

自の分子ネットワークを抽出したが、共通して CAP, CP プロテームにおける ECM-integrin シグナル伝達系の中心的役割を示唆した³⁾。Integrin は複数の α , β 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 のリガンドとしてはたらく。 $\beta 1$ integrin ファミリーは collagen, fibronectin, laminin と結合し、 αv integrin ファミリーは vitronectin と結合する。ECM-integrin 相互作用を介する outside-in, inside-out シグナルは、細胞骨格の動態制御を介する細胞接着、遊走、分化、増殖にとって必須である。MS 脳病巣プロテームで同定した fibronectin や vitronectin は、主として破綻した BBB を通過して脳実質に浸透した血漿成分に由来する。ECM, integrin が著増している慢性病巣において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 蛋白質自体が髄鞘や軸索の再生阻害因子としてはたらく可能性や、活性化マクロファージやミクログリアが産生する蛋白質分解酵素が ECM に結合して長期に保持され、髄鞘の崩壊が遷延化している可能性があげられている⁴⁾。また ECM-integrin シグナル伝達系は、リンパ球のホーミングや血管外遊出、アストログリアやミクログリアの活性化、オリゴデンドログリア前駆細胞の分化抑制を介して、脱髄と軸索傷害を増強する⁵⁾。

現在欧米において、MS 再発抑制のために、 $\alpha 4\beta 1$ integrin (VLA4) に対するヒト化モノクロナル抗体 Natalizumab が臨床で用いられている。しかしながら、Natalizumab は進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy : PML) を惹起する危険性があり、より安全な薬の開発が必要である。分子ネットワークから創薬標的分子を探索する場合には、多数の分子からリレーションが集中しているハブ (hub) とよ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の維持に重大な影響を及ぼす。ECM-in-

tegrin シグナル伝達系は、炎症性脱髄遷延化の抑制薬の標的パスウェイであり、focal adhesion kinase (FAK) がハブとなる (図 1 楕円)。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⁶⁾。したがって TAE226 は FAK を分子標的とする MS 慢性炎症性脱髄抑制薬の候補となる可能性があり、EAE における前臨床試験の実施が待たれる。

3. Th17 細胞分化関連遺伝子トランスクリプトーム解析からみた創薬標的分子

1990 年代まで MS は、IFN- γ 投与で病態増悪を認めた過去の臨床試験の結果より、Th1 病であるとみなされてきた。現在では、病態形成で中心的役割を果たしているのは、転写因子 RAR-related orphan receptor C (RORC, ROR γt) を発現し、IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 を産生する Th17 細胞であるとの見解になった⁷⁾。Th17 細胞は、トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor : TGF)- β と IL-6, IL-21 の存在下でナイーブ T (Th0) 細胞から分化誘導される。Th17 細胞は、活動期 RRMS 患者の血液中では、非活動期や健常者に比較して 7 倍増加しており、これらの細胞は髄鞘抗原 myelin basic protein (MBP) に対して反応性を示す⁸⁾。Th17 細胞は、MS 脳では活動性病巣に集積している⁹⁾。IFN- β は、Th1 病には有効だが Th17 病には無効であり、MS の IFN- β ノンレスポンスでは血清 IL-17F が増加している¹⁰⁾。以上の所見をまとめると、Th17 細胞分化制御関連遺伝子は、MS の創薬標的分子となり得る。

われわれは、公共の遺伝子発現データベース Gene Expression Omnibus (GEO) に登録されている Huh らのトランスクリプトームデータセット (GSE27241) を再解析し、Th17 細胞分化制御遺伝

子の分子ネットワークを同定した。彼らは ROR γ t 欠損(knockout: KO)および野生型(wild-type: WT) C57BL/6 マウスのリンパ節と脾臓から細胞自動解析-分離装置(fluorescence activated cell sorter: FACS)で分離した CD4⁺CD8⁻CD19⁻CD25⁻CD44^{low/int}CD62L⁺ ナイーブ T 細胞を、プレートコートした抗 CD3 ϵ 抗体と抗 CD28 抗体で刺激し、さらに IL-6, TGF- β , 抗 IFN- γ 抗体と抗 IL-4 抗体を添加した培地(Th17-inducing condition)で 48 時間培養して、Th17 細胞の分化を誘導した¹¹⁾。また培養系に dimethyl sulfoxide (DMSO) または DMSO に溶解した digoxin (DIG: 10 μ M) を添加し、Th17 細胞分化に対する抑制効果を調べた。GSE27241 は、各条件の細胞から RNA を精製し、Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) で解析し、robust multiarray average (RMA) 法で正規化したデータセットである(WT-DMSO, WT-DIG, KO-DMSO, KO-DIG 各 2 サンプル)。

われわれは Huh らのデータに関して、はじめに WT-DMSO 群と KO-DMSO 群を比較し、Th17-inducing condition において前者で 2 倍以上発現上昇した 57 遺伝子(Th17 細胞分化関連遺伝子群)を同定した(表 1)。つぎに WT-DIG 群と WT-DMSO 群を比較し、前者で 0.5 倍以下に発現低下した 12 遺伝子を同定した(DIG 応答性遺伝子群)(表 1 下線)。また 57 遺伝子を指標として階層クラスター解析をおこなったところ、WT-DMSO, KO-DMSO, WT-DIG, KO-DIG の各群はおのおの独立したクラスターを形成し、WT-DIG 群は KO-DMSO 群に近接したクラスターに分類された(図 2)。DIG で発現抑制された 12 遺伝子のうち 11 遺伝子は、ほかの遺伝子から独立したクラスターを形成し、11 遺伝子を含む 16 遺伝子は転写が共調節(co-regulation)されている可能性がある(図 2 点線)。KeyMolnet の共通上流検索により、これらの 16 遺伝子に関連する分子ネットワークを解析したところ、TGF- β 受容

体シグナル伝達系で中心的な役割を果たしている転写因子 SMAD による発現調節の関与が最も強く示唆された($p=1.194E-060$)(図 3)。

TGF- β 受容体の活性化に伴ってリン酸化された SMAD2 と SMAD3 は、SMAD4 と複合体を形成して核へ運ばれ、種々のコアクチベーターやコリプレッサーと協調して、標的遺伝子の転写を制御する。SMAD2 は Th17 細胞の分化に必須であると報告されている¹²⁾。DIG は、Huh らが 4812 種類の低分子化合物に関して、ROR γ t 転写活性化抑制を指標にスクリーニングし、ROR γ t と結合して Th17 細胞の分化を抑制することが判明した化合物である¹¹⁾。また ROR γ t, ROR α と結合して Th17 細胞の分化を抑制する合成リガンド SR1001 も報告されている¹³⁾。DIG は転写因子 SMAD が制御している分子ネットワーク上の Th17 細胞分化関連遺伝子群(表 1 下線)の発現を共抑制している可能性がある。SMAD 系転写因子は分子ネットワークのハブに位置し、MS における Th17 細胞分化制御薬の標的分子と成りうる。しかしながら、TGF- β 受容体シグナル系を全般的に抑制すると、induced Foxp3⁺ regulatory T (iTreg) 細胞の分化まで抑制してしまう可能性があること、SMAD 非依存性の Th17 細胞分化経路も存在すること¹⁴⁾、SMAD2, SMAD3 は機能的に冗長にはたらくこと、SMAD3 それ自体は ROR γ t と結合してその活性を抑制し、Th17 細胞の分化を負に制御していること¹⁵⁾などを考慮し、SMAD 系転写因子を選択的かつ部分的に抑制できるような新薬の開発が望ましい。

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もとづく解析ツールを使う必要がある。解析ツールはいまだ発展途上かつ日進月歩であり、現時点では、どのツールもスプライスバリエーションや翻訳後修飾、細胞特異的発現、細胞内局在化、

表 1. Th17 細胞分化関連 57 遺伝子

Entrez Gene ID	Gene Symbol	Gene Name	Ratio
70337	<u>iyd</u>	iodotyrosine deiodinase	11.06
16171	<u>IL17A</u>	interleukin 17A	4.30
76142	<u>ppp1r14c</u>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14c	4.25
193740	<u>Hspa1a</u>	heat shock protein 1A	3.47
50929	<u>il22</u>	interleukin 22	3.39
15511	<u>Hspa1b</u>	heat shock protein 1B	3.38
56312	<u>nupr1</u>	nuclear protein 1	3.23
14538	<u>GCNT2</u>	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme	2.79
74103	<u>Neb1</u>	nebullette	2.76
75573	<u>2310007L24Rik</u>	RIKEN cDNA 2310007L24 gene	2.55
68549	<u>SGOL2</u>	shugoshin-like 2 (S. pombe)	2.53
237436	<u>GAS2L3</u>	growth arrest-specific 2 like 3	2.47
76131	<u>depdc1a</u>	DEP domain containing 1a	2.43
100043766	<u>Gm14057</u>	predicted gene 14057	2.37
14235	<u>FOXM1</u>	forkhead box M1	2.37
230098	<u>E130306D19Rik</u>	RIKEN cDNA E130306D19 gene	2.30
171284	<u>Timd2</u>	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 2	2.29
12235	<u>BUB1</u>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae)	2.26
51944	<u>D2Ert750e</u>	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed	2.24
17863	<u>myb</u>	myeloblastosis oncogene	2.24
229841	<u>CENPE</u>	centromere protein E	2.22
270906	<u>PRR11</u>	proline rich 11	2.19
12316	<u>ASPM</u>	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	2.18
108000	<u>CENPF</u>	centromere protein F	2.18
17345	<u>MKI67</u>	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	2.16
14432	<u>gap43</u>	growth associated protein 43	2.15
105988	<u>ESPL1</u>	extra spindle poles-like 1 (S. cerevisiae)	2.15
15366	<u>HMMR</u>	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)	2.15
27053	<u>asnS</u>	asparagine synthetase	2.15
52276	<u>CDCA8</u>	cell division cycle associated 8	2.15
18005	<u>NEK2</u>	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	2.15
72080	<u>2010317E24Rik</u>	RIKEN cDNA 2010317E24 gene	2.15
74107	<u>CEP55</u>	centrosomal protein 55	2.13
29817	<u>igfbp7</u>	insulin-like growth factor binding protein 7	2.13
71819	<u>KIF23</u>	kinesin family member 23	2.10
75317	<u>4930547N16Rik</u>	RIKEN cDNA 4930547N16 gene	2.10
12704	<u>CIT</u>	citron	2.10
72140	<u>CCDC123</u>	coiled-coil domain containing 123	2.08
234258	<u>Neil3</u>	nei like 3 (E. coli)	2.08
12442	<u>CCNB2</u>	cyclin B2	2.07
72119	<u>Tpx2</u>	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	2.07
68743	<u>Anln</u>	anillin, actin binding protein	2.06
20419	<u>SHCBP1</u>	Shc SH2-domain binding protein 1	2.05
208084	<u>PIF1</u>	PIF1 5'-to-3'DNA helicase homolog (S. cerevisiae)	2.04
17279	<u>Melk</u>	maternal embryonic leucine zipper kinase	2.04
19348	<u>kif20a</u>	kinesin family member 20A	2.04
21335	<u>TACC3</u>	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	2.03
208628	<u>KNTC1</u>	kinetochore associated 1	2.02
19659	<u>Rbp1</u>	retinol binding protein 1, cellular	2.02
72155	<u>CENPN</u>	centromere protein N	2.02
257630	<u>Il17f</u>	interleukin 17F	2.02
215819	<u>nhs1</u>	NHS-like 1	2.02
54141	<u>SPAG5</u>	sperm associated antigen 5	2.01
12189	<u>BRCA1</u>	breast cancer 1	2.01
19362	<u>RAD51AP1</u>	RAD51 associated protein 1	2.01
110033	<u>Kif22</u>	kinesin family member 22	2.00
69534	<u>AVP11</u>	arginine vasopressin-induced 1	2.00

GSE27241 は ROR γ t 欠損 (knockout : KO) および野生型 (wild-type : WT) マウスナイーブ T 細胞を, Th17-inducing condition で 48 時間培養して Th17 細胞の分化を誘導し, 培養系に DMSO に溶解した digoxin (DIG) を添加した細胞のトランクリプトームデータである. GSE27241 に関して, はじめに WT-DMSO と KO-DMSO を比較し, Th17-inducing condition において前者で 2 倍以上発現上昇した Th17 細胞分化関連 57 遺伝子を同定した. つぎに WT-DIG と WT-DMSO を比較し, 前者で 0.5 倍以下に発現低下した DIG 応答性 12 遺伝子を同定した (下線).

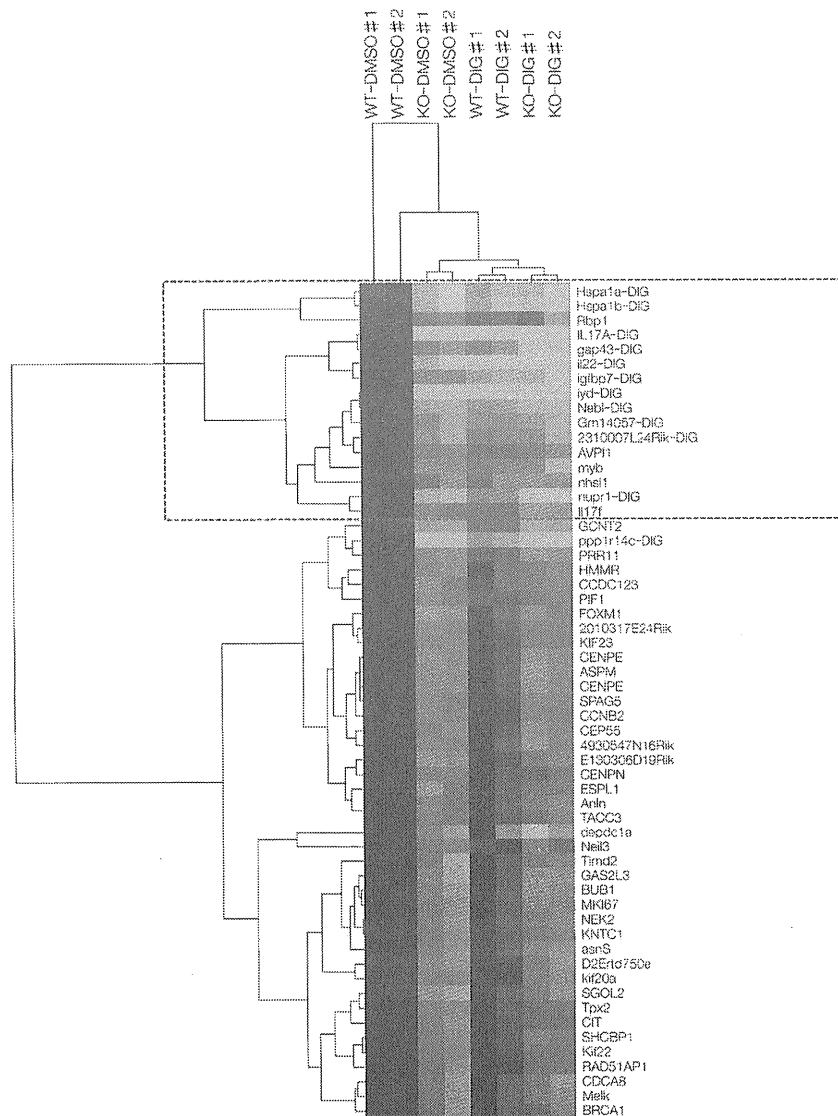


図 2. Th17 細胞分化関連 57 遺伝子の階層クラスター解析

GSE27241 は、ROR γ t 欠損(knockout : KO)および野生型(wild-type : WT)マウスナイーブ T 細胞を、Th17-inducing condition で 48 時間培養し、Th17 細胞の分化を誘導、培養系に DMSO に溶解した digoxin (DIG) を添加した細胞のトランクリプトームデータである。はじめに WT-DMSO と KO-DMSO を比較し、Th17 細胞分化関連 57 遺伝子を同定し、階層クラスター解析をおこなった。つぎに WT-DIG と WT-DMSO を比較し、DIG 応答性 12 遺伝子を同定した(図の遺伝子-DIG)。DIG 応答性 11 遺伝子は独立したクラスターを形成し、これらを含む 16 遺伝子は転写が共調節(co-regulation)されている可能性がある(点線)。

動的な特性に関しては十分対応できていない。しかしながら生命現象を複雑なシステムとして捉えるシステム生物学的観点からすると、分子ネット

ワークを詳細に解析することにより、はじめて論理的な仮説に裏づけられた創薬標的分子を効率的に同定することができる。

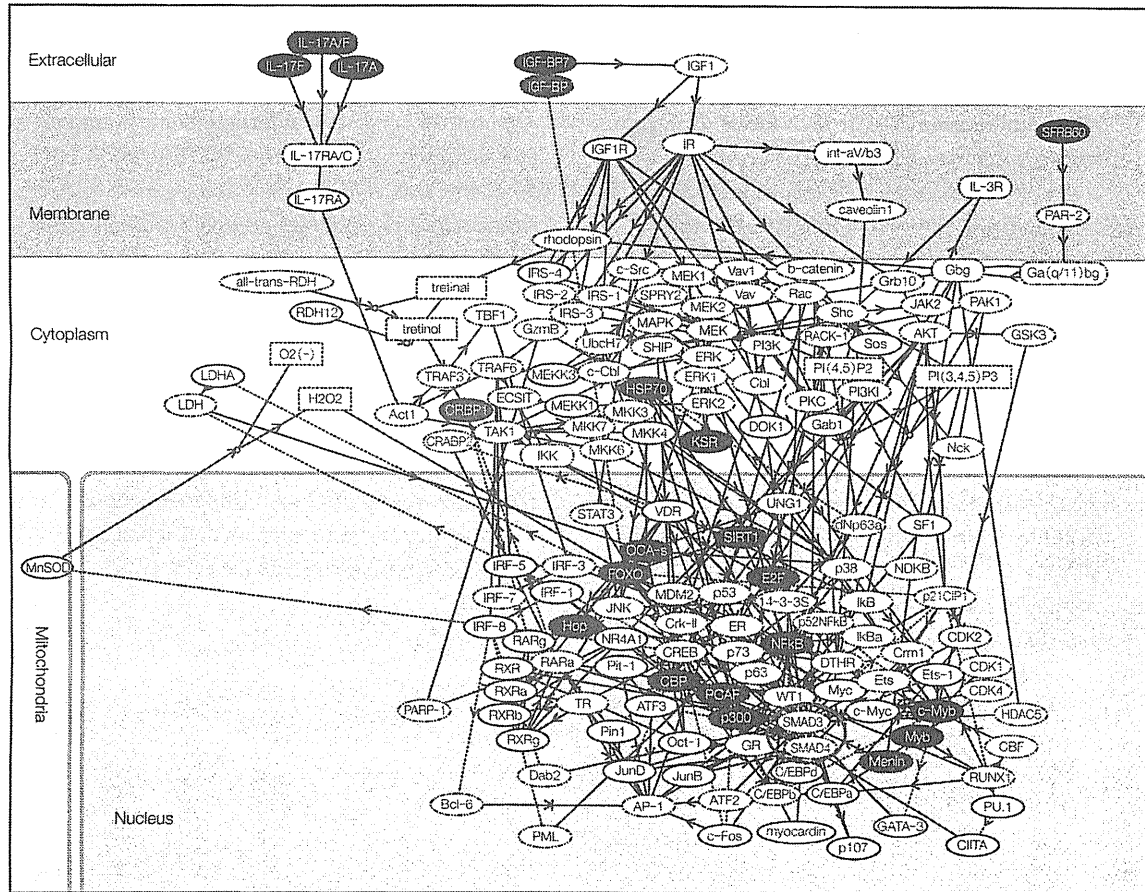


図 3. DIG 応答性 Th17 細胞分化関連遺伝子の分子ネットワーク解析

KeyMolnet 共通上流検索(コアコンテンツ: 発現制御・直接結合・複合体形成)により, DIG 応答性 11 遺伝子のクラスターの 16 遺伝子(図 2)に関連する分子ネットワークを解析した. 転写因子 SMAD(楕円)による発現調節の関与が示唆された.

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.

文献

1) Satoh J : Bioinformatics approach to identifying

molecular biomarkers and networks in multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 1 : 127-140, 2010

2) Han MH *et al* : Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 451 : 1076-1081, 2008
 3) Satoh JI *et al* : Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain-lesion proteome. *Mult Scler* 15 : 531-541, 2009
 4) van Horssen J *et al* : The extracellular matrix in multiple sclerosis pathology. *J Neurochem* 103 : 1293-1301, 2007
 5) Milner R *et al* : Fibronectin- and vitronectin-induced microglial activation and matrix metallo-

- proteinase-9 expression is mediated by integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_5$. *J Immunol* **178** : 8158-8167, 2007
- 6) Liu TJ *et al* : Inhibition of both focal adhesion kinase and insulin-like growth factor-I receptor kinase suppresses glioma proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **6** : 1357-1367, 2007
 - 7) McFarland HF *et al* : Multiple sclerosis : a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* **8** : 913-919, 2007
 - 8) Durelli L *et al* : T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon- β . *Ann Neurol* **65** : 499-509, 2009
 - 9) Tzartos JS *et al* : Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* **172** : 146-155, 2008
 - 10) Axtell RC *et al* : T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon- β in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* **16** : 406-412, 2010
 - 11) Huh JR *et al* : Digoxin and its derivatives suppress T_H17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t activity. *Nature* **472** : 486-490, 2011
 - 12) Malhotra N *et al* : SMAD2 is essential for TGF β -mediated Th17 cell generation. *J Biol Chem* **285** : 29044-29048, 2010
 - 13) Solt LA *et al* : Suppression of T_H17 differentiation and autoimmunity by a synthetic ROR ligand. *Nature* **472** : 491-494, 2011
 - 14) Lu L *et al* : Role of SMAD and non-SMAD signals in the development of Th17 and regulatory T cells. *J Immunol* **184** : 4295-4306, 2010
 - 15) Martinez GJ *et al* : Smad3 differentially regulates the induction of regulatory and inflammatory T cell differentiation. *J Biol Chem* **284** : 35283-35286, 2009

