

- 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーによる再発肺芽腫のエクソーム解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
- 34) 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 千葉健一, 田中洋子, 佐藤悠佑, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. SNP アレイをエクソーム解析を用いた横紋筋肉腫の初発・再発/転移巣のクローン比較. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
- 35) 樋渡光輝, 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 大久保淳, 永田安伸, 五十嵐隆, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いたユーズング肉腫発生の分子生物学的検討. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
- 36) Kiyokawa N, Matsumoto K, Iijima K, Hasegawa D, Oboki K, Kobayashi K, Okita H, Takada S, Asahara H, Mori T, Fukushima T, Saito M, Koh K, Hanada R, Tsuchida M, Manage A, Kikuchi A, Saito H, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Fusion gene-specific signature of microRNR expression in childhood ALL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
- 37) Iijima K, Hasegawa D, Kiyokawa N, Kobayashi K, Okita H, Miharu M, Mori, T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Gene expression profile related to prognosis of childhood ALL without fusion genes. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
- 38) Park MJ, Oda M, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. IL-7R gene mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
- 39) Oki K, Okita H, Kobayashi K, Shiba N, Park MJ, Sotomatsu M, Fukushima T, Koh K, Hanada R, Manabe A, Kikuchi A, Tsuchida M, Ohara A, Kiyokawa N, Hayashi Y. Analysis of CRLF2 and IKZF1, JAK, IL7R genes in pediatric B-precursor ALL treated on TCCSG protocol. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
- 40) Shimada A, Olfat I, Xu Y, Goto A, Nagai T, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada Y, Hayashi Y, Ogawa S. JAK2 V617F mutation in pediatric myeloproliferative neoplasm. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
- 41) Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Nagata Y, Ohki K, Kato M, Park MJ, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole exome resequencing reveals novel gene mutations in pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
- 42) Okuno Y, Shiba N, Shiraishi Y, Yoshida K, Nagata Y, Sato Y, Ohki K, Kato M, Park MJ, Kanazawa T, Kudo K, Chiba K, Tanaka H, Ito E, Takita J, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Ogawa S. Clonal architecture and evolution of pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
- 43) Takahashi H, Koh K, Kato M, Fukushima T, Inukai T, Kiyokawa N, Taki T, Saito M, Kajiwara M, Ogawa C, Maeda M, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Hanada R, Tsuchida M, Ohara A. Characteristics and prognostic impacts of structural chromosomal abnormalities in childhood ALL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.21
- 44) Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. NUP98-NSD1 related gene expression signature is associated with a poor prognosis in pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.21
- 45) 大木健太郎, 柴 徳生, 新井 心, 朴 明子, 外松 学, 清河信敬, 林 泰秀. 小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における clonal evolution の解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30

- 46) 関 正史, 西村 力, 星野倫子, 奥野友介, 白石友一, 吉田健一, 千葉健一, 田中陽子, 真田 昌, 加藤啓輔, 土田昌宏, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 先端的ゲノム解析技術を用いた胸膜肺芽腫における発症分子機構の解明. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
- 47) 朴 明子, 大木健太郎, 新井 心, 外松 学, 清河信敬, 小田 慈, 堀部敬三, 林 泰秀. MLPA 法を用いた T-ALL 遺伝子異常についての解析. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
- 48) 西 眞範, 磯村直子, 野村優子, 柳井文男, 犬飼岳史, 渡辺 新, 林 泰秀. t(17;19)(q22;p13.3)を含む染色体異常を呈した T 細胞性急性リンパ性白血病の1例. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
- 49) 柴 徳生, 吉田健一, 奥野友介, 白石友一, 加藤元博, 大木健太郎, 朴 明子, 金澤 崇, 工藤寿子, 滝田順子, 加藤啓輔, 荒川浩一, 伊藤悦朗, 花田良二, 真田 昌, 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54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.1
- 50) 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 市川 仁, 足立壮一, 外松 学, 荒川浩一, 田渕 健, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本一郎, 林 泰秀. 小児急性骨髄性白血病における GATA2 遺伝子変異同定. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.1
- 51) 出口隆生, 村松秀城, 林 泰秀, 菊地 陽, 駒田美弘. TAM 芽球における CD117 発現と末梢血中芽球割合の相関. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2
- 52) 村松秀城, 菊地 陽, 林 泰秀, 川村眞智子, 小島勢二, 矢部みはる, 磯山恵一, 滝 智彦, 辻浩一郎, 土田昌宏, 真田 昌. ダウン症候群い合併した一過性骨髄異常増殖症に対する少量シタラビン療法による腫瘍崩壊症候群. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2
- 53) 嶋田 明, Ismael Olfa, 徐 銀嶺, 後藤 綾, 永井智子, 成田 敦, 坂口大俊, 土居崎小夜子, 村松秀城, 濱 麻人, 高橋義行, 山田佳之, 林 泰秀, 小島勢二. 小児骨髄増殖疾患における JAK2V617F 遺伝子変異. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2
- 54) 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)
- 55) 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, 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)
- 56) 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. 次世代シーケンサー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, 2012.4.19-21
- 57) 星野倫子, 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, 2012.4.19-21
- 58) 柴 徳生, 朴 明子, 船戸道德, 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, 2012.4.19-21
- 59) 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，2012.4.19-21
- 60) 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，2012.4.19-21
- 61) 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，2012.4.19-21
- 62) 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，2012.4.19-21
- 63) 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
- 64) 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
- 65) 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
- 66) 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
- 67) 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
- 68) 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
- 69) Tokumasu M, Nagao M, Shimada A, Murata C, Ohki K, Hayashi Y, Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Ito H, Nakayama H, Kinoshita A, Tomizawa D, Taga T, Yamaguchi H, Tawa A, Heike T, Adachi S. Prognostic impact of KIT mutakon in t(8:21) childhood AML: The JPLSG AML-05 trial. The 75th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. Sapporo, 2013.10.11-13
- 70) 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
- 71) 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
- 72) 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
- 73) 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
- 74) 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
- 75) 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
- 76) 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
- 77) 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
- 78) 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
- 79) 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
- 80) 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
- 81) 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
- 82) 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
- 83) 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
- 84) 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
- 85) 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
- 86) 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
- 87) 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
- 88) 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
- 89) 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
- 90) 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
- 91) 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
- 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：** 既知の先天性血小板減少症の原因遺伝子に異常を認めない患者と両親検体の38家系、117人のDNA検体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。優性遺伝の先天性巨大血小板性血小板減少症（CMTP）7家系中、3家系において新規ACTN1遺伝子変異を同定した。ACTN1遺伝子変異は優性遺伝を呈するCMTPの5.5%を占め、日本人CMTPで4番目に高頻度の原因であることが判明した。1家系では、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。現在、機能解析を施行中である。優性遺伝の残りの3家系と遺伝形式が不明である25家系については原因遺伝子候補の特定には至っていない。

## 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

既知の先天性血小板減少症の原因遺伝子に異常を認めない患者と両親検体の38家系、117人のDNA検体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。

優性遺伝の先天性巨大血小板性血小板減少症（CMTP）7家系中、3家系において同定されたACTN1遺伝子異常候補のバリデーションのため、

新たに優性遺伝を呈する7家系のCMTP家系を追加し、サンガーシーケンス法にてACTN1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、および120例の正常コントロール検体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ACTN1遺伝子の全ての構造領域の配列を決定した。

ACTN1変異の機能解析として、全長ACTN1 cDNAをCHO細胞へ発現させ、ACTN1蛋白およびアクチン繊維の細胞内局在を解析した。

マウス胎児肝細胞へレトロウイルスを用いてACTN1 cDNAを感染させ、巨核球へ分化後、細胞骨格蛋白再構成と胞体突起形成能を解析した。

1家系において同定されたGFI1b遺伝子異常候補のバリデーションのため、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。

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

7家系の CMTP の全エクソン解析では NCBI SNP データベースおよび in-house データベースに登録されない 3,601 個の新規塩基置換が同定された。この内、360 個の塩基置換はそれぞれの家系において巨大血小板性血小板減少症との連鎖が認められた。統計学的解析により、ACTN1 遺伝子に有意に変異があることが判明した。3家系において3種類の変異 (c.313G>A (p.Val105Ile)、c.94C>A (p.Gln32Lys)、c.2255G>A (p.Arg752Gln)) がそれぞれの家系で巨大血小板性血小板減少症との連鎖が認められた。追加の7家系の優性遺伝 CMTP 家系でサンガーシーケンス解析を行ったところ、さらに異なる3種類の変異 (c.137G>A106 (p.Arg46Gln)、c.2212C>T (p.Arg738Trp)、c.673G>A (p.Glu225Lys)) が同定された。遺伝形式の不明な39症例の CMTP、および120例の正常コントロール検体では ACTN1 遺伝子変異は同定されなかった。同定された変異は保存されたアミノ酸残基に起こり、機能予測プログラムにより機能阻害が示唆された。

ACTN1 cDNA を CHO 細胞に発現させたところ、野生型 ACTN1 蛋白はアクチン繊維との共局在を示したが、CMTP 症例で同定された変異を有

する ACTN1 cDNA を導入した細胞では ACTN1 蛋白のアクチン繊維との繊細な共局在は観察されなかった。

マウス胎児肝細胞由来培養巨核球での発現実験においては、CHO 細胞と同様に変異型 ACTN1 蛋白がアクチン繊維へ取り込まれなかった。また、巨核球をトロンボポエチン存在下に培養し、胞体突起形成を解析したところ、野生型 ACTN1 cDNA 導入細胞と比較して、変異型を導入した細胞では胞体突起の末端数が少なく、末端サイズは大型で大小不同が観察された。

1家系では、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 (TGFB3R3 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は病因不明な疾患がおおいため、鑑別診断される症例は半数に満たない。

現在までに、血小板蛋白の生化学および分子生物学的解析やポジショナルクローニングに代表される遺伝学解析によりいくつかの原因遺伝子が同定されてきた。しかし、血小板減少のため解析に供する血小板分離困難や、連鎖解析が可能となる大家系は稀であることにより、その他の稀少疾患の原因遺伝子の同定は困難であった。次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析はこれら稀少な先天性血小板減少症の原因遺伝子同定に進展をもたらすと考えられる。

血小板は、骨髄において成熟巨核球から微小管により進展される胞体突起が形成され、個々の胞体突起末端部が流血中に放出されることにより産生されると考えられている。巨核球の分化成熟は転写因子や液性因子により時空間的に制御され、胞体突起形成時には細胞骨格蛋白の再構成が行われる。既知の *CMTP* 原因遺伝子異常の多くは巨核球特異的細胞骨格蛋白や関連する受容体／信号伝達に起こる。*ACTN1* 蛋白はアクチンを架橋することによりアクチン繊維の形成に働く。胞体突起はチューブリンから成る微小管により進展され、アクチンにより分岐される。正常な胞体突起分岐が行われないことは胞体突起末端数の低下を来すことが考えられ、実際に変異型 *ACTN1* を発現させた培養巨核球では、胞体突起の末端数が少なく、末端サイズは大型で大小不同が観察され、患者で見られる巨大血小板と血小板減少に一致した。

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

効率的に研究が行なわれ、学術的・国際的・社会的意義のある研究成果を世に出すことができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kunishima S, Kashiwagi H, Otsu M, Takayama N, Eto K, Onodera M, Miyajima Y, Takamatsu Y, Suzumiya J, Matsubara K, Tomiyama Y, Saito H: Heterozygous *ITGA2B* R995W mutation inducing constitutive activation of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 receptor affects proplatelet formation and causes congenital macrothrombocytopenia. *Blood* 117:5479-84, 2011.
- 2) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Naoe T, Saito H, Kojima T: Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin-resistance. *New Engl J Med* 366:2390-6, 2012.
- 3) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S: *ACTN1* mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet* 92:431-8, 2013.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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.

## 2. 学会発表

### 海外

- 1) Modeling congenital amegakaryocytic thrombocytopenia using patient-specific induced pluripotent stem cells: Takayama N, Hirata S, Jono-Ohnishi J, Nakamura S, Hirose S, Endo H, Nishi M, Hamazaki Y, Ishii E, Kaneko S, Nakauchi H, Kunishima S, Eto K 53<sup>rd</sup> American Society for Hematology Annual Meeting and Exposition, December 2011, San Diego, CA, USA.
- 2) International Consortium for the study of clinical and molecular aspects of Bernard-Soulier syndrome: Savoia A, Kunishima S, Noris P, Pujol-Moix P, Kenny D, Rosenberg N, Rand M, Zeiger B, Gargouri A, Beltrame MP, Karimi M, Ward CM, Kuriakose P, Ewing NP, Diamond CA, Rao JG, Balduini CL,

Lanza F 53<sup>rd</sup> American Society for Hematology Annual Meeting and Exposition, December 2011, San Diego, CA, USA.

- 3) Mutations identified in thrombocytopenia *THC2* are likely to dysregulate *ANKRD26* expression: Gnan C, Noris P, Molinas F, Kunishima S, Valencic E, Seri M, Perrotta S, Balduini CL, Savoia A: 53<sup>rd</sup> American Society for Hematology Annual Meeting and Exposition, December 2011, San Diego, CA, USA.
- 4) Platelet function tests : Shinji Kunishima International Workshop on Hemostasis and Thrombosis, Bangkok May 2013
- 5) Inherited platelet disorders : Shinji Kunishima International Workshop on Hemostasis and Thrombosis, Bangkok May 2013
- 6) Mutations responsible for *ANKRD26*-related thrombocytopenia increase the risk of hematological malignancies but are not frequently involved in de novo acute leukemias : Carlo Balduini, Jennifer 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
- 7) *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

国内

- 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) 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
- 3) 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
- 4) *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
- 5) 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

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：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る。本研究班活動により遺伝子情報を含む詳細な診断、既存症例の見直しや潜在する症例が見出されつつある。これら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. 本研究班活動により遺伝子情報が精査された症例、診断の見直し症例についての集計は進行中

である。

c. 貧血疾患：Fanconi anemia, FA と Diamond-Blackfan 貧血, DBA が代表的疾患である。FA は本研究班の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た。Congenital Dyserythropoietic anemia, Sideroblastic anemia は小児で極めて稀で、3年間で1例程である。

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 疾患である慢性良性好中球減少に対して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。

d. 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事が予想され、これからの登録症例数に反映されると予想している。今回の研究期間中にはその impact を評価する事は出来なかった。

従来の診断の手引きを用いた臨床診断と、遺伝子診断を統合した稀少血液疾患のデータベースを構築することで、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。

## 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

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

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
Fanconi Anemia	5	4	6	1	4	2	5
Diamond-Blackfan Anemia	9	6	9	10	6	8	6
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6
Schwachman-Diamond	0	1	1	2	0	0	2
Cong.Dyserythropoietic Anemia	0	1	1	0	0	1	0
Sideroblastic Anemia	0	0	2	1	1	0	0
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	3
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0
May-Hegglin anormally	3	6	6	3	3	0	1
Bernard-Soulier syndrome	1	2	2	1	2	0	4
Glanzmanns Thrombathenia,	1	0	4	3	3	2	1

As of June 2013

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。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遺伝子の検索を行った。

## A. 研究目的

小児遺伝性血液疾患の多くは極めて稀であるが、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る。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)**、**Shwachman-Diamond syndrome(SBDS)**、**先天性血小板減少症**、**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た全エクソンシーケンス・全ゲノムシーケンスをおこない、原因遺伝子を同定することを目的としている。**

また、当研究室で解析を行った TAM は、Down 症候群児の約 10% で新生児期に認められる骨髄増殖性疾患であり、通常自然寛解が得られるが、

肝不全などによる早期死亡が 20% 程度に認められる。また、寛解が得られた症例でも、20-30% 程度が数年以内に急性巨核芽球性白血病 (DS-AMKL) を発症する。従来、TAM および AMKL ではほぼ全症例に *GATA1* 遺伝子の変異が認められることが知られていたが、それ以外の遺伝子異常についてはあまりわかっていなかったため、その遺伝学的背景を明らかにするために解析を行った。

## B. 研究方法

SNP アレイ解析には一塩基多型 (SNP) プローブを高密度に配置した 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。ゲノム全域にわたる網羅的なゲノムコピー数やアレル不均衡の解析を行い、ゲノム異常の詳細について検討を行った。

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ピオチン化された 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

当研究班内には、全国調査で把握された症例の 80% の検体が保存されているが、これまでに収集した検体の約半数にあたる 579 検体では原因遺伝子が未だ検出されていないことが判明していなかった。これらの症例に加えて新規の症例を集積し、これまでに当研究室で 634 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)。

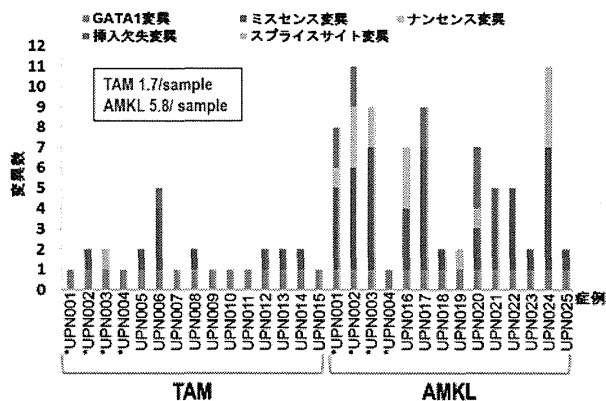


図 1 29 例の TAM、AMKL の全エクソンシーケンスによって同定された変異の個数

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.L611R	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* 遺伝子以外は今までは 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。

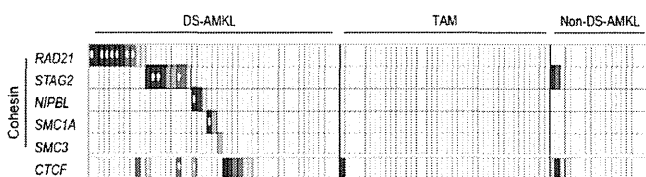


図 2 コヒーシン複合体/CTCF の遺伝子異常

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)。

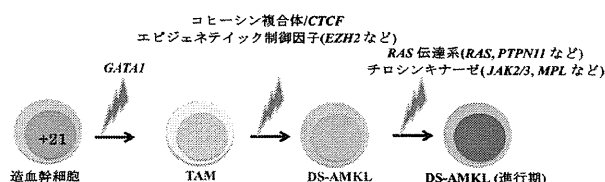


図 3 DS-AMKL の多段階発症のモデル

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遺伝性疾患の解析により、TAM、DS-AMKL などで多くの新規の遺伝子変異が同定され、小児稀少遺伝性血液疾患の研究に大きな成果をあげることができた。今回の成果をもとに、今後同疾患の生物学的理解が進み、また予後予測、遺伝子診断、標的治療につながる可能性もある。今後さらに新規の原因遺伝子の同定を進めるとともに、次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断を行うシステムが構築されることが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature.



- 2011;478(7367):64-69.
- 2) Yoshida K, Sanada M, Kato M, Kawahata R, Matsubara A, Takita J, Shih LY, Mori H, Koeffler HP, Ogawa S. A nonsense mutation of IDH1 in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia*. 2011;25(1):184-186.
  - 3) Thoennissen NH, Lasho T, Thoennissen GB, Ogawa S, Tefferi A, Koeffler HP. Novel CUX1 missense mutation in association with 7q- at leukemic transformation of MPN. *Am J Hematol*. 2011;86(8):703-705.
  - 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*. 2011;102(9):1645-1650.
  - 5) Takahashi K, Oka A, Mizuguchi M, Saitoh M, Takita J, Sato A, Mimaki M, Kato M, Ogawa S, Igarashi T. Interstitial deletion of 13q14.13-q32.3 presenting with Arima syndrome and bilateral retinoblastoma. *Brain & development*. 2011;33(4):353-356.
  - 6) Seo S, Nakamoto T, Takeshita M, Lu J, Sato T, Suzuki T, Kamikubo Y, Ichikawa M, Noda M, Ogawa S, Honda H, Oda H, Kurokawa M. Cas-L regulates myeloid cell motility and suppresses progression of leukemia induced by p210Bcr/Abl. *Cancer Sci*. 2011;102(12):2109-2117.
  - 7) Sakata-Yanagimoto M, Sakai T, Miyake Y, Saito TI, Maruyama H, Morishita Y, Nakagami-Yamaguchi E, Kumano K, Yagita H, Fukayama M, Ogawa S, Kurokawa M, Yasutomo K, Chiba S. Notch2 signaling is required for proper mast cell distribution and mucosal immunity in the intestine. *Blood*. 2011;117(1):128-134.
  - 8) 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*. 2011;25(2):382-384.
  - 9) Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y. Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma. *Cancer Sci*. 2011;102(2):302-308.
  - 10) Koren-Michowitz M, Sato-Otsubo A, Nagler A, Haferlach T, Ogawa S, Koeffler HP. Older patients with normal karyotype acute myeloid leukemia have a higher rate of genomic changes compared to young patients as determined by SNP array analysis. *Leuk Res*. 2011;36(4):467-473.
  - 11) Katagiri T, Sato-Otsubo A, Kashiwase K, Morishima S, Sato Y, Mori Y, Kato M, Sanada M, Morishima Y, Hosokawa K, Sasaki Y, Ohtake S, Ogawa S, Nakao S. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood*. 2011.
  - 12) Kao HW, Sanada M, Liang DC, Lai CL, Lee EH, Kuo MC, Lin TL, Shih YS, Wu JH, Huang CF, Ogawa S, Shih LY. A high occurrence of acquisition and/or expansion of C-CBL mutant clones in the progression of high-risk myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Neoplasia*. 2011;13(11):1035-1042.
  - 13) Iwakawa R, Kohno T, Kato M, Shiraishi K, Tsuta K, Noguchi M, Ogawa S, Yokota J. MYC amplification as a prognostic marker of early-stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clinical cancer research*. 2011;17(6):1481-1489.
  - 14) Yamamura T, Hikita J, Bleakley M, Hirosawa T, Sato-Otsubo A, Torikai H,

- Hamajima T, Nannya Y, Demachi-Okamura A, Maruya E, Saji H, Yamamoto Y, Takahashi T, Emi N, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Riddell SR, Ogawa S, Akatsuka Y. HapMap SNP Scanner: an online program to mine SNPs responsible for cell phenotype. *Tissue antigens*. 2012;80(2):119-125.
- 15) Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, Matsuda Y, Sato-Otsubo A, Muto S, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Polycomb-Mediated Loss of miR-31 Activates NIK-Dependent NF-kappaB Pathway in Adult T Cell Leukemia and Other Cancers. *Cancer Cell*. 2012;21(1):121-135.
- 16) Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda ZI, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia*. 2012;26(12):2557-2560.
- 17) Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood*. 2012;120(6):1299-1308.
- 18) 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*. 2012;26(8):1879-1881.
- 19) 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*. 2012;156(5):672-674.
- 20) Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Sato-Otsubo 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 (FPD/AML). *Blood*. 2012;119(11):2612-2614.
- 21) Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S. Single-nucleotide polymorphism array karyotyping in clinical practice: where, when, and how? *Semin Oncol*. 2012;39(1):13-25.
- 22) 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*. 2012;31(44):4667-4676.
- 23) Ogawa S. Splicing factor mutations in myelodysplasia. *International journal of hematology*. 2012;96(4):438-442.
- 24) Nowak D, Klaumuenzer M, Hanfstein B, Mossner M, Nolte F, Nowak V, Oblaender J, Hecht A, Hutter G, Ogawa S, Kohlmann A, Haferlach C, Schlegelberger B, Braess J, Seifarth W, Fabarius A, Erben P, Saussele S, Muller MC, Reiter A, Buechner T, Weiss C, Hofmann WK, Lengfelder E. SNP array analysis of acute promyelocytic leukemia may be of prognostic relevance and identifies a potential high risk group with recurrent deletions on chromosomal

- subband 1q31.3. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(8):756-767.
- 25) Nomoto J, Hiramoto N, Kato M, Sanada M, Maeshima AM, Taniguchi H, Hosoda F, Asakura Y, Munakata W, Sekiguchi N, Maruyama D, Watanabe T, Nakagama H, Takeuchi K, Tobinai K, Ogawa S, Kobayashi Y. Deletion of the TNFAIP3/A20 gene detected by FICTION analysis in classical Hodgkin lymphoma. *BMC cancer*. 2012;12(1):457.
- 26) Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, Ogawa S, Koeffler HP, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*. 2012;120(15):3080-3088.
- 27) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2012;119(10):2376-2384.
- 28) Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, Sakamoto H, Tsuta K, Furuta K, Shimada Y, Iwakawa R, Ogiwara H, Oike T, Enari M, Schetter AJ, Okayama H, Haugen A, Skaug V, Chiku S, Yamanaka I, Arai Y, Watanabe SI, Sekine I, Ogawa S, Harris CC, Tsuda H, Yoshida T, Yokota J, Shibata T. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2012;18(3):375-377.
- 29) Kamada Y, Sakata-Yanagimoto M, Sanada M, Sato-Otsubo A, Enami T, Suzukawa K, Kurita N, Nishikii H, Yokoyama Y, Okoshi Y, Hasegawa Y, Ogawa S, Chiba S. Identification of unbalanced genome copy number abnormalities in patients with multiple myeloma by single-nucleotide polymorphism genotyping microarray analysis. *International journal of hematology*. 2012;96(4):492-500.
- 30) Iwakawa R, Okayama H, Kohno T, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Yokota J. Contribution of germline mutations to PARK2 gene inactivation in lung adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(5):462-472.
- 31) Hosokawa K, Katagiri T, Sugimori N, Ishiyama K, Sasaki Y, Seiki Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S, Nakao S. Favorable outcome of patients who have 13q deletion: a suggestion for revision of the WHO 'MDS-U' designation. *Haematologica*. 2012;97(12):1845-1849.
- 32) Hirabayashi S, Flotho C, Moetter J, Heuser M, Hasle H, Gruhn B, Klingebiel T, Thol F, Schlegelberger B, Baumann I, Strahm B, Stary J, Locatelli F, Zecca M, Bergstraesser E, Dworzak M, van den Heuvel-Eibrink MM, De Moerloose B, Ogawa S, Niemeyer CM, Wlodarski MW. Spliceosomal gene aberrations are rare, coexist with oncogenic mutations, and are unlikely to exert a driver effect in childhood MDS and JMML. *Blood*. 2012;119(11):e96-99.
- 33) 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.
- 34) Yoshida K, Sanada M, Ogawa S. Deep sequencing in cancer research. *Jpn J Clin Oncol.* 2013;43(2):110-115.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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