

## T 細胞における WASP 蛋白分解機構の解析

渡辺 祐子 (東北大学大学院医学系研究科発生発達医学講座小児病態学分野)

笹原 洋二 (東北大学大学院医学系研究科発生発達医学講座小児病態学分野)

久間木 悟 (東北大学大学院医学系研究科発生発達医学講座小児病態学分野)

土屋 滋 (東北大学大学院医学系研究科発生発達医学講座小児病態学分野)

### 研究要旨

Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) 蛋白は、WASP 結合蛋白 (WIP)と複合体を形成して T 細胞受容体レセプター (T cell receptor; TCR) シグナル伝達系の下流に位置し、WIP は WASP 蛋白質の安定化に重要な役割を果たす。しかし、この TCR シグナル下での WASP 蛋白分解機構の詳細は不明であった。今回我々は、TCR 刺激下における WASP 蛋白が、カルシウム依存性蛋白分解酵素カルパインとユビキチン化により分解された後にプロテアゾームで処理されることを証明し、このユビキチン化には TCR の negative regulator である c-Cbl 蛋白と Cbl-b 蛋白が E3 ユビキチンリガーゼとして関与し、WASP 蛋白のユビキチン化及びその安定性の一部を制御することを発見した。また、WASP 蛋白の安定性に対して、恒常的活性化変異による構造変化やチロシンリン酸化よりも WASP-WIP 結合がより重要な役割を果たすことを明らかにした。これらの結果は、WAS 患者における T 細胞免疫不全の分子病態、遺伝子治療後の WASP 蛋白質発現調節機構に対する新しい洞察を提供するものである。

### A. 研究目的

Wiskott-Aldrich 症候群(WAS)は、多様な免疫不全、難治性湿疹、血小板減少を 3 主徴とした X 染色体連鎖性原発性免疫不全症であり、Xp11.22-p11.23 に存在する WASP 遺伝子が原因遺伝子である。WASP 蛋白は T 細胞活性化やアクチン重合化に重要な役割を果たす。また、恒常的活性化変異によって自身を活性化構造へ変化させて、X 染色体連鎖性好中球減少症 (X-linked severe congenital neutropenia; XLN) や骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome; MDS)を起す。一方、T 細胞において WIP 蛋白は WASP 蛋白の安定化を制御することや、Cbl ファミリー蛋白が T 細胞受容体 (TCR) と WASP-WIP 複合体の間の分子集団に存在し、TCR シグナル経路を負に制御することが知られていた。そこで我々は、T 細胞

活性化シグナル下での WASP 蛋白分解機構の詳細を体系的に明らかにすることを本研究の目的とした。

### B. 研究方法

主に T 細胞株および各ノックアウトマウス T 細胞を対象とし、免疫沈降法と Western blot 法、siRNA 法、恒常的および一過性遺伝子導入などの分子生物学的手法を用いて、WASP 蛋白質分解機構を解析した。

### C. 研究結果

1) WASP は TCR シグナル下において、カルパインに分割され、ユビキチン-プロテアゾーム経路で分解された (Figure 1)。  
2) c-Cbl と Cbl-b は WASP と複合体を形成し (Figure 2)、E3 ユビキチンリガーゼとして働いた。また、T 細胞において Cbl ファミリー蛋白をノックダウンすると、WASP

蛋白安定性とアクチン重合化は増強し

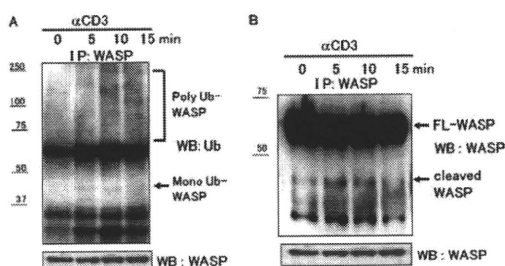


Figure 1 T細胞受容体シグナル伝達系における WASP 蛋白質分解には、カルパインおよびユビキチン-プロテアソーム経路が関与する

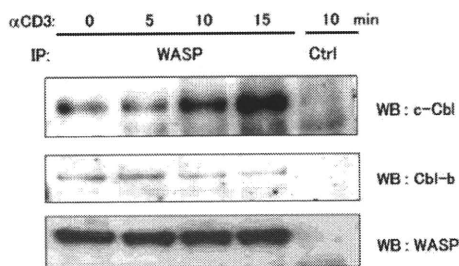


Figure 2 c-CblとCbl-bはT細胞受容体シグナル伝達系において WASP と複合体を形成する

3) WASP のチロシンリン酸化は、TCR シグナル下において WASP のユビキチン化に関わっていた。

4) WASP-WIP 結合は、WASP 蛋白安定性に最も重要な役割を果たす一方、恒常的活性化変異と非リン酸化変異は、WASP ユビキチン化と安定性に殆んど影響を与えなかった。

#### D. 考察

WASP 蛋白分解機構と、TCR シグナル下での WASP 蛋白安定性における Cbl ファミリー蛋白と WASP-WIP 結合の重要な役割を明らかにした。しかしながら、WASP 蛋白と Cbl ファミリー蛋白との結合が直接的か、他蛋白が介在しているかについては不明である。これは c-Cbl が多様な蛋白と関与しているためであり、更なる解明が必要である。また、遺伝子治療においては WIP が WASP 蛋白発現レベ

ルを制御すると推測され、今回の T 細胞における WASP 分解機構の解明は、WAS/XLT 患者の遺伝子治療における WASP 蛋白発現制御の理解に必要となると考えられた。

#### E. 結論

WASP 蛋白質は、TCR シグナル刺激後にカルシウム依存性蛋白分解酵素カルパインおよびユビキチン-プロテアソーム系で分解されることを明らかにし、このユビキチン化には E3 ユビキチンリガーゼである Cbl 蛋白質ファミリー(c-Cbl および Cbl-b)が関与することを発見した。また、WASP 蛋白の安定性に対して、恒常的活性化変異による 3 次元構造変化やチロシンリン酸化よりも WASP-WIP 結合がより重要な役割を果たすことを明らかにした。これらの結果は、WAS の病態における WIP の重要性を示すとともに、今後の遺伝子治療後の WASP 蛋白発現の制御、WIP 欠損症の分子病態の理解に新しい知見を提供した。

#### F. 研究危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Taga T, Itoh E, Noda Y, Kato H, Maruo Y, Takano T, Ohta S, Takeuchi Y, Kumaki S. Successful unrelated umbilical cord blood cell transplantation without conditioning for a neonate with severe combined immunodeficiency. *Pediatr. Transplant.*, 2010, in press.

##### 2) 土屋 滋

原発性免疫不全症—重症複合免疫不全症の遺伝子治療

小児科診療 (増刊 小児の治療指針), 73, p219-221, 2010

## 2.学会発表

### 1) Yoji Sasahara

Role of WIP in Wiskott-Aldrich syndrome  
2nd PID symposium in Asia (RIKEN, Chiba, Feb 4-5, 2010)

### 2) 力石 健、笹原洋二、星能 元、森尾友宏、土屋 滋

悪性リンパ腫を合併した Wiskott-Aldrich 症候群患者に対する RIST による骨髄移植の経験

第 32 回日本造血細胞移植学会総会 (浜松、平成 22 年 2 月 19-20 日)

### 3) 笹原洋二、堀野智史、小沼正栄、新妻秀剛、力石 健、久間木悟、土屋 滋、他

骨髄非破壊的前処置にて造血幹細胞移植を施行した原発性免疫不全症 6 症例の検討  
第 113 回日本小児科学会学術集会 (盛岡、平成 22 年 4 月 23-25 日)

### 4) 笹原洋二、堀野智史、斎藤由佳、小沼正栄、新妻秀剛、久間木悟、土屋 滋、他

RIST にて造血幹細胞移植を施行した原発性免疫不全症 6 症例の検討  
第 23 回東北 BMT 研究会 (仙台、平成 22 年 7 月 17 日)

### 5) 笹原洋二、渡辺祐子、Looi Cheng Yeng、土屋 滋

Wiskott-Aldrich 症候群の分子病態の多様性と WIP 欠損症発見の試み

第 72 回日本血液学会 (横浜、平成 22 年 9 月 24-26 日)

### 6) 笹原洋二、堀野智史、斎藤由佳、小沼正栄、新妻秀剛、力石 健、佐藤 篤、

今泉益栄、久間木悟、土屋 滋

骨髄非破壊的前処置にて造血幹細胞移植を施行した原発性免疫不全症 6 症例の検討  
第 72 回日本血液学会 (横浜、平成 22 年 9 月 24-26 日)

### 7) 笹原洋二、久間木悟、相沢敏也、土屋 滋

PFAPA と診断した周期性発熱症候群の 1 例  
第 210 回日本小児科学会宮城地方会 (仙台、平成 22 年 11 月 13 日)

### 8) 笹原洋二

シンポジウム<感染成立、維持のための宿主側因子> :

Wiskott-Aldrich 症候群の分子病態からみた感染症と WIP の役割  
第 42 回日本小児感染症学会 (仙台、平成 22 年 11 月 27,28 日)

### 9) 笹原洋二、渡辺祐子、Chung Yeng Looi、久間木悟、土屋 滋

ITP との鑑別に重要な WAS/XLT の分子病態における WIP の役割  
第 52 回日本小児血液学会 (大阪、平成 22 年 12 月 17-19 日)

## H.知的財産権の出願・登録状況

特になし

## 参考文献

1) de la Fuente MA\*, Sasahara Y\*, Calamito M, Gallego MD, Anton IM, Suresh K, Siminovitch K, Ochs HD, Rosen FS, Geha RS, Ramesh N (\*contributed equally to this work).

WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,104(3), p926-931, 2007.

2) 笹原洋二、土屋 滋  
総説 Wiskott-Aldrich 症候群の分子病態  
における WIP の役割  
日本小児血液学会雑誌, 21 巻 5/6 号,  
p217-226, 2007.

## RAG 異常症における遺伝子変異と組換え活性の解析

和田 泰三 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)  
浅井 絵利香 (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)  
谷内江 昭宏 (金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)  
今井 耕輔 (防衛医科大学校小児科)  
野々山 恵章 (防衛医科大学校小児科)  
森尾 友宏 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野)  
蒲池 吉朗 (名古屋大学大学院発育加齢医学講座小児科学)  
小原 収 (かずさ DNA 研究所ヒトゲノム研究部)

### 研究要旨

RAG (recombination activating gene) は V(D)J 組換えに必須であり、その異常は様々な免疫不全症を引き起こす。今回我々は、Omenn 症候群 3 例、TCR- $\gamma\delta^+$ T 細胞の増加、自己免疫性疾患とサイトメガロウイルス感染症を合わせ持つ免疫不全症 1 例、非典型的重症複合免疫不全症 1 例の計 5 例の RAG 異常症を見出し、遺伝子変異の同定ならびに機能解析を行った。遺伝子解析では、RAG1 もしくは RAG2 遺伝子に、新規変異 6 個を含む変異 8 個を同定した。ほとんどの変異は、機能的に重要とされるコア領域内に存在していた。V(D)J 組換え活性の解析では、約半分の活性を示す変異も存在したが、それぞれの患児における全体としての RAG 活性は有意に低下しており、RAG 異常症の病態とよく合致していた。また、非コア領域に存在する RAG2 の新規変異 Met443Ile が組換え活性の低下を示したことから、同部位が V(D)J 組換えに重要であることが明らかにされた。以上より、多彩な病型をとり得る RAG 異常症では、遺伝子解析とともに機能解析を行うことが診断や病態解明に重要であることが示された。

### A. 研究目的

RAG (recombination activating gene) は、リンパ球抗原受容体遺伝子再構成を担う重要な酵素である。RAG 活性が完全に欠損すると成熟 T 細胞、B 細胞を欠く重症複合免疫不全症 (SCID) を発症し、また活性の一部が残存すると異常 T

細胞クローンの増加に起因する紅皮症などを特徴とする Omenn 症候群となることが従来知られていた。しかし最近 RAG 異常により、TCR- $\gamma\delta^+$  T 細胞の増加、自己免疫性疾患とサイトメガロウイルス感染症を合わせ持つ免疫不全症 (CID- $\gamma\delta$ /CMV) や肉芽腫形成を伴う免疫

不全症を発症することが報告され、RAG 異常症は臨床的に様々な病型をとり得ることが判明した。本研究では、RAG 異常症 5 例において RAG 遺伝子解析ならびに機能解析を行い、その特徴と病態との関連を評価した。

## B. 研究方法

### 1) 対象患者

対象は、Omenn 症候群 3 例、CID- $\gamma\delta$ /CMV 1 例、非典型的 SCID 1 例である。いずれの症例の両親も非血族結婚で、症例 1-4 は日本人、症例 5 はインド人である。表 1 に各症例の免疫学的特徴を示す。

表 1. 解析対象

症例	1 <sup>a</sup>	2	3 <sup>a</sup>	4	5
診断	OS	OS	非典型的 OS	CID- $\gamma\delta$ /CMV	非典型的 SCID
発症年齢 (月)	0	0	7	8	0
WBC	26900	19000	2800	3900	3280
リンパ球 (/mm <sup>3</sup> )	8339	5700	1300	546	459
CD3 <sup>+</sup> (%)	84.8	41.3	20.0	53.9	7.8
CD4 <sup>+</sup> (%)	56.7	16.6	17.3	9.9	7.4
CD8 <sup>+</sup> (%)	27.0	37.8	1.3	35.4	0.1
CD19 <sup>+</sup> or 20 <sup>+</sup> (%)	0.0	0.2	0.1	11.6	0.1
IgG (mg/dl)	461	220	328	678	1475
IgA (mg/dl)	< 4	< 1	62	63	114
IgM (mg/dl)	< 4	< 2	31	65	147
IgE (IU/ml)	7	< 2	16	NA	NA

### 2) RAG 遺伝子ならびに V(D)J 組換え活性の解析

RAG1 および RAG2 遺伝子解析は、末梢血より抽出したゲノム DNA を用いて、ダイレクトシーケンス法により行った。

V(D)J 組換え活性の測定は、既報の方法を一部改変し、ヒト RAG1/RAG2 の全長、マウス

RAG1/RAG2 のコア領域を有する発現ベクターと組換え基質 pJH200 を用いて行った。すなわち、ヒト RAG1/マウス RAG2/pJH200 あるいは、ヒト RAG2/マウス RAG1/pJH200 の組み合わせでベクターを 293T 細胞に遺伝子導入した。48 時間後に細胞を回収し、pJH200 の組換え産物であるシグナルジョイントを PCR にて検出した。増幅産物をエチジウムブロマイドにて染色後、バンドの濃さを定量し、組換え活性とした。

## C. 研究結果

### 1) RAG 遺伝子変異

表 2 に示すように、RAG1 もしくは RAG2 遺伝子に、新規変異 6 個を含む変異 8 個を同定した。症例 2 と症例 5 はホモ接合性、他の症例は複合ヘテロ接合性であった。RAG2 の Met443Ile 以外のミスセンス変異は、機能的に重要とされるコア領域内に存在していた。全ての患者に少なくとも 1 つのミスセンス変異が認められた。また、健常人 100 アレルの解析では、いずれの変異も認められなかった。

表 2. RAG 遺伝子変異と V(D)J 組換え活性

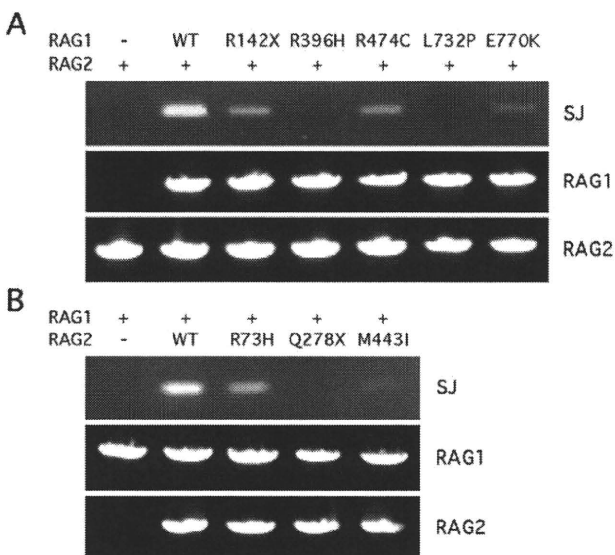
症例	遺伝子	変異	相対的組換え活性 (%) <sup>a</sup>
1	RAG2	R73H*	59.3 ± 4.7
		Q278X*	0.4 ± 0.3
2	RAG2	M443I*	8.7 ± 1.2
3	RAG1	R142X	51.2 ± 9.2
		R396H	1.0 ± 0.5
4	RAG1	R474C*	47.2 ± 7.9
		L732P*	0.5 ± 0.4
5	RAG1	E770K*	15.6 ± 9.1
Control	RAG2	wild type	100
	RAG1	wild type	100

<sup>a</sup> 野生型 RAG を 100% としたときの変異 RAG の組換え活性を示す。\*は新規変異。

## 2) 変異 RAG の組換え活性

患児にみられた RAG 遺伝子変異の病的意義を評価するため、V(D)J 組換え活性の測定を行った (表 2)。野生型 RAG1 と野生型 RAG2 を 293T 細胞に同時に遺伝子導入した場合には基質 pJH200 に組換えが起こり、どちらか一方が欠けている場合には組換えは全く認められなかった (図 1)。一方、変異 RAG を遺伝子導入した際には、全ての変異で活性の低下が認められたものの、その程度は様々で、ほぼ活性の消失を示すものから野生型の約半分の活性を示す変異も存在した。しかしそれぞれの患児における全体としての RAG 活性は有意に低下していた (図 1 と表 2)。

図 1. V(D)J 組換え活性



変異 RAG (A は変異 RAG1、B は変異 RAG2) を遺伝子導入した際の組換え産物 (シグナルジョイント、SJ) を PCR にて検出した (それぞれの上段)。中段と下段は、ベクター特異的 PCR により RAG1、RAG2 の存在を確認した。

## D. 考察

最近、RAG 異常症は様々な臨床病型を示し得ることが明らかにされている。しかし多くの場合、RAG 遺伝子変異のみが解析され、組換え活性による機能解析を行った報告は少ない。本研究では、両解析を行うことにより、RAG 異常症 5 例において新規変異 6 個を同定したほか、RAG 異常症の病態と関連する下記の点を明らかにした。

1) これまで免疫不全症を引き起こす変異 RAG の組換え活性は、野生型の約 30%までとされていた。しかし今回の検討から、RAG 異常症には約半分の活性を示す変異を有する患児も存在することが判明した。ただしこの場合、もう一方のアレルの変異の組換え活性がほぼ欠損していた。従って、RAG 異常症の発症には、患児の全体としての RAG 活性の低下が重要であることが示唆された。

2) RAG 異常症で認められる RAG 遺伝子変異は、機能的に重要とされるコア領域内に存在することが多い。しかし、最近、V(D)J 組換えにおける非コア領域の重要性を指摘する報告が散見される。実際、症例 2 では RAG2 の非コア領域に新規変異 Met443Ile が認められ、その組換え活性は著しく低下していた。本例は、非コア領域の Met443 部位の V(D)J 組換えにおける重要性を裏付ける新たなエビデンスになると考えられた。

3) 症例 3 に認められた RAG1 の R142X 変異は、完全な機能の欠損が予想されたが、野生型の約半分の残存活性が認められた。変異部の後方に位置するメチオニンが新たな翻訳開始部位となった可能性が考えられ、機能解析を行わ

なければ知り得ない興味深い所見と思われた。

4) CID- $\gamma\delta$ /CMV では、組換え活性の低下にもかかわらず、免疫グロブリン値や末梢血 B 細胞の比率は正常と報告されている。症例 4 も同様に正常であったが、さらに、B 細胞の CD27 を指標とした成熟段階や IgE 産生能、CD27<sup>+</sup>B 細胞での体細胞突然変異はコントロールと同等であった。今回の解析により、CID- $\gamma\delta$ /CMV の B 細胞の特徴がさらに明らかにされた。

5) SCID 患者に認められる RAG 遺伝子変異は、組換え活性がほぼ完全に欠損している場合が多いとされる。しかし症例 5 では、残存活性がわずかながら認められており、組換え活性のみが臨床病型を決定するわけではないことが示唆される。今後、病態に関与するその他の因子の解明が必要と考えられた。

## E. 結論

臨床的に幅広い病型をとり得る RAG 異常症では、遺伝子解析とともに機能解析を行うことが診断や病態解明に重要であることが示された。

## F. 研究危険情報

特になし

## G. 研究発表

学会発表

1) 浅井絵利香、和田泰三、梅暁子、東馬智子、林正俊、清水崇史、谷内江昭宏. 第 113 回日本小児科学会学術集会. 2010 年 4 月 23-25 日. 盛岡

2) Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S,

Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in patients with RAG1/2 deficiency. XIVth Meeting of the European Society of Immunodeficiency. 6-9 October 2010, Istanbul/Turkey

論文発表

1) Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. Clin Immunol. 2011; 138: 172-177.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

参考文献

[1] T. Nihues, R. Perez-Becker, and C. Schuetz, More than just SCID-the phenotypic range of combined immunodeficiencies associated with mutations in the recombinase activating genes (RAG) 1 and 2. Clin Immunol 135 (2010) 183-92.

[2] C. Couedel, C. Roman, A. Jones, et al, Analysis of mutations from SCID and Omenn syndrome patients reveals the central role of the Rag2 PHD domain in regulating V(D)J recombination. J Clin Invest 120 (2010) 1337-44.

## Immunes dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX)における消化管自己抗原の多様性

小林 一郎 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)  
山崎 康博 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)  
竹崎 俊一郎 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)  
大倉 有加 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)  
山田 雅文 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)  
有賀 正 (北海道大学大学院医学研究科小児科学分野)

### 研究要旨

Immunes dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) は制御性 T 細胞の発生・分化に不可欠な転写因子 FOXP3 遺伝子の変異によって起こる原発性免疫不全症の一つであり、自己免疫性腸症を始めとする多彩な自己免疫疾患やアレルギーを特徴とする。我々は既に IPEX に合併する自己免疫性腸症に関連する腸管上皮細胞の自己抗原 AIE-75 を同定してきた。しかし、一部の症例では免疫組織学的に明らかに抗腸管上皮細胞抗体があるにも関わらず抗 AIE-75 抗体が低値の例があり、他の自己抗原が存在することを示唆する。

本研究では、こうした自己抗原の同定を試み、まず小腸抽出物を抗原としたウェスタンブロット法で 95 kDa および 28 kDa の自己抗原の存在を確認した。そこで 95 kDa と強く反応し、AIE-75 との反応の弱い血清を用いて、ヒト十二指腸由来  $\lambda$ gt11 発現ライブラリーをスクリーニングし、actin-binding protein の一つである villin を同定した。遺伝子組換えを用いて作製した GST-villin を抗原としてウェスタンブロット法で検討すると、IPEX 5 例中 4 例で陽性であった。また、28 kDa 抗原との反応性は IPEX 様症候群 1 例と IPEX 3 例で認められた。

今後 28 kDa 抗原を同定することで、IPEX ないし IPEX 様症候群における主要な腸管自己抗原を遺伝子組換えで作製できることとなり、免疫組織学的方法を用いずに定量的に自己抗体の測定を行うことが可能となる。IPEX は既に造血幹細胞移植によって治癒しうる疾患であり、早期発見・早期診断が重要である。こうした自己抗体測定系の確立は難治性下痢症において FOXP3 遺伝子解析前のスクリーニングに有用と考えられる。

### A. 研究目的

Immunes dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) は制御性 T 細胞の発生・分化に不可欠な転

写因子 FOXP3 遺伝子の変異によって起こる原発性免疫不全症の一つであり、自己免疫性腸症を始めとする多彩な自己免疫疾患やアレルギーを特徴とする<sup>1,2)</sup>。我々

は既に IPEX に合併する自己免疫性腸症に関連する腸管上皮細胞の自己抗原 AIE-75 を同定してきた<sup>3)</sup>。AIE-75 は上部消化管および腎近位尿細管の刷子縁に存在することを明らかにした。その後の研究で抗 AIE-75 抗体は IPEX において人種差を超えて特異性・感度共に高い、診断的意義のある自己抗体であることが明らかとなってきた<sup>4,5)</sup>。一方、IPEX ないし IPEX 類似の症状を呈しながら FOXP3 遺伝子に変異のない IPEX 様症候群において抗 AIE-75 抗体のタイターが低いにも拘らず、免疫組織学的検討で刷子縁に強く反応する自己抗体を持つ症例や細胞質に強く反応する自己抗体を持つ症例がみられた<sup>7)</sup>。本研究はこれら AIE-75 以外の自己抗原を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

血清：FOXP3 変異を持つ IPEX 患者 5 例と変異のない IPEX 様症候群 1 例より血清を得た<sup>2,3,6,7)</sup>。

ウェスタンブロット法：ヒト空腸抽出物ないし遺伝子組換え蛋白を SDS-PAGE で泳動後、セミ・ドライ方式を用いて PVDF 膜に電氣的に転写し、1 次抗体として血清を、2 次抗体として HRP 標識抗ヒト IgG 抗体を反応させた後、DAB を用いて発色した。

自己抗原遺伝子の単離・同定と反応性の検討：抗 AIE-75 抗体低値で刷子縁に反応する IPEX 症例の血清を用いて、ヒト十二指腸由来  $\lambda$ gt11 発現ライブラリーをスクリーニングした。陽性クローンの遺伝子配列よりその蛋白を同定し、その全長を PCR で増幅して融合蛋白発現ベクター

pGEX4T-2 に組み込んだ。これで大腸菌 BL21 を形質転換し、IPTG 存在下で GST 融合蛋白発現を誘導し、アフィニティーカラムで精製して抗原として用いた。

遺伝子組換え型 AIE-75 抗原は pcDNA3-AIE-75 を用いて *in vitro* transcription/translation kit を用いて作製した<sup>3)</sup>。

## C. 研究結果

IPEX 5 例全例において抗 AIE-75 抗体は陽性であった。症例 1 では抗 AIE-75 抗体は低値で、空腸抽出物のウェスタンブロットで約 95 kDa にバンドを認めた。さらに、IPEX 様症候群の 1 例を含む 4 例で、約 28 kDa 付近にバンドを認めた (図 1)。

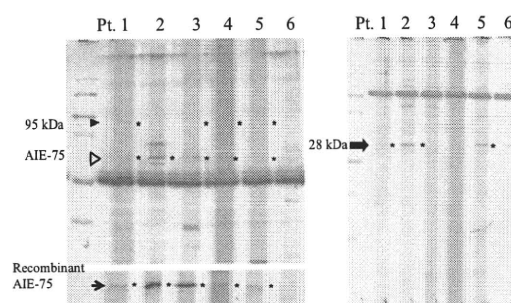


図 1: Western blot analyses of disease-specific AIE-75, 95 kDa and 28 kDa antigens in jejunal extract

抗 AIE-75 抗体低値で 95 kDa のバンドが認められた症例 1 の血清を用いて cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、この血清と強く反応する 1 クロウンを得た。DNA 配列の解析からヒト villin の C 末側の約半分をコードすることがわかった。そこでヒト villin の全長をコードする cDNA を PCR で増幅し、TA cloning vector に挿入し、正しい配列のクローンを選択した。このクローンよりイ

ンサートを切り出し、pGEX4T-2 にサブクローニングして大腸菌で発現させたところ、抗 GST 抗体および抗 villin 抗体と反応する 120 kDa の蛋白が認められた。さらにこの蛋白で血清を吸収することで空腸抽出物中の 95 kDa の蛋白との反応性が消失したことから、この 95 kDa の蛋白が villin であることがわかった。そこで GST-villin を抗原としたウェスタンブロット法で患者血清との反応性を調べると、IPEX 5 例中 4 例と反応した (図 2)。この陽性例の内、免疫組織科学的方法で細胞質のみが染色された 1 例で 1:160 陽性であった他はいずれも 1:320 以上のタイターであった。細胞質正常および各種疾患コントロール 98 例で抗 villin 抗体陽性は SLE, MCTD および大腸癌各 1 例で低値陽性 (1:160 未満) であった。

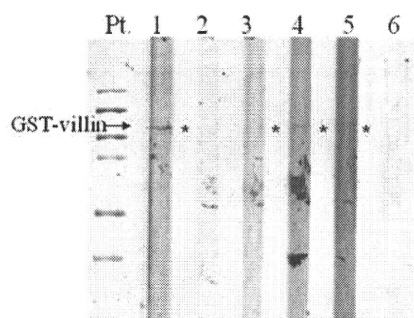


図 2: Reactivity of the sera with GST-villin

#### D. 考察

今回の検討で、既に同定していた AIE-75 抗原に加え、villin が IPEX に合併する自己免疫性腸症の自己抗原であることがわかった。AIE-75 は消化管・腎臓の他に内耳の繊毛細胞にも発現し、細胞骨格と膜蛋白を繋ぐ働きをしていることがわかっている<sup>8)</sup>。一方 villin はアクチン結合蛋白の一つで、アクチンの重合・切断

など多彩な機能を有する<sup>9)</sup>。これらはいずれも刷子縁の細胞質側に存在する蛋白であることから、流血中の自己抗体からは隔絶されている。しかし、感染などを契機に流血中に放出されると B 細胞受容体や自己抗体と結合し、B 細胞や FcγR を発現する抗原提示細胞に取り込まれ、これらが T 細胞を刺激することで自己免疫反応を増幅する可能性がある。Villin に対する抗体は大腸癌・肺癌の一部で非常に低いタイターで存在することが示されており<sup>10,11)</sup>、今回の検討と一致する。これらの症例はいずれも年長児ないし成人であることから、少なくとも年少児における高タイターの抗 villin 抗体の存在は IPEX の診断を支持するものと考えられる。

一方、空腸抽出物中の約 28 kDa 蛋白と反応する血清は IPEX 様症候群を含め 4 例に存在し、この中には免疫組織学的に細胞質にのみ反応するものがあることから、細胞質内抗原である可能性がある。この抗原を同定し、AIE-75 や villin と組み合わせることで、煩雑な免疫組織学的検討なしに定量的に自己免疫性腸症の診断が出来る可能性が示唆された。

IPEX は既に造血幹細胞移植によって治療する疾患であり、早期発見・早期診断が重要である。こうした自己抗体測定系の確立は難治性下痢症において FOXP3 遺伝子解析前のスクリーニングに有用と考えられる。

#### E. 結論

IPEX および IPEX 様症候群に合併する自己免疫性腸症では AIE-75, villin ならびに 28 kDa 抗原に対する自己抗体が存在し、

診断的意義が示唆された。

#### F. 研究危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

学会発表

European Society for Immunodeficiency

2010年9月 Istanbul, Turkey

論文作成中。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

#### 謝辞

患者血清および臨床情報を提供いただいた、田中 完先生（弘前大学小児科）、伊藤秀一先生・新井勝大先生（国立成育医療センター）、屋良朝雄先生（那覇市立病院）、Luke Whitesell 先生（Arizona Univ）に感謝いたします。

#### 参考文献

1. Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120:744-50.
2. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001; 27: 20-21.
3. Kobayashi I, Imamura K, Kubota M, et al. Identification of an autoimmune enteropathy-related 75-kilodalton antigen. *Gastroenterology* 1999; 117:823-830.
4. Patey-Mariaud de Serre N, Canioni D, Ganousse S, et al. Digestive histopathological presentation of IPEX syndrome. *Mod Pathol.* 2009;22:95-102.
5. Moes N, Rieux-Laucat F, Begue B, et al. Reduced expression of FOXP3 and regulatory T-cell function in severe forms of early-onset autoimmune enteropathy. *Gastroenterology.* 2010;139:770-8.
6. Kobayashi I, Shiari R, Yamada M, et al. Novel mutations of FOXP3 in two Japanese patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *J Med Genet.* 2001; 38: 874-876.
7. Tanaka H, Suzuki K, Nakahata T, Kobayashi I, Kubota, M, Ito E. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome without extraintestinal symptoms in a Japanese infant with a novel mutation of *FOXP3* gene. *Acta Paediatr.* 2004;93:142-143.
8. Verpy E, Leibovici M, Zwaenepoel I, et al. A defect in harmonin, a PDZ domain-containing protein expressed in the inner ear sensory hair cells, underlies Usher

- syndrome type 1C. *Nature Genetics* 2000; 26: 51-56.
9. Khurana S, George SP. Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: villin's perspective. *FEBS Lett.* 2008; 582: 2128–2139.
10. Rimm DL, Holland TE, Norrow JS, Anderson JM. Autoantibodies specific for villin found in patients with colon cancer and other colitides. *Dig. Dis. Sci.* 1995; 40: 389-395.
11. Nagashio R, Sato Y, Jiang S-X, Ryuge S, Kodera Y, Maeda T, Nakajima T. Detection of tumor-specific autoantibodies in sera of patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 62: 364-373.

# 新規自然免疫不全症同定に向けた TIRAP/Mal 遺伝子変異/ 多型の構造生物学的機能解析

大西秀典 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)  
安陽 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)  
松井永子 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)  
加藤善一郎 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)  
金子英雄 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)  
近藤直実 (岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学)

## 研究要旨

侵襲性肺炎球菌感染症等を呈する免疫不全の責任遺伝子として IRAK4、MyD88 等自然免疫関連分子の異常が報告されている。本研究では Toll 様受容体シグナルの下流で、これらの分子と複合体を形成する Mal を標的とした遺伝子解析、変異分子の *in vitro* 機能実験を行った。303 名の日本人を対象に、Mal の翻訳領域の遺伝子解析を行ったところ、8 種類の一塩基多型(SNP)が同定され、そのうち 4 種類は既報の無い新規 SNP であった。また 3 種類は頻度の少ない non synonymous SNP であり、HEK293 細胞及び THP1 細胞において機能損失型バリエーションであることが確認できた。本解析で同定された機能損失型バリエーションはいずれもヘテロ接合性に同定されている。臨床症状としてはいずれの症例も明らかな易感染性はみられないが、IRAK4 欠損症と類似の臨床像を呈する症例中に、ホモ接合性あるいは複合ヘテロ接合性の遺伝子型を有する免疫不全症例が同定される可能性が推測される。

## A. 研究目的

侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)等を呈する免疫不全の責任遺伝子として IRAK4、MyD88 等自然免疫関連分子の異常が報告されている。肺炎球菌等グラム陽性菌群の細胞膜構成成分は、Toll 様受容体(TLR)2 により認識され、アダプター分子 Mal/TIRAP を中継して、MyD88、IRAK4 と連鎖的に高次複合体(Myddosome)を形成する。本研究では自然免疫不全症の候補責任遺伝子として Mal を標的とした遺伝子解析を行った。

## B. 研究方法

1. 日本人 310 名(うち健常者 103 名、ア

レルギー疾患患者 207 名)を対象に、末梢血から genome DNA を抽出し、Mal 遺伝子の塩基配列を解読した。

2. pFLAG-CMV-6a vector(SIGMA) に Mal cDNA をクローニングし、Promega 社の Geneeditor site-directed mutagenesis kit で、同定された SNP に置換した。

3. HEK293T 細胞に pFLAG-CMV-6a\_Mal wild 及び variants を一過性発現させ、Dual Luciferase Assay 法で、NF- $\kappa$ B の reporter gene 活性を測定した。

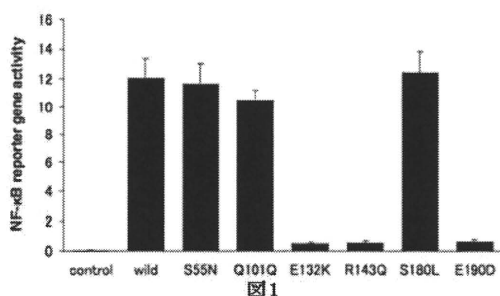
4. THP-1 細胞に pFLAG-CMV-6a\_Mal wild 及び variants を一過性発現させ、培養上清中に産生される TNF- $\alpha$ 、IL-12p40 を ELISA 法で測定した。

5. HEK293hTLR4-MD2-CD14 細胞に、

pFLAG-CMV-6a\_Mal variants (E132K, R143Q, E190D)の Transfect 量を変えて一過性発現させ、LPS 刺激(100ng/ml)によるNF- $\kappa$ B活性への影響を評価した。

### C. 研究結果

8 種類の SNP(S55N, A99A, Q101Q, E132K, R143Q, S180L, A186A, E190D)が同定され、そのうち4種類は既報の無い新規 SNPであった。また3種類は頻度の少ない(310名中7名でいずれもヘテロ接合性) non synonymous SNPであり、HEK293細胞及びTHP1細胞において機能損失型バリエーションであることが確認できた(図1、2)。



### TNF- $\alpha$

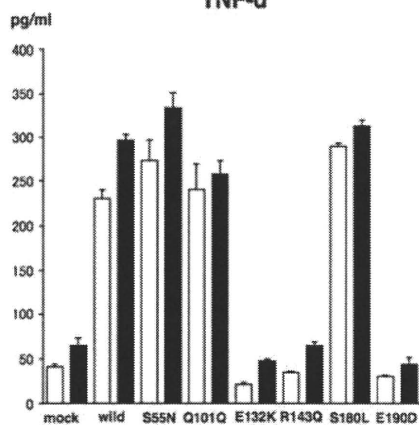


図2

さらに TLR4-MD2-CD14 恒常的発現 HEK293 細胞株を用いて、E132K, R143Q, E190DのLPS/TLR4シグナルに対する影響を評価したところ、E132K

は Dominant negative effect を有するバリエーションであることが判明した(図3)。

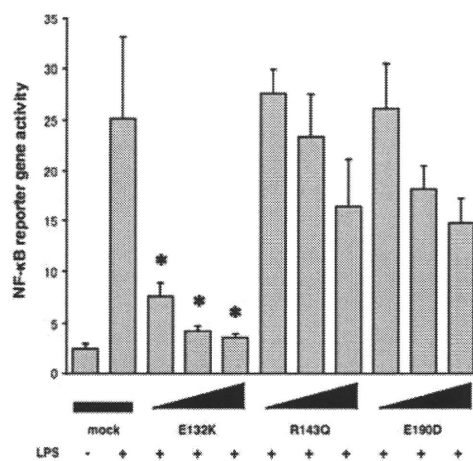


図3

MyD88-TIR ドメインのタンパク立体構造(Ohnishi H et al. PNAS 2009)を鋳型に、Mal-TIR ドメインを構築し、3つの機能損失型バリエーションの位置を図示した(図4)。E132は、TIR ドメインの機能に重要とされる BB ループ上に位置し、E190は TRAF6 との結合モチーフ配列上に位置している。一方、R143はドメイン構造のコア部分に位置しており、ドメイン構造の保持に寄与しているアミノ酸残基であることが示唆された。

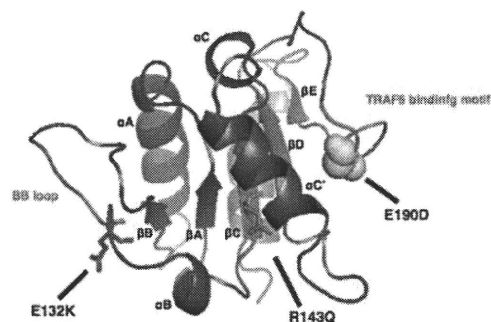


図4

### D. 考察

Mal/TIRAP ノックアウトマウスでは、細菌感染に対して易感染性を示すことが報告されている(S Jeyaseelan et al. J

Immunol 2006)。本解析で同定された機能損失型バリエーションはいずれもヘテロ接合性に同定されている。臨床症状としてはいずれの症例も明らかな易感染性はみられないが、IRAK4 欠損症と類似の臨床像を呈する症例中に、ホモ接合性あるいは複合ヘテロ接合性の遺伝子型を有する免疫不全症例が同定される可能性が推測される。

#### E. 結論

IRAK4 欠損症や MyD88 欠損症の診断には、フローサイトメーターによる簡易スクリーニングが推奨されているが、自然免疫異常症が疑われるにも関わらず、IRAK4、MyD88 に遺伝子変異を認めない場合、次の解析候補遺伝子として Mal/TIRAP が挙げられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Hiroaki H, Kondo N, Shirakawa M : (1)H, (13)C, and (15)N resonance assignment of the TIR domain of human MyD88. *Biomol NMR Assign* 4 : 123-125 (2010)
2. Ozeki M, Kunishima S, Kasahara K, Funato M, Teramoto T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N : A family having type 2B von Willebrand disease with an R1306W mutation: Severe thrombocytopenia leads to the normalization of high molecular weight multimers. *Thromb Res* 125 : e17-e12 (2010)
3. Ozeki M, Funato M, Teramoto T, Ohe N, Asano T, Kaneko H, Fukao T, Kondo N : Reversible cerebrospinal fluid edema and porencephalic cyst, a rare complication of ventricular catheter : Case report and literature review. *J Clin Neurosci* 17 :

658-661 (2010)

4. Fukao T, Zhang G, Matsuo N, Kondo N : CpG islands around exon 1 in the succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) gene are hypomethylated even in human and mouse hepatic tissues where SCOT gene expression is completely suppressed. *Molecular Medicine Reports* 3 : 355-359 (2010)
5. Fukao T, Nguyen HT, Nguyen NT, Vu DC, Can NT, Pham AT, Nguyen KN, Kobayashi H, Hasegawa Y, Bui TP, Niezen-Koning KE, Wanders RJ, de Koning T, Nguyen LT, Yamaguchi S, Kondo N : A common mutation, R208X, identified in Vietnamese patients with mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (T2) deficiency. *Mol Genet Metab* 100 : 37-41 (2010)
6. Suzuki M, Fujii H, Fujigaki H, Shinoda S, Takahashi K, Saito K, Wada H, Kimoto M, Kondo N, Seishima M. Lipocalin-type prostaglandin D synthase and egg white cystatin react with IgE antibodies from children with egg allergy. *Allergol Int* 59:175-183 (2010)
7. Hori T, Fukao T, Kobayashi H, Teramoto T, Takayanagi M, Hasegawa Y, Yasuno T, Yamaguchi S, Kondo N : Carnitine Palmitoyltransferase 2 Deficiency : The Time-Course of Blood and Urinary Acylcarnitine Levels during Initial L-Carnitine Supplementation. *Tohoku J Exp Med* 221 : 191-195 (2010)
8. Kato Z, Morimoto W, Kimura T, Matsushima A, Kondo N : Interstitial deletion of 18q: comparative genomic hybridization array analysis of 46, XX,del(18)(q21.2.q21.33). *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88 : 132-135 (2010)
9. Kato Z, Ohnishi H, Kimura T, Kondo N : Prediction of the pathogenesis of the mutation in MeCP2 C-terminal domain. *Brain Dev* 32 : 169 (2010)

10. Adachi S, Sakaguchi H, Kuwahara T, Uchida Y, Fukao T, Kondo N : High regression rate of coronary aneurysms developed in patients with immune globulin-resistant Kawasaki disease treated with steroid pulse therapy. *Tohoku J Exp Med* 220 : 285-290 (2010)
11. Fukao T, Horikawa R, Naiki Y, Tanaka T, Takayanagi M, Yamaguchi S, Kondo N : A novel mutation (c.951C>T) in an exonic splicing enhancer results in exon 10 skipping in the human mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene. *Mol Genet Metab* 100 : 339-344 (2010)
12. Omoya K, Naiki Y, Kato Z, Yoshida S, Uchida Y, Taga T, Aoki Y, Deguchi H, Kondo N : Sweet's syndrome in a neonate having non-B\*54 types of HLA. *World J Pediatr*.(in press)
13. Aoki Y, Fukao T, Zhang G, Ohnishi H, Kondo N : Mutation in the Q28SDD31SD site, but not in the two SQ sites of the survival of motor neuron protein, affects its foci formation. *Int J Mol Med* 26 : 667-671 (2010)
14. Matsui E, Shinoda S, Fukutomi O, Kaneko H, Fukao T, Kondo N : Relationship between the benefits of suplatast tosilate, a Th2 cytokine inhibitor, and gene polymorphisms in children with bronchial asthma. *Experimental and Therapeutic Medicine* 1 : 977-982 (2010)
15. Kaneko H, Teramoto T, Kondo M, Morita H, Ohnishi H, Orii K, Matsui E, Kondo N : Efficacy of the Slow Dose-up Method for Specific Oral Tolerance Induction in Children With Cow's Milk Allergy: Comparison With Reported Protocols. *J Investig Allergol Clin Immunol* 20 : 538-539 (2010)
16. Kato Z, Stern JN, Nakamura HK, Miyashita N, Kuwata K, Kondo N, Strominger JL : The autoimmune TCR-Ob.2F3 can bind to MBP85-99/HLA-DR2 having an unconventional mode as in TCR-Ob.1A12. *Mol Immunol* 48 : 314-320 (2010)
17. Kato Z, Manabe T, Teramoto T, Kondo N : Adenovirus infection mimics the cerebellitis caused by rotavirus infection. *Eur J Pediatr* : (in press) (2010)
18. Kato Z, Morimoto M, Orii KE, Kato T, Kondo N : Developmental changes of radiological findings in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Pediatr Radiol* 40 : 127-129 (2010)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

# ヒト ES/iPS 細胞からの血球分化系の構築と、これを用いた先天性免疫不全症の病態解析

中 畑 龍 俊 (京都大学 iPS 細胞研究所 臨床応用研究部門 疾患再現研究分野)

## 研究要旨

先天性免疫不全症の病因解明、病態解析のため、血球分化系を構築した。ヒト ES/iPS 細胞から分化させた血球細胞は、機能的なサイトカイン産生などを認め、患者の病態解析に使用できる可能性が示唆された。今後はさらに系を洗練し、免疫不全症の疾患 iPS 細胞を作成して解析を行いたい。

## A.研究の目的

先天性免疫不全症は、易感染性を呈し、適切な診療を行わなければ致死的になりうる疾患であるが、早期の介入により予後の改善が期待できる。しかし、病因や発症のメカニズムが判明していない患者が多数存在し、これらの患者の病態解明が行えれば臨床的な貢献は大きいと考えられる。そこで我々は、先天性免疫不全症の iPS 細胞を用いた解析を行い、病態解明を行うことを目的としている。iPS 細胞は京都大学の山中らによって見出された多能性幹細胞で、皮膚や血球などから樹立することができ、様々な体細胞に分化させることができる。患者 iPS 細胞を血球細胞や罹患臓器の細胞に分化させて解析することにより、疾患の病態解明や創薬に向けた手がかりとなりうる。

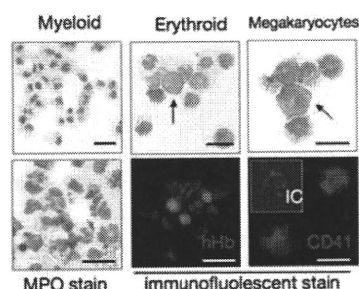
## B.研究方法

免疫不全症の iPS 細胞を用いた解析のためには、まず適切な血球分化系を構築する必要があるため、この課題に取り組んでいる。

## C.研究結果

OP9 フィーダー細胞を用いた血球分化系を用いて単球マクロファージを産生させ、貪食能・殺菌能・サイトカイン産生能などの機能評価を行ったところ、これらの機能が認められた。CINCA 症候群患者さんの iPS 細胞を樹立し、同様にマクロファージへと分化させると、過剰な IL-1 $\beta$ の産生が認められ、病態再現に成功したことが確認された。さらに、より安定した分化系を構築するため、フィーダーフリーの二次元培養で血球を分化させる系を開発中であり、すでに好中球・赤血球・血小板などの分化を確認している。

図: iPS細胞を用いて作成した血球細胞



#### D. 考察

以上のように血球分化系とその評価に成功している。さらに、抗原提示細胞やリンパ球などの分化系を構築していきたい。

#### E. 結論

研究は順調に進捗している。今後は T 細胞の適切な分化を支持する系なども開発したいと考えており、他施設と連携して疾患 iPS 細胞の樹立の取り組みを開始したい。

#### F. 研究危険情報

なし。

#### G. 研究発表

1. 中畑龍俊: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 12 回外科分子細胞治療研究会、特別講演、2010 年 4 月 8 日 名古屋国際会議場 名古屋市
2. 中畑龍俊: iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 55 回日本輸血・細胞治療学会中国四国支部例会 2010 年 9 月 11 日 米子コンベンションセンター
3. 中畑龍俊: 小児における再生医療の展望. 第 113 回日本小児科学会学術集会、教育講演、2010 年 4 月 23-25 日 (23 日) 盛岡市民文化ホール
4. 中畑龍俊: Various clinical applications of human induced pluripotent stem cells(iPS cells). 第 16 回日本遺伝子治療学会学術集会、教育講演、2010 年 7 月 1-3 日 (3 日) 栃木県総合文化センター (宇都宮市)
5. 中畑龍俊: 再生医療とレチノイド (1. iPS 細胞). 第 21 回日本レチノイド研究会学術集会、教育講演、2010 年 11 月 13-14 日 (14 日) 大阪医科大学 (看護専門学校講堂)
6. 中畑龍俊: iPS 細胞の臨床展開. 第 31 回日本臨床薬理学会年会、教育講演、2010 年 12 月 1-3 日 (1 日) 国立京都国際会館 (京都大学医学部附属病院薬剤部)
7. 中畑龍俊、伊藤守: 再生医療の基礎研究に有用なヒト化動物. 第 57 回日本実験動物学会総会 シンポジウム 3 (テーマ: 再生医療の幕を開く動物実験)、5 月 12-14 日 (14 日)、京都テルサ
8. 矢部普正、小原明、大賀正一、小林良二、土田昌宏、中畑龍俊、別所文雄、麦島秀雄、小島勢二: 小児再生不良性貧血に対する代替ドナー移植前処置の検討; Thymoglobulin in Childhood Aplastic Anemia: The Dose of Thymoglobulin. 第 32 回日本造血細胞移植学会総会 2010 年 2 月 19-20 日 (20 日)、アクトシティ浜松
9. 丹羽明、齋藤潤、加藤格、大嶋宏一、百瀬大、高橋和利、末盛博文、中辻憲夫、山中伸弥、平家俊男、中畑龍俊: ヒト ES/iPS 細胞からの試験管内造血系を用いた分化過程の解析. 第 9 回日本再生医療学会総会 2010 年 3 月 18-19 日 (19 日) 広島国際会議場 広島市
10. 中畑龍俊: 疾患特異的 iPS 細胞を用いた今後の医療. 第 47 回日本臨床分子医学会学術集会 2010 年 4 月 10-11 日 (11 日) 東京国際フォーラム 東京都
11. 中畑龍俊: Derivation of Engraftable Myogenic Precursors from Murine ES/iPS cells and Generation of Disease-specific iPS cells from Patients with Duchenne Muscular dystrophy(DMD) and Other Diseases. 51<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology(第 51 回日本神経学会総会) Symposium 7(The Forefront of Regenerative Medicine Research) 5 月 20-22 日 (22 日) 東京国際フォーラム

12. 中畑龍俊: iPS 細胞と疾患モデル細胞. (ミニシンポジウム1: 血液免疫関連疾患と iPS 細胞) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日(5日) 京王プラザホテル(東京)
13. 西小森隆太、田中尚子、井澤和司、酒井秀政、村田祐樹、横山宏司、阿部純也、田中孝之、斎藤潤、河合朋樹、八角高裕、中畑龍俊、平家俊男: 抗 IL-1 療法 (ワークショップ2: サイトカインを標的とした病態制御の可能性) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日(5日) 京王プラザホテル(東京)
14. 栗屋智就、張璽、水野雄太、丹羽明、加藤竹雄、深田宗一朗、山元弘、山中伸弥、中畑龍俊、平家俊男: マウス胚性幹細胞および誘導多能性幹細胞からの骨格筋幹/前駆細胞の誘導と移植効果 (ワークショップ7: 組織幹細胞による臓器再生) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日(5日) 京王プラザホテル(東京)
15. 丹羽明、斎藤潤、加藤格、大嶋宏一、末盛博文、平家俊男、中畑龍俊: ヒト ES/iPS 細胞からの in vitro 二次元無血清造血誘導における、分化過程の経時的解析 (ポスター) 第31回日本炎症・再生医学会 2010年8月5-6日 京王プラザホテル(東京)
16. Tatsuya Morishima, Ken-Ichiro Watanabe, Akira Niwa, Hisanori Fujino, Souichi Adachi, Tatsutoshi Nakahata: Neutrophil differentiation from human induced pluripotent stem(iPS) cells for disease investigation. (口演) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜
17. Akira Niwa, Toshio Heike, Katsutsugu Umeda, Koichi Ohima, Itaru Kato, Hirofumi Suemori, Megumu Saito, Tatsutoshi Nakahata: Tracing the developmental route from human ESC/iPSCs to blood via mesoderm in Serum-free 2D culture. (口演) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜
18. Nao Yoshida, Shinsuke Hirabayashi, Yuji Zaike, Masahiro Tsuchida, Ayami Yoshimi, Atsuko Masunaga, Masahumi Ito, Yoshitoshi Otsuka, Seiji Kojima, Kenichi Koike, Tatsutoshi Nakahata, Atsushi Manabe: A prospective registration of 75 children with juvenile myelomonocytic leukemia. (口演) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜
19. Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Hidemasa Sakai, Ryuta Nishikomori, Yoko Mizoguchi, Shin'ichiro Yasunaga, Motoaki Ohtsubo, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Yoshihiro Takihara, Masao Kobayashi: Identification of novel mutation in STAT1 and molecular pathogenesis of MSMD. (口演) 第72回日本血液学会学術集会 2010年9月24-26日 パシフィコ横浜
20. Kodera Y, Yamamoto K, Kato S, Harada M, Kanda Y, Hamajima N, Asano S, Ikeda Y, Imamura M, Kawa K, Morishima Y, Nakahata T, Tanimoto M, Dohy H, Tanosaki R, Shiobara S, Sung-Won Kim, Nagafuji K, Hino M, Miyamura K, Suzuki R; Safety and Risk of Allogenic Peripheral Blood Stem Cell Donation: The Comprehensive Report of Nation-Wide Consecutively Pre-Registered 3, 264 Family Donor Survey In 10 years Project by Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December4-7, 2010, Orland, Florida
21. Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Sakai H, Nishikomori R, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Heike T, Nakahata T, Takihara Y, Kobayashi M: A novel Mutation K673R in STAT1 impaired the STAT1 signal transduction in a dominant-Negative manner identified in a Japanese boy with MSMD. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY, December4-7, 2010, Orland, Florida