

特集：疾患の制御—臨床から免疫へ—

総説

## 多発性硬化症の病態解析から治療標的の同定へ

大木伸司, 山村 隆

### Identification of a possible therapeutic target through pathogenic T cell analysis of multiple sclerosis

Shinji OKI Ph. D., Takashi YAMAMURA M. D./Ph. D.

Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP

(Received May 28, 2009)

#### summary

Multiple sclerosis is an autoimmune disease affecting the central nervous system (CNS), in which Th17 and Th1 cells are involved. Comprehensive gene expression profiling analysis employing DNA microarray showed that NR4A2, an orphan nuclear receptor, is strongly upregulated in the peripheral blood T cells derived from MS patients. Further analysis revealed that NR4A2 plays a pivotal role for mediating production of inflammatory cytokines from pathogenic T cells. In experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of MS, NR4A2 was selectively upregulated in the CNS-infiltrating T cells and the peripheral blood T cells. Intriguingly, a forced expression of NR4A2 augmented promoter activities of IL-17 and IFN- $\gamma$  genes, leading to an excessive production of these cytokines by splenic T cells. In contrast, treatment with siRNA specific for NR4A2 resulted in a significant reduction in the production of IL-17 and IFN- $\gamma$ . Furthermore, treatment with NR4A2-specific siRNA reduced the ability of encephalitogenic T cells to adoptively transfer EAE in recipient mice. These results imply that NR4A2 is an essential transcription factor for triggering the inflammatory cascade in MS/EAE and may serve as a novel therapeutic target of the diseases.

**Key words**—多発性硬化症, NR4A2, 核内受容体, IL-17, Th17 細胞

#### 抄録

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis; MS) は中枢神経系の脱髄疾患であり, その本態は自己反応性 T 細胞を含む免疫担当細胞を介した組織障害である。長らく自己免疫疾患に関わる病原性 T 細胞の本体は, IFN- $\gamma$  産生性の Th1 細胞と考えられてきたが, 最近になって Th1 細胞や Th2 細胞とは機能的に異なる新たなエフェクター細胞 T 集団として, より強力な炎症惹起能を有する IL-17 を産生する Th17 が, 強力な自己免疫疾患誘導性を有する病原性 T 細胞集団であることが示された。我々は, 自己免疫病態形成に関わる病原性 T 細胞の機能解析を目的として, 寛解期 MS 患者由来の末梢血 T 細胞を対象に, DNA マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析を施行し, 新たな MS 治療標的候補分子として, オーフアン核内受容体 NR4A2 を同定した。RNAi 法を用いた T 細胞の NR4A2 発現抑制により, 炎症性サイトカイン産生抑制と, 実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis; EAE) の軽快が認められた。本稿では, NR4A2 をターゲットとした分子標的薬による新規 MS 治療法開発の可能性について紹介する。

#### はじめに

多発性硬化症 (Multiple Sclerosis ; 以下 MS) は, 中枢神経系の脱髄を主徴とし, Th1 細胞や Th17 細胞などのエフェクター T 細胞をはじめとする免疫担当細胞の機能亢進による組織障害が病態形成に深く関わる典型的な炎症性自己免疫疾患である<sup>1,2)</sup>。よって免疫異常制御の観点から MS の病態を理解

することは, 本疾患の予防や治療への根本的な道を開くことにつながると考えられる。現在臨床で利用されているインターフェロン・ベータ (IFN- $\beta$ ), 抗炎症性ステロイドおよび免疫抑制剤などの MS 治療薬や, 臨床導入の途上にある薬剤として 4 種のアミノ酸からなるコポリマーであるコパキソン, 抗 VLA-4 抗体製剤タイサプリ, およびスフィンゴシン 1 リン酸受容体を標的とした FTY720 (Fingolimod) などはいずれも, 上記の発想に基づいて見いだされてきたものである。このように近年の著し

い基礎免疫学の進歩により、慢性炎症を伴う自己免疫疾患の制御薬、あるいは治療薬候補分子が多数見出されてきているが、一方で視神経脊髄型 MS (NMO, Devic 病) では、IFN- $\beta$  投与により病態が増悪する例が見られるなど、それぞれの治療薬に対する MS 患者の反応性は症例ごとに大きく異なるという現状がある。このことは、MS の新規治療法を開発するためには、MS 病態の多様性に十分配慮した新たな免疫学的なアプローチが求められていることを意味しており、これは MS 患者サンプルを用いた網羅的解析の中で多様性に関わる項目を適当に相殺し、その中から普遍的な治療標的を探るという手法により克服可能であると考えられる。以上のような観点から我々は、MS の新規治療標的の同定を目的として、DNA マイクロアレイによる MS 患者末梢血 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析を行い、健常者に比較して MS 患者 T 細胞で発現が変動する一連の遺伝子群の同定に成功した<sup>3)</sup>。そのなかで、MS 患者で最も有意な発現亢進を認めた遺伝子の一つとして同定したオーファン核内受容体 NR4A2 は、MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis : 以下 EAE) マウス由来の中中枢神経浸潤 T 細胞でも認められた。T 細胞の NR4A2 発現を変動させると、各種炎症性サイトカインの産生が相関して増減し、NR4A2 特異的 siRNA 処理により、passive EAE モデルにおける EAE の発症が有意に抑制されたことから、NR4A2 が MS などの自己免疫疾患の新規治療ターゲットになりうる可能性が示された<sup>4)</sup>。本稿では、MS/EAE の病態形成における NR4A2 の挙動と、炎症性サイトカイン産生制御を介した MS の新規治療法確立の可能性について紹介する。

#### オーファン核内受容体 NR4A2 とは？

核内受容体は、エストロゲン受容体やグルココルチコイド受容体などを含む分子ファミリーをなしており、ヒトの場合 48 種類の異なる分子が知られている<sup>5,6)</sup>。実は本稿の中心となる Th17 細胞と核内受容体との関わりは思いのほか深く、今や Th17 細胞のマーカー分子として知られているレチノイドオーファン受容体 ROR $\gamma$ t/NR1F3<sup>7)</sup>、リガンド依存性に Th17 細胞機能制御能を有するレチノイン酸受容体 RAR $\alpha$ /NR1B1<sup>8)</sup>、NF-AT 阻害により IL-17 などの産生制御に関わるプロテインキナーゼ C 基質 EAR2/NR2F6<sup>9)</sup> などは、いずれもこのファミリー

に含まれる分子である。一方、NR4A ファミリー分子は NR4A1, NR4A2, NR4A3 の 3 種からなり、他の核内受容体と同様、NGFB-I/Nur77 (= NR4A1), Nurr1 (= NR4A2), NOR1 (= NR4A3) などの別名でも知られている<sup>10)</sup>。NR4A ファミリー分子は図 1 に示すような様々な生体応答に関わることが示されており、その機能の一部にはファミリー分子間の機能的オーバーラップが認められる。NR4A ファミリー分子のうち NR4A2 の発現部位は比較的中枢神経系に集中しており、なかでも中脳腹側、脳幹や脊髄に強い発現を認める。免疫系においては、T 細胞受容体の架橋や炎症性サイトカインなど刺激により、T 細胞で一過性に発現誘導される immediate early gene として知られている。NR4A ファミリー分子は、複数の機能ドメインからなる構造が、他の核内受容体分子との間で比較的良好に保存されている (図 1)。2 つの Zn フィンガーからなる N 末側の DNA 結合ドメイン (DBD) は、受容体間で非常に良く保存されており、標的分子プロモーター内の応答配列に対する特異的結合に関わる。C 末側に位置するリガンド結合ドメイン (LBD) は、各核内受容体分子間での多様性が高く、通常それぞれ異なるリガンドを認識する。一般に核内受容体は、リガンドを結合することで受容体の AF2 ドメインのコンフォメーションが変化し、ヘリックス 12 (H12) が活性型の配向をとると、コリプレッサーを遊離してコアクチベーターと会合するようになり転写活性化能を獲得する。一方、リガンドが未知の核内受容体はオーファン受容体と呼ばれ、NR4A ファミリー分子もこの中に含まれる。LBD の構造解析の結果、NR4A2 の LBD はかさ高い芳香環や疎水性の側鎖を持つアミノ酸に覆われており、典型的なリガンド結合ポケットがないことが明らかとなっている<sup>11)</sup>。さらに NR4A2 の H12 は、リガンドの存在とは無関係に活性型受容体類似のコンフォメーションをとることが示され、リガンド非依存的に転写活性化能を有するものと考えられている。

#### NR4A2 の誘導因子と標的分子<sup>10)</sup>

NR4A2 は、脂肪酸、プロスタグランジン、カルシウム、増殖因子、ペプチドホルモン、神経伝達分子など様々な因子に応答して速やかに発現が誘導される。これらの刺激はいずれも NF- $\kappa$ B あるいは CREB の活性化を誘導し、NR4A2 遺伝子プロモ-

## NR4A核内受容体スーパーファミリー

分類名	別名
NR4A1	NGFI-B, Nur77
NR4A2	Nurr1, NOT, RNR1
NR4A3	NOR1, MINOR

いずれも生理的リガンドは不明

オーファン受容体

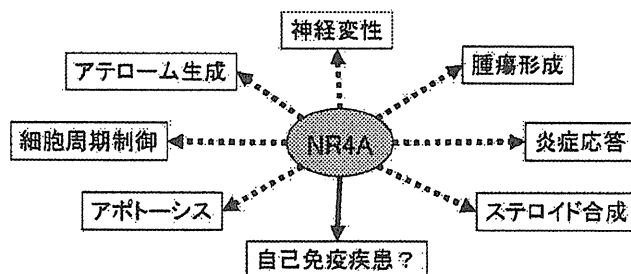
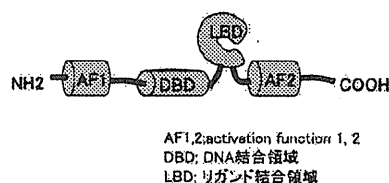


図1 NR4A核内受容体ファミリー分子

哺乳動物の NR4A 核内受容体ファミリー分子は、NR4A1 (NGFI-B/Nur77), NR4A2 (Nurr1), NR4A3 (NOR1) の3種の分子からなり、ファミリー分子に共通の構造 (AF1/2, DBD, LBD) を有する核内受容体分子である。いずれも生理的リガンドは不明であるが、図に示すようなさまざまな生体応答に関与することが知られている。免疫系との関連では、遺伝子欠損マウスを用いた解析から、NR4A1 と NR4A3 が胸腺細胞のアポトーシスに関与することが示されており、いわゆる「負の選択」の過程で重要な役割を果たしているものと考えられる。一方、NR4A2 欠損マウスではドパミン産生ニューロンの分化が著しく阻害されるが、胸腺細胞分化は比較的正常に保たれることが示されており、NR4A1/NR4A3 と NR4A2 の機能的な相違をうかがわせる知見であるといえる。

ターの転写活性化領域に結合することで、遺伝子発現を引き起こすと考えられている。一方、発現した NR4A2 分子は、リガンド非依存的に特定の DNA 配列を認識して下流の遺伝子発現を誘導する (図2)。したがって NR4A2 分子の機能制御は、主に種々の誘導因子による転写誘導レベルで行われていると考えられる。NR4A ファミリー分子の認識配列としては、①(A/T) AAAGGTCA 配列からなる NBRE (NGFI-B response element; 単量体あるいは二量体の NR4A 分子が結合)、②NBRE 類似の AAAT (G/A) (C/T) CA の逆向き繰り返し配列からなる NurRE (Nur-responsive element; プロオペオメラノコルチン (POMC) プロモーターに存在)、③DR5 配列 (レチノイド X 受容体 (RXR) とのヘテロダイマー形成による) の3種の配列が知られている。NR4A2 のターゲットとして最も良く解析されているのが、ドパミン (DA) 生成に必須の酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 遺伝子であり、NR4A2 依存的な DA の産生は、TH 遺伝子プロモーターに存在する NBRE を介して誘導される。一方、NR4A2 欠損マウスでは中脳黒質のドパミン産生ニューロンの形成が障害される<sup>12)</sup>。さらに家族性パーキンソン病の一部に NR4A2 の遺伝子異

常が認められる<sup>13)</sup>ことも明らかとなり、TH 発現における NR4A2 の重要性が再認識されている。他にも NR4A2 の標的探索を目指した個別の解析から、Neuropilin-1, vasoactive intestinal peptide (VIP), aldosterone 合成酵素, アロマトラーゼ, オステオポンチン, オステオカルシンなどがターゲットとして報告されており、NR4A2 は中枢神経機能のみならず、骨代謝の機能制御にも深く関わる可能性が示されている。NR4A2 分子の機能が、さらなる広がりを見せる予感を感じさせる。

## 免疫系における NR4A ファミリー分子の機能

免疫系における NR4A ファミリー分子の機能に関しては、T 細胞アポトーシス誘導、および胸腺における「負の選択」における NR4A1 分子の機能が、とくに詳細に解析されている<sup>14~17)</sup>。すなわち、TCR 刺激によりカルシウム依存性に活性化した MEF2 が NR4A1 の発現を引き起こし、T 細胞アポトーシスを誘導する。おそらくこの経路は、NR4A1 分子と Bcl2 分子との分子間相互作用を介した制御を受ける。そして転写抑制因子 Cabin1 が、mSin3 と HDAC1/2 をリクルートすることにより、あるいは MEF2 と p300 の結合を阻害すること

## NR4A2の上流と下流

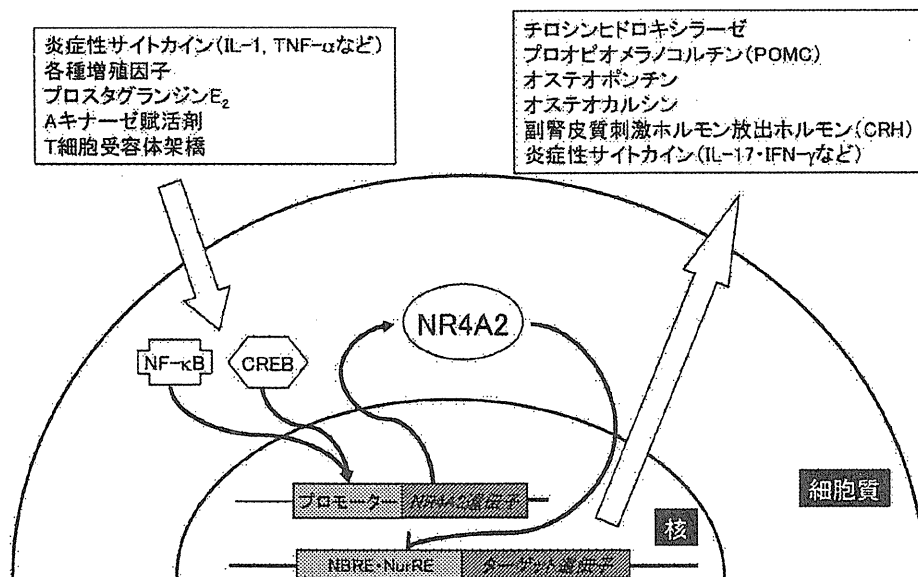


図2 NR4A2の誘導因子とターゲット分子

NR4A2は、脂肪酸、プロスタグランジン、カルシウム、増殖因子、ペプチドホルモン、神経伝達分子など、あるいはストレスや物理刺激に反応して発現が誘導され、いずれもNF-κBあるいはCREBの活性化を介すると考えられている。一方、このようにして発現したNR4A2分子は、多様な会合分子と複合体を形成し、NBRE (NGFI-B response element), NurRE (Nur-responsive element), DR5などの特定の配列を認識してターゲット遺伝子の発現を誘導する。これまでにチロシンヒドロキシラーゼを筆頭に、複数のターゲット遺伝子が報告されている (本文参照)。

により、MEF2によるNR4A1の誘導経路を遮断してアポトーシスを抑制すると考えられている<sup>18)</sup>。一方、NR4A1欠損マウスの表現系は、胸腺あるいは末梢のT細胞アポトーシスに関して大きな異常はなく、NR4A1が単独でこの経路を制御しているのではないと思われる。おそらく他の分子がNR4A1欠損を補完することにより、強い表現系の発現を抑制していることが予想され、胸腺での発現パターンなどから推測するに、その候補の一つは別のNR4Aファミリー分子NR4A3である。一方、NR4A2欠損マウスでは、中脳のドパミン産生ニューロンの欠損が著しく、胎児は生後すぐに死亡する。このNR4A2欠損マウスの表現系は、NR4A2の機能が他のNR4A1やNR4A3では補完できないことを意味しており、NR4A2が他のNR4Aファミリー分子とは異なる独自の機能を有することを強く示唆している。NR4A2欠損マウスは、生後の長期維持が極めて難しいため、免疫系を含む成体の機能異常に関する解析はほとんどなく、コンディショナル欠損マウスなどを用いた解析が待たれる。

## NR4A2と自己免疫疾患

上にも述べたように、多発性硬化症 (以下MS) では、Th1細胞やTh17細胞などの炎症性T細胞が脳炎惹起に重要な役割を果たす。CD4陽性ナイーブT細胞は複数の機能的に異なるエフェクターヘルパーT細胞に分化するが、その分化機構は、以前より知られていたTh1細胞、Th2細胞に加えて、Th17細胞<sup>19)</sup>と制御性T細胞<sup>20)</sup>が発見されたことをきっかけに、格段に複雑になりつつある (図3)。MSの病態形成初期には自己反応性T細胞が決定的な役割を果たすと考えられており、このような病原性T細胞の網羅的な機能解析は、新規治療ターゲットの絞り込みに有効な手段であると思われる。このような観点から我々は、DNAマイクロアレイによるMS患者末梢血T細胞の遺伝子発現解析を通じて、MSで健常者に比較して発現亢進する遺伝子群の同定を試み、その結果、最も有意な発現差を認めた分子としてNR4A2を同定した<sup>3)</sup>。NR4A2分子は核内受容体型の転写因子であるが、T細胞における機能は他のNR4Aファミリー分子とセットで解析されることが多く、個別の機能については不明

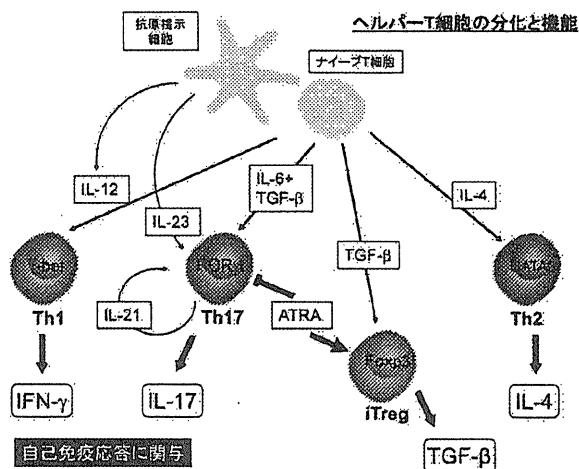


図3 ヘルパーT細胞の分化と機能

ナイーブT細胞が抗原提示細胞場の抗原を認識すると、種々のサイトカイン依存性にそれぞれ機能的に異なるエフェクターT細胞へと分化することが知られている。以前は感染免疫などに関わるTh1細胞と、アレルギー反応などに関わるTh2細胞の二極対立の構図により説明されていたが、近年のTh17細胞と制御性T細胞(Treg細胞)の発見にともない、各エフェクターT細胞の複雑な分化制御機構が次々と明らかになりつつある。自己免疫の観点からは、IFN- $\gamma$ 産生性のTh1細胞と、IL-17産生性のTh17細胞はいずれも自己免疫病態を引き起こす病原性T細胞集団であると考えられており、双方の細胞機能をコントロールできる新たな制御法の確立が重要な課題となっている。

な点が多かったため、MSのマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(以下EAE)を併用してさらなる病態との関連を解析した<sup>4)</sup>。

C57BL/6マウスにMOG<sub>35-55</sub>ペプチドを免疫することにより誘導したEAEモデルにおいて、脳脊髄(CNS)浸潤細胞、末梢血、所属リンパ節細胞、脾臓細胞から分離したT細胞のNR4A2の発現レベルを、定量PCR法により比較し、CNS浸潤T細胞および末梢血T細胞で、選択的なNR4A2の発現亢進を認めた。さらに再試激後のCNS浸潤T細胞のサイトカイン産生を調べたところ、約30%の細胞がIL-17を産生することが判明し、CNSへの顕著なTh17細胞の集積が認められた。IL-17はMS/EAEの発症に重要な炎症性サイトカインの一種であり、我々はNR4A2とT細胞のIL-17産生との間に何らかの相関がある可能性を考えて、さらに検討を加えた。まずNR4A2の発現亢進が炎症性サイトカイン産生に与える影響を調べるため、IL-17遺伝子、あるいはIFN- $\gamma$ 遺伝子のプロモーター領域を含むレポーター遺伝子を培養細胞に導入して、ルシフェラーゼアッセイを試みた。その結果、NR4A2発現プラスミドの添加により、それぞれルシフェ

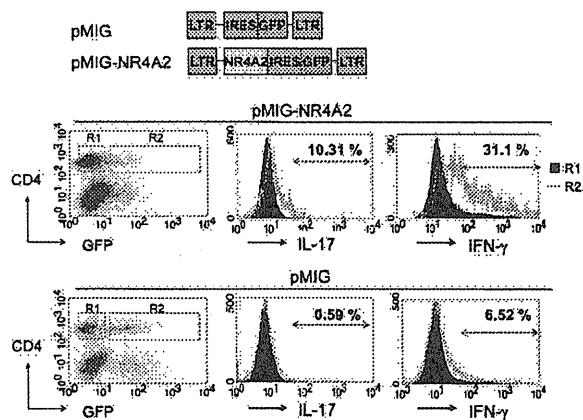


図4 NR4A2を介した炎症性サイトカイン産生増強

T細胞の炎症性サイトカイン産生に対するNR4A2分子の機能を解析するため、NR4A2遺伝子を組み込んだレトロウイルス、あるいはコントロールウイルスを用意し、マウス脾臓CD4陽性T細胞に感染させた。eGFPの発現を指標に感染細胞を同定し、再試激後の炎症性サイトカイン産生を、細胞内サイトカイン染色法を用いて比較した。GFP陰性群(R1)では図の上下でサイトカイン産生レベルに大きな差は認められないが、GFP陽性群(R2)では、コントロール細胞(下段)に比べてNR4A2遺伝子導入細胞(上段)における炎症性サイトカインの産生がいずれも増強した(IL-17; 0.59% vs 10.31%, IFN- $\gamma$ ; 6.52% vs 31.1%)。

ラーゼ活性が有意に増強した。さらにNR4A2のcDNAをコードするレトロウイルスを用いて、脾臓T細胞にNR4A2分子を過剰発現させると、TCR刺激後のIL-17およびIFN- $\gamma$ 産生が選択的に亢進した(図4)。以上の結果から、T細胞におけるNR4A2の発現亢進により、炎症性サイトカインの産生が増強することが明らかとなった。次にNR4A2のMS治療ターゲットとしての可能性を探るため、NR4A2の発現を抑制することで、炎症性サイトカインの産生が低下するかどうかを、あらたに設計したNR4A2特異的siRNAを用いて検討した。ヒトおよびマウスのNR4A2遺伝子のDNA配列は非常に良く保存されており、我々が設計したsiRNAはヒトおよびマウスのいずれにも適用可能であったことから、まず健康人の末梢血CD4陽性T細胞をsiRNA処理し、NR4A2の発現を選択的に抑制したときの炎症性サイトカイン産生を調べた。その結果、NR4A2特異的siRNA処理したT細胞では、刺激後のIL-17産生およびIFN- $\gamma$ 産生が、いずれも有意に抑制されていた。次にMS患者の末梢血CD4陽性T細胞を用いて同様の検討を行ったところ、患者T細胞の炎症性サイトカイン産生も、NR4A2特異的siRNA処理により有意に減少することが明らかとなった。さらにsiRNAによる

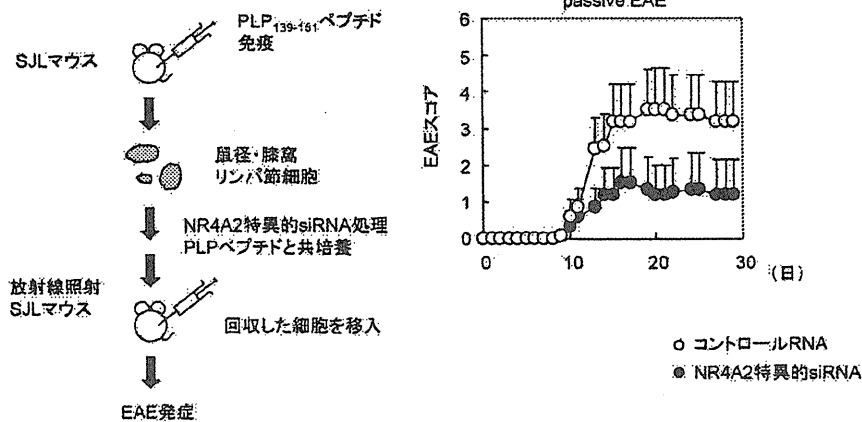


図5 passive EAE における NR4A2 特異的 siRNA の効果

PLP<sub>139-151</sub> ペプチドを免疫後 10 日目の SJL マウスより、鼠径リンパ節細胞および膝窩リンパ節細胞を分離し、NR4A2 特異的 siRNA あるいはコントロール RNA を遺伝子導入した。さらに PLP<sub>139-151</sub> ペプチド存在下 *in vitro* で 3 日間培養した細胞を回収し、放射線照射した未処理 SJL マウスに移入することで、レシピエントマウスに EAE を誘導した。各処理群の EAE スコアを比較した結果、コントロール RNA 処理群で誘導された EAE の臨床スコアに対し、NR4A2 特異的 siRNA 処理群の EAE 臨床スコアは低下し、観察期間を通じて軽度の病態で推移した。NR4A2 特異的 siRNA 処理により、EAE 病態が抑制できることが示された。

NR4A2 の発現抑制が中枢神経系の病態形成に及ぼす効果を、ミエリン抗原（プロテオリピッドプロテイン；PLP）を免疫することで SJL マウスに誘導される病原性 T 細胞を、ナイーブ SJL マウスに移入する passive EAE モデルを用いて検討した。分離した T 細胞を *in vitro* で抗原刺激する際に、NR4A2 特異的 siRNA で処理すると、対照 RNA 処理した T 細胞の移入群に比して、移入後の EAE は有意に軽症化することが明らかとなった（図 5）。これらの結果は、NR4A2 の発現あるいは機能制御を介して自己免疫病態が制御できることを示しており、NR4A2 が MS をはじめとする自己免疫疾患の治療ターゲットとなりうる可能性を示すものと考えている。

#### 疾患治療ターゲットとしての NR4A ファミリー分子の可能性

核内受容体の約半数はいまだリガンドが未知のオーファン受容体であり、個々の機能は、その多くが不明のままである。仮に欠損マウスの表現系解析から機能の一端を明らかにしても、その機能を制御できるリガンドの同定なしには、さらなる応用研究への展開は一般には難しい。しかしながら PPAR など一部の核内受容体分子に関しては、代謝制御における重要な生理機能が次々と明らかとなってきている。さらにその結果、高脂血症改善作用を有する PPAR- $\alpha$  の合成リガンドであるフィブラート系化

合物や、糖尿病治療作用を有する PPAR- $\gamma$  の合成リガンドであるチアゾリジノン系化合物など、臨床応用上も重要な小分子化合物の同定が次々となされており、核内受容体の新規リガンドの探索は創薬の観点からも非常に重要な研究領域であるといえる。免疫応答制御の分野に限ってみても、種々の核内受容体が免疫系、特に Th17 細胞の制御に深く関与することが明らかとなっている。例えば天然型レチノイン酸および合成 RAR アゴニストが、Th17 細胞分化の抑制と制御性 T 細胞の誘導を介して効果的な自己免疫疾患の抑制作用を示すことなどが明らかとなっており<sup>8,21)</sup>、合成 RAR アゴニストを用いた新規自己免疫疾患治療法の開発も、将来有望な研究分野であるといえる。

一方で、上で示した NR4A2 特異的 siRNA を用いた核酸医薬の臨床応用を考えた場合、一般的に siRNA を用いた製剤の臨床応用はいままで限定的であり、RNA 自身の *in vivo* での安定性に加えて効果的なドラッグデリバリーシステム（DDS）の構築が難しいなど多くの課題を抱えている現状がある。局所的な投与による応用可能性はあるとしても、本 siRNA そのものを用いたアプローチが MS 治療薬としての臨床応用に展開可能かどうかについては今後のさらなる検討が必要である。この他には、小分子化合物を用いた NR4A2 の機能制御が考えられる。NR4A2 のリガンド結合領域は不活性化されていると考えられているが、本来のリガンド結

合領域以外の領域と相互作用することでNR4A2の機能制御能をもつ特異的な低分子化合物をスクリーニングすることにより、効果的なNR4A2阻害剤を探索することができれば、新規自己免疫疾患治療薬のシードが見出される可能性は十分にあると考えられる。例えば、抗癌剤として用いられている6-メルカプトプリン(6-MP)には、NR4A2の活性化能があることが示されており<sup>22)</sup>、類縁分子の中に求める小分子化合物が見出される可能性もある。実際にNR4A2ファミリー分子の関与の可能性が示唆されている疾患としては、パーキンソン病、統合失調症、双極性うつ病、動脈硬化症、アルツハイマー病、関節リウマチ、癌などのさまざまな難治性疾患があり、例えば炎症性の関節炎の場合、メトトレキサート処理により滑膜組織におけるNR4A2の発現が低下し、このNR4A2の発現低下に相関して疾患活動性も減少することが示されている<sup>23)</sup>。またNR4A2は、THの発現と中脳ドパミン作動性ニューロンの発生に深く関与すること、および一部の家族性パーキンソン病家系にNR4A2変異が見出されたことから、パーキンソン病の治療ターゲットとしての期待も高まっている。実際、パーキンソン病治療薬候補としてNR4A2賦活化小分子化合物の同定がなされており、今後これらの小分子化合物の誘導体を、MSの新規治療薬として転用するアプローチは有望であろうと思われる。さらにもし求める小分子化合物が得られれば、自己免疫誘導病原性T細胞と、これらが産生するIL-17やIFN- $\gamma$ などの炎症性サイトカインは、種々の自己免疫疾患への関与が考えられるため、NR4A2をターゲットとした治療アプローチが、MSのみならず他の自己免疫疾患へとさらなる広がりをみせる可能性がある。

#### 生体内恒常性センサーとしてのNR4A2分子の可能性

MSの病態形成に遺伝的背景が関与することは論を待たないが、元々本邦では比較的稀な疾患とされてきたMSの患者数がここ30年間で約20倍に増加していることは、患者を取り巻く生活環境の急激な近代化にともなう環境要因の変化が、MS患者数の増加に関連している可能性を示唆している<sup>24)</sup>。我々は以前より、我が国における食生活の欧米化にともなう腸管免疫環境の変調がMSの発症増加と関連する、という仮説の下、MSにおける病原性T細胞の成立における腸管関連リンパ組織の関連を解析

してきた。そのなかで、中枢神経疾患であるEAEの感受性が、腸管に集積し腸内細菌叢と密接に関わるMR1拘束性NKT細胞により制御されることを報告し、様々な要因で変化する腸内細菌叢の構成が腸管免疫応答、ひいては自己免疫感受性に及ぼす影響を明らかにした<sup>25)</sup>。さらに非吸収性抗生物質を経口投与することで腸内細菌叢を変動させることで、EAE感受性が大きく変動することも見出している<sup>26)</sup>。Germ-freeマウスでは腸管免疫系が発達しないことから、腸内細菌叢が腸管免疫応答制御を介して自己免疫疾患感受性を規定する因子である可能性は高い。一方、このような観点からNR4A2は、T細胞受容体刺激によりT細胞で発現誘導されるのみならず、脂肪酸、プロスタグランジン、カルシウム、増殖因子、ペプチドホルモン、神経伝達分子など様々な生体因子に反応してNF- $\kappa$ B依存性あるいはCREB依存性に発現が誘導される。NR4A2は生体応答をモニターする、極めて鋭敏なセンサー分子として機能しているのである。興味深いことに、ストレス負荷や運動による物理刺激など、一見誘導メカニズムが簡単には想像できないような複雑な刺激に対しても、速やかなNR4A2の発現誘導がおきることが知られている。心的ストレスや過剰な運動とこれに伴う疲労は、MSの重要な再発誘導因子、あるいは増悪因子と考えられており、非本来的なNR4A2の発現誘導が、この過程に何らかのかたちで関与することは十分に考えられる。とくにNR4A2が、元々中枢神経系の機能に関わる分子であることを考えると、ストレスで発現する神経系由来の何らかのNR4A2の誘導因子が、T細胞のNR4A2発現をも同時に誘導してしまうことにより、不要な免疫応答につながる可能性も考えられる。今後さらなる研究が必要な分野であるといえるだろう。

#### おわりに

MSの病態解明を目的とした研究の過程で我々が新たに見出したオーファン核内受容体NR4A2の免疫系、とくに活性化T細胞の炎症性サイトカイン産生における機能と、引き続き中枢神経系の炎症病態形成における役割について概説した。最近になり、グリア細胞に発現したNR4A2がコリプレッサーと会合することで、炎症によるドパミン産生ニューロン死を抑制する可能性が示された<sup>27)</sup>。NR4A2にはさまざまな会合分子が存在するため、

極めて多様な機能を可能にする NR4A2 複合体の成り立ちを明らかにし、個々の機能に関わる会合分子の解析をすすめていく必要があるだろう。NR4A2 分子は病態時に末梢血中の発現レベルが亢進することから、疾患活動性をモニターするバイオマーカーとしての応用可能性も残されている。今後、MS の病態研究から見出した NR4A2 を、新規 MS 治療ターゲットに格上げしていくためのトランスレシヨナルリサーチを引き続き展開していきたいと考えている。NR4A2 が、広く他の自己免疫疾患へも適用可能なターゲットとして臨床応用される日を願っている。

### 文 献

- 1) Aranami T, Yamamura T.: Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int.* 57(2) : 115-120, 2008.
- 2) McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis : a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol.* 8(9) : 913-919, 2007.
- 3) Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, et al. : Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 18(3) : 537-550, 2005.
- 4) Doi Y, Oki S, Ozawa T, Hohjoh H, Miyake S, Yamamura T. : Orphan nuclear receptor NR4A2 expressed in T cells from multiple sclerosis mediates production of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(24) : 8381-8386, 2008, Epub 2008 Jun 11.
- 5) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell.* 97(2) : 161-163, 1999.
- 6) Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. : The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci.* 116(Pt 4) : 585-586, 2003.
- 7) Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. : The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell.* 126(6) : 1121-1133, 2006.
- 8) Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science.* 317(5835) : 256-260, 2007, Epub 2007 Jun 14.
- 9) Hermann-Kleiter N, Gruber T, Lutz-Nicoladoni C, Thuille N, Fresser F, Labi V, et al. : The nuclear orphan receptor NR2F6 suppresses lymphocyte activation and T helper 17-dependent autoimmunity. *Immunity.* 29(2) : 205-216, 2008.
- 10) Maxwell MA, Muscat GE. : The NR4A subgroup : immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal.* 4 : e002., 2006, Epub 2006 Feb 8.
- 11) Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, et al. : Structure and function of Nurrl identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature.* 423(6939) : 555-560, 2003.
- 12) Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T. : Dopamine neuron agenesis in Nurrl-deficient mice. *Science.* 276(5310) : 248-250, 1997.
- 13) Le WD, Xu P, Jankovic J, Jiang H, Appel SH, Smith RG, et al. : Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nat Genet.* 33(1) : 85-89, 2003, Epub 2002 Dec 23.
- 14) Calnan BJ, Szychowski S, Chan FK, Cado D, Winoto A. : A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity.* 3(3) : 273-282, 1995.
- 15) Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto A. : Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. *Embo J.* 16(8) : 1865-1875, 1997.
- 16) Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, Osborne BA. : Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature.* 367(6460) : 281-184, 1994.
- 17) Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, Winoto A. : Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature.* 367(6460) : 277-281, 1994.
- 18) Youn HD, Liu JO. : Cabin1 represses MEF2-dependent Nur77 expression and T cell apoptosis by controlling association of histone deacetylases and acetylases with MEF2. *Immunity.* 13(1) : 85-94, 2000.
- 19) Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. : IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 8 : 8, 2009.
- 20) Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. : Regulatory T cells and immune tolerance.



- Cell*. 133(5) : 775–787, 2008.
- 21) Klemann C, Raveney BJE, Klemann AK, Ozawa T, von Hörsten S, Shudo K, et al. : Synthetic retinoid AM80 inhibits Th17 cells and ameliorates EAE. *AmJPathol*. 2009 ; in press.
- 22) Ordentlich P, Yan Y, Zhou S, Heyman RA. : Identification of the antineoplastic agent 6-mercaptopurine as an activator of the orphan nuclear hormone receptor Nurr1. *J Biol Chem*. 278(27) : 24791–24799, 2003, Epub 2003 Apr 22.
- 23) Ralph JA, McEvoy AN, Kane D, Bresnihan B, FitzGerald O, Murphy EP. : Modulation of orphan nuclear receptor NURR1 expression by methotrexate in human inflammatory joint disease involves adenosine A2A receptor-mediated responses. *J Immunol*. 175(1) : 555–565, 2005.
- 24) Chakravarti A, Little P. : Nature, nurture and human disease. *Nature*. 421(6921) : 412–414, 2003.
- 25) Croxford JL, Miyake S, Huang YY, Shimamura M, Yamamura T. : Invariant V (alpha) 19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol*. 7(9) : 987–994, 2006, Epub 2006 Jul 30.
- 26) Yokote H, Miyake S, Croxford JL, Oki S, Mizusawa H, Yamamura T. : NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora. *Am J Pathol*. 173(6) : 1714–1723, 2008, Epub 2008 Oct 30.
- 27) Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, et al. : A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell*. 137(1) : 47–59, 2009.

# Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain-lesion proteome

Jl Satoh<sup>1,2</sup>, H Tabunoki<sup>1</sup> and T Yamamura<sup>2</sup>

**Background** A recent proteomics study of multiple sclerosis (MS) lesion-specific proteome profiling clearly revealed a pivotal role of coagulation cascade proteins in chronic active demyelination. However, among thousands of proteins examined, nearly all of remaining proteins are yet to be characterized in terms of their implications in MS brain-lesion development.

**Methods** By the systems biology approach using four different pathway analysis tools of bioinformatics, we studied molecular networks and pathways of the proteome dataset of acute plaques, chronic active plaques (CAP), and chronic plaques (CP).

**Results** The database search on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and protein analysis through evolutionary relationships (PANTHER) indicated the relevance of extracellular matrix (ECM)-mediated focal adhesion and integrin signaling to CAP and CP proteome. KeyMolnet disclosed a central role of the complex interaction among diverse cytokine signaling pathways in brain-lesion development at all disease stages, as well as a role of integrin signaling in CAP and CP. Ingenuity pathway analysis (IPA) identified the network constructed with a wide range of ECM components, such as collagen, type I  $\alpha$ 1, type I  $\alpha$ 2, type VI  $\alpha$ 2, type VI  $\alpha$ 3, fibronectin 1, fibulin 2, laminin  $\alpha$ 1, vitronectin, and heparan sulfate proteoglycan, as one of the networks highly relevant to CAP proteome.

**Conclusions** Although four distinct platforms produced diverse results, they commonly suggested a role of ECM and integrin signaling in development of chronic lesions of MS. These *in silico* observations indicate that the selective blockade of the interaction between ECM and integrins in brain lesions *in situ* would be a target for therapeutic intervention in MS. *Multiple Sclerosis* 2009; 15: 531–541. <http://msj.sagepub.com>

**Key words:** extracellular matrix; multiple sclerosis; pathway analysis; proteome; systems biology

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) presenting with relapsing-remitting and progressive clinical courses. An autoimmune process triggered by a complex interplay between genetic and environmental factors may mediate MS, although the causative agents have not yet been identified. Pathologically, MS shows remarkable heterogeneity in inflammatory demyelination, astrogliosis, and axonal degeneration [1]. Even though various drugs are lined up in clinical trials, currently, treatment options with limited efficacies, including interferon- $\beta$ , glatiramer acetate, and mitoxantrone are available for ordinary clinical practice of MS [2].

The completion of the Human Genome Project in 2003 allows us to systematically characterize the comprehensive disease-associated profiles of the whole human genome [3]. The global analysis of transcriptome, proteome, protein interactome, and metabolome helps us identify disease-specific molecular signatures and biomarkers for diagnosis and prediction of prognosis, and would broaden the spectrum of molecular mechanism-based therapy for MS [4,5]. Actually, the comprehensive gene expression profiling of MS brain tissues and peripheral blood lymphocytes by DNA microarray identified a battery of genes aberrantly regulated in MS, whose role has not been previously predicted during its pathogenesis [6,7]. A recent proteomics study of MS lesion-specific proteome profiling showed

<sup>1</sup>Department of Bioinformatics and Molecular Neuropathology, Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, Tokyo, Japan

Correspondence to: Jun-ichi Satoh, Department of Bioinformatics and Molecular Neuropathology, Meiji Pharmaceutical University, Tokyo, Japan. Email: [satoj@my-pharm.ac.jp](mailto:satoj@my-pharm.ac.jp)

Received 23 July 2008; accepted 12 November 2008

that overproduction of tissue factor and protein C inhibitor plays a central role in molecular events ongoing in chronic active plaques (CAP) [8]. *In vivo* administration of coagulation cascade inhibitors really reduced the clinical severity in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), supporting the view that the blockade of the coagulation cascade would be a potential approach for the treatment of MS [8]. However, among thousands of proteins this study examined, nearly all of remaining proteins were left behind to be characterized in terms of their implications in MS brain-lesion development.

Since the global expression analysis of transcriptome and proteome usually produces high-throughput experimental data at a time, it is often difficult to find out the meaningful biological implications of the dataset. Recent advances in systems biology enable us to illustrate the cell-wide map of the complex molecular interactions by using the literature-based knowledgebase of molecular pathways [9,10]. In the scale-free molecular network, targeted disruption of limited numbers of critical components, on which the biologically important molecular connections concentrate, could disturb the whole cellular function by destabilizing the network [11]. From this point of view, the integration of comprehensive transcriptome and proteome data of disease-affected tissues with underlying molecular networks could provide the rational approach not only to characterize disease-relevant pathways but also to achieve the network-based choice of effective drug targets. By using four different pathway analysis tools of bioinformatics, this study was designed to characterize molecular networks and pathways of MS lesion-specific proteome data of Han, *et al.* [8]. Although the analysis by distinct platforms did not lead to fully identical results, they commonly suggested a role of extracellular matrix (ECM) and integrin signaling in chronic lesions of MS. These *in silico* observations indicate that ECM and integrins would be a target candidate for designing therapeutic intervention in MS.

## Databases and methods

### The dataset of the comprehensive MS brain-lesion proteome

In the original dataset of Han, *et al.* [8], fresh-frozen brain autopsy samples were collected from six MS patients of different clinical subtypes, acute, chronic, progressive, secondary progressive, or chronic progressive, with ages 27–54, and from two age-matched control subjects free of neurological diseases. The postmortem interval of each case ranged

from 4 to 24 h. Multiple sclerosis lesions were classified into three distinct categories: acute plaques (AP), CAP (chronic active plaques), or chronic plaques (CP), based on histological evaluation of the disease activity, briefly as follows: AP showed characteristics of acute ongoing inflammation, edema, and active demyelination. CAP was characterized by chronic demyelination with active inflammation at the lesion edges, whereas CP represented chronic inactive demyelination accompanied by profound astrogliosis. Protein samples were prepared from small pieces of brain tissues isolated by laser-captured microdissection, and the tissue pieces were characterized separately by the standard histological examination. The proteins were separated on one-dimensional SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) gels. Then, the protein bands were dissected and digested in a gel with trypsin, and peptide fragments were processed for mass spectrometric analysis several times to obtain a saturation point. Among 2,574 proteins determined with high confidence, the application of a computational data exploration program named INTERSECT/INTERACT identified 158, 416, and 236 lesion-specific proteins that were detected exclusively in AP, CAP, and CP, respectively. In this study, we tentatively called them as the comprehensive MS brain-lesion proteome dataset.

### Conversion of protein IDs into Entrez Gene IDs and KEGG IDs

We converted the protein IDs listed in the dataset described above into the corresponding the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Gene IDs, Gene Symbols, and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) IDs by searching them on the UniProt knowledgebase (<http://www.expasy.org/sprot>).

### Molecular network analysis

To identify biologically relevant molecular pathways from large-scale proteome data, we have undertaken the systems biology approach. We analyzed them by using four distinct pathway analysis tools endowed with a comprehensive knowledgebase which are as follows: KEGG (<http://www.kegg.jp>), the protein analysis through evolutionary relationships (PANTHER) classification system (<http://www.pantherdb.org>), Ingenuity pathways analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA; <http://www.ingenuity.com>), and KeyMolnet (Institute of Medicinal Molecular Design, Tokyo, Japan; <http://www.immd.co.jp>).

By importing the list of KEGG IDs, we studied molecular pathways on KEGG, a public database that systematically integrates genomic and chemical information to create the whole biological system *in silico*. KEGG contains manually curated reference pathways that cover a wide range of metabolic, genetic, environmental, and cellular processes, and human diseases [12]. Currently, KEGG contains 90,931 pathways generated from 371 reference pathways. PANTHER, a public database generated by computational algorithms that relate the evolution of protein sequence to the evolution of protein functions and biological roles, provides a structured representation of protein function in the context of biological reaction networks [13]. Currently, PANTHER includes the information on 165 regulatory and metabolic pathways, manually curated by expert biologists. PANTHER visualizes pathway maps with the format compatible with the Systems Biology Markup Language (SBML) standard. By uploading the list of Entrez Gene IDs, PANTHER identifies the genes in terms of over- or under-representation in canonical pathways, followed by statistical evaluation by multiple comparison with a Bonferroni correction.

IPA is a commercial tool built upon a knowledgebase that contains approximately 1,600,000 biological and chemical interactions and functional annotations with scientific evidence. They are collected from more than 300 selected articles, textbooks, and other data sources, manually curated by expert biologists. By uploading the list of Entrez Gene IDs, the network-generation algorithm identifies focused genes integrated in a global molecular network [14]. IPA calculates the score *P*-value, the statistical significance of association between the genes and the network by the Fisher's exact test.

KeyMolnet is a commercial database, composed of knowledge-based contents on relationships among human genes, molecules, diseases, pathways, and drugs, curated by expert biologists. They are categorized into the core contents that are collected from selected review articles with the highest reliability or the secondary contents extracted from abstracts of PubMed database and Human Reference Protein database. By importing the list of Entrez gene ID, KeyMolnet automatically provides corresponding molecules as a node on networks [15]. The "N-points to N-points" network-search algorithm identifies the molecular network constructed by the shortest route connecting the start point molecules and the end point molecules. The generated network was compared side by side with 346 human canonical pathways of the KeyMolnet library. The algorithm counting the number of overlapping molecular relations between the extracted network and the canonical pathway makes it possible to identify the canonical pathway showing the most significant

contribution to the extracted network. The significance in the similarity between both is scored following the formula, where *O* = the number of overlapping molecular relations between the extracted network and the canonical pathway, *V* = the number of molecular relations located in the extracted network, *C* = the number of molecular relations located in the canonical pathway, *T* = the number of total molecular relations composed of approximately 90,000 sets, and the *X* = the sigma variable that defines coincidence.

$$\text{Score} = -\log_2(\text{Score}(p))$$

$$\text{Score}(p) = \sum_{x=0}^{\text{Min}(C,V)} f(x)$$

$$f(x) = {}_C C_x \cdot {}_T - C C_{V-x} / {}_T C_V$$

## Results

### KEGG and PANTHER searches elucidated a role of ECM-mediated cell adhesion in chronic lesions of MS

First of all, we converted all protein IDs listed in the original database [8] into the corresponding NCBI Entrez Gene IDs, Gene Symbols, and KEGG IDs by searching them on the UniProt knowledgebase. After the removal of unaccepted and redundant IDs, we finally identified 155, 407, and 232 Entrez Gene IDs and KEGG IDs from the AP, CAP, and CP-specific proteome data, respectively. They are listed in Supplementary Tables 1–3\*.

When the KEGG IDs of the proteome were uploaded onto the 'Search Objects in Pathway' tool of the KEGG database, the vast majority of AP, CAP, or CP-specific proteins was not mapped on any KEGG human reference pathways (Table 1). However, a battery of CAP-specific proteins were categorized as those located in the pathways linked to focal adhesion (KEGG pathway ID: hsa04510), cell communication (hsa01430), ECM-receptor interaction (hsa04512), purine metabolism (hsa00230), and other biological pathways (not shown). Likewise, a panel of CP-specific proteins was found to be involved in the pathways linked to focal adhesion, regulation of actin cytoskeleton (hsa04810), oxidative phosphorylation (hsa00190), and cell communication (Table 1). These results are derived chiefly from enhanced production and deposition of ECM and receptor components, including collagen, fibronectin, vitronectin, integrin, and laminin in CAP and CP lesions. In contrast, relatively small numbers of AP-specific proteins were mapped on the

\*Supplementary Tables 1–4 are available online at <http://msj.sagepub.com/>

**Table 1** The molecular pathway relevant to multiple sclerosis (MS) brain-lesion proteome suggested by KEGG search

Stage	Rank	Functional category (KEGG Pathway ID)	Genes classified
AP	1	Unclassified	123 genes
	2	Oxidative phosphorylation (hsa00190)	NDUFS7, NDUFB9, ATP4A, ATP6V0C
	3	Regulation of actin cytoskeleton (hsa04810)	FGD1, ITGB4, SSH1, ACTA1
CAP	1	Unclassified	281 genes
	2	Focal adhesion (hsa04510)	COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, LAMA1, MYLK, SHC3, PPP1CA, PARVA, PRKCB1, MYL7, RAC3, SPP1, SRC, THBS1, VTN
	3	Cell communication (hsa01430)	NES, COL1A, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, KRT78, FN1, GJA1, LAMA1, KRT3, SPP1, THBS1, VTN
	4	ECM-receptor interaction (hsa04512)	COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, LAMA1, HSPG2, SPP1, THBS1, VTN
	5	Purine metabolism (hsa00230)	ADCY5, TYMP, NT5E, PDE2A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PRPS2, GMPS, ENTPD1
CP	1	Unclassified	166 genes
	2	Focal adhesion (hsa04510)	COL4A2, COL6A1, CRK, FYN, ITGA6, LAMB2, LAMC1, PIK3CA, ZYX
	3	Regulation of actin cytoskeleton (hsa04810)	WASF2, BAIAP2, CRK, ITGA6, PIK3CA, TIAM1, MYH14, ARHGEF7
	4	Oxidative phosphorylation (hsa00190)	NDUFB6, NDUFB8, NDUFS5, ATP5I, ATP6V1F
	5	Cell communication (hsa01430)	COL4A2, COL6A1, ITGA6, LAMB2, LAMC1

The list of KEGG IDs of MS brain-lesion proteome was uploaded onto the 'Search Objects in Pathway' tool of the KEGG database. Top 2 for AP and top 4 for CAP and CP of human reference pathways relevant to the proteome data are shown with KEGG pathway IDs and the list of genes classified.

Abbreviations: AP, acute plaques; CAP, chronic active plaques; and CP, chronic plaques.

pathways, such as oxidative phosphorylation and regulation of actin cytoskeleton (Table 1). Thus, the KEGG search suggested that the biological process of ECM and integrin-mediated cell adhesion and communication plays a role in chronic lesions of MS.

When the Entrez Gene IDs of the proteome were imported into the 'Gene Expression Data Analysis' tool of the PANTHER database, the vast majority of AP, CAP, or CP-specific proteins were not mapped on any PANTHER canonical pathways in comparison with a reference set of NCBI human genes (Table 2).

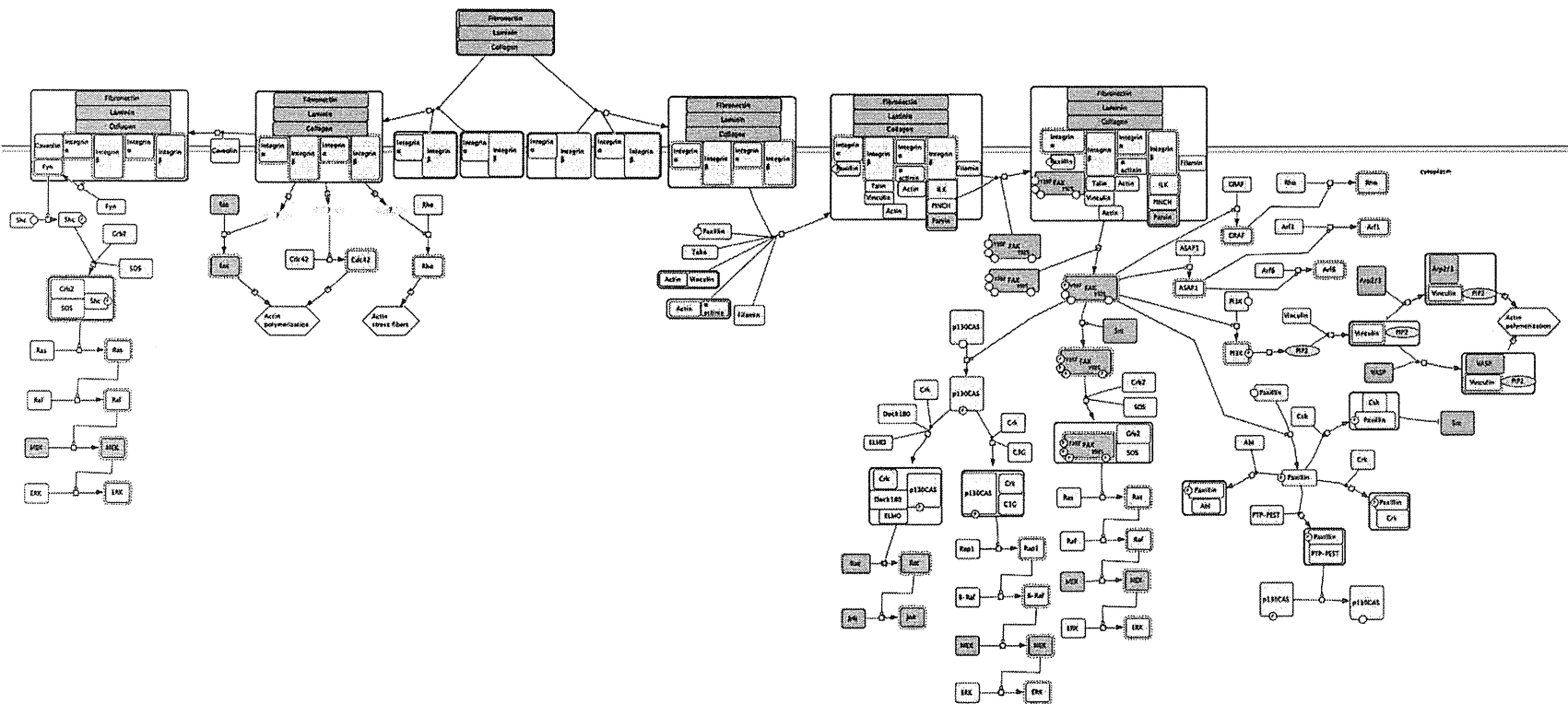
However, PANTHER identified a statistically significant relationship between a set of CAP proteins and signaling pathways of chemokines and cytokines, integrin (Figure 1), muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors (Table 2). PANTHER suggested an involvement of integrin signaling in CP, but identified no pathways relevant to AP (Table 2). Thus, the PANTHER search indicated that integrin signaling plays a role in both CAP and CP, whereas inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling plays a predominant role in CAP.

**Table 2** The molecular pathway relevant to MS brain-lesion proteome suggested by PANTHER search

Stage	Rank	Functional category	Number of genes classified	Human reference genes	<i>P</i> -value
AP	1	Unclassified	120	22436	6.89E-02 (NS)
CAP	1	Unclassified	321	22436	1.73E-04
	2	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	17	315	2.63E-03
	3	Integrin signaling pathway	14	227	3.55E-03
	4	Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway	7	62	1.17E-02
	5	Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	8	91	2.03E-02
CP	1	Unclassified	182	22436	9.75E-03
	2	Integrin signaling pathway	9	227	4.33E-02

The list of Entrez Gene IDs of MS brain-lesion proteome was uploaded onto the 'Gene Expression Data Analysis' tool of the PANTHER classification system by comparing with a reference set of NCBI human genes. The canonical pathways relevant to the proteome data are shown with the number of genes classified and *P*-value evaluated by multiple comparison with a Bonferroni correction.

Abbreviations: AP, acute plaques; CAP, chronic active plaques; CP, chronic plaques; and NS, not significant.



**Figure 1** Integrin signaling pathway relevant to CAP proteome suggested by PANTHER. The list of Entrez Gene IDs of CAP-specific proteome was uploaded onto the 'Gene Expression Data Analysis' tool of the PANTHER classification system by comparing them with a reference set of NCBI human genes. Integrin signaling pathway was identified as one of canonical pathways statistically relevant to the CAP proteome (Table 2). The pathway is illustrated as the map compatible with the Systems Biology Markup Language (SBML) standard. The molecules colored in pink represent those included in the gene list (Supplementary Table 2). They are composed of fibronectin (Gene symbol: FN1), laminin (LAMA1), collagen (COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3), Rac (RAC3), MEK (MAP2K4), FAK (PTK2B), parvin (PARVA), Src (SRC), Jnk (MAP2K4), Arp2/3 (ARPC1A), and VASP (ENAH).

### KeyMolnet and IPA searches disclosed a role of the complex interaction of diverse intracellular signaling pathways in brain lesion development of MS

Next, we investigated molecular networks of MS brain proteome by utilizing two different commercial platforms. When the Entrez Gene IDs of the proteome were uploaded onto the "N-points to N-points" search tool of KeyMolnet, it extracted highly complex large-scale molecular networks of the AP, CAP, and CAP-specific proteome (Figure 2). The network of the AP, CAP, or CP proteome is composed of 777, 1,120, or 952 fundamental nodes with 1,892, 2,772, or 2,279 molecular relations, respectively. The statistical evaluation indicated that the top five most relevant molecular networks include IL-4, IL-6, IL-2, and catenin signaling pathways and transcriptional regulation by STAT (signal transducer and activator of transcription) for the AP proteome, PI3K, IL-4, type I IFN, and IL-6 signaling pathways and transcriptional regulation by STAT for the CAP proteome, and IL-4, hepatocyte growth factor (HGF), TCR (T cell receptor), integrin and IL-6 signaling pathways for the CP proteome (Table 3). It is worthy to note that the integrin signaling pathway was ranked as the sixth relevant pathway to the CAP proteome with  $P$ -value of the score = 2.13E-012. Considerable overlap existed in the results of PANTHER (Table 2) and KeyMolnet (Table 3). The KeyMolnet search disclosed a central role of the complex interaction of diverse cytokine signaling pathways in brain lesion development at all disease stages of MS, and the role of the integrin signaling pathway in both CAP and CP.

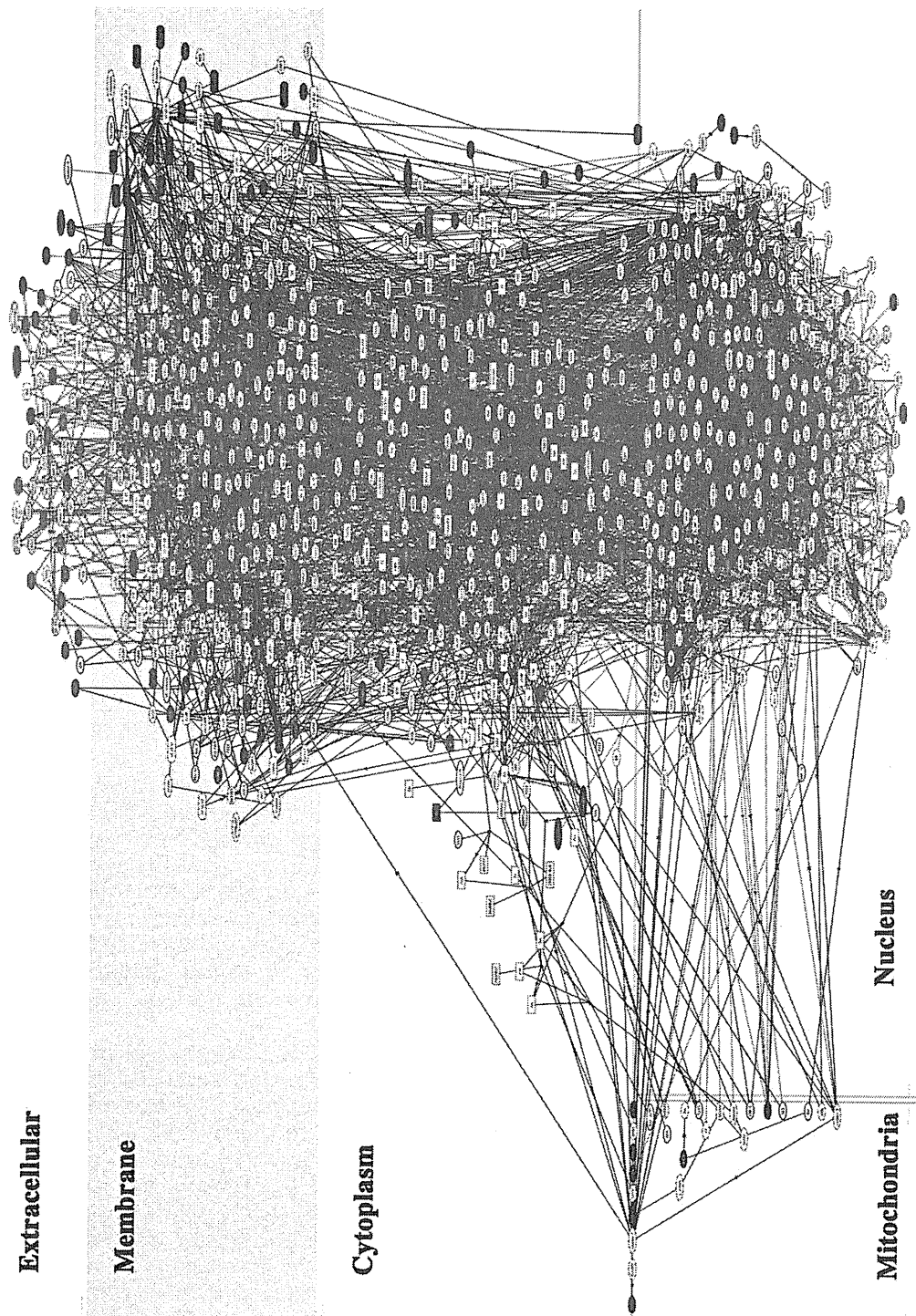
When the Entrez Gene IDs of the proteome were imported into the 'Core Analysis' tool of IPA, it highlighted several units of small-scale molecular networks relevant to the proteome data (Table 4). The network most relevant to the AP proteome was linked to the functional category of cellular assembly and organization, cancer, and cellular movement with the score  $P$ -value = 1.00E-49, where both ERK (extracellular signal-regulated kinase) and Akt (V-akt murine thymoma viral oncogene homolog) act as a hub of the network with highly connected molecular relations (Figure 3A). The network most relevant to the CAP proteome included two categories with the score  $P$ -value = 1.00E-47. One is the network of dermatological diseases and conditions, connective tissue disorders, and inflammatory disease. This network is constructed with various ECM components, including collagen, type I  $\alpha$ 1, type I,  $\alpha$ 2, type VI  $\alpha$ 2, type VI  $\alpha$ 3, fibronectin 1, fibulin 2, laminin  $\alpha$ 1, vitronectin, and heparan sulfate proteoglycan, where ERK acts as a hub (Figure 3B). The other is the network of lipid metabolism, molecular transport, and small molecule biochemistry, where Akt

acts as a hub (Figure 3C). The network most relevant to the CP proteome was linked to cell cycle, cell morphology, and cell-to-cell signaling and interaction with the score  $P$ -value = 1.00E-50, where NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) serves as a hub (Figure 3D). Overall, the biological processes involved in cellular assembly, organization, growth, proliferation, movement, and development are key functional categories shared by AP and CP molecular networks (Table 4). IPA also identified in the canonical pathways relevant to the proteome data. Both calcium signaling and oxidative phosphorylation were categorized as those relevant to AP and CAP proteome, whereas the actin cytoskeleton signaling pathway was considered as the important pathway in both CAP and CP (Table 5). Considerable overlap existed in the results of KEGG (Table 1) and IPA (Table 5).

## Discussion

A recent proteomics study of MS lesion-specific proteome profiling clearly showed a pivotal role of coagulation cascade proteins in chronic active demyelination [8]. However, among thousands of proteins this study examined, nearly all of remaining proteins are left behind to be characterized in terms of their implications in MS brain-lesion development. The present study characterized molecular networks and pathways of the proteome data by using four different pathway analysis tools of bioinformatics. Although distinct platforms produced diverse results, they commonly suggested a role of ECM and integrin-mediated signaling as the pathway relevant to chronic lesion of MS. Therefore, these *in silico* observations warrant experimental validation.

In the CNS, ECM proteins provide a microenvironment for neurons and glial cells to maintain the ionic and nutritional homeostasis. They are localized chiefly to the vascular and the astroglial basement membranes and meninges but scarcely found in the brain parenchyma under physiological conditions. ECM proteins interact with integrins, the cell-surface ligands that support a physical link between ECM and cytoskeletal components [16]. Integrins consist of 24 pairs composed of noncovalently linked heterodimeric  $\alpha\beta$  subunits. Although the interaction between integrins and ECM proteins is partially redundant,  $\beta$ 1 integrins are the principal ligand for collagen, fibronectin, and laminin, whereas  $\alpha$ v integrins are the primary ligand for vitronectin. Integrins regulate the cytoskeletal rearrangement required for cell growth, movement, proliferation, and differentiation by transducing bidirectional signals in an 'inside-out' and 'outside-in' fashion [16]. Integrins, expressed on



**Figure 2** The molecular network of the CAP proteome suggested by KeyMolnet. The list of Entrez Gene IDs of CAP-specific proteome was uploaded onto the 'N-points to N-points search' tool of KeyMolnet. This generated a complex network composed of 1,120 fundamental nodes with 2,772 molecular relations, constructed by the shortest route connecting the start point of 75 MS-linked molecules of the KeyMolnet library (Supplementary Table 4)\* and the end point of the CAP-specific proteome. The network is illustrated with respect to subcellular location of molecules. Red nodes represent start point molecules, whereas blue nodes represent end point molecules. Purple nodes express characteristics of both start and end point molecules. White nodes exhibit additional molecules extracted automatically from KeyMolnet core contents to establish molecular connections. The molecular relation is indicated by solid line with arrow (direct binding or activation), solid line without arrow (complex formation), dash line with arrow (transcriptional activation), and dash line with arrow and stop (transcriptional repression). \*Supplementary Tables 1–4 are available online at <http://msj.sagepub.com/>



**Table 3** The molecular network relevant to multiple sclerosis (MS) brain-lesion proteome suggested by KeyMolnet search

Stage	Rank	Functional category	Score	P-value
AP	1	IL-4 signaling pathway	42,324	1,794E-13
	2	IL-6 signaling pathway	40,966	4,656E-13
	3	IL-2 signaling pathway	36,684	9,059E-12
	4	Transcriptional regulation by STAT	32,789	1,347E-10
	5	Catenin signaling pathway	32,725	1,408E-10
CAP	1	PI3K signaling pathway	56,937	7,25E-18
	2	IL-4 signaling pathway	46,914	7,541E-15
	3	Transcriptional regulation by STAT	43,694	7,025E-14
	4	IFN $\alpha$ / $\beta$ signaling pathway	41,557	3,09E-13
	5	IL-6 signaling pathway	41,274	3,762E-13
CP	1	IL-4 signaling pathway	53,096	1,039E-16
	2	HGF signaling pathway	45,735	1,708E-14
	3	TCR $\alpha$ / $\beta$ signaling pathway	43,621	7,39E-14
	4	Integrin signaling pathway	38,501	2,572E-12
	5	IL-6 signaling pathway	38,115	3,359E-12

The list of Entrez Gene IDs of MS brain-lesion proteome was uploaded onto the 'N-points to N-points search' tool of KeyMolnet. The molecular network is constructed by the shortest route connecting the start point of 75 MS-related molecules of the KeyMolnet library (Supplementary Table 4) and the end point of MS lesion-specific proteome. Top 5 networks relevant to the proteome data are shown with the score and *P*-value.

Abbreviations: AP, acute plaques; CAP, chronic active plaques; CP, chronic plaques; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; and HGF, hepatocyte growth factor.

immune cells, act as an adhesion receptor for cell trafficking and serve as a scaffold for immunological synapses. By the KEGG search, we identified focal adhesion, cell communication, and ECM-receptor interaction as molecular pathways most relevant to the CAP proteome. They involve a wide range of ECM components, including collagen (COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3), fibronectin

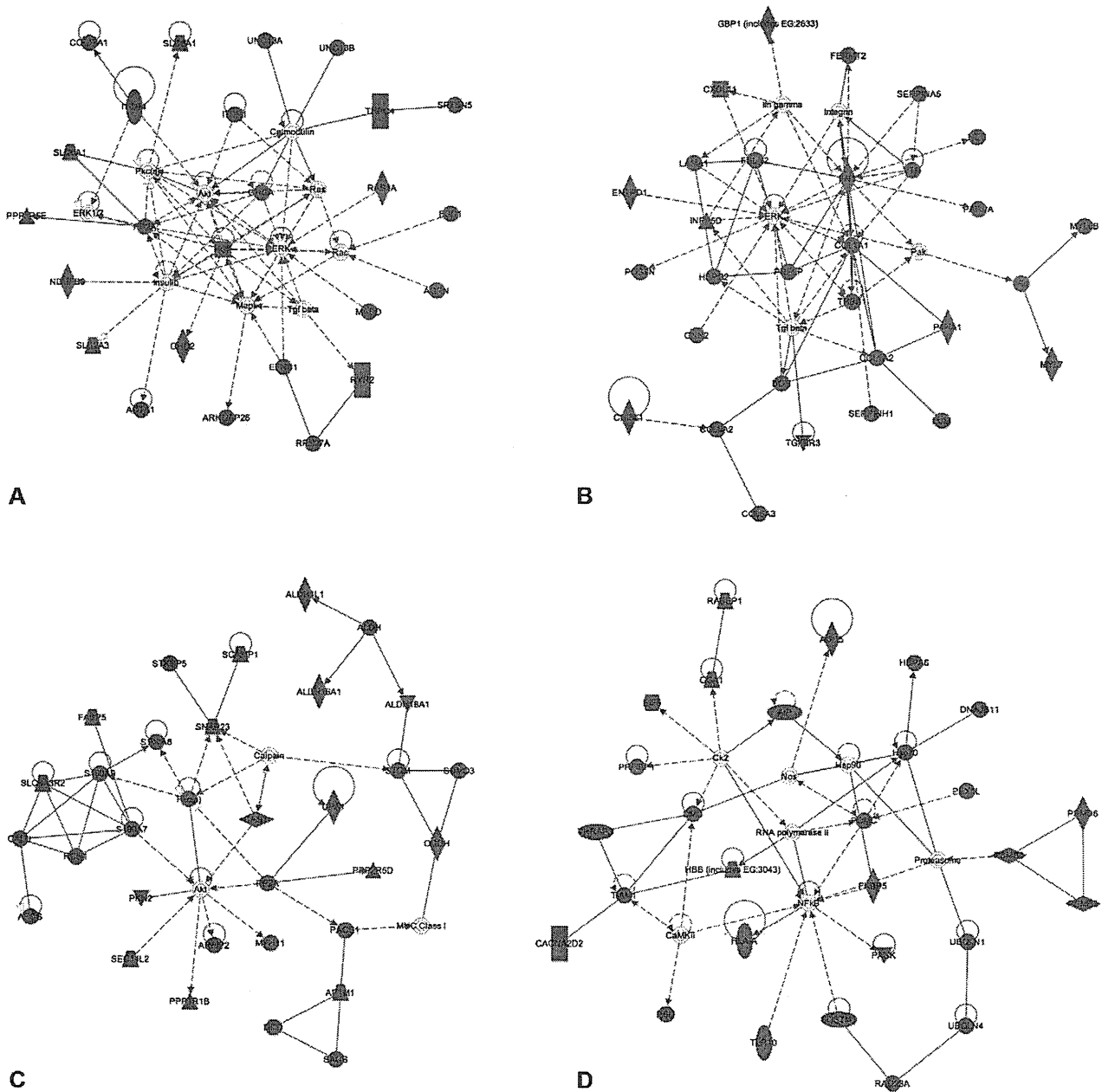
(FN1), laminin (LAMA1), vitronectin (VTN), heparan sulfate proteoglycan (HSPG2), thrombospondin (THBS1), parvin (PARVA), and osteopontin (SPP1). Furthermore, we found focal adhesion, regulation of actin cytoskeleton, and cell communication as the pathways involved in CP. They include collagen (COL4A2, COL6A1), laminin (LAMB2, LAMC1), and integrin (ITGA6). The relevance of

**Table 4** The molecular network relevant to multiple sclerosis (MS) brain-lesion proteome suggested by IPA search

Stage	Rank	Functional category	The number of genes classified	P-value
AP	1	Cellular assembly and organization; cancer; cellular movement	24	1,00E-49
	2	Small molecule biochemistry; molecular transport; cellular assembly and organization	15	1,00E-26
	3	Cellular assembly and organization; cellular function and maintenance; skeletal and muscular system	14	1,00E-24
	4	Cellular development; cellular growth and proliferation; hematological system development and function	13	1,00E-22
	5	Cellular compromise; immune and lymphatic system development and function; hair and skin development and function	12	1,00E-19
CAP	1	Dermatological diseases and conditions; connective tissue disorders; inflammatory disease	29	1,00E-47
	2	Lipid metabolism; molecular transport; small molecule biochemistry	29	1,00E-47
	3	Cardiovascular disease; nephrosis; renal and urological disease	25	1,00E-38
	4	Endocrine system disorders; metabolic disease; renal and urological disease	25	1,00E-38
	5	Skeletal and muscular system development and function; tissue morphology; cardiovascular system development and function	22	1,00E-31
CP	1	Cell cycle; cell morphology; cell-cell signaling and interaction	27	1,00E-50
	2	Tissue morphology; cardiovascular disease; cellular development	24	1,00E-43
	3	Cellular assembly and organization; cell morphology; cellular movement	22	1,00E-38
	4	Cellular assembly and organization; cellular development; cellular growth and proliferation	18	1,00E-29
	5	Cell-cell signaling and interaction, Hematological system development and function; Immune and lymphatic system development and function	15	1,00E-22

The list of Entrez Gene IDs of MS brain-lesion proteome was uploaded onto the 'Core Analysis' tool of IPA. Top five molecular networks relevant to the proteome data are shown with the number of genes classified and the score *P*-value.

Abbreviations: AP, acute plaques; CAP, chronic active plaques; and CP, chronic plaques.



**Figure 3** The molecular network of the AP, CAP, and CP proteome suggested by IPA. The list of Entrez Gene IDs of the MS lesion-specific proteome was uploaded onto the 'Core Analysis' tool of Ingenuity pathway analysis (IPA). Molecular networks most relevant to the AP (A), CAP (B and C), or CP (D) proteome are shown. Red nodes represent the molecules included in the gene list (Supplementary Tables 1–3). The molecular network (A) is constructed by 35 nodes, including ACTA1, AGRN, Akt, ARHGAP26, Calmodulin, CHD2, CHGA, COL17A1, EFNB1, ERK, ERK1/2, FGD1, HGF, insulin, ITGB4, ITSN1, MADD, Mapk, NDUFB9, Pkc(s), PP2A, PPP2R5E, RAB1A, Rac, Ras, RPS27A, RYR2, SLC2A3, SLC6A1, SLC8A1, SPTBN5, TGF- $\beta$ , TRPC4, UNC13A, and UNC13B. The network (B) is constructed by 35 nodes, including 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, and VTN. The network (C) is constructed by 35 nodes, including Akt, ALDH, ALDH16A1, ALDH18A1, ALDH1L1, AP1M1, APCS, ARFIP2, Calpain, CALU, CAST, DCD, FABP5, MHC Class I, MYH11, OGDH, PACS1, Pkc(s), PKN2, PP2A, PPP1R1B, PPP2R5D, RCN1, S100A7, S100A8, S100A9, SACS, SCAMP1, SEC14L2, SLC9A3R2, SNAP23, STOM, STXBPS, SUMO3, and UPF1. The network (D) is constructed by 35 nodes, including ADH5, AIP, CACNA2D2, CaMKII, Ck2, DMD, DNAJB11, EIF5, FKBP5, GGA1, HBB, HLA-A, Hsp70, Hsp90, HSPA6, NFkB, Nos, PASK, PEX5L, POMC, PPFIBP1, Proteasome, PSD, PSMB3, PSMB5, PSMD6, RABEP1, RAD23A, RNA polymerase II, SQSTM1, THRAP3, TIAM1, TLR10, UBQLN1, and UBQLN4. The molecular relation is indicated by solid line (direct interaction), dash line (indirect interaction), with filled arrow (acts on), stop (inhibits), stop and filled arrow (inhibits and acts on), and open arrow (translocates to).

**Table 5** The molecular pathway relevant to MS brain-lesion proteome suggested by Ingenuity pathway analysis (IPA) search

Stage	Rank	Functional category	The number of genes classified	P-value
AP	1	Calcium signaling	7	2,53E-03
	2	Oxidative phosphorylation	4	2,69E-02
CAP	1	Calcium signaling	14	5,14E-04
	2	Hepatic fibrosis and hepatic stellate cell activation	11	1,53E-03
	3	Purine metabolism	16	3,05E-03
	4	Actin cytoskeleton signaling	13	5,77E-03
	5	Oxidative phosphorylation	9	1,12E-02
CP	1	Biosynthesis of steroids	4	7,37E-04
	2	Actin cytoskeleton signaling	8	8,00E-03
	3	Ubiquinone biosynthesis	4	9,54E-03
	4	Axonal guidance signaling	11	1,37E-02
	5	Integrin signaling	7	2,19E-02

The list of Entrez Gene IDs of MS brain-lesion proteome was uploaded onto the 'Core Analysis' tool of IPA. The canonical pathways relevant to the proteome data are shown with the number of genes classified and *P*-value.

Abbreviations: AP, acute plaques; CAP, chronic active plaques; and CP, chronic plaques.

the ECM and integrin signaling pathway to CAP and CP was further verified by molecular network analysis using PANTHER, KeyMolnet, and IPA followed by statistical evaluation. These *in silico* observations agree well with *in-vivo* studies, showing remarkable upregulation of diverse ECM constituents in MS brain lesions, where cytokine/chemokine-activated microglia, astrocytes, and infiltrating macrophages release a large amount of proteolytic enzymes bound to ECM molecules, which mediate myelin breakdown [17,18]. Glial scars in chronic lesions of MS include certain ECM proteins that contribute to the failure of regeneration of damaged axons and remyelination of preserved axons [17,18].

In active demyelinating lesions of MS, the expression of vitronectin is greatly enhanced in blood vessel walls, as well as in demyelinated axons and hypertrophic astrocytes at the edge of demyelination [19]. The levels of CD51, a vitronectin receptor, are elevated in the serum of relapsing-remitting MS patients [20]. Vitronectin promotes migration of reactive astrocytes expressing  $\alpha\beta 8$  integrin [21]. In active demyelinating lesions of MS, fibronectin is accumulated in the brain parenchyma and is deposited abundantly in blood vessel walls and perivascular infiltrates [22]. Fibronectin facilitates migration of immune cells, promotes proliferation of astrocytes, and inhibits differentiation of oligodendrocyte progenitors [23]. In MS lesions, both vitronectin and fibronectin are derived mainly from plasma protein components passing across the disrupted blood-brain barrier and partly from the local synthesis by endothelial cells, macrophages, astrocytes, and infiltrating immune cells. Vitronectin and fibronectin activate microglia and upregulate MMP-9 production [24]. Thrombos-

pondin produced by reactive astrocytes facilitates macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cells and possible uptake of degraded myelin via the ECM receptors CD36 and  $\alpha\beta 3$  integrin [25]. Large-scale sequencing of MS plaque cDNA libraries showed that osteopontin (SPP1), a proinflammatory component of ECM, is one of the most abundant transcripts [26]. The clinical severity of EAE is attenuated in SPP1-deficient mice [26]. The expression of osteopontin is enhanced in astrocytes in active demyelinating lesions of MS [27]. The plasma osteopontin levels are elevated in active relapsing-remitting MS patients [28]. All of these observations support the concept that the selective blockade of the interaction between ECM and integrins in brain lesions *in situ* would be a target candidate for therapeutic intervention in MS.

Because focal adhesion kinase (FAK) is a central mediator of the integrin signaling pathway (see Figure 1), one possible choice is the use of an inhibitor for ECM-induced autophosphorylation of FAK [29]. TAE226, a FAK inhibitor, suppresses tumor cell invasion *in vivo* [29]. Another option for integrin signaling inhibitors is disintegrins, a group of small disulfide-rich peptides containing the arginine-glycine-aspartic acid sequence that mediates the selective binding to integrins [30]. Liposomal delivery of contortrostatin, a snake venom disintegrin, shows a tumor-suppressive anti-angiogenic activity [30]. However, a complete blockade of general function of integrins has a risk for inducing serious side effects [31]. Even in the context of the selective blockade, treatment with a humanized monoclonal antibody against VLA4,  $\alpha 4\beta 1$  integrin (natalizumab) reduced relapses 66% in clinical trials of MS but also activated the lethal infection of JC virus in some patients [32].

## Acknowledgments

This work was supported by grants to J-IS from Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health, the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H17-020), Research on Health Sciences Focusing on Drug Innovation, the Japan Health Sciences Foundation (KH21101), the Grant-in-Aid for Scientific Research, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (MEXT) (B18300118), the High-Tech Research Center Project, MEXT (S0801043) and from the Nakatomi Foundation.

## References

- Lassmann, H, Brück, W, Lucchinetti, CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 2007; **17**: 210–218.
- Kieseier, BC, Wiendl, H, Hemmer, B, Hartung, HP. Treatment and treatment trials in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2007; **20**: 286–293.
- Kingsmore, SF, Lindquist, IE, Mudge, J, Gessler, DD, Beavis, WD. Genome-wide association studies: progress and potential for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2008; **7**: 221–230.
- Steinman, L, Zamvil, S. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 483–492.
- Quintana, FJ, Farez, MF, Weiner, HL. Systems biology approaches for the study of multiple sclerosis. *J Cell Mol Med* 2008; doi 10.1111/j.1582-4934.2008.00375.x.
- Lock, C, Hermans, G, Pedotti, R, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002; **8**: 500–508.
- Satoh, J, Nakanishi, M, Koike, F, et al. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2005; **18**: 537–550.
- Han, MH, Hwang, SI, Roy, DB, et al. Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 2008; **451**: 1076–1081.
- Ganter, B, Giroux, CN. Emerging applications of network and pathway analysis in drug discovery and development. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2008; **11**: 86–94.
- Viswanathan, GA, Seto, J, Patil, S, Nudelman, G, Sealfon, SC. Getting started in biological pathway construction and analysis. *PLoS Comput Biol* 2008; **4**: e16.
- Albert, R, Jeong, H, Barabasi, AL. Error and attack tolerance of complex networks. *Nature* 2000; **406**: 378–382.
- Kanehisa, M, Araki, M, Goto, S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**: D480–D484.
- Mi, H, Guo, N, Kejariwal, A, Thomas, PD. PANTHER version 6: protein sequence and function evolution data with expanded representation of biological pathways. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: D247–D252.
- Palacios, R, Goni, J, Martinez-Forero, I, et al. A network analysis of the human T-cell activation gene network identifies JAGGED1 as a therapeutic target for autoimmune diseases. *PLoS ONE* 2007; **2**: e1222.
- Sato, H, Ishida, S, Toda, K, et al. New approaches to mechanism analysis for drug discovery using DNA microarray data combined with KeyMolnet. *Curr Drug Discov Technol* 2005; **2**: 89–98.
- Luo, BH, Carman, CV, Springer, TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 619–647.
- Sobel, RA. The extracellular matrix in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; **57**: 205–217.
- van Horsssen, J, Dijkstra, CD, de Vries, HE. The extracellular matrix in multiple sclerosis pathology. *J Neurochem* 2007; **103**: 1293–1301.
- Sobel, RA, Chen, M, Maeda, A, Hinojoza, JR. Vitronectin and integrin vitronectin receptor localization in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; **54**: 202–213.
- Minagar, A, Jy, W, Jimenez, JJ, et al. Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology* 2001; **56**: 1319–1324.
- Milner, R, Huang, X, Wu, J, et al. Distinct roles for astrocyte  $\alpha\beta 5$  and  $\alpha\beta 8$  integrins in adhesion and migration. *J Cell Sci* 1999; **112**: 4271–4279.
- Sobel, RA, Mitchell, ME. Fibronectin in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 1989; **135**: 161–168.
- Sisková, Z, Baron, W, de Vries, H, Hoekstra, D. Fibronectin impedes “myelin” sheet-directed flow in oligodendrocytes: a role for a beta 1 integrin-mediated PKC signaling pathway in vesicular trafficking. *Mol Cell Neurosci* 2006; **33**: 150–159.
- Milner, R, Crocker, SJ, Hung, S, Wang, X, Frausto, RF, del Zoppo, GJ. Fibronectin- and vitronectin-induced microglial activation and matrix metalloproteinase-9 expression is mediated by integrins  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha -\beta 5$ . *J Immunol* 2007; **178**: 8158–8167.
- Ren, Y, Savill, J. Proinflammatory cytokines potentiate thrombospondin-mediated phagocytosis of neutrophils undergoing apoptosis. *J Immunol* 1995; **154**: 2366–2374.
- Chabas, D, Baranzini, SE, Mitchell, D, et al. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001; **294**: 1731–1735.
- Sinclair, C, Kirk, J, Herron, B, Fitzgerald, U, McQuaid, S. Absence of aquaporin-4 expression in lesions of neuro-myelitis optica but increased expression in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol* 2007; **113**: 187–194.
- Vogt, MH, Lopatinskaya, L, Smits, M, Polman, CH, Nagelkerken, L. Elevated osteopontin levels in active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003; **53**: 819–822.
- Liu, TJ, LaFortune, T, Honda, T, 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* 2007; **6**: 1357–1367.
- Swenson, S, Costa, F, Minea, R, et al. Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. *Mol Cancer Ther* 2004; **3**: 499–511.
- Cantor, JM, Ginsberg, MH, Rose, DM. Integrin-associated proteins as potential therapeutic targets. *Immunol Rev* 2008; **223**: 236–251.
- Steinman, L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* 2005; **4**: 510–518.