

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. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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 resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3158-61.
- 2) Kanazaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood*. 116:4631-4638,2010.
- 3) Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. *Int J Hematol*. 2010 Oct;92(3):419-24. Epub 2010 Oct 1.
- 4) Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difrongo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response

Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Oct 26. [Epub ahead of print]

- 5) Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*. 2010 Nov 9. [Epub ahead of print]

##### 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

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。小児血液学会疾患登録事業を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築し、DBA の症例把握に努めた結果、2006 から 2009 年に診断されて登録された 314 例の造血障害症例から、新規診断 DBA 症例は 50 例。全国で年間平均 11 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。また、本研究班の活動により DBA が小児血液科医師に認知され、診断の手引き、遺伝子診断の体制が整ったことで今後も潜在する症例が見出される可能性が高い。

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。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。そこで、小児血液学会疾患登録事業を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築し、DBAの症例把握に努めた。

【目的】

本邦のDBA症例の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 236 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

2006, 2007, 2008, 2009 年診断登録症例数を表に示す（表）。

a. 疾患登録（一次調査）症例：小児血液学会会員 236 施設の 90%に相当する 213 施設が登録した。非腫瘍性血液疾患は毎年 1,200 から 1,300 症例であり、血小板異常症が最多。造血障害疾患は総計 314 例で、そのうち特発性再不貧は毎年 50-56 例とほぼ一定した症例数であった。同じ時期（2006, 2007 年）の MDS (RA, RCMD) 症例数は 12, 11 例。AML 165, 162 例、ALL 443, 490 例であった。

b. Diamond-Blackfan 貧血：DBA 症例は4年間で55例登録された。これは、14歳以下の小児人口17294千人から罹患率を推定すると、14歳以下小児人口10万に対して0.32（95%CI; 0.27-0.37）と推定される。今後も小児血液学会会員への診断基準啓発や遺伝子診断の開発により症例が掘り起こされている可能性がある。

#### 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先行して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、急性骨髄性白血病約160例、特発性再不貧は約50例発症に対してDBAは約11例の頻度であった。この様に稀少な疾患であるが、本研究班の活動によりDBAが小児血液科医師に認知され、診断の手引き、遺伝子診断の体制が整ったことで今後も潜在する症例が見出される可能性が高い。

#### 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11例ほどの新規診断症例が発生していることが予想された。

#### F. 健康危険情報

該当せず

(表)

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236
(%)	83%	88%	90%	90%
Idiopathic AA	58	57	59	51
Hepatitis AA	5	8	11	6
AA / PNH	2	1	1	0
Fanconi Anemia	5	4	4	1
Diamond-Blackfan	11	14	12	13
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3
Schwachman-Diamond	0	1	0	1
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1

As of June 2010

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

研究期間に本研究の成果に関する論文発表なし

##### 2. 学会発表

研究期間に本研究の成果に関する論文発表なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

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（九州大学大学院医学研究院 周産期・小児医療学 教授）

研究要旨：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行うため、赤血球アデノシンデアミナーゼ（eADA）によるスクリーニングの有用性について遺伝子診断確定例と乳児期に鑑別すべき疾患症例を比較した。また、DBA 貧血の重症例と身体奇形徴候、遺伝子型と表現型の関係も検討し診断ガイドラインを作成して、現在全国分子疫学調査を計画中である。DBA 患児は出生後早期から輸血を受ける。新生児の鉄代謝マーカー（hepcidin）の生理的動態を明らかにし、特に輸血による鉄過剰の問題点について検討した。

A. 研究目的

DBAは、*RPS19* などのリボソーム蛋白（RP）遺伝子のハプロ不全を原因とする先天性赤芽球癆である。現在13以上のRP遺伝子が同定され、ヒトリボソーム病として認識されている。患児は、多彩な奇形徴候と貧血を新生児・乳児期から呈し、診断と治療管理に苦慮する。原因遺伝子数が増え、軽症例や非典型例が見つかるようになったが、新たな診断と治療管理のガイドラインが必要である。分子疫学調査から本邦例の遺伝子型と表現型を明らかにして、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*を含むリボソーム蛋白遺伝子を解析し、赤血球アデノシンデアミナーゼ（eADA）の結果と併せて検討した。本邦のDBA登録による診断治療システムを確立するため全国分子疫学調査を進める。患児の輸血療法の問題点を明らかにするため新生児の血清prohepcidinを測定し、鉄制御機構を解析した。分子疫学研究および鉄代謝解析それぞれに倫理委員会で承認を受け、同意書を取得して行った。

C. 研究結果

当科および関連施設で経験したDBA11例について検討した。男女比は3:8であった。母子例を含み遺伝子解析はまだ進行中であるが、現在*RPS19* 2例（各男女）、*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。eADA活性は測定した6例中5例が

上昇していた。しかし*RPS19* 変異の女児は、1.32 U/gHbと正常域にあり、初診時に赤芽球癆を呈し白血病に進展した2歳男児例が2.00U/gHbと上昇していた。この白血病例は寛解後eADA活性が正常となり、*RPS19* 変異はなかった。*RPL5*と*RPL11* 変異例もeADA活性を測定し、さらに解析を進める。*RPS19* 変異の男児は貧血以外に翼状頸と舟底足を、女児も多指症、翼状頸とASDを呈し、いずれにも口蓋裂はなかった。*RPL5* 変異例には心臓病、小顎、口蓋裂、胃食道逆流などの奇形徴候が顕著であった。*RPL11* 変異の患児は心室中隔欠損を呈し奇形徴候は軽度であった。治療（prednisolone+cyclosporine）反応性について、*RPS19* 変異男児と*RPL11* 変異例は良好であったが、*RPS19* 変異女児と*RPL5* 変異例は不良である。現在、母子例など家族解析を進めている。

これらの結果を確認するため、全国分子疫学調査を行う準備を進めている。倫理委員会の申請も終了し、遺伝子と酵素活性測定を進める。従来の解析結果と照合しDBA登録システムを立ち上げるべく、ホームページも開設予定である。

新生児期から輸血を受ける患児の輸血開始時期を検討するため、血清prohepcidin値を測定し生理的動態を検討した。出生時には低く、生後後1か月までに増加することを確認した。

D. 考察

自験例を集積し、新たに発見された遺伝子群の変異についてeADA活性とともに解析を進めている。口蓋裂が*RPS19*変異患者には特異的でないこと、奇形

徴候の程度が貧血の重症度に相関する傾向などは海外の報告と一致する。日本のDBA患者および家族の分子疫学解析に展開し、データベースを構築する。

新生児は鉄代謝機構の未成熟から、特に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ため、輸血至適開始基準を鉄代謝マーカーから判断する方法を検討したい。

#### E. 結論

eADA活性は遺伝子解析と併せてDBAのスクリーニングに有用である。家族内解析や軽症例の解析を進め、早期診断と適正治療のため臨床応用を目指す。

#### F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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, Ito E: Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica*. 95(8):1293-9, 2010.
- 2) Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T: Serum prohepcidin concentrations at birth and one month after birth in premature infants. *Pediatric Blood & Cancer*. 56(2):267-72, 2011.
- 3) Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, Hara T: Genetic variation of vascular endothelial growth factor pathway does not correlate with the severity of retinopathy of prematurity. *J Perinatol*. 2011 (in press).
- 4) 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*. 169(7):899-902, 2010.

- 5) Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Tabuchi T, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T: Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatric Blood & Cancer*. 54(2):299-306, 2010.

##### 2. 学会発表

- 1) Ohga S: Hematopoietic stem cell transplantation for HLH/LCH, and a review of neonatal HLH in Japan. The 4th Seminar on Histiocytosis & Pediatric MDS. October 7, 2010 Seoul, Korea (invited speaker).
- 2) Ohga S: Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Education Session IV ~ HSCT for pediatric malignant diseases ~. The 15th Congress of the Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation. October 29-31, 2010 Phuket, Thailand (invited speaker).
- 3) 大賀正一, 工藤寿子, 足立壮一, 菊地陽: 小児血液疾患の基礎. 第3回研修医(初期・後期)のための血液学セミナー, 大津, 2010.7.9-11.
- 4) 菅野仁, 山本俊至, 大賀正一, 立石浩, 濱田貴子, 槍澤大樹, 小倉浩美, 藤井寿一: Diamond Blackfan貧血に関する新規の病因候補遺伝子同定. 第72回日本血液学会, 横浜, 2010.9.24-26.
- 5) 石村匡崇, 大賀正一, 宇都宮里奈, 牧村美佳, 土居岳彦, 井原健二, 原寿郎: ステロイドパルス療法が奏功したGraves病合併再生不良性貧血の一例. 第52回日本小児血液学会, 大阪, 2010.12.17-19.
- 6) 大賀正一, 小原明, 小島勢二, 菅野仁, 伊藤悦朗: DBA診療のガイドライン~現況と国際協力の可能性~ 平成22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研究事業 小島班「DKCの効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究」伊藤班「DBAの効果的診断法の確立に関する研究」合同班会議, 名古屋, 2010.9.4.

#### 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

DBAの診断法の開発（マーカー探索）

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。近年 DBA の 50% の患者でこれらの遺伝子変異が明らかになって来たことから、DBA の遺伝子変異の同定を DBA の診断のマーカーの 1 つとして利用することが可能になった。我々は、これまで解析方法が限られたため希少報告であった DBA 遺伝子の片アレル欠失を迅速・簡便に検出する系を開発し、弘前大学 DBA ゲノムバンクを用い検出を試みた。その結果、遺伝子変異未知の 31 例中 7 例で DBA の原因遺伝子の片アレル欠失を検出した。このことから、DBA 患者の確定診断のために DBA 原因遺伝子のゲノムコピー数の解析（片アレル欠失の検出）は有用な診断マーカーとなることが示された。

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 *RPL5*, *RPL11*, *RPL35A*, *RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS24*, *RPS26* などのリボソームタンパク質をコードする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。近年、上記の原因遺伝子の変異を調べることによって、欧米では DBA の約 50% まで原因遺伝子の特定が出来るまでになっている。このことは、DBA の原因遺伝子の変異同定が DBA の確定診断のための重要なマーカーの 1 つとしても機能し始めたことを意味している。

日本においてもすでに遺伝子配列解析による DBA 原因遺伝子の同定が DBA 診断上の重要な項目の一つとして実施されている。日本における DBA 患者のシーケンス解析での変異の確定率は約 30% と欧米に比べ低値であるが、我々はこれまで稀にしか報告のない Whole Allele Loss 変異（片アレル欠失変異）をターゲットとすることで、変異同定率の上昇が期待できると考え、簡便かつ迅速な DBA の遺伝子コピー数解析系（DBA gene copy number assay）を立ち上げた。

我々が独自に開発した本解析法を用いて、弘前大学小児科（伊藤悦朗教授）で集められた日本の DBA 患者ゲノムバンクを利用して DBA の確定診断のための DBA 原因遺伝子の欠失変異の同定を試みた。

B. 研究方法

・患者およびゲノム DNA

弘前大学小児科にて匿名化された DBA 患者の末梢血より抽出されたゲノム DNA を無作為に抽出し解析に用いた。用いた検体番号は #1, #1m, #3, #5, #14, #15, #21, #24, #26, #33, #36, #45, #50, #59, #60, #61, #62, #63, #68, #69, #70, #71, #72, #76, #77, #83, #89, #90, #91, #92, および #93 の 31 検体。

・DBA Gene Copy Number assay

それぞれのリボソームタンパク質遺伝子に対するプライマーセットを準備し、他の遺伝子プライマーセットによる Q-PCR の増幅曲線の Ct 値との差が 1 サイクル以内になるようにプライマーセットを選定した。Q-PCR は、以下の条件で行った。Genomic DNA (gDNA) 1 ng/μl DW を 95°C 5 min の後、直ちに氷上で急冷し、熱変成させた。変成させた gDNA 溶液 2 μl, 2x SYBR Premix Ex Taq II kit 10 μl, ROX dye II 0.4 μl, 10 pmol/μl Forward primer 0.8 μl, 10 pmol/μl Reverse primer 0.8 μl を混合し、total 20 μl

になるようにDWを加えた。PCRサイクルは以下のように行った。95°C30秒の後、95°C5秒-60°C34秒を35サイクル、Applied Biosystems 7500にて行った。

#### ・ Genomic PCR

PCR酵素および反応液はKOD FX (Toyobo) を用い、添付の説明書のステップダウンPCRのプロトコルに従ってPCRを行った。PCR産物は、0.8%アガロース電気泳動で確認した。PCRプライマーは図中 (Fig.2 A, C) に示す。

#### ・ シーケンス解析

Genomic PCR産物をGenElute PCR&Gel Clean Upキット (sigma) を用いて精製し、BigDye Terminator ver3.1 cycle sequencing kit (BD) のプロトコルに従ってシーケンスPCRを行った。BigDye Xterminator kit で精製後、Applied Biosystems 3130xジェネティックアナライザーで解析した。

(倫理面への配慮)

患者末梢血DNAの取り扱いについては、国立感染症研究所倫理審査会、東京医科歯科大学倫理審査会および弘前大学倫理審査会の承認の得た上で患者の同意を得た場合に限り検体を研究に使用した。

### C. 研究結果

#### 遺伝子変異未知DBA患者の遺伝子コピー数解析

DBAで高頻度に変異報告のある遺伝子として、*RPL5*, *L11*, *L35A*, *S7*, *S10*, *S17*, *S19*, *S24*, *S26* の9遺伝子、またDBAの原因としての重要度は未だ不明であるが論文や学会等において変異報告のあった遺伝子、*RPL9*, *L19*, *L26*, *L28*, *L36*, *S15*, *S27A* の7遺伝子について遺伝子コピー数測定用のQ-PCRプライマーを設定した。弘前大学においてシーケンス解析の結果、変異が同定されなかった検体を用いて上記の遺伝子についてQ-PCRで遺伝子コピー数を測定した。その結果、31例中7例で特定の1遺伝子に対するプライマーセットすべてが他の遺伝子の増殖曲線のCt値から1サイクルの遅れを示した (Fig. 1)。つまりこれら1サイクル遅れた遺伝子は、その他の遺伝子 (2N) のコピー数の半分 (N) であることを示して

おり、片アレルの欠失が起きていることが示された。7例の内訳は、*RPS17* 欠失 (3例)、*RPS19* 欠失 (2例)、*RPL5* 欠失 (1例)、*RPL35A* 欠失 (1例) であった。

#### *RPS19* 遺伝子の遺伝子内相同組換え検体の検出

片アレル欠失を示した検体の内、#24 (*RPS19* の欠失) については、一部のS19のプライマーセットは、正常の遺伝子コピー数を示した。そこで*RPS19* に対するQ-PCRプライマーを、遺伝子全体をカバーするように9セット設定し、#24検体の*RPS19* の遺伝子コピー数を詳細に調べた。その結果、*RPS19* の5'UTR領域 (S19-57, -58) およびintron 3内部から3'UTR領域に設定したプライマー (S19-28, -62, -65) ではコピー数が正常値を示したのに対して、intron 3の内部より上流に設定されたプライマー (S19-36, -24, -40, -44) では片アレルの欠失を示した (Fig. 2B)。このことから*RPS19* 遺伝子の片方のアレルのintron 3領域付近で小規模な欠失があることが考えられた。そこで、*RPS19* の5'UTRとintron 3にプライマーを設定しgenomic PCRを行い欠失領域の同定を試みたところ、#24検体では健常人とは異なり約7k塩基対の欠失が想定されるバンドが電気泳動上で認められた (Fig. 2C)。Genomic PCR産物をシーケンス解析した結果、5'UTRとintron 3にある23塩基対の相同配列 (CGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCA, nt:-1400-1374およびnt: +5758-+5784) の間で分子内相同組換えが生じ、結果として7157塩基の欠失が起きたことが明らかになった (Fig. 2D)。欠失した領域にはプロモーターおよびexon 1, 2, 3が含まれることから、このアレルは正常な*RPS19*タンパク質をコードしないと考えられた。

### D. 考察

近年DBAでリボソームタンパク質遺伝子に変異が多数同定され、欧米では約半数で遺伝子変異が明らかにされるようになった。このことから、これまでDBAの診断は主に臨床像から判断されて来たが、遺伝子変異解析によって原因遺伝子を同定することが確定診断の1つの診断マーカーとなりつつある。しかしながら日本では既知遺伝子変異の同定率は約30%であることから変異同定率の向上が期待された。DBA遺伝子の片アレル欠失は遺伝子転座の解析や

CGHアレイ解析などにより、これまで稀に報告があったものの、これらの解析方法は、操作性やコスト面において多検体を処理するには不向きであると考えられる。このためこれまでDBAで片アレル欠失のまとまった解析はされて来なかった。

我々が開発した片アレル欠失検出方法は、1回の定量PCRで多数の遺伝子についてのコピー数解析が出来る方法であることから、操作面の簡便・迅速性を達成しただけでなく、解析面においてもQ-PCRの結果を目視するだけで遺伝子欠失を検出できるため、解析のステップが非常に簡便となっている利点がある。実際に我々は、本パイロットスタディーで迅速に7例の片アレル欠失を同定することができた。

我々が同定した7例のDBAの原因遺伝子の片アレル欠失は、その多くがこれまでに報告のないものであった (*RPL5* (1例), *RPS17* (3例))。また今回の解析では、*RPS17*の遺伝子異常が3例発見され、これまで欧米では少数派とされたが、興味深いことに日本ではむしろ高頻度で*RPS17*に変異があることが明らかになった。

## E. 結論

今回パイロットスタディーとして小規模の検体数でコピー数解析を行った結果、DBAでは高頻度 (31例中7例) で原因遺伝子の片アレルの欠失が認められることが明らかになった。このことから、DBAの診断では、これまで行われて来たシーケンス解析に加えてコピー数解析を行うといった一連の遺伝子変異解析手順を踏むことによって、DBAの確定診断の同定率の向上が可能であることが示された。今後は、DBAの確定診断の一部で遺伝子コピー数解析を行うことでより多くのDBA患者の変異遺伝子の確定を行うことが可能であると考えられる。また遺伝子変異同定率が上昇することによって日本のDBAの遺伝子型と貧血・奇形等の表現型との相関がより詳しく解析することができるようになることや骨髄移植ドナーの選定の幅が広がることが考えられ、DBA患者の治療面でもより一層の質の向上が期待できると考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 'A novel method to analyze genomic copy number of Diamond Blackfan anemia responsible genes.' Madoka Kuramitsu, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi, Michio Ozeki, Atsuko Masumi, Takuo Mizukami, Haruka Momose, Kazuya Takizawa, Ito Etsuro, Kazunari Yamaguchi, Isao Hamaguchi. 第72回日本血液学会, 横浜, 2010.9.24-26.

2) New Determination Method for Extensive Gene Deletions in Diamond -Blackfan Anemia' Madoka Kuramitsu, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi, Tsutomu Toki, Kiminori Terui, RuNan Wang, Atsuko Masumi, Takuo Mizukami, Haruka Momose, Kazuya Takizawa, Kazunari Yamaguchi, Etsuro Ito, and Isao Hamaguchi. Poster III-1010. 第52回アメリカ血液学会, 米国・オーランド, 2010.12.4-7.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



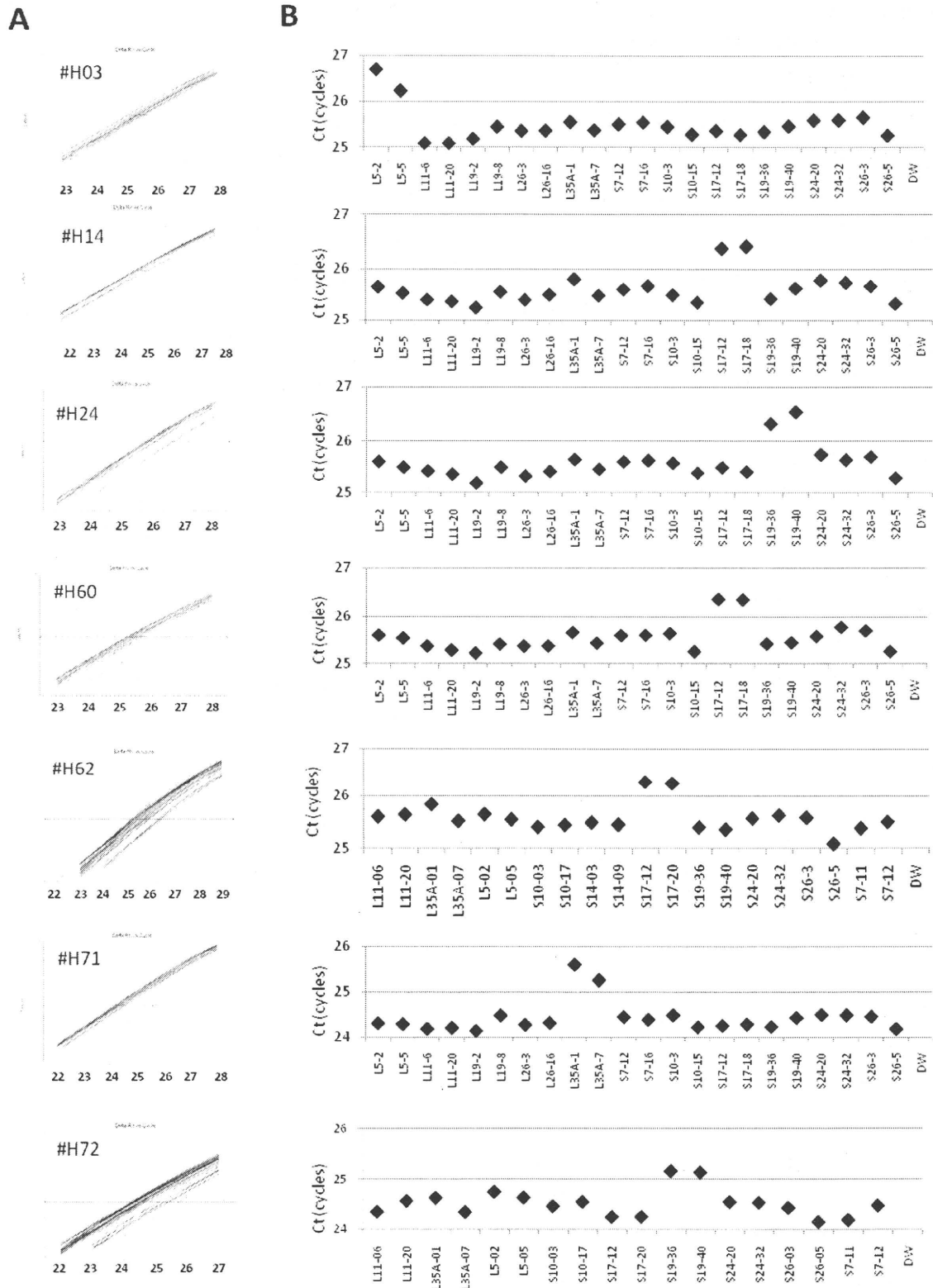


Figure 1. Q-PCRによるDBAの遺伝子コピー数検査の結果、片アレル欠失を示した7例

A. Q-PCR増幅曲線像。B. Ct値のエクセル解析結果。7検体について他の遺伝子のプライマーセットより1サイクル遅れた遺伝子プライマーセットが認められた。

Patient #H24 with a deletion in RPS19 gene

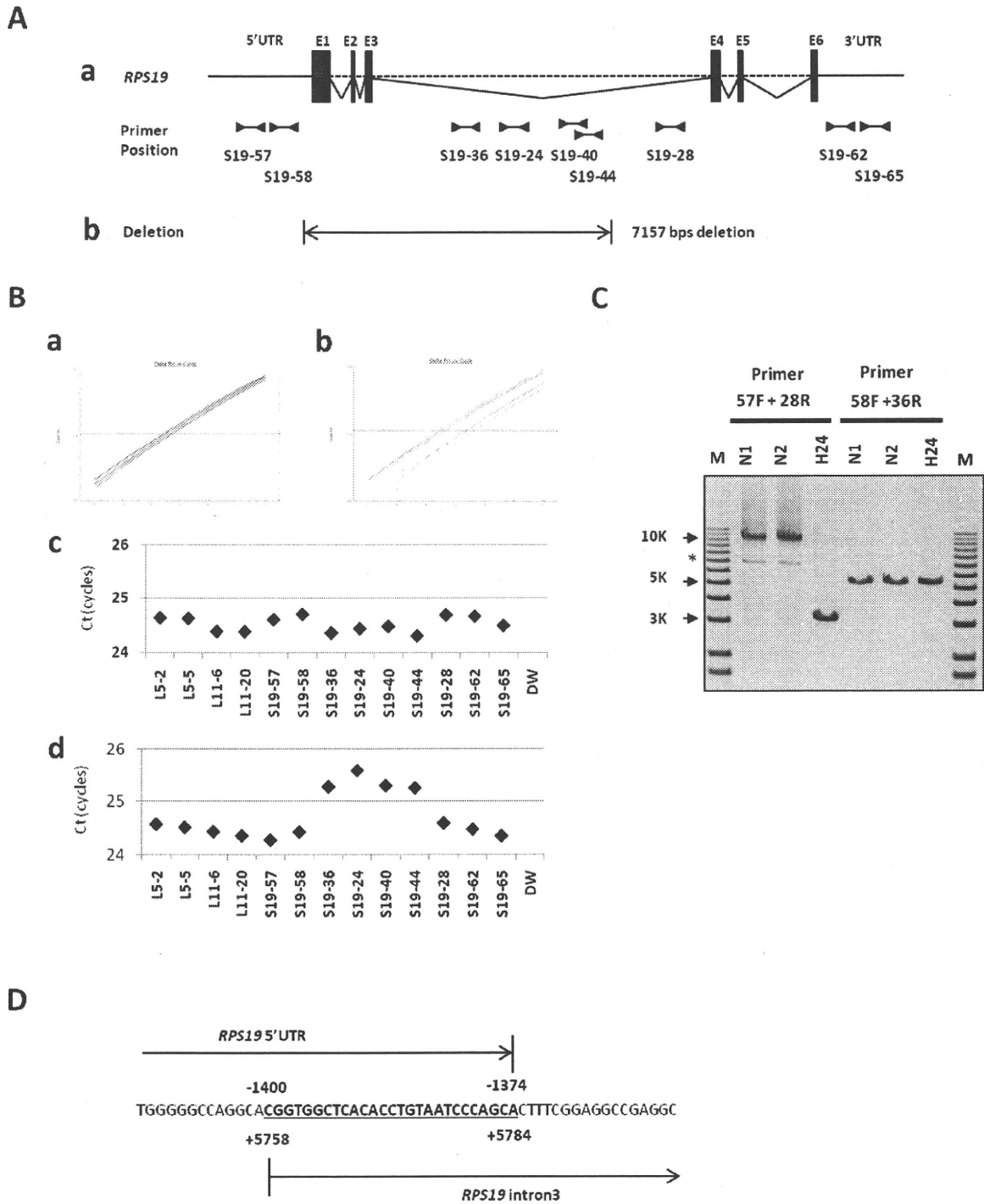


Figure 2. *RPS19* 遺伝子内相同組換えの検出

A. *RPS19* プライマーセットのゲノム上の位置 (a), 検出された欠失領域 (b)。 B. Q-PCRによる遺伝子コピー数解析結果。 a, c: 健常人、b, d, DBA患者#24検体。 C. genomic PCR産物の電気泳動結果。 N1, N2: 健常人検体、H24: DBA患者#24検体。 D. シーケンス解析によって明らかになった23塩基の*RPS19*の遺伝子内相同組換え領域。

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

DBAの診断に有用な新規バイオマーカーの同定

研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学 遺伝子医療センター 准教授）

**研究要旨：** Diamond Blackfan 貧血（DBA）の確定診断には、リボソーム蛋白遺伝子変異の同定が有用だが、原因遺伝子は多数あること、遺伝子変異が同定される症例が未だ 50～60%であることが問題であった。今回、赤血球還元型グルタチオン（GSH）が DBA 患者で有意に高値であることを発見し、従来から補助診断に用いられていた赤血球アデノシン・デアミナーゼ活性（eADA）と併用することで、検討した 9 家系 11 例の DBA 患者を 100%診断し得た。このことから、GSH は DBA 診断における新規バイオマーカーとして、極めて有用と考えられた。

A. 研究目的

DBAはリボソーム蛋白遺伝子変異によって発症する先天性骨髄不全症の一型である。現在まで13種の原因遺伝子が同定されているが、網羅的な遺伝子検査を必要とするだけでなく、その結果変異が同定される例は全体の50%程度に過ぎない。生化学的バイオマーカーとして、赤血球アデノシン・デアミナーゼ活性（eADA）の上昇が知られているが、臨床像、血液学的所見でDBAが強く疑われる症例の10～20%ではeADAが基準値内であり、より高感度にDBAを診断出来る新規バイオマーカーが必要と考えられていた。

最近、DBAにおける赤芽球細胞死の原因として、細胞内酸化ストレスの亢進によるp53活性化が報告された。酸化ストレスはp53だけでなく、Nrf2、HIF-1 $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B、STAT3など種々の転写因子発現を上昇させ、アンチオキシダントの増加により細胞内活性酸素種（ROS）の除去をおこなう。赤芽球系細胞における最も重要な抗酸化物質である還元型グルタチオン（GSH）がDBA患者赤血球で増加しているか否かを検討する目的で以下の研究をおこなった。

B. 研究方法

既にRPS19ないしRPS17遺伝子変異が同定されている9例およびDBA診断基準により、古典的DBAと診断することが出来る2例を対象にして、インフォームド・コンセントを取得の上、eADAとGSHの測定を実施した。

eADAは白血球・血小板・血漿を除去した精製赤血

球から溶血液を作製し、アデノシンを基質として265 nmにおける吸光度変化により、活性を測定した。

GSHの測定は以下の様におこなった。20  $\mu$ lのヘパリン加全血に180  $\mu$ lの蒸留水を加えて溶血させたのち、メタリン酸により得られる除タンパク抽出液に、5,5'-di-thiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)を加え、412 nmで定量した。

C. 研究結果

9家系11例のDBA症例、非罹患両親・同胞11名について、eADAとGSHを同時に測定し、平均を比較検討したところ、eADAは患者群で $3.57\pm 1.53$  (IU/gHb, M $\pm$ SD)、対照群で $1.02\pm 0.26$ 、GSHは患者群で $103\pm 18$  (mg/dl RBC, M $\pm$ SD)、対照群で $70.0\pm 9.7$ と、どちらも有意に患者群で高値を示した。

患者10例においてeADAは9例で基準値を超えて高く、またGSHは8例で基準値以上であったが、eADA・GSHの同時測定でどちらも基準値内の例は一例も認めないことから、この二つの生化学的バイオマーカーの同時測定は、DBA診断に極めて有用であることが示唆された。

D. 考察

ROSの産生、除去のバランスを維持するため、細胞は種々の機構を保持しており、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カタラーゼ、ペルオキシレドキシニンなどの酵素やGSHなどが生理的に重要な抗酸化作用をもつことが明らかになっている。

GSHはフリーラジカルや過酸化物質などのROSを除

去することで、DNA損傷を未然に防ぐ役割を演じている。また、GSHは第二相解毒反応によりがん原性物質に働き、細胞内への排泄に直接関与する。反対にGSHレベルの上昇は種々の腫瘍細胞で知られており、このGSHレベルの上昇はがん細胞の抗がん剤耐性に寄与していると考えられている。

今回の研究成果で、DBA患者赤血球においてGSH濃度の上昇が認められたが、そのメカニズムについて未だ不明である。赤血球にはグルタチオン生合成系、還元系およびグルタチオン還元酵素の補酵素であるNADPHの産生系の代謝が発達しており、それらの代謝系に属する、 $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素、グルタチオン合成酵素、グルタチオン還元酵素、そしてグルコース-6-リン酸脱水素酵素などの活性がDBA患者で亢進しているかどうか、現在検討中である。

#### E. 結論

eADAとGSHの同時測定によって、検討した11例のDBA患者を生化学的に診断可能であることを明らかにし、赤血球GSH濃度の上昇がDBAの新規バイオマーカーであることを同定した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 菅野 仁, 斎藤加代子. 電子カルテによる遺伝子情報管理の実際. 日本遺伝カウンセリング学会誌. 31: 127-129, 2010.

2) Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Funase M, Murayama T, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Okada Y. Shared molecular targets in pediatric gliomas and ependymomas. *Pediatr Blood Cancer*. 2011. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21298772.

3) Aihara Y, Tsuruta T, Kawamata T, Kanno H, Maebayashi K, Sakauchi M, Wada E, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Hori T. Double high-dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation for primary

disseminated medullo-blastoma: a report of 3 cases. *J Pediatr Hematol Oncol*. 32: e70-4, 2010. PubMed PMID: 20168248.

##### 2. 学会発表

1) 菅野 仁, 山本俊至, 大賀正一, 立石 浩, 濱田貴子, 槍澤大樹, 小倉浩美, 藤井寿一.

Diamond Blackfan貧血に関する新規の病因候補遺伝子同定. 第72回日本血液学会学術集会, 横浜, 2010.9.25.

2) 菅野 仁, 石谷 健, 相崎潤子, 濱田貴子, 内山智貴, 浦野真理, 近藤恵里, 松井英雄, 藤井寿一, 太田博明, 斎藤加代子. 薬物トランスポーター遺伝子多型を用いた薬理遺伝学的検査～ドセタキセル投与における好中球減少症予測. 第17回日本遺伝子診療学会, 三重, 2010.8.7.

3) 菅野 仁, 槍澤大樹, 小倉浩美, 濱田貴子, 藤井寿一. 免疫寛容導入療法におけるドナー、レシピエント細胞キメラリズム解析. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会, 名古屋, 2010.5.30.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

◎は本研究費によることが明記されている論文

○は本研究に関連する論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
◎Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K.	Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia.	Int J Hematol.	92(3)	413-18	2010
◎Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang RN, TeruiK, 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	95(8)	1239-9	2010
◎Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T.	Serum prohepcidin concentrations at birth and one month after birth in premature infants.	Pediatric Blood & Cancer	56(2)	267-72	2011
Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E	Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia.	Blood	116	4631-38	2010
Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishino N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S.	Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical stem cell transplantation.	Blood	115 (15)	3158-61	2010
Nishio N, Kojima S.	Recent progress in dyskeratosis congenita.	Int J Hematol.	92(3)	419-24	2010



Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S.	Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation.	Blood				2010 Nov 9. [Epub ahead of print]
Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H.	Array-based genomic resequencing of human leukemia.	Oncogene	29(25)	3723-31	2010	
Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG and Kitabayashi I.	PU.1-mediated upregulation on <i>CSF1R</i> is crucial for leukemia stem cell potentiation induced by MOZ-TIF2.	Nature Medicine	16(5)	580-585	2010	
Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difronzo N, Horowitz MM, Antin JH.	Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010.	Biol Blood Marrow Transplant.		in press	2010	
Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, Hara T.	Genetic variation of vascular endothelial growth factor pathway does not correlate with the severity of retinopathy of prematurity.	J Perinatol.		In press	2011	
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 tenovirus.	Eur J Pediatr.	169(7)	899-902	2010	

Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Tabuchi T, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T.	Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan.	Pediatric Blood & Cancer	54(2)	299-306	2010
○佐野弘純, 朴 明子, 外松 学, 今野友貴, 土岐 力, 伊藤悦朗, 林 泰秀.	[症例報告] 典型例とは異なる緩徐な臨床経過を示し, リボソームタンパク遺伝子 <i>RPL11</i> の変異の検出により診断した Diamond-Blackfan 貧血の 1 例.	日本小児血液学会 雑誌	24	225-228	2010



#### IV. 研究成果の刊行物・別冊

## Molecular pathogenesis in Diamond–Blackfan anemia

Etsuro Ito · Yuki Konno · Tsutomu Toki ·  
Kiminori Terui

Received: 26 July 2010 / Revised: 30 August 2010 / Accepted: 14 September 2010 / Published online: 30 September 2010  
© The Japanese Society of Hematology 2010

**Abstract** Diamond–Blackfan anemia (DBA) is a congenital anemia and a broad spectrum of developmental abnormalities that presents soon after birth. The anemia is due to a failure of erythropoiesis with normal platelet and myeloid lineages. Approximately 10–20% of DBA cases are inherited. Genetic studies have identified heterozygous mutations in at least one of eight ribosomal protein genes in up to 50% of cases. Mutations in *RPL5* and *RPL11* are at a high risk for developing malformation. Especially, mutations in *RPL5* are associated with multiple physical abnormalities, including cleft lip/palate and thumb and heart anomalies. Recently, the 5q– syndrome, a subtype of myelodysplastic syndrome characterized by a defect in erythroid differentiation, is caused by a somatically acquired deletion of chromosome 5q, which results in haploinsufficiency of RPS14. These data indicate that abnormalities in ribosome function are broadly implicated in both congenital and acquired bone marrow failure syndrome in humans.

**Keywords** Ribosomal protein · Diamond–Blackfan anemia · 5q– syndrome · Congenital bone marrow failure syndrome

### 1 Introduction

Diamond–Blackfan anemia (DBA) is a rare congenital, inherited bone marrow failure syndrome (IBMFS) characterized by normochromic macrocytic anemia, reticulocytopenia and absence or insufficiency of erythroid precursors

in normocellular bone marrow [1]. DBA was first reported by Josephs in 1936 and refined as a distinct clinical entity by Diamond and Blackfan in 1938 [2, 3]. Approximately, 90% of affected individuals typically present in infancy or early childhood, although a “non-classical” mild phenotype may not be diagnosed until later in life [4, 5].

Although macrocytic anemia is a prominent feature of DBA, the disease is also characterized by growth retardation and congenital anomalies, including craniofacial, upper limb/hand, cardiac and genitourinary malformations that are present in approximately half of the patients [4–6]. In addition, DBA patients have a predisposition to the development of malignancies [e.g., acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndrome (MDS) and osteogenic sarcoma] [4]. Diagnosis of DBA is often difficult due to incomplete phenotypes and a wide variability of clinical expression [4–7]. The central hematopoietic defect is characterized by an enhanced sensitivity of hematopoietic progenitors to apoptosis along with evidence of stress erythropoiesis, which includes elevations in fetal hemoglobin and mean red cell volume (MCV) [8]. The majority of patients also exhibit an increase in erythrocyte adenosine deaminase activity [9]. Corticosteroids remain the mainstay of treatment. Approximately 80% of patients respond to an initial course of steroids [4]. Bone marrow transplantation is the only curative treatment, but requires an HLA-matched sibling and is primarily reserved for patients with severe complications.

Recently, a number of mutations in ribosomal protein genes have been identified in DBA patients [4, 10, 11]. In addition, gene products mutated in the other IBMFS including dyskeratosis congenita (DKC) and Schwachman–Diamond syndrome are also predicted to be involved in ribosome biogenesis [12]. In this review article, we summarize the recent progress in understanding of the

E. Ito (✉) · Y. Konno · T. Toki · K. Terui  
Department of Pediatrics, Hirosaki University Graduate School  
of Medicine, 5 Zaifucho, Hirosaki, Aomori 036-8562, Japan  
e-mail: etou@cc.hirosaki-u.ac.jp

**Table 1** Mutations in ribosomal protein genes in DBA patients (%)

	Gazda et al. [17, 19, 21] (American and European)	Cmejla et al. [22] (Czech)	Quarello et al. [23] (Italian)	Konno et al. [24] (Japan)
<i>RPS19</i>	25	21.4	28	11.1
<i>RPL5</i>	6.6	21.4	9.3	8.9
<i>RPS10</i>	6.4	ND	ND	ND
<i>RPL11</i>	4.8	7.1	9.3	4.4
<i>RPS35A</i>	3.5	ND	0	0
<i>RPS26</i>	2.6	ND	ND	ND
<i>RPS24</i>	2	ND	1.6	0
<i>RPS17</i>	<1	3.6	ND	2.2
Total	52.9	52.6	48.2	26.6

ND not done

molecular pathogenesis of DBA and new insight into the mechanism of a defect in erythropoiesis.

## 2 Inheritance and genetics

Diamond–Blackfan anemia is a rare disease with a frequency of 2–7 per million live births and has no ethnic or gender predilection [1]. DBA occurs in both familial and sporadic forms. Most cases of DBA are sporadic with equal sex ratio, but at least 10% of patients have positive family history for the disorder. In Japan, the annual incidence is 4.02 cases per million births, and 3 out of 56 cases have a family history [13]. Autosomal dominant inheritance is the most frequently observed pattern of inheritance. The basic molecular defects behind DBA were unknown until the discovery of the first DBA gene *RPS19* [11].

Proteins are universally synthesized in ribosomes, which consist of two subunits: one small (40S) and one large (60S). The mammalian ribosome comprises 4 ribosomal RNAs (rRNA) and 80 ribosomal proteins [14]. *RPS19* encodes a protein belonging to the small subunit of the ribosome. Following the observation that a DBA patient had an X;19 chromosomal translocation, a major DBA locus was mapped to chromosome 19q13, and the breakpoint was identified in the *RPS19* gene [10, 11, 15]. Subsequent large scale studies established that *RPS19* is mutated in approximately 25% of DBA patients [16].

Since the initial description in 1999, mutations in a number of genes that encode 40S ribosomal proteins have been identified in DBA patients. Mutations in *RPS24* on chromosome 10q22–q23 account for about 2% of DBA patients, while *RPS17* variants on chromosome 15q25.2 have been found in 2 patients [17, 18]. Doherty et al. [19] reported that variants of *RPS10* and *RPS26* were observed in 6.4 and 2.6% of cases, respectively. Mutations in genes encoding proteins of the large ribosomal subunit have also been found in DBA patients. *RPL35a* on chromosome 3q29 was detected in about 3.3% of patients with DBA;

mutations in *RPL5* and *RPL11* on chromosome 1p22.1 and 1p36.12 were found in 6.6–21.4 and 4.8–9.3% of DBA patients, respectively [20–23]. Approximately 50% of DBA patients in Western countries have a single heterozygous mutation in a gene encoding a ribosomal protein (Table 1). In Japan, mutations in *RPS19*, *RPL5*, *RPL11* and *RPS17* were identified in 5 (11%), 4 (9%), 2 (4%) and 1 (2%) of 45 probands, respectively. In total, 12 (27%) of Japanese DBA patients had mutations in RP genes [24]. However, most of the studies did not include methods that are capable of detecting large deletions. Therefore, cases of DBA resulting from large chromosomal deletions or rearrangements are probably under diagnosed.

## 3 Genotype and phenotype correlation

Clinical data from European and American DBA patients show that the frequency of malformations is 31% in patients with *RPS19* mutations, which is not significantly different from that of the entire DBA population [25]. *RPS19* mutations are characterized by a wide variability of phenotypic expression. Even family members with the same mutation in *RPS19* can present with clinical differences [16]. *RPS19* mutations are found in some first degree relatives presenting only with isolated high erythrocyte adenosine deaminase activity and/or macrocytosis. However, large deletions at the 19q locus are always associated with mental retardation, which points to a contiguous gene syndrome [7].

Recent studies suggest that the patients with an *RPL5* and *RPL11* mutation are more likely to have craniofacial, thumb and heart anomalies [21–23]. 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. Consistent with these reports, 3 of 4 Japanese patients with *RPL5* mutations also had physical malformations and 2 had cleft palate, whereas only 1 of 45 patients without an *RPL5* mutation presented with cleft palate [24].

#### 4 Clinical features and diagnosis

Patients with DBA are usually seen in early childhood with profound macrocytic or normocytic anemia, reticulocytopenia and a reduction or absence of erythroid precursors in their bone marrow. More than 90% of DBA diagnoses are made before the age of 1 year [26].

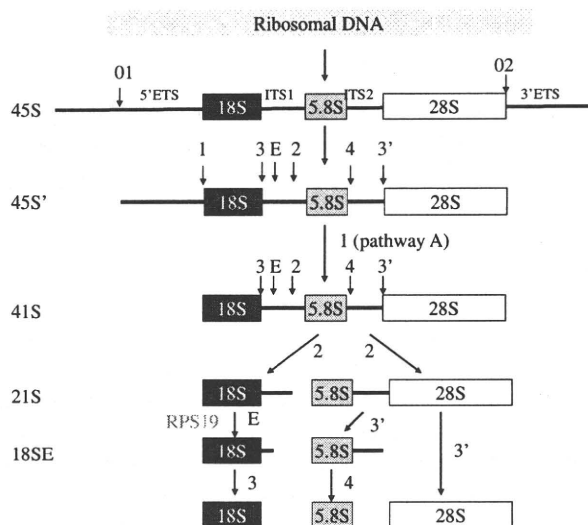
Diagnosis of DBA is often difficult due to incomplete phenotypes and the wide variability of clinical expression [4–6]. The International Clinical Consensus Conference reported diagnostic and supporting criteria for the diagnosis of DBA [4]. Only the identification of pathogenic mutations in one of the DBA genes definitively establishes a diagnosis of DBA. Furthermore, molecular diagnosis enables the detection of carriers, and the avoidance of hematopoietic stem cell transplantation from sibling donors with the mutations. However, determining the effects of missense mutations may be difficult, whereas nonsense and frameshift mutations will probably be pathogenic in the majority of cases [26].

#### 5 Impaired ribosomal biogenesis in DBA

The human ribosome is composed of 4 ribosomal RNAs and a minimum of 80 different ribosomal proteins. The catalytic component translating information encoded in RNA into polypeptides is RNA, not protein [27]. Ribosomal proteins have been added to the catalytic RNA backbone during evolution to improve ribosomal function. The 40S subunit contains 18S rRNA and the 60S subunit contains 28S, 5.8S and 5S rRNA. These mature rRNAs are transcribed as a single precursor (45S), which is subsequently processed into mature species by a complex series of cleavage and modification reactions (Fig. 1) [28, 29].

In eukaryotes, ribosomal biogenesis takes place in the nucleolus, a special compartment within the nucleus. RPS19 is one of the 33 ribosomal proteins that constitute the 40S ribosomal subunit in conjunction with 18S rRNA. Therefore, the highest concentration of RPS19 is within the nucleolus. Some patients with missense mutations in N- or C-terminal nucleolar localization signals (NOS) fail to localize RPS19 to the nucleolus. There is also a dramatic decrease in the expression of mutant DBA proteins in these patients [30].

The RPS19 protein plays an important role in 19S rRNA maturation and 40S synthesis in human cells [31, 32]. Knockdown of RPS19 expression by siRNA impairs 18S rRNA synthesis and formation of the 40S subunit. Cleavage site E is the major site affected in human cells depleted of RPS19 during pre-rRNA processing (Fig. 1). Thus, RPS19-deficient cells suffer from a relative deficiency of



**Fig. 1** Pre-rRNA processing in human cells. The major rRNA-processing pathways in human cells as initially derived from Hadjiolova et al. and modified by Rouquette et al. [28, 29]. The 18S, 5.8S and 28S rRNA is transcribed as a single precursor (45S), which is subsequently processed into mature species by a complex series of cleavage and modification reactions. The 45S precursor contains two external transcribed spacers at its 5' and 3' ends (5'-ETS and 3'-ETS) and two internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2). From 45S' pre-rRNA, there are two alternative pathways that differ in the order of cleavages 1 (pathway A) and 2 (pathway B). For simplicity, only the pathway A is shown below the 45S pre-rRNA. Cleavage site E is the major site affected in human cells depleted of RPS19 during pre-rRNA processing. Numbers 01, 02, 1, 2, 3, 4 and 3 indicate cleavage sites. In the right position of the figure, pre-rRNA precursors containing 18S rRNA (45S, 45S', 41S, 21S and 18SE) are shown

the 40S rRNA and have a reduced capacity for translation initiation. Deficiency of RPS19 leads to increased apoptosis in hematopoietic cell lines and bone marrow cells. Suppression of RPS19 inhibits cell proliferation and early erythroid differentiation, but not late erythroid maturation in RPS19-deficient DBA cell lines [33]. Haploinsufficiency of RPS19 has been demonstrated in a subset of patients and appears to be sufficient for the development of DBA [34].

The RPS24 and RPS7 proteins also play an important role in 18S rRNA maturation and small ribosomal subunit synthesis [17, 35]. However, in contrast to RPS19 involvement in the maturation of the internal transcribed spacer 1 (ITS1), RPS24 and RPS7 are required for processing of the 5' external transcribed spacer. In addition, RPL53a, RPL5 and RPL11 play essential roles in 28S and 5.8S rRNA maturation and formation of the 60S subunit [20, 21]. Connections between mutations in these genes and the occurrence of DBA support the hypothesis that DBA is directly related to a defect in ribosome biogenesis.