

スフィンゴシン 1-リン酸受容体調節薬、フィンゴリモド (FTY720) の 自己免疫疾患治療への応用

千葉 健治

A New Therapeutic Approach for Autoimmune Diseases by the Sphingosine 1-Phosphate Receptor Modulator, Fingolimod (FTY720)

Kenji CHIBA

Pharmacology Laboratory, Research Division, Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation,
1000 Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama 227-0033, Japan

(Received October 23, 2008)

Fingolimod (FTY720) is the first substance in the new immunomodulator class called sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor modulators. We isolated an immunosuppressive natural product, myriocin, from the culture broth of *Isaria sinclairii*, a kind of vegetative wasp. The chemical modification of myriocin yielded a new compound, FTY720, which has more potent immunosuppressive activity and less toxicity than myriocin. FTY720 has been shown to be highly effective in experimental allograft models and autoimmune disease models such as autoimmune encephalomyelitis, collagen-induced arthritis, and lupus nephritis. The most striking feature of FTY720 is the induction of a marked decrease in peripheral blood lymphocytes at doses that show immunosuppressive activity in these models. FTY720 is rapidly converted to FTY720-phosphate (FTY720-P) by sphingosine kinases. FTY720-P acts as a potent agonist at S1P receptor type 1 (S1P₁), internalizes S1P₁ on lymphocytes, and inhibits the migration of lymphocytes toward S1P. It is highly likely that the reduction of peripheral blood lymphocytes by FTY720 is due to the inhibition of S1P₁-dependent lymphocyte egress from secondary lymphoid organs and thymus. Recently, it has been reported that FTY720 exerted considerable therapeutic effects in a placebo-controlled clinical trial involving patients with relapsing multiple sclerosis. Patients who received FTY720 orally had a significant reduction in the clinical disease activity, the number of lesions in the central nervous system, and the relapse rates. Since FTY720 possesses a new mechanism of action that has not been observed with other immunosuppressive agents, it is believed that FTY720 provides a new therapeutic approach for autoimmune diseases including multiple sclerosis.

Key words—sphingosine 1-phosphate; fingolimod (FTY720); autoimmune diseases; multiple sclerosis; autoimmune encephalomyelitis

1. はじめに

自己と非自己の認識及び外来抗原の認識などの免疫応答において、中心的な役割を担う T 細胞は、胸腺内で分化・成熟したのちに末梢の二次リンパ系組織へと移行する。末梢へ移行した成熟 T 細胞は、脾臓、リンパ節及びパイエル板等の二次リンパ系組織、血管及びリンパ管の間を循環する。¹⁾ 胸腺内に移入した骨髄由来の前駆細胞は、胸腺皮質内において CD4⁻CD8⁻ double negative 胸腺細胞から

CD4⁺CD8⁺ double positive 胸腺細胞へと分化し、さらに CD4⁺CD8⁻ 及び CD4⁻CD8⁺ single positive の成熟型胸腺細胞へと分化するのに伴って胸腺皮質から皮質髄質境界を越えて髄質へと移動する。そして胸腺髄質内で成熟した T 細胞は胸腺から末梢の二次リンパ系組織へと移出する。また、末梢へ移行した成熟 T 細胞は血中を循環し、脾臓、リンパ節、パイエル板等の二次リンパ系組織を経由し、リンパへと再循環し、抗原と出会った際に免疫応答を引き起こす。²⁾ このように、成熟 T 細胞の血管、二次リンパ系組織及びリンパ管における再循環は、免疫応答が成立する上で必須である。

T 細胞の胸腺内での分化・成熟に伴う細胞移動及び二次リンパ系組織内への移入（ホーミング）の過

田辺三菱製薬株式会社薬理研究所（〒227-0033 横浜市青葉区鴨志田町 1000）

e-mail: Chiba.Kenji@mk.mt-pharma.co.jp

本総説は、日本薬学会第 128 年会シンポジウム S30 で発表したものを中心に記述したものである。

程には種々のケモカインとそれらの受容体との相互作用が重要な役割を果たしていることが明らかにされた.^{3,4)} 一方で、胸腺及び二次リンパ系組織からの成熟 T 細胞の移出機構については不明な点が多かった。最近、リン脂質メディエーターであるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) とその受容体の 1 サブタイプである S1P₁ 受容体の相互作用が、胸腺及び二次リンパ系組織からの成熟 T 細胞の移出機構に極めて重要な役割を果たしていることが明らかにされた.⁵⁾

フィンゴリモド (FTY720)^{6,7)} は、冬虫夏草の一種である *Isaria sinclairii* 菌が産生する天然物、マイリオシン⁸⁾ をリードとして構造変換することによって見出された世界初の S1P 受容体調節薬である。FTY720 は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) に変換され、^{9,10)} S1P₁ 受容体にアゴニストとして作用し、S1P₁ 受容体の内在化を強力に誘導することによって胸腺及び二次リンパ系組織からの成熟リンパ球の移出を阻害し、免疫抑制作用を発揮する。¹⁰⁻¹²⁾ 本稿では、FTY720 の作用メカニズム及び自己免疫疾患治療薬としての可能性について最近の知見を含めて概説する。

2. FTY720 の同種移植モデルにおける免疫抑制作用

異なる個体間で臓器移植を行うと、通常 10 日前後に急性拒絶反応が起こり、移植された臓器は拒絶されてしまう。この急性拒絶反応は、リンパ球、特に胸腺由来の T 細胞が、移植された臓器の持つ主要組織適合性抗原を非自己として認識することによって引き起こされる細胞性免疫応答である。そこで、急性拒絶反応の発現を制御し、移植臓器を長期間生着させるためには、T 細胞による細胞性免疫応答を強力に抑制できる免疫抑制薬が必要となる。1980 年代から臓器移植時の急性拒絶反応を制御するための免疫抑制薬として、カルシニューリン阻害薬であるシクロスポリン及びタクロリムスが用いられるようになり、臓器移植の生着率が飛躍的に向上した。しかし、カルシニューリン阻害薬は急性拒絶反応を抑制する用量で腎毒性、肝毒性などの副作用を示すことから、副作用の軽減を目的としてミコフェノール酸モフェチル、アザチオプリン等の他の免疫抑制薬との併用療法が主流となっている。

1980 年代後半に、吉富製薬㈱ [現田辺三菱製薬㈱] では、シクロスポリン、タクロリムス等の既存の免疫抑制薬とは異なる作用メカニズムを有し、かつこれらの薬剤との併用が可能な新しい免疫抑制薬の探索を目的として、京都大学薬学部藤多教授 (当時) 及び台糖㈱ [現三井製糖㈱] と共同研究を開始した。共同研究の過程で、古来中国で秘薬として用いられてきた冬虫夏草の一種で、タイワンツクツクボウシに寄生する *Isaria sinclairii* 菌の培養液の画分に、シクロスポリンよりも強力な免疫抑制活性を見出した。⁸⁾ そこで、*Isaria sinclairii* 菌の培養液から免疫抑制作用を示す物質の単離精製を行い、最終的に活性本体を白色の結晶として単離することに成功し、ISP-I と命名した (Fig. 1)。⁸⁾ しかし、ISP-I の化学構造を分析した結果、抗真菌作用を有する物質として報告されていたマイリオシンと同一物質であることが明らかになった。一方、マイリオシンが免疫抑制作用を有することは報告されていなかったことから、本天然物をリードとして化学修飾を行い、その結果、シクロスポリン、タクロリムスを上

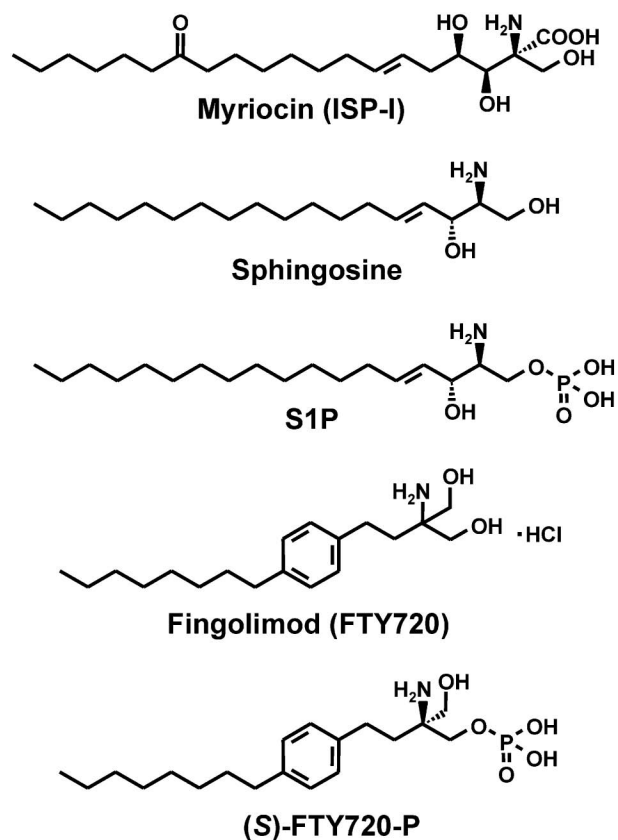


Fig. 1. The Chemical Structures of ISP-I, Sphingosine, S1P, FTY720, and (S)-FTY720-P

回る強力な免疫抑制作用を保持し、かつマイリオシンに比べて毒性の極めて低い FTY720 を見い出した (Fig. 1) (Table 1).^{6,13,14)} なお、マイリオシンは、セリンパルミトイルトランスフェラーゼの活性を阻害するのに対して、FTY720 は作用を示さないことが確認されている。¹³⁾

複数の同種移植モデルにおける FTY720 の作用を Table 1 に示した。WKAH ラット (*RTI^k*) をドナー、F344 ラット (*RTI^{lvj}*) をレシピエントとした主要組織適合抗原非適合ラット間での同種皮膚移植において、FTY720 を 0.1–10 mg/kg で移植日から 14 日間反復経口投与した結果、同種移植片の生着日数は媒体のみを投与した対照群に比べ有意かつ用量依存的に延長し、その効果はシクロスポリン及びタクロリムスを上回るものであった。^{15–18)} また、WKAH ラット (*RTI^k*) をドナー、ACI/N ラット (*RTI^{avj}*) をレシピエントとした異所性同種心移植においても同種皮膚移植の場合と同様に、FTY720 は 0.1–10 mg/kg の 14 日間反復経口投与で移植心の生着日数を有意かつ用量依存的に延長させた。¹⁹⁾ このように、FTY720 は既存の免疫抑制薬よりも低用量で同等以上の優れた急性拒絶反応抑制効果を示すことが明らかになった。上述のラット同種移植モデルにおいて、FTY720 をシクロスポリンあるいはタクロリムスと併用した場合には、それぞれの単独投与に比べて移植片の生着日数が著しく延長し、median effect analysis による解析の結果、相乗効果であることが判明した。^{15–20)} また、モンゲレル犬をド

ナー、ビーグル犬をレシピエントとして用いた同種腎移植及びカニクイザルの同種腎移植においても、FTY720 をシクロスポリンと併用した場合には、それぞれの単独投与に比べて移植腎の生着日数が著明に延長することが判明した (Table 1).^{21–23)} 以上の結果から、FTY720 は同種移植時の急性拒絶反応を用量依存的に抑制し、カルシニューリン阻害薬との併用で相乗効果を示すことが明らかとなった。

3. FTY720 による末梢血中の循環リンパ球の減少作用

FTY720 は強力な免疫抑制作用を有するが、カルシニューリン阻害薬あるいはその他の既存の免疫抑制薬とは異なり、T 細胞の活性化及び増殖の過程には全く影響を与えない。^{15–18)} 一方、FTY720 が免疫抑制作用を発揮する用量範囲では、末梢血中の循環リンパ球、特に成熟 T 細胞の著しい減少が観察される。^{15–18)} 生体内において血中を循環する成熟リンパ球は、リンパ節、パイエル板に代表される二次リンパ系組織内へ高内皮細静脈を経由して恒常的に移行 (ホーミング) し、二次リンパ系組織へ移行したリンパ球はリンパ管へ移出されたのちに、リンパ管から胸管を経由して血中へと再循環することによってほぼ一定の細胞数に維持されている。そこで、FTY720 による末梢血リンパ球の減少作用のメカニズムを解析する目的で、ラットに本化合物を投与したのちのリンパ系組織におけるリンパ球動態を解析した。その結果、投与の 3–24 時間後に末梢血、脾臓及び胸管中のリンパ球数が顕著に減少したのに対

Table 1. Pharmacological Properties of FTY720 and Calcineurin Inhibitors

Response suppressed	Species	FTY720	CsA	FK506
Allograft rejection	Rat (skin)	0.1 mg/kg	3 mg/kg	0.3 mg/kg
	Rat (heart)	0.1 mg/kg	3 mg/kg	0.3 mg/kg
Combination with CsA	Rat (skin)	0.1 mg/kg		
	Rat (heart)	0.1 mg/kg		
	Dog (Kidney)	0.03 mg/kg		
	Monkey (Kidney)	0.1 mg/kg		
Autoimmune disease models				
EAE	Rat	0.1 mg/kg	10 mg/kg	1 mg/kg
	Mouse	0.1 mg/kg		
Adjuvant-induced arthritis	Rat	0.1 mg/kg	3 mg/kg	1 mg/kg
Collagen-induced arthritis	Rat	0.1 mg/kg	3 mg/kg	1 mg/kg
	Mouse	0.1 mg/kg	10 mg/kg	1 mg/kg
Lupus nephritis (MRL/ <i>lpr</i>)	Mouse	0.1 mg/kg	10 mg/kg	1 mg/kg

CsA: cyclosporin A, FK506: tacrolimus, EAE: experimental autoimmune encephalomyelitis.

して、二次リンパ系組織であるリンパ節、パイエル板ではリンパ球数が有意に増加していることが明らかになった。^{16,24-26} また、蛍光標識リンパ球を用いた解析でも、FTY720 を投与した3時間後にはリンパ節及びパイエル板中の蛍光標識リンパ球数が有意に増加したのに対して、血中及び脾臓中では逆に減少していることが確認された。¹⁶ 以上の結果から、FTY720 による末梢血リンパ球の減少は細胞死によるものではなく、血中を循環しているリンパ球が二次リンパ系組織内に隔離されたことに起因すると推察された。また、FTY720 を投与した場合には胸腺髄質の拡張が認められ、成熟胸腺細胞の比率が増加していたが、この現象は成熟胸腺細胞の胸腺髄質から末梢への移出が阻害されたためであることが胸腺内に蛍光色素を注入する実験で明らかにされた。²⁷

4. FTY720 リン酸の S1P 受容体アゴニスト作用

FTY720 による末梢血リンパ球の減少は百日咳毒素の前処理によってほぼ完全に消失すること、¹⁸ また、FTY720 の化学構造がスフィンゴシンに類似性が高いことなどから、FTY720 の標的分子の研究が精力的に進められ、近年その全貌が明らかにされた。すなわち、FTY720 は生体内では S1P を生成するスフィンゴシンキナーゼ（主としてスフィンゴシンキナーゼ 2）によって FTY720-P に変換され、S1P 受容体にアゴニストとして作用するというものである（Fig. 1）。⁹⁻¹² S1P の受容体は7回膜貫通型の G タンパク共役レセプターであり、現在までに5種類のサブタイプ S1P₁ (Edg1, endothelial differentiation gene-1), S1P₂ (Edg5), S1P₃ (Edg3), S1P₄ (Edg6) 及び S1P₅ (Edg8) が知られている。²⁸ S1P はこれらの受容体を介して血管内皮細胞、心臓などの機能・発生分化に影響を与えるなど多彩な生理活性を発揮する。これらの S1P 受容体の中で、特に S1P₁ 受容体はリンパ球における発現量が高く、しかもスフィンゴシンから S1P を生成するスフィンゴシンキナーゼもリンパ系組織中に存在している。

スフィンゴシンキナーゼによって FTY720 から変換される FTY720-P には2種類の光学異性体が存在し得る。そこで、実際に FTY720-P の2種の光学異性体を合成し、S1P 受容体に対する結合能を評価した。²⁹ その結果、FTY720-P の (S)-エナンチオマー [(S)-FTY720-P] が、S1P₂ 受容体を除く S1P 受容体に nM オーダーで結合し、アゴニストと

して作用することを確認した (Table 2)。一方、逆の立体配置を有する (R)-体の生理活性は (S)-体の約 1/100 であり、FTY720 の S1P₁₋₅ に対する親和性も極めて低かった。また、(S)-FTY720-P を同種皮膚移植したラットに反復静脈内投与した場合、FTY720 とほぼ同程度の移植片生着延長作用及び末梢血リンパ球減少作用を示すことを確認した。^{11,23,29} 以上の結果から、FTY720 の投与によって発揮される免疫抑制作用は、生体内で生成される (S)-FTY720-P の S1P 受容体へのアゴニスト作用に起因することが示唆された。

5. FTY720 リン酸による二次リンパ系組織及び胸腺からの T 細胞移出の阻害

S1P₁₋₅ 受容体の中で、特に S1P₁ は成熟胸腺細胞及び末梢の成熟 T 細胞における発現量が高いことから、免疫系への関与が示唆されていた。最近、T 細胞特異的 S1P₁ 受容体欠損マウスについて詳細な解析が実施され、このマウスでは胸腺髄質からの成熟胸腺細胞の移出及び二次リンパ系組織からリンパ管への T 細胞の移行が極端に低いレベルであり、T 細胞が胸腺及び二次リンパ系組織内に隔離された状態であることが明らかにされた。⁵ S1P は血液中及びリンパ液中ではリンパ系組織内より高い濃度 (100-400 nM) で存在しており、成熟胸腺細胞及び成熟 T 細胞は 10~100 nM の S1P に対して遊走能を示すのに対して、S1P₁ 受容体欠損マウス由来の T 細胞は S1P に対してほとんど遊走しないことも確認された。⁶ 以上のように、S1P₁ 受容体は二次リンパ系組織及び胸腺髄質から T 細胞が放出される過程で極めて重要な役割を果たしていると考えられる。

興味深いことに、(S)-FTY720-P は S1P₁ 受容体にアゴニストとして作用したのちに、細胞表面上からの S1P₁ 受容体の内在化を長時間誘導し (Fig. 2)、成熟 T 細胞及び成熟胸腺細胞の S1P に対する遊走を nM オーダーで阻害することが示唆されている (Fig 3)。^{5,11,12,29,30} これらの結果から、FTY720 を投与した場合、生体内で生成された (S)-FTY720-P によって S1P₁ 受容体の内在化が長時間誘導され、T 細胞上に S1P₁ 受容体が発現しない状態が持続するために、S1P₁ 受容体欠損マウスと同様に S1P₁ 依存性の胸腺及び二次リンパ系組織からの T 細胞の移出が阻害され、循環 T 細胞の著しい減少が誘導されると推察される (Fig. 4)。FTY720 の投与によ

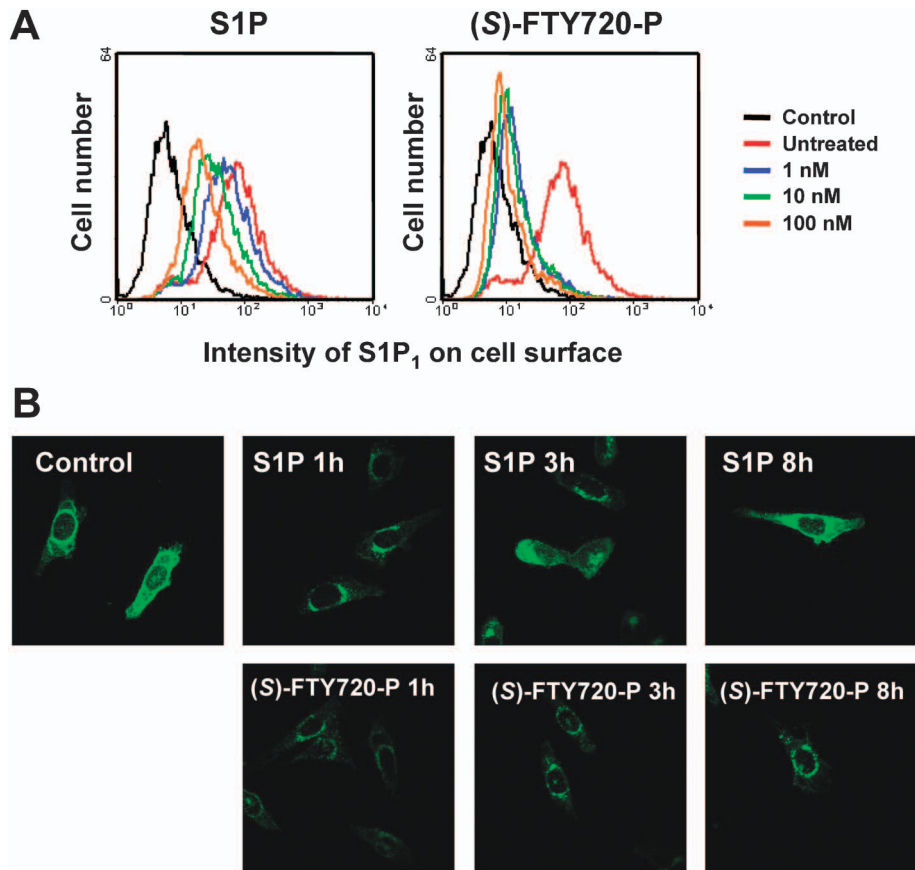


Fig. 2. Effects of S1P and (S)-FTY720-P on the Expression of S1P₁ on CHO Cells

(A) Human S1P₁ stably expressed CHO cells were stained with FITC-conjugated anti-human S1P₁ monoclonal antibody and expression of S1P₁ on cell surface was analyzed by flow cytometry. (B) Confocal microscopy of human S1P₁ stably expressing CHO cells treated with S1P or (S)-FTY720-P (100 nM).

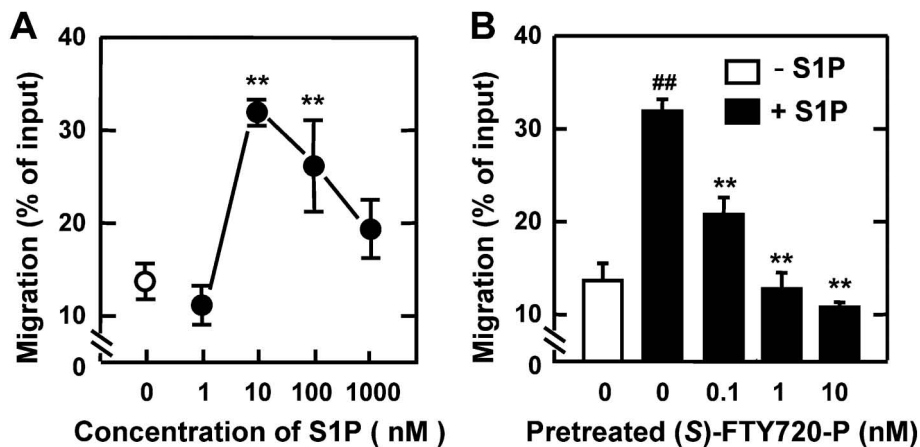


Fig. 3. Pretreatment with (S)-FTY720-P Inhibits Migration of CD4 T Cells toward S1P

(A) Mouse CD4 T cells (5×10^5 cells) were added to the upper wells of $5 \mu\text{m}$ -pore polycarbonate tissue culture inserts with S1P dilution in bottom wells. Migration toward S1P was performed at 37°C for 180 min and the migrated cells were counted by flow cytometry. (B) (S)-FTY720-P was added to upper well just before the migration assay toward S1P (10 nM). Each column represents the mean \pm S.E. of triplicate determination. Statistical significance was calculated by Dunnett's multiple comparison test (** $p < 0.01$ vs control migration toward 10 nM S1P, ## $p < 0.01$ vs migration in the absence of S1P).

って循環 T 細胞が激減することに伴い、同種移植片などの免疫反応部位への抗原特異的 T 細胞の浸潤量が減少することによって、本化合物は免疫抑制

作用を発揮すると考えられる。^{17,31,32)} 一方、カルシニューリン阻害薬は、抗原で刺激されたヘルパー T 細胞からのサイトカインの産生を抑制することによ

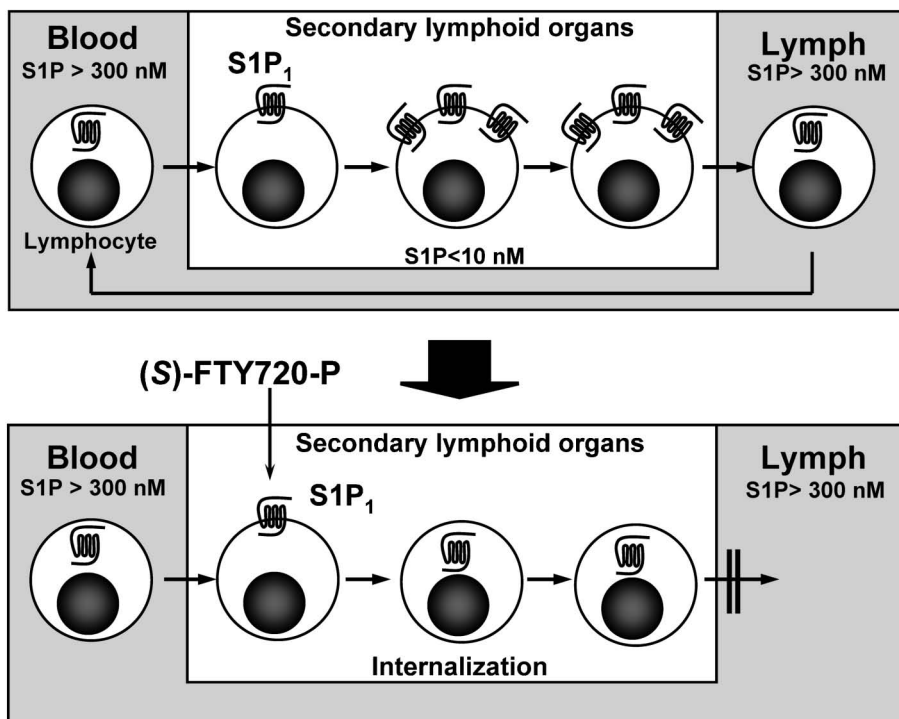


Fig. 4. (S)-FTY720-P Converted from FTY720 Inhibits S1P/S1P₁-dependent Lymphocyte Egress from Secondary Lymphoid Organs by Internalization of S1P₁ on Lymphocytes

って免疫抑制作用を発揮するので、FTY720 とカルシニューリン阻害薬とを併用した際には、両者が相補的に作用して相乗効果を示すと推察される。

6. 自己免疫性脳脊髄炎と Th17 細胞

免疫系の本来の役割は、自己を外来の細菌やウイルスから防衛するためのものであるが、ときとして自己を標的とした免疫応答が起こることがあり、自己免疫疾患と呼ばれている。自己免疫疾患としては、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎等の膠原病や、中枢神経の髄鞘の破壊を伴う多発性硬化症など多くの難治性疾患が知られている。このような自己免疫疾患の治療においても、副作用の少ない優れた免疫抑制薬の開発が期待されている。

多発性硬化症 (Multiple sclerosis; MS) は、大脳、脊髄、視神経などに炎症性脱髄病変が多発する疾患であり、中枢神経系の代表的な自己免疫疾患である。病因に関しては、中枢神経の髄鞘を標的とする細胞性免疫が主役を演じていると考えられており、特に中枢神経髄鞘タンパク質抗原に特異的な T 細胞が脳炎症の引き金を引く重要な役割を果たしている。³³⁾ 実験的自己免疫性脳性髄炎 (experimental au-

toimmune encephalomyelitis; EAE) は MS の動物モデルであり、ミエリン塩基性タンパク質 (myelin basic protein; MBP)、プロテオリピドタンパク質 (proteolipid protein; PLP)、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (myelin oligodendrocyte glycoprotein; MOG) などの中枢神経髄鞘タンパク質を抗原としてアジュバントとともにラットやマウスに免疫することによって誘導される。これらの抗原で免疫した 10 日前後には尾の麻痺が発現し、その後不安定な歩行、下肢の麻痺、上肢の麻痺へと症状が進行するが、実験系によっては一過性の症状進行のちに自然に回復する急性モデルと、再発寛解を繰り返す慢性型のモデルがある。

EAE においてはインターフェロン- γ (interferon- γ ; IFN- γ) 産生性の 1 型ヘルパー T 細胞 (Th1 細胞) の中枢神経組織内への浸潤を伴う炎症像と脱髄が観察されることから、³⁴⁾ 中枢神経髄鞘タンパク質抗原に特異的な Th1 細胞が中心的な役割を果たすと考えられてきた。しかし、最近、Th1 あるいは Th2 細胞とは明らかに異なる新たなヘルパー T 細胞サブセットである Th17 細胞が、マウス EAE の発症及び進行に重要な役割を果たしていることが明らか

にされた.³⁵⁻³⁸⁾ Th17 細胞は interleukin 17 (IL-17) を産生するのが特徴であり, ナイーヴ CD4 T 細胞からトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) と IL-6 によって分化誘導される. IL-17 は上皮細胞, 線維芽細胞, マクロファージ, 血管内皮細胞等に作用して, IL-6, IL-8, 腫瘍壊死因子 α (TNF- α), CC-ケモカインリガンド 2 (CCL2) などの炎症性サイトカイン・ケモカインの産生や細胞接着因子の発現を誘導して炎症反応を誘発する. IL-17 欠損マウスや抗 IL-17 抗体を用いた場合には, マウス EAE の発症が著しく抑制されることや, EAE マウスの脊髄及び脳では Th17 細胞の浸潤が報告されている.³⁹⁾ そこで, 中枢神経髄鞘タンパク質抗原に特異的な Th17 細胞の中中枢神経組織への浸潤が中心的な役割を果たす EAE における FTY720 の作用を評価した.

7. マウス自己免疫性脳脊髄炎に対する FTY720 の作用

SJL マウスに PLP 50 μ g をフロイント完全アジュバントとともに免疫した場合には, 免疫 10-11 日

後に EAE の症状が発現し, EAE スコアの平均値は免疫 14-15 日後に最大となったのち減少に転じたが, 21 日以降に再発及び慢性化が観察された. FTY720 を 0.1 及び 0.3 mg/kg で PLP を免疫した当日から予防的に反復経口投与したところ, EAE スコアの値は媒体のみを投与した対照群に比べて著しく低い値を示し, 特に 0.3 mg/kg 投与群では EAE の発症が完全に抑制された (Fig. 5).^{40,41)} また, FTY720 投与群では対照群で観察された EAE に伴う体重減少はほとんど認められなかった.

FTY720 の EAE における治療効果を明らかにする目的で, SJL マウスを PLP で免疫した 17 日後に, EAE を既に発症しているマウスをプールし, スコア値が均一になるように割り付けたのちに FTY720 を 0.3 及び 1 mg/kg で治療的に免疫 42 日後まで反復経口投与した. また, 対照薬として MS の治療に汎用されている IFN- β を 10000 U/マウスで週 3 回腹腔内投与した. 媒体のみを投与した対照群では免疫 24 日後から EAE の再発が観察されたのに対して, FTY720 投与群では投与期間中に再発は全く

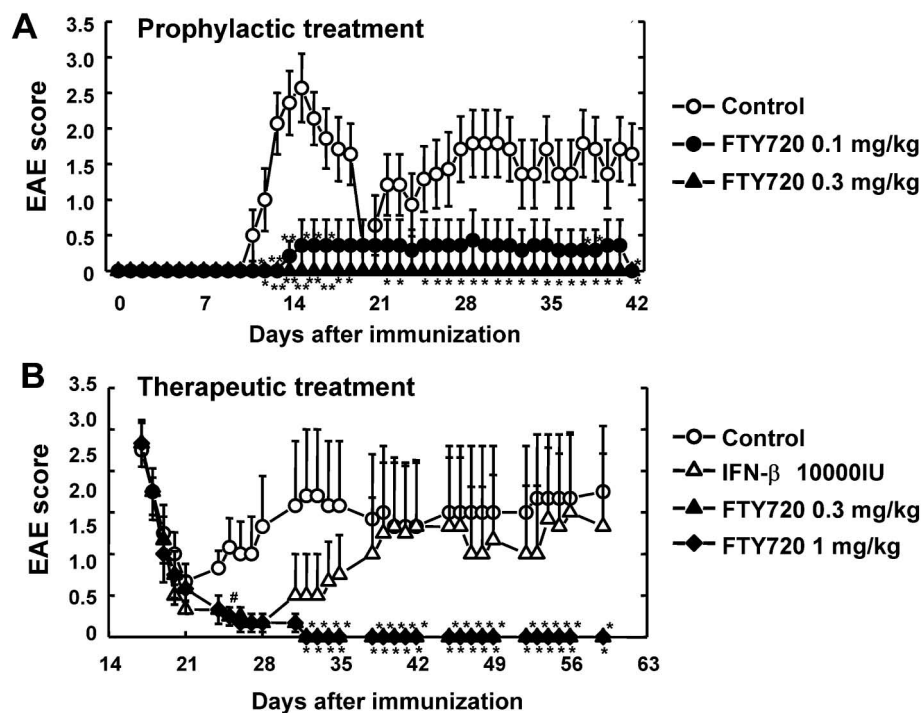


Fig. 5. Prophylactic and Therapeutic Effects of FTY720 on PLP-induced EAE in SJL/J Mice

SJL/J mice were immunized with PLP in the presence of Freund's complete adjuvant. (A) FTY720 (0.1 and 0.3 mg/kg) was administered orally (*p.o.*) to PLP-immunized SJL/J mice every day from the day of immunization for 6 weeks. (B) EAE-developed mice were pooled, divided into 4 groups and administrations of FTY720 (0.3 and 1 mg/kg *p.o.*) and recombinant mouse IFN- β (10000 IU/mouse, intraperitoneally) were started from day 17 after immunization for 6 weeks. Mice in the control group were administered vehicle only. The results are expressed as the mean \pm S.E. of 6 to 7 mice. Statistical differences in EAE scores of FTY720 groups were calculated by Steel's test (* p <0.05, ** p <0.01), and those in rm-IFN- β group were done by Mann Whitney *U* test (* p <0.05).

認められなかった。一方、IFN- β 投与群では投与の初期にスコアは低値であったが、投与後期には再発が認められ、最終投与の時点では対照群と同程度の EAE スコア値を示した (Fig. 5).^{11,40,41)} 以上のように、FTY720 は IFN- β よりも強力な治療効果を示すことが明らかとなった。また、FTY720 はプレドニゾロンと同等あるいはそれ以上の効果を示すことも確認された。⁴⁰⁾

PLP 誘発 EAE マウスの脊髄について、ヘマトキシリン・エオシン染色による組織像及び抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体を用いた免疫組織化学染色像を Fig. 6 に示した。対照群では CD4 T 細胞の浸潤を伴う炎症像と脱髄が観察された。これに対して、FTY720 の 1 mg/kg を治療的に投与した群では、CD4 T 細胞の浸潤及び脱髄はほとんど認められなかった (Fig. 6)。また、SJL マウスの PLP 誘発 EAE において、FTY720 の活性本体である (S)-FTY720-P を 0.1 及び 1 mg/kg で治療的に反復腹腔内投与した場合にも、投与期間中に EAE の再発は全く認められなかった。^{40,41)}

C57BL/6 マウスに MOG 200 μ g をフロイント完全アジュバントとともに免疫し、免疫の当日及び 2 日後に百日咳毒素 200 ng を静脈内投与することによって発症させた EAE では、症状の軽減と再発の繰り返いを伴う慢性化が観察された。そこで、EAE を発症したマウスを免疫 17 日後にスコア値が均一になるように割り付け、FTY720 を 0.1 及び 0.3 mg/kg で治療的に反復経口投与した。FTY720 投与群では投与期間に依存して EAE スコア値が有意に減少し、改善効果を示すことが明らかとなった。⁴⁰⁻⁴²⁾ MOG 誘発マウス EAE において、FTY720 を 0.3 mg/kg で予防的に反復経口投与した際の脊髄への Th17 細胞の浸潤に対する影響を評価した。その結果、FTY720 の投与によって EAE の発症は顕著に抑制され、脊髄中への Th17 細胞の浸潤もほとんど認められなかった (Fig. 7).⁴²⁾ また、Th17 細胞は、ナイーブ CD4 T 細胞と同様に生理的濃度の S1P に対して遊走能を示し、(S)-FTY720-P を前処理すると Th17 細胞の S1P に対する遊走がほぼ完全に抑制されることが判明した (Fig. 7).⁴²⁾ 一方、FTY720 リン酸は Th17 細胞からの IL-17 産生及びナイーブ CD4 T 細胞から Th17 細胞への分化の過程にはほとんど影響を与えなかった。以上の結果か

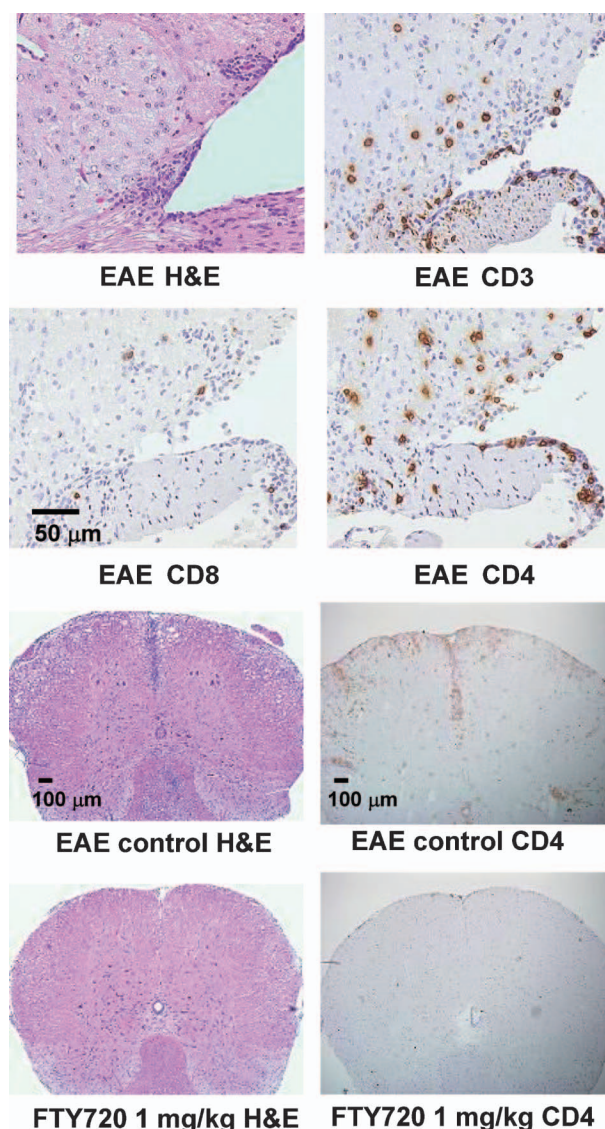


Fig. 6. Therapeutic administration of FTY720 Decreases Infiltration of CD4 T Cells into Spinal Cords of EAE Mice Induced by PLP

SJL/J mice were immunized with PLP in the presence of Freund's complete adjuvant. Therapeutic administration of FTY720 was started from day 17 and spinal cords of EAE-developed mice were obtained on day 28. Hematoxylin and eosin staining (H&E) and immunohistochemical staining were performed.

ら、中枢神経髄鞘抗原で活性化された CD4 T 細胞はリンパ節内で Th17 細胞に分化したのちに、細胞表面上の S1P₁ 受容体を介して S1P 濃度勾配に反応することでリンパ管に放出され、さらに、血管を経由して中枢神経組織内へ浸潤することによって EAE が誘発されると考えられる。FTY720 を投与した場合には、リンパ節内で生成された (S)-FTY720-P が Th17 細胞の S1P₁ 受容体の内在化を強力に誘導することによって、リンパ節からの

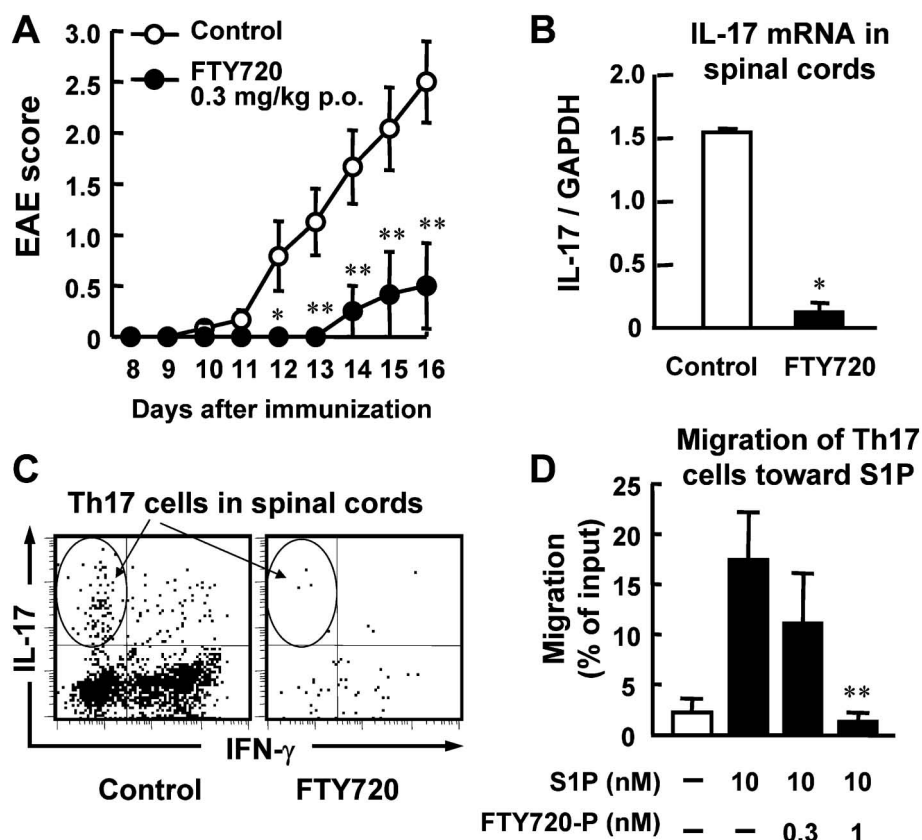


Fig. 7. FTY720 Inhibits MOG-induced EAE in C57BL/6 Mice and Decreases Infiltration of Th17 Cells in Spinal Cords of EAE Mice.

(A) C57BL/6 mice were immunized with MOG in the presence of Freund's complete adjuvant. FTY720 (0.3 mg/kg) was administered orally (*p.o.*) to MOG-immunized C57BL/6 mice every day from the day of immunization. The results are expressed as the mean \pm S.E. of 12 mice. Statistical differences in EAE scores of FTY720 group were calculated by Mann Whitney *U* test (* p <0.05, ** p <0.01). (B) The expression of IL-17 mRNA in spinal cords was determined by real time PCR on day 16 after MOG immunization. Statistical difference was calculated by Student's *t*-test (* p <0.05, n =3). (C) Th17 cells infiltrated in spinal cords of EAE mice (day 16) were determined by flow cytometry using anti-mouse IL-17 monoclonal antibody. (D) Pretreatment with (S)-FTY720-P inhibits migration of Th17 cells toward S1P (10 nM). Statistical differences were calculated by Dunnett's multiple comparison test (** p <0.01, n =3).

Th17 細胞の放出とそれに続く中枢神経組織内への浸潤が阻止され、その結果 EAE の発症及び進行に対して顕著な抑制作用を示すと推察される。

8. FTY720 の臨床試験成績

現在、FTY720 の臨床試験が欧米及び日本において進行中である。海外で実施された第 I 相試験では、FTY720 の 0.25–3.5 mg/man の経口投与によって、本剤の特徴である末梢血リンパ球数の用量依存的な減少が観察された。^{43,44} また、腎移植患者を対象とした第 II 相試験において、FTY720 とシクロスポリンとを併用した群では、ミコフェノール酸モフェチルとシクロスポリンとの併用群を上回る、優れた急性拒絶反応抑制効果が認められている。^{45,46}

最近、多発性硬化症における FTY720 の臨床試験の成績が報告された。⁴⁷ 海外で実施された再発性の MS 患者 255 例を対象とした臨床第 II 相試験において、FTY720 の 1.25 mg 及び 5 mg を 1 日 1 回、

6 ヶ月間経口投与した群では、再発率がプラセボ投与群の 50% 以下に有意に減少し、7–12 ヶ月間の投与継続でも FTY720 群の低再発率は維持されていた。また、FTY720 投与群では脳の炎症領域の数もプラセボ投与群と比べて有意に低下しており、その効果は現在 MS の治療薬として使用されている IFN- β を上回ることが示唆されている。⁴⁷ 以上のように、FTY720 は既存薬よりも優れた新しい多発性硬化症治療薬になることが期待される。

9. おわりに

FTY720 は、生体内で変換された FTY720-P の S1P₁ 受容体内在化作用に基づいて二次リンパ系組織からのリンパ球の移出を阻止し、リンパ球の循環動態を制御することによって免疫抑制作用を発揮する。このように FTY720 は既存の免疫抑制薬とは明らかに異なる新規な作用メカニズムを有することから、新しいクラスの免疫調節薬として位置付ける

のが妥当と考えられる。FTY720はEAE以外にラットアジュバント関節炎、コラーゲン関節炎、MRL/lprマウスのループス腎炎等の自己免疫疾患モデルにおいても強力な抑制作用を示すことから、MSばかりでなく、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス等の自己免疫疾患に対しても優れた新しい治療法を提供し得ると考えられる。

REFERENCES

- 1) Miyasaka M., Tanaka T., *Nat. Rev. Immunol.*, **4**, 360–370 (2004).
- 2) Butcher E. C., Picker L. J., *Science*, **272**, 60–66 (1996).
- 3) Campbell J. J., Pan J., Butcher E. C., *J. Immunol.*, **163**, 238–246 (1999).
- 4) Suzuki G., Sawa H., Kobayashi Y., Nakata Y., Nakagawa K., Uzawa A., Sakiyama H., Kakinuma S., Iwabuchi K., Nagashima K., *J. Immunol.*, **162**, 5981–5985 (1999).
- 5) Matloubian M., Lo C. G., Cinamon G., Lesneski M. J., Xu Y., Brinkmann V., Allende M., Proia R., Cyster J. G., *Nature*, **427**, 355–360 (2004).
- 6) Adachi K., Kohara T., Nakao N., Arita M., Chiba K., Mishina T., Sasaki S., Fujita T., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 835–856 (1995).
- 7) Chiba K., Adachi K., *Drugs Future*, **22**, 18–22 (1997).
- 8) Fujita T., Inoue K., Yamamoto S., Ikumoto T., Sasaki S., Toyama R., Chiba K., Hoshino Y., Okumoto T., *J. Antibiot.*, **47**, 208–215 (1994).
- 9) Mandala S., Hajdu R., Bergstrom J., Quackenbush E., Xie J., Milligan J., Thornton R., Shei G. J., Card D., Keohane C., Rosenbach M., Hale J., Lynch C. L., Rupprecht K., Parsons W., Rosen H., *Science*, **296**, 346–349 (2002).
- 10) Brinkmann V., Davis M. D., Heise C. E., Albert R., Cottens S., Hof R., Bruns C., Prieschl E., Baumruker T., Hiestand P., Foster C. A., Zollinger M., Lynch K. R., *J. Biol. Chem.*, **277**, 21453–21457 (2002).
- 11) Chiba K., *Pharmacol. Ther.*, **108**, 308–319 (2005).
- 12) Chiba K., Matsuyuki H., Maeda Y., Sugahara K., *Cell. Mol. Immunol.*, **3**, 11–19 (2006).
- 13) Fujita T., Hirose R., Yoneta M., Sasaki S., Inoue K., Kiuchi M., Hirase S., Chiba K., Sakamoto H., Arita M., *J. Med. Chem.*, **39**, 4451–4459 (1996).
- 14) Kiuchi M., Adachi K., Kohara T., Minoguchi M., Hanano T., Aoki Y., Mishina T., Arita M., Nakao N., Ohtsuki M., Hoshino Y., Teshima K., Chiba K., Sasaki S., Fujita T., *J. Med. Chem.*, **43**, 2946–2961 (2000).
- 15) Chiba K., Hoshino Y., Suzuki C., Masubuchi Y., Yanagawa Y., Ohtsuki M., Sasaki S., Fujita T., *Transplant. Proc.*, **28**, 1056–1059 (1995).
- 16) Chiba K., Yanagawa Y., Masubuchi Y., Kataoka H., Kawaguchi T., Ohtsuki M., Hoshino Y., *J. Immunol.*, **160**, 5037–5044 (1998).
- 17) Yanagawa Y., Sugahara K., Kataoka H., Kawaguchi T., Masubuchi Y., Chiba K., *J. Immunol.*, **160**, 5493–5499 (1998).
- 18) Brinkmann V., Pinschewer D., Chiba K., Feng L., *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 49–52 (2000).
- 19) Hoshino Y., Suzuki C., Ohtsuki M., Masubuchi Y., Amano Y., Chiba K., *Transplant. Proc.*, **28**, 1060–1061 (1996).
- 20) Hoshino Y., Yanagawa Y., Ohtsuki M., Nakayama S., Hashimoto T., Chiba K., *Transplant. Proc.*, **31**, 1224–1226 (1999).
- 21) Kawaguchi T., Hoshino Y., Rahman F., Amano Y., Higashi H., Kataoka H., Ohtsuki M., Teshima K., Chiba K., Kakefuda T., Suzuki S., *Transplant. Proc.*, **28**, 1062–1063 (1996).
- 22) Troncoso P., Stepkowski S. M., Wang M. E., Qu X., Chueh S. C., Clark J., Kahan B. D., *Transplantation*, **67**, 145–151 (1999).
- 23) Chiba K., Hoshino Y., Ohtsuki M., Kataoka H., Maeda Y., Matsuyuki K., Sugahara K., Kiuchi M., Hirose R., Adachi K., *Transplant. Proc.*, **37**, 102–106 (2005).
- 24) Chiba K., Yanagawa Y., Kataoka H., Kawaguchi T., Ohtsuki M., Hoshino Y., *Transplant. Proc.*, **31**, 1230–1233 (1999).
- 25) Yanagawa Y., Masubuchi Y., Chiba K., *Immunology*, **95**, 591–594 (1998).
- 26) Li H., Meno-Tetang G. L., Chiba K., Arima N., Heinig P., Jusko W. L., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 519–526 (2002).
- 27) Yagi H., Kamba R., Chiba K., Soga H., Yaguchi K., Nakamura M., Itoh T., *Eur. J.*

- Immunol.*, **30**, 1435–1444 (2000).
- 28) Hla T., Lee M. J., Ancellin N., Paik J. H., Kluk M. J., *Science*, **294**, 1875–1878 (2001).
- 29) Kiuchi M., Adachi K., Tomatsu A., Chino M., Takeda S., Tanaka Y., Maeda Y., Sato N., Mitsutomi N., Sugahara K., Chiba K., *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 425–432 (2005).
- 30) Maeda Y., Matsuyuki H., Shimano K., Kataoka H., Sugahara K., Chiba K., *J. Immunol.*, **178**, 3437–3446 (2007).
- 31) Yanagawa Y., Hoshino Y., Kataoka H., Kawaguchi T., Ohtsuki M., Sugahara K., Chiba K., *Transplant. Proc.*, **31**, 1227–1229 (1999).
- 32) Yanagawa Y., Hoshino Y., Chiba K., *Int. J. Immunopharmacol.*, **22**, 597–602 (2000).
- 33) McDonald W. I., Compston A., Edan G., Goodkin D., Hartung H. P., Lublin F. D., McFarland H. F., Paty D. W., Polman C. H., Reingold S. C., Sandberg-Wollheim M., Sibley W., Thompson A., van den Noort S., Weinshenker B. Y., Wolinsky J. S., *Ann. Neurol.*, **50**, 121–127 (2001).
- 34) Miyamoto K., Miyake S., Yamamura T., *Nature*, **413**, 531–534 (2001).
- 35) Cua D. J., Sherlock J., Chen Y., Murphy C. A., Joyce B., Seymour B., Lucian L, To W., Kwan S., Churakova T., Zurawski S., Wiekowski M., Lira S. A., Gorman D., Kastelein R. A., Sedgwick J. D., *Nature*, **421**, 744–748 (2003).
- 36) Langrish C. L., Chen Y., Blumenschein W. M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J. D., McClanahan T., Kastelein R. A., Cua D. J., *J. Exp. Med.*, **201**, 233–240 (2005).
- 37) Park H., Li Z., Yang X. O., Chang S. H., Nurieva R., Wang Y. H., Wang Y., Hood L., Zhu Z., Tian Q., Dong C., *Nat. Immunol.*, **6**, 1133–1141 (2005).
- 38) Steinman L., *Nat. Med.*, **13**, 139–145 (2007).
- 39) Komiyama Y., Nakae S., Matsuki T., Nambu A., Ishigame H., Kakuta S., Sudo K., Iwakura Y., *J. Immunol.*, **177**, 566–573 (2006).
- 40) Kataoka H., Sugahara K., Shimano K., Teshima K., Koyama M., Fukunari A., Chiba K., *Cell. Mol. Immunol.*, **2**, 439–448 (2005).
- 41) Kataoka H., Sugahara K., Shimano K., Maeda Y., Koyama M., Fukunari A., Chiba K., 8th International Congress of Neuroimmunology, ISNI2006, 117–120 (2007).
- 42) Seki N., Kataoka H., Ohtsuki M., Sato N., Fukunari A., Sugahara K., Chiba K., 8th International Congress of Neuroimmunology, ISNI2006, 121–123 (2007).
- 43) Budde K., Schmouder R. L., Brunkhorst R., Nashan B., Luker P. W., Mayer T., Choudhury S., Skerjanec A., Kraus G., Neumayer H. H., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 1073–1083 (2002).
- 44) Budde K., Schmouder R. L., Nashan B., Brunkhorst R., Luker P. W., Mayer T., Brookman L., Nedelman J., Skerjanec A., Bohler T., Neumayer H. H., *Am. J. Transplant.*, **3**, 846–854 (2003).
- 45) Kahan B. D., Karlix J. L., Ferguson R. M., Leichtman A. B., Mulgaonkar S., Gonwa T. A., Skerjanec A., Schmouder R. L., Chodoff L., *Transplantation*, **76**, 1079–1084 (2003).
- 46) Tedesco-Silva H., Mourad G., Kahan B. D., Boira J. G., Weimar W., Mulgaonkar S., Nashan S., Charpentier B., Pellet P., Vanrenterghem Y., *Transplantation*, **77**, 1826–1833 (2004).
- 47) Kappos L., Antel J., Comi G., Montalban X., O'Connor P., Polman C. H., Haas T., Korn A. A., Karlsson G., Radue E. W., *N. Engl. J. Med.*, **355**, 1124–1140 (2006).