

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16275

研究課題名（和文）皮膚T細胞性リンパ腫における紫外線療法の免疫学的メカニズムの解明

研究課題名（英文）Immunological Mechanisms of Ultraviolet Therapy in Cutaneous T-Cell Lymphoma

研究代表者

古舘 禎騎（Furudate, Sadanori）

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：90781279

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：紫外線で角化細胞から誘導される物質（FICZ）が皮膚T細胞性リンパ腫（CTCL）において腫瘍細胞、腫瘍随伴性マクロファージ（TAMs）に与える影響を調べた。FICZ刺激で誘導される物質にPAI-1、MMP-9など血管新生因子が含まれていた。CTCL（腫瘍期）の血清ではPAI-1が有意に上昇し、MMP-9がPAI-1の増加に並行して増加していた。TAMsに対するPAI-1の作用を検証したところ、PAI-1はMMP-9の産生を増加させた。さらにPAI-1はCTCL細胞株においてMMP-9の産生を増加させ、MMP-9をマウスCTCLモデルで抑制すると腫瘍内の血管内皮細胞が減少することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではPAI-1の抑制がCTCLにおいて重要な役割を果たすことが示され、CTCLに対してPAI-1阻害薬が有効である可能性を示された。将来的にはCTCLの治療薬としてPAI-1阻害薬の適応拡大が進められることが期待される。以上、本研究は研究期間中に新たなCTCLの生物学的メカニズムを解明したことに加え、近い将来の新規CTCL治療薬の開発につながる画期的な研究であったと考える。

研究成果の概要（英文）：The effect of a substance induced from keratinocytes by ultraviolet light (FICZ) on tumor cells and tumor-associated macrophages (TAMs) in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) was examined. The effect of PAI-1 on TAMs was examined, and PAI-1 increased the production of MMP-9. Furthermore, PAI-1 increased MMP-9 production in CTCL cell lines, confirming that suppression of MMP-9 in the mouse CTCL model reduced vascular endothelial cells in the tumor.

研究分野：皮膚科学

キーワード：菌状息肉症 CTCL M2マクロファージ 紫外線 FICZ PAI-1 MMP-9

### 1. 研究開始当初の背景

菌状息肉症を含むCTCLは、早期病変には紫外線が治療に用いられるが、進行期には無効であることが知られている。また、海外の臨床試験の結果から、進行期のCTCLの治療に抗PD-1抗体で一定の治療効果を認めることから、進行期CTCLでは、紫外線が遺伝子変異量に影響を与えることが推測されるが、紫外線のCTCL腫瘍微小免疫環境に与える影響に関する研究は限られている。これまで我々は、紫外線により皮膚で誘導される芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon receptor: AhR) の一つである6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) が、ヒト表皮ケラチノサイトからのIL-17関連因子を増幅し、上皮系皮膚悪性腫瘍の進展に関与することを明らかにしてきた。IL-17は皮膚の抗菌ペプチドであるLL37の樹状細胞やマクロファージなど単球由来細胞で上昇すること、LL37は抗原提示細胞における自己抗原の取り込みを増加することが知られている。

### 2. 研究の目的

本研究は環境因子の皮膚T細胞性リンパ腫(以下CTCL)腫瘍内微小環境に与える影響を腫瘍随伴性マクロファージ(Tumor-associated macrophages: TAMs)を中心に解析することにより明らかにすること、および早期と進行期CTCLにおける紫外線の役割をAhRリガンドにより誘導される免疫反応をTAMs中心に解析し、紫外線が早期および進行期CTCL進行に与える影響をTAMs中心に解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 紫外線のTAMsに与える影響をCTCLモデルマウスで検証する

はじめに、EL4マウスCTCLモデルにより、UVBのCTCL増殖に与える影響をin vivoで検証する。EL4をC57BL6マウスに $2 \times 10^5$ を接種し、腫瘍が4-5mm大になった後にUVB照射を $5 \text{ kJ/m}^2$ で510秒照射する。照射後24時間後に腫瘍を回収し腫瘍全体からmRNAを抽出し、各種炎症性ケモカインおよび抑制型ケモカインmRNAの発現を定量的PCRで検証する。また同様に作成したEL4マウスCTCLモデルにUVB照射し、照射後24時間後に腫瘍を回収し、腫瘍をgentle MACSで処理したのちに、MACSを用いて死細胞除去後にCD11bを分離、LPS  $0.5 \mu\text{g/ml}$ で刺激し、48時間後に培養上清を回収しELISAを用いて上記ケモカインの産生をELISA法で確認する。

#### (2) ヒト単球由来M2マクロファージに対するAhRリガンドの影響の検討

In vitroで健常人末梢血のCD14よりM-CSFにより誘導した未分化M2マクロファージおよび、5日目にIL-4もしくはペリオスチンで刺激した成熟マクロファージにFICZを複数の濃度で刺激し、6時間後の各種炎症性ケモカインおよび抑制型ケモカインmRNAの発現を定量的PCRで検証し、紫外線療法により腫瘍内に誘導されるT細胞サブセット(Th1, Th2, Th17, Tregsなど)を予測する。また、上記培養上清を48時間後に回収し、ELISA法により上記ケモカイン産生をタンパクレベルで実証する。

#### (3) ヒト菌状息肉症検体における炎症性サイトカイン、ケモカインの同定

菌状息肉症の斑状期から腫瘍期までの3グループにおいて、IL-17, IL-23, IL-36g, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CXCL10, LL37, MMP-9などの免疫染色を行い、腫瘍の局所浸潤度とこれら免疫染色の結果をデジタル顕微鏡で定量化後に統計学的に相関性を検証する。

#### 4 . 研究成果

研究期間全般を通して、本研究開発により、紫外線でケラチノサイトから誘導されるトリプトファン代謝物である6-Formylindo(3,2b)carbazole (FICZ) が皮膚T 細胞性リンパ腫 (CTCL) において腫瘍細胞および腫瘍随伴性マクロファージ (Tumor-associated macrophages: TAMs) など腫瘍間質細胞に与える明らかにした。さらにFICZ 刺激で誘導される物質にPAI-1、MMP-9 など血管新生因子が複数含まれていることが明らかになった。そのため、さらに紫外線により誘導されるPAI-1 のCTCL への影響を検証するため、CTCLで最も多いフェノタイプである菌状息肉症の腫瘍進行に与える影響をヒト臨床検体で評価した。その結果、菌状息肉症の腫瘍期の患者血清では、斑状期・局面期に比べてPAI-1 濃度が有意に上昇していること、血管新生因子の中でMMP-9 がPAI-1 の増加に並行して腫瘍期患者の血清中で増加していること、これら腫瘍期患者の血清は、ヒト真皮血管内皮細胞のtube formation を促進することが明らかになった。以上から腫瘍期患者は真皮における血管新生が促進することにより、腫瘍が進行することが示された。また、CTCL におけるTAMs の表現系であるM2 マクロファージを単球から誘導し、PAI-1 の作用を検証したところ、PAI-1 はM2 マクロファージからMMP-9 やVEGF-A の産生を増加させることが明らかとなった。さらにPAI-1 はCTCL 細胞株であるHUT78 においてもMMP-9 の産生を増加させることが示された。実際にMMP-9 をマウスCTCL モデル (EL-4) で抑制すると、腫瘍内の血管内皮細胞が減少することがin vivo で確認された。以上の結果を2024 年に欧州英文雑誌 Hematological Oncology に発表した。

本研究により、紫外線/PAI-1/MMP-9 の経路により、CTCL では血管新生亢進に伴う腫瘍形成の促進が生じることが明らかとなった。実際にマウスCTCL モデル (EL-4) でMMP-9 を抑制すると、腫瘍内の血管内皮細胞が減少することがin vivo で確認されており、MMP-9 の抑制がCTCL における腫瘍期への移行抑制に効果があることが示唆された。注目すべきことに、さらに本研究でMMP-9 はPAI-1 によりCTCL 腫瘍細胞やTAMs から誘導されることが示されており、PAI-1 の抑制がCTCL において重要な役割を果たすことが示された。現在、PAI-1 阻害薬は東北大学の共同研究者がすでに複数の癌腫で臨床試験が行っており、その血管新生抑制効果や免疫チェックポイントへの作用から皮膚悪性腫瘍分野ではメラノーマと血管肉腫で医師主導第II 相試験が行われており、すでにメラノーマではProof of concept を達成して第III 相試験の準備が開始している。今回の研究成果は上記 2 癌腫に加えてCTCLに対してもPAI-1阻害薬が有効である可能性を示しており、将来的にはCTCLの治療薬としてPAI-1 阻害薬の適応拡大が進められることが期待される。以上、本研究は研究期間中に新たなCTCL の生物学的メカニズムを解明したことに加え、近い将来の新規CTCL 治療薬の開発につながる画期的な研究であったと考える。

## 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 2件）

1. 著者名 Fujimura T, Furudate S, Maekawa T, Kato H, Ito T, Matsushita S, Yoshino K, Hashimoto A, Muto Y, Ohuchi K, Amagai R, Kambayashi Y, Fujisawa Y.	4. 巻 3
2. 論文標題 Cutaneous angiosarcoma treated with taxane-based chemoradiotherapy: A multicenter study of 90 Japanese cases.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Skin Health Dis.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ski2.180	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 Amagai R, Kambayashi Y, Ohuchi K, Furudate S, Hashimoto A, Asano Y, Fujimura T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Cutaneous T-cell lymphoma treated with mogamulizumab monotherapy and mogamulizumab plus etoposide combined therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dermatol Ther.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dth.15858	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Amagai M, Furudate S, Ohuchi K, Takahashi T, Yamazaki E, Chiba H, Asano Y, Fujimura T	4. 巻 15
2. 論文標題 Successful treatment of primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma with denileukin diftitox.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Case Rep Oncol.	6. 最初と最後の頁 726-731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000526312	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 Taku Fujimura, Kentaro Ohuchi, Tetsuya Ikawa, Yumi Kambayashi, Ryo Amagai, Sadanori Furudate, Yoshihide Asano	4. 巻 42
2. 論文標題 Possible effects of plasminogen activator inhibitor-1 on promoting angiogenesis through matrix metalloproteinase 9 in advanced mycosis fungoides	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Hematological Oncology	6. 最初と最後の頁 e3244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hon.3244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

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

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
---------	---------