

原 著

次世代シーケンシングを用いた多発性硬化症ウイルスモデルの解析；  
リンパ管分子発現低下が病気の進行に関連する

Computational analyses associate the CNS lymphatic molecules with  
disease progression of a viral model for multiple sclerosis

尾村 誠一、佐藤 文孝、藤田 貢、朴 雅美、  
J. Steven Alexander, Phillip C.S.R. Kilgore, Urska Cvek、角田 郁生

Seiichi Omura, Fumitaka Sato, Mitsugu Fujita, Ah-Mee Park,  
J. Steven Alexander, Phillip C.S.R. Kilgore, Urska Cvek, Ikuo Tsunoda

## 次世代シーケンシングを用いた多発性硬化症ウイルスモデルの解析； リンパ管分子発現低下が病気の進行に関連する

### Computational analyses associate the CNS lymphatic molecules with disease progression of a viral model for multiple sclerosis

尾村 誠一<sup>1</sup>、佐藤 文孝<sup>1</sup>、藤田 貢<sup>1</sup>、朴 雅美<sup>1</sup>、  
J. Steven Alexander<sup>2</sup>、Phillip C.S.R. Kilgore<sup>3</sup>、Urška Cvek<sup>3</sup>、角田 郁生<sup>1</sup>

Seiichi Omura<sup>1</sup>, Fumitaka Sato<sup>1</sup>, Mitsugu Fujita<sup>1</sup>, Ah-Mee Park<sup>1</sup>,  
J. Steven Alexander<sup>2</sup>, Phillip C.S.R. Kilgore<sup>3</sup>, Urška Cvek<sup>3</sup>, Ikuo Tsunoda<sup>1</sup>

近畿大学医学部微生物学講座<sup>1</sup>

ルイジアナ州立大学医学部分子細胞生理学講座<sup>2</sup>

ルイジアナ州立大学コンピュータサイエンス講座<sup>3</sup>

Department of Microbiology, Kindai University Faculty of Medicine, Osaka, Japan<sup>1</sup>

Department of Molecular and Cellular Physiology, Louisiana State University Health Sciences Center, Shreveport, USA<sup>2</sup>

Department of Computer Science, Louisiana State University Shreveport, USA<sup>3</sup>

**【要旨】** 多発性硬化症 (MS) の発症要因はいまだ確定していないが、ウイルス感染がその一つと考えられている。MS の病理学的特徴は中枢神経系 (CNS) への免疫細胞浸潤であり、接着分子の発現増加と血液脳関門の破綻が寄与している。一方、侵入した免疫細胞の CNS からの退出機序は不明であったが、近年 CNS 内リンパ管の存在が報告され、その役割が注目されている。本稿では MS のウイルス感染モデルであるタイラーウイルス誘導性脱髄疾患マウスを用い、その脊髄トランスクリプトームデータのバイオインフォマティクス解析により、CNS 内リンパ管の病態への寄与を検討した。タイラーウイルス感染群と対照群の接着分子、血液脳関門関連分子、リンパ管分子発現データを用いた主成分分析により、リンパ管分子の発現低下がリンパ球の CNS からの退出遅延に寄与することが示唆された。

**Key Words** : 多発性硬化症、RNA シーケンシング、リンパ管、PCA

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease in the central nervous system (CNS). While breakdown of the blood-brain barrier (BBB) as well as upregulation of adhesion molecules contribute to lymphocyte entry into the CNS in MS, the mechanism of lymphocyte exit from the CNS is unclear. Since lymphatic vessels have been discovered in the CNS recently, we aimed to determine the role of lymphatic vessels by bioinformatics analyses of CNS transcriptome data from Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection, a viral model of MS. Principal component analysis of expression of adhesion molecules, BBB-related molecules, and lymphatic molecules separated between the control and TMEV-infected groups. The factor loading indicated that downregulation of CNS lymphatic molecules could result in delayed exit of lymphocytes from the CNS, leading to chronic inflammation and disease progression.

**Key Words** : multiple sclerosis, RNA sequencing, lymphatic vessels, PCA

---

責任著者：角田郁生 近畿大学医学部微生物学講座 (〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東377-2)

Corresponding author : Ikuo Tsunoda

Department of Microbiology, Kindai University Faculty of Medicine

(377-2 Ohnohigashi, Osakasayama, Osaka 589-8511, Japan)

## はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) は中枢神経系 (central nervous system : CNS) に炎症性脱髄が時間的・空間的に多発し、長期にわたり運動障害、視神経障害などが生じることにより日常生活に支障をきたす疾患である<sup>1)</sup>。MS の原因は不明であるが、発症には自己免疫やウイルス感染が関連付けられている<sup>2)</sup>。患者の 90% は再発と寛解を繰り返す再発寛解型 (relapsing-remitting MS : RR-MS) の経過を示し、残り 10% は発症時から進行性に神経症状が悪化する一次進行型 MS となる。

MS では CNS 内の炎症性脱髄病変の形成に、リンパ球と血管の接着分子発現増加および血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB) の破綻によるリンパ球の侵入が寄与することが報告されている<sup>3)</sup>。一方、寛解時におけるリンパ球の CNS からの退出機序は不明である。われわれはこれまでに再発寛解型 MS と二次進行型 MS における血清中リンパ管マーカー発現の違いについて報告し、リンパ管分子が疾患の進行に関与しうると提唱してきた<sup>4)</sup>。従来、CNS にはリンパ管は存在しないとされてきたが、近年 Louveau らによりその存在が報告され<sup>5)</sup>、CNS 炎症時のリンパ球の退出に寄与している可能性が考えられている (図1)。そこで本稿では、進行

型 MS ウイルスモデル CNS のトランスクリプトームデータを用い、MS の病態進行とリンパ管分子の関連性について検討した。

## 方法

実験には 5 週齢の雌の SJL/J マウスを使用し、タイラーウイルス (Theiler's murine encephalomyelitis virus : TMEV) DA 株を脳内に接種した。対照群としてウイルス希釈に用いた PBS を脳内に注入した SJL/J マウスを用いた。1 ヶ月後に脊髄を採取し、RNA を抽出した。得られた RNA サンプルを用いて Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array によるマイクロアレイ解析を行った。得られたデータを Affymetrix GeneChip® Command Console (AGCC) により数値化し、ソフトウェア Affymetrix Expression Console™ を用いた Robust Multi-array Average (RMA) により正規化した<sup>6)</sup>。

また、同一サンプルを用いて Illumina NextSeq 500 System により RNA シークエンシング (RNA sequencing : RNA-seq) 解析を行い、得られたリードデータをソフトウェア “Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR)” を用いて mouse/mm10 (University of California Santa Cruz; UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/index.html>) リファ

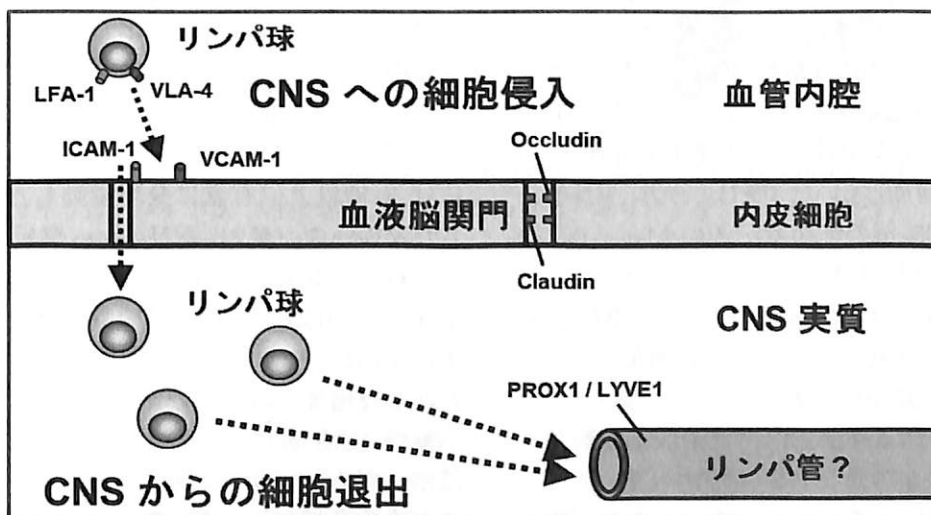


図1 中枢神経系 (CNS) におけるリンパ球の侵入・退出機序モデル

リンパ球は細胞表面上で過剰発現した接着分子 (LFA-1、VLA-4 など) が血管内皮細胞上の接着分子 (ICAM-1、VCAM-1 など) と結合し、さらに occludin や claudin などからなるタイトジャンクションを主要構成因子とする血液脳関門が破綻することにより CNS に流入、炎症を引き起こす。一方、リンパ球の退出機序の詳細は不明である。近年リンパ管特異的のマーカーである PROX1 や LYVE1 が CNS 内で同定されたことにより、CNS にもリンパ管様構造が存在することが示唆されている。リンパ球はリンパ管を通して CNS から退出する可能性がある。

表1 TMEV 感染マウス脊髄のマイクロアレイと RNA-seq による解析結果の比較

	総遺伝子数	2 倍以上に発現増加した遺伝子	1/2 倍以下に発現減少した遺伝子
マイクロアレイ (既知遺伝子のみ)	25,101	247	3
RNA-seq (既知遺伝子のみ)	22,603	1,002	40
共通部分	19,908	176	0

レンスゲノムにマッピングし、統計解析環境ソフトウェア“R”の“GenomicAlignments”および“TxDb.Mmusculus.UCSC.mm10.knownGene”パッケージを用いてリードをカウントした。さらに、Reads per kilobase (RPK) および“TCC”パッケージを用いた iDEGES/edgeR 正規化法<sup>7)</sup>により正規化を行った<sup>8)</sup>。主成分分析には R の“prcomp”プログラムを用い、分散比や因子負荷も同時に算出した<sup>9)</sup>。

データは平均値 ± 標準誤差 (SEM) で示した。有意差は Student *t* test により *P* 値を計算し、*P* < 0.05 を統計学的有意差ありとした。

## 結果

### マイクロアレイと RNA-seq の解析結果の比較

タイラーウイルスをマウスに感染させ、脊髄に慢性炎症性脱髄が成立した感染 1 ヶ月後に脊髄を採取し、マイクロアレイと RNA-seq を用いてトランスクリプトーム解析を行った。マイクロアレイ解析では、未同定の遺伝子および重複する遺伝子を除去した 25,101 遺伝子のうち、247 遺伝子の発現が対照群と比較して有意 (*P* < 0.05) に 2 倍以上増加していた (表1)。一方、RNA-seq 解析では、22,603 個の既知遺伝子のうち、1,002 遺伝子が有意に 2 倍以上に増加していた。マイクロアレイと RNA-seq のデータで共通して含まれる遺伝子の数は 19,908 個で、共通して 2 倍以上に増加していたのは 176 遺伝子、減少した遺伝子は 0 であった。以上の結果から、有意に発現が増加した遺伝子の数を基準にすると RNA-seq のほうが多く検出された。

増加比率の高い遺伝子をみると、マイクロアレイ解析では免疫関連分子が多く、特に免疫グロブリン K 鎖可変部 (*Igkv*) や免疫グロブリン重鎖可変部 (*Ighv*) などの免疫グロブリン遺伝子群 ([http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/taballeles/mouse/IGK/IGKV/Mu\\_IGKVall.html](http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/taballeles/mouse/IGK/IGKV/Mu_IGKVall.html)) が顕著に増加していた (図2A)。それに対して RNA-seq 解析では、chemokine (C-C motif) ligand 8 (*Ccl8*) や

chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (*Cxcl13*) などのケモカインをはじめとした免疫関連分子の発現増加が多くみられたが、マイクロアレイの場合と異なり免疫グロブリン遺伝子の発現増加はみられなかった (図2B)。また、MS では脱髄に伴いミエリンプロテオリピドタンパク質 (PLP) やミエリン塩基性タンパク質 (MBP) などのミエリンタンパク質の発現量低下が報告されているが<sup>10)</sup>、CNS において定常的に高発現している遺伝子であるためか、通常のプロトコルに沿ったマイクロアレイ解析ではわずかな発現変化しかみられなかった (図3A)。一方、RNA-seq 解析ではこれらミエリンタンパク質のより顕著な変化を検出できた (図3B)。以上のことから RNA-seq のほうが検出能力は高く、本研究では有用であると考えられた。

### 中枢神経系内リンパ管機能に関連する遺伝子の解析

接着分子、BBB 関連分子、リンパ管分子のなかで代表的な 41 遺伝子の発現に注目したところ、マイクロアレイ解析ではインテグリン  $\beta 2$  (*CD18*, *Itgb2*) が 2.2 倍に増加していたものの、それ以外には 2 倍以上に有意に発現変動した遺伝子は検出されなかった (表2)。RNA-seq 解析では 9 遺伝子が有意に 2 倍以上増加しており、特に LFA-2 (*Cd2*) や LFA-1 (*CD11a*, インテグリン  $\alpha L$ , *Itgal*)、L-セレクチン (*CD62L*, *Sell*) はそれぞれ 221 倍、41 倍、34 倍と顕著な増加がみられた。

慢性 CNS 炎症における上述の 41 個の遺伝子の役割を明らかにするために RNA-seq データを用いて主成分分析を行った (図4)。その結果、タイラーウイルス感染群と対照群は第 1 主成分 (principal component 1: PC1) で分離された (図4A)。分散比によると、PC1 がこのデータの多様性の 43% をカバーしていた (図4B)。PC1 に対する因子負荷量を計算すると、LFA-1 をはじめとする接着分子群の遺伝子発現増加が PC1 に寄与しており、クロロディン 10 (*Cldn10*) などの BBB 関連分子および

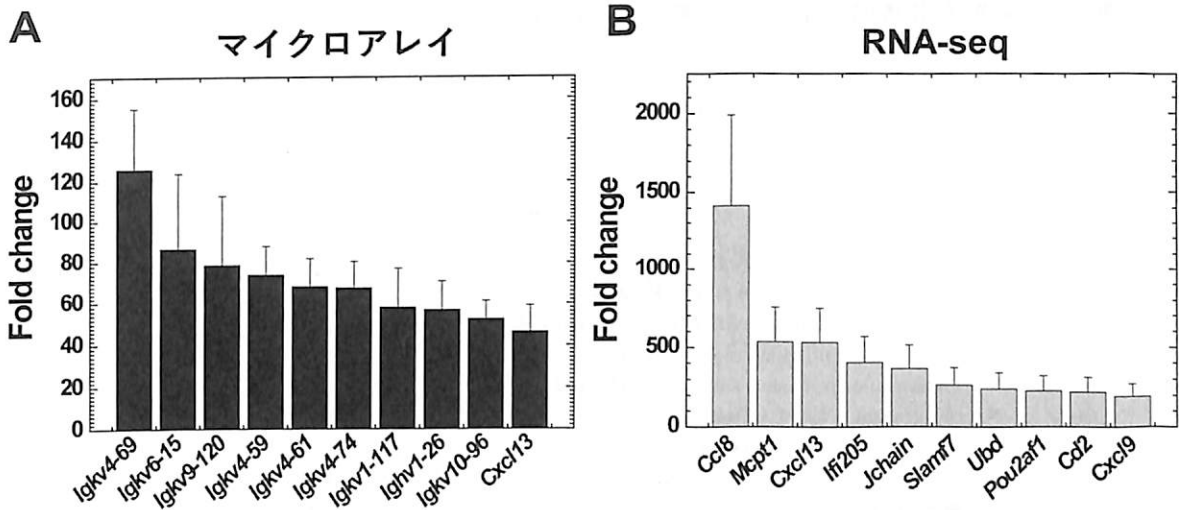


図2 タイラーウイルス (TMEV) 感染マウス脊髄を用いたマイクロアレイ解析および RNA シーケンシング (RNA-seq) 解析において対照群と比較して顕著に発現増加した上位 10 遺伝子

- A) マイクロアレイ解析では多くの免疫グロブリン遺伝子が上位を占めた。  
 B) RNA-seq 解析ではケモカインなどが上位に入った。

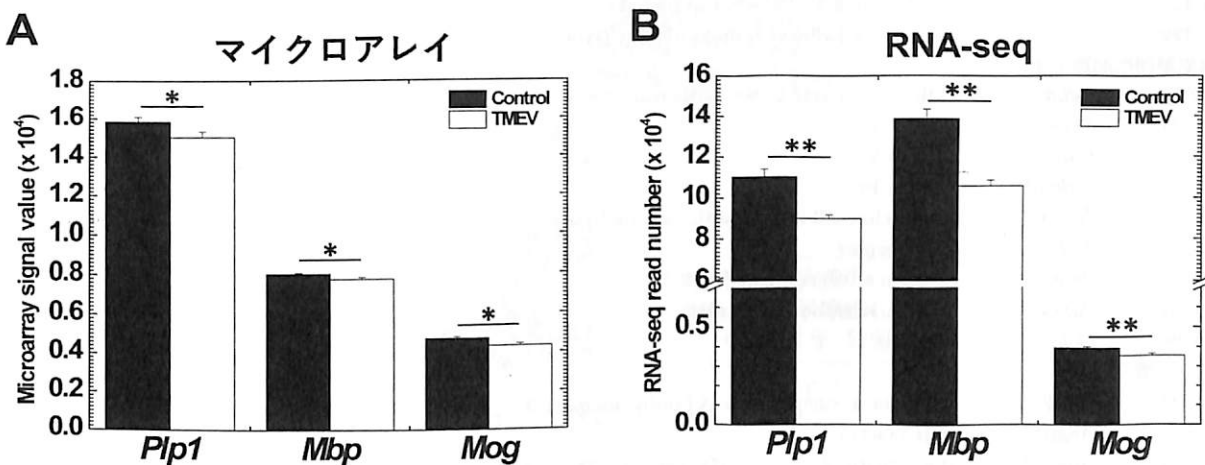


図3 マイクロアレイおよび RNA-seq データにおけるミエリンタンパク質遺伝子の発現

- A) マイクロアレイでは TMEV 感染群のミエリンプロテオリポドタンパク質 (*Plp1*)、ミエリン塩基性タンパク質 (*Mbp*)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (*Mog*) の発現量は対照群 (Control) と比較して有意差はあるものの減少はわずかであった。  
 B) RNA-seq では *Plp1* と *Mbp* のより顕著な発現減少がみられた。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 。

VEGF-D (*Vegfd*) などのリンパ管分子は、その発現減少が PC1 に寄与していた (図4C)。

### 考察

本研究ではまず、従来用いられてきたマイクロアレイ解析と比較することにより、RNA-seq 解析の有用性を検討した。結果として、RNA-seq の検出能力の高さは本研究においても有用であることが示されたが (表1、2 および図3)、データ抽出過程に

において、マッピングに用いるプログラムやアノテーションデータベースによっては異なる結果が出る可能性があることが明らかとなった (図2)。本研究では、タイラーウイルス感染マウス脊髄で顕著に発現が増加した遺伝子をマイクロアレイと RNA-seq で比較したところ、マイクロアレイでは免疫グロブリンがみられたが、RNA-seq ではほとんどみられなかった。しかしさらなるデータ精査により、本研究で RNA-seq データ解析に用いたアノテーションデータ (UCSC) には免疫グロブリンの大部分が含

表2 接着分子、血液脳関門関連分子、リンパ管分子の発現変化

Entrez ID	シンボル	遺伝子名	マイクロアレイ		RNA-seq	
			Fold change	P value	Fold change	P value
<b>接着分子</b>						
12481	<i>Cd2</i>	CD2 antigen (LFA-2)	1.7	<0.01	<b>220.9</b>	<0.01
12490	<i>Cd34</i>	CD34 antigen	1.1	<0.05	1.2	<0.05
225825	<i>Cd226</i>	CD226 antigen (DNAM-1)	1.3	<0.01	<b>3.5</b>	<0.05
20340	<i>Glg1</i>	golgi apparatus protein 1 (E-selectin ligand)	1.0	0.28	1.0	0.27
14663	<i>Glycam1</i>	glycosylation dependent cell adhesion molecule 1	1.4	<0.01	<b>4.0</b>	<0.05
15894	<i>Icam1</i>	intercellular adhesion molecule 1 (CD54)	1.5	<0.01	<b>4.5</b>	<0.01
15896	<i>Icam2</i>	intercellular adhesion molecule 2 (CD102)	1.0	0.79	1.4	<0.01
16401	<i>Itga4</i>	integrin $\alpha$ 4 (VLA-4, CD49d)	1.7	<0.01	<b>2.6</b>	<0.01
16408	<i>Itgal</i>	integrin $\alpha$ L (LFA-1, CD11a)	1.7	<0.01	<b>40.8</b>	<0.01
16412	<i>Itgb1</i>	integrin $\beta$ 1 (fibronectin receptor $\beta$ , CD29)	1.1	0.05	1.1	0.09
16414	<i>Itgb2</i>	integrin $\beta$ 2 (CD18)	<b>2.2</b>	<0.01	<b>5.0</b>	<0.01
16421	<i>Itgb7</i>	integrin $\beta$ 7	1.1	0.21	<b>3.5</b>	<0.01
18613	<i>Pecam1</i>	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31)	1.0	0.25	1.1	<0.05
52118	<i>Pvr</i>	poliovirus receptor (CD155)	1.0	0.50	1.0	0.18
19294	<i>Pvrl2</i>	poliovirus receptor-related 2 (Nectin2, CD112)	1.1	<0.01	1.2	<0.01
20339	<i>Sele</i>	selectin, endothelial cell (E-selectin, CD62E)	1.1	<0.05	2.4	0.26
20343	<i>Sell</i>	selectin, lymphocyte (L-selectin, CD62L)	1.4	<0.01	<b>33.5</b>	<0.05
20344	<i>Selp</i>	selectin, platelet (P-selectin, CD62P)	1.1	0.14	4.4	0.06
20345	<i>Selplg</i>	selectin, platelet (P-selectin) ligand (PSGL-1, CD162)	1.2	<0.01	1.5	<0.01
22329	<i>Vcam1</i>	vascular cell adhesion molecule 1 (CD106)	1.4	<0.01	1.8	<0.01
<b>血液脳関門関連分子</b>						
12562	<i>Cdh5</i>	cadherin 5 (CD144), VE-cadherin	1.0	0.66	1.0	0.74
12737	<i>Cldn1</i>	claudin 1	0.9	0.07	1.0	0.96
12741	<i>Cldn5</i>	claudin 5	1.0	0.57	1.1	0.23
58187	<i>Cldn10</i>	claudin 10	0.9	<0.05	0.9	0.07
69524	<i>Esam</i>	endothelial cell-specific adhesion molecule	1.0	0.90	1.0	0.57
16456	<i>F11r</i>	F11 receptor	1.1	<0.05	1.3	<0.05
67374	<i>Jam2</i>	junction adhesion molecule 2	1.0	0.95	1.0	0.99
83964	<i>Jam3</i>	junction adhesion molecule 3	1.0	0.27	1.0	0.65
18260	<i>Ocln</i>	occludin	1.0	0.96	1.0	0.65
<b>リンパ管分子</b>						
11731	<i>Ang2</i>	angiogenin, ribonuclease A family, member 2	1.1	0.10	0.5	0.30
11600	<i>Angpt1</i>	angiopoietin 1	1.1	<0.05	1.2	<0.01
11601	<i>Angpt2</i>	angiopoietin 2	1.0	0.27	1.2	0.07
14205	<i>Vegfd</i>	vascular endothelial growth factor D (VEGF-D)	1.0	0.37	0.9	0.29
14257	<i>Flt4</i>	FMS-like tyrosine kinase 4 (VEGFR3)	1.1	0.05	1.1	0.18
14234	<i>Foxc2</i>	forkhead box C2	1.1	0.06	1.4	0.50
15898	<i>Icam5</i>	intercellular adhesion molecule 5, telencephalin (CD50)	1.0	0.30	1.0	1.00
104099	<i>Itga9</i>	integrin $\alpha$ 9	1.0	0.35	0.9	0.18
114332	<i>Lyve1</i>	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	1.0	0.55	1.1	0.80
14726	<i>Pdpm</i>	podoplanin	1.3	<0.01	1.6	<0.01
19130	<i>Prox1</i>	prospero homeobox 1	0.9	0.11	0.9	0.13
19699	<i>Reln</i>	reelin	0.9	<0.01	0.9	<0.05

太字は有意に2倍以上増加

まれていないことが明らかとなった。免疫グロブリン遺伝子を含むデータを得るには、Ensembl (EMBL-EBI, <https://asia.ensembl.org/index.html>) など別のアノテーションデータベース<sup>11)</sup>を用いて解析する必要がある。このことから、研究目的にあわせてコンピュータ処理工程 (パイプライン)

を最適化する必要があると考えられた。

RNA-seq とマイクロアレイの両者に共通して含まれる遺伝子は 19,908 個と多かったが、2つのデータ間で高い相関性 ( $r > 0.8$ ) を示したのは 1,041 遺伝子であった (データ未掲載)。この少なさにはバックグラウンド値や検出可能範囲の違いが影響してい

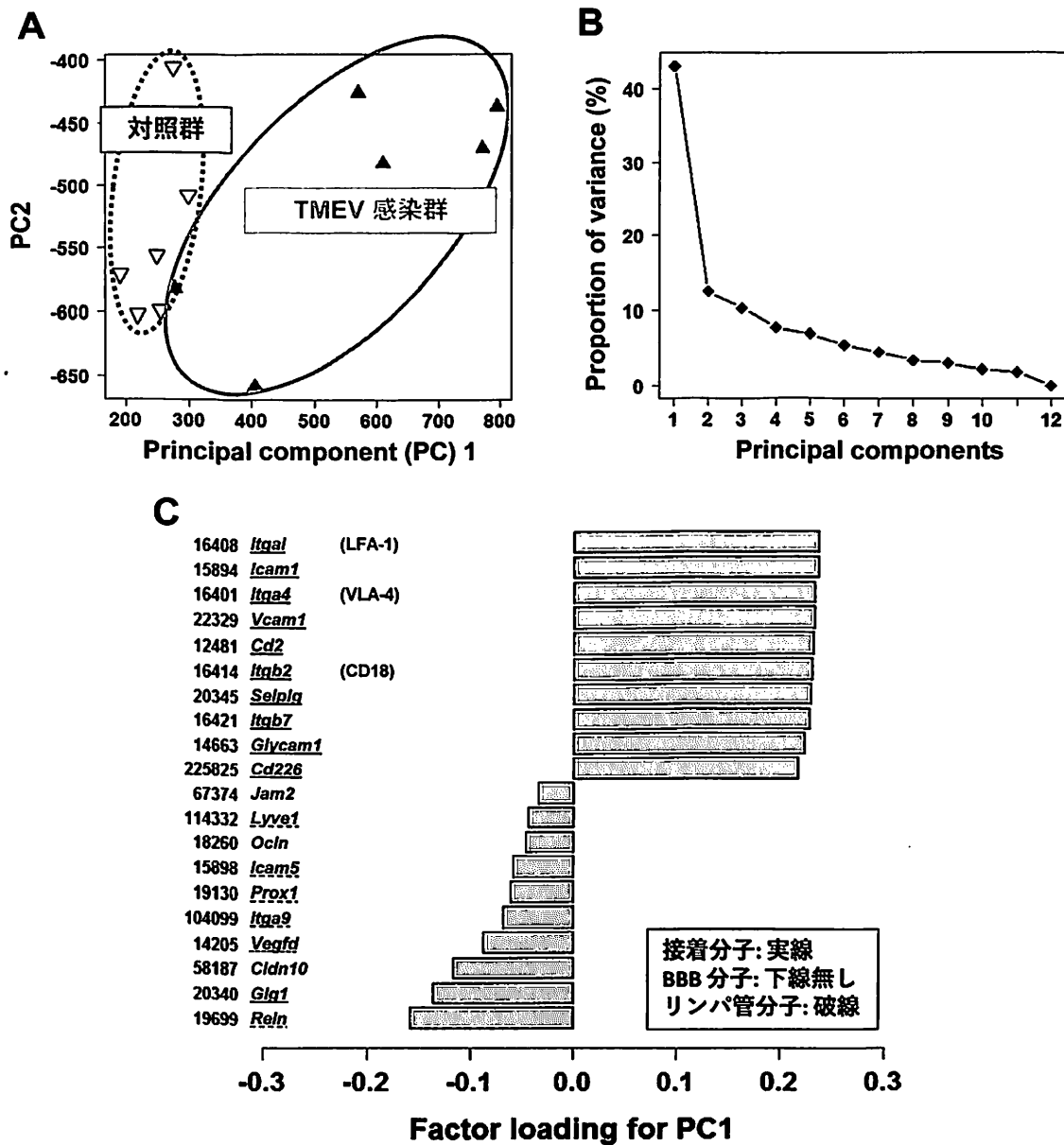


図4 接着分子、血液脳関門関連分子およびリンパ管分子の RNA-seq 発現データを用いた主成分分析  
 A) 主成分分析により第 1 主成分 (PC1) で TMEV 感染群と対照群が分かれた。  
 B) 分散比のグラフによると、PC1 を基準とした分布がサンプル間の多様性の 43% をカバーしていた。  
 C) PC1 に対する各遺伝子の負荷量をみると、多くの接着分子 (実線) が正の相関を示し、血液脳関門関連分子 (下線なし) およびリンパ管分子 (破線) は負の相関を示した。

る可能性が考えられる。また、低い相関性 ( $r < 0.8$ ) を示した遺伝子のなかで、マイクロアレイでのみ有意に発現変化がみられたのは、3,373 遺伝子であったが、そのなかに 2 倍以上変化した遺伝子はみられなかった (データ未掲載)。反対に RNA-seq でのみ有意に発現変化がみられたのは、1,570 遺伝子であり、なかには CD19 (74 倍) や IL-27 (13 倍) など大きく発現が変化した遺伝子もみられた (データ未掲

載)。この結果からも RNA-seq の検出能力の高さは明らかであるが、2 倍以下の小さい変化をみる場合はマイクロアレイでは検出できる一方で、RNA-seq では検出できない遺伝子もある可能性が考えられた。

MS ウイルス感染モデルにおける接着分子、BBB 関連分子およびリンパ管分子の関与を検討するために主成分分析を行ったところ、PC1 値によってウ

ウイルス感染群と対照群が分けられ、因子負荷量によりこの分布に相関する遺伝子の順位が示された。PC1 値と正の相関を示した分子群はおもに接着分子であり、特に高い相関を示した LFA-1 は ICAM-1 の受容体として機能する分子である<sup>12)</sup>。VLA-4 は VCAM-1 の受容体であり<sup>13)</sup>、MS の新規治療薬の一つである ナタリズマブの標的分子であることも興味深い<sup>14)</sup>。これらの分子が PC1 値と正の相関を示すことは、TMEV 感染マウス群においてリンパ球と血管内皮の接着分子の発現増加が中枢神経系へのリンパ球侵入に寄与していることを示唆している。一方、クロードイン10などの BBB タイトジャンクションタンパク質は、その発現減少が PC1 値に相関しており、BBB 破綻が CNS へのリンパ球侵入に寄与するという従来の報告と一致する。また、リーリン<sup>15)</sup>などのリンパ管分子もその発現減少が PC1 値に寄与していた。このことはリンパ管分子の発現減少によるリンパ管の機能障害が生じ、リンパ球の退出が妨げられ、炎症の慢性化さらには病気の進行にいたるといわれる仮説を支持する結果であった。

## 文献

- 1) Willenborg DO, Staykova MA : Cytokines in the pathogenesis and therapy of autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Advances in experimental medicine and biology* 520 : 96-119, 2003.
- 2) Sato F, Omura S, Martinez NE, et al : Animal models for multiple sclerosis. In : Minagar A, ed. *Neuroinflammation*, Elsevier, 2011 : 55-79.
- 3) Minagar A, Jy W, Jimenez JJ, et al : Multiple sclerosis as a vascular disease. *Neurol Res* 28 (3) : 230-235, 2006.
- 4) Chaitanya GV, Omura S, Sato F, et al : Inflammation induces neuro-lymphatic protein expression in multiple sclerosis brain neurovasculature. *J Neuroinflammation* 10 : 125, 2013.
- 5) Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, et al : Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523 (7560) : 337-341, 2015.
- 6) Omura S, Kawai E, Sato F, et al : Bioinformatics multivariate analysis determined a set of phase-specific biomarker candidates in a novel mouse model for viral myocarditis. *Circ Cardiovasc Genet* 7 (4) : 444-454, 2014.
- 7) Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, et al : TCC : an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC bioinformatics*. 14 : 219, 2013.
- 8) Smith HK, Omura S, Vital SA, et al : Metallothionein I as a direct link between therapeutic hematopoietic stem/progenitor cells and cerebral protection in stroke. *FASEB J* 32 (5) : 2381-2394, 2018.
- 9) Sato F, Omura S, Kawai E, et al : Distinct kinetics of viral replication, T cell infiltration, and fibrosis in three phases of myocarditis following Theiler's virus infection. *Cell Immunol* 292 (1-2) : 85-93, 2014.
- 10) Tsunoda I, Sato F, Omura S, et al : Three immune-mediated disease models induced by Theiler's virus : Multiple sclerosis, seizures and myocarditis. *Clin Exp Neuroimmunol* 7 (4) : 330-345, 2016.
- 11) Whelan FJ, Yap NV, Surette MG, et al : A guide to bioinformatics for immunologists. *Front Immunol* 4 : 416, 2013.
- 12) Long EO : ICAM-1 : getting a grip on leukocyte adhesion. *J Immunol* 186 (9) : 5021-5023, 2011.
- 13) Dejana E, Breviario F, Caveda L : Leukocyte-endothelial cell adhesive receptors. *Clin Exp Rheumatol* 12 Suppl 10 : S25-28, 1994.
- 14) Sheremata WA, Minagar A, Alexander JS, et al : The role of alpha-4 integrin in the aetiology of multiple sclerosis : current knowledge and therapeutic implications. *CNS Drugs* 19 (11) : 909-922, 2005.
- 15) Lutter S, Xie S, Tatin F, et al : Smooth muscle-endothelial cell communication activates Reelin signaling and regulates lymphatic vessel formation. *J Cell Biol* 197 (6) : 837-849, 2012.



