

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：分類不能血液疾患の原因究明ならびに治療法の確立

研究分担者 金兼弘和（富山大学附属病院小児科 講師）

研究要旨： 遺伝性血液疾患のなかには原発性免疫不全症とオーバーラップし、従来の症候群との位置づけが困難なものもある。本研究ではこれらの分類不能血液疾患の原因遺伝子の同定を行うべく、**whole exome sequencing (WES)**を行った。その過程で臨床的には典型的な自己免疫リンパ増殖症候群（ALPS）でありながら、**FAS**、**FASLG**、**CASP10** といった既存の遺伝子変異が同定されない症例を対象に **WES** を行ったところ、**NRAS** 変異が同定され、**RAS** 関連 **ALPS** 様疾患であることが明らかになった。**WES** は表現型の異なる疾患における既知遺伝子を見出すのにきわめて有用な方法である。

A. 研究目的

遺伝性血液疾患の一部には、免疫担当細胞以外の分化異常、さらには悪性腫瘍の合併を伴うものがあり、従来の疾患群との位置づけが困難であり、原発性免疫不全症（PID）ともオーバーラップすることがある。本研究ではこれらの分類不能血液疾患に対して、**whole exome sequencing (WES)**により原因遺伝子の探索を行い、新たな治療法の開発を目指すことを目的とする。その過程で臨床的に典型的な自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）でありながら、**FAS**、**FASLG**、**CASP10** 変異が同定されていない一例を対象に **WES** を行ったところ、**NRAS** 変異が同定されたので報告する。

B. 研究方法

症例は2歳女児である。5か月時に発熱、汎血球減少、肝機能障害を主訴にY大学病院に入院となった。肝脾腫、凝固線溶系の異常を認め、ステロイドならびにCyAの投与にて速やかに解熱し、PSL内服にて退院となった。PSLの減量に伴い、血小板低下を認め、肝脾腫は持続し、高IgG血症にも気づかれ、ALPS疑いで当大学に検査依頼があった。

患者家族から文書による同意を得て、ヘパリン加静

脈血を採取した。単核球に分離後、免疫学的検査を行った。またbuffy coatからDNAを抽出し、**FAS**、**FASLG**、**CASP10** 遺伝子解析を行った。さらに東京大学（現京都大学）小川研にて**WES**を行ったのちに、候補遺伝子についてサンガー・シークエンスによる**validation**を行った。

（倫理面への配慮）

本研究はヒト検体を用いて解析を行うものであり、検体量および採取時の苦痛には十分な配慮を行った。遺伝子解析については各種指針を遵守して、患者個人情報の保護について十分な配慮を行った。

C. 研究結果

末梢血 TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-double negative T ($\alpha\beta$ -DNT)細胞の増加を認め、ALPSが疑われ、候補遺伝子として**FAS**、**FASLG**、**CASP10** 遺伝子解析を行ったが、変異は同定されなかった。**FAS**の体細胞変異の可能性を考え、磁気ビーズ法でソーティングした $\alpha\beta$ -DNT細胞における**FAS**遺伝子解析を行ったが、変異は同定されなかった。**WES**を行ったところ、**319**の候補遺伝子が同定され、その中に**NRAS**があった。サンガー・シークエンスによる**NRAS**遺伝子解析を行ったところ、患者で**G13D**変異が同定されたが、両親で

は同部位に変異なく、生殖細胞納弁変異または体細胞変異と考えられた (図 1)。

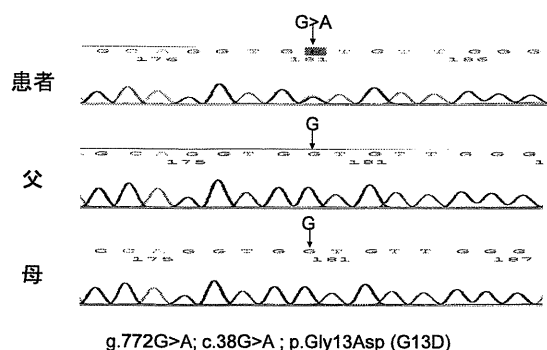


図 1 サンガー・シーケンスによる *NRAS* 遺伝子解析

患児の爪、毛根、頬粘膜から DNA を採取し、*NRAS* 遺伝子解析を行ったところ、爪、毛根においては変異アレルの小さなピークしか認められなかった (図 2 左)。それぞれの組織から得られた PCR 産物を TA クローニングして少なくとも 20 クローンにおいて *NRAS* 変異を調べたところ、変異クローンは血液、爪、毛根、頬粘膜でそれぞれ 67%、0~22%、13%、0%認められ、*NRAS* の体細胞変異と考えられた (図 2 右)。

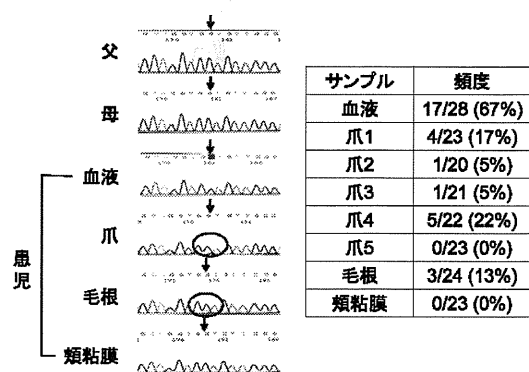


図 2 *NRAS* の体細胞変異

活性化 T 細胞を樹立したアポトーシスアッセイを行ったところ、IL-2 depletion によるアッセイでは患者由来 T 細胞は正常対照や ALPS に比べてアポトーシスの低下を認め、抗 Fas 抗体刺激では正常対照と同様にアポトーシスが認められた (図 3)。

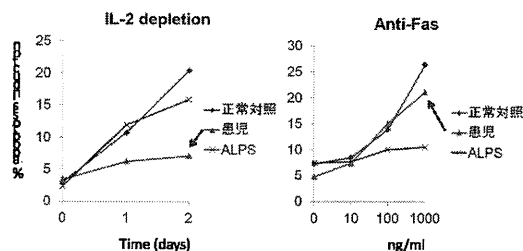


図 3 活性化 T 細胞アポトーシスアッセイ

BIM 蛋白についてウェスタンブロットを行ったところ、患児では正常対照や ALPS と異なり、BIM 蛋白の発現低下が認められた (図 4)。

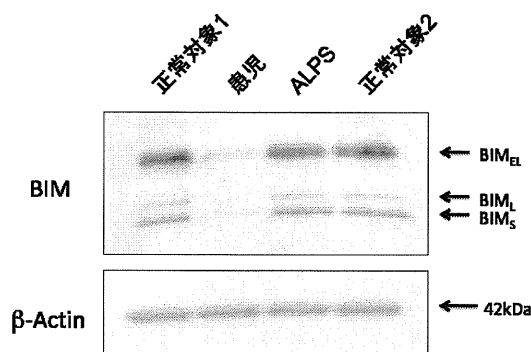


図 4 BIM ウェスタンブロット

D. 考察

非悪性リンパ増殖症、免疫抑制剤に依存する自己免疫性血球減少、高 IgG 血症ならびに $\alpha\beta$ -DNT 細胞の増加から典型的 ALPS と考えられたが、既知の *FAS*, *FASLG*, *CASP10* の変異は同定されず、WES によって *NRAS* 変異が同定された。両親に変異はなく、爪、毛髪、頬粘膜の DNA を調べたところ、組織によって変異率の異なる *NRAS* 体細胞変異による ALPS 様疾患 (RALD) であると考えられた。これまで RALD は文献上 5 例報告されているが、 $\alpha\beta$ -DNT 細胞の増加は認められておらず、ALPS と RALD の鑑別が困難であることを示唆する (表 1)。

表1 これまで報告されているRALDと自験例

	Oliverira JB ¹	Takagi M ²		Niemele JE ³		自験例
発症年齢	8か月	9か月	5か月	4歳	5歳	5か月
性別	男児	男児	女児	女児	女児	女児
肝脾腫	+	+	+	+	+	+
血球減少	データなし	+	+	+	+	+
高γグロブリン血症	データなし	+	+	+	+	+
転帰	生存	生存	生存	死亡	生存	生存
DNT細胞	2%	1.4%	1.1%	0.6%	1.4%	12.7%
自己免疫異常	+	+	+	+	+	+
遺伝子異常	NRAS G12D	KRAS G13D	KRAS G13D	KRAS G13C	KRAS G12D	NRAS G13D
FAS依存アポトーシス異常	-	-	-	-	データなし	-
IL-2枯渇アポトーシス異常	+	+	+	+	データなし	+

1. Oliveira J, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2007. 2. Takagi M, et al. Blood 2011. 3. Niemele JE Blood 2011.

E. 結論

臨床症状と $\alpha\beta$ -DNT細胞の増加からALPSと考えられたが、既知の遺伝子変異が見つからない症例に対してWESを行うことにより、世界で2例目のNRAS変異によるRALDと診断することができた。WESは表現型の異なる疾患における既知遺伝子を見出すのに有用な方法であることが示された。今後は分類不能血液疾患における新規遺伝子の発見に努めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Marsh RA., Rao K., Satwani P., Lehmborg K., Müller I., Li D., Kim MO., Fischer A., Latour S., Sedlacek P., Barlogis V., Hamamoto K., Kanegane H., Milanovich S., Margolis DA., Dimmock D., Casper J., Douglas DN., Amrolia PJ., Veys P., Kumar AR., Jordan MB., Bleesing JJ., and Filipovich AH.: Allogeneic hematopoietic cell transplantation for XIAP deficiency: an international survey reveals poor outcomes. Blood 121: 877-883, 2013.
- 2) Wada T., Kanegane H., Ohta K., Kato F., Imamura T., Nakazawa Y., Miyashita R., Hara J., Hamamoto K., Yang X., Filipovich AH., Marsh RA., and Yachie A.: Sustained elevation of serum interleukin-18 and its association with hemophagocytic lymphohistiocytosis in XIAP deficiency. Cytokine 65: 74-78, 2014.

2. 学会発表

- 1) 窪川芽衣、楊 曦、吉田健一、高木正稔、菊地雅子、横田俊平、松田和之、小池健一、村松秀城、小島勢二、小川誠司、金兼弘和 : NRAS 変異を有する自己免疫性リンパ増殖症候群様疾患の一例。第4回関東甲越免疫不全症研究会。平成25年9月22日。東京都。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：遺伝性鉄芽球性貧血の新規変異遺伝子の同定

研究分担者 張替秀郎（東北大学大学院医学系研究科血液・免疫病学分野 教授）

研究要旨： 鉄芽球性貧血(**sideroblastic anemia**)は骨髄に環状鉄芽球が出現することを特徴とする難治性貧血であり、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血の2つに大きく分類される。遺伝性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天的異常により発症するが、原因遺伝子が同定されない家系も存在する。本研究では、既知の遺伝子変異が認められない症例の責任遺伝子の同定を目的に次世代シーケンサーを用いた変異解析を行った。その結果、新規原因遺伝子の候補として **APEX2**, **NUDFV1**, **SLC39A8** を見出した。

A. 研究目的

鉄芽球性貧血(**sideroblastic anemia**)は骨髄に環状鉄芽球が出現することを特徴とする難治性貧血であり、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血の2つに大きく分類される。遺伝性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天的異常により発症する稀な疾患であるため、その頻度、病態については不明である。本研究では、本邦における遺伝性鉄芽球性貧血の病態、遺伝子異常を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

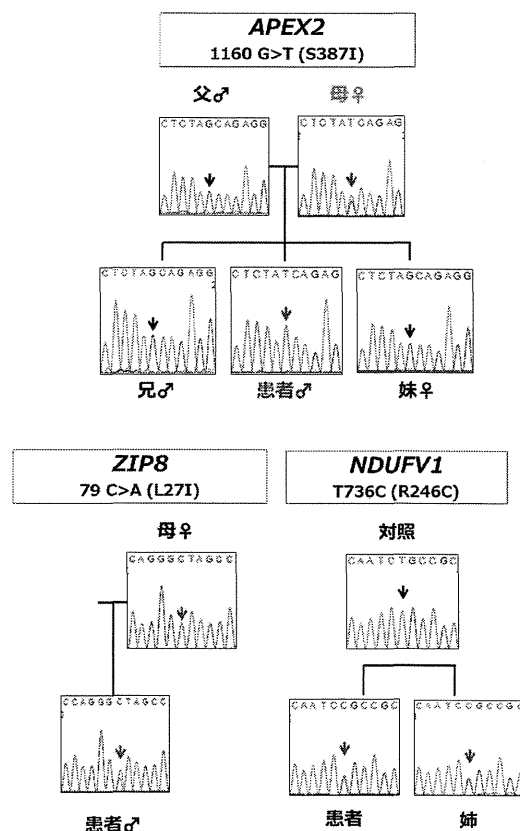
既知の遺伝子変異が認められない遺伝性鉄芽球性貧血家系について、次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、新たな原因遺伝子を同定する。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析研究について所属施設の倫理委員会の承認を得る。主治医に患者本人もしくは保護者への説明・同意の取得がなされた上で、遺伝子解析を行う。

C. 研究結果

遺伝性鉄芽球性貧血の既知の原因遺伝子が同定できない家系について解析を行った結果、新規原因遺伝子の候補として **APEX2**, **NUDFV1**, **SLC39A8** を見出した。これらの家系と変異部位を以下に示す。



D. 考察

*APEX2*についてはミトコンドリアに局在し、DNAの塩基除去修復機構に関与することが報告されている遺伝子であり、ノックアウトマウスでは貧血が認められている。*ZIP8*については細胞膜に局在し、鉄、亜鉛、マグネシウム、カドミウムの輸送に関わる蛋白質である。*NDUFV1*はmitochondrial complex Iにかかわる遺伝子であり、本遺伝子の変異により鉄の還元が阻害され、ミトコンドリアでの鉄利用が低下する可能性がある。いずれもヘム・鉄硫黄クラスターの主要な合成器官であるミトコンドリア蛋白質であること、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子の多くが、ミトコンドリアにおける鉄代謝にかかわる遺伝子であることを考慮すると、これらの遺伝子が遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子である可能性は否定できない。今後、遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究班（伊藤班）と連携して、これらの遺伝子の機能解析を進める予定である。

E. 結論

稀少遺伝性疾患の原因遺伝子の同定に次世代シーケンサーを用いた家系解析は有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Jan;92(1):1-9.
- 2) Kadirvel S, Furuyama K, Harigae H, Kaneko K, Tamai Y, Ishida Y, Shibahara S. The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinic acid synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and protein stability. *Exp Hematol*.

2012;40(6):477-86.

- 3) Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, Kobayashi R, Ishida H, Harigae H, Shibahara S. Identification of the novel erythroid-specific enhancer for *ALAS2* gene and its loss-of-function mutation associated with congenital sideroblastic anemia. *Haematologica*. 2013 Aug 9. [Epub ahead of print]
 - 4) Fujiwara T, Ikeda T, Nagasaka Y, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Tomosugi N, Harigae H. A low-molecular-weight compound K7174 represses hepcidin: Possible therapeutic strategy against anemia of chronic disease. *PLoS ONE*. 2013;8:e75568.
 - 5) Fujiwara T, Harigae H. Pathophysiology and genetic mutations in congenital sideroblastic anemia. *Pediatrics International*. 2013;55:675-679.
 - 6) Nakajima S, Ohguchi H, Fujiwara T, Onishi Y, Kamata M, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Harigae H. Induction of thymic stromal lymphopoietin in mesenchymal stem cells by interaction with myeloma cells. *Leuk Lymphoma*. In press.
- ### 2. 学会発表
- 1) Inoue A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Expression profilig for discovering the role of LIM domain only 2 (LMO2) in erythroid cells. 第74回日本血液学会学術集会 2012年10月(京都)
 - 2) Saito H, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Regulation of erythropoiesis by histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3 deazaneplanocin A (DZNep). 第74回日本血液学会学術集会 2012年10月(京都)
 - 3) Fujiwara T, Saito H, Okitsu Y, Fukuhara N,

Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Elucidation of the role of LMO2 (LIM-only protein 2) in erythroid cells. 第54回米国血液学会 2012年12月 (アトランタ)

第55回米国血液学会 2013年12月 (ニューオリンズ)

- 4) Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Regulation of erythropoiesis by histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3 deazaneplanocin A (DZNep). 第54回米国血液学会 2012年12月 (アトランタ)
- 5) Fujiwara T, Saitoh H, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Effect of histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep) on erythropoiesis. 第16回欧州血液学会 2013年6月 (ストックホルム)
- 6) Okamoto K, Fujiwara T, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Effect of 5-aminolevulinic acid (ALA) on erythroid cells. 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月 (札幌)
- 7) Ikeda T, Fujiwara T, Nagasaka Y, Inoue A, Katsuoka Y, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Regulation of hepcidin transcription by K-7174. 第75回日本血液学会学術集会 2013年10月 (札幌)
- 8) Fujiwara T, Ikeda T, Nagasaka Y, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Tomosugi N, Harigae H. A low-molecular-weight compound K7174 represses hepcidin: Possible therapeutic strategy against anemia of chronic disease. 第55回米国血液学会 2013年12月 (ニューオリンズ)
- 9) Nakamura K, Nakayama M, Kawano M, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K. Natural Killer Cell Death Mediated By NKD2D-Trogocytosis.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：先天性顆粒放出異常症の遺伝子異常の探索的研究
研究分担者 石井榮一（愛媛大学大学院医学系研究科小児科学 教授）

研究要旨： 先天性顆粒放出異常症は家族性血球貪食性リンパ組織球症（FHL）、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansly-Pudlak 症候群などが含まれ、いずれもリンパ球の分泌顆粒の放出に関わる遺伝子異常が同定されつつある。これまでの解析では日本では FHL と Chediak-Higashi 症候群が存在し FHL の約 10% および Chediak-Higashi 症候群の約 1/3 が遺伝子異常不明であった。今回はこれらの新規遺伝子の同定を進めた。また Chediak-Higashi 症候群症例から iPS 細胞を作成し、その病態解析を行った。最終的には先天性顆粒放出異常症の全容解明と治療法を確立する予定である。

A. 研究目的

先天性顆粒放出異常症は家族性血球貪食性リンパ組織球症（FHL）、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansly-Pudlak 症候群などが含まれ、いずれもリンパ球の分泌顆粒の放出に関わる遺伝子異常が同定されつつあるが、日本における実態は不明である。本研究の目的は、これら先天性顆粒放出異常症の遺伝子異常の解明を行い、その病態を明らかにすることである。

B. 研究方法

小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）および小児血液・がん学会に登録された症例を中心に、先天性顆粒放出異常症の既知および未知の遺伝子異常の解明を行いその病態を明らかにする。具体的には各症例の既知の遺伝子（FHL では *PRF1*, *UNC13D*, *STXBP2*, Chediak-Higashi 症候群では *LYST*, Griscelli 症候群では *RAB27a*, Hermansly-Pudlak 症候群では *AP3B1*）の遺伝子異常の有無を解析する。遺伝子異常が同定されなかった患者では、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスを行い新規の原因遺伝子の探索を行う。

（倫理面への配慮）

本研究事業で行われる研究は、ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り、ヒトゲノム遺伝子解析倫理委員会の承認を得て実施する。患者及び患者家族に対しては説明文を用いて文書による同意を得る。

C. 研究結果

先天性顆粒放出異常症のうち FHL の日本における各亜型の頻度を解析し、FHL2, FHL3 が全体の約 80% を占めていた。また未知の遺伝子異常による FHL が約 10% 存在していた。これらの遺伝子異常不明例は次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスを行い現在のその結果を解析しているところである。さらに今回 FHL3 の *UNC13D* ミスセンス変異例を初めて 2 症例同定した。顆粒放出解析ならびに CTL 活性の結果から、遺伝子型との相関が明らかとなった。

Chediak-Higashi 症候群の解析では、*LYST* 遺伝子異常は 1/3 の症例で不明であることが明らかになった。さらに血球貪食症候群をきたす症例では CTL 活性が低下しており、CTL 活性の異常が血球貪食症候群合併の予測因子であること

が明らかになった。また Chediak-Higashi 症候群類似の1家系を同定し、現在その遺伝子異常を解析しているところである。Chediak-Higashi 症候群の長期合併症として神経疾患がある。今回症例から iPS 細胞を樹立し各細胞へ分化させ、その病態を解析した。血球の分化ではその特徴である巨大顆粒が出現し、臨床所見が再現できた。現在神経細胞への分化を検討しているところである。

以上より今回日本における顆粒放出異常症の実態を明らかにし新たな遺伝子異常の同定と病態解明を進めている。

D. 考察

先天性顆粒放出異常症の日本における実態解明を行い、その結果 FHL の約 10%、Chediak-Higashi 症候群の約 1/3 が遺伝子異常不明であった。またいくつかの家系で診断自体も不明な症例が存在していた現在その新規遺伝子の同定と iPS 細胞を用いた病態解明を進めている。

E. 結論

先天性顆粒放出異常症の日本における実態が初めて明らかになった。またその多くで遺伝子異常およびリンパ球機能の異常も解析された。今後は新規遺伝子の同定と iPS 細胞を用いた病態解明をする予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagai K, Ochi F, Terui K, Maeda M, Ohga S, Kanegane H, Kitoh T, Kogawa K, Suzuki N, Ohta S, Ishida Y, Okamura T, Wakiguchi H, Yasukawa M, Ishii E (2013) Clinical characteristics and outcomes of Chédiak-Higashi syndrome: a nationwide survey of Japan. *Pediatr Blood Cancer* 10: 1582-1586

- 2) Hirata S, Takayama N, Jono-Ohnishi R, Endo H, Nakamura S, Dohda T, Nishi M, Hamazaki Y, Ishii E, Kaneko S, Otsu M, Nakauchi H, Kunishima S, Eto K (2013) CAMT-iPS cells exhibiting defective MPL signaling dysregulate megakaryopoiesis and erythropoiesis. *J Clin Invest* 123: 3802-3814
- 3) Sawada A, Ohga S, Ishii E, Inoue M, Okada K, Inagaki J, Goto H, Suzuki N, Koike K, Atsuta Y, Suzuki R, Yabe H, Kawa K, Kato K, Yasutomo K (2013) Feasibility of reduced-intensity conditioning followed by unrelated cord blood transplantation for primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: a nationwide retrospective analysis in Japan. *Int J Hematol* 98: 223-230
- 4) Kogawa K, Sato H, Asano T, Ohga S, Kudo K, Morimoto A, Ohta S, Wakiguchi H, Kanegane H, Oda M, Ishii E (2013) Prognostic factors of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children: Report of the Japan Histiocytosis Study Group. *Pediatr Blood Cancer* (in press)

2. 総説

- 1) 石井榮一 (2012) 先天性顆粒放出異常症. *日本小児血液・がん学会雑誌*, 49: 443-446
- 2) 田内久道、石井榮一 (2013) Wiskott-Aldrich 症候群、血液症候群 II、新領域別症候群シリーズ No.22、*日本臨床*, pp293-296
- 3) 石井榮一 (2013) 家族性血球貪食性リンパ組織球症、血液症候群 III、新領域別症候群シリーズ No.23、*日本臨床*, pp447-450

3. 学会発表

- 1) 石井榮一 (2013) 血球貪食症候群：病態解析と治療の新展開、第13回神奈川小児血液感染症フォーラム、3月、横浜

2) Ishii E (2013) HLH study in Japan.
HLH/MAS premeeting session, The 29th
annual meeting of the Histiocyte Society,
October, Washington, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
 分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：毛細血管拡張性運動失調症類縁疾患の責任遺伝子の同定

研究分担者 水谷修紀

（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野 教授）

研究要旨： 毛細血管拡張性運動失調症Ataxia Telangiectasia (AT)は運動失調、免疫不全、毛細血管拡張を主徴とする疾患で、ATMがその責任分子である。ATMはDNA損傷応答反応において中心的な役割を持つ分子である。またこのDNA損傷応答反応に関わる分子の異常でATに類似した症状を示す疾患が発症することが知られている。臨床的にATと診断される、もしくはAT疑いとなった症例のうちATMの変異の認められなかった症例を、全エクソン解析の手法を用いて責任遺伝子の同定を試みた。2例で既知の疾患の責任分子が同定され、1例はCD40LG欠損症、1例はMarinesco-Sjögren症候群であった。AT類縁疾患において臨床の現場における全エクソン解析の有用性が明らかとなった。

A. 研究目的

毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia (AT)は運動失調、免疫不全、毛細血管拡張を主徴とする疾患で、ATM が責任分子である。ATM は DNA 損傷応答反応において中心的な役割を持つ分子である。またこの DNA 損傷応答反応に関わる分子の異常で AT に類似した症状を示す疾患が発症することが知られている。臨床的に AT と診断されるも ATM に異常のなかった疾患から、その責任分子を明らかにすることを本研究の目的とする。

B. 研究方法

臨床的に AT と診断される、もしくは AT 疑いとなった症例のうち ATM の変異の認められなかった症例を、全エクソン解析の手法を用いて責任遺伝子を同定する。

（倫理面への配慮）

症例の解析にあたり遺伝子解析を行うことについてのインフォームドコンセントを得た。また、この研究計画は東京医科歯科大学倫理委員会で

承認を得た。

C. 研究結果

ATM の変異の認められなかった AT 疑い 10 症例の解析を行った。臨床的表現系を表 1 に示す。

表 1 全エクソン解析を行った AT 疑い症例の臨床的特徴

	性別	年齢	免疫不全	運動失調	毛細血管拡張	AFP
PNGS 272	M	21	あり	あり	なし	?
PNGS 273	F	5	なし	あり	あり	正常
PNGS 274	F	21	軽度	あり	あり	正常
PNGS 275	F	2	あり	あり	なし	軽度上昇
PNGS 276	M	1	あり	あり	なし	正常
PNGS 277	F	1	なし	あり	なし	上昇
PNGS 278	M	12	なし	あり	あり	上昇
PNGS 279	F	11	あり	あり	なし	正常
PNGS 280	F	7	あり	軽微	なし	?
PNGS 281	F	5	あり	軽微	軽微	?

解析の結果、このうち 1 例は AT であった。残り

のうち1例でクラススイッチの異常で発症する高IgM症候群の責任分子CD40LG、1例でMarinesco-Sjögren症候群の責任分子SIL1が発症に関与していることが明らかとなった。また1例で塩基除去修復の異常で発症する色例色素性乾皮症の責任分子ERCC5が関与する可能性が疑われた。また残りの6例に関しては責任遺伝子の同定へと進めることができなかった。

D. 考察

症状的に単一の疾患群でも、複数の遺伝子の異常によってその疾患が発症する。こういった疾患群には全エクソン解析の手法が責任遺伝子の同定に有用であると考えられる。しかし今回の解析を通して、既知疾患の責任分子がこれまで知られていなかった表現系を示す症例を同定することが出来た一方で、新規責任分子の同定には、患者個々の遺伝子解析のみでは不十分であることが明らかとなった。常染色体劣性遺伝病で同時に2つの分子に変異があれば、全エクソン解析を行うことにより、疾患遺伝子の特定につながれると当初想定したが、一つのみしか見つけられない場合や、同一の遺伝子複数のSNVが存在することもあり、疾患の発症に複数の遺伝子が関与していることが想定される場合は、1症例のみの解析では責任遺伝子の同定に至ることが困難であることが明らかとなった。de novoのケースなどは家系解析を行うことにより、その精度を上げられると考えられた。AT類似疾患の責任分子として2つの遺伝子を同定した。しかしながらこれまで知られているこれら遺伝子異常によって発症する高IgM症候群やMarinesco-Sjögren症候群の表現型はATとは異なったものであり、表現型と遺伝子系の間に差異があることが明らかとなった。おそらくこの差異は臨床経過の進行に感染や治療の影響、または同定されていないさらなる遺伝的背景などが加わり生じるものと考えられた。こういった症例に関しては従来の表現型に基づいた経験的な医療では診断に至ることはできず、全エクソン解析によってのみ同定できると考えら

れ、臨床の現場における全エクソン解析の有用性が明らかとなった。

E. 結論

AT類縁疾患において臨床の現場における全エクソン解析の有用性が明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

投稿中

2. 学会発表

- 1) 高木正稔、金子節子、今井耕介、小川誠司、小島勢二、森尾友宏、水谷修紀、ATM変異のない毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia 疑い症例のエクソーム解析、第6回日本免疫不全症研究会 2015.1.26 東京
- 2) 金子節子 毛細血管拡張性運動失調症(AT), AT類縁疾患の診断 及び iPS細胞を用いた病態解明へのアプローチ 第55回日本小児神経学会 2013.5.30 大分

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の網羅的遺伝子解析に関する研究

研究分担者 林 泰秀（群馬県立小児医療センター 院長）

研究分担者 伊藤悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）

研究要旨： ダウン症候群(DS)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区別がつかず、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-急性巨核芽球性白血病(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、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 例の非ダウン症児に合併する(non-DS)-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(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。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限り統一した手順を採用することにより効率的な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バブル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・がん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)。

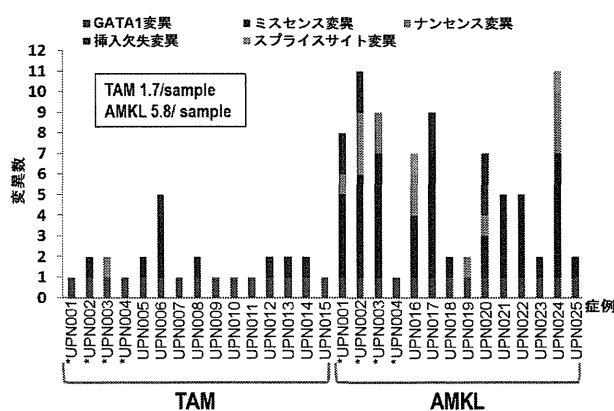


図 1. 29 例の TAM、AMKL の全エクソンシーケンスによって同定された変異の個数

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)。

表 1 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

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.R65X	c.C193T	024
STAG2	ChrX	Nonsense	p.R604X	c.C1810T	003
STAG2	ChrX	Nonsense	p.R216X	c.C646T	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 例の非ダウン症児に合併する (non-DS) -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)。

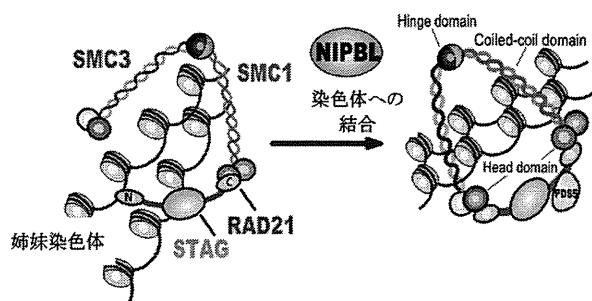


図 2. コヒーシンの構造と機能

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・ラング症候群という遺伝病が生じることが知られている。

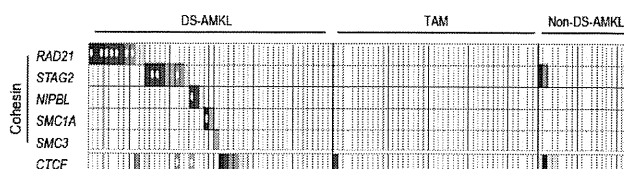


図 3. コヒーシン複合体/CTCF の遺伝子異常

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。

3. TAM から AMKL への進行のメカニズムを解明.

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 4)。

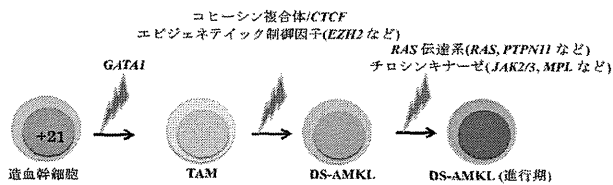


図 4 .DS-AMKL の多段階発症のモデル

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。

D. 考察

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る。

E. 結論

今回の成果によって、TAM および DS-AMKL の発症メカニズムの解明が大きく前進した。新規の遺伝子異常が判明したことで、これらの遺伝子を標的にした新たな治療法の開発が期待できる。また、さらに多くの DS-AMKL の解析をすることにより、再発する可能性の高いハイリスクの患者を予測できるようになることが期待される。さらに、この研究成果は、ダウン症に限らず、全ての白血病の発症機構の解明と治療法の開発に役立つことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sanada M, Park M, 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, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E and Seishi Ogawa S. Landscape of gene mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nature Genetics* 2013; 45: 1293–9.
- 2) 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.* 2013 [Epub ahead of print].
- 3) 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.* 2013 Aug 31. [Epub ahead of print]
- 4) 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.* 2013; 26(1): 22-31.
- 5) 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* 2013;121(16):3181-4.
- 6) 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: 4377-87.
 - 7) 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.
 - 8) 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* (in press)
 - 9) 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) doi: 10.1111/bjh.12595.
 - 10) 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 J Hematol* 98: 437-445, 2013
 - 11) 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* 164 : 142-159, 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) 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
 - 14) 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
 - 15) Toki T, Kanazaki 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
- 16) 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
2. 学会発表
- 1) 伊藤 悦朗. 次世代シーケンサーを用いた Down 症候群の TAM と急性巨核球性白血病の全エクソン解 (シンポジウム 次世代シーケンサーによる小児血液、腫瘍性疾患における研究の進展). 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 (2013 年 11 月 29 日-12 月 1 日、福岡)
- 2) Yoshida K, Toki T, Park MJ, Okuno Y, Shiraishi Y, Sanada M, Kon A, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Sato Y, Wang RN, Terui K, Kanezaki R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kojima S, Izraeli S, Miyano S, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Genetic basis of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. 第 75 回日本血液学会学術集会 (2013 年 10 月 11 日-13 日、札幌)
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜, 2013.10.3-5
- 15) 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
- 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) Takahashi H, Matsushita H, Kinoshita A, Taki T, Taki T, Deguchi T, Kiyokawa N, Hashii Y, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Adachi S, Tabe M, Miyachi H. A diversity of cases in AML with promyelocytic differentiation: A report from JPLSG. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 18) 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 mutaton 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
- 19) Hara Y, Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Shimada A, Kudo K, Tomizawa D, Taga T, Adachi S, Arakawa H, Tawa A, Hayashi Y. MUP98-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
- 20) 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
- 21) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi 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
- 22) 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
- 23) 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. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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
- 27) 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
- 28) 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
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 35) 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, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 36) 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
- 37) 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
- 38) 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
- 39) 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
- 40) 朴 明子, 大木健太郎, 佐野仁志, 新井心, 土岐文彰, 西 明, 金澤 崇, 外松学, 林 泰秀. Cushing 症候群により発見された両側副腎腫大の女兒. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 福岡, 2013.11.29-12.1
- 41) Shiba N, Ohki K, Nagata Y, Kon A, Okuno Y, Shiraishi 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
- 42) 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
- 43) Yoshida K, Shiba N, Shiraishi Y, Shimada A, Terui K, Kato M, Okuno Y, Nagata Y, Kon