

学位論文題名

Studies on the immunosuppressive and anti-angiogenic effects of novel selective S1P₁ antagonists

（選択的 S1P₁ 拮抗薬の免疫抑制作用及び血管新生抑制作用に関する研究）

学位論文内容の要旨

スフィンゴシン1-リン酸（S1P）は、スフィンゴ脂質と呼ばれる生体内に多く存在する脂質の一つである。生体内でのリンパ球の移動は、リンパ球上に発現している S1P₁ 型受容体（S1P₁）が血液ならびにリンパ液に存在する S1P と反応することにより制御されていること、また、胎生期において血管内皮細胞の S1P₁ が血管壁形成に必須であることが遺伝子改変（ノックアウト）マウスを用いた研究から明らかにされている。このようなことから、近年、リンパ球の活性化抑制による免疫抑制作用ではなく、リンパ球の S1P₁ を標的にしたリンパ球の移動制御、すなわち、病変部からの隔離を介して作用する新規免疫抑制薬や血管内皮細胞上に存在する S1P₁ の機能を抑制することによる新規血管新生抑制薬に関する研究が注目されている。しかしながら、免疫抑制作用に関して、現在までに創出された非選択的 S1P 受容体拮抗薬においては、その免疫抑制作用が確認されず、逆に、多発性硬化症の治療薬である FTY720（フィンゴリモド）のような非選択的 S1P 受容体作動薬がリンパ球移動の抑制を起こすことなど、S1P₁ を介した免疫抑制メカニズムには不明な点が多い。一方、血管新生抑制作用に関して、抗体や RNAi を用いた研究から、S1P₁ が血管新生における重要な分子の一つであることは明らかとなっているが、選択的 S1P₁ 拮抗薬を用いた検討は未だなされていない。更に、vascular endothelial growth factor（VEGF）を代表とする血管新生に重要な分子と S1P₁ の関わりについても明らかとなっていない。

本研究では、選択的 S1P₁ 拮抗薬（TASP0251078 および TASP0277308）が非選択的 S1P 受容体作動薬と同様、胸腺からのリンパ球の放出および脾臓におけるリンパ球の移動を抑制し、循環血液中のリンパ球を減少させることを示した。トリニトロクロロベンゼン（TNCB）誘発接触性皮膚炎モデルを用いて、TASP0251078 の免疫抑制作用を検討した結果、耳介浮腫を有意に抑制した。更に、コラーゲン誘導性自己免疫性関節炎モデルを用いて、TASP0277308 の免疫抑制作用を

検討した結果、関節炎の発症及びコラーゲンに対する自己抗体の産生を有意に抑制することを見いだした。また、TASP0277308による免疫抑制作用は、関節炎発症後の投与によっても認められ、更に、免疫抑制活性をもつ液性因子である TGF- β の産生に関与する CD69 と呼ばれるリンパ球表面分子の発現が増強するという、非選択的 S1P 受容体作動薬では認められない作用を見いだした。

本研究成果は、現在までの S1P₁ ノックアウトマウスを用いた遺伝学的研究と非選択的 S1P 受容体拮抗薬あるいは作動薬を用いた薬理学的研究とのリンパ球移動制御機構に関する矛盾を明らかにするものであり、S1P₁ を標的にした新規免疫抑制薬の研究開発を飛躍的に進展させるものであると期待される。

一方、血管新生抑制作用に関して、TASP0277308 が *in vitro* における S1P 及び VEGF 誘発の血管内皮細胞 (HUVEC) の細胞遊走及び細胞増殖を顕著に抑制することを見いだした。更に、*in vitro* における VEGF 誘発の血管新生、*in vivo* におけるヒト線維肉腫細胞 (HT1080) 誘発の血管新生をいずれも有意に抑制することを発見した。

本研究成果は、これまで報告があった生理的及び病理学的状況において、S1P₁ と VEGF のシグナル伝達がクロストークしていることを強く裏付けている。すなわち、血管新生における S1P₁ 刺激は、VEGF のシグナル伝達に必須であり、選択的 S1P₁ 拮抗薬が、VEGF 阻害薬と同様、血管新生抑制薬の新たな候補化合物となることを示すものである。

これらを要するに、本研究では、S1P₁ に対する選択的拮抗薬が免疫に関与するリンパ球の移動を制御することにより免疫抑制作用を有すること、また、血管内皮細胞上の S1P₁ を制御することにより、血管新生抑制作用を有することを明らかとした。本研究は、選択的 S1P₁ 拮抗薬の創出が、免疫抑制作用及び血管新生抑制作用による自己免疫疾患及び血管新生関連疾患のための新たな治療戦略となる可能性を示すものである。

学位論文審査の要旨

主査	教授	門出	健次
副査	教授	出村	誠
副査	教授	金城	政孝
副査	教授	小布施	力史

学位論文題名

Studies on the immunosuppressive and anti-angiogenic effects of novel selective S1P₁ antagonists

(選択的 S1P₁ 拮抗薬の免疫抑制作用及び血管新生抑制作用に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 1 型受容体 (S1P₁) に対する選択的拮抗薬がリンパ球の移動制御による免疫抑制作用を有すること、血管内皮細胞の細胞増殖及び細胞遊走抑制による血管新生抑制作用を有することを明らかにした。このことは、選択的 S1P₁ 拮抗薬が自己免疫疾患及び血管新生関連疾患のための新たな治療薬となる可能性を示唆している。

スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は、スフィンゴ脂質と呼ばれる生体内に多く存在する脂質の一つである。生体内でのリンパ球の移動は、リンパ球上に発現している S1P 1 型受容体 (S1P₁) が血液ならびにリンパ液に存在する S1P と反応することにより制御されている。また、胎生期において血管内皮細胞の S1P₁ が血管壁形成に必須であることが、遺伝子改変 (ノックアウト) マウスを用いた研究から明らかにされている。このようなことから、近年、リンパ球の活性化抑制による免疫抑制作用ではなく、リンパ球の S1P₁ を標的にしたリンパ球の移動制御、すなわち、病変部からの隔離を介して作用する新規免疫抑制薬の開発や血管内皮細胞上に存在する S1P₁ の機能を抑制することによる新規血管新生抑制薬開発が注目されている。しかしながら、現在までに創製された非選択的 S1P 受容体拮抗薬を用いた場合、その免疫抑制作用は確認されておらず、逆に、多発性硬化症の治療薬である FTY720 (フィンゴリモド) のような非選択的 S1P 受容体作動薬が、リンパ球移動抑制を起こすこと等、S1P₁ を介した免疫抑制メカニズムには不明良点が多い。一方、血管新生抑制作用に関して、抗体や RNAi を用いた研究から、S1P₁ が血管新生において重要な分子の一つであることは明らかとなりつつあり、新たなツールである選択的 S1P₁ 拮抗薬を用いた研究に革新的知見が期待されている。また、vascular endothelial growth factor (VEGF) を代表とする血管新生に関与する重要分子と S1P₁ の関わりに関しても、未だ十分な検討がなされていなかった。

これまでに創製された非選択的 S1P₁ 拮抗薬は S1P と極めて類似する化学構造を有しているが、本実験で用いた選択的 S1P₁ 拮抗薬 (TASP0251078 および TASP0277308) は、構造上 S1P とは全く異なる基本骨格を有している。本研究で

は、まず、選択的 S1P₁拮抗薬 (TASP0251078 および TASP0277308) が非選択的 S1P 受容体作動薬と同様、胸腺からのリンパ球の放出および脾臓におけるリンパ球の移動を抑制し、循環血液中のリンパ球を減少させることを確認した。また、トリニトロクロロベンゼン (TNCB) 誘発接触性皮膚炎モデルを用いて、TASP0251078 の免疫抑制作用を検討した結果、耳介浮腫を有意に抑制することを発見した。さらに、コラーゲン誘導関節炎モデルを用いて、TASP0277308 の免疫抑制作用を検討した結果、関節炎の発症及びコラーゲンに対する自己抗体の産生を有意に抑制することを見出すことに成功している。また、TASP0277308 による免疫抑制作用は、関節炎発症後の投与によっても認められ、さらに、免疫抑制活性をもつ液性因子である TGF-β の産生に関与する CD69 と呼ばれるリンパ球表面分子の発現が増強するという、非選択的 S1P 受容体作動薬では認められない作用を見いだしている。

本研究成果は、現在までの S1P₁ノックアウトマウスを用いた遺伝学的研究と非選択的 S1P 受容体拮抗薬あるいは作動薬を用いた薬理学的研究とのリンパ球移動制御機構に関する矛盾を明らかにするものであり、S1P₁を標的にした新規免疫抑制薬の研究開発を飛躍的に進展させるものであると期待される。一方、血管新生抑制作用に関して、TASP0277308 が *in vitro* における S1P 及び VEGF 誘発の血管内皮細胞 (HUVEC) の細胞遊走及び細胞増殖を顕著に抑制することを見いだしている。さらに、*in vitro* における VEGF 誘発の血管新生、*in vivo* におけるヒト線維肉腫細胞 (HT1080) 誘発の血管新生をいずれも有意に抑制することを発見している。

これらを要するに、著者は、選択的 S1P₁拮抗薬の創出が、免疫抑制作用及び血管新生抑制作用による自己免疫疾患及び血管新生関連疾患のための新たな治療戦略となる可能性を示すものであり、臨床応用に対して新たな道を切り開く確実な第一歩として貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。