

綜 説

脂質メディエーター Sphingosine-1-phosphate (S1P) : 自己免疫性疾患における新規 S1P 受容体アゴニスト KRP-203の作用を中心に

高橋 将文

信州大学大学院医学系研究科循環器病態学分野

Lipid Mediator Sphingosine-1-Phosphate (S1P) : Efficacy of Novel S1P Receptor Agonists in the Treatment of Autoimmune Diseases

Masafumi TAKAHASHI

Department of Cardiovascular Medicine, Shinshu University Graduate School of Medicine

Key words: T cell, FTY720, KRP-203, lipid mediator, immune response

T細胞, FTY720, KRP-203, 脂質メディエーター, 免疫反応

I はじめに

生体において脂質は、エネルギー源や細胞膜の主要構成成分として重要な役割を担っているが、近年、脂質が受容体を介して生理活性作用を示し、いわゆるシグナル分子としても機能していることがわかってきた。最近では、このような機能を持つ脂質は“脂質メディエーター”と称され、なかでも、プロスタグランジンやロイコトリエン、血小板活性化因子 (platelet activating factor : PAF) などがよく知られている。本稿で紹介するスフィンゴシン 1 リン酸 (sphingosine 1-phosphate : S1P) も脂質メディエーターの一つであり、G 蛋白に共役する 7 回膜貫通型受容体 (G-protein coupled receptor : GPCR) である S1P₁₋₅ 受容体を介して下流にシグナルを伝達して、細胞の増殖や遊走、分化など様々な作用を発揮している。特に、近年の S1P 受容体ノックアウトマウスでの解析と、本邦で開発された免疫抑制薬 FTY720 の作用が S1P 受容体を介していることがわかったことから、S1P/S1P 受容体の血管・免疫系における新たな役割が明らかとなっていった。なかでも臓器移植や自己免疫性疾患における S1P の役割が注目されており、これらの分野における新規 S1P アゴニストの開発が精力

的に行われている。我々は新規 S1P 受容体アゴニスト KRP-203 の開発に携わり、様々な疾患モデルにおけるその治療効果を検討してきた。本稿では、生体内における S1P の生成・作用から、自己免疫性疾患における新規 S1P 受容体アゴニスト KRP-203 の効果について概説する。

II S1P の生成と作用

S1P は、細胞膜の主要構成成分であるスフィンゴミエリンからセラミド、スフィンゴシンを経て生成されるリン脂質であり、スフィンゴシンがリン酸化酵素であるスフィンゴシンキナーゼによりリン酸化されることで産生される (図 1)。血清中の S1P は数百 nM という濃度で存在しており、血小板がその重要なソースとなっている。この血小板に豊富に含まれている S1P は、血小板凝集刺激によって細胞外へと放出される。また、最近では、赤血球にも S1P が含まれており、血漿における S1P のソースとなっていることも示されている¹⁾。生成された S1P の受容体は、血管内皮において分化刺激により発現が誘導されることで発見された endothelial differentiation gene (Edg/S1P 受容体) に結合して作用する。この受容体は GPCR であり、現在 5 種類の S1P 受容体 (S1P₁/Edg-1, S1P₂/Edg-5, S1P₃/Edg-3, S1P₄/Edg-6, S1P₅/Edg-8) が報告されている。これらのうち、S1P₁/Edg-1, S1P₂/Edg-5, S1P₃/Edg-3 は広範な組織・

別刷請求先: 高橋 将文 〒329-0498

栃木県下野市薬師寺3311-1 自治医科大学

分子病態治療研究センター バイオイメーキング研究部

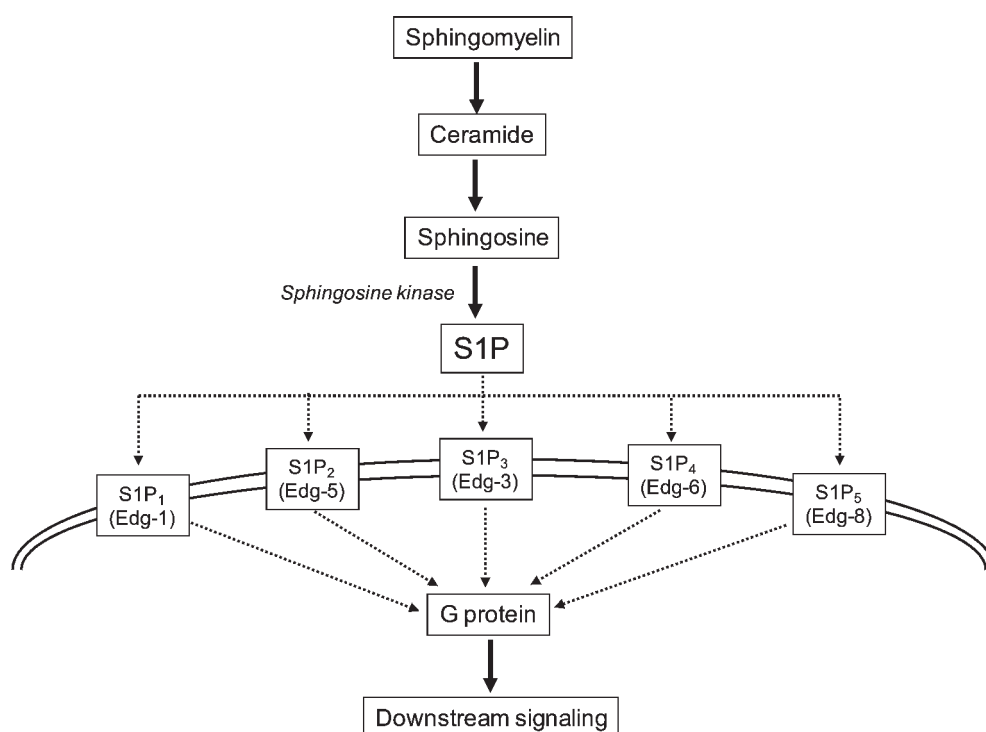


図1 S1Pの生成とその作用機序

S1Pはスフィンゴミエリンからセラミド、スフィンゴシンを経て生成される。スフィンゴシンからS1Pの生成には、スフィンゴシンキナーゼによるスフィンゴシンのリン酸化によって誘導される。S1Pは5種類のGPCR受容体(S1P₁からS1P₅受容体)に結合し、3量体G蛋白を介してさらに下流へとシグナルを伝達して作用する。

細胞で発現しており、S1P₄/Edg-6とS1P₅/Edg-8はそれぞれ造血・リンパ球系と神経系に発現している。S1Pの結合によりこれら受容体に刺激が入ると、G蛋白を介してRas-ERKやRho、ホスホリパーゼC(PLC)といった下流のシグナル分子が活性化されて作用が発揮される。

S1P受容体のノックアウト(KO)マウスの報告では、S1P₁受容体KOマウスは胎生12.5日以降に血管成熟不全で出血して14.5日までにすべて死亡し、この原因として血管内皮細胞におけるS1P₁受容体の重要性が示唆されている²⁾。一方、S1P₂受容体KOマウスでは明らかな血管の異常などは認められないが、自発的・散発的なてんかん発作を生じることが報告されている³⁾⁴⁾。しかし、S1P₁受容体とS1P₂受容体のダブルKOマウスや、さらにS1P₃受容体もKOされたトリプルKOマウスでは、血管新生過程の異常が認められ、S1P₁受容体KOマウスと比較しても早期に死亡することが報告されており、S1P₂受容体およびS1P₃受容体はS1P₁受容体と協調して機能している可能性が示されている⁵⁾。また、放射線照射したマウスにS1

P₁受容体KOマウスの胎児肝細胞(造血系細胞)を移植することで造血系細胞特異的S1P₁受容体KOマウスを作製した報告では、末梢血中のT細胞のほぼ完全な消失とB細胞の減少が認められ、T細胞の2次リンパ節から末梢への再分布が障害されていることが明らかとなっている⁶⁾。

III FTY720およびKRP-203の構造と作用

FTY720は、冬虫夏草の一つである*Isaria siclairii*菌の培養液中から発見されたミリオン(myriocin: ISP-1)をリード化合物として、化学修飾により見出されたまったく新しい機序で作用する免疫抑制薬である⁷⁾⁸⁾。FTY720は、二次リンパ系組織および胸腺からの成熟T細胞の移出を阻止して末梢血中のT細胞数を減少させて免疫抑制作用を示すことが知られていたが、その作用機序はあまりわかっていなかった。その後、FTY720の化学構造におけるスフィンゴシンとの類似性などから、FTY720がS1P₁受容体を介して作用していることが明らかとなった(図2)⁹⁾。FTY720は生体内ではスフィンゴシンキナーゼによりリン酸化体

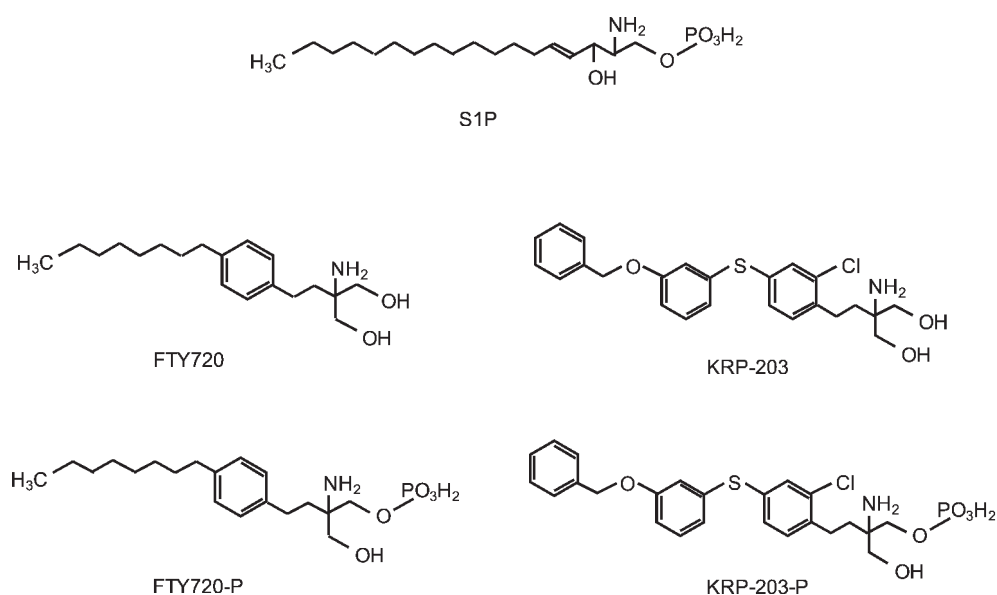


図2 FTY720およびKRP-203の構造

FTY720およびKRP-203とも生体内でリン酸化され (FTY720-P および KRP-203-P), S1P と同様に S1P 受容体に結合することで作用する。

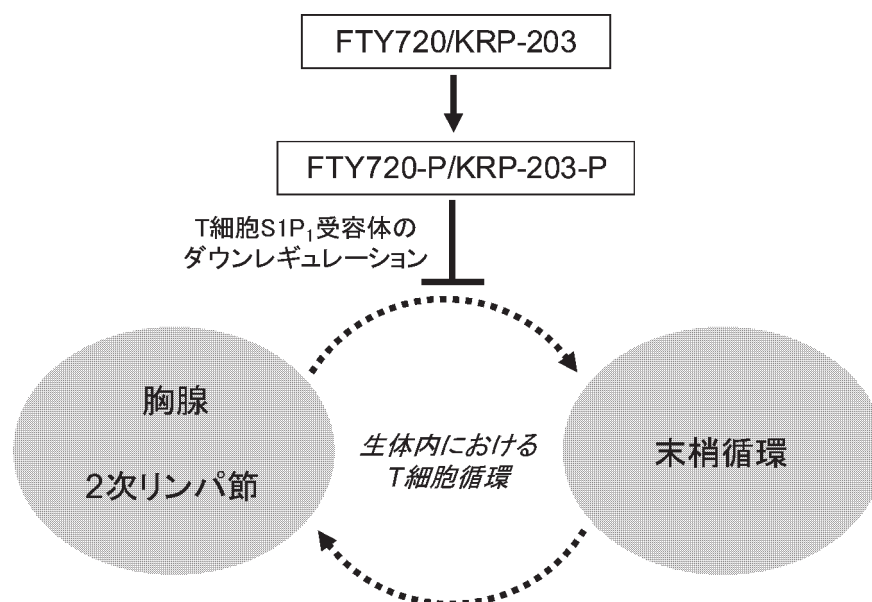


図3 T細胞の移出におけるFTY720およびKRP-203の作用機序

FTY720およびKRP-203は、生体内でリン酸化されてFTY720-PおよびKRP-203-Pとなり、T細胞上のS1P₁受容体に結合してダウンレギュレーションをおこす。T細胞は末梢循環と胸腺および2次リンパ組織との間で循環しているが、S1P₁受容体がダウンレギュレーションされたT細胞では、胸腺および2次リンパ組織から移出できなくなる。その結果、胸腺や2次リンパ節においてはT細胞がトラップされた状態となり、逆に末梢血中のT細胞数の減少が生じる。

(FTY720-P) となり、S1P₄受容体を除く四つのS1P受容体と結合する。特に、このFTY720-PはT細胞のS1P₁受容体に強く結合して、そのダウンレギュレーションを引き起こす。これによってT細胞はS1P₁受容体依存性の胸腺および2次リンパ組織から移出がで

きなくなり、結果として末梢血中のT細胞の減少が引き起こされる。実際、FTY720で処理したマウスでは、胸腺や2次リンパ節におけるT細胞の集簇が認められ、T細胞のリンパ組織から末梢への再分布の障害が認められる(図3)。

我々は、杏林製薬株式会社と共同で新たなS1PアゴニストであるKRP-203を開発してきた。KRP-203はFTY720と化学構造上も類似している(図2)⁹⁾。また、KRP-203のリン酸化体(活性型)であるKRP-203-PとFTY720-PのS1P₁受容体およびS1P₃受容体に対する親和性をみてみると、FTY720-PはS1P₁受容体とS1P₃受容体の両方に作用するが、KRP-203-PはS1P₁受容体により選択的に作用していることがわかった(図4)¹⁰⁾。さらに、FTY720を投与すると心拍数が減少することが報告されているが、この作用がS1P₃受容体を介していることが示されており¹¹⁾、実際、S1P₁受容体に選択性の高いKRP-203ではFTY720と比較して心拍数の減少作用が少なく、徐脈を誘導しにくいことも認めている¹⁰⁾。

KRP-203をラットに投与するとFTY720と同様に末梢血中T細胞数は激減し、ラット異所性心移植モデルや皮膚移植モデル、腎臓移植モデルにおける急性・慢性拒絶反応を抑制して移植臓器の生存率を有意に改善する(図5)⁹⁾¹⁰⁾。特に、ラット異所性心移植モデルでは、移植後拒絶反応による冠動脈の狭窄・閉塞を著明に抑制することが明らかとなった。さらに、カルシニューリン阻害薬の腎毒性をはじめとする副作用が問題となっているが、カルシニューリン阻害薬であるシクロスポリンを治療用量以下の低用量としてKRP-

203を併用すると、相乗的に免疫抑制効果が増強されて、心移植および腎移植後の拒絶反応をより効果的に抑制することも認めており¹⁰⁾¹²⁾、長期連用による副作用の懸念されるカルシニューリン阻害薬をこの併用療法により減量して副作用を回避できる可能性を報告している。

IV 自己免疫性疾患に対する効果

FTY720には免疫抑制作用があることから、種々の自己免疫疾患モデル動物における治療効果が報告されている。さらに最近、我々も新たなS1P受容体アゴニストであるKRP-203の動物モデルにおける治療効果を報告している。

A 動物実験

これまでにFTY720投与による治療効果の報告されている疾患モデルとしては、実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)、実験的自己免疫性甲状腺炎、MRL/lpr マウスにおけるループス腎炎、アジュバント誘発性関節炎、コラーゲン関節炎、マウス重症筋無力症モデルなどがある¹³⁾。なかでも、脳や脊髄、視神経などに病変が起る中枢性脱髄性疾患の一つである多発性硬化症のモデルとして汎用されるEAEに対する治療効果は複数のグループから報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。

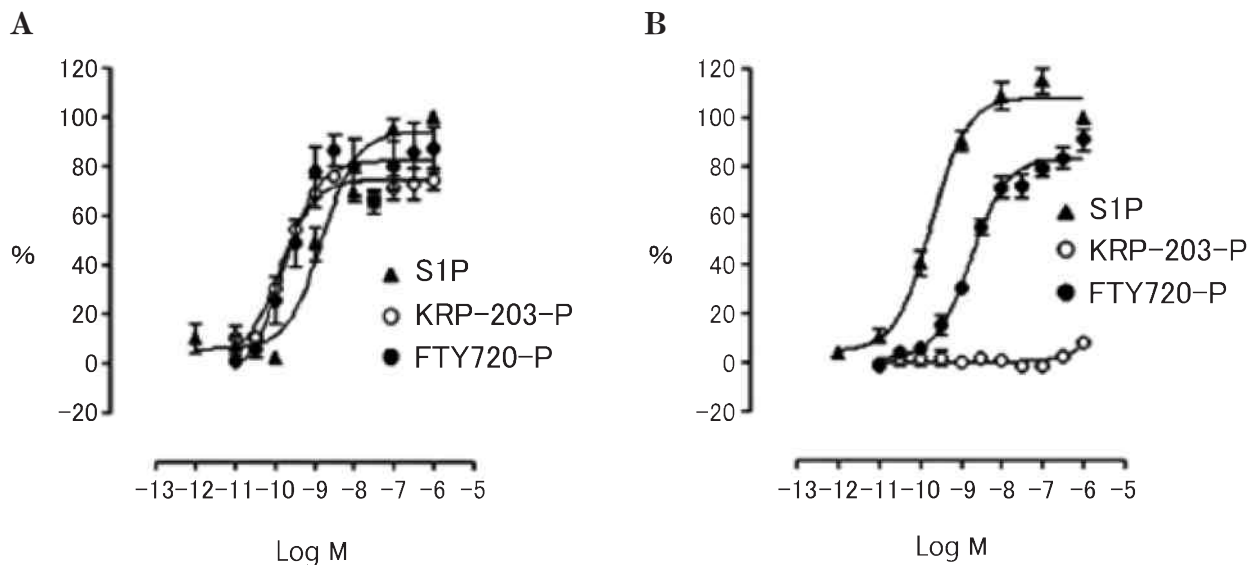


図4 S1P₁およびS1P₃受容体に対するFTY720およびKRP-203の作用

S1P₁およびS1P₃受容体を発現させたCHO-K1細胞に、FTY720-PあるいはKRP-203-Pで刺激して細胞内カルシウムの変化を測定した。FTY720-PではS1P₁とS1P₃受容体の両方が刺激された。一方、KRP-203-PではS1P₃受容体に比較してS1P₁受容体が特異的に刺激された。(A) S1P₁受容体 (B) S1P₃受容体。(文献10より改変引用)

最近、我々はラット実験的自己免疫性心筋炎 (experimental autoimmune myocarditis : EAM) モデルとマウスコンカナバリンA (concanavalin A : Con A) 誘導性肝炎モデルを用いたKRP-203の治療効果について報告した。ブタ心筋ミオシンをLewisラットにアジュバントと共に投与すると3-4週間程度でマクロファージやTリンパ球の浸潤を伴う劇症型的心筋炎を発症し、ラットは心不全に陥る。このラットにKRP-203 (0.1および1 mg/kg) をミオシン感作と同日から経口投与したところ (予防プロトコル)、心筋の炎症面積および心重量/体重比が有意に改善し、特にKRP-203の高用量投与 (1 mg/kg) では心筋炎症面積がほぼ完全に抑制された (図6)¹⁶⁾。また、心臓超音波検査による心機能 (左室内径短縮率 : % FS) の改善や炎症細胞浸潤 (Tリンパ球・マクロファージ)

の減少、インターロイキン-1 β (IL-1 β) やインターフェロン- γ (IFN- γ), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), オステオポンチン (OPN) といった炎症性サイトカインの有意な発現の低下も認められた (図7)。さらに、心筋炎発症後からKRP-203を投与する治療プロトコルにおいても、心筋炎症面積や炎症細胞浸潤の有意な改善が認められ、実際の臨床現場においても治療薬として有用である可能性が示唆された。一方、豆に存在するレクチン (糖鎖結合分子) であるCon Aは、Tリンパ球を活性化させ、マウスに投与するとTリンパ球を介した肝炎が誘導されることから、自己免疫性肝炎のモデルとして広く実験に用いられている。我々は、この肝炎モデルにおいてもKRP-203の効果を検討し、0.1 mg/kg という低用量での投与でもアラニンアミノトランスフェラーゼ

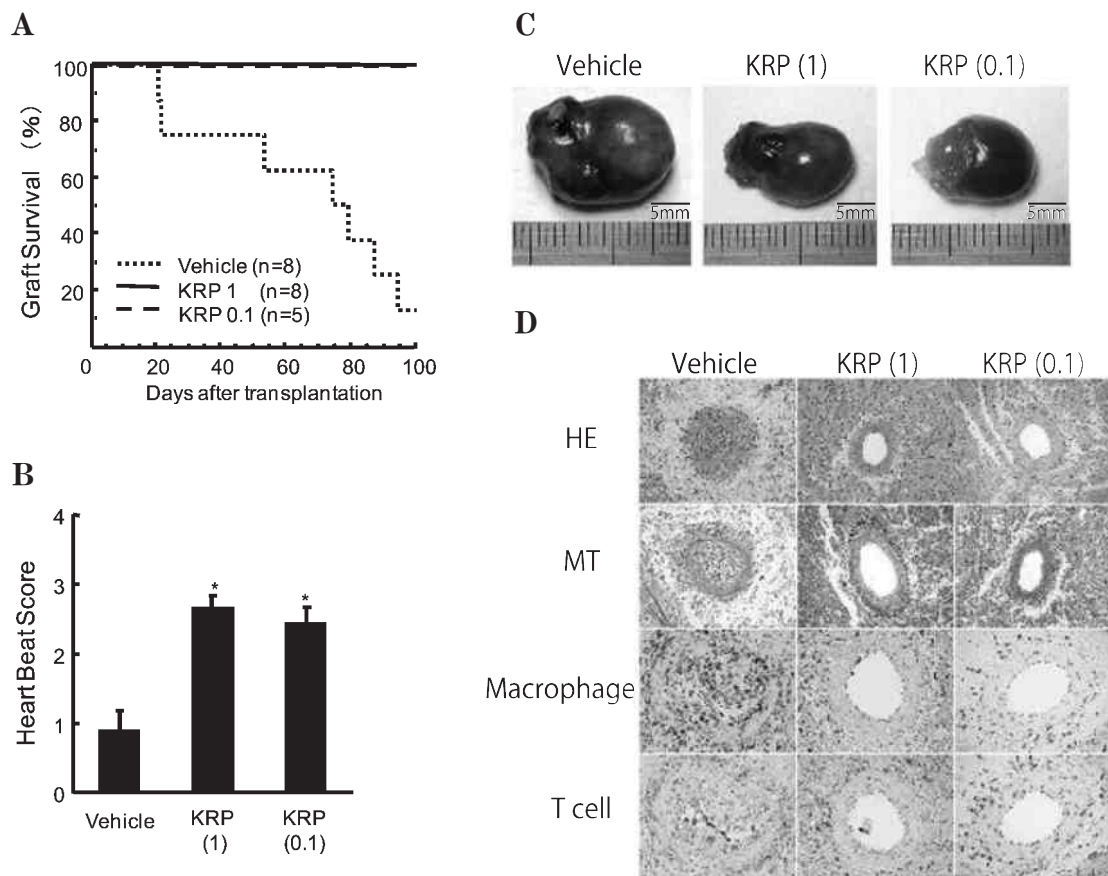


図5 ラット異所性心移植モデルに対するKRP-203の治療効果

ラット異所性心移植モデル (Lewi-to-F344) に対してKRP-203 (low dose : 0.1およびhigh dose : 1.0 mg/kg, 経口) を投与して評価した。(A) 移植心の生存率, (B) 移植心の心拍スコア, (C) 摘出移植心, (D) 組織学的評価 (HE : hematoxylin eosin 染色, MT : Masson's Trichrome 染色, Macrophage およびT細胞に対する免疫染色)。Vehicle群に比較して、KRP投与群では移植心の生存率の有意な改善、心拡大および冠動脈の狭窄・閉塞の抑制が認められた。* P < 0.05 vs. Vehicle群。(文献9より改変引用)

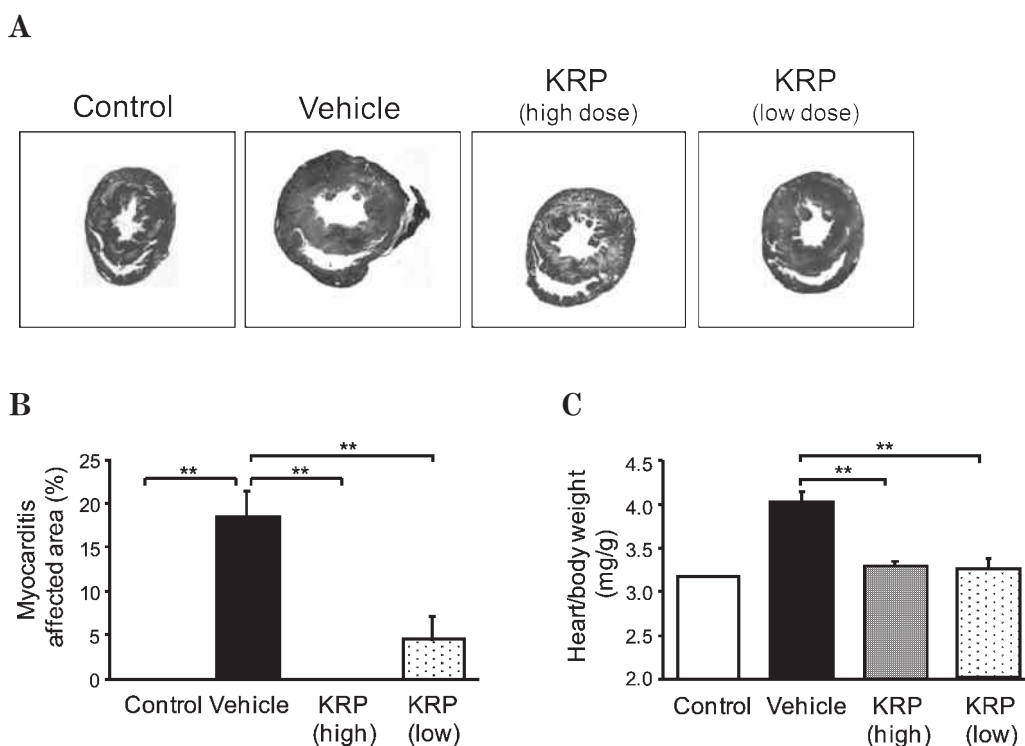


図6 自己免疫性心筋炎ラットに対する KRP-203 の治療効果

ミオシン誘導性心筋炎ラットモデルに対して KRP-203 (low dose : 0.1 および high dose : 1.0 mg/kg, 経口) を投与して評価した。(A) HE 染色, (B) 心筋炎症領域, (C) 心重量/体重比。Vehicle 群では, コントロール (心筋炎なし) 群に比べて有意に炎症領域および心重量/体重比が増加したが, これらの指標は KRP-203 の投与によって有意に減少した。特に, high dose KRP-203 群では心筋の炎症領域はほぼ完全に抑制された。** $P < 0.01$ 。(文献16より改変引用)

(ALT) の上昇を有意に抑制することや, この KRP-203 による治療効果の標的細胞が CXCR4⁺/CD4⁺-T リンパ球であることを報告している¹⁷⁾。

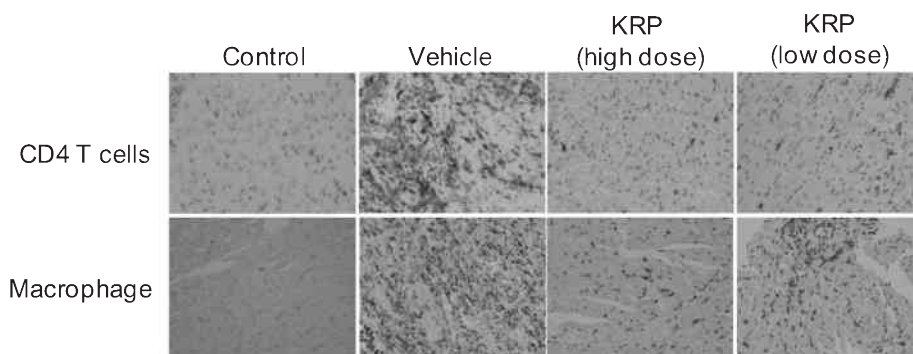
B 臨床試験

最近, 欧州およびカナダの11カ国32施設で行われた FTY720 (fingolimod) 経口投与による多発性硬化症に対する第II相臨床試験の結果が報告された¹⁸⁾。この試験では281例の再発性多発性硬化症患者を対象として, プラセボ, FTY720 1.25 mg, FTY720 5 mg 投与 (1日1回) の3群に無作為に割り付け, MRI および臨床評価により6か月間追跡調査された (主試験, 0-6か月)。さらに引き続いて行われた延長試験 (7-12か月) では, プラセボ群に FTY720 をどちらかの用量で再度無作為に割り付けられ, FTY720 群では同じ用量を継続して投与された。計255例が主試験を終了し, その結果, MRI 上の病変は FTY720 1.25 mg 群 (病変総数中央値: 1病変, $P < 0.001$) と FTY720 5 mg 群 (3病変, $P < 0.006$) ではプラセボ群 (5病変) に比較して有意に少なかった。また, 年間での

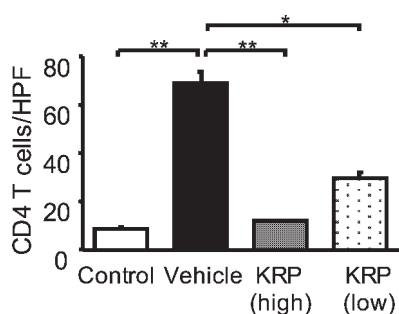
再発率はプラセボ群で0.77, FTY720 1.25 mg 群で0.35 ($P = 0.009$), FTY720 5 mg 群で0.36 ($P = 0.01$) であった。延長試験を終えた227例では, 病変数および再発率は FTY720 投与継続群で依然として少なく, プラセボから FTY720 投与へと変更された群でも, これらのパラメーターは減少した。有害事象として, 鼻咽頭炎, 呼吸困難, 頭痛, 下痢, 悪心などがあり, 無症候性肝機能酵素 (ALT) の上昇が FTY720 群で比較的高頻度に認められた (10-12%, プラセボ群では1%)。また, FTY720 5 mg 群において後頭葉の可逆性脳症候群 (posterior reversible encephalopathy syndrome) が1例認められた。さらに, FTY720 投与初期での心拍数の減少と呼吸機能検査での1秒量の低下にも関連していた。これらの結果より, FTY720 が多発性硬化症患者の治療に有効であることが示唆された (図8)。

現在, これに引き続いてより大規模および長期的な試験として, 再発性多発性硬化症に対する第III相臨床試験が2006年1月から開始されており, 2009年7月に

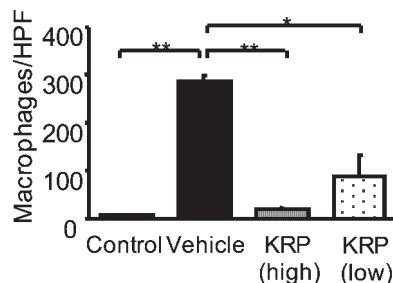
A



B



C



D

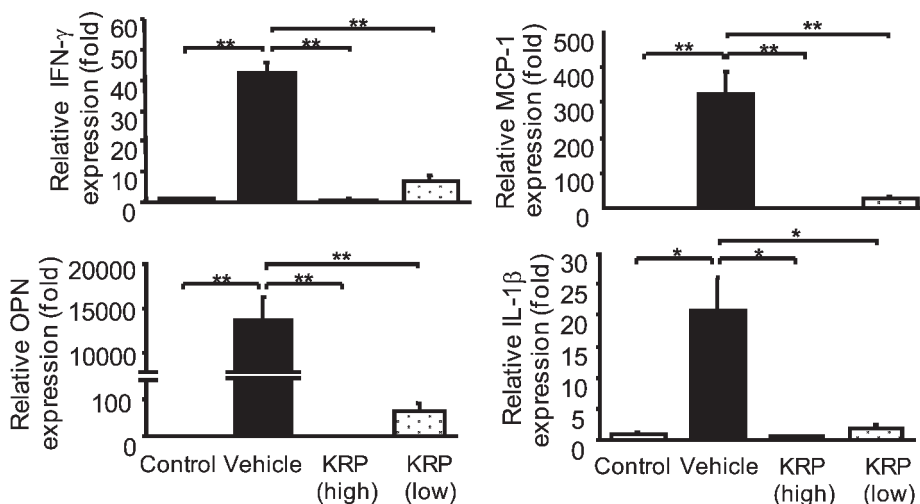


図7 自己免疫性心筋炎ラットの炎症細胞浸潤・サイトカイン発現に対するKRP-203の効果

(A-C) CD4陽性T細胞・マクロファージに対する免疫染色とその定量評価, (D) 炎症性サイトカインmRNAの発現 (IFN- γ , MCP-1, OPN, IL-1 β)。KRP-203の投与により炎症細胞浸潤・炎症性サイトカインの発現が有意に抑制された。*P<0.05, **P<0.01。(文献16より改変引用)

終了する予定となっている (ClinicalTrials.gov NCT 00289978)。これらの臨床試験によってFTY720の自己免疫性疾患に対する有効性が証明されれば、今後、

他の自己免疫性疾患に対しても応用範囲が広がり、新たな自己免疫性疾患治療薬となり得ることが期待される。また、新たなS1P受容体アゴニストであるKRP-

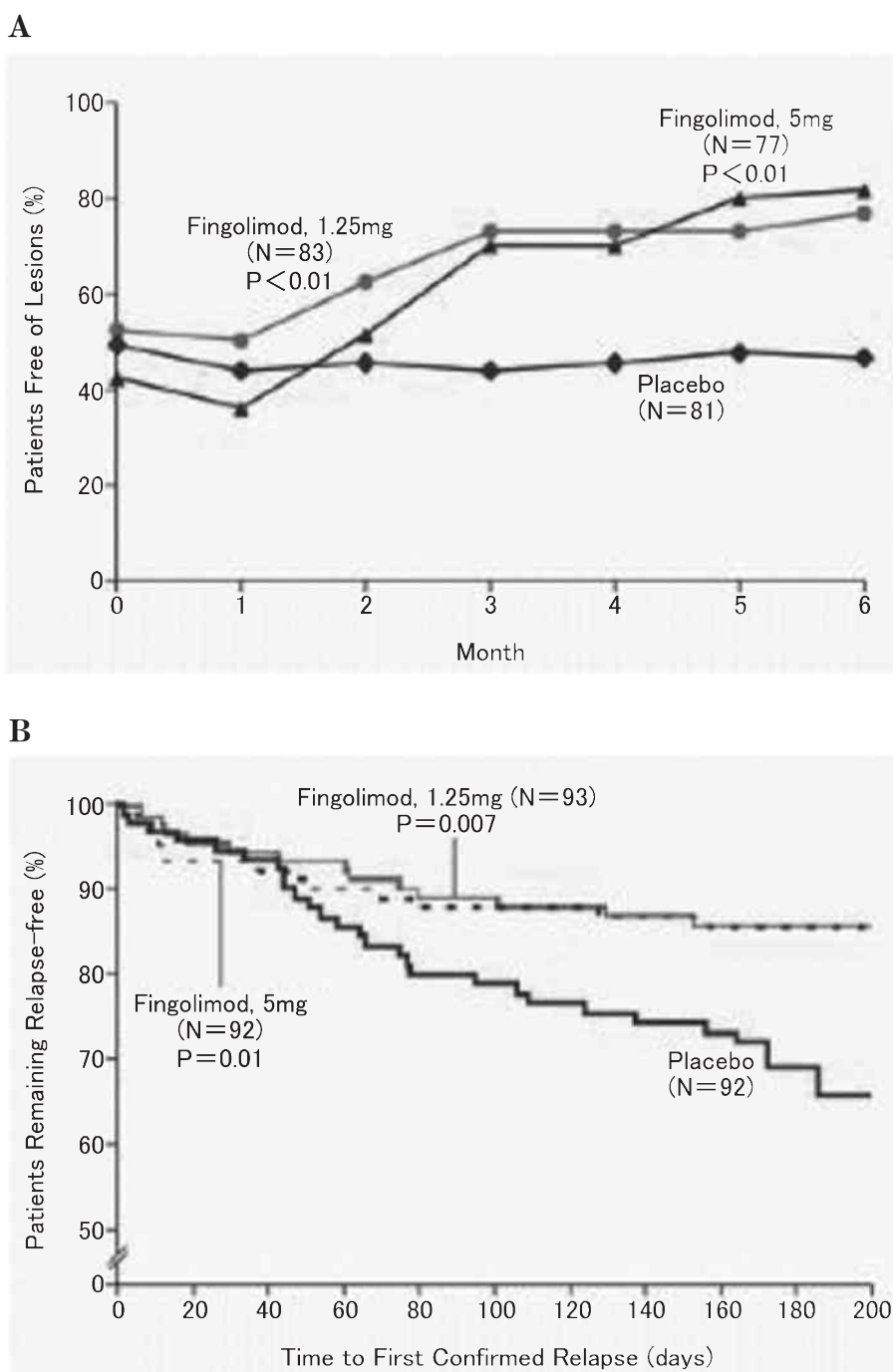


図8 再発性多発性硬化症に対するFTY720の治療効果
第II相臨床試験におけるMRI上のガドリウム増強病変数のなかった患者比率(A)および再発のなかった患者比率(B)を示す。(FTY720:Fingolimod)。P値はプラセボ群との比較を示す。(文献18より改変引用)

203に関しては、2006年にノバルティス社へとライセンスが供与され、現在、海外において第I相臨床試験が行われている。

V おわりに

S1P受容体アゴニストは、末梢血中のT細胞数を

減少させることで免疫抑制効果を示し、自己免疫疾患に対する有益な作用を発揮すると考えられる。しかし、S1Pは生体内においてリンパ球の移行のみならず、血管新生をはじめとする重要な作用も担っていることから、さらなるS1P受容体アゴニストの作用機序の解明が必要である。また、今後、新たなアゴニストの

開発が進むことによって、自己免疫性疾患をはじめとする免疫反応の関与する疾患に対する S1P 受容体アゴニストを用いた新たな治療法が確立されることが期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、自治医科大学・分子病態治療研究センター・小林英司教授ならびに杏林製薬との共同研究であり、関係の方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, Pereira JP, Regard JB, Xu Y, Camerer E, Zheng YW, Huang Y, Cyster JG, Coughlin SR: Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316: 295-298, 2007
- 2) Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL: Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 106: 951-961, 2000
- 3) Yang AH, Ishii I, Chun J: In vivo roles of lysophospholipid receptors revealed by gene targeting studies in mice. *Biochim Biophys Acta* 1582: 197-203, 2002
- 4) Ishii I, Ye X, Friedman B, Kawamura S, Contos JJ, Kingsbury MA, Yang AH, Zhang G, Brown JH, Chun J: Marked perinatal lethality and cellular signaling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P(2)/LP(B2)/EDG-5 and S1P(3)/LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem* 277: 25152-25159, 2002
- 5) Kono M, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, Allende ML, Wu YP, Yamashita T, Proia RL: The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem* 279: 29367-29373, 2004
- 6) Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG: Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427: 355-360, 2004
- 7) Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, Ikumoto T, Sasaki S, Toyama R, Chiba K, Hoshino Y, Okumoto T: Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot (Tokyo)* 47: 208-215, 1994
- 8) 千葉健治: 新しい免疫抑制薬: スフィンゴシン 1-リン酸受容体アゴニスト, FTY720. *最新医学* 60: 397-403, 2005
- 9) Shimizu H, Takahashi M, Kaneko T, Murakami T, Hakamata Y, Kudou S, Kishi T, Fukuchi K, Iwanami S, Kuriyama K, Yasue T, Enosawa S, Matsumoto K, Takeyoshi I, Morishita Y, Kobayashi E: KRP-203, a novel synthetic immunosuppressant, prolongs graft survival and attenuates chronic rejection in rat skin and heart allografts. *Circulation* 111: 222-229, 2005
- 10) Fujishiro J, Kudou S, Iwai S, Takahashi M, Hakamata Y, Kinoshita M, Iwanami S, Izawa S, Yasue T, Hashizume K, Murakami T, Kobayashi E: Use of sphingosine-1-phosphate 1 receptor agonist, KRP-203, in combination with a subtherapeutic dose of cyclosporine A for rat renal transplantation. *Transplantation* 82: 804-812, 2006
- 11) Sanna MG, Liao J, Jo E, Alfonso C, Ahn MY, Peterson MS, Webb B, Lefebvre S, Chun J, Gray N, Rosen H: Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem* 279: 13839-13848, 2004
- 12) Takahashi M, Shimizu H, Murakami T, Enosawa S, Suzuki C, Takeno Y, Hakamata Y, Kudou S, Izawa S, Yasue T, Kobayashi E: A novel immunomodulator KRP-203 combined with cyclosporine prolonged graft survival and abrogated transplant vasculopathy in rat heart allografts. *Transplant Proc* 37: 143-145, 2005
- 13) Martini S, Peters H, Bohler T, Budde K: Current perspectives on FTY720. *Expert Opin Investig Drugs* 16: 505-518, 2007
- 14) Kataoka H, Sugahara K, Shimano K, Teshima K, Koyama M, Fukunari A, Chiba K: FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration. *Cell Mol Immunol* 2: 439-448, 2005
- 15) Fujino M, Funeshima N, Kitazawa Y, Kimura H, Amemiya H, Suzuki S, Li XK: Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 70-77, 2003
- 16) Ogawa R, Takahashi M, Hirose S, Morimoto H, Ise H, Murakami T, Yasue T, Kuriyama K, Hongo M, Kobayashi

- E, Ikeda U : A novel sphingosine-1-phosphate receptor agonist KRP-203 attenuates rat autoimmune myocarditis. *Biochem Biophys Res Commun* 361 : 621-628, 2007
- 17) Kaneko T, Murakami T, Kawana H, Takahashi M, Yasue T, Kobayashi E : Sphingosine-1-phosphate receptor agonists suppress concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 345 : 85-92, 2006
- 18) Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, Haas T, Korn AA, Karlsson G, Radue EW : Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 355 : 1124-1140, 2006

(H 21. 3. 10 受稿)
