

法を確立することを目的に研究を行なった。一方、これまでの研究から、EBV 感染 T/NK 細胞を免疫学的に排除できないことが CAEBV の原因と考えられているが、その分子機構は必ずしも明らかになっていない。EBV には多くの miRNA をコードされているが、主に EBV ゲノムの BamHIA 断片から転写されるため BARTs と呼ばれている。BARTs には 40 種類以上の EBV-miRNA が含まれるが、それらの機能や病態との関連に対する理解は進んでいない。これまでの研究により、その一部は潜伏感染状態の維持に関与し EBV 感染 T/NK 細胞の成立や体内での維持にも重要な働きをしていると考えられている。本研究では、EBV 感染 T/NK 細胞の維持・増殖における EBV-miRNA の役割を明らかにするため、EBV 感染 T/NK 細胞に発現する miRNA をマイクロアレイと定量 PCR 法により解析し、細胞増殖や EBV 関連タンパク質の発現に与える影響を検討した。

## B : 研究方法

1. EBV-DNA の定量：リアルタイム PCR 法によりおこなった。

2. 固相化試薬の作成

LightCycler480 で使用する 8 well Strip に EBV 定量に使用するプライマー・プローブを安定化剤とともに減圧遠心法により固相化した Strip と、

EBV 定量に使用するプライマー・プローブに加えバッファー成分と増幅酵素 (EX-Taq: TakaraBio) を安定化剤とともに減圧遠心法により固相化した Strip の 2 種類を作成した。

4. 末梢血からの PBMC 分離

- a) 比重遠心分離法により PBMC を分離した。
- b) PBMC 分離用真空採血管 BD バキュテイナ採血管 (クエン酸ナトリウム入り: 日本 BD) を

使用し PBMC を分取した。

5. 細胞株：我々が樹立した EBV 感染 T/NK 細胞株 SNK6, 10 (NK 細胞株), SNT8, 15 ( $\gamma \delta$  T 細胞株), 16 ( $\alpha \beta$  細胞株) を使用した。

6. miRNA マイクロアレイ解析：各種細胞株から Total RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイ (LC Sciences) で解析した。

7. アンチセンスオリゴの導入と解析：EBV BART miRNA に対するアンチセンスオリゴ (Exigen) を Oligofectamine によりトランスフェクトした。

8. RT-PCR による EBV-mRNA の定量：EBV 感染細胞から Total RNA を抽出し、LMP1 の発現を定量した (control:  $\alpha$ -tubulin)。

9. 細胞増殖の検討：細胞に 100 pmol の anti-EBV-miRNA あるいはコントロールオリゴをトランスフェクトし、翌日から 24 時間毎に細胞数と生存率を計測した。

10. Immunoblot 解析：細胞を EBCD buffer により溶解し、各種単クローン抗体により EBV 関連タンパク質を検出した。

(倫理面への配慮)

倫理面の配慮が必要と考えられる研究は行わなかった

## C : 結果

1. 末梢血からの PBMC 分離

BD バキュテイナ採血管を使用すれば遠心により直接 PBMC を採取することが可能であり、リンフォセパールによる PBMC 分離と回収率や細胞種の割合などに本違いは認められなかった。分離に要する時間は、リンフォセパール法が 35 分に比べ 20 分と操作時間が短縮化される。

2. Ampdirect-plus を使用した EBV ゲノム DNA 検出系の性能検証

核酸抽出を行なった際と Ampdirect-plus を用いて DNA 抽出を行わない場合の検出感度との比較検討を行なった。その結果、検出感度に 10 倍程度の差があり、DNA 抽出した場合の方が高感度との結果が得られた。

3. 固相化試薬を用いた EBV ゲノム DNA 検出プライマー・プローブを固相化した検査ストリップを使用し、EZ1 で抽出した試験サンプル中の EBV ゲノム DNA の定量を行なった。その結果、1 反応中に EBV 陽性細胞由来 1 個分の DNA が含まれる場合でも検出可能だった。すべての試薬を固相化した検査ストリップを使用した場合も同様な検出感度だった。

#### 5. 抽出操作なしの直接検査

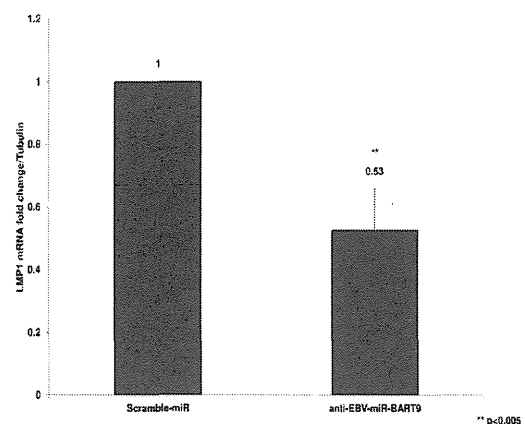
Ampdirect-plus を使用し、PBMC からの DNA 抽出なしに試験サンプル中の EBV ゲノム DNA の検出を試みたが、DNA 抽出した場合に比べ、いずれの場合も 10~100 倍程度の感度低下が認められた。

6. miRNA マイクロアレイプロファイリング： 代表的な 2 種類の細胞株 (SNK6 と SNT16) について miRNA マイクロアレイプロファイリングを行った。その結果、20 個の EBV-miRNA が 2 つの細胞ともに高値を示した (cut-off value 500)。RT-PCR 法により発現量を定量したところ 20 種のうち特に発現量が高いものは、BART17-5p, BART7, BART1-3p, BART9, BART10 だった。

7. アンチセンスオリゴによる EBVmiRNA の抑制と細胞増殖への効果： 高発現の 5 種類の EBVmiRNA を選択し、アンチセンスオリゴのトランスフェクトによる影響を調べた。その結果、anti-EBV-miRNA-BART9, anti-EBV-miRNA-BART7, anti-EBV-miRNA-BART17-5p が SNK6 の増殖を有意に抑制 (19~29%) したが、3 種類のうち anti-EBV-miRNA-BART9 のみが SNT16 の増殖も有意に抑制 (~34%)

した。これらの結果は、EBV-miRNA-BART9 が細胞増殖に関与していることを示している。

8. EBVmiRNA-BART9 の発現抑制による LMP1 の発現抑制： LMP1 は、細胞のシグナル伝達に関与し、細胞増殖に影響を与えていることが知られている。そこで、Immunoblot 解析により EBV BART miRNA の発現と LMP1 の発現との相関を解析した。その結果、anti-EBV-miRNA-BART9 による BART9 の発現抑制により LMP1 の発現が約 50%抑制されることを見出した。BART9 による LMP1 mRNA の発現は半分程度に抑制されており、BART9 miRNA は LMP1 の mRNA の蓄積を増強することにより LMP1 の発現増強に働いていることを示唆している (下図参照)



#### D: 考察

1. 現在のところ Ampdirect-plus を使用した検査系は、DNA 抽出を行なった場合に比べて感度が 10~100 倍程度低下する結果となっているが、酵素量や DNA 量の調節などにより感度を改善できる可能性があり、今後の開発により DNA 抽出を行なった場合に遜色ない結果が得られるものと考えられる。

2. 操作を一層簡略化するためには、固相化試薬を作成する際にバッファー・増幅酵素を同時に固相化する手法が効果的である。さらに、スタンダードも含め固相化した検査スト

リップと Ampdirect-plus などを組み合わせれば、ピペットによる簡単な混合操作のみで EBV ゲノム DNA 量を 70 分程度 (遠心 20 分間、PCR40 分間、その他 10 分間) で正確に定量することができ、迅速に CAEBV を含め EBV 関連疾患を診断することに寄与するだろう。

3. EBVmiRNA の発現状況は EBV 感染細胞の種類により大きく変動することが知られているが、EBV 感染 T/NK 細胞での EBVmiRNA の発現状況に関する知見は乏しかった。本研究により、EBV 感染 T/NK 細胞には約 20 種類の EBVmiRNA が発現し、そのなかでも BART17-5p, BART7, BART1-3p, BART9, BART10 の 5 種類が大量に発現していることが示された。5 種類の中でも BART9 の発現レベルが LMP1 の発現と直接的な関連があり、EBVmiRNA の発現が LMP1 の発現制御を通じ細胞増殖にも関連していることが示唆された。

4. SNK6 では BART9 の発現抑制が LMP1 mRNA および LMP1 タンパク質の発現抑制を誘導することが示され、BART9 が LMP1 mRNA 発現を制御している可能性を示唆している。BART9 は LMP1 の発現を LMP1 発現のリプレッサーの発現抑制を通じてアップレギュレートしている可能性が考えられるが、他方、BART9 が LMP1 mRNA の安定性に関与し、その半減期を伸ばしている可能性も考えられる。

5. LMP1 の発現レベルが恒常的に高いと細胞増殖がむしろ阻害され、しかも細胞障害性 T 細胞の標的となりやすい事が報告されている。しかし、特定の条件では LMP1 の発現上昇が EBV 感染細胞の維持・増殖に有利に働くことが示されており、BART9 による LMP1 発現の制御が EBV 感染 T/NK 細胞の維持・増殖および CAEBV の病態と密接に関連している可能性がある。

## E: 結論

1. 慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) 患者の末梢血中の EBV ゲノム DNA 量は高値を示すが、採血後そのまま遠心して簡便に PBMC を分離できる真空採血管と EBV ゲノムを PCR 増幅し検出するための固相化試薬を組み合わせることにより、60 分程度で簡便に EBV ゲノムコピー数を定量できる可能性が示された。

2. EBV 感染 T/NK 細胞株には BART9 が非常に高いレベルで発現していることを見出した。BART9 の発現を抑制すると細胞株の増殖および LMP-1 の発現が阻害され、BART9 miRNA を過剰発現させると LMP-1 の発現も増強した。これらの結果は、BART9 が EBV 陽性 T/NK 細胞株の増殖を LMP-1 発現の調節により制御していることを示唆している。

F: 健康危険情報      なし

## G: 研究発表

### 論文発表

1. Ogawa M, Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Nakagawa I, Mochizuki M. Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis. *Jpn J Ophthalmol.* 56(6):529-535, 2012.
2. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Ogawa M, Maruyama K, Usui N, Mochizuki M. Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 12;53(8):4692-8. 2012.
3. Ogawa M, Sugita S, Watanabe K, Shimizu N, Mochizuki M. Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR

- detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 250(12):1877-1883, 2012.
4. Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H.: Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *Journal of the Neurological Sciences* 324, 190-194(2013)
  5. Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, Shimizu N, Huang G, Yu Q, Chng WJ.: EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *blood* 121: 4512-4520(2013)
  6. Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N.: Detection of Herpes Viruses by Multiplex and Real-Time Polymerase Chain Reaction in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. *Respiration*, [Epub ahead of print] (2013)
  7. Ito K, Shimizu N, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T.: Analysis of viral infection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Internal Medicine.* 52(2):201-11 (2013)

## 著書

1. 北條浩彦、清水則夫(分担執筆). 原理からよくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド 最強のステップUPシリーズ. 北條浩彦編 「基本編ー原理と基本知識ーリアルタイム PCR を使った解析の基本 10 プライマー/プローブの設計手順②マルチプレックスの場合」 p72-74 羊土社, 2013
2. 清水則夫、渡邊健、外丸靖浩(分担執筆). 原理からよくわかるリアルタイムPCR 完全実験ガイド 最強のステップUPシリーズ. 北條浩彦編 「実践編ープロトコールを中心にーIV章 遺伝子量解析15 ウイルス感染症を診断する ウイルスゲノムの定性的検査と定量的検査」 p192-202 羊土社, 2013

## 国内学会発表

1. 吉山 裕規、高田 賢蔵、南保 明日香、清水 則夫 EBV遺伝子BNLF2aとBNLF2 bは溶解感染初期と潜伏期に発現し、腫瘍化に関与する 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月 大阪
2. 清水則夫 移植医療・細胞治療におけるウイルス検査系の開発 輸血学会関東甲信越支部会 2012年9月 東京
3. 今留謙一 松田剛 川野布由子 千葉佑規乃 新井文子 中澤温子 伊藤守 清水則夫 藤原成悦 難治性 EBウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究 日本ウイルス学会 2013 年 11 月 神戸
4. 清水則夫 再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発 第 14 回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 9 月 東京

国際学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

慢性活動性EBウイルス感染症の原因遺伝子に関する研究

研究分担者 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 森尾友宏

慢性活動性EBV感染症(Chronic active EB virus infection: CAEBV)は血液中および組織のEBV-DNA量の増加とT細胞あるいはNK細胞への感染を特徴とする予後不良の疾患であるが、その原因については未だ明らかになっていない。近年、特定の病原体に対して脆弱性を示す単一遺伝子異常症の存在が報告されており、CAEBVにおいても背景となる遺伝子異常が存在する可能性がある。ヘルペス属感染症に脆弱性を示す本研究では、まずCAEBVを呈する原発性免疫不全症(PID)患者を集積し、その免疫学的特徴を探索した。さらにCAEBVの分子基盤を明らかにするために、その責任遺伝子探索を行い、候補遺伝子の策定を行った。その結果、背景にFANCA異常症(Fanconi貧血)やPIK3CD異常症などがあること、またそれ以外にも明らかに遺伝子異常を背景とする(PIDを呈する)疾患が存在することが明らかになった。

#### A. 研究目的

慢性活動性EBV感染症(CAEBV)は、持続あるいは再発する伝染性単核症様症状と、末梢血および病変組織におけるEBVDNA量の増加を特徴とする予後不良の疾患である。臨床像や現時点での治療方針はある程度明らかになりつつある中、その真の原因探索は不十分である。免疫学的解析についてもサイトカイン測定などにとどまり未だに限定的である。この研究ではCAEBVの免疫機能解析基盤を確立すること、及び真の原因としてその遺伝的背景を明らかにすることを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 1) CAEBVの免疫学的特性に関する研究

CAEBVの免疫学的特性を明らかにするために、主にCAEBVを合併する、あるいは持続的にEBVDNA量高値をとる、先天性免疫不全症を中心に検討を行った。具体的には10 parameter flow cytometryにてB, T, NK, DC亜群を解析した。具体的には以下の亜群を明らかにした。

B細胞: transitional B (T1, T2, T3), naïve B (CD27-IgM-IgD-CD19+), memory B (IgM+, IgG+, IgA+ memory), plasmablast, plasma cells

T細胞: naïve T, central memory T, effector T, regulatory T (CD25+CD127-CD4+), NKT (V $\alpha$ 11+V $\alpha$ 24+CD3+), Th1, Th2, Th17, follicular helper T,  $\gamma\delta$ T, activated T, double negative T  
NK細胞、DC subset (pDC, mDC, activated mDC)

また末梢血全血からDNAを抽出し、リアルタイムPCRを用いてkappa-deleting recombination

excision circles (KRECs), T cell receptor excision circles(KRECs)を測定した。KRECsはsignal joint KRECs (sjKRECs)とcoding joint KRECs (cjKRECs)を解析した。

またBZLF1, EBNA1, LMP2特異的T細胞を、それぞれの領域をカバーする重複ペプチドを用いて末梢血単核球を刺激し、細胞内IFN-gamma産生で検出する方法の確立と、それぞれの特異的T細胞をさらに増幅する検討を行った。

##### 2) CAEBV患者の責任遺伝子探索

CAEBV患者のうち背景にPIDを有するものについて末梢血単核球よりDNAを抽出して、全エクソン解析を行った。2012年は患者本人でのみ解析を行ったが、2013年には両親及び同胞の検体もふくめた解析を実施するように試みた。また明らかな免疫不全症を合併しないCAEBV患者(造血細胞移植後患者)から唾液を採取してDNA抽出を行った(唾液検体にて Trio を用いた全エクソン解析は研究代表者施設で行われた得られた結果はinsertion, deletion, missense mutation, nonsense mutationを中心に抽出し、dbSNP137及びin house Japanese SNPのフィルタリングを行った後に候補遺伝子を策定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、患者検体及び家族検体(末梢血及び唾液)を用いて解析を行った。研究においては遺伝子解析が含まれており、各種指針を遵守し、個人情報管理に十分配慮し、十分な説明と同意の元で研究を実施した。本研究に関しては、医学部遺伝子解析に関わる倫理審査委員会の承認を

得て実施した。

### C. 研究結果

#### 1) CAEBV患者における免疫学的特性の解析

CAEBVを合併する免疫不全症患者においてのB, T細胞, NK, DCサブセットやKRECs, TRECs値は様々であるが、一部NKT細胞が減少するものや、KRECs/TRECs低値で複合型免疫不全症のパターンを呈する症例があることが明らかになった。大半の症例においてT細胞はCD69+, HLADR+の細胞集団を含み、活性化されていることが明らかである。またTCRVBレパートアでは偏りをしめす症例が存在した。NKT細胞の減少は1例にて認められた。KRECs, TRECsについてはTRECs低下例が約半数であった。

#### 2) 遺伝的背景の研究

2名のCAEBV合併分類不能型免疫不全症患者では染色体の安定性維持やDNA修復に関与する遺伝子のhomozygous mutationが同定された。1例ではFANCAのmutationであり、本変異は両親にhetero alleleに同定された。DNA損傷刺激後のfoci形成にも異常を認めている。既に造血細胞移植が行われているが、既知遺伝子の稀な表現型として特記すべきものである。

2013年には3例において候補遺伝子探索を行った。1例は幼小児期から20年近く継続するIgG2サブクラス欠損症で、免疫グロブリン補充まで肺炎を反復している。近年リンパ節腫大が著明になり末梢血でもEBVが検出されるようになった。当科にての候補遺伝子解析によりPIK3CD遺伝子にE1021K変異があることが明らかになった。いわゆるactivated PIK3CD syndromeであった。その他2症例においては両親及び同胞を含めた全エクソン解析を行い、候補遺伝子を絞り込んでいるところである。その中1例でEBV-LPDとなり汎血球減少症を呈しているが、兄もborderlineでIgGが低値であり、今後の解析において、患者あるいは健常者の両者を念頭においてデータ処理が必要となると考えられる。

### D. 考察

CAEBVでは遺伝的背景があるだろうとの推論から、共通の免疫学的異常を探り、さらに責任遺伝子探索を行った。それらの結果から、例えば慢性皮膚粘膜カンジダ症におけるSTAT1異常症のように、単一責任遺伝子が多くの疾患を説明できるような病態ではなさそうとの感触を得ている。一方、epigenetic modificationやlarge deletionなどが背景となっている可能性もあり、今後さらに多角的に検討する必要があると感じている。一方患者においてEBV特異的T細胞活性をIFN $\gamma$ 産生能にて

検討したところ、多くの患者では特異的T細胞が著しく減少していることが観察された。本データは結論にまとめるほど均一な結果ではないが、今後さらに詰めていく必要があると考えている。

### E. 結論

原発性免疫不全症を背景として発症したCAEBVの免疫能解析および責任遺伝子探索を行った。2年間の中で、CAEBVを呈するPIDは免疫学的にはheterogeneityを有するが、T細胞は活性化されており、一方T細胞の新生能低下を示すものが多く、獲得免疫異常を背景とするものが多いことが示唆された。本研究の中でCAEBVを呈するPIDの責任遺伝子の一部を明らかにし、また継続的な解析から候補遺伝子を絞り込みつつある。

### F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

### G. 研究発表

1. 学術雑誌での発表 (英文論文)
1. Isoda T, Mitsuiki N, Ohkawa T, Kaneko S, Endo A, Ono T, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwara M, Araki S, Nagasawa M, **Morio T**, Takagi M, Mizutani S. Irreversible Leukoencephalopathy After Reduced-intensity Stem Cell Transplantation in a Dyskeratosis Congenita Patient With TINF2 Mutation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 35: e178-82, 2012.
2. Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, **Morio T**, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y. A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 90: 164-8, 2012.
3. Shimizu M, Kanegane H, Wada T, Motoyoshi Y, **Morio T**, Candotti F, Yachie A. Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol*. 131: 587-90, 2012.
4. Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, **Morio T**, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer*. 60: 836-41, 2012.

5. Isoda T, Takagi M, Piao J, Nishii R, Masaki S, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, **Morio T**, Kawamoto H, Mizutani S. Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. *Blood*. **120**: 789-99, 2012.
  6. Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, **Morio T**, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T. Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clinical Endocrinol*. **77**: 628-34, 2012.
  7. Honda F, Kano H, Kanegane H, Nonoyama S, Kim E-S, Lee S-K, Takagi M, Mizutani S, **Morio T**. Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils. *Nature Immunol*. **13**: 369-78, 2012.
  8. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, **Morio T**, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan W, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. **119**: 2376-84, 2012.
  9. Sato R, Iizumi S, Kim E-S, Honda F, Lee S-K, Adachi N, Koyama H, Mizutani S, **Morio T**. Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP-gene disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASP. *Int. J. Hematol*. **95**:299-310, 2012.
  10. Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammerstrom Q, van Zelm MC, **Morio T**, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin  $\kappa$ -deleting recombination excision circles. *J Allerg Clin Immunol*. **131**: 1437-40, 2013.
  11. Machida S, Tomizawa D, Tamaichi H, Okawa T, Endo A, Imai K, Nagasawa M, **Morio T**, Mizutani S, Takagi M. Successful Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in a Patient With Ataxia Telangiectasia Using Rituximab. *J Pediatr Hematol Oncol*. **35**: 482-5, 2013.
- (著書・総説)
1. **森尾友宏**:(分担執筆)第 21 章 先天性免疫不全症 Wiskott-Aldrich 症候群、最新ガイド
  - ライン準拠 小児科診断・治療指針、遠藤文夫編、p840、中谷書店、東京、2012 年 9 月
  2. **森尾友宏**:(分担執筆)第 19 章 リウマチ性疾患 アレルギー性疾患 先天性補体欠損症 免疫不全症、赤林朗、大内尉義、黒川峰夫、小池和彦、辻省次、長瀬隆英、藤田敏郎、森屋恭爾、山本一彦編、門脇孝、永井良三編、カラー版内科学、p1333、西村書店、東京、2012 年 7 月
  3. **森尾友宏**:先天性免疫不全症の病態と思春期以降のマネジメント 血液内科 **65**(4) 599-607,2012.
  4. **森尾友宏**:【クローズアップ感染症】<感染性疾患の基礎的な知見の進歩・概念の変化> 感染症と自然免疫 小児内科 **44**(7): 959-965, 2012.
  5. **森尾友宏**:【サイトカインのすべて(完全改訂版)】 サイトカイン投与およびサイトカイン抑制による治療 免疫不全症 臨床免疫・アレルギー科 **57**: Suppl.21 838-844, 2012.
  6. **森尾友宏**:原発性免疫不全症における臨床遺伝学 T 細胞系免疫異常症における遺伝子診療 日本遺伝カウンセリング **33**(1): 49-53, 2012.
  7. **森尾友宏**:分類不能型免疫不全症 日本臨牀 **70**: 2011-2021, 2012.
  8. **森尾友宏**:分類不能型免疫不全症 Update 日本臨床免疫学会雑誌 **35**: 14-22, 2012.
  9. 山田尚、**森尾友宏**、古川恵一:EB ウイルス感染症のピットホール 成人病と生活習慣病 **43**: 1021-32, 2013.
  2. 学会発表
  1. **Morio T**. Primary Immunodeficiencies due the Defect in Signaling Molecules. 2012 KSMCB Annual Meeting, Seoul, Korea. October 2012.
  2. Isoda T, Takagi M, **Morio T**, Kawamoto H, Mizutani S. Visualization of chromosomal translocation and early T-cell development failure in ATM deficiency. 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October 2012.
  3. Mitsuiki N, Oshima K, Imai K, Ohara O, **Morio T**, Mizutani S. Genetic analysis for 207 cases with primary immunodeficiency (PID) consulted to a single center through PID network in Japan (PIDJ) in 5 years (2007-2011). 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies (ESID2012). Florence, Italy. October 2012.
  4. **森尾友宏**:Multivirus specific cytotoxic



T-cells for post-transplant virus infection.、**第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム)**、横浜、2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日

5. **森尾友宏**:細胞内寄生菌にたいする感染防御機構、**第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会(教育セミナー)**、北九州、2012 年 11 月 23 日
6. **森尾友宏**:先天性免疫不全症および血液系腫瘍において診断の手がかりとなる皮膚病変と、診断への道筋、**第 36 回日本小児皮膚科学会学術大会(シンポジウム)**、前橋市、2012 年 7 月 15 日
7. **森尾友宏**:悪性腫瘍を合併する免疫不全症、**第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会(シンポジウム)**、福岡、2013 年 11 月 29 日-12 月 1 日
8. **森尾友宏**:免疫不全症候群から学ぶ human immunology、**第 41 回日本臨床免疫学会総会(シンポジウム)**、山口、2013 年 11 月 27 日-29 日
9. **森尾友宏**:病原体と宿主からみる呼吸器ウイルス感染症:その分子基盤と免疫操作による感染制御、**第 16 回 茨城県小児感染症研究会(招待講演)**、茨城、2013 年 11 月 20 日
10. **森尾友宏**:易感染性、自己免疫、悪性腫瘍の分子基盤としての原発性免疫不全症、**平成 25 年度遺伝子病制御研究所研究集会**、北海道、2013 年 10 月 25 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

## CAEBV 原因遺伝子の同定を目的とする全エクソン配列解析

研究分担者 藤原成悦 国立成育医療研究センター研究所・母児感染研究部・部長

共同研究者 今留謙一 国立成育医療研究センター研究所 母児感染研究部  
新井文子 東京医科歯科大学大学院 血液内科  
大賀正一 九州大学大学院 周産期小児医療学  
澤田明久 大阪府立母子保健総合医療センター 血液・腫瘍科

研究要旨 慢性活動性 EB ウイルス感染症発症の背景には遺伝子の異常による軽度の免疫不全が存在することが疑われる。この遺伝子異常を同定するために、患者および家族の DNA を用いて全エクソン配列決定による解析を行っている。これまでに患者 11 名とその家族 16 名、合計 27 名より唾液 DNA を採取し、エクソーム解析を開始した。そのうち患者 2 名、家族 1 名の解析が終了している。2 名の患者に共通の variation は見つからなかったが、複数の免疫関連遺伝子において homozygous あるいは heterozygous な variation が見つかった。これらの免疫関連遺伝子には CVID の原因遺伝子として同定されたものが複数含まれていた。残る DNA サンプルについても近く解析を完了する予定である。

### A. 研究目的

SAP 遺伝子の変異による X 連鎖リンパ増殖症、TLR3 遺伝子の変異による単純ヘルペス脳炎、STIM1 遺伝子の変異によるカポジ肉腫など、遺伝子変異が限られた特定のウイルスに対する免疫応答を低下させることが原因となる疾患が見ついている。慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) に認められる所見、すなわち EBV がコードする蛋白質 LMP2 に特異的な細胞傷害性 T 細胞が認められないこと、NK 細胞活性が低下していることなどは、この疾患の背景には遺伝子の異常による微細な免疫応答が存在し、その

ために EBV 感染 T および NK 細胞が免疫監視機構を逃れていると推測されている。また、最近になり分類不能型免疫不全症 (CVID; common variable immunodeficiency) 患者の一部が EBV 感染あるいは NK 細胞のモノクローナルな増殖など CAEBV と区別できない病態を示すことが報告され、上記の推測に対するサポートが得られている。一方で、近年次世代シーケンサーの登場により、全エクソン塩基配列が容易となり、CAEBV のように患者数が少ない疾患においても原因遺伝子の探索が可能となっている。そこで本研究では、CAEBV 患者

およびその家族のエクソーム解析により、発症の背景となる免疫不全の原因となる遺伝子の同定を目的として研究を開始した。

## B. 研究方法

### 1. CAEBV 患者

大阪府立母子保健総合医療センター（澤田明久博士）、九州大学医学部周産期小児医療学（大賀正一博士）、および東京医科歯科大学血液内科（新井文子博士）において診断された CAEBV 患者 11 名とその家族 16 名の合計 27 名を対象とした（表 1）。CAEBV の診断は EB ウイルス感染症研究会が策定した診断指針によった。

### 2. DNA 採取

CAEBV においては EBV 感染 T あるいは NK 細胞がモノクローナルあるいはオリゴクローナルに増殖しており、末梢血中にはこのような感染細胞が多数含まれている。これらの細胞は多数回の分裂を経ているためすでに体細胞変異を蓄積している可能性が高い。体細胞変異の存在は発症の根本的原因となる germ line あるいは de novo 変異（variation）の検出を困難にすると考えられたため、本研究では唾液から Oragene DNA 採取キットを用いて抽出した DNA を用いた。また、継続的な DNA 使用を可能とするため末梢血から EBV によるリンパ芽球様細胞株を樹立した。

### 3. 全エクソン配列解析

全エクソン領域のライブラリー作成には Agilent 社 SureSelect Human All Exon V4 キットを用いた。エクソン部分の配列解析は illumina 社 HiSeq 1000 を用いた。得られた配列データをアラインメントプログラム BWA によりヒトゲノム配列 hg18

上に位置づけ、Genome analysis toolkit (GATK) などにより 1000 ゲノムプロジェクト、dbSNP、HapMap、in house database などのデータと照合し、変異を検出する作業を行った。検出される変異については、SIFT や PolyPhen 2 等のプログラムによりその変異が蛋白質機能に与える影響を推定した。

### （倫理面への配慮）

全エクソン配列解析は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則って行われた。研究計画書は国立成育医療研究センターおよび DNA 採取機関の倫理委員会による審査を受け承認されている。患者本人あるいは保護者に対して本研究に関する十分な説明を文書と口頭で行い、自由意思による同意書への署名を得ることによりインフォームドコンセントを取得した。試料、DNA 配列データおよび臨床情報は匿名化され、患者の個人情報情報は厳重に管理された。血液の提供を受ける場合は、通常の診療に必要とされる採血の際に余分に血液を採取することにより苦痛の軽減を図った。

## C. 研究結果

平成 26 年 2 月末までに、CAEBV 患者 11 名とその家族 16 名、合計 27 名より唾液 DNA を採取し、エクソーム解析を開始した。そのうち患者 2 名、家族 1 名の解析が終了している。2 名の患者に共通の variation は見つからなかったが、複数の免疫関連遺伝子において homozygous あるいは heterozygous な variation が見ついている。これらの免疫関連遺伝子には CVID の原因遺伝子として同定されたものが複数含まれていた。また、SIFT および PolyPhen2 による variant 蛋白質の機能

予測において、機能への重大な影響が予想される variation が含まれていた。これらの variation の一部に関しては、サンガー法により他の多くの CAEBV 患者において同様の variation が存在するかどうかを調べている。

#### D. 考察

CAEBV は個々の患者により発症年齢、進行スピード、合併症の有無とその種類などに大きな違いがある。従って、その背景に存在すると考えられる遺伝子異常も単一ではなく、患者により異なる遺伝子の関与が推測される (genetic heterogeneity)。すでに解析が終了した 2 名の患者からは共通の variation が見つかっていないが、CAEBV に関して予想されるこのような genetic heterogeneity を考慮するとむしろ当然の結果であると考えられる。これまでに解析を開始した 11 名の結果が得られた段階で、複数の患者において variation が見つかる遺伝子に焦点を当て、従来のサンガー法による解析をさらに多くの CAEBV 患者において行い、背景遺伝子を同定したいと考えている。候補となる variation についてはそれがコードする蛋白質の機能解析を行う予定である。

#### E. 結論

CAEBV 患者 11 名とその家族 16 名、合計 27 名より唾液 DNA を採取し、エクソーム解析を開始した。そのうち患者 2 名、家族 1 名の解析が終了している。2 名の患者に共通の variation は見つかっていないが、CAEBV では genetic heterogeneity の存在が疑われるため、さらに解析を続け複数の患者に見つかる variation に焦点を絞

り検索を続ける計画である。

#### F. 健康危機情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Fujiwara S, Matsuda G, and Imadome K. Humanized mouse models of Epstein-Barr virus infection and associated diseases. *pathogens* 2: 153-176, 2013.
- 2) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama, E, Morio T, Shimizu N, and Wakiguchi H. Current studies on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatrics International*, 2014, in press.
- 3) Fujiwara S. Reproduction of Epstein-Barr virus infection and pathogenesis in humanized mice. *Immune Network*, 2014, in press.
- 4) Arai A, Imadome K, Wang L, Nan W, Kurosu T, Wake A, Ohta Y, Harigai M, Fujiwara S, and Miura O. Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation. *Intern Med* 51: 777-782, 2012.
- 5) Yang X, Wada T, Imadome K, Nishida N, Mukai T, Fujiwara M, Kawashima H, Kato F, Fujiwara S, Yachie A, Zhao X, Miyawaki T, Kanegane H. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in two patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and type 2. *Herpesviridae* 2012, 3:1.
- 6) Imadome K, Fukuda A, Kawano F, Imai Y,

Ichikawa S, Mochizuki M, Shigeta T, Kakiuchi T, Sakamoto S, Kasahara M, Fujiwara S. Effective control of Epstein-Barr virus infection following pediatric liver transplantation by monitoring of viral DNA load and lymphocyte surface markers. *Pediatr Transplant*. 2012 Nov;16(7):748-57.

7) Arai A, Nogami A, Imadome K, Kurata M, Murakami N, Fujiwara S, Miura O. Sequential monitoring of serum IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  levels in a CAEBV patient treated by plasma exchange and immunochemotherapy. *Int J Hematol* 96(5): 669-673, 2012.

## 2. 著書

なし

## 3. 学会発表

(国際学会)

1) Fujiwara S. Reproduction and Analysis of Epstein-Barr Virus Pathogenesis in Humanized Mice. 4th International Workshop on Humanized mice. Sep 30, 2013, Seoul.

2) Fujiwara S. Reproduction of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Diseases in Humanized Mice. Fall Conference of the Korean Association of Immunologists. Nov 8, 2013.

3) Matsuda G, Imadome K, Yajima M, Ochiai N, Mochizuki M, Kawano F, Shimizu N, Komano J, Yamamoto N, Fujiwara S. A humanized mouse model of cell-mediated immunotherapy against EBV-associated lymphoproliferative disorder. 38th Annual International Herpesvirus Workshop, Jul 20-24, 2013, Grand Rapids.

4) Fujiwara S. Mouse Models of Epstein-Barr Virus-Related Diseases. 1st Samsung

Humanized Mice Symposium, April 14, 2012, Seoul.

5) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models of Chronic Active EBV Infection and EBV-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Reveals a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. VII. International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs. 2012.2.4-6 Tokyo.

(国内学会)

1) 今留 謙一、松田 剛、川野 布由子、千葉 祐規乃、新井 文子、中澤 温子、伊藤 守、清水 則夫、藤原 成悦. 難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬 3 剤の評価研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 11 日、神戸.

2) 堀野雅人、今留謙一、今井耕輔、王路丹、松田剛、浜崎霞、小松穂菜実、倉田盛人、藤原成悦、三浦修、新井文子. EBV は T、NK 細胞に感染後 AID 発現とそれによる遺伝子変異蓄積をもたらす腫瘍発症に寄与する. 第 75 回日本血液学会学術集会、平成 25 年 10 月 11 日、札幌.

3) 王路丹、今留謙一、小松穂菜実、福田哲也、倉田盛人、藤原成悦、三浦修、新井文子. EBV の感染により T、NK 細胞では IL-2 の存在下 CD137 発現が誘導され細胞生存が亢進する. 第 75 回日本血液学会学術集会、平成 25 年 10 月 11 日、札幌.

4) 小松穂菜実、今留謙一、王路丹、倉田盛人、小山高敏、藤原成悦、三浦修、新井文子. EBV 陽性 T、NK 細胞は FOX-p3

を発現し制御性 T 細胞同様 T 細胞の増殖を抑制する。第 75 回日本血液学会学術集会、平成 25 年 10 月 11 日、札幌。

5) 藤原成悦. EB ウイルス関連疾患の病態を再現するモデルマウス. 北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会「感染・免疫・炎症・発癌」. 平成 24 年 6 月 8 日、札幌。

6) 藤原成悦. EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患の病態を再現するモデルマウス. 第 19 回ヘルペス感染症フォーラム、平成 24 年 8 月 24 日、札幌。

7) 仁多美奈子、山本正英、今留謙一、藤原成悦、三浦修、新井文子. **Chronic active Epstein-Barr virus infection** 成人例に対する骨髄非破壊的前処置を用いた造血幹細胞移植成績. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会 2012 年 2 月 24-25 日 大阪。

8) Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, Ludan Wang, Honami Komatsu, Takatoshi Koyama, Ayako Nogami, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. **Inflammatory cytokines can be molecular targets for treatment of CAEBV.** 第 74 回日本血液学会総会、2012 年 10 月 18-20 日、京都。

9) Ludan Wang, Ken-Ichi Imadome, Honami Komatsu, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai. **EBV infection enhances T-cell adhesion and survival contributing to EBV-T-LPD development.** 第 74 回日本血液学会総会、2012 年 10 月 18-20 日、京都。

10) 松田剛、今留謙一、矢島美彩子、落合央、望月雅司、川野布由子、山田千尋、今井由美、瀨崎霞、浅田恵理子、原口摩耶、千葉祐規乃、清水則夫、駒野淳、山本直樹、藤原成悦. ヒト化マウスを用いた EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患に対する免疫細胞治療のモデル実験. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月 14 日、大阪。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

図 表

表 1. CAEBV 患者及びその家族からの DNA 採取の状況

| 症例 | 年齢<br>(発症時) | 年齢<br>(唾液採取時) | 性別 | EBV<br>感染細胞         | 末梢血<br>EBV DNA 量<br>(copies/ $\mu$ g DNA) | 合併症             | 両親<br>DNA |
|----|-------------|---------------|----|---------------------|---|-----------------|-----------|
| 1  | 12          | 21            | 女  | NK 細胞               | $2.1 \times 10^3$                         | 蚊刺過敏症           | 母         |
| 2  | 8           | 18            | 男  | NK 細胞               | $1.4 \times 10^3$                         | 種痘様水疱症          | なし        |
| 3  | 7           | 9             | 男  | NK 細胞               | $2.0 \times 10^6$                         | 蚊刺過敏症           | 父・母・妹     |
| 4  | 9           | 13            | 男  | $\gamma\delta$ T 細胞 | $6.0 \times 10^5$                         | 蚊刺過敏症<br>種痘様水疱症 | 父・母       |
| 5  | 8           | 10            | 女  | NK 細胞               | $1.0 \times 10^7$                         | 蚊刺過敏症           | 母         |
| 6  | 9           | 12            | 男  | NK 細胞               | $1.5 \times 10^4$                         | 蚊刺過敏症           | 母         |
| *7 | 20          | 23            | 女  | NK 細胞               | $2.5 \times 10^4$                         | CVID            | なし        |
| *8 | 16          | 20            | 女  | CD4T 細胞             | $1.9 \times 10^3$                         | CVID            | なし        |
| *9 | 4           | 6             | 女  | NK 細胞               | $3.5 \times 10^4$                         | CVID            | なし        |
| 10 | 9           | 13            | 男  | $\gamma\delta$ T 細胞 | $2.0 \times 10^3$                         | 蚊刺過敏症           | 父・母・妹     |
| 11 | 4           | 15            | 男  | NK 細胞               | $1.5 \times 10^3$                         | 蚊刺過敏症           | 父・母・兄・弟   |

\*7, 8, 9 は唾液ではなく PBMC からの DNA 抽出

研究成果の刊行に関する一覧表（平成24年度）

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名                              | 書籍全体の編集者名   | 書籍名                  | 出版社名     | 出版地 | 出版年  | ページ     |
|------|--------------------------------------|---|----------------------|----------|-----|------|---------|
| 森尾友宏 | 第21章 先天性免疫不全症<br>Wiskott-Aldrich症候群  | 遠藤文夫編   | 最新ガイドライン準拠小児科診断・治療指針 | 中谷書店     | 東京  | 2012 | 840-42  |
| 森尾友宏 | 第19章 リウマチ性疾患 アレルギー性疾患 先天性補体欠損症 免疫不全症 | 赤林朗、大内尉義、黒川峰夫、小池和彦、辻省次、長瀬隆英、藤田敏郎、森屋恭爾、山本一彦編、門脇孝、永井良三編 | カラー版内科学              | 西村書店     | 東京  | 2012 | 1333-4  |
| 木村 宏 | 臨床ウイルス学/エンベロープを有するDNAウイルス            | 吉開康信、西山幸廣（監訳）   | レビンソン微生物学・免疫学        | 丸善出版     | 東京  | 2012 | 247-262 |
| 木村 宏 | 血液幹細胞移植時のウイルス感染症                     | 柳雄介、堤裕幸、編.  | 新編ウイルスの今日の意味         | 医薬ジャーナル社 | 大阪  | 2012 | 150-157 |

雑誌

| 発表者氏名   | 論文タイトル名  | 発表誌名           | 巻号    | ページ       | 出版年  |
|---|--|----------------|-------|-----------|------|
| Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, and Fujiwara S.                  | Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. | PLoS Pathogens | 7(10) | e1002326  | 2011 |
| Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, Shimizu N, Ito M, and Fujiwara S. | Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice.  | PLoS ONE       | 6(10) | E26630    | 2011 |
| Fujiwara S, Matsuda G, and Imadome K.   | Humanized mouse models of Epstein-Barr virus infection and associated diseases.  | pathogens      |       | In press. | 2013 |



|   |  |   |       |          |      |
|---|--|---|-------|----------|------|
| Arai A, Imadome K, Watanabe Y, Takahashi M, Kawaguchi T, Nakaseko C, Fujiwara S, Miura O.   | Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis. Int J Hematol 93(5):602-9, 2011.   | Int J Hematol                                       | 93(5) | 602-9    | 2011 |
| Arai A, Imadome K, Wang L, Nan W, Kurosu T, Wake A, Ohta Y, Harigai M, Fujiwara S, and Miura O.   | Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation.   | Inter Med   |       | In press | 2012 |
| Tanyaradzwa P. Ndongwe, Adeyemi O. Adedeji, Eleftherios Michailidis, Yee Tsuey Ong, Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Emily M. Ryan, Devendra K. Rai, Karen A. Kirby, Angela S. Whatley, Donald H. Burke, Marc Johnson, Shilei Ding, Yi-Min Zheng, Shan-Lu Liu, Ei-Ichi Kodama, Krista A. | Delviks-Frankenberry, Vinay K. Pathak, Hiroaki Mitsuya, Michael A. Parniak, Kamalendra Singh, Stefan G. Sarafianos. Biochemical, inhibition, and inhibitor resistance studies of xenotropic murine leukemia virus-related virus reverse transcriptase. | Nucleic Acids Research                              | 40    | 345-359  | 2012 |
| Ryo Masuda R, Shinya Oishi, Noriko Tanahara, Hiroaki Ohno, Akira Hirasawa, Gozoh Tsujimoto, Eiichi Kodama, Masao Matsuoka and Nobutaka Fujii.   | Development and application of fluorescent SDF-1 derivatives.  | Future Medicinal Chemistry                          | 4     | 837-844  | 2012 |
| Xiaoguang Li, Hua Qian, Fusako Miyamoto, Takeshi Naito, Kumi Kawaji, Kazumi Kajiwara, Toshio Hattori, Masao Matsuoka, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Eiichi N. Kodama  | A simple, rapid, and sensitive system for the evaluation of anti-viral drugs in rats.  | Biochemical and Biophysical Research Communications | 424   | 257-261  | 2012 |

|   |  |  |          |             |      |
|---|--|--|----------|-------------|------|
| Atsuko Hachiya, Bruno Marchand, Karen A. Kirby, Eleftherios Michailidis, Xiongying Tu, Krzystof Palczewski, Yee Tsuey Ong, Daniel T. Griffin, Matthew M. Schuckmann, Junko Tanuma, Shinichi Oka, Kamalendra Singh, Eiichi N. Kodama and Stefan G. Sarafianos. | HIV-1 reverse transcriptase (RT) polymorphism 172K, suppresses the effect of clinically relevant drug resistance mutations to both nucleoside and nonnucleoside RT inhibitors. | Journal of Biological Chemistry                        | 287      | 29988-29999 | 2012 |
| Michailidis E, Singh K, Ryan EM, Hachiya A, Ong YT, Kirby KA, Marchand B, Kodama EN, Mitsuya H, Parniak MA, Sarafianos SG.  | Effect of translocation defective reverse transcriptase inhibitors on the activity of n348i, a connection subdomain drug resistant hiv-1 reverse transcriptase mutant.         | Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)                         | 58       | 187-195     | 2012 |
| Kazuki Izumi, Kumi Kawaji, Fusako Miyamoto, Kazuki Shimane, Kazuya Shimura, Yasuko Sakagami, Toshio Hattori, Kentaro Watanabe, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Masao Matsuoka, Mitsuo Kaku, Stefan G. Sarafianos, and Eiichi N. Kodama.                         | Mechanism of Resistance to S138A Substituted Enfuvirtide and its Application to Peptide Design.  | International Journal of Biochemistry and Cell Biology | In press |             | 2012 |
| Fusako Miyamoto and Eiichi N Kodama.  | Development of small molecule HIV-1 fusion inhibitors: linking Biology to Chemistry.   | Current Pharmaceutical Design                          | In press |             | 2012 |
| 児玉栄一、宮本総子   | 新しい抗ウイルス剤開発の考え方  | 臨床と微生物   | 40       | 51-55       | 2013 |
| Ogawa M et al.  | Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis.  | Jpn J Ophthalmol.                                      | 56(6)    | 529-535     | 2012 |
| Sugita S et al.   | Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders.   | Invest Ophthalmol Vis Sci.                             | 53(8)    | 4692-4698   | 2012 |

|   |   |                                   |                         |           |                                    |
|---|---|-----------------------------------|-------------------------|-----------|------------------------------------|
| Ogawa M et al.  | Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA.                               | Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. | 250(12)                 | 1877-1883 | 2012.                              |
| Isoda T, Mitsuiki N, Ohkawa T, Kaneko S, Endo A, Ono T, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwara M, Araki S, Nagasawa M, Morio T, Takagi M, Mizutani S.   | Irreversible Leukoencephalopathy After Reduced-intensity Stem Cell Transplantation in a Dyskeratosis Congenita Patient With TINF2 Mutation. | J Pediatr Hematol Oncol.          |                         |           | 2012 Dec 13. [Epub ahead of print] |
| Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y.   | A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura.                                    | Eur J Haematol.                   | 90                      | 164-8.    | 2012                               |
| Shimizu M. Kanegane H. Wada T. Motoyoshi Y. Morio T. Candotti F. Yachie A.  | Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia.  | J Allergy Clin Immunol.           | 6749                    | 01455-8.  | 2012                               |
| Yoshimi A. Kamachi Y. Imai K. Watanabe N. Nakadate H. Kanazawa T. Ozono S. Kobayashi R. Yoshida M. Kobayashi C. Hama A. Muramatsu H. Sasahara Y. Jakob M. Morio T. Ehl S. Manabe A. Niemeyer C. Kojima S. | Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia.                                    | Pediatr Blood Cancer.             | doi: 10.1002/pbc.24359. |           | 2012 Sep 28. [Epub ahead of print] |
| Isoda T. Takagi M. Piao J. Nishii R. Masaki S. Masuda K. Ikawa T. Azuma M. Morio T. Kawamoto H. Mizutani S.   | Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM.                                     | Blood.                            | 120                     | 789-799   | 2012                               |
| Nozaki T. Takada H. Ishimura M. Ihara K. Imai K. Morio T. Kobayashi M. Nonoyama S. Hara T.  | Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan.  | Clinical Endocrinol.              | 77                      | 628-634   | 2012                               |
| Honda F. Kano H. Kanegane H. Nonoyama S. Kim E-S. Lee S-K. Takagi M. Mizutani S. Morio T.   | Btk negatively regulates ROS production and stimulation-induced apoptosis in human neutrophils.   | Nature Immunol.                   | 13                      | 369-378   | 2012                               |

|   |   |                  |       |           |      |
|---|---|------------------|-------|-----------|------|
| Kuramitsu M. Sato-Otsubo A. Morio T. Takagi M. Toki T. Terui K. RuNan W. Kanno H. Ohga S. Ohara A. Kojima S. Kitoh T. Goi K. Kudo K. Matsubayashi T. Mizue N. Ozeki M. Masumi A. Momose H. Takizawa K. Mizukami T. Yamaguchi K. Ogawa S. Ito E. | Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia.   | Blood.           | 119   | 2376-84   | 2012 |
| Sato R. Iizumi S. Kim E-S. Honda F. Lee S-K. Adachi N. Koyama H. Mizutani S. Morio T.   | Impaired cell adhesion, apoptosis, and signaling in WASP-gene disrupted Nalm-6 pre-B cells and recovery of cell adhesion using a transducible form of WASP. | Int. J. Hematol. | 95    | 299-310   | 2012 |
| 森尾友宏  | 先天性免疫不全症の病態と思春期以降のマネジメント  | 血液内科             | 65    | 599-607   | 2012 |
| 森尾友宏  | 【クローズアップ感染症】 <感染性疾患の基礎的な知見の進歩・概念の変化>感染症と自然免疫  | 小児内科             | 44    | 959-965   | 2012 |
| 森尾友宏  | 【サイトカインのすべて(完全改訂版)】 サイトカイン投与およびサイトカイン抑制による治療 免疫不全症  | 臨床免疫・アレルギー科      | 57    | 838-844   | 2012 |
| 森尾友宏  | 原発性免疫不全症における臨床遺伝学 T細胞系免疫異常症における遺伝子診療  | 日本遺伝カウンセリング      | 33    | 49-53     | 2012 |
| 森尾友宏  | 分類不能型免疫不全症  | 日本臨牀             | 70    | 2011-2021 | 2012 |
| 森尾友宏  | 分類不能型免疫不全症 Update   | 日本臨床免疫           | 35    | 14-22     | 2012 |
| Kawabe S, Ito Y, Gotoh K, Kojima S, Matsumoto K, Kinoshita T, Iwata S, Nishiyama Y, Kimura H.   | Application of flow cytometric in situ hybridization assay to Epstein-Barr virus-associated T/NK lymphoproliferative diseases.                              | Cancer Sci       | 103   | 1481-1488 | 2012 |
| 内田慧美、本間りこ、五十嵐愛子、倉田盛人、今留謙一、大本英次郎、三浦修、○新井文子   | 血漿中EBV-DNA量を経時的に測定したEBV陽性Hodgkin リンパ腫   | 臨床血液             | 53(5) | 526-30    | 2012 |