

疫応答を、Th17 細胞依存性の初期病態との比較を含めて分子レベルで解明することで、各病態の特性を判別する方法を明らかにし、明確な区別が困難な RR-MS と進行型 MS の治療戦略に応用することが可能であると考えられる。

D. 考察

RR-MS 患者では末梢血 T 細胞中の NR4A2 の発現が亢進していることを最初の手がかりとして、MS の動物モデルである EAE を用いて、NR4A2 発現 T 細胞と自己免疫病態形成機構との関連を詳細に解析した。その結果、中枢神経系の自己免疫炎症において、自己反応性の Th17 細胞が NR4A2 発現亢進を伴って病態形成過程に密接に関わることが示され、その際 Th17 細胞分化に関わる複数の因子が NR4A2 の制御を受けていることが明らかとなった。NR4A2 特異的 siRNA の *in vivo* 投与により EAE 病態が有意に軽快したことから、NR4A2 が RR-MS に対する新しい治療標的となる可能性が示された。新規に樹立した NR4A2cKO マウスに EAE を誘導すると、急性期病態がほぼ完全に抑制され、Th17 細胞の機能も有意に低下したことから、NR4A2 は急性期の自己免疫病態形成において Th17 細胞の病原性を制御する極めて重要な因子であることが明らかとなった。一方で、NR4A2cKO マウスの EAE では、誘導後期に新たな病態が出現したが、Th17 細胞の活動性には変化がないことから、この病態は Th17 細胞依存性の RR-MS とは異なる病態を反映するものと考えられた。したがって、NR4A2cKO マウスにおける EAE の後期病態は、進行型 MS 病態を反映しうる全く新しい動物モデルを提供する可能性が考えられる。本マウスの病態形成メカニズムを詳細に解析することで、MS 病態の多様性を理解する手がかりが得られるものと考えられた。

E. 結論

NR4A2 依存性の病原性 Th17 細胞は、RR-MS の病態形成過程に深く関与する T 細胞である。遺伝子改変マウスを用いた EAE 解析から、Th17 細胞非依存性の病態が存在することが新たに示されたことから、MS 病態の多様性を理解するうえで、有用な動物モデルを樹立した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nuclear Receptor NR4A2 Orchestrates Th17 Cell-Mediated Autoimmune Inflammation via IL-21 Signalling. Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura; PLOS ONE. 8(2): e56595. (2013)
- 2) Plasmablasts as Migratory IgG-Producing Cells in the Pathogenesis of Neuromyelitis Optica. Norio

Chihara, Toshimasa Aranami, Shinji Oki, Takako Matsuoka, Masakazu Nakamura, Hitaru Kishida, Kazumasa Yokoyama, Yoshiyuki Kuroiwa, Nobutaka Hattori, Tomoko Okamoto, Miho Murata, Tatsushi Toda, Sachiko Miyake, Takashi Yamamura; PLOS ONE. 8(12): e83036. (2013)

2. 学会発表

[国際学会]

- 1) Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: NR4A2 controls distinct populations of Th17. 13th Annual Conference of FOCIS (FOCIS2012), Vancouver, Jun. 20th-23rd, 2013
- 2) Raveney B., S. Oki, T. Yamamura: NR4A2 modulation during autoimmune inflammation of the central nervous system reduces pathogenic T cell responses and ameliorates clinical disease. 6th Congress of the Pan-Asian Committee for Threatment and Research in Multiple Sclerosis (PACTRIMS), Kyoto, Nov. 6th-8th, 2013

[国内学会]

- 1) 病原性 IL-17 産生細胞の NR4A2 発現維持に関わる細胞間相互作用 大木 伸司、ベン レイバニー、山村 隆; 第 25 回 日本神経免疫学会・学術集会 11 月 27-29 日 (2013)
- 2) 中枢神経系の炎症性自己免疫病態形成に関わる病原性 T 細胞群の解析 大木 伸司、ベン レイバニー、山村 隆; 第 25 回 日本神経免疫学会・学術集会 11 月 27-29 日 (2013)
- 3) NR4A2 controls Th17-mediated autoimmunity. Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura; 第 42 回 日本免疫学会総会・学術集会; 12 月 11-13 日 (2013)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

拡散テンソル解析を用いた EDSS スコアと脳白質微細構造変化の検討

研究分担者 佐藤典子 国立精神・神経医療研究センター病院放射線診療部 部長
研究協力者 下地啓五 国立精神・神経医療研究センター病院放射線診療部 医長
研究協力者 岡田智子 国立精神・神経医療研究センター病院神経内科 医長

研究要旨

再発寛解型の多発性硬化症患者を対象に、EDSS で評価される神経学的所見と DTI 解析で評価される脳白質微細構造の関連を検討した。再発寛解型の多発性硬化症患者の診断で国立精神・神経医療研究センター病院に入院時に EDSS で評価され、Philips 社製 3T MRI 装置で拡散テンソル像を撮像した 47 人を対象にした。DTI の全脳解析法である Tract Based Spatial Statistics 法を用いて、47 人全員の EDSS、機能別障害度の錐体路機能、小脳機能、脳幹機能、感覚機能、膀胱直腸機能、視覚機能、精神機能のスコアと、DTI 画像から得られた拡散異方性値 (fractional anisotropy value、以下 FA 値) との相関を検討した。脳内の広い範囲で、EDSS と FA 値の間に統計学的に有意な逆相関 ($p < 0.05$ 、多重比較補正済) がみられた。機能別障害度に関しては、FA 値の低下は精神機能と小脳機能のスコアとの間でのみ統計学的に有意な逆相関 ($p < 0.05$ 、多重比較補正済) が観察された。錐体路機能、脳幹機能、感覚機能、膀胱直腸機能、視覚機能のスコアと FA 値には有意な相関はみられなかった。本検討の結果は多発性硬化症患者では精神機能低下と小脳機能低下の進行に脳白質微細構造変化が関わっている可能性を示す。拡散テンソル像解析は、再発寛解型多発性硬化症の精神機能低下と小脳機能低下の進行の評価に有用である可能性がある。

A. 研究目的

頭部 MRI と Expanded Disability Status Scale (以下、EDSS) はともに多発性硬化症の日常診療で病像評価に頻用されている。診療で使用される T2 強調像や FLAIR 像での異常所見の程度は必ずしも EDSS と相関しないことが知られている (clinico-radiological paradox)。拡散テンソル像 (diffusion tensor imaging、以下 DTI) は水拡散の動態を通じて生体脳の白質における微細白質変化を詳細に解析可能である。本検討では再発寛解型の多発性硬化症患者を対象に、EDSS で評価される神経学的所見と DTI 解析で評価される脳白質微細構造の関連を検討した。

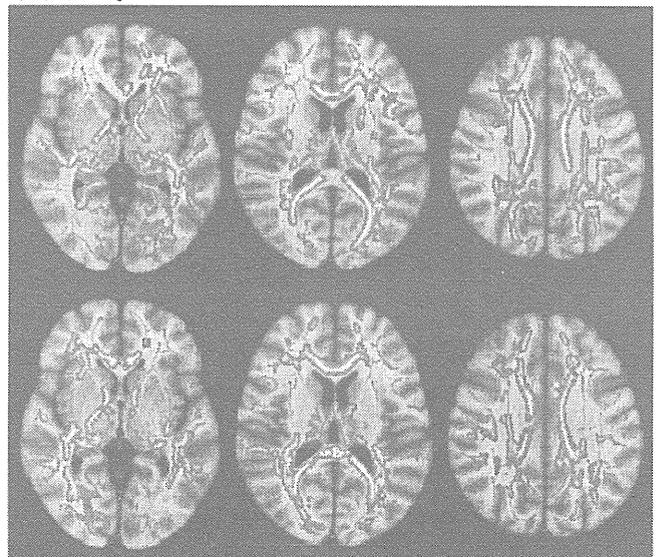
B. 研究方法

対象は 2011 年 1 月より 2013 年 8 月の間に再発寛解型の多発性硬化症患者の診断で国立精神・神経医療研究センター病院 (以下、当院) に入院時に EDSS で評価され、当院の Philips 社製 3T MRI 装置で拡散テンソル像を撮像した 47 人。DTI の全脳解析法である Tract Based Spatial Statistics 法を用いて、47 人全員の EDSS、機能別障害度の錐体路機能、小脳機能、脳幹機能、感覚機能、膀胱直腸機能、視覚機能、精神機能のスコアと、DTI 画像から得られた拡散異方性値 (fractional anisotropy value、以下 FA 値) との相関を検討した。本研究は当院の倫理委員会の承認を経て行われた。

C. 研究結果

脳内の広い範囲で、EDSS と FA 値の間に統計学的に有意

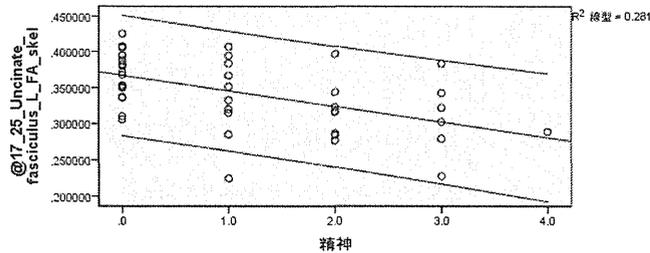
な逆相関 ($p < 0.05$ 、多重比較補正済) がみられた。また精神機能のスコアは、FA 値の間に統計学的に有意な逆相関 ($p < 0.05$ 、多重比較補正済、図上段) がみられ、小脳機能のスコアにも FA 値の間に統計学的に有意な逆相関 ($p < 0.05$ 、多重比較補正済、図下段) がみられた。



錐体路機能、脳幹機能、感覚機能、膀胱直腸機能、視覚機能のスコアと FA 値の有意な相関はみられなかった。

D. 考察

これまでも多発性硬化症患者においてEDSSが上昇すると脳内の病的状況の進行を反映してFA値が低下するとする報告があるが、本検討の結果もこれを支持する。本検討ではEDSSスコアそのものだけでなく、下位基準である機能別障害度についても個別に評価した。機能別障害度の中では、FA値の低下は精神機能と小脳機能のスコアとの間でのみ有意な相関が観察された。精神認知機能との密接が関連されている鉤状束と精神機能の間には特に強い逆相関が認められた（散布図）。



本検討により多発性硬化症患者では脳白質の微細構造変化が進行するほど精神機能と小脳機能の低下が進行する可能性が示唆される。

E. 結論

拡散テンソル像解析は、再発寛解型多発性硬化症の精神機能低下と小脳機能低下の進行の評価に有用である可能性がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamiya K, Sato N, Saito Y, Nakata Y, Ito K, Shigemoto Y, Ota M, Sasaki M, Ohtomo K. Accelerated myelination along fiber tracts in patients with hemimegalencephaly. J Neuroradiology 2013 Sep 30(Epub ahead of print)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記すべきことなし

EBNA1 標的遺伝子群の分子ネットワーク解析: MS 発症における意義

研究分担者 佐藤 準一 明治薬科大学薬学部バイオインフォマティクス教授

研究要旨 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て再発を繰り返す難病で、遺伝的要因(遺伝因子)と環境的要因(感染因子と環境因子)の複雑な相互作用により発症が規定されている。感染因子としては EB ウイルス(Epstein-Barr virus; EBV)の感染は、MS 発症率を数倍高めることが知られている。EBV は CD21 を介して B 細胞特異的に感染し、一度感染すると生涯にわたり持続感染が成立する。EBV nuclear antigen 1(EBNA1) は、EBV ゲノムのエピゾーマルな維持と複製に必須なタンパク質で、EBV の潜伏感染で中心的役割を果たしている。EBNA1 は EBV ゲノムの遺伝子発現のみならず、宿主ゲノムの遺伝子発現も制御する転写因子として働く。MS 発症 15-20 年前に抗 EBNA1 抗体が出現し、その上昇は clinically isolated syndrome(CIS)から MS への移行を予測するための指標となる。しかしながら現在まで MS 発症に直接関与する EBNA1 標的遺伝子群(EBNA1-target genes; EBNA1-TG)の全容は明らかでない。本研究では、next generation sequencer(NGS)を用いた ChIP-Seq による EBNA1-TG の網羅的解析データを再解析し、その分子ネットワークを同定し、MS 発症における EBV の役割を調べた。

A. 研究目的

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て再発を繰り返す難病で、若年成人に好発する。北欧などの高頻度地域では有病率(prevalence)は、10 万人対 50-100 人である。MS では、遺伝的要因(遺伝因子)と環境的要因(感染因子と環境因子)の複雑な相互作用に

より発症が規定されている。MS では、髄鞘自己抗原反応性ヘルパー T 細胞(Th1, Th17)が出現し、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する。エフェクター細胞が産生する炎症性サイトカインは脱髄と軸索傷害を惹起する。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基づき、4病型に分類されている。このように MS は多様な病態を呈するが、その背景となる分子機序は明らかではない。

MS 発症に関与する多数の環境因子の中でも、EB ウイルス(Epstein-Barr virus; EBV)の感染は、発症率を数倍高めることが知られている(Thacker et al. *Ann Neurol* 59: 499-405, 2006)。EBV は CD21 を介して B 細胞特異的に感染し、一度感染すると生涯にわたって持続感染が成立する。EBV nuclear antigen 1(EBNA1)は、EBV ゲノムのエピゾーマルな維持と複製に必須なタンパク質で、EBV の潜伏感染で中心的な役割を果たしている。EBNA1 は EBV ゲノムの遺伝子発現のみならず、宿主ゲノムの遺伝子発現も制御する転写因子として働く(Westhoff Smith and Sugden. *Viruses* 5: 226-240, 2013)。MS 発症の 15-20 年前に抗 EBNA1 抗体が出現し、その上昇は clinically isolated syndrome(CIS)から MS への移行を予測するための指標となる(Lünemann et al. *Ann Neurol* 67: 159-169, 2010)。しかしながら現在まで MS 発症に直接関与する EBNA1 標的遺伝子群(EBNA1-target genes; EBNA1-TG)の全容は明らかでない。

2003 年にヒトゲノム解読が完了し、マイクロ

アレイを用いて個々の細胞における全遺伝子発現情報や多型情報を迅速かつ網羅的に解析出来るようになった。また近年次世代シーケンサー(next-generation sequencer: NGS)を用いて、個人の全ゲノムやエクソームを数日で解析出来るようになった。免疫沈降法と NGS を組み合わせることにより、ゲノム上の転写因子の結合部位やヒストンの修飾を高解像度で解析する方法を ChIP-Seq と呼ぶ。システム生物学(systems biology)の立場からは、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、MS などの多くの難病が、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。遺伝子解析技術の飛躍的な進歩にも関わらず、マイクロアレイや NGS 解析から産出される膨大なデータに関しては、その生物学的な意味付けは必ずしも容易ではない。

近年、膨大な文献情報から様々な分子間相互作用を抽出して、信頼性が高いコンテンツを選択的に収録した知識データベース(knowledgebase)が樹立され、複雑な生体分子ネットワークを比較的簡単に解析出来るようになった。本研究では、ChIP-Seq による EBNA1-TG の網羅的解析データを再解析し、その分子ネットワークを同定し、MS 発症における EBV の役割を調べた。

本研究の成果は、MS の病態解明に貢献し、厚生労働行政を主導とする患者の QOL 向

上につながる。

B. 研究方法

1. EBNA1-TG ChIP-Seq データの再解析

DDBJ Sequence Read Archive (trace.ddbj.nig.ac.jp/DRAsearch) からデータセット SRP015132 をダウンロードした。SRP015132 は、EBV 陽性 Burkitt リンパ腫由来細胞株 Raji 細胞を mouse monoclonal anti-EBNA1 antibody (Advanced Biotechnologies) または mouse IgG (input control) を用いて chromatin immunoprecipitation (ChIP) と Illumina Genome Analyzer II で NGS 解析 (ChIP-Seq) を行ったデータ (SRALite format) である (Lu et al. Virol J 7: 262, 2010)。

このデータを FASTQ format に変換し、FASTX-toolkit (hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit) で quality が不十分な reads を除去、Bowtie 0.12.7 (bowtie-bio.sourceforge.net) を用いて reference sequence hg19 にマッピングし、MACS (liulab.dfci.harvard.edu/MACS) を用いて peak, summit を fold enrichment (FE) > 20, FDR < 5% の条件で抽出し、有意な EBNA1-TG を同定した。これらに関して GenomeJack ver1.4 (三菱スペースソフト) を用いて、ヒトゲノム上の位置を同定した (図1)。また MEME-ChIP (meme.sdsc.edu/meme/cgi-bin/meme-chip.cgi) を用いて、EBNA1 結合部位の

consensus sequence motif を抽出した。

2. EBNA1-TG の分子ネットワーク解析

EBNA1-TG の Entrez Gene ID を Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7 (david.abcc.ncifcrf.gov) に入力してアノテーション付けを行い、生物情報統合プラットフォーム KeyMolnet (医薬分子設計研究所)、Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems) を用いて、EBNA1-TG の分子ネットワークを解析した。

(倫理面への配慮)

全てのデータは公開された公共データであり、その使用に当たり倫理的な問題はない。

C. 研究結果

1. EBNA1 ChIP-Seq データの再解析

SRP015132 の再解析により、FE > 20, FDR < 5% の条件を満たす 418 peaks を検出した。タンパク質をコードしない non-coding genes と intergenic regions に存在する peaks と重複遺伝子を除く 228 peaks は、protein-coding genes 近傍に位置しており、the promoter (n = 34; 14.9%), 5'UTR (n = 1; 0.4%), exon (n = 5; 2.2%), intron (n = 161; 70.6%), 3'UTR (n = 4; 1.8%), 3'down (n = 23; 10.1%) に分布していた。45 遺伝子 (19.7%) は、既報の EBNA1-binding site を有する標的遺伝子と一致した (Canaan et al. Proc Natl Acad Sci USA 106: 22421-22426,

2009; Dresang et al. J Virol 83: 2930-2940, 2009; Westhoff Smith and Sugden. Viruses 5: 226-240, 2013)。

FEがtop 100のEBNA1-TGのMEME-ChIP解析では5'[G/A]GG[T/C]AG[C/T/G]A[T/A][G/A]TGC T[G/A]CCC[A/G]3' (E-value = 3.4e-339)をEBNA1結合部位のconsensus sequence motifとして同定出来た(図2)。

2. EBNA1-TGの分子ネットワーク解析

次に228 EBNA1-TGのEntez Gene IDをDAVIDに入力した。Gene Ontology(GO) termとしては“regulation of cell motion” (GO:0051270; p = 0.000006), “plasma membrane part” (GO:0044459; p = 0.000039), “apical plasma membrane” (GO:0016324; p = 0.000116)との関連性を認めた。また228 EBNA1-TGはIPAではfunctional networkとしては“Nutritional Disease, Cell Death and Survival, Cellular Development” (p = 1.00E-67)(図3), “Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Cellular Movement” (p = 1.00E-51), “Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Cell-To-Cell Signaling and Interaction” (p = 1.00E-47)との関連性を認めた。

さらにKeyMolnetを用いて、228遺伝子を始

点として、KeyMolnet libraryに格納されている92 MS関連分子を終点として、始点終点検索法で解析したところ、“transcriptional regulation by IRF” (p = 1.97E-80), “MAPK signaling pathway” (p = 1.58E-79), “transcriptional regulation by SMAD” (p = 5.05E-77), “transcriptional regulation by STAT” (p = 1.51E-68)との関連性を認めた。

D. 考察

NGSによるEBNA1 ChIP-seqデータSRP015132をバイオインフォマティクスの手法を駆使して再解析し、EBV宿主B細胞における標的遺伝子群228 EBNA1-TGを同定出来た。そのうち70.6%では、intronに結合部位が存在した。このことは、EBNA1がpromoterに直接結合して転写因子として働くのではなく、enhancerとして他の転写因子と協調的に働く可能性や、chromatin構造に変化を及ぼし、epigeneticな機序により、遠隔遺伝子の発現を制御している可能性を示唆する(Coppotelli et al. Nucleic Acids Res 41: 2950-2962, 2013)。

分子ネットワーク解析では、EBNA1-TGの主要なネットワークとして、IPAでは細胞生存・細胞死と密接に関連するネットワークとの関連性、KeyMolnetではウイルス感染防御で重要な役割を果たしているインターフェロンのシグナル伝達系IRF, STAT1との関連性が示唆された。すなわちEBNA1-TGのネットワークは、

EBV 宿主の運命やウイルス防御機構の減弱に直接影響し得るので、EBV はこのシステムをうまく利用して潜伏感染(持続感染)を維持している可能性が示唆される(Wu et al. J Virol 83: 1140-1146, 2009)。このような宿主の EBNA1-TG ネットワークを介する EBV 持続感染維持機構は、免疫寛容、自己免疫誘導、B 細胞系腫瘍の発生につながるものと思われる。

E. 結論

NGS による EBNA1 ChIP-seq データ SRP015132 をバイオインフォマティクスの手法を駆使して再解析し、EBV 宿主 B 細胞における標的遺伝子群 228 EBNA1-TG を同定出来た。宿主の EBNA1-TG ネットワークを介する EBV 持続感染維持機構は、免疫寛容、自己免疫誘導、B 細胞系腫瘍の発生につながるものと思われる (Satoh et al. Clin Exp Neuroimmunol 4: 181-192, 2013)。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Accumulation of a repulsive axonal guidance molecule RGMa in amyloid plaques: a possible hallmark of regenerative failure in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39(2): 109-120, 2013.
2. Satoh J, Tabunoki H. Molecular network of ChIP-Seq-based vitamin D receptor target genes. *Multiple Sclerosis* 19(8): 1035-1045, 2013.
3. Satoh J, Tabunoki H. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. *Gene Regulation and Systems Biology* 7: 41-56, 2013.
4. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Arima K. Ubiquilin-1 immunoreactivity is concentrated on Hirano bodies and dystrophic neurites in Alzheimer's disease brains. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 39(7): 817-830, 2013.
5. Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Konno H, Arima K. Reactive astrocytes express the potassium channel Kir4.1 in active multiple sclerosis lesions. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4(1): 19-28, 2013.
6. Satoh J. Molecular network of ChIP-Seq-based NF- κ B p65 target genes involves diverse immune functions relevant to the immunopathogenesis of

- multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 3(1): 94-106, 2013.
7. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Arima K. A survey of TREM2 antibodies reveals neuronal but not microglial staining in formalin-fixed paraffin-embedded postmortem Alzheimer's brain tissues. *Alzheimer's Research and Therapy* 5(5): e30, 2013.
 8. Tabunoki H, Ono H, Ode H, Ishikawa K, Kawana N, Banno Y, Shimada T, Nakamura Y, Yamamoto K, Satoh J, Bono H. Identification of key uric acid synthesis pathway in a unique mutant silkworm *Bombyx mori* model of Parkinson's disease. *PLoS One* 8(7): e69130, 2013.
 9. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y. Molecular network of ChIP-Seq-based EBNA1-target cellular genes supports biological implications of EBV persistence in multiple sclerosis. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4(2): 181-192, 2013.
 10. Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Konno H, Arima K, Satoh J. Reactive astrocytes and perivascular macrophages express NLRP3 inflammasome in active demyelinating lesions of multiple sclerosis and necrotic lesions of neuromyelitis optica and cerebral infarction. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4(3): 296-304, 2013.
 11. Satoh J. A possible role of microgliopathy in the pathogenesis of Nasu-Hakola disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 4(Suppl. 1): 17-26, 2013.
 12. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y. Pathway analysis of ChIP-Seq-based NRF1 target genes suggests a logical hypothesis of their involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Gene Regulation and Systems Biology* 7: 139-152, 2013.
 13. Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y. ChIP-Seq data mining: Remarkable differences in NRSF/REST target genes between human ESC and ESC-derived neurons. *Bioinformatics and Biology Insights* 7: 357-368, 2013.
 14. 佐藤準一. Nasu-Hakola 病と HDLS. 神経軸索 spheroid を伴う遺伝性白質脳症 (HDLS). *神経内科* 78(4): 396-404, 2013.
- 著書
1. Satoh J. Gene expression profiling and pathway analysis for identification of

molecular targets in MS. In *Multiple Sclerosis Immunology - A Foundation for Current and Future Treatments*, ed by Gran B and Yamamura T. Dordrecht, Springer, Netherlands, pp. 229-256, 2013.

2. 佐藤準一. 免疫性神経疾患発症要因. 免疫性神経疾患ハンドブック. 楠進編. 南江堂, p. 31-41, 2013.

2. 学会発表

国際学会

1. Satoh J, Tabunoki H. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. The 10th International Workshop on Advanced Genomics. The Genome Renaissance. Tokyo, Japan, 2013.5.21.

国内学会

1. 天竺桂弘子、川名夏生、伴野豊、嶋田透、中村有希、山本公子、坊農秀雅、佐藤準一. カイコ DJ-1 の尿酸代謝系における役割の解明. 日本薬学会第 133 年会. 横浜、2013.3.29.
2. 天竺桂弘子、島村悦光、野島陽水、川名夏生、Khanit Suwanborirux、Kornvika Charupant、齋藤直樹、佐藤準一. 海洋生

物由来新規テトラヒドロイソキノリンアルカロイドによるヒトグリオーマ細胞に対するアポトーシス誘導機序の分子ネットワーク解析. 日本薬学会第 133 年会. 横浜、2013.3.29.

3. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、齋藤祐子、有馬邦正. アルツハイマー病脳の前野小体と変性神経突起における ubiquilin-1 の高発現. 第 54 回日本神経病理学会総会. 東京、2013. 4.26.
4. 天竺桂弘子、川名夏生、野島陽水、伴野豊、嶋田透、坊農秀雅、佐藤準一. カイコ尿酸代謝における DJ-1 の役割. 第 54 回日本神経学会総会 東京、2013. 5.31.
5. 佐藤準一、島村悦光、野島陽水、川名夏生、天竺桂弘子. 次世代シーケンサー ChIP-seq データを用いたゲノムワイド VDR 結合部位の解析. 第 54 回日本神経学会総会 東京、2013. 6.1.
6. 佐藤準一、天竺桂弘子、石田剛、齋藤祐子、有馬邦正. アルツハイマー病脳の前野小体における C9orf72 の発現. 第 36 回日本神経科学大会. Neuro2013. 京都、2013. 6.20.
7. Jun-ichi Satoh. Primary microgliopathy causes demyelination and axonal degeneration: neuropathology and DNA microarray analysis in Nasu-Hakola disease. 12th MS Workshop in Fukuoka.

Cutting edge Research in MS and NMO from Asia. 福岡、2013.8.4.

8. 佐藤準一. Alzheimer 病脳における microRNA の発現異常. 国立長寿医療研究センターバイオバンクセミナー. 大府、2013.8.8.
9. Jun-ichi Satoh. Molecular network of ChIP-Seq-based NF- κ B p65 target genes. NGS 現場の会. 第 3 回研究会. 神戸、2013.9.4.
10. Jun-ichi Satoh, Natsuki Kawana, Yoji Yamamoto. A comprehensive profile of ChIP-Seq-based STAT1 target genes suggests the complexity of STAT1-mediated gene regulatory mechanisms. 生命医薬情報学連合大会. 東京、2013.10.29.
11. 佐藤準一、川名夏生、野島陽水、山本洋司. MS 活動性脳病巣反応性アストロサイトにおける Kir4.1 の高発現. 第 25 回日本神経免疫学会学術集会 下関、2013.11.29.
12. 佐藤準一. 神経難病の創薬. 平成 25 年度文京アカデミア講座. 最近話題の医学・薬学. 東京、2013.12.7.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
なし

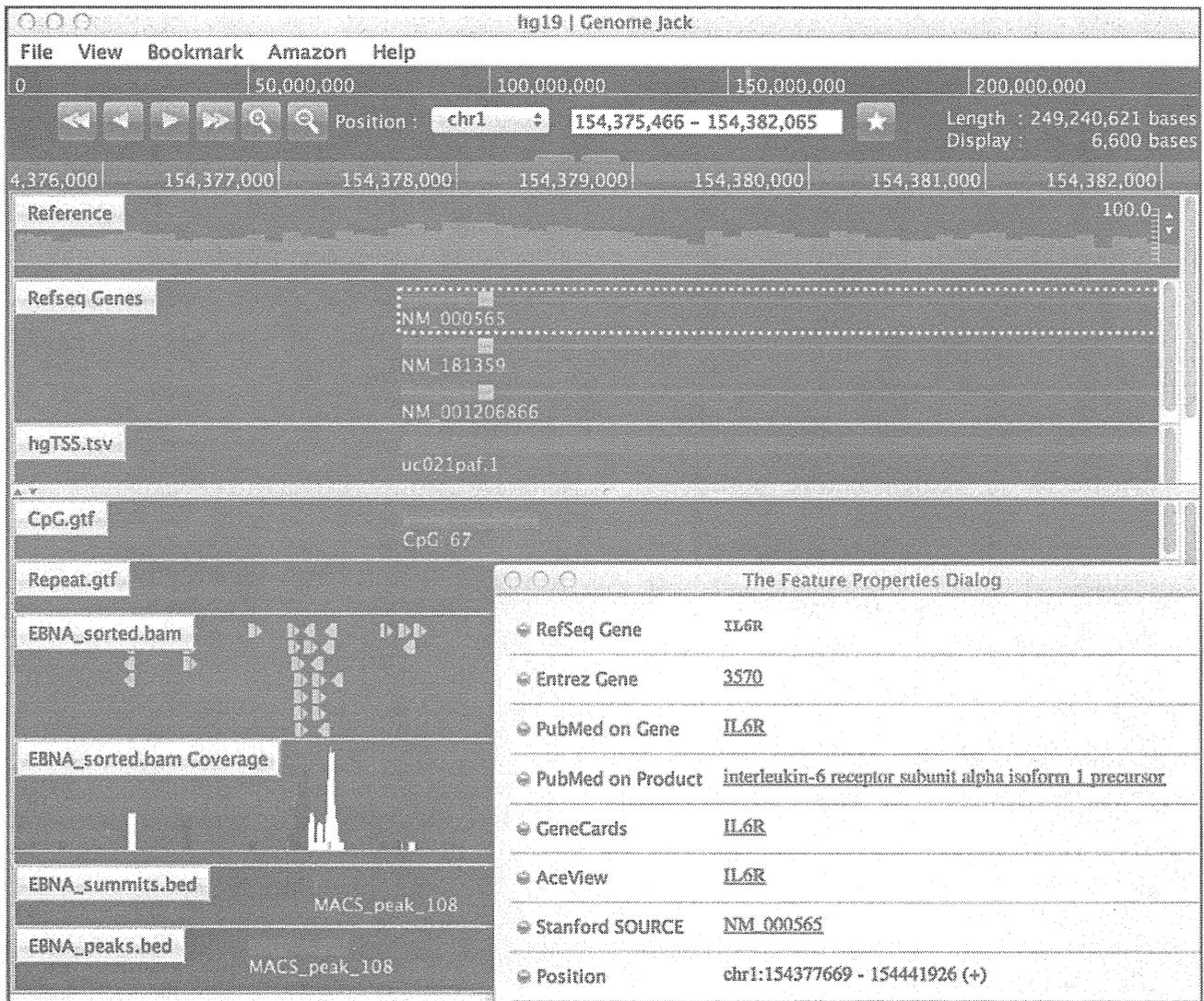


図 1. EBNA1-TG の GenomeJack 解析.

EBNA1 ChIP-Seq データに関して、Bowtie 0.12.7 を用いて hg19 にマッピング、MACS を用いて peak, summit を fold enrichment > 20, FDR ≤ 5% で検出、GenomeJack(三菱スペースソフト) 用いて、ゲノム上の位置を同定した。IL6R の解析例を示す。

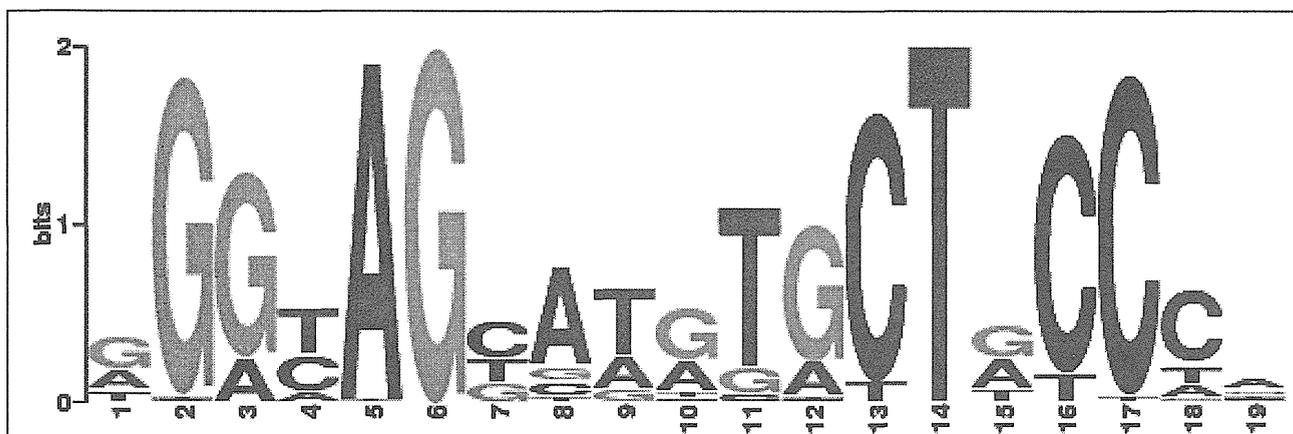


図 2. Meme-ChIP 解析.

FE が top 100 の EBNA1-TG の MEME-ChIP 解析では 5'[G/A]GG[T/C]AG[C/T/G]A[T/A][G/A]TGCT[G/A]CCC[A/G]3' (E-value = 3.4e-339) を EBNA1 結合部位の consensus sequence motif として同定出来た。

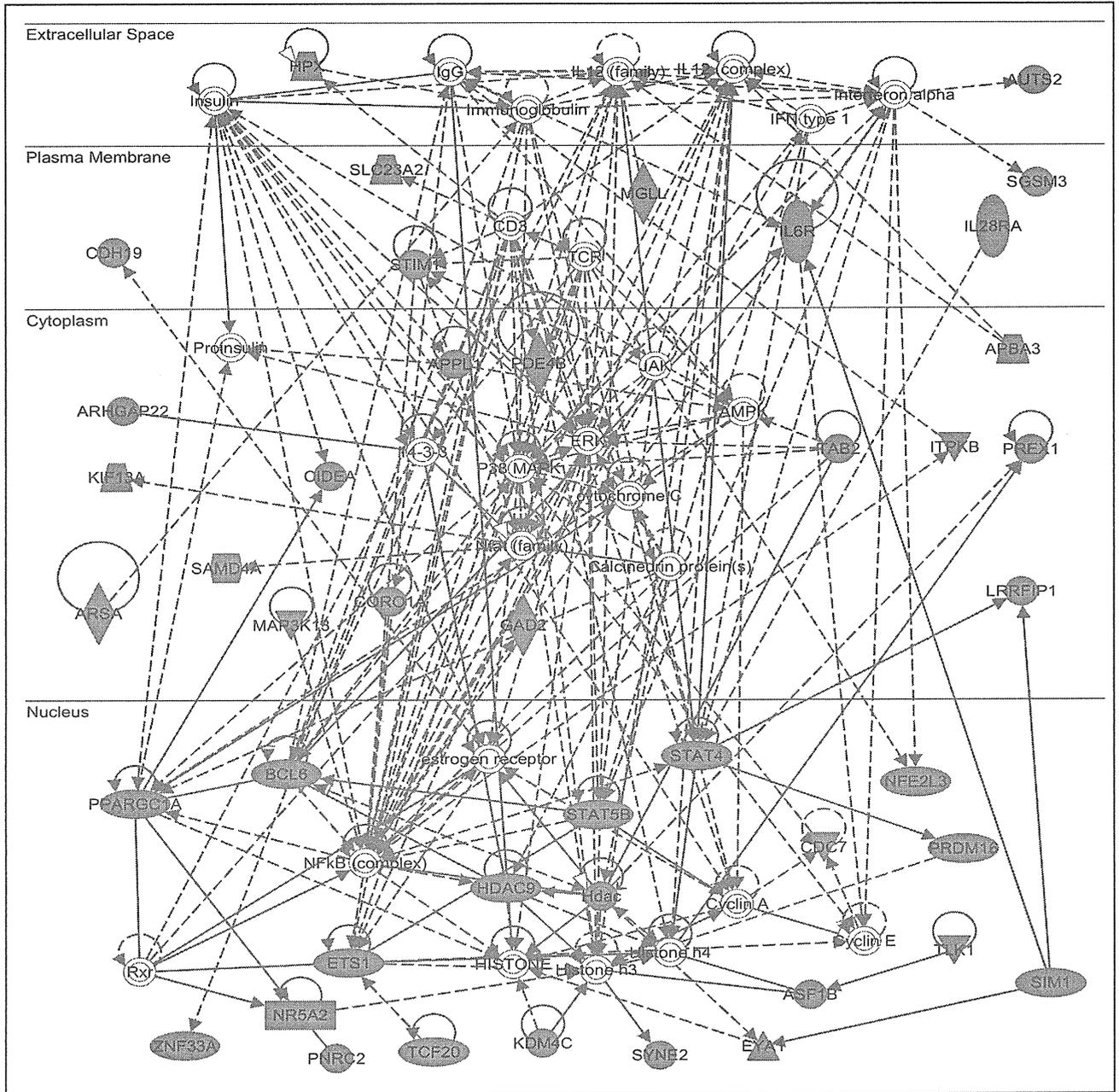


図 3. EBNA1-TG の IPA 分子ネットワーク。

228 EBNA1-TG を IPA に入力し core analysis を行った。Functional network としては “Nutritional Disease, Cell Death and Survival, Cellular Development” ($p = 1.00E-67$)との関連性を認めた。

多発性硬化症患者群の腸内細菌叢に関する研究

研究分担者 服部 正平 東京大学大学院新領域創成科学研究科 教授

研究要旨

多発性硬化症(Multiple sclerosis, MS)は慢性的な中枢神経系の脱髄疾患であり、欧米では非常に多く近年日本及びアジア諸国においても患者数が急増している。MSの原因としては遺伝的な要因と環境的な要因が知られており、T細胞に腸内細菌叢が影響を及ぼし様々な自己免疫性疾患に重要な役割をしていることが示唆されている。本研究では、環境要因としてのMS患者の腸内(糞便)細菌叢を解析し、これらMS群のデータと健常者腸内細菌叢データとの比較解析から、MS腸内細菌叢の特徴解明を行った。

A. 研究目的

本研究は、MS患者群の腸内細菌叢の菌種及び遺伝子組成を解析し、健常者群との比較によるMS腸内細菌叢の特徴及び本疾患におけるバイオマーカーあるいは発症に関わる細菌種・遺伝子・代謝系を解明し、MS発症と腸内細菌叢の関係を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

MS患者群及び成人健常者群の糞便から調製した腸内細菌叢DNAについて、次世代シーケンサー(ロシュ社454やライフテクノロジ社Ion PGM等)を用いて、16SリボソームRNA遺伝子(16S)及びメタゲノムデータを収集する。得られた16SデータのOTUクラスタリング及びデータベースへの類似度検索により、各細菌叢の菌種と菌種組成比を解明し、また、系統樹を作成する。さらに、MS群と健常者群間の上記16Sデータの比較解析により、MS群に有意に増減する菌種の特定等を行う。また、MS群と健常者群の系統樹の比較解析(UniFrac距離解析)により菌叢全体構造の両群間類似性を評価する。さらに、両群間のメタゲノムデータを比較することにより、両群間で有意に増減する遺伝子あるいは代謝系等の情報を得て、両群間の細菌叢機能の相違を評価する。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した腸内細菌叢検体については、研究代表者の機関等における生命倫理審査会の承認を得ている。

C. 研究結果

これまでに13名のMS被験者の糞便及び腸内細菌叢を採取した。これらの検体から454GSを用いて計93,000リードのハイクオリティな16Sデータを収集した。このOUTクラスタリングにより、計969のユニーク菌種を検出した。同様に、18名の成人健常者の腸内細菌叢からは1,396のユニーク菌種を検出した。これらの16Sデータをデータベースに相同検索し、Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteriaの4門が優占することが明らかになった。健常者群においても同様な結果が得られた。ついで、MS群-健常者群間のUniFrac距離解析を行い、両群の腸内細菌叢の全体構造が統計学的に有意に異なっていることを見いだした。とくに、菌種の存在量よりも菌種の有無が相対的に異なっていた。このほか、両群間で共通して有意に増減する10菌種以上の菌種を特定した。

D. 考察

炎症性腸疾患や肥満等の様々な疾患患者の腸内細菌叢は、健常者との比較において細菌叢構造の異常(dysbiosis)を示すことが知られている。本研究においては、次世代シーケンサーを用いたきわめて網羅性の高い解析法を用いて、MSの腸内細菌叢の健常者群との構

造比較を行った。UniFrac 距離解析は明らかな
両群間の違いを示し、また、両群間で特徴的
に増減する菌種を検出したことから、これら
菌種と MS との関連が示唆された。今後は、健
常者及び MS 患者の検体数を増やし、本結果の
有意差及び正確さを調べる必要がある。また、
メタゲノム解析から MS 腸内細菌叢の機能解明
を進める必要がある。

E. 結論

16S データの解析から、MS 腸内細菌叢は健常
者群との比較において、菌叢構造が有意に異
なっていることが分かった。つまり、MS 患者
群の腸内細菌叢は dysbiosis しており、腸内
細菌叢と MS との関連を示唆する解析結果が得
られた。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Kim SW 他 : Robustness of gut microbiota of
healthy adult in response to probiotic intervention
revealed by high-throughput pyrosequencing.
DNA Res., 20, 241-253 (2013).

2. 学会発表

金相完他 : 高速シーケンシングによる多発性
硬化症患者の腸内細菌叢解析. 日本分子生
物学会 第 36 回年会 ポスター発表 (2013 年
12 月 3 日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表(平成25年度)

書籍

	著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	出版社名	出版年
			書籍名	出版地	ページ
1	服部正平	ヒト腸内細菌研究の進歩	三宅幸子	先端医学社	2013
			炎症と免疫 21(6)	東京	472-479
2	服部正平	「体内の細菌が作るもう一つの世界マイクロバイオームの驚異」基礎の基礎	服部正平	秀潤社	2013
			細胞工学 32(11)	東京	1110-1114

研究成果の刊行に関する一覧表(平成25年度)

雑誌

	発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1	Chihara N, Aranami T, Oki S, Matsuoka T, Nakamura M, Kishida H, Yokoyama K, Kuroiwa Y, Hattori N, Okamoto T, Murata M, Toda T, Miyake S, Yamamura T	Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica.	PLOS one	8	e83036	2013
2	Ota, M., N. Sato, Y. Nakata, K. Ito, K. Kamiya, N. Maikusa, M. Ogawa, T. Okamoto, S. Obu, T. Noda, M. Araki, T. Yamamura, and H. Kunugi	Abnormalities of cerebral blood flow in multiple sclerosis: A pseudocontinuous arterial spin labeling MRI study.	Magn Reson Imaging	31	990-995	2013
3	Ben Raveney, Shinji Oki, Takashi Yamamura	Nuclear Receptor NR4A2 Orchestrates Th17 Cell-Mediated Autoimmune Inflammation via IL-21 Signalling.	PLOS one	8	e56595	2013
4	Di Penta A, Chiba A, Alloza I, Wyssenbach A, Yamamura T, Villoslada P, Miyake S, Vandenbroeck K.	A trifluoromethyl analogue of celecoxib exerts beneficial effects in neuroinflammation.	PLOS one	8	e83119	2013
5	Kim SW, Suda W, Kim S, Oshima K, Fukuda S, Ohno H, Morita H, and Hattori M	Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing.	DNA Res.	20(3)	241-253	2013
6	Satoh J, Tabunoki H.	Molecular network of ChIP-Seq-based vitamin D receptor target genes.	Multiple Sclerosis	19 (8)	1035-1045	2013
7	Satoh J, Tabunoki H, Ishida T, Saito Y, Konno H, Arima K.	Reactive astrocytes express the potassium channel Kir4.1 in active multiple sclerosis lesions.	Clinical and Experimental Neuroimmunology	4 (1)	19-28	2013
8	Satoh J.	Molecular network of ChIP-Seq-based NF-κB p65 target genes involves diverse immune functions relevant to the immunopathogenesis of multiple sclerosis.	Multiple Sclerosis and Related Disorders	3 (1)	94-106	2013
9	Satoh J, Kawana N, Yamamoto Y.	Molecular network of ChIP-Seq-based EBNA1-target cellular genes supports biological implications of EBV persistence in multiple sclerosis.	Clinical and Experimental Neuroimmunology	4 (2)	181-192	2013
10	Kawana N, Yamamoto Y, Ishida T, Saito Y, Konno H, Arima K, Satoh J.	Reactive astrocytes and perivascular macrophages express NLRP3 inflammasome in active demyelinating lesions of multiple sclerosis and necrotic lesions of neuromyelitis optica and cerebral infarction.	Clinical and Experimental Neuroimmunology	4 (3)	296-304	2013

11	Masakazu Nakamura, Takako Matsuoka, Norio Chihara, Sachiko Miyake, Wakiro Sato, Manabu Araki, Tomoko Okamoto, Youwei Lin, Masafumi Ogawa, Miho Murata, Toshimasa Aranami, and Takashi Yamamura	Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis	Mult Scler	2014 Feb 13 (Epub ahead of pprint)
12	Noto D, Sakuma H, Takahashi K, Saika R., Saga R., Yamada M, Yamamura T, Miyake S	Development of a culture system to induce microglia-like cells from haematopoietic cells.	Neuropathol Appl Neurobiol	Epub ahead of pprint 2013
13	Kamiya K, Sato N, Saito Y, Nakata Y, Ito K, Shigemoto Y, Ota M, Sasaki M, and Ohtomo K.	Accelerated myelination along fiber tracts in patients with hemimegalencephaly.	J Neuroradiology	2013 Sept(Epub ahead of pprint)
14	Araki M, Matsuoka T, Miyamoto K, Kusunoki S, Okamoto T, Murata M, Miyake S, Aranami T, Yamamura T.	Efficacy of the anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab in neruomyelitis optica:A pilot study.	Neurology	In press