骨髄移植による自己免疫疾患治療へのアプローチ

——モデル動物を用いて——

池原 進・中村 敬夫*・関田 憲一*
大月 均・安水 良知・濱島 義博*

Jpn. J. Clin. Immun., 8(5):241~246, 1985.

Susumu Ikehara, Takao Nakamura*, Ken'ichi Sekita*,
Hitoshi Ohtsuki, Ryoji Yasumizu, and Yoshihiro Hamashima*

1st Department of Pathology, Kansai Medical College

** 2nd Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kyoto University*

【Summary】

Allogeneic bone marrow transplantation can prevent and treat not only systemic autoimmune diseases in NZB/NZW F₁, MRL/1, and BXSB mice, but also organ-specific autoimmune diseases in NOD mice. Normal T cells, B cells, and macrophages developed in such mice transplanted with allogeneic bone marrow 3 mo after the bone marrow transplantation. The newly developed T cells were found of be tolerant of both bone marrow donor-type and host-type major histocompatibility complex determinants. Therefore, bone marrow transplantation ultimately might become a viable strategy for the treatment of severe life-threatening autoimmune diseases in humans.

Key words: bone marrow transplantation,
BXSB mice,
MRL/1 mice,
NZB/NZW F₁ mice,
NOD mice

【要 旨】

自己免疫疾患の病因は、骨髄の幹細胞レベルの異常に起因し、正常の幹細胞を移植することにより、T細胞、B細胞、マクロファージの機能が正常化し、血中の免疫複合体や自己抗体も減少して病変が著明に改善される。骨髄中のT細胞が完全に除去できれば、GVH反応も起こらず allogeneic bone marrow transplantation も可能であり、新しく分化してきたT細胞は骨髄 donor のみならず、教育を受けた胸腺の主要組織適合抗原に対して tolerance になっていることが判明した。それゆえ、骨髄移植は自己免疫疾患の根本治療として、将来ヒトへも応用されるものと考えられる。

I. はじめに

近年、種々の自己免疫疾患自然発症モデル動物が開発され、自己免疫疾患の病因の解明に役立ってきた。モデル動物としては、NZB/NZW F₁ マウスが長年利用されてきたが、最近開発された MRL/l マウス¹⁾は T リンパ腫を好発し、ヒトの SLE と同様、抗核抗体や抗 DNA 抗体が検出され、腎糸球体に wire-loop lesion や免疫複合体の沈着を認める。腎の血管周囲のみならず、肺の血管ならびに気管支周囲や肝臓にも著明なリンパ球、形質細胞の浸潤が認められる。

また Sjögren syndrome と類似の唾液腺の病変や慢性関節リウマチ様の病変も出現し、リウマチ因子も検出される。MRL/l マウスも NZB/NZW F₁ マウスと同様、雌に病変が出現しやすいが、最近開発された BXS^B マウスでは、雄の方が早期に SLE 様の腎病変が出現するという事実から、従来考えられていた性ホルモンの病因としての役割は、それほど重要でないことが判明した。BXS^B マウスでは、雄に B リンパ腫が好発し、リンパ腫と自己免疫疾患との関連を解析するうえにも、これらは恰好のモデル動物といえる。

従来、免疫担当細胞側の異常としては、T 細胞、B 細胞、マクロファージの機能の異常が指摘されてきた。一方、環境因子の異常としては、ウイルス感染やホルモン異常が考えられてきた²⁾。著者らは、自己免疫疾患自然発症モデル動物 (NZB/NZW F₁, MRL/l, BXS^B マウス) を用いて、自己免疫疾患の病因は骨髄の幹細胞レベルの異常に起因し、正常の幹細胞を移植することにより、自己免疫疾患を予防できるだけでなく治療も可能であることを見出した³⁾。

II. 方 法

1. 骨髄移植による全身性自己免疫疾患の治療法

MRL/l, BXS^B, NZB/NZW F₁ マウスともにすでにリンパ腫が出現し腎病変の認められる月齢で、致死量の放射線を照射し骨髄を移植した。ヒトで骨髄移植を行う際、HLA を match させる必要から、従来、同胞や親の骨髄が移植されてきたが、自己免疫疾患は遺伝性の疾患であることから他人の骨髄を移植しなければならず、マウスでも allogeneic bone marrow transplantation (以下 ABMT と略す) を試みた。major histocompatibility complex の barrier を越えて骨髄移植をする際、臨床的に graft-versus-host reaction (以下 GVHR と略す) が問題になる。それゆえ、まず骨髄中に T 細胞がまったくないヌードマウス (ヌードマウスの脾臓には加齢とともに T 細胞が増加することを著者らは見出した⁴⁾ので、2 ヶ月以内の若いヌードマウス) の骨髄を用いた。

骨髄移植して少なくとも 3 ヶ月後に屠殺し、免疫病理学的検索、血清学的検査、T 細胞、B 細胞、マクロファージの機能を調べた。また、コントロール群としては MRL/l マウスに放射線照射し MRL/l マウスの骨髄を移植したが、2 ヶ月以内に腎不全で死亡した。

2. 骨髄移植による臓器特異的自己免疫疾患の治療法

棚野、牧野両博士により最近開発された NOD マウス⁵⁾は、type I diabetes mellitus (若年性糖尿病) のモデル動物として注目をあびている。生後 200 日で 80% に insulinitis が認められ、生後 250 日で 80% に糖尿病が発症する。それゆえ、insulinitis の発症した 6 ヶ月齢の NOD マウスに BALB/c nu/nu マウスの骨髄を移植し、3 ヶ月

図 1-a 9 ヶ月齢の NZB/NZW F₁ マウス (雌) の腎
IgG の著明な沈着を認める

図 1-b 骨髄移植後、5 ヶ月経過した生後 11 ヶ月齢の
NZB/NZW F₁ マウス (雌) の腎。IgG の沈
着はメサンギウム領域にわずかに認められる

図 2-a 10 ヶ月齢の BXSB マウス (雄) の肝
著明なリンパ球, 形質細胞の浸潤を認
める

図 2-b ヌードマウスの骨髄を移植した 1 年 3 ヶ月
齢 BXSB のマウス (雄) の肝. リンパ球,
形質細胞の浸潤は, ほとんど認められない

表 1 Reduction of circulating immune complexes (CIC) and autoantibodies
after allogeneic bone marrow transplantation (ABMT)

Mice	ABMT*	No.**	Clq-CIC*** ($\mu\text{g/ml}$)	Anti-dsDNA (cpm)	Anti-Sm (cpm)
BALB/c 6M pooled			<0.1	529	488
BXSB	(+)	21	0.4 ± 1.2	700 ± 344	669 ± 180
	(-)	15	13.2 ± 14.9 ($P < 0.001$)	$1,943 \pm 2,050$ ($P < 0.01$)	884 ± 326 ($P < 0.02$)
MRL/1	(+)	20	3.9 ± 3.8	$13,309 \pm 13,386$	$1,385 \pm 853$
	(-)	6	19.7 ± 7.9 ($P < 0.001$)	$22,776 \pm 9,170$ (n.s.†)	$3,832 \pm 1,900$ ($P < 0.001$)
B/W F ₁	(+)	3	13.5 ± 5.9	$5,432 \pm 4,071$	$1,071 \pm 147$
	(-)	3	14.9 ± 6.8 (n.s.)	$3,134 \pm 1,754$ (n.s.)	$1,040 \pm 23$ (n.s.)

* Allogeneic bone marrow transplantation

** No. examined

*** Clq-binding circulating immune complexes

† Not significant

後屠殺し, 免疫病理学的検索を行った.

III. 結 果

1. 骨髄移植による全身性自己免疫疾患の治療

1) 免疫病理学的所見

i) 胸腺の変化

萎縮した胸腺は, 骨髄移植 3 ヶ月後には肉眼的にも大きくなり, 組織学的にも皮質にリンパ球の集簇を認めた. この事実は, 異常な幹細胞では胸腺内で T 細胞に分化できず胸腺の早期退縮をきたすが, 正常の幹細胞は, いったん退縮した胸腺内でもさらに増殖, 分化できることを意味している. それゆえ, T 細胞の機能不全は胸腺の上

皮細胞の機能不全によるのではなくて, 幹細胞の異常により前駆 T 細胞が胸腺内で分化できないことによることが, 判明した.

ii) 腎病変

NZB/NZW F₁, BXSB, MRL/l マウスともに, 未処置コントロール (以下 C と略す) 群では, リンパ球, 形質細胞の腎実質内 (とくに血管周囲) への浸潤が顕著で, 糸球体もヒトの SLE と同様の wire-loop lesion が認められたが, ABMT 群では, ほとんど正常に近い像を示した. 蛍光抗体でも図 1-a に示したように, C 群では免疫グロブリンや補体成分の沈着が高度であったが, ABMT 群では軽度の沈着を認めたにすぎなかった (図 1-b).

表 2 IgG-Rheumatoid factor in normal and MRL/l mice treated with or without allogeneic bone marrow transplantation (ABMT)

Mice	ABMT	N*	OD ⁴⁰⁵ (mean $\pm$ s.d.)
MRL/l	(+)	13	0.360 $\pm$ 0.076
	(-)	6	0.504 $\pm$ 0.119
BALB/c 6M			0.356 $\pm$ 0.026

* Number examined

** Analyzed by student's t-test

表 3 Newly-developed T cells are tolerant of both bone marrow donor-type (BALB/c) and host-type (MRL/l or BXSB) major histocompatibility complex (MHC) determinants

Age (mo)	Mice	E/T ratio*	% specific release from target cells (mean $\pm$ s.d.)		
			P815(H-2 ^d)	EL-4(H-2 ^b)	X5563(H-2 ^k)
2	BALB/c(H-2 ^d)	2/1	4.2 $\pm$ 0.6	79.6 $\pm$ 9.4	100
2	C3H/HeN(H-2 ^k)	2/1	51.4 $\pm$ 16.3	59.7 $\pm$ 0.5	0
3	MRL/l(H-2 ^k)	4/1(NW) ⁺	2.0 $\pm$ 0.5	0	1.2 $\pm$ 0.7
6	MRL/l with BALB/c nu/nu B.M.*	4/1(NW)	0	46.2 $\pm$ 0.6	0
9	BXSB(H-2 ^b)	4/1(NW)	1.4 $\pm$ 0.6	0	1.0 $\pm$ 0.5
12	BXSB with BALB/c nu/nu B.M.	4/1(NW)	0	0.5 $\pm$ 2.2	85.7 $\pm$ 3.4

* Effector/Target cell ratio.

+ Spleen cells were passed through a nylon wool column and used as responder cells.

* MRL/l mice were irradiated and reconstituted with bone marrow cells of BALB/c nu/nu mice.

表 4 Increase in both T cell and B cell functions in NOD mice

Mouse strain (♀)	Age (mo)	Thy-1 ⁺ (%)	Background	PHA (25 μ g/ml)	(2.5 μ g/ml)	LPS (25 μ g/ml)	Stimulation index		
				cpm $\times 10^{-3}$			PHA	Con A	LPS
BALB/c	4	27.8	1.3	38.5	77.1	19.9	29.6	59.3	15.3
ICR	7	22.9	1.2	7.6	27.8	16.3	6.3	23.1	13.5
NOD	7	52.9	3.9	43.0	122.3	95.0	11.0	31.3	24.3
NOD	4 $\rightarrow$ 7	18.4	4.6	27.8	77.7	65.6	6.0	16.8	14.2

iii) 肝病変

BXSB マウスでは、腎以外にも肝に著明なリンパ球の浸潤を認め (図 2-a)、ヒトのルポイド肝炎のモデルとしても有用であるが、ABMT 群では肝へのリンパ球の浸潤は、ほとんど消失した (図 2-b)。

2) 血清学的所見

表 1 に示したように、これらのマウスではヒトの SLE と同様に血中の免疫複合体 (以下 CIC と略す) や抗 dsDNA 抗体等の自己抗体が加齢とともに上昇するが、

ABMT 群では減少し、とくに CIC の血中レベルと腎病変との間に相関を認めた。MRL/l マウスでは慢性関節リウマチ様の病変が出現し、血中にも rheumatoid factor (以下 RF 略す) が検出されるが、表 2 に示したように骨髄移植により RF が正常化し、関節病変も改善されることが判明した。

2. 骨髄移植後の免疫担当細胞の機能

i) T 細胞

C群では、治療前の月齢で Con A に反応するT細胞が検出できなかったが、ABMT 後、Con A に反応するT細胞の回復を認めた。リンパ球混合培養やキラーT細胞の誘導能で解析すると、新しく分化してきたT細胞は、BALB/c origin のT細胞でありながら education を受け

図3 GTT in NOD mouse after bone marrow transplantation

た胸腺の H-2 に対しても tolerance になっていることが判明した(表3)。

ii) B細胞機能

C群では、LPS に対する反応性が亢進していたが、ABMT 群では、LPS に対する反応性は、むしろ抑制される傾向があることが判明した。

iii) マクロファージの機能

BXSB マウスでは、加齢とともに末梢血液中の単球の数が増加するが、ABMT 後では単球の数も正常化し、また Fc receptor を介しての phagocytosis (EA) の機能も正常化することが判明した。

3. 骨髄移植による臓器特異的自己免疫疾患の治療

NOD マウスに ABMT を行い、3 ヶ月後、屠殺直前に glucose tolerance test (以下 GTT と略す) で調べると、図3に示したように、ABMT 群では正常の ICR マウスよりも、むしろ低値を示した。酵素抗体で調べると図4のように、無処置群ではTリンパ球がラ氏島へ浸潤し、 β 細胞を選択的に破壊しているが、ABMT 群では Insulinitis が消失し、正常の α , β , δ 細胞の存在を確認できた(図5)。

NOD マウスの免疫能を mitogen response で調べると、表4に示したようにT細胞、B細胞の機能の亢進が認められ、ABMT により、これらの機能が正常 ICR マウスのレベルに近づくことが判明した。

一方、マクロファージの機能を調べると、NOD マウスでは4週齢の若い頃から亢進しており、T細胞、B細胞、マクロファージ、すべての機能亢進が認められ、それゆ

図4 骨髄移植後3ヵ月経過した生後7ヵ月齢の NOD マウス(雌)の膵
リンパ球の浸潤は認められず、三重染色で正常の α , β , δ 細胞が存在する

図 5 7 ヶ月齢の NOD マウス (雌) のラ氏島の酵素抗体 (抗インシュリン抗体による) T細胞が著明に浸潤し, β 細胞を選択的に破壊している

え NOD マウスでも, 幹細胞レベルの異常が示唆された。

IV. 考 案

以上の結果より, 自己免疫疾患の病因は, 骨髄の幹細胞レベルの異常に起因し, 正常の幹細胞を移植することにより, T細胞, B細胞, マクロファージの機能が正常化し, 血中の免疫複合体や種々の自己抗体の量も軽減して, 病変が改善されることが判明した。幹細胞の異常の原因としては, 内因性のウイルスが関与しているものと考えられ, 今後この方面からのアプローチが必要と考えられる。

最近骨髄移植は, ヒトでも再生不良性貧血や白血病に行われているが, GVHRを防ぐために HLA の match した donor を探さねばならず, 治療上の neck になっていた。

今回著者らは, 骨髄中の T細胞を完全に除去できれば GVHR も起こらず, 自己免疫疾患を治療できることを実証した。さらに organ-specific な自己免疫疾患の 1 つである若年性糖尿病のモデル動物 (NOD マウス) に, 骨髄移植を行い, 糖尿病の発症を予防できることも著者らは明らかにした⁶⁾。以上のように systemic な自己免疫疾患 (SLE, RA, PSS) のみならず, organ-specific な自己免疫疾患の中にも, 骨髄移植により治療できる疾患がかなり存在するものと考え, モデル動物を用いていかなる疾患が治療可能かを, 現在解析中である。

将来, ヒトの幹細胞の分画法, 培養法が確立されれば, 白血病, 再生不良性貧血などの血液疾患や自己免疫疾患のみならず, 種々の代謝疾患も骨髄移植で治療が可能と

考えられ, そういう日もそう遠くはないものと期待される。

文 献

- 1) Murphy, E.D., Roths, J.B.: Autoimmunity and lymphoproliferation induction by mutant gene *lpr*, and acceleration by a male associated factor in strain BXSB mice. In Genetic Control of Autoimmune Disease. Rose, N.R., Bigazzi, P.E. and Warner, N.L., editors, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 207~220, 1978.
- 2) Theofilopoulos, A.N., Dixon, F.J.: Etiopathogenesis of murine SLE. Immunol. Rev., 55: 179~216, 1981.
- 3) Ikehara, S., Good, R.A., Nakamura, T., et al.: Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune diseases. Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 2483~2487, 1985.
- 4) Ikehara, S., Pahwa, R.N., Fernandes, G., Hansen, C.T. and Good, R.A.: Functional T cells in athymic nude mice. Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 886~888, 1984.
- 5) Fujita, T., Yui R., Kusumoto, Y., Serizawa, Y., Makino, S., Tochino, Y.: Lymphocytic insulinitis in a 'Non-obese diabetic (NOD)' strain of mice: An immunohistochemical and electron microscope investigation. Biomedical Res., 3: 429, 1982.
- 6) Ikehara, S., Ohtsuki, H., Good, R.A., et al.: Prevention of type I diabetes in NOD mice by allogeneic bone marrow transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci., in press.