワーク解析のために樹立された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。これらは精選された文献を専門家が精読して、分子間相互作用に関する信頼性の高い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、分子ネットワークの検索法として、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) を選択できる。

## 2. MS 脳病巣プロテオーム解析からみた創薬標的分子

2008 年に 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、蛋白質を抽出し、トリプシン消化ペプチド断片を質量分析で網羅的に解析した<sup>2)</sup>。病理学的ステージは、炎症性細胞浸潤と浮腫を主徴とする急性脱髄巣 (active plaque : AP)、炎症が脱髄巣辺縁部に限局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 例の健常脳のプロテオームも解析した。その結果、AP から 1082、CAP から 1728、CP から 1514、合計 4324 種類の蛋白質を同定した。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各ステージ特異的な蛋白質

を選び出し、AP 158、CAP 416、CP 236 種類からなるプロテオームデータを公開した<sup>2)</sup>。彼らは PROTEOME-3D を用いてアノテーションを解析し、CAP において血液凝固系蛋白質 SERPINA5 (protein C inhibitor)、F3 (tissue factor)、FN1、THBS1、VTN の発現を認めた。この所見にもとづいて、抗凝固薬である thrombin inhibitor hirudin および activated protein C を用いて、MS 動物モデルであるマウス自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) を治療した。どちらの抗凝固薬も、抗原特異的リンパ球の増殖と IL-17、TNF- $\alpha$  産生を抑制した。以上の結果より、血液凝固系蛋白質が新規 MS 創薬標的分子となることが示唆された。しかしながら大多数を占める凝固系以外の蛋白質に関しては、MS 脳分子病態における意義は明らかにされなかった。

われわれは、Han らのデータのプロテオームに関する UniProt ID を、Entrez Gene ID および KEGG ID に変換して、KEGG、PANTHER、IPA、KeyMolnet に入力し、各ステージ特異的プロテオームを最も良く反映している分子ネットワークを同定した<sup>3)</sup>。KEGG では、CAP プロテオームと focal adhesion (hsa04510) ( $p=5.21E-05$ ) (図 1) および extracellular matrix (ECM)-receptor interaction (hsa04512) ( $p=1.25E-04$ ) との関連性を認めた。PANTHER 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 ( $p=3.55E-03$ )、CP プロテオームと integrin signaling pathway ( $p=4.33E-02$ ) との関連性を認めた。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が示唆された。KEGG と PANTHER による解析では、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 では、AP プロテオームは cellular as-

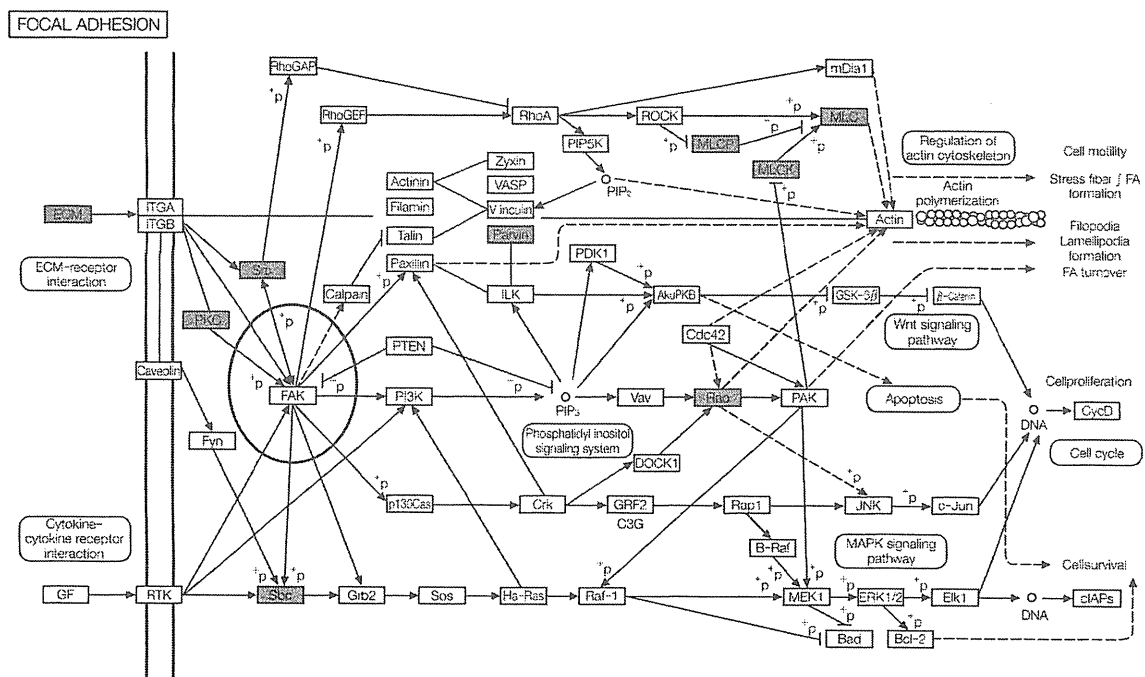


図 1. KEGG による MS 脳病巣 CAP プロテオームの分子ネットワーク解析

KEGG による解析では、MS 脳病巣 CAP プロテオーム (灰色) と focal adhesion (hsa04510 : COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, LAMA1, MYLK, SHC3, PPP1CA, PARVA, PRKCBL, MYL7, RAC3, SPP1, SRC, THBS1, VTN : ECM 構成要素は ECM として一括) との関連性が示唆された。Focal adhesion kinase (FAK) が、ネットワークのハブ (楕円) となることわかる。

sembly 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 シグナル伝達系の関与を示唆している。最後に KeyMolnet を用いて, 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, 始点終点検索で最短経路となるネットワーク解析した。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 ( $p = 2.13E-12$  および  $p = 2.57E-12$ ) との関連性も認めた。

以上のように, 4 種類の異なるツール KEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnet は, さまざまな独