

Mini Review

自己免疫疾患における再生医療としての造血細胞移植

池原 進

関西医科大学第一病理，移植センター，再生医学難病治療センター

Stem cell transplantation as a regeneration therapy for autoimmune diseases

Using chimeric resistant MRL/lpr mice, we have very recently established a novel BMT method, called intra-bone marrow (IBM)-BMT. IBM-BMT is far superior to conventional intravenous-BMT (IV-BMT), since it can be used to treat autoimmune diseases in MRL/lpr mice. In addition, we have established a new method for bone marrow cell-harvesting, called Perfusion Method (PM). BMCs collected by the PM contain both pluripotent hemopoietic stem cells and mesenchymal stem cells, but not T cells due to peripheral blood contamination. Therefore, when PM + IBM-BMT are carried out, neither GvHD nor graft reject occurs. This method should therefore become a valuable regeneration therapy for osteoporosis, emphysema, etc.

Rec.10/31/2002, Acc.12/11/2002, pp110-115

Susumu Ikehara

First Department of Pathology,

Transplantation Center,

Regeneration Research Center for Intractable Diseases,

Kansai Medical University

Key words stem cell transplantation, regeneration therapy, autoimmune disease

筆者らは、18年前にアロの骨髓移植(BMT)によって、自己免疫疾患(厚生労働省指定の難病の大半を占める)が治療できることを種々のモデル動物を用いて、世界で初めて実証した¹⁾。さらに、種々の難病のモデル動物を用いて、I型の糖尿病だけでなく、ある種のII型の糖尿病²⁾や難治性の慢性腎炎(FGS)³⁾もBMTによって治療できることを証明した。

しかしながら、全身性エリテマトーデス(SLE)や関節リウマチ(RA)を自然発症するMRL/lprマウス⁴⁾だけが例外で、このマウスは放射線感受性のため、8.5Gy以上の放射線に耐えられず、低線量(8.5Gy以下)の放射線と従来の静脈(I.V.)より骨髓細胞を注入するBMTの方法(IV-BMT)ではドナーの骨髓細胞が生着せず、自己免疫疾患が再発してくることが明らかになった⁵⁾。そこで、このマウスを用いて、mildなconditioning regimenでもアロのBMTが成功する条件を探索した。その結果、ドナーの多能性造血幹細胞(P-HSC)が増殖分化するためには、主要組織適合抗原複合体(MHC)のclass Iが一致したスト

ローマ細胞(間葉系幹細胞[MSC]を含む)のhelpが必要であることを見出した⁶⁾。

したがって、ドナー由来のP-HSCを生着させるためには、ドナーのMSCを効率良く骨髓に生着させる必要があり、全骨髓細胞(P-HSCとMSCを含む)を骨髓内(Intra-bone marrow:IBM)へ直接注入する移植方法(IBM-BMT)を開発した。このIBM-BMTは、治療抵抗性のMRL/lprマウスの自己免疫疾患の治療にも効果を示し、mildなconditioning regimen、すなわち、5Gy 2回(total 10Gy)の分割照射(8Gyの1回照射に相当)で100%自己免疫疾患が治療できることを発見した⁷⁾。

さらに、ヒトのアロのBMTで、一番問題になっている移植片対宿主病(GvHD)の予防に関しては、採取時に末梢血(T細胞が40%以上含まれる)の混入を最小限にする新しい骨髓細胞の採取方法(“灌流法”)をモンキーを用いて開発した⁸⁾。この“灌流法”で骨髓を採取するとT細胞の混入は6%以下で、T細胞を除去しなくてもGvHDは発症しない(少量のT細胞、特に本来、骨髓に存在す

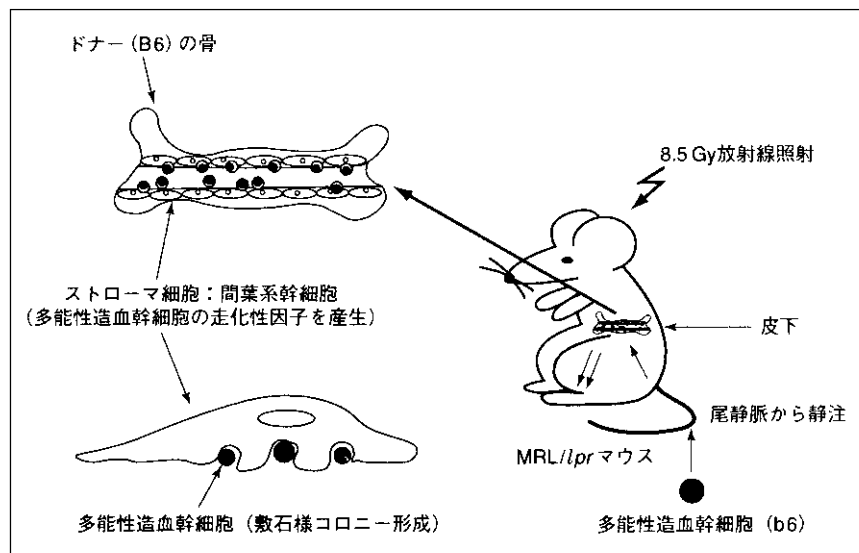


図1 骨髄ならびに骨移植

ドナー (B6) のストローマ細胞 (間葉系幹細胞を含む) を補充する目的で, B6 の骨を皮下に移植すると, 移植されたストローマ細胞から造血幹細胞を呼び寄せる液性因子が分泌されるため, ドナーの造血幹細胞が移植骨へ集まり, そこでドナー由来の造血幹細胞とストローマ細胞が増殖し, さらにMRL/lprマウスの骨髄へ移動する. その結果MRL/lprマウスの骨髄は造血細胞のみならず, ストローマ細胞もドナー側の細胞に置換される.

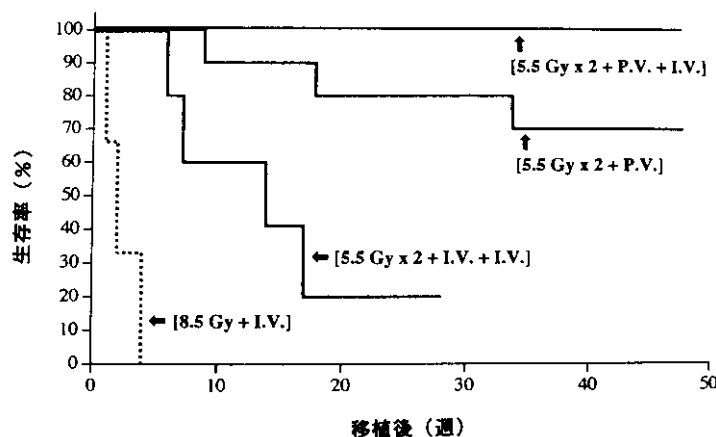


図2 骨髄細胞の経門脈投与による (PV-BMT) による難治性自己免疫疾患の治療

5.5Gy 2回分割照射後, 正常マウスの全骨髄細胞を門脈 (P.V.) から投与し, 5日後に静脈 (I.V.) から追加投与すると100%の生存率が得られている.

るT細胞はGvHDを起こさず,むしろ生着を促進する).このように, 灌流法で採取した全骨髄細胞 (P-HSCとMSCと少量のT細胞を含む) を骨髄内へ注入 (IBM-BMT) すると, 注入局所の骨髄で, P-HSCとMSCが増殖するだけでなく, 速やかに全身の骨髄へもmigrateすることが明らかになった.したがって, 正常の若いドナーの骨髄細胞を用いれば, あらゆる疾患 (特に老化に伴って発症する疾患の治療) に応用できるものと考えられるので紹介する.

ドナーのストローマ細胞の補充

アロのBMTの際, 造血幹細胞だけでなく, ドナー由来のストローマ細胞の補充が必要と考え, 骨髄微小環境構成細胞であるストローマ細胞もドナー側と置換する目的で, まず骨を皮下に移植し骨髄細胞を静注した (図1). 8.5Gy放射線照射し, 骨と骨髄を同時に移植した群では, 1年近く経過しても再発せず100%の生存率を示し, MRL/lprマウスの自己免疫疾患の予防に成功した⁹⁾.

しかしながら, MRL/lprマウスは自己免疫疾患発症後 (尿毒症性腸炎が発症するため), 放射線により感受性が強くなるため, 8.5Gyと骨移植とBMTでは, 2週間以内に全例死亡することが明らかになった.そこで, MRL/lprマウスの自己免疫疾患の治療法を検討し, 放射線の分割照射 (5Gy x 2) と2回のBMT (T細胞を除去しない骨髄細胞を移植) と骨移植とcyclophosphamideを使用することによって90%以上の生存率を得ることに成功した¹⁰⁾.

最近, 筆者らはドナーの骨髄細胞を門脈 (P.V.) より, 肝臓へ直接注入すると免疫学的寛容が誘導されやすいことを見出した¹¹⁾.これは, 多能性造血幹細胞自身がホストのCD8⁺キラー細胞をanergyに陥らしめることによると考えられる¹²⁾.そこで, 骨髄細胞をP.V.より投与し, MRL/lprマウスの自己免疫疾患の治療を試みた.図2に示したように, 正常マウスの骨髄細胞をP.V.投与とI.V.の追加投与をすることにより, MRL/lprマウスの自己免疫疾患が100%治療可能となった¹³⁾.この門脈内骨髄移植 (PV-

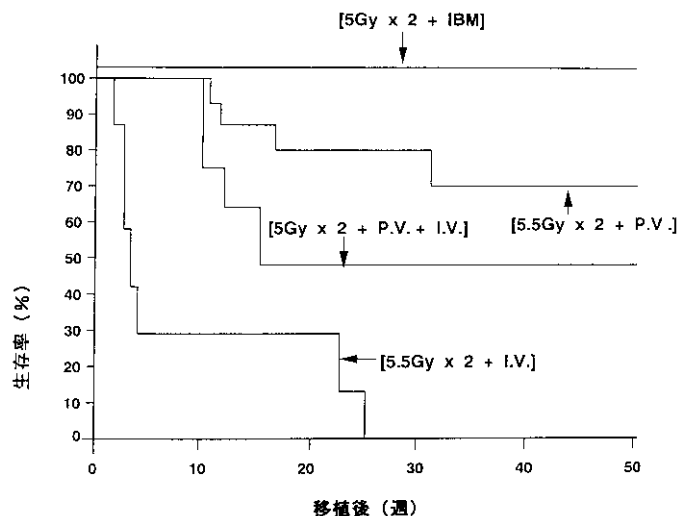


図3 “IBM-BMT”を用いたMRL/lprマウスの自己免疫疾患の治療

“IBM-BMT”(骨髄内骨髄移植)では,放射線照射量を5Gy × 2に下げても1回の“IBM-BMT”でMRL/lprマウスの自己免疫疾患を100%治療できる。

BMT)が,なぜ従来の静脈内骨髄移植(IV-BMT)に比較して,効果があるかを解析した結果,PV-BMTにおいては,ドナーの造血幹細胞のみならず,ストローマ細胞も肝にtrapされるため,ドナーのストローマ細胞がドナーの造血幹細胞の増殖分化を効率良くsupportできることによるということが明らかになった¹⁴⁾。それでは,髄外造血として肝で造血を起こすよりは,骨髄細胞を骨髄内へ直接注入する方が,より効果があるのではないかと考えて次のような方法を開発した。

灌流法を用いた骨髄内骨髄移植 (IBM-BMT)

骨髄内(Intra-bone marrow: IBM)へ全骨髄細胞(少量のT細胞とストローマ細胞を含む)を移植するとドナーのストローマ細胞がドナーの造血幹細胞を効率良くsupportできるため,ドナーの造血系並びにリンパ系細胞の回復が速やかで,放射線量を5.5Gy × 2から5Gy × 2まで減量しても生着不全が起こらないことを筆者らは発見した⁷⁾(図3)。

この“IBM-BMT”をヒトへ応用するため,モンキーを用いた実験を開始し,まず骨髄細胞の新しい採取方法を開発した。従来の腸骨よりの吸引法では末梢血が混入するた

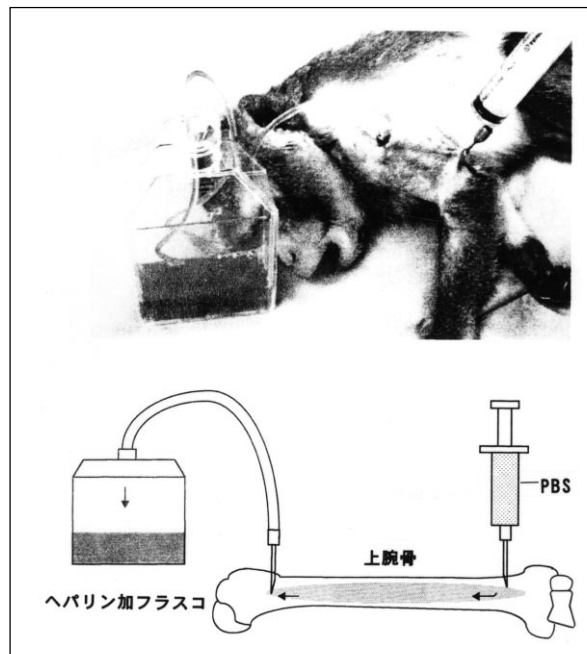


図4 新しい骨髄採取方法(灌流法)

骨髄穿刺針を長管骨の2カ所に挿入し,一方からPBS(または生食)を注入し,他方から骨髄細胞を回収する。この方法により末梢血の混入を防げる。

め,採取骨髄細胞中に20%以上T細胞が含まれる。そのためT細胞を除去しないとGvHDが発症する。そこでマウスと同様に長管骨を用いて灌流法を考案した(図4)⁸⁾。これは,骨髄穿刺針を長管骨に2箇所挿入し,一方より生食を注入し,他方より骨髄細胞を採取するもので,短時間に大量の骨髄細胞を安全に採取できる。末梢血の混入がないためT細胞も6%以下で,T細胞を除去しなくてもGvHDが発症しないことも明らかになった。それゆえ,採取全骨髄細胞を骨髄内へ注入することによって骨髄中のMSCも骨髄内へ効率良く移植が可能となる。

IBM-BMTによる肺気腫の治療

肺気腫は末梢細気管支より末梢の気腔が異常に拡大し,肺胞壁の破壊を伴うが,明らかな線維化は認められない病態と定義され,臨床的には慢性気管支炎とともに慢性閉塞性疾患 chronic obstructive pulmonary disease (COPD) に分類される¹⁵⁾。COPDは近年増加傾向を示し,わが国では,1996年の患者数は22万人で,1997年のCOPDによる死亡者は12,000人であるが,米国の患者数は1,400万人であり,重大な社会問題となっている。肺気腫の原因としては, α 1-アンチトリプシン(α 1-AT)欠損症や喫煙がよく知られているが,IgA欠損症なども肺気腫発症への関与が考え

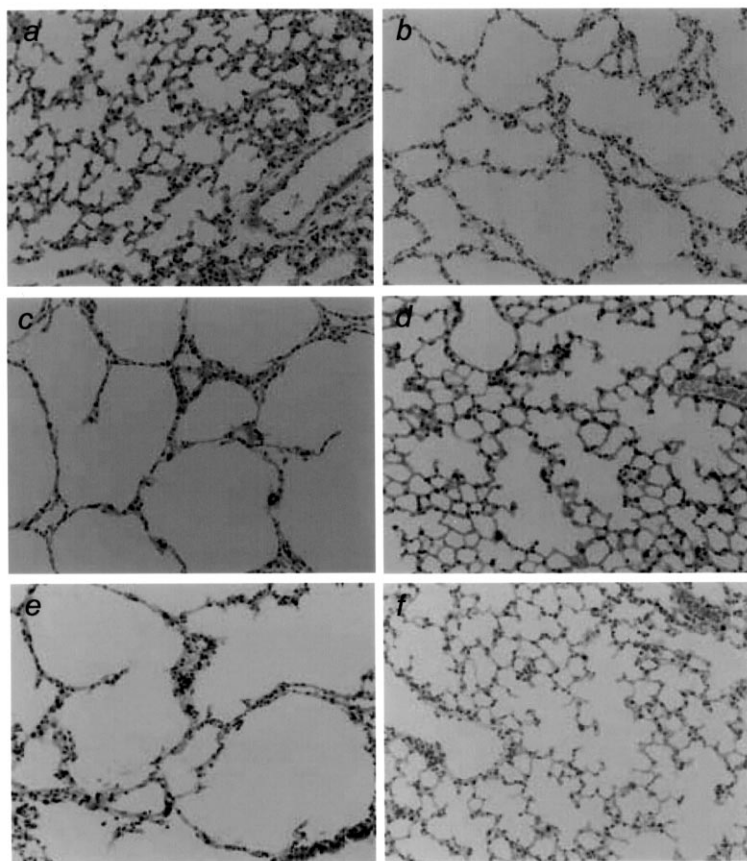


図5 IBM-BMTによる肺気腫の改善

- (a) 8週齢の正常マウス(C3H)の肺の組織像。
- (b) 8週齢のTskマウスの肺:すでに気腫性的変化を認む。
- (c) 12週齢のTskマウスの肺:肺気腫の像が顕著化している。
- (d) (C3H → C3H)キメラマウスの肺:8週齢でIBM-BMTをしたキメラマウスの6ヵ月後の肺。
- (e) (Tsk → Tsk)キメラマウスの肺:8週齢でIBM-BMTをしたキメラマウスの6ヵ月後の肺。
- (f) (C3H → Tsk)キメラマウスの肺:8週齢でIBM-BMTをしたキメラマウスの6ヵ月後の肺では肺気腫の像が改善している。

られている。

Tight skin マウス (Tsk マウス) はフィブリン-1の異常に基づく皮膚の著明な線維化が認められ、ヒトの全身性強皮症のモデルマウスとされるが肺気腫も認められ、肺気腫のモデルマウスとしても注目されている¹⁶⁾。肺気腫の発症は生後早期よりみられ、生後4日には軽度の、生後1ヵ月には明らかな肺気腫が認められる。このTskマウスを用いてBMTの肺気腫に対する効果を検討した。

最初、明らかに肺気腫を発症している8週齢のTskマウスに対し、BMTの前処置として5.5Gyの¹³⁷Csを2回照射する処置を行い、翌日に異系正常マウスであるC3Hマウスの骨髓細胞を用いて、従来の静脈内骨髓移植(IV-BMT)を行ったが、末梢血における造血系細胞の置き換えは不十分(70%程度がドナータイプ)でmixed chimeraの状態であった。移植後6ヵ月で効果を検討したが、IV-BMTの肺気腫に対する明らかな効果は認められなかった。そこでIBM-BMTを行った。この方法により、大部分の末梢血はドナーの細胞に置き換えられ、移植6ヵ月後に肺気腫の進行を検討したところ、正常マウスのC3HマウスからTskマウスにIBM-BMTした群では、TskマウスからTskマウス

にIBM-BMTした群に比較し、肺胞は小型で、C3HマウスからC3HマウスにIBM-BMTしたものに近い状態であった。8週齢の発症比較初期で未処置のTskマウスと比較しても肺胞は小型であり、IBM-BMTにより肺気腫の進行が抑制されたのみならず、肺気腫の改善も認められた(図5)¹⁷⁾。C3HマウスからTskマウスにIBM-BMTしたマウスの肺では、TskからTskマウスにIBM-BMTしたマウスの肺よりも、matrix metalloproteinase-12(MMP-12)の活性化が抑制されており、MMP-12の活性化抑制により、組織破壊が抑制され、組織の再生が促されたと考えられた。

以上の結果は、IBM-BMTにより肺気腫の進行が抑制されるのみでなく、すでに破壊された肺胞壁の修復並びに改善にも役立つことが明らかになり、肺気腫は必ずしも不可逆的でないことが証明された。さらに最近、骨髓細胞から肺胞上皮に分化しうることが報告された¹⁸⁾。我々のGreen fluorescent protein(GFP)マウスを用いた検討では、ドナーの骨髓細胞から肺胞上皮への分化は証明できなかったが、肺胞上皮に分化し得る骨髓細胞を用いたBMT(再生治療を含む)は、肺移植に代わる有効なCOPDの治療法となる可能性が考えられる。

BMTによるヒト自己免疫疾患の治療

最近, ヒトでもBMTにより自己免疫疾患が治療できるということが明らかになったので¹⁹⁾ 治療抵抗性で進行性の自己免疫疾患に対しては, BMTを実施しようという国際的な動きが活発となり, とりあえず, GVHRの起こらないautoのBMTや末梢血幹細胞移植(PBSCT)が開始された²⁰⁻²²⁾. これは動物実験でも, 抗原投与により誘導される自己免疫疾患では, syngeneicのBMTによっても病気が改善されているからである^{23, 24)}. しかしながら, 抗原で誘導される自己免疫疾患と自然発症の自己免疫疾患とは, 病因が根本的に異なり, 前者は抗原によって誘導される, autoreactiveなT細胞, B細胞, 抗原提示細胞の一時的な増殖によって病気が発症してくるものであって 造血幹細胞の異常に起因するものではない. そのため, 抗原の消退またはBMTの際の放射線照射により, autoreactiveな免疫担当細胞が除去されることによって病変の進行が抑制されるものと考えられる. しかし, 自然発症の自己免疫疾患の場合は, 造血幹細胞の異常に起因するため, autoのBMTでは再発を免れない. 実際, ヒトでもautoのBMTによって自己免疫疾患の早期再発例の報告もみられ²⁵⁾ 我々が報告してきたように, ヒトの自己免疫疾患の治療としては, アロのBMT, 特に同胞からの移植よりもunrelated ドナーからの移植が推奨される²⁶⁾.

おわりに

筆者らの開発したこのBMTの方法(“灌流法”+IBM-BMT)は, ヒトのアロのBMT(再生治療を含む)の諸問題(GvHDや生着不全等)を解決する画期的な方法で, 移植・再生医療の上に革命をもたらすものと考えられる. モンキーで最善のconditioning regimenを開発し, 安全性と有効性を確認し, ヒトへ応用し, 種々の難病をこの世からなくすことができればと考えている.

文 献

- Ikehara S, Good RA, Nakamura T, Sekita K, Inoue S, Oo MM, Muso E, Ogawa K, Hamashima Y: Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune diseases. *Proc Natl Aca Sci USA*, 82: 2483-2487, 1985.
- Than S, Ishida H, Inaba M, Fukuba Y, Seino Y, Adachi M, Imura H, Ikehara S: Bone marrow transplantation as a strategy for treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus in KK-Ay mice. *J Exp Med*, 176: 1233-1238, 1992.
- Nishimura M, Toki J, Sugiura K, Hashimoto F, Tomita T, Fujishima H, Hiramatsu Y, Nishioka N, Nagata N, Takahashi Y, Ikehara S: Focal segmental glomerular sclerosis, a type of intractable chronic glomerulonephritis, is a stem cell disorder. *J Exp Med*, 179: 1053-1058, 1994.
- Theofilopoulos AN, Balderas RS, Shawler DL, Lee S, Dixon FJ: Influence of thymic genotype on the systemic lupus erythematosus-like disease and T cell proliferation of MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Exp Med*, 153: 1405-1414, 1981.
- Ikehara S, Yasumizu R, Inaba M, Izui S, Hayakawa S, Sekita K, Toki J, Sugiura K, Iwai H, Nakamura T, Muso E, Hamashima Y, Good RA: Long-term observations of autoimmune-prone mice treated for autoimmune disease by allogeneic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 3306-3310, 1989.
- Hashimoto F, Sugiura K, Inoue K, Ikehara S: Major histocompatibility complex restriction between hematopoietic stem cells and stromal cells in vivo. *Blood*, 89: 49-54, 1997.
- Kushida T, Inaba M, Hisha H, Ichioka N, Esumi T, Ogawa R, Ikehara S: Intrabone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: A powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood*, 97: 3292-3299, 2001.
- Kushida T, Inaba M, Ikebukuro K, Nagahama T, Oyaizu H, Lee S, Ito T, Ichioka N, Hisha H, Sugiura K, Miyashima S, Ageyama N, Ono F, Iida H, Ogawa R, Ikehara S: A new method for bone marrow cell harvesting. *Stem Cells*, 18: 453-456, 2000.
- Ishida T, Inaba M, Hisha H, Sugiura K, Adachi Y, Nagata N, Ogawa R, Good RA, Ikehara S: Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation: complete prevention of recurrence of autoimmune diseases in MRL/MP-lpr/lpr mice by transplantation of bone marrow plus bone (stromal cells) from the same donor. *J Immunol*, 152: 3119-3127, 1994.
- Takeuchi K, Inaba M, Miyashima S, Ogawa R, Ikehara S: A new strategy for treatment of autoimmune diseases in chimeric resistant MRL/lpr mice. *Blood*, 91: 4616-4623, 1998.
- Zhang Y, Yasumizu R, Sugiura K, Hashimoto F, Amoh Y, Lian Z, Cherry, Nishio N, Ikehara S: Fate of allogeneic or syngeneic cells in intravenous or portal vein injection: possible explanation for the mechanism of tolerance induction by portal vein injection. *Eur J Immunol*, 24: 1558-1565, 1994.
- Sugiura K, Kato K, Hashimoto F, Jin T, Amoh Y, Yamamoto Y, Morita H, Okumura K, Ikehara S: Induction of donor-specific T cell anergy by portal venous injection of allogeneic

- neic cells. *Immunobiology*, 197: 460-477, 1997.
- 13) Kushida T, Inaba M, Takeuchi K, Sugiura K, Ogawa R, Ikehara S: Treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice using a new strategy for allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 95: 1862-1868, 2000.
 - 14) Kushida T, Inaba M, Hisha H, Ichioka N, Esumi T, Ogawa R, Ikehara S: Crucial role of donor-derived stromal cells in successful treatment for intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice by BMT via portal vein. *Stem Cells*, 19: 226-235, 2001.
 - 15) 茂木孝, 木田厚瑞: 慢性閉塞性肺疾患の免学. *日本臨床*, 57: 398-410, 1989.
 - 16) Gardi C, Martorana PA, de Santi MM, Lungarella G: A biochemical and morphological investigation of the early development of genetic emphysema in tight-skin mice. *Exp Mol Pathol*, 50: 398-410, 1989.
 - 17) Oyaizu H, Adachi Y, Taketani S, Tomita M, Minamino K, Ikebukuro K, Kaneda H, Yamaguchi K, Yasumizu R, Shultz LD, Suzuki Y, Zhang Y, Fukuhara S, Ikehara S: Treatment of emphysema in Tsk mice by a new bone marrow transplantation method. Submitted to "J Exp Med"
 - 18) Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ: Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105: 369-377, 2001.
 - 19) Marmont AM: Immune ablation and stem cell therapy: A new treatment for severe autoimmune disease? *Stem Cell*, 12: 125-135, 1994.
 - 20) Tyndall A: Hematopoietic stem cell transplantation in rheumatic diseases other than systemic sclerosis and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 24: 94-97, 1997.
 - 21) Loske DJL: Autologous bone-marrow transplantation for rheumatoid arthritis. *Lancet*, 350: 337-338, 1997.
 - 22) Burt RK, Burns W, Hess A: Bone marrow transplantation for multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant*, 16: 1-6, 1995.
 - 23) van Gelder M, van Bekkum DW: Treatment of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in rats with allogeneic bone marrow transplantation from a resistant strain. *Bone Marrow Transplant*, 16: 343-351, 1995.
 - 24) Karussis DM, Slavin S, Ben-Nun A, Ovadia H, Vourka-Karussis U, Lehmann D, Mizrahi-Kol R, Abramsky O: Chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CR-EAE): treatment and induction of tolerance with high-dose cyclophosphamide followed by syngeneic bone marrow transplantation. *J Neuroimmunol*, 39: 201-210, 1992.
 - 25) Euler HH, Marmont AM, Bacigalupo A, Fastenrath S, Dreger P, Hoffknecht M, Zander AR, Schalke B, Hahn U, Haas R, Schmitz N: Early recurrence or persistence of autoimmune diseases after unmanipulated autoimmune diseases after unmanipulated autologous stem cell transplantation. *Blood*, 88: 3621-3625, 1996.
 - 26) Nelson JL, Torrez R, Louie FM, Choe OS, Storb R, Sullivan KM: Pre-existing autoimmune disease in patients with long-term survival after allogeneic bone marrow transplantation. *J Rheumatol suppl*, 48: 23-29, 1997