

X連鎖性無ガンマグロブリン血症に菊地病を合併し血球貪食症候群をきたした1例

X linked agammaglobulinemia presenting with Kikuchi-Fujimoto disease and hemophagocytic syndrome

九州大学病院小児科 >>>

松岡 若利、石村 匡崇、本村 良知、神野 俊介、西尾 壽乗、

高田 英俊、原 寿郎

九州大学病院血液腫瘍内科 >>>

迫田 哲平、森 康雄、宮本 敏浩

九州大学形態機能病理学 >>>

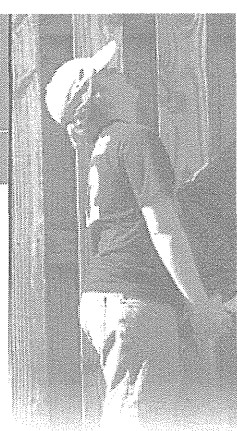
山元 英崇、小田 義直

【緒言】 X連鎖性無ガンマグロブリン血症（XLA）はBruton's tyrosine kinase（BTK）遺伝子の変異によって生じる遺伝性の免疫不全症である。B細胞の早期分化障害が原因で成熟B細胞が存在せず、液性免疫不全を生じるが、関節リウマチなどの自己免疫疾患を合併することが知られている。一方、菊地-藤本病（KFD）は、持続する発熱、有痛性頸部リンパ節腫脹を主症状とし、壊死を含めた病理学的所見に特徴づけられる良性の原因不明の疾患である。自然寛解する良性疾患であり、CD8T細胞と組織球が主に病態に関与するとされている。XLAにKFDを合併した報告はこれまでにない。今回われわれはXLAにKFDを合併し、血球貪食症候群に至った症例を経験したので報告する。

【症例】 28歳男性。XLAのためST合剤内服と3週間に1度免疫グロブリン補充療法を受けていた。1か月前より右肺炎、胸水にて入院加療中だった。肺炎は徐々に改善していたが、高熱、全身性のリンパ節腫脹が出現し、血球減少および、LDH、フェリチン、可溶性IL2受容体の異常高値を認めた。5病日の末梢血リンパ球サブセット解析で活性化T細胞の増加があり、骨髄検査では血球貪食像を認め、血球貪食症候群と診断した。その後、DICが急激に進行したため、6病日に緊急リンパ節生検を行い、ステロイドパルス療法とCSA投与を開始した。治療開始翌日より速やかに解熱し、全身状態は改善した。悪性リンパ腫の可能性も考慮し、9病日にFDG-PET/CT検査を行ったが、異常集積を認めず、またリンパ節の遺伝子再構成は認めなかった。血清学的検査よりEBV、CMV感染症は否定され、最終的に病理組織所見からKFDと診断した。CSAとステロイドを漸減し、35病日に退院した。

【考察】 KFDはT細胞と組織球がその病態に関与しているとされているが、明らかな原因はわかっていない。病巣ではB細胞、NK細胞はほとんど見られず、T細胞が大多数を占める。XLAはB細胞分化障害によるB細胞機能不全であり、病理所見が示すようにKFDの病態にはB細胞が関与しないことが示唆された。KFDは通常自然治癒をたどることが多いが、本症例のように血球貪食症候群を合併することもまれにある。一方、XLAに血球貪食症候群が合併した報告は少なく、アデノウイルスが原因とされた報告が数例あるのみである。BTKはB細胞の成熟のみならず、単球や好中球などのような自然免疫系においても重要な役割を果たすことが報告されており、本症例の病態にもBTK遺伝子の変異が関係していた可能性がある。

【結語】 KFDを合併したXLA患者を初めて報告した。血球貪食症候群の発症にBTK遺伝子変異が関与した可能性がある。



特徴的な臨床症状からNFkB2 遺伝子変異を同定しえた早発型CVIDの1例

A case of early-onset CVID with alopecia totalis and trachonychia caused by NFkB2 mutation

京都大学医学部小児科 >>>

本田 吉孝、大音 泰介、下寺 佐栄子、小田 紘嗣、田中 孝之、
河合 朋樹、八角 高裕、西小森 隆太、平家 俊男

かずさDNA研究所 >>>

小原 收

【症例】8歳女児

【現病歴】生後4か月・6か月時に尿路感染症を反復し両側完全重複腎盂尿管と診断。生後9か月時に尿路奇形根治術を受けた。その後も気道感染などによる発熱（年8-9回）および入院を反復し、4歳時にはじめて低ガンマグロブリン血症（IgG/A/M 309/9/39 mg/dL）を指摘された。7歳2か月時に爪扁平苔癬、7歳11か月時に円形脱毛症（全頭型）・鷲口瘡を認めたため、免疫不全症の精査目的に当科紹介受診した。

【既往歴】気管支喘息

【血液検査（初診時）】WBC 11000 / μ L（Neu 56%，Lym 35.7% = 3900 / μ L，Mono 4.8%，Eo 3.2%，Baso 0.3%）一般生化学に特記すべき異常なし。IgG/A/M 272/5/15 mg/dL，C3/C4 147.4/40.9 mg/dL，CH50 60 U/mL麻疹（HI）8倍未満，風疹（HI）16倍，Con-A /PHAによるリンパ球幼若化反応；51900 cpm（control 125 cpm）/60400 cpm（control 125 cpm）

【末梢血リンパ球マーカー（初診時）】Total lymphocyte count；3900 / μ L CD3+ 73.8%，CD4+ 47.2%，CD8+ 25.1%，CD3-CD16+ 24.2%，CD19+ 2.1% CD4+ naive T cells（CD45RA+ /RO-）78%（of total CD4+）CD4+ total memory T cells（CD45RA- /RO+）11.5%（of total CD4+）CD8+ naive T cells（CD45RA+ /RO-）90%（of total CD8+）CD8+ total memory T cells（CD45RA- /RO+）1.5%（of total CD8+）CD27-IgD+ naive B cells 86%（of total CD19+）CD27+ IgD+ nonswitched memory B cells 8%（of total CD19+）CD27+ IgD- switched memory B cells 0.6%（of total CD19+）

【遺伝子検査】NFkB2 遺伝子異常症に既知のヘテロ接合性変異（p. Arg853X）を認めた。

【考察】NFkB2はNoncanonical NF- κ B signaling pathwayに関与する。同遺伝子変異により、円形脱毛症などの自己免疫現象・喘息・副腎不全を伴う早発型CVIDが発症することが2013年に報告された。本症例を含め11例の報告があり、病態生理や臨床症状の比較を含め報告する。

慢性中耳炎、全身リンパ節腫脹、結核感染徴候を有しactivated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome (APDS) が疑われる4歳女児例

A 4-year-old female patient with suspected activated PI3K delta syndrome (APDS).

長崎大学病院小児科 >>> 橋本 邦生、西口 亮、小出 憲呼、佐々木 理代、蓮把 朋之、白川 利彦
中嶋 有美子、本村 秀樹、森内 浩幸

国立病院機構長崎医療センター小児科 >>> 本田 涼子

防衛医科大学校小児科 >>> 辻田 由喜、野々山 恵章

【症例】4歳7か月女児。

【主訴】頸部・腋窩・鼠径部腫瘍。

【出生・発達歴】39週で出生。有意語2歳0カ月と言語発達遅滞。

【既往歴】水痘は通常通り治癒。

【家族歴】免疫不全の家族歴なし。周囲に結核の診断なし。祖母の見舞いで老人保健施設を訪れていた。

【現病歴】2か月時から中耳炎を反復し慢性化した。また喘息性気管支炎を繰り返していた。3歳10か月ごろから顎下、鼠径部のリンパ節腫脹を認め、同部位に圧痛を認めるようになったため前医に紹介受診した。QFT3G陽性が判明し当院転院。

【入院時身体所見】身長-3.0SD、体重-1.7SD。バイタル異常なし。上肺野中心にcrackle聴取。浅頸部、顎下、腋窩、鼠径で最大4cm大の表在リンパ節腫脹を認めた。局所の熱感なし。

【画像所見】CTで縦隔リンパ節腫大、気管支壁の肥厚。末梢のすりガラス陰影、軽度肝脾腫を認めた。

【検査所見】WBC17800 (Neu58% Ly38%) CRP0.32、赤沈14mm/1h 一般生化学異常なし。結核関連は当院でのT-SPOT陰性。胃液PCR検査3回陰性。肺胞洗浄液、リンパ節生検標本でもPCR陰性。鼠径リンパ節生検で乾酪壊死巣なし。一般細菌培養は耳漏以外陰性。免疫不全関連ではIgG579 (IgG2 28) IgA181 IgM542 IgD 81.7mg/dL IgE0.2IU/mL。予防接種済の麻疹抗体価上昇なく同種血球凝集反応陰性。PHA、ConA正常。CD4/8比0.31 好中球貪食能・殺菌能正常。防衛医大での検索でCD3 + T細胞79.2% (全リンパ球中)と保たれていたが、CD45RA + CD31 + thymic T : 29.3%、CD45RO + 56.6% (CD3 + CD4 + 集団中)、であり、CD45ROへのskewを認めた。また、Follicular Tが19.9% (CD3 + CD4 + 集団中)と多めだった。CD19 + B細胞は2.15% (全リンパ球中)存在したが、CD27 + のmemory B分画が2.3% (CD19 + 集団中)と少なかった。またCD24highCD38highの未熟なtransitional B分画が86.06% (CD19 + 集団中)と異常増加を認めた。臨床症状の経過と検査所見から、APDSを疑い遺伝子検査中。

【臨床経過】免疫不全が当初から疑われたため、結核に対しては4剤で (SM, INH, RFP, PZA) 治療を開始した。SMは2か月で中止し他は計6か月継続予定。退院後 γ グロブリン定期補充を開始予定。

【考察】免疫不全スクリーニングより、T細胞系とB細胞系双方に分画異常や機能不全が認められた。APDSは呼吸器感染反復と気道傷害をきたす免疫不全症として2013年に報告され、本症例は既存の報告と臨床徴候が類似する。APDSはp110 δ の選択的阻害薬により改善する可能性が示されており、診断的価値が高い。



著明な腹水を認めた 活性化PI3K δ 症候群の一例

A case of activated PI3K δ syndrome with massive ascites

国立成育医療研究センター免疫科 >>> 後藤 文洋、内山 徹、中澤 裕美子、河合 利尚、小野寺 雅史
 国立成育医療研究センター成育遺伝研究部 >>> 渡辺 信之、枝澤 佳織、田中 壽子
 国立成育医療研究センター臨床検査部 >>> 山崎 昌子
 国立成育医療研究センター肝臓内科 >>> 工藤 豊一郎、伊藤 玲子
 国立成育医療研究センター総合診療部 >>> 竹内 一朗、前川 貴伸
 山口大学医学部 >>> 高田 香織

【背景】活性化PI3K δ 症候群（APDS）は細胞内増殖シグナルであるPI3K経路の活性化を背景として、易感染性とリンパ増殖など様々な症状を呈する原発性免疫不全症である。今回、著明な腹水と肝腫大にて発症し、APDSの診断に至った2歳男児を経験したので報告する。

【症例】2歳男児。1歳頃より腹部膨隆を主訴に近医を受診した。CT検査上著明な腹水の貯留と肝腫大および腸管膜リンパ節の腫脹を認め、また下部内視鏡検査では胃から大腸にかけて無数の消化管リンパ濾胞を認めたため、精査加療目的に当院に転院となった。転院時の血液検査ではリンパ球数の減少、IgG2およびIgG4の低下、IgM上昇、肝機能の低下が認められた。フローサイトメトリーでは活性化を伴うエフェクター、メモリーCD8T細胞の増加、Class switch B細胞の低下とTransitional B細胞の増加を認めた。また、Recent thymic emigrants (RTE)の低下に一致してTRECも低値（130コピー/μgDNA）であった。CD8T細胞の異常増殖やB細胞のクラススイッチの障害から、APDSを鑑別に挙げ、ゲノムシーケンスを行ったところ、c.3061G>A変異によるE1021Kのヘテロ変異を認めた。同様の変異は両親には認めず、de novo変異と考えられた。また、消化管組織ではEBERが陽性であり、病状の進行に対するウイルス感染の関与が考えられた。リンパ球の異常活性化の抑制を目的としてメチルプレドニゾロンによる治療を開始したところ、CD8T細胞の活性化の低下に伴い、腹水の減少が認められた。

【考察】APDSはPI3K δ の異常によって、PI3K-Akt-mTOR経路の活性化が引き起こされ、無秩序なリンパ増殖を呈する免疫不全症であり、将来的にリンパ腫発症のリスクを伴う。本疾患に腹水貯留の報告はないが、CD8T細胞の活性低下に伴い改善したことから、リンパ球の異常活性化が何らかの関与をしていると推察される。また、本疾患は近年報告されたことから、症例の蓄積が少なく明確な治療法も確立していない。低IgG血症を主症状とする他の報告例とは異なり、本症例はリンパ増殖による症状を呈したことから、mTOR活性の抑制が治療の鍵になると考えられる。

Activated PI3K δ syndrome 2 の3家系： フローサイトメトリーによる診断

Flow Cytometric diagnosis of Activated PI3K δ syndrome 2

広島大学小児科 >>> 浅野 孝基、岡田 賢、齋藤 聡志、西村 志帆、津村 弥来、小林 正夫

岡山大学小児科 >>> 嶋田 明

東京医科歯科大学小児科 >>> 葉 姿汶、今井 耕輔、森尾 友宏

防衛医科大学校小児科 >>> 関中 佳奈子、辻田 由喜、野々山 恵章

Activated PI3K δ syndrome (APDS) は class I PI3キナーゼに属する触媒サブユニット p110 δ (責任遺伝子 PIK3CD) の機能獲得性変異から、反復性気道感染、リンパ節過形成、抗体産生不全 (IgM 上昇、IgG2 減少)、EBV/CMV に対する易感染性を臨床的特徴とする原発性免疫不全症である。2014年、p110 δ と2量体を形成する調節サブユニット p85 α (責任遺伝子 PIK3R1) のヘテロ接合性変異が、APDSに類似した症状を呈する患者で同定され、APDS2と名付けられた。p110 δ と p85 α のヘテロ2量体は、AKTのリン酸化を介してシグナル伝達を行う。APDS/APDS2患者ではこれらの遺伝子の機能獲得性変異から、AKTのリン酸化が亢進し、過剰なPI3キナーゼ活性が病態に関与すると考えられている。我々はAPDS様の症状と p110 δ 正常の患者の解析で、3例でPIK3R1のヘテロ接合性変異を同定した。同定された変異は全て exon 10 skippingに至るスプライシング変異であった。AKTのリン酸化亢進をCD3陽性T細胞とCD19陽性B細胞を用いてフローサイトメトリーで検討した。患者末梢血B細胞は定常状態において健常者に比してAKTのリン酸化が優位に亢進していたが、AKT阻害薬処理後では患者と健常者においてはリン酸化の差は認められなかった。CD3陽性細胞では定常状態でのリン酸化は明らかではなかった。これらから、B細胞を利用したフローサイトメトリーでのAKTのリン酸化の検討が診断に有用と考えられた。本邦ではすでに20例以上のAPDS患者が報告されており、APDS2も含めるとAPDS/APDS2患者はある程度存在することが推定される。本邦で同定したAPDS2の3家計の臨床経過を紹介するとともに、フローサイトメトリーを用いたAPDS/APDS2の迅速診断法について報告する。本症発症の分子基盤から、mTOR阻害薬やp110 δ 阻害薬を用いた治療が将来的に検討される可能性があり、適切な診断が重要である。



次世代シーケンサー (MiSeq) を用いた 原発性免疫不全症の遺伝子解析

Genetic analysis of the primary immunodeficiency diseases by using a NGS platform, MiSeq

かずさDNA研究所技術開発研究部 >>>

中山 学

京都大学大学院医学研究科発達小児科学 >>>

小田 紘嗣、八角 高裕、西小森 隆太、平家 俊男

かずさDNA研究所・理化学研究所統合生命医科学研究センター >>>

小原 收

かずさDNA研究所と理研・統合生命医科学研究センターを含めた我々のグループは、原発性免疫不全症の臨床検体の分子遺伝学的検査のために、原因遺伝子の全エクソンのシーケンシングによる解析サービスの提供を続けてきている。近年の次世代シーケンサー技術の進歩に伴い、従来のキャピラリーシーケンサー方式（サンガー法）から次世代シーケンサーへの移行を進めている。本研究ではイルミナの次世代シーケンサー MiSeqを用いて実際の臨床検体を平行処理することにより行ったハイスループットな解析システムに関して報告する。自己炎症の原因遺伝子である9遺伝子（IL1RN, MEFV, MVK, NLRP12, NLRP3, NOD2, PSMB8, PSTPIP1, TNFRSF1A）のすべてのエクソンを増やすためのプライマーを混合し、ワンチューブでマルチプレックスPCRを行った後、約20人分の各サンプルを区別するためのインデックスタグを付加するための2段階目のPCRを行った。各ライブラリーサンプルを等モル数で混合し、次世代シーケンサー MiSeqのシーケンスのランを行った。現在のところMiSeqのリード長は300サイクルが最大であるので、フォワード向きとリバース向きの両方向きから読むことによって高い精度を得るためには、300bp程度のアンプリコンのサイズとなる。各遺伝子によりエクソン数とエクソンサイズは大きく異なるが、9遺伝子で160アンプリコン程度のPCR増幅をマルチプレックスPCRとしてワンチューブで行っている。各アンプリコンの増幅バイアスを少なくするための条件検討を行った結果、第1段階のPCRは10サイクル、第2段階のPCRは5サイクルで行う系が最も望ましかった。我々の条件のもとで各アンプリコンのリード数の差は50倍以内におさまリ、ほとんど全てのアンプリコンが400リード以上を読む条件で安定的に稼働している。このように20～25人分の臨床サンプルを次世代シーケンサー MiSeqの1回のランで行う解析システムを構築し、既に過去半年の間に約100人分の結果を出してきている。ミスセンス変異やナンセンス変異だけでなく、スプライシングサイトの変異、欠損によるフレームシフトや大きな欠損も検出してきた。病気の原因と考えられる変異に関しては、キャピラリーシーケンサー法（サンガー法）で再確認を行っているが、すべての結果が両者で一致していた。また、別のパネル解析としてFHL（家族性血球貪食リンパ組織球増多症候群）の7遺伝子、メンデル遺伝型マイコバクテリア易感染症（MSMD）の9遺伝子、分類不能型免疫不全症（common variable immunodeficiency；CVID）の9遺伝子のセットの解析システムも出来上がっている。次世代シーケンサーの結果ファイルの見方も含めて、解析システムの現状と特殊なゲノム構造の遺伝子結果の解釈に関する注意事項に関するご説明させていただく予定である。

次世代シーケンサーを用いた原発性免疫不全症の迅速遺伝子診断法の確立

Identification of responsible genes for primary immunodeficiencies by next generation sequencing.

防衛医科大学校小児科 >>>

加藤 環、釜江 智佳子、野々山 恵章

東京医科歯科大学小児科 >>>

今井 耕輔

かずさDNA研究所技術開発研究部 >>>

小原 収

【はじめに】 TREC_sを用いた、重症複合免疫不全症 (SCID) の新生児マススクリーニング法が世界的に進められている。SCIDの原因遺伝子は20種類以上あり、いくつかの頻度の高い遺伝子以外の同定は困難である。放射線感受性の高い疾患も含まれるため、造血幹細胞移植の前処置を決定する上で、速やかに原因遺伝子を同定することが必須である。また、TREC_s及びその後のFACS解析のみでは、SCIDか一過性のT細胞減少症かの判断が困難であることも多い。我々は、TREC_s陰性の場合に、速やかに診断し治療へと結びつけるため、Guthrieろ紙血由来のgDNAのみから、SCID等の既知の29の原因遺伝子を次世代シーケンサー (NGS) を用いてsequenceする方法を確立した。

【方法】 健常人、SCID18症例 (原因遺伝子変異同定済みの16症例、原因遺伝子不明の2症例) 及びキャリア2症例につき、29遺伝子 (ADA、AK2、ATM、CD247、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD8 α 、CORO1A、CRACM1、DCLRE1C、FOXP1、IL2R γ 、IL7R α 、JAK3、LCK、LIG4、MAGT1、NHEJ1、PNP、PRKDC、PTPRC、RAC2、RAG1、RAG2、RMRP、STAT5B、STIM1、ZAP70、計66、261bp、計624amplicon) を計50ngのgDNAからmultiplex PCRで最終的に1チューブ内で増幅後、Ion PGMでsequenceを行った。

【結果】 健常人で、全遺伝子で20 \times depthが99.8%の精度を達成した。残りの0.2%は78bpで1 \sim 20 \times depthを示し、これらはCRACM1、PTPRCでIUIS分類で稀とされた遺伝子であった。ろ紙血由来のDNAでの解析も可能であった。SCID18症例及びキャリア2症例では、全変異数は1症例あたり平均70個 (49-92個) で、not dbSNP、produce nonsynonymous codon changes or alter splice site、biallelicの条件でfilterをかけた。その結果、原因遺伝子が同定されている14症例及びキャリア2症例について変異が同定できた。残り2症例では、原因遺伝子がdbSNPに登録されていたが、MAFを用いたfilterで同定できた。原因不明の2症例では既知の遺伝子変異を認めなかった。以上、SCIDの既知遺伝子変異についてはNGSで全例遺伝子診断が出来た。今後はHGVBを用いた絞り込みも検討中である。

【考察】 アメリカでのTREC_sマススクリーニングの結果から、日本国内で年間約70例以上のT細胞減少症が発見されると考えられ、Guthrieろ紙血からの解析も可能な本方法は、SCIDの迅速な診断確定と予後改善に役立つと期待される。



ドメイン単位での網羅的変異スキニングによるタンパク質構造-機能ランドスケープの取得とそのミスセンス変異機能評価への応用

Structure-function landscape analysis of a disease protein by saturation mutation scanning

かずさDNA研究所技術開発研究部 >>>

小原 収

かずさDNA研究所 >>>

藤木 亮次

長浜バイオ大学バイオサイエンス学部 >>>

土方 敦司

広島大学小児科 >>>

岡田 賢、小林 正夫

シーケンシング技術の飛躍的な向上により、多くの低頻度の遺伝子多型が検出可能となり、次々と新しい疾患関連性のある遺伝子変異が見出されている。しかし、見いだされた変異がタンパク質機能に与える影響を定量的に評価する系の確立がなければ、この状況は単に評価不能な secondary findings が蓄積されていくという危険性をはらんでいる。従来こうした機能的影響の予測には、進化的な一次構造保存性などに基づく in silico 予測が汎用されてきたが、それらが完全でないことは周知の事実である。そこで、本研究では STAT1 遺伝子を例に取り、網羅的な変異スキニングによりアミノ酸置換の機能的影響を計測し、それによって構造-機能ランドスケープを獲得するというアプローチの概念実証実験を行った。具体的には、STAT1 機能に重要な Coiled-Coil ドメイン (CCD)、DNA 結合ドメイン (DBD) に焦点を絞り、これら 342 箇所のアミノ酸残基をアラニンスキニングした変異体シリーズ (STAT1 Ala Scan ライブラリー) と機能的なインパクトのある 2 か所の位置の残基を 20 種類のアミノ酸に置換した変異体シリーズを作製した。これら変異体をルシフェラーゼレポーターアッセイに供し、レポーター活性を機能リードアウトとしてそれぞれのドメインの部分的な構造-機能ランドスケープを取得した。こうした STAT1 の CCD、DBD の構造-機能ランドスケープが獲得できることによって、どのような位置のどのような変異がレポーター活性にどのような影響を与えるかの鳥瞰が初めて可能となった。更に、構造類似性の高い他の STAT ファミリーの機能予測までもがこの基盤情報から可能であることを示唆する結果を得た。近年のハイスループットオリゴヌクレオチド合成技術の進歩により、ドメイン単位での包括的な飽和的変異導入は既に現実のものとなっている (Agilent 社、QuickChange HT Protein Engineering System など)。今回の結果は、そうした技術と組み合わせることで、遺伝子変異と疾患関連性をつなぐための重要な情報基盤がこうしたアプローチによって創出できることを示すものである。

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧

雑誌(英文)

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Oshima K, Imai K, Albert M.H., Bittner T.C., Strauss G, Filipovich A.H., Morio T, Kapoor N, Dalal J, Schultz K.R., Casper J.T., Notarangelo L.D., Ochs H.D., Nonoyama S.	Hematopoietic Stem Cell Transplantation for X-Linked Thrombocytopenia With Mutations in the WAS gene.	J Clin Immunol.			2015 in press
Chida N, Kobayashi I, Takezaki S, Ueki M, Yamazaki Y, Garelli S, Scarpa R, Horikawa R, Yamada M, Betterle C, Notarangelo L, Ariga T.	Disease specificity of anti-tryptophan hydroxylase-1 and anti AIE-75 autoantibodies in APECED and IPEX syndrome.	Clinical Immunology.	156(1)	36-42	2015
Okura Y, Kawamura N, Okano M, Toita N, Takezak S, Yamada M, Kobayashi I, Ariga T.	Fusarium falciforme infection in a patient with chronic granulomatous disease.	Pediatr Int .			2015 in press
Okura Y, Yamada M, Kobayashi I, Kuribayashi F, Ariga T.	Monocyte/macrophage-specific NADPH oxidase contributes to antimicrobial host defense in X-CGD.	J Clin Immunol.			2015 in press
Hoshino A, Okuno Y, Migita M, Ban H, Yang X, Kiyokawa N, Adachi Y, Kojima S, Ohara O, Kanegane H.	X-Linked Agammaglobulinemia Associated with B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia.	J Clin Immunol.			2015 in press
Mitsuiki N, Yang X, Bartol SJ, Grosserichter-Wagener C, Kosaka Y, Takada H, Imai K, Kanegane H, Mizutani S, van der Burg M, van Zelm MC, Ohara O, Morio T.	Mutations in Bruton's tyrosine kinase impair IgA responses.	Int J Hematol.			2015 in press
Nakayama T, Sato Y, Uematsu M, Takagi M, Hasegawa S, Kumada S, Kikuchi A, Hino-Fukuyo N, Sasahara Y, Haginoya K, Kure S.	Myoclonic axial jerks for diagnosing atypical evolution of ataxia telangiectasia.	Brain & development.			2015 in press
Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanazaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E.	Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia.	Br J Haematol.		doi: 10.1111/ bjh. 13229.	2015 in press
Hirokazu Kanegane & Kohsuke Imai & Masafumi Yamada & Hidetoshi Takada & Tadashi Ariga & Martin Bexon & Mikhail Rojavin & Wilson Hu & Midori Kobayashi & John-Philip Lawo & Shigeaki Nonoyama & Toshiro Hara & Toshio Miyawaki.	Efficacy and Safety of IgPro20, a Subcutaneous Immunoglobulin, in Japanese Patients with Primary Immunodeficiency Diseases.	J Clin Immunol.	34(2)	204-11	2014
Waleed Al-Herz, Aziz Bousfiha, Jean-Laurent Casanova, Talal Chatila, Mary Ellen Conley, Charlotte Cunningham-Rundles, Amos Etzioni 8, Jose Luis Franco, H. Bobby Gaspar, Steven M. Holland, Christoph Klein, Shigeaki Nonoyama, Hans D. Ochs, Erik Oksenhendler, Capucine Picard, Jennifer M. Puck, Kate Sullivan and Mimi L. K. Tang.	Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency.	Front Immunol.	22:5	162	2014
Katsuyuki Horiuchi, MD, PhD,a Kohsuke Imai, MD, PhD,a,b Kanako Mitsui-Sekinaka, MD,a Tzu-Wen Yeh, BSc,b Hans D. Ochs, MD, PhD,c Anne Durandy, MD, PhD,d,e,f and Shigeaki Nonoyama, MD, PhDa	Analysis of somatic hypermutations in the IgM switch region in human B cells.	J Allergy Clin Immunol.	134(2)	411-419	2014

雑誌(英文)

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsui N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwar M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Homma K, Nonoyama S, Mizutani S, Morio T.	Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation.	Bone Marrow Transplantation	49	1155-1161	2014
Shirasaki Y, Yamagishi M, Suzuki N, Izawa K, Nakahara A, Mizuno J, Shoji S, Heike T, Harada Y, Nishikomori R, Ohara O.	Real-time single-cell imaging of protein secretion.	Sci Rep.	22:4	4736	2014
Horino S, Sasahara Y, Satoh M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Satoh A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S.	Selective expansion of regulatory T cells in mixed chimera after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome.	Pediatr Transplant.	18(1)	E25-30	2014
Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo J-P, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T.	Efficacy and safety of IgPro20, a subcutaneous immunoglobulin in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases.	J Clin Immunol.	34(2)	204-11	2014
Marciano BE, Huang CY, Joshi G, Rezaei N, Carvalho BC, Allwood Z, Ikinogullari A, Reda SM, Gennery A, Thon V, Espinosa-Rosales F, Al-Herz W, Porras O, Shcherbina A, Szaflarska A, Kiliç S, Franco JL, Gómez Raccio AC, Roxo P Jr, Esteves I, Galal N, Grumach AS, Al-Tamemi S, Yildiran A, Orellana JC, Yamada M, Morio T, Liberatore D, Ohtsuka Y, Lau YL, Nishikomori R, Torres-Lozano C, Mazzucchelli JT, Vilela MM, Tavares FS, Cunha L, Pinto JA, Espinosa-Padilla SE, Hernandez-Nieto L, Elfeky RA, Ariga T, Toshio H, Dogu F, Cipe F, Formankova R, Nuñez-Nuñez ME, Bezrodnik L, Marques JG, Pereira MI, Listello V, Slatter MA, Nademi Z, Kowalczyk D, Fleisher TA, Davies G, Neven B, Rosenzweig SD.	BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: Complications, risks, and vaccination policies.	J Allergy Clin Immunol.	133(4)	1134-41	2014
Akimoto T, Cho K, Hayasaka I, Morioka K, Kaneshi Y, Furuta I, Yamada M, Ariga T, Minakami H.	Hereditary interstitial lung diseases manifesting in early childhood in Japan.	Pediatr Research	76(5)	453-8	2014
Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, Morio T, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T.	Two novel gain-of-function mutations of STAT1 responsible for chronic mucocutaneous candidiasis disease: Impaired production of IL-17A and IL-22, and the presence of anti-IL-17F autoantibody.	J Immunol.	193	4880-7	2014
Koura U, Sakaki-Nakatsubo H, Otsubo K, Nomura K, Oshima K, Ohara O, Wada T, Yachie A, Imai K, Morio T, Miyawaki T, Kanegane H.	Successful treatment of systemic cytomegalovirus infection in severe combined immunodeficiency using allogeneic bone marrow transplantation followed by adoptive immunotherapy.	J Investig Allergol Clin Immunol.	24	200-2	2014
Mori M, Morio T, Ito S, Morimoto A, Ota S, Mizuta K, Iwata T, Hara T, Saji T.	Risks and prevention of severe RS virus infection among children with immunodeficiency and Down's syndrome.	J Infect Chemother.	20	455-9	2014
Matsubara Y, Chiba T, Kashimada K, Morio T, Takada S, Mizutani S, Asahara H.	Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction of exogenous gene into IL2RG locus.	Scientific Reports.	4	5043	2014

雑誌(英文)

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Mori M, Onodera M, Morimoto A, Kosaka Y, Morio T, Notario GF, Sharma S, Saji T.	Palivizumab Use in Japanese Infants and Children with Immunocompromised Conditions.	Pediatr Infect. Dis.	33	1183-85	2014
Endo A, Watanabe K, Ohye T, Matsubara T, Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, Morio T, Mizutani S.	Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. Clin.	Infect. Dis.	59	545-8	2014
Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsui N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwar M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Homma K, Nonoyama S, Mizutani S, Morio T.	Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation.	Bone Marrow Transplant.	49	1155-61	2014
Hasegawa S, Imai K, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Morio T, Mizutani S, Takagi M.	Whole-exome sequence analysis of ataxia telangiectasia-like phenotype.	J Neurol Sci	340	86-90	2014
Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H.	Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan.	Pediatr Int.	56	159-66	2014
Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H.	Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan.	Pediatr Int.	56	159-66	2014
Hoshino A, Imai K, Ohshima Y, Yasutomi M, Kasai M, Terai M, Ishigaki K, Morio T, Miyawaki T, Kanegane H.	Pneumothorax in patients with severe combined immunodeficiency.	Pediatr Int.	56(4)	510-4	2014
Igarashi A, Kanegane H, Kobayashi M, Miyawaki T, Tsutani K.	Cost-Minimization Analysis of IgPro20, a Subcutaneous Immunoglobulin, in Japanese Patients With Primary Immunodeficiency.	Clin Ther.	36(11)	1616-24	2014
Yamagami K, Miyashita T, Nakamura T, Shirano M, Nakamura T, Kameda K, Nishijima M, Imanishi M, Yang X, Kanegane H.	Campylobacter fetus bacteremia with purulent pleurisy in a young adult with primary hypogammaglobulinemia.	Intern Med.	53(11)	1221-5	2014
van Zelm MC, Bartol SJ, Driessen GJ, Mascart F, Reisli I, Franco JL, Wolska-Kusnierz B, Kanegane H, Boon L, van Dongen JJ, van der Burg M.	Human CD19 and CD40L deficiencies impair antibody selection and differentially affect somatic hypermutation.	J Allergy Clin Immunol.	134(1)	135-44	2014
Yamada A, Moritake H, Kamimura S, Yamashita S, Takeshima H, Nunoi H.	Proposed strategy for the use of high-dose chemotherapy with stem cell rescue and intrathecal topotecan without whole-brain irradiation for infantile classic medulloblastoma.	Pediatr Blood Cancer.	61(12)	2316-8	2014
Moritake H, Kamimura S, Nunoi H, Nakayama H, Suminoe A, Inada H, Inagaki J, Yanai F, Okamoto Y, Shinkoda Y, Shimomura M, Itonaga N, Hotta N, Hidaka Y, Ohara O, Yanagimachi M, Nakajima N, Okamura J, Kawano Y	Clinical characteristics and genetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia with hemophagocytic lymphohistiocytosis: a Japanese retrospective study by the Kyushu-Yamaguchi Children's Cancer Study Group.	Int J Hematol.	100(1)	70-8	2014
Konomoto T, Tanaka E, Imamura H, Orita M, Sawada H, Nunoi H.	Nephrotic syndrome complicated by idiopathic central diabetes insipidus.	Pediatr Nephrol.	29(5)	927-30	2014
Funato M, Uemura O, Ushijima K, Ohnishi H, Orri K, Kato Z, Yamakawa S, Nagai T, Ohara O, Kaneko H, Kondo N.	A complement factor B mutation in a large kindred with atypical hemolytic uremic syndrome.	J Clin Immunol.	34(6)	691-5	2014

雑誌(英文)

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Kawamoto N, Kasahara K, Ohara O, Kondo N.	Clinical and genetic characterization of Japanese sporadic cases of periodic Fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis syndrome from a single medical center in Japan.	J Clin Immunol.	34(5)	584-93	2014
Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Nakazawa Y, Goto F, Uchiyama T, Higuchi M, Maekawa T, Tamura E, Nagasaka S, Hojo M, Onodera M.	Interstitial lung disease with multiple microgranulomas in chronic granulomatous disease.	J Clin Immunol.	34	933-940	2014
Mori M, Onodera M, Morimoto A, Kosaka Y, Morio T, Notario GF Sharma S, Saji T.	Palivizumab use in Japanese infants and children with immunocompromised conditions.	Pediatr Infect Dis J.	33	1183-1185	2014
Shigeta T, Sakamoto S, Uchida H, Sasaki K, Hamano K, Kanazawa H, Fukuda A, Kawai T, Onodera M, Nakazawa A, Kasahara M.	Basiliximab treatment for steroid-resistant rejection in pediatric patients with acute liver failure after liver transplantation.	Pediatrics Transplantation	18	860-867	2014
Katsuya Y, Hojo M, Kawai S, Kawai T, Onodera M, Sugiyama H:	Chronic granulomatous disease with pulmonary mass-like opacities secondary to hypersensitivity pneumonitis.	J Med Case Rep.	8	242	2014
Lai CY, Yamazaki S, Okabe M, Suzuki S, Maeyama Y, Iimura Y, Onodera M, Kakuta S, Iwakura Y, Nojima M, Otsu M, Nakauchi H.	Stage-specific roles for Cxcr4 signaling in murine hematopoietic stem/progenitor cells in the process of bone marrow repopulation.	Stem Cells.	32	1929-1942	2014
Onuki K, Sugiyama H, Ishige K, Kawamoto T, Ota T, Ariizumi S, Yamato M, Kadota S, Takeuchi K, Ishikawa A, Onodera M, Onizawa K, Yamamoto M, Miyoshi E, Shoda J.	Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder.	J Gastroenterol.	49	702-714	2014
Akagi K, Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Arai K, Harayama S, Oana S, Onodera M.	A case of macrophage activation syndrome developing in a patient with chronic granulomatous disease-associated colitis.	J Pediatr Hematol Oncol.	36	e169-172	2014
Takeda K, Nakazawa Y, Komuro H, Yamamoto M, Shoji K, Morita K, Miyairi I, Katsuta T, Ohya Y, Ishiguro A, Onodera M.	Augmentation of anti-tubercular therapy with interferon g in a patient with dominant partial interferon g.	Clinical Immunology.	151	25-28	2014
Hasegawa S, Imai K, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Morio T, Mizutani S, Takagi M.	Whole-exome sequence analysis of ataxia telangiectasia-like phenotype.	Journal of the neurological sciences	340	86-90	2014
Horino S, Sasahara Y, Satoh M, Niizuma H, Kumaki S, Tsuchiya S, Kure S, et al.	Selective expansion of regulatory T cells in mixed chimera after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome.	Pediatr Transplant	188(1)	e25-30	2014
Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Uchiyama T, Kumaki S, Kure S, Tsuchiya S, et al.	Open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells.	Int Immunol.	26(6)	341-352	2014
Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Onishi Y, Sasahara Y, Harigae H, et al	Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in a patient with germline GATA-2 mutation evolving into myelodysplasia and acute leukaemia.	Ann Hematol.	93(9)	1515-1522	2014
Ramesh N, Massaad MJ, Kumar L, Suresh K, Sasahara Y, Anton I, Bhasin M, Geha RS, et al.	Binding of WASP/N-WASP interacting protein WIP to actin regulates focal adhesion assembly and adhesion.	Mol Cell Biol	34(14)	2600-2610	2014

雑誌(英文)

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, Muramatsu H, Takahashi Y, Natsume J, Kojima S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N.	A novel WTX mutation in a female patient with osteopathia striata with cranial sclerosis and hepatoblastoma.	Am J Med Genet A.	164A (4)	998-1002	2014
Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T, Kanezaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Imaizumi M, Mitsui T, Hori H, Hara J, Horibe K, Nagai J, Goto H, Ito E.	Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan.	Genes Chromosomes Cancer.	53(11)	902-910	2014
Hasegawa D, Chen X, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaïke Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A	Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification.	Br J Haematol.	166(5)	758-766	2014
Hasegawa S, Imai K, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Morio T, Mizutani S, Takagi M.	Whole-exome sequence analysis of ataxia telangiectasia-like phenotype.	J Neurol Sci.	340 (1-2)	86-90	2014
Honda Y, Tsuchida M, Zaïke Y, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A.	Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukaemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Paediatric Haematology/Oncology.	Br J Haematol.	165(5)	682-687	2014
Hyakuna N, Muramatsu H, Higa T, Chinen Y, Wang X, Kojima S.	Germline mutation of CBL is associated with moyamoya disease in a child with juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome-like disorder.	Pediatr Blood Cancer.		doi: 10.1002/pbc.25271.	2014 in press
Ismael O, Shimada A, Elmahdi S, Elshazley M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada M, Yamashita Y, Horide K, Kojima S.	RUNX1 mutation associated with clonal evolution in relapsed pediatric acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22).	Int J Hematol.	99(2)	169-174	2014
Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S	Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children.	Haematologica.	99(4)	664-671	2014
Kato M, Imamura T, Manabe A, Hashii Y, Koh K, Sato A, Takahashi H, Hori H, Taki T, Inoue M, Hayashi Y, Horibe K, Tsuchida M, Kojima S, Oda M, Ohara A.	Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study.	Br J Haematol.	166(2)	295-298	2014
Kawashima N, Ito Y, Sekiya Y, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S.	Choreito formula for BK virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	Biol Blood Marrow Transplant.		doi:10.1016/j.bbmt.	2014 in press
Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S.	Aldehyde dehydrogenase-2 polymorphism contributes to the progression of bone marrow failure in children with idiopathic aplastic anaemia.	Br J Haematol.	168(3)	460-3	2015
Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S.	Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia.	Biol Blood Marrow Transplant.	20(8)	1145-1149	2014

雑誌(英文)

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M.	Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis.	J Leukoc Biol.	95(4)	667-676	2014
Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, Yagasaki H, Niizuma T, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T, Kurahashi H.	Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6.	Sci Rep.	4	4559	2014
Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Japan Childhood Aplastic Anemia Study G.	Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia.	Haematologica.	99(8)	1312-1316.	2014
Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S.	Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia.	J Pediatr Hematol Oncol.	36(1)	e65-68	2014
Ueda S, Sakata N, Muramatsu H, Sakaguchi H, Wang X, Xu Y, Kojima S, Yamaguchi T, Higa T, Takemura T.	Clinical course of juvenile myelomonocytic leukemia in the blast crisis phase treated by acute myeloid leukemia-oriented chemotherapy and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	Int J Hematol.			2014 in press
Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S.	Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children.	Ann Hematol.	93(5)	747-752	2014
Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe KI, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S.	First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor vs. immunosuppressive therapy.	Haematologica.			2014 in press

雑誌(和文)

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
笹原洋二	総説 先天性血小板減少症の診断と分子病態	小児科	Vol.55 No.01	105- 114	2014
笹原洋二	一般ウイルス感染症に易感染性を示す免疫不全症	小児内科	Vol.46 No.10	1475- 1481	2014
笹原洋二	総説:免疫不全症に対する造血幹細胞移植	日本小児血液・がん学会雑誌	Vol.51 No.03	244- 250	2014

IV 研究成果の刊行に関する一覧 別冊

Analysis of somatic hypermutations in the IgM switch region in human B cells

Katsuyuki Horiuchi, MD, PhD,^a Kohsuke Imai, MD, PhD,^{a,b} Kanako Mitsui-Sekinaka, MD,^a Tzu-Wen Yeh, BSc,^b Hans D. Ochs, MD, PhD,^c Anne Durandy, MD, PhD,^{d,e,f} and Shigeaki Nonoyama, MD, PhD^a *Saitama and Tokyo, Japan, Seattle, Wash, and Paris, France*

Background: The molecular mechanism of class-switch recombination (CSR) in human subjects has not been fully elucidated. The CSR-induced mutations occurring in the switch region of the IgM gene (Smu-SHMs) in *in vitro* CSR-activated and *in vivo* switched B cells have been analyzed in mice but not in human subjects.

Objective: We sought to better characterize the molecular mechanism of CSR in human subjects.

Methods: Smu-SHMs were analyzed *in vitro* and *in vivo* by using healthy control subjects and patients with molecularly defined CSR defects.

Results: We found that Smu-SHMs can be induced *in vitro* by means of CSR activation in human subjects. We also found large amounts of Smu-SHMs in *in vivo* class-switched memory B cells, smaller (although significant) amounts in unswitched memory B cells, and very low amounts in naive B cells. In class-switched memory B cells a high frequency of Smu-SHMs was found throughout the Smu. In unswitched memory B cells, the Smu-SHM frequency was significantly decreased in the 5' part of the Smu. The difference between switched and unswitched B cells suggests that the extension of somatic hypermutation (SHM) to the 5' upstream region of the Smu might be associated with the effective induction of CSR. The analysis of the pattern of mutations within and outside the WRCY/RGYW (W, A/T; R, A/G; and Y, C/T) motifs, as well as the Smu-SHMs, in CD27⁺ B cells from CD40 ligand (CD40L)-, activation-induced cytidine

deaminase (AID)-, and uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient patients revealed the dependence of Smu-SHM on CD40L, AID, UNG, and the mismatch repair system in human subjects.

Conclusion: CD40L-, AID-, UNG-, and mismatch repair system-dependent Smu-SHMs and extension to the 5' region of Smu are necessary to accomplish effective CSR in human subjects. (*J Allergy Clin Immunol* 2014;134:411-9.)

Key words: Activation-induced cytidine deaminase, somatic hypermutation, antibody maturation, uracil-DNA glycosylase, class-switch recombination, immunoglobulin switch region

Several single gene defects are known to cause immunoglobulin class-switch recombination (CSR) defects, resulting in hyper-IgM syndromes. The affected patients have severely impaired IgG, IgA, and IgE production but normal-to-high serum IgM levels associated with recurrent bacterial infections. Of these, 2 gene defects, namely CD40 ligand (CD40L) deficiency and CD40 deficiency, are associated with bacterial and opportunistic infections and unfavorable prognosis. In contrast, patients with B cell-intrinsic CSR defects, including activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency¹ and uracil-DNA glycosylase (UNG) deficiency,² have a milder clinical course, particularly when treated with prophylactic immunoglobulin infusions, but frequently have autoimmune diseases.³

CSR is the mechanism that induces functional diversity into immunoglobulin molecules. The first step of CSR is the germline transcription of and R-loop formation in the immunoglobulin switch (S) region. In the second step DNA lesions and single-strand DNA breaks are introduced. In the third step the single-strand DNA break leads to double-strand DNA breaks through mechanisms that are not yet fully understood. In the fourth step double-strand DNA breaks are joined by nonhomologous end-joining enzymes, most likely through alternative end-joining using microhomology⁴ and not homologous recombination.⁵

In the second step uracil is introduced through the deoxycytidine deamination induced by AID and is then removed by base excision repair molecules to form single-strand DNA breaks. This process requires uracil DNA glycosylase (UNG) and AP-endonuclease, as well as several mismatch repair (MMR) proteins, including PMS2, MSH2, MSH6, and EXO1.⁵ During this process, a somatic hypermutation (SHM) is introduced into the S region (S-SHM).^{6,7} This S-SHM is likely to be closely associated with CSR but has not been well investigated, particularly in human B cells.

An SHM is also introduced into the variable (V) region of the immunoglobulin gene (V-SHM), which results in production of high-affinity immunoglobulin.⁸ Several molecules are known to be used by both V-SHM and S-SHM, but the molecular mechanisms are different and need to be clarified. In AID-deficient

From ^athe Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Saitama; ^bthe Department of Pediatrics, Tokyo Medical and Dental University (TMDU); ^cthe Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle; ^dUnité 768, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Université Paris V René-Descartes, Paris; ^eService d'Immunologie et d'Hématologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; and ^fInstitut Fédératif de Recherche 94, Site Necker, Faculté de Médecine René Descartes, Université Paris-Descartes, Paris.

Supported in part by grants from the Japan Ministry of Defense; the Japan Ministry of Health, Labour, and Welfare; the Japan Intractable Diseases Research Foundation; the Kawano Masanori Foundation for Promotion of Pediatrics; the Mitsubishi Pharma Research Foundation; l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; l'Association de la Recherche Contre le Cancer; the European Union FP7 EUROPAD contract 201549 (EUROPAD); the Agence Nationale pour la Recherche (SVSE3); the National Institutes of Health (R01HD17427-33), the Jeffrey Modell Foundation; and the Immunodeficiency Foundation.

Disclosure of potential conflict of interest: H. D. Ochs is a board member for Sigma Tau and has received support from CSL Behring (committee travel expenses). The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

Received for publication June 14, 2013; revised February 6, 2014; accepted for publication February 6, 2014.

Available online May 15, 2014.

Corresponding author: Kohsuke Imai, MD, PhD, Department of Community Pediatrics, Perinatal and Maternal Medicine, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan. E-mail: kimai.ped@tmd.ac.jp. 0091-6749/\$36.00

© 2014 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.02.043>

Abbreviations used

AID:	Activation-induced cytidine deaminase
CD40L:	CD40 ligand
CSR:	Class-switch recombination
MMR:	Mismatch repair
SHM:	Somatic hypermutation
Smu:	Switch region of IgM
UNG:	Uracil-DNA glycosylase

human subjects and mice, the frequency of V-SHM is extremely decreased.^{1,9} In UNG deficiency the frequency of V-SHM is normal, but the introduced DNA sequences are severely skewed.² However, although data on S-SHM in dominant-negative AID and UNG-deficient human B cells have been reported,¹⁰ no data are available on purified B-cell populations. After CSR activation in mice, an SHM has also been found in the S region not only near the recombination site but also in the far upstream 5' region of the highly repetitive S-core region. S-SHMs are induced *in vitro* on CSR activation in Smu regions, as well as in Sgamma, Salpha, and Sepsilon regions, in mice.^{6,7,11}

In this study we analyzed SHMs in the Smu region (Smu-SHM, Fig 1) in purified human B cells. We found that an Smu-SHM can be induced by CD40 and IL-4 stimulation, which vigorously induces CSR *in vitro*. The Smu-SHM frequency was different depending on the B-cell maturation stage and was defective in cases of CD40L, AID, and UNG deficiency. The analysis of the mutation pattern of the nucleotides suggests the involvement of a MMR in CSR.

METHODS**Patients and control subjects**

Peripheral blood samples were obtained from 4 healthy adults between 32 and 36 years of age (C1-C4) and 3 age-matched healthy children (1, 8, and 11 years old [C5-C7]). P1 was a patient with newly diagnosed AID deficiency (homozygous nonsense mutation leading to W80X) with typical hyper-IgM syndrome (IgM, 386 mg/dL; IgA, <6 mg/dL; and IgG, <10 mg/dL). The other 4 AID-deficient patients (P2-P5) and the 2 UNG-deficient patients (P6 and P7) have been previously reported: P2 and P3 were P5 and P4, respectively, in the study conducted by Revy et al¹; P4 was the younger brother of P10 and P5 was P12 in the study conducted by Zhu et al¹²; and P6 and P7 were P2 and P3 in the study conducted by Imai et al.² P8 to P11 were CD40L-deficient patients. The study was approved by the Institutional Review Board of the National Defense Medical College. Informed consent from each participant or their parents was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Detection of SHM in the Smu region of the immunoglobulin gene

The genomic DNA from PBMCs was extracted by using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The upstream flanking region to the highly repetitive Smu core region was amplified with *PfuTurbo* DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, Calif) and the following primers (Fig 1): Imu-1S, 5'-AGATTCTGTTCCGAATCACCGATG-3'; and Smu-1AS, 5'-CCATCTGAGTCCATTCTGA-3'. A 1128-bp fragment was sequenced from position 12,880 to position 13,794 of NT_010168.8. Within this region, the G/C content and the RGYW/WRCY (W, A/T; R, A/G; and Y, C/T) motifs are equally distributed, as shown in Fig 1.

The GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Calif) was used for the PCR reaction by using the following temperature program: 40 cycles of 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72°C for 2 minutes. After the PCR products were subcloned with the Topo TA cloning kit for

Sequencing (Invitrogen, Carlsbad, Calif), the plasmid was extracted by using Perfectprep Plasmid 96 Vac Direct Bind (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The sequencing reaction of the obtained plasmid was conducted by using the BigDye Terminator V1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and analyzed with Genetic analyzer 3130XL (Applied Biosystems). More than 18 unique clones (20,304 bases) were analyzed for each control.

***In vitro* induction of SHM in Smu-SHM in control B cells after CSR activation**

PBMCs were separated by means of Ficoll-Hypaque density centrifugation with Lymphoprep (Axis-Shield PoC) and were cultured at a final concentration of 2.0×10^6 cells per milliliter under standard conditions (37°C and 5% CO₂) in RPMI 1640 medium (Invitrogen) containing 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL; Cellgro, Manassas, Va), anti-CD40-stimulating mAb (anti-CD40 mAb; G28-5, 1 µg/mL), and recombinant IL-4 (100 U/mL; R&D Systems, Minneapolis, Minn). The induction of AID expression was confirmed by means of relative quantification with TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) with a 7300 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, data not shown). The genomic DNA from B cells was extracted, and the presence of Smu-SHM was analyzed as described above.

***In vivo* detection of SHM in the switch region of IgM in control subjects and CD40L-, AID-, and UNG-deficient patients**

B cells were purified from the peripheral blood of 4 control subjects (C1-C4) by using the RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail (StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada). The enriched B cells (>90% purity) were stained with anti-IgM-phycoerythrin-Cy5 (BD Biosciences, San Jose, Calif), anti-CD19-allophycocyanin, anti-CD27-phycoerythrin, and anti-IgD-fluorescein isothiocyanate (Beckman Coulter, Fullerton, Calif), according to the manufacturer's suggestions. The CD19⁺ cells were gated, and the IgD⁺IgM⁺CD27⁻, IgD⁺IgM⁺CD27⁺, and IgD⁻IgM⁻CD27⁺ cells were sorted by using FACS Vantage (BD Biosciences). The mean purities of these fractions were 95.6%, 86.9%, and 94.8%, respectively. Because of the absence of class-switched B cells (IgD⁻IgM⁻CD27⁺CD19⁺) in immunoglobulin CSR-deficient patients (P1-P11), we purified only the CD27⁺ and CD27⁻ fractions from the B cells of these patients and their age-matched control subjects (C5-C7, >90% purity). The genomic DNA from the B cells was extracted, and the presence of the switch region of IgM (Smu-SHM) was analyzed, as described above.

RESULTS***In vitro* induction of SHM in Smu-SHM in human B cells following CSR activation**

To examine whether Smu-SHMs are indeed linked to the induction of CSR in human B cells, we stimulated the PBMCs of control subjects (C1-C4) with anti-CD40 mAb and IL-4, which is a combination that powerfully stimulates the induction of *in vitro* CSR, but not V-SHM,^{13,14} in human B cells. This stimulation, as reported previously, induced AID expression, functional transcripts of IgE (as determined by using RT-PCR), and IgE production (as determined by using ELISA) in the supernatants of all (C1-C4) human B-cell cultures (data not shown).

The unstimulated PBMCs presented very few Smu-SHMs (0.006% ± 0.004% bp, mean ± SD; Fig 2, A). On CSR-inducing anti-CD40 mAb and IL-4 stimulation, the Smu-SHM frequency significantly increased (0.045% ± 0.002% bp, *P* = .0361). The induced Smu-SHMs were equally targeted to GC and AT (the GC target was 47.4%). The transition type of the mutations was increased at the G and C nucleotides (GC transition, 72.2%) but was not altered at the A and T nucleotides (AT transition,

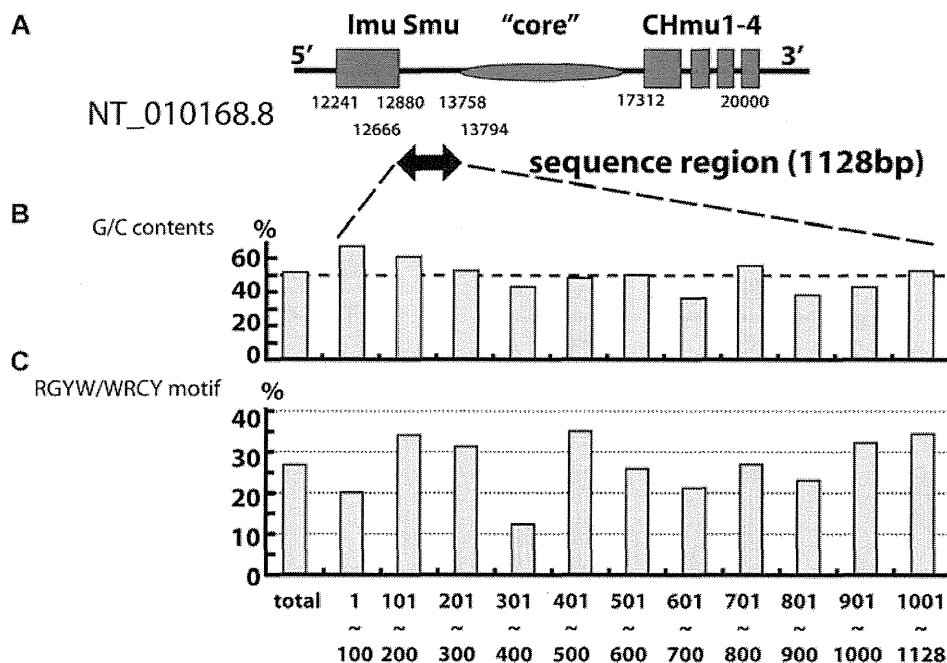


FIG 1. Sequence region for the analysis of mutations in Smu-SHM. **A**, We amplified, subcloned, and sequenced the 5' region of the highly repetitive GC-rich region of the IgM gene (Smu core) using Pfu polymerase. **B**, Percentages of G and C nucleotides (G/C contents) are equally distributed throughout the sequence region. **C**, Percentages of RGYW/WRCY motifs in each 100-bp fragment are not significantly different throughout the sequence region. *CHmu1-4*, Exons of the constant region of IgM; *Imu*, enhancer exon of the IgM gene; *R*, purines (A/G); *W*, A/T; *Y*, pyrimidines (C/T).

50.0%; Fig 2, B). In contrast, the VH-SHMs at the JH4-JH5 region were not changed because of stimulation (Fig 2, A). These results indicate that Smu-SHMs can be induced *in vitro* by means of CSR activation.

In vivo induction of Smu-SHM in human B cells

We separated human B cells into 3 subpopulations (naive B cells, unswitched memory B cells, and switched memory B cells) using fluorescence-activated cell sorting based on the expression of IgM, IgD, CD27, and CD19¹⁵ from the PBMCs of healthy adults (n = 4; Fig 3, A). We purified the genomic DNA from each purified B-cell subpopulation and amplified the Smu region (5' to the Smu core region containing repetitive sequences) with the high-fidelity *Pfu* DNA polymerase and Smu-specific primers (Fig 1, A).

We found that the frequency of Smu-SHMs in the IgD⁻IgM⁻CD27⁺ switched memory B cells was 20-fold higher (0.21% ± 0.014% bp) than that found in the IgD⁺IgM⁺CD27⁻ naive B cells (0.008% ± 0.003% bp, *P* < .001). The frequency of Smu-SHMs in the IgD⁺IgM⁺CD27⁺ unswitched memory B cells (0.13% ± 0.023% bp) was also significantly higher than that found in naive B cells (*P* < .001) and significantly lower than that found in switched memory B cells (*P* < .001; Fig 3, B). The mutations were mainly point mutations (Fig 3, C), but some small deletions were also observed in each fraction (Table I).

Distribution of Smu-SHMs within the 5' upstream region of Smu core

We then compared the frequency of SHMs among the 1- to 400-bp, 401- to 800-bp, and 801- to 1128-bp regions of the 5' upstream region of the Smu core region.

In all 5' regions (1-400 bp, 401-800 bp, and 801-1128 bp), the switched memory B-cell subpopulation exhibited a significantly higher frequency of SHMs than the unswitched memory and naive B cells (Fig 4).

In the 1- to 400-bp region (Fig 4, A), which is the most distant from the Smu core region, the SHM frequencies found in the unswitched memory and naive B cells were not significantly different. However, the switched memory B cells (0.15% ± 0.05% bp) presented a higher frequency of SHMs than the unswitched memory B cells (0.06% ± 0.04% bp, *P* < .05) and naive B cells (0.00% ± 0.00% bp, *P* < .001).

In the 401- to 800-bp region (Fig 4, B) the switched memory B cells (0.19% ± 0.02% bp) exhibited a significantly higher frequency of SHMs than the unswitched memory B cells (0.07% ± 0.03% bp, *P* < .001) and naive B cells (0.01% ± 0.01% bp), and the unswitched memory B cells presented a higher frequency of SHMs than the naive B cells (*P* < .01).

In the 801- to 1128-bp region (Fig 4, C), which is the closest to the Smu core region, both switched (0.29% ± 0.02% bp) and unswitched (0.27% ± 0.05% bp) memory B-cell subpopulations exhibited significantly higher SHM frequencies than naive B cells (0.02% ± 0.02% bp, *P* < .001). The SHM frequencies obtained for the switched and unswitched memory B cells were not significantly different.

These differences were independent of the distributions of G and C nucleotides (Fig 1, B) and WRCY/RGYW motifs (Fig 1, C) because these motifs are equally distributed in these regions.

Sequence analysis of Smu-SHMs in memory B cells

The Smu region analyzed in this study (1128 bp) contains 40 WRCY motifs (160 bp, 14.2% of the length of the Smu region)