

難治性小児腫瘍のゲノムプロファイリングによる 臨床病態・予後指標の探索

研究分担者 小川 誠司 京都大学 腫瘍生物学 教授

研究要旨： 散発性肺芽腫の発症分子機構を解明するために、初発、再発例を含む肺芽腫 12 例を用いて、SNP アレイによるゲノムコピー数の解析、次世代シーケンサーによる exom 解析を行った。SNP アレイでは、8 番染色体の増加が最も特徴的であり、次いで TP53 を含む 17 番染色体短腕(17p)領域のヘテロ接合性の消失(LOH)が高頻度に認められた。また、19q の高度増幅も 3 例に認められた。7 例における Exom 解析の結果、DICER1 と TP53 の重複変異が検出された。計 12 例の deep sequencing では、11 例に DICER1 が見出され、8 例に TP53 の変異が見出された。興味深いことに、11 例中 10 例では、DICER1 の compound hetero 変異もしくはホモ変異が検出された。compound hetero 変異の片側変異はすべてナンセンスもしくは、フレームシフト変異であり、もう一方の変異は RNaseIIIb ドメインに集中していた。RNaseIIIb ドメイン内のホットスポット変異 G1809R の機能解析を行うために、microRNA sequencing を行ったところ、G1809R では有意に 5p の産生が低下していた。以上の結果より、散発性肺芽腫の発症には、DICER1 の biallelic 変異が重要な役割を果たしており、また、TP53 変異はセカンドヒットであることが示された。

研究協力者

滝田 順子

東京大学 小児科

A. 研究目的

胸膜肺芽腫は小児期に発生する非常に稀な胸膜原発の悪性腫瘍である。3 歳以下の年少時に好発する。生物学的には悪性度が高く、胸膜浸潤や脳・骨転移なども高頻度にみられ、一般的に予後は不良である。のう胞成分の有無によってタイプ I から III に分類されるが、タイプ III は最も予後が悪く、10-30%の治癒率である。肺芽腫の約 10%には、家族性にほかの悪性腫瘍や腎のう胞、肺のう胞および先天性嚢胞性腺腫様奇形などの形成異常を合併することが知られている。このような家族性肺芽腫はタイプ I ないし II であることが多い。

近年、家族性肺芽腫の原因遺伝子として、microRNA のプロセッシングに関与する DICER1 の機能喪失型変異が見出さ

れた。DICER1 の変異は卵巣腫瘍や甲状腺腫などほかの腫瘍でも見出されている。しかし、肺芽腫の大部分を占める散発性肺芽腫の原因遺伝子は同定されていない。そこで、散発性肺芽腫の発症分子機構を解明するために、次世代シーケンサーおよび SNP アレイなど先端的ゲノム解析技術を駆使して、網羅的ゲノム解析を行った。

B. 研究方法

1. 対象

SNP アレイ解析は散発性肺芽腫 12 例、細胞株 2 株を用いた。exom 解析は、新鮮腫瘍 7 例（再発例 2 例を含む）を用いて行った。また DICER1 および TP53 に関しては、変異の頻度を検証するために計 12 例の新鮮腫瘍検体を用いて、deep sequencing を行った。さらに、検出された DICER1 変異の機能解析を行うために、microRNA sequencing も行った。

2. SNP アレイ

腫瘍検体より抽出したゲノム DNA を適切な制限酵素で消化し、断端に共通のアダプターを付加した後、PCR により増幅した。PCR 産物を精製し biotin ラベルをした後、GenChip 50K/250K アレイ上でハイブリダイゼーションを行った。我々が開発した CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いてデータを分析した。

3. exom 解析

exom 解析のサンプル調整には腫瘍と正常のゲノム DNA 1–1.5 μ g を使い、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。

4. exome 解析のデータ解析

データ解析には Genomon (<http://genomon.hgc.jp/>) を用いた。体細胞変異候補の検出には、腫瘍と正常 DNA の変異コールを Fisher 検定し、P 値 0.01 未満をカットオフとし、腫瘍でのみ変異を起こしている可能性の高い変異を抽出した。さらに病的意義が低いと考えられる SNP は除外した[dbSNP 131 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)、1000 genome (<http://www.1000genomes.org/>) 参照]。正常、腫瘍 DNA の両方で deep シーケンスにより体細胞変異を確認した。

5. microRNA sequencing

ホットスポット変異 G1809R を有する腫瘍および既知の D1810Y 変異を有する腫瘍検体より RNA を抽出し、TruSeq small RNA Sample Preparation Kit を用いて、micro RNA ライブラリーを作成した。Small RNA sequencing は、Illumina Miseq Reporter v2.3 (Illumina, Inc., San Diego, CA) を使用した。

コントロールとして、胎児の正常肺を用いた。

(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. SNP アレイ解析：染色体 7q 8、12 番染色体の増幅が有意に高頻度に認められた。特に 8 番染色体の増加は 1 例をのぞいて、全例に認められた。また LOH としては、17p 領域が最も高頻度に検出された(10/12 例)。このうち 1 例には Uniparental disomy が検出された。また、新規コピー数異常としては、19q13.11 の高度増幅が 3 例に認められた。この領域内には、LSM14A, KIAA0355, GPI, UBA2, および PDCD2L が存在することが判明した。しかし、変異解析では、これらの遺伝子に関して、有意な変異は検出されなかった。

2. Exom 解析：今までに次世代シーケンサーで解析された小児腫瘍の報告と同様に、肺芽腫においても体細胞変異が少なく、1 検体あたり平均 22 個であった。初発腫瘍と比較して、再発腫瘍では変異の個数が多い傾向がみられたが、有意差はみられなかった。解析した 7 例中 3 例に重複する変異として、DICER1 が検出された。また 2 例に重複する変異として、TP53, CTNNB1, GPR182, MYH8, PDE2A, and TMX3 が見出された。

4. 標的遺伝子の deep sequencing:exome 解析の結果、重複変異がみられた遺伝子につき、計 12 例の新鮮腫瘍検体を用いて、頻度の検証を行ってところ、DICER1 変異は 11/12 例、TP53 変異は 8/12 例で認められた。しかし、ほかの遺伝子に関しては、新たな変異は検出されなかった。興味深いことに、11 例中 10 例では、DICER1 の compound hetero 変異もしくは

ホモ変異が検出された。compound hetero 変異の片側変異はすべてナンセンスもしくは、フレームシフト変異であり、もう一方の変異は RNaseIIIb ドメインに集中していた。

3. ホットスポット変異 G1809R の機能解析: Compound hetero 変異もしくはホモ変異として高頻度に検出された G1809R の病的意義を解明するために、micrRNA sequencing を行った。その結果、G1809R および卵巣腫瘍のホットスポット変異である D1810Y を有する腫瘍では、胎児肺と比べて、microRNA の産生途中で生じる 5p が有意に減少していた。一方、同様に microRNA の産生途中で cleavage される 3p に関しては、量的減少は見られなかった。

D. 考察

SNP アレイの結果より、散発性肺芽腫におけるゲノムプロファイルとしては、染色体 8 番の増加と 17p の LOH が特徴的であることが明らかとなった。また、新規異常としては、再発例を含む 3 例において、19q13.11 の高度増幅が認められた。しかし、この領域内に存在する遺伝子の有意な変異は認めなかったことから、この領域内の micrRNA クラスターが、腫瘍の進展に関与している可能性が示唆された。

exome 解析の結果、DICER1 の biallelic 変異が高頻度に認められたが、これは従来から報告のある家族性肺芽腫の変異パターンとは明確に異なる点であった。すなわち、散発性肺芽腫と家族性肺芽腫はともに DICER1 の機能異常が発症に関与しているものの、両者には異なる分子病態が存在すると考えられる。DICER1 の RNaseIIIb ドメインは、microRNA のプロセッシングの過程で、5p の切断に関与することが知られている。散発性肺芽腫で検出された RNaseIIIb ドメイン内のホットスポット変異を有する腫瘍では、5p の発現量が有意に減少していたことから、変異によって、5p の切断が障害されていることが示された。従って、散発性肺芽

腫の発症には、単に DICER1 の機能が喪失されるのみならず、5p の切断障害が関与している可能性が示唆された。

一方、DICER1 の変異に次いで、TP53 の変異および、TP53 を含む 17p 領域の LOH が高頻度であったことから、TP53 は散発性肺芽腫のセカンドヒットとなっている可能性が示唆された。

E. 結論

散発性肺芽腫の発症には家族性肺芽腫と同様に DICER1 が重要な役割を演じていることが示された。しかし、DICER1 による発がんメカニズムは散発性と家族性とは、明確に異なることが明らかとなった。さらに、散発性肺芽腫のセカンドヒットとして、TP53 変異が重要であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-Matsubara R, Tran NB, Izutsu K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M, Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet.* 2014 Feb;46(2):171-5.
2. Lin TL, Nagata Y, Kao HW, Sanada M, Okuno Y, Huang CF, Liang DC, Kuo MC, Lai CL, Lee EH, Shih YS, Tanaka H, Shiraishi Y, Chiba K, Lin TH, Wu JH, Miyano S, Ogawa S, Shih LY. Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with TET2 and IDH1/2 mutations. *Haematologica.* 2014;99(1):28-36.
3. Hosono N, Makishima H, Jerez A, Yoshida K, Przychodzen B, McMahon S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Sanada M, Gomez-Segui I, Verma AK, McDevitt MA, Sekeres MA, Ogawa S, Maciejewski JP. Recurrent genetic defects on chromosome 7q in myeloid neoplasms. *Leukemia.* 2014.
4. Becker H, Yoshida K, Blagitko-Dorfs N, Claus R, Pantic M, Abdelkarim M,

- Niemöller C, Greil C, Hackanson B, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Döhner K, Schnittger S, Henneke P, Niemeyer C, Flotho C, Pfeifer D, Ogawa S, Lübbert M. Tracing the development of acute myeloid leukemia in CBL-syndrome *Blood* 2014.
5. Y Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet.* 2013;45(11):1293-1299.
 6. Yoshida K, Sanada M, Ogawa S. Deep sequencing in cancer research. *Jpn J Clin Oncol.* 2013;43(2):110-115.
 7. Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Leiter A, Ham M, Li D, Doan NB, Said JW, Black KL, Phillip Koeffler H. miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2013;32(9):1155-1163.
 8. Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, Shimizu M, Kawaguchi T, Chen Z, Naruse TK, Sato-Otsubo A, Ebana Y, Maejima Y, Kinoshita H, Murakami K, Kawabata D, Wada Y, Narita I, Tazaki J, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Yurugi K, Miura Y, Maekawa T, Ogawa S, Komuro I, Nagai R, Yamada R, Tabara Y, Isobe M, Mimori T, Matsuda F. Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am J Hum Genet.* 2013;93(2):289-297.
 9. Taketani T, Takita J, Ueyama J, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S, Yamaguchi S. Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth. *Journal of pediatric hematology/oncology.* 2013.
 10. Takada M, Higuchi T, Tozuka K, Takei H, Haruta M, Watanabe J, Kasai F, Inoue K, Kurosumi M, Miyazaki M, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Kaneko Y. Alterations of the genes involved in the PI3K and estrogen-receptor pathways influence outcome in human epidermal growth factor receptor 2-positive and hormone receptor-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy. *BMC cancer.* 2013;13:241.
 11. Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(4):e89.
 12. Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2013;45(8):860-867.
 13. Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(8):937-941.
 14. Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T. Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood.* 2013;121(21):4377-4387.
 15. Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol.* 2013;92(1):1-9.
 16. Nishimura R, Takita J, Sato-Otsubo A, Kato M, Koh K, Hanada R, Tanaka Y, Kato K, Maeda D, Fukayama M, Sanada M, Hayashi Y, Ogawa S. Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array. *Cancer Sci.* 2013;104(7):856-864.

17. Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S, Ishikawa Y. Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes. *BMC cancer*. 2013;13(1):8.
18. Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med*. 2013;210(12):2627-2639.
19. Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Saunthararajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013;45(8):942-946.
20. Mae S, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwarra M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otsubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2013;4:1367.
21. Lee DH, Amanat S, Goff C, Weiss LM, Said JW, Doan NB, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Forscher C, Koeffler HP. Overexpression of miR-26a-2 in human liposarcoma is correlated with poor patient survival. *Oncogenesis*. 2013;2:e47.
22. Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet*. 2013;92(3):431-438.
23. Kunishima S, Imai T, Kobayashi R, Kato M, Ogawa S, Saito H. Bernard-Soulier syndrome caused by a hemizygous GPIIb mutation and 22q11.2 deletion. *Pediatr Int*. 2013;55(4):434-437.
24. Kon S, Minegishi N, Tanabe K, Watanabe T, Funaki T, Wong WF, Sakamoto D, Higuchi Y, Kiyonari H, Asano K, Iwakura Y, Fukumoto M, Osato M, Sanada M, Ogawa S, Nakamura T, Satake M. Smap1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(3):1123-1137.
25. Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*. 2013;45(10):1232-1237.
26. Kitamura K, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Furukawa K, Miyano S, Ogawa S, Kunishima S. Normal neutrophil myosin IIA localization in an immunofluorescence analysis can rule out MYH9 disorders. *J Thromb Haemost*. 2013;11(11):2071-2073.
27. Kawamata N, Moreilhon C, Saitoh T, Karasawa M, Bernstein BK, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Raynaud S, Koeffler HP. Genetic differences between Asian and Caucasian chronic lymphocytic leukemia. *International journal of oncology*. 2013;43(2):561-565.
28. 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 due to acquired uniparental disomy. *J Pediatr*. 2013;162(6):1285-1288, 1288 e1281.
29. Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood*. 2013.
30. Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann

T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S. Landscape of Genetic Lesions in 944 Patients with Myelodysplastic Syndromes. *Leukemia*. 2013.

31. Gomez-Segui I, Makishima H, Jerez A, Yoshida K, Przychodzen B, Miyano S, Shiraishi Y, Husseinzadeh HD, Guinta K, Clemente M, Hosono N, McDevitt MA, Moliterno AR, Sekeres MA, Ogawa S, Maciejewski JP. Novel recurrent mutations in the RAS-like GTP-binding gene RIT1 in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2013;27(9):1943-1946.

32. Damm F, Chesnais V, Nagata Y, Yoshida K, Scourzic L, Okuno Y, Itzykson R, Sanada M, Shiraishi Y, Gelsi-Boyer V, Renneville A, Miyano S, Mori H, Shih LY, Park S, Dreyfus F, Guerci-Bresler A, Solary E, Rose C, Cheze S, Prebet T, Vey N, Legentil M, Duffourd Y, de Botton S, Preudhomme C, Birnbaum D, Bernard OA, Ogawa S, Fontenay M, Kosmider O. BCOR and BCORL1 mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Blood*. 2013;122(18):3169-3177.

33. Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, Yamaguchi K, Uchimarui K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth. *Cancer Sci*. 2013;104(8):1097-1106.

2. 学会発表

1. Kenichi Yoshida, Tsutomu Toki, Myoung-ja Park, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Masashi Sanada, Ayana Kon, Yasunobu Nagata, Aiko Sato-Otsubo, Yusuke Sato, RuNan Wang, Kiminori Terui, Rika Kanezaki, Norio Shiba, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Asahito Hama, Hideki Muramatsu, Daisuke Hasegawa, Kazuhiro Nakamura, Hirokazu Kanegane, Keiko Tsukamoto, Souichi Adachi, Kiyoshi Kawakami, Seiji Kojima, Shai Izraeli, Satoru Miyano, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito and Seishi Ogawa. Genetic basis of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. The 18th Congress of European Hematology Association (EHA) (Oral,

Best abstract) 2013/6/15 Stockholm (Sweden)

2. Kenichi Yoshida, Tsutomu Toki, Myoung-ja Park, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Masashi Sanada, Ayana Kon, Yasunobu Nagata, Aiko Sato-Otsubo, Yusuke Sato, RuNan Wang, Kiminori Terui, Rika Kanezaki, Norio Shiba, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Asahito Hama, Daisuke Hasegawa, Kazuhiro Nakamura, Hirokazu Kanegane, Keiko Tsukamoto, Souichi Adachi, Satoru Miyano, Seiji Kojima, Shai Izraeli, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito and Seishi Ogawa. Genetic Basis of Myeloid Proliferation Related to Down Syndrome, 2012 American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition (Oral, ASH Outstanding Abstract Achievement Award) 2012/12/10 Atlanta (U.S.A.)

3. Kenichi Yoshida, Tsutomu Toki, Myoung-ja Park, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Masashi Sanada, Ayana Kon, Yasunobu Nagata, Aiko Sato-Otsubo, Yusuke Sato, RuNan Wang, Kiminori Terui, Rika Kanezaki, Norio Shiba, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Asahito Hama, Hideki Muramatsu, Daisuke Hasegawa, Kazuhiro Nakamura, Hirokazu Kanegane, Keiko Tsukamoto, Souichi Adachi, Kiyoshi Kawakami, Seiji Kojima, Shai Izraeli, Satoru Miyano, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito and Seishi Ogawa. Genetic basis of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. American Association for Cancer Research (AACR) Annual (Poster) Meeting 2013/4/9 Washington, DC (U.S.A)

4. 吉田健一、小川誠司、國島伸治 血小板異常症 第116回日本小児科学会学術集会 2013/4/19 広島

5. Kenichi Yoshida, Tsutomu Toki, Myoung-ja Park, Yusuke Okuno, Yuichi Shiraishi, Masashi Sanada, Ayana Kon, Yasunobu Nagata, Aiko Sato-Otsubo, Yusuke Sato, RuNan Wang, Kiminori Terui, Rika Kanezaki, Norio Shiba, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Asahito Hama, Hideki Muramatsu, Daisuke Hasegawa, Kazuhiro Nakamura, Hirokazu Kanegane, Keiko Tsukamoto, Souichi Adachi, Kiyoshi Kawakami, Seiji Kojima, Shai Izraeli, Satoru Miyano, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito and Seishi Ogawa. Genetic basis of myeloid

leukemogenesis in Down syndrome. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013/10/11 札幌

6. Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraiishi Y, Nagata Y, Kon A, Chiba K, Tanaka H, Ohki K, Kato M, Terui K, Park MJ, Kanazawa T, Takita J, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome resequencing reveals novel pathogenetic gene mutations in pediatric AML. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013/10/11 札幌

7. Seishi Ogawa. Genetic analysis of myeloid neoplasms in childhood. Cambridge Research Institute Annual International Symposium 2012/11/2 Cambridge (UK)

8. Seishi Ogawa. Genetic analysis of Down Syndrome-related myeloid neoplasms. 日仏がんワークショップ 2013/11/22, Toulouse (France)

9. 瓜生久美子, 西村力, 吉田健一, 関正史, 佐藤悠佑, 佐藤亜以子, 吉田美沙, 加藤元博, 星野諭子, 樋渡光輝, 岡明, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫大規模検体における Genetic landscape. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 平成 25 年 11 月 29 日~12 月 1 日

10. 吉田美沙, 吉田健一, 佐藤悠佑, 佐藤亜以子, 関正史, 西村力, 瓜生久美子, 星野諭子, 樋渡光輝, 加藤元博, 岡明, 小川誠司, 林泰秀, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いた、神経芽腫における 11qLOH の責任遺伝子のターゲットキャプチャー. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 平成 25 年 11 月 29 日~12 月 1 日

11. 星野諭子, 西村力, 関正史, 奥野友介, 吉田健一, 白石友一, 加藤元博, 宮野悟, 岡明, 林泰秀, 岩中督, 小川誠司, 滝田順子. 全エクソーム解析による肝芽腫における羅的ゲノム解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 平成 25 年 11 月 29 日~12 月 1 日

12. 関正史, 吉田健一, 白石友一, 佐藤悠佑, 西村力, 奥野友介, 千葉健一, 田中陽子, 加藤啓輔, 加藤元博, 花田良二, 野村優子, 朴明子, 石田敏章, 岡明, 宮野悟, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 散発性胸膜肺芽腫における DICER1 の両アレル変異. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 平成 25 年 11 月 29 日~12 月 1 日

13. 関正史, 吉田健一, 白石友一, 佐藤悠佑, 千葉健一, 田中陽子, 加藤元博, 花田良二, 岡明, 宮野悟, 林泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 網羅的ゲノム解析における小児 T-ALL 再発例、非再発例の検討. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 平成 25 年 11 月 29 日~12 月 1 日

G. 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

ゲノム・遺伝子発現情報からみた 小児がんの臨床的特性の解明と治療への応用

研究分担者 大平 美紀 千葉県がんセンター研究所 がんゲノム研究室 室長

研究要旨：本分担研究では難治性小児がんの新規治療法の開発につながる標的遺伝子の同定と腫瘍層別化システムの構築を目標として、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析とゲノムコピー数異常解析による腫瘍の悪性度や患者予後に強く関わる分子的特徴の検索を進めた。小児骨肉腫については、予後ならびに化学療法感受性に関わる分子プロファイルの解明を目的に、治療前のバイオプシーサンプルを用いたゲノムコピー数解析を行い、治療感受性の異なる3つのグループにそれぞれ関連するゲノム異常プロファイルを抽出した。これらのマーカー候補について新規追加症例を用いて検証を進めており、これまでに高い再現性が得られている。また、次世代シーケンサーを用いた409種の既知がん関連遺伝子の網羅的変異解析を行い、一部症例について新規変異を見いだした。以上のようなゲノムコピー数解析と遺伝子変異を組み合わせることにより、特に治療反応性の乏しい群を早期に予測する特徴的なプロファイルの検索と検証を進める。

A. 研究目的

近年の化学療法の進展により、小児がんの予後は飛躍的に向上したものの、一部の小児がんについては依然として予後不良であり、早期層別化と新たな治療法の開発が望まれる。また、小児がんの臨床においては、治療後の生活の質を重視した治療戦略の選択は特に重要であり、その観点からも精度の高い腫瘍リスク分類システムの構築が急務である。そこで本研究では、難治性小児がんを対象に、悪性度などの臨床的特性の異なる小児がん由来組織の遺伝子発現やゲノム異常等の分子プロファイルを検索し、背景にある分子的特徴を明らかにすることにより、治療標的候補の同定と腫瘍層別化による効率的な治療法選択システムの構築に応用することを目的とする。まず骨原発性悪性腫瘍の中で最も多い骨肉腫を主な対象として研究を進めた。骨肉腫は近年多剤併用化学療法と手術等による局所療法の組み合わせにより5年生存率は約80%に達するようになったが、化学療法が奏効しない症例もしばしば見られ、その5年生存率は約30%と未だに予後不良である。現在の化学療法に対する感受性予測のためのマーカーの同定を目的に、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル、アレイCGH解析、次世代シーケンサーを用いた網羅

的遺伝子変異検索を行い、ゲノム異常の情報と治療反応性や予後情報の統計解析により層別化に必要な因子を絞り込み、治癒率向上を目標とした化学療法奏効性予測法の構築と分子プロファイルに基づいたリスク分類の提示を目指す。

B. 研究方法

1. 症例の収集と選択：

千葉県がんセンター整形外科では10年以上前より骨軟部腫瘍臨床検体の保存を行っており、近年では治療開始前の検査用バイオプシー検体の残余も合わせて保存されている。これらの組織は匿名化処理ののち同センターがんバイオバンクに適切に保管管理されている。本研究では当センターにおいて治療を受け、バイオバンクに腫瘍組織が保存された骨肉腫患者78例の中から、均一な背景、すなわち初診時に転移がなく、四肢発生であり、同一Neoadjuvant化学療法プロトコールNECO-95J治療を受け、広範切除以上の外科的治療を施行した症例群であり、かつ4年以上のフォローアップ情報がある30例を選び、解析を行った。核酸抽出には全例化学療法施行前のバイオプシーサンプルを用いた。

2. ゲノムコピー数異常解析：

上記骨肉腫生検試料由来のゲノム DNA 500ng を出発材料に、ヒトオリゴアレイ (アジレント社 Whole Human Genome oligo DNA microarray, 4x44k フォーマット) を用いてアレイ CGH 解析を行った。対照コントロールには同量のヒト胎盤由来 DNA を使用した。Feature Extraction によりハイブリダイゼーション後の数値化を行った後、Genomic Workbench CGH Module で各遺伝子座のコピー数の算出と治療奏効群、非奏効群間のコピー数比較解析を行った。

3. 遺伝子発現解析:

骨肉腫細胞株あるいは凍結腫瘍組織から調製した total RNA 1 μ g を出発材料に逆転写酵素を用いて cDNA を調製し定量 RT-PCR 解析を行った。標準化コントロールとして GAPDH 遺伝子を用いた。

4. 遺伝子変異解析:

骨肉腫細胞株あるいは凍結腫瘍組織から調製したゲノム DNA 40ng を出発材料に次世代型シーケンサーによる DNA 配列解析を行った。がんで変異が報告されている 409 遺伝子のエクソンをカバーする 16000 個の標的遺伝子領域をマルチプレックス PCR 法にて増幅し、イオン Torrent プロトン次世代シーケンサーを用いてアンプリコンシーケンシングを行った。プロトン用 PIV2 チップにより、平均約 110bp 長のアンプリコンについて約 85 メガリード (約 9 ギガベース) を解読し、平均約 1500 カバーの配列が得られ、コントロールサンプルとの比較により、各症例について変異候補を抽出した。得られた一塩基置換変異については、PolyPhen、SHIFT などの機能予測データベース検索を行った。

(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、関連法規ならびに指針を遵守し、倫理審査委員会ならびに実施機関長の承認を得た上で、検体提供者の人権の擁護、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

1. 骨肉腫のゲノムコピー数異常解析と治療感受性の関連解析:

骨肉腫のゲノム異常は高度な complexity や heterogeneity を示し、gain (増加) が

loss (欠失) に比べ圧倒的に多いことが特徴であるが、骨肉腫の予後因子や治療感受性予測因子として有用なゲノムコピー数異常プロファイルはこれまで明らかにされていない。また、過去の論文の大部分は治療後に採取された腫瘍組織の解析結果であり、本来の腫瘍のプロファイルを反映しているとはいいがたい。そこで本研究では、千葉県がんセンターにて治療前に採取された診断用の生検組織の残余ががんバイオバンクに保存された小児骨肉腫症例 78 例のうち、臨床病理学的背景がほぼ均一な 22 例 (2 年以上無病生存: 14 例、死亡例: 8 例) についてアレイ CGH 解析を行い、ゲノムコピー数プロファイルと予後あるいは治療奏効性と相関する領域の抽出を行った。標準的な骨肉腫 Neoadjuvant 化学療法プロトコールにおいては、MTX、ADM、CDDP 3 剤併用による術前化学療法 (MAP 療法) の後、奏効性の評価が効果不十分であった症例に対して術後に IFO を加えた治療を行う。そこで、治療奏効性に関する比較に関しては、症例を以下の 3 群に分けて比較解析を行った。すなわち、MAP 療法に対して good responder と判定された 8 例を A 群、MAP 療法に反応せず IFO に変更し good responder と判定された 6 例を B 群、IFO に変更するも poor responder と判定された 8 例を C 群とし、それぞれに特徴的なプロファイル Genomic Workbench CGH Module により抽出した。

生存曲線解析より A, B 群に対し C 群は有意に予後不良であった (OS, EFS とともに $p < 0.005$)。全体のパターンは 1p, 5p, 6p, 8q, 17p, 17q, 19p, 19q, 21q など多くの染色体領域の増加と 6q, 8p, 9p, 10p, 10q, 13q, 17p などの欠失が高頻度に見られ、1q, 3p, 6p, 9q, 12q, 15q の一部の連続した領域で予後に関して有意差が見られた ($p < 0.05$)。

A 群と B, C 群との比較解析では 5p 領域の増加が (X-marker, 感度 88%、特異度 93%)、また C 群と A, B 群との比較解析では 9q 領域の欠失および 12q 領域の増加が (Y-marker, 感度 100%、特異度 93%) それぞれ特徴的であった。昨年度見いだしたこれら上記 3 カ所の領域の他に同様の相関を示す 5 カ所の領域をマーカー候補として加え、各症例をスコアリングしたプロットでは、A 群 (8/8, 100%)、B 群 (6/6, 100%)、C 群 (5/8, 63%) の正答率であった。このプロット法を検証

するため、新規 8 症例 (A 群:2 例、B 群:2 例、C 群:4 例) を追加しアレイ CGH の解析結果から、スコアリングを行ったところ、A 群 (2/2, 100%)、B 群 (2/2, 100%)、C 群 (3/4, 75%) の正答率となった。以上の結果から、スコアリング検証にはさらに症例の追加が必要であるが、5p12 と 9q21 のコピー数による二次元プロットを更に進めて、同様の統計的相関を示す複数の領域をスコアリングに加えることで、より安定にこれら 3 群の予測が可能であることが示唆された。

2. 骨肉腫のバイオプシー検体における遺伝子変異解析:

上記のゲノム異常のほか、*RUNX2* 遺伝子など関連遺伝子の発現レベルやドライバー遺伝子変異のパターンも患者予後や治療感受性に影響を及ぼしていると考えられる。そこで次世代型シーケンサーを用いた網羅的ながん関連遺伝子群の遺伝子変異検索を行った。治療反応性が判明している 11 症例 (A 群:4 例、B 群:1 例、C 群:6 例) の腫瘍バイオプシー検体より調製したゲノム DNA を出発材料に、既知がん関連変異遺伝子 409 種のエクソン部分をカバーする約 16000 のアンプリコン (Comprehensive Cancer Panel) をマルチプレックス法により増幅し、イオンプロトンシーケンサーにより平均約 1500 の深度で配列を解読した。IonTorrent Suit の variant caller を用いて、これまでにチロシンキナーゼファミリー、クロマチンリモデリング関連遺伝子群、骨格筋などの lineage-specific な遺伝子発現制御に関与する転写因子群などを含む 153 の non-synonymous SNVs の候補 (frequency >5%、腫瘍あたり 13.9・SNVs) が検出され、キャピラリーシーケンサーによる検証とリシーケンシングを進めている。

D. 考察

骨肉腫全体の年間発生例数は約 200 例と少なく、術前治療が標準であるため加療前に採取された研究用の試料はこれまでにほとんど集積されていなかった。本研究では化学療法開始前の骨肉腫バイオプシー試料を用いたゲノム解析を行い、現行のプロトコールに対する治療奏効性と関連するプロファイルを抽出した。症例数の少なさから、今後多施設共同による試料の追加が必須であるが、本研究で提示したゲノムプロファ

イルに基づく治療奏効群、非奏効群の層別化モデルは、治療前の試料を用いることで検証の精度を高めることができると期待される。

E. 結論

症例数をさらに広げた再現性の検証が必須であるが、ゲノムプロファイルを治療前生検組織を用いて解析することで、骨肉腫の各患者における至適化学療法レジメンの予測が可能となりうることが示唆された。次世代型シーケンサー解析からは、少量あるいは腫瘍含量の少ない試料も deep sequencing することにより、網羅的にゲノム変異情報が得られるばかりでなく、アンプリコンシーケンシングの coverage analysis データを用いた腫瘍コピー数解析の結果とアレイ CGH 解析の比較からも、パネルに含まれる遺伝子座のコピー数予測が可能であることが示されている。今回予想用スコアリングに使用したゲノム領域を次世代シーケンサーのパネルに加えておくことにより、今後は次世代シーケンサー解析のみで、本研究のスコアリングが可能となると期待される。

平成 25 年より千葉県がんセンターは米国 NCI 主導の小児骨肉腫 TARGET プロジェクトと連携しており、全ゲノムならびに全エクソンシーケンシング、RNA シーケンシング、メチル化解析が進行中である。本邦においても臨床応用を目標に多施設共同研究を視野に入れ、さらに解析と検証を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamaguchi Y, Takenobu H, Ohira M, Nakazawa A, Yoshida S, Akita N, Shimozato O, Iwama A, Nakagawara A, Kamijo T. Novel 1p tumour suppressor Dnmt1-associated protein 1 regulates MYCN/ataxia telangiectasia mutated/p53 pathway. *Eur J Cancer* in press.
- 2) Yu F, Gao W, Yokochi T, Suenaga Y, Ando K, Ohira M, Nakamura Y, Nakagawara A. RUNX3 interacts with MYCN and facilitates protein degradation in neuroblastoma. *Oncogene* in press.
- 3) Suenaga Y, Islam SM, Alagu J, Kaneko Y, Kato M, Tanaka Y, Kawana H, Hossain S, Matsumoto D, Yamamoto M, Shoji W, Itami M, Shibata T, Nakamura Y, Ohira M, Haraguchi S, Takatori A, and Nakagawara A.

NCYM, a cis-antisense gene of MYCN, encodes a de novo evolved protein that inhibits GSK3beta resulting in the stabilization of MYCN in human neuroblastomas. *PLOS Genet* 10(1): e1003996, 2014.

- 4) Hasan, MK, Nafady A, Takatori A, Kishida S, Ohira M, Suenaga Y, Hossain S, Akter J, Ogura A, Nakamura Y, Kadomatsu K, Nakagawara A. ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Sci Rep.* 3:3450, 2013.
- 5) Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H, Nakagawara A. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *J Clin Invest.* 123(7):2935-47, 2013.
- 6) Asada K, Watanabe N, Nakamura Y, Ohira M, Westermann F, Schwab M, Nakagawara A, Ushijima T. Stronger prognostic power of the CpG island methylator phenotype than methylation of individual genes in neuroblastomas. *Jpn J Clin Oncol.* 43(6):641-5, 2013.
- 7) Takagi D, Tatsumi Y, Yokochi T, Takatori A, Ohira M, Kamijo T, Kondo S, Fujii Y, Nakagawara A. Novel adaptor protein Shf interacts with ALK receptor and negatively regulates its downstream signals in neuroblastoma. *Cancer Sci.* 104(5):563-72, 2013.

2. 学会発表

- 1) Iwata S, Ohira M, Yonemoto T, Ishii T, Kamoda H, Nakagawara A. Genomic

predictors of response to preoperative chemotherapy in patients with pediatric osteosarcoma. AACR 104th Annual Meeting 2013, Washington DC, 4月6日-10日, 2013.

- 2) 岩田慎太郎、大平美紀、石井 猛、影山 肇、片山 稔、横井左奈、永瀬浩喜、米本 司、中川原 章. ゲノム解析による小児骨肉腫患者の至適化学療法予測システム 第 72 回日本癌学会学術総会, 横浜, 10月3日-5日, 2013.
- 3) 岩田慎太郎、大平美紀、米本 司、萩原洋子、永瀬浩喜、影山 肇、片山 稔、鴨田博人、横井左奈、石井 猛、中川原 章. ゲノム解析の手法を用いた小児四肢発生骨肉腫患者の至適化学療法予測システムの確立. 第 51 回日本癌治療学会学術集会, 京都, 10月24日-26日, 2013.
- 4) Iwata S, Yonemoto T, Kageyama H, Yokoi S, Nagase H, Nakagawara A, Ishii T, Ohira M. Characterization of genomic alterations in pediatric osteosarcoma with differential chemosensitivities: Construction of genome-based prediction system using preoperative biopsy samples. AACR Special Conference on Pediatric Cancer at the Crossroads 2013, San Diego, 11月3日-6日, 2013.

G. 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

腫瘍細胞特異的遺伝子発現の経時的变化と治療の有効性についての研究

研究分担者 福島 敬 筑波大学医学医療系臨床医学域小児内科准教授

研究要旨： 小児白血病の適切な治療を選択するために正確で迅速な病型診断が必須である。小児急性リンパ性白血病では染色体転写平成23年度から臨床試験が開始されたJPLSG ALL T-11、平成24年度から開始されたJPLSG ALL B-12への登録例を対象にしてキメラ遺伝子スクリーニングを行った。全国ネットで展開される小児白血病の臨床研究においては、キメラ遺伝子スクリーニングの手法や判定基準等、標準化が必須である。学術的進歩と技術革新とを随時積極的に取り入れ、一層安定した検査手技によって臨床的意義のある中央診断システムを再構築し続ける必要があると考えられた。

研究協力者

南木 融

筑波大学附属病院検査部技師長・副部長
小林千恵

筑波大学医学医療系臨床医学域
小児科学講師

福島絃子

筑波大学医学医療系臨床医学域
小児科学助教

鈴木涼子

筑波大学附属病院小児科
アカデミックレジデント

野口恵美子

筑波大学医学医療系生命医科学域
遺伝医学准教授

A. 研究目的

小児白血病の治療成績向上のためには、正確で迅速な病型診断が必須である。その診断に基づき、以後の治療方針が決定される。本研究においては、日本小児白血病リンパ腫研究グループ JPLSG によって実施される多施設共同臨床試験に登録された急性リンパ性白血病（ALL）例の発症時検体を用いて、既知のキメラ遺伝子を対象としてスクリーニングを実施し、治療を層別化に貢献することを目的とした。

B. 研究方法

小児 ALL のうち JPLSG 登録例を対象としたキメラ遺伝子（融合 mRNA）スクリーニングについて JPLSG に登録された小児 ALL の発症時骨髄または血液から抽出された RNA 検体の送付を受けて、キメラ遺伝子スクリーニングを行った。

2013年4月以降、JPLSG 施設（表3 全166施設）の内、施設倫理委員会または施設研究審査委員会

の承認を得られた医療機関から順次、暫定診断 ALL 症例の RNA 検体が送付された。cDNA を作成し定量 PCR を行った。スクリーニング対象のキメラ遺伝子は以下のとおりである（表4）。

- ・ TEL-AML1 (ETV6-AML1)
- ・ E2A-PBX1
- ・ Minor BCR-ABL
- ・ Major BCR-ABL
- ・ MLL-AF4
- ・ MLL-AF9
- ・ MLL-ENL
- ・ MLL-AF6
- ・ SIL-TAL1

なお、検出感度は 20 コピー/100ngRNA に設定した。

発症時のスクリーニング結果は、各担当医に報告した。

（倫理面への配慮）

臨床検体を用いた本研究の実施にあたり、関連法規を遵守し筑波大学附属病院倫理審査委員会ならびに病院長の承認を得た上で、更に診療を担当する各 TCCSG 施設においても倫理委員会または研究審査委員会（IRB）の承認を得て実施した。検体提供者への人権擁護および個人情報保護に細心の注意を払った。

C. 研究結果

JPLSG 登録 ALL 全症例について送付された 119 検体のうち 21 検体（17.6%）において、いずれかのキメラ遺伝子が検出された

(表4)。

D. 考察

本研究では、TCCSG登録+JPLSG登録 ALL例を併せて、26.5%にキメラ遺伝子が検出された。海外の調査では、小児 ALLのうち20%前後に TEL-AML1 が検出されると記載されている1)が、本研究では12.9%であった。本キメラ遺伝子と関連する染色体異常は、Gバンド分染法では検出が非常に難しく、PCR法かFISH法かでスクリーニングしないと認識できないとされる。PCR法のfalse negativeの可能性を検証するには、全症例をPCR法のみでなくFISH法でもスクリーニングする必要がある。

その他のキメラ遺伝子の頻度は、先行研究の報告とほぼ同じであった。各登録症例に対する臨床実践として、白血病細胞の染色体分析またはFISH法などによる染色体異常の有無につき評価し、TCCSGデータセンターに集められているので、その集計結果と突き合わせることによって、感度、特異度等の評価が可能になる。

CMLを疑って検体を送付された47症例中41症例において、major BCR-ABLが検出され、うち2症例では同時にminor BCR-ABLが検出された。3症例ではminor BCR-ABLのみが検出された。

更に症例の集積を行うことにより、我が国の小児 ALLにおけるキメラ遺伝子発現頻度をより確実に評価し、また小児 CMLの我が国における頻度が明らかになるものと期待される。

E. 結論

ALLの臨床診断に基づいて発症時検体を送付された620症例中の146例(26.5%)でいずれかのキメラ遺伝子が検出された。CMLを疑われて検体を送付された47症例中44症例においてBCR-ABLが検出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiroko Fukushima, Takashi Fukushima, Aiko Sakai, Ryoko Suzuki, Ryoko Nakajima-Yamaguchi,

Chie Kobayashi, Atsushi Iwabuchi, Makoto Saito, Ai Yoshimi, Tomohei Nakao, Keisuke Kato, Masahiro Tsuchida, Hideto Takahashi, Kazutoshi Koike, Nobutaka Kiyokawa, Emiko Noguchi, and Ryo Sumazaki. Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies. *Leukemia Research and Treatment* 2013, Article ID 238528, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/2385288>.

2) Shaza S. A. Mahmoud, Takashi Fukushima, Takashi Shimizu, Tomohei Nakao, Ryoko Yamaguchi, Hiroko Fukushima, Hiroki Wada, Toru Nanmoku, and Ryo Sumazaki. Persistent Low Level Epstein-Barr Virus DNAemia in Childhood Cancer Survivors. *Pediatric Hematology and Oncology*, 30:216-225, 2013

3) Hiroko Fukushima, Takashi Fukushima, Ryoko Suzuki, Takashi Enokizono, Maki Matsunaga, Tomohei Nakao, Kazutoshi Koike, Kensaku Mori, Kiyoshi Matsueda and Ryo Sumazaki. Continuous regional arterial infusion effective for children with acute necrotizing pancreatitis even under neutropenia. *Pediatrics International* (2013) 55, e11-e13 doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03702.x.

2. 学会発表

1) 清河信敬, 飯島一智, 中林一彦, 市川仁, 吉原宏樹, 大隅朋生, 加藤元博, 小林健一郎, 大喜多肇, 藤本純一郎, 坂本裕美, 秦健一郎, 松本健治, 吉田輝彦, 斎藤博久, 森鉄也, 福島敬, 木下明俊, 康勝好, 真部淳, 菊地陽, 林泰秀, 小原明. 次世代シーケンサーによる小児 Ph-like ALLのキメラ遺伝子探索. 第75回日本血液学会学術集会, 札幌, 10月11日-13日, 2013.

2) 飯島一智, 清河信敬, 吉原宏樹, 富田理, 小林健一郎, 福島敬, 林泰秀, 菊地陽, 康勝好, 真部淳, 小原明. 小児 Ph-like ALL 症例の表面マーカー、遺伝子発現解析. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 11月29日~12月1日, 2013. (プレナリーセッション)

3) Kiyokawa N, Iijima K, Yoshihara H, Ohki K, Kato M, Fukushima T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi H, Koh K, Manabe A, Ohara A. An analysis of Ph-like ALL in Japanese patients. 55th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. New Orleans, LA, USA, December 6-10, 2013.

G. 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

表1 TCCSG 参加施設 (2013 年度 59 施設)

茨城県立こども病院小児科
 神奈川県立こども医療センター血液・再生医療科
 熊本大学医学部附属病院小児科
 熊本赤十字病院小児科
 群馬大学医学部附属病院 小児科
 前橋赤十字病院小児科
 慶應義塾大学病院小児科
 東京歯科大学市川総合病院小児科
 足利赤十字病院小児科
 横須賀共済病院小児科
 総合太田病院小児血液腫瘍科
 国立がんセンター中央病院小児科
 国立病院機構熊本医療センター小児科
 国立成育医療研究センター血液腫瘍科固形腫瘍科
 埼玉医科大学国立医療センター小児腫瘍科
 埼玉医科大学総合医療センター小児科
 埼玉県立小児医療センター血液・腫瘍科
 東京慈恵会医科大学附属病院小児科
 自治医科大学附属病院小児科
 順天堂大学医学部附属順天堂病院小児科
 昭和大学藤が丘病院小児科
 信州大学医学部附属病院小児科
 長野県立こども病院総合診療部
 聖マリアンナ医科大学病院小児科
 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院小児科
 聖路加国際病院小児科
 千葉大学医学部附属病院小児科
 成田赤十字病院小児血液腫瘍科
 松戸市立病院小児科
 帝京大学ちば総合医療センター小児科
 千葉県立こども病院血液・腫瘍科
 帝京大学医学部附属病院小児科
 東海大学医学部附属病院小児科・細胞移植科
 東京医科歯科大学医学部附属病院小児科
 武蔵野赤十字病院小児科
 東京医科大学病院小児科
 東京大学医学部附属病院小児科
 東京女子医科大学東医療センター小児科
 東邦大学医療センター大森病院小児科
 東邦大学医療センター大橋病院小児科
 獨協医科大学病院小児科
 東京都立小児総合医療センター血液腫瘍科
 がん・感染症センター都立駒込病院小児科
 日本医科大学附属病院小児科
 日本医科大学千葉北総病院小児科
 山梨大学医学部附属病院小児科
 横浜市立大学附属病院小児科
 済生会横浜市南部病院小児科
 東京大学医学部附属病院小児科細胞移植科
 筑波大学附属病院小児科
 群馬県立小児医療センター血液・腫瘍科
 吉林大学病院 小児科
 昭和大学病院 小児科
 東京西徳洲会病院 小児難病センター
 防衛医科大学校 小児科
 亀田総合病院 小児科
 静岡県立静岡がんセンター 小児科
 静岡県立静岡がんセンター こどもセンター小児科
 相模原協同病院小児科

表2 JPLSG 参加施設 (2013 年度 166 施設)

札幌医科大学附属病院
 北海道立子ども総合医療・療育センター
 特定医療法人北楡会札幌北楡病院
 北海道大学病院
 旭川医科大学病院
 市立釧路総合病院
 弘前大学医学部附属病院
 青森県立中央病院

中通総合病院
 秋田大学医学部附属病院
 岩手医科大学附属病院
 岩手県立中部病院
 福島県立医科大学附属病院
 東北大学病院
 宮城県立こども病院
 山形大学医学部附属病院
 仙台市立病院
 茨城県立こども病院
 筑波大学附属病院
 横浜市立大学附属病院
 済生会横浜市南部病院
 東海大学医学部附属病院
 昭和大学藤が丘病院
 神奈川県立こども医療センター
 聖マリアンナ医科大学病院
 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院
 群馬県立小児医療センター
 群馬大学医学部附属病院
 埼玉医科大学総合医療センター
 埼玉県立小児医療センター康
 防衛医科大学校病院
 帝京大学ちば総合医療センター
 日本医科大学千葉北総病院
 成田赤十字病院
 千葉大学医学部附属病院
 千葉県立こども病院
 国保松戸市立病院
 国立国際医療研究センター病院
 日本大学医学部附属板橋病院
 武蔵野赤十字病院
 帝京大学医学部附属病院
 東京医科歯科大学医学部附属病院
 東京都立小児総合医療センター
 東京慈恵会医科大学附属病院
 日本医科大学附属病院
 東京女子医科大学東医療センター
 東京大学医学部附属病院
 東京大学医学部附属病院
 慶應義塾大学病院
 がん・感染症センター都立駒込病院
 東邦大学医療センター大森病院
 昭和大学病院
 順天堂大学医学部附属順天堂医院
 独立行政法人国立成育医療研究センター
 聖路加国際病院
 吉林大学医学部附属病院
 東京歯科大学市川総合病院
 東邦大学医療センター大橋病院
 獨協医科大学病院
 自治医科大学附属病院
 信州大学医学部附属病院
 長野県立こども病院
 新潟大学医学部総合病院
 新潟県立がんセンター新潟病院
 山梨大学医学部附属病院
 埼玉医科大学国際医療センター
 JA 相模原協同病院
 名鉄病院
 藤田保健衛生大学病院
 愛知医科大学病院
 小牧市民病院
 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター
 名古屋第二赤十字病院
 安城更生病院
 名古屋第一赤十字病院
 名古屋大学医学部附属病院
 名古屋市立大学病院
 豊橋市民病院
 岡崎市民病院
 金沢大学附属病院
 金沢医科大学病院
 岐阜市民病院
 岐阜大学医学部附属病院
 県西部浜松医療センター
 浜松医科大学医学部附属病院
 静岡県立こども病院
 聖隷浜松病院
 静岡県立静岡がんセンター
 富山大学附属病院
 富山大学医学部附属病院
 福井大学医学部附属病院
 三重大学医学部附属病院
 独立行政法人国立病院機構大阪医療センター

大阪市立大学医学部附属病院
 近畿大学医学部附属病院
 松下記念病院
 大阪府立母子保健総合医療センター
 市立豊中病院
 大阪大学医学部附属病院
 近畿大学医学部堺病院
 大阪医科大学附属病院
 関西医科大学附属枚方病院
 515 JACLS 財団法人田附興風会北野病院
 516 JACLS 大阪市立総合医療センター
 大阪赤十字病院
 中野こども病院
 市立岸和田市民病院
 京都第一赤十字病院
 京都桂病院
 京都大学医学部附属病院
 京都市立病院
 独立行政法人国立病院機構舞鶴医療センター
 京都府医科大学附属病院
 滋賀医科大学附属病院
 大津赤十字病院
 天理よろづ相談所病院
 奈良県立医科大学附属病院
 神戸大学医学部附属病院
 神戸市立医療センター中央市民病院
 姫路赤十字病院
 明石市立市民病院
 兵庫県立こども病院
 兵庫医科大学大学院大塚敏大塚欣敏
 神戸医療センター
 社会保険中央病院
 日本赤十字社和歌山医療センター
 和歌山県立医科大学附属病院
 愛媛県立中央病院
 愛媛大学医学部附属病院
 松山赤十字病院
 岡山山崎総合病院
 岡山済生会総合病院
 川崎医科大学附属病院
 倉敷中央病院
 独立行政法人国立病院機構香川小児病院
 香川大学医学部附属病院
 高知医療センター
 高知赤十字病院
 高知大学医学部附属病院
 高根大学医学部附属病院
 島根県立中央病院
 徳島大学病院
 徳島大学医学部附属病院
 鳥取県立中央病院
 鳥取大学病院
 広島赤十字・原爆病院
 山口大学医学部附属病院
 徳島赤十字病院
 大分県立病院
 大分大学医学部附属病院
 琉球大学医学部附属病院
 沖縄県立南部医療センターこども医療センター
 鹿児島市立病院
 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院
 独立行政法人国立病院機構熊本医療センター
 熊本大学医学部附属病院
 熊本赤十字病院
 佐賀大学医学部附属病院
 長崎大学医学部・歯学部附属病院
 北九州市立八幡病院小児救急センター
 久留米大学病院
 産業医科大学病院
 九州大学病院
 独立行政法人国立病院機構九州がんセンター
 福岡大学病院
 福岡大学医学部附属病院
 佐世保市立病院

表3 ALL関連キメラ遺伝子スクリーニング結果 (TCCSG)

	頻度(%)	H22	H23	H24	総計
総症例数		198	172	146	516
解析不能検体数		5	9	1	15
キメラ遺伝子検出症例数		50	48	45	143
TEL-AML1 検出例数	16~22 ³⁾	22	29	24	75
E2A-PBX1 検出例数	5~6 ³⁾	11	6	12	29
minor BCR-ABL 検出例数	3~5 ³⁾	9	5	3	17
major BCR-ABL 検出例数		1	0	1	2
MLL-AF4 検出例数	2 ³⁾	3	1	1	5
MLL-AF9 検出例数	<1 ³⁾	1	2	1	4
MLL-ENL 検出例数	<1 ³⁾	1	2	1	4
SIL-TAL1 検出例数		2	3	2	7

表4 ALL関連キメラ遺伝子スクリーニング結果 (JPLSG)

	H23		H24		総計
	T-11	T-11	B-12		
総症例数	3	58	58		119
キメラ遺伝子検出症例数	1	7	13		21
TEL-AML1 検出例数	1	0	4		5
E2A-PBX1 検出例数	0	1	4		5
minor BCR-ABL 検出例数	0	1	2		3
major BCR-ABL 検出例数	0	0	2		2
MLL-AF4 検出例数	0	0	1		1
MLL-AF9 検出例数	0	0	0		0
MLL-ENL 検出例数	0	0	0		0
SIL-TAL1 検出例数	0	5	0		5
MLL-AF6 検出例数	0	0	0		0

表5 慢性骨髄性白血病疑い例における BCR-ABL スクリーニング (JPLSG)

	H22	H23	H24	総計
総検体数	17	10	20	47
minor BCR-ABL	0	0	3	3
major BCR-ABL	16	9	14	39
双方検出例	1	1	0	2

H23年度分は平成24年2月末集計

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tomita O, Iijima K, Ishibashi T, Osumi T, Kobayashi K, Okita H, Saito M, Mori T, Shimizu T, Kiyokawa N.	Sensitivity of SNX2-ABL1 toward tyrosine kinase inhibitors distinct from that of BCR-ABL1.	Leuk Res.	38(3)	361-70.	2014
Masuzawa A, Kiyotani C, Osumi T, Shioda Y, Iijima K, Tomita O, Nakabayashi K, Oboki K, Yasuda K, Sakamoto H, Ichikawa H, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Mori T.	Poor responses to tyrosine kinase inhibitors in a child with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia with SNX2-ABL1 chimeric transcript.	Eur J Haematol.	92(3)	263-7.	2014
Kobayashi K, Mitsui K, Ichikawa H, Nakabayashi K, Matsuoka M, Kojima Y, Takahashi H, Iijima K, Ootsubo K, Oboki K, Okita H, Yasuda H, Sakamoto, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Ohara A.	ATF7IP as a novel PDGFRB fusion partner in acute lymphoblastic leukemia in children.	Br J Haematol.	in press		
Kiyokawa N, Iijima K, Tomita O, Miharu M, Hasegawa D, Kobayashi K, Okita H, Kajiwara M, Shimada H, Inukai T, Makimoto A, Fukushima T, Nanmoku T, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Sugita K, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A.	Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia.	Leuk Res.	38(1)	42-8.	2014
Fukushima H, Fukushima T, Sakai A, Suzuki R, Nakajima-Yamaguchi R, Kobayashi C, Iwabuchi A, Saito M, Yoshimi A, Nakao T, Kato K, Tsuchida M, Takahashi H, Koike K, Kiyokawa N, Noguchi E, Sumazaki R.	Polymorphisms of MTHFR Associated with Higher Relapse/Death Ratio and Delayed Weekly MTX Administration in Pediatric Lymphoid Malignancies.	Leuk Res Treatment.	2013	238528	2013
Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Kiyokawa N, Isoyama K, Mizutani S, Hara J, Horibe K, Nakahata T, Adachi S.	Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group.	Int J Hematol.	98(5)	578-88.	2013
Ueno H, Okita H, Akimoto S, Kobayashi K, Nakabayashi K, Hata K, Fujimoto J, Hata J, Fukuzawa M, Kiyokawa N.	DNA methylation profile distinguishes clear cell sarcoma of the kidney from other pediatric renal tumors.	PLoS One.	26;8(4)	e62233	2013
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 due to acquired uniparental disomy.	J Pediatr.	162(6)	1285-8.	2013
Yamazaki F, Nakazawa A, Osumi T, Shimojima N, Tanaka T, Nakagawara A, Shimada H.	Two cases of neuroblastoma comprising two distinct clones.	Pediatr Blood Cancer.	61	760-762	2014
Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyauchi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T.	Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells.	BMC Genet.	14	32	2013

Attarbaschi A, Beishuizen A, Mann G, Rosolen A, Mori T, Uyttebroeck A, Niggli F, Csoka M, Krenova Z, Mellgren K, Kabickova E, Chiang AK, Reiter A, Williams D, Burkhardt B; on behalf of the European Intergroup for Childhood Non-Hodgkin Lymphoma (EICNHL) and the international Berlin-Frankfurt-Münster (i-BFM) Study Group.	Children and adolescents with follicular lymphoma have an excellent prognosis with either limited chemotherapy or with a "watch and wait" strategy after complete resection.	Annals of Hematology	92	1537-41	2013
Williams D, Mori T, Reiter A, Woessman W, Rosolen A, Wrobel G, Zsiros J, Uyttebroeck A, Marky I, Le Deley MC, Brugières L; for the European Intergroup for Childhood Non-Hodgkin Lymphoma, the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group.	Central nervous system involvement in anaplastic large cell lymphoma in childhood: Results from a multicentre European and Japanese study.	Pediatr Blood Cancer	60	E118-21.	2013
Iwao T, Toyota M, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T.	Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Functional Enterocyte-Like Cells Using a Simple Method.	Drug Metab Pharmacokin et.	in press		
Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome KI, Inoue N, Fujiwara S.	Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress.	Herpesviridae.	4(1):	2	2013
Yamazoe T, Shiraki N, Toyoda M, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Umezawa A, Sasaki Y, Kume K, Kume S.	A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vitro hepatic differentiation of embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells.	J Cell Sci.	126(Pt 23):	5391-9.	2013
Kondo Y, Iwao T, Nakamura K, Sasaki T, Takahashi S, Kamada N, Matsubara T, Gonzalez FJ, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Toyoda M, Umezawa A, Nagata K, Matsunaga T, Ohmori S.	An Efficient Method for Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells Retaining Drug Metabolizing Activity.	Drug Metab Pharmacokin et.	in press		
Shiba N, Ohki K, Park MJ, Sotomatsu M, Kudo K, Ito E, Sako M, Arakawa H, Hayashi Y.	SETBP1 mutations in juvenile myelomonocytic leukaemia and myelodysplastic syndrome but not in paediatric acute myeloid leukaemia.	Br J Haematol.	99 :	154-161	2014
Shiba N, Funato M, Ohki K, Park MJ, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y.	Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia.	Br J Haematol	J164 :	142-159	2014
Sano H, Shimada A, Tabuchi K, Taki T, Murata C, Park MJ, Ohki K, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y.	WT1 mutation in pediatric patients with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group.	Int Hematol	J98:	437-445	2013
Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S.	The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders.	Nat Genet.,	45 :	1293-1299	2013
Park MJ, Sotomatsu M, Ohki K, Arai K, Maruyama K, Kobayashi T, Nishi A, Sameshima K, Takagi T, Hayashi Y.	Liver disease is frequently observed in Down syndrome patients with transient abnormal myelopoiesis.	Int Hematol	J99 :	154-161	2014

Nishimura R, Takita J, Sato-Otsubo A, Kato M, Koh K, Hanada R, Tanaka Y, Kato K, Maeda D, Fukayama M, Sanada M, Hayashi Y, Ogawa S.	Characterization of genetic lesions in rhabdomyosarcoma using a high-density single nucleotide polymorphism array.	Cancer Sci	104	856-864	2013
Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, Kobayashi T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y.	NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia.	Genes Chromosomes Cancer.	52	683-693	2013
Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shiba N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, Ogawa S, Miyano S.	An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data.	Nucleic Acids Res.	41	e89	2013
Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, Ito E.	Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome.	Blood	121	3181-3184	2013
Wakai K, Sano H, Shimada A, Shiozawa Y, Park MJ, Sotomatsu M, Yanagisawa R, Koike K, Kozawa K, Ryo A, Tsukagoshi H, Kimura H, Hayashi Y.	Cytomegalovirus retinitis during maintenance therapy for T-cell acute lymphoblastic leukemia.	J Pediatr Hematol Oncol	35	162-163	2013
Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-Matsubara R, Tran NB, Izutsu K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M, Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S.	Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma.	Nat Genet.	46(2)	171-5	2014
Lin TL, Nagata Y, Kao HW, Sanada M, Okuno Y, Huang CF, Liang DC, Kuo MC, Lai CL, Lee EH, Shih YS, Tanaka H, Shiraishi Y, Chiba K, Lin TH, Wu JH, Miyano S, Ogawa S, Shih LY.	Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with TET2 and IDH1/2 mutations.	Haematologica.	99(1)	28-36.	2014
Hosono N, Makishima H, Jerez A, Yoshida K, Przychodzen B, McMahon S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Sanada M, Gomez-Segui I, Verma AK, McDevitt MA, Sekeres MA, Ogawa S, Maciejewski JP.	Recurrent genetic defects on chromosome 7q in myeloid neoplasms.	Leukemia.	in press		2014
Becker H, Yoshida K, Blagitko-Dorfs N, Claus R, Pantic M, Abdelkarim M, Niemöller C, Greil C, Hackanson B, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Döhner K, Schnittger S, Henneke P, Niemeyer C, Flotho C, Pfeifer D, Ogawa S, Lübbert M	Tracing the development of acute myeloid leukemia in CBL-syndrome	Blood.	in press		2014
Yoshida K, Sanada M, Ogawa S.	Deep sequencing in cancer research.	Jpn J Clin Oncol.	43(2)	110-115.	2013
Yin D, Ogawa S, Kawamata N, Leiter A, Ham M, Li D, Doan NB, Said JW, Black KL, Phillip Koeffler H.	miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme.	Oncogene.	32(9)	1155-1163.	2013

Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, Shimizu M, Kawaguchi T, Chen Z, Naruse TK, Sato-Otsubo A, Ebana Y, Maejima Y, Kinoshita H, Murakami K, Kawabata D, Wada Y, Narita I, Tazaki J, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Yurugi K, Miura Y, Maekawa T, Ogawa S, Komuro I, Nagai R, Yamada R, Tabara Y, Isobe M, Mimori T, Matsuda F.	Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population.	Am J Hum Genet.	93(2):	289-297.	2013
Taketani T, Takita J, Ueyama J, Kanai R, Kumori K, Maruyama R, Hayashi K, Ogawa S, Fukuda S, Yamaguchi S.	Ectopic Neuroblastoma in Monozygotic Twins With Different Ages of Onset: Possible Twin-to-Twin Metastasis In Utero With Distinct Genetic Alterations After Birth	Journal of pediatric hematology/oncology.	in press		
Takada M, Higuchi T, Tozuka K, Takei H, Haruta M, Watanabe J, Kasai F, Inoue K, Kurosumi M, Miyazaki M, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Kaneko Y.	Alterations of the genes involved in the PI3K and estrogen-receptor pathways influence outcome in human epidermal growth factor receptor 2-positive and hormone receptor-positive breast cancer patients treated with trastuzumab-containing neoadjuvant chemotherapy.	BMC cancer.	13:	241.	2013
Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, Maekawa S, Okuno Y, Kamura T, Shimamura T, Sato-Otsubo A, Nagae G, Suzuki H, Nagata Y, Yoshida K, Kon A, Suzuki Y, Chiba K, Tanaka H, Niida A, Fujimoto A, Tsunoda T, Morikawa T, Maeda D, Kume H, Sugano S, Fukayama M, Aburatani H, Sanada M, Miyano S, Homma Y, Ogawa S.	Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma.	Nat Genet.	45(8):	860-867.	2013
Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S.	Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia.	Nat Genet.	45(8):	937-941.	2013
Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T.	Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome.	Blood.	121(21):	4377-4387.	2013
Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H.	Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS).	Ann Hematol.	92(1):	1-9.	2013
Ninomiya H, Kato M, Sanada M, Takeuchi K, Inamura K, Motoi N, Nagano H, Nomura K, Sakao Y, Okumura S, Mano H, Ogawa S, Ishikawa Y.	Allelotypes of lung adenocarcinomas featuring ALK fusion demonstrate fewer onco- and suppressor gene changes.	BMC cancer.	13(1):	8.	2013
Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A.	Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders.	J Exp Med.	210(12):	2627-2639.	2013

Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP.	Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies.	Nat Genet.	45(8):	942-946.	2013
Mae S, Shono A, Shiota F, Yasuno T, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otsubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahon AP, Yamanaka S, Osafune K.	Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells.	Nat Commun.	4:	1367.	2013
Lee DH, Amanat S, Goff C, Weiss LM, Said JW, Doan NB, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Forscher C, Koeffler HP.	Overexpression of miR-26a-2 in human liposarcoma is correlated with poor patient survival.	Oncogenesis	2	e47.	2013
Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S.	ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia.	Am J Hum Genet.	92(3)	431-438.	2013
Kunishima S, Imai T, Kobayashi R, Kato M, Ogawa S, Saito H.	Bernard-Soulier syndrome caused by a hemizygous GPIIb/IIIa mutation and 22q11.2 deletion.	Pediatr Int.	55(4)	434-437.	2013
Kon S, Minegishi N, Tanabe K, Watanabe T, Funaki T, Wong WF, Sakamoto D, Higuchi Y, Kiyonari H, Asano K, Iwakura Y, Fukumoto M, Osato M, Sanada M, Ogawa S, Nakamura T, Satake M.	Smad1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia.	The Journal of clinical investigation	123(3):	1123-1137.	2013
Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S.	Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms.	Nat Genet.	45(10):	1232-1237.	2013
Kitamura K, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Furukawa K, Miyano S, Ogawa S, Kunishima S.	Normal neutrophil myosin IIA localization in an immunofluorescence analysis can rule out MYH9 disorders.	J Thromb Haemost.	11(11):	2071-2073.	2013
Kawamata N, Moreilhon C, Saitoh T, Karasawa M, Bernstein BK, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Raynaud S, Koeffler HP.	Genetic differences between Asian and Caucasian chronic lymphocytic leukemia. International journal of oncology.	2013	43(2):	561-565.	2013
Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe M.	Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients.	Blood.	in press		
Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S.	Landscape of Genetic Lesions in 944 Patients with Myelodysplastic Syndromes.	Leukemia.	in press		