

骨髄細胞の完全な入れ換えによる重症自己免疫疾患の治療の可能性

内田千香子 作馬有紀 志水由美
畑田雅純 吉崎志織 吉永秀

Transplantation of autologous hematopoietic stem cells in combination with an extensive ablation of host immune cells by chemotherapeutic agents is suggested to be a possible therapeutic measure for severe autoimmune diseases such as systemic erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis etc. Here, we discussed how the pathogenic immune cells against autologous tissue will be eliminated successfully. What is the rationale for immune reconstitution by transplantation of autologous bone marrow stem cells without re-emergence of self-reactive immune repertoire.

キーワード：1. 自己免疫病, 2. 骨髄幹細胞移植, 3. 免疫抑制, 4. 免疫寛容, 5. Tリンパ球

1. はじめに

自己免疫疾患と呼ばれている広範な疾患群は、特定の遺伝的背景に環境因子（例えば感染など）が加味され、自己組織に対する寛容性が破れて発症するとされている。この疾患群は、①自己寛容の破綻と免疫系細胞による自己組織の異物としての認識、②異物化された自己組織に対するエフェクター系の免疫細胞または抗体の生成、③免疫系により動員され、組織の破壊に直接関与する炎症系の細胞、分子による慢性的な組織破壊が起こる疾患であると整理できる。

この自己認識の錯誤過程において、B細胞や抗体が主役をなすような自己免疫疾患があるにせよ、寛容性破綻の主役となり初めに引き金を引くのはT細胞であることは確立されており、この意味でこの考察においてはT細胞の問題を主として取り上げる。これらの自己免疫性疾患治療の新しい方法として、高用量の免疫抑制剤の使用と自己造血幹細胞の移入を用いる方法が、自己免疫性の重度の慢性炎症性疾患、例えば多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、クローン病などに対して提唱されている⁽¹⁾。

本総説では、これらの自己免疫疾患について最近注目され始めた免疫系細胞の総入れ替えを基本にした治療法について考察を加える。また、この原理に

よる治療法は現在のところは臨床的には十分には実用化されておらず、一部の実験的治療がなされているにすぎないが、将来実用化されと考えられるので、その原理的な側面と、この原理を支える現在までの実験的な治療から浮かび上がった基礎的な問題について考える。

2. 全身性自己免疫疾患治療の現状

全身性的な病変の広がりを示す自己免疫疾患の代表はSLEや関節リウマチで、まず、これらの疾患に対する治療を中心に現行の治療の骨格を述べる。

多くの疾患について云えることではあるが、SLEや関節リウマチという特定の診断名がつけられていても、その内容はさまざまで、実際の治療は患者の現状をきめ細かく観察して実施されている。とくに臓器病変、疾患活動性、致命的危険性などがなければ、単に経過を観察することから、少量のステロイド使用、非ステロイド性抗炎症剤（NSAID）の使用による対症療法が奨められている。上記の病態が劣悪である場合にはじめて、大量のステロイドの使用、免疫抑制薬の使用が考慮される。⁽²⁾ また、免疫系のエフェクター機構の中核にある炎症性サイトカイン、TNF α 、IL - 1、IL - 6等の抑制薬の使用が比較的最近始まっている⁽³⁾。NSAIDは自己免疫疾患の種類（炎症性腸疾患など）によっては使用

できない場合もある。

これらの治療法の中で、この論文で注目するのは免疫抑制薬の使用である。免疫抑制薬には様々な薬物、生物製剤が使用されている。すなわち、cyclophosphamide, methotrexate, azathioprine, mizoribine, cyclosporin, tacrolimus など多彩なものが使用されているが、これらの免疫抑制薬は、文字通り免疫系を含め、骨髄細胞への抑制作用を示すため、危険な薬物であり、副作用も強いいため、現状では通常の他の治療では対応できないと考えられている重症の自己免疫病の治療薬とされている。

これらの免疫抑制薬のうち、最も中心的に使用されているのはアルキル化剤である cyclophosphamide や葉酸拮抗薬である methotrexate で、これらの薬物は細胞周期の S 期に働き、DNA 合成を阻害して細胞分裂を抑制する作用があり、抗がん剤としても用いられている。日本ではこれらの薬物は自己免疫病の治療のためには現在のところ比較的少量が使用されているが、この比較的穏やかな免疫抑制治療によっても、自己免疫性の障害は著しく改善され、寛解期に導入できる例のあることが報告されているが、多くの場合数週～数ヵ月後には再燃することも知られている⁽⁴⁾

自己免疫病の根源的な原因が自己寛容の崩壊にあることから、このような自己攻撃性の免疫細胞を除去するという治療法である細胞分裂阻害剤の使用は理論的には容易に考えられる。しかし、この治療法は原理的には個体の防御系、造血系を破壊してしまう方法でもあるため、致命的な副作用が生じることも予測されるので、十分な感染防御対策などの準備のもとに慎重に実施されてきた。しかし、この防御系、造血系の破壊が回復できる手段があれば、これを併用することで、この治療法を用いることも可能となることも推測できる。現在では、造血幹細胞から免疫系の細胞を含めすべての血液細胞が産生されることが判明しているし、すでに造血幹細胞を用いる様々な治療は、とくに白血病を中心として悪性腫瘍の治療には一般的な最先端の治療として普及している⁽⁵⁾。このような現状から、細胞分裂抑制剤を造血幹細胞の移入と組合せて用いることについては、技術的な問題とこれに伴う臨床的な問題点は十分検討済みのことが多い。

3. 骨髄破壊的な免疫抑制剤処理と自己造血幹細胞移入の組合せによる自己免疫病の治療の可能性

自己免疫病の原因となっている自己認識性のリンパ球とくに T 細胞がどの程度排除できれば疾病の治療目的を達成することができるのかについては十分な根拠はないが、上述のような中等用量の免疫抑制剤によっても一時的な寛解が誘導されることは明らかである。また、骨髄破壊的な量の免疫抑制剤により数年にわたる寛解、うまくいけば永久の治療が期待できると考えられている。したがって、このような骨髄破壊的な治療にどのような幹細胞移植が効果的であるのか、また、幹細胞移植をした場合に自己免疫病の再燃を防ぐのにはどのようなことが問題になるのかを次に考察する必要がある。

なお、造血幹細胞の移入には同種異型移入 (allo-transplantation) と自己幹細胞移入 (auto-transplantation) が様々な臨床分野で利用されているが、同種異型移入の場合は移植された細胞の生着の問題および移植片対自己反応 (GVH) の問題を別に考慮する必要があるし、自己免疫病の治療については悪性腫瘍の治療の場合と異なり、自己幹細胞の移入では考慮すべき問題は限られるので、本論文においては自己血液幹細胞の移入に関する問題のみを考慮する。

4. 自己造血幹細胞移入の手順

ここでは自己造血幹細胞が採取された後、どのような配慮により前処置され移入に用いられているかの概略⁽⁶⁾を紹介する。

- ① 患者の骨髄から直接採取するか、または cyclophosphamide および granulocyte colony stimulating factor による前処置により、幹細胞の骨髄から末梢血への移動を誘導して末梢血から leukapheresis により白血球を収集する。
- ② 白血球群の中から CD34⁺細胞を濃縮することが望ましい。
- ③ 細胞毒性試薬、単クローン抗体、放射線などを組み合わせて、この細胞群に混入している成熟免疫細胞を増殖できない状態にする。
- ④ ホストの免疫系を cyclophosphamide などにより除去した後に、調整した細胞を再輸血して造血系

を回復させる。

- ⑤移入後数日の間に、患者に抗胸腺細胞抗体を注射し、残存する成熟T細胞を除去する。この操作は特に移植に用いる造血系細胞が幹細胞の濃縮を受けていない場合に重要である。

現在のところ、上述のような手順で実施されているが、これらの手順が全て必要であるか否かも確立されているわけではなく、実際の臨床例が増加してゆけば当然改訂されると思われる。

5. 自己反応性T細胞の排除に関する考察

自己免疫疾患は自己反応性の免疫細胞、とくにT細胞が増殖することによる疾患であるので、当然このような自己反応性T細胞を強力に除去、または不活化することにより治療できるであろうと考えられ、関節リウマチ、多発性硬化症、SLEはじめ多くの自己免疫疾患の実験的治療法として提唱されている⁽⁶⁾。また、この治療には免疫システムの回復のため同時に造血幹細胞の移入が必要なことも自明である。このような支持療法の進歩、さらにはステロイド・パルス療法、cyclophosphamideの間歇静注法などの強力な免疫抑制法の確立により、寛解の導入、維持が可能となって自己免疫病の治療にも大きな進歩がみられている。しかし、このような治療によっても十分な病態の改善が得られない難治性の症例もあり、この場合には、より強力で、根源的な免疫系細胞の除去を含む治療法の開発が求められている。実際、Tyndallら⁽⁶⁾の先行的な実験によれば、完全寛解が得られることが十分期待できるとされている。しかし、骨髓破壊的な処置、移植造血幹細胞の生体内における増殖、ホメオスターシスの新たな成立、自己反応性クローンの再増殖の可能性など不明な点が多い。

6. 自己免疫疾患の自己造血幹細胞移入による治療のメカニズムの考察

造血幹細胞は、分裂や増殖を繰り返し、機能も形態も異なる様々な成熟血球に分化できる「多分化能 pluripotent」と自分自身を複製する「自己複製能 self-renewal」という2つの特徴を兼ね備えた細胞と定義されている。すなわち、造血幹細胞は自己複製することで、自分自身を維持しつつ各種の血

液細胞を枯渇することなく供給し続けるという特性が造血幹細胞移植の基本概念となっている。

この造血幹細胞の細胞表面には分子量11.5万の膜貫通型糖タンパクが発現しており、この分子は造血幹細胞特異抗原（CD34抗原）として知られている。CD34陽性細胞は正常ヒト骨髓単核細胞の1～2%、末梢血単核細胞の0.01%の頻度とされ、従来骨髓由来の造血幹細胞が主として用いられてきたが、抗がん剤使用後、およびコロニー刺激因子（G-CSF）の投与後、CD34陽性細胞は末梢血でも正常の数～数10倍増加しており、骨髓の採取に比較して、患者の負担が少ないため、現在では白血病をはじめ、悪性腫瘍の抗がん剤治療後の造血幹細胞移植には末梢血幹細胞の使用が主流となっている⁽⁵⁾。

骨髓破壊的な造血細胞の除去が、病的な自己反応性のT細胞やB細胞の排除にも有効であり、その後実施される骨髓または末梢血からの自己造血幹細胞の移入により、新しい免疫システムの再構成が起こり、新たな自己寛容状況が構築されと考えられているが、この免疫システムのリセットの背景にあるメカニズムについては、意外に知見が少なく、未だに実験モデルからの推定も多いが、次第に臨床例からの知見が増加している⁽⁷⁾。まず、自己寛容が成立する場としての胸腺の機能について、従来は成人の胸腺は退縮しておりほとんど機能していないと考えられてきたが、胸腺における新しいT細胞の成熟と補給機能は、老人では若干低下するものの、ほとんど生涯保たれていることが明らかになっている⁽⁸⁾。

したがって、造血幹細胞移入後における新しい免疫系の再構成は、胸腺において自己反応性T細胞が排除された後に胸腺から出てくるナイーブT細胞を中心にした自己寛容の新しい再構成であると考えられている⁽⁸⁾。しかも、この高度の免疫除去処置および自己造血幹細胞移植後であっても、ホストの末梢血T細胞は完全に新しいクローンによって置き換えられているのではない。古いクローンの生き残りの原因としては、休止期にある細胞には細胞分裂阻害剤が効きにくいこと、また、疾病によっては（例えば多発性硬化症など）薬物が侵入しにくい場所（たとえば血液-脳関門）の内部に侵入しているリンパ球があることなどが挙げられている。しかし、この古いクローンの残存が炎症性病変の持続や再燃を伴わないことも明らかにされている⁽⁹⁾。こ

の成熟した古いクローンが再燃の原因とならない理由については明瞭ではないが、次の項目で論じるような新たな造血幹細胞からの増殖により、これら古いクローンの再増殖が抑制される機構が存在すると考えられている⁽⁹⁾。

7. 造血幹細胞移植後の新しい自己寛容の成立メカニズム

この問題には、成人になった以後の免疫系の再構築過程で十分な自己寛容を誘導できるのかという疑問と、自己免疫疾患患者に自己造血幹細胞の移植を実施する場合には、移植後の免疫システム再構成の過程で患者の遺伝的背景により、再び自己反応性リンパ球クローンが増加して、元の病気の再燃に至る可能性があるのではないかという2つの疑問がある。この2つの疑問は密接に関連しており、区別して考察することは困難であるし、現状では不明の点が多いので、一括して考察する。

骨髓破壊的治療実施の後にはホスト内の免疫系細胞の生息域（ニッチ）がほとんど空になっており、新たな造血幹細胞の移入により、いわゆるホメオスタティック・シグナルが働き⁽¹⁰⁾、移入細胞と残存するホスト内の細胞の増殖が急速に起こり、免疫系の再構成がなされる。しかし、この人工的な状況下では胸腺からのT細胞の補給の速度が、特に老人においては、限られているにもかかわらず、それを超える速度でT細胞は増殖しており、これは末梢組織におけるリンパ球の増殖によって補完されていると考えられている。すなわち、造血幹細胞移入後、6-12ヵ月の間では当初期待されたように胸腺から産生されたばかりのナイーブT細胞の形質を示す細胞の数は意外に少なく、多くのT細胞はメモリー細胞の形質を示す⁽¹¹⁾。しかも、CD4⁺T細胞の数が少なく、成熟型のCD8⁺T細胞の増殖が急速に起こっている⁽¹²⁾。この現象は強度の骨髓破壊操作により、ほとんどの免疫細胞のニッチが空白となり、その場所をとりあえず増殖が容易なCD8⁺T細胞で占めることで、新たな寛容のレパートリー形成を行っているのであろうし、このニッチの占拠が残存する自己反応性のT細胞クローンの増殖をとりあえず妨げていると考えられている⁽¹²⁾。

上述のような血液幹細胞移入後早期に分化してくる成熟CD8⁺T細胞のT細胞レセプター(TCR)は

自己組織に対してアフィニティーの低いものが多く⁽¹³⁾、残存した自己反応性のCD4⁺およびCD8⁺T細胞のTCRは相対的に高いアフィニティーを持っており、抗原提示細胞との相互作用によって、高アフィニティー細胞の方がアポトーシスに陥りやすく、残存した自己反応性T細胞が残りにくいと考えられている⁽¹⁴⁾。実際、造血幹細胞移入後早期にFas⁺CD4⁺およびCD8⁺T細胞の頻度が上昇していることは、このようなT細胞のアポトーシスに陥りやすいことを示しているとされる⁽¹⁵⁾。

また、強力な化学療法の後に移入された造血幹細胞から増殖したCD8⁺T細胞の形質は、主にCD8⁺CD57⁺およびCD8⁺CD27⁻からなっており、これらのT細胞はテロメアの長さが短くin vitroにおける分裂能力が低下している⁽¹⁶⁾。このことは、移入後に幹細胞から速やかに増殖したCD8⁺細胞は、その後胸腺を経て末梢に分布するナイーブT細胞が増殖するに従って排除されていくと考えることができる。このように免疫系の除去後に末梢のT細胞プールを占める細胞は、終局的には胸腺由来の細胞であることがマウスの実験系の結果からも推測されている⁽¹⁷⁾。このことが、残存する可能性のある自己反応性T細胞による自己免疫病の再燃がないことの重要な理由と考えられる。

新たに形成されるT細胞が、ホストの持っている特定の遺伝的背景下に再び、自己組織を異物として認識する可能性については、現在知られている実験的治療においてはその可能性が少ないとされているが、そのメカニズムには不明の点が多い。しかし、自己免疫疾患においては胸腺からのT細胞の移出の低下が関節リウマチ⁽¹⁸⁾、SLE⁽¹⁹⁾において知られており、これらの疾患で造血幹細胞の移入後に胸腺での細胞増殖が増加していることとあわせて考えると、自己免疫疾患の病勢が不良な場合には胸腺からのT細胞の移出が抑制されていたのが、幹細胞移入後には回復して新しい自己寛容性が再構成されていることが伺われる。

8. おわりに

上述のような骨髓破壊的操作後の血液幹細胞移入による免疫系の再構成過程は、要するに、化学療法剤により自己反応性の病因となっているリンパ球を含めて免疫系の細胞がほとんど駆逐され、外部から

の血液幹細胞の増殖に重要なニッチを開放する。新しく移入された血液幹細胞は、このニッチを急速に埋めるが、その場合、自己組織には末梢における低い反応性の $CD8^+$ T 細胞が先ず増殖し、この細胞は徐々に胸腺由来の新しい naïve T 細胞により置き換えられ、この過程では自己免疫を起こす外部環境の影響が疾病の発症以前とは異なるため、あらたな寛容状態がもたらされて自己免疫状態が治癒すると考えられる。

ただし、重症の再生不良性貧血や白血病の治療法として確立されてきた骨髓破壊的な移植前治療と、自己造血幹細胞の移入によって得られた知見を考慮すると、自己免疫疾患の治療においても、完全な骨髓破壊的な前処置には、当然のことながら治療に使用する薬剤の毒性による致命的な副作用も予測され、とくに高齢者の治療には適していない可能性も十分予測される。したがって、このような治療の実施は十分慎重に考慮される必要性があろう。

文 献

1. Van Laar, JM and Tyndall A (2003) Intense immunosuppression and stem-cell transplantation for patients with severe rheumatic autoimmune disease: a review. *Cancer Control* 10, 57.
2. Hahn BH (2005) Systemic lupus erythematosus. in: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, Columbus, 1960.
3. Furst, DE, et. al. (2004) Updated consensus statement on biological agents, specifically tumor necrosis factor α (TNF α) blocking agents and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), for the treatment of rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 63 (Suppl II), ii 2.
4. Sospedra M and Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683.
5. 中畑龍俊 (2008) 幹細胞の臨床応用とその課題。 *日本臨床* 66, 831.
6. Tyndall A and Saccardi R (2005) Haematopoietic stem cell transplantation in the treatment of severe autoimmune disease: results from phase I/II studies, prospective randomized trials and future directions. *Clin. Exp. Immunol.* 23, 683.
7. Sykes, M and Nikolic, B (2005) Treatment of severe autoimmune disease by stem-cell transplantation. *Nature* 435, 620.
8. Douek, DC et al (2000) Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 355, 1875.
9. Muraro, PA et al (2005) Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J. Exp. Med.* 201, 805.
10. Jameson, SC (2002) Maintaining the norm; T-cell homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 547.
11. Koehne, G et al (1997) Phenotype of lymphocyte subsets after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 19, 149.
12. Mackall, CL et al (1997) Distinctions between $CD8^+$ and $CD4^+$ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 89, 3700.
13. Goldrath, AW and Bevan, MJ (1999) Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature $CD8^+$ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* 11, 183.
14. Ernst, B et al (1999) The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11, 173.
15. Singh, RK et al (1999) Fas-FasL-mediated $CD4^+$ T cell apoptosis following stem cell transplantation. *Cancer Res.* 59, 3107.
16. Monteiro, J et al (1996) Shortened telomeres in clonally expanded $CD28^- CD8^+$ T cells imply a replicative history that is distinct from their $CD28^+ CD8^+$ counterparts. *J. Immunol.* 156, 3587.
17. Mackall, CL et al (1993) T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential

CD 5 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 82, 2585.

18. Koetz, K et al (2000) T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Aca. Sci. U.S.A.* 97, 9203.
19. Kayser C et al (2004) Decreased number of T cells bearing TCR rearrangement excision circles (TREC) in active recent onset systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13, 906.

付記) この小考察は、著者の1人の吉永が指導した平成19年度熊本保健科学大学衛生技術学科のスマール・グループの卒業研究の一端として、文献蒐集と考察がなされ、その結果できあがった筆頭著者の内田千香子の卒業論文を中心に他の共著者との共同考察の結果をまとめたものである(吉永)。

A Possible Therapy for Severe Autoimmune Diseases with an Extensive Bone Marrow Ablation Followed by Transplantation with Autologous Hematopoietic Stem Cells.

Chikako Uchida, Yuki Sakuma, Yumi Shimizu, Masazumi Hatada,
Shiori Yoshizaki and Masaru Yoshinaga

Summary

Transplantation of autologous hematopoietic stem cells in combination with an extensive ablation of host immune cells by chemotherapeutic agents is suggested to be a possible therapeutic measure for severe autoimmune diseases such as systemic erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis etc. Here, we discussed how the pathogenic immune cells against autologous tissue will be eliminated successfully. What is the rationale for immune reconstitution by transplantation of autologous bone marrow stem cells without re-emergence of self-reactive immune repertoire.