

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591018
 研究課題名（和文） 中枢神経脱髄疾患に対する抗血小板薬を用いた新規治療法開発の研究
 研究課題名（英文） A novel therapeutic approach to central nervous system demyelinating disease with anti-platelet agents
 研究代表者
 宮本 勝一（MIYAMOTO KATSUICHI）
 近畿大学・医学部・講師
 研究者番号：50388526

研究成果の概要：

抗血小板薬である Cilostazol が多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の治療に有効であることを見出した。MOG 誘導マウス EAE に Cilostazol 含有エサを継続投与すると EAE 症状は有意に軽症化した。MOG 反応性 T 細胞の recall response は Cilostazol 投与群では増殖反応や IFN γ 産生が抑制され、血清中の可溶性接着分子である ICAM-1 や p-selectin が有意に低下した。以上より、Cilostazol は自己反応性 T 細胞増殖や接着分子の発現を抑制することにより EAE に対する治療効果を有する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経内科、神経免疫

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症（multiple sclerosis: MS）は未だに確実な治療法がない神経難病である。本邦での患者数は年々増加の一途をたどり、早期の治療法確立が望まれている。病因は中枢神経の髄鞘構成蛋白に対する自己免疫疾患と考えられているが、詳細な病態は依然解明されていない。現在、インターフェロンを始めとする免疫修飾療法が試みられ、一定の効果が得られているが、治癒や寛解に至るに

は程遠い状況である。研究代表者はこれまでに、MS の動物モデルとされる実験的自己免疫性脳脊髄炎（experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE）を用いて、病態解明とともに、数々の新規治療法の開発を試みてきた。

まず Natural Killer T（NKT）細胞に着目し、新規に作成した糖脂質リガンドを用いて、EAE や関節リウマチモデルの治療に成功した（*Nature* 2001; 413: 531、*Arthritis Rheum* 2004; 50: 305 など）。新規リガンドは NKT

細胞に対して、Th2 サイトカインである IL-4 や IL-10 を選択的に大量に産生させる働きがあり、免疫学的バランスを Th2 に偏倚させることによって治療に成功した。

また、T 細胞副シグナルに注目した EAE 治療の試みでは、inducible costimulatory molecule (ICOS) 分子が存在しないと免疫寛容が成立しないことを明らかにした (*J Immunol* 2005; 175: 7341)。さらに cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) の新規抗体 (3C1.B5) を用いた EAE 治療にも成功した (投稿準備中)。いずれも免疫学的バランスを Th2 側に是正することで EAE を治療することに成功した。これらの知見は、免疫学的バランス是正が EAE の治療戦略として重要であり、MS に治療にも応用できる可能性を示した。

これらと平行して、研究代表者は新世代の消炎鎮痛薬である選択的 Cyclooxygenase-2 (COX-2) 阻害剤を用いた治療研究 (*Neuroreport* 1998; 9: 2331、*Muscle Nerve* 1999; 22: 1704、*Muscle Nerve* 2002; 25: 280 など)を報告している。EAE における抗炎症薬を用いた治療は従来から多くの報告がなされているが、臨床応用では長期使用による副作用が解決しないため導入されていない。しかし近年、副作用が少ないとされる抗炎症薬 COX-2 阻害薬が登場し、慢性関節リウマチなどの鎮痛作用に臨床使用されている。研究代表者は、免疫性ニューロパチーのモデルである実験的自己免疫性神経炎 (EAN) を用いた実験において、選択的 COX-2 阻害薬はプロスタグランジン産生を抑制し、傷害的な T 細胞の浸潤抑制や炎症巣におけるマクロファージのミエリン貪食阻止に働いて末梢神経を保護し、神経炎症状を軽症化させることを明らかにした。その中で新世代の選択的 COX-2 阻害薬である Celecoxib は免疫学的バランスを Th2 に偏倚させる特徴を持つことが判明した。これまで中枢神経系のモデル動物である EAE に対しては、COX-2 阻害薬の有効性は乏しく、新世代の選択的 COX-2 阻害薬を用いた治療報告はみられなかった。しかし Celecoxib は他の選択的 COX-2 阻害薬と異なり、免疫バランスを Th2 にシフトさせる作用を有するため EAE に対する治療効果が期待された。

そこで、EAE に対する Celecoxib の治療効果を検証したところ、Celecoxib は著明に EAE を抑制し、発症後の投与でも有効であった。Celecoxib は免疫学的バランスを Th2 にシフトさせるばかりでなく、免疫細胞 (CD4 陽性 T 細胞) の中枢神経系 (CNS) への侵入を阻止していることが明らかになった。免疫細胞が CNS へ侵入する際に脳血液関門 (BBB) を通過するが、血管内皮の接着分子やケモカインなどが重要である。Celecoxib

は接着分子である ICAM-1、P-selectin、ケモカインである MCP-1 の発現を抑制していた。驚いたことに、これらの効果は COX-2 欠損マウスでも再現されたことから、Celecoxib は COX-2 阻害薬でありながら、COX-2 を介さない経路で EAE を抑制することが判明した (*Brain* 2006;129:1984)。

つまり、EAE 治療の戦略として、接着分子やケモカインなど血管内皮に関与する因子がターゲットとなることを確認した。

2. 研究の目的

前述したように、血管内皮が EAE や MS の治療ターゲットとなることが示唆された。血管内皮に関する研究は、これまで虚血性心疾患や脳梗塞の分野で多くの知見があり、血管内皮と血小板の関係は血管狭窄や閉塞に重要である。その結果、アスピリンをはじめとする抗血小板薬が次々に開発され、今日広く使用されている。しかし、中枢神経の炎症性疾患であり自己免疫病である MS に対する抗血小板薬の効果は明らかではなく、十分な研究は行われていない。特に血管内皮に対するメカニズムからアプローチした報告は見当たらない。

本研究では、Cilostazol をはじめとする種々の抗血小板薬の EAE に対する治療効果を検証し、抗血小板薬を用いた新しい治療法を見出すことを目的とする。本研究で使用する抗血小板薬はすでに臨床使用されている薬剤を用いるため、治療効果が証明できれば MS 治療薬として臨床応用できる可能性がある。

3. 研究の方法

2年間の期間内で、MS の動物モデルである EAE における抗血小板薬の治療効果、および作用機序に関する検証を終了し、有効性を明らかに出来るような方法を検討した。

初年度は、EAE を用いた *in vivo* 実験を中心に行った。実験対象として野生型 B6 マウス (雌、生後 8-10 週齢) を用い、EAE は MOG(35-55)ペプチド 100 μ g と CFA で作成した emulsion を皮下注射し、さらに百日咳毒素 (200ng/回) を投与して誘導した。

治療は、代表的な抗血小板薬であるアスピリンや Cilostazol など、すでに市販されている薬剤を用いた。

投与は薬剤を混合したエサによる経口投与、Feeding カヌラを用いる方法による経口投与、あるいは注射による腹腔投与にて行った。投与開始は EAE 感作当日、または EAE 発症後からの 2 パターンを設定した。

EAE の評価は、臨床スコア、体重変化、中枢神経の病理学的所見などを指標とする。臨床スコアは次のスケールに基づいて第三者が毎日評価する (0: 正常、1: 尾のトーン

ス低下、2:尾の完全下垂、3:歩行異常、4:後肢完全脱力、5:前肢脱力を含む後肢完全脱力、6:死亡)。

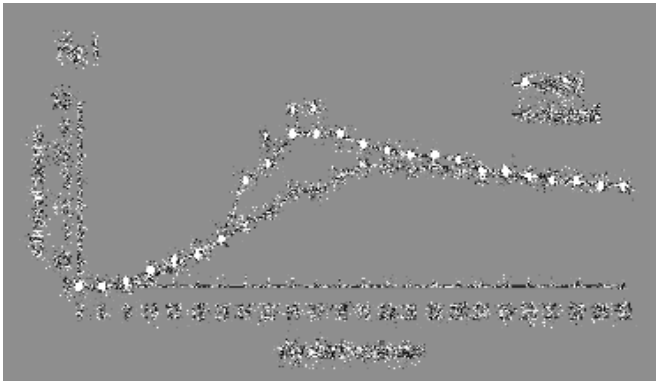
また EAE 経過中、7日毎に尾静脈より血液を採取し、血清中抗 MOG 抗体価や各種接着分子を ELISA 法にて測定した。血小板に対する評価としては、FDP 値、コラーゲン値などを測定し、評価した。

平行して EAE 感作後 10 日目前後に所属リンパ節を取り出し、single cell にし、抗原特異的 T 細胞の MOG(35-55)ペプチド再刺激に対する反応 (recall response) を、ELISA 法によるサイトカイン定量 (IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-10 など) やサイミジン取り込みによる増殖反応にて評価した。これらの評価項目から EAE 治療に有効な抗血小板薬を見いだす。

血管内皮機能に及ぼす薬理効果については、前述したよう血清中の可溶性接着分子の評価に加えて、免疫組織化学染色法を含む、病理学的評価も加えた。EAE 誘導後 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目に脳脊髄を灌流固定後に摘出し、パラフィン包埋後に薄切スライスを作成し、通常の HE 染色や LFB 染色に加えて、接着分子の抗体を用いた免疫染色も施行し評価した。

4. 研究成果

EAE に対して、抗血小板薬を 1%含有するエサ、あるいはコントロールとして通常エサを与えて症状を評価した。その結果、cilostazol 含有エサ投与群は、他の抗血小板薬投与群と比較して EAE 症状が最も軽症であり、通常エサ投与群と比較して EAE 症状は有意に抑制された (下図 Fig1、表)。



	Max. スコア	発症頻度	発症日	Cumulative score
control	3.5±0.12	28/28	13.9±0.54	42.2±2.70
cilostazol	2.9±0.28*	23/28	14.6±0.70	36.1±3.86

control 群 : n=28, cilostazol 群 : n=28

Error bars represent SEM. * $P < 0.05$

なお、EAE 発症後に投与を開始した場合は、効果は得られるものの、統計学的有意差はな

かった。

次に、EAE 誘導後 11 日目のリンパ球を in vitro にて MOG で再刺激し、細胞増殖反応や培養上清のサイトカインを測定したところ、cilostazol 投与群では MOG 反応性 T 細胞の増殖反応 (Fig2A) や IFN- γ 産生 (Fig2B) が有意に低下していた。

Fig.2A

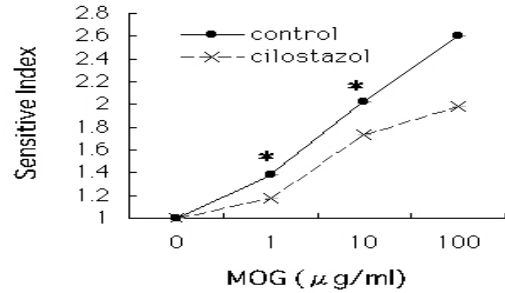
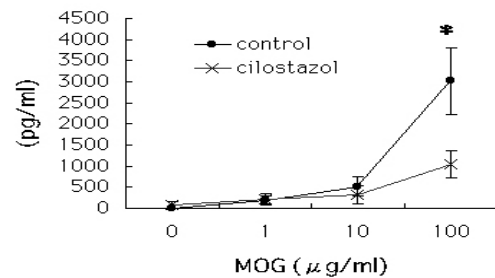


Fig.2B



つまり免疫学的バランスの Th1 を抑制する方向に作用していた。

また、血清中可溶性接着分子を ELISA にて測定したところ、EAE 症状発症時期にて、ICAM-1 (Fig3A) と p-selectin (Fig3C) が有意に低下していた。

Fig.3A

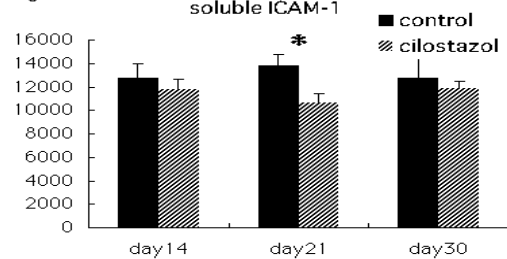
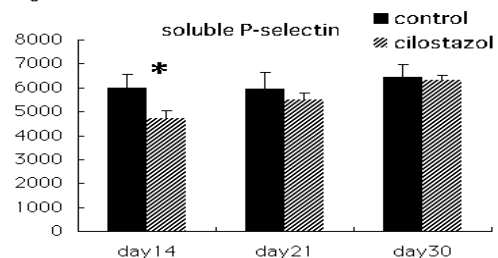


Fig.3C



接着分子は EAE において、活性化リンパ球の脳血液関門通過に重要である。これらの結果から、cilostazol は EAE における induction phase において治療効果を発揮していることが明らかになった。

以上より、Cilostazol は自己反応性 T 細胞増殖や接着分子の発現を抑制することにより EAE を抑制することが明らかになった。Cilostazol はすでに市販されている薬剤であることから、将来的に MS の治療薬となる可能性がある。

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 3 件)

① Miyamoto K (他 4 名、2 番目)、Kusunoki S (他 4 名、4 番目). 論文表題: Selective phosphodiesterase-3 inhibitor cilostazol ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. 雑誌名: Neuroreport. 査読有り. 発行年: 2009 年 (印刷中)

② Miyamoto K (他 5 名、1 番目)、Kusunoki S (他 5 名、5 番目). 論文表題: Upregulation of water channel aquaporin-4 in experimental autoimmune encephalomyelitis. 雑誌名: J Neurol Sci. 査読有り. 発行年: 2009. 276 巻 103-107 頁.

③ Miyamoto K (他 5 名、1 番目)、Kusunoki S (他 5 名、5 番目). 論文表題: Roles of complex gangliosides in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. 雑誌名: Glycobiology. 査読有り. 発行年: 2008. 18 巻 408-413 頁.

[学会発表] (計 3 件)

① Miyamoto K (他 3 名、1 番目). The treatment with selective phosphodiesterase-3 inhibitor cilostazol for experimental autoimmune encephalomyelitis. 国際神経免疫学会 (ICN 2008) 2008 年 10 月 29 日 米国・テキサス

② 宮本勝一 (他 2 名、1 番目). Selective phosphodiesterase-3 inhibitor cilostazol has repressive effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. 第 37 回日本免疫学会総会学術集会 2007 年 11 月 20 日 横浜

③ 宮本勝一 (他 3 名、2 番目). 抗血小板薬を用いた実験的自己免疫性脳脊髄炎の治療. 第 25 回日本神経治療学会総会 2007 年 6 月 21 日 仙台

[図書] (計 1 件)

① 宮本勝一. 新興医学出版社【多発性硬化症の診断と治療】多発性硬化症の新薬開発の現状: 世界の動向と日本 2008 年 271-277 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 勝一 (MIYAMOTO KATSUICHI)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 5 0 3 8 8 5 2 6

(2) 研究分担者

楠 進 (KUSUNOKI SUSUMU)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 9 0 1 9 5 4 3 8

(3) 連携研究者

なし