

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591641

研究課題名（和文）：スフィンゴシン 1-リン酸受容体を標的とした新しい脊髄損傷の治療法の開発

研究課題名（英文）：Sphingosine 1-phosphate/S1P receptor axis as a molecular target for therapeutic intervention after spinal cord injury

研究代表者

木村 敦（KIMURA ATSUSHI）

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20364507

研究成果の概要（和文）：我々はスフィンゴシン 1 リン酸（S1P）の類似物質である FTY720 の脊髄損傷に対する治療効果を、マウス脊髄圧挫損傷モデルを用いて検討した。FTY720 の経口投与は脊髄損傷後の機能回復を有意に促進した。また FTY720 投与によって、リンパ球の脊髄浸潤を有意減少し、損傷脊髄の血管透過性とアストロサイトの集積も有意に減少した。こうした治療効果はリンパ球欠損マウスでも同様に確認されたため、FTY720 は単に免疫抑制を介して発揮されるのではなく、血管透過性の抑制やアストログリア瘢痕の減少がその作用機序であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：FTY720 is phosphorylated in vivo to produce the active metabolite FTY720-P, which is a nonselective S1P receptor agonist for four of the five known S1P receptors. We examined the therapeutic effects of FTY720 on locomotor recovery after SCI in mice. Oral administration of FTY720 shortly after contusion SCI significantly improved motor function recovery, as assessed by both Basso Mouse Scale scores and Rotarod Performance test results. FTY720 induced lymphopenia and reduced T-cell infiltration in the spinal cord after SCI but did not affect the early infiltration of neutrophils and the activation of microglia. In addition, plasma levels and mRNA expression of inflammatory cytokines in the spinal cord after SCI were not attenuated by FTY720. Vascular permeability and astrocyte accumulation were both decreased by FTY720 in the injured spinal cord. The therapeutic effects of FTY720 were not solely dependent on immune modulation, as confirmed by the demonstration that FTY720 also ameliorated motor function after SCI in mice with severe combined immunodeficiency.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄損傷・生理活性脂質

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は主に交通事故や転落などの外傷によって発生し、損傷高位以下の永続的な麻痺や自律神経障害をもたらす。しかしながら、現時点における薬物治療はステロイド大量療法が行われるのみで、その効果は限られて

いる。

重度の脊髄損傷が患者のADLに与える影響は極めて重大であり、それに伴う医療経済的な損失も甚大である。そこでステロイドに代わる新しい薬物療法によって、その後の機能障害の程度を一段階でも軽減させることがで

できれば、その医学的、社会的な意義は極めて大きい。一刻も早い新規薬物療法の開発が望まれている。

我々はこれまでの研究成果を元に、リズリン脂質の一種であるスフィンゴシン1-リン酸とその受容体の機能調節が中枢神経の保護作用を發揮し、脊髄損傷後の機能回復を促進するとの仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は代表的なスフィンゴシン1-リン酸受容体作動薬である、FTY720の脊髄損傷に対する効果を、マウス脊椎脊髄損傷モデルを用いて詳細に検討することである。

3. 研究の方法

a. 脊髄損傷モデル

マウスの第10胸椎高位に60 kdynの定量的な圧挫損傷を加え、胸髄圧挫損傷モデルを作成した。

b. 薬剤投与

FTY720投与が機能回復に与える影響を調査するため、治療群にはFTY720 (3mg/kg)を連日経口投与した。対照群には同量の生食を経口投与した。

c. 運動機能評価

脊髄損傷後の後肢運動機能を、BMS scale とロータロッドテストにより、損傷後28日まで経時的に評価した。

d. 炎症性サイトカイン発現量の測定

末梢血中の炎症性サイトカインの発現を、RT-PCRとELISAにより定量化した。

e. 炎症性細胞浸潤の測定

損傷脊髄を一定量採取し、ヒアルロニダーゼで分解後に遠心し、脊髄に浸潤した炎症性細胞を分離した。これをフローサイトメトリーによって定量化した。

f. 血管透過性の評価

損傷脊髄の血管透過性を、エバンスブルーの血管外漏出量を指標として吸光度計によって定量化した。

g. 凝固・出血と血管透過性の評価

損傷脊髄への出血量を組織中のヘモグロビン濃度を指標として定量化した。また血液凝固活性も計測した。

h. 組織学的検討

損傷後28日の脊髄に対してミエリン染色を行い、残存ミエリンの面積を定量化した。またアストログリア瘢痕の面積をGFAP染色により計測した。

4. 研究成果

a. 機能評価

FTY720投与群は、BMS scale とロータロッドテストのいずれにおいても、対照群と比較し

て有意に機能回復が促進していた (図1A)。その効果は、主に損傷後14日以内の回復を促進することがわかった (図1B)

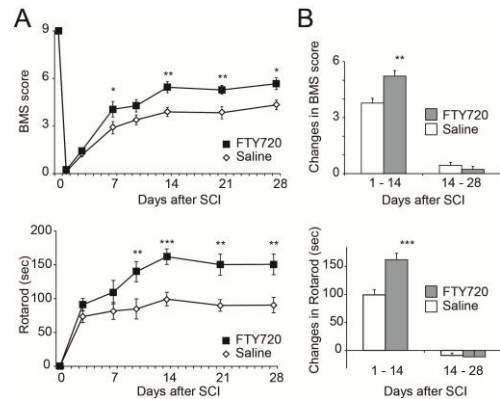


図1. 脊髄損傷後の運動機能回復の比較

b. 組織学的検討 (ミエリン染色)

損傷後28日目にミエリン染色を行うと、FTY720投与群では残存ミエリンの面積が有意に大きかった。このことから、FTY720投与が脊髄損傷に伴う組織損傷を抑制する作用があることが判明した (図2)。

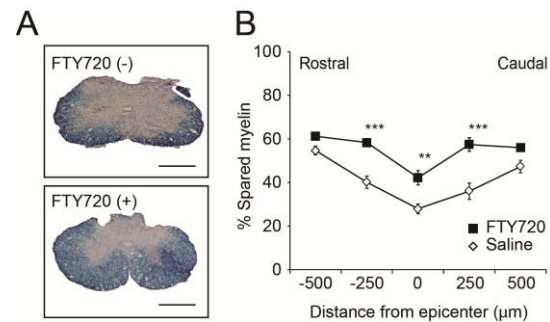


図2. 残存ミエリンの比較

c. 炎症性サイトカインの測定

損傷後1, 3, 7, 14日の各時点で末梢血中のIL-1β, IL-6, IL-18, TNF-αについて、まずRT-PCRを用いてmRNAレベルで定量化したが、2群間で有意差はなかった (図3)。

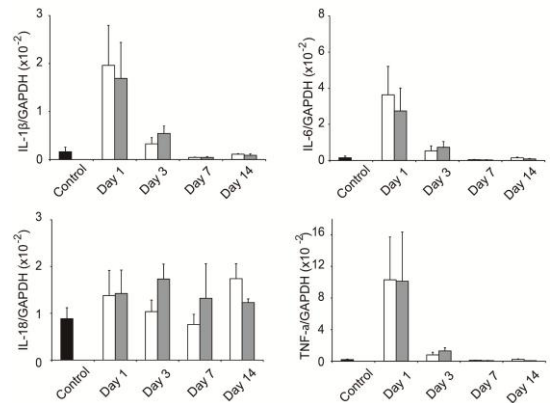


図3. 炎症性サイトカインの発現 (RT-PCR)

続いて、ELIZA による蛋白レベルでの発現も IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , MCP-1, TNF- α について比較したが、同様に 2 群間に有意差はなかった (図 4)。

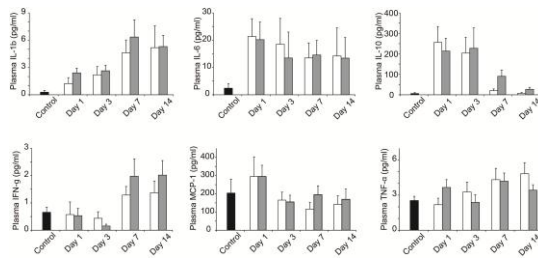


図 4. 炎症性サイトカインの測定 (ELIZA 法)

d. 炎症細胞浸潤の測定

損傷後 1, 3, 14 日の各時点で損傷脊髄を採取し、組織中の好中球、マイクログリア、B リンパ球、T リンパ球の数をそれぞれ Gr-1, CD11b, CD3e, B220 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化した。FTY720 投与群では、損傷後 14 日目に CD4 陽性の T リンパ球の浸潤が有意に少なかった。しかし、好中球、マイクログリア、B リンパ球については 2 群間で差がなかった (図 4)。

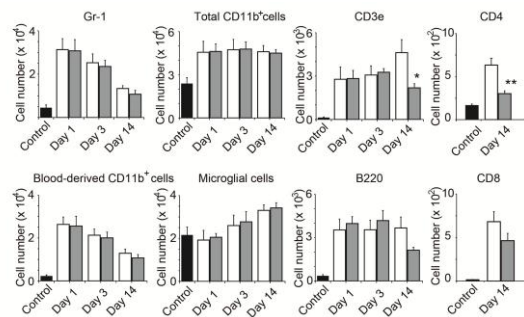


図 5. 炎症細胞浸潤数の計測

e. 凝固・出血と血管透過性の評価

凝固活性として末梢血の PT (prothrombin time) と APTT (activated partial thromboplastin time) を比較したが、2 群間で有意差はなかった (図 6A)。

損傷脊髄への出血量に関しては、FTY720 投与群で少ない傾向があったが、これも有意差はなかった (図 6B)。

血管内に投与したエバンスブルーの血管外漏出を指標とした血管透過性の評価においては、損傷後 24 時間では有意差がなかったが、損傷後 3 日では FTY720 投与群で有意に減少していた (図 6C)。以上により FTY720 による運動機能促進、損傷組織保護のメカニズムの一つとして血管透過性の抑制が重要と考えられた。

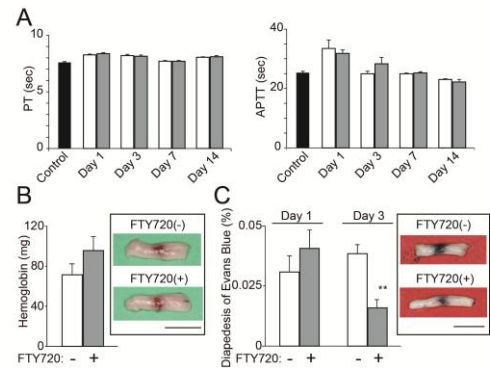


図 6. 凝固・出血と血管透過性の比較

f. アストログリア癒痕の評価

損傷後 28 日目の組織で抗 GFAP 抗体による免疫染色を行い、GFAP 陽性のアストログリア癒痕の面積を 2 群間で比較した。FTY720 投与群ではアストログリア癒痕の面積が有意に少なかった (図 7)。

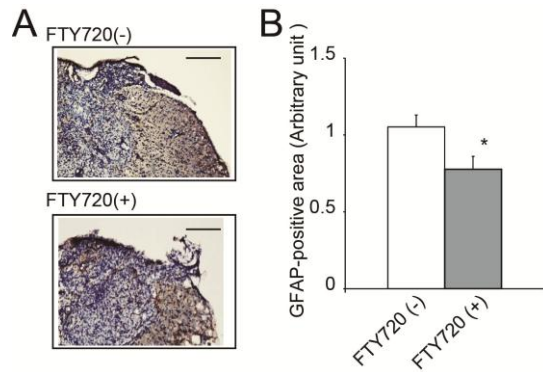


図 7. アストログリア癒痕の比較

g. S1P₁ 特異的作動薬 (SEW2871) の効果

FTY720 は、5 種類ある S1P 受容体 (S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄, S1P₅) のうち、S1P₂ を除く 4 種類に対する作動薬として機能するが、このうちのどの受容体に対する効果が重要であるかを明らかにするため、S1P₁ 受容体特異的な作動薬である SEW2871 を用いて同様の実験を行った。

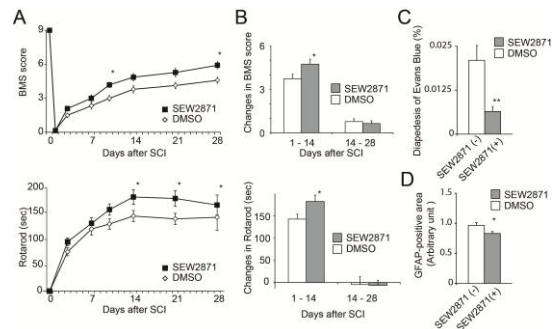


図 8. S1P₁ 特異的作動薬 (SEW2871) の効果

その結果、SEW2871はFTY720に比較して効果がやや減弱するものの、脊髄損傷後の運動機能促進、血管透過性の抑制、アストログリア癒痕の抑制のいずれについても統計学的に有意な作用を發揮することが確認された。

以上の結果から4種類あるS1P受容体のうちS1P₁を介する作用が重要であることが判明した(図8)。

h. リンパ球欠損マウスにおける治療効果

最後にFTY720の治療効果が、単にリンパ球減少などの免疫抑制を介した組織保護作用によるものか、それとも血管透過性の抑制などそれ以外の機構が重要であるのかを検討する目的で、野生型マウスの代わりにリンパ球欠損マウス(SCIDマウス)を使用して同様の実験を行った。

その結果、野生型マウスを用いた場合と同様に、FTY720投与群では運動機能促進と血管透過性の抑制、およびアストログリア癒痕の減少が確認できた(図7)。

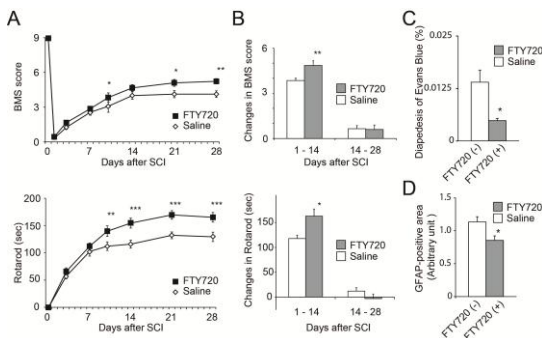


図7. SCIDマウスにおけるFTY720の効果

以上の結果により、以下の結論に到達した。

1. FTY720は脊髄損傷後の組織損傷を抑制し、機能回復を促進する。
2. FTY720は脊髄損傷部の血管透過性を有意に抑制する。
3. FTY720はアストログリア癒痕の形成を有意に抑制する。
4. FTY720による治療効果は、5種類ある受容体のうちのS1P₁受容体を介する作用が重要である。
5. FTY720による治療効果は、単にリンパ球減少などの免疫抑制を介した組織保護作用によるものではなく、血管透過性の抑制やアストログリア癒痕の抑制といった免疫機能非依存的な作用が重要である。

FTY720は、多発性硬化症に対する治療薬として最近臨床での使用が承認されており、今後さらに大型動物での実験を経て臨床応用の可能性を模索したい。

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1件)

1. Norimatsu Y, Ohmori T, Kimura A, Madoiwa S, Mimuro J, Seichi A, Yatomi Y, Hoshino Y, Sakata Y. FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. *Am J Pathol.* 2012;180(4):1625-35. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.12.012.

[学会発表] (計2件)

1. Norimatsu Y, Ohmori T, Kimura A, Madoiwa S, Mimuro J, Seichi A, Yatomi Y, Hoshino Y, Sakata Y. FTY720 improves functional recovery after spinal cord injury by primarily nonimmunomodulatory mechanisms. Orthopaedic Research Society 2012, San Francisco, USA.

2. スフィンゴシン1-リン酸受容体を標的とした新しい脊髄損傷治療法の開発。

乗松 祐佐, 大森 司, 木村 敦, 星地 亜都司, 坂田 洋一, 星野 雄一
第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012年10月26日-27日, 名古屋。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.jichi.ac.jp/medicine/about/departament/clinical/orthopedics/file/graduate_lab0.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 敦 (KIMURA ATSUSHI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 20364507

(2) 研究分担者

大森 司 (OHMORI TSUKASA)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70382843