

200936264A

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

わが国における重症サラセミアの実態把握と
無侵襲胎児遺伝子診断法および
治療基準作成の試みに関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北川道弘

平成 22(2010)年 3 月

平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

わが国における重症サラセミアの実態把握と無侵襲胎児遺伝子診断法および
治療基準作成の試みに関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北川道弘

平成 22（2010）年 3 月

目次

I. 総括研究報告

わが国におけるサラセミアの実態把握と無侵襲胎児遺伝子診断法および
治療基準作成の試み・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

北川 道弘

(資料 研究成果報告スライド)

II. 分担研究報告

1. 調査票によるわが国における重症サラセミアの実態把握・・・・・・・・13

北川 道弘、林 聡、池谷 美樹

2. 母体血末梢血を用いた胎児由来有核赤血球の濃縮・分離に関する研究・・・・17

北川 道弘、鈴木 信太郎、関沢 明彦、高林 晴夫

3. 母体血中有核赤血球回収におけるプロトコールの最適化に関する研究・・・・20

関沢 明彦、高林 晴夫

III. 研究成果の発表に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・.21

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

総括研究報告書

わが国における重症サラセミアの実態把握と無侵襲胎児遺伝子診断法
および治療基準作成の試みに関する研究

研究代表者 北川 道弘 国立成育医療センター 副院長

研究要旨

平成21年度は全国の日本血液学会専門医研修施設(470施設)に調査票を送付し有病者に関するアンケート調査を行ったところ、回答率は54.2%(255施設)で80名の重症サラセミア(α -15名、 β -59名、その他6名)の報告があり予想外に有病者が多く、ヘテロの軽症例を含めると日本人でも患者数が多いことが判明した。そこで胎児に重篤な障害が発生する可能性の高い重症サラセミアの胎児診断法の開発を試みた。母体血中の有核赤血球(NRBC)をtarget cellとし、妊娠各期より母体血7mlを採取し、レクチン法にてNRBCの分離・回収を行った。回収したNRBCをFISH法にて性別診断を行ったところ100%の正診率であった(NRBCが胎児由来である確認)。次にサラセミアの胎児診断のため、回収したNRBCをアレイCGH法を用いて胎児の遺伝子診断を開始した。平成21年度は日本人に多い α 、 β の変異部位を組み込んだアレイを作成した。今後サラセミア家系の妊婦母体血を使用し、臨床での胎児遺伝子診断への応用が可能かを検討する。さらに超音波診断にて原因不明の胎児貧血例の胎児遺伝子診断に応用し、重症度の判定およびその後の胎児遺伝子治療へ発展させ周産期管理に役だてる。

研究分担者

鈴木信太郎	関西学院大学理工学部 生命科学科教授
高林晴夫	金沢医科大 FDD-MB センター長、准教授
関沢明彦	昭和大学医学部産婦人科 准教授
林聡	国立成育医療センター 胎児診療科医長
池谷美樹	国立成育医療センター 周産期診療部医員

を行うとともに、母体血有核赤血球(NRBC)を用いたサラセミアの無侵襲胎児遺伝子診断法を開発する。

B. 研究方法

- 1) わが国におけるサラセミア重症の実態調査について、全国の日本血液学会専門医研修施設(470施設)に調査票を送付し有病者数を検討するとともに治療法や遺伝子診断状況の把握を試みた。
- 2) 正常妊娠各週の妊婦 52名より末梢血7ml採取し、パーコールによる比重遠心後、レクチン法にて有核赤血球を分

A. 研究目的

我が国におけるサラセミアの実態把握

離し、FISH 法にて性別判定を行い、胎児由来有核赤血球の判定を行った。

- 3) 我が国で報告のある α サラセミア 2 変異 β サラセミア 9 変異を組み込んだアレイ CGH を作成する。
- 4) このアレイを用いてサラセミア遺伝家系の妊娠例や妊娠中期以降に原因不明の胎児貧血例を対象に、単離した有核赤血球を WGA (全遺伝子増幅) 後、遺伝子診断を行う。

(倫理面への配慮)

有核赤血球を用いた胎児遺伝子診断は国立成育医療センター、昭和大学、金沢医科大において倫理委員会の承認を得ているが、倫理面について慎重に対応している。

C. 研究結果

1) アンケート調査結果

全国 470 の病院・施設にアンケート調査を行ったが、回収率 54.2% (255/470 施設) であった。

日本人で重症型は 80 名 (α サラセミア 7 名、 β サラセミア 73 名) であり、ヘテロの軽症型を含めると相当数の患者がいると考えられた。これまで九州地方に多いとされていたが、今回の調査で、関東や近畿地方にも患者が多く分布していることが判明した。

治療法は輸血、ステロイド療法、造血剤投与などで、遺伝子治療を行った施設は 1 施設であった。

2) 妊婦末梢血からの NRBC 分離

妊娠各週の正常妊婦 52 名から得られた NRBC は平均 3.1 個/ml であった。性別判定でも 100% の診断率であり、妊娠 16 週以下の男児懐胎妊婦 12 名 (妊娠 8-16

週) から得られた NRBC を Y プローブで FISH を行ったところ、胎児由来 NRBC は 49.1% であった。

3) アレイ CGH の作成

日本人に多い α サラセミア 2 変異、 β サラセミア 9 変異のプローブを作成し、WGA 行後 FISH を行う。対象遺伝子は表に示す。(表 1)

今後母体血中 NRBC を用いたサラセミアのサンプル検体を用意し反応性を検討し、さらにサラセミア家系の妊婦や原因不明の胎児貧血症例の母体血 NRBC を用いてサラセミア診断の臨床応用する予定である。

D. 結論

これまでサラセミアの遺伝子診断法は煩雑で、高価な検査であり、生まれてから後の検査であった。我々の開発中の診断法は胎児の時期から、しかも母児に安全な検査法であり、我が国のみではなく全世界で利用される検査法となる。

E. 研究発表

1. 学会発表

1) 国内学会:

北美紀子、高林晴夫、小木美恵子、関沢明彦、千葉博、北川道弘、伊川和美、松本由佳、末岡宗廣

母体血による胎児 DNA 診断のための有核赤血球分離法の基礎的検討

第 12 回胎児遺伝子診断研究会 (西宮 09/2) 伊川和美、北美紀子、高村禪、斎藤真人、民谷栄一、高林晴夫

Single cell からの Whole Genome Amplification (WGA) の検討

第 12 回胎児遺伝子診断研究会

(西宮 09/2) 仲村将光、関沢明彦、
Yuditiya Purwosunu、岡崎志帆、千葉
博、清水華子、齋藤裕、岡井崇
妊娠高血圧症候群における母体血中
細胞成分中の抗酸化遺伝子発現につ
いての検討

第 12 回胎児診断研究会(西宮 09/2)
雲健史、井手上公太郎、北美紀子、高
林晴夫、民谷栄一、高村禪
微小間隙を用いた胎児由来有核赤血
球の抽出

2009 年秋季第 70 回応用物理学会 学
術講演会(富山 09/9)

服部真周、富澤祐一、伊川和美、北美
紀子、高林晴夫、民谷栄一、高村禪
有核赤血球を用いた胎児診断用の WGA
チップの開発

第 20 回マイクロ・ナノシステム研究会
(金沢 09/11) 雲健史、北美紀子、高林
晴夫、民谷栄一、高村禪
微小間隙とダイアフラム構造の組み合
わせによる胎児由来有核赤血球の捕捉
および回収

2) 国際学会:

Purwosunu Y, Tkabayashi H, Kita
M, Ikawa

K, Sekizawa A, Chiba H, Kitagawa M.

FDD-MB (Fetal DNA Diagnosis from
Maternal Blood) 2.0 System

CNAPS-VI (6th International
Conference on Circulating Nucleic
Acids in Plasma and Serum)

2009 (Hong Kong, November 9-11)

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含
む。)

今後知的財産権の出願申請予定で
ある。

**厚生労働省科学研究費・難治性疾患
克服事業研究班**

**「我が国におけるサラセミアの実態把握と
無侵襲胎児遺伝子診断法および治療基準
作成の試み」**

研究代表者 北川道弘

研究班組織

北川道弘 国立成育医療センター副院長
高林晴夫 金沢医大FDD-MBセンター長
鈴木信太郎 関西学院大理工学部教授
関沢明彦 昭和大医学部産婦人科准教授
林 聡 国立成育医療センター周産期診療部
胎児診療科医長
池谷美樹 国立成育医療センター周産期診療部
産科医員

【研究協力者】

北 美紀子、Yuditiya Purwosunu、千葉博、尾崎千紗

サラセミアの概要

サラセミアは先天性の溶血性疾患であり、その原因はヘモグロビンを形成する α 鎖、 β 鎖の各2分子の一方の鎖の産生が悪いため、血中の正常Hbが減少し小型の赤血球となる。同時に正常に作られた鎖が相対的に過剰になり、それが変性をおこした結果、赤血球膜の障害を惹起し溶血に至る疾患である。地中海地方に頻発したため地中海貧血とも呼ばれ、これまで日本人には少ないとされていたが、九州大などの地域限定の新生児臍帯血スクリーニング調査報告ではヘテロの軽症サラセミアを含めた発症頻度は0.1%ほどであり九州や西日本に多いとされている。また、東南アジア地域にも多いことが確認されている。

研究目的

1. 我が国における重症サラセミアの実態把握を行う。
2. 母体血中有核赤血球(NRBC)を用いたサラセミアの無侵襲胎児遺伝子診断法を開発する。

研究方法

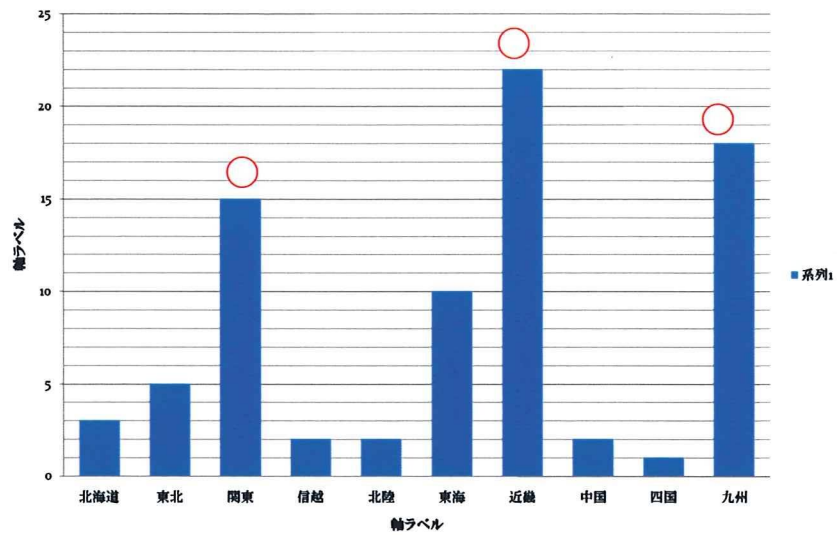
- 1) わが国における重症サラセミアの実態調査について、全国の日本血液学会専門医研修施設(470施設)に調査票を送付し有病者数を把握するとともに治療法や遺伝子診断状況の実態の調査を行った。
- 2) 正常妊娠各週の妊婦52名より末梢血7ml採取し、パーコールによる比重遠心後、レクチン法にて有核赤血球を分離・回収する。
- 3) 次に妊娠16週以下の男児妊娠妊婦12名よりNRBCを回収後FISH法にて性別判定を行い、胎児由来有核赤血球の判定を行う。
- 3) 我が国で報告のある α サラセミア2変異、 β サラセミア9変異を組み込んだアレイCGHを作成する。
- 4) このアレイを用いてサラセミア遺伝家系の妊娠例や妊娠中期以降に原因不明の胎児貧血例を対象に、単離した有核赤血球をWGA(全遺伝子増幅)後、遺伝子診断を行う。

アンケート調査

1. 全国470施設に質問票を送付し、255施設より回答を得た(54.2%)。
2. 重症サラセミア疾患は80名の報告があった。

α サラセミア	15名
β サラセミア	59名
その他	6名
3. 遺伝子診断を受けたものは34名、42.5%であった。

重症サラセミア患者80名の地域性

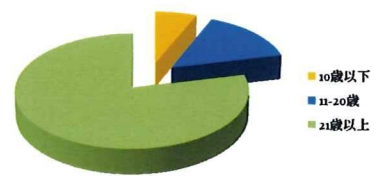


診断症例と現在の年齢

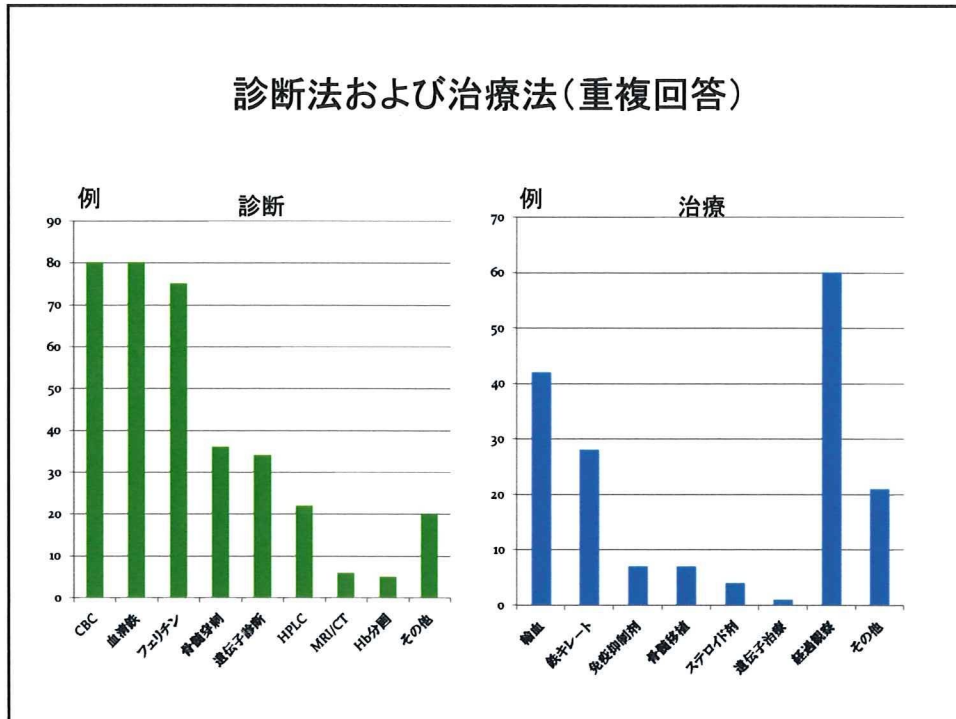
サラセミアの病型



患者年齢



診断法および治療法(重複回答)



母体血中NRBCを用いたサラセミアの 胎児遺伝子診断法の開発

1. 母体末梢血7mlをEDTA採血
2. パーコール法にてプレ濃縮を行い、レクチン法にて白血球系をpurgeし、NRBCを回収する。
3. 妊娠中どのくらいNRBCが回収されるか検討する。
4. 回収されたNRBCが胎児由来かどうかの判定を行う。
5. サラセミア家系の妊娠例、胎児貧血例を対象に胎児サラセミアの遺伝子診断を行う。

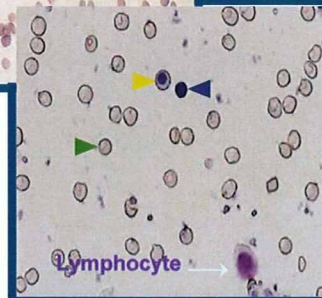
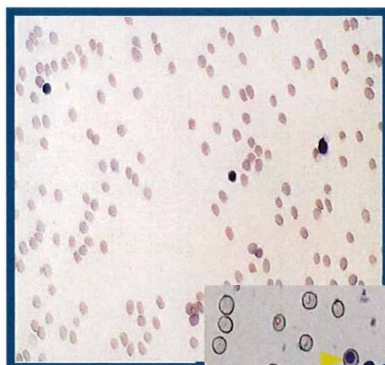
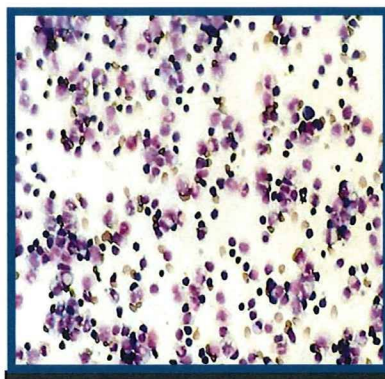
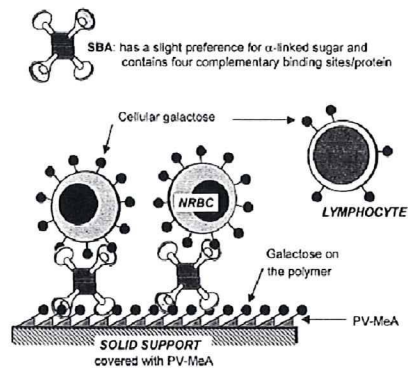
ガラクトース選択性レクチンを用いたNRBC分離法の概念




血液細胞膜でのガラクトース発現

-  (+++) 血小板
-  (+++) 赤血球
-  (+++) 赤芽球 (NRBC)
-  (++) 顆粒球
-  (++) 単球
-  (+) リンパ球

ガラクトースは赤血球系細胞の細胞膜に発現しその分化に関連している。

特に、赤血球系幹細胞で強く発現する。

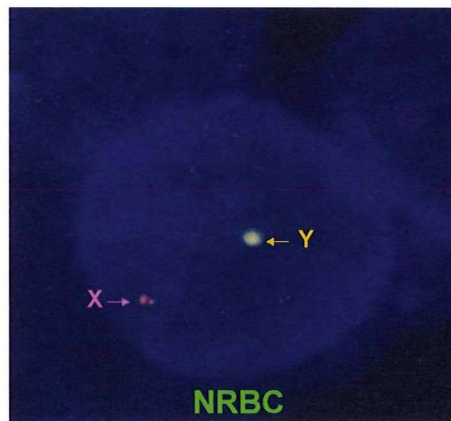


-  : NRBC
-  : RBC
-  : Small lymphocyte

男児妊娠におけるFISH (Y-chromosome)

症例	採血週数	回収NRBC(7ml)	Y chromosome陽性
1	11W2D	24	14 (58.3%)
2	16W4D	8	8 (100%)
3	12W6D	20	9 (45%)
4	13W1D	4	4 (100%)
5	15W6D	8	4 (50%)
6	14W3D	29	10 (34.4%)
7	14W5D	18	9 (50%)
8	12W0D	8	3 (35%)
9	15W2D	31	16 (51.6%)
10	13W3D	5	2 (40%)
11	9W5D	16	5 (31.2%)
12	8W1D	12	7 (58.2%)
			平均(49.1%)

FISH analysis of NRBC (male fetus)



FISH image of sex chromosomes by signal analysis in a 9-layer stack with an Auto Image Analyzer.

This analytical method produced a clear image.

検査対象遺伝子

	変異種	染色体	備考
α サラセミア	SEA FIL	16番	20kbの決失
β サラセミア	-1A-G IVS-II-1 G-A Codon90 TGA -4 codon 41/42 IVS-II-654 C-T -3 codon 127/128 Codon 121 TAA +T codon 85/86 開始 GCT	11番	ATA(-31cap A →G):promoter G→A splicing GAT→TAG nonsense TTCTTT→TT: Frame shift C→T: Splicing CAGGCT→CCT: 不安定 GAA→TAA: nonsense ATG→GTG: 翻訳開始

まとめ1

1. サラセミアは地中海地方や東南アジアに多い疾患とされているが、わが国でも比較的多い疾患と考えられた。
2. 問題はホモ重症型で、根本的な治療法は現時点ではなく、対症療法が主体であった。
3. 現在遺伝子治療が検討されているが、治療効果の高い胎児期での介入が望まれる。
4. 今回胎児期のサラセミア重症型を母児に取り安全に診断する方法の開発を目指す。
5. 母体血中に存在する胎児由来NRBCは妊娠各週で回収され、母体血1mlあたり平均3.2個であった。

まとめ2

6. 母体血中に存在する胎児由来NRBCは妊娠16週以下で平均15.8個/7ml回収され、そのうち49.1%が胎児由来と考えられた。
7. 日本人に多い変異部位を組み込んだアレイを作成した。回収したNRBCをアレイCGHにてサラセミアの胎児診断を行う予定である。

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)

調査票によるわが国におけるサラセミアの実態把握

研究代表者 北川道弘 国立成育医療センター副院長
研究分担者 林 聡 国立成育医療センター
周産期診療部胎児診療科医長
池谷美樹 国立成育医療センター
周産期診療部産科医師

【はじめに】

全国 470 の日本血液学会専門医研修施設に調査票(添付資料1)を送付し、わが国におけるサラセミア重症の実態把握を試みた。調査内容は、①サラセミア重症の患者数、②診断名、③年齢、④地域性、⑤診断法、⑥治療法などである。

【方法】

医師による自己記入方式で施設における患者数、治療状況等の把握を試みた。

【結果】

- 1、日本血液学会専門医研修施設(470施設)に調査票を送付し、255施設より回答を得た。(回答率54.2%)
- 2、重症サラセミアと診断され、治療通院あるいは定期的に検査、経過観察中のサラセミアは80名であり、 β サラセミアが圧倒的に多く59名(79.5%)日本人には α サラセミアは少なかった。国内の分布を見ると、これまで多いとされていた九州地方に加えて関東、近畿地方でも患者数多く認められた。(図1,2)
- 3、患者年齢は圧倒的に成人が多く(78.7%)10歳以下の小児は5例のみであった(6.3%)今回小児医療施設協議会参加施設に対する調査を行っていないが、今後症状が強くなり出現し、診断される例も多いものと思われた。(図3)
- 4、サラセミアの診断法はいくつかの検査から総合的に診断されていた。(図4)特にCBC、血清鉄、フェリチンはほぼ全例で実施されており、約半数

で骨髄穿刺、34例で遺伝子診断が行われていた。5、治療法に関する調査では経過観察が最も多く、貧血やその他の症状が出た場合は輸血との回答が52.5%であった。また、鉄キレート療法は28例で行われていた。免疫抑制剤や骨髄移植は各7例、ステロイド療法は4例で、遺伝子治療を行ったと回答した症例は1例のみであった。(図5)

【考察】

今回、全国的な重症サラセミアの実態把握を試みた。日本血液学会専門医研修施設470施設へ質問用紙を送付し、255施設から回答を得た。(回答率54.2%)わが国では重症サラセミアは圧倒的に β サラセミアが多く、地域性もこれまで九州地方が多いとされていたが、近畿、関東圏にも多く分布していた。

年齢別患者数は小児期が少なく、78.7%が成人であった。調査票を送付した医療機関が血液学会専門医研修施設であったためと考えられ、小児血液学会を介した再調査の必要性を感じた。また、重症サラセミア患者数から考えて、ヘテロの軽症型は相当数存在するものと考えられた。今回の結果から、治療法の基準作成は困難であり、今後遺伝子治療が進歩してくるものと考えられた。特に生着率の高いことが予測される胎児期での遺伝子治療が期待される。現在、欧米で5例実施されているものの未だ成功には至っていない。胎児期の早い段階での治療が遺伝子治療成功を導くものと推察される。

図1. 重症サラセミア患者80名の地域性

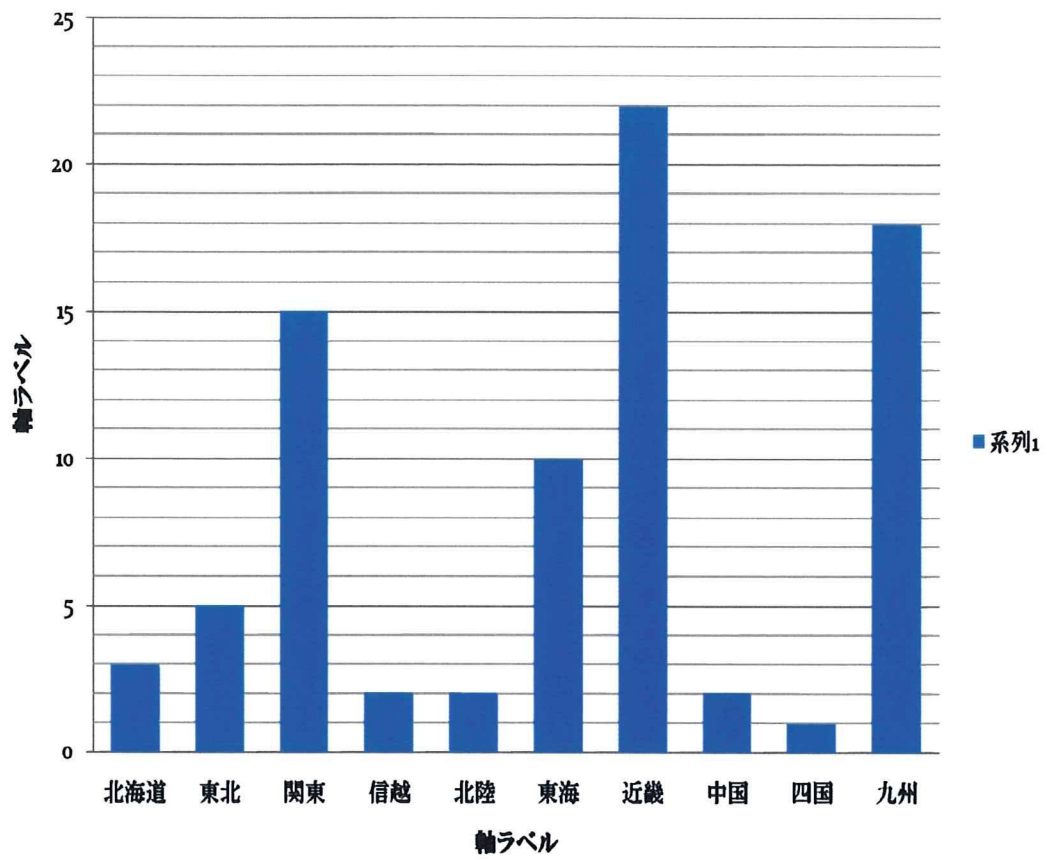


図2. 診断症例（66例）

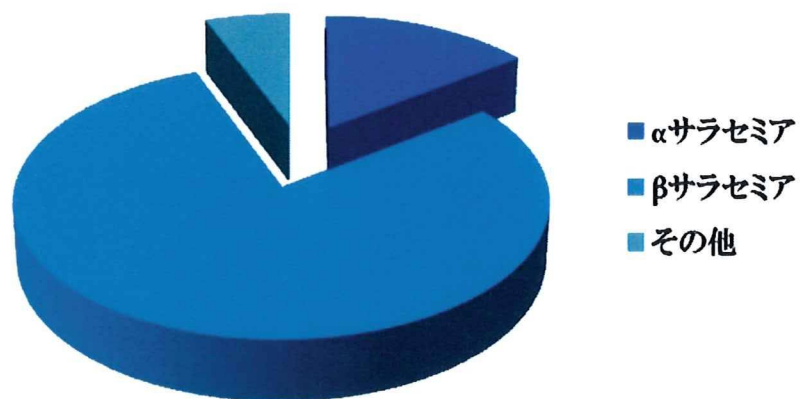


図3. 年齢 (80例)

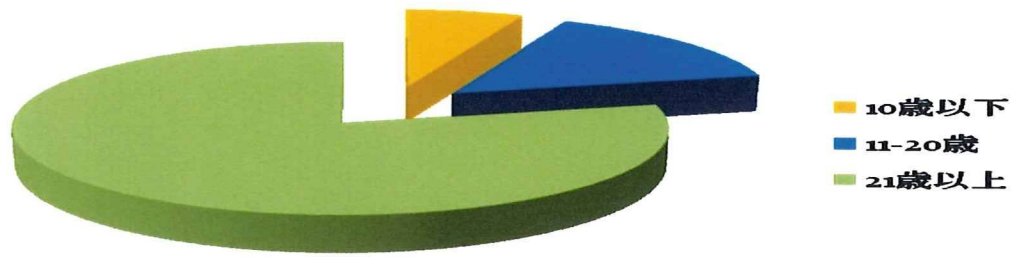


図4. 診断法 (重複回答)

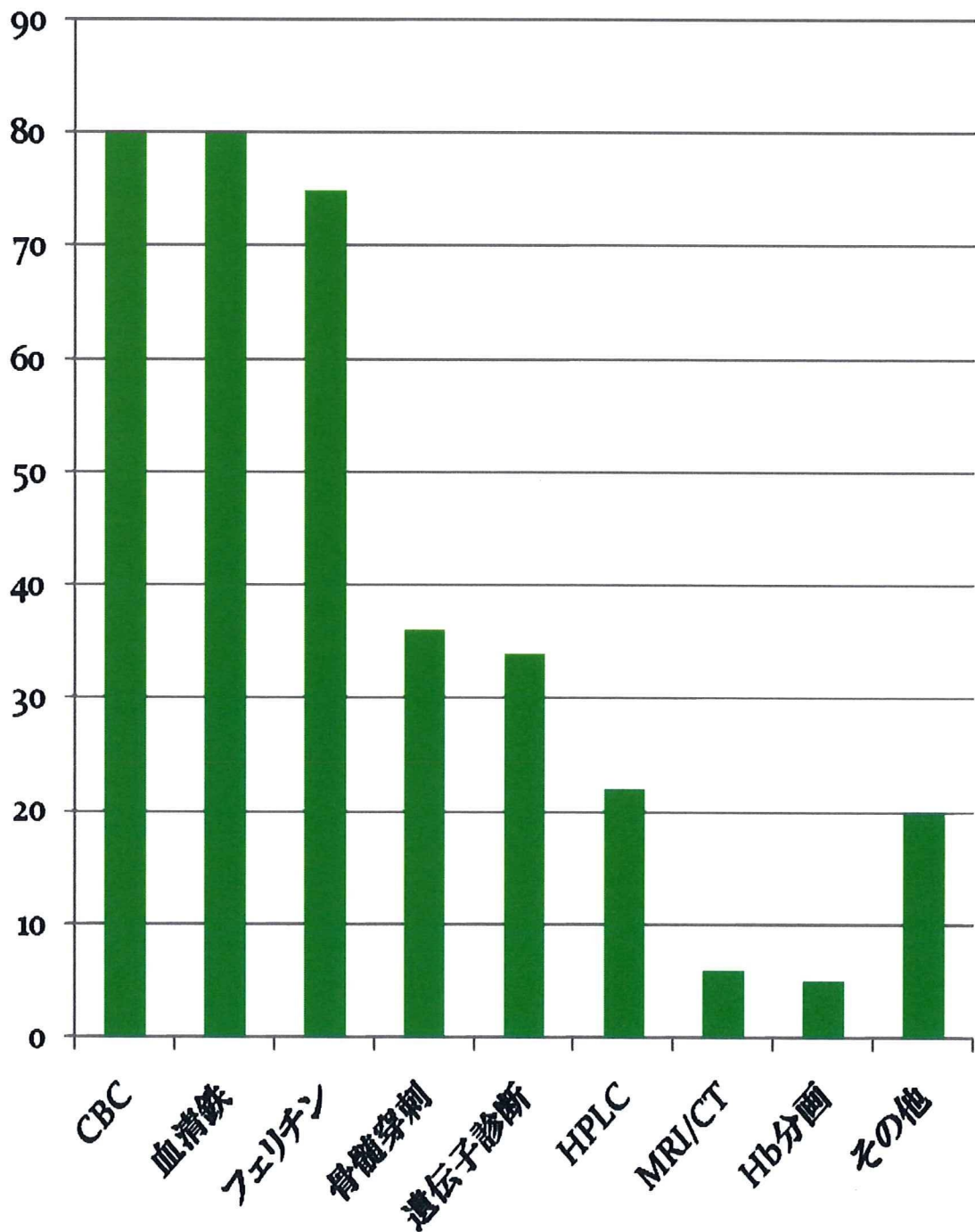
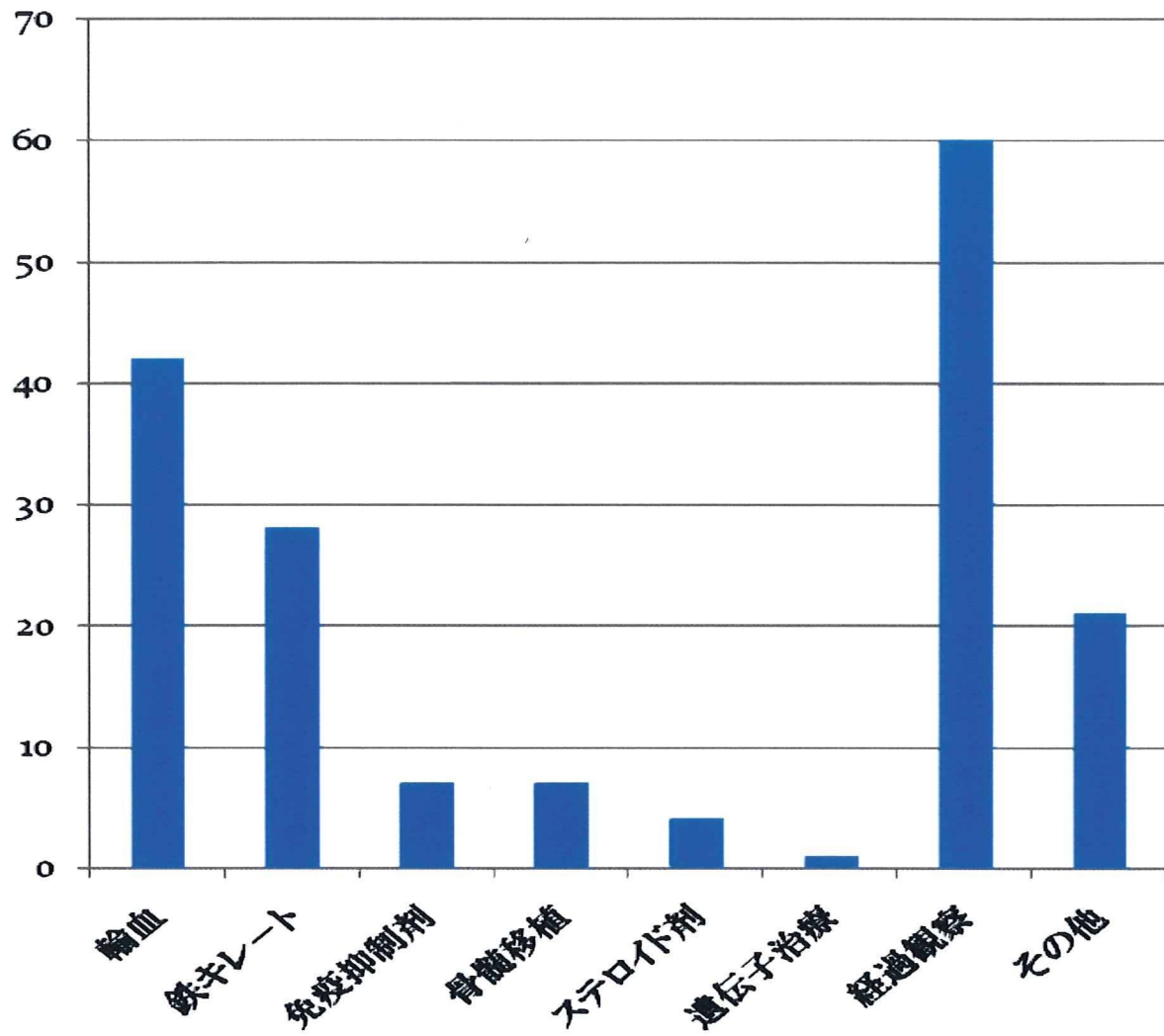


図5. 治療法（重複回答）



母体血末梢血を用いた胎児由来有核赤血球の濃縮・分離に関する研究

研究代表者	北川 道弘	国立成育医療センター	副院長
研究分担者	鈴木 信太郎	関西学院大学理工学部	教授
	関沢 明彦	昭和大学産婦人科	准教授
	高林 晴夫	金沢医科大学 FDDMB	センター長

A. 研究目的

サラセミアはこれまで日本には稀な疾患とされているが、最近の調査研究で決して少なくない疾患であることが分かってきた(服部；山口大)。サラセミアの中でもホモ接合体は重症型であり、一生涯輸血を余儀なくされる。胎児のうちに重症型が診断されれば、子宮内胎児死亡を防ぐための胎児輸血や研究段階であるが胎児遺伝子治療への道が開ける。胎児期での遺伝子治療は生着率が良く、今後期待できる治療法と考える。母体血を用いた胎児遺伝子診断法は、母体・胎児双方に侵襲を伴う羊水検査や絨毛採取に代わり、日常診療の中で胎児遺伝子診断法として妊婦に情報提供される検査になると考えられる。我々の行っている母体血中のNRBCを分離・回収するレクチン法ではほぼ100%（母体血から1mlあたり3個ほど）のNRBCの回収に成功しており、本法の実用化は、既存の胎児診断に対する考え方を革命的に変える画期的な手法であり、周産期医療・遺伝医療に与える影響は計り知れない。また、サラセミア遺伝家系を持つ女性の妊娠や原因不明の胎児貧血を認めた場合、サラセミアを含む胎児診断に対して新しい手法とし

ても期待される。出生後サラセミア貧血と診断され生涯輸血に頼らなければ生存できない患児の治療法に胎児期からの新しい治療法の開発の端緒となる。

B. 研究方法

1) 対象

国立成育医療センターおよび昭和大学病院に通院中の妊婦で、文書による同意が得られた家族性にサラセミアの診断を受けている妊婦および超音波断層法にて胎児貧血が疑われる症例を対象とする。また、正常妊婦52名も胎児診断の精度管理のため対象とする。

2) 実施施設

国立成育医療センター周産期診療部および昭和大学産婦人科外来で、採血を行う。採取した検体の処理、胎児細胞の分離は国立成育医療センター高度先進検査室および昭和大学産婦人科研究室にて行う。また、得られたNRBCは国立成育医療センターおよび昭和大学で解析を行った後、金沢医科大学にて精度の確認を行う。また、超音波検査で血流計測より胎児貧血が疑われる症例を国立成育医療センターおよび昭和大学産婦人科にて選別する。