

Title	スフィンゴシン-1-リン酸受容体作動薬W-061によるデキストラン硫酸ナトリウム誘発腸炎の抑制と粘膜免疫学的解析
Author(s)	真田, 泰明
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58556
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	真田 泰明
博士の専攻分野の名称	博士（臨床薬学）
学位記番号	第 24531 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	スフィンゴシン-1-リン酸受容体作動薬 W-061 によるデキストラン硫酸ナトリウム誘発腸炎の抑制と粘膜免疫学的解析
論文審査委員	(主査) 教授 上島 悦子 (副査) 教授 松田 敏夫 教授 八木 清仁 教授 辻川 和丈

論文内容の要旨

クローン病および潰瘍性大腸炎を代表とする炎症性腸疾患は再燃と寛解をくり返す難治性の疾患であり、本邦においては稀な疾患であったが、その患者数が年々増加している。これらの疾患の発症・増悪には遺伝的要因、環境要因のほか、免疫学的な異常が複雑に絡んでいると考えられている。正常な腸管ではヘルパー T(Th)1 細胞と Th2 細胞のバランスが成立しているが、クローン病は腸管粘膜におけるインターフェロン(IFN)- γ 発現が亢進していることから、免疫学的に Th1 にシフトした疾患であると考えられている。一方、潰瘍性大腸炎患者の腸管ではインターロイキン(IL)-4 や IL-13 発現が亢進していることから、免疫学的に Th2 にシフトした疾患であると考えられている。これらに加え、ヘルパー T 細胞やマクロファージから産生される腫瘍壊死因子(TNF)- α が炎症性腸疾患の増悪因子として報告されてきた。近年、インフリキシマブをはじめとした抗 TNF- α 抗体療法が炎症性腸疾患のみならず、種々の自己免疫疾患において良好な臨床成績を挙げているが、一方でこの薬物療法に伴う発がんリスクや結核などの重篤な感染症の罹患リスクの増加がメタ解析で報告されており、新たな作用機序を介した治療戦略の登場が望まれている。

これまで、ヘルパー T 細胞は Th1 細胞と Th2 細胞のみが知られていたが、近年新たに IL-17 を産生するヘルパー T 細胞サブセットである Th17 細胞が発見され、種々の自己免疫疾患の増悪因子と考えられている。しかしながら、腸炎モデル動物を用いた研究では Th17 細胞の役割については報告に一貫性がなく、未だ詳細は明らかになっていない。さらに、これまでに示したヘルパー T 細胞による免疫の過剰応答を制御するはたらきをもつ制御性 T (Treg) 細胞も発見された。Treg 細胞を腸炎モデル動物に移入すると腸炎が改善することが報告されており、腸炎の制御において Treg 細胞が重要なサブセットであると考えられている。

近年、新たな免疫調整薬として FTY720 をはじめとしたスフィンゴシン-1-リン酸受容体作動薬が注目されている。スフィンゴシン-1-リン酸受容体作動薬は T 細胞表面に存在する受容体サブタイプの一つである S1P₁ に結合すると二次リンパ組織へのホーミングを促進し、同部位に隔離することで炎症局所への T 細胞の遊走を抑制するという特異な作用機序を有する。FTY720 などでは IL-10 ノックアウトマウスやデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘発腸炎モデルで有効性が示されているが、Th17 細胞や Treg 細胞への影響まで検討されていない。そこで、本研究では新規に開発されたスフィンゴシン-1-リン酸受容体作動薬である W-061 (小野薬品工業より供与された)を用い、腸炎への有効性を評価し、免疫学的な解析を加えた。

まず、各受容体サブタイプを安定発現させたCHO-K1細胞から細胞膜画分を調製し、W-061のヒトスフィンゴシン-1-リン酸受容体への結合親和性を評価した。ヒト(h)SIP₁への結合親和性がその他の受容体サブタイプと比べて強いことが明らかとなった。さらに、hSIP₁およびhSIP₃に対するアゴニスト活性を評価したところ、FTY720のリン酸化体と比較してhSIP₁へのアゴニスト活性が特異的に高いことが分かった。FTY720における臨床試験では副作用として徐脈が報告されており、これはSIP₃を介して起こると考えられている。よって、W-061のSIP₁への高い選択性は副作用回避の観点で有用であると考えられる。

急性腸炎モデルは、8週齢の雄性Balb/cマウスにDSSを2.5 w/v %で5日間、自由飲水により摂取させて作成した。W-061はDSS投与開始3日前から3mg/kgで経口投与した。体重の変化や便の性状の変化を日々の観察項目としたほか、病理組織学的な評価を実施した。また、DSS投与開始から3、6または10日目の脾臓、腸管膜リンパ節、パイエル板および腸管粘膜固有層のリンパ球についてフローサイトメトリー法により詳細に解析した。

腸炎モデルマウスではDSS投与により経時的に体重が減少したが、8から10日目にかけて、W-061投与群において有意な体重の回復が認められた。このモデルにおいて、DSS投与開始6日目の時点ではW-061投与群と対照群とで病理組織学的には差がなかったものの、10日目にはW-061投与群では腸管の長さが有意に長かったのに加え、病理組織学的にほとんど炎症所見が見られなくなっていた。これを各群n=6でスコア化したところ、有意な改善が確認された。

W-061投与群において、脾臓の総リンパ球数は3日目に有意に低値を示したほか、パイエル板では6および10日目に有意な高値を、腸管粘膜固有層においては3、6および10日目に有意な低値を示したが、腸管膜リンパ節は2群間で差が見られなかった。これらの結果はCD4陽性リンパ球について解析しても同様であった。腸管粘膜固有層のTh17細胞数は対照群では6日目に増加したが、これはW-061の投与により有意に抑制された。この際、パイエル板ではW-061投与群でTh17細胞数が有意に多かった。これに加え、腸管粘膜固有層のTh1細胞数は対照群では10日目に明らかな増加が見られたが、W-061投与群で有意に細胞数が少なかった。また、腸管膜リンパ節およびパイエル板において10日目のTh1細胞数が有意に多かった。以上の結果から、W-061の投与によりTh17細胞やTh1細胞は二次リンパ組織である腸管膜リンパ節やパイエル板にホーミングさせ、同部位に隔離することにより腸管粘膜固有層へ移行せず、このことが炎症の早期の回復につながったものと考えられた。一方、腸管粘膜固有層のTreg細胞数はW-061投与の影響を受けなかった。Treg細胞のホーミングにはSIP₁のほか、ケモカイン受容体CCR7が関与することが報告されているが、W-061がこのCCR7の発現に影響した可能性が考えられる。類似の作用機序を有するFTY720ではCD4陽性リンパ球におけるCD25やFoxp3の発現亢進が報告されているほか、CD4陽性リンパ球との共培養によりIL-17産生が減少することが示されている。本研究では細胞数のみに焦点をあてて解析したが、リンパ球のサイトカイン産生能や分化能への影響を今後詳細に検討する必要があると考えられる。

以上、本研究では新規スフィンゴシン-1-リン酸受容体作動薬W-061のDSS誘発急性腸炎への有用性が示された。この効果はTh17細胞やTh1細胞を腸管膜リンパ節やパイエル板といった二次リンパ組織に隔離し、腸管粘膜固有層への遊走を制御することによるものである。W-061は炎症性腸疾患の新たな治療戦略のひとつとなり得ると考えられる。

論文審査の結果の要旨

『スフィンゴシン-1-リン酸受容体作動薬W-061によるデキストラン硫酸ナトリウム誘発腸炎の抑制と粘膜免疫学的解析』では、スフィンゴシン-1-リン酸受容体を標的として開発された薬物W-061のDSS誘発急性腸炎モデルに対する有用性ならびにTh17を含めたヘルパーT細胞およびTregの動態に着目し、DSS腸炎モデルマウスを用いて免疫学的機序について検討した。

その結果、DSS 5日間投与でW-061投与群、対象群ともDSS処置開始から体重が減少し、W-061投与群においては6日目に底値となった。その後、対照群では10日まで体重の回復が認められなかつ

たのに対し、W-061投与群では有意に増加した。また、マウスの腸管の長さは3日目および6日目は2群間で差は見られなかったが、10日目には対照群より、W-061投与群において有意な伸長がみられた。また、10日目において、対照群ではmiddleおよびdistalに炎症細胞浸潤、杯細胞の減少や腸管壁の肥厚が顕著に認められた。一方、W-061投与群ではこれらの炎症所見が軽度であり、組織学的な回復が認められた。各リンパ組織のリンパ球数は、DSSによって腸炎を惹起すると腸管粘膜固有層のリンパ球数が増加したが、この増加はW-061投与により有意に抑制された。一方、W-061投与群ではパイエル板のリンパ球数が有意に増加した。腸管リンパ節のリンパ球数の動態は2群間で差が見られなかった。腸管粘膜固有層における各T細胞数の変化は、DSSによる炎症とともにTh17数が増加し、引き続きTh1数が増加した。一方、W-061投与群では6日目におけるTh17数の増加および10日目のTh1数の増加がいずれも有意に抑制されていた。Treg数の変動については2群間で差が見られなかった。

以上、W-061投与により

- ・体重の増加の回復、腸管長の伸長および病理組織的な腸炎の改善
- ・腸管粘膜固有層へのリンパ球遊走の抑制
- ・パイエル板におけるTh17およびTh1細胞数の増加
- ・炎症の惹起に伴う腸管粘膜固有層のTh17およびTh1細胞数の増加の抑制

が見られた。

本研究では、新規免疫調整薬W-061がDSS誘発腸炎に有効であることが示され、これは腸管粘膜固有層で増加するTh17やTh1を二次リンパ組織に隔離する作用によるものと考えられた。従って、DSS誘発腸炎において病態形成にはTh17やTh1が重要な位置づけにあると考察された。これらから、SIP受容体作動薬はIBDの急激な悪化を改善する新たな治療法となる可能性を示した。

以上、本研究は現在もなお原因不明のまま増加しつつある炎症性腸疾患IBDに光明を与える可能性が示唆されており、今後のさらなる研究が望まれることから、博士論文として問題ないとの意見で全員一致した。