



Title	ルキソリチニブ局所投与による皮膚移植片対宿主病の新規治療法の開発と皮膚組織幹細胞の保護効果の検討
Author(s)	高橋, 秀一郎
Description	配架番号 : 2390
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13011号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13011
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70304
Type	doctoral thesis
File Information	Shuichiro_Takahashi.pdf



学 位 論 文

ルキシソリチニブ局所投与による皮膚移植片対宿主病の
新規治療法の開発と皮膚組織幹細胞の保護効果の検討

(Topical ruxolitinib protects skin stem cells and ameliorates skin
graft-versus-host disease)

2 0 1 8 年 3 月

北 海 道 大 学

高 橋 秀 一 郎

Shuichiro Takahashi

学 位 論 文

ルキシソリチニブ局所投与による皮膚移植片対宿主病の
新規治療法の開発と皮膚組織幹細胞の保護効果の検討

(Topical ruxolitinib protects skin stem cells and ameliorates skin
graft-versus-host disease)

2 0 1 8 年 3 月

北 海 道 大 学

高 橋 秀 一 郎

Shuichiro Takahashi

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	5 頁
実験方法	6 頁
実験結果	15 頁
考察	35 頁
総括および結論	39 頁
謝辞	41 頁
引用文献	42 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の成果の一部は以下の論文として投稿中である。

Shuichiro Takahashi, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Reiki Ogasawara, Hiroyuki Ohigashi, Takahide Ara, Emi Yokoyama, Ko Ebata, Satomi Matsuoka, Geoffrey R. Hill, Junichi Sugita, Masahiro Onozawa, and Takanori Teshima.

Topical ruxolitinib protects skin stem cells and maintain skin homeostasis in murine graft-versus-host disease.

雑誌名 Blood

Blood 2018: blood-2017-06-792614; doi:<https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-792614> (Epub ahead of print)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Shuichiro Takahashi, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, and Takanori Teshima.
Topical ruxolitinib protects LGR5⁺ stem cells in the hair follicles and ameliorates skin graft-versus-host disease.

2016 BMT Tandem Meetings (Best abstract award). 2016 年 2 月 20 日. ハワイ.

2. 高橋 秀一郎、橋本 大吾、早瀬 英子、豊嶋 崇徳

LGR5⁺ skin stem cells are targeted in GVHD and topical ruxolitinib protects them against GVHD. 第 78 回日本血液学会学術集会 (プレナリーセッション), 2016 年 10 月 14 日. 横浜.

緒言

移植片対宿主病 (graft-versus-host disease : GVHD) は同種造血幹細胞移植後の最も重大な合併症の 1 つであり、移植成績および移植後の QOL の改善を得るためには、その適切なマネジメントが重要と考えられる。GVHD は移植片由来のドナー T 細胞がレシピエントのアロ抗原によって活性化され、レシピエントの臓器障害を引き起こす疾患である。古典的な分類では、移植後 100 日以内に発症する急性 GVHD と 100 日以降に発症する慢性 GVHD に分けられるが、近年、移植法の変化に伴い GVHD の臨床像は多様化してきている。このため、GVHD の適切な管理には、その病態の理解が必須のものとなっている。

マウスモデルを用いた基礎研究により、急性 GVHD の病態の解明は飛躍的に進歩した。急性 GVHD の分子病態は、移植前処置に伴う組織障害と自然免疫の活性化、ドナー T 細胞の活性化とクローン性増殖、エフェクター細胞による組織障害の 3 つのステップによって構成されている¹。移植前処置は主に全身放射線照射および大量抗癌剤によって施され、残存する腫瘍細胞への殺細胞効果および移植する細胞の生着を担保することを目的とする。これによって傷害されたレシピエントの体細胞からは adenosine triphosphate (ATP) や尿酸などのダメージ関連分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) が放出され、同時に腸管粘膜のバリア機能の破綻によって、腸内細菌に由来する lipopolysaccharide (LPS) などの病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) が全身循環へ流入する。DAMPs や PAMPs は Toll-like receptor などのパターン認識受容体などを介して自然免疫系を賦活化し、TNF α や IL-1 β などの炎症性サイトカインの産生を促すとともに、抗原提示細胞の活性化を介してドナー T 細胞を活性化させる^{2,3}。レシピエントに輸注されたドナー T 細胞は脾臓やリンパ節などの二次リンパ組織で抗原提示細胞上のアロ抗原を認識して活性化し、クローン性に増殖しながら、IL-2 や IFN γ を産生する Th1 細胞や IL-17 など産生する Th17 細胞および細胞傷害性 T 細胞などに分化する。分化したドナー T 細胞はケモカインレセプターや接着因子によって標的臓器へと遊走し、炎症性サイトカインや細胞傷害性分子を介して組織傷害をもたらす。この際、全身循環に入った LPS などによって活性化したマクロファージも炎症性サイトカインを産生し、組織傷害に与っている。

従来、GVHD の主な標的細胞は成熟上皮細胞と考えられてきたが、近年、腸管 GVHD のモデルを利用した研究で、組織幹細胞が GVHD の標的細胞であり、組織幹細胞の傷害による組織修復機転の破綻が GVHD の難治性をもたらすと考えられている^{4,5}。腸管上皮の陰窩に存在する Lgr5⁺ 腸幹細胞は、腸吸収上皮細胞や抗菌ペプチド産生細胞であ

る Paneth 細胞などすべての腸管上皮細胞に分化する。腸管 GVHD においては Lgr5⁺腸幹細胞が傷害されることにより、腸吸収上皮細胞や Paneth 細胞の障害が修復されず、バリア機能が破綻するとともに抗菌ペプチドの分泌不全による腸内細菌叢の異常 (dysbiosis) を来し、腸内細菌由来の LPS などが全身循環に入ること、GVHD の増悪をもたらすと考えられている。一方で、Lgr5 のリガンドである R-spondin1 は Lgr5⁺腸幹細胞を刺激し、移植前処置やエフェクター細胞による腸管上皮の傷害を軽減させ、また Paneth 細胞を維持することによって、腸内細菌叢の異常を防ぎ、GVHD の改善をもたらすと報告されている^{4,6}。

このような GVHD による組織幹細胞の傷害は、腸管以外の臓器でも生じている可能性が考えられるが、これまでは研究が進んでいない。我々は GVHD の代表的な標的臓器の 1 つである皮膚において組織幹細胞の傷害について検討することとした。皮膚における組織幹細胞は、1990 年に Costasarelis らによって、マウス毛包の Bulge 領域に細胞周期が遅いラベル保持細胞 (label-retaining cell: LRC) が存在することによって発見された⁷。その後の研究により、Bulge 領域には cytokeratin 15 (CK15) および CD34 が特異的に発現していることが明らかになり^{8,9}、それらを利用した系統追跡実験 (lineage-tracing experiment) や免疫不全マウスへの移植実験により、Bulge 領域の細胞に多分化能が存在することが判明した^{10,11}。さらに近年の研究により、毛包には異なる分子マーカーを発現する複数の種類の幹細胞が存在することが報告され¹²⁻¹⁴、皮膚の恒常性維持を担っていると考えられている。その中でも Lgr5⁺幹細胞は Bulge 領域の毛包幹細胞を構成し、一部は CK15 や CD34 を共発現しており、他の細胞と比較して増殖能が高く、純化して無毛マウスに移植すると毛包を形成することから、毛包幹細胞階層の上位を構成していると考えられる¹²。さらに、毛包の Lgr5⁺細胞は定常状態では周期的な毛髪形成に寄与しているが、表皮を欠損するような傷害が生じた際には、表皮のケラチノサイトへと分化し、損傷部位を修復する働きがあり¹⁵、皮膚の恒常性維持において重要な役割を担っていると考えられる。

一方で、皮膚 GVHD に関する幹細胞の傷害に関しては、これまでに表皮乳頭間突起 (rete ridge) および毛包に存在する CK15⁺細胞が標的となって傷害を受けるとの報告が存在しているが^{16,17}、Lgr5⁺幹細胞に関する報告はなされていない。そこで我々は皮膚 GVHD のマウスモデルを利用して、皮膚 GVHD における Lgr5⁺組織幹細胞の傷害を検討することとした。

本研究により、皮膚 GVHD によって Lgr5⁺幹細胞が傷害されることが明らかになった。Lgr5⁺幹細胞の減少は移植後の毛髪再生を阻害し、移植前処置による脱毛からの回復遅延や GVHD による脱毛をもたらすことが考えられる。また、Lgr5⁺幹細胞は創傷治癒の際に再生上皮を供給する働きも担っており、GVHD による Lgr5⁺幹細胞の減少は創傷治癒遅延をきたすものと考えられた。限局性の皮膚 GVHD に対しては、ステロイド外用剤

が広く用いられているが、ステロイド外用剤はドナーT細胞の浸潤を抑えるものの、Lgr5⁺幹細胞は減少し、毛包の現象や皮膚萎縮などの組織学的変化をきたした。これに伴い、ステロイド外用剤による治療部位では毛髪再生や創傷治癒といった皮膚恒常性の維持が障害されることが確認された。そこで我々はLgr5⁺幹細胞を保護し皮膚恒常性を維持することができる、新規GVHD予防および治療薬を検討した。我々はJAK1/2阻害剤のルキシソリチニブに注目した。

JAK-STAT経路はインターフェロンのシグナル伝達経路として初めて報告され¹⁸、その後種々のサイトカイン受容体が共有するシグナル伝達経路であることが明らかになった。サイトカインが結合し受容体が重合することで、受容体に会合したJAKが近接し、お互いをリン酸化し合って活性化する。活性化したJAKは細胞内情報伝達分子のSTATをリン酸化し、リン酸化STATは二量体となって核内に移行して種々の遺伝子の転写を促進する。JAK阻害剤はこのJAK-STATのリン酸化経路を阻害することで、サイトカイン受容体からのシグナル伝達を抑制する。それぞれのサイトカイン受容体により会合するJAKや細胞内情報伝達分子のSTATの種類は異なっており¹⁹、どの分子を阻害するかによって、その効果は異なるものと考えられる。IFN γ やIL-6に対するサイトカイン受容体にはJAK1およびJAK2が会合しているため、JAK1/2阻害剤であるルキシソリチニブによりそれらのシグナル伝達は強く抑制される。これらのサイトカインはGVHDの病態形成に関わる重要なサイトカインであり、本研究で用いたマウスモデルでも同様に血清IFN γ の上昇、IFN γ 産生T細胞の浸潤、IFN γ 誘導性のケモカインの発現上昇が確認された。これらの観点から、JAK1/2阻害剤が皮膚GVHDに有効であるものと考えられ、本研究ではルキシソリチニブの外用剤での効果を検証した。その結果、ルキシソリチニブ外用剤は、ステロイド外用剤と同等の免疫抑制効果を有するだけでなく、皮膚幹細胞を保護することで皮膚の恒常性を保ち、毛髪再生や創傷治癒を阻害しない新たな皮膚GVHD治療薬であることが明らかになった。ルキシソリチニブ外用薬は皮膚恒常性維持が可能な皮膚GVHD治療薬と考えられ、今後の臨床応用が期待される薬剤と考えられた。

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。

Allo	allogeneic
BMV	betamethasone valerate
CBA	cytometric Bead Array
CK15	cytokeratin 15
CP	clobetasol propionate
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco' s modified eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FCS	fetal calf serum
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GVHD	graft-versus-host disease
HFSC	hair follicle stem cell
IFN γ	interferon γ
JAK	janus kinase
Lgr5	leucine-rich repeat containing G-protein-coupled receptor 5
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
PBS	phosphate buffered saline
RPMI	Roswell Park memorial institute medium
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate
RLP	rete-like prominence
Ruxo	ruxolitinib phosphate
STAT	signal transducers and activators of transcription
Syn	syngeneic
tdTomato	tandem dimer Tomato

実験方法

1. 実験材料

1) マウス

移植実験などを行うため、7 週齢、雌の C57BL/6 (B6, H-2^b), B6D2F1 (BDF1, H-2^{b/d}) を日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) より、BALB/c (H-2^d) を日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) より購入し、本学の動物実験施設にて 1 週間の安静期間を経た後、実験に使用した。

これに加えて、下記の遺伝子組み換えマウスを使用した。

B6-*Lgr5-enhanced green fluorescent protein (EGFP) -internal ribosome entry site (IRES)-cre-estrogen receptor^{T2} (ER^{T2})* (B6-*Lgr5-EGFP-creER^{T2}*)²⁰

Lgr5 陽性細胞に EGFP とタモキシフェンにのみに結合するように改変された変異型エストロゲンレセプターである ER^{T2} と Cre 遺伝子組換え酵素の融合蛋白である CreER^{T2} を発現しているマウスである。タモキシフェンを投与すると、Lgr5 陽性細胞においてのみ CreER^{T2} が核内に移行し、Cre 遺伝子組換え酵素による loxP 認識配列を標的とした遺伝子再構成が生じる。Lgr5 を発現している細胞が EGFP で標識されるため、免疫染色にてシグナルを増強させ、Lgr5 陽性細胞の定量の際に使用した。Jackson laboratory (Bar Harbor, ME) から購入した。

B6. *Cg-Gt (ROSA)26Sor^{tm14 (CAG-tdTOMATO)Hze/J}* (B6-*R26^{Tomato}*)²¹

第 6 染色体に存在する ROSA26 領域の CAG プロモーターの下流に、loxP 認識配列で挟まれた STOP コドンと蛍光タンパク質の tdTomato の遺伝子を導入したマウスである。Cre 遺伝子組換え酵素が作用すると loxP で挟まれた STOP 配列が消失し、tdTomato が発現する。Jackson Laboratory から購入した。

B6. *Cg-Tg[lymphocyte protein tyrosine kinase (Lck)-cre]548Jxm/J* (B6-*Lck-cre*)²²

T 細胞に特異的な Lck のプロモーター領域下に Cre 遺伝子組換え酵素を導入したマウスである。特定の遺伝子の flox マウスと交配することで、T 細胞特異的に遺伝子組換えを施すことができる。Jackson laboratory から購入した。

B6-*Lgr5-EGFP-creER^{f2}* × B6-*R26^{fTomato}*

B6-*Lgr5-EGFP-creER^{f2}*マウスの雄とB6-*R26^{fTomato}*マウスの雌を交配させて作成したマウスである。Lgr5陽性細胞にEGFPを発現し、タモキシフェンを投与することでB6-*R26^{fTomato}*のSTOP配列が消失してred fluorescent protein (RFP) であるtdTomatoも発現する。Lgr5陽性細胞において一度上記の遺伝子組み換えが生じると、Lgr5陽性細胞から分化した細胞全てにおいてRFPが発現される。創傷治癒時のLgr5陽性細胞の系統追跡実験を行う際に使用した。

B6-*Lck-cre* × B6-*R26^{fTomato}*

B6-*Lck-cre*マウスの雄とB6-*R26^{fTomato}*マウスの雌を交配させて作成したマウスである。T細胞特異的にRFPを発現するため、T細胞のレポーターマウスとして使用できる。移植後のT細胞浸潤を評価するために使用した。

B6-*IL17a^{tm1.1(cre)Stck}* × B6. *129X1-Gt (ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos}*
(B6-*IL-17a-cre* × B6-*R26^{EYFP}*)

B6-*IL-17a-cre* マウスと B6-*R26^{EYFP}* マウスを交配して作成したマウスである。IL-17A を発現した T 細胞および T 前駆細胞において、蛍光タンパクの EYFP が発現するレポーターマウスである。移植後の IL-17A 産生細胞をフローサイトメトリーで評価するために使用した。Queensland Institute of Medical Research (Brisbane, Australia) の Hill 教授から譲渡された。

これらのマウスは本学の動物実験施設にて繁殖飼育し、8 週齢以上のマウスを実験に使用した。いずれの実験においても、「北海道大学動物実験に関する規程」および「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定」に従って、動物実験（承認番号：17-0026）と遺伝子組換え実験（承認番号：2012-030）の承認を得て行った。

2) 薬剤

遺伝子組換えヒト顆粒球コロニー形成刺激因子 (recombinant human G-CSF; rhG-CSF)：協和発酵キリン株式会社から、rhG-CSF として filgrastim 300 μg / 0.7mL 製剤の提供を受けた。filgrastim を 1x phosphate buffered saline (PBS) (-) を用いて 10 μg/100 μL に希釈し、既報を参考にし、移植実験のドナーマウスに 100 μL (10 μg/body) で皮下投与した²³。

ステロイド軟膏：ベタメタゾン吉草酸エステル軟膏として、リンデロンV軟膏 0.12%を塩野義製薬より購入し、移植後1日目より解析日の前日までマウス背部皮膚に塗布した。clobetasol propionateはSigma-Aldrich社 (St. Louis, MO) より購入し、DMSOにて2 mg / 80 μ Lの濃度に溶解し、ワセリンと混和して clobetasol propionate 最終濃度が0.05% (DMSO 最終濃度 2%) の軟膏を作成し、移植後1日目解析日の前日までマウス背部皮膚に塗布した。

タクロリムス軟膏：タクロリムス軟膏として、プロトピック軟膏 0.1%をマルホ株式会社より購入し、移植後1日目より解析日の前日までマウス背部皮膚に塗布した。

ルキシソリチニブリン酸塩：LC Laboratories社 (Woburn, MA) よりルキシソリチニブリン酸塩を購入し、DMSOで溶解して20mg / 80 μ Lの溶解液を作成した。溶解液をワセリンに混和して、ルキシソリチニブ最終濃度が0.5% (DMSO 最終濃度 2%) の軟膏を作成し、外用剤として移植後1日目より解析日の前日までマウス背部皮膚に塗布した。また、全身投与実験では、ルキシソリチニブリン酸塩をエタノールで100 mg/mLに溶解し、溶解液を0.1% tween (Wako, Osaka) を含む1×PBS (-)で希釈して、マウス1匹あたり30 mg/kg/回を1日2回、移植後1日目より経口投与した。

遺伝子組換えマウスインターフェロン γ ：BioLegend社 (San Diego, CA) より recombinant mouse IFN γ (carrier-free) を購入し、0.5% FCSを含む1×PBS (-) にて0.1 μ g/100 μ Lに希釈し、100 μ Lずつマウス耳に皮内投与した。

タモキシフェン：Sigma Aldrich社より購入し、コーン油にて10 mg/mLに溶解して、100 μ Lずつ (1 mg/body) 経口投与した。

2. 方法

1) マウス同種造血幹細胞移植

ドナーマウスの皮下に10 mg/bodyのrhG-CSFを6日間連続皮下投与し、ドナーマウスをイソフルラン吸入で麻酔して安楽死させ、脾臓を摘出した。摘出した脾臓を滅菌済みのスライドガラスにてすりつぶし、RPMI1640 (Sigma Aldrich) + 4% FCS (Selborne, Tasmania, Australia) を用いて細胞浮遊液にし、BD Pharm Lyse Lysing Buffer (BD Bioscience, San Jose, CA) にて溶血処理を行い、トリパン

ブルー染色にて生細胞数をカウントした。細胞数をカウントした後に、細胞浮遊液を遠心して上清を破棄し、 $1 \times \text{PBS}$ (-)を用いて 20×10^6 cells / $250 \mu\text{L}$ の細胞濃度になるように調整した。

移植細胞を輸注するレシピエントマウスには8～10週齢の雌マウスを使用した。移植前処置として、移植前日に放射線照射装置 MBR-1520R-4 (HITACHI, Tokyo, Japan)を用いて、電圧 125 kV、電流 15 mA、照射距離 500 mm、遮蔽板 アルミニウム 0.5 mm + 銅 0.2 mm の条件で、総線量 10.5 Gy を4時間間隔の2分割照射で施行した。照射翌日に調整した移植細胞を尾静脈より1匹あたり $250 \mu\text{L}$ ずつ静脈内投与した。

移植後のマウスは specific pathogen-free 環境下で、通常の飼料とオートクレーブにて滅菌し、塩酸を加えて pH 2.5 に調整した塩酸水で飼育した。移植後のマウスの GVHD の重症度は、生存率と GVHD score で評価した。GVHD score は体重、姿勢 (posture)、活動性 (activity)、毛並み (fur texture)、脱毛 (skin integrity) の5項目を各項目 0～2 点で点数化し、合計したものとした²⁴。

2) マウスの除毛処理と外用剤の投与

移植後のマウスに外用剤の投与を行う実験では、移植の2日前に除毛処理を行った。10%ケタミン (フジタ製薬、東京、日本) と 2%キシラジン (バイエル薬品、大阪、日本) を $1 \times \text{PBS}$ (-) で希釈し、最終濃度がケタミン 20 mg/mL、キシラジン 2 mg/mL になる麻酔薬を作成し、マウス1匹あたり $70 \mu\text{L}$ を腹腔内投与して鎮痛、鎮静させた。その後、シェーバーでマウス背部の体毛を剃毛し、エピラットクリーム (クラシエホームプロダクツ、東京、日本) を用いて除毛した。外用剤の塗布は移植後投与開始日から1日1回除毛部位に解析日の前日まで行った。

3) マウス皮膚、脾臓、胸腺からの細胞単離

移植後のマウスをイソフルランの吸引によって安楽死させ、背部皮膚を採取した。採取した背部皮膚から皮下脂肪を、鑷子を用いて丁寧に剥離し、 $1 \mu\text{g/mL}$ の濃度の collagenase type IV (Sigma-Aldrich) を含む DMEM 中で 1–2 mm 片に切り刻み、 37°C で1時間静置した。その後、細胞浮遊液をよく混和し、 $70 \mu\text{m}$ のセルストレーナー (日本 BD、東京) を通して 50 mL チューブに回収した。回収した細胞浮遊液を 4°C 、1500 回/分、5 分間で遠心し、上清を破棄して細胞ペレットを得た。脾臓や胸腺は臓器を1組のスライドガラスですりつぶし、2% FCS を含む $1 \times \text{PBS}$ (-) で細胞浮遊液にした後、 $70 \mu\text{m}$ のセルストレーナーを通して、50 mL チューブに回収した。脾臓の細胞浮遊液は 4°C 、1500 回/分、5 分間で遠心し、上清を破棄して細胞ペレットにした後、BD Pharm Lyse Lysing Buffer にて溶血処理を行った。

4) フローサイトメトリーによる解析

細胞表面抗原の染色：フローサイトメトリー用の各種抗体はFlow buffer (1× PBS (-) + 2% FCS + 2 μ mol EDTA) で200倍に希釈し抗体カクテルを作成した。使用した抗体の一覧は表 1に示す。各臓器から単離した細胞に抗体カクテルを加え、4℃、30分間静置させることで反応させた。抗体反応後は十分量のflow bufferで余分な抗体を洗浄し、死細胞を除くために200 μ g/mLのDAPI溶液を加えて、FACS CantoII (BD Biosciences, San Jose, CA)にて解析した。

細胞質内サイトカイン染色：皮膚から単離したT細胞のサイトカイン産生を評価するため、抽出したT細胞をex vivoで刺激して、細胞質内のサイトカインを蛍光抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。皮膚の細胞浮遊液は、40%と80%に調整したPercoll 液 (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan) を用いた遠心分離で得られる中間層を回収して白血球を分離した。分離した細胞に50 ng/mLのPMA (Sigma-Aldrich) と1 μ g/mLのイオノマイシン (Sigma-Aldrich) を含むRPMI+10% FCSを加え、5%CO₂、37℃、6時間刺激し、刺激開始後1時間でGolgi-stop (BD Pharmingen)を加えた。刺激後に細胞表面抗原を染色し、Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて、細胞の固定と透過処理を行い、IFN γ に対する抗体にて細胞質内サイトカインを染色した。死細胞の除去には、Live/Dead Fixable Viability Dye eFluor 450 (eBioscience, San Diego, CA) を用いた。

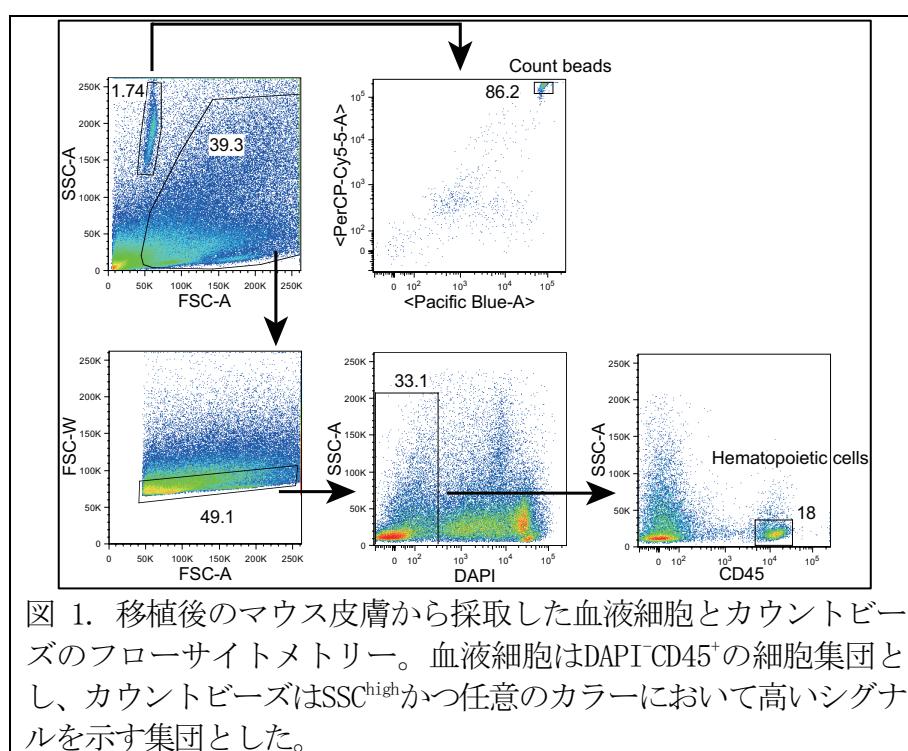
Cytometric beads assay (CBA)：BD CBA Flex sets (BD Pharmingen)を用いて、血清中のIFN γ 、TNF α 、IL-6濃度を定量した。マウスから採血し、遠心分離にて血清を分離し、測定するサイトカインのcapture beadsを加え反応させ、その後PE 標識抗体を加えて反応させた後、フローサイトメトリーで解析した。サイトカインの定量は既知のサイトカイン濃度から作成された標準曲線を用いて行った。

表 1

抗原	クローン	標識	販売元	カタログ番号
TCR β	H57-597	FITC	BD	553171
H-2Kd	SF1-1.1	FITC	BD	553565
CXCR3	CXCR3-173	PE	BD	550633
CD11b	M1/70	PerCP-Cy5.5	BD	561114
CD4	GK1.5	PE-Cy7	BioLegend	100422
IFN γ	XMG1.2	APC	BioLegend	505810

TCR β	H57-597	APC	BD	553174
CD45	30-F11	APC-Cy7	BD	557659
CD8a	53-6.7	BV510	BioLegend	100752

count beadsを用いたセルカウント：皮膚から採取した細胞の細胞数測定には、Count Bright absolute counting beads (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いた。CD45陽性の血液細胞とカウントビーズの比率から皮膚に存在する血液細胞数を算出した（図 1）。



5) 組織標本作成、蛍光免疫染色

パラフィン標本の作成：移植後のマウスから得た皮膚は短冊状にトリミングした後に、爪楊枝に巻きつけてのロール標本を作成し、4% paraformaldehyde (Merk Millipore, Billerica, MA) にて4℃で一晩固定した（図 2）。固定後の標本のパラフィン包埋から切片の作成は札幌総合病理研究所に依頼した。腸管は周囲の結合組織を取り除いた後、内腔の便を 4% PFA で洗浄し、切り開いてロール標本を作成して 4% PFA で固定した。肝臓はマウスから摘出する前に 1×PBS で灌流処理を行い、末梢血をできる限り除いた後に 4% PFA で固定した。腸管、肝臓も同様に包埋以降の処理は札幌総合病理研究所に依頼し、hematoxylin and eosin (HE) 染色標本と未染色標本を作成した。

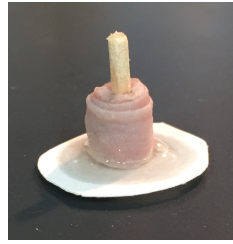


図 2. 皮膚のロール標本

凍結標本の作成：マウス舌は凍結標本にて免疫染色を行った。移植後のマウスを安楽死させ、舌を摘出し水分を十分に除去した後、ティッシュ・テック O.C.T. コンパウンドを含むティッシュ・テック クリオモルド 2 号に包埋し、未固定の状態で液体窒素にて凍結保存した。凍結標本ブロックは薄切前に -20°C で保存し、Microm HM550 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて $8\mu\text{m}$ の厚さで薄切して凍結切片を作成した。薄切した切片は十分に風乾した後、 $1\times\text{PBS}(-)$ で洗浄し、O.C.T コンパウンドを洗い流し、4% Paraformaldehyde で後固定した。固定後、標本を再度 $1\times\text{PBS}(-)$ で洗浄し、0.1% TritonX+ $1\times\text{PBS}(-)$ を用いて透過処理を行い、免疫染色を施行した。

蛍光免疫染色：パラフィン切片はキシレンとエタノールを用いて脱パラフィンした後、Dako REAL 抗原賦活化用クエン酸緩衝液に切片を浸し、 105°C 、20 分の設定でオートクレーブを用いた熱処理による抗原賦活化を行った。賦活化後、 $1\times\text{PBS}(-)$ で賦活化液を洗浄して、10%ヤギ血清を含む $1\times\text{PBS}(-)$ を用いてブロッキング処理を行った。ブロッキング処理が終了したら、各種一次抗体を 1:400 に希釈して各標本に加え、 4°C 、一晚静置した。一次抗体反応後に、蛍光標識された一次抗体の動物種に対する二次抗体を加え抗体反応させた。その後、核染色としては DAPI を $1\times\text{PBS}(-)$ で $0.2\mu\text{g/mL}$ に希釈して用いた。使用した抗体は表 2 に示す。

染色後の画像撮影はFluoview FV1000 confocal microscopy (Olympus, Tokyo, Japan)を使用し、画像処理はAdobe Photoshop CC 2017 を用いて行った。

表 2

一次抗体

抗原	クローン	販売元	カタログ番号
GFP	polyclonal	abcam	ab13970
cytokeratin 15	ERP1614Y	abcam	ab52816
RFP	polyclonal	abcam	ab34771
SOX9	polyclonal	Thermo Fisher Scientific	PA5-23383
Ki-67	SP6	Thermo Fisher Scientific	MA5-14520

二次抗体

抗原	標識	販売元	カタログ番号
chicken IgG	Alexa Fluor 488	Life Technologies	A-11039
rabbit IgG	Alexa Fluor 555	Life Technologies	A-21428

6) 定量リアルタイム PCR

移植後のマウスの背部皮膚を 5 mm² 程度採取し、RNA 抽出用の ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan) の中で、Tissue Ruptor (QUIAGEN, Hilden, Germany) を用いて粉砕した。組織を粉砕したあとは ISOGEN II のプロトコールに準じて RNA の抽出を行った。抽出した RNA をジエチルポロカーボネート処理水で溶解し、NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA 濃度を測定し、1000 ng の RNA をテンプレートとして鋳型 DNA を作成した。鋳型 DNA 作成のための逆転写反応は ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO LIFE SCIENCE, Osaka, Japan) を用いて行った。Sigma-Aldrich Japan Genosis にて、各種標的遺伝子に対する primer / probe セットの作成を依頼し、作成した鋳型 DNA と TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いてリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR は StepOne Plus real time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて施行し、18S ribosomal RNA を内在性コントロールとして、標的遺伝子の mRNA 発現レベルを delta Ct 法にて定量的に評価した。使用した primer/probe の塩基配列は表 3 に示す。

表 3

遺伝子		塩基配列
<i>18S rRNA</i>	Forward	5' -GCTCTTTCTCGATTCCGTGGG-3'
	Reverse	5' -ATGCCAGAGTCTCGTTCGTTATC-3'
	Probe	5' -CTCCACCAACTAAGAACGGCCATGCACC-3'

<i>Cxc19</i>	Forward	5' -TCGAGGAACCCTAGTGATAAGGA-3'
	Reverse	5' -CGTTCTTCAGTGTAGCAATGATTTCA-3'
	Probe	5' -AGCACCAGCCGAGGCACGATCCA-3'
<i>Cxc110</i>	Forward	5' -TGACGGGCCAGTGAGAATGA-3'
	Reverse	5' -CATCGTGGCAATGATCTCAACAC-3'
	Probe	5' -ATCATCCCTGCGAGCCTATCCTGCCC-3'
<i>Cxc111</i>	Forward	5' -TGCTCAAGGCTTCCTTATGTTCA-3'
	Reverse	5' -GCCTTCATAGTAACAATCACTTCAAC-3'
	Probe	5' -CGCTGTCTTTGCATCGGCCCCGG-3'

7) 統計処理

2 群比較は Mann-Whitney U test を用い、3 群以上の比較は One-way ANOVA とポストホックテストとして Tukey's test を用いて検定した。P 値< 0.05 をもって統計学的有意差の有無を判断し、全てのデータは平均値±標準誤差にて表記した。全ての統計学的検定は、GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA) の統計プログラムを用いて行なった。

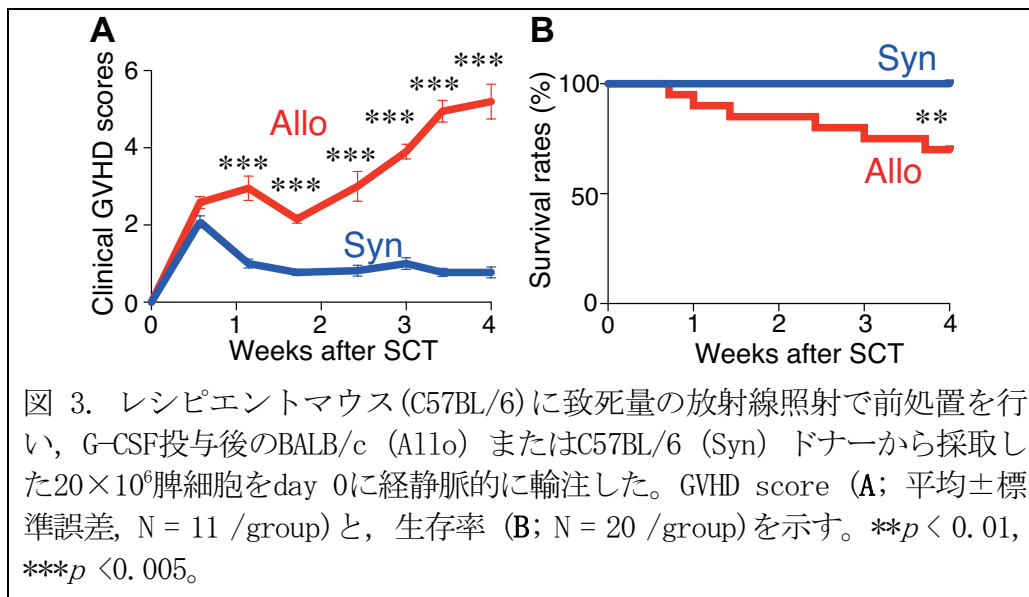
実験結果

1. 皮膚 GVHD のマウスモデルの作製

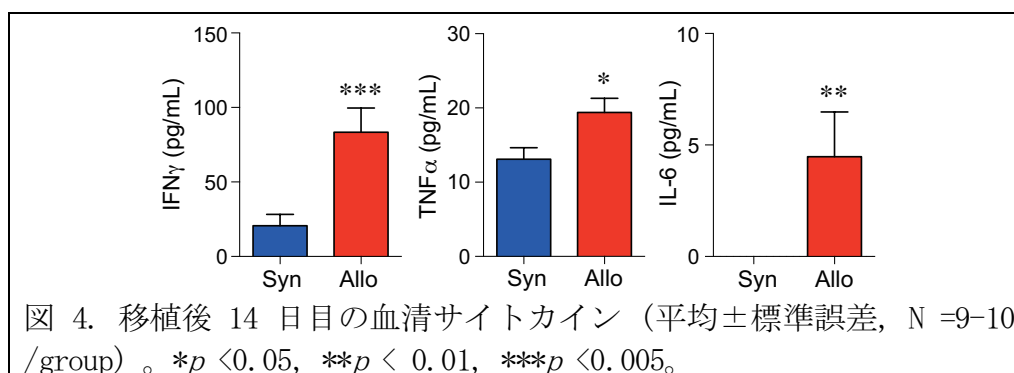
本研究では主に G-CSF を投与したドナーマウスの脾臓をレシピエントマウスに移植する同種造血幹細胞モデルを使用した。これは、臨床で多用されている G-CSF を用いた末梢血幹細胞移植を、動物モデルにしたものである。まず初めに、このマウスモデルが皮膚 GVHD を発症するか否かを検討した。

1) 移植後の GVHD 重症度の推移と生存率

GVHD が発症しない syngeneic (Syn) 群と GVHD が発症する allogeneic (Allo) 群を比較すると、GVHD score は移植後 1 週間以降から有意差を持って Allo 群で高い値を示した (図 3A)。移植後 4 週間での生存率は Syn 群では 100%、Allo 群では 70%であり、有意差をもって Allo 群で低下していた (図 3B)。

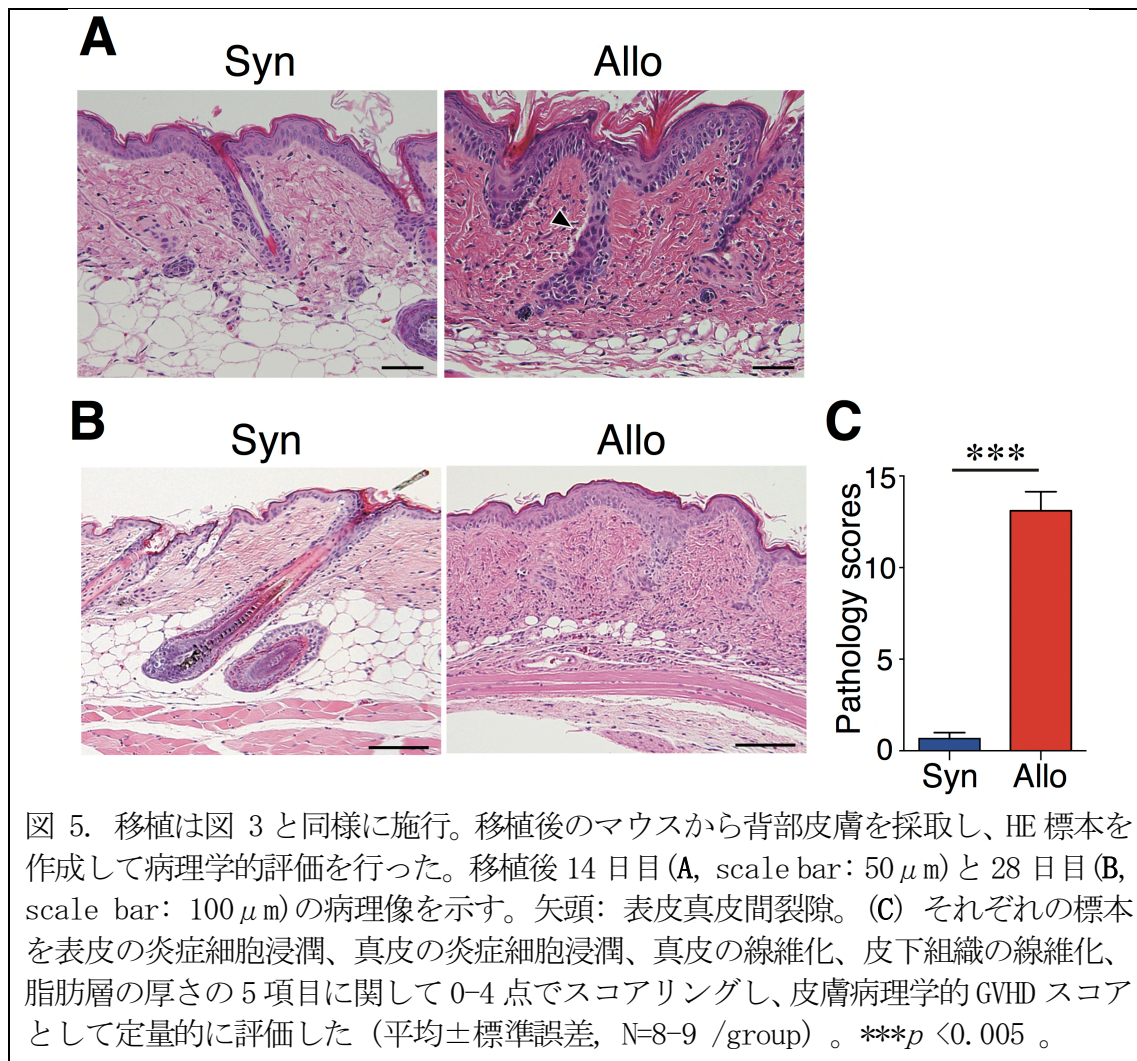


次に、全身性の炎症反応の存在を証明するため、移植後 14 日目の血清サイトカインを Cytometric Bead Array (CBA) を用いて解析したところ、Allo 群で $\text{IFN } \gamma$ 、 $\text{TNF } \alpha$ 、 IL-6 の有意な上昇を認めた (図 4)。



2) 皮膚 GVHD の組織学的評価

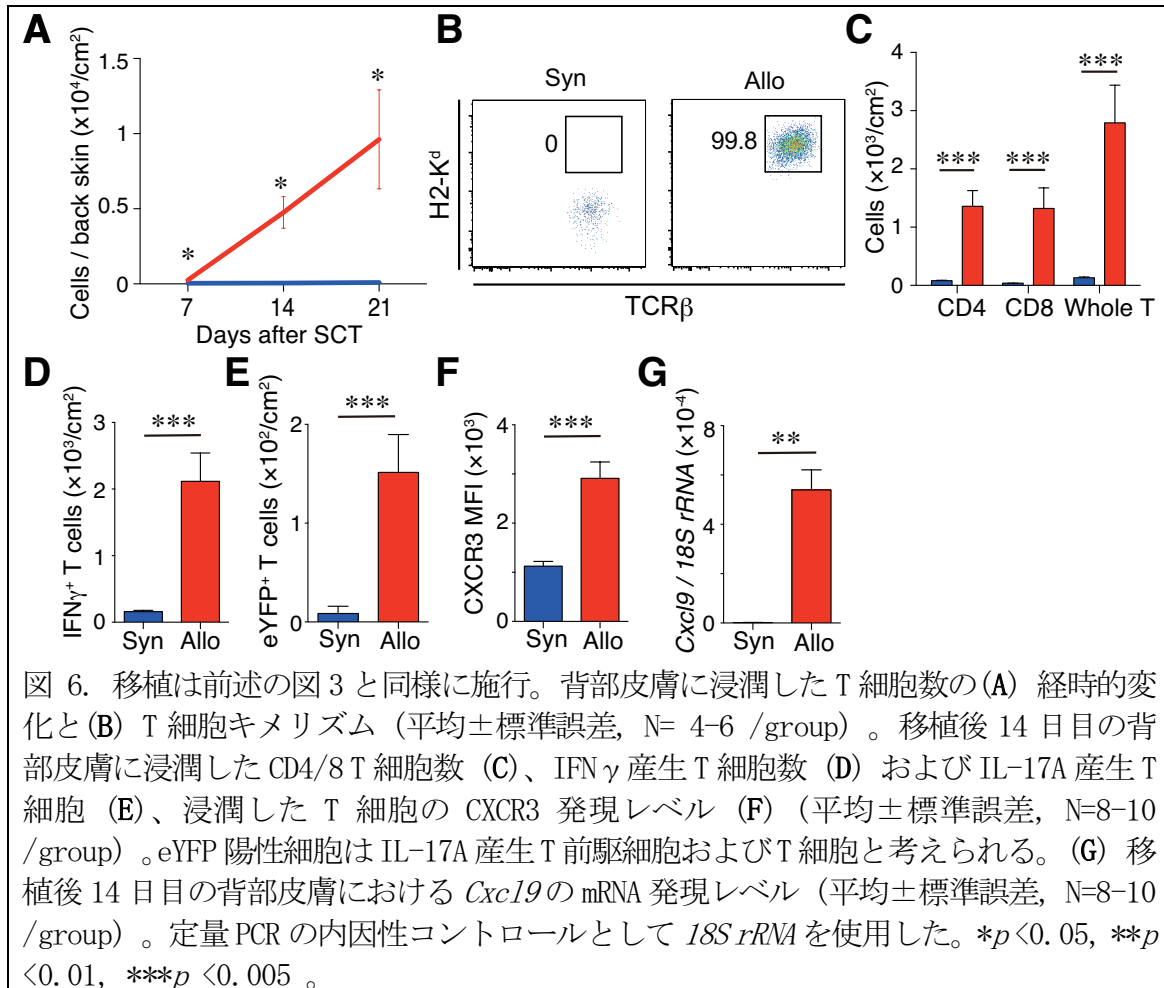
この移植モデルにおける皮膚 GVHD の発症を確認するため、移植後 14 日と 28 日に背部皮膚のロール標本を作成し、HE 標本にて組織学的検討を行った。移植後 14 日の時点では Allo 群においてリンパ球などの単核球の浸潤、表皮細胞のアポトーシス、表皮真皮境界部の離開を認めた（図 5A）。移植後 28 日の時点ではリンパ球浸潤、真皮の肥厚、脂肪層の菲薄化を認めた。一方で Syn 群ではこれらの所見は認められなかった（図 5B）。さらに皮膚 GVHD の重症度を定量評価するため、表皮の炎症所見、真皮の炎症所見、真皮の線維化、脂肪層の線維化、脂肪層の菲薄化の 5 つの項目を 0-4 点で点数化し、皮膚病理学的 GVHD スコアを算出した。移植後 28 日目の組織標本で、Allo 群において Syn 群に比較して、有意にスコアが上昇しており、本モデルで皮膚 GVHD が発症することが組織学的に確認された（図 5C）。



3) 皮膚に浸潤するドナーT細胞の経時的変化と表現型

次にGVHDの病態形成において中心的な役割を担うドナーT細胞の解析を行った。初めに皮膚に浸潤するドナーT細胞数の経時的変化を把握するために、移植後7日、14日、21日のマウス背部皮膚を採取し、血液細胞を回収してFlow cytometryにて解析した。Syn群では一貫してT細胞数は少ないのに対して、Allo群では経時的にT細胞数が増加していくことを確認できた(図6A)。Allo群では、これらのT細胞のキメリズムは95%以上がドナータイプであった(図6B)。次に、浸潤するドナーT細胞の表現型を解析した。Syn群と比較すると、Allo群において、CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞がともに有意差をもって増加しており(図6C)、IFN γ 産生するTh1およびTc1細胞(図6D)が有意に増加していることが分かった。IL-17A産生T細胞の評価に関しては、IL-17Aを発現した細胞が蛍光タンパクのeYFPを発現する遺伝子組換えマウスをドナーとして用い移植実験を行って評価した。その結果、IL-17Aを産生するTh17およびTc17細胞が有意に増加していることが分かつ

た (図 6E)。また、これらの T 細胞にはケモカインレセプターの CXCR3 が有意差をもって高発現しており (図 6F)、Allo 群の皮膚では CXCR3 のリガンドである CXCL9 の発現が Syn 群に比較して有意に高く発現していた (図 6G)。



4) 皮膚および舌に浸潤するドナー T 細胞の局在の検討

さらに皮膚に浸潤する T 細胞の局在を詳細に検討するため、ドナーマウスとして T 細胞が特異的に蛍光色素 (tdTomato) で標識される、Lck-cre/tdTomato マウスをドナーマウスとして使用し、BDF1 マウスをレシピエントとした。移植後 10 日目のマウス背部皮膚切片の蛍光免疫染色を行ったところ、Allo 群において表皮-真皮境界部と毛包周囲にドナー T 細胞の浸潤が認められた (図 7A)。なお、毛包は組織幹細胞が存在することが知られている。

毛包に加えて、ヒトの皮膚には表皮が真皮側に突出した rete ridge という構造が存在し、その部位にも皮膚幹細胞が存在しているが、マウスの皮膚には rete ridge は存在しない。そこで我々は、ヒトの rete ridge に類似した構造がみられる^{17, 25}、

マウスの舌の rete-like prominence (RLP) への、ドナーT 細胞浸潤の有無を評価した。移植後 7 日後の舌 HE 標本において RLP に単核球の浸潤をみとめ (図 7B) 、Lck-cre/tdTomato マウスをドナーにした移植では、同部位に tdTomato 陽性のドナーT 細胞の浸潤が確認された (図 7C) 。これらの結果より、移植後 14 日前後より組織幹細胞の存在する毛包や、舌 RLP にドナーT 細胞浸潤を認めることが明らかになった。

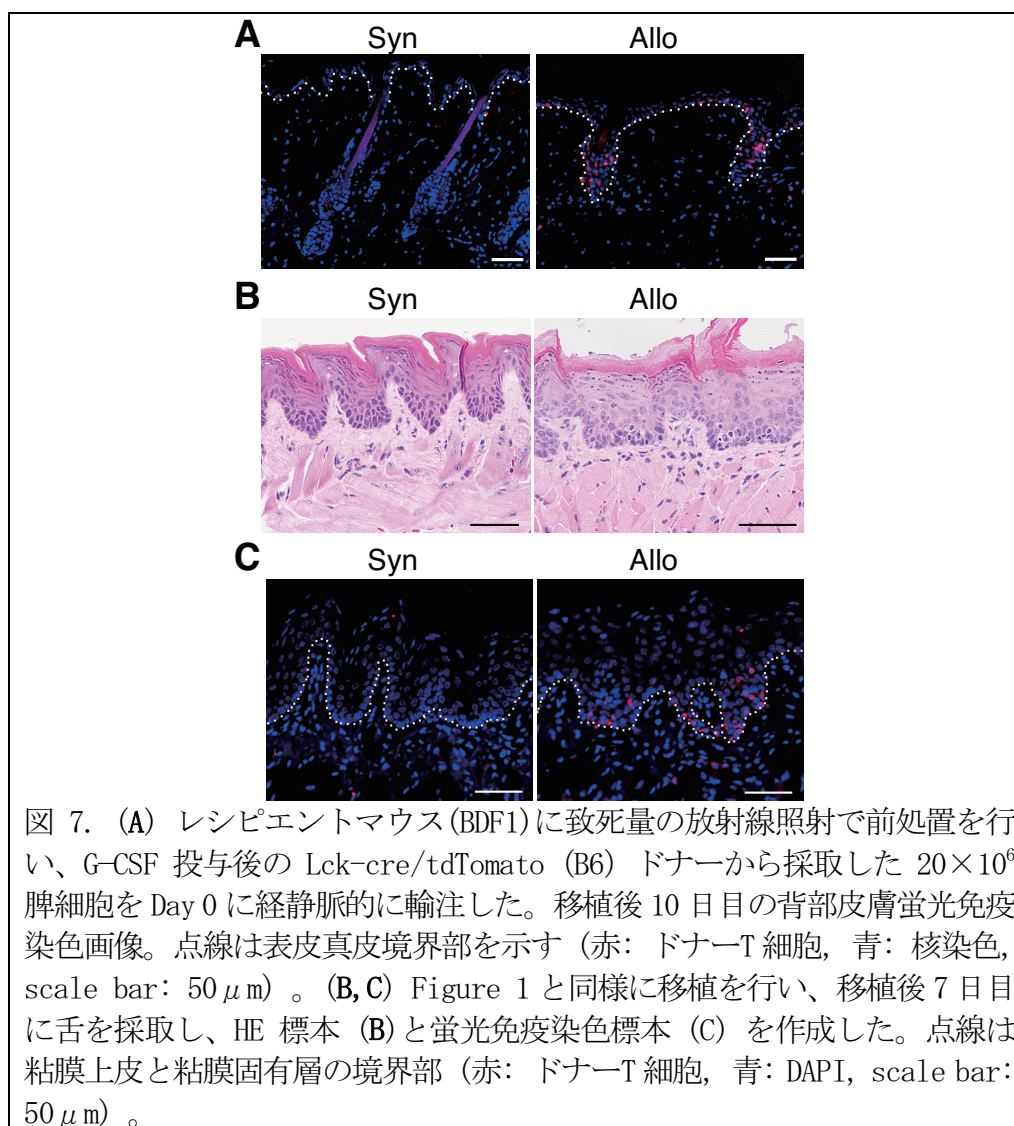


図 7. (A) レシピエントマウス (BDF1) に致死量の放射線照射で前処置を行い、G-CSF 投与後の Lck-cre/tdTomato (B6) ドナーから採取した 20×10^6 脾細胞を Day 0 に経静脈的に輸注した。移植後 10 日目の背部皮膚蛍光免疫染色画像。点線は表皮真皮境界部を示す (赤: ドナーT 細胞, 青: 核染色, scale bar: $50 \mu\text{m}$) 。 (B, C) Figure 1 と同様に移植を行い、移植後 7 日目に舌を採取し、HE 標本 (B) と蛍光免疫染色標本 (C) を作成した。点線は粘膜上皮と粘膜固有層の境界部 (赤: ドナーT 細胞, 青: DAPI, scale bar: $50 \mu\text{m}$) 。

2. 皮膚 GVHD による皮膚組織幹細胞の傷害とそれに伴う皮膚恒常性への影響

前章で確認したように、本マウスモデルでは A11o 群で皮膚 GVHD が発症し、表皮真皮境界部および毛包周囲、RLP 等にドナー T 細胞が浸潤する。毛包や RLP は皮膚幹細胞が存在している部位であり、皮膚 GVHD では皮膚幹細胞が傷害されている可能性が考えられたため、検証した。皮膚組織幹細胞は数種類が報告されているが、今回我々は毛包の Bulge 領域に存在する皮膚組織幹細胞である、Lgr5⁺ hair follicle stem cell (HFSC) に注目し、ヒトの rete ridge に存在する皮膚組織幹細胞に相当する幹細胞分画として、舌の RLP の CK15⁺細胞についても評価した。

1) 皮膚 GVHD により Lgr5⁺ HFSC は減少する

Lgr5⁺ HFSC が GVHD により傷害されるか否かを検討するために、Lgr5 プロモーター下に EGFP を発現する、B6-Lgr5^{EGFP-cre/ER} をレシピエントとして使用し、移植実験を行った。Lgr5⁺HFSC は Bulge 領域下部の CK15 陽性細胞分画に含まれているが、移植後 14 日目における背部皮膚標本の蛍光免疫染色では、Naïve マウスや Syn 群では Lgr5-EGFP と CK15 の両方が陽性の HFSC が Bulge 領域に認められたが、A11o 群では Lgr5-EGFP 陽性細胞は減少していたものの、EGFP 陰性の CK15 陽性細胞は保たれていた (図 8A)。EGFP⁺CK15⁺細胞と EGFP⁻CK15⁺細胞の数を数えると、EGFP⁺CK15⁺細胞は A11o 群において著明に減少している一方で、EGFP⁻CK15⁺細胞は Syn 群と有意差を認めなかった (図 8B)。移植後の Lgr5⁺CK15⁺HFSC の経時的変化を評価するため、移植後 7 日目、14 日目、21 日目に背部皮膚の標本を作成し、同様に EGFP⁺CK15⁺細胞数をカウントした。移植後 7 日目では、前処置の放射線照射の影響で、両群で EGFP⁺CK15⁺細胞が減少していた。Syn 群では移植後 14 日目までに回復し、Naïve マウスと同等のレベルとなったが、一方で A11o 群では回復は認められず、Syn 群と比較して有意に EGFP⁺CK15⁺細胞が少数であった (図 8C)。以上の結果より、A11o 群で GVHD が発症すると、Lgr5⁺CK15⁺HFSC が選択的に傷害されることが判明した。

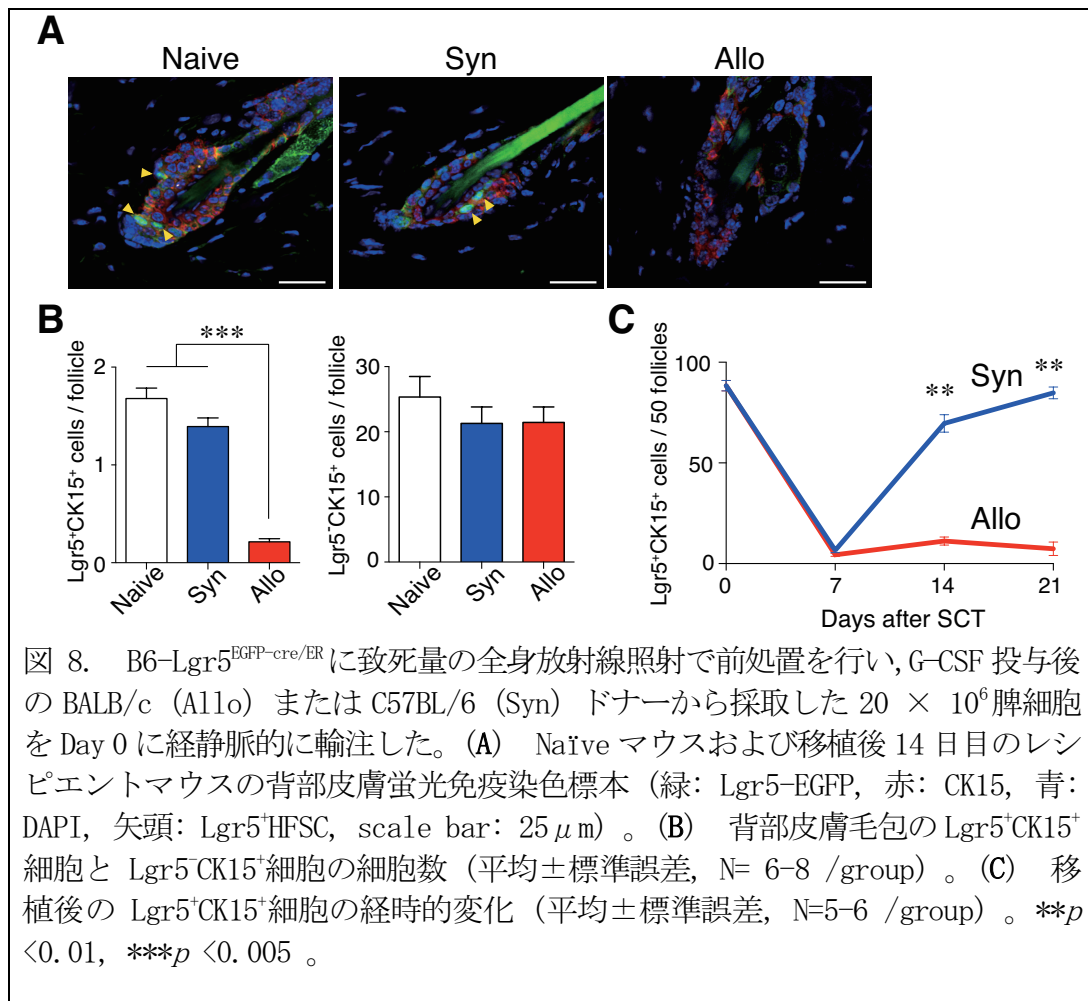


図 8. B6-Lgr5^{EGFP-cre/ER} に致死量の全身放射線照射で前処置を行い、G-CSF 投与後の BALB/c (Allo) または C57BL/6 (Syn) ドナーから採取した 20×10^6 脾細胞を Day 0 に経静脈的に輸注した。(A) Naive マウスおよび移植後 14 日目のレシピエントマウスの背部皮膚蛍光免疫染色標本 (緑: Lgr5-EGFP, 赤: CK15, 青: DAPI, 矢頭: Lgr5⁺HFSC, scale bar: 25 μ m)。(B) 背部皮膚毛包の Lgr5⁺CK15⁺細胞と Lgr5⁺CK15⁻細胞の細胞数 (平均 $\pm$ 標準誤差, N= 6-8 /group)。(C) 移植後の Lgr5⁺CK15⁺細胞の経時的変化 (平均 $\pm$ 標準誤差, N=5-6 /group)。** p < 0.01, *** p < 0.005。

2) 皮膚 GVHD により移植後の毛髪再生が有意に遅延する

次に我々は、皮膚 GVHD による HFSC の傷害が、皮膚の組織恒常性にもたらす影響を評価するため、移植後の毛髪再生を検討した。移植後 35 日において、Syn 群では HFSC のマーカーでもあり毛周期を休止期から成長期に移行させる調節因子でもある SOX9 の発現レベルが上昇し、毛包が真皮内に進展しているのに対して、Allo 群では SOX9 の発現レベルの上昇はなく、毛包の発育も認められなかった (図 9A)。また、Ki-67 にて細胞増殖を評価したところ、Syn 群では真皮内に進展した毛包に Ki-67 陽性の細胞を認めたが、Allo 群では認められなかった (図 9B)。Allo 群では皮膚 HE 標本において有意に毛包数の減少を認め (図 9C)、外面上も体毛が疎であった (図 9D)。これらの結果から、皮膚 GVHD により HFSC が減少し、毛周期が抑制されることで、Allo 群では毛包数が減少して脱毛が生じかつ毛髪の回復も遅延するものと考えられた。

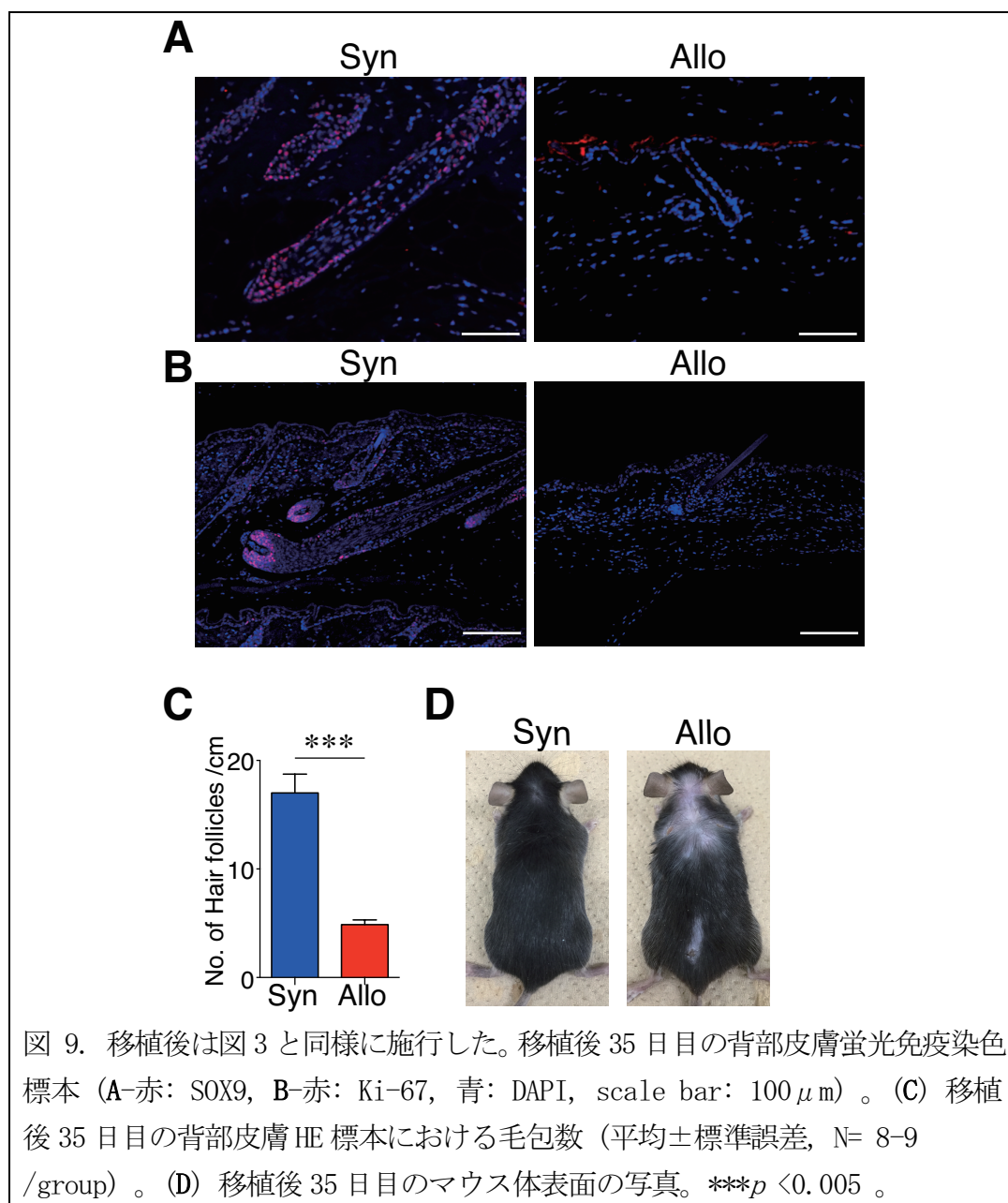


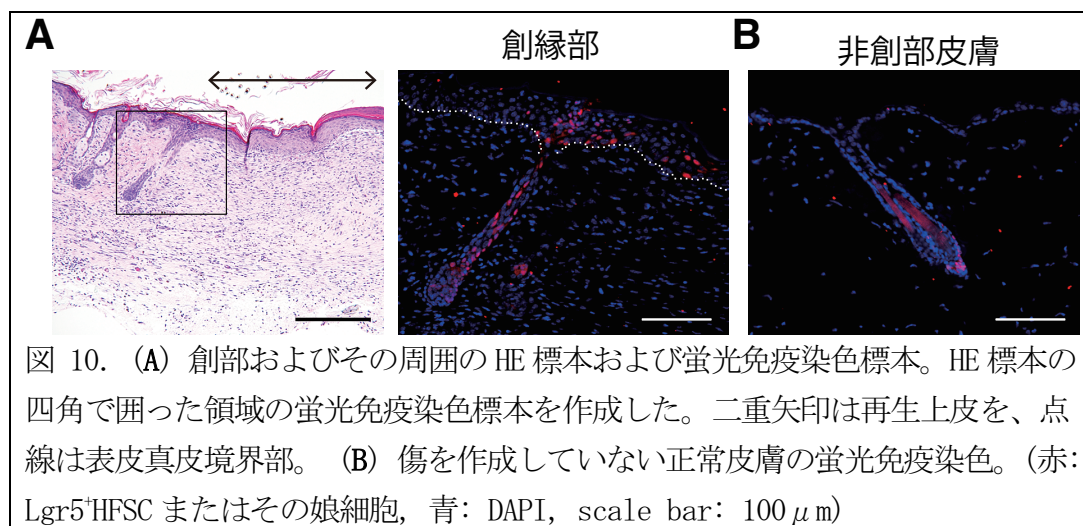
図 9. 移植後は図 3 と同様に施行した。移植後 35 日目の背部皮膚蛍光免疫染色標本 (A-赤: SOX9, B-赤: Ki-67, 青: DAPI, scale bar: 100 μ m)。(C) 移植後 35 日目の背部皮膚 HE 標本における毛包数 (平均 $\pm$ 標準誤差, N= 8-9 /group)。(D) 移植後 35 日目のマウス体表面の写真。*** $p < 0.005$ 。

3) 創傷治癒時の Lgr5⁺HFSC およびその HFSC の系統追跡実験

Lgr5⁺HFSC は毛髪再生だけでなく、創傷治癒において再生上皮を産生して表皮の欠損部を再生する能力を有している¹⁵。GVHD による Lgr5⁺HFSC の減少が創傷治癒に対してもたらす影響を検討するため、まず Naïve マウスにて創傷治癒時に Lgr5⁺HFSC から生じる子孫細胞が再生上皮の形成に寄与しているかどうかを確認した。

Lgr5^{EGFP-cre/ER} / R26^{tdTomato} マウスを使用する系統追跡システムを用い、タモキシフェン投与で Lgr5⁺HFSC で tdTomato 発現を誘導した後、直径 5 mm の傷を作成してから 10 日後に創傷治癒部と非創部の皮膚を採取し、パラフィン切片を作成して蛍光免疫染

色を行った。その結果、創部周辺の毛包および再生上皮に RFP 陽性細胞を認めたが (図 10A)、非創部皮膚の RFP 陽性細胞は Bulge 領域に認めるのみだった (図 10B)。RFP 陽性細胞は Lgr5⁺HFSC および Lgr5⁺HFSC を起源とする子孫細胞を意味するため、創傷治癒初期において Lgr5⁺HFSC は再生上皮を構成する表皮細胞を供給していることが確認された。



4) 皮膚 GVHD による HFSC の傷害は創傷治癒遅延に関連する

次に、皮膚 GVHD による Lgr5⁺HFSC の傷害がもたらす創傷治癒への影響を検討した。移植後の Lgr5^{EGFP-cre/ER} / R26^{tdTomato} マウスにタモキシフェンを内服させ、傷を作成してから 12 日後に創部皮膚を採取し蛍光免疫染色をおこなったところ、Syn 群では tdTomato 陽性細胞を毛包および再生上皮に認めたが、A11o 群ではその数は減少していた (図 11A)。また、創部の面積を経時的に測定したところ、A11o 群では有意差をもって創部の治癒遅延が認められた (図 11B, C)。

この結果から、創傷治癒において Lgr5⁺HFSC から生じる娘細胞は創傷治癒に寄与しており、皮膚 GVHD による Lgr5⁺HFSC の減少は創傷治癒においても負の影響を与えることが考えられた。

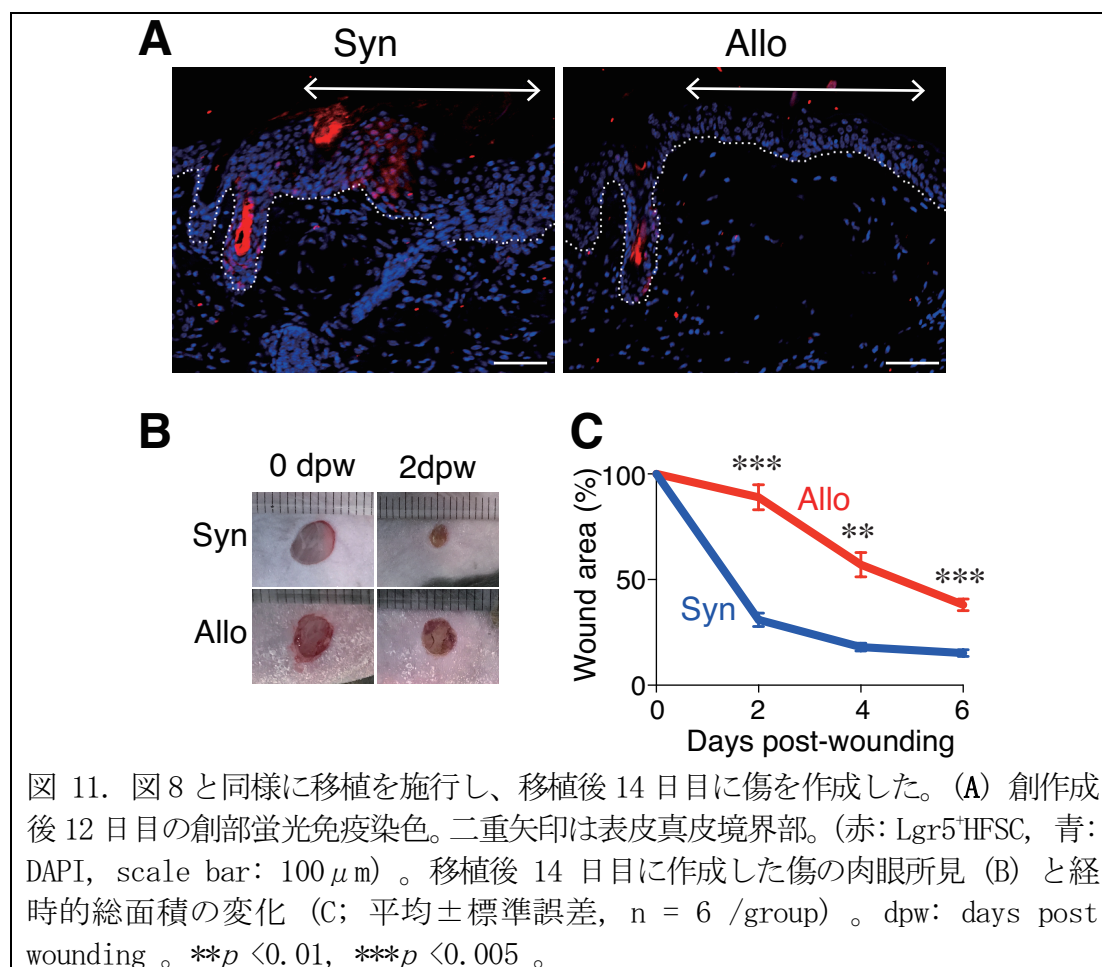


図 11. 図 8 と同様に移植を施行し、移植後 14 日目に傷を作成した。(A) 創作成後 12 日目の創部蛍光免疫染色。二重矢印は表皮真皮境界部。(赤: Lgr5⁺HFSC, 青: DAPI, scale bar: 100 μ m)。移植後 14 日目に作成した傷の肉眼所見 (B) と経時的総面積の変化 (C; 平均 $\pm$ 標準誤差, n = 6 /group)。dpw: days post wounding。** p < 0.01, *** p < 0.005。

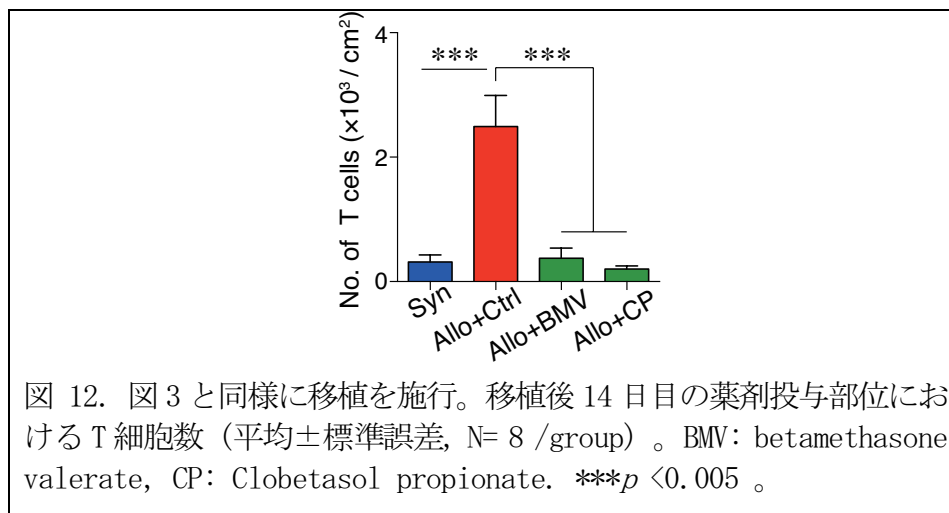
3. ステロイド局所投与の皮膚 GVHD に対する予防効果および Lgr5⁺HFSC に対する影響の検討

限局性の皮膚 GVHD に対する治療はステロイド外用が標準的な治療法である²⁶。そこで、ステロイド外用の皮膚 GVHD および Lgr5⁺HFSC に対する効果を検討した。

1) ステロイド外用による皮膚 GVHD の予防効果

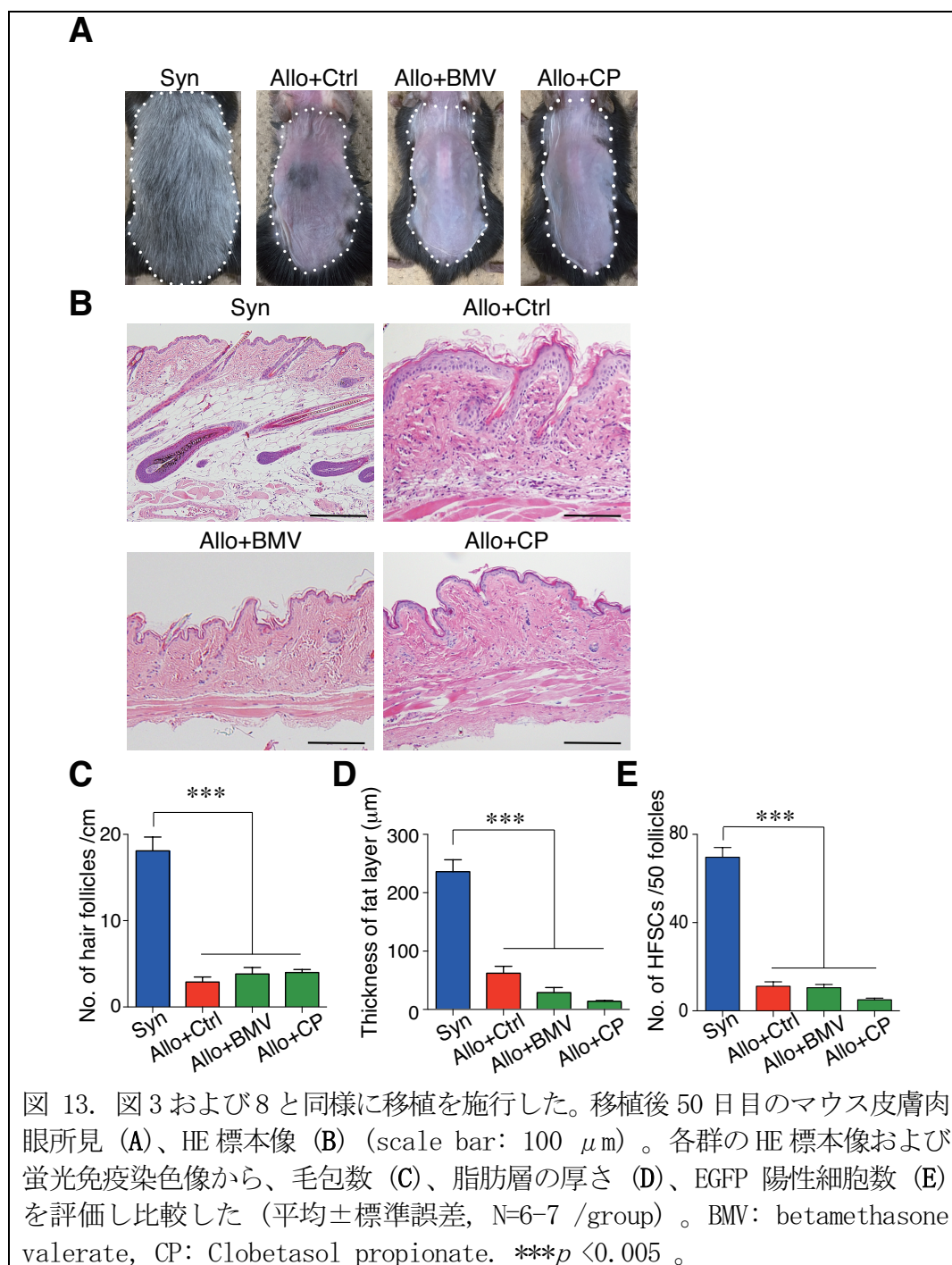
移植後より外用剤を塗布するため、移植の 2 日前にレシピエントマウスをケタミンとキシラジンにて鎮静し、背部皮膚の体毛を除毛した。ステロイド外用剤は 0.12% betamethasone valerate (BMV) と 0.05% clobetasol propionate (CP) を使用し、移植翌日より 1 日 1 回除毛部位の背部皮膚に外用剤を塗布した。移植後 14 日目の治療部位の皮膚を採取し、フローサイトメトリーにて皮膚に浸潤する T 細胞数を解析したところ、Allo 群に比べて、Allo+BMV 群、Allo+CP 群では有意差

をもって浸潤する T 細胞数が減少しており、両ステロイド剤の皮膚 GVHD 抑制効果が認められた (図 12)。



2) 移植後の長期的なステロイド外用は皮膚萎縮と Lgr5⁺HFSC の減少をきたす

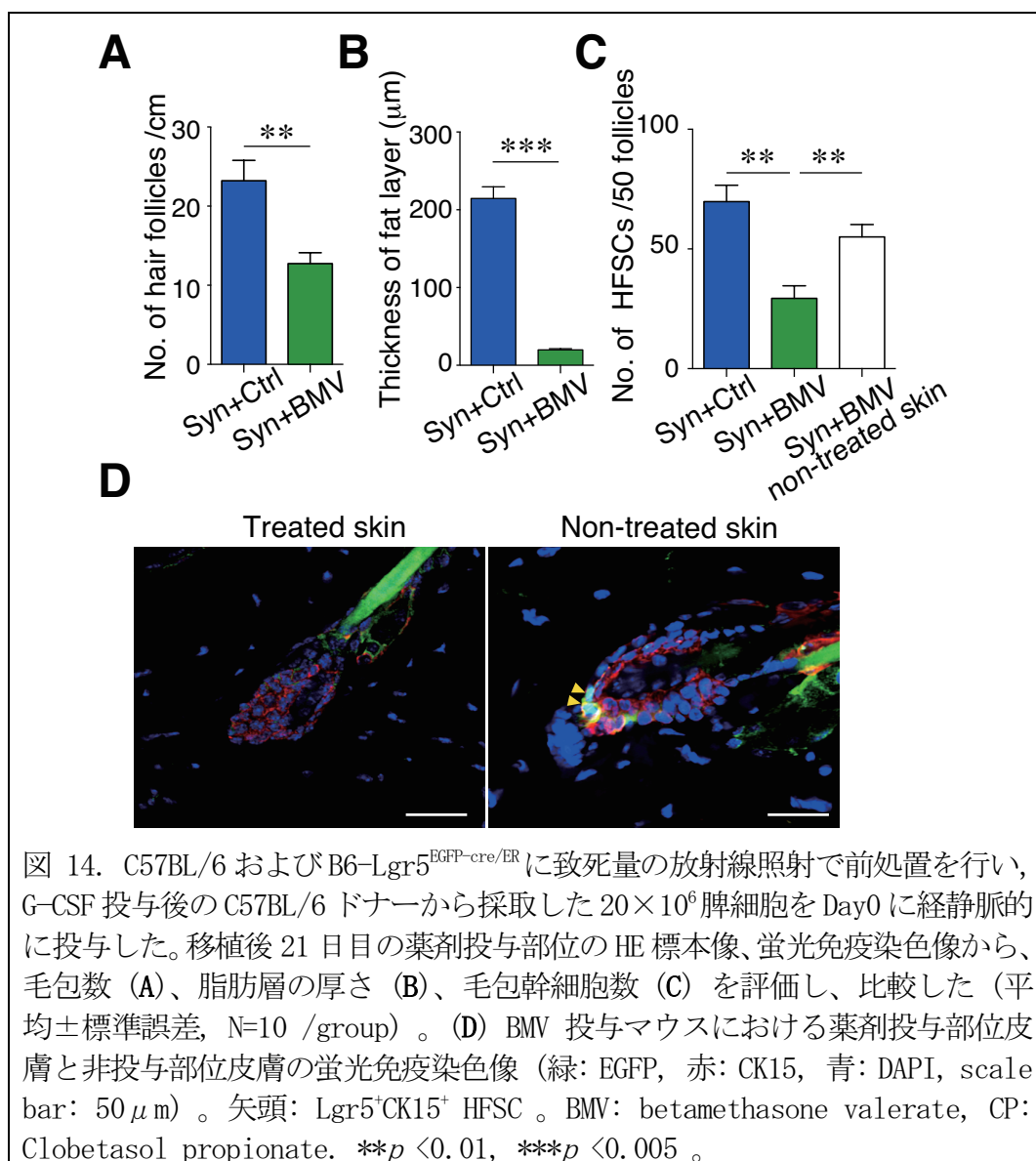
ステロイド外用は、GVHD によるドナー T 細胞の浸潤を著明に抑制することが分かったが、一方で移植後 50 日目でも毛髪再生は認められず、Allo 群で見られる毛包数の減少や皮下脂肪組織の高度な菲薄化は抑制できなかった (図 13A-D)。それに加えて、移植後 14 日目の治療部位の皮膚では EGFP 陽性細胞が Allo 群と同程度まで減少していた (図 13E)。これらの所見は、ドナー T 細胞浸潤が十分抑制されていることを考慮すると、皮膚 GVHD 以外の要因で生じるものと考えられた。



3) 長期的なステロイド外用により局所的な皮膚毒性をきたす

ドナーT細胞の抑制と皮膚組織所見の乖離は、ステロイド外用を継続することで生じる有害事象と推測された。これを検証するため、GVHDの生じないSyngeneicの移植群において、BMV外用とコントロールとしてのワセリン外用を比較することとした。移植後のレシピエントマウスに各種外用剤を3週間連日投与し、その後治療

部位の皮膚を採取し、組織所見と EGFP の免疫染色を行った。その結果、BMV 投与群において毛包数の減少、脂肪層の菲薄化、EGFP 陽性 HFSC 数の減少を認めた（図 14A, B）。一方で、BMV 投与マウスでも、未治療部位の皮膚においては、EGFP 陽性 HFSC 数は保たれていた（図 14C, D）。以上の結果より、ステロイド外用はドナー T 細胞の浸潤を抑制し皮膚 GVHD の悪化を防ぐが、長期的な使用により脂肪層の消失や HFSC の傷害などの毒性が生じるものと考えられた。

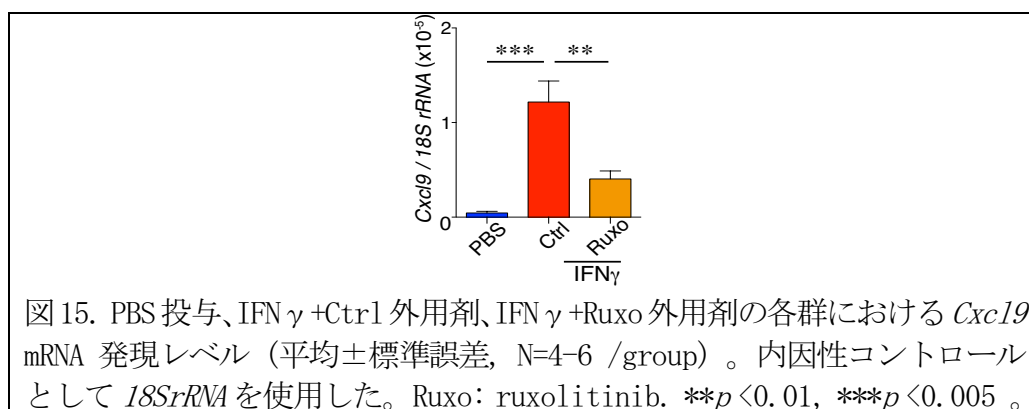


4. 皮膚の恒常性を維持できる皮膚 GVHD の新規局所療法の開発

次に、皮膚 GVHD を抑制しつつ、皮膚幹細胞を含む皮膚組織に有害な影響の少ない治療法を開発を行った。このモデルでは前述のように血清 IFN γ の上昇、皮膚に浸潤したドナーT 細胞における CXCR3 の発現上昇、皮膚における CXCR3 リガンドの CXCL9-11 の発現上昇が認められた。IFN γ は炎症組織でのケモカイン発現を促進し、CXCR3 陽性 T 細胞の浸潤に重要であると報告されており^{27,28}、GVHD の病態においても関与が示されている^{29,30}。それに加えて、扁平毛孔性苔癬では IFN γ によって Bulge 領域の免疫逃避機構が破綻し、限局性に脱毛をきたすことが報告されている³¹。JAK1/2 阻害薬であるルキシソリチニブ (Ruxo) は IFN γ 受容体のシグナルを阻害し、ドナーT 細胞の増殖や浸潤を抑制しかつ IFN γ による Bulge 領域の免疫逃避機構の破綻を防ぎ、Lgr5⁺HFSC を保護できると考えられるが、ルキシソリチニブの全身投与は造血抑制など様々な副作用を生じることが知られている³²⁻³⁵。そこで本研究では、ルキシソリチニブの局所投与により皮膚 GVHD 予防・治療を検討することにした。

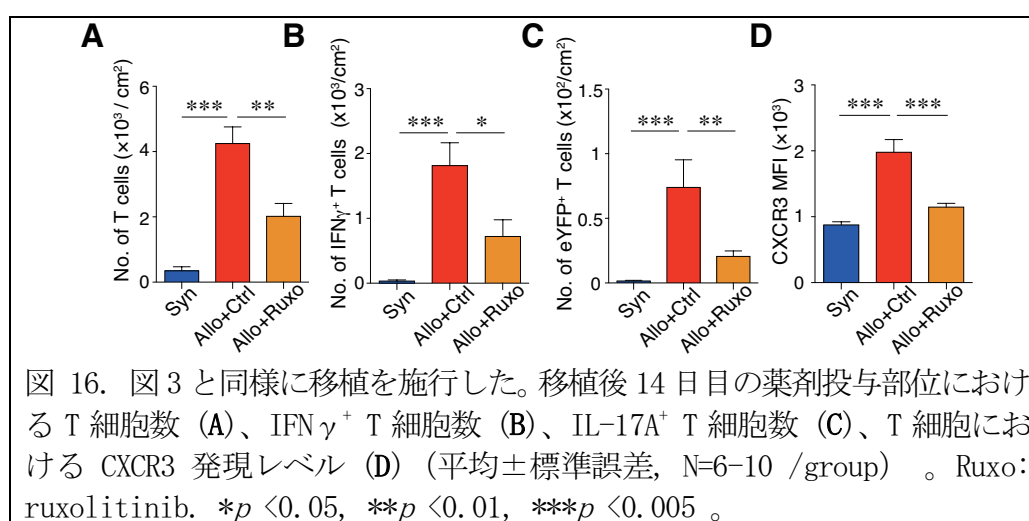
1) ルキシソリチニブ外用剤は IFN γ 投与部位のケモカイン産生を抑制する

移植実験を行う前に、ルキシソリチニブ外用剤が経皮的投与にて JAK1/2 阻害効果を示すかどうかについて検討した。Naïve マウスの耳介に 0.1 μ g の IFN γ または PBS を、Day1 と Day3 の 2 日間投与し、基剤のみのコントロール外用剤または 0.5% ルキシソリチニブ外用剤を Day1 から 4 まで耳介に塗布し、Day5 に耳介を採取して RNA を抽出し、RT-PCR にて *Cxcl9* の発現レベルを解析した。IFN γ の皮内注射後に、投与部位で *Cxcl9* 発現が亢進していたが、ルキシソリチニブ外用群では有意に *CXCL9* 発現の亢進を抑制した (図 15)。本実験により、0.5% ルキシソリチニブ外用剤の JAK1/2 抑制効果が確認されたため、本製剤の皮膚 GVHD における効果を検討することとした。

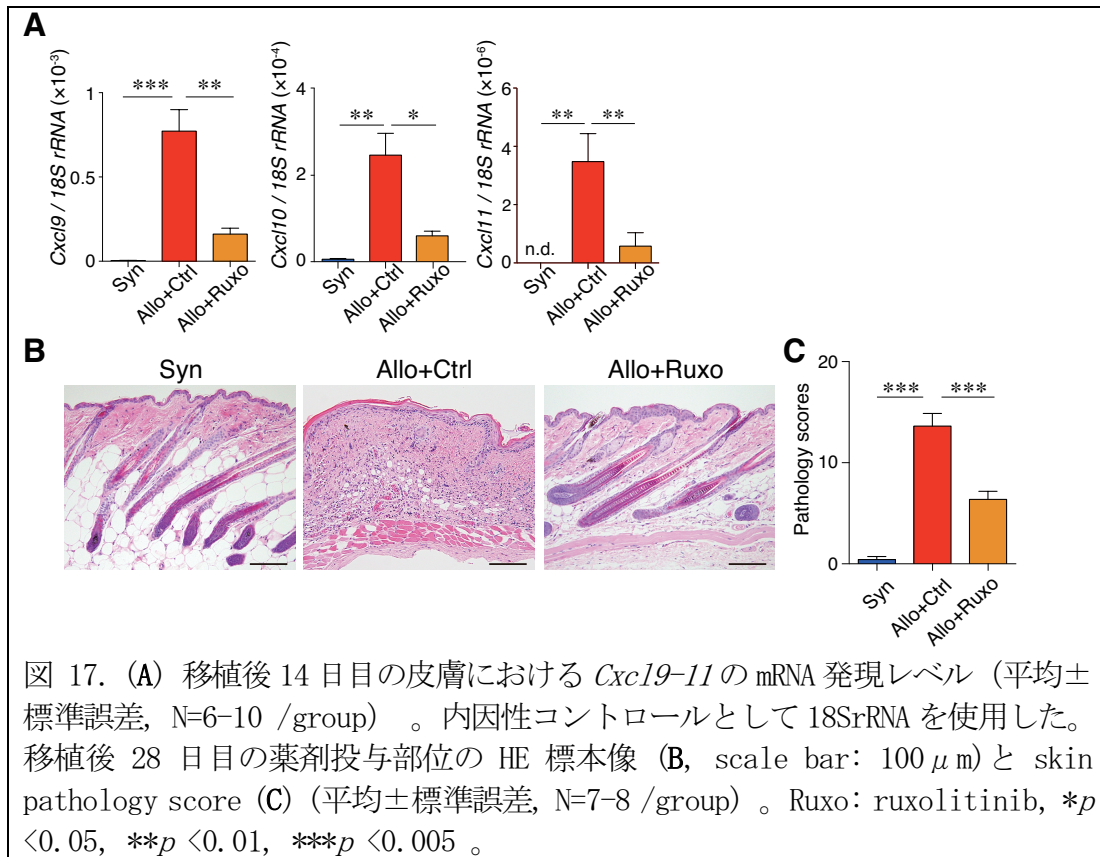


2) ルキシソリチニブ外用剤は移植後のドナーT 細胞の浸潤および皮膚におけるケモカインの発現を抑制し、病理所見の改善をもたらす

皮膚 GVHD に対しての効果を検証するため、移植後のマウスの背部皮膚に移植翌日より 0.5% ルキシソリチニブ外用剤を連日投与し、移植後 14 日目の治療部位のドナーT 細胞浸潤について、フローサイトメトリーを用いて解析した。治療部位のドナーT 細胞数は Allo+Ruxo 群で有意に減少していた (図 16A)。また、Allo 群で有意に増加していた IFN γ 産生 T 細胞数や IL-17A 産生 T 細胞数、ドナーT 細胞における CXCR3 の発現レベルも有意に減少していた (図 16B-D)。



皮膚組織全体から mRNA を抽出し CXCL family の発現レベルを検討したところ、Allo+Ruxo 群では Allo+Ctrl 群と比較して、*Cxcl9-11* 全ての発現レベルが有意に低下していた (図 17A)。移植後 28 日目に治療部位皮膚の HE 標本を作成し、ルキシソリチニブ外用剤による皮膚 GVHD の病理学的評価を行ったところ、Allo+Ctrl 群で炎症細胞の浸潤と真皮の肥厚、脂肪組織の菲薄化を認め、病理スコアでも Allo+Ruxo 群で有意に低い値を示していた (図 17B, C)。以上の結果から、ルキシソリチニブ外用剤はドナーT 細胞の浸潤および皮膚における CXCL family のケモカインの発現を抑制し、皮膚 GVHD の抑制効果をもたらすことが明らかになった。



- 3) ルキシソリチニブ外用剤は投与部位局所で作用し、全身の免疫反応を変化させない
- ルキシソリチニブ外用剤が経皮的に吸収され、全身の免疫抑制作用をもたらしているか否かについて確認したところ、移植後 14 日目の脾臓における T 細胞数 (図 18A)、移植後 28 日目の胸腺 $CD4^+CD8^+$ 細胞数 (図 18B) および GVHD スコア (図 18C) について、Allo+Ctrl 群と Allo+Ruxo 群に有意差は認めなかった。また、移植後 28 日目に未治療部位の皮膚と他の GVHD 標的臓器である、肝臓、腸管の病理所見を確認したところ、いずれの臓器においても Allo 群と Allo+Ruxo 群の間に病理スコアの有意差は認めなかった (図 18D) 。これらより、ルキシソリチニブ外用剤は投与部位局所でのみ作用し、全身の免疫反応に影響を与えないものと考えられた。

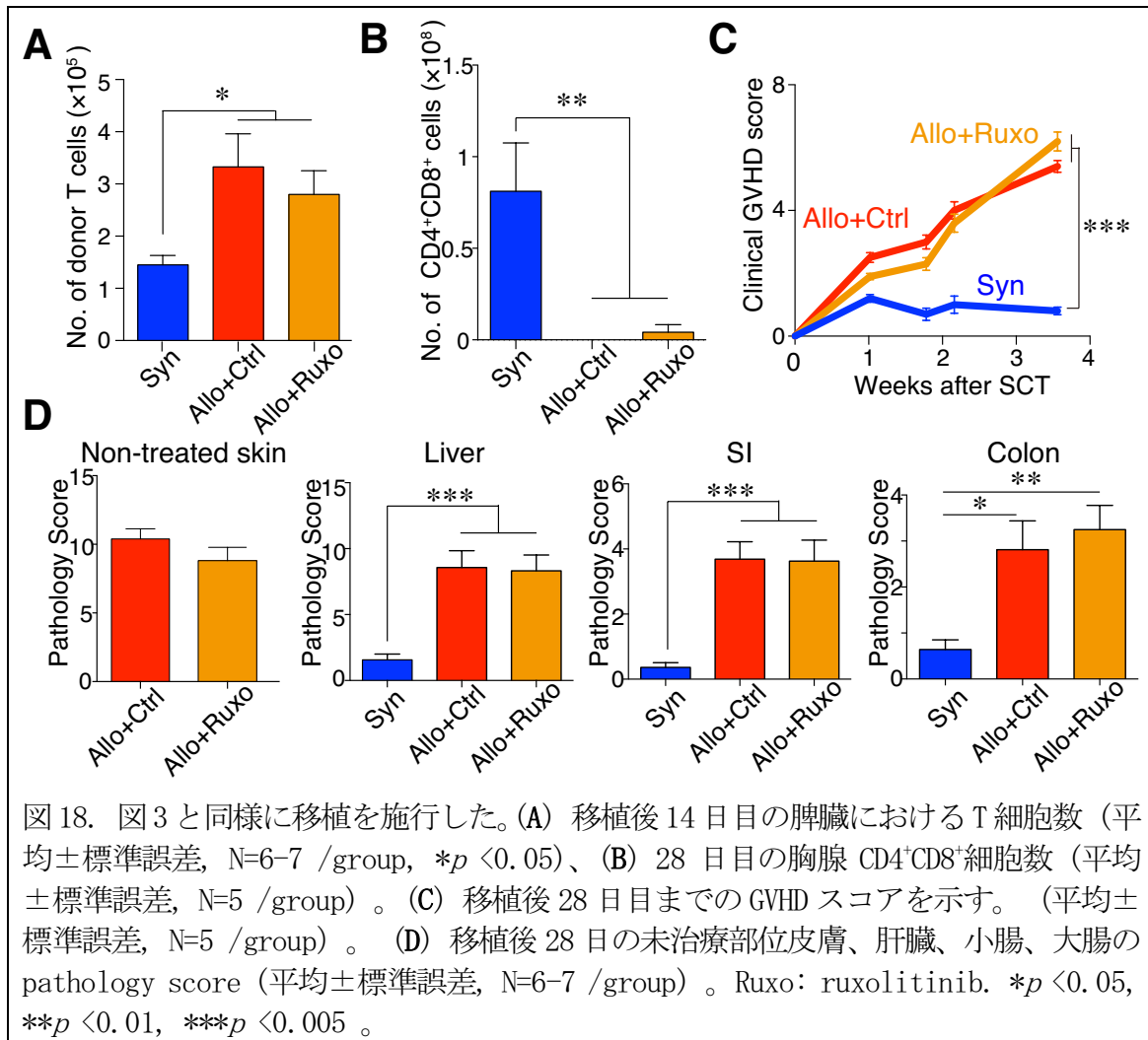


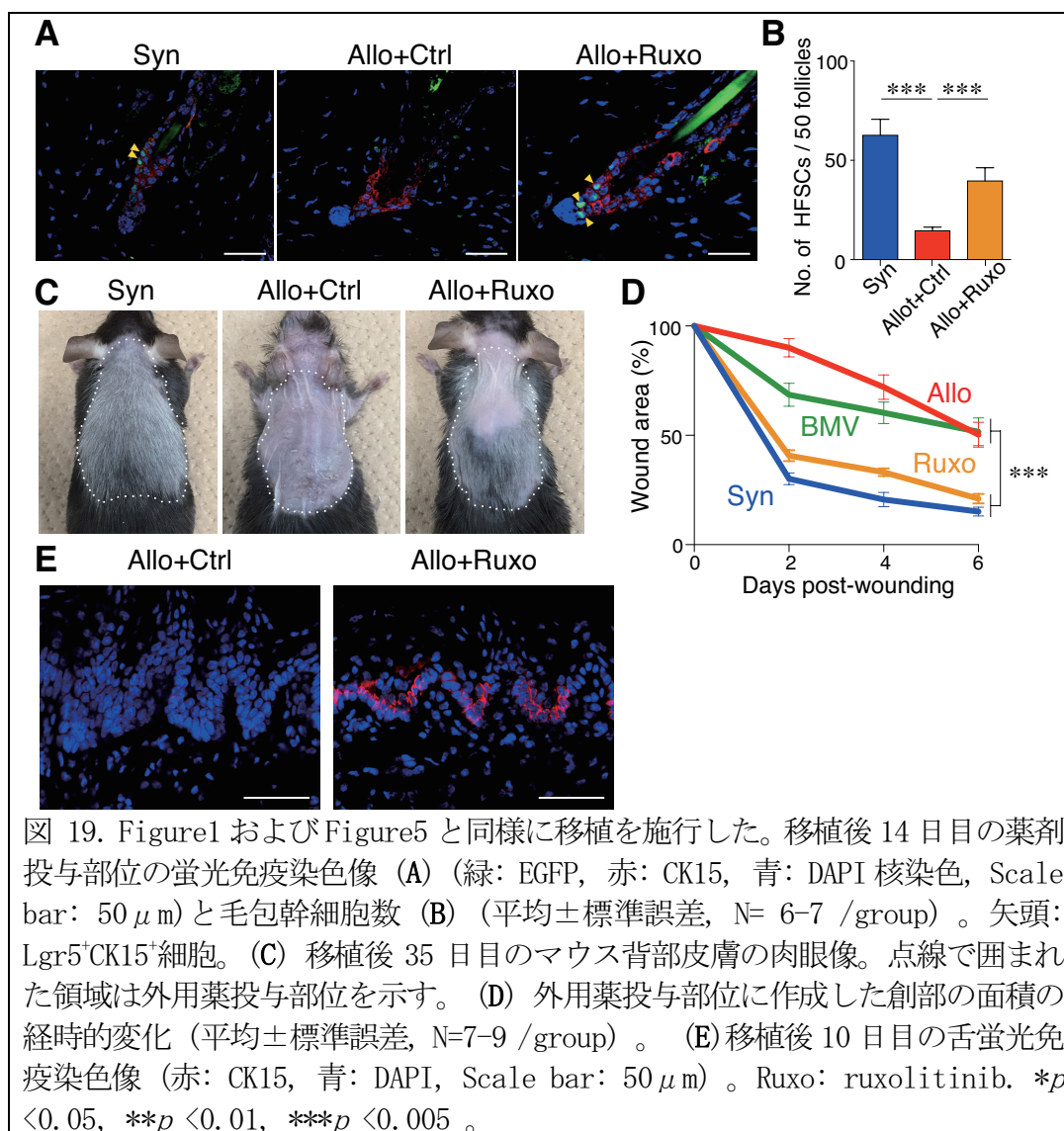
図 18. 図 3 と同様に移植を施行した。(A) 移植後 14 日目の脾臓における T 細胞数 (平均±標準誤差, N=6-7 /group, * $p < 0.05$)、(B) 28 日目の胸腺 CD4⁺CD8⁺細胞数 (平均±標準誤差, N=5 /group)。 (C) 移植後 28 日目までの GVHD スコアを示す。(平均±標準誤差, N=5 /group)。 (D) 移植後 28 日の未治療部位皮膚、肝臓、小腸、大腸の pathology score (平均±標準誤差, N=6-7 /group)。 Ruxo: ruxolitinib. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ 。

4) ルキシソリチニブ外用剤は皮膚 GVHD において Lgr5⁺HFSC を保護し、毛髪再生および創傷治癒を促進させる

ルキシソリチニブ外用剤の GVHD 抑制効果を確認したので、次に Lgr5⁺HFSC に対する影響を検討した。移植後 14 日目に外用剤投与部位の皮膚を採取し蛍光免疫染色を行ったところ、Allo 群では減少している Lgr5⁺HFSC が Allo+Ruxo 群では保たれており (図 19A, B)、ステロイド外用の際に認められたような毒性認められなかった。

ルキシソリチニブ外用剤の皮膚 GVHD に対する Lgr5⁺HFSC 保護効果は、移植後の毛髪の再生も促進した (図 19C)。創傷治癒に関しては、移植後 21 日間の外用剤投与後に傷を作成し経時的な創部面積を計測したが、Allo 群や BMV 群では創部の縮小が遅れていたのに対して、Allo+Ruxo 群では Syn 群と同等の治癒経過を示した (図 19D)。他の組織幹細胞への効果として、ルキシソリチニブを移植後翌日から内服させ、RLP の CK15⁺細胞に対する効果も検討したが、同様に幹細胞の保護効果が

確認できた (図 19E)。以上の結果より、ルキシソリチニブ外用剤は皮膚 GVHD に対して、Lgr5⁺HFSC の保護効果を有し、毛髪再生や創傷治癒などの皮膚の組織恒常性維持機構に負の影響を与えない、理想的な薬剤であることが示された。

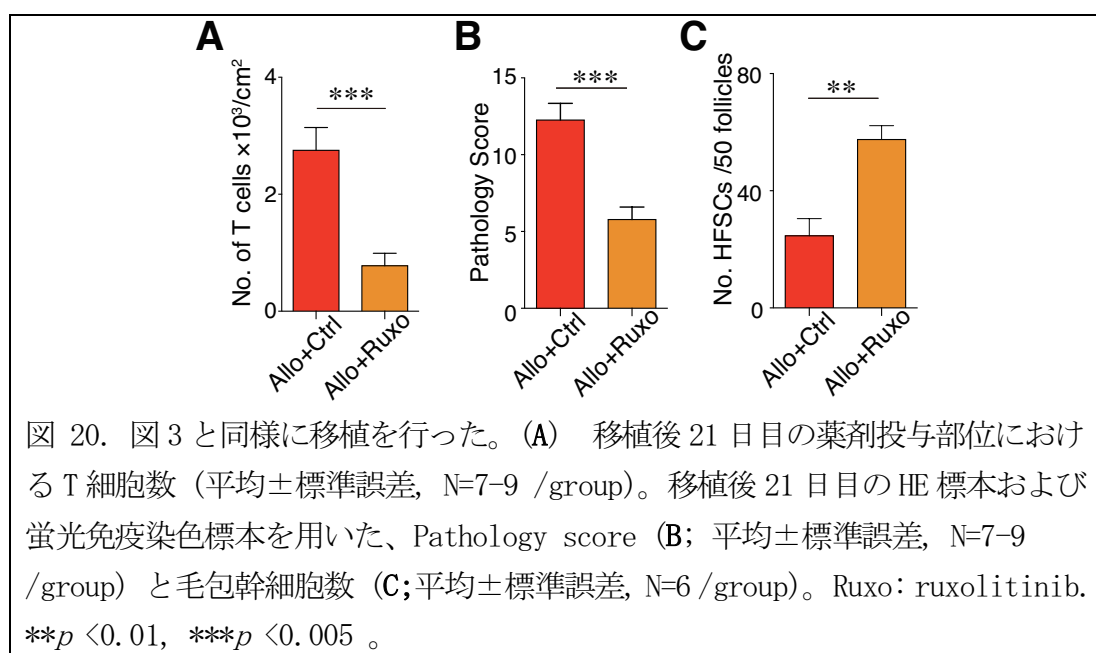


5. ルキシソリチニブ外用剤の皮膚 GVHD に対する治療モデルでの効果

実臨床で皮膚 GVHD に対して外用剤を使用する場合は、ほとんどのケースで GVHD が発症してからの治療介入になる。そこで我々は、皮膚 GVHD が発症してからルキシソリチニブ外用剤を投与した場合の効果を検討することにした。

1) ルキシソリチニブ外用剤は発症後の皮膚 GVHD に対しても効果を示す

Allo 群では移植後 10 日頃よりドナー T 細胞の浸潤が生じることを確認しており、マウス皮膚外観も発赤などの炎症所見を認めるようになるため、治療モデルとして移植後 10 日からルキシソリチニブ外用を開始し、移植後 21 日目の治療部位の皮膚を採取し、その効果を検証した。T 細胞数をフローサイトメトリーで解析したところ、Allo+Ruxo 群で有意に T 細胞数が減少していた (図 20A)。それに伴い病理スコアも改善し (図 20B)、Lgr5⁺HFSC 数も Allo 群に比較して増加していた (図 20C)。



2) ルキシソリチニブ外用剤は浸潤した T 細胞の増殖抑制により治療効果をもたらす

治療モデルにおいてルキシソリチニブ外用剤が効果を示す機序を検討するために、皮膚に浸潤したドナー T 細胞の増殖能を解析した。移植後 10 日目からルキシソリチニブ外用剤を 5 日間投与し、その後治療部位の皮膚から T 細胞を回収して、フローサイトメトリーにて Ki-67 の発現を評価したところ、Allo+Ruxo 群では有意に Ki-67 陽性率および陽性細胞数が減少しており、ルキシソリチニブ外用剤が浸潤した T 細胞の増殖抑制をもたらしていることが示された (図 21A, B)。

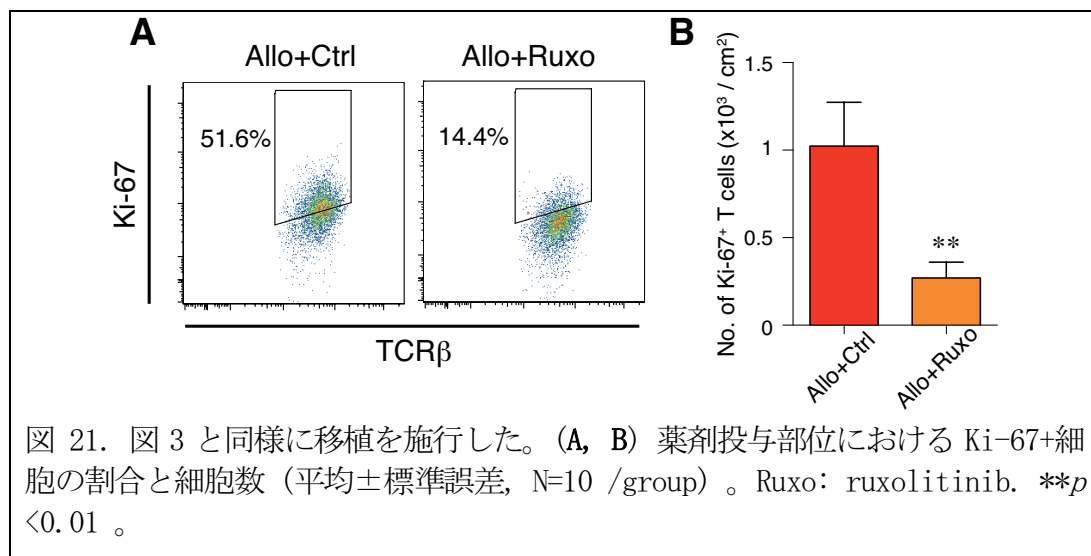


図 21. 図 3 と同様に移植を施行した。(A, B) 薬剤投与部位における Ki-67+細胞の割合と細胞数 (平均±標準誤差, N=10 /group) 。Ruxo: ruxolitinib. ** $p < 0.01$ 。

考察

近年の報告により、GVHD によって腸幹細胞が傷害されることが明らかになってきた^{4,5}。腸幹細胞の傷害は、腸管上皮の再生遅延による腸管バリア機能の低下や、抗菌ペプチドを分泌するパネト細胞の減少による腸内細菌叢の乱れをきたし、難治性 GVHD の病態を形成する要因と考えられており、腸幹細胞を保護する治療法が GVHD の新たな治療戦略として注目されてきている^{6,36}。腸管とともに GVHD の代表的な標的臓器である皮膚では、2000 年以降に幹細胞や前駆細胞のマーカーが明らかになり、それらの細胞は毛包や毛包間表皮に存在し、定常状態ではそれぞれの細胞分画が皮膚のそれぞれの構造や機能を保ち、恒常性を維持していることが分かってきた^{12, 15, 37-39}。その中でも毛包に存在する幹細胞は、その特徴や機能がよく調べられており、Lgr5⁺HFSC は周期的な毛髪の再生や皮膚損傷時の表皮の再生において重要な役割を担う幹細胞として報告されている^{12, 15, 38, 39}。一方で、1990 年代頃から、皮膚 GVHD における表皮細胞のアポトーシスやドナー T 細胞の浸潤は、皮膚幹細胞が存在すると言われている、毛包の Bulge 領域やヒトの epidermal rete ridge においてより頻繁に認められるという報告が複数なされた^{16, 17, 25, 40-43}。そこで我々は、皮膚においても幹細胞が GVHD の標的になっているのではないかという長年の疑問に答えを出すべく本研究を行った。

本研究の結果より、Lgr5⁺HFSC や RLP の CK15⁺細胞は GVHD により傷害され、その数が減少することが明らかになった。定常状態において毛包は成長期、退行期、休止期の 3 つの周期的に繰り返すことで正常な毛髪を維持しているが⁴⁴、毛髪の再生には毛包の休止期から成長期への以降が必要であり、毛包幹細胞はその際に必要不可欠な細胞であることが分かっている⁴⁵。また、化学療法や放射線療法により毛包細胞が傷害され脱毛をきたすことはよく知られているが、脱毛は慢性 GVHD の臨床所見の 1 つでもあることも広く認められていることから^{46, 47}、皮膚 GVHD による毛包幹細胞の減少は、同種移植後の脱毛、毛髪再生不全の原因となり得るものと考えられた。さらに、本研究では GVHD による創傷治癒遅延も確認された。毛包幹細胞は創傷治癒においても重要な役割を担っており、治癒過程早期の再生上皮の形成において、表皮細胞の供給源になる^{38, 48}。マウス実験においては、毛包幹細胞を欠如している毛髪のない皮膚は毛髪のある皮膚に比較して創傷治癒が遅延することが報告されている⁴⁹。また、皮膚 GVHD においては創傷治癒遅延が臨床的所見としてしばしば認められており⁴⁶、皮膚 GVHD による毛包幹細胞の減少は治癒過程の早期における再生上皮の形成を遅らせ、創傷治癒遅延をもたらす可能性が考えられた。

本研究では、Lgr5⁺CK15⁺HFSC は Lgr5⁻CK15⁺細胞より皮膚 GVHD による傷害を受けやすいことが明らかになった。幹細胞と成熟細胞の細胞周期や細胞傷害性 T 細胞および炎症性サイトカインに対する感受性の違いにより生じるものと推測される。

Bulge 領域の毛包幹細胞は、Bcl-2 の高発現および p53 の一過性安定化により、放射線照射による DNA 損傷に誘発される細胞死に対して抵抗性を示すと報告されている⁵⁰。我々の研究でも GVHD の生じない Syn 群では全身放射線照射による一過性の HFSC 減少はあっても、移植後 7 日目以降に回復しており、GVHD におけるドナー T 細胞による細胞障害や炎症性サイトカインが Lgr5⁺HFSC の減少に寄与しているものと考えられる。GVHD における炎症性サイトカインが RLP における CK15⁺幹細胞のアポトーシス関連分子の発現を誘導し、幹細胞の選択的な細胞死誘導をもたらすとの報告もあり⁵¹、毛包幹細胞においても同様の機序により、GVHD による細胞傷害の感受性が高まっている可能性がある。

また、毛包幹細胞にゲノムストレスが蓄積すると、毛包幹細胞の維持に必要なコラーゲン 17A1 が分解され、幹細胞としての自己複製能や多分化能が失われ、最終的には毛包幹細胞数が減少するとの報告もあり⁵²、幹細胞維持に必要な機構の破綻により毛包幹細胞の傷害が生じている可能性も考えられる。近年、種々の炎症環境において、各臓器の恒常性維持能の違いが疾患における組織の感受性の違いをもたらすという概念が提唱され⁵³、GVHD における炎症環境に対する腸管や皮膚の高い感受性が、急性 GVHD で標的となりやすい臓器である要因と考えられる。

皮膚移植の研究により、毛包幹細胞が存在している毛包 Bulge 領域は、MHC クラス I の発現レベルが低い、TGF β や IL-10 などの免疫抑制性サイトカインを産生している、抑制性副刺激因子の CD200 が発現しているなどの複数の免疫逃避機構を有しており、正常皮膚では他の表皮細胞と比較して相対的に免疫反応による傷害を受けにくいことが分かっている^{54,55}。一方で、円形脱毛症や扁平毛孔性苔癬では病変部位の皮膚における IFN γ が Bulge 領域の MHC の発現亢進、CD200 の発現低下などをもたらし、Bulge 領域の免疫学的逃避機構を傷害しているとの報告もある^{31,56}。本研究でも Allo 群のマウスでは血清 IFN γ の上昇および、皮膚に多数浸潤した IFN γ 産生 T 細胞を認め、それに伴う Bulge 領域の免疫逃避機構の破綻が生じている可能性が考えられる。

現在、ステロイド外用剤は皮膚 GVHD を含む様々な皮膚炎症性疾患に対する標準的な治療となっている^{26,57}。しかし、病原性の T 細胞はしばしばステロイド誘導性のアポトーシスに抵抗性であり⁵⁸、かつ長期間のステロイド投与は表皮細胞の増殖抑制をもたらす、皮膚萎縮や創傷治癒遅延をきたすことが問題となっている⁵⁹⁻⁶²。本研究では、それらに加えて、ステロイドの長期的な局所投与が Lgr5⁺HFSC の減少をきたし、

毛包幹細胞の喪失に関連する皮膚有害事象の可能性を示した。JAK-STAT 経路は種々のサイトカイン受容体の細胞内シグナル伝達に関与しており、抗原特異的 T 細胞の活性化および遊走に重要な役割を担っている^{63,64}。JAK1/2 阻害剤のルキシソリチニブの全身投与は、治療法が確立していないステロイド抵抗性の急性および慢性 GVHD に対して著明な有効性を示し^{65,66}、現在第Ⅲ相ランダム化非盲検多施設共同試験が進行中である。しかし、JAK-STAT 経路は顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポエチン、トロンプオエチンなどの血球増殖刺激因子の受容体の細胞質内シグナル伝達にも関与しており、JAK2 変異を有する原発性骨髄線維症においては投与量依存性に血球減少が認められる^{32,33}。また、ルキシソリチニブの急激な減量や中断は高サイトカイン血症から全身性毛細血管漏出症候群様の病態を呈し、重症の呼吸不全および循環不全を来すことがあるため、注意喚起がなされている^{67,68}。このように、ルキシソリチニブはその著明な有効性の背景に有害事象に関する慎重なモニタリングを要する薬剤と考えられている。

本研究では、ルキシソリチニブ外用剤が皮膚 GVHD に対して投与部位局所での効果を呈することを示した。0.5%外用剤では全身性の免疫抑制効果は呈していなかったため、全身投与で問題となる有害事象の発生は少ないものと予想される。ルキシソリチニブ外用剤により皮膚 GVHD に対する治療効果は、Th1 および Th17 型の T 細胞の浸潤および増殖を抑制する機序が考えられ、これまでの全身投与での報告でも同様の機序が示されている^{63,69,70}。最近の円形脱毛症のマウスモデルにおける報告では、ルキシソリチニブ局所投与が皮膚の IFN γ シグナリングを阻害し、T 細胞の浸潤を抑制して病状を改善させることが示されている⁵⁶。本研究でも、Alo 群において皮膚の血液細胞以外の細胞で CXCL ケモカイン、特に CXCL9 が高く発現していた。CXCL9 はその発現レベルが IFN γ に強く依存しており²⁷、ルキシソリチニブ外用剤はケラチノサイトの IFN γ 受容体の細胞内シグナル伝達を阻害することで、活性化 T 細胞の遊走に関わるケモカインの発現を抑制している可能性が考えられた。JAK 阻害剤の局所投与は汎発型円形脱毛症や乾癬においてパイロット研究⁷¹や臨床試験が進んでおり、その有効性と安全性についての検討がなされている⁷²。皮膚 GVHD においても、ルキシソリチニブ外用剤を他の免疫抑制剤と併用することで、より速やかにステロイドやカリシニューリン阻害剤の内服量を減量できる可能性があり、再発のリスクや日和見感染症の発症率を軽減できる可能性があるかもしれない。

最近の報告では、ルキシソリチニブは毛乳頭細胞の間葉系細胞を活性化することで、毛周期を成長期に移行させ発毛を促進させる効果があることが示されているが⁷³、本研究ではルキシソリチニブ外用剤は皮膚 GVHD に対して Lgr5⁺HFSC を保護するだけでなく、毛包幹細胞のニッチとして推測されている脂肪組織を維持することが明らかになった。

幹細胞ニッチは幹細胞の性質を維持するために必要とされる微小環境であるが、脂肪細胞は毛包幹細胞のニッチを構成する細胞の1つとして認識されており^{74,75}、毛乳頭間葉系細胞や毛包幹細胞に作用し、毛周期の制御に関与していると考えられている。ステロイド外用剤では毛包幹細胞の喪失や脂肪組織の著明な萎縮が認められるため、ルキシソリチニブ外用剤はステロイド外用とは異なり、皮膚幹細胞とニッチシステムを維持しつつ免疫抑制効果を発揮する薬剤である可能性が示唆される。

今回我々は、皮膚 GVHD が腸管のみならず皮膚の組織幹細胞も標的とし、毛髪再生や創傷治癒などの遅延を招いていることを明らかにした。さらに、現在の標準的な皮膚 GVHD 治療薬であるステロイド剤の局所投与は、組織幹細胞もしくはそのニッチシステムに毒性を持つことが示された。ルキシソリチニブの局所投与は、組織幹細胞および皮膚の組織恒常性維持に最適化された新規治療法となりうることが示され、今後の臨床応用が期待される。

総括および結論

本研究にて以下の知見が得られた。

- 皮膚 GVHD によって皮膚幹細胞が傷害される
- 皮膚 GVHD による Lgr5⁺HFSC の傷害は、毛髪再生や創傷治癒において悪影響を与える
- ステロイド外用剤はドナーT細胞の浸潤は抑制するが、Lgr5⁺HFSC を保護することができず、長期使用により皮膚萎縮などの有害事象をもたらす
- ルキシソリチニブ外用剤はステロイド外用剤と同等の免疫抑制作用を有し、かつ Lgr5⁺HFSC を保護することができ、皮膚恒常性を維持することができる

以上の結果より、ルキシソリチニブ外用剤は皮膚 GVHD の治療薬として皮膚幹細胞の保護効果と免疫抑制効果を有する新しい治療薬であることが明らかになった。

2. 新知見の意義

本研究により長年の疑問であった皮膚 GVHD における皮膚幹細胞の傷害が明らかになった。皮膚幹細胞は皮膚恒常性の維持において重要な細胞であり、その傷害は脱毛や創傷治癒遅延などの皮膚の機能障害につながり、移植後患者の QOL を低下させる原因になり得るものと考えられる。また、本研究によって腸管以外の臓器でも GVHD によって組織幹細胞が傷害を受けることが明らかになり、GVHD による臓器障害の共通した病態である可能性が考えられた。ルキシソリチニブ外用剤は、皮膚 GVHD の局所療法として標準的であるステロイド外用剤と同様の効果を示しかつ皮膚恒常性を損なわない治療薬と考えられ、臨床応用が期待される薬剤と考えられる。

3. 今後の研究展開

GVHD に対するルキシソリチニブの臨床応用については、現在ステロイド抵抗性 GVHD に対する内服薬での第Ⅲ相無作為化非盲検多施設共同研究が進行中であるが、この領域における外用剤での臨床研究は進んでいない。一方で、JAK1/3 阻害剤である tofacitinib の外用剤については、皮膚科疾患において臨床研究が進行しており、乾癬やアトピー性皮膚炎において有効性と安全性が確認されている^{76,77}。本研究の結果

から、ルキシソリチニブ外用剤は皮膚 GVHD に対しても効果が期待できる薬剤と考えられるため、ヒトでの治療効果と安全性を検討する臨床研究の計画を進めていく必要がある。

本研究により、GVHD では皮膚幹細胞が傷害を受けていることが明らかになったが、その詳細な機序については不明であった。Lgr5⁺HFSC 数と皮膚に浸潤した T 細胞数の経時的な変化から、同種抗原に反応する活性化 T 細胞が関与している可能性が考えられる。Perforin KO マウスや Fas ligand KO マウスをドナーにした移植実験にて、細胞傷害性 T 細胞によるアポトーシスの誘導の関与を検討する。また、このマウスモデルでは IFN γ シグナリングが皮膚 GVHD の病態の中心を担っており、ルキシソリチニブによる IFN γ シグナリングの阻害が有意な治療効果を示していた。IFN γ receptor 1 flox マウスを B6-Lgr5^{EGFP-cre/ER} と交配させ、タモキシフェン投与により Lgr5⁺細胞特異的に IFN γ receptor をノックアウトさせることができる。このマウスをレシピエントとして同様の実験を行い、Lgr5⁺HFSC における IFN γ の影響を検討する。

これまでに我々は Lgr5 のリガンドである R-spondin 1 が、GVHD による腸幹細胞の傷害を軽減させ、腸上皮バリアおよび腸内細菌叢を維持することで GVHD の改善をもたらすことを示してきた^{4,6}。毛包幹細胞においては、これまでに外因性 R-spondin 1 を投与することで、毛周期における休止期中期から成長期への移行を促進し、毛髪再生を促すことが報告されているが、同種移植に伴う R-spondin 1 投与によって、毛包幹細胞の活性化や保護が可能かどうか⁷⁸、またルキシソリチニブ外用との併用による相乗効果が見られるかどうかについて検討する。

謝辞

北海道大学大学院 医学研究院内科学系部門内科学分野 血液内科教室
豊嶋崇徳教授、橋本大吾講師、小野澤真弘教育助教、杉田純一助教、早瀬英子助教
小笠原励起先生、大東寛幸先生、荒隆英先生、横山絵美先生、江端浩先生

市立函館病院 血液内科
松岡里湖医長

Department of Immunology, QIMR Berghofer Medical Research Institute
Prof. Geoffrey R. Hill

引用文献

- 1 Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet (London, England)* **373**, 1550-1561 (2009).
- 2 Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomchik, M. J. & Emerson, S. G. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* **285**, 412-415 (1999).
- 3 Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., Gagin, S., Liu, C., Cooke, K. R. & Ferrara, J. L. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* **8**, 575-581, doi:10.1038/nm0602-575 (2002).
- 4 Takashima, S., Kadowaki, M., Aoyama, K., Koyama, M., Oshima, T., Tomizuka, K., Akashi, K. & Teshima, T. The Wnt agonist R-spondin1 regulates systemic graft-versus-host disease by protecting intestinal stem cells. *J Exp Med* **208**, 285-294, doi:10.1084/jem.20101559 (2011).
- 5 Hanash, A. M., Dudakov, J. A., Hua, G., O'Connor, M. H., Young, L. F., Singer, N. V., West, M. L., Jenq, R. R., Holland, A. M., Kappel, L. W., Ghosh, A., Tsai, J. J., Rao, U. K., Yim, N. L., Smith, O. M., Velardi, E., Hawryluk, E. B., Murphy, G. F., Liu, C., Fouser, L. A., Kolesnick, R., Blazar, B. R. & van den Brink, M. R. Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* **37**, 339-350, doi:10.1016/j.immuni.2012.05.028 (2012).
- 6 Hayase, E., Hashimoto, D., Nakamura, K., Noizat, C., Ogasawara, R., Takahashi, S., Ohigashi, H., Yokoi, Y., Sugimoto, R., Matsuoka, S., Ara, T., Yokoyama, E., Yamakawa, T., Ebata, K., Kondo, T., Hiramane, R., Aizawa, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Mori, H., Kurokawa, K., Tomizuka, K., Ayabe, T. & Teshima, T. R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. *J Exp Med*, doi:10.1084/jem.20170418 (2017).
- 7 Cotsarelis, G., Sun, T. T. & Lavker, R. M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329-1337 (1990).

- 8 Lyle, S., Christofidou-Solomidou, M., Liu, Y., Elder, D. E., Albelda, S. & Cotsarelis, G. The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells. *J Cell Sci* **111** (Pt 21), 3179-3188 (1998).
- 9 Trempus, C. S., Morris, R. J., Bortner, C. D., Cotsarelis, G., Faircloth, R. S., Reece, J. M. & Tennant, R. W. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol* **120**, 501-511, doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12088.x (2003).
- 10 Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K. & Barrandon, Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* **104**, 233-245 (2001).
- 11 Blanpain, C., Lowry, W. E., Geoghegan, A., Polak, L. & Fuchs, E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* **118**, 635-648, doi:10.1016/j.cell.2004.08.012 (2004).
- 12 Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., van Es, J. H., Snippert, H. J., Clevers, H. & Toftgård, R. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet* **40**, 1291-1299, doi:10.1038/ng.239 (2008).
- 13 Snippert, H. J., Haegebarth, A., Kasper, M., Jaks, V., van Es, J. H., Barker, N., van de Wetering, M., van den Born, M., Begthel, H., Vries, R. G., Stange, D. E., Toftgård, R. & Clevers, H. Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science* **327**, 1385-1389, doi:10.1126/science.1184733 (2010).
- 14 Jensen, K. B., Collins, C. A., Nascimento, E., Tan, D. W., Frye, M., Itami, S. & Watt, F. M. Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell Stem Cell* **4**, 427-439, doi:10.1016/j.stem.2009.04.014 (2009).
- 15 Page, M. E., Lombard, P., Ng, F., Göttgens, B. & Jensen, K. B. The epidermis comprises autonomous compartments maintained by distinct stem cell populations. *Cell Stem Cell* **13**, 471-482, doi:10.1016/j.stem.2013.07.010 (2013).
- 16 Murphy, G. F., Lavker, R. M., Whitaker, D. & Korngold, R. Cytotoxic folliculitis in GvHD. Evidence of follicular stem cell injury and recovery. *J Cutan Pathol* **18**, 309-314 (1991).
- 17 Whitaker-Menezes, D., Jones, S. C., Friedman, T. M., Korngold, R. &

- Murphy, G. F. An epithelial target site in experimental graft-versus-host disease and cytokine-mediated cytotoxicity is defined by cytokeratin 15 expression. *Biol Blood Marrow Transplant* **9**, 559-570 (2003).
- 18 Schindler, C., Shuai, K., Prezioso, V. R. & Darnell, J. E., Jr. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* **257**, 809-813 (1992).
 - 19 Murray, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* **178**, 2623-2629 (2007).
 - 20 Barker, N., van Es, J. H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegebarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P. J. & Clevers, H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* **449**, 1003-1007, doi:10.1038/nature06196 (2007).
 - 21 Madisen, L., Zwingman, T. A., Sunkin, S. M., Oh, S. W., Zariwala, H. A., Gu, H., Ng, L. L., Palmiter, R. D., Hawrylycz, M. J., Jones, A. R., Lein, E. S. & Zeng, H. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* **13**, 133-140, doi:10.1038/nn.2467 (2010).
 - 22 Hennet, T., Hagen, F. K., Tabak, L. A. & Marth, J. D. T-cell-specific deletion of a polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase gene by site-directed recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 12070-12074 (1995).
 - 23 Hill, G. R., Olver, S. D., Kuns, R. D., Varelias, A., Raffelt, N. C., Don, A. L., Markey, K. A., Wilson, Y. A., Smyth, M. J., Iwakura, Y., Tocker, J., Clouston, A. D. & Macdonald, K. P. Stem cell mobilization with G-CSF induces type 17 differentiation and promotes scleroderma. *Blood* **116**, 819-828, doi:10.1182/blood-2009-11-256495 (2010).
 - 24 Cooke, K. R., Kobzik, L., Martin, T. R., Brewer, J., Delmonte, J., Crawford, J. M. & Ferrara, J. L. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* **88**, 3230-3239 (1996).
 - 25 Zhan, Q., Signoretti, S., Whitaker-Menezes, D., Friedman, T. M., Korngold, R. & Murphy, G. F. Cytokeratin15-positive basal epithelial cells targeted in graft-versus-host disease express a constitutive antiapoptotic phenotype. *J Invest Dermatol* **127**, 106-115, doi:10.1038/sj.jid.5700583 (2007).
 - 26 Wolff, D., Schleuning, M., von Harsdorf, S., Bacher, U., Gerbitz, A., Stadler,

- M., Ayuk, F., Kiani, A., Schwerdtfeger, R., Vogelsang, G. B., Kobbe, G., Gramatzki, M., Lawitschka, A., Mohty, M., Pavletic, S. Z., Greinix, H. & Holler, E. Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **17**, 1-17, doi:10.1016/j.bbmt.2010.05.011 (2011).
- 27 Groom, J. R. & Luster, A. D. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol* **89**, 207-215, doi:10.1038/icb.2010.158 (2011).
- 28 Choi, J., Ziga, E. D., Ritchey, J., Collins, L., Prior, J. L., Cooper, M. L., Piwnica-Worms, D. & DiPersio, J. F. IFN γ signaling mediates alloreactive T-cell trafficking and GVHD. *Blood* **120**, 4093-4103, doi:10.1182/blood-2012-01-403196 (2012).
- 29 He, S., Cao, Q., Qiu, Y., Mi, J., Zhang, J. Z., Jin, M., Ge, H., Emerson, S. G., Zhang, Y. & Zhang, Y. A new approach to the blocking of alloreactive T cell-mediated graft-versus-host disease by in vivo administration of anti-CXCR3 neutralizing antibody. *J Immunol* **181**, 7581-7592 (2008).
- 30 Piper, K. P., Horlock, C., Curnow, S. J., Arrazi, J., Nicholls, S., Mahendra, P., Craddock, C. & Moss, P. A. CXCL10-CXCR3 interactions play an important role in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease in the skin following allogeneic stem-cell transplantation. *Blood* **110**, 3827-3832, doi:10.1182/blood-2006-12-061408 (2007).
- 31 Harries, M. J., Meyer, K., Chaudhry, I., E Kloepper, J., Poblet, E., Griffiths, C. E. & Paus, R. Lichen planopilaris is characterized by immune privilege collapse of the hair follicle's epithelial stem cell niche. *J Pathol* **231**, 236-247, doi:10.1002/path.4233 (2013).
- 32 Bjorn, M. E., Holmstrom, M. O. & Hasselbalch, H. C. Ruxolitinib is manageable in patients with myelofibrosis and severe thrombocytopenia: a report on 12 Danish patients. *Leuk Lymphoma* **57**, 125-128, doi:10.3109/10428194.2015.1046867 (2016).
- 33 Mesa, R. A. & Cortes, J. Optimizing management of ruxolitinib in patients with myelofibrosis: the need for individualized dosing. *J Hematol Oncol* **6**, 79, doi:10.1186/1756-8722-6-79 (2013).
- 34 Wysham, N. G., Sullivan, D. R. & Allada, G. An opportunistic infection associated with ruxolitinib, a novel janus kinase 1,2 inhibitor. *Chest* **143**, 1478-1479, doi:10.1378/chest.12-1604 (2013).

- 35 Goldberg, R. A., Reichel, E. & Oshry, L. J. Bilateral toxoplasmosis retinitis associated with ruxolitinib. *N Engl J Med* **369**, 681-683, doi:10.1056/NEJMc1302895 (2013).
- 36 Lindemans, C. A., Calafiore, M., Mertelsmann, A. M., O'Connor, M. H., Dudakov, J. A., Jenq, R. R., Velardi, E., Young, L. F., Smith, O. M., Lawrence, G., Ivanov, J. A., Fu, Y. Y., Takashima, S., Hua, G., Martin, M. L., O'Rourke, K. P., Lo, Y. H., Mokry, M., Romera-Hernandez, M., Cupedo, T., Dow, L. E., Nieuwenhuis, E. E., Shroyer, N. F., Liu, C., Kolesnick, R., van den Brink, M. R. & Hanash, A. M. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature* **528**, 560-564, doi:10.1038/nature16460 (2015).
- 37 Schepeler, T., Page, M. E. & Jensen, K. B. Heterogeneity and plasticity of epidermal stem cells. *Development* **141**, 2559-2567, doi:10.1242/dev.104588 (2014).
- 38 Ito, M., Liu, Y., Yang, Z., Nguyen, J., Liang, F., Morris, R. J. & Cotsarelis, G. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* **11**, 1351-1354, doi:10.1038/nm1328 (2005).
- 39 Levy, V., Lindon, C., Zheng, Y., Harfe, B. D. & Morgan, B. A. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J* **21**, 1358-1366, doi:10.1096/fj.06-6926com (2007).
- 40 Sale, G. E., Shulman, H. M., Gallucci, B. B. & Thomas, E. D. Young rete ridge keratinocytes are preferred targets in cutaneous graft-versus-host disease. *Am J Pathol* **118**, 278-287 (1985).
- 41 Sale, G. E., Beauchamp, M. D. & Akiyama, M. Parafollicular bulges, but not hair bulb keratinocytes, are attacked in graft-versus-host disease of human skin. *Bone Marrow Transplant* **14**, 411-413 (1994).
- 42 Murphy, G. F. & Korngold, R. Significance of selectively targeted apoptotic rete cells in graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* **10**, 357-365, doi:10.1016/j.bbmt.2004.02.005 (2004).
- 43 Gilliam, A. C., Whitaker-Menezes, D., Korngold, R. & Murphy, G. F. Apoptosis is the predominant form of epithelial target cell injury in acute experimental graft-versus-host disease. *J Invest Dermatol* **107**, 377-383 (1996).
- 44 Alonso, L. & Fuchs, E. The hair cycle. *J Cell Sci* **119**, 391-393,

- doi:10.1242/jcs02793 (2006).
- 45 Morris, R. J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J. S., Sawicki, J. A. & Cotsarelis, G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* **22**, 411-417, doi:10.1038/nbt950 (2004).
 - 46 Jagasia, M. H., Greinix, H. T., Arora, M., Williams, K. M., Wolff, D., Cowen, E. W., Palmer, J., Weisdorf, D., Treister, N. S., Cheng, G. S., Kerr, H., Stratton, P., Duarte, R. F., McDonald, G. B., Inamoto, Y., Vigorito, A., Arai, S., Datile, M. B., Jacobsohn, D., Heller, T., Kitko, C. L., Mitchell, S. A., Martin, P. J., Shulman, H., Wu, R. S., Cutler, C. S., Vogelsang, G. B., Lee, S. J., Pavletic, S. Z. & Flowers, M. E. 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, doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.001 (2015).
 - 47 Basilio, F. M., Brenner, F. M., Werner, B. & Rastelli, G. J. Clinical and histological study of permanent alopecia after bone marrow transplantation. *An Bras Dermatol* **90**, 814-821, doi:10.1590/abd1806-4841.20154013 (2015).
 - 48 Mascré, G., Dekoninck, S., Drogat, B., Youssef, K. K., Broheé, S., Sotiropoulou, P. A., Simons, B. D. & Blanpain, C. Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature* **489**, 257-262, doi:10.1038/nature11393 (2012).
 - 49 Langton, A. K., Herrick, S. E. & Headon, D. J. An extended epidermal response heals cutaneous wounds in the absence of a hair follicle stem cell contribution. *J Invest Dermatol* **128**, 1311-1318, doi:10.1038/sj.jid.5701178 (2008).
 - 50 Sotiropoulou, P. A., Candi, A., Mascré, G., De Clercq, S., Youssef, K. K., Lapouge, G., Dahl, E., Semeraro, C., Denecker, G., Marine, J. C. & Blanpain, C. Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death. *Nat Cell Biol* **12**, 572-582, doi:10.1038/ncb2059 (2010).
 - 51 Zhan, Q., Korngold, R., Lezcano, C., McKeon, F. & Murphy, G. F. Graft-versus-host disease-related cytokine-driven apoptosis depends on p73 in cytokeratin 15-positive target cells. *Biol Blood Marrow Transplant* **18**, 841-851, doi:10.1016/j.bbmt.2012.02.004 (2012).
 - 52 Matsumura, H., Mohri, Y., Binh, N. T., Morinaga, H., Fukuda, M., Ito, M.,

- Kurata, S., Hoeijmakers, J. & Nishimura, E. K. Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. *Science* **351**, aad4395, doi:10.1126/science.aad4395 (2016).
- 53 Wu, S. R. & Reddy, P. Tissue tolerance: a distinct concept to control acute GVHD severity. *Blood* **129**, 1747-1752, doi:10.1182/blood-2016-09-740431 (2017).
- 54 Meyer, K. C., Klatte, J. E., Dinh, H. V., Harries, M. J., Reithmayer, K., Meyer, W., Sinclair, R. & Paus, R. Evidence that the bulge region is a site of relative immune privilege in human hair follicles. *Br J Dermatol* **159**, 1077-1085, doi:10.1111/j.1365-2133.2008.08818.x (2008).
- 55 Paus, R., Nickoloff, B. J. & Ito, T. A 'hairy' privilege. *Trends Immunol* **26**, 32-40, doi:10.1016/j.it.2004.09.014 (2005).
- 56 Xing, L., Dai, Z., Jabbari, A., Cerise, J. E., Higgins, C. A., Gong, W., de Jong, A., Harel, S., DeStefano, G. M., Rothman, L., Singh, P., Petukhova, L., Mackay-Wiggan, J., Christiano, A. M. & Clynes, R. Alopecia areata is driven by cytotoxic T lymphocytes and is reversed by JAK inhibition. *Nat Med* **20**, 1043-1049, doi:10.1038/nm.3645 (2014).
- 57 Dignan, F. L., Clark, A., Amrolia, P., Cornish, J., Jackson, G., Mahendra, P., Scarisbrick, J. J., Taylor, P. C., Hadzic, N., Shaw, B. E., Potter, M. N., Haematology, H.-o. T. F. o. B. C. f. S. i. & Transplantation, B. S. f. B. a. M. Diagnosis and management of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* **158**, 30-45, doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09129.x (2012).
- 58 Ramesh, R., Kozhaya, L., McKevitt, K., Djuretic, I. M., Carlson, T. J., Quintero, M. A., McCauley, J. L., Abreu, M. T., Unutmaz, D. & Sundrud, M. S. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med* **211**, 89-104, doi:10.1084/jem.20130301 (2014).
- 59 Abraham, A. & Roga, G. Topical steroid-damaged skin. *Indian J Dermatol* **59**, 456-459, doi:10.4103/0019-5154.139872 (2014).
- 60 Chebotaev, D. V., Yemelyanov, A. Y., Lavker, R. M. & Budunova, I. V. Epithelial cells in the hair follicle bulge do not contribute to epidermal regeneration after glucocorticoid-induced cutaneous atrophy. *J Invest Dermatol* **127**, 2749-2758, doi:10.1038/sj.jid.5700992 (2007).
- 61 Fardet, L., Flahault, A., Kettaneh, A., Tiev, K. P., Genereau, T., Toledano, C., Lebbe, C. & Cabane, J. Corticosteroid-induced clinical adverse events:

- frequency, risk factors and patient's opinion. *Br J Dermatol* **157**, 142-148, doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07950.x (2007).
- 62 Schoepe, S., Schacke, H., May, E. & Asadullah, K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Exp Dermatol* **15**, 406-420, doi:10.1111/j.0906-6705.2006.00435.x (2006).
- 63 Choi, J., Cooper, M. L., Alahmari, B., Ritchey, J., Collins, L., Holt, M. & DiPersio, J. F. Pharmacologic blockade of JAK1/JAK2 reduces GvHD and preserves the graft-versus-leukemia effect. *PLoS One* **9**, e109799, doi:10.1371/journal.pone.0109799 (2014).
- 64 O'Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. V., Gadina, M., McInnes, I. B. & Laurence, A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu Rev Med* **66**, 311-328, doi:10.1146/annurev-med-051113-024537 (2015).
- 65 Zeiser, R. *et al.* Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey. *Leukemia* **29**, 2062-2068, doi:10.1038/leu.2015.212 (2015).
- 66 Mori, Y., Ikeda, K., Inomata, T., Yoshimoto, G., Fujii, N., Ago, H. & Teshima, T. Ruxolitinib treatment for GvHD in patients with myelofibrosis. *Bone Marrow Transplant* **51**, 1584-1587, doi:10.1038/bmt.2016.256 (2016).
- 67 Tefferi, A. & Pardanani, A. Serious adverse events during ruxolitinib treatment discontinuation in patients with myelofibrosis. *Mayo Clin Proc* **86**, 1188-1191, doi:10.4065/mcp.2011.0518 (2011).
- 68 Beauverd, Y. & Samii, K. Acute respiratory distress syndrome in a patient with primary myelofibrosis after ruxolitinib treatment discontinuation. *Int J Hematol* **100**, 498-501, doi:10.1007/s12185-014-1628-5 (2014).
- 69 Spoerl, S., Mathew, N. R., Bscheider, M., Schmitt-Graeff, A., Chen, S., Mueller, T., Verbeek, M., Fischer, J., Otten, V., Schmickl, M., Maas-Bauer, K., Finke, J., Peschel, C., Duyster, J., Poeck, H., Zeiser, R. & von Bubnoff, N. Activity of therapeutic JAK 1/2 blockade in graft-versus-host disease. *Blood* **123**, 3832-3842, doi:10.1182/blood-2013-12-543736 (2014).
- 70 Carniti, C., Gimondi, S., Vendramin, A., Recordati, C., Confalonieri, D., Bermema, A., Corradini, P. & Mariotti, J. Pharmacologic Inhibition of JAK1/JAK2 Signaling Reduces Experimental Murine Acute GVHD While Preserving GVT Effects. *Clin Cancer Res* **21**, 3740-3749, doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2758 (2015).

- 71 Mackay-Wiggan, J., Jabbari, A., Nguyen, N., Cerise, J. E., Clark, C., Ulerio, G., Furniss, M., Vaughan, R., Christiano, A. M. & Clynes, R. Oral ruxolitinib induces hair regrowth in patients with moderate-to-severe alopecia areata. *JCI Insight* **1**, e89790, doi:10.1172/jci.insight.89790 (2016).
- 72 Hsu, L. & Armstrong, A. W. JAK inhibitors: treatment efficacy and safety profile in patients with psoriasis. *J Immunol Res* **2014**, 283617, doi:10.1155/2014/283617 (2014).
- 73 Harel, S., Higgins, C. A., Cerise, J. E., Dai, Z., Chen, J. C., Clynes, R. & Christiano, A. M. Pharmacologic inhibition of JAK-STAT signaling promotes hair growth. *Sci Adv* **1**, e1500973, doi:10.1126/sciadv.1500973 (2015).
- 74 Huang, C. F., Chang, Y. J., Hsueh, Y. Y., Huang, C. W., Wang, D. H., Huang, T. C., Wu, Y. T., Su, F. C., Hughes, M., Chuong, C. M. & Wu, C. C. Assembling Composite Dermal Papilla Spheres with Adipose-derived Stem Cells to Enhance Hair Follicle Induction. *Sci Rep* **6**, 26436, doi:10.1038/srep26436 (2016).
- 75 Festa, E., Fretz, J., Berry, R., Schmidt, B., Rodeheffer, M., Horowitz, M. & Horsley, V. Adipocyte lineage cells contribute to the skin stem cell niche to drive hair cycling. *Cell* **146**, 761-771, doi:10.1016/j.cell.2011.07.019 (2011).
- 76 Papp, K. A., Bissonnette, R., Gooderham, M., Feldman, S. R., Iversen, L., Soung, J., Draelos, Z., Mamolo, C., Purohit, V., Wang, C. & Ports, W. C. Treatment of plaque psoriasis with an ointment formulation of the Janus kinase inhibitor, tofacitinib: a Phase 2b randomized clinical trial. *BMC Dermatol* **16**, 15, doi:10.1186/s12895-016-0051-4 (2016).
- 77 Bissonnette, R., Papp, K. A., Poulin, Y., Gooderham, M., Raman, M., Mallbris, L., Wang, C., Purohit, V., Mamolo, C., Papacharalambous, J. & Ports, W. C. Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase IIa randomized trial. *Br J Dermatol* **175**, 902-911, doi:10.1111/bjd.14871 (2016).
- 78 Li, N., Liu, S., Zhang, H. S., Deng, Z. L., Zhao, H. S., Zhao, Q., Lei, X. H., Ning, L. N., Cao, Y. J., Wang, H. B., Liu, S. & Duan, E. K. Exogenous R-Spondin1 Induces Precocious Telogen-to-Anagen Transition in Mouse Hair Follicles. *Int J Mol Sci* **17**, doi:10.3390/ijms17040582 (2016).