

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 10 月 12 日(12.10.2017)



(10) 国際公開番号
WO 2017/175808 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/192 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/014290
- (22) 国際出願日: 2017 年 4 月 5 日(05.04.2017)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
62/318,404 2016 年 4 月 5 日(05.04.2016) US
- (71) 出願人: 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY)
[JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目 1 5 番
4 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 向井 慎(MUKAI, Shin); 〒1608582 東京都
新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内
Tokyo (JP). 小川 葉子(OGAWA, Yoko); 〒1608582
東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医
学部内 Tokyo (JP). 坪田 一男(TSUBOTA, Kazuo);
〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應
義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 河上 裕
(KAWAKAMI, Yutaka); 〒1608582 東京都新宿区信
濃町 3 5 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo
(JP).
- (74) 代理人: 正林 真之, 外(SHOBAYASHI, Masayuki
et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内 1 - 7 -
1 2 サピアタワー Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA,
LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: THERAPEUTIC/PROPHYLACTIC AGENT FOR GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE, FIBROCYTE INVASION INHIBITOR, AND INHIBITOR AGAINST TEAR REDUCTION AND REDUCTION IN GOBLET CELLS

(54) 発明の名称: 移植片対宿主病の治療剤又は予防剤、ファイブロサイト浸潤抑制剤、及び涙液減少と杯細胞の減少の抑制剤

(57) Abstract: Provided are a new therapeutic/prophylactic agent for graft-versus-host disease, a fibrocyte invasion inhibitor, and an inhibitor against tear reduction and reduction in goblet cells. A therapeutic/prophylactic method for graft-versus-host disease comprises administering phenylbutyric acid or a pharmacologically acceptable salt thereof to a patient in need thereof. The graft-versus-host disease is preferably one acquired after a bone-marrow transplant. Also, the graft-versus-host disease is preferably one in the eyes.

(57) 要約: 新規な移植片対宿主病の治療剤又は予防剤、ファイブロサイト浸潤抑制剤並びに涙液及び杯細胞の減少の抑制剤を提供する。移植片対宿主病の治療又は予防方法は、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩をそれを必要とする患者に投与することを含む。移植片対宿主病は、骨髄移植後の移植片対宿主病であることが好ましい。また、移植片対宿主病は、眼における移植片対宿主病であることが好ましい。

WO 2017/175808 A1

明 細 書

発明の名称：

移植片対宿主病の治療剤又は予防剤、ファイブロサイト浸潤抑制剤、及び
涙液減少と杯細胞の減少の抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、移植片対宿主病の治療剤又は予防剤、ファイブロサイト浸潤抑制剤及び涙液減少と杯細胞の減少の抑制剤に関する。

背景技術

[0002] 造血幹細胞の腫瘍化に伴う血液悪性疾患に対して、他者の健康な造血幹細胞を移植して、白血病を根治させる治療法として確立されている医療である造血幹細胞移植が行われる場合がある。他方、近年、ドナーから提供された骨髓細胞、末梢血又は臍帯血の移植片が、免疫応答によってレシピエントの標的臓器を攻撃することによって発症する移植片対宿主病（*g r a f t - v e r s u s - h o s t d i s e a s e : G V H D*）が問題となっている。

[0003] この移植片対宿主病の治療剤として、例えば、眼表面の治療としてレバミピドやジクアホソルが知られており、非特許文献1には、レバミピドとジクアホソルとを併用することで、移植片対宿主病の症状の一つであるドライアイを改善することが開示されている。

[0004] 特に、慢性移植片対宿主病（*c h r o n i c g r a f t - v e r s u s - h o s t d i s e a s e : c G V H D*）は造血幹細胞移植（骨髓移植）後の重大な合併症であり、一部の患者にとっては致死的であり得る。c G V H Dは過去数十年にわたり集中的に研究されてきたが、c G V H Dの有効な治療法の開発が遅れている。

c G V H D患者は、多くの場合、シクロスポリン等の免疫抑制剤やステロイドで治療されているが、望ましい結果は得られ難い。それゆえ、臨床現場では、c G V H Dを治療する有効な方法が切望されている。

例えば、非特許文献2には、ドナー免疫細胞及びレシピエント細胞におけ

る細胞老化がcGVHDの発症プロセスに有害的に関与することが開示されている。

[0005] 一方、慢性炎症及び加齢性疾患の発症に有害な役割を果たす「小胞体ストレス」が知られている（例えば、非特許文献3、4）。

以下、図9及び10を参照して小胞体ストレスについて概説する。

タンパク質が小胞体において合成される場合、タンパク質は適切にフォールディングされなければならない、小胞体シャペロンはタンパク質のフォールディングを助ける。

しかし、低酸素、カルシウムイオン欠乏、酸化的傷害、ウイルス感染及び炎症性サイトカインは、小胞体のタンパク質の正常なフォールディングを妨げる。

[0006] 図9に示したように、フォールディングされていないタンパク質及びミスフォールドされたタンパク質が小胞体に蓄積されると小胞体ストレスが起こり、結果的に3つの膜貫通タンパク質（イノシトール要求（IRE）1 α 、PKR様ERキナーゼ（PERK）及び活性化転写因子（ATF）6 α ）が活性化されて、フォールディングされていないタンパク質に対する応答（UPR）が開始される。

しかし、UPRが長期化または失敗すると、炎症及びアポトーシス経路が活性化される（非特許文献5）。

その結果、図9及び10に示したように、失敗したUPRは、（1）炎症誘発性分子であるチオレドキシン相互作用タンパク質（TXNIP）及び活性化B細胞の転写因子核因子 κ 軽鎖エンハンサー（NF- κ B）、並びに（2）アポトーシスタンパク質C/E B P相同タンパク質（CHOP）の発現を誘導することが知られている（非特許文献6～8）。

[0007] しかし、小胞体ストレスとGVHD（特に、cGVHD）との相関はこれまで知られていなかった。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1: Mio Yamane, Yoko Ogawa, et al., "Long-term Rebamipide and Diquafosol in Two Cases of Immune-Mediated Dry Eye" Optometry and Vision Science, Vol. 92, No. 4S, April 2015

非特許文献2: Kawai M, Ogawa Y, Shimmura S, et al. Expression and localization of aging markers in lacrimal gland and of chronic graft-versus-host disease. Scientific Reports. 2013;3 (2445) : 1-6.

非特許文献3: Brown MK, Nirinjini Naidoo. The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. Front Physiol. 2012;3 (263) : 1-10.

非特許文献4: Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P. ER stress-induced inflammation: does it aid or impede disease progression? Trends Mol Med. 2012;18:589-598.

非特許文献5: Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. Methods. 2005;35:373-381.

非特許文献6: Anthony TG, Wek RC. TXNIP Sw

itches Tracks toward a Terminal UP
R. Cell Metab. 2012;16:135-137.

非特許文献7: Lerner AG, Upton JP, Praveen
PVK, et al. IRE1a Induces Thioredo-
xin-Interacting Protein to Activa-
te the NLRP3 Inflammasome and Prom-
ote Programmed Cell Death under Ir-
remediable ER Stress. Cell Metab.
2012;16:250-264.

非特許文献8: Osowski CM, Hara T, Murphy
BOS, et al. Thioredoxin-Interactin-
g Protein Mediates ER Stress-Induc-
ed Beta Cell Death through Initiat-
ion of the Inflammasome. Cell Meta-
b. 2012;16:265-273.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、以上の実情に鑑みてなされたものであり、新規な移植片対宿主病の治療剤又は予防剤、ファイibroサイト浸潤抑制剤並びに涙液及び杯細胞の減少の抑制剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、移植片対宿主病において、ファイibroサイト浸潤が涙腺に生じること、及びこのファイibroサイト浸潤をフェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩が抑制することを見出した。

更に、本発明者らは、(1) cGVHDに罹患した臓器が小胞体ストレスレベルの上昇を示すこと、(2) 小胞体ストレスの緩和がcGVHD(特に、全身性cGVHD)によって引き起こされる重篤な症状を緩和する強力な治療手段になり得るという新たな仮説を見出し、本発明を完成するに至った

。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[0011] <1>フェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩を有効成分とする、移植片対宿主病の治療又は予防剤。

<2>前記移植片対宿主病は、骨髓移植後の移植片対宿主病である、<1>に記載の治療又は予防剤。

<3>前記移植片対宿主病は、眼における移植片対宿主病である、<1>又は<2>に記載の治療又は予防剤。

<4>前記移植片対宿主病は、ドライアイである、<3>に記載の治療又は予防剤。

<5>前記移植片対宿主病は、ファイブロサイト浸潤を伴う移植片対宿主病である、<1>から<4>のいずれかに記載の治療又は予防剤。

[0012] <6>フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理的に許容される塩である、<1>から<5>のいずれかに記載の治療又は予防剤。

<7>フェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩を有効成分とする、ファイブロサイト浸潤抑制剤。

<8>フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理的に許容される塩である、<7>に記載のファイブロサイト浸潤抑制剤。

[0013] <9>フェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩を有効成分とする、杯細胞の減少の抑制剤。

<10>フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理的に許容される塩である、<9>に記載の杯細胞の減少の抑制剤。

<11>フェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩を有効成分とする、涙液減少抑制剤。

<12>フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理的に許容される塩である、<11>に記載の涙液減少抑制剤。

[0014] 本発明は以下の構成も好ましい。

(1) フェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩を投与すること

を含む、移植片対宿主病の治療又は予防方法。

[0015] (2) 前記移植片対宿主病は、骨髓移植後の移植片対宿主病である、(1)に記載の治療又は予防方法。

[0016] (3) 前記移植片対宿主病は、眼における移植片対宿主病である、(1)又は(2)に記載の治療又は予防方法。

[0017] (4) 前記移植片対宿主病は、ドライアイである、(3)に記載の治療又は予防方法。

[0018] (5) 前記移植片対宿主病は、ファイブロサイト浸潤を伴う移植片対宿主病である、(1)から(4)のいずれかに記載の治療又は予防方法。

[0019] (6) フェニル酪酸が4-フェニルー n -酪酸またはその薬理学的に許容される塩である、(1)から(5)のいずれかに記載の治療又は予防方法。

[0020] (7) フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を投与することを含む、ファイブロサイト浸潤抑制方法。

[0021] (8) フェニル酪酸が4-フェニルー n -酪酸またはその薬理学的に許容される塩である、(7)に記載のファイブロサイト浸潤抑制方法。

[0022] (9) フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を投与することを含む、杯細胞の減少の抑制方法。

[0023] (10) フェニル酪酸が4-フェニルー n -酪酸またはその薬理学的に許容される塩である、(9)に記載の杯細胞の減少の抑制方法。

[0024] (11) フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を投与することを含む、涙液減少抑制方法。

[0025] (12) フェニル酪酸が4-フェニルー n -酪酸またはその薬理学的に許容される塩である、(11)に記載の涙液減少抑制方法。

発明の効果

[0026] 本発明によれば、新規な移植片対宿主病の治療剤又は予防剤、ファイブロサイト浸潤抑制剤並びに涙液及び杯細胞の減少の抑制剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0027] [図1] cGVHD罹患臓器における小胞体ストレスマーカーの上昇結果を示す図である。図1Aは、cGVHD罹患臓器及び対照被験体におけるGRP78のqPCR分析結果を示す図である。図1Bは、小胞体ストレスマーカー及び関連炎症マーカーのイムノブロット分析結果を示す図である。図1Cは、各タンパク質バンドに対応する定量分析結果を示す図である。図1Dは、cGVHDに罹患した涙腺及びその同系対照の涙腺における上皮細胞の電子顕微鏡写真を示す図である。

[図2] PBA処理マウス群及びビヒクル処理マウス群の生存%及び体重変化を示す図である。

[図3-1] PBAによるcGVHDに起因する小胞体ストレスの抑制結果を示す図であり、図3Aは、イムノブロット分析による、cGVHD標的臓器における小胞体ストレスマーカー及び関連炎症マーカーのタンパク質レベルの試験結果を示す図である。

[図3-2] PBAによるcGVHDに起因する小胞体ストレスの抑制結果を示す図であり、図3Bは、PBA処理臓器及びビヒクル処理臓器について、各臓器の標的タンパク質をデンストメトリーによって定量した結果を示す図である。

[図4-1] PBAが小胞体ストレスを緩和することによりcGVHD誘発全身性炎症及び線維化の軽減結果を示す図であり、図4Aは、PBA処理臓器のHE（ヘマトキシリン及びエオシン）染色写真と溶媒ビヒクル処理臓器のHE染色写真である。図4Bは、PBA処理組織及びビヒクル処理組織における一般的な白血球マーカーであるCD45の免疫染色結果を示す図である。図4Cは、PBA処理臓器及びビヒクル処理臓器に対するマロリー染色結果を示す図である。

[図4-2] PBAが小胞体ストレスを緩和することによりcGVHD誘発全身性炎症及び線維化の軽減結果を示す図であり、図4Dは、PBA処理した涙腺及び小腸並びにビヒクル処理した涙腺及び小腸の電子顕微鏡写真である。図

4 E は、P B A 処理臓器及びビヒクル処理臓器における C D 4 5 陽性細胞の密度を示す図である。図 4 F は、P B A 処理小腸及び P B A 処理眼並びにビヒクル処理した小腸及び眼に対する P A S (P e r i o d i c a c i d - S c h i f f s t a i n) 染色結果を示す図である。図 4 G は、P B A 処理小腸及び P B A 処理眼並びにビヒクル処理した小腸及び眼における杯細胞の密度を示す図である。

[図5] P B A が小胞体ストレスを緩和することによる炎症及び線維化の各マーカーの低減結果を示す図である。図 5 A は、P B A 処理マウス及びビヒクル処理マウスから収集した血清中の炎症マーカーである M C P - 1、T N F - α 及び I F N - γ を測定するために骨髄移植の 28 日後に E L I S A を行った結果を示す図である。図 5 B は、線維化マーカーである C T G F のイムノブロット分析を行った結果を示す図である。図 5 C は、各臓器の C T G F をデンシトメトリーにより定量した結果 (P B A 処理臓器及びビヒクル処理臓器) を示す図である。

[図6] 小胞体ストレス緩和剤である P B A を用いた涙腺線維芽細胞における c G V H D 誘発小胞体ストレスの緩和結果を示す図である。図 6 A は、マウスの涙腺線維芽細胞における小胞体ストレスマーカー、活性化マーカー及び線維化マーカーのイムノブロット分析の結果を示す図である。図 6 B は、対応タンパク質バンドの定量分析 (P B A 処理線維芽細胞及びビヒクル処理線維芽細胞) の結果を示す図である。図 6 C は、E L I S A を用いて、P B A 処理線維芽細胞及びビヒクル処理線維芽細胞によって産生された M C P - 1 のタンパク質レベルを測定した結果を示す図である。図 6 D は、P B A 処理線維芽細胞及びビヒクル処理線維芽細胞における I L - 6 及び T G F - β の q P C R 分析結果を示す図である。

[図7] P B A を用いたマクロファージにおける c G V H D に起因する小胞体ストレスの緩和結果を示す図である。図 7 A は、P B A 注入涙腺及びビヒクル注入涙腺の免疫蛍光画像を示す図である。図 7 B は、P B A 投与マウス由来及びビヒクル投与マウス由来の培養脾臓マクロファージの免疫蛍光結果を示

す図である。図7Cは、マウス脾臓マクロファージにおける小胞体ストレス各マーカーのイムノブロット分析結果を示す図である。図7Dは、各タンパク質バンドの対応する定量分析結果を示す図である。図7Eは、脾臓からのM1マクロファージ及びM2マクロファージの各マーカーのqPCR分析結果を示す図である。

[図8] cGVHDと小胞体ストレスとの間の推定される相関を示す図である。

[図9] 小胞体ストレスシグナル伝達経路の概要を示す図である。

[図10] 小胞体ストレスシグナル伝達経路の概要を示す図である。

発明を実施するための形態

[0028] 以下、本発明の具体的な実施形態について詳細に説明するが、本発明は以下の実施形態に何ら限定されるものではなく、本発明の目的の範囲内において、適宜変更を加えて実施することができる。なお、説明が重複する箇所については、適宜説明を省略する場合があるが、発明の要旨を限定するものではない。

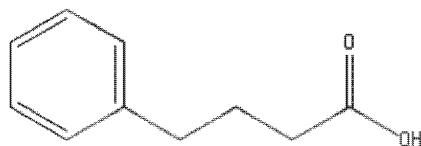
[0029] <移植片対宿主病の治療剤又は予防剤>

本発明の移植片対宿主病の治療剤又は予防剤は、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する。

[0030] (フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩)

本発明におけるフェニル酪酸は、以下の式で表される4-フェニル-n-酪酸（以下、単に「PBA」ともいう。）であることが好ましい。

[0031] [化1]



[0032] 本発明において、「ファイブロサイト浸潤」とは、ある組織中（例えば、涙腺）に、血中からファイブロサイトが浸潤することを意味する。また、「

ファイibroサイト浸潤抑制」とは、結果として、組織中にファイibroサイトが浸潤する状態となることを抑制することを意味する。

また、ファイibroサイトは、線維芽細胞（フィbroblast）と同一であると当業者に認識されている（Disease Models & Mechanisms 2011 May; 4 (3) 318-333（特に325頁））。

[0033] 本発明におけるフェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩は、公知の方法により、準備可能である。例えば、以下のような方法により、フェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩を準備することができる。

[0034] 本発明にかかるフェニル酪酸（例えば、4-Phenyl-n-butyric acid（CAS登録番号：1821-12-1））は、試薬・工業原料等として入手することもできるし、常法に従って合成することもできる。

[0035] 本発明にかかるフェニル酪酸の薬理的に許容される塩とは、カルボキシ基と塩を形成できるものであれば限定されないが、具体的には例えばアルカリ金属、アルカリ土類金属、アミン、塩基性アミノ酸などの塩を挙げることができ、特に、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩がより好ましい。

[0036] また本発明のフェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩は、投与後生体内（表面）で容易に加水分解されるエステル・エーテル等の誘導体（いわゆるプロドラッグ）の形態であってもよい。なお本発明のフェニル酪酸として、3-フェニル-n-酪酸（CAS登録番号：4593-90-2）、2-フェニル-n-酪酸（CAS登録番号：90-27-7）、2-フェニルイソ酪酸（CAS登録番号：826-55-1）、3-フェニルイソ酪酸（CAS登録番号：77-83-8）など他の構造異性体も含まれることは言うまでもない。

[0037] （移植片対宿主病）

本発明における移植片対宿主病の種類としては、特に限定されず、例えば

、その症状が眼、口腔、肝臓、消化管、皮膚、肺等の外分泌腺を備える器官において発現するものが挙げられる。これらのうち、本発明の治療剤又は予防剤は、眼における移植片対宿主病に用いることが好ましい。

[0038] 眼における移植片対宿主病としては、特に限定されないが、例えば、ドライアイ、乾性結膜炎、角膜損傷等、ドライアイに伴う結膜線維化が挙げられる。これらのうち、特に治療又は予防効果に優れることから、治療又は予防対象である眼における移植片対宿主病の疾患は、ドライアイであることが好ましい。

[0039] 口腔における移植片対宿主病としては、特に限定されないが、例えば、口腔乾燥症、皮膚硬化による開口障害等が挙げられる。

[0040] 肝臓における移植片対宿主病としては、特に限定されないが、例えば、急性肝炎等が挙げられる。

[0041] 消化管における移植片対宿主病としては、特に限定されないが、例えば、下痢、食欲不振、嘔吐、上部消化管狭窄や腸梗塞（閉塞）等が挙げられる。

[0042] 皮膚における移植片対宿主病としては、特に限定されないが、例えば、皮膚乾燥症、強皮症等が挙げられる。

[0043] 肺における移植片対宿主病としては、特に限定されないが、例えば、間質性肺炎、閉塞性肺炎等が挙げられる。

[0044] 移植片対宿主病の原因となる移植される臓器としては、特に限定されず、例えば、骨髄、血液（輸血）等が挙げられる。移植片対宿主病は、特に、骨髄移植後に、骨髄由来の造血幹細胞が、移植片対宿主病の原因であるファイブロサイトに分化して、血中を経由して、外分泌腺の組織に浸潤する可能性が指摘されている。しかしながら、本発明の治療剤又は予防剤は、ファイブロサイト浸潤の抑制効果に優れることから、このような骨髄移植後の移植片対宿主病に対して、特に優れた治療又は予防効果を発揮する。このことから、本発明の治療剤又は予防剤の対象の移植片対宿主病は、骨髄移植後の移植片対宿主病であることが好ましい。

[0045] 移植片対宿主病は、慢性移植片対宿主病（cGVHD）であってもよく、

急性移植片対宿主病（acute GVHD : aGVHD）であってもよい。なお、通常、慢性移植片対宿主病とは、移植後、一定期間経過後に発症する移植片対宿主病のことを指し、例えば、古典的な分類では移植後、100日以降に発症する移植片対宿主病を指す。急性移植片対宿主病とは、移植後、一定期間内（慢性移植片対宿主病が発症するまでの期間より短い期間内）に発症する移植片対宿主病を指し、例えば、移植後、古典的には100日以内に発症する移植片対宿主病を指す。現在の分類では時期による分類はなされておらず急性、慢性に典型的で特徴的所見により両者の区別がなされている。本発明の移植片対宿主病の治療剤又は予防剤は、特に、慢性移植片対宿主病に好適に用いることができる。その理由は、線維化抑制に有効であるためと推測される。

[0046] 本発明の治療剤又は予防剤は、軽度、中度、又は重度のいずれの移植片対宿主病にも適用可能であるが、特に、重度の移植片対宿主病の治療又は予防に好適に用いることができる。その理由は、重症例のドライアイでは線維化が著明であるからである。なお、重度の移植片対宿主病とは、通常、涙液分泌の細胞源となる涙腺細胞、角結膜ムチンの分泌上皮細胞、マイボーム腺細胞が重度の障害された眼移植片対宿主病のことを指す。

[0047] 上述のとおり、本発明におけるフェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩は、ファイブロサイト浸潤を特に抑制できる。このことから、本発明における移植片対宿主病は、ファイブロサイト浸潤を伴うものであることが特に好ましい。

[0048] （剤形）

本発明の治療剤又は予防剤の剤形は、特に限定されず、移植片対宿主病の症状が発現する器官に応じて、適宜設定することができるが、例えば、軟膏剤、静脈内注射剤（点滴を含む）、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤、皮下注射剤等の注射剤、坐剤、腫瘍内直接投与剤等に製剤化し、注射用製剤の場合は単位投与量アンプル又は多投与量容器の状態で提供されてよい。特に、本発明の治療剤又は予防剤を、眼における移植片対宿主病の治療剤又は予防剤と

して用いる場合、点眼剤、結膜下注射剤、軟膏剤として用いることが好ましい。

[0049] これらの各種製剤は、製剤上通常用いられる賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、潤滑剤、pH調整剤、界面活性剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤、等張化剤等を適宜用い、常法により製造することができる。

[0050] 本発明の治療剤又は予防剤は、上記製剤化を目的として、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩以外の成分を有してもよいが、有さなくてもよい。より具体的な、本発明の治療剤又は予防剤に含んでもよい成分の例示としては、例えば、メチルセルロース等が挙げられる。

[0051] (投与方法)

本発明の治療剤又は予防剤の投与方法は、特に限定されず、症状が発現した器官に応じて適宜選択することができるが、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により、投与が可能である。特に、眼における移植片対宿主病の場合、点眼、結膜下注射による投与が可能である。

本発明の治療剤又は予防剤は、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。その投与量は、年齢、投与経路、投与回数により異なり、当業者であれば適宜選択できる。

投与量としては特に制限はないが、一般的には、経口または経静脈投与の場合、一回につき体重1kgあたりフェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩が0.1μg～10mg程度の範囲である。

また点眼剤の場合は、一回につき1～数滴を一日に1～数回投与するが、症状により適宜増減することができる。

さらに眼軟膏の場合は、一日に1～数回、適量を塗布する。

[0052] <スクリーニング方法>

本発明は、移植片対宿主病の治療剤又は予防剤の候補物質のスクリーニング方法であって、被験物質を、ヒトを除く、移植片対宿主病のモデル動物に投与する工程と、被験物質が投与された前記モデル動物におけるファイプロ

サイト浸潤の抑制の程度又は小胞体ストレスの抑制の程度を測定する工程と、測定結果に基づいて、移植片対宿主病の治療剤又は予防剤の候補物質として被験物質を選択する工程と、を有するスクリーニング方法、あるいは炎症性サイトカインで刺激されたファイibroブラストの、摘出あるいは培養涙腺組織への浸潤に対する被験物質の抑制効果を評価する工程を有するスクリーニング方法などを包含する。

[0053] (投与工程)

本発明における投与工程は、被験物質を、ヒトを除く、移植片対宿主病のモデル動物に投与する工程である。

[0054] 被験物質は、特に限定されず、天然又は合成の有機又は無機の低分子又は高分子物質等の任意の物質であってよい。

[0055] ヒトを除く、移植片対宿主病のモデル動物の種類は、特に限定されないが、例えば、マウス、ラット、イヌ、ネコ、サル、ブタ、ウシ、ヒツジ、ウサギ等の哺乳動物等を使用することができる。

[0056] 移植片対宿主病のモデル動物は、例えば、マウスの移植片対宿主病のモデル動物を作製する場合、雄のB10.D2 (H-2^d) マウスの骨髓を、雌のBALB/c (H-2^d) マウスに移植することにより、作製することができる。

また、移植片対宿主病の上記モデルマウスで観察される過度の炎症及び線維化は、ヒトで観察される炎症及び線維化に非常に類似している。更に、上記モデルマウスにおいて全身性炎症及び線維化が観察されている (Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, et al. Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonist Attenuates Lacrimal Gland, Lung, and Liver Fibrosis in a Murine Model of Chronic Graft-Versus-Host Disease. PLoS One. 2013; 8:1-11. ; Ogawa Y, Morikawa S, Okano H,

et al. MHC-compatible bone marrow stromal/stem cells trigger fibrosis by activating host T cells in a scleroderma mouse model. eLife. 2016; 5: e09394.)。

[0057] 投与方法は、特に限定されず、例えば、目的とする、症状が発現する器官に応じて適宜選択することができるが、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等の方法で投与してもよい。また、目的とする、症状が発現する器官が、眼である場合、結膜下注射、点眼により投与してもよい。

[0058] (測定工程)

本発明における測定工程は、被験物質が投与された移植片対宿主病のモデル動物におけるファイブロサイト浸潤の抑制の程度を測定する工程である。

[0059] 測定方法は、特に限定されず、従来の公知の方法を使用することができ、例えば、被験物質の投与後のヒトを除く移植片対宿主病のモデル動物から、対象となる組織（涙腺等の外分泌腺の組織）を摘出し、ファイブロサイトのマーカー（例えば、CD45、コラーゲン・タイプI、CXCR4等）又は小胞体ストレスのマーカー（例えば、GRP78、CHOP、p-PERK、p-eIF2 α 、p-IRE1 α 等）を免疫染色等の方法で検出し、ファイブロサイト浸潤の程度（例えば、検出された面積）又は小胞体ストレスの抑制の程度を測定することで、ファイブロサイト浸潤の抑制又は小胞体ストレスの抑制の程度の程度を測定することができる。この測定結果に基づいて、後述の選択工程において、候補物質を選択することができる。

[0060] 本発明における測定工程は、ファイブロサイト浸潤の抑制の程度又は小胞体ストレスの抑制の程度以外のものを測定してもよく、測定しなくてもよい。そのような測定してもよい対象としては、例えば、粘膜における杯細胞の数、組織中の炎症の程度、マーカーとなる遺伝子（例えば、繊維化のマーカーとなる遺伝子（例えば、前線維化メディエーター結合組織成長因子（CT

G F))、炎症性のマーカーとなる遺伝子（例えば、NF- κ B、TNF- α 、MCP-1、TNF- α 、IFN- γ 等）のmRNAの発現量等が挙げられる。これらの測定結果を、ファイブロサイト浸潤の抑制の程度の測定結果と組み合わせて、後述の選択工程において、被験物質を移植片対宿主病の治療剤又は予防剤の候補物質として選択してもよい。

なお、CTGFは線維化のマーカーとなることが知られている (D z i a d z i o M, U s i n g e r W, L e a s k A, e t a l. N - t e r m i n a l c o n n e c t i v e t i s s u e g r o w t h f a c t o r i s a m a r k e r o f t h e f i b r o t i c p h e n o t y p e i n s c l e r o d e r m a. Q J M : A n I n t e r n a t i o n a l J o u r n a l o f M e d i c i n e. 2005;98:485-492.)。

[0061] (選択工程)

選択工程は、上記測定結果に基づいて、移植片対宿主病の治療剤又は予防剤の候補物質として被験物質を選択する工程である。

[0062] 選択方法は、特に限定されず、従来公知の選択方法により候補物質を選択すればよい。例えば、ヒトを除く移植片対宿主病のモデル動物の被験物質の投与前の組織中のファイブロサイト浸潤の程度と比較して、被験物質がファイブロサイト浸潤を抑制したという結果に基づいて、被験物質を候補物質として選択してもよい。また、あらかじめ測定した他の物質（例えば、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩）を、ヒトを除く移植片対宿主病のモデル動物に投与したときの測定結果と比較して、被験物質を候補物質として選択してもよい（例えば、移植片対宿主病の治療効果を有するフェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を、ヒトを除く移植片対宿主病のモデル動物に投与したときの測定結果と比較して、同様の測定結果である場合、その被験物質を候補物質として選択することができる）。

[0063] 上記の測定工程において、ファイブロサイト浸潤の抑制の程度以外のもの（粘膜における杯細胞の数、組織中の炎症の程度、マーカーとなる遺伝子の

mRNAの発現量等)を測定した場合、これらの測定結果を、ファイブロサイト浸潤の抑制の程度の測定結果と組み合わせて、被験物質を移植片対宿主病の治療剤又は予防剤の候補物質として選択してもよい。例えば、ファイブロサイト浸潤の抑制効果が示された被験物質について、該被験物質のモデル動物への投与後に更に、粘膜における杯細胞の数、組織中の炎症の程度、もしくはマーカーとなる遺伝子のmRNAの発現量、又はこれらのうち2つ以上を測定して、それぞれの効果(つまり、粘膜における杯細胞の数の減少の抑制効果、組織中の炎症の抑制効果、マーカーとなる遺伝子のmRNAの発現量の減少もしくは促進効果、又はこれらのうち2つ以上の効果)があることを確認してから、該被験物質を移植片対宿主病の治療剤又は予防剤の候補物質として選択してもよい。

[0064] (その他の工程)

本発明のスクリーニング方法は、上記で述べた工程以外の工程を有してもよく、有さなくてもよい。本発明のスクリーニング方法が、有してもよい工程としては、特に限定されないが、例えば、移植片対宿主病の治療剤又は予防剤の候補物質として選択した被験物質を、ヒトを除く移植片対宿主病のモデル動物に投与して、その治療又は予防効果を確認する工程が挙げられる。

[0065] <ファイブロサイト浸潤抑制剤>

本発明は、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、ファイブロサイト浸潤抑制剤を包含する。

[0066] 本発明のファイブロサイト浸潤抑制剤は、上記の移植片対宿主病の治療剤又は予防剤と同様のもの(同様のフェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩、同様の剤型、同様の投与方法、同様の成分等)を用いることができる。

[0067] <杯細胞の減少の抑制剤>

本発明は、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、杯細胞の減少の抑制剤を包含する。杯細胞の種類は、結膜杯細胞であることが好ましい。

[0068] 本発明の杯細胞の減少の抑制剤は、上記の移植片対宿主病の治療剤又は予防剤と同様のもの（同様のフェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩、同様の剤型、同様の投与方法、同様の成分等）を用いることができる。

[0069] <涙液減少抑制剤>

本発明は、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を有効成分として含有する、涙液減少抑制剤を包含する。

[0070] 本発明において、「涙液減少」とは、例えば、上述した移植片対宿主病（例えば、ドライアイ）による症状としての涙液減少のことを指す。

[0071] 本発明の涙液減少抑制剤は、上記の移植片対宿主病の治療剤又は予防剤と同様のもの（同様のフェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩、同様の剤型、同様の投与方法、同様の成分等）を用いることができる。

[0072] <移植片対宿主病の治療又は予防方法>

本発明は、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩をそれを必要とする患者に投与することを含む、移植片対宿主病の治療又は予防方法を包含する。本発明の方法において、上述の移植片対宿主病の治療又は予防剤と同様のもの（同様のフェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩、同様の剤型、同様の投与方法、同様の成分等）を用いることができる。

[0073] <ファイブロサイト浸潤抑制方法>

本発明は、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩をそれを必要とする患者に投与することを含む、ファイブロサイト浸潤抑制方法を包含する。上述の本発明の方法において、ファイブロサイト浸潤抑制剤と同様のもの（同様のフェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩、同様の剤型、同様の投与方法、同様の成分等）を用いることができる。

[0074] <杯細胞の減少の抑制方法>

本発明は、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩をそれを必要とする患者に投与することを含む、杯細胞の減少の抑制方法を包含する。上述の本発明の方法において、杯細胞の減少の抑制剤と同様のもの（同様のフェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩、同様の剤型、同様の投与方法

法、同様の成分等）を用いることができる。

[0075] ＜涙液減少抑制方法＞

本発明は、フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩をそれを必要とする患者に投与することを含む、涙液減少抑制方法を包含する。上述の本発明の方法において、涙液減少抑制剤と同様のもの（同様のフェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩、同様の剤型、同様の投与方法、同様の成分等）を用いることができる。

実施例

[0076] 以下、本発明の実施例を記載する。なお、本発明は以下の実施例の記載に限定されるものではない。

[0077] ＜方法＞

（骨髄移植）

8週齢のB10.D2マウス及びBALB/cマウスは三共研究所（東京、日本）から購入した。

骨髄移植をcGVHDのマウスモデルに行った（Zhang Y, McCormick LL, Desai SR, Wu C, Gilliam AC. Murine Sclerodermatous Graft-Versus-Host Disease, a Model for Human Scleroderma: Cutaneous Cytokines, Chemokines, and Immune Cell Activation. The Journal of Immunology. 2002;168:3088-3098.）。

ドナーがB10.D2マウスであり、レシピエントがBALB/cマウスであった場合、それは同種異系骨髄移植となり、cGVHDのマウスモデルを発現した。

対照的に、BALB/cマウスからBALB/cマウスへの骨髄移植は同系骨髄移植であり、cGVHDは移植レシピエントには起こらなかった。

cGVHDを発現しないレシピエントマウスを対照（コントロール）とし

た。

レシピエントに骨髓移植の前に700cGyを照射し、Gamma cell 137 Cs線源（日立メディコ社製）を用いて致死照射を行った。ドナーからの 1×10^6 個の骨髓細胞及び 2×10^6 個の脾臓細胞を含有する懸濁液を尾静脈を介して各レシピエントマウスに投与した。

ドナー細胞をRPMI 1640（Life Technologies Japan社製）に懸濁した。

[0078]（同種異系骨髓移植レシピエントマウスのPBAによる治療）

上記（骨髓移植）に記載のように骨髓移植を実施し、同種異系骨髓移植レシピエントマウスを2群に分けた。

一方の群はPBA（10mg/kg）（Aldrich社製）で腹腔内注射により処理し、他方は腹腔内注射により溶媒ビヒクル・リン酸緩衝食塩水（PBS）（pH7.4）処理した。

骨髓移植後10日目から27日目まで、同種異系骨髓移植レシピエントにPBA又は溶媒ビヒクルを1日1回投与した。

骨髓移植後28日目にサクリファイした。

本願明細書において、cGVHD罹患臓器（眼窩外涙腺、小腸の近位部、背側皮膚、肝臓、唾液腺、肺、大腸及び眼）を分析した。

[0079]（組織学的分析及び免疫組織化学）

骨髓移植の3又は4週間後、眼窩外涙腺、小腸の近位部、背側皮膚、肝臓、唾液腺、肺、大腸及び眼を移植レシピエントから採取した。

その後、これらの試料を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。

パラフィンプロックを7µm厚の切片に切断し、

（1）ヘマトキシリン及びエオシン、

（2）マロリー3色染色（Hopwood J. Fixation and fixtative. In: Bancroft JD, Stevens A, eds. Theory and Practice of

Histological Techniques 4th ed Edinburgh: Churchill-Livingstone 1996:23-46.; Anderson G, Gordon K. Tissue processing, microtomy and paraffin sections. In: Bancroft JD, Stevens A, eds. Theory and Practice of Histological Techniques 4th ed Edinburgh: Churchill-Livingstone. 1996:47-68.) 及び

(3) 抗体で染色した。

[0080] 免疫組織化学的アッセイのために、まず、パラフィンを除去し、続いて以下の2つの抗原回収法のいずれかを用いて抗原を回収した。

(A) CD45抗体(30-F11、BD Pharmingen社製)で切片を染色するために、それらを抗原回収溶液(Target Retrieval Solution; Dako社製)に浸し、次いで電子レンジオーブンで10分間沸騰した。

(B) CD68(FA-11、Abd Serotec社製)及びCHOP(F-168、Santa Cruz Biotechnology社製)の多重染色の場合、切片を抗原回収溶液(HistoVT One; ナカライテスク社製)を用いて洗浄し、続いて90℃で40分間水浴で加熱した。次に、切片を10%正常ヤギ血清でブロックし、組織切片中の抗原と一次抗体との間の反応を4℃で一晩行なった。

次いで、切片を室温(例えば、1~30℃)45分間フルオロフォア標識した二次抗体で処理し、退色防止用マウントメディウム(Fluorescent Mounting Medium; Dako社製)でマウントした。

[0081] 蛍光画像をLSM共焦点顕微鏡(Carl Zeiss社製)で撮影した。

CD45⁺細胞の計数に関しては、各組織切片の5つの領域を200倍の倍率で無作為に撮影し、続いて個々の画像におけるCD45⁺細胞の数を決定した。

二次抗体として、ヤギ抗マウスIgG (H+L) 二次抗体、Alexa Fluor 488コンジュゲート (Molecular Probes社製) 及びヤギ抗ラットIgG (H+L) 二次抗体、Alexa Fluor 568コンジュゲート (Molecular Probes社製) を使用した。

アイソタイプコントロールに関して、ラットIgG2b、 κ (eB149/10H5、eBioscience社製)、ラットIgG2a (54447、R&D Systems社製) 及びウサギIgG (Cell Signaling Technology社製) をCD45、CD68及びCHOPのためにそれぞれ使用した。

[0082] (マウス涙腺由来線維芽細胞の培養)

マウス涙腺に由来する線維芽細胞を、Yaguchiらによって報告された確立された方法を用いて培養した (Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, et al. Presence and Physiologic Function of the Renin–Angiotensin System in Mouse Lacrimal Gland. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2012;53:5416–5425)。

マウス涙腺を採取し、続いて小片に切断した。組織断片を5%ウシ胎児血清 (FBS) (Sigma社製) 及び5%の抗生物質を含むDMEM (Life Technologies Japan社製) 中37℃でインキュベートした。

抗生物質は、硫酸ストレプトマイシン (明治製菓ファーマ社製) とベンジルペニシリンカリウム (明治製菓社製) の1:1混合物を用いた。

線維芽細胞は、3～4日後に細かく切ったものから増殖を開始した。

線維芽細胞を、5%のFBS及び5%の抗生物質を含むDMEM中で培養し、3～5継代後に実験に使用した。トリプシン（Becton Dickinson社製）を使用して、線維芽細胞を培養皿から分離した。

[0083]（脾臓マクロファージの培養）

Alatery及びBestaの方法に準じてマウス脾臓マクロファージを培養した（Alatery A, Basta S. An efficient culture method for generating large quantities of mature mouse splenic macrophages. J Immunol Methods. 2008; 338: 47–57）。

5%FBSを含むRPMI中に懸濁した脾細胞を培養皿に播種し、37℃で一晩放置した。次いで、浮遊細胞を除去した。皿に付着した所望の細胞を、組換えマウスM-CSF（5 ng/mL）（Peprotech社製）、5%FBS及び5%抗生物質を含むRPMI中で7日間培養した。誘導されたマクロファージは、その後、アキュターゼ（Thermo Fisher Scientific社製）を利用して培養皿から分離し、実験に使用した。

[0084]（培養マクロファージの免疫染色）

誘導したマクロファージを8ウェルチャンバースライド（Fibronectin Culture Slide; Corning社製）に入れ、10%中性緩衝化ホルマリンで固定した。次いで、0.3%過酸化水素を含有するメタノールで室温で30分間ブロックし、一次抗体CD68（AbD Serotec社製）及びCHOP（Santa Cruz社製）と共に4℃で一晩インキュベートした。次いで、切片を、ヤギ抗マウスIgG（H+L）二次抗体、Alexa Fluor 568コンジュゲート（Molecular Probes社製）及び4'、6-ジアミジノー2-フェニルインドール（DAPI）（Life Technologies社製）を用

いて室温で45分間処理し、退色防止用のマウント媒体（D a k o社製）でマウントした。

蛍光画像をL S M共焦点顕微鏡（C a r l Z e i s s社製）で撮影した。

[0085] （電子顕微鏡）

透過電子顕微鏡分析は標準的なプロトコールに従って行った。

マウス涙腺及び小腸から組織を採取し、直ちに0.1Mリン酸緩衝液（pH7.4）中2.5%グルタルアルデヒドで4℃4時間固定し、0.1Mリン酸緩衝液で3回洗浄した。続いて試料を2%オスミウム四酸化物で再び固定し、段階的な一連のエタノール及び100%プロピレンオキシド中で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。処理した組織から1μmの切片を作製し、次いでメチレンブルーで染色した。厚い切片を顕微鏡で観察し、超薄切片の調製に適した部分を見いだした。得られた切片をメッシュグリッド上に置き、ウランアセテート及びクエン酸鉛で染色し、電子顕微鏡（1230 EX II；J O E L社製）で調べた。全ての電子顕微鏡写真は、バイオスキャンカメラ（ガタンバイオスキャンカメラモデル792）を用いて取得した。

[0086] （定量的ポリメラーゼ連鎖反応）

m i R N e a s yミニキット（Q i a g e n社製）を用いて、眼窩外涙腺、小腸近位部分、背側皮膚、肝臓、培養線維芽細胞及び培養マクロファージから全RNAを抽出し、R e v e r T r a A c e q P C R R Tキット（東洋紡績社製）を用いて対応する相補的DNAを合成した。

T a q M a nリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（P C R）の使用による下記遺伝子のmRNA発現を分析するために使用されるプライマーは、A p p l i e d B i o s y s t e m s社製から購入した。

ハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド3-リン酸（G A P D H）、グルコース調節タンパク質78（G R P 7 8）、インターロイキン-1β（I L - 1 β）、I L - 6、I L - 1 0、マクロファージ化学誘引物質タンパク質-1（M C P - 1）及び転写増殖因子-β（T G F）。

Step One Plusシステム（Applied Biosystems社製）を用いて定量的リアルタイムPCRを行い、得られたデータを解析するために $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用い、mRNAの発現を測定するための内部標準としてGAPDHを用いた。

[0087]（イムノブロットング分析）

目的の組織をエッペンドルフチューブに入れ、予め冷却したRIPA緩衝液をチューブに添加した。次いで、組織を電気ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。

各サンプルを氷上で1時間放置した後、15000rpm、4℃で5分間遠心分離した。その後、上清を氷上で新鮮なチューブに回収し、細胞溶解物として使用した。等量の5×Laemmli緩衝液を各細胞溶解物に添加し、続いて100℃で5分間タンパク質変性させた。

[0088] 各サンプルからの同量のタンパク質をSDS-PAGEゲルのウェルに充填し、次いで溶解した。タンパク質をゲルから15Vで20分間膜にトランスファーした。

膜を1×TBST（トリス緩衝食塩水及びTween 20の混合物）中の5%スキムミルク又は5%BSA（ウシ血清アルブミン）で室温1時間ブロックした。

次いで、膜を一次抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。上記一次抗体は、1×TBST中の5%スキムミルク又は5%BSAで1000倍に希釈した。一次抗体とインキュベーション後、膜を1×TBST（3×10分）で洗浄し、室温で1時間二次抗体に供し、次いで1×TBST（3×10分）及び1×TBS（2×10分）で洗浄した。

[0089] 関心対象のタンパク質は、以下の2つの方法のいずれかを用いて視覚化した。

（1）BCIP／NBT基質（Promega社製）を用いて、標的タンパク質の比色検出を行った。

（2）シグナルは、増強化学発光（ECL）検出試薬（GE Health

care社製)を用いて現像し、その後、標的タンパク質をLAS4000ミニ化学発光イメージングシステム(富士フイルム/GE Healthcare社製)で視覚化した。

[0090] 得られたタンパク質バンドの濃度測定分析は、画像処理ソフトウェアImageJを用いて行った。この実験で用いた一次抗体は、GRP78 (Abcam社製)、phospho-PERK (Thr980; Cell Signaling Technology社製)、PERK (C33E10; Cell Signaling Technology社製)、phosphor-IRE1 α (Thermo Fisher Scientific社製)、IRE1 α (14C10; Cell Signaling Technology社製)、phosphor-eIF2 α (119A11; Cell Signaling Technology社製)、eIF2 α (Cell Signaling Technology社製)、CHOP (9C8; Thermo Fisher Scientific社製)、TXNIP (D5F3E、Cell Signaling Technology社製)、NF- κ B (Abcam社製)、HSP47 (SPA-470; Stress Gen Biotechnologies社製)、CTGF (Abcam社製)及び β -アクチン (AC-15; Abcam社製)を用いた。

[0091] 二次抗体は、(1)タンパク質バンドを発色させて可視化した場合、AP結合抗マウスIgG抗体 (Promega社製)又はAP結合抗ウサギIgG抗体 (Promega社製)のいずれかを用い、(2)標的タンパク質をECLで検出するためには、HRP結合抗マウス抗体 (Thermo Fisher Scientific社製)又はHRP結合抗ウサギ抗体 (Thermo Fisher Scientific社製)を用いた。

[0092] (酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA))

血液をPBA処理マウス及びビヒクル処理マウスから採取し、続いて4000rpmで10分間遠心分離した。

得られた血清中のMCP-1レベル、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) レベル及びインターフェロン- γ (IFN- γ) レベルを、ELISAセット (Becton Dickinson社製) を用いて測定した。

これらのアッセイは、製造者Becton Dickinson社によって提供されたプロトコールに従って行われた。

[0093] (統計分析)

統計的有意性は、マンホイットニーU検定 (対応のない2群の差の検討) の使用によって決定した。差は、 $P < 0.05$ の場合に有意であると考えられる。取得されたデータは、平均値 $\pm$ SD (標準偏差) として示した。

[0094] <結果>

[cGVHDに罹患した臓器における小胞体ストレスマーカーの上昇]

小胞体ストレスマーカーを測定することにより、cGVHD罹患臓器において小胞体ストレスが上昇するか否かを調査した。

まず、cGVHD罹患臓器及び対照被験体におけるGRP78のqPCR分析を行った。結果を図1Aに示す。

図1A中、データは、平均値 $\pm$ SD、対照： $n=5$ 、cGVHD： $n=4 \sim 5$ 、 $*P < 0.05$ として示す。

[0095] 小胞体ストレスマーカー及び関連炎症マーカーのイムノブロット分析を行った。結果を図1Bに示す。

図1B中、レーン1、3、5、7は、同系対照被験体であり、レーン2、4、6、8はcGVHD罹患臓器である。

[0096] 各タンパク質バンドに対応する定量分析を行った。結果を図1Cに示す。

図1C中、データは、平均 $\pm$ SD、対照： $n=4$ 、cGVHD： $n=4$ 、 $*P < 0.05$ として示す。

[0097] 図1A～Cに示した結果から明らかなように、リアルタイム定量PCR (qPCR) 及びイムノブロット分析から、

(1) 小胞体ストレスマーカーであるGRP78、CHOP、p-PERK、p-eIF2 α 及びp-IRE1 α が、cGVHDに罹患したマウス臓器

において、コントロール（対照）被検体に比べて増加したことが分かり、

（２）それに応じて、２つの炎症マーカーNF- κ B及びTXNIPが、cGVHD罹患臓器において活性化及び／又は増加したことが分かる。

[0098] 図１Dは、cGVHDに罹患した涙腺及びその同系対照の涙腺における上皮細胞の電子顕微鏡写真を示す図である。写真は２０００倍の倍率で撮影し、スケールバーは５ μ mを表す。cGVHDに罹患した涙腺上皮写真において、＊は、タンパク質の蓄積のために小胞体が肥大した箇所を示す。

図１Dに示した電子顕微鏡写真から明らかなように、cGVHD罹患涙腺上皮において、ミスフォールドした／フォールディングしていないタンパク質の蓄積が、小胞体を肥大させた（図１D中＊）。

逆に、コントロール（対照）中の小胞体は無傷のようであった。

これら知見から、cGVHDに罹患した臓器において小胞体ストレスが上昇することが分かった。

[0099] [小胞体ストレス誘導性炎症経路のPBAによる失活]

次に、PBAによる小胞体ストレスの低減を介してcGVHDの治療を試験した。

上記＜方法＞に示すように、同種異系骨髄移植を受けたマウスをPBA又は溶媒ビヒクルで処理した。

図２は、PBA処理マウス群及びビヒクル処理マウス群の生存％（図２A）及び体重変化（図２B）を示す図である。

図２A中、値は、平均値 $\pm$ SE（標準誤差）であり、 $n=14$ 、 $*P<0.05$ として示す。

図２B中、値は、平均値 $\pm$ SEであり、 $n=10$ 、 $***P<0.001$ として示す。

図２Aから明らかなように、PBA処理マウス群は、ビヒクル処理マウス群よりも生存率が高かった。

図２Bから明らかなように、ビヒクル処理マウス群はPBA処理マウス群に比べて体重が減少した。

また、ビヒクル処理マウス群の幾匹かは（１）体毛が抜ける及び／又は（２）臥していた。

[0100] 次に、イムノブロット分析を実施して、cGVHD標的臓器における小胞体ストレスマーカー及び関連炎症マーカーのタンパク質レベルを試験した。結果を図３Ａに示す。

図３Ａ中、レーン１、３、５、７、９、１１、１３はPBA処理臓器であり、レーン２、４、６、８、１０、１２、１４はビヒクル処理臓器である。

[0101] 続いて、PBA処理臓器及びビヒクル処理臓器について、各臓器の標的タンパク質をデンストメトリーによって定量した。結果を図３Ｂに示す。

図３Ｂ中、データは平均値±SD、PBA：n=4、ビヒクル：n=4、* $P<0.05$ として示す。

[0102] 図３Ａ及びＢに示した結果から明らかなように、イムノブロット分析は、PBA処理マウスから採取した臓器が、ビヒクル処理マウス由来の臓器と比較して、GRP78、CHOP、p-PERK、p-eIF2 α 及びp-IRE1 α のタンパク質レベルが低かった。

図３Ａ及びＢに示したように、結果的に、関連する炎症促進分子NF- κ B及びTXNIPが、ビヒクル処理された臓器と比較して、PBA処理された臓器において抑制されたことがわかる。

すなわち、cGVHDに起因するマウスの臓器における小胞体ストレスがPBAによって緩和され得、それに応じて小胞体ストレス関連の炎症促進分子NF- κ B及びTXNIPが大幅に抑制されることがわかる。

ここで、上皮間葉移行がヒト眼球cGVHDで観察される線維化と関連し、TXNIPが上皮間葉転換と関連していることが知られている（Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Yoshida S, Kawakami Y, Tsubota K. Epithelial Mesenchymal Transition in Human Ocular Chronic Graft-Versus-Host Disease. The American Journal o

f Pathology. 2009;175:2372-2381.; Wei J, Shi Y, Hou Y, et al. Knockdown of thioredoxin-interacting protein ameliorates high glucose-induced epithelial to mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. Cell Signal. 2013;25:2788-2796.)。

したがって、PBAは、TXNIPの発現を低下させることによって上皮間葉転換を排除するため、cGVHD誘発性の全身性線維化を緩和することができるかと推測される。

[0103] [cGVHD標的器官の組織学的観察]

PBAが小胞体ストレスを緩和することによりcGVHD誘発性の全身性炎症及び線維化が軽減された。結果を図4A～Gに示す。

図4Aは、PBA処理臓器のHE（ヘマトキシリン及びエオシン）染色写真と溶媒ビヒクル処理臓器のHE染色写真である。

図4A中、画像は倍率200倍で、スケールバーは200 μ mで撮影した。

重度の炎症部分は*で示した。ビヒクル処置皮膚の画像では、脂肪組織が失われた箇所に楕円を付した。

PBA処理皮膚及びビヒクル処理皮膚の厚さも矢印で示した。ビヒクルによる眼の写真では、マイボーム腺が縮小し収縮した箇所に楕円を付し、結膜上皮は矢印で示した。

[0104] 図4Bは、PBA処理組織及びビヒクル処理組織における一般的な白血球マーカーであるCD45の免疫染色結果を示す図である。

図4B中、画像は倍率200倍で、スケールバーは20 μ mで撮影した。

細胞の細胞質ゾル及び核は、それぞれ赤色及び青色に染色された。

[0105] 図4Cは、PBA処理臓器及びビヒクル処理臓器に対するマロリー染色結

果を示す図である。

図4 C中、写真は200倍の倍率で撮影し、スケールバーは200 μ mを示す。異常な線維化領域は*で示した。

[0106] 図4 Dは、PBA処理した涙腺及び小腸並びにビヒクル処理した涙腺及び小腸の電子顕微鏡写真である。

図4 D中、涙腺のストローマ（左）と小腸の上皮細胞（右）の写真は2000倍の倍率で撮影し、スケールバーは5 μ mである。涙腺の血管の写真（中央）は倍率15000倍で、スケールバーは500 nmである。

図4 D中、Capは毛細血管を示し、Mはミトコンドリアを示す。

ビヒクル処理涙腺の写真では、タンパク質の蓄積により小胞体が肥大した箇所*を付し、細胞破片が長方形で示した。

ビヒクル処理小腸の画像では、微絨毛が破壊された箇所に楕円を付し、損傷組織は矢印で示した。

[0107] 図4 Eは、PBA処理臓器及びビヒクル処理臓器におけるCD45陽性細胞の密度を示す図である。

図4 E中、データは、平均値 $\pm$ SDであり、PBA : n = 3、ビヒクル : n = 3、*P < 0.05、**P < 0.01、***P < 0.001として示す。

[0108] 図4 Fは、PBA処理小腸及びPBA処理眼並びにビヒクル処理した小腸及び眼に対するPAS (Periodic acid-Schiff stain) 染色結果を示す図である。画像は200倍の倍率で撮影し、スケールバーは200 μ mである。

杯細胞は、紫色の点として染色された。

[0109] 図4 Gは、PBA処理小腸及びPBA処理眼並びにビヒクル処理した小腸及び眼における杯細胞の密度を示す図である。

図4 G中、数値は、平均値 $\pm$ SDであり、PBA : n = 3（小腸）、ビヒクル : n = 3（小腸）、PBA : n = 5（眼）、ビヒクル : n = 5（眼）***P < 0.001として示した。

[0110] 図4 A及びCに示したcGVHD罹患臓器のHE（ヘマトキシリン及びエ

オシン) 染色及びマロリー (3 色) 染色は、PBA を用いた小胞体ストレスの低減が cGVHD の有効な治療法になり得ることを示している。

図 4 A に示した HE 写真から分かるように、炎症細胞の浸潤が、PBA 処理臓器において、ビヒクル処理臓器と比較して抑制されたことがわかる。

特に、(1) PBA で処理した小腸及び大腸の腸絨毛は、溶媒ビヒクルで処理した小腸及び大腸とは対照的に損なわれていないことが見て取れ、

(2) PBA 処理皮膚とは対照的にビヒクル処理皮膚は肥厚し、脂肪組織を失い、コラーゲン束の密度が上昇し、

(3) ビヒクル処理眼のマイボーム腺は、PBA 処理マイボーム腺と比較して減少し、収縮し、

(4) PBA 処理結膜上皮とは対照的に、ビヒクル処理結膜上皮の菲薄化及び損傷が観察され、PBA の全身注射によってシンプルフアロンが予防できることが示唆された。

[0111] 図 4 C 及び E に示した免疫染色及びその後の CD45⁺ 細胞の計数から分かるように、PBA 処理臓器中の炎症細胞の数は、ビヒクル処理臓器中の炎症細胞の数よりもかなり少なかった。これら知見はまた、PBA 処理臓器における免疫細胞の移動及び増殖の抑制を示している。

さらに、全身性線維化は、cGVHD における最も重大な問題の 1 つである (Ogawa Y, Morikawa S, Okano H, et al. MHC-compatible bone marrow stromal/stem cells trigger fibrosis by activating host T cells in a scleroderma mouse model. eLife. 2016; 5: e09394.)。

[0112] 図 4 C に示したマロリー染色の結果から、cGVHD 誘発性の全身性の線維化が、ビヒクル処理臓器と比較して、PBA 処理によって実質的に抑制されることが明らかになった。

図 4 D に示した涙腺の電子顕微鏡写真の結果から、涙腺を溶媒ビヒクルで

処理した場合、（１）フォールディングしていない／ミスフォールドしたタンパク質の蓄積により上皮細胞及び内皮細胞の小胞体が肥大していること、
（２）小胞体には、ストローマに多量の細胞破片が存在すること、
（３）血管内の上皮細胞及び内皮細胞のミトコンドリアが損傷したことがわかる。

これら結果は、PBAがcGVHDに起因する小胞体ストレスから血管を保護し、それによって免疫細胞の組織への移動を抑制することを示唆している。

[0113] また、図4Dに示した小腸の電子顕微鏡写真分析の結果から、小腸を溶媒ビヒクルで処理した場合、その小絨毛が破壊され、隣接する組織が損傷していることがわかる。

これらの組織学的所見は、PBA処理涙腺及びPBA処理小腸では観察されなかった。

[0114] さらに、図4F及びGに示したPAS（Periodic acid-Schiff stain）染色の結果から、（１）PBA処理小腸及びPBA処理結膜上皮の杯細胞が、ビヒクル注入対応物の杯細胞よりも多いこと、
（２）腸粘膜及び結膜粘膜の構造は、PBAの全身注射によって保持されることがわかった。

以上の組織学的観察からわかるように、PBAは、cGVHD関連小胞体ストレスによって誘発される全身性炎症及び線維化を緩和することができる。

[0115] [炎症性メディエーター及び前線維化メディエーターのPBAによる低減]

PBAがcGVHDに起因する全身性炎症を緩和するか否かをより詳細に調査するために、PBA処理マウス及びビヒクル処理マウスから収集した血清中の炎症マーカーMCP-1、TNF- α 及びIFN- γ のレベルを測定するELISAを行った。

図5AはPBA処理マウス及びビヒクル処理マウスから収集した血清中の炎症マーカーであるMCP-1、TNF- α 及びIFN- γ を測定するため

に骨髓移植の28日後にELISAを行った結果を示す図である。

図5A中、データは平均値±SD、PBA：n=4、ビヒクルn=4、*P<0.05として示す。

図5Aに示したように、PBA処理マウスの血清は、炎症マーカーであるMCP-1、TNF- α 及びIFN- γ のタンパク質レベルが、ビヒクル処理マウスと比較して低かった。

[0116] さらに、cGVHD誘発全身性線維化の緩和についてより詳細な調査を行った。

図5Bは線維化マーカーである前線維化メディエーター結合組織成長因子(CTGF)のイムノブロット分析を行った結果を示す図である。

図5B中、レーン1、3、5、7はPBA処理臓器を示し、レーン2、4、6、8はビヒクル処理臓器を示す。

[0117] 図5Cは各臓器のCTGFをデンストメトリーにより定量した結果(PBA処理臓器及びビヒクル処理臓器)を示す図である。

データは平均値±SD、PBA：n=4、ビヒクルn=4、*P<0.05として示す。

[0118] 図5B及びCに示したように、イムノブロット分析により、CTGFがビヒクル処理臓器で過剰発現したが、PBA処理臓器では観察されなかった。これは、PBAがCTGFのcGVHD誘導性過剰発現を抑制しているといえる。

以上のデータは、PBAがcGVHD誘導性小胞体ストレスを抑制し、結果として全身性炎症及び線維化を緩和できることを示しており、cGVHD誘導性の身体障害を緩和できることを示している。

[0119] [小胞体ストレスと機能不全線維芽細胞との相関]

cGVHDに起因する全身性線維化は重大な問題であり、多臓器不全を引き起こす(Ogawa Y, Morikawa S, Okano H, et al. MHC-compatible bone marrow stromal/stem cells trigger fibros

is by activating host T cells in a scleroderma mouse model. eLife. 2016; 5: e09394.)。

cGVHD誘発性線維化のメカニズムはまだ解明されていないが、線維化の発生には線維芽細胞が関係している可能性がある (Ogawa Y, Razaque MS, Kameyama K, et al. Role of Heat Shock Protein 47, a Collagen-Binding Chaperone, in Lacrimal Gland Pathology in Patients with cGVHD. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2007; 48: 1079-1086.)。

いくつかの生物学的シグナルは線維芽細胞を刺激し、創傷治癒などのいくつかの生物学的プロセスにおいて不可欠な役割を果たし得る。しかし、線維芽細胞が制御されない様式で活性化されると異常なコラーゲン束を生成し、その異常の原因についてはほとんど知られていないものの、重篤な線維化を誘発する (Darby LA, Hewitson TD. Fibroblast Differentiation in Wound Healing and Fibrosis. International of Review of Cytology. 2007; 257: 143-179. ; Kendall R, Feghali-Bostwick CA. Fibroblasts in fibrosis : novel roles and mediators. Front Pharmacol. 2014; 5: 1-13.)。

[0120] そこで、cGVHD誘発小胞体ストレスと機能不全線維芽細胞との相関を鋭意調査する観点から、PBA処理マウス涙腺及びビヒクル処理マウス涙腺からの線維芽細胞を培養した。

PBAが小胞体ストレスを緩和することにより涙腺線維芽細胞におけるc

G V H D 誘発小胞体ストレスが緩和された結果を図 6 A ～ D に示す。

図 6 A は、マウスの涙腺線維芽細胞における小胞体ストレスマーカー、活性化マーカー及び線維化マーカーのイムノブロット分析の結果を示す図である。

図 6 A 中、レーン 1 は P B A 処理涙腺由来線維芽細胞を示し、レーン 2 はビヒクル処理涙腺由来線維芽細胞を示す。

[0121] 図 6 B は、対応タンパク質バンドの定量分析（P B A 処理線維芽細胞及びビヒクル処理線維芽細胞）の結果を示す図である。

図 6 B 中、データは平均値 ± S D、P B A : n = 4、ビヒクル : n = 4、* P < 0. 0 5 として示す。

[0122] 図 6 C は、E L I S A を用いて、P B A 処理線維芽細胞及びビヒクル処理線維芽細胞によって産生された M C P - 1 のタンパク質レベルを測定した結果を示す図である。

図 6 C 中、データは平均値 ± S D、P B A : n = 4、ビヒクル : n = 4、* P < 0. 0 5 として示す。

[0123] 図 6 D は、P B A 処理線維芽細胞及びビヒクル処理線維芽細胞における I L - 6 及び T G F - β の q P C R 分析結果を示す図である。

図 6 D 中、値は平均値 ± S D、P B A : n = 4、ビヒクル : n = 4、* P < 0. 0 5 として示す。

[0124] 図 6 A に示した培養線維芽細胞のイムノブロット分析の結果から明らかなように、G R P 7 8、C H O P、リン酸化 P E R K、リン酸化 e I F 2 α 及びリン酸化 I R E 1 α が溶媒ビヒクル処理マウスと比較してマウスを P B A で処理することによって大きく抑制されたことがわかる。

したがって、図 6 A ～ D に示した結果から明らかなように、ビヒクル処理線維芽細胞と比較して P B A 処理線維芽細胞では、（１）H S P 4 7、C T G F、線維芽細胞活性化マーカー及び線維化マーカーの各々のタンパク質レベル、（２）M C P - 1 の産生及び（３）I L - 6 の m R N A レベルが低減したことがわかる。

すなわち、上記結果は、（１）cGVHDに起因する小胞体ストレスが有害な方法で線維芽細胞を活性化し、それにより広範囲の線維化を誘発する一方、（２）PBAは小胞体ストレスを緩和することによって線維芽細胞の機能不全を防ぐことができることを示している。

[0125] [小胞体ストレスと、マクロファージのM2マクロファージへの分化との関係]

上述のように、マクロファージは免疫応答及び炎症において重要な役割を果たしており、老化マクロファージがcGVHDの発症プロセスと有害な関連性があることが知られている。

また、（１）小胞体ストレスがM2マクロファージへの分化を促進すること、及び（２）M2マクロファージが線維化関連疾患に関与することが示唆されている（Oh J, Riek AE, Weng S, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Controls M2 Macrophage Differentiation and Foam Cell Formation. The Journal of Biological Chemistry. 2012; 287:11629-11641. ;

Xue J, Sharma V, Hsieh MH, et al. Alternatively activated macrophages promote pancreatic fibrosis in chronic pancreatitis. Nature Communications. 2015; 6:1-11. ;

Shivshankar P, Halade GV, Calhoun C, et al. Caveolin-1 deletion exacerbates cardiac interstitial fibrosis by promoting M2 macrophage activation in mice after myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol. 2014

; 76 : 84 - 93.) 。

[0126] そこで、cGVHD誘導小胞体ストレスと、機能不全マクロファージ（M2マクロファージへの分化）との関係を鋭意調査した。

まず、マウス涙管内のマクロファージが小胞体ストレスマーカーであるCHOPを発現するか否かを調査するために免疫染色を行った。

[0127] PBAを用いることによりマクロファージにおけるcGVHDに起因する小胞体ストレスが緩和された結果を図7A～Eに示す。

図7Aは、PBA注入涙腺及びビヒクル注入涙腺の免疫蛍光画像を示す図である。

図7A中、写真は200倍の倍率で撮影し、スケールバーは20 μ mを示す。マクロファージ及びCHOPは、それぞれ赤色及び緑色に染色された。

図7Aに示した涙腺の蛍光写真から判断されるように、マウスを溶媒ビヒクルで処理すると、CHOPを発現するマクロファージが組織に移動したことがわかる。

これは、小胞体ストレスを受けたマクロファージがcGVHDの進行に関連していることを示している。

一方、そのようなマクロファージは、PBA処理マウスから採取した涙腺では観察されなかった。

[0128] 次に、cGVHD罹患マクロファージにおける小胞体ストレスについてのより深く考察するために、PBA処理マウス由来及びビヒクル処理マウス由来の脾臓マクロファージを培養した。

図7Bは、PBA処理マウス由来及びビヒクル処理マウス由来の培養脾臓マクロファージの免疫蛍光結果を示す図である。写真は200倍の倍率で撮影し、スケールバーは20 μ mを示す。マクロファージ及びCHOPは、それぞれ赤色及び緑色に染色された。

図7Bに示した免疫組織化学の結果から、ビヒクル処理脾臓マクロファージは、PBA処理脾臓マクロファージとは対照的に、CHOPを発現することが明らかになった。

[0129] 図7Cは、マウス脾臓マクロファージにおける小胞体ストレス各マーカーのイムノブロット分析結果を示す図である。

図7C中、レーン1はPBA処理マウス由来の脾臓マクロファージを示し、レーン2はビヒクル処理マウス由来の脾臓マクロファージを示す。

[0130] 図7Dは、各タンパク質バンドの対応する定量分析結果を示す図である。

図7D中、データは平均値±SD、PBA：n=4、ビヒクル：n=4、* $P<0.05$ として示す。

図7C及びDに示したマクロファージの免疫ブロット分析の結果から明らかなように、マクロファージをPBAで処理した場合、小胞体ストレスマーカーであるGRP78、CHOP、リン酸化PERK、リン酸化eIF2 α 及びリン酸化IRE1 α が溶媒ビヒクルと比較して実質的に抑制されていることがわかる。

[0131] さらに、脾臓マクロファージにおける(1)M1マクロファージマーカーであるIL-1 β 、IL-6及びMCP-1の遺伝子発現並びに(2)M2マクロファージマーカーであるTGF- β 及びIL-10の遺伝子発現を試験するためにqPCRを行った(Sene A, Khan AA, Cox D, et al. Impaired Cholesterol Efflux in Senescent Macrophages Promotes Age-Related Macular Degeneration. Cell Metab. 2013;17:549-561.)。

[0132] 図7Eは、脾臓からのM1マクロファージ及びM2マクロファージの各マーカーのqPCR分析結果を示す図である。

図7E中、データは平均値±SD、PBA：n=4~5、ビヒクル：n=4~5、* $P<0.05$ として示す。

図7Eに示した結果から明らかなように、M2マクロファージマーカーであるTGF- β 及びIL-10のmRNA発現が、ビヒクル処理マクロファージにおいて、PBA処理マクロファージと比較して増加したことがわかる。

。

一方、マクロファージをPBAで処理した場合、溶媒ビヒクルで処理したマクロファージよりも、M1マクロファージマーカーであるIL-1 β 及びIL-6の遺伝子発現が高いことがわかる。

以上の結果から、(1) cGVHD誘発性小胞体ストレスがマクロファージを活性化された表現型に二者択一的に分化させること、及び(2) マクロファージが活性化された表現型に変換することによるcGVHD誘導線維化を、PBAがマクロファージにおける小胞体ストレスを低減することにより緩和することができると推測される。

[0133] <考察>

以上のように、(1) 小胞体ストレスの上昇と、(2) cGVHD罹患臓器におけるNF- κ B及びTXNIPなどの炎症誘発性分子の活性及び／又は発現の増加との相関が明らかにされた。

上記のように、NF- κ BがcGVHD罹患臓器において活性化され、その一部がcGVHDに起因する小胞体ストレスから生じることを示唆している。

上述の非特許文献6～8には、(1) TXNIPがPERK及びIRE1 α 経路の下流で生成されること、(2) TXNIPが小胞体ストレスを受けた細胞が恒常性を回復するかアポトーシスを受けるかを決定する交差点において重要な役割を果たすこと、(3) TXNIPがインフラマソーム様受容体ファミリーであるピリンドメイン3 (NLRP3) を活性化することによって広範な炎症を誘発することが記載されているが、TXNIPとcGVHDとの間の関連性についてはこれまで知られていなかった。

上記のように、小胞体ストレス誘発TXNIPの発現がcGVHDによる身体障害と相関し得ることが明らかにされた。

[0134] 図8はcGVHDと小胞体ストレスとの間の推定される相関を示す図である。

図8に示したように、cGVHDに罹患した臓器は酸化的ストレスを受け

と考えられる。それに応じて、上皮細胞、線維芽細胞及びマクロファージにおける小胞体ストレスが増大し得る。

その結果、（１）NF- κ B及びTXNIPなどの炎症関連分子が制御不能な様式で発現及び／又は活性化され、（２）線維芽細胞が機能不全に陥り、その結果、異常なコラーゲン束が生成され、（３）マクロファージは、異常型線維化に関連し得るM2表現型に分化され得る。

さらに、小胞体ストレスは炎症によって増加すると考えられているので、小胞体ストレスと炎症との間の悪循環が、cGVHDに罹患した臓器において形成され得る。

したがって、cGVHDに起因する小胞体ストレスの低減はまた、上記悪循環から脱却する可能性がある。

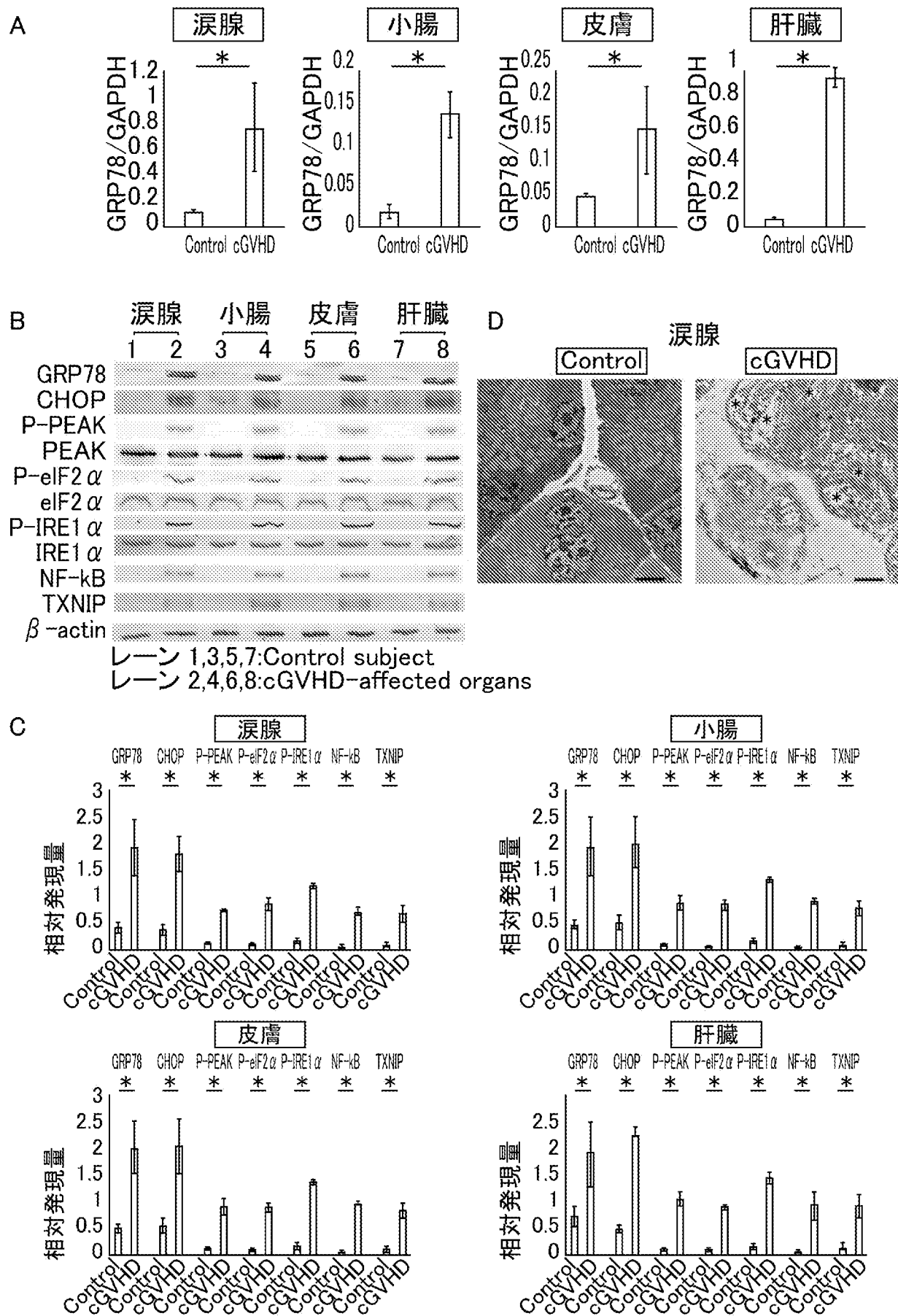
以上まとめると、PBAは小胞体ストレスを緩和することにより、cGVHDを治療するための有効な薬剤になり得る。

請求の範囲

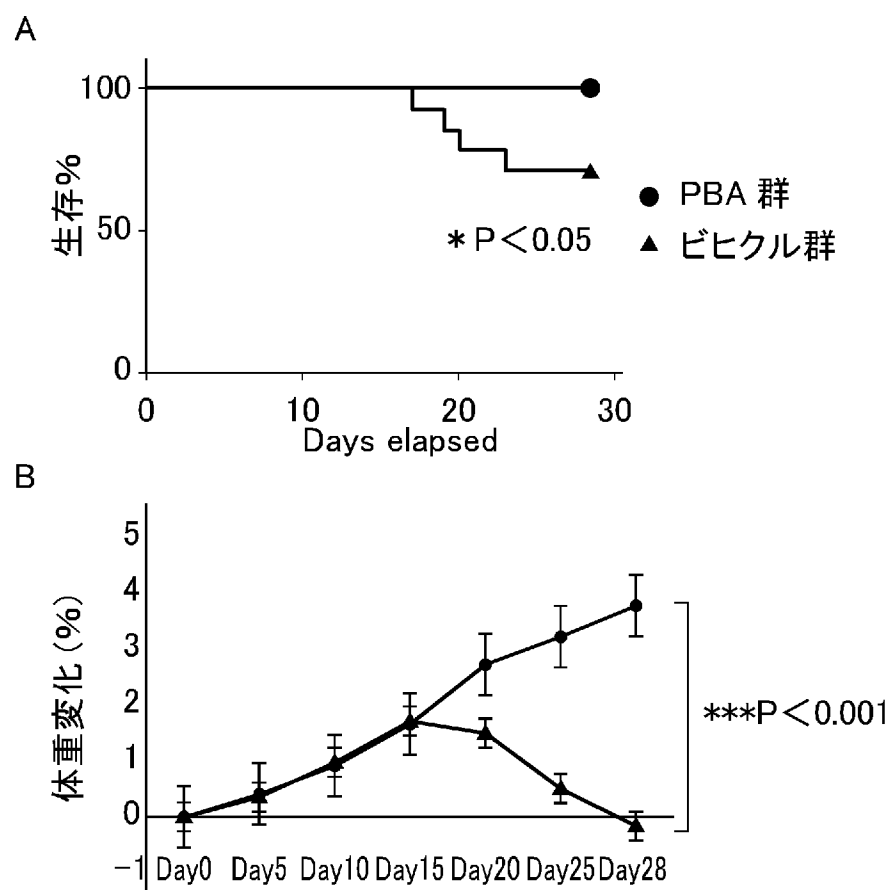
- [請求項1] フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする、移植片対宿主病の治療又は予防剤。
- [請求項2] 前記移植片対宿主病は、骨髓移植後の移植片対宿主病である、請求項1に記載の治療又は予防剤。
- [請求項3] 前記移植片対宿主病は、眼における移植片対宿主病である、請求項1又は2に記載の治療又は予防剤。
- [請求項4] 前記移植片対宿主病は、ドライアイである、請求項3に記載の治療又は予防剤。
- [請求項5] 前記移植片対宿主病は、ファイブロサイト浸潤を伴う移植片対宿主病である、請求項1から4のいずれかに記載の治療又は予防剤。
- [請求項6] フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理学的に許容される塩である、請求項1から5のいずれかに記載の治療又は予防剤。
- [請求項7] フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする、ファイブロサイト浸潤抑制剤。
- [請求項8] フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理学的に許容される塩である、請求項7に記載のファイブロサイト浸潤抑制剤。
- [請求項9] フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする、杯細胞の減少の抑制剤。
- [請求項10] フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理学的に許容される塩である、請求項9に記載の杯細胞の減少の抑制剤。
- [請求項11] フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする、涙液減少抑制剤。
- [請求項12] フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理学的に許容される塩である、請求項11に記載の涙液減少抑制剤。
- [請求項13] フェニル酪酸またはその薬理学的に許容される塩を投与することを含む、移植片対宿主病の治療又は予防方法。

- [請求項14] 前記移植片対宿主病は、骨髓移植後の移植片対宿主病である、請求項13に記載の治療又は予防方法。
- [請求項15] 前記移植片対宿主病は、眼における移植片対宿主病である、請求項13又は14に記載の治療又は予防方法。
- [請求項16] 前記移植片対宿主病は、ドライアイである、請求項15に記載の治療又は予防方法。
- [請求項17] 前記移植片対宿主病は、ファイブロサイト浸潤を伴う移植片対宿主病である、請求項13から16のいずれかに記載の治療又は予防方法。
- [請求項18] フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理的に許容される塩である、請求項13から17のいずれかに記載の治療又は予防方法。
- [請求項19] フェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩を投与することを含む、ファイブロサイト浸潤抑制方法。
- [請求項20] フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理的に許容される塩である、請求項19に記載のファイブロサイト浸潤抑制方法。
- [請求項21] フェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩を投与することを含む、杯細胞の減少の抑制方法。
- [請求項22] フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理的に許容される塩である、請求項21に記載の杯細胞の減少の抑制方法。
- [請求項23] フェニル酪酸またはその薬理的に許容される塩を投与することを含む、涙液減少抑制方法。
- [請求項24] フェニル酪酸が4-フェニル-n-酪酸またはその薬理的に許容される塩である、請求項23に記載の涙液減少抑制方法。

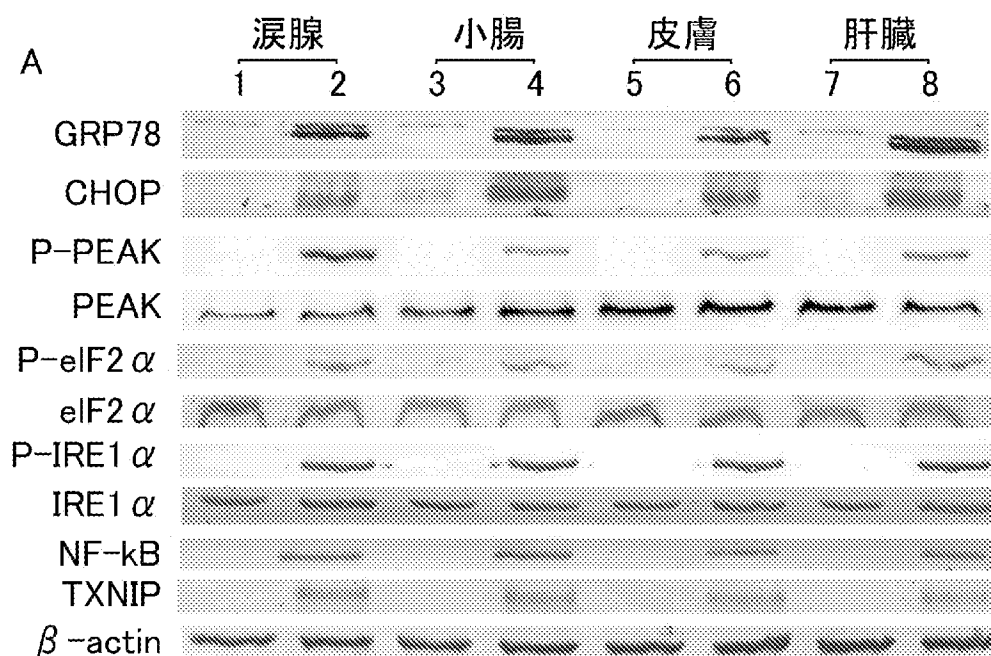
[図1]



[図2]

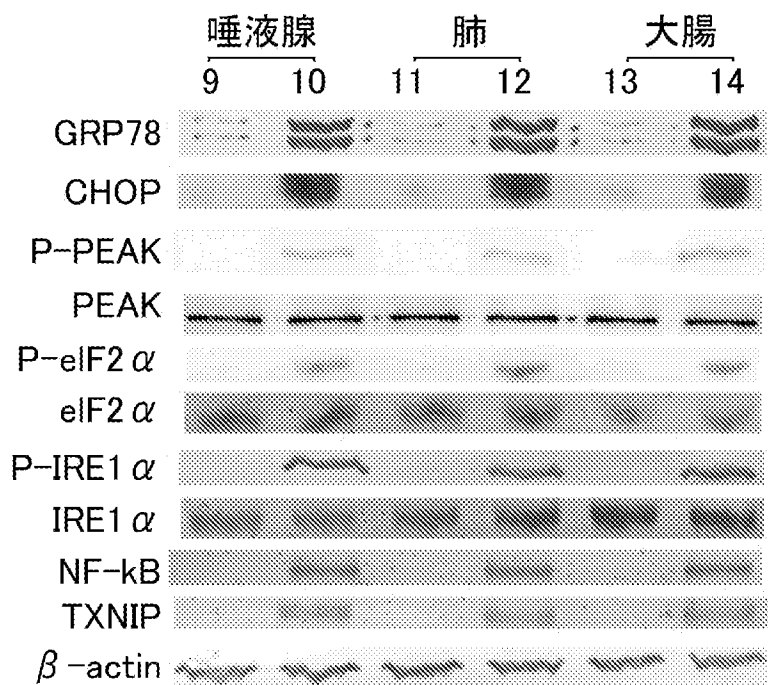


[図3-1]



レーン 1,3,5,7:PBA 処理臓器

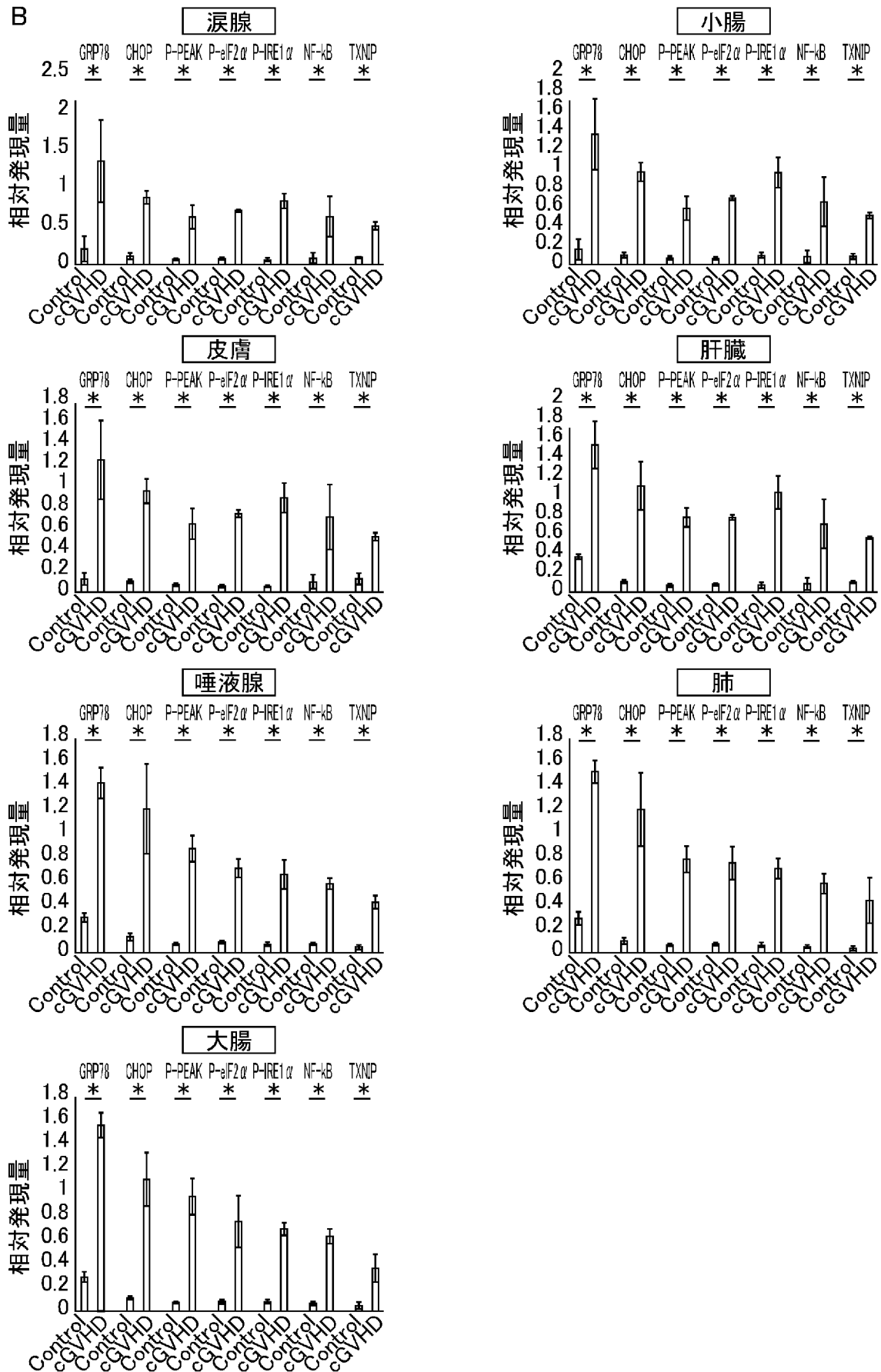
レーン 2,4,6,8: ビヒクル処理臓器



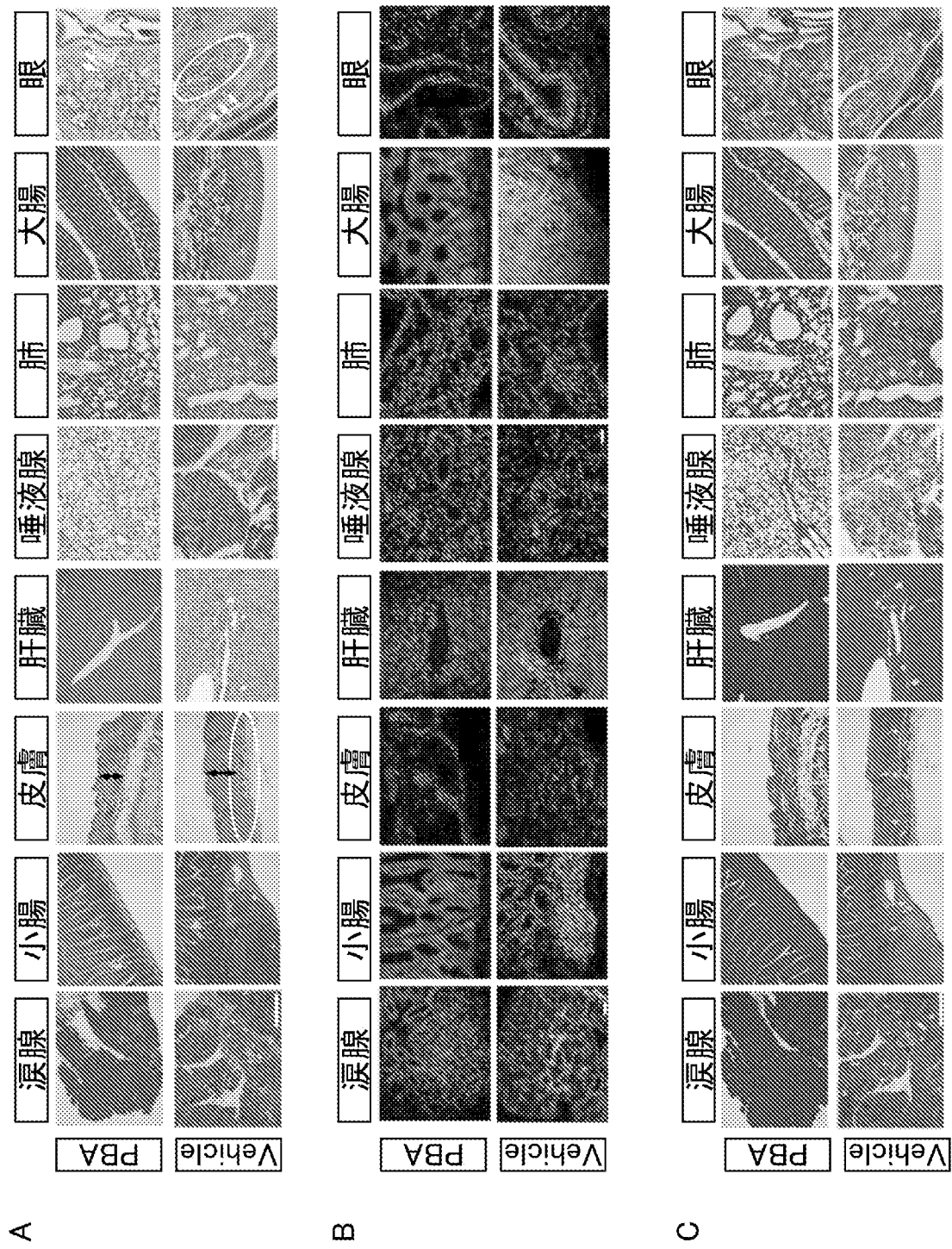
レーン 9,11,13:PBA 処理臓器

レーン 10,12,14: ビヒクル処理臓器

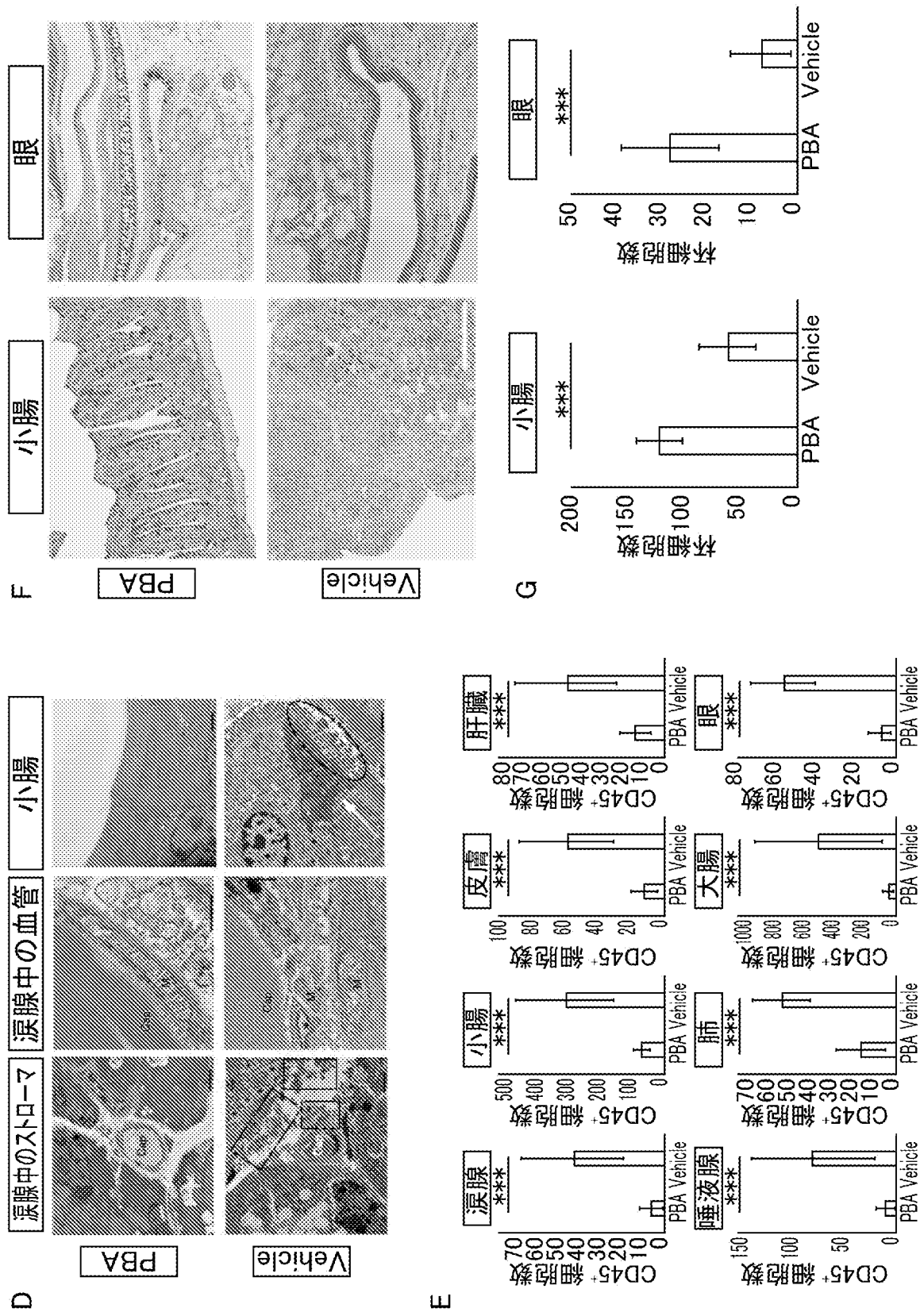
[図3-2]



[図4-1]

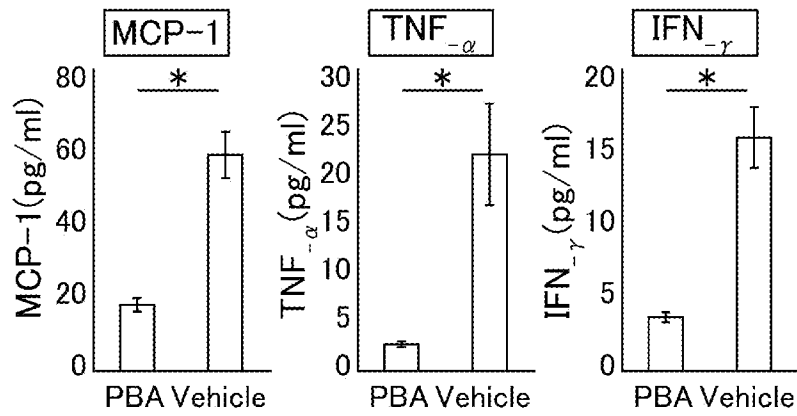


[図4-2]

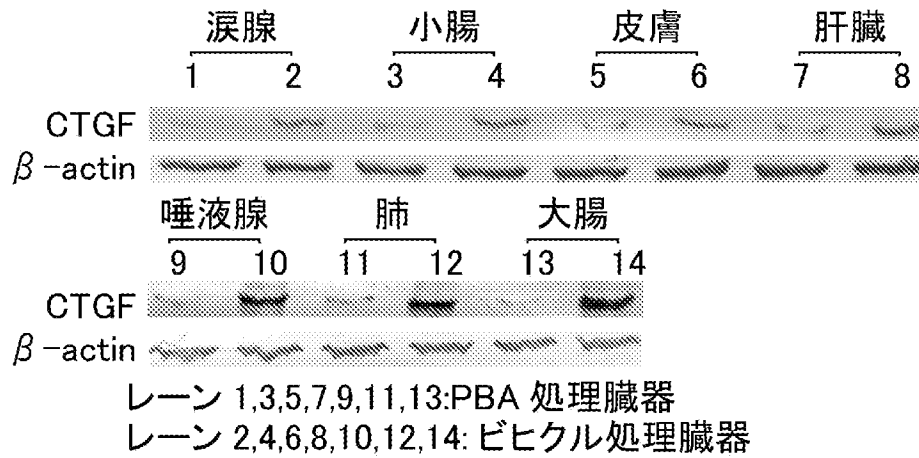


[図5]

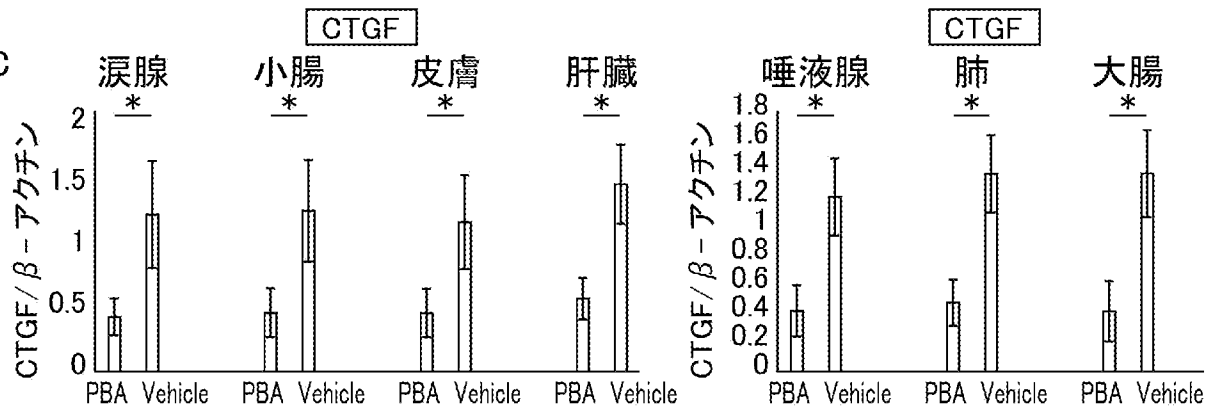
A



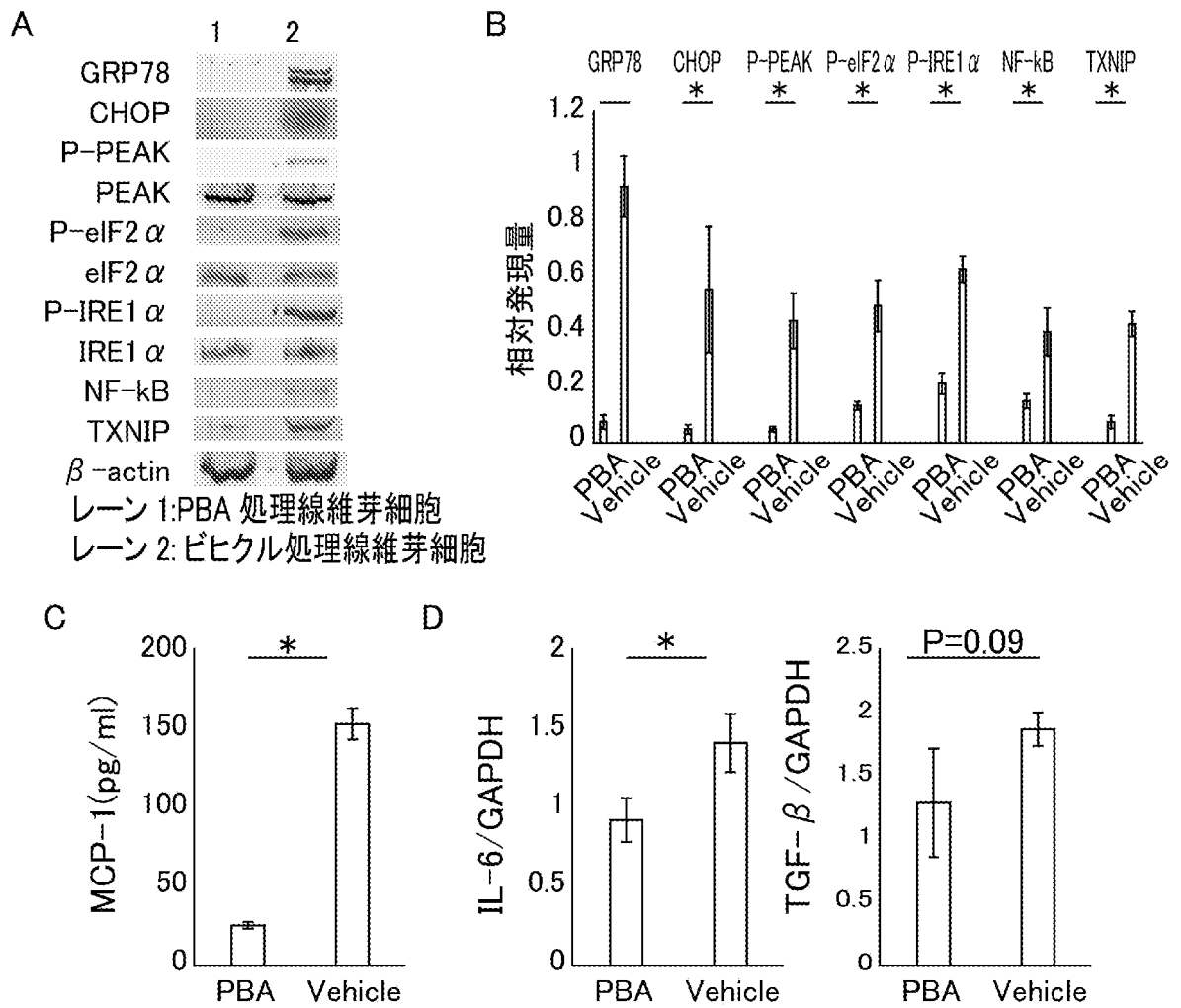
B



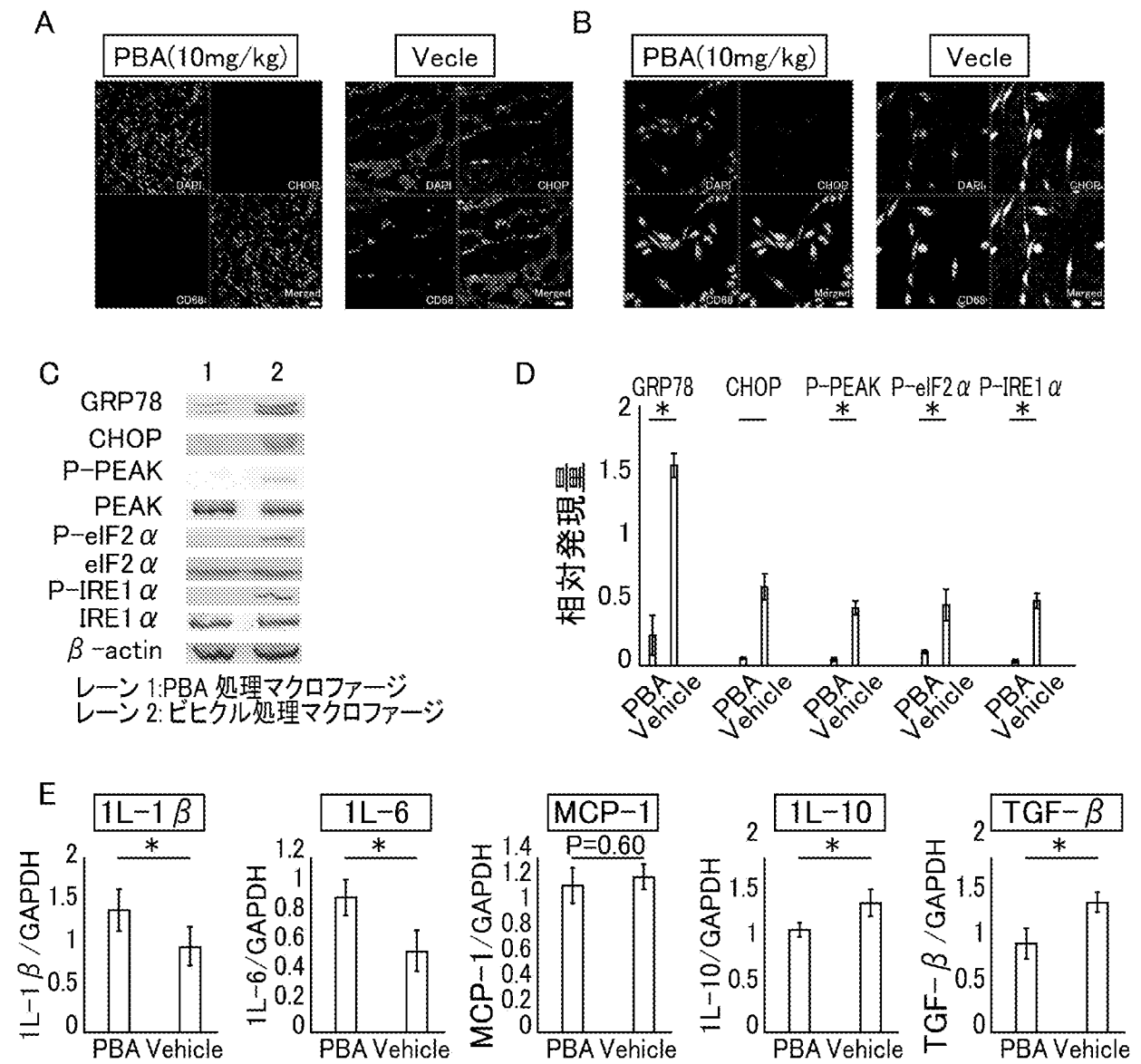
C



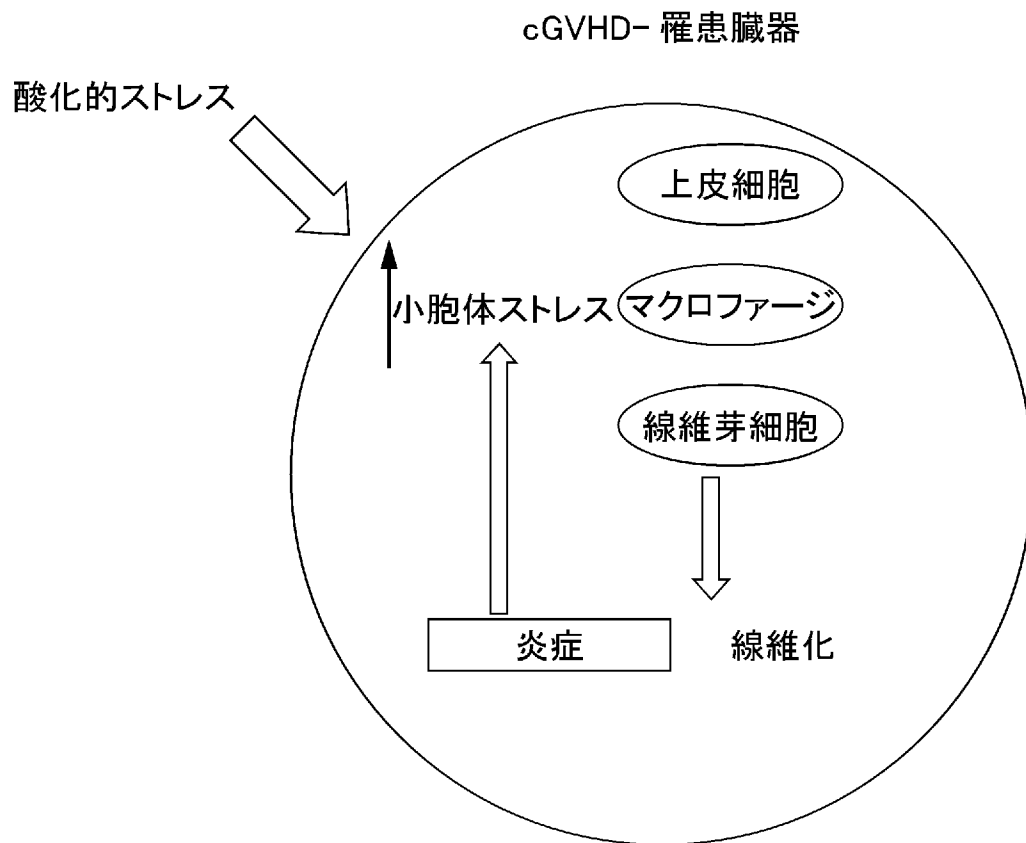
[図6]



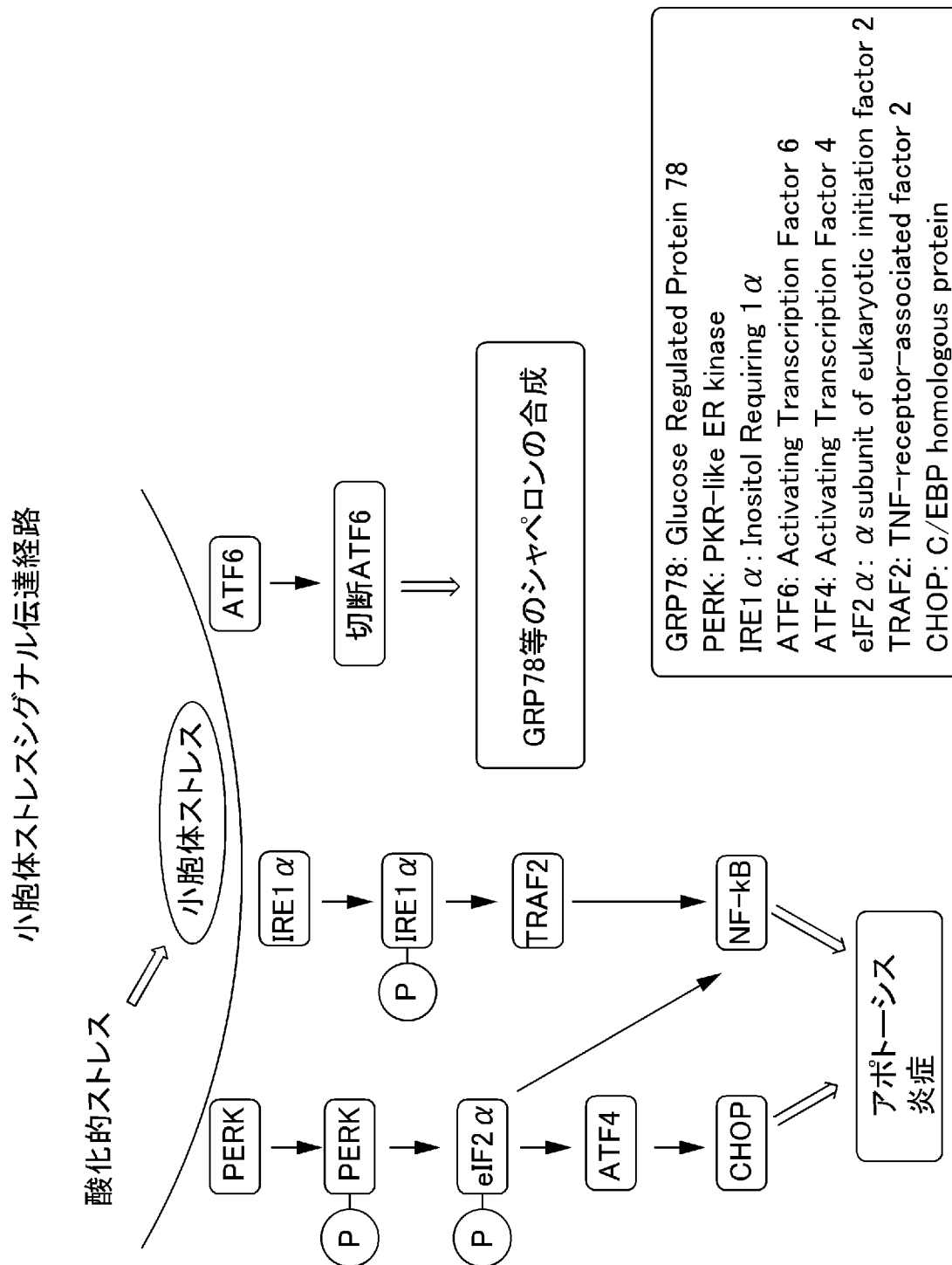
[図7]



[図8]

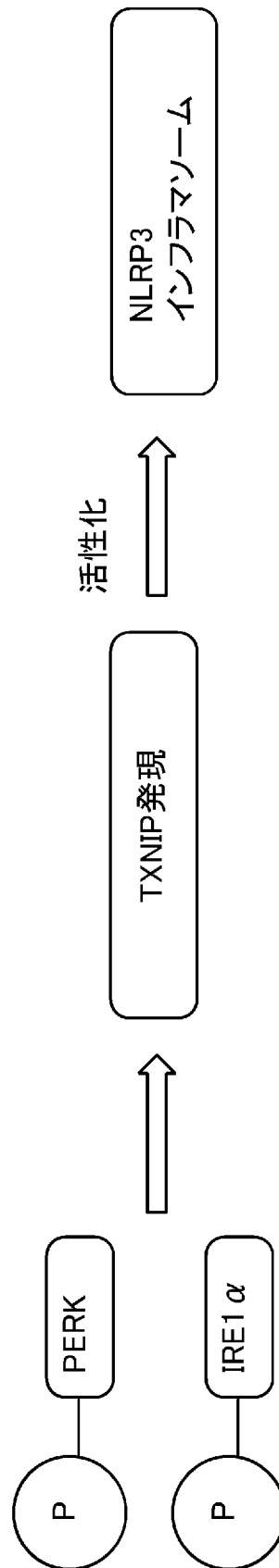


[図9]



[図10]

小胞体ストレスシグナル伝達経路



TXNIP: チオレドキシノー相互作用タンパク質

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/014290

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/192(2006.01)i, A61P27/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/192, A61P27/00, A61P37/02, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Science Direct, CiNii, PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KOLB, P.S. et al., The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis, The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2015.02.07, Vol. 61, ISSN 1357-2725, pp.45-52, particularly, Abstract, paragraph of '2. Mechanism of action'	1-8, 11-20, 23, 24
Y	MUKAI, Shin et al., Reduction of endoplasmic reticulum stress for treatment of ocular chronic graft-versus-host-disease, ARVO 2015 Annual Meeting Abstracts, 2015, Program Number: 308, Poster Board Number: C0193, entire text, particularly, paragraphs of 'Results', 'Conclusions'	1-8, 11-20, 23, 24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 May 2017 (02.05.17)

Date of mailing of the international search report
16 May 2017 (16.05.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/014290

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yoko OGAWA et al., "Zoketsu Kansaibo Ishokugo no GVHD ni yoru Dry Eye no Byotai Kaiseki", Journal of the Eye, 2005, vol.22, no.9, ISSN 0910-1810, pages 1233 to 1235, entire text, particularly, paragraph of 'Mansei GVHD ni yoru Dry Eye to Byotai'	4, 5, 7, 8, 11, 12, 16, 17, 19, 20, 23, 24
X	JP 2006-290863 A (Asan Labs Ltd.), 26 October 2006 (26.10.2006), claims 1, 3, 6; paragraph [0020] & US 2006/0229237 A1 claims 1, 2, 5; paragraph [0023] & CN 1843508 A & TW 200635573 A	1, 2, 13, 14
X	CAO, Stewart Siyan et al., The unfolded protein response and chemical chaperones reduce protein misfolding and colitis in mice, Gastroenterology, 2013, Vol.144, No.5, ISSN 0016-5085, pp.989-1000, 1000.e1-e6, particularly, paragraph of 'TUDCA and PBA Dramatically Mitigate Colitis in Il10 ^{-/-} Mice', Figure 7	9, 10, 21, 22
A	JP 2009-78977 A (Japan Health Sciences Foundation), 16 April 2009 (16.04.2009), (Family: none)	1-24
A	JP 2009-51777 A (Asan Lab Co Cayman Ltd.), 12 March 2009 (12.03.2009), (Family: none)	1-24
A	LU, Hao et al., Tauroursodeoxycholic acid and 4-phenyl butyric acid alleviate endoplasmic reticulum stress and improve prognosis of donation after cardiac death liver transplantation in rats, Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International, 2014.12.15, Vol.13, No.6, ISSN 1499-3872, pp.586-593	1-24

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/192(2006.01)i, A61P27/00(2006.01)i, A61P37/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/192, A61P27/00, A61P37/02, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 7 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 7 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 7 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Science Direct, CiNii, PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	KOLB, P.S. et al., The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis, The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2015.02.07, Vol.61, ISSN 1357-2725, pp.45-52, 特に Abstract, 「2. Mechanism of action」の項	1-8, 11-20, 23, 24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 2 . 0 5 . 2 0 1 7

国際調査報告の発送日

1 6 . 0 5 . 2 0 1 7

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

横山 敏志

4 U

2 9 2 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	MUKAI, Shin et al., Reduction of endoplasmic reticulum stress for treatment of ocular chronic graft-versus-host-disease, ARVO 2015 Annual Meeting Abstracts, 2015, Program Number: 308, Poster Board Number: C0193, 全文, 特に「Results」の項, 「Conclusions」の項	1-8, 11-20, 23, 24
Y	小川 葉子 ら, 造血幹細胞移植後のGVHDによるドライアイの病態解析, あたらしい眼科, 2005, Vol. 22, No. 9, ISSN 0910-1810, pp. 1233-1235, 全文, 特に「慢性GVHDによるドライアイと病態」の項	4, 5, 7, 8, 11, 12, 16, 17, 19, 20, 23, 24
X	JP 2006-290863 A (安成製薬科技股份有限公司) 2006. 10. 26, 請求項 1, 3, 6, [0020] & US 2006/0229237 A1, Claims 1, 2, 5, [0023] & CN 1843508 A & TW 200635573 A	1, 2, 13, 14
X	CAO, Stewart Siyan et al., The unfolded protein response and chemical chaperones reduce protein misfolding and colitis in mice, Gastroenterology, 2013, Vol. 144, No. 5, ISSN 0016-5085, pp. 989-1000, 1000.e1-e6, 特に「TUDCA and PBA Dramatically Mitigate Colitis in Il10 ^{-/-} Mice」の項, Figure 7	9, 10, 21, 22
A	JP 2009-78977 A (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2009. 04. 16 (ファミリーなし)	1-24
A	JP 2009-51777 A (英属開曼群岛商安盛開発薬物股份有限公司) 2009. 03. 12 (ファミリーなし)	1-24
A	LU, Hao et al., Tauroursodeoxycholic acid and 4-phenyl butyric acid alleviate endoplasmic reticulum stress and improve prognosis of donation after cardiac death liver transplantation in rats, Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International, 2014. 12. 15, Vol. 13, No. 6, ISSN 1499-3872, pp. 586-593	1-24