

## 審査の結果の要旨

氏名 前田 恭宏

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受容体の相互作用が重要な役割を果たす。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 S1P<sub>1-5</sub> の 5 種類のサブタイプが同定されている。なかでも成熟 T 細胞に強く発現している S1P<sub>1</sub> 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 S1P<sub>1</sub> 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、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、S1P<sub>1</sub> 受容体にアゴニストとして作用し、リンパ球上の S1P<sub>1</sub> 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 S1P<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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ている。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。そこで前田は 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。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。そこで前田はさらに、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も検討した。

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。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 *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を、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した。前田は以上の結果から、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予想した。

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。そこで前田は、骨髄を介するリンパ球循環の分子機構を調べるため、S1P<sub>1</sub> 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ることを見いだした。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を観察した。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いことを観察した。以上の結果から前田は、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<sub>1</sub> 軸によって制御されており、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した。さらに前田は、抗原特異的 Th 細胞の骨髄を介する循環における S1P-S1P<sub>1</sub> 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、顕著に増加することを見いだした。この結果から前田は、S1P-S1P<sub>1</sub> 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を強く示唆した。

前田はさらに、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を見いだした。さらに、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同定するため、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。その結果前田は、成熟樹状細胞では未成熟樹状細胞に比べ、S1P<sub>3</sub> 受容体 mRNA が優位に発現していることを明らかにした。そこで次に、S1P<sub>3</sub> 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、S1P<sub>3</sub> 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ることを見いだした。最後に前田は、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、S1P は成熟樹状細胞の抗原取り込み能を増強することを見いだした。この作用についても遊走能同様、S1P<sub>3</sub> 受容体依存的な反応であることも明らかにした。以上の結果から前田は、T 細胞の S1P に対する遊走能は S1P<sub>1</sub> 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 S1P<sub>3</sub> 受容体によって制御されていることを強く示唆した。

以上前田は、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-S1P<sub>1</sub> 軸によって制御されていることを明らかにした。この結果から、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ことが推察された。また、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 S1P<sub>3</sub> 受容体および S1P<sub>1</sub> 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。以上の結果から、前田の本研究は博士（薬学）に充分値するものと判断した。