



Title	HSP47 siRNA含有ビタミンA結合リポソームの点眼療法は慢性移植片対宿主病のドライアイ症状を改善する [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	大東, 寛幸
Description	配架番号 : 2447
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13433号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74335
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroyuki_Ohigashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 大 東 寛 幸

学 位 論 文 題 名

HSP47 siRNA 含有ビタミン A 結合リポソームの点眼療法は慢性移植片対宿主病のドライ
アイ症状を改善する

(Ocular instillation of vitamin A-coupled liposomes containing HSP47 siRNA
ameliorates dry eye syndrome in chronic graft-versus-host disease)

【背景と目的】慢性移植片対宿主病(graft-versus-host disease; GVHD)は同種造血幹細胞移植後の生活の質を低下させる重要な合併症である。眼は慢性 GVHD で高頻度に影響を受ける標的臓器であり、慢性 GVHD 患者の多くはドライアイを発症する。さらに一部の患者では眼球表面からの涙液蒸発を防ぐ役割を持つ脂質 (マイバム) 分泌に異常をきたすマイボーム腺機能不全となることが知られている。臓器線維化は慢性 GVHD の特徴的な病態であるが、慢性 GVHD 治療の多くは免疫抑制を主体とした治療であり、治療に関連して抗腫瘍効果の減弱や感染症の発症などがしばしば問題となる。我々は以前の研究で線維化において重要な役割を担う heat shock protein 47 (HSP47)に着目し、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)による、皮膚および唾液腺の抗線維化治療法を確立した。VA-lip は、ビタミン A 受容体を介して標的細胞内に取り込まれる新規薬物送達システムであり、HSP47 に対する siRNA をビタミン A 受容体を持つ筋線維芽細胞に特異的に送達することが可能であった。本研究では VA-lip HSP47 を眼慢性 GVHD の治療に応用し、さらに局所療法の開発を目指して行なった。

【材料と方法】BALB/c マウスに全身放射線を照射し、主要組織抗原一致、マイナー組織抗原不一致の B10.D2 マウス(allogeneic; Allo)または同系移植となる BALB/c マウス(syngeneic; Syn)から骨髄細胞 8×10^6 個と脾臓細胞 2×10^7 個を輸注し移植後 day +35 に涙腺の評価を行った。抗涙腺線維化効果をみる実験では vitamin A coupled liposome containing HSP47 siRNA(VA-lip HSP47)を投与した。対照群には 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; VA-lip scramble) を投与した。静注実験では移植後 day +2 から day +34 まで週 3 回投与し、day +35 に解析を行なった。また点眼実験では day +2 または day +22 から day +34 まで連日点眼し、day +35 に解析を行なった。解析方法は病理組織標本を作成し hematoxylin and eosin 染色、Masson trichrome 染色、蛍光免疫染色を行なった。一部の実験ではフェノールレッド糸を用いた涙液分泌量の測定や、涙腺のコラーゲンアッセイを行なった。

【結果】本モデルマウスでは Allo 群において涙腺の線維化と涙液量の低下が認められ、ヒトの眼慢性 GVHD の所見を反映していることが確認できた。さらに Allo 群の涙腺免疫染色で HSP47 陽性線維芽細胞が集積していた。一方で、移植後 day +35 の眼瞼を採取し行なったマイボーム腺の評価では病理学的に導管の拡張といったマイボーム腺機能不全における病理学的特徴を認めたが、マイボーム腺自体の萎縮は認められなかった。涙腺線維化に対

する VA-lip HSP47 の有効性を評価するために移植後 day +2 から day +34 まで VA-lip HSP47 を週 3 回静脈内投与したところ、涙腺の HSP47 陽性線維芽細胞の集積が抑制され、涙腺の線維化および涙液量の低下が予防された。次に VA-lip HSP47 点眼が涙腺まで到達するかを Dy647 で標識した VA-lip HSP47 を点眼することで確認したところ、Dy647 の蛍光が涙腺内に確認できたため、VA-lip HSP47 は点眼投与で涙腺に到達することが示された。そこで VA-lip HSP47 を移植後 day +2 から day +34 まで連日点眼投与したところ、涙腺の HSP47 陽性線維芽細胞の集積が抑制され、涙腺の線維化および涙液量の低下が予防された。本モデルマウスでは day +21 の時点ですでに涙腺線維化が生じていたため、VA-lip HSP47 点眼がすでに完成した涙腺線維化病変に有効であるかを評価するために day +22 から day +34 まで VA-lip HSP47 を点眼する実験を行なったところ、涙腺の HSP47 はノックダウンされ、涙腺の線維化および涙液量の低下が改善した。これらの効果は VA-lip scramble では認められなかった。

【考察】眼慢性 GVHD では動物実験モデルだけではなく、ヒトにおいても HSP47 陽性線維芽細胞が集積し、線維化が生じていることが知られていた。羊膜由来の Heavy Chain-Hyaluronan/Pentraxin 3 を眼慢性 GVHD マウスモデルに投与する実験では HSP47 陽性線維芽細胞が減少し、眼慢性 GVHD が改善することを報告しているが、HSP47 を直接の治療標的とした研究は本研究が初めてである。本研究では HSP47 のノックダウンのために siRNA を用いたが、siRNA は生体内で急速に分解されてしまうことが臨床応用への問題となっている。VA-lip 構造は siRNA を生体内での分解から保護するのみではなく、活性化した線維芽細胞や筋線維芽細胞へビタミン A を介して siRNA を輸送することを可能にしている。VA-lip HSP47 は肝臓や肺など他の線維化治療においても有効性が報告されており、肝硬変ではヒトを対象とした臨床研究が行われている。VA-lip HSP47 は線維化カスケードの下流に作用する薬剤であり、副作用が少ないことが期待されるが、ヒトにおける副作用の発現に注視する必要がある。さらにビタミン A 自体がドライアイの治療に使用されることがあるが、VA-lip scramble を対照群に使用しても涙腺線維化やドライアイの改善は認められなかったため、VA-lip HSP47 の抗涙腺線維化効果とドライアイ改善効果は HSP47 ノックダウンによるものと示唆された。

【結論】VA-lip HSP47 は慢性 GVHD マウスモデルにおいて全身投与および局所点眼投与で涙腺の HSP47 陽性線維芽細胞をノックダウンさせ、涙腺線維化とドライアイの改善効果を認めた。VA-lip HSP47 は臓器線維化を標的とした眼慢性 GVHD の新規治療法となり得る。