

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22623

研究課題名(和文) フォトフォレーシスによる制御性T細胞の誘導

研究課題名(英文) Induction of regulatory T cells by utilizing photopheresis

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：血球分離・光増感剤を用いないフォトフェレーシスの開発と制御性T細胞(Treg)の誘導の基盤技術の開発を目的とした。深紫外LEDやフォトニック結晶ファイバーという最先端の光学技術を駆使し、血球分離および光感作物質を必要としないシステムの構築をすすめ、使用する光の分光分布・照射量、最適化を行い、最適な管径、および流速を見出した。UVBを照射が至適であることもあきらかとなった。メカニズムの検証としては、制御性T細胞(Treg)の誘導について、照射後、リンパ球を分離して、Tregと思われる分画のRNAシーケンスを実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フォトフェレーシスは、尋常性天疱瘡やリウマチ性血管炎、全身性ループスエリテマトーデスなどさまざまな自己免疫疾患において有効であり、さらに心臓移植後の拒絶反応の抑制や宿主対移植片病(GvHD)にも有効であることが明らかとなった。フォトフェレーシスの普及を阻害している要因として、血球分離が必要なこと、光増感剤を使用することなどが挙げられる。そのため、血球分離および光増感剤を用いないフォトフェレーシスの開発とフォトフォレーシスによるアレルギー・免疫疾患治療を対象にした効率的な制御性T細胞(Treg)の誘導の基盤技術は、必要とされるものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop photopheresis without blood cell separation and photosensitizers, and to develop basic technology for induction of regulatory T cells (Treg). I have developed a system that does not require blood cell separation or photosensitizers using state-of-the-art optical technologies such as deep-ultraviolet LEDs and photonic crystal fibers. To verify the mechanism of Treg induction, lymphocytes were isolated after irradiation, and RNA sequencing was performed on the fraction of lymphocytes that appeared to be Tregs.

研究分野：光医学

キーワード：フォトフェレーシス 制御性T細胞 自己免疫疾患 アレルギー疾患 光線療法

## 1. 研究開始当初の背景

フォトフェレーシス ( photopheresis ) 別名、体外循環式光化学療法 ( extracorporeal photochemotherapy: ECP ) は、血液の体外循環と紫外線を用いた治療法であり、3つの工程で行われる。1) 患者血液より白血球分画を遠心分離し、赤血球や血漿成分を患者血液に戻す。2) 白血球分画に光増感物質 ( 8-methoxypsoralen ) を添加し、UVA を照射する。3) 照射後にこの白血球分画を患者の循環血液に戻す。フォトフェレーシスは皮膚 T 細胞性リンパ腫の治療として、抗腫瘍効果をもちつつも副作用の少ない方法として開発された。その後、自己免疫疾患である全身性ループスエリテマトーデス、クローン病、重症アトピー性皮膚炎など様々な疾患において有効性・安全性が確認され、動物実験・臨床研究から、これら自己 ( 炎症性 ) 免疫疾患に対する作用機序が、全身的な免疫抑制のない制御性 T 細胞 ( Treg ) 誘導がメインであると推定されている。Treg 細胞は、坂口志文博士 ( 大阪大学免疫学フロンティア研究センター特別教授 ) が、自己免疫疾患やアレルギーを抑制する機能を持つ T 細胞として発見されたもので、自己免疫疾患や炎症性疾患、アレルギー疾患などを引き起こす過剰な免疫応答を抑制する役割を担っている。しかし、体外で抗原特異的な Treg を誘導することはまだ容易ではなく、その臨床応用の実現が待ち望まれている。Treg の細胞導入は、自己免疫疾患やアレルギー性疾患の根治 ( 治癒 ) につながる可能性があり、心臓移植後の拒絶反応の抑制や宿主対移植片病 ( GvHD ) にも有効性が認められた。米国では 1988 年に皮膚 T 細胞リンパ腫の第一選択治療として FDA 認可を受けており、全米で 100 施設以上のフォトフェレーシスセンターが設立されている。海外でも Cellex ( Therakos )、UVAR XTS ( Therakos ) の 2 機種が使用されているのみで、本邦においてはその導入もなく、未承認の治療法である。血球分離および光増感剤を用いない革新的なフォトフェレーシスの開発とフォトフェレーシスによる効率的な Treg の誘導の基盤技術開発、疾患応用への基礎研究および最適化された光照射ユニットの開発までを目指す。

## 2. 研究の目的

フォトフェレーシスの普及を阻害している要因として、血球分離が必要なことによる装置の大型化、光増感剤を使用することによる遮光管理等が挙げられる。そこで我々は、システムの簡略化を目的に、深紫外 LED やフォトニック結晶ファイバー等の新たな工学 ( 光学 ) 技術を用い、血球分離および光感作物質を必要としないシステムの構築を進める。

## 3. 研究の方法

### < フォトニック結晶ファイバーの最適化 >

フォトニック結晶ファイバーは、光ファイバー断面に空孔や高屈折率ガラスを規則的・周期的に配列した構造を持つものである。紫外線透過能を有する石英管に複数の空孔を設け、その中に全血を流すことで、遠心分離を用いなくとも必要な照射量を標的細胞である白血球に照射することが可能となると考えている。最適な管径、および流速を見出し、単空孔でのシステムは処理流量が非常に少ないため、現実的な流用を処理するためには、複数の空孔を用いることが必要となる。単空孔・複数空孔を用いた際の、空孔径、孔数、長さ、流量を決定する。

### < 照射方法の最適化 >

これまでの研究において従来フォトフェレーシスにて使用されている UVA よりも短い波長である UVB ( 290 ~ 320nm ) を照射することで、光感作物質を用いなくとも同様の効果が期待できることが検証されている。UVB 光源としては、近年出力向上が著しい深紫外 LED を用いることで大幅な装置の小型化、長寿命化が期待される。サファイア基板 AlGaIn 系深紫外光 LED は深紫外の中でも長波側に適した材料である。本 UV-LED を用い、分光分布・放射照度・照射量、さらにはパルス照射等、照射方法の最適化を行う。

### < メカニズムの検証-Treg 誘導 >

フォトフェレーシスのメカニズムについては、標的細胞のアポトーシス、樹状細胞を介した免疫反応の誘導、制御性 T 細胞 ( Treg ) の誘導などのいくつかの仮説が提唱されているが、未だ不明な部分が多く残る。

これまでの研究において、マウスでの UVB の照射により皮膚で Treg が誘導されることを見出している(Yamazaki S, Morita A, et al. J Immunol 2014, J Immunol 2017)。高速セルソーター (BD FACS melody) を用いたシングルセル解析や次世代シーケンサ (Mini-Seq) によるトランスクリプトーム解析を行いメカニズムの解明を進める。

#### 4 . 研究成果

血球分離および光増感剤を用いないフォトフェレーシスの開発とフォトフェレーシスによる効率的な制御性 T 細胞 (Treg) の誘導の基盤技術の開発を目的とした。フォトフェレーシスの普及を阻害している要因として、血球分離が必要なこと、光増感剤を使用することなどが挙げられる。深紫外 LED やフォトニック結晶ファイバーという最先端の光学技術を駆使し、血球分離および光感作物質を必要としないシステムの構築を進めた。フォトニック結晶ファイバーの最適化、分光分布、放射照度、照射量などの照射方法の最適化の検討を行った。従来フォトフェレーシスにて使用されている UVA よりも短い波長である UVB (290 ~ 320nm) を照射することで、光感作物質を用いなくとも同様の効果が期待できることが明らかとなった。フォトニック結晶ファイバーは、光ファイバー断面に空孔や高屈折率ガラスを規則的・周期的に配列した構造を持つものである。紫外線透過能を有する石英管に複数の空孔を設け、その中に全血を流すことで、遠心分離を用いなくとも必要な照射量を標的細胞である白血球に照射することが可能となると考えている。単空孔の系については、遠心分離を用いなくとも、必要な照射量を標的細胞である白血球に照射することが可能であり、最適な管径、および流速を見出した。現実的な流用を処理するためには、複数空孔を用いた際の、空孔径、孔数、長さ、流量を決めた。また、さらには、照射方法の最適化として、UVB 光源として、深紫外 LED を用い、分光分布・放射照度・照射量、照射方法の最適化を行った。メカニズムの検証としては、制御性 T 細胞 (Treg) の誘導について、照射後、リンパ球を分離して、Treg と追われる分画の RNA シークエンスを実施した。現在解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田明理
2. 発表標題 紫外線の波長特性を利用した難治性皮膚疾患への応用
3. 学会等名 光医学・光生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 制御性T細胞の誘導方法	発明者 森田明理、益田秀之	権利者 名古屋市立大学、ウシオ電機
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2020-112482	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 フォトフェレーシスのための紫外光照射方法、フォトフェレーシス用マイクロデバイス、および、フォトフェレーシス用紫外光照射装置	発明者 森田 明理, 益田 秀之, 木村 誠, 影林 由郎, 浜島 健	権利者 名古屋市立大学、ウシオ電機
産業財産権の種類、番号 特許、PCT / JP 2019 / 015477	取得年 2019年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------