



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13433
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91696
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroyuki_Ohigashi.pdf



学 位 論 文

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)

2019年3月

北海道大学

大東寛幸

Hiroyuki Ohigashi

学 位 論 文

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)

2019年3月

北海道大学

大東寛幸

Hiroyuki Ohigashi

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
実験方法	10 頁
実験結果	15 頁
考察	29 頁
総括および結論	34 頁
謝辞	36 頁
利益相反	36 頁
引用文献	37 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。

Hiroyuki Ohigashi, Daigo Hashimoto, Eiko Hayase, Shuichiro Takahashi, Takahide Ara, Tomohiro Yamakawa, Junichi Sugita, Masahiro Onozawa, Masao Nakagawa, and Takanori Teshima.

Ocular instillation of vitamin A-coupled liposomes containing HSP47 siRNA ameliorates dry eye syndrome in chronic GVHD.

雑誌名 Blood Advances, submitted

本研究の一部は以下の学会に発表する。

Hiroyuki Ohigashi, Daigo Hashimoto, Shuichiro Takahashi, Tomohiro Yamakawa, Eiko Hayase, and Takanori Teshima.

Ocular Instillation of Vitamin A-Coupled Liposomes Containing HSP47 siRNA Ameliorates Dry Eye Syndrome in Chronic Graft-Versus-Host Disease.

Transplantation & Cellular Therapy Meetings of ASBMT and CIBMTR, Feb 20th-24th, 2019, Houston, Texas, USA

要旨

【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 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確認した。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。

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
α -SMA	alpha-smooth muscle actin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
GVHD	graft-versus-host disease
GRFS	GVHD-free, relapse-free survival
Gy	gray
H&E	hematoxylin and eosin
HSP47	heat shock protein 47
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	messenger RNA
MT	Masson trichrome
NIH	National Institute of Health
PBS	phosphate buffered saline
siRNA	small interfering RNA
Syn	syngeneic
TGF- β	transforming growth factor- β
VA-lip HSP47	vitamin A coupled liposome containing HSP47 siRNA
VA-lip Scr	vitamin A coupled liposome containing scramble siRNA
VA-lip Dy647	Dy647 labeled vitamin A coupled liposome containing HSP47

緒言

近年、様々な分子標的薬や免疫療法の発展が著しいが、同種造血幹細胞移植は種々の造血器悪性腫瘍及び非悪性疾患の根治療法として重要である。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)は最も重大な合併症の一つである。GVHDは移植片由来のドナーT細胞がリンパ節やパウエル板などの二次リンパ組織でレシピエント由来の抗原提示細胞からアロ抗原を提示されることで活性化され、レシピエントの臓器障害を引き起こす疾患である(Ferrara et al., 2009; Shlomchik et al., 1999; Teshima et al., 2002)。近年の急性GVHDに対する予防および治療法の進歩によって移植後長期に生存できる患者が増えているが(Wingard et al., 2011)、一方で相対的に慢性GVHDの発生率は増えている(Arai et al., 2015)。以前、急性GVHDと慢性GVHDは移植後100日を境界線として発症時期の違いによって分類されてきたが、急性GVHDが移植後100日を超えて発症することもあれば慢性GVHDに特徴的な所見が移植後100日前に発症することがあるため、2005年のNational Institute of Health (NIH)基準から両者は臨床徴候によって区分され、2014年にその一部が改定された(Filipovich et al., 2005; Jagasia et al., 2015)。急性GVHDは移植後100日以内に発症する場合を古典的急性GVHDと100日以降に発症する非古典的急性GVHDに分類され、さらに非古典的急性GVHDは移植後100日以内に発症した急性GVHDが100日以降も持続する持続型、移植後100日以内に発症した急性GVHDが一旦軽快したのちに再燃する再燃型、移植後100日以降に新たに発症する遅発型の3つの亜型に分類された。一方で慢性GVHDは2つの亜型に分類され、急性GVHDに特徴的な所見を欠く場合を古典型とし、急性GVHDの所見が混在する場合を重複型と分類された。これは主に臨床的な特徴からの分類になるが、病態生理についても両者には違いがある。急性GVHDはPhase Iで移植前処置によって宿主に炎症が起こり、抗原提示細胞の活性化や腸管粘膜バリアの破綻によってエンドトキシンなどの細菌由来成分が血中に流入し、アロ免疫応答が増強される。Phase IIで移植片由来のT細胞が宿主の抗原提示細胞によって活性化され、type 1ヘルパーT細胞となりinterferon- γ などを産生し、マクロファージが活性化される。そしてPhase IIIで細胞障害性T細胞やtumor necrosis factor- α などの炎症性サイトカインによって腸や皮膚、肝臓などの組織が障害され急性GVHDが発症する(Teshima et al., 2002; Ferrara et al., 2003)。一方、慢性GVHDはPhase Iではdamage-associated molecular patternsやpathogen-associated molecular patternsが放出され、T細胞の活性化が起こり、炎症が生じる(Zhao et al., 2011)。つまり、移植前処置や感染症、急性GVHDの発症がPhase Iの引き金となる。Phase IIは免疫再構築の段階で生じる。胸腺の傷害が移植前処置やカルシニューリン阻害薬の毒性、

アロ反応性の T 細胞や免疫グロブリンの沈着などによって生じることで(Srinivasan et al., 2012; Wu et al., 2013)、胸腺での T 細胞の positive selection や negative selection に異常が生じてアロ抗原反応性の T 細胞や B 細胞が増殖し、免疫寛容の破綻が生じる。具体的には type 1、type 2、type 17 ヘルパー T 細胞の分化・増殖が生じ、自己およびアロ反応性 CD4 陽性 T 細胞が interferon- γ や interleukin-17 を産生し炎症を持続させる(Dertschnig et al., 2015; Sakoda et al., 2007)。そして Phase III では活性化したマクロファージが transforming growth factor- β (TGF- β) や platelet-derived growth factor α を産生することで線維芽細胞の活性化が生じる。活性化した線維芽細胞による異常な細胞外マトリックスの産生や免疫グロブリンの沈着のために組織線維化が発症すると考えられている(Yamakawa et al., 2018; Cooke et al., 2017; Zeiser and Blazar, 2017)。そしてこの一連の慢性炎症は type 17 ヘルパー T 細胞によって維持されると考えられている(MacDonald et al., 2017; Forcade et al., 2017)。このように慢性 GVHD の病態生理が徐々に明らかになっており、それぞれの分子、細胞を標的とした治療法の開発が進んでいる。

慢性 GVHD の発症率は一般的な GVHD 予防法であるカルシニューリン阻害薬と代謝拮抗薬を用いる方法で移植片の T 細胞除去を行わなかった場合に 30~70% に発症すると報告されている(Zeiser and Blazar, 2017)。さらに、末梢血幹細胞が移植ソースとして使用される用いられることが多くなっているが、末梢血幹細胞移植は慢性 GVHD 発症のリスクの一つであり慢性 GVHD の予防法および治療法の開発は重要性が増している(Cutler et al., 2001; Kanda et al., 2014)。慢性 GVHD は皮膚、肝臓、肺、口腔、眼及び造血システムに至る種々の臓器に障害を引き起こす疾患であり、移植後長期生存者の quality of life に多大な悪影響を与える(Arai et al., 2011; Fraser et al., 2006; Jagasia et al., 2015; Pidala et al., 2011)。一方で、慢性 GVHD は抗腫瘍性免疫にも関連しており、原疾患の再発を抑制していると考えられている(Baron et al., 2012; Boyiadzis et al., 2015)。慢性 GVHD 治療には主に副腎皮質ステロイドの全身投与が行われるが、高用量の副腎皮質ステロイドを長期間使用することで副腎皮質ステロイドの副作用に関連した非再発死亡率や抗腫瘍免疫の減弱に伴う再発率が増加し、予後が悪化することが知られている(Stewart et al., 2004; Flowers and Martin, 2015)。従って副腎皮質ステロイドの投与量を減らすことが移植後の長期生存に寄与すると考えられ、免疫抑制作用の少ない新規慢性 GVHD 治療法の開発は重要な課題である。

眼慢性 GVHD には NIH 基準で診断的徴候とされる「他の検査所見や臓器病変がなくとも慢性 GVHD と診断できる徴候」が存在していないが、他の臓器に慢性 GVHD の診断的徴候があれば、新たなドライアイの出現や乾燥性角結膜炎の出現により診断できる疾患である(Jagasia et al., 2015)。眼慢性 GVHD は同種移植後患者の 40~60% に

発症する重要な疾患であり、涙液を分泌する涙腺と涙液の蒸発を防ぐ油分(マイバム)を分泌するマイボーム腺が機能不全を起こすためにドライアイになる(Jack et al., 1983; Ogawa et al., 1999; Pathak et al., 2018)。GVHD によるドライアイは羞明や眼の異物感、霧視や疼痛を引き起こし、quality of life の低下に大きく関わる(Jagasia et al., 2015)。眼慢性 GVHD の病理組織学的な特徴として涙腺における導管周囲を中心とした線維化と炎症細胞浸潤やマイボーム腺の線維化及び萎縮が知られており、新規抗線維化療法の開発は眼慢性 GVHD 治療に寄与できる可能性がある(Engel et al., 2015; Ogawa et al., 2001; Wang et al., 2010)。

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重要な役割を担っている(Ito and Nagata, 2017)。HSP47 陽性線維芽細胞は活性化した線維芽細胞であり、多量のコラーゲンを産生し、肝硬変や全身性強皮症、慢性 GVHD など様々な疾患での線維化に関与している(Sato et al., 2008; Kuroda et al., 1998; Yamakawa et al., 2018)。慢性 GVHD においてマウスの皮膚や唾液腺、ヒトの涙腺で HSP47 の発現が亢進していることが報告されている(Yamakawa et al., 2018; Ogawa et al., 2007)。以前、我々は慢性 GVHD モデルマウスを用いて、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、皮膚および唾液腺線維化の新たな治療法を確立した。ビタミン A 結合リポソーム (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(Yamakawa et al., 2018)。本研究では、涙腺線維化を生じる眼慢性 GVHD モデルマウスを作成し、マウスモデルを用いて VA-lip HSP47 の全身投与および局所点眼投与が HSP47 発現を抑制し、涙腺線維化およびドライアイを改善させるか否かを検討した。

本研究の結果、眼慢性 GVHD では、涙腺の間質に HSP47 陽性線維芽細胞が集積し、涙腺導管周囲を中心とした線維化を発症することを確認した。さらにこのマウスモデルではヒトと同様に涙液分泌量の低下が認められドライアイが生じていることを確認した。VA-lip HSP47 を全身投与することで涙腺の線維化とドライアイが改善することを発見した。さらに、VA-lip HSP47 は点眼投与で涙腺組織に分布し、眼慢性 GVHD を発症したマウスに点眼投与すると HSP47 陽性線維芽細胞の集積を抑制し、有意に涙腺の線維化を改善することを発見した。さらに VA-lip HSP47 の点眼投与は涙液量の低下を緩和することが可能であった。こうした結果より、VA-lip HSP47 は眼慢性 GVHD に

よる涙腺の線維化とそれに伴うドライアイを改善する新たな局所療法となり得ることを発見した。

実験方法

1) マウス

移植実験などを行うため、7週齢、雌のBALB/cを日本クレア株式会社（東京、日本）より、7週齢、雌のB10.D2を日本エスエルシー（静岡、日本）より購入した。これらのマウスは本学の動物実験施設にて飼育し、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」に従って、動物実験(承認番号：17-0026)の承認を得て行った。

2) マウス同種造血幹細胞移植

ドナーとなるB10.D2もしくはBALB/cをイソフルラン吸入により安楽死させ、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、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分間溶血処理した後、顕微鏡にてトリパンプルー法により生細胞数を計測した。レシピエント1匹あたり、脾臓細胞 2×10^7 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、移植片として使用した。

移植細胞を輸注するレシピエントには8~12週齢のBALB/cマウスを使用した。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、4時間後に移植片を1匹あたり250 μl ずつ静脈内に注射した。ドナーをB10.D2とした移植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。

移植後のマウスは、特定病原体未感染環境下にて、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。

3) 涙腺および眼瞼の採取

移植後のマウスをイソフルランの吸入により安楽死させ、涙腺を採取した。マウスの涙腺には眼窩外涙腺と眼窩内涙腺があり、眼窩外涙腺が大きく発達し涙液分泌に

おける主要な役割を担っているため眼窩外涙腺を採取した。また、マイボーム腺の評価のために眼瞼を採取した。眼瞼は上下でマイボーム腺の数と太さが異なるため、全て統一して上眼瞼を採取して評価した。

4) 組織標本作成

組織固定に用いた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℃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、攪拌した。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、その後氷冷した。0.2 M PBS を作成し、4℃で氷冷したものを250 ml 加えて混ぜ合わせ、濾過した。

①パラフィン標本の作成：採取した涙腺を、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)にパラフィンブロック作成およびヘマトキシリン・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、未染色標本の作成を依頼した。

②凍結標本の作成：VA-lip Dy647の分布を観察するため凍結標本にて免疫染色を行なった。移植後 day +33 に採取した涙腺を4%パラフォルムアルデヒドで遮光した状態で一晩固定し、その後スクロース置換した。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、液体窒素にて凍結した。凍結標本ブロックは-80℃で保存し、薄切前には-20℃で一晩保存し、Microm HM550 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて7 μmの厚さで薄切して凍結切片を作成した。薄切した切片は暗所で60分間風乾した後、1×PBS(-)で洗浄し、O.C.T コンパウンドを洗い流した後に核染色を施行した。

5) 蛍光免疫染色

未染色パラフィン切片をキシレンとエタノールを用いて脱パラフィンした後にDako REAL 抗原賦活用クエン酸緩衝液またはヒスト VT ワン(ナカライテスク、京都、日本)に切片を浸し、105℃、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。賦活化後に1×PBS(-)で賦活化液を洗浄し、10%ヤギ血清を用いて30分間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HSP47抗体、 α -SMA抗体をそれぞれ800:1, 200:1に希釈して各標本に加え、4℃、一晩静置した。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原抗体反応させた。その後、核染色としてDAPIを1×PBS(-)で0.2 μg/mLに希釈して用いた。使用した抗体は表1に示す。

染色後の画像撮影はFluoview FV1000 confocal microscopy (Olympus, Tokyo, Japan)を使用した。

表 1; 免疫染色で使用した抗体

一次抗体

抗原	クローン	販売元	カタログ番号
HSP47	polyclonal	abcam	ab77609
HSP47	EPR4217	abcam	ab109117
α -SMA	1A4	abcam	ab125057

二次抗体

抗原	標識	販売元	カタログ番号
rabbit IgG	Alexa Fluor 488	Life Technologies	A-11034
rabbit IgG	Alexa Fluor 555	Life Technologies	A-21428
streptavidin	Alexa Fluor 555	Life Technologies	S-32355

6) マイボグラフィ

移植後のマイボーム腺機能不全の評価としてマイボペン（JFCセールスプラン、東京、日本）によるマイボグラフィを行なった。マイボーム腺は通常光では観察できないが赤外光で観察すると白色に描写されることを利用してマイボーム腺の構造を同定できる。移植後 day +35 のマウスを安楽死させた後に上眼瞼を採取し、暗室内で観察し撮影した。

7) VA-lip HSP47 投与

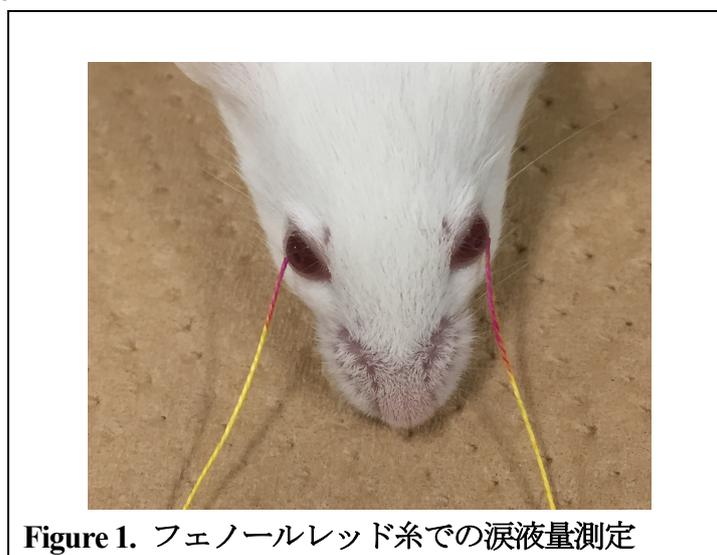
VA-lip HSP47 は、既報を元にして日東電工（大阪、日本）にて合成された。HSP47 siRNA と同一のヌクレオチド組成を持ちながら、特定の遺伝子の mRNA に結合しない核酸配列にした RNA (scramble siRNA) を含有する VA-lip (VA-lip scramble siRNA) を対照群に投与した。

全身投与の実験では VA-lip HSP47 および VA-lip scramble は移植後 day +2 から day +34 まで 4.5 mg/kg を週 3 回静脈内投与し day +35 にマウスを安楽死させ、涙腺を採取した。

点眼実験では VA-lip HSP47 および VA-lip scramble は予防投与では移植後 day +2 から day +34 まで、治療投与では day +21 から day +34 まで連日、0.4 mg/ml の VA-lip HSP47 および VA-lip scramble siRNA を 2 μ l ずつ両眼に点眼投与した。day +35 に安楽死させ、涙腺を採取した。VA-lip Dy647 は移植後 day +29 から day +33 まで片側の眼に点眼し、最終投与の 1 時間後にマウスを安楽死させて涙腺を採取した。

8) 涙液量の測定

移植後のマウスのドライアイを評価するために涙液量を測定した。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×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 μ l を腹腔内投与して鎮痛、鎮静させた。麻酔後のマウスの下眼瞼にフェノールレッド糸 (商品名：ゾーンクイック、メニコン、名古屋、日本) を15秒間接着させ、左右の黄色から赤色に変色した糸の長さを測定し平均を求めた (Figure 1)。

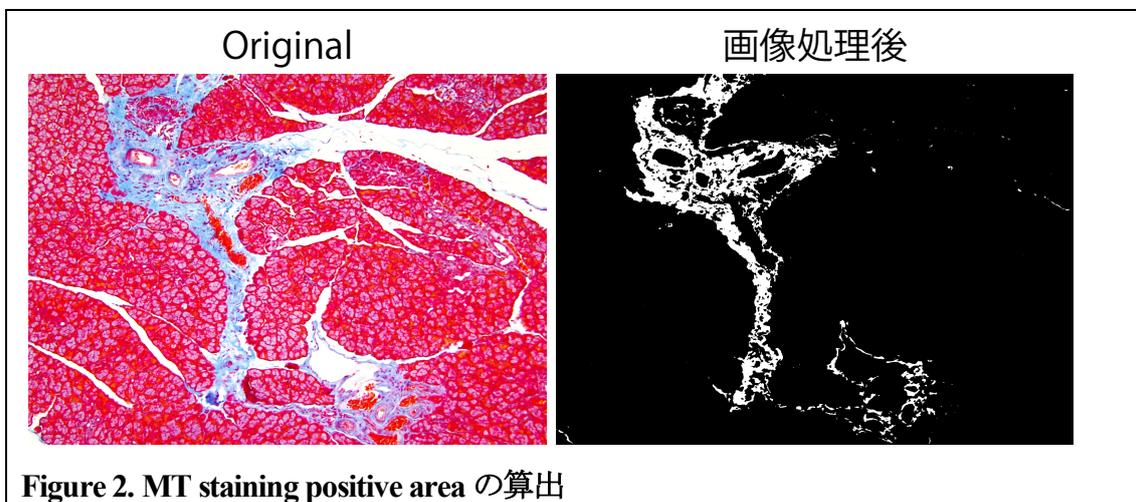


9) コラーゲンアッセイ

イソフルランで安楽死させたマウスの両側眼窩外涙腺を採取し、計量器のAE240 (メトラー・トレド、アメリカ) を用いて重量を測定したのちに1.5 ml エッペンチューブに入れた。0.1 mg/ml ペプシン添加 0.5 M 酢酸 2 ml を加えてバイオマッシャー II (ニッピ、東京、日本) を用いてホモジェナイズし、4°C・72 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、7000 rpm、10 分間遠心分離し、上清 100 μ l を1.5 ml チューブに移した。検量線描出用の bovine tail collagen を0、50、100、200、300、400 μ g/ml で100 μ l 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 rpm、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 μ l を加え、4°C、12,000 rpm、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 μ l を加え、攪拌して溶液が均一になるようにし、96 ウェルプレートに100 μ l 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濃度を算出した。

10) MT 染色での線維化部位の定量

移植後 day +35 の MT 染色標本を涙腺導管が含まれるように顕微鏡 (BX50, Olympus) で 20×/0.50 NA 対物レンズの倍率で鏡検し、画像をデジタルカメラ (DP20, Olympus) で撮影した。MT 染色陽性領域の算出には Image J software (NIH, Bethesda, MD, <http://imagej.nih.gov/ij/>) を用い、同じ条件下で撮影した MT 染色標本を Image J で開き、color split を用いて赤、青、緑色に分けた。青色画像から赤色画像を引き、作成した画像とオリジナル画像を比較して青色検出閾値を設定し、画像全体と目的部位の面積比率を算出した (Figure 2)。



11) 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. 眼慢性 GVHD モデルマウスの作成

本研究では慢性 GVHD 疾患モデルとして使用されることの多い 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、主要組織抗原一致、マイナー組織適合性抗原不一致である B10.D2 マウス(allogeneic 群、Allo 群) から採取した 8×10^6 個の骨髄細胞と 2×10^7 個の脾臓細胞を静注するモデルを用いた。対照群として GVHD が発症しない syngeneic (Syn) 群をおき、BALB/c マウスから得られた同量の骨髄細胞と脾臓細胞を静注した。まず初めにこのマウスモデルが眼慢性 GVHD を発症するか否かを検討した。

① 移植後の眼の肉眼所見と病理組織所見

移植後 day +35 に眼慢性 GVHD の評価を行った。Syn 群と比較して Allo 群では眼周囲を含めた脱毛、眼瞼の肥厚、眼裂の狭小化を認めた (Figure 3)。眼窩外涙腺を採取し、パラフィン切片を作成後に H&E 染色及び MT 染色を行ったところ、Allo 群において眼慢性 GVHD に典型的な組織所見である涙腺間質及び導管周囲を中心とした線維化を認めた(Figure 4A, B)。一方で syn 群ではこうした変化は認められなかった。

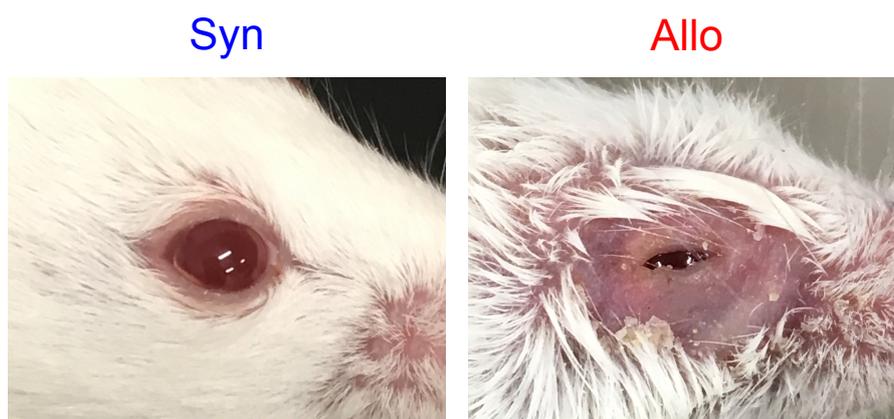


Figure 3. 移植後の眼の肉眼写真

レシピエントマウス(BALB/c)に 6 Gy の全身放射線照射を行い、その後 BALB/c (Syn 群) または B10.D2 (Allo 群) ドナーから採取した 8×10^6 個の骨髄細胞と 2

× 10⁷ 個の脾細胞を同日経静脈的に投与した。移植後 day +35 の眼の肉眼写真を示す。

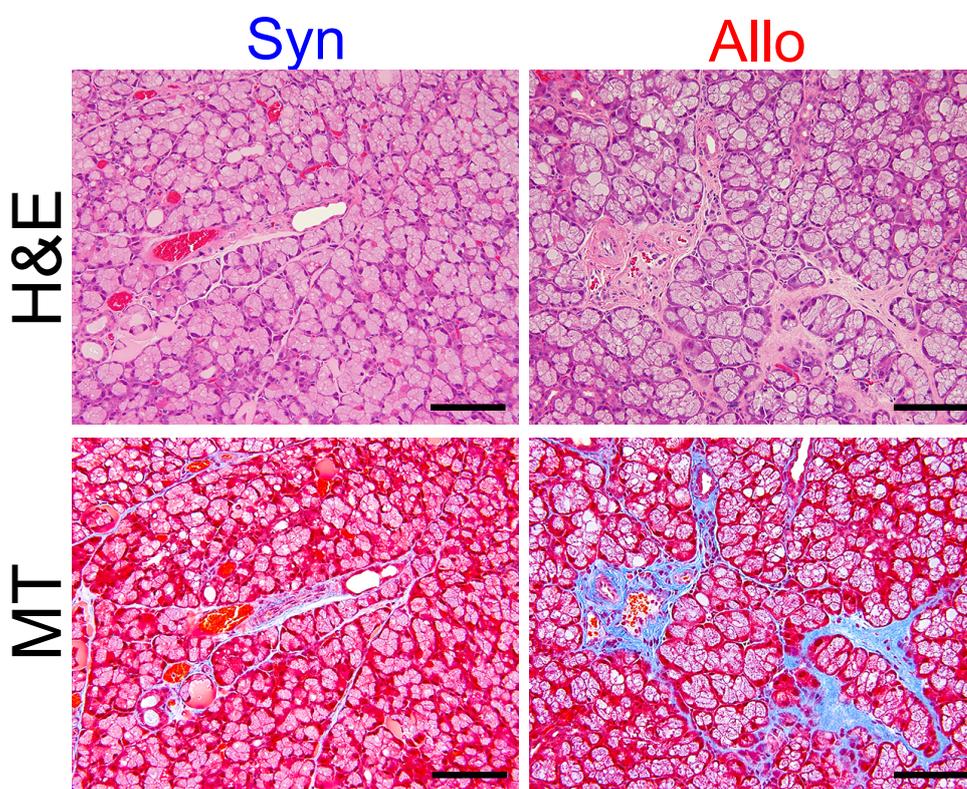


Figure 4. 移植後の眼の H&E 染色および MT 染色

骨髄移植は Figure 3 と同様に施行し、day +35 の涙腺を採取した。H&E 染色 (上) と MT 染色(下)を示す。倍率 20 倍、Scale bar; 100 μ m。

② 涙腺コラーゲン量と涙液量の測定

涙腺線維化およびドライアイの定量的な評価のために移植後 day +35 に涙腺のコラーゲンアッセイと涙液量の測定を行なった。Syn 群と Allo 群のコラーゲン量の比較は涙腺の重量あたりのコラーゲン量で比較することとした。涙腺重量あたりのコラーゲン量を比較すると Allo 群では Syn 群と比較して有意にコラーゲン量が増加していた (Figure 5A)。また、変色したフェノールレッド糸の長さは Allo 群で有意に短縮しており、Allo 群では Syn 群に比較して涙液量が減少していることが示された (Figure 5B)。以上より、このモデルマウスではドライアイと涙腺線維化が生じることが確認できた。

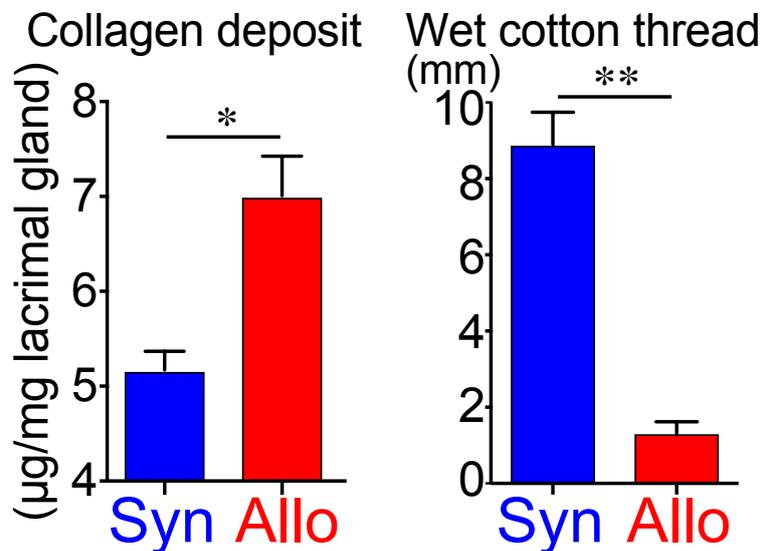


Figure 5. 移植後のコラーゲン沈着量と涙液量

移植は Figure 3 と同様に施行。(A)移植後 day +35 の涙腺を採取し、コラーゲンアッセイを行い、涙腺重量あたりのコラーゲン量を算出した (平均±標準誤差、N=7/group)。(B)移植後 day +35 にマウスを麻酔し、フェノールレッド糸で両眼の涙液量を測定し、各個体の平均値を求めた (平均±標準誤差、N=8-9/group)。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

③ マイボーム腺の病理組織とマイボグラフィ

マイボーム腺は眼瞼に位置し、脂質 (マイバム) を分泌することで眼球表面に油膜を張り、涙液の蒸発を抑制する働きを持つ。そのため、マイボーム腺の機能低下はドライアイを悪化させる。移植後のマイボーム腺機能不全の評価のために移植後 day +35 にマウスを安楽死させ、眼瞼の病理標本作成とマイボグラフィを行なった。眼瞼の H&E 病理標本では Allo 群において導管の拡張と導管内への角化物の脱落、腺内でのマイバムの充満を認めた。一方で Syn 群ではこれらの所見は認められなかった (Figure 6)。マイボグラフィではマイボーム腺は赤外光で観察し白色に描出される。Syn 群ではマイボーム腺の形態が白色に観察できたが、Allo 群では眼瞼全体が白色に描出されてしまいマイボーム腺を同定できなかった (Figure 7)。病理組織学的に移植後のマイボーム腺の構造の変化は認められたが、マイボグラフィによるマイボーム腺の萎縮の有無については評価が困難であった。原因として一つ目に今回使用したマイボペン は卓上タイプの製品であり、ヒトよりも小さいマウスのマイボーム腺の観察にはカメラの性能が及ばなかったものと考えた。二つ目に Allo 群ではマイボーム腺内

にマイバムが充満している所見が得られていたことから内圧の上昇が生じていた可能性はある。マイボーム腺の萎縮は内圧によるストレスが長期間加わった後に生じるため、マイボグラフィでの評価をするには評価日が早すぎた可能性がある。本研究では移植後 day +35 での涙腺線維化の評価を行っていたため、本研究ではマイボグラフィによるマイボーム腺の評価は行わないこととした。

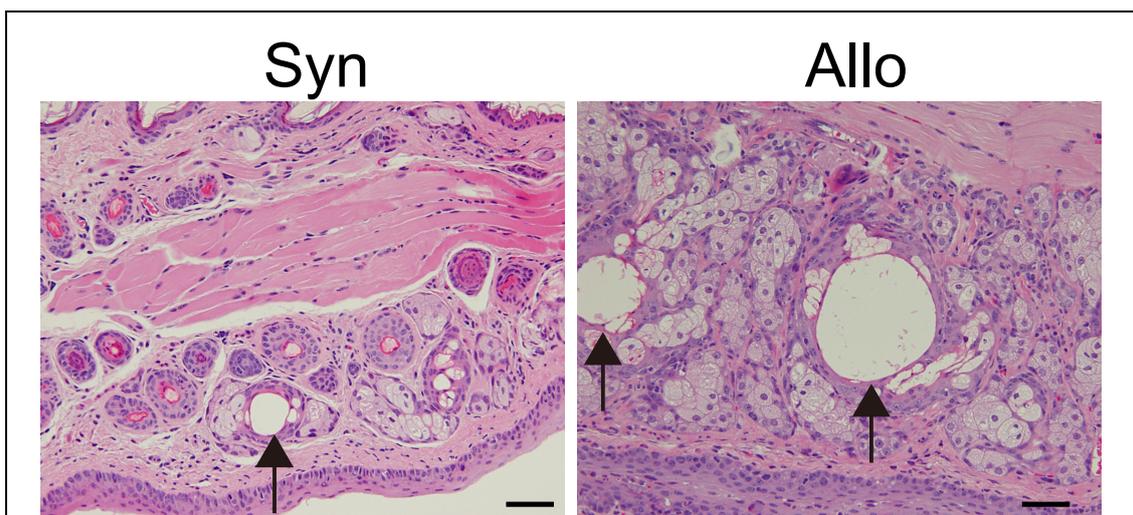


Figure 6. 移植後の上眼瞼の H&E 染色

骨髄移植は Figure 3 と同様に施行し、移植後 day +35 の眼瞼を採取した。H&E 染色を示す。マイボーム腺の導管を黒矢印で示す。倍率 20 倍。Scale bar; 50 μ m。

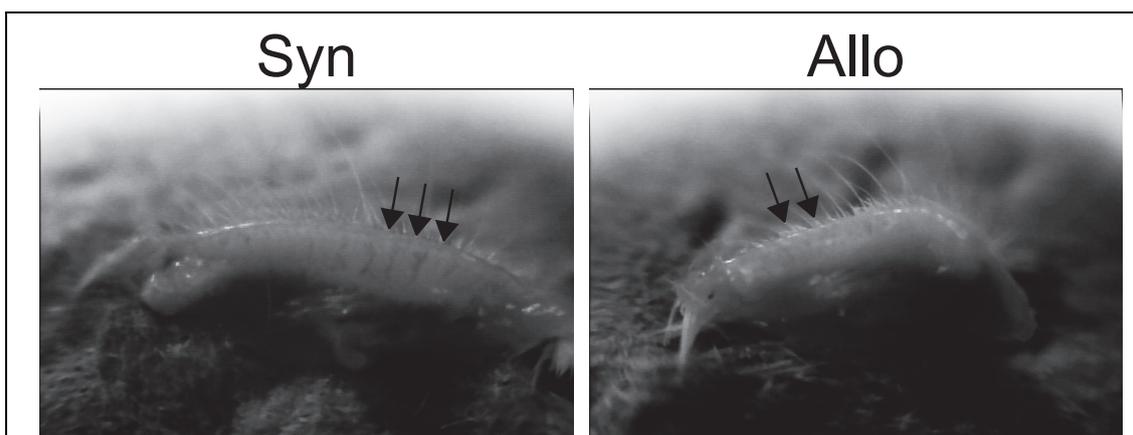


Figure 7. 移植後の上眼瞼のマイボグラフィ

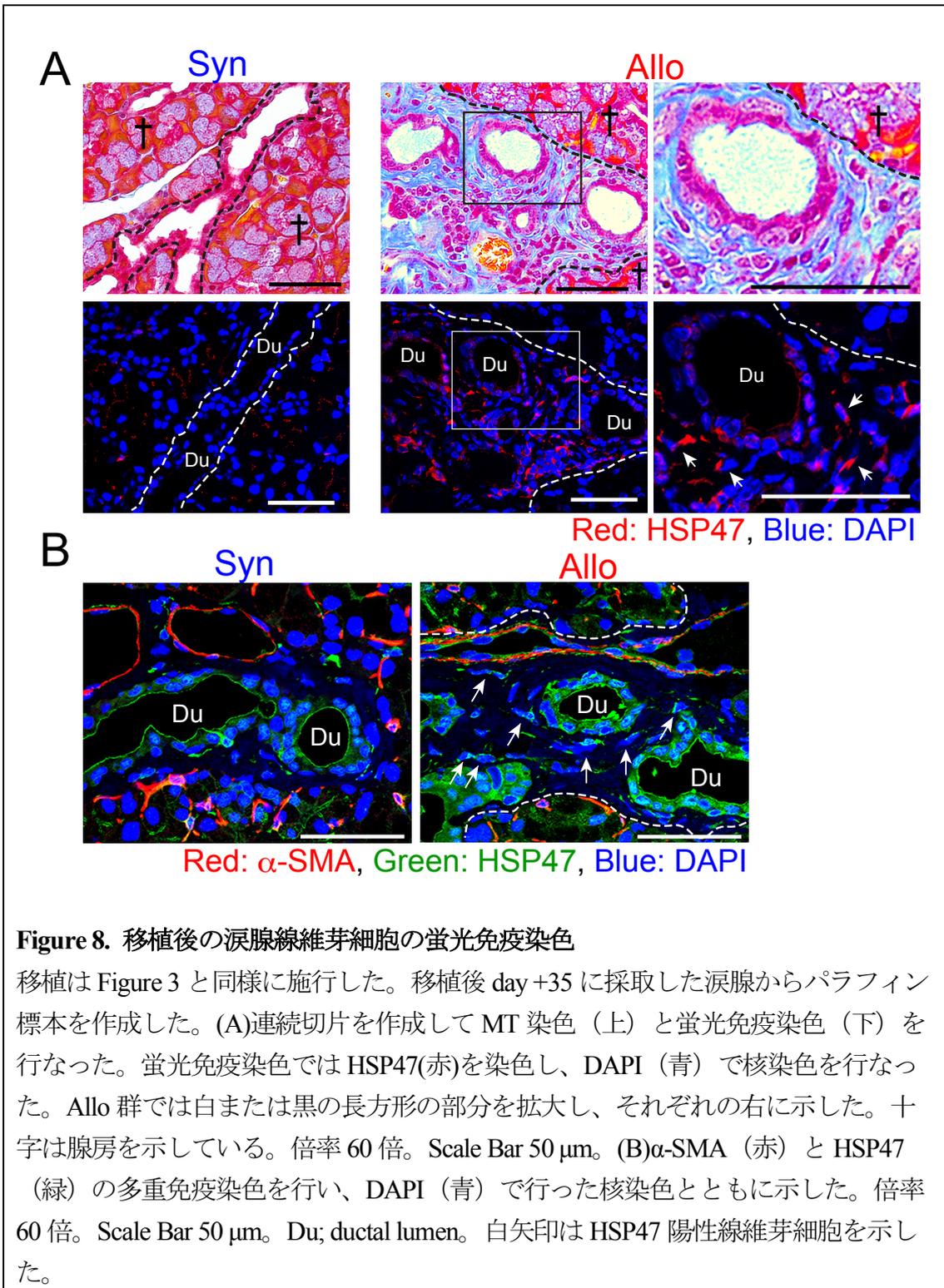
骨髄移植は Figure 3 と同様に施行し day +35 に眼瞼を採取し、暗室内でマイボグラフィによる観察および撮像を行なった。白色に描出されたマイボーム腺の一部を矢印で示した。

以上の結果から、マイボーム腺機能不全の評価はできなかったが、本マウスモデルはヒトの眼慢性 GVHD で涙腺の線維化とドライアイが生じる現象をよく反映していることが確認された。

2. 移植後の涙腺には HSP47 陽性の線維芽細胞が集積している

次に、眼慢性 GVHD モデルマウスにおいてコラーゲン特異的分子シャペロンであり、活性化した線維芽細胞のマーカーでもある HSP47 の発現が亢進しているかに関して蛍光免疫染色を用いて検討した。Allo 群において HSP47 陽性の線維芽細胞は導管周囲を中心として集積しているが、GVHD を発症しない Syn 群では導管周囲に HSP47 陽性細胞をほとんど認めなかった (Figure 8A)。さらに、肝臓や皮膚では α -SMA 陽性の筋線維芽細胞が組織線維化の中心的な役割を担うことが知られているが、涙腺において HSP47 陽性細胞が α -SMA を発現するか否かを確認するために多重蛍光免疫染色を行なった。Allo 群で HSP47 陽性線維芽細胞が導管周囲の間質に集積していたが、 α -SMA は同細胞には染色されなかった。Syn 群では HSP47 陽性線維芽細胞の集積を認めず、一方で、Syn, Allo の両群で血管や腺房周囲の筋上皮細胞には α -SMA が染色された (Figure 8B)。

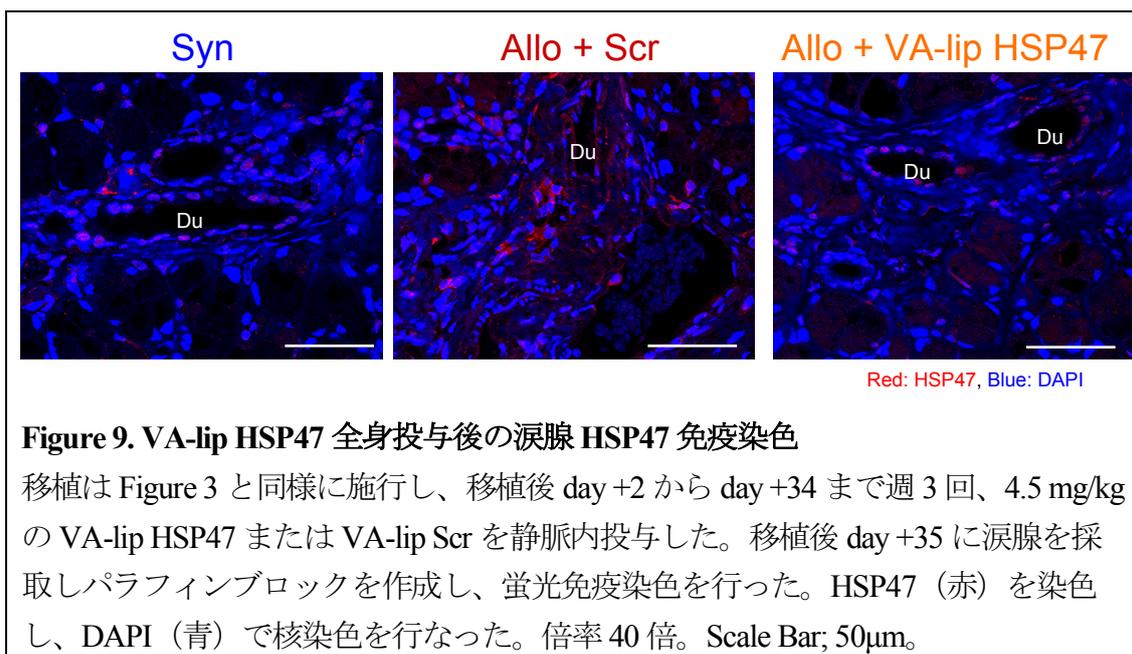
以上から、眼慢性 GVHD モデルマウスの涙腺には導管周囲を中心とした HSP47 陽性線維芽細胞の集積が認められることが確認できた。つまり、眼慢性 GVHD モデルマウスでは HSP47 陽性線維芽細胞の集積し、導管周囲を中心とした涙腺の線維化を発症することが確認できたので、HSP47 が眼慢性 GVHD の治療標的となり得ると考えた。



3. VA-lip HSP47 全身投与は慢性 GVHD の涙腺線維化を抑制する

次に本モデルマウスに移植後 day +2 から day +34 まで 4.5 mg/kg の VA-lip HSP47 を週 3 回全身投与することで涙腺の線維化に影響を与えるかどうかを検証した。対照群

には VA-lip 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) を投与し、day +35 にマウスを安楽死させて涙腺を採取した。HSP47 の蛍光免疫染色を施行したところ、VA-lip Scr を投与した群では HSP47 陽性の細胞が集積しているのに対して、VA-lip HSP47 を投与した群では HSP47 がノックダウンされていた(Figure 9)。



さらに、移植後 day +35 の MT 染色では VA-lip Scr 投与群に比べて VA-lip HSP47 投与群で線維化が改善しており(Figure 10)、涙液分泌量も保たれていた(Figure 11)。我々は、以前の研究で VA-lip HSP47 を静脈内投与することで皮膚の筋線維芽細胞へ特異的に薬剤が分布し、HSP47 をノックダウンさせることで慢性 GVHD による皮膚線維化を改善させることを報告している。今回の結果も同様の機序で慢性 GVHD による涙腺の線維化が改善したものと考えた。

以上の結果から、VA-lip HSP47 の全身投与は慢性 GVHD による涙腺の線維化およびドライアイを改善する可能性が示唆された。

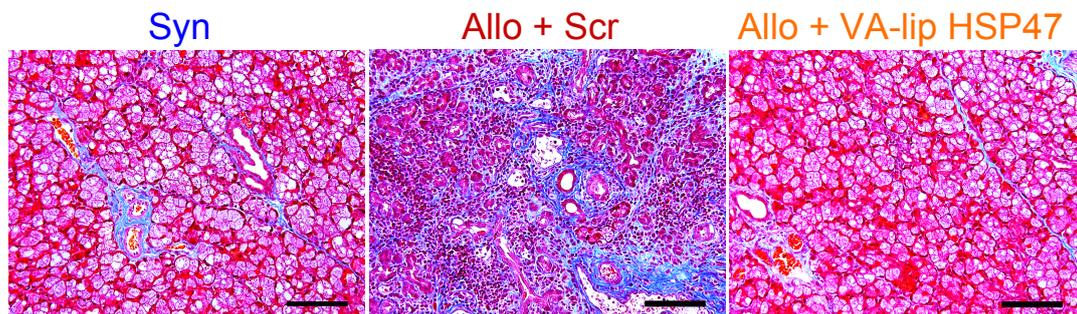


Figure 10. VA-lip HSP47 全身投与後の涙腺 MT 染色

移植および薬剤の投与は Figure 9 と同様に施行した。移植後 day +35 の涙腺 MT 染色を示した。倍率 20 倍。Scale Bar; 100 μ m。

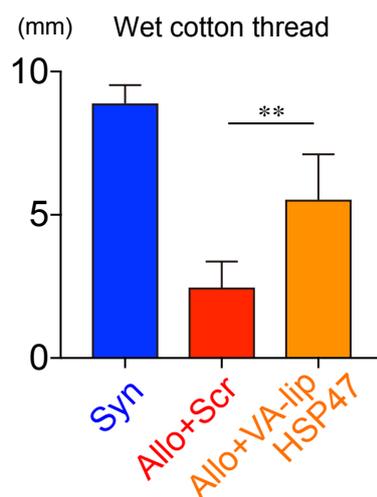


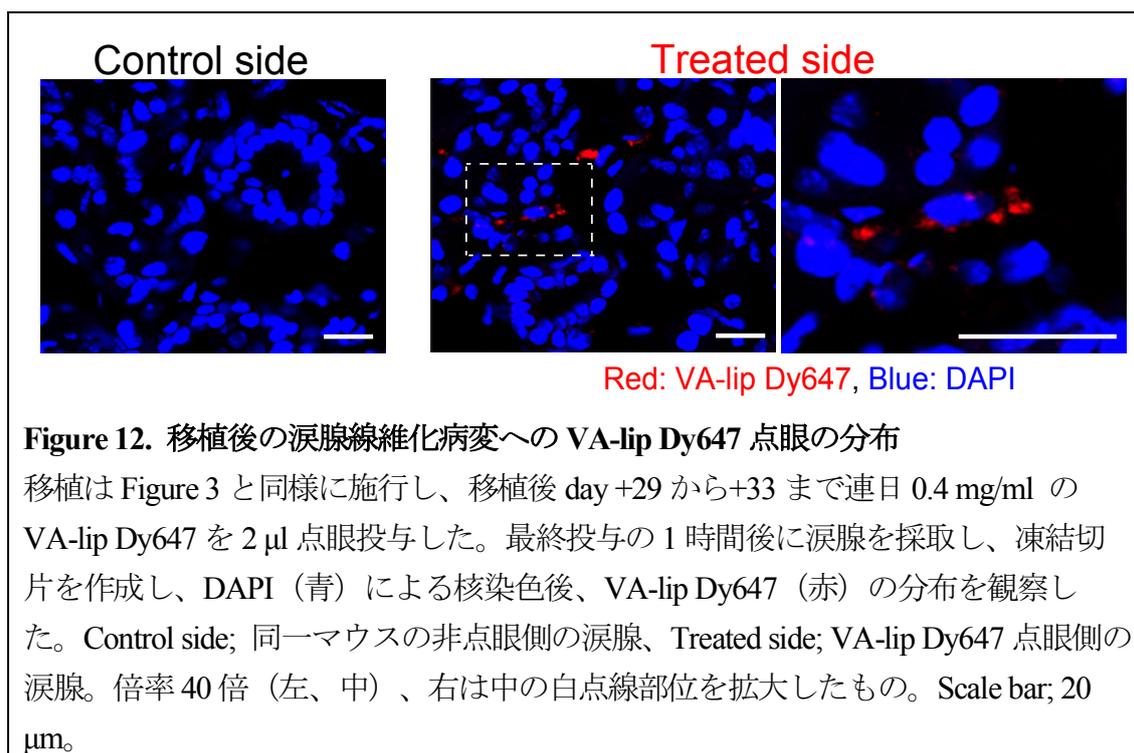
Figure 11. VA-lip HSP47 全身投与後の涙液分泌量

移植および薬剤の投与は Figure 9 と同様に施行した。移植後 day +35 にマウスを麻酔し、フェノールレッド糸で測定した涙液量を示した (平均 \pm 標準誤差、N=5/group) 。** P <0.01。

4. VA-lip HSP47 は点眼投与で涙腺組織に到達する

次に、我々は VA-lip HSP47 による局所療法の可能性について検討した。VA-lip HSP47 全身投与でも免疫系への影響が少ないことを以前の研究で報告しているが、さらに全身に対する安全性を高めつつ、頻度の高い眼慢性 GVHD 患者の治療へのコストダウンに寄与できると考えて局所療法の開発に取り組んだ。

まず、VA-lip HSP47 点眼によって移植後の涙腺線維化病変に VA-lip HSP47 が分布するか否かを検討するために、Dy647 で蛍光標識した VA-lip HSP47 (VA-lip Dy647) を移植後 day +29 から+33 まで片側の眼に点眼し涙腺を採取した。対照群として同一マウスの反対側の涙腺を採取した。蛍光顕微鏡で観察したところ、VA-lip Dy647 点眼側では涙腺組織に蛍光色素が分布していたが対照群では蛍光色素の分布がなく、VA-lip HSP47 点眼は涙腺組織まで到達することが確認された(Figure 12)。



5. VA-lip HSP47 点眼は涙腺線維化とドライアイの発症を抑制する

次に、Allo 群に対して移植後 day +2 から day +34 まで 0.4 mg/ml の VA-lip HSP47 または VA-lip Scr を両眼に 2 μ l ずつ点眼投与することで涙腺線維化およびドライアイに影響を与えるかを検討した。移植後 day +35 にマウスから涙腺を採取し、蛍光免疫染色を行なったところ、VA-lip HSP47 点眼群では HSP47 がノックダウンされていたが VA-lip Scr 点眼群では HSP47 がノックダウンされなかった(Figure 13A)。VA-lip HSP47 点眼による HSP47 陽性線維芽細胞の減少が線維化改善効果に寄与しているか否かを検討するために H&E 染色と MT 染色による検討を行なった。移植後 day +35 の MT 染色の画像から VA-lip Scr 点眼群では導管周囲を中心とした線維化が発症しているが、VA-lip HSP47 点眼の投与によって線維化が改善していることが確認された(Figure 13B)。

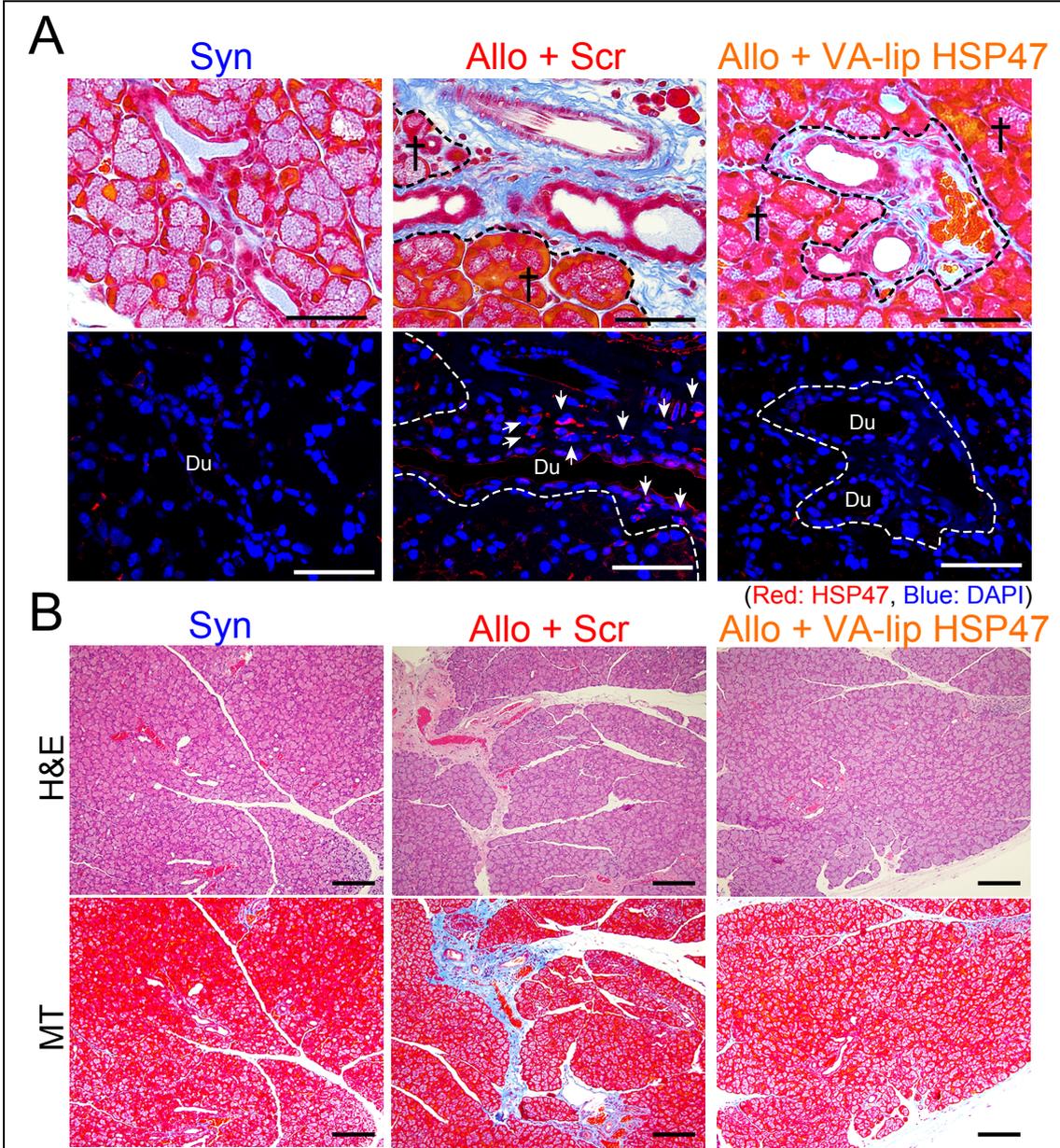
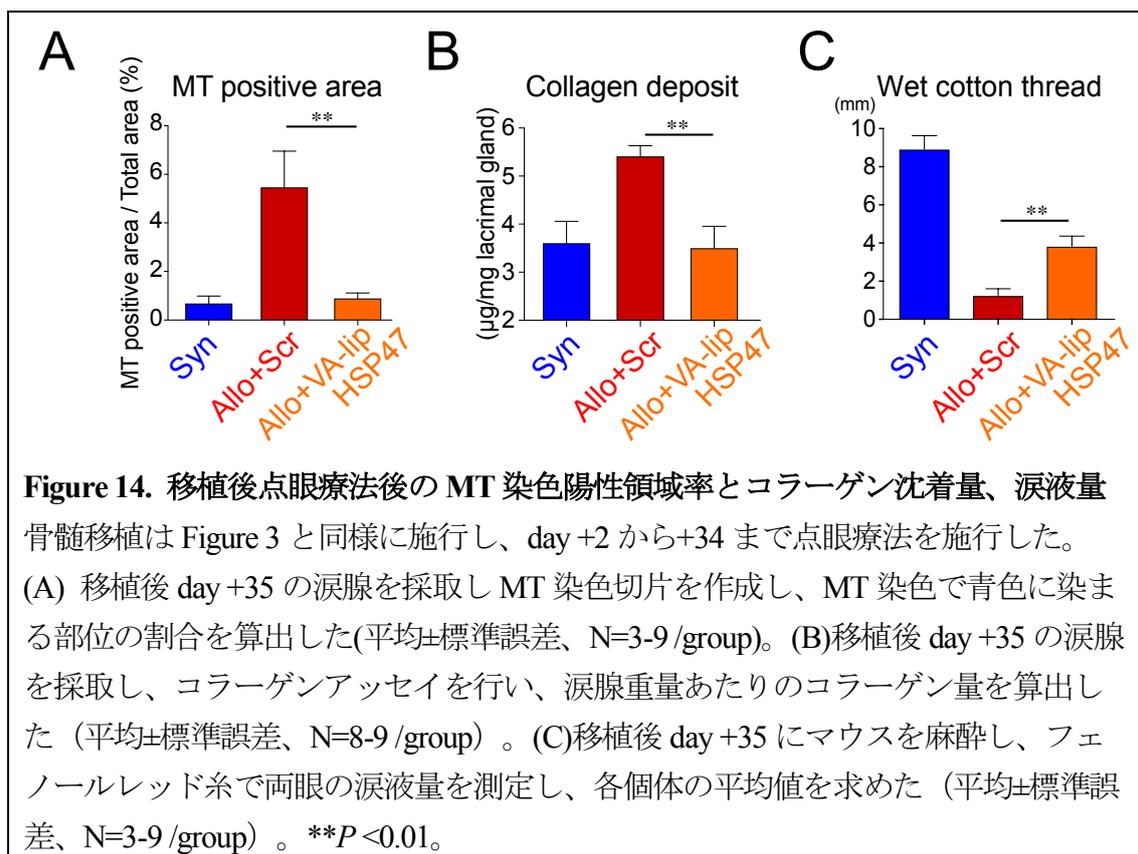


Figure 13. 眼慢性 GVHD に対する VA-lip HSP47 点眼予防投与の涙腺 HSP47 蛍光免疫染色と H&E 染色、MT 染色

骨髄移植は Figure 3 と同様に施行した。移植後のマウスに VA-lip HSP47 もしくは VA-lip scramble siRNA を day +2 から day +34 まで連日点眼投与し day +35 に涙腺を採取した。(A)MT 染色標本 (上) との連続切片で未染色標本を作成し、HSP47 (赤) の蛍光免疫染色を行い、DAPI (青) で行なった核染色とともに示している。MT 染色の黒い点線、免疫染色の白い点線は腺房と間質の境界を示し、十字は涙腺腺房領域を示している。白矢印は HSP47 陽性線維芽細胞を示した。導管 (Duct; Du)、倍率 60 倍、Scale bar; 50 μ m。(B) H&E 染色 (上) と MT 染色(下)を示す。倍率 20 倍、Scale bar; 100 μ m。

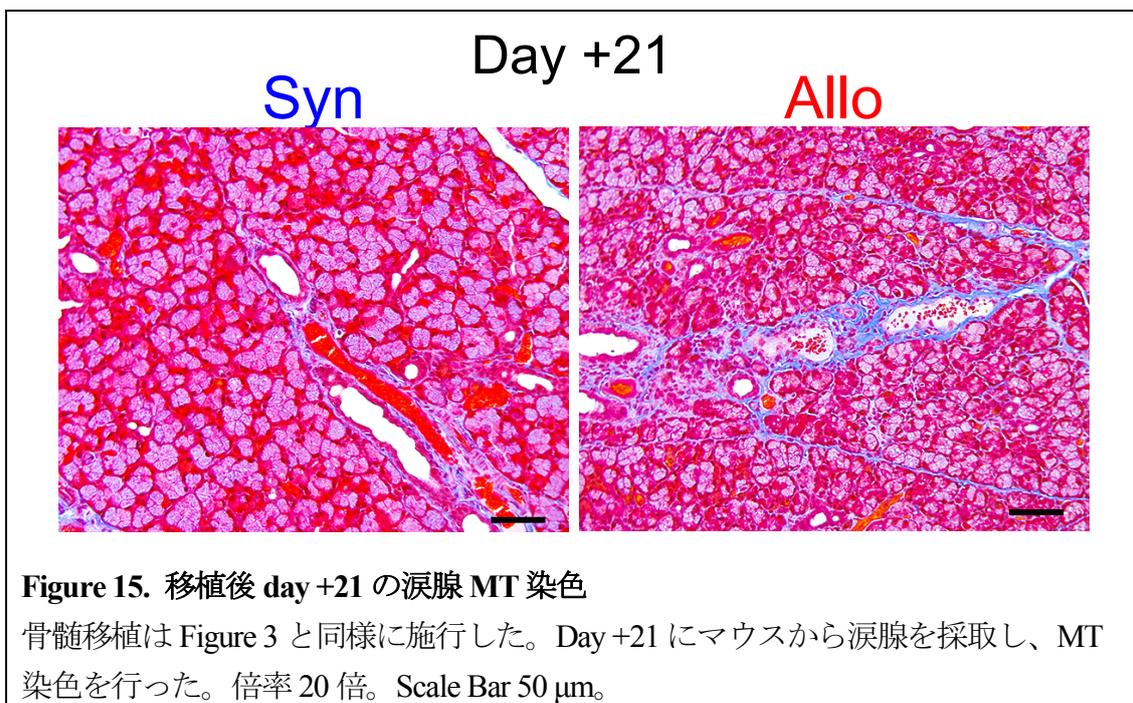
MT 染色でコラーゲンの沈着している領域の改善の程度を定量的に判断するために、それぞれの MT 染色標本を同条件で撮影し、Image J による画像解析を行い、MT 染色陽性領域の比率を算出し比較した。すると VA-lip HSP47 点眼群では VA-lip Scr 点眼群と比較して有意に MT 染色陽性領域の比率が低下していた(Figure 14A)。さらに、コラーゲンアッセイでも VA-lip Scr 点眼群と比較して VA-lip HSP47 点眼群ではコラーゲンの沈着が減少しており、フェノールレッド糸で測定した涙液分泌量も保たれていた(Figure 14B, C)。以上の結果から、VA-lip HSP47 点眼は慢性 GVHD による涙腺線維化とドライアイの発症を抑制する効果があることが示された。さらに VA-lip Scr 点眼では涙腺線維化とドライアイ発症の抑制効果がないことから、本研究における涙腺線維化とドライアイの改善効果は薬剤の表面を覆うビタミン A 誘導体による効果ではなく、生体内での HSP47 ノックダウンによる効果であることが示された。



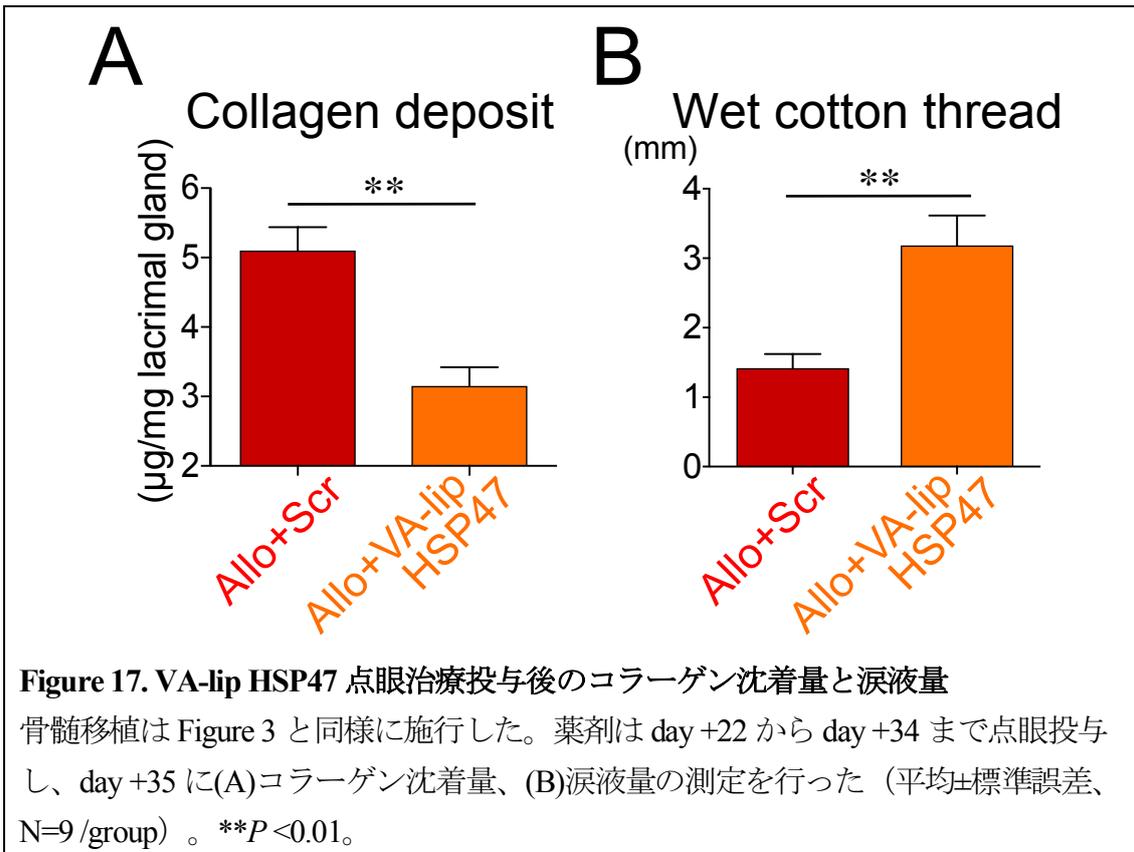
6. VA-lip HSP47 点眼は完成した涙腺線維化を改善させる

最後に、すでに生じた涙腺線維化病変にも VA-lip HSP47 点眼が有効であるか否かを確認することとした。実臨床では VA-lip HSP47 を予防的に投与することは困難であるため、すでに発症した慢性 GVHD の治療として VA-lip HSP47 点眼の効果がある

かが重要になるため治療効果を評価した。まず、移植後 day +21 のマウスで涙腺線維化が発症しているか確認するために MT 染色標本を作成して組織学的に評価した。画像的に、Syn 群では涙腺線維化が生じていなかったが、Allo 群では移植後 day +21 の時点ですでに線維化が生じていることが確認できた(Figure 15)。



そこで移植後 day +21 から day +34 まで 0.4 mg/ml の VA-lip HSP47 もしくは VA-lip Scr を 2 μ l ずつ両眼に点眼し、day +35 に解析する実験を行なった。蛍光免疫染色で VA-lip Scr 点眼群では HSP47 陽性細胞の集積を認めていたが、VA-lip HSP47 点眼群では HSP47 陽性細胞の集積は抑制されていた(Figure 16A)。さらに MT 染色でコラーゲンが沈着している青色部位を確認すると、VA-lip Scr 点眼群に比較して明らかに VA-lip HSP47 点眼群で線維化部位が少なく、涙腺線維化が改善していた(Figure 16B)。



以上より VA-lip HSP47 は全身投与で眼慢性 GVHD による涙腺の線維化と涙液量の分泌を改善させるだけでなく、点眼投与によっても眼慢性 GVHD による涙腺の線維化およびドライアイを予防かつ治療できる可能性があることが示された。

考察

慢性 GVHD は多臓器が標的となる移植後の合併症であり、臓器線維化と機能不全を特徴とする疾患である。移植の支持療法や急性 GVHD の予防法が発展し、移植後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くなっている。実際、造血幹細胞移植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 (Solomon et al., 2017)。GRFS を達成するためには、治療が必要となる慢性 GVHD を発症させないこと、過大な免疫抑制によって再発が増加しないことが条件であり、急性 GVHD だけでなく慢性 GVHD の予防も移植の成功に重要であることを示している。造血幹細胞移植後に大量シクロフォスファミドを投与し、アロ反応性 T 細胞を除去する GVHD 予防法や抗胸腺グロブリンを用いた GVHD 予防法は慢性 GVHD の発症が抑えられると報告されており、急性 GVHD だけでなく慢性 GVHD にも期待できる GVHD 予防法である (Kanakry et al., 2014; Sugita et al., 2015; Finke et al., 2009)。

慢性 GVHD の治療には一次治療として副腎皮質ステロイドの全身投与が行われるが、二次治療については標準的治療法がないのが現状である (Wolff et al., 2011)。欧米ではミコフェノール酸モフェチルやシロリムス、ヒドロキシクロロキン、体外循環式光化学療法、リツキシマブ、ペントスタチン、イマチニブ、ステロイドパルス療法などが使用されるが、明らかに優れている治療法は確立していない (Wolff et al., 2011)。そのため、慢性 GVHD の新たな治療法の開発が精力的に行われている。慢性 GVHD の病態の一端として B 細胞の異常な活性化がある。そこで、B 細胞シグナル伝達に関連する Bruton's tyrosine kinase と T 細胞のシグナル伝達に関連する interleukin-2 inducible T-cell kinase の阻害薬であるイブルチニブはマウスモデルにおいて T 細胞と B 細胞の機能を抑制することで慢性 GVHD を改善させることが報告された (Dubovsky et al., 2014; Schutt et al., 2015)。さらに第 II 相試験でイブルチニブは副腎皮質ステロイド治療に抵抗性であった慢性 GVHD 患者に対して、67% の奏効率を認め (Miklos et al., 2017)、イブルチニブは米国食品医薬品局で初めて、副腎皮質ステロイド抵抗性慢性 GVHD に対する治療薬として認可された。また、ヒトおよびマウス慢性 GVHD の B 細胞では細胞内キナーゼである spleen tyrosine kinase の発現が亢進しており、spleen tyrosine kinase 阻害薬を用いることで慢性 GVHD が改善することが報告されている (Le Huu et al., 2014; Flynn et al., 2014; Allen et al., 2014; Flynn et al., 2015)。Spleen tyrosine kinase 阻害薬が慢性 GVHD を改善させる機序として、慢性 GVHD によって活性化し

た胚中心の機能と樹状細胞の働きを抑えるということがマウスモデルで報告されている(Flynn et al., 2015)。さらに、制御性 T 細胞の生存と増殖に関わる interleukin-2 を用いる低用量 interleukin-2 療法は第 I / II 相試験で慢性 GVHD 患者の制御性 T 細胞を増やし、慢性 GVHD を改善すると報告されており、期待される治療法である(Matsuoka et al., 2013)。一方で臓器線維化に着目した治療としては特発性肺線維症に対して認可されている抗線維化薬の pirfenidone がある(Noble et al., 2011)。Pirfenidone は TGF- β 受容体のシグナリングを阻害することでコラーゲン産生を抑制する薬剤であるが、マウスの慢性 GVHD による肺線維化病変においてマクロファージの浸潤を抑制し、TGF- β の産生を抑えることで肺慢性 GVHD を改善させることが報告されている(Du et al., 2017)。さらに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 や 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ている(Wu et al., 2014)。

本研究では慢性 GVHD 病態の最終段階に当たる線維化病態に着目し HSP47 を標的とした治療開発を行った。HSP47 はプロコラーゲンをコラーゲンへと成熟させるのに重要な役割を担っている。そのため、HSP47 の機能を阻害することでプロコラーゲンのフォールディングが阻害され、小胞体内にフォールディングされない異常なコラーゲンが蓄積し小胞体ストレスによって線維芽細胞はアポトーシスを起こす(Ito and Nagata, 2017)。このことは HSP47 が慢性 GVHD による線維化病変において治療標的となり得ることを示唆しており、本研究の標的として HSP47 に着目した。本研究では慢性 GVHD による涙腺線維化病変で HSP47 の発現が亢進しており、HSP47 が眼慢性 GVHD の治療標的となり得ることを示した。

HSP47 陽性線維芽細胞が涙腺間質の線維化部位に集積することが慢性 GVHD モデルマウスのみではなく、慢性 GVHD を発症したヒトでも生じることが知られている(Ogawa et al., 2007; Ogawa et al., 2017)。肝硬変をはじめとする臓器線維化病変では α -SMA 陽性の筋線維芽細胞が線維化病変形成の重要な役割を担っていることが知られており、我々は以前、皮膚慢性 GVHD での線維化でも筋線維芽細胞がマクロファージ依存的に集積することを発見した(Yamakawa et al., 2018; Hinz et al., 2007; Wynn and Ramalingam, 2012; Zhang et al., 2014)。しかし、涙腺の HSP47 陽性線維芽細胞は α -SMA を発現しておらず、このことは眼慢性 GVHD の涙腺線維化では α -SMA が陰性であることを報告した過去の報告と一致していた(Ogawa et al., 2007; Yamane et al., 2018)。これは例えば皮膚では真皮乳頭層、真皮網状層、皮下組織と解剖学的な部位の違いによって、それぞれ異なる線維芽細胞が存在するという報告にあるように、臓

器線維化に関わる線維芽細胞の表現型はその前駆細胞や組織、微小環境によって変化するためと考えられる(Lynch and Watt, 2018)。

眼慢性 GVHD は NIH 基準 2015 の段階では「他の検査所見や臓器病変がなくても慢性 GVHD と診断できる徴候」とされる診断的徴候が存在していないが、他の臓器に慢性 GVHD の診断的徴候があれば、新たなドライアイの出現や乾燥性角結膜炎の出現により診断できる疾患である(Jagasia et al., 2015)。一方で、眼慢性 GVHD が他の慢性 GVHD の診断的徴候よりも先に出現するという報告も多く、慢性 GVHD 診断における眼の重要性が示唆されている(Jacobs et al., 2012)。さらに重症なドライアイは移植後平均 6.8 ヶ月で発症し、ほぼ全例が他臓器の慢性 GVHD を合併するのに対して軽度のドライアイは移植後平均 13.2 ヶ月で発症し、他の慢性 GVHD の徴候を有していないことが多いとする報告があり、他の慢性 GVHD の診断的徴候がない状況でもドライアイについての評価が重要であることが示唆される(Wang et al., 2010)。また、結膜炎を生じる慢性 GVHD は重症 GVHD の徴候であるとする報告があり、結膜炎を有する場合は生存率が低下すると報告されている(Jabs et al., 1989)。この報告に関しては現在の GVHD についての NIH 基準に照らし合わせると急性 GVHD も含まれている可能性があり、検証が必要と考えられる。眼慢性 GVHD の重要性は高まっており、診断的徴候となりうる徴候であるため、International Chronic Ocular GVHD Consensus Group から眼慢性 GVHD の新たな診断基準が示された(Ogawa et al., 2013)。今後はこの基準をもとに眼慢性 GVHD を正確に診断、評価することで眼慢性 GVHD が全身の慢性 GVHD の診断的徴候となり得るのか、慢性 GVHD 早期治療への指標となり得るのか評価されてくると考えられる。

ドライアイは慢性 GVHD だけではなく炎症や加齢、さらには特発性にも発症することが知られている(Conrady et al., 2016)。涙腺の線維化は他のドライアイでも生じていることがあり、VA-lip HSP47 はドライアイ全般に有効である可能性がある。ヒトとは異なり、マウスでは主要な涙腺が眼窩外にあるが、我々は Dy647 で蛍光標識した VA-lip HSP47 を移植後のマウスに点眼することで薬剤が涙腺組織に分布することを示した。臨床研究での検証が必要だが、ヒトでは涙腺が眼球近傍にあり、マウスよりも薬剤が分布しやすい可能性があり、ヒトでの臨床研究へ期待できる要素であると考えている。

さらに、近年の報告では眼慢性 GVHD でドライアイを発症したものは同時にマイボーム腺機能不全を合併することが高いことが報告されている(Ogawa et al., 1999)。マイボーム腺機能不全とは涙液蒸発の抑制や瞬目時の摩擦抑制などの役割を担う脂質

(マイバム)の分泌が様々な原因により障害される病態であり、ドライアイとの強い関連が言われている。慢性GVHDにおいては分泌減少型のマイボーム腺機能不全が生じると報告されており、慢性炎症をきっかけに導管内上皮の角化や腺内脂質の性状変化が生じてマイバムの分泌が低下すると考えられている(Obata, 2002)。本研究でも導管の角化を確認しており、過角化を抑えることが出来ればマイボーム腺機能不全を改善する可能性があると考えた。我々は皮膚慢性GVHDに対してVA-lip HSP47を全身投与することで皮膚線維化を改善すると同時に過角化を抑えることを確認しており、VA-lip HSP47点眼はマイボーム腺機能不全を改善する可能性があると考えられる。本研究ではマイボーム腺機能不全の評価が十分に行えなかったためVA-lip HSP47点眼の効果については不明だが、今後はマイボーム腺機能不全を評価する方法を導入して研究を行いたい。

siRNAは特定の遺伝子の翻訳を阻害するため、様々な疾患で臨床応用が期待されているが生体内では急速に分解されてしまうことが臨床応用への障害の一つとなっている。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(Sato et al., 2008; Takagawa and Hirose, 1989; Kurashima et al., 2014)。VA-lip HSP47の全身投与は肝臓や肺、脾臓の線維化モデル動物で有効であることが報告されており(Sato et al., 2008; Otsuka et al., 2017; Ishiwatari et al., 2013)、現在、肝硬変患者で抗線維化効果についての臨床試験が行われている(NCT02227459)。我々は以前、慢性GVHDモデルマウスを用いてVA-lip HSP47の全身投与が慢性GVHDによる皮膚および唾液腺の線維化を改善することを報告している(Yamakawa et al., 2018)。本研究では、眼慢性GVHDモデルマウスを用いてVA-lip HSP47点眼が慢性GVHDによる涙腺線維化を改善することを発見した。ドライアイは慢性GVHDが生じる他の標的臓器の病変に先行して生じることが報告されており、VA-lip HSP47点眼はそのような患者の早期治療に有用である(Ogawa et al., 2013)。加えて、全身治療と比較して治療費用を抑えることが可能であり、全身的な有害事象が生じる可能性も低いと考えられる。

眼に限らず、慢性GVHDの治療には症状に応じて全身ステロイド投与などの免疫抑制療法が行われる。一方で免疫抑制療法は感染症や原疾患の再発などのリスクがあるため、眼慢性GVHDに対してはステロイド点眼、シクロスポリン点眼、人工涙液や自家血清点眼といった局所療法が開発されている(Ahmad et al., 2002; Espana et al., 2013)。これらの治療法はいずれも明確な優劣はないが、初期治療として局所の炎症を抑制するためにステロイド点眼が用いられることが多い(Nassiri et al., 2013)。しか

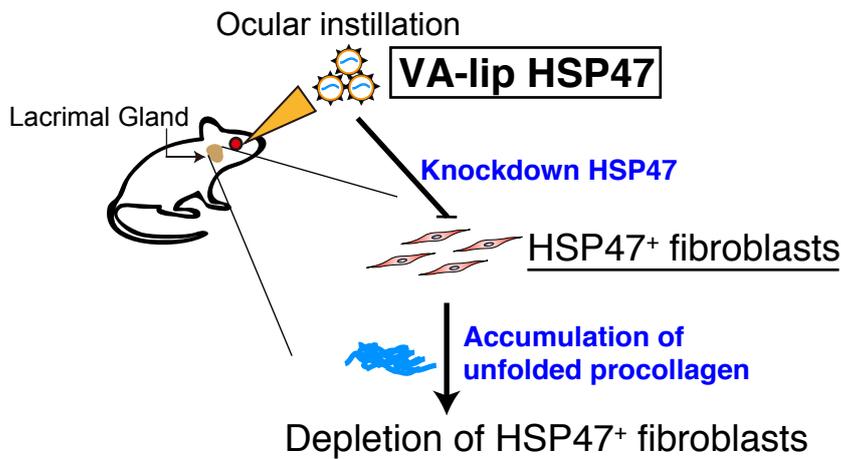
し、ステロイド点眼は緑内障や白内障、感染性結膜炎の発症に繋がるため長期使用は勧められない。一方でシクロスポリン点眼はステロイド点眼よりも副作用が少なく、T cell の活性化を抑えて眼慢性 GVHD による症状を抑制するとされ、有効という報告がある(Wang et al., 2008)。また、羊膜抽出液が角膜の修復作用や炎症細胞の抑制、線維芽細胞の活性化抑制に有効であるとされることから、眼慢性 GVHD の治療に羊膜抽出液点眼を用いる臨床研究が行われている(Murri et al., 2018) (NCT03298815)。さらにヒト羊膜から作成した Heavy Chain-Hyaluronan/Pentraxin 3 を眼慢性 GVHD モデルマウスの結膜下および皮下に投与することで、HSP47 陽性線維芽細胞の減少と涙腺の線維化およびドライアイが改善したとする報告もある(Ogawa et al., 2017)。Heavy Chain-Hyaluronan/Pentraxin 3 も免疫抑制作用があることが知られており(He et al., 2013; Zhang et al., 2012; He et al., 2014)、VA-lip HSP47 は線維化カスケードのより下層を標的している点が異なっていると考ええる。一方で、眼慢性 GVHD の重要性から全身治療においても眼慢性 GVHD を評価する研究が近年報告されている。前述している spleen tyrosine kinase 阻害薬の一種である entospletinib は GVHD モデルマウスで皮膚の線維化およびマウス眼瞼の過角化を改善させ、GVHD による眼および皮膚の症状を改善させることを報告している(Poe et al., 2018)。このように眼慢性 GVHD の治療法の開発は近年盛んに研究されている分野である。

今回の研究で我々は VA-lip HSP47 が全身投与でも点眼投与でも慢性 GVHD による涙腺線維化およびドライアイに対する新たな治療選択肢となることを発見した。移植後の QOL を向上させるためにも眼慢性 GVHD の治療の位置付けは重要となっており、治療選択肢の少ない中で新規治療法を提示することができたことは意義のあるものと考えられる。

総括および結論

本研究にて以下の知見が得られた。

- VA-lip HSP47 は眼慢性 GVHD モデルマウスへの全身投与で涙腺線維化と涙液量の低下を軽減する。
- VA-lip HSP47 は眼慢性 GVHD モデルマウスへの点眼投与後に涙腺組織に分布する。
- VA-lip HSP47 点眼は慢性 GVHD による涙腺線維化と涙液量の低下を軽減する。
- VA-lip HSP47 点眼は発症した涙腺線維化を改善し、涙液量の低下を改善する。



2. 新知見の意義

HSP47 は眼慢性 GVHD による涙腺線維化に関与することは報告されていたが、直接の治療標的となるかは不明であった。肝硬変や肺線維症、慢性 GVHD による皮膚及び唾液腺の線維化に有効であることが報告されている VA-lip HSP47 を全身投与だけではなく、局所投与することでも涙腺線維化に有効であることを初めて証明した。さらに VA-lip HSP47 点眼は眼慢性 GVHD の予防効果だけではなく、治療効果があることが証明された。眼慢性 GVHD は他の慢性 GVHD の症状に先駆けて自覚されることもあり、VA-lip HSP47 点眼療法は全身性の免疫抑制を起こす治療を避けることで

免疫抑制に伴う副作用や GVHD 治療に伴う原疾患の再発リスクを軽減できる可能性があり、大きな意義がある。加えて、VA-lip HSP47 点眼は VA-lip HSP47 の全身投与と比較して使用する薬剤の量が少なく済むため経済的な面でも大きな意義がある。

3. 今後の研究展開

これまでの我々の研究で VA-lip HSP47 は全身投与で皮膚および唾液腺の慢性 GVHD に効果があること、局所投与での眼慢性 GVHD に効果があることを示してきた。これら研究の限界は動物モデルでの検証ということであり、ヒトでの臨床研究へと発展させたい。現在、肝硬変患者に対する VA-lip HSP47 の全身投与の臨床試験が行われており (NCT02227459)、安全性を確認する。更に、眼慢性 GVHD では涙腺の線維化だけではなくマイボーム腺の線維化に伴うマイボーム腺機能不全が合併していることが多く、VA-lip HSP47 による治療効果が期待できる。本研究ではマイボーム腺の評価ができなかったが、ヒトでは非侵襲的な検査で評価が可能のため、ヒトでの臨床研究が可能となった場合にはマイボーム腺についても評価すべきである。

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、橋本大吾准教授、早瀬英子先生、高橋秀一郎先生、山川知宏先生、荒
隆英先生、横山絵美先生、立野貴大先生

利益相反

VA-lip 製剤は日東電工株式会社より提供いただいた。

引用文献

- Ahmad, S.M., Stegman, Z., Fruchtmann, S., and Asbell, P.A. (2002). Successful treatment of acute ocular graft-versus-host disease with tacrolimus (FK506). *Cornea* *21*, 432-433.
- Allen, J.L., Tata, P.V., Fore, M.S., Wooten, J., Rudra, S., Deal, A.M., Sharf, A., Hoffert, T., Roehrs, P.A., Shea, T.C., *et al.* (2014). Increased BCR responsiveness in B cells from patients with chronic GVHD. *Blood* *123*, 2108-2115.
- Arai, S., Arora, M., Wang, T., Spellman, S.R., He, W., Couriel, D.R., Urbano-Ispizua, A., Cutler, C.S., Bacigalupo, A.A., Battiwalla, M., *et al.* (2015). 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.
- Arai, S., Jagasia, M., Storer, B., Chai, X., Pidala, J., Cutler, C., Arora, M., Weisdorf, D.J., Flowers, M.E., Martin, P.J., *et al.* (2011). Global and organ-specific chronic graft-versus-host disease severity according to the 2005 NIH Consensus Criteria. *Blood* *118*, 4242-4249.
- Baron, F., Labopin, M., Niederwieser, D., Vigouroux, S., Cornelissen, J.J., Malm, C., Vindelov, L.L., Blaise, D., Janssen, J.J., Petersen, E., *et al.* (2012). Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia* *26*, 2462-2468.
- Boyiadzis, M., Arora, M., Klein, J.P., Hassebroek, A., Hemmer, M., Urbano-Ispizua, A., Antin, J.H., Bolwell, B.J., Cahn, J.Y., Cairo, M.S., *et al.* (2015). Impact of Chronic Graft-versus-Host Disease on Late Relapse and Survival on 7,489 Patients after Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Leukemia. *Clin. Cancer Res.* *21*, 2020-2028.
- Conrady, C.D., Joos, Z.P., and Patel, B.C. (2016). Review: The Lacrimal Gland and Its Role in Dry Eye. *J. Ophthalmol.* *2016*, 7542929.
- Cooke, K.R., Luznik, L., Sarantopoulos, S., Hakim, F.T., Jagasia, M., Fowler, D.H., van den Brink, M.R.M., Hansen, J.A., Parkman, R., Miklos, D.B., *et al.* (2017). 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.

Cutler, C., Giri, S., Jeyapalan, S., Paniagua, D., Viswanathan, A., and Antin, J.H. (2001). Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *J. Clin. Oncol.* *19*, 3685-3691.

Dertschnig, S., Hauri-Hohl, M.M., Vollmer, M., Holländer, G.A., and Krenger, W. (2015). Impaired thymic expression of tissue-restricted antigens licenses the de novo generation of autoreactive CD4+ T cells in acute GVHD. *Blood* *125*, 2720-2723.

Du, J., Paz, K., Flynn, R., Vulic, A., Robinson, T.M., Lineburg, K.E., Alexander, K.A., Meng, J., Roy, S., Panoskaltis-Mortari, A., *et al.* (2017). Pirfenidone ameliorates murine chronic GVHD through inhibition of macrophage infiltration and TGF- β production. *Blood* *129*, 2570-2580.

Dubovsky, J.A., Flynn, R., Du, J., Harrington, B.K., Zhong, Y., Kaffenberger, B., Yang, C., Towns, W.H., Lehman, A., Johnson, A.J., *et al.* (2014). Ibrutinib treatment ameliorates murine chronic graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* *124*, 4867-4876.

Engel, L.A., Wittig, S., Bock, F., Sauerbier, L., Scheid, C., Holtick, U., Chemnitz, J.M., Hallek, M., Cursiefen, C., and Steven, P. (2015). Meibography and meibomian gland measurements in ocular graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* *50*, 961-967.

Espana, E.M., Shah, S., Santhiago, M.R., and Singh, A.D. (2013). Graft versus host disease: clinical evaluation, diagnosis and management. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *251*, 1257-1266.

Ferrara, J.L., Cooke, K.R., and Teshima, T. (2003). The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Int. J. Hematol.* *78*, 181-187.

Ferrara, J.L., Levine, J.E., Reddy, P., and Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *Lancet* *373*, 1550-1561.

Filipovich, A.H., Weisdorf, D., Pavletic, S., Socie, G., Wingard, J.R., Lee, S.J., Martin, P., Chien, J., Przepiorka, D., Couriel, D., *et al.* (2005). National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *11*, 945-956.

Finke, J., Bethge, W.A., Schmoor, C., Ottinger, H.D., Stelljes, M., Zander, A.R., Volin,

L., Ruutu, T., Heim, D.A., Schwerdtfeger, R., *et al.* (2009). Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *Lancet Oncol.* *10*, 855-864.

Flowers, M.E., and Martin, P.J. (2015). How we treat chronic graft-versus-host disease. *Blood* *125*, 606-615.

Flynn, R., Allen, J.L., Luznik, L., MacDonald, K.P., Paz, K., Alexander, K.A., Vulic, A., Du, J., Panoskaltis-Mortari, A., Taylor, P.A., *et al.* (2015). Targeting Syk-activated B cells in murine and human chronic graft-versus-host disease. *Blood* *125*, 4085-4094.

Flynn, R., Du, J., Veenstra, R.G., Reichenbach, D.K., Panoskaltis-Mortari, A., Taylor, P.A., Freeman, G.J., Serody, J.S., Murphy, W.J., Munn, D.H., *et al.* (2014). Increased T follicular helper cells and germinal center B cells are required for cGVHD and bronchiolitis obliterans. *Blood* *123*, 3988-3998.

Forcade, E., Paz, K., Flynn, R., Griesenauer, B., Amet, T., Li, W., Liu, L., Bakoyannis, G., Jiang, D., Chu, H.W., *et al.* (2017). An activated Th17-prone T cell subset involved in chronic graft-versus-host disease sensitive to pharmacological inhibition. *JCI Insight* *2*.

Fraser, C.J., Bhatia, S., Ness, K., Carter, A., Francisco, L., Arora, M., Parker, P., Forman, S., Weisdorf, D., Gurney, J.G., *et al.* (2006). Impact of chronic graft-versus-host disease on the health status of hematopoietic cell transplantation survivors: a report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood* *108*, 2867-2873.

He, H., Tan, Y., Duffort, S., Perez, V.L., and Tseng, S.C. (2014). In vivo downregulation of innate and adaptive immune responses in corneal allograft rejection by HC-HA/PTX3 complex purified from amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *55*, 1647-1656.

He, H., Zhang, S., Tighe, S., Son, J., and Tseng, S.C. (2013). Immobilized heavy chain-hyaluronic acid polarizes lipopolysaccharide-activated macrophages toward M2 phenotype. *J. Biol. Chem.* *288*, 25792-25803.

Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.L., and Gabbiani, G. (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am. J. Pathol.* *170*, 1807-1816.

Ishiwatari, H., Sato, Y., Murase, K., Yoneda, A., Fujita, R., Nishita, H., Birukawa, N.K., Hayashi, T., Sato, T., Miyanishi, K., *et al.* (2013). Treatment of pancreatic fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone in vitamin A-coupled

liposomes. *Gut* *62*, 1328-1339.

Ito, S., and Nagata, K. (2017). Biology of Hsp47 (Serpin H1), a collagen-specific molecular chaperone. *Semin. Cell Dev. Biol.* *62*, 142-151.

Jabs, D.A., Wingard, J., Green, W.R., Farmer, E.R., Vogelsang, G., and Saral, R. (1989). The eye in bone marrow transplantation. III. Conjunctival graft-vs-host disease. *Arch. Ophthalmol.* *107*, 1343-1348.

Jack, M.K., Jack, G.M., Sale, G.E., Shulman, H.M., and Sullivan, K.M. (1983). Ocular manifestations of graft-v-host disease. *Arch. Ophthalmol.* *101*, 1080-1084.

Jacobs, R., Tran, U., Chen, H., Kassim, A., Engelhardt, B.G., Greer, J.P., Goodman, S.G., Clifton, C., Lucid, C., Vaughan, L.A., *et al.* (2012). Prevalence and risk factors associated with development of ocular GVHD defined by NIH consensus criteria. *Bone Marrow Transplant.* *47*, 1470-1473.

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., *et al.* (2015). 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.

Kanakry, C.G., Tsai, H.L., Bolaños-Meade, J., Smith, B.D., Gojo, I., Kanakry, J.A., Kasamon, Y.L., Gladstone, D.E., Matsui, W., Borrello, I., *et al.* (2014). Single-agent GVHD prophylaxis with posttransplantation cyclophosphamide after myeloablative, HLA-matched BMT for AML, ALL, and MDS. *Blood* *124*, 3817-3827.

Kanda, J., Nakasone, H., Atsuta, Y., Toubai, T., Yokoyama, H., Fukuda, T., Taniguchi, S., Ohashi, K., Ogawa, H., Eto, T., *et al.* (2014). Risk factors and organ involvement of chronic GVHD in Japan. *Bone Marrow Transplant.* *49*, 228-235.

Kurashima, Y., Amiya, T., Fujisawa, K., Shibata, N., Suzuki, Y., Kogure, Y., Hashimoto, E., Otsuka, A., Kabashima, K., Sato, S., *et al.* (2014). The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity* *40*, 530-541.

Kuroda, K., Tsukifuji, R., and Shinkai, H. (1998). Increased expression of heat-shock protein 47 is associated with overproduction of type I procollagen in systemic sclerosis skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* *111*, 1023-1028.

Le Huu, D., Kimura, H., Date, M., Hamaguchi, Y., Hasegawa, M., Hau, K.T., Fujimoto, M., Takehara, K., and Matsushita, T. (2014). Blockade of Syk ameliorates the development of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *J. Dermatol. Sci.* *74*, 214-221.

Lynch, M.D., and Watt, F.M. (2018). Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J. Clin. Invest.* *128*, 26-35.

MacDonald, K.P., Hill, G.R., and Blazar, B.R. (2017). Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood* *129*, 13-21.

Matsuoka, K., Koreth, J., Kim, H.T., Bascug, G., McDonough, S., Kawano, Y., Murase, K., Cutler, C., Ho, V.T., Alyea, E.P., *et al.* (2013). Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Sci. Transl. Med.* *5*, 179ra143.

Miklos, D., Cutler, C.S., Arora, M., Waller, E.K., Jagasia, M., Pusic, I., Flowers, M.E., Logan, A.C., Nakamura, R., Blazar, B.R., *et al.* (2017). Ibrutinib for chronic graft-versus-host disease after failure of prior therapy. *Blood* *130*, 2243-2250.

Murri, M.S., Moshirfar, M., Birdsong, O.C., Ronquillo, Y.C., Ding, Y., and Hoopes, P.C. (2018). Amniotic membrane extract and eye drops: a review of literature and clinical application. *Clin. Ophthalmol.* *12*, 1105-1112.

Nassiri, N., Eslani, M., Panahi, N., Mehravaran, S., Ziaei, A., and Djalilian, A.R. (2013). Ocular graft versus host disease following allogeneic stem cell transplantation: a review of current knowledge and recommendations. *J. Ophthalmic. Vis. Res.* *8*, 351-358.

Noble, P.W., Albera, C., Bradford, W.Z., Costabel, U., Glassberg, M.K., Kardatzke, D., King, T.E., Lancaster, L., Sahn, S.A., Szwarcberg, J., *et al.* (2011). Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials. *Lancet* *377*, 1760-1769.

Obata, H. (2002). Anatomy and histopathology of human meibomian gland. *Cornea* *21*, S70-74.

Ogawa, Y., He, H., Mukai, S., Imada, T., Nakamura, S., Su, C.W., Mahabole, M., Tseng, S.C., and Tsubota, K. (2017). Heavy Chain-Hyaluronan/Pentraxin 3 from Amniotic Membrane Suppresses Inflammation and Scarring in Murine Lacrimal Gland and Conjunctiva of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Sci. Rep.* *7*, 42195.

Ogawa, Y., Kim, S.K., Dana, R., Clayton, J., Jain, S., Rosenblatt, M.I., Perez, V.L., Shikari, H., Riemens, A., and Tsubota, K. (2013). International Chronic Ocular Graft-vs-Host-Disease (GVHD) Consensus Group: proposed diagnostic criteria for chronic GVHD (Part I). *Sci. Rep.* *3*, 3419.

Ogawa, Y., Okamoto, S., Wakui, M., Watanabe, R., Yamada, M., Yoshino, M., Ono, M., Yang, H.Y., Mashima, Y., Oguchi, Y., *et al.* (1999). Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Ophthalmol.* *83*, 1125-1130.

Ogawa, Y., Razzaque, M.S., Kameyama, K., Hasegawa, G., Shimmura, S., Kawai, M., Okamoto, S., Ikeda, Y., Tsubota, K., Kawakami, Y., *et al.* (2007). 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.

Ogawa, Y., Yamazaki, K., Kuwana, M., Mashima, Y., Nakamura, Y., Ishida, S., Toda, I., Oguchi, Y., Tsubota, K., Okamoto, S., *et al.* (2001). A significant role of stromal fibroblasts in rapidly progressive dry eye in patients with chronic GVHD. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 111-119.

Otsuka, M., Shiratori, M., Chiba, H., Kuronuma, K., Sato, Y., Niitsu, Y., and Takahashi, H. (2017). Treatment of pulmonary fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone HSP47 in vitamin A-coupled liposomes. *Exp. Lung Res.* *43*, 271-282.

Pathak, M., Diep, P.P., Lai, X., Brinch, L., Ruud, E., and Drolsum, L. (2018). Ocular findings and ocular graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation without total body irradiation. *Bone Marrow Transplant.* *53*, 863-872.

Pidala, J., Kurland, B., Chai, X., Majhail, N., Weisdorf, D.J., Pavletic, S., Cutler, C., Jacobsohn, D., Palmer, J., Arai, S., *et al.* (2011). Patient-reported quality of life is associated with severity of chronic graft-versus-host disease as measured by NIH criteria: report on baseline data from the Chronic GVHD Consortium. *Blood* *117*, 4651-4657.

Poe, J.C., Jia, W., Di Paolo, J.A., Reyes, N.J., Kim, J.Y., Su, H., Sundy, J.S., Cardones, A.R., Perez, V.L., Chen, B.J., *et al.* (2018). SYK inhibitor entospletinib prevents ocular and skin GVHD in mice. *JCI Insight* *3*.

Sakoda, Y., Hashimoto, D., Asakura, S., Takeuchi, K., Harada, M., Tanimoto, M., and Teshima, T. (2007). Donor-derived thymic-dependent T cells cause chronic graft-versus-host disease. *Blood* *109*, 1756-1764.

Sato, Y., Murase, K., Kato, J., Kobune, M., Sato, T., Kawano, Y., Takimoto, R., Takada, K., Miyanishi, K., Matsunaga, T., *et al.* (2008). Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat. Biotechnol.* *26*, 431-442.

Schutt, S.D., Fu, J., Nguyen, H., Bastian, D., Heinrichs, J., Wu, Y., Liu, C., McDonald, D.G., Pidala, J., and Yu, X.Z. (2015). Inhibition of BTK and ITK with Ibrutinib Is Effective in the Prevention of Chronic Graft-versus-Host Disease in Mice. *PLoS One* *10*, e0137641.

Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., and Emerson, S.G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* *285*, 412-415.

Solomon, S.R., Sizemore, C., Zhang, X., Ridgeway, M., Solh, M., Morris, L.E., Holland, H.K., and Bashey, A. (2017). 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.

Srinivasan, M., Flynn, R., Price, A., Ranger, A., Browning, J.L., Taylor, P.A., Ritz, J., Antin, J.H., Murphy, W.J., Luznik, L., *et al.* (2012). 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.

Stewart, B.L., Storer, B., Storek, J., Deeg, H.J., Storb, R., Hansen, J.A., Appelbaum, F.R., Carpenter, P.A., Sanders, J.E., Kiem, H.P., *et al.* (2004). Duration of immunosuppressive treatment for chronic graft-versus-host disease. *Blood* *104*, 3501-3506.

Sugita, J., Kawashima, N., Fujisaki, T., Kakihana, K., Ota, S., Matsuo, K., Miyamoto, T., Akashi, K., Taniguchi, S., Harada, M., *et al.* (2015). HLA-Haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplantation with Post-Transplant Cyclophosphamide after Busulfan-Containing Reduced-Intensity Conditioning. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *21*, 1646-1652.

Takagawa, K., and Hirosawa, K. (1989). Uptake of retinol by cultured fibroblasts. *Cell Struct. Funct.* *14*, 353-362.

Teshima, T., Ordemann, R., Reddy, P., Gagin, S., Liu, C., Cooke, K.R., and Ferrara, J.L. (2002). Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat. Med.* *8*, 575-581.

Wang, Y., Ogawa, Y., Dogru, M., Kawai, M., Tatematsu, Y., Uchino, M., Okada, N., Igarashi, A., Kujira, A., Fujishima, H., *et al.* (2008). Ocular surface and tear functions after topical cyclosporine treatment in dry eye patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* *41*, 293-302.

Wang, Y., Ogawa, Y., Dogru, M., Tatematsu, Y., Uchino, M., Kamoi, M., Okada, N., Okamoto, S., and Tsubota, K. (2010). Baseline profiles of ocular surface and tear dynamics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with or without chronic GVHD-related dry eye. *Bone Marrow Transplant.* *45*, 1077-1083.

Wingard, J.R., Majhail, N.S., Brazauskas, R., Wang, Z., Sobocinski, K.A., Jacobsohn, D., Sorrow, M.L., Horowitz, M.M., Bolwell, B., Rizzo, J.D., *et al.* (2011). Long-term

survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Oncol.* *29*, 2230-2239.

Wolff, D., Schleuning, M., von Harsdorf, S., Bacher, U., Gerbitz, A., Stadler, M., Ayuk, F., Kiani, A., Schwerdtfeger, R., Vogelsang, G.B., *et al.* (2011). Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *17*, 1-17.

Wu, T., Young, J.S., Johnston, H., Ni, X., Deng, R., Racine, J., Wang, M., Wang, A., Todorov, I., Wang, J., *et al.* (2013). Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells. *J. Immunol.* *191*, 488-499.

Wu, Y., Huang, S., Enhe, J., Ma, K., Yang, S., Sun, T., and Fu, X. (2014). Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int. Wound J.* *11*, 701-710.

Wynn, T.A., and Ramalingam, T.R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* *18*, 1028-1040.

Yamakawa, T., Ohigashi, H., Hashimoto, D., Hayase, E., Takahashi, S., Miyazaki, M., Minomi, K., Onozawa, M., Niitsu, Y., and Teshima, T. (2018). Vitamin A-coupled liposomes containing siRNA against HSP47 ameliorate skin fibrosis in chronic graft-versus-host disease. *Blood* *131*, 1476-1485.

Yamane, M., Ogawa, Y., Mukai, S., Yaguchi, S., Kamijuku, H., Inaba, T., Asai, K., Morikawa, S., Kawakami, Y., Shimmura, S., *et al.* (2018). Functional Role of Lacrimal Gland Fibroblasts in a Mouse Model of Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Cornea* *37*, 102-108.

Zeiser, R., and Blazar, B.R. (2017). Pathophysiology of Chronic Graft-versus-Host Disease and Therapeutic Targets. *N. Engl. J. Med.* *377*, 2565-2579.

Zhang, S., He, H., Day, A.J., and Tseng, S.C. (2012). Constitutive expression of inter- α -inhibitor (I α I) family proteins and tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) by human amniotic membrane epithelial and stromal cells supporting formation of the heavy chain-hyaluronan (HC-HA) complex. *J. Biol. Chem.* *287*, 12433-12444.

Zhang, Y., Ghazwani, M., Li, J., Sun, M., Stolz, D.B., He, F., Fan, J., Xie, W., and Li, S. (2014). 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.

Zhao, D., Young, J.S., Chen, Y.H., Shen, E., Yi, T., Todorov, I., Chu, P.G., Forman, S.J., and Zeng, D. (2011). Alloimmune response results in expansion of autoreactive

donor CD4⁺ T cells in transplants that can mediate chronic graft-versus-host disease. *J. Immunol.* *186*, 856-868.