

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04242

研究課題名(和文) 免疫制御を可能とする紫外線波長特性の解析 あらたな深紫外光LED光線治療の開発

研究課題名(英文) Optimal ultraviolet wavelength for immune regulation and development of ultraviolet-LED phototherapy

研究代表者

森田 明理 (Morita, Akimichi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：30264732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：iTregを誘導する波長解析では、310nmに遅延型過敏反応の抑制とTregの誘導が見られ、nTregでは、290～300nmで誘導が見られた。Treg関連の遺伝子における脱メチル化がみられ、安定した抑制機能のあるTregが誘導される。乾癬患者のTregの抑制能の低下は、光線療法後においてほぼ正常へ回復したことから、光線療法によるTregの機能回復が示された。ヒト皮膚病変でTregの誘導について、皮疹血として採取したわずかな全血から、FACS解析、さらに高速セルソーターで、CD4/CD8を分離することも成功し、末梢血に比べ、皮疹血では、分画に差があり、制御性T細胞の分離にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果は、光線療法のメカニズムの一部を明らかにするとともに、乾癬の病態がより明確になることが期待される。またTh17細胞がその病態に関与していると考えられている自己免疫性脳脊髄炎(多発性硬化症)や様々な自己免疫疾患に対し光線療法が応用できる可能性があり、今回の研究がその足がかりとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Wavelength analysis to induce iTreg showed inhibition of delayed-type hypersensitivity and induction of Treg at 310 nm and induction of nTreg at 290-300 nm. Demethylation in Treg-related genes leads to Tregs with stable inhibitory functions. The decreased ability to suppress Treg in patients with psoriasis returned to almost normal after phototherapy, indicating that phototherapy restored Treg function. Regarding the induction of Treg in human skin lesions, we succeeded in FACS analysis from a small amount of whole blood collected as lesional blood and in the separation of CD4/CD8 by high-speed cell sorter. We also succeeded in the separation of regulatory T cells.

研究分野：要入力

キーワード：紫外線 免疫制御 制御性T細胞 光線治療 LED

1. 研究開始当初の背景

申請者は、本邦における 311nm ナローバンド UVB、308nm エキシマライトの照射機器の開発をすすめ、本邦における皮膚疾患における紫外線療法の革新的な変化をもたらした。1976 年、当教室の水野信行らは、世界に先駆け、乾癬に対する外用 PUVA 療法を行い、教室には、約 40 年にわたる紫外線療法のノウハウと基礎となる研究が行われてきた。311nm ナローバンド UVB は、最少紅斑量を用いたスタンダードレジメンの開発によって、波長特異的紫外線療法が、一般レベルとなった。

これまで、選択的長波長紫外線(UVA1)の基礎および臨床的な研究を行い、平成 17-19 年は、UVB による末梢性免疫寛容を誘導する方法の確立を行った。また、同時期に、ハイパワー UVA1-LED による細胞レベルでの解析を開始した。平成 23-24 年は、波長特性を生かした新たな光線療法の開発の研究を開始した。波長特異性については、UVB 領域(290-320nm)では、明らかに 300~310nm 内に抗原特異的遅延型過敏反応を抑制する波長が存在し、CD4+Foxp3+制御性 T 細胞(Treg)を誘導することをマウスモデル実験のレベルとして明らかとした。また、同時に、リンパ節細胞において、IL-10 を誘導すること、TH17 細胞から産生される IL-17 の抑制、TH17 細胞を誘導する IL-23 の抑制などが、明らかとなり、有効な紫外線波長の利用で、現在多くの薬剤開発(抗体療法)が向けられている開発のポイントをクリアしているとう驚くべき結果が得られた。また、TH17 が乾癬の病態に重要であるので、光線療法の乾癬治療に関わるメカニズムとして TH17 の抑制が重要な可能性が示唆される。今までに、UVA、UVA1、UVB、ソーラーシミュレーター、回折格子によるモノクロメーターなど、紫外線領域において、波長ごとの生物学的な作用(細胞、実験動物、ヒト)を解析する照射装置の整備を行った。本研究では、光による免疫制御めざし紫外線波長特性の解析から、新たな UV-LED 光線治療機器の開発にかかわる基礎技術を構築する。

2. 研究の目的

生体にとって有用となる波長の解析を回折格子を用いたモノクロメーター、さらに最近開発された UV-LED を用い、メカニズムの解析-臨床応用への基礎となる技術開発を行う。

本申請では、光の免疫制御に焦点をあて、紫外線(UVB・UVA)であきらかとなっている免疫制御とまだ、明らかにはなっていない点について検討を進めていく。自然免疫に関与するβ-defensin や LL-37 は、UVB の短波長側(290nm)で誘導され、一方、フィラグリンや HMGB1 の誘導は、長波長側(310nm)であり、獲得免疫を抑制する波長と近似する。しかし、波長ごとの免疫制御は、国内外での研究でもあきらかではない。これを明らかにするため、(1)免疫寛容誘導：外来抗原の反応を抑制する誘導性制御性 T 細胞(inducible Treg: iTreg)と自己免疫性反応を抑制する内在性制御性 T 細胞(naturally occurring Treg: nTreg)の誘導波長の探索(マウスモデル)、(2)臨床レベル(難治性皮膚疾患に対する光線療法)での活性化制御性 T 細胞の誘導、(3)表皮細胞から誘導される免疫制御にかかわる分子の波長特異性の解析、(4)制御性 T 細胞を誘導する樹状細胞の波長特性の解析、(5)免疫を制御する UVA1(340-400nm)の有効波長の探索を行う。

3. 研究の方法

1. 制御性 T 細胞(Treg)による免疫寛容誘導する波長探索(マウスモデル~臨床レベルでの解析)

1) iTreg(誘導性制御性T細胞)を誘導する波長解析

外来抗原(OVA)を用いた遅延型過敏反応(DTH)のマウスモデルを用いた実験では、モノクロメーター(回折格子で分光)で、290~320nmを照射したところ、310nmに明らかに、遅延型過敏反応の抑制とTregの誘導が見られた。リンパ節細胞において、IL-10を誘導すること、TH17細胞から産生されるIL-17の抑制、TH17細胞を誘導するIL-23の抑制などが、明らかとなり、Tregの誘導のみならず、TH17細胞の誘導を抑えている可能性が示唆された。

2) nTreg(内在性制御性T細胞)の誘導波長解析

抗原の投与していないマウス皮膚にモノクロメーターを用い290~320nmの照射で、リンパ節・脾臓でCD4+CD25+Foxp3+Neuropilin-1+細胞(nTreg)が、290~300nmで誘導が見られた。最近、ブロードバンドUVB(290-320nm)の照射(抗原なし)で、7日後で明らかに皮膚とリンパ節でTregが増加(皮膚のCD4+Tリンパ球の約60%にもTregが増殖)、Neuropilin1陽性のnTregであり、Treg関連の遺伝子におけるメチル化を調べたところ、脱メチル化がみられ、安定した抑制機能のあるTregが誘導されることを明らかとした。

上記1)と2)に対して、モノクロメーターに加え、UV-LED(300nm, 305nm, 310nm, 313nm, 325nm)を用い、短時間・均一な照射を行う。また、CD4(CD25)細胞分離し、RNAシーケンスを行い、遺伝子発現プロファイルを検討する。Treg関連遺伝子のエピジェネティック解析で、誘導されるTregの質の解析も行う。ほとんどのUVB-LEDは、市販品ではなく、試作レベルのものであり、19種類のLEDを手に入れた。

3) 臨床レベルでのTreg誘導解析(ナローバンドUVB・308nmエキシマライト・PUVAバス照射患者におけるTreg誘導解析)

乾癬では、末梢血ではTreg数の減少はみられず、機能不全であることが報告されている。健常人Treg存在下ではCD4+CD25-Tcellsの分裂増殖がほぼ完全に抑制された(94.4%)のに対して、乾癬患者Tregでは完全に抑制できず(70.3%)、抑制能の有意な低下を認めた。また乾癬患者のTregの抑制能の低下は、PUVAバス療法後において、70.3%から88.1%($p=0.030$)へほぼ正常へ回復したことから、PUVAバスによる乾癬患者末梢血Dysfunctional Tregの機能回復が示した。

活性化(=抑制作用)によってヒトのTregは、3つの分画[I: 休止期Treg(rTreg), II: 活性化Treg(aTreg) III: 非抑制性Treg(nTreg)]に分けられた。照射開始(PUVAバス)から5回ごとに、3つの分画を調べたところ、aTreg(CD4+CD25+Foxp3^{high}CD45RA⁻)が、明らかに上昇することが明らかとなった。比較的早期にaTregが上昇し、rTregも同様に誘導され、非抑制性Tregは、TH17細胞に分化する可能性のある細胞群で、減少がみられた。これらの細胞群をセルソーターで分離し、RNAシーケンス、Treg関連遺伝子のエピジェネティック解析(次世代シーケンサー)で行った。

1)~3)の研究をすすめることで、マウス・ヒトレベルでの紫外線(~可視光線)の選択的波長の利用することによるTreg誘導(しかも、nTregとiTregを波長ごとに誘導する可能性)が明らかとなる。表面マーカーの解析(FACS)、RNAシーケンス、Treg関連遺伝子のエピジェネティック解析から、誘導されるTregの詳細なタンパク・遺伝子発現・エピジェネティックプロファイルが明らかとなり、より詳細な波長ごとの特性を明らかにすることができる。これらの結果から、さらに、どのような光生物学的メカニズムによって、波長ごとの特性がえられるか、検討を進めた。

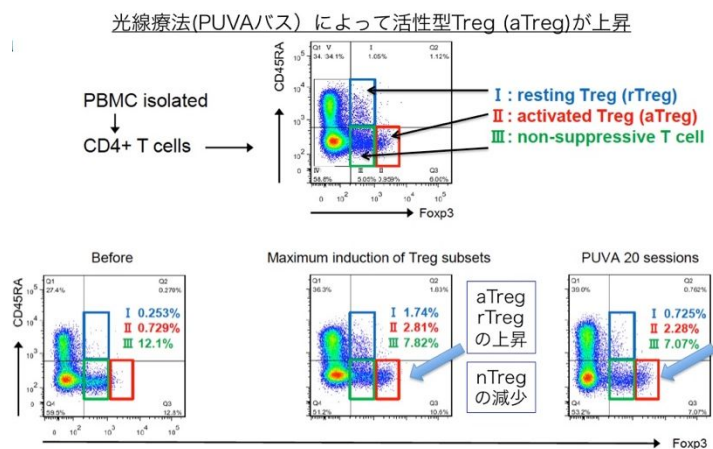
4 . 研究成果

iTreg(誘導性制御性 T 細胞)を誘導する波長解析 遅延型過敏反応(DTH)のマウスモデルを用いた実験では、290~320nm 中で、310nm に遅延型過敏反応の抑制と Treg の誘導が見られた。リンパ節細胞で IL-10 を誘導、IL-17 の抑制、IL-23 の抑制などが明らかとなり、Treg の誘導のみならず、TH17 細胞の誘導を抑えていることが明らかとなった。

nTreg (内在性制御性 T 細胞)の誘導波長解析 抗原の投与していないマウス皮膚にリンパ節・脾臓で CD4+CD25+Foxp3+Neuropilin-1+細胞(nTreg)が、290~300nm で誘導が見られた。ブロードバンド UVB の照射で、7日後で明らかに皮膚とリンパ節で Treg が増加、Neuropilin1 陽性の nTreg であり、Treg 関連の遺伝子におけるメチル化を調べたところ、脱メチル化がみられ、安定した抑制機能のある Treg が誘導されることを明らかとなった。

臨床レベルでの Treg 誘導解析 乾癬では、Treg 数の減少はなく機能不全であることが報告されている。健常人 Treg 存在下では CD4+CD25-Tcells の分裂増殖がほぼ完全に抑制された(94.4%)のに対して、乾癬患者 Treg では完全に抑制できず(70.3%)、抑制能の有意な低下を認めた。乾癬患者の Treg の抑制能の低下は、PUVA バス療法後においてほぼ正常へ回復した

ことから、PUVA バスによる Treg の機能回復が示した。照射開始(PUVA バス)から 5 回ごとに、3つの分画を調べたところ、aTreg (CD4+CD25+Foxp3highCD45RA-) が、明らかに上昇することが明らかとなった。比較的早期に aTreg が上昇し、rTreg も同様に誘導され、非抑制性 Treg の減少もみられた。



マウス皮膚で、Treg が誘導されたことから、ヒトでも同様の Treg の誘導がわかるかどうかを確かめるため、皮疹血として採取したわずかな全血から、細胞解析ができるかどうかの検討を行った。マルチカラーでの FACS 解析、さらに高速セルソーターで、CD4/ CD8 を分離することも成功した。末梢血に比べ、皮疹血では、CD4 および CD8 の population に差があり、制御性 T 細胞の分離にも成功し、現在、RNA シーエンスの解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sayuri Yamazaki, Mizuyu Odanaka, Akiko Nishioka, Saori Kasuya, Shime Hiroaki, Hiroaki Hemmi, Masaki Imai, Dieter Riethmacher, Tsuneyasu Kaisho, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi, Akimichi Morita	4. 巻 200
2. 論文標題 Ultraviolet B-induced maturation of CD11b-type Langerin-dendritic cells control the expansion of Foxp3+ regulatory T cells in the skin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 119-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1701056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ryoji Kubo, Shinnosuke Muramatsu, Yoko Sagawa, Chiyo Sait, Saori Kasuya, Akiko Nishioka, Emi Nishida, Sayuri Yamazaki, Akimichi Morita	4. 巻 86
2. 論文標題 Bath-PUVA therapy improves impaired resting regulatory T cells and increases activated regulatory T cells in psoriasis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 46-53
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jderm.2017.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hideyuki Masuda, Makoto Kimura, Akimichi Morita	4. 巻 93
2. 論文標題 Optimum wavelength characteristics for phototherapy using deep ultraviolet light-emitting diodes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 186-188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jderm.2019.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kyoko Ikumi, Mizuyu Odanaka, Hiroaki Shime, Masaki Imai, Osamu Taguchi, Hiroaki Hemmi, Tsuneyasu Kaisho, Akimichi Morita, Sayuri Yamazaki	4. 巻 139
2. 論文標題 Hyperglycemia is associated with psoriatic inflammationPsoriatic cytokine milieu induces hyperglycemia in psoriasis in patients and mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol	6. 最初と最後の頁 1329-1338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） /10.1016/j.jid.2019.01.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計25件(うち招待講演 0件/うち国際学会 23件)

1. 発表者名 Akimichi Morita
2. 発表標題 New aspects of Phototherapy
3. 学会等名 13th meeting of German-Japanese Society for Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akimichi Morita
2. 発表標題 Regulatory T cell induction prolongs the efficacy for the treatment of psoriasis
3. 学会等名 Psoriasis symposium in Thammasat University (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akimichi Morita
2. 発表標題 New aspects of phototherapy
3. 学会等名 TSID (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideyuki Masuda, Makoto Kimura, Akimichi Morita
2. 発表標題 Wavelength specific gene expression clustering identified by Cap Analysis of Gene Expression in normal human epidermal melanocytes
3. 学会等名 2017 SID annual meeting, April 26-29, 2016, Portland (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Emi Nishida, Kan Torii, Saori Kasuya, Akiko Nishioka, Kyoko Ikumi, Shinnosuke Muramatsu, Akimichi Morita
2. 発表標題 Quantifying of serum IL-17A and TNFa to estimate the formation of psoriatic skin
3. 学会等名 PASI formula, 2017 SID annual meeting, April 26-29, 2016, Portland (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinnosuke Muramatsu, Emi Nishida, Ryoji Kubo, Akimichi Morita
2. 発表標題 Serum TNF- levels in patients with psoriasis treated with biologics
3. 学会等名 2017 SID annual meeting, April 26-29, 2016, Portland (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kyoko Ikumi, Emi Nishida, Akimichi Morita
2. 発表標題 Sacroiliitis susceptibility of psoriatic arthritis in Asian associates with HLA B46
3. 学会等名 2017 SID annual meeting, April 26-29, 2016, Portland (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kan Torii, Akimichi Morita
2. 発表標題 Comparative transcriptome analysis in normal human keratinocytes irradiated with monochromatic UVB wavelength
3. 学会等名 2017 SID annual meeting, April 26-29, 2016, Portland (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akimichi Morita
2. 発表標題 Phototherapy and future development for Dermatology
3. 学会等名 The 1st CICM Academic Meeting " Translation Research: From Bench to Bedside " ,August 28, 2017, Thailand (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideyuki Masuda, Makoto Kimura, Akimichi Morita
2. 発表標題 Wavelength specific gene expression identified by Cap Analysis of Gene Expression in normal human dermal fibroblasts.
3. 学会等名 47th Annual ESDR meeting, 27-30 September, 2017, Salzburg
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kan Torii, Ryoji Kubo, Takuya Furuhashi, Shinnosuke Muramatsu, Yoko Sagawa, Chiyo Saito, Sayuri Yamazaki, Akimichi Morita
2. 発表標題 Photochemotherapy limits Treg plasticity and restores Treg function in psoriasis patients.
3. 学会等名 47th Annual ESDR meeting, 27-30 September, 2017, Salzburg (Poster work) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinnosuke Muramatsu, Kan Torii, Hideyuki Masuda, Akimichi Morita
2. 発表標題 The influence of photoirradiation on the circadian clock genes in human keratinocyte and melanocyte.
3. 学会等名 47th Annual ESDR meeting, 27-30 September, 2017, Salzburg (Poster work) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kyoko Ikumi, Emi Nishida, Akimichi Morita
2. 発表標題 HLA-B46 associates with sacroiliitis susceptibility in patients with psoriatic arthritis.
3. 学会等名 47th Annual ESDR meeting, 27-30 September, 2017, Salzburg (Poster work) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sayuri Yamazaki, Akiko Nishioka, Saori Kasuya, Mizuyu Odanaka, Hiroaki Hemmi, Masaki Imai, Dieter Riethmacher, Tsuneyasu Kaisho, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi, Akimichi Morita
2. 発表標題 The critical role of dendritic cell subset in expanding Foxp3+ regulatory T cells in the murine skin after ultraviolet B exposure.
3. 学会等名 5th International Workshop on Langerhans cell. 6-8 October, 2017, New York (Oral) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akimichi Morita
2. 発表標題 Phototherapy and future development for Dermatology
3. 学会等名 Emirates Derma 2017, Nov 2 2017, Abu Dhabi. UAE (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sayuri Yamazaki, Mizuyu Odanaka, Hiroaki Shime, Masaki Imai, Hiroaki Hemmi, Tsuneyasu Kaisho, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi, and Akimichi Morita
2. 発表標題 Skin dendritic cells expressing a unique set of genes associated with immunological tolerance are specialized to expand thymus-derived Foxp3+ regulatory T cells upon ultraviolet B exposure
3. 学会等名 Japan-Sigapore International Skin Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideyuki Masuda, Makoto Kimura, Akimichi Morita
2. 発表標題 Wavelength characteristics on application of deep ultraviolet light-emitting diodes to phototherapy
3. 学会等名 Society of Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayuri Yamazaki, Mizuyu Odanaka, Hiroaki Shime, Masaki Imai, Hiroaki Hemmi, Tsuneyasu Kaisho, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi, Akimichi Morita
2. 発表標題 Dermal dendritic cells present neo-self antigens induced by ultraviolet B exposure to expand Foxp3+ regulatory T cells
3. 学会等名 Society of Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akimichi Morita
2. 発表標題 Dual wavelength photodynamic therapy using a flexible light-emitting diode unit
3. 学会等名 Photobiology Symposium at the SID 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideyuki Masuda and Akimichi Morita
2. 発表標題 UVA1 phototherapy with suppressed immediate pigment darkening by selective wavelength irradiation
3. 学会等名 ESDR2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akimichi Morita
2. 発表標題 New immunological aspects of phototherapy for refractory skin diseases
3. 学会等名 4th Chinese Society of Investigative Dermatology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sayuri Yamazaki, Mizuyu Odanaka, Hiroaki Shime, Masaki Imai, Hiroaki Hemmi, Tsuneyasu Kaisho, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi, Akimichi Morita
2. 発表標題 Regulatory T cells with a distinctive feature expand through dermal dendritic cells in the ultraviolet B exposed skin
3. 学会等名 16th international workshop on Langerhans cells (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideyuki Masuda and Akimichi Morita
2. 発表標題 UVA1 phototherapy with suppressed immediate pigment darkening by selective wavelength irradiation
3. 学会等名 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akimichi Morita
2. 発表標題 UVA1 phototherapy for the treatment of T cell mediated skin diseases and scleroderma
3. 学会等名 45th annual meeting of TDA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akimichi Morita
2. 発表標題 Dual wavelength photodynamic therapy using a flexible light-emitting diode unit
3. 学会等名 14th annal meeting of TSID (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	山崎 小百合 (Yamazaki Sayuri) (70567255)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授 (23903)	