

201128006B

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21年度～平成23年度

総合研究報告書

厚生労働省

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21年度～平成23年度
総合研究報告書

研究代表者 山 村 隆

平成24年（2012年）3月

目 次

I. 総合研究報告

- 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
独) 国立精神・神経医療研究センター 山村 隆 P1

II. 分担（総合）研究報告

- 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
独) 国立精神・神経医療研究センター 荒浪 利昌 P7
- 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
独) 国立精神・神経医療研究センター 三宅 幸子 P10
- 分子ネットワーク解析からみた MS 新規創薬標的分子
明治薬科大学 佐藤 準一 P15
- 核内転写因子標的医薬の薬効評価研究
独) 国立精神・神経医療研究センター 大木 伸司 P29
- 『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；生活習慣病をモデルとして
北里大学 岩渕 和也 P34
- 多発性硬化症の MRI・SPECT を用いた定量的解析に関する研究
独) 国立精神・神経医療研究センター 小川 雅文 P43
- 多発性硬化症の MR による定量的解析に関する研究
独) 国立精神・神経医療研究センター 佐藤 典子 P46

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 P49

IV. 研究成果の刊行物・別刷 P55

I . 総合研究報告 (研究代表者)

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。MSは慢性の中枢神経系炎症疾患で、終生に及ぶ医療介入の対象になる。インターフェロン β などの従来薬の効果は限定的であり、分子標的医薬には長期投与を躊躇させる副作用（PML、悪性腫瘍など）があり、薬剤相互作用などについて情報が充分でない。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 アスピオファーマ株式会社・化学ファカルティ長

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・ノンレスポンドーではステロイドや免疫抑制剤の長期投与を余儀なくされている。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ドと β 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

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

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- α , IFN- γ) 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 でモネンシン存在下 4 時間刺激し、定法によって IFN- γ 、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 を使い、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:

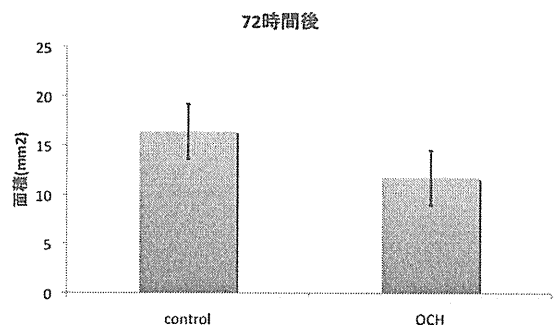
NCNP のトランスレーショナル・メディカル・センター (TMC) の体制整備が進み、プロジェクトマネージャー (PM)、治験関連業務 (プロトコル作成、生物統計など) の担当が決定した。また治験担当専門医師の人事も発令した。

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- α , IFN- γ) 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

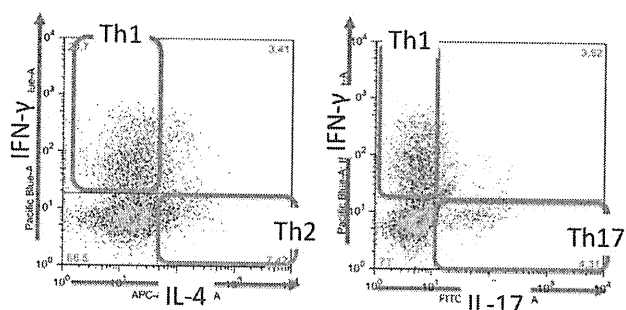


6) OCH 臨床試験に有用なバイオマーカー探索:

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、治験プロトコル（原案）作成、プロトコ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、プロトコル案が大枠で承認されたところである。

D. 考察

平成 21 年度に研究課題が採択されてから、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 月頃に 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 OCH 3 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. 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- β and interferon- β 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. Fujita, M., T. Otsuka, M. Mizuno, C. Tomi, T.M. Gallagher, T. Yamamura, and S. Miyake: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis via iNKT cell-dependent mechanism. *Am. J. Pathol.* 175: 1163-1123, 2009
8. Theil, M.M., S. Miyake, M. Mizuno, C. Tomi, J.L. Croxford, H. Hosoda, J. Theil, S. von Hoersten, H. Yokote, A. Chiba, Y. Lin, S. Oki, T. Akamizu, K. Kangawa, and T. Yamamura: Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by Ghrelin. *J. Immunol.* 183: 2859-2866, 2009
9. Klemann, C., B.J.E. Raveney, A.K. Klemann, T. Ozawa, S. von Hörsten, K. Shudo, S. Oki and T. Yamamura: Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE. *Am. J. Pathol.* 174(6): 2234-2245, 2009
10. Satoh, J.I., H. Tabunoki, and T. Yamamura: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Mult. Scler* 15:531-541, 2009
11. Sakuishi, K., S. Miyake and Yamamura, T.: Role of NK cells and NKT cells in multiple sclerosis. Molecular Basis of Multiple Sclerosis. The Immune System Series "Results and Problems in Cell Differentiation" 51, 2009 pp127-147 Roland Martin, and Andreas Lutterotti, ed, Springer-Verlag, Heidelberg
12. Yokote, H., S. Miyake, J.L. Croxford, S. Oki, H. Mizusawa, T. Yamamura: NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am. J. Pathol.* 173-1714, 2008 山村 隆、千葉健治：自己免疫疾患の治療薬開発-病態の多様性を見据えて. *Yakugaku Zasshi* 129: 647-648, 2009
13. 宮崎雄生, 山村 隆: NKT細胞と自己免疫. 医学のあゆみ (最新・自己免疫疾患 Update-研究と治療の最前線) 3230: 651-656, 2009
14. 大木伸司, 山村 隆 : 多発性硬化症の病態解析から治療標的の同定へ. *Jpn J Clin Immunol* 32 : 214-222, 2009
15. 三宅幸子, 山村 隆: NKT細胞と多発性硬化症. *Mebio* 27: 94-101, 2010
16. 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. Yamamura T: Second German-Japanese Neuroimmunology Symposium. Opening lecture- Multiple sclerosis research in Japan: past, present and future. Second German-Japanese Neuroimmunology Symposium, Eibsee, Germany, 7.9, 2009
2. 山村 隆: 多発性硬化症の基礎と臨床. レビュートーク「神経免疫と臨床免疫: 現在の到達点」. 第22回日本神経免疫学会. 東京, 3.17, 2010
3. Yamamura T: Invariant T cells as sensors and regulators of commensal flora. 14th International Congress of Immunology (ICI), Kobe, Japan, 8. 24, 2010
4. Yamamura, T.: Immunological basis of multiple sclerosis and neuromyelitis optica in Japan. Max Planck Institute & National Center of Neurology and Psychiatry. Joint Symposium. Front Line of the Research on Psychiatry & Neurology. Tokyo 10.13, 2010
5. Yamamura, T.: Keynote lecture. Immunology of NK and NKT cells in MS. Multiple Sclerosis Immunology: A foundation for Current and Future Treatments. Nottingham, UK, 10.31, 2010
6. 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
7. 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
8. 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. 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

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
 ノルウェー 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

G. 知的所有権の取得状況

Ⅱ. 総合研究報告（研究分担者）

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、ケモカイン受容体発現パターンおよび細胞内サイトカイン多重染色を用いて、NKT 細胞、NK 細胞、T 細胞に関する、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。1) 健常者と MS の NKT 細胞に占める、ケモカイン受容体発現パターンに有意な差は認められなかったが、CD4 陰性 NKT 細胞の頻度の減少傾向が認められた。2) MS 患者或いは健常者から分離した末梢血単核細胞（PBMC）を α -GalCer (α -GC) や OCH の存在下および非存在下で培養すると、OCH 存在下で培養することにより、IFN- γ 産生性 T 細胞の頻度の減少が認められた。一方、 α -GC 存在下ではこのような変化は見られなかった。3) 健常者に比べて、MS の NK 細胞は、IFN- γ 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、NKT 細胞の頻度、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 α -galactosyl ceramide (α GalCer) を同時に加えて培養した。
フローサイトメトリー：健常者或いは MS 患者 PBMC を CD3, CD4, CD1d-tetramer, CCR2, CCR4,

CCR5, CCR6 に対する蛍光標識抗体で染色し、(CD3 陽性 CD1d-tetramer 陽性)NKT 細胞に占める亜分画の頻度を解析した。また、前記細胞培養 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- γ 、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) 健常者と MS 患者の NKT 細胞の、ケモカイン受容体発現パターンに有意な差は認められなかった。NKT 細胞に占める、CD4 陽性 NKT 細胞の頻度は、健常者と MS で差を認めなかったが、CD4 陰性 NKT 細胞の頻度は、MS において減少傾向が見られた。
2) 試験管内での PBMC における抗原特異的な IFN- γ 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、 α GalCer 存在下ではその頻度に変化は認められなかった。

3) OCH 或いは α GalCer 存在下で、IFN- γ 、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。

4) MS の NK 細胞では健常者と比較し、IFN- γ 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

以前に当研究部の荒木らが、MS 寛解期における CD4 陰性 NKT 細胞の頻度の減少を報告しているが、それを確認することが出来た。また、当研究部の以前の報告で、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- γ 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

NKT 細胞の頻度、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. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

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- β and interferon- β 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.

総説

1) 荒浪利昌、山村隆：多発性硬化症. 炎症・再生医学事典：216-218, 2009

2) 富田敦子、荒浪利昌、山村隆. 2010 年、MS の免疫病態のトピックス. Brain Medical 22 : 25-30.

3) 荒浪利昌、山村隆. 2010 年、Th17 細胞のケモカインレセプターの発現. Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology 4 : 28-32.

4) 荒浪利昌、山村隆. 2010 年、炎症と T 細胞サブセット. 治療学 : 44 : 11-13.

5) 荒浪利昌、山村隆. 2010 年、多発性硬化症における α B-crystallin と osteopontin の関与. 臨床免疫・アレルギー科 : 55 : 223-228.

6) 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

国際学会

1) Tagawa A, Aranami T, Matsumoto M, Yamamura T : Aire-deficient Mice Develop Spontaneous Autoimmunity to the Central Nervous System Antigens. Annual meeting of Federation Of Clinical Immunology Societies (FOCIS). San Francisco, CA, USA. June 14 2009.

2) Aranami T, Sato, Yamamura T : α B-crystallin as an immunomodulator in MS. Second German-Japanese Neuroimmunology Symposium. Eibsee, Germany. July 11 2009

3) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T : Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. Kyoto: Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, August 21.

4) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y,

Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Auto-reactive anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from peripheral plasma cell-like B cells in neuromyelitis optica. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, August 23.

5) Wakiro Sato, Atsuko Tomita, Youwei Lin, Masafumi Ogawa, Tomoko Okamoto, Miho Murata, Toshimasa Aranami and Takashi Yamamura: CCR2+ CCR5+ CD4+ T cells enriched in cerebrospinal fluid of relapsing multiple sclerosis patients strongly express matrix metalloproteinase-9 and osteopontin. Kobe: 14th International Congress of Immunology 2010, August 23.

6) Aranami T, Sato, Yamamura T: T cell subsets identified with chemokine receptors in MS. MS Immunology Seminar. Nottingham, England. October 31 2010.

7) 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

8) 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

国内学会

1) 佐藤和貴郎、荒浪利昌、山村隆：ケモカイン受容体の発現を用いた多発性硬化症患者におけるヒト Th17 細胞の検討。第 21 回日本神経免疫学会学術集会，大阪，3.12，2009

2) 佐藤和貴郎、荒浪利昌、富田敦子、岡本智子、小川雅文、山村隆：MMP9 を高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞の多発性硬化症における重要性。第 22 回日本神経免疫学会学術集会，東京，3.18，2010

3) 荒浪利昌、佐藤和貴郎、山村隆：多発性硬化症病巣に高発現する熱ショック蛋白 α B-crystallin による CD28 陰性 Th1 細胞偏倚の誘導。第 21 回日本神経免疫学会学術集会，大阪，3.12，2009

4) 佐藤和貴郎、富田敦子、荒浪利昌、岡本智子、小川雅文、山村隆：MMP9 を高発現する CCR2 陽性 CCR5 陽性細胞の多発性硬化症における重要性。第 37 回日本臨床免疫学会総会，東京，11.3，2009

5) 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

6) 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

G. 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）
分担研究報告書（総合）

○ 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

分担研究者 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。

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- α , IFN- γ) を ELISA 法にて測定した。

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

(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- α , IFN- γ) 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
治験プロトコー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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Theil MM, Miyake S, Mizuno M, Tomi C, Croxford
J, Hosoda H, Theil J, von Horsten S, Yokote H, Chiba
A, Lin Y, Oki S, Akamizu T, Kanagawa K, Yamamura
T: Suppression of experimental autoimmune
encephalomyelitis by Ghrelin. *J Immunol*
83(4):2859-66, 2009
- 2) Fujita M, Otsuka T, Mizuno M, Tomi C, Yamamura
T, Miyake S. Carcinoembryonic antigen-related cell
adhesion molecule 1 modulates experimental
autoimmune encephalomyelitis via iNKT
cell-dependent mechanism. *Ame J Pathol*
175(3):1116-23, 2009
- 3) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T: Role of NKT
cells in multiple sclerosis: In a quest to understand and
overcome their highly efficient double edged swords.
**Molecular Basis of Multiple Sclerosis. The Immune
System Series "Results and Problems in Cell
Differentiation"** Gramm U, ed, Springer-Verlag,
Heidelberg 51:127-147, 2010
- 4) Miyake S, Yamamura T. Ghrelin: friend or foe for
neuroinflammation. *Discov Med* 8(41):64-67, 2009
- 5) Noto D, Takahashi K, Miyake S, Yamada M. In
vitro differentiation of lineage-negative bone marrow
cells into microglia-like cells. *Eur J Neurosci*
31:1155-63, 2010
- 6) 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

7) 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

8) 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

9) Ichikawa D, Mizuno M, Yamamura T, Miyake S: Gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL) regulates cytoskeletal reorganization thorough ubiquitination and degradation of Arp2/3-5 and coronin A. **J Biol Chem** 286(50):43465-74, 2011

10) 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

国際学会

1) Miyake S, Yokote H, Lin Y, Yamamura T. The role of regulatory cells in the regulation of EAE. 2nd German-Japanese Neuroimmunology Symposium, Eibsee, 10th, July 2009

2) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR-1restricted MAIT cells in the pathogenesis of arthritis. American College of Rheumatology 73rd Annual Scientific Meeting, Philadelphia, 10.19, 2009

3) Miyake S. MAIT cells in autoimmunity Neuroimmunology Kyoto Conference 2010, Kyoto, August 18, 2010

4) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR-1restricted MAIT cells in the pathogenesis of murines models of arthritis. 10th Annual Conference of FOCIS, Boston, June 24, 2010 (Clinical Immunology, 135S:S52, 2010)

5) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: The role of MR-1restricted MAIT cells in the pathogenesis of arthritis. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug 24, 2010

6) Ogura H, Satoh M, Gilfillan S, Miyake S, Onoe K, Iwabuchi K:MR1-restricted NKT cells exhibit beneficial role for the development of atherosclerosis. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010

7) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis, through induction of “armoured” regulatory T cells. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010

8) Chihara N, Sato W, Aranami T, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Yamamura T: Auto-reactive anti-aquaporin 4 antibodies are secreted from peripheral plasma cell-like B cells in neuromyelitis optica. 14th International Congress of Immunology, Kobe, Aug 23, 2010

9) Noto D, Kazuya T, Yamamura T, Masahito Y, Miyake S: In vitro differentiation of lineage-negative

bone marrow cells and monocyte into microglia-like cells. 10th International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010

10) Chiba A, Miyazaki Y, Ryohsuke T, Miho M, Tomi C, , Ichikawa D, Iraide A, Yamamura T, Vandebroek K, Miyake S: Celecoxib analogue lacking COX-2 inhibitory activity suppresses inflammatory disorders by inhibiting inflammatory cytokines. 10th International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010

11) Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, Ogawa M, Toda T, Yamamura T: Plasma cell-like B cells produce aquaporin 4 autoantibody in neuromyelitis optica. 10th International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010

12) Lin Y, Miyake S, Yamamura T: Dominancy of encephalitogenic peptide itself directs sustainable regulation of a model of multiple sclerosis, by induction of “armoured” T regs. 10th International Congress of Neuroimmunology, Barcelona, Nov15, 2010

13) Chiba A, Ryohsuke T, Miho M, Tomi C, , Ichikawa D, Iraide A, Yamamura T, Vandebroek K, Miyake S: Celecoxib analogue lacking COX-2 inhibitory activity inhibits arthritis by suppressing IL-23 and inflammatory cytokines. American College of Rheumatology 73th Annual Scientific Meeting, Atlanta, Georgia, November 7, 2010 (Arthritis Rheum. 62:S371, 2010)

14) Chiba A, Tajima R, Miyazaki Y, Ichikawa D, Yamamura T, Miyake S: Mucosal associated invariant T cells contribute to the pathogenesis of arthritis.

American College of Rheumatology 73th Annual Scientific Meeting, Atlanta, Georgia, November 11, 2010 (Arthritis Rheum. 62:S938, 2010)

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

国内学会

1) 宮崎雄生, 三宅幸子, 山村 隆: ヒト末梢血における mucosal associated invariant T 細胞に関する研究. 第 37 回日本臨床免疫学会総会, 東京, 11. 13, 2009

2) 宮崎雄生, 千葉麻子, 水野美歩, 任海千春, 市川大樹, Iraide Alloza, 山村 隆, Koen Vandebroek, 三宅幸子: 新規 celecoxib アナログは Th17, Th1 細胞の抑制を介して多発性硬化症, 関節リウマチのマウスモデルを抑制する. ワークショップ 18, 第 39 回日本免疫学会総会, 大阪, 12. 2, 2009

3) 三宅幸子: T 細胞アナジーに関連した E3 リガーゼ GRAIL の基質同定. 第 39 回日本免疫学会, 大阪, 12. 2, 2009

4) 千葉麻子, 宮崎雄生, 市川大樹, 山村隆, 三宅幸子: 炎症性関節炎における MR1 拘束性 MAIT 細胞の役割, 第 39 回日本免疫学会, 大阪, 12.2, 2009

5) 三宅幸子: NKT 細胞と自己免疫. 第 53 回日本リウマチ学会, 横浜, 4 月 23 日, 2010 (第 54 回日本リウマチ学会総会抄録集 p243)

6) 千原典夫, 佐藤和貴郎, 荒浪利昌, 宮崎雄生, 三宅幸子, 岡本智子, 小川雅文, 山村隆: 視神経脊髄炎 (NMO) における B 細胞の役割について. 第 22 回日本神経免疫学会学術集会, 東京, 3. 18, 2010

7) 宮崎雄生, 三宅幸子, Olivier Lantz, 山村隆: 多発性硬化症における Mucosal Associated

Invariant T細胞に関する研究. 第22回日本神経免疫学会学術集会、東京、3.18, 2010

8) 能登大介, 高橋和也, 山村隆, 三宅幸子: 末梢血単球からミクログリアへの分化誘導法に関する検討. 第22回日本神経免疫学会学術集会、東京、3.19, 2010

9) 千葉麻子, 三宅幸子: 関節リウマチなど関節炎におけるMRI拘束性MAIT細胞の役割. 第54回日本リウマチ学会総会・学術集会、神戸、4.22, 2010(第54回日本リウマチ学会総会抄録集 p500)

10) 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

11) 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

12) 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

13) 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

14) 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

15) 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

16) 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

17) 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

18) 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

G. 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）

分担研究報告書(総合)

分子ネットワーク解析からみた MS 新規創薬標的分子

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(3 年間)では、DNA マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現データに関して、分子ネットワークを詳細に解析することにより、いくつかの MS 新規創薬標的分子の候補を同定出来た。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)や FTY-720(fingolimod)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(robustness)の破綻に起因する。

近年、DNA マイクロアレイや次世代シーケンサーを用いて、個々の細胞における数万遺伝子の発現情報を短時間で網羅的に解析出来るようになった。多数のサンプルの遺伝子発現プロフィールを迅速に比較解析出来るマイクロアレイは、臨床所見や画像のみでは鑑

別困難な疾患の補助診断ツール、腫瘍の悪性度や予後、薬物応答や副作用の予測、治療効果の判定など幅広い臨床の場で利用されている。通常は、統計学的な処理を行って、比較するサンプル間で有意な発現差異を呈している遺伝子群(differentially expressed genes: DEG)を抽出し、定量的 PCR で発現レベルを検証する。また DEG に関して、生物学的意味付けを行うために、個々の遺伝子のアノテーション(annotation)を調べ、分子ネットワークを解析する。現在、公共データベース Gene Expression Omnibus(GEO)には、600,000 種類以上のサンプルの網羅的遺伝子発現解析データが登録されている。

本研究では、平成 21 年度(1 年目)には T 細胞活性化に対する IFNB の効果を調べるため、GEO GSE14386 データセットを解析した。平成 22 年度(2 年目)には培養ヒトミクログリア HMO6 に対する FTY720 のアポトーシス誘導機序をゲノムワイドマイクロアレイで解析し解明した。平成 23 年度(3 年目)には GEO GSE26484 を解析し、自己免疫増強分子 Semaphorin 4A(Sema4A)が血清中で上昇している高活動性 MS 患者末梢血リンパ球の遺伝子発現プロファイルの特徴を明らかにした。一連の研究からいくつかの新規創薬標的分子の候補を同定出来た。

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 向上につながると思われる。

B. 研究方法

1. GSE14386 の再解析

GSE14386 は発症 1 年以内、MRI で 2 病巣以上を有し、6 週間は IVMP を行っていない clinically isolated syndrome(CIS)患者(n = 15)の PBMC を用いて、IFNB-1a(1000 U/ml)添加または未添加で、プレートコート抗 CD3, CD28 抗体で 24 時間刺激、RNA を抽出、HG-133 Plus 2.0 アレイ(Affymetrix; 38,500 genes)で解析したデータセットである。データを GeneSpring GX10.0.2(Agilent)に入力、robust multiarray average(RMA)または MicroArray Suite 5(MAS5)で正規化、paired T-Test と multiple testing correction with Benjamini Hochberg FDR ($p \leq 0.05$), fold change ≥ 2.0 で DEG を絞り込んだ。IFN 応答プロモーター(ISRE, IRF, STAT, NF- κ B) は INTERFEROME、分子ネットワークは生物情報統合プラットフォーム KeyMolnet(医薬分子設計研究所)の共通上流検索法、正常組織における発現は GNF SymAtlas で解析した。

2. FTY720 により HMO6 で発現変動を呈する遺伝子群の網羅的解析(GEO に GSE28642 として登録済み)

ヒトミクログリア HMO6(Nagai A et al. Neurobiol Dis 8: 1057-1068, 2001)を 10% FBS 添加 Dulbecco's MEM で培養、0-20 μ M FTY720 に 15 分-24 時間暴露後、total protein を抽出、抗 PARP 抗体によるウエスタンブロットでアポトーシスの誘導を確認した。また 10 μ M FTY720 or DMSO(vehicle)に 2 時間暴露後に、total RNA を抽出、HG 1.0 ST アレイ(Affymetrix; 28,869 genes)を用いて遺伝子発