

令和元年6月20日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10835

研究課題名(和文) スフィンゴシン1-リン酸の代謝経路を標的とする新しい脊髄損傷治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic strategy for the treatment of spinal cord injury by modulating sphingosine 1-phosphate metabolism

研究代表者

木村 敦 (Kimura, Atsushi)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20364507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン1-リン酸(S1P)の主要な分解酵素であるS1P lyaseを阻害することが脊髄損傷後の機能回復に与える影響について検討した。脊髄損傷後にS1P阻害剤である4-deoxyribose (DOP)を飲料水により投与したマウスは、対照群に比較して有意に後肢の機能回復が良好であった。DOPを投与したマウスでは、脊髄損傷部における炎症性サイトカインの発現が減少しており、TNF、IL-27、CCL-1、G-CSF、IL-13、IL-1、IL-23、CXCL-9の8つの因子で有意差が認められた。S1P lyaseは脊髄損傷治療の新しい治療標的となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷に対する薬物治療は選択肢が限られており、本研究はスフィンゴシン1-リン酸とその代謝経路がその治療標的となり得る点を示した点で意義があると考えられる。今後S1P lyase阻害剤の投与方法と投与時期を最適化すること、また同様の作用を持つ他の薬物の効果についてもさらなる検討が待たれる。

研究成果の概要(英文)：Here, we investigated whether modulation of sphingosine 1-phosphate (S1P) lyase enhances functional recovery after spinal cord injury (SCI). We employed a mouse contusion SCI model, induced by the Infinite Horizons impactor using a force of 60 kdyn at the level of T10. Functional outcome was assessed with the Basso Mouse Scale. Mice were divided into two groups: Mice treated with per os administration of 4-deoxyribose (DOP), a S1P lyase inhibitor, via drinking water at a concentration of 50 mg/L and saline-treated control mice. Mice treated with DOP showed significantly better BMS score compared with that of control mice. A proteome cytokine array analysis revealed that DOP-treated mice show significantly decreased expression of inflammatory cytokines, including TNF, IL-27, CCL-1, G-CSF, IL-13, IL-1, IL-23, and CXCL-9. These results suggest that inhibition of S1P lyase can be a novel therapeutic strategy for the treatment of SCI.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄損傷 生理活性脂質 スフィンゴシン1リン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

我々は中枢神経損傷に対する新しい治療の標的として、生理活性脂質の一種であるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) と 5 種類の特異的受容体 (S1P1 - S1P5) の中枢神経における機能に関する研究を行ってきた。これまでに、S1P が脊髄損傷や脳梗塞などの中枢神経損傷部位で上昇すること、また S1P が神経幹細胞の S1P1 受容体に作用して強力な走化性子として作用することを報告した (文献 1, 2)。さらに S1P 受容体の作動薬で、免疫抑制剤として臨床応用されている FTY720 (一般名: Fingomolid) が脊髄損傷後の機能回復を促進し、その作用機序は血管透過性の抑制など、免疫抑制以外の作用が重要であることを明らかにした (文献 3)。しかしながら、中枢神経における S1P シグナルの役割には依然として未解明の部分が多く、FTY720 が作用する S1P 受容体以外にも脊髄損傷治療の標的分子が存在する可能性が残されている。

今回、新たな脊髄損傷治療の標的として、S1P の分解を調節する S1P リアーゼの役割に着目した。S1P は中枢神経にも豊富に存在するスフィンゴミエリンの分解産物であるスフィンゴシンが特異的リン酸化酵素によってリン酸化されて生成されるが、S1P リアーゼの作用を受けて不可逆的に分解される。これまでに S1P リアーゼの阻害剤がリンパ節中の S1P 濃度を著しく上昇させ、血液中のリンパ球数を減少させることが報告され、免疫抑制剤としての応用が期待されている (文献 4)。中枢神経疾患では多発性硬化症への応用が期待されているが、脊髄損傷に対する治療効果を検討した報告はない。S1P リアーゼは脊髄に強く発現していることが報告されており、我々は脊髄損傷後急性期における S1P リアーゼ活性の抑制が損傷部における S1P 濃度の増加を促進し、S1P が有する生のシグナルとしての作用が神経組織の保護と機能回復の促進につながるとの仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、S1P の主要な分解酵素である S1P lyase を阻害することが脊髄損傷後の機能回復を促進につながるか検討することである。

## 3. 研究の方法

### 実験動物

生後 10 - 12 週の野生型マウス (C57BL/6) を使用。

### 脊髄損傷モデル

吸入麻酔下に第 10 胸椎の椎弓切除を行い、Infinite Horizons impactor (Infinite Horizons, L.L.C., Lexington, KY, USA) を使用して、脊髄に 60 kdyn の定量的な圧挫損傷を加えて脊髄損傷モデルを作成した。

### 運動機能評価

運動機能評価は、平面上でのマウスの歩行能力を 0 - 9 点の 10 段階で判定する Basso Mouse Scale (BMS) を用いて評価した。脊髄損傷後 1, 3, 7, 14, 28, 35 日の各時点で測定を行った。

### S1P 阻害剤の至適投与量の検討

S1P 阻害剤として 4-deoxypyridoxine (DOP) を使用し、飲料水に溶かして持続投与した。DOP の効果は、マウスの末梢血液中の白血球分画 (顆粒球、B リンパ球、T リンパ球) を指標として評価し、適切な薬物濃度を検討した。血球数は顆粒球、B リンパ球、T リンパ球の割合を、それぞれ Gr-1、CD-19、CD3 の各表面抗体を指標としてフローサイトメトリーで定量評価した。

### 炎症性サイトカイン・ケモカイン濃度の定量化

脊髄損傷後 24 時間のマウスから損傷中心より頭尾側 2.5mm (長さ 5mm) の脊髄を採取し、タンパク分解酵素阻害剤と 1% Triton X-100 を含む溶液中で損傷脊髄中のタンパク質を精製し、Proteome Profiler Mouse Cytokine Array Panel A Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて、炎症に関連した 40 種類のサイトカインやケモカインのタンパク濃度を定量化した。

### 統計解析

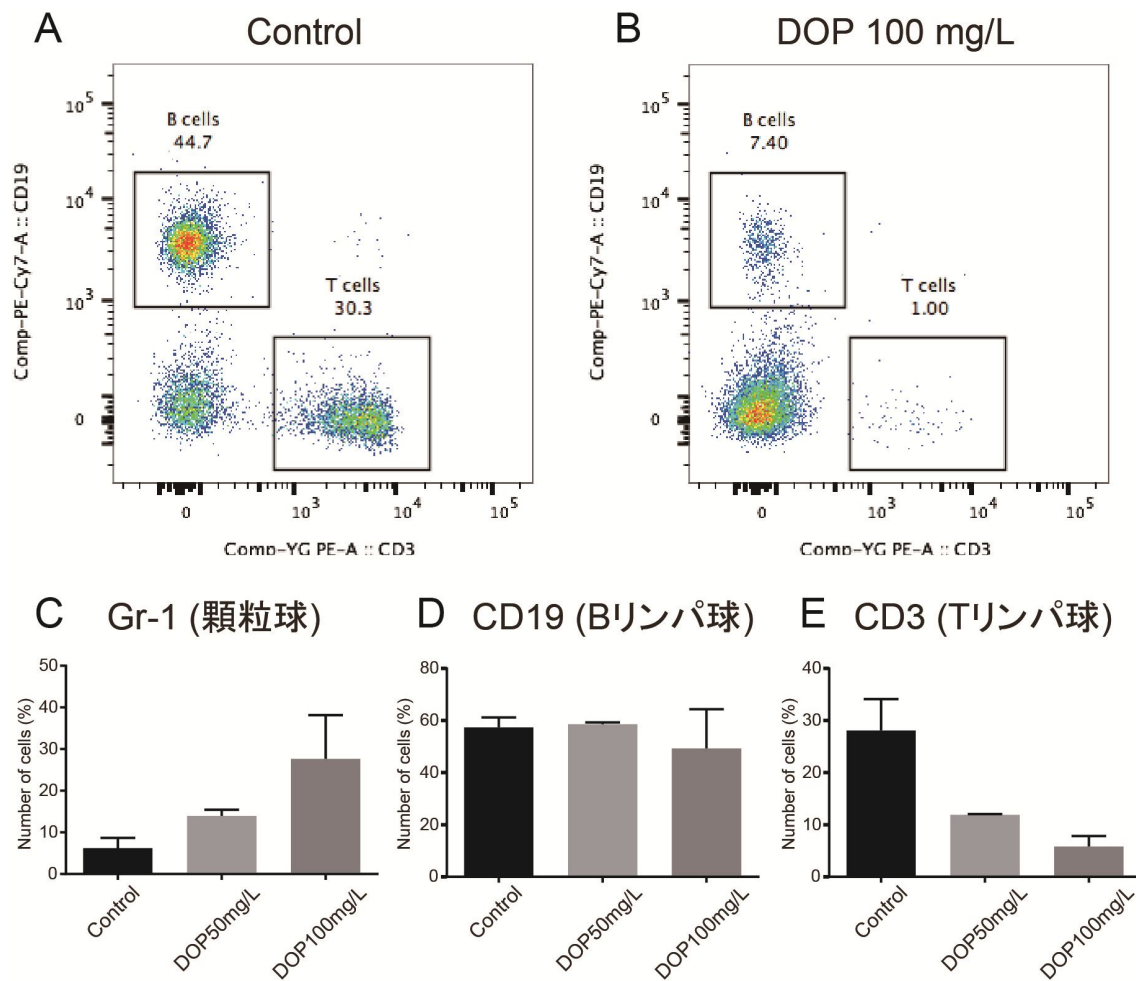
2 群間の比較には unpaired t test を、3 群間の比較には One-way ANOVA を使用した。運動機能の経時的変化の 2 群間比較には Repeated-measures ANOVA を使用した。

## 4. 研究成果

### S1P 阻害剤投与濃度と白血球分画

S1P 阻害剤である DOP を飲料水中に 50 mg/L と 100 mg/L の濃度で溶解して持続投与を行い、投与開始から 3 日後の白血球分画をフローサイトメトリー法で定量化した (図 1A, B)。100 mg/L では T リンパ球数が著しく減少するとともに顆粒球が有意に増加し (図 1C-E)、マウスの体重も減少していた。100 mg/L では免疫不全による細菌感染が生じていると考えられ、DOP の濃度は 50 mg/L を採用した。

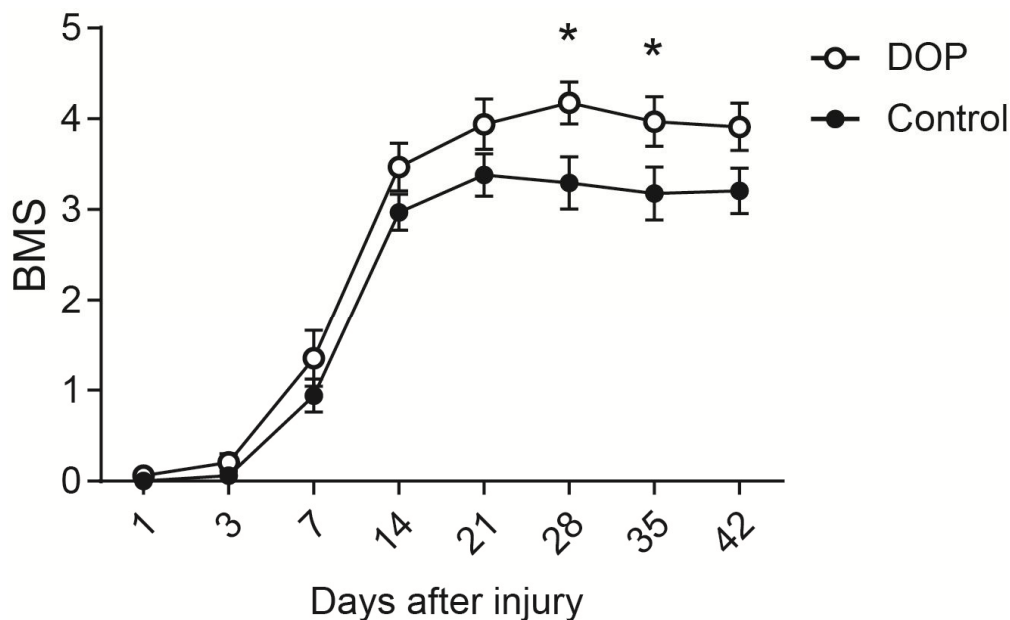
図 1



**DOP 投与が脊髄損傷後の機能回復に与える影響**

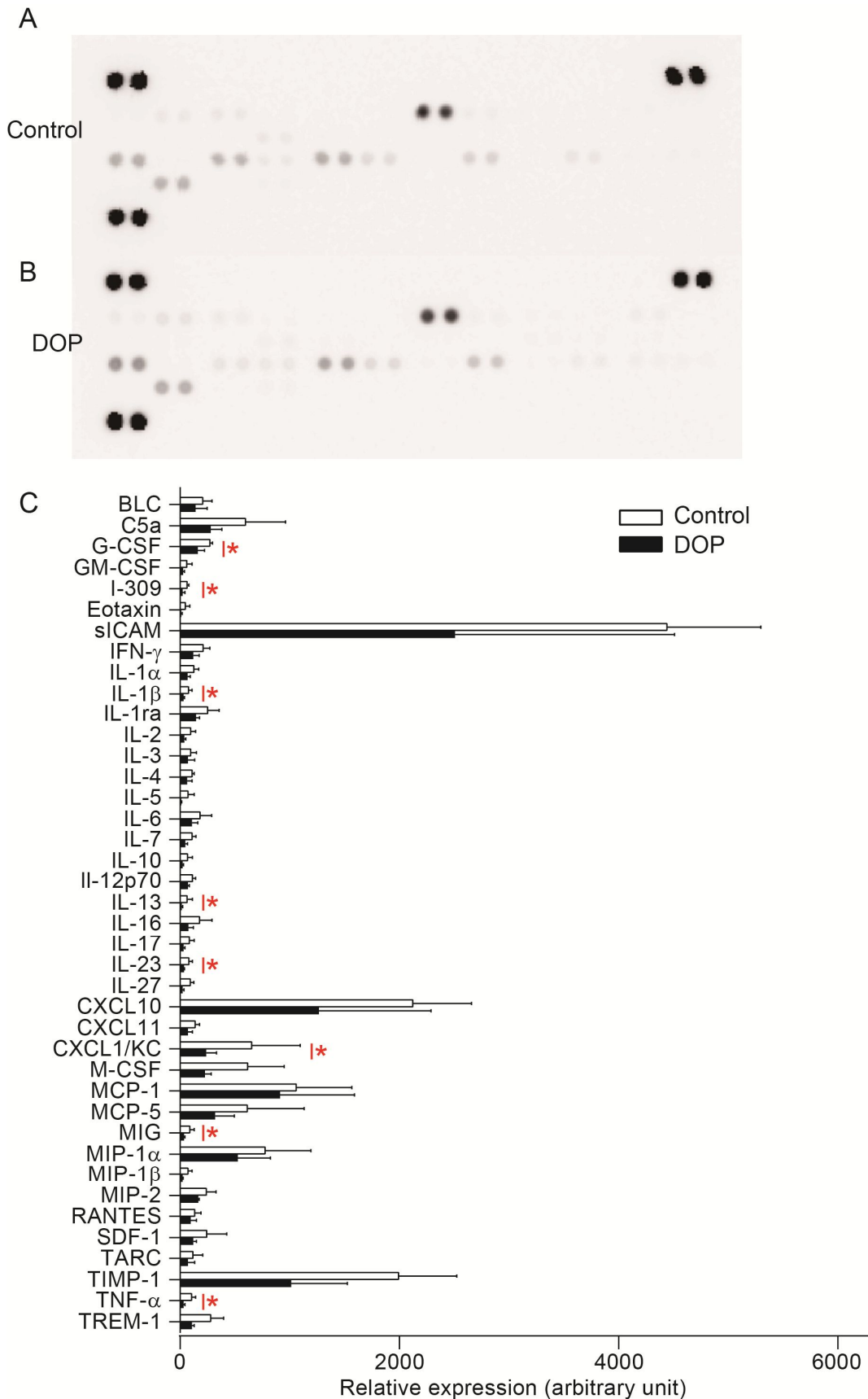
脊髄損傷マウスに対して通常の飲料水投与群 (Control) と DOP 50 mg/L 投与群で損傷後の下肢機能の推移を BMS により評価した。DOP 投与群は Control 群に比較して有意に機能回復が良好であった (P = 0.04, repeated measures ANOVA, n=16 each group)。

図 2



DOP が炎症性サイトカイン・ケモカイン発現に与える影響  
 損傷後 24 時間の脊髄における炎症性サイトカイン・ケモカインの発現を比較した。40 種類の候補のうち、TNF $\alpha$ 、IL-27、CCL-1、G-CSF、IL-13、IL-1 $\beta$ 、IL-23、CXCL-9 の 8 つの因子は、DOP 投与群でコントロール群に比較して有意に減少していた ( 図 3 )。

図 3



## 参考文献

1. Kimura A. Essential roles of S1P/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. Stem Cells. 2007
2. Kimura A. Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor-2 enhances migration of neural progenitor cells toward an area of brain. Stroke. 2008.
3. Norimatsu Y. FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily non-immunomodulatory mechanisms. Am J Pathol. 2012.
4. Schwab SR. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. Science 2005.

## 5 . 主な発表論文等

現在投稿準備中。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：大森 司

ローマ字氏名：Ohmori Tsukasa

所属研究機関名：自治医科大学

部局名：病態生理学

職名：教授

研究者番号(8桁): 70382843

研究分担者氏名：白石康幸

ローマ字氏名：Shiraishi Yasuyuki

所属研究機関名：自治医科大学

部局名：整形外科

職名：助教

研究者番号(8桁): 50646338

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。