

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461429

研究課題名(和文) ナローバンドUVBによる制御性T細胞の誘導を介したGVHDに対する新規治療の開発

研究課題名(英文) Novel strategy against GVHD using NB-UVB with expansion of Treg cells

研究代表者

佐藤 勉 (Sato, Tsutomu)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40404602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Graft versus host disease (GVHD)は、同種造血幹細胞移植における代表的な合併症であり、免疫抑制剤などでこれの十分なコントロールが得られない場合、患者の生命予後は著しく不良である。一方、これまで申請者らは、難治性皮膚GVHDの症例にnarrow-band ultraviolet B (NB-UVB)を照射する自主臨床研究を行って、この紫外線療法の優れた効果を報告してきた。そこで今回、マウスの移植モデルを用いて、NB-UVB照射が消化管や肝のGVHDにも有効か検討した。

研究成果の概要(英文)：Narrowband ultraviolet B (NB-UVB) has been widely used in dermatological phototherapy. As for the application of NB-UVB phototherapy to GVHD, we previously reported that it was highly efficacious for cutaneous lesions of acute GVHD (aGVHD) and that expansion of regulatory T (Treg) cells induced by NB-UVB might be one of the mechanisms. In order to examine whether NB-UVB irradiation through expansion of Treg cells is effective for the treatment of not only cutaneous aGVHD but also aGVHD of inner organs such as the intestine or liver, we conducted experiments in which a murine lethal aGVHD model, characterized by severe involvement of the intestine, were irradiated with NB-UVB. We found that NB-UVB irradiation improved the clinical score and survival rate. The numbers of infiltrating Treg cells in inflamed tissue of the intestine and those in spleen were increased in mice treated with NB-UVB.

研究分野：血液

キーワード：GVHD NB-UVB

### 1. 研究開始当初の背景

Graft versus host disease (以下、GVHD)は、同種造血幹細胞移植における代表的な合併症のひとつである。急性GVHDが重症化すると患者の生存率は低下し、慢性GVHDが遷延すると患者の quality of life (QOL)が著しく低下する。これらの予防・治療を目的として、メソトレキセートや副腎皮質ホルモン、抗胸腺細胞グロブリンやカルシニューリン阻害剤などが使われているものの、十分な効果が得られない場合や、口内炎や免疫抑制による感染症、微小血管障害などの副作用に難渋する場合がある。

一方、これまで申請者らは、GVHDの発症における制御性T細胞 (Regulatory T cells; 以下、Treg) の関与について検討し、Tregの細胞数やテロメラーゼ活性、Bcl-2の発現と慢性GVHDの重症度には負の相関があることを明らかにした (Kawano Y, Blood. 2012)(1)。また一方で申請者らは、治療抵抗性の皮膚GVHDに対して narrow-band ultraviolet B (以下、NB-UVB)の照射を行い、この紫外線療法が極めて有効な治療法であることを発表してきた (2012年第34回造血幹細胞移植学会など)。

紫外線療法は尋常性乾癬やアトピー性皮膚炎などの皮膚科疾患に効果があり、長波長315-380 nmの ultraviolet A (以下、UVA)が主に用いられている。UVAは強い組織浸透力を有するもののエネルギーが弱く、増感剤である Psoralen の併用が必要であるため、同薬剤の内服・外用を組み合わせたPUVA療法が一般的である。中波長280-315 nmの ultraviolet B (以下、UVB)を照射に用いる場合もあるが、皮膚熱傷の副作用が用量規定因子となり、必ずしも十分量を照射できない。近年では、UVBから皮膚熱傷の原因となる波長を除き、311-312 nmと極めて狭い波長のUVB、すなわちNB-UVBを発する蛍光管が開発され、安全性や簡便さの点から皮膚科領域で徐々に普及しつつある。

上述のように我々は、このNB-UVB療法を自主臨床研究として治療抵抗性の皮膚GVHDに試みている。急性型は6例でGradeはI-II、慢性型は5例でScoreは2-3、1回の照射線量は300-1,400 mJ/m<sup>2</sup>で、平均総量は7,750 mJ/m<sup>2</sup> (10.5分割)であった。結果、急性型では83%、慢性型では40%の奏功率 (CR+PR)が得られた。照射による副作用はGrade 2の皮膚色素沈着を認めるのみだった。その後、同療法が効果を発揮する機序を解析したところ、奏功例では照射によって末梢血中のTregが増加していた。皮膚に照射したNB-UVBが末梢血のTregを増加させたという事実は、NB-UVB療法が皮膚のみならず肝臓や消化管、肺のGVHDなどにも有効である可能性を示唆している。実際、我々の検討において、難治性皮膚GVHDにNB-UVBを照射したところ、他に併用する治療がなかったにも関わらず、Grade IIの消化管GVHD

が軽快した症例を経験している。

一方、海外からは、GVHDに対する Extracorporeal photopheresis (以下、ECP)の有効性が報告されている (2)。このECP療法は、体外循環で患者単核球を採取し、これに対し8-methoxypsoralen存在下でUVAを照射した後、患者へ戻す治療法である。急性型では50%、慢性型では44%の奏功率 (CR+PR)が得られ、GVHDに対する新たな治療の選択肢として期待されている。しかしながら、もしNB-UVBを皮膚へ照射するだけで各臓器のGVHDが改善するならば、より簡便で特記すべき副作用のないNB-UVB療法はECP療法と同等かそれ以上の選択肢となる可能性がある。更に、移植する骨髄へNB-UVBを事前照射することにより、生着率を低下させずにGVHDを予防することが可能であれば、現在GVHD予防に用いられているメソトレキセートやカルシニューリン阻害剤などの適応や容量が変わる可能性もある。

<文献>

(1) Kawano Y, et al. Blood.

2011;118(18):5021-5030

(2) Hautmann AH, et al. Bone Marrow Transplant. 2012;27 [Epub ahead of print]

### 2. 研究の目的

本研究では、まずマウスのGVHDモデルを用いて、NB-UVB照射が皮膚GVHDのみならず、肝や消化管のGVHDにも有効か検討する。また、その機序としてNB-UVB照射がTregに及ぼす影響を解析する。具体的には、レシピエントのBALB/cマウスに前処置の全身放射線照射を行う。ドナーのC57BL/6マウスから骨髄細胞と脾細胞を採取、これをレシピエントマウスへ移植し、翌日からシクロスポリンを投与する。更に、NB-UVB照射を併用し、マウスの生存、臨床的なGVHDの評価および組織学的な検討を行う。また、末梢血ではフローサイトメトリー法でTregの半定量を行う。

次に、ドナーマウスから採取した骨髄細胞と脾細胞にNB-UVBを直接照射し、これをレシピエントマウスへ移植する実験系において、NB-UVB照射による移植片への前処置がGVHDを予防するか検討する。また、その機序としてNB-UVB照射がTregに及ぼす影響を解析する。具体的には、ドナーのC57BL/6マウスから骨髄細胞と脾細胞を採取、これに対してNB-UVBの直接照射を行った後、レシピエントマウスへ移植する。レシピエントのBALB/cマウスには、あらかじめ全身放射線照射を行う。翌日からシクロスポリンを投与し、マウスの生存、臨床的なGVHDの評価および組織学的な検討を行う。また、末梢血ではフローサイトメトリー法でTregの半定量を行う。

### 3. 研究の方法

## GVHD マウスモデル

レシピエントのメス BALB/c マウス (H-2<sup>d</sup>, CD45.2<sup>+</sup>) には、10-12 週齢で総量 8 グレイ (<sup>60</sup>Co 線) の全身放射線照射 (total body irradiation: TBI) を移植前処置として行う。一方、ドナーのメス C57BL/6 マウス (B6, H-2<sup>b</sup>, CD45.2<sup>+</sup>) 10-12 週齢から大腿骨、脛骨および脾臓を摘出する。大腿骨と頸骨はその骨端を切離し、一端から注射針を用いて細胞培養液を骨髓腔へ注入することで骨髓細胞を放出させる。脾臓は細切することで細胞を遊離させ、組織片はフィルターで分離する。骨髓細胞と脾細胞の比を 2:1 で 1×10<sup>8</sup> 個/mL に調整し、これの 0.2 mL を TBI 終了後のレシピエントマウス尾静脈へ投与する。移植の 1 週間前から 2 週間後まで、250 mg/L のエリスロマイシンと 320 mg/L のゲンタマイシンを飲水に混合して投与する。移植の翌日からは、15 mg/kg/day のシクロスポリン (以下、CsA) を腹腔内へ投与する。

## 発症した GVHD に対する NB-UVB の治療効果

CsA 非投与群をコントロールとし、CsA 投与単独群 (以下、CsA 群)、NB-UVB 照射単独群 (以下、NB-UVB 群) と CsA 投与および NB-UVB 照射併用群 (以下、CsA + NB-UVB 群) を比較する。コントロール群、CsA 群、NB-UVB 群、CsA+NB-UVB 群のマウスはいずれも TBI の前に剃毛を行い、NB-UVB 群と CsA+NB-UVB 群には移植の 1 週間後から週に 3 回で NB-UVB の照射を行う。1 回の照射量は 1,000 mJ/cm<sup>2</sup> とし、背側からと腹側からの 2 回行う。照射には、フィリップス社製の NB-UVB 蛍光灯 (PL-L36W/TL01) を 2 本搭載した装置を用いる。これは、今回の研究のために作製したオリジナルの照射装置である (図 2)。移植後、マウスの生死は連日で確認する。臨床的な GVHD の検討は週に 2 回行う。評価項目は、体重減少、姿勢 (いわゆる hunching)、活動性、毛並み、皮膚の状態、とする。これらの指標はそれぞれ Grade 0 から 2 までの 3 段階で評価する (Blood 88: 3230-3239, 1996)。皮膚、肝臓、腸管については組織学的な検討も行う。組織はホルマリン固定とパラフィン包埋の後に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行う。皮膚に関しては萎縮とリンパ球浸潤を、肝臓は門脈周囲へのリンパ球浸潤を、腸管は陰窩のアポトーシス細胞数を評価する (J Exp Med 194: 1433-1440, 2001)。更に、末梢血では Treg の解析を行う。コントロール群、CsA 群、NB-UVB 群、CsA+NB-UVB 群のマウスから、NB-UVB の照射開始と同時に週 1 回の採血を行う。フローサイトメトリー法で CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> の T 細胞を分画し、これを Treg として半定量を行う。

## 移植片への NB-UVB 照射による GVHD 予防効果

ドナーのメス C57BL/6 マウスから大腿骨、脛骨および脾臓を摘出する。大腿骨と頸骨は

その骨端を切離し、一端から注射針を用いて細胞培養液を骨髓腔へ注入することで骨髓細胞を放出させる。脾臓は細切することで細胞を遊離させ、組織片はフィルターで分離する。骨髓細胞と脾細胞の比を 2:1 で混合して 1×10<sup>8</sup> 個/50 mL に調整し、これに対して 0、500、1,000、1,500 mJ/cm<sup>2</sup> の NB-UVB 照射を行う。照射後 1×10<sup>8</sup> 個/mL に調整し、これの 0.2 mL を TBI 終了後のレシピエントマウス尾静脈へ投与する。レシピエントのメス BALB/c マウスには総量 8 グレイの TBI を移植前処置として行う。移植の 1 週間前から 2 週間後まで、250 mg/L のエリスロマイシンと 320 mg/L のゲンタマイシンを飲水に混合して投与する。移植の翌日からは、15 mg/kg/day の CsA を腹腔内へ投与する。移植後、マウスの生死は連日で確認する。臨床的な GVHD の検討は週に 2 回行う。皮膚、肝臓、腸管については組織学的な検討も行う。更に、末梢血では Treg の解析を行う。移植の 1 週間後から週 1 回の採血を行い、フローサイトメトリー法で CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> の T 細胞を分画して半定量する。

## 4. 研究成果

NB-UVB 群では Treg の誘導と GVHD の改善が認められた。

移植片への NB-UVB 照射は骨髓の生着を遅延させず、GVHD の発症を予防した。

深部臓器の GVHD に対する NB-UVB を用いた治療の試みは国内外で報告されておらず、インパクトのある結果が得られた。

今後は実臨床への応用を検討したい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Hashimoto A, Sato T, Iyama S, Yoshida M, Ibata S, Tatekoshi A, Kamihara Y, Horiguchi H, Murase K, Kawano Y, Takada K, Miyanishi K, Kobune M, Ichimiya S, Kato J. Narrow-Band Ultraviolet B Phototherapy Ameliorates Acute Graft-Versus-Host Disease of the Intestine by Expansion of Regulatory T Cells. PLoS One. 2016 Mar 31;11(3):e0152823.

2. Iyama S, Murase K, Sato T, Hashimoto A, Tatekoshi A, Horiguchi H, Kamihara Y, Ono K, Kikuchi S, Takada K, Kawano Y, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Mori S, Kato J, Yamashita T, Kato J. Narrowband ultraviolet B phototherapy ameliorates acute graft-versus-host disease by a mechanism involving in vivo expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. Int J Hematol. 2014 Apr;99(4):471-6.

3. Ono K, Sato T, Iyama S, Tatekoshi A, Hashimoto A, Kamihara Y, Horiguchi H, Kikuchi S, Kawano Y, Takada K, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin. Blood Cancer J. 2014 Feb 7;4:e180.

〔学会発表〕(計4件)

1. Yoshida M, Sato T, Tatekoshi A, Hashimoto A, Murase K, Takada K, Iyama S, Takimoto R, Kobune M, Kato J: Denosumab for prevention of bone loss in patients with lymphoma receiving chemotherapy with steroids. 第77回日本血液学会学術集会, 2015年10月16-18日, 石川県立音楽堂(石川県金沢市).

2. 佐藤勉, 黒田裕行, 長町康弘, 井山諭, 藤見章仁, 神原悠輔, 小沼祐一, 村瀬和幸, 高田弘一, 瀧本理修, 小船雅義, 平山泰生, 加藤淳二: 減量ボルテゾミブ・レナリドミド・デキサメタゾン併用療法(sVRD)による多発性骨髄腫のメンテナンス. 第40回日本骨髄腫学会学術集会, 2015年5月16-17日, くまもと森都心プラザ(熊本県熊本市).

3. 佐藤勉, 井山諭, 高田弘一, 井畑壮詞, 舘越結美, 橋本亜香利, 神原悠輔, 堀口拓人, 小野薫, 村瀬和幸, 瀧本理修, 小船雅義, 加藤淳二: ソレドロン酸からデノスマブに切り替えた多発性骨髄腫における骨髄代謝マーカーの検討. 第39回日本骨髄腫学会学術集会, 2014年5月17-18日, 掛川グランドホテル(静岡県掛川市).

4. Ono K, Sato T, Iyama S, Yamaguchi A, Hashimoto A, Kamihara Y, Horiguchi H, Takada K, Hayash T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J: Novel strategy inducing autophagy for Burkitt's lymphoma with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin. 第75回日本血液学会学術集会, 2013年10月11-13日, ロイトン札幌(北海道札幌市).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
佐藤 勉(Sato Tsutomu)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 40404602

(2)研究分担者  
井山 諭(Iyama Satoshi)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 50398319

(3)連携研究者  
河野 豊(Kawano Yutaka)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 80398320