

■図2 アルツハイマー病の分子ネットワーク解析

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

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

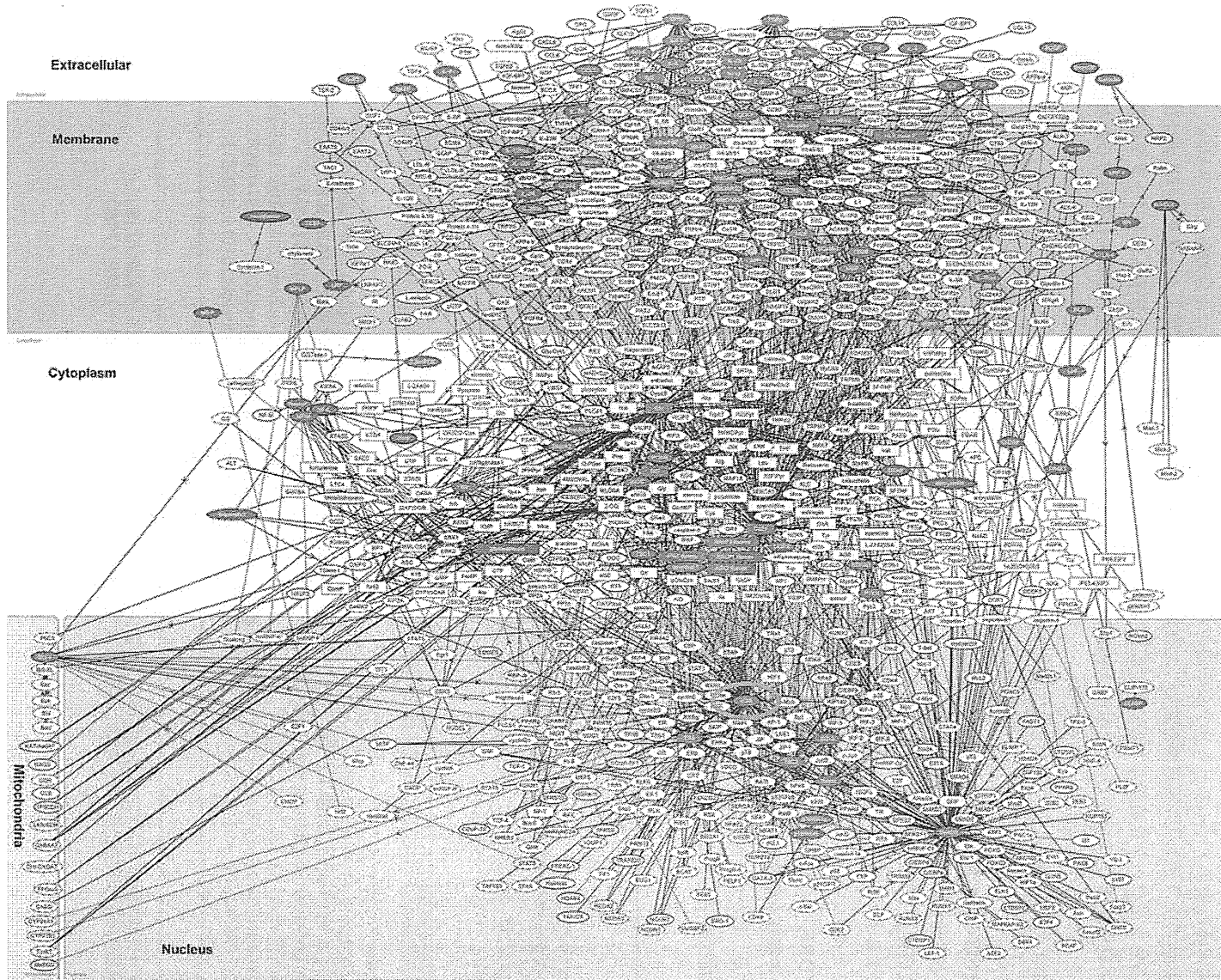
また、KeyMolnetには、精選された文献から専門家により収集された42種類のAD疾患メダイエート分子が収録されている。KeyMolnetの上下流1パス周辺検索法で、これら42分子が構成するネットワークを解析したところ、再びCREBによる発現調節との関連性が最も強く示唆された ($p = 2.225E-308$) (図2)。以上の結果は、CREBがAD病態ネットワークのハブとして働くことを示している。KeyMolnetライブラリーのCREBによる発現調節 canonical pathwayは、162分子 (CREBおよび入力27分子と出力134分子) で構成されている (図3)。このうち65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

III 分子ネットワーク解析から見たMSの創薬標的分子

2008年にHanらは、6例のMS凍結脳を用いて、病理学的ステージを確認した脳病巣からレーザーマイクロダイセクションで採取したサンプルを、SDS-PAGEで分離後に、タンパク質を抽出し、トリプシン消化ペプチド断片を質量分析で網羅的に解析した¹⁰⁾。病理学的ステージに関しては、炎症性細胞浸潤と浮腫を主徴とする急性脱髄巣 (active plaque ; AP)、炎症が脱髄巣辺縁部に限局している慢性活動性脱髄巣 (chronic active plaque ; CAP)、炎症所見に乏しくグリア瘢痕を主徴とする慢性非活動性脱髄巣 (chronic plaque ; CP)

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

筆者らは、HanらのプロテオームデータをKEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnetに入力し、ステージ特異的プロテオームを最もよく反映している分子ネットワークを同定した¹¹⁾。4種類の異なるツールは様々な独自の分子ネットワークを抽出したが、共通してCAP, CPプロテオームにおける細胞外基質 (extracellular matrix ; ECM) -インテグリンシグナル伝達系の中心的役割を示唆した¹¹⁾。インテグリンは複数の α , β サブユニットから構成される24種類のヘテロダイマー分子で、ECMリガンドとして働く。 $\beta 1$ インテグリンファミリーはコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンと結合し、 αv インテグリンファミリーはビトロネクチンと結合する。ECM-インテグリン系は細胞接着、遊走、分化、増殖に必須なシグナルを伝達する。MS慢性病巣においては、髄鞘や軸索の再生が著しく乏しい。その理由として、グリア瘢痕に含まれているECMが再生阻害因子として働く可能性や、活性化マクロファージやミクログリアが産生するタンパク質分解酵素がECMに結合して長期に保持され、その結果、髄鞘崩壊が遅延化している可能性がある¹²⁾。現在欧米においてMS再発抑制のために、 $\alpha 4 \beta 1$ インテグリン (VLA4) に対するヒト化モノクローナル抗体ナタリズマブ (Natalizumab) が臨床で用いられている。しかしながら、ナタリズマブは致死的な進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalo pathy ; PML) を惹起する危険性があり、安全な薬の開発が必要である。ECM-インテグリンシグナル伝達系では、FAK (focal adhesion kinase) がハブとして働く。低分子化合物TAE226は、ECMによるFAKの自己リン酸化を選択的に抑制し、*in vivo*モデル系では経口投与により腫瘍細胞の増殖と血管新生を抑制する¹³⁾。



■ 図4 多発性硬化症の分子ネットワーク解析

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

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

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

おわりに

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

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

謝辞 本稿で紹介した研究は、国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部山村隆部長、明治薬科大学バイオインフォマティクス天竺桂弘子助教との共同研究でなされ、文部科学省基盤研究(C22500322)と私立大学戦略的研究基盤形成支援事業明治薬科大学ハイテクリサーチセンター研究事業(S0801043)および厚生労働科学難治性疾患克服研究事業(H21-難治-一般-201; H22-難治-一般-136)の補助を受けた。

PROFILE 佐藤 準一

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

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

文献

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

for beginners

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

分子ネットワークからみた 多発性硬化症の創薬標的分子

佐藤準一*

中枢神経系炎症性脱髄疾患である多発性硬化症(multiple sclerosis : MS)では、自己反応性 Th17 細胞や Th1 細胞が血液脳関門(blood-brain barrier : BBB)を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化して、脱髄と軸索傷害を惹起する。現在 MS の臨床では、インターフェロン(IFN)- β などの免疫調節薬が投与されているが難治例も多く、新規の標的分子に対する画期的な創薬が待望されている。近年、ヒトゲノムの解読が完了し、個々の細胞における遺伝子や蛋白質の発現情報を網羅的に解析可能なポストゲノム時代が到来し、創薬研究の中心はゲノム創薬へとパラダイムシフトした。ヒトは大規模な分子ネットワークで精密に構築された複雑系であり、多くの難病がシステム固有の防御機構であるロバストネスの破綻に起因する。最近、われわれは公共の MS データをバイオインフォマティクスの分子ネットワーク解析ツールで再解析し、創薬標的分子を同定した。今後はゲノムワイドの分子ネットワーク解析が、MS の病態解明・治療薬開発のために重要な研究手段となると思われる。

はじめに

多発性硬化症(multiple sclerosis : MS)は、中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、さまざまな神経症状が再発をくり返して進行する難病である。MS では、遺伝的要因と環境因子の複雑な相互作用を背景に出現した活性化自己反応性 Th17 細胞や Th1 細胞が、血液脳関門(blood-brain barrier : BBB)を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化して、腫瘍壊死

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

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

因子(tumor necrosis factor : TNF)- α 、一酸化窒素(nitric oxide : NO)などの炎症増強因子(proinflammatory mediators)の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている。回復期には髄鞘再生を認めるが、炎症が遷延化すると軸索傷害をきたして不可逆的機能障害が残存する。臨床では急性増悪期にステロイドパルス(intravenous methylprednisolone pulse : IVMP)をおこない、寛解期にインターフェロン(IFN)- β の継続的投与をおこなう方法が最も一般的な治療法として選択されているが、IFN- β ノンレスポンスも多い。MS は臨床経過から再発寛解型(relapsing-remitting MS : RRMS)、2次進行型(secondary-progressive MS : SPMS)、1次進行型(primary-progressive MS : PPMS)に分類され、病理学的には T 細胞浸潤、抗体沈着、オリゴデンドロサイトアポトーシスの所見により 4 型に分類されており、このよ

うな病態の不均一性(heterogeneity)が治療難航の一因となっている。現在まで、髄鞘や軸索の再生促進薬はなく、新規の標的分子に対する画期的な創薬が待望されている。

2003年にヒトゲノムの解読が完了し、個々の細胞における全遺伝子や蛋白質の発現を網羅的に解析可能なポストゲノム時代が到来し、創薬研究の中心はゲノム創薬へとパラダイムシフトした。網羅的発現解析を統合したオミックス研究により、がんや神経難病の診断バイオマーカーや治療標的分子が次々明らかになった。同時に薬理ゲノミクスの分野は急成長を遂げ、薬物応答性個人差をある程度予測可能となり、テーラメイド医療(personalized medicine)の樹立に道が開かれた。システム生物学(systems biology)の観点からは、ヒトは大規模な分子ネットワークで精密に構築された複雑系であり、多くの難病がシステム固有の防御機構であるロバストネス(robustness)の破綻に起因すると考えられている。したがって難病の病態解明のためには、オミックス研究に直結したゲノムワイドの分子ネットワーク解析が重要な研究手段となる。

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

1. 分子ネットワークの解析方法

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

運搬、酵素反応、複合体形成など多彩な相互作用様式が存在する。複雑多岐のオミックスデータに関連している分子ネットワークを解析するためには、精査された文献情報に裏づけられた専用の解析ツールを使う必要がある。すなわち、膨大な文献情報からさまざまな分子間相互作用を抽出し、信頼性の高い知識を整理してコンテンツとして収録した知識データベース(knowledgebase)を利用して、既知のどのネットワークやパスウェイに最も高い類似性を呈しているかについて、統計学的解析手法を用いて調べる方法である¹⁾。Web上で自由に利用できる代表的なknowledgebaseには、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (www.kegg.jp), the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) classification system (www.pantherdb.org), Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) (string.embl.de)などがある。とくにKEGGとPANTHERは、キュレーターとよばれる専門家によって精査された遺伝子や代謝物の情報を収録している。2011年4月現在、KEGG PATHWAYには392 reference pathwaysから構成される134,607パスウェイが収録されている。また利用価値の高いデータベースとして、DAVID Bioinformatics Resources(david.abcc.ncifcrf.gov)は、網羅的解析で同定した膨大な遺伝子セットのアノテーションを一括しておこなうために開発されたツールである。Functional Annotation ツールに目的の遺伝子セットを入力すると、統計学的な検定をおこなって、最も密接に関連しているKEGG pathwayを同定できる。PANTHERでも同様にreference setとの比較により、類似性の統計学的有意差を多重検定で評価できる。STRINGはKEGG, HPRD, BIND, IntActなどの網羅的PPI情報も統合して収録しており、PubMed アブストラクトからは自然言語処理(natural language processing)によるテキストマイニングを介して、分子間相互作用に関する

膨大な情報を収集している。

また分子ネットワーク解析のために樹立された有償ツールとしては、Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA) (www.ingenuity.com) や KeyMolnet (Institute of Medicinal Molecular Design, Tokyo) (www.immd.co.jp) などがある。これらは精選された文献を専門家が精読して、分子間相互作用に関する信頼性の高い情報を収集しており、定期的にアップデートされている。KeyMolnet は日本語入力にも対応しており、分子ネットワークの検索法として、結合・発現制御・複合体形成を包括的に調べる周辺検索 (neighboring search), 発現制御に関与する転写因子群を調べる共通上流検索 (common upstream search), 始点と終点間のネットワークを調べる始点終点検索 (N-points to N-points search), 複数の端点を始点として、最多数の始点を含む最小の分子ネットワークを調べる相互関係検索 (interrelation search) を選択できる。

2. MS 脳病巣プロテオーム解析からみた創薬標的分子

2008 年に Han らは 6 例の MS 凍結脳を用いて、病理学的にステージを確認した脳病巣から laser microdissection で採取したサンプルを SDS-PAGE で分離後に、蛋白質を抽出し、トリプシン消化ペプチド断片を質量分析で網羅的に解析した²⁾。病理学的ステージは、炎症性細胞浸潤と浮腫を主徴とする急性脱髄巣 (active plaque : AP), 炎症が脱髄巣辺縁部に限局している慢性活動性脱髄巣 (chronic active plaque : CAP), 炎症所見に乏しくアストログリアの瘢痕形成を主徴とする慢性非活動性脱髄巣 (chronic plaque : CP) に分類した。同時に 2 例の健常脳のプロテオームも解析した。その結果、AP から 1082, CAP から 1728, CP から 1514, 合計 4324 種類の蛋白質を同定した。さらに INTERSECT プログラムを用いて、健常脳では検出されずかつ各ステージ特異的な蛋白質

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

われわれは、Han らのデータのプロテオームに関する UniProt ID を、Entrez Gene ID および KEGG ID に変換して、KEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnet に入力し、各ステージ特異的プロテオームを最も良く反映している分子ネットワークを同定した³⁾。KEGG では、CAP プロテオームと focal adhesion (hsa04510) ($p=5.21E-05$) (図 1) および extracellular matrix (ECM)-receptor interaction (hsa04512) ($p=1.25E-04$) との関連性を認めた。PANTHER では、CAP プロテオームと inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway ($p=2.63E-03$), integrin signaling pathway ($p=3.55E-03$), CP プロテオームと integrin signaling pathway ($p=4.33E-02$) との関連性を認めた。すなわち KEGG と PANTHER の解析から、MS 慢性病巣における ECM-integrin シグナル伝達系の中心的役割が示唆された。KEGG と PANTHER による解析では、AP プロテオームと密接に関連するパスウェイは検出されなかった。

一方 IPA では、AP プロテオームは cellular as-

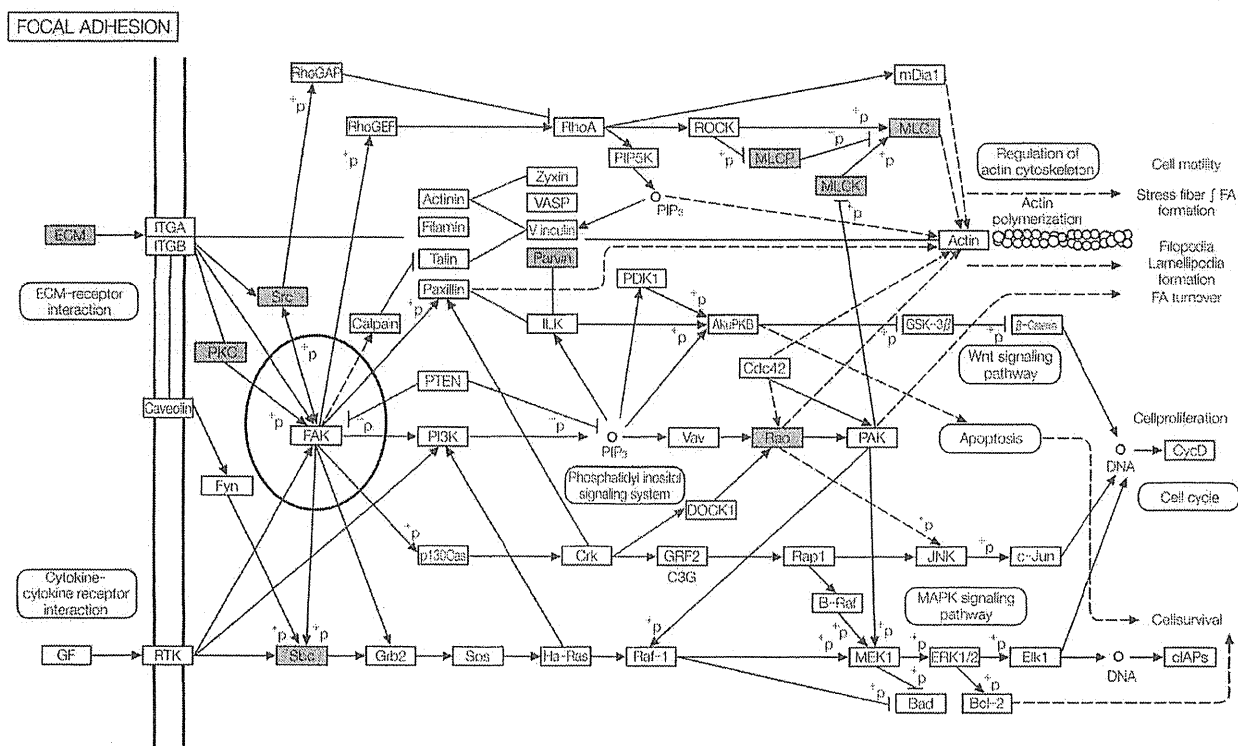


図 1. KEGG による MS 脳病巣 CAP プロテオームの分子ネットワーク解析

KEGG による解析では、MS 脳病巣 CAP プロテオーム (灰色) と focal adhesion (hsa04510: COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, LAMA1, MYLK, SHC3, PPP1CA, PARVA, PRKCB1, MYL7, RAC3, SPPI, SRC, THBS1, VTN: ECM 構成要素は ECM として一括) との関連性が示唆された。Focal adhesion kinase (FAK) が、ネットワークのハブ(樞門)となることがわかる。

sembly and organization, cancer, and cellular movement ($p=1.00E-49$), CAP プロテオームは dermatological diseases and conditions, connective tissue disorders, and inflammatory disease ($p=1.00E-47$), lipid metabolism, molecular transport, and small molecule biochemistry ($p=1.00E-47$), CP プロテオームは cell cycle, cell morphology, and cell-to-cell signaling and interaction ($p=1.00E-50$) との関連性を認めた。CAP プロテオームの dermatological diseases and conditions, connective tissue disorders, and inflammatory disease ネットワークは、BGN, CHI3L1, CNN2, COL1A1, COL1A2, COL6A2, COL6A3, CXCL11, ENTPD1, ERK, FBLN2, FERMT2, FN1, GBP1, HSPG2, Ifn gamma, INPP5D, Integrin, LAMA1, LUM, Mlc, MYL7, MYL6B, NES, P4HA1, Pak,

PARVA, POSTN, PRELP, SERPINA5, SERPINH1, Tgf beta, TGFBR3, THBS1, VTN から構成されており、ECM-integrin シグナル伝達系の関与を示唆している。最後に KeyMolnet を用いて、MS 関連 75 分子を始点、ステージ特異的プロテオームの各分子を終点として、始点終点検索で最短経路となるネットワーク解析した。AP プロテオームは IL-4 signaling pathway ($p=1.79E-13$), CAP プロテオームは PI3K signaling pathway ($p=7.25E-18$), CP プロテオームは IL-4 signaling pathway ($p=1.04E-16$) と最も密接に関連していた。また CAP と CP は integrin signaling pathway ($p=2.13E-12$ および $p=2.57E-12$) との関連性も認めた。

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

自の分子ネットワークを抽出したが、共通して CAP, CP プロテームにおける ECM-integrin シグナル伝達系の中心的役割を示唆した³⁾。Integrin は複数の α , β サブユニットから構成される 24 種類のヘテロダイマー分子で、ECM のリガンドとしてはたらく。 $\beta 1$ integrin ファミリーは collagen, fibronectin, laminin と結合し、 αv integrin ファミリーは vitronectin と結合する。ECM-integrin 相互作用を介する outside-in, inside-out シグナルは、細胞骨格の動態制御を介する細胞接着、遊走、分化、増殖にとって必須である。MS 脳病巣プロテームで同定した fibronectin や vitronectin は、主として破綻した BBB を通過して脳実質に浸透した血漿成分に由来する。ECM, integrin が著増している慢性病巣においては髄鞘や軸索の再生が著しく乏しい。その理由として、グリア瘢痕に含まれている ECM 蛋白質自体が髄鞘や軸索の再生阻害因子としてはたらく可能性や、活性化マクロファージやミクログリアが産生する蛋白質分解酵素が ECM に結合して長期に保持され、髄鞘の崩壊が遷延化している可能性があげられている⁴⁾。また ECM-integrin シグナル伝達系は、リンパ球のホーミングや血管外遊出、アストログリアやミクログリアの活性化、オリゴデンドログリア前駆細胞の分化抑制を介して、脱髄と軸索傷害を増強する⁵⁾。

現在欧米において、MS 再発抑制のために、 $\alpha 4\beta 1$ integrin (VLA4) に対するヒトモノクローナル抗体 Natalizumab が臨床で用いられている。しかしながら、Natalizumab は進行性多巣性白質脳症 (progressive multifocal leukoencephalopathy: PML) を惹起する危険性があり、より安全な薬の開発が必要である。分子ネットワークから創薬標的分子を探索する場合には、多数の分子からリレーションが集中しているハブ (hub) とよばれる中心分子を同定することが重要である。ハブの抑制薬または活性化薬は、ネットワークのロバストネスの維持に重大な影響を及ぼす。ECM-in-

tegrin シグナル伝達系は、炎症性脱髄遷延化の抑制薬の標的パスウェイであり、focal adhesion kinase (FAK) がハブとなる (図 1 楕円)。低分子化合物 TAE226 は、ECM による FAK の自己リン酸化を選択的に抑制し、*in vivo* モデル系では経口投与により腫瘍細胞の増殖と血管新生を抑制する⁶⁾。したがって TAE226 は FAK を分子標的とする MS 慢性炎症性脱髄抑制薬の候補となる可能性があり、EAE における前臨床試験の実施が待たれる。

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

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

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

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

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

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

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

おわりに

膨大なオミックスデータに関与する分子ネットワークを手際よく解析するためには、精査された文献情報にもとづく解析ツールを使う必要がある。解析ツールはいまだ発展途上かつ日進月歩であり、現時点では、どのツールもスプライスバリエーションや翻訳後修飾、細胞特異的発現、細胞内局在化、

表 1. Th17 細胞分化関連 57 遺伝子

Entrez Gene ID	Gene Symbol	Gene Name	Ratio
70337	<u>iyd</u>	iodotyrosine deiodinase	11.06
16171	<u>IL17A</u>	interleukin 17A	4.30
76142	<u>ppp1r14c</u>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14c	4.25
193740	<u>Hspa1a</u>	heat shock protein 1A	3.47
50929	<u>il22</u>	interleukin 22	3.39
15511	<u>Hspa1b</u>	heat shock protein 1B	3.38
56312	<u>nupr1</u>	nuclear protein 1	3.23
14538	<u>GCNT2</u>	glucosaminyl(N-acetyl)transferase 2, I-branching enzyme	2.79
74103	<u>Nebi</u>	nebullette	2.76
75573	<u>2310007L24Rik</u>	RIKEN cDNA 2310007L24 gene	2.55
68549	<u>SGOL2</u>	shugoshin-like 2 (S. pombe)	2.53
237436	<u>GAS2L3</u>	growth arrest-specific 2 like 3	2.47
76131	<u>depdc1a</u>	DEP domain containing 1a	2.43
100043766	<u>Gm14057</u>	predicted gene 14057	2.37
14235	<u>FOXM1</u>	forkhead box M1	2.37
230098	<u>E130306D19Rik</u>	RIKEN cDNA E130306D19 gene	2.30
171284	<u>Timd2</u>	T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 2	2.29
12235	<u>BUB1</u>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae)	2.26
51944	<u>D2Ertd750e</u>	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed	2.24
17863	<u>myb</u>	myeloblastosis oncogene	2.24
229841	<u>CENPE</u>	centromere protein E	2.22
270906	<u>PRR11</u>	proline rich 11	2.19
12316	<u>ASPM</u>	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)	2.18
108000	<u>CENPF</u>	centromere protein F	2.18
17345	<u>MKI67</u>	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67	2.16
14432	<u>gap43</u>	growth associated protein 43	2.15
105988	<u>ESPL1</u>	extra spindle poles-like 1 (S. cerevisiae)	2.15
15366	<u>HMMR</u>	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)	2.15
27053	<u>asnS</u>	asparagine synthetase	2.15
52276	<u>CDCA8</u>	cell division cycle associated 8	2.15
18005	<u>NEK2</u>	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	2.15
72080	<u>2010317E24Rik</u>	RIKEN cDNA 2010317E24 gene	2.15
74107	<u>CEP55</u>	centrosomal protein 55	2.13
29817	<u>igfbp7</u>	insulin-like growth factor binding protein 7	2.13
71819	<u>KIF23</u>	kinesin family member 23	2.10
75317	<u>4930547N16Rik</u>	RIKEN cDNA 4930547N16 gene	2.10
12704	<u>CIT</u>	citron	2.10
72140	<u>CCDC123</u>	coiled-coil domain containing 123	2.08
234258	<u>Neil3</u>	nei like 3 (E. coli)	2.08
12442	<u>CCNB2</u>	cyclin B2	2.07
72119	<u>Tpx2</u>	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	2.07
68743	<u>Anln</u>	anillin, actin binding protein	2.06
20419	<u>SHCBP1</u>	Shc SH2-domain binding protein 1	2.05
208084	<u>PIF1</u>	PIF1 5'-to-3'DNA helicase homolog (S. cerevisiae)	2.04
17279	<u>Melk</u>	maternal embryonic leucine zipper kinase	2.04
19348	<u>kif20a</u>	kinesin family member 20A	2.04
21335	<u>TACC3</u>	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	2.03
208628	<u>KNTC1</u>	kinetochore associated 1	2.02
19659	<u>Rbp1</u>	retinol binding protein 1, cellular	2.02
72155	<u>CENPN</u>	centromere protein N	2.02
257630	<u>Il17f</u>	interleukin 17F	2.02
215819	<u>nhs1</u>	NHS-like 1	2.02
54141	<u>SPAG5</u>	sperm associated antigen 5	2.01
12189	<u>BRCA1</u>	breast cancer 1	2.01
19362	<u>RAD51AP1</u>	RAD51 associated protein 1	2.01
110033	<u>Kif22</u>	kinesin family member 22	2.00
69534	<u>AVP11</u>	arginine vasopressin-induced 1	2.00

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

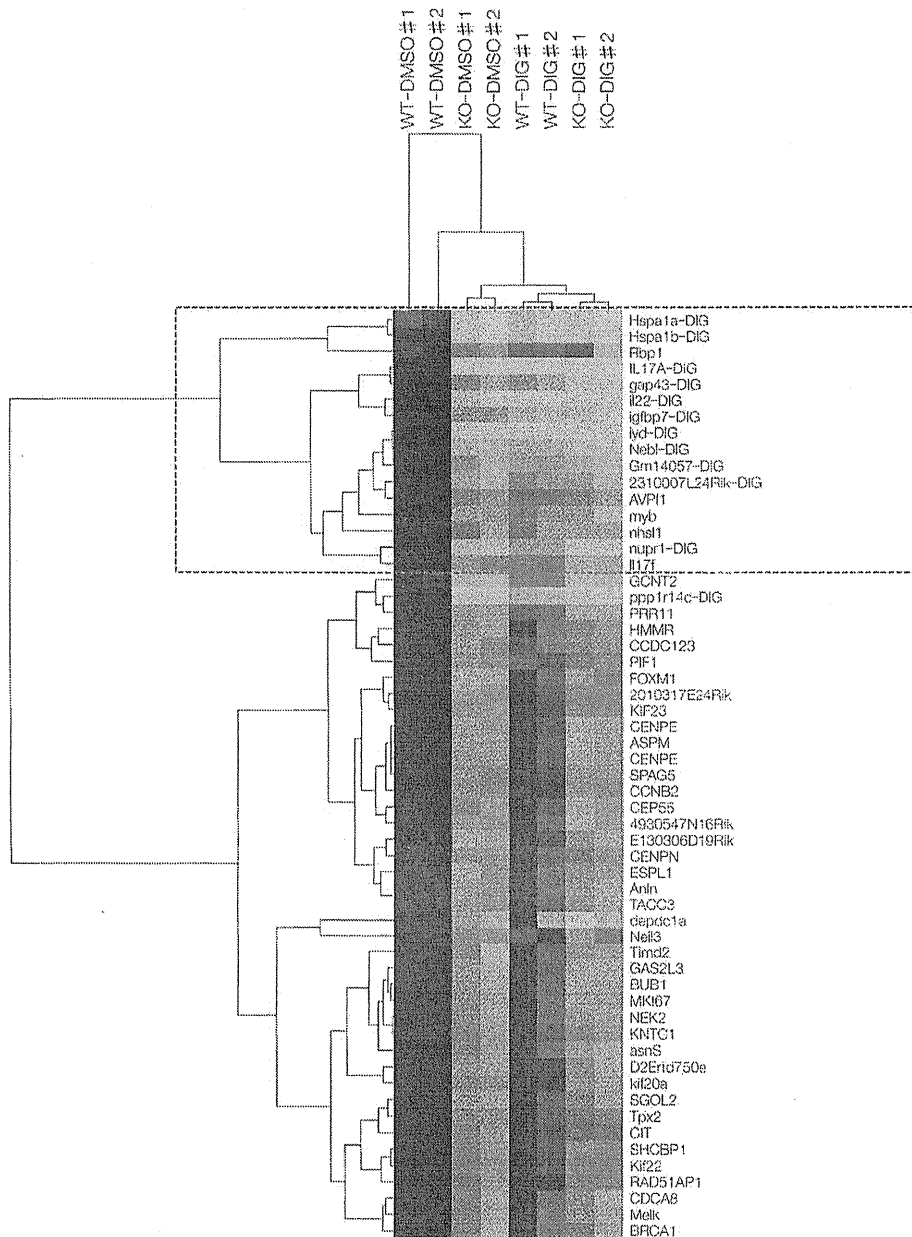


図 2. Th17 細胞分化関連 57 遺伝子の階層クラスター解析

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

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

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

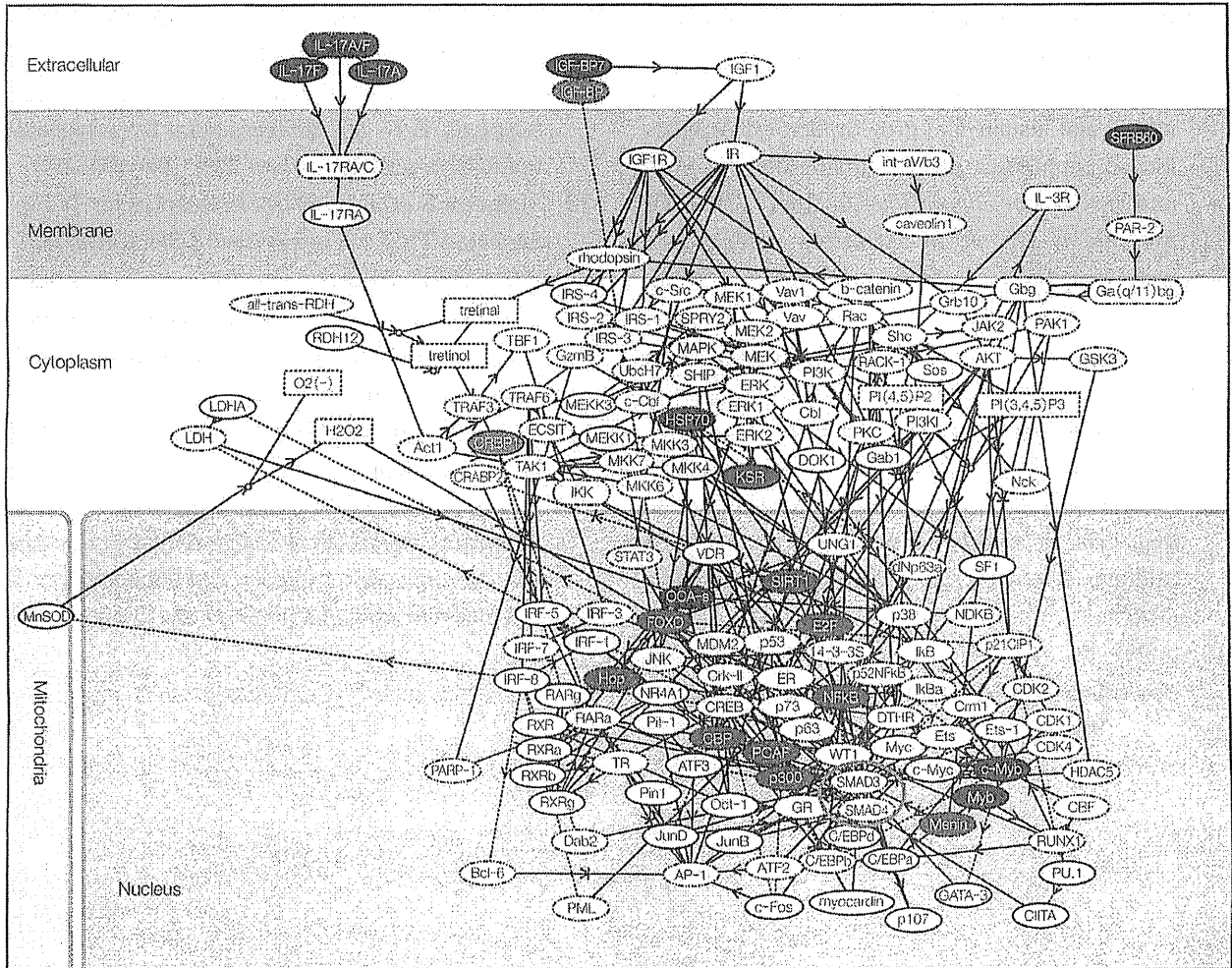


図 3. DIG 応答性 Th17 細胞分化関連遺伝子の分子ネットワーク解析

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

謝辞

本稿で紹介した研究は, 国立精神・神経医療研究センター神経研究所免疫研究部 山村隆部長, 明治薬科大学バイオインフォマティクス 天竺桂弘子助教との共同研究でなされ, 文部科学省基盤研究(C22500322)と私立大学戦略的研究基盤形成支援事業明治薬科大学ハイテクリサーチセンター研究事業(S0801043)および厚生労働科学難治性疾患克服研究事業(H21-難治一般-201: H22-難治一般-136)の補助を受けた.

文献

1) Satoh J : Bioinformatics approach to identifying

molecular biomarkers and networks in multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 1 : 127-140, 2010
 2) Han MH *et al* : Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 451 : 1076-1081, 2008
 3) Satoh JI *et al* : Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain-lesion proteome. *Mult Scler* 15 : 531-541, 2009
 4) van Horssen J *et al* : The extracellular matrix in multiple sclerosis pathology. *J Neurochem* 103 : 1293-1301, 2007
 5) Milner R *et al* : Fibronectin- and vitronectin-induced microglial activation and matrix metallo-

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

Second Version, Submitted on October 11, 2011

The Book Entitled “Biomedical Engineering and Cognitive Neuroscience for Healthcare: Interdisciplinary Applications” Published by IGI Global

The Section: Complex Bioinformatics and Healthcare

Title:

Molecular network analysis of target RNAs and interacting proteins of TDP-43, a causative gene for neurodegenerative diseases ALS/FTLD

Jun-ichi Satoh

Correspondence to Jun-ichi Satoh, MD, PhD, Department of Bioinformatics and Molecular Neuropathology, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.

Tel.: +81-42-495-8678

e-mail: satoj@my-pharm.ac.jp

The manuscript is composed of the text (33 pages), four figures, and two tables.

Total number of the words is 6,755.

I recommend that Figure 1 and Figure 2 are suitable for those occupying the half page, and Figure 3 and Figure 4 are suitable for those occupying the full page, individually, in view of their resolution of the images.

ABSTRACT

TAR DNA-binding protein-43 (TDP-43) is an evolutionarily conserved nuclear protein that regulates gene expression by forming a multimolecular complex with a wide variety of target RNAs and interacting proteins. Abnormally phosphorylated, ubiquitinated, and aggregated TDP-43 proteins constitute a principal component of neuronal and glial cytoplasmic and nuclear inclusions in the brains of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD), establishing a novel clinical entity designated as TDP-43 proteinopathy. Although increasing evidence suggests that the neurodegenerative process underlying ALS and FTLD is attributable to a toxic gain of function or a loss of cellular function of TDP-43, the precise molecular mechanisms remain largely unknown. Recent advances in systems biology enable us to characterize the global molecular network extracted from large-scale data of the genome, transcriptome and proteome by using pathway analysis tools of bioinformatics endowed with comprehensive knowledgebase. The present study is conducted to characterize the comprehensive molecular network of TDP-43 target RNAs and interacting proteins, recently identified by deep sequencing with next-generation sequencers and mass spectrometric analysis. Our results propose the systems biological view that TDP-43 serves as a molecular coordinator of RNA-dependent regulation of gene transcription and translation pivotal for achievement of diverse neuronal functions, and the disruption of TDP-43-mediated molecular coordination induces neurodegeneration in ALS and FTLD.

INDEX WORDS: ALS; FTLD; KEGG; KeyMolnet; IPA; Molecular Network; Systems Biology; TDP-43

INTRODUCTION

TDP-43 is a nuclear RNA/DNA-binding protein highly conserved through evolution, encoded by the TARDBP gene on chromosome 1p36.22, originally identified as a transcriptional repressor of the human immunodeficiency virus (HIV) gene (Ou et al., 1995). TDP-43, capable of interacting with UG/TG repeat stretches of target RNAs/DNAs, plays a key role in regulation of transcription, alternative splicing, mRNA stability and transport, and microRNA biogenesis (Buratti and Baralle, 2010; Lagier-Tourenne et al., 2010). Structurally, it is composed of an N-terminal domain and two highly conserved RNA-recognition motifs named RRM1 and RRM2, followed by a glycine-rich C-terminal domain (Lagier-Tourenne and Cleveland, 2009). The RRM1 domain is necessary and sufficient for recognition of UG repeats of target RNAs, while the C-terminal domain that mediates the protein-protein interaction plays an essential role in regulation of splicing (Ayala et al., 2005; Buratti et al., 2005). In normal cells under physiological conditions, the vast majority of TDP-43 proteins are located in the nucleus, highly enriched in nuclear bodies.

Accumulating evidence indicates that abnormally phosphorylated, ubiquitinated, and aggregated TDP-43 proteins constitute a principal component of neuronal and glial cytoplasmic and nuclear inclusions in the brains of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions (FTLD-TDP) (Arai et al., 2006; Neumann et al., 2006). ALS and FTLD share substantial clinical and pathological manifestations (Mackenzie et al., 2010). ALS patients show generalized skeletal and bulbar muscle atrophy owing to progressive loss of cortical and spinal motor neurons. Up to 10% of ALS cases are caused by inheritable genetic mutations. FTLD is a cause of the second most common early-onset dementia. FTLD patients show behavioral changes with progressive decline in cognitive function caused by neuronal loss chiefly affecting the frontotemporal cortex. Importantly, substantial numbers of ALS patients show cognitive impairment, while significant populations of FTLD patients develop symptoms of motor neuron disease. Approximately 50% of the cases of clinical FTLD exhibit TDP-43 pathology (Chen-Plotkin et al., 2010).

Furthermore, TDP-43-immunoreactive inclusions are accumulated, to a lesser extent, in the brains of various neurodegenerative diseases, such as Alzheimer disease (AD), dementia with Lewy bodies (DLB), Pick disease (PiD), and the Guam parkinsonism-dementia complex (G-PDC) (Geser et al., 2009).

Because ALS and FTLN show clinicopathologically overlapping features, they are recently categorized into a novel disease entity named TDP-43 proteinopathy (Geser et al., 2009). In TDP-43 proteinopathy, TDP-43 often translocates from the nucleus to the cytoplasm where it forms detergent-insoluble urea-soluble aggregates. The accumulated proteins are hyperphosphorylated, polyubiquitinated, and proteolytically cleaved to produce 25-kDa and 35-kDa C-terminal fragments (Hasegawa et al., 2008). Following exposure to stressful insults, TDP-43 promptly accumulates in cytoplasmic stress granules (SGs) that regulate stress-induced translational arrest (Colombrita et al., 2009). Impaired dynein-mediated microtubule transport promotes aggregation of the C-terminal fragments (Pesiridis et al., 2011). The C-terminal domain of TDP-43 contains multiple phosphorylation consensus sites, among which phosphorylation of Ser-409/410 on TDP-43 serves as the pathological hallmark of sporadic and familial ALS cases (Neumann et al., 2009). Hyperphosphorylation of TDP-43 promotes oligomerization and fibril formation *in vitro* (Hasegawa et al., 2008). Overexpression of the TDP-43 C-terminal fragment is sufficient to generate hyperphosphorylated and ubiquitinated cytoplasmic aggregates that alter the exon-splicing pattern (Zhang et al., 2009). Importantly, various missense mutations encoding mutant proteins with an increased aggregation property are clustered in the C-terminal domain of the TDP-43 gene in the patients with sporadic and familial ALS and FTLN (Mackenzie et al., 2010). TDP-43 A315T mutant peptides form prion protein-like proteinase K-resistant amyloid fibrils with profound neurotoxicity (Guo et al., 2011). The gene named fused in sarcoma/translocated in liposarcoma (FUS/TLS) encodes another RNA/DNA-binding protein with the structural relationship to TDP-43. Genetic mutations of the FUS/TLS gene are also causative for ALS (Kwiatkowski et al., 2009). TDP-43 and FUS/TLS are located in the common disease-related pathway involving RNA metabolism (Lagier-Tourenne et al., 2010; Mackenzie et al., 2010).

Transgenic mice overexpressing wild-type and ALS-linked mutant TDP-43 proteins develop motor dysfunction and cognitive impairment with cytoplasmic ubiquitinated TDP-43 inclusions (Wils et al., 2010). In contrast, TDP-43 knockout mice are embryonically lethal, indicating that TDP-43 is indispensable for early embryonic development (Kraemer et al., 2010). However, conditional knockout mice revealed an unexpected role of TDP-43 related to fat metabolism and embryonic stem (ES) cell survival (Chiang et al., 2010). All of these observations, taken together, suggest that the neurodegenerative process underlying ALS and FTLN is attributable to a toxic gain of function or a loss of essential function of TDP-43 (Kabashi et al., 2010; Janssens et al., 2011). However, at present, the precise molecular mechanisms remain largely unknown.

Recent advances in systems biology have made major breakthroughs by illustrating the cell-wide map of complex molecular interactions extracted from large-scale data of the genome, transcriptome and proteome with the aid of the literature-based knowledgebase of molecular pathways (Sato, 2010). The logically arranged molecular networks construct the whole system characterized by robustness that maintains the proper function of the system in the face of genetic and environmental perturbations (Kitano, 2007). In the scale-free molecular network, targeted disruption of several critical components designated hubs, on which the biologically important molecular interactions concentrate, efficiently disturbs the whole cellular function by destabilizing the network (Albert et al., 2000). Therefore, the intensive characterization of large-scale molecular networks and pathways that specifically regulate biologically relevant functions *in vivo* would help us to understand the disease-linked molecular mechanisms. By analyzing molecular networks, we recently clarified key roles of transcriptional regulation by NF- κ B in acute relapse of multiple sclerosis (MS) (Sato et al., 2008), integrin and extracellular matrix proteins in development of chronic active plaques in MS brains (Sato et al., 2009c), Akt signaling pathway in the cellular prion protein interactome (Sato et al., 2009a), transcriptional regulation by CREB (Sato et al., 2009b) and microRNA-controlled cell cycle regulators (Sato, 2011) in the pathology of AD brains.

To achieve proper biological functions, TDP-43 forms a multimolecular complex with