

# 22q11.2欠失症候群患児の加齢に伴う T細胞の動態と遺伝子発現

大賀 正 一 (九州大学病院周産母子センター・小児科講師)  
金谷 能 明 (九州大学病院小児科・救急部助手)  
野村 明 彦 (九州大学病院小児科助手)  
高田 英 俊 (九州大学病院小児科講師)  
原 寿 郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学教授)

## 【研究要旨】

22q11.2欠失症候群における T細胞の加齢変化と遺伝子発現を検討した。患児のCD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T、 $\alpha\beta$ T及びCD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>細胞数は成人まで対照より少なくCD56<sup>+</sup>細胞数は多かった。患児の T細胞とCD4<sup>+</sup>T細胞の割合の変化は対照と同様であったが、数の減少は緩やかであった。 $\gamma\delta$ T細胞は対照と差がなかった。健常者CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>細胞の割合は加齢で上昇し、傾きは患児より大きかった。一方、患児V $\alpha$ 24<sup>+</sup>細胞の数と割合は上昇し、その傾きは対照より大きい傾向にあった。T細胞とCD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>細胞数の相関は患者のみ、T細胞とV $\alpha$ 24<sup>+</sup>細胞数の相関は対照のみでみられた。6歳以上の患児T細胞のFoxp3発現のみ低下傾向にあったが、IFN $\gamma$ 、IL-10、TGF $\beta$ 及びCTLA4を含む発現量は対照と差がなかった。患児の T細胞は胸腺非依存細胞を含む亜群と関連して緩徐に減少し、遺伝子発現が保たれ、T細胞の恒常性維持機構が示唆された。

## A. 研究目的

22q11.2欠失症候群 (del22) は頻度の高い遺伝子疾患で、DiGeorge症候群/口蓋-心臓-顔症候群 (円錐動脈幹心奇形、胸腺低形成、副甲状腺機能低下症、口蓋汎咽頭不全および精神発達遅滞)、CHARGE連合などに関連する [1]。T細胞欠損 (完全DiGeorge症候群) はまれで、8割以上の患者は胸腺低形成に伴いT細胞減少が見られる (部分DiGeorge症候群) [2]。del22患児はT細胞抗原受容体 (TCR) レパートアの偏りとT細胞減少が特徴であるが [3, 4]、この末梢血T細胞の減少は加齢に伴い緩やかとなる [5, 6]。完全型DiGeorge症候群では胸腺外分化T細胞が増加することがあるが、del22患者の胸腺依存性と非依存性T細胞の加齢変化は明らかではない。近年、心奇形と感染症に対する管理の進歩から患者の生存率が改善したが、それに伴い慢性関節リウマチや血球減少などの自己免疫疾患の合併が注目されている [5, 7]。本症の免疫異常に関しては、いくつかの報告があるが [8-10]、サイトカイン発現

とヘルパー T細胞 (Th)1/Th2バランスなどについては明らかではない。本研究では、del22患者の末梢血T細胞におけるT細胞サブセットの加齢変化を胸腺外分化亜群も含めて検討し、T細胞に発現する遺伝子を定量して、患者T細胞の数的および質的成熟過程を解析した。

## B. 研究方法

**対象：**FISH法にて22q11.2欠失が確認された他の核型異常のない15例。年齢相対照は基礎疾患と感染のない32例。患児の臨床的特徴を表1に示す。男女比は6：9。全例に心血管奇形、精神運動発達遅滞とリンパ球減少、7例に口蓋汎咽頭不全あり。12例は心臓病手術時に胸腺低形成を確認した。血球貪食症候群で26生月に死亡した患者12以外は、重症感染症もなく生ワクチンを安全に接種できた。3例に免疫検査異常 (抗核抗体陽性：患者3、IgG3低値：患者7、IgG単独低値：患者8) を認めたが自己免疫疾患の発症はなかった。

**フローサイトメトリーと細胞分離：**抗CD3、CD4、

No.	性別	年齢* (年、月)	胸腺	心奇形 /大動脈弓奇形	VPI	PMR	低カルシウム 血症	易感染性	免疫学的異常
1	女	4	痕跡	VSD / IAA	なし	軽度	あり	なし	
2	女	8	小さい	VSD / IAA	あり	中等度	あり	あり	
3	女	14	小さい	VSD / RAA	なし	軽度	あり	なし	抗核抗体陽性
4	女	8	痕跡	VSD / LAA	あり	重度	あり	あり	
5	女	21	痕跡	TOF / RAA	あり	軽度	あり	なし	
6	男	10	小さい	TOF / RAA	なし	軽度	なし	あり	
7	女	13	小さい	VSD / IAA	なし	軽度	あり	あり	IgG3 低値
8	男	1,6	小さい	TOF / LAA	なし	軽度	なし	あり	IgG 低値
9	男	2,0	NR	VSD / LAA	あり	軽度	なし	なし	
10	男	13	小さい	TOF / LAA	なし	軽度	なし	あり	
11	女	2,2	NR	TOF / RAA	なし	重度**	あり	なし	
12	女	2,0	小さい	TOF / RAA	あり	重度**	あり	なし	血球貪食症候群
13	女	7,6	小さい	VSD / LAA	あり	中等度	なし	あり	
14	男	1,0	NR	TOF / LAA	なし	重度	あり	なし	
15	男	1,3	痕跡	TOF / RAA	あり	軽度	なし	あり	

IAA: 大動脈離断症, LAA: 左大動脈弓, RAA: 右大動脈弓, VSD: 心室中隔欠損症, TOF: ファロー四徴症, VPI: 口蓋咽頭不全; PMR: 精神運動発達遅滞, ANA: 抗核抗体, Ig: 免疫グロブリン, NR: 記録なし  
\* T細胞分画のサイトカイン遺伝子定量のためリアルタイムPCRを実施した年齢。  
\*\* 患者 11 と 12 の神経学的機能はそれぞれ頭蓋内出血と低酸素脳症のため重度障害がみられた。

表 1. 22q11.2欠失症候群患者の臨床的特徴

CD8, CD8 $\alpha$ , CD19, CD56, TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ , V $\alpha$ 24抗体で染色しEPICS-XLにて解析。単核細胞を末梢血から分離し、磁気ビーズで高純度CD3<sup>+</sup>細胞を分画し凍結保存した。

**TaqMan法による定量リアルタイムPCR:** 保存細胞からRNA抽出とcDNA合成を行い、インターフェロン(IFN) $\gamma$ 、インターロイキン(IL)-10、transforming growth factor (TGF) $\beta$ 、cytotoxic T-lymphocyte antigen (CTLA) 4、そして転写因子forkhead box (Fox) p3のmRNAをABI PRISM 7700を用いて定量した。蛍光値をGAPDH遺伝子量で除し刺激単核球の遺伝子量との相対比として計算した。

**統計解析:** 平均値の比較にはMann-Whitney's U-testを、相関の検討にはPearson係数とFisher-z変換を、回帰方程式の傾きの差の検定には共分散分析を用いた。

### C. 研究結果

**リンパ球サブセットの比較:** 15例の末梢血リンパ球の表面マーカーを解析し、32例の年齢相対照と比較した。2から247生月までの観察期間の中央値は42.6生月であった。リンパ球の絶対数を図1に示す。患者で割合と絶対数が有意に低かった

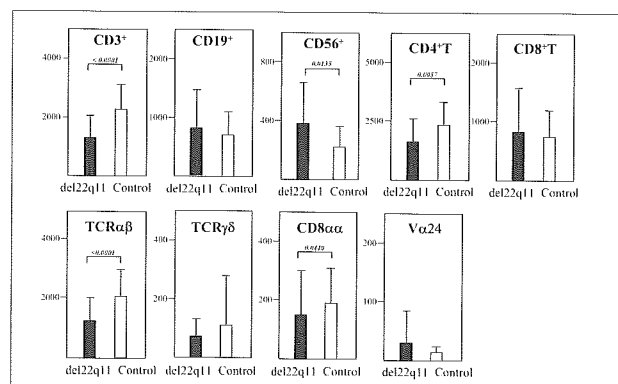


図 1. 末梢リンパ球の絶対数 (観察期間中央値: 42.6か月, 範囲: 2~247生月)

細胞数の平均+標準偏差をdel22患者は(■)、年齢相対照を(□)で示す。統計解析にはMann-Whitney's U-testを用いた。各検体数はCD3<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、 $\alpha\beta$ Tおよび $\gamma\delta$ T細胞で43, 対照で32である。

のは、CD3<sup>+</sup>細胞 (共にp<0.0001)、CD4<sup>+</sup>T細胞 (各p=0.0069と0.0057)、 $\alpha\beta$ T細胞 (共にp<0.0001)であった。CD4/CD8比は対照のほうが低かった (p=0.0388)。患者のCD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>細胞数は対照より低かった (p=0.0440) が、割合に差はなかった。一方、患者のCD56<sup>+</sup>細胞の割合と数は高かった (各p<0.0001と0.0135)。患者のCD19<sup>+</sup>細胞の割合は対照より高かったが、数に差はなかった (p=0.0113)。 $\gamma\delta$ T細胞とV $\alpha$ 24<sup>+</sup>細胞に差はなかった。

**成熟過程におけるT細胞の変化:** T細胞亜群の加齢変化を検討した。図2aにT細胞数の変化を示

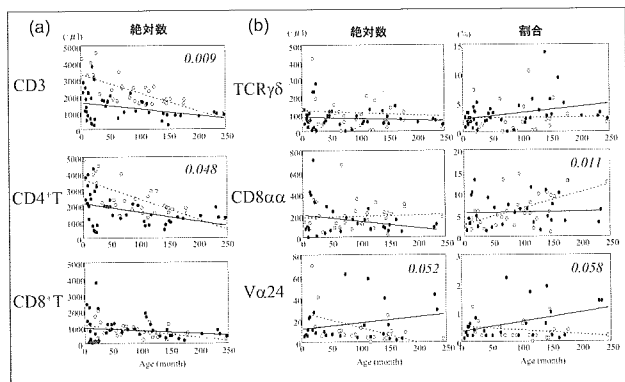


図2. T細胞絶対数と年齢との相関

回帰直線は、患者が実線 (a); n=43, (b); n=29~42、対照は破線 (n=32) で、各サブセットの絶対数または割合と年齢との関係から計算した。患者と対照の回帰方程式の傾きの差を、共分散分析を用いて比較した。

す。図2bに胸腺外分化を含むT細胞亜群の数と割合の変化を示す。患者のCD3<sup>+</sup>細胞数の減少の傾きは対照より緩やかであった (p=0.009, 患者:  $y = -3.8678x + 1605$ , 対照:  $y = -12.086x + 3431$ ) が、割合に差はなかった。CD4<sup>+</sup>T細胞数はCD3<sup>+</sup>細胞と同様に減少した (p=0.048, 患者:  $y = -5.5848x + 2139$ , 対照:  $y = -12.411x + 3619$ )。αβT細胞も同様の減少パターンを示したが、有意差はなかった (データ未掲載)。CD8<sup>+</sup>T細胞、CD19<sup>+</sup>細胞またはCD56<sup>+</sup>細胞の数と割合は患者と対照で傾きの差はなかった (データ未掲載)。

γδT細胞の動態は患者対照間で差はなかった (図2b)。対照のCD8αα<sup>+</sup>細胞の割合は増加傾向にあり、傾きは患者よりも大きかった (p=0.011, 患者:  $y = 0.0014x + 5.5213$ , 対照:  $y = 0.0324x + 2.9278$ )。CD8αα<sup>+</sup>細胞数の傾きは患者と対照で差がなかった。一方、患者のVα24<sup>+</sup>細胞の数と割合は増加し、対照では減少していた (絶対数: p=0.052, 患者:  $y = 0.0549x + 11.997$ , 対照:  $y = -0.1367x + 27.006$ ; 割合: p=0.058, 患者:  $y = 0.0033x + 0.3478$ , 対照:  $y = -0.0014x + 0.5238$ ) (図2b)。

リンパ球サブセットの相関: 患者 (A) と対照 (B) における各亜群細胞数の関係を解析した (表2)。患者に認められたT細胞とCD8αα<sup>+</sup>細胞の正の相関 (相関係数: CC=0.386, p=0.0342) は、対照にはなかった。一方、T細胞とVα24<sup>+</sup>細胞の正の相関 (CC=0.657, p<0.0001) は対照でのみ認められた。対照ではVα24<sup>+</sup>細胞は6つの亜群の数との

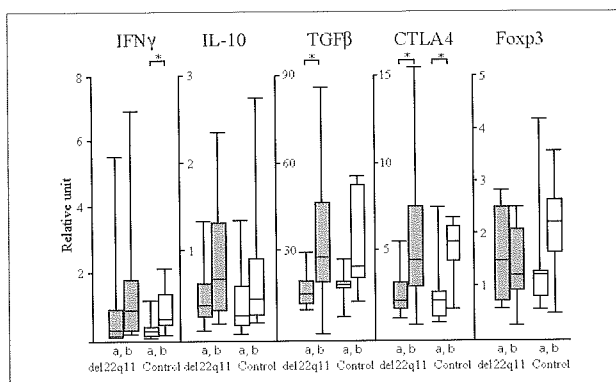


図3. 6歳未満(a)とそれ以上(b)の患者および対照の末梢血T細胞におけるIFNγ、IL-10、TGFβ1、CTLA4、Foxp3遺伝子の定量

患者 (黒棒) と年齢相対照 (白棒) のT細胞から全RNAを抽出し発現遺伝子をリアルタイムPCRで定量した。71か月未満(a)と71か月以上(b)の2群の間に差はなかった。Bonferroni補正を用いた多重比較により各単一比較の有意差 (\*) (IFNγ 対照: p=0.028, TGFβ1 患者: p=0.030, CTLA4 患者: p=0.040, 対照: p=0.049) は否定された。グラフの上下の辺、中央線、上下のひげの横線は10%、25%、50%、75%、90%値。平均値の比較にMann-Whitney's U-testを用いた。

間に正の相関を認めた。CD8<sup>+</sup>T細胞またはαβT細胞とCD56<sup>+</sup>細胞の間に正の相関を患者でのみ認めた。患者または対照でのみ認められた相関を疾患特異的または対照特異的関連と考えた (灰色強調ボックス, 表2)。患者と対照の両方に17の有意な関連を認めた (表2)。

T細胞におけるmRNA発現レベル: 機能的評価のためT細胞のmRNA量を患者 (15例) と年齢相対照 (14例) で比較した。発現解析時の年齢中央値は4歳であった (範囲1~21歳) (表1)。Th1サイトカインとしてIFNγ, Th2および調節性サイトカインとしてIL-10, TGFβ, Tr細胞関連分子としてCTLA4, Foxp3を検討した。患者対照間に有意な発現量の差がなかったため、0~71と72~250か月の2群を比較した (図3)。患者と対照のいずれも6歳以上ではIFNγ, IL-10, TGFβ, CTLA4の遺伝子発現量が6歳未満より高い傾向にあった (図3脚注)。一方、Foxp3発現量は患者においてのみ加齢により減少傾向にあったが、共分散分析でその傾きに差はなかった。Th1/Th2シフトをIFNγ/IL-10、IFNγ/TGFβ比にて比較したが、患者と対象、各年齢群で差はなかった (データ未掲載)。

臨床的特徴とリンパ球パラメーター: 各リンパ球の割合と数、または遺伝子発現と円錐動脈幹奇形の型 (表1脚注)、口蓋汎咽頭不全、易感染性、

A) 対照										B) 患者								
	CD3	CD19	CD56	CD4	CD8	$\alpha\beta$ T	$\gamma\delta$ T	CD8 $\alpha\alpha$	V $\alpha$ 24	CD3	CD19	CD56	CD4	CD8	$\alpha\beta$ T	$\gamma\delta$ T	CD8 $\alpha\alpha$	V $\alpha$ 24
CD3 CC		0.568	0.421	0.962	0.588	0.664	NS	NS	0.657		0.654	0.551	0.743	0.814	0.938	NS	0.386	NS
p 値		0.0005	0.0157	<0.0001	0.0007	<0.0001			<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001		0.0342	
CD19 CC			0.516	0.535	0.740	0.679	0.424	0.349	NS			0.499	0.859	0.502	0.808	NS	0.514	NS
p 値			0.0021	0.0028	<0.0001	<0.0001	0.0149	0.0499				0.0005	<0.0001	0.0005	<0.0001		0.0031	
CD56 CC				0.466	NS	NS	0.377	0.632	0.395				0.622	0.471	0.566	NS	0.636	NS
p 値				0.0115			0.0329	<0.0001	0.0245				<0.0001	0.0012	<0.0001		<0.0001	
CD4 CC					0.469	0.646	NS	0.401	0.551					0.442	0.807	NS	0.481	NS
p 値					0.0109	0.0001		0.0338	0.0020					0.0027	<0.0001		0.0065	
CD8 CC						0.421	0.510	NS	0.533						0.769	0.374	NS	NS
p 値						0.0248	0.0049		0.0030						<0.0001	0.0142		
$\alpha\beta$ T CC							NS	NS	0.359							NS	NS	NS
p 値									0.0430									
$\gamma\delta$ T CC								NS	0.607								NS	NS
p 値									0.0002									
CD8 $\alpha\alpha$ CC										NS								NS
p 値																		
V $\alpha$ 24 CC																		
p 値																		

この表では Fisher の z 変換によって解析した Pearson の相関係数 (CC) を示す  
 Pearson の相関係数を用いて解析した結果は Spearman 相関係数を用いたものと同様であった。  
 ■ 対照特異的もしくは患者特異的      NS: 有意差なし

表 2. 各リンパ球サブセットの絶対数の相関

低カルシウム血症などの臨床像との間に相関はなかった。免疫学的異常を有する患者（患者3, 7, 8, 12; 表 1）に特有な解析異常はなかった。

#### D. 考察

del22患者のほとんどは部分DiGeorge症候群で、T細胞数は減少するがmitogen反応が保たれ、易感染性は少ない [2]。Sullivanら [11] は、患者は出生時にT細胞が少ないが、1歳時に健常児との差が縮まると報告した。患者のmitogen反応は対照より高いこともある [8]。免疫学的所見と他の臨床症状に相関はない [12]。今回のT細胞の緩徐な減少はCD4<sup>+</sup>優位であり、最近の報告に一致する [5,13]。患児T細胞のCD4<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>TCR V $\beta$ レパートリアは制限されるが多様性が保たれ、胸腺依存性T細胞の成熟は高度に損なわれていないだろう [3,4]。胸腺外分化を含む $\gamma\delta$ T細胞、CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>細胞、V $\alpha$ 24<sup>+</sup>細胞は先天性免疫および免疫制御に重要な役割を担うことから、数的にマイナーだが影響力の大きいこの細胞群の動態に焦点を絞った。患者のCD56<sup>+</sup>NK細胞の数と割合は対照よりも多かったが、 $\gamma\delta$ T細胞は患者で多くはなかった (図 1)。 $\gamma\delta$ T細胞とNK細胞の異なる動態は、これまでの報告と一致した [5]。患者の $\gamma\delta$ T細胞数の加齢による減少は対

照と同様であった [14]。一方、患者と対照の $\gamma\delta$ T細胞、CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>細胞そしてV $\alpha$ 24<sup>+</sup>細胞はそれぞれ異なる動態を示した (図 2 B, 表 2)。

del22患者T細胞の緩やかな減少機序は明らかでない。Pilieroら [6]は、成人患者胸腺のT細胞産生とアポトーシスのバランスを評価し、T細胞は生涯ゆっくり減少し、CD45RA<sup>+</sup>からCD45RA<sup>-</sup>T細胞への加速的増殖がCD4<sup>+</sup>T細胞の緩やかな減少に寄与すると考えた [6]。活性化T細胞の予想外の増加は患者に特徴的である。これは胸腺低形成によりT細胞産生が制限された患者における恒常的T細胞増殖を示唆するもので、反復感染によるものではない [6, 15]。本研究ではCD4<sup>+</sup>T細胞の緩やかな減少のほか、患者の特徴として 1) CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>細胞の割合の低い増加率、と、2) V $\alpha$ 24<sup>+</sup>細胞の割合と数の高い増加率、を示した (図 2 B)。Konnoら [16] は健常人の末梢血におけるCD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>細胞は胸腺依存性経路に由来するが、TCR $\gamma\delta$ を発現する腸管上皮内のCD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>細胞は胸腺外分化であると報告した。健常人の末梢血CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>T細胞は加齢によりCD8<sup>+</sup>TCR $\alpha\beta$ T細胞の約10%まで増加するとされるが [16]、これは本研究の結果と一致する。健常人末梢CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>細胞はperforin, TIA-1, IFN $\gamma$ 陽性, granzyme B, IL-2陰性のCD45RO<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>メモ

リーエフェクター細胞で、 $CD8\alpha\alpha^{-}TCR\alpha\beta$  T細胞からオリゴクローナルに増殖したものである[16]。患者末梢 $CD8\alpha\alpha^{-}$ 細胞も胸腺由来で加齢により増殖しにくいのかもしれない。 $CD8\alpha\alpha^{-}$ 細胞とT細胞の正の相関(表2)は、患者末梢 $CD8\alpha\alpha^{+}$ 細胞も胸腺依存性であることを示唆するものであろう。

ヒトNKT細胞は $V\alpha 24^{-}/V\beta 11$ を有しCD1d拘束性に糖脂質を認識する。NKT細胞は自然免疫に関与し $IFN\gamma$ や $IL-4$ を介した調節能を有する。 $V\alpha 24^{+}$ NKT細胞は胸腺内分化である $CD4^{+}CD8^{-}$ または $CD4^{-}CD8^{-}$  double negative (DN)の主要な集団と胸腺外分化である $CD4^{-}CD8^{+}V\beta 24^{-}$ NKT細胞のマイナー集団にわけられる。DelaRosaら[17]は加齢により $CD4^{+}$ またはDNの $V\alpha 24^{+}$ 細胞が減少し、 $CD4^{-}CD8^{+}V\alpha 24^{+}$ 細胞は増加すると報告した。末梢 $V\alpha 24^{+}$ 細胞の生理的減少は $CD3^{+}CD28^{+}$ の減少と $CD3^{+}CD28^{-}$ の増加に特徴づけられるT細胞の加齢変化に続発するものであろう[17]。本研究ではdel22患者の $V\alpha 24^{+}$ 細胞は加齢により増加傾向を呈した(図2b)。しかも対照では他の亜群と相関を認めたが、患者ではそれが失われ、 $V\alpha 24^{+}$ 細胞と $CD8\alpha\alpha^{+}$ 細胞の間にも相関はなかった(表2)。患者においては $V\alpha 24^{+}$ 細胞の主要なサブセットがT細胞減少に反して増殖しているようである。NKT細胞の加齢による増加は自然免疫の代償、あるいはT細胞の活性化促進と自己免疫発症に対する免疫調節効果を示唆するのかもしれない。いずれにしても、患者の末梢血 $CD8\alpha\alpha^{+}$ 細胞と $V\alpha 24^{+}$ 細胞の大部分は胸腺依存性に成熟したのであろうと推測される。

del22患者に自己免疫疾患のリスクが高い機序は明らかでない。Sullivanら[10]は患者の $CD4^{+}CD25^{-}$ T細胞数が健常児より少ないことを報告した。今回、患者と対照でサイトカイン遺伝子の発現レベルに統計学的差はなかったものの、患者のFoxp3のみが6歳以降減少傾向にあった。Foxp3は胎児期に胸腺から発生する $CD4^{+}CD25^{+}$ 調節性T細胞のマスター遺伝子である。この結果は患者が加齢によりTr細胞の産生低下をきたすと示唆

しているのかもしれない。本研究は患者のT細胞機能が保存されていることを支持し、胸腺依存性の免疫調節性 $CD4^{+}CD25^{+}$ 細胞とNKT細胞の潜在的役割を示唆した。T細胞プールを厳密に評価するには末梢におけるT細胞増殖を考慮して、自己免疫疾患を発症した患者を対象にTCR excision circles (TREC)の定量までを行う必要がある。

## E. 結論

del22患者において、末梢血T細胞の加齢減少が対照より緩やかであることを示した。この変化と $CD8\alpha\alpha^{+}$ 細胞および $V\alpha 24^{+}$ 細胞などとの関連性を解析し、それぞれの亜群特有な動態からその意義を考察した。遺伝子発現の結果は患児T細胞の機能的成熟を示唆した。これらの結果は、胸腺欠損を有する本症患者における制限されたT細胞プールの免疫学的恒常性を示唆している。本症の免疫学的解析は患者の臨床管理に有用な情報を提供するのみならず、免疫の恒常性における胸腺機能の解明に役立つと考えられる。

## 謝辞

本研究は本研究班補助金と文部科学省科学研究費補助金の一部により行われた。研究の推進にご協力頂いた池田和幸、古野憲司、大野拓郎、田中珠美先生(九州大学病院小児科)、絹川直子先生(九大病院医療情報部)、および総崎直樹、石川司郎先生、福重淳一郎院長(福岡市立こども病院)に深謝する。

## 参考文献

1. Sullivan KE. The clinical, immunological, and molecular spectrum of chromosome 22q11.2 deletion syndrome and DiGeorge syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4:505-12.
2. Martin Mateos MA, Perez Duenas BP, Iriando M, Krauel J, Gean Molins E. Clinical and immunological spectrum of partial DiGeorge syndrome. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2000; 10:352-60.

3. Pierdominici M, Mazzetta F, Caprini E, *et al.* Biased T-cell receptor repertoires in patients with chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome / velocardiofacial syndrome). *Clin Exp Immunol* 2003; 132:323-31.
4. Cancrini C, Romiti ML, Finocchi A, *et al.* Post-natal ontogenesis of the T-cell receptor CD4 and CD8 Vbeta repertoire and immune function in children with DiGeorge syndrome. *J Clin Immunol* 2005; 25:265-74.
5. Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, Sullivan KE. Immunologic features of chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome). *J Pediatr* 2001; 139:715-23.
6. Piliero LM, Sanford AN, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Sullivan KE. T-cell homeostasis in humans with thymic hypoplasia due to chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Blood* 2004; 103:1020-5.
7. Sullivan KE, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA *et al.* Juvenile rheumatoid arthritis-like polyarthritis in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge anomaly / velocardiofacial syndrome / conotruncal anomaly face syndrome). *Arthritis Rheum* 1997; 40:430-6.
8. Sediva A, Bartunkova J, Zachova R *et al.* Early development of immunity in diGeorge syndrome. *Med Sci Monit* 2005; 11:CR182-7.
9. Gupta S, Aggarwal S, Nguyen T. Increased spontaneous apoptosis in T lymphocytes in DiGeorge anomaly. *Clin Exp Immunol* 1998; 113:65-71.
10. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Zackai EH. CD4(+) CD25(+) T-cell production in healthy humans and in patients with thymic hypoplasia. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:1129-31.
11. Sullivan KE, McDonald-McGinn D, Driscoll DA, Emanuel BS, Zackai EH, Jawad AF. Longitudinal analysis of lymphocyte function and numbers in the first year of life in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome / velocardiofacial syndrome). *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:906-11.
12. Sullivan KE, Jawad AF, Randall P, Driscoll DA, Emanuel BS, McDonald-McGinn DM, Zackai EH. Lack of correlation between impaired T cell production, immunodeficiency, and other phenotypic features in chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 86:141-6.
13. Chinen J, Rosenblatt HM, Smith EO, Shearer WT, Noroski LM. Long-term assessment of T-cell populations in DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:573-9.
14. Argentati K, Re F, Donnini A *et al.* Numerical and functional alterations of circulating gammadelta T lymphocytes in aged people and centenarians. *J Leukoc Biol* 2002; 72:65-71.
15. Hakim FT, Memon SA, Cepeda R *et al.* Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults. *J Clin Invest* 2005; 115:930-9.
16. Konno A, Okada K, Mizuno K *et al.* CD8alpha alpha memory effector T cells descend directly from clonally expanded CD8alpha + beta high TCRalpha beta T cells in vivo. *Blood* 2002; 100:4090-7.
17. DelaRosa O, Tarazona R, Casado JG, Alonso C, Ostos B, Pena J, Solana R. Valpha24+ NKT cells are decreased in elderly humans. *Exp Gerontol* 2002; 37:213-7.

# 原発性免疫不全症の原因の解明と早期診断および治療法の開発

今 井 耕 輔 (防衛医科大学校小児科)  
森 西 洋 一 (防衛医科大学校小児科)  
堀 内 勝 行 (防衛医科大学校小児科)  
辻 陽一郎 (防衛医科大学校小児科)  
子 川 和 宏 (防衛医科大学校小児科)  
野々山 恵 章 (防衛医科大学校小児科)

## 【研究要旨】

高IgM症候群の診断法、治療法の改善を行った。また、病態を明らかにし、ヒトクラススイッチ機構の解明に貢献した。TREC によるT細胞分化障害の免疫不全症のスクリーニング法を確立した。

## A. 研究目的

原発性免疫不全症の診断法、病態解明、より適切な治療法の開発と確立を目的とした。

対象は、高IgM症候群、重症複合型免疫不全症とした。診断法の確立としては、遺伝子を同定し、遺伝子解析による遺伝子診断、遺伝子がコードする蛋白をFACSで解析する方法、TRECを解析する方法を確立した。病態解明は、高IgM症候群におけるイムノグロブリンクラススイッチ異常の解析を行った。治療法の開発、確立としては、造血幹細胞移植の改良を行った。

## B. 研究方法

当科に診断依頼のあった高IgM症候群患者84例を対象とした。臨床データの収集および遺伝子解析は文書による同意を得た。また本研究は倫理委員会承認済みである。

CD40 ligandは患者末消血単核球をPMA+Ca ionophoreで刺激後、flow cytometryにて発現を検討した。DNA sequenceは活性化T細胞から得られたcDNAとgenomic DNAを用い解析した。

AIDは患者B細胞をEBVにより細胞株にし、cDNAとgenomic DNAを抽出してDNA sequenceを行った。

UNGの遺伝子解析はgenomic DNAをdirect

sequenceして行った。

B細胞のクラススイッチ (class switch recombination, CSR) 能は、B細胞をCD40+IL4刺激後にIgE germline transcripts (GLT), circle transcripts (CT), functional transcripts (FT)の発現をRT-PCRで検討した。また、B細胞をCD40+IL4, CD40+IL10刺激後、培養上清中のIgE, IgG, IgA, IgMをELISAで解析した。IgMスイッチ領域のsomatic hypermutationをDNA sequenceにより測定した。

体細胞突然変異は、患者B細胞よりcDNAを複製し、VH領域の変異を多数のクローンでsequenceして検討した。IgMスイッチ領域(S $\mu$ 領域) DNA 2重鎖切断は、CD40+IL4刺激後のB細胞のS $\mu$ 領域をlinker mediated semi-nested PCR (LM-PCR) 法にて増幅後S $\mu$ 特異的probeでハイブリダイズして検討した。

TREC解析は、全血 (EDTA加) からgenomic DNAを抽出 (Qiagen DNA microkit)、濃度測定した。PCRで得られた $\delta$  TRECをplasmidに組み込み、段階希釈し、段階希釈したplasmidと検体を同時に定量PCR (ABI 7300) を行い、標準曲線を作成し、添加DNA量からTRECs: copy/ $\mu$ gDNAを算定した。

免疫不全症治療法の確立のために、これまでに

行った造血幹細胞移植患者の成績をレトロスペクティブに解析した。

### C. 研究結果

#### 1. 高IgM症候群 (HIGM) の原因遺伝子の同定と病態の解明

主として国内のHIGM症例の病型診断の依頼を受け、84例の解析を行い、連結可能匿名化データベースの作成を行った (図1)。

その中から、女性でありながら、CD40Lの発現異常のため高IgM症候群を呈した例を2例同定した。CD40LはX染色体上に原因遺伝子が存在するため、通常男性しか発症しない。しかし、1例は染色体の相互転座 (46, X, t (X;14) (q26.3 ; q13.1)) により、もう1例は原因不明の理由でX染色体の不活化が偏倚し、変異CD40Lの存在するX染色体が活性化されたため、発症したと考えられた。転座例については、FISH, 3'RACEを用いて断裂点も決定し報告した (Imai, et al. Biochim Biophys Acta. 2006;1762:335-340)。

また、AID遺伝子の異常による常染色体劣性型 (AR)HIGM2症例を3例新たに同定し、計16例となった。更に、AID遺伝子の異常をヘテロで持つ常染色体優性遺伝型 (AD) HIGM2患者を3家系7例同定し、報告した (Imai et al. Clin Immunol. 2005;115:277-285)。全患者で190番目のArgがストップコドンになる変異で、そのC末7アミノ酸に核排出シグナルが存在することから、変異AIDが核内に蓄積することがヘテロでの発症につながっていると考えられた。これらの患者では、AR-HIGM2患者とは異なり、クラススイッチ

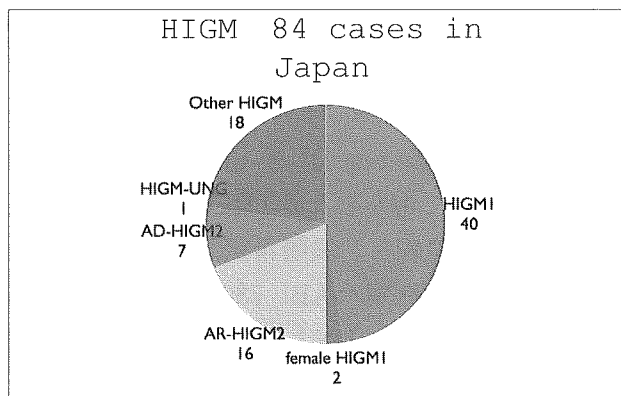


図1. 国内高IgM 症候群84例の内訳

チは障害されているものの、スイッチ領域のDNA二重鎖切断は正常に見られ、免疫グロブリン可変領域の体細胞高頻度突然変異 (VH-SHM) は正常であり、C末に結合する未知の分子がクラススイッチ特異的DNA修復に働く可能性が示唆され、HIGM4の原因を探る上で貴重な所見が得られた。

UNG欠損症の発症機序についても、生化学的な検討を通して、UNGが変異により機能低下していることを示した。(Kavli et al. J Exp Med. 2005;201:2011-2021)。

#### 2. クラススイッチ機構の基礎的検討

また、未知のHIGM患者のクラススイッチ異常の障害部位を検討する目的で、IgM遺伝子のスイッチ領域部分のSHMをin vivoで検討する系を確立した (図2, 図3)。

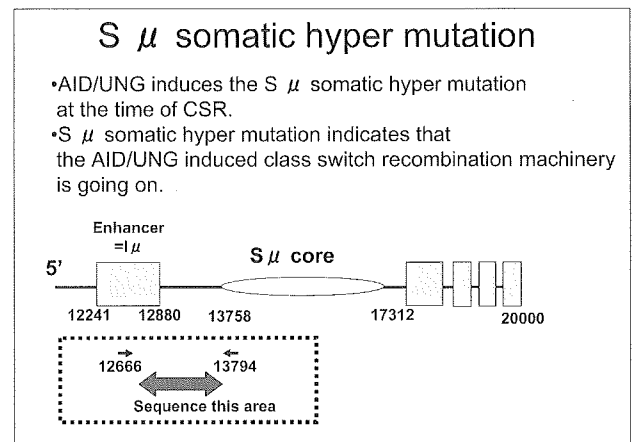


図4. S $\mu$ 領域の体細胞突然変異の測定法

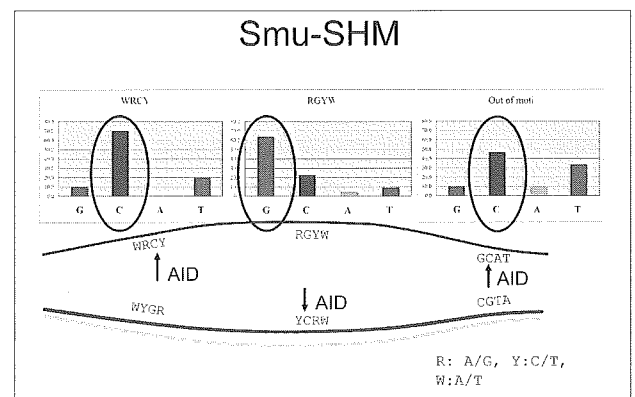


図3. S $\mu$ 領域の体細胞突然変異測定の結果

#### 3. 重症複合免疫不全症 (SCID) の早期診断、早期治療による予後の改善のため、新生児期乾燥濾紙血を用いたマススクリーニング法の開発

T細胞受容体（TCR）の遺伝子再構成時にゲノムDNAから切り出される環状DNA（TREC）をPCR法を用いて定量する方法を確立し、未熟T細胞の新生を定量化し、SCIDの早期診断を行うことが、国内で初めて可能になった。DNA検体としては現在先天性代謝異常症のための新生児マススクリーニング（ガスリー法）に用いている乾燥濾紙血の利用が可能であり、被験者の負担はほとんどない。

また、年齢別の正常値の検討も行い、新生児期には、10,000コピー程度検出される事、加齢に応じてTREC量が減少することが明らかになった。また、内在性コントロール遺伝子を用いて、相対定量も可能となり、DNA量が未知の検体でも定量的検討が可能となった。

原因不明の免疫不全症や骨髄移植後のT細胞機能の検討も可能である。母のT細胞の混入しているSCID患者1例について、移植前後で検討し、T細胞数がほとんど同じにもかかわらず、TREC量は2 log上昇していることが確認でき、非常に有用であることを明らかにした（図4、図5）。

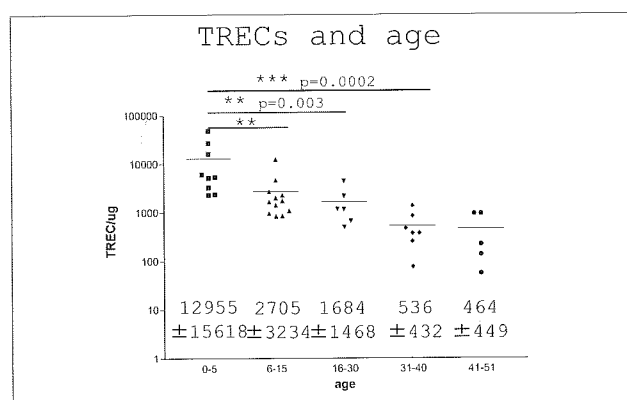


図4. TRECの年齢別正常値

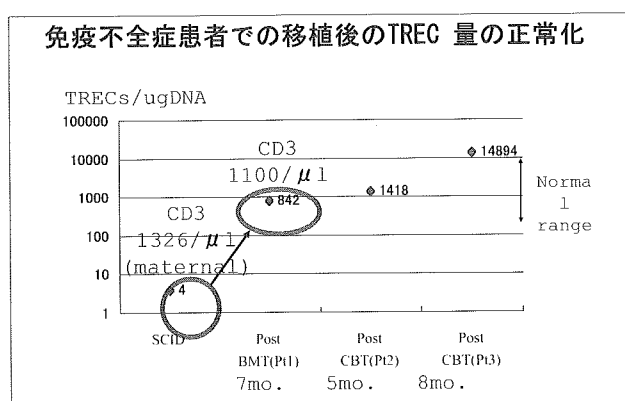


図5. 重症複合型免疫不全症患者における移植後のTRECの正常化

#### 4. 免疫不全症に対する造血幹細胞移植法の検討

当科、及び東京医科歯科大学で行った免疫不全症に対する造血幹細胞移植について後方視的検討を行った。その結果、HLA haploidentical donorからのT細胞除去移植は、予後が不良であること、臍帯血移植が有望であること、感染症のコントロールが重要であることなどが明らかになった。また、前処置についても検討を加え、ミニ移植の適応について考察した。

(Tsuji et al. Bone Marrow Transplant. 2006)。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析に関しては、防衛医科大学校倫理委員会の承認を得ている。文書による同意書を得、個人情報保護のため、連結可能匿名化を行った。

#### D. 考 察

高IgM症候群（HIGM）84例についてCD40 ligand, AID, UNGの遺伝子解析、蛋白発現解析、PCRによるRNA解析を行い、診断を行った。既知遺伝子が正常である高IgM症候群の存在を確認した。その結果をまとめ、データベースを構築した。

免疫グロブリンクラススイッチを検討する方法として、IgM遺伝子のスイッチ領域部分のSHMを測定する方法を確立した。この方法を用いて高IgMタイプ4の原因遺伝子同定に向けて、基礎データを収集している。

TRECのreal time PCRによる定量的な測定法を確立した。それをもとに、重症複合免疫不全症（SCID）の早期診断に利用する予定である。

また、造血幹細胞移植治療の結果をまとめたので、その結果をもとにして、安全性を高めかつ免疫系の完全な再構築を得られるように治療法を改善する。

以上の成果をもとに、免疫不全症の診断、病態解明、治療法の確立を行っていく。

#### E. 結 論

新しい方法論を確立し、免疫不全症の診断、病態解明、治療法の確立に貢献ができた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 参考文献

Sato K, Kinoshita M, Motegi A, Habu Y, Takayama E, Nonoyama S, Hiraide H, Seki S. Critical role of the liver CD8(+) CD122(+) T cells in the generalized Shwartzman reaction of mice.

Eur J Immunol. 2005 35:593-602.

Nagasawa M, Zhu Y, Isoda T, Tomizawa D, Itoh S, Kajiwara M, Morio T, Nonoyama S, Shimizu N, Mizutani S.

Analysis of serum soluble CD40 ligand (sCD40L) in the patients undergoing allogeneic stem cell transplantation: platelet is a major source of serum sCD40L.

Eur J Haematol. 2005 74:54-60.

Takeshita S, Kawamura Y, Takabayashi H, Yoshida N, Nonoyama S.

Imbalance in the production between vascular endothelial growth factor and endostatin in Kawasaki disease.

Clin Exp Immunol. 2005 139:575-579.

Analysis of class switch recombination and somatic hypermutation in patients affected with autosomal dominant hyper-IgM syndrome type 2

Imai, K, Zhu Y, Revy P, Morio T, Mizutani S, Fischer A, Nonoyama S, Durandy A.

Clin. Immunol. 2005 115:277-285.

Imadome K, Shimizu N, Arai A, Miura O, Watanabe K, Nakamura H, Nonoyama S, Yamamoto K, Fujiwara S

Coexpression of CD40 and CD40 ligand in Epstein-Barr virus-infected T and NK cells and their role in cell survival. J. Infect. Dis. 192:1340-1348. 2005

Kavli B, Andersen S, Otterlei M, et al. B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil. J Exp Med. 2005;201:2011-2021.

Imai K, Shimadzu M, Kubota T, Morio T, Matsunaga T, Park YD, Yoshioka A, Nonoyama S.

Female hyper IgM syndrome type 1 with a chromosomal translocation disrupting CD40LG. Biochimica et Biophysica Acta. 2006 1762:335-340

Tsuji Y, Imai K, Kajiwara M, Aoki Y, Isoda T, Tomizawa D, Imai M, Ito S, Maeda H, Minegishi Y, Ohkawa H, Yata J, Sasaki N, Kogawa K, Nagasawa M, Morio T, Nonoyama S, Mizutani S.

Hematopoietic stem cell transplantation for 30 patients with primary immunodeficiency diseases: 20 years experience of a single team. Bone Marrow Transplant. 2006;37:469-477.

Motegi A, Kinoshita M, Sato K, Shinomiya N, Ono S, Nonoyama S, Hiraide H, Seki S. An in vitro Shwartzman reaction-like response is augmented age-dependently in human peripheral blood mononuclear cells. J Leukoc Biol. 2006 79:463-472.

## 総説

Durandy A, Revy P, Imai K, Fischer A. Hyper-immunoglobulin M syndromes caused by intrinsic B-lymphocyte defects. Immunol Rev. 2005;203:67-79.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

# Artemis異常症の診断法と造血幹細胞移植の検討

上 松 一 永 (信州大学医学研究科移植免疫感染症)  
川 井 淳 也 (信州大学医学研究科移植免疫感染症)  
山 崎 和 子 (信州大学医学研究科移植免疫感染症)  
小 林 紀 元 (信州大学医学部小児科)  
山 崎 崇 志 (信州大学医学部小児科)  
南 雲 治 夫 (信州大学医学部小児科)  
安 井 耕 三 (信州大学医学部小児科)  
小 池 健 一 (信州大学医学部小児科)  
稲 垣 二 郎 (奈良県立医科大学小児科)

## 【研究要旨】

本邦におけるArtemis変異重症複合免疫不全症5例の診断と造血幹細胞移植成績について総括する。Artemis変異は一般にExon skipが多く、Exon 3欠損2例、Exon 3欠損/2塩基挿入、Exon 3欠損/不明1例、そして新たにExon1, 2欠損1例を見出した。Exon 3欠損は、ゲノムLong-PCRによって確定診断したが、Exon1-2欠損例では、Western blotの併用によって確定できた。造血幹細胞移植前処置は、前処置なし1例、エンドキサンを主体とした従来の方法3例、1例はフルダラビン主体のミニ移植を行った。2例は、サイトメガロウイルス感染と肺障害で死亡、3例は順調に経過しているものの、1例でドナーT細胞の肺浸潤がみられる。体細胞にArtemis変異があるものの悪性腫瘍などの合併症はみられていない。Artemisの機能については不明な点が多いが、これまでに得られた基礎的なデータも併せて報告したい。

## はじめに

重症複合免疫不全症 (severe combined immunodeficiency: 以下SCIDと略す)は、T細胞が欠損し細胞性と液性免疫能が著しく障害され、造血幹細胞移植などの根治治療がなされなければ乳児期に重症感染症によって死亡する。SCIDの約半数以上は末梢血B細胞を認め、サイトカイン受容体を構成するcommon gamma鎖の異常である。残りの半数はB細胞が欠損しDNAの切断や接続に関与するRAGやArtemisの異常である(B細胞欠損型SCID)。本邦においてはB細胞欠損型SCIDの原因は、RAGの異常は少なく、多くはArtemisの遺伝子変異であると思われる。エクソンスキップの多いArtemis遺伝子は塩基配列決定が一部で困難であるため、Long-PCRに加え、

最近樹立したニワトリArtemisノックアウトならびにArtemis移入細胞株をコントロールに用いて、ウェスタン法による診断を検討した。このようにして確定診断したArtemis異常の5例における造血幹細胞移植成績と予後について検討を行った。

## 方 法

### 1. 対象患者と造血幹細胞移植方法

Artemis異常のSCID患者5例の移植経過を検討した。4例(信州大2例、山梨大学1例、大阪市民病院1例)は、エンドキサンを中心とした骨髄破壊の前処置であり1例(奈良県立医大)は、フルダラビンを中心としたミニ移植を行なった。

### 2. 対象と細胞分離

B細胞欠損型SCID患者および正常人から、

ヘパリン血 5 - 20mlを採取し当科に郵送。ヘパリン加末梢血などから単核球を分離、DNA、RNAや細胞の保存ならびにEBウイルス感染B細胞株および線維芽細胞の樹立を行なった。

### 3. 塩基配列の決定

DNAならびにsingle step法によってtotal RNAを抽出した。PCR法で増幅したmRNAおよびDNA産物を直接シーケンスした。広範囲のエクソン欠損によってPCR産物が得られないものに対しては、ゲノムDNAを用いてlong-PCRを行なった。

### 4. Western blotting

現在入手できる抗ヒトArtemis抗体を用いて、蛋白レベルの解析を行った。Non specificなバンドがでやすいため、樹立したニワトリDT40 Artemisノックアウト株をnegative controlに、さらにそこに正常Artemisを移入した細胞株をpositive controlとして用いた。細胞はMNCsとそれをマイトジェンで刺激したもの、患児線維芽細胞などを用いた。

### 5. フローサイトメトリー

リンパ球細胞膜を軽度破壊し、細胞内ArtemisをFACScanを用いた解析を試みた。

### 6. Artemis機能解析

ニワトリArtemisノックアウト細胞株を用いてArtemisの機能を明らかにした。ニワトリDT40 Artemisノックアウト株に変異Artemis遺伝子を移入して、放射線感受性について調べた。DT40 Artemisノックアウト株からIgMを表出しない株を同定し、刺激後のIgM表出を調べ、Artemisがジーンコンバージョンに関わっているかどうか解析した。

### 7. 放射線感受性

線維芽細胞に放射線を照射し、その後のコロニーによって、放射線感受性を検討した。

## 結果と考察

SCIDにおけるArtemis患者の頻度は、ヨーロッパにおいては約7%といわれているが、本邦においても10%弱と推定され同様の発症頻度と考えられた。Exon 3欠損2例、Exon 3欠損/2塩基挿

入、は長野と山梨の症例であり、中部地方に多い傾向がある(Exon 3欠損/不明は大阪、文献1)。なお、名古屋大学(蒲池先生から報告)の1例もExon 3欠損が示唆され、この変異のこの地域特異性が考えられる。Long-PCRによって確定できたこの変異は、両親が保因者であることも証明でき、保因者が特に中部地方に存在している可能性が高い。今回、新たに奈良県からExon1-2欠損を見出した。Exon1-2欠損では、Long-PCRによる確定診断が困難なため、Western blotの併用によって確定できた。

造血幹細胞移植は、症例1はHLA一致の同胞から前処置なしで行い、全く合併症なしで生着に成功、順調に経過している(文献2)。Pro-B細胞が残存していても前処置なしで生着が可能であることを物語っている。症例2は、従来のエンドキサンを用いたが、ドナーが母親であり、母親由来のT細胞が混入していたため、現在GVHD反応を認めている。特に肺にT細胞とB細胞の浸潤および胚中心の形成がみられる。症例3は、診断時に著明なCMV感染症があり移植死している。早期発見の重要性が再認識される。症例4も従来のエンドキサンを用いて移植に成功しているものの、その後の肺障害によって死亡している。症例5ではSCIDにおいては本邦数例目のミニ移植を行った。前処置は、白血病のミニ移植のプロトコルに従い、フルグラビン・ブスルフェンを用いた。やや生着が遷延したが現在順調に経過している。予後は移植後最長7年経過するものの、悪性腫瘍などの合併はなく、現在体細胞のArtemis異常に伴う疾患は発症していない。

Artemis機能に関しては、VDJ再構成とDNA修復における関与は確定的である。ニワトリDT40 Artemisノックアウト株を用いた解析でも、放射線感受性を認め、Artemis変異体は放射線に対して弱いものと考えられる。しかしながら、シスプラチンに対する感受性は認めず、こうした薬剤に対しては問題がない可能性がある(文献3)。Artemisのクラススイッチに対する関与については、ヒトArtemis欠損株を用いては証明できなかった。免疫グロブリン遺伝子ノックインマウスも用

いた解析では、その関与は否定的であることが報告されている。最後に、Artemisがジーンコンバージョンに関わっているかどうか解析した。DT40 Artemis ノックアウト株からIgMを表出しない株を同定し、刺激後のIgM表出を調べたところ、ジーンコンバージョンによって誘導されるIgMの細胞表面への発現がみられたため、Artemisはジーンコンバージョンにかかわっていない可能性が示唆された。

おわりに、Artemis異常患者における造血幹細胞移植は、フルダラピンを中心としたミニ移植が推奨される。しかしながら、造血細胞以外の患者体細胞のArtemis変異は改善していない。このことから、Artemis変異に基づく合併症が危惧されるが、今回報告した移植成功例において、今のところ特別な異常は認められていない。ただ、実験的には、患者細胞に強い放射線感受性がみられるため、本症患者における造血幹細胞移植後は、この点にも注意して観察していく必要があると思われる。

## 文 献

1. Kobayashi N, Agematsu K, Sugita K, Sako M, Nonoyama S, Yachie A, Kumaki S, Tsuchiya S, Ochs HD, Sugita K, Fukushima Y, Komiyama A. Novel Artemis gene mutations of radiosensitive severe combined immunodeficiency in Japanese families. *Hum. Genet.* 112:348-52, 2003.
2. Agematsu K, Nagumo H, Hokibara S, Mori T, Wada T, Yachie A, Kanegane H, Miyawaki T, Sugita K, Karasuyama H, Komiyama A. Complete arrest from pro-to pre-B cells in a case of B cell-negative severe combined immunodeficiency (SCID) without recombina-se activating gene (RAG) mutations. *Clin. Exp. Immunol.* 124:461-464, 2001.
3. Ishiai M, Kimura M, Agematsu K, Matsushita N, Takeda S, Buerstedde J-M, and Takata M. DNA crosslink repair protein SNM1A interacts with PIAS1 in nuclear focus formation. *Mol. Cell. Biol.* 24:10733-41, 2004.

## IV 研究成果の刊行に関する一覧

## 研究成果の刊行に関する一覧

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
宮脇利男	原発性免疫不全症候群	山口徹他	今日の治療指針2005	医学書院	東京	2005	959
金兼弘和、松倉裕喜、野村恵子、宮脇利男	リンパ球サブセット、NK 活性、血清免疫グロブリン	青木継穂他	数値から見る小児の成長と発達	金原出版	東京	2005	47-55
川口浩史、中村和洋、小林正夫	好中球エラスターゼと周期性好中球減少症・急性前骨髄性白血病	高久史麿、溝口秀昭、小宮山淳、坂田洋一、金倉讓	Annual Review 血液 2005	中外医学社	東京	2005	144-150
近藤直実	補体系	衛藤義勝他	ネルソン小児科学第17版	エルセビア・ジャパン	東京	2005	741-746
楠原浩一、原 寿郎	感染症	衛藤義勝他	ネルソン小児科学 原著第17版	エルセビア・ジャパン	東京	2005	853-913
金兼弘和、宮脇利男	ウイルス感染症	衛藤義勝他	ネルソン小児科学第17版	エルセビア・ジャパン	東京	2005	1051-1091
原 寿郎	小児の成長と発達		看護のための最新医学講座 第2版 新生児・小児科疾患			2005	2-15
原 寿郎		原 寿郎	第14巻 看護のための最新医学講座 第2版			2005	
有賀 正	原発性免疫不全症に対する新しい治療の流れー血液幹細胞移植と遺伝子治療の現状と問題点。	柳澤正義、衛藤義勝、五十嵐隆	先端医療シリーズ34 小児科の新しい流れ	先端医療技術研究所	東京	2005	349-353
蒲池吉朗	原発性免疫不全症候群		血液疾患ハンドブック	再生つばさの会ー正基金		2005	77-81
烏山 一	B細胞の分化		免疫研究集中マスター	羊土社	東京	2005	67-75
原 寿郎	免疫疾患		小児科学・新生児学テキスト				印刷中
原 寿郎			小児のエイズ 今日の治療指針				印刷中
原 寿郎	小児の成長・小児の発達		標準小児科学 第5版				印刷中
有賀 正	免疫不全症の検査	小児臨床検査ガイド	五十嵐 隆、水口 雅	文光堂	東京		印刷中
有賀 正	原発性免疫不全症	今日の治療指針 2007年度版。私はこう治療している。	山口徹、北原光夫、福井次矢	医学書院	東京		印刷中
Ariga T	ADA deficiency	Inborn errors of purine & pyrimidine metabolism in man: Diagnosis and treatment	Yuji Moriwaki, Tesuya Yamamoto	Research Signpost	Kerala/India		in press
Kaneko H, Kondo N.	Bloom syndrome	Hereditary Cancer Syndrome	Bianchi-Scarr, ed.	Humana Press	NJ		in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Miyawaki T</u>	Primary immunodeficiencies inducing EBV-associated severe illness.	Iranian J Allergy Asthma Immunol	3	51-57	2004
Asghar A., Parvaneh N., Kanegane H., Moin M., Amirzargar A.A., Farhodi A., Pourpak Z., Movahedi M., Gharagozlou M., Rezaei N., Futatani T., and <u>Miyawaki T.</u>	Screening of the Bruton tyrosine kinase (BTK) gene mutations in 13 Iranian patients with presumed X-linked agammaglobulinemia.	Iranian J Allergy Asthma Immunol	3	175-179	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-E11	2004
Kanegane H., Kasahara Y., Okamura J., Hongo T., Tanaka R., Nomura K., Kojima S., and <u>Miyawaki T.</u>	Identification of <i>DKCI</i> gene mutations in Japanese patients with X-linked dyskeratosis congenita.	Brit J Haematol	78	130-133	2005
Kanegane H., Taneichi H., Nomura K., Futatani T., and <u>Miyawaki T.</u>	Severe neutropenia in Japanese patients with X-linked agammaglobulinemia.	J Clin Immunol	25	491-495	2005
Tabata Y., Villanueva J., Lee S.M., Zhang K., Kanegane H., <u>Miyawaki T.</u> , Sumegi J., and Filipovich A.H.	Rapid detection of intracellular SH2D1A protein in cytotoxic lymphocytes from patients with X-linked lymphoproliferative disease and their family members.	Blood	105	3066-3071	2005
Conley M.E., Broides A., Hernandez-Trujillo V., Howard V., Kanegane H., <u>Miyawaki T.</u> , and Shurtleff S.A.	Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development.	Immunol Rev	78	130-133	2005
Wang X.C., Wang Y., Kanegane H., <u>Miyawaki T.</u> , and Yu YH.	Gene diagnosis of X-linked agammaglobulinemia.	Zhonghua Er Ke Za Zhi	43	449-452	2005
Kanegane H., Ito Y., Ohshima K., Shichijo T., Tomimasu K., Nomura K., Futatani T., Sumazaki R., and <u>Miyawaki T.</u>	X-linked lymphoproliferative syndrome presenting with systemic lymphocytic vasculitis.	Am J Hematol	78	130-133	2005
Hoshino T., Kanegane H., Doki N., Irisawa H., Sakura T., Nojima Y., <u>Miyawaki S.</u> , and <u>Miyawaki T.</u>	X-linked lymphoproliferative disease in an adult.	Int J Hematol	82	55-58	2005
Sera Y., Kawaguchi H., Nakamura K., Sato T., Habara M., Okada S., Ishikawa N., Kojima S., Katoh O., and <u>Kobayashi M.</u>	A comparison of the defective granulopoiesis in childhood cyclic neutropenia and in severe congenital neutropenia.	Haematologica	90	1032-1041	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mizoguchi Y., Nakamura K., Miyagawa S., Nishimura S., Arihiro .K, and Kobayashi M.	A case of adolescent primary adrenal natural killer cell lymphoma.	Int J Hematol	81	330-334	2005
Takada H., Kusuhara K., Nomura A., Ohga S., Hayashi M., Furue M.,and Hara T.	A novel CIAS1 mutation in a Japanese patient with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome.	Eur J Pediatr	164	785-786	2005
Takada H., Nomura A., Roifman CM., and Hara T.	Severe combined immunodeficiency caused by a splicing abnormality of the CD3delta gene.	Eur J Pediatr	164	311-314	2005
Tanaka T., Takada H., Nomura A., Ohga S., Shibata R.,and Hara T.	Distinct gene expression patterns of peripheral blood cells in hyper-IgE syndrome.	Clin Exp Immunol	140	524-531	2005
Nomura A., Takada H., Ohga S., Ishii N., Inoue T., and Hara T.	T-cell-depleted CD34+ cell transplantation from an HLA-mismatched donor in a low-birth weight infant with X-linked severe combined immunodeficiency.	J Pediatr Hematol	27	80-84	2005
Ishii E., Ueda I., Shirakawa R., Yamamoto K., Horiuchi H., Ohga S., Furuno K., Morimoto A., Imayoshi M., Ogata Y., Zaitu M., Sako M., Koike K., Sakata A., Takada H., Hara T., Imashuku S., Sasazuki T., and Yasukawa M.	Genetic subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis: correlations with clinical features and cytotoxic T lymphocyte/natural killer cell functions.	Blood	105	3442-3448	2005
Yamamoto K., Ishii E., Horiuchi H., Ueda I., Ohga S., Nishi M., Ogata Y., Zaitu M., Morimoto A., Hara T., Imashuku S, Sasazuki T, Yasukawa M.	Mutations of syntaxin 11 and SNAP23 genes as causes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis were not found in Japanese people.	J Human Genet	50	600-603	2005
Takada H., Saito Y., Nomura A., Ohga S., Kuwano K., Nakashima N., Aishima S., Tsuru N., and Hara T.	Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia as an initial manifestation in systemic lupus erythematosus.	Pediatr Pulmonol	40	257-260	2005
Ishimura M., Ohga S., Nomura A., Toubu T., Morihana E., Saito Y., Nishio H., Ide M., Takada H., and Hara T.	Successful umbilical cord blood transplantation for severe chronic active Epstein-Barr virus infection after double failures of hematopoietic stem cell transplantation.	Am J Haematol	80	207-212	2005
Hara T., Ohga S, Hattori S, Hatano M, Kaku N, Nomura A, Takada H, Kokuba N, and Hara T.	Prolonged severe pancytopenia as the first manifestation of systemic juvenile xanthogranuloma.	Pediatr Blood Cancer			2005
Takemoto M., Kira R., Kusuhara K., Torisu H., Sakai Y., and Hara T.	Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with subacute sclerosing panencephalitis using oligonucleotide microarrays.	J Neurovirol	11	299-305	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kira R., Torisu H., Takemoto M., Nomura A., Sakai Y., Sanefuji M., Sakamoto K., Matsumoto S., Gondo K., and Hara T.	Genetic susceptibility to simple febrile seizures: interleukin-1 beta promoter polymorphisms are associated with sporadic cases.	Neurosci Lett	384	239-244	2005
Nakayama H., Ihara K., Hikino S., Yamamoto J., Nagatomo T., Takemoto M., and Hara T.	Thrombocytosis in preterm infants: A possible involvement of thrombopoietin and its receptor gene expression.	J Mol Med	83	316-20	2005
Kato Y., Ihara K., Miyako K., Kuhara T., Inoue Y., and Hara T.	Acute encephalopathy associated with influenza virus infection in a patient with hyperprolinemia type II	J Inherit Metab Dis	28	789-790	2005
Muraoka K., Ishii E., Ihara K., Imayoshi M., Miyazaki S., Hara T., and Hamasaki Y.	Successful bone marrow transplantation in a patient with c-mpl-mutated congenital amegakaryocytic thrombocytopenia from a carrier donor.	Pediatr Transplant	9	101-103	2005
Ihara K., Miyako K., Ishimura M., Kuromaru R., Wang H-Y., Yasuda K., and Hara T.	A case of hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome with reduced carbamylphosphate synthetase-1 activity in liver: a pitfall in enzymatic diagnosis for hyperammonemia.	J Inherit Metab Dis	28	681-687	2005
Koga Y., Matsuzaki A., Suminoe A., Hattori H., Kanemitsu S., and Hara T.	Differential mRNA expression of glucocorticoid receptor $\alpha$ and $\beta$ is associated with glucocorticoid sensitivity of acute lymphoblastic leukemia in children.	Pediatr Blood Cancer	45	121-127	2005
Matsuzaki A., Suminoe A., Koga Y., Kinukawa N., Kusuhara .K, and Hara T.	Immune response after influenza vaccination in children with cancer.	Pediatr Blood Cancer	45	831-837	2005
Masumoto K., Nishimoto Y., Taguchi T., Tsutsumi Y., Kanemitsu S., Hara T., and Suita S.	Colonic stricture secondary to hemolytic uremic syndrome caused by Escherichia coli O-157.	Pediatr Nephrol	20	1496-1499	2005
Hirata S., Senju S., Matsuyoshi H., Fukuma D., Uemura Y. and Nishimura Y.	Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of ES cell-derived dendritic cells expressing MOG peptide along with TRAIL or PD-L1.	J. Immunol.	174	1888-1897	2005
Fukuma D., Matsuyoshi H., Hirata S., Kurisaki A., Yoshitake Y., Sinohara M., Nishimura Y., and Senju S.	Anti-cancer immunotherapy with semi-allogeneic embryonic stem cell-derived dendritic cells genetically engineered to express a model tumor antigen.	Biochem. Biophys. Res. Comm.	335	5-13	2005
Matsuyoshi H., Hirata S., Yoshitake Y., Motomura Y., Fukuma D., Kurisaki A., Nakatsura T., Nishimura Y., and Senju S.	Therapeutic effect of $\alpha$ -galactosylceramide-loaded dendritic cells genetically engineered to express SLC/CCL21 along with tumor antigen against peritoneally disseminated tumor cells.	Cancer Science	96	889-896	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Qian X., <u>Agematsu K.</u> , Freeman GJ., Tagawa Y., Sugane K., and Hayashi T.	ICOS-ligand B7H2, expressed on human type II alveolar epithelial cells, plays a role in pulmonary host defense system.	Eur J Immunol	In press.		
Yamazaki T., Nagumo H., Hayashi T., Sugane K., and <u>Agematsu K.</u>	CD72-mediated suppression of human naive B cell differentiation by down-regulating X-box binding protein 1.	Eur J Immunol	35	2325-2334	2005
Wada T., Toma T., Okamoto H., Kasahara Y., Koizumi S., <u>Agematsu K.</u> , Kimura H., Shimada A., Hayashi Y., Kato M., and Yachie A.	Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads to Omenn syndrome in a patient with RAG1-deficient severe combined immunodeficiency.	Blood	106	2099-2101	2005
Shi Y., Okubo, Yoshio Y., Uehara Y., and Sugane K., and <u>Agematsu K.</u>	Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell.	J Immunol	175	3267-3277	2005
Sekiguchi Y., Yasui K., Yamazaki T., <u>Agematsu K.</u> , Kobayashi N., and Koike K.	Effective combination therapy using interferon-gamma and interleukin-2 for disseminated Mycobacterium avium complex infection in a pediatric patient with AIDS.	Clin Infect	41	104-106	2005
Matsuzaki S., Shinozaki K., Kobayashi N., and <u>Agematsu K.</u>	Polarization of Th1/Th2 gene expression in subpopulations of human CD45RO+CD4+ T lymphocytes distinguished by CD62L.	Allergy	60	780-787	2005
Yasui K., Kobayashi N., Yamazaki T., <u>Agematsu K.</u> , Matsuzaki S., Nakata S., and Baba A.	Differential effects of short-acting beta2-agonists on human granulocyte functions.	Int Arch Allergy Immunol	139	1-8	2005
Yasui K., Kobayashi N., Yamazaki T., and <u>Agematsu K.</u>	Thalidomide as an immunotherapeutic agent: the effects on neutrophil-mediated inflammation. (Review)	Curr Pharm Design	1	395-401	2005
Yasui K., Kobayashi N., Yamazaki T., <u>Agematsu K.</u> , Matsuzaki S., Ito S., Nakata S., Baba A., and Koike K.	Superoxide dismutase (SOD) as a potential inhibitory mediator of inflammation via neutrophil apoptosis.	Free Radic Res	39	755-762	2005
Sato T., Kobayashi R., Nakajima M., Iguchi A., and <u>Ariga T.</u>	Significance of eosinophilia after stem cell transplantation as a possible prognostic marker of favorable outcome.	Bone Marrow Transplant	36	985-991	2005
Horiuchi K., <u>Ariga T.</u> , Fujioka H., Kawashima K., Yamamoto Y., Ikawa H., and Sakiyama Y.	Mutational analysis of the TCOF1 gene in 11 Japanese patients with Treacher Collins syndrome.	Am J Med Genet	134A	363-367	2005
Fujioka H., <u>Ariga T.</u> , Yoda M., Ohsaki M., Horiuchi K., Otsu M., Sugihara T., and Sakiyama Y.	A case of C3 deficiency with a novel homozygous two-base deletion in the C3 gene.	Am J Med Genet	138A	399-400	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mizuno K., Toma T., Tsukiji H., Okamoto H., Yamazaki H., Ohta K., Ohta K., Kasahara Y., Koizumi S., and <u>Yachie A.</u>	Selective expansion of CD16highCCR2-subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation.	Clin Exp Immunol	142	461-470	2005
Tomizawa D., Aoki Y., Nagasawa M., <u>Morio T.</u> , Kajiwara M., Sekine T., Shimizu N., Kato M., <u>Yachie A.</u> , and Mizutani S.	Novel adopted immunotherapy for mixed chimerism after unrelated cord blood transplantation in Omenn syndrome.	Eur J Haematol	75	441-444	2005
Okano M., Kawa K., Kimura H., <u>Yachie A.</u> , Wakiguchi H., Maeda A., Imai S., Ohga S., Kanegane H., <u>Tsuchiya S.</u> , <u>Morio T.</u> , <u>Mori M.</u> , <u>Yokota S.</u> , and Imashuku S.	Proposed guidelines for diagnosing chronic active Epstein-Barr virus infection.	Am J Hematol	80	64-69	2005
Wada T., Schurman SH., Garabedian EK., <u>Yachie A.</u> , and Candotti F.	Analysis of T-cell repertoire diversity in Wiskott-Aldrich syndrome.	Blood	106	3895-3897	2005
Hashimoto K., Kato Z., Nagase T., Shimozawa N., Kuwata K., Omoya K., Li A., Matsukuma E., Yamamoto Y., Ohnishi H., Tochio H., Shirakawa M., Suzuki Y., Wanders RA., and <u>Kondo N.</u>	Molecular mechanism of a temperature-sensitive phenotype in peroxisomal biogenesis disorder.	Pediatr Res	58	263-269	2005
Fukao T., Fukutomi O., Hirayama K., Teramoto T., Kaneko H., Kondo M., Matsui E., and <u>Kondo N.</u>	Questionnaire-based study on the relationship between pet-keeping and allergic diseases in young children in Japan.	Allergol Int	54	521-526	2005
Kaneko H., Kawamoto N., Asano T., Mabuchi Y., Horikosi H., Teramoto T., Matsui E., Kondo M., Fukao T., Kasahara K., and <u>Kondo N.</u>	Leaky phenotype of X-linked agammaglobulinaemia in a Japanese family.	Clin Exp Immunol	140	520-523	2005
Takahashi Y., Mori H., Mishina M., Watanabe M., <u>Kondo N.</u> , Shimomura J., Kubota Y., Matsuda K., Fukushima K., Shiroma N., Akasaka N., Nishida H., Imamura A., Watanabe H., Sugiyama N., Ikezawa M., and Fujiwara T.	Autoantibodies and cell-mediated autoimmunity to NMDA-type GluRepsilon2 in patients with Rasmussen's encephalitis and chronic progressive epilepsy partialis continua.	Epilepsia	46	152-158	2005
Tatebayasi K., Matsui E., Kaneko H., Fukao T., Kasahara K., <u>Kondo N.</u>	IL-12B promoter polymorphism associated with asthma and IL-12B transcriptional activity.	Allergol Int	54	345-349	2005
Kato Z., Tsubouchi K., and <u>Kondo N.</u>	Molluscum contagiosum prevents progression of staphylococcal scalded skin syndrome.	Eur J Pediatr	164	768-769	2005