

博士論文

Integrated genetic and epigenetic analysis revealed  
heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in  
Down syndrome

(ダウン症候群に発症した急性リンパ性白血病の  
包括的なゲノム及びエピゲノム解析)

久保田 泰央

Integrated genetic and epigenetic analysis revealed heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome

(ダウン症候群に発症した急性リンパ性白血病の包括的なゲノム及びエピゲノム解析)

所属 東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻 小児科学

指導教員 岡 明 教授

氏名 久保田 泰央

## 目次

代表的な略語一覧.....	4
要旨.....	5
序文.....	6
方法.....	12
結果.....	28
考察.....	59
結論.....	70
謝辞.....	71
参考文献.....	72

## 代表的な略語一覧

DS, Down syndrome ダウン症候群

ALL, Acute lymphoblastic leukemia 急性リンパ性白血病

AML, Acute myeloid leukemia 急性骨髄性白血病

ML-DS, Myeloid leukemia associated with Down syndrome

ダウン症候群に伴う急性骨髄性白血病

DS-ALL, Acute lymphoblastic leukemia associated with Down syndrome

ダウン症候群に伴う急性リンパ性白血病

Non-DS-ALL, Acute lymphoblastic leukemia in individuals without Down syndrome

非ダウン症候群患者に発生した急性リンパ性白血病

Ph-like, Philadelphia chromosome-like フィラデルフィア染色体様

## 要旨

ダウン症候群の患者に発症する急性リンパ性白血病(DS-ALL)の詳細な分子病態はいまだ明らかとはなっていない。本研究では DS-ALL を対象として統合的な分子生物学的解析を行い、DS-ALL は極めてヘテロな疾患であり、健常児の ALL(non-DS-ALL)とはサブタイプの頻度が大きく異なることを明らかとした。一方、DS-ALL における遺伝子発現、DNA メチル化の特徴は、それぞれのサブタイプに応じて non-DS-ALL と共通であった。DS-ALL の大部分で、21 番染色体上に存在する *RUNX1* のプロモーター領域に高メチル化を認め、これは DS 患者における ALL の高い有病率と関係していると予想された。

## 序文

小児急性リンパ性白血病(Acute lymphoblastic leukemia; ALL)は小児腫瘍の中で25%を占め、小児では最も発生数が多い腫瘍である[1]。小児 ALL の中で80%はB前駆細胞性、20%はT細胞性となっている。本邦での年間の発症頻度は小児人口10万人あたり3-4人であり、年間の発症数は500人程度と推測されている。小児 ALL の予後は1960年代においては10%程度であったが、時代とともに成績が大きく向上し、現在では90%以上の患児が長期生存可能となっている[2]。この成績の向上は、使用する抗癌剤の使用量やその組み合わせ、支持療法の進歩に加え、ALLにおけるサブタイプの同定とそれに基づくリスク分類が大きな役割を果たしてきた。

小児 ALL は古典的に染色体異常によってサブタイプが存在することが知られており、予後良好なものとしては12番、21番染色体の相互転座に伴う *ETV6-RUNX1* 融合遺伝子を有するものや、染色体本数が増加する high hyperdiploidy(HeH)が挙げられ、逆に予後不良のものとしては9番、22番染色体の相互転座に伴う *BCR-ABL1* や11番染色体長腕上の *MLL* 遺伝子が再構成を起こしたものなどが挙げられる[3]。その後も次々と ALL のサブタイプが同定され、現在では20種類以上のサブタイプが同定されている(表1)[4]。

表 1 ALL のサブタイプ別リスク

低リスク	中間リスク	高リスク
<i>ETV6-RUNX1</i>	<i>ZNF384</i> -rearranged	<i>BCR-ABL1</i>
High hyperdiploidy	<i>PAX5</i> 異常	<i>TCF3-HLF</i>
<i>TCF3-PBX1</i>	<i>DUX4</i> -rearranged	<i>MLL</i> -rearranged
	<i>ETV6-RUNX1</i> -like	<i>MEF2D</i> -rearranged
	<i>ZNF384</i> -rearranged-like	iAMP21
	dic(9;20)	Hypodiploidy
	<i>IKZF1</i> N159Y変異	Ph-like
	<i>PAX5</i> P80R変異	

同定されたサブタイプの中で、Ph-like(*BCR-ABL1*-like)、*ETV6-RUNX1*-like、*ZNF384*-rearranged-like のようなサブタイプも存在し、これらはサブタイプを規定するような融合遺伝子を有していないが、発現プロファイルは融合遺伝子を有するものと同様の発現プロファイルを有するとして定義されている。この中で、Ph-like は 9 番、22 番染色体転座によって発生するフィラデルフィア染色体を有していないが、発現プロファイルはフィラデルフィア染色体を有するものと同様であり、発現アレイを用いたプロファイリングによってその存在が同定された[5]。後続の研究で、Ph-like は *BCR-ABL1* 融合遺伝子を有していないが、その他の ABL-class のキナーゼ、*EPOR*、*JAK2* の融合遺伝子を有するものや、中には RAS 経路の遺伝子変異を有するものがあることが同定された[6]。ABL-class のキナーゼの下流には RAS 経路が存在するため、Ph-like においては ABL-class の融合遺伝子と RAS 経路の変異を伴うものは RAS 経路の活性化、*EPOR*、*JAK2* などの異常を伴うものは JAK/STAT 経路の活性化を引き起こしていると考えら

れる。Ph-like も *BCR-ABL1* のように予後が悪いことから、ハイリスクのサブタイプとされているが、ABL-class のキナーゼ、*EPOR*、*JAK2* の融合遺伝子を有するものの中にはキナーゼ阻害薬などの分子標的治療薬が有効な症例もある[7]。

近年では小児 B 前駆細胞性 ALL において *IKZF1*、*PAX5* や *EBF1* など B 細胞への分化因子に高頻度に異常が認められることが明らかとなっている[8]。認められる異常としては欠失と変異が大部分だが、*PAX5* では融合遺伝子も多い。特に、*IKZF1* の欠失がある ALL は予後が悪いことが知られており、*IKZF1* の欠失に加えて *PAX5*、*ETV6*、*RBI*、*BTG1*、*EBF1*、*CDKN2A*、*CDKN2B* のいずれかに欠失がある場合は *IKZF1plus* として予後不良なサブグループとして定義されている[9]。*IKZF1* や *PAX5* は germline でも変異を認めることがあり、*IKZF1* N159Y や *PAX5* P80R などは家族性 ALL の原因の一つであるとされている[10]。

ダウン症候群(Down syndrome; DS)は先天的に 21 番染色体を 3 本保有する疾患であり、先天性の心奇形、甲状腺機能低下症、精神発達遅滞など複数の臓器にわたって様々な合併症を伴うことが知られている[11]。健常小児と比較すると、DS 患児は血液系の悪性腫瘍を高頻度に発症することが知られており、急性骨髄性白血病(acute myeloid leukemia; AML)の発症頻度は健常小児の 400 倍、ALL の発症頻度は健常小児の 20 倍とされている[12]。固形悪性腫瘍はほとんど発症しないため、悪性腫瘍自体を発症しやすいわけではなく、血液系の悪性腫瘍に特化



した発症パターンを示す。

DS 患児における AML は形態的な分類である FAB 分類で、巨核球の前駆細胞である巨核芽球性の白血病であり、急性巨核芽球性白血病(*acute megakaryoblastic leukemia; AMKL*)と呼ばれる。一般小児における AMKL の予後は 50%未満と不良だが、DS 患児における AMKL は少量の化学療法のみでほぼ全例が治癒することが知られている。後続の研究で、DS 患児における AMKL は巨核球への分化を促進する転写因子である *GATA1* の異常を背景として発症することが明らかとなった[13]。このように、DS 患児における AML は独特な遺伝子異常によって発症し、予後が大きく異なるという独特な生物学的特徴を有するため、一般小児における AML と区別して *ML-DS(myeloid leukemia associated with Down syndrome)*と呼ばれる。しかし、現在では *GATA1* の異常を背景として発症する AMKL は一般小児にも 10%程度認められることが明らかとなっており[14]、*GATA1* 変異を有する AMKL は一般小児においても非常に良好な成績である。これらのことから、DS 患児は AML においてはサブタイプの偏りを認める発症パターンを呈する。

一方、DS 患児における ALL(*acute lymphoblastic leukemia associated with Down syndrome; DS-ALL*)は古典的なサブタイプが少なく、サブタイプが不明な B-other が大部分を占めるとされていた[15]。本邦での正確な発症頻度は不明だが、年間

5 から 25 人程度と予想されている[16]。DS-ALL は一般小児と比較して予後が悪く、現在でも 70%程度の治癒率である[15]。加えて、予後が良好なサブタイプ同士と比較しても、DS-ALL は予後が悪いことが知られている。これは、DS 患児の化学療法に対する感受性が高く、治療関連の有害事象が多いためだとされてきた。しかし、近年、DS-ALL に対して網羅的な変異解析を行い、DS-ALL には *JAK2*、*NRAS*、*KRAS* の変異や *CRLF2* の高発現といった独特な分子生物学的特徴を有していることが報告された[17]。これらのことから、DS-ALL は ML-DS と同様に独特な生物学的特徴を有していると予想されるようになった。DS 患者は 21 番染色体を 3 本保有する疾患であるため、21 番染色体上に存在する遺伝子が ALL の発症と関係すると予想されており、21 番染色体上に存在する *HMGNI* や *DYRKIA* の ALL 発症に対する関与が報告されている[18,19]。予後良好なサブタイプである HeH においても、21 番染色体が高頻度に増加していることも、21 番染色体上に存在する遺伝子が ALL の発症に関与していることが示唆される。DS-ALL の予後の悪さは、前述のように *ETV6-RUNX1* 融合遺伝子や HeH といった予後良好なサブタイプが少ないことや、化学療法に伴う有害事象が多いためだとされているが、DS-ALL の分子生物学的な特徴も予後の悪さと関連していると予想される[20]。事実、DS-ALL における独特な遺伝子変異の偏りや予後の悪さは、DS-ALL が non-DS-ALL とは異なる独特な分子生物学的特徴を有していること

を示唆するが、いまだ DS-ALL の分子病態の全貌は明らかとされていない。そのため、本研究では 21 番染色体の ALL 発症に及ぼす役割を明らかとし、それを基に DS-ALL の分子病態を明らかとするべく、RNA シーケンス、DNA メチル化アレイ、SNP アレイ、ターゲットキャプチャーシーケンスを行い、発現パターン、DNA メチル化、コピー数、変異のプロファイリングを行った。

## 方法

### 患者及び検体

本研究は東京大学倫理委員会の承認を受けて施行された(G0948-(15))。本研究では DS 患者に発症した ALL を DS-ALL とし、43 例の DS-ALL 検体(表 2)を用いた。用いた DS-ALL はすべて B 前駆細胞性のものであり、T 細胞性のものは含まれていない。DS-ALL との比較として、38 例の non-DS-ALL 検体(表 3)、ALL、AML を発症していない 18 例の DS 患者の検体(表 4)を用い、これらの検体は東京大学医学部附属病院及び Japan Association of Childhood Leukemia Study (JACLS) などの研究協力機関から提供されたものである。本研究は患者もしくはその保護者から同意を取得し、同意の取得後に末梢血および骨髄血から検体を採取した。DS-ALL の発現、DNA メチル化を non-DS-ALL のそれらと比較するため、non-DS-ALL におけるそれぞれの公開データを用いた[21,22]。

### RNA シーケンス

RNA サンプルは Macherey Nagel 社の Nucleospin を用いて患者サンプルから抽出した。Agilent 社の TapeStation によって RNA のクオリティを測定し、クオリティの良好な RNA(RNA integrity number equivalent >5.5)が抽出できた 25 例の DS-ALL 検体を用いて RNA シーケンスを行った。サンプルは New England BioLabs

社の NEBNext Ultra RNA library prep kit for the Illumina platform を用いてライブラリを作成した。シーケンサーには Illumina 社の HiSeq 2000, 2500 ないしは MiSeq を用いた。融合遺伝子の検出は京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座(小川誠司教授)と東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターDNA 情報解析分野(宮野悟教授)による共同開発の解析パイプライン Genomon の version 2.5.0 を用い、繰り返し領域にマッピングされたもの、リードカウント数が 7 未満のもの、アウトオブフレームのもの、断端がエクソン・イントロン接合部外のものとは解析対象外とした。本研究で新規に検出されたインフレームの融合遺伝子は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)とサンガー法(表 5)で全ての融合遺伝子が存在することを確認した。

発現解析に用いるリードカウントは R パッケージの DESeq2 version 1.16.1 に含まれる分散安定化機能を用いて標準化したカウントを使用した。クラスタリングに用いる遺伝子として、X 染色体、Y 染色体の遺伝子は解析対象外とした。また、末梢血、骨髄のサンプルでは赤芽球系の細胞が含まれているため、赤芽球系細胞の混入による影響を減少させるため、赤芽球系細胞に特有の遺伝子[5]も解析対象外とした(表 6)。クラスタリング法としては Ward 法を用い、遺伝子を全サンプルにおける分散順にランク付けし、分散が大きい上位 1%の 250 遺伝子を用いてクラスタリングを行った(表 7)。ヒートマップは標準化したリードカウ

ントデータを用い、R パッケージの phetmap version 1.0.8 で作成した。

表 2 解析を行った DS-ALL 43 例の臨床情報

サンプルID	性別	発症時年齢 (日)	初発時白血球数 (/ $\mu$ l)	核型	無イベント生存期間 (日)	全生存期間 (日)	イベント	予後
DS_01	男性	5267	2700	N/A	584	584	死亡	死亡
DS_02	男性	5897	2100	47,XY,-7,+8,del(20)(q11.2),+21	610	3263	再発	生存
DS_03	男性	1204	8600	47,XY,+21	2046	2046	無	生存
DS_04	女性	576	2800	47,XX,+21	926	926	無	生存
DS_05	男性	2453	26400	47,XY,+21	1820	1820	無	生存
DS_06	男性	2310	21000	47,XY,+21	873	873	死亡	死亡
DS_07	男性	3217	64700	47,XY,+21	691	691	無	生存
DS_08	男性	1764	59000	49, XY, +21, +22, +X (9/15)	238	829	再発	死亡
DS_09	女性	3904	10900	47,XX,+21	1282	1282	再発	死亡
DS_10	男性	2674	28200	N/A	5758	5758	無	生存
DS_11	男性	2168	96200	47,XY,+21	938	1401	再発	死亡
DS_12	男性	N/A	N/A	N/A	2821	2821	無	生存
DS_13	男性	796	57270	47,XY,+21	3830	3830	無	生存
DS_14	男性	1603	2100	47,XY,+X	733	926	再発	死亡
DS_15	男性	2326	55000	47,XY,+21	1522	1522	無	生存
DS_16	女性	2558	2200	47,XX,+21	1497	1497	無	生存
DS_17	女性	2350	3940	47,XX,+21	322	681	再発	死亡
DS_18	男性	1767	N/A	N/A	N/A	N/A	再発	死亡
DS_19	女性	2958	4500	47,XX,+21	800	800	無	生存
DS_20	女性	1651	107500	47,XX,+21	1596	1596	無	生存
DS_21	女性	1761	108900	47,XX,+21	3897	3897	無	生存
DS_22	男性	1018	10900	52,XY,+8,-14,-14,del(14)t(14;?), +17,+19,-20,+21,+21,+2mar	6755	6755	無	生存
DS_23	女性	5775	2000	47,XX,+21	136	136	死亡	死亡
DS_24	男性	2448	10490	47,XY,+21	0	1558	寛解導入不能	死亡
DS_25	男性	6976	2550	47,XY,+21	1839	1839	無	生存
DS_26	男性	2263	26930	47,XY,+21	924	2652	再発	生存
DS_27	女性	1048	38900	46,X,+21.add(4)(p1?)	2315	5019	再発	生存
DS_28	男性	1763	51200	47,XY,+21	2344	2344	無	生存
DS_29	女性	3525	44920	47,XX,+21 [6/20]	3188	3188	無	生存
DS_30	男性	5469	187500	45,idem,-X, del(6)(q?), dic(9;20)(p11;q11) [10/20]	2481	2481	無	生存
DS_31	女性	3578	61700	47,XX,+21 (14/20)	1590	3380	再発	死亡
DS_32	男性	2682	13590	47,XY,+21	0	625	寛解導入不能	死亡
DS_33	女性	2989	65400	47,XX,+21	2724	2724	無	生存
DS_34	女性	6279	47290	47,X,-X,+8,t (14;19)(q32;q11),+21	1250	1250	無	生存
DS_35	男性	4981	13200	47,XY,+21	2566	4162	再発	生存
DS_36	女性	1229	3700	46,XX,+21	81	81	死亡	死亡
DS_37	女性	1528	1900	47,XX,+21	1901	1901	無	生存
DS_38	女性	2588	19500	47,XX,+21	1129	1129	無	生存
DS_39	女性	1758	2170	47,XX,+21	1512	1512	無	生存
DS_40	女性	4022	359950	47,XX,+21	813	813	無	生存
DS_41	女性	2612	4500	47,XX,+21	906	906	無	生存
DS_42	男性	1189	282500	47,XY,+21	447	837	再発	死亡
DS_43	女性	7742	4510	47,XX,+21 [9]	245	674	再発	死亡
				47,idem,der(2)add(2)(p21)add(2)(q31),+5,-7 [8]				

表3 解析を行った non-DS-ALL 38 例の臨床情報

サンプルID	性別	発症時年齢 (日)	初発時白血球数 (/ $\mu$ l)	核型	無イベント生存期間 (日)	全生存期間 (日)	イベント	予後
HD_01	女性	1032	2100	46, XX	1727	1727	無	生存
HD_02	男性	810	7800	N/A	1852	4256	再発	生存
HD_03	男性	3075	6200	53, XY, +X, +6, -7, -9, +add(12)(p11.2), +14, i(17)(q10), +21, +21, +3mar	1493	1493	無	生存
HD_04	男性	672	1200	52, XY, +6, +14, +17, +21 [4]	890	1449	再発	生存
HD_05	女性	2621	68500	56, XX, add(1)(q32), +4, +6, +10, +11, +15, add(16)(q13), +18, +21, +21, +2mar [7]	1001	1211	再発	生存
HD_06	女性	553	1500	N/A	1253	1253	無	生存
HD_07	女性	3211	1800	46, XX [6] 54, XX, +X, +4, +add(6)(q13), +9, +10, -13, +14, +18, +21, +22 [14]	1498	1498	無	生存
HD_10	男性	1634	1700	55 [4]	1421	1421	無	生存
HD_13	男性	1395	34200	46, XY [1]	2367	2367	無	生存
HD_14	女性	1220	1200	46, XX [3]	2061	2061	無	生存
HD_15	女性	2346	7700	N/A	2004	2004	無	生存
HD_29	女性	994	21000	46, XX [20]	671	671	無	生存
HD_37	女性	991	2500	N/A	649	649	無	生存
EP_08	女性	1454	8500	46, XX, add(6)(p13)	1074	1074	無	生存
EP_09	女性	4024	13600	57, XX, +X, +4, +5, +der(6)t(1;6)(q21;q25), -7, -8, +9, +10, +18, +19, +21, +4mar	2985	2985	無	生存
EP_11	女性	2318	34700	45, XX, -9, del(17)(p11.1), der(19)t(1;19)(q23;p13.3)	1666	2576	再発	死亡
EP_12	男性	1142	4700	N/A	3154	3154	無	生存
EP_30	男性	1335	7800	46, XY	933	933	無	生存
EP_31	男性	1706	4110	46, XY	819	819	無	生存
EP_32	女性	2711	360300	45, XX, der(9)add(9)(p13)t(9;22)(q34;q11.2), -20, der(22)t(9;22)	1070	1336	再発	生存
EP_33	男性	3693	14800	46, XY, t(1;19)(q21;p13.3)	498	549	再発	死亡
EP_34	女性	4657	8200	N/A	250	4486	再発	生存
EP_35	男性	2438	4610	N/A	4696	4696	無	生存
EP_36	女性	1907	2100	N/A	2969	2969	無	生存
EP_38	男性	4397	95400	46, XY 20 Cell	2429	2429	無	生存
EP_39	女性	1017	8400	46, XX 50 Cell	368	368	無	生存
HD_40	女性	2140	18300	46, XX [4/12] 59, XXX, +X, add(1)(p13), -2, -3, -7, -8, -9, -11, -12, -13, -14, -19, -20, +21, -22 [7/12]	1921	1921	無	生存
EP_41	男性	6142	31300	46, XY, del(9)(p22)[7]/47, XY, del(9)(p22), +mar	N/A	N/A	無	生存
EP_42	男性	1519	52900	46, XY, del(9)(p22), der(19)t(1;19)(q23;p13.3)	918	918	無	生存
EP_43	女性	923	25300	46, XX	N/A	N/A	無	生存
EP_44	女性	4136	22400	46, XX, add(1)(p13), der(9)t(1;9)(p32;p24), der(9)t(8;9)(q21;p24)	3465	3465	無	生存
EP_45	女性	159	25100	46, XX	4685	4685	無	生存
EP_46	男性	2501	1700	45, XY, -7, add(9)(p11), -13, +mar	1210	1210	無	生存
HD_47	女性	1524	14000	N/A	1178	1227	再発	死亡
HD_48	女性	2820	58100	59, XXX, -1, -2, -3, -7, -8, -9, -11, -12, -13, der(15)t(1;15)(q21;q22), -19, -20, +21, +21, -22	1561	1561	無	生存
EP_49	男性	670	8200	46, XY, add(9)(p13), add(15)(q24), inc	591	4167	再発	生存
HD_50	男性	1694	3500	54, X, -Y, +X, +4, +6, +10, +14, +17, +18, +21, +21	1956	1956	無	生存
EP_51	男性	1903	10400	46, XY, add(18)(p11.1)	1353	3241	再発	生存



表 4 ALL、AML を発症していない DS 患者 18 例の臨床情報

サンプルID	年齢(歳)	性別
DS-44	3	女性
DS-45	4	女性
DS-46	7	男性
DS-47	16	男性
DS-48	18	男性
DS-49	19	男性
DS-50	21	男性
DS-51	27	女性
DS-52	27	女性
DS-53	30	男性
DS-54	31	男性
DS-55	32	男性
DS-56	33	男性
DS-57	35	女性
DS-58	35	女性
DS-59	37	女性
DS-60	45	女性
DS-61	54	女性

表 5 新規融合遺伝子の確認に用いたプライマー配列

Sample ID	5' chr	5' position	3' chr	3' position	5' gene	3' gene	Forward primer	Reverse primer
DS_14	1	54870249	1	55349446	<i>SSBP3</i>	<i>DHCR24</i>	TCTTCTTGTACTTCCCGACACG	CAGGCTCGGGAAAAGTTAGCT
DS_31	7	552092	7	2671912	<i>PDGFA</i>	<i>TTYH3</i>	ATCAGGAAGTTGGCGGACG	CTGAGCTGGGAGGCCACTA
DS_31	14	51297182	22	42483179	<i>NIN</i>	<i>NDUFA6</i>	GTCCGCTGCTTCCATACTTTAATTG	TGCGCCAGCGGCCATGGTT
DS_34	7	552092	7	2671912	<i>PDGFA</i>	<i>TTYH3</i>	ATCAGGAAGTTGGCGGACG	CTGAGCTGGGAGGCCACTA

表 6 解析対象外とした遺伝子リスト

Gene Symbol					
<i>LOC100652931</i>	<i>FAM197Y7</i>	<i>RBMY1A1</i>	<i>TSPY8</i>	<i>TTY9B</i>	<i>GYP A</i>
<i>LOC101929148</i>	<i>FAM197Y8</i>	<i>RBMY1A3P</i>	<i>TTY1</i>	<i>USP9Y</i>	<i>GYPB</i>
<i>PRORY</i>	<i>FAM197Y9</i>	<i>RBMY1B</i>	<i>TTY10</i>	<i>UTY</i>	<i>HBA1</i>
<i>TXLNGY</i>	<i>FAM224A</i>	<i>RBMY1D</i>	<i>TTY11</i>	<i>ZFY</i>	<i>HBA2</i>
<i>AMELY</i>	<i>FAM224B</i>	<i>RBMY1E</i>	<i>TTY12</i>	<i>ZFY-AS1</i>	<i>HBB</i>
<i>BCORP1</i>	<i>FAM41AY1</i>	<i>RBMY1F</i>	<i>TTY13</i>	<i>TSIX</i>	<i>HBBP1</i>
<i>BPY2</i>	<i>FAM41AY2</i>	<i>RBMY1J</i>	<i>TTY14</i>	<i>XIST</i>	<i>HBD</i>
<i>BPY2B</i>	<i>GOLGA2P2Y</i>	<i>RBMY2EP</i>	<i>TTY15</i>	<i>AHSP</i>	<i>HBE1</i>
<i>BPY2C</i>	<i>GOLGA2P3Y</i>	<i>RBMY2FP</i>	<i>TTY16</i>	<i>ALAS1</i>	<i>HBG1</i>
<i>CDY2A</i>	<i>GYG2P1</i>	<i>RBMY3AP</i>	<i>TTY18</i>	<i>ALAS2</i>	<i>HBG2</i>
<i>CDY2B</i>	<i>HSFY1</i>	<i>RPS4Y1</i>	<i>TTY19</i>	<i>DMTN</i>	<i>HBM</i>
<i>DAZ2</i>	<i>HSFY2</i>	<i>RPS4Y2</i>	<i>TTY1B</i>	<i>EPB41</i>	<i>HBQ1</i>
<i>DAZ3</i>	<i>KDM5D</i>	<i>SRY</i>	<i>TTY20</i>	<i>EPB41L1</i>	<i>HBZ</i>
<i>DAZ4</i>	<i>LINC00278</i>	<i>TBL1Y</i>	<i>TTY22</i>	<i>EPB41L2</i>	<i>HEMGN</i>
<i>DDX3Y</i>	<i>LINC00279</i>	<i>TGIF2LY</i>	<i>TTY23</i>	<i>EPB41L3</i>	<i>RHAG</i>
<i>EIF1AY</i>	<i>NLGN4Y</i>	<i>TMSB4Y</i>	<i>TTY23B</i>	<i>EPB41L4A</i>	<i>SLC4A1</i>
<i>FAM197Y2</i>	<i>NLGN4Y-AS1</i>	<i>TSPY1</i>	<i>TTY4</i>	<i>EPB41L4A-AS1</i>	
<i>FAM197Y3</i>	<i>PCDH11Y</i>	<i>TSPY10</i>	<i>TTY4B</i>	<i>EPB41L4A-AS2</i>	
<i>FAM197Y4</i>	<i>PRKY</i>	<i>TSPY2</i>	<i>TTY4C</i>	<i>EPB41L4B</i>	
<i>FAM197Y5</i>	<i>PRY</i>	<i>TSPY3</i>	<i>TTY5</i>	<i>EPB41L5</i>	
<i>FAM197Y6</i>	<i>PRY2</i>	<i>TSPY4</i>	<i>TTY9A</i>	<i>EPB42</i>	

表7 クラスタリングに用いた 250 遺伝子

Gene Symbol				
<i>IRX1</i>	<i>CALD1</i>	<i>PTPRG</i>	<i>NRP1</i>	<i>TPTEP1</i>
<i>PCLO</i>	<i>EVC</i>	<i>OR13A1</i>	<i>CREG2</i>	<i>LINC00494</i>
<i>PEG10</i>	<i>L3MBTL4</i>	<i>HS6ST2</i>	<i>LINC01163</i>	<i>FSD1L</i>
<i>POU4F1</i>	<i>MN1</i>	<i>LINC01529</i>	<i>LY6H</i>	<i>AZU1</i>
<i>SCN3A</i>	<i>COL27A1</i>	<i>IFI44L</i>	<i>RTP5</i>	<i>PHGDH</i>
<i>FLT4</i>	<i>LOC283299</i>	<i>MORC4</i>	<i>HMX2</i>	<i>EFCC1</i>
<i>CALN1</i>	<i>PLCH1</i>	<i>CA1</i>	<i>PPP2R2C</i>	<i>TP53INP1</i>
<i>ZNF711</i>	<i>ARNT2</i>	<i>GJC1</i>	<i>NINL</i>	<i>NEU4</i>
<i>ARHGAP32</i>	<i>SLIT2</i>	<i>LINC01181</i>	<i>KCNQ5</i>	<i>ACKR3</i>
<i>NRN1</i>	<i>TMPRSS15</i>	<i>DLGAP2</i>	<i>TSHZ3</i>	<i>ABCA13</i>
<i>NFATC4</i>	<i>CXCL8</i>	<i>LINC00689</i>	<i>SYT1</i>	<i>KLHL14</i>
<i>SHROOM3</i>	<i>LINC01922</i>	<i>NKD2</i>	<i>CD177</i>	<i>APBB2</i>
<i>CRMP1</i>	<i>LRRC32</i>	<i>ARHGGEF17</i>	<i>MMP8</i>	<i>EGR3</i>
<i>PLVAP</i>	<i>XIRP1</i>	<i>CNN3</i>	<i>ELANE</i>	<i>CTSG</i>
<i>TSPYL5</i>	<i>TENM4</i>	<i>NR3C2</i>	<i>CD34</i>	<i>FAM30A</i>
<i>GREM1</i>	<i>INHBB</i>	<i>SIGLEC14</i>	<i>ALDH1A1</i>	<i>MYT1L</i>
<i>BTNL9</i>	<i>STAB1</i>	<i>LDOC1</i>	<i>SELENBP1</i>	<i>BAALC</i>
<i>TCL6</i>	<i>LAMB2</i>	<i>SIGLEC15</i>	<i>KCNJ16</i>	<i>ROBO4</i>
<i>OVCH2</i>	<i>JCHAIN</i>	<i>MDGA1</i>	<i>PLXDC2</i>	<i>EPHB3</i>
<i>PTPRD</i>	<i>CTHRC1</i>	<i>SLC7A3</i>	<i>MRV11</i>	<i>WDR35</i>
<i>THSD7A</i>	<i>RHOBTB1</i>	<i>EVC2</i>	<i>C14orf132</i>	<i>PLPP3</i>
<i>LINC01139</i>	<i>LOC102723753</i>	<i>LRRC14B</i>	<i>ELOVL2</i>	<i>GOLGA8M</i>
<i>RGMA</i>	<i>NGFR</i>	<i>SYNM</i>	<i>CYTL1</i>	<i>LHFP</i>
<i>FAM69C</i>	<i>LTF</i>	<i>MGC70870</i>	<i>PCDH9</i>	<i>CEACAM6</i>
<i>ARHGAP29</i>	<i>TTC28</i>	<i>FAM171A1</i>	<i>PALM</i>	<i>VAT1L</i>
<i>LOXHD1</i>	<i>AKAP12</i>	<i>CECR2</i>	<i>CPAMD8</i>	<i>TRH</i>
<i>GPR176</i>	<i>PCDH18</i>	<i>SPRY4</i>	<i>S100A8</i>	<i>DYNC2H1</i>
<i>DEFA1</i>	<i>CRISPLD1</i>	<i>SGCE</i>	<i>UACA</i>	<i>TBC1D9</i>
<i>DEFA1B</i>	<i>NOS2</i>	<i>SGCB</i>	<i>NPDC1</i>	<i>S100A9</i>
<i>CYB5R2</i>	<i>DFNA5</i>	<i>TRO</i>	<i>TMEM63C</i>	<i>SDK1</i>
<i>MYO10</i>	<i>SPATS2L</i>	<i>ABHD12B</i>	<i>IGFBP2</i>	<i>DDO</i>
<i>VWA2</i>	<i>DSG2</i>	<i>KIAA1462</i>	<i>CYP4F3</i>	<i>CCNJL</i>
<i>DEFA3</i>	<i>BMP2</i>	<i>RGS1</i>	<i>GLI3</i>	<i>UNC79</i>
<i>KCNK17</i>	<i>CSMD1</i>	<i>CLEC14A</i>	<i>BPI</i>	<i>DTX1</i>
<i>PAX8-AS1</i>	<i>ALKAL2</i>	<i>F13A1</i>	<i>CDH4</i>	<i>FCRL1</i>
<i>DDIT4L</i>	<i>MYEF2</i>	<i>CDC42BPB</i>	<i>MPO</i>	<i>LINC01226</i>
<i>TMEM136</i>	<i>NRXN3</i>	<i>FXYP6</i>	<i>GGCX</i>	<i>SPTB</i>
<i>PTPN14</i>	<i>VLDLR</i>	<i>BEST3</i>	<i>NPY</i>	<i>CTGF</i>
<i>NETO1</i>	<i>GNG11</i>	<i>BEND4</i>	<i>LOC284581</i>	<i>C1orf226</i>
<i>LOC399975</i>	<i>ANO1</i>	<i>LINC01507</i>	<i>LCN6</i>	<i>STK33</i>
<i>HTRA3</i>	<i>RASAL1</i>	<i>ZFP37</i>	<i>GPRC5C</i>	<i>SDC2</i>
<i>TCL1B</i>	<i>PRX</i>	<i>BMP3</i>	<i>IFNLR1</i>	<i>NR4A3</i>
<i>LRFN2</i>	<i>EVPL</i>	<i>ADGRF1</i>	<i>NR4A1</i>	<i>ADARB2</i>
<i>SHISA2</i>	<i>CAMP</i>	<i>LCN10</i>	<i>COL24A1</i>	<i>S100A12</i>
<i>GSTM1</i>	<i>MDF1</i>	<i>SEMA6A</i>	<i>LOC100507346</i>	<i>IGLL1</i>
<i>H2AFY2</i>	<i>EPHA7</i>	<i>RASSF8</i>	<i>NYNRIN</i>	<i>NOTCH3</i>
<i>TUSC1</i>	<i>PTCH1</i>	<i>NR4A2</i>	<i>FBN2</i>	<i>OLFM4</i>
<i>TMEM236</i>	<i>NEGR1</i>	<i>LCN2</i>	<i>AIF1L</i>	<i>BRE-AS1</i>
<i>ZNF662</i>	<i>F2RL3</i>	<i>LGR5</i>	<i>LINC00649</i>	<i>CECR6</i>
<i>PROM1</i>	<i>PDGFA</i>	<i>LINC00487</i>	<i>CD1C</i>	<i>NOV</i>

## Ph-like の検出

フィラデルフィア染色体様(Philadelphia-chromosome like; Ph-like)のサンプルを検出するため、Harvey らが ROSE(Recognition of Outliers by Sampling Ends)法によって同定した遺伝子セットによってクラスタリングされた R1-R8 クラスタ[5]のそれぞれから発現変動遺伝子上位 25 個を抽出し、合計 200 個の遺伝子セットを設定した(表 8)。

ROSE 法は、発現アレイにおいて Ph-like を同定するために使用された手法であり、あるプローブにおける外れ値を示すサンプル集団と、残りの集団の平均値との差から、外れ値を示すサンプル集団のサイズを決定する手法であり、これを用いることで各サブタイプにおいて特徴的に高発現であるプローブのセットと、それらのプローブが高発現であるサンプル数を決定することができる。設定した遺伝子セットにおいて複数のクラスタに同じ遺伝子が含まれていた場合は、より発現が大きいクラスタの遺伝子として採用した。クラスタリング法としては Ward 法による階層的クラスタリングを用いた。このクラスタリングによって、R8 クラスタにクラスタリングされたサンプルを Ph-like とした。次に、Ph-like としたサンプルとその他のサンプルの比較によって、R パッケージの DESeq2 version 1.16.1 を用いて有意な発現変動遺伝子 (adjusted  $P < 0.0001$ )を抽出し、この遺伝子セット(表 9)を用いてサンプル全体(DS-ALL 25 サンプルと non-DS-ALL 118 サンプル)を再クラスタリングした。この再クラスタリングによって Ph-like と同じクラスタにクラスタリングされたサンプルも Ph-like とした。

表 8 Ph-like の検出に用いた 200 遺伝子

Gene Symbol			
<i>LAMP5</i>	<i>ADAM23</i>	<i>FAM168A</i>	<i>ITGA6</i>
<i>CCNA1</i>	<i>BCL9</i>	<i>ABCC1</i>	<i>CYB5R2</i>
<i>CPEB2</i>	<i>COBL</i>	<i>ACP5</i>	<i>KCTD12</i>
<i>CPNE8</i>	<i>HDAC9</i>	<i>AP1B1</i>	<i>USF3</i>
<i>EMB</i>	<i>HSD17B12</i>	<i>ATP9A</i>	<i>MEGF6</i>
<i>ERMP1</i>	<i>IRS1</i>	<i>BTLA</i>	<i>PSAP</i>
<i>HOXA10</i>	<i>KCNJ2</i>	<i>CEACAM1</i>	<i>TBC1D9</i>
<i>HOXA3</i>	<i>LAMA3</i>	<i>CHST12</i>	<i>CD1C</i>
<i>HOXA9</i>	<i>MYLK</i>	<i>CLCF1</i>	<i>EPHA7</i>
<i>MAP7</i>	<i>PDE4D</i>	<i>CNN3</i>	<i>AUTS2</i>
<i>MEIS1</i>	<i>PIP5K1B</i>	<i>ENTPD1</i>	<i>DAGLB</i>
<i>PARP8</i>	<i>PTPRZ1</i>	<i>FRMD8</i>	<i>GRK5</i>
<i>PROM1</i>	<i>RBFOX2</i>	<i>GCNT2</i>	<i>PYHIN1</i>
<i>QPRT</i>	<i>VPS13B</i>	<i>MAN2A2</i>	<i>SLC5A3</i>
<i>REEP3</i>	<i>ADSSL1</i>	<i>METTL7A</i>	<i>TMC8</i>
<i>ZC3H12C</i>	<i>ELL3</i>	<i>ORAI1</i>	<i>CMTM2</i>
<i>ATP8B4</i>	<i>KCNMA1</i>	<i>RIN3</i>	<i>ELK3</i>
<i>HENMT1</i>	<i>OSR2</i>	<i>RNF125</i>	<i>ITGB7</i>
<i>ANXA2R</i>	<i>OXCT1</i>	<i>SALL4</i>	<i>PPIL4</i>
<i>CD44</i>	<i>PLCL2</i>	<i>SLC2A14</i>	<i>PSD3</i>
<i>HOXA5</i>	<i>RABGAP1L</i>	<i>SLC2A3</i>	<i>RAB9A</i>
<i>IGF2BP2</i>	<i>RAPGEF2</i>	<i>SLC35D2</i>	<i>SFMBT2</i>
<i>IGFBP7</i>	<i>SMAP1</i>	<i>TFPI</i>	<i>ADM</i>
<i>LGALS1</i>	<i>STRBP</i>	<i>TNFRSF10A</i>	<i>BMP2</i>
<i>LOC643072</i>	<i>SYTL2</i>	<i>ZMYM6</i>	<i>CYTL1</i>
<i>ANKS1B</i>	<i>MS4A1</i>	<i>DAPK1</i>	<i>KIAA1462</i>
<i>ARL4C</i>	<i>AGPS</i>	<i>AGAP1</i>	<i>AMBRA1</i>
<i>FBLN7</i>	<i>FBXW2</i>	<i>CHST7</i>	<i>ARHGEF17</i>
<i>FOXO6</i>	<i>ABL1</i>	<i>CLTC</i>	<i>ASB13</i>
<i>GOLGA3</i>	<i>TPBG</i>	<i>GPR155</i>	<i>BMPR1B</i>
<i>KANK1</i>	<i>ANXA11</i>	<i>PCDH17</i>	<i>NDUFAF6</i>
<i>KCNJ12</i>	<i>GYPC</i>	<i>PHYH</i>	<i>CA6</i>
<i>LRRC15</i>	<i>PHLN1</i>	<i>PTPRM</i>	<i>CCL17</i>
<i>MERTK</i>	<i>SYNM</i>	<i>STAP1</i>	<i>CD27</i>
<i>MPP7</i>	<i>GPR176</i>	<i>CAPN3</i>	<i>ADGRE5</i>
<i>NCAPD3</i>	<i>GALNT2</i>	<i>CCNJ</i>	<i>CD99</i>
<i>PBX1</i>	<i>TTN</i>	<i>CHST2</i>	<i>CEACAM21</i>
<i>PHACTR3</i>	<i>NUDT21</i>	<i>CLEC12A</i>	<i>CISH</i>
<i>PITPNC1</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>GFOD1</i>	<i>CMAHP</i>
<i>PRKCZ</i>	<i>GID8</i>	<i>IGF2</i>	<i>CRLF2</i>
<i>RADIL</i>	<i>NEPRO</i>	<i>ELOA</i>	<i>DCTN4</i>
<i>SORBS1</i>	<i>ARF4</i>	<i>ABCG1</i>	<i>DENND3</i>
<i>TSPAN17</i>	<i>MPO</i>	<i>CABLES1</i>	<i>DPEP1</i>
<i>VPS26B</i>	<i>WDR20</i>	<i>MCAM</i>	<i>ENAM</i>
<i>WNT16</i>	<i>RAC1</i>	<i>MYLIP</i>	<i>FAM129A</i>
<i>BLK</i>	<i>CUX2</i>	<i>ADAMTS9</i>	<i>FERMT2</i>
<i>CHST6</i>	<i>HMGB1</i>	<i>B4GALT1</i>	<i>GAB1</i>
<i>CRYM</i>	<i>ZFP91</i>	<i>RALGAPA2</i>	<i>GIMAP1</i>
<i>CSF2RB</i>	<i>GMEB1</i>	<i>CLEC12B</i>	<i>GIMAP6</i>
<i>DOCK9</i>	<i>SUMO1</i>	<i>CLK1</i>	<i>ADGRF1</i>

表 9 Ph-like において有意に高発現であった 92 遺伝子

Gene Symbol		
<i>LDB3</i>	<i>ARL15</i>	<i>LOC283140</i>
<i>CABIN1</i>	<i>CRHR2</i>	<i>UST</i>
<i>SLC37A3</i>	<i>MYBL1</i>	<i>SATB1</i>
<i>TTYH2</i>	<i>PPP6R2</i>	<i>DGKA</i>
<i>CASP10</i>	<i>GAS8</i>	<i>STX3</i>
<i>SNAP47</i>	<i>KSR1</i>	<i>PRX</i>
<i>CISH</i>	<i>CTNS</i>	<i>SIRT3</i>
<i>SLC48A1</i>	<i>STN1</i>	<i>PGAM2</i>
<i>CRLF2</i>	<i>WNT9A</i>	<i>CCL17</i>
<i>JCHAIN</i>	<i>DCTN4</i>	<i>C15orf52</i>
<i>RNF157</i>	<i>HDAC7</i>	<i>CCDC24</i>
<i>MUC4</i>	<i>PRR5L</i>	<i>CA6</i>
<i>NXPH3</i>	<i>TSC22D4</i>	<i>NECAP2</i>
<i>LOXL3</i>	<i>FAM47E</i>	<i>SV2A</i>
<i>RNF157-AS1</i>	<i>AFAP1L2</i>	<i>AGPAT4-IT1</i>
<i>NOD1</i>	<i>SCUBE3</i>	<i>CABP7</i>
<i>AMBRA1</i>	<i>PLXNB2</i>	<i>MMP25-AS1</i>
<i>CDK9</i>	<i>CMAHP</i>	<i>PNLDC1</i>
<i>C5orf66</i>	<i>ITGA4</i>	<i>UBE4B</i>
<i>MRPS31P5</i>	<i>DENND3</i>	<i>C3orf18</i>
<i>HSPA12B</i>	<i>ECEL1</i>	<i>LINC00114</i>
<i>B4GALNT4</i>	<i>H2AFY</i>	<i>TRABD2A</i>
<i>TBCD</i>	<i>LOC105369747</i>	<i>ENAM</i>
<i>LOC102723566</i>	<i>ZNF846</i>	<i>B3GNTL1</i>
<i>NUDT4</i>	<i>SPATS2L</i>	<i>HTRA2</i>
<i>CCR6</i>	<i>FGF6</i>	<i>KIAA1257</i>
<i>MKNK1</i>	<i>C19orf71</i>	<i>URAHP</i>
<i>NUDT4P1</i>	<i>IKZF4</i>	<i>MACF1</i>
<i>NUDT4P2</i>	<i>LINGO3</i>	<i>CHN2</i>
<i>PTGER2</i>	<i>PLXNB3</i>	<i>SERHL2</i>
<i>TFAP2E</i>	<i>MAPKAPK3</i>	

## DNA メチル化アレイ

DNA メチル化解析は DS-ALL 35 例、non-DS-ALL 24 例に対して行った。メチル化アレイのライブラリ作成には Illumina 社の Infinium HumanMethylationEPIC BeadChip ないしは Infinium HumanMethylation450K BeadChip を用いた。プローブデザインバイアスを補正するため、beta-mixture quantile normalization method[23]を用いて  $\beta$  値の補正を行った。次に不完全な  $\beta$  値を補完するため、 $\beta$  値を M 値[24]へ変換し、変換された M 値に対して R パッケージの `pcaMethods` version 1.78.0 を用い、不完全な M 値を補正して再度  $\beta$  値へ変換した。この処理を行った  $\beta$  値を用いて、この後の解析を行った。2 種類のプラットフォームにおける結果を統合するため、両者に共通だった 453,093 プローブを抽出して両者の結果を統合した。前述のように、DNA メチル化の解析において、Infinium HumanMethylation450K BeadChip で解析を行った小児 ALL の公開データ[22]を使用した。DNA メチル化のプロファイルを行うため、以下のようにプローブを抽出し、クラスタリングを行った。階層的クラスタリングでは、安定なクラスター数が明確ではなかったため、DNA メチル化のクラスタリングにおいてはコンセンサスクラスタリングを使用した。X 染色体、Y 染色体上の遺伝子は性バイアスの原因となるため、これらの遺伝子に設定されたプローブは解析の対象外とした。次に、プロモーター内の CpG アイランドに設定されたプローブのみを解析の対象とした。残ったプローブの上位 10%を全サンプルにおける分散順にランク付けし、分散が大きい順に 8,000 プローブを用いてコンセンサ

スクラスタリングを行った。クラスタリング法には Ward 法を用いた。R パッケージの ConsensusClusterPlus version1.50.5 を用い、1000 回の計算を繰り返してクラスターの安定性を決定した。ヒートマップは  $\beta$  値を用いて R パッケージの pheatmap version 1.0.8 によって作成した。DS-ALL、non-DS-ALL 間の各プローブにおける有意差の推定は Wilcoxon's rank-sum test で行い、Benjamini-Hochberg 法で補正した。

### バイサルファイト処理を用いた *RUNXI* プロモーターメチル化の確認

ALL、AML を発症していない DS 患者(表 4)で *RUNXI* プロモーターのメチル化を確認するため、まず Miltenyi Biotec 社の MACS cell separation kit を用いて末梢血から CD19 陽性 B 細胞を分離した。分離した CD19 陽性 B 細胞から DNA を抽出して QIAGEN 社の EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit を用いてバイサルファイト処理を行い、バイサルファイト処理産物に PCR(forward primer: 5'-tcttgaaaagaagaacagacca-3', reverse primer: 5'-agtaaattctagcattactccaggga-3')を行い、Sanger 法で配列を確認した。バイサルファイト処理にはそれぞれのサンプルで DNA を 500ng 使用した。バイサルファイト処理の確認として、複製した正常 DNA をコントロールとして用いた。

### ターゲットキャプチャーシーケンス

ALL において相互排他的なドライバー、転写因子として報告されている 11 遺伝子 (*JAK2*、*SH2B3*、*KRAS*、*NRAS*、*PTPN11*、*FLT3*、*BRAF*、*NF1*、*KIT*、*IKZF1*、*PAX5*)[17]



を対象として DS-ALL 43 例にターゲットキャプチャーシーケンスを行った。43 例のうち 31 例は Agilent 社の SureSelect、Agilent 社の HaloPlex、Illumina 社の Nextera、Roche 社の SecCaP のいずれかを用いてキャプチャーを行い、残り 12 例は PCR ベースのターゲットディープシーケンス[25]を行った。ターゲット領域は NotI 配列でタグ付けされたプライマーで増幅し、NotI で処理後に T4 ligase で連結し、Covaris 社の Covaris sonicator を用いて 200bp 程度のフラグメントに分解した。この産物を Illumina 社の HiSeq 2000 ないしは MiSeq でシーケンスした。

これら 43 例における変異の抽出は以下のクライテリアを用いて行った。まず、対象の遺伝子を ALL において相互排他的なドライバー、転写因子として報告されている 11 遺伝子(*JAK2*、*SH2B3*、*KRAS*、*NRAS*、*PTPN11*、*FLT3*、*BRAF*、*NF1*、*KIT*、*IKZF1*、*PAX5*)とし、エクソン領域のみを対象とした。変異は非同義置換のみとし、アレル頻度が 0.1 以上、Catalog of Somatic Mutations in Cancer(COSMIC) version 70 で造血器腫瘍における報告があり、EB call[26]の *P* value が  $10^{-60}$  以下のものを真の変異とした。

### コピー数解析

31 例に対しては末梢血ないしは骨髄から抽出した DNA を multiplex ligation-dependent probe amplification(MLPA)法で解析し、残りの 13 例は single nucleotide polymorphism(SNP) array で解析した。MLPA は MRCHolland 社の SALSA MLPA probemix P335-B1 ALL-*IKZF1* キットを使用し、ALL の発症に関連がある領域の染色体

欠失や増幅を検出した。コピーナンバー異常として0.75未満を欠失、1.3以上を増幅とした[27]。短腕の擬似常染色体領域は*CRLF2*と*P2RY8*間の領域とし、この領域のコピーナンバー変化で*CRLF2*の増幅を評価した。SNP arrayはAffymetrix社のAffymetrix GeneChip 250K NspないしはCytoScan HD を使用した。SNPアレイ結果の解析は対照の正常検体無しで正確なコピーナンバーの評価を行うことのできるCNAG/AsCNARを使用した[28]。

### non-DS-ALL サンプルにおける変異

RNA シーケンスのデータを利用できた non-DS-ALL 118 例の中で、正常コントロールが利用できる 42 例に対しては whole-exome sequencing(WES)の結果を使用した。これら 42 例における変異の抽出は以下のクライテリアを用いて行った。まず、ターゲットキャプチャーシーケンスと同様に、目的の遺伝子を ALL において相互排他的なドライバー、転写因子として報告されている 11 遺伝子(*JAK2*、*SH2B3*、*KRAS*、*NRAS*、*PTPN11*、*FLT3*、*BRAF*、*NF1*、*KIT*、*IKZF1*、*PAX5*)とし、エクソン領域のみを対象とした。同義置換、Catalog of Somatic Mutations in Cancer(COSMIC) version 70 で造血器腫瘍における報告が無い変異、リード上で一方向だけでしか確認できない変異は対象外とした。加えて、対象となった変異の中で、全体のリード数が 30 以上のもの、変異のリード数が 5 以上のもの、アレル頻度が 0.1 以上のもの、EB call の *P* value が  $10^{-5}$  未満のものを真の変異とした。

残りの対照 DNA を使用できなかった 76 例は RNA シーケンスの結果を用いて変異解析を行った。これら 76 例における変異の抽出は WES と同様のクライテリアを用いて行ったが、EB call の基準は  $P$  value が  $10^{-10}$  未満とした。バリデーションとして、WES を行った 42 例においても RNA シーケンスの結果を用い、上述のクライテリアを用いて変異の検出を行った。検出制度を確認したところ、WES で検出された 23 個中 21 個の変異を抽出することができた。陽性的中率は 91.3%(21/23 SNVs)であり、WES で検出できなかった変異は含まれていなかった。変異の検出における正常コントロールとして、in-house の小児正常組織の RNA シーケンスの結果と Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatment project(TARGET)の小児の正常組織を使用した。

## 生存解析

生存解析は DS-ALL 43 例(表 2)を対象として行った。全生存率には診断から死亡までの日数、無イベント生存率には診断から死亡、再発、寛解導入不能のいずれかまでの日数を用いた。寛解導入不能の症例においては、イベント発生日を診断日と同様に 0 日とした。カプランマイヤー法を用いて全生存率、無イベント生存率を求め、log-rank 検定を用いて有意差を求めた。これらの計算には R パッケージの survival 2.43.3 を使用した。

## 結果

### 発現解析

DS-ALL 25 例に対して RNAseq を行い、19 個の融合遺伝子を確認した(表 10)。この 19 個は小児の B 前駆細胞性 ALL においてよく認められる既知の融合遺伝子 15 個 (*ETV6-RUNX1*、*PAX5-ZCCHC7*、*P2RY8-CRLF2*)を含んでいたが、これまでに報告の無い新規の融合遺伝子も同定した。

表 10 DS-ALL 25 例で検出された融合遺伝子

Sample ID	5' Chr	5' Position	3' Chr	3' Position	5' Gene	3' Gene	Read Pairs
DS_14	1	54870249	1	55349446	<i>SSBP3</i>	<i>DHCR24</i>	7
DS_14	9	37002645	9	37302185	<i>PAX5</i>	<i>ZCCHC7</i>	46
DS_20	12	12037379	21	36421139	<i>ETV6</i>	<i>RUNX1</i>	24
DS_21	12	12037379	21	36421139	<i>ETV6</i>	<i>RUNX1</i>	27
DS_04	12	12037379	21	36421139	<i>ETV6</i>	<i>RUNX1</i>	26
DS_28	12	12037379	21	36421139	<i>ETV6</i>	<i>RUNX1</i>	19
DS_31	7	552092	7	2671912	<i>PDGFA</i>	<i>TTYH3</i>	23
DS_31	14	51297182	22	42483179	<i>NIN</i>	<i>NDUFA6</i>	298
DS_34	7	552092	7	2671912	<i>PDGFA</i>	<i>TTYH3</i>	11
DS_42	9	37033983	9	37302185	<i>PAX5</i>	<i>ZCCHC7</i>	71
DS_14	X	1331530	X	1655813	<i>CRLF2</i>	<i>P2RY8</i>	47
DS_23	X	1331530	X	1655813	<i>CRLF2</i>	<i>P2RY8</i>	7
DS_03	X	1331530	X	1655813	<i>CRLF2</i>	<i>P2RY8</i>	889
DS_30	X	1331530	X	1655813	<i>CRLF2</i>	<i>P2RY8</i>	144
DS_33	X	1331530	X	1655813	<i>CRLF2</i>	<i>P2RY8</i>	152
DS_36	X	1331530	X	1655813	<i>CRLF2</i>	<i>P2RY8</i>	1677
DS_37	X	1331530	X	1655813	<i>CRLF2</i>	<i>P2RY8</i>	762
DS_39	X	1331530	X	1655813	<i>CRLF2</i>	<i>P2RY8</i>	243
DS_42	X	1331530	X	1655813	<i>CRLF2</i>	<i>P2RY8</i>	800

小児 ALL における既知の融合遺伝子の中で *CRLF2* 高発現の原因となる *P2RY8-CRLF2* は 9 例に認められたが、*IGH-CRLF2* は認めなかった。新規に同定した

融合遺伝子の中で *PDGFA-TTYH3* は 2 例に認められた。次に、Ph-like を検出するため、ROSE 法[5]によって同定された遺伝子セットを用いて発現解析を行った(図 1)。

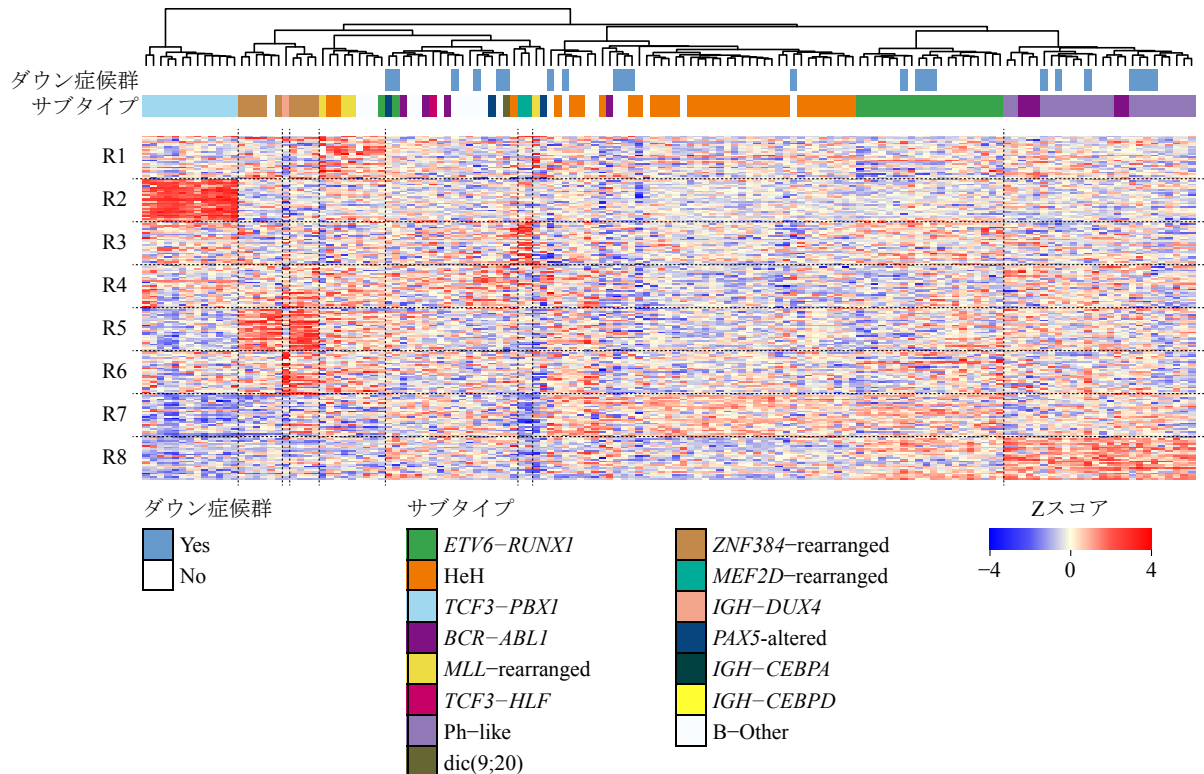


図 1 ROSE 法による遺伝子による階層的クラスタリング

小児 BCP-ALL 143 サンプルに対して、Ph-like を検出できるように ROSE 法によって求められた 200 遺伝子で階層的クラスタリングを行った。使用したサンプルは DS-ALL 25 サンプル、non-DS-ALL 25 サンプル、小児 non-DS-ALL 93 サンプルの RNA シーケンス公開データである。このクラスタリングによって ALL サンプルの一部は R1 から R8 のいずれかのクラスターに含まれる遺伝子が高発現となっており、クラスター R1、R2、R3、R5、R6、R8 にそれぞれ *MLL-rearranged*、*TCF3-PBX1*、*MEF2D-rearranged*、*ZNF384-rearranged*、*IGH-DUX4*、*BCR-ABL1* か Ph-like が含まれている。R8 に *BCR-ABL1* 陰性のサンプルが含まれており、これらを Ph-like とした。ダウン症候群、それぞれのサブタイプは図に示すように色づけされている。

この解析の結果、DS-ALL 7 例が Ph-like であることが明らかとなった。DS-ALL の

検体で核型が  $t(14;19)(q32;q13)[29]$ 、 $t(8;14)(q11;q32)[30]$ であるものを 1 例ずつ認め、  
 これらはそれぞれ *CEBPA*、*CEBPD* が高発現であった(図 2)。

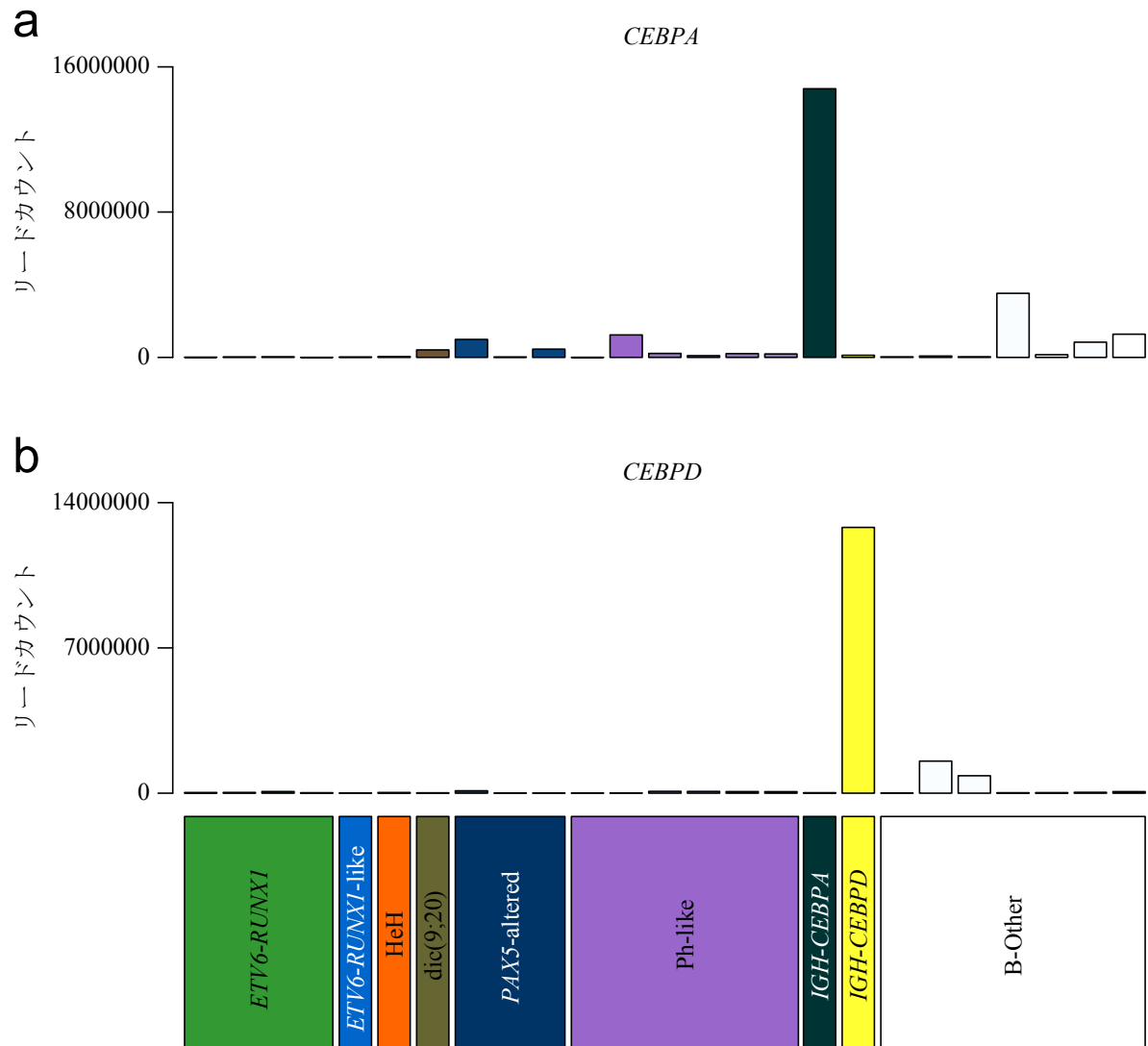


図 2 DS-ALL 25 例における *CEBPA* と *CEBPD* の発現

両グラフの縦軸はノーマライズされた *CEBPA* 及び *CEBPD* の発現であり、横軸はそれぞれのサンプルのサブタイプを示している。それぞれ 1 サンプルが *CEBPA* (a) または *CEBPD* (b)を高発現している。

これらの 2 例はそれぞれ *IGH* が存在する 14q32 に転座の切断部位があるため、それ

それを *IGH-CEBPA*、*IGH-CEBPD* 融合遺伝子を有する症例と同定した。これらの融合遺伝子は non-DS-ALL では稀だが、DS-ALL では比較的よく認められることが知られている[30,31]。これらの融合遺伝子は *IGH* のプロモーター部位のみを使用しており、*IGH* のエクソン部位は含まれていないため、次世代シーケンサーのシーケンス結果を直接 IGV(integrative genomics viewer) version 2.3 で確認しても転座部位は明らかではなかった。

DS-ALL の発現プロファイルを明らかとするため、DS-ALL 25 例と比較のために RNAseq を行った non-DS-ALL 25 例、公開データの non-DS-ALL 93 例(この DS-ALL 25 例、non-DS-ALL 118 例を発現コホートとする)を用い、アンスーパーバイズな階層的クラスタリングによる解析を行った(図 3)。この解析に用いた non-DS-ALL は *ETV6-RUNX1*、HeH など小児 ALL における複数のサブタイプを含んでいた。この解析の中で、8 例は *PAX5* 以外に異常を認めず、これらの症例を *PAX5*-altered とした。階層的クラスタリングによって ALL 全体は大きく 6 つのクラスターに分かれ、DS-ALL は 4 つのクラスターにクラスタリングされたが、E6 には有意に多くの DS-ALL がクラスタリングされていた(表 11)。クラスターE3 は多様なサブタイプからなるクラスターであり、*MLL* の再構成を伴うもの、*TCF3-HLF*、*IGH-DUX4*、*MEF2D* の再構成を伴うもの、*PAX5*-altered など複数の ALL のサブタイプを含んでいた。E3 にクラスタリングされなかった *PAX5*-altered は E6 にクラスタリングされていた。*ETV6-RUNX1* を有する DS-ALL は全て E4 にクラスタリングされ、E4 は non-DS-ALL の *ETV6-RUNX1*

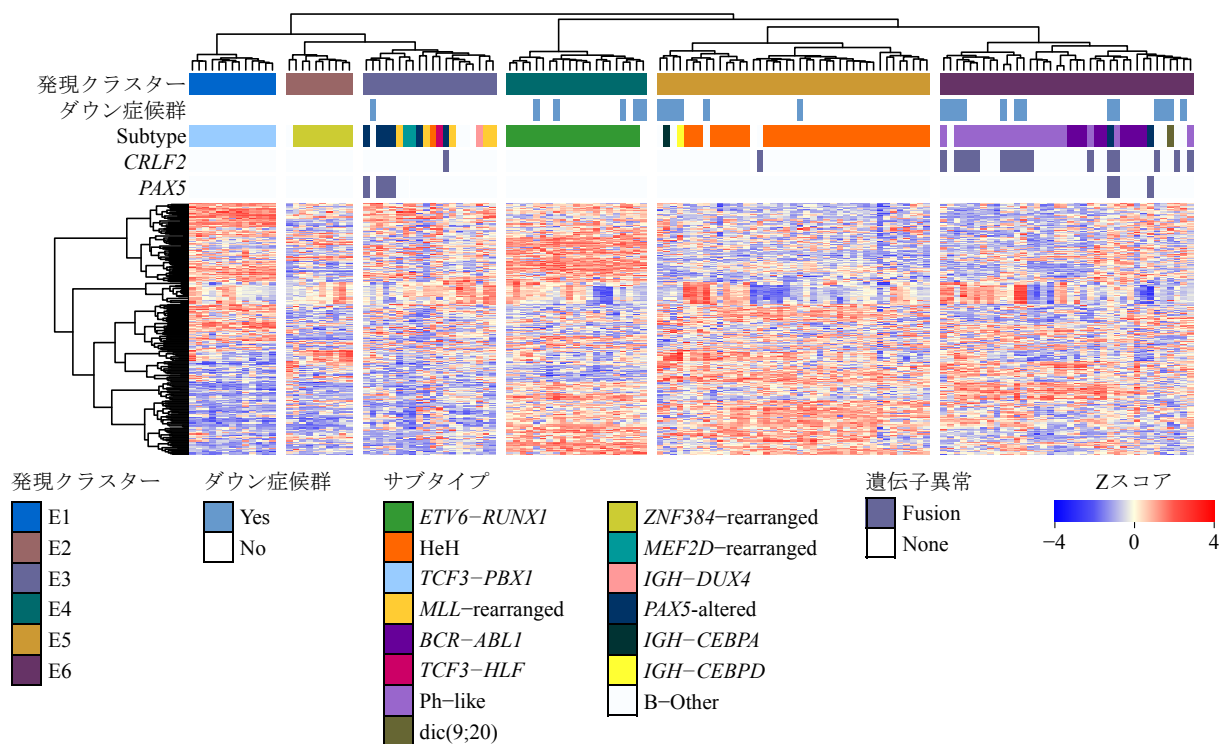


図3 BCP-ALL 143例(DS-ALL 25例、non-DS-ALL 118例)の発現による階層的クラスタリング

サンプル全体を全遺伝子の約1%である250遺伝子を用いて階層的クラスタリングを行った。使用したサンプルはDS-ALL 25サンプル、non-DS-ALL 25サンプル、小児non-DS-ALL 93サンプルのRNAシーケンス公開データである。クラスタリングによってALL全体は6クラスターに分かれた。6クラスター中でDS-ALLは4クラスターに含まれていた。それぞれのクラスターはALLのサブタイプを反映しており、クラスターによって特徴的なサブタイプが集まっている。CRLF2融合遺伝子を有するサンプルは大部分がE6にクラスタリングされており、PAX5融合遺伝子を有するサンプルはE3、E6に集まっている。発見クラスター、DS-ALL、サブタイプ、遺伝子異常は図のように色づけされている。DS-ALLとnon-DS-ALLはそれぞれのサブタイプに応じて同じクラスターにクラスタリングされている。

表11 各クラスターと含まれるDS-ALLのサンプル数に対する $\chi^2$ 検定の結果

Cluster	1	2	3	4	5	6	Total	
DS-ALL	Count	0	0	1	5	6	13	25
	Expected Count	2.27	1.75	3.50	3.67	7.17	6.64	25
	Adjusted residual	-1.74	-1.51	-1.58	0.826	-0.569	3.17	
Non-DS-ALL	Count	13	10	19	16	35	25	118
	Expected Count	10.7	8.25	16.5	17.3	33.8	31.4	118
	Adjusted residual	1.74	1.51	1.58	-0.826	0.569	-3.17	
Total	Count	13	10	20	21	41	38	143
	Expected Count	13	10	20	21	41	38	143

$\chi^2(5)=15.2$   
 $p < 0.01$



を有する症例全てもクラスタリングされていたが、*ETV6-RUNX1* を有さない DS-ALL 1 例も含まれていた。HeH の DS-ALL 1 例は E5 にクラスタリングされ、E5 は non-DS-ALL の大部分がクラスタリングされていた。E6 は *BCR-ABL1* 融合遺伝子を有する症例と Ph-like のクラスターであった。

発現解析で DS-ALL は単一の遺伝子プロファイルを有するというよりは、ヘテロな集団であることが明らかとなった。それぞれの症例は DS-ALL のサブタイプに応じた発現プロファイルを有しており、それらの発現プロファイルは non-DS-ALL と同様であったが、サブタイプの頻度は DS-ALL と non-DS-ALL で大きく異なっていた。DS 患者は ALL を発症しやすいことから、DS 患者が先天的に 3 本保有している 21 番染色体上の遺伝子が ALL の発症に大きく関係していることが予想されたが、21 番染色体上の遺伝子の発現レベルを DS-ALL と non-DS-ALL で比較した場合、有意な発現変動遺伝子(adjusted  $P < 0.0001$ )には DS-ALL において高発現であるものの方が多いが、4 割程度は non-DS-ALL において高発現となっていた(表 12)。当初の予想に反して *HMGNI* や *DYRK1A* といった 21 番染色体上の遺伝子は non-DS-ALL と同様の発現レベルであり、有意な差は認めなかった。

表 12 DS-ALL、non-DS-ALL における 21 番染色体上の遺伝子発現の比較

Genes	Log2 Fold Change	P value	adjusted P value	Genes	Log2 Fold Change	P value	adjusted P value
<i>UBBP4</i>	2.76	1.62E-33	3.20E-29	<i>RPSAP9</i>	1.62	1.16E-10	2.86E-08
<i>POTEE</i>	3.47	4.68E-30	4.63E-26	<i>HPCAL1</i>	1.29	1.27E-10	3.10E-08
<i>POTEI</i>	3.49	1.42E-26	9.39E-23	<i>PKN1</i>	0.78	1.32E-10	3.19E-08
<i>PABPC3</i>	3.00	2.90E-26	1.43E-22	<i>JUND</i>	1.65	1.53E-10	3.63E-08
<i>POTEF</i>	3.09	6.38E-23	2.52E-19	<i>TIPRL</i>	-1.12	2.16E-10	5.03E-08
<i>POTEJ</i>	4.27	1.50E-22	4.94E-19	<i>CPEB1</i>	2.70	2.50E-10	5.76E-08
<i>LOC440311</i>	2.63	1.13E-20	3.20E-17	<i>C19orf43</i>	0.85	2.65E-10	5.99E-08
<i>RPL19P12</i>	2.23	3.63E-19	7.98E-16	<i>AMFR</i>	0.93	3.08E-10	6.85E-08
<i>RPL23P8</i>	2.55	7.43E-18	1.34E-14	<i>TEFM</i>	-0.92	3.12E-10	6.86E-08
<i>CYB5R3</i>	1.16	2.05E-17	3.30E-14	<i>CDIPT</i>	0.80	3.18E-10	6.90E-08
<i>MYDGF</i>	1.35	2.17E-17	3.30E-14	<i>MROH8</i>	0.92	3.24E-10	6.97E-08
<i>LOC407835</i>	2.56	5.16E-17	7.30E-14	<i>INTS11</i>	0.57	4.08E-10	8.67E-08
<i>RPL13AP20</i>	2.48	1.59E-16	2.10E-13	<i>EMC10</i>	0.90	4.89E-10	1.03E-07
<i>SCARNA13</i>	-2.20	1.79E-16	2.21E-13	<i>FAM234A</i>	0.93	5.15E-10	1.07E-07
<i>RPS17</i>	2.28	3.44E-16	4.00E-13	<i>EIF3F</i>	1.01	6.64E-10	1.37E-07
<i>GLUD2</i>	2.34	1.28E-15	1.41E-12	<i>SLAMF1</i>	-2.79	6.97E-10	1.41E-07
<i>ARL6IP6</i>	1.12	1.78E-15	1.85E-12	<i>ZSCAN26</i>	-0.95	6.94E-10	1.41E-07
<i>SCARNA5</i>	-3.07	6.38E-15	6.31E-12	<i>TMCO3</i>	0.90	7.30E-10	1.46E-07
<i>SCARNA17</i>	-1.97	7.74E-15	6.96E-12	<i>MPG</i>	1.10	7.48E-10	1.48E-07
<i>SCARNA6</i>	-2.51	9.85E-15	8.47E-12	<i>CASC1</i>	-1.98	8.13E-10	1.58E-07
<i>EIF5AL1</i>	1.82	1.32E-14	1.09E-11	<i>PIPSL</i>	1.46	8.09E-10	1.58E-07
<i>RBM42</i>	0.95	5.85E-14	4.63E-11	<i>EPN1</i>	1.00	8.24E-10	1.58E-07
<i>YBX3P1</i>	2.44	7.71E-14	5.87E-11	<i>HSF1</i>	0.78	8.48E-10	1.61E-07
<i>RMDN3</i>	0.68	8.26E-14	6.05E-11	<i>SCARNA21</i>	-2.05	8.83E-10	1.66E-07
<i>RPL13AP6</i>	2.18	9.28E-14	6.56E-11	<i>DCLRE1C</i>	-0.87	9.01E-10	1.68E-07
<i>SCARNA10</i>	-2.79	1.28E-13	8.74E-11	<i>HIST2H2AA3</i>	2.31	9.27E-10	1.70E-07
<i>SCARNA9</i>	-1.96	3.65E-13	2.41E-10	<i>HIST2H2AA4</i>	2.31	9.27E-10	1.70E-07
<i>MAF1</i>	0.88	6.88E-13	4.01E-10	<i>RHBDF1</i>	2.62	1.14E-09	2.05E-07
<i>PPIAL4D</i>	2.55	6.71E-13	4.01E-10	<i>SND1</i>	0.88	1.16E-09	2.07E-07
<i>PPIAL4E</i>	2.55	6.71E-13	4.01E-10	<i>CRYGS</i>	-1.67	1.34E-09	2.34E-07
<i>PPIAL4F</i>	2.55	6.71E-13	4.01E-10	<i>FCRL2</i>	-2.71	1.33E-09	2.34E-07
<i>SLC52A2</i>	1.32	7.80E-13	4.32E-10	<i>SPAG6</i>	-3.42	1.35E-09	2.34E-07
<i>VPS51</i>	1.03	7.85E-13	4.32E-10	<i>PDZK1</i>	-1.61	1.39E-09	2.39E-07
<i>CHRNA3</i>	-2.35	8.28E-13	4.42E-10	<i>NBPF25P</i>	-1.06	1.58E-09	2.69E-07
<i>TERC</i>	-2.61	8.48E-13	4.42E-10	<i>AASDH</i>	-0.74	1.78E-09	3.01E-07
<i>UBXN6</i>	1.16	1.00E-12	5.09E-10	<i>RFTN1</i>	1.26	1.87E-09	3.14E-07
<i>DDOST</i>	0.94	1.36E-12	6.70E-10	<i>HSPA1B</i>	2.28	1.98E-09	3.29E-07
<i>HNRNPCL2</i>	2.29	1.43E-12	6.75E-10	<i>RPL8</i>	1.13	2.32E-09	3.83E-07
<i>LDLRAD3</i>	-3.92	1.41E-12	6.75E-10	<i>RNF126</i>	0.95	2.49E-09	4.07E-07
<i>HIST1H4A</i>	-2.41	1.49E-12	6.85E-10	<i>IL17RE</i>	2.47	3.02E-09	4.90E-07
<i>RAB11B</i>	0.87	1.96E-12	8.80E-10	<i>ACOT13</i>	-0.75	3.25E-09	5.23E-07
<i>SUZ12P1</i>	-1.54	2.15E-12	9.45E-10	<i>DCAF4L1</i>	-2.12	3.54E-09	5.65E-07
<i>EFHD2</i>	1.17	3.17E-12	1.36E-09	<i>KHSRP</i>	0.83	3.75E-09	5.94E-07
<i>DOHH</i>	1.00	3.56E-12	1.50E-09	<i>PHOX2A</i>	-1.93	3.91E-09	6.14E-07
<i>NCK2</i>	1.17	4.65E-12	1.92E-09	<i>MAN2B1</i>	0.83	4.34E-09	6.71E-07
<i>RAB11FIP5</i>	2.63	7.30E-12	2.95E-09	<i>TMED7-TICAM2</i>	0.97	4.31E-09	6.71E-07
<i>HNRNPCL1</i>	2.02	8.82E-12	3.36E-09	<i>LTV1</i>	-0.82	4.82E-09	7.28E-07
<i>HNRNPCL3</i>	2.02	8.76E-12	3.36E-09	<i>UBE2MP1</i>	1.59	4.79E-09	7.28E-07
<i>HNRNPCL4</i>	2.02	8.57E-12	3.36E-09	<i>ACO2</i>	0.59	5.23E-09	7.79E-07
<i>CMPK1</i>	0.74	1.04E-11	3.89E-09	<i>FOSB</i>	2.32	5.24E-09	7.79E-07
<i>SCARNA7</i>	-2.44	1.08E-11	3.95E-09	<i>STK38</i>	-1.02	5.30E-09	7.83E-07
<i>MAP2K2</i>	0.87	1.17E-11	4.13E-09	<i>SETD6</i>	-0.78	5.46E-09	8.00E-07
<i>SF3A2</i>	1.08	1.32E-11	4.58E-09	<i>ZNF589</i>	-1.07	5.82E-09	8.40E-07
<i>PRKCSH</i>	0.89	1.62E-11	5.44E-09	<i>RTN4</i>	0.78	5.95E-09	8.53E-07
<i>SDF4</i>	0.84	1.71E-11	5.62E-09	<i>LOC101929147</i>	-1.12	6.28E-09	8.93E-07
<i>EEF2</i>	1.26	1.88E-11	6.10E-09	<i>AP2A1</i>	0.73	6.79E-09	9.49E-07
<i>GIPR</i>	-2.91	2.43E-11	7.67E-09	<i>USF2</i>	0.74	6.78E-09	9.49E-07
<i>MAP1B</i>	-2.73	2.44E-11	7.67E-09	<i>CRTAP</i>	0.93	7.52E-09	1.02E-06
<i>RMRP</i>	-2.52	2.77E-11	8.57E-09	<i>NRDE2</i>	-1.03	7.53E-09	1.02E-06
<i>LMNA</i>	2.51	3.19E-11	9.72E-09	<i>WIPF1</i>	0.86	7.83E-09	1.05E-06
<i>GLTSCR2</i>	1.28	3.91E-11	1.17E-08	<i>COMT</i>	1.08	8.12E-09	1.08E-06
<i>CRIP3</i>	-2.56	4.19E-11	1.24E-08	<i>SNHG25</i>	-1.68	8.32E-09	1.10E-06
<i>ATP6V0C</i>	1.47	4.26E-11	1.24E-08	<i>SBSPON</i>	-1.95	8.97E-09	1.17E-06
<i>STK40</i>	1.05	4.38E-11	1.26E-08	<i>MED16</i>	0.85	9.04E-09	1.18E-06
<i>KATNB1</i>	0.96	4.67E-11	1.32E-08	<i>SLC39A9</i>	-1.13	9.26E-09	1.20E-06
<i>NXN</i>	-3.14	5.77E-11	1.61E-08	<i>METTL17</i>	-0.69	9.45E-09	1.21E-06
<i>NUCB1</i>	0.90	6.28E-11	1.73E-08	<i>PNPLA2</i>	0.97	9.68E-09	1.24E-06
<i>MBOAT7</i>	1.24	6.60E-11	1.79E-08	<i>CITED4</i>	1.85	1.00E-08	1.26E-06
<i>MAP3K4</i>	-0.63	7.21E-11	1.90E-08	<i>RNF8</i>	-0.78	9.93E-09	1.26E-06
<i>SNHG22</i>	-1.82	7.11E-11	1.90E-08	<i>SPINT2</i>	1.08	1.00E-08	1.26E-06
<i>SRSF9</i>	0.62	8.80E-11	2.29E-08	<i>BTBD2</i>	0.74	1.02E-08	1.27E-06
<i>SLC41A3</i>	0.69	9.45E-11	2.43E-08	<i>APLP1</i>	2.44	1.04E-08	1.28E-06
<i>GTF2F1</i>	0.91	1.02E-10	2.60E-08	<i>FKBP8</i>	0.99	1.07E-08	1.31E-06
<i>RABAC1</i>	1.08	1.12E-10	2.81E-08	<i>EVI5L</i>	0.82	1.08E-08	1.32E-06
<i>RPSAP9</i>	1.62	1.16E-10	2.86E-08	<i>BSG</i>	1.14	1.09E-08	1.33E-06

## DNA メチル化解析

DS-ALL と non-DS-ALL の DNA メチル化を比較した。使用した検体は DS-ALL 35 例、non-DS-ALL 24 例(この DS-ALL 35 例と non-DS-ALL 24 例をメチル化コホートとする)であり、non-DS-ALL 症例が少なかったため、小児 ALL 664 例(DS-ALL 14 例, non-DS-ALL 650 例)の公開データも用いた[22]。DNA メチル化のクラスタリングでは DS-ALL は 5 つのクラスターに分かれた(図 4)。クラスター M1 と M2 には主に HeH が含まれており、M3、M5 は複数のサブタイプを含むヘテロなクラスターとなっていた。2 段階のクラスタリングによって M3(図 5)と M5(図 6)はそれぞれ 5 つ、6 つのクラスターに分かれた。一般に、コンセンサスクラスタリングの CDF プロットは直線が水平であればあるほどクラスターが安定であり、コンセンサスマトリックスはそれぞれのマトリックスが明確に分かれているほどクラスターが安定とされている。M3、M5 とは対照的に M4 は大部分が *ETV6-RUNX1* 陽性の症例であったが、*ETV6-RUNX1* 陰性の DS-ALL も 2 例認められた。DNA メチル化において *ETV6-RUNX1-like* のサブタイプは *ETV6-RUNX1* と同様の DNA メチル化プロファイルを有することが報告されている[22]ため、*ETV6-RUNX1* 陰性の DS-ALL 2 例は *ETV6-RUNX1-like* のサブタイプであることが示唆された。発現プロファイルの結果と同様に、DNA メチル化解析でも DS-ALL はそのサブタイプに応じて non-DS-ALL と同様の DNA メチル化プロファイルを有することが明らかとなった。

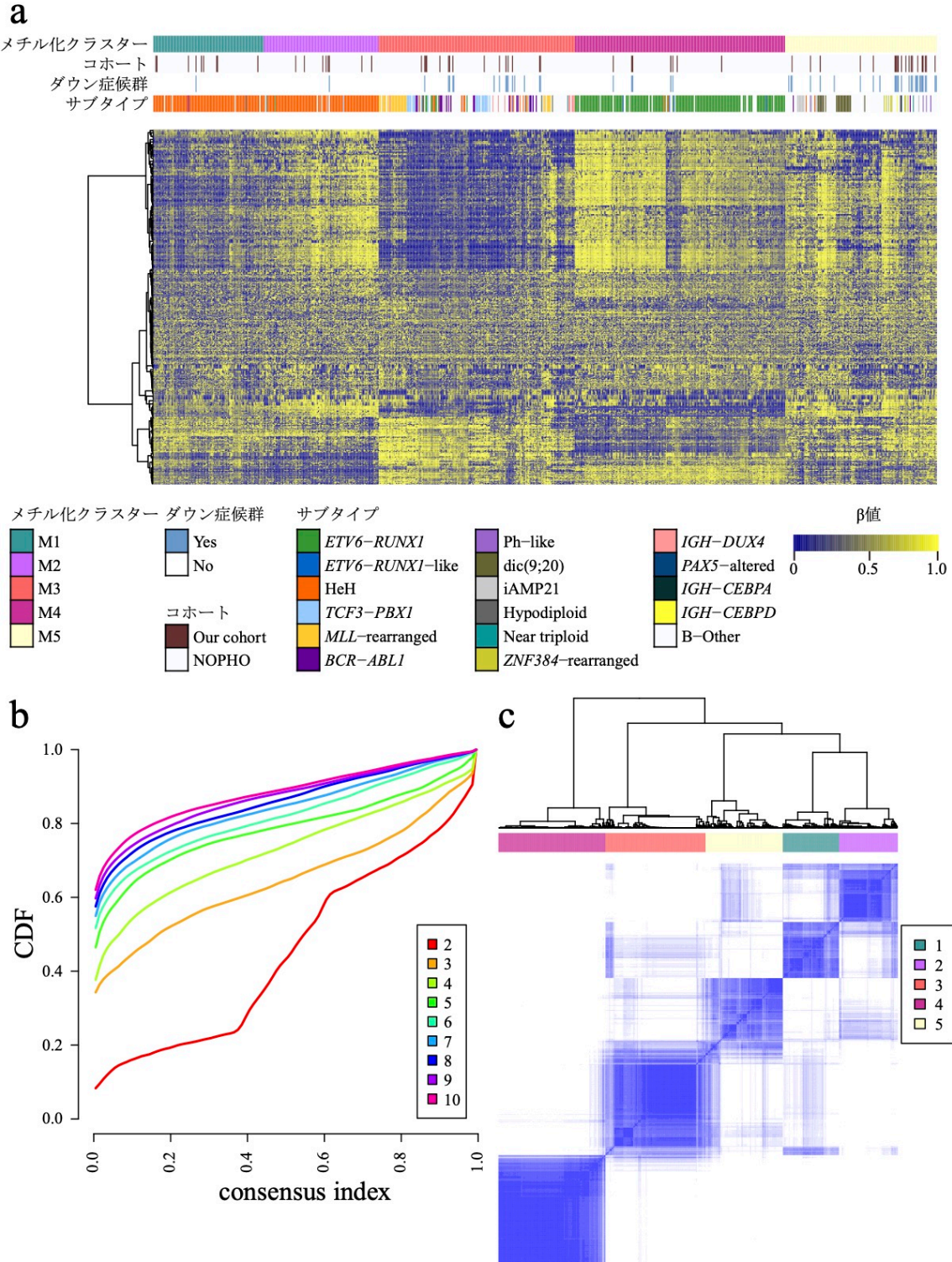


図4 BCP-ALL 723 サンプルの DNA メチル化によるコンセンサスクラスタリング  
 (a) コンセンサスクラスタリングによって BCP-ALL 全体は 5 つのクラスターに分かれた。メチル化クラスター、コホート、DS-ALL、サブタイプは図のように色付けされている。発現と同様に、DS-ALL と non-DS-ALL はそのサブタイプに応じて同じクラスターにクラスタリングされている。(b) コンセンサスクラスタリングの CDF プロット (c)コンセンサスマトリックス

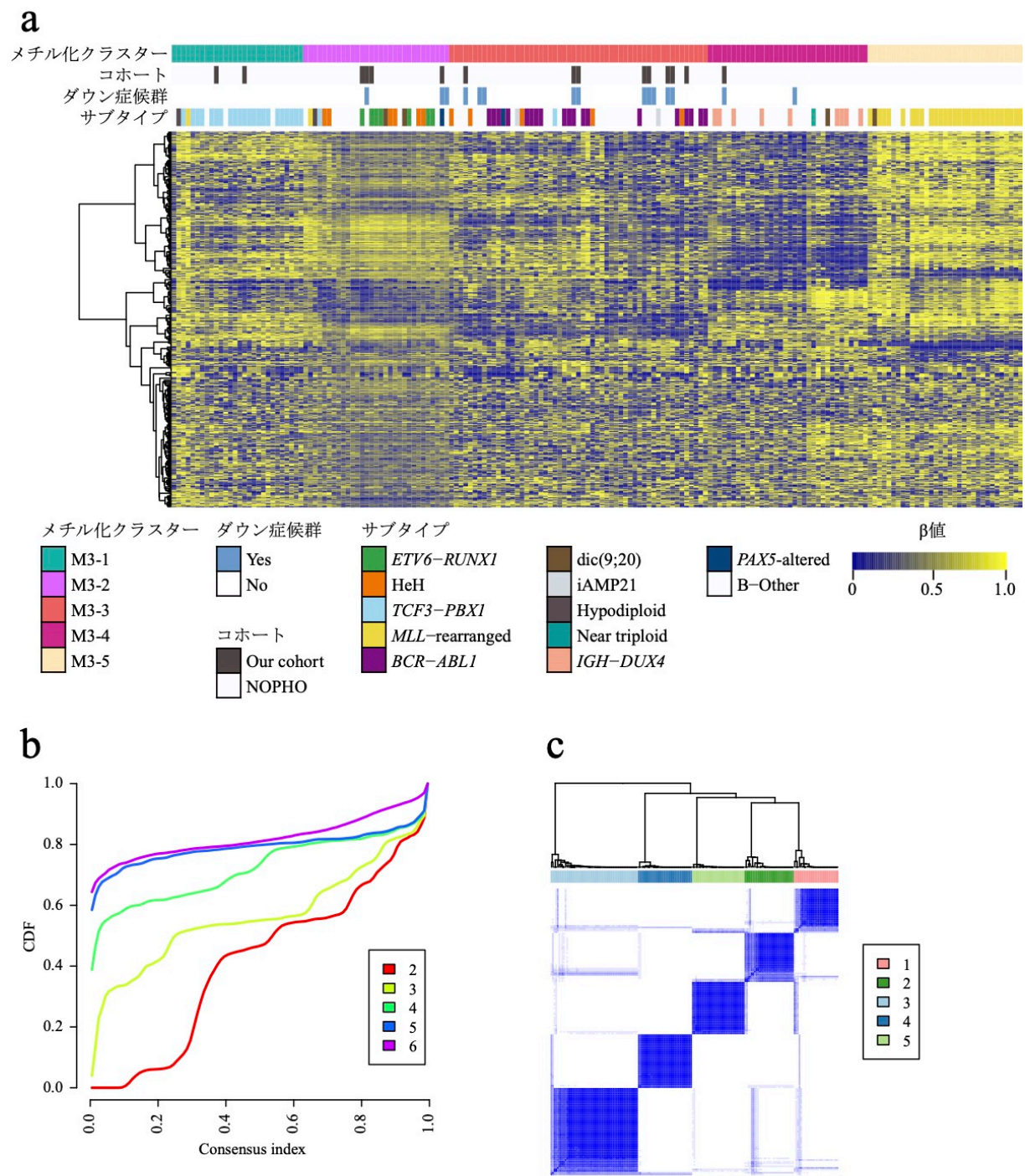


図 5 M3 クラスター 181 サンプルに対するコンセンサスクラスタリング  
 (a) クラスター、コホート、DS-ALL、サブタイプは図のように色付けされている。  
 (b) コンセンサスクラスタリングの CDF プロット (c) コンセンサスマトリックス





一方で、DS 患者はその母親や同胞と比較して *RUNXI* や *KDM2B* が高メチル化であることが報告されている[32]。DNA メチル化のクラスタリングでは DS-ALL と non-DS-ALL の差異が認められなかったため、DS-ALL と non-DS-ALL においてそれぞれの遺伝子のメチル化をスーパーバイズに比較したところ、DS-ALL において *RUNXI* の P1 プロモーター領域が高メチル化となっており、これは non-DS-ALL には認められなかった(図 7)。それぞれのサブタイプごとに *RUNXI* プロモーターのメチル化を比較したところ、Ph-like や *PAX5*-altered など検体数が少ないサブタイプもあるが、*ETV6*-*RUNXI* を除く全てのサブタイプで DS-ALL の方が高メチル化となっていた(図 8)。次に、DS-ALL において最も有意に高メチル化であった *RUNXI* プロモーターのプロンプ(cg22698744)における DS-ALL、non-DS-ALL、胎児骨髄(CD19 陰性 B 細胞、CD19 陽性 B 細胞)の公開データ[33]、成人骨髄(CD19 陽性 B 細胞)の公開データ[34]、DS-ALL 患者の寛解期骨髄中の CD19 陽性細胞の DNA メチル化を比較した。DS-ALL 患者の寛解期骨髄中の CD19 陽性 B 細胞の DNA メチル化は胎児骨髄、成人骨髄の CD19 陽性 B 細胞よりも高メチル化となっていたため、*RUNXI* プロモーターの高メチル化は DS 患者において特徴的なものと予想された(図 9)。ALL を発症していない DS 患者でも同様の検討を行った結果、DS 患者全例で *RUNXI* プロモーターの高メチル化を確認した(図 10)。図 10 で先頭の三番目の塩基であるシトシン(21 番染色体のポジション 36263808)はバイサルファイト処理によってシトシンのままかチミンへと変換されるが、その比はシトシンのメチル化に依存する。そのため、図 10 の各患者において

シトシンのピークとチミンのピークの比を比較したところ、DS 患者では有意にシトシンのピークが大きくなっていた(図 11)。このように、過去の報告[32]とも一致するように、*RUNXI* プロモーターは DS 患者において高メチル化であった。P1 プロモーターを使用して転写される *RUNXI* のアイソフォームは造血細胞に主に発現しており[35]、*RUNXI* は B 細胞の分化に不可欠な遺伝子であるため、*RUNXI* プロモーターの高メチル化は DS 患者における B 前駆細胞性 ALL の高い発症率と関連していると予想された。



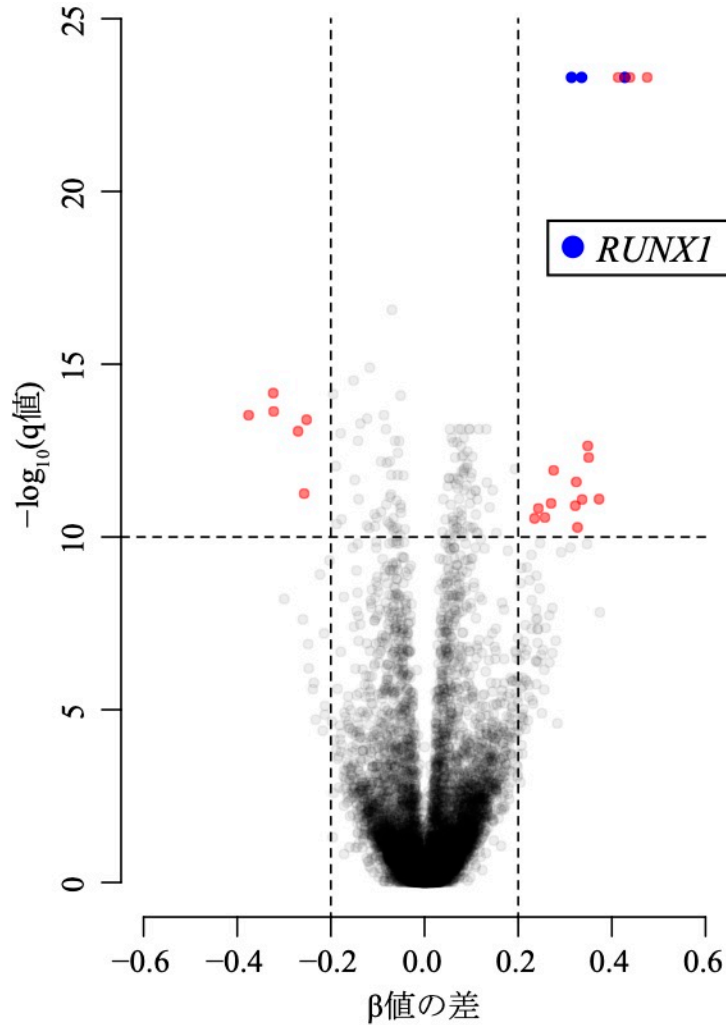


図7 DS-ALL と non-DS-ALL で有意にメチル化に差を認めたプローブ

DS-ALL と non-DS-ALL でメチル化アレイのそれぞれのプローブで  $\beta$  値の差を横軸とし、それぞれのプローブにおいて有意さの検定を行った  $q$  値の対数をとったものを縦軸とした。 $\beta$  値の差が 0.2 より大きいか-0.2 未満で  $q$  値が  $10^{-10}$  未満のものを有意とし、赤色で示している。これら有意なプローブの中で *RUNXI* のプロモーターは青色で示しており、DS-ALL では高メチル化となっている。 $q$  値はウィルコクソンの順位和検定で求め、Benjamini-Hochberg 法で補正した。

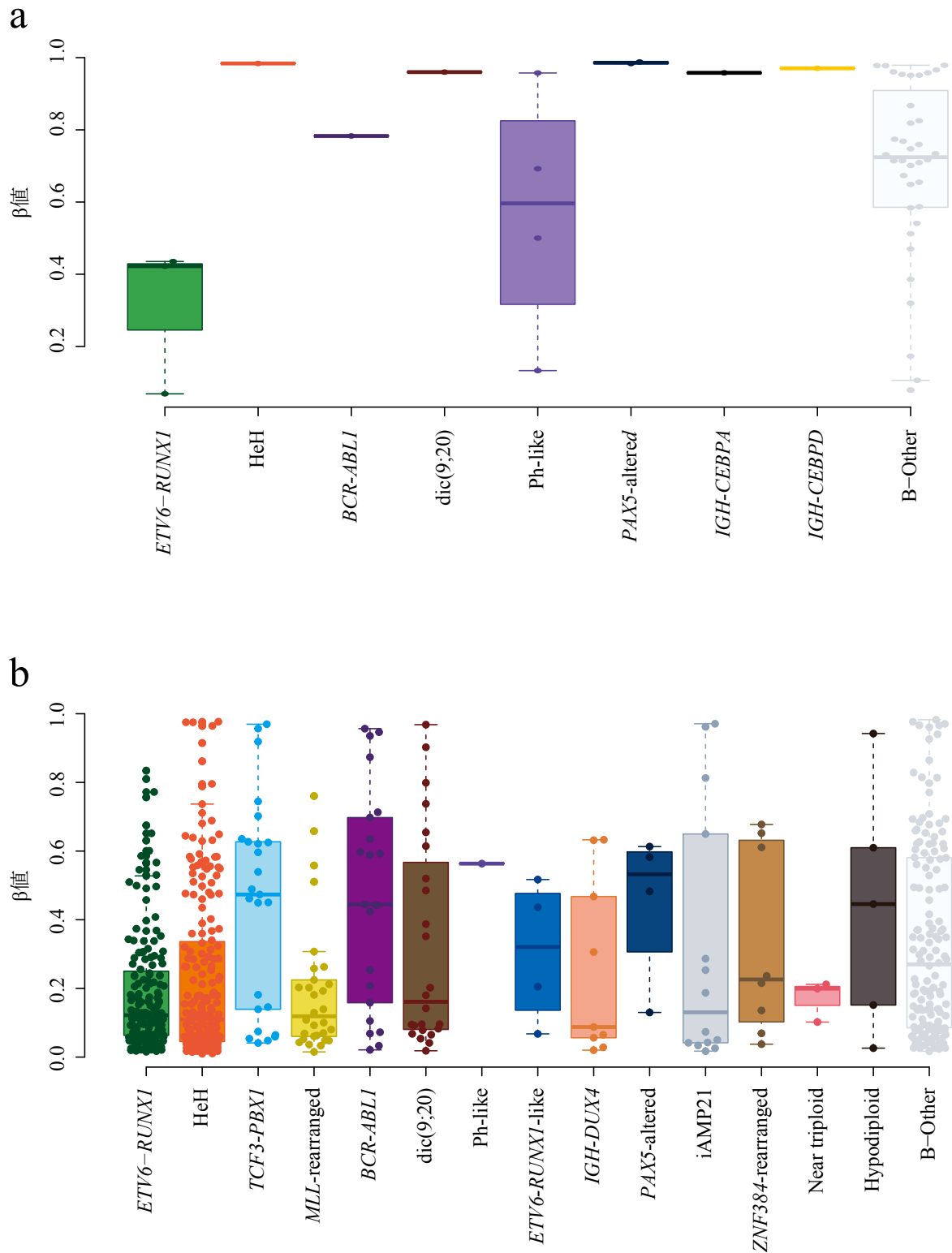


図8 サブタイプごとの *RUNXI* プロモーターのメチル化  
 それぞれのサンプルにおける  $\beta$  値を縦軸とし、それぞれのサブタイプを横軸としている。グラフ上の各点は、DS-ALL(a)と non-DS-ALL(b)において最も差が有意であったプローブ(cg22698744)を用いた  $\beta$  値を示している。non-DS-ALL と比較すると、DS-ALL は全体的に高メチル化となっている。

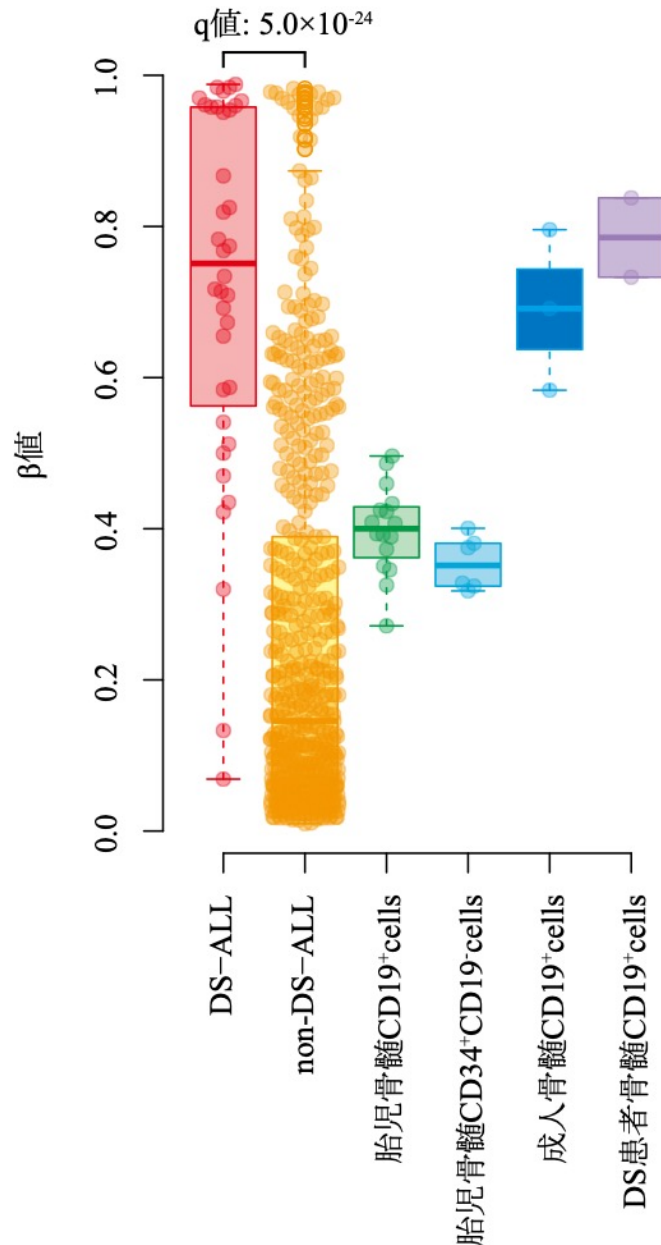


図9 正常骨髄との *RUNXI* プロモーターのメチル化の比較

DS-ALL と non-DS-ALL においてメチル化の差が最も有意であったプローブ (cg22698744) を用い DS-ALL、non-DS-ALL、胎児骨髄中 CD19<sup>+</sup>細胞(n=16)、CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>細胞(n=6)、成人骨髄中 CD19<sup>+</sup>細胞(n=3)、DS-ALL 患者の寛解期骨髄中 CD19<sup>+</sup>細胞(n=2) における *RUNXI* プロモーターのメチル化を比較した。それぞれの点は各サンプルにおける β 値を示している。正常骨髄において、成人骨髄中 CD19<sup>+</sup>細胞と DS-ALL 患者の寛解期骨髄中 CD19<sup>+</sup>細胞は胎児骨髄中の CD19<sup>+</sup>細胞、CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>細胞よりも高メチル化となっている。q 値はウィルコクソンの順位和検定で求め、Benjamini-Hochberg 法で補正した。



図 10 ALL を発症していない DS 患者における *RUNXI* プロモーターのメチル化  
 18 人の DS 患者の末梢血から CD19<sup>+</sup>細胞を抽出し、バイサルファイト処理後に Sanger  
 法で *RUNXI* プロモーターのメチル化を確認した。複製 DNA、対照に用いた小児と比  
 較すると、DS 患者は高メチル化となっている。

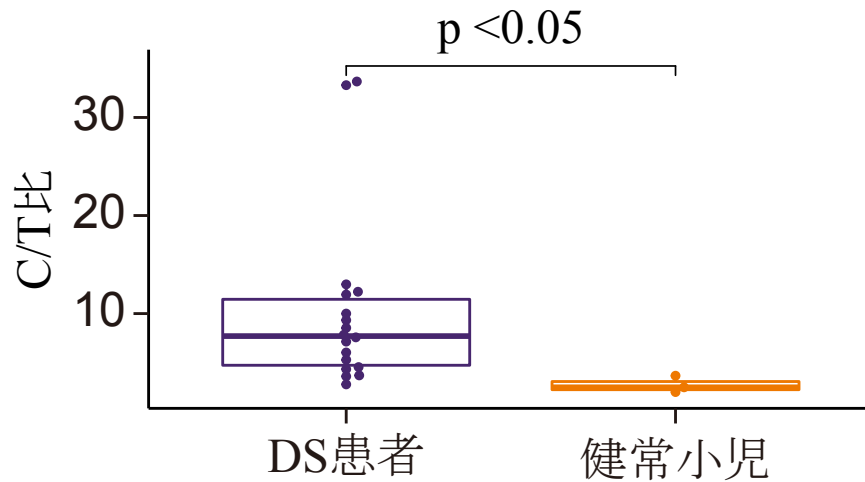


図 11 DS 患者、健常小児における RUNX1 プロモーターのメチル化されると非メチル化アレルの比

バイサルファイト処理後のメチル化アレル(C)、非メチル化アレル(T)の比を DS 患者と一般小児で比較した。DS 患者では健常小児と比較して有意にメチル化アレルの割合が大きい。検定はウィルコクソンの順位和検定で行った。

#### 変異及びコピー数解析

発現、メチル化及びゲノム異常の関係を明らかにするため、発現解析および、または DNA メチル化解析を行った 43 例の DS-ALL に変異解析(表 12)及びコピー数解析(表 13、表 14)を追加した(図 12)。加えて、発現解析で比較するために用いた non-DS-ALL 118 例(発現コホート)の変異解析の結果(表 15、表 16)も使用した。*CRLF2* 融合遺伝子を有していた DS-ALL の 9 例中 6 例に *JAK2* の変異を認めた。*JAK2* 変異と *CRLF2* 融合遺伝子を有していた症例は全症例が発現解析で Ph-like であった。一般的に *JAK2* 変異と *CRLF2* 融合遺伝子を有する症例は non-DS-ALL においても Ph-like であるため[6,7]、メチル化コホートで *JAK2* 変異と *CRLF2* 融合遺伝子を有する症例も Ph-like とした。しかし、クラスター E5 の *JAK2* 変異と *CRLF2* 融合遺伝子を有す

る non-DS-ALL 1 例は Ph-like であるはずだが、前述の遺伝子セットを用いた解析では Ph-like と同定できていなかった。そのため、前述の解析では同定しきれていない Ph-like の症例が存在すると判断し、すでに同定した Ph-like の症例において有意に高発現であった遺伝子セット(表 9)を用い、症例全体(発現コホート)を階層的クラスタリングで再クラスタリングした(図 13)。その結果、新たに DS-ALL 2 例と non-DS-ALL 1 例が Ph-like と同様の発現プロファイルを有していることが同定できたため、これらの症例も Ph-like とした。JAK2 変異を有する症例が Ph-like であったこととは対照的に、non-DS-ALL の複数のサブタイプにおいて RAS 経路の遺伝子に変異を認めため、RAS 経路の遺伝子は小児 B 前駆細胞性 ALL において一般的なドライバーであると考えられた。

表 12 DS-ALL に検出された変異

Sample ID	Chr	Start	End	Ref	Obs	Gene	ExonicFunc	AAChange	Allelic Frequency
DS_03	9	5089702	5089702	G	A	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:c.G2600A:p.R867Q	0.319
DS_08	13	28602329	28602329	G	A	<i>FLT3</i>	nonsynonymous SNV	NM_004119:c.C2039T:p.A680V	0.215
DS_05	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:c.A2047G:p.R683G	0.434
DS_07	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:c.A2047G:p.R683G	0.427
DS_09	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:c.A2047G:p.R683G	0.431
DS_11	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:c.A2047G:p.R683G	0.472
DS_17	12	112926888	112926888	G	T	<i>PTPN11</i>	nonsynonymous SNV	NM_002834:exon13:c.G1508T:p.G503V	0.296
DS_24	12	25398284	25398284	C	A	<i>KRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_004985:exon2:c.G35T:p.G12V	0.473
DS_30	12	25398284	25398284	C	T	<i>KRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_004985:exon2:c.G35A:p.G12D	0.496
DS_35	13	28592641	28592641	T	A	<i>FLT3</i>	nonsynonymous SNV	NM_004119:exon20:c.A2504T:p.D835V	0.282
DS_38	12	112915523	112915523	A	G	<i>PTPN11</i>	nonsynonymous SNV	NM_002834:exon8:c.A922G:p.N308D	0.129
DS_36	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:exon16:c.A2047G:p.R683G	0.432
DS_37	9	5089719	5089719	G	A	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:exon20:c.G2617A:p.D873N	0.312
DS_43	13	28592640	28592640	A	T	<i>FLT3</i>	nonsynonymous SNV	NM_004119:exon20:c.T2505A:p.D835E	0.222
DS_30	7	50450288	50450288	G	A	<i>IKZF1</i>	nonsynonymous SNV	NM_006060:exon5:c.G472A:p.G158S	0.989
DS_15	13	28592642	28592642	C	A	<i>FLT3</i>	nonsynonymous SNV	NM_004119:exon20:c.G2503T:p.D835Y	0.369
DS_15	12	111886029	111886029	C	T	<i>SH2B3</i>	nonsynonymous SNV	NM_001291424:exon7:c.C1045T:p.R349W	0.343
DS_19	1	115258744	115258744	C	T	<i>NRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	0.500
DS_21	12	112888210	112888210	G	A	<i>PTPN11</i>	nonsynonymous SNV	NM_002834:exon3:c.G226A:p.E76K	0.329
DS_20	1	115258747	115258747	C	T	<i>NRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_002524:exon2:c.G35A:p.G12D	0.333
DS_26	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:exon16:c.A2047G:p.R683G	0.287
DS_33	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:exon16:c.A2047G:p.R683G	0.287
DS_39	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:exon16:c.A2047G:p.R683G	0.494
DS_42	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:exon16:c.A2047G:p.R683G	0.100

表 13 SNP アレイで検出したコピー数異常

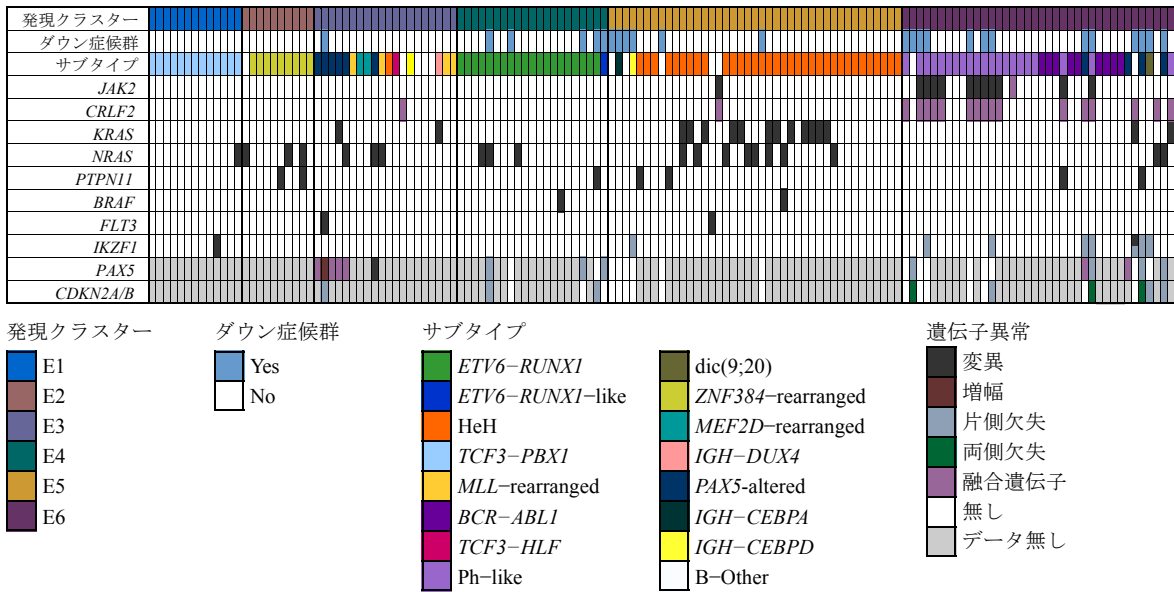
Sample ID	<i>CD200/BTLA</i>	<i>EBF1</i>	<i>CDKN2A/B</i>	<i>IKZF1</i>	<i>PAX5</i>	<i>ETV6</i>	<i>BTG1</i>	<i>RBI</i>	<i>VPREB1</i>	<i>PAR1</i>
DS_01	Focal deletion	Focal deletion	Focal deletion	Focal deletion	Focal deletion	Focal deletion	Focal deletion	Deletion		
DS_02				Deletion						
DS_03										Focal deletion
DS_04										
DS_05	Focal deletion			Focal deletion						Focal deletion
DS_06	Deletion		Deletion				Focal deletion			
DS_07										Focal deletion
DS_08				Focal deletion			Focal deletion			Focal deletion
DS_09		Focal deletion								Focal deletion
DS_10						Focal deletion				
DS_11										Focal deletion
DS_12			Deletion	Deletion	Loss					
DS_13	Focal deletion				Focal deletion	Deletion	Focal deletion		Focal deletion	
DS_14				Focal deletion						Focal deletion
DS_15			Focal deletion							
DS_16								Focal deletion		
DS_17			Deletion		Focal deletion					
DS_21			Focal deletion			Focal deletion			Deletion	
DS_22										
DS_24										
DS_25		Focal deletion					Focal deletion		Focal deletion	Focal deletion
DS_26										Focal deletion
DS_27					Focal deletion	Focal deletion	Focal deletion			
DS_28			Deletion		Focal deletion	Deletion	Focal deletion		Focal deletion	
DS_29				Focal deletion						
DS_32	Focal deletion	Focal deletion								
DS_33						Focal deletion	Focal deletion			Focal deletion
DS_34										
DS_35										
DS_38			Focal deletion	Focal deletion	Focal deletion				Focal deletion	
DS_39		Focal deletion		Focal deletion			Focal deletion			Focal deletion
DS_40	Focal deletion		Deletion	Focal deletion			Focal deletion	Focal deletion		
DS_41			Deletion		Focal deletion					
DS_42			Focal deletion	Focal deletion	Deletion	Deletion	Focal deletion		Focal deletion	Focal deletion
DS_43				Focal deletion					Focal deletion	



表 14 MLPA で検出したコピー数異常

Sample ID	<i>EBF1</i>	<i>CDKN2A/B</i>	<i>IKZF1</i>	<i>PAX5</i>	<i>ETV6</i>	<i>BTGI</i>	<i>RBI</i>	PAR1
DS_13				Deletion	Deletion	Deletion		
DS_14			Deletion					
DS_15		Deletion						
DS_16							Deletion	
DS_19		Deletion		Deletion			Deletion	
DS_20		Deletion		Deletion		Deletion		
DS_21		Deletion			Deletion			
DS_22								
DS_24		Deletion						
DS_25								
DS_26	Deletion					Deletion		Deletion
DS_27								
DS_28				Deletion	Deletion	Deletion		
DS_29		Deletion	Deletion	Deletion				
DS_30			Deletion					Deletion
DS_31								
DS_32	Deletion							
DS_33						Deletion		Deletion
DS_34								
DS_35								
DS_36	Deletion							Deletion
DS_37		Deletion		Deletion				Deletion
DS_38		Deletion	Deletion	Deletion				
DS_39	Deletion		Deletion			Deletion		Deletion

a



b

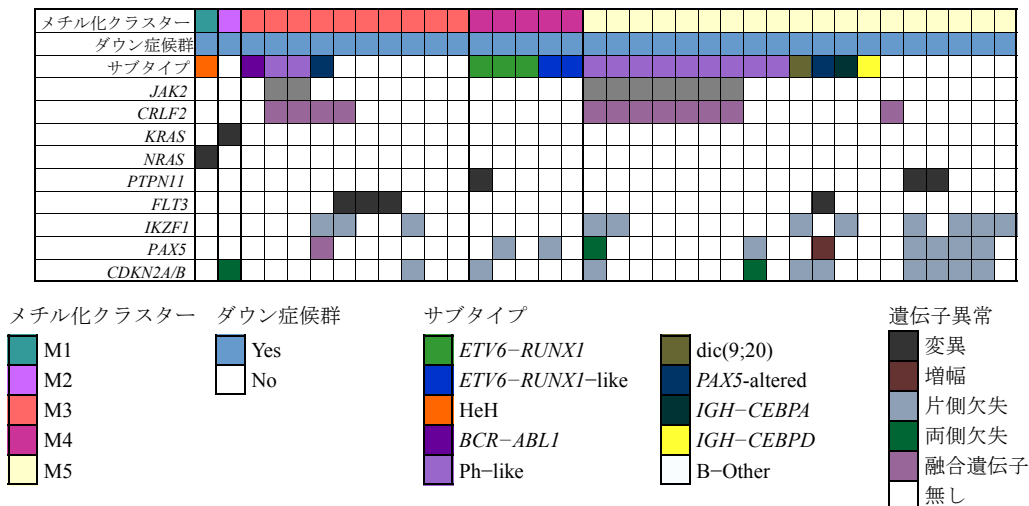


図 12 遺伝子発現、DNA メチル化とゲノム異常の関係

(a) 発現クラスターにおけるサンプルで変異、コピー数の異常を比較した。クラスター、DS-ALL、サブタイプ、遺伝子異常はそれぞれ図のように色づけされている。*IKZF1* と *PAX5* のコピー数異常は DS-ALL のサンプルのみで示されている。E3 における DS-ALL のサンプルは *PAX5* の増幅を認めている。*PAX5* 異常を有するサンプルは E3 または E6 に認める。E4 で *ETV6-RUNX1* 陰性の DS-ALL サンプルは *ETV6* を欠失しており、*ETV6-RUNX1-like* と同定した。*JAK2* 変異と *CRLF2* 融合遺伝子を有するサンプルは DS-ALL も含めて全て Ph-like であった。対照的に *RAS* 経路の変異は複数のサブタイプで認められた。

(b) メチル化クラスターにおけるサンプルで変異、コピー数の異常を比較した。*IKZF1* と *PAX5* のコピー数異常は DS-ALL のサンプルのみで示されている。Ph-like は M3 及び M5 にクラスタリングされている。

表 15 non-DS-ALL において全エクソームシーケンスで検出した変異

Sample ID	Chr	Start	End	Ref	Obs	Gene	ExonicFunc	AACChange.refGene	Allelic Frequency	P-value(EBCall)
NCCHD_001T	1	115258744	115258744	C	T	<i>NRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	0.316	60
NCCHD_005T	1	115256529	115256529	T	A	<i>NRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_002524:exon3:c.A182T:p.Q61L	0.51	60
NCCHD_006T	1	115258747	115258747	C	T	<i>NRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_002524:exon2:c.G35A:p.G12D	0.107	60
NCCHD_006T	12	25398284	25398284	C	A	<i>KRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_004985:exon2:c.G35T:p.G12V	0.115	6.945
NCCHD_016T	12	25398284	25398284	C	T	<i>KRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_004985:exon2:c.G35A:p.G12D	0.357	60
NCCHD_073T	1	115258744	115258744	C	T	<i>NRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	0.404	60
NCCHD_121T	9	5078362	5078362	A	T	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:exon16:c.A2049T:p.R683S	0.344	60
NCCHD_121T	12	112888195	112888195	T	C	<i>PTPNI1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002834:exon3:c.T211C:p.F71L	0.4	60
NCCHD_123T	12	25398284	25398284	C	T	<i>KRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_004985:exon2:c.G35A:p.G12D	0.132	9.142
NCCHD_123T	13	28592635	28592637	ATG	-	<i>FLT3</i>	nonframeshift deletion	NM_004119:exon20:c.2508_2510del:p.836_837del	0.086	12.894
NCCHD_125T	1	115258747	115258747	C	T	<i>NRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_002524:exon2:c.G35A:p.G12D	0.446	60
NCCHD_126T	12	25380285	25380285	G	A	<i>KRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_004985:exon3:c.C173T:p.T58I	0.185	11.687
NCCHD_131T	1	115258744	115258744	C	T	<i>NRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	0.056	5.54
NCCHD_131T	12	112888199	112888199	C	T	<i>PTPNI1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002834:exon3:c.C215T:p.A72V	0.192	60
NCCHD_132T	12	25398284	25398284	C	G	<i>KRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_004985:exon2:c.G35C:p.G12A	0.324	60
NCCHD_135T	9	5089726	5089726	C	A	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:exon20:c.C2624A:p.T875N	0.409	60
NCCHD_136T	12	112888189	112888189	G	A	<i>PTPNI1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002834:exon3:c.G205A:p.E69K	0.044	7.292
NCCHD_136T	12	112888210	112888210	G	A	<i>PTPNI1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002834:exon3:c.G226A:p.E76K	0.127	11.75
NCCHD_138T	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	nonsynonymous SNV	NM_004972:exon16:c.A2047G:p.R683G	0.419	60
NCCHD_142T	12	25398281	25398281	C	T	<i>KRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_004985:exon2:c.G38A:p.G13D	0.075	8.138
NCCHD_142T	12	25398284	25398284	C	T	<i>KRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_004985:exon2:c.G35A:p.G12D	0.1	8.705
NCCHD_151T	1	115258747	115258747	C	A	<i>NRAS</i>	nonsynonymous SNV	NM_002524:exon2:c.G35T:p.G12V	0.358	60
NCCHD_158T	12	112888165	112888165	G	T	<i>PTPNI1</i>	nonsynonymous SNV	NM_002834:exon3:c.G181T:p.D61Y	0.325	60

表 16 non-DS-ALL において RNAseq で検出した変異

Sample ID	Chr	Start	End	Ref	Obs	Gene	AChange.refGene	Allelic Frequency	P-value(EBCall)
NCCHD_001T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	0.527	60
NCCHD_005T	1	1.15E+08	1.15E+08	T	A	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon3:c.A182T:p.Q61L	0.433	60
NCCHD_006T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G35A:p.G12D	0.202	60
NCCHD_006T	12	25398284	25398284	C	A	<i>KRAS</i>	NM_004985:exon2:c.G35T:p.G12V	0.177	13.938
NCCHD_011T	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	NM_004972:exon16:c.A2047G:p.R683G	0.281	13.398
NCCHD_016T	12	25398284	25398284	C	T	<i>KRAS</i>	NM_004985:exon2:c.G35A:p.G12D	0.509	60
NCCHD_020T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	0.274	60
NCCHD_021T	9	5089702	5089702	G	A	<i>JAK2</i>	NM_004972:exon20:c.G2600A:p.R867Q	0.389	60
NCCHD_028T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G34A:p.G12S	0.261	60
NCCHD_031T	12	25378647	25378647	T	A	<i>KRAS</i>	NM_004985:exon4:c.A351T:p.K117N	0.267	60
NCCHD_032T	7	50450288	50450288	G	A	<i>IKZF1</i>	NM_001291837:exon5:c.G472A:p.G158S	0.383	60
NCCHD_039T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G35A:p.G12D	0.095	14.778
NCCHD_040T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	0.205	60
NCCHD_040T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G35A:p.G12D	0.218	60
NCCHD_073T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	0.52	60
NCCHD_101T	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	NM_004972:exon16:c.A2047G:p.R683G	0.31	60
NCCHD_106T	1	1.15E+08	1.15E+08	T	A	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon3:c.A183T:p.Q61H	0.398	60
NCCHD_110T	12	25398281	25398281	C	T	<i>KRAS</i>	NM_004985:exon2:c.G38A:p.G13D	0.373	60
NCCHD_111T	1	1.15E+08	1.15E+08	G	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon3:c.C181A:p.Q61K	0.304	60
NCCHD_111T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	0.09	12.411
NCCHD_112T	13	28592641	28592641	T	A	<i>FLT3</i>	NM_004119:exon20:c.A2504T:p.D835V	0.453	60
NCCHD_114T	7	1.4E+08	1.4E+08	C	G	<i>BRAF</i>	NM_004333:exon11:c.G1406C:p.G469A	0.225	10.862
NCCHD_116T	12	25398281	25398281	C	T	<i>KRAS</i>	NM_004985:exon2:c.G38A:p.G13D	0.536	60
NCCHD_121T	9	5078362	5078362	A	T	<i>JAK2</i>	NM_004972:exon16:c.A2049T:p.R683S	0.348	60
NCCHD_121T	12	1.13E+08	1.13E+08	T	C	<i>PTPN11</i>	NM_002834:exon3:c.T211C:p.F71L	0.347	60
NCCHD_123T	12	25398284	25398284	C	T	<i>KRAS</i>	NM_004985:exon2:c.G35A:p.G12D	0.229	10.733
NCCHD_123T	13	28592635	28592637	ATG	-	<i>FLT3</i>	NM_004119:exon20:c.2508_2510del:p.836_837del	0.143	60
NCCHD_125T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G35A:p.G12D	0.549	60
NCCHD_126T	12	25380285	25380285	G	A	<i>KRAS</i>	NM_004985:exon3:c.C173T:p.T58I	0.311	60
NCCHD_127T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	G	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G35C:p.G12A	0.393	60
NCCHD_131T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	T	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G38A:p.G13D	0.137	14.353
NCCHD_131T	12	1.13E+08	1.13E+08	C	T	<i>PTPN11</i>	NM_002834:exon3:c.C215T:p.A72V	0.212	60
NCCHD_132T	12	25398284	25398284	C	G	<i>KRAS</i>	NM_004985:exon2:c.G35C:p.G12A	0.339	60
NCCHD_135T	9	5089726	5089726	C	A	<i>JAK2</i>	NM_004972:exon20:c.C2624A:p.T875N	0.333	14.247
NCCHD_136T	12	1.13E+08	1.13E+08	G	A	<i>PTPN11</i>	NM_002834:exon3:c.G226A:p.E76K	0.212	60
NCCHD_138T	9	5078360	5078360	A	G	<i>JAK2</i>	NM_004972:exon16:c.A2047G:p.R683G	0.484	15.955
NCCHD_142T	12	25398284	25398284	C	T	<i>KRAS</i>	NM_004985:exon2:c.G35A:p.G12D	0.275	15.955
NCCHD_151T	1	1.15E+08	1.15E+08	C	A	<i>NRAS</i>	NM_002524:exon2:c.G35T:p.G12V	0.343	60
NCCHD_158T	12	1.13E+08	1.13E+08	G	T	<i>PTPN11</i>	NM_002834:exon3:c.G181T:p.D61Y	0.34	60

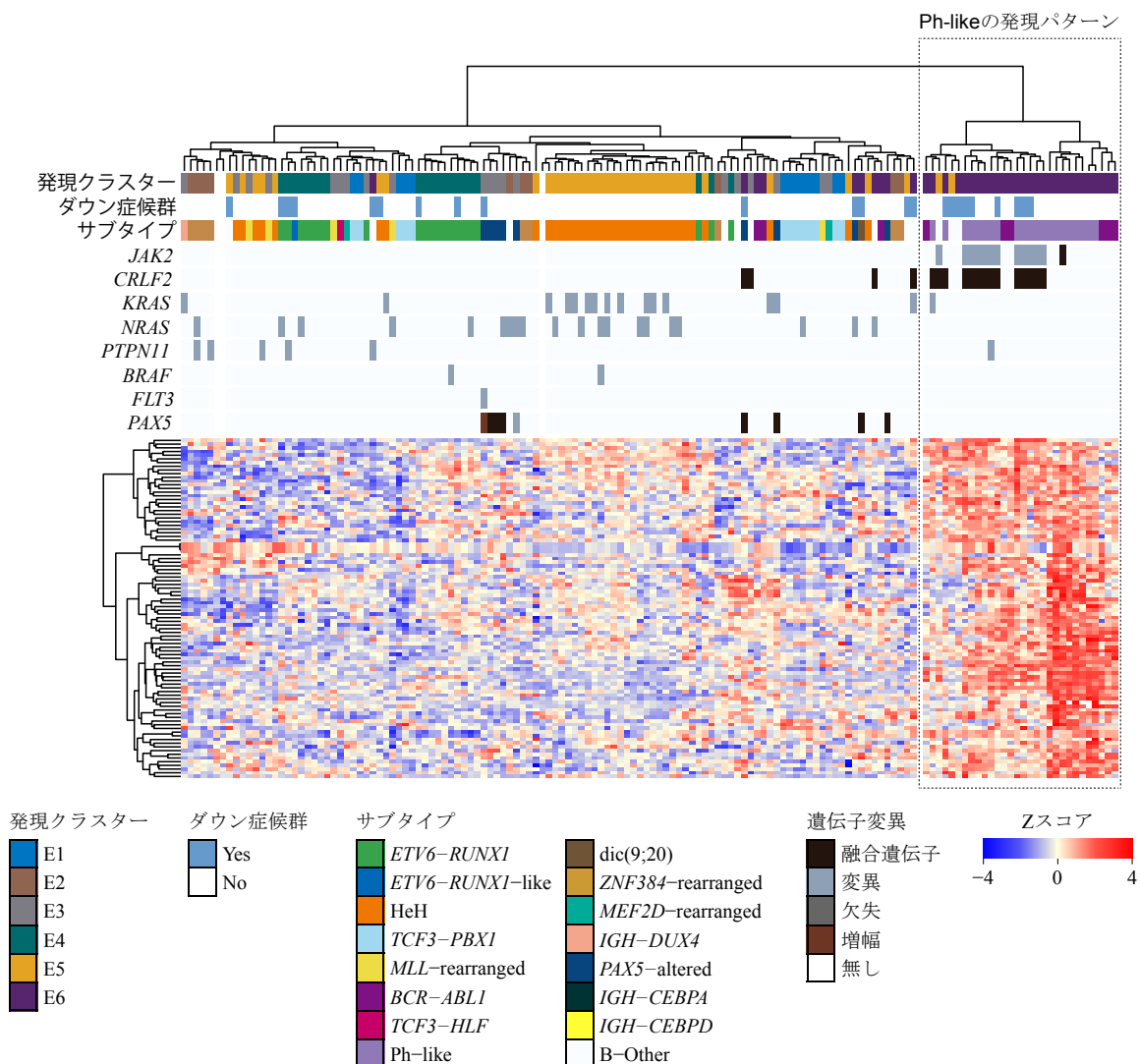


図 13 Ph-like において有意に高発現であった遺伝子を用いた階層的クラスタリング  
 すでに同定された Ph-like において有意に高発現であった遺伝子(q 値<0.0001)を用い  
 て再度階層的クラスタリングを行った。使用したサンプルは DS-ALL 25 サンプル、  
 non-DS-ALL 25 サンプル、小児 non-DS-ALL 93 サンプルの RNA シーケンス公開デー  
 タである。このクラスタリングで、すでに同定された Ph-like と同様の発現パターン  
 を呈していた 3 サンプル(DS-ALL 2 サンプルと non-DS-ALL 1 サンプル)も Ph-like と  
 した。

コピーナンバー解析ではクラスターE3 にクラスタリングされた DS-ALL 1 例に  
*PAX5* のエクソン 2 から 5 の局所的な増幅(図 14)を認め、これは小児 ALL において  
 認められることが知られている既知の異常であった[36]。この症例における *PAX5* の

エクソン 2 から 5 の発現レベルは他のエクソンと比較して高発現となっていたため (図 15)、異常な構造を有する PAX5 蛋白が発現しているか、PAX5 の機能喪失が起きていると考えられた。この PAX5 増幅を伴う DS-ALL は他の PAX5-altered の症例と同様の発現プロファイルを有していたため、この症例のサブタイプを PAX5-altered とした。

Chromosome 9 of Sample DS-15

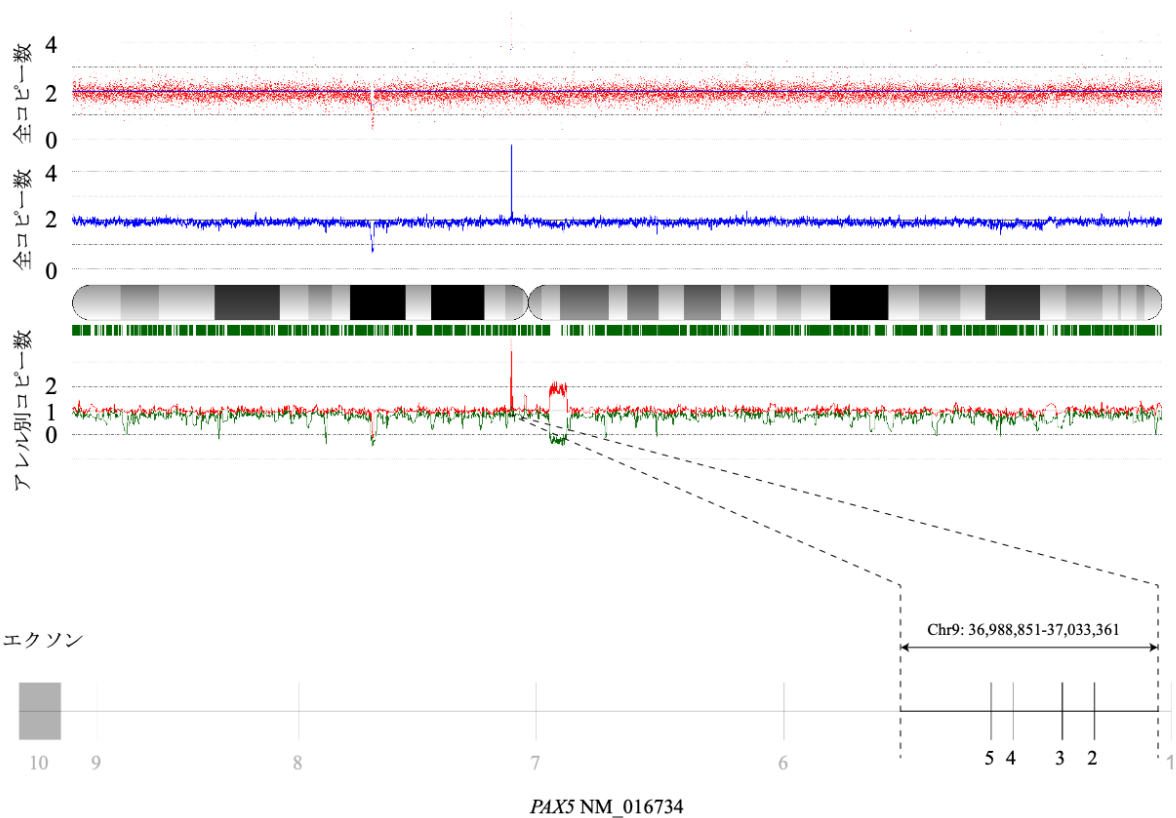


図 14 PAX5 エクソン 2-5 の部分的な増幅

DS-15 の 9 番染色体の SNP アレイの結果を示す。全コピー数は図上部では赤い点、図中央部では青い線で示してある。その下には 9 番染色体の全体図を示しており、ヘテロ接合の SNP は緑の線で示している。図下部にはアレル別コピー数を示してあり、赤及び緑の点で示してある。コピー数解析により、DS-15 の 9 番染色体に部分的な増幅を認めた。部分的な増幅部位は PAX5 のエクソン 2 から 5 が含まれていた。

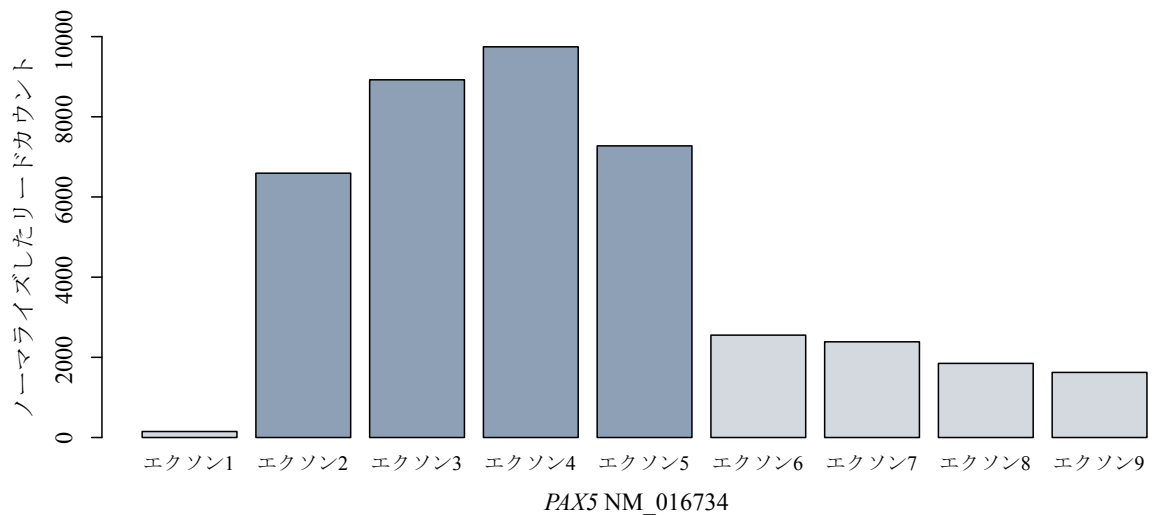


図 15 DS-15 における *PAX5* のエクソンごとのノーマライズドリードカウント  
 増幅しているエクソンは他のエクソンよりも高発現となっており、異常な構造の  
*PAX5* 蛋白が発現している可能性がある。

*PAX5* 欠失を除くと、これまでに DS-ALL における *PAX5* 異常は詳細には検討されていなかったが、今回の解析で DS-ALL において *PAX5* は欠失のみならず増幅や融合遺伝子、変異などの様々な *PAX5* 異常を有することが明らかとなった。小児 B 前駆細胞性 ALL には *PAX5* の融合遺伝子、増幅、変異と様々な異常が認められるが、*PAX5* 欠失を除けば、*PAX5* 異常の種類に関わらずこれらの発現プロファイルは同様であることが示された[37]。今回のコホートでは症例数が少ないために正確性が低いことが予想されるが、大部分の *PAX5*-altered は単一のクラスターである E3 にクラスタリングされた。これに対して、*PAX5* 欠失を伴う例は複数のクラスターにクラスタリングされたため、*PAX5* 欠失はその他の *PAX5* 異常とは異なる病原性を有すると考えられる。これは、上述のように *PAX5* 欠失は *PAX5* の発現を低下させるだけだが、その他

の *PAX5* 異常は異常な *PAX5* 蛋白を発現するためかもしれない。

発現解析で *ETV6-RUNX1* のクラスターE4 にクラスタリングされた *ETV6-RUNX1* 陰性であった DS-ALL 1 例(DS-13)はコピー数解析で *ETV6* の両側欠失を認めた(図 16) ため、この症例は *ETV6-RUNX1*-like であると考えられた[38]。

### Chromosome 12 of DS-13

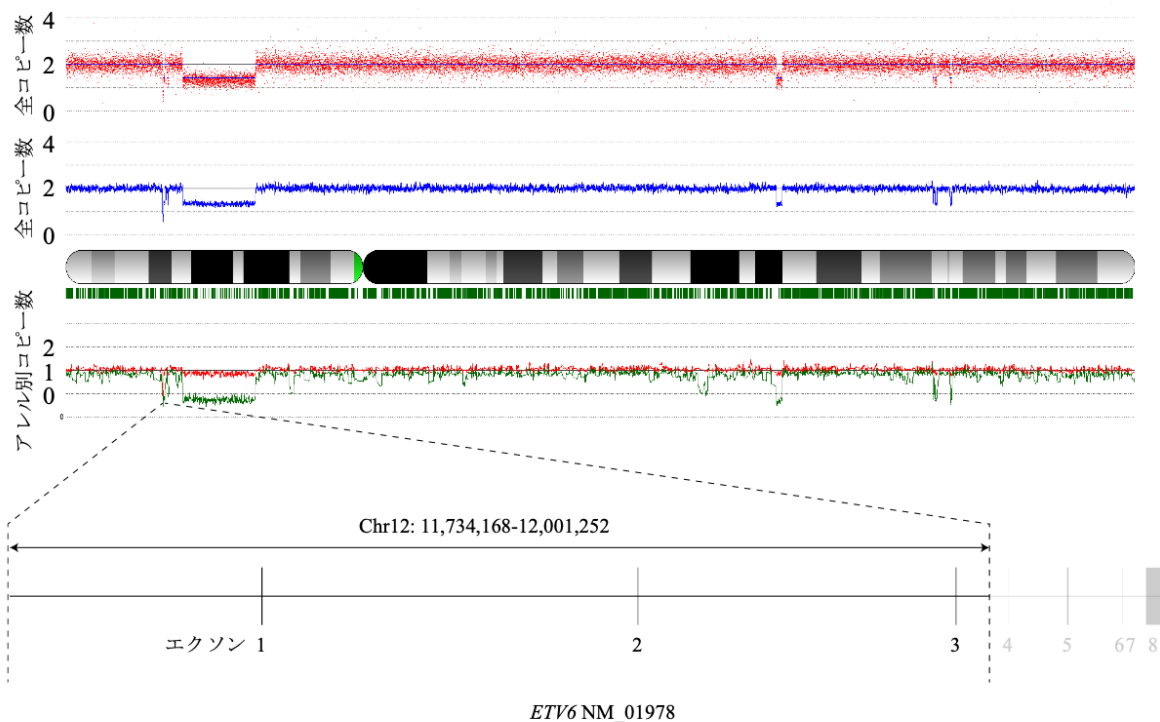


図 16 DS-13 における *ETV6* の欠失

DS-13 の 12 番染色体の SNP アレイの結果を示す。全コピー数は図上部では赤い点、図中央部では青い線で示してある。その下には 9 番染色体の全体図を示しており、ヘテロ接合の SNP は緑の線で示している。図下部にはアレル別コピー数を示してあり、赤及び緑の点で示してある。コピー数解析により、DS-13 の 12 番染色体に部分的な欠失を認めた。欠失部位は *ETV6* のエクソン 1-3 が含まれていた。

DNA メチル化解析で *ETV6-RUNX1* のクラスターM4 にクラスタリングされた *ETV6-RUNX1* 陰性であった DS-ALL 2 例(DS-10, DS-13)のうち、DS-10 では RNA のクオリ



ティが低かったために発現プロファイルを同定することができなかった。コピー数解析で DS-10 に *ETV6-RUNX1-like* で特徴的に欠失する遺伝子である *ETV6* と *ARPP21* の欠失[39]を認めたために DS-13 も *ETV6-RUNX1-like* と同定した(図 17)。

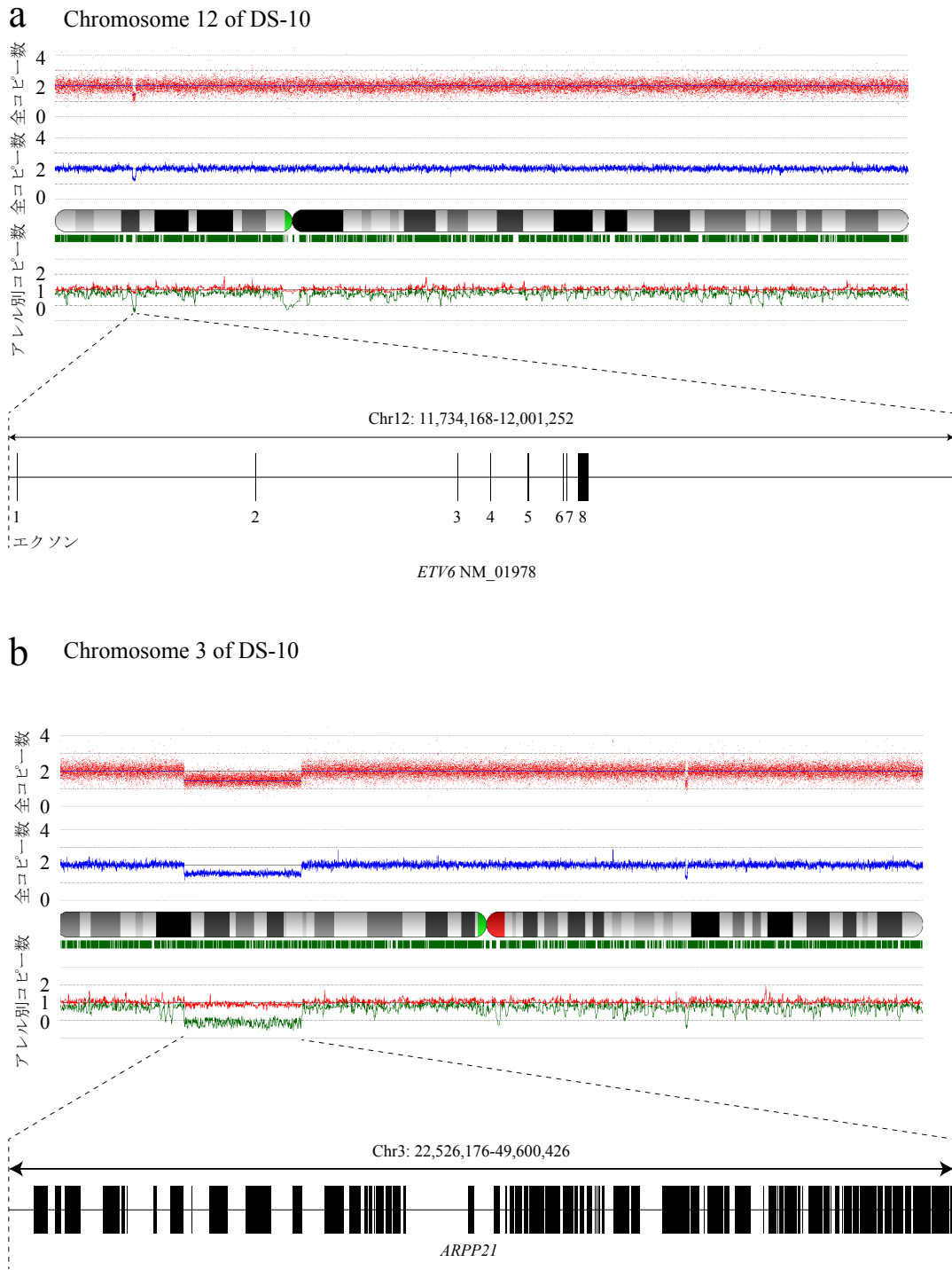


図 17 DS-10 における *ETV6*、*ARPP21* の欠失

DS-10 の 12 番染色体(a)、3 番染色体(b)の SNP アレイの結果を示す。全コピー数はそれぞれの図上部では赤い点、図中央部では青い線で示してある。その下には 9 番染色体の全体図を示しており、ヘテロ接合の SNP は緑の線で示している。図下部にはアレル別コピー数を示してあり、赤及び緑の点で示してある。12 番染色体の欠失部位には *ETV6*(a)、3 番染色体の欠失部位には *ARPP21*(b)が含まれていた。

## 考察

今回の解析で明らかにしたこととして、DS-ALL は ML-DS と異なって高度に多様な遺伝学的特性を有していることである(図 18)。これは *GATA1* 変異を基礎として発生し、遺伝学的に単一な性質を有するとされている ML-DS とは大きく異なっていた。発現や DNA メチル化のプロファイルはそのサブタイプに応じて、DS-ALL は non-DS-ALL と同様であったが、そのサブタイプの頻度は大きく異なっており、DS-ALL では *ETV6-RUNX1* や HeH の頻度が小さく、Ph-like の頻度が大きかった。今回のコホートでは Ph-like の割合は non-DS-ALL よりも有意( $p=0.0056$ )に大きく、non-DS-ALL では本来は思春期以降に多いとされるが、10 歳未満の DS-ALL でも頻度が大きくなっていった。発現と DNA メチル化のクラスターでは分かれ方に一部差異を認めたが、遺伝子発現は DNA メチル化だけではなく、変異やコピー数変化、融合遺伝子の存在にも影響を受けるためだと考えられる。以前の報告では、DS-ALL においては *MLL* の再構成を伴うもの、*BCR-ABL1*、*ETV6-RUNX1*、HeH の頻度が小さく、それぞれ 0.7%、8%、9%であるとされていたが[15]、DS 患者においては ALL の発症リスクが一般に小児の 20 倍以上[12]であり、non-DS-ALL でのこれらのサブタイプの割合(*ETV6-RUNX1* 25%、HeH 25%、*BCR-ABL1* 2%)を考慮に入れると、これらの発症頻度が小さいサブタイプの発症リスクも数倍となると予想される。さらに、Ph-like は DS-ALL では 40%近くを占めるが、non-DS-ALL では 10%程度であるため、DS 患者における Ph-like ALL の発症リスクは数十倍以上と予想される。一般的に Ph-like は



## 図 18 DS-ALL における遺伝的なランドスケープ

(a) DS-ALL における遺伝的なランドスケープにそれぞれのサンプルの臨床情報を加えた。NCI リスク、性別、予後、サブタイプ、遺伝子異常は図のように色づけされている。*IKZF1*plus は *IKZF1* の欠失と *CDKN2A*、*CDKN2B*、*PAX5*、*PAR1* のいずれかの欠失を伴うものとしたが、*PAR1* 欠失を認めるものでも *ERG* の欠失があるものは除外した。DS-ALL は極めて多様な疾患であり、これまでに DS-ALL において認められていた *ETV6-RUNX1*、HeH、*dic(9;20)*、*BCR-ABL1* に加えて Ph-like、*ETV6-RUNX1*-like、*PAX5* 異常、*IGH-CEBPA* 融合遺伝子、*IGH-CEBPD* 融合遺伝子を同定した。

(b) それぞれの DS-ALL サンプルにおける遺伝子変異を上側に示し、サブタイプを下側に示している。DS-ALL において高頻度に認められることが示された遺伝子の中で *JAK2* 変異を伴うものは全例が Ph-like であったが、*RAS* 経路の遺伝子変異は複数のサブタイプに認められた。

1) ABL-class(*ABL1*、*ABL2*、*CSF1R*、*PDGFRB*)の再構成を伴うもの、2) JAK/STAT 経路(*CRLF2*、*JAK2*、*EPOR*、*IL7R*、*SH2B3*)の異常を伴うもの、3) その他の稀なキナーゼ(*NTRK3*、*DGKH*、*FGFR1*)の異常を伴うもの、の3種類に大別できる。このうち、JAK/STAT 経路の異常を伴うものは non-DS-ALL の Ph-like では 50%程度の頻度[6]であるが、DS-ALL では 2 例を除いた全例が *JAK2* 変異と *CRLF2* 融合遺伝子を有する JAK/STAT 経路の異常を伴うタイプとなっており、ABL-class、*JAK2*、*EPOR* などの融合遺伝子は認められなかった。これまでに DS-ALL において *CRLF2* 融合遺伝子以外の融合遺伝子を有する Ph-like は報告されていない。Ph-like の中で JAK/STAT 経路の異常を伴うタイプでは、*CRLF2* 融合遺伝子だけを有するものと、*CRLF2* 融合遺伝子と *JAK2* 変異の組み合わせの両方を有するものがあるが、これまでに *JAK2* 変異だけを有している Ph-like は報告されていない[6]。我々のコホートにおいても、*JAK2* 変異を有するサンプルの全例に *CRLF2* 融合遺伝子が認められるため、*CRLF2* 融合遺

伝子は *JAK2* 変異に先行すると予想される。そのため、DS 患者において Ph-like が多い原因は DS 患者において *CRLF2* 融合遺伝子の頻度が大きいことによると考えられる。

今回のコホートでは *IKZF1* G158S 変異、*PAX5* の増幅、*ETV6-RUNXI-like* などの最近同定されたサブタイプも認め、DS-ALL 全体の 2/3 のサブタイプを同定できたが、まだ 1/3 程度はサブタイプが不明である B-other であった。B-other の半数程度に *RAS* 経路の遺伝子変異を認めた。*RAS* 経路の遺伝子変異は non-DS-ALL、特に HeH においてよく認められることが報告されている[40]。DS-ALL においては *JAK2*、*RAS* 経路の遺伝子変異が特徴的だという報告があるが[17]、non-DS-ALL においても *RAS* 経路の遺伝子変異が認められることから、DS-ALL において *RAS* 経路の遺伝子変異は特徴的なものではないと考えられる。DS-ALL において B-other が多い原因として、DS-ALL は *IGH-CEBPA* や *IGH-CEBPD* 融合遺伝子のように、non-DS-ALL では頻度が小さい稀なサブタイプの割合が高いことから、まだ同定されていない稀なサブタイプを多く含む可能性があると考えられる。

以前の報告では、DS 患者は *HMGNI* や *DYRK1A* といった 21 番染色体上の遺伝子を多く保有するために、ALL を発症しやすい遺伝的素因を有するとされていた。加えて、本研究で明らかとした *RUNXI* プロモーターの高メチル化もそのような遺伝的素因の一つである可能性がある。*RUNXI* はリンパ球系共通前駆細胞から B 前駆細胞への分化を促進する分化因子であり、*RUNXI* プロモーターの高メチル化はリンパ球

系共通前駆細胞における *RUNXI* の発現を低下させる[41]ためである。DS 患者は異数性に伴う染色体の不安定性を有する[42]ことから、これも ALL の発症に関与している可能性もある。DS-ALL の中で最も common なサブタイプである *JAK2* 変異と *CRLF2* 融合遺伝子を有する Ph-like の発症の契機となるのは *CRLF2* 融合遺伝子の形成であり、ML-DS の発症の契機となるのは *GATA1* の変異である。これら両遺伝子は X 染色体上に存在する。よって、余分な 21 番染色体は直接白血病の発症を起こすわけではなく、X 染色体のクロマチン構造を変化させるなど、間接的な要因となっている可能性もあると考えられる。これらの遺伝的およびエピジェネティックな要因が強調し、DS 患者において ALL を発症させていると予想される。*RUNXI* を含む複数の遺伝子は DS における一過性骨髄増殖性疾患や AML においても高メチル化であることが知られている[43]ため、ALL 以外の血液悪性腫瘍にも *RUNXI* プロモーターの高メチル化が関与している可能性がある。発現解析では DS-ALL と non-DS-ALL で *RUNXI*、*HMGNI*、*DYRK1A* など 21 番染色体上の遺伝子の発現レベルに差を認めなかったが、ALL では一般的にこれらの遺伝子は低発現であるため、ALL の発症には関与しても発症後の病態には関与しないためだと考えられる。我々の当初の予想としては、DS-ALL において 21 番染色体の遺伝子が高発現であることを明らかにし、それらの遺伝子が ALL の発症を誘導することを示したかったが、残念ながら当初の予想とは異なり、21 番染色体のコピー数と 21 番染色体の遺伝子の発現レベルには相関が認められなかった。

*RUNX1* プロモーターの高メチル化は *ETV6-RUNX1* や一部の Ph-like には認められなかった。*ETV6-RUNX1* 融合遺伝子の ALL 発症に対する役割はいまだ不明だが、*ETV6-RUNX1* 融合遺伝子単体では ALL に至らず、必ずしも *RUNX1* の抑制を伴うものではないと考えられている。Ph-like は *BCR-ABL1* のように、ABL-class のキナーゼや *EPOR*、*JAK2* の融合遺伝子が形成され、直接細胞増殖を刺激するキナーゼが高発現となることで腫瘍化に至ると考えられている。Non-DS-ALL ではこれらのサブタイプは *RUNX1* に依存しない発症メカニズムを有しているため、DS-ALL においても *RUNX1* の抑制とは異なるメカニズムで発症していると考えられる。

今回のコホートにおいて、DS-ALL の予後は一般的な non-DS-ALL の予後と比較すると不良であった(図 19)。これは DS 患者が化学療法に対しての感受性が高く、粘膜障害などの有害事象やそれに伴う治療関連死が多いためであると考えられる。加えて、DS-ALL においては独特なサブタイプや Ph-like などの高リスクなサブタイプが多いことから、ALL の分子生物学的なサブタイプに応じたリスク分類ができていない可能性があると考えられる。Non-DS-ALL において予後の良好なサブタイプである *ETV6-RUNX1* や HeH は、DS-ALL においても全例が治癒していた。DS-ALL における Ph-like の予後は non-DS-ALL における Ph-like ほど不良ではなかった(図 20)。これは Ph-like の中でもサブタイプによって予後が異なるためだと考えられる。すなわち、



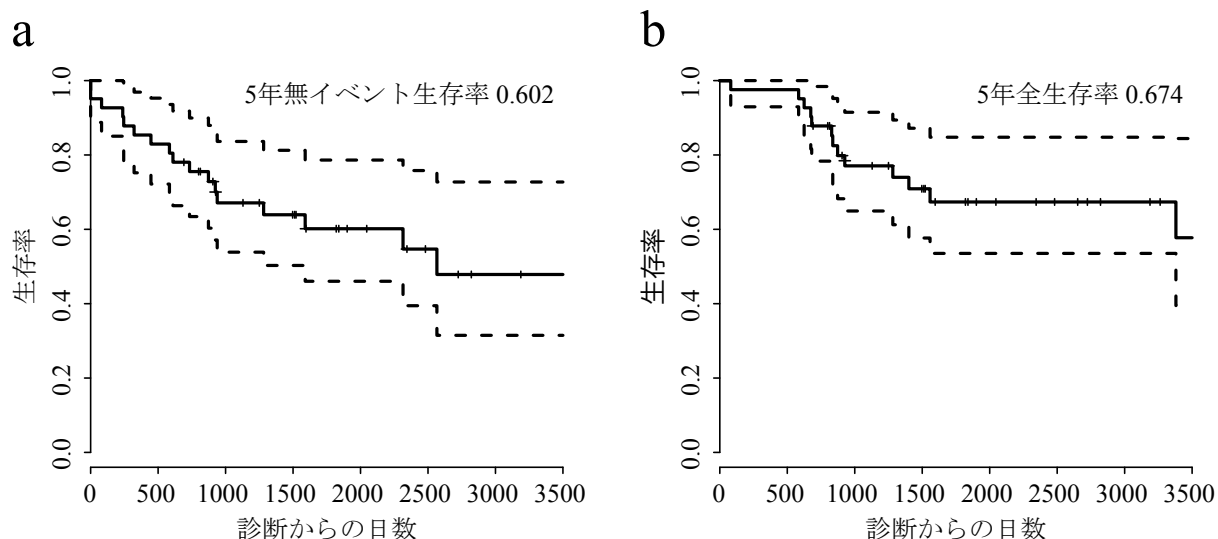


図 19 今回のコホートにおける DS-ALL の生存解析

今回のコホートにおける DS-ALL 全サンプルのカプランマイヤー曲線を示した。破線は 95%信頼区間を示している。全生存率(a)、無イベント生存率(b)は過去の報告と同様であった。

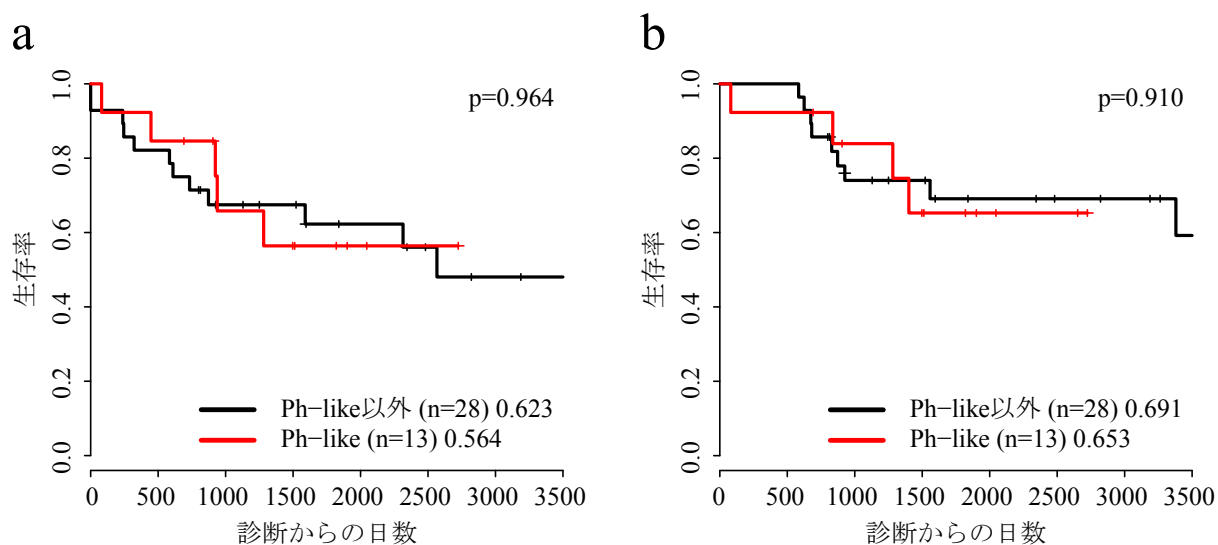


図 20 今回のコホートにおける Ph-like の生存解析

今回のコホートにおける DS-ALL で Ph-like(a)とそれ以外(b)のサブタイプで Kaplan-Meier 曲線と比較した。Non-DS-ALL では Ph-like の予後は悪いが、DS-ALL においては他のサブタイプと比較しても予後は同様であった。

Ph-like の中でも *JAK2* 変異を有する ALL は、*ABL-class*、*EPOR*、*JAK2* の融合遺伝子

を有する ALL よりも予後が良好であると予想される。これに対して、**B-other** の予後は大きく不良であった(図 21)ため、**B-other** におけるサンプルのサブタイプの同定を行い、それに応じたリスク分類を行う必要があると考えられる。小児 ALL の成績が向上してきたのは、分子生物学的なサブタイプの同定とそれに応じた化学療法の強度を変更してきたためだと考えられるが、**DS-ALL** における独特なサブタイプは稀なために化学療法の強度をどのようにすべきかまだ明らかではない。これら稀なサブタイプの発症頻度と治療への反応性を確認するために、より多くの **DS-ALL** を含むコホートでの検証が望ましい。

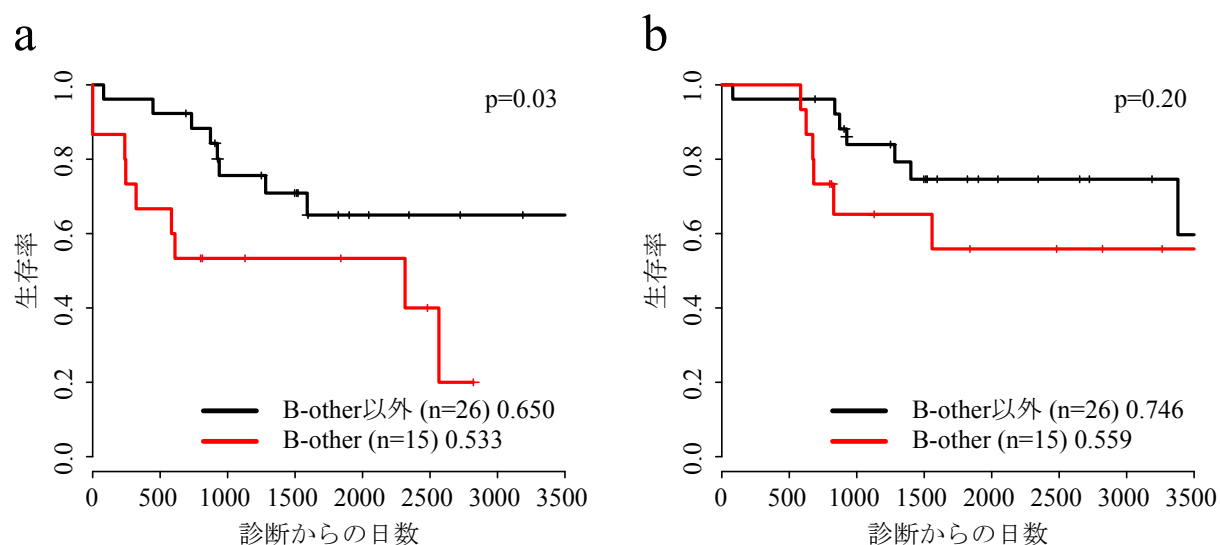


図 21 今回のコホートにおける **B-other** の生存解析

今回のコホートにおける **DS-ALL** で **B-other**(a)とそれ以外(b)のサブタイプで Kaplan-Meier 曲線を比較した。**B-other** はその他のサブタイプと比較して有意に生存率が低かった。

本研究では当初に明確なスタディデザインの設定ができていなかったことが欠点

として挙げられる。研究を遂行するにあたっての背景の整理ができておらず、それぞれのシーケンスからどのような結果が得られるのかも考慮していなかった。漠然と、シーケンスによって得られる知見から新規的なことを見出すとして、必要なサンプル数の設定を行わないでサンプルの収集を開始したため、ターゲットシーケンス、コピー数解析、DNA メチル化解析でそれぞれ 2 種類のプロトコールが混在してしまい、結果のマージに難渋した。21 番染色体のコピー数と 21 番染色体上の遺伝子発現の関係を明らかとするのだったら、遺伝子の発現レベルで有意差がつくと予想される DS-ALL、non-DS-ALL それぞれの検体数を当初から設定し、サブタイプ別にそれぞれのサンプルを収集すべきであった。そのようにしておけば、DS-ALL、non-DS-ALL の比較を行いやすく、プロトコールも統一されて、より解析しやすいデータとなったと予想される。*RUNX1* の高メチル化は偶発的に得られた知見であり、DS 患者に特徴的であって血液腫瘍の発症と関連していることが予想されるが、偶発的に得られた知見であるため、この結果をどのように扱うべきか明らかではなかった。今後このようなスタディを行う際は、これらのことを念頭においてスタディデザインを設定すべきだと考えられた。

加えて、本研究の限界として、シーケンスを行う前に必要なサンプル数の設定、どのようなシーケンスを行うべきか、他の小児 ALL のゲノム解析における報告と比較するとサンプルサイズが小さいことが挙げられる。そのために、DS-ALL と non-DS-ALL で比較を行うことが困難なサブタイプがあった。加えて、検体が希少であるため

に全ゲノムシーケンスが行えなかったことが挙げられる。そのため、今回の知見はより大きなコホートの前向き研究で検証される必要があると考えられる。

今後の DS-ALL の治療において最も重要なことは、それぞれのサブタイプのリスク分類に基づき、それに応じた治療を行うことである。本研究によって、RNA シーケンス、コピー数解析を行うことで DS-ALL の多くのサブタイプを明らかにできることが示されたため、G-banding、白血病のキメラ遺伝子スクリーニングなど古典的な手法でサブタイプを明らかとできないものは RNA シーケンス、コピー数変化を追加すべきである。Ph-like に関しては *JAK2* 変異が多いため、*JAK2* R683G と *CRLF2* 融合遺伝子の変異解析を行うことで同定できると考えられる。*JAK2* 変異を認めた場合は、現在臨床試験でも投与されている *JAK2* インヒビターである ruxolitinib の併用を考慮すべきである。これらの解析を行っても同定できないサブタイプに関しては全ゲノム解析を追加してサブタイプを明らかとすべきである。G-banding、*JAK2* 変異解析、白血病のキメラ遺伝子スクリーニングなど簡易的な検査で同定できるサブタイプはまずこれらの手法で同定し、できないものに RNA シーケンス、コピー数解析などの追加解析を行うという戦略が望ましい。DS-ALL 症例のそれぞれのサブタイプを同定できた後は、後方視的に予後を解析して暫定的なリスク分類を行い、臨床試験で暫定的なリスク分類に基づいて治療を行うべきである。

*RUNX1* の高メチル化を含め、21 番染色体には *DYRK1A*、*HMGNI* など ALL の発症に関連しそうな遺伝子があるが、これは発症後の発現を調べても ALL との関連を明

らかとはできなかつたため、これらの遺伝子の作用に関しては ALL 発症段階の細胞における発現を調べる必要がある。これは本研究のようなアプローチでは困難であり、採取した腫瘍細胞を iPS 化し、腫瘍へと再分化させるような処理を行うことで明らかにできると予想される。もう一つは余分な 21 番染色体が存在することで、他の染色体、特に X 染色体のクロマチン構造に変化が起きていないかどうかを明らかにすべきであり、こちらは DS-ALL の腫瘍細胞に対して Chip シーケンスや Hi-C シーケンスを行うことで検証できると考えられる。

## 結論

本研究で DS-ALL が多くのサブタイプを含む遺伝学的に多様な集団であることを明らかとした。発現や DNA メチル化のプロファイルは non-DS-ALL と同様であったが、サブタイプの頻度は大きく異なっていた。DS-ALL では Ph-like が最も頻度の大きいサブタイプであり、全体の 1/3 程度を占めていた。RUNXI プロモーターの高メチル化は DS 患者に特徴的なものであり、これは DS 患者における ALL の高い発症率と関連していると予想された。

## 謝辞

本研究の遂行におきまして御指導を頂きました東京大学医学部小児科の岡明教授、京都大学医学部小児科の滝田順子教授、弘前大学医学部小児科の伊藤悦郎教授、京都大学腫瘍生物学の小川誠司教授、およびご支援頂きました東京大学医学部小児科の樋渡光輝先生、関正史先生、渡邊健太郎先生、関口昌央先生、磯部知弥先生、広島大学医学部小児科の木村俊介先生、弘前大学医学部小児科の照井君典先生、土岐力先生、伊東竜也先生、京都大学腫瘍生物学の吉田健一先生、鈴木啓道先生、片岡圭亮先生、群馬県立小児医療センターの林泰秀先生、宮城県立こども病院血液腫瘍科の佐藤篤先生に深謝いたします。

また、本研究における貴重な検体を御供与頂きました神奈川県立こども医療センターの後藤裕明先生、埼玉県立小児医療センターの花田良二先生、康勝好先生、京都府立医科大学の今村俊彦先生、茨城県立こども病院の加藤啓輔先生、鳥取大学の上山潤一先生、成育医療研究センターの清河信敬先生、大木健太郎先生、藤枝市立総合病院の香川二郎先生、熊谷淳之先生、解析面で多大な御協力を頂きました東京大学医科学研究所の宮野悟教授、田中洋子先生、国立がん研究センター研究所の白石友一先生、千葉健一先生、成育医療研究センターの秦健一郎先生、河合智子先生に深謝いたします。

## 参考文献

- 1 Nakata, K., Ito, Y., Magadi, W., Bonaventure, A., Stiller, C. A., Katanoda, K., Matsuda, T., Miyashiro, I., Pritchard-Jones, K., Rachet, B. Childhood cancer incidence and survival in Japan and England: A population-based study (1993-2010). *Cancer Sci* **109**, 422–434 (2018).
- 2 Hunger, S. P., Mullighan, C. G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med* **373**, 1541-1552 (2015).
- 3 Inaba, H., Greaves, M., Mullighan, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **381**, 1943-55 (2013).
- 4 Zaliouva, M., Stuchly, J., Winkowska, L., Musilova, A., Fiser, K., Slamova, M., Starkova, J., Vaskova, M., Hrusak, O., Sramkova, L., Sary, J., Zuna, J., Trka, J. Genomic landscape of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia in a consecutive European cohort. *Haematologica* **104**, 1396-1406 (2019).
- 5 Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Wang, X., Dobbin, K. K., Davidson, G. S., Bedrick, E. J., Chen, I. M., Atlas, S. R., Kang, H., Ar, K., Wilson, C. S., Wharton, W., Murphy, M., Devidas, M., Carroll, A. J., Borowitz, M. J., Bowman, W. P., Downing, J. R., Relling, M., Yang, J., Bhojwani, D., Carroll, W. L., Camitta, B., Reaman, G. H., Smith, M., Hunger, S. P., Willman, C. L. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling:



- correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* **116**, 4874-4884 (2010).
- 6 Roberts, K. G., Li, Y., Payne-Turner, D., Harvey, R. C., Yang, Y. L., Pei, D., McCastlain, K., Ding, L., Lu, C., Song, G., Ma, J., Becksfort, J., Rusch, M., Chen, S. C., Easton, J., Cheng, J., Boggs, K., Santiago-Morales, N., Iacobucci, I., Fulton, R. S., Wen, J., Valentine, M., Cheng, C., Paugh, S. W., Devidas, M., Chen, I. M., Reshmi, S., Smith, A., Hedlund, E., Gupta, P., Nagahawatte, P., Wu, G., Chen, X., Yergeau, D., Vadodaria, B., Mulder, H., Winick, N. J., Larsen, E. C., Carroll, W. L., Heerema, N. A., Carroll, A. J., Grayson, G., Tasian, S. K., Moore, A. S., Keller, F., Frei-Jones, M., Whitlock, J. A., Raetz, E. A., White, D. L., Hughes, T. P., Guidry Auvil, J. M., Smith, M. A., Marcucci, G., Bloomfield, C. D., Mrózek, K., Kohlschmidt, J., Stock, W., Kornblau, S. M., Konopleva, M., Paietta, E., Pui, C. H., Jeha, S., Relling, M. V., Evans, W. E., Gerhard, D. S., Gastier-Foster, J. M., Mardis, E., Wilson, R. K., Loh, M. L., Downing, J. R., Hunger, S. P., Willman, C. L., Zhang, J., Mullighan, C. G. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* **371**, 1005-1015 (2014).
- 7 Wells, J., Jain, N., Konopleva, M. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia: progress in a new cancer subtype. *Clin Adv Hematol Oncol* **15**, 554-561 (2017).
- 8 Ou, Z., Sherer, M., Casey, J., Bakos, H. A., Vitullo, K., Hu, J., Friehling, E., Gollin, S.

- M. , Surti, U., Yatsenko, S.A. The Genomic Landscape of PAX5, IKZF1, and CDKN2A/B Alterations in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytogenet Genome Res* **150**, 242-252 (2016).
- 9 Stanulla, M., Dagdan, E., Zaliova, M., Mörricke, A., Palmi, C., Cazzaniga, G., Eckert, C., Te Kronnie, G., Bourquin, J. P., Bornhauser, B., Koehler, R., Bartram, C. R., Ludwig, W. D., Bleckmann, K., Groeneveld-Krentz, S., Schewe, D., Junk, S. V., Hinze, L., Klein, N., Kratz, C. P., Biondi, A., Borkhardt, A., Kulozik, A., Muckenthaler, M. U., Basso, G., Valsecchi, M. G., Izraeli, S., Petersen, B. S., Franke, A., Dörge, P., Steinemann, D., Haas, O. A., Panzer-Grümayer, R., Cavé, H., Houlston, R. S., Cario, G., Schrappe, M., Zimmermann, M. TRANSCALL Consortium; International BFM Study Group. IKZF1plus Defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* **36**, 1240-1249 (2018).
- 10 Churchman, M. L., Qian, M., Te Kronnie, G., Zhang, R., Yang, W., Zhang, H., Lana, T., Tedrick, P., Baskin, R., Verbist, K., Peters, J. L., Devidas, M., Larsen, E., Moore, I. M., Gu, Z., Qu, C., Yoshihara, H., Porter, S. N., Pruett-Miller, S. M., Wu, G., Raetz, E., Martin, P. L., Bowman, W. P., Winick, N., Mardis, E., Fulton, R., Stanulla, M., Evans, W. E., Relling, M. V., Pui, C. H., Hunger, S. P., Loh, M. L., Handgretinger, R., Nichols, K. E., Yang, J. J., Mullighan, C. G. Germline Genetic IKZF1 Variation and

- Predisposition to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **33**, 937-948 (2018).
- 11 Bull, M. J. & Genetics, C. o. Health supervision for children with Down syndrome. *Pediatrics* **128**, 393-406 (2011).
- 12 Hasle, H., Clemmensen, I. H., Mikkelsen, M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* **355**, 165-169 (2000).
- 13 Ito, E., Kasai, M., Hayashi, Y., Toki, T., Arai, K., Yokoyama, S., Kato, K., Tachibana, N., Yamamoto, M., Yokoyama, M. Expression of erythroid-specific genes in acute megakaryoblastic leukaemia and transient myeloproliferative disorder in Down's syndrome. *Br J Haematol* **90**, 607-614 (1995).
- 14 de Rooij, J. D., Branstetter, C., Ma, J., Li, Y., Walsh, M. P., Cheng, J., Obulkasim, A., Dang, J., Easton, J., Verboon, L. J., Mulder, H. L., Zimmermann, M., Koss, C., Gupta, P., Edmonson, M., Rusch, M., Lim, J. Y., Reinhardt, K., Pigazzi, M., Song, G., Yeoh, A. E., Shih, L. Y., Liang, D. C., Halene, S., Krause, D. S., Zhang, J., Downing, J. R., Locatelli, F., Reinhardt, D., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Zwaan, C. M., Fornerod, M., Gruber, T. A. Pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia is characterized by distinct genomic subsets with varying outcomes. *Nat Genet* **49**, 451-456 (2017).
- 15 Buitenkamp, T. D., Izraeli, S., Zimmermann, M., Forestier, E., Heerema, N. A., van den

- Heuvel-Eibrink, M. M., Pieters, R., Korbijn, C. M., Silverman, L. B., Schmiegelow, K., Liang, D. C., Horibe, K., Arico, M., Biondi, A., Basso, G., Rabin, K. R., Schrappe, M., Cario, G., Mann, G., Morak, M., Panzer-Grümayer, R., Mondelaers, V., Lammens, T., Cavé, H., Stark, B., Ganmore, I., Moorman, A. V., Vora, A., Hunger, S. P., Pui, C. H., Mullighan, C. G., Manabe, A., Escherich, G., Kowalczyk, J. R., Whitlock, J. A., Zwaan, C. M. Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood* **123**, 70-77 (2014).
- 16 後藤裕明. ダウン症候群に合併した急性リンパ性白血病. *J Pediatr Hematol Oncol.* **53**, 196–202 (2016).
- 17 Nikolaev, S. I., Garieri, M., Santoni, F., Falconnet, E., Ribaux, P., Guipponi, M., Murray, A., Groet, J., Giarin, E., Basso, G., Nizetic, D., Antonarakis, S. E. Frequent cases of RAS-mutated Down syndrome acute lymphoblastic leukaemia lack JAK2 mutations. *Nat Commun* **5**, 4654 (2014).
- 18 Lane, A. A., Chapuy, B., Lin, C. Y., Tivey, T., Li, H., Townsend, E. C., van Bodegom, D., Day, T. A., Wu, S. C., Liu, H., Yoda, A., Alexe, G., Schinzel, A. C., Sullivan, T. J., Malinge, S., Taylor, J. E., Stegmaier, K., Jaffe, J. D., Bustin, M., te Kronnie, G., Izraeli, S., Harris, M.H., Stevenson, K. E., Neuberg, D., Silverman, L. B., Sallan, S. E., Bradner, J. E., Hahn, W. C., Crispino, J. D., Pellman, D., Weinstock, D. M. Triplication of a 21q22 region contributes to B cell transformation through HMGN1 overexpression and loss of

- histone H3 Lys27 trimethylation. *Nat Genet* **46**, 618-623 (2014).
- 19 Thompson, B. J., Bhansali, R., Diebold, L., Cook, D. E., Stolzenburg, L., Casagrande, A. S., Besson, T., Leblond, B., Désiré, L., Malinge, S., Crispino, J. D. DYRK1A controls the transition from proliferation to quiescence during lymphoid development by destabilizing Cyclin D3. *J Exp Med* **212**, 953-970 (2015).
- 20 Buitenkamp, T. D., Pieters, R., Gallimore, N. E., van der Veer, A., Meijerink, J. P., Beverloo, H. B., Zimmermann, M., de Haas, V., Richards, S. M., Vora, A. J., Mitchell, C. D., Russell, L. J., Schwab, C., Harrison, C. J., Moorman, A. V., van den Heuvel-Eibrink, M. M., den Boer, M. L., Zwaan, C. M. Outcome in children with Down's syndrome and acute lymphoblastic leukemia: role of IKZF1 deletions and CRLF2 aberrations. *Leukemia* **26**, 2204-2211 (2012).
- 21 Hirabayashi, S., Ohki, K., Nakabayashi, K., Ichikawa, H., Momozawa, Y., Okamura, K., Yaguchi, A., Terada, K., Saito, Y., Yoshimi, A., Ogata-Kawata, H., Sakamoto, H., Kato, M., Fujimura, J., Hino, M., Kinoshita, A., Kakuda, H., Kurosawa, H., Kato, K., Kajiwara, R., Moriwaki, K., Morimoto, T., Nakamura, K., Noguchi, Y., Osumi, T., Sakashita, K., Takita, J., Yuza, Y., Matsuda, K., Yoshida, T., Matsumoto, K., Hata, K., Kubo, M., Matsubara, Y., Fukushima, T., Koh, K., Manabe, A., Ohara, A., Kiyokawa, N.; Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG). ZNF384-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a

- characteristic immunotype. *Haematologica* **102**, 118-129 (2017).
- 22 Nordlund, J., Bäcklin, C. L., Wahlberg, P., Busche, S., Berglund, E. C., Eloranta, M. L., Flaegstad, T., Forestier, E., Frost, B. M., Harila-Saari, A., Heyman, M., Jónsson, O. G., Larsson, R., Palle, J., Rönnblom, L., Schmiegelow, K., Sinnett, D., Söderhäll, S., Pastinen, T., Gustafsson, M. G., Lönnerholm, G., Syvänen, A. C. Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biol* **14**, r105 (2013).
- 23 Teschendorff, A. E., Marabita, F., Lechner, M., Bartlett, T., Tegner, J., Gomez-Cabrero, D., Beck, S. A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data. *Bioinformatics* **29**, 189-196 (2013).
- 24 Du, P., Zhang, X., Huang, C. C., Jafari, N., Kibbe, W. A., Hou, L., Lin, S. M. Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics* **11**, 587 (2010).
- 25 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, W. K., Miyawaki, S., Sugano, S., Haferlach, C., Koeffler, H. P., Shih, L. Y., Haferlach, T., Chiba, S., Nakauchi, H., Miyano, S., Ogawa,

- S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64-69 (2011).
- 26 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).
- 27 Schwab, C. J., Jones, L.R., Morrison, H., Ryan, S. L., Yigittop, H., Schouten, J. P., Harrison, C. J. Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification as a method for the detection of copy number abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **49**, 1104-1113 (2010).
- 28 Yamamoto, G., Nannya, Y., Kato, M., Sanada, M., Levine, R. L., Kawamata, N., Hangaishi, A., Kurokawa, M., Chiba, S., Gilliland, D. G., Koeffler, H. P., Ogawa S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet* **81**, 114-126 (2007).
- 29 Chapiro, E., Russell, L., Radford-Weiss, I., Bastard, C., Lessard, M., Struski, S., Cave, H., Fert-Ferrer, S., Barin, C., Maarek, O., Della-Valle, V., Strefford, J. C., Berger, R., Harrison, C. J., Bernard, O. A., Nguyen-Khac, F. Overexpression of CEBPA resulting from the translocation t(14;19)(q32;q13) of human precursor B acute lymphoblastic

- leukemia. *Blood* **108**, 3560-3563, doi:10.1182/blood-2006-03-010835 (2006).
- 30 Messinger, Y. H., Higgins, R. R., Devidas, M., Hunger, S. P., Carroll, A. J., Heerema, N. A. Pediatric acute lymphoblastic leukemia with a t(8;14)(q11.2;q32): B-cell disease with a high proportion of Down syndrome: a Children's Oncology Group study. *Cancer Genet* **205**, 453-458, doi:10.1016/j.cancergen.2012.07.016 (2012).
- 31 Pui, C. H., Raimondi, S. C., Borowitz, M. J., Land, V. J., Behm, F. G., Pullen, D. J., Hancock, M. L., Shuster, J. J., Steuber, C. P., Crist, W.M. Immunophenotypes and karyotypes of leukemic cells in children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **11**, 1361-1367, doi:10.1200/JCO.1993.11.7.1361 (1993).
- 32 Bacalini, M. G., Gentilini, D., Boattini, A., Giampieri, E., Pirazzini, C., Giuliani, C., Fontanesi, E., Scurti, M., Remondini, D., Capri, M., Cocchi, G., Ghezzi, A., Del Rio, A., Luiselli, D., Vitale, G., Mari, D., Castellani, G., Fraga, M., Di Blasio, A. M., Salvioli, S., Franceschi, C., Garagnani, P. Identification of a DNA methylation signature in blood cells from persons with Down Syndrome. *Aging (Albany NY)* **7**, 82-96, doi:10.18632/aging.100715 (2015).
- 33 Lee, A. S., Tang, C., Rao, M. S., Weissman, I. L., Wu, J. C. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med* **19**, 998-1004, doi:10.1038/nm.3267 (2013).
- 34 Ley, T. J., Miller, C., Ding, L., Raphael, B. J., Mungall, A. J., Robertson, A., Hoadley,



K., Triche, T. J. Jr, Laird, P. W., Baty, J. D., Fulton, L. L., Fulton, R., Heath, S. E., Kalicki-Weizer, J., Kandoth, C., Klco, J. M., Koboldt, D. C., Kanchi, K. L., Kulkarni, S., Lamprecht, T. L., Larson, D. E., Lin, L., Lu, C., McLellan, M. D., McMichael, J. F., Payton, J., Schmidt, H., Spencer, D. H., Tomasson, M. H., Wallis, J. W., Wartman, L. D., Watson, M. A., Welch, J., Wendl, M. C., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Butterfield, Y., Chiu, R., Chu, A., Chuah, E., Chun, H. J., Corbett, R., Dhalla, N., Guin, R., He, A., Hirst, C., Hirst, M., Holt, R. A., Jones, S., Karsan, A., Lee, D., Li, H. I., Marra, M. A., Mayo, M., Moore, R. A., Mungall, K., Parker, J., Pleasance, E., Plettner, P., Schein, J., Stoll, D., Swanson, L., Tam, A., Thiessen, N., Varhol, R., Wye, N., Zhao, Y., Gabriel, S., Getz, G., Sougnez, C., Zou, L., Leiserson, M. D., Vandin, F., Wu, H. T., Applebaum, F., Baylin, S. B., Akbani, R., Broom, B. M., Chen, K., Motter, T. C., Nguyen, K., Weinstein, J. N., Zhang, N., Ferguson, M. L., Adams, C., Black, A., Bowen, J., Gastier-Foster, J., Grossman, T., Lichtenberg, T., Wise, L., Davidsen, T., Demchok, J. A., Shaw, K. R., Sheth, M., Sofia, H. J., Yang, L., Downing, J. R., Eley, G. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **368**, 2059-2074, doi:10.1056/NEJMoa1301689 (2013).

- 35 Martinez, M., Hinojosa, M., Trombly, D., Morin, V., Stein, J., Stein, G., Javed, A., Gutierrez, S. E. Transcriptional Auto-Regulation of RUNX1 P1 Promoter. *PLoS One* **11**, e0149119, doi:10.1371/journal.pone.0149119 (2016).

- 36 Ofverholm, I., Tran, A. N., Heyman, M., Zachariadis, V., Nordenskjöld, M., Nordgren, A., Barbany, G. Impact of IKZF1 deletions and PAX5 amplifications in pediatric B-cell precursor ALL treated according to NOPHO protocols. *Leukemia* **27**, 1936-1939, doi:10.1038/leu.2013.92 (2013).
- 37 Gu, Z., Churchman, M. L., Roberts, K. G., Moore, I., Zhou, X., Nakitandwe, J., Hagiwara, K., Pelletier, S., Gingras, S., Berns, H., Payne-Turner, D., Hill, A., Iacobucci, I., Shi, L., Pounds, S., Cheng, C., Pei, D., Qu, C., Newman, S., Devidas, M., Dai, Y., Reshmi, S. C., Gastier-Foster, J., Raetz, E. A., Borowitz, M. J., Wood, B. L., Carroll, W. L., Zweidler-McKay, P. A., Rabin, K. R., Mattano, L. A., Maloney, K. W., Rambaldi, A., Spinelli, O., Radich, J. P., Minden, M. D., Rowe, J. M., Luger, S., Litzow, M. R., Tallman, M. S., Racevskis, J., Zhang, Y., Bhatia, R., Kohlschmidt, J., Mrózek, K., Bloomfield, C. D., Stock, W., Kornblau, S., Kantarjian, H. M., Konopleva, M., Evans, W. E., Jeha, S., Pui, C. H., Yang, J., Paietta, E., Downing, J. R., Relling, M. V., Zhang, J., Loh, M. L., Hunger, S. P., Mullighan, C. G. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* **51**, 296-307, doi:10.1038/s41588-018-0315-5 (2019).
- 38 Lilljebjörn, H., Henningsson, R., Hyrenius-Wittsten, A., Olsson, L., Orsmark-Pietras, C., von Palffy, S., Askmyr, M., Rissler, M., Schrappe, M., Cario, G., Castor, A., Pronk, C. J., Behrendtz, M., Mitelman, F., Johansson, B., Paulsson, K., Andersson, A. K.,

- Fontes, M., Fioretos, T. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun* **7**, 11790, doi:10.1038/ncomms11790 (2016).
- 39 Zaliova, M., Kotrova, M., Bresolin, S., Stuchly, J., Stary, J., Hrusak, O., Te Kronnie, G., Trka, J., Zuna, J., Vaskova, M. ETV6/RUNX1-like acute lymphoblastic leukemia: A novel B-cell precursor leukemia subtype associated with the CD27/CD44 immunophenotype. *Genes Chromosomes Cancer* **56**, 608-616, doi:10.1002/gcc.22464 (2017).
- 40 Paulsson, K., Horvat, A., Strömbeck, B., Nilsson, F., Heldrup, J., Behrendtz, M., Forestier, E., Andersson, A., Fioretos, T., Johansson, B. Mutations of FLT3, NRAS, KRAS, and PTPN11 are frequent and possibly mutually exclusive in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **47**, 26-33, doi:10.1002/gcc.20502 (2008).
- 41 Webber, B. R., Iacovino, M., Choi, S. H., Tolar, J., Kyba, M., Blazar, B. R. DNA methylation of Runx1 regulatory regions correlates with transition from primitive to definitive hematopoietic potential in vitro and in vivo. *Blood* **122**, 2978-2986, doi:10.1182/blood-2013-03-489369 (2013).
- 42 Hadi, E., Sharony, R., Goldberg-Bittman, L., Biron-Shental, T., Fejgin, M., Amiel, A. Telomere aggregates in trisomy 21 amniocytes. *Cancer Genet Cytogenet* **195**, 23-26,

doi:10.1016/j.cancergencyto.2009.03.003 (2009).

- 43 Malinge, S., Chlon, T., Doré, L. C., Ketterling, R. P., Tallman, M. S., Paietta, E., Gams, A. S., Taub, J. W., Chou, S. T., Weiss, M. J., Crispino, J. D., Figueroa, M. E. Development of acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome is associated with sequential epigenetic changes. *Blood* **122**, e33-43, doi:10.1182/blood-2013-05-503011 (2013).