

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09960

研究課題名（和文）SCIDに対する子宮内造血幹細胞移植治療のブタモデル

研究課題名（英文）A Pig Model of In Utero Transplantation of Hematopoietic Stem Cells for SCID

研究代表者

花園 豊（HANAZONO, Yutaka）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：70251246

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で我々は、X-SCIDピッグの6ヶ月にわたる長期飼育に成功した。また、X-SCIDピッグ造血幹細胞の自家移植実験を4頭に対して実施した。この系では、X-SCIDピッグから造血幹細胞を採取し、正常IL2RG遺伝子を発現できるように遺伝子改変したものを自家移植した。この過程で、ピッグ骨髓細胞の採取、造血幹細胞の濃縮、培養、移植、感染症予防等について標準プロトコールが完成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

X-SCIDピッグが造血幹細胞移植治療の前臨床試験のモデルとして活用できることを示した。X-SCIDピッグは、造血幹細胞移植治療ばかりでなく、造血幹細胞の遺伝子治療やゲノム編集治療のモデルとしても有用である。さらに、本研究でX-SCIDピッグの6ヶ月にわたる飼育が可能になったことから、本成果はX-SCIDピッグの普及を進める礎となる。今後、X-SCIDピッグは、細胞・遺伝子治療のレシピエント動物として、また、人のがんを植え付けて抗がん剤の有効性・安全性評価など、広い用途での利用が想定され、免疫不全マウスでは得られない貴重な知見が得られると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have successfully achieved rearing of X-SCID pigs for 6 months and performed autologous transplantation of hematopoietic stem cells derived from four X-SCID pigs. In this setting, hematopoietic stem cells were prepared from X-SCID pigs, modified to express the normal IL2RG gene, and autologously transplanted into the pigs. As a result, we have established standard procedures for harvest of pig bone marrow cells, enrichment of hematopoietic stem cells, culture and transplantation of the cells, prevention of infection, etc.

研究分野：血液内科

キーワード：X-SCID 造血幹細胞移植 ピッグモデル

## 1. 研究開始当初の背景

重症複合免疫不全症 (SCID) は、生まれつき免疫がなく、頻繁に感染症に罹患する。SCID のうち最も多い X 染色体連鎖 SCID (X-SCID) は、IL2 受容体 鎖 (IL2RG) 遺伝子に変異があり、男子のみ発症する。約 10 万人に 1 人。患児が無菌アイソレーターの中で過ごすため、Bubble boy disease と呼ばれる (下図)。2 歳までに骨髄移植が必須 (未移植例は死亡、移植により約半数が生存)。多くのケースではドナーが見つからない (>75%)。本研究では、X-SCID のピッグモデルを利用して、X-SCID の出生前造血幹細胞治療法を開発する。出生前なら、HLA が不一致でも移植可能で、両親をドナーにできるメリットがある。

## 2. 研究の目的

当初の目的は、X-SCID のピッグモデルを利用して、X-SCID の出生前造血幹細胞治療を開発することであった。しかし、生かしたままピッグ胎仔の組織採取が技術的に難しいことが分かった。ピッグ子宮の構造上の問題や、ピッグが流産しやすいといったことが理由である。ピッグ胎仔の組織採取ができなければ、X-SCID の出生前診断は困難である。出生前に X-SCID を診断できなければ出生前の治療はもとより難しい。このことは研究計画段階で予想されていたことではあった。交付申請書の研究計画で述べたとおり、X-SCID ピッグ出生直後の治療実験に変更となった。

## 3. 研究の方法

(1) X-SCID ピッグの飼育: X-SCID ピッグは、その免疫不全の故、生後 1 ヶ月以内に感染症で死亡する。そこで、まず我々は、無菌的に娩出した X-SCID ピッグを無菌アイソレーターに収容し無菌的に飼育し、3 ヶ月にわたる X-SCID ピッグの生存を成功させた (右図)。



### X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID) ピッグモデルの長期飼育に成功

(2) ピッグ造血幹細胞の準備: ピッグでは造血幹細胞マーカー、たとえば CD34 に対する抗体がなく、造血幹細胞を濃縮できなかった。そこで、ピッグ骨髄細胞から各種分化マーカー陽性細胞を除去したもの (Lin-) を移植用ドナー細胞として使用することにした。

(3) ピッグ造血幹細胞移植: 初年度、まず健康ピッグをレシピエントとする造血幹細胞移植を実施した (自家移植)。移植自体は成功した。ただし、レシピエントのピッグは、ブスルファン前処置による重度の貧血によって死亡した。ピッグでは赤血球寿命が 17 日余りしかないことが判明。これだけ赤血球寿命が短いと、人間と異なり輸血療法がほとんど無効。SCID ピッグの治療的移植では前処置を行わない方針に変更となった。

## 4. 研究成果

現在までに 4 頭の X-SCID ピッグ (生後約 1 か月) に対して、造血幹細胞の自家移植実験を実施した。すなわち、正常 IL2RG 遺伝子を発現できるように遺伝子改変したピッグ造血幹細胞を前処置なしで自家移植した。4 頭のうち 3 頭は移植 2~3 ヶ月後、免疫系が再構築される前に感染症で死亡した。感染症の原因として同一菌 X が検出された。これは、人間の感染症の起因菌としては珍しいものであった。病原体 X フリーの環境下で X-SCID ピッグを飼育したところ、6 ヶ月にわたる生存が得られ、X-SCID ピッグ飼育では X フリー環境の構築が重要と分かった。

移植後死亡した4頭のうち残りの1頭は生着不全が死亡原因であった。これを回避するためには、より多くの造血幹細胞を移植することが重要となる。これまでピッグ造血幹細胞は、ピッグ骨髄細胞から各種分化マーカー陽性細胞を除去したもの(Lin-)をドナー細胞として使用していた。しかし、これだけでは濃縮率は不十分であり、大量の造血幹細胞の調達を困難にしていた。そこでLin マーカー以外に Positive selection マーカーを追加することで、造血幹細胞の濃縮率を高められないか検討した。ピッグ細胞に交差する CD34 抗体を見出し、Lin-に CD34 を組み合わせることで、造血幹細胞の濃縮率を 5.2 倍高めることに成功した(コロニーアッセイによる)。

ヒトやマウスにおいて造血幹細胞の培養には stem cell factor, thrombopoietin, Flt-3 ligand (SCF/TPO/FL)が必須とされている。ピッグと交差するこれらサイトカインの確保は困難であったことがピッグ造血幹細胞の安定培養を困難にしていた。そこで、これらのピッグサイトカインを安定的に供給する体制を構築した。具体的には、これらのサイトカインを発現するピッグ cDNA をクローニングした。クローニングしたサイトカイン cDNA を適当な細胞に強制発現させ、その培養上清をピッグ造血細胞の培養液に添加したところ、細胞のチミジン取り込み量の増加が認められた。チミジン取り込みの増加量は、マウスのサイトカインをマウス造血幹細胞(Lin-)に加えた場合と同程度であった。

本研究によって、ピッグ造血幹細胞の効率的な濃縮、同細胞の培養条件最適化、X-SCID ピッグの感染症予防対策などの技術が開発された。これらの技術を駆使して、今後、移植治療後の X-SCID ピッグの感染死および生着不全を回避し、最終的に X-SCID ピッグの表現型の修復(T/B/NK 細胞や胸腺の出現) すなわち治癒を目指したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hara H, Shibata H, Nakano K, Abe T, Uosaki H, Ohnuki T, Hishikawa S, Kunita S, Watanabe M, Nureki O, Nagashima H, Hanazono Y	4. 巻 67
2. 論文標題 Production and rearing germ-free X-SCID pigs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 139-146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.17-0095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsunari Hitomi, Watanabe Masahito, Nakano Kazuaki, Enosawa Shin, Umeyama Kazuhiro, Uchikura Ayuko, Yashima Sayaka, Fukuda Toru, Klymiuk Nikolai, Kurome Mayuko, Kessler Barbara, Wuensch Annegret, Zakhartchenko Valeri, Wolf Eckhard, Hanazono Yutaka, Nagaya Masaki, Umezawa Akihiro, Nakauchi Hiromitsu, Nagashima Hiroshi	4. 巻 115
2. 論文標題 Modeling lethal X-linked genetic disorders in pigs with ensured fertility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 708 ~ 713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1715940115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原弘真、伊藤拓哉、菱川修司、中野和明、阿部朋行、柴田宏昭、魚崎英毅、渡邊将人、國田智、長嶋比呂志、花園豊
2. 発表標題 SCIDビッグの長期飼育：再生医療・細胞治療評価系の確立をめざして
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原弘真、菱川修司、伊藤拓哉、阿部朋行、柴田宏昭、魚崎英毅、國田智、花園豊
2. 発表標題 ビッグ同種輸血の試み
3. 学会等名 第46回日本臓器保存生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原弘真、菱川修司、伊藤拓哉、阿部朋行、柴田宏昭、魚崎英毅、國田智、花園豊
2. 発表標題 汎血球減少ピッグへの同種輸血
3. 学会等名 第7回日本先進医工学ブタ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原弘真、柴田宏昭、中野和明、阿部朋行、魚崎英毅、大貫貴広、スブド・ビャンパー、ナーウィン・ジャントラー、菱川修司、國田智、長嶋比呂志、濡木理、花園豊
2. 発表標題 ブタの無菌的娩出・飼育技術の確立とSCIDブタ飼育の試み
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原弘真、柴田宏昭、中野和明、阿部朋行、魚崎英毅、大貫貴広、菱川修司、國田智、渡邊將人、濡木理、長嶋比呂志、花園豊
2. 発表標題 無菌環境下におけるSCIDブタ長期飼育の試み
3. 学会等名 第5回日本先進医工学ブタ研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----