

- 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
- 44) 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
- 45) 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
- 46) 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
- 47) Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, TanakaH, 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
- 48) 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
- 49) 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
- 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：先天性血小板減少症の遺伝子解析

研究分担者 國島伸治

（国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター高度診断研究部 室長）

**研究要旨：** 既知の原因遺伝子に異常を認めない優性遺伝の先天性巨大血小板性血小板減少症（CMTP）家系において次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を施行し、新規 GFI1b 遺伝子変異を同定した。この変異は一塩基置換によるスプライス変異であるため、病的変異の可能性が極めて高い。患者家族の血小板において変異型及び野生型 GFI1b の発現を確認した。変異転写因子の機能解析としてルシフェラーゼアッセイを施行中である。

#### A. 研究目的

先天性血小板減少症は病因不明な疾患が多く、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）と診断され不必要な治療を受ける症例も少なくない。本研究は、既知の原因遺伝子に異常を認めない原因不明の先天性血小板減少症において、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を施行することにより新規原因遺伝子を同定、病態を解析し、鑑別診断法を確立することを目的とする。

#### B. 研究方法

優性遺伝の先天性巨大血小板性血小板減少症（CMTP）を呈し、既知の原因遺伝子に異常を認めない親子例について、東京大学小川誠司研究室（現京都大学）にて次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を施行した。

サンガーシーケンス法にて GFI1b 遺伝子の全ての構造領域の配列を決定した。さらに、遺伝形式の不明な 39 症例の CMTP については次世代シーケンサーを用いたプールシーケンス解析により GFI1b 遺伝子の全ての構造領域の配列を決定した。

血小板における GFI1b 発現を確認するため、

患者家族血小板由来 cDNA を用い RT-PCR を行った。

GFI1b 変異による転写調節の機能解析のため、ルシフェラーゼアッセイを計画し、野生型及び変異型 GFI1b を挿入した発現ベクター、また GFI1b の認識配列を挿入したルシフェラーゼレポーターベクターを調整した。

（倫理面への配慮）

本研究を行なうにあたっては、当施設で施行中の先天性血小板減少症の遺伝子解析に関する研究に、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析方法を追加することを当院ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会に申請し、審査承認を得た。東京大学へ送付する DNA は、匿名化し、罹患の有無、親子関係、性別のみの情報を付与した。DNA 組み換え実験および動物を用いた実験についても審査承認を得た。

#### C. 研究結果

全エクソン解析の結果、赤芽球系及び巨核球系に特異的な転写因子であり、これまでヒトにおける病因として報告がない新規遺伝子 GFI1b 変異を同定した。

サンガーシーケンス法にてGFI1b遺伝子の全ての構造領域の配列を決定したところ、今回同定された変異は一塩基置換によるスプライス変異に伴う未熟終末変異であることが示唆された。遺伝形式の不明な39症例のCMTP検体では、GFI1b変異は同定されなかった。

血小板におけるGFI1bの発現を確認するため、患者家族血小板由来cDNAを用いてRT-PCRを行い、野生型及び変異型が共に発現していることを確認した。

GFI1b変異の機能解析のためにルシフェラーゼアッセイを計画した。CMK細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成した。CMK細胞由来のcDNAの全長をRT-PCR法によりクローニングし、野生型GFI1bを得た。また、患者家族血小板cDNAのクローニング及び部位特異的変異導入法により変異型GFI1bを得た。これらを真核細胞用発現ベクターであるpcDNA3.1に挿入した。また、GFI1bが結合する遺伝子 (TGFB3及びGFI1b) のプロモーター配列を正常DNAからクローニングし、ルシフェラーゼレポーターベクターであるpGL4-luc2に挿入した。

#### D. 考察

先天性血小板減少症の原因は多岐にわたるが、転写因子の異常によるものはこれまでに *GATA1*、*RUNX1* 変異によるものが報告されているのみである。今回同定された転写因子 *GFI1b* は、巨核球系及び赤芽球系の分化と細胞増殖に抑制的に働くことが知られている。本転写因子の変異により、DNA のプロモーター領域への結合能が低下し、転写抑制作用が阻害され、結果として巨核球の分化・成熟が障害され、血小板産生異常を来すことが予想される。

#### E. 結論

転写因子の巨核球系における病態への関与については、いまだ不明な部分も多いが、本研究において転写因子による巨核球の分化・成熟や血小板産生への影響を解明する。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of integrin  $\beta 3$  L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. *Br J Haematol* 160:521-9, 2013.
- 2) Murayama S, Akiyama M, Namba H, Wada Y, Ida H, Kunishima S: Familial cases with *MYH9* disorders caused by *MYH9* S96L mutation. *Pediatr Int* 55:102-4, 2013.
- 3) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraiishi 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* 92:431-8, 2013.
- 4) Kunishima S, Hayakawa A, Fujita K, Saito H: Transient macrothrombocytopenia associated with maternal-neonatal HPA-21bw incompatibility. *Thromb Res* 131:e286-8, 2013.
- 5) Kashiwagi H, Kunishima S, Kiyomizu K, Amano Y, Shimada H, Morishita M, Kanakura Y, Tomiyama Y: Demonstration of novel gain-of-function mutations of  $\alpha IIb\beta 3$ : association with macrothrombocytopenia and Glanzmann thrombasthenia-like phenotype. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 1:77-86, 2013.
- 6) 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* 55:434-7, 2013.
- 7) Suzuki N, Kunishima S, Ikejiri M,

- Maruyama S, Sone M, Takagi A, Ikawa M, Okabe M, Kojima T, Saito H, Naoe T, Matsushita T: Establishment of mouse model of *MYH9* disorders: Heterozygous R702C mutation provokes macrothrombocytopenia with leukocyte inclusion bodies, renal glomerulosclerosis and hearing disability. *PloS One* 8:e71187, 2013.
- 8) Ishida M, Mori Y, Ota N, Inaba T, Kunishima S: Association of a novel in-frame deletion mutation of the *MYH9* gene with end-stage renal failure: case report and review of the literature. *Clin Nephrol* 80:218-22, 2013.
- 9) 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: Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia iPS cells exhibit defective MPL-mediated signaling. *J Clin Invest* 123:3802-14, 2013.
- 10) Noris P, Favier R, Alessi MC, Geddis AE, Kunishima S, Heller PG, Giordano P, Niederhoffer K, Bussel JB, Podda M, Vianelli N, Kersseboom R, Pecci A, Gnam C, Marconi C, Auvrignon A, Cohen W, Yu JC, Iguchi A, Imahiyerobo AM, Boehlen F, Ghalloussi D, De Rocco D, Magini P, Civaschi E, Biino G, Seri M, Savoia A, Balduini CL: *ANKRD26*-related thrombocytopenia and myeloid malignancies. *Blood* 122:1987-9, 2013.
- 11) Sato T, Kunishima S, Shirayama R, Ichikawa S, Sakai M, Kusuhara K: Bernard-Soulier syndrome due to compound heterozygosity for a novel glycoprotein Ib $\beta$  mutation. *Acta Haematol* 131:46-9, 2014.
- 12) 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* 12: 2071-3, 2013.
- 13) Miura K, Kurihara H, Horita S, Chikamoto H, Hattori M, Harita Y, Tsurumi H, Kajiho Y, Sasaki S, Igarashi T, Kunishima S, Sekine T: Expression of nonmuscle myosin heavy chain-IIA in podocyte decreases in idiopathic nephrotic syndrome, especially in focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 28: 2993-3003, 2013.
2. 学会発表
- 1) 分野別シンポジウム「先天性血液疾患の病態研究に関する最近の進歩」血小板異常症：國島伸治 第 116 回日本小児科学会学術集会 平成 25 年 4 月 広島
- 2) 難聴を伴った May-Hegglin 異常の家族例：金田 眞 鳥海尚久 更科岳大 國島伸治 東寛 第 116 回日本小児科学会学術集会 平成 25 年 4 月 広島
- 3) Platelet function tests : Shinji Kunishima International Workshop on Hemostasis and Thrombosis, Bangkok May 2013
- 4) Inherited platelet disorders : Shinji Kunishima International Workshop on Hemostasis and Thrombosis, Bangkok May 2013
- 5) 先天性血小板異常症の分子病態 -先天性巨大血小板症- (教育講演)：國島伸治 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 平成 25 年 5 月 山形
- 6) 針生検施行時に出血傾向の存在が疑われた巨大血小板性血小板減少症(GPD)の 1 例：小川孔 幸 柳澤邦雄 林 俊誠 合田 史 馬渡桃子 内海英貴 鬼頭有里 國島伸治 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 平成 25 年 5 月

山形

- 7) 血小板減少を契機に von Willebrand 病 type2B と診断された 2 家系の遺伝子解析：三田直美 田中竜平 岸本鷹由子 鈴木伸明 國島伸治 高津真由美 松本祐之 中村栄男 松下正 第 35 回日本血栓止血学会学術集会 平成 25 年 5 月 山形
- 8) 周産期血液疾患の Up to Date 「先天性巨大血小板症の病因解明と鑑別診断の進歩」(ワークショップ)：國島伸治 第 23 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会 平成 25 年 6 月 奈良
- 9) Mutations responsible for ANKRD26-related thrombocytopenia increase the risk of hematological malignancies but are not frequently involved in de novo acute leukemias : Carlo Balduini, Gennifer Yu, Paula Heller, Marie-Christine Alessi, Paola Giordano, Shinji Kunishima, Jim Bussel, Nicola Vianelli, Rogier Niederhoffer, Gian Marco Podda, Giuseppe Saglio, Giovanni Martinelli, Patrizia Noris, Remi Favier 18th Congress of the European Hematology Association, Stockholm June 2013
- 10) A case of MYH9 disorder with kidney dysfunction successfully treated by Eltrombopag for inherited thrombocytopenia : Eri Tanaka, Naoko Kinugawa, Shinji Kunishima 18th Congress of the European Hematology Association, Stockholm June 2013
- 11) Impaired proplatelet formation in a novel Glanzmann variant macrothrombocytopenia : Koji Miyazaki, Shinji Kunishima, Hirokazu Kashiwagi, Yoshiaki Tomiyama, Masaaki Higashihara 18th Congress of the European Hematology Association, Stockholm June 2013
- 12) *ACTN1* mutations cause congenital macrothrombocytopenia (symposium)：Shinji Kunishima, Yusuke Okuno, Masashi Sanada, Koji Miyazaki, Michio Sakai, Akihiro Iguchi, Satoru Miyano, Hidehiko Saito, Seiji Kojima, and Seishi Ogawa XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam June 2013
- 13) Aberrant mRNA processing in compound heterozygote with glycoprotein IIb gene mutations causing Glanzmann thrombasthenia : Junko Fujita, Moe Murata, Yoko Kajiura, Akira Takagi, Takashi Murate, Tadashi Matsushita, Shinji Kunishima, Tetsuhito Kojima XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam June 2013
- 14) Demonstration of novel gain-of-function mutations of  $\alpha$ IIb  $\beta$  3: association with macrothrombocytopenia and Glanzmann thrombasthenia-like phenotype : Hirokazu Kashiwagi, Shinji Kunishima, Kazunobu Kiyomizu, Yoshiro Amano, Hiroyuki Shimada, Masashi Morishita, Yuzuru Kanakura, Yoshiaki Tomiyama XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam June 2013
- 15) Genetic analyses of two patients with von Willebrand disease (VWD) type2B Implication of type 2B in the differential diagnosis for thrombocytopenic patients Naomi Sanda, Ryuhei Tanaka, Mayuko Kishimoto, Nobuaki Suzuki, Shinji Kunishima, Mayumi Takatsu, Hiroyuki Matsumoto, Shigeo Nakamura, Tadashi Matsushita : XXIV Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Amsterdam June 2013
- 16) 血小板減少と末梢血標本の観察から type2B

VWD の診断に至った 1 症例：前田奈弥 高津真由美 亀山なつみ 杉浦由姫乃 三田直美 稲垣恵章 松本祐之 濱 麻人 國島伸治 松下正 第 14 回日本検査血液学会学術集会 平成 25 年 7 月 東京

性：北村勝誠 國島伸治 吉田健一 小川誠司 白石友一 千葉健一 田中洋子 宮野悟 古川鋼一 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 平成 25 年 11 月 福岡

17) 腎障害の経過が緩徐な Epstein 症候群の 1 例：遣田美貴 菅野直希 古谷麻衣子 坪井伸夫 宮崎陽一 小倉誠 徳留悟朗 細谷龍男 横尾隆 海渡健 國島伸治 第 43 回日本腎臓学会東部学術大会 平成 25 年 10 月 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

18) *ACTN1* mutations cause congenital macrothrombocytopenia : Shinji Kunishima, Yusuke Okuno, Kenichi Yoshida, Yuichi Shiraishi, Masashi Sanada, Hideki Muramatsu, Kenichi Chiba, Hiroko Tanaka, Koji Miyazaki, Michio Sakai, Masatoshi Ohtake, Ryoji Kobayashi, Akihiro Iguchi, Gen Niimi, Makoto Otsu, Yoshiyuki Takahashi, Satoru Miyano, Hidehiko Saito, Seiji Kojima, and Seishi Ogawa 第 75 回日本血液学会総会 平成 25 年 10 月 札幌

19) Successful treatment of *MYH9* disorders with romiplostim for neurosurgery : Jun Yamanouchi, Takaaki Hato, Toshiyuki Niiya, Shinji Kunishima, Masaki Yasukawa 第 75 回日本血液学会総会 平成 25 年 10 月 札幌

20) Dominant inheritance of familial thrombocytopenia caused by integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GPIIb/IIIa) mutation : Tsumura M, Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M 第 75 回日本血液学会総会 平成 25 年 10 月 札幌

21) 先天性巨大血小板症（シンポジウム「次世代シーケンサーによる小児血液、腫瘍疾患における研究の進展」）：國島伸治 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 平成 25 年 11 月 福岡

22) *MYH9* 異常症における免疫蛍光染色の有用

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：先天性造血不全症の表現型と遺伝子型に関する研究

研究分担者 大賀正一（九州大学大学院医学研究院周産期小児医療学 教授）

研究協力者 石村匡崇（九州大学大学院医学研究院成長発達医学 助教）

研究協力者 瀧本智仁（九州大学大学院医学研究院成長発達医学 特任助教）

研究協力者 高田英俊（九州大学大学院医学研究院成長発達医学 准教授）

研究協力者 原 寿郎（九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授）

**研究要旨：** 小児期に発症する原因不明の先天性造血不全患者とその家族に、全エクソーム解析を行い確定診断を得た。6患者、5家系、4疾患の原因遺伝子を同定した。いずれも臨床診断を受けて長期に加療された治療抵抗例や散発例であったが、遺伝子診断に至り、治療と遺伝カウンセリングを効率的に進めることができた。このうち2例は国内の未報告変異であった。**Fanconi**貧血姉妹例（**FANCA**変異）の重症度と表現型の著しい乖離に関して、解析を継続中である。稀少造血不全症の診療における全エクソーム解析の有用性が示された。

#### A. 研究目的

新生児及び小児期に血球減少を主徴とする先天性造血不全症は稀少で臨床病型も多彩なため診断と治療が困難である。まだ、候補遺伝子さえ不明な疾患群も少なくない。臨床診断は得たものの確定に至らず診療に苦慮する患者に全エクソーム解析を行い遺伝子診断の有用性を検討した。

#### B. 研究方法

当科にて原因遺伝子未確定の先天性造血不全症の患児（臨床診断：**Fanconi**貧血[FA]2例、**Hoyeraal-Hreidarsson**症候群[HHS]を含む早老症2例、**Diamond-Blackfan**貧血1例、鉄芽球形貧血1例）とその家族を対象に、候補遺伝子を**Sanger**法にて解析し、全エクソーム解析（本班：小川誠司/小島勢二両研究室）を進めた。変異を家系内に確認し、遺伝子型と臨床病型の関連を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は九州大学病院倫理委員会にて承認後（488-00）、患者と両親に研究に関して説明し、書面により同意を得た。検体は匿名化し個人情報保護に配慮し遺伝カウンセリングを行った。

#### C. 研究結果

汎血球減少型：血球減少の重症度が異なるFA姉妹の各片アレルに**FANCA c. 2602-2A>T +F868V**を認めた。重症の妹は乳癌を発症した。表現型の乖離を説明する要因について家系解析中である。

HHSと臨床診断された児は子宮内発育遅延、体重増加不良、発達遅滞と小脳低形成を認めた。1歳時に**E.coli**敗血症をおこし汎血球減少と低γグロブリン血症が進行した。末梢血**Flow-FISH**法によるテロメア長短縮から先天性角化不全症（**Dyskeratosis congenital: DKC**）最重症型HHSと診断した。**Sanger**法にて**DKC**原因遺伝子（**TERC, TERT, DKC1, NHP2, NOP10, TINF2,**

*TCAB1*)と *APOLLO/IKAROS* に変異を認めなかった。全エクソーム解析では、in house SNP (正常検体 SNV)、dbSNP131 で既報告の SNP、アミノ酸置換のない synonymous SNV、Mismatch 率 25%以下 (in/del は 10%) で信頼度の低い SNV を除外後、患児検体で 354SNV/SNP または in/del を同定した。常染色体劣性遺伝形式のテロメア関連遺伝子 *RTEL1* (Regulator of telomere elongation helicase 1) にのみ、複合ヘテロ変異 ( c.1915C>T: p.R639C, c.3134G>A: p.W1045X) を同定した。両親は保因者であった。DKC の鑑別疾患に若年型早老症 Hutchinson-Gilford progeria 症候群(HGPS)がある。造血不全のない HGPS 児の末梢血単核球由来 DNA に *LMNA* p.G608G を同定し、Flow-FISH 法にて同細胞にテロメア短縮がないことを確認した。

単血球減少 (貧血単独) 型: 遺伝子診断が未確定であった輸血依存の DBA 母が児を出産し、母子の解析を行った。児は新生児期に貧血傾向にあったが軽快した。母には *RPL11* 変異 (c.58\_59del: p.20\_20del FS) を同定したが、児にこの変異はなかった。鉄芽球性貧血とリウマチを合併した例に *ALAS2* 変異 (p.R181C) を同定した。

#### D. 考察

先天性造血不全症の 6 患者、5 家系に遺伝子診断が確定した。国内初の 2 例を含み全て既報告変異であった。HHS と HGPS の比較から、解析 DNA の細胞源が細胞の機能と臨床症候を反映することが示唆された。典型例は全エクソーム解析により遺伝子診断が可能となったが、重症度と治療反応性を予見するためさらに検討が必要である。

#### E. 結論

全エクソーム解析は、汎および単血球減少型、いずれの稀少先天性造血不全症においても、その確定診断に有用であった。本法は患児の治療方針決定のみならず、家系内未発症者の造血不全以外

の関連症候を予見する遺伝カウンセリングにも今後応用が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Narazaki R, Makimura M, Sanefuji M, Fukamachi S, Akiyoshi H, So H, Yamamura K, Doizaki S, Kojima S, Ihara K, Hara T, Ohga S: Bilateral stenosis of carotid siphon in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Brain Dev* 35(7): 690-3, 2013
- 2) Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S: Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children. *Ann Hematol.* 2013 (in press)

##### 2. 学会発表

- 1) 大賀正一: 小児再生不良性貧血の治療の進歩。再生つばさの会福岡医療講演会, 福岡, 2013.
- 2) 大賀正一: 感染症と貧血 小児の貧血 A to Z 第 351 回福岡東部地区小児科医会, 福岡, 2013.
- 3) 石村匡崇, 土居岳彦, 高田英俊, 瀧本智仁, 山元裕之, 白石暁, 小川誠司, 小島勢二, 大賀正一, 原寿郎: Whole exome sequence により本邦初の *RTEL1* 変異を同定した Hoyeraal-Hreidarsson 症候群. 第 4 回 Q-PID 九州地区免疫不全症研究会, 福岡, 2013.
- 4) Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Muramatsu H, Nakanishi K, Takahashi Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Hasegawa D, Manabe A, Ito M, Kojima S. Telomere length as a predictor for the immune-suppressive therapy in acquired aplastic anemia. 第 75 回日本血液学会, 札幌, 2013.



- 5) 大園秀一、野口磨依子、中川慎一郎、上田耕一郎、稲田浩子、大賀正一、笹原洋二、小島勢二：若年性骨髄単球性白血病（JMML）と類似したWiskott-Aldrich 症候群（WAS）の2 症例. 第19 回九州山口小児血液・腫瘍研究会，福岡，2013.

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：小児血液疾患登録による稀少小児遺伝性血液疾患のデータベース構築  
研究分担者 小原 明（東邦大学医療センター大森病院輸血部 教授）

**研究要旨：** 稀少小児遺伝性血液疾患の診断法や治療法開発には疫学データベースの構築が必須である。日本小児血液学会（現 日本小児血液・がん学会）疾患登録事業を一次調査とした疫学観察研究を実施し、2006年から2012年診断の登録症例を検討した。この7年間に214例の稀少小児遺伝性血液疾患が登録されている。遺伝子診断技術が進歩して臨床でも積極的に活用される傾向にあり、今後既存症例の見直しや潜在する症例が見出される事が予想される。高い診断精度に基づく、悉皆性のある稀少小児遺伝性血液疾患のデータベースは、この分野の治療や病態研究に益々重要性が高まっている。

## A. 研究目的

### 【背景】

稀少小児遺伝性血液疾患の診断法や治療法開発に疫学データベースの構築が欠かせない。小児血液学会（現 日本小児血液・がん学会）疾患登録事業を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築し症例把握に努めた。

### 【目的】

本邦の稀少小児遺伝性血液疾患を収集する疫学データベース構築を目的に、小児血液学会疾患登録事業、現日本小児血液・がん学会疾患登録事業を一次調査とした疫学観察を実施する。本研究班で実施される診断法の開発・確立により、正確な診断がされ、不明であった病態が解明され、新規診断症例が発掘される事により、高い診断精度に基づく質の高いデータベースが構築される。これを基盤とした稀少小児遺伝性血液疾患の診断法・治療法開発を目指す。

## B. 研究方法

本研究班の研究では治療介入を行わない、疫学観察研究として実施する。小児血液学会会員 239 施設を対象にした全例登録（疾患登録事業）は、

前年診断症例を対象に Web 登録にて実施される。構築されるデータベースには小児期発症の血液疾患を網羅する。

（倫理面への配慮）

研究計画は、疾患登録事業、小児血液再不貧 2005 研究・MDS2006 研究により構成され、いずれも小児血液学会、日本小児血液・がん学会研究倫理審査承認を得た。

## C. 研究結果

2006 から 2012 年までの診断登録症例数を表に示す（表）。

a. 疾患登録症例：2012 年は小児血液学会会員 239 施設の 90%に相当する 219 施設が登録した。非腫瘍性血液疾患は毎年 1,200 から 1,300 症例であり、血小板異常症が最多。表に挙げた稀少小児遺伝性血液疾患 12 疾患は 7 年間に総計 214 例であり、同期間で特発性再不貧は毎年 50-56 例、急性白血病は 650 例とほぼ一定した症例数であった。

b. 貧血疾患：Fanconi anemia、FA と Diamond-Blackfan 貧血、DBA が代表的な疾患である。FA は診断法の情報発信による啓発により、また DBA 症例は遺伝子診断の開発により潜在的な症

例が確定診断されている。Congenital Dyserythropoietic anemia, Sideroblastic anemia は小児で極めて稀である。

c.白血球減少：責任遺伝子が同定されるにつれて、診断精度が向上している。Acquiredの慢性良性好中球減少の抗好中球抗体測定が多く行われる様になっていることも遺伝性血液疾患診断には好都合である。

d. 血小板疾患：May-Hegglin異常が、近年積極的に診断されるようになった。血小板異常（減少）は、他の造血疾患、免疫不全とoverlapする事が多く、新規病態の手がかりとなる症例の存在が予想される。

e. 日本小児血液・がん学会再生不良性貧血・MDS委員会中央形態診断事業、ならびに本研究班の活動により、新規症例が毎年診断され、多くは遺伝子診断へと繋がっている。

#### D. 考察

小児血液学会（現 日本小児血液・がん学会）疾患登録事業は 2006 年に開始され、会員施設において診断された全ての血液疾患を対象にした、全数把握疫学研究事業である。また学会形態中央診断事業は、診断困難な小児期の造血不全を対象にしており、この中から稀少小児遺伝性血液疾患症例が毎年発見されている。本研究班の遺伝子診断の開発、情報発信により、新規症例の発掘、overlap 病態の解明から潜在する症例の発掘、既存症例の確定診断例が増加している。これらを統合した疾患データベースを構築することは、本研究班の成果（遺伝子診断法）が裏打ちされ、精度の高い研究成果となる事が期待される。本研究班の成果によって新たに診断された、または既存症例の確定診断例の頻度が明らかになれば、本研究班による遺伝子診断体制の成果評価が可能となり、新たな診断の手引きの提案に繋がる。

#### E. 結論

臨床情報で裏打ちされた稀少小児遺伝性血液疾患の疫学データベースが構築されている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ishida Y, Maeda M, Urayama KY, Kiyotani C, Aoki Y, Kato Y, Goto S, Sakaguchi S, Sugita K, Tokuyama M, Nakadate N, Ishii E, Tsuchida M, Ohara A: Secondary cancers among children with acute lymphoblastic leukaemia treated by the Tokyo Children's Cancer Study Group protocols: a retrospective cohort study. Br J Haematol 2013
- 2) Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S: Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children. Haematologica 2013
- 3) Kato M, Koh K, Manabe A, Saito T, Hasegawa D, Isoyama K, Kinoshita A, Maeda M, Okimoto Y, Kajiwara M, Kaneko T, Sugita K, Kikuchi A, Tsuchida M, Ohara A: No impact of high-dose cytarabine and asparaginase as early intensification with intermediate-risk paediatric acute lymphoblastic leukaemia: results of randomized trial TCCSG study L99-15. Br J Haematol 2013
- 4) 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 32:42-48, 2013
- 5) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

2. 学会発表

なし

(表)

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	216 / 239	219 / 242
(%)	83%	88%	90%	90%	90.3%	90.4%	90.5%
Idiopathic Aplastic Anemia	58	62	68	68	55	61	45
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5	11
AA / PNH	2	1	1	0	1	0	0
<b>Fanconi Anemia</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
<b>Diamond-Blackfan Anemia</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>6</b>
<b>Idiopathic PRCA</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>6</b>
<b>Schwachman-Diamond</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>Cong. Dyserthropoietic Anemia</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Sideroblastic Anemia</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Svere Cong. Neutropenia</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>Cyclic Neutropenia</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>Dyskeratosis congenita</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>May-Hegglin anomaly</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Bernard-Soulier syndrome</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
<b>Glanzmanns Thrombathenia,</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>

As of June 2013

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：次世代シーケンサーを用いた稀少小児遺伝性血液疾患の原因遺伝子探索  
研究分担者 小川誠司（京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 教授）

**研究要旨：** 小児遺伝性血液疾患の多くは、国内年間発症数が10例以下と極めて稀であるが、致命的経過をたどることが少なくない。ここ数年、原因遺伝子の解明が進みつつあるが、いまだ多くは原因不明であり、的確な診断・有効な治療につながる原因遺伝子の発見が求められている。一方、近年多くの遺伝性疾患で次世代シーケンサーを利用した新たな原因遺伝子の発見が報告されており、単一遺伝子病である遺伝性血液疾患は、次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子探索が極めて有用であると考えられる。本研究では、既知の原因遺伝子の異常が同定されなかった小児遺伝性血液疾患症例に対して、家族発症例を中心に次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスによる網羅的な原因検索を行う。

#### A. 研究目的

本研究では、**Fanconi 貧血 (FA)**、先天性赤芽球ろう (**DBA**)、先天性角化不全症(**DKC**)、遺伝性鉄芽球性貧血(**CSA**)、先天性好中球減少症(**SCN**)、先天性顆粒放出異常症、毛細血管拡張性小脳失調症 (**AT**)、一過性骨髄異常増殖症 (**TAM**)、若年性骨髄単球性白血病 (**JMML**)、**Congenital dyserythropoietic anemia(CDA)**、先天性血小板減少症、**Shwachman-Diamond syndrome(SBDS)**、先天性溶血性貧血、先天性免疫不全症を含む分類不能の先天性骨髄不全などの疾患を対象に、原因遺伝子が不明な症例について **SNP array** 解析、次世代シーケンサーを用いて、原因遺伝子を同定することを目的とする。

#### B. 研究方法

**SNP** アレイ解析には **Affymetrix** 社の **SNP** アレイである **GeneChip 250K** アレイを用い、解析アルゴリズムとして **CNAG/AsCNAR** を用いた。

また、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスは、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 **Hiseq 2000**) で解析を行った。全ゲノムシーケンスについても、**illumina** 社のプロトコールにしたがってライブラリーを作成し、高速シーケンサーで解析した。また、原因遺伝子を同定するために、患者検体に加えて、家族から得られた **DNA** 検体についても遺伝子変異の解析を行った。また、**TAM**、**DS-AMKL** の解析では寛解期の末梢血などから得られた検体を正常コントロールとして体細胞変異を検出した。(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた遺伝子解析研究は、京都大学および分担研究者の前所属機関である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(2001年、2008年改訂)」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

昨年度に引き続き、過去に当研究班で収集していた症例および新規症例で原因遺伝子が不明な

症例の全エクソンシーケンスを行った。309 検体の全エクソンシーケンスを行い、それぞれの疾患の解析を担当する施設にデータを送付した。

当研究室では、TAM および DS-AMKL の体細胞遺伝子変異の解析を行った。全エクソンシーケンスの結果、TAM (N = 15) では従来から知られていた *GATA1* 遺伝子変異が全ての症例に同定され、次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスの高い感度が示された。一方、他の遺伝子では 1 症例あたりのアミノ酸置換を伴う変異の数が 1 症例あたり 0.7 個と少なく、TAM は *GATA1* 遺伝子の変異と trisomy 21 のみによって発症している可能性が高いことを報告した。一方、DS-AMKL (N = 14) では、1 症例あたり 5.8 個のアミノ酸置換を伴う変異が同定された(図 1)。

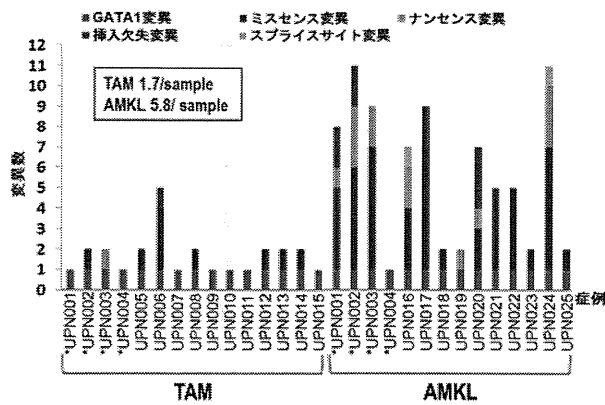


図 1 29 例の TAM、AMKL の全エクソンシーケンスによって同定された変異の個数

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。

DS-AMKL では、多くの遺伝子が複数の症例で高頻度に変異が認められ、DS-AMKL の発症に関わる重要な遺伝子であることが示唆された(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
<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.L811R	c.T1832G	018
<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

表 1 14 症例の DS-AMKL で複数の変異が認められた遺伝子  
*TP53* 遺伝子以外はこれまで AMKL で変異の報告がない遺伝子であった。

さらに、これらの遺伝子を 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) について遺伝子変異を検索した。その結果、注目すべき所見としては *RAD21*、*STAG2* などのコヒーシン複合体関係の遺伝子変異・欠失が 53% と高頻度にみられ、これらは変異・欠失のある症例では完全に排他的にみられていて、DS-AMKL の発症に強く関わっていることが示唆された(図 2)。さらに *CTCF* 遺伝子 (20%)、*EZH2* (45%) などのエピゲノム制御因子、RAS やチロシンキナーゼ(TK)などのシグナル伝達分子の変異が高頻度に認められた。

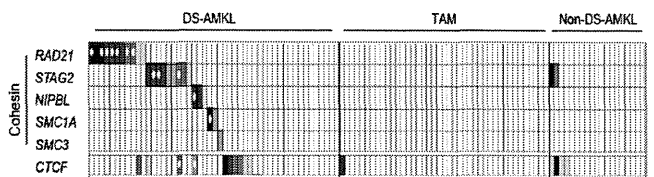


図 2 コヒーシン複合体/*CTCF* の遺伝子異常

コヒーシンの 5 つの遺伝子に同定された変異は、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た。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ことが知られ、*CTCF* の変異を含めると DS-AMKL の 65% に変異が検出された。

コヒーシン複合体を構成する遺伝子、*CTCF*、*EZH2* などのエピゲノムの制御因子の変異は

*GATA1* 遺伝子と同一患者において同程度の変異アレル頻度で認められたことから、DS-AMKL 発症の初期に獲得された変異と考えられた。一方、RAS や TK の遺伝子変異は *GATA1* の遺伝子変異より同一患者において低いアレル頻度で認められ、より後期に獲得された DS-AMKL の進行に伴う遺伝子変異であると考えられた (図 3)。

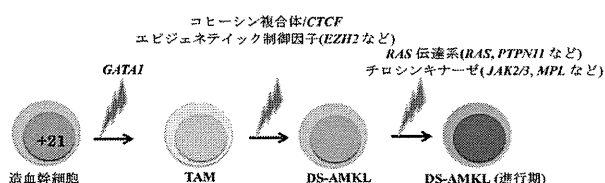


図 3 DS-AMKL の多段階発症のモデル

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。

さらに、同一患者の TAM、DS-AMKL 検体の全ゲノムシーケンスを行った結果、DS-AMKL は TAM 時期に存在している複数のクローンの一つが新たな変異を獲得して AMKL を発症していることが明らかになった。

#### D. 考察

次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスは従来の方法に比べて格段に効率よく網羅的に全遺伝子の遺伝子解析が可能であった。TAM、DS-AMKL においても、はじめて遺伝子変異の全貌を知ることが可能となり、TAM は trisomy 21 と *GATA1* 遺伝子変異によっておこっていて、DS-AMKL ではコヒーシン複合体関係の遺伝子の変異などが発症に関わっていることが示され、Down 症候群児が TAM、AMKL を発症する遺伝学的背景が明らかになった。

#### E. 結論

本研究による次世代シーケンサーを用いた小児稀少遺伝性血液疾患の解析により、TAM、

DS-AMKL など効率的に多くの新規の遺伝子変異が同定することができた。

#### 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.
- 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, Sauntharajah 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, Kajiwara M, Gotoda-Nishimura N, Arai S, Sato-Otsubo A, Toyoda T, Takahashi K, Nakayama N, Cowan CA, Aoi T, Ogawa S, McMahan 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/IIIa 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. Smad1 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, Koefler 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, Koefler 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, Koefler 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, Uchimaruru 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) Seishi Ogawa. Genetic analysis of myeloid neoplasms in childhood. Cambridge Research Institute Annual International Symposium. 2012/11/2 Cambridge (UK)

7) 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし