

200936229A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

先天性赤芽球癆（**Diamond Blackfan 貧血**）の

効果的診断法の確立に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 22（2010）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科・小児科学・教授)	
II. 分担研究報告書	
1. リボソームタンパクの遺伝子解析	9
照井 君典 (弘前大学医学部附属病院・小児科・助教)	
2. 中央診断の整備	11
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科・小児科学・教授)	
3. 小児期造血障害疾患登録による先天性赤芽球癆の疫学 データベース構築	13
小原 明 (東邦大学医療センター大森病院・輸血部・部長)	
4. 遺伝子型と表現型に基づいた治療法確立に関する研究	15
大賀 正一 (九州大学病院総合周産期母子医療センター・准教授)	
5. リボソームタンパク質の発現解析	17
浜口 功 (国立感染症研究所血液・安全性研究部・部長)	
6. Diamond Blackfan 貧血診断法の開発	21
森尾 友宏 (東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野・准教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
IV. 研究成果の刊行物・別冊	29

I . 総括研究報告

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

研究代表者 伊藤 悦朗（弘前大学大学院医学研究科 小児科学 教授）

研究要旨： Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、乳児期に発症する赤血球造血のみが障害される先天性の赤芽球癆である。約40%の例は種々の奇形を合併する。治療は副腎皮質ステロイドが第一選択であるが、ステロイド依存や輸血依存症例が全体の約40%存在する。難治例には造血幹細胞移植（HSCT）が行なわれている。これまでに、原因遺伝子として6種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子が同定されている。海外では約50%のDBA患者にRP遺伝子の変異が認められ、DBAはリボソームの異常に起因した新たな疾患「リボソーム病」の一つであると考えられるようになった。また、家族内に発端者と同一の遺伝子異常をもつ貧血のない軽症例が存在することも明らかになった。本症が悪性疾患を合併しやすいことから、HSCTのドナーを選択する上で軽症例の診断は重要課題になっている。しかし、本邦では原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなく、家族の解析もほとんど行なわれていない。軽症例も含めたDBAの診断基準の作成は海外でも検討が始まったばかりであり、我が国でも利用できるような診断基準は存在しない。我が国では、毎年約7例のDBAが新規に発症していると推定されているが、診断は各施設に任せられており血液標本の中央診断も施行されていなかった。

新たに中央診断された症例とこれまでに弘前大学小児科が全国から収集した 49 例（45 家系）の臨床検体の遺伝子解析を行った。DBA で遺伝子変異が報告されている 6 遺伝子（*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*）と 5q-症候群の原因遺伝子として最近同定された *RPS14* を解析した。その結果、*RPS19* 遺伝子変異が 7 例（6 家系）で検出され、その内の 3 つは新しい遺伝子変異であった。*RPL5* 変異は 4 例、*RPL11* 変異は 2 例、*RPS17* 変異は 1 例で検出された。*RPS19*, *RPL5*, *RPL11* の遺伝子変異の頻度は、それぞれ 13%、9%、4% および 2% であった。一方、*RPS24*、*RPL35a* および *RPS14* 遺伝子には変異を認めなかった。興味深いことに、*RPS19* あるいは *RPL5* の変異をもつ患者は全例とも身体的異常を合併していた。特に、*RPL5* 変異をもつ症例の内の 2 例は、*RPL5* 変異を持たない 45 例では 1 例のみに認められた口蓋裂を合併していた。以上、本邦における DBA の発端者 45 例中 13 例（29%）に RP 遺伝子の変異を認めた。欧米に比して本邦における RP 遺伝子の変異頻度は低く、70% の症例では原因遺伝子が不明であることが明らかになった。また、DBA の確定診断にリボソームタンパク（RP）の発現量の低下がバイオマーカーとして有用であることを見出した。バイオマーカーとしての有用性について検証を進めている。以上の結果と海外からの報告を参考にして、軽症例を含む DBA の診断基準案を作成した。この診断基準案を含む診断の手引きを添えて、全国の小児科専門医研修施設（520 施設）および小児血液学会評議員（150 名）を対象に、一次疫学調査を行った。その結果、132 例の DBA 症例の報告があった。来年度以降さらに詳細に二次調査を行う予定である。

【研究分担者】

照井君典：弘前大学医学部附属病院	助教	大賀正一：九州大学病院総合周産期医療センター	准教授
小島勢二：名古屋大学大学院医学系研究科	教授	浜口 功：国立感染症研究所	部長
小原 明：東邦大学医療センター大森病院	教授	森尾友宏：東京医科歯科大学大学院	准教授

A. 研究目的

Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。治療は副腎皮質ステロイドが第一選択であるが、ステロイド依存や輸血依存症例が全体の約40%存在する。難治例には造血幹細胞移植 (HSCT) が行なわれている。原因遺伝子として6種類のリボソームタンパク (RP) 遺伝子が同定されている。海外では約40%のDBA患者にRP遺伝子の変異が認められているが、本邦では原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなく、家族の解析も行なわれていない。家族内に発端者と同一の遺伝子異常をもつ貧血のない軽症例が存在する。本症が悪性疾患を合併しやすいことから、造血幹細胞移植のドナーを選択する上で軽症例の診断は重要課題になっている。しかし、本邦では原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなく、家族の解析もほとんど行なわれていない。軽症例も含めたDBAの診断基準の作成は海外でも検討が始まったばかりであり、我が国でも利用できるような診断基準は存在しない。本研究の目的はDBAの診断基準を作成し、それに基づいた家族内の軽症例をも含む包括的な疾患登録を行ない、本症の全貌を明らかにすることである。中央診断を伴う登録システムの確立することで、我が国における疫学を明らかにすることができる。さらに、原因遺伝子の解析と疾患特異的なバイオマーカーの検索を行ない、病態解明とともに精度の高い診断を目指す。80個のRP遺伝子をすべて解析し、新規原因遺伝子を同定する。

また、小児施設を対象に一次アンケート調査を行い、後方視的に我が国における本症の実態を把握する。一次調査で把握された症例を対象に二次調査、さらに遺伝子解析を行う。

B. 研究方法

1) 疾患登録システムの確立 (図1)

日本小児血液学会の疾患登録システムの中でDBAの登録システムを立ち上げ、これを用いてオンラインによる登録ができるようにする。オンライン登録ができない場合は、FAXによる登録も受け付け

る。中央診断は末梢血や骨髄塗抹標本を用いて主に名古屋大学で行い、遺伝子解析は弘前大学で行う。

2) 遺伝子解析

新たに中央診断された症例とこれまでに弘前大学小児科が全国から収集した49例(45家系)の臨床検体の遺伝子解析を行った。末梢血からDNAを抽出し、DBAで遺伝子変異が報告されている6遺伝子(*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*)と5q-症候群の原因遺伝子として最近同定された*RPS14*を解析した。遺伝子解析は、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、本人あるいは両親の同意の上実施した。

3) DBA診断のタンパク質バイオマーカーの探索

我々は、DBAの確定診断にリボソームタンパク(RP)の発現量の低下がバイオマーカーとして有用であることを見出した。まず始めに最も変異報告の多い*RPS19*について抗*RPS19*抗体でタンパク質発現量を測定し、バイオマーカーとしての有用性について検証する。*RPS19*に変異のあるDBA患者より採取した血液細胞を用いてウエスタンブロッティング法で*RPS19*の発現量を測定し、GAPDHとの比較で定量する。健常人の値と比較し、患者で*RPS19*の発現量が有意に減少しているか検討する。この結果より、DBAの確定診断にバイオマーカーとしてRPの発現量測定が有用か検証する。DBAで複数例の変異報告のある遺伝子は、*RPS19*、*RPS24*、*RPS17*、*RPL35a*、*RPL11*、*RPL5*の6遺伝子である。*RPS19*以外の残り5種類のタンパク質についても随時、抗体を入手または作製する。

4) 診断基準の作成

上記の解析結果と臨床情報をもとに、診断基準を作成する。診断基準の立案には、日本小児血液学会再生不良性委員会の有力メンバーである小原と大賀が担当する。また、日本小児血液学会がこれまでに収集したDBAの疫学データも解析し、診断基準の立案に役立てる。

5) 一次アンケート調査

全国の小児科専門医研修施設（520 施設）および小児血液学会評議員（150 名）を対象に 2000 年 1 月以降に把握された症例について一次疫学調査を行った。把握された症例についてさらに臨床症状、検査所見、治療、予後を含む二次アンケート調査を行う。

（倫理面への配慮）

小児血液学会として行う疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として、既に学会倫理審査委員会の承認を受けている。調査にあたっては、個人情報を守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても、患者検体の匿名化を図る。本研究で行うゲノム解析は政府の定める各種倫理指針に準拠し、弘前大学医学部の倫理委員会の審査・承認を得て行われた。

C. 研究結果

1) 疾患登録システムの確立（図 1）

平成21年度は、中央診断を伴う日本小児血液学会のDBA登録システムを確立し、登録を開始した。平成21年度は4名のDBA症例の末梢血や骨髓血塗抹標本を名古屋大学小児科で中央診断した（図 1）。中央診断を開始してから12ヶ月間で186例がレビューされた。レビュー結果はAAが75例、MDSが25例、JMMLが20例、CBFSが11例、急性白血病が14例、その他41例であった。CBFS11例の中にDBAが4例含まれていた。DBAと診断された4例の詳細は以下のとおりである。

症例1：生後2ヶ月女児。外表奇形なし。WBC 5,300/ μ l、RBC 68万/ μ l、Hb 2.4 g/dl、Ht 6.5%、MCV 96 fl、Ret 0‰、Plt 56万/ μ l。骨髓像：赤芽球は全体の3%で前赤芽球までは観察された。

症例2：生後3ヶ月女児。外表奇形なし。WBC 10,500/ μ l、RBC 79万/ μ l、Hb 2.3 g/dl、Ht 7.8%、MCV 99fl、Ret 15.9‰、Plt 61.2万/ μ l。骨髓像：赤芽球は全体の1.5%で前赤芽球までは観察された。RPL5変異が確認された。

症例3：生後5ヶ月女児。外表奇形なし。WBC

3,500/ μ l、Hb 5.4 g/dl。骨髓像：赤芽球は全体の0.5%で前赤芽球までは観察された。

症例4：生後0ヶ月女児。胎児水腫、重症仮死で出生。右拇指多指症あり。WBC 3,500/ μ l、RBC 186万/ μ l、Hb 5.1 g/dl、Ht 14.8%、MCV 80fl、Ret 1‰、Plt 4.2万/ μ l。骨髓像：赤芽球は全く観察されなかった。DBAの4症例は、いずれも生後5ヶ月未満の発症で著明な貧血を呈していた。外表奇形の合併が知られているが、実際に確認されているのは1例のみであった。DBAと診断された症例については弘前大学小児科に遺伝子解析を依頼しているが、1例でRPL5変異が確認された。

日本小児血液学会疾患登録や日本小児血液学会再生不良性貧血委員会による後方視的調査から、日本において臨床的に発見されるDBAの発症数は年間7例であると推定された。しかし、これらの情報はいずれも後方視的調査によるものであり、診断の正確性や症例の把握率に関しては不十分なため、中央診断を行った上での前方視的登録による実態把握が不可欠であると考えられた。

2) 遺伝子解析

新たに中央診断された症例とこれまでに弘前大学小児科が全国から収集した49例（45家系）の臨床検体の遺伝子解析を行った。末梢血からDNAを抽出し、DBAで遺伝子変異が報告されている6遺伝子（RPS19、RPS24、RPS17、RPL5、RPL11、RPL35a）と5q-症候群の原因遺伝子として最近同定されたRPS14を解析した。遺伝子解析は、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、本人あるいは両親の同意の上実施した。その結果、RPS19遺伝子変異が7例（6家系）で検出され、その内の3つは新しい遺伝子変異であった。RPL5変異は4例、RPL11変異は2例、RPS17変異は1例で検出された。RPS19、RPL5、RPL11の遺伝子変異の頻度は、それぞれ13%、9%、4%および2%であった。一方、RPS24、RPL35aおよびRPS14遺伝子には変異を認めなかった。興味深いことに、RPS19あるいはRPL5の変異をもつ患者は全例とも身体的異常を合併していた。特に、RPL5変異をもつ症例の内の2例は、RPL5変異を持

たない 45 例では 1 例のみに認められた口蓋裂を合併していた。以上、本邦における DBA の発端者 45 例中 13 例 (29%) に RP 遺伝子の変異を認めた。欧米に比して本邦における RP 遺伝子の変異頻度は低く、70%の症例では原因遺伝子が不明であることが明らかになった。

3) DBA のバイオマーカーの検索

遺伝子として近年 *RPS19* や *RPL11* などのリボソームタンパク質の遺伝子が数多く明らかになった。DBA は 100 万出生あたり約 4 人の頻度と非常に稀であり、確定診断が困難な疾患の 1 つである。DBA の診断マーカーを見つけることは、DBA の診断を正確かつ迅速に行うことができ、患者のその後の治療法選択に多いに役立つと考えられる。これまでに報告された DBA の変異タンパク質を *in vitro* で発現させると極めて不安定であることから、DBA 患者では一方の正常アレルからのタンパク質のみが発現していると考えられる。よって、DBA の原因遺伝子のタンパク質の発現量の減少を検知することが DBA の診断マーカーとなる可能性があると考えられた。

そこで、DBA 診断法の開発を目的としてヒト *RPS19* や *RPL11* などに対する抗体を用いて siRNA で発現抑制した培養細胞や DBA 患者末梢血単核球 (MNC) を用いてタンパク質発現の減少の検出系の構築を試みた。

DBA の診断マーカーとして DBA の原因遺伝子の発現量の減少を指標にできるかどうか、培養細胞を用いた遺伝子発現抑制系と MNC で解析した。培養細胞において DBA の原因遺伝子発現を抑制した場合、タンパク質量の顕著な減少が観察され、DBA の培養モデル系において発現量の減少の検出は可能であると考えられた。

しかしながら、Primary 細胞において DBA の原因遺伝子産物のうち *RPS19* タンパク質は、採血後の時間経過に伴って発現量の低下が認められた。このことから、実際に患者から採血された検体が検査機関に送られてくるまでの保存期間の差によって *RPS19* の発現量が大きく左右されることが考えられた。

また、*RPL11* 欠損のある DBA 患者全血から分離

した MNC からすぐにタンパク質抽出した場合には、健常人検体と比べ *RPL11* のタンパク質量の減少は認められなかった。これは、MNC のほとんどが基本的に G0 期 (休止期) にあり細胞の遺伝子発現全体が低下していること、また遺伝子変異による発現量の低下の影響が正常アレルによって十分に補われている可能性があることが原因と考えられた。このため、患者の MNC で原因遺伝子のタンパク質発現の減少を解析するには、培養細胞のように細胞周期を増殖期へと移行させる必要があると考えられた。

これらの結果から、患者の血液細胞で解析するには、MNC を IL-3 や IL-2 などのサイトカインを添加した培地で細胞増殖を促しながら数日間培養することで採血後の保存による細胞ストレスを除去し、また細胞周期を増殖期に移行させた状態で原因遺伝子タンパク質量の減少を検出する必要があると考えられた。現在 MNC の増殖期の細胞での発現量解析を進めている。

4) 一次アンケート調査

以上の結果と海外からの報告を参考にして、軽症例を含む DBA の診断基準案を作成した。この診断基準案を含む診断の手引きを添えて、全国の小児科専門医研修施設 (520 施設) および小児血液学会評議員 (150 名) を対象に、2000 年 1 月以降に把握された症例について一次疫学調査を行った。その結果、539 施設から回答が得られ、132 例の DBA 症例の報告があった。来年度以降さらに詳細に二次調査を行う予定である。

D. 考察

DBA は、軽症例から最重症例まで広範囲な病像を示すことから、臨床所見のみで診断することは容易ではない。診断は各施設に任されていたが、必ずしも正確な診断が行われていなかった。平成 21 年度は、中央診断を伴う DBA 登録システムを確立し、登録を開始した。これにより、本邦における新規発症例の正確な把握が可能となり、本症の全貌を明らかにするための大きな一歩となった。全国レベルでのスクリーニングから確定診断にいたるシステムの整備が

進んだことで、発症頻度をはじめ原因遺伝子、病型分布などの疫学事項を高い精度で把握することが可能となり、その社会的意義はきわめて高いと思われる。

本邦の DBA 患者における RP 遺伝子変異の頻度は 29% であり、欧米の約 50% よりも低いことが明らかとなった。特に、本邦では *RPS19* 遺伝子変異の頻度が 13% と欧米の約 25% に比べて明らかに低く、このことが RP 遺伝子変異全体の頻度を下げている大きな要因と考えられた。我が国の DBA はまだ 70% が原因遺伝子不明である。平成 22 年から 2 年間で残りの 74 種類の RP 遺伝子をすべて解析する予定であるが、リボソームの機能にはさらに多くの遺伝子が関わっている。80 種類の RP 遺伝子に変異の認められない DBA については、次世代シーケンサーを用い、全ゲノムの網羅的な解析を行い、新規原因遺伝子を同定する必要があると考えられる。

患者の約半数が何らかの身体的異常を合併しており、全体としては欧米とほぼ同様の頻度であった。しかし、*RPS19* あるいは *RPL5* の変異をもつ患者の全例で何らかの身体的異常がみられ、身体的異常を高率に合併する変異であることが示唆された。拇指の異常を認めた 6 例全例が *RPS19* あるいは *RPL5*、口蓋裂を認めた 3 例のうち 2 例が *RPL5* 変異をもっていたことは、特定の遺伝子変異と臨床像との関連を示唆するものであった。これらの関連を明らかにするためには、さらに多数例を解析する必要がある。

本年度施行した一次疫学調査の結果、2000 年 1 月以降に把握された DBA 症例 132 例が集計された。さらに、詳細な遺伝子診断を含む二次調査を行うことにより、本邦の DBA の全体像が把握されることが期待できる。弘前大学小児科では、既に遺伝子解析のために約 50 例の DBA の臨床検体を全国の小児科施設から収集した。これは、我が国における唯一・最大の DBA 検体バンクであるが、二次疫学調査によって臨床検体をさらに収集することにより、今後このバンクを欧米のレベルまで発展させることが期待できる。

最近、骨髄異形成症候群の 1 つである 5q 欠失症候群の原因が、*RPS14* 遺伝子の欠失であることが明ら

かになった。また、DBA 以外の天性骨髄不全症候群である Shwachman-Diamond 症候群や先天性角化異常症なども「リボソーム病」のものであることが明らかになってきた。本研究は、これらの難病の診断や治療法の開発に貢献する可能性がある。

E. 結論

欧米では、DBA の登録制度が確立し、検体保存やそれを用いた疾患の研究が行われている。特に北米の DBA 登録制度は充実しており、米国とカナダの患者登録数は 600 名以上にのぼる。これに対して、日本ではこのような登録制度はなく、本疾患に対する研究は著しく遅れていた。本研究班が中心となり、永続的な制度としての「日本 DBA 登録制度」の確立を目指す。これは、DBA の患者の支援や、DBA の臨床および基礎研究を行うための基盤になり、国際貢献にも繋がると思われる。

F. 健康危険情報

今年度は登録システムを確立しているところであり、健康危険情報は無い。本研究は治療介入を伴わない観察研究であるが、有害事象に対して今後も注意を払う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang RN, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park M-J, Sugita K, Ito E: Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan Anemia. *Haematologica* 2010 (in press)
- 2) Ishimura M, Ohga S, Ichiyama M, Kusuhara K, Takada H, Hara T, Takahashi M, Okamoto H: Hepatitis-associated aplastic anemia during a primary infection of genotype 1a torque teno virus. *Eur J Pediatr* 2010 (in press)
- 3) Katsuragi S, Ohga S, Horiuchi H, Hara T, Terao K, Ikeda T: Neonatal onset hemophagocytic

lymphohistiocytosis in a premature infant. *Pediatr Blood Cancer* 53: 244-245, 2009.

- 4) Suzuki N, Morimoto A, Ohga S, Kudo K, Ishida Y, Ishii E: Characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis in neonates: a nationwide survey in Japan. *J Pediatr* 155: 235-238, 2009.
 - 5) Xu Y, Takahashi Y, Yoshimi A, Tanaka M, Yagasaki H, Kojima S. Immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells is not decreased in children with aplastic anemia. *Int J Hematol.* 2009;89(1):126-7.
 - 6) Xu Y, Takahashi Y, Wang Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Tanaka M, Yoshida N, Villalobos IB, Yagasaki H, Kojima S. Downregulation of GATA-2 and Overexpression of Adipogenic Gene-PPARGamma in Mesenchymal Stem Cells from Patients with Aplastic Anaemia. *Exp Hematol.* 2009; 37(12): 1393-9.
 - 7) Muramatsu H, Makishima H, Cazzolli H, O'Keefe C, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2010; 115(10): 1969-75.
 - 8) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA due to uniparental disomy following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2010; 115(15): 3158-61.
 - 9) Ito E. Ribosomal protein in impaired erythropoiesis: Diamond-Blackfan anemia and 5q- syndrome. *Rinsho Ketsueki.* 2009;50(10):1539-47.
- 2) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Terui K, Ohga S, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Kanei R, Imai T, Hongo T, Park M-J, Yanagisawa R, Koike K, Ito E: Mutations in ribosomal protein genes of Diamond-Blackfan anemia patients in Japan. 51st ASH Annual Meeting and Exposition December 5-8, 2009 New Orleans, LA.
 - 3) 今野友貴, 丹代論, 徐剛, 土岐力, 工藤耕, 照井君典, 大賀正一, 小島勢二, 長谷川大二郎, 青木由貴, 金井理恵, 今井剛, 本郷輝明, 朴明子, 柳沢龍, 伊藤悦朗: 本邦のDiamond-Blackfan貧血患者におけるリボソーム蛋白遺伝子の変異. 第71回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25.
 - 4) 浜口功: Ribosomal proteinと造血障害(シンポジウム). 第71回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25.
 - 5) 槍澤大樹, 濱田貴子, 小倉浩美, 村野一郎, 大賀正一, 菅野仁, 藤井寿一: Diamond-Blackfan貧血に対するリボソーム蛋白遺伝子検査システムの構築. 第71回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25.
 - 6) 秋原美華, 松本隼人, 福田美和子, 白川嘉継, 大賀正一: 重症新生児仮死で出生し、出生時に発症した血球貪食症候群の1例. 第455回日本小児科学会福岡地方会, 福岡, 2009.6.27.
 - 7) 石村匡崇, 大賀正一, 西山慶, 市山正子, 守川尚子, 土居岳彦, 高田英俊, 原寿郎: 肝炎関連最重症再生不良性貧血の2例～病態と治療選択～ 第51回日本小児血液学会, 第25回日本小児がん学会, 東京, 2009.11.27-30.
 - 8) 濱 麻人, 小島 勢二: 小児再生不良性貧血の中央診断. 第51回日本小児血液学会総会, 千葉, 2009.11.27.

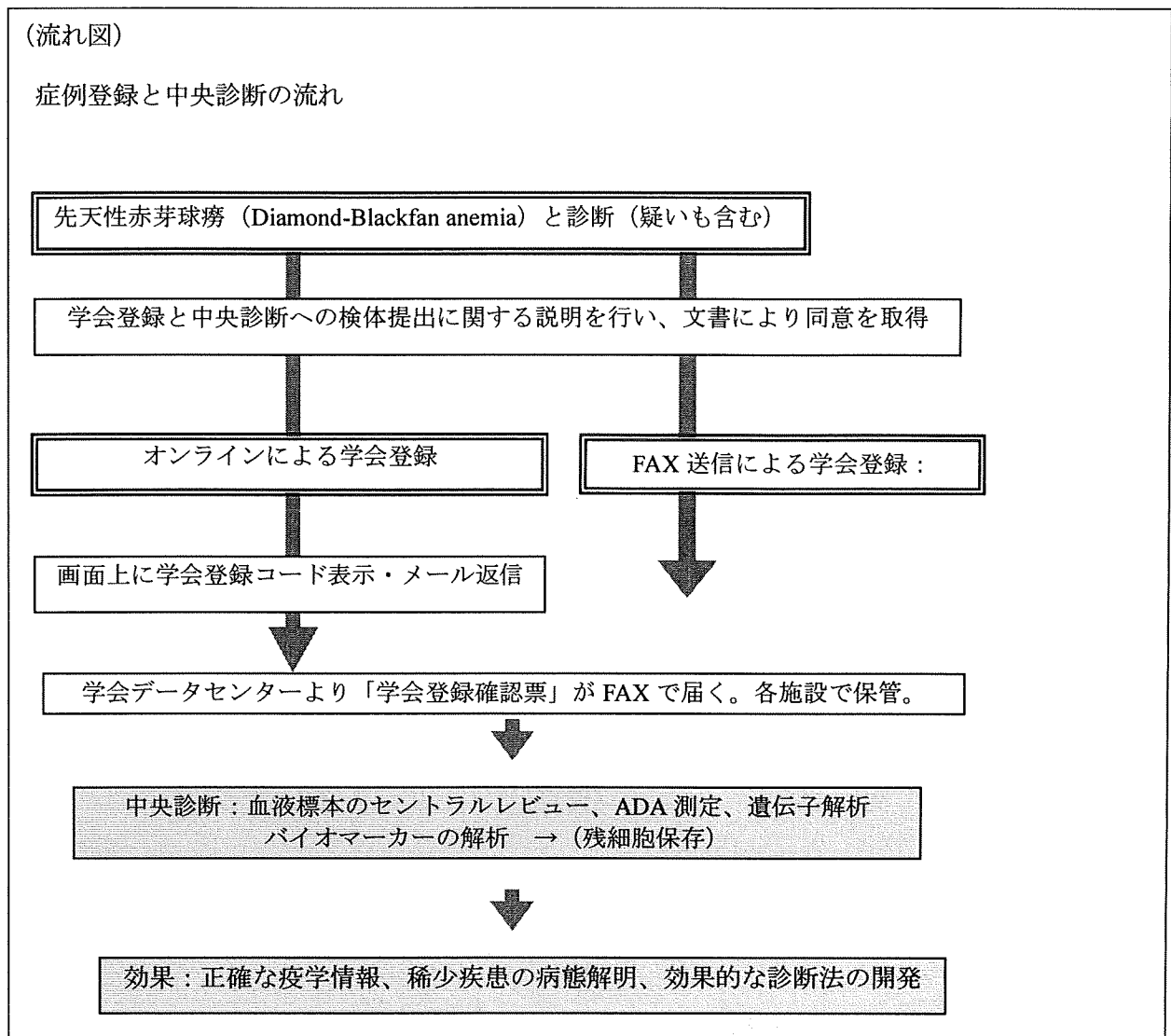
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. 学会発表

- 1) 伊藤悦朗: Ribosomal protein と赤血球産生障害 (Diamond-Blackfan anemia と 5q 欠失症候群) (教育講演). 第 71 回日本血液学会, 京都,

(図1)



II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

リボソームタンパクの遺伝子解析

研究分担者 照井 君典（弘前大学医学部附属病院 小児科 助教）

研究要旨： Diamond-Blackfan anemia (DBA)は、乳児期に発症する先天性の赤芽球癆である。欧米からの報告によると、DBAの約50%にリボソームタンパク（RP）の遺伝子変異がみられるが、本邦での頻度は不明である。そこで、本邦のDBA患者49例（45家系）のDBA患者について、既に変異が報告されている6遺伝子（*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*）と5q-症候群の原因遺伝子*RPS14*の遺伝子解析を行った。その結果、本邦のDBA患者におけるRP遺伝子変異の頻度は29%であり、欧米の約50%よりも低いことが明らかとなった。特定の遺伝子変異と臨床像との関連が示唆され、今後症例数を増やして解析する予定である。

A. 研究目的

Diamond-Blackfan anemia (DBA)は、乳児期に発症する先天性の赤芽球癆である。DBA患者の約40%は種々の奇形を合併する。欧米からの報告によると、DBAの約50%にリボソームタンパク（RP）の遺伝子変異がみられるが、本邦での頻度は不明である。本研究の目的は、本邦のDBA患者におけるRP遺伝子変異の頻度ならびに変異の種類と臨床像の関係を明らかにすることである。

B. 研究方法

常法に従い末梢血よりDNAを抽出し、DBAで遺伝子変異が報告されている6遺伝子（*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*）と5q-症候群の原因遺伝子*RPS14*のコーディングエクソンとエクソン/イントロン境界についてPCRを行い、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した。

遺伝子解析は、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、本人あるいは両親の同意の上実施した。

C. 研究結果

本邦のDBA患者49例（45家系）の臨床検体の遺伝子解析を行った。その結果、*RPS19* 遺伝子変異が7

例（6家系）で検出され、その内の3つは新しい遺伝子変異であった。*RPL5* 変異は4例、*RPL11* 変異は2例、*RPS17* 変異は1例で検出された。*RPS19*、*RPL5*、*RPL11* の遺伝子変異の頻度は、それぞれ13%、9%、4%および2%であった。一方、*RPS24*、*RPL35a*および*RPS14*遺伝子には変異を認めなかった。奇形や成長障害などの身体的異常は55%の患者にみられ、*RPS19* あるいは *RPL5* の変異をもつ患者は全例身体的異常を合併していた。拇指の異常は6例にみられ、いずれも*RPS19* あるいは *RPL5* の変異をもっていた。口蓋裂は3例にみられ、その内2例は*RPL5*変異をもっていた。以上、本邦におけるDBAの発端者45例中13例（29%）にRP遺伝子の変異を認めた。

D. 考察

本邦のDBA患者におけるRP遺伝子変異の頻度は29%であり、欧米の約50%よりも低いことが明らかとなった。特に、本邦では*RPS19* 遺伝子変異の頻度が13%と欧米の約25%に比べて明らかに低く、このことがRP遺伝子変異全体の頻度を下げている大きな要因と考えられた。

患者の約半数が何らかの身体的異常を合併しており、欧米とほぼ同様の頻度であった。*RPS19* あるいは

*RPL5*の変異をもつ患者の全例で何らかの身体的異常がみられ、身体的異常を高率に合併する変異であることが示唆された。拇指の異常を認めた6例全例が*RPS19*あるいは*RPL5*、口蓋裂を認めた3例のうち2例が*RPL5*変異をもっていたことは、特定の遺伝子変異と臨床像との関連を示唆するものであった。これらの関連を明らかにするためには、さらに多数例を解析する必要がある。

E. 結論

本邦のDBA患者におけるRP遺伝子変異の頻度は欧米よりも低いことが明らかとなった。特定の遺伝子変異と臨床像との関連が示唆され、今後症例数を増やして解析する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, and Ito E. Mutation in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 2010 [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Terui K, Ohga S, Kojima S, Yanagisawa R, Koike K, Hasegawa D, Kosaka Y, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Watanabe A, and Ito E. Mutations in ribosomal protein genes of Diamond-Blackfan anemia patients in Japan. *Blood* 2009; 114: S1241.
- 2) 今野友貴, 丹代諭, 徐剛, 土岐力, 工藤耕, 照井君典, 大賀正一, 小島勢二, 長谷川大一郎, 金井理恵, 今井剛, 本郷輝明, 朴明子, 柳沢龍, 伊藤悦朗. 本邦のDiamond-Blackfan貧血患者にお

けるリボソームタンパク遺伝子の変異. *臨床血液* 2009; 50: 969.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

中央診断の整備

研究分担者 小島 勢二（名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学 教授）

研究要旨： 日本小児血液学会は平成21年2月より再生不良性貧血(AA)、骨髄異形性症候群(MDS)および先天性造血不全症候群(CBFS)を対象とした中央診断を開始した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設（名古屋大学、聖路加国際病院）で、骨髄病理標本を1施設（名古屋第一赤十字病院）で行っている。レビュー開始から12ヶ月間で186例がレビューされたが、うちDiamond-Blackfan anemia(DBA)が4例含まれていた。AA、MDSおよびDBAを含むCBFSの診断は必ずしも容易ではなく、中央診断を行うことによりその診断の精度があがっていると考えられる。

A. 研究目的

小児AA、MDSおよびDBAを含むCBFSは比較的多数な疾患で、その診断は必ずしも容易ではない。そこで日本小児血液学会においてAA、MDSおよびCBFSを対象とした中央診断を行うことになった。

B. 研究方法

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。AA、MDS、あるいはCBFSが疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設（名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科）で、骨髄病理標本を1施設（名古屋第一赤十字病院病理部）で行った。

（倫理面への配慮）

中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得、患者及び患者保護者の同意を取得した後に行った。

C. 研究結果

レビュー開始から12ヶ月間で186例がレビューされた。レビュー結果はAAが75例、MDSが25例、JMMLが20例、CBFSが11例、急性白血病が14例、

その他41例であった。CBFS11例の中にDBAが4例含まれていた。DBAと診断された4例の詳細は以下のとおりである。

症例1：生後2ヶ月女児。外表奇形なし。WBC 5,300/ μ l、RBC 68万/ μ l、Hb 2.4g/dl、Ht 6.5%、MCV 96fl、Ret 0%、Plt 56万/ μ l。骨髄像：赤芽球は全体の3%で前赤芽球までは観察された。

症例2：生後3ヶ月女児。外表奇形なし。WBC 10,500/ μ l、RBC 79万/ μ l、Hb 2.3g/dl、Ht 7.8%、MCV 99fl、Ret 15.9%、Plt 61.2万/ μ l。骨髄像：赤芽球は全体の1.5%で前赤芽球までは観察された。RPL5変異が確認された。

症例3：生後5ヶ月女児。外表奇形なし。WBC 3,500/ μ l、Hb 5.4g/dl。骨髄像：赤芽球は全体の0.5%で前赤芽球までは観察された。

症例4：生後0ヶ月女児。胎児水腫、重症仮死で出生。右拇指多指症あり。WBC 3,500/ μ l、RBC 186万/ μ l、Hb 5.1g/dl、Ht 14.8%、MCV 80fl、Ret 1%、Plt 4.2万/ μ l。骨髄像：赤芽球は全く観察されなかった。

D. 考察

先天性AAは今回検討した症例の約10%を占め、

Fanconi貧血、DC、SDD、CAMTなどが代表的な疾患である。そのうちDBAは4例みられた。いずれも生後5ヶ月未満の発症で著明な貧血を呈していた。外表奇形の合併が知られているが、実際に確認されているのは1例のみであった。骨髄ではいずれも赤芽球の著明な減少がみられた。1例を除いてわずかに赤芽球を認め、いずれも前赤芽球までの分化を認めた。骨髄像から類推するに、赤芽球が全く消失する物と前赤芽球レベルで成熟停止が起こるものの2つのタイプの存在が考えられる。DBAと診断された症例については弘前大学小児科に遺伝子解析を依頼しているが、1例で*RPL5*変異が確認された。

中央診断システムにおいては、DBAを含む先天性骨髄不全症候群の網羅的かつ系統的なスクリーニングや診断システムの構築に取り組んでいるところである。

E. 結論

AA、MDSおよびCBFSを対象とした中央診断を行うことにより、必ずしも診断が容易ではないこれらの疾患の診断の精度があがったと考えられる。特にDBAのようなまれな疾患はこのような中央診断登録システムを通して確実に診断がつけられていくと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Xu Y, Takahashi Y, Yoshimi A, Tanaka M, Yagasaki H, Kojima S. Immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells is not decreased in children with aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2009 Jan;89(1):126-7.
- 2) Xu Y, Takahashi Y, Wang Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Tanaka M, Yoshida N, Villalobos IB, Yagasaki H, Kojima S.

Downregulation of GATA-2 and Overexpression of Adipogenic Gene-PPARgamma in Mesenchymal Stem Cells from Patients with Aplastic Anaemia. *Exp Hematol*. 2009 Dec;37(12):1393-9.

3) Muramatsu H, Makishima H, Cazzolli H, O'Keefe C, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. [Epub ahead of print]

4) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA due to uniparental disomy following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Feb 1.

5) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang RN, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park M-J, Sugita K, Ito E: Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan Anemia. *Haematologica* 2010 (in press)

2. 学会発表

濱麻人, 小島勢二: 小児再生不良性貧血の中央診断. 第51回日本小児血液学会総会, 千葉, 2009.11.27.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

小児期造血障害疾患登録による先天性赤芽球癆の疫学データベース構築

研究分担者 小原 明（東邦大学医療センター大森病院 輸血部 教授）

研究要旨： 小児の代表的な先天性貧血である先天性赤芽球癆 DBA は稀な疾患であり、研究の基礎となる疫学データベースの構築が必要である。これまでの小児血液学会の疫学調査によれば 1988 年から 2005 年の間に 98 例の症例が登録されている。症例登録の悉皆性を求めて小児血液学会疾患登録事業を実施し、DBA の症例把握に努めた結果、2006 から 2008 年に診断されて登録された 222 例の造血障害症例から、新規診断 DBA 症例は 22 例。全国で年間平均 7 例の発生と推定された。同じ時期、同じ調査対象施設の特発性再不貧は年間約 50 例、急性骨髄性白血病は約 160 例であり、およその相対的な疾患頻度が推定された。

A. 研究目的

【背景】

小児血液学会再生不良性貧血委員会による疫学調査（対象期間1988年から2005年）には1,411例の小児造血障害疾患が登録され、DBA症例は98例(7%)であった。生命予後が良好な疾患であるが、同種骨髄移植が21例報告されている。すなわち軽症例から同種移植を必要とする輸血異存の重症例まで様々な臨床像を呈していることが予想され、不全型の診断や適切な治療の開発が必要な疾患である。DBAは稀少疾患であり、診断法や治療法開発には疫学データベースの構築が欠かせない。

【目的】

本邦のDBA症例を悉皆性をもって収集する疫学データベース構築を目的に、小児血液学会疾患登録事業（全数把握）を一次調査とした疫学観察研究（小児血液再不貧2005研究・MDS2006研究）を実施した。質の高いデータベース構築により、これを基盤としたDBAの診断法・治療法開発を目指す。

B. 研究方法

本研究班の研究では治療介入を行わない、疫学観察研究として実施する。小児血液学会会員 235 施設

を対象にした全例登録（疾患登録事業）は、前年診断症例を対象に Web 登録にて実施され、およそ診断から 1 年経過した段階で二次調査（再不貧 2005 研究・MDS2006 研究）が実施した。構築されるデータベースには小児期発症の造血障害全般を網羅し、DBA 症例に限定はしない。

（倫理面への配慮）

研究計画は、疾患登録事業、小児血液再不貧2005研究・MDS2006研究により構成され、いずれも小児血液学会臨床研究審査委員会の科学倫理審査承認を得た。

C. 研究結果

現在研究は進行中であり、2006, 2007, 2008年診断症例を対象にすると、疾患登録（一次調査）は、2006,2007,2008年順に163,171,170施設から登録された。この期間にDBAと診断された症例は11, 5, 6例、総計22例であった。同じ期間に特発性再生不良性貧血は53, 54, 45例、先天性造血障害であるFanconi貧血5, 3, 1例、MDS (RA, RCMD, MDS unclassified) 症例数は17, 14, 6例。AML 164, 158, 131例、ALL 443, 477,356例であった。

D. 考察

小児血液学会疾患登録事業は2006年に開始され、会員施設において診断された全ての血液疾患を対象にした、全数把握疫学研究事業である。再生不良性貧血、DBA等の造血障害疾患は1988年診断症例から登録されて追跡調査されているが、2006年に開始された疾患登録事業は全ての小児血液疾患を対象にしており、疾患間の相対的頻度が明らかになる利点を有している。すなわち年間、急性骨髄性白血病160例、特発性再不貧は約50例発症に対してDBAは約7例の頻度であった。この様に稀少な疾患であるが、さらに先行する観察研究でDBAは軽症例から輸血依存で同種骨髄移植が必要になる重症例まで様々である事が判明しており、診断法や治療の研究開発が必要な疾患である。また診断が新生児科で行われて今回の調査から漏れた症例がある可能性もあり、引き続き広く全国に調査を実施する必要がある。

E. 結論

今回の疾患登録調査により、およそ日本全国で年間7例ほどの新規診断症例が発生している事が予想された。しかしながら調査対象を小児血液科医師から新生児科まで広げることにより、また診断法の開発により潜在する症例が見いだされる可能性は高いと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

遺伝子型と表現型に基づいた治療法確立に関する研究

研究分担者 大賀 正一（九州大学病院総合周産期母子医療センター 准教授）

研究要旨： 新生児および乳児期早期に発症する先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血：DBA）を正確に診断し、早期に有効な治療を開始するため、遺伝子診断による確定例から症例の特徴を明らかにし、とくにこの時期に鑑別となる重症例とも比較した。貧血の重症例は身体奇形徴候も多く、遺伝子型と表現型の関係からリボゾーム外機能が示唆された。さらに、新生児DBAに対する輸血療法に関しては、新生児・未熟児における鉄代謝マーカー（hepcidin）の生理的動態を解析し、とくに出生1か月以内の輸血による鉄過剰の危険性について検討中である。

A. 研究目的

DBAは*RPS19*のハプロ不全によるが、それ以外の遺伝子変異も近年同定され、リボゾーム病として認識されるようになった。本症は奇形徴候を有する先天性赤芽球癆であるが、多彩な臨床症状を呈し、診断に苦慮する。とくに、重症例の診断と治療は容易ではない。日本での遺伝子型と表現型を明らかにしながら、確定診断と治療に有用な臨床情報を集積する。

B. 研究方法

*RPS19*を含むリボゾーム蛋白10遺伝子の塩基配列を決定した。これまでのアレイ解析から発現の低かった遺伝子を中心に7症例を対象とした。また、胎児水腫で発症した重症例の遺伝子解析を行った。早産児を含む新生児の鉄代謝について血清のprohepcidinを測定し、この時期の鉄制御機構から輸血リスクについて検討した。遺伝子検査は患児を対象とし、倫理委員会承認済みの研究同意書を取得して行った。

C. 研究結果

*RPS19*以外にこれまでの解析から発現低下が明かな*RPL41*、*Large p2*、*RPL32*、*RPL30*、*RPL22*、*RPL11*、

RPL7、*RPS20*、およびリボゾーム蛋白遺伝子のプロモーター活性を有する遺伝子*NPIP1*について解析した。さらに共同研究者の協力を得て、解析遺伝子数を多くした。*RPS19*（男児）、*RPL5*と*RPL11*（いずれも女児）のヘテロ変異が同定された。いずれの患者もG-bandingにて染色体異常はなかった。*RPL5*変異例には心臓病、小顎、胃食道逆流などの奇形徴候が顕著であった。*RPS19*変異例は貧血以外に翼状頸と舟底足を、*RPL11*変異の患児は心室中隔欠損を呈した。その他の患児に、まだ遺伝子変異は同定されていない。経口prednisolone療法に対する反応性は、*RPS19*と*RPL11*変異例では良好であったが、*RPL5*変異例では、シクロスポリンの反応も不良で輸血依存となっている。胎児水腫で発症した新生児は、perforin遺伝子のヘテロ変異（Exon 3, 1090-91delCT）が同定された。これは日本人FHL2の63%を占める最も頻度の高い欠失であったが、片アレルの変異を現在検索中である。新生児・乳児期に輸血をうける可能性の高いDBA患児に対する輸血開始時期を検討するため、低出生体重児を含む新生児の血清prohepcidin値を測定し、動態を検討したところ、出生時には低く、その後1生月までに増加することを確認した。

D. 考察

この研究班の調査から、日本のDBA患者の遺伝子型と表現型が明らかになりつつある。自験例でも、*RPL5*の重症度は貧血のみならず、それ以外の身体徴候に及ぶことが示唆された。これはリボゾームが有する蛋白合成能以外の広範な生理機能を推察させる。胎児水腫をきたす重症例では、家族性血球貪食リンパ組織球症も鑑別疾患のひとつとなることが遺伝子解析から明らかとなった。さらに症例を集積して検討を進める。新生児では鉄代謝機構の未成熟から、とくに1生月までの輸血療法が急速な鉄過剰をおこす可能性があることを示唆するデータを得ており、現在解析を継続中である。

E. 結論

DBA患児の遺伝子診断は、適切な診断と治療法確立のために必須であり、さらにリボゾーム外機能を解明する鍵となる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang RN, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park M-J, Sugita K, Ito E: Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan Anemia. *Haematologica* 2010 (in press)
- 2) Ishimura M, Ohga S, Ichiyama M, Kusuhara K, Takada H, Hara T, Takahashi M, Okamoto H: Hepatitis-associated aplastic anemia during a primary infection of genotype 1a torque teno virus. *Eur J Pediatr* 2010 (in press)
- 3) Katsuragi S, Ohga S, Horiuchi H, Hara T, Terao K, Ikeda T: Neonatal onset hemophagocytic

lymphohistiocytosis in a premature infant.

Pediatr Blood Cancer 53: 244-245, 2009.

- 4) Suzuki N, Morimoto A, Ohga S, Kudo K, Ishida Y, Ishii E: Characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis in neonates: a nationwide survey in Japan. *J Pediatr* 155: 235-238, 2009.

2. 学会発表

- 1) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Terui K, Ohga S, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Kanei R, Imai T, Hongo T, Park M-J, Yanagisawa R, Koike K, Ito E: Mutations in ribosomal protein genes of Diamond-Blackfan anemia patients in Japan. 51st ASH Annual Meeting and Exposition December 5-8, 2009 New Orleans, LA
- 2) 今野友貴, 丹代論, 徐剛, 土岐力, 工藤耕, 照井君典, 大賀正一, 小島勢二, 長谷川大二郎, 青木由貴, 金井理恵, 今井剛, 本郷輝明, 朴明子, 柳沢龍, 伊藤悦朗: 本邦のDiamond-Blackfan貧血患者におけるリボゾーム蛋白遺伝子の変異. 第71回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25.
- 3) 槍澤大樹, 濱田貴子, 小倉浩美, 村野一郎, 大賀正一, 菅野仁, 藤井寿一: Diamond-Blackfan貧血に対するリボゾーム蛋白遺伝子検査システムの構築. 第71回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25.
- 4) 秋原美華, 松本隼人, 福田美和子, 白川嘉継, 大賀正一: 重症新生児仮死で出生し、出生時に発症した血球貪食症候群の1例. 第455回日本小児科学会福岡地方会, 福岡, 2009. 6.27.
- 5) 石村匡崇, 大賀正一, 西山慶, 市山正子, 守川尚子, 土居岳彦, 高田英俊, 原寿郎: 肝炎関連最重症再生不良性貧血の2例～病態と治療選択～. 第51回日本小児血液学会・第25回日本小児がん学会, 東京, 2009.11.27-30.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性赤芽球癆(Diamond Blackfan貧血)の効果的診断法の確立に関する研究

リボソームタンパク質の発現解析

研究分担者 浜口 功（国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長）
研究分担者 森尾友宏（東京医科歯科大学発生発達病態学分野 准教授）
研究協力者 倉光 球（国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員）

研究要旨： 先天性赤芽球癆(Diamond blackfan anemia (DBA))の原因遺伝子として RPS19 などのリボソームタンパク質が知られる。変異タンパク質は *in vitro* では極めて不安定であることから、患者では変異遺伝子のタンパク質発現量が低下している可能性が考えられる。原因遺伝子のタンパク質の減少が DBA の診断マーカーとなる可能性が示唆されたため RPL11 のアレル欠損が疑われた患者末梢血（1例）で RPL11 タンパク質の発現解析を行った。その結果、末梢血単核球では、RPL11 の発現量に健常人との有意な差はなかった。このことは、RPL11 の異常によるタンパク質合成の減少が細胞増殖の盛んな赤芽球前駆細胞などに限局的に起こっている可能性があり、更に解析を進める。

A. 研究目的

先天性赤芽球癆(Diamond blackfan anemia (DBA))の原因遺伝子として近年 RPS19 や RPL11 などのリボソームタンパク質の遺伝子が数多く明らかになった。DBA は 100 万出生あたり約 4 人の頻度と非常に稀であり、確定診断が困難な疾患の 1 つである。DBA の診断マーカーを見つけることは、DBA の診断を正確かつ迅速に行うことができ、患者のその後の治療法選択に大いに役立つと考えられる。これまでに報告された DBA の変異タンパク質を *in vitro* で発現させると極めて不安定であることから、DBA 患者では一方の正常アレルからのタンパク質のみが発現していると考えられる。よって、DBA の原因遺伝子のタンパク質の発現量の減少を検知することが DBA の診断マーカーとなる可能性があると考えられた。

そこで、DBA 診断法の開発を目的としてヒト RPS19 や RPL11 などに対する抗体を用いて siRNA で発現抑制した培養細胞や DBA 患者末梢血単核球 (MNC) を用いてタンパク質発現の減少の検出系の構築を試みた。

B. 研究方法

・ shRNA 発現レンチウイルスベクター

shRNA の配列情報は、iGENE 社より購入した。H1 promoter 下に PCR で shRNA 配列を連結した。pLV-TH lentiviral vector の EcoRI, ClaI サイトに H1-shRNA 配列を挿入し、shRNA 発現レンチウイルスベクターを構築した。

・ Transduction

293T 細胞へ pLVTH, pCMV Δ R8.2, pMD.G をリン酸カルシウム法で co-transfection した。培養上清を回収し、24000G で 2 時間超遠心しウイルス粒子を濃縮した。濃縮したウイルス液を HeLa 細胞に段階稀釈で感染させウイルス力価を測定した。KRAB-Red を発現する MCF7 乳がん細胞株および U2OS 骨肉腫細胞株へそれぞれ M.O.I に換算してそれぞれ 50 および 10 の力価で感染させた。

・ Protein extraction

培養細胞：Doxycycline を 0.5 μ g/ml で培養液に加え shRNA の発現誘導後、72 時間または 96 時間後 PBS で 2 回洗浄し、1%SDS/PBS でタンパク質を抽出した。