総 説

特集：ヒト免疫疾患研究の新展開—From clinic to bench

多発性硬化症病変分子のネットワーク解析

佐藤 準一

Molecular Network Analysis of Multiple Sclerosis Brain Lesion Proteome

Jun-ichi SATOH

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

(Received April 4, 2010)

summary

A recent proteomics study of multiple sclerosis (MS) brain lesion-specific proteome profiling clearly revealed a pivotal role of coagulation cascade proteins in chronic active demyelination (Han MH et al. *Nature* **451**: 1076–1081, 2008). However, among thousands of proteins identified, nearly all of remaining proteins were left behind to be characterized in terms of their implications in MS brain lesion development. By the systems biology approach using four different pathway analysis tools of bioinformatics, we studied molecular networks and pathways of the proteome dataset of acute plaque (AP), chronic active plaque (CAP), and chronic plaque (CP). The database search on KEGG and PANTHER indicated the relevance of extracellular matrix (ECM)-mediated focal adhesion and integrin signaling to CAP and CP proteome. IPA identified the network constructed with a wide range of ECM components as one of the networks highly relevant to CAP proteome. KeyMolnet disclosed a central role of the complex interaction among diverse cytokine signaling pathways in brain lesion development at all disease stages, as well as a role of integrin signaling in CAP and CP. Although four distinct platforms produced diverse results, they commonly suggested a role of ECM and integrin signaling in development of chronic lesions of MS. These observations indicate that the selective blockade of the interaction between ECM and integrins would be a rational approach for designing inhibitors of chronic inflammatory demyelination in MS brain lesions.

Key words—KeyMolnet; molecular network; multiple sclerosis; proteome; systems biology

抄 録

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、様々な神経症状が再発を繰り返す難病である。MS では、自己反応性 Th1 細胞や Th17 細胞が血液脳関門を通過して脳や脊髄に浸潤し、マクローファージやミクログリアを活性化して、脱髄を惹起する。炎症が遷延化すると軸索傷害を来して不可逆的機能障害が残存する。現在まで、髄鞘や軸索の再生に有効な治療薬は開発されていない。最近、MS 脳病巣の網羅的プロテオーム解析データが報告された (Han MH et al. *Nature* **451**: 1076–1081, 2008)。Han らはステージを確認した病巣から laser microdissection で分離したサンプルを質量分析で解析して、4324 種類のタンパク質を同定した。彼らは慢性活動性脱髄巣 (chronic active plaque ; CAP) における血液凝固系の亢進を見出し、抗凝固薬を用いて MS 動物モデル自己免疫性脳脊髄炎の治療に成功した。しかしながら、凝固系以外の多く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ではない。われわれは、Han らのデータセットを分子ネットワーク解析ツール KEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnet を用いて再解析し、MS 脳病巣プロテオームの主要分子ネットワークを調べた。その結果、CAP における extracellular matrix (ECM)-integrin ネットワークの中心的役割を発見した。すなわちシステム生物学の観点からは、ECM-integrin シグナル伝達系は、MS における炎症性脱髄遷延化抑制のための創薬標的パスイェとなる可能性がある。

I. 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、様々な神経症状が再発を繰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 Th1 細胞や Th17 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、 $\text{TNF}\alpha$ などの proinflammatory mediator の産生を誘導し、脱髄を惹起すると考えられている¹⁾。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来して不可逆的機能障害が残存する。MS では、急性増悪期に intravenous methylprednisolone pulse (IVMP) を行い、寛解期に $\text{IFN}\beta$ の継続的投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。しかし $\text{IFN}\beta$ に対する nonresponder や副作用のため投与出来ない症例も存在する。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、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、このような不均一性 (heterogeneity) の存在も治療難航の一因となっている²⁾。現在まで、髄鞘や軸索の再生を促進する治療薬はなく、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 年に全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タンパク質の発現情報をルーチン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。このようなオミックス研究により、癌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された。さら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、テーラメード医療 (personalized medicine) の樹立に道が開かれた。またシステム生物学 (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の持つロバストネスの破綻に起因す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、オミックス解析に直結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⁾。

最近、MS 脳病巣の網羅的プロテオーム解析データが報告された⁵⁾。この研究では、種々のステージの MS 脳病巣から 4324 種類のタンパク質を同定した。彼らはその中から慢性活動性脱髄巣における血液凝固系の亢進を見出した。その所見に基づき、抗凝固薬を用いて、MS 動物モデルである自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomye-

litis ; EAE) の治療に成功し、膨大なプロテオミクスデータから新規創薬標的候補を同定出来た。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にされていない。われわれは彼らのデータセットを利用して、分子ネットワーク解析ツール KEGG, Panther, KeyMolnet, IPA を用いて再解析し、MS 脳病巣プロテオームの主要分子ネットワークを調べ、システム生物学の観点から創薬標的の探索を試みた⁶⁾。

II. MS 脳病巣の網羅的プロテオーム解析

2008 年、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、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解析した⁵⁾。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), 脱髄巣辺縁部に炎症が局限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 例の健常脳に関しても質量分析で解析した。その結果、AP から 1082, CAP から 1728, CP から 1514, 合計 4324 種類のタンパク質を同定した。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ステージ特異的なタンパク質を選び出し、AP 158, CAP 416, CP 236 種類のタンパク質データを公開した。彼らは PROTEOME-3D を用いてアノテーションを調べた結果、CAP において血液凝固系タンパク質 protein C inhibitor, tissue factor, thrombospondin 1, fibronectin 1, vitronectin の発現を認めた。この所見に基づいて、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 PLP139-151 ペプチド誘導性 SJL/J マウス EAE を治療した。どちらの抗凝固薬も、脾細胞やリンパ節細胞の増殖と IL-17 , $\text{TNF}\alpha$ 産生を抑制した。以上の結果より、血液凝固系タンパク質は新規創薬標的分子となることが明らかになった。しかしながらどのような経緯で、膨大なプロテオミクスデータから上記 5 種類のタンパク質を選出し、焦点を絞ったのかに関しては記載がない。また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にされていない。

III. MS 脳病巣プロテオームデータの分子ネットワーク解析

生体では、タンパク質は複雑なシステムを構築しているので、病態の解明には個々のタンパク質の機能解析のみならず、タンパク質が構築する分子ネットワークやパスウェイの同定も重要である。タンパク質間相互作用 (protein-protein interaction ; PPI) には、単純な直接的結合関係のみならず、活性化、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付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様々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調べる方法である。Web 上でフリーに利用出来る代表的な knowledgebase としては、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (www.kegg.jp)⁷⁾, the Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER) classification system (www.pantherdb.org)⁸⁾, Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) (string.embl.de)⁹⁾ などがある。特に KEGG と PANTHER は、curator と呼ばれる専門家によって精査された遺伝子や代謝物などの情報を統合しており、2010 年 4 月現在、KEGG PATHWAY には 352 reference pathways から構成される 104,520 パスウェイが登録されており、search objects in pathways ボックスに目的分子の KEGG ID を入力することにより、該当するパスウェイを検索出来る。PANTHER では reference set との比較により、類似性に関する統計学的有意差を多重検定で評価出来る。STRING では KEGG, HPRD, BIND, IntAct の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情報を収集している。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。どちらも専門家

が精選された文献を精読して、信頼性の高い分子間相互作用に関する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、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、検索法として選択出来る¹⁰⁾。

著者らは、Han らの MS 脳病巣 AP 158, CAP 416, CP 236 プロテオームデータ⁵⁾に該当する UniProt ID を、Entrez Gene ID および KEGG ID に変換して、KEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnet に入力し、それぞれのステージ特異的プロテオームデータを最も良く反映している分子ネットワークを同定した⁶⁾。ID 変換には UniProt (www.uniprot.org) と KEGG Identifiers を用いたが、DAVID Bioinformatics Resources (david.abcc.ncifcrf.gov)¹¹⁾ の Gene ID conversion ツールを利用しても、Entrez Gene ID への一括変換は容易に行える。なお DAVID はプロテオミクスデータのアノテーション解析の際にも非常に有用なツールである¹²⁾。

KEGG による解析では、CAP プロテオームと focal adhesion (hsa04510), cell communication (hsa01430), ECM-receptor interaction (hsa04512), CP プロテオームと focal adhesion (hsa04510) との関連性が示唆された。CAP プロテオームの focal adhesion (hsa04510) は、COL1A1, COL1A2, COL5A2, COL6A2, COL6A3, FN1, LAMA1, MYLK, SHC3, PPP1CA, PARVA, PRKCB1, MYL7, RAC3, SPP1, SRC, THBS1, VTN から構成され、CP プロテオームの focal adhesion (hsa04510) は、COL4A2, COL6A1, CRK, FYN, ITGA6, LAMB2, LAMC1, PIK3CA, ZYX から構成されていた。PANTHER による解析では、CAP プロテオームと inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway ($p=2.63E-03$), integrin signaling pathway ($p=3.55E-03$) (図 1), CP プロテオームと integrin signaling pathway ($p=4.33E-02$) との関連性が検出された。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

図1 PANTHER 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

MS 脳病巣 CAP プロテオームの PANTHER による解析では、integrin signaling pathway との関連性が示唆された ($p=3.55E-03$)。Reference pathway 上の分子とヒットしたタンパク質を濃いシャドウで示す。Focal adhesion kinase (FAK) が、ネットワークのハブ (矢印) となることからわかる。文献 6) より改変。

が示唆された。KEGG と PANTHER の解析では、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 core analysis による解析では、AP プロテオームは cellular assembly 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 相互作用の関与を強く示唆している。最後に KeyMolnet に収録されている 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、最短経路で始点終点検索を施行したところ、非常に複雑な分子ネットワークが抽出された⁶⁾。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 との関連性も認め ($p=2.13E-12$ および $p=2.57E-12$)、他にも様々なサイトカインシグナル伝達系との関連性も見られた。

IV. MS 脳病巣プロテオームネットワークの創薬標的分子

上述のように、MS 脳病巣網羅的プロテオームデータセット⁵⁾に関して、4 種類の異なる分子ネットワーク解析ツール KEGG, PANTHER, IPA, KeyMolnet 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 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⁶⁾。さらに CAP プロテオームデータを STRING で解析したところ、描画された複雑な分子ネットワーク中に、ECM のクラスターを同定することが出来た (図 2)。

図2 STRING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

MS脳病巣CAPプロテオームのSTRINGによる解析では、複雑な分子ネットワーク中にECMのクラスター(赤楕円)が存在するのがわかる。

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タンパク質であり、細胞外基質ECMのリガンドである。例えば $\beta 1$ 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。細胞骨格動態制御を介する細胞の接着、遊走、分化、増殖には、ECM-integrin間の相互作用を介するoutside-in, inside-outシグナルが必須である¹³⁾。MS脳病巣に集積を認めた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髄鞘や軸索の再生が乏しい理由として、グリア瘢痕に含まれているECMタンパク質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

する種々のタンパク質分解酵素がECMに結合して長期に保持され、髄鞘崩壊が遷延化している可能性が挙げられている^{14,15)}。またECM-integrin間の相互作用は、リンパ球のホーミングや血管外遊出、アストログリア・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の抑制を介して、脱髄と軸索傷害を増強する^{16,17)}。

MSにおける臨床試験では、 $\alpha 4 \beta 1$ integrin (VLA4) に対するヒト化モノクローナル抗体natalizumabが再発抑制に著効を呈した。しかしながら、natalizumabは進行性多巣性白質脳症(progressive multifocal leukoencephalopathy; PML)を惹起するので、より安全な治療薬の登場が待望されている¹⁸⁾。分子ネットワークから創薬標的分子を探索する場合は、ハブ(hub)と呼ばれる、多くの分子が

らのリレーションが集中しているネットワークの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、ネットワーク全体すなわちシステムの維持に多大な影響をもたらす¹⁹⁾。システム生物学の観点からは、ECM-integrin シグナル伝達系は、MS における炎症性脱髄遷延化抑制のための創薬標的パスイェイとなる可能性がある。PANTHER による CAP プロテオームの解析で同定された integrin signaling pathway においては、focal adhesion kinase (FAK) がハブとなることが明らかである (図 1 矢印)。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 モデル系で経口投与により腫瘍細胞の増殖と血管新生を抑制する²⁰⁾。従って分子ネットワークから見ると、TAE226 は FAK を分子標的とする MS 慢性炎症性脱髄抑制薬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。

V. おわりに

ポストゲノム時代の膨大なオミックスデータに関する分子ネットワーク解析のためには、精査された文献情報 (knowledgebase) に基づく解析ツールを使う必要がある。解析ツールは未だ発展途上・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や翻訳後修飾、細胞・組織特異的発現、細胞内局在化、動的な特性に関しては十分対応出来ていない。しかしながら生体をシステムとして捉える見方から、分子ネットワークを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・分子ネットワークを効率的に同定することが出来る。

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) と厚生労働科学難治性疾患克服研究事業 (H21-難治一般-201) の補助を受けた。

文 献

- 1) McFarland HF, Martin R. : Multiple sclerosis : a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* **8** : 913-919, 2007.
- 2) Lassmann H, et al. : The immunopathology of multiple sclerosis : an overview. *Brain Pathol* **17** : 210-218, 2007.
- 3) Kitano H. : A robustness-based approach to systems-oriented drug design. *Nat Rev Drug Discov* **6** : 202-210, 2007.
- 4) Quintana FJ, et al. : Systems biology approaches for the study of multiple sclerosis. *J Cell Mol Med* **12** : 1087-1093, 2008.
- 5) Han MH, et al. : Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* **451** : 1076-1081, 2008.
- 6) Satoh JI, et al. : Molecular network of the comprehensive multiple sclerosis brain-lesion proteome. *Mult Scler* **15** : 531-541, 2009.
- 7) Kanehisa M, et al. : KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* **38** : D355-D360, 2010.
- 8) Mi H, et al. : PANTHER version 7 : improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res* **38** : D204-D210, 2010.
- 9) Jensen LJ, et al. : STRING 8—a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* **37** : D412-D416, 2009.
- 10) Sato H, et al. : New approaches to mechanism analysis for drug discovery using DNA microarray data combined with KeyMolnet. *Curr Drug Discov Technol* **2** : 89-98, 2005.
- 11) Huang da W, et al. : Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4** : 44-57, 2009.
- 12) Satoh J, et al. : Protein microarray analysis identifies human cellular prion protein interactors. *Neuropathol Appl Neurobiol* **35** : 16-35, 2009.
- 13) Luo BH, et al. : Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25** : 619-647, 2007.
- 14) Sobel RA. : The extracellular matrix in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* **57** : 205-217, 1998.
- 15) van Horssen J, et al. : The extracellular matrix in multiple sclerosis pathology. *J Neurochem* **103** : 1293-1301, 2007.
- 16) Sisková Z, et al. : Fibronectin impedes “myelin” sheet-directed flow in oligodendrocytes : a

- role for a beta 1 integrin-mediated PKC signaling pathway in vesicular trafficking. *Mol Cell Neurosci* **33** : 150–159, 2006.
- 17) Milner R, et al. : Fibronectin- and vitronectin-induced microglial activation and matrix metalloproteinase-9 expression is mediated by integrins $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_5$. *J Immunol* **178** : 8158–67, 2007.
- 18) Clifford DB, et al. : Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis : lessons from 28 cases. *Lancet Neurol* **9** : 438–446, 2010.
- 19) Albert R, et al. : Error and attack tolerance of complex networks. *Nature* **406** : 378–382, 2000.
- 20) 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.