無巨核球性血小板減少症を伴う橈尺骨癒合症の原因遺伝子の同定

新堀哲也*, 青木洋子

Novel causative gene for radioulnar synostosis with amegakaryocytic thrombocytopenia

Tetsuya NIIHORI, Yoko AOKI

要約：無巨核球性血小板減少症を伴う橈尺骨癒合症(RUSAT)は骨髄不全、近位橈尺骨癒合症、斜指症などを主徴とするまれな疾患である。われわれは患者1人およびその健常な両親の全エクソーム解析を行い、*MECOM*(*MDS1* and *EV11* complex locus)のミスセンス変異を同定した。*MECOM*は造血幹細胞の自己複製に重要な役割を果たすこと、再生不良性貧血患者で同遺伝子欠失の症例報告があること、発生期にlimb budに一過性に発現することなどから機能的にも原因と強く疑われた。そこで更に2例において同遺伝子を解析し、いずれにおいても1例目の近傍にミスセンス変異を同定した。計3例のうち2例はde novo 変異であり、健常人には同定されず原因と考えられた。*MECOM*は白血病や固形腫瘍において過剰発現、再生不良性貧血症例において欠失が同定されていた。本研究により*MECOM*の特定の部位のミスセンス変異がRUSATを起こすことが明らかとなった。

Key words: RUSAT, *MECOM*, *EV11*, thrombocytopenia, radioulnar synostosis

新堀哲也

2000年
東北大学医学部卒業
2000～2002年
仙台市立病院小児科研修医
2006年
東北大学大学院医学系研究科
博士課程修了(医学博士)
2006～2008年
東北大学病院遺伝科医員
2008～2015年
東北大学大学院医学系研究科
助教
2015年～
東北大学大学院医学系研究科
准教授
2016年～
Duke大学 Center for Human
Disease Modeling客員研究員

1. はじめに

無巨核球性血小板減少症を伴う橈尺骨癒合症(Radio-Ulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia, RUSAT)は、遺伝性骨髄不全症候群(Inherited Bone Marrow Failure Syndrome, IBMFS)の一つであり、血小板が中心ではあるが3血球系統におよぶ血球減少、前腕の回内・回外制限(手のひらの向きを変えづらい)を症状とする近位橈尺骨癒合症、主に第五指が橈骨側に偏位している斜指症(または彎指症, clinodactyly)などを主徴とする。近年は次世代シーケンサーの普及により網羅的遺伝子解析

が可能となり、同じIBMFSに分類されるDiamond-Blackfan 貧血やFanconi 貧血などでも新規原因遺伝子の同定が報告されているが¹⁾、われわれもRUSATの新規原因遺伝子を同定したので²⁾ここに紹介する。

2. RUSATの臨床像

RUSATは大変まれな疾患であり、症例報告も少ない(表1)。RUSATに関する最初の報告は1989年にDokalらによってなされたものと考えられる³⁾。彼らは4世代6人が橈尺骨癒合症を持ち、そのうち2人が骨髄不全であるイギリスの家系と、2世代10人が橈尺骨癒合症を持ち、そのうち2人が再生不良性貧血であるポルトガル家系の2家系を報告しており、それら2家系は(1)成人発症、進行性の3血球系統の骨髄不全、(2)家族内での造血不全症状の多様性を持つ、(3)常染色体優性遺伝形式の近位橈尺骨癒

*責任者連絡先：
東北大学大学院医学系研究科遺伝医療学分野
〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町1-1
Tel: 022-717-8139, Fax: 022-717-8142
E-mail: tniihori@med.tohoku.ac.jp

表 1 RUSAT 症例まとめ

報告者	Dokal ら ³⁾				Tompson ら ^{4,12)}				Sola ら ⁵⁾	Sugita ら ⁶⁾ , Nihihori ら ²⁾	Yoshida ら ⁷⁾ , Nihihori ら ²⁾	Castillo-Caro ら ⁸⁾	Nihihori ら ²⁾
患者	case 1	case 2	case 3	case 4	case 1	case 2	-	case 3	case 4	-	TRS3 ²⁾	-	TRS1
家族歴	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
家族における 関係	発端者	case 1 のおば	発端者	case 3 の弟	発端者 の妹	case 1 の妹	case 1, 2 の父	発端者	case 3 の妹	N の母	-	-	-
性別	女	女	男	男	女	女	男	男	女	女	男	男	女
血液疾患発症 年齢	31 歳	70 歳	22 歳	18 歳	2 日	1 日	なし	数週	生下時	n.d.	生下時	生下時	生下時
白血球 (μl)	3,100	4,200	1,900	3,400	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	17,100	3,220	7,000	6,780
ヘモグロビン (g/dl)	10.7	12	9.9	12.9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12.9	2.7	8.6	4
血小板 (μl)	15,000	118,000	3,000	97,000	8,000	32,000	n.d.	19,000	66,000	44,000	89,000	8,000	5,000
造血幹細胞移 植	-	-	-	-	骨髄移植 (6 カ月)	臍帯血移植 (2 カ月)	-	case 4 をド ナーとする 骨髄移植 (7 歳)	-	幹細胞移植 (不明)	骨髄移植 (8 カ月時)	同胞をドナー とする骨髄移 植 (3 カ月)	臍帯血移植 (4 カ月)
腕尺骨癒合症	両側	両側	両側	両側	両側	両側	両側	両側	片側	両側	両側	両側	両側
指異常	両側第五 指斜指症	n.d.	n.d.	n.d.	右斜指症	n.d.	合指症 (詳 細記載な し), 両側第 五指斜指症	両側第五指 斜指症	両側第五指 斜指症	両側第五指 斜指症	指の重なり	両側第五指斜 指症	両側第五指中 節骨欠損, 第 四指中節骨短 縮症
聴力	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	両側感音性 難聴	n.d.	n.d.	両側感音性 難聴	n.d.	正常
その他	n.d.	巨赤血球 症 (MCV 107.6 fl),	n.d.	n.d.	浅い白蓋, 左股関節垂 脱臼	浅い白蓋, 左股関節脱 臼	骨髄不全な し	n.d.	n.d.	n.d.	胎児水腫, 軽 度精神発達遅 滞 (IQ 67), 陰嚢水腫	n.d.	-
遺伝子解析	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	HOXA11 c.872delA, p.Asn291fs	HOXA11 c.872delA, p.Asn291fs	HOXA11 c.872delA, p.Asn291fs	HOXA11 c.872delA, p.Asn291fs	HOXA11 c.872delA, p.Asn291fs	n.d.	MECOM c.2248C>T, p.Arg7501rp	HOXA11 変異 なし	MECOM c.2266A>G, p.Thr756Ala

+: あり, - : なし, n.d. : 報告なし

合、(4)骨髄球、リンパ球における細胞遺伝学的異常はない、という点で共通していた。約10年後にThompsonらによって新たな2家系が報告された⁴⁾。家系1の発端者は白人とネイティブアメリカンを祖先とする女兒(表1, Thompsonらのcase1)で、生後2日で血小板減少に気づかれ、両側の近位橈尺骨癒合症を持っていた。輸血依存性に経過し、6カ月までには汎血球減少となり、非血縁者間骨髄移植を受けた。またその妹(同case2)も生後血小板減少に気づかれ、両側の近位橈尺骨癒合症を合併し、2カ月時に非血縁者間臍帯血移植を受けている。その父は両側近位橈尺骨癒合症を持っていたが、血球減少はなかった。家系2の発端者はフィリピン人を祖先とする男児(同case3)で、生後数週のうちに血小板減少に、2歳時には発語の遅れと感音性難聴に気づかれた。6歳までに再生不良性貧血となり、7歳時に妹をドナーとして骨髄移植を受けた。この妹(同case4)は片側性の近位橈尺骨癒合症と生後一過性の血小板減少があった。発端者では移植1カ月後にはドナー細胞での造血が確認されたものの、70日目までには血小板減少を認めた。肺炎や菌血症を発症するなど次第に症状は悪化し、移植後1年でシュードモナス肺炎により死亡した。彼らの父は両側の回内・回外に制限があるものの、出血や血小板減少の既往はなかった。ThompsonらはCongenital thrombocytopenia and radio-ulnar synostosisとして発表し、Dokalらの例では成人発症で3血球系統の骨髄不全であることに言及している。その後も先天性症例の報告が続くものの⁵⁻⁸⁾、Thompsonらの2家系いずれにおいても患者の父は骨格異常のみで血球減少はなく、case4では一過性の血小板減少症以後無症候性に経過しており、Solaらの症例報告⁵⁾においても先天性である発端者(表1, N)の母は血小板減少がごく軽度の患者であることから、本疾患は血球減少が明らかでないものから重篤なものまで幅広い症状をとりうると思われる。また、他のIBMFSではしばしば血液腫瘍や固形腫瘍の発生リスクの増加が見られるが⁹⁾、RUSATにおいてはそのような報告はない。

鑑別疾患としては他のIBMFSが重要である。Fanconi 貧血、Diamond-Blackfan 貧血、Thrombocytopenia - Absent Radii (TAR) 症候群などはRUSAT同様、前腕・指の異常を合併するが、それらでは現在

までに近位橈尺骨癒合の報告はない。Fanconi 貧血は常染色体またはX連鎖劣性遺伝形式をとる。汎血球減少、皮膚色素沈着、低身長、性腺機能不全とともに身体奇形が診断基準に挙げられ、上肢の異常としては母指低形成、多指症、橈骨欠損などが見られる。Diamond-Blackfan 貧血は常染色体優性遺伝形式をとり、大球性貧血を呈する。上肢の異常としては母指球の平坦化や母指骨異常、橈骨低形成などが見られる。TAR 症候群は常染色体劣性遺伝形式をとり、橈骨の無形成(母指は保たれる)と学校入学までにはほぼ正常ほどに改善する血小板減少症が特徴である。一方、先天性橈尺骨癒合症はそれのみを持つ場合では常染色体優性遺伝形式の報告がある¹⁰⁾。また、症候群の一症状としては、核型が48,XXXY, 49,XXXXYを含むクラインフェルター症候群、Williams 症候群、Holt-Oram 症候群、Apert 症候群などに合併することが知られている¹¹⁾。

3. RUSAT の原因遺伝子

ホメオボックス遺伝子は体節などの形態形成や血球の分化・増殖に重要な役割を持つことが知られており、とくにHOXA10, HOXA11は前腕の形態形成に関与する¹²⁾。このことにThompsonらは着目し、前述の2家系についてHOXA10, HOXA11を責任候補遺伝子として解析を行い、異なる人種の2家系の患者6人が同一のHOXA11の1塩基欠失変異をヘテロ接合性に持っていることを示し、HOXA11変異とRUSATの関連を発表した¹²⁾。しかしそれ以降RUSATにおけるHOXA11変異の報告はなく、HOXA11変異を持たないRUSAT症例の報告が続き⁶⁻⁸⁾、HOXA11以外の疾患関連遺伝子の存在が示唆されていた。

そこでわれわれは次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンス(WES)をRUSAT患者1名(症例TRS1)およびその健常な両親の末梢血から抽出したDNAを用いて行った。その結果、MECOM (MDS1 and EVI1 complex locus)にde novoのミスセンス変異を同定した²⁾。その後患者は臍帯血移植を受けたが、変異が血液のみで起こった体細胞変異である可能性を否定するため、毛髪、爪、頬粘膜細胞由来のDNAを用いて同変異を解析し、その存在を確認した。更にHOXA11変異陰性として症例報告さ

図1 Evi1 の構造

(A)Evi1 のドメイン構造とアイソフォーム. 主要なアイソフォームとして, MDS1-EVI1, EVI1, 6, 7 番目の ZF モチーフを含む 324 アミノ酸が欠失する EVI1Δ324 が存在する. EVI1, EVI1Δ324 は PR ドメインを欠いている. いずれのアイソフォームも 7 つ(または 5 つ)の ZF モチーフからなる N-ZF ドメインと, 3 つの ZF モチーフからなる C-ZF ドメインを持つ. (B)8 番目の ZF モチーフの立体構造および患者で同定された変異の分布. Cys735, Cys738, His751, His755 は亜鉛イオンと結合し, 立体構造の安定化に重要な役割を果たしている. 患者で同定された変異は Arg750, His751, Thr756 に存在した. (文献 2 より引用)

れていた 2 例^{6,7)}について *MECOM* のエクソン領域および近接するイントロンを解析した. いずれも骨髓移植後であったため毛髪, 爪, 頬粘膜細胞での解析を行い, それぞれの症例においてミスセンス変異を同定した²⁾. しかしいずれの例でも爪, 頬粘膜細胞ではシーケンスにおける野生型と変異のピークの割合が 1:1 ではなく, とくに症例 TRS2 の爪では変異が同定されなかった. 体細胞モザイクの可能性は否定できないものの, 爪にはドナー由来 DNA の混入が多い場合があること¹³⁾や, 頬粘膜細胞検体にもドナー由来 DNA の混入が存在すること¹⁴⁾から, いずれもそのためである可能性が高い. また, 健常両親の解析によって症例 TRS2 での変異も *de novo* であることが確認され, 症例 TRS3 においても健常な母では変異が同定されなかった²⁾. 合計 3 例で同定された 3 つの変異は日本人 382 人の健常人には同

定されず, dbSNP, 1000 ゲノムプロジェクト, Exome Aggregation Consortium (ExAC), Human genetic variation database¹⁵⁾といった公共のバリエーションデータベースには含まれていなかった. 更にそれらは EVI1 の N 末端から 8 番目のジンクフィンガー (ZF) モチーフに集中しており (図 1A), 種を超えて保存されているアミノ酸配列内に存在していた. SIFT, PROVEAN, Polyphen-2, LRT, MutationTaster といった変異の機能予測解析でいずれも *damaging* や *deleterious* とされた. 以上より RUSAT 患者で同定された変異は疾患原因であると考えられた.

4. *MECOM* の機能

MECOM は染色体 3q26 に位置し, 多種類の産物が転写されることが知られている. RefSeq には 7

種類の転写産物および5種類のタンパクが登録され、アイソフォームにはMDS1-EVI1, EVI1, およびEVI1Δ324などが存在する¹⁶⁾。(図1A)いずれも転写調節因子であり、生体の発生や細胞の増殖・分化において多彩な役割を持つ。MDS1は当初AML1(RUNX1)との融合タンパクの一部として発見された¹⁷⁾。EVI1はecotropic viral integration 1 siteの略であり、マウス骨髄性白血病で見られるレトロウイルスの挿入部位として同定されたことに由来している¹⁸⁾。また、ヒトにおいてもX連鎖慢性肉芽腫症の遺伝子治療の際のレトロウイルスの挿入部位として知られている¹⁹⁾。これまでEVI1としては1051アミノ酸のアイソフォーム(EVI1_aとして知られる)が最も研究に用いられている。

*Mecom*は発生期には尿路やMuller管、肺、心臓、limb budに発現している²⁰⁾。Limb budでの発現パターンから、四肢の形態形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている²⁰⁾。*MECOM*は成人においても腎、脾、肺、卵巣²¹⁾、造血幹細胞²²⁾等で発現しており、造血前駆細胞から分化していくに従いその発現は減少する²³⁾。AMLにおいて、inv(3)(q21;q26), t(3;3)(q21;q26)などの3q26を含む領域の構造異常を伴う過剰発現は5-10%程度に見られるとされ、予後不良因子である²⁴⁾。また、白血病のみならず、卵巣がん²⁵⁾や大腸がん²⁶⁾などの固形がんでも過剰発現が報告されているがん遺伝子である。Mds1-Evi1, Evi1, Evi1Δ324のいずれのアイソフォームもノックアウトされたマウスは、出血および皮下浮腫を呈し胎生13.5-16.5日に死亡した²⁷⁾。*Mecom*は造血幹細胞の増殖・維持に重要な役割を持つことが知られている²⁴⁾。

MDS1-EVI1はN末端側にPR(PRDI-BF1 and RIZ homology)ドメインと、中央に7つ、C末端側に3つのCys2His2型ZFモチーフを持つ(図1A)。EVI1はPRドメインを持たない¹⁶⁾。PRドメインはヒストンメチル化活性を持つSET(Suppressor of variegation 3-9, Enhancer of zeste and Trithorax)ドメインに相同性を持つが、MDS1-EVI1のヒストンメチル化活性については知られていない。PRドメインはMDS1-EVI1のホモオリゴマー化を調節しているとの報告²⁸⁾はあるが、役割の詳細については不明である。7つのZFモチーフからなるN-ZFドメインと、3つのZFモチー

フからなるC-ZFドメインは、いずれもDNA結合能力を持ち、N-ZFドメインはGATAGAモチーフを、C-ZFドメインはEts-likeモチーフをコンセンサス配列とする²⁹⁾。EVI1のGATA2プロモーターへの結合はN-ZFドメインを介して行われる³⁰⁾。また、両ドメインはタンパク-タンパクの相互作用にも関わっており、N-ZFドメインは、SMAD3との結合を介したTGFβシグナルの抑制³¹⁾、c-Jun N-terminal kinaseとの結合によるアポトーシスの抑制³²⁾、SUV39H1との結合による転写抑制³³⁾、PTENの発現抑制³⁴⁾などに重要な役割を果たしている。また、C-ZFドメインはEVI1のactivator protein-1(AP-1)活性を亢進させる機能に必要とされている³⁵⁾。

5. 患者で同定されたMECOM変異の機能

5-1 立体構造予測

Cys2His2型ZFモチーフは2つのβシートと1つのαヘリックスを持ち、βシート内の2つのシステイン基とαヘリックス内の2つのヒスチジン基が亜鉛イオンと結合し、構造を安定化させている³⁶⁾。(図1B)個々のCys2His2型ZFモチーフは単一の配列を認識することができ、その性質は遺伝子改変技術のZFNにも使用されている³⁷⁾。塩基を認識するのはαヘリックスの始まりを1とすると-1, 2, 3, 6番目の残基であり、EVI1の8番目のZFモチーフにおいては743, 746, 747, 750番目の残基となる。患者で同定された変異は立体構造の解析から、ZFモチーフの構造の安定化に重要なヒスチジン残基およびその周辺に集中していた。(表1, 図1B)また、p.Arg750Trpは上記の塩基を認識する部位に存在しており、患者で同定された変異はZFドメイン構造の不安定化および認識部位の直接の変異によって、DNAとの結合に影響を与えている可能性が示唆された²⁾。

5-2 レポーターアッセイによる評価

EVI1の代表的な機能であるTGFβシグナル伝達経路およびC-ZFドメインが重要な役割を果たすとされるAP-1の活性化に着目してレポーターアッセイを行った。まずTGFβ反応性レポーターベクターp3TP-lux³⁸⁾とともにcDNAを持たない発現ベクターまたは野生型または3種類の変異型EVI1のcDNAを持つ発現ベクターをNIH3T3細胞に導入し、ルシフェラー

ゼ活性を測定したところ、TGFβ 刺激後において cDNA を持たない発現ベクターを導入した場合と比較して野生型 EVI1 を導入した細胞では活性の抑制が認められた。更に患者で同定された変異を持つ EVI1 を導入した場合と比較すると、3 種類全てにおいて抑制効果は減弱していた²⁾。次に、AP-1 の認識配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に持つレポーターベクター pAP-1 を用いて同様の測定を行ったところ、野生型 EVI1 を導入した細胞では活性の抑制が認められた。変異型 EVI1 を導入した細胞においては野生型と比較して 3 種類ともにその抑制効果が増強していた²⁾。野生型 EVI1 による AP-1 の活性化については過去の報告³⁵⁾と合致していないものの、各変異型 EVI1 がプロモーター配列に依存して一方では減弱、一方では増強した効果を見せており、転写調節の障害が病態に関与している可能性が示唆された²⁾。更なる詳細な解析が必要である。

5-3 臨床症状についての考察

MECOM に変異が同定された患者はいずれも孤発例であり、3 例中 2 例では生直後から重度の貧血が見られ、いずれも 18 カ月までに造血幹細胞移植を必要とした。これに対し *HOXA11* 変異陽性の 6 例では 3 例は移植を必要としたものの、3 例は軽度または無症候性に経過している。*HOXA11* 変異陽性症例では臨床症状が幅広い一方で、*MECOM* 変異陽性例では血液症状が重症である可能性が考えられた。また、これまで RUSAT での難聴の合併例は 1 例(*HOXA11* 変異陽性例)のみであったが、*MECOM* 変異陽性例では 3 例中 2 例で感音性難聴を認めた。化学物質誘発の突然変異として *Mecom* p.Asn763Ile (ヒトでは p.Asn782Ile に相同)を持つ Junbo マウスでは、中耳炎および難聴を持つことが報告されている³⁹⁾。しかしわれわれの 2 例は慢性中耳炎の既往は明らかでなく、患者変異が内耳・聴神経の発生に関連している可能性が考えられた。また、同マウスは多指症を持ち、指の異常を示すという点においては RUSAT 患者と共通していた。

5-4 *MECOM* 欠失例との比較

これまでに *MECOM* の欠失例は 2 例報告がある。Nielsen ら⁴⁰⁾は 2012 年に *MECOM* および *EGFEMIP* (偽遺伝子)を含む領域の新生突然変異である欠失を持つ先天性血小板減少症の症例を報告した。本症例は

後に再生不良性貧血となり 4 カ月時に造血幹細胞移植を受けており、血液疾患としての経過は *MECOM* のミスセンス症例に類似しているが、ばち指を除いては形態異常を指摘されていない。もう一例は *MDS1* (*MECOM* の一部)および *TERC* を含む領域の欠失を持つ先天性血小板減少症で呼吸不全により生後 28 日に死亡した症例の報告である⁴¹⁾。*TERC* は先天性角化症の原因遺伝子の一つであり、先天性角化症自体でも血球減少は起こりうるため、本例の血球減少における *MDS1* 欠失の意義は解釈が困難である。Nielsen らの症例では橈尺骨癒合を伴わないこと、および機能解析の結果より、RUSAT 患者で同定された変異は血液に関してはヌルアレルと同様の機能であるが、橈尺骨癒合症の発生においては完全な機能喪失変異ではなく、部分的な機能喪失変異または機能獲得型変異あるいはドミナントネガティブ変異として働いている可能性が考えられた。変異の集中している 8 番目の ZF モチーフは *MDS1-EVI1*, *EVI1* のオリゴマー化に重要な役割を果たしているとしており⁴²⁾、変異体の転写調節に与える影響のメカニズムは興味深い。

6. おわりに

網羅的遺伝子解析技術を用いることによりわれわれは RUSAT の新規原因遺伝子を同定でき、病態把握へ向けて一歩進めることができた。しかし報告症例が極めて少なく、本疾患のとりうる臨床症状および経過の把握は未だ不十分である。また、*HOXA11* および *MECOM* 以外の疾患関連遺伝子が存在する可能性や、更には患者で同定される変異の分布や詳細な genotype-phenotype correlation などを知るためには、更なる症例の蓄積が必要不可欠である。これらは患者の予後予測・治療時期の選択や遺伝カウンセリングに極めて重要な情報となる。患者で同定された遺伝子変異が生体内でどのように機能して症状を生じさせているのかについてもほとんど不明であり、更なる機能解析研究が必要である。現在は骨髄不全に対し造血幹細胞移植などの治療が行われているが、詳細な病態解析が新たな治療法開発へと繋がる可能性もある。病態解析により *MECOM* の機能の詳細が明らかになり、*EVI1* 高発現の腫瘍への治療

に対し新たな知見を加えることもできるかもしれない。今回の新規原因遺伝子同定が契機となり、今後症例の蓄積や病態解明が進み、患者およびその家族に有益な情報および治療の選択肢が得られるようになることが期待される。

7. 謝辞

稿を終えるにあたり、遺伝子解析研究にご協力いただいた患者さんおよびそのご家族、共同研究者である今泉益栄先生(宮城県立こども病院)、笹原洋二先生(東北大学小児科)、および主治医の先生方に感謝いたします。また、本研究はAMED 難治性疾患実用化研究事業「小児科・産科領域疾患の大規模解析ネットワークとエピゲノム解析拠点整備」、成育疾患克服等総合研究事業「原因不明遺伝子関連疾患の全国横断的症例収集・バンキングと網羅的解析(IRUD-P)の支援によって行われました。深謝いたします。

著者全員の利益相反(COI)の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業との利益相反なし

文献

- Okuno Y: Inherited bone marrow failure syndromes. *Rinsho Ketsueki* **57**: 98–103, 2016.
- Niihori T, Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, Kaneko T, Hashii Y, Irie M, Sato A, Saito-Nanjo Y, Funayama R, Nagashima T, Inoue S, Nakayama K, Ozono K, Kure S, Matsubara Y, Imaizumi M, Aoki Y: Mutations in MECOM, Encoding Onco-protein EVI1, Cause Radioulnar Synostosis with Amegakaryocytic Thrombocytopenia. *Am J Hum Genet* **97**: 848–854, 2015.
- Dokal I, Ganly P, Riebero I, Marsh J, Steed A, Kendra J, Drysdale C, Hows J: Late onset bone marrow failure associated with proximal fusion of radius and ulna: a new syndrome. *Br J Haematol* **71**: 277–280, 1989.
- Thompson AA, Woodruff K, Feig SA, Nguyen LT, Schanen NC: Congenital thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis: a new familial syndrome. *Br J Haematol* **113**: 866–870, 2001.
- Sola MC, Slayton WB, Rimsza LM, Perez JA, Fuchs D, Fuch D, Calhoun DA, Christensen RD: A neonate with severe thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis. *J Perinatol* **24**: 528–530, 2004.
- Sugita M, Yokokawa Y, Yoneyama H, Kaneko T: A case of amegakaryocytic thrombocytopenia with radio-ulnar synostosis syndrome, successfully treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* **92**(Suppl 1): 1, 2007.
- Yoshida H, Hashii Y, Okuda T, Kusuki S, Sato E, Inoue A, Kawakami C, Yabe M, Ohta H, Ozono K: A case of congenital bone marrow failure with radio-ulnar synostosis. *Int J Hematol* **91**: 331–332, 2010.
- Castillo-Caro P, Dhanraj S, Haut P, Robertson K, Dror Y, Sharathkumar AA: Proximal radio-ulnar synostosis with bone marrow failure syndrome in an infant without a HOXA11 mutation. *J Pediatr Hematol Oncol* **32**: 479–485, 2010.
- Khincha PP, Savage SA: Neonatal manifestations of inherited bone marrow failure syndromes. *Semin Fetal Neonatal Med* **21**: 57–65, 2016.
- Rizzo R, Pavone V, Corsello G, Sorge G, Neri G, Opitz JM: Autosomal dominant and sporadic radio-ulnar synostosis. *Am J Med Genet* **68**: 127–134, 1997.
- Charvat KA, Hornstein L, Oestreich AE: Radio-ulnar synostosis in Williams syndrome. A frequently associated anomaly. *Pediatr Radiol* **21**: 508–510, 1991.
- Thompson AA, Nguyen LT: Amegakaryocytic thrombocytopenia and radio-ulnar synostosis are associated with HOXA11 mutation. *Nat Genet* **26**: 397–398, 2000.
- Imanishi D, Miyazaki Y, Yamasaki R, Sawayama Y, Taguchi J, Tsushima H, Fukushima T, Yoshida S, Sasaki H, Hata T, Tomonaga M: Donor-derived DNA in fingernails among recipients of allogeneic hematopoietic stem-cell transplants. *Blood* **110**(7): 2231–2234, 2007.
- Berger B, Parson R, Clausen J, Berger C, Nachbaur D, Parson W: Chimerism in DNA of buccal swabs from recipients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantations: implications for forensic DNA testing. *Int J Legal Med* **127**: 49–54, 2013.
- Higasa K, Miyake N, Yoshimura J, Okamura K, Niihori T, Saito H, Doi K, Shimizu M, Nakabayashi K, Aoki Y, Tsurusaki Y, Morishita S, Kawaguchi T, Migita O, Nakayama K, Nakashima M, Mitsui J, Narahara M, Hayashi K, Funayama R, Yamaguchi D, Ishiura H, Ko WY, Hata K, Nagashima T, Yamada R, Matsubara Y, Umezawa A, Tsuji S, Matsumoto N, Matsuda F: Human genetic variation database, a reference database of genetic variations in the Japanese population. *J Hum Genet* **61**: 547–553, 2016.
- Goyama S, Kurokawa M: Evi-1 as a critical regulator of leukemic cells. *Int J Hematol* **91**: 753–757, 2010.
- Nucifora G, Begy CR, Kobayashi H, Roulston D, Claxton D, Pedersen-Bjergaard J, Parganas E, Ihle JN, Rowley JD: Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(9): 4004–4008, 1994.
- Morishita K, Parker DS, Mucenski ML, Jenkins NA, Copeland NG, Ihle JN: Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger protein in IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *Cell* **54**: 831–840, 1988.
- Stein S, Ott MG, Schultze-Strasser S, Jauch A, Burwinkel B, Kinner A, Schmidt M, Krämer A, Schwäbe J, Glimm H, Koehl U, Preiss C, Ball C, Martin H, Göhring G, Schwarzwälder K, Hofmann WK, Karakaya K, Tchatchou S, Yang R, Reinecke P, Kühlcke K, Schlegelberger B, Thrasher AJ, Hoelzer D, Seger

- R, von Kalle C, Grez M: Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat Med* **16**: 198–204, 2010.
- 20) Perkins AS, Mercer JA, Jenkins NA, Copeland NG: Patterns of Evi-1 expression in embryonic and adult tissues suggest that Evi-1 plays an important regulatory role in mouse development. *Development* **111**: 479–487, 1991.
 - 21) Morishita K, Parganas E, Parham DM, Matsugi T, Ihle JN: The Evi-1 zinc finger myeloid transforming gene is normally expressed in the kidney and in developing oocytes. *Oncogene* **5**(9): 1419–1423, 1990.
 - 22) Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, Van Galen P, Metzeler KH, Poepl A, Ling V, Beyene J, Canty AJ, Danska JS, Bohlander SK, Buske C, Minden MD, Golub TR, Jurisica I, Ebert BL, Dick JE: Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med* **17**(9): 1086–1093, 2011.
 - 23) Steinleitner K, Rampetsreiter P, Koffel R, Ramanathan G, Mannhalter C, Strobl H, Wieser R: EVI1 and MDS1/EVI1 expression during primary human hematopoietic progenitor cell differentiation into various myeloid lineages. *Anticancer Res* **32**(11): 4883–4889, 2012.
 - 24) Kataoka K, Kurokawa M: Ecotropic viral integration site 1, stem cell self-renewal and leukemogenesis. *Cancer Sci* **103**(8): 1371–1377, 2012.
 - 25) Sunde JS, Donninger H, Wu K, Johnson ME, Pestell RG, Rose GS, Mok SC, Brady J, Bonome T, Birrer MJ: Expression profiling identifies altered expression of genes that contribute to the inhibition of transforming growth factor-beta signaling in ovarian cancer. *Cancer Res* **66**(17): 8404–8412, 2006.
 - 26) Deng X, Cao Y, Liu Y, Li F, Sambandam K, Rajaraman S, Perkins AS, Fields AP, Hellmich MR, Townsend CM, Thompson EA, Ko TC: Overexpression of Evi-1 oncoprotein represses TGF- β signaling in colorectal cancer. *Mol Carcinog* **52**: 255–264, 2013.
 - 27) Goyama S, Yamamoto G, Shimabe M, Sato T, Ichikawa M, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M: Evi-1 is a critical regulator for hematopoietic stem cells and transformed leukemic cells. *Cell Stem Cell* **3**: 207–220, 2008.
 - 28) Nitta E, Izutsu K, Yamaguchi Y, Imai Y, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H: Oligomerization of Evi-1 regulated by the PR domain contributes to recruitment of corepressor CtBP. *Oncogene* **24**(40): 6165–6173, 2005.
 - 29) Bard-Chapeau EA, Jeyakani J, Kok CH, Muller J, Chua BQ, Gunaratne J, Batagov A, Jenjaroenpun P, Kuznetsov VA, Wei CL, D'andrea RJ, Bourque G, Jenkins NA, Copeland NG: Ecotopic viral integration site 1 (EVI1) regulates multiple cellular processes important for cancer and is a synergistic partner for FOS protein in invasive tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(6): 2168–2173, 2012.
 - 30) Yuasa H, Oike Y, Iwama A, Nishikata I, Sugiyama D, Perkins A, Mucenski ML, Suda T, Morishita K: Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. *Embo J* **24**(11): 1976–1987, 2005.
 - 31) Kurokawa M, Mitani K, Irie K, Matsuyama T, Takahashi T, Chiba S, Yazaki Y, Matsumoto K, Hirai H: The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. *Nature* **394**(6688): 92–96, 1998.
 - 32) Kurokawa M, Mitani K, Yamagata T, Takahashi T, Izutsu K, Ogawa S, Moriguchi T, Nishida E, Yazaki Y, Hirai H: The evi-1 oncoprotein inhibits c-Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death. *EMBO J* **19**(12): 2958–2968, 2000.
 - 33) Spensberger D, Delwel R: A novel interaction between the proto-oncogene Evi1 and histone methyltransferases, SUV39H1 and G9a. *FEBS Lett* **582**(18): 2761–2767, 2008.
 - 34) Yoshimi A, Goyama S, Watanabe-Okochi N, Yoshiki Y, Nannya Y, Nitta E, Arai S, Sato T, Shimabe M, Nakagawa M, Imai Y, Kitamura T, Kurokawa M: Evi1 represses PTEN expression and activates PI3K/AKT/mTOR via interactions with polycomb proteins. *Blood* **117**(13): 3617–3628, 2011.
 - 35) Tanaka T, Nishida J, Mitani K, Ogawa S, Yazaki Y, Hirai H: Evi-1 raises AP-1 activity and stimulates c-fos promoter transactivation with dependence on the second zinc finger domain. *J Biol Chem* **269**(39): 24020–24026, 1994.
 - 36) Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO: DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**: 183–212, 2000.
 - 37) Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH., Chandrasegaran S: Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **33**(18): 5978–5990, 2005.
 - 38) Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J: TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* **71**(6): 1003–1014, 1992.
 - 39) Parkinson N, Hardisty-Hughes RE, Tateossian H, Tsai HT, Brooker D, Morse S, Lalane Z, Mackenzie F, Fray M, Glenister P, Woodward AM, Polley S, Barbaric I, Dear N, Hough TA, Hunter AJ, Cheeseman MT, Brown SD: Mutation at the Evi1 locus in Junbo mice causes susceptibility to otitis media. *PLoS Genet* **2**(10): e149, 2006.
 - 40) Nielsen M, Vermont CL, Aten E, Ruivenkamp CA, van Herrewegen F, Santen GW, Breuning MH: Deletion of the 3q26 region including the EVI1 and MDS1 genes in a neonate with congenital thrombocytopenia and subsequent aplastic anaemia. *J Med Genet* **49**: 598–600, 2012.
 - 41) Bouman A, Knecht L, Gröschel S, Erpelinck C, Sanders M, Delwel R, Kuijpers T, Cobben JM: Congenital thrombocytopenia in a neonate with an interstitial microdeletion of 3q26.2q26.31. *Am J Med Genet A* **170A**: 504–509, 2016.
 - 42) Senyuk V, Sinha KK, Li D, Rinaldi CR, Yanamandra S, Nucifora G: Repression of RUNX1 activity by EVI1: a new role of EVI1 in leukemogenesis. *Cancer Res* **67**(12): 5658–5666, 2007.