



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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	王, 子豊
Description	配架番号 : 2439
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13425号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74310
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Zifeng_Wang_abstract.pdf, 論文内容の要旨



(様式 9)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 王子豊

学 位 論 文 題 名

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)

【背景と目的】脳梗塞の虚血再灌流障害 (Brain ischemia reperfusion injury; I/R injury) 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おり、その理解・治療は喫緊の問題である。FTY720 は近年開発された免疫抑制作用のある薬剤で有り体内取り込み後、リン酸化 FTY720 (Phosphorylated FTY720; FTY720-P) となり、S1P レセプター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。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、腎臓、心臓、脳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。

【材料と方法】

8 週オス SD ラットを使用した。①Vehicle グループ、②低用量 (0.5mg/kg) FTY720 グループ、③高用量 (1.5mg/kg) FTY720 グループを使用し、中大脳動脈の 2 時間一過性脳虚血モデルを作成した。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を用いて作成した。レーザードップラーと神経症状で梗塞が出来ていることを評価した。神経学的評価、脳梗塞サイズ、BBB の破綻、炎症細胞およびアポトーシス細胞の免疫染色法を評価した。また神経炎症の経過を脳梗塞後 2 日目と 9 日目に動物用 PET で測定した。細胞培養を用いた in-vitro 研究は Bovine Brain Microvascular Endothelial Cell を使用し、培養細胞を 4 時間の酸素栄養飢餓状態 (Oxygen-glucose deprivation; OGD) で作成した。(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 投与、(4) FTY720-P グループ : OGD 解除直前に 100 nM の FTY720-P 投与、(5) FTY720-P と百日咳毒素 (PTX : S1P レセプターのアンタゴニスト) 投与グループ : OGD 解除直前に 100 nM の FTY720-P と PTX を投与。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 の発現をリアルタイム PCR と Western blotting で調べ、免疫染色で発現部位を調べた。シグナリングを調べるため S1P レセプターの下流に存在する ERK1/2 の発現も western blotting で検討した。

【結果】

FTY720 投与により、脳梗塞のサイズの縮小、死亡率の改善、運動機能回復の促進、BBB 保護効果、

マイクログリア、マクロファージの活性抑制、細胞死（アポトーシス）抑制が得られた。PET による経時的な炎症反応の経過を観察したところ、FTY720 投与は用量依存性に炎症反応の亜急性期の悪化を抑制したことが分かった（脳梗塞後 2 日目の炎症は各グループで変わりなかったが、9 日後では FTY 投与グループで有意に抑制され、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かった）。Real time PCR・Western blotting で BBB の tight/adherens junction の構成要素の発現を検討したが、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。一方、tight/adherens junction の細胞間隙での分布は虚血負荷によって Vehicle 群では細胞内に入ったが、FTY720-P を投与することで細胞内への移動を防ぐことが出来ることが確認され、この効果は S1P レセプターアゴニストの PTX を投与することでブロック出来た。この効果は S1P レセプターの下流の ERK1/2 に関係していることも証明された。

【考察】

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 投与による BBB の保護効果が、tight および adherens junction の構成要素の細胞内移動を防ぐことによって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。

BBB は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。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 を S1P レセプターを介して強化することが知られており、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。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。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ていることを示した。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。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。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。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思われた。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。

【結論】

FTY720 は脳虚血再灌流において保護的に作用し、その機序として BBB の保護効果および亜急性期の炎症制御が関与していることが示唆された。