

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790950

研究課題名（和文） 骨髄混合キメラにおいてドナー T 細胞の制御が自己反応性 B 細胞に及ぼす影響について

研究課題名（英文） T cells derived from donor bone marrow cells selectively regulate auto-reactive B cells in bone marrow mixed chimeric mice.

研究代表者

竹内 恵美子 (TAKEUCHI EMIKO)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：00406935

研究成果の概要（和文）：骨髄移植による骨髄混合キメラ導入は難治性 SLE の治療に有効であるが、なぜ異常な host の細胞を残したまま正常骨髄を移植して疾患が治癒するのかその理由はわかっていない。本研究では、移入した骨髄から由来する T 細胞が host の MHC に拘束され、MHC 完全不一致 donor の B 細胞を T 細胞が認識しないことを利用し、T 細胞が TCR/MHC interaction を介して自己反応性 B 細胞を認識し選択的に刈り込んでいるということを提示した。

研究成果の概要（英文）：Induction of allogeneic bone marrow mixed chimerism through bone marrow transplantation has been proposed as a therapy for patient with severe systemic lupus erythematosus. Yet, the mechanism through which mixed chimerism suppresses the development of autoimmune state is still unknown. Reporting on one possible candidate mechanism, we indicated that newly developed donor T cells that are restricted host MHC and incapable of interactions with donor MHC expressed on donor B cells could selectively regulate and/or trim auto-reactive B cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：臨床免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

Systemic lupus erythematosus (SLE) を代表とする自己免疫性疾患の治療は、ステロイドなどの免疫抑制が主である。しかし、これらの患者の中にはステロイド抵抗性の難治例があり、またステロイド治療はあくまで対症療法であるため、根治療法の確立が切実に求められている。近年、これらの自己免疫疾患に対し、骨髄移植（bone marrow

transplantation: BMT) が試みられており、動物実験のレベルでは有意な効果があることが知られるようになってきた。しかし、実際の臨床例では BMT を行える条件がまだ限られており、特に日本では根治療法として用いられるよりも免疫抑制剤の副作用である骨髄抑制の補助療法として取り入れられているために成功例の報告は少ない。

BMT が SLE の根治療法として普及しない原

因として、1) BMT を行うための前処置が患者に対して侵襲的であり、骨髄性の疾患であるかわからない SLE 患者に対してこれを用いることに抵抗がある、2) MHC の一致したドナーを見つけることが難しく、BMT によりあらたに host versus graft disease (GVHD) などを引き起こす危険性がある、等の問題があると考えられる。

これらの問題は、骨髄を donor の細胞で完全に置き換える完全骨髄キメラを治療の目標にせず、host の骨髄を温存し donor の細胞と共存させる骨髄混合キメラを導入するようにすれば解決できると我々は考えた。なぜなら、混合キメラでは donor、host 双方の骨髄から由来する抗原提示細胞 (APC) が胸腺に移住し、T 細胞の負の選択を行うため、MHC が一致しなくてもお互いの MHC に中枢性 tolerance を誘導することができるからである。しかし、動物実験で骨髄混合キメラが自己免疫状態を reverse するという報告はいくつかあるものの、自己反応性の host の細胞が残っているところへ正常な骨髄を移植して、なぜ自己免疫を改善することができるのかというメカニズムに関してははっきりとわかっていない。この点が明らかにしなければ、BMT の臨床応用はすすまないと考えられる。

## 2. 研究の目的

現在自己抗体が正常個体では産生されない理由として定説となっている仕組みは、自己反応性の抗体を産生するようになった B 細胞は CD4<sup>+</sup>T 細胞からの刺激が入らなくなりいずれ apoptosis をおこすというものである。しかし、それでは外来抗原に親和性を持つと同時に自己抗原にも交叉反応するように体細胞超変異をおこした B 細胞がなぜ抗体を作り続けられないのか説明できない。我々は以前から CD4<sup>+</sup>T 細胞には自己抗体産生性 B 細胞を見つけ出して除去するメカニズムがあるのではないかと考えている。SLE の個体では T 細胞による B 細胞の監視システムに欠陥があると仮定し、骨髄混合キメラでは欠陥のある host の T 細胞にかわって donor の T 細胞が自己反応性 B 細胞を除去すると考えれば、自己抗体産生細胞が体内に残っていても正常骨髄から分化した CD4<sup>+</sup>T 細胞がこれを見つけ出し除去するので、骨髄混合キメラの状態にするだけで自己免疫状態を reverse できることの説明がつく。

このモデルを検証するため、SLE のモデルである BXSB を host に用いて、侵襲の少ないプロトコールで骨髄混合キメラを誘導し、T 細胞による監視システムの存在することを明らかにすることが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) BXSB (H-2<sup>b</sup>) を host にした骨髄混合キ

メラの誘導 : host には 7 週齢のオスの BXSB mouse を用いた。骨髄移植の前日に host mouse に 4Gy の少量放射線全身照射を行い翌日、抗 CD40L 抗体 (MR1) 2mg を骨髄移植と同時に腹腔内投与し、APC/T 細胞間の補助シグナルである CD40/CD40L interaction をブロックし tolerance を誘導した。骨髄細胞は donor mouse の大腿骨、脛骨、上腕骨、腸骨より採取し、1 個体当たり  $2.0 \times 10^7$  cell を静脈投与した。Donor には①BALB/c (H-2<sup>d</sup>)、②C57BL/6-GFP Tg (H-2<sup>b</sup>)、③これらの F1 (H-2<sup>b/d</sup>) をもちいて、それぞれ①MHC 完全不一致骨髄キメラ、②MHC 完全一致骨髄キメラ、③haplo-identical 骨髄キメラのモデルとした。

(2) stable な donor 特異的 tolerance の獲得 : キメラマウスの末梢血は BMT 後 4 週ごとに FACS で混合キメラの状態が保たれていることを確認した。さらに donor 特異的 tolerance が誘導されていることを確認するため、donor と同系統のマウスと host, donor の両系統と全く異なる系統のマウスの皮膚を移植し、donor の皮膚のみが生着することを確認した。

(3) 骨髄混合キメラの誘導がもたらす SLE 治療効果の検討 : これらのキメラマウスと未治療 BXSB, および放射線照射対照群 BXSB の血清を 4 週ごとに採取し ELISA 法にて抗 DNA 抗体を測定し SLE の消長を評価した。50 週間の観察を行い、生存率および腎糸球体の病理学的評価によって BMT の治療効果を検討した。

(4) IgM allotype の違いによる抗体産生細胞の特定 : host BXSB の B 細胞の産生する IgM の allotype は IgMb であるが、BALB/c の IgM は IgMa である。この違いを利用し、混合キメラマウスにおいて抗原特異的 IgM を産生したのが host, donor のどちらの B 細胞であるかを ELISA 法にて特定した。

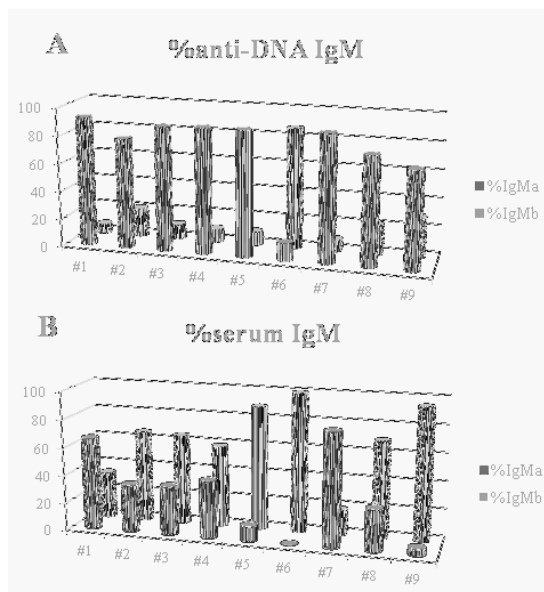
(5) allo 抗原の免疫による allo 抗原交叉性自己抗体の誘導 : cytochrome c は異種動物間で相同性の高いタンパクである。Pigeon cytochrome c (PCC) をマウスに免疫すると抗 PCC 抗体が産生されるが、mouse cytochrome c (MCC) と PCC の相同性が高いため抗 PCC 抗体の一部は MCC と交叉反応する自己抗体となる。この性質を利用し、BXSB キメラマウスに PCC (100  $\mu$ g) を初回のみ CFA とともに腹腔内に免疫し、その後 1 週間ごとに PCC のみを 7 回、計 8 回投与した。PCC 投与前、4 週目、8 週目に採血し血清中の抗 PCC 抗体価、および抗 MCC 抗体価を ELISA 法にて測定した。

## 4. 研究成果

(1) 前記した前処置を行い骨髄移植すると、骨髄が生着し、末梢血に donor, host 双方の骨髄から由来した細胞が観察されるようになった。これらキメラマウスは体重減少など

の GVHD の所見を呈することはなく、また放射線照射対照群は放射線の急性障害で死亡することもなく、安全で安定なプロトコールであると考えられた。キメラマウスは MHC の一致、不一致に関わらず生存期間が延長し BMT の治療効果が認められた。BXSB の主な死因は腎不全であるため、50 週の経過観察後、生存していたマウスの腎臓を摘出し糸球体腎炎の程度を病理学的に比較したところ、MHC の一致する骨髄を移植した群ではほぼ正常な糸球体像を示したのに対し、MHC 完全不一致キメラは PAS 染色陽性の沈着物をわずかに認めた。しかし、補体に対する蛍光免疫染色では未治療群や放射線対照群では linear な染色 pattern を示すのに対しキメラ群では全く沈着していなかった。さらに、BXSB は自己免疫性血小板減少をきたすことが知られているが、これについてもキメラの導入により発症を防げることがわかった。

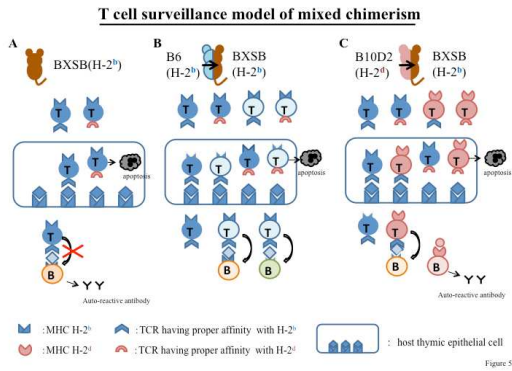
(2) 一方血清の抗 DNA 抗体価は未治療群や放射線対照群と比較するとキメラ群は有意に低くなるものの、MHC 完全不一致キメラでは MHC 一致キメラと比較して抗体価が下らない個体が多く存在した。そこで抗 DNA 抗体のクラスを調べたところ、通常 BXSB の抗 DNA 抗体はほとんどが IgG であるのに対し、MHC 完全不一致キメラの抗 DNA 抗体は IgM であり、抗 DNA-IgM の力価は未治療群と同程度であることがわかった。さらにこれらの IgM 抗体を host, donor のどちらの B 細胞が産生しているかを同定したところ、血清中の正常 IgM は host の B 細胞が産生するのに対し、自己抗体である抗 DNA 抗体は donor の B 細胞が産生しているという逆転現象がみられた (下図)。一方、foreign Ag である羊赤血球を免疫した場合は host B 細胞のみが反応し、donor 細胞由来の抗体は検出されなかった。つまり MHC 完全不一致キメラでは移入した T



細胞と残存した hostB 細胞によって正常液性免疫機能が保たれているが、自己抗体はこのシステムから隔離されている donor の B 細胞が産生しているという結果となった。

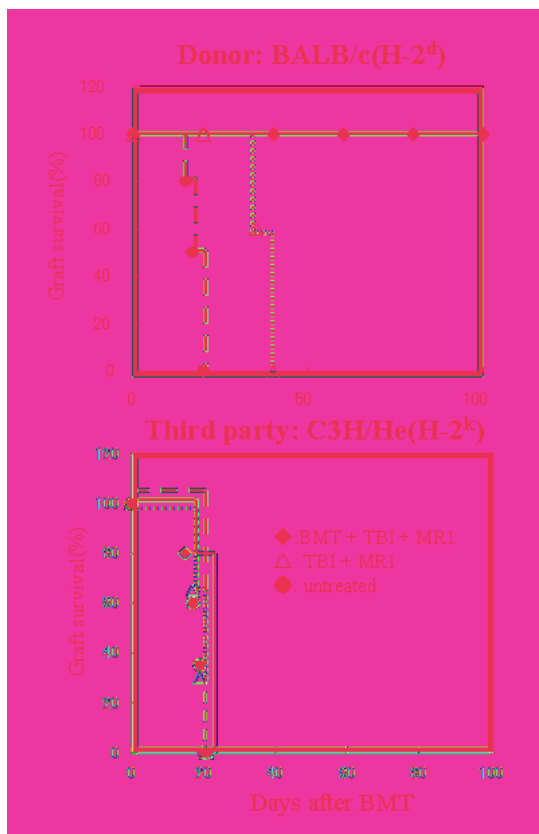
(3) さらにこれらのマウスに PCC を免疫して異種抗原交叉反応性自己抗体の産生を誘導した。BXSB は H-2<sup>b</sup> MHC を持つため本来 PCC に抗体を作りにくい系統ではあるはずだが、未治療の BXSB は抗 PCC 抗体を産生しこれらは自己抗原 MCC に交叉反応する自己抗体であった。SLE の素因を持たない正常のマウスは抗 MCC 抗体を作り始めても、免疫を続けると MCC に交叉反応する抗体の力価は頭打ちになり、PCC に特異的に反応する抗体だけが産生されるようになる。ところが BXSB では抗 PCC 抗体とともに抗 MCC 抗体の力価も上がり続けるので、BXSB はできてしまった自己抗体を制御する機能に欠陥があることが推測できる。BXSB に BMT を行い同様に免疫すると、MHC の一致した donor とのキメラでは抗 MCC 抗体価が上がらないが、MHC 完全不一致キメラでは抗 MCC 抗体価が上昇した。つまり、正常個体では自己抗体が産生されないのではなく、産生された後で自己抗体であることを認識され、除去されること、自己抗体産生 B 細胞を認識するには B 細胞の MHC を T 細胞が認識できることが必要であることがわかった。

(4) T 細胞は host の胸腺上皮により正の選択を受けるため host と donor の MHC が完全に一致しないと donor の細胞から由来した T 細胞も donor B 細胞の発現している MHC を認識できなくなる。MHC 完全不一致 donor の骨髄で host の骨髄を完全に置き換えてしまうと液性免疫不全をおこすのはこのためである。混合キメラは host の細胞を一部残すことでこの問題を解決しようとしているが、前記 (2) (3) に示したように、T 細胞の監視から隔離されてしまった donor B 細胞は正常の液性免疫応答を担わないばかりでなく、何らかの原因で自己反応性になってしまった場合に T 細胞の除去システムからも逃れてしまう可能性がある。理論的には donor B 細胞は体内に残るだけで免疫応答には関わらないはずであるが、(3) に示したように同じ抗原に繰り返し暴露される場合には accidental に自己抗体がつくられる可能性があり、これは MHC ミスマッチ BMT が新たな autoimmune disease を生む可能性があることを示唆している (次図 C)。



では donor の MHC は完全に host と一致していなければならないのだろうか。BALB/c×C57BL/6 F1 は allo-MHC を 1 セット持っているため激しい拒絶反応が起こり、GVHD の危険もあるため、従来の BMT の考え方では移植に適さない donor である。しかし、この組み合わせの場合、host と同じ MHC も発現するため全ての B 細胞が T 細胞の制御化におかれることになる。実際に我々の実験結果では F1 骨髄を BXSb に移植した場合の治療効果は MHC 完全一致 donor の移植の場合と有意差がなく、自己抗体の産生もみられない。つまり、SLE の治療として骨髄移植をする場合、親子間という身近な donor からの移植が極めて有効である可能性がある。

(5) 下図は骨髄キメラが donor 特異的に tolerance を獲得することをキメラマウスに皮膚移植をして確認した結果である。



混骨髄混合キメラマウスは、third party の皮膚は拒絶するが、骨髄と同じ donor の皮膚は、生着させることがわかる。同時に移植した third party の皮膚が拒絶されたことは、host が正常な免疫機能を持っていることの証左であり、この点が、この方法の単なる免疫抑制とはちがうところである。皮膚移植は臓器移植の中で最も拒絶が起こりやすいため、皮膚が生着すれば他の臓器も概ね生着すると考えてよい。

以上の結果を総合すると、

① SLE のモデルマウスに MHC が異なる正常マウスの骨髄を非侵襲的なプロトコールで安定に生着させることができる。

② 正常骨髄細胞から分化した T 細胞は胸腺で host の MHC に拘束される。この T 細胞は TCR/MHC interaction を介して自己反応性 B 細胞を選択的に除去するので、host の細胞が残存していても、骨髄移植によって自己免疫を reverse できる。

③ MHC が完全に一致しない donor との骨髄移植を行うと、新たに分化する T 細胞は host の B 細胞は制御できるが、donor の B 細胞が発現している MHC を認識できなくなるので donor B 細胞を制御できなくなる。

④ lupus prone mouse の体内環境におくと遺伝的に正常な B 細胞が自己免疫化することがある。特に自己抗原に相同性のある抗原を繰り返し免疫した場合、自己抗体産生が誘導されることがある。

⑤ 但し、上記した危険性を回避するために donor の MHC を完全に一致させる必要はなく、例えば親子間移植のような haplo-identical donor との移植は有効な治療法となり得る。

⑥ 骨髄混合キメラが生着した host は同じ donor の他の臓器も拒絶しないため、SLE の治療のための骨髄移植と SLE によって引き起こされた腎不全などの臓器障害に対する臓器移植を同一の donor から免疫抑制なしに行うことができる、ということになる。

自己免疫性疾患に対する臓器移植は、donor の選定の難しさに加え、基礎疾患を治療しなければ移植された臓器も結局同じ疾患で傷害を受けてしまう点に問題がある。再生医療の進歩により、例えば膵臓のβ細胞等は in vitro で誘導することもできるが、I 型糖尿病の患者本人の細胞から作ったβ細胞をただ患者に戻したのでは拒絶反応は起こらなくても結局リンパ球の攻撃をうけて破壊されてしまうであろう。本研究は、生体間腎移植の donor としては最も実用であろう親子という関係の骨髄移植が、原疾患 SLE そのものを reverse する可能性があることを提示した。自己免疫の制御は、基礎免疫学の観点からも興味深い問題ではあるが、臨床への

応用も視野に入れさらに発展させていく必要があると考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Dysfunction of selective suppression of auto-antibody production in SLE mouse and reconstruction of this mechanism by induction of bone marrow chimerism. Takeuchi E, Takeuchi Y. *J of Transplantation Technologies & Research* special issue 5 (2012) in press
2. Cognate interaction plays a key role in the surveillance of autoreactive B cells in induced mixed bone marrow chimerism in BXS lupus mice. Takeuchi E, Shinohara N, Takeuchi Y. *Autoimmunity* 44(5):363-372(2011)
3. Allogenic mixed chimerism prevented autoimmune thrombocytopenia in BXS lupus mice receiving donor BMT with nonlymphoablative conditioning of low-dose TBI and anti CD40L mAb. Takeuchi E. *Kitasato Med J* 41(1):50-56(2011)

[学会発表] (計4件)

1. Takeuchi E, Katagiri H, Eshima K, Shinohara N, Takeuchi Y. Dysfunction of selective suppression of auto-antibody production in SLE mice and reconstruction of this mechanism by induction of bone-marrow chimerism. 1<sup>st</sup> Controversies in Rheumatology and Autoimmunity, Firenze, Italy, March. 10-12 2011 (CORA Notable Poster) *Clinical and Experimental rheumatology* 29(1):209 Poster No263
2. Takeuchi E, Kanoh Y. MHC完全不一致ドナーからの骨髄移植による自己免疫性血小板減少症の改善についての検討. 第57回日本臨床検査医学会学術集会, Sinnjyuku, Japan, Sep. 9-12 2010 (座長推薦)
3. Takeuchi E, Kobayashi K, Katagiri H, Eshima K, Shinohara N, Takeuchi Y. Dysfunction of selective suppression of auto-antibody production in SLE

mouse and reconstruction of this mechanism by induction of bone-marrow chimerism. 7<sup>th</sup> International congress on autoimmunity, Ljubljana, Slovenia, May. 5-9 2010.

4. Takeuchi Y, Otsu M, Onodera M, Takeuchi E, Nakauchi H. A threshold in expression levels of gp91phox transgene limits the degree of functional correction in granulocytes after gene therapy for CGD. 17<sup>th</sup> Annual congress of the European society of gene & cell therapy, Hannover, Germany, Nov. 20-25 2009 (p143)

[図書] (計1件)

Mixed Hematopoietic Chimerism Allows Cure of Autoimmune Glomerulonephritis: Its Potential and Risks. Takeuchi E, *An Update Glomerulopathies*. Chapter 16:277-290(2011) INTECK, Rijeka, Croatia. ISBN 978-953-307-673-7

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

竹内恵美子 (Emiko Takeuchi)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号: 00406935