

201324122A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患克服研究事業)

「一過性骨髄異常増殖症の病態解明と
診断・治療法の確立に関する研究」

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 林 泰秀

平成26 (2014) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

一過性骨髄異常増殖症の病態解明と診断・治療法の確立に関する研究

林 泰 秀…………… 1

II. 分担研究報告

1. TAM の遺伝子解析

伊 藤 悦 朗……………17

2. 次世代シーケンサーによるエクソーム解析、全ゲノム解析

小 川 誠 司……………21

3. 細胞表面マーカー解析と細胞保存

大喜多 肇……………27

4. 異種移植モデルを用いた一過性骨髄異常増殖症の病態に関する研究

渡 邊 健一郎……………31

5. iPS 細胞を用いたダウン症候群の造血障害に関する研究

望 月 慎 史……………33

6. 新生児の症例登録システムの確立とその解析に関する研究

田 村 正 徳……………35

7. 疫学研究用登録システムの確立と統計解析に関する研究

齋 藤 明 子……………37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………43

IV. 研究成果の代表的論文……………49

I 総括研究報告書

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

研究代表者 林 泰秀 群馬県立小児医療センター院長

研究要旨:

本邦で発生する一過性骨髄異常増殖症(TAM)の正確な患者数を把握するために、日本小児血液学会の疾患登録システムの中で TAM の登録システムを立ち上げ、日本未熟児新生児学会の中にある希有疾患サーベイランス委員会の協力も得ることができ、収集されたデータを本研究班で統合することによって、正確な TAM の疾患頻度の把握が可能なシステムを構築することができ運用されている。

重症度分類のための診断基準と治療指針の作成のため、日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)の中に設置された TAM 委員会が主体となって平成 23 年度に「ダウン症候群に合併した TAM に対する多施設共同観察研究」の観察研究が開始され、シタラビン少量療法による前方視的観察研究を開始した。形態の中央診断、マーカーの解析と微小残存病変の検討、細胞と DNA の保存を行い、153 症例が登録されている。また、高サイトカイン血症や肝線維症の指標として 27 種のサイトカインの測定を行い役割の解明を進めている。さらに *GATA1* 遺伝子の解析を行い変異の部位と発現量により白血病への進展の有無が予測可能となった。平成 25 年度は特に、15 例の TAM 症例と 14 例の AMKL 症例について次世代シーケンサーを用いて全エクソン解析を行った。1 症例あたりの体細胞遺伝子変異は TAM では 1.7 個と少なく、AMKL では 5.8 個であった。TAM は 21 トリソミーと *GATA1* 変異のみで発症すること、白血病への移行にはコヒーシ複合体(RAD21, STAG2, NIF, SMC1A, SML3)が 53%、EZ などのエピゲノムの制御因子が 45%、RAS/チロシンキナーゼなどのシグナル伝達系分子が 47%の遺伝子の変異が関与することを明らかにし、また TAM 細胞を移植した NGO マウスの作整と iPS 細胞の基盤整備により TAM から白血病への移行の機序の解明に貢献できた。これらにより TAM の診断の精度の向上と重症度の判定および治療薬の開発の基盤の確立を推進することができた。

研究分担者氏名

伊藤悦朗 弘前大学医学部小児科 教授
菊地 陽 帝京大学医学部小児科 教授
(7月まで)
渡邊健一郎 京都大学大学院医学研究科
発達小児科学(8月から)
小川誠司 京都大学大学院医学研究科
腫瘍生物学 教授
大喜多肇 国立成育医療研究センター研究所
小児血液・腫瘍研究部 分子病理研究
室 室長
望月慎史 東京大学医科学研究所 幹細胞治療
研究センター 幹細胞プロセッシング
分野 特任助教
田村正徳 埼玉医科大学総合医療センター 教授
齋藤明子 名古屋医療センター臨床研究センター
臨床疫学研究室 室長

A. 研究目的

ダウン症候群(DS)では新生児期に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加することがあり、一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)と呼ばれている。その頻度は約 10% (100 人/年)とされているが、新生児期に発症するため新生児施設で診断、治療されることも多く、また自然治癒する予後良好な疾患と考えられていたため登録もされず、正確な数の把握はされていなかった。近年の多数例の検討で、死亡例が 20~30%みられることが判明し、重症例を診断するための診断基準も、重症例に対する標準的治療もまだ確立していなかった。近年、重症例に対して少量シタラビンによる治療の有効性が示されている。

これまでの活動で日本小児血液学会の疾患登録システムの中で TAM の登録システムを立ち上げ、これにより新生児科の医師も小児血液学会員を通して登録ができるようになった。また、日本小児血液学会のシステムと未熟児新生児学会の希有疾患登録を用いて全体が把握可能となったので、重症例の診断基準を確立し、観察研究により標準的治療の確立を目指し、予後の改善と生存の質を向上させることが研究の目的である。

平成 23 年3月よりシタラビン少量療法による前方視

的観察研究を開始した。形態の中央診断、マーカーの解析と微小残存病変の検討を行い、細胞とDNAの保存を行っている。さらにGATA1遺伝子の解析を行い変異の部位と発現量により白血病への進展の有無が予測可能となった。今年度はさらに次世代シーケンサーによる全エクソン解析と全ゲノム解析により病態解析を行う。また、TAM細胞を移植したNGOマウスを作整して発症機構の解明と治療に役立てる。さらにモザイク型ダウン症と非ダウン症に発症したTAM、母体内で胎児水腫となっているTAMについても病態の研究を開始する。これらによりTAMの診断の精度の向上と重症度の判定および治療薬の開発の基盤を確立する。

本年度からは観察研究の登録症例を蓄積しており疫学的検討を行い、重症度の分類と標準治療法の確立を目指す。

B. 研究方法

1) 疾患登録システムの確立(図1)

①日本小児血液学会の登録システム

日本小児血液学会の疾患登録システムの中でTAMの登録システムを立ち上げ、これを用いて新生児科の医師も小児血液学会員を通してオンラインによる登録ができるようにした。この研究は日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)に平成22年度から設置されたTAM委員会が実施主体となって行われた。

②日本未熟児新生児学会の登録システム

A) 日本未熟児新生児学会の学会事業としての稀有疾患サーベイランスの利用

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

B) サーベイランス非参加施設の調査

TAM委員会が主導となって、前方視的調査が整備されつつあるが、実際にTAM症例に最初に遭遇する機会が最も多いのは新生児医療の現場であり、このような現場においてTAM症例を有効に登録するシステムを構築することを目的とした。

C) TAMの臨床試験

平成22年に設置されたJPLSGのTAM委員会において計7回の検討を行い、TAMの実態解明を目的とした観察研究計画を立案した。GATA1変異を弘前大学小児科、表面マーカーを三重大学小児科、血球形態を名古屋大学小児科でそれぞれ中央診断として行い、末梢血中の微小残存腫瘍を三重大学小児科、サイトカインプロファイルを群馬県立小児医療センターでそれぞれ中央検査として行うことを盛り込んだ観察研究計画で、日本小児血液学会臨床研究審査委員会の承認を得て各施設に研究計画書を配布し、実施された。

実際の臨床試験は、独立行政法人国立病院機構

名古屋医療センター臨床研究センター内に、特定非営利活動法人臨床研究支援機構(NPO OSCRC) データセンター(OSCRC DC)を設置し、名古屋医療センター臨床研究センター 臨床研究企画室 臨床疫学研究室と共同で、臨床研究の質確保を担当した。臨床研究の質向上の為の方法論の研究を行い、データセンターとしての標準化・効率化を図った。このシステムを用いて、JPLSG TAM 観察研究のデータ管理を行った。また、データ管理部門として、患者の個人情報及び診療情報の保護に関するポリシーを遵守した活動を行うとともに、関係者への個人情報保護に関する啓蒙をはかった。

2) 重症例の抽出と病態解析

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

① GATA1 遺伝子等の解析

これまでに全国から集めた200例以上の症例を弘前大学小児科に集め末梢血からDNAおよびRNAを抽出し、GATA1遺伝子を解析した。

② 網羅的ゲノム解析

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

③ マーカー解析

TAM10登録例の白血球のマーカー解析の発現状況について、末梢血、骨髄、臍帯血を全血法により蛍光3~10重染色し、Beckman-Coulter社のフローサイトメトリーFC500およびGalliosを用いて解析し、3カラー、5カラー、10カラーのそれぞれの解析の精度について比較を行なった。解析後の残余白血球を保存した。

④ NOG マウス

TAM細胞はin vitroで維持することは困難で、十分に病態を再現できている遺伝子改変マウスモデルの報告も限られている。本研究はTAMの病態、AMKLへの移行のメカニズムを解明し治療法を開発するため、高度免疫不全マウス(NOGマウス)を用いてヒト化マウスを作成し、新たな疾患解析モデルを確立することを目的とする。末梢血から単核球を分離して、NOGマウスに尾静脈より移植した。経時的にマウス骨髄における患者由来TAM細胞のキメラリズムをフローサイトメトリーで解析した。生着した細胞については、形態、表面

抗原、GATA1 遺伝子変異、染色体を調べ、患者末梢血球の TAM 細胞と同一であるかを検討した。

⑤iPS 細胞

A) ダウン症患者由来 iPS 細胞から造血/血液細胞への分化の解析

ダウン症患者由来 iPS 細胞を造血/血液細胞へ分化誘導し、その分化過程を、細胞生物学方法(種々の分化マーカーの発現や機能解析等)及び分子生物学的方法(発現遺伝子解析等)で追跡し、ヒトES細胞、あるいは健常人から樹立されたヒト iPS 細胞の分化と比較検討を行う。

B)ダウン症・TAM 患者の血液/骨髄細胞からの iPS 細胞の樹立

倫理審査委員会の承認を得た後、山中らの方法を用いて、ダウン症・TAM 患者由来血液/骨髄細胞から iPS 細胞を樹立する。

⑥サイトカイン測定

Bio-Prex Cytokine Assay により 27 種類の血清サイトカインの測定を行った。

3) 細胞保存

マーカー解析後の余剰検体の細胞を保存するために国立成育医療研究センター内に TAM 患児の末梢血由来の余剰検体の保管システムを構築した。これまでの成育の検体保存システムと可能な限り統一した手順を採用することにより効率良い検体保存システムを目指して作成した。

(倫理面への配慮)

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

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

C. 研究結果

1) 疾患登録システムの確立(図1)

①日本小児血液学会の登録システムとTAMの観察研究

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

今年度はJPLSGのTAM委員会において3回の検討

を行い、TAMの観察研究のデータ、2011年3月から研究が開始したTAMの観察研究(TAM10)の問題点を討議した。

A. 臨床研究の質確保

TAM 観察研究開始に先立ち、実施計画書/同意説明文書作成支援、データ管理計画作成、登録受付番号発行システム確立、臨床研究開始説明会などを実施した。又、収集したデータを入力する為のデータベースの構築による研究の進捗管理や督促機能を装備したシステムを整備・運用すると共に、安全性情報管理業務を継続中である。今年度 TAM 観察研究に関する中間解析(予備解析)を実施した。

B. 個人情報保護ポリシーの遵守

患者の個人情報及び診療情報の漏洩、混交、紛失、盗用などを防ぐ為、各種基準、ガイドランに従い実務を適切に行った。

C. JPLSG の各種委員会の効率的かつ円滑な連携の為のシステム整備

データセンターは、監査委員会への資料提供や監査同行業務をサポートしている。これらの活動を通して、データの質を維持したまま、効率的な運営を実施する為の具体的な提案を行ってきた。

D. 臨床研究デザインの工夫及び疫学研究の開発

当該グループは研究開始当初より、臨床研究への症例登録手続きに先立ち、JPLSG 登録を行ってきた。これは主として、研究グループが診断技術向上と標準化を目指した中央診断施設への一貫した検体搬送システムを確立する意図に基づいていた。JPLSG 登録症例の中には、臨床研究の候補者であっても細かい対象に関する規定への抵触などの理由で臨床研究に参加しない症例が存在する。臨床研究不参加症例のその後の治療内容と臨床効果を把握することが出来れば、臨床研究に参加し、厳密な管理の下で規定の治療を受けた患者から得られた臨床研究結果の一般化の妥当性評価が可能となる。この点に着目し、当該領域の患者を網羅的に把握できる前向きコホート研究のシステムを確立するための実施計画書を作成し、日本小児血液・がん学会の倫理審査承認を取得して運用を開始している。研究代表者施設の倫理審査委員会の承認取得後、2014年12月28日までに85施設で倫理委員会承認済みであり、153症例が登録された。

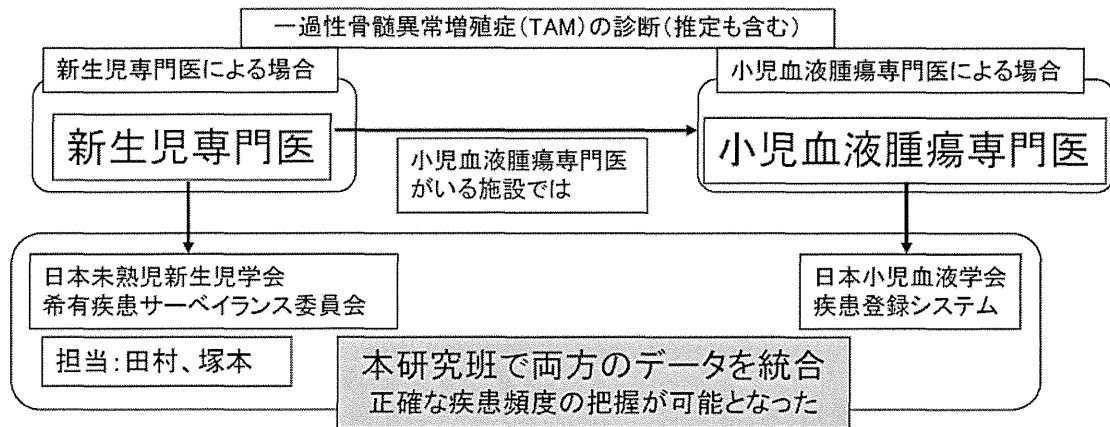
②日本未熟児新生児学会の登録システム

A) 日本未熟児新生児学会の学会事業としてのサーベイランス

55施設から74例の報告があった。うち複数例の報告のあった施設は、6例の報告1施設、4例の報告1施設、3例の報告3施設、2例の報告が5施設だった。二次調査が終了したのは71例中63例であり残りは追跡調査中である。死亡例は11例で、うち日齢0に死亡した4例は全例全身浮腫を伴っていた。他施設の小児血液専門医へのコンサルトは63例中14例あり、小児血液分野のみの調査では脱落すると考えられた。

図1

TAMの正確な患者数を把握するためのシステム



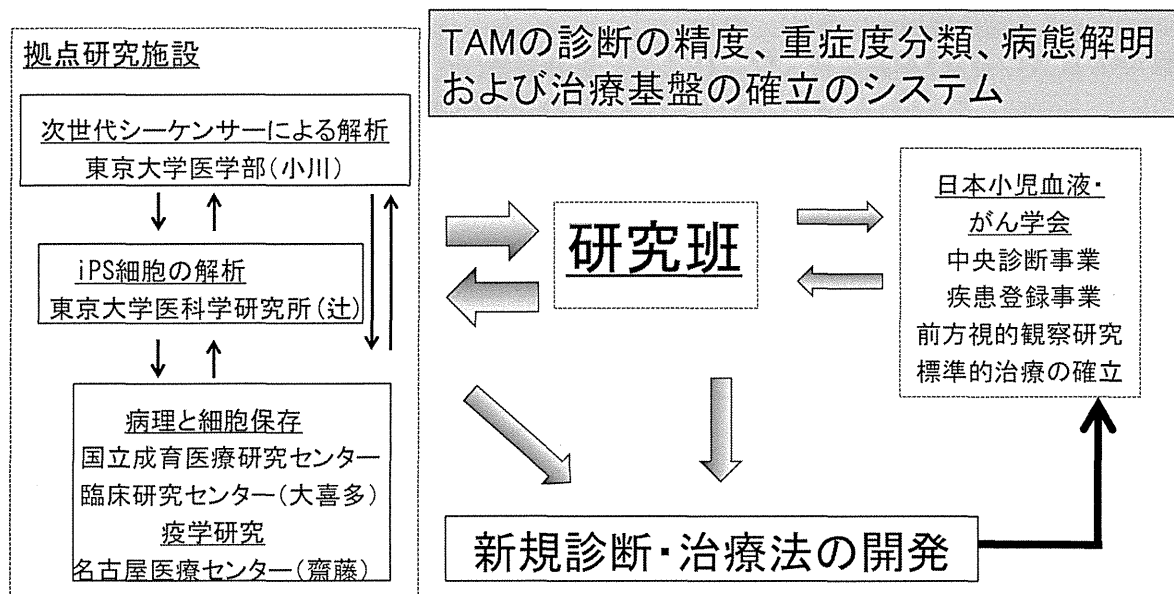
TAMの診断基準、治療指針の作成のためのシステム

日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)
TAM委員会

ダウン症候群に合併したTAMに対する多施設共同観察研究
(研究計画書→平成22年度早期に日本小児血液学会研究
審査委員会に提出し了承され、登録を開始した)

- ・診断基準の作成につながる因子の抽出
- ・治療指針の作成につながるデータの収集
- ・中央診断: 末梢血GATA1解析、
- ・末梢血マーカー診断→(残細胞保存)
- ・血清: サイトカインの解析

図2



③病態解析と重症例の抽出

A. 全エクソン解析

次世代シーケンサーを用いて、15 例の TAM 症例と 14 例の DS-AMKL 症例について、ゲノムのうちタンパク質をコードする領域(エクソン)の全塩基配列を徹底的に解読することにより(全エクソン解析)、その遺伝子変異の網羅的解析を行った。全てのサンプルで確認された *GATA1* 変異を含め、全エクソン解析で同定された 1 症例あたりの体細胞遺伝子変異数は、TAM では 1.7 個と少なく、これは他の様々な腫瘍と比較して、はるかに少数であった。一方、DS-AMKL では 5.8 個と、より有意に多く変異が認められた(図3)。

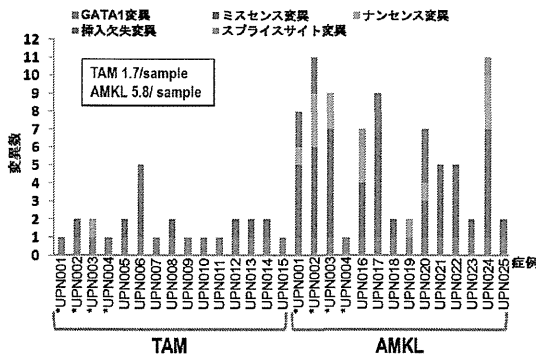


図3. 29 例の TAM, AMKL の全エクソンシーケンスによって同定された変異の個数

TAM では 1 症例あたりの平均の変異の数は 1.7 個と少なく、一方 AMKL では 1 症例あたり 5.8 個とより多くの変異が検出された。

B. ダウン症候群児に発症する AMKL において新たに発見された遺伝子変異。

DS-AMKL では *GATA1* 以外の 8 個の遺伝子 (*RAD21*, *STAG2*, *NRAS*, *CTCF*, *DCAF7*, *EZH2*, *KANSL1* と *TP53*) に繰り返し(高頻度の)変異が認められた(表 1)。

表 1 DS-AMKL でみられた遺伝子変異

遺伝子	染色体	変異のタイプ	アミノ酸の変化	塩基の変化	検体番号
<i>CTCF</i>	Chr16	Splice site	p.G318_splice	c.953-2A>G	016
<i>CTCF</i>	Chr16	Frameshift	p.T317fs	c.951_952insCA	020
<i>DCAF7</i>	Chr17	Missense	p.L340F	c.C1018T	001
<i>DCAF7</i>	Chr17	Missense	p.L340F	c.C1018T	003
<i>EZH2</i>	Chr7	Frameshift	p.705_711del	c.2114_2133del	001
<i>EZH2</i>	Chr7	Missense	p.R25Q	c.G74A	002
<i>KANSL1</i>	Chr17	Frameshift	p.R720fs	c.2159_2160insCG	020
<i>KANSL1</i>	Chr17	Nonsense	p.R462X	c.C1384T	024
<i>NRAS</i>	Chr1	Missense	p.G12S	c.G34A	001
<i>NRAS</i>	Chr1	Missense	p.Y64C	c.A191G	001
<i>NRAS</i>	Chr1	Missense	p.G12A	c.G35C	003
<i>RAD21</i>	Chr8	Nonsense	p.R139X	c.A415T	001
<i>RAD21</i>	Chr8	Frameshift	p.374_375del	c.1120_1124del	002
<i>RAD21</i>	Chr8	Missense	p.L611R	c.T1932G	019
<i>RAD21</i>	Chr8	Nonsense	p.R65X	c.C193T	024
<i>STAG2</i>	ChrX	Nonsense	p.R604X	c.C1810T	003
<i>STAG2</i>	ChrX	Nonsense	p.R216X	c.C646T	019
<i>STAG2</i>	ChrX	Frameshift	p.N863fs	c.2588_2589insT	020
<i>TP53</i>	Chr17	Nonsense	p.E68X	c.G202T	002
<i>TP53</i>	Chr17	NonFrameshift	p.25_30del	c.73_90del	002

この結果を受けて、41 例の TAM、49 例の DS-AMKL、19 例の non-DS-AMKL (非ダウン症児に合併する AMKL) について、これらの遺伝子や白血病で高頻度に変異がみられる他の遺伝子群を詳細に検索した。その結果、TAM では *GATA1* 以外の遺伝子変

異はきわめて稀であるが、DS-AMKL ではコヒーシン複合体 (*RAD21*, *STAG2*, *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*) (53%)、*CTCF* (20%)、*EZH2* などのエピゲノムの制御因子 (45%)、および RAS/チロシンキナーゼ (以下 TK) などのシグナル伝達系分子 (47%) をコードする遺伝子群に高頻度に変異が存在することが明らかになった。特に、コヒーシン複合体(図4)にみられた遺伝子変異は完全に相互排他的であり、DS-AMKL の発症に重要な役割を果たしていることが推定された(図 5)。

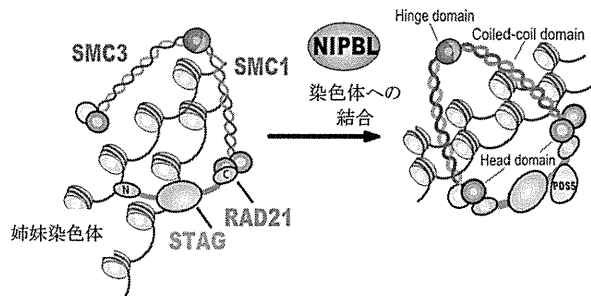


図4.コヒーシンの構造と機能

コヒーシンは SMC1, SMC3, RAD21 と STAG 蛋白からなる蛋白複合体で、細胞が分裂するときにリング上の構造をとって染色体を束ね、DNA 合成後姉妹染色体が2つの娘細胞に正確に分配されるのに重要な役割をはたしている。この過程で、NIPBL はコヒーシンの染色体への結合に不可欠である。また、コヒーシンは DNA 修復や転写調整に関わっている。コヒーシンの変異により、コルネリア・デ・ランゲ症候群という遺伝病が生じることが知られている。



図5.コヒーシン複合体/CTCF の遺伝子異常

コヒーシンの5つの遺伝子にみつけた変異は、変異がみられた症例では完全に重複なく「排他的」に生じていた。この結果は、コヒーシンを構成するどの分子が障害されても、共通の機序で TAM から真の白血病である DS-AMKL に進展することを示唆している。また、CTCF はジンクフィンガー型蛋白で、コヒーシンと一緒に遺伝子発現の制御に関わっている。CTCF の変異を含めると DS-AMKL の 65% に変異が検出された。

一方、non-DS-AMKL では、コヒーシン、*EZH2*、*GATA1* などの変異は DS-AMKL より少なく、逆に non-DS-AMK でよく認められる *CBFA2T3/GLIS2* や *OTT/MAL* キメラ遺伝子は、TAM と DS-AMKL には 1 例も検出されなかった。この結果より、DS-AMKL と non-DS-AMKL は遺伝学的に異なった疾患群であることが改めて確認された。

C. TAM から AMKL への進行のメカニズム解析

次世代シーケンサーを用いて、変異部分の遺伝子配列を何千回も読みこむことで、DS-AMKL の症例で、既に知られていた *GATA1* 遺伝子変異と他の経路の遺伝子変異(コヒーシン、*CTCF*、*EZH2*、TK および RAS) の遺伝子変異を持っている腫瘍細胞の割合を計算・比較した。その結果、*GATA1* 変異を有する腫瘍細胞の割合はコヒーシン/*CTCF* あるいは *EZH2* 変異を有す

る腫瘍細胞の割合と同程度であったが、TK/RAS 変異を有する腫瘍細胞の割合は低いことがわかった。これは、コヒーシン/CTCF および EZH2 の変異は、DS-AMKL 発症早期に獲得された、DS-AMKL 発症に関わる重要な遺伝子であり、TK/RAS 変異はその後の腫瘍の進展に関与していることを示唆している(図6)。

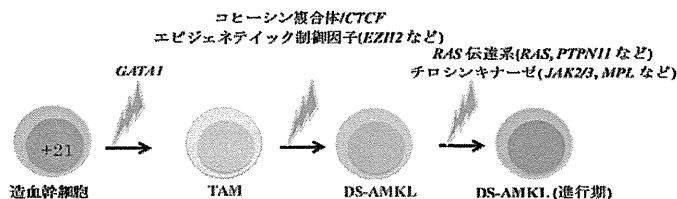


図6.DS-AMKLの多段階発症のモデル

ダウン症の急性巨核芽球性白血病の発症過程において、最初に 21 トリソミーを持った造血幹細胞に GATA1 変異が起こって TAM が発症する。その後、いったんは寛解した TAM の腫瘍細胞にコヒーシンと CTCF の変異およびエピゲノムの制御因子などの遺伝子変異が起こって白血病 (DS-AMKL) へ進展し、さらに RAS 伝達系やチロシンキナーゼの変異が生じて白血病が進行する。

④ マーカー解析

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

⑤ NOG マウス

現在までに 11 例の TAM 患者検体を移植し、うち 3 例で生着を確認した。いずれも生着したヒト細胞は、形態、フローサイトメトリーによる表面抗原解析、GATA1 遺伝子変異解析で患者検体と同一の特徴を示しており、TAM の異種移植モデルを確立した。生着した細胞は移植後 12 週と長期に渡り NOG マウス内で維持が可能であった。3 例中 1 例では、生着した細胞を別の NOG マウスに移植し継代することが可能であり、さらに 8 代目まで継代できた。

これら自己複製能を有する細胞には何らかの付加的なゲノム構造の変化が起きているのではないかと考え、多数のマウスで継代移植を行い、生着した TAM 細胞について DNA コピー数解析を行った。1 例で 21 トリソミー以外の染色体異常や DNA コピー数異常は認めず、単一の GATA-1 遺伝子異常が検出された。本症例の多数のレシピエントマウスにおける解析では、生着した TAM 細胞に、患者検体には見られなかった GATA-1 変異と、多様な DNA コピー数異常 (16q 部分欠失, 1q 増幅, 3q 欠失) が観察され、多様な自己複製能を示した。TAM は通常 21

トリソミー以外の染色体異常を伴わず、ML-DS では高頻度に付加的染色体異常を伴うことが報告されており、マウス内で観察されたコピー数異常は白血病に特徴的なものであった。また本症例は後に白血病を発症した。

これら異常を有するクローンは複数の 1 代目レシピエントマウスで再現性をもって観察され、もともとの TAM 患者検体に潜在している可能性が示唆された。そこで全ゲノム解析により切断点の同定が可能であった異常クローン (16q 部分欠失) について、切断点特異的 PCR を施行し、このクローンが患者検体中にマイナークローンとして既に存在していたことを証明した。また、新たにマウス内で観察された GATA-1 異常クローン (c.1A>G) について、制限酵素による配列特異的な PCR 産物の切断と DNA シークエンシングにより、患者検体中に存在していたことを証明した。

⑥ iPS 細胞

A. DS-iPS 細胞及び健常人由来 iPS 細胞を、AGM-S3 細胞と共培養した後、血液細胞コロニー法を用いて、その造血/血液細胞への分化能を比較検討した。その結果、DS-iPS 細胞からの分化誘導系においては、健常人由来 iPS 細胞からの分化誘導系と比較べて、全血球系において造血が亢進していることが明らかとなった。また、分化誘導された赤血球の解析から、二次造血、特に成人型造血の亢進が明らかとなった。

B. DS-iPS 細胞と健常人由来 iPS 細胞から造血/血液細胞への分化過程における遺伝子発現をマイクロアレイで解析したところ、21 番染色体上の RUNX1 の発現が亢進しており、このことはリアルタイム PCR 法による解析でも確認された。以上の結果は、ダウン症候群患者の造血障害には、21 番染色体トリソミーによる RUNX1 の発現亢進が深く関与している可能性を示唆しており、これを標的とするダウン症候群及び TAM における造血障害に対する新規治療法の可能性が示された。

⑥ サイトカイン

126 検体で 27 種類のサイトカインの検索を行い、これまでに報告されている小児のアレルギー疾患の結果と比較して、IL-8, IL-12, IL-17, GM-CSF, MCP-1, MIP-1β 等が高値であり、IL-4 が定値であった。臨床データとの関係を検討している。

3) 細胞保存

検体保存は、患者ひとりにつき末梢血由来の TAM 検体を最大 5 本保存し、検査後の検体は -80°C で凍結、液体窒素タンクで保管した。検体 1 個につき個別の保存用匿名化番号 (乱数) を発行し、登録研究の登録番号、検査施設整理番号とは異なる独自の番号で管理し、保存用匿名化番号は、検体保存施設である国立成育医療研究センター研究所で発行し、検査担当施設に事前に送付され、検査担当施設で検体チューブに添付し、検体の保存用匿名化番号、種類、量、保管場所等は専用の検体情報シートにて管理した。検査担当施設に、一定数の検体が集まった時点で、

検体と情報を記入した検体情報シートを検体保存施設に送付する予定である。

D. 考察

これまでの研究班の活動により新生児科医師が日本小児血液学会の疾患登録システムを用いることにより TAM の全体像の把握が可能となり、これまで診療する医師により分断されていた TAM の診断と治療が統一された。また、このシステムに登録されていない新生児側の症例については、日本未熟児新生児学会の希有疾患サーベイランス委員会の対象疾患として承認されたので、これまで把握ができなかった新生児施設のみ入院した TAM 症例も把握できるようになった。実際はサーベイランス事業は報告数が少ないのが課題であり、今後さらに学会等で啓蒙する必要があり、平成 23 年 8 月に開催された第 114 回日本小児科学会でも TAM のシンポジウムを開催し(林班長が座長)、平成 24 年 7 月の周産期新生児学会(田村班員が会長)でも産科、新生児科向けのシンポジウムを開催して啓蒙を行った。TAM の場合 *GATA1* 遺伝子の異常が全例にみられるが、今回二次調査を行った 24 例中 10 例では遺伝子異常の検索が行われていなかった。小児血液疾患を診療する施設はかなり集約化が進んでいるが、新生児施設は地域周産期センターまで入れると 600 施設を超える。早急に新生児医と血液専門医が連携するためのルール作りとネットワークの構築が必要であり、均てん化を測っていく必要があると考えられた。

<サーベイランス参加施設と非参加施設への調査>

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

<JPLSG TAM 委員会の観察研究>

今回の観察研究の開始により、日本の TAM 症例の均質な情報が集積され、推奨治療の提示により TAM に対する対応が統一して行われ、症例の把握と重症例の治療などが標準化されて行われるようになり、予後不良であった TAM の予後を改善することができ、死亡例を減少させるのみならず、重症例の生存の質(QOL)を改善し、長期入院する患者が少なくなり、経済的効果も得られると思われる。

稀少な小児造血器疾患領域の診療の質向上を目指した病態研究や治療開発研究は、将来ある小児の福祉向上に必要不可欠であるが、市場が小さく、極めて困難であることも事実である。登録、中央診断・検査、

症例経過報告などの手順を、簡便かつ標準化すること、及び希少疾患の全容を把握することも目指し、JPLSG 疫学研究と TAM 治療研究を平行して管理しており、患者リクルートや長期フォローアップとの連携が整理できる可能性があり有望であると考えている。被験者を危険に晒すことなく、データの質を落とさない範囲で業務の簡略化・標準化が図れるよう、今後も引き続き地道な努力を払う予定である。

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

<細胞を用いた研究>

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

微小残存病変(MRD)の検討では、初回に 126 例中 123 例で検査可能であり、1か月後の 0.1%以上の MRB は 107 例中 67 例(62.6%)、3か月後 0.1%以上の MRD は 87 例中 10 例(11.5%)であり、MRD により白血病への移行が可能であることが示唆された。

NOG マウスでは、海外で TAM 細胞を別の免疫不全マウスの骨髄内に移植をした報告はあるが、十分な生着は得られていない(Leukemia, 2010;24:1012-7)。今回の我々の検討では、TAM の中には NOG マウスの骨髄環境で長期に維持できるものが存在することが示された。この系を用いれば、TAM の病態、AMKL 発症機構の解析が可能になると考えられた。本実験系は前白血病から白血病への進展過程を生体内で再現し得るモデルで、TAM に遺伝的多様性があり、初期段階に不規則に起こるクローン選択が白血病発症に重要である可能性が示唆された。また、のちに ML-DS へ進展した TAM 患者でのみ、NOG マウスでの継代移植が可能であった点からは、本実験系が白血病発症の予測因子となり得る可能性も示唆された。

エクソーム解析 TAM では *GATA1* 変異以外に繰り返し(高頻度)に認められる遺伝子変異は検出されず、TAM はダウン症候群の特徴である 21 トリソミーと *GATA1* 遺伝子の変異によって起こっている疾患であることが示唆された。

DS-AMKL は、TAM にコヒーシン/*CTCF* および

EZH2 の変異が生じて発症し、TK/RAS 変異はその後の腫瘍の進展に関与していると示唆された。

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

サイトカインの解析では、現在までの解析結果から、Th1/Th2 バランスの異常だけではなく、ヘルパー T 細胞サブセットである Th17 細胞から産生される IL-17 増加により、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞接着因子など、種々の因子を誘導して炎症を誘導されている可能性が示唆された。

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

E. 結論

登録システムの確立により全症例の登録が可能となり、質の高い観察研究が開始され、多大な成果が期待される。病態解析も全エクソン解析により世界に先駆けた成果を上げることができた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

- 論文発表
1. 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 J Hematol* 99 : 154-161, 2014
2. 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
3. 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
4. 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 : 4377-4387, 2013
5. 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.*(in press)
6. Shiba N, Funato M, Ohki K, Park MJ, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukamoto I, Hayashi Y. Mutations of the GATA2 and CEBPA genes in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 164 : 142-159, 2014
7. 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
8. 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, Tsukamoto 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
9. 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, Tsukamoto I, Hayashi Y. WT1 mutation in pediatric patients with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 98: 437-445, 2013
10. Kiyokawa N, Iijima K, Tomita O, Miharuru 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 : 42-48, 2014
11. Takita J, Chen Y, Kato M, Ohki K, Sato Y, Ohta S, Sugita K, Nishimura R, Hoshino N, Seki M, Sanada M, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S.

- Genome-wide approach to identify second gene targets for malignant rhabdoid tumors using high-density oligonucleotide microarrays. *Cancer Sci.* 105:258-264, 2014
12. 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
 13. 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
 14. Katayama K, Asano K, Ohkuma H, Terui K, Sasaki S, Sato T, Ito E, Komori T. A case of pediatric optic pathway oligodendroglioma presenting widespread invasion and dissemination in the cerebrospinal fluid. *Brain Tumor Pathol.* (in press)
 15. Takata K, Sato Y, Nakamura N, Tokunaka M, Miki Y, Yukie Kikuti Y, Igarashi K, Ito E, Harigae H, Kato S, Hayashi E, Oka T, Hoshii Y, Tari A, Okada H, Mohamad AA, Maeda Y, Tanimoto M, Kinoshita T, Yoshino T. Duodenal follicular lymphoma lacks AID but expresses BACH2 and has memory B-cell characteristics. *Mod Pathol* 26: 22-31, 2013
 16. 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: 1-9, 2013
 17. Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. *Blood* 121:862-863, 2013
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.* 45:942-946, 2013
 21. 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.* 46:171-175, 2014.
 22. 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
 23. 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.* 8:e62233, 2013
 24. 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 Pharmacokinet.* 2013 Jul, in press
 25. 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.* 4:2, 2013
 26. 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):5391-5399, 2013
 27. 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.*(in press)
28. Ebihara Y, Yamamoto S, Mochizuki S, et al. Pneumothorax in an early phase after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Hematology reports* 5:34-35, 2013
 29. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, et al. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. *PNAS USA* 110:3023-3028, 2013
 30. Konuma T, Kato S, Ooi J, et al. Single-Unit Cord Blood Transplantation after Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Combined Myeloablative Conditioning for Myeloid Malignancies Not in Remission. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2013. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20:396-401, 2014
 31. Konuma T, Kato S, Ooi J, et al. The effect of ABO blood group incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation following myeloablative conditioning. *Biology of blood and marrow transplantation : American Society Blood and Marrow Transpl* 2013. 20:577-581, 2014
 32. Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, et al. Quantitative polymerase chain reaction detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 myeloproliferative syndrome. *Leukemia & lymphoma* 54:2068-2069, 2013
 33. Asai D, Imamura T, Suenobu S, Saito AM, Hasegawa D, Hashii Y, Matsumoto K, Kawasaki H, Hori H, Iguchi A, Kosaka Y, Kato K, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Oda M. IKZF1 deletion is associated with a poor outcome in pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in Japan. *Cancer Medicine.* 2:412-419, 2013
 34. 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, Koh K, Kigasawa H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Excess treatment reduction including anthracyclines results in higher incidence of relapse in core binding factor acute myeloid leukemia in children. *Leukemia.* 2013 May 16. doi: 10.1038/leu.2013.153..
 35. Horibe K, Saito AM, Takimoto T, Tsuchida M, Manabe A, Shima M, Ohara A, Mizutani S. Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Int J Hematol.* 98:74-88, 2013
 36. Yamashita Y, Shimada A, Yamada T, Yamaji K, Hori T, Tsurusawa M, Watanabe A, Kikuta A, Asami K, Saito AM, Horibe K. IKZF1 and CRLF2 gene alterations correlate with poor prognosis in Japanese BCR-ABL1-negative high-risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 60:1587-1592, 2013
 37. 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.* 2013 Sep 26.
 38. Tanabe H, Sahashi K, Kitano T, Tomita Y, Saito AM, Hirose H. Effects of oral propranolol on circumscribed choroidal hemangioma: a pilot study. *JAMA Ophthalmol.*;131: 1617-1622, 2013
2. 学会発表
 1. 朴 明子, 大木健太郎, 新井 心, 外松 学, 林 泰秀. 染色体異常を伴ったダウン症合併 TAM と AMKL の遺伝子解析. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
 2. 朴 明子, 吉田健一, 大木健太郎, 新井 心, 外松 学, 伊藤悦朗, 小川誠司, 林 泰秀. 13q 欠失を伴ったダウン症合併 TAM と AMKL の遺伝子解析. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
 3. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanazaki R, Shiraiishi Y, Sanada M, Park MJ, Terui K, Kon A, Nagata Y, Sato-Otsubo A, 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, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. Genetic basis of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
 4. 原 勇介, 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 富澤大輔, 多賀 崇, 足立壮一, 荒川浩一, 多和昭雄, 堀部敬三, 林 泰秀. 小児 non-Down 急性巨核芽球性白血病における遺伝子解析. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
 5. 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサを用いた横紋筋肉腫の標的分子の探索. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
 6. 星野諭子, 西村 力, 関 正史, 奥野友介, 吉田健一, 白石友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 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 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
 7. 柴 徳生, 朴 明子, 船戸道徳, 小林正夫, 木下明俊, 足立壮一, 荒川浩一, 多和昭雄, 月本一郎, 林 泰秀. 小児急性骨髄性白血病における GATA2 遺伝子変異の解析. 第 116 回日本小

- 児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
8. 原 勇介, 柴 徳生, 嶋田 明, 工藤寿子, 富澤大輔, 多賀 崇, 多和昭雄, 荒川浩一, 足立壮一, 林 泰秀. NUP98-NSD1 融合遺伝子陽性例は小児急性骨髄性白血病において予後不良である. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
 9. 大木健太郎, 朴 明子, 柴 徳生, 清河信敬, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地 陽, 小原明, 林 泰秀. 小児 B 型前駆細胞型 ALL における CRLF2 高発現例の特徴: TCCSG-ALL 研究. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
 10. 関 正史, 西村 力, 星野諭子, 奥野友介, 白石友一, 吉田健一, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 再発 T 細胞性 ALL における網羅的ゲノム解析. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.19-21
 11. Hara Y, Shiba N, Shimada A, Kudo K, Tomizawa D, Taga T, Horibe K, Adachi S, Arakawa H, Tawa A, Hayashi Y. NUP98-MSD1 gene fusion is a strong poor prognostic factor in pediatric AML. 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology. Hong Kong, 2013.9.25-28
 12. Seki M, Nishimura R, Hoshino H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology. Hong Kong, 2013.9.25-28
 13. 三谷幸代, 坂本裕美, 柴 徳生, 林 泰秀, 吉田輝彦, 市川 仁. RNA シークエンシングによる小児 AML の融合遺伝子探索. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
 14. 星野諭子, 西村 力, 関 正史, 奥野友介, 白石友一, 佐藤祐介, 吉田健一, 宮野 悟, 林 泰秀, 岩中 督, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いた肝芽腫の全エクソーム解析. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
 15. 関 正史, 西村 力, 星野諭子, 吉田健一, 佐藤悠佑, 奥野雄介, 白石悠一, 加藤元博, 康勝好, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 小児 T 細胞性 ALL における網羅的ゲノム解析. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
 16. 大木健太郎, 柴 徳生, 朴 明子, 富澤大輔, 多賀 崇, 堀部敬三, 多和昭雄, 足立壮一, 林 泰秀. JPLSG AML05 臨床試験登録症例において MLPA 法による MLL-PTD の頻度はこれまでの報告より少なく予後不良である. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
 17. Tokumasu M, Nagao M, Shimada A, Murata C, Ohki K, Hayashi Y, Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Ito H, Nakayama H, Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T, Yamaguchi H, Tawa A, Heike T, Adachi S. Prognostic impact of KIT mutakon in t(8;21) childhood AML: The JPLSG AML-05 trial. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
 18. Hara Y, Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Shimada A, Kudo K, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Arakawa H, Tawa A, Hayashi Y. NUP98-NSD1 gene fusion is a strong poor prognostic factor in pediatric AML. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
 19. Ohki K, Kama Y, Shiba N, Arai K, Park MJ, Sotomatsu M, Hayashi Y. Clonal architecture in a case of acute myeloid leukemia with trisomy 8 and MLL-AF9. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
 20. Iijima K, Kiyokawa N, Yoshihara H, Osumi T, Kato M, Kobayashi K, Okita H, Fujimoto J, Hanada R, Tsuchida M, Shimada H, Fukushima T, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Ohara A. Gene expression profile in childhood BCP-ALL without common chimeric genes. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
 21. Seki M, Hoshino N, Nishimura R, Okuno Y, Shiraishi Y, Yoshida K, Kato M, Kho K, Hanada R, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Genome-wide analysis of relapsed T cell acute lymphoblastic leukemia. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
 22. Hara Y, Shiba N, Funato M, Oki K, Park MJ, Mizushima Y, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. Gata2 mutations are found in pediatric AML but not in other leukemias including JMML. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
 23. Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi 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. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
 24. Kiyokawa N, Iijima K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Yoshida H, Osumi T, Kato M, Kobayashi K, Okita H, Fujimoto J, Sakamoto H, Hata K, Matsumoto K, Yoshida T, Saito H, Mori T, Fukushima T, Kinoshita A, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Ohara A. Identification of chimeric genes expressed in Ph-like ALL in childhood by transcriptome sequencing. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
 25. Shiba N, Hara Y, Park MJ, Ohki K, Fukushima K, Sako M, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Hayashi Y. Recurrent SETBP1 mutation in juvenile

- myelomonocytic leukemia and myelodysplastic syndrome. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
26. 大木健太郎, 朴 明子, 原 勇介, 柴 徳生, 大喜多 肇, 小林健一郎, 外松 学, 福島 敬, 康勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地 陽, 土田昌宏, 小原 明, 清河信敬, 林 泰秀. 小児 B 前駆細胞型 ALL における EBF1-PDGFRB 融合遺伝子の解析:TCCSG-ALL 研究. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
 27. 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よる小児 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, 福岡, 2013.11.29-12.1 29
 28. 林 泰秀. 小児血液・腫瘍の染色体・分子遺伝学入門とその臨床応用. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 (Meet the expert), 福岡, 2013.11.29-12.1
 29. 柴 徳生, 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原因遺伝子の同定. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 (シンポジウム), 福岡, 2013.11.29-12.1
 30. 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 工藤寿子, 福島啓太郎, 伊藤悦朗, 迫 正廣, 多和昭雄, 荒川浩一, 林 泰秀. 小児白血病における SETBP1 遺伝子変異の解析. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
 31. 佐野弘純, 嶋田 明, 田渕 健, 滝 智彦, 村田知里, 朴 明子, 大木健太郎, 外松 学, 足立壮一, 多和昭雄, 小林良二, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 林 泰秀. 急性骨髄性白血病における WT1 遺伝子変異の解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
 32. 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, 福岡, 2013.11.29-12.1
 33. 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網羅的ゲノム解析. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
 34. 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, 福岡, 2013.11.29-12.1
 35. 佐野仁志, 大木健太郎, 朴 明子, 柴 徳生, 原 勇介, 外松 学, 足立壮一, 堀部敬三, 多和昭雄, 花田良二, 月本一郎, 林 泰秀. 小児骨髄造血器腫瘍における CSF3R 遺伝子異常の解析. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
 36. Shiba N, Ohki K, Nagata Y, Kon A, Okuno Y, Shiraiishi Y, Kato M, Park MJ, Ohki K, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Ito E, Sanada M, Tomizawa D, Tawa A, Adachi S, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-Exome Resequencing Identifies Somatic Mutations Of *BCOR* and *BCORL1* Transcriptional Corepressor Genes and Major Cohesin Complex Component Genes In Pediatric Acute Myeloid Leukemia. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
 37. Ohki K, Park MJ, Sano H, Hara Y, Shiba N, Tomizawa D, Taga T, Moriya Saito A, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Low Frequency and Poor Prognosis Of *MLL*-Partial Tandem Duplications In Pediatric Acute Myeloid Leukemia Using MLPA Method: The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 Trial. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
 38. Yoshida K, Shiba N, Shiraiishi Y, Shimada A, Terui K, Kato M, Okuno Y, Nagata Y, Kon A, Yoshizato T, Matsunawa, M, Chiba K, Tanaka H, Sanada M, Miyano S, Ito E, Hayashi Y, Ogawa S. Whole Exome Sequencing Reveals Clonal Evolution Pattern and Driver Mutations Of Relapsed Pediatric AML. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
 39. Shimada A, Yamashita Y, Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Yokozawa T, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Moriya Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Oki K, Hayashi Y, Adachi S. Poor Prognosis With Different Induction Rate Was Observed In Children With Acute Myeloid Leukemia and *FLT3*-ITD According To The ITD/WT Allelic Ratio: A Result From The Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
 40. Hara Y, Shiba n, Ohki K, Park MJ, Tomizawa D, Taga T, Saito A, Fujimoto J, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. Comprehensive Fusion Gene Analysis Of Pediatric Non-Down Syndrome Acute Megakaryoblastic Leukemia. 55rd

- Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
41. Kiyokawa N, Iijima K, Yoshihara H, Ohki K, Kato M, Fukushima T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi Y, Koh K, Manabe A, Ohara A. An Analysis Of Ph-Like ALL In Japanese Patients. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
 42. Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kato M, Hiwatari M, Koh K, Hanada R, Sanada M, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Genetic Landscapes Of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
 43. Yoshimi A, Toya T, Nakagawa M, Kawazu M, Nannya Y, Ichikawa M, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Mano H, Kurokawa M. The Genetic Landscape Of FPD/AML Revealed CDC25C Mutation As a Driver That Promotes Malignant Transformation. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013
 44. Sano H, Ohki K, Park MJ, Hara Y, Shiba N, Tomizawa D, Taga T, Moriya Saito A, Fujimoto J, Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y. *CSF3R* Gene Mutations In Myeloid Malignancy Of Childhood. 55rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 7-10, 2013

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

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服等研究事業(難治性疾患克服研究事業)
平成 25 年度第 1 回 TAM 班会議

平成 25 年 11 月 15 日 13 時 00 分より

国立病院機構名古屋医療センター

座長:渡邊健一郎

1. TAM 委員会の現状と今後の課題 渡邊健一郎(京都大学小児科)

2. TAM の MRD 解析

①FCM 出口隆生、岩本彰太郎(三重大学小児科)

②GATA1 照井君典(弘前大学小児科)

3. TAM の形態からの提案 濱 麻人、村松秀城(名古屋大学小児科)

座長:伊藤悦朗

4. TAM のサイトカインの解析 朴 明子、林 泰秀(群馬県立小児医療センター血液腫瘍科)

5. NOG マウスを用いた白血病進展モデルの作製:異種移植モデルにおける

TAM のクローン選択 才田 聡、渡邊健一郎(京都大学小児科)

6. 次世代シーケンサーを用いた TAM と DS-AMKL の解析 伊藤悦朗(弘前大学小児科)

Ⅱ. 分担研究報告書

一過性骨髄異常増殖症の病態解明と診断・治療法の確立に関する研究
分担研究項目 TAM の遺伝子解析
研究分担者 伊藤悦朗 弘前大学小児科 教授

研究要旨: ダウン症候群では、5-10%の新生児に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加する一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)が発症する。この疾患の芽球は白血病のものと同様で、約 20%が早期死亡に至る。さらに、TAMが自然寛解した後、20-30%は生後3年以内に真の白血病であるDS-AMKLを発症する。全てのTAMとDS-AMKL症例では、血球系転写因子GATA1の遺伝子変異があることが知られていたが、「TAMの発症にはGATA1変異で十分であるのか?」、「TAMからDS-AMKLに進展には付加的遺伝子異常が必要か?」、「もし必要ならどのような付加的遺伝子変異が起こっているか?」などの問題が残されていた。我々は、TAM、寛解期細胞、急性巨核芽球性白血病(AMKL)を次世代シーケンサーで解析を行った。GATA1以外の変異数は平均してTAMでは0.7個、AMKLでは4.8個とAMKLで多い傾向にあった。TAMではGATA1変異以外に繰り返し(高頻度に)認められる遺伝子変異は検出されず、TAMは21トリソミーとGATA1遺伝子の変異によって起こっている疾患であることが示唆された。一方、DS-AMKLではGATA1以外の8個の遺伝子(RAD21, STAG2, NRAS, CTCF, DCAF7, EZH2, KANSL1とTP53)に繰り返し(高頻度の)変異が認められた。この結果を受けて、41例のTAM、49例のDS-AMKL、19例のnon-DS-AMKL(非ダウン症児に合併するAMKL)について、これらの遺伝子や白血病で高頻度に変異がみられる他の遺伝子群を詳細に検索した。その結果、TAMではGATA1以外の遺伝子変異はきわめて稀であるが、DS-AMKLではコヒーシ複合体(RAD21, STAG2, NIPBL, SMC1A, SMC3)(53%)、CTCF(20%)、EZH2などのエピゲノムの制御因子(45%)、およびRAS/チロシンキナーゼ(以下TK)などのシグナル伝達系分子(47%)をコードする遺伝子群に高頻度に変異が存在することが明らかになった。特に、コヒーシ複合体にみられた遺伝子変異は変異がみられた症例では遺伝子変異は完全に相互排他的であり、DS-AMKLの発症に重要な役割を果たしていることが推定された。

A. 研究目的

ダウン症候群では新生児期に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加することがあり、一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)と呼ばれている。その頻度は約10%(100人/年)とされている。近年の多数例の検討で、死亡例が20~30%みられることが判明した。これまでの厚生労働省のTAM班の活動により、TAMの登録システムを立ち上げて全数把握ができるようになり、検体保存ができるようになったので、これまでの検体とこの保存検体を用いて次世代シーケンサーにより発症、進展に関与する遺伝子の探索をすることが研究の目的である。

B. 研究方法

1) 細胞保存

マーカー解析後の余剰検体の細胞を保存するために国立成育医療研究センター内にTAM患児の末梢血由来の余剰検体の保管システムを構築した。これまでの成育の検体保存システムと可能なかぎり統一した手順を採用することにより効率良い検体保存システムを目指して作成した。

2) 病態解析

① 染色体・遺伝子・SNP解析

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

② GATA1 遺伝子等の解析

これまでに全国から集められた200例以上のTAMの臨床検体の遺伝子解析を行った。末梢血からDNAおよびRNAを抽出し、GATA1遺伝子を解析した。

③ 網羅的ゲノム解析

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

(倫理面への配慮)

本研究事業で行われる臨床試験は、日本小児血液学会臨床研究審査委員会の承認の後、各施設の倫理委員会の承認を得て実施している。本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、参加研究施設の倫理委員会の審査・承認を得て行われた。またJPLSGのもとで行なわれる観察研究は、文書による説明同意を行い、同意の得られた症例のみが観察研究の対象となる。また、連結可能匿名化により、症例の登録・追跡調査を行うことにより、対象症例の個人情報外部に流出する危険を限りなくゼロにする配慮をしている。

C. 研究結果

1. 全エクソンシーケンス

次世代シーケンサーを用いて、15 例の TAM 症例と 14 例の DS-AMKL 症例について、ゲノムのうちタンパク質をコードする領域(エクソン)の全塩基配列を徹底的に解読することにより(全エクソンシーケンス)、その遺伝子変異の網羅的解析を行った。全てのサンプルで確認された *GATA1* 変異を含め、全エクソームシーケンスで同定された1症例あたりの体細胞遺伝子変異数は、TAM では 1.7 個と少なく、これは他の様々な腫瘍と比較して、はるかに少数であった。一方、DS-AMKL では 5.8 個と、より有意に多く変異が認められた(図 1)。

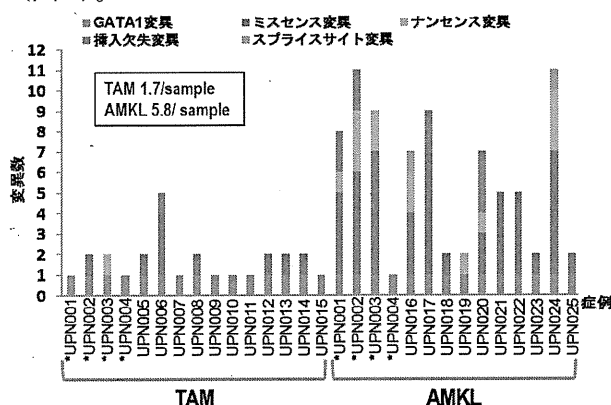


図 1. 29 例の TAM、AMKL の全エクソンシーケンスによって同定された変異の個数
TAM では 1 症例あたりの平均の変異の数は 1.7 個と少なく、一方 AMKL では 1 症例あたり 5.8 個とより多くの変異が検出された。

2. ダウン症候群児に発症する AMKL において新たに発見された遺伝子変異

DS-AMKL では *GATA1* 以外の 8 個の遺伝子 (*RAD21*, *STAG2*, *NRAS*, *CTCF*, *DCAF7*, *EZH2*, *KANSL1* と *TP53*) に繰り返し(高頻度)の変異が認められた(表 1)。

遺伝子	染色体	変異のタイプ	アミノ酸の変化	塩基の変化	検体番号
CTCF	Chr16	Splice site	p.G318_splice	c.953-2A>G	016
CTCF	Chr16	Frameshift	p.T317fs	c.951_952insCA	020
DCAF7	Chr17	Missense	p.L340F	c.C1018T	001
DCAF7	Chr17	Missense	p.L340F	c.C1018T	003
EZH2	Chr7	Frameshift	p.705_711del	c.2114_2133del	001
EZH2	Chr7	Missense	p.R25Q	c.G74A	002
KANSL1	Chr17	Frameshift	p.R720fs	c.2159_2160insCG	020
KANSL1	Chr17	Nonsense	p.R462X	c.C1384T	024
NRAS	Chr1	Missense	p.G12S	c.G34A	001
NRAS	Chr1	Missense	p.Y64C	c.A191G	001
NRAS	Chr1	Missense	p.G12A	c.G35C	003
RAD21	Chr8	Nonsense	p.R139X	c.A415T	001
RAD21	Chr8	Frameshift	p.374_375del	c.1120_1124del	002
RAD21	Chr8	Missense	p.L611R	c.T1832G	018
RAD21	Chr8	Nonsense	p.R85X	c.C193T	024
STAG2	ChrX	Nonsense	p.R604X	c.C1810T	003
STAG2	ChrX	Nonsense	p.R216X	c.G646T	019
STAG2	ChrX	Frameshift	p.N863fs	c.2588_2589insT	020
TP53	Chr17	Nonsense	p.E68X	c.G202T	002
TP53	Chr17	NonFrameshift	p.25_30del	c.73_90del	002

この結果を受けて、41 例の TAM、49 例の DS-AMKL、19 例の non-DS-AMKL (非ダウン症児に合併する AMKL) について、これらの遺伝子や白血病で高頻度に変異がみられる他の遺伝子群を詳細に検索した。その結果、TAM では *GATA1* 以外の遺伝子変異はきわめて稀であるが、DS-AMKL ではコヒーシン複合体 (*RAD21*, *STAG2*, *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*) (53%)、*CTCF* (20%)、*EZH2* などのエピゲノム^{注3}の制御因子(45%)、および *RAS*/チロシンキナーゼ(以下 TK)などのシグナル伝達系分子(47%)をコードする遺伝子群に高頻度に変異が存在することが明らかになった。特に、コヒーシン複合体(図 2)にみられた遺伝子変異は変異がみられた症例では遺伝子変異は完全に相互排他的であり、DS-AMKL の発症に重要な役割を果たしていることが推定された(図 3)。

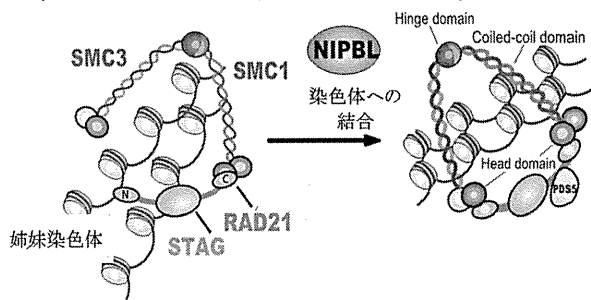


図 2. コヒーシンの構造と機能

コヒーシンは *SMC1*, *SMC3*, *RAD21* と *STAG* 蛋白からなる蛋白複合体で、細胞が分裂するときリング上の構造をとって染色体を束ね、DNA 合成後姉妹染色体が2つの娘細胞に正確に分配されるのに重要な役割をはたしている。この過程で、*NIPBL* はコヒーシンの染色体への結合に不可欠である。また、コヒーシンは DNA 修復や転写調整に関わっている。コヒーシンの変異により、コルネリア・デ・ランゲ症候群という遺伝病が生じることが知られている。

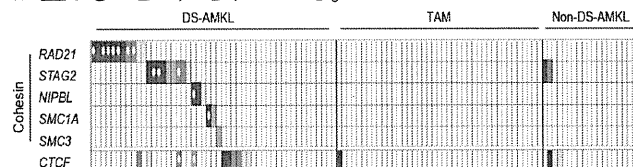


図 3. コヒーシン複合体/CTCF の遺伝子異常

コヒーシンの5つの遺伝子にみつけた変異は、変異がみられた症例では完全に重複なく「排他的」に生じ