

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性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**, **NUDVF1**, **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性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

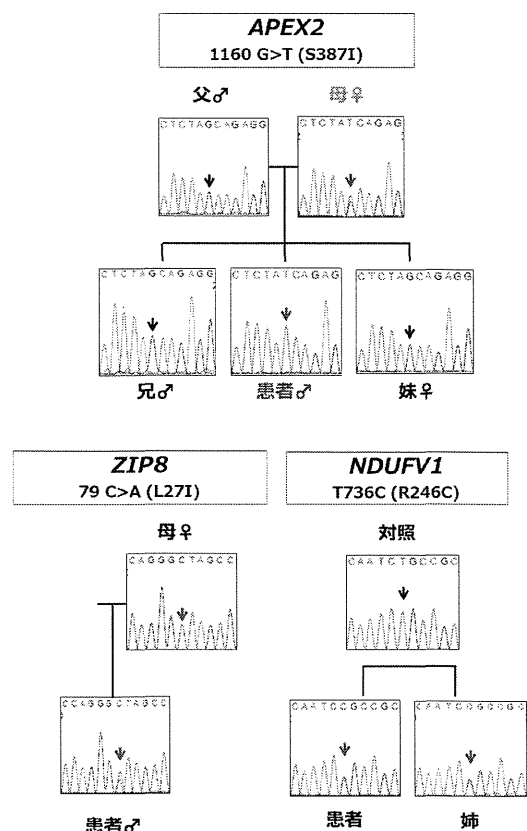
既知の遺伝子変異が認められない遺伝性鉄芽球性貧血家系について、次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、新たな原因遺伝子を同定する。

(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**, **NUDVF1**, **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。*NDUFB1*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) Kadirvel S, Furuyama K, Harigae H, Kaneko K, Tamai Y, Ishida Y, Shibahara S. The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and protein stability. *Exp Hematol*. 2012;40(6):477-86.
- 2) 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]

- 3) 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.
- 4) Fujiwara T, Harigae H. Pathophysiology and genetic mutations in congenital sideroblastic anemia. *Pediatrics International*. 2013;55:675-679.
- 5) 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

海外

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)

国内

- 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) 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の顆粒放出の異常によりさまざまな臨床所見を呈する乳幼児の疾患の総称であり、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 type 2、Hermansky-Pudlak 症候群 type 2 などが含まれる。Chediak-Higashi 症候群は今回初めてその実態を明らかにし、臨床的には血球貪食症候群の合併頻度は低く、むしろ長期生存例における神経合併症が問題であった。またCTL活性低下とHLHの合併は相関する傾向にあった。現在iPSを用いた新たな治療法の開発を進めている。Griscelli 症候群、Hermansky-Pudlak 症候群の報告例がなかったが、特有の症状を有する家系が散見され遺伝子検査を含めた解明を進めている。FHLは症例集積と原因遺伝子の解析、リンパ球機能解析を行い、日本ではその約90%の症例が4種類の遺伝子異常を有していた。残り約10%の未知の遺伝子については次世代シーケンサーを用いた同定を進めている。また骨髄非破壊的前処置を用いた非血縁臍帯血移植の有用性が証明された。以上、これまで実態が不明であった先天性顆粒放出異常症の詳細が明らかになったが、今後は残された遺伝子異常を同定するとともにiPSを用いた疾患特有の合併症の病態を解明し新たな治療法の開発を進める必要がある。

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、Hermansky-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*）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た結果、FHL2 と FHL3 が約 80% と多かった。また顆粒放出解析ならびに CTL 活性の結果からは未知の遺伝子異常による FHL が約 10% 存在する可能性が示唆された。これらの遺伝子異常不明例は新規遺伝子の同定を進めており、いくつかの候補遺伝子が同定されている。

さらに Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansky-Pudlak 症候群の全国調査を行い、Chediak-Higashi 症候群のみが確認された。Chediak-Higashi 症候群は、血球貪食症候群をきたす症例は少なく、長期生存例では消化管合併症および中枢神経合併症が多いことが明らかになった。LYST 遺伝子異常は 1/3 の症例では明らかではなく、LYST 以外の遺伝子異常の存在が推測された。Griscelli 症候群、Hermansky-Pudlak 症候群の報告例はないものの類似の家族発症例が数件報告されており、現在その遺伝子解析を進めているところである。

以上より日本における顆粒放出異常症の実態と問題点が明らかになった。今後は未知遺伝子の同定を進め、全体像を明らかにする予定である。

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、FHL と Chediak-Higashi 症候群の実態が明らかとなった。その多くは遺伝子異常が同定されたものの、FHL の約 10%、Chediak-Higashi 症候群の約 1/3 が遺伝子異常不明であり現在その新規遺伝子の同定を進めている。

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。今後は未知の遺伝子同定や合併症の病態を明らかにするとともに、国際的な診断法および治療法を確立

していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asano T, Ishii E, et al (2011) Hemophagocytic lymphohistiocytosis after hematopoietic stem cell transplantation in children: a nationwide survey in Japan. *Ped Blood Cancer* 59: 110-114
- 2) Yanagimachi M, Ishii E, et al (2011) Association of *IRF5* polymorphisms with susceptibility to hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *J Clin Immunol* 31: 946-951
- 3) Matsuda K, Ishii E, et al (2011) Detection of T-cell receptor gene rearrangement in children with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis using the IOMED-2 multiplex polymerase chain reaction combined with GeneScan analysis. *Clin Chim Acta* 412: 1554-1558
- 4) Murata Y, Ishii E, et al (2011) Rapid diagnosis of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3 (FHL3) by flow cytometric detection of intraplatelet Munc13-4 protein. *Blood* 118: 1225-1230
- 5) Kanegane H, Ishii E, et al (2012) Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. *Pediatr Allergy Immunol* 23: 488-493
- 6) Nishi M, Ishii E, et al (2012) Reduced intensity conditioning in unrelated donor cord blood transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hematol* 87: 637-639
- 7) Yang X, Ishii E, et al (2012) Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in

- Japan. J Clin Immunol 32: 411-420
- 8) Sawada A, Ishii E, et al. (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
 - 9) Hirata S, Ishii E, et al (2013) CAMT-iPS cells exhibiting defective MPL signaling dysregulate megakaryopoiesis and erythropoiesis. J Clin Invest 123: 3802-3814
 - 10) Nagai K, Ishii E, et al (2013) Clinical characteristics and outcomes of Chédiak-Higashi syndrome: a nationwide survey of Japan. Pediatr Blood Cancer 10: 1582-1586
 - 11) Kogawa K, Ishii E, et al (2014) Prognostic factors of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children: Report of the Japan Histiocytosis Study Group. Pediatr Blood Cancer (in press)
2. 学会発表
- 1) Nakazawa Y, Ishii E, et al (2011) Monitoring of T-cell receptor gene rearrangement in children treated with HLH-2004 for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. 27th Annual Meeting of Histiocyte Society, October, Vienna, Austria,
 - 2) Ishii E (2012) Successful treatment of EBV-HLH in Japan. ICORD 2012 Conference, January, Tokyo
 - 3) Nagai K, Ishii E, et al (2013) Pathogenesis and outcome of Chediak-Higashi syndrome, a lytic granule disorder of lymphocytes, in Japan. The 29th annual meeting of the Histiocyte Society, October, Washington, USA
 - 4) Maeda M, Ishii E, et al (2013) A survey of disseminated juvenile xanthogranuloma in Japan. 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）
 - 総合研究報告書 -
 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は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

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。GATA1遺伝子について、GATA1の高発現と低発現変異群に分類すると低発現変異群が高率に白血病化すること、2種類のGATA1内部欠失変異を6例のTAM患者で見出し、これらは43あるいは15アミノ酸の内部欠損が生じ、変異蛋白は正常な赤血球造血に不可欠なGATA1のRB結合モチーフを欠いていた。次に次世代シーケンサーを用いてTAM、寛解期細胞、AMKLを解析したところ、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。今回の結果は、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つ。また、TAMから白血病に進展する機序も明らかになり、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。

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、進展に關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) 細胞保存

検体保存は、患者ひとりにつき末梢血由来の TAM 芽球検体を最大 5 本保存し、検査後の検体は-80℃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。

2) 病態解析

① GATA1 遺伝子の解析

2003年から2010年までに106例のTAMの臨床検体を収集し、GATA1遺伝子の解析を行った。GATA1変異はそのうち99例に検出された。GATA1 cDNAの解析では、ほとんどがN末端の83

アミノ酸を欠いたGATA1蛋白 (GATA1s) のみが発現する変異であった。しかし、6例のTAM患者で、129塩基あるいは45塩基がin frameで欠失し、84番目のメチオニンを含む43 (GATA1 ID type-1) あるいは15アミノ酸の内部欠損 (GATA1 ID type-2) 蛋白が発現していると推定された。Western blot解析により、GATA1 ID type 1変異をもつ2例のTAM細胞で、GATA1 ID蛋白の発現を確認することができた。次に、genomic DNAの解析から、これらの症例では、2から21塩基の挿入あるいは欠失が第3エクソンに存在することが明らかになった。

② 次世代シーケンサーによる解析

A) 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)。

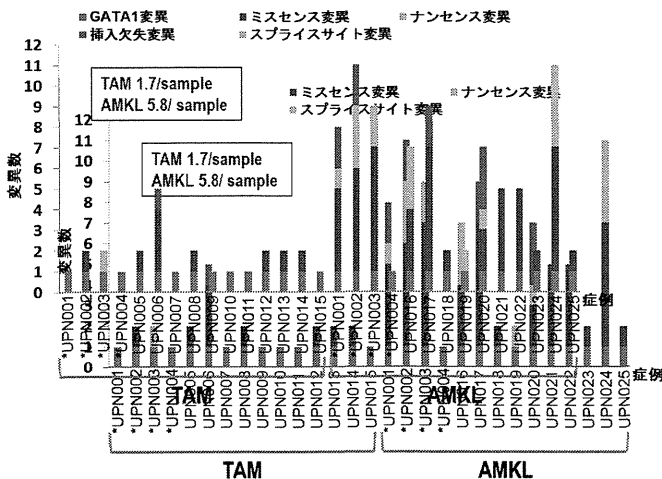


図1. 29例のTAM、AMKLの全エクソンシーケンスによって同定された変異の個数

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。

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 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.E88X	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)。

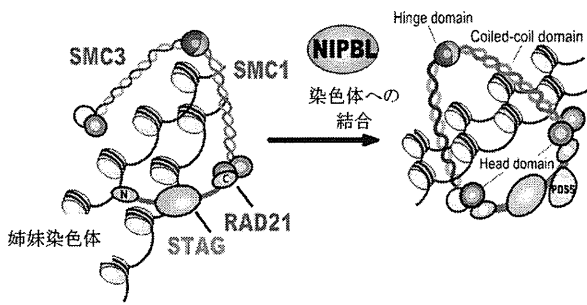


図 2. コヒーシンの構造と機能

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。

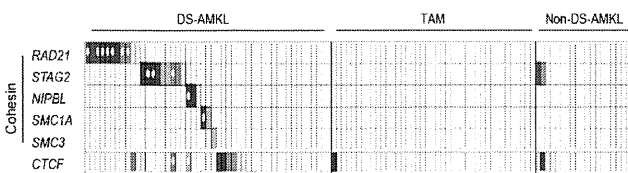


図 3. コヒーシン複合体/CTCF の遺伝子異常

コヒーシンの5つの遺伝子にみつかった変異は、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）。

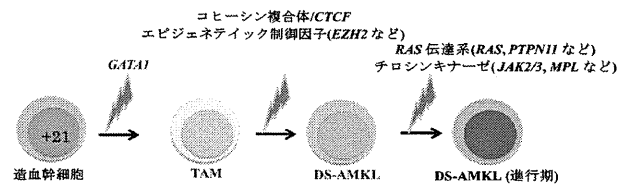


図 4. DS-AMKL の多段階発症のモデル

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

これまでの保存検体を用いて遺伝子解析を行ってきたが、三年間のTAM研究班の活動によりTAMの全国レベルでの検体保存ができるようになり、今後の遺伝子解析に使えるようになった。

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、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た。

次世代シーケンサーの解析では、TAM は somatic mutation の候補が変異数は 1.5 個と AMKL 検体に比べて少なく、これまで考えられていた trisomy 21 (first event) に加えて、*GATA1* 遺伝子変異が起こる (second hit) ことにより TAM を発症し、*GATA1* 変異以外に繰り返し認め

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。

今回の結果は、TAM における *GATA1* 遺伝子異常に加えていくつかの遺伝子変異が蓄積して AMKL を発症するというダウン症候群における TAM、AMKL 発症のモデルを裏付けるものであると考えられた。一方、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。

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。現在、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しており、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、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

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) Shiba N, Taki T, Park MJ, Nagasawa M, Kanazawa T, Takita J, Ohnishi H,

Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y. CBL mutation in childhood therapy-related leukemia. *Leukemia* 25 : 1356-1358, 2011

2) Shiba N, Taki T, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 413-414, 2011

3) Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies. *Leukemia* 25 : 382-384, 2011

4) Takita J, Chen Y, Okubo J, Sanada M, Adachi M, Ohki K, Nishimura R, Hanada R, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Aberrations of NEGR1 on 1p31 and MYEOV on 11q13 in neuroblastoma. *Cancer Sci* 102 : 1645-1650, 2011

5) Sekimizu M, Sunami S, Nakazawa A, Hayashi Y, Okimoto Y, Saito AM, Horibe K, Tsurusawa M, Mori T. Chromosome abnormalities in advanced stage T-cell lymphoblastic lymphoma of children and adolescents: a report from Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) and review of the literature. *Br J Haematol*. 154 : 612-617, 2011

6) Gruber TA, Larson Gedman A, Zhang J, Koss CS, Marada S, Ta HQ, Chen SC, Su X, Ogden SK, Dang J, Wu G, Gupta V, Andersson AK, Pounds S, Shi L, Easton J, Barbato MI, Mulder HL, Manne J, Wang J, Rusch M, Ranade S, Ganti R, Parker M, Ma J, Radtke I, Ding L, Cazzaniga G, Biondi A, Kornblau SM, Ravandi F, Kantarjian H,

- Nimer SD, Döhner K, Döhner H, Ley TJ, Ballerini P, Shurtleff S, Tomizawa D, Adachi S, Hayashi Y, Tawa A, Shih LY, Liang DC, Rubnitz JE, Pui CH, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR. An Inv(16)(p13.3q24.3)-Encoded CBFA2T3-GLIS2 Fusion Protein Defines an Aggressive Subtype of Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 22 : 683-697, 2012
- 7) Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Kanazaki R, Park MJ, Kanno Y, Takahara T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. *Blood* 119 : 2608-2611, 2012
- 8) Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 26 : 1879-1898, 2012
- 9) Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. *CBL* mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia. *Blood* 119 : 2612-2614, 2012
- 10) Shiba N, Taki T, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 413-414, 2012
- 11) Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. *CBL* mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 672-674, 2012
- 12) Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 120 : 1485-1488, 2012
- 13) Shimada A, Taki T, Koga D, Tabuchi K, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Adachi S, Kojima S, Hayashi Y. High WT1 mRNA expression after induction chemotherapy and FLT3-ITD have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol*. 96 : 469-476, 2012
- 14) Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park MJ, Sotomatsu M, Tabuchi K, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 95 : 509-515, 2012
- 15) Kawashima N, Shimada A, Taketani T, Hayashi Y, Yoshida N, Matsumoto K, Takahashi Y, Kojima S, Kato K. Childhood acute myeloid leukemia with bone marrow eosinophilia caused by t(16;21)(q24;q22). *Int J Hematol*. 95 : 577-580, 2012
- 16) Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene*. 31 : 4667-4676, 2012
- 17) Inukai T, Kiyokawa N, Campana D, Coustan-Smith E, Kikuchi A, Kobayashi M, Takahashi H, Koh K, Manabe A, Kumagai

- M, Ikuta K, Hayashi Y, Tsuchida M, Sugita K, Ohara A. Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Brit J Haematol* 156 : 358-365, 2012
- 18) Yamada Y, Kato M, Toki F, Watanabe M, Nishi A, Matsushita I, Hirato J, Hayashi Y. Eosinophilic gastrointestinal disorder in an infant with feeding dysfunction. *Int Arch Allergy Immunol*. 158 Suppl 1:83-86, 2012
- 19) 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.
- 20) 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].
- 21) 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]
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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* 2012;121(5):862-3.
- 27) 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)
- 28) 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.
- 29) 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
- 30) 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 35) 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
- 36) 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
海外
- 1) Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, RuNan Wang, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Ito E. GATA1 Mutants lacking Rb-Binding motif observed in transient abnormal myelopoiesis in Down Syndrome. 第53回アメリカ血液学会, 米国・サンディエゴ 2011.12.9~13
- 2) Shiba N, Taki T, Park M, Murata C, Oki K, Ichikawa H, Shimada A, Kanazawa T, Sotomatsu M, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. NUP98-NSD1 fusion gene is strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the

- Japanese Childhood AML99 Cooperative Study Group. 53rd ASH, San Diego, December 9-13, 2011
- 3) Taketani T, Taki T, Fukuda S, Hyuga M, Onishi C, Yamaguchi S, Hayashi Y. The Concurrent mutations in hematological malignancies with *NUP98*-fusion genes are associated with clinical prognosis. 53rd ASH, San Diego, December 9-13, 2011
 - 4) Shiba N, Ichikawa H, Taki T, MJ Park, 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* related gene expression signature is strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. 54rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 8, 2012
 - 5) Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Nagata Y, Ohki K, Kato M, MJ Park, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole exome sequencing reveals spectrum of gene mutations in pediatric AML. 54rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 9, 2012
 - 6) Shiba N, Ohki K, MJ Park, Adachi S, Kobayashi M, Kinoshita A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tawa A, Horibe K, Tsukimoto I, Hayashi Y. *GATA2* mutations in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. 54rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 9, 2012
 - 7) 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, Kanazaki R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Miyano S, Kojima S, Izraeli S, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Genetic basis of myeloid proliferation related to down syndrome. 54rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 9, 2012
 - 8) Kinoshita A, Miyachi H, Matsushita H, Yabe M, Taki T, Watanabe T, Saito A, Tomizawa D, Kiyokawa N, Taga T, Deguchi T, Hashii Y, Terui K, Takahashi H, Hayashi Y, Tawa A, Horibe K, Adachi S. Myelodysplasia-Related Changes Have Adverse Prognostic Significance in Children with Acute Myeloid Leukemia: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). 54rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, December 9, 2012
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 12) 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
- 13) Yoshida K, Shiba N, Shiraishi 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 国内
- 1) 小川誠司, 加藤元博, 林 泰秀. TAMにおける遺伝学的基盤探索 (シンポジウム). 第114回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
- 2) 村松秀城, 菊地 陽, 林 泰秀, 真部 淳. ダウン症候群に合併した一過性骨髄異常増殖症 153例の後方視的解析. 第114回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
- 3) 塚本桂子, 伊藤祐司, 林 泰秀, 田村正徳. ダウン症候群にみられる一過性骨髄異常増殖症(TAM)についての新生児施設への調査 (シ

- ンポジウム). 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
- 4) Yoshida K, Toki T, Park MJ, Nagata Y, RuNan Wang, Shiraishi Y, Sanada M, Nagasaki M, Miyano S, Kanegane H, Kawakami K, Kato K, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Whole exome analysis of transient abnormal myelopoiesis and acute megakaryocytic leukemia with Down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
- 5) 鮫島希代子, 林 泰秀. ダウン症候群の診断告知に関するアンケート. 遺伝医学合同学術集会 2011, 京都, 2011.6.19.
- 6) 鮫島希代子, 高木剛, 家坂直子, 竹中俊文, 丸山憲一, 林 泰秀, 尾崎 守. 出生前診断を行った 13 番染色体部分トリソミー、21 番染色体モノソミーの 1 例. 日本人類遺伝学会第 56 回大会, 第 11 回東アジア人類遺伝学会 2011.11.9-12
- 7) 朴 明子, 外松 学, 林 泰秀. 肝機能障害を伴う TAM の臨床像について. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
- 8) Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Koike T, Endo M, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Ito E. Novel GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
- 9) Toshida K, Toki T, Park MJ, Nagata Y, Wang R, Shiraishi Y, Sanada M, Nagasaki M, Miyano S, Kanegane H, Kawakami K, Kato K, Kojima S, Hayashi Y, Ito E, Ogawa S. Whole exome analysis of transient abnormal myelopoiesis (TAM) and AMKL with down syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
- 10) 吉田健一, 土岐 力, 朴 明子, 永田安伸, 王 汝南, 白石友一, 真田 昌, 昆 彩菜, 佐藤亜依子, 長崎正朗, 宮野 悟, 金兼弘和, 川上 清, 加藤剛二, 小島勢二, 林 泰秀, 伊藤悦朗, 小川誠司. ダウン症候群に合併した一過性骨髄増殖症(TAM)および急性巨核芽球性白血病(AMKL)の全エクソンシーケンス. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 11) 花田 勇, 照井君典, 土岐 力, 工藤 耕, 佐藤知彦, 神尾卓哉, 佐々木伸也, 高橋良博, 林 泰秀, 杉田完爾, 小島勢二, 小池健一, 小阪嘉之, 小林正夫, 伊藤悦朗. ダウン症候群関連 ALL の発症における JAK2、および CRLF2 遺伝子異常の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.27
- 12) 滝田順子, 西村 力, 安達正時, 大木健太郎, 大久保 淳, 樋渡光輝, 真田 昌, 林 泰秀, 小川誠司, 五十嵐 隆. 革新的ゲノム解析技術を用いた難治性小児固形腫瘍における発症分子機構の解明. 第 114 回日本小児科学会学術集会, 東京, 2011.8.12
- 13) 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 川幡亮一郎, 永田安伸, 大久保淳, 真田 昌, 五十嵐隆, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司. 次世代シーケンサーによる神経芽腫のエクソーム解析. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2011.10.4
- 14) Hiwatari M, Ohki K, Takita J, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Mutation analysis for IDH1 and IDH2 in infantile leukemia. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.14
- 15) Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutation in CMML secondary to familial platelet disorder with propensity to develop AML. 第 73 回日本血液学会学術集会, 名古屋, 2011.10.15
- 16) 大木健太郎, 大喜多肇, 小林健一郎, 清河信敬, 朴 明子, 新井 心, 外松 学, 柴 徳生, 福島 敬, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地 陽, 小原 明, 土田昌宏, 林 泰秀. TCCSG 小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における CRLF2 と IKZF1 の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.27
- 17) 柴 徳生, 朴 明子, 村田知里, 嶋田 明, 滝 智彦, 外松 学, 田渕 健, 足立壮一,

- 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 荒川浩一, 林 泰秀. 小児急性骨髄性白血病における *NUP98-NSD* 転座の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 18) 朴 明子, 清河信敬, 小田 慈, 真部 淳, 原 純一, 小原 明, 花田良二, 土田昌宏, 小川誠司, 堀部敬三, 林 泰秀. T 細胞型小児急性リンパ性白血病における遺伝子異常の解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 19) 堤 修一, 王 凌華, 朴 明子, 照井君典, 佐々木伸也, 伊藤悦朗, 林 泰秀, 油谷浩幸. MLL 再構成陽性の小児急性リンパ性白血病のエクソーム解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.25
- 20) 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 川幡亮一郎, 永田安伸, 大久保淳, 真田 昌, 林 泰秀, 五十嵐隆, 宮野 悟, 小川誠司. 次世代シーケンサによる神経芽腫のエクソーム解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋, 2011.11.26
- 21) 滝田順子, 西村 力, 大久保純, 吉田健一, 星野諭子, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 先端的ゲノムスキニングを用いた難治性小児固形腫瘍における標的分子の探索. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 22) 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 大久保純, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 次世代シーケンサーを用いた神経芽腫のエクソーム解析. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 23) 大久保純, 滝田順子, 西村 力, 星野諭子, 吉田健一, 白石友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 次世代シーケンサーを用いた **Ewing** 肉腫のエクソーム解析. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 24) 柴 徳生, 市川 仁, 滝 智彦, 朴 明子, 嶋田 明, 田渕 健, 荒川浩一, 足立壮一, 堀部敬三, 林 泰秀. 発現アレイを用いた小児急性骨髄性白血病における、*NUP98-NSD1* 融合遺伝子の解析. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 25) 大木健太郎, 大喜多肇, 清河信敬, 朴 明子, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地陽, 小原 明, 林 泰秀. TCCSG の小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における **CRLF2** と **IKZF1**, **JAK** 遺伝子解析. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 26) 鮫島希代子, 林 泰秀. ダウン症候群の診断告知に関するアンケート調査. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 27) 大木健太郎, 奥野はるな, 柴 徳生, 金澤崇, 朴 明子, 外松 学, 神谷尚宏, 小川千登世, 林 泰秀. 第 2 再発時に初めて **MLL-AF4** 陽性となった B 前駆型急性リンパ性白血病 1 例におけるクローン構造の検討. 第 8 回来た関東小児がんセミナー, 高崎, 2012.5.19
- 28) 朴 明子, 林 泰秀. **TAM** に合併する肝機能障害について. 第 48 回日本周産期・新生児医学会学術集会, さいたま, 2012.7.8
- 29) 三谷幸代, 城 青衣, 嶋田 明, 柴 徳生, 林 泰秀, 市川 仁. 2 遺伝子の発現に基づく高リスク小児急性骨髄性白血病の同定. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.19
- 30) 倉田盛人, 後飯塚僚, 北村大介, 滝田順子, 林 泰秀, 北川正伸, 中村卓郎. **BLNK** 欠損 **preB-ALL** と B 細胞分化における **C/Ebpb** の働き. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20
- 31) 星野諭子, 西村 力, 奥野友介, 樋渡光輝, 永田安伸, 吉田健一, 真田 昌, 白石友一, 宮野 悟, 林 泰秀, 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 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20
- 32) 柴 徳生, 吉田健一, 奥野友介, 白石友一, 田中洋子, 永田安伸, 滝田順子, 荒川浩一, 伊藤悦朗, 真田 昌, 宮野 悟, 小川誠司, 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発症原因遺伝子変異の同定. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
- 33) 関 正史, 西村 力, 奥野友介, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 吉田健一, 真田 昌,