

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19713

研究課題名(和文)皮膚硬化型慢性GVHDマウスにおける選択的S1P1阻害剤の有効性の検討

研究課題名(英文)The selective S1P1 modulator ameliorates murine Sclerodermatous Chronic Graft Versus Host Disease

研究代表者

加納 美優 (KANO, MIYU)

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：60756237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)/S1P受容体シグナルは免疫担当細胞の分化・遊走を制御しており、全身性強皮症において重要な治療標的である。新規選択的S1P1受容体阻害剤を皮膚硬化型慢性GVHDモデルマウスに投与したところ、皮膚及び肺の線維化は改善し皮膚への炎症細胞浸潤は減少した。さらに脾臓における制御性T細胞の増加を認めた。以上より強皮症に対する選択的S1P1受容体阻害剤の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine-1-phosphate (S1P) / S1P receptor signal regulates the differentiation and migration of immunocompetent cells and is an important therapeutic target in systemic sclerosis. A novel selective S1P1 receptor inhibitor was administered to chronic GVHD model mice. Skin and pulmonary fibrosis was improved and inflammatory cell infiltration into the skin was decreased. By contrast, S1P1 receptor inhibitor increased the frequency of regulatory T cells in the spleen of Scl-cGVHD mice. In addition, S1P1 receptor inhibitor attenuated the mRNA expression of extracellular matrix and fibrogenic cytokines such as IL-1 and IL-6, in the skin of Scl-cGVHD mice. These results suggested that the selective S1P1 inhibitor is a promising candidate for treating patients with SSc and Scl-cGVHD.

研究分野：自己免疫疾患

キーワード：S1P1受容体阻害剤 全身性強皮症 慢性cGVHD

### 1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症(Systemic sclerosis, SSc)は皮膚および内臓諸臓器の線維化を来す膠原病で、その原因は未だ不明である。SScは皮膚硬化型慢性GVHD (Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease, Scl-cGVHD)との共通点が知られている。B10.D2 (H-2<sup>d</sup>) マウスの骨髄を BALB/c (H-2<sup>d</sup>) マウスに移植することにより Scl-cGVHD を誘導することができ、SSc のモデルマウスとして有用である。

スフィンゴ脂質代謝産物であるスフィンゴシン1-リン酸(S1P)は、赤血球と血管内皮から活発に産生・放出され血漿中に数百nMの濃度で存在する脂質メディエーターである。S1P受容体はこれまで、S1P<sub>1</sub>からS1P<sub>5</sub>まで5つの受容体が同定されている。なかでもS1P<sub>1</sub>が生理的に最も重要である。S1Pシグナル系の主要な標的は血管系と免疫系である。血管系においては胎生期の血管形成、障壁機能の維持、血管障害に対する防御などに関与する。一方、免疫系においてはリンパ球の体内循環・活性化・分化や、マクロファージ系細胞の機能の調節により、免疫機能の生理的調整、炎症応答に関与する。Tリンパ球は胸腺で成熟後、血液へと移出し、血液と二次リンパ組織中を循環する。未感作Tリンパ球は二次リンパ組織へ移行後、抗原を提示されなかった場合はそのまま血液へと戻るが、抗原提示細胞によって提示された抗原を認識した場合はエフェクター細胞へと分化、増殖後、血液へと戻る。胸腺及び二次リンパ組織からの移出には、S1PおよびS1P<sub>1</sub>が中心的な働きをしている。リンパ球上に発現しているS1P<sub>1</sub>が、胸腺-血漿間あるいは二次リンパ組織-リンパ液-血漿間のS1P濃度勾配に依存した化学遊走を引き起こす。

近年、S1PとS1P<sub>1</sub>受容体がSScの発症に重要であるとの報告がなされている。SSc患者において、血清S1Pレベルが増加することや、SSc患者の線維芽細胞において、S1P<sub>1</sub>受容体とS1P<sub>2</sub>受容体の発現低下ならびにS1P<sub>3</sub>受容

体の発現増加が報告されている。ACT-334441は生体内にて速やかにリン酸化され、S1P受容体アゴニストとして作用し、その結果リンパ球状S1P<sub>1</sub>受容体の内在化を誘導することでリンパ球の再循環を制御し免疫抑制作用を発揮する。

### 2. 研究の目的

(1) 強皮症モデルマウスに選択的S1P<sub>1</sub>受容体阻害剤を投与し、皮膚硬化の改善効果を検討する。

(2) 選択的S1P<sub>1</sub>受容体阻害剤の線維化抑制効果を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Scl-GVHDモデル

800 cGy照射された8-12週のBALB/c(H-2d)マウスをレシピエントとして使用した。B10.D2(H-2d)マウスをドナーとして使用した。まずB10.D2マウスから骨髄細胞(10x10<sup>6</sup>細胞)と脾臓細胞(10x10<sup>6</sup>細胞)を採取し、レシピエントマウスに骨髄移植し、Scl-GVHDを誘導した。

#### (2) 薬剤の投与

ACT334441は1mg/kgを経口にて投与した。day 0からday42までもしくはday 22からday 42まで投与した。Control群は蒸留水を投与した。

#### (3) GVHD スキンスコア

以下のスコアリングシステムを用いた。

スコア 0=正常、スコア 1= 皮膚病変<1cm<sup>2</sup>、スコア 2= 皮膚病変 1-2cm<sup>2</sup>、スコア 3= 皮膚病変 2-5cm<sup>2</sup>、スコア 4= 皮膚病変 5-10cm<sup>2</sup>、スコア 5= 皮膚病変 10-15cm<sup>2</sup>、スコア 6= 皮膚病変 15-20cm<sup>2</sup>、スコア 7= 皮膚病変>20cm<sup>2</sup>。尻尾の皮膚病変は0.4、耳や手足の皮膚病変をそれぞれ0.3とし、すべての合計点で示した。皮膚病変はH&E染色、Masson's trichrome染色にて評価した。病理組織学的スコアはepidermal morphology、dermal fibrosis、inflammation、subdermal fat、skin appendage numberをそれぞれ0-2で評価した。

#### (5) 統計

全てのデータは平均±標準誤差(SEM)で示した。有意差検定はStudent's t testを使

用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) スキンスコア

脱毛面積に応じて skin score を決め、3 日おきに測定した。薬を全期間投与した群も後半のみ投与した群もいずれも、PBS 投与群と比較して、有意差をもって skin score が改善していた。

##### (2) 皮膚および肺の病理組織

皮膚および肺の病理組織を HE 染色、マッソントリクローム染色を行い検討した。コントロールの PBS 投与群で厚くなった真皮は ACT-334441 を投与することで薄くなっていた。また肺でも、増加した膠原線維が、薬投与後に減少していた。パラフィン包埋した検体を用いて皮膚および肺のコラーゲン量を測定した。皮膚では PBS 投与群と比較して薬を全期間投与した群でのみコラーゲン量が減少しており、肺では PBS 群と比較して薬剤を投与したいずれの群でも有意差をもってコラーゲン量の減少がみられた。

##### (3) 免疫担当細胞の皮膚への浸潤

CD4<sup>+</sup> T cells、CD8<sup>+</sup> T cells、CD11b<sup>+</sup> monocyte/macrophages それぞれにおいて PBS 投与群は Syngenic 群と比較して細胞浸潤数が増加しており、薬投与にて細胞浸潤数は減少していた。また、フローサイトメトリーでも、皮膚における炎症細胞浸潤を比較した。免疫染色の結果と同様で CD4<sup>+</sup> T cells、CD8<sup>+</sup> T cells、CD11b<sup>+</sup> monocyte/macrophages 細胞数が薬投与により有意に減少していた。

##### (4) 制御性 T 細胞に対する効果

移植後 14 日目の脾臓における制御性 T 細胞についてフローサイトメトリーで測定した。薬投与群において PBS 投与群と比較して CD4CD25 陽性細胞における制御性 T 細胞の割合が、有意差をもって増加していた。

##### (5) サイトカインに対する影響

移植後 4 2 日目の皮膚を用いて、リアルタイム PCR を行い、サイトカインなどの mRNA を測定した。炎症性サイトカインである IL-1B IL-6 IL-13 が薬投与により有意に減少していました。ColA2, Fibronectin1 も、有意差をもって減少していた。

##### (6) プレオマイシンモデルにおける効果

Bleomycin 誘発性強皮症モデルマウスにおいても S1P1 受容体阻害剤を投与し、皮膚硬化が改善するかを検討した。B6 マウスの背部皮内にプレオマイシンを 1 日おきに投与し、S1P1 受容体阻害剤は経口で毎日投与し、28 日目に評価した。プレオマイシンを投与して誘発された皮膚および肺の線維化は、薬剤を投与することで、改善がみられた。

以上より、ACT334441 はリンパ節やパイエル板にリンパ球を蓄積させることによって、循環リンパ球を減少させて、炎症部位へのリンパ球の浸潤を抑制することで免疫抑制作用を発揮していると考えられる。本研究にて、ACT334441 は Scl-cGVHD 皮膚への免疫担当細胞の浸潤を抑制し、サイトカインならびにケモカインの発現低下を促すことにより Scl-cGVHD の発症を抑制していることが明らかとなった。このように、ACT334441 は Scl-cGVHD の発症において、免疫担当細胞の浸潤抑制を介して作用していることが明らかとなり、ヒトでの Scl-cGVHD ならびに SSc 患者の有効な治療薬となる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

5th World Systemic Sclerosis Congress 2018

The selective S1P1 agonist ACT-334441 ameliorates murine Sclerodermatous Chronic Graft Versus Host Disease

Miyu Kano, Mutsumi Date, Takashi Matsushita, Yasuhito Hamaguchi, Kazuhiko Takehara

Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Kanazawa, Japan

[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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
加納 美優 (KANO, Miyu)  
金沢大学・附属病院・医員  
研究者番号：60756237

(2)研究分担者  
該当者なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
該当者なし ( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
該当者なし ( )