

博士論文

後天性再生不良性貧血におけるクローン構造

吉里 哲一

## 目次

要旨 .....	pp.4
序文 .....	pp.5
方法 .....	pp.10
症例と検体 .....	pp.10
標的シーケンス .....	pp.12
全エクソンシーケンス .....	pp.16
Droplet digital PCR (ddPCR) .....	pp.18
診断時検体における変異評価 .....	pp.19
Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) アレイ核型分析 .....	pp.19
フローサイトメトリー .....	pp.20
シングルコロニー解析 .....	pp.22
統計解析 .....	pp.26
結果 .....	pp.27
標的シーケンスと SNP アレイ核型分析 .....	pp.27
臨床指標との関係 .....	pp.29
再生不良性貧血におけるクローン構造の継時的挙動 .....	pp.31
考察 .....	pp.35
結論 .....	pp.41
謝辞 .....	pp.42
参考文献 .....	pp.43
図表 .....	pp.74
図1. 3コホートのCONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials: 臨床試験報告に関する統合基準) フローチャート .....	pp.74
図2. 標的シーケンスの性能評価 .....	pp.75
図3. 標的シーケンスにおける変異頻度 .....	pp.76
図4. 蛍光活性化セルソーティングによる造血幹細胞・前駆細胞プロファイル .....	pp.77
図5. 標的シーケンスで同定された変異の診断時との比較 .....	pp.79
図6. SNPアレイによるコピー数変化とアレル不均衡 .....	pp.80
図7. 再生不良性貧血における変異パターンと染色体異常 .....	pp.81
図8. 標的シーケンスにより同定された変異スペクトラム .....	pp.82
図9. 変異と免疫抑制療法に対する反応性 .....	pp.83
図10. 変異・コピー数異常の予後への影響 .....	pp.84
図11. 各年齢層における変異の予後への影響 .....	pp.86
図12. 全エクソンシーケンスの性能評価 .....	pp.87

図13. 全エクソンシーケンスによって明らかになったクローン構造 .....	pp.88
図14. 健常人における体細胞変異パターン .....	pp.89
図15. 全エクソンシーケンス症例の継時的解析 クローンサイズが経過中安定していた症例 .....	pp.90
図16. 全エクソンシーケンス症例の継時的解析 初期クローンが経過中拡大した症例 .....	pp.91
図17. 全エクソンシーケンス症例の継時的解析 経過中に新規に出現したクローンが拡大した症例 .....	pp.92
図18. 症例NIH075の継時的解析 .....	pp.92
図19. 標的シーケンスで同定された変異の継時的挙動 .....	pp.93
表1. 本研究に用いた検体数 .....	pp.94
表2. 各コホートの臨床情報 .....	pp.95
表3. 標的シーケンスの検体リスト .....	pp.96
表4. 標的シーケンスで解析した遺伝子リスト .....	pp.102
表5. 標的シーケンスにおける各遺伝子の平均depth .....	pp.104
表6. U.S.コホート(NIHとClevelandコホート)とJapanコホートにおける変異頻度の比較 .....	pp.106
表7. 造血幹細胞・前駆細胞に対し施行したアンプリコンシーケンスの結果 .....	pp.107
表8. 各造血細胞コロニーに対するシーケンス結果 .....	pp.108
表9. 免疫抑制療法反応性に対する予後因子 .....	pp.109
表10. 全生存に対する予後因子 .....	pp.110
表11. 全エクソンシーケンスを実施した検体リスト .....	pp.111
表12. 各検査法により同定されたクローン性造血 .....	pp.114

## 要旨

後天性再生不良性貧血は、骨髄不全の一型である。約 15%の症例は、骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病を発症するが、再生不良性貧血のクローン構造については不明な点が多い。今回、再生不良性貧血 439 症例に対し、次世代シーケンサによる変異解析を実施した。体細胞変異を約 1/3 の症例で認め、変異保有率は年齢とともに上昇した。*DNMT3A*、*ASXL1* 変異クローンは経時的に増大し、*BCOR*、*BCORL1*、*PIGA* 変異クローンは安定または縮小する傾向を認めた。また *PIGA*、*BCOR*、*BCORL1* 変異症例は、良好な転帰を、他の遺伝子変異を有する症例は、不良な転帰を示した。しかし、クローン動態は症例により多様であり、個々の症例については、必ずしも予後を予測するものではなかった。

## 序文

後天性再生不良性貧血は、骨髄低形成により血球減少を呈する特発性骨髄不全症候群の一型である<sup>1</sup>。非重症例では貧血と血小板減少の2系統の血球減少のみのこともあるが、多くの場合、白血球・赤血球・血小板の3系統とも減少する汎血球減少を呈する。欧米における発症率は、年間100万人あたり約2人と推定されているが<sup>2</sup>、東アジア・東南アジアで発症率が高く<sup>3</sup>、我が国では年間100万人あたり約6人前後である<sup>4</sup>。

後天性再生不良性貧血の病態は免疫学的機序による造血幹細胞・前駆細胞の排除が主体と考えられている<sup>1</sup>。後天性再生不良性貧血の自己抗原は同定されていないが、一卵性双生児をドナーとした骨髄移植後に再発した再生不良性貧血症例に対し、免疫抑制剤を併用した同一ドナーからの再移植により生着が得られたことや<sup>5</sup>、後天性再生不良性貧血検体からT細胞を除去することで*in vitro*でのcolony形成効率を改善した<sup>6</sup>などの事実は、後天性再生不良性貧血の病態には、T細胞を介した造血幹細胞・前駆細胞の抑制が関与していることを示唆している。実際、抗胸腺細胞グロブリンとシクロスポリン併用や大量エンドキサンの免疫抑制療法が奏功し<sup>7,8</sup>、従来は造血幹細胞移植が唯一の根本的治療であったが、免疫抑制療法の発達に伴い、近年その予後は大きく改善してきている<sup>8,9</sup>。

一方で、免疫抑制療法による長期生存例を中心として、約 10-15%の症例が骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndromes; MDS) や急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia; AML) などの造血器腫瘍に進展したり、発作性夜間血色素尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; PNH) に移行したりすることが知られている<sup>10-12</sup>。1967年 William Dameshek は、PNH との併発や PNH への移行をしばしば認めることより、”What do aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and hypoplastic leukemia have in common?”と疑問を呈し、その病態は共通の骨髄障害に対する異なった反応に起因するのではないかという考えを提唱した<sup>13</sup>。

また、MDS のうち数十%の症例は、骨髄低形成を呈するが<sup>14</sup>、低形成性 MDS ではしばしば再生不良性貧血との鑑別が問題になる<sup>15,16</sup>。低形成 MDS においても、後天性再生不良性貧血同様、免疫抑制療法が奏功する症例が存在し、異常クローンによる無効造血に加え、後天性再生不良性貧血と共通した免疫学機序による造血抑制の存在が想定される<sup>17</sup>。

加えて、免疫学的機序がその病態の主体と考えられている後天性再生不良性貧血そのものにも、PNH 型クローン血球<sup>18</sup>・6番染色体短腕の片親性ダイソミー (6pUPD) などの染色体異常<sup>19</sup>・女性患者における X 染色体不活化パターンの偏向<sup>20-23</sup>などのクローン性造血を認めることが知られている。

PNH は *PIGA* 遺伝子の体細胞変異による glycosyl phosphatidylinositol (GPI) ア

ンカー蛋白の欠失により生じるクローン性疾患であり、GPI に結合する補体制御タンパクが欠失することで補体が活性化し溶血を生じることが解明されている<sup>24,25</sup>。後天性再生不良性貧血においては、Sugimori らはフローサイトメトリーによる高感度検出法を用いて、68%の症例に PNH 型血球が検出したことを報告している<sup>26</sup>。PNH 型血球陽性例は陰性例と比較して、免疫抑制療法に対する奏効率が高いことより<sup>26,27</sup>、標的抗原は同定されていないが、骨髓不全環境下では GPI アンカー欠損細胞が免疫細胞の認識から回避し相対的に増加している可能性が示唆される。

染色体異常に関しては後天性再生不良性貧血症例の 10-20%程度に 8 番染色体トリソミーや 7 番染色体・13 番染色体欠失などの染色体異常を認め、モノソミー7は MDS/AML 移行へのリスクファクターとして認識されている<sup>28-30</sup>。

近年、single nucleotide polymorphism (SNP) アレイ解析による核型分析が行われるようになり、染色体分染法による核型分析に比べ、より微小なクローンや微細領域の異常も検出可能となった。加えて従来は同定することのできなかつたコピー数異常を伴わないヘテロ接合性の消失 (Loss of Heterozygosity; LOH) も同定可能となった。コピー数異常を伴わない LOH は、相同染色体間の組換えと染色体の異常分配によって生じると考えられ、片親のみに由来する染色体によって構成される片親性二倍体 (uniparental disomy; UPD) となる<sup>31</sup>。

金沢大学の Katagiri らは 306 例の後天性再生不良性貧血患者の末梢血 DNA に対し、SNP アレイ解析を施行し、13%もの症例に 6 番染色体短腕に UPD (6pUPD) を認めることを報告した<sup>19</sup>。6pUPD は、全症例で HLA クラス I 領域を含んでおり、6pUPD 陽性例で欠失している HLA アレルは、造血幹細胞における自己抗原提示に関わっている可能性が想定される。実際、HLA 欠失ハプロタイプに含まれている HLA クラス I アレルには大きな偏りがあり、特に HLA-A\*02:01、A\*02:06、A\*31:01、B\*40:02 の 4 アレルに高頻度に認めると報告している。

近年、次世代シーケンサの出現により、大規模に遺伝子解析をすることが可能となり、MDS においては、*TET2*・*IDH1/2*・*DNMT3A*・*ASXL1* といったエピジェネティック修飾に関わる遺伝子や *SF3B1*・*U2AF1*・*SF3B1*・*SRSF2* などの RNA スプライシング因子に関わる遺伝子、*STAG2*・*RAD21* などのコヒーシ複合体を構成する遺伝子における変異が同定され、分子病態学的な知見は飛躍的に増加している<sup>32-36</sup>。

後天性再生不良性貧血においても、その技術は応用され始め、2013 年 Dana Faber 癌研究所の Lane らは 39 例の後天性再生不良性貧血患者において、219 遺伝子の標的シーケンスを行い、9 症例 (23%) に変異を同定したことを報告した<sup>37</sup>。King's College の Kulasekararaj らは、150 症例の後天性再生不良性貧血症例に対し、標的シーケンスを行い、29 症例 (19%) に変異を同定した<sup>38</sup>。平均アリ



ル頻度は、20%（1.5%-68%）で、*ASXL1*（12 変異）・*DNMT3A*（8 変異）・*BCOR*（6 変異）に複数の変異を認めた。更に、変異陽性群は変異陰性群と比較して、検体採取までの罹患期間が長く、テロメア長が短い傾向があり、また MDS/AML への進展を多く認めたことも報告している。

以上のように、後天性再生不良性貧血には様々なクローン性造血を認めることが明らかになっているが、クローン性造血の起源、病態への関与、継時的な挙動、臨床における意義、さらには MDS・AML 進展への関与等に関しては不明な点が多い。

後天性再生不良性貧血は、高頻度に MDS・AML に進展することより、後天性再生不良性貧血におけるクローン構造を評価することで、白血病発症に先行して生じるクローン性造血の変化を明らかにすることができると期待される。そこで今回我々は、日米 3 施設で取得した 439 症例の後天性再生不良性貧血患者の検体に対して、次世代シーケンサを用いて骨髄系腫瘍の主要標的遺伝子を中心とした標的シーケンスを施行し、臨床データとともに解析した。更に一部の症例においては継時的検体とともに全エクソンシーケンスを施行し、変異という観点から継時的なクローン構造を明らかにすることを目的とした。

## 方法

### 症例と検体

本研究に日米 3 施設より後天性再生不良性貧血患者 439 例を登録した（米国国立衛生研究所 the National Institutes of Health (NIH) 256 例・金沢大学 (Japan) 159 例・米国 Cleveland Clinic 24 例）（図 1、表 1-3）。各施設の倫理委員会に承認されたプロトコールに従って、同意書を取得し、その後に末梢血・骨髄・頬粘膜検体を採取した。Japan コホートの検体に関しては、Katagiri らが SNP アレイによるコピー数解析を実施した症例<sup>19</sup>のうち十分量の DNA の得られた検体も本研究に含めた。Japan コホートの検体は全血の DNA を用いたが、NIH と Cleveland コホートの検体に関しては、CD3 microbeads (MACS) を用いて、CD3 陽性細胞と陰性細胞に分離し、CD3 陰性細胞を解析用の検体として、CD3 陽性細胞を正常コントロール用検体として用いた。DNA 抽出は、Maxwell 16 blood DNA purification kit (Promega) と Qiagen DNA extraction kit (Qiagen) を用いて抽出した。正常コントロールとなる DNA は NIH・Cleveland コホートの検体に関しては、上記のように CD3 microbeads で分離した CD3 陽性 T 細胞から抽出した。Japan コホートの検体では、22 症例で頬粘膜 DNA が得られ、これらの検体を正常ペア検体として使用した。後天性再生不良性貧血の診断基準・重症度・免疫抑制剤に対する反応性は、報告されている方法に従った<sup>7</sup>。以下に重症度の

基準を記載する。

- 重症: 骨髄細胞密度<25% または、25–50% かつ 血球細胞割合<30%

以下の 2/3 項目以上を満たす:

- 好中球< $0.5 \times 10^9/l$
  - 血小板< $20 \times 10^9/l$
  - 網状赤血球< $20 \times 10^9/l$
- 最重症: 重症の基準を満たし、かつ好中球< $0.2 \times 10^9/l$
  - 非重症: 重症・最重症の基準を満たさない症例

MDS や AML への進展は骨髄検査での核型分析・異型性の有無・CD34 陽性細胞の増加で判断した。Cleveland Clinic にて同意書を取得し、その後得られた健常ドナーの骨髄液をフローサイトメトリーの正常コントロールとして用いた。また、固形腫瘍患者由来の末梢血 DNA12 検体<sup>39</sup> をシーケンス・PCR エラー評価用の正常コントロールとして用いた。

シーケンスデータと SNP アレイデータは The European Genome-Phenome Archive にデポジットした (Accession number: EGAS00001001153)。

## 標的シーケンス

標的シーケンスに用いた 106 遺伝子を下記の方法で選択し、この遺伝子セットカスタム cRNA ベイトライブラリーを作成した (SureSelect; Agilent Technology) (表 4)。

- 1) MDS や他の骨髄系腫瘍の変異標的遺伝子として報告されている遺伝子<sup>33,36,40-49</sup> (N = 66)
- 2) 再生不良性貧血で体細胞・胚細胞変異が報告されている遺伝子<sup>50,51</sup> (N = 2)
- 3) 自施設で後天性再生不良性貧血に対し全エクソンシーケンスを実施して同定された変異遺伝子 (N = 1)
- 4) 先天性骨髄不全の原因遺伝子<sup>52-58</sup> (N = 26)
- 5) 上記遺伝子に関連した遺伝子 (N = 11)

標的シーケンスは全症例に対して施行した。臨床的に MDS/AML に進展したと判断した 17 検体に対しても標的シーケンスを実施した (NIH コホート: 16 例、Cleveland コホート: 1 例) (表 3)。

1.5 $\mu$ g の DNA を SureSelect custom kit を用いて、添付文書通りに増幅し、その後液相ハイブリダイゼーションにより 106 遺伝子のコーディング領域を濃縮し

た。シーケンスは以前記載した方法で実施した<sup>33</sup>。シーケンスリードは Burrows-Wheeler Aligner, version 0.5.8 を用いてヒトゲノムのリファレンス配列 hg19 にマッピングした。PCR の重複配列は picard-tools version 1.39 (<http://picard.sourceforge.net/>) を用いて除外した。変異コールは自施設のパイプラインを用いて、以下のパラメータで施行した<sup>33,45</sup>。

下記の基準を満たすものを採用:

- (i) Mapping Quality score  $\geq 25$
- (ii) Base Quality score  $\geq 15$
- (iii) 同一リード上の一塩基置換変異数  $< 5$
- (iv) 同一リード上の insertion / deletion 数  $< 2$
- (v) 全リード数  $\geq 10$
- (vi) 変異リード数  $\geq 5$
- (vii) 変異アレル頻度  $\geq 0.02$

以下のいずれかに該当するものは除外:

- (i) 同義変異
- (ii) 以下の一塩基多型のデータベースに登録されている変異候補  
dbSNP131、ESP6500、 the 1000 genomes (23 Nov 2010)、自施設のデータベース (COSMIC v67: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (<http://cancer.sanger.ac.uk>) に同一部位の変異が 5 変異以上登録されているものは変異候補として採用した)

- (iii) COSMIC v67 での登録が 4 変異以下の insertion / deletion
- (iv) 一方向からしか読まれていない変異候補
- (v) Repeat 領域にある変異候補 (COSMIC v67 に同一部位の変異が 5 変異以上登録されているものは変異候補として採用した)
- (vi) 当該部位に変異コールされていない検体での平均アレル頻度  $> 0.01$  の変異候補
- (vii) Integrative Genomics Viewer (IGV)<sup>59</sup> による目視にてエラーと考えられる変異候補

上記基準にて採用された候補はアンプリコンシーケンスにより確認をした<sup>33</sup>。正常ペア検体があるものに関しては正常ペア検体もアンプリコンシーケンスを実施した。アンプリコンシーケンスは以下の如く施行した。

5'末端に制限酵素 NotI 認識配列を付けた primer を、変異領域を挟むように設計した。設計には Primer3<sup>60</sup> を用いた。変異候補がコールされた検体の DNA10ng を、当該領域を設計した primer を用いて、KOD plus neo (TOYOBO) で PCR 増幅し、電気泳動により目的の PCR 産物が増幅されていることを確認した。複数の PCR 増幅産物をプールし、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics) にて精製後、NotI 制限酵素 (Takara Bio) にて切断した。NotI 制限酵素で切断したアンプリコン同士を T4 DNA polymerase (Takara Bio) を使用して結合し、その後 Covaris sonicator (Covaris inc.) で約 200bp 長に超音波裁断した。ランダム裁断したアンプリコンから、NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina

(New England BioLabs) を用いて、シーケンスライブラリーを作成した。シーケンスライブラリーは HiSeq 2000 または 2500 によりシーケンスした。

正常のペア検体は NIH コホートと Cleveland コホートでは大部分の症例で得られたが、金沢コホートでは 13.8% しか得られなかったため、正常ペア検体の有無別に下記の基準を用いた。以下の基準のうち少なくとも一つを満たすものを体細胞変異として採用した。

正常ペア検体のある場合:

- (i) 当該検体アレル頻度  $\geq 0.02$ , 正常検体アレル頻度  $\leq 0.10$ 、かつ当該検体と正常検体のアレル頻度の比  $> 1.3$
- (ii) 正常検体アレル頻度  $\geq 0.10$  かつ、当該検体と正常検体のアレル頻度の比  $\geq 2$
- (iii) 当該検体アレル頻度  $\geq 0.02$  かつ、COSMIC v67 に 5 変異以上登録されている

PNH 血球は高頻度で T 細胞分画にも認めることが知られているため<sup>61</sup>、*PIGA* 遺伝子の変異に関しては正常ペア検体のアレル頻度は考慮しなかった。

正常ペア検体のない場合:

- (i) 当該検体アレル頻度  $\geq 0.02$ ,  $< 0.40$
- (ii) 当該検体アレル頻度  $\geq 0.02$  かつ、同一部位の変異が COSMIC v67 に 5 変異以上登録されている

正常ペアのある検体を上記の正常ペアのない検体の基準で検証したところ、陽性的中率・陰性的中率は各々90.5%と99.8%であった。陽性的中率はやや低値であったが、多くの症例でCD3陽性T細胞を正常ペア検体として用いているため、下記のような理由で変異陽性の検体を真陰性とみなしてしまっているからだと考えられる。

- 1) CD3陽性T細胞分画への骨髄系細胞の混入
- 2) 後述しているように変異が造血幹細胞レベルで生じる症例を認め、その場合、T細胞にも変異が検出される

男性患者のX染色体上の変異のアリル頻度は1/2に補正した。また、当該変異上にコピー数異常を認める変異に関しては、周辺のSNPのアリル頻度をアンプリコンシーケンスで測定し、その結果を用いて補正した。特に記載のない限り解析は補正したアリル頻度を用いて実施した。

## 全エクソンシーケンス

1.5 $\mu$ gのDNAを標的シーケンスと同様の方法で処理した。一部のDNA量の少なかった検体に関しては、200ngプロトコールで処理した。全エクソンシーケンスの標的領域のキャプチャーはAgilent SureSelect Human All Exon v4 or v5を用いて実施した。作成したシーケンスライブラリーは以前記載したのと同様に100bpペアエンドモードで、HiSeq 2000 or 2500でシーケンスした<sup>33</sup>。シーケンスデータは、自施設のパイプラインを使用し（Genomon;



<http://genomon.hgc.jp/exome/en/index.html>）、以下のパラメータを用いて解析した。

- (i) Mapping Quality score  $\geq 30$
- (ii) Base Quality score  $\geq 15$
- (iii) 同一リード上の一塩基変異数  $< 5$
- (iv) 同一リード上の insertion / deletion 数  $< 2$
- (v) 全リード数  $\geq 10$
- (vi) 変異リード数  $\geq 5$
- (vii) 変異アレル頻度  $\geq 0.07$

以下のいずれかに該当するものは除外:

- (i) 以下の一塩基多型のデータベースに登録されている変異
  - ① dbSNP131、ESP6500、 the 1000 genomes (23 Nov 2010)、自施設のデータベース (COSMIC v67 に同一部位の変異が 5 変異以上登録されているものは変異候補として採用した)
- (ii) COSMIC v67 での登録が 4 変異以下の insertion / deletion
- (iii) 一方向からしか読まれていない変異候補
- (iv) Repeat 領域にある変異候補 (COSMIC v67 に同一部位の変異が 5 変異以上登録されているものは変異候補として採用した)
- (v) 当該部位に変異コールされていない検体での平均アレル頻度  $> 0.01$  の変異候補
- (vi) Integrative Genomics Viewer (IGV) による目視にてエラーと考えられる変異候補

(vii) Fisher's 正確検定にて  $P \text{ value} \leq 10^{-3}$

上記基準にて採用された候補はアンプリコンシーケンスによる確認を実施し、以下の基準のうち少なくとも一つを満たすものを体細胞変異として採用した。

(i) 当該検体アレル頻度  $\geq 0.05$

(ii) 当該検体と正常検体のアレル頻度の比  $\geq 2$

### **Droplet digital PCR (ddPCR)**

症例 NIH075 には *ASXL1* 遺伝子に 23 塩基の frameshift deletion を認めたが、deletion サイズが大きく、また欠損塩基配列が repeat 配列となっていたため、通常のシーケンスでは正確なアレル頻度決定は困難であった。この変異のアレル頻度を正確に測定するために、Droplet digital PCR を用いた。以下の TaqMan probe (Integrated DNA Technologies) と primer を使用した。

変異用 Probe: FAM-AGAGGTCACCACTGCCATCGGAG-IBFQ

野生型用 Probe: HEX-AGAGGTCACCACTGCCATAGAGAG-IBFQ

Primer forward: GGACCCTCGCAGACATTA

Primer reverse: CTCTGCCACCTCCCTCATC

DNA を ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad) を用いて PCR 反応を行い、QX100 Droplet Digital PCR (Bio-Rad) で解析した。

## 診断時検体における変異評価

NIH コホートに関しては、治療開始 6 か月後に採取された検体に対して標的シーケンスを実施したが、検出された変異が診断時に存在したかどうかについてアンプリコンシーケンスにより評価した。

まず診断時検体のアンプリコンシーケンスにてアレル頻度が 2%以上であった変異候補は、診断時変異陽性と判断した。アレル頻度が 2%未満の変異に関しては、造血器疾患のない 12 症例の末梢血 DNA に対してもアンプリコンシーケンスを実施し、当該変異部位のエラー率と P 値を Empirical Bayesian mutation Calling (EBCall)<sup>62</sup> を用いて計算した。計算には統計ソフト R version 3.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) で実施し、R パッケージ“VGAM”を使用した。P 値  $10^{-5}$  未満の変異を診断時変異陽性と判定した。

## Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) アレイ核型分析

標的シーケンスを実施した検体は、DNA が不足していた 22 検体 (NIH コホート: 21 検体、Cleveland コホート: 1 検体) を除いてすべて SNP アレイ核型分析を実施した。Japan コホートの検体に関しては、Katagiri らが SNP アレイ解析した症例<sup>19</sup> も本研究に含めたが、重複した症例に関しては、既報のデータを利用した。SNP アレイ核型分析は GeneChip 500K arrays (Affymetrix) を用いて以前記載したのと同様の方法で実施した<sup>63,64</sup>。6 番染色体短腕の片親性ダイソミー (6pUPD) の微小クロソームの検出は Mann-Whitney U 検定で実施した<sup>19</sup>。多重検定は Benjamini-Hochberg 法で補正し P 値 < 0.01 を陽性とした。検出された 6pUPD のクロソームサイズの推定は以前記載したのと同様の方法で実施した<sup>19</sup>。

## フローサイトメトリー

凍結保存されていた骨髄細胞を解凍し、以下の抗体と添付文書に記載された方法で反応させた。

分化細胞の解析用:

- CD33 PE (BD Phamingen, Catalogue number: 561816)
- CD19 PerCP-Cy5.5 (BD Phamingen, Catalogue number: 340951)
- CD3 PE-Cy7 (BD Phamingen, Catalogue number: 557851)
- CD45 FITC (BD Phamingen, Catalogue number: 560976)
- CD235a APC (BD Phamingen, Catalogue number: 551336)

幹細胞・前駆細胞解析用 (一次反応) :

- CD235a Biotin (eBioscience, Catalogue number: 13-9987-80)
- CD20 Biotin (eBioscience, Catalogue number: 13-0209-80)
- CD3 Biotin (BioLegend, Catalogue number: 300403)
- CD14 Biotin (BioLegend, Catalogue number: 325623)
- CD19 Biotin (BioLegend, Catalogue number: 302203)
- CD16 Biotin (BioLegend, Catalogue number: 302003)
- CD56 Biotin (BioLegend, Catalogue number: 318319)

- CD2 Biotin (BioLegend, Catalogue number: 300203)

幹細胞・前駆細胞解析用（二次反応）：

- CD38 BV421 (BD Horizon, Catalogue number: 5624459)
- CD34 APC (BD Phamingen, Catalogue number: 560940)
- CD45RA FITC (BD Phamingen, Catalogue number: 561882)
- CD90 PE (BD Phamingen, Catalogue number: 561970)
- CD123 PE-Cy7 (BD Phamingen, Catalogue number: 560826)
- Streptavidin PerCP-Cy5.5 (BioLegend, Catalog number: 405214)

細胞のソートには FACS Aria II (Becton Dickinson) を用いた。Woll らの報告

<sup>65</sup> を参照して、以下の分画の細胞を採取した。

分化細胞:

- 赤芽球: CD45- CD235a+
- 骨髄系細胞: CD45+ CD235a- CD33+
- T リンパ球: CD45+ CD235a- CD33- CD3+ CD19-
- B リンパ球: CD45+ CD235a- CD33- CD3- CD19+

幹細胞・前駆細胞:

- 造血幹細胞 (hematopoietic stem cells, HSC) : lineage- CD34+ CD38-  
CD45RA- CD90+
- 骨髓球性共通前駆細胞 (common myeloid progenitor cells, CMP) : lineage-  
CD34+ CD38+ CD45RA- CD123+
- 顆粒球・マクロファージ前駆細胞 (granulocyte macrophage progenitor cells,  
GMP) : lineage- CD34+ CD38+ CD45RA+ CD123+
- 巨核球赤芽球前駆細胞 (megakaryocyte erythroid progenitor cells, MEP) :  
lineage- CD34+ CD38+ CD45RA- CD123-

50 個以上の細胞が得られた分画に対してアンプリコンシーケンスを実施した。

DNA は Genra Puregene Cell Kit (Qiagen) を用いて抽出し、KOD FX Neo (TOYOBO) を PCR 反応に使用した。シーケンスライブラリーは上記に記載したアンプリコンシーケンスと同様の方法で作成し、シーケンスした。変異の有無は正常 12 検体におけるアレル頻度を用いて上述したのと同様に EBCall で評価した。P 値  $10^{-5}$  未満を変異陽性と判断した。

#### シングルコロニー解析

骨髓単核球細胞を Methocult 04535 (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)

に 10<sup>4</sup> cells/mL の濃度で撒き、37°C 5%CO<sub>2</sub> の条件下で 14 日間培養した。形成された各コロニーを回収し、DNA 抽出後以下の Primer を用いてサンガーシーケンス法で変異の評価を行った。

*OR51A4* (chr11: 4968030 C to T)

Forward: AGGGTTGTGGATGGCTAGG

Reverse: TGCCCACTGTGTTAAGCATC

*EPHA5* (chr4: 66201815 C to T)

Forward: ACGTATCAGCTTGTCCAACAT

Reverse: AGCCGTGGATTTTAAAGACAG

*UBR4* (chr1: 19436676 C to T)

Forward: CCCTGCCCTTCCTTGTTAG

Reverse: GAAACTGATGCTTGGGCG

*YTHDF2* (chr1: 29070141 C to -)

Forward: CTCAGAACCCCACCCAGT

Reverse: GCGAATGTGTCGCAGTTG

*TSC22D1* (chr13: 45147482 A to G)

Forward: GAGAAGCAGAGGCTGCTAGG

Reverse: TTCAAAGTGTTAGTCAACCTCCC

*SETBP1* (chr18: 42531913 G to A)

Forward: GAAGCTGTCTCCACCCAGA

Reverse: TGGTGTCGGACGGAATG

*LARGE* (chr22: 33673105 G to A)

Forward: TCCAAGGATCCCTTAAGCTC

Reverse: TGGCTTTTCTCCGTGTGTC

*PDE4D* (chr5: 59284501 G to A)

Forward: CTCACCCACTGGATTCTGC

Reverse: CAAGCCACACCTGGTGAA

*EYA4* (chr6: 133783563 C to T)

Forward: TCCTGGATATTATAGGGTTTCACTG

Reverse: CTGGCAACATCACACCCA

*ASXLI* (chr20: 31022403-31022425 CACCACTGCCATAGAGAGGCGGC deletion)

Forward: TCCCTAGGTCAGATCACCCAGTCAGT

Reverse: AAGGCGGCAGTAGTTGTGTTTCGCT

*BCOR* (chrX: 39921487 G to A)

Forward: CTCTGCTCTCCATGTCCCTC

Reverse: TGTTAGAAGGACACGGGCTT



*BCOR* (chrX: 39913528 G deletion)

Forward: TCCAATTTCCCTCACCCA

Reverse: ACGTGGCTCTGCCATCAT

*BCOR* (chrX: 39922112 T deletion)

Forward: GGAAAGCTTTGTCCCCTCA

Reverse: TGTAACGCCCGCTTCTTC

*TET2* (chr4: 106164779 G to A)

Forward: TTGTTTTGGTTGGGGTGG

Reverse: CGCATGACTGCCAAACAG

*SLC17A4* (chr6: 25779305 T to C)

Forward: ACCAACTGGGAAGCCCAT

Reverse: GGTTTGCTCAGAGGTGGGT

*PIGA* (chrX: 15349356 T to deletion)

Forward: TGAAAAATCGCTCTTCTTGG

Reverse: TTCTGCTATGGCCCATGAT

*PIGA* (chrX: 15349759 G to T)

Forward: TTCAGGATTCAGTGCTGCTC

*PIGA* Reverse: CCCATGCTTATGGAAATCG

*PIGA* (chrX: 15349922 G deletion)

Forward: TGAAAGAGGGTCGTGGCT

Reverse: TGGGTTGCTCTAAGAACTGATG

*RAD21* (chr8: 117864887 C to T)

Forward: CCTCATTTCCTTCACTCTGACA

Reverse: GAAAAGCCCTTAAGGTTGTGA

## 統計解析

多群の比較は、特に記載ない限りは Fisher 正確検定、Welch's 2 標本 t 検定、Mann-Whitney U 検定、一元分散分析を使用した。傾向の検定は Cochran-Armitage trend 検定と Jonckheere-Terpstra 検定を使用した。全生存解析の観察期間は診断時から死亡または打ち切りまでとした。無進展生存解析は、進展をイベント、死亡をイベントまたは打ち切りとして、イベントまたは打ち切りまでを観察期間とした。生存率は Kaplan-Meier 法により計算し、検定は log-rank 検定・Cox 比例ハザードモデルにより実施した。多変量解析はロジスティクス回帰分析により実施した。

統計解析は統計解析ソフト R version 3.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて、R パッケージ“stats”、“clinfun”、“survival”を使用した。有意検定は特に記載のない限り 0.05 をカットオフとした。

## 結果

### 標的シーケンスと SNP アレイ核型分析

骨髄系腫瘍における変異標的遺伝子 106 を対象とした標的シーケンスは全 439 症例に対して施行した。標的シーケンスの平均 depth は 1248x であった (図 2、表 5)。コールされた変異候補をアンプリコンシーケンスで確認した結果、最終的に 249 の体細胞変異が 156 症例 (36%) に同定された。変異陽性例のうち 56 症例 (36%) に複数の変異を認めた (最大変異数 7) (図 3B)。 *BCOR* または *BCORL1* 遺伝子に最も高頻度に変異を認めた (9.3%)。続いて、*PIGA* (7.5%)、*DNMT3A* (8.4%)、*ASXL1* (6.2%) に多く変異が同定された。変異陽性症例のうち 77% がこれら 5 遺伝子のいずれに変異を持っていた。変異陽性率、変異スペクトラムは米国・日本のコホートで概ね似た傾向を示した (図 3A、3B、表 6.)。変異陽性率・変異数ともに年齢と相関し (両方とも  $P < 0.001$ )、その傾向は *PIGA*・*BCOR*・*BCORL1* 変異を除いて解析するとさらに顕著となった (図 3C)。NIH コホートの変異陽性 6 症例に対しては、骨髄細胞をフローサイトメトリーでソートして、各分画における変異クローンの存在を探索したが、その結果全症例において、造血幹細胞、骨髄系前駆細胞、骨髄赤芽球系前駆細胞でも変異が同定された。各分画の細胞数は、再生不良性貧血という疾患の定義から予想されている通り減少していた (図 4、表 7)。

NIH コホートは、前述の通り免疫抑制療法開始 6 か月後に採取した検体で標的シーケンスを実施したが、45 検体において診断時の検体も得られた。診断時検体の得られた 45 症例において 79 の体細胞変異が治療開始 6 か月後に同定された。これらの変異が診断時にも存在したかどうかアンプリコンシーケンスにより確認したところ、アリル頻度は低いものの ( $P<0.001$ )、58 変異 (73%) が診断時にすでに存在していることが明らかとなった (図 5A)。診断時と治療開始 6 か月の変異スペクトラムを比較したところ、各遺伝子の変異頻度は診断時・治療 6 か月後で大きな相違を認めなかった (図 5B)。

Katagiri らの報告と同様に<sup>19</sup>、SNP アレイ核型分析で最も高頻度に認めた異常は 6 番染色体短腕の片親性ダイソミー (6pUPD) で、各コホートとも約 13% の症例に認めた (図 6、図 7)。コピー数異常は 417 例中 18 症例に認め、モノソミー 7 を 7 症例、13 番染色体短腕欠損を 2 症例、その他のコピー数異常を 10 症例に認めた。標的シーケンスと SNP アレイ核型分析両者を合わせて 47% もの症例でクローン性造血を認めた (図 7)。

後天性再生不良性貧血における変異は、変異遺伝子のスペクトラムやナンセンス変異・フレームシフト変異・スプライスサイト変異に偏っていることなどは、MDS や AML と類似した所見であった (図 8A)<sup>34,35,50,66,67</sup>。一方、平均アリル頻度は Haferlach らが報告した MDS の変異データと比較すると後天性再生不良

性貧血では低値であった（後天性再生不良性貧血： 9.3%、MDS： 30.4%）（図 8B、C）<sup>45</sup>。また、変異のスペクトラムに関しては、*DNMT3A* と *ASXL1* 変異は後天性再生不良性貧血と MDS・AML で共通に認められたが、*PIGA* と *BCOR*・*BCORL1* 変異は MDS に比べ後天性再生不良性貧血で高頻度に同定された。一方、*TET2*・スプライシング因子・*JAK2*・*RUNX1*・*TP53* といった変異は後天性再生不良性貧血で低頻度であった。このことは後天性再生不良性貧血におけるクローン選択が MDS や AML と異なった機序で生じていることを示唆している。再生不良性貧血内では遺伝子間にアレル頻度の目立った差異は認めなかった（図 8D）。

同一遺伝子に変異を持った症例を 20 症例認め（*PIGA*：12 症例、*BCOR*：4 症例、*ASXL1*：2 症例、*DNMT3A*：1 症例、*RUNX1*：1 症例、*ZRSR2*：1 症例、1 症例 2 遺伝子に複数変異を認めた症例あり）（図 7）、同一症例内に独立した複数クローンに変異が存在する可能性が示唆された。そこで、実際に複数クローンが同一症例内に存在することを確認するために 2 つの *BCOR* 変異が同定された症例（症例 NIH076）と 3 つの *PIGA* 変異が同定された症例（症例 NIH207）に対し、骨髓造血細胞を用いてシングルコロニーシーケンスを行った。その結果、両症例ともに各変異が独立したクローンに存在することが示された（表 8）。

## 臨床指標との関係

次に遺伝子変異と臨床データとの関係を検体が治療 6 か月後に均一に採取されており、また全例が重症の後天性再生不良性貧血症例であった NIH コホートを中心に解析した。変異の有無と免疫抑制剤に対する治療反応性には明らかな相関は認めなかった ( $P=0.28$ ) (図 9A)。しかし各遺伝子別に解析すると、*BCOR* と *BCORL1* 変異を有する症例は免疫抑制剤に対する反応性が良好であった ( $P=0.013$ ) (図 9B)。治療後 6 か月時点での治療反応性と相関すると報告されている臨床指標<sup>68</sup>とともにロジスティクス回帰分析を施行したところ、*BCOR*・*BCORL1* 変異は独立した治療反応性良好因子として同定された (表 9)。

同様に変異の有無では、全生存・無進展生存 (MDS または AML への進展) には有意差を認めなかった (図 10A-C)。そこで再生不良性貧血において MDS よりも高頻度に認め、年齢との相関を認めず、また免疫抑制療法に対する良好な反応性を示した *PIGA*・*BCOR*・*BCORL1* を分けて解析したところ、*PIGA*・*BCOR*・*BCORL1* 変異は全生存・無進展生存に対して予後良好・それ以外の変異は予後不良な傾向を認めた (図 10D-F)。Japan コホートでも同じ遺伝子セットを用いて、解析したところ、Japan コホート全体では有意差は認めなかったが、NIH コホートと同様に重症例のみに絞って解析すると *PIGA*・*BCOR*・*BCORL1* 以外の変異は重症後天性再生不良性貧血患者群で予後不良な傾向を示した (図 10G-I)。

染色体異常に関しては、予後不良因子として知られているモノソミー7は本研究

でも予後不良であった (図 10J-L)。後天性再生不良性貧血患者において、年齢は全生存に対する予後不良因子として知られているため<sup>69</sup>、Cox 比例ハザードモデルを用いて他の臨床指標とともに多変量解析を行った (表 10)。

その結果 *PIGA*・*BCOR*・*BCORL1* 変異は良好な全生存と関連し、年齢 60 歳以上・モノソミー7・男性が有意に予後不良因子として検出された。年齢が強力な予後規定因子として作用していたため、若年者層と高齢者層に分けて解析したところ、変異は高齢層より若年層において予後への強い影響を認めた (図 11)。

#### 再生不良性貧血におけるクローン構造の継時的挙動

クローン構造の詳細な評価を行うために、継時的検体の得られた 28 例を含む、52 症例 135 検体に対して、全エクソンシーケンスを行った (表 11)。この探索は、臨床的に MDS や AML に進展する前のクローン構造を評価することを目的としていたため、検体は標的シーケンスで変異を認めた症例をより多く採用した。全エクソンシーケンスの平均 depth は 112x であった (図 12)。まず標的シーケンスを実施した各症例を代表する 52 検体に対して全エクソンシーケンスを実施したところ、52 症例中 25 症例 (48%) に 95 の体細胞変異を認めた。そのうちの 5 症例は、標的シーケンスでは変異は認められなかった (図 13A)。

標的シーケンス・全エクソンシーケンス・SNP アレイを組み合わせると、52

症例中 85%の症例でクローン性造血を認めた (表 12)。全エクソンシーケンスでは一検体あたり、平均 1.21 個の非同義変異を認めた。同義変異も含めると平均 1.83 個の変異を認めた (図 13A)。全エクソンシーケンスを施行した検体の選択方法にバイアスはあるものの、標的シーケンスと同様に全エクソンシーケンスでも平均非同義変異数は年齢とともに上昇し、変異の頻度も増える傾向を認めた (図 13B.)。一塩基置換変異は加齢に伴う変異パターン<sup>70</sup>である CpG ジヌクレオチド部位 (シトシン-ホスホジエステル結合-グアニン) のシトシンからチミンへのトランジションに大きく偏向していた。このパターンは標的シーケンスでも優位であり (図 13C)、また既報の健常者末梢血で検出された変異で解析しても同様の結果であった (図 14)<sup>71-73</sup>。

全エクソンシーケンスでは、標的シーケンスの標的遺伝子以外には、4つの巨大な遺伝子 (*ITGA1* (タンパク : 1179 アミノ酸長)、*HDLBP* (同 : 1268)、*AKAP9* (同 : 3911)、*MUC16* (同 : 22152)) に複数変異を認めたのみでそれ以外の遺伝子はすべて孤発であった。治療開始 6 か月後の検体で、アレル頻度の異なった複数の変異を認めることから複数のサブクローンが存在することが推察されるが、このことは全エクソンシーケンスを実施することで、より明瞭に確認できた。

次に 35 症例の年余に渡って採取された継時的検体を用いて、クローン構造の挙動をより詳細に評価した。多くの症例では、診断時より存在する微小クローン



由来のクローン性造血を認めた。しかし、その後のクローン構造の継時的挙動は症例によって大きく異なっていた。一部の症例では、経過中クローンサイズに大きな変化を認めなかった（観察期間中央値 5 年（2-10 年））。それらの症例の多くは持続的な血球減少を認めた（図 15）。また、初期クローンが継時的に拡大する症例（図 16）、新規に出現したクローンが拡大する症例（図 17）など様々なパターンを認めた。図 17 の 4 症例はいずれも MDS・AML へと進展した。

症例 NIH075 では 12 年間に渡ってクローン構造の継時的変化を評価することができた（図 18）。この症例では *OR51A4* の変異クローンが診断以前より既に存在し、診断時には *OR51A4* 変異クローン内に、*ASXL1* 変異クローンと *TET2*・*BCOR* 変異クローンを認めた。初期の免疫抑制療法に反応したが、同時期に *BCOR*・*TET2* 変異クローンは、*ASXL1* 変異クローン内に出現した *EHD2* 変異を含むクローンの出現とともに縮小・消失した。その後血小板減少が進行し、時期を同じくして *EHD2* 変異クローンは拡大した。その後、更に *ASXL1* 変異クローン内に *SETBP1* 変異クローンを含め、種々のクローンが出現し、*EHD2* 変異クローンは消退した。シングルコロニーシーケンスも併せて施行し、クローンの独立・共存関係を確認した（表 8）。この症例は新規クローンの出現・交代を繰り返し、また持続的な血小板減少を呈していたが、観察期間中、骨髄検査では明らかな異型性や芽球の増加を認めず、MDS の診断基準を満たさずにいた。以上の

事実は後天性再生不良性貧血において個々の変異クローンの挙動を予測することは困難であることを示唆している。

症例 NIH044 と NIH169 (図 16) では、*DNMT3A*・*ASXL1* 変異を認め、またこれらのクローンは継時的に拡大する傾向を示したにもかかわらず、経過中、血球は正常または正常に近い値で推移した。

次に継時的検体の得られた全症例を用いて、遺伝子別に継時的挙動を評価したところ、*DNMT3A*・*ASXL1*・*RUNX1*・*U2AF1* 変異クローンは継時的に拡大する傾向を認めたが、*PIGA*・*BCOR*・*BCORL1* 変異クローンは不変または縮小する傾向を呈した (図 19)。

## 考察

標的シーケンス・全エクソンシーケンス・SNP アレイ核型分析により後天性再生不良性貧血におけるクローン構造の詳細、またその継時的挙動を評価した。この統合的解析により後天性再生不良性貧血のおおよそ半数の症例でクローン性造血が存在し、約 1/3 の症例では MDS や AML における変異標的遺伝子に変異を呈することが明らかになった。

後天性再生不良性貧血におけるクローン性造血は MDS や AML におけるドライバー変異 (*DNMT3A*、*ASXL1*、*BCOR*・*BCORL1*) を高頻度に認め、先行する論文と同様の結果が得られた<sup>37,38,74</sup>。

まず、Dana Faber 癌研究所の Lane らは 39 例の再生不良性貧血患者に対し、標的シーケンスを実施し、2 症例に *ASXL1* 変異、1 症例に *DNMT3A* 変異を認めたことを報告した。更に King's College の Kulasekararaj らと 19% の症例に変異を認め、*ASXL1* (N=12)、*DNMT3A* (N=8)、*BCOR* (N=6) 変異が高頻度であることを報告した。一方、Hannover Medical School の HeuserIn らは、38 症例中 2 症例に MDS に関連した変異を報告した (2 症例 3 変異 *SLIT1*、*SETBP1*、*ASXL1*)。

これらの先行研究と比較し、我々の研究は規模が大きく、また NIH コホートに関しては、全例重症症例かつ治療開始 6 か月後に検体採取しており、より均質な評価が可能となった。更に継時的検体を用いることで、MDS・AML に至る以

前のクローン性造血の挙動も観察することができた。本研究では、NIH コホート・Japan コホート・Cleveland コホートと3つのコホートを用いたが、3コホートで整合性のとれた結果が得られており、本研究の結果は後天性再生不良性貧血における遺伝子変異の全体像を詳細に捉えていると考えられる。

今回明らかになった後天性再生不良性貧血の特徴的な変異スペクトラムは、後天性再生不良性貧血の分類・病態、臨床応用に関し、以下のような重要な知見を含んでいる。

まず、後天性再生不良性貧血と MDS では多くの共通した遺伝子変異を認めたが、後天性再生不良性貧血のアリル頻度は MDS と比較して小さく、治療開始6か月後の時点では、多くの症例で10%以下であり、またそのクローンが支配的になるにはしばしば年余の経過を要した。更に変異遺伝子によって、その挙動と臨床的指標との関連は異なり、*BCOR*・*BCORL1* 変異と *PIGA* 変異は継時的に不変または縮小する傾向があり、また臨床的には良好な免疫抑制剤に対する反応性、全生存を呈した。一方、*DNMT3A*・*ASXL1* 変異を含むいくつかの変異は、継時的に拡大する傾向を認め、免疫抑制剤に対する不良な反応性、不良な予後と関連した。これらの事実は、後天性再生不良性貧血におけるクローン性造血は MDS や AML に進展する前の初期変化を観察している可能性を示唆している。実際、一次性の白血病における前白血病クローンはしばしば *DNMT3A* 変異を持っている

ることが示されている<sup>75,76</sup>。

二点目は、後天性再生不良性貧血と正常造血における加齢の影響の類似性を明らかにしたことである。後天性再生不良性貧血では変異症例の割合・変異数ともに年齢と相関し、またそのパターンはシトシンのチミンへのトランジションが優位であった。メチル化修飾を受けたシトシン-グアニン (CpG) 配列のシトシンは、自然にチミンに変換され<sup>77</sup>、他の領域に比べ、10-50 倍変異が生じやすいが<sup>78</sup>、この変異パターンは加齢と相関した変異パターンとして知られている<sup>70</sup>。同様の変異パターンは既報のデータを解析したところ、健常者造血幹細胞・末梢血 DNA においても有意であった (図 14)<sup>71-73</sup>。加齢に伴うクローン性造血は、SNP アレイ核型分析<sup>79,80</sup> や全エクソンシーケンス<sup>72,73,81</sup> により検討されており、造血器腫瘍以外の担癌患者や健常人において約 1-3% の頻度で認めることが報告されている。また、クローン性造血を認める症例では、造血器腫瘍発症とリスクが高いことが示されている<sup>72,73,79-82</sup>。後天性再生不良性貧血における変異と加齢による変異は、両者ともアリル頻度が概して低いこと、シトシンからチミンへのトランジションが優位であること、骨髄系腫瘍との変異遺伝子の重複を認めることより<sup>72,73,79-82</sup>、共通した起源を持ち、また共通したクローン選択を受けていることが窺われる。後天性再生不良性貧血では MDS や AML に進展する以前にテロメア長が短くなること<sup>83</sup> も骨髄不全環境下でのゲノムの加齢と健常

高齢者におけるゲノム加齢に何らかの共通した機序が存在することを示唆している。

更に、特定の変異は特定の機能を有していると考えられるが<sup>84,85</sup>、後天性再生不良性貧血において、変異細胞の正確な選択機序は不明である。*DNMT3A* 変異や *ASXL1* 変異をもったクローンが免疫応答を誘発して後天性再生不良性貧血を発症させることは、これらの変異の存在が免疫抑制剤に対する反応と関連しないことから否定的である。*DNMT3A* 変異・*ASXL1* 変異は骨髄不全環境下で上昇している外的シグナルに応答して、分化よりも自己複製に作用する傾向があり、増殖優位性を有している可能性が考えられる。また、高齢の骨髄環境下で選択されているような遺伝子変異をもったクローンも骨髄不全環境下で選択されやすいのかもしれない。

一方、*BCOR*・*BCORL1*、*PIGA* 変異は後天性再生不良性貧血で高頻度あったが、*TET2*・*JAK2*・スプライシング因子の変異は、*MDS* や健常高齢者に比べ低頻度であった。このことは、造血不全環境下では、加齢骨髄環境下とは異なった機序のクローン選択も生じている可能性を示唆している。*6pUPD* は後天性再生不良性貧血で高頻度に検出されるが、*6pUPD* は、全例で *HLA* クラス I 領域を含んでおり<sup>19</sup>、*6pUPD* 陽性例で欠失している *HLA* アレルは、抗原提示に必要な *HLA* 分子の発現を欠失することで、免疫監視機構を回避し、*HLA* アレルを欠失してい

ない細胞に比べ、増殖優位性を示し、クローン性を獲得していると考えられている。 *PIGA* 変異クローンは、 *PIGA* 変異により GPI アンカー蛋白を欠失することで、免疫機構を活性化させる分子を提示できなくなり、骨髄不全環境下で免疫細胞からの認識を回避し、相対的に増加する機序が想定されている<sup>86-89</sup>。

*BCOR*・*BCORL1* 遺伝子はともに転写コリプレッサーであるが、後天性再生不良性貧血で高頻度に認め、また免疫抑制療法に対する良好な反応性・良好な生存と関与していることが今回示されたことから、 *BCOR*・*BCORL1* 変異クローンも 6pUPD クローンや *PIGA* 変異クローンと同様に T 細胞による造血幹細胞の破壊から回避している可能性が考えられる。

また、予後良好変異と予後不良変異双方を持った症例は、免疫抑制剤に対する反応性といった早期の指標に対しては良好な傾向を示したが（図 10D）、無進展死亡では予後不良な傾向を示した（図 10E-F）。このことは予後不良な変異は治療反応性など早期の臨床指標に対する影響は低いが、MDS や AML への進展などの晩期の臨床指標に強く影響する可能性を示唆している。

以下の点に関しては、今後の研究課題としたい。まず、本研究では予後良好変異・不良変異を同定したが、症例毎に観察すると、予後不良の変異を持っていても経過中にそのクローンが消失する症例や、MDS/AML に移行しない症例も認めることから、必ずしもその予後を決定するものではないと考えられる。

MDS/AML への進展には、今回標的とした遺伝子の変異以外にも、エピジェネティックな変化等も関与している可能性が考えられる。近年 MDS/AML の発症・進展に骨髄微小環境の異常が関与していることが報告されており<sup>90-92</sup>、骨髄微小環境の影響も評価する必要があると考えられる。また、今回同定された予後不良群に対して、DNA メチル化阻害剤投与等 MDS に対する治療の早期介入により、予後の改善が得られるかに関しては、より多数例での長期観察が必要と考えられる。

次に、Katagiri らは、6pUPD 陽性例は陰性例と比較し、免疫抑制療法に対する反応性が良好であることを報告しているが、本研究の NIH コホートでは、6pUPD の有無による治療反応性の差異は認められなかった。NIH コホートでは、治療開始後 6 か月の検体を用いたが、6pUPD クローンが免疫監視機構を回避しているとすると、免疫抑制療法開始前の検体で評価することで、治療反応性・予後との相関が同定されるかもしれない。

また、本研究では MDS/AML に移行した 17 症例に対しても標的シーケンスも実施したが、スプライシング因子の変異は *U2AF1* 変異を 1 症例認めたのみであり、既報の原発性 MDS と比較し低頻度であった。再生不良性貧血からの二次性 MDS は、原発性 MDS とは異なった病態で発症している可能性があり、多数例の二次性 MDS/AML 症例を解析することで新たな知見が得られると考えられる。



## 結論

後天性再生不良性貧血におけるクローン性造血の頻度は、従来考えられていた以上に高率であることが明らかになった。特定の遺伝子が治療反応性や生存と関連していたが、後天性再生不良性貧血におけるクローン構造の複雑な挙動は症例により大きく異なり、必ずしもその予後を決定するものではなかった。実際、特定の遺伝子変異がない症例でも MDS や AML への進展を認め、また逆に予後不良な変異を認めた症例でも免疫抑制剤に反応し、その後正常造血を維持し、長期生存を維持する症例も観察された。臨床指標とともに、シーケンスと SNP アレイ核型分析によりクローン性造血を綿密に評価することが予後予測や治療判断において重要であろう。

## 謝辞

本研究を遂行し、また学位論文をまとめるに当たり、多くのご支援とご指導を賜りました。博士課程への進学・研究の遂行において多大なご支援・ご指導をいただいた指導教官である東京大学医学部附属病院輸血部の岡崎仁教授、東京大学医学部附属病院輸血部前教授である高橋孝喜先生には、深く感謝しております。

京都大学医学研究科腫瘍生物学講座の小川誠司教授には、本研究の計画・遂行全般のご指導をしていただきました。また、米国国立衛生研究所の Neal S. Young 教授、金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学の中尾眞二教授、Cleveland Clinic の Jaroslaw P. Maciejewski 教授には臨床検体・臨床情報の収集にご尽力いただき、解析に対する様々なご指導もいただきました。東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターの宮野悟教授にはシーケンスデータ解析全般のご指導を賜りました。感謝申し上げます。

最後に、本研究にご助力いただいた京都大学腫瘍生物学講座、東京大学医科学研究所ヒトゲノムセンター、金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学、Hematology Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)、 Department of Translational Hematology and Oncology Research, Cleveland Clinic の皆様に御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1 Young, N. S., Calado, R. T. & Scheinberg, P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* **108**, 2509-2519, doi:10.1182/blood-2006-03-010777 (2006).
- 2 Montane, E., Ibanez, L., Vidal, X., Ballarin, E., Puig, R., Garcia, N., Laporte, J. R., Catalan Group for Study of, A. & Aplastic, A. Epidemiology of aplastic anemia: a prospective multicenter study. *Haematologica* **93**, 518-523, doi:10.3324/haematol.12020 (2008).
- 3 Issaragrisil, S., Kaufman, D. W., Anderson, T., Chansung, K., Leaverton, P. E., Shapiro, S. & Young, N. S. The epidemiology of aplastic anemia in Thailand. *Blood* **107**, 1299-1307, doi:10.1182/blood-2005-01-0161 (2006).
- 4 再生不良性貧血の診断基準と診療の参照ガイド作成のためのワーキンググループ. 再生不良性貧血診療の参照ガイド 2014 年改訂. (2014).
- 5 Appelbaum, F. R., Cheever, M. A., Fefer, A., Storb, R. & Thomas, E. D. Recurrence of aplastic anemia following cyclophosphamide and syngeneic bone marrow transplantation: evidence for two mechanisms of graft failure. *Blood* **65**, 553-556 (1985).
- 6 Torok-Storb, B. J., Sieff, C., Storb, R., Adamson, J. & Thomas, E. D. In vitro tests

- for distinguishing possible immune-mediated aplastic anemia from transfusion-induced sensitization. *Blood* **55**, 211-215 (1980).
- 7 Marsh, J. C., Ball, S. E., Cavenagh, J., Darbyshire, P., Dokal, I., Gordon-Smith, E. C., Keidan, J., Laurie, A., Martin, A., Mercieca, J., Killick, S. B., Stewart, R., Yin, J. A. & British Committee for Standards in, H. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br J Haematol* **147**, 43-70, doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07842.x (2009).
- 8 Scheinberg, P. & Young, N. S. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood* **120**, 1185-1196, doi:10.1182/blood-2011-12-274019 (2012).
- 9 Scheinberg, P., Nunez, O., Weinstein, B., Scheinberg, P., Biancotto, A., Wu, C. O. & Young, N. S. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. *The New England journal of medicine* **365**, 430-438, doi:10.1056/NEJMoa1103975 (2011).
- 10 Socie, G., Henry-Amar, M., Bacigalupo, A., Hows, J., Tichelli, A., Ljungman, P., McCann, S. R., Frickhofen, N., Van't Veer-Korthof, E. & Gluckman, E. Malignant tumors occurring after treatment of aplastic anemia. European Bone Marrow Transplantation-Severe Aplastic Anaemia Working Party. *The New England journal of medicine* **329**, 1152-1157, doi:10.1056/NEJM199310143291603

- (1993).
- 11 Najean, Y. & Haguenuer, O. Long-term (5 to 20 years) Evolution of nongrafted aplastic anemias. The Cooperative Group for the Study of Aplastic and Refractory Anemias. *Blood* **76**, 2222-2228 (1990).
  - 12 Tisdale, J. F., Maciejewski, J. P., Nunez, O., Rosenfeld, S. J. & Young, N. S. Late complications following treatment for severe aplastic anemia (SAA) with high-dose cyclophosphamide (Cy): follow-up of a randomized trial. *Blood* **100**, 4668-4670, doi:10.1182/blood-2002-02-0494 (2002).
  - 13 Dameshek, W. Riddle: what do aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and "hypoplastic" leukemia have in common? *Blood* **30**, 251-254 (1967).
  - 14 Cancer Genome Atlas Research, N. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **368**, 2059-2074, doi:10.1056/NEJMoa1301689 (2013).
  - 15 Bennett, J. M. & Orazi, A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. *Haematologica* **94**, 264-268, doi:10.3324/haematol.13755 (2009).

- 16 Konoplev, S., Medeiros, L. J., Lennon, P. A., Prajapati, S., Kanungo, A. & Lin, P. Therapy may unmask hypoplastic myelodysplastic syndrome that mimics aplastic anemia. *Cancer* **110**, 1520-1526, doi:10.1002/cncr.22935 (2007).
- 17 Calado, R. T. Immunologic aspects of hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Semin Oncol* **38**, 667-672, doi:10.1053/j.seminoncol.2011.04.006 (2011).
- 18 Maciejewski, J. P., Rivera, C., Kook, H., Dunn, D. & Young, N. S. Relationship between bone marrow failure syndromes and the presence of glycoposphatidyl inositol-anchored protein-deficient clones. *Br J Haematol* **115**, 1015-1022 (2001).
- 19 Katagiri, T., Sato-Otsubo, A., Kashiwase, K., Morishima, S., Sato, Y., Mori, Y., Kato, M., Sanada, M., Morishima, Y., Hosokawa, K., Sasaki, Y., Ohtake, S., Ogawa, S., Nakao, S. & Japan Marrow Donor, P. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood* **118**, 6601-6609, doi:10.1182/blood-2011-07-365189 (2011).
- 20 Josten, K. M., Tooze, J. A., Borthwick-Clarke, C., Gordon-Smith, E. C. & Rutherford, T. R. Acquired aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: studies on clonality. *Blood* **78**, 3162-3167 (1991).
- 21 Abkowitz, J. L., Fialkow, P. J., Niebrugge, D. J., Raskind, W. H. & Adamson, J. W. Pancytopenia as a clonal disorder of a multipotent hematopoietic stem cell. *J*

- Clin Invest* **73**, 258-261, doi:10.1172/JCII111199 (1984).
- 22 Mortazavi, Y., Chopra, R., Gordon-Smith, E. C. & Rutherford, T. R. Clonal patterns of X-chromosome inactivation in female patients with aplastic anaemia studies using a novel reverse transcription polymerase chain reaction method. *Eur J Haematol* **64**, 385-395 (2000).
- 23 van Kamp, H., Landegent, J. E., Jansen, R. P., Willemze, R. & Fibbe, W. E. Clonal hematopoiesis in patients with acquired aplastic anemia. *Blood* **78**, 3209-3214 (1991).
- 24 Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Iida, Y., Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T. & Kinoshita, T. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* **73**, 703-711 (1993).
- 25 Miyata, T., Yamada, N., Iida, Y., Nishimura, J., Takeda, J., Kitani, T. & Kinoshita, T. Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *The New England journal of medicine* **330**, 249-255, doi:10.1056/NEJM199401273300404 (1994).
- 26 Sugimori, C., Chuhjo, T., Feng, X., Yamazaki, H., Takami, A., Teramura, M., Mizoguchi, H., Omine, M. & Nakao, S. Minor population of CD55-CD59- blood

- cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* **107**, 1308-1314, doi:10.1182/blood-2005-06-2485 (2006).
- 27 Wang, H., Chuhjo, T., Yasue, S., Omine, M. & Nakao, S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* **100**, 3897-3902, doi:10.1182/blood-2002-03-0799 (2002).
- 28 Mikhailova, N., Sessarego, M., Fugazza, G., Caimo, A., De Filippi, S., van Lint, M. T., Bregante, S., Valeriani, A., Mordini, N., Lamparelli, T., Gualandi, F., Occhini, D. & Bacigalupo, A. Cytogenetic abnormalities in patients with severe aplastic anemia. *Haematologica* **81**, 418-422 (1996).
- 29 Socie, G., Rosenfeld, S., Frickhofen, N., Gluckman, E. & Tichelli, A. Late clonal diseases of treated aplastic anemia. *Semin Hematol* **37**, 91-101 (2000).
- 30 Maciejewski, J. P., Risitano, A., Sloand, E. M., Nunez, O. & Young, N. S. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood* **99**, 3129-3135 (2002).
- 31 Kotzot, D. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *Journal of medical genetics* **38**, 497-507



- (2001).
- 32 Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Masse, A., Kosmider, O., Le Couedic, J. P., Robert, F., Alberdi, A., Lecluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F. J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S. P., Dessen, P., Soulier, J., Viguie, F., Fontenay, M., Vainchenker, W. & Bernard, O. A. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England journal of medicine* **360**, 2289-2301, doi:10.1056/NEJMoa0810069 (2009).
- 33 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., Koefler, 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, doi:10.1038/nature10496 (2011).
- 34 Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., Larson, D. E., Kandoth, C., Payton, J. E., Baty, J., Welch, J., Harris, C. C., Lichti, C. F., Townsend, R. R., Fulton, R. S., Dooling, D. J., Koboldt, D. C., Schmidt, H., Zhang,

- Q., Osborne, J. R., Lin, L., O'Laughlin, M., McMichael, J. F., Delehaunty, K. D., McGrath, S. D., Fulton, L. A., Magrini, V. J., Vickery, T. L., Hundal, J., Cook, L. L., Conyers, J. J., Swift, G. W., Reed, J. P., Alldredge, P. A., Wylie, T., Walker, J., Kalicki, J., Watson, M. A., Heath, S., Shannon, W. D., Varghese, N., Nagarajan, R., Westervelt, P., Tomasson, M. H., Link, D. C., Graubert, T. A., DiPersio, J. F., Mardis, E. R. & Wilson, R. K. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **363**, 2424-2433, doi:10.1056/NEJMoa1005143 (2010).
- 35 Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adelaide, J., Bonansea, J., Cervera, N., Carbuccia, N., Lagarde, A., Prebet, T., Nezri, M., Sainty, D., Olschwang, S., Xerri, L., Chaffanet, M., Mozziconacci, M. J., Vey, N. & Birnbaum, D. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* **145**, 788-800, doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x (2009).
- 36 Kon, A., Shih, L. Y., Minamino, M., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nagata, Y., Yoshida, K., Okuno, Y., Bando, M., Nakato, R., Ishikawa, S., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Nishimoto, A., Haferlach, C., Nowak, D., Sato, Y., Alpermann, T., Nagasaki, M., Shimamura, T., Tanaka, H., Chiba, K., Yamamoto, R., Yamaguchi, T., Otsu, M.,

- Obara, N., Sakata-Yanagimoto, M., Nakamaki, T., Ishiyama, K., Nolte, F., Hofmann, W. K., Miyawaki, S., Chiba, S., Mori, H., Nakauchi, H., Koeffler, H. P., Aburatani, H., Haferlach, T., Shirahige, K., Miyano, S. & Ogawa, S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nature genetics* **45**, 1232-1237, doi:10.1038/ng.2731 (2013).
- 37 Lane, A. A., Odejide, O., Kopp, N., Kim, S., Yoda, A., Erlich, R., Wagle, N., Abel, G. A., Rodig, S. J., Antin, J. H. & Weinstock, D. M. Low frequency clonal mutations recoverable by deep sequencing in patients with aplastic anemia. *Leukemia* **27**, 968-971, doi:10.1038/leu.2013.30 (2013).
- 38 Kulasekararaj, A. G., Jiang, J., Smith, A. E., Mohamedali, A. M., Mian, S., Gandhi, S., Gaken, J., Czepulkowski, B., Marsh, J. C. & Mufti, G. J. Somatic mutations identify a sub-group of aplastic anemia patients that progress to myelodysplastic syndrome. *Blood*, doi:10.1182/blood-2014-05-574889 (2014).
- 39 Sato, Y., Yoshizato, T., Shiraishi, Y., Maekawa, S., Okuno, Y., Kamura, T., Shimamura, T., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Suzuki, H., Nagata, Y., Yoshida, K., Kon, A., Suzuki, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Niida, A., Fujimoto, A., Tsunoda, T., Morikawa, T., Maeda, D., Kume, H., Sugano, S., Fukayama, M., Aburatani, H., Sanada, M., Miyano, S., Homma, Y. & Ogawa, S. Integrated molecular analysis

- of clear-cell renal cell carcinoma. *Nature genetics* **45**, 860-867, doi:10.1038/ng.2699 (2013).
- 40 Walter, M. J., Shen, D., Ding, L., Shao, J., Koboldt, D. C., Chen, K., Larson, D. E., McLellan, M. D., Dooling, D., Abbott, R., Fulton, R., Magrini, V., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O'Laughlin, M., Fan, X., Grillot, M., Witowski, S., Heath, S., Frater, J. L., Eades, W., Tomasson, M., Westervelt, P., DiPersio, J. F., Link, D. C., Mardis, E. R., Ley, T. J., Wilson, R. K. & Graubert, T. A. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* **366**, 1090-1098, doi:10.1056/NEJMoa1106968 (2012).
- 41 Gomez-Segui, I., Makishima, H., Jerez, A., Yoshida, K., Przychodzen, B., Miyano, S., Shiraishi, Y., Husseinzadeh, H. D., Guinta, K., Clemente, M., Hosono, N., McDevitt, M. A., Moliterno, A. R., Sekeres, M. A., Ogawa, S. & Maciejewski, J. P. Novel recurrent mutations in the RAS-like GTP-binding gene RIT1 in myeloid malignancies. *Leukemia* **27**, 1943-1946, doi:10.1038/leu.2013.179 (2013).
- 42 Jardin, F., Callanan, M., Penther, D., Ruminy, P., Troussard, X., Kerckaert, J. P., Figeac, M., Parmentier, F., Rainville, V., Vaida, I., Bertrand, P., Duval, A. B., Picquenot, J. M., Chaperot, L., Marolleau, J. P., Plumas, J., Tilly, H. & Bastard, C. Recurrent genomic aberrations combined with deletions of various tumour

suppressor genes may deregulate the G1/S transition in CD4+CD56+ haematodermic neoplasms and contribute to the aggressiveness of the disease.

*Leukemia* **23**, 698-707, doi:10.1038/leu.2008.359 (2009).

- 43 Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., Ritchey, J. K., Young, M. A., Lamprecht, T., McLellan, M. D., McMichael, J. F., Wallis, J. W., Lu, C., Shen, D., Harris, C. C., Dooling, D. J., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Chen, K., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., Magrini, V. J., Cook, L., McGrath, S. D., Vickery, T. L., Wendl, M. C., Heath, S., Watson, M. A., Link, D. C., Tomasson, M. H., Shannon, W. D., Payton, J. E., Kulkarni, S., Westervelt, P., Walter, M. J., Graubert, T. A., Mardis, E. R., Wilson, R. K. & DiPersio, J. F. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* **481**, 506-510, doi:10.1038/nature10738 (2012).
- 44 Milosevic, J. D., Puda, A., Malcovati, L., Berg, T., Hofbauer, M., Stukalov, A., Klampfl, T., Harutyunyan, A. S., Gisslinger, H., Gisslinger, B., Burjanivova, T., Rumi, E., Pietra, D., Elena, C., Vannucchi, A. M., Doubek, M., Dvorakova, D., Robesova, B., Wieser, R., Koller, E., Suvajdzic, N., Tomin, D., Tosic, N., Colinge, J., Racil, Z., Steurer, M., Pavlovic, S., Cazzola, M. & Kralovics, R. Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am J*

- Hematol* **87**, 1010-1016, doi:10.1002/ajh.23309 (2012).
- 45 Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, A., Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Koeffler, H. P., Klein, H. U., Dugas, M., Aburatani, H., Kohlmann, A., Miyano, S., Haferlach, C., Kern, W. & Ogawa, S. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **28**, 241-247, doi:10.1038/leu.2013.336 (2014).
- 46 Score, J., Hidalgo-Curtis, C., Jones, A. V., Winkelmann, N., Skinner, A., Ward, D., Zoi, K., Ernst, T., Stegelmann, F., Dohner, K., Chase, A. & Cross, N. C. Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **119**, 1208-1213, doi:10.1182/blood-2011-07-367243 (2012).
- 47 Puda, A., Milosevic, J. D., Berg, T., Klampfl, T., Harutyunyan, A. S., Gisslinger, B., Rumi, E., Pietra, D., Malcovati, L., Elena, C., Doubek, M., Steurer, M., Tomic, N., Pavlovic, S., Guglielmelli, P., Pieri, L., Vannucchi, A. M., Gisslinger, H., Cazzola, M. & Kralovics, R. Frequent deletions of JARID2 in leukemic transformation of chronic myeloid malignancies. *Am J Hematol* **87**, 245-250,

- doi:10.1002/ajh.22257 (2012).
- 48 Makishima, H., Yoshida, K., Nguyen, N., Przychodzen, B., Sanada, M., Okuno, Y., Ng, K. P., Gudmundsson, K. O., Vishwakarma, B. A., Jerez, A., Gomez-Segui, I., Takahashi, M., Shiraishi, Y., Nagata, Y., Guinta, K., Mori, H., Sekeres, M. A., Chiba, K., Tanaka, H., Muramatsu, H., Sakaguchi, H., Paquette, R. L., McDevitt, M. A., Kojima, S., Sauntharajah, Y., Miyano, S., Shih, L. Y., Du, Y., Ogawa, S. & Maciejewski, J. P. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nature genetics* **45**, 942-946, doi:10.1038/ng.2696 (2013).
- 49 Yoshida, K., Toki, T., Okuno, Y., Kanezaki, R., Shiraishi, Y., Sato-Otsubo, A., Sanada, M., Park, M. J., Terui, K., Suzuki, H., Kon, A., Nagata, Y., Sato, Y., Wang, R., Shiba, N., Chiba, K., Tanaka, H., Hama, A., Muramatsu, H., Hasegawa, D., Nakamura, K., Kanegane, H., Tsukamoto, K., Adachi, S., Kawakami, K., Kato, K., Nishimura, R., Izraeli, S., Hayashi, Y., Miyano, S., Kojima, S., Ito, E. & Ogawa, S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nature genetics* **45**, 1293-1299, doi:10.1038/ng.2759 (2013).
- 50 Mortazavi, Y., Merk, B., McIntosh, J., Marsh, J. C., Schrezenmeier, H., Rutherford, T. R., Pathophysiology, B. I. & Treatment of Aplastic Anaemia Study, G. The spectrum of PIG-A gene mutations in aplastic anemia/paroxysmal

- nocturnal hemoglobinuria (AA/PNH): a high incidence of multiple mutations and evidence of a mutational hot spot. *Blood* **101**, 2833-2841, doi:10.1182/blood-2002-07-2095 (2003).
- 51 Solomou, E. E., Gibellini, F., Stewart, B., Malide, D., Berg, M., Visconte, V., Green, S., Childs, R., Chanock, S. J. & Young, N. S. Perforin gene mutations in patients with acquired aplastic anemia. *Blood* **109**, 5234-5237, doi:10.1182/blood-2006-12-063495 (2007).
- 52 Germeshausen, M., Deerberg, S., Peter, Y., Reimer, C., Kratz, C. P. & Ballmaier, M. The spectrum of ELANE mutations and their implications in severe congenital and cyclic neutropenia. *Human mutation* **34**, 905-914, doi:10.1002/humu.22308 (2013).
- 53 Dgany, O., Avidan, N., Delaunay, J., Krasnov, T., Shalmon, L., Shalev, H., Eidelitz-Markus, T., Kapelushnik, J., Cattani, D., Pariente, A., Tulliez, M., Cretien, A., Schischmanoff, P. O., Iolascon, A., Fibach, E., Koren, A., Rossler, J., Le Merrer, M., Yaniv, I., Zaizov, R., Ben-Asher, E., Olender, T., Lancet, D., Beckmann, J. S. & Tamary, H. Congenital dyserythropoietic anemia type I is caused by mutations in codanin-1. *American journal of human genetics* **71**, 1467-1474, doi:10.1086/344781 (2002).



- 54 Kirwan, M., Walne, A. J., Plagnol, V., Velangi, M., Ho, A., Hossain, U., Vulliamy, T. & Dokal, I. Exome sequencing identifies autosomal-dominant SRP72 mutations associated with familial aplasia and myelodysplasia. *American journal of human genetics* **90**, 888-892, doi:10.1016/j.ajhg.2012.03.020 (2012).
- 55 Parikh, S. & Bessler, M. Recent insights into inherited bone marrow failure syndromes. *Current opinion in pediatrics* **24**, 23-32, doi:10.1097/MOP.0b013e32834eca77 (2012).
- 56 Dong, F., Brynes, R. K., Tidow, N., Welte, K., Lowenberg, B. & Touw, I. P. Mutations in the gene for the granulocyte colony-stimulating-factor receptor in patients with acute myeloid leukemia preceded by severe congenital neutropenia. *The New England journal of medicine* **333**, 487-493, doi:10.1056/NEJM199508243330804 (1995).
- 57 Shimamura, A. & Alter, B. P. Pathophysiology and management of inherited bone marrow failure syndromes. *Blood Rev* **24**, 101-122, doi:10.1016/j.blre.2010.03.002 (2010).
- 58 Ballew, B. J., Yeager, M., Jacobs, K., Giri, N., Boland, J., Burdett, L., Alter, B. P. & Savage, S. A. Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. *Human genetics* **132**, 473-480,

- doi:10.1007/s00439-013-1265-8 (2013).
- 59 Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. & Mesirov, J. P. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**, 24-26, doi:10.1038/nbt.1754 (2011).
- 60 Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**, e115, doi:10.1093/nar/gks596 (2012).
- 61 Katagiri, T., Qi, Z., Ohtake, S. & Nakao, S. GPI-anchored protein-deficient T cells in patients with aplastic anemia and low-risk myelodysplastic syndrome: implications for the immunopathophysiology of bone marrow failure. *Eur J Haematol* **86**, 226-236, doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01563.x (2011).
- 62 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, doi:10.1093/nar/gkt126 (2013).
- 63 Nannya, Y., Sanada, M., Nakazaki, K., Hosoya, N., Wang, L., Hangaishi, A., Kurokawa, M., Chiba, S., Bailey, D. K., Kennedy, G. C. & Ogawa, S. A robust

algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* **65**, 6071-6079, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0465 (2005).

- 64 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, doi:10.1086/518809 (2007).
- 65 Woll, P. S., Kjallquist, U., Chowdhury, O., Doolittle, H., Wedge, D. C., Thongjuea, S., Erlandsson, R., Ngara, M., Anderson, K., Deng, Q., Mead, A. J., Stenson, L., Giustacchini, A., Duarte, S., Giannoulatou, E., Taylor, S., Karimi, M., Scharenberg, C., Mortera-Blanco, T., Macaulay, I. C., Clark, S. A., Dybedal, I., Josefsen, D., Fenaux, P., Hokland, P., Holm, M. S., Cazzola, M., Malcovati, L., Tauro, S., Bowen, D., Boulwood, J., Pellagatti, A., Pimanda, J. E., Unnikrishnan, A., Vyas, P., Gohring, G., Schlegelberger, B., Tobiasson, M., Kvalheim, G., Constantinescu, S. N., Nerlov, C., Nilsson, L., Campbell, P. J., Sandberg, R., Papaemmanuil, E., Hellstrom-Lindberg, E., Linnarsson, S. & Jacobsen, S. E.

- Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell* **25**, 794-808, doi:10.1016/j.ccr.2014.03.036 (2014).
- 66 Damm, F., Chesnais, V., Nagata, Y., Yoshida, K., Scourzic, L., Okuno, Y., Itzykson, R., Sanada, M., Shiraishi, Y., Gelsi-Boyer, V., Renneville, A., Miyano, S., Mori, H., Shih, L. Y., Park, S., Dreyfus, F., Guerci-Bresler, A., Solary, E., Rose, C., Cheze, S., Prebet, T., Vey, N., Legentil, M., Duffourd, Y., de Botton, S., Preudhomme, C., Birnbaum, D., Bernard, O. A., Ogawa, S., Fontenay, M. & Kosmider, O. BCOR and BCORL1 mutations in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Blood* **122**, 3169-3177, doi:10.1182/blood-2012-11-469619 (2013).
- 67 Nafa, K., Bessler, M., Castro-Malaspina, H., Jhanwar, S. & Luzzatto, L. The spectrum of somatic mutations in the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria includes large deletions and small duplications. *Blood Cells Mol Dis* **24**, 370-384, doi:10.1006/bcmd.1998.0203 (1998).
- 68 Scheinberg, P., Wu, C. O., Nunez, O. & Young, N. S. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol* **144**, 206-216, doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07450.x (2009).
- 69 Scheinberg, P., Cooper, J. N., Sloand, E. M., Wu, C. O., Calado, R. T. & Young,

N. S. Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia. *JAMA* **304**, 1358-1364, doi:10.1001/jama.2010.1376 (2010).

- 70 Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Borresen-Dale, A. L., Boyault, S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., Desmedt, C., Eils, R., Eyfjord, J. E., Foekens, J. A., Greaves, M., Hosoda, F., Hutter, B., Ilicic, T., Imbeaud, S., Imielinski, M., Jager, N., Jones, D. T., Jones, D., Knappskog, S., Kool, M., Lakhani, S. R., Lopez-Otin, C., Martin, S., Munshi, N. C., Nakamura, H., Northcott, P. A., Pajic, M., Papaemmanuil, E., Paradiso, A., Pearson, J. V., Puente, X. S., Raine, K., Ramakrishna, M., Richardson, A. L., Richter, J., Rosenstiel, P., Schlesner, M., Schumacher, T. N., Span, P. N., Teague, J. W., Totoki, Y., Tutt, A. N., Valdes-Mas, R., van Buuren, M. M., van 't Veer, L., Vincent-Salomon, A., Waddell, N., Yates, L. R., Australian Pancreatic Cancer Genome, I., Consortium, I. B. C., Consortium, I. M.-S., PedBrain, I., Zucman-Rossi, J., Futreal, P. A., McDermott, U., Lichter, P., Meyerson, M., Grimmond, S. M., Siebert, R., Campo, E., Shibata, T., Pfister, S. M., Campbell, P. J. & Stratton, M. R. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415-421,

doi:10.1038/nature12477 (2013).

- 71 Welch, J. S., Ley, T. J., Link, D. C., Miller, C. A., Larson, D. E., Koboldt, D. C., Wartman, L. D., Lamprecht, T. L., Liu, F., Xia, J., Kandoth, C., Fulton, R. S., McLellan, M. D., Dooling, D. J., Wallis, J. W., Chen, K., Harris, C. C., Schmidt, H. K., Kalicki-Veizer, J. M., Lu, C., Zhang, Q., Lin, L., O'Laughlin, M. D., McMichael, J. F., Delehaunty, K. D., Fulton, L. A., Magrini, V. J., McGrath, S. D., Demeter, R. T., Vickery, T. L., Hundal, J., Cook, L. L., Swift, G. W., Reed, J. P., Alldredge, P. A., Wylie, T. N., Walker, J. R., Watson, M. A., Heath, S. E., Shannon, W. D., Varghese, N., Nagarajan, R., Payton, J. E., Baty, J. D., Kulkarni, S., Klco, J. M., Tomasson, M. H., Westervelt, P., Walter, M. J., Graubert, T. A., DiPersio, J. F., Ding, L., Mardis, E. R. & Wilson, R. K. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell* **150**, 264-278, doi:10.1016/j.cell.2012.06.023 (2012).
- 72 Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P. V., Mar, B. G., Lindsley, R. C., Mermel, C. H., Burt, N., Chavez, A., Higgins, J. M., Moltchanov, V., Kuo, F. C., Kluk, M. J., Henderson, B., Kinnunen, L., Koistinen, H. A., Ladenvall, C., Getz, G., Correa, A., Banahan, B. F., Gabriel, S., Kathiresan, S., Stringham, H. M., McCarthy, M. I., Boehnke, M., Tuomilehto, J., Haiman, C.,

- Groop, L., Atzmon, G., Wilson, J. G., Neuberg, D., Altshuler, D. & Ebert, B. L. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *The New England journal of medicine* **371**, 2488-2498, doi:10.1056/NEJMoa1408617 (2014).
- 73 Genovese, G., Kahler, A. K., Handsaker, R. E., Lindberg, J., Rose, S. A., Bakhoum, S. F., Chambert, K., Mick, E., Neale, B. M., Fromer, M., Purcell, S. M., Svantesson, O., Landen, M., Hoglund, M., Lehmann, S., Gabriel, S. B., Moran, J. L., Lander, E. S., Sullivan, P. F., Sklar, P., Gronberg, H., Hultman, C. M. & McCarroll, S. A. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *The New England journal of medicine* **371**, 2477-2487, doi:10.1056/NEJMoa1409405 (2014).
- 74 Heuser, M., Schlarmann, C., Dobbernack, V., Panagiota, V., Wiehlmann, L., Walter, C., Beier, F., Ziegler, P., Yun, H., Kade, S., Kirchner, A., Huang, L., Koenecke, C., Eder, M., Brummendorf, T. H., Dugas, M., Ganser, A. & Thol, F. Genetic characterization of acquired aplastic anemia by targeted sequencing. *Haematologica* **99**, e165-167, doi:10.3324/haematol.2013.101642 (2014).
- 75 Shlush, L. I., Zandi, S., Mitchell, A., Chen, W. C., Brandwein, J. M., Gupta, V., Kennedy, J. A., Schimmer, A. D., Schuh, A. C., Yee, K. W., McLeod, J. L.,

- Doedens, M., Medeiros, J. J., Marke, R., Kim, H. J., Lee, K., McPherson, J. D., Hudson, T. J., Consortium, H. P.-L. G. P., Brown, A. M., Yousif, F., Trinh, Q. M., Stein, L. D., Minden, M. D., Wang, J. C. & Dick, J. E. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature* **506**, 328-333, doi:10.1038/nature13038 (2014).
- 76 Yasuda, T., Ueno, T., Fukumura, K., Yamato, A., Ando, M., Yamaguchi, H., Soda, M., Kawazu, M., Sai, E., Yamashita, Y., Murata, M., Kiyoi, H., Naoe, T. & Mano, H. Leukemic evolution of donor-derived cells harboring IDH2 and DNMT3A mutations after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* **28**, 426-428, doi:10.1038/leu.2013.278 (2014).
- 77 Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L.,



Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J.,

Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrino, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y. J. & International Human Genome Sequencing, C. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921,

doi:10.1038/35057062 (2001).

- 78 Zhao, Z. & Jiang, C. Methylation-dependent transition rates are dependent on local sequence lengths and genomic regions. *Molecular biology and evolution* **24**, 23-25, doi:10.1093/molbev/msl156 (2007).
- 79 Jacobs, K. B., Yeager, M., Zhou, W., Wacholder, S., Wang, Z., Rodriguez-Santiago, B., Hutchinson, A., Deng, X., Liu, C., Horner, M. J., Cullen, M., Epstein, C. G., Burdett, L., Dean, M. C., Chatterjee, N., Sampson, J., Chung, C. C., Kovaks, J., Gapstur, S. M., Stevens, V. L., Teras, L. T., Gaudet, M. M., Albanes, D., Weinstein, S. J., Virtamo, J., Taylor, P. R., Freedman, N. D., Abnet, C. C., Goldstein, A. M., Hu, N., Yu, K., Yuan, J. M., Liao, L., Ding, T., Qiao, Y. L., Gao, Y. T., Koh, W. P., Xiang, Y. B., Tang, Z. Z., Fan, J. H., Aldrich, M. C., Amos, C., Blot, W. J., Bock, C. H., Gillanders, E. M., Harris, C. C., Haiman, C. A., Henderson, B. E., Kolonel, L. N., Le Marchand, L., McNeill, L. H., Rybicki, B. A., Schwartz, A. G., Signorello, L. B., Spitz, M. R., Wiencke, J. K., Wrensch, M., Wu, X., Zanetti, K. A., Ziegler, R. G., Figueroa, J. D., Garcia-Closas, M., Malats, N., Marenne, G., Prokunina-Olsson, L., Baris, D., Schwenn, M., Johnson, A., Landi, M. T., Goldin, L., Consonni, D., Bertazzi, P. A., Rotunno, M., Rajaraman, P., Andersson, U., Beane Freeman, L. E., Berg, C. D., Buring, J. E., Butler, M. A.,

Carreon, T., Feychting, M., Ahlbom, A., Gaziano, J. M., Giles, G. G., Hallmans, G., Hankinson, S. E., Hartge, P., Henriksson, R., Inskip, P. D., Johansen, C., Landgren, A., McKean-Cowdin, R., Michaud, D. S., Melin, B. S., Peters, U., Ruder, A. M., Sesso, H. D., Severi, G., Shu, X. O., Visvanathan, K., White, E., Wolk, A., Zeleniuch-Jacquotte, A., Zheng, W., Silverman, D. T., Kogevinas, M., Gonzalez, J. R., Villa, O., Li, D., Duell, E. J., Risch, H. A., Olson, S. H., Kooperberg, C., Wolpin, B. M., Jiao, L., Hassan, M., Wheeler, W., Arslan, A. A., Bueno-de-Mesquita, H. B., Fuchs, C. S., Gallinger, S., Gross, M. D., Holly, E. A., Klein, A. P., LaCroix, A., Mandelson, M. T., Petersen, G., Boutron-Ruault, M. C., Bracci, P. M., Canzian, F., Chang, K., Cotterchio, M., Giovannucci, E. L., Goggins, M., Hoffman Bolton, J. A., Jenab, M., Khaw, K. T., Krogh, V., Kurtz, R. C., McWilliams, R. R., Mendelsohn, J. B., Rabe, K. G., Riboli, E., Tjonneland, A., Tobias, G. S., Trichopoulos, D., Elena, J. W., Yu, H., Amundadottir, L., Stolzenberg-Solomon, R. Z., Kraft, P., Schumacher, F., Stram, D., Savage, S. A., Mirabello, L., Andrulis, I. L., Wunder, J. S., Patino Garcia, A., Sierrasesumaga, L., Barkauskas, D. A., Gorlick, R. G., Purdue, M., Chow, W. H., Moore, L. E., Schwartz, K. L., Davis, F. G., Hsing, A. W., Berndt, S. I., Black, A., Wentzensen, N., Brinton, L. A., Lissowska, J., Peplonska, B., McGlynn, K. A., Cook, M. B.,

Graubard, B. I., Kratz, C. P., Greene, M. H., Erickson, R. L., Hunter, D. J., Thomas, G., Hoover, R. N., Real, F. X., Fraumeni, J. F., Jr., Caporaso, N. E., Tucker, M., Rothman, N., Perez-Jurado, L. A. & Chanock, S. J. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nature genetics* **44**, 651-658, doi:10.1038/ng.2270 (2012).

80 Laurie, C. C., Laurie, C. A., Rice, K., Doheny, K. F., Zelnick, L. R., McHugh, C. P., Ling, H., Hetrick, K. N., Pugh, E. W., Amos, C., Wei, Q., Wang, L. E., Lee, J. E., Barnes, K. C., Hansel, N. N., Mathias, R., Daley, D., Beaty, T. H., Scott, A. F., Ruczinski, I., Scharpf, R. B., Bierut, L. J., Hartz, S. M., Landi, M. T., Freedman, N. D., Goldin, L. R., Ginsburg, D., Li, J., Desch, K. C., Strom, S. S., Blot, W. J., Signorello, L. B., Ingles, S. A., Chanock, S. J., Berndt, S. I., Le Marchand, L., Henderson, B. E., Monroe, K. R., Heit, J. A., de Andrade, M., Armasu, S. M., Regnier, C., Lowe, W. L., Hayes, M. G., Marazita, M. L., Feingold, E., Murray, J. C., Melbye, M., Feenstra, B., Kang, J. H., Wiggs, J. L., Jarvik, G. P., McDavid, A. N., Seshan, V. E., Mirel, D. B., Crenshaw, A., Sharopova, N., Wise, A., Shen, J., Crosslin, D. R., Levine, D. M., Zheng, X., Udren, J. I., Bennett, S., Nelson, S. C., Gogarten, S. M., Conomos, M. P., Heagerty, P., Manolio, T., Pasquale, L. R., Haiman, C. A., Caporaso, N. & Weir, B. S. Detectable clonal mosaicism from

- birth to old age and its relationship to cancer. *Nature genetics* **44**, 642-650, doi:10.1038/ng.2271 (2012).
- 81 Xie, M., Lu, C., Wang, J., McLellan, M. D., Johnson, K. J., Wendl, M. C., McMichael, J. F., Schmidt, H. K., Yellapantula, V., Miller, C. A., Ozenberger, B. A., Welch, J. S., Link, D. C., Walter, M. J., Mardis, E. R., Dipersio, J. F., Chen, F., Wilson, R. K., Ley, T. J. & Ding, L. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* **20**, 1472-1478, doi:10.1038/nm.3733 (2014).
- 82 Busque, L., Patel, J. P., Figueroa, M. E., Vasanthakumar, A., Provost, S., Hamilou, Z., Mollica, L., Li, J., Viale, A., Heguy, A., Hassimi, M., Socci, N., Bhatt, P. K., Gonen, M., Mason, C. E., Melnick, A., Godley, L. A., Brennan, C. W., Abdel-Wahab, O. & Levine, R. L. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nature genetics* **44**, 1179-1181, doi:10.1038/ng.2413 (2012).
- 83 Dumitriu, B., Feng, X., Townsley, D. M., Ueda, Y., Yoshizato, T., Calado, R. T., Yang, Y., Wakabayashi, Y., Kajigaya, S., Ogawa, S., Zhu, J. & Young, N. S. Telomere attrition and candidate gene mutations preceding monosomy 7 in aplastic anemia. *Blood* **125**, 706-709, doi:10.1182/blood-2014-10-607572 (2015).

- 84 Challen, G. A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J. S., Bock, C., Vasanthakumar, A., Gu, H., Xi, Y., Liang, S., Lu, Y., Darlington, G. J., Meissner, A., Issa, J. P., Godley, L. A., Li, W. & Goodell, M. A. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nature genetics* **44**, 23-31, doi:10.1038/ng.1009 (2012).
- 85 Abdel-Wahab, O., Gao, J., Adli, M., Dey, A., Trimarchi, T., Chung, Y. R., Kuscu, C., Hricik, T., Ndiaye-Lobry, D., Lafave, L. M., Koche, R., Shih, A. H., Guryanova, O. A., Kim, E., Li, S., Pandey, S., Shin, J. Y., Telis, L., Liu, J., Bhatt, P. K., Monette, S., Zhao, X., Mason, C. E., Park, C. Y., Bernstein, B. E., Aifantis, I. & Levine, R. L. Deletion of *Asx11* results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med* **210**, 2641-2659, doi:10.1084/jem.20131141 (2013).
- 86 Takami, A., Zeng, W., Wang, H., Matsuda, T. & Nakao, S. Cytotoxicity against lymphoblastoid cells mediated by a T-cell clone from an aplastic anaemia patient: role of CD59 on target cells. *Br J Haematol* **107**, 791-796 (1999).
- 87 Murakami, Y., Kosaka, H., Maeda, Y., Nishimura, J., Inoue, N., Ohishi, K., Okabe, M., Takeda, J. & Kinoshita, T. Inefficient response of T lymphocytes to glycosylphosphatidylinositol anchor-negative cells: implications for paroxysmal

- nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **100**, 4116-4122, doi:10.1182/blood-2002-06-1669 (2002).
- 88 Nagakura, S., Ishihara, S., Dunn, D. E., Nishimura, J., Kawaguchi, T., Horikawa, K., Hidaka, M., Kagimoto, T., Eto, N., Mitsuya, H., Kinoshita, T., Young, N. S. & Nakakuma, H. Decreased susceptibility of leukemic cells with PIG-A mutation to natural killer cells in vitro. *Blood* **100**, 1031-1037 (2002).
- 89 Gargiulo, L., Papaioannou, M., Sica, M., Talini, G., Chaidos, A., Richichi, B., Nikolaev, A. V., Nativi, C., Layton, M., de la Fuente, J., Roberts, I., Luzzatto, L., Notaro, R. & Karadimitris, A. Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* **121**, 2753-2761, doi:10.1182/blood-2012-11-469353 (2013).
- 90 Raaijmakers, M. H., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J. A., Ebert, B. L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R. P., Scadden, E. O., Aung, Z., Matza, M., Merkschlager, M., Lin, C., Rommens, J. M. & Scadden, D. T. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* **464**, 852-857, doi:10.1038/nature08851 (2010).
- 91 Kode, A., Manavalan, J. S., Mosialou, I., Bhagat, G., Rathinam, C. V., Luo, N., Khiabani, H., Lee, A., Murty, V. V., Friedman, R., Brum, A., Park, D., Galili,



N., Mukherjee, S., Teruya-Feldstein, J., Raza, A., Rabadan, R., Berman, E. & Kousteni, S. Leukaemogenesis induced by an activating beta-catenin mutation in osteoblasts. *Nature* **506**, 240-244, doi:10.1038/nature12883 (2014).

- 92 Medyouf, H., Mossner, M., Jann, J. C., Nolte, F., Raffel, S., Herrmann, C., Lier, A., Eisen, C., Nowak, V., Zens, B., Mudder, K., Klein, C., Oblander, J., Fey, S., Vogler, J., Fabarius, A., Riedl, E., Roehl, H., Kohlmann, A., Staller, M., Haferlach, C., Muller, N., John, T., Platzbecker, U., Metzgeroth, G., Hofmann, W. K., Trumpp, A. & Nowak, D. Myelodysplastic cells in patients reprogram mesenchymal stromal cells to establish a transplantable stem cell niche disease unit. *Cell stem cell* **14**, 824-837, doi:10.1016/j.stem.2014.02.014 (2014).

図 1.

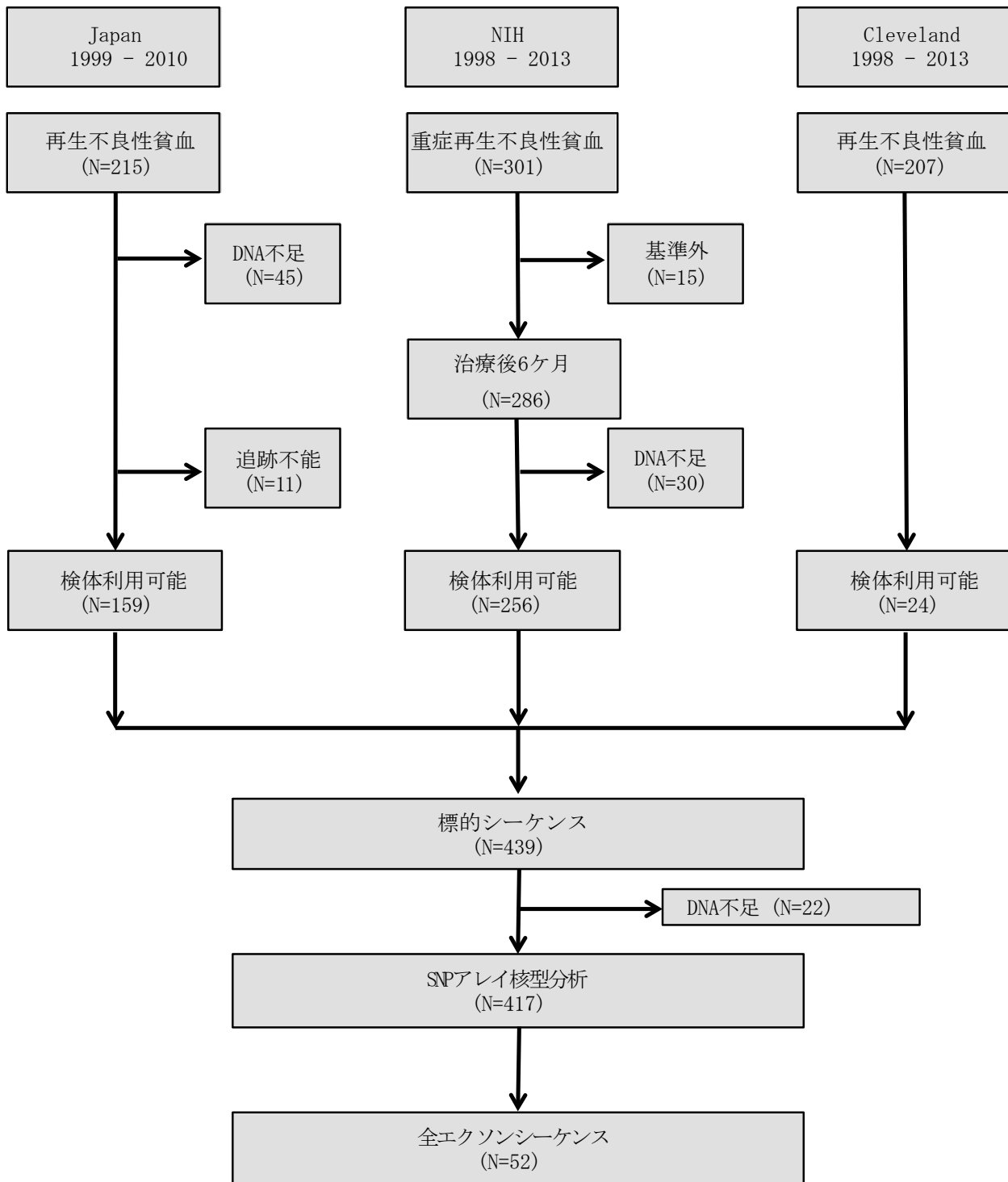


図1. 3コホートのCONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials: 臨床試験報告に関する統合基準) フローチャート

各コホートにおける登録症例を上部に、解析法を下部に記載した。検体利用可能症例はすべて標的シーケンスを実施した。標的シーケンスを実施したのうち十分なDNA量の得られた検体はすべてSNPアレイ核型分析を実施した。一部症例に関しては継時的検体の得られた症例に対して全エクソンシーケンスを実施した。

図2.

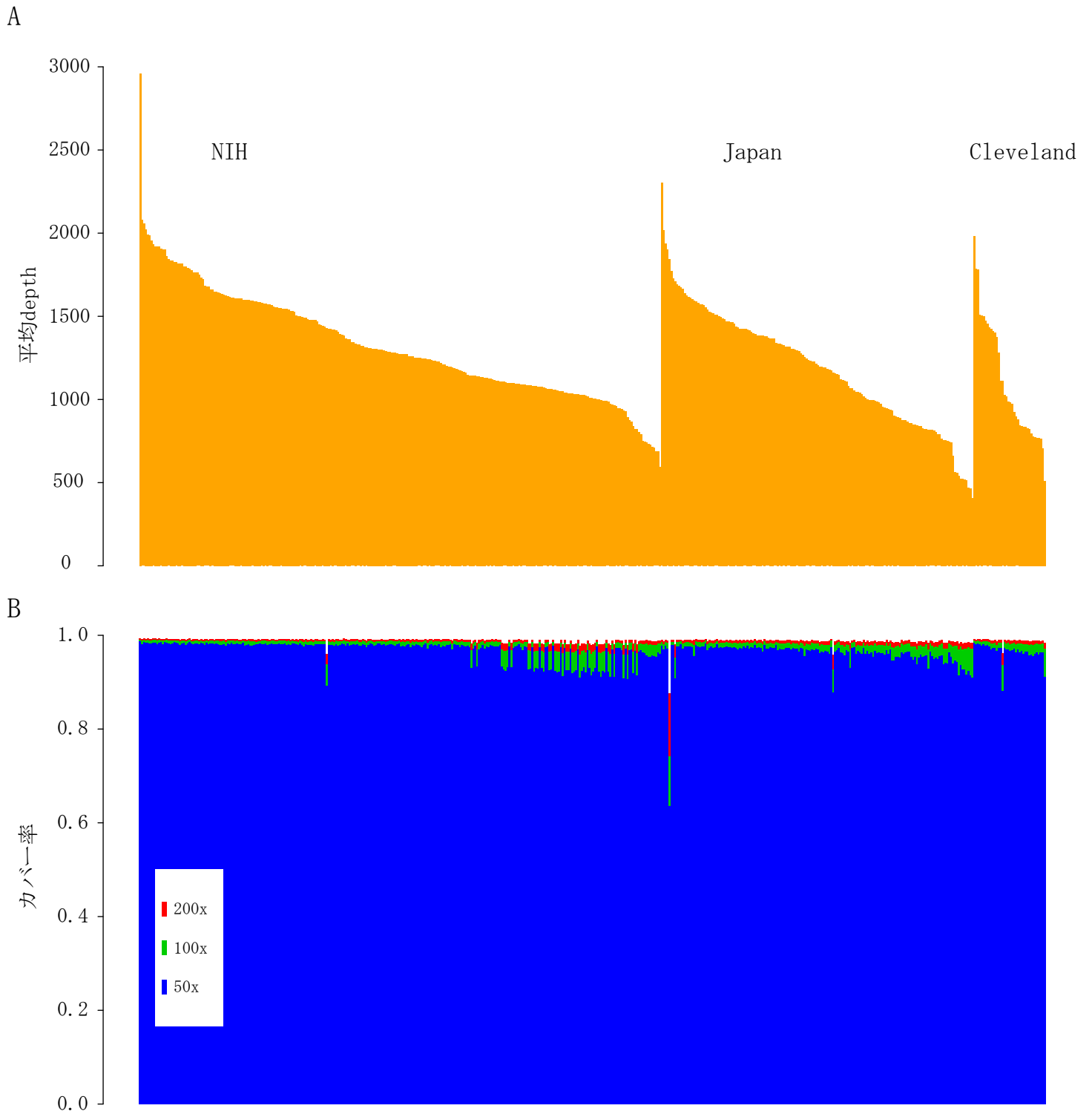


図2. 標的シーケンスの性能評価

各コホートにおける各症例の平均depth (A)とカバー率 (B)。各カラムが各検体を表している。

図 3.

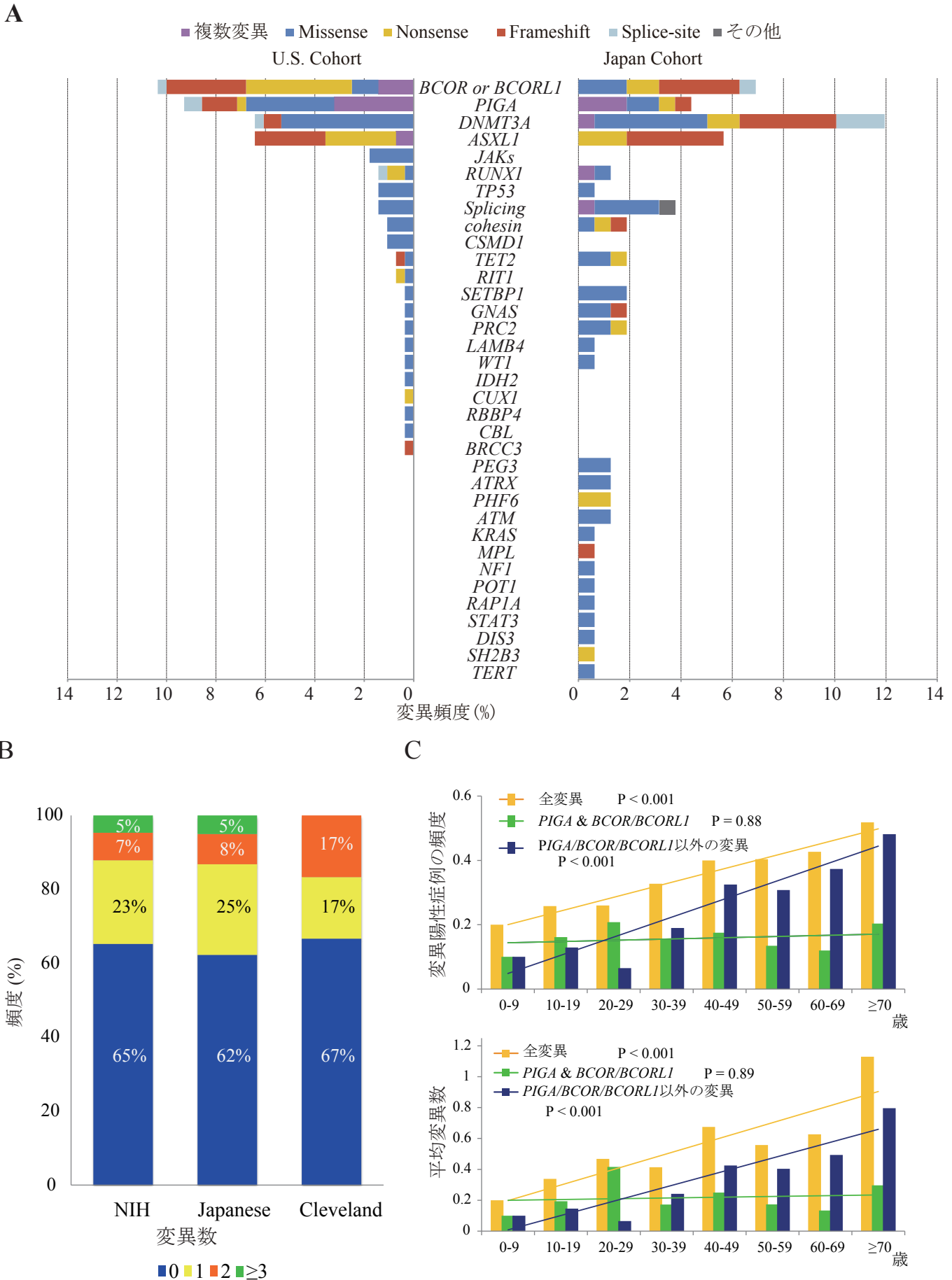


図3. 標的シーケンスにおける変異頻度

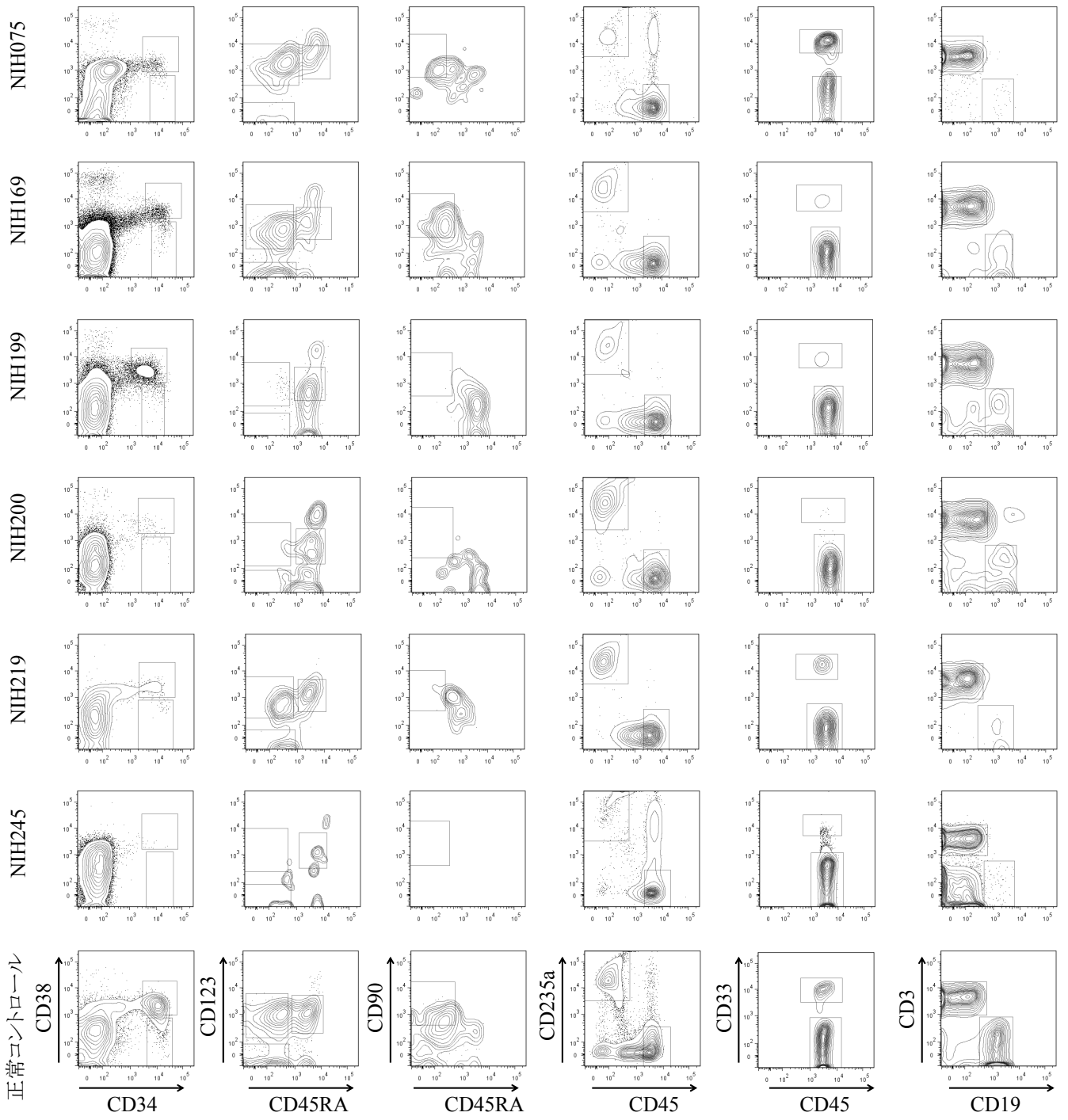
(A) U. S. コホート (NIHコホートとClevelandコホート) とJapanコホートにおいて標的シーケンスで同定された変異の遺伝子別の頻度とそのタイプ。

(B) 各コホートにおける変異数別の変異陽性症例の頻度。

(C) 全コホートにおける各年齢層における各遺伝子群の変異頻度と平均変異数。直線は回帰直線を表している。

図 4.

A



B

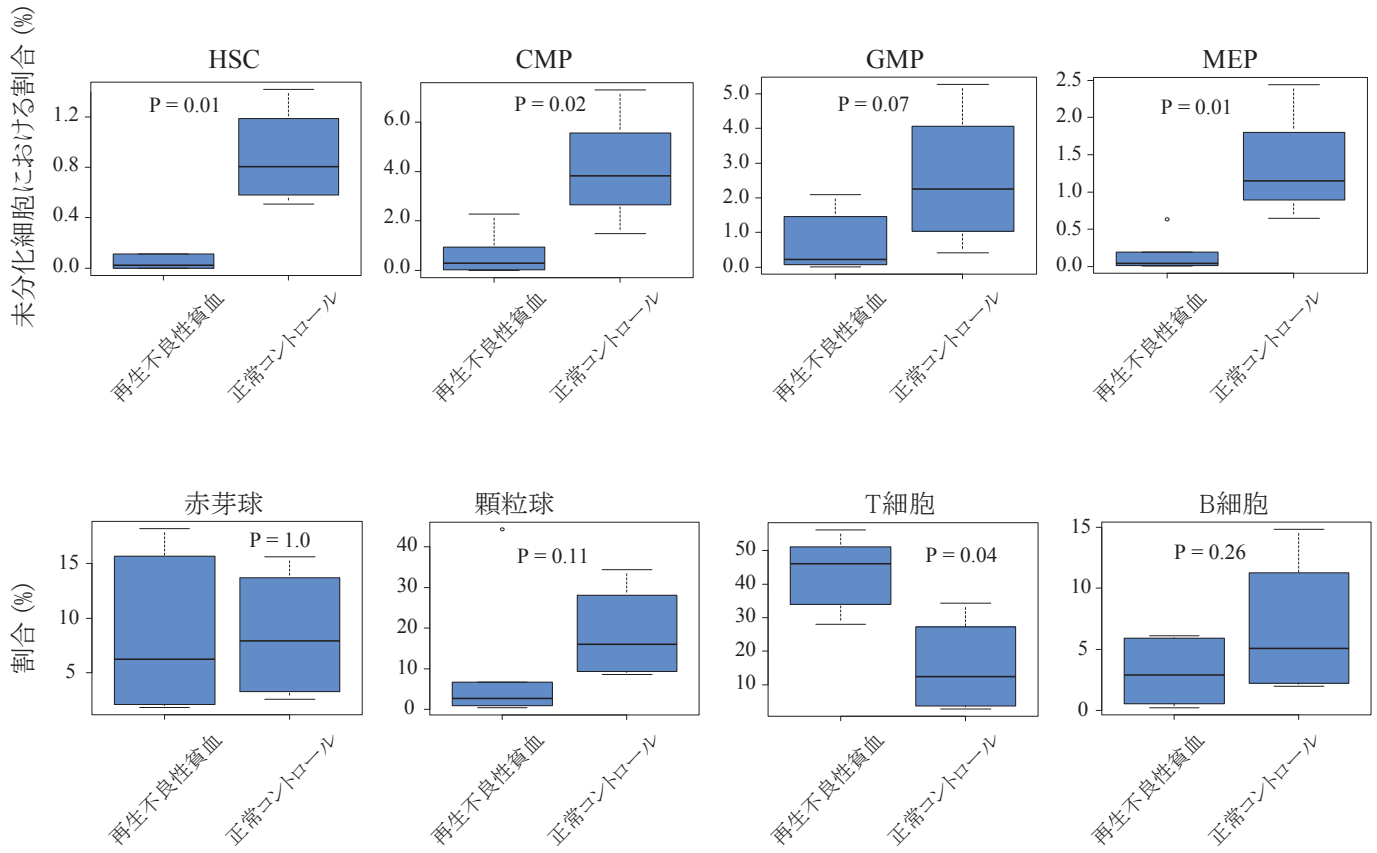


図4. 蛍光活性化セルソーティングによる造血幹細胞・前駆細胞プロファイル

(A) NIHコホート6症例と正常コントロール1症例の骨髓造血幹細胞・前駆細胞のフローサイトメトリーの結果。各ボックスはソートした分画を表している。蛍光強度は対数スケールで表記している。(B). NIHコホート6症例と正常コントロール4症例の各細胞分画割合(上段:幹細胞・前駆細胞、下段:分化細胞)。P値はMann-Whitney U検定にて計算した。HSC: hematopoietic stem cells (造血幹細胞)、CMP: common myeloid progenitor cells (骨髓球性共通前駆細胞)、GMP: granulocyte macrophage progenitor cells (顆粒球・マクロファージ前駆細胞)、MEP: megakaryocyte erythroid progenitor cells (巨核球赤芽球前駆細胞)。

図 5.

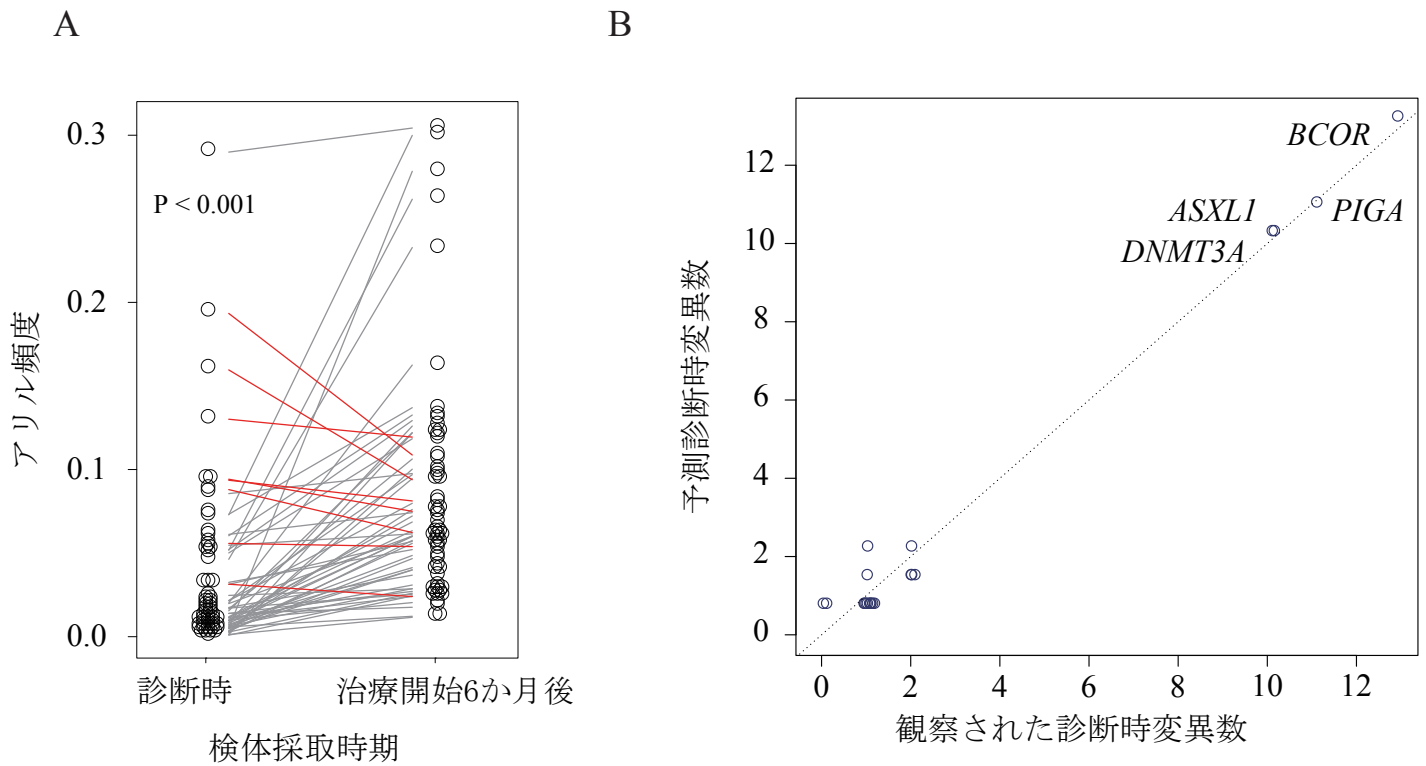


図5. 標的シーケンスで同定された変異の診断時との比較

(A) NIHコホートの治療開始後6か月の検体で同定された変異(N = 256)のうち診断時検体の得られた変異(N = 89)のアレル頻度を診断時のアレル頻度と比較した。

(B) NIHコホートの治療開始後6か月の検体で同定された変異(N = 256)のうち診断時検体の得られた変異(N = 89)の、診断時検体での各遺伝子別の変異陽性数(X軸、計58変異)と変異が各遺伝子均等に診断時に陽性と仮定した場合の各遺伝子別の予測診断時変異数(Y軸)。

図6.

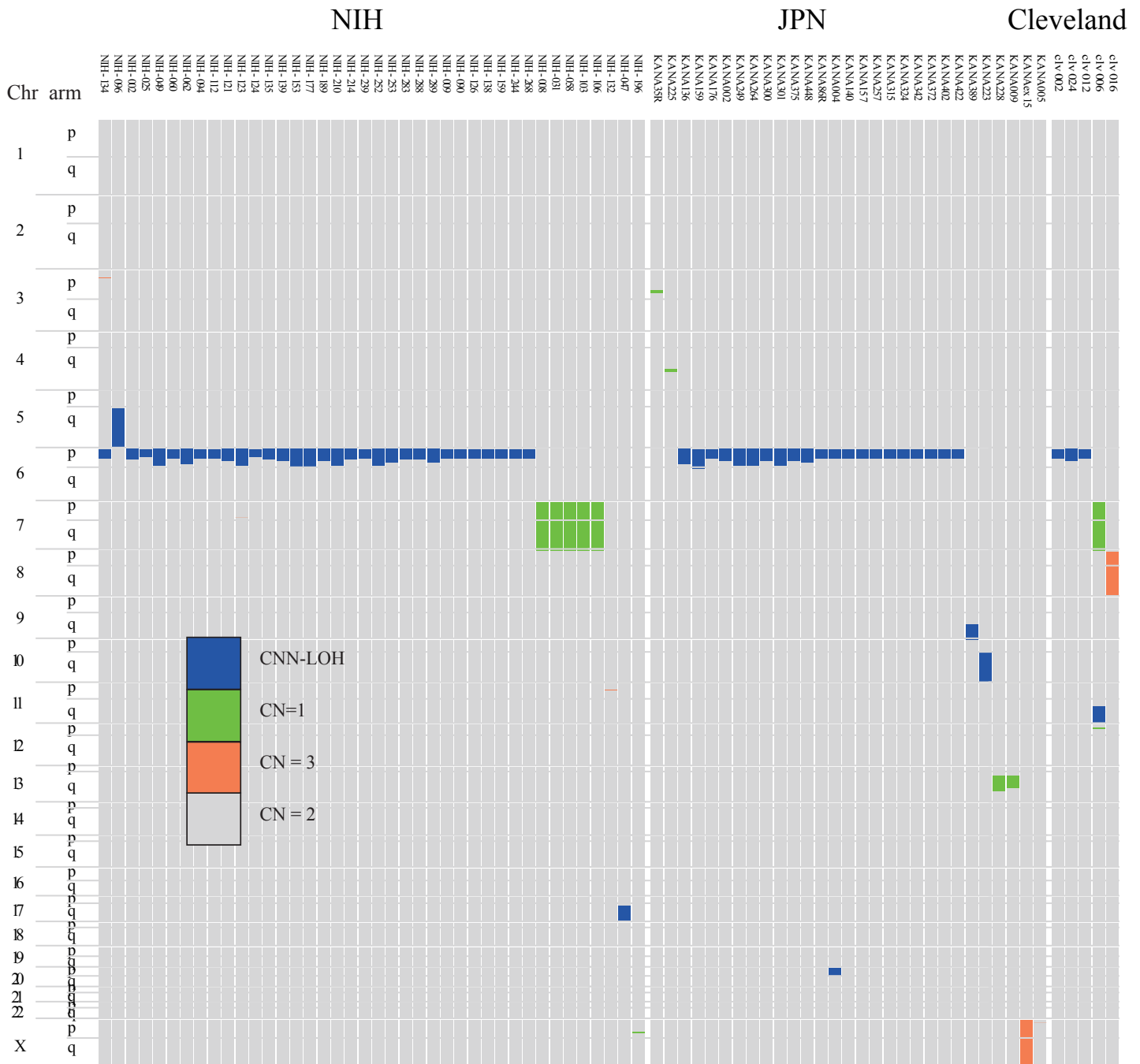


図6. SNPアレイによるコピー数変化とアレル不均衡  
 SNPアレイ核型分析により同定されたコピー数変化とアレル不均衡またはUPDを各症例ごとにプロットした。染色体は上から順に染色体番号順に並べている。CN: Copy number (コピー数)、CNN-LOH: コピー数正常LOH (UPD)。



図 7.

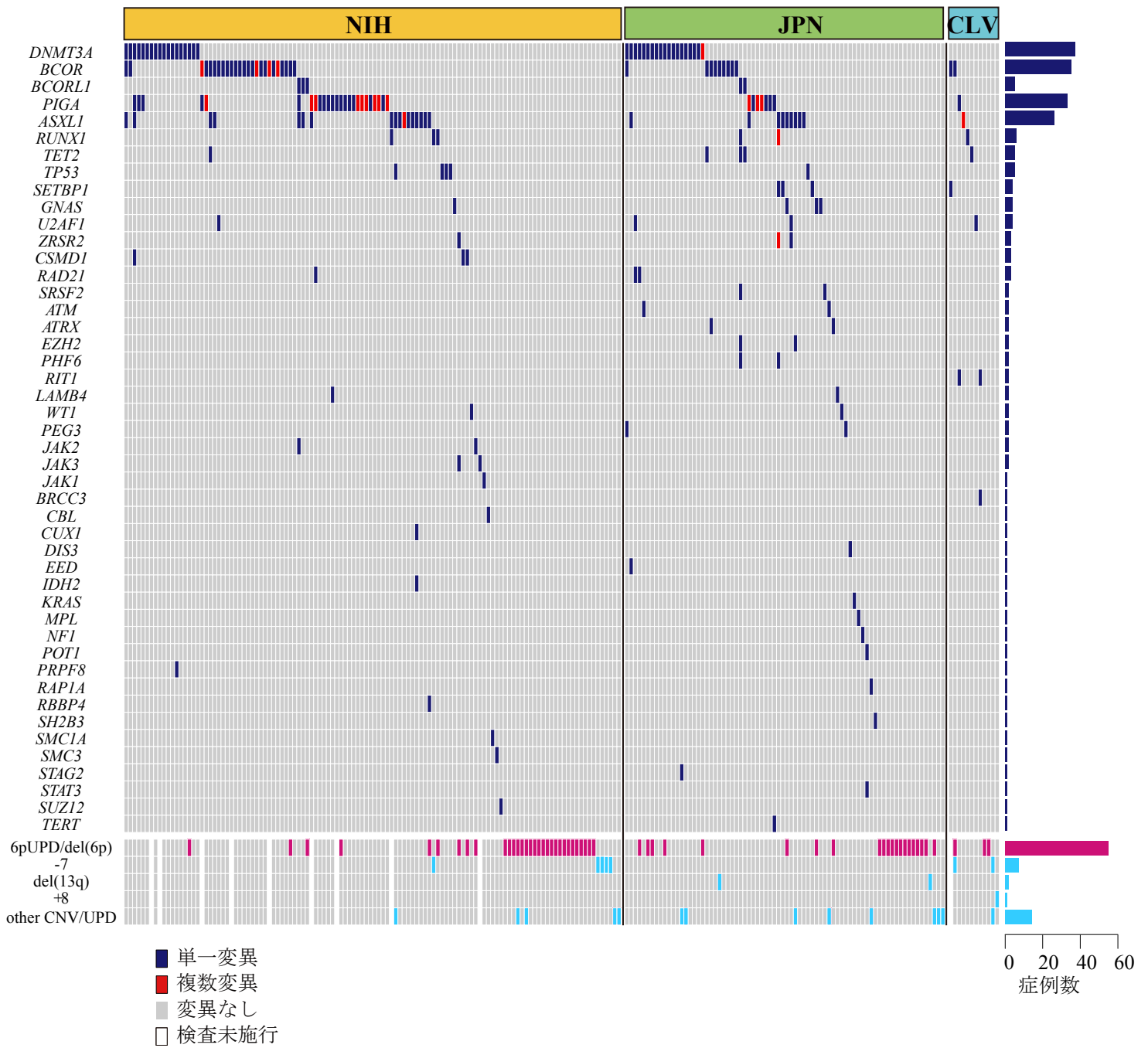


図7. 再生不良性貧血における変異パターンと染色体異常

各コホートにおける標的シーケンスで同定された遺伝子変異(上部)とコピー数異常・6pUPD(下部)。各列は症例を表している。青いバーは単一変異、赤いバーは同一症例内の複数変異を表している。右方の棒グラフは各変異・染色体異常の陽性症例数を表している。NIH: NIHコホート、JPN: Japanコホート、CLV: Clevelandコホート

図8.

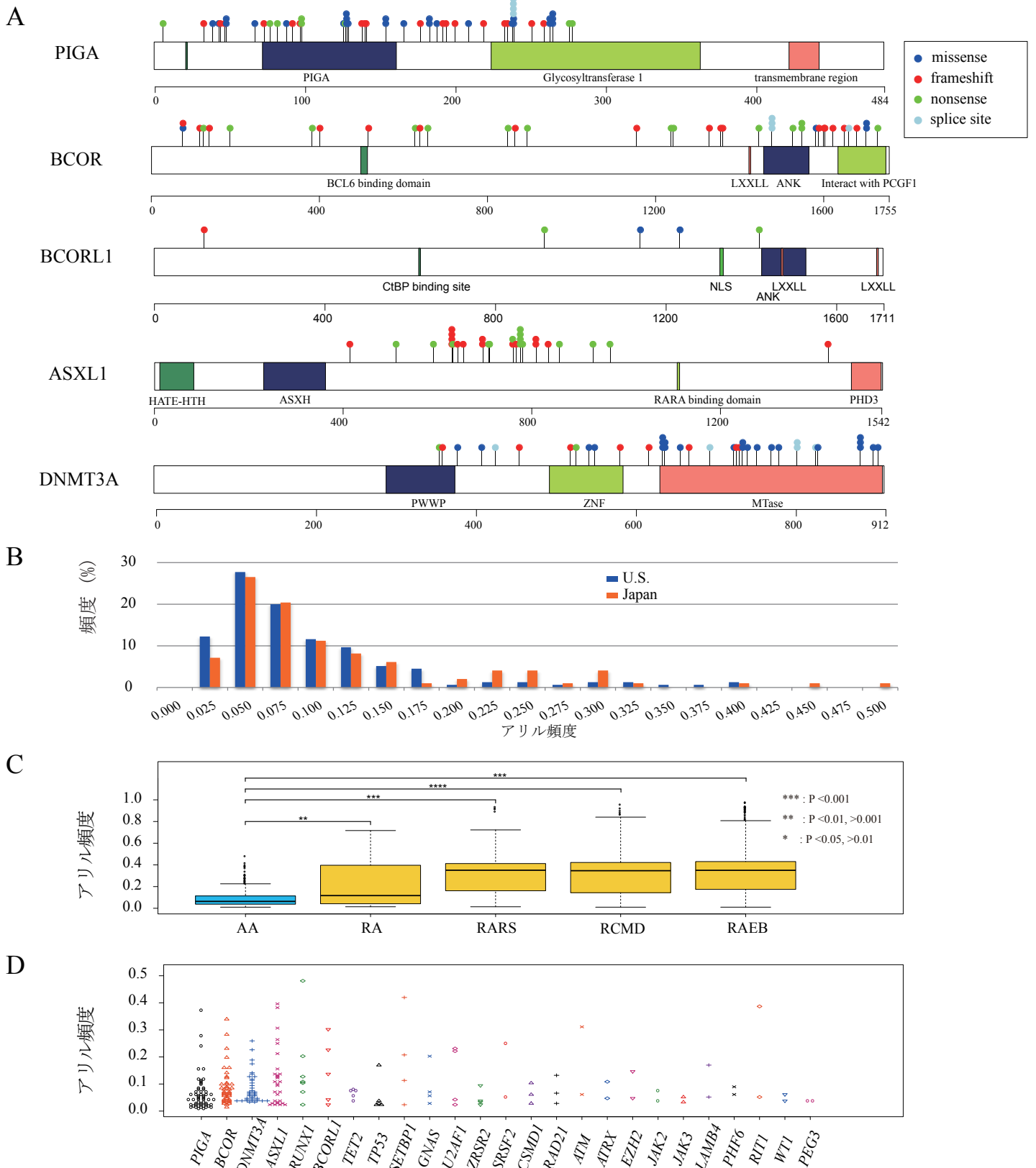


図8. 標的シーケンスにより同定された変異スペクトラム

(A) 再生不良性貧血症例で同定された5主要遺伝子の変異をアミノ酸のポジション上に記載したPIGA (Protein accession number: NP\_002632)、BCOR (NP\_001116857)、BCORL1 (NP\_068765)、ASXL1 (NP\_056153)、DNMT3A (NP\_783328)。各アミノ酸上の色の付いたボックスは機能的な部位を示している。(B) 全変異のアレル頻度をU. S. コホート (NIHコホートとClevelandコホート) とJapanコホートに群分けして、棒グラフで表示した。(C) 再生不良性貧血と骨髄異形成症候群のアレル頻度の比較。再生不良性貧血 (AA) のアレル頻度を骨髄異形成症候群の応答性貧血 (refractory anemia, RA)、環状鉄芽球を伴う応答性貧血 (RARS)、多血球系異形成を伴う応答性血球減少症 (refractory anemia with ringed sideroblasts, RCMD)、芽球増加を伴う応答性貧血1と2 (refractory anemia with excess of blasts-1 and 2, RAEB) と比較した。箱ひげ図の箱の上下端は第一四分位点・第三四分位点、中央の線は中央値、上下のびげはそれぞれ上下端からの距離が箱の大きさの1.5倍以内の大・最小値を、丸は外れ値を表している。P値はWilcoxon順位和検定の結果の多重検定をBenjamini-Hochberg法で補正した。(D) 2つ以上の変異を認めた遺伝子のアレル頻度をドットプロットした。

図9.

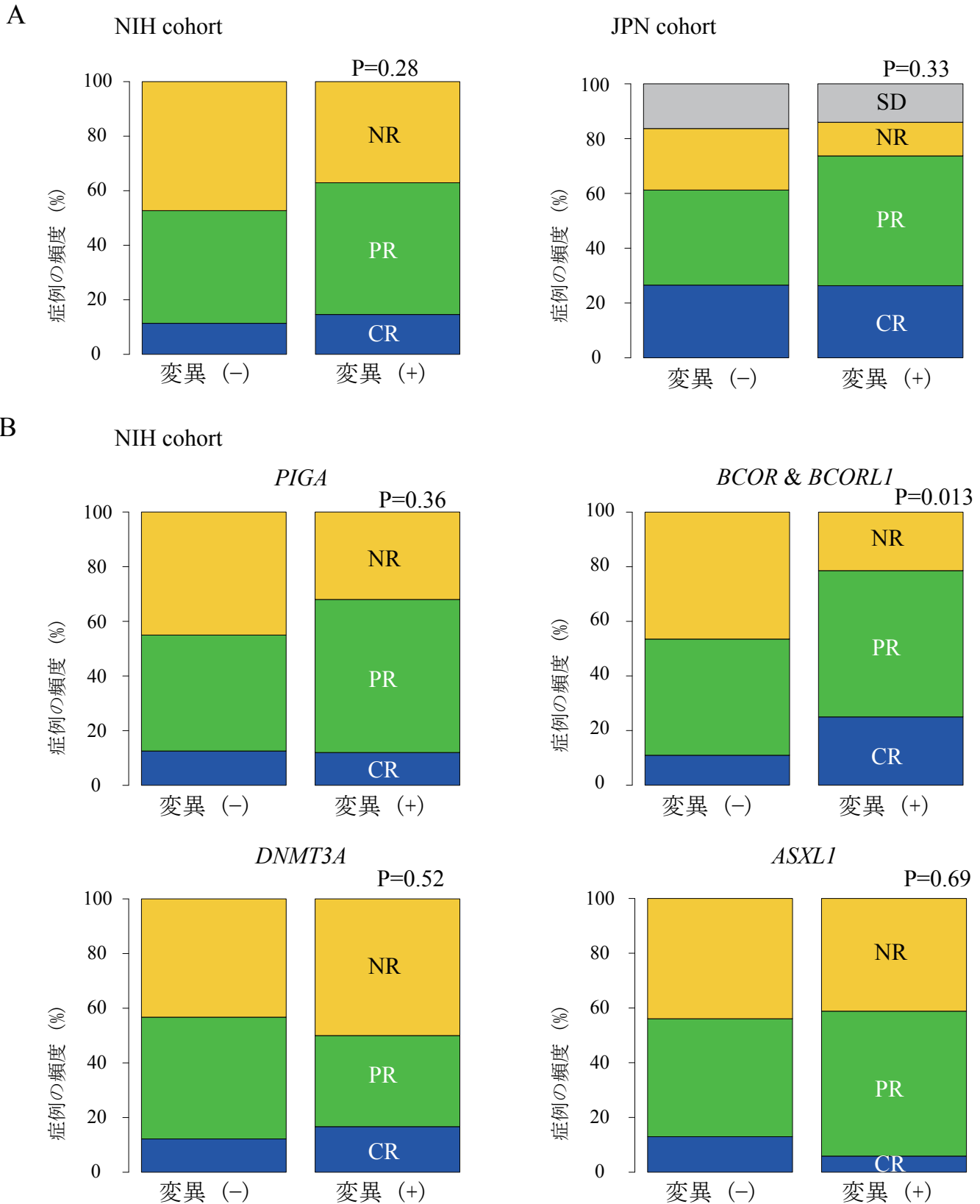
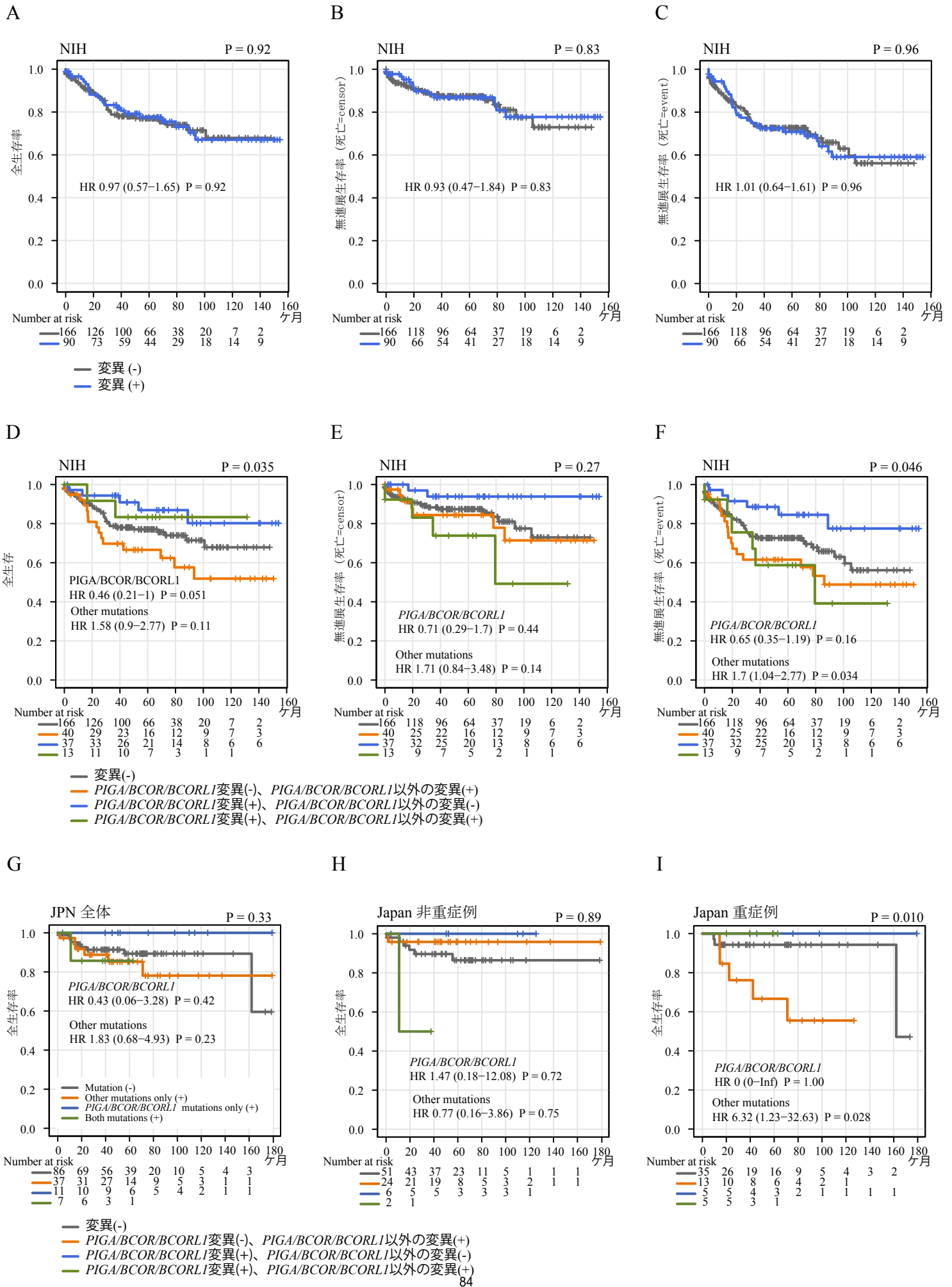


図9. 変異と免疫抑制療法に対する反応性

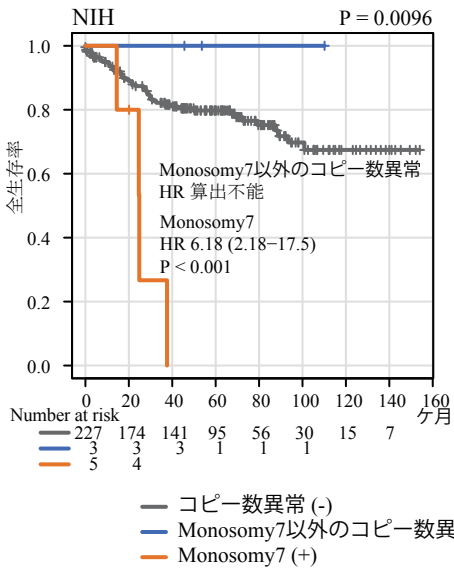
(A) NIHコホート(左)とJapanコホート(右)における標的シーケンスで同定された全変異の有無と初回免疫抑制療法に対する反応性。(B) NIHコホートにおける各遺伝子変異別の変異の有無と免疫抑制療法に対する反応性。CR: Complete response、完全完解、PR: Partial response、部分寛解、NR: No response、非奏功、SD: Stable disease 変化なし(非重症例における無治療)。

P 値は Fisher's 正確検定にて計算した(多重検定の補正はしていない)。

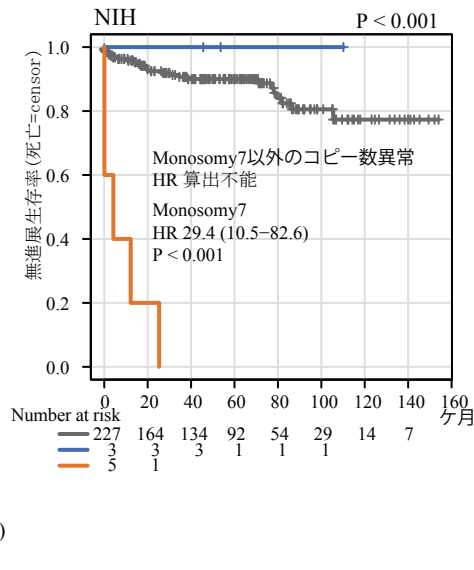
図10.



J



K



L

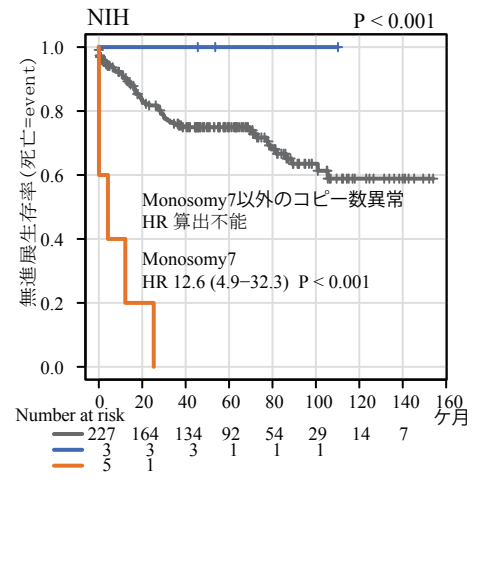


図10. 変異・コピー数異常の予後への影響

NIHコホートにおける標的シーケンスで同定された全変異の全生存への影響(A)、無進展生存への影響(B: 死亡をcensorとして解析、C: 死亡をeventとして解析)をKaplan-Meier曲線で表示している。(D-F) A-Cと同様の解析を*PIGA*・*BCOR*・*BCORL1*変異とその他の変異に分けて施行した。同様の群分けの影響をJapanコホートに対して評価した(G: Japanコホート全体、H: 非重症例、I: 重症例)。NIHコホートにおけるコピー数異常の全生存への影響(A)、無進展生存への影響(B: 死亡をcensorとして解析、C: 死亡をeventとして解析)を評価した。各図右上のP値はLog-rank検定の結果を表している。図内のハザード比(HR(95%信頼区間))とそのP値は変異またはコピー数異常陰性群に対して計算した。

図11.

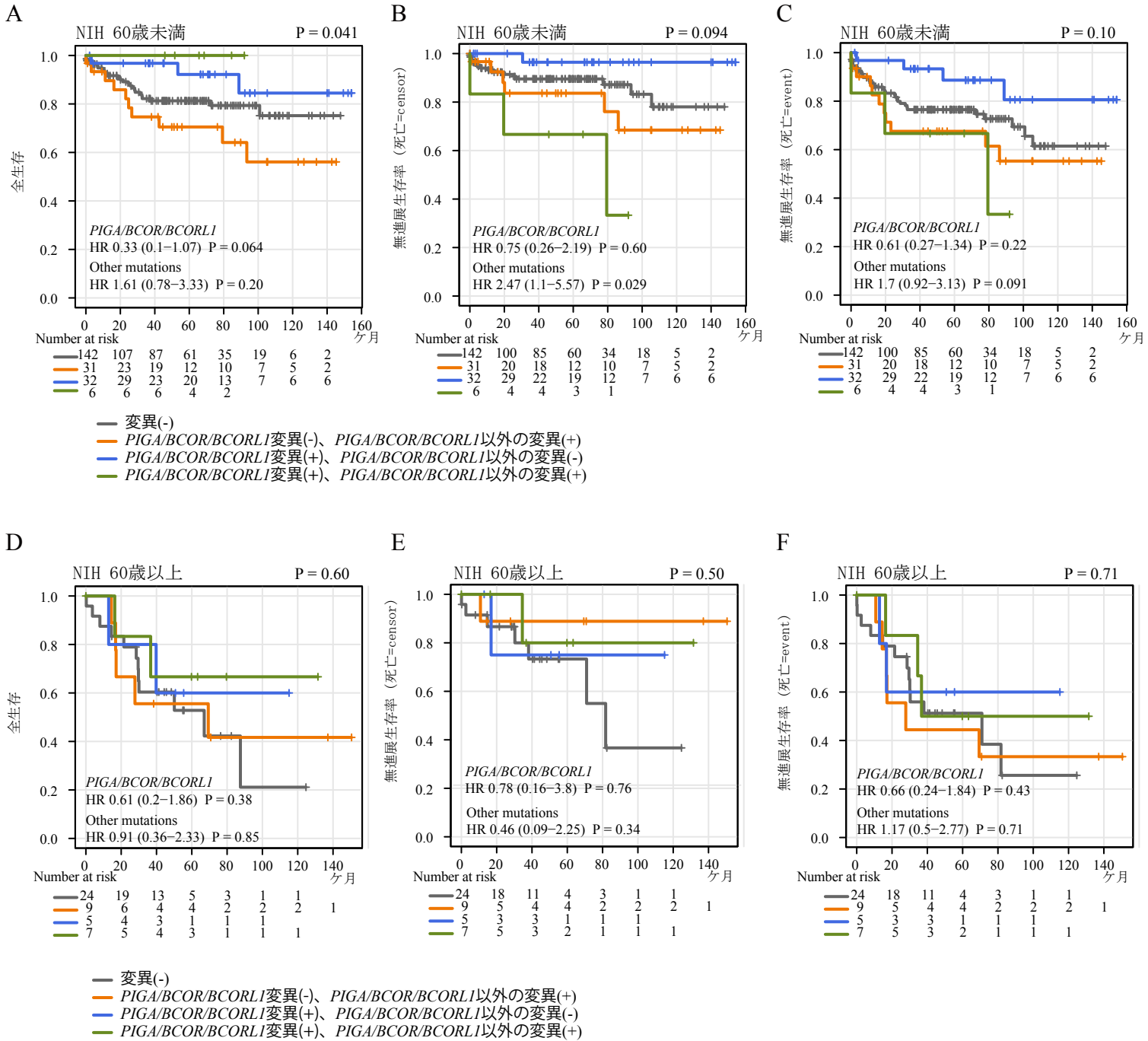


図11. 各年齢層における変異の予後への影響

NIHコホート若年者層(60歳未満)における標的シーケンスで同定された全変異の全生存への影響(A)、無進展生存への影響(B: 死亡をcensorとして解析、C: 死亡をeventとして解析)を評価した。(D-F) A-Cと同様の解析をNIHコホート高年齢者(60歳以上)層に対し施行した。各図右上のP値はLog-rank検定の結果を表している。図内のハザード比(HR(95%信頼区間))とそのP値は変異またはコピー数異常陰性群に対して計算した。

図12.

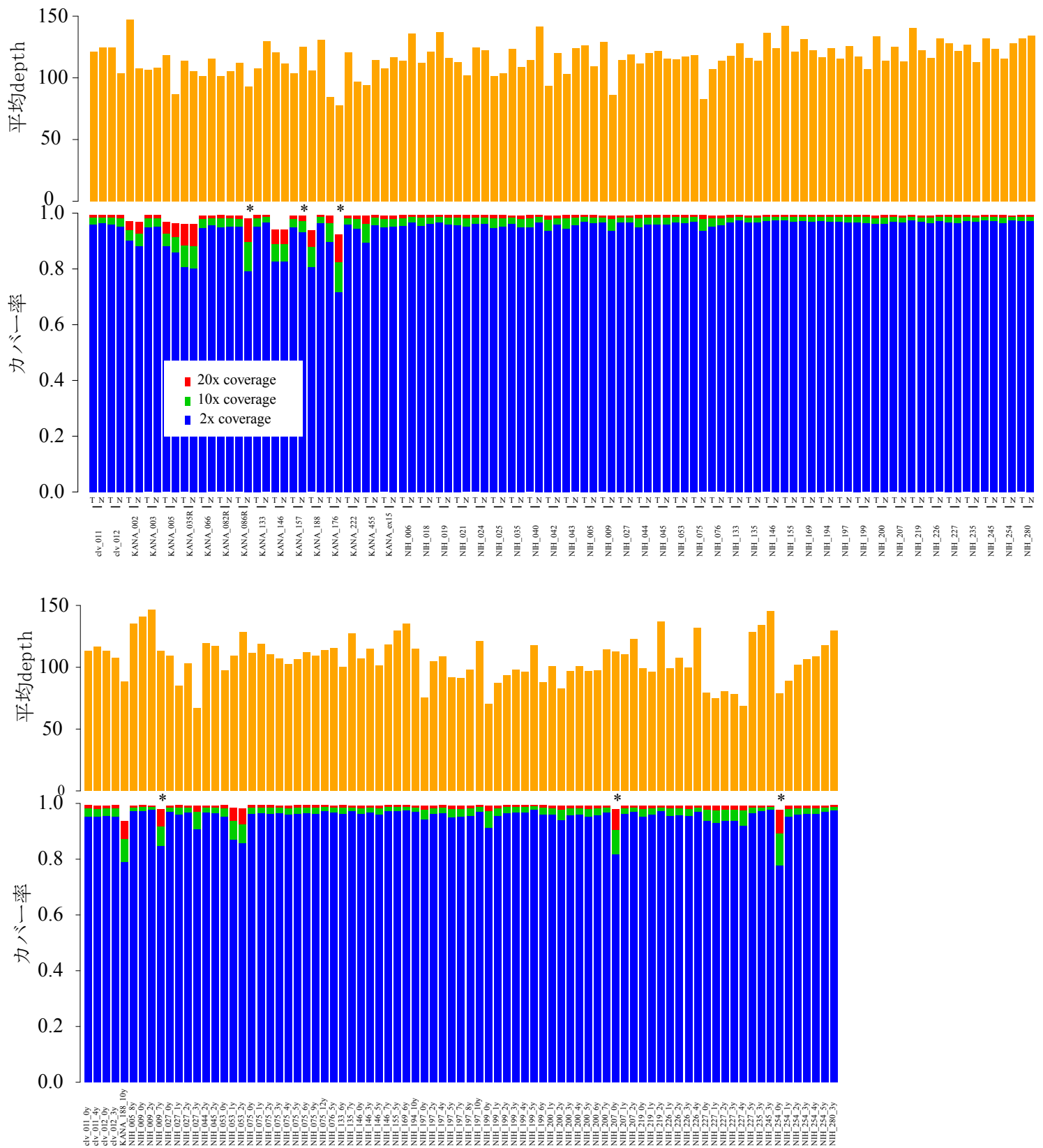


図12. 全エクソンシーケンスの性能評価

(A) 各症例を代表する検体における全エクソンシーケンスの平均depth(上段)とカバー率(下段)。各症例に対し、2列ずつ表示をしており、T:顆粒球または全血DNA検体、N:正常ペアDNA検体を表している。(B) 継時的検体における全エクソンシーケンスの平均depth(上段)とカバー率(下段)。\* はRepliGにより全ゲノム増幅した検体を表している。

図13.

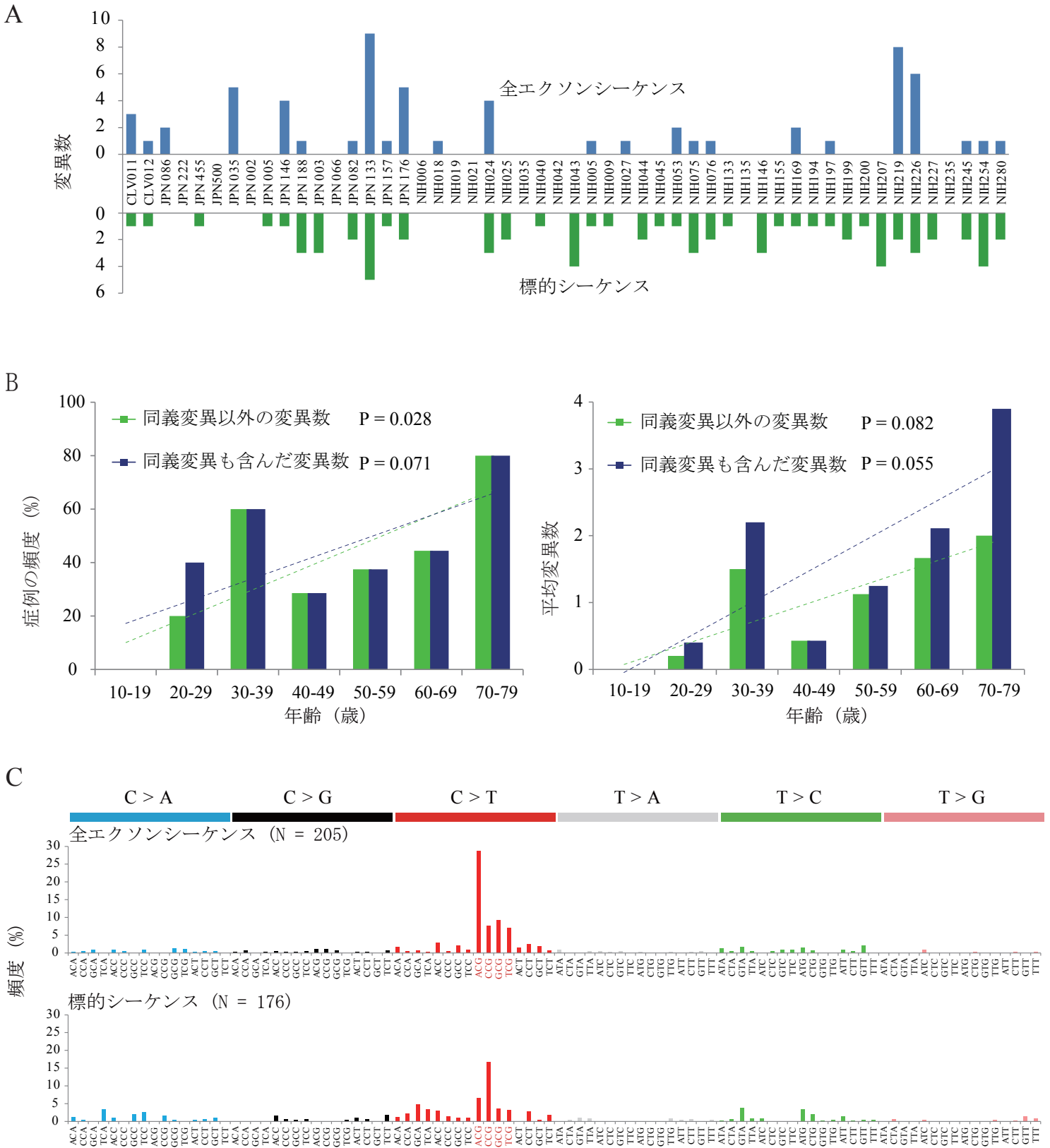


図13. 全エクソンシーケンスによって明らかになったクローン構造

(A) 各症例の標的シーケンスと全エクソンシーケンスによる変異数の比較。同義変異は標的シーケンスでは評価していないため除外した。(B) 各年齢層における全エクソンシーケンスにより同定された変異陽性症例の頻度(左図)と平均変異数(右図)。同義変異を含めた場合と含めない場合の2通りで解析した。直線は回帰直線を表している。P値は、変異陽性症例の頻度に関してはCochran-Armitage傾向検定、変異数はJonckheere-Terpstra検定により算出した。(C) 全エクソンシーケンス(上段)と標的シーケンス(下段)により同定された一塩基置換変異を当該部位の変異パターンとその一塩基3'側、5'側の配列の3ヌクレオチドのパターンにより96種類に分類し、その頻度を図示化した。頻度は各シーケンス法の標的領域における3ヌクレオチドパターンの出現頻度で補正した。



図14.

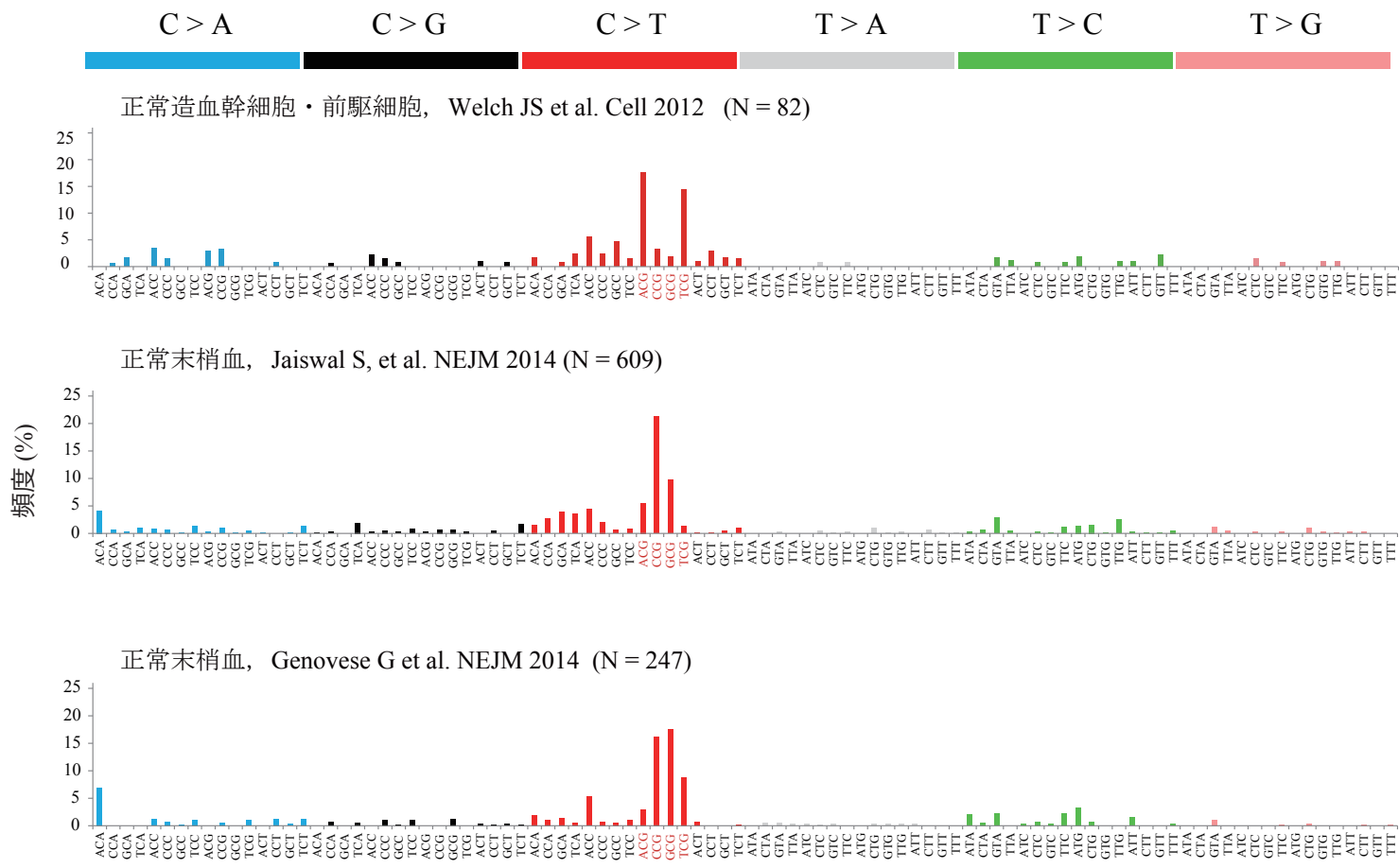


図14. 健常人における体細胞変異パターン  
 健常人または造血器疾患のない症例で報告されている造血幹細胞・前駆細胞(上段)、末梢血(中段・下段)における一塩基置換変異を当該部位の変異パターンとその一塩基3'側、5'側の配列の3ヌクレオチドのパターンにより96種類に分類し、その頻度を図示化した。頻度は各シーケンス法における3ヌクレオチドパターンの出現頻度で補正した。

図15.

● 白血球数 ● ヘモグロビン濃度 ● 血小板数 ○ 網状赤血球数

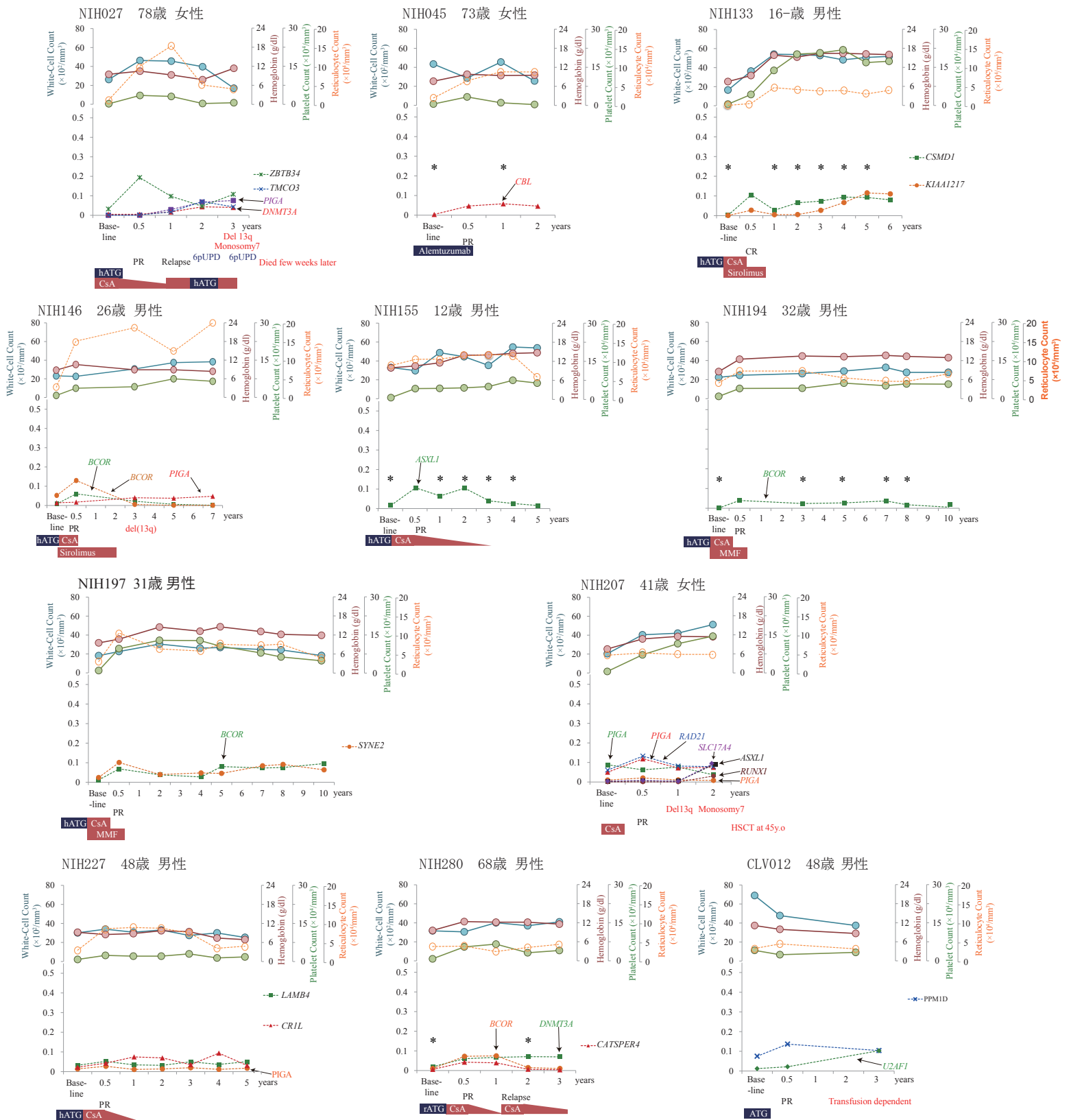


図15. 全エクソンシーケンス症例の継時的解析 クローンサイズが経過中安定していた症例  
各症例の血算(上段)、全エクソンシーケンス・標的シーケンスで同定された変異のアリル頻度(中段)の推移と  
治療・臨床経過(下段)を表示している。CsA: シクロスポリン、MMF: ミコフェノール酸モフェチル、h/rATG:  
ウマ/ウサギ抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリン。\*は全エクソンシーケンスを施行していない検体を表している。

図16.

●白血球数 ●ヘモグロビン濃度 ●血小板数 ●網状赤血球数

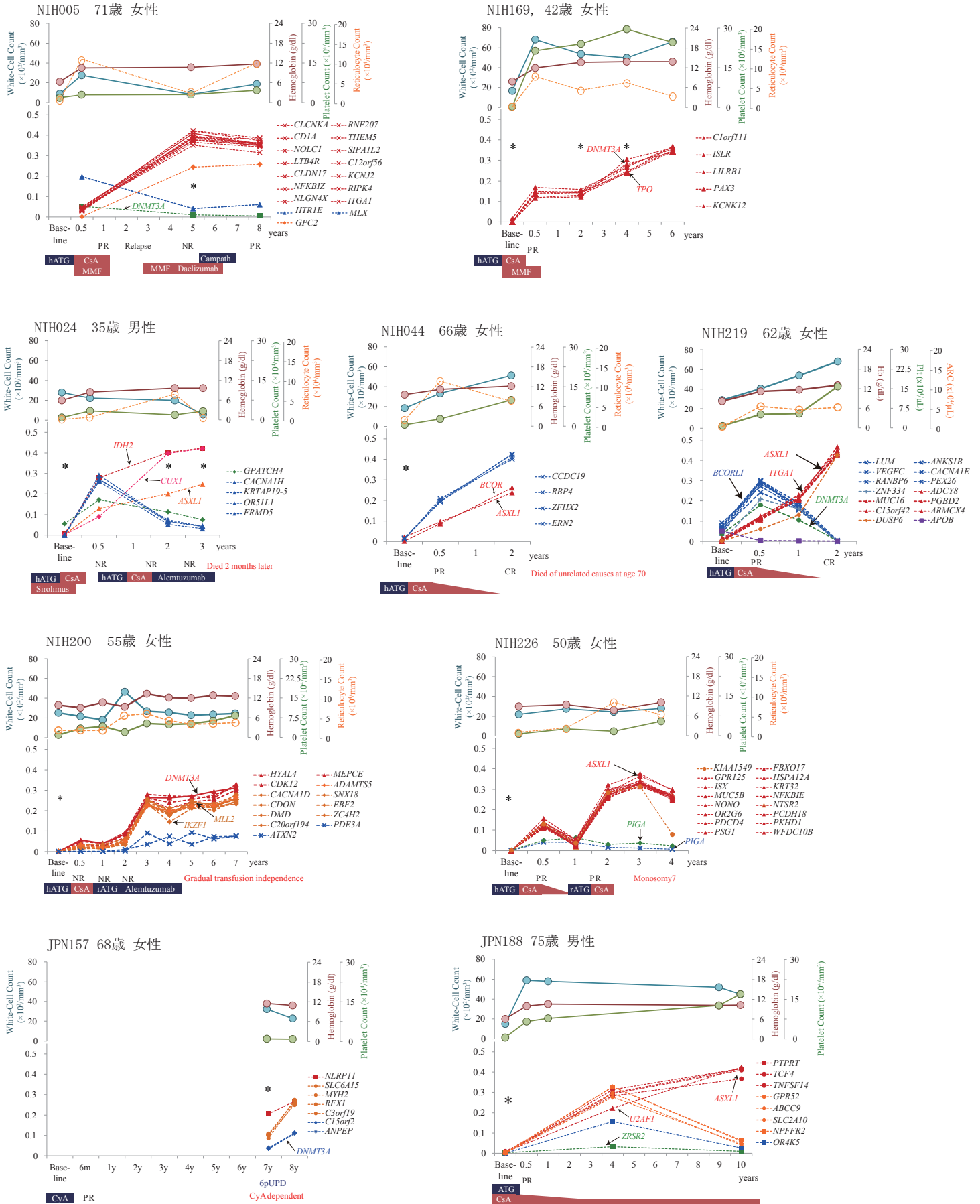


図16. 全エクソンシーケンス症例の継時的解析 初期クローンが経過中拡大した症例  
図15. のレジェンド参照

図17.

● 白血球数 ● ヘモグロビン濃度 ● 血小板数 ● 網状赤血球数

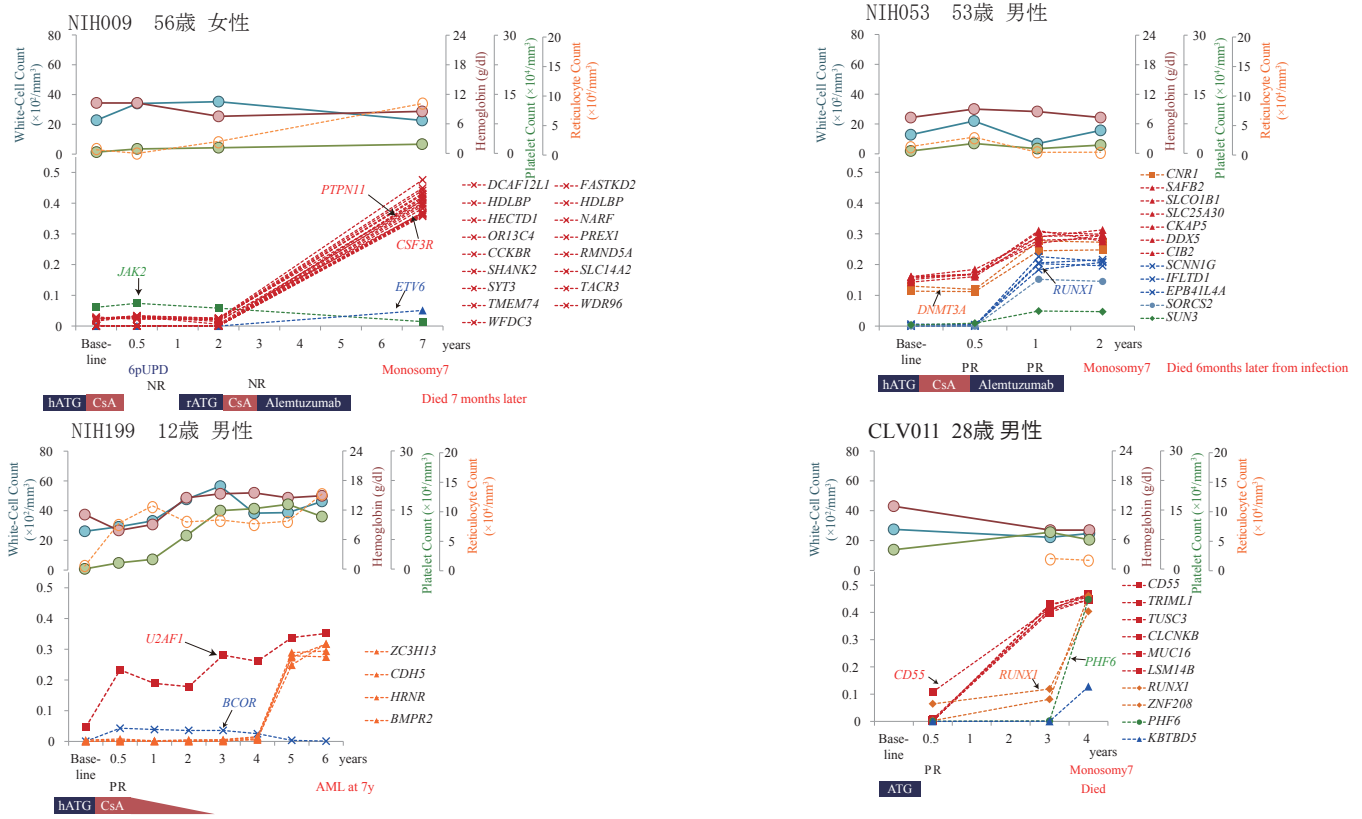


図17. 全エクソンシーケンス症例の継時的解析 経過中に新規に出現したクローンが拡大した症例  
図15. のレジェンド参照

図18.

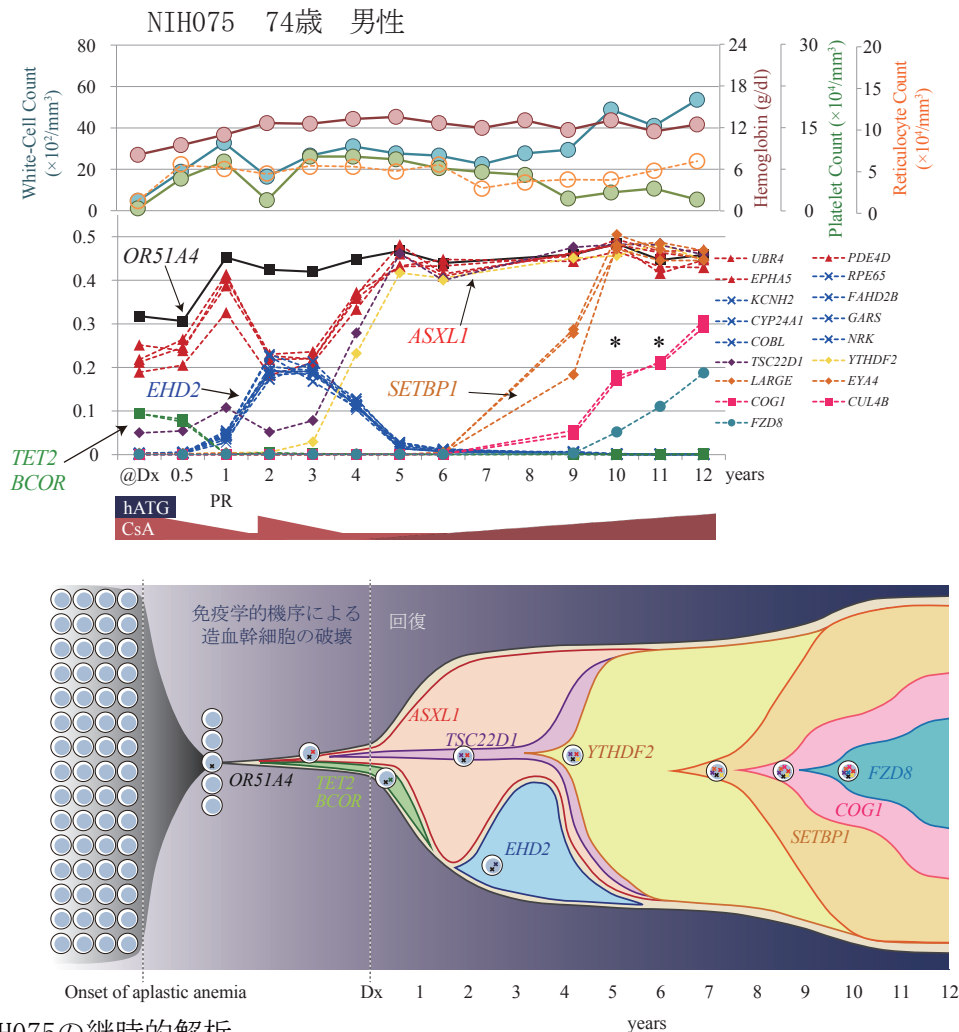


図18. 症例NIH075の継時的解析  
図15. のレジェンド参照

図 19.

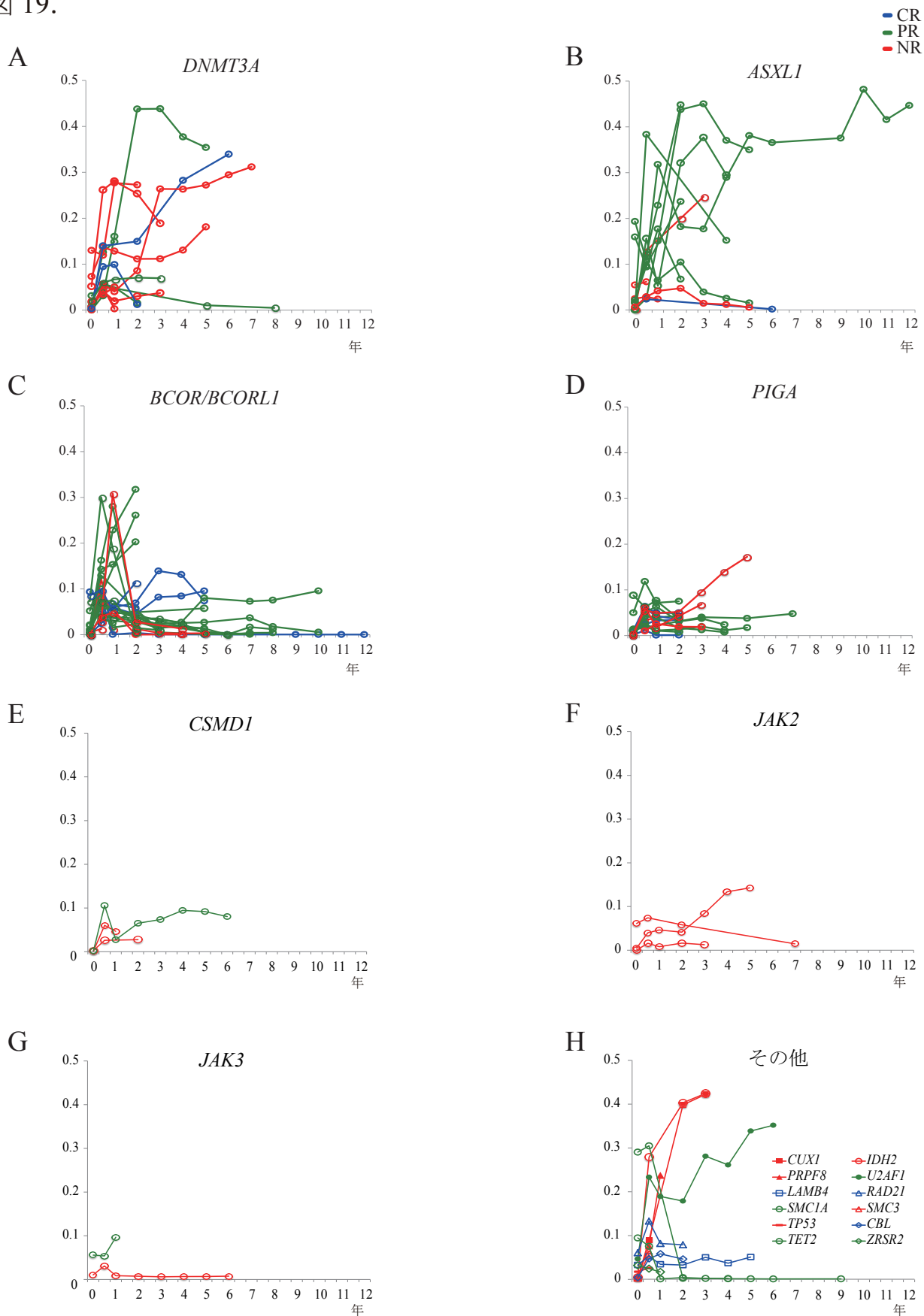


図19. 標的シーケンスで同定された変異の継時的挙動

NIHコホートにて治療開始6か月後に同定された変異のうち、継時的検体の得られた変異におけるアリル頻度の継時的挙動を図示した。個々の変異を実線をつないだ。2変異以上認められた遺伝子に関しては、各遺伝子別に(A-G)に図示し、2変異以上認めなかった変異は(H)にまとめて図示した。初期治療に対する反応性により色分けした。CR: Complete response (完全完解)、PR: Partial response (部分寛解)、NR: No response (非奏功)。

表1. 本研究に用いた検体数

コホート	NIH	Japan	Cleveland	計
標的シーケンスを施行した症例数	256	159	24	439
全エクソンシーケンスを施行した症例数	35	15	2	52
SNPアレイ核型分析を施行した症例数	235	159	23	417
CD3+ T cells	247	0	23	270
正常ペア検体のある症例数				
頬粘膜	0	22	0	22
計	247	22	23	292
2時点以上の検体ある症例数	62	8	12	82
2時点以上の検体に対し全エクソンシーケンスを施行した症例数	25	1	2	28
全検体数（アンプリコンシーケンスのみに使用した検体も含む）	462	168	38	668

表2. 各コホートの臨床情報

	NIH	Japan	Cleveland	P値	
症例数	256	159	24		
診断時年齢 (歳)	29 (2-82)	56 (7-88)	46 (18-71)	<0.001	‡
検体採取時年齢 (歳)	29.5 (2.5-82.5)	60 (7.8-88.1)	46.9 (18.5-71.8)	<0.001	‡
診断から検体採取までの期間 (月)	6 in all cases	3.3 (0-308)	8.2 (0.1-84)	<0.001	‡
性別 (男性 / 女性)	157 / 99	72 / 87	15 / 9	0.0045	§
検体採取時の状態				<0.001	§
診断時	0	35	5		
治療開始前	0	51	19		
治療後	256	72	0		
不明	0	1	0		
重症度				<0.001	§
Moderate	0	92	3		
Severe	109	54	21		
Very severe	147	13	0		
PNH血球の有無 (+/-)	146 / 110	95 / 64	16 / 8	0.001	§
初期治療				<0.001	§
プレドニゾロン	0	2	0		
タンパク同化ステロイド	0	9	0		
抗胸腺細胞グロブリンベース	256	70	21		
シクロスポリンベース	0	51	3		
造血幹細胞移植	0	1	0		
無治療	0	23	0		
不明	0	3	0		
初期治療に対する反応				<0.001	§
完全完解	32	41	3		
部分寛解	112	61	16		
効果なし	112	29	5		
不変	0	24	0		
不明	0	4	0		
MDS/AMLへの進展				0.0016	§
有	36	6	5		
無	220	135	19		
不明	0	18	0		
観察期間 (診断 - 最終観察) (月)	58.3 (1.9-160)	75.1 (4.07-438.3)	71.2 (1.37-181.8)	<0.001	‡
不明	0	19	0		
観察期間 (検体採取 - 最終観察) (月)	52.3 (0-154.2)	57.2 (0.47-179.2)	50.0 (0-102.9)	0.30	‡
不明	0	18	0		

‡: 一元分散分析

§: Fisher's正確検定

表3. 標的シーケンスの検体リスト

ID	コホート	診断から検体採取までの期間 (年)	検体採取時期	正常ペア検体の有無	SNPアレイ	全エクソンシーケンス	継時的検体の有無	解析した全検体数 (正常ペア検体を除く)
NIH002	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH003	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH005	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	+	+	3
NIH006	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
NIH008	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH009	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	4
NIH009	NIH	7	MDS	+	-	+	継時的検体	継時的検体
NIH010	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	-	1
NIH011	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH012	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH013	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	-	1
NIH014	NIH	0.3	免疫抑制療法後	+	-	-	-	1
NIH015	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH016	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	3
NIH017	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH018	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
NIH019	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
NIH020	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	+	2
NIH021	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
NIH022	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH024	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	4
NIH025	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
NIH027	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	5
NIH027	NIH	2	MDS	+	+	+	継時的検体	継時的検体
NIH027	NIH	3	MDS	+	+	-	継時的検体	継時的検体
NIH028	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	4
NIH029	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	4
NIH031	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	3
NIH031	NIH	1	MDS	+	-	-	継時的検体	継時的検体
NIH032	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH034	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	4
NIH034	NIH	2	MDS	+	+	-	継時的検体	継時的検体
NIH035	NIH	0.3	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
NIH036	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH037	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH039	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH040	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	3
NIH041	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	3
NIH042	NIH	0.2	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
NIH043	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	3
NIH044	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	3
NIH045	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	4
NIH046	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	-	1
NIH047	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
NIH048	NIH	0.3	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH049	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	3
NIH050	NIH	0.3	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH053	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	4
NIH053	NIH	2	MDS	+	-	+	継時的検体	継時的検体
NIH054	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH055	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH058	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
NIH058	NIH	2	MDS	+	+	-	継時的検体	継時的検体
NIH059	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	-	1
NIH060	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	3
NIH061	NIH	0.5	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
NIH062	NIH	0.5	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
NIH063	NIH	0.3	免疫抑制療法後	-	-	-	-	1
NIH064	NIH	0.5	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
NIH066	NIH	0.5	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
NIH069	NIH	0.5	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
NIH070	NIH	0.5	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
NIH071	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH072	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH073	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
NIH074	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	-	1
NIH075	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	12
NIH076	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	+	+	5
NIH077	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH079	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH080	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH081	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	-	1
NIH082	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	+	1
NIH083	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	-	1
NIH084	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH085	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	4
NIH086	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	+	2
NIH087	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH089	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	-	1
NIH090	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1







NIH270	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH271	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH272	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH273	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH274	NIH	0.3	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH275	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH276	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH277	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	-	-	-	1
NIH278	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH279	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH280	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	5
NIH281	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH282	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH283	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH284	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH285	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH286	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH287	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH288	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH289	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH290	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH291	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH292	NIH	0.3	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
NIH293	NIH	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
JPN002	JPN	6.1	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
JPN003	JPN	22.1	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
JPN004	JPN	0.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN005	JPN	12.3	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
JPN009	JPN	4.6	治療前	-	+	-	-	1
JPN016	JPN	0.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN021	JPN	12.2	免疫抑制療法後	-	+	-	+	1
JPN035R	JPN	8.4	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
JPN044	JPN	0.6	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN046	JPN	5.8	免疫抑制療法後	+	+	-	+	1
JPN063	JPN	0.5	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN066_1	JPN	3.1	免疫抑制療法後	+	+	+	繼時的検体	繼時的検体
JPN066_2	JPN	14.9	免疫抑制療法後	+	-	+	+	1
JPN075	JPN	0.2	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN077	JPN	0.2	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN078	JPN	0.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN082R_1	JPN	0.4	診断時	+	+	+	繼時的検体	繼時的検体
JPN082R_2	JPN	4.2	免疫抑制療法後	+	-	+	+	2
JPN086R_1	JPN	0.1	診断時	+	+	+	繼時的検体	繼時的検体
JPN086R_2	JPN	8.2	免疫抑制療法後	+	-	+	+	2
JPN095	JPN	0.4	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN100	JPN	4.9	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN107R	JPN	7.9	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN111	JPN	0.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN119	JPN	1.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN120	JPN	0.2	不明	-	+	-	-	1
JPN133	JPN	14.3	免疫抑制療法後	+	+	+	+	2
JPN136	JPN	21.6	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN140	JPN	0.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN146	JPN	2.7	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
JPN153	JPN	11.5	治療前	-	+	-	-	1
JPN157	JPN	8.5	免疫抑制療法後	+	+	+	+	2
JPN159	JPN	NA	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
JPN160	JPN	0.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN171	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN176_1	JPN	6.5	免疫抑制療法後	+	+	+	繼時的検体	繼時的検体
JPN176_2	JPN	12.6	免疫抑制療法後	+	-	+	+	2
JPN188	JPN	4.3	免疫抑制療法後	+	+	+	+	3
JPN190	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN201	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN209	JPN	0.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN220	JPN	5.2	免疫抑制療法後	+	+	-	+	1
JPN222	JPN	12.9	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
JPN223	JPN	1.5	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN225	JPN	14.8	治療前	+	+	-	+	2
JPN228	JPN	1.6	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN230	JPN	5.9	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN235	JPN	1.7	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN236	JPN	23.0	免疫抑制療法後	+	+	-	+	1
JPN239	JPN	5.7	免疫抑制療法後	-	+	-	+	1
JPN240	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN241	JPN	1.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN242	JPN	2.8	治療前	-	+	-	-	1
JPN244	JPN	8.2	免疫抑制療法後	+	+	-	+	1
JPN245	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN246	JPN	0.5	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN249	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN252	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN253	JPN	0.7	治療前	-	+	-	-	1
JPN257	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1

JPN260	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN264	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN289	JPN	1.0	治療前	-	+	-	-	1
JPN290	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN292	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN293	JPN	0.7	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN294	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN295	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN296	JPN	20.3	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN297	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN298	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN299	JPN	0.9	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN300	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN301	JPN	5.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN303	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN304	JPN	2.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN305	JPN	1.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN306	JPN	17.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN307	JPN	9.8	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN309	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN310	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN311	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN314	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN315	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN316	JPN	6.2	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN317	JPN	0.9	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN319	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN320	JPN	5.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN321	JPN	1.0	治療前	-	+	-	-	1
JPN322	JPN	5.9	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN323	JPN	0.4	治療前	-	+	-	-	1
JPN324	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN325	JPN	0.5	治療前	-	+	-	-	1
JPN328	JPN	0.6	治療前	-	+	-	-	1
JPN331	JPN	0.3	治療前	-	+	-	-	1
JPN332	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN335	JPN	25.6	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN337	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN339	JPN	2.3	治療前	-	+	-	-	1
JPN342	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN343	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN344	JPN	0.3	治療前	-	+	-	-	1
JPN345	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN346	JPN	2.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN347	JPN	5.7	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN348	JPN	2.8	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN349	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN353	JPN	12.5	治療前	-	+	-	-	1
JPN358	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN359	JPN	0.4	治療前	-	+	-	-	1
JPN360	JPN	12.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN361	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN363	JPN	0.3	治療前	-	+	-	-	1
JPN364	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN366	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN367	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN368	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN371	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN372	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN373	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN374	JPN	0.8	治療前	-	+	-	-	1
JPN375	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN377	JPN	0.6	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN378	JPN	0.8	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN379	JPN	1.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN381	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN382	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN383	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN385	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN386	JPN	0.6	治療前	-	+	-	-	1
JPN387	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN388	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN389	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN390	JPN	0.2	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN391	JPN	0.8	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN393	JPN	0.3	治療前	-	+	-	-	1
JPN394	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN396	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN397	JPN	0.3	治療前	-	+	-	-	1
JPN398	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN399	JPN	12.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN402	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN403	JPN	0.1	治療前	-	+	-	-	1
JPN407	JPN	1.1	治療前	-	+	-	-	1

JPN408	JPN	1.5	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN409	JPN	0.9	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN410	JPN	3.8	治療前	-	+	-	-	1
JPN411	JPN	4.0	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN413	JPN	0.1	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN422	JPN	0.2	治療前	-	+	-	-	1
JPN433	JPN	1.6	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN434	JPN	3.3	免疫抑制療法後	-	+	-	-	1
JPN436	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN437	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN438	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN439	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN440	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN441	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN442	JPN	0.1	診断時	-	+	-	-	1
JPN447R	JPN	0.0	診断時	-	+	-	-	1
JPN448	JPN	6.3	免疫抑制療法後	+	+	-	+	1
JPN455	JPN	0.2	診断時	+	+	+	繼時的検体	繼時的検体
JPN455	JPN	0.4	免疫抑制療法後	+	-	+	+	2
JPN500	JPN	0.2	免疫抑制療法後	+	+	+	-	1
CLV001	CLV	0.1	診断時	+	+	-	-	1
CLV002	CLV	7	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
CLV003	CLV	0.0	診断時	+	+	-	-	1
CLV004	CLV	0.7	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
CLV006	CLV	4.5	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
CLV007	CLV	0.0	診断時	+	+	-	-	1
CLV008	CLV	0.3	免疫抑制療法後	+	+	-	-	1
CLV009	CLV	0.1	診断時	+	+	-	-	1
CLV010	CLV	0.2	診断時	+	+	-	-	1
CLV011	CLV	0.2	診断時	+	+	+	繼時的検体	繼時的検体
CLV011	CLV	2.7	免疫抑制療法後	+	-	+	+	3
CLV011	CLV	3.3	MDS	+	+	+	繼時的検体	繼時的検体
CLV012	CLV	0.2	診断時	+	+	+	繼時的検体	繼時的検体
CLV012	CLV	0.7	免疫抑制療法後	+	-	+	+	3
CLV012	CLV	2.7	免疫抑制療法後	+	-	+	繼時的検体	繼時的検体
CLV013	CLV	0.0	診断時	-	+	-	繼時的検体	繼時的検体
CLV013	CLV	0.7	免疫抑制療法後	-	+	-	+	2
CLV014	CLV	0.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
CLV014	CLV	5.4	PNH	+	+	-	繼時的検体	繼時的検体
CLV015	CLV	0.1	診断時	+	+	-	繼時的検体	繼時的検体
CLV015	CLV	7.2	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
CLV016	CLV	0.1	診断時	+	+	-	繼時的検体	繼時的検体
CLV016	CLV	1.6	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
CLV017	CLV	0.1	診断時	+	+	-	繼時的検体	繼時的検体
CLV017	CLV	5.6	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
CLV018	CLV	3.5	免疫抑制療法後	+	+	-	+	1
CLV019	CLV	0.9	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
CLV019	CLV	5.2	免疫抑制療法後	+	+	-	繼時的検体	繼時的検体
CLV020	CLV	0.8	免疫抑制療法後	+	-	-	+	2
CLV020	CLV	2.0	免疫抑制療法後	+	-	-	繼時的検体	繼時的検体
CLV021	CLV	1.6	免疫抑制療法後	+	+	-	+	1
CLV022	CLV	0.0	診断時	+	+	-	繼時的検体	繼時的検体
CLV022	CLV	2.4	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
CLV023	CLV	0.0	診断時	+	-	-	繼時的検体	繼時的検体
CLV023	CLV	2.4	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
CLV024	CLV	5.8	免疫抑制療法後	+	+	-	+	1
CLV025	CLV	1.3	免疫抑制療法後	+	+	-	+	2
CLV025	CLV	1.8	PNH	+	+	-	繼時的検体	繼時的検体

表4. 標的シーケンスで解析した遺伝子リスト

遺伝子	機能	変異が報告されている疾患	採用理由	文献
<i>AEBP2</i>	Epigenetic regulation	secondary AML	報告されている	Am J Hematol. 2012 Mar;87(3):245-50.
<i>ASXL1</i>	Epigenetic regulation	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>ATRX</i>	Epigenetic regulation	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>DNMT3A</i>	Epigenetic regulation	AML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>EED</i>	Epigenetic regulation	MDS	報告されている	Blood. 2012 Feb 2;119(5):1208-13.
<i>EZH1</i>	Epigenetic regulation		PRC2 complex componet	
<i>EZH2</i>	Epigenetic regulation	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>IDH1</i>	Epigenetic regulation	AML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>IDH2</i>	Epigenetic regulation	AML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>JARID2</i>	Epigenetic regulation	MDS	報告されている	Blood. 2012 Feb 2;119(5):1208-13.
<i>KDM6A</i>	Epigenetic regulation	CMML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>RBBP4</i>	Epigenetic regulation		PRC2 complex componet	
<i>RBBP7</i>	Epigenetic regulation		PRC2 complex componet	
<i>SUZ12</i>	Epigenetic regulation	MDS/MPN	報告されている	Blood. 2012 Feb 2;119(5):1208-13.
<i>TET2</i>	Epigenetic regulation	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>ATM</i>	Transcription	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>BCOR</i>	Transcription	AML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>BCORL1</i>	Transcription	AML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>CEBPA</i>	Transcription	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>CTCF</i>	Transcription	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>CUX1</i>	Transcription	MDS	報告されている	Am J Hematol. 2012 Nov;87(11):1010-6.
<i>DAXX</i>	Transcription	AML	報告されている	Nature. 2012 Jan 11;481(7382):506-10. ASH annual meeting 2012: <a href="https://ash.confex.com/ash/2012/webprogram/Paper47490.html">https://ash.confex.com/ash/2012/webprogram/Paper47490.html</a>
<i>DIDO1</i>	Transcription	familial MDS	報告されている	<a href="https://ash.confex.com/ash/2012/webprogram/Paper47490.html">https://ash.confex.com/ash/2012/webprogram/Paper47490.html</a>
<i>ETV6</i>	Transcription	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>GATA1</i>	Transcription	Megakaryoblastic leukemia of Down syndrome	報告されている	Nat Genet. 2013 Nov;45(11):1293-9.
<i>GATA2</i>	Transcription	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>IRF1</i>	Transcription	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>NCOR2</i>	Transcription	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>NPM1</i>	Transcription	AML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>PHF6</i>	Transcription	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>Rb</i>	Transcription	Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm	報告されている	Leukemia. 2009 Apr;23(4):698-707.
<i>RUNX1</i>	Transcription	AML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>TP53</i>	Transcription	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>WT1</i>	Transcription	AML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>BRAF</i>	Signal transduction	AML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7. TCGA database ver2.2.14:
<i>CSMD1</i>	Signal transduction	AML	報告されている	<a href="http://cancergenome.nih.gov/">http://cancergenome.nih.gov/</a>
<i>GNAS</i>	Signal transduction	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>GPRC5A</i>	Signal transduction	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>JAK1</i>	Signal transduction		JAK/STAT pathway	
<i>JAK2</i>	Signal transduction	MPD	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>JAK3</i>	Signal transduction		JAK/STAT pathway	
<i>KRAS</i>	Signal transduction	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7. TCGA database ver2.2.14:
<i>MAP3K4</i>	Signal transduction	AML	報告されている	<a href="http://cancergenome.nih.gov/">http://cancergenome.nih.gov/</a>
<i>NF1</i>	Signal transduction	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>NRAS</i>	Signal transduction	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>PTPN11</i>	Signal transduction	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>RIT1</i>	Signal transduction	CMML	報告されている	Leukemia. 2013 Sep;27(9):1943-6.
<i>SH2B3</i>	Signal transduction		JAK/STAT pathway	
<i>SRP72</i>	Signal transduction	Familial aplasia and myelodysplasia	報告されている	Am J Hum Genet. 2012 May 4;90(5):888-92.
<i>STAT3</i>	Signal transduction		JAK/STAT pathway	
<i>FANCA</i>	DNA repair	Fanconi anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>FANCC</i>	DNA repair	Fanconi anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>BRCA2</i>	DNA repair	Fanconi anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>FANCD2</i>	DNA repair	Fanconi anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>FANCE</i>	DNA repair	Fanconi anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>FANCG</i>	DNA repair	Fanconi anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>FLT3</i>	Receptor	AML	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7. TCGA database ver2.2.14:
<i>KIT</i>	Receptor	AML	報告されている	<a href="http://cancergenome.nih.gov/">http://cancergenome.nih.gov/</a>
<i>CSF3R</i>	Receptor	Severe congenital neutropenia	報告されている	N Engl J Med. 1995 Aug 24;333(8):487-93.
<i>MPL</i>	Receptor	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>RPL11</i>	Ribosomal protein related gene	Diamond Blackfan anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>RPL35a</i>	Ribosomal protein related gene	Diamond Blackfan anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>RPL5</i>	Ribosomal protein related gene	Diamond Blackfan anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>RPS10</i>	Ribosomal protein related gene	Diamond Blackfan anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>RPS19</i>	Ribosomal protein related gene	Diamond Blackfan anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>RPS26</i>	Ribosomal protein related gene	Diamond Blackfan anemia	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>SBDS</i>	Ribosomal protein related gene	Shwachman Bodian Diamond syndrome	報告されている	Blood Rev. 2010 May;24(3):101-22.

<i>NHP2</i>	Telomere related gene	Dyskeratosis congenita	報告されている	Blood Rev. 2010 May;24(3):101-22.
<i>NOP10</i>	Telomere related gene	Dyskeratosis congenita	報告されている	Blood Rev. 2010 May;24(3):101-22.
<i>POT1</i>	Telomere related gene		テロメア関連遺伝子	
<i>RAP1</i>	Telomere related gene		テロメア関連遺伝子	
<i>RTEL1</i>	Telomere related gene	Dyskeratosis congenita	報告されている	Hum Genet. 2013 Apr;132(4):473-80.
<i>TERC</i>	Telomere related gene	Dyskeratosis congenita	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>TERF1</i>	Telomere related gene		テロメア関連遺伝子	
<i>TERF2</i>	Telomere related gene	Dyskeratosis congenita	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>TERT</i>	Telomere related gene	Dyskeratosis congenita	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>TINF2</i>	Telomere related gene	Dyskeratosis congenita	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>TPP1</i>	Telomere related gene		テロメア関連遺伝子	
<i>DDX41</i>	RNA splicing	MDS	報告されている	Nature. 2012 Jan 11;481(7382):506-10.
<i>LUC7L2</i>	RNA splicing	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>PRPF8</i>	RNA splicing	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>SF3B1</i>	RNA splicing	MDS	報告されている	Nature. 2011 Sep 11;478(7367):64-9.
<i>SRSF2</i>	RNA splicing	MDS	報告されている	Nature. 2011 Sep 11;478(7367):64-9.
<i>U2AF1</i>	RNA splicing	MDS	報告されている	Nature. 2011 Sep 11;478(7367):64-9.
<i>U2AF2</i>	RNA splicing	MDS	報告されている	Nature. 2011 Sep 11;478(7367):64-9.
<i>ZRSR2</i>	RNA splicing	MDS	報告されている	Nature. 2011 Sep 11;478(7367):64-9.
<i>RAD21</i>	Cohesin	AML	報告されている	Nat Genet. 2013 Oct;45(10):1232-7.
<i>SMC1A</i>	Cohesin	AML	報告されている	Nat Genet. 2013 Oct;45(10):1232-7.
<i>SMC3</i>	Cohesin	MDS	報告されている	Nat Genet. 2013 Oct;45(10):1232-7.
<i>STAG2</i>	Cohesin	MDS	報告されている	Nat Genet. 2013 Oct;45(10):1232-7.
<i>BRCC3</i>	Ubiquitination	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>CBL</i>	Ubiquitination	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>FBXW7</i>	Ubiquitination	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>CDAN1</i>	Chromatin modification	congenital dyserythropoietic anemia type I	報告されている	Am J Hum Genet. 2002 Dec;71(6):1467-74.
<i>CDH23</i>	Cell adhesion	AML	報告されている	N Engl J Med. 2012 Mar 22;366(12):1090-8.
<i>DIS3</i>	RNA processing and degradation	AML	報告されている	Nature. 2012 Jan 11;481(7382):506-10.
<i>DKC1</i>	RNA processing and degradation	Dyskeratosis congenita	報告されている	Curr Opin Pediatr. 2012 Feb;24(1):23-32.
<i>ELANE</i>	Elastases	Severe congenital neutropenia	報告されている	Hum Mutat. 2013 Jun;34(6):905-14.
<i>ETNK1</i>	Phosphatidylethanolamine synthesis	MDS	報告されている	Nature. 2011 Sep 11;478(7367):64-9.
<i>LAMB4</i>	Cell adhesion	MDS	報告されている	Leukemia. 2014 Feb;28(2):241-7.
<i>PEG3</i>	Apoptosis	acquired AA	自験データ	
<i>PIGA</i>	GPI anchor	acquired AA	報告されている	Blood. 2003 Apr 1;101(7):2833-41.
<i>PRF1</i>	Perforin	acquired AA	報告されている	Blood. 2007 Jun 15;109(12):5234-7.
<i>SETBP1</i>	Bind to SET nuclear oncogene	MDS	報告されている	Nat Genet. 2013 Aug;45(8):942-6.
<i>UMODL1</i>	Cell adhesion	AML	報告されている	N Engl J Med. 2012 Mar 22;366(12):1090-8.
<i>ZSWIM4</i>	Cell division	AML	報告されている	N Engl J Med. 2012 Mar 22;366(12):1090-8.

AA: 再生不良性貧血  
AML: 急性骨髄性白血病  
CMML: 慢性骨髄単球性白血病  
MDS: 骨髄異形成症候群  
MDS/MPN: 骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍  
MPN: 骨髄増殖性腫瘍

表 5. 標的シーケンスにおける各遺伝子の平均depth

番号	遺伝子	解析した塩基数	NIH cohort		Japan cohort		Cleveland cohort	
			平均depth	標準偏差	平均depth	標準偏差	平均depth	標準偏差
1	<i>AEBP2</i>	2424	1027	613	903	633	841	571
2	<i>ASXL1</i>	6608	1552	702	1410	732	1358	688
3	<i>ATM</i>	14646	1569	463	1415	576	1288	545
4	<i>ATRX</i>	11331	947	460	944	574	753	439
5	<i>BCOR</i>	6692	1007	494	1023	575	825	423
6	<i>BCORL1</i>	6484	1021	503	1024	597	860	412
7	<i>BRAF</i>	4782	1444	577	1293	591	1151	582
8	<i>BRCC3</i>	2466	1011	469	987	523	827	420
9	<i>CBL</i>	3992	1619	601	1440	623	1404	618
10	<i>CDAN1</i>	6544	1186	553	1059	572	1037	496
11	<i>CDH23</i>	17792	1129	488	1004	518	1002	426
12	<i>CEBPA</i>	908	343	465	286	428	297	399
13	<i>CSMD1</i>	17006	1575	531	1390	561	1343	535
14	<i>CTCF</i>	3020	1680	571	1534	609	1465	565
15	<i>CUX1</i>	9374	1107	629	988	632	895	512
16	<i>DAXX</i>	2928	1292	553	1159	573	1136	499
17	<i>DDX41</i>	3952	1286	515	1159	552	1128	455
18	<i>DIDO1</i>	8130	1540	466	1384	536	1303	480
19	<i>DIS3</i>	5009	1473	503	1315	599	1187	551
20	<i>DKC1</i>	3597	1115	578	1130	638	919	498
21	<i>DNMT3A</i>	5491	1016	534	885	536	880	470
22	<i>EED</i>	2664	1468	445	1305	541	1241	507
23	<i>ELANE</i>	1210	762	513	643	515	668	443
24	<i>ETNK1</i>	2420	1343	513	1157	560	1126	553
25	<i>ETV6</i>	2600	1503	495	1307	510	1234	472
26	<i>EZH1</i>	4118	1551	508	1405	540	1330	506
27	<i>EZH2</i>	4711	1494	494	1342	519	1169	487
28	<i>FANCA</i>	9692	1301	607	1152	604	1096	554
29	<i>FANCC</i>	3210	1443	493	1304	519	1223	503
30	<i>FANCD1</i>	12366	1584	543	1431	627	1298	606
31	<i>FANCD2</i>	9506	1703	550	1547	593	1457	596
32	<i>FANCE</i>	2660	1228	642	1104	593	1102	574
33	<i>FANCG</i>	3265	1521	550	1398	546	1321	495
34	<i>FBXW7</i>	3801	1632	580	1408	620	1389	642
35	<i>FLT3</i>	5741	1545	576	1395	606	1295	599
36	<i>GATA1</i>	1690	814	491	774	531	709	391
37	<i>GATA2</i>	1870	848	334	691	350	754	301
38	<i>GCSFR</i>	4112	982	490	862	483	882	438
39	<i>GNAS</i>	5720	1383	563	1206	586	1205	536
40	<i>GPRC5A</i>	1326	1447	566	1276	588	1280	547
41	<i>IDH1</i>	1996	1507	487	1350	532	1234	516
42	<i>IDH2</i>	2416	1062	640	974	651	949	554
43	<i>IRF1</i>	1924	1346	535	1227	534	1154	478
44	<i>JAK1</i>	5748	1499	497	1343	526	1282	498
45	<i>JAK2</i>	5686	1523	446	1343	554	1259	563
46	<i>JAK3</i>	5656	892	479	787	504	803	432
47	<i>JARID2</i>	5956	1474	533	1285	575	1273	520
48	<i>KDM6A</i>	7750	1020	489	1012	582	827	452
49	<i>KIT</i>	5069	1644	486	1443	549	1390	523
50	<i>KRAS</i>	1392	1297	382	1157	486	1051	463
51	<i>LAMB4</i>	8228	1541	552	1389	568	1241	518
52	<i>LNK</i>	2448	993	619	878	588	900	552
53	<i>LUC7L2</i>	2968	1439	633	1297	652	1150	575
54	<i>MAP3K4</i>	7962	1607	614	1418	622	1377	630
55	<i>MPL</i>	2964	1181	631	1061	626	1054	565
56	<i>NCOR2</i>	12711	755	456	658	459	672	402



57	<i>NF1</i>	14946	1528	543	1364	597	1286	592
58	<i>NHP2</i>	899	1153	388	990	418	971	362
59	<i>NOP10</i>	424	1536	509	1383	546	1326	548
60	<i>NPM1</i>	2252	1346	484	1198	547	1114	536
61	<i>NRAS</i>	968	1795	486	1619	532	1546	559
62	<i>PEG3</i>	5416	1688	555	1505	575	1497	522
63	<i>PHF6</i>	2118	1078	503	1078	618	856	483
64	<i>PIGA</i>	1992	938	552	935	617	747	498
65	<i>POT1</i>	3814	1364	451	1219	532	1059	488
66	<i>PRF1</i>	1804	1057	518	913	556	952	459
67	<i>PRPF8</i>	10506	1572	576	1430	599	1365	541
68	<i>PTPN11</i>	3588	1577	653	1404	656	1321	639
69	<i>RAD21</i>	3200	1559	430	1370	516	1302	504
70	<i>RAP1</i>	1212	1590	567	1394	604	1341	709
71	<i>RB</i>	5775	1241	544	1120	631	1051	624
72	<i>RBBP4</i>	2888	1610	605	1448	667	1344	629
73	<i>RBBP7</i>	2906	1090	500	1076	577	882	447
74	<i>RIT1</i>	1272	1751	509	1585	554	1483	544
75	<i>RPL11</i>	1332	1522	494	1386	546	1332	530
76	<i>RPL35A</i>	1030	1745	511	1542	541	1420	556
77	<i>RPL5</i>	1663	1481	510	1291	562	1264	579
78	<i>RPS10</i>	1212	1579	445	1367	441	1348	456
79	<i>RPS19</i>	1030	1300	568	1149	623	1139	535
80	<i>RPS26</i>	848	1227	378	1033	423	1091	400
81	<i>RTEL1</i>	8333	883	487	773	489	771	423
82	<i>RUNX1</i>	2904	1049	753	922	719	903	672
83	<i>SBDS</i>	1210	1498	471	1356	552	1171	469
84	<i>SETBP1</i>	5354	1492	701	1308	688	1318	647
85	<i>SF3B1</i>	6447	1631	465	1423	547	1349	539
86	<i>SMC1A</i>	6312	1067	515	1058	572	908	468
87	<i>SMC3</i>	6418	1512	525	1352	597	1241	578
88	<i>SRP72</i>	4114	1481	539	1345	616	1232	576
89	<i>SRSF2</i>	1026	1315	592	1137	606	1119	570
90	<i>STAG2</i>	7237	977	468	989	577	782	444
91	<i>STAT3</i>	4630	1431	518	1265	520	1237	514
92	<i>SUZ12</i>	3762	1310	495	1201	575	1065	515
93	<i>TERC</i>	482	751	257	586	293	619	218
94	<i>TERF1</i>	2590	1158	516	1038	606	923	533
95	<i>TERF2</i>	2447	1538	432	1397	483	1320	599
96	<i>TERT</i>	4772	897	539	783	546	770	476
97	<i>TET2</i>	7042	1729	618	1509	660	1487	645
98	<i>TINF2</i>	2260	1715	637	1565	692	1456	587
99	<i>TP53</i>	2553	1251	437	1112	485	1132	437
100	<i>TPP1</i>	3025	1413	542	1247	555	1237	481
101	<i>U2AF1</i>	1691	1479	450	1327	538	1236	478
102	<i>U2AF2</i>	2696	819	417	711	447	726	359
103	<i>UMODL1</i>	6710	1292	550	1142	565	1126	497
104	<i>WT1</i>	2784	1116	622	970	609	957	567
105	<i>ZRSR2</i>	2838	1067	473	1070	576	868	443
106	<i>ZSWIM4</i>	4397	780	487	667	481	700	418

表6. U.S.コホート(NIHとClevelandコホート)とJapanコホートにおける変異頻度の比較

U.S. vs Japanコホート		
遺伝子	P値	Q値*
<i>BCOR</i> または <i>BCORLI</i>	0.300	0.38
<i>PIGA</i>	0.089	0.15
<i>DNMT3A</i>	0.051	0.13
<i>ASXL1</i>	0.84	0.84
その他	0.019	0.094

\*: Q値はP値をBenjamini-Hochberg法で補正して計算した

表7. 造血幹細胞・前駆細胞に対し施行したアンプリコンシーケンスの結果

ID	診断から検体採取までの時間(年)	遺伝子	末梢血顆粒球でのアリル頻度	HSC	CMP	GMP	MEP	Erythroid	Granulocyte	Tcell	Bcell
NIH075	12	<i>OR51A4</i>	0.46	+	+	+	+	+	+	+	-
NIH075	12	<i>ASXL1</i>	0.39	+	+	+	+	+	+	+	-
NIH075	12	<i>YTHDF2</i>	0.45	+	+	+	+	+	+	-	+
NIH075	12	<i>SETBP1</i>	0.47	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH075	12	<i>EYA4</i>	0.45	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH075	12	<i>CUL4B</i>	0.29	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH075	12	<i>FZD8</i>	0.19	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH075	12	<i>TET2</i>	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
NIH075	12	<i>BCOR</i>	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
NIH169	6	<i>DNMT3A</i>	0.34	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH169	6	<i>ISLR</i>	0.35	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH169	6	<i>KCNK12</i>	0.37	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH169	6	<i>PAX3</i>	0.37	+	+	+	+	+	+	+	-
NIH169	6	<i>TPO</i>	0.34	+	+	+	+	+	+	+	-
NIH199	4	<i>BCOR</i>	0.03	NA	NA	-	NA	-	-	-	-
NIH199	4	<i>U2AF1</i>	0.26	NA	NA	+	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>DNMT3A</i>	0.29	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>HYAL4</i>	0.28	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>MEPCE</i>	0.26	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>ADAMTS5</i>	0.22	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>C20orf194</i>	0.21	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>CACNA1D</i>	0.22	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>CDK12</i>	0.25	NA	NA	NA	NA	+	-	+	+
NIH200	6	<i>CDON</i>	0.22	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>DMD</i>	0.22	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>EBF2</i>	0.23	NA	NA	NA	NA	+	-	+	+
NIH200	6	<i>IKZF1</i>	0.20	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>MLL2</i>	0.22	NA	NA	NA	NA	+	+	+	+
NIH200	6	<i>ATXN2</i>	0.06	NA	NA	NA	NA	+	-	-	-
NIH219	2	<i>ASXL1</i>	0.45	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH219	2	<i>ADCY8</i>	0.43	+	+	+	+	+	+	-	+
NIH219	2	<i>ARMCX4</i>	0.44	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH219	2	<i>C15orf42</i>	0.43	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH219	2	<i>ITGA1</i>	0.44	+	+	+	+	+	+	-	+
NIH219	2	<i>MUC16</i>	0.43	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH219	2	<i>PGBD2</i>	0.47	+	+	+	+	+	+	-	+
NIH219	2	<i>DUSP6</i>	0.43	+	+	+	+	+	+	-	-
NIH245	2	<i>PIGA</i>	0.04	NA	NA	NA	NA	+	+	-	+
NIH245	2	<i>DNMT3A</i>	0.25	NA	NA	NA	NA	+	+	-	-

HSC: hematopoietic stem cell (造血幹細胞)

CMP: common myeloid progenitor (骨髄球性共通前駆細胞)

GMP: granulocyte macrophage progenitor (顆粒球・マクロファージ前駆細胞)

MEP: myeloid erythroid progenitor (巨核球赤芽球前駆細胞)

+: 変異陽性

-: 変異陰性

NA: 未解析

表8. 各造血細胞コロニーに対するシーケンス結果  
NIH075

診断後1年	<i>OR51A4</i>	<i>EPHA5</i>	<i>UBR4</i>	<i>PDE4D</i>	<i>ASXL1</i>	<i>EHD2</i>	<i>SETBP1</i>	<i>LARGE</i>	<i>EYA4</i>	<i>YTHDF2</i>	<i>TSC22D1</i>	<i>BCOR</i>	<i>TET2</i>
colony 1	+	+	+	+	+	-				-	-	-	-
colony 2	+	+	+	+	+	-				-	+	-	-
colony 3	+	+	-	+	+	-				-	-	-	-
colony 4	+	+	+	+	+	-				-	+	-	-
colony 5	+	+	-	+	+	-				-	-	-	-
colony 6	+	+	+	+	+	-				-	-	-	-
colony 7	+	-	-	-	-	-				-	-	+	+
colony 8						-				-	-	-	-
colony 9						-				-	+	-	-
colony 10						-				-	-	-	-

診断後3年	<i>OR51A4</i>	<i>EPHA5</i>	<i>UBR4</i>	<i>PDE4D</i>	<i>ASXL1</i>	<i>EHD2</i>	<i>SETBP1</i>	<i>LARGE</i>	<i>EYA4</i>	<i>YTHDF2</i>	<i>TSC22D1</i>	<i>BCOR</i>	<i>TET2</i>
colony 1	+	+	+	+	+	-				+	+	-	-
colony 2	+	+	+	+	+	-				+	+	-	-
colony 3	+	+	+	+	+	-				+	+	-	-
colony 4	+	+	+	+	+	-				+	+	-	-
colony 5	+	+	+	+	+	-				+	+	-	-
colony 6	+	+	+	+	+	-				+	+	-	-
colony 7	+	-	-	-	-	+				-	-	-	-

診断後6年	<i>OR51A4</i>	<i>EPHA5</i>	<i>UBR4</i>	<i>PDE4D</i>	<i>ASXL1</i>	<i>EHD2</i>	<i>SETBP1</i>	<i>LARGE</i>	<i>EYA4</i>	<i>YTHDF2</i>	<i>TSC22D1</i>	<i>BCOR</i>	<i>TET2</i>
colony 1	+	+	+	+	+	-	-	-		-	+	-	-
colony 2	+	+	+	+	+	-	-	-		+	+	-	-
colony 3	+	+	+	+	+	-	-	-		+	+	-	-
colony 4	+	+	+	+	+	-	-	-		-	+	-	-
colony 5	+	+	+	+	+	-	-	-		+	+	-	-
colony 6	+	+	+	+	+	-	-	-		+	+	-	-
colony 7	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-

NIH076

診断後2年	<i>BCOR</i> <i>F1600fs</i>	<i>BCOR</i> <i>S1354fs</i>
colony 1	-	-
colony 2	+	-
colony 3	-	-
colony 4	+	-
colony 5	+	-
colony 6	+	-
colony 7	-	+
colony 8	-	+

NIH207

診断後1年	<i>PIGA</i> <i>R233fs</i>	<i>PIGA</i> <i>Y98X</i>	<i>RAD21</i>	<i>PIGA</i> <i>P44fs</i>	<i>SLC17A4</i>
colony 1	+	-	-	-	-
colony 2	-	-	-	-	-
colony 3	-	-	-	-	-
colony 4	-	-	+	-	-
colony 5	-	-	+	+	-
colony 6	-	-	+	+	-
colony 7	-	+	-	-	-

+: 変異陽性  
-: 変異陰性  
空欄: 解析未施行

表9. 免疫抑制療法反応性に対する予後因子

	係数	P値
年齢 (≥60歳)	-0.18	0.63
性別 (男性)	-0.59	0.053
体細胞変異の有無		
<i>ASXL1</i>	-0.51	0.52
<i>DNMT3A</i>	-0.31	0.58
<i>BCOR</i> または <i>BCORL1</i>	1.50	0.011
<i>PIGA</i>	0.18	0.80
その他の変異	0.20	0.73
コピー数変化/UPD		
Monosomy7	-1.18	0.33
6pUPD	-0.36	0.39
診断時血算		
網状赤血球数	1.75	<0.001
好中球数	-0.17	0.29
リンパ球数	0.33	0.21
血小板数	0.080	0.65

予後因子をロジスティクス回帰分析にて解析した。診断時血算に関しては、各変数を10を底とした対数変換を施行し、連続変数として扱った。それ以外の変数は二値変数として扱った。各因子に対するP値はWald検定により算出した。

表10. 全生存に対する予後因子

	ハザード比 (95%信頼区間)	P値
<i>PIGA, BCOR/BCORL1</i>	0.24 (0.09-0.63)	0.004
その他の変異	1.7 (0.9-3.22)	0.104
Monosomy7	3.59 (1.16-11.1)	0.026
6pUPD	0.69 (0.29-1.68)	0.42
年齢 (≥60歳)	4.84 (2.66-8.83)	<0.001
性別 (男性)	2.74 (1.4-5.36)	0.003
網状赤血球数	0.51 (0.25-1.03)	0.059
好中球数	1.1 (0.8-1.52)	0.56
リンパ球数	1.01 (0.62-1.66)	0.96
血小板数	1.01 (0.7-1.46)	0.94

予後因子に対しCox比例ハザードモデルを用いて重回帰分析を実施した。診断時血算に関しては、各変数を10を底とした対数変換を施行し、連続変数として扱った。それ以外の変数は二値変数として扱った。各因子に対するP値はWald検定により算出した。

表11. 全エクソンシーケンスを実施した検体リスト

ID	コホート	診断から検体採取 までの期間(年)	検体採取の タイミング	コメント
CLV011	CLV	0	診断時	
CLV011	CLV	3	免疫抑制療法後	
CLV011	CLV	4	MDS	
CLV011	CLV	正常ペア検体	正常ペア検体	
CLV012	CLV	0	診断時	
CLV012	CLV	0.5	免疫抑制療法後	
CLV012	CLV	3	免疫抑制療法後	
CLV012	CLV	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN002	JPN	6	免疫抑制療法後	
JPN002	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN003	JPN	22	免疫抑制療法後	
JPN003	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN005	JPN	12	免疫抑制療法後	
JPN005	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN035	JPN	8	免疫抑制療法後	
JPN035	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN066	JPN	15	免疫抑制療法後	
JPN066	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN082	JPN	4	免疫抑制療法後	
JPN082	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN086	JPN	8	免疫抑制療法後	
JPN086	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	#
JPN133	JPN	14	免疫抑制療法後	
JPN133	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN146	JPN	3	治療前	
JPN146	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN157	JPN	8	免疫抑制療法後	
JPN157	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	#
JPN176	JPN	13	免疫抑制療法後	
JPN176	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	#
JPN188	JPN	4	免疫抑制療法後	
JPN188	JPN	10	免疫抑制療法後	
JPN188	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN222	JPN	13	免疫抑制療法後	
JPN222	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN455	JPN	0	免疫抑制療法後	
JPN455	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
JPN500	JPN	0	免疫抑制療法後	
JPN500	JPN	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH005	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH005	NIH	8	免疫抑制療法後	
NIH005	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH006	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH006	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH009	NIH	0	診断時	
NIH009	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH009	NIH	2	免疫抑制療法後	
NIH009	NIH	7	MDS	
NIH009	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH018	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH018	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH019	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH019	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH021	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH021	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH024	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH024	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH025	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH025	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH027	NIH	0	診断時	
NIH027	NIH	0.5	免疫抑制療法後	

NIH027	NIH	1	免疫抑制療法後	
NIH027	NIH	2	MDS	#
NIH027	NIH	3	MDS	
NIH027	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH035	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH035	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH040	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH040	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH042	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH042	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH043	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH043	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH044	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH044	NIH	2	免疫抑制療法後	‡
NIH044	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH045	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH045	NIH	2	免疫抑制療法後	‡
NIH045	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH053	NIH	0	診断時	
NIH053	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH053	NIH	1	免疫抑制療法後	
NIH053	NIH	2	MDS	
NIH053	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH075	NIH	0	診断時	
NIH075	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH075	NIH	1	免疫抑制療法後	
NIH075	NIH	2	免疫抑制療法後	
NIH075	NIH	3	免疫抑制療法後	
NIH075	NIH	4	免疫抑制療法後	
NIH075	NIH	5	免疫抑制療法後	
NIH075	NIH	6	免疫抑制療法後	
NIH075	NIH	9	免疫抑制療法後	
NIH075	NIH	12	免疫抑制療法後	
NIH075	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH076	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH076	NIH	5	免疫抑制療法後	‡
NIH076	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH133	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH133	NIH	6	免疫抑制療法後	‡
NIH133	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH135	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH135	NIH	7	免疫抑制療法後	‡
NIH135	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH146	NIH	0	診断時	‡
NIH146	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH146	NIH	3	免疫抑制療法後	‡
NIH146	NIH	5	免疫抑制療法後	‡
NIH146	NIH	7	免疫抑制療法後	‡
NIH146	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH155	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH155	NIH	5	免疫抑制療法後	‡
NIH155	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH169	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH169	NIH	6	免疫抑制療法後	‡
NIH169	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH194	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH194	NIH	10	免疫抑制療法後	‡
NIH194	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH197	NIH	0	診断時	‡
NIH197	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH197	NIH	2	免疫抑制療法後	‡
NIH197	NIH	4	免疫抑制療法後	‡
NIH197	NIH	5	免疫抑制療法後	‡
NIH197	NIH	7	免疫抑制療法後	‡



NIH197	NIH	8	免疫抑制療法後	‡
NIH197	NIH	10	免疫抑制療法後	‡
NIH197	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH199	NIH	0	診断時	‡
NIH199	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH199	NIH	1	免疫抑制療法後	
NIH199	NIH	2	免疫抑制療法後	
NIH199	NIH	3	免疫抑制療法後	
NIH199	NIH	4	免疫抑制療法後	
NIH199	NIH	5	免疫抑制療法後	
NIH199	NIH	6	MDS	
NIH199	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH200	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH200	NIH	1	免疫抑制療法後	‡
NIH200	NIH	2	免疫抑制療法後	‡
NIH200	NIH	3	免疫抑制療法後	‡
NIH200	NIH	4	免疫抑制療法後	‡
NIH200	NIH	5	免疫抑制療法後	‡
NIH200	NIH	6	免疫抑制療法後	‡
NIH200	NIH	7	免疫抑制療法後	‡
NIH200	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH207	NIH	0	診断時	#
NIH207	NIH	0.5	免疫抑制療法後	
NIH207	NIH	1	免疫抑制療法後	
NIH207	NIH	2	MDS	
NIH207	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	
NIH219	NIH	0	診断時	‡
NIH219	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH219	NIH	1	免疫抑制療法後	‡
NIH219	NIH	2	免疫抑制療法後	‡
NIH219	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH226	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH226	NIH	1	免疫抑制療法後	‡
NIH226	NIH	2	免疫抑制療法後	‡
NIH226	NIH	3	免疫抑制療法後	‡
NIH226	NIH	4	MDS	
NIH226	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH227	NIH	0	診断時	
NIH227	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH227	NIH	1	免疫抑制療法後	
NIH227	NIH	2	免疫抑制療法後	
NIH227	NIH	3	免疫抑制療法後	
NIH227	NIH	4	免疫抑制療法後	
NIH227	NIH	5	免疫抑制療法後	‡
NIH227	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH235	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH235	NIH	3	MDS	‡
NIH235	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH245	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH245	NIH	3	免疫抑制療法後	‡
NIH245	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH254	NIH	0	診断時	#
NIH254	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH254	NIH	1	免疫抑制療法後	‡
NIH254	NIH	2	免疫抑制療法後	‡
NIH254	NIH	3	免疫抑制療法後	‡
NIH254	NIH	4	免疫抑制療法後	‡
NIH254	NIH	5	免疫抑制療法後	‡
NIH254	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡
NIH280	NIH	0.5	免疫抑制療法後	‡
NIH280	NIH	3	免疫抑制療法後	‡
NIH280	NIH	正常ペア検体	正常ペア検体	‡

‡: 200ng DNAプロトコールで全エクソンシーケンスを実施した

#: REPLI-g Mini Kit (QIAGEN)で全ゲノム増幅した検体を用いて全エクソンシーケンスを実施した

表12. 各検査法により同定されたクローン性造血

ID	変異数			SNPアレイ
	全エクソンシーケンス			
	標的シーケンス	同義変異含む	同義変異除く	
NIH005	1	2	1	NA
NIH006	0	0	0	正常
NIH009	1	0	0	6pUPD
NIH018	0	1	1	正常
NIH019	0	0	0	正常
NIH021	0	0	0	正常
NIH024	3	6	4	正常
NIH025	2	0	0	6pUPD
NIH027	0	1	1	正常
NIH035	0	0	0	正常
NIH040	1	0	0	正常
NIH042	0	0	0	正常
NIH043	4	0	0	正常
NIH044	2	0	0	正常
NIH045	1	0	0	正常
NIH053	1	2	2	正常
NIH075	3	1	1	正常
NIH076	2	1	1	NA
NIH133	1	0	0	正常
NIH135	0	0	0	6pUPD
NIH146	3	0	0	NA
NIH155	1	0	0	正常
NIH169	1	2	2	正常
NIH194	1	0	0	正常
NIH197	1	1	1	正常
NIH199	2	0	0	正常
NIH200	1	0	0	正常
NIH207	4	0	0	正常
NIH219	2	10	8	正常
NIH226	3	7	6	NA
NIH227	2	0	0	正常
NIH235	0	0	0	正常
NIH245	2	1	1	正常
NIH254	4	1	1	正常
NIH280	2	1	1	正常
CLV011	1	6	3	正常
CLV012	1	1	1	正常
JPN002	0	1	0	6pUPD
JPN003	3	0	0	正常
JPN005	1	0	0	Xp gain
JPN035	0	7	5	3p deletion
JPN066	0	0	0	正常
JPN082	2	1	1	正常
JPN086	0	3	2	6pUPD
JPN133	5	11	9	正常
JPN146	1	5	4	正常
JPN157	1	7	1	6p deletion
JPN176	2	10	5	6pUPD
JPN188	3	6	1	正常
JPN222	0	0	0	正常
JPN455	1	0	0	正常
JPN500	0	0	0	X gain

NA: 検査未施行