



Title	HSP47 siRNA含有ビタミンA結合リポソームは慢性移植片対宿主病の皮膚線維化を改善する
Author(s)	山川, 知宏
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第12840号
Issue Date	2017-09-25
DOI	10.14943/doctoral.k12840
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/71106
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2344
File Information	Tomohiro_Yamakawa.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

HSP47 siRNA 含有ビタミン A 結合リポソームは
慢性移植片対宿主病の皮膚線維化を改善する
(Vitamin A-coupled liposomes containing siRNA against
HSP47 ameliorate skin fibrosis in chronic graft-versus-host
disease)

2017 年 9 月
北海道大学
山川 知宏

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	4 頁
実験方法	5 頁
実験結果	12 頁
考察	28 頁
総括および結論	32 頁
謝辞	33 頁
引用文献	34 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

1. Tomohiro Yamakawa, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Shuichiro Takahashi, Miyono Miyazaki, Kenjiro Minomi, Yoshiro Niitsu, Masahiro Onozawa, and Takanori Teshima. Vitamin A-coupled liposomes containing siRNA against HSP47 ameliorate skin fibrosis in chronic graft-versus-host disease.

Blood 2017. submitted

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Tomohiro Yamakawa, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Shuichiro Takahashi, Miyono Miyazaki, Kenjiro Minomi, Yoshiro Niitsu, Masahiro Onozawa, and Takanori Teshima. Vitamin A-coupled liposomes carrying siRNA against HSP47 ameliorate skin fibrosis in chronic graft-versus-host disease.

58th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting, Dec 5th, 2016, San Diego, California, USA

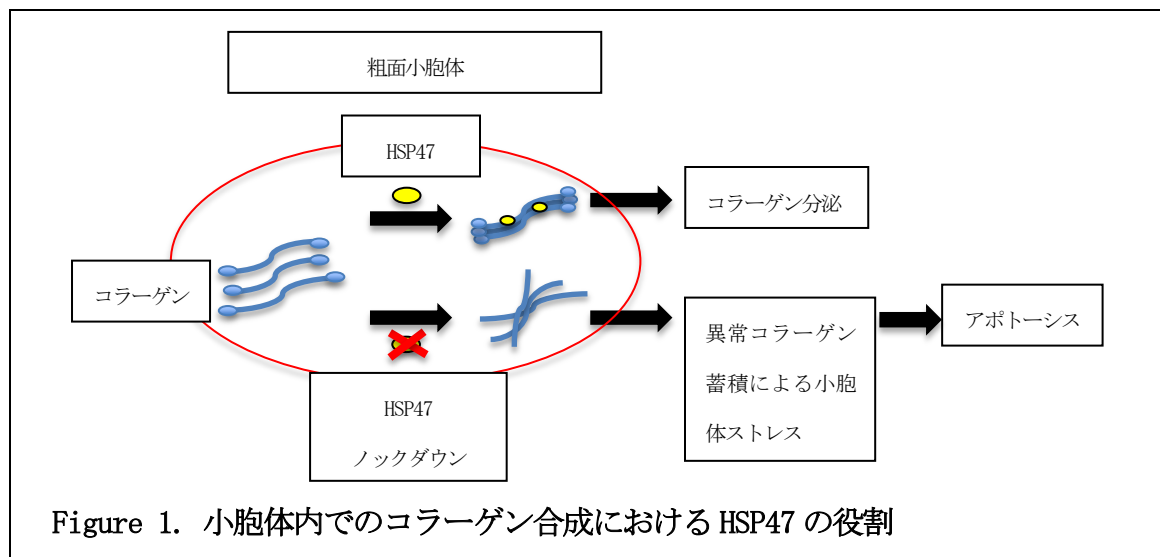
緒言

同種造血幹細胞移植は、難治性の血液悪性疾患に対して治癒の望める重要な治療法である。移植後には様々な合併症が生じるが、なかでも移植片対宿主病 (graft-versus-host disease; GVHD) は、ドナーの移植片中に存在するアロ反応性のドナーT細胞が、レシピエント組織のアロ抗原を認識して傷害する医原性疾患であり、しばしば致命的となる重大な合併症である。近年の急性 GVHD に対する予防・治療法の発展と支持療法の改善により、移植後長期生存する患者が増加しており¹、相対的に慢性 GVHD の発症が増加している²。慢性 GVHD は、皮膚、肝臓、腸管、肺、唾液腺など様々な臓器を標的とし、患者の生活の質に重大な影響を与える³。慢性 GVHD は、炎症反応の遷延による、組織の線維化を主病態としている⁴。慢性 GVHD の治療は、副腎皮質ステロイドの全身投与が標準になっているが、免疫抑制作用が強いため、感染症の発症や抗腫瘍性免疫の減弱を招く可能性があり、治療成績は必ずしも満足のものではない^{5,6}。更に、副腎皮質ステロイドによる一次治療が奏功しなかった場合の二次治療に関しては、標準的治療法が存在しないのが現状である。以上より、慢性 GVHD に対して、免疫抑制作用が少ない新規治療法の開発が急務であると言える。

臓器線維症は、活性化線維芽細胞である筋線維芽細胞が、コラーゲン線維を過剰分泌することで発症する⁷。Heat shock protein 47 (HSP47) は、コラーゲン特異的分子シャペロンであり、小胞体内のプロコラーゲンに結合し、コラーゲン生成と分泌において重要な役割を担っている (Figure 1)^{8,9}。HSP47 活性が欠損すると、筋線維芽細胞におけるコラーゲン線維の結束が障害されて異常構造となり、異常なコラーゲンは分泌されずに蓄積されて粗面小胞体ストレスを生じて筋線維芽細胞のアポトーシスを誘導する⁹。このことより、HSP47 は線維化治療の理想的な治療標的と考えられる。近年開発された HSP47 small interfering RNA (siRNA) 含有ビタミン A 結合リポソーム (vitamin A coupled liposome containing HSP47 siRNA; VA-lip HSP47) は、筋線維芽細胞に HSP47 siRNA を特異的に送達することのできる、筋線維芽細胞を標的とした新規薬物送達システム (drug delivery system) である¹⁰。VA-lip HSP47 は、動物実験モデルにおいて、肝硬変や慢性膵炎における膵臓線維化、ブレオマイシン誘発肺線維症を改善することが示されており、現在肝硬変に対する臨床試験が進行中である^{10,11}。一方、VA-lip HSP47 が皮膚線維化における皮膚筋線維芽細胞を標的とし、皮膚線維化を改善できるか否かはこれまで検討されていない。本研究では、マウス骨髄移植後の皮膚慢性 GVHD モデルを用いて、VA-lip HSP47 が皮膚筋線維芽細胞を標的とし、皮膚線維化を改善させるか否かについて検討した。

本研究の結果、慢性 GVHD の皮膚線維化病変において、マクロファージ依存性に、筋線維芽細胞が集積しており、これらの筋線維芽細胞は HSP47 とともにビタミン A の受容体である RBP1 を発現していることが判明した。また、VA-lip HSP47 は、静脈内投与後、皮膚線維化部位に特異的に集積し、正常皮膚には分布しないことが判明した。さらに本研究では、VA-lip HSP47 は *in vitro* および *in vivo* で皮膚筋線維芽細胞の HSP47 の発現を抑制することが確認され、皮膚慢性 GVHD を発症したマウスに投与すると、有意に線維化を軽減できることを発見した。VA-lip HSP47 は、皮膚正常部位でのコラーゲン量には影響せず、また免疫再構築や血球生着にも影響しないことがわかった。こうした結果より、VA-lip

HSP47は、免疫抑制を起こすことなく、慢性GVHDの皮膚線維を特異的に抑制する、理想的な治療法となることが判明した。



略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

α CSF1R	anti-colony stimulating factor 1 receptor
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ER	endoplasmic reticulum
FCS	fetal calf serum
GVHD	graft versus host disease
Gy	gray
H&E	hematoxylin and eosin stain
HSP47	heat shock protein 47
MT	Masson trichrome
PBS	phosphate buffer saline
RBP1	retinol binding protein 1
siRNA	small interfering RNA
TGF- β	tumor growth factor- β
VA-lip HSP47	vitamin A coupled liposome containing HSP47 siRNA
VA-lip scramble	vitamin A coupled liposome containing scramble siRNA
VA-lip Dy647	Dy647 labeled vitamin A coupled liposome containing HSP47

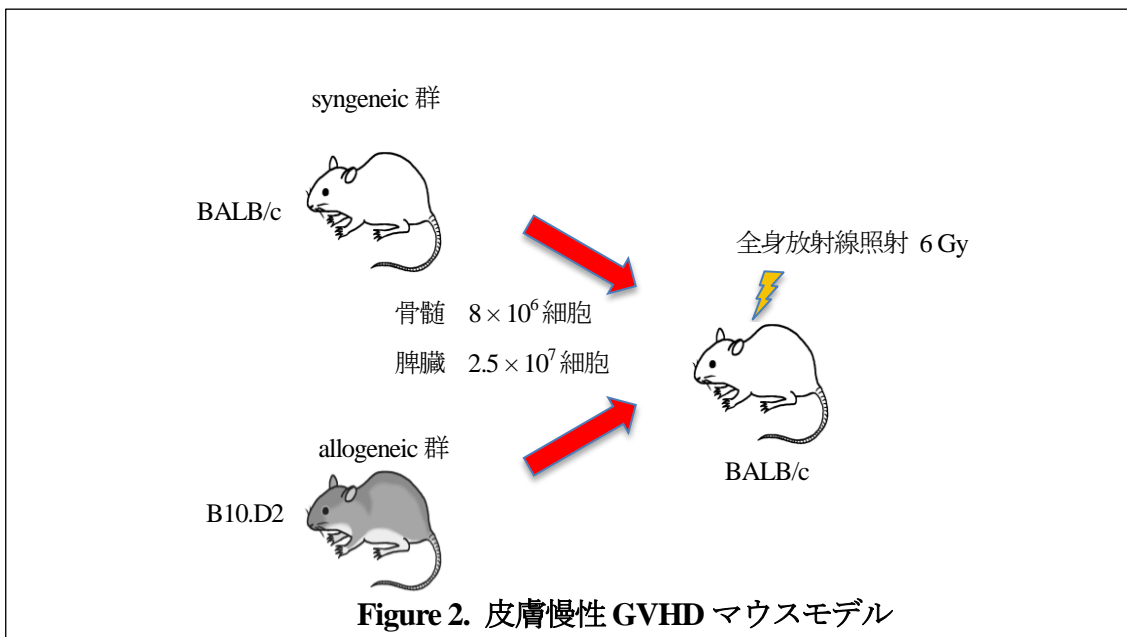
実験方法

マウス

C57BL/6 は日本クレア (東京、日本)、BALB/c マウスは、チャールズリバー・ジャパン (横浜、日本) より、B10.D2 マウスは日本エスエルシー (静岡、日本) より雌 7 週齢のものを購入し、本学の動物実験施設にて飼育して、8 週齢以上のマウスを本実験に使用した。すべての動物実験は、北海道大学動物実験に関する規定に従い、実施した (承認番号: 12-0106, 13-0127)。

皮膚慢性 GVHD マウスモデル (Figure 2)

ドナーとなる B10.D2 もしくは BALB/c を麻酔後に安楽死させ、脾臓および両側大腿骨・脛骨・骨盤骨を採取した。脾臓はスライドガラス 2 枚を使用してすりつぶし、70 μm セルストレイナーを通した上で、50 ml チューブに移して細胞を採取した。大腿骨・脛骨・骨盤骨は 23 ゲージ針と 1 ml 注射器で骨髓を押しだして取り出し、18 ゲージ針と 10 ml 注射器で吸引・吐出を繰り返して、攪拌した後に、70 μm セルストレイナーを通して 50 ml チューブに細胞を採取した。これらの細胞懸濁液中の赤血球を、red blood cell lysis buffer (BD Biosciences, 東京、日本) 2 ml を用いて 2 分間溶血させた後、顕微鏡にてトリパンブルー法により細胞数を計測した。レシピエント 1 匹あたり、脾臓細胞 2.5×10^7 細胞と骨髓細胞 8×10^6 細胞を、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline; PBS) 250 μl で希釈したものを移植片として使用した。レシピエントの BALB/c マウスに、移植前処置として、放射線照射装置 MBR-1520R-4 (日立、東京、日本) を用いて、管電圧 125 kV、管電流 15 mA、焦点-テーブル面距離 500 mm、フィルターはアルミニウム 0.5 mm + 銅 0.2 mm の設定にて、6 gray (Gy) 単回の全身放射線照射を行い、2 時間後に移植片を尾静脈内に注射した。ドナーを B10.D2 とした移植では、主要組織適合遺伝子複合体一致、マイナー組織適合性抗原不一致となり、同種移植 (allogeneic) 群とした。BALB/c をドナーとして使用したものは、同系移植 (syngeneic) 群とした¹²。マウスは、特定病原体未感染にて、通常の餌と、オートクレーブ滅菌後に塩酸で pH 2.5 に調整した酸性水を与えて飼育した。



ブレオマイシン誘発皮膚線維症モデル

C57BL/6をインフルランにて麻酔し、背部皮膚を剃毛して注射部位にマーキングした。マーキング部位を中心にして、PBSで溶解して1 mg/mlに調整したブレオマイシン(日本化薬、東京、日本)を100 µg、21日間連日皮下注射した。このモデルでは、22日目の時点で注射部位に著明な皮膚線維化を呈した。

抗 colony stimulating factor 1 レセプターモノクローナル抗体(α CSF1R)精製

ハイブリドーマ (AFS98) を CELLLine Bioreactor (Wheaton, Millville, USA) の中で、PFHM-II Protein-Free Hybridoma Medium (Thermo Fisher Scientific, 横浜, 日本) の培養液を用いて培養した。AFS98 約 1×10^5 個を PFHM-II 15 ml に浮遊させ、5 ml ピペットを用いて中層に入れた。ペニシリンとストレプトマイシンを添加した PFHM-II 培養液約 1 ml を上層に入れて、37°C、CO₂ 5% の条件で、培養フラスコ中層に細胞が充満するまでインキュベーターで培養した。培養が終了した後、中層の細胞液 15 ml を 50 ml チューブに回収した。さらに中層内を PBS 5 ml で 2 回洗い、洗浄液を回収した。総量約 25 ml を 1000 G、4°C で 3 分間遠心分離して細胞成分を沈殿させた。上清を回収し、10,000 G、4°C で 20 分間遠心分離した。上清を回収し、0.22 µm フィルターに通して 50 ml チューブ 2 つに分けた。等量の飽和硫酸アンモニウムを vortex しながら少しずつ加えた。遠心用チューブ 8 本に分け、冷蔵庫内で 1 時間振盪した。10,000 G、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を破棄した。ペレットにそれぞれ 1 ml ずつ PBS を加えて回収し、更に 1 ml の PBS を加えた後、3 つの遠心チューブに 3 ml ずつ分けた。等量の飽和硫酸アンモニウム (WAKO、東京、日本) を振盪しながら少しずつ加え、冷蔵庫内で 1 時間振盪した。10000 G、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を捨て、PBS 2.5 ml を加え、PD-10 カラム (GE Healthcare、東京、日本) で分子量 5000 以上と 1000 以下の物質を分離し、高分子のモノクローナル抗体を脱塩化・回収した。10,000 G、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 0.22 µm フィルターに通した後、チューブに分注し、-80°C で凍結保存した。

マクロファージ除去

上記により精製した α CSF1R を、上記の同種骨髄移植後のマウスに 1 匹あたり 0.5 mg を、移植後 day +7 から day +41 まで週 3 回、腹腔内注射した。

VA-lip HSP47 投与

VA-lip HSP47 は、既報を元にして日東電工 (大阪、日本) にて合成された¹⁰。HSP47 siRNA と同一のヌクレオチド組成を持ちながら、特定の遺伝子の mRNA に結合しない核酸配列にした RNA (scramble siRNA) を含有する VA-lip (VA-lip scramble siRNA) を対照群に投与した。VA-lip HSP47 および VA-lip scramble は、ブレオマイシン誘発皮膚線維症モデルにおいては day +1 から day +21 まで、皮膚慢性 GVHD に対する予防投与では移植後 day +1 から day +41 まで、皮膚慢性 GVHD に対する治療投与では day +21 から day +41 まで、4.5 mg/kg を週 3 回、後眼窩静脈叢から静脈内投与した。ブレオマイシン誘発皮膚線維症モデルでは day +21 に、慢性 GVHD モデルでは day +42 に安楽死させ、皮膚を採取した。

VA-lip HSP47 の分布の検討

静脈注射後の VA-lip HSP47 の皮膚への分布を検討するため、日東電工より提供された、蛍光色素 Dy647 含有 VA-lip HSP47 (Dy647 labeled vitamin A coupled liposome containing HSP47; VA-lip Dy647) を用いた。上記の方法で、ブレオマイシン誘発皮膚線維症を発症させた後、22 日目に VA-lip Dy647 を 1 回 4.5 mg/kg、2 時間毎に計 3 回静脈注射した。最終投与の 1 時間後に安楽死させ、背部のブレオマイシン注射部位と、非注射部位の皮膚を、除毛した後に皮下脂肪組織も含めて剥離・切除した。皮膚サンプルは 4 % パラフォルムアルデヒド 5 ml に一晩浸軟させ、その後に 30%スクロースにて置換した。O.C.T コンパウンド (Sakura Finetek Japan、東京、日本) に漬けて -80 °C で凍結させた後、クリオスタット HM550 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、7 μm の薄切凍結標本を作成した。1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Dojindo、熊本、日本) を 100 μl 添加し、室温、15 分間、遮光して核染色を行い、その後、共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000 (Olympus、東京、日本) を用いて観察した。

慢性 GVHD の組織学的検討

4%パラフォルムアルデヒドは、以下の手順にて作成した。三角フラスコに脱イオン水 250 ml を入れ、ヒーターで約 80°C に加熱したものに、パラフォルムアルデヒド (Merck, Darmstadt, Germany) 20 g を入れ、攪拌する。溶液が透明になるまで、1.25 規定水酸化ナトリウムを滴下し、その後氷冷する。0.2 M PBS を作成し、4°C で氷冷したものを 250 ml 加えて混ぜ合わせ、濾過する。採取した皮膚を、4%パラフォルムアルデヒドで一晩固定後に、札幌総合病理研究所 (札幌、日本) に標本作成と、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, H&E) 染色とマッソン・トリクローム (Masson trichrome stain, MT) 染色を依頼した。

オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence、大阪、日本) を用いて、10 \times /0.30 NA 対物レンズにての画像を撮影した。皮膚病理スコアは、真皮の線維化、脂肪組織喪失、炎症細胞浸潤、表皮間質変化、毛包喪失の 5 項目において、それぞれ 0-2 点で評価し、合計したものをを用いた¹³。皮膚厚 (skin thickness) は、表皮最下層から皮下脂肪組織直上までを無作為に 5 カ所で測定し、平均値を用いた。また、慢性 GVHD モデルでは、皮膚以外にも涙腺、肺、肝臓を同様に固定し、切片を作成して H&E、MT 染色にて組織学的評価を行った。

線維芽細胞培養

マウスの皮膚線維芽細胞の単離と培養を行った。BALB/c の背部を剃毛し、除毛クリームを用いて除毛した後に、皮下脂肪組織も含めて 3 cm 四方大の皮膚片を採取した。皮下脂肪を剥離し、ポピドンヨードで消毒後、洗浄した。5 mg/ml の濃度にてタイプ IV コラーゲナーゼ (Sigma Aldrich Japan、東京、日本) を添加した培養液 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich Japan) を 2 ml 加えた。ハサミで皮膚片を 1 mm 大程度に切り刻み、インキュベーターにて 37°C、CO₂ 5% の条件で 1 時間反応させた。10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum; FCS) 添加培養液 2 ml を加えて酵素反応を止め、1000 G で遠心分離し、上清をピペットで吸引・破棄した。10% FCS 添加培養液 10 ml を加え、再度同条件で遠心分離して上清を破棄した。10% FCS 添加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium を 10 ml 加えて、6 cm 培養皿に 5 ml ずつ分割し、37°C、CO₂ 5% にて培養した。2、3 日後に、培養皿底部に接着細胞が出現したら、培養液を破棄・交換した。細胞がコンフルエントになり次第、以下の手順にて継代した。培養液を吸引・破棄し、10 倍に希釈したトリプシン EDTA 溶液 (Thermo

Fisher Scientific) を3~5 ml 添加し、37°C、CO₂ 5%で2分間反応させた。顕微鏡にて、接着していた線維芽細胞が遊離していることを確認し、10% FCS 添加培養液を3~5 ml 添加する。ピペットにて攪拌しながら吸引し、50 ml チューブに移した。4°C、215G で3分間遠心分離し、上清を破棄する。10% FCS 添加培養液を調整して加え、2~3個の6 cm 細胞培養ディッシュに細胞溶液を3~5 ml ずつ移す。この際、1つの6 cm 細胞培養ディッシュあたり、細胞数 5×10^3 個を播種した。37°C、CO₂ 5% で培養し、継代を3、4回行った細胞を実験に使用した。マウス皮膚線維芽細胞株 NIH/3T3 は、同様に10% FCS 添加培養液内で37°C、CO₂ 5%で培養し、上記と同様に1つの6 cm 細胞培養ディッシュあたり、細胞数 5×10^3 個を播種し継代した。

***In vitro* HSP47 抑制実験**

上記のように培養した線維芽細胞、またはマウス線維芽細胞株である NIH/3T3 を、96 ウェルプレートに1ウェルあたり 5×10^3 個ずつ播種し、細胞が培養ウェルの底全体に広がるまで3、4日間培養した。その後、FCS 非添加の培養液に変更して12時間培養し、同じくFCS 非添加培養液に recombinant human tumor growth factor- β 1 (TGF- β 1) (R&D Systems, Minneapolis, USA) を5 ng/ml で添加した。VA-lip HSP47 およびVA-lip scrambleを50 nM ずつ加え、12時間培養する。培養液を破棄してウェルをPBSにて洗浄し、接着している細胞をISOGEN II (NIPPON GENE、東京、日本) 500 μ lにて剥離・回収しRNA抽出を行った。

RNA 抽出、相補的DNA (cDNA) の作成

ISOGEN II 500 μ lに入った細胞を1.5 ml チューブに移した。RNase-free water を200 μ l 加えて攪拌し、室温で5分間静置させた。4°C、12000 Gで15分間遠心分離を行い、分離した上清500 μ lを新しいチューブに移した。2 μ lのエタ沈メイト (NIPPON GENE) と500 μ lの2-プロパノール (WAKO) を添加し、vortex でよく混合させた後、室温で10分間静置した。4°C、12000 Gで15分間遠心分離を行い、上清を破棄した。1 mlの75%エタノールを添加し、攪拌せず4°C、12,000 Gで15分間遠心分離をした。これを2回くり返した後、真空アスピレーターを用いてペレットを乾燥させ、RNase-free waterを加え、60°Cで15分間温めた。NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) を用いてRNA量を測定した。RNA 1000 ngを用いて各サンプルからcDNAを作製した。cDNA作製にはReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo、大阪、日本) を使用した。作製方法は、まずRNA 1000 ngをRNase-free waterを用いて12 μ lに調整し、4 \times DN Master Mix (Toyobo) 4 μ lを加えて37°Cで5分間インキュベートしゲノムDNA除去反応を行った。次に5 \times RT Master Mix II (Toyobo) を4 μ l加え、37°Cで15分間、50°Cで5分間、98°Cで5分間インキュベートし、サーマルサイクラーT100™ (BIORAD、東京、日本) を使用して逆転写反応を行った。反応終了後は-20°Cで保存した。皮膚組織のcDNA作成では、麻酔下でマウスの皮膚片を採取し、すぐにISOGEN II 500 μ lの入った3.8 mlクライオチューブに入れた。Tissue Ruptor (QIAGEN, Hulsterweg, Holand) を用いてホモジナイズした後、1.5 ml チューブに移した。その後の手順は上記と同様に行い、cDNAを作成した。

定量リアルタイムPCR

Mouse *Hsp47* と *Gapdh* に対するプライマー・プローブセットを、Sigma Aldrich Japan より購入し、TaqMan Universal PCR master mix (Thermo Fisher Scientific) と Step One Plus (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量リアルタイム PCR を行った。使用したプライマーとプローブの配列は、以下である。

Mouse *Hsp47* (*Serpinh1*):

forward primer	5'-CTGCTTGTGAACGCCATGTTTC-3'
reverse primer	5'-TCACCATGAAGCCACGGTTG-3'
probe	5'-6-AGCCACACTGGGATGAGAAGTTTCACCA-TAMRA-3'

Mouse *Gapdh*

forward primer	5'-TGTC AAGCTCATTTCCTGGTATGA-3'
reverse primer	5'-TTGGGATAGGGCCTCTCTCTTGC-3'
probe	5'-6-TGGTGGACCTCATGGCCTACATGGCC-TAMRA-3'

定量PCRの手順は次のように行った。2 × Master Mix 25 μl、20 × DNAプライマー 2.5 μl、DEPC 処理水 12.5 μl、cDNA 2 μl、DEPC 処理水 8 μl を混合し、計 50 μl とした。MicroAmp®Optical 96-Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific) に、3 ウェルに 15 μl ずつ複製して添加した後シールし、StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific) にて、94°C・30 秒間、55°C・30 秒間、72°C・1 分間を 1 サイクルとし、50 サイクルの定量リアルタイム PCR を行った。各検体の *Hsp47* の発現量は、*Gapdh* の発現によって標準化し、 Δ CT 法を用いて算出した。

コラーゲンアッセイ

皮膚サンプルは、デルマパンチ (NIPRO、大阪、日本) を用いて、直径 5 mm の円盤状に採取した。皮下脂肪組織を入念に除去し、3.8 ml クライオチューブに入れた。0.1 mg/ml ペプシン添加 0.5 M 酢酸 2 ml に入れて Tissue Ruptor (QIAGEN) を用いてホモジェナイズし、4°C・48 時間反応させた。Sircol Collagen Assay kit (Biocolor, Northern Ireland, UK) を用いて可溶性コラーゲンを抽出した。まず、上記サンプルを 4°C、105 G、10 分間遠心分離し、上清 100 μl を 1.5 ml チューブに移した。検量線描出用の bovine tail collagen を 50、100、150、200、300 μg/ml で 100 μl ずつ調整した。これらに、Dye Reagent 1 ml を加え、室温で 30 分間、静かに攪拌した。4°C、12000 G、10 分間で遠心分離し、上清を破棄してチューブ内面の Dye Reagent も除去した。Acid-Salt Wash Reagent 750 μl を加え、4°C、12,000 G、10 分間で遠心分離し、上清を破棄してチューブ内面に付着している色素もキムワイプにて除去した。Alkali Reagent 250 μl を加え、攪拌して溶液が均一になるようにする。96 ウェルプレートに 100 μl ずつ入れ、GloMax-Multi Luminescence System (Promega、東京、日本) を用いて、555 nm の吸光度を測定した。スタンダードカーブ用サンプルの吸光度より、サンプルのコラーゲン量(collagen volume)を算出した。

ハイドロキシプロリンアッセイ

コラーゲンアッセイの際と同様に採取した皮膚サンプルを、マイティバイアル (マルエム、大阪、日本) に入れ、滅菌水を 750 μl 加えた。Tissue Ruptor (QIAGEN) にてホモジェナイズし、750 μl の 12 規定塩酸を加え、キャップを閉めてビニルテープでシールした。キムタオ

ルとアルミホイルで包み、120°C・24時間 dry heating を行った。サンプルを室温で15分冷却し、1.5 ml チューブに移した。12000 G、10分間遠心分離し、上清を0.33 µm フィルターにかけ、500 µl 分を新しいチューブに移した。500 µl の6規定水酸化ナトリウムを加え、vortex した後に氷冷した。そこから100 µl を取り、別の1.5 ml チューブに移した。スタンダードカーブ用のヒドロキシプロリンを1.5 ml チューブに取り、0、2、4、6、8、10 µg になるように調整した。これらに、chloramin T 溶液 (chloramineT, dH₂O, n-propanol, citric acid buffer) を400 µl ずつ加えて vortex し、20 °C・20 分間、遮光して反応させた。400 µl の Ehrlich's 溶液 (4-DMAB, 70% perchloric acid, n-propanol) を加えて Vortex し、65°C・15 分間、遮光して反応させた。1 分間氷冷し、サンプルを96 ウェルプレートに移して、コラーゲンアッセイと同様に、GloMax-Multi Luminescence System (Promega) を用いて、550 nm の吸光度を測定して、定量した。

蛍光免疫染色

7 µm 厚のパラフィン切片を、100%キシレンに5分間を3回、100%エタノールに3分間を3回、95% エタノールに3分間、80%エタノールに3分間、70%エタノールに3分間、精製水に3分間を2回、PBSに3分間それぞれ浸し、脱パラフィンした。Target Retrieval Solution, Citrate pH6 (DAKO、東京、日本) 20 ml と脱イオン水 180 ml をビーカーに入れる。その中に、脱パラフィンしたスライドガラスを入れ、105°C、20 分間オートクレーブして抗原不活化を行った。ブロックエース (DS Pharma Biomedical、大阪、日本) にて10倍に希釈したヤギ血清を100 µl ずつ添加し、室温30分間静置してブロッキングを行った。PBS にて洗浄後、1次抗体反応を行った。1次抗体は、Rabbit polyclonal anti-retinol binding protein 1 antibody (RBP1: Abcam、Cambridge、UK)、Rabbit polyclonal anti-HSP47 antibody (Abcam)、Rabbit polyclonal anti-TGF-β antibody (Abcam)、mouse polyclonal biotinylated anti-α-smooth muscle actin antibody (α-SMA: Abcam) を200倍希釈したものを100 µl ずつ添加し、湿潤箱の中で4°C、1晩反応させた。新鮮凍結切片は、4%パラフォルムアルデヒドで10分間固定後、Rat monoclonal biotinylated anti-F4/80 antibody (BioLegend、San Diego、USA) を200倍希釈して、室温・2時間て1次抗体反応を行った。PBS で洗浄後、2次抗体反応を行った。2次抗体は、anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488、anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 555、Streptavidin Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific) を400倍希釈し、100 µl ずつ添加して室温、1時間、遮光して反応させた。PBS で洗浄後、1 µg/mL の DAPI を100 µl 添加し、室温、15分間、遮光して反応させた。PBS で洗浄後、フルオロゲル (VWR、Radnor、USA) 1滴を滴下後にカバーガラスで閉じた。画像は、共焦点レーザー顕微鏡 FV-1000 (Olympus) にて、20× /0.75 NA もしくは 40× /1.30 NA 対物レンズを使用して撮影した。蛍光染色の定量的解析では、Aperio Image Scope software (Aperio、Vista、USA) を使用して、真皮内の陽性細胞を設定面積あたりのピクセル数で計測した¹⁴。

フローサイトメトリー

慢性 GVHD マウスから胸腺、脾臓を採取し、10% FCS 添加 RPMI1640 培地 (Thermo Fisher Scientific) に入れた。胸腺は70 µm セルストレイナー上で3 mL シリンジ用のプランジャーを用いてすりつぶし、フローバッファー (1× PBS+4%FCS) で洗浄して細胞混濁液を作成した。脾臓はスライドガラスですりつぶし、70 µm セルストレイナーを通した。それぞれの細胞混濁液を4°C、485 G、5分間遠心した。胸腺は、遠心後に上清を捨て、ペレットを

フローバッファーで攪拌しフローチューブに移した。脾臓は、遠心後に上清を捨て、ペレットに 2 mL の 1× red blood cell lysis buffer (BioLegend) を加え、2 分静置した後にフローバッファーを 8 ml 加えて、4 °C、485G、5 分間遠心分離し、上清を除去した後、フローチューブに移した。1 検体あたり、40 µl のフローバッファーに、下記の抗体を 200 倍希釈になるように添加し、抗体カクテルを作成した。胸腺細胞の染色には、Phycoerythrin 標識抗マウス CD8 抗体 (BD Biosciences), Phycoerythrin-Cyanin7 標識 anti-mouse CD4 antibody (BioLegend) を使用。脾細胞の染色には、Fluorescein isothiocyanate 標識 anti-mouse TCR-β antibody (BD Biosciences), Peridinin Chlorophyll Protein Cyanin5.5 標識 anti-mouse CD11b antibody (BD Biosciences), Phycoerythrin-Cyanin7 標識 anti-mouse CD4 antibody (BioLegend), Allophycocyanin-Cyanin7 標識 anti-mouse B220 antibody (BD Biosciences), Biotin anti-mouse CD229.1 antibody (BD Biosciences) を使用。胸腺、脾臓の細胞混濁液 5×10^4 細胞ずつを 300 G, 4 °C で 5 分間遠心分離して、上清を捨てペレットにし、抗体カクテルを 40 µL ずつ添加し、遮光、4 °C、30 分間静置した。静置後、細胞混濁液にフローバッファーを 1 mL 加え攪拌し、485 G, 4 °C、5 分間遠心分離して上清を捨て、0.2 µg/mL DAPI 溶液をフローバッファーにて 2 倍希釈して加えた。BD FACSCanto II (BD Biosciences) によりフローサイトメトリーを行った。

統計解析

データ比較には、Mann-Whitney U test を用いた。生存率解析では、Kaplan-Meier method を用いてプロットし、log-rank test にて比較した。解析には、Prism software version 6 (GraphPad, La Holla, USA) を使用した。P 値は、*P < 0.05, **P < 0.01 と定義した。

結果

慢性 GVHD の皮膚線維化部位には、HSP47 陽性の筋線維芽細胞が集積する

肝硬変や全身性硬化症、慢性 GVHD などの種々の線維症において、筋線維芽細胞は過剰なコラーゲンを分泌し、線維化の発症に寄与している^{15,16}。我々はまず、慢性 GVHD による皮膚線維化病変に筋線維芽細胞が集積しているか否かを検討するため、マウスの皮膚慢性 GVHD モデルを作成した。レシピエントである BALB/c マウスに、6 Gy の全身放射線照射で前処置を行った後、BALB/c (syngeneic 群) もしくは B10.D2 (allogeneic 群) から採取した 2.5×10^7 個の脾臓細胞と 8×10^6 個の骨髄細胞を尾静脈から静脈注射した。移植後 day +42 に皮膚サンプルを採取し、パラフィン切片を作成後に H&E 染色を行ったところ、allogeneic 群では毛包や脂肪層の減少、表皮肥厚、真皮の線維化などの典型的な慢性 GVHD の像が見られた (Figure 3)。MT 染色を行ったところ、allogeneic 群で著明なコラーゲン沈着がみとめられ、慢性 GVHD による皮膚線維化が起こることが確認された。一方、syngeneic 群ではこうした変化は認められなかった。

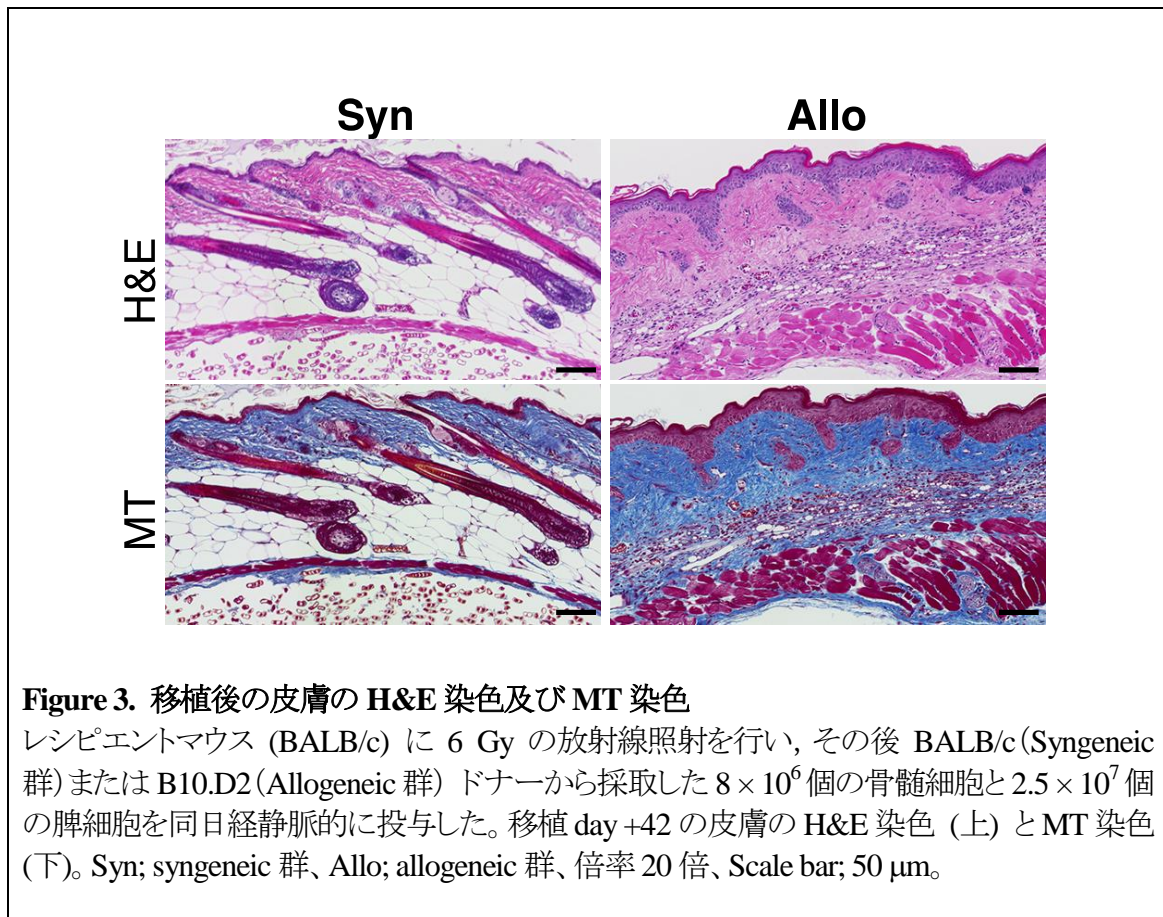
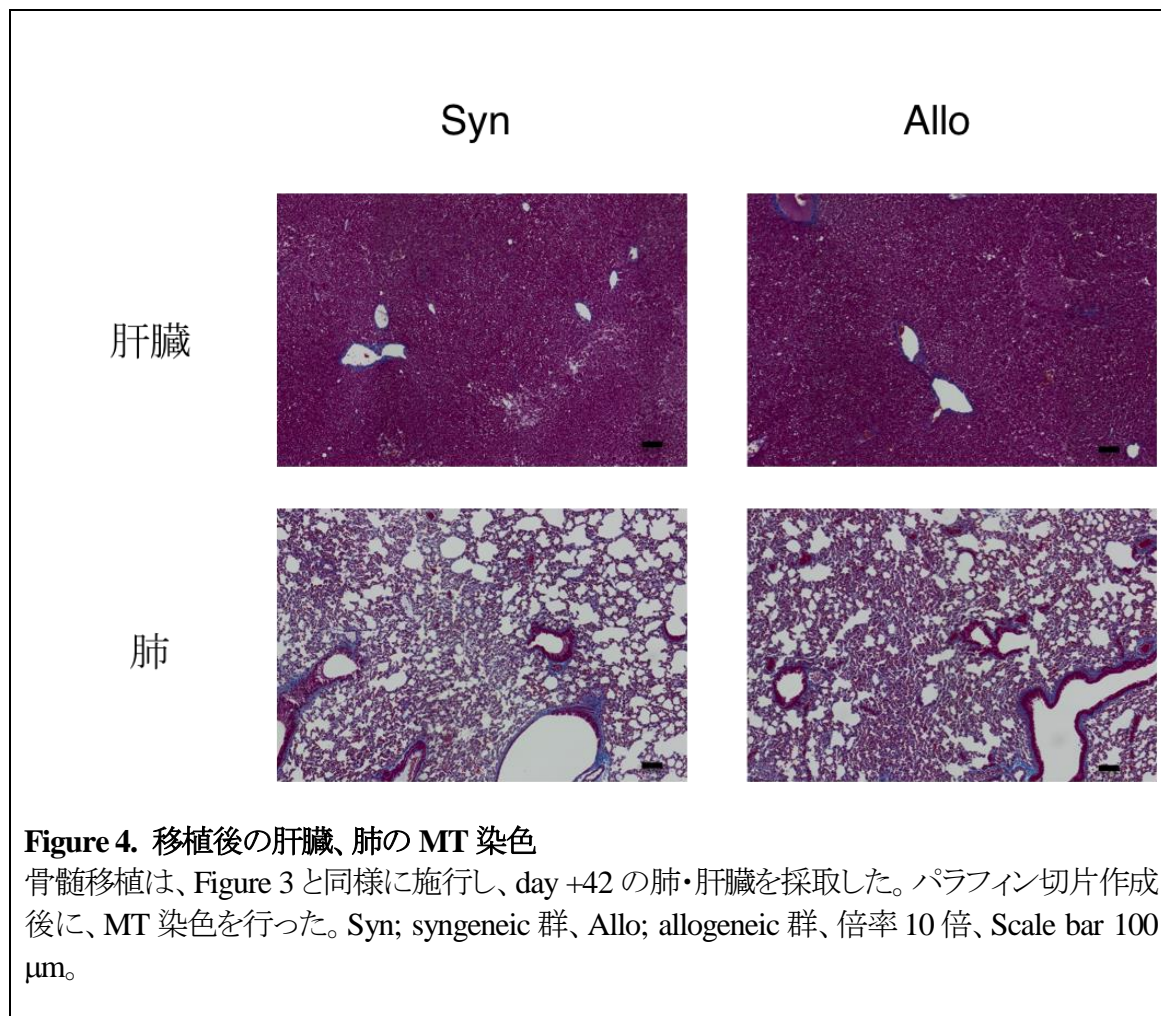


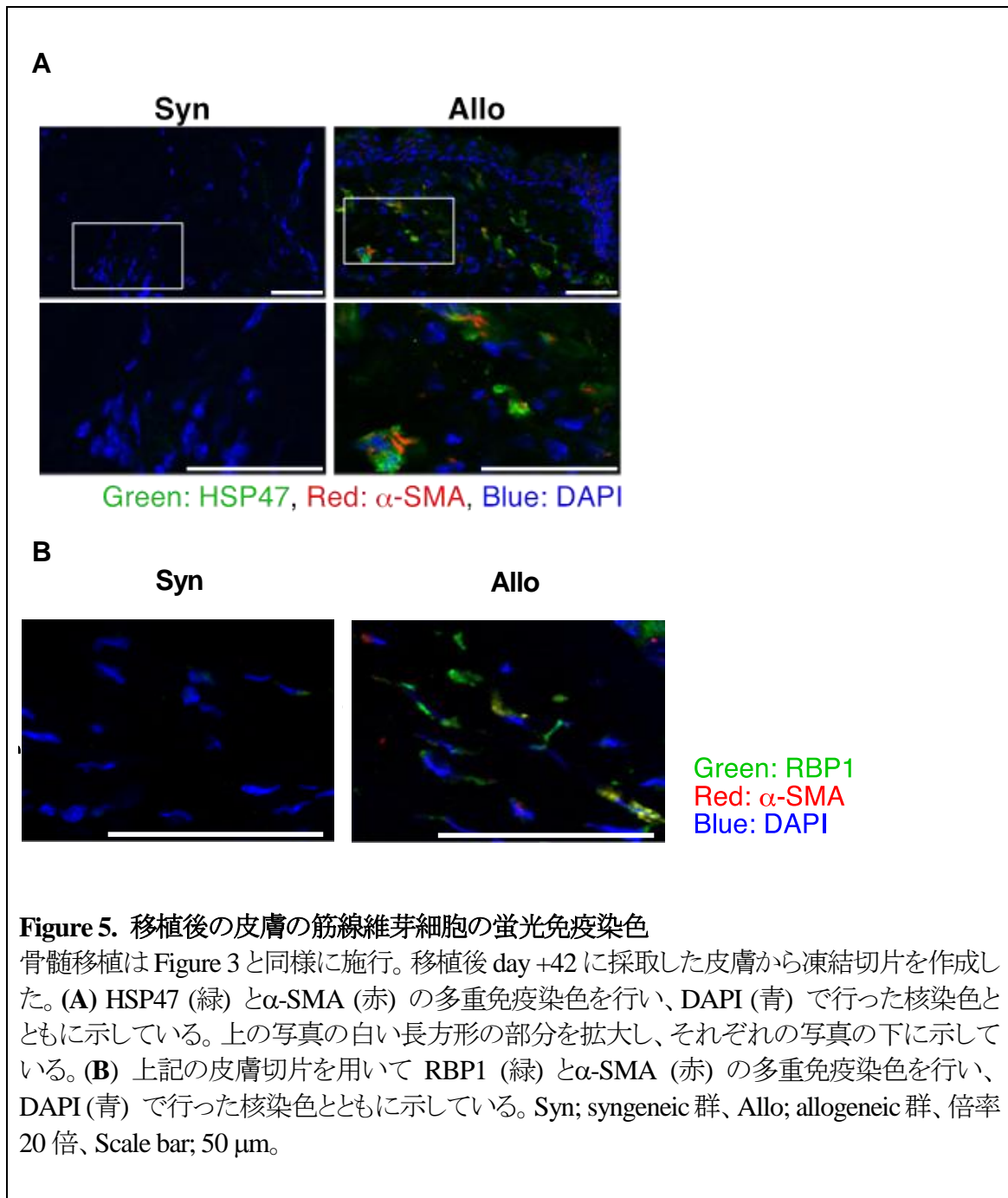
Figure 3. 移植後の皮膚の H&E 染色及び MT 染色

レシピエントマウス (BALB/c) に 6 Gy の放射線照射を行い、その後 BALB/c (Syngeneic 群) または B10.D2 (Allogeneic 群) ドナーから採取した 8×10^6 個の骨髄細胞と 2.5×10^7 個の脾細胞を同日経静脈的に投与した。移植 day +42 の皮膚の H&E 染色 (上) と MT 染色 (下)。Syn; syngeneic 群、Allo; allogeneic 群、倍率 20 倍、Scale bar; 50 μ m。

肺、肝臓も同様に day +42 に採取し、MT 染色を行って観察したが、いずれも syngeneic 群に比較して allogeneic 群において明らかなコラーゲン増殖は認めず、本モデルでは皮膚の線維化が特異的に発症するモデルであることが確認された (Figure 4)。



筋線維芽細胞のマーカーである α -SMA と、コラーゲン特異的分子シャペロンである HSP47 を、多重蛍光免疫染色法を用いて観察したところ、Allogeneic 群では真皮に α -SMA 陽性の筋線維芽細胞が集積していた。こうした筋線維芽細胞は HSP47 も発現しており、皮膚慢性 GVHD の線維化病変には、HSP47 を発現する筋線維芽細胞が集積していることが確認された (Figure 5A)。次に慢性 GVHD の皮膚病変に集積する筋線維芽細胞が、VA-lip HSP47 の選択的な標的となりうるか否かを検討するため、ビタミン A の膜型受容体である RBP1 の発現を、 α -SMA の発現とともに多重蛍光免疫染色法で観察した。 α -SMA 陽性の筋線維芽細胞は、RBP1 も共発現しており、こうした α -SMA 陽性・HSP47 陽性・RBP1 陽性の筋線維芽細胞は、VA-lip HSP47 の標的となりうるかと予測された (Figure 5B)。一方、GVHD を発症しない syngeneic 群のレシピエントの皮膚には、 α -SMA・HSP47・RBP1 の染色は認められず、筋線維芽細胞が集積していないことが確認された。



CSF1R 依存性マクロファージにより、慢性 GVHD の皮膚線維化部位へ筋線維芽細胞が集積する

マクロファージは筋線維芽細胞の分化に必要なサイトカインである TGF-β を産生することが知られており、皮膚慢性 GVHD での筋線維芽細胞集積における、マクロファージの役割について検討した。移植後 day+42 日後の皮膚の免疫染色にて、HSP47 とマクロファージのマーカーである F4/80 を観察した結果、慢性 GVHD を発症した allogeneic 群の真皮には

HSP47 陽性の筋線維芽細胞と、F4/80 陽性のマクロファージが集積していた (**Figure 6**)。筋線維芽細胞はマクロファージと接するように分布しており、マクロファージが筋線維芽細胞の集積に重要な役割を果たすことが予測された。マクロファージの分化・生存には CSF1 レセプターのシグナルが重要であることが知られているが、同種移植後レシピエントマウスに、 α CSF1R 0.5 mg を、週 3 回、腹腔内投与したところ、allogeneic 群で皮膚に集積していた F4/80 陽性マクロファージが除去されていた。allogeneic 群に α CSF1R を投与した群では、マクロファージとともに HSP47 陽性の筋線維芽細胞も消失していた。

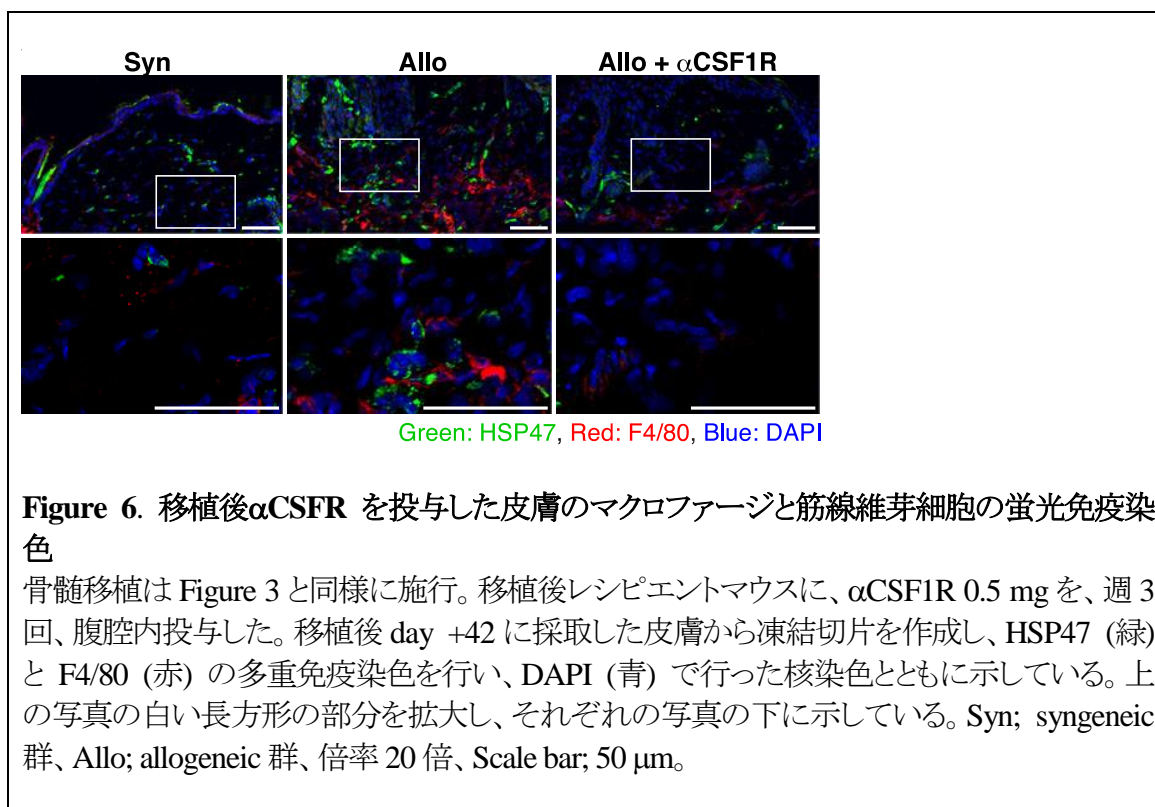


Figure 6 の免疫染色の結果を用いて、マクロファージや筋線維芽細胞の集積を定量するため Aperio Image Scope software (Aperio) を使用して解析した。単位面積あたりの陽性ピクセル数を定量化し、それぞれ比較したところ、allogeneic 群では syngeneic 群に比較して、F4/80 と HSP47 の陽性ピクセル数が増加しており、皮膚慢性 GVHD の病変では、マクロファージと筋線維芽細胞の両方が集積していることが確認された。 α CSF1R の投与でマクロファージを除去すると、HSP47 の陽性ピクセル数が有意に減少することが確認された (**Figure 7**)。これらの結果より、皮膚慢性 GVHD での筋線維芽細胞の集積は、マクロファージの浸潤に依存していることが解明された。

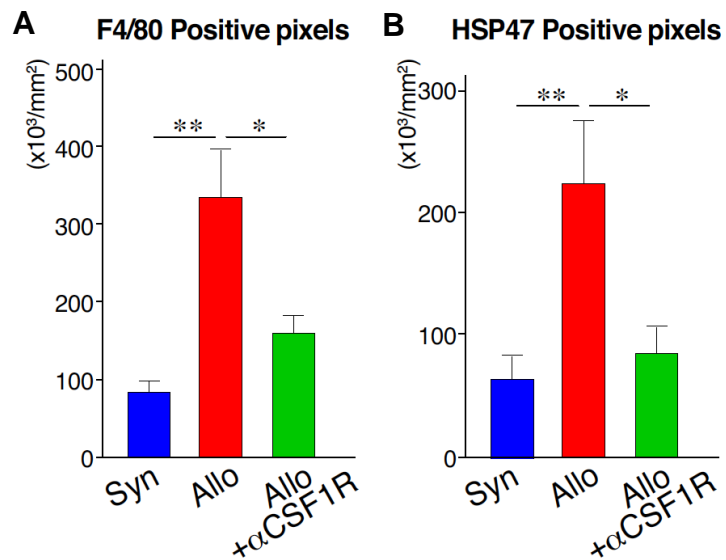


Figure 7. 移植後の皮膚の F4/80 と HSP47 の陽性ピクセル数

多重免疫染色を **Figure 6** と同様に行った。画像を撮影後、Aperio Image Scope software を用いて、単位面積あたりの F4/80 および HSP47 染色の陽性ピクセル数を測定した。Syn; syngeneic 群、Allo: allogeneic 群、Allo+CSF1R; allogeneic+αCSF1R 群、各群 n=7-10。データは平均値と標準誤差で示している。*P < 0.05、**P < 0.01。

また、免疫染色にて TGF-β の蛍光免疫染色を行ったところ、allogeneic 群の皮膚において、線維化関連サイトカインである TGF-β が増加していたが、αCSF1R 投与でマクロファージを除去すると、その産生が抑制されていた (**Figure 8**)。これらの結果より、線維化部位への HSP47 陽性筋線維芽細胞の集積において、CSF1R 依存性マクロファージによる TGF-β 産生が重要な役割を果たすことが示された。

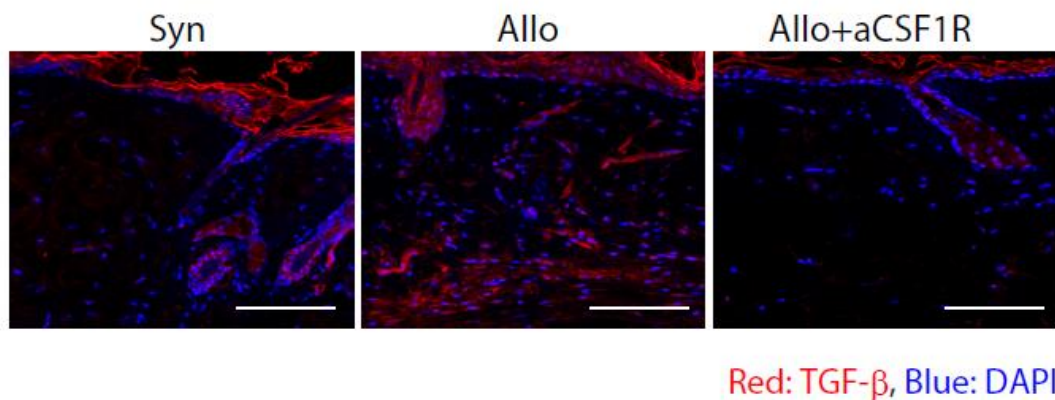


Figure 8. 移植後の皮膚の TGF β 蛍光免疫染色

骨髄移植は Figure 3 と同様に施行。移植後レシピエントマウスに、 α CSF1R モノクローナル抗体を 0.5 mg で、週 3 回、腹腔内投与した。移植後 day +42 に採取した皮膚からパラフィン切片を作成し、TGF- β (赤)、DAPI (青) の多重免疫染色を行い、DAPI (青) で行った核染色とともに示している。Syn; syngeneic 群、Allo; allogeneic 群、Allo+ α CSF1R; allogeneic+ α CSF1R 群。倍率 20 倍、Scale bar: 50 μ m。

VA-lip HSP47 は、*in vitro* にて TGF- β 刺激による線維芽細胞の HSP47 発現上昇を抑制する

慢性 GVHD の真皮に RBP1 陽性筋線維芽細胞が集積することより、VA-lip HSP47 は皮膚慢性 GVHD の線維化病変に集積する筋線維芽細胞の HSP47 をノックダウンし、皮膚線維化を改善すると仮説を立てた。まず、*in vitro* にて VA-lip HSP47 が筋線維芽細胞の HSP47 をノックダウンするかを検証した。ナイーブマウスの皮膚線維芽細胞を分離・培養し、recombinant human TGF- β 1 を添加して 12 時間刺激すると、*Hsp47* の発現が有意に上昇し、筋線維芽細胞へ分化した。この培養細胞に VA-lip HSP47 を添加すると、TGF- β 介在の *Hsp47* mRNA 上昇が抑制されるが、VA-lip scramble siRNA では抑制されなかった (Figure 9)。同様の結果は、マウス胎児線維芽細胞の NIH/3T3 を用いても得られた。

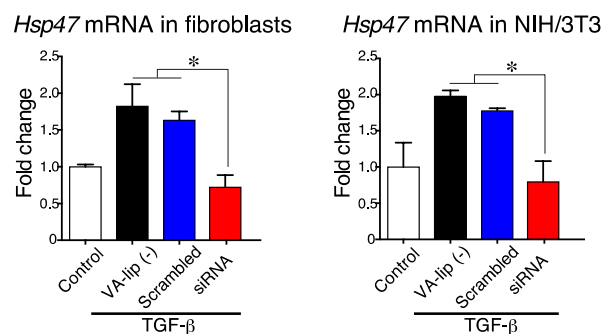


Figure 9. 皮膚線維芽細胞と NIH/3T3 における HSP47 mRNA 発現量

マウスの皮膚線維芽細胞を分離したものと、マウス胎児線維芽細胞の NIH/3T3 を培養・継代した。Control; TGF- β 刺激なしの群 (n=3)、VA-lip(-); TGF- β 刺激のみの群 (n=3)、Scramble; TGF- β 刺激と VA-lip scramble 投与群 (n=3)、siRNA; TGF- β 刺激と VA-lip HSP47 投与群 (n=3)。データは、同様の結果の 2 実験のうちの 1 つを、平均値と標準誤差で示している。*P < 0.05

VA-lip HSP47 は静脈内投与後皮膚線維化部位に特異的に分布する

VA-lip HSP47 が皮膚線維化部位の筋線維芽細胞に特異的に分布するかを検証するために、ブレオマイシン皮下注射で局所的な皮膚線維化を引き起こしたマウスに、VA-lip Dy647 を投与して生体内分布を調べた。C57BL/6 の背部皮膚に、1 mg/ml に調整したブレオマイシン (日本化薬) を 100 μ g、21 日間連日皮下注射して、局所的な皮膚線維化を発症させた後、day +22 に、VA-lip Dy647 4.5 mg/kg を、2 時間毎に計 3 回静脈注射した。最終投与の 1 時間後に、除毛した背部のブレオマイシン注射部位と、非注射部位の皮膚を採取し、DAPI で染色した後に観察した。VA-lip Dy647 は、皮膚線維化部位に分布していたが、同一マウスの皮膚正常部位には分布しなかった (Figure 10)。

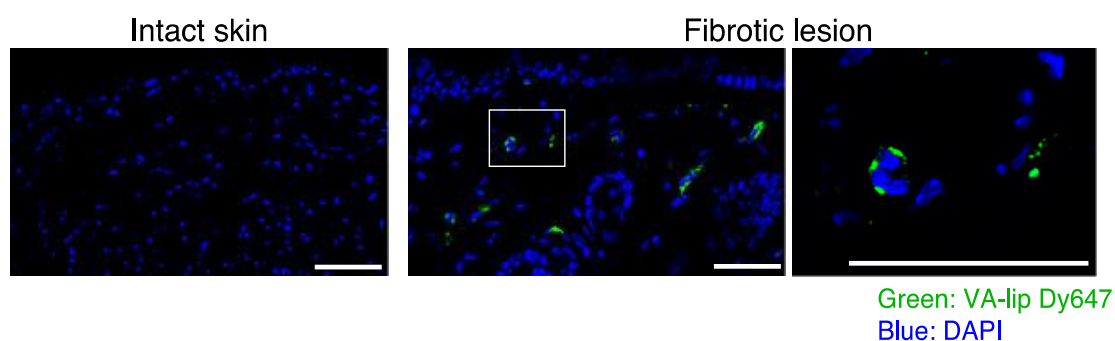


Figure 10. ブレオマイシン誘発皮膚線維症モデルにおける VA-lip Dy647 の生体内分布
 ブレオマイシン誘発皮膚線維症モデルで、day +22 に VA-lip Dy647 4.5 mg/kg を、2 時間毎に計 3 回静脈注射した。最終投与の 1 時間後に、除毛した背部のブレオマイシン注射部位と、非注射部位の皮膚の凍結切片を作成し、DAPI (青) による核染色後、VA-lip Dy647 (緑) の分布を観察した。Intact skin; 正常皮膚、Fibrotic lesion; 同一マウスのブレオマイシン注射部位。倍率 20 倍 (左、中)、40 倍 (右)、右は中の白い長方形部位を拡大したもの。Scale bar; 50 μ m。

ブレオマイシンによる局所的な皮膚線維化を持つマウスに VA-lip HSP47 を週 3 回、day +2 から day +21 まで、3 週間投与して day +22 にコラーゲンアッセイを行って、正常皮膚と線維化皮膚のコラーゲン量を測定した。VA-lip HSP47 は、線維化部位のコラーゲン量を正常化した。同一マウスの正常部位のコラーゲン量は変化させなかった (Figure 11)。

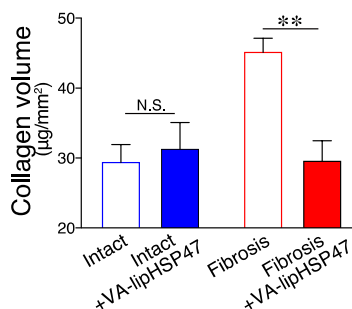


Figure 11. ブレオマイシン誘発皮膚線維症モデルのコラーゲン量

ブレオマイシン誘発皮膚線維症モデルに、VA-lip HSP47 を週 3 回、day +2 から day +21、3 週間投与して day +22 に、皮膚を採取し、コラーゲン量を測定した。Intact; 正常皮膚、Fibrosis; 同一マウスのブレオマイシン注射部位。2 実験を組み合わせ、VA-lip HSP47 投与群 (n=9)、非投与群 (n=17)としている。データは平均値と標準誤差で示している。**P < 0.01、N.S.; not significant.

VA-lip HSP47 は慢性 GVHD の皮膚線維化を改善する

次に、VA-lip HSP47 の *in vivo* での効果を検証した。前述した骨髄移植モデルを用いて、VA-lip HSP47 を移植後 day +1 から週 3 回、4.5 mg/kg で静脈注射した。Day +42 に皮膚を採取して免疫染色を行った。免疫染色では、syngeneic 群と比較して allogeneic 群では HSP47 の発現が亢進しており、VA-lip HSP47 投与により、HSP47 がノックダウンされていた (Figure 12)。VA-lip scramble siRNA を投与した群では、このノックダウンが見られなかった。

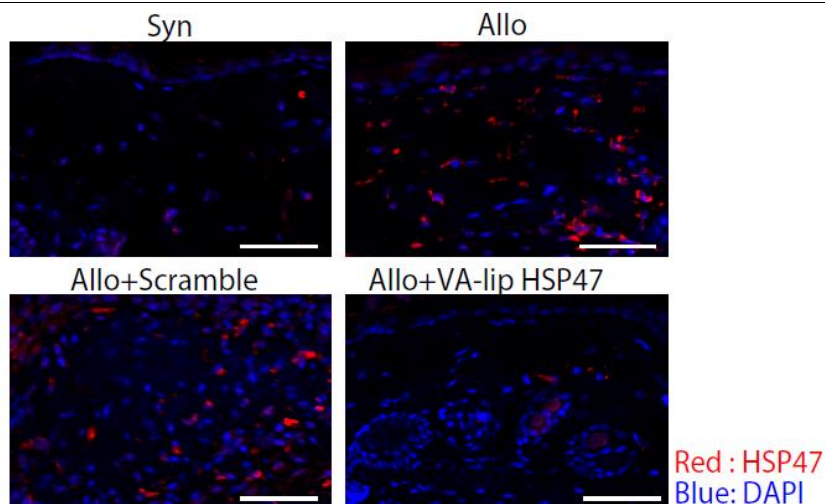
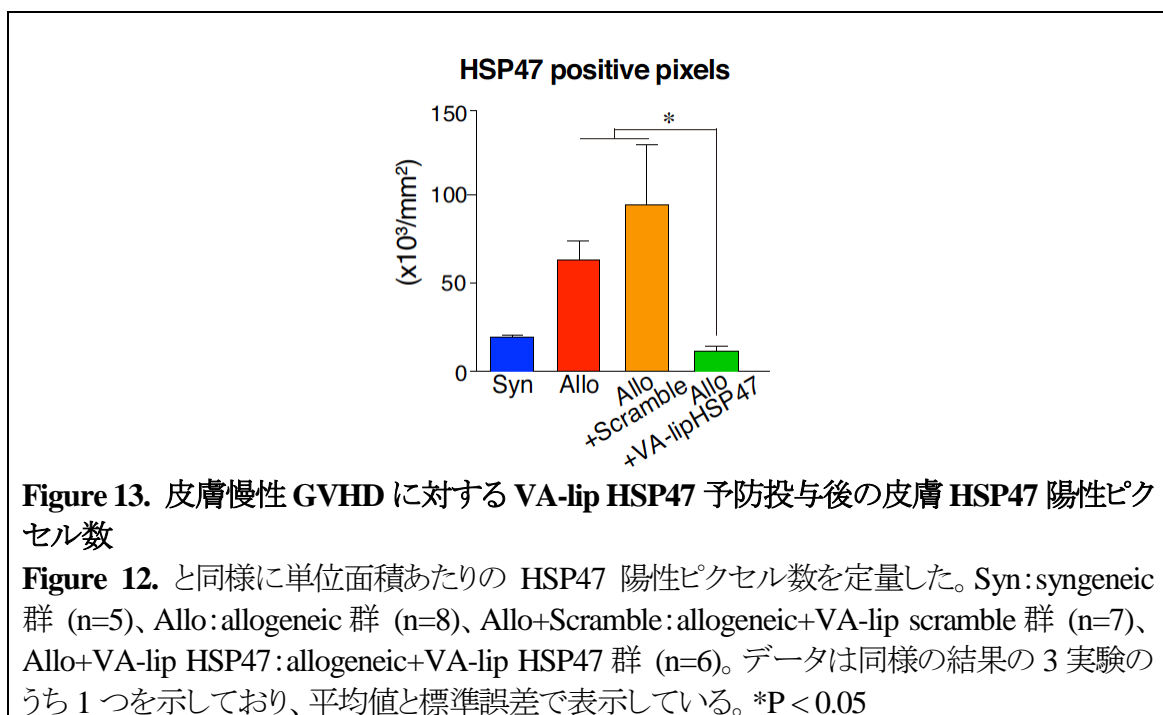


Figure 12. 皮膚慢性 GVHD に対する VA-lip HSP47 予防投与後の皮膚 HSP47 免疫染色
Figure 3と同様に移植したマウスに、VA-lip HSP47 もしくは VA-lip scramble siRNA を週 3 回、day +1 から day +41 に投与し、day +42 に皮膚サンプルを採取した。皮膚サンプルの、HSP47 (赤) の免疫染色を DAPI (青) で行った核染色とともに示している。Syn; syngeneic 群、Allo; allogeneic 群、Allo+Scramble; allogeneic+VA-lip scramble 群。倍率 40 倍、Scale bar; 50 μm 。

免疫染色の画像を使用して、HSP47 陽性ピクセル数を定量化すると、allogeneic 群でみられる HSP47 の上昇が、VA-lip HSP47 投与で有意に抑制されていることが判明した。**(Figure 13)**。



さらに皮膚から cDNA を抽出し、定量 PCR を行うことで、allogeneic 群での *Hsp47* の発現亢進と VA-lip HSP47 による発現抑制を確認しようとしたが、syngeneic 群と Allogeneic 群の間に有意差が得られず断念した (**Figure 14**)。これは、allogeneic 群にて、皮膚に大量にリンパ球が浸潤していることにより、cDNA を定量して作成する際に影響を与えていたことが原因と考えられる。

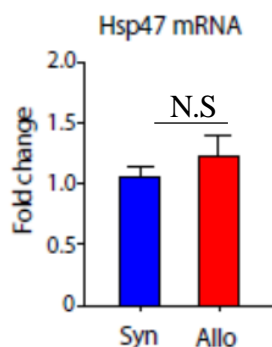


Figure 14. 移植後の皮膚の HSP47 発現 (定量 PCR)

Figure 3と同様に移植を行い、day+42の皮膚からcDNAを作成し、*Hsp47* mRNAの定量PCRを行った。Syn; syngeneic群 (n=14)、Allo; allogeneic群 (n=27)。データは3実験の結果を組み合わせたもので、平均値と標準誤差で示した。N.S.; not significant.

また、**Figure 5B**で示しているとおおり、皮膚慢性GVHDの線維化病変に集積する筋線維芽細胞は、RBP1を発現しているが、VA-lip HSP47の投与によって、allogeneic群でのRBP1陽性細胞の増加が見られなくなることが判明し、VA-lip HSP47は皮膚慢性GVHDを発症したマウスの皮膚の筋線維芽細胞に取り込まれて、HSP47の発現を抑制するのみならず、筋線維芽細胞そのものを減少させていることが判明した (**Figure 15**)。

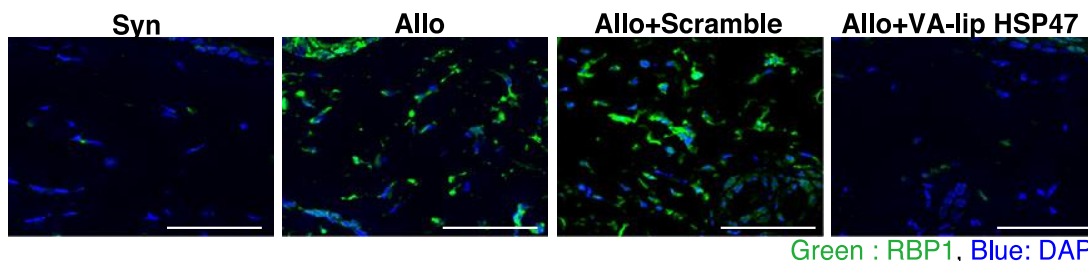


Figure 15 皮膚慢性GVHDに対するVA-lip HSP47予防投与後の皮膚RBP1免疫染色
Figure 1と同様に移植したマウスに、VA-lip HSP47もしくはVA-lip scramble siRNAを週3回、day +1からday +41に投与し、day +42に皮膚サンプルを採取した。皮膚サンプルの、RBP1 (緑)の免疫染色を、DAPI (青)で行った核染色とともに示している。Syn; syngeneic群、Allo; allogeneic群、Allo+Scramble; allogeneic+VA-lip scramble群、Allo+VA-lip HSP47; allogeneic+VA-lip HSP47群。倍率40倍、Scale bar; 50 μ m。

上記の様な、VA-lip HSP47投与による筋線維芽細胞の減少が、皮膚慢性GVHDにおける線維化改善効果につながっているかを検討するため、MT染色にて組織学的検討を行った。day+42のMT染色の画像から、allogeneic群では著明な真皮の肥厚やコラーゲン沈着が見られ線維化が発症していることがわかるが、VA-lip HSP47投与によって、これらの所見が改善していると考えられた (**Figure 16**)。

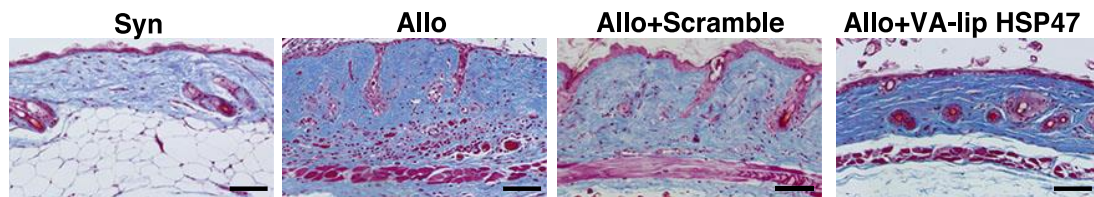


Figure 16. 皮膚慢性 GVHD に対する VA-lip HSP47 予防投与後の皮膚 MT 染色
 骨髄移植は Figure3 と同様に, VA-lip HSP47 投与は Figure 12 と同様に行った。day+42 の皮膚のパラフィン切片の MT 染色を示す。Syn; syngeneic 群、Allo; allogeneic 群、Scramble; allogeneic+VA-lip scramble 群。倍率 20 倍、Scale bar; 50 μ m。

MT 染色の画像を用いて、真皮厚 (**Figure 17A**) を測定したところ、慢性 GVHD の線維化を発症した皮膚では、著明な真皮の肥厚が見られており、VA-lip HSP47 投与によって肥厚が抑制されていることが示された。day+42 に採取した皮膚でコラーゲンアッセイを行って、コラーゲンの沈着量を測定したところ、慢性 GVHD の線維化によって見られるコラーゲン沈着量の増加が、VA-lip HSP47 によって有意に減少していた (**Figure 17B**)。こうした結果より、VA-lip HSP47 は慢性 GVHD の皮膚線維化に対して、線維化予防効果があることが示された。一方で、VA-lip scramble siRNA を投与した群では、VA-lip HSP47 群のような線維化予防効果は得られず、このことは、VA-lip HSP47 に含まれているビタミン A には線維化抑制効果はなく、HSP47 に対する siRNA の配列に特有の線維化抑制効果であることが示された (**Figure 12-13,15-17**)。

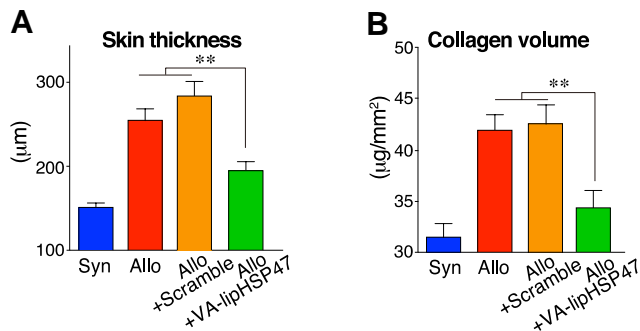


Figure 17. 皮膚慢性 GVHD に対する VA-lip HSP47 予防投与後の真皮厚と皮膚コラーゲン沈着量

(A) day +42 の MT 染色の画像を用いて真皮厚を測定した。(B) day +42 の皮膚でコラーゲンアッセイを行い、皮膚に沈着しているコラーゲン量を測定した。Syn; syngeneic 群 (n=19)、Allo; allogeneic 群 (n=28)、Allo+VA-lip HSP47; allogeneic+VA-lip scramble 群 (n=10)、Allo+ VA-lip HSP47; allogeneic +VA-lip HSP47 群 (n=18)。データは 5 実験の結果を組み合わせたもので、平均値と標準誤差で示した。 **P < 0.01

更に、コラーゲンアッセイでのコラーゲン量測定の外に、ヒドロキシプロリンアッセイによるヒドロキシプロリン測定を行ったが、syngeneic 群と allogeneic 群の間に有意差がなく、コラーゲンアッセイのような結果が得られなかった(Figure 18)。原因としては、サンプル量の均一化や中和過程での微小な誤差などが重なり、両群の差が小さくなってしまったと考えられる。

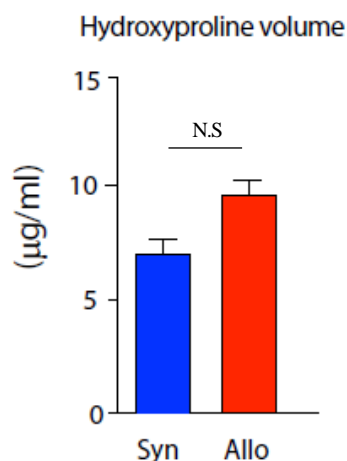


Figure 18. 皮膚慢性 GVHD モデルのヒドロキシプロリンアッセイ

day+42 の皮膚を採取し、ヒドロキシプロリン量を比較した。

Syn; syngeneic 群 (n=14)、Allo; allogeneic 群 (n=27) データは 3 実験の結果を組み合わせたもので、平均値と標準誤差で示した。 N.S.; not significant.

VA-lip HSP47 は移植後生存率や免疫、ドナー血球生着に影響を与えない

現行の GVHD 治療薬はステロイド剤を始めとして、その免疫抑制効果が薬効の主体となっている。VA-lip HSP47 は、線維芽細胞を直接標的とするため、免疫抑制効果は有しないため、全身性の GVHD の抑制や生着に対する影響は有しないことが予想される。移植後に VA-lip HSP47 の予防投与を行った際の、生存率を検討したところ、VA-lip HSP47 投与によって移植後の生存率は変化がなく、消化管 GVHD などのその他全身性 GVHD に対しては効果が無いことが確認された (Figure 19)。

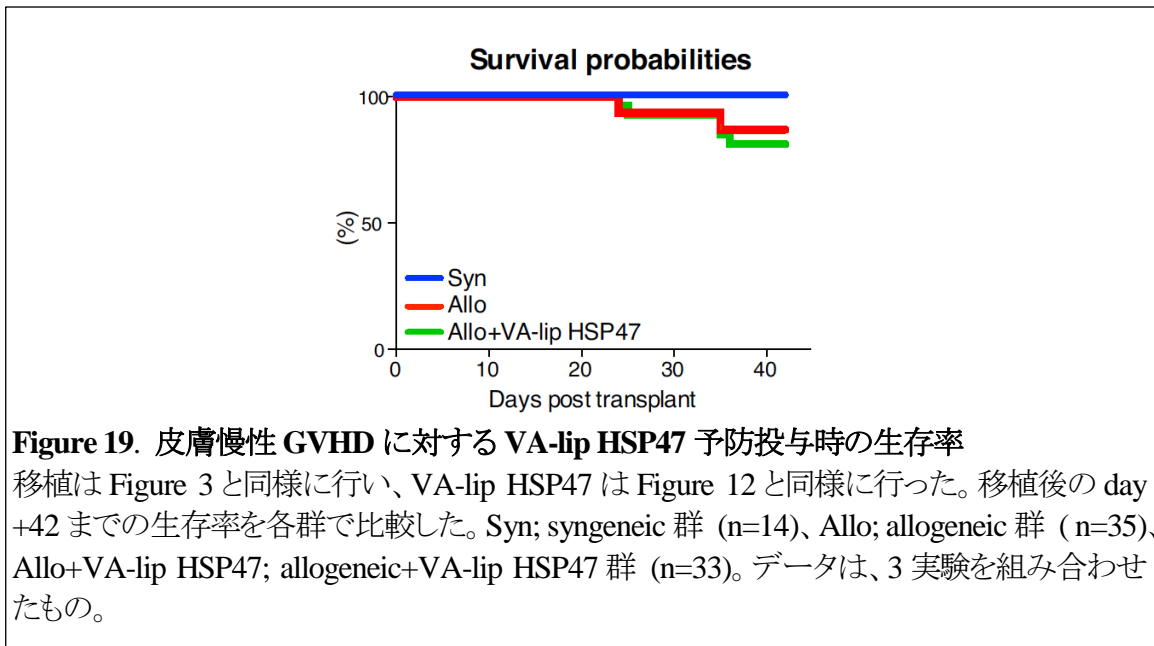


Figure 19. 皮膚慢性 GVHD に対する VA-lip HSP47 予防投与時の生存率

移植は Figure 3 と同様に行い、VA-lip HSP47 は Figure 12 と同様に行った。移植後の day +42 までの生存率を各群で比較した。Syn; syngeneic 群 (n=14)、Allo; allogeneic 群 (n=35)、Allo+VA-lip HSP47; allogeneic+VA-lip HSP47 群 (n=33)。データは、3 実験を組み合わせたもの。

胸腺の CD4/CD8 共陽性細胞は GVHD の標的となり、著明に減少することが知られているので、day +42 における胸腺の CD4/CD8 共陽性細胞数を測定した。また脾臓のドナー T 細胞数も GVHD によって変化するためこれも検討した。ドナー T 細胞は CD229.1 陽性の T 細胞として定義した。その結果、胸腺の CD4/CD8 共陽性 T 細胞数や脾臓の T 細胞数は、allogeneic 群と VA-lip HSP47 を投与した allogeneic 群の間で有意差はなく、VA-lip HSP47 は副腎皮質ステロイドのように、全身的な免疫抑制効果を有していないことが確認された (Figure 20A, B)。

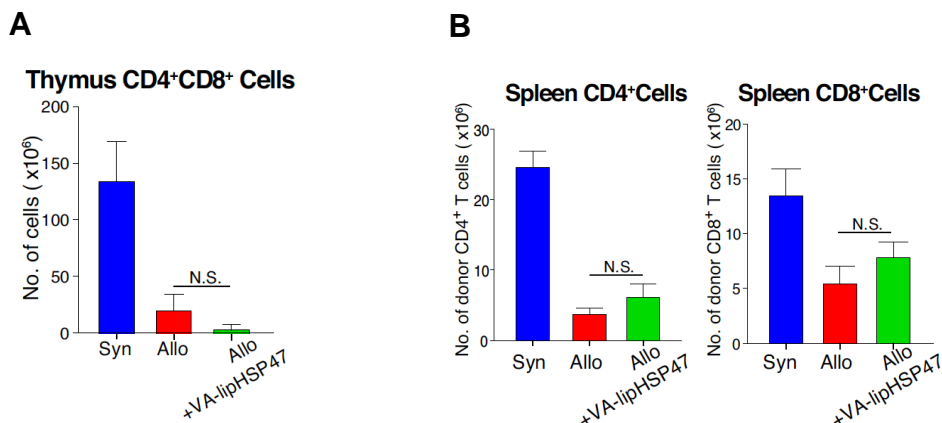


Figure 20. 皮膚慢性 GVHD に対する VA-lip HSP47 予防投与後の胸腺 CD4/CD8 共陽性 T 細胞数と脾臓のドナー T 細胞数

移植は Figure 3 と同様に行い、VA-lip HSP47 投与は Figure 12 と同様に行った。移植後 day+42 の胸腺 CD4/CD8 共陽性 T 細胞数 (A)、脾臓の CD4, CD8 陽性ドナー T 細胞数 (B) をフローサイトメリーによって検討した。Syn; syngeneic 群、Allo; allogeneic 群。各群 n=4-9。データは 2 実験を組み合わせたもので、平均値と標準誤差で示している。N.S.; not significant.

移植の成功には、ドナー血球の生着が必須となるので、移植後のドナー血球の生着に関しても検討した。day+42 の脾臓にて T 細胞におけるドナー細胞の割合を検討したところ、VA-lip HSP47 を投与群・非投与群いずれも、100%に近い生着が得られており、VA-lip HSP47 は移植後の血球生着も阻害しなかった (Figure 21)。以上より、VA-lip HSP47 は全身性の GVHD やドナー血球生着、免疫再構築に影響を与えることなく、皮膚線維化を抑制することが示された。

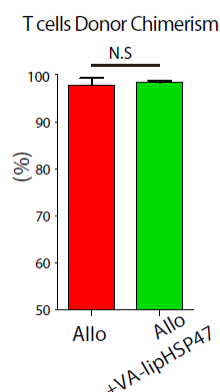


Figure 21. 皮膚慢性 GVHD に対する VA-lip HSP47 予防投与後の脾臓 T 細胞のドナーキメリズム解析

Figure 3 と同様に Allogeneic の骨髄移植を行い、Figure 12 と同様に VA-lip HSP47 を投与した。day+42 の脾臓でドナーのキメリズムをフローサイトメリー法で検討した。Syn; syngeneic 群、Allo; allogeneic 群。各群 n=8-9、データは平均値と標準誤差で示している。

VA-lip HSP47 は完成した皮膚線維化を改善させる

以上の結果、VA-lip HSP47 は全身的な免疫抑制や生着阻害を起こすことなく、皮膚慢性 GVHD による線維化を予防することが示された。最後に、VA-lip HSP47 を慢性 GVHD による皮膚線維化の治療に応用するため、既に発症した慢性 GVHD の皮膚線維化病変への治療的効果を検討した。まず、前述した骨髄移植モデルでは、day +21 時点で Allogeneic 群に慢性 GVHD が既に発症していることを、病理スコア上昇と組織学的な線維化によって確認した (Figure 22)。

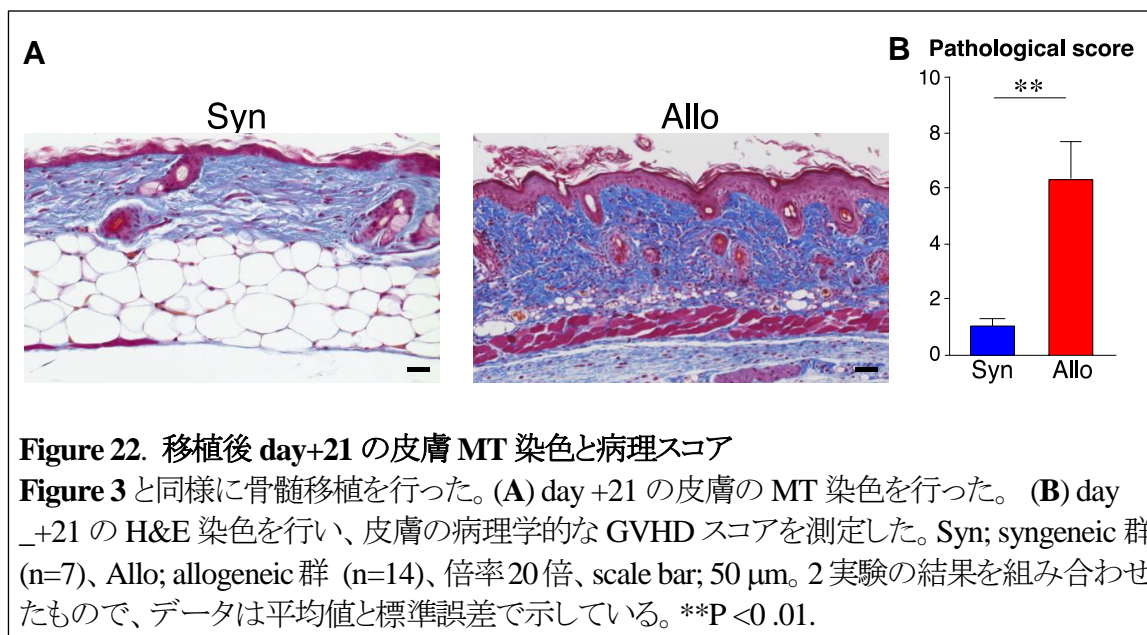


Figure 22. 移植後 day+21 の皮膚 MT 染色と病理スコア

Figure 3 と同様に骨髄移植を行った。(A) day +21 の皮膚の MT 染色を行った。(B) day +21 の H&E 染色を行い、皮膚の病理学的な GVHD スコアを測定した。Syn; syngeneic 群 (n=7)、Allo; allogeneic 群 (n=14)、倍率 20 倍、scale bar; 50 μ m。2 実験の結果を組み合わせたもので、データは平均値と標準誤差で示している。**P < 0.01.

この慢性 GVHD の皮膚線維化を既に発症したマウスに、day +21 から day +41 まで週 3 回、VA-lip HSP47 を投与したところ、VA-lip HSP47 投与群では、真皮の肥厚やコラーゲン沈着量が有意に改善していた (Figure 23)。このことより、VA-lip HSP47 は皮膚慢性 GVHD の線維化に対して、予防効果のみならず治療効果も持つことが示され、臨床的に有望な薬剤であることが期待される。

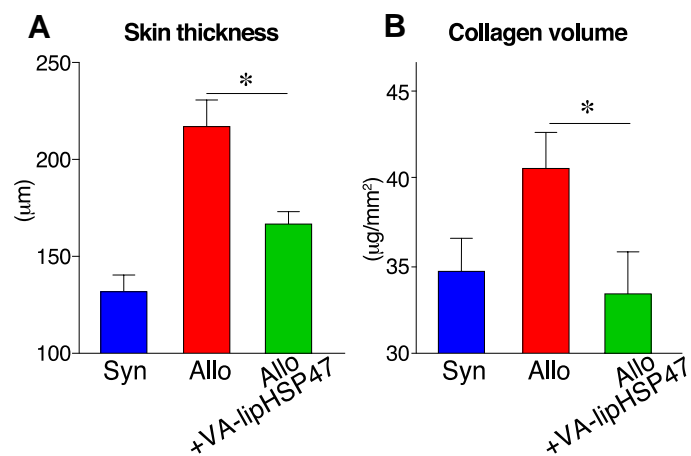


Figure 23. 慢性皮膚 GVHD に対する VA-lip HSP47 治療投与後の真皮厚(A)とコラーゲン量(B)

移植は Figure 3 と同様に行い、day +21 から day +41 まで週 3 回、VA-lip HSP47 を投与した。day +42 の真皮厚(A)とコラーゲン量 (B)を比較した。Syn; syngeneic 群 (n=7)、Allo; allogeneic 群 (n=14)、Allo+VA-lip HSP47; allogeneic+VA-lip HSP47 群 (n=11)。2 実験を組み合わせたもので、データは平均値と標準誤差で示している。*P < 0.05.

考察

慢性 GVHD は、多臓器の線維化と機能不全を特徴とする。強皮症様の線維化を呈する皮膚慢性 GVHD は、慢性 GVHD 全体の 15.5% を占め、治療に難渋するもののひとつである¹⁷。現在、移植の支持療法や急性 GVHD の予防法が発展し、移植の長期生存者が増加しており、慢性 GVHD の重要性はますます大きなものとなっている。近年、移植医療における臨床試験の指標として、GVHD-free, relapse-free survival (GRFS) が盛んに用いられるようになってきている¹⁸。GRFS を達成するためには、治療を必要とするような慢性 GVHD を発症しないことが条件となり、慢性 GVHD の予防が移植の成功に重要であることを示している。

慢性 GVHD の病態生理については、急性 GVHD と比較すると、未だ解明されていない点が多いが、これまでのマウスモデルやヒト検体を用いた研究で、T 細胞に加えて、B 細胞も重要な役割を果たしていることが知られている¹⁹⁻²³。急性 GVHD などによる胸腺の異常が、胸腺の T 細胞の negative selection を障害し、自己反応性の T 細胞の出現と慢性 GVHD の病理所見の出現につながることを示唆されており^{24, 25}、自己免疫性疾患との病態の共通性が指摘されている。また皮膚慢性 GVHD では、Th/Tc17 細胞の重要性が指摘されている¹²。こうした T 細胞の果たす役割とともに、慢性 GVHD を発症した患者では、様々な自己抗体が検出されることも知られており、B 細胞の異常な活性化も、慢性 GVHD の病態に関与していると考えられる²⁶。さらに近年、T 細胞の異常と B 細胞の活性化をつなぐものとして、濾胞性ヘルパー T 細胞の重要性も指摘されている²⁰。こうした、T 細胞・B 細胞の活性化の結果、慢性炎症や自己抗体の組織への沈着が起き、組織傷害が生じると考えられる。

現在、皮膚慢性 GVHD の治療としては、T 細胞・B 細胞の抑制を目的とした、副腎皮質ステロイドの投与が標準的治療であるが、長期間の副腎皮質ステロイドの使用は、広範な免疫抑制のため、感染症の発症や腫瘍の再発につながる可能性がある。また副腎皮質ステロイドに抵抗性の症例には、ミコフェノール酸モフェチル、リツキシマブ、イマチニブメシレート、ボルテゾミブ、ルキソリチニブなどが使用されることがあるが^{27, 28, 29, 30, 31}、未だ標準的な二次治療は存在しない。また、これらの薬剤はいずれも、免疫抑制・調整作用を持つため、感染症の発症や移植片対白血病効果の減弱を起こす可能性がある。VA-lip HSP47 は上記薬剤と比較して、慢性 GVHD による線維化過程の、T 細胞や B 細胞より下流を阻害するため、免疫に与える作用が少ないと考えられる。従って、移植片対白血病効果を障害することが少ないと予想される。今後の課題として、腫瘍モデルにおいて、VA-lip HSP47 が腫瘍免疫に与える影響を検討する必要がある。

過度の線維化は、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの過剰な蓄積がその病態で、様々な臓器の機能不全につながる。こうした線維化の病態では、炎症期の際に浸潤する、炎症性マクロファージもしくは炎症期に活性化された組織常在マクロファージが重要な役割を果たすと考えられる。こうしたマクロファージは、TGF- β のような線維化に関連するサイトカインを大量に分泌し、線維芽細胞を、線維化および組織リモデリングにおける主要なメディエーターである筋線維芽細胞へと分化させる^{6, 15-16, 32}。マクロファージの生存は CSF-1 レセプターのシグナルに依存するため、CSF1 レセプター阻害抗体 (α CSF1R) を移植後に投与

すると、マクロファージを除去することができる。我々の行ったマクロファージの除去実験において、マクロファージを除去すると、慢性 GVHD において皮膚の TGF- β 量が低下し、筋線維芽細胞の集積が見られなくなることが示された。また、培養線維芽細胞を TGF- β で刺激すると、HSP47 の発現が亢進し、筋線維芽細胞へ分化することが示された。この結果は、我々のものとは異なるクローンの α CSF1R モノクローナル抗体を用いたマクロファージ除去により、GVHD の病理像が著明に改善したという、最近発表された知見とも一致している³³。以上のように、CSF1R シグナルを標的とし、TGF- β を始めとする線維化関連サイトカインの産生を抑えることは、皮膚慢性 GVHD の有効な治療になると考えられる^{33,34,35}。しかしながら、マクロファージは異物や老化細胞の除去によって組織のホメオスタシスを維持する重要な細胞であり、環境によっては抗炎症作用を持つこともある重要な細胞である。移植前に α CSF1R モノクローナル抗体を用いて、レシピエントのマクロファージを除去することで、ドナーT細胞の活性化が亢進し、急性 GVHD を増悪してしまうことも報告されており^{33,36}、マクロファージ除去はタイミング等によっては等によっては有害になる可能性があり、より安全な線維化治療薬の開発が望ましい。

病的状態では、筋線維芽細胞は組織に定常し、過剰な線維化を引き起こしている^{7,16}。我々は、マウスの皮膚慢性 GVHD の線維化部位において、筋線維芽細胞が蓄積していることを示した。慢性 GVHD を発症した患者でも、皮膚の生検標本で筋線維芽細胞が増加していることが示されており、筋線維芽細胞は臨床の造血幹細胞移植後の慢性 GVHD においても重要な役割を果たしていると考えられる³⁷。HSP47 は、コラーゲンの成熟と分泌に重要な役割を担っており⁹、皮膚線維化以外の様々な線維症疾患においても、この HSP47 が過剰発現していることが示されている³⁸⁻⁴²。これまで造血幹細胞移植後の HSP47 の役割に関しては、眼科領域での研究が進んでいる。慢性 GVHD は涙腺の線維化をきたし、角膜障害を呈することがあるが、こうした慢性 GVHD 患者の涙腺では HSP47 が増加していることが報告されており、慢性 GVHD による様々な臓器・組織の線維化の治療に HSP47 が標的となる可能性がある⁴³。本研究では、慢性 GVHD の皮膚で、HSP47 を発現する筋線維芽細胞が集積していることが示された。コラーゲン産生における HSP47 の重要性と、複数の臓器での HSP47 の亢進があることから、筋線維芽細胞の HSP47 は慢性 GVHD による、様々な臓器の線維化の治療標的として非常に有望なものである。HSP ファミリーは、熱などのストレス下で発現が上昇し、様々なタンパクのシャペロンとなって、蛋白のフォールディング、輸送、分解などに慣用する分子の一群である。GVHD と HSP ファミリーの関連性としては、HSP47 の他に、HSP70 や HSP90 が報告されている。ラットの皮膚 explant モデルにおいて、HSP70-1・70-2 遺伝子の増幅が、GVHD のグレードと相関することや⁴⁴、HSP90 阻害剤である 17-allylamino-demethoxygeldanamycin が、腸管の幹細胞を保護し、腸管急性 GVHD を改善することが示されている⁴⁵。また、末梢血幹細胞移植のレシピエントにおいて、血清中の抗 HSP70 抗体と抗 HSP90 抗体のレベルが、急性・慢性 GVHD 発症と平行するという結果も出ている⁴⁶。以上より、HSP47 を含む HSP ファミリーは、急性・慢性 GVHD の治療ターゲットとなってくる可能性がある。

コラーゲンは正常組織の細胞外基質としても重要なものであり、正常のコラーゲン産生を阻害すると毒性につながるため、これが HSP47 を標的とした治療法の欠点となる可能性がある。我々の使用した VA-lip はビタミン A の受容体である RBP を介して細胞内に取り込ま

れる、筋線維芽細胞を標的とした新しい薬物伝達システムである¹⁰。我々の研究成果により、皮膚慢性GVHDにおける線維化病変では、筋線維芽細胞がHSP47と膜結合型のRBPであるRBP1の両方を発現していることが判明した。一方正常の皮膚の線維芽細胞は、ほとんどRBP1を発現していなかった。そのため、VA-lipにHSP47に対するsiRNAを包含させたVA-lip HSP47は、筋線維芽細胞で特異的にHSP47を抑制し、正常組織のコラーゲンを減少させることなく、線維化を改善できることが予測された。移植後にVA-lip HSP47を投与したところ、予想通りに、線維化部位の筋線維芽細胞のHSP47の発現を抑制し、コラーゲン蓄積量を減少させ皮膚の肥厚などを改善できることが示された。さらに、局所的な線維化病変を作成したマウスでは、VA-lip HSP47は、線維化部位に特異的に分布する一方で、健常部位の皮膚には分布せず、コラーゲン産生も低下させないことも確認された。こうした知見は、VA-lip HSP47による皮膚線維化治療は、健常部位の皮膚弾性や整合性は維持したまま、病変部位の線維化を軽減できることを示しており、今後臨床応用での毒性を考える上で非常に重要な所見である⁴⁷。一方、創傷治癒過程でHSP47発現が亢進し、重要な役割を担っていることが報告されている^{48, 49}。また、HSP47発現亢進により、創傷治癒過程で過剰なコラーゲン産生が起こり、ケロイドを形成することが知られており、ケロイド治療のターゲットとしても注目されている⁵⁰。VA-lip HSP47投与により、この創傷治癒過程にどのような影響を与えるかに関して、今後更なる検討を行う必要がある。

今回用いたVA-Lipは、ビタミンAを含有しており、選択的に筋線維芽細胞に取り込まれると考えられている。一方、ビタミンAは様々な免疫調整作用を持つことが知られている。ビタミンA誘導体であるレチノイン酸の類似体であるAm80は、マウス慢性GVHDに有効であることが報告され、現在臨床試験が行われている¹²。またビタミンAの誘導体であるEtretinateも慢性GVHDの皮膚線維化に有効であることが報告されている⁵¹。興味深いことに、ビタミンA欠乏食は、腸管の急性GVHDを軽減することが報告されているが、小児の移植患者では、ビタミンAの血液中の濃度が低いと、腸管のGVHDが増えるとの報告もあり、今後の検討が待たれる^{52, 53}。こうした報告より、VA-lip HSP47の組成であるビタミンA自体がGVHDを改善させた可能性も考えられたため、われわれは、HSP47を抑制しないscramble RNAを含有したVA-lipを、コントロールとして使用し、VA-lip自体には線維化の抑制効果が見られないことを確認しており、少なくとも我々の用いた薬剤に含有される用量では、ビタミンA自体による、線維化抑制は否定的である。

近年、全身性硬化症や肺線維症、肝硬変などに対する、抗線維化薬が開発されており、HSP47をターゲットにしたものも報告されている。Pirfenidoneは、特発性肺線維症に対してFDA認可の抗線維化薬であるが⁵⁴、実験モデルにおいて、マクロファージ浸潤とTGF- β 産生を抑制し、HSP47を減少させることで、皮膚や肺の慢性GVHDを改善させることが報告されている。MiR-29bもまた、線維症でのHSP47発現を抑制する⁵⁵。抗TGF- β モノクローナル抗体であるfresolimumabは、全身性硬化症患者の皮膚において、HSP47発現を減少させることで線維化を改善する⁵⁶。骨髄由来間葉系幹細胞は、筋線維芽細胞の増殖を抑制し、TGF- β 1・HSP47などを減少させて線維化を改善するとの報告もあり、現在主に急性GVHDの治療に使用されている間葉系幹細胞療法が、慢性GVHDの線維化病変に奏功する可能性も示唆される⁵⁷。HSP47 siRNAを包含したMesoporous silica nanoparticleが、皮膚線維化を軽減すること報告されているが、この薬剤は我々の用いたVA-lip HSP47とは異なり、

RBPI 陽性の筋線維芽細胞を選択的に標的するわけでは無いので、線維化部位への集積や正常部位への毒性に関しては未だ不明な点が多い⁵⁸。いずれにしても、こうした線維化阻害剤は、ステロイド剤を始めとする、これまでの GVHD の治療薬とは異なり、直接 T 細胞を抑制しないため、移植の主目的である抗白血病効果や、感染防御を減弱させることなく、慢性 GVHD を治療することができる画期的な治療薬である。中でも、VA-lip HSP47 は、線維化病変への選択性が高く、安全性の優れる薬剤と考える。現在、VA-lip HSP47 は、肝硬変に対する臨床治験が行われている段階であり、臨床応用も現実的に考えられる薬剤となっている。さらに、本研究の結果、VA-lip HSP47 は投与後に、皮膚に到達することが証明されたので、全身性皮膚硬化症など様々な皮膚線維症に対して、安全性の高い治療法となりうることが示され、臨床応用が待たれる。

慢性 GVHD は全身性疾患であるが、本研究では皮膚の線維化に限定して研究を行った。別の移植モデルでは、皮膚以外の線維化病変を生ずることが知られており¹²、そうしたモデルを用いて VA-lip HSP47 の有効性を示すことができる可能性がある。最後に、本研究の限界としては、検証内容が動物実験の域を出ていないことが挙げられる。今後、ヒトへの応用を検証する際には、慢性 GVHD 患者の皮膚サンプルを収集し、線維化部位にて HSP47 が増加していることや、ヒトの筋線維芽細胞が VA-lip HSP47 を取り込むことを証明する必要がある。ヒトの強皮症では、皮膚の HSP47 発現が亢進していることが既に示されている²⁵ので、同様に慢性 GVHD でも示すことができる可能性が高い。また、HSP47 が直腸癌のリンパ節転移や、急性間質性肺炎、強皮症のバイオマーカーとして有用であるとの報告もあり^{59,60}、同様に慢性 GVHD のバイオマーカーとして利用できる可能性がある。本研究は、これまで有効な治療の少なかった慢性 GVHD に対して、新規治療法を提示することができた点において、意義のあるものと考えられる。

総括および結論

本研究から得られた新知見

- ・慢性 GVHD の皮膚線維化部位には、RBP1 と HSP47 が共に陽性の筋線維芽細胞が集積する
- ・CSF1R 依存性マクロファージ依存性に、慢性 GVHD の皮膚線維化部位へ筋線維芽細胞が集積する
- ・VA-lip HSP47 は、in vitro にて TGF- β 刺激筋線維芽細胞の HSP47 発現を抑制する
- ・VA-lip HSP47 は、経静脈投与後、皮膚線維化部位に特異的に分布する。
- ・VA-lip HSP47 は、ブレオマイシン誘発皮膚線維症や、慢性 GVHD の皮膚線維化を軽減する。
- ・VA-lip HSP47 は、移植後生存率や、ドナー血球生着に影響を与えない
- ・VA-lip HSP47 は、発症した皮膚線維化に対する治療効果もある。

上記の新知見の意義

HSP47 が慢性 GVHD の皮膚線維化にて、重要な役割を果たしていることを発見し、これまで、肝硬変や膵臓線維化などに対して有効であることが報告されてきた VA-lip HSP47 が、皮膚線維化治療にも有効であることを初めて証明した。更に、VA-lip HSP47 は、慢性 GVHD の皮膚線維化に対して、予防効果のみならず治療効果を持つことが判明した。VA-lip HSP47 は、正常皮膚には分布せず、全身性の免疫抑制を起こさないことが判明し、これは、従来の免疫抑制を主体とした治療法と比較して、有効で副作用の少ない新規治療戦略となりうることを示し、大きな意義を持つと考える。

今後の課題

本研究の限界は、マウスモデルでの検証に留まっている点である。今後は、VA-lip HSP47 がヒトに応用可能かを検討する必要がある。具体的には、ヒトの皮膚慢性 GVHD においても、マウスと同様の現象が起こっていることを確認し、ヒトでの有効性を立証しなければならない。また、VA-lip HSP47 の副作用に関しても、より詳細に検証して、安全性を検証する。VA-lip HSP47 は、皮膚以外の慢性 GVHD の臓器線維化に対しても有効である可能性が高いので、他臓器の慢性 GVHD に対する治療応用も検討すべきである。

謝辞

北海道大学大学院 医学研究院 内科系部門 内科学分野 血液内科学教室
豊嶋崇徳教授、橋本大吾講師、小野澤真弘助教、早瀬英子助教
小笠原励起, 高橋秀一郎, 大東寛幸, 松岡里湖, 荒隆英, 横山絵美, 江端浩
札幌医科大学
新津洋司郎名誉教授

日東電工株式会社
味吞憲二郎氏、宮崎美代乃氏

引用文献

1. Wingard, J. R. et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Oncol* 29, 2230-2239 (2011).
2. Arai, S. et al. Increasing incidence of chronic graft-versus-host disease in allogeneic transplantation: a report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research. *Biol. Blood. Marrow. Transplant* 21, 266-274 (2015).
3. Jagasia, M. H. et al. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol. Blood. Marrow. Transplant* 21, 389-401.e381 (2015).
4. Cooke, K. R. et al. The Biology of Chronic Graft-versus-Host Disease: A Task Force Report from the National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood. Marrow. Transplant* 23, 211-234 (2017).
5. Stewart, B. L. et al. Duration of immunosuppressive treatment for chronic graft-versus-host disease. *Blood* 104, 3501-3506 (2004).
6. Flowers, M. E. & Martin, P. J. How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood* 125, 606-615 (2015).
7. Hinz, B. et al. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am. J. Pathol* 170, 1807-1816 (2007).
8. Nagata, K., Saga, S. & Yamada, K. M. A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J. Cell. Biol* 103, 223-229 (1986).
9. Ito, S. & Nagata, K. Biology of Hsp47 (Serpin H1), a collagen-specific molecular chaperone. *Semin. Cell. Dev. Biol* 62, 142-151 (2017).
10. Sato, Y. et al. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat. Biotechnol* 26, 431-442 (2008).
11. Ishiwatari, H. et al. Treatment of pancreatic fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone in vitamin A-coupled liposomes. *Gut* 62, 1328-1339 (2013).
12. Nishimori, H. et al. Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating Th1 and Th17. *Blood* 119, 285-295 (2012).
13. Anderson, B. E. et al. Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. *Blood* 104, 1565-1573 (2004).
14. Alexander KA, Flynn R, Lineburg KE, et al. CSF-1-dependant donor-derived macrophages mediate chronic graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest* 124, 4266-4280 (2014).
15. Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for

fibrotic disease. *Nat. Med* 18, 1028-1040 (2012).

16. Teshima, T., Wynn, T. A., Soiffer, R. J., Matsuoka, K. & Martin, P. J. Chronic graft-versus-host disease: how can we release Prometheus? *Biol. Blood. Marrow. Transplant* 14, 142-150 (2008).
17. Skert, C. et al. Sclerodermatous chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: incidence, predictors and outcome. *Haematologica* 91, 258-261 (2006).
18. Solomon, S. R. et al. Current Graft-versus-Host Disease-Free, Relapse-Free Survival: A Dynamic Endpoint to Better Define Efficacy after Allogeneic Transplant. *Biol. Blood. Marrow. Transplant* 23, 1208-1214 (2017).
19. Allen, J. L. et al. B cells from patients with chronic GVHD are activated and primed for survival via BAFF-mediated pathways. *Blood* 120, 2529-2536 (2012).
20. Srinivasan, M. et al. Donor B-cell alloantibody deposition and germinal center formation are required for the development of murine chronic GVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood* 119, 1570-1580 (2012).
21. Zhang, C. et al. Donor CD4+ T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations. *Blood* 107, 2993-3001 (2006).
22. Kuzmina, Z. et al. CD19(+)CD21(low) B cells and patients at risk for NIH-defined chronic graft-versus-host disease with bronchiolitis obliterans syndrome. *Blood* 121, 1886-1895 (2013).
23. Young, J. S. et al. Donor B cells in transplants augment clonal expansion and survival of pathogenic CD4+ T cells that mediate autoimmune-like chronic graft-versus-host disease. *J. Immunol* 189, 222-233 (2012).
24. Tivol, E., Komorowski, R. & Drobyski, W. R. Emergent autoimmunity in graft-versus-host disease. *Blood* 105, 4885-4891 (2005).
25. Sakoda, Y. et al. Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* 109, 1756-1764 (2007).
26. Zorn, E. et al. Minor histocompatibility antigen DBY elicits a coordinated B and T cell response after allogeneic stem cell transplantation. *J. Exp. Med* 199, 1133-1142 (2004).
27. Baudard, M. et al. Mycophenolate mofetil for the treatment of acute and chronic GVHD is effective and well tolerated but induces a high risk of infectious complications: a series of 21 BM or PBSC transplant patients. *Bone. Marrow. Transplant* 30, 287-295 (2002).
28. Bates, J. S., Engemann, A. M. & Hammond, J. M. Clinical utility of rituximab in chronic graft-versus-host disease. *Ann. Pharmacother* 43, 316-321 (2009).
29. Magro, L. et al. Efficacy of imatinib mesylate in the treatment of refractory

- sclerodermatous chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 42, 757-760 (2008).
30. Pai, C. C. et al. Treatment of chronic graft-versus-host disease with bortezomib. *Blood* 124, 1677-1688 (2014).
 31. Hurabielle, C. et al. Efficacy and tolerance of ruxolitinib in refractory sclerodermatous chronic Graft-Versus-Host Disease. *Br. J. Dermatol* (2017).
 32. Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell. Biol* 122, 103-111 (1993).
 33. Hashimoto, D. et al. Pretransplant CSF-1 therapy expands recipient macrophages and ameliorates GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Exp. Med* 208, 1069-1082 (2011).
 34. MacDonald, K. P., Hill, G. R. & Blazar, B. R. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood* 129, 13-21 (2017).
 35. Du, J. et al. Pirfenidone ameliorates murine chronic GVHD through inhibition of macrophage infiltration and TGF- β production. *Blood* 129, 2570-2580 (2017).
 36. MacDonald, K. P. et al. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood* 116, 3955-3963 (2010).
 37. Fleming, J. N. et al. Cutaneous chronic graft-versus-host disease does not have the abnormal endothelial phenotype or vascular rarefaction characteristic of systemic sclerosis. *PLoS. One* 4 (2009).
 38. Takeda, K. et al. Greater than normal expression of the collagen-binding stress protein heat-shock protein-47 in the infarct zone in rats after experimentally-induced myocardial infarction. *Coron. Artery. Dis* 11, 57-68 (2000).
 39. Chu, H. et al. Involvement of collagen-binding heat shock protein 47 in scleroderma-associated fibrosis. *Protein. Cell* 6, 589-598 (2015).
 40. Kakugawa, T. et al. Expression of HSP47 in usual interstitial pneumonia and nonspecific interstitial pneumonia. *Respir. Res* 6, 57 (2005).
 41. Razzaque, M. S., Le, V. T. & Taguchi, T. Heat shock protein 47 and renal fibrogenesis. *Contrib. Nephrol* 148, 57-69 (2005).
 42. Abe, K. et al. Interstitial expression of heat shock protein 47 and alpha-smooth muscle actin in renal allograft failure. *Nephrol. Dial. Transplant* 15, 529-535 (2000).
 43. Ogawa, Y. et al. Role of heat shock protein 47, a collagen-binding chaperone, in lacrimal gland pathology in patients with cGVHD. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 48, 1079-1086 (2007).

44. Novota, P. et al. Correlation of Hsp70-1 and Hsp70-2 gene expression with the degree of graft-versus-host reaction in a rat skin explant model. *Transplantation* 85, 1809-1816 (2008).
45. Joly, A. L. et al. The HSP90 inhibitor, 17AAG, protects the intestinal stem cell niche and inhibits graft versus host disease development. *Oncogene* 35, 2948 (2016).
46. Goral, J., Shenoy, S., Mohanakumar, T. & Clancy, J. Antibodies to 70 kD and 90 kD heat shock proteins are associated with graft-versus-host disease in peripheral blood stem cell transplant recipients. *Clin. Exp. Immunol* 127, 553-559 (2002).
47. Nagai, N. et al. Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J. Cell. Biol* 150, 1499-1506 (2000).
48. Zhu, Y. et al. Overexpression of miR-29b reduces collagen biosynthesis by inhibiting heat shock protein 47 during skin wound healing. *Transl. Res* 178, 38-53.e36 (2016).
49. Singh, K., Agrawal, N. K., Gupta, S. K., Mohan, G. & Chaturvedi, S. Decreased expression of heat shock proteins may lead to compromised wound healing in type 2 diabetes mellitus patients. *J. Diabetes. Complications* 29, 578-588 (2015).
50. Chen, J. J. et al. Effect of heat shock protein 47 on collagen accumulation in keloid fibroblast cells. *Br. J. Dermatol* 156, 1188-1195 (2007).
51. Marcellus, D. C. et al. Etretnate therapy for refractory sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood* 93, 66-70 (1999).
52. Aoyama, K. et al. Inhibiting retinoic acid signaling ameliorates graft-versus-host disease by modifying T-cell differentiation and intestinal migration. *Blood* 122, 2125-2134 (2013).
53. Louder, D. T. et al. Lower levels of vitamin A are associated with increased gastrointestinal graft-versus-host disease in children. *Blood* 129, 2801-2807 (2017).
54. Noble, P. W. et al. Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet* 377, 1760-1769 (2011).
55. Zhang, Y. et al. MiR-29b inhibits collagen maturation in hepatic stellate cells through down-regulating the expression of HSP47 and lysyl oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 446, 940-944 (2014).
56. Rice, L. M. et al. Fresolimumab treatment decreases biomarkers and improves clinical symptoms in systemic sclerosis patients. *J. Clin. Invest* 125, 2795-2807 (2015).
57. Wu, Y. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int. Wound. J* 11, 701-710 (2014).
58. Morry, J. et al. Dermal delivery of HSP47 siRNA with NOX4-modulating mesoporous silica-based nanoparticles for treating fibrosis. *Biomaterials* 66, 41-52 (2015).
59. Mori, K. et al. Proteomics analysis of differential protein expression identifies heat

shock protein 47 as a predictive marker for lymph node metastasis in patients with colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 140, 1425-1435 (2017).

60. Kakugawa, T. et al. Serum heat shock protein 47 levels are elevated in acute interstitial pneumonia. *BMC. Pulm. Med* 14, 48 (2014).