



Title	FTY720は脳血液関門構成タンパク質の保護および亜急性期炎症制御により脳虚血による障害を軽減する
Author(s)	王, 子澧
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13425号
Issue Date	2019-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k13425
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/91697">http://hdl.handle.net/2115/91697</a>
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2439
File Information	Zifeng_Wang.pdf



[Instructions for use](#)

# 学位論文

FTY720 は脳血液関門構成タンパク質の保護および亜急性期炎症制御により脳虚血による障害を軽減する

(FTY720 protects against ischemia reperfusion injury by preventing redistribution of tight junction proteins and decreases inflammation in sub-acute phase in experimental stroke model)

2019年3月

北海道大学

王子豊



# 学位論文

FTY720 は脳血液関門構成タンパク質の保護および亜急性期炎症制御により脳虚血による障害を軽減する

(FTY720 protects against ischemia reperfusion injury by preventing redistribution of tight junction proteins and decreases inflammation in sub-acute phase in experimental stroke model)

2019年3月

北海道大学

王子豊

## 目次

発表論文目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	3 頁
実験方法	4 頁
実験結果	8 頁
考察	18 頁
総括および結論	21 頁
謝辞	22 頁
引用文献	23 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Zifeng Wang, Kei Higashikawa, Hironobu Yasui, Yuji Kuge, Takeo Abumiya, Chengbo Tan, Chengxian Hou, Yukitomo Ishi, Yusuke Ohno, Akio Kihara, Kiyohiro Houkin, Masahito Kawabori. FTY720 ameliorates ischemia reperfusion injury by protecting blood-brain barrier permeability in experimental stroke model

Brain (submitting)

Zifeng Wang, Masahito Kawabori, Kiyohiro Houkin. FTY720 (fingolimod) ameliorates brain injury by multiple mechanisms and may be a strong candidate drug for stroke treatment.

Current Medicinal Chemistry (submitting revised manuscript)

## 緒言

脳梗塞は非常に高い死亡率および後遺症率で現在でも世界における重要対策疾患である<sup>1</sup>。近年、重症脳梗塞に対して血栓回収療法が開発され、脳梗塞治療は新たな時代に入ったといえる<sup>2-4</sup>。血栓回収は高い再開通率が見込め、最大で24時間後まで有効であることが証明されている。しかしこのように高い再開通率が得られるようになった血栓回収療法であるが、依然として十分満足できる機能回復を得られる患者の比率はそれまでよりは高いとは言え限られており、虚血再灌流障害 (Brain ischemia reperfusion injury; I/R injury) がその原因の一つであると考えられている<sup>5</sup>。虚血再灌流障害は再開通を果たした脳内で生じる biochemical cascade で、細胞毒性・アポトーシス・炎症・活性酸素およびラジカル生成、脳血液関門 (BBB) の透過性亢進などから免疫系細胞の脳内浸潤・細胞外マトリックスの破綻などを来し、最終的に脳浮腫や出血性梗塞等を生じると考えられている<sup>6</sup>。血栓回収療法の効果を高めるためにも虚血再灌流の機序および治療法の解明が必要と考えた。FTY720 は近年開発された免疫抑制作用のある薬剤で有り、スフィンゴシン1リン酸 (S1P) レセプターのアゴニストとして多発性硬化症に対する治療薬として FDA に認可されている<sup>7</sup>。FTY720 は取り込み後、細胞内において可及的にリン酸化され、リン酸化 FTY720 (Phosphorylated FTY720; FTY720-P) となり、既知の5つ有る S1P レセプターの4つに結合することで細胞へのシグナル伝達を行っていることが分かっている<sup>8</sup>。その効果は多岐にわたるが血中リンパ球減少、炎症制御、血管内接着因子の抑制などが知られている。近年、FTY720 が虚血再灌流に組織保護的に作用することが、肝臓<sup>9,10</sup>、腎臓<sup>11,12</sup>、心臓<sup>13-15</sup>、脳<sup>16-20</sup>などで報告されてきている。しかしながら FTY720 が虚血再灌流においてどのように BBB 保護に働くのか、また炎症反応を制御している時間経過はどのようなものかについては明らかになっていない。そこで本研究では脳虚血再灌流における FTY720 の保護効果を BBB 保護および炎症反応制御を中心に研究することにした。

### 【本研究の倫理面における配慮】

本研究の内容は、北海道大学北海道大学動物実験に関する規程に基づき、「スフィンゴリン脂質による中枢神経保護効果の研究」(承認番号 17-0066) として承認されている。

## 略語表

BBB=Blood brain barrier  
BBMVEC=Bovine Brain Microvascular Endothelial Cell  
BSA=Bovine Serum Albumin  
CBF=cerebral blood flow  
CCA=common carotid artery  
CNS =central nervous system  
DMEM=Dulbecco's modified Eagle's medium  
FBS=fetal bovine serum  
GFAP=glial fibrillary acidic protein  
GFP =green fluorescence protein  
HE =Hematoxilin·Eosin  
I/R=ischemic reperfusion  
MCA=middle cerebral artery  
MCAO=middle cerebral artery occlusion model  
MTT=3-(4, 5-dimethyl-2-thizoly)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide  
NeuN =neuronal nuclear antigen  
OGD = Oxygen-Glucose Deprivation  
PET =positron emission tomography  
PTX= pertussis toxin  
ROI =region of interest  
Rt-PA=recombinant tissue plasminogen activator  
S1P=sphingosine 1 phosphate  
SD =Sprague-Dawley  
SUV= standardized uptake values  
TSPO= translocator protein  
TTC=2,3,5-triphenyltetrazolium chloride



## 実験方法

### 【実験動物】

123匹の8週オスSDラット(260-300g, CLEA Japan, Inc)を使用した。動物愛護に注意し、25℃・50%湿度・12時間明暗サイクルの部屋で飼育し、水・食料は自由に摂取できる環境とした。実験動物は無作為に割り付け、①Vehicleグループ(n=60)、②低用量(0.5mg/kg)FTY720グループ(n=29)、③高用量(1.5mg/kg)FTY720グループ(n=28)を使用した。

### 【脳梗塞(中大脳動脈閉塞)モデル】

過去に本研究室で報告した方法を用いて中大脳動脈の一過性脳虚血モデルを作成した<sup>21-23</sup>。ラットはマスクを使用し、窒素70%酸素30%のガスにイソフルラン4.0%を混入し麻酔導入し、イソフルラン2.0%で麻酔維持した状態で手術を行った。直腸温をモニターし36.5-37.5℃になるように自動ヒートパッドを用いて調整した。脳梗塞モデルは0.37mmの先端にゴムコーティングがされているシリコンフィラメント(Doccol Corp.)を用いて作成した。方法は右総頸動脈・外頸動脈を露出して、外頸動脈を切断した。切断断面からフィラメントを抵抗が感じられるMCA分岐部まで内頸動脈側に進め血流を遮断した。MCA領域の脳血流(Cerebral blood flow; CBF)をBregmaから5mm外側、2mm後方でレーザードップラー(OMEGA FLOW, Omega wave, Inc)を用いて測定し、70%以上の低下が見られない個体は実験より除外した。また虚血後に一旦覚醒させ、神経機能評価であるmodified Bederson scoreが2点以下の個体も除外した。2時間の血流遮断後にゆっくりフィラメントを抜き再灌流を行った。

### 【FTY720投与】

FTY720の投与に関して3つのグループを設定し、生理食塩水に溶かした0.5mg/kg(低容量)、もしくは1.5mg/kg(高用量)を再灌流直前に腹腔内に投与した。

### 【神経学的評価】

18ポイントの神経学的評価スケール(modified Neurological Severity Score

(mNSS))と4ポイントの modified Bederson scale を使用した<sup>24,25</sup>。

#### 【脳梗塞サイズ測定】

脳梗塞7日後に2,3,5-tiphenyltetrazolium chloride (TTC)染色で脳梗塞を評価した。深麻酔下のラットを頸髄亜脱臼および頸部切断を行い、脳をすぐに取り出した。脳は2mmの厚さの6つの冠状断スライスにして、2%のTTCで15分間染色した<sup>26,27</sup>。サンプルの写真を撮影した後、評価者がblindの状態 Image J software (Image J 1.37v)を用いて梗塞巣を脳浮腫の影響を小さくするため以下の方程式を用いて計算した<sup>28</sup>。

梗塞巣 (%) = (対側半球の面積 - 同側の非脳梗塞面積) / 対側半球の面積

#### 【in-vivo BBB 評価】

ラットにおけるBBBの破綻をEvans blue dye 染色法で検討した<sup>22</sup>。再灌流直後に4mL/kgで生理食塩水に希釈し2% Evans blue (Wako)を尾静脈より投与した。24時間後にラットを安楽死させ、十分量の生理食塩水で灌流することで血管内のEvans blueを除去した。その後、右大脳半球を3mLの50%トリクロロアセチル酸でhomogenize(均質化)し、遠心(12,000rpm, 10min)して上清を取得した。620nmの吸光度を吸光度計(TECAN, Inc)で計測し、mg/gで表示した。

#### 【免疫染色法およびアポトーシスアッセイ】

4%のparaformaldehydeで固定した脳組織をパラフィン包埋した。4μmの切片を作成し、線条体の高さを評価に用いた。免疫染色に用いた抗体はanti-Iba1抗体(1:1500で室温1時間、019-19741、Wako)、anti-CD68抗体(1:1000で室温1時間、MCA341GA、BIO-RAD)で、Histofine® Simple Stain™ Rat MAX PO (NICHIREI BIOSCIENCES INC)を用いてシグナルを強化した後、DAB chromogen of the DAB Substitute Kit (NICHIREI BIOSCIENCES INC)を用いてDAB染色を行った。アポトーシスアッセイはTUNEL染色を用いたApopTag Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit (S7110, Chemicon International)を使用した。評価は脳梗塞近傍のperi-infarct areaに10個のROI(100 μm x 100 μm)をランダムに設定し、陽性細胞を測定した<sup>29</sup>。

### 【PETによる神経炎症評価】

神経炎症マーカーである Translocator protein (TSPO) を脳梗塞後 2 日目と 9 日目に TSPO ligand [<sup>18</sup>F]DPA-714 を使用し動物用 PET (Inveon small animal imaging system、Siemens Medical Solutions) で測定した<sup>30,31</sup>。各グループ 4 匹のラットを使用し、鎮静下に 13.2±0.8 MBq の[<sup>18</sup>F]DPA-714 を尾静脈より投与し、30 分後にイメージを取得した<sup>32</sup>。ROI は脳梗塞巣において、対側にも同様のエリアを設定し対照とし、standardized uptake values (SUV)を計算した。また Autoradiography (ARG) 測定も行った。[<sup>18</sup>F]DPA-714 投与 90 分後に rat の脳組織を取得し、2mm の coronal 切片を作成した。先端から 2 枚目と 4 枚目のスライスにて測定を行った<sup>32</sup>。

### 【細胞培養】

Bovine Brain Microvascular Endothelial Cell (BBMVEC、Cell Applications, Inc)を使用し in-vitro の実験を行った。100mm の培養皿 (Thermo Fisher Scientific) もしくは、2 well チャンバースライド (Watson Biolab) に DMEM に 10%FBS と 100U/mL のペニシリン G を入れた培養液を使用し細胞を培養下。細胞は 37°C、5%CO<sub>2</sub> のインキュベーターで培養し、パッセージ 2-4 を使用した<sup>30</sup>。

### 【In-vitro 虚血再灌流モデル (OGD)】

培養細胞を 4 時間の酸素栄養飢餓状態 (Oxygen-glucose deprivation; OGD) とし、その後 4 時間通常の培養液に戻した状態で実験を進めた<sup>21</sup>。詳細としては、細胞培養液に含まれる FBS 内には S1P が含まれることが知られているため、Charcoal filter で濾過した FBS を用いて細胞を虚血前 12 時間培養することで細胞内の S1P を飢餓状態とした。その後、低酸素ワークステーション (InvivoO2 300, Baker Ruskin) を用いて 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 94% N<sub>2</sub>, 37°C の状態で細胞を 4 時間培養した。培養液はオーバーナイトで低酸素チャンバー内に留置し培養液中の酸素を除去した。細胞を 5 つのグループ (各グループ n=5) にランダムにわけて後述の実験を行った。(1)コントロールグループ: OGD なし、(2)Vehicle グループ: OGD のみ、(3)FTY720 グループ: OGD 解除直前に 100 nM の FTY720 を培養液に投与、(4)FTY720-P グループ: OGD 解除直前に 100 nM の FTY720-P (Cayman Chemical, Michigan, USA) を投与、(5)FTY720-P と百日咳毒素 (PTX) 投与グループ: OGD 解除直前に 100 nM の FTY720-P と PTX (100 ng/ml, Fujifilm Wako, Inc.)

をメディウムに投与。BBMVEC は FTY720 を FTY720-P に変換する enzyme が少ないことが知られていることから FTY 群のみならず FTY720-P を準備した。また PTX は細胞表面に存在する S1P レセプターのアンタゴニストであり、FTY720-P の効果が S1P レセプターを介しているかどうかについての検証に使用した。

### 【リアルタイム PCR と Western blotting】

リアルタイム PCR を用いて脳血液関門の tight junction と adherens junction の構成要素である、ZO-1, Occludin, Claudin-5, VE-cadherin の mRNA 発現量を評価した。上記 In-vitro 虚血再灌流モデル 5 グループの細胞を用いた。RNA 抽出は AllPrep RNA Mini Kit (Qiagen) を使用し、cDNA 作成には PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を使用した。GAPDH をインターナルコントロールとして Cycle time (Ct) を比較した。使用したプライマーは

GAPDH	F: AGGTCGGAGTGAACGGATTC R: TGCCGTGGGTGGAATCATAAC
ZO-1	F: CAAGTTCCCGGCCTAGTAGA, R: CCCGAGGTTCACCTTTTTCGCG
Occludin	F: GAACGCCGAGTAGCCCTCGC R: GCAGCCATGGCCAGCAGGAAT
Claudin5	F: CGTGCCCATGTCTCAGAAGT R: TCACCGGGAAGCTGAAATCC
VE-cadherin	F: AGCGATGGATGCAGATGACC R: ATGAGTCCAGAACCACGGATG

とした。

またこれらの構成要素のタンパク質レベルでの発現を調べるため

ZO-1: polyclonal antibody, :61-7300, 1:80, Thermo Fisher

Occludin: Lifepan BioSciences, LS-B5737, 1:500、Aviva Systems Biology, ARP42889\_P050, 1:1000

Claudin5: GeneTex, GTX49371, 1:100

で Western blotting を行った。

S1P レセプターの下流に存在する ERK1/2 のシグナリングを western blotting で検討した。使用した抗体は anti-ERK1/2 monoclonal antibody (1 : 2000, ThermoFisher)

で、上記培養細胞 5 グループを検討した。細胞を回収した後 RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology)で Homogenize し、10 $\mu$ g のタンパク質を NuPage 4-12 % Bis-Tris Gel (Life Technologies)を用いて電気泳動した。iBlot2 (ThermoFisher Scientific)を用いてセルロースメンブレンに転写し、0.05% tween 入りの PBS で ECL Prime blocking agent (GE Healthcare Life Science)を作成しブロッキングした。その後一晩 4 $^{\circ}$ C で一時抗体を incubate し chemical luminescence (ECL Advanced Western Blotting Detection Kit; GE Healthcare Life Science)を用いた。ChemiDoc (Bio-Rad)を用いて発色を評価した。

#### 【細胞免疫染色】

BBB の Junctional protein である ZO-1 および VE-cadherin の挙動を細胞免疫染色法で評価した。上記 5 グループの細胞を 4%パラフォルムアルデヒドで 15 分間固定したのち、0.1% triton X-100 で透明化し、3%の BSA と Blockace (DS Pharma Biomedical Inc)でブロッキングした。1 次抗体として VE-cadherin (1:100, PA5-17401, ThermoFisher Scientific)、ZO-1 (1:100, 33-9100, Thermo Fisher Scientific)、Occludin (1:100, LS-B5737, Lifepan BioSciences)、Claudin 5 (1:200, GTX49371, GeneTex)とを用いて、適宜最適な 2 次抗体を投与し、DAPI で封入した。画像は蛍光顕微鏡 (BZ X-700, Keyence) を用いて、10 個の重ならない視野 (700  $\mu$ m x 560  $\mu$ m) を選択し撮影を行った。Junctional protein が細胞周囲に残っている細胞の全ての細胞に占める比率を検討した<sup>33-35</sup>。

#### 【統計学的解析】

データは、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。JMP Pro 13 (Systat Software)を用い、多群間比較には one-factor ANOVA と Dunnett post hoc test を用いた。p<0.05 を統計学的に有意とした。

## 結果

### 【FTY720 は死亡率・脳梗塞サイズを低下・縮小し、運動機能回復を促進する】

FTY720 投与により、容量依存的に脳梗塞のサイズが認められ、特に高用量グループは Vehicle グループに比較し有意な縮小が得られた (Fig.1)。Vehicle グループに比較し高用量グループでは 55%もの脳梗塞縮小効果が得られた。

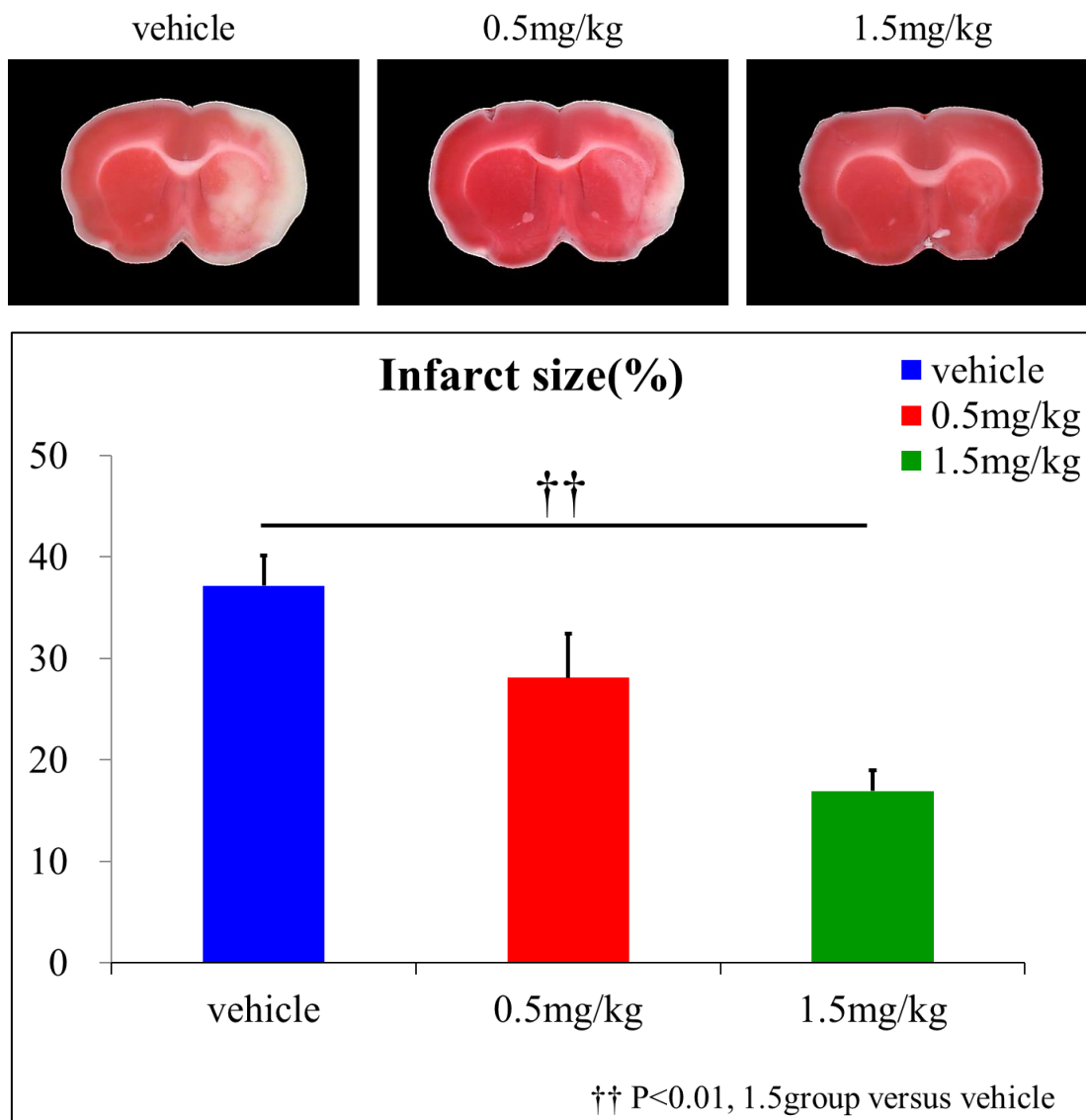


Fig. 1 脳梗塞サイズ : FTY720 投与によって用量依存的に梗塞巣の縮小を認めている。

死亡率も Vehicle グループでは 20%、低用量グループでは 8%、高用量グルー

プで 0%で、FTY720 投与グループで Vehicle グループに比して良好な結果となった (Fig. 2)。

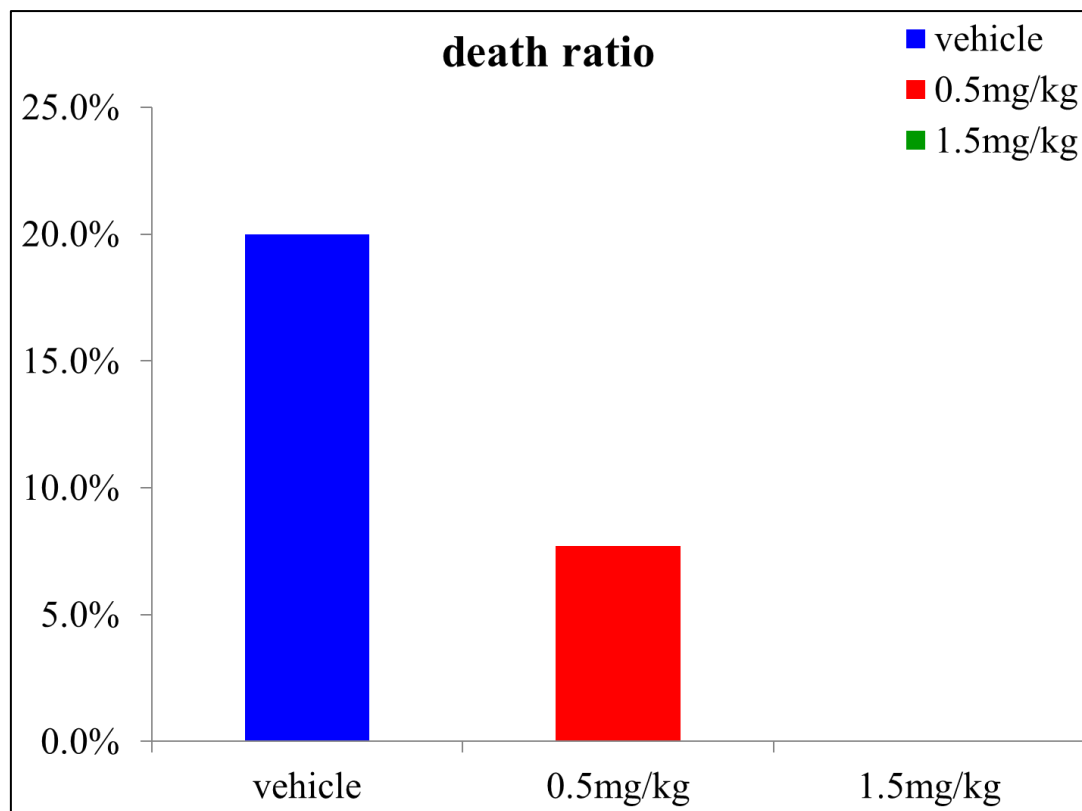


Fig. 2 死亡率 : FTY720 の用量依存的に死亡率の低減を認めている。

運動機能回復も mNSS と modified Bederson score の両方で Vehicle グループに比して FTY 投与グループで改善した。しかし高用量と低用量での違いは認められなかった (Fig. 3)。

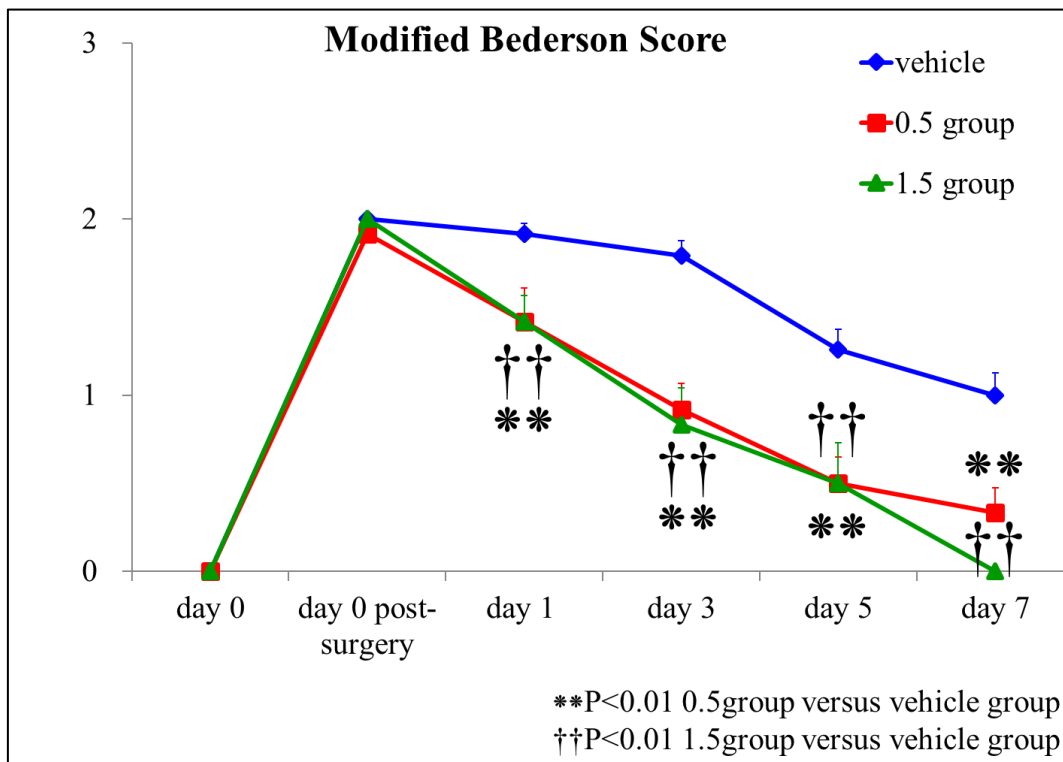
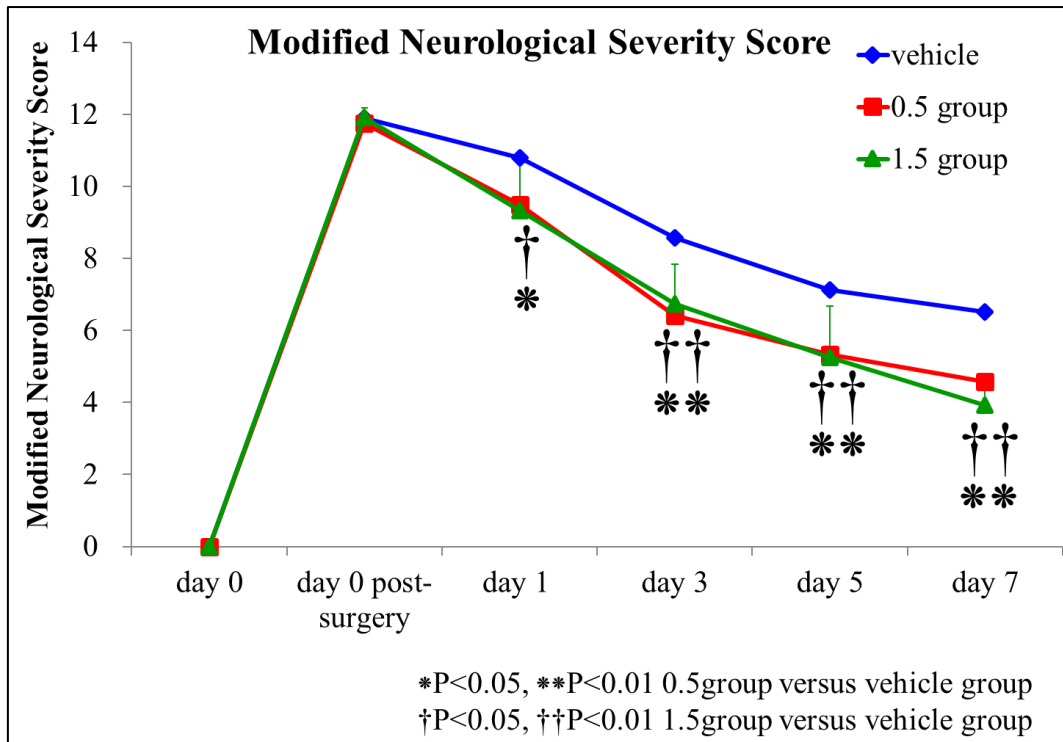


Fig.3 運動機能評価：FTY720 投与の両グループにおいて vehicle グループに比して有意な運動機能改善を認めている



### 【FTY720 は in-vitro の BBB の破綻を軽減する】

Evans blue 染色による BBB の破綻の検出において FTY720 グループは Vehicle グループに比較し有意に漏出を抑制した。(Fig. 4)

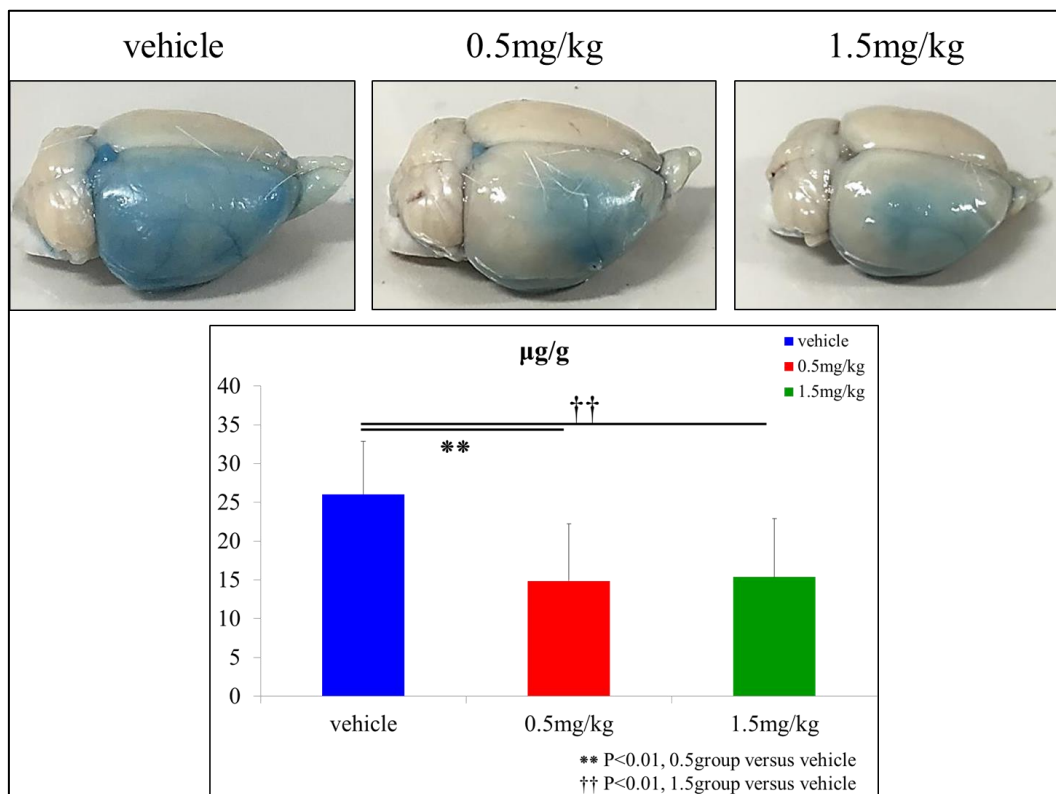


Fig. 4 BBB の漏出: FTY720 投与の両グループにおいて vehicle グループに比して有意に Evans blue の漏出抑制を認めている

### 【FTY720 は脳内の炎症反応およびアポトーシスを抑制する】

炎症反応を引き起こす活性化 microglia を Iba1 で、脳内に侵入してきた macrophage を CD68 で染色したところ Vehicle グループに比較し用量依存的に有意に発現が抑制されていることが確認できた。また細胞アポトーシスに関しては、FTY720 の両グループにおいて 90%以上抑制されていることが確認できた。(Fig. 5)

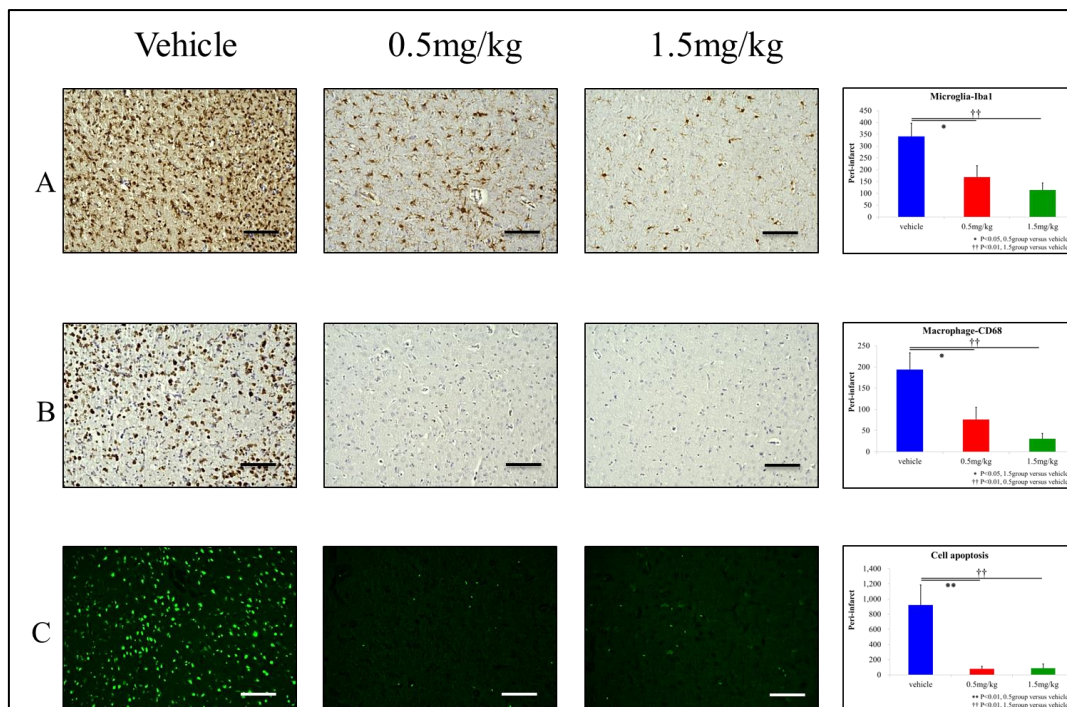


Fig. 5 炎症反応の抑制：活性型マイクログリア (Iba1 (A)) および活性型脳内マクロファージ (CD68 (B)) は FTY720 の投与によって用量依存的に活性が抑制されているのが分かる。またアポトーシス細胞 (Apoptag : C) は FTY720 の両グループにおいて vehicle グループに比して有意に減少している

PET による経時的な炎症反応の経過を観察したところ、同一個体の rat において、FTY720 投与グループは用量依存性に炎症反応の垂急性での悪化を抑制したことが分かった。脳梗塞後 2 日目の炎症は Vehicle グループ、FTY720 グループで変わりなかったが、9 日後では有意に抑制され、特に FTY720 高用量グループではほとんど炎症の進行が認められないという結果であった (Fig. 6)。

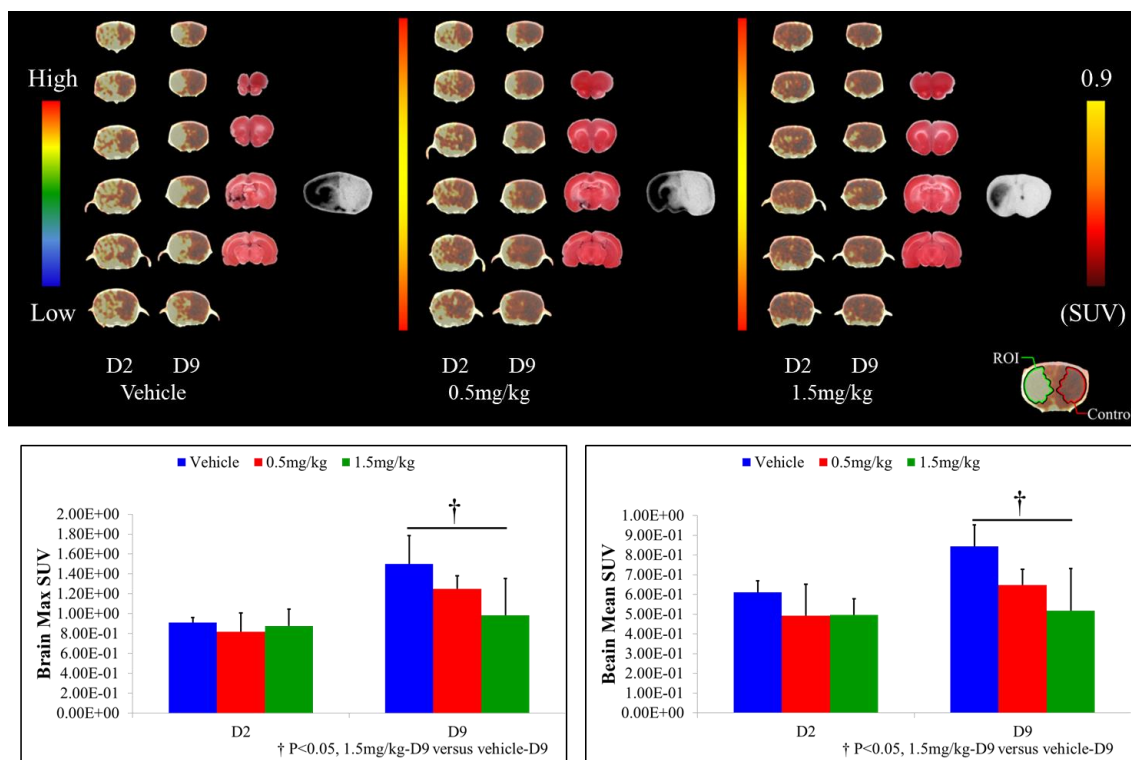


Fig. 6 PET による経時的炎症反応の推移。上：各グループにおける代表的症例（左から Vehicle、低用量、高用量）左下: Max SUV 値、右下: Mean SUV 値  
炎症反応は脳梗塞 2 日目ではほとんど変わらなかったが、9 日目の増悪が用量依存的に抑制されていた。

【FTY720 は BBB の tight/adherens junction の発現は亢進しないが、junctional protein の細胞内移動を防ぐ】

Real time PCR によって BBB の tight/adherens junction の構成要素である ZO-1/Occludin/Claudin/VE-Cadherin の発現を検討したが、これらは control に比較し、虚血負荷で発現が減少することが占められた (Vehicle) が、FTY720 および FTY720-P の投与を行っても改善は認められなかった (Fig. 7)。

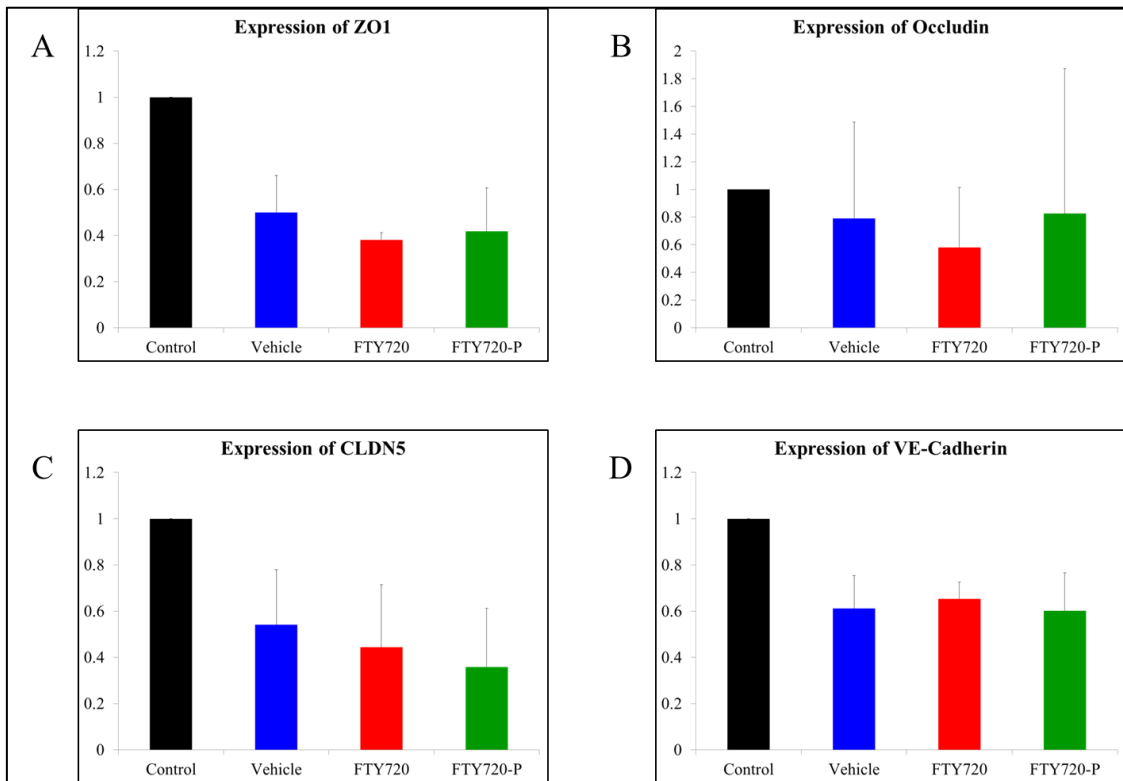


Fig. 7: 虚血負荷による BBB の junctional protein の mRNA 発現量は FTY720 および FTY720-P では改善しない

ただし、ZO-1、Occludin、Claudin5 のタンパク質レベルでの発現量に関して Western blotting を行ったが、評価に耐えうる再現性の良いデータは得ることが出来ず、断念した。

一方、tight/adherens junction の細胞間隙での分布は虚血負荷によって変化し、ZO-1 および VE-cadherin は細胞質内に移動したが、FTY720-P を投与することでこの細胞内への移動を防ぐことが出来ることが確認された (Fig. 8)。またこの効果は S1P レセプターアゴニストの PTX を投与することで、完全に消失させることが可能で、FTY720-P が S1P レセプターを介して BBB の保護を行っていることを示唆するものと思われた。Occludin の免疫染色は十分な画像化が得られなかったため断念した。

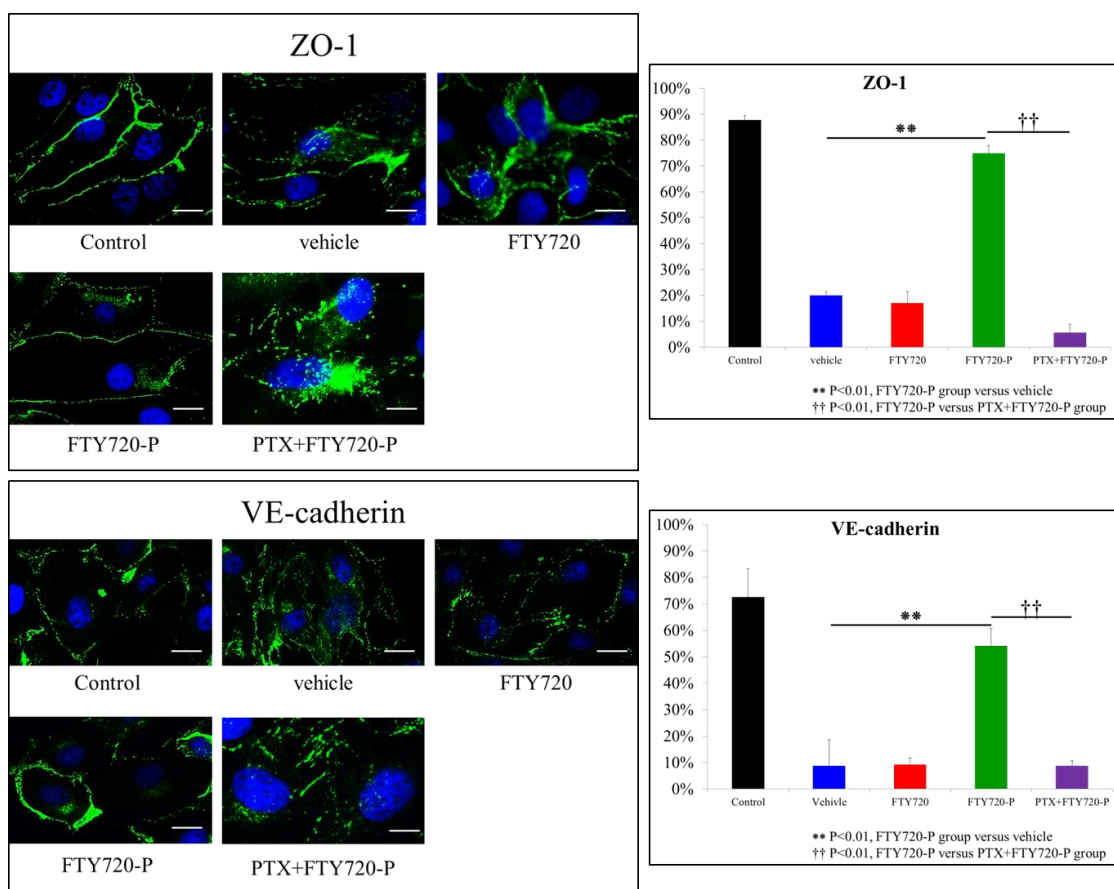


Fig. 8 : FTY720-P のみで tight/adherens junctional protein の細胞内移動を防ぐことが可能であった。また PTX によってその効果を完全に拮抗することが確認された。(左上 : ZO-1、左下 : VE-cadherin の代表的画像、右上 : ZO-1 の半定量的計測結果、右下 : VE-cadherin の半定量的計測結果)

さらに FTY720-P の効果が S1P レセプターに働いているかどうかについて、S1P レセプターの下流に存在する ERK1/2 のタンパク質の発現量を調べた結果、FTY720-P において有意に Vehicle に比較し発現が亢進すること、PTX によって reverse されることが確認された。

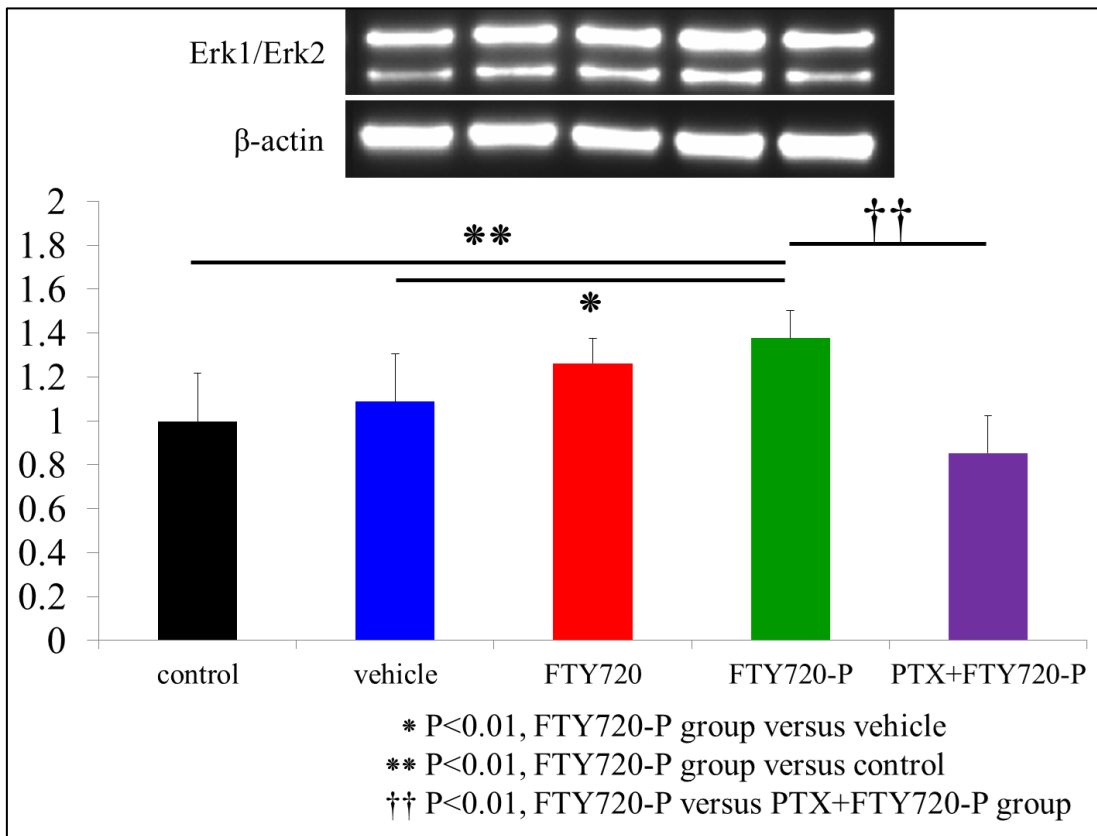


Fig. 9 : FTY720 及び FTY720-P による下流シグナリングの検討 : FTY-P は vehicle に比して有意に下流シグナリングである ERK1/2 蛋白を upregulation していた。またこの効果は PTX 投与により消失した。

## 考察

過去の報告で **FTY720** が脳虚血再灌流に対して保護作用を示すメカニズムとして血中リンパ球減少、免疫抑制、アポトーシスの減少、**BBB** の保護などが指摘されてきている<sup>16-18</sup>。しかしながら **FTY720** による炎症反応抑制の時間的経過およびどのように **BBB** を保護しているのかについては不明であった。本研究によって我々は 2 つの新しい機序についての知見を得ることが出来た。一つ目は **FTY** 投与によって **tight** および **adherens junction** の構成要素の細胞内移動を防ぐことが出来、それによって **BBB** の保護が得られている可能性が示唆されたこと、二つ目は **FTY720** 投与による炎症反応制御が急性期ではなく亜急性期以降に生じていることである。

・ **FTY720** は虚血による **BBB** 構成成分の細胞内移動および破綻を防ぐ

**BBB** は脳の血管内皮細胞を中心とする非常に特殊な機構で有り、脳内と血管内の物質の通過を制御することによって中枢神経を外的因子から保護している。しかしながら虚血によって **BBB** が破綻することによって、このバリアが傷害され、様々な細胞や液性因子が脳内に侵入し、以後炎症反応のカスケードが進行することで、結果脳損傷の悪化をきたすことになると考えられている<sup>5,22</sup>。過去の報告では、**FTY720** は正常の生理的状況下においては **tight/adherens junction** の構成要素である **VE-cadherin** と  **$\beta$ -catenin** を **S1P** レセプターを介して強化することが証明されており<sup>35</sup>、感染、けいれん、多発性硬化症、アルツハイマー病などの病的状況下では **BBB** の透過性亢進を抑え保護することによる脳保護的効果が実験的に確認されている<sup>36,37</sup>。また **FTY720** ではないものの、同じレセプターを介して機能する **S1P** が **tight/adherens junctional protein** の細胞内移動を抑えて、細胞表面に留めることによるバリア機能の保持が報告されている<sup>33</sup>。これらの報告は今回我々が見つけた、虚血時においても **FTY720-P** が **BBB** の **junctional protein** を細胞表面に残すという結果と同様の方向性を有しており、虚血時においても **FTY720** が **BBB** に対して脳保護的に作用し、その機序は構成要素の細胞内移動を防ぐことであると考えられる。我々はこれらの結果から、**BBB** を構成する **junctional protein** はエネルギー依存能動的に細胞表面に存在しており、虚血等の細胞エネルギー枯渇となった際に細胞内に引き込まれ、バリア機能が破綻するのではないかという機序を推定している。**mRNA** の発現

が FTY720 投与によって増加しなかったという事は、虚血時に FTY720 が BBB 保護効果を示したのは新たな junctional protein 発現の亢進によるものではなく、細胞内移動を抑えた結果によるものだと思われる。過去の報告の多くは単純に Evans blue の漏出で BBB が破綻したと結論付けており、その詳細なメカニズムに関しては不明であった事からも今回の発見が新規的であると思われる。またその作用が S1P レセプターを介して行われていることも下流シグナルの ERK1/2 蛋白の上昇とアンタゴニストである百日咳毒素による効果の消失により証明することが出来た。しかしながら逆の報告として、rt-PA 投与による脳血管再開通療法時に FTY720 を同時に投与しても BBB の保護効果が得られなかったという報告や生理的状況においては FTY720 が BBB を一部開放し小さな molecule のみの透過性を亢進しているとの報告も存在することから<sup>38,39</sup>、FTY720 の BBB に対する保護効果に関しては更なる検討が必要なのは間違いないと思われる。

#### ・ FTY720 は亜急性期の炎症増悪を抑制する

本研究のもう一つの新規的発見として FTY720 は急性期の炎症ではなく、亜急性期において炎症反応の増悪を抑制する働きがあることを動物 PET で明らかとしたことである。TSPO はミトコンドリア細胞膜上に主に発現しており、免疫応答やステロイド合成、アポトーシスに関与している<sup>40</sup>、中枢神経系では生理的状況下では非常に低くしか発現していないが、活性型マイクログリアによって強く発現されるため中枢神経炎症マーカーとして非常に有効であると考えられている<sup>41,42</sup>。我々の検討では脳梗塞 2 日目の炎症はどのグループでも概ね同様であった。しかし脳梗塞 9 日目には Vehicle グループで非常に強く炎症が亢進していたにも関わらず、FTY720 グループ、特に高用量グループにおいてはほとんど炎症の悪化を認めていなかった。この効果は FTY720 を用いた際の脳内炎症評価がどの時点が最適化を知るための非常に良い指標になり得ると考えられた。この効果については FTY720 の血中リンパ球減少が寄与する可能性が一番高いと考えられるが、他の機序の可能性も今後検討する必要があると思われる。

#### ・ それ以外の検討

それ以外としても本研究では FTY720 による microglia/macrophage の集積低下が認められている。興味深いことに macrophage は S1P<sub>2</sub> レセプターを有して



いると考えられており<sup>43</sup>、これは FTY720 が効果を示す S1P<sub>1,3,4,5</sub> からは外れており、直接の作用ではない可能性がある。また FTY720 は神経細胞への直接のアポトーシス保護効果がないという報告もなされていて<sup>18</sup>、本報告による FTY720 による頭蓋内アポトーシス抑制も直接の効果ではない可能性が考えられる。これらは BBB の保護および血中リンパ球減少による副次的効果である可能性が示唆される。

#### ・本研究の限界

新規的な知見が得られた反面、本研究にはいくつかの Limitation が存在していると考えられる。一つ目として我々は FTY720-P が tight/adherens junctional protein を細胞膜上に留めることと、BBB の破綻が防げたことを示すことが出来たが、細胞膜上に protein を留めたことが直接 BBB を保護したかどうかについて証明していない点が上げられる。このことを証明するには電子顕微鏡による BBB の形態的変化や細胞膜電位測定などを行う必要があると考える。また FTY720 の最も大きな作用として血中リンパ球減少が上げられ、これが BBB の破綻に寄与している可能性を除外していない点である。白血球上の S1P レセプターの knockout などを用いることで検討が可能かもしれないと考えるが、現時点で我々の施設において早急にこれらの課題を解決するのは難しく今後の課題として残っている。

#### ・結語

結論として FTY720 は脳梗塞後の虚血再灌流において BBB の tight/adherens junctional protein の移動を抑え、かつ、亜急性期の炎症を抑えることが示された。血栓回収療法などの際に生じうる虚血再灌流障害を軽減させうる薬剤として期待できると思われた。

## 総括および結論

### ①本研究全体から得られた新知見

- FTY720 は脳血液関門（BBB）上に発現する蛋白の虚血時に生じる細胞内移動を防ぎ、バリア機能を保持する働きがあることを示した。
- その機能は細胞膜上に存在する S1P レセプターに結合することで生じていることを示した。
- FTY720 は脳内炎症を抑えるが、その効果は急性期ではなく、亜急性期に生じていることが分かった。

### ②新知見の意義

- 臨床で問題となっている虚血再灌流障害を軽減する薬剤として FTY720 が Promising であることが示唆された。

### ③今後どのような研究が展開されうるか

FTY720 の虚血再灌流障害の軽減作用に際し、今回 Limitation ともなった BBB の保護効果に対して電子顕微鏡や細胞膜電位測定などを通じて直接保護効果を示す研究への展開が考えられる。また FTY720 は既に物質特許が切れている状況で有り、製薬会社も今後の新規適応に慎重な姿勢を示している。FTY720 以外でも S1P レセプターに結合可能な薬剤などによる虚血再灌流障害に対する保護効果を調べることで、製品化出来る可能性が考えられる。

## 謝辞

本研究の機会を与えていただいた北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野 寶金清博教授に謝意を申し上げます。また本研究全般にわたり、直接ご指導・ご鞭撻をいただいた同分野 川堀真人特任講師に深く感謝いたします。最後に、本研究にご協力いただいた長島里香実験助手、そして研究に関して多くの議論・助言をいただきました他の当教室員の皆様に御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1 Feigin, V. L. *et al.* Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **383**, 245-254 (2014).
- 2 Campbell, B. C. *et al.* Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med* **372**, 1009-1018, doi:10.1056/NEJMoa1414792 (2015).
- 3 Goyal, M. *et al.* Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med* **372**, 1019-1030, doi:10.1056/NEJMoa1414905 (2015).
- 4 Saver, J. L. *et al.* Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med* **372**, 2285-2295, doi:10.1056/NEJMoa1415061 (2015).
- 5 Yenari, M. A. & Han, H. S. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci* **13**, 267-278, doi:10.1038/nrn3174 (2012).
- 6 Sun, M. S. *et al.* Free Radical Damage in Ischemia-Reperfusion Injury: An Obstacle in Acute Ischemic Stroke after Revascularization Therapy. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 3804979, doi:10.1155/2018/3804979 (2018).
- 7 Fujita, T. *et al.* Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot (Tokyo)* **47**, 208-215 (1994).
- 8 Chiba, K. *et al.* Fingolimod (FTY720), sphingosine 1-phosphate receptor modulator, shows superior efficacy as compared with interferon-beta in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunopharmacol* **11**, 366-372, doi:10.1016/j.intimp.2010.10.005 (2011).
- 9 Man, K. *et al.* FTY720 attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury

- in normal and cirrhotic livers. *Am J Transplant* **5**, 40-49, doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00642.x (2005).
- 10 Mizuta, K. *et al.* Effect of pretreatment with FTY720 and cyclosporin on ischaemia-reperfusion injury of the liver in rats. *J Pharm Pharmacol* **51**, 1423-1428 (1999).
- 11 Delbridge, M. S., Shrestha, B. M., Raftery, A. T., El Nahas, A. M. & Haylor, J. FTY720 reduces extracellular matrix expansion associated with ischemia-reperfusion induced injury. *Transplant Proc* **39**, 2992-2996, doi:10.1016/j.transproceed.2007.04.027 (2007).
- 12 Kaudel, C. P. *et al.* FTY720 for treatment of ischemia-reperfusion injury following complete renal ischemia; impact on long-term survival and T-lymphocyte tissue infiltration. *Transplant Proc* **39**, 499-502, doi:10.1016/j.transproceed.2006.12.010 (2007).
- 13 Goltz, D. *et al.* Immunomodulation by splenectomy or by FTY720 protects the heart against ischemia reperfusion injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **42**, 1168-1177, doi:10.1111/1440-1681.12465 (2015).
- 14 van Vuuren, D., Marais, E., Genade, S. & Lochner, A. The differential effects of FTY720 on functional recovery and infarct size following myocardial ischaemia/reperfusion. *Cardiovasc J Afr* **27**, 375-386, doi:10.5830/CVJA-2016-039 (2016).
- 15 Wang, M., Lu, L., Liu, Y., Gu, G. & Tao, R. FTY720 attenuates hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Exp Mol Pathol* **97**, 218-224, doi:10.1016/j.yexmp.2014.07.008 (2014).
- 16 Brait, V. H., Tarrason, G., Gavaldà, A., Godessart, N. & Planas, A. M. Selective Sphingosine 1-Phosphate Receptor 1 Agonist Is Protective Against Ischemia/Reperfusion in Mice. *Stroke* **47**, 3053-3056, doi:10.1161/STROKEAHA.116.015371 (2016).
- 17 Hasegawa, Y., Suzuki, H., Sozen, T., Rolland, W. & Zhang, J. H. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats. *Stroke* **41**, 368-374, doi:10.1161/STROKEAHA.109.568899 (2010).
- 18 Kraft, P. *et al.* FTY720 ameliorates acute ischemic stroke in mice by reducing thrombo-inflammation but not by direct neuroprotection.

- Stroke* **44**, 3202-3210, doi:10.1161/STROKEAHA.113.002880 (2013).
- 19 Nazari, M., Keshavarz, S., Rafati, A., Namavar, M. R. & Haghani, M. Fingolimod (FTY720) improves hippocampal synaptic plasticity and memory deficit in rats following focal cerebral ischemia. *Brain Res Bull* **124**, 95-102, doi:10.1016/j.brainresbull.2016.04.004 (2016).
- 20 Wei, Y. *et al.* Fingolimod provides long-term protection in rodent models of cerebral ischemia. *Ann Neurol* **69**, 119-129, doi:10.1002/ana.22186 (2011).
- 21 Gekka, M. *et al.* Novel Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Bound With Albumin Shows Neuroprotection With Possible Antioxidant Effects. *Stroke* **49**, 1960-1968, doi:10.1161/STROKEAHA.118.021467 (2018).
- 22 Shimbo, D. *et al.* Superior Microvascular Perfusion of Infused Liposome-Encapsulated Hemoglobin Prior to Reductions in Infarctions after Transient Focal Cerebral Ischemia. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **26**, 2994-3003, doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.07.026 (2017).
- 23 Shimbo, D. *et al.* Post-ischemic intra-arterial infusion of liposome-encapsulated hemoglobin can reduce ischemia reperfusion injury. *Brain Res* **1554**, 59-66, doi:10.1016/j.brainres.2014.01.038 (2014).
- 24 Chen, J. *et al.* Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* **32**, 2682-2688 (2001).
- 25 Choe, C. U. *et al.* Homoarginine levels are regulated by L-arginine:glycine amidinotransferase and affect stroke outcome: results from human and murine studies. *Circulation* **128**, 1451-1461, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000580 (2013).
- 26 Kaur, H., Kumar, A., Jaggi, A. S. & Singh, N. Pharmacologic investigations on the role of Sirt-1 in neuroprotective mechanism of postconditioning in mice. *J Surg Res* **197**, 191-200, doi:10.1016/j.jss.2015.03.010 (2015).
- 27 Mao, Y. *et al.* Heat shock protein A12A encodes a novel prosurvival pathway during ischaemic stroke. *Biochim Biophys Acta* **1864**,

- 1862-1872, doi:10.1016/j.bbadis.2018.03.006 (2018).
- 28 Lu, C. *et al.* TLR2 ligand induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling. *J Immunol* **187**, 1458-1466, doi:10.4049/jimmunol.1003428 (2011).
- 29 Kawabori, M. *et al.* Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct: an optical imaging study. *Neuropathology* **32**, 217-226, doi:10.1111/j.1440-1789.2011.01260.x (2012).
- 30 Tan, C. *et al.* [(18)F]DPA-714 PET imaging shows immunomodulatory effect of intravenous administration of bone marrow stromal cells after transient focal ischemia. *EJNMMI Res* **8**, 35, doi:10.1186/s13550-018-0392-6 (2018).
- 31 Miyamoto, M. *et al.* Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of local glucose metabolism after cerebral infarction in rats: a serial 18F-FDG PET study. *J Nucl Med* **54**, 145-150, doi:10.2967/jnumed.112.109017 (2013).
- 32 Magota, K. *et al.* Performance characterization of the Inveon preclinical small-animal PET/SPECT/CT system for multimodality imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **38**, 742-752, doi:10.1007/s00259-010-1683-y (2011).
- 33 Lee, J. F. *et al.* Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity. *J Biol Chem* **281**, 29190-29200, doi:10.1074/jbc.M604310200 (2006).
- 34 Lee, M. J. *et al.* Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* **99**, 301-312 (1999).
- 35 Sanchez, T. *et al.* Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem* **278**, 47281-47290, doi:10.1074/jbc.M306896200 (2003).

- 36 Shi, D. *et al.* FTY720 attenuates behavioral deficits in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Brain Behav Immun* **70**, 293-304, doi:10.1016/j.bbi.2018.03.009 (2018).
- 37 McManus, R. M., Finucane, O. M., Wilk, M. M., Mills, K. H. G. & Lynch, M. A. FTY720 Attenuates Infection-Induced Enhancement of Abeta Accumulation in APP/PS1 Mice by Modulating Astrocytic Activation. *J Neuroimmune Pharmacol* **12**, 670-681, doi:10.1007/s11481-017-9753-6 (2017).
- 38 Cai, A. *et al.* Coadministration of FTY720 and rt-PA in an experimental model of large hemispheric stroke-no influence on functional outcome and blood-brain barrier disruption. *Exp Transl Stroke Med* **5**, 11, doi:10.1186/2040-7378-5-11 (2013).
- 39 Yanagida, K. *et al.* Size-selective opening of the blood-brain barrier by targeting endothelial sphingosine 1-phosphate receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 4531-4536, doi:10.1073/pnas.1618659114 (2017).
- 40 Papadopoulos, V. *et al.* Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 402-409, doi:10.1016/j.tips.2006.06.005 (2006).
- 41 Chen, M. K. & Guilarte, T. R. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther* **118**, 1-17, doi:10.1016/j.pharmthera.2007.12.004 (2008).
- 42 Jacobs, A. H., Tavitian, B. & consortium, I. N. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**, 1393-1415, doi:10.1038/jcbfm.2012.53 (2012).
- 43 Michaud, J., Im, D. S. & Hla, T. Inhibitory role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in macrophage recruitment during inflammation. *J Immunol* **184**, 1475-1483, doi:10.4049/jimmunol.0901586 (2010).