

多量体免疫グロブリン受容体の構造と機能
その変異と分泌効率との関連

日本大学医学部病態病理学系病理学分野

砂川 恵伸

2014年

指導教官 根本 則道

多量体免疫グロブリン受容体の構造と機能
その変異と分泌効率との関連

日本大学医学部病態病理学系病理学分野

砂川 恵伸

2014年

指導教官 根本 則道

目次

第1章	要旨	1
第2章	背景	4
第3章	研究の目的	10
第4章	研究の対象および方法	11
第5章	結果	14
第6章	考察	20
第7章	今後の展望	24
第8章	結語	25
第9章	臨床への応用	26
第10章	謝辞	27
第11章	引用文献	28
第12章	図表	31
第13章	業績集	33

第1章 要旨

[背景]

多量体免疫グロブリン受容体 polymeric immunoglobulin receptor (pIgR)は、I型の膜貫通型タンパク質であり、腸管上皮細胞に表出される。pIgRの細胞外部位は6つの異なるdomainからなる。Domain 6は、腸管上皮細胞の膜上に表出しているタンパク分解酵素により切断され、分泌型免疫グロブリン (pIgs) としてpIgRと一緒に放出される。pIgR自体はpIgsに結合せず単独でも細胞内輸送され、free secretory component (fSC)として放出される。このpIgRの酵素的切断部位の点突然変異は、IgA腎症やEB virus関連上咽頭癌など様々な疾患の発症と関与することが報告されてきたが、詳細は不明である。

[目的]

pIgRにおいて、domain 6の580番目のAlaからValへの置換は、pIgRの上皮内輸送の効率を低下させ、pIgRの機能低下の可能性が示唆されている。本研究では、pIgRの細胞外domain 6における酵素切断に関与する種々のmutantを作製し、mutationを起こすことによって分泌能の上昇・低下の変化が起こることを検討した。これによりpIgRの細胞外domain 6における酵素切断に関与する部位を明らかにすることを目的とした。

[研究に使用した培養細胞と方法]

培養細胞Chinese hamster ovary (CHO) cellを使用し、この培養細胞に対して、非標識化抗体、ないしはhorseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-human SC antibody (Ab) (DAKO, Tokyo, Japan)、HRP conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (Jackson ImmunoResearch, Tokyo, Japan)を使用した。

ヒトpIgR cDNA EcoRI断片を発現ベクターに挿入した。このプラスミドを鋳型として、種々のmutantを作製した。Transfection and metabolic labellingは、培養細胞に、recombinant vaccinia virusをinfectionさせた。Transfection後に、metabolic labellingした細胞の培養上清および細胞溶解液を回収し免疫沈降を行った。

pIgR の domain 6 における各 mutant を stable transfection させ作製し、各プラスミドを CHO 細胞に Lipofectamine plus reagent を用いて、transfection した。単一のクローンを得るために、限界希釈法 limiting dilution を用いた。

また、ELISA を用いて、rabbit anti-human SC antibody でコーティングした後に、インキュベーションした培養上清または細胞溶解液に対して、HRP 標識 rabbit anti-human SC antibody 反応させ、吸光度を測定し分泌効率の判定を行い、統計解析を行った。

[結果]

ヒト pIgR 分子の酵素的切断部位は、580 番目の Ala から Val への置換、606 番目/607 番目の Glu から Ala に置換、動物種間で高度に保存された領域 9 アミノ酸の各 mutation は、pIgR の酵素的切断には全く影響しないことが分かった。

一方、種間で高度に保存された 9 アミノ酸に隣接する N 末端側の 10 アミノ酸を欠損させた mutant と C 末端側の 10 アミノ酸を欠損させた mutant は、pIgR の酵素的切断には逆の効果があることが明らかとなった。すなわち N 末端側を欠失させた mutant では pIgR の酵素的切断は増強され、C 末端側の 10 アミノ酸を欠失させた mutant は pIgR の酵素的切断に対して抑制効果を示した。

[考察]

pIgR は、分子内の様々な部位が酵素的切断部位に対して、異なる機能を担っている可能性が示唆された。

[結語]

種の間で高度に保存されたアミノ酸領域は、9 アミノ酸とそれに隣接するアミノ酸は、pIgR の酵素的切断においては重要な役割をしていると考える。

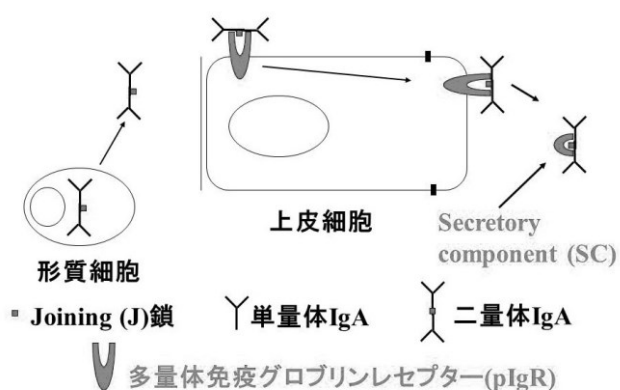
第2章 背景

2-1 粘膜免疫の概要[1, 2]

ヒト成人の粘膜面を覆う上皮層はおよそ400 m² に及ぶと言われている。この粘膜面は外来刺激に対して防御機構を有し、局所免疫機構と呼ばれる免疫システムがその主体を担う[3, 4, 5]。粘膜面の防御はこの他種々の化学的および生理学的機構によっても担われているが、多くの感染源、アレルゲン、癌原性物質の主たる侵入門戸としての粘膜面の防御にとっては、両者が機能的に協調することが重要である。分泌型免疫グロブリンは局所免疫機構の主役として活躍する分子である。その役割は粘膜面を通じて体内に侵入しようとする微生物やその毒素、その他の病原性抗原の排除である[6]。

2-2 分泌型免疫グロブリンの構造

図1に、消化管粘膜免疫における多量体免疫グロブリンとSCの産生と分泌を示す。



[図 1] 消化管粘膜免疫における多量体免疫グロブリンと SC の産生と分泌。
[文献 1]より引用、一部改編

ヒト免疫グロブリンは5種類のクラスに分類される。このうち局所免疫機構で主体的な働きをするのはIgAである。血清中に存在するIgA分子は単量体であり、分子量約170 kDaで、

H鎖とL鎖それぞれ2分子ずつから構成されているのに対して、粘膜面で働くIgA分子は主に二量体dimerで、分子量約390 kDaの分泌型IgAと呼ばれるものである。

分泌型IgAは2つのIgA分子に加えて分子量15 kDaのjoining chain (J鎖)と分子量80 kDaのsecretory component (SC) を含有している。

2-3 Secretory component (SC)

多量体免疫グロブリンとSCについて概説する。SCは分泌型IgAの構成成分の一部として発見された分子量70-80 kDaの糖蛋白質である。SCは、その前駆体であるpIgRとして粘膜面を被覆する上皮細胞中で産生される。pIgRの主な産生部位は唾液腺、涙腺、乳腺、胃、腸、膵臓、腎臓、肺、子宮、肝臓、胆嚢などの消化器系、呼吸器系、泌尿生殖器系など広範に分布し、通常は漿液性上皮細胞により産生される。免疫グロブリンスーパーファミリーに属する分子であり、N末端を細胞外に向けたI型の膜貫通型蛋白質である。ヒトpIgRの遺伝子は11個のexonから構成され、細胞外domain、膜貫通領域、細胞質内領域をコードしている。このうちexon 3によりコードされる細胞外領域のdomain 1は、様々な動物種で保存された領域であり、免疫グロブリンigV κ domainのcomplementary determining region 1 (CDR1)に類似している。そして、この部位がJ鎖を介したIgAとの結合に重要であるとされている。Exon 7は細胞膜直上の領域をコードしており、細胞膜上の蛋白質分解酵素により切断される領域と考えられている。またexon 9-11は細胞質内領域をコードしているが、セリン残基や

チロシン残基などリン酸化酵素の基質を含むと同時に細胞内輸送や基底側細胞膜上での再循環にとって重要である。つまり、上皮細胞の小胞体内で産生されたpIgRはゴルジ体に輸送され糖鎖の修飾を受けた後、上皮細胞中の基底側に運ばれるが、C末端側の細胞質内領域に存在するアミノ酸配列がpIgRを基底側に輸送するために重要な情報を含んでいると考えられている。また、基底側細胞膜上に表出されたpIgRは細胞内に移行するが、pIgRの細胞質内領域はこうしたpIgRの動態にとっても重要な情報を含むものと考えられている[5]。

このようにして基底側細胞膜上に表出されたpIgRは、上皮細胞下の粘膜固有層に分布するIgA産生細胞で産生された二量体IgAの受容体として機能する。J鎖を含む二量体IgAと結合したpIgRは上皮細胞内を輸送され、上皮細胞の管腔側に表出される（トランスサイトosis [7]）。ここでpIgRの細胞外領域が細胞膜上の蛋白質分解酵素により切断され結合した二量体IgAとともに細胞外に分泌され、分泌型IgAとなる。pIgRの細胞外領域を切断する酵素はまだ同定されていないが、蛋白質分解酵素の阻害薬であるleupeptinにより活性が抑制される酵素であることが報告されている[8]。pIgRの細胞外への遊離はリガンドである二量体IgAの結合の有無にかかわらず起こり、こうして形成されるfree SCの機能は完全には解明されていないが、細菌の粘膜面への付着を阻害するなどが知られている。また、SCの二量体IgAへの添加により細胞外に存在する蛋白質分解酵素に対して抵抗性を示すようになったり、最近の報告ではSCの糖鎖が腸管上皮細胞表面に付着するムチンなどとの結合を促進することが明らかとなり、分泌型IgA中のSCの役割が解明されつつある[9]。しかし、

pIgRの最大の機能はJ鎖を有する多量体免疫グロブリンのみを細胞外に分泌することであり、粘膜下に形成された免疫複合体も同様の様式で細胞外に除去される。このことが局所免疫機構の特殊性である。したがって、pIgRの局所免疫機構に寄与する役割はきわめて大きいといえる。

2-4 多量体免疫グロブリン受容体 polymeric immunoglobulin receptor (pIgR)の役割

多量体免疫グロブリン polymeric immunoglobulins (pIgs) および多量体免疫グロブリン受容体 polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) について概説する。

粘膜免疫系は様々な抗原に対する防御の第一線にある[10]。この免疫系の主役として機能するのが、pIgsである。pIgは、粘膜固有層内の形質細胞により産生され、腸管上皮細胞の基底側細胞膜表面に存在する多量体免疫グロブリン受容体 polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) に結合し、細胞内輸送された後に腸管内腔側に表出する[9]。pIgRの細胞外domainは、腸管上皮細胞の膜上に表出しているタンパク分解酵素により切断され、分泌型免疫グロブリンとしてpIgRと一緒に放出される。pIgR自体はpIgsに結合せず単独でも、細胞内輸送され、free secretory component (fSC)として放出される。pIgRのdomain構造、特に酵素的切断を受けると考えられている部位は、さまざまな種間で高度に保存されていると考えられている[11]。

Eiffertらは、ヒトSCのC末端のアミノ酸残基について検索し、fSCのC末端が、Ala⁵⁵⁰から

Lys⁵⁵⁹まで変化に富んでいることを報告している[12]。私の共同研究者である浅野らは、recombinant vaccinia virusを用いた実験でpIgRの細胞内および細胞外領域に関して種々のmutantを作成し、アミノ酸欠損領域を作りだし、pIgRの様々な切断部分に関して検討した。その結果細胞外領域のdomain 6が重要な役割を果たすことを報告している。[13]。しかしこの部位が酵素的切断に関与しているか否かは不明であり、また切断に関する酵素も未だ同定されていない。

EB virus関連上咽頭癌は、東南アジア、極東アジアにおいて重要な病態と考えられており、多くの要因が関連した疾患と考えられている[14]。まだはっきりと解明されていないが、少なくとも2つの分子がその発症に重要であると考えられている。それぞれtype 2 補体受容体と、pIgRである。EB virusが鼻咽頭上皮に侵入する際に重要な因子と考えられている [15]。PIgR は、EB virusに結合したIgAを上皮内輸送により取り込む。これは腸管の内腔で、EB virusとそれに対するIgA が結合したときに、pIgRがこのimmune complexを細胞内に取り込むと考えられている。しかしながら、pIgR遺伝子に突然変異が存在する場合に、EB virusがとりこまれなくなりEB virusの感染に至る、と考えられている[16]。1739C (1739番目のcytosine) がT (thymine)へ点突然変異を起こすと、pIgRとIgA-EB virus complexの解離の効率が変化する、ということが知られている[17]。この1739番目のCからTへの点変異は、アミノ酸レベルでは、580番目のAlaがValへ変化するという変異を意味し、この変異がIgA 腎症にも深く関与している[18]。更に、IgA 腎症では末梢血液中のIgAが上昇していることが知られている[18]。

第3章 研究の目的

ヒト・ゲノムのsingle-nucleotide polymorphisms (SNP)解析は、疾患解析などにつながる有効な手法である。この手法による解析の結果、pIgRの点突然変異はその分泌の異常につながり、IgA腎症やEB virus関連上咽頭癌の発症と関与することが報告されている[17, 18]。しかしpIgRの分泌異常に関して詳細は不明である。

pIgRは構造上、6つのdomainに分類される。このうちdomain 6の580番目のAlaからValへの置換は、pIgRの上皮内輸送の効率を低下させ、pIgRの機能低下の可能性が示唆されている。本研究では、pIgRのIgRの細胞外domain 6における酵素切断に関与する種々のmutantを作製し、mutationを起こすことによって分泌能の上昇・低下の変化が起こることを検討した。これによりpIgRの細胞外domain 6における酵素切断に関与する部位を明らかにすることを目的とした。

第4章 研究の対象および方法

pIgRの構築とmutant発現およびpIgR欠失株の発現

4-1 培養細胞

Chinese hamster ovary (CHO)細胞をJapanese Cancer Research細胞バンクから入手し継代しているものを使用した(CHO K-1, JCRB9018)。Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を、10%ウシ胎児血清(FBS)を添加したDulbecco's minimum essential medium (10% FCS-DMEM)で培養した。さらに、50 U/mlペニシリン、50 mg/mlストレプトマイシンを添加した。5% CO₂ 下、37°Cにて培養した。

4-2 抗体

非標識化抗体、ないしはhorseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-human SC antibody (Ab) (DAKO, Tokyo, Japan)、HRP conjugated goat anti-rabbit IgG Ab (Jackson ImmunoResearch, Tokyo, Japan)を使用した。

4-3 Plasmid construction

ヒトpIgR cDNA EcoRI断片を発現ベクターであるpcDNA3.1 (Invitrogen, Tokyo, Japan) に挿入した。このプラスミドをpcDNA-pIgR-WTとした。さらにこのプラスミドを鋳型としてQuickchange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)により種々のmutant

を作製した。

4-4 Transfection and metabolic labelling

培養細胞に、recombinant vaccinia virus を infection させた。Transfection は、既報の方法に従って行った[12]。本実験の組換えウイルスに関する実験は「培養細胞に対する rota virus の感染実験 (2009-歯-004)」にて P2 の拡散防止措置を取っている。Transfection の 5 時間後に、labelling medium で洗浄した (Sigma, St Louis, MO, USA)。さらに 15 分間インキュベーションした後、37 度で 30 分間、Trans-[³⁵S] で metabolic labelling を行った (ICN Biochemicals, CA, USA)。Labelling 後の細胞は、10% FCS-DMEM で洗浄し、更に 16 時間インキュベーションした。その後、培養上清および細胞溶解液を回収し免疫沈降を行った。概要は既知の方法に従った[12]。ΔCL に関しては、Δ604-612、Δ594-612、Δ604-622 の mutant を、stable transfection させ作製した。この目的のためには、各プラスミドを NheI で切断・直線化し、CHO 細胞に Lipofectamine plus reagent (Invitrogen) を用いて、transfection した。さらに細胞を G418 (250 g/ml)存在下で培養し、transfection した。その後、単一のクローンを得るために、限界希釈法 limiting dilution を用いた。

4-5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA は既知の方法に従った[19]。すなわち 96 well plate を用いて、50 μl の rabbit

anti-human SC antibody (リン酸緩衝液 [PBS]を用いて 1,000 倍希釈) でコーティングした後、18 時間、4 °C でインキュベーションした。その後、PBS で 3 回洗浄し、1% ウシ血清アルブミン (BSA) – PBS、200 μ l で 1 時間 37°C でインキュベーションした。その後、1% BSA – PBS は廃棄し、回収した 50 μ l の培養上清または細胞溶解液は、プレート上に 1 時間、室温でインキュベーションした。プレートは、0.05% Tween 20/PBS で 3 回洗浄した。HRP 標識 rabbit anti-human SC antibody (DAKO, 1% BSA-PBS で 1000 倍希釈) 50 μ l を plate に、室温で 30 分間反応させた。Plate は 0.05% Tween 20/PBS を用いて洗浄した。ELISA の反応は、0.1 M のクエン酸リン酸バッファー (pH 5.0) を加えた 1 mg/ml *o*-phenylenediamine (Kanto Chemical, Tokyo, Japan)、0.03%過酸化水素水を加え、20 分間室温で反応させた。反応後、25 μ l の 2 M 硫化水素で停止させた。

吸光度は Microplate reader model 3550 (Bio Rad, Tokyo, Japan) を用いた。分泌効率の判定は、 $\text{Secreted SC} / (\text{cellular pIgR} + \text{secreted SC}) \times 100\%$ の計算式を用い、算定した。実験は標準偏差をとり、3 回検討した。

4-6 統計解析

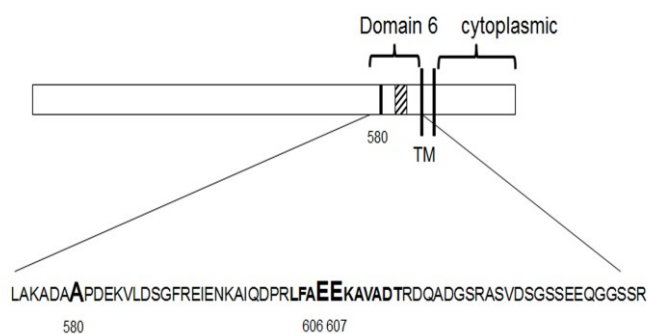
Post hoc Bonferroni 多変量解析テストを用いたワン・ウェイ analysis of variance (ANOVA) により統計解析で行った。結果は標準偏差で表した。P 値は、 < 0.05 で有意差をとった。

第5章 結果

5-1 pIgR の構築と mutant 発現

酵素的切断部位の検討

ヒト pIgR 分子の 580 番目の Ala から Val への置換が、IgA 腎症や EBV 関連上咽頭癌に関連しているという報告[17, 18]に基づいて、我々は最初に Ala 残基の pIgR の発現と酵素的切断に関する機能的重要性に関して、検索を行った。それに加えて、様々な動物種間のアミノ酸配列を比較したところ、酵素的切断が行われるであろうと考えられている部位が、高度に保存されているということが明らかになっている[20]。ヒトにおいて、酵素的切断部位はこのうちの 606 番目と 607 番目 Glu の間に存在すると考えられている[12]。この Glu を一方ないしは、両方 Ala に置換した mutant を作製した。図 2 では、pIgR の domain 6 のアミノ酸配列と 580 番目の Ala および 606 番目、607 番目の Glu の位置を模式的に示している。



[図 2] Domain 6 の全アミノ酸配列。斜線の部分は各種間で保存された 9 アミノ酸を示す。580 番目のアラニン、606 および 607 番目のグルタミン残基を大文字で示す。TM：細胞膜貫通領域

それぞれの mutant は、DNA sequence を行い、変異の挿入について確認を行った。CHO 細胞を用いて、wild type の pIgR と、前述の mutant を transfection させた。それぞれの分子の発現は、metabolic labelling とそれに続く免疫沈降法によって確認を行った。その結果、120

kDa と 110 kDa の位置に、それぞれのバンドを認めた。それらは成熟した pIgR、あるいは未成熟な pIgR 分子であると考えられた。これらの 120 kDa および 110 kDa の分子は、wild type に加えて全ての mutant で認められたことから、それぞれの分子が正しく CHO 細胞で発現されていることが確認できた。この方法を用いて、free SC の分泌効率の検討を行った。全てのサンプルにおいて、100 kDa の位置に free SC のバンドを確認することができた。そのバンドの intensity を比較したところ、wild type とそれぞれの mutant で、ほとんど変化を認めなかった。

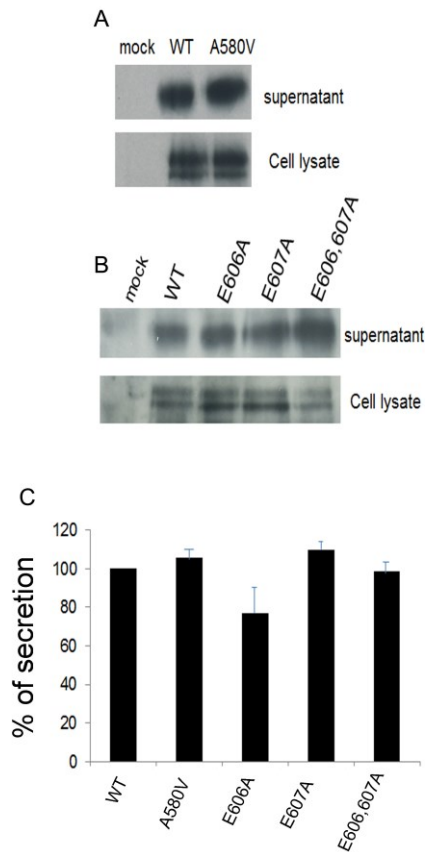
ELISA を用いた分泌効率の検討

次に、ELISA を用いて、分泌効率の詳細な検討を行った（図 3）。

CHO 細胞に WT, A580V (A) および E606A, E607A, E606,607A mutant (B) を transfection し分泌効率を比較した。Transfection 後の細胞は Trans-[³⁵S]-label により標識した後、10% FCS-DMEM にて 16 時間培養を行った。培養終了後細胞溶解液と培養上清を回収し、抗 SC 抗体により免疫沈降実験を行った。沈降物を洗浄後、8% SDS-PAGE にて展開し、ゲルを乾燥させた後オートラジオグラフィーにより解析した。(C)それぞれの mutant を transfection した後、16 時間 10% FCS-DMEM にて培養後、細胞溶解液と培養上清を回収し ELISA によりそれぞれに含まれる fSC と pIgR を定量し解析した。fSC の分泌効率は (free SC/cellular pIgR + free SC) により算出した。WT transfectant における分泌効率を 100% としてそれぞれの transfectant について比較を行った。結果を図 3 に示す。

[図 3] fSC の分泌効率は A580、E606、E607 残基の mutation には影響されない

(A) CHO 細胞に野生株 (WT) と A580V、(B) E606A, E607A, E606,607A mutant の SC の分泌効率を比較した。培養細胞の細胞溶解液 (supernatant) と培養上清 (Cell lysate) を回収し、抗 SC 抗体により免疫沈降実験した。(C)各 mutant を transfection した後の細胞溶解液と培養上清内の fSC と pIgR の ELISA



分泌効率の検討は、実験の材料と方法に記載した通りに行った。それぞれの mutant の分泌効率を計算したところ、各 mutant において、分泌効率には大きな差を認めなかった。以上のことから、各 mutation は、pIgR の分泌効率には全く影響しないことが分かった。

5-2 pIgR 欠失株の発現

Mutant の作製

以前の我々の報告で、domain 6 を全て欠失した mutant については、pIgR の分泌効率に決

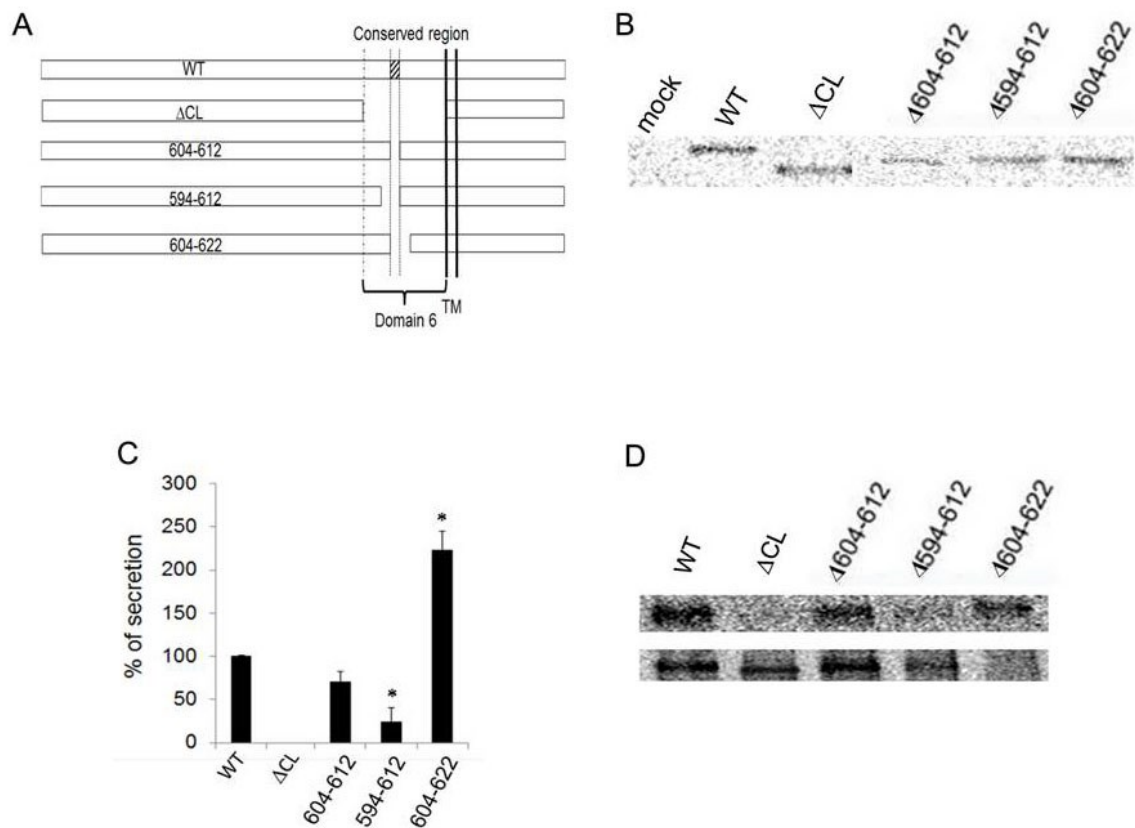
定的な影響を及ぼすことが分かっており[13]、この domain 6 の酵素的切断に対する影響について、より詳細に検討することを目的として、次の実験を行った。結果を図 4 に示す。

図 4A に提示した種々の mutant を作製した。図 2 の pIgR sequence のなかで、斜線部位は、各動物種間で高度に保存された 9 アミノ酸を示している[10]。この sequence は、 α -helix を構成しており、pIgR の酵素的切断には、極めて重要であると考えられている。そこで我々は最初に 9 アミノ酸を欠失した mutant の作製し、検討を行った。この mutant の発現レベルは、Western blotting により確認を行った。その結果、wild type と比較して、やや低い位置に一本のバンドが検出された。そこでこの細胞を用いて、SC の分泌効率について ELISA 法で検討した(図 4C)。Wild type の pIgR transfectant では、86.1 pg/ml の free SC を培養上清中に分泌することが判明した。これは細胞内に発現されている pIgR の総量の 0.3% に相当した(Wild type の pIgR transfectant では、細胞質内の濃度が 27 ng/ml に達した)。Domain 6 全体を欠失した mutant は、cleavage region deletion (Δ CL)と名付け[13]、wild type との間で分泌効率の比較を行った。 Δ CL における free SC の分泌効率は極めて低く、5 pg/ml 未満であった。そして free SC は培養上清中にほとんど検出することができなかった。一方、 Δ 604-612 mutant においては、わずかに free SC の分泌効率は低下し、76 pg/ml であった。しかしながら wild type との間では有意な差は認められなかった。

これらの結果に基づき、我々はさらに Δ 604-612 の領域に隣接する 10 アミノ酸を、N 末端側ないしは C 末端側に欠失させた mutant を作製した。それぞれの mutant は、 Δ 594-612 ない

し $\Delta 604-622$ mutant と命名した。それぞれの mutant を用いた Western blotting 法では wild type と比較して、わずかに低い位置に単一のバンドが検出された (図 4B: 第 5 および第 6 レーン)。そこでこのふたつを用いて、分泌効率を比較したところ、 $\Delta 594-612$ transfectant では、明かに SC の分泌効率の低下が認められ、約 30 pg/ml であった (図 4B: 第 4 番目のレーン)。これに対し、 $\Delta 604-612$ の mutant では、逆に free SC の分泌効率が上昇し、wild type の 2.2 倍、実測値は 199.5 pg/ml を呈した。

これらの結果を再確認するために、metabolic labeling と免疫沈降法を用いて検証を行った。図 4D に示すように、 $\Delta 604-612$ の mutant では、wild type に匹敵するほどの free SC の分泌が認められた。一方 ΔCL mutant では、バンドは検出されなかった (図 4D: 第 2 番目のレーン)。 $\Delta 594-612$ mutant では、細胞質内 pIgR のバンドは明らかに検出されたのにも拘わらず、培養上清中にはごくわずかなバンドしか検出することができなかった (図 4D: 第 4 番目のレーン)。一方で、 $\Delta 604-622$ mutant においては、非常に明瞭なバンドが検出された (図 4D: 第 5 番目のレーン)。これらの結果は、 $\Delta 604-622$ mutant では、wild type に比較して分泌効率の上昇を認めたことを意味している。以上の結果は、594 から 603 のアミノ酸と、613 から 622 までのアミノ酸は、pIgR の酵素的切断に対して、全く反対の役割を担っている可能性が示唆された。



[図 4] pIgR の部位による機能的差異

(A)各 deletion mutant の構造。WT における各種間で保存された領域は斜線で示す。ΔCL mutant は domain 6 全体を欠失、Δ604-612 は保存された 9 アミノ酸を欠失、Δ594-612 は N 末端側に 10 アミノ酸を欠失、Δ604-622 は C 末端に 10 アミノ酸欠失させたものである。(B)各 mutant の細胞溶解液を回収し、抗 SC 抗体を用いた Western blot 法。(C)各 mutant をそれぞれの transfectant させ、培養上清を回収し ELISA により fSC 量を定量した。ELISA の実験は標準偏差をとり 3 回検討した。(D)それぞれの stable transfectant をメタボリック標識し、培養後細胞溶解液（下段）と培養上清（上段）を回収し、抗 SC 抗体により免疫沈降した

第6章 考察

我々は本研究で pIgR の domain 6 において、580 番目の Ala から Val への変異が、pIgR の酵素的切断に大きく影響を与えているかも知れないと予測し、詳細に検討した。そこで wild type と A580V mutant との分泌効率を比較した。しかし SC の分泌効率には、全く変化が認められなかった。

私の共同研究者である浅野らは、これまで pIgR の研究において、CHO 細胞（ハムスター由来卵巣線維芽細胞）[20]、Baby Hamster Kidney (BHK) cell（ハムスター腎由来の細胞株）[13]、HT-29 および Caco-2（いずれもヒト結腸癌由来の細胞株）[21]などの培養細胞を用いて種々の実験を行ってきた。また Emmerson らは Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞（イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株）[22]を用い pIgR に関して報告している。今回の実験で我々が用いた CHO 細胞は、比較的 pIgR の transfection およびその分泌効率において安定した結果が得られたため、これを使用した。一方、Su T らは Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)細胞を用いた実験では、A580V mutant が、pIgR の上皮内輸送を低下させ、SC の分泌効率を低下させる、ということが報告した[23]。この結果は、我々の結果とは明らかに異なるものである。CHO 細胞は、上皮性の MDCK 細胞とは異なり極性を有していないうえに、上皮細胞と線維芽細胞という点で、pIgR の酵素的切断に関与するであろう酵素を有していない可能性がある。理由は明らかではないが、これらの結果の違いは使用する培養細胞や酵素の種類の違いに由来するものであるかも知れない。

この A580V mutant に加えて、我々はさらに 606 番と 607 番におけるグルタミン酸の違いの重要性[10]について検討を行った。606 番と 607 番のグルタミン酸というのは、酵素的切断を受けるであろうという部位に相当している。しかしながらこれらの mutant も pIgR の酵素的切断にはなんら影響を及ぼさなかった。我々の結果は、これらのグルタミン酸残基とは pIgR の酵素的切断を担う酵素の認識には、影響を及ぼさない可能性を示唆した。

pIgR の最も重要な役割は、多量体免疫グロブリンを上皮細胞の基底側で結合し、上皮細胞内を transcytosis し、腸管内腔へ分泌することである[24]。pIgR と多量体免疫グロブリンが上皮細胞内管腔側表面に達したあとは、pIgR は多量体免疫グロブリンを機能させるために、細胞表面で酵素的に切断されなければならない[9]。したがって、pIgR の酵素的切断と、それに続く分泌型免疫グロブリンの分泌は、局所免疫機構における適切な免疫学的な surveillance にとっては、最も重要な点である。pIgR の細胞内領域に関する解析は、これまで詳細な多数の報告がある[25-30]。Casanova の論文を入れる。一方で、細胞外領域の機能については、詳細な解析結果は報告されていない。私の共同研究者である浅野らは以前の報告で、pIgR の細胞外領域の domain 6 が、pIgR の酵素的切断と分泌に関して重要であると報告した[12]。本報告では、domain 6 内の pIgR の酵素的切断と領域をさらに詳細に検索した。その結果、604 番から 612 番目までの 9 個のアミノ酸は、種の間で高度に保存されている領域であるが、 α -ヘリックスを構成していて、pIgR の酵素的切断には絶対的に重要であろうと予想されている。しかし今回の実験では、この 9 アミノ酸を欠失させた mutant にお

いては、SC の分泌効率に何ら影響を及ぼすことはなく、分泌効率の低下は極めて僅少な結果であった。一方で、594 番から 612 番目までの mutant では、SC の分泌効率は高度に抑制された。584 番から 612 番目までの mutation では、pIgR の酵素的切断には大きな影響を及ぼさなかった(データは示さない)。594 番から 612 番目までのアミノ酸は、上記で述べた高度に保存された 9 アミノ酸の部位に加えて、pIgR の酵素的切断部位を行う上で必要不可欠な部分である。一方で、604 番目から 622 番目までの mutant においては、SC の分泌効率は増強した。この結果は 613 から 622 番目のアミノ酸は、SC の分泌には抑制的な働きを有している可能性が示唆された。以上、本実験の結果から種の間で高度に保存された 9 アミノ酸とそれに隣接するアミノ酸は、pIgR の酵素的切断においては重要な役割をしていることが示唆された。

第7章 今後の展望

今後の研究課題として、1) pIgRの切断酵素を同定する、2) pIgRの領域によって機能的差異があることが、どのような意味をもつのかを明らかにする。

第8章 結語

粘膜免疫において、多量体免疫グロブリンとSCIは重要な役割を担っている。多量体免疫グロブリンの受容体であるpIgRは、動物種の間で高度に保存された9アミノ酸を有し、それに隣接するアミノ酸は、pIgRの酵素的切断においては重要な役割をしていると考える。

第9章 臨床への応用

腸管粘膜に局在する免疫機構は分泌型IgAに大きく依存する。腸管免疫に加えて、pIgRの酵素的切断部位の点突然変異は、IgA腎症やEB virus関連上咽頭癌の発症と関与することが報告されてきた。今回の研究結果を臨床応用の観点から考えると、pIgRの上皮内輸送の効率の機能低下が、IgA腎症やEB virus関連上咽頭癌の発症に関与していることが示唆されている。pIgR のdomain構造、特に酵素的切断部位を明らかにすることが、これらの疾患の病態の解明ならびに治療につながる可能性があると考えられる。

第10章 謝辞

本研究に関して、研究の御指導、ならびに学位論文の御指導、御高閲を賜りました日本大学医学部病態病理学系病理学分野 根本則道教授、杉谷雅彦教授、そして直接御指導を頂きました日本大学歯学部病理学 浅野正岳准教授、小宮山一雄教授に深謝致します。また、歯学部専修研究員である尾曲大輔先生に深謝致します。

また日本大学医学部板橋病院病理診断科ならびに病理部、日本大学歯学部病理学の皆様に深謝致します。

なお本研究は、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「インフルエンザウィルスと口腔・気道細菌との相互作用の機序と呼吸器疾患重症化の病態解明」プロジェクトから一部支援を受けました。

第11章 引用文献

- 1 Asano M, Komiyama K : Polymeric immunoglobulin receptor. *J Oral Sci.* 2011; 53:147-156.
- 2 今井浩三: 免疫グロブリン : pp. 111-134. : 菊池浩吉, 上出利光編, 医科免疫学, 南江堂, 東京, 2001.
- 3 Mestecky J, McGhee JR: Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv Immunol.* 1987; 40: 153-245.
- 4 Mestecky J: Mucosa immunoglobulins. In *Mucosal immunology*, ed by Ogra PL et al, pp133, Academic Press, New York, 1999.
- 5 Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol.* 2009; 70: 505-515. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02319.x.
- 6 Brandtzaeg P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front Immunol.* 2013; 4: 1-12. doi: 10.3389/fimmu.2013.00222. eCollection 2013.
- 7 Rojas R, Apodaca G: Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 944–55.
- 8 Musil LS, Baenziger JU: Cleavage of membrane secretory component to soluble secretory component occurs on the cell surface of rat hepatocyte monolayers. *J Cell Biol.* 1987; 104: 1725-1733.
- 9 Phalipon A, Cardona A, Kraehenbuhl JP, et al: Secretory component: a new role in secretory

- IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity*. 2002; 17: 107-115.
- 10 Kaetzel CS: The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev*. 2005; 206: 83–99.
- 11 Piskurich JF, Blanchard MH, Youngman KR, et al: Molecular cloning of the mouse polymeric Ig receptor. Functional regions of the molecule are conserved among five mammalian species. *J Immunol*. 1995; 154:1735-1747.
- 12 Eiffert H, Quentin E, Decker J et al: The primary structure of human free secretory component and the arrangement of disulfide bonds. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 1984; 365: 1489–95.
- 13 Asano M, Takenouchi-Ohkubo N, Matsumoto N et al: Multiple cleavage sites for polymeric immunoglobulin receptor. *Immunology*. 2004; 112: 583–9.
- 14 Chou J, Lin YC, Kim J et al: Nasopharyngeal carcinoma—review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. *Head Neck*. 2008; 30: 946–63.
- 15 Lin CT, Lin CR, Tan GK, et al: The mechanism of Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma cells. *Am J Pathol*. 1997; 150: 1745–56.
- 16 Norderhaug IN, Johansen FE, Schjerven H, et al: Regulation of the formation and external transport of secretory immunoglobulins. *Crit Rev Immunol*. 1999; 19: 481–508.
- 17 Hirunsatit R, Kongruttanachok N, Shotelersuk K et al: Polymeric immunoglobulin receptor polymorphisms and risk of nasopharyngeal cancer. *BMC Genet*. 2003; 4: 3.

- 18 Obara W, Iida A, Suzuki Y et al: Association of single-nucleotide polymorphisms in the polymeric immunoglobulin receptor gene with immunoglobulin A nephropathy (IgAN) in Japanese patients. *J Hum Genet.* 2003; 48: 293–9.
- 19 Omagari D, Iijima M, Suguro H, et al; Differential Distribution of Mouse Polymeric Immunoglobulin Receptor (mpIgR): Establishment of Enzyme - Linked Immunosorbent Assay System for mpIgR. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2008; 68: 543-551.
DOI:10.1111/j.1365-3083.2008.02166.x
- 20 Asano M, Saito M, Fujita H, et al. Molecular maturation and functional expression of mouse polymeric immunoglobulin receptor. *J Immunol Methods.* 1998; 214: 131-139.
- 21 Takenouchi-Ohkubo, Asano M, Chihaya H, et al. Retinoic acid enhances the gene expression of human polymeric immunoglobulin receptor (pIgR) by TNF-alpha. *Clin Exp Immunol.* 2004; 135: 448-454.
- 22 Matsumoto N, Asano M, Ogura Y, et al: Release of non-glycosylated polymeric immunoglobulin receptor protein. *Scand J Immunol.* 2003; 58: 471-476. *Immunology.* 2004 Aug;112(4):583-9.
- 23 Su T, Chapin SJ, Bryant DM, et al: Reduced immunoglobulin A transcytosis associated with immunoglobulin A nephropathy and nasopharyngeal carcinoma. *J Biol Chem.* 2011; 286: 44921-44925. doi: 10.1074/jbc.M111.296731. Epub 2011 Nov 15.
- 24 Mostov KE, Verges M, Altschuler Y. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr Opin*

Cell Biol. 2000;12: 483-490.

25 Casanova JE, Apodaca G, Mostov KE: An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. Cell. 1991; 66: 65-75.

26 Norderhaug IN, Johansen FE, Krajci P, Brandtzaeg P. Domain deletions in the human polymeric Ig receptor disclose differences between its dimeric IgA and pentameric IgM interaction. Eur J Immunol. 1999 Oct;29(10):3401-9.

27 Aroeti B, Kosen PA, Kuntz ID, et al: Mutational and secondary structural analysis of the basolateral sorting signal of the polymeric immunoglobulin receptor. J Cell Biol. 1993; 123: 1149–60.

28 Aroeti B, Mostov KE. Polarized sorting of the polymeric immuno-globulin receptor in the exocytotic and endocytotic pathways is controlled by the same amino acids. EMBO J. 1994; 13: 2297–304.

29 Mostov KE, Breitfeld P, Harris JM. An anchor-minus form of the polymeric immunoglobulin receptor is secreted predominantly apically in Madin-Darby canine kidney cells. J Cell Biol. 1987; 105: 2031–6.

30 Mostov KE, de Bruyn Kops A, Deitcher DL. Deletion of the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor prevents basolateral localization and endocytosis. Cell. 1986; 47: 359–64

第12章 図表

図1：消化管粘膜免疫における多量体免疫グロブリンと分泌型多量体免疫グロブリンレセプター（SC）の産生と分泌[文献1を一部改編].

二量体IgAのトランスサイトシスを示す。J鎖を含む二量体IgA（dIgA）は粘膜固有層内の形質細胞により産生・分泌される。分泌されたIgAは粘膜上皮細胞の側面に存在する多量体免疫グロブリンレセプター（pIgR）により捕捉される。dIgA-pIgRは複合体を形成し、細胞内に取り込まれ、上皮腔面まで運搬される。上皮表面で、pIgRの細胞外領域は酵素的に切断され、dIgAとして分泌される。

図2: Domain 6の全アミノ酸配列を示す。斜線の部分は各種間で保存された9アミノ酸を示す。580番目のアラニン、606および607番目のグルタミン残基を大文字で示している。TM：細胞膜貫通領域

図3：分泌型SC（fSC）の分泌効率はA580、E606、E607残基のmutationには影響されないCHO細胞にWT, A580V (A) および E606A, E607A, E606,607A mutant (B)をtransfectionし分泌効率を比較した。Transfection後の細胞はTrans-[35S]-labelにより標識した後、10% FCS-DMEMにて16時間培養を行った。培養終了後細胞溶解液と培養上清を回収し、抗SC抗体により免疫沈降実験を行った。沈降物を洗浄後、8% SDS-PAGEにて展開し、ゲルを乾燥させた後オートラジオグラフィーにより解析した。(C)それぞれのmutantをtransfectionした後、16時間10% FCS-DMEMにて培養後、細胞溶解液と培養上清を回収しELISAによりそれぞれに含ま

れるfSCとpIgRを定量し解析した。fSCの分泌効率は(free SC/cellular pIgR + free SC)により算出した。WT transfectantにおける分泌効率を100%としてそれぞれのtransfectantについて比較を行った。

図4：pIgRの部位による機能的差異

(A) 各deletion mutantの構造。WTにおける各種間で保存された領域は斜線で示す。Δ CL mutantはdomain 6全体を欠失した、Δ 604-612は保存された9アミノ酸を欠失、Δ 594-612はN末端側に10アミノ酸を欠失、Δ 604-622はC末端に10アミノ酸欠失したものである。(B) すべてのmutantの細胞溶解液を回収し、抗SC抗体を用いたWestern blot法により発現の有無について確認した。(C) 5×10^5 のそれぞれのtransfectantを6-well plateに播種し16時間培養した。培養上清を回収しELISA法によりfSC量を定量した。ELISAの実験は標準偏差をとり3回行った。(D) それぞれのstable transfectantをメタボリック標識し、培養後細胞溶解液（下段）と培養上清（上段）を回収し、抗SC抗体により免疫沈降した。

第13章 業績集 一覧

①原著論文 筆頭 6 (共 4)

②症例報告 筆頭 13 (共 10)

③総説 筆頭 4 (共 0)

④著書 筆頭 3 (共 1)

⑤その他

⑥学会報告

特別講演

シンポジウム 筆頭 2 (共 2)

パネルディスカッション

ワークショップ

一般演題 筆頭 22 (共 6)

⑦指導学位論文

⑧講演・放送 6

(1) 原著

1. Sunagawa K, Omagari D, Nishiyama M, et al. Distinct functional regions of the human polymeric immunoglobulin receptor. *Scand J Immunol*. 2013; 78: 339-344.
2. Yamada T, Sunagawa K, Homma T, et al: Ubiquitin-Positive Pneumocytes and Inclusion Bodies are Present in Secondary Organizing Pneumonia. *Intern Med*. 2011; 50: 277-283.
3. Omagari D, Mikami Y, Sunagawa K, et al: Poly I:C-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in intestinal epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 2009; 156: 294-302.
4. 砂川恵伸, 瀧之上史, 本間琢, 他: 消化管アニサキス症 5 例の臨床的および病理学的検討. *診断病理*. 2007; 24: 2: 175-177.
5. 山田勉, 佐藤末隆, 砂川恵伸, 他: 間質性肺炎とユビキチン陽性細胞についての肺各種検体における検討. *日本病理学会会誌*. 2007; 96: 1; 344.
6. Kikuchi Y, Genka I, Sunagawa K, et al: Serious Bradyarrhythmia That Was Possibly Induced by Lopinavir-Ritonavir in 2 Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clinical Infectious Diseases*. 2002; 35: 4: 488-90.

(2) 症例報告

1. Sunagawa K, Ishige T, Kusumi Y, et al: Renal Abscess Involving Mucormycosis by Immunohistochemical Detection in a Patient with Acute Lymphocytic Leukemia: a Case Report and Literature Review. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. , 2013; 66: 345-347.
2. Sunagawa K, Haruko Nishio, Noriko Kinukawa, et al: An Autopsy Case of Disseminated Strongyloidiasis combined with Cytomegalovirus Infection. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2011; 64: 2: 150-1522.
3. 西尾晴子, 砂川恵伸, 落合豊子, 他: 播種性糞線虫症による出血性肺炎で死亡した重症薬疹皮膚科の臨床播種性糞線虫症による出血性肺炎で死亡した重症薬疹皮膚科の臨床. 2010; 52: 12: 1855-1858..
4. 山田勉, 砂川恵伸, 本間琢, 他: 虚血性心菌にユビキチン陽性の好酸球性封入体を認めた急性心筋梗塞症の 1 例. *呼吸と循環*. 2010; 58: 11: 1179-1182.
5. 砂川恵伸, 逸見明博, 西川英里, 他: ステロイド治療中に空洞形成を特徴とした侵襲性肺アスペルギルス症の一例. *臨床病理 臨床検査医学会*. 2010; 58: 8: 786-791.
6. 竹川義則, 砂川恵伸, 五島桂子, 他: 2 次性高血圧を呈した心臓原発横紋筋肉腫の 1 剖検例. *診断病理*. 2009; 26: 1: 28-30.
7. 北原拓也, 久保恭仁, 砂川恵伸, 他: 進行性で致命的な経過をたどった特発性 Peliosis hepatis の 1 例. *肝臓*. 2009; 50: 5: 229-237.
8. Sunagawa K, Mitsumata M, Kusumi Y, et al: Ruptured Giant Aneurysm of the Left Anterior Descending Coronary Artery in Kawasaki Disease. *Pediatric Cardiology*. 2008; 29: 6: 1115-1119.

9. 尾花 ゆかり, 生沼 利倫, 砂川 恵伸, 他: 細胞診が早期発見に役立った悪性胸膜中皮腫の 1 例. 2008; 47: 3: 205-210.
10. Imai Y, Sunagawa K, Ayusawa M, et al: A fatal case of ruptured giant coronary artery aneurysm. Eur J Peidiatri. 2006; 165: 2: 130-133.
11. 住友 直方, 今井 由生, 砂川 恵伸, 他: 巨大化する冠動脈瘤の管理中に突然死した川崎病の 5 歳男児例. 日大醫學雑誌. 2006; 65: 3: 227-235
12. 林紀乃, 本間琢, 砂川恵伸, 他: 一過性骨髄増殖症と脳室周囲白質軟化症を合併した Down 症候群の 1 剖検例. 診断病理. 2004; 24: 1: 26-29.
13. 今井由生, 鮎沢衛, 砂川恵伸, 他: ‘超巨大’冠動脈瘤の破裂により死亡した 1 例 - 臨床経過. Progress in Medicine. 2005; 25: 1: 189.

(3) 総説

1. 砂川恵伸, 堤寛: 第 6 部 病理解剖の前に B. 感染症, 環境対策 1. 感染症対策 (1). 病理と臨床【臨時増刊号】. 2012; 30: 373-384.
2. 砂川恵伸, 堤寛: 消化管感染症の病理 形態診断に役立つ病理組織所見 胃と腸 2011; 46: 13: 20 1247-2054.
3. 砂川恵伸, 根本則道: 化学療法と全身炎症反応症候群(SIRS)/MODS. 病理と臨床. 2005; 23: 10: 1079-1085.
4. 砂川恵伸, 青木眞: 抗菌薬マネジメント-細菌感染症治療の基礎と実践 セファロスポリン系. Medicina. 2001; 38: 1: 50-51.

(4) 学会発表

1. 大荷澄江, 増田しのぶ, 砂川恵伸, 他: 臓器癌の胃転移に第 102 回日本病理学会北海道における臨床病理学的検討と CD44 の発現. 第 102 回日本病理学会総会, 札幌, 2013. 6
2. 大荷澄江, 増田しのぶ, 砂川恵伸, 他: 他臓器癌の胃転移における臨床病理学的検討. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会, 京都, 2012.12
3. 砂川恵伸, 石毛俊幸, 楠美嘉晃, 他: 腎生検にてムコール症と確定診断し腎臓摘出・救命された急性リンパ球性白血病の一例. 第 101 回病理学会総会, 東京, 2012. 4
4. 砂川恵伸: クリプトコッカス 17 例の臨床的および病理学的検討. 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会, 長崎, 2012. 4
5. 砂川恵伸: Catastrophic *Clostridium perfringens* infection in an adult T-cell leukemia/lymphoma, autopsy case.(劇症型 *C. perfringens* 剖検の一例). 第 86 回日本感染症学会総会・学術講演会, 長崎, 2012. 4
6. 砂川恵伸: 感染症病理医の角度から見える一般臨床. CPA 研究会. 神戸, 2012. 2
7. 大荷澄江, 増田しのぶ, 砂川恵伸, 他: Combined hepatocellular and cholangiocellular carcinoma (混合型肝癌) の臨床病理学的検討. 第 58 回 日本臨床検査医学会, 岡山, 2011. 11
8. 砂川恵伸, 根本則道: スライドカンファレンス乳腺. 第 30 回 日本臨床細胞学会 東京支部学術集会, 東京, 2011. 7
9. 砂川恵伸, 尾曲大輔, 浅野正岳, 他: 院内下痢症における *Clostridium difficile* 関連性下痢症の臨床的および遺伝子学的検討. 第 100 回日本病理学会総会, 横浜,

2011. 4

10. 中西陽子, 清水哲男, 砂川恵伸, 他: 肺生検微小検体からの遺伝子発現解析による肺癌の組織型鑑別への応用. 第 100 回日本病理学会総会. 横浜. 2011.4
11. 砂川恵伸. 院内関連性下痢症における *Clostridium difficile* の臨床的解析. 第 85 回日本感染症学会. 東京. 2011.4
12. 芳野淳子, 関利美, 砂川恵伸, 他: 頭頸部における粘表皮癌の穿刺吸引細胞診の検討. 第 49 回 日本臨床細胞学会秋季大会. 和歌山. 2010.11
13. 砂川恵伸, 逸見明博, 西川英里, 他: ステロイド治療中に空洞形成を特徴とした侵襲性肺アスペルギルス症の一例. 第 57 回 日本臨床検査医学会学術集会, 東京, 2010. 9
14. 砂川恵伸, 尾曲大輔, 浅野正岳, 他: *Clostridium difficile* 産生菌体外毒素 toxin A の生物学的機能およびその遺伝子発現. 第 99 回 日本病理学会総会, 東京, 2010. 4
15. 砂川恵伸, 根本則道: ニューモシスチス肺炎の生存例と死亡例における臨床的・病理学的比較検討. 第 98 回 日本病理学会総会, 京都, 2009. 5
16. 砂川恵伸, 絹川典子, 生沼利倫, 他: 播種性糞線虫症およびサイトメガロウイルス感染症を合併した一剖検例. 第 42 回 日本病理学会関東支部学術集会, 千葉, 2009. 3
17. 砂川恵伸, 絹川典子, 生沼利倫, 他: 偽膜性腸炎の臨床的および病理学的検討. 第 97 回 第 42 回日本病理学会総会, 金沢, 2008. 5
18. 砂川恵伸, 山田勉, 橋本賢一, 他: メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染性心内膜炎/僧帽弁弁輪周囲膿瘍を来した一剖検例. 第 479 回 日本医学会例会, 東京, 2007. 11
19. 砂川恵伸, 林紀乃, 大荷澄江, 他: 膀胱原発絨毛癌の一剖検例. 第 96 回 日本病理学会総会, 東京, 2007. 3
20. 砂川恵伸, 生沼利倫, 根本則道: 全身播種性真菌症の臨床的病理学的検討. 第 95 回日本病理学会総会, 東京, 2006. 5
21. 尾花ゆかり, 小松京子, 関利美, 砂川恵伸, 生沼利倫, 楠美嘉晃, 杉谷雅彦, 根本則道: 胸水細胞診が診断に有効であった画像陰性悪性中皮腫の一症例. 第 44 回 日本臨床細胞学会秋期大会, 奈良, 2005. 9
22. 砂川恵伸, 菊池建太郎, 生沼利倫, 他: 顕著な壊死を伴い診断に苦慮した悪性リンパ腫の一例. 第 26 回 日本病理学会関東支部学術集会, 川越, 2005. 3
23. 砂川恵伸, 三俣昌子: 巨大冠動脈瘤の破裂による川崎病男児の死亡例. 第 24 回 日本川崎病研究会, 京都, 2004. 9
24. 砂川恵伸, 三俣昌子: 超巨大冠動脈瘤の破裂による死亡例. 第 14 回 東京川崎病研究会. 東京, 2004. 6
25. 砂川恵伸, 岡慎一: AIDS 患者において Lopinavir/ritonavir(LPV)により誘発されたと思われる重症不整脈の 2 例. 第 77 回 日本感染症学会. 東京, 2002. 4
26. 砂川恵伸, 岡慎一: アメーバ肝膿瘍についての検討. 第 15 回 日本エイズ学会. 東京, 2001. 11
27. 砂川恵伸, 平良正昭: 化学療法 2 コースで著明に反応し寛解を得た成人 T 細胞

性白血病性リンパ腫(ATLL)の一例. 第 92 回 沖縄県医師会医学会総会. 沖縄, 2000. 12

28. 砂川恵伸, 平良正昭: 沖縄県宮古島における糞線虫症の臨床的検討. 第 98 回 日本内科学会総会. 京都, 2000. 2

シンポジウム

1. Sunagawa K, Nemoto N: Clinical and Pathological Aspects of Deep fungal infections. 6th Asia Pacific Congress of International Academy of Pathology (Symposium), Kochi, India, 2009. 8
2. 砂川恵伸, 根本則道: HIV/AIDS 患者胎盤における Hofbauer cell の役割に関する病理学的検討. 横浜, 2004. 4

(5) 著書

1. 砂川恵伸: レプトスピラ, A 型および C 型肝炎ウイルス, B 型肝炎ウイルス(青木眞, 佐竹幸子, 柴田清編). わかりやすい微生物学・感染症学, ヌーヴェルヒロカワ. pp131-4, pp211-5, pp221-4. 東京. 2003.
2. 砂川恵伸, 岡慎一: HIV 患者における結核治療 (島田馨編). HIV Q and A, 医薬ジャーナル社, pp126-27. 東京. 2002.
3. 砂川恵伸, 林紀乃, 根本則道. カラールービン病理学. 臨床医学への基盤. 第 10 章血管 413-454. 東京. 2007.

(6) 講演

1. 砂川恵伸: 臨床医のための病理標本の見方 感染症の病理学的考え方入門. 第 28 回 福岡臨床感染症研究会. 福岡. 2013. 9
2. 砂川恵伸: 感染症の病理学的考え方入門. 大阪厚生年金病院. 大阪. 2013. 5
3. 砂川恵伸: 臨床医のための病理組織標本の見方-30 分で明日から NEJM の病理写真が読める!- 第 8 回 市中病院で見る世界の感染症. 東京. 2013. 5
4. 砂川恵伸: 免疫不全者の感染症の病理診断. 臨床微生物学会 第 8 回 医師・臨床検査技師・薬剤師・看護師のための感染症学セミナー: 免疫不全患者の感染症. 東京 (東京大学). 2012. 9
5. 砂川恵伸: 感染症病理医の角度から見える一般臨床. CPA 研究会. 神戸 (神戸市立中央医療センター中央市民病院). 2012. 9
6. 砂川恵伸: 感染症医療における病理診断の有用性とその利用-肉芽腫性疾患を例に-第 12 回東部感染症研究会. 静岡 (静岡県立静岡がんセンター). 2012. 3