

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書

小児白血病におけるバイオマーカーによる早期診断技術の確立と実用化に関する研究

「小児ALLの網羅的遺伝子解析研究による新規予後不良因子の同定と
治療開始早期の層別化の検討に関する研究」

業務主任者又は担当責任者

担当責任者 今村 俊彦 京都府立医科大学小児科講師

研究要旨

小児 ALL における治療開始後早期の層別化を可能にするバイオマーカーを見出すため、トランスクリプトーム解析を含む遺伝子解析を行い、ABL1, PDGFRB, JAK2 の再構成が重要である事を明らかにし、FISH によるスクリーニングシステムを確立する事を今後の目標とする。

A. 研究目的

小児ALLにおける治療開始後早期の層別化を可能にするバイオマーカーを見出し、そのスクリーニングシステムを確立する事を本研究の目的とする。

B. 研究方法

日本小児白血病研究 (JACLS) 登録小児ALLの臨床検体を用いた、網羅的遺伝子解析研究を含んだ遺伝子解析を行い、予後に関連し、治療開始早期の層別化に係るバイオマーカーのスクリーニングシステムを確立する。

(倫理面への配慮)

臨床検体は検体保存時に包括同意を得た検体を用い、遺伝子解析については京都府立医科大学倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

今年度は、研究成果として小児ALLにおいて、LNK 遺伝子の高発現およびABL1, PDGFRB, JAK2を含むチロシンキナーゼやサイトカイン受容体の再構成が層別化因子および治療標的として有用である事を見出した。ABL1, PDGFRB, JAK2の再構成にちては、FISH 解析の系を構築し、スクリーニング検査の体制作りを目指している。また、再発T-ALL患者でJAK3変異のUPDを見出した。

D. 考察

チロシンキナーゼの再構成をFISH検査で効率よく見いだせれば、これらの再構成陽性の小児ALLの予後が飛躍的に改善する事が期待される。

E. 結論

今年度の研究で、治療早期の層別化を可能とするバイオマーカーとして、ABL1, PDGFRB, JAK2の再構成が重要である事が示唆されたので、FISHによるスクリーニングの系を確立し、これら再構成が陽性である小児ALLのチロシンキナーゼ阻害剤投与試験の一助となるよう努めたい。

F. 健康危険情報
該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

Yano M, Imamura T, Asai D, et al. An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with CRLF2 overexpression. Genes Chromosomes Cancer. 2014; 53(10):815-23

Kawashima-Goto S, Imamura T, Seki M, et al. Identification of homozygous JAK3 V674A mutation caused by acquired uniparental disomy in a relapse early T cell precursor ALL patient Int J Hematol. 2014 Epub ahead of print

2. 学会発表

Yano M, Imamura T, Asai D, et al. Messenger RNA sequencing in pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia with IKZF1 deletion. 第56回日本小児血液がん学会

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

取得なし

2. 実用新案登録

登録なし

3. その他

特記事項無

小児白血病におけるバイオマーカーによる早期診断技術の確立と実用化に関する研究

「欠失型および複雑型染色体異常の評価法および診断法の開発」

業務主任者又は担当責任者

滝 智彦 京都府立医科大学大学院医学研究科 講師

研究要旨

小児白血病の重要な予後因子であり、診断困難な欠失型を中心とする染色体異常を正確に診断する方法について検討を行った。SKY法とゲノムアレイ法という特徴の異なる高精度の解析法の結果を詳細に比較検討したが、両者で一致する切断点を同定するのは非常に困難であることが判明した。臨床での治療選択の基準として使用するために、どのレベルの検査が必要であるかを検討する必要があるとともに、これらの異常の真の責任領域を明らかにすることが重要である。

A. 研究目的

小児白血病における予後に重要な影響を及ぼす染色体異常のうち、急性骨髄性白血病における5q-やモノソミー7などの欠失型の染色体異常、急性リンパ性白血病における低2倍体、その他どの病型においても予後不良に関係すると考えられる複雑型染色体異常については、それぞれの異常の責任領域が未だ不明であり、正確な診断法が確定していない。これらの異常を有する白血病細胞のゲノム異常を様々な方法により詳細に解析し、より精度の高い診断法の確立を目指す。

B. 研究方法

欠失型および複雑型染色体異常の評価法および診断法を開発するための基礎データを収集するために各種造血器腫瘍細胞株8株を用いてSKY (spectral karyotyping) 法とゲノムアレイ法を行って両者の結果を比較検討した。

(倫理面への配慮)

今年度は細胞株のみの解析を行った。

C. 研究結果

SKY法によって同定できた切断点は1細胞株あたり7~26箇所（平均：19箇所）であった。このうち、SKY法での切断点が7箇所のみだった1細胞株では、該当する箇所のコピー数の変化をゲノムアレイでは検出できなかったが、他の細胞株では6~19箇所の切断点に相当すると考えられるコピー数変化部位を同定できた。しかし、バンドレベルでSKY法とゲノムアレイでの切断点（コピー数変化部位）が完全に一致した部位は非常に少なかった。また、いずれの細胞株にも、SKY法で検出した切断点の数とほぼ同じか、それ以上の他のコピー数変化部位が存在していた。そのため、ゲノムアレイでのどの部位の変化がSKY法での切断点に一致するのかを最終的に決定できた部位は非常に少なかった。

D. 考察

染色体再構成を同定する方法としてのSKY法は、G分染法に比べて高解像度の方法であるが、多数の切断点を有する複雑核型ではゲノムアレイ法によるコピー数変化部位との比較検討でも、両検査法での切断点（再構成部位）を一致させることは非常に困難であった。臨床上重要な染色体異常の一つである5q-が疑われる症例ほとんどが複雑核型であり、もっとも診断が難しい核型である。JPLSG AML-05登録症例中の5q-が疑われた症例12例のG分染法での切断点（由来不明部分を含む）は1症例あたり5~19箇所（平均11箇所）であり、今回検討した細胞株での切断点より少ない傾向だった。しかし、切断点が比較的少ない細胞株（ゲノムアレイでコピー数変化を検出できなかった1細胞株を除く）でも、両検査法での切断点を一致させることは困難であったことから、臨床検体を解析した場合も同様の問題が生じることが予想される。一方、このようにこれらの染色体異常の診断が困難である最大の原因は、これらの異常の真の責任領域が不明であることである。したがって、引き続きその探索を行っていくことが重要である。

E. 結論

複雑な核型では、原理や解像度が異なる方法での解析結果を一致させることは難しい。単に高解像度を求めるのではなく、臨床で必要十分な結果を得るために最適な診断法を開発することが重要である。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Chinen Y, Taki T, Tsutsumi Y, Kobayashi S, Matsumoto Y, Sakamoto N, Kuroda J, Horiike S,

Nishida K, Ohno H, Uike N, Taniwaki M. The leucine twenty homeobox (LEUTX) gene, which lacks a histone acetyltransferase domain, is fused to KAT6A in therapy-related AML with t(8;19)(p11;q13). *Genes Chromosomes Cancer* 53: 299-308, 2014

2) Kobayashi S, Taki T, Nagoshi H, Chinen Y, Yokokawa Y, Kanegane H, Matsumoto Y, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Taniwaki M. Identification of novel fusion genes with 28S ribosomal DNA in hematologic malignancies. *Int J Oncol* 44: 1193-1198, 2014

3) Chinen Y, Sakamoto N, Nagoshi H, Taki T, Maegawa S, Tatekawa S, Tsukamoto T, Mizutani S, Shimura Y, Yamamoto-Sugitani M, Kobayashi T, Matsumoto Y, Horiike S, Kuroda J, Taniwaki M. 8q24 amplified segments involve novel fusion genes between NSMCE2 and long noncoding RNAs in acute myelogenous leukemia. *J Hematol Oncol* 7: 68, 2014

4) Kawamura M, Taki T, Kaku H, Ohki K, Hayashi Y. Identification of SPAG9 as a novel JAK2 fusion partner gene in paediatric acute lymphoblastic leukaemia with t(9;17)(p24;q21). *Genes Chromosomes Cancer* in press

2. 学会発表

1) 犬飼岳史, 滝 智彦, 根本 篤, 赤羽 弘資, 合井久美子, 黒田 格, 廣瀬衣子, 阿部正子, 加賀美恵子, 杉田完爾: 卵巣胚細胞腫から発症した急性骨髄性白血病のゲノム解析. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会. 2014年11月28日

2) 石丸紗恵, 斎藤雄弥, 横川裕一, 加藤元博, 清河信敬, 滝 智彦, 金子 隆, 湯坐有希: 低二倍体の急性リンパ芽球性白血病の3症例. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会. 2014年11月29日

3) 川村眞智子, 賀来秀文, 滝 智彦, 大木健太郎, 林 泰秀: t(9;17)(p24;q21)をもつ思春期急性リンパ性白血病における新規JAK2融合遺伝子の同定. 第56回日本小児血液・がん学会学術集会. 2014年11月30日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得 予定なし
2. 実用新案登録 予定なし
3. その他 特になし

白血病のキャンサーパネルの確立に関する研究

研究分担者 嶋田 明 岡山大学病院小児科講師

研究要旨

小児白血病（ALL, AML）の予後は改善されたが、いまだ再発・難治例も多い。卓上型次世代シーケンサーを使用して、小児白血病に関与する約 150 遺伝子を網羅的に解析する白血病パネルの作製を目指した。解析例では KRAS, NRAS, CREBBP, SETBP1, MLH1, IKZF1, GATA1, PU.1 などがみついている。今後はパネルの改良のみならず、次世代シーケンサーの解析で得られた分子標的を target とする薬剤の探索を組みこむなどの、臨床応用を模索している。

A. 研究目的

小児白血病により特異的で、迅速かつ安価に利用できる白血病に関連した遺伝子解析パネルの開発を目指す。

B. 研究方法

小児白血病パネルにのせる遺伝子についてはこれまでの研究で白血病の予後との関連がわかっている遺伝子群のほかに、MDS や小児に特有の免疫不全症、染色体異常にかかわる遺伝子なども選定した白血病パネル Ver1.0 を作成した (Agilent 社, Haloplex カスタマイズネル)。実際の解析は卓上型シーケンサーである MiSeq で行った。出てきたデータについては SureCall (Agilent 社) というソフトウェアで解析し、遺伝子候補の選定を行う。できるものについては別の方法 (Sanger 法、Pyrosequencing 法) で確認した。

(倫理面への配慮)

実際の解析に際しては、検体に番号が振られて匿名化され、個人情報保護される。

臨床情報と照らし合わせる時のみ、符号表で確認する。本研究は当院の倫理委員会承認済みである。

C. 研究結果

現在のところ、10 数名の解析が終了しているが、初発、寛解、再発で解析できた症例については、ALL では KRAS, NRAS, CREBBP, SETBP1, MLH1, AML では IKZF1, GATA1, PU.1 などの変異が見つかり、予後との関連が示唆された。また 1-10% などの従来のサンガー法では検出できない、低頻度の変異も解析可能であった。

D. 考察

本法は、1 検体 250ng と少ない DNA 量から開始でき、ほかの次世代解析でよく使用されるソニケーションなどの手技を必要としないため、比較的簡単に素早く結果を得ることができること、また bioinformatics に精通していないユーザーでも、ソフトウェアと、dbSNP, COSMIC などの online デー

データベースを利用することで、比較的簡単に最終結果までたどり着ける点は利点と考えられた。このため将来的には初診の患者さんが来て、寛解導入療法を終了する 1-1.5 か月以内に結果が判明し、治療強度の調整に応用していくことも十分可能と考えられる。また再発検体では本法で得られた分子標的を target とする薬を MTT 法などでスクリーニングし、難治再発例の臨床応用につなげていくことも可能と考えられる。

欠点としては、本法の酵素処理部位の変異があった場合は見逃すこと、変異の候補が比較的多数見つかるため、寛解期検体での引き算は必須と考えられる。

E. 結論

F. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

準備中

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

次世代シーケンサーを用いた超高感度微小残存白血病の検出

研究分担者 加藤 元博 東京大学医学部附属病院 講師

研究要旨： 小児白血病の治療成績の進歩には、治療反応性による層別化が重要な役割を果たしており、高感度に残存病変の定量を行うことの意義が広く確認されている。本研究では、次世代シーケンサーを用いて、現在用いられている PCR 法を用いた微小残存病変（MRD）の検出法よりも広い対象範囲で、さらに高感度な検出の検査系を確立することを目的としている。実際に、一塩基多型を標的とした仮想的な検体では、少なくとも 10^{-4} の感度で検出が可能であった。さらに感度を高めることと、臨床的な意義を確認することで、実際の治療戦略への応用が可能になると期待される。

A. 研究目的

“予後予測因子による層別化治療”は小児急性白血病の治療骨格の根幹をなす要素のひとつである。これまでの臨床試験の積み重ねによって確認された予後に関係する因子によって白血病の難治度を予測し、再発リスクに応じた強度の治療を行うことで、不要な合併症を回避しながら長期生存率の向上が達成されてきた。

小児白血病の予後予測因子として、微小残存病変（minimal residual disease: MRD）を精密に測定することの有用性が認識され、国内外の臨床試験においても層別化因子として用いられている。

本研究では、次世代シーケンサーを用い、従来の PCR を主体とした MRD 検出法よりも広い対象で、かつより高感度に検出可能な検査系を確立することを目的とする。その成果は、より正確な再発リスクの推定を可能とし、個々の症例に最適な強度での個別化治療の確立へとつながることが期待される。

B. 研究方法

次世代シーケンサーを用いた検査系の検出感度および定量性を確認する目的で、仮想的な臨床検体とするために、異なる個人の末梢血由来の DNA を段階的な希釈系列（1 倍 = 10^0 から 10^{-6} ）で作成した。異なる一塩基多型（SNP）を SNP アレイ

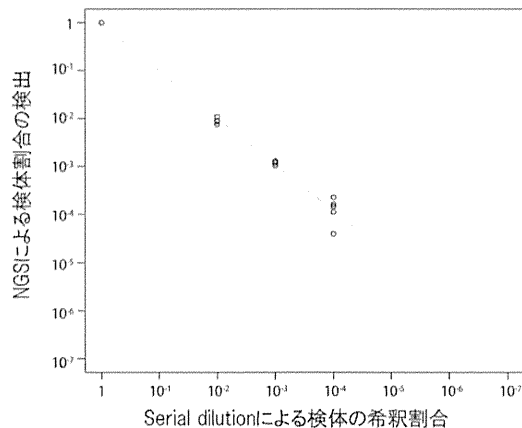
を用いて異なる染色体上の 8 箇所特定し、その箇所を標的として次世代シーケンサー（Illumina HiSeq2000）で deep sequencing を行い、得られた read から DNA の混合比をどの程度推定できるかを解析した。

（倫理面への配慮）

本研究で行った臨床検体を用いた実験は、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」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

次世代シーケンサーでの deep sequencing により、1 箇所の SNP あたり平均で 50 万の read が得られた。測定は 8 箇所の SNP を対象として行ったが、どの SNP 箇所でもばらつきはきわめて小さく、 10^{-4} までは高い定量性をもって DNA の混合比を測定することが可能であった（次ページ図）。 10^{-5} は定量性が担保されなかった。



D. 考察

平均の読み取り深度は50万であったことから、理論的な定量性は 10^{-5} を上回ることができるが、読み取りの重複や、試料中に存在するDNAのモル数の限界、次世代シーケンサーのsequence by synthesisの際のエラーなどにより、現行の解析アルゴリズムでは 10^{-4} が検出感度の限界であった。

しかし、その 10^{-4} まではきわめて高い定量性をもって微量なDNAの混入を検出することが確認された。従来のMRD検出法は、Ig/TCRの配列がモノクローナルであること、白血病細胞に固有のIg/TCRに対する特異的なPCR系が確立できること、この2点に依存しているため、本検査法によるMRD検出は、これらの2点に制限されずに同等の感度で検出が可能であることが示された。

今後の方向性として、以下の2点を考える。

1) 解析系の最適化・解析アルゴリズムの改善

解析に投入するDNA量や、次世代シーケンサーへの投入までのPCRサイクル数の制限、解析後データの統計処理などにより、より信頼性の高い定量範囲を広げることを目指す。

2) 実際の臨床検体でのMRD検出と、その意義の確認

白血病患者の寛解期検体から本件作法でMRD検出を行い、臨床経過との関連を調べることで、本検査によるMRD検出の臨床的な意義を探索する。

E. 結論

本研究により、次世代シーケンサーによるMRD検出は、従来の方法による検出よりも同等以上の検出感度が可能であることが示された。再発リスクをより広い症例範囲で正確に予測することで、適切な治療強度の選択が可能になり、治療の進歩に貢献しうることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kato M, Imamura T, Manabe A, Hashii Y, Koh K, Sato A, Takahashi H, Hori H, Taki T, Inoue M, Hayashi Y, Horibe K, Tsuchida M, Kojima S, Oda M, Ohara A. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) and Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS). *Br J Haematol* 164:376-83, 2014
2. Kawashima-Goto S, Imamura T, Seki M, Kato M, Yoshida K, Sugimoto A, Kaneda D, Fujiki A, Miyachi M, Nakatani T, Osone S, Ishida H, Taki T, Takita J, Shiraichi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Hosoi H. Identification of a homozygous JAK3 V674A mutation caused by acquired uniparental disomy in a relapsed early T-cell precursor ALL patient. *Int J Hematol* 2014 Nov 29[Epub ahead of print]
3. Nowak D, Liem NM, Mossner M, Klaumuenzer, Papa RA, Nowak V, Jann JC, Akagi T, Kawamata N, Okamoto R, Thoennissen NH, Kato M, Sanada M, Hofmann WK, Ogawa S, Marshall GM, Lock RB, Koeffler PH. Variegated clonality and rapid emergence of new molecular lesions in xenografts of acute lymphoblastic leukemia (ALL) are associated with drug resistance. *Exp Hematol* 43:32-43, 2015
4. Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Shimamura T, Sato Y, Nishimura R,

Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kato K, Kato M, Hanada R, Nomura Y, Park MJ, Ishida T, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Biallelic DICER1 mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma. *Cancer Res* 74:2742-9, 2014

2. 学会発表

1. Kato M, Manabe A, Ishimaru S, Tomizawa D, Hasegawa D, Inukai T, Arakawa Y, Aoki T, Okuya M, Kaizu K, Kato K, Taneyama Y, Koh K, Tsuchida M, Ohara A. Long-term outcome of six months maintenance chemotherapy for ALL in children: An extended follow up study of TCCSG L92-13. 56th Annual meeting of American Society of Hematology, 2014
2. Seki M, Yoshida K, Shiraichi Y, Chiba K, Tanaka H, Kato M, Hanada R, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Whole exome and transcriptome analyses in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia 56th Annual meeting of American Society of Hematology, 2014
3. Seki M, Kato M, Ohyama R, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Arakawa Y, Kishimoto H, Sanada M, Miyano S, Oka A, Hanada R, Ogawa S, Koh K, Takita J. Integrative genome analysis of T cell acute lymphoblastic leukemia with subsequent development of Langerhans cell histiocytosis 第76回日本血液学会

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
特になし

小児白血病におけるバイオマーカーによる早期診断技術の確立と実用化に関する研究

「MicroRNA を標的とした MRD 測定系の開発と白血病制御に関する基盤技術の開発に関する研究」

業務主任者又は担当責任者

担当責任者 平松 英文 京都大学大学院医学研究科・発達小児科学・講師

研究要旨

小児白血病において微小残存病変（MRD; minimal residual disease）は予後を規定する因子として重要性が確立しているが、測定には高度の技術を要する。本研究では近年有用性が注目されている末梢血中の microRNA が新たな MRD マーカーとなりえないか、検討を行う。末梢血における microRNA は数日にわたって安定であることが確認されたが、種々の治療薬が測定に影響を及ぼす可能性が考えられ、今後、初発患者の検体を収集し、候補 microRNA の選定を行っていく予定である。

A. 研究目的

小児白血病では治療中の MRD が予後を規定する重要な因子として治療の層別化に用いられている。複数の測定法が実用化されているが、一般に精密で高度な技術を要する。

microRNA が様々ながんにおいて発現の異常を来していること、さらに microRNA が末梢血液中にも安定して存在していることに着目し、白血病患者における末梢血中の microRNA の推移が新たな MRD 測定系になり得ないかを検証し、簡便で有用な MRD 解析系の確立を目指す。

B. 研究方法

初発の小児白血病患者において、治療前の末梢血ならびに化学療法を 1～数コース終了後の寛解状態の患者末梢血をペアで採取し、PCR Array を用いて microRNA を網羅的に解析し、白血病細胞の増減と高い相関を示す末梢血中の microRNA を同定する。併せて、測定されているフローサイトメトリー法もしくは PCR 法による MRD 測定と比較検討を行う。なお、患者末梢血は臨床上必要な採血の残余献体を用いて行い、患者及び若しくは代諾者の書面による承諾を得て測定を行う。

C. 研究結果

本年度は患者検体収集にむけたシステム作りと PCR array による microRNA の網羅的解析系の立ち上げを行った。末梢血液中の microRNA は数

日にわたって安定であることが確認できた。また、患者は治療中であるため、種々の薬剤治療を受けており、ときとして測定系に影響することが考えられ、できるだけ治療前採血が望ましいと考えられた。

D. 考察

microRNA が末梢血中で安定であることから遠方からの送付でも測定に大きな問題を来さないことがわかった。今後、承諾の得られた患者から初診時と寛解導入後の末梢血をペアで採取し、網羅的 microRNA 解析データを蓄積していく。

F. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

G. 研究発表

なし

F. 健康危険情報 該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

取得なし

2. 実用新案登録

登録なし

3. その他 特記事項無

小児白血病におけるバイオマーカーによる早期診断技術の確立と実用化に関する研究

「小児 AML における RNA シーケンスによるリスク層別化技術の精度向上」

業務主任者又は担当責任者
柴徳生 群馬大学小児科 助教

研究要旨

正常核型 AML を中心に 47 例で RNA シーケンスを行い、既知、新規合わせて遺伝子再構成を多数同定した。小児 AML では、成人とは異なり、遺伝子変異よりも染色体転座が病気の主因であると考えられ、今後、それらの意義を検討し、治療層別化の精度向上に努めていく。

A. 研究目的

小児急性骨髄性白血病（AML）は、5 年全生存率は 60-70%程度と依然として予後不良な疾患である。近年、成人領域を中心に AML の遺伝子異常について様々な報告がなされているが、小児 AML では、それらの遺伝子異常の多くはまれであり、成人とは異なった病因が存在するものと考えられる。

B. 研究方法

RNA シーケンスを用いて、遺伝子再構成を中心に遺伝子異常を網羅的に解析することで小児 AML の病因を同定し、リスク層別化ないし診断精度向上に努める。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則り遂行する。

C. 研究結果

正常核型の AML を中心に 47 例で RNA シーケンスを行い、多くの症例で既知、新規合わせて遺伝子再構成（染色体転座）の候補を同定した。

D. 考察

小児 AML では、成人とは異なり、遺伝子変異よりも染色体転座が病気の主因であることを突き止めた。今後、遺伝子変異と遺伝子再構成、および臨床デー

タとのつけあわせを行い、その意義を検討する。

E. 結論

これまで、病態の不明であった正常核型 AML の多くで、病因となる遺伝子再構成（染色体転座）を同定し今後、治療層別化に役立てていく。

F. 健康危険情報 該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表
現在、作成中。
2. 学会発表
2015年血液学会での発表を予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況 （予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

III. 学会等発表実績

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「小児白血病におけるバイオマーカーによる早期診断技術の確立と実用化に関する研究」

機関名 京都大学, 国立病院機構名古屋医療センター, 国立成育医療センター, 京都府立医科大学, 岡山大学
 東京大学, 群馬大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
10カラーフローサイトメトリーによるB前駆細胞性ALLのMRD検出. 口頭	石橋武士, 三春晶嗣, 橋本互, 清河信敬.	第24回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京.	6月28-29日 2014.	国内
慢性骨髄性白血病検体の白血球pCrkL染色方法の検討. 口頭	橋本互, 富田理, 石橋武士, 三春晶嗣, 嶋晴子, 嶋田博之, 清河信敬.	第24回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京.	6月28-29日 2014.	国内
Investigation of Ph-like ALL by Gene Set Enrichment Analysis and Identification of Their Specific Expression Genes. ポスター	Iijima K, Kiyokawa N, Nakabayashi K, Ichikawa H, Osumi T, Yoshihara H, Ohki K, Kato M, Fukushima T, Shimada H, Mori T, Kinoshita A, Matsumoto K, Koh K, Kikuchi A, Hayashi Y, Manabe A, Ohara A.	The 19th Congress of the European Hematology Association. Milan, Italy,	6月12-15日2014.	国外
小児急性白血病のimmunophenotyping-中央診断とMRDモニタリング. 口頭	清河信敬.	第61回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡,	11月23日 ~12月25日 2014.	国内
Gene expression and DNA methylation related to prognosis of childhood All without fusion genes. 口頭	Iijima K, Kiyokawa N, Ueno H, Yoshihara H, Hasegawa D, Ohki K, Kato M, Fukushima T, Koh K, Hayashi Y, Manabe A, Ohara A.	第76回日本血液学会学術集会, 大阪.	10月31日~11月 2日, 2014.	国内
Analysis of iAMP21 and ERG genes in pediatric B-precursor ALL treated on TCCSG protocol. 口頭	Ohki K, Ohkita H, Kobayashi K, Shiba N, Park M, Sotoatsu M, Fukushima T, Koh K, Hanada R, Manabe A, Kikuchi A, Tsutida M, Ohara A, Kiyokawa N, Hayashi Y.	第76回日本血液学会学術集会, 大阪.	10月31日~11月 2日, 2014.	国内
Molecular analysis of recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia. 口頭	Kato K, Yamashita Y, Yoshimi A, Nakao T, Kobayashi C, Fukushima T, Koike K, Kiyokawa N, Horibe K, Tsuchida M.	第76回日本血液学会学術集会, 大阪.	10月31日~11月 2日, 2014.	国内

CSF3R and CALR mutations and cytogenetic findings in pediatric myeloid malignancies. 口頭	Sano H, Ohki K, Park M, Shiba N, Hara Y, Sotomatsu M, Tomizawa D, Taga T, <u>Kiyokawa N.</u> Tawa A, Horibe K, Adachi S, Hayashi Y.	第76回日本血液学会学術集会, 大阪.	10月31日～11月2日, 2014.	国内
Ph-like 関連新規キメラ遺伝子ATF71P-PDGFRBはマウスBa/F3細胞にIL-3h非依存性の増殖能を誘導する. ポスター	石橋武士, 上野瞳, 小林健一郎, 大喜多肇, 清河信敬	第76回日本血液学会学術集会, 大阪.	10月31日～11月2日, 2014.	国内
Decision making by drug susceptibility test and MRD monitoring for acute undifferentiated leukemia. ポスター	Keino D, Nakano M, Kakuage S, Morimoto M, Tsuzuki Y, Kondoh K, Mori T, Goto H, <u>Kiyokawa N.</u> , Kinoshita A.	第76回日本血液学会学術集会, 大阪.	10月31日～11月2日, 2014.	国内
Messenger RNA sequencing in pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia with IKZF1 deletion. 口頭	Yano M, <u>Imamura T.</u> , Asai D, <u>Kiyokawa N.</u> , Nakabayashi K, Matsumoto K, Deguchi T, Hashii Y, Honda Y, Hasegawa D, Sasahara Y, Ishii M, Kato K, Kosaka Y, Hori H, Yumura-Yagi K, Hara J, Oda M, Horibe K, Ichikawa H, Sato A.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日～30日, 2014.	国内
Companion diagnostics for a patient with Ph-like ALL bearing the PDGFRB fusion gene and response to second-generation TKI dasatinib. 口頭	Kobayashi K, Sara S, Ishibashi T, Ueno H, Okita H, Iijima K, Mitsui K, Matsuoka M, Kojima Y, Takahashi H, Miyagawa N, Goto H, Nagai J, Matsumoto K, <u>Kiyokawa N.</u> , Ohara A.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日～30日, 2014.	国内
Polymorphism of MRP4 is associated with toxicity of maintenance chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia 口頭	Suzuki R, Fukushima T, Fukushima H, Tanaka Y, Kobayashi C, Koike K, Manabe A, Noguchi E, <u>Kiyokawa N.</u> , Sumazaki R.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日～30日, 2014.	国内
Effects of ATF71P-PDGFRB, a novel Ph-like ALL-related chimeric molecule, on cell proliferation and stimulating intracellular signal transduction. 口頭	Ishibashi T, Ueno H, <u>Kiyokawa N.</u>	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日～30日, 2014.	国内
小児慢性期CMLにおける治療反応性予測因子としての細胞表面マーカー解析. 口頭	嶋晴子, 清河信敬, 谷澤昭彦, 黒澤秀光, 渡辺輝浩, 伊藤正樹, 遠野千佳子, 湯坐有希, 村松秀城, 堀田紀子, 岡田正樹, 嶋田博之.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日～30日, 2014.	国内

標準LMB化学療法により治療された成熟B細胞性リンパ腫10例の検討. 口頭	大隅朋生, 塩田曜子, 清谷知賀子, 寺島慶太, 山崎文登, 増澤亜紀, 中澤温子, 清河信敬, 松本公一, 森鉄也.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日~30日, 2014.	国内
SNX2-ABL1の機能解析とチロシンキナーゼ阻害剤抵抗性機序の解明. 口頭	飯島一智, 富田理, 石橋武士, 増澤亜紀, 大隅朋生, 森鉄也, 清河信敬.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日~30日, 2014.	国内
AML型の再寛解導入療法が奏功したATF71P/PDGFRB融合遺伝子を伴うPh-like ALLの一例. 口頭	松岡正樹, 三井一賢, 羽賀洋一, 小嶋靖子, 高橋浩之, 小原明, 小林健一郎, 清河信敬, 宮川直将, 後藤裕明.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日~30日, 2014.	国内
乳児白血病における免疫学的表現型と臨床像の関係. 口頭	出口隆生, 富澤大輔, 清河信敬, 堀部敬三, 駒田美弘.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日~30日, 2014.	国内
B前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病の新規融合遺伝子EP300-ZNF384:新たなサブグループ. 口頭	牛腸義宏, 清河信敬, 市川仁, 中林一彦, 上野瞳, 大隅朋生, 石橋武士, 寺田和樹, 大保木啓介, 坂本裕美, 塩田曜子, 今井雅子, 野口靖, 外山大輔, 秦健一郎, 吉田輝彦, 松本健治, 福島敬, 康勝好, 真部淳, 小原明.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日~30日, 2014.	国内
低二倍体の急性リンパ芽球性白血病の3症例. 口頭	石丸紗恵, 斎藤雄弥, 横川裕一, 加藤元博, 清河信敬, 滝智彦, 金子隆, 湯坐有希.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日~30日, 2014.	国内
PAX5-ZNF521融合遺伝子を認めたB前駆細胞型急性リンパ性白血病(BCP-ALL)の1例. ポスター	渡邊大輔, 渡邊敦, 柚津晋平, 大城浩子, 赤羽弘資, 古市嘉行, 合并久美子, 清河信敬, 松本健治, 犬飼岳史, 杉田完爾.	第56回日本小児血液・がん学会学術集会, 岡山.	11月28日~30日, 2014.	国内
Genetic Abnormalities and Prognosis in Pediatric B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Treated On Tokyo Children's Cancer Study Group Protocol. ポスター	Ohki K, Park M, Hara Y, Shiba N, <u>Kiyokawa N</u> , Fukushima T, Koh K, Manabe A, Ohara A, Hayashi Y.	56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA.	December 6-9, 2014.	国外
The Clinical Features and Prognosis of Early T-Cell Precursor Subtype of Lymphoblastic Lymphoma in the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group ALB-NHL03 Study. ポスター	Fukano R, Sunami S, Sekimizu M, Takimoto T, Mori T, Mitsui T, Mori T, Saito AM, Watanabe T, Ohshima K, Fujimoto J Nakazawa A, <u>Kiyokawa N</u> , Kobayashi R, Horibe K, Tsurusawa M.	56th ASH Annual Meeting and Exposition, San Francisco, CA, USA.	December 6-9, 2014.	国外
Identification of a monozygous JAK3 V674A mutation caused by acquired uniparental disomy in a relapsed early T-cell precursor ALL patient	後藤 幸子, 今村 俊彦, 杉本 篤哉, 金田 大介, 藤木 敦, 宮地 充, 中谷 拓也, 大曾根 眞也, 石田 宏之, 滝 智彦, 細井 創	第56回小児血液がん学会	2014.11.29	国内

Clinical significance of <i>LNK</i> (SH2B3) expression in pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia	中谷 拓也、大曾根 真也、石田 宏之、滝 智彦、細井 創	第56回米国血液学会	2014.12.8	国外
卵巣胚細胞腫から発症した急性骨髄性白血病のゲノム解析 (ポスター)	犬飼岳史, 滝 智彦, 根本 篤, 赤羽 弘資, 合井久美子, 黒田 格, 廣瀬衣子, 阿部正子, 加賀美恵子, 杉田完爾	第56回日本小児血液・がん学会学術集会	11月28日 2014	国内
t(9;17)(p24;q21)をもつ思春期急性リンパ性白血病における新規 <i>JAK2</i> 融合遺伝子の同定	川村真智子, 賀来秀文, 滝 智彦, 大木健太郎, 林 泰秀	第56回日本小児血液・がん学会学術集会	11月30日 2014	国内
Long-term outcome of six months maintenance chemotherapy for ALL in children: An extended follow up study of TCCSG L92-13. ポスター	Kato M, Manabe A, Ishimaru S, Tomizawa D, Hasegawa D, Inukai T, Arakawa Y, Aoki T, Okuya M, Kaizu K, Kato K, Taneyama Y, Koh K, Tsuchida M, Ohara A.	第56回米国血液学会	2014年12月	国外
Whole exome and transcriptome analyses in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia、ポスター	Seki M, Yoshida K, Shiraichi Y, Chiba K, Tanaka H, Kato M, Hanada R, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J.	第56回米国血液学会	2014年12月	国外
Integrative genome analysis of T cell acute lymphoblastic leukemia with subsequent development of Langerhans cell histiocytosis、口演	Seki M, Kato M, Ohyama R, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Arakawa Y, Kishimoto H, Sanada M, Miyano S, Oka A, Hanada R, Ogawa S, Koh K, Takita J.	第76回日本血液学会	2014年11月	国内
The prognostic impact of high <i>EVII</i> -related genes expression in pediatric acute myeloid leukemia (口演)	Shiba N, Hara Y, Ohki K, Yamato G, Park MJ, Kobayashi T, Ichikawa H, Tomizawa D, Taki T, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Taga T, Adachi S, Tawa A, Hayashi Y	第76回日本血液学会	2014年10月	国内
The prognostic impact of MEL1 gene expression in pediatric acute myeloid leukemia (ポスター)	Shiba N, Ohki K, Hara Y, Yamato G, Park MJ, Ichikawa H, Kobayashi T, Tomizawa D, Sotomatsu M, Arakawa H, Horibe K, Taga T, Adachi S, Tawa A, Hayashi Y.	第56回米国血液学会	2014年12月	国外

学会等発表実績

委託業務題目「小児白血病におけるバイオマーカーによる早期診断技術の確立と実用化に関する研究」

機関名 京都大学, 国立病院機構名古屋医療センター, 国立成育医療センター, 京都府立医科大学, 岡山大学
東京大学, 群馬大学

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・ 外の別
Aberrant splicing of U12-type introns is the hallmark of ZRSR2 mutant myelodysplastic syndrome.	Madan V, Kanojia D, Li J, Okamoto R, Sato-Otsubo A, Kohlmann A, <u>Sanada M</u> , Grossmann V, Sundaresan J, Shiraishi Y, Satoru M, Thol F, Ganser A, Yang H, Haferlach T, Ogawa S, Koeffler HP.	Nature Communications 14;6:6042	2015	国外
Variegated clonality and rapid emergence of new molecular lesions in xenografts of acute lymphoblastic leukemia are associated with drug resistance.	Nowak D, Liem NL, Mossner M, Klaumünzer M, Papa RA, Nowak V, Jann JC, Akagi T, Kawamata N, Okamoto R, Thoennissen NH, Kato M, <u>Sanada M</u> , Hofmann WK, Ogawa S, Marshall GM, Lock RB, Koeffler HP.	Experimental Hematology 43(1):32-43.e35	2015	国外
Recurrent somatic mutations underlie corticotropin-independent Cushing's syndrome.	Sato Y, Maekawa S, Ishii R, <u>Sanada M</u> , Morikawa T, Shiraishi Y, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Yoshizato T, Suzuki H, Shiozawa Y, Kataoka K, Kon A, Aoki K, Chiba K, Tanaka H, Kume H, Miyano S, Fukayama M, Nureki O, Homma Y, Ogawa S.	Science. 344(6186):917-20,	2014	国外
ATF7IP as a novel PDGFRB fusion partner in acute lymphoblastic leukemia in children.	Kobayashi K, Mitsui K, Ichikawa H, Nakabayashi K, Matsuoka M, Kojima Y, Takahashi H, Iijima K, Ootsubo K, Oboki K, Okita H, Yasuda H, Sakamoto, Hata K, Yoshida T, Matsumoto K, Kiyokawa N, Ohara A.	Br J Haematol. 2014.Jun;165(6):836-41. doi: 10.1111/bjh.12834.	2014	国外
Treatment outcomes of adolescent acute lymphoblastic leukemia treated on Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) clinical trials.	Kato M, Manabe A, Koh K, Inukai T, <u>Kiyokawa N</u> , Fukushima T, Goto H, Hasegawa D, Ogawa C, Koike K, Ota S, Noguchi Y, Kikuchi A, Tsuchida M, Ohara A.	Int J Hematol. 2014 Aug;100(2):180-7. doi: 10.1007/s12185-014-1622-y. Epub 2014 Jun 18.	2014	国外

An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with 2 overexpression.	Yano M, Imamura T, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu SI, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Kawasaki H, Hori H, Kosaka Y, Kato K, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Matsumoto K, <u>Kiyokawa N</u> , Oda M, Sato A; for the Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS).	Genes Chromosomes Cancer.doi: 10.1002/gcc.22190. Epub 2014 Jun 17.	2014 Oct;53(10):815-23.	国外
TKI dasatinib monotherapy for a patient with Ph-like ALL bearing ATF7IP/PDGFRB translocation.	Kobayashi K, Miyagawa N, Mitsui K, Matsuoka M, Kojima Y, Takahashi H, Ootsubo K, Nagai J, Ueno H, Ishibashi T, Sultana S, Okada Y, Akimoto S, Okita H, Matsumoto K, Goto H, Kiyokawa N, Ohara A.	Pediatr Blood Cancer.doi: 10.1002/pbc.25327. [Epub ahead of print]	2014 Nov 14.	国外
小児Ph-like急性リンパ芽球性白血病の臨床的および細胞遺伝学的特徴。(総説)	清河信敬.	血液内科. 2014 Aug;68(2):274-8.	2014	国内
An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with CRLF2 overexpression	Yano M, Imamura T, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu SI, Hasegawa D, Deguchi T, Hashii Y, Kawasaki H, Hori H, Kosaka Y, Kato K, Horibe K, Yumura-Yagi K, Hara J, Matsumoto K, <u>Kiyokawa N</u> , Oda M, Sato A	Genes Chromosomes Cancer	2014	国外
Identification of a homozygous JAK3 V674A mutation caused by acquired uniparental disomy in a relapsed early T-cell precursor ALL patient	Kawashima-Goto S, <u>Imamura T</u> , Seki M, Kato M, Yoshida K, Sugimoto A, Kaneda D, Fujiki A, Miyachi M, Nakatani T, Osone S, Ishida H, Taki T, Takita J, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Hosoi H	Int J Hematol	2014	国外
The leucine twenty homeobox (LEUTX) gene, which lacks a histone acetyltransferase domain, is fused to KAT6A in therapy-related AML with t(8:19)(p11;q13).	Chinen Y, <u>Taki T</u> , Tsutsumi Y, Kobayashi S, Matsumoto Y, Sakamoto N, Kuroda J, Horiike S, Nishida K, Ohno H, Uike N, Taniwaki M.	Genes Chromosomes Cancer 53: 299-308	2014	国外
Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) and Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS).	Kato M, <u>Imamura T</u> , Manabe A, Hashii Y, Koh K, Sato A, Takahashi H, Hori H, Taki T, Inoue M, Hayashi Y, Horibe K, Tsuchida M, Kojima S, Oda M, Ohara A.	Br J Haematol	2014	国外

Identification of a homozygous JAK3 V674A mutation caused by acquired uniparental disomy in a relapsed early T-cell precursor ALL patient.	Kawashima-Goto S, <u>Imamura T</u> , Seki M, Kato M, Yoshida K, Sugimoto A, Kaneda D, Fujiki A, Miyachi M, Nakatani T, Osone S, Ishida H, Taki T, Takita J, Shiraichi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Hosoi H.	Int J Hematol	2014	国外
Variegated clonality and rapid emergence of new molecular lesions in xenografts of acute lymphoblastic leukemia (ALL) are associated with drug resistance.	Nowak D, Liem NM, Mossner M, Klaumuenzer, Papa RA, Nowak V, Jann JC, Akagi T, Kawamata N, Okamoto R, Thoennissen NH, <u>Kato M</u> , Sanada M, Hofmann WK, Ogawa S, Marshall GM, Lock RB, Koeffler PH	Exp Hematol	2015	国外
Biallelic DICER1 mutations in sporadic pleuropulmonary blastoma.	Seki M, <u>Yoshida K</u> , Shiraishi Y, Shimamura T, Sato Y, Nishimura R, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Kato K, <u>Kato M</u> , Hanada R, Nomura Y, Park MJ, Ishida T, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J.	Cancer Res	2014	国外
急性骨髄性白血病における遺伝子異常	<u>柴 徳生</u> 、 <u>林 泰秀</u>	日本小児血液がん学会雑誌	2014	国内

IV. 研究成果の刊行物・別刷

ARTICLE

Received 10 May 2014 | Accepted 4 Dec 2014 | Published 14 Jan 2015

DOI: 10.1038/ncomms7042

Aberrant splicing of U12-type introns is the hallmark of ZRSR2 mutant myelodysplastic syndrome

Vikas Madan¹, Deepika Kanojia^{1,*}, Jia Li^{1,2,*}, Ryoko Okamoto³, Aiko Sato-Otsubo^{4,5}, Alexander Kohlmann^{6,†}, Masashi Sanada^{4,5}, Vera Grossmann⁶, Janani Sundaresan¹, Yuichi Shiraishi⁷, Satoru Miyano⁷, Felicitas Thol⁸, Arnold Ganser⁸, Henry Yang¹, Torsten Haferlach⁶, Seishi Ogawa^{4,5} & H. Phillip Koeffler^{1,3,9}

Somatic mutations in the spliceosome gene *ZRSR2*—located on the X chromosome—are associated with myelodysplastic syndrome (MDS). *ZRSR2* is involved in the recognition of 3′-splice site during the early stages of spliceosome assembly; however, its precise role in RNA splicing has remained unclear. Here we characterize *ZRSR2* as an essential component of the minor spliceosome (U12 dependent) assembly. shRNA-mediated knockdown of *ZRSR2* leads to impaired splicing of the U12-type introns and RNA-sequencing of MDS bone marrow reveals that loss of *ZRSR2* activity causes increased mis-splicing. These splicing defects involve retention of the U12-type introns, while splicing of the U2-type introns remain mostly unaffected. *ZRSR2*-deficient cells also exhibit reduced proliferation potential and distinct alterations in myeloid and erythroid differentiation *in vitro*. These data identify a specific role for *ZRSR2* in RNA splicing and highlight dysregulated splicing of U12-type introns as a characteristic feature of *ZRSR2* mutations in MDS.

¹Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, 14 Medical Drive, 12-01, Singapore 117599, Singapore. ²Department of Medicine, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 119228, Singapore. ³Cedars-Sinai Medical Center, Division of Hematology/Oncology, UCLA School of Medicine, Los Angeles, California 90048, USA. ⁴Cancer Genomics Project, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan. ⁵Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan. ⁶MLL Munich Leukemia Laboratory, 81377 Munich, Germany. ⁷Laboratory of DNA Information Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan. ⁸Department of Hematology, Hemostasis, Oncology, and Stem Cell Transplantation, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany. ⁹National University Cancer Institute, National University Hospital Singapore, Singapore 119228, Singapore. * These authors contributed equally to this work. † Present address: AstraZeneca, Personalized Healthcare and Biomarkers, Innovative Medicines, Cambridge, UK. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.M. (email: csivm@nus.edu.sg) or to H.Y. (email: csiyangh@nus.edu.sg).