

博士論文

ハイスループット解析を用いた  
神経芽腫における分子病態

星野 論子

## 目次

要旨	3
序文	4
方法	10
結果	19
考察	33
結論	41
謝辭	42
参考文献	43
略語集	59
図表	60

## 要旨

近年、次世代シーケンサーなどを用いたハイスループット解析により、神経芽腫における分子病態の解明が多数試みられているが、神経芽腫の分子病態の全貌、とりわけエピジェネティック制御における役割は十分解明されていない。本研究では、次世代シーケンサーとアレイ解析技術を駆使して、エピジェネティック制御遺伝子の解読深度ターゲットキャプチャー、網羅的ゲノムコピー数およびメチル化解析を行い、神経芽腫におけるエピジェネティック制御の遺伝学的全体図を作成した。変異解析と網羅的ゲノムコピー数解析では、神経芽腫においてエピジェネティック制御遺伝子の異常は、SWI/SNF 複合体における頻度が高く、病期 4 や年長児など予後不良な症例に随伴していることが明らかになった。またメチル化パターンの違いにより神経芽腫は 3 つのサブグループに分類され、それぞれ特徴的な遺伝子異常、臨床像を有していることが見出された。3 つのサブグループの中で高メチル化しているプローブを多く含む Hyper-methylated 群は、*MYCN* 増幅例もしくは進行病期かつ年長児の症例から構成され、予後不良であり、免疫応答に関連する遺伝子の高メチル化が検出された。

## 序文

近年、次世代シーケンサー(配列解読装置)が開発され、大量検体におけるゲノム配列を短時間で解析すること(ハイスループット解析)が可能となった。このようなハイスループット解析により、網羅的な遺伝子解析が施行され、遺伝学領域は目覚ましい発展を遂げている。次世代シーケンサーを用いることにより、ヒトゲノムの塩基配列決定の効率は飛躍的に高まっており、従来のサンガー法では全ゲノムを解読するのに13年と3千億円かかった [1], [2]のに対し、現在、次世代シーケンサーを用いることで約1ヶ月と100万程度の費用で可能となっている。

とりわけがん領域においては、腫瘍細胞と正常細胞の塩基配列を比較することで腫瘍特異的変異を特定することが可能となり、多数のがんで共通する既知であった *TP53*, *APC*, *CTNGB1*, *RB* などの変異の他に、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、大腸がん、乳がんにおいて頻度は高くないものの今までは知られていなかった転写や接着、浸潤に関する遺伝子変異が検出された[3]。また乳がんでは、2000例を用いたゲノムコピー数と遺伝子発現の統合的な解析により、ゲノム情報に基づいた新規の分子的層別化が報告されている[4]。このように次世代シーケンサーを用いた網羅的解析と臨床情報を結びつけた新既の分

子標的の発見は、飛躍的にがんの分子腫瘍学、遺伝学の発展をもたらしている。

成人がんの領域では、ICGC (International Cancer Genome Consortium) が 2008 年に設立され、臨床的に重要な 50 種類のがんを選定し、世界中の研究施設が協力してゲノムやトランスクリプトーム、エピジェネティック解析を行っている。大規模検体を用いた統合的解析によりがんのゲノム変異の全貌とゲノム異常の包括的なカタログの作成が進められることで、がんの新たな治療法や診断法、予防法を開発するための基盤となることが期待されている (<http://icgc.org>)。

小児がんの領域でも同様に TARGET (The Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatment) project がすすめられ、ALL (Acute lymphoblastic leukemia)、B-ALL (B-cell acute lymphoblastic leukemia)、神経芽腫、ウィルムス腫瘍、CCSK (Clear cell sarcoma of the kidney) などが対象となっている。このプロジェクトにより、ALL、ウィルムス腫瘍における新たな変異の検出[5]-[7]や神経芽腫における変異の全体像[8]、CCSK のメチル化の異常[9]、Ph-like ALL における変異パスイ別の新規サブグループの同定[10]などの成果が報告されている。

一方、近年後天的なゲノム修飾であるエピジェネティックな制御が、がんの病態に関与していることが明らかとなった[11], [12]。成人の大腸がんや膠芽

腫では、統合的ゲノム・エピゲノム解析によりゲノム異常と DNA メチル化異常が協調して分子病態に関与することが示された[13], [14]。また小児腫瘍である横紋筋肉腫では DNA メチル化情報を基盤としたサブグループが見出され、これらは遺伝子異常と臨床情報と強く相関することが報告された[15]。さらにマウスを用いた実験では、胎生期に一時的に山中因子を強制発現させるとメチル化異常のみで小児のウィルムス腫瘍類似の腫瘍が発生することが証明されている[16]。すなわち、成人のみならず小児腫瘍においてもエピジェネティックな制御の破綻が分子病態に重要な影響を及ぼしている可能性が示された。

神経芽腫は、小児において白血病、脳腫瘍について頻度の高い腫瘍であり、15歳未満の小児腫瘍の8~10%を占める。1歳以下発症の神経芽腫では自然退縮することが多く、5年生存率が95%と予後の良い腫瘍であるが、発症が1歳~14歳では、5年生存率は68%となっている[17]。病理学的には、神経分化の様々な段階の腫瘍スペクトラムを示し、未熟小円形細胞腫瘍から成熟神経節細胞までを含む。生物学的特性としては、*MYCN*がん原遺伝子の増幅が神経芽腫の16~25%に認められ[18]、1番染色体短腕(1p)の欠失や17染色体番長腕(17q)の増加と関連し[19]、予後不良因子として重要である。また、11番染色体長腕(11q)の欠失は年長児でよく認められ、単独で予後不良因子とされている[20], [21]。腫瘍

細胞のテロメラーゼ活性は、*TERT* プロモーター領域のリアレンジメントと関連し、ハイリスク神経芽腫において、*MYCN* 増幅群、*ATRX* 機能喪失変異群と別のサブグループである、*TERT* リアレンジメント群に分類されるようになった[22]。

近年、次世代シーケンサーなどを用いたハイスループット解析により、神経芽腫における分子病態の解明が多数試みられている。腫瘍の発生に関与することが証明されている *ALK* の変異と増幅は神経芽腫の 7%~11%[23], [24] に報告され、また全ゲノム解析や全エクソン解析により、chromothripsis が予後不良因子であることが見出された[25]。年長児(12 歳以上)における高頻度(43.8%)の *ATRX* の nonsense 変異と欠失[26]、高リスク神経芽腫における *ARID1A* の変異と *ARID1B* の欠失[27]なども明らかになった。しかし、臨床的、病理学的、生物学的に多様性を示し、腫瘍内部においても不均一でその標的は多岐にわたるであろうことが推察される神経芽腫の分子病態の全貌はいまだに明らかにされていない。とりわけ神経芽腫の分子病態におけるエピジェネティック制御の役割は十分解明されていない。エピジェネティック制御の一つであるメチル化については、神経芽腫において個々の遺伝子におけるメチル化解析はなされているが[28]-[35]、網羅的メチル化解析は、Abe ら[36], [37]と Gomez ら[38]の報告のみである。Abe らは、MS-RDA(Methylation-sensitive representational

difference analysis)法により神経芽腫において予後と関連するメチル化異常をゲノムワイドにスクリーニングしており、*PCDHB*, *HLP*, *CYP26C1* などにおける CpG アイランドのメチル化が予後不良な症例に多く認められることを発見した。また、これらの遺伝子における CpG アイランドのメチル化は同時にみられ、CpG アイランドメチル化形質(CIMP: CpG island methylation phenotype)ともいえることを見出した。CIMP を示す症例では、*RASSF1* や *BLU* などのがん抑制遺伝子も高頻度にサイレンシングされていた。Gomez らの報告では、バイサルファイト法とマイクロアレイを用いて網羅的メチル化アレイ解析が行われており、予後不良症例と予後良好症例を比較することで、分化や神経の発達に関わる遺伝子の CpG 領域がメチル化していることを見出している。Abe らの報告や他の報告において、神経芽腫におけるメチル化遺伝子に関しては一致している遺伝子が少なく、メチル化における予後不良因子についてのコンセンサスは得られていない。

そこで本研究では、神経芽腫の分子病態にエピジェネティック制御の破綻が関与するか否かを検討し、本症の分子病態のさらなる解明を試みた。具体的には、次世代シーケンサーとアレイ解析技術を駆使して、エピジェネティック制御遺伝子の解読深度ターゲットキャプチャー、網羅的ゲノムコピー数および

メチル化解析を行い、神経芽腫におけるエピジェネティック制御の遺伝学的全体図を作成した。

## 方法

### 神経芽腫検体

エピジェネティック制御遺伝子の変異を網羅的に検索するため、ディスカバリーコホートとして神経芽腫新鮮凍結腫瘍 21 例(初発腫瘍 20 検体、再発腫瘍 3 検体、2 症例は初発、再発のペア)とそのペアとなる正常検体(末梢血もしくは転移のない骨髄血)を用い、ターゲットキャプチャー法(後述)による変異解析を行った。ゲノムコピー数解析と PCR に基づいたターゲットディープシーケンス解析は、ディスカバリーコホートに加え、バリデーションコホートとして新鮮腫瘍検体 81 例(初発腫瘍 77 検体、再発腫瘍 7 検体、初発と再発のペア 3 症例)を追加して行った(表 1)。メチル化解析は、新鮮腫瘍検体初発 44 例で施行した(表 2)。新鮮腫瘍検体は東京大学医学部附属病院、埼玉県立小児医療センター、太田総合病院附属太田西ノ内病院、慶応義塾大学病院、富山大学附属病院、島根県立医科大学病院、大阪大学医学部附属病院、長野こども病院、筑波大学附属病院、亀田総合病院を含む複数の施設から収集した。腫瘍検体における神経芽腫の診断は、光学的顕微鏡所見、免疫染色所見、遺伝子検査等を用いて、各施設にて診断もしくは中央病理診断が行われた。本研究は東京大学倫理委員会の承認を受けており(承認番号 G1598)、インフォームド・コンセントは患児が小

児であったため、保護者より文書で取得した。解析症例の一部は倫理委員会承認以前に収集され、すでに亡くなられているなど現時点で同意書の取得が困難な症例に関しては厚生省ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき連結不可能匿名化を行ったうえで解析に用いた。また、他施設から提供いただいた検体は、各施設にて倫理委員会を通していただいた。

## ターゲットキャプチャー法を用いたエピジェネティック制御遺伝子の網羅的変異解析

エピジェネティック関連遺伝子 80 個(表 3)の全エクソン 1463 個、計 0.5メガベースペアの標的領域を解析するために、標的領域に相補的な配列をもつ各々120 ベース長のベイトが領域全体を覆うように WEB 上のフリーツール SureDesign (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara CA) を用いてベイトライブラリーを設計した(図 1A:

<http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002100>)。

ターゲットキャプチャー法のサンプル調整には、メーカープロトコルに従い、腫瘍のゲノム DNA 1.5  $\mu$ g を用いて Covaris® で 150-200 ベースペアのサイズに断片化、末端修復とアダプター連結を行った後に PCR 増幅した。次に、前述の

とおり設計した SureSelect XT Reagents® (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara CA) のビオチン化 RNA ベイトライブラリーと調整したサンプルを 16 時間ハイブリダイゼーションさせ、標的領域の抽出を行った。その後、抽出した領域の増幅と、同時に各サンプルを識別するためのインデックス (バーコード) 配列を付加するための PCR を行い、サンプルをプールした (図 1B)。プールしたインデックスタグ付きサンプルは、Illumina HiSeq 2000 (Illumina, Inc. San Diego, CA) を用いてシーケンシングを行い、Genomon (<http://genomon.hgc.jp>) を用いてデータ解析を行った。体細胞変異の候補遺伝子は、Genomon によって抽出された変異リストのなかで COSMICv61 (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) に登録がなく、dbSNP131 に登録されている SNPs、変異頻度が 0.01 以下であるレアバリエントを除いた 1000genomes (<http://www.1000genomes.org>) に登録されている SNPs と東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのシーケンスデータベース内に登録されている In-house SNPs を除外した後、腫瘍のアレル頻度が 0.07 以上のアミノ酸置換をもたらす変異を対象とした。検出された変異は、腫瘍検体とペアの正常検体の DNA を両方用いて、Sanger 法もしくは、後述する PCR に基づいたターゲットディープシーケンス解析 [3] にて確認した [39] (図 2)。

## ターゲットディープシーケンス解析

ターゲットキャプチャー法を用いた変異解析で候補となった59個の変異の確認と、バリデーションコホート81例において2例以上で変異の重複があった遺伝子 (*ASH1L*, *CHD7*, *KDM5C*, *MLL*, *MLL3*, *SMARCA4*, *RBBP4*)、また神経芽腫の変異で最も頻度の高い *ALK* とエピジェネティック関連遺伝子ですでに変異の報告がある、*ARID1A*, *ARID1B*, *ATRX* の計11遺伝子の変異について、その変異頻度を検索するためにターゲットディープシーケンス解析を行った。ゲノムDNAは、REPLI-g mini kit® (QIAGEN, Inc. Valencia, CA)により増幅した後、Qubit® dsDNA BR アッセイキット (Life Technologies Corporation/Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA.) と Qubit®2.0 フルオロメーター (Invitrogen Corporation/Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA.) を用いて 25ng/ $\mu$ l に調整した。調整したゲノムDNAは、1つの変異確認に対し、0.5 $\mu$ l 使用した。また、バリデーションコホートにおける変異頻度の検出には、81検体を9 $\times$ 9検体とし、調整したゲノムDNA 9検体を一つにプール、計18個のプールDNAを用いた。(図3)。ターゲットディープシーケンスは、はじめに NotI 配列を付加したプライマーで候補遺伝子の全エクソン領域もしくは変異候補の標的領域をPCRで増幅する。PCR産物を2%アガロースゲルによる電気泳動にて

確認した後、PCR産物をプールごとにまとめ、QIAquick PCR Purification Kit® (QIAGEN, Inc. Valencia, CA) で精製。1.5  $\mu$ g の精製した DNA を Not1 制限酵素にて切断後、T4 ligase を用いて、5 時間反応させ *Not 1* 配列を介して PCR 産物を結合させた。結合してできた PCR 産物を Covaris® を用いて 200 ベースペアに断片化した後、改良を加えた Illumina 社の pair-end library プロトコールに準じて、アダプターを連結、インデックスタグを付加した PCR にて増幅後、HiSeq2000 を用いてシーケンシングを行った[3]。ターゲットディープシーケンス解析で用いたプライマーセットは、表 4 に示す。

### SNP アレイによるゲノムコピー数解析

ゲノムコピー数解析は、The GeneChip® Human Mapping 250K Nsp Array (Affymetrix, Inc. Santa Clara, CA.) もしくは、CytoScan® HD Array (Affymetrix, Inc. Santa Clara, CA.) を用いて行った。サンプル調整は、メーカープロトコールに従い、腫瘍のゲノム DNA 250ng を *Nsp I* (250K) もしくは、の制限酵素を用いて切断後、共通アダプターを付加、単一プライマーを用いて PCR を行った。PCR 生成物を DNase I を用いて断片化後、ビオチン標識されたアレイ上で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。それを洗浄した後、専用ス

キャナーで読み取りを行い、アレイデータの解析には、CNAG(copy number analysis for GeneChip) / AsCNAR ( allele-specific copy-number analysis using anonymous references)アルゴリズムを使用した[40], [41]。

## メチル化アレイ解析

網羅的メチル化アレイ解析は、The Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit (Illumina, Inc. San Diego, CA.)を使用し、44例の初発神経芽腫検体に対して行った。メーカープロトコールに従い、500ngのゲノムDNAを用いてサンプルの調製をおこなった[42], [43]。解析のために、本研究のデータに加え、正常組織のデータとして、公開データであるGEO(Genome Expression Omnibus)より、同じプラットフォームを使用したメチル化アレイのデータ(正常胎児副腎3例、正常成人副腎2例、リンパ球4例、リンパ節2例、胚性幹細胞2例、神経前駆細胞2例、人工幹細胞4例:GSE25931, GSE31848, GSE57853)をダウンロードし使用。他細胞と神経芽腫を比較することで、神経芽腫におけるメチル化の全体像を示した後、以下の操作とフィルタリングを行い、自験例における神経芽腫のメチル化プロファイルを決定した。また、解析結果の再現性を確かめるために、先行論文であるGomezらの網羅的メチル化解析の公開データ(35例の神経

芽腫検体、2例の神経節芽腫検体、2例の正常副腎、2例の胎児脳：GSE54719）

を用い、同様に解析を行った。最終的な神経芽腫のメチル化プロファイルは、

自験例と Gomez らの公開データを統合、解析することにより決定した。

神経芽腫のメチル化プロファイルを決定するために、以下の操作とフィルタリングを行った。まず、The Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit のプローブデザインのバイアスを補正するため、Beta-mixture quantile normalization を行った。480,000 を超えるプローブの中で、X もしくは Y 染色体上にあるプローブと検体の 10%以上で欠損値のあるプローブを除外、その中で “Promoter\_Associated” もしくは

“Promoter\_Associated\_Cell\_type\_specific” のアノテーションが付いているプローブと “Island” , “N\_Shore” もしくは “S\_Shore” 領域にデザインされているプローブを選択した。以上のフィルタリングの後、残ったのは 80,057 プローブであった。さらに、Bioconductor package にある PCA methods を用いてプローブの欠損値を補った。各メチル化サイトにおけるメチル化の程度は、プローブの  $\beta$  値により表され、0 が低メチル化状態を、1 が高メチル化状態を示す。

自験例データ、Gomez らの公開データにおけるメチル化プローブの  $\beta$  値を用いて、各メチル化プローブにおける MAD (median absolute deviation: 中央絶対偏差)

を計算、検体間において変動が大きいプローブ (MAD が大きな値をとるプローブ) を上位順に選択。集団における特徴が最も顕著となり、かつ安定するクラスター数を決定するのに有用であるとされる、コンセンサスクラスタリングを行った。コンセンサスクラスタリングは、無作為に 1000 回、選択されたプローブ数の 80% を抽出し、その抽出されたプローブを用いて Ward 法と Pearson 相関係数、もしくは Euclid 相関係数に基づいたアルゴリズムによる階層的クラスタリングを繰り返すことにより、初期値の検体の設定でサブグループ分類の結果が異なってしまうバイアスを減らし、クラスターを安定させる。さらに CDF (cumulative distribution function) カーブ下の領域の相対的な変化 (Relative change in area under CDF curve) が大きくなるクラスター数が、そのデータの特徴を最もよく示すと考えられており、各集団におけるメチル化アレイデータを用いて最適なクラスター数を各集団で決定した [43]。また、クラスターが安定するプローブ数を決定するために、consensus CDF と consensus matrix を用いた。自験例と Gomez の公開データを統合して解析するために、各集団で選択されたメチル化プローブのうち共通するプローブを抽出。再度コンセンサスクラスタリングを行い、最終的な神経芽腫のメチル化プロファイルを決定した。また、クラスターを分けるメチル化プローブの決定は、2 群間における  $\beta$  値を比較し、

Wilcoxon の順位和検定により 2 群間の p 値と fold change を計算、2 群間で  $\beta$  値に有意に差があるプローブを抽出した。

## 結果

### ターゲットキャプチャー法による神経芽腫のエピジェネティック制御遺伝子の変異解析データ精度

ディスカバリーコホートとして、神経芽腫新鮮腫瘍検体の初発 20 検体と、再発時腫瘍 2 検体、さらに再発時のみの 1 検体を加え計 23 検体で、ターゲットキャプチャー法によるエピジェネティック制御遺伝子の変異解析を行った。得られたシーケンスデータは、平均解読深度が 536.0x (125.4-1268x)、標的領域において 30x 以上シーケンスされた塩基の割合は 95.4% (61.2-99.7%)であった (図 4)。最も少ないデータ量であった DC004 でも、平均解読深度は 125.4x あり、全エクソン解析における一般的な平均解読深度と同程度であった。ディスカバリーコホートでの変異候補は計 67 個で、最終的に確認された変異は 31 個 (True Positive rate 0.462) であった。検体において変異が確認された割合は、平均 67.9%で、平均解読深度が最も低かった DC\_004 は、0/18 であった。初発検体での平均変異個数は 1.1 (0-3)、再発検体での平均変異個数は 4 (2-6) であった。

### ターゲットキャプチャー法で検出された神経芽腫におけるエピジェネティック制御遺伝子の変異候補遺伝子

解析した 21 例で、2 例以上の重複する腫瘍特異的変異があった遺伝子は、*ASH1L* と *CHD7* の 2 遺伝子であり、再発かつ転移巣 2 検体において認められた。また、他の腫瘍特異的変異も、この再発 2 検体に集中していた。DC004 は、初発、再発検体のペアであったが、再発でみられた腫瘍特異的変異は、初発検体では認められなかった。変異は *KDM5C*(P495S) の 1 例を除き全てヘテロであり、多くはミスセンス変異であったが、DC015 では *ASH1L* と *MLL3* の 2 つの遺伝子でナンセンス変異を認めた。腫瘍検体におけるアレル頻度は最も低いもので 10.8%であった。変異を認めた遺伝子には、*ASH1L* など symphathoadrenal 系において分化への関わりが示唆されているもの[44]、*CHD7* など CHARGE 症候群の原因遺伝子とされ神経堤細胞の遊走に関わるとされる遺伝子[45]や、血球系の幹細胞の分化に関わるとされる *MLL* 遺伝子[46]、[47]、また、*KDM5C*[48][49]などががん原遺伝子と推定されているもの含まれていた。ディスカバリーコホートにおける変異遺伝子のまとめを表 5 に示す。胚細胞における変異の病的意義については未だ定まった見解はないが、*ALK* の R1275Q 変異など腫瘍のみならず胚細胞にも生じ、病的意義をもつことが知られている変異も存在する[50]、[51]。そこで、1000genome で 1%以下のレアバリエントを含め、SIFT、Polyphen, MutationTaster で Disease causing とされている胚細胞変異もあわせて検討した。2 例以上重複した変異は、

*ASH1L*(4/21)、*ARID1B*(3/21)、*CHD7*(2/21)、*MLL3*(2/21)であり、Trithorax group (TrxG) や Switch/Sucrose non-fermentable (SWI/SNF) 複合体に属していた(表 6)。腫瘍特異的遺伝子、もしくは胚細胞変異も合わせて 2 例以上で変異のあった遺伝子(*ASH1L*, *CHD7*, *KDM5C*, *MLL*, *MLL3*, *SMARCA4*, *RBBP4*)を候補遺伝子とし、バリデーションコホートを用いて、変異解析を追加した。

#### SNP アレイによるゲノムコピー数解析

神経芽腫においては、すでに述べたように 1p、11q の欠失、17q の増加と *MYCN* の増幅が、予後因子としてよく知られており、サブグループを分類する上で重要な指標である。バリデーションコホートにおける生物学的特性を明らかにするため、SNP アレイを用いたゲノムコピー数解析を 102 症例(初発 77 検体、再発 7 検体、初発と再発のペア 3 検体)で行った。結果は、*MYCN* 増幅 26/102 (25.5%)、1p 欠失 22/102 (21.6%)、11q 欠失 29/102 (28.4%)、17q 増加 81/102 (79.4%)であった。エピジェネティック制御遺伝子の中で、SNP アレイ解析でホモ欠失を認めたのは、*ATRX* のみで 5 例(4.9%)であった(図 6)。ハプロ不全でも細胞の増殖に関連するとされる、*MLL3*、*ARID1A* に関しては、*MLL3* ではコピー数の低下はなし、*ARID1A* では 18/102 (17.6%)でゲノムコピー数の低下を認めた(図 6)。

## ターゲットディープシーケンスを用いた候補遺伝子の解析

ディスカバリーコホートにおいて検出された 2 例以上で変異が重複している遺伝子 (*ASH1L*, *CHD7*, *KDM5C*, *MLL*, *MLL3*, *SMARCA4*, *RBBP4*) と神経芽腫で最も頻度の高い *ALK*、またエピジェネティック関連遺伝子ですでに変異の報告がある遺伝子 (*ARID1A*, *ARID1B*, *ATRX*) の計 11 遺伝子について、変異頻度と相互関係を調べるために、バリデーションコホートとして 81 症例 (初発 77 検体、再発 7 検体、初発と再発のペア 3 検体) (表 1) を加え、計 102 例における候補遺伝子の変異解析を行った。一部の検体は、正常検体が得られなかったため、アレル頻度が 0.474 から 0.526 の変異を胚細胞変異 (probably germline mutations) と定義した。これは、変異確認のシーケンスの平均解読深度は 2000x をこえているため、胚細胞変異の真のアレル頻度である 0.5 が、99% の確率で入る範囲を規定し、定義づけた [52]。変異の頻度が最も高かったのは、*ALK* と *ARID1B* であり、8/102 (7.8%) で認められた。*CHD7* は変異を認めたのは 4/102 (3.9%) であったが、全て腫瘍特異的変異と推定され、神経芽腫では報告のない新規の変異であった。全症例における 11 遺伝子の変異頻度のまとめを表 8、各遺伝子における変異の位置を図 5 に示す。

## エピジェネティック制御遺伝子の異常とゲノムコピー数変化、臨床情報との関連

次に、エピジェネティック制御遺伝子の異常と神経芽腫関連遺伝子の変異およびゲノムコピー数変化や臨床情報との関連性を検討した。また、エピジェネティック制御遺伝子の変異の他に、SNP アレイで認められた *ATRX* のホモ欠失、*ARID1A* のヘテロ欠失など腫瘍化に影響があると考えられるゲノムコピー数の変化も合わせて解析した(図 6)。エピジェネティック制御遺伝子異常は、全体の 40/102 (39.2%) で検出され、特に SWI/SNF グループでは排他的に生じていた。エピジェネティック制御異常群とその他の群で予後因子を比較すると、*MYCN* 増幅や Stage4 症例、1p 欠失の割合が有意に多く(表 9)、発症年齢も高かった(図 7A)。11q 欠失や 17q 増加、転移巣における変異の割合に有意差は認めなかった。エピジェネティック制御異常群とその他の群での 5 年 EFS (Event Free Survival) を Kaplan-Meier 法にて算出し、log-rank 検定を行ったところ、エピジェネティック制御異常群で有意に予後不良であった ( $P < 0.001$ ) (図 7B)。Stage4 の症例のみでは、2 群間に予後の差はなかった。*MYCN* 増幅例のみや Stage4 を除いた症例においては、両群における検体数が十分でないため、予後に関する信頼しうる結果は得られなかった。

## 神経芽腫における網羅的メチル化解析

神経芽腫の分子病態におけるメチル化の影響について解析するために、神経芽腫初発 44 例について網羅的メチル化解析を行った。神経芽腫検体には様々な割合で正常組織が混入しており、それが腫瘍のメチル化解析結果に影響を与えている可能性があると思われたため、公開データである GEO (Genome Expression Omnibus) から正常副腎 (成人と胎児)、リンパ球 (リンパ球とリンパ節)、また、神経芽腫の幼若性も考え、胚性幹細胞細胞 (ES)、神経前駆細胞 (NPC)、人工幹細胞細胞 (iPS) (同一人物からの培養) も加えてデータ解析を行った。はじめに神経芽腫検体と、各正常組織におけるプロモーター領域の全体的なメチル化の状態を、各組織 (神経芽腫、正常副腎、正常リンパ節、幹細胞) におけるメチル化サイトプローブの  $\beta$  値の中央値と、中央絶対偏差 (MAD) を用いて検討した。各組織におけるプロモーター領域のメチル化サイトプローブは 94,797 プローブ存在し、各々のプローブに対する組織における  $\beta$  値の中央値を密度プロットで示すと peak は 0 に近く、非メチル化状態のプローブが多数をしめていると考えられた。またこれらメチル化サイト 94,797 プローブのうち 82,115 プローブはどの組織においても MAD が 0.05 以下であり、プロモーター領域における多くのプロ

プローブはどの組織においても同様、かつ非メチル化状態であると考えられた (data not shown)。エピジェネティック制御遺伝子の変異解析から、エピジェネティック制御遺伝子の異常は病期 4 に多かったため、病期ごとと各正常組織における  $\beta$  値を比較した (図 8A)。また各群におけるメチル化プローブの  $\beta$  値の分布は、密度プロットで示した (図 8B)。図 8A では、各検体におけるプローブ状態の代表値を  $\beta$  値の中央値とし、黒点で示した。幹細胞群は、他群よりも各検体における  $\beta$  値の中央値が高く、メチル化状態のプローブの頻度が高いと考えられた。神経芽腫では、病期 3 において正常副腎よりも非メチル化状態にあるプローブの頻度が高い検体が多いと考えられた。各群のメチル化プローブサイトにおける  $\beta$  値の分布を密度プロット (図 8B) でみると、幹細胞群以外の神経芽腫、正常副腎、正常リンパ節で  $\beta$  値が 0 に近い値である非メチル化状態のプローブの頻度が高かった。特に神経芽腫群ではステージにかかわらず、正常副腎よりも非メチル化状態のプローブの頻度が高いことが示された (図 8B)。一方、CpG 領域のメチル化は、成人のがんにおいて、一部の特徴づけられたサブグループに存在し [12]、神経芽腫でも CIMP に *MYCN* 増幅症例が多く、予後不良とされている [36]。そこでプロモーター領域のプローブを CpG island 領域と非 CpG island 領域にわけ、ステージごとに同様に比較をした (図 9 A、B)。図 9 A に示される

ように CpG island 領域では、幹細胞群でメチル化しているプローブの頻度が高い検体が多かったが、神経芽腫群のなかでは、病期 4 の症例群が病期 1 の症例群に対して有意にメチル化プローブの頻度が高い検体が多かった。病期 4 の中には、幹細胞と同様にメチル化プローブの頻度が高い症例も、病期 1 同様に非メチル化プローブの頻度が高い症例も含んでおり、多様性を持っていた。図 9 B に示す、非 CpG island 領域では、病期 4 と病期 3 が正常副腎よりも有意に非メチル化プローブの頻度が高い傾向にあったが、各病期におけるメチル化症例は、同じような範囲(0-0.5)に存在し病期による差異は認められなかった。以上より、神経芽腫における CpG island 領域のメチル化は、非 CpG island 領域よりも予後や進展に関わる可能性が示唆され、かつ多様性を示すことから神経芽腫のメチル化プロファイルに有用であると考え、神経芽腫と正常副腎組織のプロモーター領域にある CpG island 領域のプローブを選択、コンセンサスクラスタリングを行い、神経芽腫における特徴的なクラスターの抽出を試みた。自験例の初発神経芽腫 44 検体と公開データである副腎 5 例を用いた結果、図 10 B に示されるように K=3 において、CDF(cumulative distribution function)カーブ下の面積の相対的変化が大きくなっており、クラスターを 3 群にわけることが、この集団の特徴を最も顕著に示すと考えられた。また、クラスター検定を繰り返

してもクラスター内の検体が入れ変わらない確率が高いとクラスターは濃い青で表されが、図 10 C では、K=3 におけるクラスターは濃い青で表されており、クラスターが安定していることが示された。以上より自験例のメチル化解析のデータからは、3 群に分類することが最適であると考えられた。次にメチル化クラスターのヒートマップと臨床情報、遺伝子変異、コピー数変化を統合した図を図 10 D に示す。図 10 D におけるメチル化のヒートマップに注目すると、コンセンサスクラスタリングにより決定した Methyl1 群は、青色で示される非メチル化プローブの割合が高く、正常副腎群と似たメチル化パターンであり、Adrenal-like 群とした。Methyl2 群は、黄色で示されるメチル化プローブの割合が高く、Hyper-methylated 群と定義した。Methyl3 群は、その中間であり、Intermediate-methylated 群とした。神経芽腫における 3 群間の臨床情報に着目すると(表 10)、Hyper-methylated 群は、全例が病期 4 であった。また、他の群と比較して 1p 欠失、17q 増加の症例の割合が高かった( $p < 0.01$ )。エピジェネティック異常群は、Hyper-methylated 群で頻度が高い傾向があったが、カイ二乗検定では有意差は認めなかった。予後良好因子とされる 18 か月以下、かつ *MYCN* 増幅のない Hyperploidy の症例は、Intermediate-methylated 群に集中していた。その他、11q 欠失、*ALK* 変異の頻度は、3 群間で有意差を認めなかった。メチル

化による3群と神経芽腫の臨床像、分子生物学的特徴についてのまとめを表10に示す。

3群間の年齢分布は、Mann-Whitney法を用いて算出したところ、Hyper-methylated群症例は有意に年齢が高かった(図11A)。また、5年EFSは、Log-rank法にて(図11B) Intermediated-methylated群が予後良好な傾向にあったものの有意差はなかった( $P=0.058$ )。

次に、同じプラットフォームでメチル化の解析を行っている、Gomezらの公開データ(神経芽腫35例と対照として正常副腎2例、胎児脳組織2例と予後良好な神経節芽腫2例を含めた計41検体)を用い、自験例と同じアルゴリズムで再解析を行った(図12 A, B, C, D)。図12 Bより $K=3$ が最適なクラスター数と考えられた。図12 Dのメチル化ヒートマップに注目すると、Methyl 1群は、副腎正常組織や胎児脳組織が含まれ、Adrenal-like群と定義。Methyl 3は他群と比較して黄色で示されるメチル化プローブを多く含んでおり、Hyper-methylated群、Methyl 2群は Intermediate-methylated群と定義した。自験例では、Adrenal-like群に13例含まれ、そのうちMYCN増幅症例は7例含まれていたが、Gomezらのデータでは、MYCN増幅のない一例のみがAdrenal-like群に含まれているのみであった。Gomezらのデータでは、MYCN増幅症例は、明らかに

Hyper-methylated 群 (Methyl 3 群) に、18 か月以下の症例は、  
Intermediated-methylated 群 (Methyl 2 群) に集中していたが、その他の臨床情  
報では有意差はなかった (表 11)。

自験例と Gomez らの公開データを利用したメチル化解析を比較すると、  
Hyper-methylated 群で *MYCN* 増幅例が多いこと、Intermediate-methylated 群で  
18 ヶ月以下などの予後良好因子を持つ症例が多いことは共通したが、  
Adrenal-like 群に含まれる症例数やその臨床像は大きく異なっていた。固形腫  
瘍検体は、しばしばリンパ球を含み、正常組織の混在による腫瘍含有量の低下  
が結果に影響することが危惧される。そこで、公開データから取得したリンパ  
球のメチル化データから自験例で使用したメチル化プローブを抽出、自験例と  
統合することでリンパ球の及ぼす影響についても検討した。図 13 B に提示され  
るように、コンセンサスクラスタリングにより 4 群に分類された。図 13 D に示  
されるように、リンパ球を含まないデータでは Adrenal-like 群に分類されてい  
た 2 症例は、Lymphocyte-like 群に分類された。この 2 例は、コピー数変化も乏  
しく、メチル化パターンもリンパ球に酷似していることから、リンパ球正常組  
織の混入がかなり存在すると考えられた。また、Adrenal-like 群に分類されて  
いた 3 例は、Hyper-methylated 群に含まれた。

次に、検体選択のバイアスを減じ、また各集団におけるメチル化のプロファイルが偶然でないことを示すために自験例と Gomez らの公開データを統合し、解析を行った。両解析で使用した共通するメチル化プローブを抽出、コンセンサスクラスタリングを行った結果を提示する(図 14 A, B, C, D)。図 14 D のメチル化ヒートマップより、Methyl1 群は、副腎やリンパ球などの正常組織が含まれるため、Normal-like 群と定義、Methyl2 群を図 14-D のヒートマップにおいて黄色で示される高メチル化プローブが多く含まれることから Hyper-methylated 群、Methyl3 群を Intermediate-methylated 群と定義した。Methyltype\_M は、自験例におけるメチル化解析結果を、MethylType\_G は Gomez らの公開データの結果を示しているが、データを統合しても各実験におけるクラスター分類はほぼ再現されていた。自験例において Hyper-methylated 群に分類されていた 4 例が Intermediate-methylated 群に、Intermediate-methylated 群に分類されていた 1 例は Normal-like 群に分類され、自験例においてクラスター間における移動(クラスターの動揺)が多く認められた。Hyper-methylated 群は、MYCN 増幅があるか年長児かつ進行病期 (INSS 3 or 4) の症例で構成されていた (図 14 D)。クラスターごとの臨床像についてまとめたものを図 15、表 12 に示す。5 年再発率を Kaplan-Meier 法にて算出すると Hyper-methylated 群は予後不良であった

(図 15C)。予後の差は *MYCN* 増幅の影響によると考えられたため、*MYCN* 非増幅例かつ年長児の集団で、Hyper-methylated 群と Intermediate-methylated 群のメチル化クラスターの差による予後を比較したが、各集団に 10 例と少数であり、再発率も生存率も有意差は認めなかった (Data not shown)。Intermediate-methylated 群と Normal-like 群は、どちらも 18 ヶ月以下の若年発症例が多く、病期の割合も似ており (図 15A, B) 臨床的な差異は今回の解析では認められなかった。

次に、統合したデータにおいて、正常副腎組織と、Hyper-methylated 群の 2 群を分類する因子となるメチル化プローブを抽出するために、2 群におけるメチル化プローブの比較を Wilcoxon の順位和検定を用いて行った。検出された結果に対し、 $p\text{-value} < 0.001$ 、 $\text{fold change} > 2$  かつ 2 つ以上のプローブを有する遺伝子を有意とした。高メチル化している遺伝子として、既知の *RASSF1* に加え、*CYTH2*、*GRIN1* など RAS パスウェイに関わる遺伝子や、*ACP5*、*C6orf150*、*EPST11* などインターフェロンの応答や免疫に関わると考えられる遺伝子、また胃がんで高メチル化が報告されておりアポトーシスに関わるとされる *TMEM106A* などが抽出された (表 13)。予後に有意差のあった、Hyper-methylated 群と Intermediate-methylated 群では、2 群を分類するメチル化プローブは、正常副

腎組織と差があったプローブのうち、*ACP5*、*C6orf150*、*EPST11* などインターフェロンの応答や免疫に関わると考えられる遺伝子が抽出された。正常副腎組織では、相対的に *IL17C* の高メチル化が認められた。高メチル化を示した遺伝子名と染色体位置、機能についてまとめたものを表 13 に示す。

## 考察

エピジェネティック制御遺伝子の変異解析では、神経芽腫において、10%以下のマイナークローンも含めても重複する変異の頻度は低い傾向が認められた。小児固形腫瘍におけるエピジェネティック制御遺伝子 622 個を全エクソン解析と本研究と同様のターゲットキャプチャー法によって解析した先行論文では、神経芽腫 117 検体において 3 検体以上で重複する遺伝子は、*KDM5C*(3/117:2.56%) と *ATRX*(5/117:4.28%)のみであった[53]。2 個以上重複する遺伝子も 12/622 個と少数であり、本研究と同様に変異頻度の高い遺伝子は認めなかった。これらの結果より、エピジェネティック制御遺伝子の変異は、神経芽腫の一部の分子病態に関与している可能性が考えられた。本研究では、3 検体以上で重複する腫瘍特異的変異を認めた遺伝子は、*ARID1B*(4/102:3.92%)、*CHD7*(4/102:3.92%)、*MLL3*(3/102:2.94%)、*KDM5C*(3/102:2.94%)の 4 遺伝子であり先行論文よりもやや多かったが、これは、変異確認のための方法として、PCR に基づいたディープターゲット法を用いており、サンガーシーケンス法で視認できない変異を全リード数と変異リード数による客観的な数値として検出することが可能であったためと考えられた。

本研究では、変異は SWI/SNF グループを筆頭に転写を活性化させる遺伝子グル

ープに集中していた。SWI/SNF グループにおける異常は、神経芽腫においては、年長児における *ATRX* の機能喪失型の遺伝子変異[25], [26]や、高リスク群の *ARID1A+ARID1B* の変異[27]などが知られているが、その他に予後不良な小児固形がんとして知られる悪性ラブドイド腫瘍の35%に *SMARCB1* の機能喪失型の胚細胞変異が[54]、75%に腫瘍特異的変異の報告がある[55]。多くの成人がん、特にホルモンレセプター系のがんである、卵巣がん、膀胱がん、胃がん、肝細胞癌にも高い頻度で *ARID1A* の変異が生じることが知られており[56]、その他のSWI/SNF複合体のサブユニットも、がんの発生に深く関わる遺伝子群として注目され、特定の組織では特定のサブユニットが組織特異的に発がんを抑制していると考えられている[57]。*SMARCA2* もしくは *SMARCA4* は、SWI/SNF 複合体の中で neural progenitor cell の転写を制御する、neural progenitor BAF の中心的な構成遺伝子であり、そこに *SMARCC1* と、*ARID1A* もしくは *ARID1B* がサブユニットとして加わって複合体を形成している[58]。その他、分化した neural cell の転写を制御する neuron BAF は、やはり *SMARCA2* もしくは *SMARCA4* を中心に *ARID1A*、*ARID1B* の両方または *ARID2* をサブユニットとして複合体を形成する。本研究においても、*ARID1A*, *ARID1B*, *ATRX* の他に、頻度は低いものの neural progenitor SWI/SNF 複合体の中心的となる *SMARCA2*、*SMARCA4* とそのサブユニットである

*SMARCC1* に変異があり、さらに neurons BAF のサブユニットである *ARID2* にも変異は排他的に生じていた (図 11)。従って、神経芽腫の分子病態に頻度は低いものの SWI/SNF 複合体の機能異常が関与している可能性が示唆された。また、SWI/SNF 複合体のサブユニットである *ARID1A* は、神経芽腫において 1p の共通欠失領域 1p36 [20], [59], [60] 近傍に存在している。*ARID1A* の変異は、卵巣がん、胃がん、膀胱がん、肝細胞癌など、多くの成人がんで認められており、その変異はヘテロミスセンス変異であるにもかかわらず、*ARID1A* の発現は低下していることが多い。また類内膜がんでは *ARID1A* の発現の低下が認められる 5% の検体に変異なしのヘテロ接合体との報告がある [56]。マウスの実験では *ARID1A* のヘテロ接合体では、胎児期の死亡が確認されており、生物学的には *ARID1A* の単一アレルは、ハプロ不全の効果があることが示唆されている [61]。

*ATRX* のホモ欠失、*ARID1A* のヘテロ接合体とエピジェネティック制御遺伝子の変異症例をあわせると自験例の 32/102 (31.4%) 例で異常が生じていることから、これまでの報告 [26], [27] と同様に、この経路が神経芽腫においても重要な役割をはたしている可能性が示唆された。本研究では、ターゲットキャプチャー法の限界である 120bp 以上のゲノム欠失は捉えられないため、*ATRX* や *ARID1B* に生じる 200bp 以上の欠失がある場合 [25], [27] には、検出された遺伝子異常の

頻度は、実際はより低い可能性がある。現在のハイスループット解析をもってしても小児固形腫瘍のゲノム異常がみつからないのは、解析手法の限界によりこのような欠失領域を十分検出できていないことが一因であると推察された。

また、エピジェネティック制御遺伝子異常とゲノムコピー数異常、臨床情報との関連性を示したランドスケープでは、エピジェネティック異常が *MYCN* 増幅を伴うことが多く、進行病期で発症年齢が高い症例に生じており、予後が悪いことが示された。病期 4 のみでエピジェネティック異常群と異常なし群を比較すると予後に差は出ないが、病期 4 以外に注目すると、エピジェネティック異常群でやや再発率が高かったことよりエピジェネティック制御遺伝子の異常は、それだけでは予後因子とはならないが、病勢の進行に影響を及ぼしている可能性は否定できない。また、病期 4 の患者のうちエピジェネティック制御の破綻が病因に関与している例においては、分子標的薬が治療選択となる可能性が示唆された。

近年、胎児期の一時的な山中因子の発現により細胞に異常なメチル化がおこることで、ウィルムス類似腫瘍が発生することが報告され [16]、小児腫瘍においてもがん化にメチル化が関与していることが示唆されている。そのため、本解析では、神経芽腫検体と正常対照群(副腎、リンパ球)に加え、胚性幹細胞の

メチル化プローブも含めて解析を試みた。メチル化プローブは、プロモーター領域、プロモーター関連領域のみを抜き出して神経芽腫を分類する最も分散の大きなプローブを選択しているが、胚性幹細胞を含めた神経前駆細胞、人工多能性幹細胞群は神経芽腫群に比較して、選択されたプローブが高メチル化状態のプローブの頻度が高く、神経芽腫は、幹細胞とは異なったメチル化パターンであることが推察された。選択されたプローブを CpG island 領域とそれ以外に分けると、CpG island 領域では、病期間における差が大きく、その他の領域では、正常副腎組織が神経芽腫に対しメチル化しているプローブの頻度が高かった。CpG island 以外のプロモーター領域では、組織特異的に DNA のメチル化が消失しているとされることから [62]、選択されたプローブは副腎に特異的なプローブであると考えられ、正常副腎に対し、神経芽腫では、組織特異的なプローブに関して低メチル化の異常が生じていると考えられた。神経芽腫のメチル化解析に関しては、成人がんで高メチル化が報告されているがん関連遺伝子を選択的に解析した報告がほとんどであり [28]-[29], [34], [36]-[37], [63]-[66]、本研究のように患者検体を用いて網羅的にメチル化解析を行った報告は少ない [36], [67]。従って、これまで神経芽腫におけるメチル化の全体図は明らかになっていなかった。成人のがんでは CpG island に高メチル化がある CIMP

が予後不良とされているが、どの遺伝子を CIMP 選択の基準とするかは、がんにより別々に定義されている[68]-[70]。Abe らは、神経芽腫においては *PCDHB* 遺伝子群が CIMP と関連していると定義付け、神経芽腫における CIMP は *MYCN* 増幅と関連があり予後不良因子であるとしたが[36]、本研究でも Abe らの報告にあるように CpG island 領域が高メチル化している Hyper-methylated 群は *MYCN* 増幅症例が多く、予後不良な傾向があった。また CIMP は、*MYCN* 増幅群のみならず病期 4 かつ年長児、エピジェネティック制御遺伝子の異常がある症例群であることが新たに明らかになった。

自験例と Gomez らのデータの検体を比較すると、*MYCN* 増幅症例が hyper-methylated 群である CIMP に分類されたこと、Adrenal-like 群に神経芽腫症例が含まれたこと、低年齢かつ hyperploidy の予後良好症例群が Intermediate-methylated 群に分類されたことなど類似した解析結果が得られ、神経芽腫におけるメチル化プロファイルが明らかとなった。リンパ球も加えた自験例の再解析では、Adrenal-like 群の 2 例がリンパ球のメチル化パターンと酷似しており腫瘍含有量が低いことより、Adrenal-like 群に分類された検体の中に腫瘍含有量が少ない検体が含まれることが示唆された。同じく Adrenal-like 群であった 2 例が Hyper-methylated 群に分類され、選択する検体

により集団のクラスター分類が異なってしまうことから、背景である副腎、神経組織の混入により神経芽腫組織の特徴的なメチル化が顕著でない症例が存在すること、また自験例では病期 4 の割合が高く選択する検体に偏りがあることでメチル化分類が異なってしまう可能性が考えられた。

統合したメチル化解析においても各集団における解析結果とほぼ一致しており、Normal-like 群に関しては正常組織の混入や選択する検体の偏りは否定出来ないが、神経芽腫にはメチル化異常を伴わないサブグループが存在すると考えられた。メチル化異常を伴わない Normal-like 群は、18 ヶ月以下の若い症例が多く含まれ、Hyper-methylated 群は *MYCN* 増幅もしくは年長児かつ進行病期であることから、神経芽腫におけるメチル化は、*MYCN* 増幅と年齢による影響が大きいことが改めて示された。

多くの論文で、神経芽腫と正常を分類するメチル化の遺伝子は報告されているが[31], [36], [67]、発現と相関するものは少ない。Abe らの報告でも *PCDHB* 遺伝子のメチル化が必ずしも発現と相関していたわけではなかった[36]。高メチル化遺伝子で発現と相関があり、かつ予後因子として矛盾のないものは *KRT19*、*PRKCDBP* などが報告されている[32], [36]-[37], [65]。本研究では、検体の制限によりメチル化と発現の関係を示せなかったが、正常副腎組織と比較して

Hyper-methylated 群では、既知の RAS パスウェイに加え、免疫応答、アポトーシスに関する遺伝子が高メチル化していた。また、予後に有意差のあった、intermediate-methylated 群と hyper-methylated 群を分ける遺伝子は、正常副腎組織とメチル化に差のあった遺伝子プローブのなかで、*ACP5*、*C6orf150*、*EPST1* など免疫応答に関わる遺伝子が特にメチル化していた。今後症例数を増やし、メチル化と遺伝子発現との関連、予後不良である Hyper-methylated 群で高メチル化している遺伝子がバイオマーカーとして使用可能か否か、また *MYCN* 増幅がある予後不良群のなかでも特に Hyper-methylated 群に含まれる症例が、より予後の悪いサブグループを形成するのかなどを検討する必要があると考えられた。

## 結論

エピジェネティック制御遺伝子の変異解析と SNP アレイ解析を組み合わせることにより、神経芽腫においてエピジェネティック制御遺伝子の異常が、SWI/SNF 複合体に集中しており、この複合体が重要である可能性が示唆された。また、エピジェネティック制御関連遺伝子異常は、病期 4 や再発例、年長児に随伴しており、この異常が腫瘍の悪性化に関与している可能性が示唆された。

網羅的メチル化解析の結果、神経芽腫においてはメチル化パターンの違いにより 3 つのサブグループが存在することが明らかとなり、それぞれの遺伝学的特性と臨床的な特徴を見出した。*MYCN* 増幅を伴う、もしくは年長児かつ進行病期である神経芽腫は、Hyper-methylated 群に分類され、免疫応答に関する遺伝子群の高メチル化を検出した。

## 謝辞

本研究の全般について直接ご指導いただいた、東京大学小児科 滝田順子准教授、京都大学腫瘍生物学 小川誠司教授、群馬県赤十字血液センター 林泰秀所長、東京大学小児科 加藤元博前講師、樋渡光輝講師、東京大学小児外科 岩中督前教授および小室広昭前准教授、藤代準准教授に心より深謝申し上げます。次世代シーケンサーデータ解析でご指導いただいた東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センターゲノムデータベース分野・DNA 情報解析分野 宮野悟教授、メチル化解析でご指導いただいた東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野 油谷浩幸教授、神経芽腫検体を多数提供いただいた埼玉県立小児医療センター血液腫瘍科 花田良二副病院長に深く感謝致します。また、本研究室実験助手、松村雅世氏、星野直幸氏、殷毅氏、斎藤文江氏、森有加氏、溝田紀子氏には優れた実験技術をもってサポートいただき、深く感謝致します。

## 参考文献

- [1] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. a Evans, R. a Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. M. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. a McKusick, N. Zinder, a J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, a Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, a Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, a E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. a Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, a K. Naik, V. a Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, a Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, a Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, a Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, a Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, a Carver, a Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, a Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, a Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech,

G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. H. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigó, M. J. Campbell, K. V Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, a Narechania, K. Diemer, a Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, a Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, a Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, a Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, a Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, a Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, a Xia, a Zandieh, and X. Zhu, “The sequence of the human genome.,” *Science (80-. )*., vol. 291, no. 5507, pp. 1304-51, 2001.

- [2] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, a Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, a Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, a Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, a Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, a Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, a Hunt, M. Jones, C. Lloyd, a McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, a Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. a Marra, E. R. Mardis, L. a Fulton, a T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, a Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins,

E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, a Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. a Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, a Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, a Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, a Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, a Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, a Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. a Federspiel, a P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V Olson, R. Kaul, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. a Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. a Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blöcker, K. Hornischer, G. Nordsieck, R. Agarwala, L. Aravind, J. a Bailey, a Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. a Jones, S. Kasif, a Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, a McLysaght, T. Mikkelsen, J. V Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, a F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, a Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, a Felsenfeld, K. a Wetterstrand, a Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y. J. Chen, and J. Szustakowki, "Initial sequencing and analysis of the human genome.," *Nature*, vol. 409, no. 6822, pp. 860-921, 2001.

- [3] T. Sjöblom, S. Jones, L. D. Wood, D. W. Parsons, J. Lin, T. D. Barber, D. Mandelker, R. J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S. D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J. K. V Willson, A. F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B. H. Park, K. E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, and V. E. Velculescu, “The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers,” *Sci.*, vol. 314, no. 5797, pp. 268-274, Oct. 2006.
- [4] C. Curtis, S. P. Shah, S.-F. Chin, G. Turashvili, O. M. Rueda, M. J. Dunning, D. Speed, A. G. Lynch, S. Samarajiwa, Y. Yuan, S. Graf, G. Ha, G. Haffari, A. Bashashati, R. Russell, S. McKinney, A. Langerod, A. Green, E. Provenzano, G. Wishart, S. Pinder, P. Watson, F. Markowitz, L. Murphy, I. Ellis, A. Purushotham, A.-L. Borresen-Dale, J. D. Brenton, S. Tavaré, C. Caldas, and S. Aparicio, “The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups,” *Nature*, vol. 486, no. 7403, pp. 346-352, Jun. 2012.
- [5] I. Issaeva, “Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, pp. 1889-1903, 2007.
- [6] C. G. Mullighan, J. Zhang, R. C. Harvey, J. R. Collins-Underwood, B. A. Schulman, L. A. Phillips, S. K. Tasian, M. L. Loh, X. Su, W. Liu, M. Devidas, S. R. Atlas, I.-M. Chen, R. J. Clifford, D. S. Gerhard, W. L. Carroll, G. H. Reaman, M. Smith, J. R. Downing, S. P. Hunger, and C. L. Willman, “JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 23, pp. 9414-9418, Jun. 2009.
- [7] A. L. Walz, A. Ooms, S. Gadd, D. S. Gerhard, M. A. Smith, J. M. Guidry Auvil, D. Meerzaman, Q.-R. Chen, C. H. Hsu, C. Yan, C. Nguyen, Y. Hu, R. Bowlby, D. Brooks, Y. Ma, A. J. Mungall, R. A. Moore, J. Schein, M. A. Marra, V. Huff, J. S. Dome, Y.-Y. Chi, C. G. Mullighan, J. Ma, D. A. Wheeler, O. A. Hampton, N. Jafari, N. Ross, J. M. Gastier-Foster, and E. J. Perlman, “Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX

- Homeodomain Mutations in Favorable Histology Wilms Tumors,” *Cancer Cell*, vol. 27, no. 2, pp. 286-297, Oct. 2015.
- [8] T. J. Pugh, O. Morozova, E. F. Attiyeh, S. Asgharzadeh, J. S. Wei, D. Auclair, S. L. Carter, K. Cibulskis, M. Hanna, A. Kiezun, J. Kim, M. S. Lawrence, L. Lichtenstein, A. McKenna, C. S. Peadarallu, A. H. Ramos, E. Shefler, A. Sivachenko, C. Sougnez, C. Stewart, A. Ally, I. Birol, R. Chiu, R. D. Corbett, M. Hirst, S. D. Jackman, B. Kamoh, A. H. Khodabakshi, M. Krzywinski, A. Lo, R. a Moore, K. L. Mungall, J. Qian, A. Tam, N. Thiessen, Y. Zhao, K. a Cole, M. Diamond, S. J. Diskin, Y. P. Mosse, A. C. Wood, L. Ji, R. Sposto, T. Badgett, W. B. London, Y. Moyer, J. M. Gastier-Foster, M. a Smith, J. M. Guidry Auvil, D. S. Gerhard, M. D. Hogarty, S. J. M. Jones, E. S. Lander, S. B. Gabriel, G. Getz, R. C. Seeger, J. Khan, M. a Marra, M. Meyerson, and J. M. Maris, “The genetic landscape of high-risk neuroblastoma.,” *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 3, pp. 279-84, Mar. 2013.
- [9] S. L. Gooskens, S. Gadd, J. M. Guidry Auvil, D. S. Gerhard, J. Khan, R. Patidar, D. Meerzaman, Q.-R. Chen, C. H. Hsu, C. Yan, C. Nguyen, Y. Hu, C. G. Mullighan, J. Ma, L. J. Jennings, R. R. de Krijge, M. M. van den Heuvel-Eibrink, M. A. Smith, N. Ross, J. M. Gastier-Foster, and E. J. Perlman, “TCF21 hypermethylation in genetically quiescent clear cell sarcoma of the kidney,” *Oncotarget; Vol 6, No 18*, 2015.
- [10] K. G. Roberts, Y. Li, D. Payne-Turner, R. C. Harvey, Y.-L. Yang, D. Pei, K. McCastlain, L. Ding, C. Lu, G. Song, J. Ma, J. Becksfort, M. Rusch, S.-C. Chen, J. Easton, J. Cheng, K. Boggs, N. Santiago-Morales, I. Iacobucci, R. S. Fulton, J. Wen, M. Valentine, C. Cheng, S. W. Paugh, M. Devidas, I.-M. Chen, S. Reshmi, A. Smith, E. Hedlund, P. Gupta, P. Nagahawatte, G. Wu, X. Chen, D. Yergeau, B. Vadodaria, H. Mulder, N. J. Winick, E. C. Larsen, W. L. Carroll, N. A. Heerema, A. J. Carroll, G. Grayson, S. K. Tasian, A. S. Moore, F. Keller, M. Frei-Jones, J. A. Whitlock, E. A. Raetz, D. L. White, T. P. Hughes, J. M. Guidry Auvil, M. A. Smith, G. Marcucci, C. D. Bloomfield, K. Mrózek, J. Kohlschmidt, W. Stock, S. M. Kornblau, M. Konopleva, E. Paietta, C.-H. Pui, S. Jeha,

- M. V Relling, W. E. Evans, D. S. Gerhard, J. M. Gastier-Foster, E. Mardis, R. K. Wilson, M. L. Loh, J. R. Downing, S. P. Hunger, C. L. Willman, J. Zhang, and C. G. Mullighan, “Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 371, no. 11, pp. 1005-1015, Sep. 2014.
- [11] P. A. Jones and S. B. Baylin, “The epigenomics of cancer.,” *Cell*, vol. 128, no. 4, pp. 683-92, Feb. 2007.
- [12] L. A. E. Hughes, V. Melotte, J. de Schrijver, M. de Maat, V. T. H. B. M. Smit, J. V. M. G. Bovée, P. J. French, P. A. van den Brandt, L. J. Schouten, T. de Meyer, W. van Criekinge, N. Ahuja, J. G. Herman, M. P. Weijnenberg, and M. van Engeland, “The CpG Island Methylator Phenotype: What’ s in a Name?,” *Cancer Res.* , vol. 73 , no. 19 , pp. 5858-5868, Oct. 2013.
- [13] J. M. Rumbajan, T. Maeda, R. Souzaki, K. Mitsui, K. Higashimoto, K. Nakabayashi, H. Yatsuki, K. Nishioka, R. Harada, S. Aoki, K. Kohashi, Y. Oda, K. Hata, T. Saji, T. Taguchi, T. Tajiri, H. Soejima, and K. Joh, “Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma.,” *BMC Cancer*, vol. 13, no. 608, pp. 1-11, 2013.
- [14] D. Sturm, H. Witt, V. Hovestadt, D.-A. Khuong-Quang, D. T. W. Jones, C. Konermann, E. Pfaff, M. Tönjes, M. Sill, S. Bender, M. Kool, M. Zapatka, N. Becker, M. Zucknick, T. Hielscher, X.-Y. Liu, A. M. Fontebasso, M. Ryzhova, S. Albrecht, K. Jacob, M. Wolter, M. Ebinger, M. U. Schuhmann, T. van Meter, M. C. Frühwald, H. Hauch, A. Pekrun, B. Radlwimmer, T. Niehues, G. von Komorowski, M. Dürken, A. E. Kulozik, J. Madden, A. Donson, N. K. Foreman, R. Drissi, M. Fouladi, W. Scheurlen, A. von Deimling, C. Monoranu, W. Riggendorf, C. Herold-Mende, A. Unterberg, C. M. Kramm, J. Felsberg, C. Hartmann, B. Wiestler, W. Wick, T. Milde, O. Witt, A. M. Lindroth, J. Schwartzentruber, D. Faury, A. Fleming, M. Zakrzewska, P. P. Liberski, K. Zakrzewski, P. Hauser, M. Garami, A. Klekner, L. Bognar, S. Morrissy, F. Cavalli, M. D. Taylor, P. van Sluis, J. Koster, R.

- Versteeg, R. Volckmann, T. Mikkelsen, K. Aldape, G. Reifenberger, V. P. Collins, J. Majewski, A. Korshunov, P. Lichter, C. Plass, N. Jabado, and S. M. Pfister, “Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma.,” *Cancer Cell*, vol. 22, no. 4, pp. 425-37, Oct. 2012.
- [15] M. Seki, R. Nishimura, K. Yoshida, T. Shimamura, Y. Shiraishi, Y. Sato, M. Kato, K. Chiba, H. Tanaka, N. Hoshino, G. Nagae, Y. Shiozawa, Y. Okuno, H. Hosoi, Y. Tanaka, H. Okita, M. Miyachi, R. Souzaki, T. Taguchi, K. Koh, R. Hanada, K. Kato, Y. Nomura, M. Akiyama, A. Oka, T. Igarashi, S. Miyano, H. Aburatani, Y. Hayashi, S. Ogawa, and J. Takita, “Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma,” *Nat Commun*, vol. 6, Jul. 2015.
- [16] K. Ohnishi, K. Semi, T. Yamamoto, M. Shimizu, A. Tanaka, K. Mitsunaga, K. Okita, K. Osafune, Y. Arioka, T. Maeda, H. Soejima, H. Moriwaki, S. Yamanaka, K. Woltjen, and Y. Yamada, “Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation,” *Cell*, vol. 156, no. 4, pp. 663-677, Feb. 2014.
- [17] M. A. Smith, S. F. Altekruse, P. C. Adamson, G. H. Reaman, and N. L. Seibel, “Declining Childhood and Adolescent Cancer Mortality,” *Cancer*, vol. 120, no. 16, pp. 2497-2506, Aug. 2014.
- [18] P. F. Ambros, I. M. Ambros, G. M. Brodeur, M. Haber, J. Khan, A. Nakagawara, G. Schleiermacher, F. Speleman, R. Spitz, W. B. London, S. L. Cohn, A. D. J. Pearson, and J. M. Maris, “International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee,” *Br. J. Cancer*, vol. 100, no. 9, pp. 1471-1482, May 2009.
- [19] M. Lastowska, C. Cullinane, S. Variend, S. Cotterill, N. Bown, S. O’Neill, K. Mazzocco, P. Roberts, J. Nicholson, C. Ellershaw, a. D. J. Pearson, and M. S. Jackson, “Comprehensive genetic and

- histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 12, pp. 3080-3090, 2001.
- [20] E. F. Attiyeh, W. B. London, Y. P. Mossé, Q. Wang, C. Winter, D. Khazi, P. W. McGrady, R. C. Seeger, a T. Look, H. Shimada, G. M. Brodeur, S. L. Cohn, K. K. Matthay, and J. M. Maris, “Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 353, no. 21, pp. 2243-2253, 2008.
- [21] H. Carén, H. Kryh, M. Nethander, R.-M. Sjöberg, C. Träger, S. Nilsson, J. Abrahamsson, P. Kogner, and T. Martinsson, “High-risk neuroblastoma tumors with 11q-deletion display a poor prognostic, chromosome instability phenotype with later onset.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 9, pp. 4323-4328, 2010.
- [22] M. Peifer, F. Hertwig, F. Roels, D. Dreidax, M. Gartlgruber, R. Menon, A. Kramer, J. L. Roncaioli, F. Sand, J. M. Heuckmann, F. Ikram, R. Schmidt, S. Ackermann, A. Engesser, Y. Kahlert, W. Vogel, J. Altmüller, P. Nurnberg, J. Thierry-Mieg, D. Thierry-Mieg, A. Mariappan, S. Heynck, E. Mariotti, K.-O. Henrich, C. Glockner, G. Bosco, I. Leuschner, M. R. Schweiger, L. Savelyeva, S. C. Watkins, C. Shao, E. Bell, T. Hofer, V. Achter, U. Lang, J. Theissen, R. Volland, M. Saadati, A. Eggert, B. de Wilde, F. Berthold, Z. Peng, C. Zhao, L. Shi, M. Ortmann, R. Buttner, S. Perner, B. Hero, A. Schramm, J. H. Schulte, C. Herrmann, R. J. O’ Sullivan, F. Westermann, R. K. Thomas, and M. Fischer, “Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma,” *Nature*, vol. advance on, Oct. 2015.
- [23] Y. Chen, J. Takita, Y. L. Choi, M. Kato, M. Ohira, M. Sanada, L. Wang, M. Soda, A. Kikuchi, T. Igarashi, A. Nakagawara, Y. Hayashi, H. Mano, and S. Ogawa, “Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma.,” *Nature*, vol. 455, no. 7215, pp. 971-4, Oct. 2008.
- [24] S. C. Bresler, D. A. Weiser, P. J. Huwe, J. H. Park, K. Krytska, H. Ryles, M. Laudenslager, E. F. Rappaport, A. C. Wood, P. W. McGrady, M. D. Hogarty, W. B. London, R. Radhakrishnan, M. A. Lemmon, and Y.

- P. Mossé, “ALK Mutations Confer Differential Oncogenic Activation and Sensitivity to ALK Inhibition Therapy in Neuroblastoma,” *Cancer Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 682-694, Oct. 2015.
- [25] J. J. Molenaar, J. Koster, D. a Zwijnenburg, P. van Sluis, L. J. Valentijn, I. van der Ploeg, M. Hamdi, J. van Nes, B. a Westerman, J. van Arkel, M. E. Ebus, F. Haneveld, A. Lakeman, L. Schild, P. Molenaar, P. Stroeken, M. M. van Noesel, I. Ora, E. E. Santo, H. N. Caron, E. M. Westerhout, and R. Versteeg, “Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes.,” *Nature*, vol. 483, no. 7391, pp. 589-93, Mar. 2012.
- [26] N. N.-K. V. Cheung, J. Zhang, C. Lu, and M. Parker, “Association of Age at Diagnosis and Genetic Mutations in Patients With Neuroblastoma,” *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, vol. 307, no. 10, p. 1062, 2012.
- [27] M. Sausen, R. J. Leary, S. Jones, J. Wu, C. P. Reynolds, X. Liu, A. Blackford, G. Parmigiani, L. a Diaz, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, and M. D. Hogarty, “Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma.,” *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 1, pp. 12-7, Jan. 2013.
- [28] K. Wimmer, X. Zhu Xx, J. M. Rouillard, P. F. Ambros, B. J. Lamb, R. Kuick, M. Eckart, A. Weinhäusl, C. Fonatsch, and S. M. Hanash, “Combined restriction landmark genomic scanning and virtual genome scans identify a novel human homeobox gene, ALX3, that is hypermethylated in neuroblastoma.,” *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 33, no. 3, pp. 285-94, Mar. 2002.
- [29] M. M. van Noesel, S. van Bezouw, P. a Voûte, J. G. Herman, R. Pieters, and R. Versteeg, “Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma.,” *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 38, no. 3, pp. 226-33, Nov. 2003.

- [30] M. Alaminos, V. Davalos, N.-K. V Cheung, W. L. Gerald, and M. Esteller, “Clustering of gene hypermethylation associated with clinical risk groups in neuroblastoma.,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 96, no. 16, pp. 1208-1219, 2004.
- [31] B. Banelli, I. Gelvi, A. Di Vinci, P. Scaruffi, I. Casciano, G. Allemanni, S. Bonassi, G. P. Tonini, and M. Romani, “Distinct CpG methylation profiles characterize different clinical groups of neuroblastic tumors,” *Oncogene*, vol. 24, no. 26, pp. 5619-5628, Jul. 2005.
- [32] H. Carén, A. Djos, M. Nethander, R.-M. Sjöberg, P. Kogner, C. Enström, S. Nilsson, and T. Martinsson, “Identification of epigenetically regulated genes that predict patient outcome in neuroblastoma.,” *BMC Cancer*, vol. 11, no. 1, p. 66, 2011.
- [33] A. Decock, M. Ongenaert, J. Vandesompele, and F. Speleman, “Neuroblastoma epigenetics: from candidate gene approaches to genome-wide screenings.,” *Epigenetics*, vol. 6, no. 8, pp. 962-70, Aug. 2011.
- [34] A. Decock, M. Ongenaert, J. Hoebeeck, K. De Preter, G. Van Peer, W. Van Criekinge, R. Ladenstein, J. H. Schulte, R. Noguera, R. L. Stallings, A. Van Damme, G. Laureys, J. Vermeulen, T. Van Maerken, F. Speleman, and J. Vandesompele, “Genome-wide promoter methylation analysis in neuroblastoma identifies prognostic methylation biomarkers,” *Genome Biol.*, vol. 13, no. 10, p. R95, 2012.
- [35] D. T. Lau, L. B. Hesson, M. D. Norris, G. M. Marshall, M. Haber, and L. J. Ashton, “Prognostic significance of promoter DNA methylation in patients with childhood neuroblastoma,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 18, no. 20, pp. 5690-5700, 2012.
- [36] M. Abe, M. Ohira, A. Kaneda, Y. Yagi, and S. Yamamoto, “CpG Island Methylator Phenotype Is a Strong Determinant of Poor Prognosis in Neuroblastomas CpG Island Methylator Phenotype Is a Strong Determinant of Poor Prognosis in Neuroblastomas,” *Cancer Res.*, vol.

65, no. 3, pp. 828-834, 2005.

- [37] M. Abe, N. Watanabe, N. McDonnell, T. Takato, M. Ohira, A. Nakagawara, and T. Ushijima, "Identification of genes targeted by CpG island methylator phenotype in neuroblastomas, and their possible integrative involvement in poor prognosis," *Oncology*, vol. 74, pp. 50-60, 2008.
- [38] S. Gómez, G. Castellano, G. Mayol, M. Suñol, A. Queiros, M. Bibikova, K. L. Nazor, J. F. Loring, I. Lemos, E. Rodríguez, C. de Torres, J. Mora, J. I. Martín-Subero, and C. Lavarino, "DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights," *Epigenomics*, vol. 7, no. 7, pp. 1137-1153, Jun. 2015.
- [39] K. Yoshida, M. Sanada, Y. Shiraishi, D. Nowak, Y. Nagata, R. Yamamoto, Y. Sato, A. Sato-Otsubo, A. Kon, M. Nagasaki, G. Chalkidis, Y. Suzuki, M. Shiosaka, R. Kawahata, T. Yamaguchi, M. Otsu, N. Obara, M. Sakata-Yanagimoto, K. Ishiyama, H. Mori, F. Nolte, W.-K. Hofmann, S. Miyawaki, S. Sugano, C. Haferlach, H. P. Koeffler, L.-Y. Shih, T. Haferlach, S. Chiba, H. Nakauchi, S. Miyano, and S. Ogawa, "Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia," *Nature*, vol. 478, no. 7367, pp. 64-69, Oct. 2011.
- [40] Y. Nannya, M. Sanada, K. Nakazaki, N. Hosoya, L. Wang, A. Hangaishi, M. Kurokawa, S. Chiba, D. K. Bailey, G. C. Kennedy, and S. Ogawa, "A Robust Algorithm for Copy Number Detection Using High-Density Oligonucleotide Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Arrays," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 14, pp. 6071-6079, Jul. 2005.
- [41] G. Yamamoto, Y. Nannya, M. Kato, M. Sanada, R. L. Levine, N. Kawamata, A. Hangaishi, M. Kurokawa, S. Chiba, D. G. Gilliland, H. P. Koeffler, and S. Ogawa, "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.*, vol. 81, no. 1, pp. 114-126, Oct. 2015.
- [42] Y. Sato, T. Yoshizato, Y. Shiraishi, S. Maekawa, Y. Okuno, T. Kamura,

- T. Shimamura, A. Sato-Otsubo, G. Nagae, H. Suzuki, Y. Nagata, K. Yoshida, A. Kon, Y. Suzuki, K. Chiba, H. Tanaka, A. Niida, A. Fujimoto, T. Tsunoda, T. Morikawa, D. Maeda, H. Kume, S. Sugano, M. Fukayama, H. Aburatani, M. Sanada, S. Miyano, Y. Homma, and S. Ogawa, “Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma.,” *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 8, pp. 860-7, Aug. 2013.
- [43] H. Suzuki, K. Aoki, K. Chiba, Y. Sato, Y. Shiozawa, Y. Shiraishi, T. Shimamura, A. Niida, K. Motomura, F. Ohka, T. Yamamoto, K. Tanahashi, M. Ranjit, T. Wakabayashi, T. Yoshizato, K. Kataoka, K. Yoshida, Y. Nagata, A. Sato-Otsubo, H. Tanaka, M. Sanada, Y. Kondo, H. Nakamura, M. Mizoguchi, T. Abe, Y. Muragaki, R. Watanabe, I. Ito, S. Miyano, A. Natsume, and S. Ogawa, “Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas,” *Nat Genet*, vol. 47, no. 5, pp. 458-468, May 2015.
- [44] M. Bilodeau, T. Boulineau, J. M. Greulich, R. Hullinger, and O. Andrisani, “Differential expression of sympathoadrenal lineage-determining genes and phenotypic markers in cultured primary neural crest cells,” *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, vol. 37, no. 3, pp. 185-192, 2001.
- [45] Y. Schulz, P. Wehner, L. Opitz, G. Salinas-Riester, E. H. F. Bongers, C. A. van Ravenswaaij-Arts, J. Wincent, J. Schoumans, J. Kohlhase, A. Borchers, and S. Pauli, “CHD7, the gene mutated in CHARGE syndrome, regulates genes involved in neural crest cell guidance,” *Hum. Genet.*, vol. 133, no. 8, pp. 997-1009, 2014.
- [46] T. A. Milne, S. D. Briggs, H. W. Brock, M. E. Martin, D. Gibbs, C. D. Allis, and J. L. Hess, “MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters,” *Mol. Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 1107-1117, Nov. 2002.
- [47] J. L. Hess, “MLL, Hox genes, and leukemia: the plot thickens,” *Blood*, vol. 103, no. 8, pp. 2870-2871, Apr. 2004.
- [48] J. Stein, M. Majores, M. Rohde, S. Lim, S. Schneider, E. Krappe, J.

- Ellinger, M. Dietel, C. Stephan, K. Jung, S. Perner, G. Kristiansen, and J. Kirfel, “KDM5C Is Overexpressed in Prostate Cancer and Is a Prognostic Marker for Prostate-Specific Antigen-Relapse Following Radical Prostatectomy,” *Am. J. Pathol.*, vol. 184, no. 9, pp. 2430-2437, Nov. 2015.
- [49] N. S. Outchkourov, J. M. Muiño, K. Kaufmann, W. F. J. van IJcken, M. J. G. Koerkamp, D. van Leenen, P. de Graaf, F. C. P. Holstege, F. G. Grosveld, and H. T. M. Timmers, “Balancing of Histone H3K4 Methylation States by the Kdm5c/SMCX Histone Demethylase Modulates Promoter and Enhancer Function,” *Cell Rep.*, vol. 3, no. 4, pp. 1071-1079, Nov. 2015.
- [50] R. E. George, T. Sanda, M. Hanna, S. Frohling, W. L. II, J. Zhang, Y. Ahn, W. Zhou, W. B. London, P. McGrady, L. Xue, S. Zozulya, V. E. Gregor, T. R. Webb, N. S. Gray, D. G. Gilliland, L. Diller, H. Greulich, S. W. Morris, M. Meyerson, and A. T. Look, “Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma,” *Nature*, vol. 455, no. 7215, pp. 975-978, Oct. 2008.
- [51] G. Montavon, N. Jauquier, A. Coulon, M. Peuchmaur, M. Flahaut, K. B. Bourlout, P. Yan, O. Delattre, L. Sommer, J.-M. Joseph, I. Janoueix-Lerosey, N. Gross, and A. Mühlethaler-Mottet, “Wild-type ALK and activating ALK-R1275Q and ALK-F1174L mutations upregulate Myc and initiate tumor formation in murine neural crest progenitor cells,” *Oncotarget*, vol. 5, no. 12, pp. 4452-4466, Jun. 2014.
- [52] M. Seki, K. Yoshida, Y. Shiraishi, T. Shimamura, Y. Sato, R. Nishimura, Y. Okuno, K. Chiba, H. Tanaka, K. Kato, M. Kato, R. Hanada, Y. Nomura, M.-J. Park, T. Ishida, A. Oka, T. Igarashi, S. Miyano, Y. Hayashi, S. Ogawa, and J. Takita, “Biallelic DICER1 Mutations in Sporadic Pleuropulmonary Blastoma,” *Cancer Res.*, vol. 74, no. 10, pp. 2742-2749, May 2014.
- [53] R. Huether, L. Dong, X. Chen, and G. Wu, “The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer

- genomes,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 5, p. 3630, Jan. 2014.
- [54] K. W. Eaton, L. S. Tooke, L. M. Wainwright, A. R. Judkins, and J. A. Biegel, “Spectrum of SMARCB1/INI1 mutations in familial and sporadic rhabdoid tumors,” *Pediatr. Blood Cancer*, vol. 56, no. 1, pp. 7-15, Jan. 2011.
- [55] J. A. Biegel, L. Tan, F. Zhang, L. Wainwright, P. Russo, and L. B. Rorke, “Alterations of the hSNF5/INI1 Gene in Central Nervous System Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors and Renal and Extrarenal Rhabdoid Tumors,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, no. 11, pp. 3461-3467, Nov. 2002.
- [56] J. N. Wu and C. W. M. Roberts, “ARID1A Mutations in Cancer: Another Epigenetic Tumor Suppressor?,” *Cancer Discov.*, vol. 3, no. 1, pp. 35-43, Jan. 2013.
- [57] C. Kadoch, D. C. Hargreaves, C. Hodges, L. Elias, L. Ho, J. Ranish, and G. R. Crabtree, “Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy,” *Nat Genet*, vol. 45, no. 6, pp. 592-601, Jun. 2013.
- [58] A. S. Yoo and G. R. Crabtree, “ATP-DEPENDENT CHROMATIN REMODELING IN NEURAL DEVELOPMENT,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 19, no. 2, pp. 120-126, Apr. 2009.
- [59] J. A. Biegel, P. S. White, H. N. Marshall, M. Fujimori, E. H. Zackai, C. D. Scher, G. M. Brodeur, and B. S. Emanuel, “Constitutional 1p36 deletion in a child with neuroblastoma,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 52, no. 1, pp. 176-182, Jan. 1993.
- [60] P. S. White, P. M. Thompson, T. Gotoh, E. R. Okawa, J. Igarashi, M. Kok, C. Winter, S. G. Gregory, M. D. Hogarty, J. M. Maris, and G. M. Brodeur, “Definition and characterization of a region of 1p36.3 consistently deleted in neuroblastoma,” *Oncogene*, vol. 24, no. 16, pp. 2684-2694, 2005.
- [61] X. Gao, P. Tate, P. Hu, R. Tjian, W. C. Skarnes, and Z. Wang, “ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF

- chromatin remodeling component BAF250a,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 18, pp. 6656-6661, May 2008.
- [62] G. Nagae, T. Isagawa, N. Shiraki, T. Fujita, S. Yamamoto, S. Tsutsumi, A. Nonaka, S. Yoshiba, K. Matsusaka, Y. Midorikawa, S. Ishikawa, H. Soejima, M. Fukayama, H. Suemori, N. Nakatsuji, S. Kume, and H. Aburatani, “Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 20, no. 14, pp. 2710-2721, Jul. 2011.
- [63] J.-P. Issa, “CpG island methylator phenotype in cancer,” *Nat Rev Cancer*, vol. 4, no. 12, pp. 988-993, Dec. 2004.
- [64] J. Becker, B. Erdlenbruch, I. Noskova, A. Schramm, M. Aumailley, D. F. Schorderet, and L. Schweigerer, “Keratoepithelin suppresses the progression of experimental human neuroblastomas,” *Cancer Res.*, vol. 66, no. 10, pp. 5314-5321, 2006.
- [65] M. Abe, F. Westermann, A. Nakagawara, T. Takato, M. Schwab, and T. Ushijima, “Marked and independent prognostic significance of the CpG island methylator phenotype in neuroblastomas,” *Cancer Lett.*, vol. 247, no. 2, pp. 253-8, Mar. 2007.
- [66] J. Vermeulen, K. De Preter, G. Laureys, F. Speleman, and J. Vandesompele, “59-gene prognostic signature sub-stratifies high-risk neuroblastoma patients,” *Lancet. Oncol.*, vol. 10, no. 11, p. 1030, Nov. 2009.
- [67] M. Bibikova, K. L. Nazor, F. Loring, and I. Lemos, “DNA methylation fingerprint of neuroblastoma reveals new biological and clinical insights,” *Epigenomics*, vol. 2015 Jun 1, 2015.
- [68] M. Toyota, N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J. G. Herman, S. B. Baylin, and J.-P. J. Issa, “CpG island methylator phenotype in colorectal cancer,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 15, pp. 8681-8686, Jul. 1999.
- [69] H. Noushmehr, D. J. Weisenberger, K. Diefes, H. S. Phillips, K. Pujara,

- B. P. Berman, F. Pan, C. E. Pelloso, E. P. Sulman, K. P. Bhat, R. G. W. Verhaak, K. A. Hoadley, D. N. Hayes, C. M. Perou, H. K. Schmidt, L. Ding, R. K. Wilson, D. Van Den Berg, H. Shen, H. Bengtsson, P. Neuvial, L. M. Cope, J. Buckley, J. G. Herman, S. B. Baylin, P. W. Laird, and K. Aldape, "Identification of a CpG Island Methylator Phenotype that Defines a Distinct Subgroup of Glioma," *Cancer Cell*, vol. 17, no. 5, pp. 510-522, May 2010.
- [70] F. Fang, S. Turcan, A. Rimmer, A. Kaufman, D. Giri, L. G. T. Morris, R. Shen, V. Seshan, Q. Mo, A. Heguy, S. B. Baylin, N. Ahuja, A. Viale, J. Massague, L. Norton, L. T. Vahdat, M. E. Moynahan, and T. A. Chan, "Breast Cancer Methylomes Establish an Epigenomic Foundation for Metastasis," *Sci. Transl. Med.*, vol. 3, no. 75, pp. 75ra25-75ra25, Mar. 2011.

## 略語一覧

MAD: Median Absolute Deviation

中央絶対偏差

GEO: Genome Expression Omnibus

NCBI が管理する主にマイクロアレイ  
実験で得られたデータが登録されて  
いる公開データベース

CIMP: CpG island methylation phenotype CpG アイランドメチル化形質

表 1 神経芽腫腫瘍検体の臨床情報

	症例数			
	全症例 (N=102)	ディスカバリー コホート (n=21)	バリデーション コホート (n=81)	
性別	男性	65	16	49
	女性	37	5	32
病期	1	12	1	11
	2	4	0	4
	3	18	2	16
	4	58	18	40
	4s	5	0	5
	不明	5	0	5
	診断時年齢(月)	12カ 月以 下	48	4
12カ 月以 上		46	17	29
不明		8	0	8
MYCN	増幅	26	10	16
	非増 幅	76	11	65
再発例		3	7	10

表 2 メチル化解析に用いた神経芽腫検体の臨床情報のまとめ

		症例数
		メチル化解析
		n=44
性別	男性	25
	女性	19
病期	1	6
	3	9
	4	29
診断時年齢(月)	12 ヲ月以下	19
	12 ヲ月以上	25
MYCN	増幅	14
	非増幅	30

**表 3 ターゲットキャプチャー法にて変異解析を行ったエピジェネティック関連遺伝子**

複合体	個数
SWI/SNF	14
TrxG	10
PRC1	27
PRC2	10
HAT	2
HDAC	1
DNMT	3
HMT	2
HDT	7
Others	4
80	

SWI/SNF, Switch/ Sucrose non-fermentable: TrxG, Trithorax group:  
 PRC, Polycomb recessive complex: HAT, Histone acetyltransferase:  
 HDAC, Histone deacetylase: DNMT, DNA methyltransferase:  
 HMT, Histone methyltransferase: HDT, Histone demethylase.

表 4 本研究で使用したプライマー配列

Gene	Exon	Forward	Reverse
バリデーションコホートの変異検索に使用した primer			
<i>ALK</i>	Exon1-1	AAGCGGCCGCAAAACACTAAATCCCGGCAC	AAGCGGCCGCTACTGCTGCCACCATCCTC
<i>ALK</i>	Exon1-2	AAGCGGCCGCTCCAGCACCAACTGCTTG	AAGCGGCCGCTTGGGGAAAGCAAGAGA
<i>ALK</i>	Exon2	AAGCGGCCGCTGCCCTGGAGCACTATGA	AAGCGGCCGCCACCCCAAGCACATGGAT
<i>ALK</i>	Exon3	AAGCGGCCGCAACCTCCTAGTGTGGAGTGG	AAGCGGCCGCAATAGGTATTCCAGCCTGGC
<i>ALK</i>	Exon4	AAGCGGCCGCGAGACTACTGCTGTGCTTAC	AAGCGGCCGCCAAAAGCCAAATCACTGG
<i>ALK</i>	Exon5	AAGCGGCCGCGCACATTCCAGCCTAAC	AAGCGGCCGCGGACATGACCCCTGCCACAT
<i>ALK</i>	Exon6	AAGCGGCCGCCAGGATAATGCTGTCCCTGC	AAGCGGCCGCTATCAGGAAGGCTGCCATG
<i>ALK</i>	Exon7	AAGCGGCCGCTGGTGGGAGCTATATTAC	AAGCGGCCGCGAGTCTCCCATCTGTCTATG
<i>ALK</i>	Exon8	AAGCGGCCGCGGTTCCGGAAGTGACAA	AAGCGGCCGCTGCAGGCCAGAAACCTGT
<i>ALK</i>	Exon9	AAGCGGCCGCGAACTTCAGTGGAGAATTC	AAGCGGCCGCCATTTTAGCTGATAGAGGAG
<i>ALK</i>	Exon10	AAGCGGCCGCTCACATTCTGAGCCAGGTG	AAGCGGCCGCGACAGTCAGGCTTAGGCTGAG
<i>ALK</i>	Exon11	AAGCGGCCGCTCCCTCAGTGTGAAATCATC	AAGCGGCCGCCAAGAAGTTACTGTGCTCAC
<i>ALK</i>	Exon12	AAGCGGCCGCTGGAGCAGATATCTCAGAGG	AAGCGGCCGCTGCACCCATAGGCAAGACTC
<i>ALK</i>	Exon13	AAGCGGCCGCTGTGCTTAGCCCACTGGAAG	AAGCGGCCGCTGAGTGTGGTGCCTCCAAG
<i>ALK</i>	Exon14	AAGCGGCCGCTGTGCAAAGTGGAGA	AAGCGGCCGCTCATGAGGCTCTGACATTGC
<i>ALK</i>	Exon15	AAGCGGCCGCAACAGCAAAACCTCAGTCAG	AAGCGGCCGCGAGTACTAAGATGCCCTCAG
<i>ALK</i>	Exon16	AAGCGGCCGCCCAGCATGGTAATTGAACC	AAGCGGCCGCCACATCAGTCCACACTTG
<i>ALK</i>	Exon17	AAGCGGCCGCTGACCTGCGCCATAGGA	AAGCGGCCGCGAGATTTTGGCACCCACCC
<i>ALK</i>	Exon18	AAGCGGCCGCTGGAGACATAGTACTGAGGC	AAGCGGCCGCCATTTGTGCTATGGGCCAA
<i>ALK</i>	Exon19	AAGCGGCCGCAACTCAAAGGAGACCTGGTG	AAGCGGCCGCTATTCAGTCTCCCTCCTCTG
<i>ALK</i>	Exon20	AAGCGGCCGCGAGGAAGTGGCTGTGTAGTG	AAGCGGCCGCATAACATTGAGCCCTACAC
<i>ALK</i>	Exon21-22	AAGCGGCCGCTGACTCTGTCTCCTCTTGTG	AAGCGGCCGCTTAGAAACCTCTCCAGGTTT
<i>ALK</i>	Exon23	AAGCGGCCGCAAGATTTGCCAGACTCAGC	AAGCGGCCGCTGTCTTGGCACAACAACCTG
<i>ALK</i>	Exon24	AAGCGGCCGCGAGATTTCCCTCCTCCTACTG	AAGCGGCCGCATGTGAGCCCTTGAGATCTG
<i>ALK</i>	Exon25	AAGCGGCCGCTAGTGATGGCCGTTGTACAC	AAGCGGCCGCCCAGGAGATGATGTAAGGGA
<i>ALK</i>	Exon26	AAGCGGCCGCGCGAGATGCTTAATGCCATC	AAGCGGCCGCTCCCGCTTAGAGTATAGA
<i>ALK</i>	Exon27	AAGCGGCCGCTGGTGTGTCTATATCCATC	AAGCGGCCGCGTAAGTACGAGAAGTGTCC
<i>ALK</i>	Exon28	AAGCGGCCGCCCTCAACGTATTGCTTGCA	AAGCGGCCGCTGACTGCTGCTTGACCTA
<i>ALK</i>	Exon29-1	AAGCGGCCGCTGTGAAGGAGCCATTGCC	AAGCGGCCGCTCCTTCGGAGTTGCACAAG
<i>ALK</i>	Exon29-2	AAGCGGCCGCCAAGCTGGTGGGCTTGT	AAGCGGCCGCATGCCCAAGTGCCTGTAA
<i>ARID1A</i>	Exon1	AAGCGGCCGCACTCCTACTACCCCAACCCG	AAGCGGCCGCGAGAAGAGCCAGACAATGGC
<i>ARID1A</i>	Exon2	AAGCGGCCGCGGTTGGTCTCATGCTCTTTC	AAGCGGCCGCATTCTGTCAAGAGGCTTGG
<i>ARID1A</i>	Exon3	AAGCGGCCGCTCCTAAGTATGAGGCTTGC	AAGCGGCCGCTGCACGTTAGAGAACCACTCTG
<i>ARID1A</i>	Exon4	AAGCGGCCGCTTCGCAACTGGACTTTCTCTC	AAGCGGCCGCCACAACCTATTCCCTGGGC
<i>ARID1A</i>	Exon5	AAGCGGCCGCTTTGCTCTTGGTTGTTAAGG	AAGCGGCCGCTGCCAGTGAAGACTAGGG
<i>ARID1A</i>	Exon6	AAGCGGCCGCGGAGGACTTGGCCTCTTC	AAGCGGCCGCAATTTGCTGCAGGGATTGTC
<i>ARID1A</i>	Exon7	AAGCGGCCGCAATGATAGTGGTAAAGTCCCAGG	AAGCGGCCGCTCTCTCACAAGGTTACAAGC
<i>ARID1A</i>	Exon8	AAGCGGCCGCTTGAATGACATTGTTGGTGTTC	AAGCGGCCGCTGGTTAGTCCAGAAGC
<i>ARID1A</i>	Exon9-10	AAGCGGCCGCCACAGCACTATTGGCTCCAG	AAGCGGCCGCGAGGCTGGGATCTTGTCACTC
<i>ARID1A</i>	Exon11	AAGCGGCCGCAACTGCTCCAGTCAAGAGAC	AAGCGGCCGCGGTACCACATGAAGCCAGTG
<i>ARID1A</i>	Exon12	AAGCGGCCGCACCTTACAGCCTGATGGGG	AAGCGGCCGCTCCTTGGCATATCTGTTGG
<i>ARID1A</i>	Exon13-14	AAGCGGCCGCGAGATTCTGGGTCGTTCTGTG	AAGCGGCCGCCACAAGAACCCTGAGCCATTC
<i>ARID1A</i>	Exon15-16	AAGCGGCCGCGAGGGCTGGGTCAAAG	AAGCGGCCGCGGAGAAGTATTGCCATAGG
<i>ARID1A</i>	Exon17	AAGCGGCCGCCAAGGTTGAGTAAAGCTGG	AAGCGGCCGCTGAGCTTCTTAGACTTCAACAGC
<i>ARID1A</i>	Exon18	AAGCGGCCGCCAAGCATCTGGTTGTAGCC	AAGCGGCCGCTGTGTGAGCATTTTATCTG

<i>ARID1A</i>	Exon18	AAGCGGCCGCCAAGGCACCATGTGGCAG	AAGCGGCCGCCCTCATCCAGAATAGTAAGGTGG
<i>ARID1A</i>	Exon19	AAGCGGCCGCAGTAGCTTCACTGATGGGGC	AAGCGGCCGCCAAAGAGAAAGACCAAGGTGGC
<i>ARID1A</i>	Exon20-1	AAGCGGCCGCTCTGCCTCTCCAACTGATAC	AAGCGGCCGCAGGCAGCAGCTCTGTCTTG
<i>ARID1A</i>	Exon20-2	AAGCGGCCGCAGGAGTTTGACAGTGGCCTG	AAGCGGCCGCGTGCAGCAGGATCAGCTTG
<i>ARID1A</i>	Exon20-3	AAGCGGCCGCGCTGTGTGTGCCAATACC	AAGCGGCCCGGGTTCTTTGCGTCACTGAG
<i>ARID1A</i>	Exon20-4	AAGCGGCCGCATCCAGGACAACAATGTG	AAGCGGCCGCGATTCTGAGGTGGTTTTGC
<i>ARID1B</i>	Exon1-1	AAGCGGCCGCAACAGTGTGCACCACCAC	AAGCGGCCGCATGGGATGTTGCTGTGGTGTG
<i>ARID1B</i>	Exon1-2	AAGCGGCCGCAGCAGCTAAACCAGTTCCAG	AAGCGGCCGCTGTAGCCCGGATAATGGTTG
<i>ARID1B</i>	Exon1-3	AAGCGGCCGCTGCAGAACTCCACGAAAG	AAGCGGCCGCGGGTACTCCTTTGTTGC
<i>ARID1B</i>	Exon1-4	AAGCGGCCGCCAACATTATCCGGGTAC	AAGCGGCCGCCAAAGTACGCGGCAAAAGAAAG
<i>ARID1B</i>	Exon2-1	AAGCGGCCGCTTCTCTCTGCTTATGGTCC	AAGCGGCCGCTGAGGGTACTGCATTCC
<i>ARID1B</i>	Exon2-2	AAGCGGCCGCTGGTGTGAGAGACCTCAG	AAGCGGCCGCTGTGCCCTTCTACCAAAAC
<i>ARID1B</i>	Exon3	AAGCGGCCGCAATAGAAAGCAGCGTGTGG	AAGCGGCCGCTCTTCTCACCCCTCCAATCTC
<i>ARID1B</i>	Exon4	AAGCGGCCGCTGGAGTCTCCCTACATTGC	AAGCGGCCGCGACTTATCCAGACTACAGAGC
<i>ARID1B</i>	Exon5-1	AAGCGGCCGCTGAAGGGCAAACCTGTATGG	AAGCGGCCGCAGATCGAGACTGGTTGCTTC
<i>ARID1B</i>	Exon5-2	AAGCGGCCGCAAGCAGGAAGCACTTTGAGC	AAGCGGCCGCTTTAGGAACTGGACTCTCG
<i>ARID1B</i>	Exon6	AAGCGGCCGCGCATTGCAGAAAGTGTGTGC	AAGCGGCCGCCAAGGAGGTGCATAGGTAAGC
<i>ARID1B</i>	Exon7	AAGCGGCCGCAATTCAGGGTTAGGACCAGG	AAGCGGCCGCGACTGTGGGCTTGTATGAACC
<i>ARID1B</i>	Exon8	AAGCGGCCGCAACAGGAAGGCCATATAACG	AAGCGGCCGCCAGGGAACAATGCAGATATG
<i>ARID1B</i>	Exon9	AAGCGGCCGCAACCTGGAACACTTGACATG	AAGCGGCCGCGTTTAGCGAGATCACTGG
<i>ARID1B</i>	Exon10	AAGCGGCCGCTCCTGCTTCACTCTGTAAC	AAGCGGCCGCTTCTTAGTGGTCTTTGTCC
<i>ARID1B</i>	Exon11	AAGCGGCCGCTGCCTTCTGGGATTCACAG	AAGCGGCCCGCGACTTTCACACAGGCTTAG
<i>ARID1B</i>	Exon12	AAGCGGCCGCGACTGCTGAGTGGGAGTAATG	AAGCGGCCGCTCTCATCCCTTAACACTGC
<i>ARID1B</i>	Exon13	AAGCGGCCGCGTATAACTAGCAAGGCAGC	AAGCGGCCGCGAGTTACTCCAAACAGTAC
<i>ARID1B</i>	Exon14	AAGCGGCCGCGGGCAAACCTCACAGAGAG	AAGCGGCCGCGGTTTCTGAGTGAAGGTG
<i>ARID1B</i>	Exon15	AAGCGGCCGCGATCACACCACTGCATTAGC	AAGCGGCCGCTTCTCCCTGGTCTGAATAG
<i>ARID1B</i>	Exon16	AAGCGGCCGCGAGTCAGGGTTCAGAAATG	AAGCGGCCGCGACTTCAACATCCAGGAGTAC
<i>ARID1B</i>	Exon17-1	AAGCGGCCGCTCCTCCTCAGTGTGTGACATG	AAGCGGCCGCTATCGTCTGTGCGGTTTCATG
<i>ARID1B</i>	Exon17-2	AAGCGGCCGCTCAGCAGAATATGTGGGCAG	AAGCGGCCGCCCTTTAAGATGAGCAGGAACAGC
<i>ARID1B</i>	Exon18	AAGCGGCCGCCACGCTTAACTGTCTTGAG	AAGCGGCCGCGCTCATCAACTCAGGCATTAG
<i>ARID1B</i>	Exon19-1	AAGCGGCCGCAAGGTATTGACGGGTCTCAG	AAGCGGCCGCAGTGCAGAAAGGCCACTATTG
<i>ARID1B</i>	Exon19-2	AAGCGGCCGCTTGTGACGACGAGGAAGAC	AAGCGGCCGCCGATGGTACACAGAGGAGTC
<i>ARID1B</i>	Exon19-3	AAGCGGCCGCAAGCATCATAGCAACCATCG	AAGCGGCCGCACAGTTGGAAGGGATCTTG
<i>ARID1B</i>	Exon19-4	AAGCGGCCGCAAGAGGAGGATGAGGACAAG	AAGCGGCCGCCACATCATGTCTACGCTAGG
<i>ARID1B</i>	Exon19-5	AAGCGGCCGCTGTGCGAAAAATGTCCATG	AAGCGGCCGCTCCTACGCTGGATAAACAAG
<i>ASH1L</i>	Exon2	AAGCGGCCGCTGTTGACCTCCTTGTCTTCC	AAGCGGCCGCTAAGTGTCTTCTTGGGTGC
<i>ASH1L</i>	Exon2-1	AAGCGGCCGCTTTGACTGATGCACAGCAAC	AAGCGGCCGCACATCTTTGACAAGCCTTGG
<i>ASH1L</i>	Exon3-1	AAGCGGCCGCTCGTATAGCAGCAGATGAGC	AAGCGGCCGCTTCCAGCTACAGAGCCAAC
<i>ASH1L</i>	Exon3-2	AAGCGGCCGCTTGTACCTGTCTCCTTTC	AAGCGGCCGCTTCTTTGCACAGTCTTGG
<i>ASH1L</i>	Exon3-3	AAGCGGCCGCGCCAGTGTAAATGCAGCAG	AAGCGGCCGCTGGTGGCACTATCTTTCAGG
<i>ASH1L</i>	Exon3-4	AAGCGGCCGCACCTTAAAGCCGAAGCACTG	AAGCGGCCGC CAACTGACCTATGACCAACG
<i>ASH1L</i>	Exon3-5	AAGCGGCCGCCAGCCTCCTGTATATTGCAC	AAGCGGCCGCTTTCAGCAACTTGGCAGTG
<i>ASH1L</i>	Exon3-6	AAGCGGCCGCAAGATAAGCTCTTCCCTTGG	AAGCGGCCGCAGAGACACACATACTGGAGG
<i>ASH1L</i>	Exon3-7	AAGCGGCCGCTTCTTAAACGCGGATTGC	AAGCGGCCGCTCACAGACACTTGGCCTATG
<i>ASH1L</i>	Exon3-8	AAGCGGCCGCTAAGAGGCAAAATGAGTGCAC	AAGCGGCCGCAACAGCAAGGCTAGTAGGAC
<i>ASH1L</i>	Exon3-9	AAGCGGCCGCTCTAAATGGGCCAACAG	AAGCGGCCGCTGGCAACAAGTAGGAGGAG
<i>ASH1L</i>	Exon3-10	AAGCGGCCGCTCAGAGCCCTGTAAGTAGTG	AAGCGGCCGCTTAGTTCTCCAGCTCTGC
<i>ASH1L</i>	Exon3-11	AAGCGGCCGCACCTCTACAGTGTAAAGCAG	AAGCGGCCGCTGGTGAAGAAGGAGATG
<i>ASH1L</i>	Exon3-12	AAGCGGCCGCTAAGTAGAGGGAGGCAATGG	AAGCGGCCGCTATCGCTCTCCAACAGCATC
<i>ASH1L</i>	Exon3-13	AAGCGGCCGCCCTTTCATGAGTACCTACC	AAGCGGCCGCTCGTTAGAAAGCAGTACTC
<i>ASH1L</i>	Exon3-14	AAGCGGCCGCGGATTGCAGACACCTTTAC	AAGCGGCCGCACAGACCTATGAGCCATTG

ASHIL	Exon4	AAGCGGCCGCGCAGCAACTAAACTGTAAC	AAGCGGCCGCACAGCTACAATCCACATTCC
ASHIL	Exon5-1	AAGCGGCCGCCCTCAAAGTGAGAGTTGTTT	AAGCGGCCGCTTGCATAGCTTCCACTACAC
ASHIL	Exon5-2	AAGCGGCCGCACTCTGTGGATAGTCTGCTG	AAGCGGCCGCACACTCTGAACAACAGCCTC
ASHIL	Exon5-3	AAGCGGCCGCCCTTTGTAAACGTAGGCCAG	AAGCGGCCGCTCAAGTGATCCATCCACCTC
ASHIL	Exon6	AAGCGGCCGCTGTGAGGAGAAGTCTGGTAC	AAGCGGCCGCAAAGTTTGAGGGAGGCGTAC
ASHIL	Exon7	AAGCGGCCGCTACTTGGTACCCTCTCCTCA	AAGCGGCCGCATCAACTCCTGGGCTCAA
ASHIL	Exon8	AAGCGGCCGCCGTGTGGAGTATAGTGGGAA	AAGCGGCCGCCAACAGAAGTTGCCTAGGA
ASHIL	Exon9	AAGCGGCCGCTTTCCAGATGAGCAGAGCAC	AAGCGGCCGCTGTTTCTGTATTCCGCCAC
ASHIL	Exon11	AAGCGGCCGCGCATTGAGATTGTCAGC	AAGCGGCCGCCCTGCTCAATCATCTGTTCC
ASHIL	Exon12	AAGCGGCCGCGCATGAATGGTGCAATGTC	AAGCGGCCGCAGCTGACTGACACTGAAAAG
ASHIL	Exon13	AAGCGGCCGCACCTGTAGTCCAGCTACTC	AAGCGGCCGCTCCAGCCTCCACATACTTC
ASHIL	Exon14	AAGCGGCCGCGATAGGAGGATCAGTTGAGC	AAGCGGCCGCATGCCACCCTCTGGTAATTC
ASHIL	Exon15	AAGCGGCCGCAAGGAATTACCAGAGGGTG	AAGCGGCCGCCCTGGGTGACAGAGTAAGATC
ASHIL	Exon16	AAGCGGCCGCTGGTCAGGCTGTTTCACTTG	AAGCGGCCGCTGCAGTGAGCTAGATCATG
ASHIL	Exon17	AAGCGGCCGCTCTGTGCCACTAATCTACC	AAGCGGCCGCGACAGAAGGATCACTTGAGC
ASHIL	Exon18	AAGCGGCCGCCGACAAGAGTGAGACTCTG	AAGCGGCCCGGCTGATAGAGGAGGGTAA
ASHIL	Exon20	AAGCGGCCCGGGAGGGTAAAGAAAGTC	AAGCGGCCGCCAAGAAGAGAGGAGAGAAGG
ASHIL	Exon21	AAGCGGCCGCCCAGTTATCCCTTAGTTCC	AAGCGGCCGCTAAGAAACCAGGCCACAGAG
ASHIL	Exon22	AAGCGGCCGCATGTTTGGCTTCTTGGACC	AAGCGGCCGCTTGTATTGAGGCCGTATG
ASHIL	Exon23	AAGCGGCCGCTCCTTGTGCTTACATGC	AAGCGGCCGCTGAGAAGGGAGAGGTTTAG
ASHIL	Exon24	AAGCGGCCGCTGTACCAGTGAGCTGAATG	AAGCGGCCGCTTCTGTTGCACAGTTGGAG
ASHIL	Exon25	AAGCGGCCGCTTAAGGCTAGCTGCTCTC	AAGCGGCCGCGCAGAACTACGTGAAG
ASHIL	Exon26	AAGCGGCCGCTCTACTGCCCTACTGTGTTT	AAGCGGCCGCCCTCCATAATGGGACCACATC
ASHIL	Exon27	AAGCGGCCGCTAAGGCTCTAAGTGTGAGC	AAGCGGCCGCCACCTTCCAGTTTCACTACC
ASHIL	Exon28	AAGCGGCCGCGTAGTGAAACTGGAAGGTG	AAGCGGCCGCTTCTCTCCCTCTCCACTAG
ATRX	Exon1	AAGCGGCCGCCAGGAAGAAATGGTATGCCCTA	AAGCGGCCGCCAACTAAGCTAAATGCTGTTGC
ATRX	Exon2	AAGCGGCCGCTCCCATTTAGTAGCTGTTGC	AAGCGGCCGCACCTTGGGAAATCCCGAATA
ATRX	Exon3	AAGCGGCCCGGTTTGGCATTATCCATCCA	AAGCGGCCGCCCTGAATTTTGTCTCTCTTCA
ATRX	Exon4	AAGCGGCCGCTTGGTTCAAACGGTCAACA	AAGCGGCCGCAGGGTTAAAGCTTTCCTTG
ATRX	Exon5	AAGCGGCCGCGCTGAAACCAACCCATAAAGA	AAGCGGCCGCTGGTGTACATGTTTGTGCT
ATRX	Exon6	AAGCGGCCGCCCTTAAAAATCTGAAATATAGCC	AAGCGGCCGCTGCTGCTCCTCCTACAGAG
ATRX	Exon7	AAGCGGCCGCAACTGACTTCTGCTGTTTATGT	AAGCGGCCGCGGCATATGATTATCATCCTGA
ATRX	Exon8	AAGCGGCCGCTGACACTGTTTTGCAACCTGA	AAGCGGCCCGGCTTAAAAATACCTGTGCTCAT
ATRX	Exon9	AAGCGGCCGCAATTTTATGATGATAGAGTTGTGAGAC	AAGCGGCCGCAATCCTGCTGGGATTTTTG
ATRX	Exon10	AAGCGGCCGCGCAATCAGAAGTGTGCTTACAA	AAGCGGCCGCTGTGCTGCTTCTCTTTTT
ATRX	Exon11-12	AAGCGGCCGCCGACATGACATTTTCCAAATTAAGT	AAGCGGCCGCTCAGTCTTCTCCTCAGCTCGT
ATRX	Exon13	AAGCGGCCCGGGCTCAATAAAATAACATTTAACAC	AAGCGGCCGCTTCTCTACACTGCCAAAAGTG
ATRX	Exon14	AAGCGGCCGCTGCTTTTAAAGCATACCCATTTT	AAGCGGCCGCCCTGGTGTGTTGCAAGTGTCT
ATRX	Exon15	AAGCGGCCGCAAAAGTTGAATGCAGCAGAAA	AAGCGGCCGCTTCTAATGCATGTTTTTGCACA
ATRX	Exon16	AAGCGGCCGCACCCTCATTTATAAGCATCTCA	AAGCGGCCGCCCTCAGAGGACCCTGACTACCA
ATRX	Exon17	AAGCGGCCGCCAAGGTATCCCTAAAACCCCTAA	AAGCGGCCGCGCAAGAGGGATTAAGAGATGA
ATRX	Exon18	AAGCGGCCGCTTCCCACTGAAATATGCATCAC	AAGCGGCCGCATCTCTTCCCTGTGCCCTTG
ATRX	Exon19	AAGCGGCCGCTTCCAGCCCTACGACTGT	AAGCGGCCGCCATCTACTGTGATAGCTTAGAGAAG
ATRX	Exon20	AAGCGGCCGCCGCTCATTGTTTTGAAATCACCC	AAGCGGCCGCCAATTGGATTTGTTGTTGG
ATRX	Exon21	AAGCGGCCGCTTGAAGTAAATCCTGTGG	AAGCGGCCGCCACCTTTTCTGCTGTGTT
ATRX	Exon22	AAGCGGCCGCTCAATAACCAATCCTTCCACAA	AAGCGGCCGCAACAAACCTCCCTCAGGAT
ATRX	Exon23	AAGCGGCCGCACAATTTCCCCGTAACAAT	AAGCGGCCGCTGAATAGCCAAACTCTTTTTCA
ATRX	Exon24	AAGCGGCCGCCAGCTTCCAAAAGTGTAGG	AAGCGGCCGCGCAGTAGTTGTCAACAGGCAA
ATRX	Exon25	AAGCGGCCGCACGCGGGCCATTAAG	AAGCGGCCCGGTTAAAACATGGTTTTGCTAGTTG
ATRX	Exon26	AAGCGGCCGCCCATTTTCTGGCTTTCTT	AAGCGGCCGCTGGCACTTCAAAAATAACC
ATRX	Exon27-1	AAGCGGCCGCACCAGTCCGCTTTTCTTCT	AAGCGGCCGCCATCTGATGCTGAGGAAAGTTCTG

<i>ATRX</i>	Exon27-2	AAGCGGCCGCTTCTGTTTCATCGCTGCTTCCCTC	AAGCGGCCGCGAGGAATGGATAATCAAGGGCACA
<i>ATRX</i>	Exon27-3	AAGCGGCCGCCAGAAAGCTTATCGACACCA	AAGCGGCCGCGGATAAAGCGTAATTCTTGTGACAGTGC
<i>ATRX</i>	Exon27-4	AAGCGGCCGCCCGCCTGAGTCTTTAAATC	AAGCGGCCGCCCGGTGGTGAACATAAAGAAATCTG
<i>ATRX</i>	Exon27-5	AAGCGGCCGCTTGTTCAGTCCACTGCTGCCAT	AAGCGGCCGCCATCCAGATTTTCTCCAAAGAAAG
<i>ATRX</i>	Exon27-6	AAGCGGCCGCCAATGCAAGATGAGCCTTC	AAGCGGCCGCTTCTTTCCATAAAAACCTGGGA
<i>ATRX</i>	Exon28	AAGCGGCCGCATGTAACAATTCCTCCCAAAAG	AAGCGGCCGCCACACCAGTGTCTGGAGATTT
<i>ATRX</i>	Exon29	AAGCGGCCGCGAAGTCTTCCAAGGGCAGATACCA	AAGCGGCCGCGCATTGTCATCTGTAAAAGGAA
<i>ATRX</i>	Exon30	AAGCGGCCGCCAAAAGGCAGAAAAGTGGAG	AAGCGGCCGCTTGACACTGGCCCTTTTAC
<i>ATRX</i>	Exon31	AAGCGGCCGCTTCTTGTGAGACCCACTGCTCA	AAGCGGCCGCCCATGTTTGGTGTGTTGACATAGT
<i>ATRX</i>	Exon32	AAGCGGCCGCTCAGGTGATAGATACAAAGGGATTC	AAGCGGCCGCTCACTGTATTGAAGTGTATAGGG
<i>ATRX</i>	Exon33	AAGCGGCCGCTCTCAAAGTGA AAAACAACGAA	AAGCGGCCGCGGGTGTAGTATGAAAAGGAGA
<i>ATRX</i>	Exon34	AAGCGGCCGCCATAAATGCTTCTTTTCTAAGC	AAGCGGCCGCCACCACACTGGCCCTAAAAT
<i>ATRX</i>	Exon35	AAGCGGCCGCTGTGCTTTGGAGGAGGTAGCCAAT	AAGCGGCCGCTAAGCAACACACAGGCTAACCCA
<i>CHD7</i>	Exon2-1	AAGCGGCCGCCAGTGAAGTGAAGCACAGGC	AAGCGGCCGCTCTGGTACCTGAACAGCCC
<i>CHD7</i>	Exon2-2	AAGCGGCCGCCAGATGGGTGCTACCCCTGG	AAGCGGCCGCAAGTTAAGGGTTTGGCGC
<i>CHD7</i>	Exon2-3	AAGCGGCCGCTTCCATCACCACCCCTCTAC	AAGCGGCCGCGAGGATGGGCATATTTGG
<i>CHD7</i>	Exon2-4	AAGCGGCCGCTGAAAAGCAATGAGTAATCCAGC	AAGCGGCCGCAATTCGATCAGACAAGTTAGCC
<i>CHD7</i>	Exon3-1	AAGCGGCCGCTTACCATTTCATGTAGGCTG	AAGCGGCCGCCACCAGGAAGTCACTTTTACC
<i>CHD7</i>	Exon3-2	AAGCGGCCGCCCATCAATAGAACAGCAGC	AAGCGGCCGCTCCCACCCCTCATTTTCATAG
<i>CHD7</i>	Exon4	AAGCGGCCGCCCAGGAAAACCTTAATTGGG	AAGCGGCCGCCAAGATAGGGGAGTCTTGTG
<i>CHD7</i>	Exon5	AAGCGGCCGCCGAAATCTCGGCTCACTGCA	AAGCGGCCGCTAGGTGGATGTTCCCTGTCT
<i>CHD7</i>	Exon6	AAGCGGCCGCCGGGAATGATTTCTTGCTC	AAGCGGCCGCCAGCCAACAATCTGTAAAGTGC
<i>CHD7</i>	Exon7	AAGCGGCCGCGTGAAGTCTTTGCTGCTC	AAGCGGCCGCCCAGGCCATGATGACTAAAG
<i>CHD7</i>	Exon8	AAGCGGCCGCGCTCAGCAGCCTTAATGGG	AAGCGGCCGCCCAATATGCAAGTTGACAGCAC
<i>CHD7</i>	Exon9	AAGCGGCCGCTGCTTGGTGAAGTGAATAG	AAGCGGCCGCCAACAATGATAGGGTTGCCTG
<i>CHD7</i>	Exon10	AAGCGGCCGCGAGCATGCTTTTCTTAATGTG	AAGCGGCCGCTTTCCAAAAGACCACACCAC
<i>CHD7</i>	Exon11	AAGCGGCCGCGCATAGTGGTGTGGTCTTTG	AAGCGGCCGCTGTACCACAAAATGCATACCC
<i>CHD7</i>	Exon12	AAGCGGCCGCTGCATTTGTGGGTACAATGG	AAGCGGCCGCCGACCTTCCCAAGTCAACAAG
<i>CHD7</i>	Exon13	AAGCGGCCGCTGATGCATGTGCTCTGTTAGG	AAGCGGCCGCATCAAATTCGAGCAACGGG
<i>CHD7</i>	Exon14	AAGCGGCCGCGGTGCTAGTGAGAGGCTCTGG	AAGCGGCCGCCAAGTTCTGTGACTAGGTGGG
<i>CHD7</i>	Exon15	AAGCGGCCGCTCCTTCACTCTCACTGGGC	AAGCGGCCGCCGAGAAAAGGATTCTGGTG
<i>CHD7</i>	Exon16	AAGCGGCCGCTTGGCAATGGGTTTGAAG	AAGCGGCCGCTTAGTGGACTGCTTGGACC
<i>CHD7</i>	Exon17	AAGCGGCCGCCAAGGAGCAAGTATGTTGCGC	AAGCGGCCGCCACACAGCCTGAGTGACGAGC
<i>CHD7</i>	Exon18	AAGCGGCCGCTTGGTGGGAGACAGAAAC	AAGCGGCCGCCCTTGGAAAGCTGTTGACCTG
<i>CHD7</i>	Exon19	AAGCGGCCGCGGTAAAACCCCTTGCCC	AAGCGGCCGCGCTGGGAAGCAGATACAAGG
<i>CHD7</i>	Exon20-21	AAGCGGCCGCCGAATGCACAATATCGGAGC	AAGCGGCCGCCGGTGTACACAAAATTCAAAC
<i>CHD7</i>	Exon22	AAGCGGCCGCGCTAGTTTTGACCCAGGATTTG	AAGCGGCCGCCAAAAGTTCTGTTGGCTTTG
<i>CHD7</i>	Exon23	AAGCGGCCGCGCCTCGTGCATTAAGCTCTC	AAGCGGCCGCCCTGCATCTGCAGACGTGAAG
<i>CHD7</i>	Exon24	AAGCGGCCGCGTTGGCAAACAGTCTGAAG	AAGCGGCCGCCCATGATGTTTTCCGGCTAC
<i>CHD7</i>	Exon25	AAGCGGCCGCTTATCGTGGGAGAGAGGGC	AAGCGGCCGCCGCCAAGAGTCTTTTGGAAAC
<i>CHD7</i>	Exon26	AAGCGGCCGCGTGTGTGATTTTGCCAGTG	AAGCGGCCGCCCTGCCAATAGATGTGAAACTG
<i>CHD7</i>	Exon27-28	AAGCGGCCGCCCTTCTTCTTTTGTCTTATC	AAGCGGCCGCCACCAGTGAACAATGACTGC
<i>CHD7</i>	Exon29	AAGCGGCCGCCCTTCCACACTGTOATTTG	AAGCGGCCGCCCTTGGGTCTACAGGAGCAG
<i>CHD7</i>	Exon30	AAGCGGCCGCCGGGAAGAAGAAAAGAAACAG	AAGCGGCCGCCACTTGGGGAAGTCAAGGG
<i>CHD7</i>	Exon31	AAGCGGCCGCTCAAGCCAGATGATGGTAGG	AAGCGGCCGCCCTTCCGCTTGTTCAGTACC
<i>CHD7</i>	Exon31	AAGCGGCCGCCTCAAACAGAGGGGCAGG	AAGCGGCCGCCAGAAAAGCAACGCATCTCAC
<i>CHD7</i>	Exon32	AAGCGGCCGCTGCCAATACCATTCTAGCC	AAGCGGCCGCTCACATCACATTTCCCATCC
<i>CHD7</i>	Exon33	AAGCGGCCGCTTTTTGCATCTTGATGGATG	AAGCGGCCGCCAAGCTCGCAAACCTCAGTTAAGG
<i>CHD7</i>	Exon34	AAGCGGCCGCCAAAAGCCAGCCATATAGCAG	AAGCGGCCGCCCATCGTGAACATCACAGGAC
<i>CHD7</i>	Exon35	AAGCGGCCGCCAAAATAGGACATTTGTAGAGGC	AAGCGGCCGCTAAGGGAATGAAGTGGACCG
<i>CHD7</i>	Exon36	AAGCGGCCGCTGATTTCTTAATGGACGGG	AAGCGGCCGCATACACGCACACAGCATTTC

<i>CHD7</i>	Exon37	AAGCGGCCGCAATGCGTGTGCGGTATG	AAGCGGCCGCCAACCCCTTTAAATTTGGAGCTG
<i>CHD7</i>	Exon38-1	AAGCGGCCGCCATTGAGATCAAGTTGTCTTCG	AAGCGGCCGCCAGCATGTGTCTTTCTCAG
<i>CHD7</i>	Exon38-2	AAGCGGCCGCCCTGACGAGCCTTCAGAATC	AAGCGGCCGCCCTCAAGGGTCTCTCCATC
<i>CHD7</i>	Exon38-3	AAGCGGCCGCCAGCATTGGCAGACTTCAG	AAGCGGCCGCCACTTTCTCCATTAGTGCC
<i>MLL</i>	Exon1	AAGCGGCCGCGAGCTGGTTAGGCAGTTCC	AAGCGGCCGCATGGTCCCAGAATTGGGATG
<i>MLL</i>	Exon2	AAGCGGCCGCGGGATGTTTTGTATGCACG	AAGCGGCCCGGAAGGCAAGAGGAAGCCAC
<i>MLL</i>	Exon3-1	AAGCGGCCGCCAGTACAAAATGGCCAGTGC	AAGCGGCCGCTGTCTTTCCGGACTTTCTGG
<i>MLL</i>	Exon3-2	AAGCGGCCGCTTGTACGACGGAGAGGAAGG	AAGCGGCCGCAACTGGGCTACTAGATCG
<i>MLL</i>	Exon3-3	AAGCGGCCGCCGAATAGTAGATTCAAGTCCCC	AAGCGGCCGCGTGAGGAAAAGTATTGTGGC
<i>MLL</i>	Exon3-4	AAGCGGCCGCCCAACAATCCCTTAGCATC	AAGCGGCCGCGGGTGAGAGGTGAGAGC
<i>MLL</i>	Exon3-5	AAGCGGCCGCTGCTGAACATCTTCTCAGG	AAGCGGCCGCGTGGAACATCTTCCACCAAC
<i>MLL</i>	Exon3-6	AAGCGGCCGCTAAGCGGAGTCAAGGAAAG	AAGCGGCCGCTTCCCATAGAAAGGGCTC
<i>MLL</i>	Exon4	AAGCGGCCGCGATACCTTGGCTTCGTTCAAG	AAGCGGCCGCGGCATCCCCAGAATAATCAAC
<i>MLL</i>	Exon5	AAGCGGCCGCATTCTGGCCAAGTTATTG	AAGCGGCCGCATTTAAGCAGAGCCACACC
<i>MLL</i>	Exon6	AAGCGGCCGCATCCAGGATTCAAAGGCTC	AAGCGGCCGCCAGGAAATAGTCCAATCAACCC
<i>MLL</i>	Exon7	AAGCGGCCGCACCTAGCTGTGGATTGCTG	AAGCGGCCGCTGTGTTGAGACATCAGTGC
<i>MLL</i>	Exon8	AAGCGGCCGCATGGCCCTTTCTTACACAGG	AAGCGGCCCGAAGAAATCCACTGCCATCTAC
<i>MLL</i>	Exon9	AAGCGGCCGCCAAATGTGAAGGCAAATAGGG	AAGCGGCCGCTTGGTGTGATTTCTCTTTTC
<i>MLL</i>	Exon10	AAGCGGCCGCTCAATCCAGTGTATTTTCGC	AAGCGGCCGCAATAACCATCAATAGCATCCC
<i>MLL</i>	Exon11	AAGCGGCCGCTGCCAGTGACTACTAAAACCC	AAGCGGCCGCCCCAGATACATTCAATCAAAG
<i>MLL</i>	Exon12-13	AAGCGGCCGCTGCCAGTAAATGTGAAATGGG	AAGCGGCCGCTTCCCTCCAGAACACCAAG
<i>MLL</i>	Exon14	AAGCGGCCGCTGGTAAATGCAAGTCGAGGG	AAGCGGCCGCAAGGCATATGTTGGAAACC
<i>MLL</i>	Exon15	AAGCGGCCGCTGTGGTTCCCAACATATGGC	AAGCGGCCGCGCTCCTTCTATTTCTTACGC
<i>MLL</i>	Exon16	AAGCGGCCGCGAATTTACATGGACACCTTGG	AAGCGGCCGCTTACTCAGTTTCATGCCCC
<i>MLL</i>	Exon17-18	AAGCGGCCGCTGCTGGATGATTAAGGAGGG	AAGCGGCCGCAACCTTTTGAAAATGCAATC
<i>MLL</i>	Exon19	AAGCGGCCGCACATGGGGCAACAGGTG	AAGCGGCCGCTGGATTACGAAAGTCAATCATC
<i>MLL</i>	Exon20	AAGCGGCCGCGAGGCTGTGGCTATGTAAGC	AAGCGGCCGCAATGGCACCCAGTCAAG
<i>MLL</i>	Exon21	AAGCGGCCGCGGAAAAGCTAATGCCGAGG	AAGCGGCCGCAATATCAGGGAGGCCATATTC
<i>MLL</i>	Exon22	AAGCGGCCGCGAAGACTGTAGAATGGGATGAG	AAGCGGCCGCGGGGCATATGGGAAATCTCT
<i>MLL</i>	Exon23	AAGCGGCCGCGCTATGTGCCTTCCACTCTG	AAGCGGCCGCGACCGAAGAAATTTCCCAATG
<i>MLL</i>	Exon24	AAGCGGCCGCTGAGGCACAGGAATCACTTG	AAGCGGCCGCAATGACCTGCACATGGCTTC
<i>MLL</i>	Exon25	AAGCGGCCGCGGCCAGGAACTAGGATAA	AAGCGGCCGCGCCAGGCTGTTCTTGAACCTC
<i>MLL</i>	Exon26	AAGCGGCCGCGGGAAAAGTCAATTTACTTGGG	AAGCGGCCGCCCAAGATAAAGTTGCTGAAAG
<i>MLL</i>	Exon27-1	AAGCGGCCGCTCAAATCATTGAAACCAGTGAC	AAGCGGCCGCTGTGTTATGAACCTGTGGGG
<i>MLL</i>	Exon27-2	AAGCGGCCGCCCAAAGTGTGAGTCCAAAG	AAGCGGCCGCGACTCCTGGCATAGAAAGGC
<i>MLL</i>	Exon27-3	AAGCGGCCGCTGGATGAGTTTTGACTCCTG	AAGCGGCCGCTGATCTCTTGGCTCGCTTC
<i>MLL</i>	Exon27-4	AAGCGGCCGCGAGGTATCCCGTCCGACG	AAGCGGCCGCGACTCTGCGGCTTGACTCC
<i>MLL</i>	Exon27-5	AAGCGGCCGCGCCAAAGATGGATAACTGCC	AAGCGGCCGCTGGGTCACTTTCCAGAGGAGG
<i>MLL</i>	Exon27-6	AAGCGGCCGCTGTCTTGTACCACCCG	AAGCGGCCGCTCCCATGGTCCCAATAC
<i>MLL</i>	Exon27-7	AAGCGGCCGCTAACCAGAACATGCACCCAC	AAGCGGCCGCCCGGTTCAAAAATACATGATGC
<i>MLL</i>	Exon27-8	AAGCGGCCGCCATTGCCCTTCTGATGTG	AAGCGGCCGCGGCTGTATGCCCGTAGTC
<i>MLL</i>	Exon27-9	AAGCGGCCGCCACAAGTGGGACATCACAG	AAGCGGCCGCGACTACCACATCAACAGCCCC
<i>MLL</i>	Exon28	AAGCGGCCGCTCGACTACCTCCACATTCA	AAGCGGCCGCGGCTGGAAGAACTATTTT
<i>MLL</i>	Exon29	AAGCGGCCGCCCTGTGGCTCATTTTCTAGC	AAGCGGCCGCTGTGGGCCAAATCACTTAAC
<i>MLL</i>	Exon30	AAGCGGCCGCGGAATAATAAACCAACTGTGG	AAGCGGCCGCGACTCTAGCTGAAACAGGGC
<i>MLL</i>	Exon31	AAGCGGCCGCTGCTCTAGGAGGCAAGTG	AAGCGGCCGCGAGGGCTGAGGAATGACTG
<i>MLL</i>	Exon32-33	AAGCGGCCGCTGTAGGACCATGCTGTTTCC	AAGCGGCCGCTCCTACGTAGTGCCTGACC
<i>MLL</i>	Exon34	AAGCGGCCGCCCTTCGATTCAAGACTCAAAAC	AAGCGGCCGCTCACTCCAGCATTTGGTCTG
<i>MLL</i>	Exon35	AAGCGGCCGCTGGGAACTAACAGACCAGG	AAGCGGCCGCTGATCCAGGGCTACTACTGG
<i>MLL</i>	Exon36	AAGCGGCCGCTTGGGACATGTTCTTAAAGCTG	AAGCGGCCGCTTCCAGGTTGCTTTGGATG
<i>MLL3</i>	Exon2	AAGCGGCCGCTTCAAATTTGCTTATGTTG	AAGCGGCCGCCAAACAAGGCAGATGGAAAC

MLL3	Exon3	AAGCGGCCGCCGTGCATGAACTTTTCTTG	AAGCGGCCGCCGCCACCCAGATTTTCATCC
MLL3	Exon4	AAGCGGCCGCCCCACCTTTAGCTTTCTTAC	AAGCGGCCGCAATTCATGAACTCCCTCCC
MLL3	Exon5	AAGCGGCCGCATACTTCCCTGTGGTTTGG	AAGCGGCCGCCAGTCCGGTGGTGGTACTG
MLL3	Exon6	AAGCGGCCGCTACTGGCACTCAGTGGTTGG	AAGCGGCCGCCACCACATACCTGGCCTAGAA
MLL3	Exon7	AAGCGGCCCGGTAGCACACGAAGCGCTAAA	AAGCGGCCCGCAACGATCCCTCAGATTTT
MLL3	Exon8	AAGCGGCCGCAGACCTGCTTATGGTCTCAAGT	AAGCGGCCGCCCTCTTAAACCCAATACACAGC
MLL3	Exon9	AAGCGGCCCGCTGCAAGTCCCAAGACTGAT	AAGCGGCCGCCCGATTTGTCTGGTCTCCAT
MLL3	Exon10	AAGCGGCCCGCTGGTGGCACACACCTGTAG	AAGCGGCCCGGCCATTACTTCTTATGCC
MLL3	Exon11	AAGCGGCCGCCAGCAATGCCTTCTTTACC	AAGCGGCCGCTTGGTGATACAATGGACAAC
MLL3	Exon12	AAGCGGCCGCTGGTGTATTTGCCCTTAC	AAGCGGCCGCTGACTGCATCTTGGCTTTAC
MLL3	Exon13	AAGCGGCCCGGCTCATCTGAAAGTCTTTGG	AAGCGGCCGCTATCGCCAGGCATACAT
MLL3	Exon14-1	AAGCGGCCGCTTCTGGTGTGGCTGATTC	AAGCGGCCGCAACCAACTGTTCTCAGGAC
MLL3	Exon14-2	AAGCGGCCGCAGAGGAACCTGAAACAGTGG	AAGCGGCCCGCATGATGTTTCCAGCAGAG
MLL3	Exon14-3	AAGCGGCCGCAGCAGACATAAGCAAGGCAG	AAGCGGCCCGCATCTTTATGCCCAACTG
MLL3	Exon15	AAGCGGCCGCTTGTAGTGTCTCAGGCAG	AAGCGGCCGCCATGTCAAGACTTCTCCCTC
MLL3	Exon16	AAGCGGCCGCTCACAGTGACAGCCTAAGGT	AAGCGGCCCGAGAGGTTGGCATAGAAAGA
MLL3	Exon17-18	AAGCGGCCCGTCCAGACTCCATTTACGG	AAGCGGCCGCTTGTGAGAACTGGGAGCTCAT
MLL3	Exon19	AAGCGGCCGCCAGTATTTGGCCCTCCGATAGTG	AAGCGGCCGCCAAGGCAACAAACCCCTAGAGTAC
MLL3	Exon20	AAGCGGCCGCCATTTCCCTCATTATGTTCCG	AAGCGGCCCGCCTTCTGTAAAGTTCTAGGTGAC
MLL3	Exon21	AAGCGGCCCGCCCTAACTAGCTTCTTCTGTG	AAGCGGCCGCTGCAAGTGTGGTACAAGAGTG
MLL3	Exon22	AAGCGGCCGCTTAGCCAGGTTTTCTCCA	AAGCGGCCCGCCTAACTAGGCCGTGTTTT
MLL3	Exon23	AAGCGGCCGCCCTTGACATGGTATTTTGG	AAGCGGCCGCAATGGCAAGGTCAGTCAC
MLL3	Exon24	AAGCGGCCGCAAAATGGCTCAGCAACAACC	AAGCGGCCGCACATTTGGGACAAGGCATTC
MLL3	Exon25	AAGCGGCCCGTGTACTGTGAAATGTAGGGAG	AAGCGGCCGCAAGGCTTGGAGATGACCAG
MLL3	Exon26	AAGCGGCCGCAAAATTACCTCAGTGGTTTTG	AAGCGGCCGCTCCTATCCAAAGTGTCTTGG
MLL3	Exon27	AAGCGGCCGCAAAAGTCTTATGCTGTCTCTGC	AAGCGGCCGCTATAACCCCTCAGATTGCC
MLL3	Exon28	AAGCGGCCGCTCCAGTACTTGCCCTCACTCAG	AAGCGGCCGCCACCTCTCGCTCACATCAG
MLL3	Exon29-30	AAGCGGCCGCTGAGCGACTCTCCAAATTGA	AAGCGGCCGCTGGTATGGGGAAGCCATT
MLL3	Exon31	AAGCGGCCGCTTAATGAAATGGCGTTCCC	AAGCGGCCGCTAGGGCAAACTTGCTTGTG
MLL3	Exon32	AAGCGGCCGCTGTCAAGGCCAGCTTTAC	AAGCGGCCCGCCACAATAAACGCAACATAC
MLL3	Exon33	AAGCGGCCGCTGTATGTTGCGTTTATTGGGC	AAGCGGCCCGGGAATCTTATGTTGTGGG
MLL3	Exon34	AAGCGGCCGCTGGTCTGGTGTGCTTACC	AAGCGGCCCGGACGGCAACTGTACCTCTG
MLL3	Exon35	AAGCGGCCCGGGAGGTGCCGTAAGTATTTT	AAGCGGCCGCAATGCAAAAGCTCCCTCTC
MLL3	Exon36-1	AAGCGGCCGCCCCCATGATGGTATTTTCTTC	AAGCGGCCGCTTGTGTTGTCTCATTATTGG
MLL3	Exon36-2	AAGCGGCCGCTCCTCAACTCACGACCACC	AAGCGGCCCGGGTAAGGGGAGGCTGAC
MLL3	Exon36-3	AAGCGGCCGCAATGCAACCTCCCTCATCC	AAGCGGCCCGGACTGGTCTTGTATTGAGG
MLL3	Exon36-4	AAGCGGCCGCTCCTCCTGGAACCAAGAC	AAGCGGCCGCTATTTAAGATTCCCTGCG
MLL3	Exon37	AAGCGGCCGCTCCAGGAATTTGAGGCCAG	AAGCGGCCGCACCCAGCTCTGTTTCCC
MLL3	Exon38-1	AAGCGGCCCGCTTGGTGTCTTCTTTGTG	AAGCGGCCCGAGCTGATTAGGTAGACCCTGG
MLL3	Exon38-2	AAGCGGCCGCTAGACACACAGCCCATGC	AAGCGGCCGCTTGGATTCCACCTTAGAATTTG
MLL3	Exon38-3	AAGCGGCCGCTCCAGAATTGACATGGGAG	AAGCGGCCGCTTGCACATGATTGGATGGG
MLL3	Exon38-4	AAGCGGCCCGCATCCACTCAACTACCTGC	AAGCGGCCCGCATGCCACTCTAATACCC
MLL3	Exon39	AAGCGGCCGCAAAACCCAGGATAAGGTTGCC	AAGCGGCCGCAAGGGCTTTCCATTTCTG
MLL3	Exon40	AAGCGGCCGCAAAATGCCACTGTTCTTCTCTG	AAGCGGCCGCTCTAAAGCATGAGTTTGTCTG
MLL3	Exon41	AAGCGGCCGCTCAGAATTAGTTGCCACCAC	AAGCGGCCGCAATGAAAACACAGCCTTG
MLL3	Exon42	AAGCGGCCGCTTCTATTATGTGTCATGGTG	AAGCGGCCCGGACTGGAGCTGTTATGGCTG
MLL3	Exon43-1	AAGCGGCCGCTCATCAGCCAGTGTTTACTTC	AAGCGGCCGCCGTTGTCTCTTGTCTGTTT
MLL3	Exon43-2	AAGCGGCCGCCACAGAGTGGACCACCACC	AAGCGGCCGCTAAAAGAGGCTCACTGGG
MLL3	Exon43-3	AAGCGGCCGCAATCCCTGTTGGAAGCC	AAGCGGCCGCCATGGAGAGCTTGTCTACTTC
MLL3	Exon43-4	AAGCGGCCGCTATAACTGCCACCAGACTC	AAGCGGCCCGGTTCCAGAGAGGTAGAAATG
MLL3	Exon44	AAGCGGCCGCTAGCTTGGCACTGCATGAAC	AAGCGGCCGCCCCAGCCTATATCCTTGTAC

<i>MLL3</i>	Exon45-46	AAGCGGCCGCGCAAGGTCATTGCATATTCG	AAGCGGCCGCGCATGGAGATTTTCCACTACC
<i>MLL3</i>	Exon47-48	AAGCGGCCGCGTGTGAGCAGGGTTGGTACAG	AAGCGGCCGCCCATCTTTGAAAATTTGGGGAC
<i>MLL3</i>	Exon49	AAGCGGCCGCGCAGTGGTTCACTGTTGCCTTC	AAGCGGCCGCGCATGTTACCTGTCCGTTG
<i>MLL3</i>	Exon50	AAGCGGCCGCGTGCACCTTTGTGCATCAG	AAGCGGCCGCCAAGGACATTTTCGCTGGAG
<i>MLL3</i>	Exon51	AAGCGGCCGCGAGTGAACCGTGGACCACATAG	AAGCGGCCGCGTAGCACGACTCAAGGCTCC
<i>MLL3</i>	Exon52-1	AAGCGGCCGCGACAAGAATTGCTTTCCGGG	AAGCGGCCGCGTCCGATAGTCTTTGGGCAC
<i>MLL3</i>	Exon52-2	AAGCGGCCGCCCTAAGGGACATTTAAACC	AAGCGGCCGCCCTCCTGAAGACTGCAAAG
<i>MLL3</i>	Exon52-3	AAGCGGCCGCTCACTTGCGCCATTAAGC	AAGCGGCCGCGAACACAAACATTGGCATTTG
<i>MLL3</i>	Exon53	AAGCGGCCGCGCCCAACAGGATTTATTTGG	AAGCGGCCGCGGTTAATGCACAGGCTCAG
<i>MLL3</i>	Exon54	AAGCGGCCGCCCTTTGACCAGTTGAGATTG	AAGCGGCCGCGCACAGAAACCACTAATACGC
<i>MLL3</i>	Exon55	AAGCGGCCGCCCTGGTTTTGGGATTACTC	AAGCGGCCGCGAGATTGTAGACTCCACCCTG
<i>MLL3</i>	Exon56	AAGCGGCCGCCCGAGGGTGAACCTTTG	AAGCGGCCGCGAGAAAGGGAGAGGATGATGG
<i>MLL3</i>	Exon57-58	AAGCGGCCGCGTGGATAGGAACACAGAGGGG	AAGCGGCCGCGACCTGTGTGAGAGGGAAC
<i>MLL3</i>	Exon59	AAGCGGCCGCGCAGTATTGCCTTCCCTTGC	AAGCGGCCGCTCCAATGGTGTGTTGAATCG
<i>KDM5C</i>	Exon1	AAGCGGCCGCGATGAGTCCTTAAGGGCGGTC	AAGCGGCCGCGCGCTGGCTATCCTACTG
<i>KDM5C</i>	Exon2	AAGCGGCCGCGAGCTGCTTTGGTGACTTCC	AAGCGGCCGCTCAGCCAGAACTATAAGGG
<i>KDM5C</i>	Exon3	AAGCGGCCGCGGGAGAAACCTGGGTAGTG	AAGCGGCCGCCCTTCCATTGCACGCTAAAG
<i>KDM5C</i>	Exon4	AAGCGGCCGCTGCCCTTTCTACAGGCCCTAC	AAGCGGCCGCGCAAGTGTGAAATCTGTGC
<i>KDM5C</i>	Exon5	AAGCGGCCGCGAAGTATTGCTTTTGGGGG	AAGCGGCCGCGACCTTAGCCAGAAGGAAGG
<i>KDM5C</i>	Exon6-7	AAGCGGCCGCGCCTCAGCATGAGATCAG	AAGCGGCCGCGATGCAGGGAAATGCTTATTG
<i>KDM5C</i>	Exon8	AAGCGGCCGCGCAGCCAGCAACACAGTGG	AAGCGGCCGCAAGAGGCTGCCCTCAATAAG
<i>KDM5C</i>	Exon9-10	AAGCGGCCGCTTGGGAGGATTCTTACCTC	AAGCGGCCGCTCTCATGGCTACATAAGACAGG
<i>KDM5C</i>	Exon11-12	AAGCGGCCGCTGACCTCAAATAAGGTTCCC	AAGCGGCCGCCCAGGGGAGAAACACAGATG
<i>KDM5C</i>	Exon13-14	AAGCGGCCGCCCTGAGGCTTTTCTTTGTC	AAGCGGCCGCGCTACATCTTCTTGGTGTGC
<i>KDM5C</i>	Exon15-16	AAGCGGCCGCTGGAGGATTTTGTACCTGG	AAGCGGCCGCGAGGCAGTATTGAATAGAGGCAG
<i>KDM5C</i>	Exon17	AAGCGGCCGCTCCACAGGCAAGTTCTATTCC	AAGCGGCCGCTACCCCTTGACAGCTTTTC
<i>KDM5C</i>	Exon18	AAGCGGCCGCGATGGAGGGAAGGCAGTGG	AAGCGGCCGCGAGCTTTTGAAGGAGCCAAAG
<i>KDM5C</i>	Exon19	AAGCGGCCGCGTGGGACAAGTTCCATCTG	AAGCGGCCGCTCCACTCAACTTTGATGTTTGG
<i>KDM5C</i>	Exon20	AAGCGGCCGCGTGGTCAAGGCTGGGCTTC	AAGCGGCCGCGATATGCCATCTCTCCCAGC
<i>KDM5C</i>	Exon21-22	AAGCGGCCGCGTAAGCATCAATAGCATTGGC	AAGCGGCCGCGTCTGCTCATGGCCACC
<i>KDM5C</i>	Exon23	AAGCGGCCGCCAGAGAAGGGAAGGGTAGG	AAGCGGCCGCGATCTGAGGACAAGAGCTGGG
<i>KDM5C</i>	Exon24-25	AAGCGGCCGCGGAATAGGGCTGGTTCTTC	AAGCGGCCGCGACAGGTTGTGGGCCAGTG
<i>KDM5C</i>	Exon26	AAGCGGCCGCGAGTCAAGCCAGTAGGG	AAGCGGCCGCCAGAAAGAGGATCTTTGAGGC
<i>RBBP4</i>	Exon1	AAGCGGCCGCGAGCTCTTGCAGCCTCCC	AAGCGGCCGCTTAGGCCATGTCGAGGC
<i>RBBP4</i>	Exon2	AAGCGGCCGCGTGTAGGAGTATGCAGGTGG	AAGCGGCCGCGCTCCGGGTGACTGAAGAGC
<i>RBBP4</i>	Exon3	AAGCGGCCGCTTCCCTCTCTTAAACCTGG	AAGCGGCCGCGACTCAGGCTTCCCTCAACC
<i>RBBP4</i>	Exon4	AAGCGGCCGCGACTACCTGGAGTACGGGG	AAGCGGCCGCGCTCTCTGGGCTACTGAGC
<i>RBBP4</i>	Exon5-6	AAGCGGCCGCGAGTAGGCCAGAGGCCAGT	AAGCGGCCGCGCAACTGAGTGGCTTGGTTTGG
<i>RBBP4</i>	Exon7-8	AAGCGGCCGCGTTTGGGTCAGTTGCTGATG	AAGCGGCCGCTTAGCAACGGCATAAAGCAC
<i>RBBP4</i>	Exon9-11	AAGCGGCCGCGAATACCTTGACTTCTCTTCCC	AAGCGGCCGCGCTCTTAAATCACACCTGGGG
<i>RBBP4</i>	Exon12	AAGCGGCCGCGGCTTCTGCGCTAATCTGT	AAGCGGCCGCGCAGGTTTGGGCTAATAGCAT
<i>SMACA4</i>	Exon2	AAGCGGCCGCGAACCCAGACTGACCAGG	AAGCGGCCGCCCTGCAGCCCTAGTGGG
<i>SMACA4</i>	Exon3	AAGCGGCCGCGATAGCTGCGTGCCACC	AAGCGGCCGCCAGGGGAGGAAAATGATCTG
<i>SMACA4</i>	Exon4	AAGCGGCCGCCAGAGTAGGAGCTGGTGTAGGG	AAGCGGCCGCCACCCAGTCCGCAACAGAG
<i>SMACA4</i>	Exon5	AAGCGGCCGCGCAGGCATAAACCTGGGAC	AAGCGGCCGCCCTCATCTCAAGGACCCAAGC
<i>SMACA4</i>	Exon6	AAGCGGCCGCTTCCATTTCCAGCCCG	AAGCGGCCGCGAGTTGAGTGGCTTCCCAG
<i>SMACA4</i>	Exon7	AAGCGGCCGCTCCAGCTGTAACCTGGGTGC	AAGCGGCCGCCCTTAGCAGAGTGTGGTGTG
<i>SMACA4</i>	Exon8	AAGCGGCCGCTGTTTGTATTGTGGATGCC	AAGCGGCCGCGCTGGACAAGCCAGGCAG
<i>SMACA4</i>	Exon9	AAGCGGCCGCGTTTTAAACAAGCCTTGGCG	AAGCGGCCGCCCGCAGTACCAGCTACAC
<i>SMACA4</i>	Exon10-11	AAGCGGCCGCGCTCACAGACATGCACATTG	AAGCGGCCGCGCTGTAACAGACCAACGCC
<i>SMACA4</i>	Exon12-13	AAGCGGCCGCTGTGCAACAGTTGAGTGGG	AAGCGGCCGCCACAACACACAGGGTGAAG

SMACA4	Exon14	AAGCGGCCGCGCTTCTGAGACTGTTCTCCCC	AAGCGGCCGCCCAGCGCCACCTCACAG
SMACA4	Exon15	AAGCGGCCGCGAGCCAGCACATTGTACAG	AAGCGGCCGCACCTGGGAACACCTGCAC
SMACA4	Exon16	AAGCGGCCGCTCTCTGAAGTGGGAGGACC	AAGCGGCCGCCAAACACAGGAGCGTGTGAG
SMACA4	Exon17	AAGCGGCCGCCAGTGGCTATGGGTTGCAC	AAGCGGCCGCGACGTCCTGCCACCAC
SMACA4	Exon18	AAGCGGCCGCCACTGGGCGAGTTGCAGG	AAGCGGCCCGGGAAGAACTTGTAGGGGC
SMACA4	Exon19	AAGCGGCCGCGAGATTCTCCCCATGTGCC	AAGCGGCCGCACAGTTC AACACGCAAG
SMACA4	Exon20	AAGCGGCCGCTAGTGAGACCTCTGTCGCCC	AAGCGGCCGCAGCCCTGGAGAAAGCCC
SMACA4	Exon21	AAGCGGCCGCGAGTCAAGCCCTCAAGCCAC	AAGCGGCCGCACAGATCATGACCCGATG
SMACA4	Exon22	AAGCGGCCGCCAACACCCACCCATCCAC	AAGCGGCCGCTGCCTAGGAGCTCAGCAGAC
SMACA4	Exon23	AAGCGGCCGCAGCACGAGCGGTGTGTG	AAGCGGCCGCCAGAAAACCTCTGGGTGGAC
SMACA4	Exon24	AAGCGGCCGCTTACCTGCCTGCAGGGTTC	AAGCGGCCGCGCAGTGGAGGCTTCTGTG
SMACA4	Exon25	AAGCGGCCGCAGCAGGTTCCTTGGTGTG	AAGCGGCCGCTCTCGAGGTTTTGCAGG
SMACA4	Exon26	AAGCGGCCGCAGGCCACCTCCCTTTATG	AAGCGGCCGCAAATGAAAGCCGCTCACG
SMACA4	Exon27-28	AAGCGGCCGCAAAGTGTGGTAAAGAGCGC	AAGCGGCCGCGAGCTGCTTTGCTCCTG
SMACA4	Exon29	AAGCGGCCGCGGTGTTCTGGCTCTAGCGTG	AAGCGGCCGCTTTGTCTCCCCAGCCC
SMACA4	Exon30	AAGCGGCCCGGGAGGCTAAATTAGGGCAC	AAGCGGCCGCAGTTCAGGGGCTTAGGCAC
SMACA4	Exon31	AAGCGGCCGCTGCTGTGCGACCTGGGTG	AAGCGGCCGCTGCAGAGTCAAGTGCAGATG
SMACA4	Exon32	AAGCGGCCGCAACAATGTGGAACTGTGTG	AAGCGGCCGCTGGGTGAGACTCCCCCTCC
SMACA4	Exon33	AAGCGGCCGCTCTCCAGCACACAGCCAG	AAGCGGCCGCGTTGGTCAAAGCCGAG
SMACA4	Exon34-35	AAGCGGCCGCCAGGCAGCCCTCCAGTC	AAGCGGCCGCAGGGTGTCCCATCAGG
SMACA4	Exon36	AAGCGGCCGCTTTAAAGTTTGGCAGGTCCC	AAGCGGCCGCTATGCCATCTCAGCTCTGG

ディスカバリーコホートにおける変異検索にて発見された変異の確認に使用した primer

ARID1A	Exon1	AAGCGGCCGCTCCTCGTCGTCTTCTGCTCT	AAGCGGCCGCTGGTGGCTCCTTTGTTGGG
ASH1L	Exon3	AAGCGGCCGCGGTCTAAGGGGAAAGAAGATGT	AAGCGGCCGCCCTCTACAGTGTAAAGCAGTCT
CBX4	Exon5	AAGCGGCCGCTTCTCGAGGCTTTGCTG	AAGCGGCCGCTACCAGCCGCACAGCAA
CBX8	Exon5	AAGCGGCCGCTCACACCACACTGCACCA	AAGCGGCCGCGAAGCTGAGAGGGAACGA
CHD4	Exon6	AAGCGGCCGCCCCATTCAACCTTTGCC	AAGCGGCCGCTGCTGCCAAAAATCCCAAGA
DNMT1	Exon6	AAGCGGCCGCTGTCTAGAGAACAGAACCGCA	AAGCGGCCGCGATTATTGCTGTGGGCTTTCT
DNMT3A	Exon3	AAGCGGCCGCTGTGTGTTGTGTGTGCAC	AAGCGGCCGCACACAGCCCTGGAAGTGTG
DNMT3B	Exon14	AAGCGGCCGCAAGGACACCAAGCCACCAG	AAGCGGCCGCACTGCAGGAACGTAGGAGC
EP400	Exon2	AAGCGGCCGCACCAGCAGATCACACTGGC	AAGCGGCCGCGCTCAAGCTGATCTGCCT
EP400	Exon7	AAGCGGCCGCGAACCAGGTGCATCAGCG	AAGCGGCCGCTGCAAACCTCAAAGCCCA
KDM1A_1	Exon4	AAGCGGCCGCTTCTGTTAGGTGTGGAGGGC	AAGCGGCCGCGGATCCAAAAAATGTATCCAAGA
KDM1A_2	Exon21	AAGCGGCCGCTCTGGAAAGTGCTACTGA	AAGCGGCCGCATGGCCCCAAAACTGG
KDM2B_1	Exon11	AAGCGGCCGCCGACTCATTAGACAAAGTCTCT	AAGCGGCCGCAGGAAGCCAGCATAGACG
KDM2B_2	Exon14	AAGCGGCCGCTGCATCCACCATTCTCAC	AAGCGGCCGCTTCTCCTGGTCTCCTCA
KDM2B_3	Exon20	AAGCGGCCGCAGCTGGGTGTGAGGGTAA	AAGCGGCCGCCGACCTCAGCTGGACCAAT
KDM5A	Exon28	AAGCGGCCGCGCATCTGCTAACTGGTCTCT	AAGCGGCCGCAGCCAAAGAAAGCTTTGGT
L3MBTL2	Exon14	AAGCGGCCGCCCTGCCAGTCTTCTCAAGTGC	AAGCGGCCGCCAAAGAACGGAGATGGGCAC
MLL (KMT2A)	Exon27	AAGCGGCCGCACCTGTGGATAGTAGTCTCT	AAGCGGCCGCTGGCCTTCAAGAGTTGGA
MLL2_1 (KMT2D)	Exon3	AAGCGGCCGCTTCTCCTAGGTGGGAGGT	AAGCGGCCGCTGGCGTGGTACTGATGCT
MLL2_2 (KMT2D)	Exon10	AAGCGGCCGCAGATGCGATTCTCAGGCC	AAGCGGCCGCAGCCACACCTATCTCGCA
MLL2_3 (KMT2D)	Exon38	AAGCGGCCGCTGCTGCTGTTGTTG	AAGCGGCCGCTTTCAGGCTCCTGACACC
MLL2_4 (KMT2D)	Exon39	AAGCGGCCGCTACTGCTGACTCTGCTGC	AAGCGGCCGCACTCCTGCTTGTCCAACC
MLL2_5 (KMT2D)	Exon48	AAGCGGCCGCTGAGAACAGGTCCTCCA	AAGCGGCCGCTGCACATGTTCCGTGT
MLL3 (KMT2C)	Exon14	AAGCGGCCGCTGTCCACATGAGGAAAGT	AAGCGGCCGATGCGAAGGCAAGTCTGAAG
MLL4 (KMT2B)	Exon37	AAGCGGCCGCTGGTGTGGAAAGACAGT	AAGCGGCCGCGAGGGCGAAGATAACAATG

<i>PCGF6</i>	Exon10	AAGCGGCCGCCACAAGGAGTGTGGTGAA	AAGCGGCCCGGAAATCTTTGGTGAGATGC
<i>RBBP5</i>	Exon12	AAGCGGCCGCCTTCTTAGGTGGCTGGGACC	AAGCGGCCCGGGCTCATGGTTTAAGCAACT
<i>RBBP7</i>	Exon4	AAGCGGCCCGGGACCCCAAAGCAATT	AAGCGGCCGCTTGGTGCTTTGGTTCTGT
<i>SFMBT1</i>	Exon7	AAGCGGCCGCAGGGGAGCAATACCGGTCT	AAGCGGCCGCACCCCTTTCTAGTCCAGTGGA
<i>SMARCA2</i>	Exon4	AAGCGGCCGCTAAAATGCTGGCCCGAGG	AAGCGGCCCGCCGGTGTGGTGAGCA
<i>SMARCA4_1</i>	Exon4	AAGCGGCCGCCCCCTGGTGAAGCAAGAGA	AAGCGGCCCGGTTAAATGGGGTTGGGCC
<i>SMARCA4_2</i>	Exon24	AAGCGGCCGCCGAGCCTCGGGTAAATTTGA	AAGCGGCCGCCACAGGAGGAATGCCAGT
<i>SMARCB1</i>	Exon3	AAGCGGCCGCTGGAAGAGGCCAGCATTACAG	AAGCGGCCCGGCCAGGAACGCATTACCT
<i>SMARCC1_1</i>	Exon18	AAGCGGCCGCTGCTGGATTGCAGCCCAT	AAGCGGCCGCTGACCTTGTGATCCGCCTG
<i>SMARCC1_2</i>	Exon28	AAGCGGCCGCATCCCACTCCAGCTCATG	AAGCGGCCCGAGAAAGGACTTCTGTGCTTT
<i>SMARCD1</i>	Exon1	AAGCGGCCGCTCCGGTTCTTTGTGCGG	AAGCGGCCGCACCCCTGTACTCCCATGT
<i>YY1_1</i>	Exon1	AAGCGGCCGCTGGAGACCATCGAGCCAC	AAGCGGCCGCTGATCCTCGAAGCCGCCT
<i>YY1_2</i>	Exon4	AAGCGGCCGCAGATGTTCAAGGATAACTCGGC	AAGCGGCCGCTCCCAGGAGAAGTTTTGTTTCT

表 5 ディスカバリーコホートにおける全変異

遺伝子名	染色体位置	検体	変異	アレル頻度	腫瘍特異的変異/ 胚細胞変異
ASH1L	1q22	DC004R	A2299T	0.102	腫瘍特異的変異
		DC005	K732E	0.580	胚細胞変異
		DC011P	F1287L	0.245	胚細胞変異
		DC011R		0.516	
		DC015	K290fs	0.385	腫瘍特異的変異
ARID1B	6q25	DC007	Q912H	0.487	胚細胞変異
		DC009	P724S	0.480	胚細胞変異
		DC013	P724S	0.484	胚細胞変異
MLL3	7q36	DC015	K4647fs	0.555	腫瘍特異的変異
		DC019	P2502L	0.546	胚細胞変異
CHD7	8q12.2	DC004R	R1359M	0.107	腫瘍特異的変異
		DC015	A2137T	0.416	腫瘍特異的変異
MLL2	12q13.12	DC012	P3838S	0.497	胚細胞変異
		DC018	R4162Q	0.488	胚細胞変異
CHD1	5q21.1	DC011P	Q1552H	0.486	胚細胞変異
		DC011R		0.517	
KDM5C	Xp11.22	DC015	P494S	0.811	腫瘍特異的変異
MLL	11q23	DC004R	A2538S	0.111	腫瘍特異的変異
RBBP4	1p35	DC015	c.1-1C>G	0.400	腫瘍特異的変異
SMARCA4	19p13.2	DC015	G125C	0.421	腫瘍特異的変異
ARID1A	1p35.3	DC020	S303T	0.387	胚細胞変異
ARID2	12q12	DC005	R652K	0.482	胚細胞変異
ASXL1	20q11	DC018	C1240R	0.492	胚細胞変異
ASXL3	18q11	DC010	Q2071R	0.484	胚細胞変異
CHD4	12p13	DC002	A230delinsAA	0.715	胚細胞変異
DNMT3B	20q11.2	DC016	D440E	0.484	胚細胞変異
EP400	12q24.33	DC013	T137M	0.364	胚細胞変異
SMARCA2	9p22.3	DC018	236_236del	0.908	胚細胞変異
SMARCC1	3p21.31	DC001	P1083L	0.532	胚細胞変異
SMARCC2	12q13.2	DC019	A759S	0.568	胚細胞変異
YY1	14q32.2	DC019	74_75del	0.124	胚細胞変異

表 6 ディスカバリーコホートにおける遺伝子の変異数のまとめ

複合体	遺伝子名	ポジション	合計	腫瘍特異的変異	胚細胞変異
TrxG	<i>ASH1L</i>	1q22	4	2	2
	<i>MLL</i>	11q23	1	1	0
	<i>MLL3</i>	7q36	2	1	1
	<i>CHD1</i>	5q21.1	1	0	1
	<i>CHD4</i>	12p13	1	0	1
	<i>CHD7</i>	8q12.2	2	2	0
	SWI/SNF	<i>ARID1A</i>	1p35.3	1	0
<i>ARID1B</i>		6q25	3	0	3
<i>ARID2</i>		12q12	1	0	1
<i>SMARCA2</i>		9p22.3	1	0	1
<i>SMARCA4</i>		19p13.2	1	1	0
<i>SMARCC1</i>		3p21.31	1	0	1
<i>SMARCC2</i>		12q13.2	1	0	1
HAT	<i>EP400</i>	12q24.33	1	0	1
PRC	<i>ASXL1</i>	20q11	1	0	1
	<i>ASXL3</i>	18q11	1	0	1
	<i>RBBP4</i>	1p35	1	1	0
DNMT	<i>DNMT3B</i>	20q11.2	1	0	1
HDT	<i>KDM5C</i>	Xp11.22	1	1	0
Other	<i>YY1</i>	14q32.2	1	0	1

TrxG, Trithorax group: SWI/SNF, Switch/ Sucrose non-fermentable:

HAT, Histone acetyltransferase: PRC, Polycomb recessive complex:

DNMT, DNA methyltransferase: HDT, Histone demethylase.

表 7 神経芽腫 102 検体におけるゲノムコピー数変化による予後因子とその割合

予後因子	人数	%
<i>MYCN</i> 増幅	26	25.5
1p 欠失	22	21.6
11q 欠失	29	28.4
17q 欠失	81	79.4
Diploidy	65	63.7
Hyperploidy	37	36.3

表 8 神経芽腫 102 例における 11 遺伝子の変異頻度

複合体	遺伝子名	染色体位置	遺伝子長(bp)	合計	腫瘍特異的変異 *1	胚細胞変異 *2
	<i>ALK</i>	2p23	6220	8	8 (5)	0
SWI/SNF	<i>ARID1B</i>	6q25	9639	8	4 (0)	4 (3)
TrxG	<i>MLL3</i>	7q36	16862	7	5 (3)	2 (2)
TrxG	<i>ASH1L</i>	1q22	10979	6	2 (2)	4 (4)
HDT	<i>KDM5C</i>	Xp11.22	6096	4	3 (2)	1 (1)
TrxG	<i>CHD7</i>	8q12.2	10446	4	4 (3)	0
SWI/SNF	<i>ATRX</i>	Xq21.1	11167	3	2 (0)	1 (1)
SWI/SNF	<i>ARID1A</i>	1p35.3	8577	3	2 (0)	1 (1)
TrxG	<i>MLL</i>	11q23	16594	1	1 (1)	0
SWI/SNF	<i>SMARCA4</i>	19p13.2	5691	1	1 (1)	0
PRC	<i>RBBP4</i>	1p35	7943	1	1 (1)	0

\*1 で()は正常組織により確定された腫瘍特異的変異の数

\*2 で()は正常組織により確定された胚細胞変異の数

表 9 2 群間における予後因子の検討

予後因子	エピジェネティック制御異常群	その他群	P 値
病期 4	33/40	25/62	P<0.01
12 カ月以上	29/40	19/62	P<0.01
MYCN 増幅	21/40	5/62	P<0.01
1p 欠失	20/40	2/62	P<0.01
11q 欠失	14/40	15/62	P=0.39
17q 増加	33/40	48/62	P=0.29
転移巣	8/40	6/62	P=0.20

表 10 自験例メチル化解析結果

～神経芽腫サブグループと臨床像、分子生物学的特徴のまとめ

予後因子	Hyper (n=13)	Intermediate (n=18)	Normal-like (n=13)	P 値
病期 4	13	8	9	P=0.0046*
MYCN 増幅	7	1	6	P=0.0072*
1p 欠失	5	1	7	P=0.0102*
11q 欠失	3	8	3	P=0.326
17q 増加	11	17	6	P=0.005 *
ALK	4	1	1	P=0.098
エピジェネティック異常	9	7	3	P=0.053
Hyperploidy				
MYCN 増幅なし	0	8	0	P=0.001 *
年齢<18				

カイ二乗検定にて比率に有意差があるかを算出、\*は有意差あり

表 11 Gomez らの公開データを使用したメチル化解析結果

～メチル化サブグループにおける臨床像と *MYCN* 増幅、リスク分類

	Hyper (n=11)	Intermediate (n=23)	P 値
病期 4	6	8	P=0.469
18 カ月以下	2	15	P=0.028 *
<i>MYCN</i> 増幅	6	1	P=0.0034 *
High risk**	8	8	P=0.088
Low risk**	3	15	P=0.088
Event(recurrence)	8	10	P=0.218
Survival	5	4	P=0.187

カイ二乗検定にて比率に有意差があるかを算出、\*は有意差あり

\*\* *MYCN* 増幅または病期 4 の症例を High risk と定義した。

Adrenal-like 群は一例のため、表からは除いた

表 12 統合したデータによるメチル化解析結果

～メチル化サブグループにおける臨床像と *MYCN* 増幅、リスク分離

	Hyper (n=23)	Intermediate (n=44)	Normal (n=12)	P 値
病期 4	18	20	6	P=0.034*
18 カ月以下	3	26	9	P=0.0002*
<i>MYCN</i> 増幅	13	5	3	P=0.0004*
**High risk	20	21	6	P=0.009 *
**Low risk	3	23	6	P=0.006*
Event (recurrence)	17	16	5	P=0.013*
Survival	9	9	5	P=0.162

カイ二乗検定にて比率に有意差があるかを算出、\*は有意差あり

\*\* *MYCN* 増幅または病期 4 の症例を High risk、それ以外を Low risk と定義した。

表 13 各メチル化サブグループ群で高メチル化していた遺伝子のまとめ

遺伝子	染色体位置	機能
Hyper-methylated 群で高メチル化している遺伝子(Intermediate 群と正常副腎組織群の両群)		
<i>ACP5</i>	19p13.2	劣性遺伝で脊椎内軟骨異形成-免疫不全の原因遺伝子
<i>C6orf150</i>	6q13	DNA に結合、cGAMP を合成し、インターフェロン type1 の誘導に関連
<i>EPSTI1</i>	13q14.11	インターフェロン応答や上皮間葉移行に関与
<i>MEST</i>	7q32.2	インプリンティング遺伝子であり、胎児期の中胚葉に発現
<i>PGCP</i>	8q22.2	加水分解酵素の一つ、甲状腺ホルモンの分解に関与
<i>NAPRT1</i>	8q24.3	酸化ストレス反応経路においてニコチン酸をニコチンアミドアデニンジヌクレオチドに変換
<i>ACTG1</i>	17q25.3	アクチン $\gamma$ 1、非筋肉系の細胞質に存在し、細胞内の運動性に関与
<i>SLC17A9</i>	20q13.33	副腎クロム親和性顆粒やシナプス小胞の放出に関与と推定
Hyper-methylated 群で高メチル化している遺伝子(正常副腎と比較)		
<i>SLC17A9</i>	20q13.33	副腎クロム親和性顆粒やシナプス小胞の放出に関与と推定
<i>FBXL16</i>	16p13.3	SCF タイプ E3 ユビキチンリガーゼ 細胞の分化に関与
<i>GRIN1</i>	9q34.3	Ras パスウェイに関連 NMDA レセプター 神経細胞の保護作用
<i>LMTK3</i>	19q13.33	AKT パスウェイに関連し、チロシンキナーゼの一つ。胎児脳に発現
<i>PHF11</i>	13q14.2	Th1 タイプサイトカインの活性化転写因子 がん抑制遺伝子
<i>PTER</i>	10p13	高発現で TGF $\beta$ や profibrotic cytokine の誘導に関与
<i>RASSF1</i>	3p21.31	アポトーシス誘発がん抑制 Ras 関連遺伝子 様々ながんで高メチル化
<i>CYTH2</i>	19q13.33	グアニンヌクレオチド交換因子の一つ Ras パスウェイに関与
<i>TMEM106A</i>	17q21.31	胃がんで高メチル化 高発現でアポトーシスを誘導
正常副腎と比較して神経芽腫群で低メチル化している遺伝子		
<i>IL17C</i>	16q24.2	IL1 や TNF $\alpha$ の放出を刺激

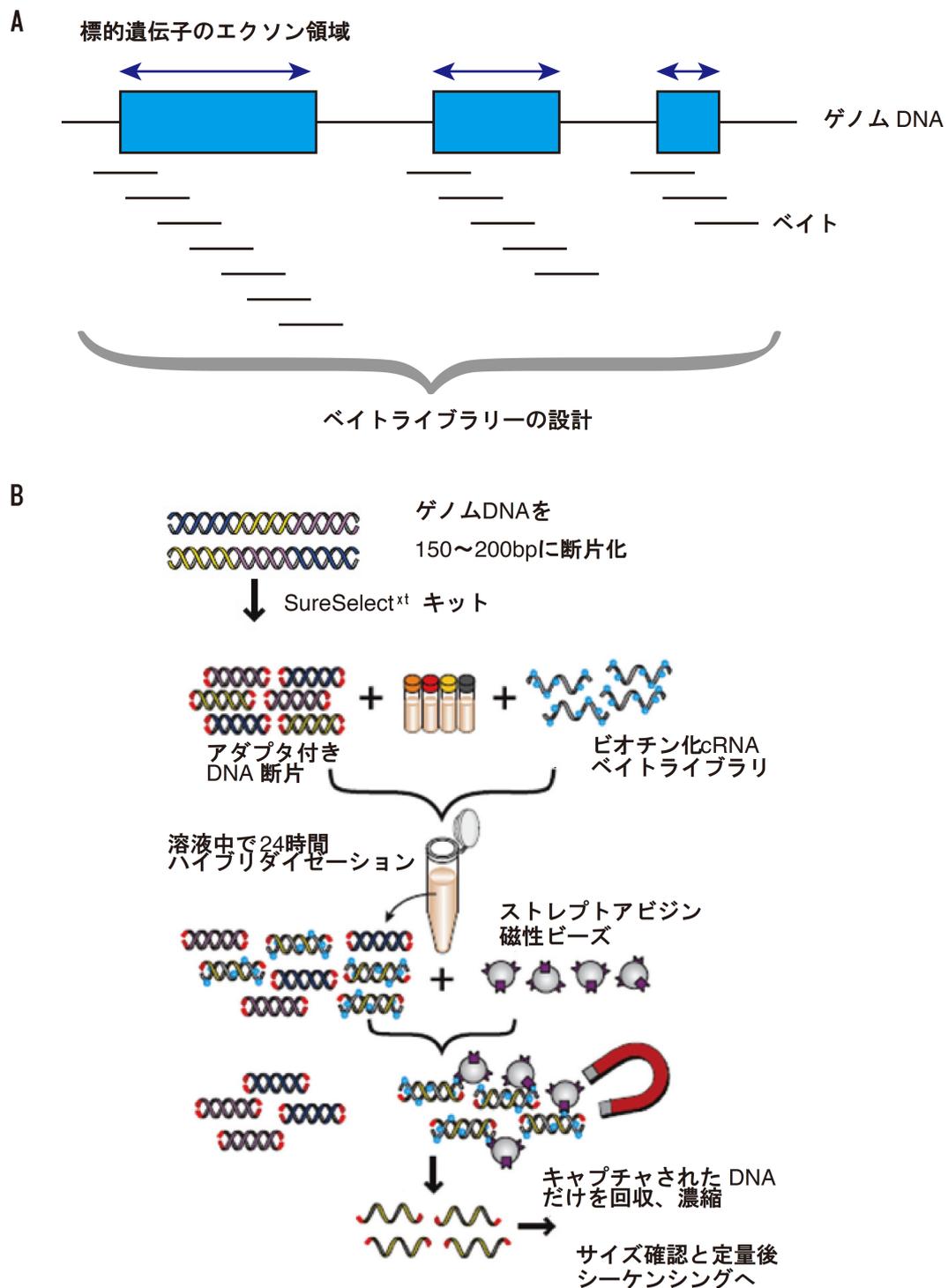


図 1 ターゲットキャプチャーシーケンス

(A) ベイト設計の模式図を示す。ゲノム DNA 上にある遺伝子のエクソンを青い長方形、その標的領域を青矢印、ベイトは矢印のない黒線で示す。標的領域を全域カバーするようにベイトライブラリーを設計した。(B) ベイトを用いた SureSelect 実験プロトコールを示す。設計したベイトライブラリーをビオチン化 cRNA に転写し、アダプター付き DNA 断片とハイブリダイゼーションすることで、標的領域を抽出する。 <http://www.chem-agilent.com/contents.php?id=1002100>

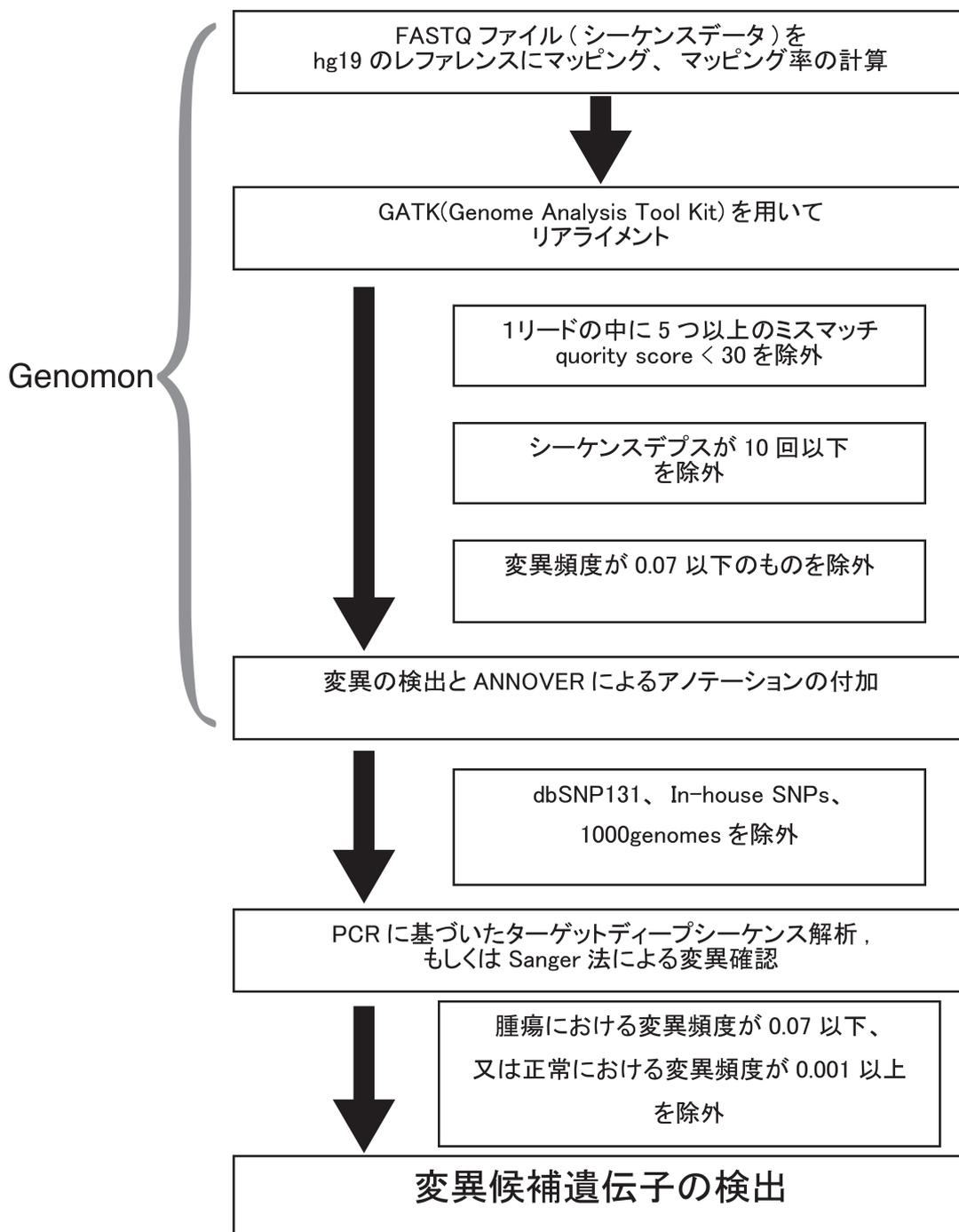


図 2 変異候補遺伝子検出のアルゴリズム

次世代シーケンサーで得られたデータをリファレンスとなるヒトゲノム配列にマッピングし、解読深度や変異頻度が低いものは除く。残ったものからがんとの関連が報告されていない既知の SNP を除き、ターゲットディープシーケンスもしくは Sanger 法にて正常と腫瘍の変異頻度を比較。変異候補遺伝子を検出した

<http://genomon.hgc.jp/exome/command.html>

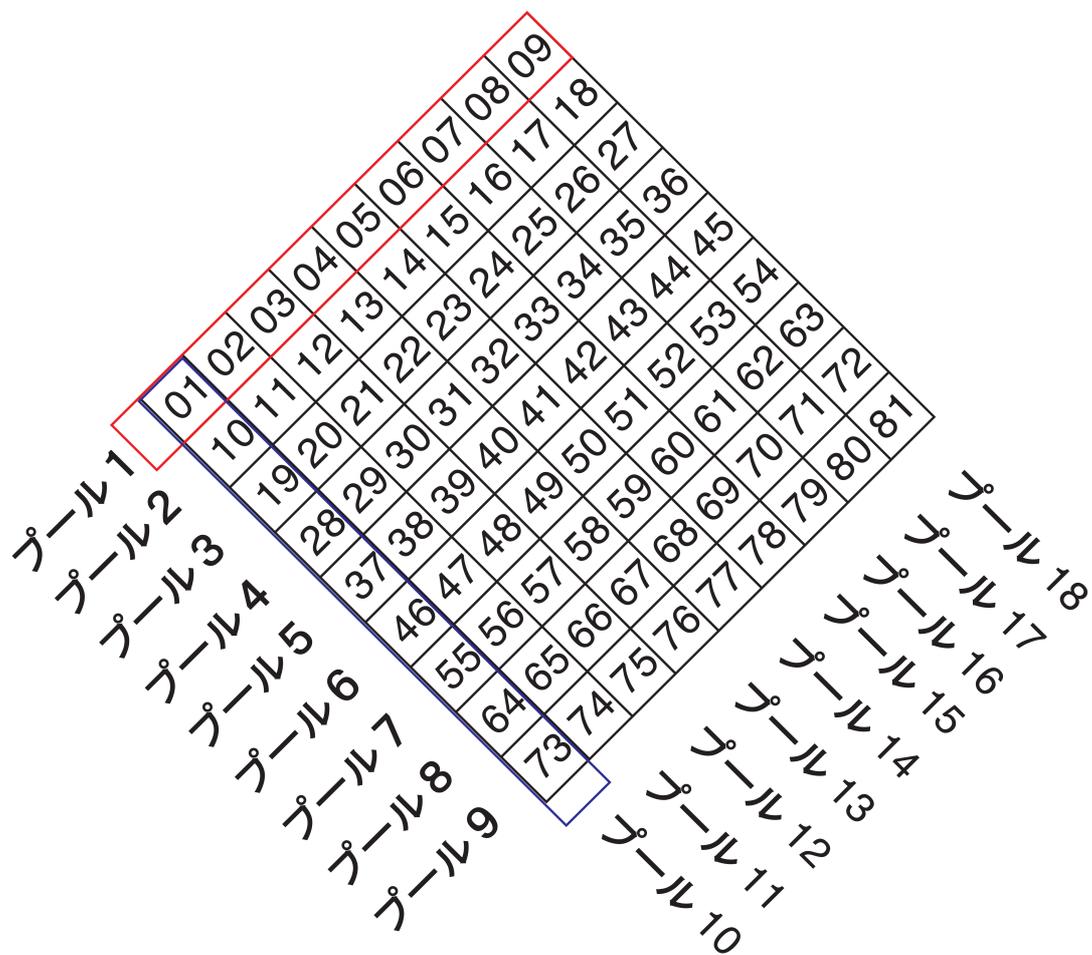


図3 プールDNAの模式図

プールDNAにおける81検体のプール方法を示す。01から81はバリデーションコホートにおける各症例の番号を示している。赤と青の長方形で囲われた症例はそれぞれ一つにプールされる。25ng/ $\mu$ lに調整したゲノムDNAを各サンプルから18 $\mu$ lずつ採取し一つのプールを作成。計18プールとした。プールDNAを用いることで、ゲノムDNAとPCRの労力を減らし、効率のよい変異検索が可能となる。

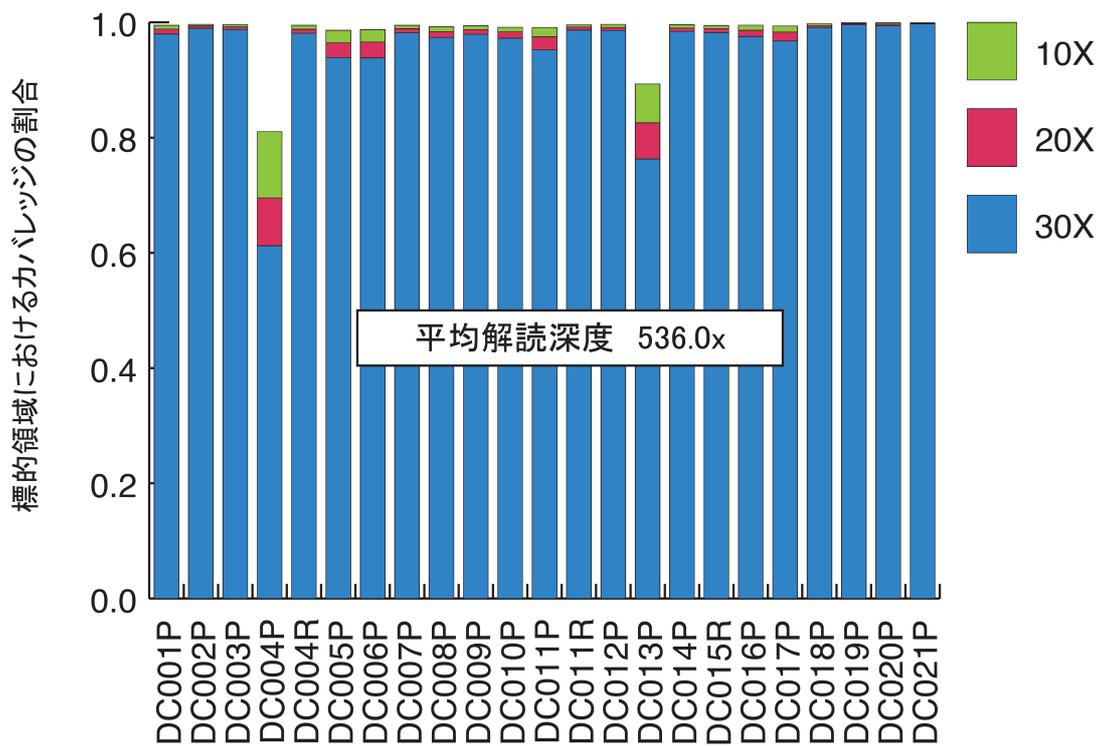


図 4 標的領域におけるカバレッジの割合と平均解読深度

ターゲットキャプチャー法によるエピジェネティック制御遺伝子の変異解析を行った、21 症例、初発、再発を含めた 23 検体が、標的領域においてシーケンスされた回数の割合をしめす。凡例の 30x は、標的領域において 30 回以上シーケンスされた塩基の割合を意味する。他、20 回以上、10 回以上を積み上げグラフにて示した。X 軸の検体番号に続く P は初発検体、R は再発検体であることを意味する。

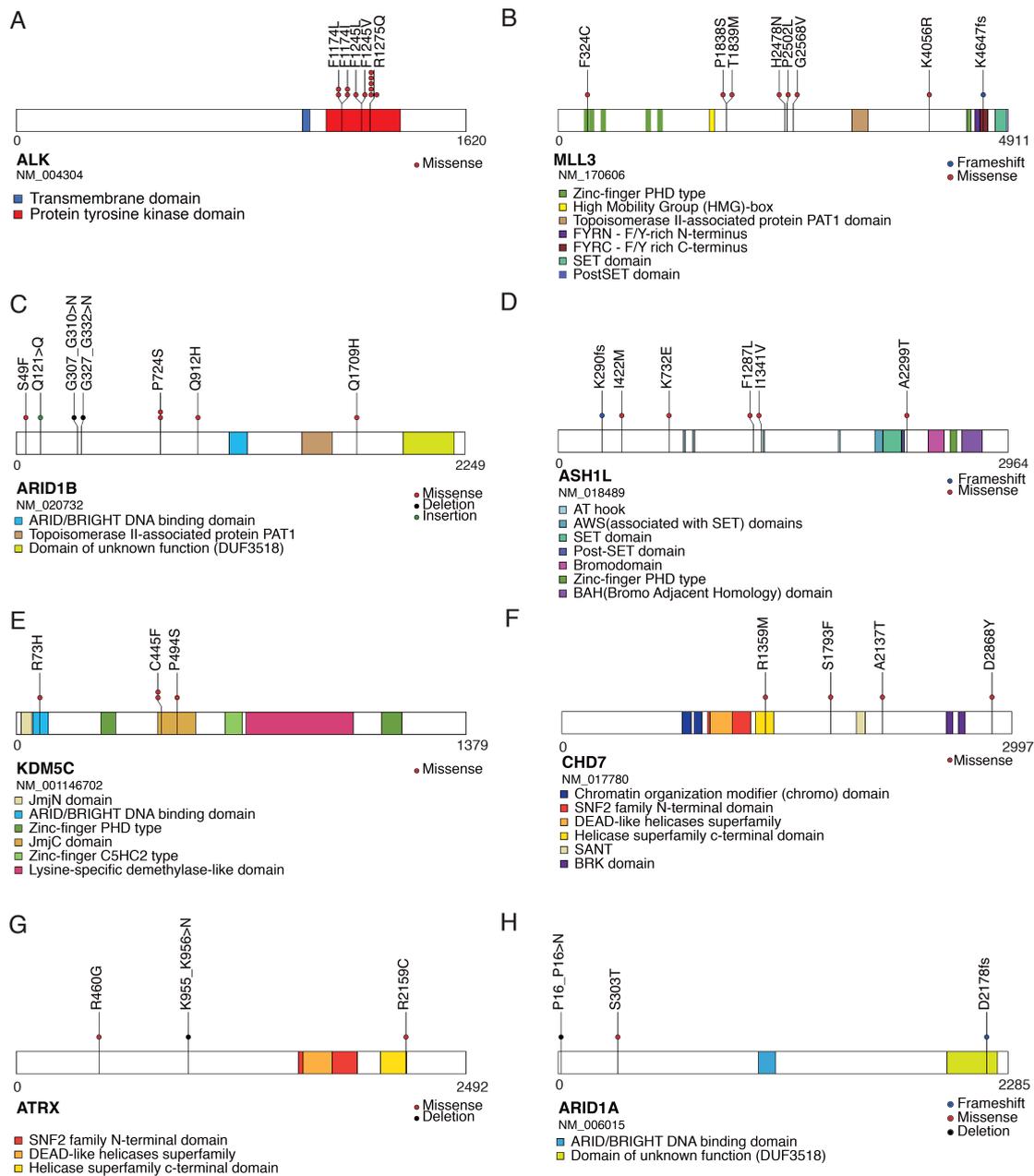


図 5 (A)-(G) PCR に基づいたディープシーケンスによる神経芽腫 102 例における変異のあった遺伝子と変異の分布

白い長方形は遺伝子全体を示し、ARID/BRIGHT DNA binding ドメインなどの共通するドメインは、同色で示している。各遺伝子の左下にある凡例で色を提示した。変異は丸で示し円に囲まれた中の色によって、変異の違いを表している。ミスセンス変異は赤、フレームシフトは青、欠失は黒、インサクションは緑で示した。

Protein painter (<http://explorepcgp.org.proteinPainter>)

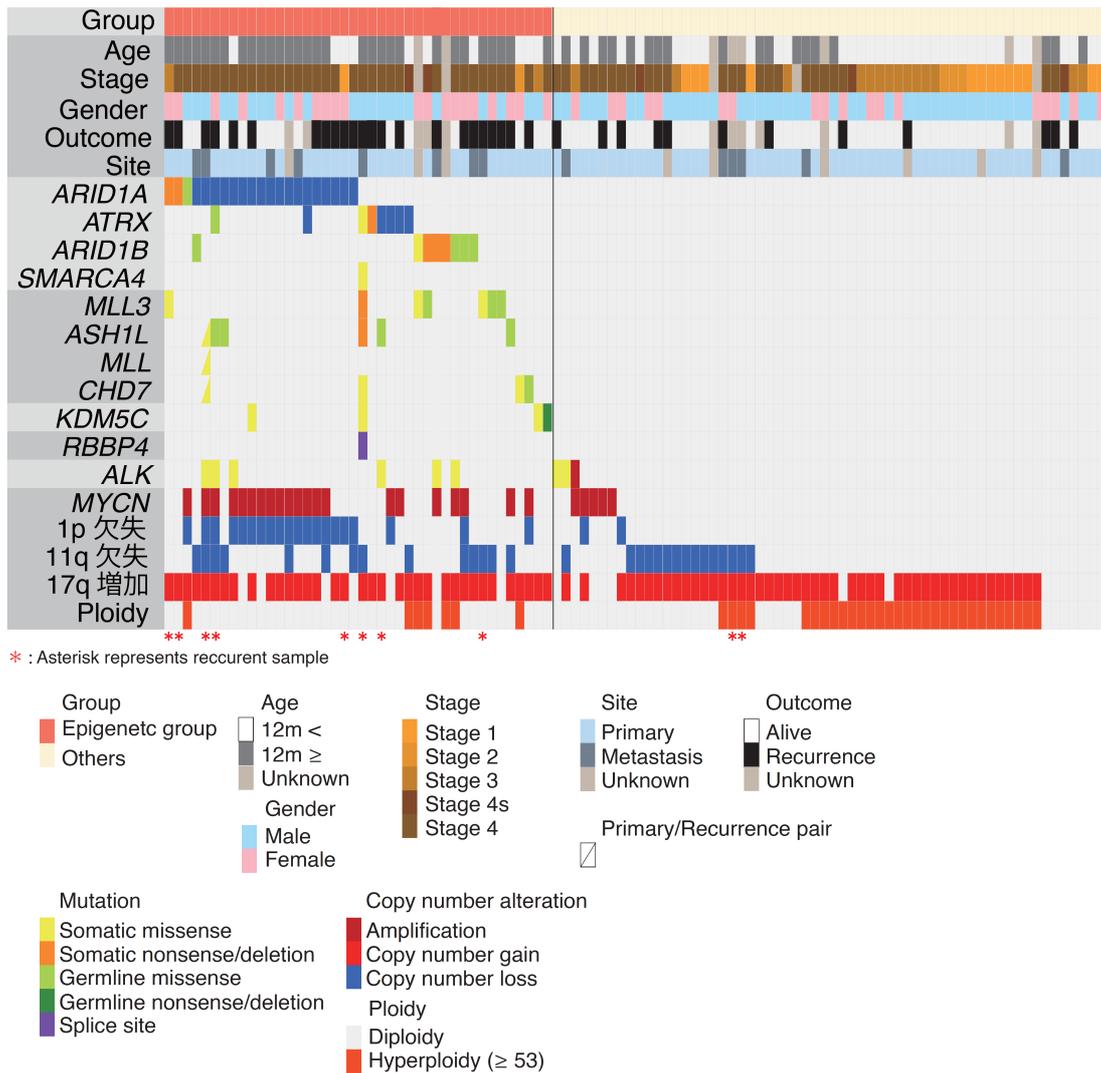


図6 神経芽腫におけるエピジェネティック制御遺伝子変異とゲノムコピー数変化、臨床情報のランドスケープ  
 ディスカバリーコホートとバリデーションコホートの神経芽腫 102 例における、変異解析、ゲノムコピー数解析、  
 臨床情報を統合して示す。行は、比較する臨床情報や遺伝子変異、ゲノムコピー数変化について表し、列は  
 神経芽腫の検体 1 例を示す。エピジェネティック制御遺伝子に変異もしくは、ゲノムコピー数の欠失があるものを  
 エピジェネティック群とし、オレンジで色分けした。発症年齢は予後がわかる、12ヶ月未満と12ヶ月以上で分  
 類した。Stageは、1から4と4Sを茶色のカラーバーで示した。予後は、発症時期を0とし5年後の再発の有  
 無で色分けしている。変異は、腫瘍特異的変異はオレンジ系で、胚細胞変異を緑系で示した。SNPアレイ解析  
 から得たゲノムコピー数変化は、3、4コピー数を増加、5コピー数以上を増幅としている。Ploidyは、18ヶ月以  
 下の発症の場合、予後良好とされるHyperdiploidyをDNA index>1.15から近似的に53本以上とした。また、  
 再発検体をアスタリスクで表した。

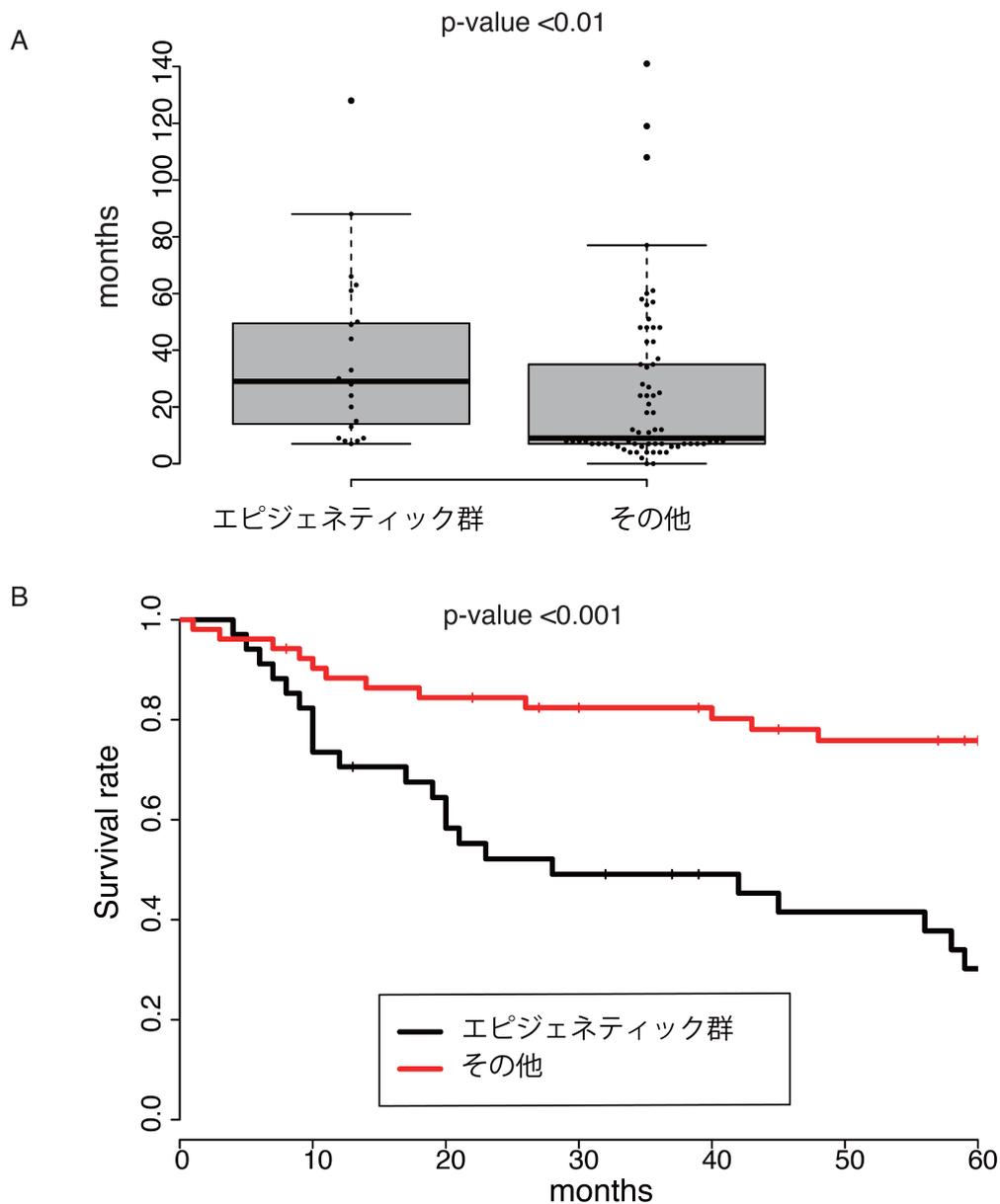


図 7 エピジェネティック群とその他の群における年齢と予後の比較

(A) 2 群間における月齢を箱ひげ図で示す。箱の中にある太い黒線はデータの中央値、箱の横線は、下が第一四分位数、上が第三四分位数、箱の上下の短い横線は、外れ値を除いたあとの下が最小値、上が最大値を示す。黒丸は各々の症例を示している。エピジェネティック群とその他の群で、月齢に差があるかをマンホイットニーの U 検定を用いて検討した結果、有意差 ( $P < 0.01$ ) をもってエピジェネティック群で月齢が高かった。

(B) 2 群間における 5 年 EFS を Kaplan-Meier 法にて算出した。黒線がエピジェネティック群で、赤線がその他の群での生存曲線を示す。Log-rank 検定にて 2 群間の再発率の有意差 ( $P < 0.001$ ) を認めた。

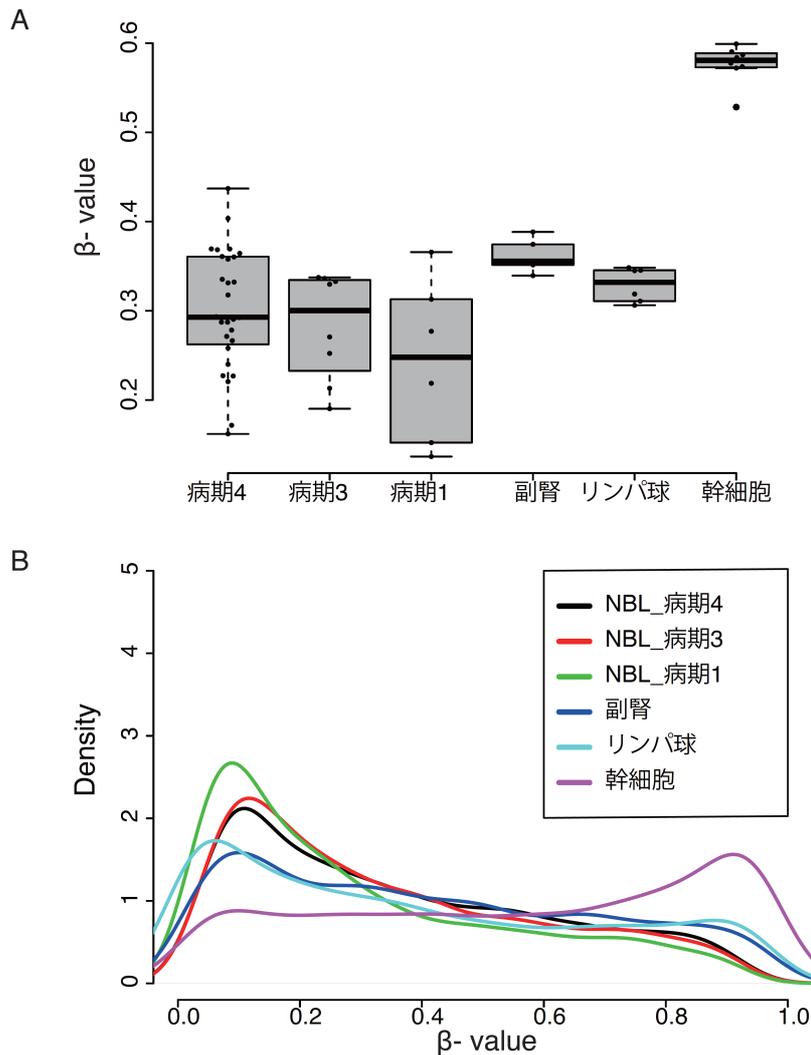


図 8 プロモーター領域における神経芽腫ステージと細胞種ごとのメチル化状態の比較とメチル化プローブの分布

(A) 6 群間におけるメチル化状態の比較を箱ひげ図で示す。縦軸はプローブの  $\beta$  値を、横軸は各群を示す。神経芽腫間で最も中央絶対偏差が大きい、プロモーター領域の上位約 3000 プローブを選択し、各ステージ、細胞種ごとにメチル化の状態を比較した。各検体におけるメチル化の程度の指標として、検体の中央値を代表プローブ値とし、群ごとに箱ひげ図で示した。箱の中にある太い黒線はデータの中央値、箱の横線は下が第一四分位数、上が第三四分位数、箱の上下の短い横線は、外れ値を除いたあとの下が最小値、上が最大値を示す。黒丸は各症例の中央値を示している。群間の有意差の検定は、Steel-Dwass 法で算出した。幹細胞群と他群、Stage3 と正常副腎で有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めた。

(B) 6 群間におけるプローブ中央値の分布を示す。縦軸はプローブの頻度、横軸はプローブの  $\beta$  値を示す。各群におけるプローブの中央値を代表プローブ値とした。各群の色分けは、レジェンドに従う。神経芽腫群は、ステージに関わらず、低メチルなプローブの頻度が正常副腎よりも高かった。

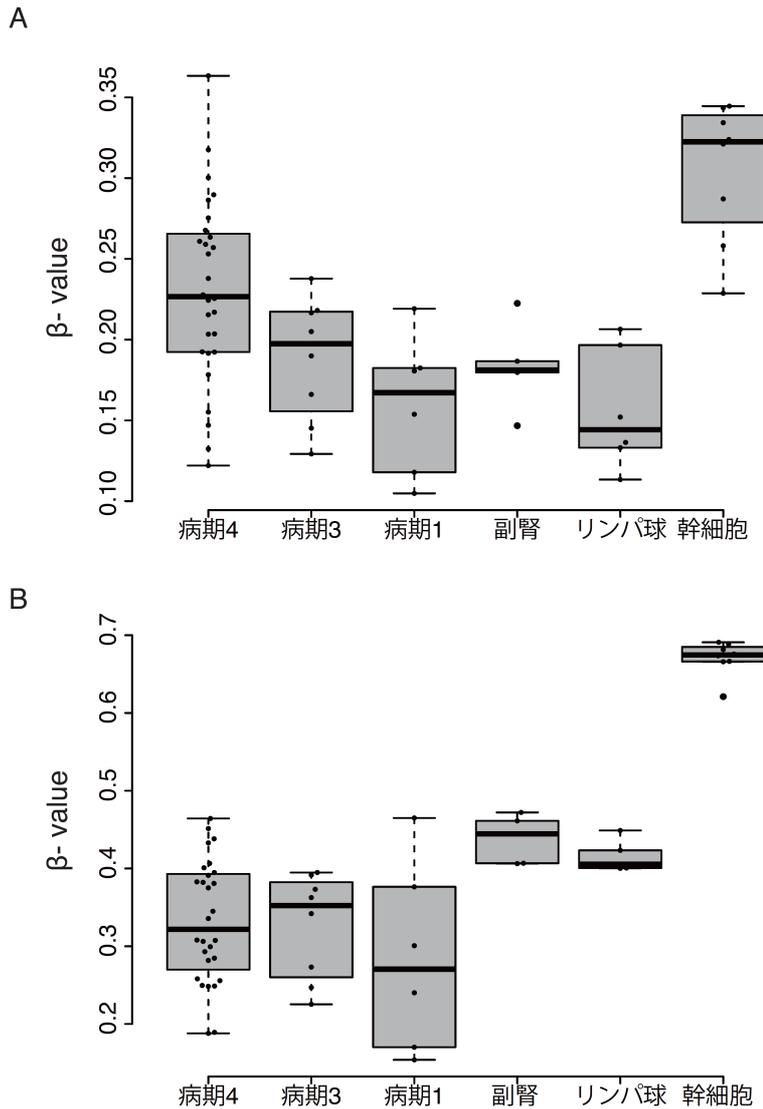


図 9 プロモーター領域の CpG と非 CpG 別における神経芽腫ステージと細胞種ごとのメチル化状態の比較  
 (A) 6 群間におけるプロモーター CpG 領域のメチル化状態の比較を箱ひげ図で示す。縦軸はプローブの  $\beta$  値を、横軸は各群を示す。神経芽腫間で最も中央絶対偏差が大きい、プロモーター領域における上位約 3000 プローブを選択し、さらに CpG 領域をぬきだして各群におけるメチル化状態を比較した。各検体におけるメチル化の程度の指標として、検体の中央値を代表プローブ値とし、各ステージ、細胞種ごとに箱ひげ図で示した。箱の中にある太い黒線はデータの中央値、箱の横線は、下が第一四分位数、上が第三四分位数、箱の上下の短い横線は、外れ値を除いたあとの下が最小値、上が最大値を示す。黒丸は各症例の中央値を示している。群間の有意差の検定は、Steel-Dwass 法で算出した。幹細胞群と他群、Stage4 と Stage1 で有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めた。  
 (B) 6 群間におけるプロモーター CpG 領域のメチル化状態の比較を箱ひげ図で示す。stage4, 3 と正常副腎で有意差を認めた。

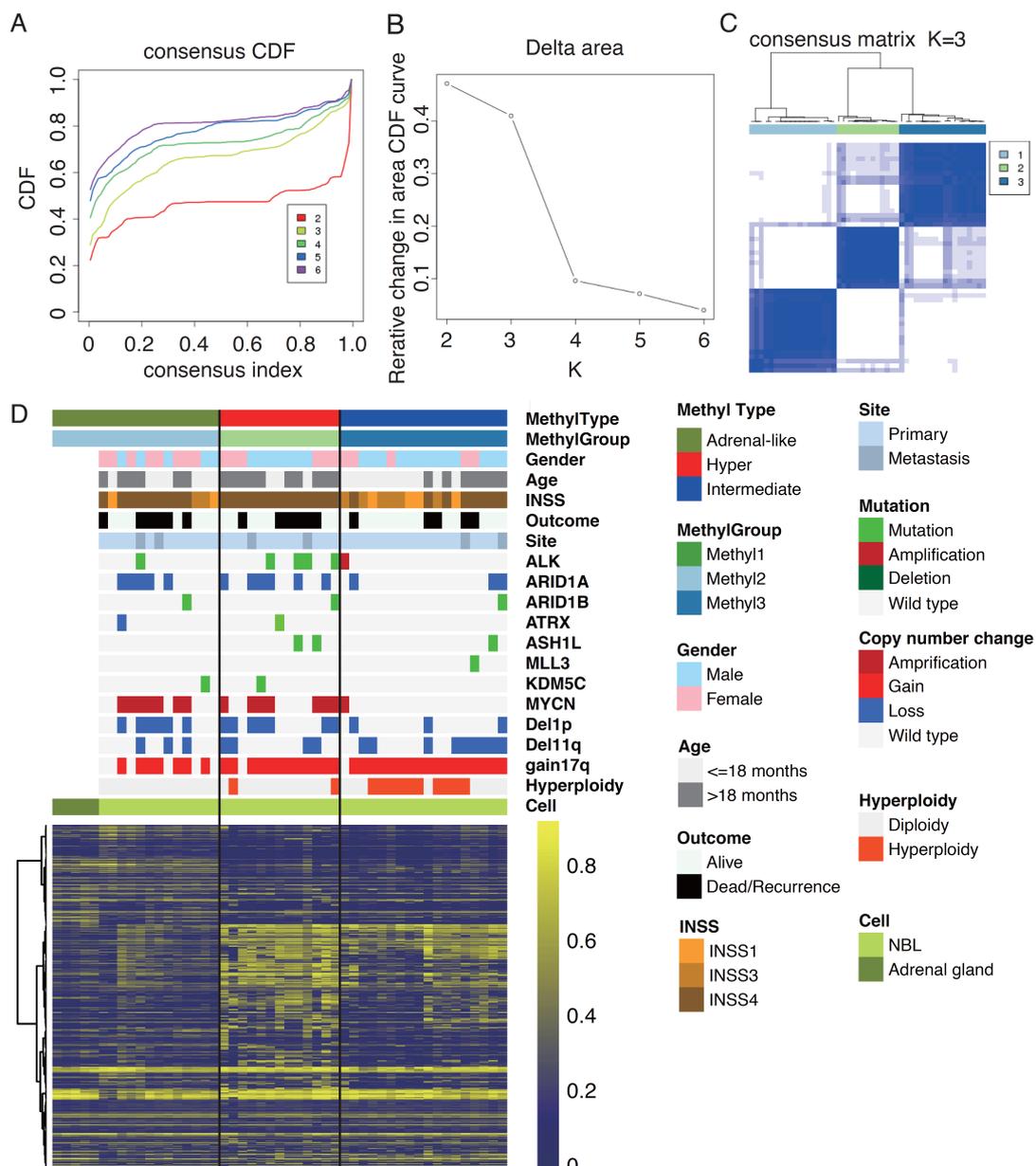


図 10 神経芽腫 44 例（自験例）と正常対照として公開データ（副腎 5 例）のメチル化アレイデータを用いた、コンセンサスクラスタリングによる解析結果 (A) クラスターの数が、K=2 から K=6 におけるコンセンサスマトリックスの累積分布関数 (CDF:cumulative distribution function) を図示する。コンセンサスマトリックスのインデックスは 1~0 の間を取り、検体  $i, j$  が常に同じ群ならば 1、常に異なる群ならば 0 の値を取る。(B) CDF カーブ下の面積の相対的变化を示す。K=3 は、K=4,5,6 と比較し CDF カーブ下の面積の相対的变化が高くなっており、集団を 3 群にわけるとで集団の特徴を最も顕著に示すにと考えられる。(C) 3 群のモデル (K=3) におけるコンセンサスマトリックスを示す。(D) DNA メチル化のヒートマップと遺伝子変異、臨床情報、ゲノムコピー数変化の統合的な図を示す。縦の列は 1 検体を表す。プローブのメチル化状態をヒートマップにて可視化しており、高メチル化しているプローブは黄色で、低メチル化しているプローブを青で表し、カラースケールをヒートマップの右側に図示した。NA, not available.

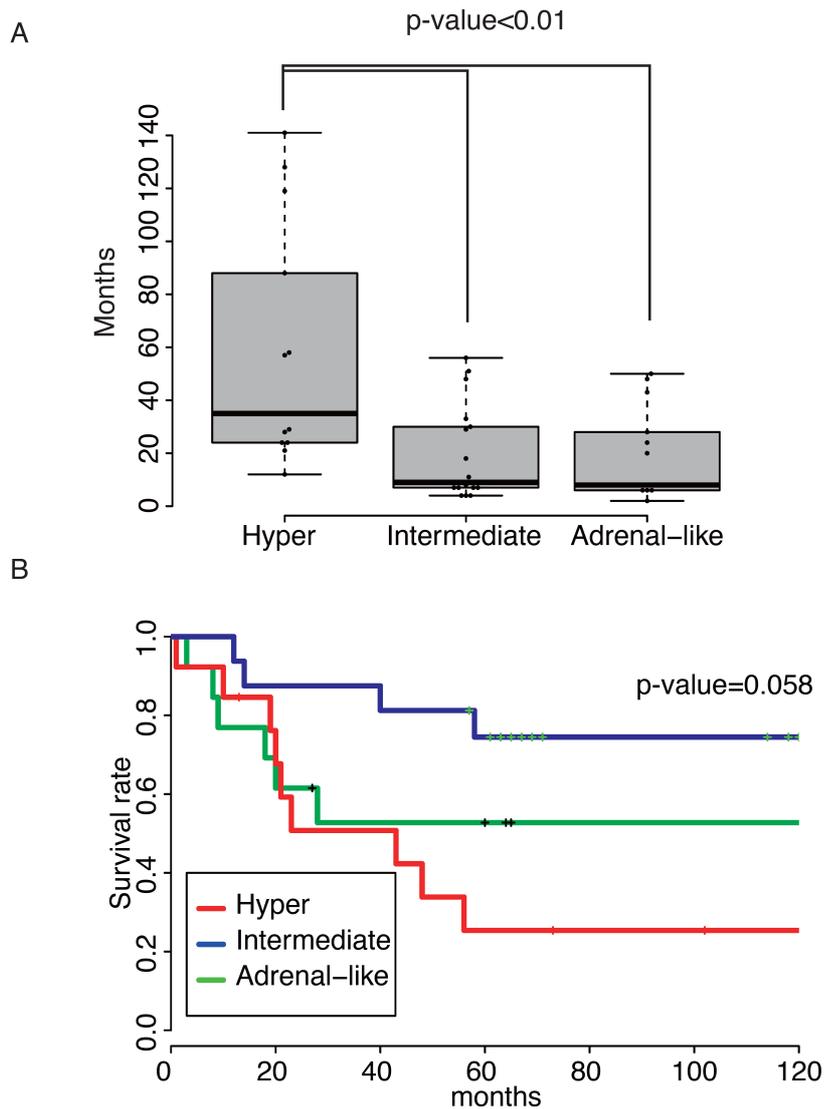


図 11 自験例のメチル化解析におけるサブグループの臨床像

(A) CpG island 領域のメチル化の程度により分類された 3 群間における月齢を箱ひげ図で示す。箱の中にある太い黒線はデータの中央値、箱の横線は、下が第一四分位数、上が第三四分位数、箱の上下の短い横線は、外れ値を除いたあとの下が最小値、上が最大値を示す。黒丸は各々の症例を示している。

Hyper-methylated 群とその他の群で、月齢に差があるかをマンホイットニーの U 検定を用いて検討した結果、有意差 ( $P < 0.01$ ) をもって Hyper-methylated 群で月齢が高かった。

(B) 3 群間における 5 年 EFS をカプランマイヤー法にて算出した。Log-rank 検定にて再発率の有意差を認めず。

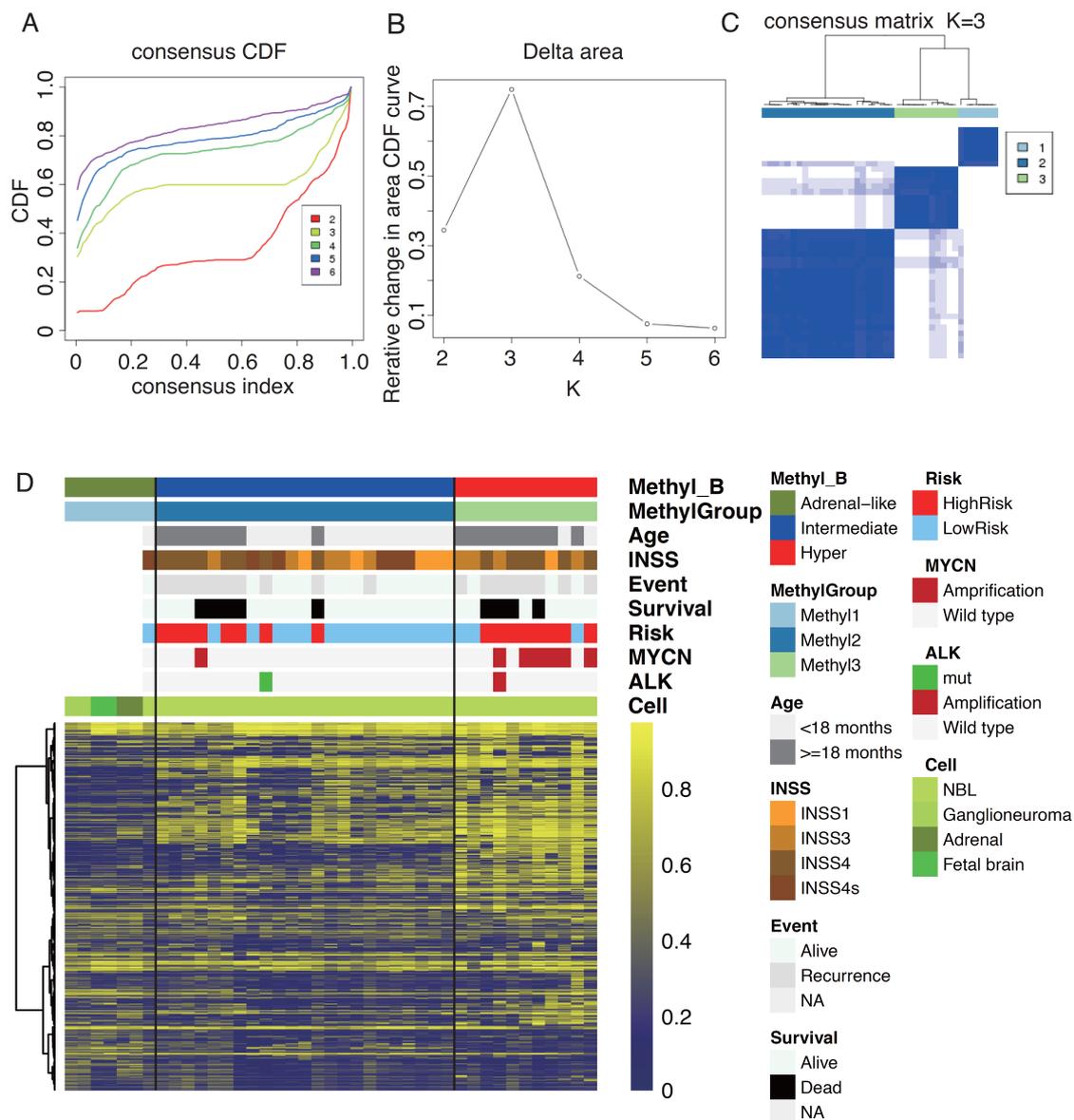


図 12 公開データベースにある Gomez らの神経芽腫 35 例と神経節芽腫 2 例、正常対照検体（副腎 2 例、胎児脳 2 例）のメチル化アレイデータを用いた、コンセンサスクラスタリングによる解析結果 (A) クラスターの数が、K=2 から K=6 におけるコンセンサスマトリックスの累積分布関数 (CDF:cumulative distribution function) を図示する。コンセンサスマトリックスのインデックスは 1~0 の間を取り、検体 i、j が常に同じ群ならば 1、常に異なる群ならば 0 の値を取る。(B) CDF カーブ下の面積の相対的变化を示す。K=2 から 3 への変化が最も高くなっており、Gomez らの神経芽腫 35 検体と対照群 6 検体（神経節芽腫 2 検体、副腎 2 検体、胎児脳 2 検体）の公開データによるメチル化解析では、クラスターを 3 群にわけることがデータの特徴を最も顕著に示すと考えられる。(C) 3 群のモデル (K=3 におけるコンセンサスマトリックスを示す)。(D) DNA メチル化のヒートマップと臨床情報、ゲノムコピー数変化の統合的な図を示す。縦の列は 1 検体を表す。プローブのメチル化状態をヒートマップにて可視化しており、高メチル化しているプローブは黄色で、低メチル化しているプローブを青で表し、カラースケールをヒートアップの右側に図示した。NA, not available.

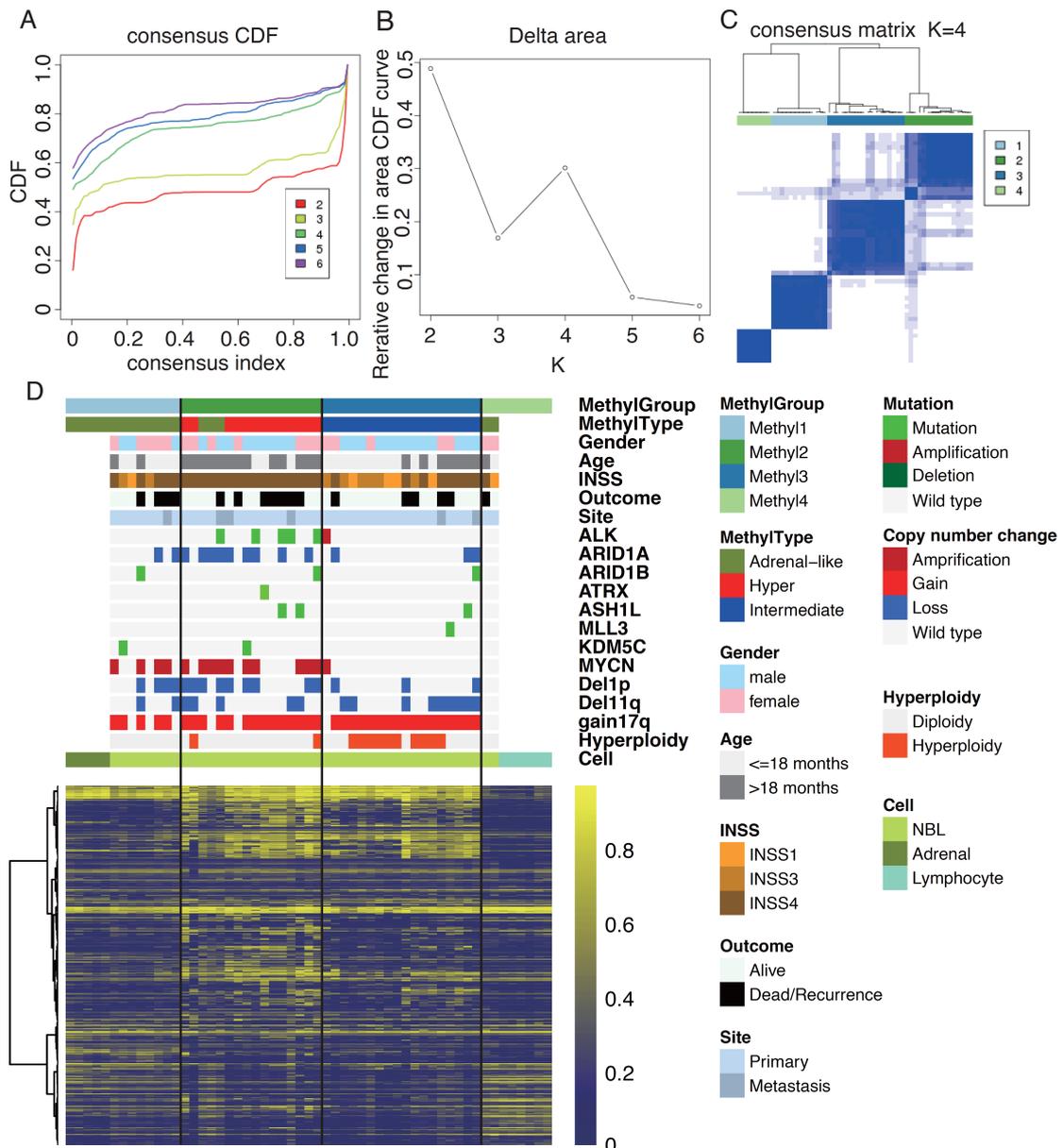


図 13 神経芽腫 44 例（自験例）と公開データ（副腎 5 例、リンパ球 6 例）のメチル化アレイデータを用いた、コンセンサスクラスタリングによる解析結果 (A) クラスターの数、K=2 から K=6 におけるコンセンサスマトリックスの累積分布関数 (CDF:cumulative distribution function) を図示する。(B) CDF カーブ下の面積の相対的变化を示す。K=3 から 4 への変化が高くなっており、本研究と公開データを統合した網羅的メチル化解析では、4 群のクラスターにおいて最も特徴が顕著となることを示す。(C) 4 群のモデル (K=4) におけるコンセンサスマトリックスを示す。(D) DNA メチル化のヒートマップと臨床情報、リスク分類、遺伝子変異の統合的な図を示す。MethylType は図 11-D におけるクラスタリングの結果を提示しているが、Adrenal-like 群に分類されていた検体のうち、2 例はリンパ球と同じ群に、3 例は Hyper-methylated 群に分類され、正常組織の混入が疑われた。NA, not available.

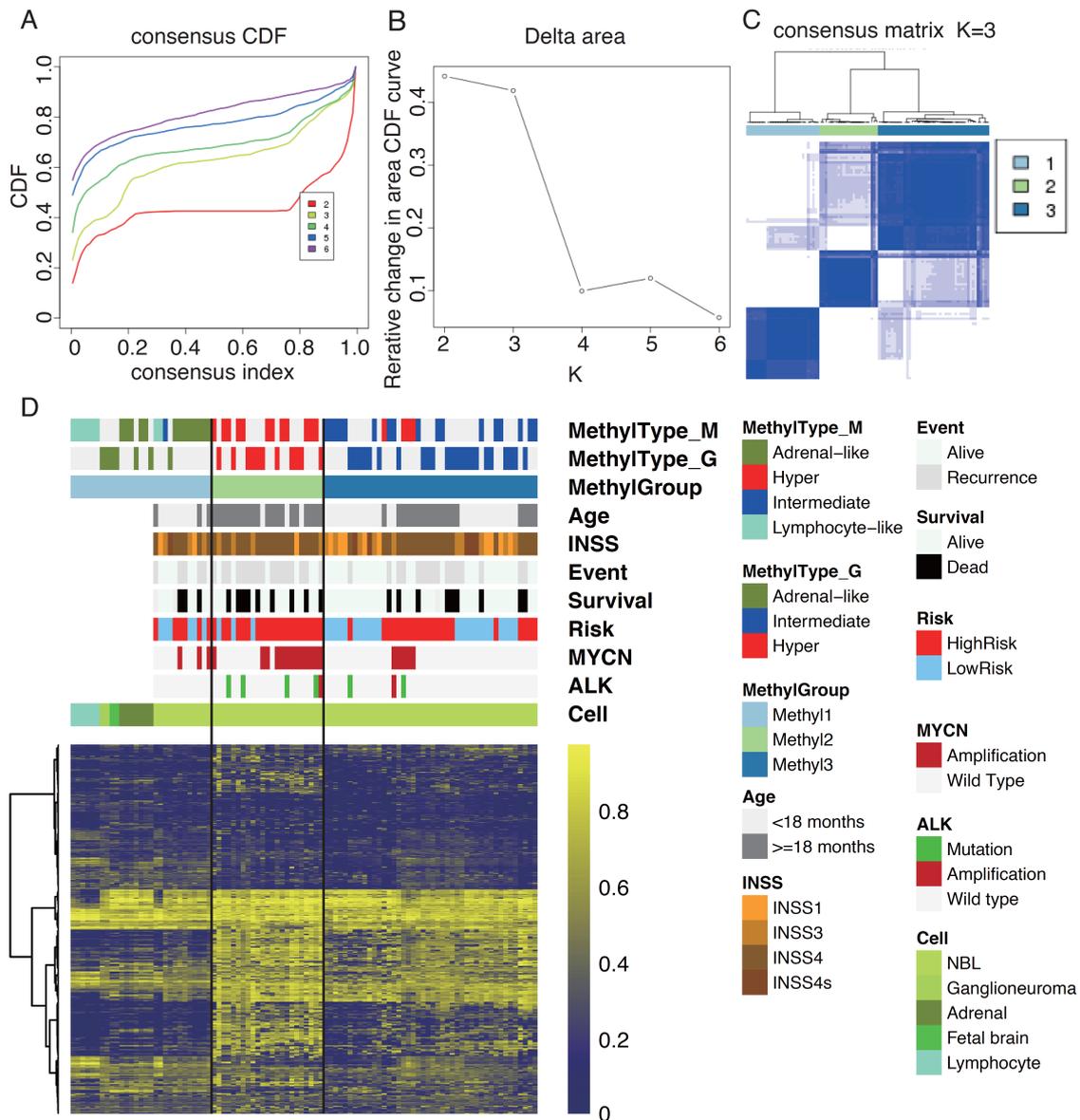


図 14 神経芽腫 44 例（自験例）と公開データ(Gomez らの神経芽腫 35 例、神経節芽腫 2 例、副腎 11 例、リンパ球 6 例)のメチル化アレイデータを統合した、コンセンサスクラスタリングによる解析結果 (A) クラスターの数が、K=2 から K=6 におけるコンセンサスマトリックスの累積分布関数(CDF:cumulative distribution function)を図示する。(B) CDF カーブ下の面積の相対的変化を示す。K=3 の値が高くなっており、本研究と公開データを統合した網羅的メチル化解析では、3 群のクラスターにおいて最も特徴が顕著となることを示す。(C)3 群のモデル (K=3) におけるコンセンサスマトリックスを示す。(D)DNA メチル化のヒートマップと臨床情報、リスク分類、遺伝子変異の統合的な図を示す。MethylType\_M は本研究におけるメチル化クラスター分類(図 13-D)を、MethylType\_G は Gomez らの公開データを同じアルゴリズムで解析したメチル化クラスター分類(図 12-D)を示す。データを統合しても、各実験におけるクラスター分類はほぼ再現されており、このクラスター分類は強固であると考えられる。NA, not available.

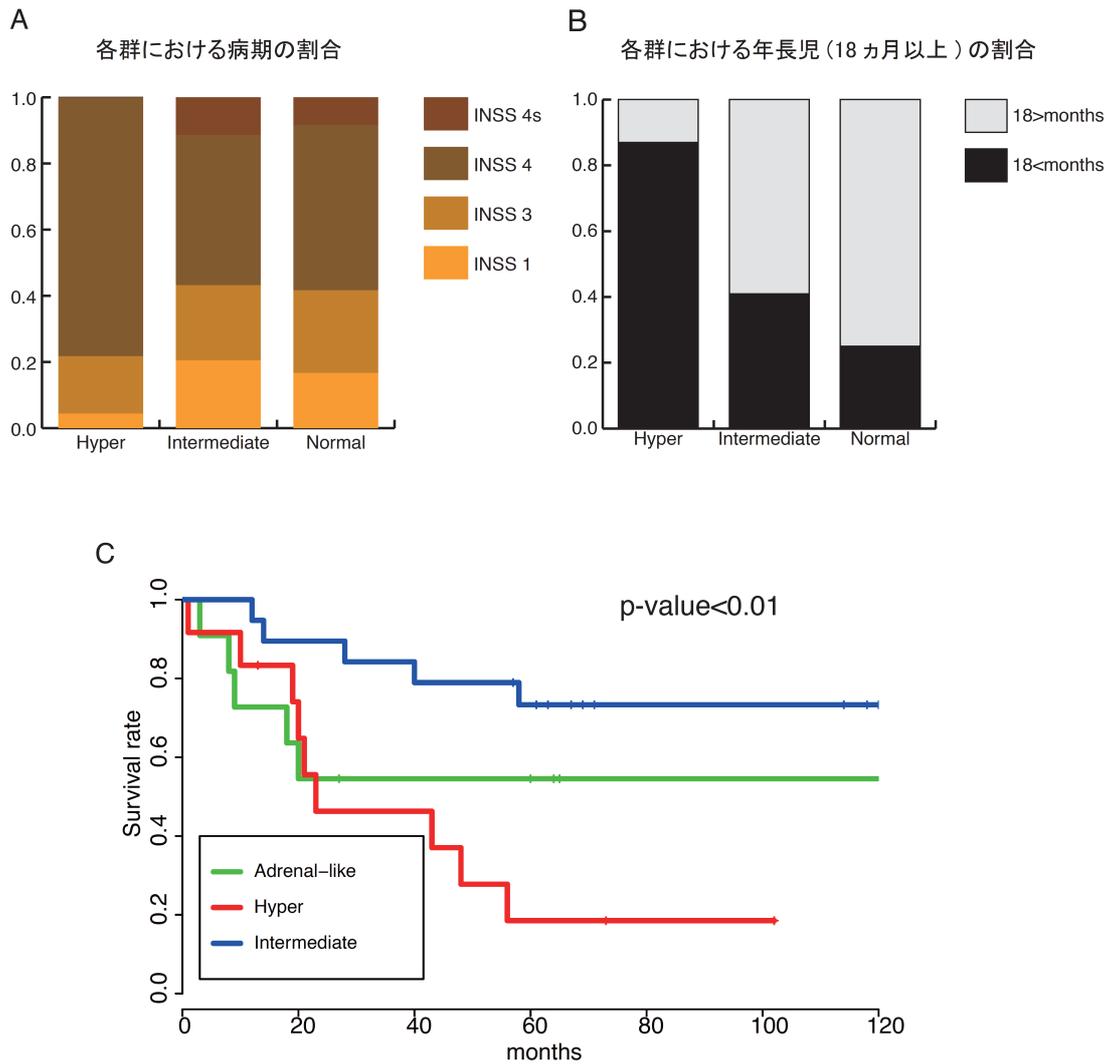


図 15 自験例と Gomez らの公開データを統合したメチル化解析におけるサブグループの臨床像  
 (A) CpG island 領域のメチル化の程度により分類された 3 群間における病期の割合を積み上げグラフで示す。Hyper-methylated 群とにおいて病期 4 の割合は高く、各群における病期 4 の割合をカイニ乗検定を用いて計算したところ、有意差を認めた ( $P<0.05$ )。 (B) 各群における年長児 (18 ヶ月以上) の占める割合を、棒グラフにて示す。各群における年長児の割合をカイニ乗検定を用いて計算したところ、有意差 ( $P<0.01$ ) をもって Hyper-methylated 群で年長児の割合が高かった。  
 (B) 3 群間における 5 年 EFS をカプランマイヤー法にて算出した。Log-rank 検定にて再発率の有意差を認めた ( $P<0.01$ )