

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

平成 14 年度～平成 16 年度 総合研究報告書

主任研究者 宮脇 利男

平成 17 (2005) 年 3 月

## 目 次

|  |    |
|--|----|
| I. 総合研究報告<br>原発性免疫不全症候群に関する調査研究<br>宮脇 利男 | 1  |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表                       | 10 |
| III. 研究成果の刊行物・別冊                         | 17 |

総合研究報告書

原発性免疫不全症候群に関する調査研究

主任研究者 宮脇 利男 富山医科薬科大学医学部 小児科学教授

**研究要旨** 本調査研究では、原発性免疫不全症候群の疫学調査、病因や病態の解明、診断法や治療法の開発、患者 QOL の向上を目的に、重点目標として、1) 疫学調査研究、2) 簡易診断法の開発と遺伝子解析、3) 責任遺伝子、発症機構、病態の解明、4) 治療法の改良と遺伝子治療研究、5) ホームページの充実と患者 QOL の改善を掲げ、平成 14 年より 3 年間にわたり調査研究を推進した。疫学調査研究では、臨床調査個人票を活用した全国登録に努め、登録総数は 1,250 名となった。簡易診断法の開発と遺伝子解析では、責任遺伝子の明らかとなっている疾患の遺伝子解析を進め、新規責任遺伝子を含め新たに 158 家系で遺伝子解析による確定診断を行なった。責任遺伝子、発症機構、病態の解明では、各種疾患の基礎的・臨床的検討を行い、新規責任遺伝子の同定に寄与した。治療法の改良と遺伝子治療研究に関しては、ドナーに優しい骨髄非破壊的同種骨髄移植の応用に加え、ベクターによる副反応の軽減のために新たなベクター開発の基礎的研究を行い、臨床応用として血液幹細胞を標的とした遺伝子治療をアデノシンデアミナーゼ欠損症に施行し、順調に経過している。ホームページの充実と患者 QOL の改善については、ホームページを介した患者・家族からの問合せに機敏に答え、成人例を含めた遺伝子解析や遺伝カウンセリングに誠意をもって対応した。また、慢性肉芽腫症について、真菌感染予防を目指した日常生活マニュアルを作成し、啓蒙活動にも尽力した。

分担研究者

有賀 正 (小林 邦彦)  
北海道大学大学院医学研究科小児発達学  
教授  
土屋 滋  
東北大学加齢医学研究所発達病態研究分野  
教授  
野々山恵章  
防衛医科大学校医学研究科小児科学  
教授  
上松 一永  
信州大学大学院医学研究科臓器移植細胞工学医  
科学系専攻移植免疫感染症学  
助教授  
近藤 直実  
岐阜大学大学院医学研究科小児病態学分野  
教授  
布井 博幸  
宮崎大学医学部小児科学  
教授

原 寿郎  
九州大学大学院医学研究院成長発達医学  
教授  
小林陽之助  
関西医科大学医学部小児科学  
教授  
岩田 力  
東京大学大学院医学系研究科生殖発達加齢医  
学専攻小児医学講座発達発育学分野  
助教授  
小安 重夫  
慶応大学医学部微生物学・免疫学  
教授  
斉藤 隆  
理化学研究所横浜研究所免疫・アレルギー科学  
総合研究センター免疫シグナル研究  
グループディレクター  
烏山 一  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免  
疫アレルギー学分野  
教授

## A. 研究目的

本調査研究班は、昭和49年に発足以来、原発性免疫不全症候群の疫学調査、病因や病態の解明、診断法や治療法の開発、患者QOLの改善に貢献してきた。近年の基礎免疫学の著しい進歩の基に、ここ10年の間に永い間原因が不明であった多くの疾患で責任遺伝子が明らかとなり、臨床の現場で有用なフローサイトメトリー法による簡易診断の開発を進めるとともに、確定診断に欠かせない遺伝子解析を積極的に導入し、正確な患者・保因者診断に努めてきた。原発性免疫不全症候群は平成6年に特定疾患治療研究事業の対象としての指定も受け、診断基準の策定、根治療法としての骨髄移植の適応拡大を図り、ホームページを開設し、知識の普及、意見交換、患者・家族、主治医からの診断や治療に関する質問に対応してきた。しかし、本症候群に含まれる疾患は多岐にわたり責任遺伝子が明らかでないものが数多く残されていて、多くの疾患で適切な治療が施されないと、致死的となるか、成人期まで尾を引く合併症を残す危惧があり、遺伝子治療の導入など更なる治療法の改良が求められている。

これらを背景に、平成14年度からは3年間に渡り、従来にも増して、原発性免疫不全症候群に含まれる多種の疾患について、基礎と臨床の連携を深め、包括的・総合的に調査・研究を進めるべく、重点目標として、1) 疫学調査研究の推進、2) 簡易診断法の開発と遺伝子解析、3) 責任遺伝子、発症機構、病態の解明、4) 治療法の改良と遺伝子治療研究の遂行、5) ホームページの充実と患者QOLの改善を掲げ、国際的動向をも十分に視野に入れつつ、患者・家族のQOLの向上に寄与することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 疫学調査研究

特定疾患治療研究事業の臨床調査個人票を活用した患者登録を推進し、遺伝子診断による正確な診断

に努め、個々の疾患の頻度、臨床的多様性や予後を明らかにすることを目指した。

### 2. 簡易診断法の開発と遺伝子解析

臨床の現場で有用な診断基準の整備、単クローン抗体を用いた簡易診断の開発、確定診断に必要な遺伝子解析については、研究者間の役割分担を明確にして行った。

### 3. 責任遺伝子、発症機構、病態の解明

責任遺伝子の同定や病態の解明は、正確な診断や適切な治療法の開発につながる。臨床と基礎の連携を密にして、日本を発信地とした新たな責任遺伝子の同定や病態の解明に努めた。

### 4. 治療法の改良と遺伝子治療研究

成人期に達した患者の生活や治療の実態を調査し、個々の患者に則した $\gamma$ グロブリン置換療法、抗菌薬の適切使用を検討し、骨髄移植の適応拡大を図るとともに、期待の多い遺伝子治療の基礎的・臨床的研究を行った。

### 5. ホームページの充実と患者QOLの改善

患者・家族や主治医からの声を反映することに常に心がけ、ホームページをさらに充実するとともに、患者会との連携を一層深め、患者からの相談にも親身に対応して、患者のQOLの改善を目指した。

#### (倫理面への配慮)

本調査研究に必要なとされる遺伝子解析については、各研究者の所属する機関の倫理委員会の承認を得た。遺伝子解析に必要な血液試料の採取にあたっては、遺伝子解析に供すること、そのことが確定診断に必要であること、結果は本人が特定できるような形では公表しないこと、同意が得られれば不明な責任遺伝子の解明や遺伝子治療の開発のための研究に使用することがあることなど、患者・代諾者の理解を求め、経緯を書面に残すこととした。

## C. 研究結果

### 1. 疫学調査研究

症例の登録推進については、各学会や論文などの発表症例をサーチし、主治医に登録依頼するという方法で行なった。患者登録に努め、新規に総計 53 例（平成 14 年度 8 例：男 6 例、女 2 例；平成 15 年度 27 例：男 26 例、女 1 例；平成 16 年度 18 例：男 12 例、女 6 例）が登録された。昭和 48 年の本登録事業開始以来の延べ登録数は、平成 16 年 11 月 19 日までに男 907 例、女 343 例、合計 1250 例となった。他に、遺伝子解析済みであるが未登録の症例が 98 例（男 98 例、女 7 例）ある。

これまでの登録率を勘案し、試みに X 連鎖無ガンマグロブリン血症（XLA）と重症複合免疫不全症（SCID）の日本における発症率を計算すると、それぞれ約 20 万人に 1 人、10 万人に 1 人と推測された。特定疾患臨床調査個人票との対比では、臨床調査個人票の一部が登録されているにすぎないことが判明し、本邦の真の発症率を明らかにする意味でも、遺伝子解析済み例の登録の勧奨に加え、臨床調査個人票を真に活用した登録事業が必要となる。

### 2. 簡易診断法の開発と遺伝子解析

臨床の現場で実施可能な簡易診断法として、責任遺伝子産物に対する単クローン抗体を用いたフローサイトメトリーによる患者診断は、比較的頻度の高い X 連鎖性免疫不全症の XLA、X 連鎖 SCID (XSCID)、X 連鎖性慢性肉芽腫症 (XCGD)、Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS)、X 連鎖リンパ増殖症候群 (XLP) について本調査研究班で開発済みで、遺伝子診断の前段階のスクリーニングとして積極的に利用した。加えて、これら簡易診断法は、保因者の同定のみならず、血液幹細胞移植後の正着のモニタリングに有用な手段を提供した。

確定診断としての遺伝子解析については、臨床からの要請に積極的に応じて、研究者間で分担し実施し、新たに 158 家系で遺伝子診断を行なった。この

間に新たに同定された新規責任遺伝子については、SCID における *Artemis* 遺伝子変異、IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) 症候群における *FOXP3* 遺伝子変異、Omenn 症候群における *RAG1/2* 遺伝子変異、DNA ligase IV 症候群における *LIG4* 遺伝子変異、WHIM (wart, hypogammaglobulinemia, immunodeficiency, myeloma-thesis) 症候群における *CXCR4* 遺伝子変異、CD3delta 欠損による SCID、NEMO 欠損症などが、日本の症例で確認された。

### 3. 責任遺伝子、発症機構、病態の解明

XLA、SCID、CGD、高 IgM 症候群、WAS、CVID などの比較的頻度の高い疾患群に加え、幾つかの疾患について、我が国における症例の集積を図り、責任遺伝子の解明や発症機構の解明に関わり、臨床的多様性や発症機構を明らかにした。

#### 1) 無 $\gamma$ グロブリン血症

無 $\gamma$ グロブリン血症を来す疾患で最も多いのが XLA である。1998 年にフローサイトメトリーによる簡易診断法を開発して以来、*BTK* 遺伝子解析を併用して XLA と診断された例は平成 16 年までに 135 例に達している。教科書的には母親の移行抗体が児から消失する生後 4-6 ヶ月頃から 2 才までに発症し、細菌感染を反復するようになるとされるが、非典型例も存在することが分かった。XLA の診断につながった感染症などの臨床症状につき検討すると、臨床診断のきっかけとなった感染症は乳児群では中耳炎、肺炎が多かったが、幼児群では肺炎の他髄膜炎、関節炎が比較的多く認められた。年長児群 7 歳以上では肺炎が多かった。約半数は孤発例で、XLA の臨床診断にあたっては家族歴や発症年齢に関係なく反復する感染症や重症感染が契機となることがあるので注意が必要である。遺伝子診断が進み、同胞で、無症状の段階で診断がつき早期より $\gamma$ グロブリン置換療法が開始されている例が増えていることが注目される。最近では、低 $\gamma$ グロブリン血症に気づかれてか

ら1年以内にXLAと確定診断される症例が増加しているものの、発症から確定診断までに10数年近くかかっている症例が今なおみられる。低 $\gamma$ グロブリン血症でB細胞比率が著減している男児では、XLAを念頭に検索することが望まれる。

XLAに類似してB細胞を欠損する無 $\gamma$ グロブリン血症をもたらす責任遺伝子として、プレB細胞レセプターの構成成分をコードする5種類の遺伝子が同定されている。その一つに代替軽鎖の $\lambda 5$ 欠損症があり、本症患者の骨髄プロB細胞の解析から、代替軽鎖・免疫グロブリン軽鎖のいずれとの会合も必要とせず、細胞表面に単独で発現する異常な $\mu H$ 鎖が存在することを見出した。モデルマウスを用いて、プレB細胞レセプターが成熟B細胞に発現するIg受容体の品質管理、レパートリー形成に極めて重要な働きをしていることを明らかにした。

B細胞欠損を伴う無 $\gamma$ グロブリン血症を来す可能性のある新規の責任遺伝子を同定する意味で、動物モデルの解析は有用である。すでに、PI3Kの調節サブユニットであるp85 $\alpha$ を欠損したマウスにおいて、末梢におけるB細胞の割合が著減することを明らかにしている。p85 $\alpha$ 欠損のマウスのB細胞においては、NF- $\kappa$ B経路の重要なコンポーネントであるc-Relの発現が著しく低下しており、さらにRelAの発現低下も観察された。p85 $\alpha$ 欠損B細胞におけるc-Rel遺伝子の発現レベルは野生型マウス由来B細胞と同程度であり、PI3K経路の活性がc-Relタンパク質の細胞内での安定性に寄与している可能性が強く示唆された。ヒトのp85 $\alpha$ 遺伝子変異は未だ見つかっていないが、非XLA症例から発見されることが期待される。

## 2) 高IgM症候群

高IgM症候群は、免疫グロブリンがクラススイッチできないことにより、IgMは正常ないし高値をとるが、血清IgG、IgAは低値をとる原発性免疫不全症である。現在までに、責任遺伝子として、CD40 ligand、

CD40、AID、NEMOが同定されている。AID遺伝子変異による高IgM症候群は、日本にも少なからず存在する。AIDは12番染色体に局在し、通常は常染色体劣性遺伝する。しかし、片方のアレルのAID遺伝子変異のみで臨床的に高IgM症候群を来し、遺伝的に常染色体優性遺伝形式をとる家系を、世界で初めて見出した。病態として変異AIDのdominant negative効果が推測された。重要なことは、仏国ネッカー小児病院との共同研究により、高IgM症候群の責任遺伝子としてuracil-DNA glycosylase (UNG)の同定に寄与したことである。

我が国で集積された75例の高IgM症候群患者を臨床遺伝学的に解析した。内訳として、CD40 ligand遺伝子変異によるもの39例、AID遺伝子変異によるもの15例、UNG遺伝子変異によるもの1例であった。原因不明のものが20例あり、DNA修復機構の異常の観点から原因遺伝子を同定すべく更なる検討を進める予定である。CD40 ligand遺伝子異常では、T細胞機能不全を伴うことより、予後不良が懸念され造血幹細胞移植が必要である。AID異常では、B細胞のクラススイッチと体細胞突然変異の異常があり、臨床的には低 $\gamma$ グロブリン血症の症状が主体であることと $\gamma$ グロブリン定期補充により生命予後は良好である事が示された。しかし、診断が遅れると慢性肺疾患に陥る事が明らかになった。

## 3) 分類不能型免疫不全症 (CVID)

CVIDは、臨床上遭遇することが多く、比較的よくみられる疾患である。末梢血にB細胞がある程度存在しながら低 $\gamma$ グロブリン血症と反復する細菌感染を呈する。しかし、その本態は明らかではない。CVIDでは末梢血B細胞数や他の免疫担当細胞数にも異常を認めないことが多く、病因的に異なる種々の疾患群の集合と考えられている。最近、CVIDを来す病因としてCD28/CTLA4ファミリーに属するInducible costimulator (ICOS)の遺伝子変異が見出された。我が国のCVIDと診断された15例において、

ICOS を解析したところいずれも正常に発現していた。ICOS とそのリガンド B7h の作用は、T/B 相互作用による免疫応答において重要であるが、不明な点も多く、特にヒトにおいては十分な解析がなされていない。COVID 発症における ICOS/B7h 異常の意義を検討した。B7h はナイーブ B 細胞の大部分に発現しているが、メモリー B 細胞においては、その発現が減少しており、その約 50% において発現を認めなかった。B7h はナイーブ B 細胞と活性化 T 細胞の相互作用に重要な役割を担っているものと思われた。ナイーブ B 細胞上の B7h は、CD40 刺激によって発現が増加し、他の刺激ではほとんど発現に変化がみられない。B7h/ICOS 相互作用は、IFN- $\gamma$  産生を促すものと考えられた。

#### 4) 選択的 IgA 欠損症

選択的 IgA 欠損症は、血清 IgA のみが低値で自己免疫疾患の合併症をしばしばみる。我が国では、欧米に比べ頻度が低いものの、臨床しばしば遭遇する。しかし、その病態は不明である。選択的 IgA 欠損の病態を解明するための一助として、患者 B 細胞の B 細胞分化の障害部位について分子遺伝学的に検討を行い、 $C\alpha$  germline transcript の発現低下が重要であることを明らかにした。

#### 5) IgG サブクラス欠損症

IgG サブクラス欠損症は、繰り返す肺炎、中耳炎が特徴である。すでに、膜型 IgG2 の変異により完全 IgG2 欠損を来すことを明らかにしているが、IgG1 のみを完全に欠損する女性例に遭遇し、遺伝学的に検討したところ、*C $\gamma$ 1* 遺伝子が欠失していることが示された。選択的にある一つの IgG サブクラスが完全に欠損している例では IgG 定常部領域の変異もしくは欠失を考慮することが重要である。

易感染性を引き起こす疾患の一つとして、IgG サブクラス欠損症は臨床の現場で問題となる。しかし、IgG サブクラス測定が健康保険採用されていないこともあり、その実態は明らかでない。そこで、IgG

サブクラス測定の臨床的必要性を知るために全国アンケート調査を行った。IgG サブクラス測定を行ったことがある施設は 49.8% であり、将来測定するかもしれないと考えている施設を加えると、全体の 61.0% であった。対象疾患は反復気道感染症が最も多かったが、次いで重症細菌感染症、先天性免疫不全症、低ガンマグロブリン血症であった。測定の結果、IgG サブクラス欠損症が 221 例で診断されていた。多くの施設で易感染性を有する小児の診断のために、個人あるいは病院負担で IgG サブクラスの測定を行っていることが明らかとなった。95.2% の施設で IgG サブクラス測定の健康保険適応を望んでいた。IgG サブクラス欠損症の診断にあたっての IgG サブクラス測定の臨床的ニーズは高く、今後、健康保険採用を含めた本症の衆知が求められる。

#### 6) Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS)

WAS は血小板減少、湿疹、易感染を 3 主徴とする X 連鎖性の免疫不全症で、症例も多い。責任遺伝子 *WASP* の同定後、フローサイトメトリー法による簡易診断の導入もあり、*WASP* 遺伝子による臨床的多様性が観察されている。我が国における *WASP* 遺伝子変異を証明された 50 例について、*WASP* 蛋白発現と臨床的表現型の相互関係を検討した。*WASP* 蛋白欠損例では重症患者が多く、このような例では早期の血液幹細胞移植が望まれる。

WAS 責任遺伝子蛋白である *WASP* は、主に T 細胞受容体 (TCR) シグナル伝達系にて細胞骨格系と T 細胞活性化を司る分子である。*WIP* (*WASP*-interacting protein) は *WASP* WH1 ドメインと結合し、常染色体上にコードされ、*WASP* 活性化を負に制御する分子として知られる。TCR 刺激後の *WASP* と *WIP* 相互反応、とりわけ、*WIP* リン酸化を介した *WASP* 活性化のメカニズムにつき検討し、*WASP* は TCR 上流の分子群や *WIP*、SH3 ドメインをもつアダプター分子を介して、immunological synapse へリクルートされること、その後 PKC $\theta$  により *WIP*

はリン酸化され、WASP-WIP 間の結合が解離し、WASP 活性化に関与することを明らかにした。このような知見より、WIP の異常により WAS 様の臨床所見を呈する常染色体性 Type 2 WAS の存在の可能性があることが示された。

#### 7) 重症複合免疫不全症 (SCID)

SCID は早期の骨髄移植によってのみ救命が可能な免疫学的救急疾患であるが、その責任遺伝子の多くが同定されている。そのうち、*RAG1/RAG2* 遺伝子異常は、重症複合免疫不全症 (B<sup>-</sup> SCID) のみならず Omenn 症候群としての臨床像を呈する。特に RAG 活性を部分的に残す Omenn 症候群は特徴的な臨床症状を示す免疫不全症例で、このような臨床症状は RAG 遺伝子異常に基づく T 細胞分化障害と異常 T 細胞クローンの選択的増加を反映していることが示されている。Omenn 症候群の病態評価と、血液幹細胞移植後の T 細胞再構築過程を評価する上での TCR 構造多様性解析を検討し、TCR V $\beta$  repertoire 解析や CDR3 サイズ分布解析が T 細胞再構築過程の評価に有用であること、臍帯血幹細胞移植では、極めて早期に TCR 構造の多様性が得られることが示唆された。

近年、SCID の原因として新たに CD3delta 欠損症が報告された。本邦における *CD3delta* 遺伝子変異による SCID の存在を確認するために、SCID の姉弟例に関して、*CD3delta* 遺伝子異常の有無について検討し、我が国初の家系であることを報告した。

#### 8) 慢性肉芽腫症 (CGD)

CGD 患者にクローン病類似の炎症性腸疾患を合併することが知られている。腹痛、水様性下痢などの消化器症状を認めることが多いが、これらの症状がなくとも腸炎をきたすことがあることを明らかにした。熱源が不明の場合は腸炎も念頭に置き、大腸ファイバーによる組織診断を実施し、治療としてクローン病同様にメサラジンの使用を念頭に置く必要がある。ST 合剤は、CGD の感染予防として頻用さ

れているが、好中球における NO 産生を促進することが明らかにした。

#### 9) Chediak-Higashi 症候群

Chediak-Higashi 症候群は白子症を伴う原発性免疫不全症であり、好中球やマクロファージの殺菌能低下と NK 活性の低下を特徴とする。この疾患の責任遺伝子である *CHSI* の cDNA は全長 13kb と長大で、その機能についてはまだ明らかではない。また、これまでに CHS 患者の *CHSI* の変異についての情報も十分とはいえない状況である。我が国の CHS について患者由来の細胞株を用い変異同定を行った。

#### 10) Bloom 症候群

Bloom 症候群は小柄な体型、日光過敏性紅斑、免疫不全さらには高率に癌腫を合併する常染色体劣性の遺伝性疾患である。責任遺伝子 *BLM* は helicase 活性を有し、DNA の複製・修復に関与するとされる。我が国の BS 患者の *BLM* 遺伝子変異について解析した。対象にした 5 BS 症例のうち、3 例が 631delCAA の homozygous であり、1 例が 631delCAA と 1610insA の compound heterozygous、1 例が 631delCAA と 735delCAA の compound heterozygous であった。これら BS の 10 allele のうち、8 allele が 631delCAA であり、日本人に比較的共通した変異であると考えられた。

#### 11) 高 IgE 症候群

高 IgE 血症に加え反復性のブドウ球菌性感染やアトピー様皮膚炎を示す本免疫不全症の本態は明らかでない。高 IgE 症候群患者から単球を純化し、マイクロアレイ法による解析により、健常成人やアトピー性皮膚炎患者と比較検討した。この結果に基づき、高 IgE 症候群の責任遺伝子の同定を進行中である。

#### 12) 補体 C9 欠損症

補体の一成分である C9 欠損症は常染色体劣性遺伝型式をとり、髄膜炎菌性髄膜炎をしばしば併発する。日本における発症率は欧米人に比べ高く、日本人 1000 人に 1 例、保因者の頻度は約 6.7%と予測さ



れている。日本人の C9 欠損症の変異は R95X 変異に限られているのが特徴である。中国、韓国においても同様の変異があり、C9 遺伝子近傍に存在する CA リピート、GA リピートの多型解析より、東洋に起源する共通変異と考えられた。

### 13) WHIM 症候群

WHIM 症候群は、疣贅、低 $\gamma$ グロブリン血症、免疫不全、好中球の特異な形態異常を伴う好中球減少を特徴とする。近年、WHIM 症候群の責任遺伝子がケモカインレセプターの一つである CXCR4 であることが判明し、我が国にあっても 2 例が確認された。CXCR4 はストローマ細胞由来因子 1 (SDF-1) のレセプターであり、多くの血液細胞に発現し、CXCR4 は多彩な生物学的機能を有することが知られているが、WHIM 症候群における責任遺伝子 (CXCR4) の病態生理学的役割を明らかではない。本症での CXCR4 変異蛋白の機能を解明する目的で、2 卵性双胎姉妹症例を検討した。姉、妹および父で CXCR4 領域の 334 番目 (1000C-T) がヘテロに変異し、ストップコドンとなっていた。母と兄とでは変異を認めず、父の体細胞で突然変異が起こり、その変異遺伝子が姉妹に遺伝したため発症したと考えられた。患者の好中球では SDF-1 に対して、アポトーシスの遅延と走化能の亢進が認められたが、リンパ球では正常人と差はなかった。

### 14) プロテオーム解析による免疫不全症の原因探索

原因不明な免疫不全症の原因遺伝子の同定へのプロテオーム解析の適応を試みた。免疫不全症細胞を用いて 2 次元電気泳動 (2D) 解析を行った。XLA 及び WAS 患者由来の細胞株の解析では、BTK 欠損は検出可能であったが WASP は困難であった。しかし、4 つの WAS 患者由来細胞株は同様な 2D パターンを示し、患者細胞に特異的な蛋白が同定できたことから、プロテオーム解析による疾病関連蛋白同定の可能性が示唆された。TCR 発現低下を伴う未知先天性免疫不全症と考えられる患者の末梢リンパ球に

この 2D 解析を応用した。TCR 刺激培養後に患者特異的に欠損している蛋白として procaspase-3 を同定した。しかし、刺激前の患者リンパ球では procaspase-3 が発現し、活性化されていることが判明した。caspase-8 も同様であり、アポトーシスシグナルの制御に異常があると考えられた。

## 4. 治療法の改良と遺伝子治療研究

### 1) 血液幹細胞移植

原発性免疫不全症の根治療法としての骨髄移植や臍帯血移植などの血液幹細胞移植は、ここ 10 年間で 150 以上に実施され、定着してきた。JAK3 異常による SCID の女兒に、HLA 一座不一致非血縁臍帯血造血幹細胞移植 (CBSCT) を施行した。前処置は行わず、GVHD 予防には短期メソトレキセートと FK506 を用いた。細胞性免疫能の改善は順調で、経過中急性、慢性 GVHD は認められなかった。臍帯血バンクドナーを用いた CBSCT は HLA 一致血縁ドナーが得られない症例において短期間にドナーが得られることやドナーの負担がないこと、成人血と異なり HLA 不適合移植においても比較的 GVH 反応が弱いことや潜伏ウイルス感染のリスクがほとんどないことなどから今後 SCID の根治療法の有望な選択肢の一つになり得ると考えられた。

しかし、一般に、移植に伴う合併症は避けることができなく、その軽減が求められている。最近、血液幹細胞移植一つの選択肢として、ドナーに優しい骨髄非破壊的同種骨髄移植が有望視されている。Myelokathexis 患者と X-SCID に行い、明らかな GVHD はなく、免疫機能の回復も順調に経過している。今後、他の疾患への適応が期待される。

### 2) 血液幹細胞移植後の T 細胞再構築

血液幹細胞移植後の病態評価と移植後の免疫能回復を客観的指標として、TCR の多様性をマーカーとした T 細胞機能評価の可能性を検討した。胸腺由来のナイーブ T 細胞が末梢血中に増加する以前の早い段階で、ドナー由来の成熟 T 細胞の増殖が起こるこ

と、それらが移植後早期の T 細胞機能回復に重要な役割を果たす可能性が示唆された。また移植後合併症が少なく順調に回復した症例では、移植後早期の TCR 多様性は経過を追って維持されており、T 細胞再構築の客観的評価の指標として TCR 多様性解析は有用であると考えられた。

### 3) 遺伝子治療の基礎的検討

造血幹細胞を標的としてウイルスベクターを用いた免疫不全症に対する遺伝子治療については、休止期の造血幹細胞にも遺伝子導入が可能なレンチウイルスベクターを用い、マウス造血細胞に遺伝子導入し XLA 遺伝子治療の可能性を明らかにした。

### 4) 遺伝子治療の臨床応用

原発性免疫不全症の遺伝治療については、日本で最初に重症複合型免疫不全症の一つのアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症に対して行われたが、末梢血 T 細胞を標的にしたものであった。ADA 欠損症 2 例に対して、平成 15 年と平成 16 年に、骨髄の血液幹細胞を標的にした遺伝子治療を実施された。酵素療法を持続することなく、臨床経過は順調であることが観察されている。ここでは、前処置なしで遺伝子導入細胞を輸注したが、リンパ球数の増加はイタリアの同様の遺伝子治療例に比較して緩慢であり、B および NK 細胞数の増多も現時点ではみられていない。イタリアでは busulfan 投与による前処置を施行しており、このことが両者の臨床経過の差に影響しているものと考えられた。臨床効果の面からは前処置の施行がより早期の免疫能の再建には必要に思えるが、本研究においても今後の免疫能再建は十分に期待でき、またイタリアの症例での busulfan による晩期障害の発現等の懸念もあることから、より長期に渡り経過をみることでより効果的かつ安全性の高い治療法の確立を目指す必要があると考えられる。

XSCID については東北大学にて準備が進んでいるところであるが、2005 年になりフランスの実施例

で新たに白血病発症例が見つかり、世界的にも XSCID の遺伝子治療が暗礁に乗り上がっている。国際的動向を鑑み、我が国での実施の可能性を探ることとしたい。

### 5. ホームページの充実と患者 QOL の改善

ホームページを通じての患者・家族からの問合せが増えていて、その対応には鋭意努めている。患者 QOL の改善の観点から、CGD 患者へのアンケートに基づいた日常生活マニュアル作成、成人期にある低 $\gamma$ グロブリン血症の遺伝子解析などを実施した。

#### 1) CGD 患者のための日常生活マニュアル作成

CGD の管理において、反復性化膿性疾患に加えて、肺などの深部真菌感染に難渋する。命に関わることさえあり、患者さんの日常的関心事でもある。そのような CGD 患者の悩みを知るために、105 施設 206 名を対象にアンケート調査を行い、71 名 (回収率は 34.5%、生存者の 68.9%)、56 施設 (52.4% 回収率) からの回答を得た。一般的に医師からの服薬指導はよく守られていたが、日常生活でのカビ対策の実践的知識が足りず、不安が多く、メリハリのある安全な生活環境の確保出来ていないのではないかと思われた。そこで、日常生活での家庭や学校、食品、住宅について指導要綱をまとめ、患者さん、主治医に配付することとした。

#### 2) 成人の低 $\gamma$ グロブリン血症の検討

原発性免疫不全症候群は繰り返す細菌感染症を契機に小児期に診断されることが多い。しかし、小児期には明らかな感染のエピソードを示さず成人期になって易感染性が出現する例や、検査にて偶然低 $\gamma$ グロブリンが発見される成人例も見受けられる。また、小児期に発症しながら確定診断がつかず、成人期にキャリアオーバーする例も存在するものと推測される。成人期にある原発性免疫不全症候群の QOL の改善を目的に、成人の低 $\gamma$ グロブリン血症を対象に遺伝学的検索を行った。臨床免疫学会員 1424 名に成人低 $\gamma$ グロブリン血症の有無を調査し、63 施設で成

人低 $\gamma$ グロブリン血症ありとの回答を得た。インフォームドコンセントの得られた 23 例に対して血液採取を行い、責任遺伝子の解析を試みた。その結果、5 例 (22%) において原因が確定された。今回の調査により、成人低 $\gamma$ グロブリン血症の症例の中には既知の遺伝子異常を持ちながら診断されずに観察されている症例が比較的多く存在することが明らかとなった。責任遺伝子を明らかにし、確定診断を行うことは、より正確な遺伝子カウンセリングや治療方針を決定する上で重要であり、さらに症例を集め検討する必要があると考えられる。

## 考察

近年、原発性免疫不全症候群に含まれる疾患の多くの責任遺伝子が判明し、遺伝子変異解析は確定診断に欠かせない。本調査研究班で開発しているフローサイトメトリーを用いた簡易診断法は、臨床の現場で短時間に実施可能であり、早期診断に大きく寄与してきた。このような簡易診断法は、XLA を始めいくつかの疾患について、遺伝子解析前のスクリーニングとして普及した。遺伝子解析にはついては、責任分担を明確とし、ホームページを介して主治医、患者・家族からの要望に親身に対応してきた。このような連携体制により培われた症例の蓄積が、病態の解明や新規責任遺伝子の同定の糸口を開くものと考えられる。その一つの成果として、高 IgM 症候群タイプ 5 の責任遺伝子 *UNG* の発見がある。

原発性免疫不全症候群の臨床的・基礎的解析は、病態の解明や治療法の改善のみならず、免疫機能分子のヒトにおける生物学的役割を明らかにするものであり、本調査研究班での症例検討は学術面で少なからず貢献するものと考えられる。我が国を発進地として開発した簡易診断法は国際的にもインパクトを与え、技術提供、国際共同研究と発展した。また、社会的意義として、遺伝子解析を含め早期診断が可能であるとの主治医、患者・家族からの信頼を得つつ

あるものとする。

本調査研究班の責務の一つに、臨床個人調査票を活用した患者登録事業があるが、登録については主治医に登録を促すという形で行われてきた。事実、遺伝子解析例が登録例を大きく越えている。この問題点を解決するため、さらには、本邦における原発性免疫不全症候群の真の発生状況を明らかにするためにも、ホームページを通じた登録の実施、疫学調査担当者と遺伝子解析担当との円滑な連携プレー、臨床個人調査票との対比作業など、新たな登録システムの確立が望まれる。原発性免疫不全症候群の多くの責任遺伝子はまだ明らかでない。本調査研究班で蓄積された症例の更なる病態解明により、新たな責任遺伝子の同定やその生物学的意義を明らかにでき、簡易診断の開発にも繋がるものと期待される。

本調査研究班の主要な責務は、治療法向上などによる患者 QOL の改善にある。原発性免疫不全症候群に含まれる疾患は 100 以上と多岐にわたり、また、比較的まれであることより、患者・家族や主治医からの正確な診断や適切な治療に対する要望が強い。これに対して、一層の役割分担を明確にした連携、時代にあった診断基準の見直し、個々の疾患に則した治療方針の見直し、血液幹細胞移植のレジメ作成、遺伝子治療の拡大、患者・家族に分かりやすい専門病院の整備などが急務となっている。

## 結論

本調査研究では、原発性免疫不全症候群に含まれる疾患の診断や治療に結びつく臨床的基礎的調査研究を実施した。つまり、重点目標として、1) 疫学調査研究の推進、2) 簡易診断法の開発と遺伝子解析、3) 責任遺伝子、発症機構、病態の解明、4) 治療法の改良と遺伝子治療研究の遂行、5) ホームページの充実と患者 QOL の改善を掲げ、分担研究者の連携を密に尽力した。得られた成果を生かした今後の調査研究の活用や展開が望まれる。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

| 発表者氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名             | 巻号  | 頁         | 出版年  |
|--|---|------------------|-----|-----------|------|
| Taniuchi S, Masuda M, Tsuji S, Hasui M, Takahashi H, and <u>Kobayashi Y.</u>   | Differential diagnosis and clinical course of autoimmune neutropenia in infancy: comparison of congenital neutropenia.  | Acta Paediatr    | 91  | 1179-1182 | 2002 |
| Wang Y, Kanegane H, Sanal O, Tezcan I, Ersoy F, Futatani T, and <u>Miyawaki T.</u>   | Novel Ig $\alpha$ (CD79a) gene mutation in a Turkish patient with B cell-deficient agammaglobulinemia.  | Am J Med Genet   | 108 | 333-336   | 2002 |
| Nagumo H, <u>Agematsu K.</u> , Kobayashi N, Shinozaki K, Hokibara S, Nagase H, Takamoto M, Yasui K, Sugane K, and <u>Komiyama A.</u>   | The different process of class switching and somatic hypermutation; a novel analysis by CD27(-) naive B cells.  | Blood            | 99  | 567-575   | 2002 |
| Wang Y-H, Stephan R P, Scheffold A, Kunkel D, <u>Karasuyama H.</u> , Radbruch, A and Cooper MD.  | Differential surrogate light chain expression governs B cell differentiation.   | Blood            | 99  | 2459-2467 | 2002 |
| Yamaguchi K, <u>Ariga T.</u> , Yamada M, Nelson DL, Kobayashi R, Kobayashi C, Noguchi Y, Iro Y, Katamura K, Nagatoshi Y, Kondo S, Katoh H, and <u>Sakiyama Y.</u>              | Mixed chimera status of 12 patients with Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) after hematopoietic stem cell transplantation; evaluation by flow cytometric analysis of intracellular WAS protein expression.                        | Blood            | 100 | 1208-1214 | 2002 |
| Konno A, Okada K, Mizuno K, Nishida M, Nagaoki S, Toma T, Uehara T, Ohta K, Kasahara Y, Seki H, <u>Yachie A.</u> , and Koizumi S.  | CD8 $\alpha$ memory effector T cells descend directly from clonally expanded CD8 $\alpha$ + $\beta$ high TCR $\beta$ T cells in vivo.   | Blood            | 100 | 4090-4097 | 2002 |
| Katamura K, Hattori H, Kunishima T, Kanegane H, <u>Miyawaki T.</u> , and Nakahata T.   | Non-progressive viral myelitis in X-linked agammaglobulinemia.  | Brain Dev-JPN    | 24  | 109-111   | 2002 |
| Suga N, Takada H, Nomura A, Ohga S, Ishii E, Ihara K, Ohshima K, and <u>Hara T.</u>  | Perforin defects of primary hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan.  | Br J Haematol    | 116 | 346-349   | 2002 |
| <u>Ariga T.</u> , Yamaguchi K, Yoshida J, Miyanoshita A, Watanabe T, Date T, Miura J, Kumaki S, Ishii N, <u>Sakiyama Y.</u>  | The role of common gamma chain on monocytes in vivo; evaluation from the studies of carriers of X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) and X-SCID patients who had received cord blood stem cell transplantation. | Br J Haematol    | 118 | 858-863   | 2002 |
| Inoue H, Kurosawa H, <u>Nonoyama S.</u> , Imai K, Kumazaki H, Matsunaga T, Sato Y, Sugita K, and Eguchi M  | X-linked thrombocytopenia in a girl.  | Br J Haematol    | 118 | 1163-1165 | 2002 |
| Ohga S, Nomura A, Takahata Y, Ihara K, Takada H, Wakiguchi H, Kudo Y, and <u>Hara T.</u>   | Dominant expression of IL-10 but not IFN- $\gamma$ in CD4 $^{+}$ CD8 $^{-}$ $\alpha\beta$ T cells of autoimmune lymphoproliferative syndrome.   | Br J Haematol    | 119 | 535-538   | 2002 |
| Yamamoto A, Taniuchi S, Tsuji S, Hasui M, and <u>Kobayashi Y.</u>  | Role of reactive oxygen species in neutrophil apoptosis following ingestion of heat-killed Staphylococcus aureus.   | Clin Exp Immunol | 129 | 479-484   | 2002 |
| <u>Agematsu K.</u> , Futatani T, Hokibara S, Kobayashi N, Takamoto M, Tsukada S, Suzuki H, <u>Koyasu S.</u> , <u>Miyawaki T.</u> , Sugane K, <u>Komiyama A.</u> , and Ochs HD. | Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency.  | Clin Immunol     | 103 | 34-42     | 2002 |
| Kogawa K, Kudoh J, Nagafuchi S, Katsuta H, Ohga S, Tamiya S, Sakai Y, Harada M, <u>Hara T.</u> , and Shimizu N.  | Phenotype of autoimmune polyglandular syndrome type 1 and genotype of AIRE gene in a Japanese family.   | Clin Immunol     | 103 | 277-283   | 2002 |
| Kuribayashi F, <u>Nunoi H.</u> , Wakamatsu K, Tsunawaki S, Sato K, Ito T, and Sumimoto H.  | The adaptor protein p40 (phox) as a positive regulator of the superoxide-producing phagocyte oxidase.   | EMBO J           | 21  | 6312-6320 | 2002 |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名             | 巻号  | 頁             | 出版年  |
|--|---|------------------|-----|---------------|------|
| Hasui M, Kotera F, Tsuji S, Yamamoto A, Taniuchi S, Fujikawa Y, Nakajima M, Yoshioka A, and <u>Kobayashi Y.</u>  | Successful resumption trimethoprim-sulfamethoxazole after oral desensitisation in patients with chronic granulomatous disease.  | Eur J Pediatr    | 161 | 356-357       | 2002 |
| Inaba K, <u>Miyawaki T</u> , Longnecker R, Matsukura H, Tsukada S, and Kurosaki T.   | Bruton's tyrosine kinase regulates B cell antigen receptor-mediated JNK1 response through Rac1 and phospholipase C $\gamma$ 2 activation.   | FEBS Lett        | 13  | 260-262       | 2002 |
| Otsu M, Hershfield MS, Tuschong LM, Muul LM, Onodera M, <u>Ariga T</u> , <u>Sakiyama Y</u> , and Candott F.  | Flow cytometry analysis of adenosine deaminase (ADA) expression: a simple and reliable tool for the assessment of ADA-deficient patients before and after gene therapy.             | Hum Gene Ther    | 13  | 425-432       | 2002 |
| Tani SM, Wang Y, Kanegane H, Futatani T, Pinto J, Viela MMS, and <u>Miyawaki T.</u>  | Identification of mutations of Bruton's tyrosine kinase gene (BTK) in Brazilian patients with X-linked agammaglobulinemia.  | Hum Mutat        | 531 | 195-205       | 2002 |
| Shinozaki K, Kanegane H, Matsukura H, Sumazaki R, Tsuchida M, Makita M, Kimoto Y, Kanai R, Tsumura K, Kondoh T, Moriuchi H, and <u>Miyawaki T.</u>   | Activation-dependent T cell expression of the X-linked lymphoproliferative disease gene product SLAM-associated protein and its assessment for patient detection.                   | Int Immunol      | 14  | 1215-1223     | 2002 |
| Morimoto W, Kancko H, Isogai K, Kasahara K, and <u>Kondo N.</u>  | Expression of BLM (the causative gene for Bloom syndrome) and screening of Bloom syndrome.  | Int J Mol Med    | 10  | 95-99         | 2002 |
| Hirata D, Nara H, Inaba T, Muroi R, Kanegane H, <u>Miyawaki T</u> , Okazaki H, and Minota S  | von Recklinghausen disease in a patients with X-linked agammaglobulinemia.  | Intern Med       | 41  | 1039-1043     | 2002 |
| Beamish H, Kedar P, Kancko H, Chen P, Fukao T, Peng C, Beresten S, Gueven N, Purdie D, Lees-Miller S, Ellis N, <u>Kondo N</u> , and Lavin MF.  | Functional link between BLM defective in Bloom's syndrome and the ataxia-telangiectasia-mutated protein, ATM.   | J Biol Chem      | 23  | 30515 - 30523 | 2002 |
| Kawai S, Mincigishi M, Ohashi Y, Sasahara Y, Kumai S, Konno T, Miki H, Derry J, <u>Nonoyama S</u> , <u>Miyawaki T</u> , Horibe K, Tachibana N, Kudoh E, Yoshimura Y, Izumikawa Y, Sako M, and <u>Tsuchiya S.</u> | Flow cytometric determination of intracytoplasmic Wiskott-Aldrich syndrome protein in peripheral blood lymphocyte subpopulations.   | J Immunol Method | 260 | 195-205       | 2002 |
| Sasaki Y, Nomura A, Kusuhara K, Hidetoshi Takada, Ahmed S, Obinata K, Hamada K, Okimoto Y, and <u>Hara T.</u>  | Genetic basis of patients with Bacille Calmette-Guerin osteomyelitis in Japan: identification of dominant partial interferon- $\gamma$ receptor 1 deficiency as a predominant type. | J Infect Dis     | 185 | 706-709       | 2002 |
| Yasui K, Sckiguchi Y, Ichikawa M, Nagumo H, Yamazaki T, <u>Komiyama A</u> , and Suzuki H.  | Granulocyte macrophage-colony stimulating factor delays neutrophil apoptosis and primes its function through Ia-type phosphoinositide 3-kinase.                                     | J Leukoc Biol    | 72  | 1020-1026     | 2002 |
| Shinozaki K, <u>Agematsu K</u> , Yasui K, Nagumo H, Naitoh H, Naganuma K, and <u>Komiyama A.</u>   | Familial Mediterranean fever in 2 Japanese families.  | J Rheumatol      | 29  | 1324-1325     | 2002 |
| Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Takayama T, Asano T, Takeuchi T, Kadowaki T, Hata J and <u>Koyasu S.</u>   | Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice.   | Nat Immunol      | 3   | 295-304       | 2002 |

| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名                          | 巻号  | 頁         | 出版年  |
|---|--|-------------------------------|-----|-----------|------|
| Tsuji S, Taniuchi S, Hasui M, Yamamoto A, and <u>Kobayashi Y.</u>   | Increased nitric oxide production by neutrophils from patients with chronic granulomatous disease on trimethoprim-sulfamethoxazole.  | Nitric Oxide                  | 7   | 283-288   | 2002 |
| Ito I, Ishida T, Hashimoto T, Atita M, Osawa M, Mishima M, and <u>Nonoyama S.</u>   | Hyper IgM syndrome with systemic tuberculosis.   | Scand J Infect Dis            | 34  | 305-307   | 2002 |
| Matsumoto K, Watanabe N, Akikusa B, Kurasawa K, Matsumura R, Saito Y, Iwamoto I, and <u>Saito T.</u>  | Fc receptor-independent development of autoimmune glomerulonephritis in lupus-prone MRL lpr mice.  | Arthritis Rheum               | 48  | 486-494   | 2003 |
| Watanabe N, Nakajima H, Suzuki H, Oda A, Matsubara Y, Moroi M, Terauchi Y, Kadowaki T, Suzuki H, <u>Koyasu S.</u> Ikeda Y, and Handa M.                               | Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85alpha-null platelets characterized by an impaired response to GP VI stimulation.  | Blood                         | 102 | 541-548   | 2003 |
| Ohga S, Nomura A, Ihara K, Takahata Y, Akeda H, Shibata R, Okamura J, Kinukawa N, and <u>Hara T.</u>  | Cytokine imbalance in hyper-IgE syndrome: reduced expression of transforming growth factor- $\beta$ and interferon- $\gamma$ genes in circulating activated T cells.                     | Br J Haematol                 | 121 | 324-331   | 2003 |
| Gagliardi MC, Finocchi A, Orlandi P, Cursi L, Cancrini C, Moschese V, <u>Miyawaki T.</u> and Rossi P.   | Bruton's tyrosine kinase defect in dendritic cells from X-linked agammaglobulinaemia patients does not influence their differentiation, maturation and antigen-presenting cell function. | Clin Exp Immunol              | 133 | 115-122   | 2003 |
| Kobayashi N, <u>Agematsu K.</u> Nagumo H, Yasui K, Katsuyama Y, Yoshizawa K, Ota M, <u>Yachie A.</u> and <u>Komiyama A.</u>   | Expansion of clonotype-restricted HLA-identical maternal CD4+ T cells in response to tissue specific antigens in severe combined immunodeficiency with Artemis gene mutation.            | Clin Immunol                  | 108 | 159-166   | 2003 |
| Shi Y, <u>Agematsu K.</u> Ochs HD, and Sugane K.  | Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD+CD27+B Cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM.                                     | Clin Immunol                  | 108 | 128-137   | 2003 |
| Imai K, <u>Nonoyama S.</u> and Ochs HD.   | Wiskott-Aldrich Syndrome: A model for defective actin reorganization, cell trafficking and synapse formation.  | Curr Opin Allerg Clin Immunol | 3   | 427-436   | 2003 |
| Terai I, <u>Kobayashi K.</u> Matsushita M, Miyakawa H, Mafune N, and Kikuta H.  | Relationship between gene polymorphism of mannose-binding lectin (MBL) and two molecular forms of MBL.   | Eur J Immunol                 | 33  | 2755-2763 | 2003 |
| Kato Z, Watanabe M, and <u>Kondo N.</u>   | IgG2, IgG4 and IgA deficiency possibly associated with carbamazepine treatment.  | Eur J Pediatr                 | 162 | 209-211   | 2003 |
| Gueven N, Keating K, Fukao T, Loeffler H, <u>Kondo N.</u> Rodemann HP, and Lavin MF.  | Site-directed mutagenesis of the ATM promoter: consequences for response to proliferation and ionizing radiation.  | Genes Chromosomes Cancer      | 38  | 157-167   | 2003 |
| Khajooe V, Ihara K, Kira R, Takemoto M, Torisu H, Sakai Y, Guanjun J, Hee PM, Tokunaga K, and <u>Hara T.</u>  | Founder effect of the C9 R95X mutation in Orientals.   | Hum Genet                     | 112 | 244-248   | 2003 |
| Kobayashi N, <u>Agematsu K.</u> Sugita K, Sako M, <u>Nonoyama S.</u> <u>Yachie A.</u> Kumaki S, <u>Tsuchiya S.</u> Ochs HD, Sugita K, Fukushima Y, <u>Komiyama A.</u> | Novel Artemis gene mutations of radiosensitive severe combined immunodeficiency in Japanese families.  | Hum Genet                     | 112 | 348-352   | 2003 |
| <u>Saito T.</u> and Yamasaki S.   | Negative feedback of T cell activation through inhibitory adaptors and co-stimulatory receptors.   | Immunol Rev                   | 192 | 143-160   | 2003 |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名                     | 巻号  | 頁             | 出版年  |
|--|---|--------------------------|-----|---------------|------|
| Maezawa Y, Nakajima H, Kumano K, Kubo S, <u>Karasuyama H</u> , and Iwamoto I.  | Role of IgE in Th2 cell-mediated allergic airway inflammation.  | Int Arch Allergy Immunol | 131 | 2-6           | 2003 |
| Jo EK, Futatani T, Kanegane H, Kubota T, Lee YH, Jung JA, Song CH, Park JK, Nonoyama S, and <u>Miyawaki T</u> .  | Mutational analysis of the WASP gene in 2 Korean families with Wiskott-Aldrich syndrome.  | Int J Hematol            | 78  | 40-44         | 2003 |
| Aghamohammadi A, Kanegane H, Moein M, Farhoudi A, Pourpak Z, Movahedi M, Gharagozlou, Zarger AAA, and <u>Miyawaki T</u> .  | Identification of an SH2D1A mutation in a hypogammaglobulinemic male patient with a diagnosis of common variable immunodeficiency.  | Int J Hematol            | 78  | 45-47         | 2003 |
| Amoras AL, Kanegane H, <u>Miyawaki T</u> , and Vilela MM.  | Defective Fc $\gamma$ 1, CR1- and CR3-mediated monocyte phagocytosis and chemotaxis in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia patients.                       | J Invest Allergy Clin    | 13  | 181-188       | 2003 |
| Sato E, Hirahara K, Wada Y, Yoshitomi T, Azuma T, Matsuoka K, Kubo S, Taya C, Yonekawa H, <u>Karasuyama H</u> and Shiraishi A.   | Chronic inflammation of the skin can be induced in IgE transgenic mice by means of a single challenge of multivalent antigen.   | J Allergy Clin Immun     | 111 | 143-148       | 2003 |
| Kasahara Y, Kaneko H, Fukao T, Terada T, Asano T, Kasahara K, and <u>Kondo N</u> .   | Hyper-IgM syndrome with putative dominant negative mutation in activation-induced cytidine deaminase.   | J Allergy Clin Immun     | 112 | 755-760       | 2003 |
| Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, <u>Nunoi H</u> , and Sumimoto H.  | Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases.   | J Biol Chem              | 278 | 25234 - 25246 | 2003 |
| Sugimoto Y, Tsukahara S, Sato S, Suzuki M, <u>Nunoi H</u> , Malech HL, Gottesman MM, and Tsuruo T.   | Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 in vivo from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91.   | J Gene Med               | 5   | 366-376       | 2003 |
| Jo EK, Wang Y, Kanegane H, Futatani T, Song CH, Park JK, Kim JS, Kim DS, Ahn KM, Lee SI, Park HJ, Hahn YS, Lee JH, and <u>Miyawaki T</u> .                                 | Identification of mutations in the Bruton's tyrosine kinase gene, including a novel genomic rearrangements resulting in large deletion, in Korean X-linked agammaglobulinemia patients. | J Hum Genet              | 48  | 322-326       | 2003 |
| Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri Y, Matsuo N, Matsuo Y, <u>Karasuyama H</u> and Fujimoto J.                              | Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells.   | J Immunol                | 170 | 252-260       | 2003 |
| Kubo S, Nakayama T, Matsuoka K, Yonekawa H, and <u>Karasuyama H</u> .  | Long-term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE.  | J Immunol                | 170 | 775-760       | 2003 |
| Arase N, Arase H, Hirano S, Yokosuka T, Sakurai D, and <u>Saito T</u> .  | IgE-mediated activation of NK cells through Fc $\gamma$ RIII.   | J Immunol                | 170 | 3054-3058     | 2003 |
| Suzuki N, Suzuki S, Eriksson U, Hara H, Mirtosis C, Chen N-J, Wada T, Bouchard D, Hwang I, Takeda K, Fujita F, Der S, Penninger JM, Akira A, <u>Saito T</u> , and Yeh W-C. | IRAK-4 is required for LPS-induced activation of antigen-presenting cells.  | J Immunol                | 171 | 6065-6071     | 2003 |
| Fukao T, Terauchi Y, Kadowaki T, and <u>Koyasu S</u> .   | Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in mast cells: new insights from knockout mouse studies.  | J Mol Med                | 81  | 524-535       | 2003 |
| <u>Nunoi H</u> , Kohi F, Kajiwara H, and Suzuki K.   | Prevalence of inherited myeloperoxidase deficiency in Japan.  | Microbiol Immunol        | 47  | 527-531       | 2003 |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名  | 発表誌名                  | 巻号  | 頁         | 出版年  |
|--|--|-----------------------|-----|-----------|------|
| Vaerman JP, Parkhouse REM, and Kobayashi K.  | Rat J chain is disulfide-linked to a chains in rat polymeric (pIgA) and secretory IgA (sIgA).  | Mol Immunol           | 39  | 977-979   | 2003 |
| Saijo K, Schmedt C, Su I, Karasuyama H, Lowell CA, Reth M, Adachi T, Patke A, Santana A, and Tarakhovsky A.  | Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF- $\kappa$ B activation during B cell development.                                | Nat Immunol           | 4   | 274-279   | 2003 |
| Suzuki H, Matsuda S, Terauchi Y, Fujiwara M, Ohteki T, Asano T, Behrens T W, Kouro T, Takatsu K, Kadowaki T and Koyasu S.                                | PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor mediated signal transduction.   | Nat Immunol           | 4   | 280-286   | 2003 |
| Koyasu S.  | The role of PI3K in immune cells.  | Nat Immunol           | 4   | 313-319   | 2003 |
| Ta VT, Nagaoka H, Catalan N, Durandy A, Fischer A, Imai K, Nonoyama S, Tashiro J, Ikegawa M, Ito S, Kinoshita K, Muramatsu M, and Honjo T.               | AID mutant analyses indicate requirement for class-switch-specific cofactors.  | Nat Immunol           | 4   | 843-848   | 2003 |
| Imai K, Slupphaug G, Lee WI, Revy P, Nonoyama S, Catalan N, Yel L, Forveille M, Kavli B, Krokan HE, Ochs HD, Fischer A, and Durandy A.                   | Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination.                       | Nat Immunol           | 4   | 1023-1028 | 2003 |
| Kato Z, Jee J, Shikano H, Mishima M, Ohki I, Ohnishi H, Li A, Hashimoto K, Matsukuma E, Omoya K, Yamamoto Y, Yoneda T, Hara T, Kondo N, and Shirakawa M. | The structure and binding mode of interleukin-18.  | Nat Struct Biol       | 10  | 966-971   | 2003 |
| Glassford J, Soeiro I, Skarell SM, Banerji L, Holman M, Klaus G G, Kadowaki T, Koyasu S, and Lam EW.   | BCR targets cyclin D2 via Btk and the p85alpha subunit of PI3-K to induce cell cycle progression in primary mouse B cells.                   | Oncogene              | 22  | 2248-2259 | 2003 |
| Kanegane H, Vilela MMS, Wang Y, Futatani T, Matsukura H, and Miyawaki  | Autoimmune lymphoproliferative syndrome presenting with glomerulonephritis.  | Pediatr Nephrol       | 18  | 454-456   | 2003 |
| Imadome K, Shirakata M, Shimizu N, Nonoyama S, and Yamanashi Y.  | CD40 ligand is a critical effector of Epstein-Barr virus in host cell survival and transformation.   | Proc Nat Acad Sci USA | 100 | 7836-7840 | 2003 |
| Terada T, Kaneko H, Fukao T, Teramoto T, Asano T, Li AL, Kasahara K, and Kondo N.  | Semiquantitative evaluation of mRNAs for the membranous form of immunoglobulin heavy chain is useful for investigating the etiology in CVID. | Scand J Immunol       | 58  | 649-654   | 2003 |
| Teramoto T, Kaneko H, Funato M, Sawa H, Nagashima K, Hirose Y, and Kondo N.  | Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient with X-linked agammaglobulinemia.  | Scand J Inf Dis       | 35  | 909-910   | 2003 |
| Fukao T, and Koyasu S.   | PI3K and negative regulation of TLR signaling.   | Trends Immunol        | 24  | 358-363   | 2003 |
| Irga N, Wierzbza J, Brozek J, Ochman K, Kanegane H, Miyawaki T, and Neuman-Laniec M.   | X-linked agammaglobulinemia (XLA) associated to agranulocytosis-Case report. (in Polish)   | Wiad Lek              | 56  | 378-380   | 2003 |
| Kaneko,H., Fukao, T., and Kondo, N.  | The function of RecQ helicase gene family (especially BLM) in DNA recombination and joining.   | Adv Biophys           | 38  | 45-64     | 2004 |
| Nagasawa M., Itoh S., Sawada Y., Morio T., Nonoyama S., and Mizutani S.  | Coagulopathy in a patient with X-linked hyper-IgM syndrome who developed Kaposi's sarcoma.   | Am J Hematol          | 75  | 116-117   | 2004 |



| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名                 | 巻号  | 頁         | 出版年  |
|---|--|----------------------|-----|-----------|------|
| Tomizawa D., Imai K., Ito S., Kajiwara M., Minegishi Y., Nagasawa M., Morio T., <u>Nonoyama S.</u> , and Mizutani S.                                    | Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for seven children with X-linked hyper-IgM syndrome: a single center experience.  | Am J Hematol         | 76  | 33-39     | 2004 |
| Matsukura H, Kanegane H, Miya K, Ohtsubo K, Higuchi A, Tanizawa T, and <u>Miyawaki T.</u>   | IgA nephropathy associated with X-linked thrombocytopenia.   | Am J Kidney Dis      | 43  | e7-12     | 2004 |
| Kuroyama H., Ikeda T., Kasai M., Yamasaki S., Tatsumi M., Utsuyama M., <u>Saito T.</u> , and Hirokawa K.  | Identification of a novel isoform of ZAP-70, truncated ZAP kinase.   | Biochem Bioph Res Co | 315 | 935-941   | 2004 |
| Takada H., Kanegane H., Nomura A., Yamamoto K., Ihara K., Takahashi Y., Tsukada S., <u>Miyawaki T.</u> , and <u>Hara T</u>                              | Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation.   | Blood                | 103 | 185-187   | 2004 |
| Imai K., Morio T., Zhu Y., Jin Y., Itoh S., Kajiwara M., Yata JI., Mizutani S., Ochs HD., and <u>Nonoyama S.</u>  | Clinical course of patients with WASP gene mutations.  | Blood                | 103 | 456-464   | 2004 |
| Yamasaki S., Ishikawa E., Kohno M. and <u>Saito T.</u>  | The quantity and duration of Fc $\gamma$ signals determines mast cell degranulation and survival.  | Blood                | 103 | 3093-3101 | 2004 |
| Nishikomori R., Akutagawa H., Maruyama K., Nakata-Hizume M., Ohmori K., Mizuno K., <u>Yachie A.</u> , Yasumi T., Kusunoki T., Heike T., and Nakahata T. | X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival.                         | Blood                | 103 | 4565-4572 | 2004 |
| Asano T, Kaneko H, Terada T, Kasahara Y, Fukao T, Kasahara K, and <u>Kondo N.</u>   | Molecular analysis of B-cell differentiation in selective or partial IgA deficiency.   | Clin Exp Immunol     | 136 | 284-290   | 2004 |
| Hasui M., Sasaki M., Tsuji S., Yamamoto A., Takaya J., Taniuchi S., Izumi H., Hagihara H., Daito M., and <u>Kobayashi Y.</u>                            | Dental infections as a cause of persist fever in a patient with chronic granulomatous disease.   | Clin Pediatr         | 43  | 171-173   | 2004 |
| Matsuda S., Miwa Y., Hirata Y., Minowa A., Tanaka J., Nishida E., and <u>Koyasu S.</u>  | Negative feedback loop in T cell activation through MAPK-catalyzed threonine phosphorylation of LAT.   | EMBO                 | 23  | 2577-2585 | 2004 |
| Kusuhara K., Nomura A., Nakao F., and <u>Hara T.</u>  | Tumour necrosis factor receptor-associated periodic syndrome with a novel mutation in the TNFRSF1A gene in a Japanese family.  | Eur J Pediatr        | 163 | 30-32     | 2004 |
| Tanaka S., Teraguchi M., Hasui M., Taniuchi S., <u>Ikemoto Y.</u> , and <u>Kobayashi Y.</u>   | Idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia in a boy with Down syndrome. Report of a patient and a review of the literature.   | Eur J Pediatr        | 163 | 122-123   | 2004 |
| Kaneko H., and <u>Kondo N.</u>  | Clinical features of Bloom syndrome and function of the causative gene. BLM helicase.  | Expert Rev Mol Diagn | 4   | 393-401   | 2004 |
| Fujiwara T., Yamada M., Miyamura K., Tomiya Y., Ishizawa K., Harigae H., Kameoka J., Minegishi M., <u>Tsuchiya S.</u> , and Sasaki T.                   | Fludarabine- and cyclophosphamide-based nonmyeloablative conditioning regimen for transplantation of chronic granulomatous disease: possible correlation with prolonged pure red cell aplasia. | Int J Hematol        | 79  | 293-297   | 2004 |
| Jo E-K., Kook H., Uchiyama T., Hakozaiki I., Kim Y-O., Song C-H., Park J-K., Kanegane H., <u>Tsuchiya S.</u> , and Kumaki S.                            | Characterization of a novel nonsense mutation in the IL-7 receptor $\alpha$ gene in a Korean patient with severe combined immunodeficiency.  | Int J Hematol        | 80  | 332-335   | 2004 |

| 発表者氏名  | 論文タイトル名   | 発表誌名                       | 巻号  | 頁         | 出版年  |
|--|---|----------------------------|-----|-----------|------|
| Kaneko H, Isogai K, Fukao T, Matsui E, Kasahara K, <u>Yachie A</u> , Seki H, Koizumi S, Arai M, Utunomiya J, Miki Y, and <u>Kondo N</u> .  | Relatively common mutations of the Bloom syndrome gene in the Japanese population.  | Int J Mol Med              | 14  | 439-442   | 2004 |
| Shiratori I., Ogasawara K., <u>Saito T.</u> , and Lanier L. L.   | Activation of natural killer cells and dendritic cells upon recognition of a novel CD99-like ligand by paired immunoglobulin-like type 2 receptor.                | J Exp Med                  | 199 | 525-533   | 2004 |
| Sakurai D., Yamasaki S., Arase K., Park S. Y., Arase H., Konno, A. and <u>Saito T.</u>   | FcεRI γ-immunoreceptor tyrosine-based activation motif is differentially required for mast cell function in vivo.   | J Immunol                  | 172 | 2374-2381 | 2004 |
| Jo EK., Kumaki S., Wei D., <u>Tsuchiya S.</u> , Kanegane H., Song CH., Noh HY., Kim YO., Kim SY., Chung HY., Kim YH., and Kook H.  | X-linked severe combined immunodeficiency syndrome: the first Korean case with γc chain gene mutation and subsequent genetic counseling.                          | J Korean Med Sci           | 19  | 123-126   | 2004 |
| Yamamoto K., Ishii E., Sako M., Ohga S., Furuno K., Suzuki N., Ueda I., Imayoshi M., Yamamoto S., Morimoto A., Takada H., <u>Hara T.</u> , Imashuku S., Sasazuki T., and Yasukawa M. | Identification of novel MUNC13-4 mutations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis and functional analysis of MUNC13-4-deficient cytotoxic T lymphocytes. | J Med Genet                | 41  | 763-767   | 2004 |
| Chien YH., Hwu WL., <u>Ariga T.</u> , Chang KW., Yang YH., Lin KH., and Chiang BL.   | Molecular diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome in Taiwan.  | J Microbiol Immunol Infect | 37  | 276-281   | 2004 |
| Zhi CL., Migita M., Hayakawa J., and <u>Fukunaga Y.</u>  | Establishment of modified retroviral vector targeting X-linked severe combined immunodeficiency.  | J Nippon Med Sch           | 71  | 51-56     | 2004 |
| <u>Ariga T.</u> , Nakajima M, Yoshida J, Yamato K, Nagatoshi Y, Yanai F, Caviles AP, Nelson DL, and <u>Sakiyama Y.</u>   | Confirming or excluding the diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome in children with thrombocytopenia of an unknown etiology.                                       | J Pediatr Hematol Oncol    | 26  | 435-440   | 2004 |
| <u>Nunoi H.</u> , Ishibashi F., Mizukami T., and Hidaka F.   | Clinical evaluation of interferon-gamma treatment to chronic granulomatous disease patients with splice site mutations.   | Jpn J Infect Dis           | 57  | S25-S26   | 2004 |
| Dupre L., Trifari S., Follenzi A., Marangoni F., Lain de Lera T., Bernad A., Martino S., <u>Tsuchiya S.</u> , Bordignon C., Naldini L., Aiuti A., and Roncarolo MG.                  | Lentiviral vector-mediated gene transfer in T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients leads to functional correction   | Mol Ther                   | 10  | 903-915   | 2004 |
| Fukao T., Chen P., Ren J., Kaneko H., Zhang G.X., Kondo M., Yamamoto K., Furuichi T., Takeda S., <u>Kondo, N.</u> , and Lavin M.F.   | Disruption of the BLM gene in ATM -null DT40 cells does not exacerbate either phenotype.  | Oncogene                   | 23  | 1498-1506 | 2004 |
| Ohtsuka M., Arase H., Takeuchi A., Yamasaki S., Shiina R., Sucnaga T., Sakurai D., Yokosuka T., Arase N., Iwashima M., Kitamura T., Moriya H., and <u>Saito T.</u>                   | NFAM1, a new ITAM+ surface molecule that regulates development and signaling of B lymphocytes.  | Proc Natl Acad Sci USA     | 101 | 8126-8131 | 2004 |
| Yamasaki S., and <u>Saito T.</u>   | Inhibitory adaptors in lymphocytes.   | Semin Immunol              | 16  | 421-427   | 2004 |

### III. 研究成果の刊行物・別冊

## Mixed chimera status of 12 patients with Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) after hematopoietic stem cell transplantation: evaluation by flow cytometric analysis of intracellular WAS protein expression

Koji Yamaguchi, Tadashi Ariga, Masafumi Yamada, David L. Nelson, Ryouji Kobayashi, Chie Kobayashi, Yasushi Noguchi, Yasuhiko Ito, Kenji Katamura, Yoshihisa Nagatoshi, Satoshi Kondo, Hiroyuki Katoh, and Yukio Sakiyama

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is caused by defects in the WAS protein (WASP) gene on the X chromosome. We previously reported that flow cytometric analysis of intracellular WASP expression (FCM-WASP) was useful in the diagnosis of WAS in patients and carriers. In this study, we applied FCM-WASP to evaluate the mixed chimera (MC) status of 12 WAS patients who underwent hematopoietic stem cell transplantation (HST). After HST, donor- and recipient-derived peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) could be distinguished easily with this method, since the donor cells

were WASP<sup>bright</sup>, whereas the defective recipient cells were WASP<sup>dim</sup>. Furthermore, with use of 2-color FCM-WASP, the MC status could be characterized by cell lineage. Six of the 12 patients with WAS were found to have MC status after HST, whereas others had complete chimera status. MC status was observed in every cell lineage examined. However, among PBMCs, recipient cells were most commonly observed in the monocyte population. Finally, to investigate the naive/memory status of donor and recipient T cells in these patients, 3-color FCM-WASP using anti-CD45RA or CD45RO was

performed. We found that, in contrast to WASP<sup>bright</sup> T cells, most WASP<sup>dim</sup> T cells remained naive (CD45RA<sup>+</sup>/RO<sup>-</sup>) more than a year after HST. No imbalance in the ratio of naive to memory T cells was observed in WAS patients before HST. We conclude that FCM-WASP is a potentially useful method for clinical follow-up of WAS patients who have undergone HST. Our findings may also have important implications for the role of WASP during hematopoietic development. (Blood. 2002; 100:1208-1214)

© 2002 by The American Society of Hematology

### Introduction

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is an X-linked recessive disorder characterized by the triad of thrombocytopenia, eczema, and immune deficiency, as well as a proclivity toward lymphoid malignant disease.<sup>1-3</sup> The gene responsible for WAS has been identified and termed WASP, for WAS protein.<sup>4</sup> The WASP gene is expressed mainly in all nonerythroid hematopoietic cells,<sup>5</sup> and its product, WASP, seems to play a role in transducing signals related to cell growth.<sup>6</sup> In addition, WASP specifically associates with the activated form of Cdc42, suggesting that WASP is involved in regulating cytoskeletal architecture through actin polymerization.<sup>7</sup> Indeed, lymphocytes from patients with WAS have activation and cytoskeletal-structure defects.<sup>8-11</sup> However, the mechanisms by which defective WASP gene expression lead to most of the clinical features observed in these patients have not been fully elucidated.

Without successful hematopoietic stem cell transplantation (HST), patients with WAS have a poor prognosis. The median survival time for these patients is about 15 years, and the usual causes of death are infection, bleeding, and malignant disease.<sup>3</sup> The results of a multivariate outcome analysis of HST in WAS patients,

however, encourage physicians to use this treatment, especially in patients under 5 years of age.<sup>12</sup>

We previously established a method for flow cytometric analysis of intracellular WASP expression (FCM-WASP) and reported that it was useful in the diagnosis of WAS in patients<sup>13</sup> and carriers.<sup>14</sup> Furthermore, during the course of WAS screening using FCM-WASP, we observed a patient with WAS who had a small population of lymphocytes in which a spontaneous reversion of the inherited WASP gene mutation had occurred.<sup>15</sup> It was shown that the WASP gene-corrected cells had growth advantages over other cells. We concluded that the case could be a good example for showing that WASP is involved in cell growth.

In this study, we used FCM-WASP to evaluate the mixed chimera (MC) status of 12 patients with WAS who had undergone HST. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in WAS patients show little or no expression of intracellular WASP (WASP<sup>dim</sup>).<sup>13,14</sup> No exceptional WAS patients have been found. Therefore, using FCM-WASP, we could distinguish between donor cells (WASP<sup>bright</sup>) and recipient cells (WASP<sup>dim</sup>), which allows analysis of MC status without

From the Research Group of Human Gene Therapy, the Division of Cancer Medicine, Department of Surgical Oncology, and the Department of Pediatrics, Hokkaido University, Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan; the Metabolism Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD; the Department of Pediatrics, Ibaraki Children's Hospital, Mito, Japan; the Department of Pediatrics, Chiba University, Graduate School of Medicine, Chiba, Japan; the Department of Pediatrics, Medical School, Nagoya City University, Nagoya, Japan; the Department of Pediatrics, Kyoto University, Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan; and the Section of Pediatrics, National Kyusyu Cancer Center, Fukuoka, Japan.

Submitted January 25, 2002; accepted April 8, 2002. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, April 30, 2002; DOI 10.1182/blood-2002-01-0211.

Supported by grant H12 genome 003 from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and grant 13670776 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

Reprints: Tadashi Ariga, Research Group of Human Gene Therapy, Hokkaido University, Graduate School of Medicine, N-14, W-7, Kita-ku, Sapporo, Japan, 060-8638.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2002 by The American Society of Hematology