

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：34428

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790483

研究課題名(和文) 実験的自己免疫性脳脊髄炎(多発性硬化症)に完全寛解を導入できる新規治療方法の創成

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for experimental autoimmune encephalomyelitis to introduce a complete remission

研究代表者

吉田 侑矢 (YOSHIDA, YUYA)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：50581435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいくつかの研究で、実験的自己免疫性脳脊髄炎において、FTY720を休薬すると重篤な再燃が齎されることおよびFTY720に病因自己抗原を併用することで、その再燃を抑制できることを見い出している。本研究では、FTY720休薬後の再燃メカニズムおよびFTY720+病因自己抗原併用療法の有用性とそのメカニズムについて検討した。FTY720休薬後の再燃は、二次リンパ組織からの自己抗原特異的T細胞のホーミング解除が要因であることを明らかとした。また、FTY720+病因自己抗原併用療法がその自己抗原特異的T細胞にアナジーを誘導し、再燃を抑制している可能性を見い出した。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that relapse of experimental autoimmune encephalomyelitis occurred about one week after discontinuation of FTY720, but combination treatment with FTY720 plus pathogenic autoantigen significantly suppressed occurrence of relapse. Here, we investigated the mechanism(s). We demonstrated that relapse after FTY720 alone was caused by release of autoantigen-specific T cells from secondary lymphoid tissues. Also, it was considered that the combination treatment with FTY720 plus pathogenic autoantigen might efficiently suppress relapse following discontinuation of treatment by inducing autoantigen-specific T-cell anergy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：免疫学

キーワード：免疫寛容 自己免疫 自己抗原

1. 研究開始当初の背景

多発性硬化症は、髄鞘や神経線維に対する障害を病因とし、寛解・再発を繰り返す難治性自己免疫神経疾患である。既存の免疫抑制剤（メチルプレドニゾンなど）によって一時的に寛解を導入できるが、再燃する事例が多い。また、既存の免疫抑制剤の長期間投与では、免疫力が低下し、日和見感染などの有害事象が生じる危険性がある。これらのことから、多発性硬化症に迅速かつ安全に完全寛解を導入できる新たな治療方法の開発には強い臨床的要請がある。これまでの研究で、多発性硬化症モデル動物の実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) において、1) FTY720 が極めて優れた治療効果を示すが、2) FTY720 を休薬すると重篤な再燃が齎されることを明らかとした。一方、興味深いことに、3) FTY720 に病因自己抗原を併用することで、その再燃を抑制できることを見出ししている。

2. 研究の目的

本研究では、FTY720 休薬後の再燃メカニズムおよび FTY720 + 病因自己抗原併用療法が長期間の寛容状態を誘導できたメカニズムの解明に迫ると共に、これまで完治が困難であった多発性硬化症に対する新たな治療方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスをフロイント完全アジュバント (Complete Freund's adjuvant, CFA) 存在下、Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) の部分ペプチド (MOG<sub>35-55</sub>) 200 μg で感作し、感作の当日および2日後に百日咳毒素 (Pertussis toxin, PT) 200 ng を静脈内投与して EAE を作製した。症状を呈したマウスを FTY720 (0.3 mg/kg, *p.o.*, 週 6 回)あるいは、MOG<sub>35-55</sub> (10-20 μg/mouse, *i.v.*, FTY720 投与 2-3 日後から 4 日間, 1 日 1 回)との併用で 3-5 週間治療し、その後休薬した。治療完了時および休薬 8-9 日後の鼠径リンパ節のリンパ球サブセットや活性能などについて解析した。また、休薬 8 日後に脊髄を採取し、組織化学的解析を行った。なお、本研究は動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議: 2006 年 6 月 1 日) および摂南大学動物実験に関する規程に従い、実施した。

4. 研究成果

(1) FTY720 休薬後の再燃率および末梢血液中の CD4<sup>+</sup>T 細胞の割合

EAE マウス (n=23) を FTY720 (0.3 mg/kg, *p.o.*, 週 6 回) で 3-5 週間治療し、休薬後、病勢の推移を経過観察 / スコア化した。全個体の 91% (重度 (78%)、軽度 (13%)) で再燃が確認された。また、再燃は高頻度で休薬 6-7 日後に起こり、それは二次リンパ組織から末

梢血液中へ CD4<sup>+</sup>T 細胞が再循環するタイミングと合致していた (図 1)。

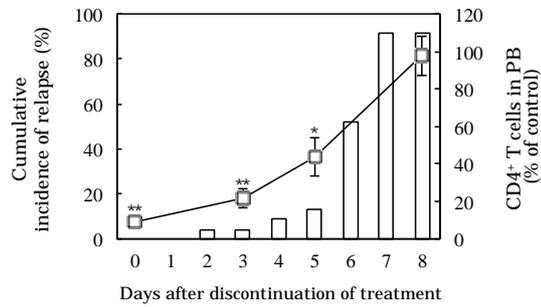


図 1 再燃率と末梢血液中 CD4<sup>+</sup>T 細胞の推移

(2) MOG<sub>35-55</sub> 特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞の活性能

EAE マウスを FTY720 (0.3 mg/kg, *p.o.*, 週 6 回) で 3-5 週間治療し、治療完了時の鼠径リンパ節から CD4<sup>+</sup>T 細胞および CD11c<sup>+</sup>細胞を分取した。それらの細胞を MOG<sub>35-55</sub> 存在下で 72 時間共培養し、CD4<sup>+</sup>T 細胞中の IL-17<sup>+</sup>および IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。その結果、IL-17<sup>+</sup>および IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>細胞の割合が FTY720 群では、Placebo 群と比較して上昇していた (図 2)。即ち、抗原に対して再活性化する T 細胞が治療 3-5 週間後でも鼠径リンパ節に多く存在していることが明らかとなった。

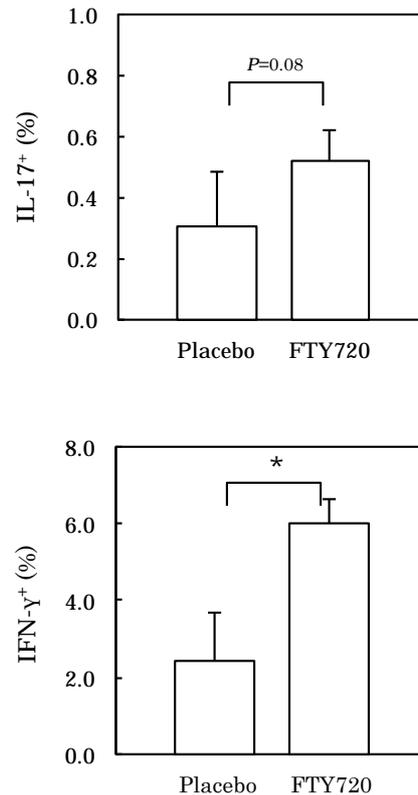


図 2 MOG 特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞のサイトカイン産生

(3) FTY720 治療完了時の鼠径リンパ節中メモリーT細胞の割合

EAE マウスを FTY720 (0.3 mg/kg, *p.o.*, 週6回) で 3-5 週間治療し、治療完了時の鼠径リンパ節中のメモリーT細胞およびナイーブT細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。FTY720 で治療した個体で CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>low</sup> 細胞 (エフェクターメモリーT細胞) の割合が有意 ( $P < 0.05$ ) に上昇していた。また、CD4<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>high</sup> 細胞 (セントラルメモリーT細胞) も上昇傾向を示した。一方、CD4<sup>+</sup>CD44<sup>low</sup>CD62L<sup>high</sup> 細胞 (ナイーブT細胞) の割合は有意 ( $P < 0.05$ ) に減少していた (図3)。

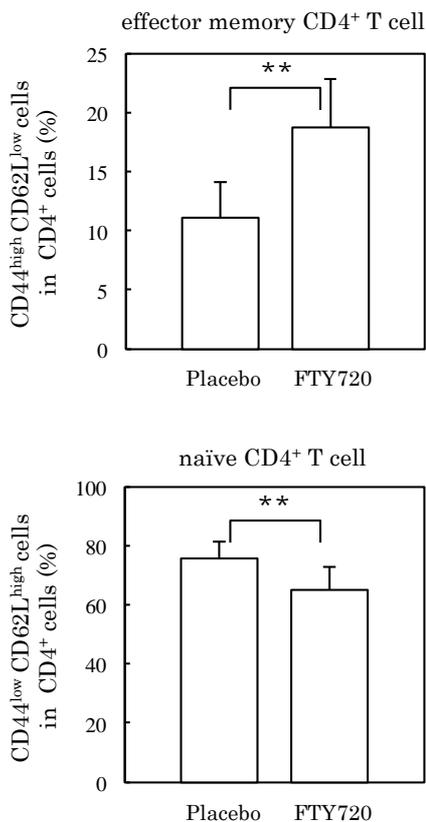


図3 鼠径リンパ節中のメモリーT細胞およびナイーブT細胞の割合

(4) FTY720 + 病因自己抗原併用療法がリンパ節中リンパ球数に及ぼす影響

リンパ節中 CD4<sup>+</sup>T細胞の絶対数

EAE マウスを FTY720 (0.3 mg/kg, *p.o.*, 週6回) 単独あるいは MOG<sub>35-55</sub> (10-20 μg/mouse, *i.v.*, FTY720 投与 2-3 日後から 4 日間, 1 日 1 回) との併用で 3-5 週間治療し、病勢の推移を経過観察した。FTY720+MOG<sub>35-55</sub> 併用群では、FTY720 単独群と比較し、休薬後の再燃がみられないあるいは軽度であった (図4)。次に、治療完了時の鼠径リンパ節中のメモリーT細胞およびナイーブT細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。FTY720 + MOG<sub>35-55</sub> 併用群のそれら細胞の割合は、FTY720 単独群と比較して、有意な差は見られなかった。一方で、FTY720 群では、治療完了時と比較して

休薬 8 日後の鼠径リンパ節中の CD4<sup>+</sup>T 細胞の絶対数が有意 ( $P < 0.05$ ) に減少していたのに対して、FTY720+ MOG<sub>35-55</sub> 併用群では変化が見られなかった (図5)。

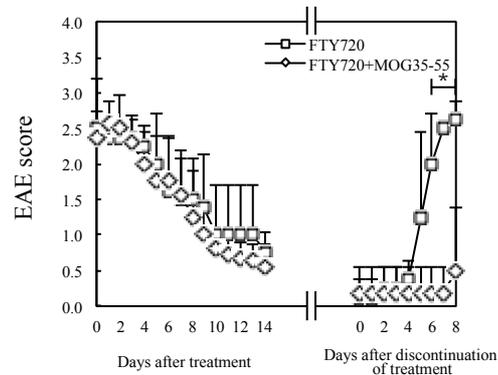


図4 FTY720+MOG<sub>35-55</sub> 併用療法の治療予後

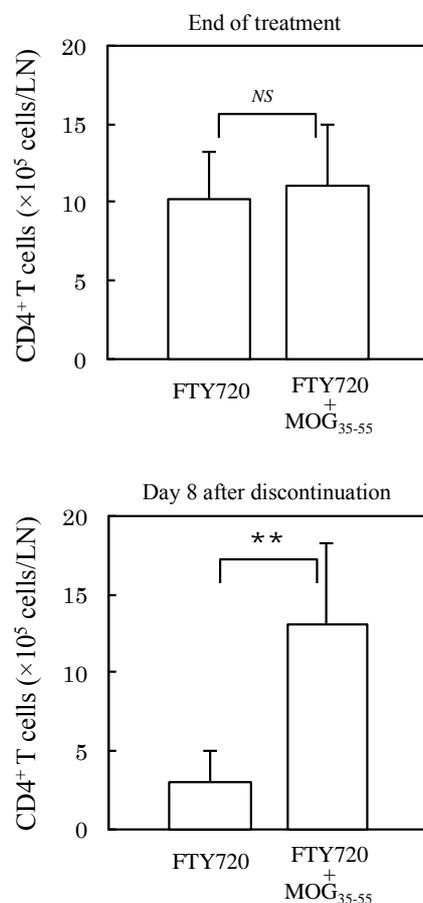


図5 リンパ節中 CD4<sup>+</sup>T細胞の絶対数

脊髄中の CD3<sup>+</sup>T細胞および CD4<sup>+</sup>T細胞数

休薬 8 日後の脊髄の組織化学的解析を行った。FTY720+MOG<sub>35-55</sub> 併用群では FTY720 群と比較し、CD3<sup>+</sup>細胞および CD4<sup>+</sup>細胞の単位面積あたりの浸潤数が有意 ( $P < 0.05$ ) に減少していた (図6)。

本研究結果 (図1および2) から、EAE マウスに対する FTY720 休薬後の再燃は、二次

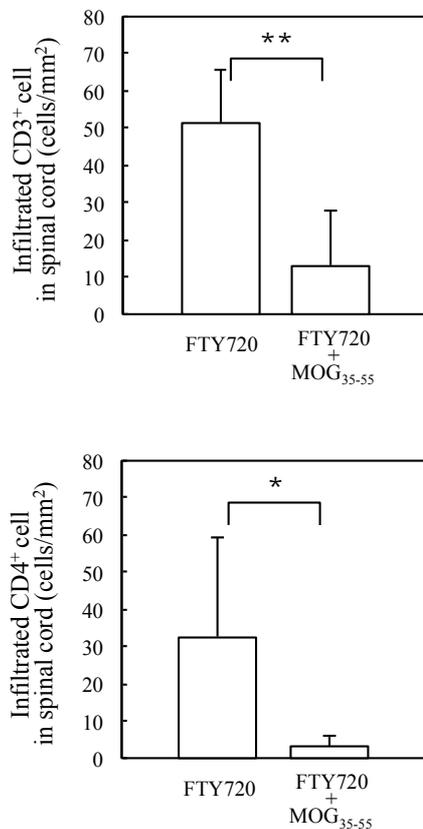


図 6 脊髄単位面積あたりの CD3<sup>+</sup>および CD4<sup>+</sup>細胞の浸潤数

リンパ組織内に隔離されていた抗原特異的リンパ球のホーミング解除が要因と考えられた。また、二次リンパ組織中のエフェクターメモリーT細胞の割合が上昇していた(図3)ことから、FTY720単独投与では抗原特異的リンパ球の活性が長期間維持されてしまうことが示唆された。

一方、FTY720にMOG<sub>35-55</sub>を併用すると、FTY720単独群と比較して、休薬後の再燃が有意に抑制された(図4)。休薬8日後、FTY720群では、治療完了時と比較して、CD4<sup>+</sup>細胞の絶対数が有意( $P < 0.05$ )に減少していたが、FTY720+MOG<sub>35-55</sub>併用群では維持されていた(図5)。また、FTY720+MOG<sub>35-55</sub>併用群はFTY720単独群と比較して、休薬8日後のCD3<sup>+</sup>細胞及びCD4<sup>+</sup>細胞の浸潤が有意( $P < 0.05$ )に抑制されていた(図6)。これらのことから、FTY720+MOG<sub>35-55</sub>併用は二次リンパ組織内に抗原特異的なメモリーT細胞を隔離後、それらに効率よく何らかの機序でアナジーを誘導し、休薬後の放出・再活性化を制御している可能性が考えられた。今後、本治療方法の更なる詳細なメカニズムを解明できれば、多発性硬化症だけではなく、自己免疫疾患一般に完全寛解を導入できる新規治療戦略となる可能性を秘めている。これによる臨床的貢献度は極めて高いと考えられた。

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1件)

Yoshida Y, Tsuji T, Watanabe S, Matsushima A, Matsushima Y, Banno R, Fujita T, Kohno T. Efficacy of combination treatment with fingolimod (FTY720) plus pathogenic autoantigen in a glucose-6-phosphate isomerase peptide (GPI<sub>325-339</sub>)-induced arthritis mouse model. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, **36**(11), 2013, 1739-1746. DOI: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b13-00297>

〔学会発表〕(計4件)

吉田侑矢, 三上統久, 高田裕基, 中澤裕香, 壇梨恵, 高辻未来, 辻琢己, 藤多哲朗, 辻川和文, 河野武幸, 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するFTY720と自己抗原併用療法の有効性-その2-. 第25回日本神経免疫学術集会, 2013年11月27日, 海峡メッセ下関(山口)

高田裕基, 中澤裕香, 壇梨恵, 吉田侑矢, 三上統久, 高辻未来, 辻琢己, 藤多哲朗, 辻川和文, 河野武幸, 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するFingolimod (FTY720)を用いた治療の問題点とその改善策-その2-. 第63回日本薬学会近畿支部大会, 2013年10月12日, 同志社女子大学(京都)

吉田侑矢, 入佐恵美, 伴具也, 辻琢己, 藤多哲朗, 河野武幸, Efficacy of combination therapy with Fingolimod (FTY720) and pathogenic autoantigen on experimental autoimmune encephalomyelitis. 第41回日本免疫学会学術集会, 2012年12月5日, 神戸国際会議場(兵庫)

伴具也, 入佐恵美, 高田裕基, 中澤裕香, 吉田侑矢, 辻琢己, 藤多哲朗, 三上統久, 辻川和文, 河野武幸, 実験的自己免疫性脳脊髄炎に対するFingolimod (FTY720)を用いた治療の問題点とその改善策. 第62回日本薬学会近畿支部大会, 2012年10月20日, 武庫川女子大学(兵庫)

〔その他〕

摂南大学 薬学部 病態医科学研究室ホーム

ページ [http://www.setsunan.ac.jp/~p-rins  
ho/index.html](http://www.setsunan.ac.jp/~p-rins<br/>ho/index.html)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 侑矢 (YOSHIDA YUYA)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号： 50581435