

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790701  
 研究課題名 (和文) FTY720 投与による SKG マウスにおける Treg への影響と関節炎抑制効果  
 研究課題名 (英文) The analysis of FTY720 effect on Treg and arthritis in SKG mice  
 研究代表者  
 常見 幸 (TSUNEMI SACHI)  
 兵庫医科大学・医学部・ポストドクター  
 研究者番号：80425123

研究成果の概要 (和文) : スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の機能的アンタゴニストである FTY720 の投与により、関節リウマチモデルマウスにおける関節炎が抑制された。その機序として、循環 T 細胞減少作用の他、抗炎症作用、Th2 免疫応答誘導など、FTY720 の多彩な作用の関与が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : FTY720 (a high-affinity agonist for sphingosine 1-phosphate receptors) administration suppressed the progression of laminarin-induced arthritis in rheumatoid arthritis (RA) model of SKG mice. FTY720 can inhibit arthritis in SKG mice via sequestration of autoimmune CD4<sup>+</sup> T cells in the thymus, enhancement of Th2 immune responses, and inhibition of PGE<sub>2</sub> production by synovial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：関節リウマチ、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P)、FTY720、SKG マウス

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は、細胞膜の構成成分であるスフィンゴミエリンから派生するリン脂質で、細胞外に放出された後、標的細胞上の受容体に結合して作用を発揮する。その作用は、増殖・分化・アポトーシス・形態変化・遊走・浸潤など多彩であり、血管新生・炎症・発癌などに深く関与している。現在、5 種類の受容体 (S1P<sub>1-5</sub>) が同定さ

れており、免疫系において重要な役割を担う T 細胞の遊走に関しては、S1P と S1P<sub>1</sub> の相互作用により、胸腺・二次リンパ系組織からの T 細胞の遊走が促進されることが近年明らかにされた。

また、近年発見された FTY720 は、生体内でリン酸化された後に S1P<sub>1</sub> に結合し、S1P<sub>1</sub> のダウンレギュレーションを惹起し、機能的にはアンタゴニストとして作用する。そして、胸

腺・二次リンパ系組織からの成熟リンパ球の移出を抑制して循環 T リンパ球を減少させることにより、炎症部位へのリンパ球浸潤を抑制し、免疫抑制効果を発揮する。ヒトでは多発性硬化症患者に対する第二相試験において、一定の治療効果が認められているが、そのメカニズムについては未知の部分も多い。申請者の教室では、すでに S1P<sub>1</sub> の関節リウマチ (RA) 患者滑膜組織での発現と S1P の滑膜細胞機能に対する役割を証明し (Arthritis Rheum, 54:742-753, 2006)、またシェーグレン症候群 (SS) 患者唾液腺組織において S1P<sub>1</sub> の発現が認められること、唾液腺上皮細胞株に S1P と FTY720 を添加すると、S1P 添加では IL-6 産生が亢進されるのに対し、FTY720 では亢進されなかったことなどを報告し (J. Immunol, 180 (3), 1921-1928, 2008)、S1P/S1P<sub>1</sub> シグナルが自己免疫疾患に及ぼす影響について検討を続けている。申請者は、RA の動物モデルである SKG マウスに対して FTY720 の投与実験を行い、関節炎抑制効果を確認することができているが、その関節炎抑制メカニズムについては、まだ明らかにできていない。多くの自己免疫疾患において Treg の量的・機能的異常が認められることが明らかになっているため、本研究では、FTY720 の SKG マウス関節炎抑制効果を詳細に解析するとともに、関節炎発症における Treg の動態も検討する。

## 2. 研究の目的

FTY720 による関節炎抑制の機序を明らかにし、関節炎発症における Treg の動態についても検討する。さらには RA に対する新規薬剤としての FTY720 の可能性を探求する。

## 3. 研究の方法

- (1) SKG マウスに FTY720 を連日経口投与し、経時的に関節腫脹スコアを記録。
- (2) 末梢血中リンパ球、胸腺・脾臓の細胞数、胸腺・脾臓の各細胞の Flow Cytometry 結果を対照群と比較。
- (3) 腫脹関節の Xp 写真・病理組織を、対照群と比較して検討。
- (4) FTY720 を投与した SKG マウスと対照群の後肢関節の炎症性サイトカインの発現を免疫組織染色にて解析。
- (5) FTY720 を投与したマウス脾臓 CD4+T 細胞上の RANKL の発現を FCM にて解析。
- (6) MH7A の PGE<sub>2</sub> の産生に及ぼす FTY720 の効果を検討
- (7) アロ抗原刺激脾臓 CD4+T 細胞のサイトカイン産生に及ぼす FTY720 の効果を検討。

## 4. 研究成果

FTY720 投与群では、対照群と比較して関節腫脹スコア・末梢血中リンパ球数・脾臓の細胞

数が低下し、胸腺の細胞数が増加した (Fig1, 2)。FACS 解析では、脾臓における CD4+T 細胞・CD8+T 細胞の比率が低下し、胸腺における CD4+T 細胞・CD8+T 細胞の比率が上昇していた (Fig2)。Treg の比率は両群間で有意差が認められなかった。対照群では腫脹関節の Xp 写真において骨破壊が認められ、また病理組織においてリンパ球浸潤・滑膜増殖が認められたが、FTY720 投与群では殆ど認められなかった (Fig3)。さらに FTY720 投与群では、免疫組織染色にて炎症性サイトカインの発現が低下していた一方で、脾臓 CD4+T 細胞上の RANKL の発現は増加していた (Fig3, 4)。また、FTY720 添加により、MH7A による PGE<sub>2</sub> 産生は低下し、アロ抗原刺激脾臓 CD4+T 細胞による IL-4 産生が増加した (Fig5, 6)。以上より、FTY720 投与による関節炎抑制機構として、循環 T 細胞減少作用の他、抗炎症作用、Th2 免疫応答誘導など、FTY720 の多彩な作用の関与が示唆された。FTY720 は今後、関節リウマチの新たな治療アプローチとなる可能性がある。

Fig1 関節炎の経過:

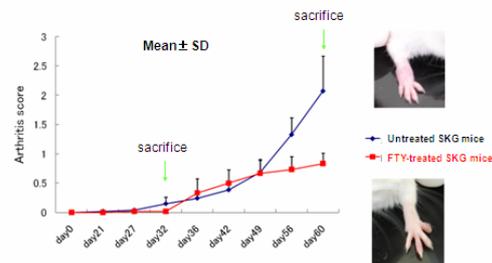


Fig2 細胞数、FACS:

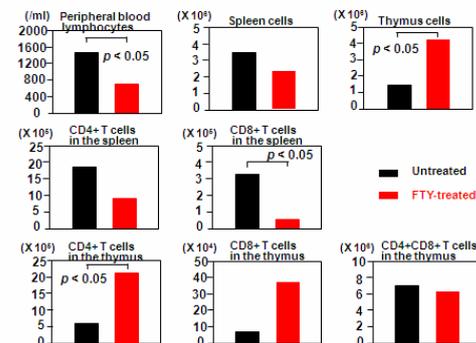


Fig3.病理組織:



Fig4.CD4+T細胞上のRANKLの発現:

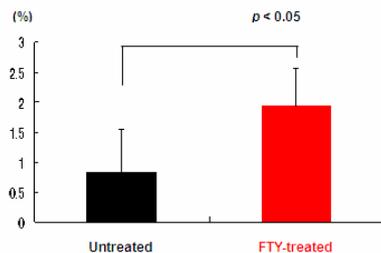


Fig5.PGE<sub>2</sub>産生:

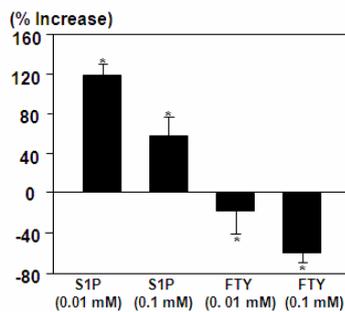
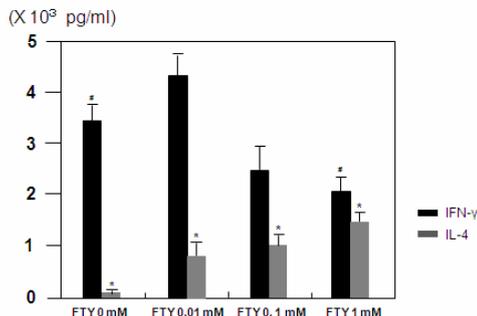


Fig6.Th1/Th2免疫応答:



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2件)

①Tsunemi S, Iwasaki T, Kitano S, Imado T, Miyazawa K, Sano H. Effects of the novel immunosuppressant FTY720 in a murine rheumatoid arthritis model. 査読有り, Clinical Immunology. 2010 Apr 24. [Epub ahead of print]

②北野将康, 関口昌弘, 常見 幸, 橋本尚明, 岩崎 剛, 佐野 統. 自己免疫疾患におけるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) /S1Pレセプターシグナルの役割—関節リウマチとシェーグレン症候群を中心に—査読無し, Minophagen Medical Review, 2008, 53, 135-145.

〔学会発表〕(計20件)

①Kitano M, Takeshita H, Tsunemi S, Kanda C, Sekiguchi M, Azuma N, Iwasaki T, Sano H. The role of sphingosine 1-phosphate/S1P1 signaling in the osteoclastogenesis of rheumatoid arthritis. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009.12.2-4, 大阪

②Kanda C, Iwasaki T, Tsunemi S, Kitano S, Takeshita H, Sano H. 関節リウマチの骨再生におけるFTY720の効果. 第39回日本免疫学会総会・学術集会 2009.12.2-4, 大阪

③常見 幸, 岩崎 剛, 北野幸恵, 神田ちえり, 関口昌弘, 北野将康, 佐野 統. FTY720の関節炎抑制効果機序に関する検討. 第37回日本臨床免疫学会総会 2009.11.13-15, 東京

④Iwasaki T, Tsunemi S, Kitano S, Kanda C, Sano H. Multiple effects of FTY on the immune system, inflammation, and bone remodeling in rheumatoid arthritis. The 73th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology (ACR/ARHP2009) 2009.10.16-21, Philadelphia, U. S. A.

⑤Kitano M, Takeshita H, Tsunemi S, Kanda C, Sekiguchi M, Azuma N, Iwasaki T. The role of sphingosine 1-phosphate /S1P1 signaling in the osteoclastogenesis of rheumatoid arthritis. The 73th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology (ACR/ARHP2009) 2009.10.16-21, Philadelphia, U. S. A.

⑥Kanda C, Iwasaki T, Tsunemi S, Kitano S, Takeshita H, Sano H. Effect of FTY720 on bone remodeling in rheumatoid arthritis. The 73th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology (ACR/ARHP2009) 2009.10.16-21, Philadelphia, U. S. A.

⑦北野将康, 常見 幸, 竹下治範, 神田ちえり, 関口昌弘, 岩崎 剛, 佐野 統. スフィ

ンゴシン 1 燐酸(S1P)/S1P受容体シグナルの関節リウマチ病態における役割. 第 19 回日本リウマチ学会近畿支部学術集会 2009. 9. 5, 大阪

⑧ 関口昌弘, 岩崎 剛, 神田ちえり, 西岡亜紀, 常見 幸, 東 直人, 北野将康, 黒岩孝則, 橋本尚明, 松井 聖, 佐野 統. シェーグレン症候群(SS)におけるTh17 細胞と制御性T細胞の役割 -S1P1/FTY720 シグナルの関与について. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会(JCR2009) 2009. 4. 23-26, 東京

⑨ 佐野 統, 北野将康, 常見 幸, 関口昌弘, 神田ちえり, 西岡亜紀, 東 直人, 黒岩孝則, 橋本尚明, 松井 聖, 岩崎 剛. 関節リウマチ発症におけるスフィンゴシン 1 リン酸(S1P)/S1P受容体シグナルの役割. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会(JCR2009) 2009. 4. 23-26, 東京

⑩ 北野将康, 竹下治範, 神田ちえり, 常見 幸, 西岡亜紀, 関口昌弘, 東 直人, 黒岩孝則, 橋本尚明, 松井 聖, 岩崎 剛, 佐野 統. 関節リウマチ滑膜細胞でのRANKL発現におけるスフィンゴシン 1 リン酸(S1P)/S1P受容体シグナルの役割. 第 53 回日本リウマチ学会総会・学術集会(JCR2009) 2009. 4. 23-26, 東京

⑪ 常見 幸, 岩崎 剛, 北野幸恵, 関口昌弘, 今戸健人, 北野将康, 佐野 統. 関節リウマチモデルマウスに対するFTY720 による関節炎抑制効果の検討/Suppression of arthritis in a murine arthritis model by FTY720. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008. 12. 1-3, 京都

⑫ 北野将康, 竹下治範, 北野幸恵, 関口昌弘, 常見 幸, 黒岩孝則, 橋本尚明, 松井 聖, 岩崎 剛, 佐野 統. 関節リウマチ滑膜細胞でのRANKL発現におけるSphingosine 1-phosphate/S1P1 シグナルの役割. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会 2008. 12. 1-3, 京都

⑬ 常見 幸, 関口昌弘, 北野将康, 今戸健人, 北野幸恵, 岩崎 剛, 佐野 統. FTY720 によるSKGマウス関節炎抑制効果. 第 3 回スフィンゴテラピィ研究会. 2008. 7. 18-19, 鳥取

⑭ 常見 幸, 関口昌弘, 北野将康, 佐野 統. 関節リウマチモデルマウスにおけるFTY720 による関節炎抑制効果. 第 29 回日本炎症・再生医学会 2008. 7. 8-10, 東京

⑮ 関口昌弘, 常見 幸, 北野将康, 佐野 統. シェーグレン症候群の病態形成におけるS1PとFTY720 の関与. 第 29 回日本炎症・再生医学会 2008. 7. 8-10, 東京

⑯ Tsunemi S, Iwasaki T, Kitano M, Sekiguchi M, Kitano S, Imado T, Sano H. Treatment of a murine arthritis model, SKG mouse, by FTY720 a new immunosuppressant. The annual European Congress of

Rheumatology (EULAR2008)

2008. 6. 11-14, Paris, France

⑰ Kitano M, Takeshita H, Tsunemi S, Kitano S, Sekiguchi M, Nishioka A, Azuma N, Hashimoto N, Iwasaki T, Hla T, Sano H. The role of sphingosine 1-Phosphate/S1P1 signaling in the osteoclastogenesis via RANKL expression of rheumatoid synoviocytes. Annual European Congress of Rheumatology (EULAR2008)

2008. 6. 11-14, Paris, France

⑱ 北野将康, 関口昌弘, 常見 幸, 神田ちえり, 西岡亜紀, 東 直人, 黒岩孝則, 橋本尚明, 松井 聖, 岩崎 剛, 佐野 統. 炎症性サイトカインはリウマチ滑膜細胞でのスフィンゴシン 1 燐酸/スフィンゴシン 1 燐酸レセプター1シグナルを増強する. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会(JCR2008) 2008. 4. 20-23, 札幌

⑲ 関口昌弘, 岩崎 剛, 常見 幸, 佐野 統. FTY720 投与による関節リウマチモデルマウスにおける関節炎抑制効果. 第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会(JCR2008) 2008. 4. 20-23, 札幌

⑳ 常見 幸 関節リウマチモデルマウスにおけるFTY720 による関節炎抑制効果. 第 2 回 YRAR (Young Researchers in Advanced Rheumatology) 2008. 1. 5, 大阪

[その他]

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/rhmt/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

常見 幸 (TSUNEMI SACHI)

兵庫医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：80425123