

全移植のEFSは85.2±6.8%、OS92.6±5.0%であった。死亡例は急性GVHDとEBVによるBLPDを合併した最年長31歳移植のCGD症例、および前出の前処置のCYによる心筋障害例の2例のみで、その他は全例生存している。

D. 考察

PID全体の移植成績としては比較的良好な結果であったが、CGD症例およびRICでの拒絶および混合キメラが課題である。

またMACではCYの心筋障害のような前処置薬剤の致死毒性が問題となることが懸念され可能な限り移植前処置を軽減する必要がある一方で、混合キメラやそれによる自己免疫疾患の発症の危険性を低下せしめることも課題である。いわばこの相反する課題の解決こそ本研究班の使命であり各疾患各症例に応じた至適な移植前処置、移植ソースの選定およびGVHD対策が必要であり、より多数の症例での検討が必要と考えられる。

さらにはPIDでは移植後のウイルス再活性化のリスクが高いものと考えられ、慎重なウイルスモニタリングと迅速な治療が必要と考えられた。

E. 結論

北海道大学病院におけるPIDに対する造血幹細胞移植症例について後方視的に検討した。

CGD症例およびRICでの拒絶および混合キメラが課題であった。また生着を担保しつつ可能な限り移植前処置を軽減するため、各疾患各症例に応じた至適な移植前処置、移植ソースの選定、GVHD対策およびウイルス感染対策について今後より多数例での検討が必要である。

F. 研究発表

学会発表

1. Ohshima J, Sugiyama M, Terashita Y, Sato T, Cho Y, Iguchi A, Ariga T. Risk factors and outcome of pulmonary complication of pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. 40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), April, 2014 (Milan, Italy)
2. Iguchi A, Sugiyama M, Terashita Y, Ohshima J, Sato T, Cho Y, Kobayashi R, and Ariga T. GVHD prophylaxis using MTX decreases pre-engraftment syndrome and accelerates engraftment after CBT.
3. 第76回日本血液学会学術集会、2014年10月、大阪

論文

1. Sato T, Takahashi H, Hatakeyama S, Iguchi A, Ariga T. The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway. *Oncogene*. 2014 Mar 31;0. doi: 10.1038/onc.2014.68.
2. 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: E25-E30, 2014.
3. Kobayashi I, Mori M, Yamaguchi K, Ito S, Iwata N, Masunaga K, Shimojo N, Ariga T, Okada O, Takei S. Pediatric

Rheumatology Association of Japan (PRAJ) Recommendation for Vaccination in Pediatric Rheumatic Diseases. *Modern Rheumatol Mod Rheumatol*, 2014; Early Online: 1–9

4. 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*. 2014 Oct 6. pii: 1401467.
5. Chida N, Kobayashi I, Takezaki S, Ueki M, Yamazaki Y, Garelli S, Scarpa R,

Horikawa R, Yamada M, Betterle C, D Notarangelo L, Ariga T. Disease specificity of anti-tryptophan hydroxylase-1 and anti AIE-75 autoantibodies in APECED and IPEX syndrome. *Clinical Immunology* 2014;156, 36–42

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患等実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

造血幹細胞移植に関する各施設からのデータ収集（東北・中部地区）
キメリズム解析、遺伝子治療基礎研究、新たな感染症診断法、合併症予防・治療法の開発に関する
基礎研究

担当責任者： 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学
今井耕輔

研究要旨

日本造血細胞移植学会の統合データベースである TRUMP に登録された 509 例の原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植についての検討を行った。移植は 1974 年から 2012 年までに行われており、疾患別の内訳は、重症複合免疫不全症 192 例、Wiskott-Aldrich 症候群 112 例、慢性肉芽腫症 96 例、CD40L 欠損高 IgM 症候群 41 例、その他 68 例であった。

Wiskott-Aldrich 症候群の亜型である X 連鎖血小板減少症（XLT）については、造血幹細胞移植の有用性・安全性が明らかでなかったが、5 か国、15 施設からの 24 例の XLT に対する移植成績をまとめ、報告した。WAS に比べ高年齢での移植であったが（13 例が 6 歳以上）、85.1%の長期生存率を達成していた。

CD40L 欠損高 IgM 症候群については、1988 年～2012 年に診断された 56 症例、および HSCT を施行された 29 例を対象として解析を行った。56 例の長期生存率は 30%であり、平均生存年数は 23 年であり、自然予後不良であることが改めて示された。HSCT 非施行例は 28.2%であり、移植例の 65.9%と比較し、有意に不良であった（ $p=0.0231$ ）。5 歳までに移植を行った 14 例は全例生存しており、5 歳以上で移植した症例の 71.8%と比較し、有意に良好であった。

当科では、1984 年から 2014 年まで 57 例の造血幹細胞移植を行ってきた。20 年生存率は 48.8%だったが、2011 年・2014 年に移植した症例の生存率は、81.5%に向上しており、移植技術の向上が得られたと考えられた。

A. 研究目的

原発性免疫不全症（PID）の中で自然経過が不良である病型、特に細胞性免疫不全症患者に対して、その根治療法として、造血幹細胞移植（骨髄移植、臍帯血移植）が行われて

いるが、希少疾患であるため、その方法については、確立されてはいない。

そこで、本研究では、日本造血細胞移植学会を母体とした統合データベース TRUMP に登録された PID に対する造血幹細胞移植の件数について調べ、国内の移植実態につい

て調べた。次に、Wiskott-Aldrich 症候群の亜型である X 連鎖血小板減少症に対する移植の実態について、国際調査を行った。また、CD40L 欠損高 IgM 症候群については、非移植例も含めて調査を行い、その予後について検討した。最後に当科における造血細胞移植について検討した。

B. 研究方法

TRUMP データベースについては、日本造血細胞移植学会統一データベースを参照し、解析を行った。WAS 遺伝子異常を持つ XLT 患者および CD40 遺伝子異常をもつ高 IgM 症候群の移植成績については、各主治医に後方視的に情報を収集した。

(倫理面への配慮)

本研究は、東京医科歯科大学、および防衛医科大学校倫理審査委員会で承認を得られた研究計画に基づいて行われた。

C. 研究結果

日本造血細胞移植学会の統合データベースである TRUMP に登録された 509 例の原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植についての検討を行った (図 1)。移植は 1974 年から 2012 年までに行われており、疾患別の内訳は、重症複合免疫不全症 192 例、Wiskott-Aldrich 症候群 112 例、慢性肉芽腫症 96 例、CD40L 欠損高 IgM 症候群 41 例、その他 68 例であった。その他の中では、CVID 12 例、Chediak-Higashi 症候群 8 例、LAD 7 例、XLP 7 例、EDA-ID 5 例、重症好中球減少症 4 例、慢性皮膚粘膜カンジダ症 4 例、DiGeorge 症候群 3 例、高 IgE 症候群 3 例、IPEX 症候群 3 例、MonoMAC 症候群 3 例、DKC 2 例、家族性血球貪食症候

群 2 例、分類不能 5 例、であった。SCN、MonoMAC、DKC、FHL など疾患によっては、別のカテゴリに入っていると考えられるものもあるため、こうした疾患についての調査については、個別に行う必要があると考えられた。

Wiskott-Aldrich 症候群の亜型である X 連鎖血小板減少症 (XLT) については、造血幹細胞移植の有用性・安全性が明らかでなかったため国際調査が企画され、以前共同研究で行った XLT の国際調査例 (Albert M, et al, Blood, 2010) 173 例の中から、造血幹細胞移植を行った 24 例を抽出し、解析を行い報告した (Oshima K, et al, JoCI, 2014)。5 か国、15 施設からの登録があった。WAS に比べ高年齢での移植であったが (13 例が 6 歳以上)、85.1% の長期生存率を達成していた。前処置方法は大部分が骨髄破壊的前処置であったが、今後、骨髄非破壊的前処置による方法の開発も必要である。

CD40L 欠損高 IgM 症候群については、1988 年～2012 年に診断された 56 症例、および HSCT を施行された 29 例を対象として解析を行った。56 例の長期生存率は 30% であり、平均生存年数は 23 年と、自然予後不良であることが改めて示された。HSCT 非施行例は 28.2% であり、移植例の 65.9% と比較し、有意に不良であった ($p=0.0231$)。死因は、感染症が 8 例、悪性腫瘍が 2 例、肝不全が 2 例、その他が 2 例であった。移植群 29 例の解析では、5 歳までに移植を行った 14 例は全例生存しており、5 歳以上で移植した症例の 71.8% と比較し、有意に良好であった ($p=0.037$)。移植後死亡の 4 例は 15 歳以上のみであり、移植後の合併症も 10 歳以上の例で多く見られており、早期の

移植と移植方法の改善も今後の課題であると考えられた。今回の解析症例では、骨髄破壊的前処置が大部分であったが、今後、有効な骨髄非破壊的前処置の開発も必要であると考えられた。

当科では、1984年から2014年まで57例の造血幹細胞移植を行ってきた。20年生存率は48.8%だったが、2011年-2014年に移植した症例の生存率は、81.5%に向上しており、移植技術の向上が得られたと考えられた(図2)。

D. 考察

今回、CD40L欠損症は、遺伝子解析施行例を中心に、29例の移植例を集めたが、TRUMPデータベースでは、41例が登録されており、悉皆性においてはTRUMPデータの方がすぐれており、今後、日本造血細胞移植学会と連携して、解析を行っていくことが重要であると考えられた。XLT、CD40Lに対する移植では、どちらも骨髄破壊的前処置が用いられ、生着の面では、満足できる成績が得られていた。しかし、晩期障害の評価はこれからの課題であり、極早期の合併症

(骨髄抑制に伴う細菌・真菌感染症、粘膜障害、VOD、心不全、肺障害など)を考えると骨髄非破壊的前処置の検討も必要であると考えられる。しかし、混合キメラ状態により、新たな合併症に難渋している症例も存在しており、十分なキメリズムを達成しつつ、早期、晩期合併症の少ない移植方法の開発が急務と考えられた。そのためにも希少疾患である本疾患においては、欧米との連携が必要であり、アメリカPIDTC、欧州EBMT/ESID-IEWPとの連携を今後も強化していく予定である。

また、海外学会では、造血幹細胞遺伝子治療も盛んであり、X連鎖重症複合免疫不全症、ADA欠損症、Wiskott-Aldrich症候群が国際共同治験中であり、それ以外の疾患についても開発中である。先天性の遺伝性疾患である原発性免疫不全症は、遺伝子治療の有用性が証明された疾患群であり、GVHDがない点からも、日本でも推進されていくべきであると考えられた。

E. 結論

原発性免疫不全症に対する移植法については、前処置法、GVHD予防法、感染症に対する予防および治療法、移植後早期合併症のコントロール、晩期合併症の対策など、改善の余地は多々ある。国内未承認薬の問題も大きく、継続して、研究を重ね、患者の予後改善に寄与するべきと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

1. 宮本智史、足洗美穂、岡野翼、小林千佳、宮脇零士、青木由貴、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、今井耕輔、森尾友宏. Fludarabine+Busulfanによる前処置を用いた重症先天性好中球減少症に対する造血幹細胞移植. 第22回食細胞機能異常症研究会. 東京, 2014年12月13日
2. 岡本浩之、和田泰三、村岡正裕、榊原康久、東馬智子、谷内江昭宏、宮本智史、青木由貴、富澤大輔、今井耕輔、森尾友宏. 再生不良性貧血移植後の汎血球減少において認められたCD177(HNA-2)に対する抗好中球抗体. 第5回関東甲越

免疫不全症研究会. 東京, 2014年9月21日

3. 小林千佳、宮脇零士、青木由貴、富澤大輔、今井耕輔、高木正稔、梶原道子、森尾友宏、水谷修紀. 重症先天性好中球減少症 (ELANE 変異) に対して同種臍帯血移植を施行した 2 例. 第 36 回日本造血細胞移植学会総会. 沖縄, 2014 年 3 月 7 日
4. 岡野翼、奥津美夏、宮脇零士、高島健浩、青木由貴、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、今井耕輔、水谷修紀、森尾友宏. 非結核性抗酸菌感染後の NEMO 異常症に対して非血縁者間骨髄移植を施行した 1 例. 第 128 回小児血液腫瘍免疫懇話会. 東京, 2014 年 5 月 23 日
5. 岡野翼、今井耕輔、宮脇零士、奥津美夏、高島健浩、青木由貴、富澤大輔、高木正稔、梶原道子、水谷修紀、森尾友宏. 炎症性腸疾患と *Mycobacterium avium* 感染症を合併した NEMO 異常症に対する非血縁者間骨髄移植. 第 56 回小児血液・がん学会. 岡山 2014 年 11 月 28 日
6. Imai K, Okawa T, Miyawaki R, Takashima T, Mitsuiki N, Aoki Y, Tomizawa D, Kajiwara M, Ozaki Y, Imai T, Wada T, Okada S, Morio T, Hematopoietic stem cell transplantations for severe chronic mucocutaneous candidiasis due to gain of function mutations in STAT1. ESID/EBMT Inborn Errors Working Party Conference. Munich, Germany. 2014. Oct.18
7. Imai K, Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Mitsuiki N, Takashima T, Okano T,

Aoki Y, Kimoto F, Inoue M, Iwasaki F, Kaneko T, Waragai T, Sano H, Kikuta A, Morio T, Nonoyama S, Hematopoietic stem cell transplantation for the patients with activated PI3K-delta syndrome. Hematopoietic stem cell transplantation for the patients with activated PI3K-delta syndrome. 16th Biennial Meeting of the European society for immunodeficiencies, 2014. Oct.30.

8. Imai K, Horikoshi Y, Kato K, Yabe H, Nonoyama S, Morio T. Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in Japan: 1974-2010. 4th annual scientific workshop of primary immunodeficiency treatment consortium (PIDTC). Seattle, 2014. May.3

論文

1. Oshima K, Imai K, Albert MH, Bittner TC, Strauss G, Filipovich AH, Morio T, Kapoor N, Dalal J, Schultz KR, Casper JT, Notarangelo LD, Ochs HD, Nonoyama S. Hematopoietic stem cell transplantation for X-linked thrombocytopenia with mutations in the WAS gene. J Clin Immunol (2014) [Epub ahead of print]
2. Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Sato H, Tomizawa D, Kajiwara M, Nagasawa M, Morio T, Nonoyama S. Clinical features and hematopoietic stem cell

transplantations for CD40 ligand
deficiency in Japan. J Allergy Clin
Immunol (2015) [in press]

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

図 1: TRUM データにおける基礎疾患の割合

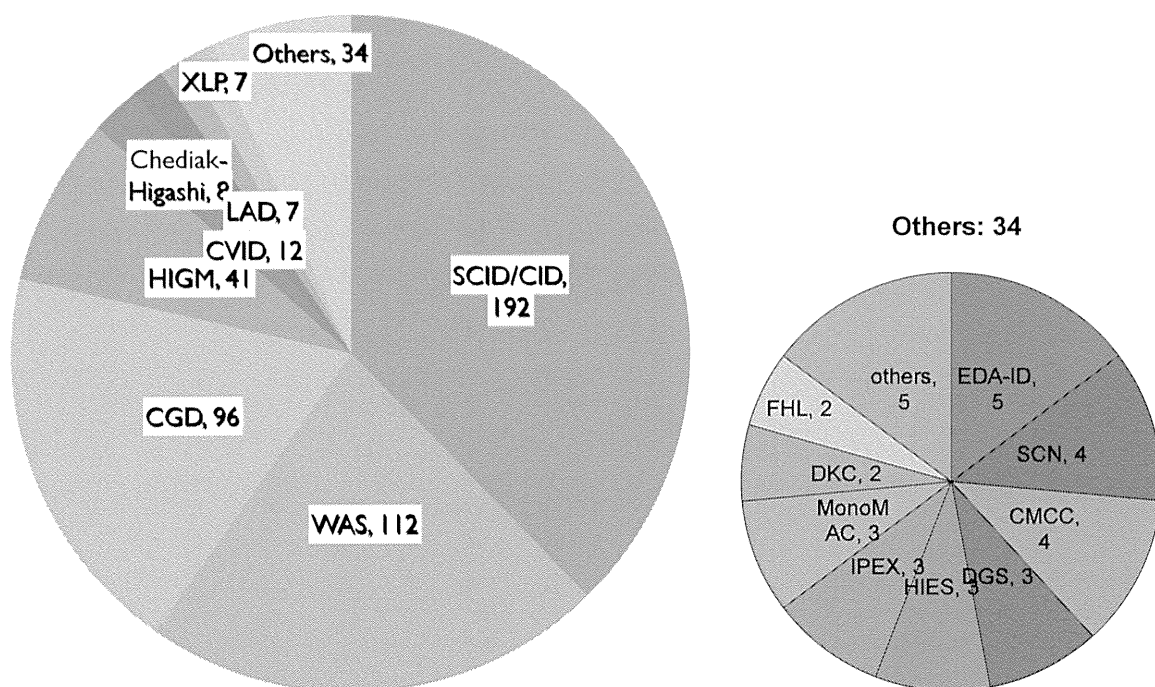
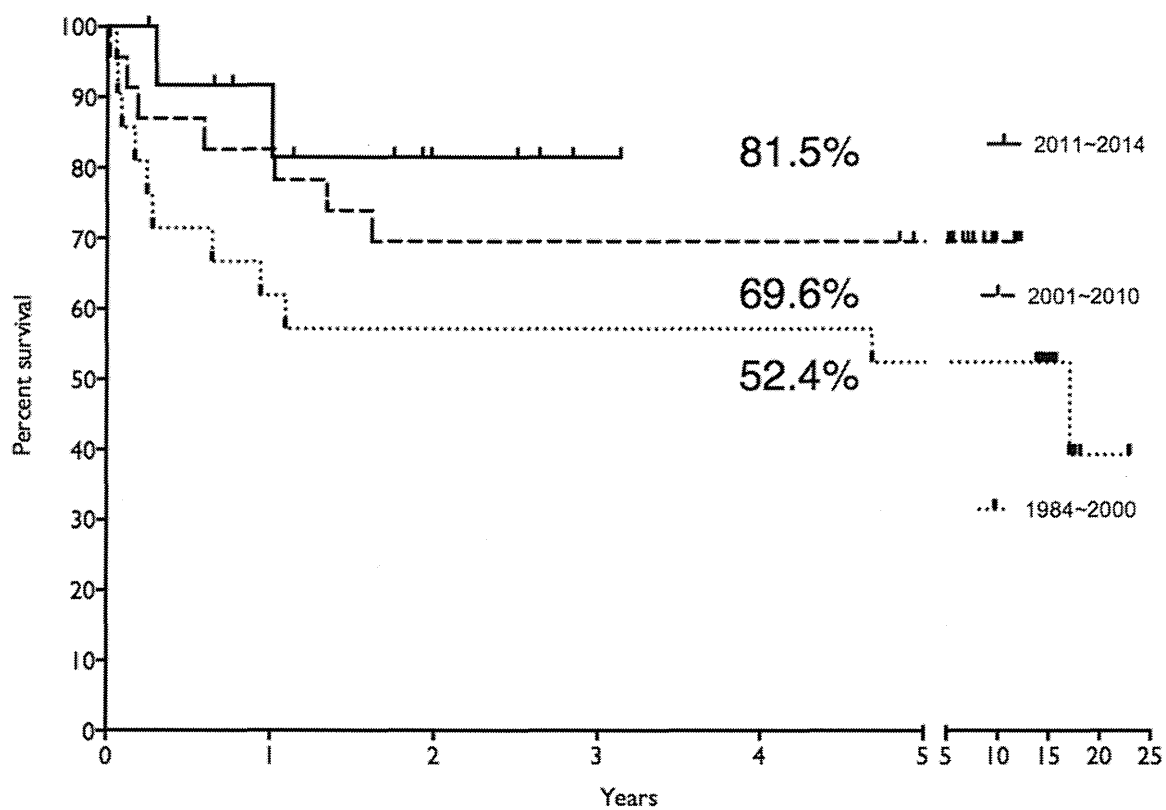


図 2: 当科における造血幹細胞移植の年代別成績



IV. 学会等発表実績

学会等発表実績

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果 (発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所(学会等名)	発表した時期	国内・ 外の別
Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: an association of non-random X-chromosome inactivation and uniparental isodisomy 6.(ポスター)	Takada H, Takimoto T, Ishimura M, Urata M, Morio T, Hara T	16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (Prague)	Oct 29-Nov 1, 2014	国外
Mutations in Bruton's tyrosine kinase impair IgA responses.(ポスター)	Mitsuiki N, Yang X, Bartol S, Kosaka Y, Takada H, Imai K, Kanegane H, Mizutani S, Burg VD, Zeim MV, Ohara O, Morio T	16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (Prague)	Oct 29-Nov 1, 2014	国外
Association between primary immunodeficiency diseases and vasculitis syndrome.(ポスター)	Hara T, Ishimura M, Takada H, Kusuda Y, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H	16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (Prague)	Oct 29-Nov 1, 2014	国外
Safety and tolerability of Hizentra in patients with primary immunodeficiency in Japan, Europe, and the US.(ポスター)	Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Hara T, Rojavin M, Hu W, Hubsch A, Nonoyama S	16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (Prague)	Oct 29-Nov 1, 2014	国外
Safety, Tolerability, and Efficacy of Hizentra in Japanese Patients with Primary Immunodeficiency over 48 Weeks.(ポスター)	mai K, Kanegane H, Yamada M, Takada H, Ariga T, Kobayashi M, Rojavin M, Bexon M, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T	American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (San Diego)	Feb.28-Mar.4.2014	国外
Health-related quality of life of Japanese patients with primary immunodeficiency diseases receiving IgPro20, a 20% liquid subcutaneous immunoglobulin (Hizentra).(ポスター)	Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Tsutani K, Igarashi A, Bexon M, Rojavin M, Kobayashi M, Lawo JP, Zbrozek A, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T	American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (San Diego)	Feb.28-Mar.4.2014	国外
An Early and Non-invasive Diagnostic Method for Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis.(口頭発表)	Ishimura M, Mizuno Y, Takada H, Ohga S, Hara T	FISP/M.(Fukuoka)	Aug.30.2014.	国内
本邦におけるICF症候群5例の検討(口頭発表)	釜江智佳子、加藤環、小原收、本間健一、今井耕輔、久保田健夫、野々山恵章	名古屋(第117回日本小児科学会学術集会)	平成26年4月11日 -13日	国内
Muckle-Wells症候群におけるNLRP3体細胞モザイク変異の検討(口頭発表)	中川権史、西小森隆太、Eva Gonzalez-Roca, Juan I. Arosutegui, 河合利尚、梅林宏明、武井修治、小林法元、小原收、井澤和司、河合朋樹、八角高裕、平家俊男	第37回日本小児遺伝学会学術集会	平成26年4月10日	国内
次世代シーケンサーを用いた、“変異陰性TRAPS”における体細胞モザイクの検索(ポスター)	中川権史、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男	第117回日本小児科学会学術集会	平成26年4月11日 -13日	国内
当科におけるFHL(家族性血球貪食性リンパ組織球症)スクリーニングの現状(ポスター)	堀雅之、八角高裕、西小森隆太、平家俊男	第117回日本小児科学会学術集会	平成26年4月11日 -13日	国内
自己炎症性疾患における診療研究の新展開 “炎症”と小児発熱性疾患 疾患特異的iPS細胞を用いたCINCA/NOMIDにおける骨幹端家系の機序解明(口頭発表)	西小森隆太、横山宏司、梅田雄嗣、池谷真、中川権史、納富誠司郎、八角高裕、田中孝之、斎藤潤、小田紘嗣、小原收、中山直樹、戸口田淳也、平家俊男	第117回日本小児科学会学術集会	平成26年4月11日 -13日	国内
罹患者由来iPS細胞を用いたCINCA症候群における関節病態の解明(口頭発表)	横山宏司、西小森隆太、納富誠司郎、田中孝之、斎藤潤、梅田雄嗣、池谷真、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男	第117回日本小児科学会学術集会	平成26年4月11日 -13日	国内
エクソスキップに伴い非典型的な表現型を呈したFilamin A異常症の兄弟例(口頭発表)	小田紘嗣、河合朋樹、中川権史、日衛嶋栄太郎、井澤和司、西小森隆太、小原收、沼部博直、平家俊男	第117回日本小児科学会学術集会	平成26年4月11日 -13日	国内
Muckle-Wells症候群におけるNLRP3体細胞モザイク変異の検討(ポスター)	中川権史、西小森隆太、河合朋樹、八角高裕、平家俊男	第58回日本リウマチ学会総会・学術集会	平成26年4月24日 -26日	国内

ヒト免疫とリウマチ性疾患 自己炎症性疾患とリウマチ性疾患の Crossroad CINCA 症候群/NOMIDの骨幹端過形成をとりあげて(口頭発表)	西小森隆太、横山宏司、梅田雄嗣、池谷真、中川権史、納富誠司郎、八角高裕、田中孝之、斎藤潤、小田紘嗣、小原収、中山直樹、戸口田淳也、平家俊男	第58回日本リウマチ学会総会・学術集会	平成26年4月24日-26日	国内
IBD 患者では有意な Mucosal associated invariant T 細胞の減少、アポトーシスの亢進が認められる(口頭発表)	日衛嶋栄太郎、河合朋樹、仲瀬裕志、鶴山竜昭、森本剛、八角高裕、松浦稔、吉野琢哉、池内浩基、久松理一、河田健二、酒井義治、千葉勉、西小森隆太、平家俊男	第51回日本消化器免疫学会総会(京都)	平成26年7月10日-11日	国内
アナキンラを用いて治療を行った高IgD症候群の2例(口頭発表)	下寺佐栄子、西小森隆太、吉岡耕平、河合朋樹、八角高裕、平家俊男	第24回小児リウマチ学会総会・学術集会	平成26年10月3日-5日	国内
当科におけるFHL(家族性血球貪食性リンパ組織球症)スクリーニングの現状(ポスター)	堀雅之、八角高裕、西小森隆太、平家俊男	第43回日本臨床免疫学会総会	平成26年10月22日-24日	国内
免疫疾患のホットピック IBD患者では有意な Mucosal associated invariant T細胞の減少、アポトーシスの亢進が認められる(口頭発表)	西小森隆太、日衛嶋栄太郎、河合朋樹、仲瀬裕志、鶴山竜昭、森本剛、八角高裕、松浦稔、吉野琢哉、池内浩基、久松理一、河田健二、酒井義治、千葉勉、平家俊男	第43回日本臨床免疫学会総会	平成26年10月22日-24日	国内
インフラマソーム(口頭発表)	西小森隆太、中川権史、横山宏司、平家俊男	第43回日本臨床免疫学会総会	平成26年10月22日-24日	国内
The Clinical and Genetic Features of Dyskeratosis Congenita, Cryptic Dyskeratosis Congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome in Japan.(ポスター)	Yamaguchi H., Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Yui S, Inokuchi, K, Ito E, Ogawa S, Kojima S.	56th ASH Annual Meeting.	Dec.6 2014.	海外
Whole-Exome Sequencing Reveals a Paucity of Somatic Gene Mutations in Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. (ポスター)	Okuno U, Atsushi N, Muramatsu H, Yoshida K, Hama A, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Sakaguchi H, Doisaki S, Takahashi Y, Shiraishi, Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S.	56th ASH Annual Meeting.	Dec.8 2014.	海外
Diagnostic Efficacy of Whole-Exome Sequencing in 250 Patients with Congenital Bone Marrow Failure.(ポスター)	Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Doisaki S, Hama A, Wang X, Narita A, Kawashima N, Xu Y, Sakaguchi H, Takahashi Y, Sanada M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S.	56th ASH Annual Meeting.	Dec.8 2014.	海外
Diagnosis of Fanconi anemia by FANCD2 monoubiquitination analysis.(口頭発表)	川島 希、関屋 由子、成田 敦、王 希楠、土居崎 小夜子、奥野 友介、村松 秀城、入江 正寛、濱 麻人、高橋 義行、小島 勢二.	第76回日本血液学会学術集会	平成26年10月30日	国内
血縁パプロー致ドナーから造血幹細胞移植を行った慢性肉芽腫症の一例。(口頭発表)	亀井 美智、村松 秀城、西川 英里、関屋 由子、成田 敦、川島 希、王 希楠、奥野 友介、土居崎 小夜子、入江 正寛、濱 麻人、伊藤 康彦、矢崎 信、高橋 義行、小島 勢二.	56回日本小児血液・がん学会学術集会	平成26年11月29日	国内
結核感染症から診断に至ったSTAT1遺伝子変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症の1例。(口頭発表)	片岡 伸介、村松 秀城、関屋 由子、川島 希、成田 敦、土居崎 小夜子、亀井 美智、奥野 友介、入江 正寛、濱 麻人、高橋 義行、小島 勢二.	56回日本小児血液・がん学会学術集会	平成26年11月28日	国内
アトバコンが有効であった小児ニューモシステス肺炎の2例 (口頭発表)	植木将弘、山崎康博、山田雅文、小林 一郎、有賀正	第46回日本小児感染症学会総会・学術集会	平成26年10月18日-19日	国内
単球/マクロファージに特異的にNADPH oxidase 活性を有し非典型的臨床家かを呈するX-CGDの1例(口頭発表)	大倉有加、山田雅文、小林 一郎、栗林 太、有賀 正	第22回食細胞機能異常症研究会	平成26年12月13日	国内
自己免疫疾患をきたす免疫不全症(口頭発表)	小林 一郎	第117回日本小児科学会総会	平成26年4月11日-13日	国内

多彩な自己免疫疾患を呈するIPEX症候群(口頭発表)	小林一郎	第42回日本臨床免疫学会総会	平成26年9月25日-27日	国内
PECEDおよびIPEX症候群における抗トリプトファン水酸化酵素-1抗体および抗AIE-75抗体の疾患特異性の検討。(口頭発表)	千田奈津子 小林一郎 植木将弘 山崎康博 竹崎俊一郎 堀川玲子 Notarangelo LD Betterle C 山田雅文 有賀 正	第42回日本臨床免疫学会総会	平成26年9月25日-27日	国内
生体防御:免疫不全・自己炎症・自己免疫(口頭発表)	小林一郎	日本小児科学会専門医のためのインテンシブコース	平成26年8月9日-10日	国内
自己免疫疾患を呈する原発性免疫不全症(口頭発表)	小林一郎	第3回東北小児膠原病研究会	平成26年11月1日	国内
Fludarabine+Busulfanによる前処置を用いた重症先天性好中球減少症に対する造血幹細胞移植(口頭発表)	宮本智史, 足洗美穂, 岡野翼, 小林千佳, 宮脇零士, 青木由貴, 富澤大輔, 高木正稔, 梶原道子, 今井耕輔, 森尾友宏	第22回食細胞機能異常症研究会	平成26年12月13日	国内
再生不良性貧血移植後の汎血球減少において認められたCD177 (HNA-2) に対する抗好中球抗体(口頭発表)	岡本浩之, 和田泰三, 村岡正裕, 榑原康久, 東馬智子, 谷内江昭宏, 宮本智史, 青木由貴, 富澤大輔, 今井耕輔, 森尾友宏	第5回関東甲越免疫不全症研究会	平成26年9月21日	国内
炎症性腸疾患とMycobacterium avium感染症を合併したNEMO異常症に対する非血縁者間骨髄移植(口頭発表)	岡野翼, 今井耕輔, 宮脇零士, 奥津美夏, 高島健浩, 青木由貴, 富澤大輔, 高木正稔, 梶原道子, 水谷修紀, 森尾友宏	第56回日本小児血液・がん学会学術集会	平成26年11月29日	国内
重症先天性好中球減少症(ELANE変異)に対して同種臍帯血移植を施行した2例(口頭発表)	小林千佳, 宮脇零士, 青木由貴, 富澤大輔, 今井耕輔, 高木正稔, 梶原道子, 森尾友宏, 水谷修紀	第36回日本造血細胞移植学会総会	平成26年3月7日	国内
非結核性抗酸菌感染後のNEMO異常症に対して非血縁者間骨髄移植を施行した1例(口頭発表)	岡野翼, 奥津美夏, 宮脇零士, 高島健浩, 青木由貴, 富澤大輔, 高木正稔, 梶原道子, 今井耕輔, 水谷修紀, 森尾友宏	第128回小児血液腫瘍免疫懇話会	平成26年5月23日	国内
Hematopoietic stem cell transplantations for severe chronic mucocutaneous candidiasis due to gain of function mutations in STAT1(口頭発表)	K. IMAI, T.Okawa, R.Miyawaki, T. Takashima, N.Mitsuiki, Y.Aoki, D.Tomizawa, M. Kajiwara, Y.Ozaki, T. Imai, T. Wada, S. Okada, T. Morio	ESID/EBMT Inborn Errors Working Party Conference	Nov.28.2014	国外
Hematopoietic stem cell transplantation for the patients with activated PI3K-delta syndrome (ポスター)	K. Imai, Y. Tsujita, K. Mitsui-Sekinaka, N. Mitsuiki, T. Takashima, T. Okano, Y. Aoki, F. Kimoto, M. Inoue, F. Iwasaki, T. Kaneko, T. Waragai, H. Sano, A. Kikuta, T. Morio, S. Nonoyama, Hematopoietic stem cell transplantation for the patients with activated PI3K-delta syndrome	16th Biennial Meeting of the European society for immunodeficiencies, 2014.10.30	Oct.30.2014	国外
Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in Japan: 1974-2010(ポスター)	K.Imai,Y.Horikoshi,K.Kato,H Yabe, S. Nonoyama, T. Morio	4th annual scientific workshop of primary immunodeficiency treatment consortium (PIDTC)	May.3.2014	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所	発表した時期	国内・外の別
Wiskott-Aldrich syndrome in a girl caused by heterozygous WASP mutation and extremely skewed X-chromosome inactivation: A novel association with maternal uniparental isodisomy 6.	Takimoto T, Takada H, Ishimura M, Kirino M, Hata K, Ohara O, Morio T, Hara T	Neonatology	2015	国外
Idiopathic disseminated bacillus Calmette-Guerin infection in three infants.	Kido J, Mizukami T, Ohara O, Takada H, Yanai M	Pediatrics International	in press	国外

Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms.	Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H, Saito M, Tanaka T, Yamamura K, Sakai Y, Takada H, Miyamoto T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T	PLoS One	2014	国外
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.	Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, Morio T, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T	J Immunol	2014	国外
Early progression of atherosclerosis in children with chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome.	Yamamura K, Takada H, Uike K, Nakashima Y, Hirata Y, Nagata H, Takimoto T, Ishimura M, Morihana E, Ohga S, Hara T	Rheumatology (Oxford)	2014	国外
Efficacy and safety of IgPro20, a subcutaneous immunoglobulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases.	Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T	J Clin Immunol	2014	国外
Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant.	Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T	Pediatr Transplant	2014	国外
Mutations of NOTCH3 in childhood pulmonary arterial hypertension.	Chida A, Shintani M, Matsushita Y, Sato H, Eitoku T, Nakayama T, Furutani Y, Hayama E, Kawamura Y, Inai K, Ohtsuki S, Saji T, Nonoyama S, Nakanishi T.	Mol Genet Med.	2014	国外
Efficacy and Safety of IgPro20, a Subcutaneous Immunoglobulin, in Japanese Patients with Primary Immunodeficiency Diseases.	Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T.	J Clin Immunol. 34:204-211.	2014	国外
Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency.	Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Boly Gaspar H, Holland SM, Klein C, Nonoyama S, Ochs HD, Oksenhandler E, Picard C, Puck JM, Sullivan KE, Tang ML.	Front Immunol	2014	国外
Analysis of somatic hypermutation in the IgM switch region in human B cells.	Horiuchi K, Imai K, Mitsui-Sekinaka K, Yeh ZW, Ochs HD, Durandy A, Nonoyama S.	J Allergy Clin Immunol	2014	国外
Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation.	Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsui N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Honma K, Nonoyama S, Mizutani S, Morio T.	Bone Marrow Transplant.	2014	国外
Chromosome 9q33q34 microdeletion with early infantile epileptic encephalopathy, severe dystonia, abnormal eye movements, and nephroureteral malformations.	Matsumoto H, Zaha K, Nakamura Y, Hayashi S, Inazawa J, Nonoyama S.	Pediatr Neurol.	2014	国外

Hematopoietic Stem Cell Transplantation for X-Linked Thrombocytopenia With Mutations in the WAS gene.	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.	J Clin Immunol. in press.	2014	国外
自己炎症性疾患の新展開（総説）	西小森隆太、中川権史、粟屋美絵、河合朋樹、八角高裕、平家俊男	臨床リウマチ	2014	国内
BCG vaccination in patients with severe combined immunodeficiency: complications, risks, and vaccination policies.	Marciano BE, Huang CY, Joshi G, Rezaei N, Carvalho BC, Allwood Z, Ikinciogullari A, Reda SM, Gennery A, Thon V, Espinosa-Rosales F, Al-Herz W, Porras O, Shcherbina A, Szaflarska A, Kiliç Ş, 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	J Allergy Clin Immunol.	2014	国外
Real-time single-cell imaging of protein secretion.	Shirasaki Y, Yamagishi M, Suzuki N, Izawa K, Nakahara A, Mizuno J, Shoji S, Heike T, Harada Y, Nishikomori R, Ohara O.	Sci Rep.	2014	国外
Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations.	Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai T, Ohara O, Fujita T, Heike T.	Am J Hum Genet.	2014	国外
Munc13-4 deficiency with CD5 downregulation on activated CD8+ T cells.	Wada T, Yasumi T, Toma T, Hori M, Maeda S, Umeda K, Heike T, Adachi S, Usami I, Yachie A.	Pediatr Int.	2014	国内
Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway.	Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J.	Arthritis Rheumatol.	In press	国外
Whole-exome sequence analysis of ataxia telangiectasia-like phenotype.	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.	J Neurol Sci.	2014	国外
Aldehyde dehydrogenase-2 polymorphism contributes to the progression of bone marrow failure in children with idiopathic aplastic anaemia.	Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S.	Br J Haematol.	2014	国外

Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis.	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.	J Leukoc Biol.	2014	国外
Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia.	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.	Haematologica.	2014	国外
Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis.	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.	J Leukoc Biol	2014	国外
A 2-year-old Japanese girl with TNF receptor-associated periodic syndrome: A case report of the youngest diagnosed proband in Japan.	Yasumura J, Wago M, Okada S, Nishikomori R, Takei S, Kobayashi M.	Mod Rheumatol	Epub ahead of print	国外
真菌感染症－カビを極める：真菌に対する感染防御機構。	竹崎 俊一郎、有賀 正	小児内科	2014	国内
自己免疫性内分泌疾患などを呈する免疫不全症。	小林一郎	小児内科	2014	国内
免疫不全を疑う時：家族歴・病歴/緊急に対応すべき免疫不全症を含めて	有賀正	小児内科	2014.1	国内
原発性免疫不全症の差分	山田雅文、有賀正	日本医事新報	投稿中	国内
Disease specificity of anti-tryptophan hydroxylase-1 and anti-AIE-75 autoantibodies in APECED and IPEX syndrome.	Chida N, Kobayashi I, Takezaki S, Ueki M, Yamazaki Y, Garelli S, Scarpa R, Horikawa R, Yamada M, Betterle C, Notarangelo LD, Yawaka Y, Ariga T.	Clin Immunol	2014.11	国外
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.	Yamazaki Y, Yamada M, Kawai T, Morio T, Onodera M, Ueki M, Watanabe N, Takada H, Takezaki S, Chida N, Kobayashi I, Ariga T.	J Immunol	2014.11	国外
Hereditary interstitial lung diseases manifesting in early childhood in Japan.	Akimoto T, Cho K, Hayasaka I, Morioka K, Kaneshi Y, Furuta I, Yamada M, Ariga T, Minakami H.	Pediatr Res	2014.11	国外
The TRIM-FLMN protein TRIM45 directly interacts with RACK1 and negatively regulates PKC-mediated signaling pathway.	Sato T, Takahashi H, Hatakeyama S, Iguchi A, Ariga T.	Oncogene	2014.3	国外

Efficacy and safety of IgPro20, a subcutaneous immunoglobulin, in Japanese patients with primary immunodeficiency diseases.	Kanegane H, Imai K, Yamada M, Takada H, Ariga T, Bexon M, Rojavin M, Hu W, Kobayashi M, Lawo JP, Nonoyama S, Hara T, Miyawaki T.	J Clin Immunol.	2014	国外
Selective expansion of donor-derived regulatory T cells after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome.	Horino S, Sasahara Y, Sato M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Sato A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S.	Pediatr Transplant	2014	国外
Fusarium falciforme infection in a patient with chronic granulomatous disease.	Okura Y, Kawamura N, Okano M, Toita N, Takezak S, Yamada M, Kobayashi I, Ariga T		inpress	国外
Hematopoietic Stem Cell Transplantation for X-Linked Thrombocytopenia With Mutations in the WAS gene.	K.Oshima, K.Imai, M.H. Albert, T.C. Bittner, G.Strauss, A.H. Filipovich, T.Morio, N.Kapoor, J.Dalal, K.R. Schultz, J.T. Casper, L.D. Notarangelo, H.D. Ochs, S.Nonoyama	J Clin Immunol	Epub ahead of print	国外

V. 研究成果の刊行物・別刷

Galectin-9 Enhances Cytokine Secretion, but Suppresses Survival and Degranulation, in Human Mast Cell Line

Reiji Kojima^{1,2,3,9}, Tatsukuni Ohno^{3,9,‡}, Motoyasu Iikura⁴, Toshiro Niki^{5,6}, Mitsuomi Hirashima^{5,6}, Keichi Iwaya¹, Hitoshi Tsuda¹, Shigeaki Nonoyama², Akio Matsuda³, Hirohisa Saito³, Kenji Matsumoto³, Susumu Nakae^{3,7,8,*}

1 Department of Basic Pathology, National Defense Medical College, Saitama, Japan, **2** Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Saitama, Japan, **3** Department of Allergy and Immunology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan, **4** Department of Respiratory Medicine, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan, **5** Departments of Immunology and Immunopathology, Faculty of Medicine, Kagawa University, Takamatsu, Japan, **6** Research Center, GalPharma Company, Takamatsu, Japan, **7** Laboratory of Systems Biology, Center for Experimental Medicine and Systems Biology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, **8** Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency, Saitama, Japan

Abstract

Galectin-9 (Gal-9), a lectin having a β -galactoside-binding domain, can induce apoptosis of Th1 cells by binding to TIM-3. In addition, Gal-9 inhibits IgE/Ag-mediated degranulation of mast cell/basophilic cell lines by binding to IgE, thus blocking IgE/Ag complex formation. However, the role of Gal-9 in mast cell function in the absence of IgE is not fully understood. Here, we found that recombinant Gal-9 directly induced phosphorylation of Erk1/2 but not p38 MAPK in a human mast cell line, HMC-1, which does not express Fc ϵ R1. Gal-9 induced apoptosis and inhibited PMA/ionomycin-mediated degranulation of HMC-1 cells. On the other hand, Gal-9 induced cytokine and/or chemokine production by HMC-1 cells, dependent on activation of ERK1/2 but not p38 MAPK. In addition, the lectin activity of Gal-9 was required for Gal-9-mediated cytokine secretion by HMC-1 cells. These observations suggest that Gal-9 has dual properties as both a regulator and an activator of mast cells.

Citation: Kojima R, Ohno T, Iikura M, Niki T, Hirashima M, et al. (2014) Galectin-9 Enhances Cytokine Secretion, but Suppresses Survival and Degranulation, in Human Mast Cell Line. PLoS ONE 9(1): e86106. doi:10.1371/journal.pone.0086106

Editor: Bernhard Ryffel, French National Centre for Scientific Research, France

Received: June 17, 2013; **Accepted:** December 5, 2013; **Published:** January 20, 2014

Copyright: © 2014 Kojima et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Grants-in-Aid for Young Scientists (B) (T.O.), Scientific Research (C) (M.I.) and Scientific Research (B) (H.S. and K.M.) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, by the Program for Improvement of Research Environments for Young Researchers, The Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology (S.N.), PRESTO from the Japan Science and Technology Agency, (S.N.), and by Grants-in-Aid from the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (H.S. and K.M.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Toshiro Niki and Mitsuomi Hirashima are board members of GalPharma Co., Ltd. The authors have the following patents related to material pertinent to this article: "Novel modified galectin 9 proteins and use thereof" which is applied by GalPharma and issued in Japan (4792390), the USA (8,268,324), EPC (1736541), Canada (2,561,696), India (239130), and Korea ((10-1222281) as of 2013.12.2). The authors have the following products related to material pertinent to this article: stable-form Gal-9. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: snakae@ims.u-tokyo.ac.jp

‡ These authors contributed equally to this work.

‡ Current address: Department of Molecular Immunology, Graduate School of Medical and Dental Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Introduction

Galectin-9 (Gal-9) was first identified as a chemoattractant and activating factor for eosinophils. [1–3] It is abundantly expressed in various tissues, especially the epithelium of the gastrointestinal tract, and in a variety of cells such as macrophages, eosinophils, mast cells, fibroblasts and synovial cells. [4–7].

Gal-9 influences various biological functions such as cell aggregation, adhesion, apoptosis, survival, activation and differentiation by binding to T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3 (TIM-3). [5,8,9] Like Gal-9, Tim-3 is also expressed on various types of cells, including Th1 cells, [9] Tc1 cells, [10] Th17 cells, [11] NK cells, [12] NKT cells, [13,14] dendritic cells (DC) [15] and mast cells (MCs). [16,17] It is known that Gal-9 has anti-tumor activity by promoting activation of NK cells [18] and cytotoxic T lymphocytes by enhancing DC maturation. [19] Moreover, Gal-9 induces aggregation of melano-

noma and breast cancer cell lines and suppresses metastasis. [20–22] It was suggested that Gal-9 is a negative regulator of development of autoimmune diseases such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and collagen-induced arthritis (CIA) in mice. Indeed, like anti-TIM-3 mAb, [10] Gal-9 can suppress development of EAE by inducing Th1 cell apoptosis via TIM-3. [9] Gal-9 can also attenuate development of CIA by inhibiting differentiation of Th17 cells while enhancing differentiation of regulatory T cells. [23] Moreover, expression of each of Gal-9 and TIM-3 was shown to be increased in the lungs of rodents during allergic airway inflammation, [24–26] suggesting roles for Gal-9 and TIM-3 in induction of that disease. Indeed, Gal-9 administration to mice suppressed ovalbumin- and house dust mite antigen-induced airway inflammation and hypersensitivity. [27] In the setting, Gal-9 bound to CD44, interfering with binding of hyaluronan, a known ligand for CD44, and resulting in inhibition of Th2 cell recruitment through CD44-hyaluronan

interaction. [27] On the other hand, the role of TIM-3 in development of ovalbumin-induced airway inflammation and hypersensitivity is controversial. That is, the response was attenuated in mice treated with anti-TIM-3 mAb, [24] but normal in TIM-3-deficient mice. [28] Although the reason for that apparent discrepancy is unclear, the report using anti-TIM-3 mAbs did not fully characterize them, i.e., whether they were agonistic, blocking or depletion Abs. These observations suggest that the biological function of Gal-9 may be mediated independently of TIM-3 in certain settings. In support of this, binding of Gal-9 to IgE blocks IgE/Ag complex formation and thus inhibits IgE/Ag-FcεRI crosslinking-induced degranulation of mast cell/basophilic cell lines. [29] In contrast, we showed that anti-TIM-3 agonistic antibody promoted cytokine secretion, but did not influence degranulation, by mouse bone marrow cell-derived cultured mast cells (BMCs) after IgE/Ag-FcεRI crosslinking. [16] On the other hand, the role of Gal-9 in mast cell function in the absence of IgE remains unclear. Therefore, in the present study we examined the role of Gal-9 in the functions of a human mast cell line, HMC-1, which does not express FcεRI, in the absence of IgE/Ag stimulation. We found that human Gal-9 enhanced cytokine secretion, but suppressed survival and degranulation, of HMC-1. These observations suggest that Gal-9 has dual properties as a regulator and activator of mast cells.

Materials and Methods

Cell Culture

HMC-1 cells (a human mast cell line) [30] were cultured in α -minimum essential medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin under a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Half of the medium was replaced twice per week. Normal human bronchial epithelial cells (NHBEs), normal human coronary artery endothelial cells (HCAECs) and normal human lung fibroblasts (NHLF) were obtained from Lonza (Wakerville, MD, USA) and were cultured as described elsewhere. [31].

Quantitative PCR

Total RNA samples were isolated from HMC-1 cells, NHBEs and HCAECs using RNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA) and digested with RNase-free DNase I (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. Human universal reference (HUR) RNA (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) was used as a positive control. Then first-strand cDNA was synthesized from the isolated RNA using an iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Primers for TIMs and GAPDH were designed as follows: TIM-1 (sense, 5'-TGT TCC TCC AAT GCC TTT GC-3'; antisense, 5'-TTG CTC CCT GCA GTG TCG TA-3'), TIM-3 (sense, 5'-CAA TGC CAT AGA TCC AAC CAC C-3'; antisense, 5'-GCA GTG GAC AGA ACC TCC AAA A-3'), TIM-4 (sense, 5'-TCC TGC TGA CAT CCA AAG CA-3'; antisense, 5'-TGG GAG ATG GGC ATT TCA TT-3') and GAPDH (sense, 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'; antisense, 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'). To determine the exact copy numbers of the target genes, quantified concentrations of the purified PCR products of TIM-1, TIM-3, TIM-4 and GAPDH were serially diluted and used as standards in each experiment. Aliquots of cDNA equivalent to 5 ng of the total RNA samples were used for each quantitative PCR. The mRNA expression levels were normalized to the GAPDH level in each sample.

Flow Cytometry

Cells (HMC-1 cells and PBMCs) were incubated with human AB serum (Lonza) at 4°C for 5 min, and then stained with PE-conjugated anti-human TIM-1 mAb (Clone Name 1D12, BioLegend, San Diego, CA, USA), PE-conjugated anti-human TIM-3 mAb (Clone Name F38-2E2, BioLegend), PE-conjugated anti-human TIM-4 mAb (Clone Name 9F4, BioLegend) and PE-conjugated mouse IgG1 (Clone Name MOPC-21, BioLegend) at 4°C for 30 min. The expression of TIMs on the cells was determined with a FACS Canto II using Diva Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Western Blotting

HMC-1 cells (5×10^5 cells/well in a 24-well plate) were treated with 1 μ M recombinant human galectin-9 (rhGal-9) (GalPharma Co., Ltd., Kagawa, Japan) at 37°C for the indicated time periods. Then the cells were lysed and sonicated in 200 μ l of NuPAGE sample buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 5% 2-mercaptoethanol. Proteins in the whole-cell lysates were separated by SDS-PAGE (5–15% Ready Gels J; Bio-Rad) gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (iBlot Gel Transfer Stacks, mini; Invitrogen). Immunoblotting was performed using rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) mAb (clone D13.14.4E; Cell Signaling Technology, Danvers, MA) and rabbit anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) mAb (clone 137F5; Cell Signaling Technology) as the 1st Abs and horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology) as the 2nd Ab. The protein bands were visualized by enhanced Pierce Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Cell Survival

HMC-1 cells were pretreated with or without 5 μ g/ml mitomycin-C (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 2 hours. After washing, the cells (4×10^5 cells/ml) were cultured in the presence and absence of 0.25, 0.5 and 1 μ M rhGal-9 at 37°C for 0, 24 or 48 h. Live cells were counted under a microscope after trypan blue staining. The cells were incubated with FITC-conjugated annexin V and propidium iodide (MEB-CYTO-Apoptosis Kit; MBL Co., Ltd., Nagoya, Japan), and the percentage of propidium iodide-negative and annexin V-positive apoptotic cells was determined using a FACSCanto II with Diva Software.

Caspase Activity

HMC-1 cells (1×10^5 cells/ml) were cultured in the presence and absence of 0.5 μ M rhGal-9 or 0.1 μ M staurosporine (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) at 37°C for 16 hours. Then the caspase-3/7 activities in the cells were determined by Caspase-Glo 3/7 assay (Promega, Madison, WI, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The luminescence (Relative Light Unit [RLU]) of each sample was measured with a fluorescence plate reader (ARVO X5, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) at 490/535 nm.

β -hexosaminidase Release Assay

HMC-1 cells (1×10^5 cells/well in a 96-well plate; not treated with mitomycin C) were pre-treated with rhGal-9 (0, 0.25, 0.5 and 1 μ M) at 37°C for 30 min, and then stimulated with 0.1 μ g/ml PMA (Sigma Chemical Co.) and 1 μ g/ml ionomycin (Sigma Chemical Co.) at 37°C for 30 min. The culture supernatants were collected, and the activity of β -hexosaminidase in each was determined as described previously, with minor modification. [32] In brief, 50- μ l samples were incubated with 100 μ l of 1.3 mg/ml