新規免疫抑制化合物 FTY720の作用機構の解析： リンパ球ホーミングの促進による免疫抑制作用の発現

学位論文内容の要旨

I 序論

臓器移植における急性拒絶反応の予防には免疫抑制剤が不可欠であり、cyclosporine A (CsA) および tacrolimus (FK506) は、最も汎用されている免疫抑制剤である。これらの薬剤は、ともに移植片の急性拒絶反応を抑制する用量で、腎毒性や肝毒性などを示すため、臨床においては低用量で用いられ、免疫抑制作用を補うために他の薬剤との併用が行われている。したがって、CsA および FK506 とは作用機構を異なり、これらと併用可能な副作用の少ない新規免疫抑制剤の開発が待望されている。最近、冬虫夏草菌類の一種であるツクツクボウシダケ (*Isaria sinclairii*) の培養上清から免疫抑制物質、ISP-I が発見された。ISP-I は *in vivo* での毒性が強かったため、種々の ISP-I 誘導体が合成された。その結果、強力な免疫抑制活性を保持しかつ毒性が軽減された合成化合物、FTY720 が見い出された。FTY720 は CsA および FK506 で問題とされている腎毒性や肝毒性を示さず、種々の同種移植モデルにおいて著しい移植片生着延長効果を示した。本研究においては、*in vivo* における FTY720 の作用機構を解析し、本化合物がこれまでにないユニークな機構によって免疫抑制作用を発現することを明らかにしたので報告する。

II 同種皮膚移植における FTY720, CsA と FK506 による移植片生着延長作用

WKAH ラットをドナーとし、F344 ラットをレシピエントとした主要組織適合抗原が異なるラット間での同種皮膚移植モデルにおいて、CsA, FK506 と FTY720 の移植片生着延長作用を比較した。FTY720 は、0.03 mg/kg の用量で有意となる、用量依存的な移植片の生着延長作用を示した。一方、CsA および FK506 も移植片の生着を延長したが、FTY720 よりも高い用量が必要であった。すなわち、FTY720 は CsA や FK506 よりも強力な免疫抑制作用を示すことが明らかとなった。

III FTY720 による末梢血リンパ球減少作用の解析

FTY720 の最も特徴的な作用は、免疫抑制作用を示す用量で、投与後数時間以内に、末梢血中のリンパ球、とくに T 細胞を著しく減少させることである。血中のリンパ球は血流を介して全身を循環するとともに、リンパ節およびパイエル板へ移行する。このリンパ球の移行はリンパ球ホーミングと呼ばれ、リンパ節およびパイエル板に存在

する特殊な構造をもった高内皮性細静脈 (HEV) を介していると考えられている。リンパ球は、リンパ節およびパイエル板へ移行した後、輸出リンパ管を通過して再び血中へ移行し、血流中を再循環する。このリンパ球のホーミングおよび再循環に着目し、FTY720 の作用機構を検討した。ラットに FTY720 を 0.1 および 1 mg/kg で単回経口投与し、末梢血、末梢リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板および脾臓におけるリンパ球数をフローサイトメトリーによって経時的に測定した。FTY720 の投与後 3~24 時間で、末梢血中のリンパ球が著しく減少し、その後徐々に増加して、7 日目には control と同程度にまで回復した。脾臓においても同様にリンパ球の減少が認められた。これとは逆に、リンパ節およびパイエル板においては投与後 3~24 時間で、リンパ球が control の 1.5~3 倍に増加し、その後減少して、7 日目には control と同程度の値を示した。蛍光標識リンパ球を用いて、末梢血から各リンパ系組織へのリンパ球の移行に対する FTY720 の作用を調べた結果、本化合物はリンパ節およびパイエル板へのリンパ球ホーミングを促進していることが判明した。以上の結果から、FTY720 は末梢血からリンパ節およびパイエル板へのリンパ球ホーミングを促進させ、これらのリンパ系組織にリンパ球を隔絶することによって末梢血中のリンパ球を著しく減少させると考えられる。

IV 移植片中の interleukin-2 (IL-2) と interferon- γ (IFN- γ) の mRNA 発現および T 細胞浸潤に対する FTY720 と CsA の作用

同種移植片は、末梢血から移植片への T 細胞の浸潤および移植片中での IL-2 および IFN- γ による浸潤 T 細胞の活性化など、一連の免疫反応によって拒絶されることが考えられている。FTY720 は CsA との併用により、同種移植片の生着に対して著しい相乗効果を発揮した。そこで、この相乗効果の発現機構を解析するため、移植片中の IL-2 と IFN- γ の mRNA 発現および T 細胞浸潤に対する FTY720 および CsA の作用を検討した。WKAH ラットの皮膚を F344 ラットに移植して 5 日後に移植片中の IL-2 および IFN- γ の mRNA 発現量を、また、移植片中の T 細胞浸潤量の指標として T 細胞に定常的に発現されている CD3 mRNA の発現量を各々 RT-PCR 法により測定した。FTY720 (0.1 mg/kg) および CsA (10 mg/kg) をそれぞれ単剤で投与した場合、移植片生着の中央値 (MST) はそれぞれ 10.5 および 11 日であり、同等の免疫抑制作用を示した。一方、FTY720 は移植片中の CD3 mRNA の発現 (T 細胞浸潤) の増加を強く抑制したのに対し、CsA は IL-2 および IFN- γ の mRNA 発現を強く抑制し、移植片中の免疫反応に対する作用は FTY720 と CsA で全く異なっていた。また、FTY720 (0.1 mg/kg) および CsA (10 mg/kg) を併用した場合、IL-2、IFN- γ および CD3 の mRNA 発現の増加は、ともに同系移植のレベルにまで抑制され、MST は 70 日以上と著しい相乗作用が認められた。さらに、FTY720 による移植片への T 細胞浸潤の抑制については、フローサイトメトリーによっても確認した。以上の結果から、FTY720 は、CsA とは異なり、T 細胞の移植片への浸潤を著しく抑制することによって免疫抑制作用を発現すると考えられる。また、FTY720 と CsA の併用時においては、T 細胞の移植片への浸潤および移植片中でのサイトカイン産生がともに著しく抑制されることによって、相乗効果が発現すると推察された。

V まとめ

本研究で得られた結果をまとめると、FTY720 はリンパ節およびパイエル板へのリンパ球ホーミングを促進させることによって血中を循環するリンパ球、とくに T 細胞

を著しく減少させた。その結果、移植片へのT細胞の浸潤は抑制され、免疫抑制作用が発現すると考えられる。CsAなどこれまでの免疫抑制剤は、免疫担当細胞に直接作用し、細胞の機能あるいは増殖を抑制することによって作用を発現する。FTY720は、これら既存の薬剤とは異なり、全身におけるリンパ球の動態に作用することによって免疫抑制作用を発現するユニークな機序をもつことが示された。以上のことから、FTY720は、臓器移植における急性拒絶予防薬としてばかりでなく、免疫反応を研究する際のツールとして極めて有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 澤 滋 治
副 査 教 授 徳 光 幸 子
副 査 教 授 野 村 靖 幸
副 査 助 教 授 高 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

新規免疫抑制化合物 FTY720の作用機構の解析： リンパ球ホーミングの促進による免疫抑制作用の発現

冬虫夏草菌類の一種であるツクツクボウシダケ (*Isaria sinclairii*) の培養上清から免疫抑制物質が見い出されたが、毒性が強かったため、種々の誘導体が合成された。その結果、強力な免疫抑制活性を保持しかつ毒性が軽減された化合物、FTY720 の合成に成功した。FTY720 は従来免疫抑制薬である CsA および FK506 とは異なり腎毒性、肝毒性などを示さず、著しい移植片生着延長効果を示した。また、*in vitro* において、FTY720 は、CsA や FK506 とは異なり、IL-2 の産生を抑制しないことが示された。したがって、FTY720 は、CsA または FK506 との併用が可能であり、臓器移植における急性拒絶反応の予防に有用であると期待される。本論文提出者は、*in vivo* における FTY720 の作用機序を解析し、本化合物がこれまでにないユニークな機構によって免疫抑制作用を発現することを明らかにした。

ラットの同種皮膚移植モデルにおいて、CsA、FK506 および FTY720 の移植片生着延長作用を比較した。Control 群において、移植片は術後 6~7 日で拒絶された。FTY720 の投与は移植片の生着延長作用を示した。CsA および FK506 も移植片の生着を延長したが、FTY720 は CsA や FK506 よりも強力な免疫抑制作用を示すことが明らかとなった。

FTY720 の最も特徴的な作用は末梢血中のリンパ球、とくに T 細胞を著しく減少させることである。このような現象は、CsA および FK506 を投与した場合には認められない。血中のリンパ球の移行はリンパ球ホーミングと呼ばれ、リンパ節およびパイエル板に存在する特殊な構造をもった高内皮性細静脈 (high endothelial venule, HEV) を介している。ラットに FTY720 を単回経口投与し、末梢血、末梢リンパ節 (PLN)、腸間膜リンパ節 (MLN)、パイエル板

(PP) および脾臓におけるリンパ球数を測定すると、FTY720 の投与は末梢血中のリンパ球を著しく減少させた。脾臓においても同様にリンパ球の減少が認められた。一方、末梢リンパ節、腸間膜リンパ節およびパイエル板のリンパ球数は、これとは逆に増加した。

FTY720 の作用は B 細胞に比べて T 細胞に対して顕著であった。さらに、蛍光物質である calcein で標識したリンパ球を用いて、末梢血から各リンパ系組織へのリンパ球の移行に対する FTY720 の作用を調べた。FTY720 は末梢リンパ節、腸間膜リンパ節およびパイエル板へのリンパ球ホーミングを促進させた。FTY720 によるリンパ球ホーミングは、通常のリンパ球ホーミングと同様に、リンパ球ホーミングレセプターに対する抗体の処理によって抑制された。

以上の結果から、FTY720 は末梢血からリンパ節およびパイエル板へのリンパ球ホーミングを促進させ、これらのリンパ系組織にリンパ球を隔絶することによって、末梢血中のリンパ球を著しく減少させると考えられる。

同種移植片は、末梢血から移植片への T 細胞の浸潤および移植片中での IL-2 および interferon- γ (IFN- γ) による浸潤 T 細胞の活性化などで拒絶されることが考えられている。FTY720 は CsA との併用により、同種移植片の生着に対して著しい相乗効果を発揮した。一方、FTY720 は移植片中の CD3 mRNA の発現 (T 細胞浸潤) の増加を強く抑制したのに対し、CsA は IL-2 および IFN- γ の mRNA 発現を強く抑制し、移植片中の免疫反応に対する作用は FTY720 と CsA で全く異なっていた。また、FTY720 および CsA を併用した場合、IL-2、IFN- γ および CD3 の mRNA 発現の増加は、ともに同系移植 (Isograft) のレベルにまで抑制され、移植片生着の中央値は 70 日以上と著しい相乗作用が認められた。以上の結果から、FTY720 は、CsA とは異なり、T 細胞の移植片への浸潤を著しく抑制することによって免疫抑制作用を発現すると考えられる。したがって、FTY720 および CsA の併用は、T 細胞の移植片への浸潤および移植片中でのサイトカイン産生がともに著しく抑制されることによって、相乗効果が発現すると推察された。

CsA などこれまでの免疫抑制剤は、免疫担当細胞に直接作用し、細胞の機能あるいは増殖を抑制することによって作用を発現する。FTY720 は、これら既存の薬剤とは異なり、全身におけるリンパ球の動態に作用することによって免疫抑制作用を発現するユニークな機序をもつことが示された。

以上の免疫抑制薬として合成された新規化合物 FTY720 は臓器移植の拒絶反応予防薬として大きく貢献したものである。審査員一同これらの研究を高く評価し、本論文提出者が博士 (薬学) の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。