

201128038A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

「ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常
増殖症の重症度分類のための診断基準と
治療指針の作成に関する研究」

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 泰秀

平成24（2012）年3月

目次

I. 総括研究報告

ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための診断基準と
治療指針の作成に関する研究

林 泰 秀 1

II. 分担研究報告

1. ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の遺伝子変異による
病型分類に関する研究

伊 藤 悦 朗 17

2. TAMの病態への関与が疑われる染色体異常とその関連遺伝子に関する研究

滝 智 彦 19

3. 一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための細胞表面マーカー解析と
細胞保存に関する研究

大 喜 多 肇 23

4. ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症および
急性巨核芽球性白血病の原因遺伝子の探索

小 川 誠 司 25

5. TAM症例の登録システムと治療指針の確立のための臨床試験に関する研究

菊 地 陽 29

6. 少量シタラビン療法を施行したダウン症候群に合併した一過性骨髄異常増殖症
29例の合併症プロファイル

村 松 秀 城 31

7. 新生児期に発見されたTAM症例に対する新生児科医の対応とフォローアップの
マニュアルの作成 そのための基礎調査としてのサーベイランス

田 村 正 徳 35

8. 新生児の症例登録システムの確立とその解析指針の確立	
塚本桂子	37
9. ヒト化マウスを用いた一過性骨髄異常増殖症の病態に関する研究	
渡邊健一郎	47
10. 疫学研究用登録システムの確立と統計解析に関する研究	
齋藤明子	49
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	55
IV. 研究成果の代表的論文	61

I . 総括研究報告書

ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための
診断基準と治療指針の作成に関する研究

研究代表者 林 泰秀 群馬県立小児医療センター院長

研究要旨: 研究要旨: ダウン症候群では新生児期に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加することがあり、一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)と呼ばれている。新生児期に発症するため新生児施設で診断、治療されることも多く、また自然治癒する予後良好な疾患と考えられていたため登録もされず、正確な数の把握はされていなかった。最近の多数例の検討で、TAMの死亡例が20~30%みられることが報告された。これまで新生児専門医と小児血液専門医で別々に行なわれていたTAMの診断と治療が、平成21年度の研究班により日本小児血液学会の疾患登録システムと新生児側のサーベイランス等により全体像も把握できるようになり、昨年度開始された日本小児血液学会のシステム等を用いたTAMの登録と重症例に対する観察研究は順調に進み、2012年2月15日現在で76施設で倫理委員会承認済みであり、24症例が登録されている。また、重症例の抽出と病態解明のために、マーカー、染色体、GATA1、網羅的ゲノムアレイによる解析と次世代シーケンサーによる解析を開始し、TAMに関連する遺伝子の異常が把握できるようになった。GATA1遺伝子について、昨年度はGATA1の高発現と低発現変異群に分類すると低発現変異群が高率に白血病化することを明らかにした。今年度は2種類のGATA1内部欠失変異(GATA1ID)を6例のTAM患者で見出した。多くのGATA1変異は第2エクソンに存在するが、これらの症例では第3エクソンに存在し、alternative splicingが生じていた。その結果、43(GATA1 ID type-1)あるいは15アミノ酸の内部欠損(GATA1 ID type-2)が生じていた。さらに、これらをML-DS細胞株やGATA1の発現を欠いたマウスの胎児巨核球前駆細胞にレトロウイルス・ベクターを用いて発現させても、GATA1sと同様に、その増殖を抑制できなかった。興味深いことに、これらのGATA1変異蛋白はいずれも、正常な赤血球造血に不可欠なGATA1のRB結合モチーフを欠いていた。今回の結果は、TAM発症の仕組みの解明に重要な示唆を与えられた。また、NOGマウスの検討で、マウスにTAM細胞の移植が可能となり、今後TAMの発症機序の解明に貢献できると思われる。登録が開始された多数の症例の保存細胞と血清の解析は、TAMでみられる高サイトカイン血症や肝線維症の機序やTAMの分子機構およびモザイク型ダウン症候群や正常児に発生したTAMの機序の解明に役立つ。また、TAMから白血病に進展する機序も明らかになり、ひいては成人のがんの発生と進展機構の解明にも貢献すると思われる。

研究分担者氏名

伊藤悦朗 弘前大学医学部小児科 教授
滝智彦 京都府立医科大学大学院医学研究科
分子診断・治療医学講師
大喜多肇 国立成育医療研究センター研究所
小児血液・腫瘍研究部 分子病理研究室
室長
小川誠司 東京大学医学部附属病院 Cancer Board
特任准教授
菊地陽 帝京大学医学部小児科 教授
村松秀城 名古屋大学医学部小児科 助教
田村正徳 埼玉医科大学総合医療センター 教授
塚本桂子 国立成育医療研究センター
周産期診療部 新生児科 医員
渡邊健一郎 京都大学医学部小児科 講師
齋藤明子 名古屋医療センター臨床研究センター
臨床疫学研究室 室長

A. 研究目的

ダウン症候群では新生児期に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加することがあり、一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)と呼ばれている。その頻度は約10%(100人/年)とされているが、新生児期に発症するため新生児施設で診断、治療されることも多く、また自然治癒する予後良好な疾患と考えられていたため登録もされず、正確な数の把握はされていなかった。近年の多数例の検討で、死亡例が20~30%みられることが判明し、重症例を診断するための診断基準も、重症例に対する標準的治療もまだ確立していなかった。近年、重症例に対して少量シタラピンによる治療の有効性が示されている。今後前方視的試験により国内のTAM症例の重症度の診断と予後を正確に把握する必要がある。TAMの登録システムを小児血液と新生児の側で立ち上げて全数把握ができるようになったので、重症例の診断基準を確立し、観察研究により標準的治療

の確立を目指し、予後の改善と生存の質を向上させることが研究の目的である。

B. 研究方法

1) 疾患登録システムの確立 (図 1)

① 日本小児血液学会の登録システム

日本小児血液学会の疾患登録システムの中で TAM の登録システムを立ち上げ、これを用いて新生児科の医師も小児血液学会員を通してオンラインによる登録ができるようにした。この研究は日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)に昨年度から設置された TAM 委員会が実施主体となって行われた。

② 日本未熟児新生児学会の登録システム

A) 日本未熟児新生児学会の学会事業としての稀有疾患サーベイランスの利用

TAMは血液疾患ではあるが、新生児期に発症する疾患であり、新生児集中治療室(NICU)施設で診療することが多い。そして、NICU施設に小児血液専門医がいない場合には、日本未熟児新生児学会の稀有疾患サーベイランスで症例を把握することにし、運用を開始している。

B) サーベイランス非参加施設の調査

TAM 委員会が主導となって、前方視的調査が整備されつつあるが、実際に TAM 症例に最初に遭遇する機会が最も多いのは新生児医療の現場であり、この日本小児血液学会の疾患登録のみでは TAM 症例全数を把握することは困難な可能性がある。このような新生児医療現場において TAM 症例を有効に登録するシステムを構築することを目的とした。

C) 日本小児血液学会のアンケート調査

2003 年から 2005 年診断例に対する全国アンケート調査および 2006 年から 2008 年に小児血液学会疾患登録がなされた症例に対する二次調査の結果、解析可能であった計 153 例の調査結果について検討した。

D) TAM の臨床試験

一昨年設置された JPLSG の TAM 委員会において計 8 回の検討を行い、TAM の実態解明を目的とした観察研究計画を立案した。GATA1 変異を弘前大学小児科、表面マーカーを三重大学小児科、血球形態を名古屋大学小児科でそれぞれ中央診断として行い、末梢血中の微小残存腫瘍を三重大学小児科、サイトカインプロファイルを群馬県立小児医療センターでそれぞれ中央検査として行うことを盛り込んだ観察研究計画で、日本小児血液学会臨床研究審査委員会の承認を得て各施設に研究計画書を配布した。

2) 重症例の抽出と病態解析

また、重症 TAM 症例に対する治療に関しては、今回の研究計画では介入試験は時期尚早であるとして盛り込まれなかったが新生児領域を中心に重症 TAM 症例に対する治療指針作成の要望が強いため、今年度は従来行われてきて報告のあるものについてその内容をまとめて、推奨治療という形で日本小児血液学会雑誌に総説として呈示した(村松秀城、菊地陽、日小血会誌 25:179-194,2011)。

① 染色体・遺伝子解析

TAM の経過後に発症した染色体異常を有する急性巨核芽球性白血病 (AMKL) 症例と骨髄異形成症候群 (MDS) 症例の各 1 例の DNA を用いて、Affymetrix 社の Genome-Wide Human SNP Array 6.0 によりゲノムコピー数の増減を検討した。コピー数の変化が生じている部位に存在する遺伝子と融合する遺伝子を、cDNA バブル PCR 法、inverse PCR 法などを用いて同定を試みる。

② GATA1 遺伝子等の解析

これまでに全国から弘前大学小児科に集められた 100 例以上の TAM の臨床検体の遺伝子解析を行った。末梢血から DNA および RNA を抽出し、TAM のほとんどの症例で遺伝子変異が検出される GATA1 遺伝子を解析した。

③ 網羅的ゲノム解析

TAM 11 例および AMKL 5 例の DNA を用いて、ヒト全エクソン領域をターゲットとするビオチン化された cRNA (Agilent 社 SureSelect ®) を用いて濃縮したのち、高速シーケンサー (illumina 社 GA IIx, Hiseq 2000) で解析を行った。寛解期に採取した末梢血由来の DNA を自己正常検体として、TAM あるいは AMKL における腫瘍細胞特異的な変異を検出した。

④ マーカー解析

TAM の白血球のマーカー解析の発現状況について、末梢血、骨髄、臍帯血を全血法により蛍光 3~10 重染色し、Beckman-Coulter 社のフローサイトメトリー FC500 (2レーザー・5カラー) および Gallios (3レーザー・10カラー) を用いて解析し、3カラー (CD45-gating+2カラー)、5カラー (CD45-gating+4カラー)、10カラー (CD45-gating+9カラー) のそれぞれの解析の精度について比較を行なった。解析後の残余白血球の保存法について検討した。

⑤ NOG マウス

TAM 細胞は *in vitro* で維持することは困難で、十分に病態を再現できている遺伝子改変マウスモデルの報告も限られている。TAM の病態、AMKL への移行のメカニズムを解明し治療法を開発するため、高度免疫不全マウス NOG マウスを用いてヒト化マウスを作成し、新たな疾患解析モデルを確立することを目的とする。

保護者の同意が得られた患者の末梢血から単核球を分離して、NOG マウスに尾静脈より移植した。経時的にマウス骨髄における患者由来 TAM 細胞のキメラリズムをフローサイトメトリーで解析した。生着した細胞については、形態、表面抗原、GATA1 遺伝子変異、染色体を調べ、患者末梢血球の TAM 細胞と同一であるかを検討した。

⑥ iPS 細胞

東京大学医科学研究所の辻浩一郎准教授とダウン症候群および TAM 細胞からの iPS 細胞作成につき研究を開始した。

3) 細胞保存

マーカー解析後の余剰検体の細胞を保存するために国立成育医療研究センター内に TAM 患児の末梢血由来の余剰検体の保管システムを構築した。これまでの成育の検体保存システムと可能なかぎり統一した手順を

採用することにより効率良い検体保存システムを目指して作成した。

(倫理面への配慮)

本研究事業で行われる臨床試験は、日本小児血液学会臨床研究審査委員会の承認の後、各施設の倫理委員会の承認を得て実施している。本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、参加研究施設の倫理委員会の審査・承認を得て行われた。

またJPLSGのもとで行なわれる観察研究は、文書による説明同意を行い、同意の得られた症例のみが観察研究の対象となる。また、連結可能匿名化により、症例の登録・追跡調査を行うことにより、対象症例の個人情報外部に流出する危険を限りなくゼロにする配慮をしている。また、研究の安全性を担保するため、本研究は介入試験における効果安全性評価委員会の役割をもつものとして JPLSGの倫理委員会の監視の下に行われている。

C. 研究結果

1) 疾患登録システムの確立(図1)

①日本小児血液学会の登録システムとTAMの観察研究
2006年から日本小児血液学会で始まったオンラインによる登録システムにTAMの項目を入れたことにより患者数把握が可能になった。

昨年設置されたJPLSGのTAM委員会において計8回の検討を行い、TAMの実態解明を目的とした観察研究計画を立案し、日本小児血液学会臨床研究審査委員会の承認を得て各施設に研究計画書を配布し、2011年3月から研究を開始した。2012年2月15日現在で76施設で倫理委員会承認済みであり、24症例が登録されている。

②日本小児血液学会疾患登録例のアンケート調査

初診時白血球数の中央値は37,800/uL(4,400-356,900)、在胎週数の中央値は37週(27-40)であった。31例(20%)が診断後9ヶ月以内に死亡した。少量シタラビン療法を施行した症例は28例(18%)であった。投与量および投与期間の中央値はそれぞれ、0.95 mg/kg/day(0.4-3.1 mg/kg/day)、7日間(2-15日間)であった。白血球数100,000/uL以上の症例に限定したサブグループ解析の結果、診断後10日以内に治療開始された症例の予後は有意に予後良好であった(1年全生存率66.1 ± 13.9% (n = 13) vs. 33.3 ± 8.6% (n = 30); $p = 0.035$ 、図2)。少量シタラビンを投与した28例のうち、3例(10%)で腫瘍崩壊症候群を発症し、高K血症、敗血症、多臓器不全によりそれぞれ死亡した。

③日本未熟児新生児学会の登録システム

A) 日本未熟児新生児学会の学会事業としてのサーベイランス

2010年3月より日本未熟児新生児学会のサーベイランス事業が開始された。今後3年間の予定で全国120の主要な新生児集中治療室(NICU)のあるモニター施設から症例登録があることになる。2010年度は21例の報告があり、16例について二次調査が終了している。2011年度は11月末までで16例の報告がある。直近の報告も含

まれているため二次調査が終了しているものは半数の8例である。二次調査の終了した24例中7例に化学療法が行われている。死亡例は4例で、うち3例に対して化学療法が施行されていたことが判明した。

B) サーベイランス非参加施設

アンケート回収率は40.0%で、各NICU入院数に対するダウン症候群の割合は1.3%、そのうちの8.6%がTAMであった。TAM症例の日本小児血液学会疾患登録率は28.7%であった。また、これらの施設のうち、相談可能な小児血液専門医がいる施設は約半数であった。

<2次調査票の検討>

A) 早期死亡危険因子…2次調査票が得られた79例について詳細に検討した。生後6カ月以内の早期死亡例は19例(24%)であった。早期死亡に関連する因子について、カットオフ値を用いて多変量解析を行った。統計学的に有意と判断された因子は、出血症状あり、LDH 1200IU/L以上、末梢血白血球数10万/mm³以上で、腹水ありが関連する傾向がみられた。

B) 少量シタラビン療法…施行例は14例で、増加する傾向があった。開始日齢中央値9[範囲1-50]から、シタラビン1.0 ± 0.5mg/kg/日を6 ± 2日間投与された。副作用は、貧血、好中球・血小板減少、凝固異常などであった。TAMに対して、交換輸血・ステロイド・化学療法など何らかの介入を要した症例で検討すると、少量シタラビン療法はOR7.2[95%CI: 1.2-62.0]($p = 0.0277$)で、生存に寄与していた。生存曲線の検討でも、 $p = 0.0193$ で少量シタラビン療法あり群のほうが生存率が良好であった。

2) 重症例の抽出と病態解析

① 染色体・遺伝子解析

TAMおよびAMKLの両方の時期にder(7)t(1;7)(q25;p15)を有した症例のAMKL細胞のSNPアレイ解析では、1q25および7p15領域でのゲノムコピー数の変化が確認された。1q25領域のコピー数が変化していた箇所の近傍には3つの遺伝子が存在し、そのうちの1つは白血病との関連が知られている遺伝子であった。存在した3つの遺伝子のどれかが染色体転座に関与していると考え、cDNAバブルPCR法、inverse-PCR法などを用いて相手遺伝子の同定を試みている。現時点で相手遺伝子の同定には成功していないが、引き続き解析を行っている。一方、t(7;11)(p13;p14)を有するMDS症例では、染色体分析での切断点に相当する箇所にはコピー数の変化は観察されなかった。

② GATA1 遺伝子の解析

2003年から2010年までに106例のTAMの臨床検体を収集し、GATA1遺伝子の解析を行った。GATA1変異はそのうち99例に検出された。GATA1 cDNAの解析では、ほとんどがN末端の83アミノ酸を欠いたGATA1蛋白(GATA1s)のみが発現する変異であった。しかし、6例のTAM患者で、129塩基あるいは45塩基がin frameで欠失し、84番目のメチオニンを含む43(GATA1 ID type-1)あるいは15アミノ酸の内部欠損(GATA1 ID type-2)蛋白が発現していると推定された。Western blot

図1

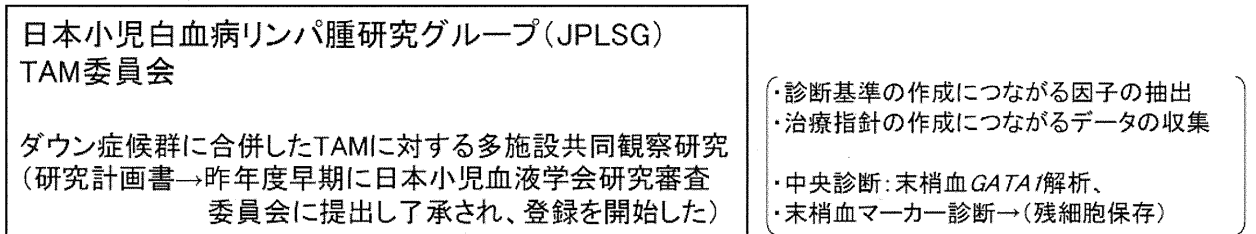
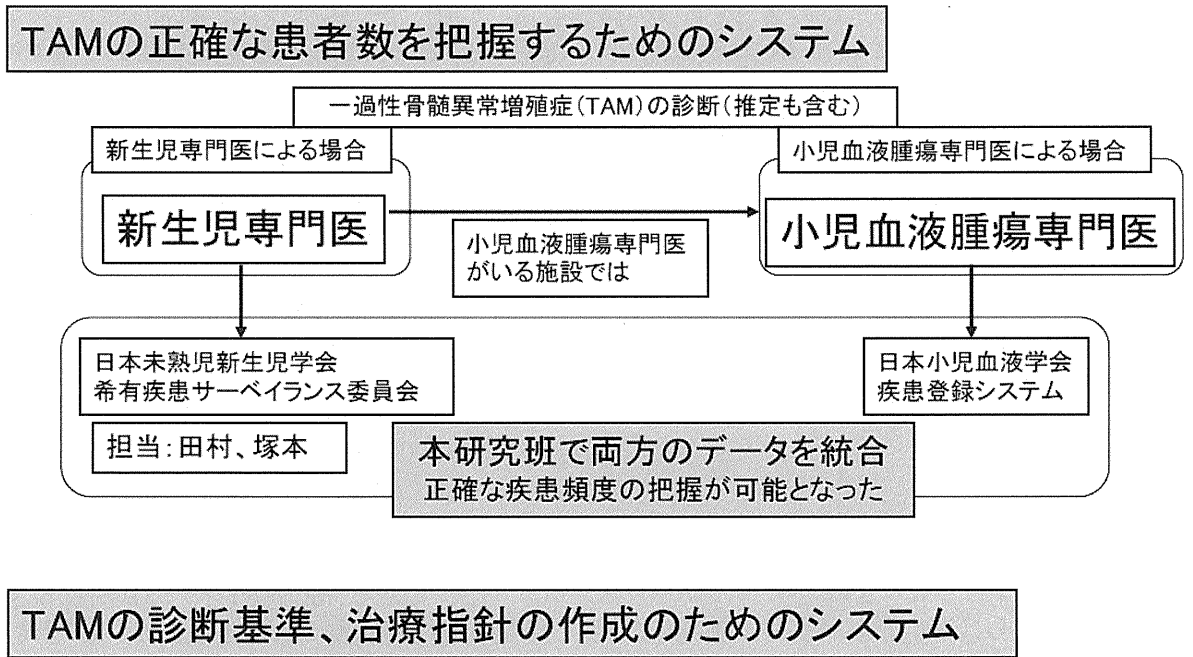
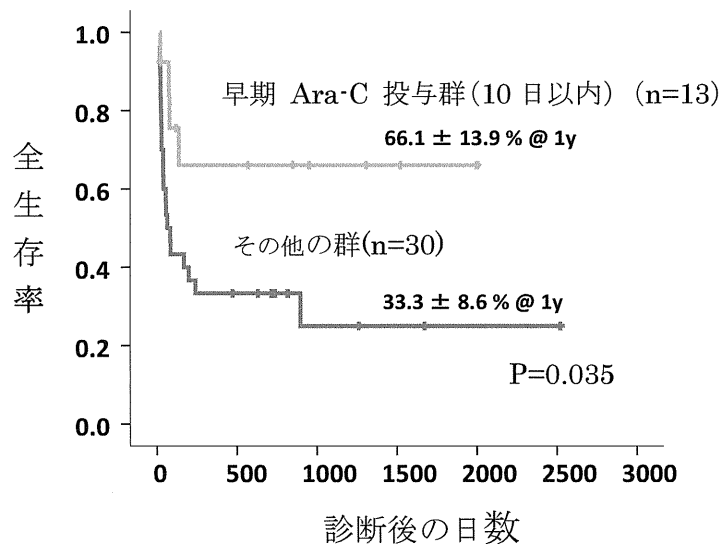


図2 白血球数 10 万以上の症例の少量シタラビン療法の有無による Kaplan-Meier 解析



解析により、GATA1 ID type 1変異をもつ2例のTAM細胞で、GATA1 ID蛋白の発現を確認することができた。次に、genomic DNAの解析から、これらの症例では、2から21塩基の挿入あるいは欠失が第3エクソンに存在することが明らかになった。GATA1遺伝子のmini-geneを用いた遺伝子導入実験を用いて、これらの症例では変異のためにalternative splicingが生じていることが証明された。

GATA1 IDの機能解析を解析するために、一過性の遺伝子導入実験を行った。その結果、GATA1sは、転写活性化能が正常のGATA1に比べ約60%に低下していたが、GATA1 IDは活性低下は認められなかった。さらに、GATA1 IDをML-DS細胞株やGATA1の発現を欠いたマウスの胎児巨核球前駆細胞にレトロウイルス・ベクターを用いて発現させた。GATA1を発現させると、巨核球の増殖は著しく抑制されたが、IDを発現させても巨核球の異常増殖を抑制することはできなかった。

③ 次世代シーケンサーによる解析

TAMでは症例あたり平均して1.5個、AMKLでは平均して7個のsomatic mutationが同定された。AMKLではこれまでにGATA1変異に加えてこれまでも報告があったTP53遺伝子のなど変異も同定されたが、多くはAMKLで報告のない遺伝子変異だった。

④ マーカー解析

TAM患児8例の末梢血および臍帯血の白血球球マーカー解析を行なった。TAMの芽球に特徴的なマーカー発現は、骨髄球系のCD33に加えて、CD7, CD117, CD34, CD244, CD56と考えられた。CD41, CD42bの巨核球・血小板系抗原およびCD36, CD61の関連抗原発現の状況は多様であり、必ずしも陽性でない症例が認められた。3カラー、5カラー、10カラー解析の比較を行なったところ、10カラー解析でも抗体の組合せを工夫することにより、蛍光補正や抗体結合の干渉などの問題もなく、精度の高い解析が可能であり、さらに同時に多くの抗原を検出することによって、抗体の相互の発現状況について把握することが可能であった。

⑤ NOGマウス

現在までに10例のTAM患者検体を移植し、うち3例で生着を確認した。いずれも生着したヒト細胞は、形態、フローサイトメリーによる表面抗原解析、GATA1遺伝子変異解析で患者検体と同一の特徴を示していた。生着した細胞は移植後12週と長期に渡りNOGマウス内で維持が可能であった。3例中1例では、生着した細胞を別のNOGマウスに移植し継代することが可能であった。

3) 細胞保存

検体保存は、患者ひとりにつき末梢血由来のTAM芽球検体を最大5本保存し、検査後の検体は-80℃で凍結、液体窒素タンクで保管した。検体1個につき個別の保存用匿名化番号(乱数)を発行し、登録研究の登録番号、検査施設整理番号とは異なる独自の番号で管理し、保存用匿名化番号は、検体保存施設である国立成育医療研究センター研究所で発行し、検査担当施設に事前に送付され、検査担当施設で検体チューブに添付

し、検体の保存用匿名化番号、種類、量、保管場所等は専用の検体情報シートにて管理した。検査担当施設に、一定数の検体が集まった時点で、検体と情報を記入した検体情報シートを検体保存施設に送付する予定である。

D. 考察

過去二年間と今年度の研究班の活動により新生児科医師が日本小児血液学会の疾患登録システムを用いることによりTAMの全体像の把握が可能となり、これまで診療する医師により分断されていたTAMの診断と治療が統一される画期的なことになった。また、このシステムに登録されていない新生児側の症例については、日本未熟児新生児学会の希有疾患サーベイランス委員会の対象疾患として承認されたので、これまで把握ができなかった新生児施設のみに入院したTAM症例も把握できるようになった。実際はサーベイランス事業は始まったばかりで報告数が少ないのが課題であり、今後さらに学会等で啓蒙する必要があり、昨年8月に開催された第114回日本小児科学会でもTAMのシンポジウムを開催し、今年7月の周産期新生児学会(田村班員が会長)でも開催する予定である。TAMの場合GATA1遺伝子の異常がこれまで報告されている。しかし、今回二次調査を行った24例中10例では遺伝子異常の検索が行われておらず、TAMの診療について均てん化を測っていく必要があると考えられる。

<日本小児血液学会のアンケート調査>

少量シタラピン療法施行の副作用は全般には少なく、早期に治療介入を行うことで白血球数高値の症例において予後を改善しうる可能性が示された。一方、3例(10%)と無視できない割合で腫瘍崩壊症候群を合併することが判明した。今後、非常に白血球数が高値(30万/ μ L以上)の症例においては、交換輸血等により腫瘍量を減じること、ラスブリカーゼの使用の検討、電解質バランスおよび腎機能悪化に注意を十分に払って少量シタラピン療法を施行する必要があるものと考えられる。

<サーベイランス参加施設と非参加施設への調査>

今回、新生児期に発症し、日本小児血液学会の疾患登録されない症例を把握するために、新生児施設での登録事業、アンケートによる調査が重要であることが、再確認された。今後も、引き続き、①日本未熟児新生児学会希有疾患サーベイランス事業と、②サーベイランス非参加施設へのアンケート調査を通じて、実態の把握に努めるとともに、各関連学会等での発表や雑誌掲載、インターネットを介した情報提供などで、TAMの管理治療指針が、広く新生児科医に提供されることが望まれる。

<JPLSG TAM 委員会の観察研究>

今回の観察研究の開始により、日本のTAM症例の均質な情報が集積され、推奨治療の提示によりTAMに対する対応が統一して行われ、症例の把握と重症例の治療などが標準化されて行われるようになり、予後不良であったTAMの予後を改善することができ、死亡例を

減少させるのみならず、重症例の生存の質(QOL)を改善し、長期入院する患者が少なくなり、経済的効果も得られると思われる。

少量シタラビン療法施行例の検討では、副作用は少なく、早期に治療介入を行うことで白血球数高値の症例において予後を改善しうる可能性が示された。今後、ハイリスク TAM に対する前向き治療研究による確認が必要である。

<細胞を用いた研究>

マーカー解析では、CD244は一般にはNK細胞、細胞傷害性T、単球のマーカーとされているが、骨髄の非腫瘍性骨髄系細胞の一部にも陽性であることが明らかになり、未分化な骨髄球にも発現していることが示唆された。MRD解析を考慮した場合、末梢血中におけるTAM芽球の検出に関しては、CD34やCD117等、通常末梢白血球では発現を認めない抗原を指標に追跡する方法が最も確実であり、これらの抗原の発現を認めない症例の場合には、CD33、CD7、CD244、CD56の中から、各症例の初発時のマーカー所見を基本に、末梢血中の正常白血球と区別可能な抗体の組み合わせを選択する方法が最も現実的で確実と考えられた。

TAM 患児から採取可能な検体量は非常に限られている。そのため、マーカー解析では、マルチカラー解析によって少量の検体で多数の抗原に対する精密かつ詳細な解析を行ない、多くの情報を収集するとともに、少しでも多くの検体を残して有効に保存し、将来的な基礎研究に活用するために工夫している。

NOG マウスでは、海外でTAM 細胞を別の免疫不全マウスの骨髄内に移植をした報告はあるが、十分な生着は得られていない(Leukemia, 2010;24:1012-7)。今回の我々の検討では、TAM の中には NOG マウスの骨髄環境で長期に維持できるものが存在することが示された。この系を用いれば、TAMの病態、AMKL 発症機構の解析が可能になると考えられた。

染色体遺伝子異常の解析では、同一症例での TAM および AMKL に共通して観察された転座切断点近傍に存在する遺伝子の中に、TAM および AMKL の発症に関与する遺伝子が存在する可能性を考え解析を行っている。データベース上にはこの症例と同一の染色体異常は存在しなかったが、いずれか一方の切断点を有する症例は複数存在していた。このような症例の切断点には共通の遺伝子が関与している可能性が示唆される。近年、染色体転座関連遺伝子が、染色体転座を伴わない変異によってさまざまな悪性腫瘍に関与していることが知られている。このことは、染色体転座を手掛かりとした関連遺伝子の同定が、染色体転座を有さない症例の腫瘍化のメカニズムの解明にも役立つことを示唆している。

次世代シーケンサーの解析では、TAM 検体では変異数は 1.5 個と比較的少なく、これまで考えられていた trisomy 21 に加えて、GATA1 遺伝子変異が起こることにより TAM を発症するというモデルを裏付ける結果となった。一方、AMKL では GATA1 遺伝子変異に加えていく

つかの変異が同定された。今後さらに症例を増やして解析を行う必要がある。また、新たに同定された遺伝子変異については TAM、AMKL の発症にどのように関与しているか、あるいは多数例での頻度などについて、さらに詳細な検討の必要があると考えられた。

また、**TAM 検体**では somatic mutation の候補が AMKL 検体に比べて少なく、これまで考えられていた trisomy 21 (first event)に加えて、GATA1 遺伝子変異が起こる(second hit)ことにより TAM を発症し、TAM における GATA1 遺伝子異常に加えていくつかの遺伝子変異が蓄積して AMKL を発症するというダウン症候群における TAM、AMKL 発症のモデルを裏付けるものであると考えられた。今後さらに複数例で同様の解析を行って、同様の傾向がみられるか検討する必要がある。また、GATA1 遺伝子以外に同定された変異遺伝子については TAM、AMKL の発症にどのように関与しているか、あるいは複数症例で共通する遺伝子変異があるかなど、さらに詳細な検討の必要があると考えられた。

GATA1 遺伝子の解析では、GATA1s と IDs に共通して欠損している GATA1 の領域には、興味深いことに、正常な赤血球造血に不可欠な GATA1 の RB 結合モチーフが含まれていた。RB との結合が失われることが TAM の発症に重要であることが示唆され、今後検討していく予定である。

検体保存では、TAMの登録システムの末梢血の細胞表面マーカーの余剰分を検体保存を行うことにより、これらの研究が推進されることが期待される。今後、この細胞保存システムを利用して次世代シーケンサーを用いて解析すれば、TAMでみられる高サイトカイン血症や肝線維症の機序やTAMの分子機構およびモザイク型ダウン症候群や正常児に発生したTAMの機序の解明に役立ち、TAMから白血病に進展する機序も明らかになり、ひいては成人のがんの発生と進展機構の解明にも貢献すると思われる。

E. 結論

今年度の班活動により、中央診断による確実な症例の把握とそれらの症例の確実な追跡を目的とした前方視的登録による観察研究を開始できた。今後、この観察研究の蓄積により、より正確な情報が得られ、重症TAMの予後の改善につながる情報が得られるものと期待される。また新生児側の症例も把握できるシステムが確立したので、本邦のTAMの実態が明らかにされ、機序の解明や患者のQOLも改善されるものと思われる。細胞保存を利用した次世代シーケンサーの解析も始まり、近い将来、TAMの病態の解明が期待される。

F. 健康危険情報

昨年度よりシタラビン少量療法等の観察研究が開始されたので、有害事象と健康危険情報に対して注意を払う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表
1. 村松秀城、菊地陽. 一過性骨髓異常増殖症(TAM)の治療戦略. 日本小児血液学会雑誌 25: 179-184, 2011
2. Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. (in press)
3. Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Kanezaki R, Park MJ, Kanno Y, Takahara T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. *Blood* 119 : 2608-2611, 2012
4. Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia(FPD/AML). *Blood* 119 : 2612-2614, 2012
5. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan W, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* (in press)
6. Shiba N, Taki T, Park MJ, Nagasawa M, Kanazawa T, Takita J, Ohnishi H, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. CBL mutation in childhood therapy-related leukemia. *Leukemia* 25 : 1356-1358, 2011
7. Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 672-674, 2012
8. Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia* 25 : 382-384, 2011
9. Yoshida K, Sanada M, Shiraiishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koeffler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 478 : 64-69, 2011
10. Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene* (in press)
11. Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami T, Tsutsumi A, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T-cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* 21 : 121-135, 2012
12. Inukai T, Kiyokawa N, Campana D, Coustan-Smith E, Kikuchi A, Kobayashi M, Takahashi H, Koh K, Manabe A, Kumagai M, Ikuta K, Hayashi Y, Tsuchida M, Sugita K, Ohara A. Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Brit J Haematol* 156 : 358-365, 2012
13. Shiba N, Taki T, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 413-414, 2012
14. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood* 117 : 2887-2890, 2011
15. Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Sci* 102 : 1645-1650, 2011
16. Sekimizu M, Sunami S, Nakazawa A, Hayashi Y, Okimoto Y, Saito AM, Horibe K, Tsurusawa M, Mori T. Chromosome abnormalities in advanced stage T-cell lymphoblastic lymphoma of children and adolescents: a report from Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) and review of the literature. *Br J Haematol*. 154 : 612-617, 2011
17. Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY, Mori H, Koeffler HP, Ogawa S. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia*. 25 : 184-186, 2011
18. Thoennissen NH, Lasho T, Thoennissen GB, Ogawa S, Tefferi A, Koeffler HP. Novel CUX1 missense mutation in association with 7q- at leukemic transformation of MPN. *Am J Hematol*. 86 : 703-705, 2011
19. Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 102 : 1645-1650, 2011.
20. Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 2011;102 : 302-308.
21. Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, Morishima S, Sato Y, Mori Y, Kato M, Sanada M, Morishima Y, Hosokawa K, Sasaki Y, Ohtake S, Ogawa S, Nakao S. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood*. 118 : 6601-6609, 2011

22. Iwakawa R, Kohno T, Kato M, Shiraishi K, Tsuta K, Noguchi M, Ogawa S, Yokota J. MYC amplification as a prognostic marker of early-stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin Cancer Res.* 17 : 1481-1489, 2011
23. Isome K, Matsubara K, Taki T, Nigami H, Yura K, Iwata A, Wada T, Taniwaki M, Fukaya T. Spinal cord compression by epidural involvement over 21 vertebral levels in acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 33: 153-157, 2011
24. Kobayashi S, Taki T, Chinen Y, Tsutsumi Y, Ohshiro M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Identification of IGHC δ -BACH2 fusion transcripts resulting from cryptic chromosomal rearrangements of 14q32 with 6q15 in aggressive B-cell lymphoma/leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 50: 207-216, 2011
25. Sasaki N, Kuroda J, Nagoshi H, Yamamoto M, Kobayashi S, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Shimura Y, Matsumoto Y, Taki T, Nishida K, Horiike S, Akao Y, Taniwaki M. Bcl-2 is a better therapeutic target than c-Myc, but attacking both could be a more effective treatment strategy for B-cell lymphoma with concurrent Bcl-2 and c-Myc overexpression. *Exp Hematol* 39: 817-828.e1, 2011
26. Yamamoto-Sugitani M, Kuroda J, Ashihara E, Nagoshi H, Kobayashi T, Matsumoto Y, Sasaki N, Shimura Y, Kiyota M, Nakayama R, Akaji K, Taki T, Uoshima N, Kobayashi Y, Horiike S, Maekawa T, Taniwaki M. Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17468-17473, 2011
27. Gotou M, Hanamura I, Nagoshi H, Wakabayashi M, Sakamoto N, Tsunekawa N, Horio T, Goto M, Mizuno S, Takahashi M, Suganuma K, Yamamoto H, Hiramatsu A, Watarai M, Shikami M, Imamura A, Mihara H, Taki T, Miwa H, Taniwaki M, Nitta M. Establishment of a novel human myeloid leukemia cell line, AMU-AML1, carrying t(12;22)(p13;q11) without chimeric MN1-TEL and with high expression of MN1. *Genes Chromosomes Cancer* 51: 42-53, 2012
28. Hori T, Suzuki N, Hatakeyama N, Yamamoto M, Inazawa N, Miyachi H, Taki T, Tsutsumi H. Infantile acute promyelocytic leukemia without a RARA rearrangement. *Pediatr Int* (in press)
29. Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Horikoshi Y, Hama A, Muramatsu H, Yoshida N, Yagasaki H, Kudo K, Horibe K, Kato K, Kojima S. Total body irradiation and melphalan as a conditioning regimen for children with hematological malignancies undergoing transplantation with stem cells from HLA-identical related donors. *Pediatr Transplant* 15 : 642-649, 2011
30. Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Hama A, Muramatsu H, Doisaki S, Horibe K, Kato K, Kojima S. Prognostic factors for outcomes of pediatric patients with refractory or relapsed acute leukemia undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 17 : 516-523, 2011
31. Shima H, Tokuyama M, Tanizawa A, Tono C, Hamamoto K, Muramatsu H, Watanabe A, Hotta N, Ito M, Kurosawa H, Kato K, Tsurusawa M, Horibe K, Shimada H. Distinct impact of imatinib on growth at prepubertal and pubertal ages of children with chronic myeloid leukemia. *J Pediatr* 159 : 676-681, 2011
32. Sakaguchi H, Takahashi Y, Watanabe N, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kudo K, Kojima S. Incidence, clinical features, and risk factors of idiopathic pneumonia syndrome following hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Blood Cancer* 58 : 780-784, 2012
33. Nishio N, Takahashi Y, Tanaka M, Xu Y, Yoshida N, Sakaguchi H, Doisaki S, Hama A, Muramatsu H, Shimada A, Kojima S. Aberrant phosphorylation of STAT5 by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in infant cytomegalovirus infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia Res* 35 : 1261-1264, 2011
34. Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Pediatr Transplant* 15 : 161-166, 2011
35. Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Hama A, Shimada A, Ito M, Kojima S. Autoimmune-like hepatitis following unrelated BMT successfully treated with rituximab. *Bone marrow transplantation* (in press)
36. Muramatsu H, Takahashi Y, Shimoyama Y, Doisaki S, Nishio N, Ito Y, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Ito M, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease refractory to rituximab in a patient with severe aplastic anemia. *Int J Hematol* 93 : 779-781, 2011
37. Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Shimada A, Nishio N, Hama A, Doisaki S, Yagasaki H, Matsumoto K, Kato K, Kojima S. Excellent outcomes of children with CML treated with imatinib mesylate compared to that in pre-imatinib era. *Int J Hematol* 93 : 186-191, 2011
38. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica* 96 : 814 -819, 2011
39. Ismael O, Shimada A, Hama A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Yoshida N, Ito M, Takahashi Y, Akita N, Sunami S, Ohtsuka Y, Asada Y, Fujisaki H, Kojima S. Mutations profile of polycythemia vera and essential thrombocythemia among Japanese children. *Pediatr Blood Cancer* (in press)

40. Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, O'Keefe C, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Shimada A, Watanabe N, Kato K, Kiyoi H, Naoe T, Kojima S, Maciejewski JP. Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. *British J Haematol* 2012;156:316-325
41. Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A. Analysis of mutations and recombination activity in RAG-deficient patients. *Clin Immunol* 138 : 172-177, 2011
42. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica*. 96 : 814-819, 2011
2. 学会発表
1. 小川誠司, 加藤元博, 林 泰秀. TAMにおける遺伝学的基盤探索. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
2. 土岐力, 伊藤悦朗. TAMにみられたGATA1遺伝子異常の最近の話題(シンポジウム:ダウン症候群に発症する一過性骨髄異常増殖症(TAM)). 第 114回日本小児科学会学術集会, 2011.8.12~14, 東京.
3. 村松秀城, 菊地 陽, 林 泰秀, 真部 淳. ダウン症候群に合併した一過性骨髄異常増殖症 153 例の後方視的解析. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
4. 塚本桂子, 伊藤祐司, 林 泰秀, 田村正徳. ダウン症候群にみられる一過性骨髄異常増殖症(TAM)についての新生児施設への調査. 第 114回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
5. Yoshida K, Toki T, Park MJ, Nagata Y, RuNan Wang, Shiraishi Y, Sanada M, Nagasaki M, Miyano S, Kanegane H, Kawakami K, Kato K, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Whole exome analysis of transient abnormal myelopoiesis and acute megakaryocytic leukemia with Down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
6. Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, RuNan Wang, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Ito E. GATA1 Mutants lacking Rb-Binding motif observed in transient abnormal myelopoiesis in Down Syndrome. 第 54 回アメリカ血液学会, 米国・サンディエゴ 2011.12.9~13
7. 鮫島希代子, 林 泰秀. ダウン症候群の診断告知に関するアンケート. 遺伝医学合同学術集会 2011, 京都, 2011.6.19.
8. 鮫島希代子, 高木剛, 家坂直子, 竹中俊文, 丸山 憲一, 林 泰秀, 尾崎 守. 出生前診断を行った 13 番染色体部分トリソミー、21 番染色体モノソミーの 1 例. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 第 11 回東アジア人類遺伝学会 2011.11.9-12
9. 朴 明子, 外松 学, 林 泰秀. 肝機能障害を伴う TAM の臨床像について. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
10. Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Koike T, Endo M, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Ito E. Novel GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
11. Yoshida K, Toki T, Park MJ, Nagata Y, Wang R, Shiraishi Y, Sanada M, Nagasaki M, Miyano S, Kanegane H, Kawakami K, Kato K, Kojima S, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Whole exome analysis of transient abnormal myelopoiesis (TAM) and AMKL with down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
12. 吉田健一, 土岐 力, 朴 明子, 永田安伸, 王 汝南, 白石友一, 真田 昌, 昆 彩菜, 佐藤亜依子, 長崎正朗, 宮野 悟, 金兼弘和, 川上 清, 加藤剛二, 小島勢二, 林 泰秀, 伊藤悦朗, 小川誠司. ダウン症候群に合併した一過性骨髄増殖症(TAM)および急性巨核芽球性白血病(AMKL)の全エクソシーケンス. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
13. 花田 勇, 照井君典, 土岐 力, 工藤 耕, 佐藤知彦, 神尾卓哉, 佐々木伸也, 高橋良博, 林 泰秀, 杉田完爾, 小島勢二, 小池健一, 小阪嘉之, 小林正夫, 伊藤悦朗. ダウン症候群関連 ALL の発症における JAK2、および CRLF2 遺伝子異常の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.27
14. 清河信敬, 山田浩之, 康 勝好, 福島 敬, 真部 淳, 菊地 陽, 熊谷昌明, 小原 明, 林 泰秀, 土田昌宏. 10 カラーフローサイトメリー解析による小児白血病のマーカー診断. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.13
15. 滝田順子, 西村 力, 安達正時, 大木健太郎, 大久保 淳, 樋渡光輝, 真田 昌, 林 泰秀, 小川誠司, 五十嵐 隆. 革新的ゲノム解析技術を用いた難治性小児固形腫瘍における発症分子機構の解明. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
16. 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 川幡亮一郎, 永田安伸, 大久保淳, 真田 昌, 五十嵐隆, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司. 次世代シーケンサーによる神経芽腫のエクソーム解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.4
17. Kobayashi S, Taki T, Tsutsumi Y, Nagoshi H, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Expression analysis of *BACH2*-related genes in B-cell malignancies. 第 70 回日

- 本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.4
18. Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nishida K, Kuroda J, Okuda K, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Otsuki T, Nitta M, Taniwaki M. Recurrent involvement of *PVT1* gene in multiple myeloma with 8q24 abnormality. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.3~5
 19. Taki T, Nishida K, Ohtake S, Miyazaki Y, Takeuchi J, Miura I, Jinnai I, Ohyashiki K, Sakamaki H, Miyawaki S, Honda S, Ohnishi K, Ohno R, Naoe T, Taniwaki M. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia: the JALSG AML201 study. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.14~16
 20. Kobayashi S, Taki T, Tsutsumi T, Nagoshi H, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Analysis of *BACH2*-Related Genes in B-cell Malignancies. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.14~16
 21. Nagoshi H, Taki T, Hanamura I, Nishida K, Kuroda J, Okuda K, Kobayashi S, Yamamoto M, Tsutsumi Y, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Otsuki T, Nitta M, Taniwaki M. Analysis of *PVT1* rearrangements in multiple myeloma and identification of a chimeric gene *PVT1-NBEA*. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.14
 22. Hiwatari M, Ohki K, Takita J, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Mutation analysis for IDH1 and IDH2 in infantile leukemia. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.14
 23. Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in CMML secondary to familial platelet disorder with propensity to develop AML. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
 24. 大木健太郎, 大喜多肇, 小林健一郎, 清河信敬, 朴 明子, 新井 心, 外松 学, 柴 徳生, 福島 敬, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地 陽, 小原明, 土田昌宏, 林 泰秀. TCCSG小児B前駆細胞型急性リンパ性白血病における*CRLF2*と*IKZF1*の解析. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.27
 25. 柴 徳生, 朴 明子, 村田知里, 嶋田 明, 滝 智彦, 外松 学, 田渕 健, 足立壮一, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 荒川浩一, 林 泰秀. 小児急性骨髄性白血病における*NUP98-NSD*転座の解析. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
 26. 朴 明子, 清河信敬, 小田 慈, 真部 淳, 原 純一, 小原 明, 花田良二, 土田昌宏, 小川誠司, 堀部敬三, 林 泰秀. T細胞型小児急性リンパ性白血病における遺伝子異常の解析. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
 27. 堤 修一, 王 凌華, 朴 明子, 照井君典, 佐々木伸也, 伊藤悦朗, 林 泰秀, 油谷浩幸. MLL再構成陽性の小児急性リンパ性白血病のエクソーム解析. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
 28. 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 川幡亮一郎, 永田安伸, 大久保淳, 真田 昌, 林 泰秀, 五十嵐隆, 宮野 悟, 小川誠司. 次世代シーケンサによる神経芽腫のエクソーム解析. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.26
 29. Shiba N, Taki T, Park M, Murata C, Oki K, Ichikawa H, Shimada A, Kanazawa T, Sotomatsu M, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. *NUP98-NSD1* fusion gene is strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML99 Cooperative Study Group. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego(ASH), December 9-13, 2011
 30. Taketani T, Taki T, Fukuda S, Hyuga M, Onishi C, Yamaguchi S, Hayashi Y. The Concurrent mutations in hematological malignancies with *NUP98*-fusion genes are associated with clinical prognosis. 53rd Annual Meeting of the American Society of Hematology(ASH), San Diego, December 9-13, 2011
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

平成 23 年度班会議

第 1 回 平成 23 年 11 月 4 日

名古屋(国立病院機構名古屋医療センター)

平成 23 年度 JPLSG TAM 委員会

第 7 回 平成 23 年 6 月 18 日

名古屋(国立病院機構名古屋医療センター)

第 8 回 平成 23 年 11 月 5 日

名古屋(国立病院機構名古屋医療センター)

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

平成 23 年度第 1 回 TAM 班会議

平成 23 年 11 月 4 日 (15 時 45 分～17 時 15 分)

国立病院機構名古屋医療センター

座長：伊藤悦朗(弘前大学小児科)

1) 患者由来 iPS 細胞を用いたダウン症候群における造血障害の解析

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞プロセッシング分野
望月 慎史

2) TAM 芽球の増殖・分化に及ぼす造血因子と造血微小環境の影響

東京歯科大学市川総合病院臨床検査科 宮内潤

3) ヒト化マウスを用いた TAM の病態解析

才田聡¹⁾、渡邊健一郎¹⁾、加藤格¹⁾、森嶋達也¹⁾、平松英文¹⁾、梅田雄嗣¹⁾、
足立壮一²⁾、照井君典³⁾、伊藤悦朗³⁾、佐藤亜以子⁴⁾、小川誠司⁴⁾、
中畑龍俊⁵⁾、平家俊男¹⁾

1)京都大学小児科、

2)京都大学医学研究科人間健康科学系専攻

3)弘前大学小児科

4)東京大学医学部附属病院 がんゲノミクスプロジェクト

5)京都大学物質-細胞統合システム拠点 iPS 細胞研究センター

座長：林泰秀(群馬県立小児医療センター)

4) TAM にみられた GATA1 の内部欠損変異の機能解析

伊藤悦朗¹⁾、土岐力¹⁾、金崎里香¹⁾、王汝南¹⁾、照井君典¹⁾、前田美穂²⁾、
金兼弘和³⁾、遠藤幹也⁴⁾、足立壮一⁵⁾、林泰秀⁶⁾、
小林枝里⁷⁾、清水律子⁷⁾、山本雅之⁷⁾

1)弘前大学小児科、2)日本医科大学小児科、3)富山大学小児科、

4)岩手医科大学小児科、5)京都大学医学部人間健康科学科、

6)群馬県立小児医療センター、7)東北大学医学部医化学

5) TAM と AMKL の全エクソン解析

東京大学・分子遺伝学(Cancer Board) 吉田健一、小川誠司、他

6) TAM-10 の進捗状況

帝京大学小児科 菊地 陽

第7回 JPLSG TAM 委員会

2011年6月18日 12時10分～13時30分

会場:名古屋医療センター 第一会議室

1. 厚生労働省難治性疾患克服研究事業について

厚生労働省難治性疾患克服研究事業の報告があり、今期は3年目で区切りをつける時期にあたり、来年度以降は小児の造血障害の研究班をいくつかまとめた研究が申請される予定であることが報告された。

2. TAM-10 の進捗状況

現在までに2例の登録があり、中央診断に関しては今までのところ、おおむね順調に行われていることが報告された。

3. 中央診断で提出された検体の返却に要する費用について

この費用については林班で負担することで合意された。

4. 新生児科に対するアンケート調査の解析結果の発表

オブザーバー参加の成育医療センター新生児科塚本医師から、全国の新生児診療施設に対する TAM アンケート調査の解析結果が報告された。2006年から2009年の間に136例の TAM 症例が報告されたが、日本小児血液学会の学会登録がなされていたのは45例で全体の33%であった。TAMはDown症全体の8.6%にみられ、早期死亡例はTAM全体の24%で、従来の報告と変わらない割合であった。日本小児血液学会への登録率が低く、今後も新生児領域としてデータ収集を継続する必要があることが確認された。また、小児血液学会雑誌2011年8月号に掲載予定の TAM 診療の手引きの別冊を全国の新生児診療施設に送付することが決定された。

第 8 回 JPLSG TAM 委員会

2011 年 11 月 5 日 13 時 00 分～13 時 30 分

会場:名古屋医療センター 臨床研究センター 3 階 カンファレンスルーム

1. TAM-10 登録症例 フローシート記載内容の検討

TAM10 登録症例が 10 例について各症例のフローシートについて記載内容の検討を行った。GATA1 変異解析、フローサイトメトリ法による MRD 解析、形態診断などの中央診断がきわめてうまく機能していることが確認された。登録例 10 例のなかには、少量シタラビン介入例 3 例、早期死亡例 1 例、TAM 診断困難例 1 例が認められた。今後も定期的に登録症例について、委員会でフローシートの記載内容の検討を行うことが確認された。

2. JPLSG TAM 委員改選について

来年度の TAM 委員改選について JPLSG 全体として、各委員会の活動内容に応じて委員数を調整する方向であること、グループ枠が減少し、公募枠が増加する方向性であることが報告された。

Ⅱ. 分担研究報告書

ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の遺伝子変異による
病型分類に関する研究

研究分担者 伊藤悦朗 弘前大学大学院医学研究科小児科

研究要旨: 平成23年度は、我々が見出した2種類の GATA1 内部欠失変異 (GATA1ID) について解析を進めた。GATA1 遺伝子の突然変異が、TAM および ML-DS のほぼ全症例で検出される。突然変異の結果、ほとんどの TAM や ML-DS 細胞では N 末端の転写活性化ドメイン (最初の 83 アミノ酸) を欠く short form の GATA1 蛋白 (GATA1s) のみが発現している。我々は、最近、2種類の GATA1 内部欠失変異 (GATA1ID) を6例の TAM 患者で見出した。多くの GATA1 変異は第2エクソンに存在するが、これらの症例では、2から21塩基の挿入あるいは欠失が第3エクソンに存在し、alternative splicing が生じていた。その結果、129あるいは45塩基の欠失が起こり、84番目のメチオニンを含む43 (GATA1 ID type-1)あるいは15アミノ酸の内部欠損 (GATA1 ID type-2) が生じていた。さらに、GATA1 ID type-1 と GATA1 ID type-2 を ML-DS 細胞株や GATA1 の発現を欠いたマウスの胎児巨核球前駆細胞にレトロウイルス・ベクターを用いて発現させても、GATA1s と同様に、その増殖を抑制できなかった。大変興味深いことに、これらの GATA1 変異蛋白はいずれも、正常な赤血球造血に不可欠な GATA1 の Rb 結合モチーフを欠いていた。TAM に自然に生じた新たな GATA1 変異、GATA1ID の発見は、TAM 発症の仕組みの解明に重要なヒントを与えてくれると思われる。

A. 研究目的

本研究の目的は、ダウン症候群に伴う TAM の遺伝子解析を行い、治療介入が必要な重症 TAM を抽出するための精度の高い診断基準と治療指針を作成することである。

B. 研究方法

これまでに全国から弘前大学小児科に集められた100例以上の TAM の臨床検体の遺伝子解析を行った。末梢血から DNA および RNA を抽出し、TAM のほとんどの症例で遺伝子変異が検出される GATA1 変異を解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析は、弘前大学医学部倫理委員会の承認を得て、本人あるいは両親の同意の上実施した。

C. 研究結果

2003年から2010年までに106例の TAM の臨床検体を収集し、GATA1 遺伝子の解析を行った。GATA1 変異はそのうち99例に検出された。GATA1 cDNA の

解析では、ほとんどが N 末端の83アミノ酸を欠いた GATA1 蛋白 (GATA1s) のみが発現する変異であった。しかし、6例の TAM 患者で、129塩基あるいは45塩基が in frame で欠失し、84番目のメチオニンを含む43 (GATA1 ID type-1)あるいは15アミノ酸の内部欠損 (GATA1 ID type-2) 蛋白が発現していると推定された。Western blot 解析により、GATA1 ID type 1 変異をもつ2例の TAM 細胞で、GATA1 ID 蛋白の発現を確認することができた。次に、genomic DNA の解析から、これらの症例では、2から21塩基の挿入あるいは欠失が第3エクソンに存在することが明らかになった。GATA1 遺伝子の mini-gene を用いた遺伝子導入実験を用いて、これらの症例では変異のために alternative splicing が生じていることが証明された。

GATA1 ID の機能解析を解析するために、一過性の遺伝子導入実験を試行した。その結果、GATA1s は、転写活性化能が正常の GATA1 に比べ約60%に低下していたが、GATA1 ID は活性低下は認められなかった。さらに、GATA1 ID を ML-DS 細胞株や GATA1 の発現を欠いたマウスの胎児巨核球前駆細胞にレト