

論文の内容の要旨

論文題目 リンパ球循環および樹状細胞の遊走能における
スフィンゴシン 1-リン酸の役割

氏 名 前 田 恭 宏

序論

自己と非自己の認識および外来抗原に対する免疫応答の成立において、リンパ球の生体内動態は厳密に制御されている必要がある。免疫応答の主要な場である二次リンパ組織へのリンパ球移入過程は、種々のケモカインおよびそれらの受容体の相互作用が重要な役割を果たすことは以前から知られていた。一方、二次リンパ組織からリンパ管へのリンパ球移出過程を制御する因子として、リン脂質の一種であるスフィンゴシン 1-リン酸 (sphingosine 1-phosphate, S1P) が主要な役割を担っていることが最近明らかにされつつある。S1P 特異的受容体は 7 回膜貫通型の G タンパク共役型受容体であり、現在までに S1P₁₋₅ の 5 種類のサブタイプが知られている。なかでも成熟 T 細胞に強く発現している S1P₁ 受容体は、二次リンパ組織からリンパ管へのリンパ球移出過程において重要な役割を担っていることが、リンパ球特異的 S1P₁ 受容体欠損マウスの解析によって明らかにされている。

Fingolimod (FTY720) は、種々の自己免疫疾患動物モデルにおいて優れた免疫調節作用を発揮する新規免疫調節薬であるが、免疫調節作用を発揮する際には、循環リンパ球の著しい減少が観察される。FTY720 による循環リンパ球減少作用は、細胞死の誘導によるものではなく、循環リンパ球がリンパ節やパイエル板等の二次リンパ組織中に隔離されるためであることが、蛍光標識リンパ球を使用した解析によって明らかになっている。FTY720 はスフィンゴシンと類似の化学構造を有しており、生体内ではスフィンゴシンキナーゼによって速やかに FTY720 リン酸 (FTY720-P) へと変換された後、S1P₁ 受容体にアゴニストとして作用し、リンパ球上の S1P₁ 受容体を長期間にわたり内在化させる。その結果、リンパ球表面上ではほとんど S1P₁ 受容体が発現していない状態となり、リンパ球の S1P

に対する反応性はほぼ完全に消失する。したがって、FTY720 は $S1P_1$ 受容体を介する二次リンパ組織からのリンパ球移出を阻害し、リンパ球を二次リンパ組織中に隔離することで、顕著な循環リンパ球減少作用を発揮するものと考えられる。しかし、リンパ球の主要な隔離先である二次リンパ組織を欠損したマウスにおいても、FTY720 は循環リンパ球を減少させることが報告されており、その原因は長い間不明であった。そこで第 1 章では FTY720 が二次リンパ組織欠損マウスの循環リンパ球を減少させる機序を解明すると共に、リンパ球循環における $S1P$ の役割をさらに詳細に検討した。

T 細胞の $S1P$ に対する遊走能が $S1P_1$ 受容体によって制御されていることはすでに多数の報告が為されている。しかしながら、免疫応答のもう一方の担い手である樹状細胞の遊走能における $S1P$ の役割についてはほとんど報告されていない。そこで第 2 章では、樹状細胞の遊走能における $S1P$ および $S1P$ 受容体の関与について検討した。

第 1 章 骨髄を介するリンパ球循環における $S1P$ の役割

FTY720 はリンパ節やパイエル板といった二次リンパ組織中にリンパ球を隔離することで、末梢血中の循環リンパ球を減少させることは広く知られている。しかし、リンパ球の隔離先である二次リンパ組織を先天的に欠損している *alymphoplasia (aly/aly)* マウスにおいても、FTY720 は循環リンパ球減少作用を示す。FTY720 を 1 mg/kg の用量で単回経口投与したマウスの末梢血中における FTY720 濃度は約 0.2 μM 以下であったが、この濃度では *aly/aly* マウスのリンパ球に apoptosis は誘導されなかった。FTY720 を投与した *aly/aly* マウスの各臓器を検索した結果、骨髄において成熟リンパ球数、特に T 細胞数が増加していることを見出した。FTY720 投与後の *aly/aly* マウス骨髄における成熟リンパ球の集積は、骨髄切片の観察およびリンパ球移入実験によっても確認された。以上の結果から、FTY720 はリンパ球の apoptosis を誘導するのではなく、循環リンパ球を骨髄中に隔離することによって、*aly/aly* マウスの循環リンパ球を減少させるものと考えられる。

興味深いことに、FTY720 による成熟リンパ球の骨髄への隔離は、*aly/aly* マウスだけではなく、二次リンパ組織を持つ正常マウスにおいても確認された。そこで、骨髄を介するリンパ球循環の分子機構を調べるため、 $S1P_1$ 受容体選択的アゴニスト SEW2871 を投与したマウスのリンパ球動態を検討した。その結果、FTY720 を投与した場合と同じく、骨髄中での成熟リンパ球数が有意に増加していた。また、 $S1P$ 分解酵素の阻害剤を投与し、骨髄内外の $S1P$ 濃度差を消失させた場合も、骨髄中の成熟リンパ球数の増加が観察された。さらに *in vitro* 試験において、FTY720 リン酸および SEW2871 は $S1P$ に対する骨髄成熟 T 細胞の遊走能をほぼ完全に抑制する一方、骨髄へのホーミングケモカインである CXCL12 に対する末梢血 T 細胞の遊走能には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、骨髄を介するリンパ球循環過程は他の二次リンパ組織と同様、 $S1P$ - $S1P_1$ 軸によって制御されており、FTY720 は骨髄への循環リンパ球の移入を促進するのではなく、骨髄からのリンパ球移出を阻害することで骨髄中に成熟リンパ球を隔離するものと推察される。最後に、抗原特異的 Th 細胞の骨髄を介する循環における $S1P$ - $S1P_1$ の寄与を調べるため、Th17 細胞および Th1 細胞の動態に対する FTY720 の作用を検討した。免疫成立後、抗原特異的 Th 細胞が生体内を循環している状態にあるマウスに FTY720 を投与した場合、骨髄および所属リンパ節における抗原特異的 Th17 細胞および Th1 細胞数はナイーブ T 細胞

同様、顕著に増加した。したがって、S1P-S1P₁ 軸はナイーブ T 細胞だけではなく、抗原特異的 Th 細胞の骨髄からの移出も制御していることが強く示唆された。

第 2 章 樹状細胞の遊走能における S1P の役割

骨髄細胞から顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子を用いて誘導した樹状細胞について、S1P に対する遊走能を検討した。その結果、S1P は 10-1000 nM の濃度範囲において、LPS で刺激した成熟型の樹状細胞選択的に強力な遊走能を惹起することが判明した。各成熟段階における樹状細胞の S1P に対する反応性の違いが、どのサブタイプの S1P 受容体に起因しているのか見当をつけるため、未成熟樹状細胞および成熟樹状細胞について各 S1P 受容体の mRNA 発現量を real-time PCR 法を用いて解析した。その結果、成熟樹状細胞では未成熟樹状細胞に比べ、S1P₃ 受容体 mRNA が優位に発現していることが明らかになった。そこで、S1P₃ 受容体欠損マウスを作製し、その成熟樹状細胞の S1P に対する遊走能を測定した。その結果、S1P₃ 受容体欠損マウス由来成熟樹状細胞では、CCL21 に対して野生型と同程度の遊走能を示したが、S1P に対する遊走能はほぼ完全に消失していた。一方、S1P₃ 受容体欠損マウス由来 T 細胞は S1P に対する遊走能を保持していた。最後に、樹状細胞の抗原取り込み能に対する S1P の作用を検討した。各成熟段階の樹状細胞について、蛍光粒子の取り込みに対する S1P の作用を経時的に測定したところ、S1P は成熟樹状細胞の抗原取り込み能を増強することが判明した。この作用についても遊走能同様、S1P₃ 受容体依存的な反応であった。以上の結果から、T 細胞の S1P に対する遊走能は S1P₁ 受容体依存的であるのに対し、成熟樹状細胞の遊走能および抗原取り込み能は S1P₃ 受容体によって制御されていることが強く示唆される。

結論および考察

1. FTY720 は循環リンパ球を二次リンパ組織だけではなく「骨髄」にも隔離すること、および骨髄を介するリンパ球循環過程もまた他の二次リンパ組織と同様、S1P-S1P₁ 軸によって制御されていることを明らかにした。したがって、骨髄は血球系細胞の供給源としてばかりでなく、成熟リンパ球の循環過程においては二次リンパ組織と類似の機能を担っているものと推察される。
2. 成熟樹状細胞および T 細胞の S1P に対する遊走能はそれぞれ S1P₃ 受容体および S1P₁ 受容体と、それぞれ別の受容体によって制御されていることを明らかにした。S1P 存在下で S1P₁ は down-regulation するのに対し、S1P₃ は細胞表面上に残存するという性質を持つことから、S1P-S1P 受容体軸は末梢血やリンパ管および炎症応答部位など、S1P の濃度が高い部位において成熟樹状細胞および T 細胞の体内動態を適切に制御することに寄与しているものと推察される。