

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

H. 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

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

分担研究課題: Bloom 症候群の迅速診断法の確立

研究分担者 清河 信敬 独立行政法人 国立成育医療研究センター 研究所
小児血液・腫瘍研究部 部長

研究要旨

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(FCM)による BLM 蛋白検出法の確立を試みた Bloom 患者由来細胞株を用いた検討によって、最も特異性の高いマウス単クローン性抗 BLM 抗体を選定した。今後、さらに特異性の確認に関する検討を進める。FCM による BLM 蛋白検出は、Bloom 症候群診断の簡易スクリーニング法としての応用が期待される。一方、フローサイトメトリーによる sister chromatid exchange (SCE) 検出法について検討し、thymidine の analog である 5-ethynyl-2'- deoxyuridine (EdU)と Propidium iodide を組み合わせて、細胞の増殖に伴って新たに合成された娘 DNA 鎖と染色体全体を同時にラベルし、フローサイトメトリー解析を行なった結果、個々の染色体の EdU の取り込みを検出することが可能であることが示された。今後さらに検討を進め、SCE 検出法への応用を目指す。

研究協力者

富田理、三春晶嗣（国立成育医療研究センター）

A. 研究目的

Bloom 症候群は、生下時からの小柄な体型、日光過敏性紅斑、免疫不全を特徴とする常染色体劣性の遺伝形式を示す疾患である。さらに際立った特徴は、高率に癌腫を合併することである。国外での報告では、20 歳代までに約 1/3 の Bloom 症候群がなんらかの癌腫を発症するとされている。また、複数の癌腫を合併することも知られており、早期に診断して、定期的にフォローすることが重要である。しかし、本邦での報告例は極めて少なく、患者数を含め国内におけるその現状は不明な点が多い。さらに、診断法や、診断の指針も十分には確立されてはいない。

本症候群の病因は DNA の複製・修復に関与する RecQ 型 DNA ヘリカーゼの一つである Bloom ヘリカーゼ (BLM) である。ゲノム遺伝子上の *blm* 遺伝子

の異常に起因して、BLM 蛋白の異常が起こり、酵素活性が低下することによって、複製・修復能に障害が生じる。細胞レベルでは、染色体の不安定性が強くなり、紫外線による細胞傷害を受けやすくなる。また、DNA が損傷を受けたまま細胞分裂に入る頻度が多くなる結果、姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange SCE) が正常細胞の 10-15 倍程度起りやすくなるとされている。そのため、Bloom 症候群の確定診断には SCE の増加が参考となる。

通常、SCE の検出は、被検細胞を thymidine の analog である臭素化デオキシウリジン (BrDU) 添加培養によって、細胞分裂中に合成される DNA 鎖に BrDU を取り込ませ、M 期に同調させた後、染色体標本を作製して、BrDU を蛍光標識抗 BrDU 抗体によって検出し、蛍光顕微鏡を用いた観察によって、SCE の増加を検出する。すなわち、健常人では、2 本鎖の染色体のうち、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'-gtcactctcaagaagcttgc-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

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。

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

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

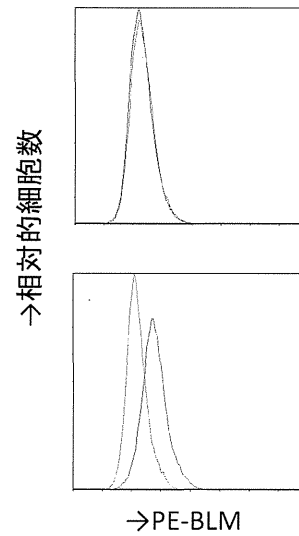
該当無し

3. その他

該当無し

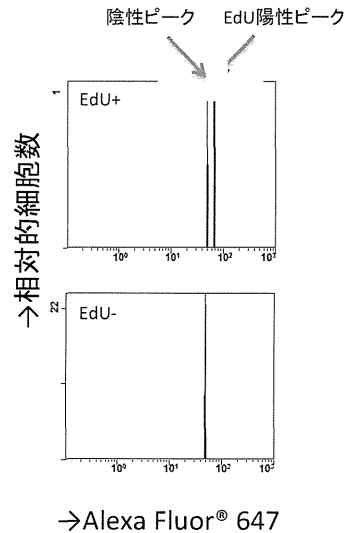
図1

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。

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

分担研究課題：Bloom 症候群と Ataxia telangiectasia における T 細胞多様性の障害

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 症候群においては、進行性の T 細胞機能障害が存在する可能性が示唆されるが、その実態は明らかではない。本年度は、同様な DNA 修復機序の障害を特徴とする遺伝性疾患である Ataxia telangiectasia (AT) との比較を行うことにより、Bloom 症候群に特徴的な T 細胞分化障害を明らかにすることを目的とした。ほぼ同年齢(20 歳前後)の AT 2例と、Bloom 症候群2例を対象として、末梢血 T 細胞亜群分布ならびに TCR 多様性を解析した。AT 症例では thymic extract を反映する CD45RO 陰性ナイーブ T 細胞の著明な減少を認めた、一方 Bloom 症候群ではナイーブ T 細胞は比較的保持されており、加齢に伴う減少も認めなかった。T 細胞多様性の低下も AT に比べ Bloom 症候群では軽度にとどまった。以上の結果は、Bloom 症候群における T 細胞機能異常が限定的であることを示唆している。

共同研究者

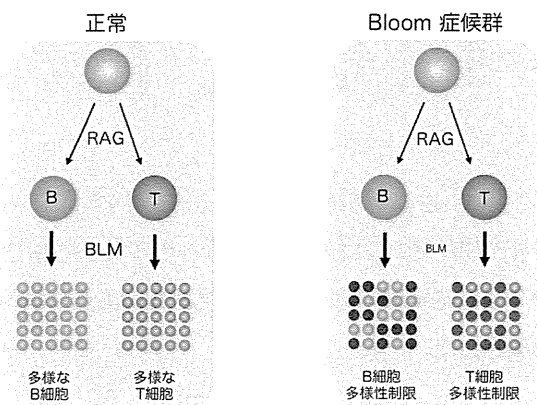
和田 泰三(金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

東馬 智子(金沢大学医薬保健研究域医学系小児科)

A. 研究目的

Bloom 症候群では、進行性の T 細胞免疫不全が起こることが予想されが、これについて詳細は明らかにされていない(図1)。本研究では、T 細胞分化の微細な障害を T 細胞抗原受容体(TCR)の多様性を解析することにより評価する。特に、DNA 修復障害を特徴とする AT と比較することにより Bloom 症候群における T 細胞異常の特徴を明らかにすることを目的とした。

図1; Bloom 症候群におけるリンパ球分化障害モデル



B. 研究方法

対象はいずれも 20 歳前後の Bloom 症候群2例、AT 2例である。末梢血 静脈血を用いて、①リンパ球亜群分布、②TCR Vβ repertoire 分布をいずれもフローサイトメトリー法により解析した。X-SCID、Omenn 症候群、DiGeorge 症候群についても検討した。

(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。

- 1) 末梢血液に関して、血清ならびにリンパ球検体は連結可能匿名化とし、本研究の目的以外には使用しない。
- 2) 得られた情報の秘密は厳守し、決して他人に漏らしたり譲渡したりしないこと。

C. 研究結果

本年度は以下の検討を行った。

1) 末梢血リンパ球亜群分布解析; Bloom 症候群2症例、AT 2症例について、末梢血リンパ球亜群分布と naïve/memory T 細胞比率の検討を行った。後者のデータを図2、図3に示す。Bloom 症例では、2例とも正常対照に比べてやや低値ではあるが十分な比率の naïve (CD45RO negative) T 細胞が存在した。一方、AT の2症例では、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞のいずれにおいても、naïve T 細胞比率は著明に低下し、その傾向は特に CD4⁺T 細胞において顕著に認められた。

図2; Bloom 症候群ならびに AT における末梢血 naïve T 細胞比率の比較 (FCM プロフィール)

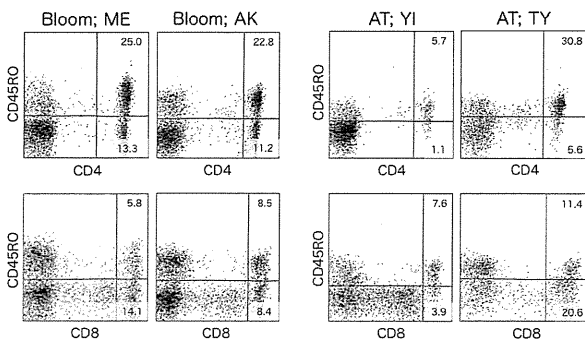
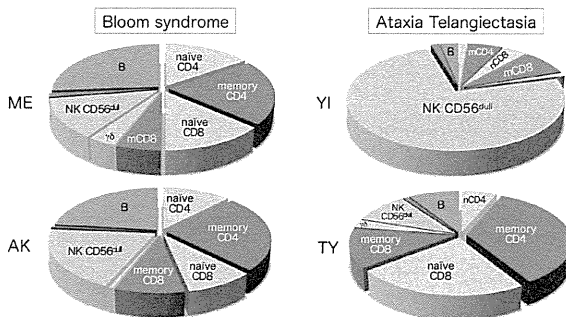


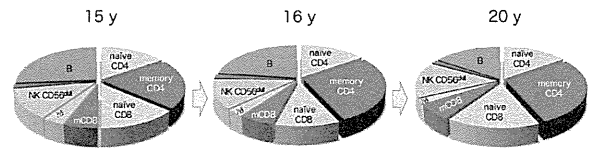
図3; Bloom 症候群ならびに AT における末梢血 naïve T 細胞比率の比較 (分布比率表示)



Bloom 症候群の1例でのみ、このような末梢血リンパ球亜群分布の加齢による変化を比較することが可能であっ

た(図4)。少なくとも5年間の経過では著明な変化は認められなかった。

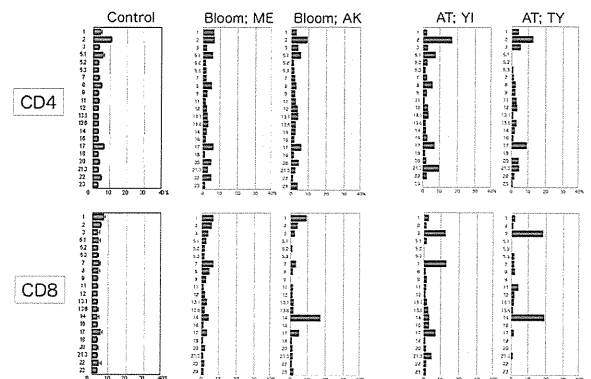
図4; Bloom 症候群1例における加齢変化



2) FCM 法による TCR Vβ repertoire 分布解析;

各 Vβ 特異抗体を用いて、FCM による TCR 多様性解析を試みた。AT 症例では2例とも、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞のいずれにおいても、repertoire 分布の偏りを認めた。特に、CD8⁺T 細胞においては、特定の Vβ repertoire の選択的増殖(YI では Vβ3 ならびに Vβ7、TY では Vβ3 と Vβ14)が認められた。一方、Bloom 症候群の2例においては、CD4⁺T 細胞はいずれも正常対照とほぼ同様の多様性が確認された。CD8⁺T 細胞においても、AK の Vβ14 の増加が認められたのみで、背景の多様性障害はわずかであった(図5)。

図5; TCR Vβ repertoire 分布



さらに、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、Omen 症候群類似の病態発現と強く関連していることが示唆された。

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 症候群の2例においては、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。Bloom 症候群における T 細胞分化障害は著しいクローンサイズの減少となる可能性は少ないことが示された。CDR3 サイズ分布解析を併用することにより、微細な多様性制限を検出できる可能性があり、今後の検討課題としたい。

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、明らかな異常は見出されなかった。潜在的な多様性形成障害を検出するためには、より微細な解析法を併用することが必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Wada T, Nishimura K, Kuroda M, Asai E, Vu QV, Toma T, et al. A case of acute encephalopathy with hemophagocytic lymphohistiocytosis and clonal T-cell expansion. *Brain Dev* 34:376-9, 2012

2) Yang X, Wada T, Imadome KI, Nishida N, Mukai T, Fujiwara M, et al. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in two patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and type 2. *Herpesviridae* 3(1):1, 2012

3) Kanegane H, Taneichi H, Nomura K, Wada T, Yachie A, Imai K, Ariga T, Santisteban I, Hershfield MS, Miyawaki T.

Successful bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency.

Pediatr Transplant. 2013 Feb;17(1):E29-32.

4) Kawai T, Saito M, Nishikomori R, Yasumi T, Izawa K, Murakami T, Okamoto S, Mori Y, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Ohmori K, Nakahata T, Heike T. Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. *J Clin Immunol.* 2012 Aug;32(4):690-7.

2. 学会発表

なし

H. 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

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

分担研究課題：Bloom 症候群に合併した血液腫瘍に対する化学療法の検討

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 谷内江昭宏（金沢大学医薬保健研究域医学系小児科 教授）
研究分担者 田内久道（愛媛大学医学部 准教授）

研究要旨：Bloom 症候群の特徴に、高率な癌腫の合併がある。しかし、その治療法は個々の症例ごとに異なっている。今回、全国調査で報告された Bloom 症候群に血液腫瘍を合併した異なる施設の 3 症例についてプロトコルを検討した。Bloom 症候群の抗がん剤に対する感受性を考量して、通常施行されているプロトコルより抗がん剤の量や投与回数が減量されていた。今後、さらに症例の集積が続け、分子標的療法などの、より効果的な化学療法のプロトコルについて検討することが必要である。

A. 研究目的

Bloom 症候群は、小柄な体型、日光過敏性紅斑、免疫不全を特徴とするが、際立った特徴は高率に認められる癌腫の合併である。本研究班の、全国調査でも Bloom 症候群の 9 例中 7 例に癌腫の合併があった。Bloom 症候群に合併した癌腫の治療法は、個々の症例で、通常のプロトコルと異なっていることが推測されるが、その実態は明らかではない。今回、全国調査で明らかになった血液腫瘍合併の 3 症例について、用いられたプロトコルを比較した。

B. 研究方法

異なる 3 施設の血液腫瘍を合併した Bloom 症候群の 3 人の患者データから、治療プロトコルを抽出した。個人情報保護には細心の注意を払った。

C. 研究結果

全国調査の結果、Bloom 症候群に悪性腫瘍の合併が高率に認められることが、日本人症例でも改めて確認された。なかでも、造血器系の腫瘍が高率であった。乳癌の合併も認められた（表 1）

表 1 本邦の Bloom 症候群に合併した、血液悪性腫瘍または腫瘍性病変（9 症例中）

B 細胞リンパ腫	6 例
急性骨髄性白血病	2 例
MDS	3 例
再生不良性貧血	2 例
Wilms 腫瘍	1 例
乳癌	2 例

このうち治療に用いられたプロトコルが明らかでないリンパ腫、白血病の 3 症例につき、標準的なプロトコルと比較した。

症例 1 9 歳 12 指腸の diffuse medium sized cell type lymphoma (B cell)

TCCSG B-8801 Protocol をもとに減量を行った。

手術の後 Block1 を施行。その後 Block2 と Block3 を交互にそれぞれ 6 回ずつ施行した。ドーズや回数を変更した場合を→で示した。

Block1

VP16 (100mg/m² 変更なし) day1, 2, 3, 4

CY (1.2g/m²→0.5g/m²) day7

MTX (3g/m²/12h→1.5g/m²/12h) day13

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総合研究報告書

ADM(50mg/m²→30mg/m²) day16
PDS(60mg/m² 変更なし) day1~18
髄注(MTX15mg/m², HDC30mg/m², AraC30mg/m²) 4回
day2, 4, 6, 13→2回 day2, 13

Block2

VCR(1.5mg/m² 変更なし) day1
CY(1.2g/m²→0.5g/m²) day2
ADM(30mg/m² 変更なし) day5
VP16(200mg/m²→100mg/m²) day8, 9, 10, 11
BH-AC(200mg/m²→50mg/m²) day8, 9, 10, 11
PDS(60mg/m² 変更なし) day1~11
髄注(MTX15mg/m², HDC30mg/m², AraC30mg/m²) day5 変更なし

Block3

VCR(1.5mg/m²→1mg/m²) day1
MTX(3g/m²/12h→1.5g/m²/12h) day2
ADM(30mg/m² 変更なし) day5
VP16(200mg/m²→100mg/m²) day8, 9, 10, 11
CY(200mg/m²→100mg/m²) day8, 9, 10, 11
髄注(MTX15mg/m², HDC30mg/m²,) day2 変更なし

症例2 25歳 非ホジキンリンパ腫 (diffuse large B cell lymphoma)

東海小児がん研究会 9104 ALLのスタンダードリスクのプロトコールの半量で治療が行われた¹⁾。

vincristine 0.75mg/m² on days
1, 8, 15, 22, 29, 71, 85, 99, 113, 127, 134, 141
dexamethasone 6mg/m² on days 1-7 and 127-133
predonisolone 30mg/m² on days 8-14 and 134-140
predonisolone 15mg/m² on days 15-28
L-asparaginsae 5000IU/ml on days
15, 18, 21, 24, 27, 30, 87, 101 and 115
methotrexate 6mg/m², cytarabine 15mg/m² and
hydrocortisone 10mg/m² intrathecally on days
22, 29, 36, 43, 72, 86, 100 and 114
daunorubicin 15mg/m² on days 43, 50 and 57
cytarabine 35mg/m² on days 44-47, 51-54 and 58-61
mercaptopurine 25mg/m² on days 36-63

methotrexate 1500mg/m² on days 85, 99 and 113 with
leucovorin rescue
cyclophosphamide 300mg/m² on days 87, 101 and 115
pirarubicine 15mg/m² on days 127, 134 and 141
enocitabine 50mg/m² on days 128-131, 135-138 and
142-145.

症例3 16歳 AML

(13歳時に頸部の非ホジキンリンパ腫 (diffuse large B cell lymphoma)を発症したが、化学療法後寛解を維持)。

CCLSG9805RE protocol AVC1の半量のプロトコールが
用いられた(50% dose:AraC 50mg/m² 7日間,
THP-ADR20mg/m², VCR0.5mg/m²)。ITはAraC 20mgと
HDC25mgの2剤投与を行った。

D. 結論と考察

Bloom症候群には、高率に癌腫の合併をみる。なかでも、血液腫瘍の頻度が多い。Bloom症候群では、抗癌剤に対する感受性の亢進などを考慮して、通常の治療プロトコールとは異なるプロトコールが用いられていた。今回、異なる3施設での血液腫瘍のプロトコールを解析したところ、どの症例も通常の1/2程度に減量したプロトコールを用いていた。今後、さらに症例を蓄積すると同時に、リツキサンの分子標的療法の有効性についても検討していきたい。

E. 研究発表

1) Kaneko H, Inoue R, Yamada Y, Fukao T, Kondo N. Management of malignant lymphoma in two siblings with Bloom's syndrome. Oncology Reports 4: 1281-1283; 1997.

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

分担研究課題:Rothmund-Thomson 症候群の全国調査の解析

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
山崎 直也 国立がん研究センター 皮膚科 科長

研究要旨:本研究の目的は、Rothmund-Thomson 症候群症候群に関して、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向上、生命予後の改善を図ることである。二次調査表を用いて本邦のRothmund-Thomson 症候群に関して詳細な調査を施行した。確診例は9家系、10症例であった。10例中2例が死亡していた。診断は特徴的な皮膚症状によりなされている場合が多かった。10例中に7例に多形皮膚萎縮症が認められた。10例中2例に骨肉腫が合併していた。RECQL4 遺伝子の変異は同定されなかった。本調査により、本邦におけるRothmund-Thomson 症候群の実態が明らかになった。

A. 研究目的

本研究の目的は、Rothmund-Thomson 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向上、生命予後の改善を図ることである。

B. 研究方法

一次アンケートにて、Rothmund-Thomson 症候群の患者の診療経験ありと回答があった施設に二次アンケート調査を行った。臨床経過、皮膚症状の特徴、合併腫瘍等について、調査を行った。

(倫理面への配慮)

臨床情報を収集する場合は、連結可能匿名化する。一次調査、二次調査に関しては、「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」として倫理委員会の承認を既に得ている。十分なインフォームドコンセントを行ったのち、書面にて署名を得て行った。

C. 研究結果

10例中8例が男性であった。小柄な体型が7例に認められた(表1)。生下時の体重の記載がある2例は、いずれも低出生体重児であった。多形皮膚萎縮症が8例に認められ、診断の根拠とされている場合が多かった。発癌に関して10症例中2例に骨肉腫が認められた。RECQL4 遺伝子検査施行された症例もあったが、病因となる変異を認める症例はいなかった(表2)。

表1 Rothmund-Thomson 症候群二次調査の結果

No	性別	年齢	身長 (年齢)	体重 (年齢)	皮膚症状	発癌の有無	その他の合併症
1	M	8歳 (死亡)	103cm (7歳)	14Kg (7歳)	・多形皮膚萎縮症 (10か月) 色素沈着 (10か月)	骨肉腫 (7歳)	骨肉腫の肺転移8歳死亡
2	M	10歳 (生存)	135cm (10歳)	33Kg (10歳)	・日光過敏性紅斑 (7歳) 色素沈着(2歳)	無	合指症
3	M	10歳 (生存)	84cm (3歳) 130cm (10歳)	2126g (生下時) 26Kg (10歳)	・日光過敏性紅斑 (6か月) 多形皮膚萎縮症 (6か月) 粗な頭髪(6か月から 抜け始め、現在は非 常に少ない頭髪) ・多形皮膚萎縮症、 毛細血管拡張、色素 沈着、毛髪、眉毛の 減少 (5か月) 発汗低下 (14歳)	無	歯牙形成異常(6歳) 知的な障害はなく、成績も 普通 肺動脈弁狭窄 左室瘤 クレチン症(ガスリーで指摘 甲状腺ホルモン内服中)
4	F	25歳 (生存)	150cm (18歳)	34Kg (18歳)		骨肉腫 (20歳)	側彎(14歳) 萎縮性胃炎(16歳) 肺機能低下(脂肪変性)(16 歳)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総合研究報告書

No	性別	年齢	身長 (年齢)	体重 (年齢)	皮膚症状	発癌の有無	その他の合併症
5	M	37歳 (生存)	168cm (37歳)	55Kg (37歳)	結節性紅斑 (34歳)	無	合指症
6	M	25歳 (死亡) 5の弟	150cm (25歳)	31Kg (25歳)	皮膚潰瘍、感染性肉芽腫などを繰り返した	無	急速系球体腎炎(25歳)、腎不全、肺炎、呼吸不全(25歳)、精神運動発達遅滞
7	M	6歳 (生存)	100cm (6歳)	2000g (6歳)	1歳半ごろより、顔下面、下肢に網目状の色素沈着、1歳ごろより、多形皮膚萎縮症	無	
8	M	27歳 (生存)	144.7cm (20歳)	43Kg (20歳)	13歳ごろ全身がうす黒い色素沈着、多形皮膚萎縮症	無	小顎症
9	M	1歳 (生存)	72cm (1歳2か月)	7600g (1歳2か月)	多形皮膚萎縮症、網目状紅斑、水泡	無	皮膚外症状なし
10	F	5歳 (生存)	106.4cm (5歳)	19.5Kg (5歳)	網状の色素消失、多形皮膚萎縮症	無	両側の白内障、難聴

表2 Rothmund-Thomson 症候群の検査値

	RecQL4遺伝子変異	WBC	好中球	リンパ球	IgG	IgA	IgM
1	検査未	6600	69%	21%	不明	不明	不明
2	変異なし 弘前大学	3500	50%	44%	1369	359	103
3	変異なし ジーンケア研究所	8500	49%	49%	不明	不明	不明
4	変異なし Texas Children's Cancer Center	6810	79%	14%	不明	不明	不明

D. 考察

Rothmund-Thomson 症候群は、小柄な体型、日光過敏性紅斑、多形皮膚萎縮症を特徴とする常染色体劣性の遺伝病である。さらに、高率に癌腫(特に、骨肉腫、皮膚扁平上皮癌等)を合併する。今回の二次調査でも、小柄な体型と多形皮膚萎縮症等の皮膚症状が高率に認められた。また、診断の根拠が皮膚症状による場合が多かった。RECQL4 遺伝子検査が行われている症例もあったが、遺伝子変異が同定された症例は無かった。文献では、Rothmund-Thomson 症候群における RECQL4 遺伝子変異は60%程度の患者に検出されると報告されている。今後、RECQL4 遺伝子変異を有する一群とそうでない一群を区別して、検討する必要があると考えられた。

本邦の Rothmund-Thomson 症候群の診断は臨床情報により成されている場合が多いことが明らかになった。今後、遺伝子検査も含めた診断を補助する検査法の開発が必要と考えられた。

E. 結論

Rothmund-Thomson 症候群の二次調査を施行した。確診例は9家系、10症例であった。10例中2例が死亡していた。診断の根拠としては、特徴的な皮膚症状の存在が多かった。10例中に7例に多形皮膚萎縮症が認められた。10例中2例に骨肉腫が合併していた。RECQL4 遺伝子変異が同定された症例はなかった。本調査により、本邦における Rothmund-Thomson 症候群の実態が明らかになった。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

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

分担研究課題:Rothmund-Thomson 症候群の診断指針の作製、並びに Rothmund-Thomson 症候群類似の表現型を呈した疾患の病態解析

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： Bloom 症候群の類縁疾患である 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、予後不良な難治性疾患である。臨床的には外胚葉形成異常(毛髪異常、爪形成不全)、白内障を合併する I 型と先天性骨欠損および骨肉腫を効率に合併する II 型に分類されるが、両者を合わせてもこれまでに世界で 300 例程度の報告しかなく、本邦における正確な発生数は不明である。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有効な治療法も確立されていない。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様々な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。そこで本研究では、RTS の診断指針を作製し、本邦における発症率の把握と実態調査を行うための基盤を作製した。RTS の原因の一部として 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、1868年に Rothmund らによって初めて報告された。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、両者とも多形皮膚萎縮症、低身長は必発である。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。本症はこれまでに世界で300例程度の報告しかなく、本邦における発症頻度は不明である。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、そのためには明確な診断基準の策定が急務である。そこで、本研究では、RTS の診断指針を作製し、本邦における発症率の把握と実態調査を行うための研究基盤を作製する。

さらに、RTS の発症メカニズムを解明することを目的として、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

文献的に情報収集を行い、RTS の診断指針を作製する。

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 Exon V4 (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. 診断指針(案)

RTS に関して、これまでに確定診断法は確立されていない。Wang と Plon らは、乳児期に発症する難治性非典型的湿疹に加えて、毛髪異常、低身長、骨格異常、白内障、爪の異常、角化症のいずれか 2 つが見られれば、RTS 疑いと定義している。この提唱を参考に以下の RTS 診断指針(案)を作成した。

多形皮膚萎縮症(前駆症状は難治性非典型的湿疹)に加えて、典型的臨床症状が 2 つ以上みられれば、RTS 疑いとする。さらに家族歴あり、なしに分類し、ありの場合、RECQL4 遺伝子検査を行う。また家族歴なしの場合、皮膚生検による多形皮膚萎縮所見の確認、もしくは皮膚線維芽細胞、リンパ球の FISH 解析による染色体異常の確認を行い、いずれかの異常所見が得られれば RECQL4 遺伝子検査を行う。遺伝子検査で異常がみられない場合でも暫定診断とし、確定診断例と同様に定期検査による悪性腫瘍のスクリーニングを行うことを推奨する。また暫定診断例に関して、同意が得られたものに関しては新たな候補遺伝子の解析を進める。

2. RTS 類似の表現型を呈した症例におけるエクソーム解析

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%以上のもののうち、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

RTS の主な臨床症状は、1) 多形皮膚萎縮症(前駆症状は難治性非典型的湿疹)、2) 低身長、3) 骨格異常、4) 日光過敏症、5) 若年性白内障、6) 毛髪異常と多彩であり、特異的なものはなく、また疾患特異的な検査所見もない。原因遺伝子の一つとして RECQL4 遺伝子が同定されているので、遺伝子検査は有用と

考えられるが陽性率は 70%程度である。従って、現時点では複数の臨床症状の組み合わせにより診断基準を定める必要があり、本研究で提唱する診断指針案も主として、複数の臨床症状による診断が主体となっている。RTS には高頻度に悪性腫瘍が合併することから、予防医学の観点からも疑い症例を含めた定期検査を奨励する方針とした。

RTS 類縁疾患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つたが、解析 Algorithm を工夫したり、血縁者の遺伝子解析を行うことで、ターゲットを絞り定める可能性が考えられた。

E. 結論

RTS の本邦における診断指針を作製した。また、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 修復障害が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. 健康危惧情報

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, Shiihara 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, Shiraiishi Y, Hoshino N, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Igarashi T, Ogawa S: Whole-exome sequencing of advanced neuroblastomas. Advances Neuroblastoma Research Conference, Toront, 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 論子, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川 誠司, 五十嵐 隆: 先端的ゲノムスクリー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イ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 睦 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: 骨髄球系抗原陽性 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, 星野論子, 関 正史, 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と SNP アレイを用いた横紋筋肉腫 3 例における初発/再発・転移巣の比較, 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

35) 高橋 寛吉, 加藤 元博, 関 正史, 磯部 清孝, 安井直子, 森 麻希子, 秋山 康介, 康 勝好, 岸本 宏志, 内田 広夫, 滝田 順子, 佐藤 亜以子, 小川 誠司, 花田 良二: FGFR1 および PRDM14 の増幅を認めた rhabdoid rhabdomyosarcoma 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

36) 才田 謙, 松岡 大輔, 塚原 孝典, 野田 俊輔, 日高 義彦, 上條 祐司, 三浦 健一郎, 滝田 順子, 五十嵐 隆, 小池 健一. CLCN5 遺伝子変異を認めた同一家系内の Dent 病の 2 例 (会議録/症例報告). 日本小児腎臓病学会雑誌 (0915-2245)25 巻 1Suppl. Page232(2012.05)

37) 金子 英雄, 内田 靖, 大西 秀典, 深尾 敏幸, 谷内江 昭宏, 清河 信敬, 滝田 順子, 山崎 直也, 田内 久道, 近藤 直実. 本邦における Bloom 症候群の実態調査(会議録). 日本小児アレルギー学会誌(0914-2649)26 巻 3 号 Page506(2012.08)

38) 三浦 健一郎, 張田 豊, 高橋 和浩, 滝田 順子, 五十嵐 隆. 常染色体劣性遠位尿細管性アシドーシスの臨床像と遺伝子変異の解析(会議録). 日本腎臓学会誌(0385-2385)54 巻 3 号 Page233(2012.04)

39) 倉田 盛人, 菅野 陽平, 高原 智子, 後飯 塚 僚, 北村 大介, 滝田 順子, 林 泰秀, 北川 昌伸, 中村 卓郎. preB 細胞性リンパ性白血病 (preB-ALL)発症における BLNK と C/EBP β の協調作用(会議録). 日本病理学会会誌(0300-9181)101 巻 1 号 Page292(2012.03)

40) 滝田 順子. 【造血器腫瘍の新たな分子病態とその臨床的意義】 白血病、MDS における IDH1/2 変異の分子病態と臨床的意義(解説/特集). 血液内科(2185-582X)64 巻 2 号 Page133-138(2012.02)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表