HOKKAIDO UNIVERSITY

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［全文の要約］
Author(s)	山川, 知宏
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2344 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12840号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67480
Type	doctoral thesis
File Information	Tomohiro_Yamakawa_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文(要約)

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

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、相対的に慢性 GVHD の発症が増加している。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。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。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いくものではない。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。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。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。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、HSP47 に対する siRNA をリポゾーム化コーティングし、表面にビタミン A を発現したものである。肝臓の筋線維芽細胞の一種である星細胞は、レチノール結合受容体(RBP)を介して VA-lip HSP47 を取り込み、HSP47 がノックダウンされることでアポトーシスに至り、肝硬変が改善されることが報告されている。VA-lip HSP47 は、動物実験モデルにおいて、肝硬変の他にも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治験が進行中である。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。

まず、B10.D2 マウスもしくは BALB/c マウスをドナーとして、レシピエントの BALB/c マウスに 6 グレイの全身放射線照射後に、骨髄細胞 8×10^6 細胞・脾臓細胞 2.5×10^7 細胞を静脈内注射した。BALB/c マウスをドナーとした syngeneic 群と比較して、B10.D2 マウスをドナーとした allogeneic 群では、皮膚慢性 GVHD を発症し、移植後 day+42 時点で表皮・真皮肥厚と脂肪層消失が見られ、真皮内に著明なコラーゲン蓄積を認めた。また、非移植線維化モデルとして、B6 マウスの背部皮膚にブレオマイシン 100 μg を連日、21 日間皮下注射したところ、注射部位に限局する皮膚線維化を発症した。allogeneic 群の皮膚線維化部位では、α-SMA 陽性の筋線維芽細胞が増加・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 を発現していた。このことは、これらが VA-lip HSP47 のターゲットとなりうることを示していた。また、このモデルに抗 CSF1 受容体抗体を 0.5mg/body、day+7 から day+41 まで連日腹腔内投与し、マクロファージを除去したところ、allogeneic 群における真皮内の HSP47 発現と TGF-β発現が抑制された。このことより、allogeneic 群ではマクロファージ依存性に皮膚の TGF-β発現が亢進し、HSP47 陽性の筋線維芽細胞が集積することが示された。

in vitro にて VA-lip HSP47 を投与すると、皮膚線維芽細胞の TGF-β刺激を介した HSP47 mRNA 上昇を抑制し、同様の傾向が NIH/3T3 でも得られた。*in vivo* にて、蛍光標識した VA-lip HSP47 をブレオマイシン誘発皮膚線維症モデルに投与すると、VA-lip HSP47 はブレオマイシン注射部位の皮膚線維化病変に特異的に集積するが、正常皮膚には分布しなかった。更に、線維化部位のコラーゲン上昇は抑制されていたが、正常皮膚のコラーゲン量は減少しておらず、VA-lip HSP47 は正常皮膚に影響を及ぼさないことがわかった。次に、皮膚慢性 GVHD モデルに、VA-lip HSP47 を移植後 day+1 から day+41 まで、4.5mg/kg、週 3 回静脈内注射し、予防的に投与した。day+42 の allogeneic 群では真皮内の HSP47 が増加するが、これが VA-lip HSP47 によりノックダウンされ、真皮肥厚やコラーゲン量増加も抑制されて、有意に線維化を改善した。更に VA-lip HSP47 は、allogeneic 群における胸腺の CD4/CD8 共陽性細胞数や脾臓の CD4 陽性細胞・CD8 陽性細胞数、脾臓のドナーT 細胞キメリズムに変化を起こさず、移植後の生存率にも影響を及ぼさなかった。このことは、移植後の免疫再構築や血球生着、全身性 GVHD に影響しないことを示唆していた。

また、この慢性 GVHD モデルは移植後 day+21 時点で allogeneic 群にて皮膚線維化が完成しているが、VA-lip HSP47 を day+21 から day+41 まで、4.5mg/kg、週 3 回静脈内注射し、治療的に投与したところ、同様に day+42 時点の皮膚肥厚やコラーゲン量増加が抑制され、治療効果も示した。

以上の結果を総括すると、慢性 GVHD の皮膚線維化部位では、CSF1 陽性のマクロファージ依存性に、HSP47/RBP1 陽性の筋線維芽細胞が集積すること、この筋線維芽細胞は HSP47 依存性にコラーゲンを分泌すること、VA-lip HSP47 は筋線維芽細胞の HSP47 をノックダウンすることがまず判明した。そこで、VA-lip HSP47 を慢性皮膚 GVHD に対して投与したところ、予防的および治療的効果を示し、免疫抑制や全身性 GVHD 増悪などの副作用をきたさなかった。従って、VA-lip HSP47 は、皮膚慢性 GVHD に対して有用な治療方法となりうることが示された。