

るモノクローナル抗体 Rituximab は、RRMS における Phase II 臨床試験で著効を呈した(Hauser *et al. N Engl J Med* 2008; **358**: 676-688)。

3. MS 血液中の自己抗体と生体分子

MSの病理学的分類パターンII型は、抗体と補体(C9neo)の沈着を主徴とする脱髄(antibody-mediated demyelination)を呈し、液性免疫の関与が示唆されている。オリゴデンドロサイト細胞膜上のmyelin oligodendrocyte glycoprotein(MOG)に対する自己抗体は、MS脳の急性期脱髄巣に沈着している(Genan *et al. Nat Med* 1999; **5**: 170-175)。血清抗MOG抗体と抗MBP抗体を有する患者は、clinically isolated syndrome(CIS)からclinically definite MS(CDMS)へ移行するリスクが高い(Berger *et al. N Engl J Med* 2003; **349**: 139-145)。抗MOG抗体はEpstein-Barrウイルス核抗原EBNAと交差反応性を呈する(Wang *et al. Neurology* 2008; **71**: 1142-1146)。

活性化T細胞やマクロファージが産生するosteopontin(OPN)は、 $\alpha 4\beta 1$ インテグリンと結合し、Th1細胞やTh17細胞を刺激して炎症増強に働く。MS再発期には血漿OPNレベルが上昇する(Vogt *et al. Ann Neurol* 2003; **53**: 819-822)。日照時間の短い高緯度地域でMS発症頻度が高いという疫学的調査結果から、vitamin DのMS発症予防効果が議論されているが、血清25-OH-vitamin Dレベル上昇と再発リスク減少が関連している(Simpson *et al. Ann Neurol* 2010; **68**: 193-203)。髄鞘特異的に発現しているNogo-Aは、脱髄時に遊離すると、Nogo-66ドメインを介して神経細胞上のNgR/LINGO-1/p75NTR複合体と結合し、RhoAを活性化して神経突起伸長抑制シグナルを伝達する。脊髄損傷やMSの動物モデルに、Nogo-A中和抗体を投与してNogo-66とNgRの結合を阻止すると、軸索再生と機能的回復が促進される。MSの血清では対照群に比較して、抗NgR抗体の検出頻度が高い(Onoue *et al. Acta Neurol Scand* 2007; **115**: 153-160)。MSの血清やCSFでは、様々な自己抗原(neurofilament proteins, α B-crystallin, heat shock proteins, gangliosides)に対する抗体が検出されているが、病態への直接的関与は明らかではない⁹⁾。マイクロアレイは、多数の自己抗体を効率的にスクリーニングするには有用なツールとなる。Quintanaらは、RRMS患者(n=38)と健常者(n=30)の血清を、63種類の抗原がスポットされたアレイで解析し、RRMSにおいて抗HSP60, HSP70 IgM抗体を特徴とするパターンを見出した(*Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 18889-18894)。

14-3-3 は神経組織に豊富に含まれている酸性蛋白質で、Ras/Raf-1/MAPK 系やBad/Bcl-2 系のシグナル伝達においてコーオディネーター分子として働き、神経細胞

の分化増殖・生存を制御している。CSF 14-3-3 はプリオン病診断特異的マーカーとして有用であるが、MS においても 14-3-3, tau, neurofilament proteins は、急速な脳組織の破壊の際に CSF 中に遊出し、axonal injury のマーカーとなる可能性がある(Satoh *et al. J Neurol Sci* 2003; **212**: 11-20)。

4. DNA マイクロアレイによる MS の診断

DNA マイクロアレイは、スライドガラス基盤上に数万遺伝子のオリゴヌクレオチドを高密度に固定したチップで、個々の細胞における全遺伝子発現情報(transcriptome)や遺伝子多型(single nucleotide polymorphism; SNP)を包括的に解析出来るツールである。近年マイクロアレイによる網羅的解析が、MS の発症リスク評価、鑑別診断、再発予測、IFNB 治療反応性予測のために応用されている。例えば MS 931 家系(family trios)がジェノタイプングアレイを用いて解析され、発症リスク関連遺伝子として ILR2A, ILR7A の SNP が同定された(The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. *N Engl J Med* 2007; **357**: 851-862)。マイクロアレイ解析の原理とわれわれ研究成果¹⁰⁾に関しては、「Mini Lecture DNA マイクロアレイ」の項を参照されたい。以下国外における MS リンパ球の遺伝子発現解析研究の現況を概説する。

Bomprezzi らは、RRMS 患者(n = 27)と健常者(n = 19)の peripheral blood mononuclear cells(PBMC)で発現差異を示す 53 遺伝子を同定し、MS における T 細胞活性化関連遺伝子 IL-7R, ZAP70, TNFRSF7 の発現上昇を報告した(*Hum Mol Genet* 2003; **12**: 2191-2199)。Achiron らは、RRMS 患者(n = 26)と健常者(n = 18)の PBMC の遺伝子発現プロフィールを比較し、両群間で 1,109 遺伝子の発現差異を認め、MS における T 細胞活性化関連遺伝子 LEF1, TCF3, SLAM, ITGB2, CTSB の上昇を報告した(*Ann Neurol* 2004; **55**: 410-417)。しかし MS 14 例では採血時に IFNB, glatiramer acetate, intravenous immunoglobulins を投与中であり、治療薬が遺伝子発現に直接影響している可能性がある。Corvol らは、CIS 患者(n = 37)の CD4⁺ T 細胞で、患者群を 4 群に分類する 975 遺伝子を同定し、T 細胞増殖抑制因子 TOB1 の発現低下が CDMS への移行のマーカーとなることを報告した(*Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 11839-11844)。Gurevich らは、未治療 RRMS 患者(n = 62)と CIS 患者(n = 32)の PBMC の遺伝子発現プロフィールを比較し、500 日以内または 50 日以内の再発を予測する遺伝子セット first level predictors (FTP), fine tuning predictors (FTP)を同定した(*BMC Med Genet* 2009; **2**: 46)。再発予測遺伝子には、TGFB2 シグナル伝達系遺伝子が多く含まれていた。Archiron らは、9 年間の追跡期間中に、MS を発症した群

(MS-to-be; n = 9)とMSを発症しなかった群(MS-free; n=11)のPBMCの遺伝子発現プロフィールを比較し、MS前駆病態(preactive stage of MS)において、T細胞アポトーシス誘導因子NR4A1の発現低下を認めた(*Neurobiol Dis* 2010; **38**: 201-209)。Brynedalらは、RRMS患者(n = 26)のCSF細胞とPBMCのペアで遺伝子発現プロフィールを比較し、再発期にPBMCでは266遺伝子が発現変動したが、CSF細胞では顕著な変動が見られなかった(*Neurobiol Dis* 2010; **37**: 613-621)。

PBMCではIFN β 治療を開始すると数時間以内に、プロモーターにIFN-stimulated response element(ISRE)を有するIFN応答遺伝子(IFN-responsive genes; IRG)の発現が上昇する(Weinstock-Guttman *et al. J Immunol* 2003; **171**: 2694-2702)。Stürzebecherらは、RRMS患者(n = 10)で、IFN β 治療前後にPBMCの遺伝子発現プロフィールを解析し、IFNレスポンドーで25遺伝子の変動(IFI17, OAS, STAT1などの上昇)を認めた(*Brain* 2003; **126**: 1419-1429)。しかし、彼らは一度凍結保存したリンパ球を解凍してから解析しており、実験操作が遺伝子発現に影響した可能性を否定出来ない。Byunらは、ジェノタイプングアレイを用いて、RRMS患者(n = 206)のIFN β レスポンドーとノンレスポンドーを識別するHAPLN1, GPC5, COL25A1, CAST, NPAS3のSNPを同定した(*Arch Neurol* 2008; **65**: 337-344)。Comabellaらは、RRMS患者(n = 47)のうちIFN β ノンレスポンドーのPBMCでは、治療前からIRGの発現亢進を認めた(*Brain* 2009; **132**: 3353-3365)。Sellebjergらは、IFN β 中和抗体陽性者のPBMCで、IRG発現誘導の低下を認めた(*Eur J Neurol* 2009; **16**: 1291-1298)。Gertschesらは、RRMS患者(n = 25)のPBMCではIFN β 治療により、STAT1を中心とする遺伝子ネットワークの発現上昇とITGA2Bを中心とする遺伝子ネットワークの発現低下を認めることを報告した(*Pharmacogenomics* 2010; **11**: 147-161)。

マイクロRNA(microRNA; miRNA)は、ゲノムにコードされた約22塩基からなるnon-coding RNAであり、標的となる遺伝子mRNAの3'-untranslated regionに存在する配列に、不完全な相補性で結合してタンパク質の翻訳を抑制するか、完全な相補性で結合してmRNAを分解する。現在までに、ヒトでは1000種類以上のmiRNAが同定されている。その多くは進化を通じてよく保存されており、発現は時間的・空間的に制御され、発生・癌化・細胞死・免疫制御において、重要な役割を果たしている。未治療MS患者末梢血では、T細胞活性化遺伝子群の発現を抑制するmiR-17とmiR-20aの発現が低下している(Cox *et al. PLoS One* 2010; **5**: e12132)。他にもMS末梢血特異的miRNAとしてmiR-145(Keller *et al. PLoS One* 2009; **4**: e7440)、再発特異的miRNAとしてmiR-18b(Otaegui *et al. PLoS One* 2009; **4**: e6309)などが報告されている。

文献

- 1) Bielekova B, Martin R: Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 2004; **127**: 3225-3232
- 2) Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, *et al.*: T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010; **162**: 1-11
- 3) McFarland HF, Martin R: Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007; **8**: 913-919
- 4) Durelli L, Conti L, Clerico M, *et al.*: T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon- β . *Ann Neurol* 2009; **65**: 499-509
- 5) Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, *et al.*: T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon- β in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 2010; **16**: 406-412
- 6) Zozulya AL, Wiendl H: The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 2008; **4**: 384-398
- 7) Friese MA, Fugger L: Pathogenic CD8⁺ T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009; **66**: 132-141
- 8) Dalakas MC: B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nat Clin Pract Neurol* 2008; **4**: 557-567
- 9) Vyshkina T, Kalman B: Autoantibodies and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Lab Invest* 2008; **88**: 796-807
- 10) Satoh J: Bioinformatics approach to identifying molecular biomarkers and networks in multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 2010; **1**: 127-140

図の説明

図 1. MS 病態形成に関与するリンパ球. イタリックは主要な転写因子を示す。文献 2 より引用改変。

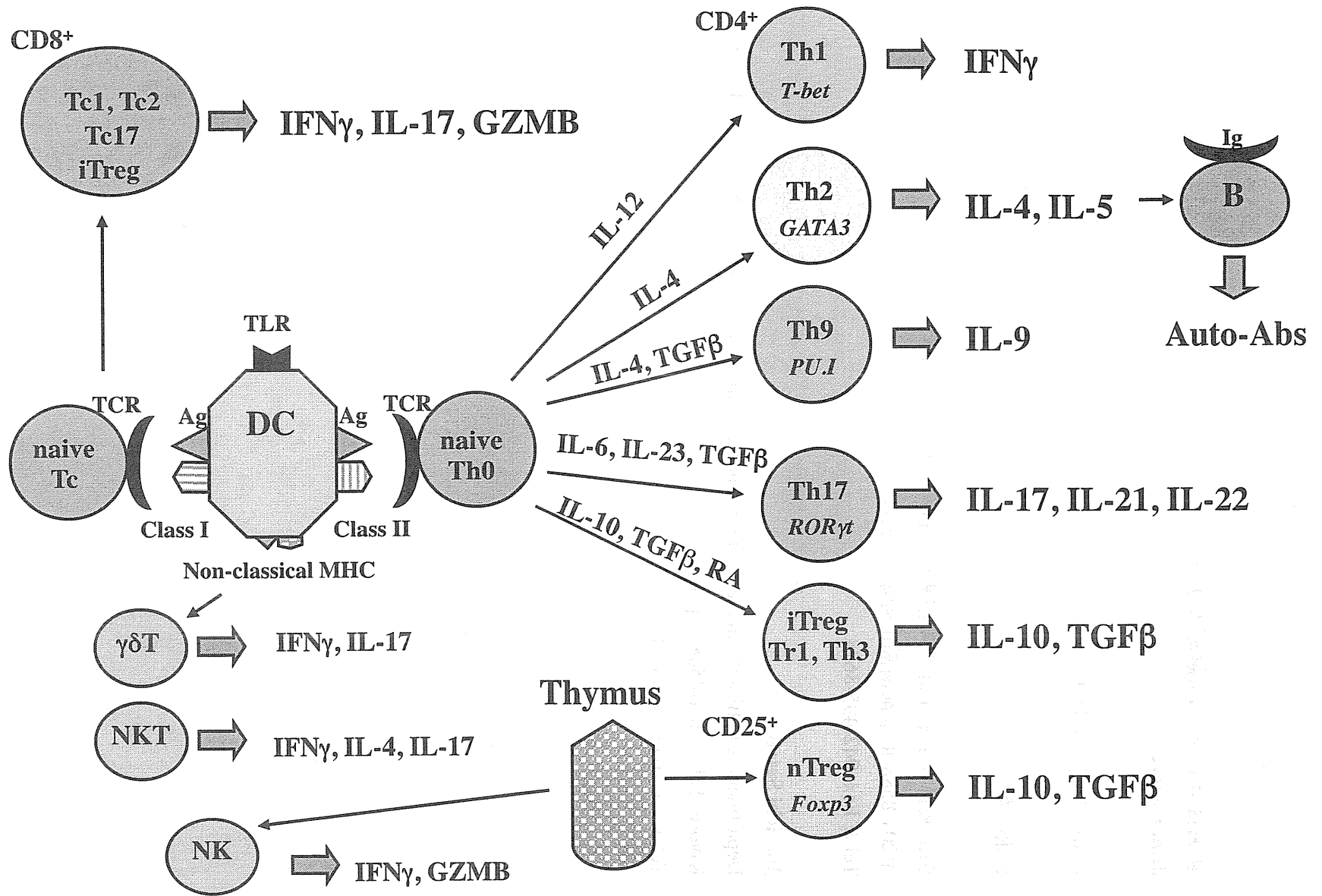


图1

多発性硬化症(MS)診療のすべて

Mini Lecture

DNA マイクロアレイ

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

〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1

Tel & Fax: 042-495-8678

Jun-ichi Satoh

Department of Bioinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio,
Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.

Tel & Fax: 042-495-8678

1. DNA マイクロアレイ解析の意義

2003年にヒトゲノムプロジェクトが完了し、全ヒト遺伝子約22,000の塩基配列が解読された。DNA マイクロアレイは、スライドガラス基盤上に数万遺伝子のcDNAやオリゴヌクレオチドを高密度に固定したチップで、個々の細胞における全遺伝子発現情報(transcriptome)を包括的に解析出来るツールである¹⁾。ヒト以外では、既にゲノムプロジェクトが完了している生物種、マウス・ラット・アカゲザル・イヌ・ウシ・イネ・ゼブラフィッシュ・ショウジョウバエ・酵母・線虫・大腸菌でも、マイクロアレイ解析が可能となっている。さらに最近、タンパク質をスライドガラス上に高密度に固定し、タンパク質間相互作用を網羅的に解析可能なプロテインマイクロアレイも登場した²⁾。近年、マイクロアレイを用いた網羅的解析により、癌や神経難病のバイオマーカーや創薬の標的分子が次々明らかにされた。さらに臨床所見や画像のみでは鑑別困難な疾患の補助診断、腫瘍悪性度や予後の予測、薬物応答や副作用の予測、治療効果の判定にも幅広く応用され、テーラメド医療(personalized medicine)の樹立に必須の研究手法となっている。システム生物学の観点から、ヒトは大規模な分子ネットワークにより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ロバストネスの破綻に起因すると考えられている。従って難病の病態解明のためには、ゲノムワイドの分子ネットワーク解析が重要な研究課題となる³⁾。

2. DNA マイクロアレイ解析の原理

DNA マイクロアレイは、cDNAを基盤上にスポッターで固定するスタンフォード方式と、基盤上で直接オリゴヌクレオチドを合成伸長するGeneChip(Affymetrix)に大別される。発現解析アレイ以外には、スプライスバリエーションの解析が可能なエクソンアレイ、遺伝子多型や染色体コピー数の解析が可能なジェノタイピングアレイ、chromatin immunoprecipitation(ChIP) on Chip解析が可能なゲノムタイリングアレイが市販されている。マイクロアレイ解析では、2種類以上の細胞や組織からmRNAまたはtotal RNAを抽出し、T7 RNA増幅法で増幅する。スタンフォード方式では、比較の対象となるcDNA、cRNAを個別の蛍光色素Cy3、Cy5で標識し、同一チップ上で競合的ハイブリダイゼーションを行うため2色法と呼ばれる。GeneChipでは、cDNAからin vitro transcription反応によりビオチン標識cRNAを作成、フラグメントに切断してハイブリダイゼーションを行い、ストレプトアビジン-フィコエリスリンで検出する。1サンプルに1アレイを使用してアレイ間の発現レベルを比較するので1色法と呼ばれる。スキャナーで蛍光を検出、シグナル強度を正規化し、サンプル間の遺伝子発現プロフィールを比較

する。グローバルノーマリゼーションは、比較するチップ上の全遺伝子の発現強度の総和が等しいと仮定する正規化法である。DNA マイクロアレイ解析では、一度に多数の遺伝子の発現差異を比較するため、遺伝子毎に t 検定で評価すると、多数の偽陽性遺伝子を拾ってしまう。通常は多重検定を行って Bonferroni 補正を付加するか、偽陽性率(false discovery rate; FDR)を考慮して、統計学的有意差を評価する。

有意な発現変動を示す遺伝子(differentially expressed genes; DEGs)に関しては、発現レベルをリアルタイム RT-PCR で定量的に検証する。さらに Web 上の解析ツール DAVID Bioinformatics Resources 6.7(david.abcc.ncifcrf.gov)や Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)(www.kegg.jp)を用いて、アノテーションを調べて生物学的な意味付けを行う。KeyMolnet(医薬分子設計研究所)は、専門家が一流のレビューや PubMed から 123,000 種類の生体分子のリレーションに関する情報を収集して構築した knowledgebase であり、アレイデータを入力することにより、最も密接に関連している分子ネットワークを同定することが出来る⁴⁾。

多数のサンプルを比較解析する場合は、データセットの要素特性を分類するために、GeneSpring(Agilent)を用いて階層的クラスター解析を行う。サポートベクターマシン(support vector machine; SVM)は、指標遺伝子(classifier)の抽出に用いたデータを訓練セットとして機械学習することによりパラメータ(Kernel 関数)を選出し、新規のデータセットにおけるクラスターを識別可能な超平面を同定する解析方法である。

3. DNA マイクロアレイによる MS 病型・治療反応性・再発予測マーカーの解析

以下 DNA マイクロアレイによる MS リンパ球の遺伝子発現解析に関するわれわれの研究成果に関して概説する。国外における研究の現況は、「多発性硬化症(MS)の血液診断」の項を参照されたい。

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、多様な病態を呈する。DNA マイクロアレイは、MS 多様性の分子遺伝学的背景の解析に威力を発揮する。われわれは interferon-beta(IFNB)未治療活動性 MS 患者(n = 72; 46 例は初回採血直後から 2 年間 IFNB 治療を開始)と健常者(n = 22)の末梢血 CD3⁺ T 細胞の遺伝子発現プロフィールを、DNA マイクロアレイ(Hitachi Life Science)で解析した^{5,6)}。両群間で発現差異を示す上位 30 遺伝子のうち 25 遺伝子が、アポトーシス制御遺伝子に分類され、MS の T 細胞ではアポトーシス促進遺伝子と抑制遺伝子の拮抗的バランスが存在していた⁵⁾。

さらに MS 患者と健常者で有意な発現差異を示す 286 遺伝子を抽出し、KeyMolnet で分子ネットワークを解析し、共通上流として NF- κ B を介する遺伝子発現制御系を同定した⁷⁾。NF- κ B はサイトカインやケモカインの正の制御転写因子で、炎症の増幅および遷延化に働く。この 286 遺伝子を指標遺伝子として階層的クラスタ解析を行い、臨床データとの関連性を評価した(図 1)。286 遺伝子は 5 クラスに分類され、患者群は健常者群から独立したクラスタを形成し、4 サブグループ A, B, C, D に分類された。A 群は軽症例が多く、発現プロファイルが最も健常者に類似し、B 群は臨床的活動性が最も高く、ケモカインが集積しているクラス 5 遺伝子群の発現レベルが最も高く、C 群は大脳限局病変を呈する患者が多く、D 群は Expanded Disability Status Scale(EDSS)スコアが最も高値であった⁹⁾。IFNB 治療を開始した 46 例で、治療前後 2 年間の再発回数・ステロイドパルス日数・入院日数・EDSS・MRI T2 強調画像病巣数・患者の治療満足度をスコア化して、IFNB レスポンダーとノンレスポナーに分類すると、レスポナーは A 群と B 群に集積していた⁹⁾。

また peripheral blood mononuclear cells(PBMC)を IFNB で刺激すると、3 時間以内に CXCR3 リガンドケモカイン(CXCL11, CXCL10, CXCL9)と CCR2 リガンドケモカイン(MCP1, MCP2)の発現が、100 倍以上上昇することを見出した⁸⁾。前者は Th1 細胞、後者は単球・マクロファージの遊走を促進し、炎症を増強する。すなわち多数のケモカインが、早期 IFN 応答遺伝子(IFN-responsive genes; IRG)であることがわかった。ケモカインバーストは、IFNB 治療早期副作用である発熱・皮膚潰瘍・肝障害の発現と関連している可能性がある。

さらにハンガリー人一卵性双生児 MS ペア 4 組(MS/MS, MS/MS, MS/MS, MS/健常者)の末梢血 CD3⁺ T 細胞を DNA マイクロアレイで解析し、MS 特異的 20 遺伝子を同定し、KeyMolnet で分子ネットワークを解析し、共通上流として Ets を介する遺伝子発現制御系を同定した⁷⁾。Ets-1 は Th17 細胞分化の負の制御転写因子である⁹⁾。また RRMS 患者(n = 6)の再発期と寛解期の末梢血 CD3⁺ T 細胞を DNA マイクロアレイで解析し、再発期特異的 43 遺伝子を同定した¹⁰⁾。この 43 遺伝子を階層的クラスタ解析の指標遺伝子とすると、再発期と寛解期のサンプルを独立したクラスタとして分離出来た。すなわち 43 遺伝子のセットは、MS 再発予測のバイオマーカーとなる可能性がある¹⁰⁾。

文献

- 1) 佐藤準一: アレイインフォマティクスの進展. 薬学雑誌 2008; **128**: 1537-1545

- 2) 佐藤準一: プロトアレイによるタンパク質インターラクトーム解析. 小田吉哉・長野光司(編), 創薬研究のためのタンパク質・プロテオミクス解析技術. 羊土社, 2010; 75-80
- 3) Satoh J: Bioinformatics approach to identifying molecular biomarkers and networks in multiple sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 2010; **1**: 127-140
- 4) Satoh J, Tabunoki H, Yamamura T: Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain lesion proteome. *Mult Scler* 2009; **15**: 531-541
- 5) 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
- 6) Satoh J, Nakanishi M, Koike F, *et al.*: T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2006; **174**: 108-118
- 7) Satoh J, Illes Z, Peterfalvi A, *et al.*: Aberrant transcriptional regulatory network in T cells of multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2007; **422**: 30-33
- 8) Satoh J, Nanri Y, Tabunoki H, *et al.*: Microarray analysis identifies a set of CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early IFN β -responsive genes in peripheral blood lymphocytes: an implication for IFN β -related adverse effects in multiple sclerosis. *BMC Neurology* 2006; **6**: 18-34
- 9) Du C, Liu C, Kang J, *et al.*: MicroRNA miR-326 regulates T_H-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2009; **10**: 1252-1259
- 10) Satoh J, Misawa T, Tabunoki H, *et al.*: Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF- κ B as a biomarker for relapse of multiple sclerosis. *Dis Markers* 2008; **25**: 27-35

図の説明

図 1. 階層クラスター解析. MS 患者(n =72)と健常者(n = 22)の末梢血 CD3⁺ T 細胞で有意な発現差異を示す 286 遺伝子を抽出し、指標遺伝子として階層的クラスター解析を行った。286 遺伝子は 5 クラスに分類され、患者群(紫色)は健常者群(紺色)から分離され、4 サブグループ A(緑色), B(水色), C(赤色), D(橙色)に分類された。文献 6 より引用改変。

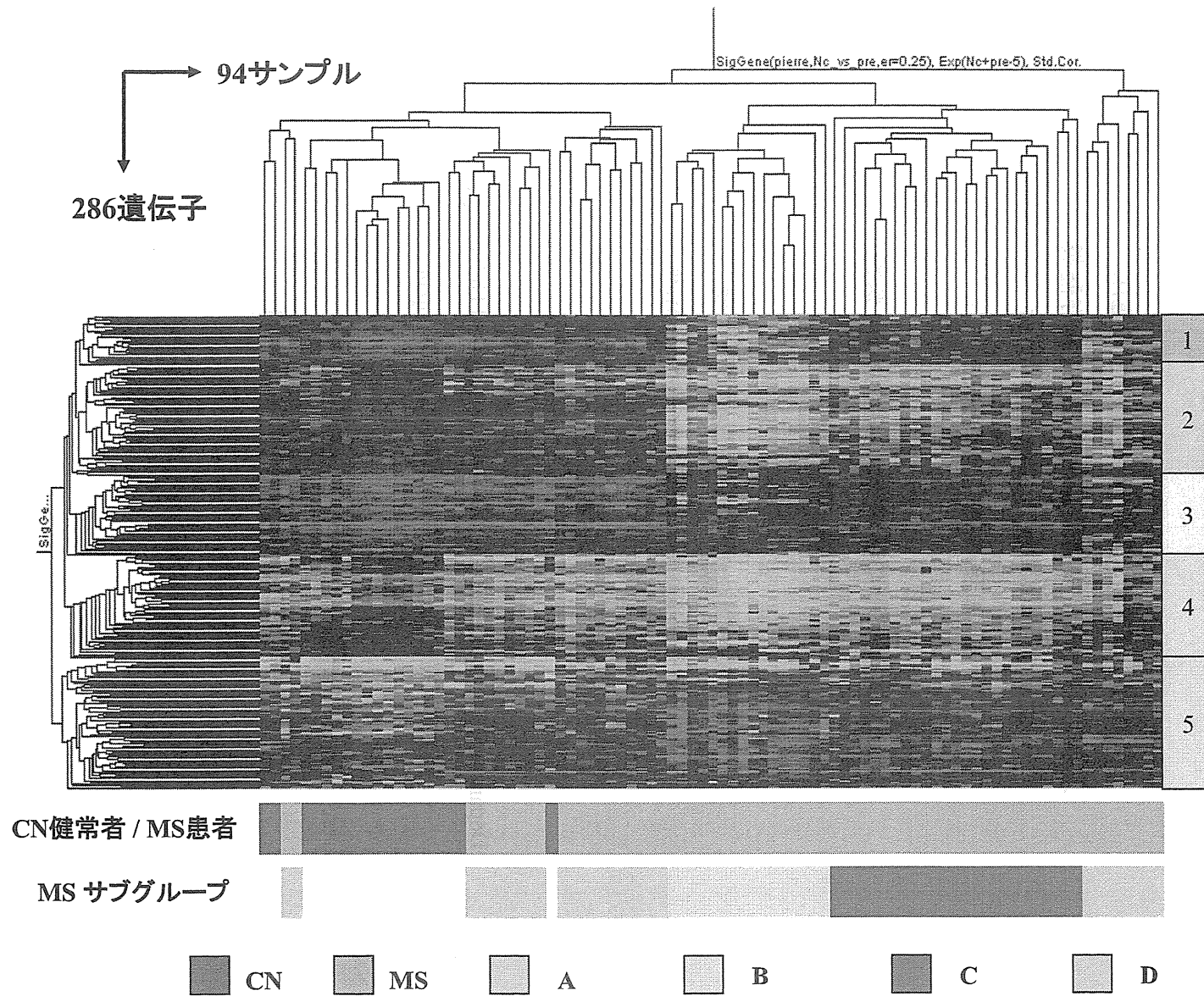


図1

中山書店

シリーズ アクチュアル脳・神経疾患の臨床
最新アプローチ 多発性硬化症と視神経脊髄炎

第1章 多発性硬化症の病態と診断

K. 病因・病態をめぐって

2. 網羅的遺伝子発現解析からみた病因・病態

佐藤 準一

Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis
Clarified by Global Gene Expression Analysis

Jun-ichi SATOH

Department of Bioinformatics, Meiji Pharmaceutical University,
2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan

明治薬科大学バイオインフォマティクス
〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1

TEL & FAX 042-495-8678

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

Point

- 多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)では、遺伝要因と環境要因の複雑な相互作用により誘導された自己抗原反応性の Th1 細胞や Th17 細胞が炎症性脱髄を惹起し、臨床的病理学的に多様な病態を呈する。
- ヒトゲノムが解読され、DNA マイクロアレイや次世代シーケンサーを用いて、個々の細胞における全遺伝子の発現情報を網羅的に解析出来るようになった。
- 近年、ゲノムワイド関連解析(genome-wide association study: GWAS)により、MS 発症のリスクアレルが多数同定された。
- MS と健常者、再発期と寛解期、インターフェロンベータレスポonderとノンレスポonderを比較したトランスクリプトーム解析により、各病態に特徴的な遺伝子が多数同定された。
- 生体を複雑なシステムとして捉える観点からすると、分子ネットワークを詳細に解析することにより、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することが出来る。

MS の病態多様性

MS は主として若年成人に好発し、中枢神経系白質に炎症性脱髄巣が多発し、様々な神経症状が再発を繰り返す難病である。MS では遺伝要因と環境要因の複雑な相互作用により、自己抗原反応性を示す Th1 細胞や Th17 細胞が誘導される¹⁾。これらの細胞は血液脳関門を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクロファージやミクログリアを活性化して、炎症性サイトカインの産生を誘導し、脱髄と軸索傷害を惹起する。現在最も一般的な治療法として、再発期にステロイドパルス、寛解期にインターフェロンベータ(interferon-beta: IFNB)の継続的投与が行われている。しかしながら IFNB 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)に分類される。病理学的には T 細胞の浸潤、抗体の沈着、オリゴデンドロサイトのアポトーシスの所見に基づき、4病型に分類されている²⁾。このような MS の病態多様性が、治療難航の一因となっている。また現在まで、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。

ポストゲノム時代の創薬研究

2003 年にヒトゲノムプロジェクトが完了し、全塩基配列が解読され、DNA マイクロアレイを用いて、個々の細胞における全遺伝子の発現情報(トランスクリプトーム)を網羅的に解析出来るようになった。さらに最近では、次世代シーケンサー(next-generation sequencing technology: NGS)を用いて、発現量の低い遺伝子も一括して解析可能となっている。また質量分析装置を用いて、細胞のタンパク質(プロテオーム)や代謝物(メタボローム)の網羅的解析も行われている。このようなポストゲノム時代を迎え、創薬研究の中心はオミックス(omics)研究に足場を置くゲノム創薬へとパラダイムシフトした。さらに薬理ゲノミクスは急成長を遂げ、遺伝子多型から薬物応答性の個人差を予測可能となり、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)の破綻に起因していると考えられている³⁾。従って難病の病態

解明のためには、バイオインフォマティクスの手法を駆使したゲノムワイドの分子ネットワーク解析が必須の研究手段となりつつある⁴⁾。

網羅的発現解析から分子ネットワーク解析へ

現在、DNA マイクロアレイや次世代シーケンサーを用いて、個々の細胞における数万遺伝子の発現情報を短時間で網羅的に解析出来る。多数のサンプルの遺伝子発現情報を迅速に比較解析出来るマイクロアレイは、臨床所見や画像のみでは鑑別困難な疾患の補助診断ツール、腫瘍の悪性度や予後の予測、薬物応答や副作用の予測、治療効果の判定など幅広い臨床の場で利用されている⁵⁾。DNA マイクロアレイは、プローブと呼ばれるオリゴヌクレオチドをスライドガラスやシリカビーズの基盤上に固定するスタンフォード方式と、基盤上で直接オリゴヌクレオチドを合成する®GeneChip(Affymetrix)に大別される。発現解析アレイの他には、スプライスバリエントの網羅的解析が可能なエクソンアレイ、全ゲノムにおける遺伝子多型マッピングや染色体コピー数を解析出来るジェノタイピングアレイ、Chromatin immunoprecipitation (ChIP) on Chip 解析に用いるゲノムタイリングアレイがある。

マイクロアレイでは、比較の対象なる遺伝子発現レベルが異なる2種類以上の細胞や組織(例えば正常細胞と癌細胞、治療前後の細胞など)から total RNA または mRNA を抽出し、cDNA, cRNA に変換して蛍光色素で標識後に、フラグメントに切断してハイブリダイゼーションを行う(図1)⁴⁾。1色法では1サンプルに対して1アレイを使用し、アレイ間の発現レベルを比較する。同じ実験条件で、レプリケートとしてアレイを2-3枚使用する。アレイを専用スキャナーでスキャン後に、シグナル強度を正規化(normalization)して、サンプル間の遺伝子発現プロフィールを統計学的に比較解析する。マイクロアレイでは一度に非常に多数の遺伝子の発現レベルを解析するため、遺伝子毎に t 検定で評価すると、多数の偽陽性遺伝子を拾ってしまう。通常は多重検定を行い Bonferroni の補正を付加するか、偽陽性率(false discovery rate: FDR)を考慮する。最終的に、比較するサンプル間で、有意な発現差異を呈している遺伝子群(differentially expressed genes: DEG)を抽出し、定量的 PCR を行って発現レベルを検証する。

次に DEG に関して生物学的意味付けを行うために、個々の遺伝子のアノテーション(annotation)を調べる。National Center for Biotechnology Information (NCBI)のデータベース Entrez Gene を利用して、逐一 Gene Ontology (GO)を調べることも出来るが、DAVID Bioinformatics Resources (david.abcc.ncifcrf.gov)の Functional Annotation ツールを用いると、膨大な遺伝子セットのアノテーションを一括して解析可能である⁶⁾。多数のサンプルを比較解析する場合は、@GeneSpring(Agilent)などを用いて、DEG を指標に階層的クラスター解析を行うと、発現プロファイルのビジュアルな比較が出来る。

さらに DEG が構成している分子ネットワークを調べると、生物学的意味をより明確に把握することが出来る。生体内では、遺伝子でコードされたタンパク質は複雑なネットワークから成るシステムを構築している³⁾。タンパク質間相互作用には、直接的結合、活性化、不活化、酵素反応、運搬、複合体形成など多彩な作用様式が存在する。従って、複雑多岐のオミックスデータで、最も重要な役割を果たしている分子ネットワークを同定するためには、精査された文献情報に裏付けられた専用の解析ツールを使用する必要がある。すなわち、膨大な文献情報から様々な分子間相互作用を抽出し、信頼性が高い知識を整理して、コンテンツとして収録した知識データベース (knowledgebase)を用いて、既知のどのネットワークやパスウェイに最も高い類似性を呈しているかについて、統計学に解析する方法である⁴⁾。

無償で利用出来る代表的なデータベースには、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (www.kegg.jp), Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) classification system (www.pantherdb.org), Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) (string.embl.de)がある。2011年8月現在、KEGG には 407 種類のレファレンスを含む 146,624 種類のパスウェイが収録されている。マイクロアレイ解析から得られた DEG のリストを、DAVID Functional Annotation ツールに入力すると、自動的に統計学的検定を行って、最も密接に関連している KEGG のパスウェイを同定することが出来る。有償ツールとしては、@Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems)や@KeyMolnet (Institute of Medicinal Molecular Design)がある。どちらも医学生物学などの専門家が精選された文献を精読して、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 は種々の疾患のメディエート分子を網羅的に収録しており、日本語にも対応している。解析法として、結合・発現制御・複合体形成を包括的に調べる周辺検索、発現制御に関与する転写因子群を調べる共通上流検索、始点と終点間のネットワークを調べる始点終点検索を選択することが出来る(図 2)⁴⁾。

解析ツールで調べた分子ネットワークから、創薬標的分子を探索する場合は、多数の分子からのリレーションが集中しているハブ(hub)と呼ばれる中心分子を同定することが重要である。ハブの抑制薬や活性化薬は、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し、治療効果や副作用の発現が大きい³⁾。

ゲノム解析からみた MS の疾患感受性遺伝子

従来の MS の双生児や兄弟例の遺伝的研究より、何らかの遺伝因子が MS 疾患感受性に影響していると考えられ、候補遺伝子解析により、主要適合性複合体(major histocompatibility complex: MHC) 遺伝子座の一塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)との関連が示唆されていた。近年、マイクロアレイを用いた網羅的なゲノムワイド関連解析(genome-wide association study: GWAS)により、いくつかの MS リスクアレルが同定された⁷⁾。この研究では、931 家系のトリオの全ゲノム上の SNP をスクリーニングし、別の 609 家系のトリオ、2,322 例の孤発性 MS、789 例のコントロールと 2 種類の外部データベースコントロールで再現性を検証した。最終的に、IL2RA、IL7RA の SNP が MS 発症と関連していることがわかった。その後追従する研究により、20 以上の MS リスクアレルが同定され、最近、15ヶ国 23 研究グループによって収集された 9,772 症例を含む大規模共同研究により、従来の報告の再現性が確認され、さらに 29 の新規のリスクアレルが追加された⁸⁾。しかしながら、GWAS で同定された MS リスクアレルのオッズ比はおおむね 2 以下で、疾患発症に対する貢献度は小さい。そのため、次世代シーケンサーを用いて全ゲノムや全エクソン(エクソーム)を網羅的に解析し、効果の大きい遺伝子バリエントを同定する試みが始まっている。Baranzini らは、片方が MS、他方が健常者である一卵性双生児 3 組の CD4 陽性 T 細胞を用いて、全ゲノム、トランスクリプトーム、メチル化部位配列を@GAIIX シーケンサー(Illumina)で網羅的に解析した⁹⁾。しかしながら、MS 発症に関与する遺伝子上の差異を検出出来

なかった。

トランスクリプトーム解析からみた MS の免疫病態

現在までに、多くの研究者が主として末梢血リンパ球(peripheral blood mononuclear cells: PBMC)を用いて、トランスクリプトームを網羅的に解析し、MS と健常者、再発期と寛解期、IFNB レスポンダーとノンレスポナーの病態を比較している⁴⁾。

Achiron らは、26 例の RRMS 患者と 18 名の健常者の PBMC の遺伝子発現プロフィールを比較解析した¹⁰⁾。両群間で、1,109 遺伝子の発現差異を認め、MS における T 細胞活性化関連遺伝子 LEF1, TCF3, SLAM, ITGB2, CTSB の上昇を報告した。しかし 14 例の患者では、採血時に IFNB や Copaxone, イムノグロブリンを投与中であり、治療薬が遺伝子発現に直接影響した可能性がある。Stürzebecher らは、10 例の RRMS 患者で IFNB 治療前後に末梢血リンパ球を解析し、レスポナーで 25 遺伝子の発現変動(IFI17, OAS, Stat1 などの上昇)を確認した¹¹⁾。しかし、彼らは一度凍結保存したリンパ球を解凍後に解析しており、実験操作が遺伝子発現に影響した可能性を否定出来ない。

われわれは、72 例の IFNB 未治療の活動性 MS 患者(そのうち 46 例は初回採血直後から 2 年間 IFNB 治療を開始)と、年齢と性を一致させた 22 名の健常者の末梢血リンパ球から、CD3 陽性 T 細胞と CD3 陰性 non-T 細胞を分離し、各細胞分画の遺伝子発現プロフィールを解析した¹²⁾。両群間で発現差異を認めた上位 30 遺伝子では、T 細胞で 25 遺伝子(NR4A2, TCF8 の上昇と MAPK1, SMARCA3, HSPA1A, TRAIL, TOP1, CCR5, BAG1, DAXX, TSC22, PARP の低下), non-T 細胞で 27 遺伝子(ICAM1, CDC42, RIPK2, SODD, TOP2A の上昇と BCL2, RPA1, NFATC3, HSPA1L, RBBP4, PRKDC の低下)が、アポトーシス制御遺伝子に分類された。すなわち患者の末梢血リンパ球では、アポトーシスに関して促進遺伝子と抑制遺伝子の拮抗的バランスが存在していると考えられた。

またわれわれは、MS と健常者の両群間の多重検定と Bonferroni 補正を行い、T 細胞で有意な発現差異を示す 286 遺伝子を同定した¹³⁾。KeyMolnet によるネットワー

ク解析で、共通上流として NF- κ B を介する遺伝子発現制御系を検出した。NF- κ B はサイトカインやケモカインの発現を正に調節する転写因子で、炎症の増幅と遷延化に働く。すなわち MS の T 細胞では NF- κ B を介する遺伝子発現制御系に恒常的な異常が存在すると考えられる。さらに 286 遺伝子を指標遺伝子として階層的クラスタ解析を行い、臨床データとの関連性を評価した(図 3)¹³⁾。286 遺伝子は 5 クラスに分類され、患者群は健常者群から識別され、さらに 4 グループ A, B, C, D に分類された。A 群は遺伝子発現プロファイルが最も健常者群に類似しており、軽症者が多く、B 群は臨床的活動性が最も高く、多数のケモカイン遺伝子が集積している class #5 遺伝子群の発現レベルが最も高く、C 群は大脳限局病変を呈する患者が多く、D 群は神経学的機能障害度(Expanded Disability Status Scale: EDSS)スコアが最も高値であった。IFNB 治療を開始した 46 例に関して 2 年間追跡し、治療前後 2 年間の再発回数、ステロイドパルス日数、入院日数、EDSS, MRI T2 強調画像病巣数、患者の治療に対する満足度をスコア化して、IFNB レスポンダーとノンレスポンダーに分類すると、レスポンダーは A 群と B 群に集積していた。またレスポンダーでは IFN 応答遺伝子群(IFN-responsive genes: IRG)の発現レベルが、治療開始 6 ヶ月の時点でも高レベルに維持されていたが、ノンレスポンダーでは低下傾向を呈した。すなわち階層的クラスタ解析による病型分類と IRG の経時的発現変化を組み合わせると、IFNB 治療反応性のある程度予測出来ることがわかった。最近 Comabella らは、IFNB ノンレスポンダーは治療前から I 型 IFN の産生が恒常的に高い可能性を指摘している¹⁴⁾。

さらにわれわれは、末梢血リンパ球を IFNB で刺激した場合、3 時間以内に CXCR3 リガンドケモカインである CXCL11, CXCL10, CXCL9 と CCR2 リガンドケモカインである MCP1, MCP2 の発現が、100 倍以上上昇することを見出した¹⁵⁾。前者はエフェクター Th1 細胞、後者は単球やマクロファージの遊走を促進し、炎症を増強するケモカインである。すなわち多くのケモカインが、早期 IRG として検出された。このようなケモカインバーストは、MS で IFNB 治療開始後早期に出現する発熱、皮膚潰瘍形成、肝障害の発現と関連している可能性がある。

最近われわれは、ハンガリー人一卵性双生児 MS ペア 4 組(MS/MS, MS/MS, MS/MS, MS/健常者)より分離した末梢血 CD3 陽性 T 細胞を解析し、MS 病態特異的

20 遺伝子を同定した¹⁶⁾。KeyMolnet によるネットワーク解析で、共通上流として T 細胞の生存と分化を制御する転写因子 Ets を介する遺伝子発現制御系を検出した。

またわれわれは、6 例の RRMS 患者を追跡して再発期と寛解期に採血し、CD3 陽性 T 細胞を分離して比較解析し、再発期特異的 43 遺伝子を同定した¹⁷⁾。KeyMolnet によるネットワーク解析で、共通上流として NF- κ B を介する遺伝子発現制御系を検出した。以上の知見は、NF- κ B は MS と健常者を識別し、MS の再発期と寛解期を識別する分子ネットワークを制御するハブ的な転写因子として働き、MS 治療薬の創薬ターゲットと成り得ることを示唆している。実際に NF- κ B 阻害薬は、MS モデル動物系である自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)において有効性が確認されている。

この他の重要な研究として、Lock らは、MS 脳組織の急性炎症性病巣と慢性非活動性病巣の遺伝子発現プロフィールを比較し、前者における G-CSF の上昇と後者における IgG Fc receptor, IgE receptor, histamine receptor type 1 の上昇を認め、G-CSF 投与で EAE が軽症化し、FcR γ -chain 遺伝子欠損マウスで EAE の慢性化が抑制されることを証明した¹⁸⁾。

プロテオーム解析からみたMSの脳分子病態

2008 年に、Han らは 6 例の MS 患者の凍結脳を用いて、病巣から病理学的ステージを確認後にレーザーマイクロダイセクションでサンプルを採取し、電気泳動で分離後にタンパク質を抽出しペプチドを精製して、質量分析装置を用いて網羅的に解析した¹⁹⁾。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。また同時に 2 例の健常脳も解析した。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同定し、AP 158, CAP 416, CP 236 種類のプロテオームデータを公開した。彼らは CAP において 5 種類の血液凝固系タンパク質を同定した。この所見に基づき、抗凝固薬で EAE を治療することに成功し、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を示した。しかしなが