HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	王, 子澧
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2439 他
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/2115/74311
Type	doctoral thesis
File Information	Zifeng_Wang_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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

王子澧

学位論文（要約）

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

王子澧

学位論文内容の要約

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　王子澧

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。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。今までにない効果が得られるようになったものの、依然後遺症を残す患者は少なくなく、その原因として虚血再灌流障害（Brain ischemia reperfusion injury; I/R injury）が考えられている。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たし、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、その解決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、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。体内取り込み後、リン酸化FTY720（Phosphorylated FTY720; FTY720-P）となり、S1Pレセプターに結合し様々な作用を来す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（健常時に比較し 70%以上の血流低下）と神経症状（modified Bederson score 3以上）で梗塞が出来ていることを評価した。その後、1週間にわたって、神経学的評価を行い、その後、切片を用いて脳梗塞サイズ、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研究として、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)、4時間再灌流を行いOGDモデルを確立した。その後5つのグループに分け実験を行った。(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。その上で、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、microglia と macrophage 抑制効果は用量依存的に改善した。また運動機能回復の促進、BBB 保護効果、アポトーシス抑制効果に関しては FTY 投与の低・高用量の両群で vehicle に比較し有意に改善が確認された。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通常の状態であれば、細胞間にこれら BBB 構成要素タンパク質が局在しており、虚血負荷によって細胞内にこれらのタンパクが移動し、結果 BBB の破綻をもたらしていたが、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た。この機序は FTY720 投与では得ることが出来なかった。その理由として血管内皮細胞は十分な酵素を有していないことから FTY720 が FTY720-P に変換されなかったことが考えられた。またこの効果は S1P レセプターアゴニストの PTX を投与することでブロック出来、BBB 構成要素は S1P レセプターのシグナリングが関与していることが証明された。そしてその効果は S1P レセプター下流の ERK1/2 が関係していることも証明された。

【考察】

過去の報告で FT720 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 [16-18]。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 [5,22]。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β-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 [35]、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 [36,37]。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 [33]。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た。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 [38,39]、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 FYT720 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て [40]、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 [41,42]。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。

・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 $S1P_2$ レセプターを有していると考えられており [43]、これは FTY720 が効果を示す $S1P_{1,3,4,5}$ 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 [18]、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。