

Therapeutic response

Corticosteroids and transfusion are the mainstays of DBA treatment.^{1,3} Of 45 patients evaluable for first treatment response, 73% were responsive to steroid therapy, 8% were non-responsive and 16% were never treated with steroids. The proportions of patients that responded to the first steroid treatment were 5/5 (*RPS19*), 2/3 (*RPL5*), 1/2 (*RPL11*), 1/1 (*RPS17*), and 22/27 (no mutation). There were no significant differences in the response rates among these patients.

Sixty-nine percent of patients received red blood cell transfusions. Of 48 patients available for therapy in follow-up, 8 patients (17%) were transfusion-dependent, 18 patients (37%) were steroid-dependent, and 18 patients (37%) were transfusion-independent with no other treatment. Three patients received bone marrow transplants and were alive and well (Table 3). Malignancy was detected in one case (case 50 proband), who developed MDS one year after diagnosis of DBA.

Discussion

This is the first report of an investigation of DBA patients in Japan. Thirteen types of mutations were detected in 4 RP genes. These mutations occurred in 29% of Japanese DBA patients. Mutations in *RPS19*, which have been found in 25% of patients in Western countries,²⁶ were detected in only 6 of 45 probands (13%) in Japan, and three of these mutations were unique. Novel mutations in *RPL5* (4 probands; 9%), *RPL11* (2; 4%) and *RPS17* (1; 2%) were identified. The frequencies of mutations in *RPL5*, *RPL11* and *RPS17* were very similar to those in Western countries.¹⁶⁻¹⁹ These results may suggest that a lower incidence of mutations in RP genes in Japanese patients with DBA is due to a lower incidence of *RPS19* mutations, although we might miss the large deletions or re-arrangements in this study.

Physical abnormalities and growth retardation were detected in 55% of Japanese DBA patients, similar to previous reports in Western countries.⁴⁻⁶ Recent studies suggest that the patients with *RPL5* mutation are more likely to have physical malformations including craniofacial, thumb, and heart anomalies.^{17,18} Remarkably, patients with *RPL5* mutations tend to have cleft lip and/or palate or cleft soft palate, isolated or in combination with other physical abnormalities.^{17,18} We found that 3 of 4 patients with *RPL5* mutations had multiple physical malformations, and 2 had cleft palate, whereas only one patient without an *RPL5* mutation had cleft palate. In the general population, 0.1% to 0.2% of children are born with cleft lip and/or palate.²⁸ Our data, and those from previous findings, suggest that *RPL5* mutations are associated with multiple physical abnormalities, especially cleft lip and/or palate.

Cmejla et al. reported that 87.5% of *RPL5*-mutated patients were born SFD, whereas only 42.9% of *RPS19*-mutated patients were born SFD.¹⁸ However, in our data, SFD was seen in 7 patients, and all of them

were *RPL5*-non-mutated patients. Our data suggest that *RPL5* mutations in Japanese DBA patients have no relevance to SFD, and may be a unique characteristic of Japanese DBA.

According to recent studies, the frequency of malformation, particularly thumb anomalies, in *RPS19*-mutated patients, was relatively low compared to *RPL5*- or *RPL11*-mutated patients.^{22-24,29} In Italian DBA patients, the risk of malformation was 7-fold higher in *RPL5*-mutated patients compared to *RPS19*-mutated patients.²⁹ In contrast, all of the Japanese DBA patients with *RPS19* mutations had one or more malformations. The frequency of thumb anomalies was significantly higher in patients with *RPS19* mutations, as well as in patients with *RPL5* mutations, compared to other groups of patients.

Although steroid therapy is one of the established treatments for DBA, the mechanism of action is unknown and reliable prediction of response to initial steroid therapy is not available.^{1,3} *RPS19* mutation status has not been predictive of response in any series.³ In our data, the responsiveness to first steroid therapy in Japanese DBA patients was as good as that reported in Western countries.^{1,3} In this study, the comparison showed no significant differences of responsiveness to initial steroid therapy between *RPS19*-mutated and *RPS19*-non-mutated groups, or between *RPS19*-mutated and other RP gene mutated groups.

In summary, we found that heterozygous mutations in either *RPS19*, *RPL5*, *RPL11* or *RPS17* were present in 29% of Japanese DBA patients. No mutations were detected in *RPS14*, *RPS24* or *RPL35A*. We observed a slightly lower frequency of mutations in ribosomal protein genes in DBA patients when compared to previous reports from Western countries, although the data from both populations are based on a relatively low number of patients and values showing significant differences between populations are missing. Our data suggest an association between *RPL5* mutation and malformation, especially cleft palate, and between *RPS19* mutation and malformation, particularly thumb anomalies. This study also suggests that no association exists between *RPL5* mutation and SFD or between *RPS19* mutation and non-responsiveness to initial steroid therapy in Japanese DBA patients.

Authorship and Disclosures

EI was the principal investigator and takes primary responsibility for the paper. YK, TT, ST, GX, RNW, KT, and SO performed the laboratory work for this study. SO, TH, AH, SK, DH, YK, RY, KK, RK, TI, TH, MHP, and KS enrolled the patients. EI and YK wrote the paper.

The authors reported no potential conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to all physician of the institutions listed in the Appendix for their contribution to the present study. This work was supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Appendices

The online version of this article contains a supplementary appendix.

References

1. Alter BP, Young NS. The bone marrow failure syndromes. In: Nathan DG, Orkin HS, editors. *Hematology of Infancy and Childhood*. Volume 1. Saunders; Philadelphia, PA: 1998. pp. 237-335.
2. Badhai J, Fröjmark AS, J Davey E, Schuster J, Dahl N. Ribosomal protein S19 and S24 insufficiency cause distinct cell cycle defects in Diamond-Blackfan anemia. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792:1036-42.
3. Vlachos A, Ball S, Dahl N, Alter BP, Sheth S, Ramenghi U, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol*. 2008;142:859-76.
4. Lipton JM, Atsidaftos E, Zyskind I, Vlachos A. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: an update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:558-564.
5. Willig TN, Niemeyer CM, Leblanc T, Tiemann C, Robert A, Budde J, et al. Identification of new prognosis factors from the clinical and epidemiologic analysis of a registry of 229 Diamond-Blackfan anemia patients. DBA group of Societe d'Hematologie et d'Immunologie Pediatrique (SHIP), Gesellschaft für Padiatrische Onkologie und Hamatologie (GPOH), and the European Society for Pediatric Hematology and Immunology (ESPHI). *Pediatr Res* 1999;46:553-61.
6. Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, Carando A, Varotto S, Nobili B, et al. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica*. 2004;89:480-9.
7. Glader BE, Backer K, Diamond LK. Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in congenital hypoplastic anemia. *N Engl J Med*. 1983;309:1486-90.
8. Lecompte O, Ripp R, Thierry JC, Moras D, Poch O. Comparative analysis of ribosomal proteins in

- complete genomes: an example of reductive evolution at the domain scale. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:5382-90.
9. Gustavsson P, Willing TN, van Haeringen A, Tchernia G, Dianzani I, Donnér M, et al. Diamond-Blackfan anaemia: genetic homogeneity for a gene on chromosome 19q13 restricted to 1.8 Mb. *Nat Genet.* 1997;16:368-71.
 10. Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 1999;21:169-75.
 11. Gazda HT, Zhong R, Long L, Niewiadomska E, Lipton JM, Ploszynska A, et al. RNA and protein evidence for haplo-insufficiency in Diamond-Blackfan anaemia patients with RPS19 mutations. 2004;127:105-13.
 12. Choesmel V, Bacqueville D, Rouquette J, Noaillac-Depeyre J, Fribourg S, Crétien A, et al. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood.*2007;109:1275-83.
 13. Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, Miyake K, Caffrey JM, Karlsson S, et al. Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood.* 2007;109:980-6.
 14. Miyake K, Utsugisawa T, Flygare J, Kiefer T, Hamaguchi I, Richter J, et al. Ribosomal protein S19 deficiency leads to reduced proliferation and increased apoptosis but does not affect terminal erythroid differentiation in a cell line model of Diamond-Blackfan anemia. *Stem Cells.* 2008;26:323-9.
 15. Gazda HT, Grabowska A, Merida-Long LB, Latawiec E, Schneider HE, Lipton JM, et al. Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet.* 2006;79:1110-8.
 16. Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat.* 2007;28:1178-82.
 17. Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choesmel V, O'Donohue MF, Schneider H, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet.* 2008;83:769-80.
 18. Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Petrylova K, Mihal V, et al. Identification of mutations in the ribosomal protein L5 (RPL5) and ribosomal protein L11 (RPL11) genes in Czech patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat.* 2009;30:321-7.
 19. Farrar JE, Nater M, Caywood E, McDevitt MA, Kowalski J, Takemoto CM, et al. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2008;112:1582-92.
 20. Ebert BL, Pretz J, Bosco J, Chang CY, Tamayo P, Galili N, et al. Identification of RPS14 as a 5q-syndrome gene by RNA interference screen. *Nature.* 2008;451:335-9.
 21. Xu G, Nagano M, Kanezaki R, Toki T, Hayashi Y, Taketani T, et al. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood.* 2003;102:2960-8.

22. Willig TN, Draptchinskaia N, Dianzani I, Ball S, Niemeyer C, Ramenghi U, et al. Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood*. 1999;94:4294-306.
23. Ramenghi U, Campagnoli MF, Garelli E, Carando A, Brusco A, Bagnara GP, et al. Diamond-Blackfan anemia: report of seven further mutations in the RPS19 gene and evidence of mutation heterogeneity in the Italian population. *Blood Cells Mol Dis*. 2000;26:417-22.
24. Cmejla R, Blafkova J, Stopka T, Zavadil J, Pospisilova D, Mihal V, et al. Ribosomal protein S19 gene mutations in patients with diamond-blackfan anemia and identification of ribosomal protein S19 pseudogenes. *Blood Cells Mol Dis*. 2000;26:124-32.
25. Proust A, Da Costa L, Rince P, Landois A, Tamary H, Zaizov R, et al. Ten novel Diamond-Blackfan anemia mutations and three polymorphisms within the rps19 gene. *Hematol J*. 2003;4:132-6.
26. Campagnoli MF, Ramenghi U, Armiraglio M, Quarello P, Garelli E, Carando A, et al. RPS19 mutations in patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat*. 2008;29:911-20.
27. Gazda H, Lipton JM, Willig TN, Ball S, Niemeyer CM, Tchernia G, et al. Evidence for linkage of familial Diamond-Blackfan anemia to chromosome 8p23.3-p22 and for non-19q non-8p disease. *Blood*. 2001;97:2145-50.
28. Lidral AC, Murray JC. Genetic approaches to identify disease genes for birth defects with cleft lip/palate as a model. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2004;70:893-901.
29. Quarello P, Garelli E, Carando A, Brusco A, Calabrese R, Dufour C, et al. Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlation in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica*. 2009 Sep 22. [Epub ahead of print]

Supplementary Appendix. List of hospitals and persons cooperate to accumulate clinical samples of DBA patients.

Iwate prefectural Chubu Hospital (N. Onodera)

Iwata City Hospital (M. Shirai)

Osaka City General Hospital (J. Hara)

Kagoshima City Hospital (K. Kawakami)

Kagoshima University (Y. Okamoto)

Kyoto University (K. Watanabe)

Kyoto Prefectural Yosanoumi Hospital (H. Ogawa)

Saitama Children's Medical Center (K. Koh)

Shiga Medical Center for Children (T. Kitoh)

Shizuoka Children's Hospital (K. Sakaguchi)

Tokyo University (K. Ida)

National Hospital Organization Saitama Hospital (I. Kamimaki)

Dokkyo University (H. Kurosawa)

Nakadori General Hospital (A. Watanabe)

East Medical Center Moriyama Municipal Hospital, City of Nagoya (M. Yazaki)

Nara Medical University (Y. Takeshita)

Japanese Red Cross Narita Hospital (S. Igarashi)

Hiroshima Red Cross Hospital & Atomic-bomb Survivors Hospital (N. Fujita)

Fukushima Medical University (A. Kikuta)

Yamagata University (T. Mitsui)

Wakayama Medical University (M. Yoshiyama)

Table 1. Mutations identified in *RPS19*, *RPL5*, *RPL11*, and *RPS17* in Japanese DBA patients

Patients (Gender)	Inheritance	Age at diagnosis	Mutation	Predicted amino acid change
Mutations in the <i>RPS19</i> gene				
43 proband (F)	Sporadic	0 D	Exon2:g.3G>A	p.0
28 proband (M)	Sporadic	6 D	Exon3:g.130_131insA	E44fsX50
44 proband (F)	Sporadic	1 M	Exon4:g.184C>T	R62W
30 proband (F)	Familial	1 M	Exon4:g.185G>A	R62Q
30 father (M)	Familial	0 M	Exon4:g.185G>A	R62Q
25 proband (M)	Sporadic	2 M	Exon4:g.284G>T	G95V
20 proband (M)	Sporadic	4 M	Exon4:g.353A>G	D118G
Mutations in the <i>RPL5</i> gene				
10 proband (F)	Sporadic	0 M	Exon5:g.473_474delAA	K158fsX183
41 proband (F)	Sporadic	1 Y	Exon1:g.3G>T	p.0
55 proband (F)	Sporadic	3 Y	Exon1:g.3G>A	p.0
65 proband (F)	Sporadic	4 M	Exon2:g.37_38insT	F13fsX14
Mutations in the <i>RPL11</i> gene				
9 proband (F)	Sporadic	1 Y 10 M	Exon2:g.58_59delCT	L20fsX53
23 proband (M)	sporadic	1 Y 6 M	Exon5:g.460delA	R154fsX189
Mutations in the <i>RPS17</i> gene				
56 proband (F)	Sporadic	1 M	Exon2:g.26delT	V9fsX17

Table 2. Summary of sequence changes in seven RP genes identified in Japanese DBA patients

Gene symbol	No. of tested DNA samples from unrelated probands	No. of probands with mutations	No. of subjects with mutations	Mutation types
<i>RPS19</i>	45	6 (13%)	7	missense, loss of 1st methionine, small insertion
<i>RPL5</i>	45	4 (9%)	4	loss of 1st methionine, small deletion, small insertion
<i>RPL11</i>	34	2 (4%)	2	small deletion
<i>RPS17</i>	45	1 (2%)	1	small deletion

Table 3. Characteristics of Japanese DBA patients

Patient	Malformation status	Response at first steroid therapy	Present therapy
Patients with mutation of <i>RPS19</i>			
20 proband	craniofacial abnormalities, CHD etc.	response	Transfusion dependent
25 proband	thumb anomaly, growth retardation (-2.0SD) etc.	ND	ND
28 proband	thumb anomaly, CHD etc.	response	Steroid dependent
30 proband	thumb anomaly, growth retardation (-3.4SD)	response	Steroid dependent
30 father	growth retardation (-3.6SD)	NA	CR
43 proband	thumb anomaly	response	Steroid dependent
44 proband	SFD	response	CR
Patients with mutation of <i>RPL5</i>			
10 proband	thumb anomaly (flat thenar), cleft palate, CHD etc.	poor	Transfusion dependent
41 proband	craniofacial abnormalities, cleft palate, CHD etc.	ND	Transfusion dependent
55 proband	thumb anomaly, polydactyly	response	Steroid dependent
65 proband	growth retardation (-3.0SD)	response	Steroid
Patients with mutation of <i>RPL11</i>			
9 proband	CHD, SFD etc.	response	CR
23 proband	None	poor	Steroid dependent
Patients with mutation of <i>RPS17</i>			
56 proband	None	response	Steroid dependent
Patients without mutation of seven RP genes*			
1 proband	growth retardation (-4.0SD)	response	CR
1 daughter	None	response	CR
3 proband	growth retardation (-3.6SD)	response	Steroid dependent
4 proband	craniofacial abnormalities, SFD, Short stature, webbed neck	response	Steroid dependent
5 proband	None	response	CR
6 proband	cleft palate, SFD etc.	poor	BMT
7 proband	craniofacial abnormalities, SFD, growth retardation, etc.	response	CR
8 proband	growth retardation, webbed neck	response	Steroid dependent
13 proband	None	NA	CyA, BMT
14 proband	None	response	CR
15 proband	None	response	Transfusion dependent
21 proband	None	response	Steroid dependent
22 proband	None	response	CR
24 proband	growth retardation (-4.0SD)	response	Steroid dependent
26 proband	growth retardation (-4.1SD), craniofacial abnormalities, etc.	response	Transfusion dependent
33 proband	None	response	BMT
36 proband	hypospadias, cryptorchidism	response	Steroid dependent
36 cousin	None	response	Steroid dependent
37 proband	hypospadias, cryptorchidism	ND	CR
42 proband	None	response	CR
45 proband	craniofacial abnormalities, growth retardation, etc.	poor	Transfusion dependent
48 proband	fetal hydrops	ND	CR
49 proband	None	response	Steroid dependent
50 proband	None	response	Steroid dependent, CBT
50 sister	None	response	Steroid dependent
51 proband	None	poor	CR
54 proband	None	ND	Transfusion dependent
59 proband	None	ND	Transfusion
60 proband	SFD	ND	Transfusion
61 proband	None	response	cyclosporine
62 proband	CHD, SFD, growth retardation (-3.1SD)	response	Steroid dependent
63 proband	craniofacial abnormalities, growth retardation (-7.5SD)	response	Steroid dependent
64 proband	None	response	Steroid dependent
66 proband	None	NA	Transfusion dependent
67 proband	None	NA	NA

Abbreviations are as follows: ND, not done; NA, not available; SFD, small for date; CHD, congenital heart disease;

BMT, bone marrow transplantation; CBT, cord blood stem cell transplantation; CR, complete remission.

* *RPS19, RPS24, RPS17, RPS14, RPL5, RPL11, RPL35A*

Ribosomal protein と赤血球産生障害 (Diamond-Blackfan anemia と 5q 欠失症候群)

伊藤悦朗

Key words: Diamond-Blackfan anemia, 5q⁻ syndrome, RPS19, RPS14, Ribosome

1. はじめに

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。骨髓は正形成であるが赤血球系細胞のみが著減し、末梢血では網赤血球が減少し、大球性正色素性貧血を呈する。約30%の症例で様々な奇形を合併することが知られている。大頭、小頭などの頭部、顔部の異常が最も多く、上肢、眼、泌尿生殖器系、心臓の異常や低身長が見られる。ほとんどが散発例であるが、約10~20%の症例では家族歴があり、常染色体性優性あるいは劣性遺伝の形式をとる¹⁾。

1936年 Josephs により2例²⁾、2年後には Diamond および Blackfan により congenital hypoplastic anemia として4例が報告³⁾されて以来、この疾患の病因に関する様々な研究が行われてきた。造血微小環境や支持細胞よりむしろ赤血球系造血前駆細胞自体の分化増殖能になんらかの heterogenous な異常が存在する可能性が高いと推定されていたが、長らく病因は不明であった。最近、染色体転座をもつ DBA 患者の遺伝子解析などから病因遺伝子の遺伝子座が第19番染色体長腕 (19q13) に同定され、さらにそこに存在する原因遺伝子が80個あるリボソームタンパクの一つである PRS19 をコードする遺伝子であることが明らかにされた⁴⁾。RPS19 遺伝子変異は約25%の DBA 患者に認められるが、最近 RPS24, RPS17, RPL5, RPL11 および RPL35A の遺伝子変異が少数例の DBA で発見され、リボソームの異常に起因した新たな疾患「リボソーム病」の疾患概念が確立されつつある⁵⁾。

一方、5q 欠失症候群は、1974年に初めて報告された

del(5q) の染色体異常と赤血球系細胞の分化障害を特徴とする骨髓異形成症候群の一つである⁶⁾。この疾患は、中年女性に好発し、大球性貧血、血小板増加、骨髓の芽球は5%未満、単核か低分葉小型巨核球が目立つことなどの特徴がある。多くは赤血球輸血依存性に陥るが、急性白血病への移行は比較的少ない。5q 欠失症候群の原因となるがん抑制遺伝子を見出すための長年の研究によって共通欠失領域はしだいに狭められた^{7,8)}。その結果、最終的には原因遺伝子が 5q32 に位置する 1.5 Mb の範囲に存在する 40 個の遺伝子に絞られた⁹⁾。2008年、Ebert らはこの領域に存在する 40 個の遺伝子を RNA 干渉法でスクリーニングし、本疾患の原因がやはりリボソームタンパクをコードする RPS14 遺伝子であることを明らかにした¹⁰⁾。この2つのまったく異なる疾患の研究成果によって、後天性血液疾患である 5q 欠失症候群と先天性血液疾患である DBA が共通の分子基盤によって生じていることが明らかになり、血液学に新たな研究領域が加わることになった。本稿では、これらの流れを踏まえ、リボソームタンパクの異常に起因する赤血球産生障害の病因研究の最近の進歩について概説する。

2. DBA の原因遺伝子の発見

1938年、既に Diamond と Blackfan は DBA の原因が先天的な造血システムの異常であると推定していた。しかし、DBA の原因は19番染色体上の最初の DBA 遺伝子が見つかるまでは大きな謎であった。Gustavsson らは、相互転座 46, XX, t(X;19)(p21;q13) を持つ DBA 患者を見出した¹¹⁾。19番染色体の長腕上に DBA の原因遺伝子が存在する可能性が示唆されたため、DBA の13家系の連鎖解析を染色体 19q のマーカーを用いて行なった。その結果、19q13 に強い連鎖を認め¹²⁾、さらに3例の DBA 患者に 19q13 上の部分的に重なり合う microdele-

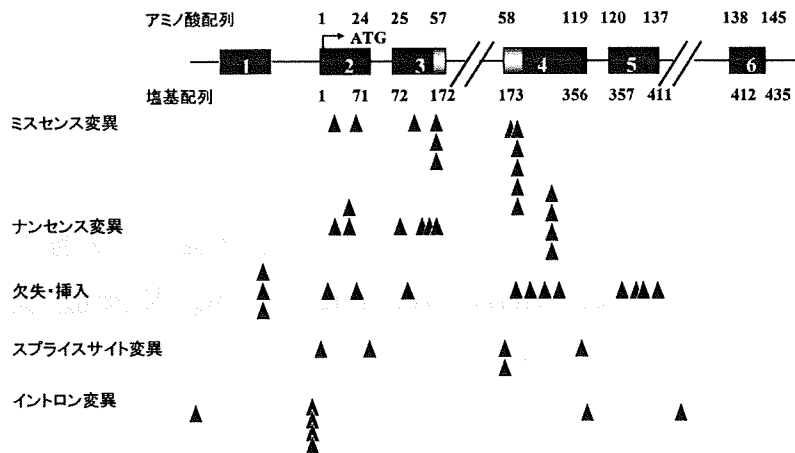


図1 RPS19 遺伝子の点変異の種類と位置 (文献 14 より改変)

RPS19 遺伝子は 6 個のエクソンから構成されている。エクソン 1 は、5' 非翻訳領域に相当し、翻訳開始コードンはエクソン 2 に存在する。点突然変異の hot spot を黄色で示した。

tion を見出した¹³⁾。以上の結果より、DBA 病因遺伝子の遺伝子座が 19q13 に存在することが強く示唆されたため、上記の相互転座を持つ DBA 患者の DNA から、positional cloning の手法で原因遺伝子の同定が行なわれた。即ち、19q13 上の転座切断点を含む領域をクローニングし、切断点がリボソームタンパク遺伝子 RPS19 の第 3 イントロンに存在することを明らかにした。さらに、40 例の DBA 症例を解析し、10 例に RPS19 遺伝子の変異を検出した⁴⁾。その後、大規模なスクリーニングが行なわれ、172 家系の DBA 症例が解析され、約 25% の患者に RPS19 遺伝子の変異が認められた¹⁴⁾。遺伝子の変異は、ミスセンス、ナンセンス、スプライスサイト、フレームシフト変異と様々であったが、全てヘテロ変異であった。遺伝子変異は広く遺伝子全体に散らばっていたが、変異のホットスポットがコードン 52~62 の間 (エクソン 3 とエクソン 4) に存在していた (図 1)。しかし、遺伝子変異の性質と臨床症状との間にははっきりした関係は認められなかった。その後、欧米を中心にさらに解析が進められ、約 20~25% の DBA 症例に RPS19 の遺伝子変異が見出された^{15,16)}。多くの症例の情報をもとに遺伝子変異の性質と臨床症状について検討され、19q13 領域の広範な欠失は常に精神発達遅延を合併することが指摘された^{4,16)}。また、Arg62Trp 変異を持つ患者は重症例が多く、9 例中 8 例が輸血依存性であった。

1999 年に RPS19 遺伝子が DBA の原因遺伝子であることが報告されてから、Gazda によって第 2 の DBA の原因遺伝子が同定されるまでに数年を要したが、その後、次々に RP 遺伝子が DBA の原因遺伝子として同定された。Gazda らは Affymetrix 社の GeneChip Human

Mapping 10 K Array を用いて、常染色体優性の遺伝形式をもつ DBA の 1 家系のゲノム全体にわたる連鎖解析を行なった。その結果、染色体 8q の 17.5Mb の領域、染色体 10 の 5.8 Mb 及び染色体 6 の 3.8 Mb の領域に DBA と連鎖を認めた¹⁷⁾。彼らは特定された領域に存在するリボソームタンパク遺伝子に注目し、RPS20 と RPL7 (染色体 8q) と RPS24 (染色体 10q22-q23) のシーケンズ解析を行なった。その結果、RPS20 と RPL7 は正常であったが、RPS24 にヘテロ変異を認めた。そこで、210 名の DBA 発端者の解析を行ない、さらに 2 名に RPS24 に遺伝子変異を検出した。RPS24 遺伝子変異の頻度は、約 1.4% であった。また、Cmejla らは別のリボソームタンパク遺伝子 RPS17 の変異を DBA 症例で見出した¹⁸⁾。点変異 (2T>G) のために翻訳開始コードン (ATG) が失われ、一方の RPS17 の発現が失われる変異であった。

それまでの報告は、すべて小サブユニットを構成するリボソームタンパク遺伝子であったが、最近、大サブユニットを構成するリボソームタンパク遺伝子の変異も見出された。Farrar らは CGH による高感度染色体マッピングとマイクロアレイによる発現解析を駆使して、染色体 3q の欠失をもつ 2 例の DBA 患者の解析から、DBA の原因候補遺伝子として大サブユニットを構成するリボソームタンパク遺伝子 RPL35A を同定した。そこで、RPL35A の変異が本当に DBA で起こっているかどうかを知るために、148 名の DBA 発端者をスクリーニングし、3 名にヘテロ変異を見出した¹⁹⁾。さらに、最近、Gazda らは、DBA の症例に別の大サブユニットを構成するリボソームタンパク遺伝子の変異を見出した²⁰⁾。彼女らは、これまでに RPS19、RPS24 および RPL35A に

遺伝子変異のみられない 196 名の DBA 発端者の検体を用いて、遺伝子変異が報告されていない 24 個の RP 遺伝子と 1 例のみの報告があった *RPS17* 遺伝子の解析を行った。その結果、*RPL5* と *RPL11* にヘテロ変異を見出した。*RPL5* と *RPL11* の変異の頻度は、それぞれ 6.6% と 4.8% であった。また、その他にも *RPS7*, *RPS17*, *RPL36*, *RPS15*, *RPS27A* に変異をみとめたが、その頻度はいずれも 1% 未満であった。チェコの DBA registry には 31 名 (28 家族) の DBA 症例が登録されているが、この均一な population における *RPL5* および *RPL11* の遺伝子変異の頻度は、それぞれ 21.4% と 7.1% であった²¹⁾。興味あることに、*RPS19* 変異とは対照的に、*RPL5* 変異のある症例には口唇・口蓋裂、先天性心疾患や母指の異常などの多発奇形が、*RPL11* 変異では単独の母指異常が高頻度に認められた。

これまで発見された DBA の遺伝子変異は、すべてリボソームタンパク遺伝子のヘテロ変異であった。これは、DBA の原因がリボソームタンパクの haploinsufficiency によって生じるリボソームの機能不全であることを強く示唆している。

しかし、これまでの DBA の原因遺伝子の研究は、すべて海外で行われたのであり、本邦での大規模な解析の報告はなかった。我々はこれまでに 44 家系 (46 例) の DBA を解析し、6 家系 (7 例) に *RPS19* 遺伝子の変異を検出した (未発表)。また、*RPL5*, *RPL11* と *RPS17* の遺伝子変異を見出した。*RPS19* 変異の頻度は、13.6% と欧米に比してやや低い傾向がみられたが、全体像を把握するためにはさらに多くの症例の解析が必要と思われる。

3. リボソームタンパク遺伝子の異常とリボソーム合成の障害

リボソームは mRNA の翻訳を担う細胞内装置である。ヒトリボソームは 4 種類の RNA と 80 種類のリボソームタンパク質からなる巨大な複合体であり、その基本的構造は酵母や細菌にいたるまで全ての生物でたいへん良く保存されている⁵⁾。ヒトを含めたほ乳類のリボソーム (80S) は、大サブユニット (60S) と小サブユニット (40S) から成り、それぞれのサブユニットはリボソーム RNA (rRNA) とリボソームタンパク質で構成されている (図 2)。ほ乳類のリボソームは 80 個のリボソームタンパク質を含んでいるが、mRNA を polypeptide に翻訳する触媒反応は RNA が担っている²²⁾。したがって、リボソームタンパク質は pre-rRNA のプロセッシング、リボソームの組み立てや安定化、細胞内輸送および翻訳効率の向上や制御などリボソーム機能を改善するために、進化の過程で RNA の骨組みに付け加えられたと考

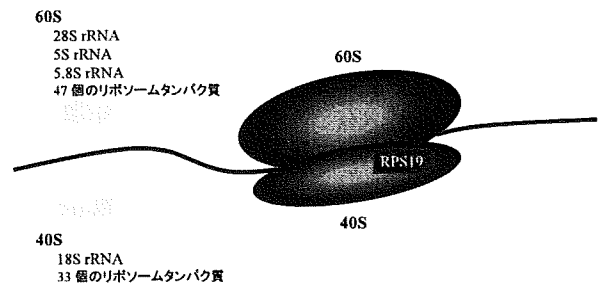


図 2 ヒトリボソームの構造

ヒトを含む高等動物のリボソームは、4 つのリボソーム RNA (rRNA) と 80 種類のリボソームタンパク質からなる巨大な複合体である。完全なリボソーム (80S) は、大サブユニット (60S) と小サブユニット (40S) から成り、mRNA の polypeptide への翻訳を司っている。18S rRNA は 40S 小サブユニットの構成要素であり、28S、5S と 5.8S rRNA は 60S 大サブユニットの構成要素である。60S と 40S を構成するリボソームタンパク質は RPL、RPS とそれぞれ呼ばれ、RPS19 は 40S を構成するリボソームタンパク質の一つである。

えられる。*RPS19* は、18S rRNA とともにリボソームの 40S 小サブユニットを形成する 33 個のリボソームタンパク質の一つである。

Da Costa らは、*RPS19* は、リボソームが生成される核小体に最も高濃度に存在することを見出した²³⁾。彼らは、さらに *RPS19* の N 末端の 15 個のアミノ酸と C 末端の 22 個のアミノ酸に核小体局在シグナル (Nos) があることを同定した。重要なことに、*RPS19* の Nos にミスセンス変異をもつ DBA 患者では核小体への *RPS19* の局在が不良となり、変異 *RPS19* タンパクが著明に低下していた。

最近、*RPS19* が 18S rRNA の成熟と 40S リボソームサブユニットの組み立てに重要な役割を果たしていることが 3 つのグループから報告された^{24~26)}。*RPS19* を欠損した酵母細胞やヒトの子宮頸がん由来の HeLa 細胞では、不完全なプロセッシングを受けた 18S rRNA を含む 40S リボソームサブユニットの前駆体が核に蓄積し、細胞質では成熟した 40S リボソームサブユニットの減少がみられた^{24, 25)}。18S rRNA 成熟と 40S 小サブユニット合成の同様の障害は、*RPS19* を欠損させたヒト造血前駆細胞株 TF-1 や *RPS19* 変異を有する DBA 患者の骨髓から純化された CD34⁻細胞でも認められた。しかし、この異常は、意外なことに *RPS19* 変異陽性 DBA 患者の骨髓 CD34⁺細胞では CD34⁻細胞に比して軽度であった²⁶⁾。ヒトの細胞における 18S rRNA の 3' end の成熟は、多段階的に起る。まず、internal transcribed spacer 1 (ITS1) 上の site 2 で切断が起こり、次に site E、そして最後に site 3 で切断され、成熟した 18S rRNA の

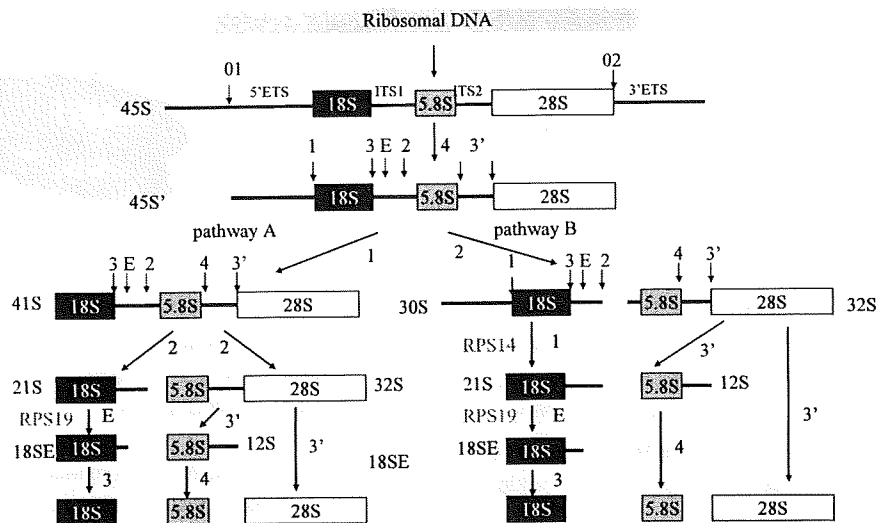


図3 Pre-rRNAのプロセッシングにおけるRPS19とRPS14の機能

成熟した18S, 5.8S, 28S rRNAの塩基配列は、45S転写産物の中でexternal transcribed spacer (5'-ETSと3'-ETS)が両側面に位置し、internal transcribed spacer (ITS1とITS2)によって隔てられている。45S'に切断点を記載した。最初に5'-ETS上のsite 1でプロセッシングされるpathway AとITS1上のsite 2でプロセッシングされるpathway Bの2つの経路がある。ヒトの細胞における18S rRNAの3' endの成熟は、多段階的に起る。Pathway Aでは、まず、ITS1上のsite 2で開裂が起こり、次にsite E、そして最後にsite 3で切断され、成熟した18S rRNAの3' endが完成する。RPS19とRPS14の推定される機能を図中に記載した。矢印はcleavage siteを示す。

3' endが完成する(図3)。RPS19を欠損させたTF-1細胞では、18S rRNAの成熟障害が生じ、より大きな21S rRNA前駆体が細胞に蓄積するのが観察された。これは、RPS19がsite Eの効率的な切断に不可欠であることを示唆している。この18S rRNA成熟の最終過程は、40Sリボソームの完成と翻訳開始に不可欠である。したがって、RPS19欠損細胞は、相対的な40Sリボソームの欠乏を招き、翻訳開始能の低下を引き起こすと考えられる。RPS24とRPS7も18S rRNAの成熟と40Sリボソームの産生に不可欠であることが示された^{20, 27)}。しかし、RPS19はITS1の成熟に関わっているのに対して、RPS24とRPS7は5' external transcribed spacer (5'-ETS)のプロセッシングに必要であった。RPS24あるいはRPS7をノックダウンした細胞では、45Sと30S rRNA前駆体が蓄積し、41S, 21Sと18S-E rRNA前駆体が著しく減少していることが観察された。

一方、大サブユニットを構成するリボソームタンパクであるRPL35A, RPL5とRPL11は、28Sと5.8S rRNAの成熟と60Sリボソームサブユニットの組み立てに重要な役割を果たしていることが明らかにされた^{19, 20)}。いずれかの分子をノックダウンしたヒト培養細胞では、60Sリボソームの合成に不可欠な28S rRNAと5.8S

rRNAの成熟障害が起こり、より大きなそれぞれの前駆体である32S rRNAと12S rRNAが細胞に蓄積されるのが観察された。

4. RPS19変異によるDBA発症の分子機構

赤血球は骨髄内で造血幹細胞から絶えず生み出されている。CD34⁺造血前駆細胞は、赤血球造血の過程でCD71⁺, glycophorin A (GlyA)⁺の赤芽球、さらにCD71⁻, GlyA⁺の赤血球へと分化するが、BFU-Eの分化段階からエリスロポエチン(EPO)依存性となる。Ohene-Abuakwaらは2段階赤血球系液体培養を用いて、DBAにおける赤血球造血の異常はEPOに依存する赤血球分化の最終段階にあることを示した。彼らはDBAと健常人の末梢血単核球を解析し、EPO非依存の第一段階の培養では両者に差は認められないが、EPO依存系の第二段階培養ではDBA患者単核球からの同期した赤芽球の増生と最終分化がみられないことを報告した²⁸⁾。興味深いことに、リボソーム合成は未分化な前駆細胞で低く、グロビン合成の活発な成熟した赤芽球では非常に高くなるが、逆にRPS19の発現は赤血球の最終分化の過程で減少し40Sリボソーム合成が低下する(図4)^{30, 31)}。FlygareとKarlssonは、DBAではRPS19の変

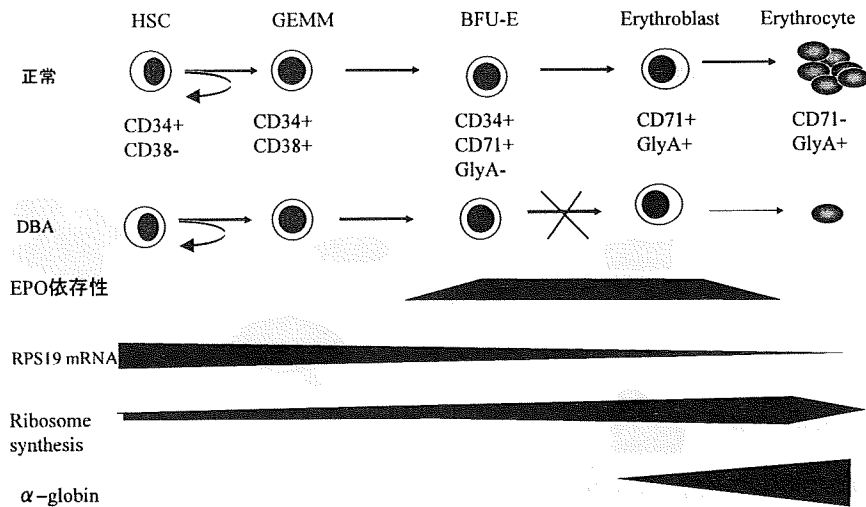


図4 正常とDBA患者における赤芽球分化

赤血球は骨髄内で造血幹細胞から絶えず生み出されている。CD34⁺造血前駆細胞は、赤血球造血の過程でCD71⁺、glycophorin A (GlyA)⁺の赤芽球、さらにCD71⁻、GlyA⁺の赤血球へと分化するが、BFU-Eの分化段階からエリスロポエチン (EPO) 依存性となる。DBAにおける赤血球造血の異常は、EPOに依存する赤血球分化の最終段階 (BFU-Eの段階の後)にある。リボソーム合成は未分化な前駆細胞で低く、グロビン合成の活発な成熟した赤芽球では非常に高くなるが、逆にRPS19の発現は赤血球の最終分化の過程で減少し40Sリボソーム合成が低下する。

異により40Sリボソーム合成障害が起るので、40S/60S比が最も低くなる赤血球最終分化段階において相対的な40Sリボソームの欠乏が最も顕著になり、この結果、赤芽球は大量のグロビンなどの翻訳が充分できるために赤血球造血がこの段階で停止すると推定している。

しかし、赤芽球造血の異常以外の臨床症状が、どのような仕組みで起っているかはまだ明らかではない。その理解のためには、RPS19の機能をさらに知る必要がある。RPS19は、RPS3a、RPS13/16やRPS24と近接して40Sサブユニットの外表面に存在する。ヒトのRPS19 mRNAは、145個のアミノ酸をコードしているが、N末端のメチオニンは翻訳後に除去され、アミノ酸144個のタンパクとなる³¹⁾。生理的な条件では証明されていないが、Flygareらは少なくとも7箇所のリン酸化を受ける部位が存在すると予想している²⁹⁾。RPS19には、複数のRPS19結合タンパクが同定されている (図5)²⁹⁾。その中でも、特にproto-oncogeneであるserine-threonine kinase PIM-1は興味深い分子である。PIM-1ノックアウトマウスは、赤血球のサイズが縮小し、逆にトランスジェニックマウスではMCVが増大する³²⁾。PIM-1はEPOにより発現が誘導され、リボソーム上でRPS19と結合すると、RPS19をリン酸化する³³⁾。DBAの変異のホットスポットであるRPS19のコードン52~62は、極めて保存性の高い領域であり、予想されるリン酸化site

が存在する。したがって、PIM-1によるRPS19のリン酸化はリボソームの翻訳効率の制御などに重要な役割を果たしている可能性がある。また、興味深いことに、DBAの患者に見られた変異RPS19は、正常とは異なった親和性でPIM-1と結合したことから、発がんとの関連にも興味を持たれる³³⁾。

RPS19は二量体を形成し、単球に対して走化性因子として機能することが示されており、リボソーム以外での機能も持つと考えられる³⁴⁾。しかし、RPS19のリボソーム以外での機能がDBAの病態に関与するかどうかは不明である。

5. 5q欠失症候群の原因遺伝子の発見

1974年に5q欠失症候群が初めて報告されて以来、今日まで、その原因解明に向けて多数のグループによって研究が展開されてきた。これまでに5qに存在する多くの癌抑制遺伝子が責任遺伝子の候補にあり、対立遺伝子の欠失や不活化が解析されてきたが、いずれも広く容認されるには至らなかった^{35, 36)}。一方、Boultonwoodらは5q欠失症候群でみられる共通欠失領域をFISHやphysical mappingによって狭める戦略で原因遺伝子の同定を目指してきた⁷⁻⁹⁾。その結果、共通欠失領域は、最終的に5q32のD5S413~GLRA1の1.5 Mbの領域に狭められ、原因遺伝子はこの領域に存在する40個の遺伝

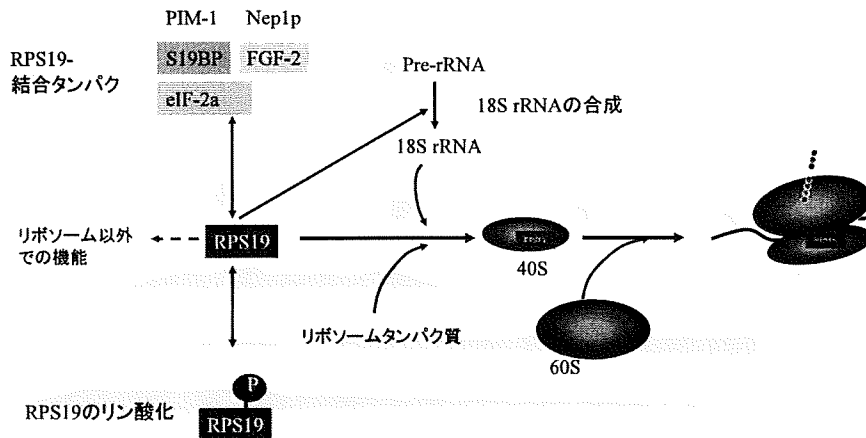


図5 RPS19の機能 (文献29より改変)

RPS19には、複数のRPS19結合タンパクが同定されている。少なくとも7箇所のリン酸化を受ける部位が存在すると予想される。RPS19は、18S rRNAの成熟と40S小サブユニットの合成に不可欠である。

子に絞られた⁹⁾。しかし、残ったアレル上の遺伝子に点変異が見つかったという報告は無く、共通欠失領域が両アレルとも欠失した5q欠失症候群の患者は報告されていない。

そこで、Ebertらは、5q欠失症候群はこの40個のいずれかの遺伝子のhaploinsufficiencyによって生じると考え、責任遺伝子を同定するための新たな方法を選択した¹⁰⁾。即ち、共通欠失領域の遺伝子を標的とするshRNAを用いて、5q欠失症候群の最も本質的な特徴『巨核球の分化障害を伴わない赤血球の成熟障害』を実験的に再現できるかを指標に責任遺伝子の同定を試みた。それぞれの遺伝子に対する複数のshRNAをレンチウイルスベクターで正常のヒト臍帯血由来のCD34陽性造血前駆細胞に発現させ、標的遺伝子の発現を抑制した状態で赤血球と巨核球系に分化を誘導した。FACSを用いてCD41とGlyA陽性細胞を測定することによって巨核球/赤芽球の比率を測定したところ、RPS14をノックダウンした場合のみ、巨核球/赤芽球の比率が有意に増加することが判明した。さらに、5q欠失症候群の患者から得られたCD34陽性骨髄細胞にレンチウイルスベクターでRPS14を過剰発現させると、赤血球分化が回復することが明らかになった。また、RPS14の発現を抑えたTF-1細胞では18S rRNAの成熟障害が生じ、30S rRNA前駆体の蓄積と21S・18SE rRNA前駆体および成熟した18S rRNAの欠乏が観察された。さらに、RPS14のノックダウンは、40S小サブユニットの欠乏を招くことも明らかになった。5q欠失症候群と非常に類似した臨床症状を呈するDBAにも、RPS19などのリボソームタンパク遺伝子の変異がみられ、18S rRNAのプロセッ

シングの異常が認められることから、RPS14が5q欠失症候群の原因遺伝子であることが強く示唆される。しかし、RPS14の機能喪失は赤血球分化障害を引き起こすのに十分であると思われるが、RPS14の欠損したクローンが正常細胞より優位に増殖し、悪性化して急性骨髄性白血病に進展するためには、付加的な遺伝子異常が必要であると考えられる。その候補として最近報告された2つの遺伝子(EGRIとCTNNA1)が有力である^{37,38)}。これらの遺伝子は、5q欠失を有する治療関連や高リスクMDSおよびAMLの共通欠失領域に存在する9個の遺伝子の中に含まれている³⁹⁾。この領域は5q上のよりセントロメア側に存在していて、5q欠失症候群の共通欠失領域とは重複していない。しかし、ほとんどの患者は5qの大きな領域が欠失しているため、RPS14の欠失と同時にこれらの遺伝子の欠失が生じる可能性がある。

6. リボソームの異常に起因した疾患群

DBAと5q欠失症候群は、リボソームタンパクの欠損によって起るヒトの疾患である。しかし、一群の先天性骨髄不全症(dyskeratosis congenita(DKC), cartilage-hair hypoplasia(CHH), Shwachman-Diamond症候群(SDS))の原因遺伝子産物も全てリボソーム合成に関与していると考えられている(図6)^{5,40)}。これらの疾患は、骨髄不全の他に先天奇形や発がん素因を共有している。

SDSは、好中球減少症、腺外分泌能の低下、骨格の異常や白血病の高発症などを特徴とする疾患である。原因遺伝子SBDSの産物は、核小体に局在するタンパクをコードし、リボソーム合成に関与していると考えられ

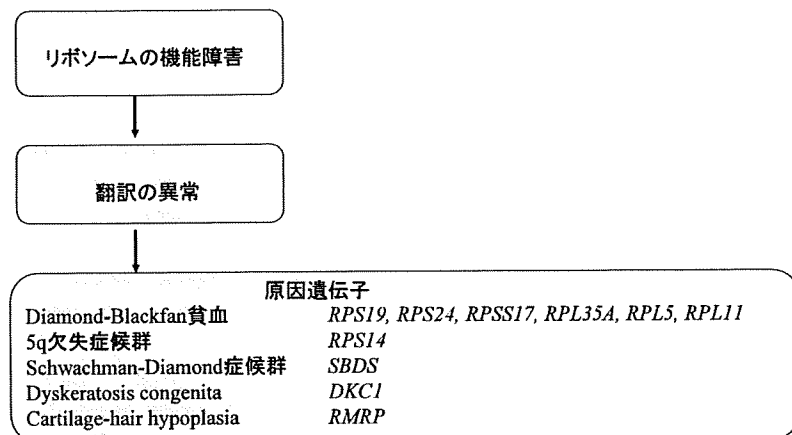


図6 リボソームの機能異常によって起る疾患：リボソーム病

DBAと5q欠失症候群は、リボソームタンパクの欠損によって起るヒトの疾患である。一群の先天性骨髄不全症（dyskeratosis congenita, cartilage-hair hypoplasia, Schwachman-Diamond症候群）の原因遺伝子産物も全てリボソーム合成に関与していると考えられている。これらの疾患は、骨髄不全の他に先天奇形や発がん素因を共有している。

ている^{41, 42)}。

DKCは皮膚の網状色素沈着、爪の萎縮、粘膜の白斑を特徴とし、骨髄不全も高頻度に合併する先天性疾患である。遺伝形式により、X連鎖劣性、常染色体性優性および常染色体性劣性の3つのタイプが知られているが、最も多いX連鎖型DKCの原因遺伝子*DKC1*の産物dyskeratinは、rRNAの成熟とテロメレースのRNA成分の安定化に関与している。リボソーム合成の障害とテロメレース活性の低下の両者がDKCの病態に関与していると考えられている³⁹⁾。

CHHは、骨格の形成異常による低身長、毛髪の低形成、リンパ球減少、貧血と発がん素因を特徴とする疾患である。原因遺伝子*RMRP*の変異によって、rRNAのプロセッシングが障害されリボソームの合成が障害されるが、mRNAの代謝回転やミトコンドリアDNAの複製も障害されて複雑な病態が形成されると考えられる³⁹⁾。

7. むすび

Blackfan-Diamond Anemiaと5q欠失症候群の病因研究の進歩について述べた。最近の研究は、リボソームの機能障害のために生じる翻訳の異常がDBAや5q欠失症候群の赤血球造血の障害を引き起こす中心的なメカニズムであることを明らかにした。後天性血液疾患である5q欠失症候群と先天性血液疾患であるDBAが共通の分子基盤によって生じていることが明らかになり、血液学に新たな研究領域が加わるようになった。しかし、まだ50%以上のDBAの症例の原因遺伝子は不明であり、5q欠失症候群の原因が完全に解明された訳ではない。小児

に発症する先天性骨髄不全症候群の研究が、骨髄異形成症候群などの成人にみられる血液疾患の病因解明に大きな手がかりを与えられると思われる。今後、「リボソーム病」の病因究明が急速に進み、これらの疾患に対する新たな治療法の開発に繋がることが期待される。

文 献

- 1) Da Costa L, Willig TN, Fixler J, Mohandas N, Tchernia G. Diamond-Blackfan anemia. *Curr Opin Pediatr.* 2001; **13**: 10-15.
- 2) Josephs HW. Anaemia of infancy and early childhood. *Medicine.* 1936; **15**: 307.
- 3) Diamond LK, Blackfan KD. Hypoplastic anemia. *Am J Dis Child.* 1938; **56**: 464-67.
- 4) Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet.* 1999; **21**: 169-175.
- 5) 剣持直哉. リボソームと疾患. *実験医.* 2004; **22**: 2550-2555.
- 6) Van den Berghe H, Cassiman JJ, David G, Fryns JP, Michaux JL, Sokal G. Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature.* 1974; **251**: 437-438.
- 7) Boultonwood J, Fidler C, Lewis S, et al. Molecular mapping of uncharacteristically small 5q deletions in two patients with the 5q-syndrome: delineation of the critical region on 5q and identification of a 5q-breakpoint. *Genomics.* 1994; **19**: 425-432.
- 8) Jaju RJ, Boultonwood J, Oliver FJ, et al. Molecular cytogenetic delineation of the critical deleted region in the 5q-syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998; **22**: 251-256.
- 9) Boultonwood J, Fidler C, Strickson AJ, et al. Narrowing and

- genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q-syndrome. *Blood*. 2002; **99**: 4638-4641.
- 10) Ebert BL, Pretz J, Bosco J, et al. Identification of RPS14 as a 5q-syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*. 2008; **451**: 335-339.
 - 11) Gustavsson P, Skeppner G, Johansson B, et al. Diamond-Blackfan anaemia in a girl with a *de novo* balanced reciprocal X; 19 translocation. *J Med Genet*. 1997; **34**: 779-82.
 - 12) Gustavsson P, Willing TN, van Haeringen A, et al. Diamond-Blackfan anaemia: genetic homogeneity for a gene on chromosome 19q13 restricted to 1.8 Mb. *Nat Genet*. 1997; **16**: 368-371.
 - 13) Gustavsson P, Garelli E, Draptchinskaia N, et al. Identification of microdeletions spanning the Diamond-Blackfan anemia locus on 19q13 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*. 1998; **63**: 1388-1395.
 - 14) Willig TN, Draptchinskaia N, Dianzani I, et al. Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood*. 1999; **94**: 4294-4306.
 - 15) Ramenghi U, Garelli E, Valtolina S, et al. Diamond-Blackfan anaemia in the Italian population. *Br J Haematol*. 1999; **104**: 841-848.
 - 16) Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, et al. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica*. 2004; **89**: 480-489.
 - 17) Gazda HT, Grabowska A, Merida-Long LB, et al. Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet*. 2006; **79**: 1110-1118.
 - 18) Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat*. 2007; **28**: 1178-1182.
 - 19) Farrar JE, Nater M, Caywood E, et al. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2008; **112**: 1582-1592.
 - 20) Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet*. 2008; **83**: 769-780.
 - 21) Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, et al. Identification of mutations in the ribosomal protein L5 (RPL5) and ribosomal protein L11 (RPL11) genes in Czech patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat*. 2009; **30**: 321-327.
 - 22) Nissen P, Hansen J, Ban N, Moore PB, Steitz TA. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 2000; **289**: 920-930.
 - 23) Da Costa L, Tchernia G, Gascard P, et al. Nucleolar localization of RPS19 protein in normal cells and mislocalization due to mutations in the nucleolar localization signals in 2 Diamond-Blackfan anemia patients: potential insights into pathophysiology. *Blood*. 2003; **101**: 5039-5045.
 - 24) Léger-Silvestre I, Caffrey JM, Dawaliby R, et al. Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis. *J Biol Chem*. 2005; **280**: 38177-38185.
 - 25) Choemmel V, Bacqueville D, Rouquette J, et al. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*. 2007; **109**: 1275-1283.
 - 26) Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, et al. Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood*. 2007; **109**: 980-986.
 - 27) Choemmel V, Fribourg S, Aguisa-Touré AH, et al. Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum Mol Genet*. 2008; **17**: 1253-1263.
 - 28) Ohene-Abuakwa Y, Orfali KA, Marius C, Bal SE. Two-phase culture in Diamond Blackfan anemia: localization of erythroid defect. *Blood*. 2005; **105**: 838-846.
 - 29) Flygare J, Karlsson S. Diamond-Blackfan anemia: erythropoiesis lost in translation. *Blood*. 2007; **109**: 3152-3154.
 - 30) Da Costa L, Narla G, Willig TN, et al. Ribosomal protein S19 expression during erythroid differentiation. *Blood*. 2003; **101**: 318-324.
 - 31) Vladimirov SN, Ivanov AV, Karpova GG, et al. Characterization of the human small-ribosomal-subunit proteins by N-terminal and internal sequencing, and mass spectrometry. *Eur J Biochem*. 1996; **239**: 144-149.
 - 32) Laird PW, van der Lugt NM, Clarke A, et al. *In vivo* analysis of Pim-1 deficiency. *Nucleic Acids Res*. 1993; **21**: 4750-4755.
 - 33) Chiochetti A, Gibello L, Carando A, et al. Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein. *Haematologica*. 2005; **90**: 1453-1462.
 - 34) Revollo I, Nishiura H, Shibuya Y, Oda Y, Nishino N, Yamamoto T. Agonist and antagonist dual effect of the cross-linked S19 ribosomal protein dimer in the C5a receptor-mediated respiratory burst reaction of phagocytic leukocytes. *Inflamm Res*. 2005; **54**: 82-90.
 - 35) Harada H, Kondo T, Ogawa S, et al. Accelerated exon skipping of IRF-1 mRNA in human myelodysplasia/leukemia; a possible mechanism of tumor suppressor inactivation. *Oncogene*. 1994; **9**: 3313-3320.
 - 36) Borkhardt A, Bojesen S, Haas OA, et al. The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; **97**: 9168-9173.
 - 37) Joslin JM, Fernald AA, Tennant TR, et al. Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood*. 2007; **110**: 719-726.
 - 38) Liu TX, Becker MW, Jelinek J, et al. Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding α -catenin

- (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nat Med.* 2007; **13**: 78-83.
- 39) Horrigan SK, Arbieva ZH, Xie HY, et al. Delineation of a minimal interval and identification of 9 candidates for a tumor suppressor gene in malignant myeloid disorders on 5q31. *Blood.* 2000; **95**: 2372-2377.
- 40) Liu JM, Ellis SR. Ribosomes and marrow failure: coincidental association or molecular paradigm? *Blood.* 2006; **107**: 4583-4588.
- 41) Austin KM, Leary RJ, Shimamura A. The Shwachman-Diamond SBDS protein localizes to the nucleolus. *Blood.* 2005; **106**: 1253-1258.
- 42) Ganapathi KA, Austin KM, Lee CS, et al. The human Shwachman-Diamond syndrome protein, SBDS, associates with ribosomal RNA. *Blood.* 2007; **110**: 1458-1465.

