

Figure 4 Heme biosynthesis in erythroid cells.

Iron-laden transferrin (Fe_2 -Tf) binds to transferrin receptors (TfR) and the complex is incorporated into endosomes. The iron transporter DMT1 transfers iron to the cytoplasm. The iron transport pathway from the cytoplasm to mitochondria has not been clarified. Eight enzymes are involved in heme synthesis, started by erythroid specific 5-aminolevulinic acid synthase (ALAS2) and completed by ferrochelatase (FeCH).

が、ミトコンドリアからのヘム排出経路は明らかになっていない。ミトコンドリアには細胞質内フェリチンとは別の遺伝子にコードされているミトコンドリアフェリチンと呼ばれるフェリチンが存在し、ミトコンドリア内の鉄の恒常性を維持していると考えられている¹⁵⁾。

IV. 鉄関連貧血

A. 鉄欠乏性貧血

鉄欠乏性貧血は貧血の中で最も頻度の高い貧血である。前述のように体内の鉄代謝は半閉鎖系であるため、利用される鉄の殆どは老化してマクロファージで処理された赤血球由来の再利用鉄であり、新たに吸収され利用される鉄は極めて微量である。したがって、少量であっても持続的な出血があると、容易に体内の鉄プールが減少し、鉄欠乏状態に陥ることになる。閉経前の成人女性は、月経により定期的に鉄を喪失することから、当然、高頻度で鉄欠乏状態にあることが予想され、月経のある日本の女性の半数近くが鉄欠乏状態にあるとの報告もある¹⁶⁾。生体内の鉄の貯蔵を最も鋭敏に反映する指標が血清フェリチン値である。血清フェリチン値は基本的に組織フェリチン値を反映しており、鉄欠乏状態では低値を示し、鉄過剰状態では高値を示す。鉄欠乏状態

が続くと、まず貯蔵鉄が減少し、次に血清鉄、最終的にヘモグロビン鉄が減少し貧血が明らかとなる。日本鉄バイオサイエンス学会は、鉄欠乏性貧血の診断基準として、ヘモグロビン 12g/dl 以下、総鉄結合能 360 μ g/dl 以上、血清フェリチン値 12ng/ml 以下をあげており¹⁷⁾、鉄欠乏性貧血の診断において、血清フェリチン値低下は主要な検査所見であるといえる。

B. 慢性炎症による貧血

慢性炎症の症例においては、鉄の利用障害により貧血を呈するが、その病態の中心となる分子がヘプシジンである。すなわち、炎症性サイトカインによりヘプシジンの分泌が亢進することにより十二指腸、マクロファージにおける ferroportin を介した鉄の吸収や放出が抑制されることが慢性炎症に伴う貧血の原因である。慢性炎症により長期にわたり鉄利用障害が継続すると、小球性貧血を呈するようになり、血清鉄も低値を呈することから、慢性炎症に伴う貧血は鉄欠乏性貧血と間違われやすいが、貯蔵鉄量を反映して鉄欠乏性貧血ではフェリチン値が低値であるのに対し、慢性炎症に伴う貧血ではフェリチン値が高値となる。治療についても、慢性炎症に伴う貧血は鉄剤が有効ではなく、原疾患のコントロールによる炎症の鎮静化が基本となる。

Table 1 Inherited sideroblastic anemia

	Inheritance	Chromosome	Gene	Treatment
XLSA*	X-linked	Xp11.21	ALAS2	Vit B6
XLSA/A**	X-linked	Xq13.1	ABC7	—
SA/GLRX5	Autosomal recessive ?	14q32.13	GLRX5	?
SA/SCL25A38	Autosomal recessive ?	3p22.1	SCL25A38	?
PMPS***	Maternal	Mitochondria	Mitochondria	—
TRMA****	Autosomal recessive ?	1q23.3	SCL19A2	Thiamine
MLASA*****	Autosomal recessive ?	12q24.33	PUS1	—

*X-linked sideroblastic anemia, **X-linked sideroblastic anemia with ataxia,
 Pearson Marrow-pancreas syndrome, *Thiamine-responsive megaloblastic anemia,
 *****Mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia

C. 鉄芽球性貧血

鉄芽球性貧血は、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする貧血であり、その実態は、鉄の利用障害を原因とするミトコンドリアへの鉄の異常蓄積である。骨髄異形成症候群の一型である後天性鉄芽球性貧血については、遺伝学的発症機序が明らかになっていないが、遺伝性鉄芽球性貧血は、単一の遺伝子変異により発症するため、その機能を解析することにより鉄芽球の形成メカニズムが理解できる。83例の遺伝性鉄芽球性貧血症例を解析した米国の報告では、ALAS2、SLC25A38、mitochondria DNA、PUS1に変異を認めた頻度はそれぞれ37%、15%、2.5%、2.5%であった¹⁸⁾。43%においては既報の遺伝子変異が認められず、これ以外の未知の遺伝子変異により発症する遺伝性鉄芽球性貧血が多く存在するものと推測される。以下、主な遺伝性鉄芽球性貧血とその原因遺伝子について紹介する(**Table 1**)。

1. 赤血球型5-アミノレブリン酸合成酵素

(ALAS2)の変異によるX連鎖性鉄芽球性貧血
(X-linked sideroblastic anemia: XLSA)

赤血球型5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS-2)はグリシンとスクシニル CoA を重合しアミノレブリン酸を合成する赤血球におけるヘム合成の初発酵素である。このALAS2の変異によって発症する鉄芽球性貧血がX連鎖性鉄芽球性貧血(XLSA)である。XLSAは遺伝性鉄芽球性貧血の中で最も頻度が高い。赤血球型アイソザイムであるALAS2の遺伝子座がX染色体(Xp11.21)であることが1992年に明らかと

なり¹⁹⁾、さらにXLSAでALAS2変異が報告されたこと²⁰⁾、ALAS2がXLSAの原因遺伝子であることが確認された。本遺伝子の変異によりヘム合成が不全となり、ミトコンドリアでの鉄利用障害が起こり、結果として鉄芽球が形成されるものと考えられている。我々はALAS2変異と鉄芽球性発症をより明確に関連づけるためにALAS2欠損マウスを作製した。このマウスは貧血のため、胎生11.5日までに死亡し、その赤芽球には鉄の沈着が認められ、ALAS2の変異が赤芽球における鉄代謝異常を惹き起こすことが明らかとなった²¹⁾。これまでに40家系以上のXLSAが報告されているが²²⁾、XLSAの臨床的特徴は、小球性貧血、鉄過剰状態、男児発症であることと、半数以上の症例がビタミンB6の投与に反応することである。ALAS2は補酵素としてビタミンB6を必要とするが、アミノ酸変異があるとALAS2の構造変化が起こり、ビタミンB6との結合性が低下することが予想される。このような変異を有する症例においてはビタミンB6の大量投与にて結合性の低下を補うことが可能と考えられ、実際に*in vitro*の活性解析結果と、臨床の有効性には相関が認められている。

2. SLC25A38変異による運動失調を伴うX連鎖性鉄芽球性貧血

SLC25A38はミトコンドリア内膜に存在するトランスポーターであり、赤芽球に強く発現している。ゼブラフィッシュを用いた解析では、SLC25A38の欠損で認められる形質はALAS2欠損と類似していた。また、yeastを用いた解析では、SLC25A38の欠

損はヘム合成障害をもたらす、この合成障害はグリシン、アミノレブリン酸の補充によりレスキューされること、スクシニル CoA のミトコンドリア内濃度は低下していないことから、*SLC25A38* はグリシンの輸送に関与していると考えられている²³⁾。したがって、鉄芽球性貧血の発症機序は *ALAS2* 変異と同様であることが予想される。前述のように本遺伝子の変異は *ALAS2* に次いで頻度が高く、日本人においてもその解析が必要と思われる。

3. *Glutaredoxin 5 (GLRX5)* 変異による鉄芽球性貧血

鉄-硫黄クラスターは電子伝達系、TCA サイクル、DNA 修復など生体維持に関わる様々な酵素の活性中心であるが、*GLRX5* は、ミトコンドリアにおける鉄-硫黄クラスターの生合成に関わる遺伝子である。最近、*GLRX5* 遺伝子の変異が、遺伝性鉄芽球性貧血において同定された²⁴⁾。*GLRX5* 遺伝子の変異による鉄芽球形成のメカニズムについては以下のように考えられている。細胞内鉄濃度が高い場合は、十分量の鉄-硫黄クラスターが形成されることから、IRP1 は鉄-硫黄クラスターを有する aconitase として機能しているが、鉄が低濃度になると鉄-硫黄クラスターが形成されなくなるため、aconitase としての機能を失い、IRP として機能する。*GLRX5* の変異により鉄-硫黄クラスター合成が低下すると、IRP1 は aconitase ではなく IRP としての機能を発揮することになり、鉄が存在するにも拘らず、細胞内の鉄制御は鉄利用・排出ではなく、取り込み促進へ傾く。特に、ヘム合成系の *ALAS2* の発現抑制により、ミトコンドリアでのヘム合成が低下し、XLSA 同様のメカニズムにより、ミトコンドリアでの鉄の沈着が誘導される。このヘム合成の低下により、もう一つの IRP である IRP2 の分解が抑制される結果、鉄利用から取り込みへのシフトがさらに促進されることが考えられている。

4. *ABC/B7* 変異による運動失調を伴う X 連鎖性鉄芽球性貧血 (X-linked sideroblastic anemia with ataxia: XLSA/A)

XLSA/A は前述の XLSA と同様に X 染色体に連鎖した遺伝形式をとるが、XLSA と異なり乳幼児期から非進行性の脊髄・小脳の機能異常を呈することが特徴である。これまでに 4 家系の XLSA/A の報告がある²⁵⁾。XLSA/A の貧血は軽度であり骨髄で環状鉄芽球が認められるものの、XLSA と異なり組織の貯

蔵鉄の増加はなく、赤血球中のポルフィリンレベルもむしろ増加している。遺伝学的解析から XLSA/A における責任遺伝子は X13q に位置する *ABCB7* であることが明らかとなった²⁶⁾。*ABCB7* はミトコンドリアに存在するトランスポーターであり、yeast のミトコンドリアトランスポーターの ATM1 のヒトホモログである。ATM1 は鉄-硫黄クラスターのミトコンドリアから細胞質への輸送に機能していると考えられており、その欠損は細胞質での鉄-硫黄クラスターの欠乏を来す。鉄-硫黄クラスター合成に関わる *GLRX5* 変異による鉄芽球性貧血と異なり XLSA/A ではプロトポルフィリンの増加が見られることから、*ABCB7* の変異による鉄の沈着は、*ALAS2* の発現低下を介したヘム合成不全ではなく、排出不全を基礎とした別の機序による可能性が高い。

V. ま と め

最近の分子生物学的解析により、鉄の代謝に関わる分子メカニズムが急速に解明されてきた。遺伝性鉄芽球性貧血は稀な疾患であるが、その原因遺伝子の同定によりミトコンドリアへの鉄沈着メカニズムが明らかになってきた。今後、新たな原因遺伝子の同定により未だ解明されていないミトコンドリアにおける鉄代謝機構が明らかになっていくことが期待される。

文 献

- 1) Taketani S. Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation. *Tohoku J Exp Med* 2005; 205: 297-318.
- 2) Hallberg L. Bioavailability of dietary iron in man. *Ann Rev Nutr* 1981; 1: 123-47.
- 3) McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 2001; 291: 1755-9.
- 4) Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal ion transporter. *Nature* 1997; 388: 482-8.
- 5) Donovan A, Brownlie A, Zhou Y, et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 2000; 403: 776-81.
- 6) Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005;

- 122: 789-801.
- 7) Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 1999; 21: 195-9.
 - 8) Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe iron overload in upstream stimulatory factor (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 8780-5.
 - 9) Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306: 2090-3.
 - 10) Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004; 113: 1271-6.
 - 11) Klausner RD, Rouault TA, Harford JB. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell* 1993; 72: 19-28.
 - 12) Muckenthaler MU, Galy B, Henyze MW. Systemic iron homeostasis and the iron responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Ann Rev Nutr* 2008; 28: 3.1-3.17.
 - 13) Ciechanover A, Schwartz AL, Dautry-Varsat A, et al. Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. *J Biol Chem* 1983; 258: 9681-9.
 - 14) Sassa S, Regulation of the genes for heme pathway enzymes in erythroid and in non-erythroid cells. *Int J Cell Cloning* 1990; 8: 10-26.
 - 15) Levi S, Corsi B, Bosisio M, et al. A human mitochondrial ferritin encoded by an intronless gene. *J Biol Chem* 2001; 276: 24437-40.
 - 16) 内田立身, 日本人女性の貧血, 最近の動向とその成因. *臨床血液* 2004; 45: 1085-9.
 - 17) 鉄剤の適正使用による貧血治療指針. 編集 日本鉄バイオサイエンス学会. 2009.
 - 18) Bergmann AK, Campagne DR, McLoughlin EM, et al. Systemic molecular genetic analysis of congenital sideroblastic anemia: evidence for genetic heterogeneity and identification of novel mutations. *Pediatr Blood Cancer* 2010; 54: 271-8.
 - 19) Cotter PD, Willard HF, Gorski JL, et al. Assignment of human erythroid delta-aminolevulinate synthase (ALAS2) to a distal subregion of band Xp11.21 by PCR analysis of somatic cell hybrids containing X; autosome translocations. *Genomics* 1992; 13: 211-2.
 - 20) Cox TC, Bottomley SS, Wiley JS, et al. X-linked pyridoxine-responsive sideroblastic anemia due to a Thr388-to-Ser substitution in erythroid 5-aminolevulinate synthase. *N Engl J Med* 1994; 330: 675-9.
 - 21) Nakajima O, Takahashi S, Harigae H, et al. Heme deficiency in erythroid lineage causes differentiation arrest and cytoplasmic iron overload. *EMBO Journal* 1999; 22: 6282-9.
 - 22) Furuyama K, Sassa S. Multiple mechanisms for hereditary sideroblastic anemia. *Cell Mol Biol* 2002; 48: 5-10.
 - 23) Guernsey DL, Jiang H, Campagna DR, et al. Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat Genet* 2009; 41: 651-3.
 - 24) Camaschella C, Campanella A, De Falco L, et al. The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* 2007; 110: 1353-8.
 - 25) Fleming MD. The genetics of inherited sideroblastic anemias. *Semin Hematol* 2002; 39: 270-81.
 - 26) Shimada Y, Okuno A, Kawai S, et al. Cloning and chromosomal mapping of a novel ABC transporter gene (hABC7) a candidate for X-linked sideroblastic anemia with spinocerebellar ataxia. *J Hum Genet* 1998; 43: 115-22.

綜合臨牀 第58巻第8号
(平成21年8月1日発行 別刷)

輸血後鉄過剰症の診断と治療

The diagnosis and treatment for iron overload due to blood transfusion

張替 秀郎
HARIGAE Hideo

永 井 書 店

輸血後鉄過剰症の診断と治療

The diagnosis and treatment for iron overload due to blood transfusion



張 替 秀 郎
HARIGAE Hideo

貧血を診る

Key words 輸血 鉄過剰 フェリチン 鉄キレート療法



鉄過剰症の病態

鉄は、酸素運搬以外にも細胞の分裂・増殖や呼吸など生体にとって必須の金属元素であるが、きわめて毒性の高い元素である。しかしながら、鉄は半閉鎖的回路で再利用されているため、1日あたりの鉄の吸収・排泄のバランスは1~2mgと きわめて小さく、生体は積極的に鉄を排除する機構を有していない。したがって、先天的遺伝子異常や輸血などにより鉄が負荷されると、容易に鉄過剰状態となる。

通常、鉄は循環血液中ではトランスフェリンと、細胞内ではフェリチンと結合することによって、その細胞障害作用は抑制されている。しかし、鉄過剰状態によりトランスフェリンが過飽和の状態になると、トランスフェリンと結合しきれなくなった鉄は血漿中のアルブミンなどの低分子と結合し非トランスフェリン結合鉄(Non transferrin bound iron: NTBI)となる¹⁾。

Labile plasma iron (LPI)はNTBIのなかでもとくに毒性の強い低分子鉄分画であり、酸化還元能が高く、細胞に対する鉄毒性が強い。NTBI/LPIは、トランスフェリンレセプターを介さず細胞内へ侵入し、細胞内においてヒドロキシラジカル

(OHラジカル)などの活性酸素種(ROS)を産生することにより、DNA、タンパク質、脂質などを酸化し、細胞を障害する¹⁾。その結果、肝臓の線維化による肝硬変、膵内分泌機能障害による耐糖能低下、糖尿病、心不全などの全身の臓器障害を発症することになる。



鉄過剰症の臨床的重要性

臨床的に鉄過剰症をきたす疾患は大きくわけて、遺伝性ヘモクロマトーシス、輸血依存性の造血不全症・貧血があげられる。日本においては、前者はきわめてまれであるため、鉄過剰症として対処すべき病態は、主として輸血後鉄過剰症である。赤血球輸血1単位(全血200mL由来)に含まれる鉄量は約100mgであり、例えば、月2回、計4単位の頻度で赤血球輸血が行われると鉄負荷量は400mg/月にのぼる。この量は、通常の鉄排泄量の200~400日分にあたり、輸血による鉄過剰症のリスクが容易に理解できる。

骨髄異形成症候群(MDS)はheterogeneousな疾患であるが、その多くは貧血症状を伴い輸血依存となり、輸血後鉄過剰症のリスクがきわめて高い疾患である。実際に、MDSの非白血病死亡の原因では心不全が最も多く、とくに輸血依存MDS例の心疾患発生率は、非輸血依存患者より有意に

東北大学大学院医学系研究科血液・免疫病学分野 教授

高い(79% vs 54%)ことが報告されており²⁾, 輸血量に応じてその生存率が低下することが知られている³⁾. MDSの予後スコアリングシステム(WPSS)においても, 輸血依存が独立した予後因子として認められており, その臨床的重要性が指摘されている⁴⁾.

また, 再生不良性貧血, β -サラセミアといった長期に輸血が必要とされる貧血・造血不全症においても, 心臓への鉄蓄積に起因する心不全がその死因として重要であることが知られている. 日本の症例においても, 日本の輸血依存患者の死亡理由のうち, 鉄過剰症の関与が疑われる死因(心不全・肝不全)は3割を占め, 死亡例の90%以上が血清フェリチン1,000ng/mLを超えていることが示されている⁵⁾. さらに, 造血幹細胞移植においても, 移植前の血清フェリチン高値と治療関連死亡リスクの上昇との相関性が報告され, 移植前の鉄過剰症による臓器障害や易感染性が移植成績を低下させることが明らかとなった⁶⁾.

このようにさまざまな疾患において, 輸血依存による鉄過剰症が予後を規定する因子として認識されている.



鉄過剰の評価方法

前述のように, 鉄毒性の原因となるNTBI, とくに, NTBIの低分子鉄画分であるLPIは毒性が強いことから, 鉄による臓器障害をきたす中心分子である. 実際に, 造血幹細胞移植の際にはLPIが増加し合併症の原因となり得ることが示唆されている⁷⁾. したがって, その測定は直接的な鉄による臓器障害を反映するマーカーとなり得るが, 実用的なNTBI測定系の構築はいまだ確立されていない.

現在, 実地臨床においては, 鉄過剰症のモニタリングとして, 輸血歴, 血清学的検査, 肝鉄濃度(liver iron concentration: LIC), 画像診断などが用いられる. 画像による評価法として, 国外ではMRIによる心鉄濃度(T2 *MRI)が定量的方法

として臨床応用されているが, 残念ながらわが国では定性レベルであり定量的評価法としては普及していない. LICは生体の貯蔵鉄のゴールドスタンダードな指標であり, 生体内の鉄バランスや鉄キレート療法の効果を評価する適切な方法であるが, 生検を必要とするため侵襲性が高く手軽な検査とは言い難い.

血清学的検査としては, 血清鉄, 不飽和鉄結合能(UIBC), 総鉄結合能(TIBC), 血清フェリチン値があげられる. このうち, 血清鉄, UIBC, TIBC, とくに血清鉄をTIBCで除して算出するトランスフェリン飽和度は, 鉄代謝を容易かつ良好に反映するマーカーであるが, どちらかという生体内の鉄の動態をあらわす指標といえる. 細胞内の余剰鉄を保持するフェリチンは, その一部が血清中に放出され, 血清フェリチン値として測定される. 血清フェリチン値は, 体内の鉄総量を反映するため貯蔵鉄の指標となり, 実際に, MDS, Diamond Blackfan 貧血, β -サラセミアなどでは, LICと血清フェリチン値との間に相関性が認められている⁸⁾. 安価で測定の侵襲性も低いことから, 経時的な観察が可能であり, 鉄過剰の評価法としては血清フェリチン値が最も実用的と考えられる.

この他, 臓器障害については, 心機能障害は心エコー検査での左室駆出分画(LVEF)が簡便な評価法として用いられている. 肝機能障害は, CT

表1 鉄評価指標

	臨床的	研究的
体内貯蔵鉄	血清フェリチン 輸血歴	定量的MRI
体内鉄動態	トランスフェリン飽和度 血清鉄 UIBC TIBC	NTBI ペプシジン
心機能	心エコー	
肝機能	ALT/AST 画像診断	
内分泌	空腹時血糖値 グリコアルブミン	
造血機能	末梢血球数 網赤血球数 骨髓検査	

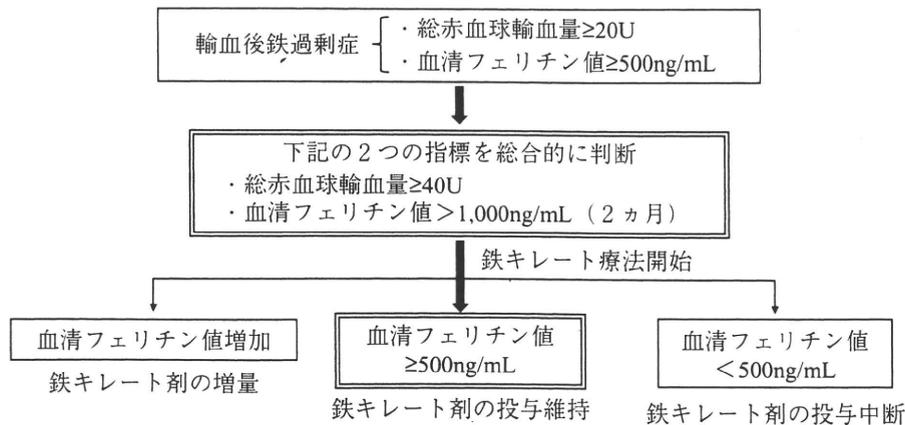


図1 鉄過剰症の治療フローチャート
(特発性造血障害に関する調査研究, 平成20年度)

やMRIなど画像検査による肝硬変所見の有無, ASTやALTなどの血清学的肝機能検査が用いられる。膵内分泌機能障害は尿糖, 血糖値, グリコアルブミンなど耐糖能低下の所見から判定する。

表1にこれらの鉄評価の指標をまとめた。これらの指標が, 血清フェリチン値の上昇や総輸血量の増加に伴って出現あるいは増悪した場合には, 鉄過剰による臓器障害を疑うことになる。

鉄過剰症に対する治療

これまでに低リスクのMDS例では, 鉄キレート療法によって生命予後の改善が得られることが示唆されており, 現在, 血清フェリチン値が1,000 ng/mLを超える鉄過剰症で, 生命予後が1年を超えると思われるMDS症例に対しては, 鉄キレート療法による鉄過剰症の改善が推奨されている⁹⁾。

わが国の特発性造血障害調査研究班による輸血後鉄過剰症の診療ガイドでは, 輸血後鉄過剰症は, 総赤血球輸血量20単位(小児の場合, ヒト赤血球濃厚液50mL/体重kg)以上および血清フェリチン値500ng/mL以上と定義している。輸血後鉄過剰症と診断された症例のうち, 血清フェリチン値>1,000ng/mL, 総赤血球輸血量40単位以上を満たした場合, 鉄キレート療法を考慮することとしている¹⁰⁾。

図1に, 本ガイドラインで提唱された鉄過剰症の治療のフローチャートを示す。これまでに, 赤血球輸血40単位によって, LICが肝障害を発症する閾値である7 mg Fe/gr dry weightに達することがすでに示されており¹¹⁾, この鉄キレート療法の開始基準は妥当な基準であると考えられる。一方で, 鉄過剰症の臨床的重要性は認識されていながらも, 鉄の除去を試みる際に用いることができる鉄キレート剤は限られており, 本邦では, 非経口投与薬である deferoxamine(デスフェラール[®])のみが投与可能な薬剤であった。しかしながら, deferoxamineの血中半減期は5~10分ときわめて短いため, 十分な鉄キレート作用を得るためには長時間の持続投与が必要であり, 外来でこのような投与を連日行うのはきわめて困難であった。実際に, 本邦の調査研究においても, deferoxamineの投与は輸血時の間欠投与が多く, その効果は限定的であると考えられた⁵⁾。

その点, 最近承認された経口鉄キレート剤である deferasirox(エクジェート[®])は, 半減期が約20時間と長く, 1日1回投与で deferoxamineの持続投与と同様の効果が得られる薬剤である。deferasiroxの多施設国際臨床試験である EPIC studyの結果が2008年のアメリカ血液学会にて多数報告されたが, サラセミア, 再生不良性貧血, MDSいずれの疾患においても良好な鉄キレート効果が認められており, また心筋からの鉄キレ-

ト効果も確認された。実際に、直接的な細胞傷害活性を有する血漿中の自由鉄(LPI)も、deferasiroxの投与にて減少することが明らかとなっており、この点からも臓器障害の抑制効果が裏付けられている。興味深いことに、deferasiroxの投与にて造血が回復する症例も報告されており、鉄をキレートすることにより鉄の造血抑制作用が解除され、輸血頻度が少なくなる可能性が示唆され

ている¹²⁾。本邦の輸血後鉄過剰症に対する臨床研究においても、deferasiroxの有効性が確認されており¹³⁾、その投与の簡便性からも deferoxamineにかわるキレート剤であると考えられる。注意すべき副作用として腎機能障害があり、とくに再生不良性貧血などサイクロスポリンを併用する疾患の場合には注意が必要である。

文 献

- 1) Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, et al : Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol* 88 : 7-15, 2008.
- 2) Goldberg SL : Novel treatment options for transfusional iron overload in patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 3 : S16-22, 2007.
- 3) Malcovati L, Della Porta MG, Cazzola M : Predicting survival and leukemic evolution in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 91 : 1588-1590, 2006.
- 4) Malcovati L, Germing U, Kuendgen A, et al : Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 25 : 3503-3510, 2007.
- 5) Takatoku M, Uchiyama T, Okamoto S, et al : Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality. *Eur J Haematol* 78 : 487-494, 2007.
- 6) Armand P, Kim HT, Cutler CS, et al : Prognostic impact of elevated pretransplantation serum ferritin in patients undergoing myeloablative stem cell transplantation. *Blood* 109 : 4586-4588, 2007.
- 7) Sahlstedt L, Ebeling F, von Bonsdorff L, et al : Non-transferrin-bound iron during allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 113 : 836-838, 2001.
- 8) Porter J, Galanello R, Saglio G, et al : Relative response of patients with myelodysplastic syndromes and other transfusion-dependent anaemias to deferasirox (ICL670) : a 1-yr prospective study. *Eur J Haematol* 80 : 168-176, 2008.
- 9) Gattermann N : Overview of guidelines on iron chelation therapy in patients with myelodysplastic syndromes and transfusional iron overload. *Int J Hematol* 88 : 24-29, 2008.
- 10) Suzuki T, Tomonaga M, Miyazaki Y, et al : Japanese epidemiological survey with consensus statement on Japanese guidelines for treatment of iron overload in bone marrow failure syndromes. *Int J Hematol* 88 : 30-35, 2008.
- 11) Oliveieri NF, Brittenham GM : Iron chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 89 : 739-761, 1997.
- 12) Messa E, Cilloni D, Messa F, et al : Deferasirox treatment improved the hemoglobin level and decreased transfusion requirements in four patients with the myelodysplastic syndrome and primary myelofibrosis. *Acta Haematol* 120 : 70-74, 2008.
- 13) Miyazawa K, Ohyashiki K, Urabe A, et al : A safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic investigation of deferasirox (Exjade, ICL670) in patients with transfusion-dependent anemias and iron-overload : a Phase I study in Japan. *Int J Hematol* 88 : 73-81, 2008.

Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia

Yuki Konno,¹ Tsutomu Toki,¹ Satoru Tandai,¹ Gang Xu,¹ RuNan Wang,¹ Kiminori Terui,¹ Shouichi Ohga,² Toshiro Hara,² Asahito Hama,³ Seiji Kojima,³ Daiichiro Hasegawa,⁴ Yoshiyuki Kosaka,⁴ Ryu Yanagisawa,⁵ Kenichi Koike,⁵ Rie Kanai,⁶ Tsuyoshi Imai,⁷ Teruaki Hongo,⁸ Myoung-Ja Park,⁹ Kanji Sugita,¹⁰ and Etsuro Ito¹

¹Department of Pediatrics, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Hirosaki; ²Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka; ³Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya; ⁴Department of Hematology and Oncology, Hyogo Children's Hospital, Kobe; ⁵Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto; ⁶Department of Pediatrics, Shimane University Faculty of Medicine, Izumo; ⁷Department of Pediatrics, Otsu Red-Cross Hospital, Otsu; ⁸Department of Pediatrics, Iwata City Hospital, Iwata; ⁹Department of Hematology and Oncology, Gunma Children's Medical Center, Gunma, and ¹⁰Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan

Acknowledgments: the authors are grateful to all physicians of the institutions listed in the Appendix for their contribution to the present study.

Funding: this work was supported in part by a grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

Manuscript received on December 3, 2009. Revised version arrived on January 2, 2010. Manuscript accepted on January 7, 2010.

Correspondence: Etsuro Ito, M.D., Ph.D., Department of Pediatrics, Hirosaki University Graduate School of Medicine, 5 Zaifucho, Hirosaki, Aomori, 036-8562 Japan. E-mail: eturo@cc.hirosaki-u.ac.jp

ABSTRACT

Background

Diamond-Blackfan anemia is a rare, clinically heterogeneous, congenital red cell aplasia: 40% of patients have congenital abnormalities. Recent studies have shown that in western countries, the disease is associated with heterozygous mutations in the ribosomal protein (RP) genes in about 50% of patients. There have been no studies to determine the incidence of these mutations in Asian patients with Diamond-Blackfan anemia.

Design and Methods

We screened 49 Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia (45 probands) for mutations in the six known genes associated with Diamond-Blackfan anemia: *RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPL5*, *RPL11*, and *RPL35A*. *RPS14* was also examined due to its implied involvement in 5q- syndrome.

Results

Mutations in *RPS19*, *RPL5*, *RPL11* and *RPS17* were identified in five, four, two and one of the probands, respectively. In total, 12 (27%) of the Japanese Diamond-Blackfan anemia patients had mutations in ribosomal protein genes. No mutations were detected in *RPS14*, *RPS24* or *RPL35A*. All patients with *RPS19* and *RPL5* mutations had physical abnormalities. Remarkably, cleft palate was seen in two patients with *RPL5* mutations, and thumb anomalies were seen in six patients with an *RPS19* or *RPL5* mutation. In contrast, a small-for-date phenotype was seen in five patients without an *RPL5* mutation.

Conclusions

We observed a slightly lower frequency of mutations in the ribosomal protein genes in patients with Diamond-Blackfan anemia compared to the frequency reported in western countries. Genotype-phenotype data suggest an association between anomalies and *RPS19* mutations, and a negative association between small-for-date phenotype and *RPL5* mutations.

Key words: protein genes, Diamond-Blackfan anemia, *RPL5* mutation.

Citation: 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, and Ito E. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. Haematologica 2010;95(8):1293-1299. doi:10.3324/haematol.2009.020826

©2010 Ferrata Storti Foundation. This is an open-access paper.

Introduction

Diamond-Blackfan anemia (DBA, MIM#105650) is a congenital, inherited bone marrow failure syndrome, 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 defined as a distinct clinical entity 2 years later by Diamond and Blackfan. Recent investigations have shown that the cellular defect in DBA fibroblasts is primarily caused by reduced proliferation and a prolonged cell cycle corresponding to the bone marrow characteristics of DBA.² DBA is a rare disease with a frequency of two to seven cases per million live births and has no ethnic or gender predilection.¹

Approximately 90% of affected patients typically present in infancy or early childhood, although patients with a 'non-classical', mild phenotype are diagnosed later in life.^{3,4} Macrocytic anemia is a prominent feature of DBA, but 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.^{3,5} In addition, DBA patients have a predisposition to malignancies including acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and osteogenic sarcoma.³ The diagnosis of DBA is often difficult because incomplete phenotypes and wide variability of clinical expression are present.^{4,6} The central hematopoietic defect is enhanced sensitivity of hematopoietic progenitors to apoptosis along with evidence of stress erythropoiesis, including elevations in fetal hemoglobin and mean red cell volume.² The majority of patients have an increase in erythrocyte adenosine deaminase activity.⁷

Proteins are universally synthesized in ribosomes. This macromolecular ribonucleoprotein machinery consists of two subunits: one small and one large. The mammalian ribosome comprises four RNA and 80 ribosomal proteins.⁹ The first genetic anomaly identified in DBA involves the *RPS19* gene, which is mutated in approximately 25% of DBA patients. This gene is located at chromosome 19q13.2 and encodes a protein belonging to the small subunit of the ribosome.^{9,10} Haploinsufficiency of the *RPS19* gene product has been demonstrated in a subset of cases¹¹ and appears to be sufficient to cause DBA. The *RPS19* protein plays an important role in 18S rRNA maturation and small ribosomal subunit synthesis in human cells.^{12,13} 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.¹⁴

Mutations in two other genes, *RPS24* and *RPS17*, encoding proteins of the small ribosomal subunits have been found in approximately 2% of patients.^{15,16} Furthermore, mutations in genes encoding large ribosomal subunit-associated proteins, *RPL5*, *RPL11* and *RPL35A*, have been reported in 9% to 21.4%, 6.5% to 7.1%, and 3.3% of patients, respectively.¹⁷⁻¹⁹ To date, approximately 50% of DBA patients in western countries have been found to have a single heterozygous mutation in a gene encoding a ribosomal protein.^{1,3} These findings imply that DBA is a disorder of ribosome biogenesis and/or function. However, there have been no studies of the incidences of these mutations in Asian DBA patients.

In this study, we screened 49 Japanese DBA patients (45 probands) for mutations of the six known DBA genes and *RPS14*, which has been implicated in the 5q- syndrome, a subtype of myelodysplastic syndrome characterized by a defect in erythroid differentiation.²⁰

Design and Methods

Patients

Forty-nine patients were studied in order to define the frequency and type of mutations of ribosomal protein genes associated with DBA in Japan. Eight patients were from families with more than one affected member, whereas 41 were from families with only one affected patient. The diagnosis of DBA was based on the criteria of normochromic, often macrocytic anemia; reticulocytopenia; a low number or lack of erythroid precursors in bone marrow; and, in some patients, congenital malformations, without known causes of single cytopenia including acquired or congenital infection, transient erythroblastopenia of childhood, metabolic disorders, malignancies, or autoimmune diseases. All clinical samples were obtained with informed consent from 28 pediatric and/or hematology departments throughout Japan. Additional information was obtained by a standardized questionnaire including information on birth history, age of onset or diagnosis, family history, physical examination (especially regarding malformations), hematologic data, response to therapeutic procedures, and prognosis. This study was approved by the Ethics Committee of Hirosaki University Graduate School of Medicine.

Ribosomal protein gene analysis

DNA was extracted from peripheral blood using a standard proteinase K, phenol and chloroform protocol.²¹ A polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify fragments from genomic DNA using primer sets designed to amplify the coding exons and exon/intron boundaries of the *RPS19*, *RPS17*, *RPS24*, *RPS14*, *RPL5*, *RPL11* and *RPL35A*. PCR products were directly sequenced in the forward and/or reverse direction using the ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) on an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *RPS19* was analyzed by determining the genomic DNA sequence of the non-coding first exon, with flanking regions, and the 450-base pair (bp) sequence upstream of the first exon (5'UTR) for each DNA sample, as previously described.⁵

To clarify the sequence of heterozygous insertion/deletion sequence variations, the respective PCR products were cloned into a TA pCR 2.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and their sequences were confirmed.

Genotype-phenotype correlations and statistical analysis

Physical abnormalities in the Japanese DBA patients were evaluated from a viewpoint of correlations with genotype. Although growth retardation can be modified by several factors such as steroid therapy, chronic anemia, and iron overload, the retardation was considered pathognomonic for DBA if it was marked, being below -3 standard deviations (SD). Response to treatment is usually seen within 1 month of treatment in DBA, but a prediction of response has not been reported previously.^{1,3} We, therefore, also examined the correlation between genotype and response to the first round of steroid therapy. Associations between two groups of variables were assessed with Fisher's exact test. All tests were two-sided and *P* levels less than 0.05 were considered statistically significant. Data were analyzed with SPSS 11.0J software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Patients' characteristics

Overall, 49 patients (45 probands) were available for analysis. The male to female ratio was 1:1.2. Forty-one index cases were classified as sporadic without unexplained anemia in first-degree relatives, while the remaining eight patients were from four families. All patients were Japanese except two cases: case 10 was Chinese and case 23 was a Brazilian of Japanese extraction. Case 15 had a Filipina mother and a Japanese father.

Genetics

RPS19

Five different mutations were detected in five probands out of 45 families (11%) (Table 1). The median age at presentation of the index cases with *RPS19* mutations was 1 month (range, 0 to 2 months). There appears to be a lower percentage of *RPS19* mutations in Japanese DBA patients than in patients from western countries. All mutations were in the coding region of the gene. Missense mutations resulting in amino acid substitutions were noted in four index cases. The three mutations, p.R62Q in case 30, p.R62W in case 44 and p.0 in case 43, have been reported in seven, ten and two families, respectively,^{6,10,11,22-26} whereas one mutation, p.G95V in case 25, was novel, and could not be found in the Single Polymorphism Database (dbSNP at www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP). Furthermore, the mutation was not observed in DNA from 50 normal individuals. An insertion of one nucleotide was found in one case (case 28), resulting in a novel frameshift mutation.

RPL5 and RPL11

The human *RPL5* gene consists of eight exons and is located on chromosome 1. Four novel mutations were found among the 45 probands (9%) (Table 1). The median age at presentation of the index cases with *RPL5* mutations was 10 months. A deletion of two nucleotides was found in case 10, and an insertion of one nucleotide was found in case 65, each affecting the reading frame. Two cases (cases 41 and 55) had point mutations that resulted

in a loss of the translation initiation codon.

The human *RPL11* gene, which consists of six exons, is also located on chromosome 1. All exons and exon/intron boundaries were PCR-amplified and sequenced in DBA patients who were negative for mutations in *RPS19* and *RPL5*. Two mutations (4%) were found, and they were diagnosed at 18 and 20 months old, respectively (Table 1). A deletion of two nucleotides was found in case 9, and a deletion of one nucleotide was found in case 23, in each patient leading to a shift in the reading frame and the introduction of a premature stop codon.

RPS17

The *RPS17* gene is located on chromosome 15, and consists of five exons. *RPS17* mutations are rare and have been reported in only two patients with DBA. A novel one-nucleotide deletion in *RPS17* was identified in one patient (2%), resulting in the introduction of a premature stop codon (Table 1). The patient with the *RPS17* mutation (case 56) was born to healthy non-consanguineous parents and diagnosed as having DBA at the age of 1 month. He responded to the initial steroid treatment, and had a course of steroid-dependent therapy. No physical anomalies were seen in this patient.

RPL35A, RPS24 and RPS14

Mutations in *RPS24* and *RPL35A* are rare and have been reported in only eight and six patients with DBA, respectively. DBA patients were screened for *RPS24* and *RPL35A*, in addition to *RPS14*, which is implicated in the 5q- syndrome. No mutations were detected in *RPS24*, *RPL35A* or *RPS14* in Japanese DBA patients.

In total, sequence changes were found in four out of seven screened ribosomal protein genes (Table 2). Mutations in *RPS19*, *RPS17*, *RPL5*, and *RPL11* were detected in 11%, 2%, 9%, and 4% of the probands, respectively. The frequency of ribosomal protein gene mutations in Japanese DBA patients was 27%.

Genotype-phenotype correlations: congenital anomalies

The patients' characteristics are summarized in Table 3.

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
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

Anomalies associated with DBA were found in 27 patients (55%). Sixteen had two or more malformations (33%). All six patients with an *RPS19* mutation had physical anomalies, and three of them had multiple anomalies. In contrast, clinical data from European and American DBA patients showed that the frequency of malformations was 31% in patients with *RPS19* mutations, which is not significantly different from that of the entire DBA population.²⁶ *RPS19* mutations are characterized by a wide variability of phenotypic expression.²⁶ A mutation is frequently associated with various degrees of anemia, different responses to treatment, and dissimilar malformations. Even various family members having the same mutation in *RPS19* present with different clinical expressions. Cases 30, 44 and 43 harbored the same *RPS19* mutations reported in multicase families (p.R62Q, p.R62W, p.O).^{6,10,11,22-27} Comparable to previous observations, no consistent clinical features were found in patients from different families displaying mutations in *RPS19*. For example, the father of case 30 harboring the same mutation had no finger anomalies, although case 30 had syndactyly and thumb polydactyly.

Consistent with reports that patients with *RPL5* and *RPL11* mutations are at high risk of developing malformations,^{17,18} all four patients with *RPL5* mutations had physical anomalies. Furthermore, three of them had multiple physical anomalies, particularly case 41, who had very severe congenital heart disease (Table 3). One of two patients with *RPL11* mutations had physical anomalies. In contrast, of the 36 patients with no mutations, physical anomalies were seen in 16 (44%).

Nine patients had craniofacial anomalies. Of these, two had *RPL5* mutations, while the remaining patients had no mutations. Gazda *et al.* suggested an association between *RPL5/RPL11* mutation and cleft lip and/or palate.¹⁷ Data in the Diamond-Blackfan Anemia Registry (DBAR) of North America also suggest that the DBA phenotype associated with cleft lip/palate is caused by non-*RPS19* mutations.⁴ In our cohort, the frequency of cleft palate was significantly different between *RPL5*-mutated and *RPL5* non-mutated groups ($P < 0.05$): cleft palate was seen in three patients, two of whom had *RPL5* mutations while the other patient belonged to the *RPL5* non-mutated group.

Thumb anomalies were seen in six patients, four of whom had *RPS19* mutations while two had *RPL5* mutations. There was a statistically significant difference in the frequency of thumb anomalies between *RPS19*-mutated

and *RPS19* non-mutated groups ($P < 0.05$). Flat thenar was seen in one patient with an *RPL5* mutation. In contrast to previous reports on patients with *RPL11* mutations, thumb anomalies were not found in our patients with these mutations.

A small-for-date phenotype was seen in seven patients (14%): one had an *RPS19* mutation, one had an *RPL11* mutation, and the four others had no mutations. None of the patients with *RPL5* mutations was born small-for-date.

Genotype-phenotype correlations: therapeutic response

Corticosteroids and transfusions are the mainstays of DBA treatment.¹³ Of 45 patients evaluable for first treatment response, 73% responded to steroid therapy, 8% did not respond and 16% were never treated with steroids. The proportions of patients who 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). A malignancy was detected in one case (case 50, proband), who developed a myelodysplastic syndrome 1 year after the diagnosis of DBA.

Discussion

This is the first report of an investigation of DBA patients in Japan. Twelve types of mutations were detected in four ribosomal protein genes. These mutations occurred in 27% of Japanese DBA patients. Mutations in *RPS19*, which have been found in 25% of patients in western countries,²⁶ were detected in only five of 45 probands (11%) in Japan, and two of these mutations were unique. Novel mutations in *RPL5* (four probands; 9%), *RPL11* (two probands; 4%) and *RPS17* (one proband; 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 ribosomal protein genes in Japanese patients with DBA is due to a lower incidence of *RPS19* mutations, although we might have missed large deletions or re-arrangements in this study.

Physical abnormalities and growth retardation were detected in 55% of the Japanese DBA patients, consistent with previous reports from western countries.⁴⁻⁶ Recent studies suggest that 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 three of four patients with *RPL5* mutations had multiple physical malformations, and two 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 associ-

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

Gene symbol	N. of tested DNA samples from unrelated probands	N. of probands with mutations	N. of subjects with mutations	Mutation types
<i>RPS19</i>	45	5 (11%)	6	missense, loss of 1 st methionine, small insertion
<i>RPL5</i>	45	4 (9%)	4	loss of 1 st 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 to first steroid therapy	Present therapy
Patients with mutation of <i>RPS19</i>			
25 proband	Thumb polydactyly, growth retardation (-2.0SD), etc.	ND	ND
28 proband	Thumb polydactyly, CHD, etc.	Response	Steroid-dependent
30 proband	Thumb polydactyly, syndactyly, growth retardation (-3.4SD)	Response	Steroid-dependent
30 father	Growth retardation (-3.6SD)	NA	CR
43 proband	Thumb polydactyly	Response	Steroid-dependent
44 proband	SFD	Response	CR
Patients with mutation of <i>RPL5</i>			
10 proband	Flat thenar, cleft palate, CHD, etc.	Poor	Transfusion-dependent
41 proband	Craniofacial abnormalities, cleft palate, CHD, etc.	ND	Transfusion-dependent
55 proband	Thumb 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
Patient 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
20 proband	Craniofacial abnormalities, CHD, etc.	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 (due to MDS)
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

ND: not done; NA: not available; SFD: small-for-date; CHD: congenital heart disease; MDS: myelodysplastic syndrome; BMT: bone marrow transplantation; CBT: cord blood stem cell transplantation; CR: complete remission. * *RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPS14*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35A*.

ated with multiple physical abnormalities, especially cleft lip and/or palate.

Cmejla *et al.* reported that 87.5% of *RPL5*-mutated patients were born small-for-date, whereas only 42.9% of *RPS19*-mutated patients were born small-for-date.¹⁸ However, in our series, the small-for-date phenotype was seen in seven patients, and all of them were *RPL5*-non-mutated patients. Our data suggest that *RPL5* mutations in Japanese DBA patients have no relevance to the small-for-date phenotype, which 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 that in *RPL5*- or *RPL11*-mutated patients.^{22-24,29} In Italian DBA patients, the risk of malformation was 7-fold higher in *RPL5*-mutated patients than in *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 in the 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 cohort, responsiveness to first steroid therapy in Japanese DBA patients was as good as that reported in western populations.^{1,3} In this study, no significant differences in response to initial steroid therapy were found between *RPS19*-mutated and *RPS19*-non-mutated groups, or between the groups with *RPS19* mutations and other ribosomal protein gene mutations.

In summary, we found that heterozygous mutations in *RPS19*, *RPL5*, *RPL11* or *RPS17* were present in 27% 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 our cohort of Japanese DBA patients than the frequencies reported previously from western countries,

although the data from both populations are based on relatively low numbers of patients and values showing significant differences between populations are lacking. Our data suggest an association between *RPL5* mutation and malformations, especially cleft palate, and between *RPS19* mutation and malformations, particularly thumb anomalies. This study also suggests that no association exists between *RPL5* mutations and the small-for-date phenotype or between *RPS19* mutations 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.

List of hospitals and people who cooperated in collecting clinical samples from the 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 Yosanoimi 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).

References

- 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.
- 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(10):1036-42.
- 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(6):859-76.
- 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(5):558-64.
- 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(5):553-61.
- 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(4):480-9.
- Glader BE, Backer K, Diamond LK. Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in congenital hypoplastic anemia. *N Engl J Med*. 1983;309(24):1486-90.
- 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(24):5382-90.
- Gustavsson P, Willing TN, van Haeringen A, Tchernia G, Dianzani I, Donner M, et al. Diamond-Blackfan anaemia: genetic homogeneity for a gene on chromosome 19q13 restricted to 1.8 Mb. *Nat Genet*. 1997;16(4):368-71.
- 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(2):169-75.
- 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. *Br J Haematol*. 2004;127(1):105-13.
- 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(3):1275-83.
- 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(3):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(2):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(6):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(12):1178-82.
 17. Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choesmel V, O'Donohue ME, 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(6):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(3):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(5):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(7176):335-9.
 21. Xu G, Nagano M, Kanazaki 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(8):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(12):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(5):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(2):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(2):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(7):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(7):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(12):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*. 2010;95(2):206-13.

先天性造血不全シンポジウム

抄録集

2011年2月5日（土）13：00～17：30

ホテルサンルートプラザ東京 2階ローズルーム

主催：東京医科歯科大学小児科 水谷修紀
聖路加国際病院小児科 真部 淳

ごあいさつ

みなさま、こんにちは。

本日はお忙しい中、先天性造血不全シンポジウムにご参加いただき、まことにありがとうございます。小児において血球減少を来す疾患は、再生不良性貧血や骨髄異形成症候群などさまざまですが、先天性造血不全も無視できないことがわかってきました。また、それらの疾患の多くにおいて責任遺伝子が同定されてきました。そのような中、平成21年度に先天性疾患を扱う厚労省の研究班が多数誕生しました。この機運に乗じ、今回、先天性造血不全とその周縁疾患の主任研究者が一堂に会して各分野の研究成果を発表していただく機会を設けることにいたしました。皆様には活発なご討論をしていただけますよう期待しますとともに、会の運営等につきましては忌憚のないご意見を頂戴できればと思っております。なお、このシンポジウムは、班研究の老舗とも言われる特発性造血障害に関する調査研究（小澤班）の活動と連動しております。今回は非公開で行いますが、このシンポジウムが成功しました暁には、今度は公開シンポジウムを企画したく存じますので、みなさまのご協力をお願いいたします。

東京医科歯科大学小児科 水谷修紀

聖路加国際病院小児科 真部 淳

プログラム

第1部 座長：水谷修紀（東京医科歯科大学小児科）

- 13：00～13：20 1. 遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立
大場理恵、張替秀郎（東北大学血液免疫科）
- 13：20～13：40 2. 先天性巨大血小板性血小板減少症
國島伸治（名古屋医療センター臨床研究センター高度診断研究部）
- 13：40～14：00 3. リバージョン・モザイク型 Fanconi 貧血の診断と臨床
矢部みはる、矢部普正（東海大学医学部細胞移植科）
- 14：00～14：20 4. 造血不全症における血球テロメア長の測定意義
坂口大俊（名古屋大学小児科）
- 14：20～14：40 5. Shwachman-Diamond 症候群の病態
渡邊健一郎（京都大学大学院発達小児科学）
- 14：40～15：00 6. サラセミア疾患の胎児診断に向けての母体血中有核赤血球の分離・
同定法（レクチン法）の最適化
大坂享史（国立成育医療センター研究所周産期病態研究部）

15：00～15：20 コーヒーブレイク

第2部 座長：真部 淳（聖路加国際病院小児科）

- 15：20～15：30 来賓あいさつ 鈴木隆浩（自治医科大学血液内科）
- 15：30～15：50 7. 重症先天性好中球減少症 (Severe congenital neutropenia, SCN)
中村和洋（広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学）
- 15：50～16：10 8. Ataxia Telangiectasia と細胞分化、腫瘍化の関連
高木正稔（東京医科歯科大学大学院発生発達病態学）
- 16：10～16：30 9. 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
伊藤悦朗（弘前大学小児科）
- 16：30～16：50 10. 本邦における Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の責任
遺伝子の解析
土居崎小夜子（名古屋大学小児科）、神谷尚宏（聖路加国際病院）
- 16：50～17：10 11. 先天性顆粒放出異常症
石井栄一（愛媛大学大学院小児医学）
- 17：10～17：30 12. i P S 細胞を用いた、先天性造血不全疾患の解析への取り組み
丹羽 明（京都大学 i P S 細胞研究所）

遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立

○大場理恵、張替秀郎

東北大学血液免疫科

遺伝性鉄芽球性貧血は骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする難治性の貧血であり、ミトコンドリアにおける鉄の代謝・輸送、ヘム合成に関わる遺伝子の変異により発症する。鉄芽球性貧血は、遺伝性鉄芽球性貧血と、骨髄異形成症候群(MDS)およびアルコールや薬剤による二次性鉄芽球性貧血からなる後天性鉄芽球性貧血に大別される。遺伝性鉄芽球性貧血のうち最も解析が進んでいる鉄芽球性貧血は、赤血球におけるヘム合成系の初発酵素である赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS-E ; ALAS-2)の変異による X 連鎖性鉄芽球性貧血(XLSA)であり、成人発症例も存在することが見出されている。遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として、ALAS2 以外にもミトコンドリアでのヘム合成・鉄代謝に関わる遺伝子の変異が報告されており、その病態は多様であると考えられるが、これまでに鉄芽球性貧血の疫学調査がなされたことはなく、その実態は不明である。

そこで、「遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立」班では、まず、日本における鉄芽球性貧血の実態を調査し、その中で遺伝性鉄芽球性貧血が疑われる症例について原因遺伝子の変異解析を行い、その病態を明らかにするというステップを踏んで研究を進めている。これまでに予備調査として 299 例の鉄芽球性貧血が確認された。これら症例のうち、一次調査にて、134 例の臨床情報が得られている。遺伝性鉄芽球性貧血と考えられる症例が 17 例、MDS-RARS が 40 例、MDS-RCMD が 68 例、MDS-RAEB が 9 例であった。これらの症例のうち、遺伝性鉄芽球性貧血と考えられる症例で、遺伝子検査が未施行の症例と臨床上、RARS ではあるが、染色体異常がなく異形成に乏しい症例と合わせて、14 例で新たに遺伝子解析を施行した。うち 2 例で ALAS2 の遺伝子変異を認め、現在までに合計 8 症例で ALAS2 遺伝子の変異を確認している。現時点では ALAS2 以外の変異は認められていないが、今後、新規遺伝子の同定も含め継続して解析を進めていく予定である。