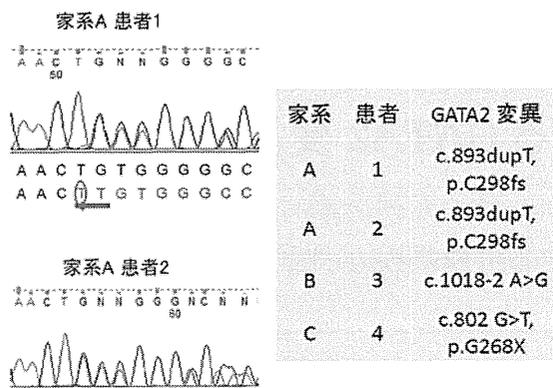


図 1. 家族性 MDS の GATA2 変異



## 2) 特発性再生不良性貧血における GATA2 変異解析

小児特発性再生不良性貧血患者 96 例の末梢血から genomic DNA を抽出し、GATA2 遺伝子変異を解析したが、変異例は認めなかった。

## D. 考察

本邦の小児特発性再生不良性貧血患者では GATA2 変異例は認められなかったことから、頻度は高くないものと考えられるが、ヨーロッパのグループから、再生不良性貧血と鑑別が難しい RCC (Refractory cytopenia of childhood) 症例で GATA2 異常症が高頻度に見出されることが報告されている。また、米国 NIH から、成人特発性再生不良性貧血患者のうち少数例に GATA2 変異例が認められることを報告している。今後、小児造血不全症候群において、免疫抑制療法の適応判定および適切なドナー選択のために、GATA2 遺伝子変異のスクリーニングが必要であると考えられる。

## E. 結論

日本人の小児再生不良性貧血患者 96 例において、GATA2 遺伝子変異について解析を行ったが変異は認められなかったが、今後、小児造血不全症候群において、免疫抑制療法の適応判定および適切なドナー選択のために、GATA2 遺伝子変異のスクリーニングが必要であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatric blood & cancer* 2013(in press)
- 2) Wang X, Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Narita A, Tsumura Y, Doisaki S, Tanaka M, Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Mutation in the THPO gene is not associated with aplastic anaemia in Japanese children. *British journal of haematology* 2012;158:553-555.
- 3) Shimada A, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Ismael O, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Tanaka M, Yoshida N, Matsumoto K, Kato K, Watanabe N, Kojima S. Excellent outcome of allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia using fludarabine-based reduced-intensity conditioning regimen. *International journal of hematology* 2012;95:675-679.

- 4) 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. *Pediatric blood & cancer* 2012;58:780-784.
- 5) Sakaguchi H, Makishima H, Muramatsu H, Visconte V, Jerez A, Jankowska AM, Tiu RV, Maciejewski JP, Kojima S. Mutational analysis of RNA splicing machinery components in 206 children with myeloid malignancies. *Leukemia research*. 2012;36:215-7.
- 6) Saito Y, Aoki Y, Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP, Imaizumi M, Rikiishi T, Sasahara Y, Kure S, Niihori T, Tsuchiya S, Kojima S, Matsubara Y. Casitas B-cell lymphoma mutation in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research* 2012;36:1009-1015.
- 7) 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* 2012;47:600-602.
- 8) Muramatsu H, Makishima H, Maciejewski JP. Chronic myelomonocytic leukemia and atypical chronic myeloid leukemia: novel pathogenetic lesions. *Seminars in oncology* 2012;39:67-73.
- 9) Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Clemente MJ, Ng KP, Muramatsu H, O'Keefe C, Sauntharajah Y, Maciejewski JP. CBL mutation-related patterns of phosphorylation and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia* 2012;26:1547-1554.
- 10) Kato K, Otake H, Tagaya M, Takahashi Y, Ito Y, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Naganawa S, Nakashima T. Progressive hearing loss following acquired cytomegalovirus infection in an immunocompromised child. *American journal of otolaryngology* 2013;34:89-92.
- 11) Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, Verma A, Jankowska AM, Przychodzen B, Visconte V, Tiu RV, O'Keefe CL, Mohamedali AM, Kulasekararaj AG, Pellagatti A, McGraw K, Muramatsu H, Moliterno AR, Sekeres MA, McDevitt MA, Kojima S, List A, Boultonwood J, Mufti GJ, Maciejewski JP. Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood* 2012;119:6109-6117.
- 12) 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. *Pediatric blood & cancer* 2012;59:530-535.
- 13) Ismael O, Shimada A, Hama A, Elshazley M, Muramatsu H, Goto A, Sakaguchi H, Tanaka M, Takahashi Y, Yinyan X, Fukuda M, Miyajima Y, Yamashita Y, Horibe K, Hanada R, Ito M, Kojima S. De novo childhood

myelodysplastic/myeloproliferative disease with unique molecular characteristics. British journal of haematology 2012;158:129-137.

- 14) 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 journal of haematology 2012;156:316-325.
- 15) Fukushima H, Fukushima T, Hiraki A, Suzuki R, Mahmoud SS, Yoshimi A, Nakao T, Kato K, Kobayashi C, Koike K, Fukasawa M, Morishita Y, Doisaki S, Muramatsu H, Sumazaki R. Central nervous system lesions due to juvenile myelomonocytic leukemia progressed in a boy undergoing first line chemotherapy. International journal of hematology 2012;95:581-584.
- 16) Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. Blood 2012;120:1485-1488.
- 17) Abu Kar S, Jankowska AM, Makishima H, Visconte V, Jerez A, Sugimoto Y, Muramatsu H, Traina F, Afable M, Guinta K, Tiu RV, Przychodzen B,

Sakaguchi H, Kojima S, Sekeres MA, List AF, McDevitt MA, Maciejewski JP. Spliceosomal gene mutations are frequent events in the diverse mutational spectrum of chronic myelomonocytic leukemia but largely absent in juvenile myelomonocytic leukemia. Haematologica 2013;98:107-113.

## 2. 学会発表

特になし。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし。

### 2. 実用新案登録

特になし。

### 3. その他

特になし。

## 常染色体優性遺伝形式を示す血小板減少症家系における インテグリンβ3 L718P 変異の同定

研究分担者 小林 正夫(広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学)  
研究協力者 小林 良行(広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学)

### 研究要旨

インテグリンαIIbβ3 (GPIIb/IIIa 複合体)はフィブリノゲン (Fg) とフォンウィルブランド因子 (VWF) の受容体で、そのリガンドとの結合は血栓形成の最終段階である血小板凝集に不可欠なシグナル伝達である。常染色体優性遺伝形式をとる先天性血小板減少症家系、4世代、10名が血小板減少と軽度の出血傾向を示した。疾患原因遺伝子を同定するために家系内患者4名のゲノムDNAを用いて全エクソンシーケンスを行った。4名に共通する90のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の中から、*ITGB3* 遺伝子の T2231C 変異を原因遺伝子変異候補として同定した。L718P 変異の機能解析から、インテグリンβ3 の細胞膜周辺領域のヘテロ接合性変異が機能獲得型変異としてインテグリンシグナル伝達経路の恒常的部分活性化と RhoA シグナルの抑制を示すことを明らかにした。これらの機序が血小板機能異常と大小不同を伴った血小板減少に関与していることが示唆された。

### A. 研究の目的

常染色体優性遺伝形式をとる先天性血小板減少症家系、4世代、10名について、既存の方法での解析を行ってきたが、疾患を同定するには至らなかった。遺伝性が明らかであることから、全エクソンシーケンス解析を行い、責任遺伝子の検索を行った。インテグリンβ3 タンパク質をコードする *ITGB3* 遺伝子のヘテロ接合性遺伝子変異 (T2231C) を同定し、本遺伝子変異により産生されるインテグリンβ3L718P 変異の血小板機能の解析を通して血小板減少への関与を検討した。

### B. 研究方法

発端症例は4歳の女兒で、血小板数は  $49-72 \times 10^9/L$  であった。末梢血塗沫標本では血小板大小不同、巨大血小板を認めた。血小板凝集能検査でADP、コラーゲン刺激による凝集は著明に低下していた。(参照:Figure1) 本家系内で4世代10名に同様の症状が認められ、疾患原因遺伝子を同定するために家系内患者4名のゲノムDNAを用いて全エクソンシーケンスを行った。本研究は広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会ならびに臨床研究倫理審査委員会での承認を得た。

### C. 研究結果

4名に共通する90のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の中から、*ITGB3* 遺伝子の T2231C 変異を原因遺伝子変異候補として同定した。また、家系内のその他の患者2名でもサンガーシーケンス法により同部位の変異を確認した。(参照:Table1)

*ITGB3* 遺伝子の T2231C 変異を確認した6名においてインテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3の血小板表面発現は、健常人の50-60%に低下していた。インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3は、通常非活性化状態(静止期)にありFgやVWFなどのリガンドを結合しないが、アゴニスト刺激により生じたinside-outシグナルにより構造変化して活性化型となりリガンドを結合する。インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化型構造を認識するPAC-1抗体を用いた検討で、健常コントロール由来の静止期血小板にはPAC-1抗体の結合はみられなかったが、患者由来の静止期血小板では明らかな結合を認めた。一方、ADP刺激下の血小板ではPAC-1抗体の結合は患者群で健常コントロールより著明に低下していたことから、患者血小板のインテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3は恒常的活性化状態であるが、ADP刺激による活性化の増強を認めず、完全な活性化が妨げられていると考えられた。インテグリン $\beta$ 3の野生型と種々の変異体をインテグリン $\alpha$ IIbとともにCHO-K1細胞に発現させPAC-1抗体への結合を検討した結果、本変異ではインテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3が部分活性化状態にありADP刺激に対する活性化が障害されていると考えられた。

次に、インテグリンシグナル伝達経路の異常を検討するために、WT、L718P変異、およびインテグリン $\beta$ 3のC末端の

CSK(C-Src)結合部位を欠失させたL718P(del.759)変異をもつインテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3変異体を作成し、CHO-K1細胞に発現させ、変異体の性質を個々に検討した。インテグリン $\beta$ 3 L718P変異を発現させたCHO-K1細胞は固相化フィブリノゲン上で異常な胞体突起(proplatelet)形成を認めたが、これに低分子量G蛋白質であるRhoAの恒常的活性化型変異体(Q63L)を共発現させると胞体突起形成は阻害された。C-Srcはインテグリン $\beta$ 3のC末端への結合を介してRhoA活性を抑制することが知られており、C-Srcとの結合部位を欠失させたL718P(del.759)変異体が発現させた場合も同様に胞体突起形成は認めなかった。このことから、本変異で認められる異常胞体突起形成に、恒常的なC-Srcのインテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3への結合によるRhoAシグナルの抑制の関与が考えられた。

### D. 考察

全エクソンシーケンスから4名に共通する90のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の中から、*ITGB3* 遺伝子の T2231C 変異を原因遺伝子変異候補として同定した。また、家系内のその他の患者2名でもサンガーシーケンス法により同部位の変異を確認したことから疾患責任遺伝子と考えた。本変異は2011年にイタリアの家系で報告されたのが最初であったが、血小板数においては表現型が若干異なっていると考えられた。家族性血小板減少症の一つの病型を同定した。

インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3の活性化型構造を認識するPAC-1抗体を用いた検討からはこ

の変異が Gain-of-function として働いていることが推測された。

血小板減少をもたらす機序の解明は明確ではないが、RhoA シグナルの抑制が関与している結果を得た。しかし、血小板が巨核球から産生される機序は不明な点が多く、本家系で認められた血小板の大小不同を伴う減少の機序をインテグリンシグナル伝達経路との関係から明らかにしていく必要がある。

## E. 結論

全エクソンシーケンスから *ITGB3* 遺伝子の T2231C 変異を同定した。家族性血小板減少症の一病型を明らかにすることが出来た。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous ELANE mutation. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 (in press)
- 2) Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency.. Blood. 2012;119(23):5458-66.
- 3) Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin  $\beta 3$  L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. Br J Haematol. 2013(in press)
- 4) Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong XF, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Alzahrani M, Shehri MA, Elghazali G, Takihara Y, Kobayashi M: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease.. Human Mutation 2012;33(9):1377-87.
- 5) Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Endo M, Yagita H, Kurosawa H, Thomas Look A, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K: Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. Leukemia. 2012;26(12):2483-93
- 6) Ohno N, Kobayashi M, Hayakawa S, Utsunomiya A, Karakawa S: Transient pseudothrombocytopenia in a neonate: Transmission of a maternal EDTA-dependent anticoagulant. Platelets. 2012;23(5):399-400.
- 7) Kajiume T, Sera Y, Kawahara Y, Matsumoto M, Fukazawa T, Imura T,

Yuge L, Kobayashi M. Exp Hematol. Regulation of hematopoietic stem cells using protein transduction domain-fused Polycomb.2012;40(9):751-760.

- 8) 溝口 洋子, 鎌田 綾, 三木 瑞香, 谷博雄, 世羅 康彦, 中村 和洋, 小林 正夫: Glanzmann thrombasthenia への遺伝子組み換え活性型第 VII 因子製剤による止血効果, 日本小児血液・がん学会雑誌. 49(1-2)9: 61-66. 2012.
- 9) 梶梅 輝之, 浅野 孝基, 世羅 康彦, 小林 正夫: 輸血後蕁麻疹発症前の末梢血一般検査所見, アレルギー. 61(8): 1086-1091. 2012.
- 10) 溝口洋子, 津村弥来, 岡田賢, 小林 正夫. 慢性性皮膚粘膜カンジダ症と機能獲得性 STAT1 変異. 臨床免疫・アレルギー科. 57(4): 437-443. 2012.

## 2. 学会発表

- 1) Osamu Hirata, Miyuki Tsumura, Yoko Mizoguchi, Satoshi Okada, Shizuko Minegishi, Tomohiro Morio, Masao Kobayashi: Gain-of-function mutations of STAT1 in Japanese patients with CMCD. The 15th European Society for Immunodeficiencies Meeting. Florence, Italy, 2012.10
- 2) Yoshiyuki Kobayashi, Hirotaka Matsui, Akinori Kanai, Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Mizuka Miki, Kazuhiro Nakamura, Shinji Kunishima, Toshiya Inaba and Masao Kobayashi: Identification of integrin b3 L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant macrothrombocytopenia.
- 3) Rie Onodera, Kazuhiro Nakamura, Kikuyo Taniguchi, Emi Kurita, Asako Hiraoka, Kaduta Yasui, Nobuki Matsuyama, Fumiya Hirayama, and

Masao Kobayashi: A novel method using extracted human neutrophil antigens from HNA gene-transfected cell lines for detection of antibodies against human neutrophil antigens. The 54th Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta 2012.12

- 4) 溝口 洋子, 津村 弥来, 平田 修, 峯岸 志津子, 森尾 友宏, 岡田 賢, 小林 正夫: 機能獲得性 STAT1 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症の解析. 第 54 回日本小児血液学会 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし。

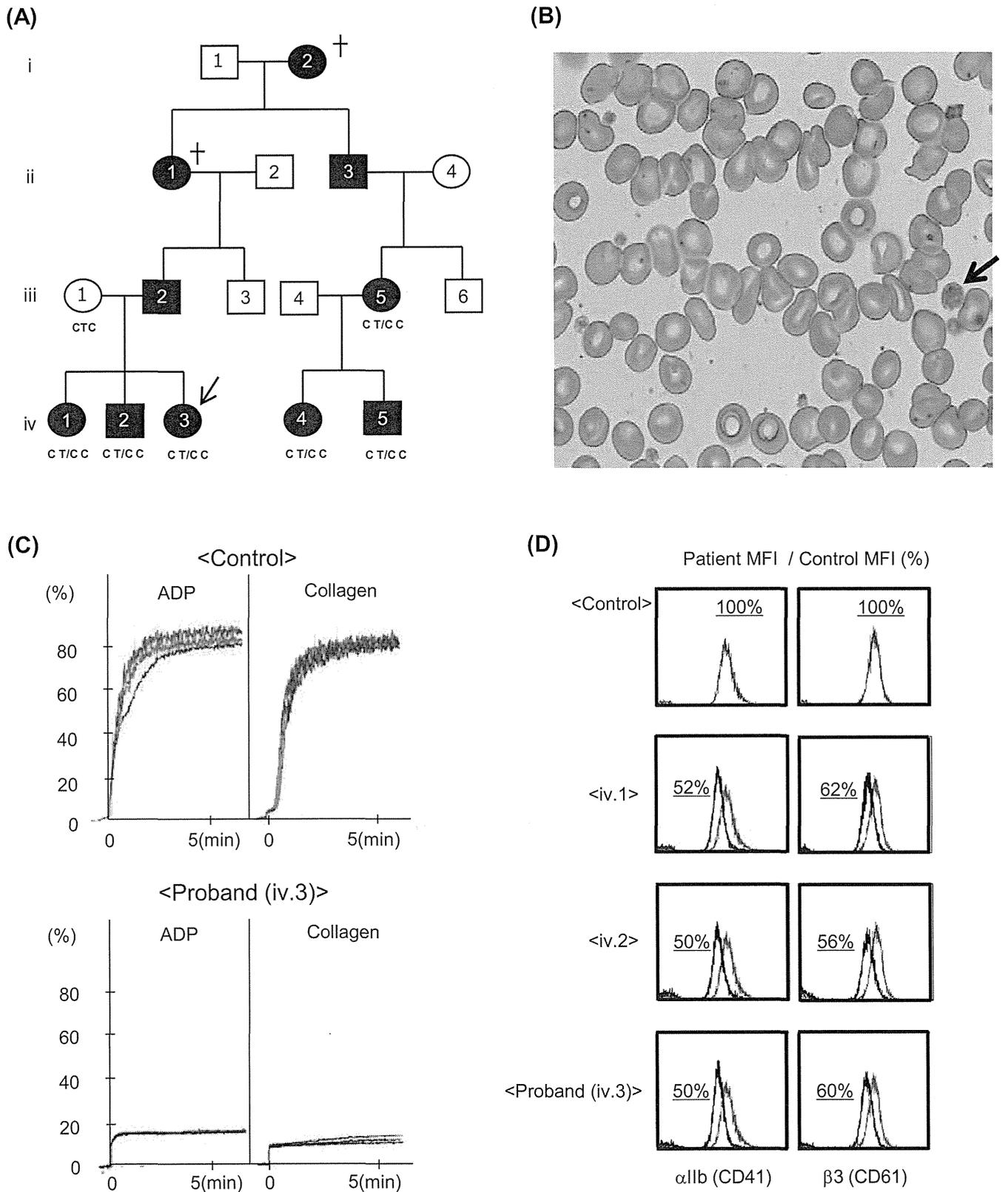
### 2. 実用新案登録

特になし。

### 3. その他

特になし。

Figure 1



**Table 1** Laboratory data of seven individuals of the pedigree

Patient	Sex	Age	Platelet count ( $\times 10^9/L$ )	MPV (fl)	PDW (%)	Relative MFI value compared to control (%)		$\alpha$ IIb $\beta$ 3 molecules		Platelet aggregation (%)	
						$\alpha$ IIb	$\beta$ 3	MFI	copies/platelet	ADP (4 $\mu$ M)	collagen (2.0 $\mu$ g/ml)
iii.1	F	37	210.0	10.2	12.1	110	111	389.2	65,200	NA	NA
iii.5	F	34	38~67	8.5~11.3	10.0~19.0	43	75	NA	NA	15	12
iv.1	F	11	30~43	7.8~11.2	9.7~16.3	52	62	232.4	38,400	16	8
iv.2	M	8	49~64	10.3~11.1	10.1~14.7	50	56	216.4	35,700	23	16
iv.3	F	6	49~72	9.8~10.9	11.1~13.3	50	60	212.1	35,000	12	8
iv.4	F	4	32~59	9.9~10.8	12.3~15.6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
iv.5	M	2	28~50	8.9~9.0	18.0~18.4	49	51	NA	NA	NA	NA

MPV: mean platelet volume (normal range: 9.4 - 12.3 fl ), PDW: Platelet distribution width (normal range: 9.5 - 14.8 % ), NA: not available  
 $\alpha$ IIb $\beta$ 3 molecules (copies/platelet) were calculated as  $10^{(1.022 \times \log(\text{MFI}) + 2.1679) - 241}$

## X 染色体不活化異常により発症した Wiskott-Aldrich 症候群

研究分担者 原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授)

### 研究要旨

Wiskott-Aldrich 症候群(WAS)は、X 染色体上に code された WASP 遺伝子の変異によって通常男児に発症する。近年、常染色体劣性遺伝形式をとる WASP-interacting protein (WIP)欠損による WAS が報告されたが極めてまれである。今回我々は WAS 女児例を明らかにした。患児は超低出生体重児として出生し、生下時より血小板減少が持続した。生後 4 か月時に内視鏡検査で分類不能型腸炎を確認したことから WAS を疑い、WASP 欠損を確認した。cDNA 解析では、WASP 遺伝子にナンセンス変異を認め、正常 WASP 遺伝子の発現を認めなかった。他方、genome DNA の解析では、heterozygous な WASP ナンセンス変異を認めた。WIP 遺伝子に異常は認めなかった。Human androgen receptor gene の繰り返し配列多型を利用して X 染色体不活化を解析したところ、血液・頬粘膜・爪のいずれにおいても父親由来の X 染色体が完全に不活化していた。X 染色体不活化異常によって発症した女性 WAS は本邦初であり、海外の報告を含めても 2 例目である。正常細胞は WASP 欠損細胞と比較して増殖優位性があるため女性には WAS は発症しにくいとされている。患児は X 染色体不活化のほぼ完全な skewing により発症したものと考えられた。

### A. 研究の目的

Wiskott-Aldrich 症候群(WAS)は、サイズの減少を伴う血小板減少、湿疹、易感染性を3主徴とし、X 染色体上に code された WASP 遺伝子の変異によって通常男児に発症する。近年、常染色体劣性遺伝形式をとる WASP-interacting protein (WIP) 欠損による WAS が報告されたが、きわめて稀であり、国内からの報告はない。元来、正常細胞は WASP 欠損細胞に比して増殖優位性があるため女性には WAS は発症しにくいものと考えられている。今回我々は WASP 遺伝子変異に伴って発症した WAS

の女児例を経験した。本症例では、血液細胞中の WASP の発現はほぼ完全に欠損しており、女児における WAS 発症のメカニズムについて検討した。

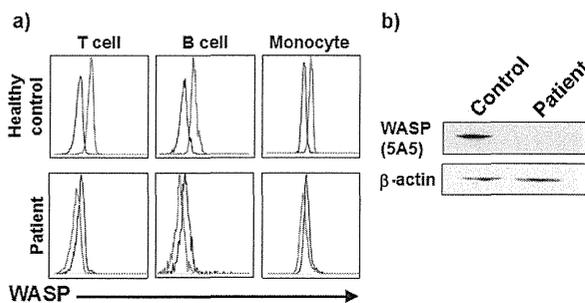
### B. 研究方法

#### 症例

生後 6 か月の女児。家族歴に特記事項なし。在胎 29 週 2 日、出生体重 641g (small for gestational age)、Apgar 6/ 7 点 (1 分値/ 5 分値)で出生し、前医NICUへ入院。生下時より血小板数  $1-3 \times 10^4/L$ の血小板減少を認め、骨髄巨核数も減少していた。TORCH症候群などの感染症は否定的

で、血小板輸血、大量免疫グロブリン療法、デキサメサゾン投与などを施行されたが改善はみられなかった。適宜血小板輸血を施行したが、血小板数によらず血便を認めるようになった。消化管造影検査で腸回転異常症を認め、修復術を施行したが血便は改善なく、下部消化管内視鏡検査及び病理検査で分類不能型腸炎と診断した。血小板減少と炎症性腸疾患を認めたことから WAS を疑い、フローサイトメトリ法・Western blot 法により末梢血単核球において WASP 欠損を確認したことから同症と診断した (図 1)。

遺伝子解析に関しては、九州大学ヒトゲノム・図 1



### 方法

X 染色体不活化の状態は、Human androgen receptor gene の繰り返し配列多型近傍のメチル化感受性制限酵素部位を利用した解析によって解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析研究倫理委審査委員会の承認を得て行った。

### C. 研究結果

女性 WAS 発症のメカニズムを解明するために、WASP 遺伝子の解析を行った。cDNA 塩基配列解析では、WIPF1 遺伝子に変異はなく、WASP 遺伝子 exon 10 の 10 塩基欠失によるフレームシフト変異 (c.1276\_1285 del\_GCCCCTGGTG (exon 10); p.Ala426GlyfsX15) を確認した (図 2)。父に WASP 遺伝子の変異は認めず、母はキャリアであった (data not shown)。また、genomic DNA 塩基配列解析では、患者は WASP 遺伝子に関して、上記異常アリルと父由来の正常アリルのヘテロ接合体であった (図 3)。

図 2

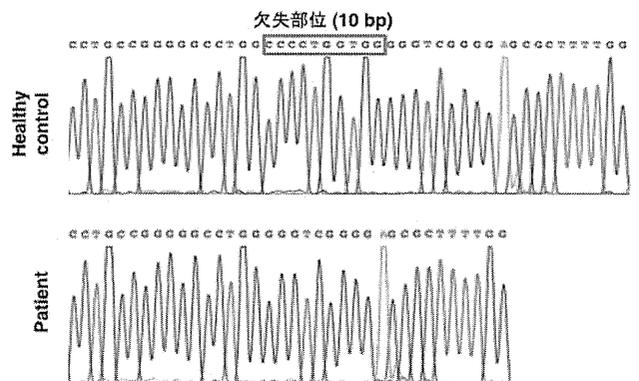
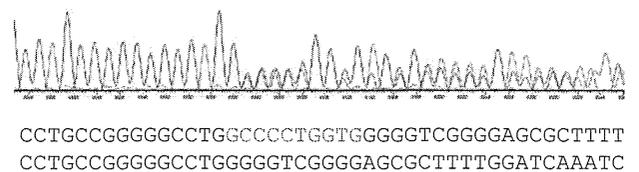


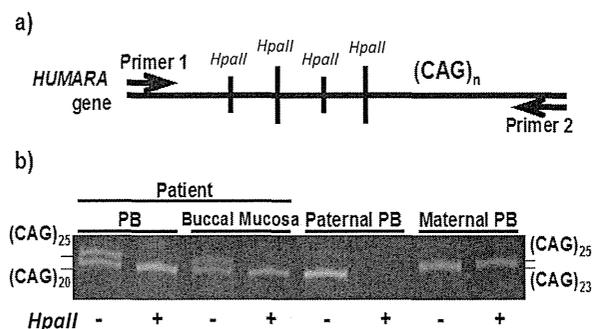
図 3



これらの結果から、患児は変異 WASP 遺伝子のヘテロ接合体における X 染色体の不活性化異常によって WAS を発症したと考えられたため、X 染色体不活性化異常について検討を行った。X 染色体の不活性化異常は、X 染色体に局在する human

androgen receptor (*HUMARA*)遺伝子上の CAG 繰り返し配列多型を利用して解析した (*HUMARA* clonality assay)。メチル化特異的制限酵素である *Hpa*II により、メチル化されていない *HUMARA* 遺伝子は切断され、PCR による増幅が不可能となる (図 4a)。

図 4



一般に、女性は X 染色体がランダムに不活性化されていることから 2 種類の大きさの PCR 産物を検出するが、X 染色体の不活性化に偏りが生じると片親に由来する PCR 産物のバンドが強く検出され、この信号強度の差異により X 染色体の不活性化パターンを判別することが可能となる。患者末梢血および患者頬粘膜では、父由来の *HUMARA* 遺伝子領域のみが PCR により増幅され、父由来の X 染色体が完全に不活性化されていることが確認された(図 4b)。

#### D. 考察

変異 *WASP* 遺伝子のヘテロ接合にも関わらず WAS を発症した女児例を経験した。本症例においては、何らかの原因により生殖細胞レベルで生じた X 染色体の不活性化異常が原因となり、WAS を発症したと考えられた。現在までに WAS の女児例は 3 例報告されており、X 染色体の不活性化異常に伴い発症した症例は 1 例のみであっ

た<sup>1)</sup>。加齢や発がんに関連して X 染色体の不活性化パターンに偏りが生じることは以前より知られているが<sup>2)</sup>、本症例のように生下時より極めて高度な偏りが生じることは稀である。X 染色体の不活性化は胎生初期に無作為に決定される現象であり、本症例のように生殖細胞レベルで生じたと考えられる X 染色体不活性化の異常においては、WAS とは独立した何らかの遺伝的要因が背景に存在するものと推測される。今までに、血友病や X 連鎖性無  $\gamma$  グロブリン血症<sup>3)</sup>などの伴性劣性遺伝性疾患でも、X 染色体不活性化の異常により女性キャリアに発症した報告は複数みられ、血友病 A が複数の同胞女性キャリアに発症した家族例<sup>4)</sup>のように X 染色体不活性化に関与する遺伝的異常を示唆する報告も散見される。これら症例の多くは未だ原因が明らかとなっていないが、X 染色体不活性化に関与する X-inactive specific transcript (*XIST*) 遺伝子のプロモーター領域の変異によって X 染色体の不活性化に偏りが生じ、女性キャリアに発症した家族例も報告されており<sup>5)</sup>、X 染色体不活性化のメカニズムや疾患との関連性が徐々に明らかとなりつつある。本症例でみられた X 染色体の不活性化異常の原因を明らかにすることは、家族診断や遺伝相談などの臨床的側面と X 染色体の不活性化メカニズムの解明という基礎的側面の双方において重要な情報をもたらすと考える。

#### E. 結論

X 染色体不活性化異常により、X 連鎖劣性遺伝性疾患が女性にも生じ得る。さらに、

この症例のように、X 染色体不活化は、完全に偏る場合がある事が確認された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T: Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. *Clin Endocrinol. (Oxf)* 77: 628-634, 2012
- 2) Obinata K, Lee T, Niizuma T, Kinoshita K, Shimizu T, Hoshina T, Sasaki Y, Hara T: Two cases of partial dominant interferon- $\gamma$  receptor 1 deficiency that presented with different clinical courses of bacille Calmette-Guérin multiple osteomyelitis. *J Infect Chemother.* (in press)
- 3) Kusuhara K, Hoshina T, Saito M, Ishimura M, Inoue H, Horiuchi T, Sato T, Hara T: Successful treatment of a patient with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome using a half-dose of etanercept. *Pediatr Int.* 54: 552-555, 2012
- 4) Hoshina T, Kusuhara K, Saito M, Mizuno Y, Hara T: NKRP1A+  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T cells are preferentially induced in patients with Salmonella infection. *Hum Immunol.* 73: 623-628, 2012
- 5) Yamamura K, Ihara K, Ikeda K, Nagata H, Mizuno Y, Hara T: Histo-blood group gene polymorphisms as potential genetic modifiers of the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. *Int J Immunogenet.* 39(2): 119-125, 2012
- 6) Onoyama S, Ihara K, Yamaguchi Y, Ikeda K, Yamaguchi K, Yamamura K, Hoshina T, Mizuno Y, Hara T: Genetic susceptibility to Kawasaki disease: analysis of pattern recognition receptor genes. *Hum Immunol.* 73: 654-660, 2012
- 7) Yamamura K, Joo K, Ohga S, Nagata H, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T: Thrombocytosis in asplenia syndrome with congenital heart disease: a previously unrecognized risk factor for thromboembolism. *Int J Cardiol.* 2012 (in press)
- 8) Shiraishi A, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Takimoto T, Takada H, Miyamoto T, Abe Y, Hara T: Treatment choice of immunotherapy or further chemotherapy for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 59: 265-270, 2012
- 9) Imagawa T, Takei S, Umebayashi H, Yamaguchi K, Itoh Y, Kawai T, Iwata N, Murata T, Okafuji

I, Miyoshi M, Onoe Y, Kawano Y, Kinjo N, Mori M, Mozaffarian N, Kupper H, Santra S, Patel G, Kawai S, Yokota S: Efficacy, pharmacokinetics, and safety of adalimumab in pediatric patients with juvenile idiopathic arthritis in Japan. Clin Rheumatol. 31: 1713-1721, 2012

- 10) Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T: Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. Mod Rheumatol. (in press)
- 11) Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusuhara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. Pediatr Development Pathol. 15: 151-155, 2012

## 2. 学会発表

特になし。

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし。

### 2. 実用新案登録

特になし。

### 3. その他

特になし。

## 参考文献

- 1) Parolini O, Ressmann G, Haas OA, Pawlowsky J, Gadner H, Knapp W, Holter W. X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. N Engl J Med. 29;338(5):291-5, 1998
- 2) Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. Blood 88:59-65, 1996
- 3) Takada H, Kanegane H, Nomura A, Yamamoto K, Ihara K, Takahashi Y, Tsukada S, Miyawaki T, Hara T. Female agammaglobulinemia due to the Bruton tyrosine kinase deficiency caused by extremely skewed X-chromosome inactivation. Blood. 103(1):185-7, 2004
- 4) Bicocchi MP, Migeon BR, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Boeri E, et al. Familial nonrandom inactivation linked to the X inactivation centre in heterozygotes manifesting haemophilia A. Eur J Hum Genet 13:635-40, 2005
- 5) Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena JF, Naumova A, Sapienza C, et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X chromosome inactivation. Nat Genet 17:353-6, 1997

## 血液免疫系細胞分化障害による疾患の診断と 治療に関する調査研究

研究分担者 山口 博樹 (日本医科大学血液内科 講師)

### 研究要旨

先天性角化不全症(DKC)におけるテロメア関連遺伝子変異は診断に重要である。次世代シーケンサーによる遺伝子変異検索は、正確で効率的にDKCの既知の原因遺伝子変異を同定することができた。また新規遺伝子変異の探索では、ロスモンド・トムソン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、Bloom症候群の原因遺伝子であるRECQL4、ATM、BLMのヘテロ変異が高率に認められ、DKCの病態への関与が考えられた。

### A. 研究の目的

先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DKC)は網状色素沈着、爪の萎縮、舌の粘膜白斑症などといった特徴的身体的所見を伴う先天性の骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)である。10歳前後までに約80%以上の症例にこれらの特徴的身体所見が付随しBMFを発症する。また約8%の症例に皮膚、上咽頭、消化管の扁平上皮癌や腺癌などの悪性腫瘍や、急性白血病などの造血器腫瘍の発生が認められる。遺伝型式はX連鎖劣性遺伝が35%、常染色体優性遺伝が5%、常染色体劣勢遺伝が数%に認められるが、残りの約60%近くが型式不明である。DKCの約60%の症例において原因遺伝子が同定され、テロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、*DKC1*、*telomerase RNA component (TERC)*、*telomerase reverse transcriptase (TERT)*などや、Shelterin複合体を構成する

蛋白である *TRF-interacting nuclear protein (TINF2)*に変異が認められている。

テロメラーゼ複合体は細胞分裂によるテロメアの短縮化に対しテロメアの複製、安定の役割をもち、Shelterin複合体はテロメアの先端部位の特異的な構造形成や保護などを行っている。DKCはこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結果造血幹細胞などの増殖能に障害が起き上記の症候が形成されると考えられている。

これまでに我々はDKCの原因遺伝子である上述のテロメア制御遺伝子の変異が、一部の再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)や骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)に認められ、特徴的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型DKCの存在が明らかにした(Lancet 2003;362:1628, Blood 2003;102:916, N Engl J Med. 2005 352: 1413)。不全型DKC

は臨床的に AA や MDS と診断され、効果が得られない免疫抑制療法 (immunosuppressive therapy: IST)が行われることがある。以上より BMF の臨床診断において不全型 DKC を鑑別することは重要である。

現在のところ DKC や不全型 DKC の診断基準は定まっておらず、臨床的には上述の特徴的身体的所見を伴う BMF、テロメア長の短縮、テロメア関連遺伝子の変異の同定によって診断を下している。しかしテロメア関連遺伝子の変異の同定に関しては原因遺伝子だけでも 6 種類存在し、その変異も一塩基変異から大欠失変異や片アレル欠失まで多彩で従来のサンガー法による変異のスクリーニングは効率的ではない。また約 40%の症例は原因遺伝子が同定されていないことも問題である。

近年次世代高速シーケンサーが登場し、これまでのサンガー法による直接塩基決定法より、より早く効率的に塩基配列の決定が可能となった。本研究は大欠失変異や片アレル欠失に関しては SNP アレイ解析で、一塩基変異に関しては次世代シーケンサーを応用し、効率的に原因遺伝子の変異が同定できるかを検討することを目的としている。また原因遺伝子が同定されていない症例に関しては、全 exon シーケンスを行い、新規原因遺伝子を同定することを目標としている。

## B. 研究方法

研究対象は、特徴的身体的所見を伴う DKC 症例、もしくはテロメア長の短縮が認められた不全型 DKC 症例。目標症例数は 20 症例。

既知の遺伝子変異のスクリーニングは、*DKC1*、*TERC*、*TERT*、*NOPI0*、*NHP2*、*TINF2*を対象に遺伝子解析を行う。大欠失変異や片アレル欠失のスクリーニングは、東京大学医学部附属病院・がんセンターの SNP アレイ解析を用いて行う。一塩基変異などのスクリーニングは、日本医科大学生命科学センターの ABI Ion PGM™ シーケンサーもしくは、従来の direct sequence 法にて行う。

新規遺伝子変異の探索は、上記のスクリーニングにおいて変異が同定出来なかった症例に関して、東京大学医学部附属病院・がんセンターの次世代シーケンサー Illumina 社 GAI, GAIx, HiSeq2000 を用いて全 exon シーケンスを行う。新規遺伝子が同定された場合は、そのバリデーションや機能解析を日本医科大学生命科学センターにて行う。

倫理面への配慮として、本研究は当施設遺伝子倫理審査委員会において承認が得られており以下の配慮を予定している。生命倫理上の配慮に関しては、患者、及び健康ボランティアの人権、利益の保護について文書にて十分説明をしたうえで同意を得る。また研究への協力に同意した後であってもその同意を取り消すことができること、更に本研究への同意が得られない場合においても今後の治療などにはなんら不利益を被らないことを説明する。個人情報漏洩に対する取り組みとして研究組織とは別に個人情報管理者をおき連結可能匿名化をはかったうえで解析をおこなう。同意が撤回された場合は、検体、診療情報、遺伝情報はすべて匿名化されたまま焼却により破棄する。得られた結果は学会や論文と

して発表するが個人情報が出ることはない。遺伝子結果の開示を研究対象者が要求する場合は、倫理的問題を考慮し遺伝子カウンセリングを施行し、結果の告知は臨床遺伝専門医(遺伝カウンセラー)により行う。

## C. 研究結果

### 1. 既知の遺伝子変異の次世代高速シーケンサーを用いたスクリーニング

2012年12月現在、既知の原因遺伝子に変異を認めず、テロメア長の短縮が確認されたDKC症例、不全型DKC症例16症例を集積した。

その中で表1に示す様に、5症例においては、サンガー法による直接塩基決定法では原因遺伝子が同定できなかったが、次世代高速シーケンサーによって既知の原因遺伝子の変異を同定することが出来た。

表1 次世代高速シーケンサーによって同定された既知の遺伝子変異

Pt No.	Gene	Mutation type	Mutation
299	<i>TINF2</i>	nonsynonymous SNV	c.G845A:p.R282H
300	<i>TINF2</i>	frameshift insertion	c.824_825insA:p.T275fs
301	<i>DKC1</i>	nonsynonymous SNV	c.T1193C:p.L398P
303	<i>DKC1</i>	nonsynonymous SNV	c.C91A:p.Q31K
385	<i>TERT</i>	nonsynonymous SNV	c.C1895G:p.P632R

### 2. 次世代高速シーケンサーを用いた新規遺伝子変異の探索

既知の遺伝子変異がサンガー法や次世代高速シーケンサーにて同定されなかった症例に関して現在新規の遺伝子変異の探索を行っている。現時点では表2に示す様な新規遺伝子変異の候補が抽出されている。

表2 次世代高速シーケンサーによって抽出された新規遺伝子変異候補

Pt No.	Gene	Mutation type	Mutation
378	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.G3313C:p.G1105R
379	<i>HSPBP1</i>	nonsynonymous SNV	c.C92G:p.S31C
379	<i>HSPBP1</i>	nonsynonymous SNV	c.T91G:p.S31A
380	<i>TP53BP1</i>	nonsynonymous SNV	c.C2591G:p.T864R
384	<i>ATM</i>	nonsynonymous SNV	c.G3778A:p.V1260M
384	<i>BLM</i>	nonsynonymous SNV	c.G3385C:p.G1129R
385	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.G1405A:p.V469M
386	<i>BLM</i>	nonsynonymous SNV	c.G2148C:p.L716F
386	<i>TP53BP2</i>	nonsynonymous SNV	c.A1375G:p.K459E
390	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.C1394T:p.T465M
391	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.C215T:p.A72V

## D. 考察

次世代高速シーケンサーによる遺伝子変異検索は、従来のサンガー法による直接塩基決定法と比較してより正確で効率的に既知の遺伝子変異を同定することができた。DKCのように原因遺伝子が多く、変異も一塩基変異から大欠失変異や片アレル欠失まで多彩である疾患において、臨床遺伝子診断をする場合に、次世代高速シーケンサーによるターゲットシーケンスは有用であると考えられる。

新規遺伝子探索に関しては、現在探索中ではあるが、表2に示すように早老症の一つとして考えられているロスモンド・トムソン症候群の原因遺伝子である*RECQL4*のヘテロ変異が高率(4/11(36.3%))に抽出された。ロスモンド・トムソン症候群は常染色体劣性遺伝疾患であるので*RECQL4*のヘテロ変異がDKCの病態にどのように関与しているのかは不明である。また症例384のように常染色体劣性遺伝疾患である毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子である*ATM*と毛細血管拡張性運動失調症様疾患であるBloom症候群の原因遺伝子である*BLM*のヘテロ変異を同時に認める症例があった。*ATM*と*BLM*は遺伝子修復に関与する遺伝子群であり、これらのヘテロ変

異の共存がどのように DKC の病態に関与しているのかは不明だが、次世代高速シーケンサーで網羅的遺伝子変異探索をすることによって、既知の常染色体劣性遺伝疾患のヘテロ遺伝子変異の組み合わせによる新たな病態が明らかになるのかもしれない。

## E. 結論

次世代高速シーケンサーによる遺伝子変異検索は、正確で効率的に DKC の既知の原因遺伝子変異を同定することができた。また *RECQL4*, *ATM*, *BLM* といった常染色体劣性遺伝疾患のヘテロ変異が高率に認められ、DKC の病態への関与が考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 山口博樹、檀 和夫. 骨髄不全症候群におけるテロメア制御異常. 血液フロンティア. 2012; 22(6): 941-952.

### 2. 学会発表

1) 山口博樹、檀 和夫. 先天性造血障害の病態解明の進歩. 日本小児血液がん学会学術集会. 2012 年 12 月. 横浜

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特になし。

### 2. 実用新案登録

特になし。

### 3. その他

特になし。

### Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O.	A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins.	Curr Chem Genomics	6	27-37	2012
Yang X, Kanegane H, Nishida N, Imamura T, Hamamoto K, Miyashita R, Imai K, Nonoyama S, Sanayama K, Yamaide A, Kato F, Nagai K, Ishii E, van Zelm M.C., Latour S, Zhao X.D., Miyawaki T.	Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan.	J Clin Immunol.	32	411-420	2012
Ishida H, Imai K, Honma K, Tamura S, Imamura T, Ito M, Nonoyama S.	GATA-2 anomaly and clinical phenotype of a sporadic case of lymphedema, dendritic cell, monocyte, B- and NK-cell (DCML) deficiency, and myelodysplasia.	Eur J Pediatr.	171	1273-1276.	2012
Suri, D, Singh S, Rawat A, Gupta A, Kamae C, Honma K, Nakagawa N, Imai K, Nonoyama S, Oshima K, Mitsui K, Ohara O, Bilhou-Nabera C, Proust A, Ahluwalia J, Dogra S, Saikia B, Minz R. W, Sehgal S.	Clinical profile and genetic basis of Wiskott-Aldrich syndrome at Chandigarh, North India.	Asian Pac J Allergy Immunol.	30	71-78	2012
Nozaki, T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T.	Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan.	Clin Endocrinol (Oxf)	77	628-634	2012
Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, Miya K, Yang X, Nomura K, Takezaki S, Yamada M, Ohara O, Kamae C, Imai K, Nonoyama S, Wada T, Yachie A, Hershfield M.S, Ariga T, Miyawaki T.	Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis.	Int J Hematol	95	692-696	2012
Kobayashi D, Kogawa K, Imai K, Tanaka T, Sada A, Nonoyama S.	Hyper-eosinophilia in granular acute B-cell lymphoblastic leukemia with myeloid antigen expression.	Pediatr Int.	54	543-546	2012
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.	32	690-697	2012
Kanegane H, Taneichi H, Nomura K, Wada T, Yachie A, Imai K, Ariga T, Santisteban I, Hershfield M.S, Miyawaki T.	Successful bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency.	Pediatr Transplant	in press		2012
Sakai H, Okafuji I, Nishikomori R, Abe J, Izawa K, Kambe N, Yasumi T, Nakahata T, Heike T.	The CD40-CD40L axis and INF-g play critical roles in Langerhans giant cell formation.	Int. Immunol.	24(1)	5-15	2012
Hiejima E, Komatsu H, Takeda Y, Sogo T, Inui A, Okafuji I, Nishikomori R, Nakahata T, Fujisawa T.	Acute liver failure in young children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis without macrophage activation syndrome: Report of two cases.	J. Pediatr. Child Health	48(3)	E122-5	2012
Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Mutara T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T.	Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency.	Blood	119(23)	5458-5466	2012
Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong X, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova J, AlZahrani M, Shehri MA, ElGhazali G, Takihara Y, Kobayashi M.	Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease.	Human Mutation	33(9)	1377-1387	2012
Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuse J.E, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ozawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito M.K.	Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery.	Blood	120(6)	1299-1308	2012
Izawa K, Hijikata A, Tanaka N, Kawai T, Saito MK, Goldbach-Mansky R, Aksentijevich I, Yasumi T, Nakahata T, Heike T, Nishikomori R, Ohara O.	Detection of base substitution-type somatic mosaicism of the NLRP3 gene with >99.9% statistical confidence by massively parallel sequencing.	DNA Res.	19(2)	143-152	2012
Mizuno T, Sakai H, Nishikomori R, Oshima K, Ohara O, Hata I, Shigematsu Y, Ishige T, Tamura K, Arakawa H.	Novel mutations of MVK gene in Japanese family members affected with hyperimmunoglobulinemia D and periodic fever syndrome.	Rheumatol Int.	32(12)	3761-3764	2012