

主論文の要旨

**Fingolimod phosphate promotes
the neuroprotective effects of microglia**

リン酸化 FTY720 は
ミクログリアの神経保護作用を促進させる

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
高次神経統御学講座 神経免疫学分野
(指導：錫村 明生 教授)

野田 裕美

【緒言】

免疫調節薬であるフィンゴリモド (FTY720) は、多発性硬化症の治療薬として開発され (Foster, C. A. *et al.* 2007. *J Pharmacol Exp Ther.* 323:469-475.)、昨年より日本でも臨床応用されている。多発性硬化症は自己免疫疾患の1つであり、末梢組織の自己抗原特異的なリンパ球が中枢神経系に浸潤し、主に炎症性サイトカインを産生して、神経およびミエリンを傷害する。臨床症状として視力障害、運動障害、感覚障害がみられ、日本では指定難病に認定されている神経変性疾患である (Suzumura, A. *et al.* 2008. *Rinsho Shinkeigaku.* 48: 937-939.)。

多発性硬化症治療薬としての FTY720 の作用機序は、リンパ球のスフィンゴシン 1 リン酸レセプターである S1P_{1, 3, 4, 5} に結合してその発現を減少させ、リンパ球の炎症部位への移動を抑制することにより、炎症細胞による神経組織への浸潤を抑えることである (Foster, C. A. *et al.*)。FTY720 は血液脳関門を通過することができ、中枢神経系細胞での S1PR の発現も確認されていることから、中枢神経系細胞の1つであるアストロサイトを介した神経保護作用や、直接の神経保護作用も報告されている (Chun, J. *et al.* 2010. *Clin Neuropharmacol.* 33:91-101.) が、脳内免疫細胞のミクログリアに関する作用は不明である。

【研究目的】

ミクログリアに対する FTY720 の作用について検討した。

【研究方法】

マウス新生仔脳のコモジェネートを、培養フラスコで約2週間培養し、混合グリア細胞を作製した。培養フラスコをシェーカーで軽く振とうすることで得た上清を、ペトリディッシュに静置し付着させた後、非付着細胞を洗浄及び除去し、純化したミクログリアを得た。得られたミクログリアを各培養プレートに培養し、FTY720 及びリポポリサッカロイド (LPS) で刺激し、24 時間後に細胞を回収した。

S1PR 及び炎症性サイトカイン、神経栄養因子の遺伝子発現を検討するために、RT-PCR を行った。また、タンパク質発現検討のため、ELISA、フローサイトメトリー、ウエスタンブロットを行った。

【研究結果】

(i) ミクログリアにおける S1PR の発現

ミクログリアは、遺伝子及びタンパク質発現レベルで、全ての S1PR を発現していることが示された。LPS 刺激により活性化したミクログリアでは、S1P_{2, 4, 5} の発現が抑制されることが明らかとなった (Fig. 1)。

(ii) FTY720 のミクログリアに対する作用

ミクログリアは炎症性因子を産生して神経傷害性に作用する一方で、神経栄養因子の産生により神経保護作用も有している (Glass, C. K. *et al.* 2010. *Cell.* 19:918-934.)。

本研究において、LPSにより活性化したミクログリアに FTY720 を添加し、炎症性サイトカインと神経栄養因子の産生を解析した。その結果、炎症性サイトカインである TNF- α と IL-1 β 、IL-6 の産生は FTY720 により濃度依存的に抑制され、神経栄養因子である BDNF と GDNF の産生は FTY720 により増強されることが明らかとなった (Fig. 2, 3)。また、FTY720 によるミクログリアの TNF- α 産生抑制は、特に S1P₁ を介していることが明らかとなった (Fig. 4)。

【考察】

FTY720 は、多発性硬化症の治療薬として臨床で応用されている。その作用機序として、末梢リンパ球の S1PR の発現を下げることでリンパ節からの移動を防ぎ、中枢神経系へ浸潤することを抑えることが知られている (Foster, C. A. *et al.*) が、ミクログリアに対する直接的な効果は不明であった。本研究により FTY720 は活性化ミクログリアの炎症性サイトカイン産生を抑制し、神経栄養因子産生を増強させることから、FTY720 がミクログリアの抗炎症作用と神経保護作用を誘導する可能性が考えられた。さらに、ミクログリアの抗炎症作用と神経保護作用が多発性硬化症の新しい作用機序として示唆された。

FTY720 は S1P₁, 3, 4, 5 への結合が報告されている (Foster, C. A. *et al.*) が、本研究により FTY720 のミクログリアの抗炎症効果には、特に S1P₁ の関与が示された。一方で、LPS 刺激により発現量が下がった S1P₄, 5 は、ミクログリアの抗炎症効果に大きく影響を与えないこともわかった。LPS 刺激により S1PR の発現量に変化がないことと、ミクログリアの抗炎症効果への関与との間に因果関係があるかは、今後の研究の発展に期待がかかる。

【結論】

本研究により、ミクログリアに対する FTY720 の抗炎症作用と神経保護作用が、多発性硬化症治療薬としての新たな作用機序として考えられた。

ミクログリアは、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患でみられる慢性神経炎症に関与することが知られている (Glass, C. K. *et al.*)。FTY720 は血液脳関門を通り中枢神経系内への移行性もよく、抗炎症作用と神経保護作用があることから、多発性硬化症以外の神経変性疾患に対する FTY720 の治療効果も期待できる。