

厚生労働科学研究費補助金
特定疾患対策研究事業

多発性硬化症に対するインターフェロン療法の
効果の発現及びその持続性に関する要因等の
解析に関する研究（H13—特疾—08）

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 山村 隆

平成 15 年（2003）3 月

目 次

I. 総括研究報告

多発性硬化症に対するインターフェロン療法の
効果の発現及びその持続性に関する要因等の
解析に関する研究

山村 隆 1 ~ 9

資料：班員共同執筆論文 10 ~ 34

Microarray analysis identifies IFN β -regulated
genes in MS

II. 分担研究報告

1. 再発寛解型多発性硬化症患者末梢血リンパ球に
おける IFN β -responsive genes(IRG) :
DNA microarray による解析

佐藤準一 35 ~ 40

2. インターフェロン治療導入のクリニカルパスと
バリエーション管理

川井 充 41 ~ 44

3. 多発性硬化症に対するインターフェロン療法の
効果の発現及びその持続性に関する要因などの
解析に関する研究

三宅幸子 45 ~ 48

4. 日本人多発性硬化症における $\beta 2$ adrenergic
receptor 遺伝子多型解析

菊地誠志 49 ~ 53

5. アミノ酸代謝阻害剤による実験的自己免疫性
脳脊髄炎の抑制及びインターフェロン β のもつ役割

横山和正 54 ~ 60

6. 免疫吸着療法は多発性硬化症の免疫異常を 調節し再発を抑制する 野村恭一	61 ~ 66
7. 多発性硬化症における脳委縮 太田宏平	67 ~ 71
8. 培養ヒト脳毛細血管由来内皮細胞に 発現する遺伝子の解析 神田 隆	72 ~ 77
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	78 ~ 83
IV. 研究成果の刊行物・別刷	84 ~ 158
V. 平成 14 年度班会議プログラム	159 ~ 177
VI. 構成員名簿	178

I .総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金 (特定疾患対策研究事業)
総括研究報告書

多発性硬化症に対するインターフェロン療法の効果の発現及びその持続性に関する
要因等の解析に関する研究

主任研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所 疾病研究第六部長

研究要旨 本研究班は、多発性硬化症(MS)患者に対するインターフェロン・ベータ(IFN-β)療法の効果発現機序を明らかにし、個人差まで考慮したきめ細かい医療(テーラーメイド医療)の確立に役立てることを目標として組織された。本年度は、当初の計画に沿って試料収集、解析、情報収集を進め、まず IFN-β療法によって発現レベルが有意に変動する遺伝子を DNA マイクロアレイで複数同定することに成功した。これらの IFN 応答遺伝子群 (IFN-responsive genes; IRG) は、MS の IFN-β療法反応性を規定する重要なマーカーとなる可能性が高く、IFN-β療法に対するレスポonder、ノン・レスポonder解析を進める上で鍵となる遺伝子を含む。IRG には、IFN-β産生における正の制御転写因子 IRF-7 や抗原提示機構の主要構成因子である IFI30 や TAP1、抗炎症作用を持つ TSG-6 が含まれていたが、Th1 や Th2 に関連するサイトカインやケモカインの遺伝子については、IFN-β療法による有意な変動はなかった。この他にも、IFN-βの作用機構について、これまでの説を覆すような事実が複数浮かび上がってきた。

分担研究者名

佐藤 準一
国立精神・神経センター神経研究所
免疫研究部 室長

川井 充
国立精神・神経センター武蔵病院
神経内科 部長

三宅 幸子
国立精神・神経センター神経研究所
免疫研究部 室長

菊地 誠志
北海道大学医学部神経内科 助手

横山 和正
順天堂大学医学部脳神経内科 助手

野村 恭一
埼玉医科大学神経内科助教授

太田 宏平
東京理科大学理学部教授

神田 隆
東京医科歯科大学神経内科助教授

研究協力者

古池 史子
国立精神・神経センター神経研究所
免疫研究部

深澤 俊行
北祐会病院神経内科

大橋 高志
公立昭和病院 神経内科

A. 研究目的と序文

多発性硬化症 (MS) は、再発と寛解を繰り返す自己免疫病とされているが、実際は複雑な遺伝子背景や外因を基礎とする自己免疫症候群と考えられている。例えば、標的自己抗原一つをとってみても、患者ごとに異なる可能性が強く、病変分布についても脳病変が主体のもの、そうでないものなどがある。このような免疫学的あるいは病理学的な多様性は、MS 病態が個人ごとに相当異なること、治療反応性も均一ではないことを意味する。事実、欧米やわが国におけるインターフェロン・ベータ (IFN- β) 療法の治療成績を見ると、IFN- β 療法がきわめて有効であったと考えられる患者群と、そうではない群に分かれることが、容易に見て取れる。

IFN- β は MS の再発回数を減少させ長期予後を改善することが証明された治療薬で、現在世界中で使用されている。その効果に限界はあるものの、科学的根拠のある治療薬として、今後相当長期にわたってわが国の MS 臨床において中心的な薬剤となることが想定される。医療費のコストや副作用などを考慮すると、IFN- β の作用発現機序を科学的に検証し、治療反応性を予測する方法を開発し、臨床現場で活用できるような治療指針を作成することは、厚生労働科学の研究課題として適切であり、時宜にかなっていると考えられる。

本研究班では、多施設共同研究により、IFN- β 療法によってその発現が変動する遺伝子を同定し、得られた情報を MS の臨床や基礎研究に還元することを一義として研究を進めた。方法論としては、cDNA マイクロアレイによるリンパ球遺伝子発現解析を中核に据えた。最終的な目標は、IFN- β の治療反応性を予測する方法の開発であるが、研究を進める過程において多くの副産物が得られた。詳細

については、班員共同執筆による英語論文 (Microarray analysis identifies IFN β -regulated genes in MS; 資料として添付) を参照されたい。

また、分担研究者は班研究に協力するだけでなく、MS の医療水準を向上させるために、個々の研究テーマを設定して研究を進めている。川井班員は、国立精神・神経センター武蔵病院における IFN- β 療法導入の進め方を紹介し、クリニカル・パスとバリエーションに関する研究を進めた。症例数の少ない病院で IFN- β 療法を導入する際の参考になる有用な情報が提供されている。三宅班員は、Gene chip と cDNA マイクロアレイの比較検討を行い、それぞれの利点と欠点をまとめた。その他の分担研究については、分担研究報告書を参照にしていたきたい。

A. 研究方法

Poser の診断基準を満たす 13 例の再発寛解型 clinically definite MS (EDSS 2.7 \pm 1.7) で、インフォームド・コンセントを取得後に、IFN- β (Betaferon 800 MIU、皮下、隔日投与) の開始前 (Pre)、投与後 3 ヶ月 (3 mo)、6 ヶ月 (6 mo) に末梢血を採取し、Ficoll-Paque でリンパ球 (PBMC) を得た。MACS cell separator で CD3+ T 細胞分画、および CD3- 非 T 細胞分画を分離し、おのおのより total RNA を抽出、増幅し、蛍光色素 Cy5 でラベルした。また健常者 3 名の T および非 T 細胞分画より同様に RNA を増幅。蛍光色素 Cy3 でラベルして、これを universal reference として用いた。1,263 cDNA microarray (Hitachi Life Science) を、同量の Cy3、Cy5 ラベル cDNA で競合的ハイブリダイゼーションを行い、シグナルを Scan Array 5000 scanner (GSI Lumonics) で検出し、データを Quant Array software (GSI

Lunomics)で定量的に解析した。Gene expression level (GEL)= the signal intensity of the MS sample/the signal intensity of universal reference と Gene regulation index (GRI)=GEL at 3 mo or at 6 mo/GEL at Pre を算出し、Cyber-T (regularized t) test で有意な変動を示した遺伝子群を同定した。

B. 研究結果

詳細については佐藤班員の分担研究報告書および添付資料の班員共同執筆論文 (**Microarray analysis identifies IFN β -regulated genes in MS**) に記載した。要点は、1) 解析した 1,263 遺伝子のうち 21 遺伝子について、IFN- β 治療に伴う有意な変動を見た。2) うち 16 遺伝子は IFN- β 治療で発現が亢進し、5 遺伝子が発現が低下した。3) 発現亢進が認められた 16 遺伝子のうち 9 遺伝子は、IFN-responsive promoter elements (IFN-stimulated response element または IFN-regulatory factor-element と呼称)を含む、既知の IRG であった。またその他の 5 遺伝子についても、IFN 応答性がこれまでに報告されているものであった。4) Th1 や Th2 偏倚に関連した遺伝子は、IFN- β 治療にともなって有意な変動を示さなかった。

D. 考察

今回の検討により、IFN- β 治療によって有意に発現変動を示した遺伝子の大多数は、interferon-responsive element を持つ遺伝子であることが、はじめて明らかになった。この結果は、班研究で用いた cDNA マイクロアレイ解析の信頼性を保証するとともに、IFN- β 治療反応性を決定する重要な遺伝子の特徴

(interferon-responsive element を持つ)を明らかにしたものと考えられよう。

IFN- β 治療で変動した 21 遺伝子の中

で、治療効果を反映することがほぼ明らかに変化としては、TNFAIP6 の誘導 (抗炎症作用)、IL-3 の低下、MIG の低下、SLC7A1 の低下などである。その他の遺伝子発現変動の意義は明らかでないが、今後 MS の治療標的となる可能性のある分子と考えられ、きわめて貴重な情報が得られたものと理解している。

古くから支持されているドグマとして、IFN- β 治療は Th2 偏倚を誘導するという説がある。しかし、我々の解析結果は、この仮説を支持しない。もし Th2 偏倚が誘導されるとしても、限られた自己反応性 T 細胞について見られる現象であり、免疫系全般を Th2 に偏倚させるものではないと考えられる。

E. 結論

IFN- β 治療によって発現レベルの変動する遺伝子の大部分は、プロモーター領域に interferon responsive element を持つ IRG であった。これらの遺伝子に解析を絞ることで、IFN- β 治療に反応する患者を隔日に同定することが可能になるかもしれない。副産物として、自己免疫性炎症の新しい治療標的を多数同定することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

英文原著

Miyamoto K, Oka N, Kawasaki T, Miyake S, Yamamura T, and Akiguchi I: New cyclooxygenase-2 inhibitors for treatment of experimental autoimmune neuritis. **Muscle and Nerve** 25 : 280-282, 2002.

Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, and Brenner MB: Functionally

distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* 195: 625-636, 2002

Kondo T, Takahashi K, Kohara N, Takahashi Y, Hayashi S, Takahashi H, Matsuo H, Yamazaki M, Inoue K, Miyamoto K, and Yamamura T: Heterogeneity of presenile dementia with bone cysts (Nasu-Hakola disease): Three genetic forms. *Neurology* 59: 1105-1107, 2002

Araki M, Kondo T, Gumperz JE, Brenner MB, Miyake S and Yamamura T: Th2 bias of CD4⁺ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int. Immunol.* 15: 279-288, 2003

Sakami S, Nakata A, Yamamura T, and Kawamura N: Stressors increase in vitro T cell apoptosis in humans. *Neuroimmunomodulation* 10:224-231 (2002-2003)

Miyamoto K, Miyake S, Schachner M, and Yamamura T: Heterozygous null mutation of myelin P0 protein enhances susceptibility to autoimmune neuritis targeting P0 peptide. *Eur. J. Immunol.* 33: 656-665, 2003

Watabe K, Sakamoto T, Kawazoe Y, Michikawa M, Miyamoto K, Yamamura T, Saya H and Araki N: Tissue culture methods to study neurological disorders: Establishment of immortalized Schwann cells from murine disease models. *Neuropathology* (in press)

Chiba A, Miyamoto K, Hashimoto H, Yamamura T, and Miyake S: Natural killer T-cell activation by OCH, a sphingosine truncated analogue of α -galactosylceramide, prevents collagen-induced arthritis. (submitted)

Takahashi K, Miyake S, Endoh M and Yamamura T: The regulatory role for natural killer cells in the "smouldering" state of multiple sclerosis. (submitted)

Bedoui S, Miyake S, Miyamoto K, Oki S, Kawamura N, Beck-Sickinger A, von Horsten S, and Yamamura T: Neuropeptide Y suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: Y1 receptor-specific induction of a TH2 shift in vivo. (submitted)

英文総説

Bedoui S, Kawamura N, Straub RH, Pabst R, Yamamura T, and von Horsten S: Review. Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. *J. Neuroimmunol.* 134: 1-11, 2003

Yamamura T, K. Miyamoto, Zs. Illes, E. Pal, M. Araki, and S. Miyake: Synthetic glycolipids as potential therapeutics for autoimmune disease. *Curr. Topics. Medic. Chem.* (in press)

和文原著

宮本勝一、三宅幸子、水野美歩、岡伸幸、山村 隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎

(EAE) の治療における選択的 COX-2 阻害剤の効果. 神経免疫学 10:106-107, 2002

林 幼偉、三宅幸子、山村 隆 :
CD4⁺CD25⁺T 細胞による実験的自免疫性脳脊髄炎(EAE)の調節. 神経免疫学 10: 108-109, 2002

山村 隆 : シンポジウム「日本における多発性硬化症の多様性とその病態」動物モデルからの提言. 臨床神経学 (印刷中)

宮本勝一、三宅幸子、水野美歩、岡伸幸、山村 隆 : 実験的自免疫性脳脊髄炎 (EAE) の治療における選択的 COX-2 阻害剤の効果. 神経免疫学 10:251-254, 2002

和文総説

三宅幸子、山村 隆 : NKT 細胞と実験的自免疫性脳脊髄炎. 免疫病研究の最先端. 分子制御というアプローチ. Mebio 19:61-67, 2002

荒木 学、高橋 和也、山村 隆 : 多発性硬化症における NK 細胞、NKT 細胞の関与. 神経内科 56:312-318, 2002

山村 隆 : NKT 細胞と新しい自己免疫病治療薬. Medical Science Digest 28:306-307, 2002

宮本勝一、三宅幸子、山村 隆 : 糖脂質による自己免疫病の制御. 感染・炎症・免疫 32 : 200-201, 2002

山村 隆、宮本勝一、長山成美、三宅幸子 : NK・NKT 細胞による実験的自免疫性脳脊髄炎 (EAE) の発症制御. 蛋白質核酸酵素増刊号「免疫研究の最前線 :

高次複雑系免疫システムの包括的理解をめざして」47: 1115-1120, 2002

宮本 勝一、三宅 幸子、山村 隆 : 自己免疫性脳脊髄炎に対する NKT 細胞糖脂質リガンド療法. 神経免疫学 10:209-211, 2002

佐藤 準一、山村 隆 : 多発性硬化症におけるインターフェロンベータ療法の効果発現機序. 医療 (印刷中)

山村 隆 : NKT 細胞による自己免疫疾患の制御. Molecular Medicine 40 2003 (印刷中)

長山 成美、山村 隆 : 抗コレステロール薬による Th2 優位の誘導 (MS の治療への応用は可能か?). 臨床免疫 (印刷中)

2. 学会発表

国際学会発表
招待講演

Yamamura T: Autoimmune encephalomyelitis and natural killer T (NKT) cells. Special lecture. The 6th Annual Meeting of Taiwan Child Neurology Society. Taipei, May 18, 2002

Araki M, Kondo T, and Yamamura T: Th2 bias of CD4⁺ NKT cells in multiple sclerosis. Concurrent Thematic Symposium II. Innate Immunity. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2nd Annual Meeting. San Francisco, June 29, 2002

Yamamura T, Araki M, and Miyake S: OCH, an altered glycolipid ligand of α -

GalCer, induces Th2 bias of rodent and human NKT cells: The implication for treatment of human autoimmune disease. 2nd International Workshop on CD1 antigen presentation & NK T cells. **Woods Hole, USA, Nov 8, 2002**

Yamamura T: The involvement of NK and NKT cells in multiple sclerosis. COE International Symposium. Neuroimmunology: Recent advances in Basic and Clinical Research. Nagasaki, March 12, 2003

Yamamura T: P0+/- mutation enhances susceptibility to P0-induced autoimmune neuritis owing to a defect in central tolerance. Unzen Workshop on Immunoregulation and Autoimmunity. Unzen, Nagasaki, March 15, 2003

海外学会発表 (一般)

Miyamoto K, Miyake S, and Yamamura T: Prevention of autoimmune ecephalomyelitis by a novel glycolipid ligand for natural killer T cells. Experimental Biology 2002, New Orleans, Louisiana, April 23, 2002

Koike F, Kondo T, Fukazawa T, and Yamamura T: Immunomodulatory effects of interferon (IFN)- β 1b. cDNA microarray analysis of peripheral blood T and non-T cells. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2nd Annual Meeting. San Francisco, June 30, 2002

Chiba A, Yamamura T, Miyamoto K, and Miyake S: A new synthetic

glycolipid OCH prevents collagen-induced arthritis by inducing Th2 bias of natural killer (NK) T cells. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2nd Annual Meeting. San Francisco, June 30, 2002

Araki M, Kondo T, and Yamamura T: Th2 bias of CD4+ NKT cells in multiple sclerosis. FOCIS (Federation of Clinical Immunology Societies) 2nd Annual Meeting. San Francisco, June 30, 2002

Miyake S, Chiba A, Mizuno M, and Yamamura T: A synthetic glycolipid OCH prevents collagen induced arthritis and diabetes in NOD mouse by inducing Th2 bias of NKT cells. CD1 & NK T cell Workshop. 2nd International Workshop on CD1 antigen presentation and NK T cells. Woods Hole, MA, USA, Nov 6, 2002

Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Cardell S, Kronenberg M, and Herrmann T: Investigation on CD1d restricted rat T cells. CD1 & NK T cell Workshop. 2nd International Workshop on CD1 antigen presentation and NK T cells. Woods Hole, MA, USA, Nov 7, 2002

Bedoui S, Miyake S, Miyamoto K, Oki S, Beck-Sickinger AG, von Hoersten S, and Yamamura T: NPY suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: induction of a Th2 shift in vivo. The 60th Anniversary meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. Denver, USA, Mar 11, 2003

国内学会講演
招待講演

山村 隆：シンポジウム「日本における多発性硬化症の多様性とその病態」動物モデルからの病態への提言. 第 43 回日本神経学会総会. 2002 年 5 月 31 日、札幌

山村 隆：変異リガンドによる NKT 細胞の偏倚活性化と自己免疫疾患制御. シンポジウム「炎症・免疫とその制御」第 23 回日本炎症・再生医学会. 2002 年 7 月 3 日、東京

Yamamura T: The involvement of NK and NKT cells in multiple sclerosis. COE International Symposium. Neuroimmunology: Recent advances in Basic and Clinical Research. Nagasaki, March 12, 2003

国内学会（一般）

三宅幸子、宮本勝一、千葉麻子、山村 隆：NK・NKT 細胞による自己免疫疾患の特異的制御法の研究. 日本リウマチ学会総会、神戸、2002 年 4 月 23 日

千葉麻子、橋本博史、山中健次郎、山村 隆、三宅幸子：抗 CD3+抗 CD28 抗体刺激による SLE 患者末梢血 T リンパ球のシグナル伝達異常. 日本リウマチ学会総会、神戸、2002 年 4 月 24 日

荒木 学、近藤誉之、山村 隆：多発性硬化症における NKT 細胞減少と CD4+NKT 細胞 Th2 偏倚の意義. 第 43 回日本神経学会総会. 札幌、2002 年 5 月 29 日

高橋和也、田平 武、山村 隆：多発性硬化症（MS）患者末梢血中 natural killer (NK)細胞の apoptosis 感受性亢進. 第 43 回日本神経学会総会. 札幌、

2002 年 5 月 29 日

宮本勝一、三宅幸子、山村 隆：新たな糖脂質による多発性硬化症モデルの治療. 第 43 回日本神経学会総会. 札幌、2002 年 5 月 29 日

Watabe K, Sakamoto T, Kawazoe Y, Shen J-S, Ohashi T, Eto Y, Michikawa M, Yanagisawa K, Miyamoto K, Yamamura T, Araki N: Establishment and characterization of immortalized Schwann cells from murine disease models. 日本神経化学会、札幌、7 月 17-19 日

佐藤 準一、雪竹 基弘、黒原 和博、高島 洋、黒田 康夫、山村 隆：ドパミンニューロン分化制御転写因子 Nurr1 により発現誘導される遺伝子群の解析. 第 25 回日本神経科学大会. 東京、2002 年 7 月 9 日

千葉 麻子、高橋 和也、阿部 香織、橋本 博史、山中健次郎、山村 隆、三宅幸子：T 細胞受容体刺激による apoptosis の著明亢進を示す SLE 患者 T 細胞の解析. 第 30 回日本臨床免疫学会. 東京、2002 年 12 月 3 日

林 幼偉、三宅 幸子、山村 隆：CD4+CD25+ T 細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の調節. 第 30 回日本臨床免疫学会. 東京、2002 年 12 月 4 日

荒木 学、三宅 幸子、山村 隆：多発性硬化症における NKT 細胞減少は長期ステロイド治療により補正される. 第 30 回日本臨床免疫学会. 東京、2002 年 12 月 4 日

三宅 幸子、千葉 麻子、山村 隆：NKT

細胞合成糖脂質リガンド OCH による自己免疫弛緩治療法の開発. 第 30 回日本臨床免疫学会. 東京、2002 年 12 月 4 日

Jiang, X, Kuroiwa, K Miyake S, Yamamura T, Ohkochi N, Taniguchi M, and Seino K: Effect of glycolipid ligands for NKT cells in allogenic transplant rejection. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会. 東京、2002 年 12 月 4 日

古池 史子、佐藤 準一、近藤 誉之、山村 隆：多発性硬化症患者末梢血 T、non-T 細胞で IFN β 治療後に発現変動を示す遺伝子群の解析. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会. 東京、2002 年 12 月 4 日

Bedoui S, Miyake S, Miyamoto K, von Horsten S, Beck-Sickinger A, and Yamamura T. Evidence for a regulatory role of Neuropeptide Y in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. 第 32 回 日本免疫学会総会・学術集会. 東京、2002 年 12 月 4 日

中井 之人、岩渕 和也、藤井 聡、石森 直樹、綿野 敬子、三島 鉄也、中山 俊憲、谷口 克、Luc van Kaer、三宅 幸子、山村 隆、小野江 和則： α -GalCer および OCH による NKT 細胞の活性化はいずれも動脈硬化促進性に寄与する. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会. 東京、2002 年 12 月 5 日

千葉 麻子、山村 隆、三宅 幸子：NKT 細胞合成糖脂質リガンド OCH によるコラーゲン関節炎の抑制. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会. 東京、2002 年 12 月 6 日

酒見正太郎、中田光紀、山村 隆、川村 則行：心理的ストレスによるヒトの末梢 Tリンパ球の in vitro アポトーシスの増加. 第 15 回日本神経免疫学会学術集会. 長崎、2003 年 3 月 12-14 日

佐藤 準一、雪竹基弘、黒原和博、高島 洋、黒田 康夫、山村 隆：MS における髄液 14-3-3 蛋白質の検出：予後の指標. 第 15 回日本神経免疫学会学術集会. 長崎、2003 年 3 月 12-14 日

荒木 学、三宅 幸子、山村 隆：新規糖脂質 OCH リガンドによる多発性硬化症治療の可能性. ヒト NKT 細胞クローンによる解析. 第 15 回日本神経免疫学会学術集会. 長崎、2003 年 3 月 12-14 日

林 幼偉、宮本勝一、三宅幸子、橋本修治、山村 隆：P0(+/-)ヘテロミュータントマウスと類似のヒトの遺伝子疾患の検討. 第 15 回日本神経免疫学会学術集会. 長崎、2003 年 3 月 12-14 日

その他口頭発表

Yamamura T: Regulation of autoimmune encephalomyelitis by NK and NKT cells. Seminar. Department of Pediatrics, National Taiwan University Hospital, Taipei, May 20, 2002

Yamamura T: The role of NK and NKT cells in multiple sclerosis. Neuroimmunology Seminar Series at Center for Neurologic Diseases. Harvard Medical School. Nov 5, 2002. (Host: Vijay K. Kuchroo).

Yamamura T: The role of NKT cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis.

Seminar at European Neuroscience
Institute Goettingen, Goettingen,
Germany, Jan 16, 2003 (Gastgeber:
Harald Neumann)

Yamamura T: The role of NK and
NKT cells in experimental
autoimmune encephalomyelitis and
multiple sclerosis . Medizinische
Hochschule Hannover Akademischer
Abend. Immunologisches
Kolloquium, Hannover, Germany,
Jan 21, 2003 (Gastgeber: Dr. S. von
Hoersten)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

(申請中案件)

新規な糖脂質及びこれを有効成分とする
自己免疫疾患治療薬；出願番号特願
2001-247055；出願人株式会社ジェノ
ックス創薬研究所；発明者 山村 隆、
三宅 幸子

PCT 国際出願 新規な糖脂質及びこれ
を有効成分とする自己免疫疾患治療薬；
国際出願番号 PCT/JP02/08280；出
願人株式会社ジェノックス創薬研究所；
発明者 山村 隆、三宅 幸子

糖脂質誘導体及びその製造法並びにそれ
らの合成中間体及びその製造法；出願番
号特願 2003-037397；出願人 第一サ
ントリーファーマ株式会社、国立精神・
神経センター総長 高橋 清久；発明者
山村 隆 他

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

資 料

Microarray analysis identifies IFN β -regulated genes in MS

Fumiko Koike^a, Jun-ichi Satoh^a, Takayuki Kondo^a, Sachiko Miyake^a, Toshiyuki Yamamoto^b, Mitsuru Kawai^b, Seiji Kikuchi^c, Kyouichi Nomura^d, Kazumasa Yokoyama^e, Kohei Ota^f, Takashi Kanda^g, Toshiyuki Fukazawa^h, Takashi Yamamura^{a,*}

^aDepartment of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan; ^bNational Center Hospital for Mental, Nervous and Muscular Disorders, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan; ^cDepartment of Neurology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Kita-15 Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan; ^dDepartment of Neurology, Saitama Medical School, 38 Morohongo, Moroyamachou, Saitama 350-0495, Japan; ^eDepartment of Neurology, Juntendo University School of Medicine, Hongo 2-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113-841, Japan; ^fDepartment of Neurology, Tokyo Women's Medical University, 8-1 Kawadachou, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8666, Japan; ^gDepartment of Neurology, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan; ^hHokuyukai Neurology Hospital, Niju-Yon-Ken 2-2-4-30, Nishi-ku, Sapporo 063-0802, Japan

*Corresponding author. Tel.: +81-42-341-2711; fax: +81-42-346-1753.

E-mail address: yamamura@ncnp.go.jp (T. Yamamura).

Abstract

Objective: To identify the genes regulated by interferon-beta (IFN β) [IFN β -regulated genes (IRGs)] in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) patients following treatment with IFN β . **Background:** Although IFN β is an approved drug for the treatment of MS, the molecular mechanisms for the therapeutic effects remain to be characterized. IRG-encoding proteins would chiefly mediate the biological activities of IFN β . **Methods:** By using a cDNA microarray containing 1,263 genes of various functional classes, the gene expression profile was studied in CD3⁺ T cells and CD3⁻ non-T cells separated from PBMC of 13 Japanese RRMS patients before treatment with IFN β 1b and at 3 and 6 months after starting the treatment. **Results:** IFN β treatment significantly altered expression of 21 genes in the T or non-T cell samples, including 9 with IFN-responsive promoter elements. These genes did not contain the markers characteristic for the T helper type 1 (Th1) or Th2 cells. Interestingly, up-regulation of the genes for an anti-inflammatory protein or down-regulation of the genes involved in the formation of inflammatory demyelination have been observed. **Conclusion:** Microarray analysis identified a battery of known and heretofore unreported IRGs in T cells and non-T cells of MS patients. The IRGs may represent validated research targets for understanding the *in vivo* effects of IFN β .

Keywords: Interferon beta; Interferon beta-regulated genes; Microarray; Multiple sclerosis

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) white matter. Although the cause for MS remains elusive, immunological studies have showed evidence that MS is an autoimmune disease mediated by T-lymphocytes secreting proinflammatory T helper type 1 (Th1) cytokines (Compston and Coles, 2002; Keegan et al., 2002). A previous study showed that administration of interferon (IFN) γ induced acute relapses along with activation of the systemic immune response (Panitchi et al., 1987). Because IFN γ is a Th1 cytokine promoting the inflammation process, the exacerbation of MS triggered by IFN γ could now be interpreted as evidence for the major role of Th1 cells in MS. Although IFN γ showed detrimental effects on MS, IFN β , an approved drug for MS, significantly reduces the frequency of clinical exacerbations in relapsing-remitting MS (RRMS), and delays the progression of disability in secondary progressive MS (SPMS), associated with a reduction in the number of new brain lesions on MRI (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993; Paty et al., 1993; Jacobs et al., 1996).

IFNs are a family of cytokines that mediate anti-viral, anti-proliferative and immunoregulatory activities (De Maeyer and De Maeyer-Guignard, 1994). IFN α and β (type I IFNs), whose recombinant forms are now being used in the clinic, are produced principally by virus-infected host cells, whereas IFN γ (type II IFN) is produced by activated T cells and natural killer (NK) cells. Both type I and type II IFNs regulate the transcription of IFN-stimulated genes (ISGs) or IFN-repressed genes, which encode the proteins responsible for the biological activities of IFNs. Here we use the term IFN β -regulated genes (IRGs) in this paper for covering both IFN β -stimulated and IFN β -repressed genes. Type I IFNs activate JAK protein tyrosine kinases associated with the cell surface receptors for IFNs, leading to formation of the complex of signal transducer and activator of transcription (STAT) molecules with the IFN regulatory factor (IRF) family of transcription factors (Darnell et al., 1994; Mamane et al., 1999; Taniguchi and Takaoka, 2002). The STAT/IRF complex translocates into the nucleus of the cells and binds to the DNA sequences termed the IFN-stimulated response element (ISRE) or the IRF-recognition element. This binding subsequently activates transcription of a variety of ISGs as well as the genes of type I and type II IFNs, leading to the biological responses triggered by the IFNs. In contrast, much less is clear about the mechanism for regulation of IFN-repressed genes by IFNs (Der et al., 1998).

Although the precise mechanisms underlying the beneficial effects of IFN β on MS remain to be fully elucidated, previous studies proposed possible mechanisms, including a shift of the T cell cytokine profile towards an anti-inflammatory Th2 phenotype (Hall et al., 1997; Karp et al., 2000), a restoration of the function of the disrupted blood-brain barrier (BBB) (Stone et al., 1995; Yong et al., 1998), and an inhibition of IFN γ -induced expression of class II major histocompatibility complex (MHC) molecules on glial cells that might result in down-regulation of their antigen-presenting capacity (Sato et al., 1995; Jiang et al., 1995). These studies, however, do not exclude other mechanisms accounting for the disease-modulating potentials of IFN β .

DNA microarray technology is a novel approach that would allow us to systematically monitor the expression of a large number of genes (Greenberg, 2001; Staudt, 2001). Application of this technique has begun to give us new insights into the pathomechanism of MS. In fact, recent studies of active inflammatory lesions in the MS brains identified up-regulation of the genes whose role in MS has not been previously anticipated (Whitney et al., 2001; Chabas et al., 2001; Lock et al., 2002). With regard to IFN β therapy, microarray analysis has disclosed an elevation of the genes encoding Th1 cell markers such as IL-12 receptor β 2 chain and CCR5 in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) exposed to IFN β *in vitro* (Wandinger et al., 2001). The up-regulation of these Th1-associated markers was also confirmed in the PBMC obtained from patients with MS treated with IFN β . These observations suggest that the biological effects of IFN β in MS are not purely mediated by anti-inflammatory mechanisms such as a Th2 bias.

Here we investigated a comprehensive gene expression profile in CD3 $^+$ T cells and CD3 $^-$ non-T cells isolated from 13 patients with RRMS following a 6 month-treatment with IFN β 1b. Using a cDNA microarray containing 2,881 genes of various functional classes, we found that 21 genes had showed an increase or a decrease in expression. Of note, these IRGs contained the genes encoding an anti-inflammatory protein or those involved in the CNS demyelination. The present observations provide an intriguing possibility that the observed changes in the IRGs might contribute to the therapeutic effect of IFN β on MS.

2. Materials and Methods

2.1. The study population

The present study enrolled 13 Japanese, clinically definite RRMS patients diagnosed according to the established criteria (Poser et al., 1983). The subjects consisted of 9 women and 4 men, presenting with the mean age of 34.2 ± 10.9 years and the mean Expanded Disability Status Scale (EDSS) score of 2.7 ± 1.7 . All the patients exhibited more than two episodes of clinically evident relapse and remission, and showed at least one gadolinium-enhancing lesion on MRI, during one year before starting treatment with 800 MIU IFN β (Betaferon, Schering, Osaka, Japan) given subcutaneously on alternate days. The patients have not been treated with either corticosteroids or immunosuppressants during at least one month before IFN β treatment. Written informed consent was obtained from all the patients.

2.2. RNA isolation from T cell and non-T cell fraction

Thirty ml of heparinized blood was collected before starting IFN β treatment (designated Pre), and at 3 and 6 months after the treatment. PBMC were isolated from the blood by centrifugation on a Ficoll density gradient, labeled with anti-CD3 antibody-coated magnetic microbeads, and were separated by AutoMACS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) into a CD3⁺ T cell fraction and a CD3⁻ non-T cell fraction comprised of monocytes, B cells and NK cells. Total RNA was isolated from each fraction by using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Five μ g of purified RNA was *in vitro* amplified either once or twice within a linear range of the amplification according to the methods described previously (Phillips and Eberwine, 1996), and then the antisense RNA (aRNA) was processed for cDNA microarray analysis.

2.3. cDNA microarray analysis

The present study utilized the custom microarray containing duplicate spots of cDNA prepared by PCR of 1,263 sequence-known genes of various functional classes. The cDNAs were immobilized on a poly-L-lysine-coated slide glass (Hitachi Life Science, Kawagoe, Saitama, Japan). The complete gene list of the microarray is available upon request. aRNAs isolated from

MS patient lymphocytes were labeled with a fluorescent dye Cy3 by reverse transcriptase reaction. Pooled aRNA labeled with Cy5, amplified from RNA of T cell and non-T cell fractions of three healthy volunteers, were used as a universal reference to standardize the gene expression levels throughout the experiments. The arrays were hybridized at 62°C for 10 hours in the hybridization buffer containing equal amounts of Cy3- or Cy5-labeled cDNA, and they were then scanned by the ScanArray 5000 scanner (GSI Lumonics, Boston, MA). The data were analyzed by using the QuantArray software (GSI Lumonics). The average of signal intensities of duplicate spots was obtained after global normalization between Cy3 and Cy5 signals. The impact of inter-experiment variability was verified by analyzing a scatter plot (data not shown). The gene expression level (GEL) was calculated according to the formula: $GEL = \frac{\text{the signal intensity of the MS patient's sample}}{\text{the signal intensity of the universal reference}}$. The gene regulation index (GRI) was calculated according to the formula: $GRI = \frac{\text{GEL at 3 months or at 6 months after IFN}\beta \text{ treatment}}{\text{GEL at Pre}}$. The results were also expressed as box and whisker plots.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using Cyber-T software (www.genomics.uci.edu/software.html), a modified version of *t* test using the Bayesian inference of variance (Baldi and Long, 2001). The discernible increases or decreases which do not reach the levels of statistical significance were considered to indicate a trend of up-regulation or down-regulation.

2.5 Northern blot analysis

Unfractionated PBMC isolated from a healthy subject were suspended at 1×10^7 cells/ml in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 55 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. They were then incubated at 37°C for 4 to 24 hours in the medium supplemented with 100 ng/ml of recombinant human IFN β (PeproTec, London, UK), recombinant human IFN γ (PeproTec), or both in a 5%CO₂/95% air incubator, followed by processing for RNA preparation. Four μ g of total RNA was separated on a 1.5% agarose-6% formaldehyde gel and transferred onto a nylon membrane. After prehybridization, the membranes were hybridized at 54°C overnight with the DIG-labeled DNA

probe synthesized by the PCR DIG probe synthesis kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) using the following sense and antisense primer sets; for IRF7 (640 bp), 5'CGCTGGACGTGACCATCATGTACA3' and 5'TGCTCCAGCTCCATAAGGAAGCAC3'; for ISG15 (423 bp), 5'CAACGAATTCCAGGTGTCCCTGAG3' and 5'CGCAGATTCATG-AACACGGTGCTC3'; and for IFI6-16 (379 bp), 5'AAGGCGGTATCCGTTTTCTTGTGC3' and 5'CCTCATCCTCCTCACTATCGAGAT3'. The specific reaction was visualized on Kodak X-OMAT AR x-ray films by the DIG chemiluminescence detection kit (Roche Diagnostics).