

新たに合成された娘染色体にのみ BrDU が取り込まれるが、Bloom 症候群の患者に由来する細胞では、SCE の亢進によって、2 本鎖の染色体双方に BrDU の取り込みを認める。SCE の検査は保険適応が無く、検査方法が煩雑で、高度な技術を要することから、簡便に患者をスクリーニングする方法の開発が望まれている。

そこで本研究では、上記 SCE 検出法と同等の精度で、簡便かつ短時間で診断可能な、Bloom 症候群のスクリーニング法を開発することを目的として、フローサイトメトリーによる特異抗体を用いた BLM 蛋白の検出法と、フローサイトメトリーによる SCE の解析法について検討する。本研究で目指す、Bloom 症候群スクリーニング法開発によって、迅速な診断が可能となれば、その QOL 向上に寄与することが期待される。

B. 研究方法

ヒト Bloom 症候群患者由来 Epstein-Barr virus (EBV) 形質転換 B リンパ芽球様株 BSL2KA (JCRB 細胞バンク JCRB1042) は独立行政法人医薬基盤研より購入した。対照として、非 Bloom 症候群患者由来 EBV 形質転換 B リンパ芽球様株 ER (札幌医大病理学教室より分与) を用いた。細胞株は、10%ウシ胎仔血清添加 RPMI1640 培地中で、5%CO₂ 存在化で培養、経代した。Bloom へリカーゼ (BLM) に対する抗体として、1) ウサギ抗 BLM ポリクローナル抗体 (Abcam 社 ab86664)、2) マウス抗 BLM モノクローナル抗体 (クローン BFL-103、SantaCruz 社)、3) 同 (クローン 4i317、SantaCruz 社) を用いた。フローサイトメトリーによる Bloom 蛋白の検出法として、 1×10^6 個の細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、IntraPrep 細胞膜透過処理試薬 (ベックマンコールター) を用いて処理し、100 μ L の PBS 中で 1 μ g の抗 BLM 抗体と 4°C で 30 分反応させ、PBS で洗浄したのち、さらに 100 μ L の PBS で希釈した Phycoerythrin 標識の抗マウスあるいは抗ウサギ抗体 (Jackson ImmunoResearch Inc.) と上記と同様の条件で反応させ、洗浄後、500 μ l のシース液 (アイソフロー、ベックマンコールター) に浮遊させ、フローサイトメトリー (FC500、ベックマンコ

ールター) を用いて測定した。

blm 遺伝子の発現は total RNA 100ng から逆転写反応 (ReverTra Ace qPCR RT Master Mix、東洋紡) で合成した cDNA をテンプレートとして、fwd 5'-gtcactctcaagaagcttg-3', rev 5'-aggctgaactggatccaatg-3' のプライマーセットを用いて、polymerase chain reaction (PCR) によって検出した。

フローサイトメトリーによる SCE の解析法の確立を目的として、Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay Kit (ライフテクノロジーズ) を用いて、ヒト白血病細胞株 K562 (JCRB 細胞バンク JCRB0019) を thymidine の analog である 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) 10 μ M 添加 2 時間培養して合成された DNA をラベルし、さらに Colcemid 0.2 μ g/ml 存在下 12 時間培養によって、M 期に同調させた後、細胞を回収し、アジ化ナトリウムを結合させた蛍光色素 Alexa Fluor® 647 を添加して、EdU に結合させた。さらに、低張処理溶液 (50mM KCl, 10mM MgSO₄, 5mM HEPES, 0.25mg/ml RNase, 3mM Dithiothreitol, 0.25% Triton-X 100) によって、染色体を分離、調整し、等量の Propidium iodide (PI) 溶液 (PI 50 μ g/ml, 75 mM KCl) を加えて染色体を染色後、フローサイトメトリーによって解析した。

(倫理面への配慮)

関連法規を遵守し、検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って実施した。

C. 研究結果

昨年度までに検討してきた、フローサイトメトリーによる特異抗体を用いた BLM 蛋白の検出法について検討をさらに進め、その特異性に関して、ヒト Bloom 症候群患者由来細胞株を用いて検討した。まず、PCR によって *blm* 遺伝子の mRNA の発現を確認したところ、非 Bloom 症候群患者由来 EBV 形質転換 B リンパ芽球様株 ER では mRNA の発現を認めたが、ヒト Bloom 症候群患者に由来する EBV 形質転換 B リンパ芽球様株 BSL2KA では発現を認めず、BSL2KA が *blm* 遺伝子の発現を欠くことが確認された。そこで、両者の細胞を用いて、フローサイトメトリーにより、BLM 蛋白の検出を行なった結果、クローン BFL-103 を用

いた場合、非 Bloom 症候群患者由来株では陽性シグナルが得られたが、ヒト Bloom 症候群患者由来株では陽性シグナルを認めず、この抗体の反応の特異性が確認された（図 1）。一方、クローン 4i317 を用いた場合には、双方の細胞で陽性シグナルが検出されたため、特異性に問題がある可能性が考えられた。また、新たにフローサイトメトリー検出用として発売されたウサギ抗 BLM ポリクローナル抗体（Abcam 社 ab86664）を用いて同様の検討を行ったが、非 Bloom 症候群患者由来株で非常に強い陽性シグナルが得られたものの、Bloom 症候群患者由来株でも明らかな陽性シグナルを認めたことから、やはり特異性に関して問題があることが示唆された。

昨年度、採血直後より、24 時間常温で保管した後、あるいは採血直後に単核球を分離して 24 時間培養したあとの方が、BLM 蛋白の発現が高くなる可能性が示唆されたため、定性 PCR によって、遺伝子発現レベルでの差について検討したが、明らかな差は認められなかった。今後定量 PCR によりより厳密な遺伝子発現量の変化について検討を進める他、遺伝子発現の増加以外の機構による蛋白検出量の増加の可能性についても検討を行う。

フローサイトメトリーによる SCE の解析法開発については、BrDU に変わる thymidine analog として、EdU を用いた検出法の確立を目指した。EdU は、抗体を用いずに蛍光標識可能であることから、特異抗体を用いた BrDU の検出に必要な DNA の部分変性処理が不要であるため、簡便に合成 DNA を標識、検出できる。EdU をあらかじめ取込ませ、M 期に同調させた K562 細胞を膜透過処理後に、アジ化ナトリウム付加 Alexa Fluor® 647 を添加し、取込まれた EdU を標識してフローサイトメトリーにより検出可能であることを確認した。さらに、この細胞から、低調処理によって染色体を分離し、PI で染色体全体を標識し、フローサイトメトリーを用いて解析したところ、染色体を EdU と PI で二重に染色し、フローサイトメトリーにより検出することが可能であることが確認された。PI で標識された染色体のピークのうち、特定のピークのみを選択して、EdU のシグナルをみたところ、陰性と陽性の 2 つのピークが確認された（図 2）。陰性のピ

ークは DNA 合成の際に鋳型となった染色体を、陽性ピークは新たに合成された際に、EdU が取込まれた娘染色体を、それぞれ検出しているものと考えられた。

D. 考察

今回は、Bloom 症候群患者由来の細胞株を用いた検討により、最も効率的、かつ、特異的に BLM 蛋白をフローサイトメトリー法によって検出できるマウス単クローン性抗 BLM 蛋白抗体を選定した。今後、さらに例数を増やし、臨床検体、あるいは Bloom 患者由来細胞株を用いて、イムノプロット法による蛋白定量などとの比較検討を行なうことにより、フローサイトメトリーでの BLM 蛋白の検出法の特異性、信頼性についてさらに確認を行なう。フローサイトメトリーによる BLM 蛋白の検出は非常に簡便な方法で、迅速に結果を得ることができるため、この測定法の特異性について信頼性が確認できれば、Bloom 症候群の簡易スクリーニング法として非常に有望と期待される。

一方、フローサイトメトリーによる SCE 解析法については、今後さらに検出方法についての至適な条件の検討が必要である。今回は、PI での染色体の単染色によって、各染色体の分画を試みたが、Hoechst と ChromomycinA3 での二重染色法を用いれば、より厳密な個々の染色体の分画が可能であるため、今後その方法について検討を進める。さらに、Bloom 由来細胞株を用いて検討を行い、この方法によって実際に SCE の増加を検出することが可能か否か、確認が必要である。すなわち、今回検出可能であった EdU の陰性と陽性の 2 つのピークの間、SCE によって生じる中間のピークを検出することが可能かどうか検討を行う必要がある。しかし、この方法が確立されれば、より迅速、かつ簡便に SCE の増加の有無を解析することが可能となる。SCE の解析は、機能的な解析法であり、現時点では Bloom 症候群の診断法として最も信頼性の高い方法であるので、今後さらに検討を進めてその実用化を目指す。

E. 結論

Bloom 症候群の簡易スクリーニング法として、フローサイトメトリーによる BLM 蛋白検出法の確立を試

みた。様々な抗体について、Bloom 症候群患者由来の細胞株を用いた検討により、検出に最も適した抗体 BFL-103 を選択した。さらに適切な検出条件を設定すれば、Bloom 症候群患者白血球における BLM 蛋白の欠如をフローサイトメトリー法によって簡便に判別可能であると考えられ、簡易スクリーニング法への応用が可能と期待される。一方、フローサイトメトリーによる SCE 解析法についても、今回の検討によってその確立の可能性が示されており、Bloom 症候群の簡便で確実な診断法として応用するために今後さらに検討を進める。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当無し

2. 学会発表

富田理，三春晶嗣，飯島一智，小林健一郎，大喜多肇，金子英雄，清河信敬. Bloom 症候群簡易スクリーニング法としての末梢血白血球 Bloom 蛋白検出の試み. 第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会，大阪，6 月 29 日-30 日，2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

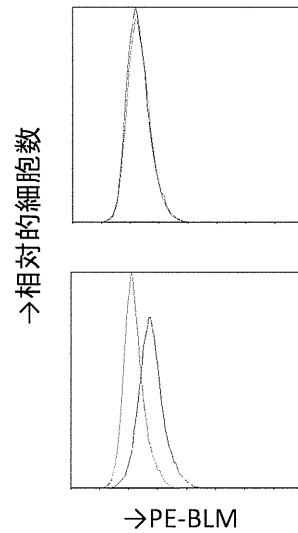
該当無し

3. その他

該当無し

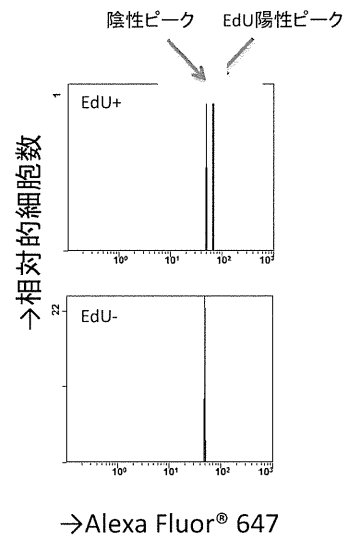
図 1

フローサイトメトリーによる BLM 蛋白の検出



上段:Bloom 症候群由来細胞株、下段:非 Bloom 症候群由来細胞株

図 2



EdU を取込ませた場合、陰性のピーク(鋳型となった DNA)と、EdU 陽性のピーク(新たに合成された娘染色体)の 2 つのピークが認められる。SCE の亢進により、両者の中間のピークの出現が予測される。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

遺伝子修復異常症（Bloom 症候群、Rothmund-Thomson 症候群、RAPADILINO 症候群、Baller-Gerold 症候群）の実態調査、早期診断法の確立に関する研究

T 細胞分化障害評価のためのクローンサイズ解析

研究分担者 谷内江昭宏 金沢大学医薬保健研究域医学系小児科 教授

研究要旨 Bloom 症候群その他の新たな症例の追加はないが、現在 Bloom 症候群一例について、臨床経過と免疫能の変化を追跡している。追跡の指標は T 細胞多様性とオリゴクローナルな活性化である。いずれも、FCM 法による細胞表面抗原解析を手法としている。

Bloom 症候群における免疫異常は、易感染性としては現れることが少ないが、染色体脆弱性と併せて、将来の発癌との関連が強く示唆される。本疾患における T 細胞多様性解析の対照として、種々の T 細胞分化障害、自己免疫疾患などにおける同様の解析データが有用であり、成果を蓄積している。

特に、DiGeorge 症候群における解析では、著しい T 細胞分化障害とそれによるオリゴクローナルな T 細胞活性化が、Omenn 症候群類似の病態発現と強く関連していることが示された。

A. 研究目的

遺伝子修復異常症においては、その機能障害から様々な程度のリンパ球分化障害を合併することが予想される。

これまでに、Ataxia telangiectasia (AT) ならびに Bloom 症候群における T 細胞分化障害を TCR V β repertoire 解析を用いた T 細胞クローンサイズ評価により比較検討してきた。これまでの検討では、AT では強いクローンサイズの低下と T 細胞分化障害が進行するのに比べ、Bloom 症候群では分化異常がきわめて緩やかに進行することを示してきた。

今回の研究では、Bloom 症候群患者における分化異常の進行を評価すると同時に、最も強い分化障害を示す Omenn 類似症候群との比較を試みた。

B. 研究方法

対象：当科ならびに共同研究施設で経過観察している AT 症例 2 例。Bloom 症候群 2 例。Omenn 症候群ならびに Omenn 症候群類似疾患 5 例。Omenn 症候群類似疾患には、complete DiGeorge 症候群、X-SCID が含まれる。

方法：末梢血リンパ球亜群分布、ならびに TCR V β repertoire 分布は FCM 法により行った。

倫理面への配慮：本研究における遺伝子解析の施行にあたっては、文部科学省、厚生労働省ならびに経済産業省より告示された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、学内倫理審査委員会の審査を得ることとする。さらに、本研究における遺伝子解析ならびにリンパ球解析に際して研究の内

容ならびに以下の確認事項をあらかじめ書面により説明し、本人あるいは家族の承諾を書面により得るものとする。

C. 研究結果

1 ; 末梢血リンパ球亜群解析

Omenn症候群、Omenn症候群類似症例などでは、例外なくCD45RO陽性メモリー T細胞の著明な増加を認め、CD45RO陰性ナイーブ T細胞は欠如していた。一方、Bloom症候群の2例では、少なくとも10代半ばまではほぼ年齢相応の T細胞分布を示した。AT症例では、ナイーブ T細胞の相対的減少が進行していた(図1)。

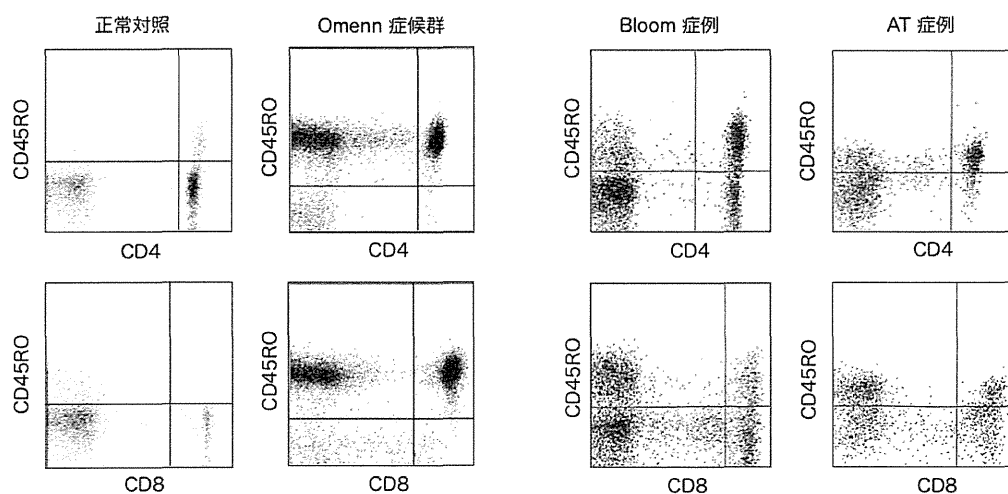


図1 ; 末梢血リンパ球亜群分布の比較

2 ; TCR Vβ repertoire 分布解析

正常対照では、CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞のいずれにおいても、多様性のあるVβ repertoire分布が観察され、特定のクローンの選択的増殖を示唆する所見は得られなかった。一方、Omenn症候群などのT細胞分化障害を示す疾患では、多様性の欠如と特定の限られたクローンの著明な増殖が示唆された。Bloom症候群では、このようなTCR Vβ

repertoire分布の異常はほとんど認めなかった、しかしATでは、一部の repertoire の増加が観察され、多様性に制限が加わっていることが示唆された(図2)。

3 ; リンパ球亜群分布の経時的変化

Bloom症候群患者で、加齢に伴うリンパ球亜群分布の経時的変化を解析しているのは1名のみである。そのデータを図3に示す。10代では、その分布はほぼ正常で、T細胞のクローンサイズ縮小を示唆するような亜群分布の異常は観察されなかった。一方、20代に入るとメモリーT細胞亜群の減少が観察された。しかし、この時点でもTCR Vβ repertoire分布はほぼ正常であり、少なくとも

著しいレベルのクローンサイズ縮小やオリゴクローナルなT細胞活性化は認められなかった(データ示さず)。

D. 考察

AT症例においては naïve T細胞の減少やTCR Vβ repertoire 分布の異常という、T細胞分化障害を反映する所見が認められた。一方、

Bloom 症候群においては、10 代ではこれらの手法により検出できるレベルでの明らかな異常は認められなかった。しかし解析対象とした 2 例の内 1 例は、20 代になって以降、急速に naïve T 細胞比率の減少を示している。この減少が一過性的な変化なのか、thymic output の減少を伴う T 細胞クローンサイズの

E. 結論

TCR 構造解析は T 細胞分化障害の検出に有用であるが、Bloom 症候群においては、早期には明らかな異常は見出されず、進行性に多様性が縮小する可能性が示唆された。

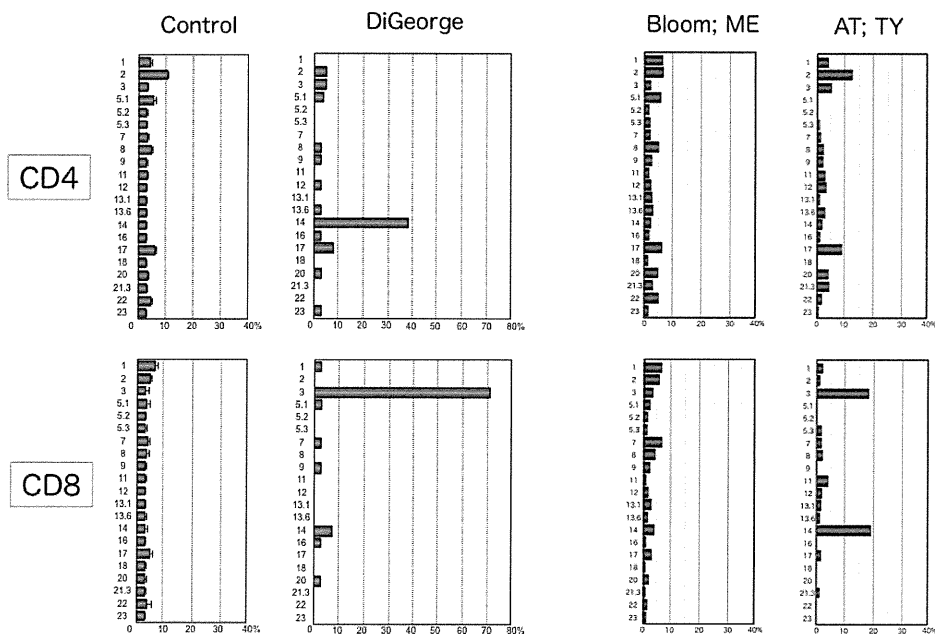


図 2 ; TCR Vβ repertoire 分布の比較

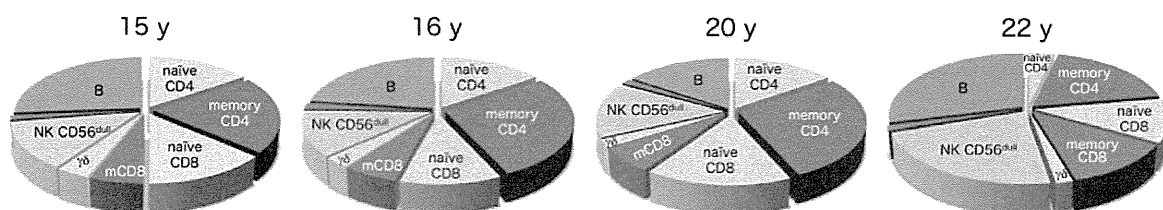


図 3 ; Bloom 症候群症例におけるリンパ球亜群分布の経時的変動

減少を反映しているのかについて、今後注意して経過観察する必要がある。いずれにしても、FCM を駆使した T 細胞多様性とクローンサイズの評価は、AT や Bloom 症候群などの染色体脆弱性を示す遺伝性疾患における免疫病態評価に有用であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawai T, et al. Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. J Clin Immunol 2012; 32: 690-697.

2) Ohta K, et al. Evaluation of T-cell receptor diversity in pediatric patients with minimal change nephritic syndrome. Clin Nephrol 2012; 77: 296-304.

2. Vu QV, et al Clinical and immunophenotypic features of atypical complete DiGeorge syndrome. Pediatr Int 2012, in press.

3. Kanegane H, et al. Successful bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. Pediatr Transplant 2012, in press.

2. 学会発表

1. 和田泰三、ブクワン、東馬智子、谷内江昭宏、田嶋華子、前田美穂、田中理砂、大石勉 Omenn 症候群様症状を呈した完全型 DiGeorge 症候群 2 例の解析 第 6 回日本免疫不全症研究会 2013年1月 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

Bloom 症候群の分子病態・構造解析研究

研究分担者 加藤善一郎 岐阜大学大学院医学系研究科小児病態学 臨床教授

研究要旨

遺伝子型—表現系相関解析について、大腸菌システムを用いた発現系の確立を行い、ヘリカーゼドメイン等を精製し、構造機能相関解析を行うことを目的とした。大腸菌システムにおける発現・精製は可能となっているが、立体構造解析までには至っておらず、今後、さらにシステムの改良が必要と考えられた。これまで関連が指摘されていない変異・多型についても、そのリスクが考慮される必要があり、遺伝子変異をもつヒトキャリアを含めた医療の確立において、BLM タンパクにおける変異の影響について、さらなる機能・構造解析が必要である。

共同研究者

金子英雄(国立病院機構 長良医療センター臨床研究部)

A. 研究目的

Bloom syndrome (BS)は、まれな遺伝子疾患であるが、小人症、日光過敏、色素沈着、免疫不全などにより特徴づけられる。BSに罹患したヒトでは、発がん性が高く、平均寿命は20歳代と予後不良である。

BSは、DNAヘリカーゼをコードするBLM遺伝子変異により発症し、BSに関連した多くの変異は、ストップコドン・フレームシフトなどであるが、ミスセンス変異・遺伝子多型も報告されており、遺伝子変異キャリアのヒトでは発がんリスクの上昇が認められている。しかし、遺伝子型—表現系相関解析については、未だ十分でなく、より詳細な検討として、遺伝子産物であるBLMタンパクにおける変異による影響についての解析を目的とした。

B. 研究方法

BLM遺伝子を用いたリコンビナントタンパク産生システムの確立と、発現精製したタンパクを用いた機能解析・構造解析を実施する。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

これまでに大腸菌システムを用いた発現系の確立を行い、ヘリカーゼドメイン等を精製することが可能となってきている。しかしながら、立体構造解析を行うに必要な大量発現精製系までには至っておらず、今後、さらにシステムの改良が必要と考えられた。

D. 考察

これまでに、構造解析が行われた他のヘリカーゼタンパクの立体構造を用いた構造解析では、配列の同一性は低いものの、構造及び機能的な面は保存されている。これらの構造をもとにしたBLMヘリカーゼドメインのモデル構造と細胞内機能実験にも基づくと、これまで、BSとの関連性が報告されていない遺伝子多型においても、その疾患関連性を強く示唆する結果が得られており、今後、遺伝子多型を含めた、機能・構造相関解析が重要と考えられた。

E. 結論

現時点では明らかでない、遺伝子型—表現系相関解析について、遺伝子変異キャリアを含めた医療の確立において、BLMタンパクにおける変異による影響についての機能解析・構造解析を引き続き継続する必要性がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nada M, Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Kamatari YO, Tsutsumi N, Shirakawa M, Kondo N. Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling. *Mol Immunol.* 52, 108-116, 2012

Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, Kato Z, Kaneko H, Kondo N. A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* 129, 578-580, 2012

Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Funasaka T, Nakano H, Wong RW, Shirakawa M, Kondo N. TRAM Is Involved in IL-18 Signaling and Functions as a Sorting Adaptor for MyD88. *PLoS One.* 7, e38423, 2012

Ohnishi H, Teramoto T, Iwata H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Nishikomori R, Kaneko H, Seishima M, Kondo N. Characterization of NLRP3 variants in Japanese cryopyrin-associated periodic syndrome patients. *J Clin Immunol.* 32, 221-229, 2012

Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Matsui E, Murase K, Kanoh H, Kato Z, Kaneko H, Seishima M, Kondo N. In Vitro Analysis of the Functional Effects of an NLRP3 G809S Variant with the co-Existence of MEFV Haplotype Variants in Atypical Autoinflammatory Syndrome. *J Clin Immunol.* Epub 2012 sep 27.

加藤善一郎, 大西秀典, 近藤直実: 自己炎症性疾患 1. 自己炎症性疾患 総論. 自己炎症性疾患・自然免疫不

全症とその近縁疾患. 62-66, 診断と治療社, 2012

加藤善一郎, 大西秀典, 近藤直実: 自然免疫不全症 4. ヒトパピローマウイルス易感染症 (WHIM 症候群・疣贅状表皮発育異常症). 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患. 115-116, 診断と治療社, 2012

加藤善一郎, 近藤直実: 分子標的治療とその機序. アレルギー疾患の免疫療法と分子標的療法. 21-26 診断と治療社, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

遺伝子修復異常症（Bloom 症候群、Rothmund-Thomson 症候群、RAPADILINO 症候群、Baller-Gerold 症候群）
の実態調査、早期診断法の確立に関する研究

RAPADILINO 症候群、Baller-Gerold 症候群の全国調査

研究分担者 金子英雄（国立病院機構長良医療センター 臨床研究部長）

研究分担者 山崎直也（国立がんセンター 皮膚腫瘍科 科長）

研究要旨：Rothmund-Thomson 症候群の類縁疾患として、RAPADILINO 症候群、Baller-Gerold 症候群が知られている。しかし、本邦での実態は不明であった。本研究班で二つの症候群の全国調査を行った。RAPADILINO 症候群 1 例、Baller-Gerold 症候群 2 例（兄弟例）の報告があった。橈骨欠損、母指欠損などの臨床症状から診断がなされていた。RECQL4 遺伝子検索はされていなかった。臨床症状に加えて RECQL4 遺伝子検査等により診断の精度を高める必要がある。これらの疾患は RECQL4 異常症として、Rothmund-Thomson 症候群も含めて 3 疾患を包括して整理が可能であると考えられた。

A. 研究目的

本研究の目的は、RAPADILINO 症候群、Baller-Gerold 症候群に関して、今まで明らかになっていなかった本邦の患者数、QOL 等を明らかにし、診断指針を作製し普及させることで、患者の QOL の向上、生命予後の改善を図ることである。RAPADILINO 症候群は、以下の特徴を有する。橈骨欠損・低形成（radial hypoplasia/aplasia）、膝蓋骨低形成（patella hypoplasia）、口蓋の低形成、口蓋裂（cleft palate）、慢性の下痢（diarrhea）、関節の脱臼（dislocated joints）、小柄な体型（little size）、四肢の奇形（limb malformation）、細長い鼻（nose slender）、正常な知能（normal intelligence）、多形皮膚萎縮は認められない。高率に骨肉腫等の癌腫の合併が認められる。一方、Baller-Gerold 症候群は、以下の特徴が認められる。冠状縫合の早期癒合による短頭、前頭の突出、眼球の突出、耳介低位、橈骨欠損、母指の欠損、多形皮膚萎縮症、骨肉腫、皮膚癌、悪性リンパ腫の合併を認める。これら二つの症候群は、一般の小児科医にはあまり認知されていないと考えられる。本邦における実態把握のために二次アンケート調査を実施した。

B. 研究方法

一次アンケートで報告あった施設は、RAPADILINO 症候群 3 施設、Baller-Gerold 症候群 1 施設であった。この施設に二次調査票を送り、最終的に RAPADILINO 症候群 1 例、Baller-Gerold 症候群 2 例（兄弟例）の回答を得た。

C. 研究結果

RAPADILINO 症候群の報告は、13 歳女性であった。小柄な体型が認められた。

	生下時	6 歳	12 歳
体重	2.49 K g	12 K g	25 K g
身長	46 c m	97 c m	127 c m

橈骨形成異常、母指低形成が認められた。1 歳時に難聴を指摘。現在、特別支援学級に通学。IQ 81（12 歳時）であった。アトピー性皮膚炎の合併を認めた。RECQL4 遺伝子解析未施行であった。

Baller-Gerold 症候群の兄弟例は以下の様であった。
3 歳 男性（兄）
頭蓋早期癒合（手術施行）、母指低形成、低位鎖肛（手術施行）、鼻涙管位置異常（手術施行）を認めた。

一過性顔面神経麻痺を合併した。発達の遅れはなかった。

	生下時	1歳9か月	3歳9か月
体重	3.2K g	12K g	14.9K g
身長	51 c m	84.5 c m	94.5 c m

RECQL4 遺伝子の検索は未施行（琉球大学に依頼中）

1歳 男性（弟）

頭蓋早期癒合（手術予定）、母指低形成、左眼瞼下垂を認めた。発達の遅れはなかった。

	生下時	6か月	1歳
体重	2.52K g	6.15K g	7.30K g
身長	48 c m	65.3 c m	70.5 c m

RECQL4 遺伝子の検索は未施行（琉球大学に依頼中）。

兄弟とも、頭蓋早期融合、母指低形成、全身骨 X-P 所見より診断されていた。

D. 考察と結論

RPADILINO 症候群 1 例、Baller-Gerold 症候群 2 例の報告があった。橈骨欠損、母指欠損などの臨床症状から診断がなされていた。RECQL4 遺伝子検索はされていなかった。今後、臨床症状に加えて RECQL4 遺伝子検査等により診断の精度を高める必要があると考えられた。これらの疾患は RECQL4 の遺伝子を検索した後、RECQL4 の遺伝子異常がある場合は RECQL4 の遺伝子異常症として、Rothmund-Thomson 症候群、RPADILINO 症候群、Baller-Gerold 症候群の 3 疾患を包括して整理、分類すべきと考えられた。

E. 研究発表

論文発表

和文

1. 黒岡定浩、並川健二郎、堤田 新、田中亮多、加藤潤史、山崎直也。当科における過去 10 年の乳房外 Paget 病に対する治療経験。日本皮膚科学会雑誌, 2012, 122:2891-97
2. 堤田新、並川健二郎、山崎直也、加藤潤史、田中亮多。メラノーマにおける腋窩センチネルリンパ節転移陽性例に対する郭清範囲: 国立がん

研究センター中央病院皮膚腫瘍科における検討。Skin Cancer, 2012, 27:215-217.

欧文

- 1) Namikawa K, Yamazaki N, Nakai Y, Ihn H, Tomita Y, Uhara H, Takenouchi T, Kiyohara Y, Moroi Y, Yamamoto Y, Otsuka F, Kamiya H, Iizuka H, Hatta N, Kadono T. Prediction of additional lymph node positivity and clinical outcome of micrometastases in sentinel lymph nodes in cutaneous melanoma: A multi-institutional study of 450 patients in Japan. J Dermatol, 2012, 39:130-7.
- 2) Uhara H, Yamazaki N, Takata M, Inoue Y, Sakakibara A, Nakamura Y, Suehiro K, Yamamoto A, Kamo R, Mochida K, Takenaka H, Yamashita T, Takenouchi T, Yoshikawa S, Takahashi A, Uehara J, Kawai M, Iwata H, Kadono T, Kai Y, Watanabe S, Murata S, Ikeda T, Fukamizu H, Tanaka T, Hatta N, Saida T: Applicability of radiocolloids, blue dyes and fluorescent indocyanine green to sentinel node biopsy in melanoma. J Dermatol, 2012, 39:336-338.

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Rothmund-Thomson 症候群の Clinical utility gene card に関する検討

研究分担者 深尾敏幸

(岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科/大学院医学系研究科小児病態学 教授)

研究要旨

ヨーロッパにおいて EuroGentest の遺伝学的検査の臨床的有用性が個々の疾患について示されている。Clinical utility gene card という名称で専門家によって作成され Eur J Hum Genet に公表されている。本年 Rothmund-Thomson 症候群についても公表され、本邦においても有用な情報源になると考え、その内容について検証した。

A. 研究目的

ヨーロッパにおいて EuroGentest の遺伝学的検査の臨床的有用性が個々の疾患について示されている。Clinical utility gene card という名称で専門家によって作成され Eur J Hum Genet に公表されている。本年 Rothmund-Thomson 症候群についても公表され、本邦においても有用な情報源になると考え、その内容について検証した

B. 研究方法

Eur J Hum Genet に公表された内容について要約を行った。

C. 研究結果

以下は要約である。

1. 疾患特徴

遺伝子変異のスペクトラム

RECQL4 遺伝子の両アレルの変異は Rothmund-Thomson (RTS) 症候群、関連する RAPADILINO 症候群、Baller-Gerold 症候群と関連する。60 以上の疾患変異が同定され、その少なくとも 40 は RTS 患者で同定された。変異の種類は多い方からナンセンス変異とフレームシフト変異、スプライシング部位の変異、スプライシング異常をきたすイントロンの短縮変異、ミスセンス変異であった。エクソン9の c.1573delT 変異は最もコモンな変異で、上述の3疾患で同定さ

れている。この変異は RTS の変異の約 1/3 を占め、種々の民族において複合ヘテロ接合として同定されている。

解析方法

RECQL4 遺伝子のすべてのエクソンとイントロンの両方向性のシークエンスをおこなう。

どちらかのアレルに変異が同定できないとき MLPA 法が行われるべきである。

通常染色体検査では、イソ染色体やモザイクのトリソミーと同様に染色体切断などが高頻度にみつか

解析の検証法

シークエンスの結果は異なるプライマーセットを用いて確認できる。新規ミスセンス変異については、同じ民族のコントロール少なくとも 100 名の解析をするか、もしくは in Silico の予測法によって確認しなければいけない。RT-PCR と cDNA シークエンスはスプライシング変異の確認やミスセンス変異でのスプライシングに与える影響をみるために行われる。

疾患の予測される頻度

不明である。非常に稀な疾患で、400 人に満たない論文報告数である。しかし疾患自体がよく知られておらず未診断例が多いであろう。

診断設定

(鑑別) 診断	はい
症状のない人の予知試験	いいえ
親族におけるリスク評価	はい
出生前診断	はい

コメント: RTS の主な診断徴候は poikiloderma (血管拡張病変、脱色素、色素沈着、点状萎縮の網状領域で、2 歳までに明らかとなる。最初顔その後四肢におこる最初紅斑状の発疹からの慢性的病変としてみられる。他の特徴は成長障害で、2/3 にみられ、子宮内発育遅滞として、そして生後は少なくとも -2 SD に沿った成長障害としてみられる。Poikiloderma をもつ遺伝性皮膚症が多いことを考えれば、症状のパターンを注意深く考慮すべきで、ほかのコモンの RTS の徴候と共存することを考慮する: それは放射線障害、成長障害そして疎毛である。Poikiloderma with neutropenia (PN) 症候群は RTS として多くの例が誤診されていたが、特異的な遺伝子テストで診断可能になっているが、臨床的に RTS と診断されている患者には依然として分子的な病因が不明なサブグループが存在する。そのようなものには poikiloderma と白内障が特徴で、骨異常をしばしば伴わないものが含まれる。ファンコニー貧血 (FA)、Werner 症候群 (WS)、Dyskeratosis congenita (DC) などとの部分的な臨床的 overlap は RECQ4 テストにより解決できる。しかし他の RECQ4-関連疾患、とくに RAPADILINO 症候群との鑑別はできない。Poikiloderma 様皮膚をもつ若年性骨肉腫のすべての症例にこのテストがなされるべきである。

2. 診断テストの特徴

1) 解析感度 解析方法による。

DNA テストがエクソンシーケンスに限らなければ感度は 95% 以上

2) 解析特異度

95% 以上

3) 臨床的感度

発症年齢、臨床的特徴は多様であるが、主な臨床的徴候は 2 歳までに出現する。シーケンス解析 (イントロンを含む) では、RTS と診断された ~66% に変異が同定される。この不十分な臨床的感度は、

(i) Locus heterogeneity (ii) プロモーター領域の変異 (iii) 遺伝子内もしくは遺伝子全体の欠失などによると考えられる。

4) 臨床的特異度

ほぼ 100%

5) 陽性臨床的中率

100%

浸透率 100%

幼少期の骨肉腫と成人期の皮膚癌の頻度が高いことにカウンセリングとサーベイランスが必要。しかしいくつかの変異は、臨床的に異なった合併症と易発癌性の PAPADILINO 症候群, Baller-Gerold 症候群と共通である。

6) 陰性臨床的中率

最初の症例の遺伝子検査が陽性で、その家族の臨床像のない人においては 100%

最初の症例の遺伝子検査がなされていない場合リスクのある家族メンバーは 2 歳までは検査しない。

3. 臨床的有用性

1) (鑑別) 診断

典型例は早発顔面 poikiloderma と放射線障害をもつ臨床的所見から正しい診断ができる。非典型例では、オーバーラップした特徴を持つ

PN (Poikiloderma with Neutropenia)

DC (Dyskeratosis Congenita)

WS (Werner syndrome)

との鑑別のため遺伝子テストを考慮すべきである。

PAPADILINO 症候群, Baller-Gerold 症候群を疑う症例でも同様である。正しい診断は症候群特異的腫瘍サーベイランスのために必要である。

他の診断法との費用対効果

遺伝学的検査は継続的、結論の出にくい臨床的評価を避けることができ。遺伝学的検査の費用対効果は高い、

遺伝学的検査により疾患管理が影響されるか はい
治療: パルス色素レーザー光凝固術による皮疹の血管拡張部を改善, GH 欠損を持つ症例の GH 療法, 幼少時の歯周囲炎治療, RECQL4 変異を持たない症例の

白内障, RECQL4 変異を持つ症例の骨肉腫や皮膚腫瘍の手術.

RECQL4 変異を持つ症例が DNA 障害剤に対して軽度の感受性を示すことから, 骨肉腫の放射線スクリーニングに対する放射線照射の潜在的リスクは議論のあるところである

他の染色体不安定性を持つ疾患の症例とは, 遺伝毒性をもつ薬剤への感受性はおなじではないので, 初期には通常量で治療すべきである. しかし注意は必要で, doxorubicin に対する高感受性には注意して, 粘膜炎の副作用に注意する必要がある. Cisplatin の毒性上昇は認められないので, doxorubicin の代わりに化学療法剤として置き換えられる.

標準的化学療法の骨肉腫の組織学的反応と臨床的転帰は RTS と RTS 以外の患者で同様で, 5 年生存率は 60-70% である. 治療後, 主に肺への転移や RTS でかなりの症例に見られる 2 次癌のための長いフォローアップが必要である.

予後

臨床徴候や RECQL4 の欠損により障害される経路についての最近の解明が早老を示唆しているが, 適時に悪性疾患を診断し治療すれば, 患者の寿命は正常とかわらない. 悪性疾患がない場合の寿命は, フォローアップデータが限られているが正常であろう. RECQL4 陽性の患者においては, 変異の状況と骨格の異常に有意な相関があり, 平均 14.3 歳で, 時に多発性のこともあるが, 骨肉腫を高い頻度で生じる. 皮膚の上皮系腫瘍 (ほとんどは扁平上皮癌) は成人の RTS によくみられ (発症は平均 34.4 歳) だが, これらの腫瘍と分子的サブクラスの関係ははっきりしていない.

管理

遺伝的検査は症候群関連兆候の早期診断, 治療のために, 適切な遺伝カウンセリングとともに行わなければ行けない. 少数例においてみられる光感受性亢進のため, サンスクリーンを用いるようアドバイスすべきである. RTS 患者の長期フォローと治療のためには多くの専門分野にわたるチームが必要である. チームには皮膚科, 整形外科, 腫瘍科が含まれるべき

である. 毎年の理学的検査において, poikiloderma の発症と状況, 高い白内障合併率のための眼の検査, う歯, 不正咬合, 早期発症の歯周囲炎の頻度が高いため口腔内検査, そして歯科的異常の X 線スクリーニング, 5 歳までに骨格系形成不全をみるためにベースラインの骨格系の X 線などが必要である. 特に癌のサーベイランスに注意を払い, は骨腫瘍を示唆する骨痛, 腫脹, 四肢の増大する病変, 通常と異なる色調や触感の皮膚をモニターすべきである.

2) Predictive setting

無症状ではあるが, 家族歴などからリスクが高いと考えられる人への検査一本疾患では適応外.

3) 患者家族における遺伝的リスク評価

ある家系における RECQL4 原因変異が同定されれば, その家系における保因者かどうかの評価ができ, 遺伝カウンセリングを提供できる, 発症が 2 歳まえと早いので, 発症前診断はまれとなる.

4) 出生前診断

病因となる 2 アレルの変異が同定されていれば, 可能である.

4. 遺伝学的テストが患者またはその親類にとって役立つか?

健康な保因者に直接の健康上の問題はないが, 彼らが遺伝学にキャリアであることを知っていることは家族プランにとって重要である.

D. 考察と結論

この Clinical utility card は Rothmund-Thomson (RTS) 症候群の遺伝的背景および鑑別診断, どのような検査をどのようにすべきかを明確に示しており有用性は高いと考えられた

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Fukao T, Maruyama S, Ohura T, Hasegawa Y, Toyoshima M, Haapalainen AM, Kuwada N, Imamura M, Yuasa I, Wierenga RK, Yamaguchi S, Kondo N. Three Japanese patients with beta- ketothiolase

deficiency whoshare a mutation , c. 431A>C(H144P) in ACAT1: subtle abnormality in urinary organic acid analysis and blood acylcarnitine analysis using tandem mass spectrometry. JIMD reports 3:107-115, 2012

2. Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N: Autosomal-dominant chronic mucocutaneous candidiasis with STAT1-mutation can be complicated with chronic active hepatitis and hypothyroidism. J Clin Immunol 32:1213-1220, 2012

3. Teramoto T, Matsui E, Fukao T, Sakai K, Yonezawa H, Kato Z, Ohnishi H, Kaneko H, Kondo N, Azuma J, Nishima S. Repeated-Dose Pharmacokinetics of Inhaled Ciclesonide (CIC-HFA) in Japanese Children with Bronchial Asthma: A Phase I Study. Allergol Int. 61:619-624, 2012

4. Funato M, Fukao T, Sasai H, Hori T, Terazawa D, Kanda K, Ozeki M, Mizuta K, Hirose Y, Kaneko H, Kondo N: Paclitaxel-based chemotherapy for aggressive kaposiform hemangioendothelioma of the temporomastoid region: Case report and review of the literature. Head Neck. 2012 Aug 21. doi: 10.1002/hed.23107

5. Hori T, Fukao T, Murase K, Sakaguchi N, Harding CO, Kondo N. Molecular basis of two exon skipping (exons 12 and 13) by c.1248+5g>a in OXCT1 gene. Study on intermediates of OXCT1 transcripts in fibroblasts. Hum Mutat in press

6. Ozeki M, Kando K, Kawamoto N, Ohnishi H, Fujino A, Hirayama M, Kato Z, Azuma E, Fukao T, Kondo N. Propranolol as an alternative treatment option

for pediatric lymphatic malformation. Tohoku J Exp Med. 229:61-66, 2013.

2. 学会発表

1) Fukao T, Sass JO, Konstantopoulou V, Marquardt T, Frauendienst-Egger G, Kondo N. An Exonic splicing enhancer mutation indentified in German beta-ketothiolase deficient patients. Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. September 4-7, 2012(Birmingham, UK)

2) Hori T, Fukao T, Harding CO, Kondo N. Molecular basis of two exon skipping (exons 12 and 13) by c. 1248+5G>A in fibroblasts from a SCOT deficient patient. Study of splicing order in SCOT transcripts in fibroblasts from controls and the patient. Annual symposium of Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism. September 4-7, 2012(Birmingham, UK)

3) 大倉絵梨, 長沼邦明, 中田節子, 萩元緑朗, 佐野葉子, 多田明良, 山口清次, 長谷川有紀, 小林弘典, 深尾敏幸: 新生児期に診断され, 良好な経過を示している3-ヒドロキシ3-メチルグルタル酸血症の1例. 第54回日本先天代謝異常学会総会. 岐阜, 2012年11月15日-17日

4) 大塚博樹, 深尾敏幸, 森本将敬, 折居建治, 山田健治, 小林弘典, 長谷川有紀, 山口清次, 近藤直実: 新生児期にGA2と診断され, 生後5か月よりBEZ投与を開始した二絨毛膜二羊膜双胎例. 第54回日本先天代謝異常学会総会. 岐阜, 2012年11月15日-17日

F. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

遺伝子修復異常症（Bloom 症候群、Rothmund-Thomson 症候群、RAPADILINO 症候群、
Baller-Gerold 症候群）の実態調査、早期診断法の確立に関する研究

研究分担者 滝田 順子 東京大学医学部附属病院 無菌治療部 講師

研究要旨：Rothmund-Thomson 症候群(RTS)は多形成皮膚萎縮症、低身長、白内障、骨形成異常、骨肉腫の合併を特徴とする早老症であり、予後不良な遺伝子修復異常症である。原因の一部として RECQL4 の変異が報告されているが、発症機構は十分解明されておらず有効な治療法も確立されていない。正確な分子診断や有効な治療法の確立のためにも、本症の発症機構の解明は重要と考えられる。そこで、RTC の発症分子機構を解明するために多重がん、精神運動発達遅滞、低身長、骨異常、先天性白内障を合併し、RTS 類似の表現型を呈した症例におけるエクソーム解析を施行した。その結果、本症例に合併した横紋筋肉腫および脳腫瘍では共通する腫瘍特異的な遺伝子変異は検出されなかったが、それぞれ細胞周期関連遺伝子などドライバー変異と考えられる遺伝子異常が複数検出された。これらの遺伝子変異が腫瘍の発症に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Rothmund-Thomson 症候群(RTS)は多形成皮膚萎縮症、低身長、白内障、骨形成異常、骨肉腫を高率に合併する非常に稀な早老症であり、本邦における発症頻度は不明である。臨床的には外胚葉形成異常、白内障を合併する I 型と先天性骨欠損および骨肉腫を高率に合併する II 型に分類されるが、両者とも皮膚症状は必発である。常染色体劣性の遺伝形式をとることが知られており、II 型の約60%に RECQL4 の変異が報告されているが、発症機構は十分解明されておらず標準治療も確立されていない。予後は極めて不良であり、大部分が小児期に発症する骨肉腫もしくは成人以降に発症する種々の固形癌により死亡する。従って、合併するがんの早期発見・予防が本症の予後の改善に有効と考えられるが、そのためには発症分子機構の解明が重要と考えられる。そこで、RTS の発症メカニズムを解明することを目的として、本研究では脳腫瘍、横紋筋肉腫、精神運動発達遅滞、低身長、骨異常、先天性白内障を合併し、RTS 類似の表現型を呈した症例のエクソーム解析を行った。

B. 研究方法

脳腫瘍、横紋筋肉腫、精神運動発達遅滞、低身長、骨異常、先天性白内障および難治性湿疹を合併した患児の腫瘍検体および末梢血より DNA を抽出し、1-1.5 μ g を用い、メーカープロトコールに従い、調整を行った。その後アダプターを連結し PCR を行った後、Agilent Technologies 社の SureSelect Human All Exon 50Mb または SureSelect Human All ExonV4 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara CA) を用いて、全ゲノムから標的領域の抽出を行った。その後更にアダプター付加した上でシーケンスを行った。シーケンサーは Illumina HiSeq2000 (Illumina, Inc., San Diego, CA) を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、東京大学の倫理審査委員会で審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（2003年3月）」を遵守することを条件に承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

C. 研究結果

1. Somatic 変異の検出

アミノ酸置換の伴うミスセンス変異、ナンセンス変異もしくは indel 変異で、変異の頻度が全体の 20%以上のもものうち、対応する正常との比較で P 値(Fisher 検定)が 0.01 未満であるものと inhouseSNP は除外した。さらに、1000 ゲノム(ヒトゲノムデータベース)で頻度が 0.1 以上のもものは除外した。一方、よく知られた変異であっても、germline での変異がみつかり SNP として登録されるため、意味のある変異を取りこぼす可能性があるため dbSNP は温存した。その結果、横紋筋肉腫における somatic 変異は計 52 個、髄芽腫における somatic 変異は計 12 個であった。それぞれの腫瘍で共通する変異は見出されなかった。

2. 横紋筋肉腫における somatic 変異

本研究で検出された横紋筋肉腫における腫瘍特異的変異は計 52 個であったが、このうちアミノ酸置換を伴う Nonsynonymous 変異は 45 個、フレームシフト変異は 3 個、ナンセンス変異は 2 個で、インフレーム挿入、スプライスサイト変異はそれぞれ 1 個であった。これらの候補変異の中には PTEN、NOTC2 など腫瘍関連の新規変異が複数含まれていた。

3. 髄芽腫における somatic 変異

髄芽腫検体で検出された somatic 変異 12 個のうち、Nonsynonymous 変異は 11 個、ナンセンス変異が 1 個であった。これらの中には、髄芽腫に関連する既知のものは含まれておらず、すべて新規の変異であった。ミスセンス変異が検出された SEPT2 は細胞分裂関連アクチン結合蛋白であり、がん抑制遺伝子と考えられている。またナンセンス変異を認めた DCHS1 はカドヘリンスーパーファミリーであり、細胞接着に関与することが知られている。

4. 生殖細胞系列(germline)変異

既知の遺伝子修復関連遺伝子である RECQL4、p53、CHEK2 の変異は検出されなかった。これまでに髄芽腫に関連することが報告されている、SMARCA4、SMO および BCOR のミスセンス変異が検出された。

D. 考察

本研究における横紋筋肉腫の解析では、これまで

に分担研究者らが行った横紋筋肉腫初発腫瘍 15 例におけるエクソーム解析において検出された平均 8 個の somatic 変異よりも多数の変異が検出された。この中には、ドライバー変異のみならずパッセンジャー変異も含まれている可能性があり、今後、検証する必要がある。本症例の横紋筋肉腫で検出された変異の中に新規の腫瘍関連遺伝子変異が含まれていたことから、これらの遺伝子は新たな横紋筋肉腫の標的分子である可能性もあり、今後大多数の検体での解析が望まれる。髄芽腫で検出された新規の SEPT2、DCHS1 も造腫瘍化に関与している可能性があり、検証を行う必要がある。本症例の横紋筋肉腫と髄芽腫で共通する遺伝子変異が検出されなかったことから、本症例におけるセカンドヒットはそれぞれの腫瘍で異なる経路であることが示唆された。今回の解析は、germline 変異として有力なものを絞り込みことができなかったが、解析 Algorithm を工夫したり、血縁者の遺伝子解析を行うことで、ターゲットを絞り込める可能性が考えられた。

E. 結論

RTS 類縁疾患のゲノム解析を行ったところ、合併した腫瘍検体で複数の遺伝子変異が検出され、発症機構に DNA 修復障害に関与している可能性が示唆された。標的分子の同定に、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析は有用なツールと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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**. 2012 Jan 16. doi: 10.1038/onc.2011.616. [Epub ahead of print]

2) 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

3) Miura K, Sekine T, Takamizawa M, Terashima H, Furuya A, Koh K, Takita J, Ida K, Igarashi T: Early occurrence of nephrotic syndrome associated with cord blood stem cell transplantation. **Clin Exp Nephrol**. Oct

12. 2011 [Epub ahead of print]

4) Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y and Ogawa S: Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. **Cancer Science**. 102:1645-1650, 2011

5) 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

6) 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

7) Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y: Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. **Cancer Sci**. 102:302-308, 2011

8) 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

9) Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, Saitoh M, Takita J, Sato A, Mimaki M, Kato M, Ogawa S, Igarashi T: Interstitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma. **Brain Dev**. 33:353-356, 2011

10) 加藤元博, 真田昌, 加藤格, 佐藤康晴, 滝田順子, 竹内賢吾, 丹羽明, 陳玉彦, 中崎久美, 野本順子, 朝倉義崇, 赤塚美紀, 林泰秀, 森啓, 五十嵐隆, 黒川峰夫, 千葉滋, 森茂郎, 石川雄一, 岡本康司, 飛内賢正, 中釜齊, 中畑龍俊, 吉野正, 小林幸夫, 小川誠司: B細胞性悪性リンパ腫における A20 の遺伝子変異による不活性化(解説). **臨床血液** 52 : 313-319, 2011

11) 滝田順子: 【神経芽腫】 神経芽腫の分子病態と ALK 遺伝子の異常(解説/特集) **Pharma Medica**.29:45-49, 2011

12) 滝田順子: リボソームの異常による造血器疾患(解説). **血液内科** 62:256-261, 2011

2. 学会発表

1) Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi J, Takita J, Kikuchi K, Kubota M, Yamanaka G, Shihara T, Kumakura A, Kikuchi M, Toyoshima M, Goto T, Yamanouchi H, and Mizuguchi M. Polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. **Neurology** (in press)

2) Kato M, Yasui N, Seki M, Kishimoto H, Sato-Otsubo A, Hasegawa D, Kiyokawa N, Hanada R. Ogawa S, Manabe A, Takita J, Koh K. Aggressive transformation

of juvenile myelomonocytic leukemia associated with duplication of oncogenic KRAS in consequence of acquired uniparental disomy. **J Pediatr**. (in press)

3) Mori M, Hiwatari M, Takita J, Ida K, Kawaguchi H. Successful syngeneic PBSC transplantation for a patient with refractory Evans syndrome. **Bone Marrow Transplant**. 2012 Jul 16. [Epub ahead of print]

4) Kato M, Shiozawa R, Koh K, Nagatoshi Y, Takita J, Ida K, Kikuchi A, Hanada R. The Effect of the Order of Total Body Irradiation and Chemotherapy on Graft-Versus-Host Disease. **J Pediatr Hematol Oncol**. 2012 Dec 13. [Epub ahead of print]

5) Kato M, Horikoshi Y, Okamoto Y, Takahashi Y, Hasegawa D, Koh K, Takita J, Inoue M, Kigasawa H, Ogawa A, Sasahara Y, Kawa K, Yabe H, Sakamaki H, Suzuki R, Kato K. Second allogeneic hematopoietic SCT for relapsed ALL in children. **Bone Marrow Transplant**. 47:1307-11, 2012

6) 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**. 26:1879-81, 2012

7) 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**. 31:4667-76, 2012

8) 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**. 156:672-4, 2012

9) Miura K, Sekine T, Takamizawa M, Terashima H, Furuya A, Koh K, Takita J, Ida K, Igarashi T. Early occurrence of nephrotic syndrome associated with cord blood stem cell transplantation. **Clin Exp Nephrol**. 16:180-2, 2012

2. 学会発表

1) Hiwatari M, Takita J, Nishimura R, Okubo J, Oki K, and Ogawa S. Mutational analysis for *IDH1* and *IDH2* in pediatric leukemia. AACR Annual Meeting 2012

2) Nishimura R, Takita J, Yoshida K, Shiraishi Y, Hoshino N, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Igarashi T, Ogawa S:

Whole-exome sequencing of advanced neuroblastomas.
Advances Neuroblastoma Research Conference, Toronto,
June 18 - 21, 2012

3) 半谷 まゆみ, 渡邊 健太郎, 塩澤 亮輔, 樋渡 光輝,
滝田 順子, 井田 孔明: 多発骨病変を呈し診断に難渋
した再発 ALL の 1 例, 第 115 回日本小児科学会学術
集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日

4) 藤野 修平, 三浦 健一郎, 張田 豊, 磯島 豪, 竹内
正人, 木村 有希, 滝田 順子, 北中 幸子, 五十嵐
隆: 体重増加不良を契機に診断した先天性腎性尿崩症
の 1 例, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012
年 4 月 20 日~22 日

5) 苗代 有鈴, 樋渡 光輝, 塩澤 亮輔, 本村 あい, 滝
田 順子, 井田 孔明, 川嶋 寛, 赤羽 正章, 河野 博隆,
高澤 豊, 五十嵐 隆: Kasabach-Merritt syndrome を呈
した Kaposiform hemangioendothelioma の 1 例, 第 115
回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日
~22 日

6) 樋渡 光輝, 滝田 順子, 井田 孔明, 杉山 正彦, 岩
中 督, 三上 信太郎, 椎名 秀一郎, 高澤 豊, 五十嵐
隆: 発時に肝転移を認めた腎細胞癌 stage 4 の 1 例,
第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4
月 20 日~22 日

7) 塩澤 亮輔, 本村 あい, 樋渡 光輝, 滝田 順子, 井
田 孔明, 五十嵐 隆: 造血幹細胞移植を併用した大量
化学療法により寛解を維持している胸膜肺芽腫の 2
例, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012
年 4 月 20 日~22 日

8) 本村 あい, 樋渡 光輝, 竹内 正人, 滝田 順子, 井
田 孔明, 五十嵐 隆: Francisella Philomiragia による肝
脾膿瘍のため死亡した慢性肉芽腫症の 10 歳男児例,
第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4
月 20 日~22 日

9) 星野 論子, 滝田 順子, 西村 力, 大久保 淳, 真田
昌, 白石 友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五十
嵐 隆: 神経芽腫におけるポリコム群たんぱくの網
羅的ゲノム解析, 第 115 回日本小児科学会学術集会,
福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日

10) 大久保 淳, 滝田 順子, 西村 力, 星野 論子, 吉田
健一, 白石 友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五
十嵐 隆: 次世代シーケンサーを用いた Ewing 肉腫
のエクソーム解析, 第 115 回日本小児科学会学術集会,
福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日

11) 西村 力, 滝田 順子, 吉田 健一, 白石 友一, 大久
保 淳, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五十
嵐 隆: 次世代シーケンサーを用いた神経芽腫のエク
ソーム解析, 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡,
2012 年 4 月 20 日~22 日

12) 滝田 順子, 西村 力, 大久保 淳, 吉田 健一, 星
野 倫子, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五
十嵐 隆: 先端的ゲノムスキニングを用いた難治性
小児固形腫瘍における標的分子の探索, 第 115 回日本
小児科学会学術集会, 福岡, 2012 年 4 月 20 日~22 日

13) 中田 雄一郎, 長町 安希子, 上田 健, 山崎 憲政,
仙谷 和弘, 稲葉 俊哉, 滝田 順子, 小川 誠司, 本田
浩章: 活性化 ALK は増幅した MYCN と協調して神経
芽腫細胞腫瘍発症に関与する. 第 71 回日本癌学会学術
総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日~21 日

14) 倉田 盛人, 後飯 塚僚, 北村 大介, 滝田 順子,
林泰秀, 北川 昌伸, 中村 卓郎: BLNK 欠損 preB-ALL
と B 細胞分化における C/Ebpb の働き. 第 71 回日本
癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日~21 日

15) 星野 論子, 西村 力, 奥野 友介, 樋渡 光輝, 永
田安伸, 吉田 健一, 真田 昌, 白石 友一, 宮野 悟,
林泰秀, 小川 誠司, 滝田 順子: 神経芽腫におけるエ
ピジェネスティック関連遺伝子の網羅的ゲノム解析.
第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19
日~21 日

16) 柴 徳生, 吉田 健一, 奥野 友介, 白石 友一, 田
中洋子, 永田安伸, 滝田 順子, 荒川 浩一, 伊藤 悦
朗, 真田 昌, 宮野 悟, 小川 誠司, 林泰秀: 全エク
ソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症
原因遺伝子変異の同定. 第 71 回日本癌学会学術総会,
札幌, 2012 年 9 月 19 日~21 日

17) 大西 伸幸, サンペトラオルデア, 杉原 英志, 清
水孝恒, 滝田 順子, 小川 誠司, 佐谷 秀行: 神経幹
細胞を用いたマウス脳腫瘍モデルにおける活性化型
ALK 誘導発がんメカニズム. 第 71 回日本癌学会学術
総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日~21 日

18) 関 正史, 西村 力, 奥野 友介, 白石 友一, 千葉
健一, 田中 洋子, 吉田 健一, 真田 昌, 林 泰秀, 宮
野悟, 小川 誠司, 滝田 順子: 次世代シーケンサーに
よる再発肺芽腫のエクソーム解析. 第 71 回日本癌学
会学術総会, 札幌, 2012 年 9 月 19 日~21 日

19) 西村 力, 吉田 健一, 白石友一, 奥野 友介, 千

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

葉健一，田中 洋子，佐藤 悠佑，真田 昌，林 泰秀，宮野悟，小川 誠司，滝田 順子：SNP アレイとエクソーム解析を用いた横紋筋肉腫の初発・再発／転移巣のクローン比較．第 71 回日本癌学会学術総会，札幌，2012 年 9 月 19 日～21 日

20) 樋渡 光輝，西村 力，吉田 健一，白石 友一，奥野友介，大久保 淳，永田 安伸，五十嵐 隆，宮野 悟，林泰秀，小川 誠司，滝田 順子：次世代シーケンサーを用いたユーズング肉腫発生の分子生物学的検討．第 71 回日本癌学会学術総会，札幌，2012 年 9 月 19 日～21 日

21) 中澤 温子，大喜多 肇，田中 祐吉，中川原 章，滝田 順子，家原 知子，田尻 達郎，池田 均，秦 順一：神経芽腫における ALK 発現と国際神経芽腫病理分類との関連．第 71 回日本癌学会学術総会，札幌，2012 年 9 月 19 日～21 日

22) 加藤 啓輔，吉見 愛，中尾 賭 朋平，小林 千恵，滝田 順子，柏井 良文，清河 信敬，小池 和俊，土田 昌宏：骨髓球系抗原陽性 T 細胞型急性リンパ性白血病より樹立された細胞株 ICH-TALL-1 ならびに ICH-TALL-2 の解析，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

23) 関 正史，西村 力，星野 子，奥野 友介，白石 友一，吉田 健一，千葉 健一，田中 陽子，真田 昌，加藤 啓輔，土田 昌宏，宮野 悟，林 泰秀，小川 誠司，滝田 順子：先端的ゲノム解析技術を用いた胸膜肺芽腫における発症分子機構の解明，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

24) 柴 徳生，吉田 健一，奥野 友介，白石 友一，加藤元博，大木 健太郎，朴 明子，金澤 崇，工藤 寿子，滝田 順子，加藤 啓輔，荒川 浩一，伊藤 悦朗，花田 良二，真田 昌，小川 誠司，林 泰秀：全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

25) 半谷 まゆみ，渡邊 健太郎，塩澤 亮輔，樋渡 光輝，滝田 順子，井田 孔明：多発骨病変を呈し診断に難渋した再発急性リンパ性白血病の一例，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

26) 安井 直子，康 勝好，関 正史，加藤 元博，滝田 順子，佐藤 亜以子，小川 誠司，磯部 清孝，森 麻希子，秋山 康介，荒川 ゆうき，林 真由美，岸本 宏志，

清河信敬，花田 良二：AML に急性転化し死亡した K-RAS 変異を伴う JMML の一例，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

27) 鈴木 完，塩澤 亮輔，滝田 順子，工藤 宏樹，小西健一郎，魚谷 千都絵，石丸 哲也，寺脇 幹，吉村 眞，杉山 正彦，小室 広昭，岩中 督：再発巣摘出，術後化学療法，自己末梢血幹細胞移植を経て再々発なく経過している胸膜肺芽腫の 1 例，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

28) 星野 論子，西村 力，奥野 友介，永田 安伸，吉田健一，真田 昌，白石 友一，林 泰秀，宮野 悟，岩中督，小川 誠司，滝田 順子：神経芽腫におけるエピジェネティック関連遺伝子の網羅的ゲノム解析，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

29) 関 正史，西村 力，星野 論子，島村 徹平，宮野 悟，永江 弦太，油谷 浩幸，林 泰秀，小川 誠司，滝田 順子：神経芽腫における網羅的メチル解析，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

30) 塩澤 亮輔，中野 克俊，滝澤 慶一，半谷 まゆみ，柿本 優，渡邊 健太郎，樋渡 光輝，滝田 順子，井田 孔明：当院で経験した再発 T-ALL の 5 例，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

31) 樋渡 光輝，柿本 優，太田 英仁，塩澤 亮輔，渡邊健太郎，滝田 順子，井田 孔明：消化管 GVHD に対して経口ベクロメタゾン製剤を投与した骨髄異形成症候群の 1 例，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

32) 渡邊 健太郎，塩澤 亮輔，樋渡 光輝，滝田 順子，杉山 正彦，絹谷 清剛，井田 孔明，岩中 督：集学的治療に抵抗性で胆癌状態のまま小康状態を保っている進行神経芽腫の 2 例，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

33) 滝澤 慶一，塩澤 亮輔，渡邊 健太郎，樋渡 光輝，滝田 順子，井田 孔明：経過に相違を示した 3 例から考察する Kaposiform hemangioendothelioma の治療戦略，第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会，横浜，2012 年 11 月 30 日～12 月 2 日

34) 西村 力，吉田 健一，白石 友一，奥野 友介，星