

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：難治性疾患実用化研究事業

研究開発課題名：医療用免疫不全モデルブタを用いた原発性免疫不全症候群に対する新規治療技術開発に向けた基盤研究

研究開発担当者 (日本語) 野地智法、東北大学大学院農学研究科 准教授  
所属 役職 氏名： (英語) Tomonori Nochi  
Tohoku University Graduate School of Agricultural Science  
Associate Professor

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 二次リンパ組織の形態及び機能形成に関する免疫学的研究

研究開発分担者 (日本語) 野地智法、東北大学大学院農学研究科、准教授  
所属 役職 氏名： (英語) Tomonori Nochi  
Tohoku University Graduate School of Agricultural Science  
Associate Professor

分担研究 (日本語) X連鎖重症複合免疫不全症患者に対す現行治療法の有効性評価

研究開発分担者 (日本語) 笹原洋二、東北大学大学院医学系研究科、准教授  
所属 役職 氏名： (英語) Yoji Sasahara  
Tohoku University Graduate School of Medicine  
Associate Professor

分担研究 (日本語) X連鎖重症複合免疫不全症モデルブタの作出

研究開発分担者 (日本語) 中井美智子、農業・食品産業技術総合研究機構、研究員

所属 役職 氏名 : (英語) Michiko Nakai  
National Agriculture and Food Research Organization  
Researcher

分担研究 (日本語) 胎生期造血幹細胞移植技術の確立

研究開発分担者 (日本語) 板野理、国際医療福祉大学、教授

所属 役職 氏名 : (英語) Osamu Itano  
International University of Health and Welfare  
Professor

分担研究 (日本語) 胎生期造血幹細胞移植技術の確立

研究開発分担者 (日本語) 北郷実、慶應義塾大学医学部、講師

所属 役職 氏名 : (英語) Minoru Kitago  
Keio University School of Medicine  
Lecturer

## II. 成果の概要（総括研究報告）

X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)に対する革新的治療技術を確立すべく、その責任遺伝子である IL-2R $\gamma$  を欠損した免疫不全ブタ (Cell Stem Cell, 10: 753-758, 2012) をモデル動物とした、新規治療技術を開発するための基盤研究を実施している。研究開発代表者の野地智法准教授(東北大学大学院農学研究科)と研究開発分担者の中井美智子研究員(農業・食品産業技術総合研究機構)とのこれまでの共同研究から、現行の X-SCID 治療を模倣した「出生後」の X-SCID モデルブタに対する造血幹細胞移植では、①造血幹細胞移植後の二次リンパ組織の形態形成は極めて未熟であり、腸管での二次リンパ組織の代表格と言えるパイエル板の形成も不完全であること、②パイエル板の主たる機能である腸管での IgA 産生も、殆ど誘導されていないこと、③腸管の IgA 産生と極めて密接な関係にある腸内細菌叢の構築に関しても、健全な状態に近付くことはないことを見出してきた。そこで本研究では、これらの問題を克服し、現行法に変わる X-SCID 患者に対する革新的治療技術を構築するための研究開発基盤を形成すべく、二次リンパ組織の形態形成時期である胎生期に着目した新たな試みに挑戦している。具体的には、エコー下穿刺技術を駆使し、X-SCID モデルブタの胎仔に造血幹細胞を移植することで、出生後の造血幹細胞移植を上回る治療成績を実証することを目指している。また、現行の造血幹細胞移植を行った X-SCID 患者の血液・糞便解析も実施することで、X-SCID モデルブタを用いて得られた研究成果のヒトでの普遍性も合わせて実証していく。

研究代表者の野地智法准教授(東北大学大学院農学研究科)は、本研究でモデル動物として用いているブタの胎仔(野生型、胎齢 76 日、91 日、110 日)を用いた組織学的解析を通して、二次リンパ組織(例:パイエル板や腸管膜リンパ節)が形成される具体的な時期を明らかにし、X-SCID モデルブタへの胎生期治療に最も適した時期を決定するための研究を行った。ヒトの妊娠期間は 280 日であり、またブタは 114 日であることから、妊娠期間に相応しい移植時期を特定することは、モデルを正しく利用する上でも極めて重要である。その結果、胎齢 91 日のブタの腸内には、パイエル板の濾胞の大きさこそ小さいものの、明瞭な T 細胞および B 細胞の存在が確認されたが、胎生 76 日目では、それらの細胞は殆ど認められなかった。一方で、腸管膜には、胎齢 76 日の段階で、十分量の T 細胞および B 細胞の発達が確認された。過去に報告されたヒトでの二次リンパ組織形成時期と今回のブタでの結果を照らし合わせると、X-SCID モデルブタにパイエル板および腸管膜リンパ節を正しく形成させるためには、胎齢 50 日頃(ヒトでいう、120 日頃)の造血幹細胞移植が最も効果的と判断された。研究開発分担者の板野理教授(国際医療福祉大学)および北郷実講師(慶応義塾大学)は、妊娠週齢の異なるブタ(野生型)を用いた複数回の予備試験を通して、胎仔の肝臓内への造血幹細胞移植を可能にするためのエコー下穿刺技術を確立し、研究代表者の野地が判断した胎齢 50 日の胎仔への造血幹細胞移植を成功させた。また、研究開発分担者の中井美智子研究員(農業・食品産業技術総合研究機構)は、造血幹細胞の「胎生期」移植を行うための X-SCID モデルブタの生産に尽力し、効率的に研究成果を得るための研究環境を整えた。また、板野・北郷によって、中井が生産した 1 頭の X-SCID モデルブタへの造血幹細胞移植が実施された。さらには、研究開発分担者の笹原准教授は、X-SCID モデルブタを用いて得られた成果のヒトでの普遍性を実証すべく、「出生後」に造血幹細胞移植を行った X-SCID 患者の血液および糞便を採取し、免疫および微生物学解析を行うための準備を行った。本サンプルを用いた解析を通して、X-SCID モデルブタを用いて得られた成果と X-SCID 患者から得られた臨床結果との比較が初めて可能になり、X-SCID モデルブタの有用性がさらに実証される予定である。

Generating an innovative strategy for X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID), we have utilized an immuno-deficient pig model that lack a gene coding Interleukin 2 receptor gamma chain (IL-2Rg), which is the responsible gene of X-SCID. Using neonates of the pig model, Tomonori Nochi (Tohoku University) and Michiko Nakai (Maff) have discovered that, even after adoptive transfer with hematopoietic stem cells, 1) development of secondary lymphoid tissues (e.g., Peyer's patches and mesenteric lymph nodes) is incomplete, 2) IgA level in the gastrointestinal tract is low and 3) intestinal microflora is abnormal. The aim of our AMED project is to overcome such obstacles to develop secondary lymphoid tissues with complete function and morphology in the X-SCID pig model. Specifically, we have tried to develop a puncture technique with echo to transfer the hematopoietic stem cells into the liver of X-SCID neonates since the developmental process of secondary lymphoid tissues is initiated in the embryonic stage. Tomonori Nochi firstly tried to determine the exact period of secondary lymphoid organogenesis in pigs and found that in the gastrointestinal tract the lymphoid structures with T and B cells is found in neonates whose gestational age is 110 and 91 (not 76). In the mesenterium, the organogenesis was initiated before the gestational age 76 days. Given that the gestation period of pig and humans is 114 and 280 days, respectively, and compared with previous researches in terms of secondary lymphoid organogenesis in humans, we have concluded that the optimal period for adoptive transfer in the pig model could be the gestational age 50 days that is equivalent to 120 days in humans. Osamu Itano (International University of Health and Welfare) and Minoru Kitago (Keio University) has tried to transfer the hematopoietic stem cells in the liver of porcine neonates whose gestational age is 50 days and succeeded to establish the technique using echo. Michiko Nakai has produced enough numbers of immuno-deficient pigs used for the adoptive transfer. Verifying the data obtained by the pig model and clinical results obtained from X-SCID patients, Yoji Sasahara (Tohoku University) has collected plasma and feces from X-SCID patients who received adoptive transfer with hematopoietic stem cells. Through the AMED project using samples obtained from humans and immuno-deficient pigs, we have tried to form an academic foundation to develop a novel therapeutics for X-SCID patients.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌0件）

Sasahara Y. The WASP-WIP complex in the molecular pathogenesis of Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Int*, 58: 4-7, 2016

Moriya K, Niizuma H, Rikiishi T, Yamaguchi H, Sasahara Y., Kure S. Novel compound heterozygous RTEL1 mutations in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Pediatr Blood Cancer*, 63: 1683-1684, 2016

Nanishi E, Hoshina T, Takada H, Ishimura M, Nishio H, Uehara Y, Mizuni Y, Hasegawa S, Ohga S, Nagao M, Igarashi M, Yajima S, Kusuo Y, Onishi N, Sasahara Y., Yasumi T, Heike T, Hara T: PID-Infection study group. A nation-wide survey of medically preventable viral infections in patients with primary immunodeficiency diseases. *J Infect*, 73: 358-368, 2016

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 免疫不全ブタを用いたパイエル板の機能及び形態形成に関する免疫学的研究、盛田彰太郎、鈴木俊一、渡邊康一、麻生久、大西彰、野地智法、第 121 回日本畜産学会、2016/03/28、国内
2. ITP と鑑別が必要な原発性免疫不全症と遺伝性血小板減少症、笹原洋二。第 1 回道北免疫不全症講演会、2016/04/15、国内
3. 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植、笹原洋二、第 52 回東海小児造血細胞移植研究会、2016/09/16、国内
4. 小児がんを合併する免疫不全症症例とその分子病態の考察、笹原洋二、第 7 回関東甲信越免疫不全研究会、2016/09/18、国内
5. 造血障害を伴う先天性免疫不全症：免疫不全と造血不全の境界、笹原洋二、第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会、2016/12/15、国内
6. ADA2 欠損症、笹原洋二、第 10 回自己炎症疾患研究会、2017/02/04
7. 免疫不全症の鑑別診断を行った BCG 骨髄炎の一例、笹原洋二、鈴木資、片山紗乙莉、渡辺祐子、入江正寛、新妻秀剛、力石健、呉繁夫、2017/02/18、国内
8. XIAP 欠損症に対する造血幹細胞移植、笹原洋二、第 39 回日本造血細胞移植学会学術集会、2017/03/02、国内

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

#### (4) 特許出願

なし