

の指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1. 高 IgE 症候群の末梢血中のナイーブ CD4 陽性 T 細胞は正常に Th1/Th2 細胞に分化する。

PBMC より、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を分離し、Th1/Th2 条件で培養し、IFN γ と IL-4 の産生細胞分画を細胞内染色により検討した。高 IgE 症候群のナイーブ CD4 陽性 T 細胞は、コントロールと同等に IFN γ と IL-4 を産生し、T 細胞には内因性の分化異常は存在しないと考えられた。

2. 高 IgE 症候群の単球由来樹状細胞は IL-10 のシグナル伝達が障害されている。

正常コントロールと高 IgE 症候群患児の PBMC より、単球を分離し、GM-CSF と IL-4 を添加培養することにより単球由来樹状細胞を樹立した。これを IL-10 で刺激したところ、高 IgE 症候群の MoDC には、IL-10 のシグナル伝達障害があることが明らかになった。このため、細胞表面上の抑制分子、PD-L1, PD-L2, ILT-3, ILT-4 の発現上昇が障害されていた。そこで、この IL-10 で処理した MoDC とナイーブ CD4 陽性 T 細胞を共培養すると、高 IgE 症候群由来の樹状細胞は、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞に FOXP3 の発現を誘導できなかった。このため、この iTreg 細胞の増殖抑制とサイトカイン抑制が障害されていた。この現象は、単球由来樹状細胞だけでなく、患児末梢血中の primary DC でも確認された。

3. ヒトにおける iTreg 細胞の誘導メカニズムの検討

これまでの報告で、ヒトの iTreg 細胞の誘導には TGF β が重要な役割を果たしていることが知られていた。そこで、高 IgE 症候群の試験管内における IL-10 処理樹状細胞の機能障害が、生体内でどのような効果をもたらすかを検討するために、TGF β と IL-10 処理樹状細胞の iTreg 細胞の誘導能を比較した。す

ると、IL-10 処理樹状細胞は、TGF β と同等の iTreg 細胞誘導能を有しており、両者が存在すると相乗的に iTreg 細胞を誘導することが明らかになった。以上より、樹状細胞における IL-10 のシグナル伝達障害は、生体内での iTreg 細胞の生成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

D. 考察

高 IgE 症候群においては、出生直後からのアトピー性皮膚炎と著しい高 IgE 血症が、その臨床的特徴であるが今回の我々の検討により、高 IgE 症候群においては、1) 樹状細胞の IL-10 シグナル伝達障害により、樹状細胞が PD-L1、ILT-4 などを発現する抑制性の樹状細胞への分化が障害されていること、2) このため、FOXP3 陽性の iTreg 細胞の分化が障害されていることが明らかとなった。高 IgE 症候群のアトピー性皮膚炎発症のメカニズムは複雑で、iTreg 細胞と Th17 細胞の機能低下と正常な Th1/Th2 細胞分化と nTreg 細胞機能が、本症候群の病態形成に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

本研究によって、ヒトの STAT3 のドミナントネガティブ変異により発症する高 IgE 症候群において、iTreg 細胞の誘導能が低下していることを証明した。このことより、生体内においても重要な病態形成機構となっている可能性を示唆した。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Minegishi Y., Saito M. Karasuyama H. “Molecular origins and mechanism of hyper-IgE syndrome.” Primary Immunodeficiency in Asia, Kazusa Academia Hall, February 4-5, 2010.

2. Minegishi Y., Saito M. Karasuyama H.

“Hyper-IgE Syndrome and STAT3” European Society for Immunodeficiency, Oct. 6-10, 2010, Istanbul, Turkey

2. 論文発表

1. Wada T, Ishiwata K, Koseki H, Ishikura T, Ugajin T, Ohnuma N, Obata K, Ishikawa R, Yoshikawa S, Mukai K, Kawano Y, Minegishi Y, Yokozeki H, Watanabe N, Karasuyama H. Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks. *J Clin Invest*. 120:2867-2875. 2010

2. Matsushima Y, Kikkawa Y, Takada T, Matsuoka K, Seki Y, Yoshida H, Minegishi Y, Karasuyama H, Yonekawa H. An atopic dermatitis-like skin disease with hyper-IgE-emia develops in mice carrying a spontaneous recessive point mutation in the Traf3ip2 (Act1/CIKS) gene. *J Immunol*. 185: 2340-2349. 2010

3. Ishikawa R, Tsujimura Y, Obata K, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. IgG-mediated systemic anaphylaxis to protein antigen can be induced even under conditions of limited amounts of antibody and antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 402:742-746, 2010

4. Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y, Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells, *J Exp Med* (in press)

H. 知的財産権の出願登録状況

該当なし

参考文献

1. Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, et al.: Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature* 2007, **448**:1058-1062.

2. Minegishi Y: Hyper-IgE syndrome. *Curr Opin Immunol* 2009, **21**:487-492.

IL-17 産生 T 細胞(Th17)と制御性 T 細胞(Treg)の分化制御における TGF- β -Smad シグナルの機能的意義

瀧 本 智 仁 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)
若 林 裕 (慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室)
吉 村 昭 彦 (慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室)
原 寿 郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野)

研究要旨

Tumor growth factor (TGF)- β は生体の免疫学的恒常性に重要なサイトカインであるが、如何なる細胞内シグナルがそれに寄与するかは十分理解されていない。特に TGF- β の下流シグナル分子として重要な Smad2 と Smad3 の内、Smad2 の免疫系での役割については、その遺伝子欠損マウスが胎生致死である為に検証されていなかった。今回我々は、T 細胞特異的 Smad2 欠損マウスを作成し、Foxp3 発現制御性 T 細胞や IL-17 を高産生する Th17 細胞の分化における TGF- β -Smad シグナルの役割を明らかにした。又、胸腺由来 Foxp3 発現制御性 T 細胞 (nTreg) は自己反応性 T 細胞受容体を発現し自己の免疫寛容に重要と考えられているが、この nTreg において Smad シグナルが欠損すると nTreg は容易に Foxp3 発現を失い IFN- γ 産生細胞に変化することから、自己免疫疾患の新たな病因としての可能性が示唆された。

A. 研究目的

Transforming growth factor (TGF)- β は、そのノックアウト (KO)マウスが全身性の炎症を呈し生後早期に死亡することから、生体の免疫学的恒常性を維持する上で不可欠な抑制性因子と考えられてきた。T 細胞、特にヘルパー T 細胞において TGF- β はその分化・増殖・細胞死等様々な現象を制御することが知られている。近年になって TGF- β が IL-17 を高産生する Th17 という炎症性サブセットを分化誘導することが報告されたことで、TGF- β が免疫を負に制御するのみならず、正の方向にも働くことが明らかとなった (図 1)。しかし、この二面性を有す TGF- β の機能的多様性が如何なる細胞内シグナルを介してもたらされるのかは十分に解明されていない。そこで、我々は TGF- β の主要シグナル分子である Smad (Smad2/Smad3)の欠損マウスを作製し、TGF- β -Smad シグナルの T 細胞免疫における機能的役割について解析した。

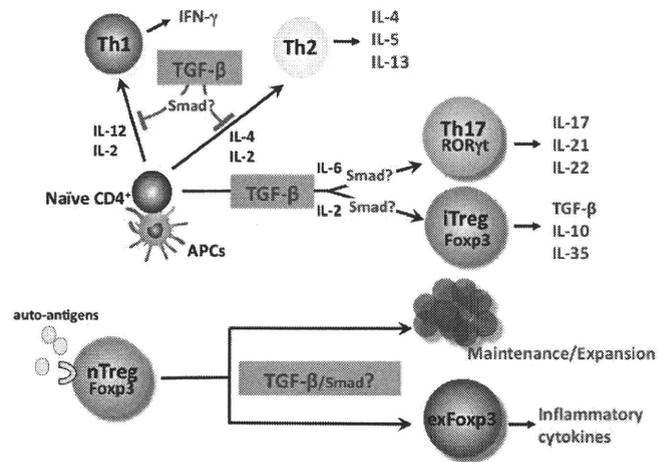


図 1. TGF- β によるヘルパー T 細胞分化制御

B. 研究方法

1) T 細胞特異的 Smad2 欠損マウスの作製及び各 Smad 欠損マウスの表現型解析

Cre-loxp システム (Lck-Cre)を用いて T 細胞特異的 Smad2 欠損マウスを作製した。本マウス、Smad3 欠損マウス及び両欠損マウスを用いてその表現型を解析した。

2) 末梢誘導型制御性 T 細胞 (iTreg)における TGF- β -Smad シグナルの役割についての検討

各 Smad 欠損マウスより単離した CD4 陽性 T 細胞を iTreg 分化条件下で刺激培養し、Treg の制御転写因子 Foxp3 の発現を real-time PCR 法を用いて検討した。又、TGF- β 存在下で刺激培養した各 Smad 欠損 CD4 陽性 T 細胞と抗 Smad2/3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法及び HEK293T 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより Smad による Foxp3 の発現制御メカニズムを検討した。

3) 胸腺由来制御性 T 細胞 (nTreg)における TGF- β -Smad シグナルの役割についての検討

各 Smad 欠損マウスを用いて nTreg の分化における TGF- β -Smad シグナルの必要性を検証した。又、nTreg の Foxp3 の発現維持における TGF- β -Smad シグナルの役割について、各 Smad 欠損マウスの胸腺より単離した nTreg を用いて抗 CD3 ϵ /28 抗体+IL-2 で刺激培養を行いフローサイトメトリ法で検討した。

4) IL-17 産生 T 細胞 (Th17)における TGF- β -Smad シグナルの役割についての検討

各 Smad 欠損マウスより単離した CD4 陽性 T 細胞を Th17 分化条件下で刺激培養し、Th17 の制御転写因子 ROR γ t や IL-17 の発現を real-time PCR 法・フローサイトメトリ法・ELISA 法を用いて検討した。又、Th17 病と考えられている多発性硬化症の疾患モデル 実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)を用いて、個体レベルでの Th17 分化における TGF- β -Smad シグナルの役割を検討した。

C. 研究結果

1) T細胞特異的 Smad2 欠損マウスの作製及び各 Smad 欠損マウスの表現型解析

Smad2 もしくは Smad3 の単独欠損マウスは T 細胞の軽度の活性化は認めるものの野生型と同等に長期間生存した。一方、Smad2/3 両欠損 (DKO)マウスは、TGF- β 1 KO マウスと同様に皮膚や消化管等の全身の炎症性病態を呈し生後

早期に死亡した。この Smad2/3 DKO マウスではナイーブ T 細胞の割合は 5%未満と著明な T 細胞の活性化を認めた。

2) 末梢誘導型制御性 T 細胞 (iTreg)における TGF- β -Smad シグナルの役割についての検討

TGF- β による Foxp3 mRNA の発現誘導は、Smad2 或いは Smad3 の単独欠損 CD4 陽性 T 細胞では野生型の半分程度に減弱し、Smad2/3 両欠損 CD4 陽性 T 細胞では完全に消失した(図 2)。

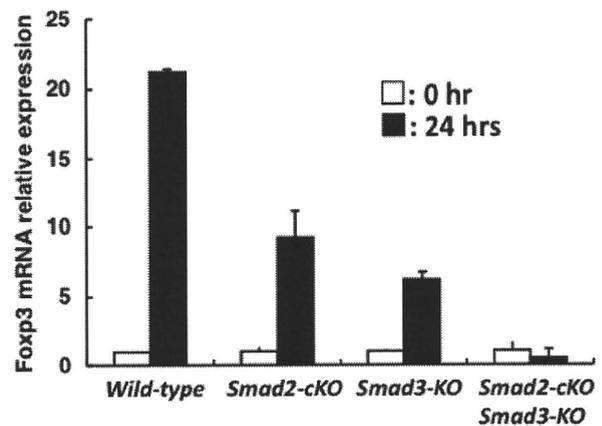


図 2. TGF- β による Foxp3 発現誘導は Smad2 と Smad3 に完全に依存する。

又、クロマチン免疫沈降法により、Smad2 と Smad3 は Foxp3 のエンハンサー領域に作用することが示唆された。この同定した領域を含む発現ベクターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ法では、Smad2/3 を過剰発現することで転写活性が促進されることを確認した (図 3)。

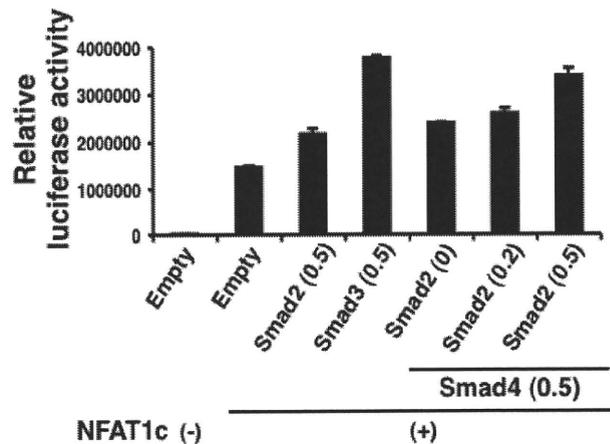


図 3. TGF- β は Smad2 と Smad3 が Foxp3 enhancer 領域に作用することで Foxp3 発現を誘導する。

3) 胸腺由来制御性 T 細胞 (nTreg)における TGF- β -Smad シグナルの役割についての検討

nTreg は Smad2/3 DKO マウスにおいても存在するが、その数は特に末梢において有意に低下していた。又、胸腺より単離した nTreg を刺激培養すると、Foxp3 発現レベルは低下し、TGF- β を添加することで Foxp3 発現は維持される。一方、Smad 欠損 nTreg では、TGF- β による Foxp3 の発現維持が破綻し、より多くの細胞が炎症性サイトカインを産生するようになった (図 4)。

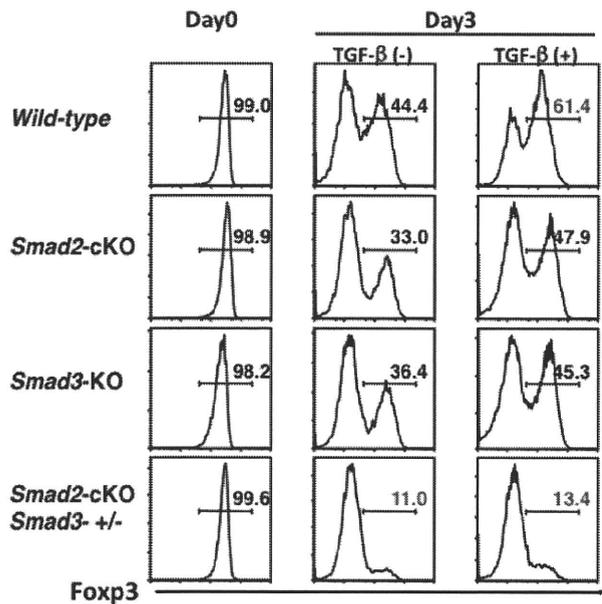


図 4. nTreg における Smad シグナルの欠落は TGF- β による Foxp3 発現維持を障害する。

4) IL-17 産生 T 細胞 (Th17)における TGF- β -Smad シグナルの役割についての検討

Th17 の制御転写因子 ROR γ t は抗 CD3 ϵ /28 抗体刺激下に TGF- β で発現誘導されることが知られているが、同条件下において Smad 欠損 T 細胞も野生型と同等に ROR γ t を発現した (図 5a)。一方、Th17 反応が病態の中心である EAE モデルでは Smad 欠損マウスにおいて軽症化を認め、個体内での Th17 の数も有意に少なかった。同様に、Th17 分化誘導条件で培養した Smad 欠損 T 細胞では IL-17 の発現は有意に低下しており、野生型と異なり IL-2、IFN- γ 、IL-4 等の Th17 分化を抑制する Th1/2 サイトカインの産生を認めた。更に、この抑制性サイトカインに対する中和抗体を添加することで Smad 欠損 T 細胞にお

いても野生型と同等の Th17 分化効率を得た (図 5b)。

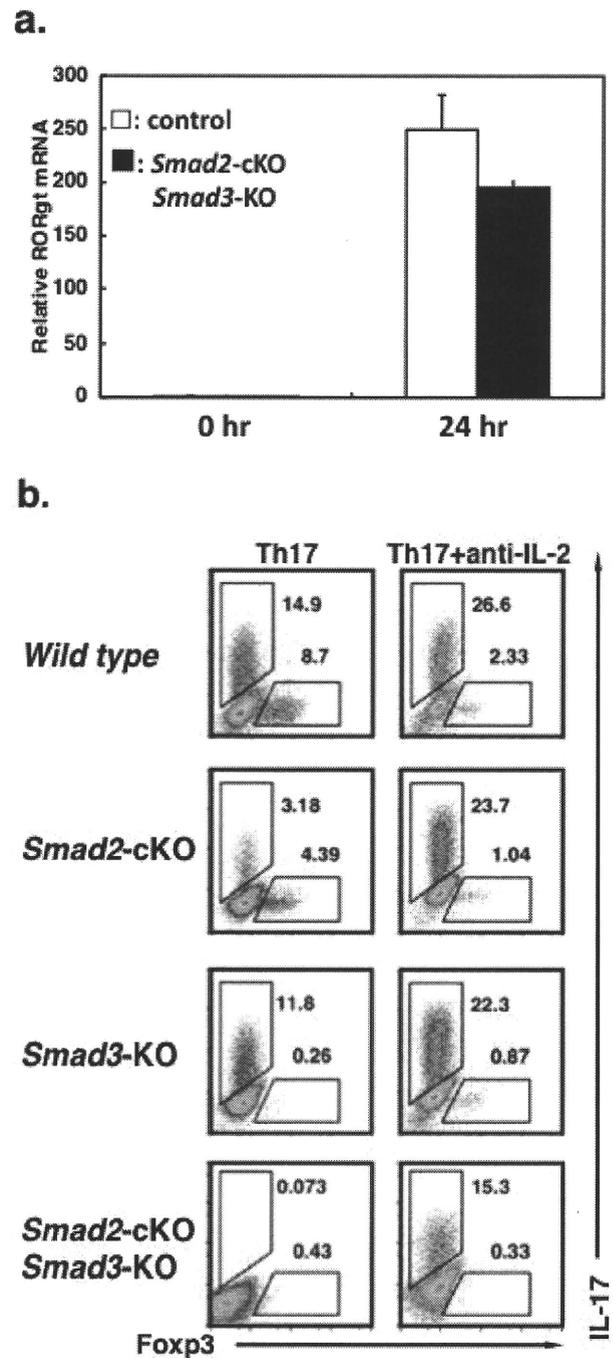


図 5. a. TGF- β による ROR γ t の発現誘導は Smad シグナルに依存しない。 b. TGF- β は Smad シグナルを介して Th1/2 サイトカイン産生を負に制御し間接的に Th17 分化を促進する。

D. 考察

TGF- β はヘルパー T 細胞を中心とする獲得免疫系において分化や増殖等様々な現象を制御することが知られ、炎症と免疫抑制・寛容という相反した免疫反応を促進する機能的二面性

も有しているが、その分子メカニズムは十分に明らかとなっていなかった。又、TGF- β の下流シグナル分子である Smad2 と Smad3 においては、Smad3 と異なり Smad2 欠損マウスが胎生致死であることから Smad2 は発生・分化に重要な分子と考えられ、免疫系への関与について十分検討されていなかった。

今回我々はT細胞特異的 Smad2 欠損マウスを作製し、Smad2 も Smad3 と同様に TGF- β による T 細胞免疫制御に重要であることを明らかにし、TGF- β -Smad シグナルは生体の恒常性維持に必須であることを示した。Smad2 と Smad3 は機能的に相補し得るものの、一方の分子が欠損した場合の TGF- β による効果は不完全である。このことは、マウス疾患モデルでみられたように Smad 分子が個体レベルでの免疫異常や感染症等の疾患感受性を規定する因子である可能性を示唆しており、ヒトの疾患での TGF- β -Smad シグナルの異常についての検討が必要と考える。又、胸腺で分化した自己反応性 T 細胞受容体を有す nTreg は、Smad シグナルが欠損することで Foxp3 の発現を容易に失い、炎症性サイトカインを産生する異なるサブセットに再分化することが明らかとなった。このことは新たな自己免疫疾患の発症モデルを提起するものと考えられた。

E. 結論

TGF- β は下流シグナル分子である Smad2 と Smad3 が redundant な機能を介して生体の免疫学的恒常性を維持する。TGF- β により誘導される転写因子の内、Foxp3 は Smad2/3 に完全に依存するのに対し、ROR γ t は Smad 非依存的に発現誘導されることが明らかとなった。一方で、TGF- β -Smad シグナルは Th1/2 サイトカインを抑制し、効率的な Th17 分化に間接的に寄与することを示した。ROR γ t を誘導する TGF- β の下流シグナルを同定することは、自己免疫や感染免疫において重要な Th17 が関与する免疫不全症の発見・病態解明に通ずると考える。又、自

己反応性 T 細胞受容体を有す nTreg の分化においては、TGF- β -Smad シグナルは必須ではないものの本シグナル経路の異常は nTreg の Foxp3 の消失と炎症性サイトカイン産生能の獲得をもたらした。本知見は自己免疫疾患の新たな病態の可能性を示唆するものと思われる。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF- β -mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development.

Takimoto T, Wakabayashi Y, Sekiya T, Inoue N, Morita R, Ichiyama K, Takahashi R, Asakawa M, Muto G, Mori T, Hasegawa E, Shizuya S, Hara T, Nomura M, Yoshimura A. *J Immunol.* 2010. 185:842-55.

H. 知的財産の出願・登録状況

特になし

X連鎖リンパ増殖症候群の臨床的、遺伝学的特徴

金 兼 弘 和 (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)

Y a n g X i (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)

宮 脇 利 男 (富山大学大学院医学薬学研究部小児科学)

研究要旨

X連鎖リンパ増殖症候群(XLP)はEBウイルス(EBV)感染に対する異常な免疫応答を特徴とする原発性免疫不全症であるが、致死性伝染性単核症(60%)、悪性リンパ腫(30%)、異常ガンマグロブリン血症(30%)と多彩な臨床像をとるため、家族歴がない場合には臨床診断が困難であるが、しばしば致死性経過をとるため、早期の診断が望まれる。当教室ではフローサイトメトリーと遺伝子解析を組み合わせることによってXLPの早期診断を行ってきた。これまで当教室で診断したXLPタイプ1(SAP欠損症)20家系32例とXLPタイプ2(XIAP欠損症)4家系6例の臨床的、遺伝学特徴をまとめた。

A. 研究目的

XLPはしばしば致死性経過をとることがあり、迅速な診断が必要とされる。フローサイトメトリーと遺伝子解析を組み合わせることによってXLPタイプ1ならびにタイプ2の迅速かつ正確な診断を行うことを本研究の目的とする。過去に当教室で診断されたXLPのデータと合わせてわが国のXLPの臨床的、遺伝学的特徴を明らかとする。

B. 研究方法

当教室で樹立された抗SAPモノクローナル抗体(KST3)を用いてCD8+T細胞ならびにCD56+NK細胞内のSAP蛋白の発現を調べた。また抗XIAPモノクローナル抗体(BD)を用いてリンパ球内のXIAP蛋白の発現を調べた。同時にbuffy coatよりDNAを抽出して、*SH2D1A*ならびに

BIRC4 遺伝子の各エキソンを増幅して、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。

C. 研究結果

2005年から2009年にEBV関連血球貪食性組織球症などよりXLPを疑われた24例のSAP蛋白の発現を調べたところ、うち6例においてCD8+T細胞ならびにCD56+NK細胞のいずれにおいてもSAP蛋白の発現低下を認め、遺伝子解析にて*SH2D1A*変異が同定され、XLPタイプ1と診断された。うち4例は速やかに骨髄移植を行うことで救命することができた。

これまでの症例と合わせて20家系32例のXLPタイプ1が当教室で診断された(表1)。

その臨床的特徴は致死性伝染性単核症が16例(50%)、悪性リンパ腫が6例(19%)、

Patient ID	Age at diagnosis	Family history	Clinical presentation	Outcome	SH2D1A mutation	SAP ^{+/+} expression ^{+/+}
1.1	12y	+	hypo- γ , ML	dead	NE	NE ^{+/+}
1.2	7y	-	hypo- γ , FIM	alive*	Asp33Tyr	NE ^{+/+}
2.1	3y	-	FIM	dead	Arg55stop	NE ^{+/+}
3.1	2y	+	FIM	dead	Arg55stop	NE ^{+/+}
3.2	2y	-	FIM	dead	Arg55stop	NE ^{+/+}
4.1	2y	+	FIM	dead	416C>T, fs	NE ^{+/+}
4.2	4y	-	ML, vasculitis, HLH	dead	416C>T, fs	deficient ^{+/+}
5.1	1y	+	FIM	dead	del of whole gene	NE ^{+/+}
6.1	1y	-	FIM	dead	Gly27Ser	NE ^{+/+}
7.1	1y	+	hypo- γ	dead	NE	NE ^{+/+}
7.2	3y	-	hypo- γ , vasculitis	alive*	His8Asp	deficient ^{+/+}
8.1	1y	-	FIM	dead	584delA, fs	NE ^{+/+}
9.1	6y	+	hypo- γ	alive*	Arg55stop	deficient ^{+/+}
9.2	6m	-	FIM	dead*	Arg55stop	deficient ^{+/+}
10.1	4y	+	ML	alive*	Gly49Val	deficient ^{+/+}
10.2	0m	-	healthy	alive*	Gly49Val	deficient ^{+/+}
11.1	1y	+	FIM	dead	del of exons 3, 4	NE ^{+/+}
11.2	1y	-	FIM	dead	del of exons 3, 4	deficient ^{+/+}
11.3	0m	-	healthy	alive*	del of exons 3, 4	deficient ^{+/+}
12.1	12y	+	hypo- γ , ML	dead	Ser34Gly	deficient ^{+/+}
12.2	10y	-	hypo- γ	alive	Ser34Gly	deficient ^{+/+}
13.1	23y	-	FIM	dead	Tyr7Cys	deficient ^{+/+}
14.1	8y	-	hypo- γ , ML	alive*	Arg55stop	deficient ^{+/+}
15.1	2y	-	FIM	dead	His8Asp	NE ^{+/+}
16.1	10y	-	hypo- γ , HLH	alive*	545insA, fs	deficient ^{+/+}
17.1	2y	+	FIM	dead	IVS2+1G>A	deficient ^{+/+}
17.2	2y	-	ADEM	alive*	IVS2+1G>A	deficient ^{+/+}
18.1	6y	-	hypo- γ	alive	312insG, fs	deficient ^{+/+}
19.1	10m	+	hypo- γ	dead	NE	NE ^{+/+}
19.2	1y	-	FIM	dead	NE	NE ^{+/+}
19.3	3y	-	hypo- γ , HLH, ML	alive*	del of exons 3, 4	deficient ^{+/+}
20.1	41y	-	FIM	dead	Ala3Ser	deficient ^{+/+}

異常ガンマグロブリン血症が12例(38%)であり、Seemyerらが報告したXLP registryと平均発症年齢、生存率も含めて同様であった。

またXLPタイプ2も4家系6例が同定された。

D. 考察

フローサイトメトリーと遺伝子解析を組み合わせるによりXLPの迅速かつ正確な診断をこれまでに行い、タイプ1を20家系32例、タイプ2を4家系6例同定した。欧米ではタイプ1が80%、タイプ2が20%とされ、わが国でもほぼ同様のデータであり、また臨床像も同様であった。

E. 結論

わが国のXLPタイプ1とタイプ2の発症頻度ならびに臨床像は欧米のそれと同様であり、人種による大きな違いはないものと思われる。またタイプ1とタイプ2はリンパ腫(タイプ2にない)、脾腫(タイプ2に多い)、出血性腸炎(タイプ2に多い)の発症率が異なり、臨床的にもある程度は鑑別しうるものであり、分子生物学的にも異なる症候群であると思われる。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Zhao M, Kanegane H, Ouchi K, Imamura T, Latour S, Miyawaki T. A novel *XIAP* mutation in a Japanese boy with recurrent pancytopenia and splenomegaly. *Haematologica* 2010; 95:688-9.
2. Zhao M, Kanegane H, Kobayashi C, Nakazawa Y, Ishii E, Kasai M, Terui K, Gocho Y, Imai K, Kiyasu J, Nonoyama S, Miyawaki T. Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with *SH2D1A* mutations by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2011; 80:8-13.
3. Booth C, Gilmour KC, Veys P, Gennery AR, Slatter MA, Chapel H, Heath PT, Steward CG, Smith O, O'Meara A, Kerrigan H, Mahlaoui N, Cavazzana-Calvo M, Fischer A, Moshous D, Blanche S, Pachlopnik-Schmid J, Latour S, de Saint-Basile G, Albert M, Notheis G, Rieber N, Strahm B, Ritterbusch H, Lankester A, Hartwig NG, Meyts I, Plebani A, Soresina A, Finocchi A, Pignata C, Cirillo E, Bonanomi S, Peters C, Kalwak K, Pasic S, Sedlacek P, Jazbec J, Kanegane H, Nichols KE, Hanson IC, Kapoor N, Haddad E, Cowan M, Choo S, Smart J, Arkwright PD, Gaspar HB. X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management, and outcome of the disease. *Blood*. 2011; 117: 53-62.
4. Pachlopnik Schmid J, Canioni D, Moshous D, Touzot F, Mahlaoui N, Hauck F, Kanegane H, Lopez Granados E, Mejstrikova E, Pellier I, Galicier L, Galambrun C, Barlogis V, Bordigoni P, Fourmaintraux A, Hamidou M, Dabadie A, Le Deist F, Haerynck F, Ouachée-Chardin M, Rohrlich P, Stephan JL, Lenoir C, Rigaud S, Lambert N, Milili M, Schiff C, Chapel H, Picard C, de Saint Basile G, Blanche S, Fischer A, Latour S. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP-deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP-deficiency). *Blood*. 2010 Nov 30. [Epub ahead of print]

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)

満 生 紀 子 (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、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少症、抗核抗体陽性、リンパ節腫大、肝脾腫などを呈する疾患の原因が、K-ras 変異によることを明らかにした。Ras associated autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) like disease (RALD)の概念を提唱した。

治療については、先天性免疫不全症に対する移植後のキメリズム解析を HLA-Flow 法にて実施した。

A:研究目的

1) 特異的な症状や所見を示す原発性免疫不全症患者の病態を明らかにするとともに、本年度は 2) 造血細胞移植後の新規キメリズム解析法を実際の移植患者に応用することを目的として研究を進めた。

B:研究方法

1) ALPS 様の症状と検査データを呈し、Fas/FasL 系に異常を認めない患者において、リンパ球表面抗原分析、アポトーシスアッセイ、遺伝子解析を行う。

2) 各種 HLA に対する単クローン抗体と、多色表面抗原分析を組み合わせることにより、Class I MHC ミスマッチ移植における各分画でのキメリズム解析を実施した。具体的には CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, CD14 などと特異的 HLA 抗体、Propidium iodide を用いて、CD4T 細胞、

CD8T 細胞、NK 細胞、B 細胞、単球、好中球におけるキメリズムを解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体を用いて解析を行う。実際には診療に役立つ情報が得られるが、採取量及び、採取時の苦痛には十分な配慮を行う。また遺伝子解析については各種指針に則り、患者個人情報の保護について十分な配慮を行う。本研究は医学部倫理審査委員会の承認をえて行われたものである。

C:研究結果

1) 3 例の JMML あるいは MDS 様の身体所見、検査所見を呈し、また Evans 症候群様の身体所見、検査所見（自己免疫性溶血性貧血、ITP、抗核抗体陽性）を示す症例につき解析を行った。まず図 1 に示すように、患者では B 細胞が増加してお

り、一方、DNT 細胞の増加は認めなかった。また Fas 刺激に対するアポトーシス抵抗性は認めなかったが、T 細胞を固相化 CD3 抗体と IL-2 で培養し、IL-2 を除いて培養した場合にはアポトーシスに抵抗し、Bim の誘導が低下していた。

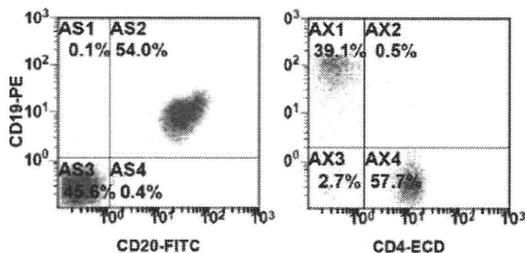


図1 RALD 患者リンパ球の表面抗原分析

以上より、N-Ras 異常に近い状態と考えて、K-Ras の遺伝子解析を行ったところ、3 例共に 13 番目のアミノ酸にて置換が認められ、active mutant であると想定された。

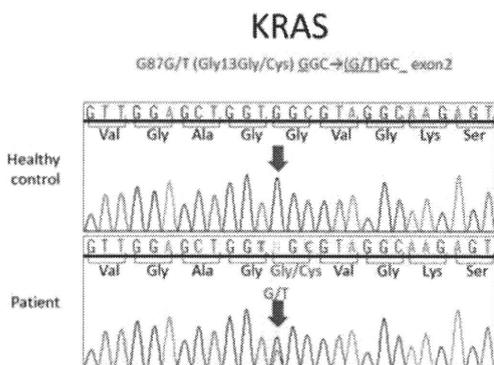


図2 K-Ras 変異の同定

2) 重症複合型免疫不全症に対する臍帯血移植後のキメリズム解析を、多色フローサイトメトリーと HLA 抗体を用いて実施した。その結果、例えば母親の T 細胞が生着している Artemis 欠損症 (B-T-NK+SCID) に対して、骨髄非破壊の前処置の元での臍帯血移植を行った際

の、3 者のキメリズム解析が可能になっている。重症複合型免疫不全症に対する造血細胞移植については、後方視的及び前方視的に系統毎のキメリズム解析を実施する臨床研究を立案し、研究分担者において承認が得られた。この研究は東京大学医科学研究所幹細胞治療部門の渡辺信和先生、高橋聡先生、中内啓光先生との共同研究で実施された。

D: 考察

1) の RALD はおそらく若年性骨髄単球性白血病 (JMML) と近縁の疾患と捕らえることができるが、どの分化段階で変異が入れば JMML となり、どの段階で変異が認められれば自己免疫疾患が中心となるのか、など今後つめていく必要がある。2) に関しては今まで 4 例にて解析を実施しており、HLA 不一致移植特に臍帯血移植においては少量の細胞数にて解析が行えるためにメリットが大きいと考えられる。今のところ HLA-DR や C 座での不一致は解析できず、今後新たな単クローン抗体の作成や、Class II MHC にまで展開可能な手法の確立が必要である。一方 γ C 欠損症や JAK3 欠損症では細胞内染色によりキメリズム解析が可能であり、今後多色 FACS との組み合わせの中で適応が広がっていくものと想定される。移植後長期的免疫学的再構築などとの関連についても、研究を進めていく予定である。

E: 結論

K-ras 変異による新しい免疫不全症を見いだし、RALD としての疾患概念を提唱した。今後 Evans 症候群様患者における解

析で、さらに研究の展開が期待できる。移植後のキメリズム解析手法として、HLA-Flow 法を個々とみた。HLA 不一致の場合に簡便に少量検体で解析できる検査方法として期待できる。

F:研究危険情報

なし

G:研究発表

1. 論文発表

1. Asai E. Wada T. Sakakibara Y. Toga A. Toma T. Shimizu T. Imai K. Nonoyama S. Morio T. Kamachi Y. Ohara O. Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patient. *Clin. Immunol.* (in press), 2010.
2. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T., Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation. *Blood* [Nov 9, Epub ahead of print], 2010.
3. Seki M. Kimura H. Mori A. Shimada A. Yamada Y. Maruyama K. Hayashi Y. Agematsu K. Morio T. Yachie A. Kato M. Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome. *Pediatr. Int.* 52:e196-9, 2010.

4. Shin MJ, Shim JH, Lee JY, Chae WJ, Lee HK, Morio T. Park JH, Chang EJ, Lee SK. Qualitative and quantitative differences in the intensity of Fas-mediated intracellular signals determine life and death in T cells. *Int J. Hematol.* 92:262-70, 2010.

5. Okamoto K, Iwai Y, Ohhora M, Yamamoto M, Morio T. Aoki K, Ohya K, Jetten AM, Akira S, Muta T, Takayanagi H. I κ B ζ regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature.* 464: 1381–1385, 2010.

6. Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, Morio T. Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ, Belohradsky BH, Ochs HD. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood.* 115:3231-3238, 2010.

2. 学会発表

国外

1. Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with

- primary immunodeficiency in Japan. The 52nd ASH Annual Meeting, Orlando, Florida, USA. December 2010.
2. Morio T, Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Istanbul, Republic of Turkey. October 2010.
 3. Morio T. Btk Controls ROS Production and Apoptosis in Human Neutrophils. XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies. Istanbul, Republic of Turkey. October 2010.
 4. Morio T, Terada N, Nanki T, Miyasaka N, Kobata T, Matsumoto K, Azuma M, Mizutani S. PP-102-32 - Impaired CD4 and CD8 Effector Function and Decreased Memory T-cell Populations in ICOS-deficient Patients. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.
 5. Okamoto K, Iwai Y, Oh-hora M, Yamamoto M, Morio T, Jetten A M, Akira S, Muta T, Takayanag H. WS/PP-014-02 - I κ B ζ is required for the transcriptional program in Th17 development. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.
 6. Shin M J, Shim J, Lee J, Chae W, Lee H, Morio T, Park J H, Chang E, Lee S. PP-059-37 - Functional analysis of Fas-mediated activation signaling pathways in T cells. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.
 7. Honda F, Ikeda Y, Takahashi N, Lee S, Mizutani S, Morio T. WS/PP-034-04 - Btk controls ROS production and apoptosis in human neutrophil. 14th International Congress of Immunology 2010. Kobe in Japan. August 2010.
- 国内
1. 森尾友宏：原発性免疫不全症に対する臍帯血移植とキメリズム解析、第2回移植簿キメリズム解析研究会平成22年度厚生労働科学研究 医療技術実用化総合研究事業「HLAミスマッチ造血細胞移植後の新規キメリズム解析法による臨床診断の有効性に関するエビ伝す創出」（研究代表者：中内啓光）2011年2月1日、東京
 2. 森尾友宏：造血細胞移植後の免疫学的モニタリング、平成22年度厚生労働科学研究 免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業「灌流法により採取された骨髓細胞を用いた骨髓内骨髓移植療法：基礎から臨床へ」班第2回班会議（研究代表者：

池原進)、2011年1月29日、東京

續、第113回日本小児科学会学術集会、2010年4月23日～25日、岩手

3. 高木正稔、満生紀子、Piao Jinhua、長澤正之、森尾友宏、篠田邦大、鷹尾明、笠原善仁、小池健一、村松英城、小島勢二、水谷修紀：RAS associated ALPS like disease、平成22年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究」班会議（研究代表者：原寿郎）、2011年1月21日、福岡
4. 満生紀子、森尾友宏、小原 収：かずさDNA研究所におけるPIDJ登録患者の遺伝子解析報告、平成22年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「原発性免疫不全症候群に関する調査研究」班会議（研究代表者：原寿郎）、2011年1月21日、福岡
5. 森尾友宏、峯岸志津子、満生紀子：分類不能型免疫不全症亜群分類と原因探索へのアプローチ、平成22年度厚生労働科学研究 難治性疾患克服事業「成人型分類不能型免疫不全症の実態把握、亜群特定に基づく診断基準策定及び病態解明に関する研究」班会議（研究代表者：森尾友宏）、2010年9月17日、東京
6. 森尾友宏、富澤大輔、梶原道子、水谷修紀、熱田由子、加藤剛二、原寿郎、加藤俊一：日本における先天性免疫不全症に対する臍帯血移植成

TREC, KREC, FACS を用いた Common variable immunodeficiency の新規亜群分類

釜 江 智佳子 (防衛医科大学校小児科)

本 間 健 一 (防衛医科大学校小児科)

中 川 紀 子 (防衛医科大学校小児科)

今 井 耕 輔 (防衛医科大学校小児科医療情報部)

野々山 恵 章 (防衛医科大学校小児科)

研究要旨

Common variable immunodeficiency (CVID)は定義があいまいであり、雑多な疾患が含まれている。その大部分は原因不明であり、様々な亜群分類が試みられている。

今回我々は、当科に紹介のあった国内の CVID 患者 32 例について、T cell receptor recombination excision circles (TREC)、および signal joint Kappa chain recombination excision circles (sjKREC)の定量と、FACS を用いたリンパ球サブセット解析を組み合わせ、CVID の亜群分類を試みた。

その結果、TREC 陽性が 22 人、TREC 陰性が 10 人となり 2 群に分けることができた。sjKREC も測定できた 31 例では、TREC、sjKREC とともに正常が 19 例、sjKREC のみ陰性が 3 例、TREC のみ陰性が 5 例、TREC、sjKREC とともに陰性が 4 例の 4 群に分類できた。

FACS 解析との関連では、sjKREC 陰性群では全例で B 細胞の低下を認めた。TREC 陰性群ではメモリー B 細胞が全例で低下していた。また TREC 陰性群でも CD4/CD8 が正常の例が存在したが、CD4 陽性細胞が CD45RO 陽性に偏倚していた症例が多かった。しかし CD45RO 偏倚が認められない症例もいた。

TREC、sjKREC 正常の 1 兄弟例で、TAC1 の複合ヘテロ変異(c.571_572insA; c.226G>T)を認めた。また、TREC、sjKREC とともに低下した群に XIAP 変異例を見いだした。

TREC、sjKREC とともに陰性の群は、臨床的に易感染性が強く、重症例が多く認められた。

以上の結果から、TREC、sjKREC、FACS 解析の組み合わせにより、CVID が大きく 4 群に分けられ、臨床像も異なることが示された。

A. 研究の目的

Common variable immunodeficiency (CVID) は低 γ グロブリン血症を呈する免疫不全症で、原発性免疫不全症の中でもっとも多く認められる。自己免疫疾患、リンパ組織の増大、悪性腫瘍等を合併しやすいが、様々な疾

患が含まれているため、適切な治療法の選択が困難である。

そこで、TREC、KREC 解析、および FACS 解析により新規亜群分類を行い、患者病態に合わせた適切な治療法を選択できるようにすることを目的とした。

B. 研究方法

2005-2010年に当科に紹介のあった国内低 γ グロブリン血症のうち、SCID、乳児一過性低ガンマグロブリン血症、2歳未満の例、HIGM(IgM>100)、XLA(BTK異常)を除いたいわゆる”CVID”32例を対象として検討した。

32例全例で、TREC、KREC解析、およびFACS解析を行った。

両者の結果をもとに、病歴、臨床情報を加味して、解析候補遺伝子について検討し、理研を通じて、かずさDNA研究所でのシーケンス解析を行った。

また、臨床症状との相関を検討した。

C. 研究結果

1. TREC, sjKRECによるCVIDの分類

今回の対象患者をTREC陽性、陰性で分けると、TREC陽性が22人、TREC陰性が10人となり2群に分けることができた。更にsjKRECを組み合わせることで4群に分類することが可能で、TREC、sjKRECともに正常が19例、sjKRECのみ低下が3例、TRECのみ低下が5例、そしてTREC、sjKRECともに低下が4例という内訳になった。割合としては、TREC正常、sjKREC正常が61%、sjKRECのみ低下群で10%、TRECのみ低下群で16%、TREC、sjKRECともに低下群は13%となった。

2. FACS解析との相関

次に各4群におけるFACSデータの検討を行った。

まず、TREC、sjKREC、CD3陽性T細胞絶対数、CD19陽性B細胞絶対数の関係を検討した。TREC正常群ではCD3陽性T細胞

数が正常値を示し、TREC低下群ではCD3陽性T細胞数が低下していた。またsjKREC正常群ではCD19陽性B細胞数は正常値を示し、sjKREC低下群ではCD19陽性B細胞数が低下していた。

次に各群でのメモリーT細胞を検討すると、1) TREC、KRECともに陽性群、2) TREC陽性、KREC陰性群、3) TREC陰性群(sjKREC陽性および陰性を含む)の順、すなわち3)の群でCD45RO陽性T細胞に最も強く偏倚していた。なお、2)の群では、TRECが正常でもCD45ROに偏倚していた症例もある一方、偏倚の認められない症例も存在した。

CD4/CD8比を検討すると、TREC、sjKREC正常群に比較して、TREC低下群でCD4/8比の低下が認められた。またTREC陰性群でもCD4/CD8が正常の例が存在したが、こうした例でもCD4陽性細胞はCD45RO陽性に偏倚していた。

NKT細胞の割合を検討すると、TRECまたはsjKREC低下群で低値であった。

メモリーB細胞を各群で比較すると、TREC陰性群ではメモリーB細胞が検討可能であった7例中6例で低下していた。メモリーB細胞の増加、正常例はTREC、sjKREC正常群で認めた。

3. 臨床像との相関

次に各群の臨床像について検討した。

TREC陽性、sjKREC群正常群は19例あった。この群では、小児と成人の2峰性の集団を認め、各群の人数は11人、8人で平均年齢は7.4歳、26.4歳であった。自己免疫疾患やリンパ組織の増大といった合併症は示した割合はそれぞれ1人、3人と少数であった。

この群で、TACI の複合ヘテロを示した 1 家系 2 症例を見いだした。難治性中耳炎、難治性下痢既往、低 γ グロブリン血症を主訴に紹介のあった 2 歳男児で、その弟にも低 γ グロブリン血症を認めた。TACI のミスセンス変異、Ins. 変異のコンパウンドヘテロを認め、弟でも同様の変異を認めた。父母は、症状、 γ グロブリン値異常を認めないが、父では ins. 変異のみを、母ではミスセンス変異のみを認めた。

また、TREC 陽性、sjKREC 陽性群の中に NK 欠損症例を 2 例認めた。NK 低下症例 2 例のうち、1 例では進行性の CD4/8 の低下があり全身にカフェオレ斑があり、1 例では $\gamma\delta$ T と Treg の低下を認めた。

sjKREC 低下例 3 例では、いずれの症例も B 細胞減少に加え、CD4/8 低下、CD45RO+/CD4+ 上昇がみられ、1 例で甲状腺癌の合併が認められた。

TREC 低下例 5 例では、5 例中 4 例でリンパ球減少を認め、いずれの症例も入院を要する肺炎の既往を認めた。また 3/5 例でリンパ組織腫脹を合併し、1 例で HPS を、1 例では悪性疾患の合併例を認めた。全例で CD4/CD8 の低下を認めた。

TREC、sjKREC いずれも低下を示した 4 例では、顕著な易感染性を認めた。4 症例のうち、1 症例は生後早期からの 10 回以上の反復性肺炎を認め、また他 2 例は EBV 持続感染、1 例は麻疹、帯状疱疹反復感染と日和見感染を示唆する経過を認めた。1/4 症例で自己免疫疾患の合併を、1/4 症例でリンパ組織の腫脹を、1 症例で悪性リンパ腫を合併し、1 症例はカリニ肺炎で死亡した。

この群に 1 例 XIAP の変異を認めた。生後 2 ヶ月から 10 回以上の肺炎を繰り返した例

で、6 歳時に低 γ グロブリン血症 (IgG/IgA/IgM : 400/<6.7/264 mg/dl) を認め診断にいたった。グロブリン補充開始後は入院を要する肺炎の罹患は認めなくなった。B 細胞欠損 (CD19 : 0.51(%) / Lymph)、NKT 細胞欠損 (NKT : 0(%) / CD3) を認め、XIAP の変異を確認した。

D. 考察

以上 CVID が TREC, sjKREC で 4 群に分類されることを示した。

TREC、sjKREC 正常群は低ガンマグロブリン血症を主要症状とする症例で、いわゆる古典的な CVID と考えられた。この群から、新たに TACI 変異の患者を 2 例みいだした。

sjKREC 低下群では、TREC 正常であったが全例で軽度の CD4/8 の低下、CD45RO の軽度の偏倚を認めた。1 例で甲状腺癌の合併があった。sjKREC が低下した場合、TREC が正常でも、T 細胞異常はある程度存在すると思われる。今回の検討では、XLA, HIM を除外しており、sjKREC 低下が B 細胞の内因性の障害のみならず、T 細胞障害による B 細胞分化障害を反映している可能性がある。すなわち、sjKREC は T 細胞機能を鋭敏に反映している可能性が考えられた。

TREC 低下群では、メモリー B 細胞の減少を全例で認めた。T 細胞による B 細胞のメモリー細胞への機能的成熟が障害されていると考えられた。またリンパ球数の低下を 4/5 例、リンパ組織の腫脹を 3/5 例で認め、1 例で HPS、1 例で子宮頸癌を認めた。

12 例 (37.5%) が TREC または sjKREC が低値を示しており、臨床的にも感染症、悪性腫瘍、自己免疫疾患が見られ、いずれかの低下でも T 細胞機能不全が疑われた。TREC、

sjKREC 両低下群は、リンパ球数の低下を 3/4 例で認め、日和見感染を 3 例で、悪性リンパ腫を 1 例で認めた。易感染性が強く、感染症を多く認めた。またこの群に一例 XIAP 変異を見いだした。

CVID で原因遺伝子が明らかになる例はまだ少数である。我々の研究室での解析候補遺伝子戦略を示す。TREC、sjKREC 正常群ではいわゆる CVID の原因遺伝子検索を行い、sjKREC 低下群では、VDJ 再構成異常など B 欠損を来す遺伝子変異を検索する。TREC 低下群では SCID 遺伝子の軽症例を念頭に置き、検索を進める

E. 結論

国内 32 例のいわゆる”CVID”患者について、TREC、sjKREC を用いて、4 群に分類し、FACS 解析との相関、臨床像との関係について検討し、良好な相関関係を得た。しかし、TREC 低下、sjKREC 低下がリンパ球サブセットの異常が明らかでない症例でも認められた症例があり、より感度ないし新生能を反映していると考えたと予後の予想に有用であることが示唆された。

さらに、TREC、sjKREC を用いた CVID の亜分類は、病態の理解につながり、より効率の良い候補遺伝子探索に利用可能であると考えられた。実際に TACI 変異例を 2 例、XIAP の変異例 1 例を同定した。

以上、TREC、KREC、FACS による解析は、CVID の病態の解明、治療の選択に有用であると考えられた。

F. 研究危険情報

特になし。

G. 研究発表

- 1) Matsumoto H, Kajiwara S, Ogura Y, Asano T, Horikawa R and Nonoyama S. A case of glycogen storage disease type Ib presenting with prolonged neonatal hypoglycaemia and minimal metabolic abnormalities. *Acta Paediatr.* 2010 Feb; 99(2):163-4.
- 2) Matsuda K, Sakashita K, Taira C, Tanaka-Yanagisawa M, Yanagisawa R, Shiohara M, Kanegane H, Hasegawa D, Kawasaki K, Endo M, Yajima S, Sasaki S, Kato K, Koike K, Kikuchi A, Ogawa A, Watanabe A, Sotomatsu M, Nonoyama S and Koike K. Quantitative assessment of PTPN11 or RAS mutations at the neonatal period and during the clinical course in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2010 Feb; 148(4): 593-9.
- 3) Okuya M, Kurosawa H, Kubota T, Endoh K, Ogiwara A, Nonoyama S, Hagiwara S, Sato Y, Matsushita T, Fukushima K, Sugita K, Sato T and Arisaka O. Hematopoietic stem cell transplantation for X-linked thrombocytopenia from mild symptomatic carrier. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Mar; 45(3):607-9.
- 4) Albert MH, Bittner TC, Nonoyama S, Notarangelo LD, Burns S, Imai K, Espanol T, Fasth A, Pellier I, Strauss G, Morio T, Gathmann B, Noordzij JG, Fillat C, Hoenig M, Nathrath M, Meindl A, Pagel P, Wintergerst U, Fischer A, Thrasher AJ,

- Belohradsky BH, Ochs HD. X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome and treatment options. *Blood*. 2010 Apr 22; 115(16):3231-8.
- 5) Kawamura Y, Ishiwata T, Takizawa M, Ishida H, Asano Y, Nonoyama S. Fetal and neonatal development of Ca²⁺ transients and functional sarcoplasmic reticulum in beating mouse hearts. *Circ J*. 2010; 74(7): 1442-50.
- 6) Chida A, Matsumoto H, Asano T, Nonoyama S. Rapidly progressive encephalopathy with coagulation abnormality. *Acta Paediatr*. 2010 Jul 1. (in press)
- 7) Tsuge I, Kondo Y, Nakajima Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Ohara O, Hatanaka M, Kitano E, Kitamura H, Urisu A. Hyper IgM syndrome and complement C1q deficiency in an individual with systemic lupus erythematosus-like disease. *Clin Exp Rheumatol*. 2010 Jul-Aug; 28(4): 558-60.
- 8) Nishiyama M, Yoshida Y, Sato M, Nishioka M, Kato T, Kanai T, Ishiwata T, Wakamatsu H, Nakagawa S, Kawana A, Nonoyama S. Characteristics of paediatric patients with 2009 pandemic influenza A (H1N1) and severe, oxygen-requiring pneumonia in the Tokyo region, 1 September-31 October 2009. *Euro Surveill*. 2010 Sep 9; 15(36). pii: 19659.
- 9) Hashii Y, Yoshida H, Kuroda S, Kusuki S, Sato E, Tokimasa S, Ohta H, Matsubara Y, Kinoshita S, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Ohara O, Ozono K. Hemophagocytosis after bone marrow transplantation for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency. *Pediatr Transplant*. 2010; 14(8); E105-9.
- 10) Aghamohammadi A, Imai K, Moazzami K, Abolhassani H, Tabatabaeiyan M, Parvaneh N, Nasiri Kalmarzi R, Nakagawa N, Oshima K, Ohara O, Nonoyama S, Rezaei N. Ataxia-telangiectasia in a patient presenting with hyper-immunoglobulin M syndrome. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010; 20(5):442-5.
- 11) Picard C, Bernuth H, Ghandil P, Chrabieh M, Levy O, Arkwright PD, McDonald D, Takada H, Krause JC, Creech CB, Ku CL, Ehl S, Maródi L, Al-Hajjar S, Al-Ghonaium A, Day-Good NK, Holland SM, Gallin J, Chapel H, Speert DP, Rodriguez-Gallego C, Colino E, Garty BZ, Roifman C, Hara T, Yoshikawa H, Nonoyama S, Domachowske J, Issekutz AC, Tang M, Smart J, Zitnik SE, Hoarau C, Kumararatne D, Thrasher A, Davies EG, Bethune C, Sirvent N, Ricaud D, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Guedes M, Vitor AB, Rodrigo C, Almazán F, Méndez M, Aróstegui JI, Alsina L, Fortuny C,

- Reichenbach J, Al-Muhsen S, Rainer Doffinger R, Abel L, Puel A and Casanova JL. Clinical features and outcome of patients with IRAK-4 and MyD88 deficiency. *Medicine*. 2010; 89(6):403-25.
- 12) Takizawa M, Ishiwata T, Kawamura Y, Kanai T, Kurokawa T, Nishiyama M, Ishida H, Asano Y, Nonoyama S. Contribution of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺Release and Ca²⁺ Transporters on Sarcolemmal Channels to Ca²⁺ Transient in Fetal Mouse Heart. *Pediatric Research*. 2011 (in press)
- 13) Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S, Agematsu K, Yamada M, Kawamura N, Ariga T, Tsuge I, Nonoyama S, Karasuyama H, Minegishi Y. Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *JEM*. 2011 (in press)
- 14) Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsui N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of kappa-deleting recombination excision 1 circles in Guthrie 2 cards for the identification of early B-cell maturation defects. *JACI*. 2011 (in press)
- 15) Zhao M, Kanegane H, Kobayashi C, Nakazawa Y, Ishii E, Kasai M, Terui K, Gocho Y, Imai K, Kiyasu J, Nonoyama S, Miyawaki T. Early and rapid detection of X-linked lymphoproliferative syndrome with SH2D1A mutations by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2011 Jan; 80(1): 8-13.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。