

# 外胚葉形成不全免疫不全症候群 (XL-EDA-ID) の解析

唐 川 修 平 (広島大学小児科)

岡 田 賢 (広島大学小児科)

小 林 正 夫 (広島大学小児科)

## 研究要旨

X連鎖性外胚葉形成不全免疫不全症候群 (XL-EDA-ID) は皮膚、汗腺、歯などの外胚葉の異常に免疫不全を合併するまれな疾患であり、NF- $\kappa$ Bの活性に重要な役割を担うNEMOに異常が認められる。XL-EDA-IDの患者において*IKBK*Gのイントロン6の領域にヘミ接合性新規遺伝子変異769-1 G>Cを同定した。本変異は、splice-acceptor siteに存在し、患者ではスプライス異常があることが予想された。mRNAの検討では、異常なスプライシングを受けたNEMO mRNAと、正常なNEMO mRNAの両方が検出された。このWTとmutantの比率は採血する日によって変動がみられた。患者白血球では炎症性サイトカイン産生の低下、メモリーB細胞の低下、麻疹ウイルスに対する反応性の低下と抗体産生不全が認められた。これらの検査結果から、本症例はNEMOの量的異常によりXL-EDA-IDを発症したことが推測された。

## A. 研究の目的

X連鎖性外胚葉形成不全免疫不全症候群 (XL-EDA-ID) は、歯牙欠損、錐体状歯、粗な頭髪、発汗低下などの外胚葉形成不全と免疫不全を呈するまれな疾患である。本症の原因として、NF- $\kappa$ Bの活性に重要な役割を演じているNEMOの責任遺伝子である*IKBK*Gに異常があることが判明している。

本研究では、*IKBK*Gに新規遺伝子変異を認めたXL-EDA-ID患者の解析を行い、本新規遺伝子異常の機能的異常を明らかにすることから、XL-EDA-IDの病態解明を目的とする。

## B. 研究方法

### 1) 症例

症例は12歳の男児で、幼少期より化膿性髄膜炎3回、急性膵炎2回、化膿性膝関節炎、骨髄炎、蜂窩織炎など重症細菌性感染を繰り返

返し発症していた。これらの起因菌の多くは肺炎球菌であった。また麻疹ワクチン接種後にもかかわらず麻疹に罹患した。軽度の知能低下 (IQ 93) を呈していた。永久歯が7本欠損しており一部が錐体状歯であったが、頭髪、爪、汗腺などに異常は認めなかった。

白血球数やその分画またリンパ球分画に異常はなく、IgGなどの免疫グロブリンや補体にも異常は認めなかった。IgG2およびIgG4は軽度低下していた。肺炎球菌特異的抗体および麻疹抗体はそれぞれ感染の既往があるにもかかわらず陰性であった。さらにワクチン接種の既往にもかかわらずポリオ、ムンプス、日本脳炎の特異抗体は産生されていなかった。しかし風疹、サイトメガロ、EB、水痘帯状疱疹ウイルスなどに対する抗体は正常に上昇していた。PHA幼若化試験は正常であったがNK細胞活性は6%と低下していた。

## 2) シークエンス

患者末梢血より cDNA を抽出し、*IKBK* をシークエンスした。cDNA の解析でエクソン 7 におけるスプライシングの異常が疑われたため、患者末梢血より DNA を抽出し、エクソン 7 とその近傍のイントロンをシークエンスした。さらにエクソン 5 と 8 にプライマーを設定し cDNA を PCR で増幅後 pGEM easy Vector に導入しシークエンスした。

## 3) フローサイトメトリー

細胞内 NEMO タンパク および CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> メモリー B 細胞の測定を行った。さらに CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) で染色したリンパ球を measles lysate とともに培養し、細胞分裂回数を測定することで、麻疹に対するリンパ球の反応性を解析した。

## 4) サイトカイン産生能

患者末梢血から CD3 陽性細胞および CD14 陽性細胞をビーズ法にて純化し、それぞれ IFN- $\gamma$  および IL-12 刺激で 48 時間培養後、それぞれの上清の TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  を Luminex で測定した。

## C. 研究結果

### 1) シークエンス

DNA 解析により、エクソン 7 のスプライスアクセプターサイトにヘミ接合性の新規遺伝子変異 769-1 G>C を同定した (図 1)。cDNA の解析にて、本変異によりスプライシングに異常がおこると考えられた (図 2)。同変異が mRNA に及ぼす影響を調べるため、PCR で増幅した cDNA をベクターに導入しシークエンスをした。解析した 24 クローンのうち 7 クローン (30%) は WT NEMO mRNA であり、17 クローンは種々の異常スプライシング由来の mutant NEMO mRNA

であった (図 3)。この比率は同じ検体を PHA および IL-2 で 4 日間刺激した後におこなった解析では大きな変化はなかったが、異なる日に採血を行った検体および感染合併時に採血した検体では大きく変化し、WT の比率は 5-30% の間で変化していた。これらの結果から、患者では mutant NEMO mRNA だけでなく WT NEMO mRNA が存在しており、その比率は一定ではないことが示された。

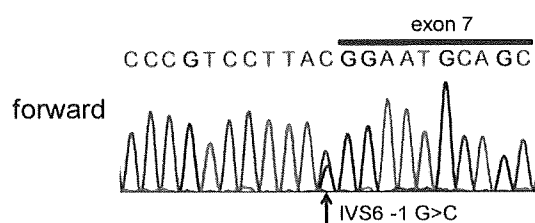


図 1

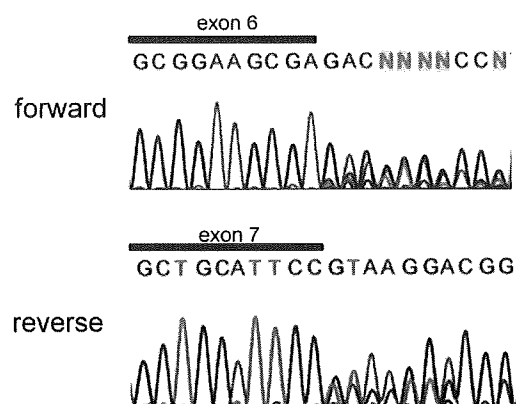


図 2

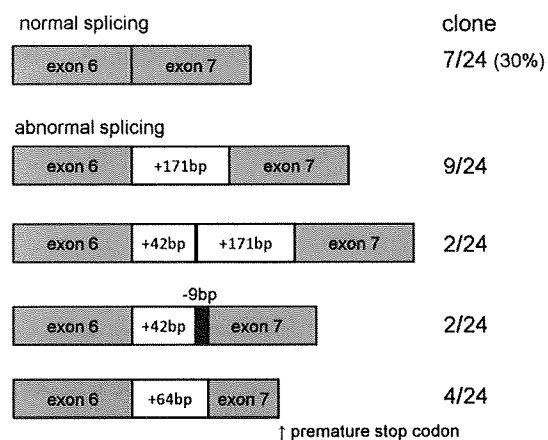


図 3

## 2) フローサイトメトリー

患者において CD27<sup>+</sup> メモリー B 細胞の減少がみられた。また CD3, 4, 8, 19, 14, 56 陽性細胞における細胞内 NEMO タンパクの発現低下を認めた。また CFSE assay によると患者の CD4<sup>+</sup>T 細胞の麻疹に対する分裂能は低下していたが、風疹に対しては保たれていた。(図 4)。

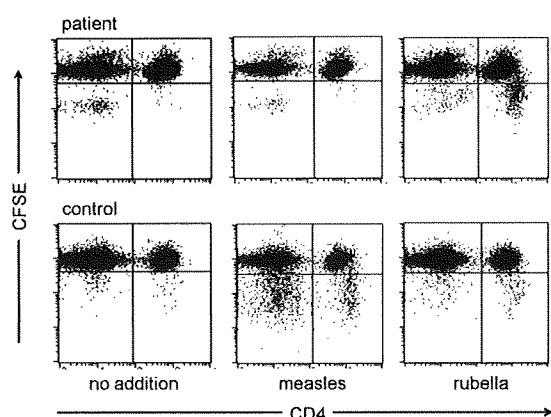


図 4

## 3) サイトカイン産生能

患者 CD3<sup>+</sup> 細胞および CD14<sup>+</sup> 細胞はそれぞれ TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  の産生能が低下していた。

## D. 考 察

自験例では少ないながらも WT NEMO mRNA が存在することが確認された。XL-EDA-ID は *IKBKG* 遺伝子の変異部位によってその表現型が異なることが明らかになっている。自験例は splicing の異常により mutant NEMO が産生されるが、一部は leakage through splice-site mutation によって WT NEMO が産生されると考えられた。XL-EDA-ID を発症した *IKBKG* の splice-site mutation の報告はいまのところ 2 例認める。1 例は家族発症で変異は 768+5 G>A であり、exon4-6 の欠失のた

め胎生致死や乳児期早期の死亡をおこしている。もう 1 例は 1056-1 G>A であり、自験例と同様に WT の NEMO も存在している。興味深いことにその症例では明らかな外胚葉形成不全がなく、免疫不全のみ呈していた。我々の検討結果から、本症例は NEMO の量的低下により XL-EDA-ID を発症していることが推測され興味深い症例と考えられた。自験例では T リンパ球の IL-12 刺激による IFN- $\gamma$  産生能および単球の IFN- $\gamma$  刺激による TNF- $\alpha$  産生能がともに低下していた。これは MSMD の末梢血単核球を用いた検討結果に類似していた。自験例では臨床症状として mycobacterium のような細胞内寄生菌に対する易感染性は呈していないが、XL-EDA-ID の約 4 割で Mycobacterium の感染歴を有することが知られており、注意深い観察が必要と考えられた。

自験例では麻疹の予防接種を受けた後に麻疹に罹患していた。さらに、麻疹に罹患したにも関わらず、麻疹特異的抗体の産生が認められなかった。しかし風疹特異的抗体の産生は正常に認められた。そのため、患者では麻疹に対する特異的な免疫反応の異常が存在すると考えられた。今回の CFSE assay では、CD4<sup>+</sup>T 細胞の麻疹に対する反応性の低下が示されたが、この所見は麻疹に対する抗体産生障害の一側面を示していると考えられた。

## E. 結 論

EDA-ID の新規遺伝子変異を同定した。NEMO の量的な低下により EDA-ID を発症していると推測された。

## F. 研究危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 学会発表

A novel splicing mutation of NEMO with X-linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency. Karakawa S, Okada S, Tumura M, Mizoguchi Y, Kawai T, Nishikomori R, Yasunaga S, Takihara Y, Kobayashi M: 51st American Society of Hematology Annual Meeting, December 5-8, 2009

Effective hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning for patients with chronic granulomatous disease. Mizoguchi Y, Miki M, Kajiume T, Nakamura K, Kawaguchi H, Sato T, Kobayashi M: 51st American Society of Hematology Annual Meeting, December 5-8, 2009

Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Reduced Intensity Regimens in Patients with Severe Congenital Neutropenia without Malignant Transformation. Kobayashi Y, Nakamura K, Sato T, Kobayashi M: 51st American Society of Hematology Annual Meeting, December 5-8, 2009

新規 NEMO 遺伝子変異を認めた外胚葉形成不全免疫不全症候群の解析

唐川修平 岡田賢 溝口洋子 津村弥来 小林正夫 河合朋樹 西小森隆太

第 71 回日本血液学会学術集会 2009 年 10 月 23-25 日

先天性好中球減少症と血液腫瘍

岡田賢 中村和洋 小林正夫

第 71 回日本血液学会学術集会 2009 年 10 月 23-25 日

### 2. 論文発表

Nakamura K, Miki M, Karakawa S, Sato T, Kobayashi M: Deficiency of regulatory T cells in children with autoimmune neutropenia. *British Journal of Haematology*, 145: 642-647, 2009.

Miki M, Ono A, Kawamura A, Miyagawa S, Onodera R, Kurita E, Hiraoka A, Hidaka F, Mizukami T, Nunoi H, Kobayashi M: Successful bone marrow transplantation in a patient with chronic granulomatous disease complicated by serious infections using nonmyeloablative conditioning. *Pediatrics International* 51: 838-841, 2009.

Hara K, Kajiume T, Kondo T, Sera Y, Kawaguchi H, Kobayashi M: Respiratory complications after haematopoietic stem cell transplantation in a patient with chronic granulomatous disease. *Transfusion Medicine* 19: 105-108, 2009.

Okada S, Konishi N, Tsumura M, Shirao K, Yasunga S, Sakai H, Nishikomori R, Takihara Y, Kobayashi M: Cardiac infiltration in Early-Onset Sarcoidosis Associated with a Novel Heterozygous Mutation, G481D, in CARD15. *Rheumatology* 48: 706-7, 2009.

Kajiume T, Ohno N, Sera Y, Kawahara Y, Yuge L, Kobayashi M: Reciprocal expression of Bmi1 and Mel-18 is associated with the functioning of primitive hematopoietic cells. *Experimental Hematology* 37:857-866, 2009.

Shiohara M, Shigemura T, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Sakashita K, Asada K, Ishii E, Koike K, Chin M, Kobayashi M, Koike K: Ela2 mutations and clinical manifestations in familial

congenital neutropenia

Journal of Pediatric Hematology Oncology 31:  
319-324, 2009.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

#### 参考文献

Doffinger R, Smahi A, Bessia C, et al. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. Nat Genet. 2001;27:277-285.

Fusco F, Pescatore A, Bal E, et al. Alterations of the IKBKG locus and diseases: an update and a report of 13 novel mutations. Hum Mutat. 2008;29:595-604.

Orange JS, Levy O, Brodeur SR, et al. Human nuclear factor kappa B essential modulator mutation can result in immunodeficiency without ectodermal dysplasia. J Allergy Clin Immunol. 2004;114:650-656.

Nishikomori R, Akutagawa H, Maruyama K, et al. 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. 2004;103:4565-4572.

Orstavik KH, Kristiansen M, Knudsen GP, et al. Novel splicing mutation in the NEMO (IKK-gamma) gene with severe

immunodeficiency and heterogeneity of X-chromosome inactivation. Am J Med Genet A. 2006;140:31-39.

Eric P. Hansen, Linda Monaco-Shawver et al. Hypomorphic NEMO mutation database and reconstitution system identifies phenotypic and immunologic diversity. J Allergy Clin Immunol. 2008;122:1169-1177

# Shwachman-Diamond Syndrome症例の走化能解析

布井博幸 (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)  
唐澤直希 (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)  
水上智之 (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)  
松山美静代 (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)  
小原めぐみ (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)  
澤田浩武 (宮崎大学生殖発達医学講座小児科学分野)  
山内明 (株式会社 ECI 研究1部)

## 研究要旨

低身長精査の目的で来院された8歳女児が、腹部エコー検査で脾臓の著明な脂肪浸潤と脾実質萎縮所見を契機に、脾外分泌不全、膝関節骨端軟骨の石灰化、好中球減少症などを呈している事がわかり、SBDS 遺伝子検査から Shwachman-Diamond Syndrome(SDS) と診断された。同症例で fMLP に対する Taxiscan による走化能解析を行い、velocity も directionality も低下していたこと、および、fMLP 低濃度 ( $10^{-10}$ - $10^{-9}$ M) での directionality の異常がコントロールに対して顕著であり、SBDS 蛋白が velocity も directionality にも関わる PI3 Kinase や SHIP1 などのシグナル伝達機構に関与し、走化能異常をきたしているのではないかと考察した。

## A. 研究の目的

Shwachman-Diamond Syndrome(SDS) は先天性骨髄不全症候群の一つである。骨髄不全と脾外分泌異常を主徴とし、成長障害、易感染性、骨異常、時に発達障害を伴っている。その病因遺伝子は2003年に Boocock らによりクローニングされた SBDS (Shwachman-Bodian-Diamond syndrome) 遺伝子であり、多くの患者でその変異が確認され、ホットスポット (IVS2:258 + 2T>C と TA>CT[K62X]) も報告されている (1,2)。

SBDS がコードする SBDS 蛋白は種を越えて広く存在する。最近、SBDS 蛋白には類似のドメイン構造として、FYSD (Fungal Yhr087wp Shwachman domain) が報告された。FYSD ドメインは RNA 代謝に関

与していると思われており、しかも、SDS での遺伝子変異が多く局在するドメインとして報告され、欠失変異は致死的であるが、missense 変異により軽症化するようである (2)。SBDS 蛋白は多機能蛋白質で、F-actin と共局在し細胞の遊走に関与する (3) ことや、核小体に存在し細胞周期に依存して細胞増殖に関与したり (4)、リボソームの生成や各種のストレスセンサーとなっている (5) 等が報告されているが、まだ十分その機能については解明されていない。

Shwachman Diamond Syndrome の走化能について、2004年 fMLP 濃度勾配に対する方向性低下が指摘されていた (6)。2007年 Nishio, M., Franca-Koh, J., Vaillancourt, M., らは走化因子受容体後の PtdIns(3,4,5)P3 シグナル伝達に関わる

PTEN や SHIP1-KO マウス等を作製し、好中球の走化能 (velocity や directionality) に関わる遺伝子をおきらかにした (7,8,9)。これらの知見に加え、Orelia らは SDS 患者好中球で 2009 年 fMLP (10-7M) 刺激で F-actin 形成が遅れていることが走化能低下の原因ではないかと述べている (3)。

今回、我々は上記のホットスポットで欠失変異である IVS2:258 + 2T>C と FYSD ドメインの missense 変異である 97A>G[K33E] のヘテロ接合変異から SDS 患者と診断した。この SDS 患者で、一個一個の細胞の動きを解析出来る Taxiscan (10) をもちいて、好中球走化能検査する事が出来た。同患者の走化能低下についてので、上記の最近の観点から若干の考察を加え、報告する。

## B. 症例：8 歳，女児

【主訴】 低身長 (-2.5SD), 白色便

【現病歴】 在胎 41 週，2576g, 48.4cm で出生。

乳児期より白色便認め、生後より 4 ヶ月時に肺炎罹患した際に体重増加不良、肝機能異常を指摘され、精査されたが原因不明であった。3 歳時に肝機能正常化した。5 歳時に低身長と白色便持続するため当科外来紹介となった。腹部エコーで総胆管最尾側までの描出不能、腹部 CT で脾に著明な脂肪浸潤と萎縮を認め膵外分泌の機能検査目的で入院となった。

【家族歴】 家族内に著明な低身長および肝機能異常なし

【既往歴】 4 か月, 6 か月：肺炎で入院，肝機能異常 (3 歳時に正常化)

乳児期～：反復性中耳炎，年に 4～5 回熱発

5 歳：熱性けいれん

【入院時現症】：身長：111.7cm (-2.5SD),

体重：18.9kg (-1.46SD)、体温：36.2℃  
心拍数：70bpm 血圧：94/54mmHg, 呼吸数：12/min SpO<sub>2</sub>: 99% (room air)

眼瞼結膜：貧血なし，眼球結膜：黄疸なし，  
口腔内：所見なし頸部リンパ節：腫脹なし，  
肺音：no rale, 呼吸音左右差なし，心音：  
S1(→), S2(→), S3(-), S4(-), 腹部：soft  
and flat, 肝腫大なし，腸蠕動音減弱なし，  
圧痛なし

### 【入院時検査結果】

生化学検査 (表 1)：アミラーゼ低値、好中球減少が認められる。

膵外分泌機能検査：膵アミラーゼ：15 IU/L (基準値 61～177), リパーゼ：3.8 IU/L (基準値 10.8～42.9), トリプシン：<50 ng/mL (基準値 110～460), PABA 排泄率：34.3% (基準値 72 ± 12.8%)，

腹部エコー：膵臓は全体的に高エコーであり，総胆管最尾側までの描出不能

腹部 CT (図 1a)：膵臓の著明な脂肪浸潤と膵実質萎縮を認める

膝関節 X 線所見 (図 1b)：6 歳時骨年齢で 5 歳 0 ヶ月相当と判断、また、年齢に比して大腿骨骨端軟骨の石灰化を認められる。

内分泌検査：身長は 111.7cm (-2.5SD)、クロニジン、アルギニン負荷試験にて GH 分泌不全は否定

好中球現症と骨髓機能検査：(3 ヶ月以上持続する好中球減少 < 1500/μL、骨髓低形成 (異常細胞，芽球なし)、骨髓染色体 46,XX,del(20)(q11.2q13.1) 5/20、46,XX 15/20 のモザイク

遺伝子解析結果 (図 2)：SBDS ゲノム遺伝子解析で、母由来の 258 + 2 T > C、父由来の 97A > G のコンパウンドヘテロを認め、SDS と確定診断した。

Taxiscan による好中球走化能検査：図 3 には各 fMLP 濃度での縦軸に走化

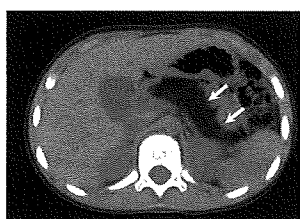
速度 (velocity 3a) と横軸に方向性 (directionality 3b) を示した。コントロールに比べ、患者好中球では全ての fMLP 濃度での velocity が低下していたが、directionality は低濃度 fMLP ( $10^{-10}$  -  $10^{-9}$ ) で低下が認められた。至適濃度の fMLP ( $10^{-8}$ ) では velocity も directionality もほぼコントロールと同等であったが、それより高濃度になると、走化速度の減少が著明であった。

### 検査所見

<Chemistry>		IgG:	781	mg/dl	
総蛋白:	6.10	g/dl	IgA:	57	mg/dl
アルブミン:	4.22	g/dl	IgM:	48	mg/dl
尿素窒素:	10.4	mg/dl	IgE:	38.1	mg/dl
クレアチニン:	0.48	mg/dl	PIVKA-II:	20	mau/ml
総ビリルビン:	1.1	mg/dl	フェリチン:	45.3	ng/ml
直接ビリルビン:	0.3	mg/dl	IGF-I:	104	ng/ml
グルコース:	103	mg/dl	1,25-(OH) <sub>2</sub> vit.D	58.4	pg/ml
AST:	28	IU/L	<CBC>		
ALT:	23	IU/L	白血球数:	4900	/μL
ALP:	788	IU/L	好中球:	1274	/μL
LD(LDH):	223	IU/L	赤血球数:	377万	/μL
CK:	70	IU/L	ヘモグロビン:	10.8	g/dL
AMY:	15	IU/L	ヘマトクリット:	31.5	%
CRP:	0.01	mg/dl	血小板数:	9.5万	/μL
Na:	138	mEq/l	<Coaguation>		
K:	3.6	mEq/l	PT-INR:	1.53	
Cl:	98	mEq/l	APTT:	37.4	sec
Ca:	8.5	mg/dl	AT III:	82	%
Mg:	2.1	mEq/l			

表 1. 入院時生化学検査結果

1a: 腹部CT検査



1b: 膝関節XP検査

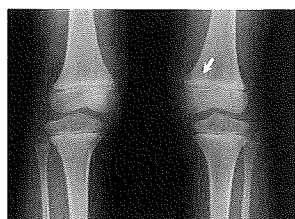


図 1. 腹部 CT(a)、膝関節 X 線検査 (b)

### SBDSゲノム解析結果

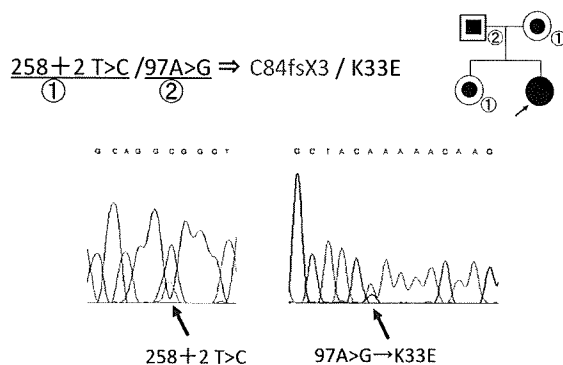


図 2. SBDS 遺伝子解析結果

### Taxiscanによる走化能解析

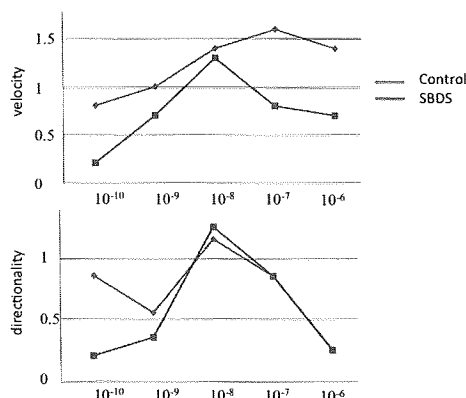


図 3. fMLP に対する Taxiscan による走化能検 (上段: velocity 解析、下段: Directionality)

### D. 考 察

Shwachman-Diamond Syndrome(SDS)の原因遺伝子 SBDS は 7 番染色体に 1,650bp で 5 exon に 250aa としてコードされている。偽遺伝子 (pseudogene) が存在し、gene conversion による変異のホットスポットとして、IVS2:258 + 2T > C と、TA > CT[K62X] の変異が報告されている。我々の患者でもホットスポットの一つである IVS2:258 + 2T > C が確認され、もう一方の allele に 97A > G [K33E] という変



異を持つヘテロ接合変異が確認された (図 2)。Shammas らによると、FYSD ドメインに遺伝子変異が多く局在し、欠失変異は致死的であるが、missense 変異により軽症化すると考えられている (2)。我々の患者では IVS2:258 + 2T > C は欠失変異で、一方は 97A > G [K33E] という missense 変異で、*Ylr022cp* 変異とその類似分子を用いた遺伝的相補解析 (2) によると、K33E 近傍の E28A, E44G 変異とも相補性を持っている所から考えると軽症型なのかもしれない。

我々は、Taxiscan を用いて、1 個 1 個の好中球 *and orthologues* の動きを観察する事により、走化能解析を行った。好中球走化能には遊走方向に対する directionality と方向性とは関係のない遊走速度 (velocity) の 2 つの要素を時間的に分析した。前者 (directionality) には PTEN ではなく SHIP1 という PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> phosphatase が重要な役割を果たしていることが、後者に関しては PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> kinase  $\gamma$  が深く関わっている事が報告されている (7)。しかしこれだけでは走化能の一部を説明出来るにすぎない。Vaillancourt らの総説 (9) では、PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> の代謝調節系の他に何らかのコンパスか細胞骨格形成からの Feedback 機構が必要であろうと述べている (図 4)。

我々の SDS 患者好中球走化能解析の結果 (図 3) では、コントロールに比べ、患者好中球は、1) 低濃度 fMLP ( $10^{-10}$  -  $10^{-9}$  M) で好中球走化速度 (velocity) および好中球走化方向性 (directionality) とともに低下していた。しかし、2) 至適濃度の fMLP ( $10^{-8}$  M) では velocity も directionality もほぼコントロールと同等となり、3) 高濃度 ( $10^{-8}$  -  $10^{-6}$  M) では directionality はほとんど同じく低下していたが、SDS 患者好中球では velocity の低下も認められた。SDS

患者好中球の fMLP receptor はコントロールと同等に存在している (6) ことを前提にして考えると、以降のシグナル伝達系の異常と考えられる。高濃度では directionality がコントロールと SDS 患者で差がないことから、SHIP1 による脱リン酸化が十分追いつかず directionality が低下している可能性がある。低濃度での directionality 低下については、SHIP1 の制御に SBDS が関与している事が考えられる (7)。しかし、velocity が fMLP の全濃度でコントロールよりも低下していることから、変異 SBDS 蛋白と PI3K $\gamma$  などの PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 代謝系にも何らかの障害が引き起されている可能性もある。至適濃度の fMLP ( $10^{-8}$ ) での velocity と directionality がコントロールと SDS 患者でほぼ同等であったことについては、Nishio, Franca-Koh, らの報告では幅広い fMLP 濃度で測定されておらず、fMLP による走化能の至適濃度に差がないか、さらに細かく濃度をふって検討する必要がある。

Orelia らは (3) fMLP ( $10^{-7}$  M) 刺激で F-actin 形成が遅れていることが SDS 患者好中球走化能低下の原因ではないかと述べている。Vaillancourt らが提唱している「方向性センサー」モデル (図 5) で PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> 代謝系から、その下位の胞骨格形成にも SBDS 変異蛋白が関わっているかもしれない。実際、Heather L. Ball らは HEK293 細胞を用いて、SBDS が 27 蛋白 (RNA 合成に関わる Large ribosome サブユニット、RPL4, DNA 修復に関わる DNA-PK, や RPA70) に結合おり、細胞の種々のストレスに対応する機構の一部としての機能が有るのではないかと述べている (5)。SBDS 蛋白は広く種を越えて、そのホモログが存在しており、細胞の機能と関わっているようである。

走化能解析は Taxiscan をはじめ解析方法が進んできたこと、遺伝子改変が可能になったことなどでより多くの知見が積み上げられつつある。さらなる解明が進むと考えている。

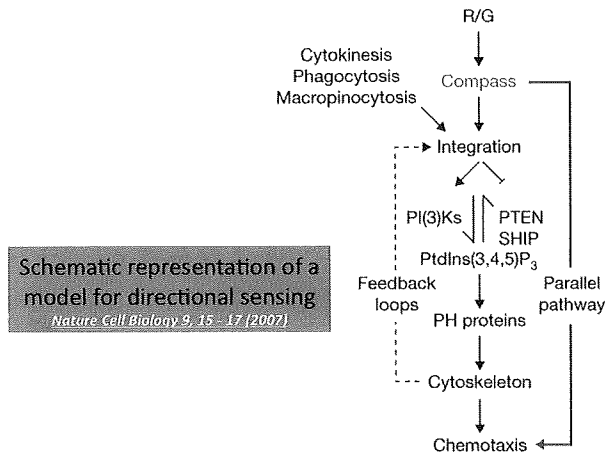


図 4. Vaillancourt らの提唱する方向性感知モデル

## E. 結 論

今回 Taxiscan による走化能解析を行う事により、単に directionality 障害だけでなく、むしろ PtdIns(3,4,5)P3 代謝系との関与した Velocity にも問題があり、SDS 疾患で原因遺伝子 SBDS と走化能に関わる分子との解明が待たれる。

## 参考文献

- 1) Taco W. Kuijpers, Blood. 106, 356-361:2005
- 2) Camille Shammas et al., J Bio Chem. 280, 19221-19229: 2005
- 3) Orelia C, Kuijpers TW. Haematologica. 94, 409-13: 2009
- 4) Karyn M. Austin, et al. Blood. 106, 1253-1258:2005

5) Heather L. Ball, et al., Human Molecular Genetics, 18,3684-3695, 2009

6) Stepanovic V, et al., Cell Motil Cytoskeleton. 57, 158-74: 2004

7) Nishio, M., et al., Nature Cell Biology 9, 36-4: 2007

8) Franca-Koh, J., et al., Nature Cell Biology 9, 15-17: 2007

9) Vaillancourt, M., et al., Cellular Signalling 18, 2022: 2007

10) Nitta N, et al., J Immunol Methods. 320, 155-63:2007

## F. 研究危険情報

なし

## G. 研究発表

<2008 年度論文 >

1. Successful treatment of refractory donor lymphocyte infusion-induced immune-mediated pancytopenia with rituximab.

Kato I, Umeda K, Awaya T, Yui Y, Niwa A, Fujino H, Matsubara H, Watanabe K, Heike T, Adachi N, Endo F, Mizukami T, Nunoi H, Nakahata T, Adachi S. Pediatr Blood Cancer. 2010;54(2):329-31.

2. Cytomegalovirus infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia showing hypersensitivity to granulocyte-macrophage colony stimulating factor.

Moritake H, Ikeda T, Manabe A, Kamimura S, Nunoi H.

Pediatr Blood Cancer. 2009 ;53(7):1324-6.

3. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome and avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. Kawachi S, Luong ST, Shigematsu M, Furuya H, Phung TT, Phan PH, Nuno H, Nguyen LT, Suzuki K. J Infect Dis. 2009;200(4):510-5.

H. 知的財産圏の出現・登録状況、参考文献  
なし

# 特異な変異c.910G>Aを認める家族性地中海熱2例での MEFV遺伝子発現と発症病態の解析

和田 泰 三 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

刀 祢 裕 美 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

東 馬 智 子 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

笠 原 善 仁 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

谷内江 昭 宏 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

## 研究要旨

家族性地中海熱症例で特異な変異 c.910G > A をホモ接合体性に認める2症例について、MEFV 遺伝子発現ならびに蛋白発現の特徴を検討した。本変異は exon2 の最終塩基の変異で、主として exon 2 が skipping するスプライス異常が生じることが mRNA ならびに蛋白レベルで確認された。さらに、exon 2 を欠損した MEFV 遺伝子を導入した細胞では、pyrin 蛋白の発現低下や分布異常が起こる可能性が示唆された。これらの結果より、すでに報告されている、ミスセンス変異以外にも pyrin 蛋白発現量の低下や異常蛋白発現による炎症制御異常が惹起されることが明らかにされた。

## A. 研究の目的

家族性地中海熱 (familial Mediterranean fever, FMF) は周期性発熱、無菌性漿膜炎、関節痛 (炎)、滑膜炎をきたす遺伝性炎症性疾患であり、自己炎症疾患の一つである。地中海沿岸の民族に多くみられる疾患のため地中海熱と呼ばれているが、日本でも 1976 年に最初の症例が報告された。1997 年に FMF の責任遺伝子として *MEFV* が同定されたことから、原因不明の周期性発熱の診断過程において本疾患が鑑別にあげられるようになり、最近では国内でも症例報告が相次いでなされている。

FMF は常染色体劣性遺伝形式をとるとされる。しかし、臨床的に FMF と診断された例でも *MEFV* 変異が見つからない例、あるいはヘテロ接合体例も報告されている。したがって、現段階では遺伝子検査はあくまでも診断の一助にすぎず、確定診断に苦慮するこ

とが多い。一方、発作時の患者の苦痛は大きく、合併症の重篤性からも正確に本疾患を診断する方法の確立が必要である。

*MEFV* 遺伝子がコードする蛋白は pyrin と呼ばれ、N 末端に PYRIN ドメイン (PYD) をもつ。Pyrin は PYD を介して炎症におけるシグナル伝達複合体である inflammasome の機能を抑制し、炎症の遷延を防いでいると考えられている。したがって FMF の本態は pyrin の機能低下による炎症制御の破綻と考えられているが、なぜコルヒチンがよく効くのか、同じ遺伝子変異があっても臨床的に無症状な phenotype があるのはなぜかなど、よくわかっていない部分が多い。FMF 患者の pyrin 蛋白の機能解析法が確立すれば、疾患の確実な診断が可能となるだけでなく、炎症性サイトカイン制御に関わる pyrin および関連蛋白の機能をさらに明らかにすることが可能となる。

本研究では、最近経験した c.910G>A 変異を有する 2 例について、MEFV 遺伝子発現の特徴と病態との関連を検討した。

## B. 研究方法

1) MEFV 遺伝子発現；末梢血中ならびに LPS 刺激後の MEFV 遺伝子発現解析

正常対照ならびに c.910G>A 変異を有する患者末梢血より新鮮分離された顆粒球ならびに単核球から cDNA を調整した。さらに、分離した細胞について、無刺激あるいは種々の濃度の LPS を添加、培養後に cDNA を調整した。これらの cDNA より、MEFV 遺伝子発現プロフィール（総発現量ならびに、alternative splicing 量）を比較して検討した。MEFV mRNA 発現は、densitometry にて半定量した。

2) Pypin 蛋白発現と細胞内局在

上記と同様に単球、顆粒球を分離。一部の実験では LPS 刺激後の細胞を採取、それぞれサイトスピン標本を作成。あるいは、Immunoblotting 用サンプルを調製した。また、核成分と細胞質成分を超遠心法により分離した後に同様の試料調製を行った。酵素抗体法により pypin 蛋白の免疫染色を施行、その局在と核/細胞質分布プロフィールを解析した。また、immunoblotting 用サンプルを用いて pypin 蛋白のサイズ解析を施行。LPS 刺激、あるいは c.910G>A 変異に伴う蛋白発現プロフィールの変化を検討した。

3) MEFV 遺伝子ならびに変異 MEFV 遺伝子導入による pypin 蛋白発現の検討

正常、G304R 変異ならびに exon 2 欠損の MEFV 遺伝子について、GFP を標識としたプラスミドを作成、HEK293T 細胞に遺伝子導入した。GFP を指標として、フロー

サイトメトリーならびに蛍光免疫染色により蛋白発現の特徴を検討した。また抗 pypin 抗体を用いて、直接 pypin 発現パターンも比較検討した。

## C. 研究結果

1) MEFV 遺伝子変異の特徴と MEFV mRNA 発現プロフィール

家族性地中海熱を示唆する臨床症状を示す異なる家系の 2 症例において、exon 2 の最終塩基の変異である c.910G>A をホモに認めた（図 1）。これらの症例について、MEFV mRNA 発現の特徴を解析した。単核球、顆粒球いずれを用いた場合も、正常対照では full size の mRNA がほとんどを占め、exon 2 skipping はわずかに認められるのみであった。一方、c.910G>A 変異を有する患者 2 例では、exon 2 skipping が大部分に生じていた。従来、本変異はミスセンス変異 G304R を起こすのみと考えられていたが、G304R を有する full size mRNA はごくわずかししか認めなかった（図 2）。短い product が exon 2 を欠損する塩基配列を示すことは、453 bp バンドを切り出して精製、塩基配列を決定して確認した。

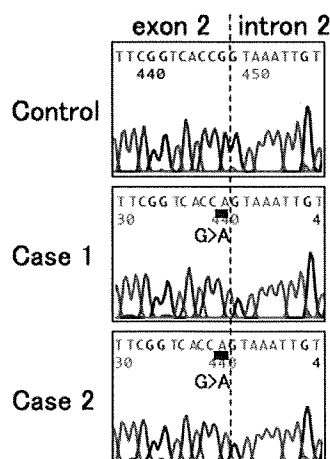


図 1；対象 2 症例の MEFV 遺伝子変異

Exon 2 の末端の G が A に置換する変異をホモに認めた。スプライス異常が起きない場合、G304R のアミノ酸置換を伴うミスセンス変異となる。

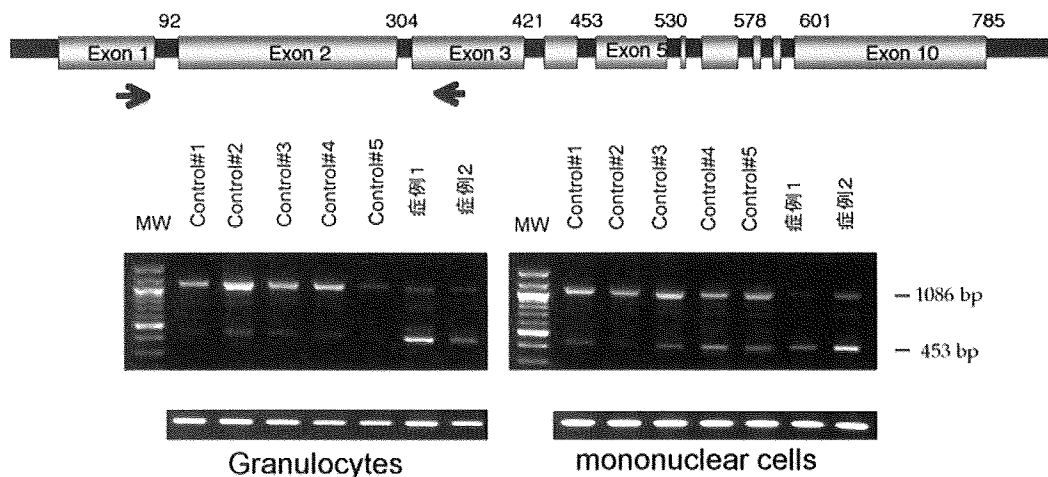


図2；対象2症例のMEFV mRNA 発現プロフィール

Granulocyte (左)、mononuclear cell (右) 共に、正常対照では 1086 bp の mRNA が大部分を占めるが、対象症例では 453 bp の短い mRNA が優位であった。下に示すのは対照としての  $\beta$ -actin mRNA。

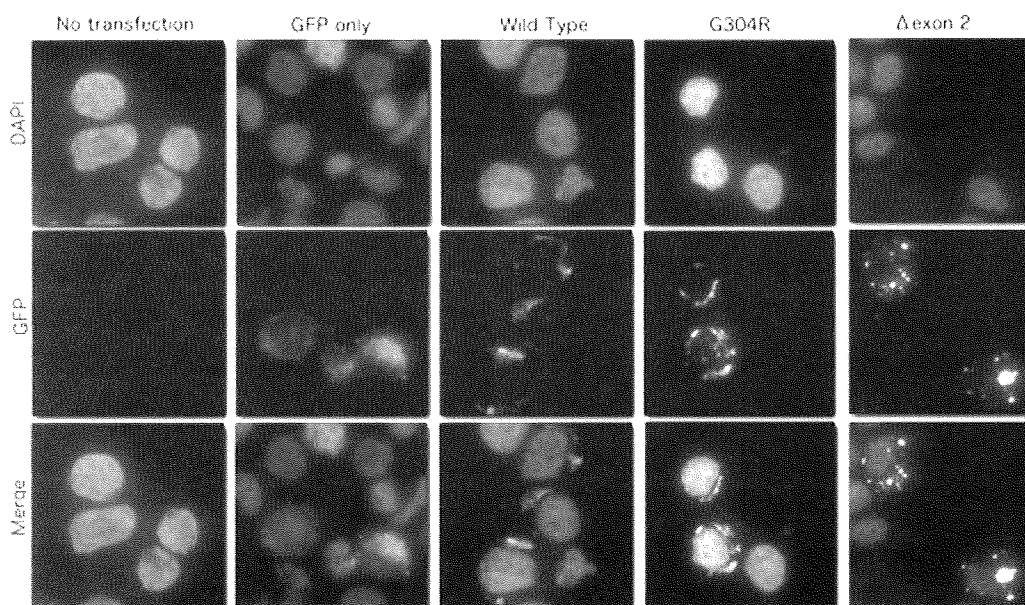


図3；MEFV 変異 cDNA 遺伝子導入細胞での GFP 発現プロフィール

## 2) MEFV 遺伝子導入による GFP ならびに pyrin 発現の特徴

HEK293T 細胞に正常 MEFVcDNA を導入した場合には、細胞質全体に GFP 発現を確認した。また、抗 pyrin 抗体を用いた解析では、GFP 発現に一致して細胞質内に

pyrin 発現が認められた。G304R 変異を有する MEFV cDNA を用いた場合もほぼ同様のプロフィールが得られた。一方、exon 2 を欠損する cDNA を導入した場合には GFP は細胞質内に顆粒状分布を示し、MEFV 蛋白輸送の異常が起こっている可能性が示唆

された (図3)。遺伝子導入細胞を用いた immunoblotting では、exon 2 欠損 cDNA を導入した細胞での pyrin 蛋白量が著しく低下していることが示された (図4)。

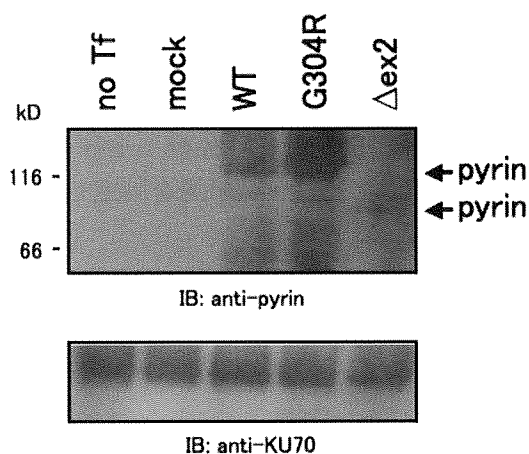


図4；MEFV 変異 cDNA 導入細胞での pyrin 蛋白発現プロフィール

対照として、Ku70 の発現を比較した。正常対照ならびに G304R 変異 cDNA 導入では正常サイズの pyrin 蛋白発現が確認されたが、 $\Delta$  exon 2 cDNA 導入細胞ではサイズの小さな pyrin 蛋白が少量のみ検出された。

#### D. 考 察

これまで、家族性地中海熱の遺伝子変異は限られた変異の報告が大部分であり、明らかな疾患関連が示唆される変異以外を認めた場合、特に弧発例の場合に病態との関連を明らかにすることは極めて困難であった。一方で、これまで MEFV 遺伝子異常ではミスセンス変異の報告例しかなく、明らかな蛋白欠損や異常蛋白によるものは知られていない。また、確認されたミスセンス変異が多型、あるいは機能低下を伴わない変異であるのか。重大な機能低下をもたらすのかが評価された報告もほとんどない。本研究は下記の二つの点で貴重な先駆的研究となった。

1) 2 症例で観察された変異 c.910G>A は、

明らかな異常蛋白産生をもたらすものであり、これまでの FMF 症例とはことなるタイプの MEFV 遺伝子異常である。

2) 観察された MEFV 遺伝子変異がもたらす mRNA 発現や蛋白発現の特徴について分析を試みている。

今後、このような変異のもたらす異常について、症例由来の細胞を用いて詳細に検討を加える予定である。さらに、次年度の研究ではこのような変異のもたらす機能異常を客観的に評価するための解析系を確立する予定である。

#### E. 結 論

MEFV 遺伝子変異 c.910G>A は、pyrin 蛋白発現量の低下や異常蛋白発現により炎症制御異常を惹起し、FMF を引き起こすことが示唆された。

#### F. 研究危険情報

特になし

#### G. 研究発表

学会発表

1) 刀祢裕美、石崎顕子、柴田文恵、和田泰三、東馬智子、谷内江昭宏、第 112 回日本小児科学会学術集会、2009 年 4 月 17-19 日、奈良

2) 刀祢裕美、柴田文恵、前田顕子、和田泰三、東馬智子、谷内江昭宏、第 37 回日本臨床免疫学会総会、2009 年 11 月 13-15 日、東京

#### 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病態解析

森 尾 友 宏 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)

高 木 正 稔 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)

水 谷 修 紀 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)

## 研究要旨

原発性免疫不全症の病態解析を進め、特に DNA 損傷修復異常を合併する免疫不全症につき解析を進めた。本年は、悪性腫瘍を発症した初めての Mre11 欠損症兄弟例を同定し、その機能解析を行った。

ICOS 欠損症では、T 細胞機能異常について検討を加え、ICOS が CD4 および CD8 メモリー T 細胞の増殖・維持に重要であることを明らかにした。治療については、重症複合型免疫不全症患者 4 名に対して骨髄非破壊的前処置臍帯血移植を、X 連鎖高 IgM 症候群患者に対して骨髄非破壊的前処置非血縁間骨髄移植を行った。

## A. 研究の目的

原発性免疫不全症の早期診断、治療のためには、臨床症状、合併症を明らかにすると共に、疾患の病態解析が重要である。本年は、特に DNA 損傷修復反応を呈する疾患群を中心に悪性腫瘍発生機序について解析を行い、ICOS 欠損症ではどの細胞にどのような機能不全があるかを検討することを目的とした。臨床では骨髄非破壊的前処置を用いた臍帯血移植を重症複合型免疫不全症 (SCID) に実施し、その効果と問題点を検証することを目的とした。

## B. 研究方法

1) 小脳失調と肺腺癌を主症状とする 2 例の兄弟例において、遺伝子解析を行うと共に、機能解析を行う。

2) ICOS 欠損症の T 細胞を分離し、その表現型について詳細に検討を行うと共に、CD3/CD28 刺激、PMA 刺激後のサイトカイン産生について、細胞内サイトカインの FACS 解析及び細胞外分泌の ELISA による

解析を用いて検討する。

3) 数例の SCID に対して Fludarabine (25-30mg/m<sup>2</sup>, 5-6 days) + L-PAM (40-80mg/m<sup>2</sup>, 2 days) による前処置のもとに、臍帯血移植を行い、混合キメリズムや有害事象について検討を行った。

## C. 研究結果

1) Ataxia telangiectasia like disorder (ATLD) の同定

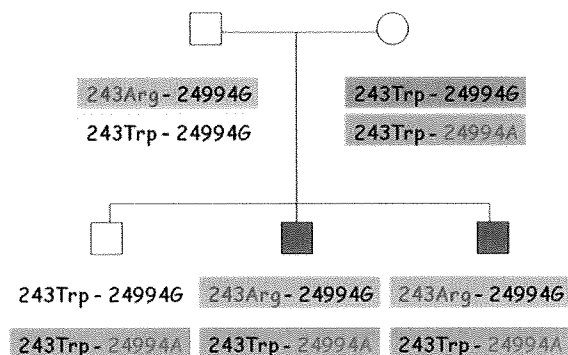
兄弟共に幼少時期より小脳失調症を呈し、以後上下気道炎にて入院を必要としたが、AFP は正常で、IgG, A, M にも異常値を認めず、毛細血管拡張症もないことより Ataxia telangiectasia (AT) は否定的であった。9 歳時、15 歳時に肺腺癌を合併した、共に骨転移を認めた。

末梢血リンパ球サブセットはほぼ正常であり、TRECs (T-cell receptor excision circles) は若干の低下を認める程度であった。

ATM の Western blot は正常であり、



DNA-PKcs, Ku70/80 の発現も正常であったが、Mre11, Rad50 の発現は低下し、NBN はほぼ消失していた。この結果を受けて、NBN → Mre11 → Rad50 の順で遺伝子塩基配列決定に進んだところ、Mre11 において以下の異常が判明した。



## 2) ICOS 欠損症における T 細胞異常の検討

ICOS 欠損症姉弟例において T 細胞サブセット解析を行ったところ、CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> 細胞の著減、特に CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> 群の effector memory 群の著減が明らかになった。また記憶 T 細胞の減少は CD4 細胞に留まらず、CD8T 細胞においても同様の現象が観察された。

さらに末梢血 CD4T 細胞を精製し、CD3/CD28 刺激を行ったところ、IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-17 の産生が不良であることが明らかになった。PMA/Ionophore 刺激後の細胞内サイトカイン染色でも同様の結果が得られ、患者では T 細胞シグナル異常ではなく、Effector 細胞の polarization に問題があることが示唆された。

さらに ICOS が欠損した状態では、IL-10 産生制御性 T 細胞が減少しているのみならず、CTLA-4 の誘導も不良であることが明らかになった。

## 3) SCID に対する臍帯血ミニ移植

4 例の SCID に対して Flu/L-PAM

regimen にて前処置を行い、Tacrolimus/short MTX による免疫抑制を行って、HLA1 座不一致までの臍帯血移植を行った。1 例では移植後の TMA, HPS により拒絶され、1 例は完全キメラ、1 例は混合キメラ (リンパ球は 100%ドナー、顆粒球は 10%ドナー)、1 例は混合キメラ (リンパ球は 100%ドナー、顆粒球は 10%ドナー) + 移植後 BCG 症という結果であった。

なおそれ以外の症例として、L-PAM を 40mg/m<sup>2</sup> x 2 days とした SCID の 1 例 (2009 年初に移植) では、生着不全、TMA、GVHD、拒絶を認めた。

## D. 考察

免疫不全症患者では易感染性に加えて自己免疫疾患や悪性腫瘍を合併し、予後及び生活の質に大きな問題となっている。

今回の解析では Mre11 欠損症においては NBS1 及び Rad50 との複合体形成に異常を認めるのみならず、DNA 結合も不良であるとの結果がでており、MRN 複合体の機能不全と環境因子が相まって悪性腫瘍が発症したと推察している。今後、変異 Mre11 の機能解析が極めて重要である。今回の ATLD は腫瘍発生を認めた世界で初めての ATLD であり、解析結果は貴重な情報をもたらしてくれるものと期待される。

ICOS 欠損症は自己免疫疾患を合併するものの、ICOS 欠損状態はむしろ自己免疫を抑制する (ICOS が自己免疫の成立と維持に重要) との報告が多数認められる。今回の結果は、ICOS がエフェクター細胞の中で、Th1, Th2, Th17 のみならず、Treg を代表とする抑制性エフェクター細胞の分化・生成・維持に重要であることを示し、各分画の ICOS 欠損における障害の程度により、症状が決定されることが示唆された。

SCID に対する Flu/L-PAM の臍帯血移植は今後の臨床試験の中での検証が重要である。

## E. 結 論

原発性免疫不全症の病態解析特に合併症の発症機構について解析を加えた。ATLD, ICOS 欠損症は共に世界的にも極めて稀な疾患であるが、変異 Mre11 および変異 ICOS の機能についての解析によって、臨床につながる貴重な情報が得られた。疾患を DNA 損傷修復異常症、副分子異常症などに絞ることにより、さらに詳細な解析が進むものと思われる。SCID を含め、対症療法、根治療法の分野における研究につながることを期待される。

## F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報はない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Oba D, Hayashi M, Minamitani M, Hamano S, Uchisaka N, Kikuchi A, Kishimoto H, Takagi M, Morio T, Mizutani S. Autopsic study of cerebellar degeneration in siblings with ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD). *Acta Neuroathologica*. 2010. (in press).

2. Inoue H, Takada H, Kusuda T, Goto T, Ochiai M, Kinjo T, Muneuchi J, Takahata Y, Takahashi N, Morio T, Kosaki K, Hara T. Successful cord blood transplantation for a CHARGE syndrome with CHD7 mutation showing DiGeorge sequence including hypoparathyroidism. *Eur J Pediatr*. 2010 Jan 6. [Epub ahead of print]

3. Nanki T, Takada K, Komano Y, Morio T, Kanegane H, Nakajima A, Lipsky PE, Miyasaka

N. Chemokine receptor expression and functional effects of chemokines on B cells: implication in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2009 Oct 5;11(5):R149. [Epub ahead of print]

4. Miyagawa Y, Kiyokawa N, Ochiai N, Imadome K-I, Horiuchi Y, Onda K, Yajima M, Nakamura H, Katagiri YU, Okita H, Morio T, Shimizu N, Fujimoto J, Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology* 128:405-419, 2009.

5. Morinishi Y, Imai K, Nakagawa N, Sato H, Horiuchi K, Ohtsuka Y, Kaneda Y, Taga T, Hisakawa H, Miyaji R, Endo M, Oh-Ishi T, Kamachi Y, Akahane K, Kobayashi C, Tsuchida M, Morio T, Sasahara Y, Kumaki S, Ishigaki K, Yoshida M, Urabe T, Kobayashi N, Okimoto Y, Reichenbach J, Hashii Y, Tsuji Y, Kogawa K, Yamaguchi S, Kanegane H, Miyawaki T, Yamada M, Ariga T, Nonoyama S. *J. Pediatr*. 155: 829-833, 2009.

6. Morio T, Takahashi N, Watanabe F, Honda F, Sato M, Takagi M, Imadome KI, Miyawaki T, Delia D, Nakamura K, Gatti RA, Mizutani S. Phenotypic variations between affected siblings with ataxia-telangiectasia: ataxia-telangiectasia in Japan. *Int. J. Hematol*. 90:455-462, 2009.

7. Isoda T, Ford A, Tomizawa D, van Delft F, De Castro DG, Mitsuiki N, Score J, Taki T, Takagi M, Morio T, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA. 106: 17882-5. 2009.

8. Uchisaka N. Takahashi N. Sato M. Kikuchi A. Mochizuki S. Imai K. Nonoyama S. Ohara O. Watanabe F. Mizutani S. Hanada R. Morio T.: Two brothers with ataxia-telangiectasia-like disorder with lung adenocarcinoma. *J. Pediatr.* 155:435-438, 2009.

9. Takahashi N. Matsukoto K. Saito H. Nanki T. Miyasaka N. Kobata T. Azuma M. Lee S-K. Mizutani S. Morio T.: Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T-cell populations in ICOS deficient patients. *J. Immunol.* 182:5515-5527, 2009.

## 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

1. 本田富美子、水谷修紀、Sang-KyouLee、森尾友宏：Btkによる好中球活性酸素産生及びアポトーシスの制御、第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月2日～4日、大阪

2. 清河信敬、恩田恵子、今留謙一、矢島美佐子、中村宏紀、片桐洋子、藤本純一郎、藤原成悦：ドナーリンパ球輸注を目的とした臍帯血由来活性化CD4細胞の性状解析、第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月2日～4日、大阪

3. 森尾友宏、水谷修紀：Basic to Clinical: Artemis/Cernnunos/Lig4 deficiency、第51回日本小児血液学会、2009年11月27日～29日、東京

4. 満生紀子、遠藤明史、小野敏明、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：

当科における原発性免疫不全症に対する骨髄非破壊的前処置による移植の検討、第51回日本小児血液学会 2009年11月27日～29日、東京

5. 鬼頭敏幸、高木正稔、熊田知浩、才田聡、藤井達哉、森尾友宏、水谷修紀、鶴澤正仁：MDSで発症し毛細血管拡張を欠くAtaxia Telangiectasiaの女兒、第51回日本小児血液学会、2009年11月27日～29日、東京

6. 遠藤明史、満生紀子、小野敏明、高木正稔、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：RISTにて臍帯血移植後、TMA、血球貪食症候群を発症し死亡したX連鎖重症複合型免疫不全症の1例、第51回日本小児血液学会、2009年11月27日～29日、東京

7. 本田富美子、水谷修紀、Sang-KyouLee、森尾友宏：Btkによる好中球活性酸素産生及びアポトーシスの制御 第37回日本臨床免疫学会総会、2009年11月13日～14日、東京

8. 本田富美子、水谷修紀、LeeSang-Kyou、森尾友宏：感染症と免疫異常症 Btkによる好中球活性酸素産生及びアポトーシスの制御、第37回日本臨床免疫学会総会、2009年11月13日～14日、東京

9. 森尾友宏：ex vivo増殖臍帯血T細胞輸注療法の臨床研究、政策創薬総合研究事業平成21年度「臍帯血DLIの実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナルリサーチ」(研究代表者 藤原成悦) 2009年10月20日、東京

10. 満生紀子、大川哲平、高橋考治、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、落合央、峯岸志津子、高木正稔、梶原道子、長澤正之、森尾友宏、水谷修紀：RISTによる非血縁臍帯血移植を施行した SCID3 例、小児 H-SCT 研究会、2009 年 10 月 9 日、東京

11. 長澤正之、小野敏明、遠藤明史、青木由貴、磯田健志、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀：当科における同種造血幹細胞移植 (1995-2007 年) の検討、第 112 回日本小児科学会学術総会、2009 年 4 月 17 日～19 日、奈良

#### H. 知的財産権の出願・登録状況、参考文献

なし