

## 特集「造血幹細胞移植の新展開」

## 新しい造血幹細胞採取法 &amp; 移植法 (骨髄内直接注入)

池原 進

関西医科大学共同研究講座幹細胞異常症学

## はじめに

著者らは25年前に自己免疫疾患を自然発症するマウスを用いて、正常マウスの骨髄細胞を移植すると病気が治療できることを発見した<sup>1)</sup>。その後、種々の難病のモデル動物を用いて、1型糖尿病だけでなく、ある種の2型糖尿病<sup>2)</sup>や難治性の腎炎<sup>3)</sup>もアロの骨髄移植(BMT)によって治療できることを証明した。しかし、MRL/lpr マウス<sup>4)</sup>だけが例外で、このマウスは放射線に感受性のため 8.5Gy 以上の放射線に耐えられず、低線量 (8.5Gy以下) の放射線と静脈 (iv) から骨髄細胞を注入する従来の BMT の方法 (IV-BMT) ではドナーの骨髄細胞が生着せず、自己免疫疾患が再発してくることが明らかになった<sup>5)</sup>。そこで、このマウスを用いて mild な conditioning regimen (前処置) でもアロの BMT が成功する方法の開発に努め、新しい骨髄移植の方法を発見したので紹介する。

## 新しい骨髄移植方法の特徴

従来の同種骨髄移植 (BMT) の問題点としては、①移植片付宿主病 (GvHD)、②生着不全、③前処置 (放射線や骨髄に毒性のある薬剤を使用) による副作用、④T細胞機能の不完全な回復などが挙げられる。著者らが開発した新しい BMT の方法 (灌流法+骨髄内骨髄移植法) はこれらの問題を解決できる画期的な方法で、ヒトへ応用できるようになれば、HLA の一致したドナーを探す必要もなくなり、患者にとって負担の少ない前処置で移植が可能となるため、臓器移植にも応用できる。したがって、免疫抑制剤を使用する

必要もなくなる。さらに、若い正常人の造血幹細胞と間葉系幹細胞に置換できれば加齢に伴って発症する難病の根治にも直結する。

ここでは、新しい骨髄移植法 (灌流法+骨髄内骨髄移植法) を用いることによって、いかなる疾患が治療可能かを、最新の動物実験結果を混じえて紹介し、ヒトへの臨床応用に関しても考察する。

## 間葉系幹細胞の重要性

著者らは多機能性造血幹細胞を精製する方法を開発し<sup>6)</sup>、造血幹細胞の分化・増殖を解析した結果、多機能性造血幹細胞が増殖・分化するためには骨髄の微少環境構成細胞 (ストローマ細胞) が必須であることを明らかにした。さらに BMT の際、造血幹細胞をストローマ細胞 (間葉系細胞を含む) との主要組織適合抗原複合体 (特に MHC の class I) が一致していると、造血幹細胞の増殖率が高いことを見出した<sup>7,8)</sup>。以上の結果に基づいてアロの 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ための種々の方法 (骨移植や肝への造血細胞の注入) を考案したが、骨髄内 (intra-bone marrow: IBM) へ全骨髄細胞 (造血幹細胞と間葉系幹細胞を含む) を移植する方法、"IBM-BMT" が最善であることが判明した<sup>9)</sup>。

## 灌流法 vs. 吸引法

大動物 (ウサギ、イヌ、サルなど) やヒトで骨髄細

胞を採取するには、これまで、複数個所に、骨髄穿刺針を挿入し、吸引法で採取していたが、末梢血が混入するため、GvHD が発生しやすかった。著者らが、サルを用いて開発した灌流法は、2箇所穿刺針を入れて、片方から生食で骨髄内を灌流するもので、T細胞の混入も 10% 以下のため、GvHD も発症しにくい<sup>10,11)</sup>。ヒトでも、T細胞の混入が少ないだけでなく、ドナーの痛みも軽減でき、短時間で純粋な骨髄細胞を大量に採取できることなど、灌流法のメリットは甚大である<sup>11)</sup>。

### ■ ■ 骨髄内骨髄移植法 vs. ■ ■ 静脈内骨髄移植法

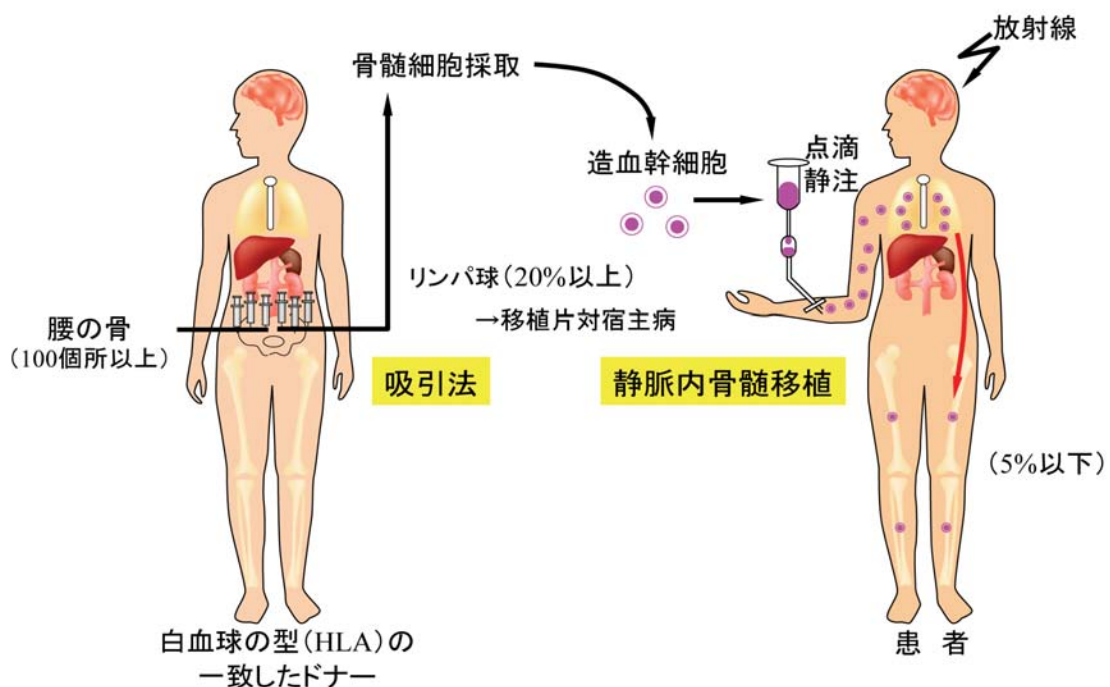
従来の骨髄移植のように、吸引法で採取した細胞を静脈内へ注入すると、図1のように、肺にほとんどが trap されるが、これらの細胞を直接、骨髄内へ注入（文字通りの“骨髄移植”：図2）をすると、ドナーの骨髄細胞が、注入骨髄内に効率よくとどまり、生着率が高まる。この骨髄内骨髄移植によって、造血幹細胞（“種”）と骨髄の環境の構成細胞である間葉系幹細胞

（“畑”）の両者が、ドナーの正常な細胞に置換することが可能である<sup>9)</sup>。

### ■ ■ 臓器移植への応用

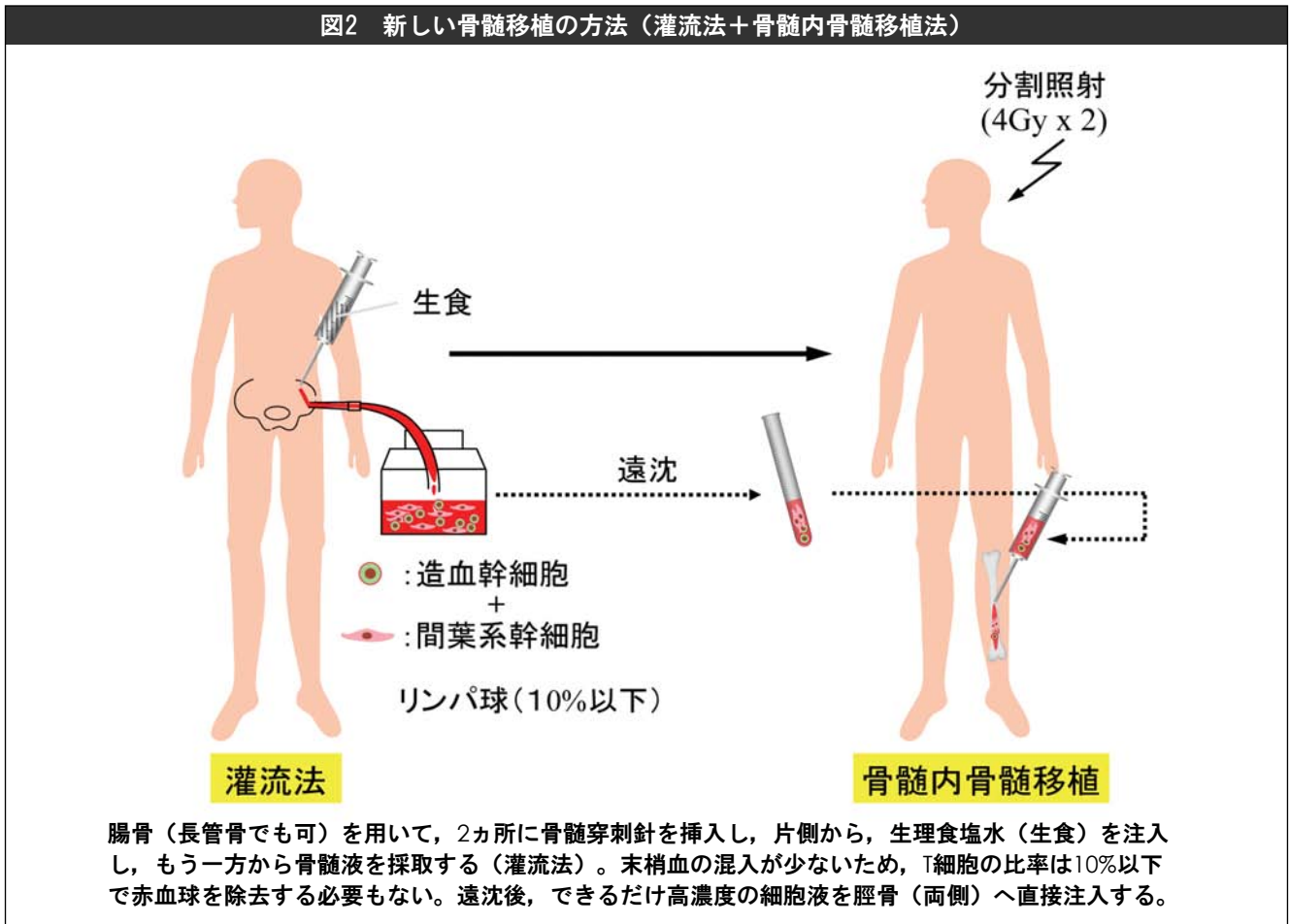
マウスやラットにおいては、BMT と臓器移植を同時に行うと拒絶反応が起こらないことは古くから知られている。著者らも 20 年以上前にマウスで肝移植と BMT を同時に実施し、拒絶反応が起こらないことを証明している<sup>2)</sup>。ヒトでも、BMT と臓器移植の同時移植はこれまで実施されてきたが、成功には至っていない。その理由は、アロの BMT の際、GvHD が発症しやすいことや、大量の放射線照射などの前処置が不可欠であるため、レシピエントに対する負担が大きいからである。そこで、mixed allogeneic chimerism（混合キメラ）の方法が Ildstad と Sachs らによって開発された<sup>3)</sup>。しかし長期観察すると、レシピエント側の造血幹細胞が優勢となり、著者らの豚島の移植実験ではドナーの豚島が拒絶されることも明らかになった<sup>14)</sup>。

図1 従来の骨髄移植の方法（吸引法+静脈内骨髄移植方法）



腸骨に100カ所以上、骨髄穿刺針を挿入して吸引法で骨髄細胞を採取する。末梢血の混入のため、T細胞が20%以上含まれ、T細胞を除去しないとGvHDが発症する。1L近くの採取液を点滴で静脈内へ注入するため、ほとんどが肺にtrapされ、骨髄内へhomingする細胞は5%以下である。

図2 新しい骨髄移植の方法（灌流法+骨髄内骨髄移植法）



Starzlらは肝移植を受けた患者のなかにドナーの血球系の細胞が共存し(microchimerism)、免疫抑制剤を中止しても移植臓器が拒絶されないことを見出した<sup>15)</sup>。これは肝移植の際に、肝にドナーの造血細胞、前駆細胞が含まれているためと考えられる。著者らはこの事実に着目し、門脈よりドナーの骨髄細胞を肝へ注入し、これと同じ状態を作製することに成功した。この門脈からのドナーの骨髄細胞の注入は、sublethal irradiation (マウスでは7Gy)においても100%アロの皮膚が生着することが明らかになり<sup>16)</sup>、臨床応用の道がひらけてきた。この門脈よりのトレランス誘導機序を解析した結果、ドナーのストローマ細胞が肝にtrapし、このストローマ細胞がドナーの造血系の細胞を肝でsupportしていることが明らかになった<sup>17),18)</sup>。ただし、肝で増殖した造血幹細胞も最終的には骨髄へ移住し、骨髄が造血臓器として中心的な役割を果たしていることが判明したので、肝を介さずに直接、骨髄内へ骨髄細胞を注入するほうが、より効率が良いのでは

ないかと考え、“IBM-BMT”の方法を開発した<sup>9)</sup>。“IBM-BMT”は骨髄内にドナーの骨髄細胞を直接注入するため、ドナーの造血幹細胞のみならず、ドナーのストローマ細胞(間葉系幹細胞を含む)を効率よく移植することが可能である。そのため、従来の静脈内骨髄移植(IV-BMT)と比較して、放射線量を減量しても移植臓器の拒絶を受けない。皮膚のアロ移植に関しても、IBM-BMTでは放射線の量を、4Gy×2に減量しても100%の生着率が得られる<sup>19)</sup>。この新しい骨髄移植方法を臓器移植と併用すると、免疫抑制剤を使用しなくても半永久的に拒絶反応が起こらないことが明らかになった。

難病治療への応用



このように造血幹細胞も間葉系幹細胞も正常のものと置換する、この新しい骨髄移植方法は、加齢とともに発症してくる骨粗鬆症、肺気腫、糖尿病、動脈硬化

症、アルツハイマー病、悪性腫瘍等の根本治療につながる可能性を秘めている。実際、著者らは、モデル動物を用いて、骨粗鬆症<sup>20)</sup>や肺気腫<sup>21)</sup>が、治療できるだけでなく、病気を正常マウスに transfer できることを明らかにし、間葉系幹細胞異常症という概念を提唱している<sup>19,22)</sup> (図3参照)。

難病中の難病である悪性腫瘍に関しても、骨髄内骨髄移植法はドナーリンパ球輸注法 (DLI) と併用することにより、DLI の副作用である GvHD を抑制し、担がん動物に対して延命効果を発揮することを発見している<sup>23,25)</sup>。

### ■ ■ 胸腺移植の併用の効果

著者らは、①骨髄細胞 (造血幹細胞+間葉系幹細胞を含む)、②胸腺、③レシピエントの環境の3つが異なったトリプル・キメラマウスの系においても、それぞれに対して tolerance が誘導されることを証明した<sup>26)</sup>。この事実は、将来、脳死者から、高齢者 (胸腺の萎縮を認める) に対して骨髄内骨髄移植をする際、流産した第三者の退胸腺 (両親の許可を得て使用)

の移植を併用することにより、高齢者の難病治療に役立てうる重要な発見と考える。

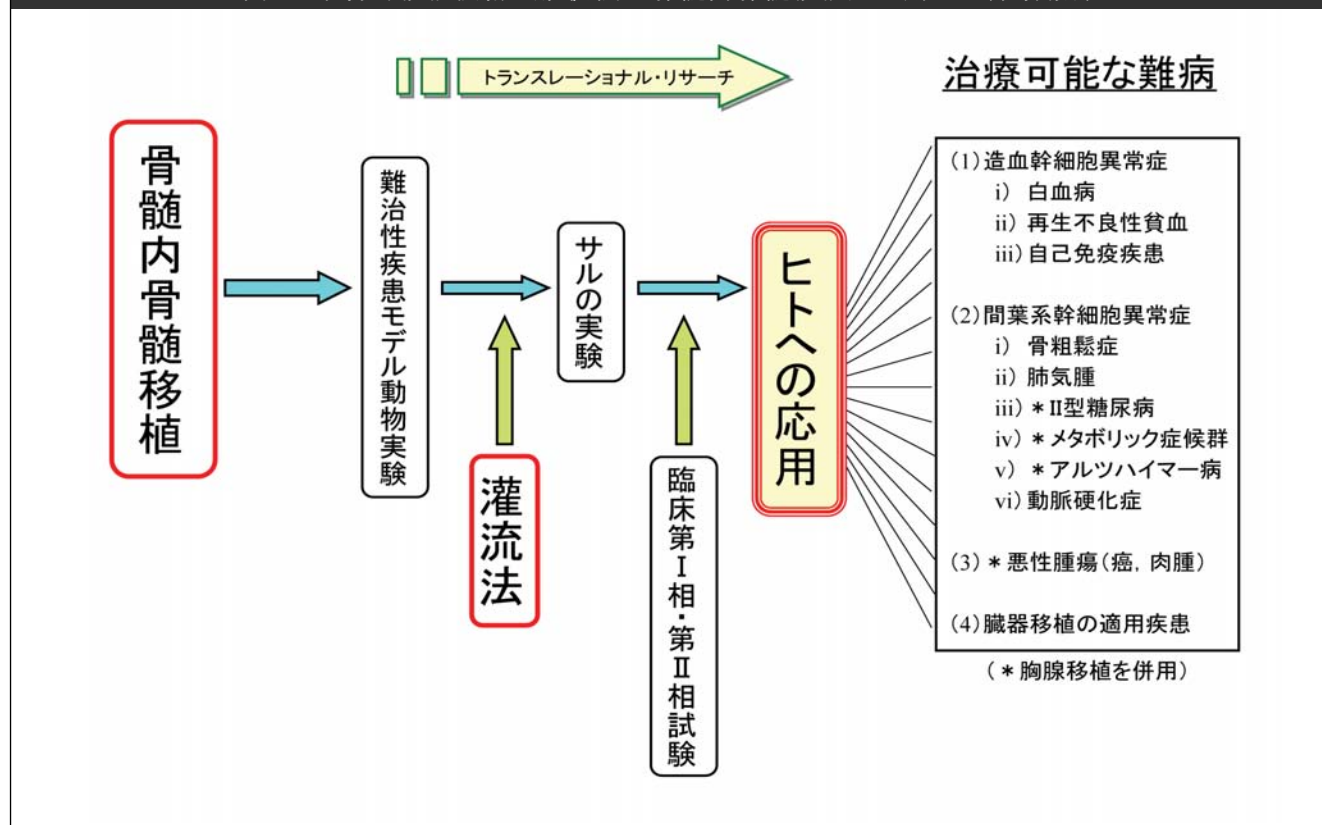
また、著者らは、骨髄内骨髄移植によって、ドナー由来の間葉系の細胞が胸腺へ移住し、胸腺上皮に分化することを見出した<sup>27)</sup>。この胸腺上皮は、positive selectionのみならず、negative selection にも関与していることが判明している。

さらに、筆者らは骨髄内骨髄移植に成体胸腺移植 (持続的なドナーリンパ球輸注を目的に) を併用することによって、GvHDは抑制するが、強力な抗腫瘍効果を引き出すことができることを発見している<sup>28)</sup>。

また、骨髄内骨髄移植と成体胸腺移植の併用は、mild な前処置 (低放射線量+低細胞数) でもアロの骨髄細胞を生着させ、長期の生存が可能となる事を見出している<sup>29)</sup>。

最近、著者らは骨髄内骨髄移植法に胸腺移植を併用すると、加齢に伴って発症してくるアルツハイマー病や II型の糖尿病の進行を抑えることができることを発見した<sup>30,31)</sup>。このように骨髄移植と胸腺移植、さらには、臓器移植を組み合わせれば、かなりの難治性の疾患が、将来、治療可能と考えられる。

図3 革新的移植技術 (灌流法+骨髄内骨髄移植) を用いた難病治療



## 国内外の動向

最近、臍帯血を腸骨内へ注入する腸骨内臍帯血移植が、米国<sup>30)</sup>、イタリア<sup>31)</sup>をはじめとして、わが国の数カ所の施設でも開始されるようになった。しかしながら、この方法には、2つの欠点がある。1つは、臍帯血中には、ストローマ細胞(間葉系幹細胞を含む)が骨髄細胞と比較して、はるかに少量であること、もう1つは、血管の豊富な腸骨内への臍帯血移植は、脛骨内骨髄移植と異なり、移植細胞が、骨髄内へ trap されずに循環系へと移行しやすいという欠点がある。以上の理由で、著者らは、灌流法で採取した純粋の骨髄細胞を脛骨内へ移植する脛骨内骨髄移植法を推奨してきた。腸骨であれ、脛骨であれ、いずれにしろ、ヒトでも骨髄内への造血幹細胞の直接注入の安全性が国際的にも証明されつつあるものと考えられる。

今後、脳死や心臓死の症例だけでなく、ボランティアから、骨髄細胞が灌流法で採取され、移植に利用されることを期待する。

## おわりに

新移植技術(灌流法+骨髄内骨髄移植法)の得特徴としては、灌流法での骨髄採取によって、末梢血の混入が少ないこと、したがって、GvHD が起こらないこと、一方、骨髄内骨髄移植法を用いることによって、効率よくドナーの造血幹細胞と間葉系幹細胞が移植可能であることが挙げられる。それゆえ、造血幹細胞異常症(図3参照)のみならず、間葉系肝細胞異常症(加齢に伴って発症する患者)の根治療法としてこの新移植技術がクローズアップされてきている。

ヒトへの臨床応用としては、現在、灌流法+骨髄内骨髄移植法の両技術の combination における安全性を最重点として、phase I study を開始しようとしているが、安全性が確認されれば、ただちに phase II study が実施できるように、臨床プロトコルを準備中である。新しい骨髄移植の方法(灌流法+骨髄内骨髄移植法)が、ヒトへ応用されるようになれば、骨髄ドナーの負担が軽減される。すなわち、骨髄穿刺針の穿刺部位が8カ所(従来の方法では100カ所以上)で済み、麻酔から覚醒後には痛みも少なく、歩行可能である<sup>11)</sup>。それゆえ、骨髄バンクへの登録者が増加するし、たとえば、HLA が不一致でも、新しい移植方法では、GvHD も起こらず、生着が促進されるため、前処置も

軽減され、患者の負担も少なくなる。新技術により、これまで不治の病であった、種々の難病が根治できれば、患者にとって、これ以上の福音はない。

## 文献

- 1) Ikehara S, Good RA, Nakamura T, *et al.* Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 2483-2487.
- 2) Than S, Ishida H, Inaba M, *et al.* Bone marrow transplantation as a strategy for treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus in KK-Ay mice. *J Exp Med* 1992; 176: 1233-1238.
- 3) Nishimura M, Toki J, Sugiura K, *et al.* Focal segmental glomerular Sclerosis, a type of intractable chronic glomerulonephritis, is a stem cell disorder. *J Exp Med* 1994; 179: 1053-1058.
- 4) Theofilopoulos AN, Balderas RS, Showler DL, *et al.* Influence of thymic genotype on the systemic lupus erythematosus-like disease and T cell proliferation of MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Exp Med* 1981; 153: 1405-1414.
- 5) Ikehara S, Yasumizu R, Inaba M, *et al.* Long-term observations of autoimmune-prone mice treated for autoimmune disease by allogeneic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 3306-3310.
- 6) Doi H, Inaba M, Yamamoto Y, *et al.* Pluripotent hemopoietic stem cells are c-kit<sup>low</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2513-2517.
- 7) Hashimoto F, Sugiura K, Inoue K *et al.* major histocompatibility complex restriction between hemopoietic stem cells and stromal cells *in vivo*. *Blood* 1997; 89: 49-54.
- 8) Sugiura K, Hisha H, Ishikawa J, *et al.* Major histocompatibility complex restriction between hemopoietic stem cells and stromal cells *in vivo*. *Stem Cells* 2001; 19: 46-58.
- 9) Kushida T, Inaba M, Hisha H, *et al.* Intra-bone marrow injection of allogeneic bone marrow cells: a powerful new strategy for treatment of intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice. *Blood* 2001; 97: 2392-3299.

- 10) Kushid T, Inaba M, Ikebukuro K, *et al.* Comparison of bone marrow cells harvested from various bones of cynomolgus monkeyes at various ages by perfusion or aspiration methods: a preclinical study for human BMT. *Stem Cells* 2002; 20: 155-162.
- 11) Li C, He Y, Feng X, *et al.* An innovative approach to bone marrow collection and transplantation in a patient with beta-thalassemia major: marrow collection using a perfusion method followed by intra-bone marrow injection of collected bone marrow cells. *Int J Hematol* 2007; 85: 73-77.
- 12) Nakamura T, Good RA, Yasumizu R, *et al.* Successful liver allografts in mice by combination with allogeneic bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4529-4532.
- 13) Ildstad ST, Sachs DH. Reconstitution with syngeneic plus allogeneic or xenogeneic bone marrow leads to specific acceptance of allografts or xenografts. *Nature* 1984; 307: 168-170.
- 14) Ikebukuro K, Adachi Y, Yamada Y, *et al.* Treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus by transplantation of islet cells plus bone marrow cells via portal vein in rats. *Transplantation* 2002; 73: 512-518.
- 15) Starzl TE, Zinkernagel RM. Transplantation tolerance from a historical perspective. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 233-239.
- 16) Jin T, Toki J, Inaba M, *et al.* A novel strategy for organ allografts using sublethal (7 Gy) irradiation followed by injection of donor bone marrow cells via portal vein. *Transplantation* 2001; 71: 1725-1731.
- 17) kushida T, Inaba M, Hisha H, *et al.* 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* 2001; 19: 226-235.
- 18) Fan TX, Hisha H, Jin TN, *et al.* Successful allogeneic bone marrow transplantation (BMT) by injection of bone-marrow cells via portal vein: stromal cells as BMT-facilitating cells. *Stem Cells* 2001; 19: 144-150.
- 19) Ikehara S. A novel method of bone marrow transplantation (BMT) for intractable autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2008; 30: 108-115.
- 20) Ueda K, hanazono Y, Shibata H, *et al.* High-level *in vivo* gene making after gene-modified autologous hematopoietic syem cell transplantation without marrow conditioning in nonhuman primates. *Mol Ther* 2004; 10: 469-477.
- 21) Adachi Y, Oyaizu H, taketani S, *et al.* Treatment and transfer of emphysema by a new bone marrow transplantation method from normal mice to Tsk mice and vice versa. *Stem Cells* 2006; 24: 2071-2077.
- 22) Ikehara S. A new bone marrow transplantation method for stem cell disorders. *Ann NY Acad Sci* 2009; 1173: 774-780.
- 23) Suzuki Y, Adachi Y, Minamino K, *et al.* A new strategy for treatment of malignant tumor: intra-bone marrow-bone marrow transplantation plus CD4-donor lymphocyte infusion. *Stem Cells* 2005; 23: 265-370.
- 24) Koike Y, Adachi Y, Suzuki Y, *et al.* Allogeneic intrabone marrow-bone marrow transplantation plus donor lymphocyte infusion suppresses gyrowth of colon cancer cells implanted in skin and liver of rats. *Stem Cells* 2007; 25: 385-391.
- 25) Mukaide H, Adachi Y, Koike-kiriyama N, *et al.* Immunotherapy for malignant tumours using combination of allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation, donor lymphocyte infusion and dendritic cells. *Int J Oncol* 2007; 30: 1309-1315.
- 26) Cui W, Hosaka N, Miyake T, *et al.* Analysis of tolerance induction using triple chimeric mice: major histocompatibility complex-disparate thymus, hemopoietic cells, and microenvironment. *Transplantation* 2008; 85: 1151-1158.
- 27) Takaki T, Hosaka N, Miyake T, *et al.* Presence of donor-derived thymic epithelial cells in [B6->MRL/lpr] mice after allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation (IBM-BMT). *J Autoimmun* 2008; 31: 408-415.
- 28) Miyake T, Hosaka N, Cui W, *et al.* Adult thymus transplantation with allogeneic intra-bone marrow-bone marrow transplantation from same donor induces high thymopoiesis, mild graft-versus-host reaction and strong graft-versus-tumour effects. *Immunology* 2009; 126: 552-564.
- 29) Nishida T, Hosaka N, Takaki T, *et al.* Allogeneic intra-BM-BMT plus adult thymus transplantation

- From same donor has benefits for long-term survival even after sublethal irradiation or low-dose BM cell injection. *Bone Marrow Transplant* 2009; 43: 829-837.
- 30) Li M, Inaba M, Guo K, *et al.* Amelioration of cognitive ability in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP 8) by intra-bone marrow-bone marrow transplantation. *neurosci Lett* 2009; 465: 36-40.
- 31) Li M, Abraham NG, Vanella L, *et al.* successful modulation of type 2 diabetes in db/db mice with intra-bone marrow-bone marrow transplantation plus concurrent thymic transplantation. *J Autoimmun* 2010; 35: 414-423.
- 32) Wagner JE. A new route to the stem-cell niche. *lancet Oncol* 2008; 9: 812-814.
- 33) Frassoni F, Gualandi F, Podesta M, *et al.* Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol* 2008; 9: 831-839.