

れた。

E. 結 論

正常コントロールではFOXP3はCD25⁺CD4⁺T細胞に殆どが発現していた。FOXP3陽性CD25⁺CD4⁺T細胞は出生から成人に至るまでほぼ同じ割合で存在したが、臍帯血のみ若干少ない傾向があった。新生児ではFOXP3陽性CD25⁺CD4⁺T細胞は主にナイーブなphenotype (CD45RA陽性)であり、成長に伴いメモリーなphenotype (CD45RO陽性)に変化をしていた。

FOXP3遺伝子異常のあるIPEX症候群の患者では末梢血中にFOXP3陽性CD25⁺CD4⁺T細胞は殆ど認められなかった。フレームシフト異常のある患者では、典型的なIPEX症候群の症状、T細胞の異常な活性化が認められたが、point mutation

の患者では臨床症状、T細胞の活性化は軽微であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

H18年12月 日本免疫学会 (大阪)

「Developmental changes of FOXP3-expressing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and their impairment in patients with FOXP3 gene mutations」

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

原発性免疫不全症の遺伝子とコモンディジーズ： UNC93B1と熱性けいれん

石 崎 義 人 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
吉 良 龍太郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
鳥 巢 浩 幸 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
實 藤 雅 文 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
岩 山 真理子 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
由 茅 直 子 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)
原 寿 郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学)

【研究要旨】

ウイルス核酸の受容体であるToll-like receptor (TLR)3、TLR7、TLR9とこれらの機能を制御しているUNC93B1について、熱性けいれん発症との関連を明らかにするため、一塩基多型(SNP)を用いて患者対照研究を行った。UNC93B1のintron7にあるrs308328において、熱性けいれん患者のGアレルの頻度(36.8%)が対照(29.7%)と比べ有意に高かった($p=0.02$)。サブグループの解析では、複雑型(41.4%)と対照との間にGアレル頻度の有意な違いがあり(corrected $p=0.039$)、単純型では違いはなかった。ハプロタイプ解析でも有意差を認めた。TLR3、TLR7、TLR9遺伝子多型については、熱性けいれん患者対照間に有意な違いを認めなかった。UNC93B1遺伝子が熱性けいれん特に複雑型に関連することが示唆された。UNC93B1は家族性単純ヘルペス脳炎の原因遺伝子であることが最近報告されている(Science, 2006)。ウイルスの直接侵襲による炎症性病変が、熱性けいれん特に複雑型の病態に関与している可能性がある。

A. 研究目的

乳幼児の痙攣性疾患の中ではもっとも高頻度なコモンディジーズで、特に日本においては6-9%と欧米より高いと報告されている。熱性けいれんの発症には、遺伝的因子、感染症などの環境因子など多様な因子が関与している¹⁾。我々はこれまでにinterleukin (IL) 1B遺伝子 -511C/T多型が単純型熱性けいれん孤発例の感受性に関与することを明らかにしてきた²⁾。熱性けいれんの主要な原因の一つであるウイルス感染では、自然免疫応答が重要である。免疫担当細胞に取り込まれたウイルスやウイルス感染細胞からウイルス核酸が遊離し、エンドゾーム内のToll-like receptor (TLR)によって認識され、1型インターフェロンを誘導し、免疫応答を起こす。エンドゾームに局在するTLR3、TLR7、TLR9はウイルス核酸の

構成成分を認識する。TLR3、7、9の機能は新しく見つかった遺伝子UNC93B1で制御されていることが想定されている。本研究では、ウイルス核酸の受容体であるTLR3、TLR7、TLR9とこれらの機能を制御しているUNC93B1について、熱性けいれん発症との関連を明らかにするため、一塩基多型(SNP)を用いて患者対照研究を行った。

B. 研究方法

1) 対象

1999年1月から2000年3月に九州大学病院および関連病院を受診した熱性けいれん患者249名(単純型186名、複雑型63名)と健常対照225名。熱性けいれんは38°C異常の発熱に伴い起こったけいれんで、中枢神経感染症のないものと定義した。単純型は、①てんかんの家族歴がない、②周産期

障害など脳障害の既往がない、③初回熱性けいれんが6ヶ月から6歳、④けいれん持続が20分以内、⑤全身性けいれんで焦点性の要素がない、⑥短時間に頻発しない、⑦けいれん後に後遺症がない、⑧発作間欠期に神経学的異常所見や精神遅滞を認めない、の条件を満たすものとした。

2) 方法

ゲノムDNAは末梢血からMagExtractor (Toyobo, Japan) を用いて抽出した。TLR3, TLR7, TLR9, UNC93B1遺伝子のNCBIに登録されているSNPから、International HapMap Project (www.hapmap.org) を参考に、検出力の高いSNPを選択した。TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, CA) を使用して、ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, CA) で遺伝子多型を決定した。統計解析はカイ二乗検定、Fisher直接確率検定で行った。なお本研究は九州大学遺伝子解析倫理委員会の承認 (No.87) を得ている。

C. 研究結果 (Table 1, 2)

	control n=225	FS			p-value		
		all n=249	simple n=186	complex n=63	all vs. controls	simple controls	complex controls
TLR3 rs3775291(L412F)							
GG	83	102	72	30	N.S.	N.S.	N.S.
GA	108	110	88	22			
AA	34	37	26	11			
TLR7 rs179010 (intron2)							
CC	138	165	132	33	N.S.	N.S.	N.S.
CT	80	77	54	23			
TT	5	9	6	3			
TLR9 rs187084							
TT	123	114	86	28	N.S.	N.S.	N.S.
TC	52	75	56	19			
CC	50	60	44	16			
UNC93B1							
rs3808969							
TT	159	184	139	45	N.S.	N.S.	N.S.
TC	62	58	41	17			
CC	4	7	6	1			
rs11228120							
TT	172	190	144	46	N.S.	N.S.	N.S.
TC	49	54	37	17			
CC	4	5	5	0			
rs308328							
AA	114	102	80	22	0.017	N.S.	0.03
AG	88	110	80	30			
GG	23	37	26	11			

	Control(%)	FS, all(%)	Fisher's p	Odds Ratio [95%CI]
T T A	65.2	61.7	0.265	0.860 [0.660~1.121]
T T G	19.0	23.6	0.084	1.318 [0.963~1.804]
C C G	10.8	12.4	0.441	1.170 [0.784~1.745]
C T A	3.1	0.9	0.012	0.268 [0.090~0.801]

UNC93B1のintron7にあるrs308328において、熱性けいれん患者のGアレルの頻度 (36.8%) が対照 (29.7%) と比べ有意に高かった (p=0.017)。サブグループの解析では、複雑型 (41.4%) と対照との間にGアレル頻度の有意な違いがあり (corrected p=0.039)、単純型では違いはなかった。TLR3、TLR7、TLR9遺伝子多型については、熱性けいれん患者対照間に有意な違いを認めなかった。UNC93B1の3SNPでハプロタイプ解析を行ったところ、頻度は少ないがハプロタイプCTAでは熱性けいれん群 (0.9%) とコントロール群 (3.1%) で有意差を認めた。サブグループ解析では有意差は見られなかった。

D. 考察

UNC93B1は2002年に *C.elegans* のunc93というタンパク質と相同なタンパク質として発見された³⁾。2006年、*N*-ethyl-*N*-nitrosourea mutantで作成した遺伝子変異マウスの解析で、unc93b1がTLR3, TLR7, TLR9のシグナル伝達に重要であることが報告された⁴⁾。その後、単純ヘルペス脳炎患者の中からin vitroでHSV-1刺激に対するIFN産生能の低下が見られた近親婚の患者2名で、UNC93B1の変異が同定された⁵⁾。UNC93B1変異患者末梢血単核球ではHSV-1の他にTLR3, TLR7, TLR9のリガンド刺激に対しても反応が低下していた。UNC93B1は小胞体に存在しTLR3, 7, 9の機能を制御していると考えられている。

熱性けいれんでは、病因・病態の異質性があると考えられている。Aicardiは病因からみた3つの概念的なサブグループを提唱している¹⁾。第1のサブグループは、通常は遺伝的に決められる、“純粋な”熱性けいれん感受性によるもので、最も頻度の高い集団である。第2は発熱疾患による潜在的な脳障害によるもの、第3はてんかん感受

性によるものである。

今回UNC93B1の遺伝子多型解析で、熱性けいれん、特に複雑型とより強い相関がみられたことは、ウイルスの直接侵襲または免疫応答（サイトカインなど）を介した脳障害が熱性けいれんの発症の原因になりうることを示唆すると考えられる。

E. 結 論

UNC93B1遺伝子が熱性けいれん特に複雑型に関連することが示唆された。ウイルスの直接侵襲による炎症性病変が、熱性けいれん特に複雑型の病態に関与している可能性がある。今後ハプロタイプの機能解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) Aicarii J. Febrile convulsions, Epilepsy in children. New York: Raven Press 253-75, 1944
- 2) Kira R. et al. Genetic susceptibility to simple febrile seizures: interleukin-1beta promoter polymorphisms are associated with sporadic cases. *Neurosci Lett.* 384(3): 239-44, 2005
- 3) Kashuba VI. et al. hUNC93B1: a novel human gene representing a new gene family and encoding an unc-93-like protein. *Gene.* 283(1-2) 209-17, 2002
- 4) Tabeta K. et al. The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat Immunol.* 7(2): 156-64, 2006
- 5) Casrouge A. et al. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science.* 314(5797): 308-12, 2006

肺の感染防御におけるICOS/B7h相互作用の役割

林 琢 磨 (信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症)
銭 雪 松 (信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症)
上 松 一 永 (信州大学大学院医学研究科移植免疫感染症)

【研究要旨】

分類不能型免疫不全症の責任遺伝子として、活性型T細胞が発現するICOSの異常が知られている。ICOSのリガンドであるBh7は、ナイーブB細胞に優先的に発現しているが、II型肺胞上皮細胞にも有意な発現が認められた。ヒトII型肺胞上皮細胞株A549は、TNF- α の刺激によりB7hの発現の増強が認められ、ICOS/B7h相互作用により、CD4陽性T細胞の活性化、増殖、IFN- γ 産生を増強した。LPSなどの菌体成分刺激による単球/マクロファージから産生されるTNF- α が、II型肺胞上皮細胞に作用していると考えられた。以上の結果より、肺組織において、ICOS/B7h相互作用を介するT細胞/II型肺胞上皮細胞の作用によって、IFN- γ などによる自然免疫システムが肺に侵入する病原体を排除していることが考えられる。ICOSの異常は、抗体不全だけでなく肺における感染防御も低下させる可能性が示唆される。

はじめに

成人は、呼吸により一日に約2万リットルの空気を肺胞内に取り込んでいる。当然ながら、吸い込んだ空気の中には、有害なカビ、真菌、ウイルスなどが存在し、これら全ては、まず気道や肺胞の表面に付着する。しかし、肺胞の主な役割は、ガス交換であるため、肺胞自身は、他の臓器と異なり粘液層や線毛によって保護されていない。つまり、生体防御機構として有効的に働く粘液層は通常厚く、酸素と二酸化炭素の移動を妨げている。その代わりに、肺胞には別の生体防御機構が備わっていると考えられている。通常、貪食細胞である肺胞マクロファージが、肺胞表面を自由に移動して、真菌、ウイルスなどの外的侵入者と結合し、取り込み殺して消化する。しかし、肺胞マクロファージが、他の肺胞の構築細胞とどのように作用して、外的侵入者に攻撃をかけるのか、その反応機構は明らかとされていない。

I型肺胞上皮細胞は、肺胞構築細胞の90%をしめ、主に酸素と二酸化炭素のガス交換を担っている(図1)。しかし、II型肺胞上皮細胞は、肺胞表面を保護すべく粘液性物質を分泌するとされて

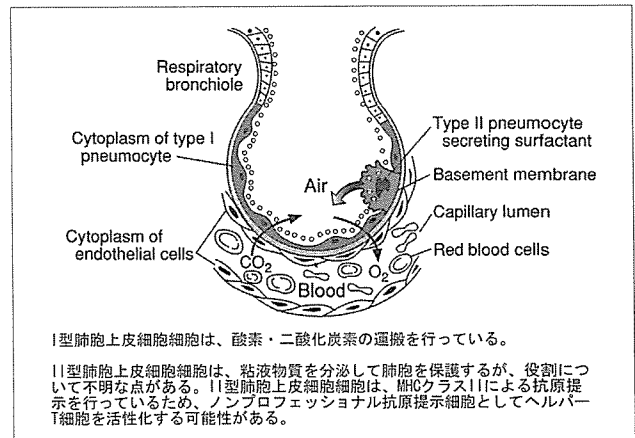


図1. 肺胞上皮細胞における役割

いるが、その役割は明らかとされていない(図1)。病原体などの侵入を阻止するために、上皮系細胞は、通常ノンプロフェッショナル抗原提示細胞として病原体を貪食しMHCクラスIIにより抗原提示し、MHCクラスII/TCR相互作用のもとCD4陽性T細胞などの免疫担当細胞を補助刺激分子によって刺激することが知られている^{1,2}。マクロファージ、樹状細胞、B細胞などの抗原提示細胞は、B7.1 (CD80) とB7.2 (CD86) を補助刺激分子として発現して、MHCクラスII/TCR相互作用のもとCD4陽性T細胞などの免疫担当細胞を補

助刺激分子により刺激する。ナイーブT細胞が活性化されるために、補助刺激分子によるシグナルが、上皮系細胞からナイーブT細胞へと伝達されることが重要とされている。上記以外に補助刺激分子として、誘導性共刺激伝達分子 (ICOS) とそのリガンド (ICOSL/B7h, B7-H2) が免疫機構で働いている³。

我々の研究グループは、II型肺胞上皮細胞が、補助刺激分子またはICOSのリガンドファミリー分子を発現することでT細胞などの免疫担当細胞を有意に活性化するか否か、ヒトII型肺胞上皮培養細胞と遺伝子改変マウスを用いて検討している。誘導性共刺激伝達分子のリガンド (ICOSL/B7h, B7-H2) は、B細胞等の抗原提示細胞において発現しているが、その免疫応答における役割は明らかとされていない。肺胞マクロファージは、真菌、ウイルスなどの外的侵入者に対して著しく活性化することが知られている。肺胞における自然免疫機構でありますII型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージ、T細胞とのコミュニケーションを分子生物学的に明らかにすることを目的とする。

方法

I型肺胞上皮細胞は、毛細血管と隣接し酸素と二酸化炭素のガス交換を行なっているが、II型肺胞上皮細胞の役割は、呼吸する際に肺の拡張を助ける粘液物質 (サーファクタント) を分泌しているが、生体防御における役割は明らかとされていない⁴。おそらく、II型肺胞上皮細胞は、吸気に混入し生体内に侵入した微生物を殺菌し、微生物の感染から肺胞を守っている肺胞マクロファージの貪食作用をアシストしていると思われる⁴。これまで、他の臓器由来の上皮系細胞では、B7-1やB7-2などを細胞表面上に発現させT細胞に対して補助刺激シグナルを伝えていることが報告されている^{5,6}。そこで、我々の研究グループは、ヒトII型肺胞上皮培養細胞株A549とT細胞やマクロファージとのコミュニケーションを補助刺激分子の発現を中心に検討を行った。II型肺胞上皮細胞における微生物に対する生体防御機能が、分子生物学的に明らかとする。

- (1) ヒトII型肺胞上皮培養細胞株A549の細胞表面上にB7hファミリー⁷が発現しているか、RT-PCR法と抗B7h抗体を用いたFACS法により解析した。
- (2) 生体内のII型肺胞上皮細胞において、B7hファミリーが発現しているか、抗B7h抗体を用いた組織免疫染色法により解析した。また、TNF- α 欠損マウスを用いて、生体内でのTNF- α のII型肺胞上皮細胞におけるB7hファミリーの発現に対する関与を検討した。
- (3) 他の臓器の上皮細胞で認められるようにII型肺胞上皮細胞が、ノンプロフェッショナル抗原提示細胞としてヘルパーT細胞の活性化を誘導するか検討した。具体的には、TNF- α で刺激した後ホルマリン固定したA549細胞とCD3刺激を行ったCD4陽性T細胞とを混合培養し、B7-H2によるICOSの刺激依存的にCD4陽性T細胞が活性化されるか抗B7h抗体を用いて検討した。CD4陽性T細胞の活性化の指標として、CD4陽性T細胞の増殖を放射線標識されたサイミジンの取り込みにより検討した。また、CD4陽性T細胞より産生されるサイトカインについては、Cytometric Beads Arrayによって検討した。

結果

RT-PCRとFACSの結果より、ヒトII型肺胞上皮細胞株A549の細胞表面上にB7hファミリーであるB7-H2の発現が認められ、その発現が、TNF- α の刺激によって顕著に誘導されることが明らかとされた⁸ (図2)。そこで、生体内におけるII型肺胞上皮細胞において、B7hファミリーの発現が認められるか、マウスの肺胞の生検組織を用いて組織染色法により検討した。

マウスの肺胞の生検組織において、II型肺胞上皮細胞での著しいB7hファミリーの発現が認められた⁸ (図3)。一方、TNF- α 欠損マウスの生検組織において、コントロールマウスの生検組織と比較してII型肺胞上皮細胞での明らかなB7hファミリーの発現低下が認められた (図3)。つまり、TNF- α 欠損マウスの結果は、生体内においても

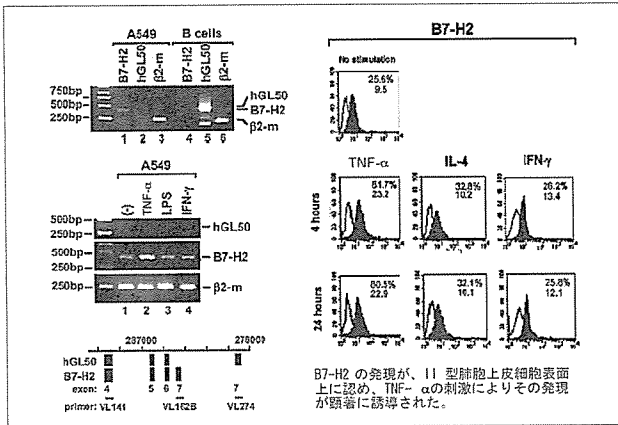


図2. ヒトII型肺胞上皮培養細胞株A549におけるB7hファミリー分子の発現

RT-PCRとFACS解析法により、以下の結果が得られた。ヒトII型肺胞上皮培養細胞株A549において、誘導性共刺激伝達分子(B7h)ファミリーB7-H2が、著しく発現している。一方、ヒトB細胞では、誘導性共刺激伝達分子(B7h)ファミリーhGL50が顕著に発現している。A549細胞では、B7-H2の発現が、TNF- α の刺激により顕著に誘導される。

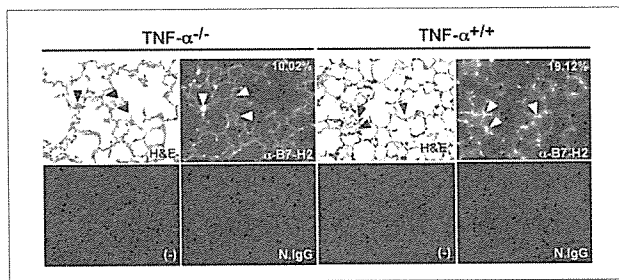


図3. TNF- α 依存的にマウス肺胞上皮細胞におけるB7-H2の発現
マウスの肺胞の生検組織において、II型肺胞上皮細胞での著しいB7hファミリーの発現が認められた。一方、TNF- α 欠損マウスの生検組織において、コントロールマウスの生検組織と比較してII型肺胞上皮細胞での明らかなB7hファミリーの発現低下が認められた。つまり、生体内においてもB7hファミリーの発現は、TNF- α により強く誘導される可能性を示している。

B7hファミリーの発現は、TNF- α により強く誘導される可能性を示している⁸。

ヒトII型肺胞上皮培養細胞株A549においてB7-H2の発現、さらにマウスの肺胞の生検組織でのII型肺胞上皮細胞において、顕著なB7hファミリーの発現が認められた(図2、3)。そこで、他の臓器の上皮細胞で認められるようにII型肺胞上皮細胞が、ノンプロフェッショナル抗原提示細胞としてヘルパーT細胞の活性化を誘導するか検討した。具体的には、TNF- α で刺激した後ホルマリン固定したA549細胞とCD3刺激を行ったCD4陽性T細胞とを混合培養し、B7-H2によるICOSの刺激依存的にCD4陽性T細胞が活性化されるか検討した。CD4陽性T細胞の活性化の指標として、CD4陽性T細胞の増殖、CD4陽性T細胞より産生されるサイトカインについて検討した。その結果、混合培養におけるA549細胞の数依存的にCD4陽

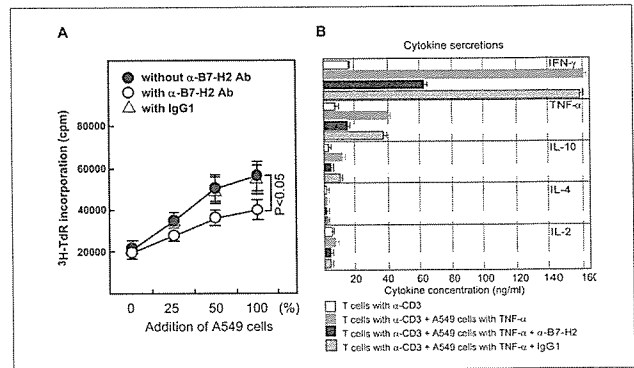


図4. B7h/ICOS相互作用を介したII型肺胞上皮細胞によるCD4陽性T細胞の活性化

TNF- α で刺激した後ホルマリン固定したA549細胞とCD3刺激を行ったCD4陽性T細胞とを混合培養し、B7-H2によるICOSの刺激依存的にCD4陽性T細胞が活性化されるか検討した。混合培養におけるA549細胞の数依存的にCD4陽性T細胞の増殖活性化が認められた。この増殖活性化は、B7-H2によるICOSへの刺激に依存している。さらに、混合培養によって、CD4陽性T細胞が活性化され著しいサイトカインの産生(特にIFN- γ の産生)が認められる。このサイトカインの産生は、B7-H2によるICOSへの刺激依存的誘導である。

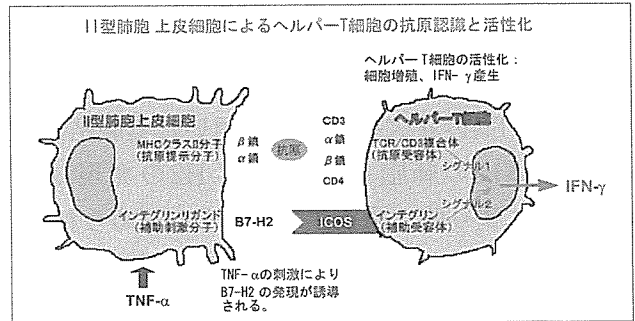


図5. II型肺胞上皮細胞によるCD4陽性T細胞の活性化

生体内においてII型肺胞上皮細胞が、B7-H2を補助刺激分子として発現して、MHCクラスII/TCR相互作用のもとCD4陽性T細胞などの免疫担当細胞を活性化する可能性を示す。

性T細胞の増殖活性化が認められた。この増殖活性化は、B7-H2によるICOSへの刺激に依存していた⁸(図4)。さらに、混合培養によって、CD4陽性T細胞が活性化され著しいサイトカインの産生(特にIFN- γ の産生)が認められた。このサイトカインの産生は、B7-H2によるICOSへの刺激依存的誘導されていた⁸(図4)。つまり、腎臓上皮細胞や腸管上皮細胞で認められるように、生体内においてII型肺胞上皮細胞が、B7-H2を補助刺激分子として発現して、MHCクラスII/TCR相互作用のもとCD4陽性T細胞などの免疫担当細胞を刺激する可能性を示した(図5)。

考察

抗B7-H2抗体を用いた免疫組織染色結果より、A549培養細胞と同様にマウスの個体でのII型肺胞上皮細胞において著しいB7-H2の発現を認めた。

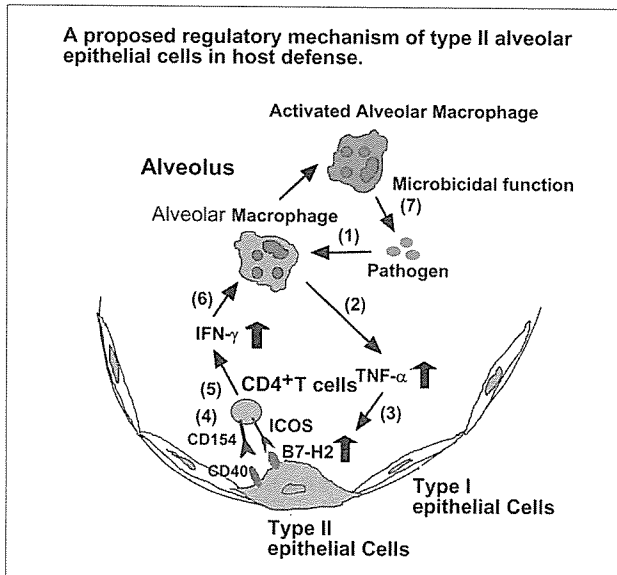


図6. II型肺胞上皮細胞による生体防御機構

肺胞内にバイクテリア等が侵入すると肺胞マクロファージが活性化し、TNF- α を産生する。TNF- α は、II型肺胞上皮細胞でのB7-H2の発現を誘導して、CD4陽性T細胞などの免疫担当細胞を活性化する。活性化されたCD4陽性T細胞は、IFN- γ を産生してマクロファージを活性化する。

さらに、TNF- α 欠損マウスを用いた実験結果より、生体内の肺胞におけるB7-H2の発現は、TNF- α により強く誘導されることが認められた。おそらく、図6で示されている様に、肺胞内にバイクテリア等が侵入すると肺胞マクロファージが活性化し、TNF- α を産生する。TNF- α は、II型肺胞上皮細胞でのB7-H2の発現を誘導して、CD4陽性T細胞などの免疫担当細胞を活性化する。活性化されたCD4陽性T細胞は、IFN- γ を産生してマクロファージを活性化するらしい。そこで、この仮説を実証するために、受容体であるICOS、ICOSリガンドであるB7-H2、それぞれの遺伝子を欠損したマウス (B6. 129P2-*IcosltmIMak*/J、B6. 129P2-*IcostmIMak*/J)を用いて、LPSなどの刺激による肺胞マクロファージのTNF- α などのサイトカイン産生能やバイクテリア等に対する生体防御機能について検討することが必要である。さらに、同遺伝子欠損マウスを用いてアスベスト吸入法によりB7-H2およびICOSの肺細胞マクロファージの活性化誘導作用を組織学的に検討する。さらに、信州大学医学部寄生虫学教室の協力のもと上記遺伝子欠損マウスにニューモシスチス・カリニを吸入感染させて、肺胞内における肺胞マクロファージによる生体防御反応を組織学的に解析することが必要である。

本実験系により、肺組織において、B7h/ICOSを介するT細胞/II型肺胞上皮細胞の作用によって、IFN- γ などによる自然免疫システムが肺に侵入する病原体を排除している可能性が示唆された。分類不能型免疫不全症の責任遺伝子として、活性型T細胞が発現するICOSの異常が知られている。分類不能型免疫不全は、通常、10~20歳の間に発病する。患者によっては、T細胞の機能不良が認められる。肺の感染症、特に肺炎を繰り返すのが共通した症状である。アジソン病、甲状腺炎、関節リウマチなどの自己免疫疾患も認められる。下痢症状を起すことも多く、消化管からの食物の吸収が不良となる。本実験結果を踏まえると、ICOSの発現異常は、粘膜免疫に重大な影響を及ぼし、「肺炎」や「消化管での食物の吸収不良」のリスクファクターとなり得る。分類不能型免疫不全症に対しては、生涯を通じて免疫グロブリンを注入し、感染症の治療には抗生物質を用いるが、この場合、短命となることが懸念される。したがって、さらなる粘膜免疫におけるB7hファミリー/ICOS相互作用の役割を検討結果は、分類不能型免疫不全症の新規治療法の確立に還元されることは明らかである。

参考文献

1. Mezzetti, M., Soloperto, M., Fasoli, A., Mattoli, S., Human bronchial epithelial cells modulate CD3 and mitogen-induced DNA synthesis in T cells but function poorly as antigen-presenting cells compare to pulmonary macrophage. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1991. 87: 930-938.
2. Kalb, T.H., Chuang, M.T., Marom, Z., Mayer, L., Evidence for accessory cell function by class II MHC antigen-expressing airway epithelial cells. *Am. J. Respir Cell. Mol. Biol.* 1991. 4: 320-329.
3. Greenward, R.J., Freeman, G.J. and Sharpe, A.H., The B7 family revisited. *Annu.Rev.Immunol.* 2005. 23: 515-548.
4. Wright, J.R., Immunomodulatory

- functions of surfactant. *Physiological Reviews*. 1997. 77: 931-962.
- 5 . Wahl, P., Schoop, R., Bilic, G., Neuweiler, J., Le Hir, M., Yoshinaga, S.K. and Wuthrich, R.P., Renal tubular epithelial expression of the costimulatory molecule B7RP-1 (Inducible costimulator ligand). *J.Am.Soc.Nephrol*. 2002. 13: 1517-1526.
- 6 . Kurosawa, S., Myers, A.C., Chen L.P., Wang, S., Ni, J., Plitt, J.R., Heller, N.M., Bochner, B.S., Schleimer, R.P., Expression of costimulatory molecule B7-H2 (inducible costimulator ligand) by human airway epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol*. 2003. 28: 563-573.
- 7 . Ling, V., Wu, P.W., Finnerty, H.F., Bean, K.M., Spaulding, V., Fouser, L.A., Leonard, J.P., Hunter, S.E., Zollner, R., Thomas, J.L., Miyashiro, J.S., Jacobs, K.A. and Collins, M., Identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J.Immunol*. 2000. 164: 1653-1657.
- 8 . Qian X, Agematsu K, Freeman GJ, Sugane K, Hayashi T. ICOS-ligand B7-H2, expressed on human type II alveolar epithelial cells, promotes cytokine production by CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 2006; 36 : 906-918.

ヒトにおける免疫グロブリンスイッチ領域の体細胞高頻度突然変異の検討

今井 耕輔 (防衛医科大学校医学研究科小児科学)

森 西 洋 一 (防衛医科大学校医学研究科小児科学)

堀 内 勝 行 (防衛医科大学校医学研究科小児科学)

辻 陽一郎 (防衛医科大学校医学研究科小児科学)

子 川 和 宏 (防衛医科大学校医学研究科小児科学)

野々山 恵 章 (防衛医科大学校医学研究科小児科学)

【研究要旨】

免疫グロブリンのクラススイッチ再構成において、スイッチ領域 (S領域) に体細胞高頻度突然変異 (Somatic Hypermutation, SHM) が導入される。我々は、ヒトIgM S領域へのSHM (Smu-SHM) を解析する方法を確立した。この方法を用いて、in vitroでB細胞のクラススイッチ誘導刺激時にS領域に変異が導入されること、in vivoにおいてswitched memory B細胞のSmu-SHMがNaive B細胞よりも高頻度であることを見いだした。さらに、クラススイッチに障害があり高IgM 症候群を呈するAID変異患者、UNG変異患者では、Smu-SHMが障害されていることを示した。このことから、クラススイッチ再構成にAIDとUNGによるDNAへの変異導入が関わっていることが明らかになった。

A. 研究目的

免疫グロブリンの機能的成熟は、クラススイッチ再構成 (Class Switch Recombination CSR) と可変領域 (V領域) の体細胞高頻度突然変異 (Somatic Hypermutation SHM) によりもたらされる。近年、マウスでは、定常領域の5側のスイッチ領域 (S領域) において、V領域でみられるSHMと同様にクラススイッチ刺激時に突然変異が入ることが示されている。

一方、クラススイッチ障害による先天性免疫不全症候群である高IgM症候群 (HIGM) の原因として、AID (Activation induced cytidine deaminase) および UNG (Uracil DNA glycosylase) が知られているが、AID, UNGの機能については不明な点も多い。

今回の研究では、IgMのS領域へのSHM (Smu-SHM) を、正常ヒトB細胞およびAIDおよびUNG欠損患者B細胞を用いて検討することにより、AIDおよびUNGによる一本鎖DNA切断

後の修復機構の検討およびその障害の解析を行い、ヒトにおけるCSR機構を解明することを目的とした。

B. 研究方法

正常コントロールとして成人4名、小児1名。AID変異患者3例、UNG変異患者2名について検討した。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。

ヒトB細胞のin vitroにおけるSmu-SHMについての検討では、末梢血単核球を抗CD40抗体+IL-4にて刺激し、その前後のgenomic DNAを抽出し、ImuからSmu領域 (1128塩基) をPfuを用いてPCRした。得られた産物をサブクローニングした後、プラスミドをシーケンスし、変異導入について検討した。

In vivoでのSmuへの変異導入率をB細胞の成熟段階別に評価するため、B細胞をCD19⁺CD27⁻IgD⁺ (Naive B) 分画、CD19⁺CD27⁺IgD⁺IgM⁺

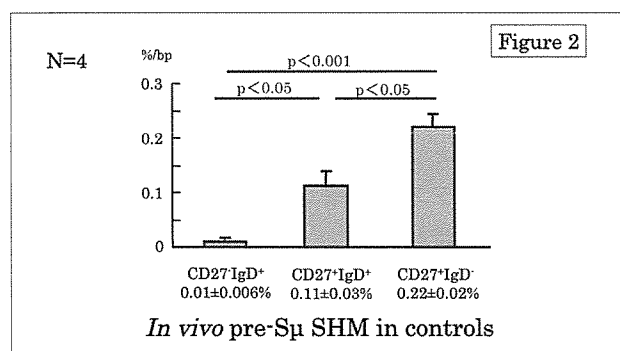
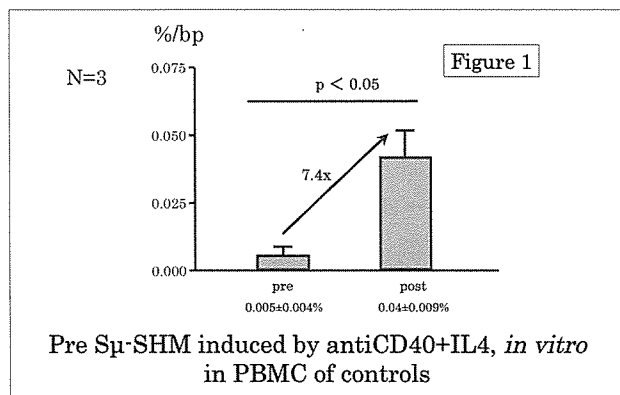
(CSR⁻ memory B) 分画、CD19⁺CD27⁺IgD⁻IgM⁻ (CSR⁺ memory B) 分画にsortingにより分離後、それぞれの分画からgenomic DNAを抽出し、同様の方法でSmu-SHMについて検討した。

変異塩基の分布を検討するため、5'側より100塩基毎に変異塩基数を算定した。また、変異塩基と標的配列の関係について、AIDおよびリン酸化したAIDに結合するRPAの標的配列であるWRCYモチーフと、その相補配列RGYWモチーフに着目して解析した。

更に、AID変異患者3例、UNG変異患者2例でSmuへの変異導入を検討した。なお、患者ではクラススイッチが行われていないため、CD27陽性分画全体を分離し、CD27陰性分画と比較した。

C. 研究結果

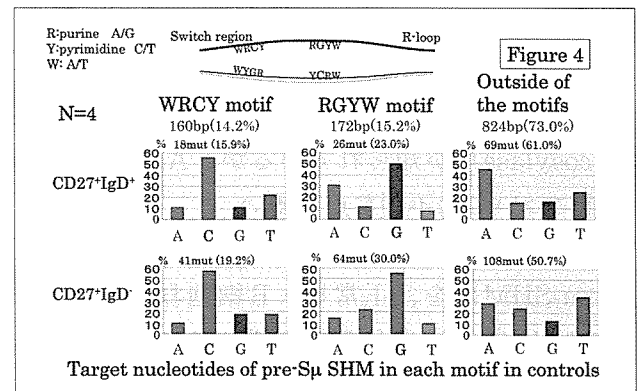
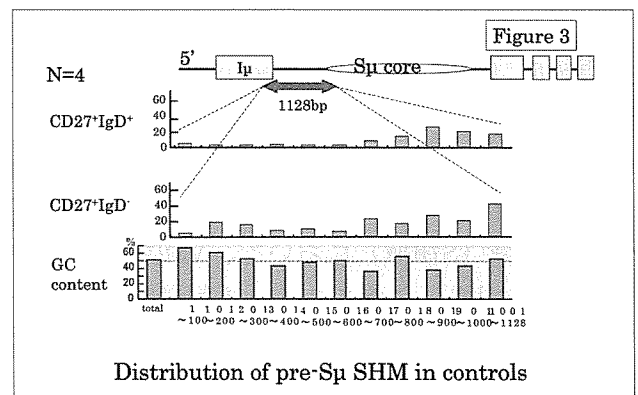
in vitroでの抗CD40抗体+IL-4による刺激前後でSmu-SHMを検討した結果、刺激後に変異は7.4倍上昇しており、クラススイッチの刺激時にS領域に変異が導入されることが明らかになった[Figure 1]。



In vivoにおいて成熟B細胞の各分画のSmu領域の変異導入率は、Naive B 0.01 ± 0.006%、CSR⁻ memory B 0.11 ± 0.03%、CSR⁺ memory B 0.22 ± 0.02%であり、生体内でSmuの変異がCSRの進展状況と相関することが示された[Figure 2]。

前半の500塩基と後半の628塩基と比較すると、有意に後半で変異塩基が多くみられた。この領域のG、Cの量とは関連していなかった。また、Smu-SHMはSmu core領域に近いほど多く見られた。前半の500塩基と後半の628塩基と比較すると、有意に後半で変異塩基が多くみられた。この領域のG、Cの量とは関連していなかった。[Figure 3]。

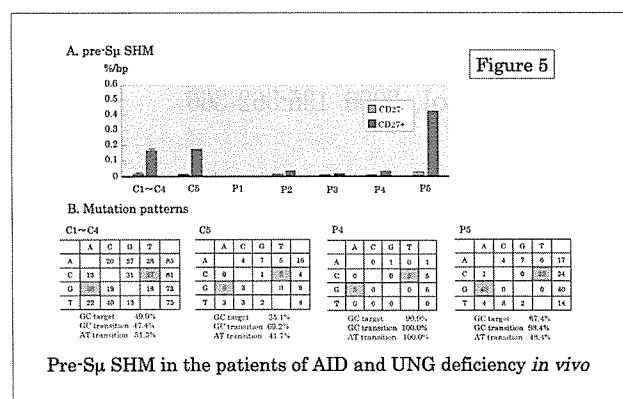
変異塩基と標的配列に関係について検討したところ、RGYW/WRCYモチーフ内では、モチーフ外に比べ変異導入率が上昇していた。この配列はAIDおよびリン酸化したAIDに結合するRPAの標的配列であることが報告されており、Smu領域の変異導入へのAIDの関与が考えられた。また、各モチーフ内での標的塩基について検討した。WRCY motif内ではCへ、RGYW motif内ではGへの変異導入が高頻度に見られており、デオ



キシチジンへの変異導入は主にこのmotif内で生じていることが明らかになった。一方、AおよびTへの変異導入は主にmotif外で行われていた。[Figure 4]。

更に、Smuへの変異導入へのAID、UNGの関与を調べるため、AID変異患者3例、UNG変異患者2例で検討した。

AID変異患者ではCD19⁺CD27⁺分画においてそれぞれ0%、0.03%、0.01%と変異導入率が著しく低下していた。このことからin vivoにおいても、Smu-SHMはAID依存性であることが明らかになった [Figure 5]。



UNG変異患者では、1名でSmu-SHMは減少、もう1名ではむしろ上昇していて、一定の傾向は認められなかった。しかし変異パターンは、GからAまたはCからTへのTransition変異がそれぞれ100%、98.4%と、コントロールの47.6%と比して、著しく上昇していた。このことから、AIDによる変異導入後の反応にUNGが関わっていることが明らかになった [Figure 5]。

(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

以上の結果は、スイッチ領域のSHMの導入にAIDとUNGが関与していることを示し、AIDはDNAに作用するというDNA脱アミノ化モデルを支持するものである。すなわちAIDによりCが脱アミノ化されUになり、これをUNGが認識し、U塩基を取り除くため、無塩基を形成する。この

無塩基をエンドヌクレアーゼが認識しDNA鎖が切断される。DNA切断が両方のDNA鎖でおきれば、DNAの二重鎖切断となり、その修復時に異なるスイッチ領域と結合すればクラススイッチに到ると考えられる。

AID変異患者では、CからUへの変異が起きないためSmu領域のSHMが導入されずDNA二重鎖切断も起きない。その結果クラススイッチも起きないと考えられた。

UNG患者では、導入されたUの除去反応が進まないため、DNA二重鎖切断が起きず、クラススイッチも進行しない。Smu変異に関しては、DNA複製により、CからT、GからAへのトランジション変異が見られると考えられる。U/Gのミスマッチはミスマッチ修復系に認識され、AおよびTへの変異導入を起こしやすい。すなわちDNAポリメラーゼにより修復されるためにUNG患者でもA/Tへの変異導入は正常に見られると考えられる。UNG患者でのSmu変異の解析により、修復反応が可変領域だけでなくスイッチ領域でも行われていること、クラススイッチにいたらなかった場合でも、可変領域と同様の修復により、変異導入につながっていることが明らかになった。

こうしたことから、Smu-SHMは、CSR時のsingle strand DNA切断の導入までの機構を示しており、AIDおよびUNGの関与するCSR上流の障害か、DNA切断後の修復機構の障害か判別可能となり、まだ解明されていない高IgM症候群の病態解明に役立つと考えられる。

E. 結論

クラススイッチにおけるヒトIgM S領域へのSHM (Smu-SHM) を解析する方法を確立し、クラススイッチ再構成にAIDとUNGによるDNAへの変異導入が関わっていることを示した。Smu-SHMを検討する方法は、まだ解明されていない高IgM症候群の病態解明に役立つと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 参考文献

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.

Biochim Biophys Acta. 2006 1762:335-340

Komatsu H, Inui A, Sogo T, Fujisawa T, Nagasaka H, Nonoyama S, Sierro S, Northfield J, Lucas M, Vargas A, Klenerman P.

Large scale analysis of pediatric antiviral CD8⁺ T cell populations reveals sustained, functional and mature responses.

Immun Ageing. 2006 3:11.

Kubo T, Sato K, Kobayashi D, Motegi A, Kobayashi O, Takeshita S, Nonoyama S.

A case of HHV-6 associated acute necrotizing encephalopathy with increase of CD56bright NK cells.

Scand J Infect Dis. 2006 38:1122-1125.

Minegishi Y, Saito M, Morio T, Watanabe K, Agematsu K, Tsuchiya S, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Kaneko H, Kondo N, Tsuge I, Yachie A, Sakiyama Y, Iwata T, Bessho F, Ohishi T, Joh K, Imai K, Kogawa K, Shinohara M, Fujieda M, Wakiguchi H, Pasic S, Abinun M, Ochs HD, Renner ED, Jansson A, Belohradsky BH, Metin A, Shimizu N, Mizutani S, Miyawaki T, Nonoyama S, Karasuyama H.

Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity.

Immunity. 2006 25:745-755.

Komatsu H, Kogawa K, Nonoyama S, Inui A, Sogo T, Fujisawa T, Klenerman P.

Bone marrow transplantation from a pediatric donor with a high frequency of cytomegalovirus-specific T-cells.

J Med Virol. 2006 78:1616-1623.

Kobayashi R, Ariga T, Nonoyama S, Kanegane H, Tsuchiya S, Morio T, Yabe H, Nagatoshi Y, Kawa K, Tabuchi K, Tsuchida M, Miyawaki T, Kato S.

Outcome in patients with Wiskott-Aldrich syndrome following stem cell transplantation: an analysis of 57 patients in Japan.

Br J Haematol. 2006 135:362-366.

Tsuboi S, Nonoyama S, Ochs HD.

Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in α IIB β 3-mediated cell adhesion.

EMBO Rep. 2006 7:506-511.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

ヒトES細胞からの樹状細胞分化誘導法の開発

千 住 覚 (熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野)
西 村 泰 治 (熊本大学大学院医学薬学研究部免疫識別学分野)

【研究要旨】

樹状細胞は、T細胞機能の制御を介して免疫応答を調節する抗原提示細胞である。我々は、昨年度までの研究により、マウスとカニクイザル胚性幹 (ES) 細胞から、免疫学的機能を有する樹状細胞 (ES-DC) を分化誘導する方法を開発している。また、マウスを用いた実験により、ES-DC が抗腫瘍免疫の誘導、あるいは自己免疫疾患の予防において非常に有用であることを証明している。本年度は、ヒトES細胞からES-DCを分化誘導する培養プロトコルの開発を試みた。その結果、マウス由来のOP9細胞をフィーダーとしてヒトES細胞を培養し、さらに、GM-CSF、M-CSF、IL-4等のサイトカインを加えることにより、ヒトのES-DCを作製できることを見出した。ヒトES-DCは、突起を有する不規則な形態を有する浮遊細胞であり、細胞表面にHLA-DR、CD80、CD86、CD83とCD40等の分子を発現していた。また、ヒトES-DCは、HLA-DR拘束性T細胞への抗原提示機能、および同種異系T細胞に対する強い増殖応答刺激活性を有していた。

A. 研究目的

近年の研究から、樹状細胞が、生体内における主要な抗原提示細胞であることが明らかにされた。すなわち、感染性微生物の侵入に際しては、各組織に分布する樹状細胞がこれを認識して貪食し、これに由来する抗原のエピトープを細胞表面のMHC分子上に提示し、抗原特異的なT細胞を活性化することにより、免疫応答が開始される。

我々は、マウスのES細胞を生体外において樹状細胞 (ES-DC) へ分化させる技術を開発している。さらに、ES細胞の段階で遺伝子導入を行ない、これを樹状細胞に分化させることにより、任意の遺伝子を発現する樹状細胞を作製する技術を開発している。以前の研究により、この方法による遺伝子導入により、特定の抗原を発現するES-DCを遺伝的背景が同一のマウス個体へ移入することにより、この樹状細胞が発現する抗原に対するT細胞反応を正あるいは負の両方向へ制御できることを明らかにしている。

本年度の研究では、ES-DCの将来の臨床応用を目指して、ヒトES細胞からES-DCの分化を誘導する培養プロトコルの開発を試みた。

B. 研究方法

本研究は、京都大学再生医学研究所において樹立されたヒトES細胞株 (KhES-1およびKhES-3) の提供を受けて行った。ヒトES細胞の血球細胞系への分化誘導には、これまでのマウスおよびカニクイザルのES細胞を用いた研究成果に準じて、フィーダー細胞共培養法を採用した。フィーダー細胞として、マウス由来ストローマ細胞である、OP9、ST2、PA6の3種類を使用し、その効果を比較した。また、樹状細胞への分化および樹状細胞の成熟を促す因子として、ヒトGM-CSF、M-CSF、IL-4、Flt-3Lなどのサイトカイン、およびLPSの効果を検討した。樹状細胞への分化の確認は、細胞の形態ならびにフローサイトメトリーによる細胞表面分子の解析により行った。

ヒトES-DCのT細胞への抗原提示機能については、まずHLA-DRを共有しない健康なドナーから分離したアロT細胞と、ヒトES-DCとの共培養による、アロ一次混合リンパ球反応 (MLR) の誘導の有無について検討した。さらに、ヒトES-DCにGAD65ペプチドあるいはGAD65蛋白質を負荷した後に、I型糖尿病患者由来のGAD65ペ

チド特異的HLA-DR53拘束性CD4⁺T細胞クローンと共培養し、その後のT細胞増殖反応の誘導を観察することにより、ヒトES-DCによる抗原のプロセッシングと抗原提示機能を検討した。

(倫理面への配慮) 本研究を開始するにあたって、熊本大学倫理委員会および文部科学省ヒトES細胞倫理委員会から、ヒトES細胞使用研究の承認を得た。さらに、ヒトES細胞使用研究の遂行にあたっては、文部科学省のヒトES細胞指針および熊本大学の倫理規定を遵守しつつ、熊本大学倫理委員会ヒトES細胞分科会の監視のもとに、承認された使用計画書に沿って研究を行なった。

C. 研究結果

本研究の結果として、以下の3段階の手順によりヒトES細胞からES-DCを分化誘導できることを見出した。

[第1段階] まず、未分化状態のヒトES細胞をマイトマイシンC処理を行ったOP9フィーダー細胞上へ播種し、分化誘導培養を開始する。ES細胞の分化の進行を見ながら、3日に一度培養液を交換しつつ、通常14-18日間の培養を継続する。

[第2段階] 第1段階の培養の結果として出現する非付着性の細胞を、新たに調整したOP9フィーダー細胞上へ播種する。この段階では、培養液にGM-CSFとM-CSFを添加する。その結果、浮遊性あるいは弱付着性の球形の細胞が出現し、徐々にその数が増加する。第2段階の培養は、ES細胞由来の浮遊細胞の数とOP9細胞の状態により、7-10日間継続する。

[第3段階] 第2段階の培養の結果出現したES細胞由来の浮遊細胞をピペッティング操作により回収し、GM-CSFとIL-4を含む培養液に浮遊させて細菌培養用のディッシュへ播種する。浮遊細胞の形態は、第2段階の後半から第3段階を通じて、球形から突起を有する不規則な形態へと徐々に変化する。第3段階開始後、2-4日目に成熟誘導因子として、TNF- α とLPSを加えてES-DCの成熟を促した。

以上の培養法により、樹状細胞としての形態、細胞表面分子(CD80、CD86、CD40、HLA-DR)、およびアロT細胞への一次MLR刺激性と、CD4⁺T細胞クローンへの蛋白質ならびにペプチド抗原の提示機能を有するES-DCを分化誘導できることを確認した。

D. 考察

以上の結果は、ヒトES細胞から免疫学的機能を有する樹状細胞の分化誘導が可能であることを示すものである。これまでのマウスを用いたES-DCのin vivo投与による免疫制御の研究結果と合わせ、本研究により、ES-DCによる免疫制御法の臨床応用に向けて一步前進したものと考えられる。今後の実用化への課題として、技術的にはアロ反応の問題の解決と、GMP対応の培養技術の開発が求められる。また、ES細胞由来の分化細胞のヒトへの投与について、倫理的な観点からの議論を行う必要があると考えられる。

E. 結論

マウス、カニクイザルに続き、優れた抗原提示機能を有するヒトES-DCの分化誘導技術の開発に成功した。ES-DC技術の臨床応用に向けて、今後さらなる技術的、倫理的課題の解決が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

1) Senju, S., Suemori, H., Zembutsu, H., Uemura, Y., Hirata, S., Fukuma, D., Matsuyoshi, H., Shimomura, M., Haruta M., Fukushima, S., Matsunaga, Y., Katagiri, T., Nakamura, Y., Furuya, M., Nakatsuji, N., and Nishimura, Y.: Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Submitted*

2) Hirata, S., Matsuyoshi, H., Fukuma, D., Kurisaki, A., Uemura, Y., Nishimura, Y.* and Senju, S.* (*equal contribution) Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis -preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL.
J. Immunol. 178: 918-925, 2007.

2. 学会発表

1) Generation of immune-competent dendritic cells from human embryonic stem cells, SENJU Satoru, SUEMORI Hirofumi, HIRATA Shinya, MATSUYOSHI Hidetake, UEMURA Yasushi, FUKUMA Daiki, SHIMOMURA Manami, CHEN Yu-Zhen, FURUYA Masataka, NAKATSUJI Norio, NISHIMURA Yasuharu, 第36回日本免疫学会総会・学術総会、平成18年12月11日～13日 (大阪)

2) Prevention of EAE through induction of Treg cells by transfer of ES-DC-TRAIL/MOG. Shinya Hirata, Satoru Senju, Hidetake Matsuyoshi, Daiki Fukuma and Yasuharu Nishimura. The 8th International Congress of Neuroimmunology. (Nagoya), Oct. 16-19 2006. (Oral presentation、Travel award 受賞)

3) The transfer of ES-DC expressing MOG peptide along with TRAIL prevents MBP induced-EAE via induction of regulatory T cells: 平田真哉、千住 覚、松吉秀武、福間大喜、西村泰治、第36回日本免疫学会学術集会、12月11日～13日 (大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

本年度の研究に関連するものはない

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	血友病等血液免疫疾患	加藤忠明	小児慢性疾患マニュアル	診断と治療社	東京	2006	484-488
宮脇利男	原発性免疫不全症	大関武彦他	今日の小児治療指針第14版	医学書院	東京	2006	225
宮脇利男、 金兼弘和	低または無 γ -グロブリン血症	正岡 徹	静注用免疫グロブリン製剤ハンドブック	メディカルレビュー社	大阪	2006	30-37
金兼弘和、 宮脇利男	免疫系	別所文雄	これだけは知っておきたい. 小児医療の知識	振興医学出版社	東京	2006	21-25
金兼弘和、 宮脇利男	EBV に対する免疫応答	西山幸廣	ヘルペスウイルス学, 日本臨牀増刊	日本臨牀社	大阪	2006	564-567
近藤直実	免疫疾患.	森川昭廣、内山 聖、 原 寿郎	標準小児科学 6	医学書院	東京	2006	288-311
岩田 力、 奥山伸彦	免疫・アレルギー疾患	五十嵐隆、高橋孝雄	New Bedside Memo 小児科 改訂2版	南山堂	東京	2006	397-460

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Alangari A., Abobaker A., Kanegane H., and Miyawaki T.	X-linked lymphoproliferative disease associated with hypogammaglobulinemia and growth-hormone deficiency.	Eur J Pediatr	165	165-167	2006
Aghamohammadi A., Fiorini M., Moin M., Parvaneh., Teimourian S., Yeganeh M., Goffi F., Kanegane H., Amirzargar A. A., Pourpak Z., Rezaei N., Salavati A., Pouladi N., Abdollahzade S., Notarangelo L.D., Miyawaki T., and Plebani A.	Clinical, immunological and molecular characteristics of 37 Iranian patients with X-linked agammaglobulinemia.	Int Arch Allergy Immunol	141	408-414	2006
Taneichi H., Kanegane H., Futatani T., Otsubo K., Nomura K., Sato Y., Hama A., Kojima S., Kohdera U., Nakano T., Hori H., Kawashima H., Inoh Y., Kamizono J., Adachi N., Osugi Y., Mizuno H., Hotta N., Yoneyama H., Nakashima E., Ikegawa S., and Miyawaki T.	Clinical and genetic analyses of presumed Shwachman-Diamond syndrome in Japan.	Int J Hematol	84	60-62	2006
Mitsui T., Tsukamoto N., Kanegane H., Agematsu K., Sekigami T., Irisawa H., Saitoh T., Uchiumi H., Handa H., Matsushima T., Karasawa M., Murakami H., Miyawaki T., and Nojima Y.	X-linked agammaglobulinemia diagnosed in adulthood: A case report.	Int J Hematol	84	154-157	2006
Kobayashi R., Ariga T., Nonoyama S., Kanegane H., Tsuchiya S., Morio T., Yabe H., Nagatoshi Y., Kawa K., Tabuchi K., Tsuchida M., Miyawaki T., and Kato S.	Outcome in patients with Wiskott-Aldrich syndrome following stem cell transplantation: an analysis of 57 patients in Japan.	Brit J Haematol	135	362-366	2006
Yoshino A., Honda M., Kanegane H., Obata K., Matsukura H., Sakazume S., Katada Y., Miyawaki T., Ueda Y., and Nagai T.	Membranoproliferative glomerulonephritis in a patient with X-linked agammaglobulinemia.	Pediatr Nephrol	21	36-38	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Atarod L., Aghamohammdi A., Moin M., Kanegane H., Rezaei N., Rezaei Kalantari K., Amirzagar A.A., Futatani T., and <u>Miyawaki M.</u>	Successful management of neutropenia in a patient with CD40 ligand deficiency by immunoglobulin replacement therapy.	Iran J Allergy Asthma Immunol	6	37-40	2007
Iguchi A., Kobayashi R., Sato ZT., Nakajima M., Kaneda M., and <u>Ariga T.</u>	Successful report of reduced-intensity stem cell transplantation from unrelated umbilical cord blood in a girl with chronic active Epstein-Barr virus infection.	J Pediatr Hematol Oncol	28	254-256	2006
<u>Ariga T.</u>	Gene therapy for primary immunodeficiency diseases; recent progress and misgivings.	Curr Pharm Dsign	12	557-563	2006
Cho K., Nakata K., <u>Ariga T.</u> , Okajima S., Matsuda T., Ueda K., Furuta I., Kobayashi K., and Minakami H.	Successful treatment of congenital pulmonary alveolar proteinosis with intravenous immunoglobulin G administration	Respirology		S74-77	2006
Dogu F., <u>Ariga T.</u> , Ikinciogullari A., Bozdogan G., Aytekin C., Metin A., and Babacan E.	A case of Wilkott-Aldrich syndrome with de novo mutation at exon 4.	Turkish J Pediatr	48	66-68	2006
Uchiyama T., Kumaki S., Ishikawa Y., Onodera M., Sato M., Du W., Sasahara Y., Tanaka N., Sugamura K., and <u>Tsuchiya S.</u>	Application of HSVtk suicide gene to X-SCID gene therapy: Ganciclovir treatment offsets gene corrected X-SCID B cells.	Biochem Biophys Res Commun	341	391-398	2006
Du W., Kumaki S., Uchiyama S., <u>Yachie A.</u> , Chung Yeng L., Kawai S., Minegishi M., Ramesh N., Geha R.S., Sasahara Y., and <u>Tsuchiya S.</u>	A second-site mutation in the initiation codon of WAS (<i>WASP</i>) gene results in expansion of subsets of lymphocytes in an Wiskott-Aldrich Syndrome patient.	Hum Mutat	27	370-375	2006
Shirahata A., Ishii E., Eguchi H., Okawa H., Ohta S., Kaneko T., Konishi S., Sako M., Sekine I., Takahashi Y., Taki M., <u>Tsuchiya S.</u> , Fujisawa K., Bessho F., Horikoshi Y., Mimaya J., Akatsuka J., Miyazaki S., ITP Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology.	Consensus guideline for diagnosis and treatment of childhood idiopathic thrombocytopenic purpura.	Int J Hematol	83	29-38	2006
Itoh T., Minegishi M., Kudo Y., Saito N., Takahashi H., Suzuki A., Narita A., Sato Y., Miura J., Inoue Y., Kameoka J.I., Suwabe N., Imaizumi M., Okuda M., and <u>Tsuchiya S.</u>	Predictive value of the original content of CD34 ⁺ cells for enrichment of hematopoietic progenitor cells from bone marrow harvests by the apheresis procedure.	J Clin Apher	21	176-180	2006
Ishikawa Y., Tanaka N., Murakami K., Uchiyama T., Kumaki S., <u>Tsuchiya S.</u> , Kugoh H., Oshima M., Calos M.P., and Sugamura K.	Phage ϕ C31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cells.	J Gene Med	8	646-653	2006
Koga S.Y., Kumaki S., Ichinohasama R., Munakata M., Haginoya K., Ohashi Y., Tanaka Y., Sakamoto O., Minegishi M., <u>Morio T.</u> , Iinuma K., and <u>Tsuchiya S.</u>	The first infant case with hepatosplenic gammadelta T-cell lymphoma after acute disseminated encephalomyelitis (ADEM)-like exacerbation.	J Pediatr Hematol Oncol	28	741-745	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Minegishi M., Itoh T., Fukawa N., Kitaura T., Miura J., Takahashi H., Suzuki A., Kudo Y., Narita A., Sato Y., Suzuki M., Watanabe T., Wada Y., Takeyama Y., and Tsuchiya S.	Quality of umbilical cord blood CD34 ⁺ cells in a double-compartment freezing bag cryopreserved without a rate-controlled programmed freezer.	Int J Hematol	85	78-84	2007
Imai K., Shimadzu M., Kubota T., Morio T., Matsunaga T., Park Y.D., Yoshioka A., and Nonoyama S.	Female hyper IgM syndrome type 1 with a chromosomal translocation disrupting CD40LG.	Biochim Biophys Acta	1762	335-340	2006
Tsuboi S., Nonoyama S., and Ochs H.D.	Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in α IIb β 3-mediated cell adhesion.	EMBO Rep	7	506-511	2006
Komatsu H., Inui A., Sogo T., Fujisawa T., Nagasaka H., Nonoyama S., Sierro S., Northfield J., Lucas M., Vargas A., and Klenerman P.	Large scale analysis of pediatric antiviral CD8 ⁺ T cell populations reveals sustained, functional and mature responses.	Immun Ageing	3	11	2006
Komatsu H., Kogawa K., Nonoyama S., Inui A., Sogo T., Fujisawa T., and Klenerman P.	Bone marrow transplantation from a pediatric donor with a high frequency of cytomegalovirus-specific T-cells.	J Med Virol	78	1616-1623	2006
Kubo T., Sato K., Kobayashi D., Motegi A., Kobayashi O., Takeshita S., and Nonoyama S.	A case of HHV-6 associated acute necrotizing encephalopathy with increase of CD56bright NK cells.	Scand J Infect Dis	38	1122-1125	2006
Qian X., Agematsu K., Freeman G.J., 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	36	906-918	2006
Takizawa M., Sugane K., and Agematsu K.	Role of tonsillar IgD ⁺ CD27 ⁺ memory B cells in humoral immunity against pneumococcal infection.	Hum Immunol	67	966-975	2006
Yasui K., Kobayashi N., Yamazaki T., Agematsu K., 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	2006
Uehara Y., Agematsu K., Kikuchi K., Matsuzaki S., Imai S., Takamoto M., Sugane K., Sugiura T., Konishi Y., Yoshino N., Takeuchi S., Seo H., Kuramoto S., and Sugai M.	Secretory IgA, salivary peroxidase, and catalase-mediated microbicidal activity during hydrogen peroxide catabolism in viridans streptococci: pathogen coaggregation.	J Infect Dis	194	98-107	2006
Matsukuma E., Kato Z., Omoya K., Hashimoto K., Li A., Yamamoto Y., Ohnishi H., Hiranuma H., Komine H., and Kondo N.	Development of fluorescence linked immunosorbent assay (FLISA) for high throughput screening (HTS) of interferon-gamma.	Allergol Int	55	49-54	2006
Kondo N., Katsunuma T., Odajima Y., and Morikawa A.	A randomized open-label comparative study of montelukast versus theophylline added to inhaled corticosteroid in asthmatic children.	Allergol Int	55	287-293	2006
Teramoto T., Fukao T., Tomita Y., Terauchi Y., Hosoi K., Matsui E., Aoki M., Kondo N., and Mikawa H.	Pharmacokinetics of beclomethasone dipropionate in an hydrofluoroalkane-134a propellant system in Japanese children with bronchial asthma.	Allergol Int	55	317-320	2006
Uehara R., Peng G., Nakamura Y., Matsuura N., Kondo N., and Tada H.	Human milk survey for dioxins in the general population in Japan.	Chemosphere	62	1135-1141	2006