

20102425/A

# 厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA)およびサラセミア貧血  
の効果的診断法確立に関する研究

平成 22 年度 総括研究報告書

研究代表者 真部 淳

平成 23 (2011) 年 3 月

# 目 次

I. 総括研究報告	真部淳	1
II. 分担研究報告		
1. 北川 道弘、高林 晴夫		7
2. 鈴木 信太郎		10
3. 小島 勢二		12
4. 小原 明		14
5. 藤本 純一郎		15
6. 多賀 崇		18
7. 渡邊 健一郎		20
8. 関沢 明彦		21
III. 先天性造血不全シンポジウム (抄録集)		23
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表		39
V. 研究成果の刊行物・別刷		43
VI. 研究班員名簿		129

# I 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA)およびサラセミア貧血  
の効果的診断法確立に関する研究

研究代表者 真部淳 聖路加国際病院 小児科 医長

研究趣旨

本研究の第1の目的はCongenital dyserythropoietic anemia(CDA：先天性赤血球産生異常性貧血)の疾患像を明らかにすることである。CDAは先天性の赤血球系細胞の形成異常により、慢性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う疾患である。平成21年度に全国の小児科専門医研修施設(520施設)等を対象に2000年1月以降の症例を調査したところ17例のCDA症例が把握された(回答率69%)。平成22年度はその症例の二次調査と遺伝子検索を行った。8例の検体が集まり2例で解析が終了し、1例でCDAN1変異が、また1例でSEC23Bの変異が見つかった。併せてCDAの診療ガイドラインを作成中である。

本研究の第2の目的はサラセミアの出生前診断法を確立することである。サラセミアは従来日本人には少ないとされていたが、平成21年度に全国の日本血液学会専門医研修施設(470施設)を対象に有病者数の調査を行ったところ(回答率54.2%)、80名の重症例( $\alpha$ -15名、 $\beta$ -59名、その他-6名)が把握された。平成22年度には有核赤血球のアレイCGH解析を用いて胎児期のサラセミア診断法を開発するため実際の妊婦に対して検討を開始した。

分担研究者氏名	神谷尚宏	聖路加国際病院小児科クリニカルフェロー
小島勢二	名古屋大学大学院医学系研究科、小児科学教授	伊藤雅文
小原明	東邦大学医学部輸血部	名古屋第一赤十字病院病理部長
多賀 崇	滋賀医科大学小児科、小児科学・血液腫瘍学講師	
渡邊健一郎	京都大学大学院医学研究科発達小児科学助教	A. 研究目的
北川 道弘	国立成育医療研究センター副院長	Congenital dyserythropoietic anemia (CDA)は先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不応性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う稀な疾患群である。我が国ではこれまでCDAの実態が十分把握されておらず、本研究により我が国におけるCDAの実態を明らかにし最終的に効果的診断法や治療ガイドラインを作成することを目的とする。
鈴木 信太郎	関西学院大理工学部生命科学科教授	一方、サラセミアはヘモグロビン $\alpha$ または $\beta$ 遺伝子変異を原因とする遺伝性貧血症候群である。海外ではハイリスクの変異キャリアカップルに対して、胎児の遺伝子解析を行
藤本 純一郎	国立成育医療研究センター臨床研究センター所長	
関沢 明彦	昭和大学病院産婦人科准教授	
高林 晴夫	金沢医科大学総合医学研究所遺伝学准教授	
研究協力者氏名		
土居崎小夜子	名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学	

っているが、羊水検査や絨毛採取といった侵襲的な方法によって胎児細胞が採取されている。本研究では、非侵襲的な胎児診断を行うために、胎児有核赤血球 (NRBC) を用いたサラセミアの遺伝子変異の解析を行う。まず、基礎的段階として、母体血からNRBCを効率的に分離・同定するための方法を確立する。母体血中のNRBCの存在数は極めて少ないため、遺伝子解析に十分な細胞数を得るためには、分離方法や同定方法を最適化する必要がある。次に分離を行ったNRBCが胎児由来である証明を行い、PCRやアレイCGH等の遺伝子解析技術を用いて解析可能な条件を確立し診断に結び付ける。

## B. 研究方法

CDAについては従来行われている日本小児血液学会疾患登録、中央診断事業をもとに、我が国におけるCDAの把握ならびに診断を行う。診断を行うための診断基準、中央形態診断、遺伝子診断のシステムを構築する。疾患の把握は、過去に行われた全国調査を参考に、疑い症例を含みアンケート方式で行う。診断基準については既存のものを参考にする。軽症で診断基準に合致しないものも存在する可能性があるため、独自のものを作成する。調査は血液専門医だけでなく一般小児科医にも協力してもらう (図1)。

サラセミアについては男児を妊娠した妊婦30名より、母体末梢血をEDTA加採血管に採取し検体とした。レクチン法により細胞を分離・濃縮し、抗胎児性ヘモグロビン抗体を用いた蛍光免疫染色によりNRBC候補細胞を同定後、Y染色体特異的プローブを用いたFISH法を行った。次いで本邦に多い変異をカバーするアレイCGHでの解析のための条件の最適化を行う。さらに、変異部位の判明している母体血よりNRBCを分離・回収し、PCR法・アレイCGH法を用いて胎児診断を行う。

わが国における先天性造血不全症候群の診療の問題点を議論するため、他の研究班と協力してシンポジウムを開催した (平成23年2月5日、於千葉、主催：水谷修紀東京医科歯科大学小児科教授、真部淳)。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)、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)、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)、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)、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)、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)、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)、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)、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)、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)、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)、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)。抄録を別に掲載する。

(倫理面への配慮)

本研究で行われる臨床試験は、

- ① ヘルシンキ宣言に則り、患者の利益を最優先に考えて実施する。
- ② 調査フィールドとなる各施設における倫理委員会で承認を得て実施する。
- ③ 患者および家族に対して面談・介入開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得る。同意説明文では、調査を行う目的、介入・面談の内容、協力者に起こりうる利益・不利益について、未成年者の場合には年齢に応じた説明をする。
- ④ 協力によって得られたデータは、個人情報保護を厳重に行い、研究目的以外には利用しないことを文書による同意を得て実施する。

### C. 研究結果

CDAについては分担研究者の多賀が以前おこなったCDAの全国調査ならびに今回の調査で新たに調査されたCDAとその疑い症例に、現在2次調査と中央遺伝子診断を開始した。現在までに8例の検体が集まり2例で解析が終了し、1例でCDAN1の変異が、1例でSEC23Bの変異が見つかった。また、本疾患の診療ガイドラインを作成した。

サラセミアについては、レクチン法により母体末梢血から分離した細胞を用いて免疫染色の条件を絞り込み、抗胎児性ヘモグロビン抗体陽性かつDAPI陽性細胞をNRBC候補とした。Y染色体特異的プローブを用いたFISH法により候補細胞からシグナルを検出した。また、18トリソミーと疑われる妊婦の母体血から、FISH法により3つの18番染色体のシグナルを検出した。またスライドガラス上に分離した細胞群からレーザーマイクロダイセクションにより、NRBCを単離した。単離したNRBCに対するPCR法での遺伝子解析のための条件検討を開始している。またアレイCGHのための反応条件の絞り込みを行っている。さらに、NRBCの同定精度を上げるため、抗胎児

性ヘモグロビン抗体と抗GPA抗体での蛍光二重染色の条件検討を行っている。

### D. 考察

わが国でもCDA患者が一定数存在することが明らかになったが、諸外国に比べ稀な疾患なのか、軽症例が多く見逃されているのかわかるとともにスクリーニングする集団を広げていき、実態を明らかにする必要がある。

サラセミアについては、母体血に存在するNRBCの同定が可能であり、FISH法による遺伝子解析が可能であることが示唆された。今後は、分離した細胞に対してサラセミア変異の遺伝子解析が可能かどうかを検証していく。そのためには、単離されたシングルセルでの遺伝子解析の条件の確立、および既知の変異サンプルを用いた遺伝子解析の条件の確立が必要である。単離された細胞での遺伝子解析では、アレル・ドロップアウトが発生し解析に支障をきたすことが知られており、PCR法やアレイCGHでの解析のためには、十分な細胞数を単離する必要がある。引き続き条件を最適化していくことにより、NRBCの分離数・精度を向上させる必要がある。また、シングルセルでの遺伝子解析の困難さを解消するために、Whole Genome Amplification法による増幅や、シングルセルPCRの条件を検討する必要がある。

### E. 結論

わが国のCDAの実態の正確な把握をし、よりよい治療法を開発するため、今度も調査、研究が必要である。

レクチン法により母体血からNRBCを同定し、非侵襲的に胎児の遺伝子解析が可能であることが示唆された。今後も精度向上のための条件最適化が必要であると共に、シングルセルレベルでの遺伝子解析の条件を確立す

る必要がある。

## F.健康危険情報

該当せず。

## G.研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Muramatsu H, Makishima H, Jankowska AM, Cazzolli H, O' Keefe C, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 115:1969-1975, 2010
- 2) Sugimoto Y, Muramatsu H, Makishima H, Prince C, Jankowska AM, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations. *Br J Haematol* 2010;150:83-7
- 3) Watanabe S, Azami Y, Ozawa M, Kamiya T, Hasegawa D, Ogawa C, Ishida Y, Hosoya R, Kizu J, Manabe A. Intellectual development after treatment in children with acute leukemia and brain tumor. *Pediatr Int*, in press
- 4) Hasegawa D, Manabe A, Ohara A, Kikuchi A, Koh K, Kiyokawa N, Fukushima T, Ishida Y, Saito T, Hanada R, Tsuchida M; The Tokyo Children's Cancer Study Group. The utility of performing the initial lumbar puncture on day 8 in remission induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: TCCSG L99-15 study. *Pediatr Blood Cancer*, in press
- 5) Aricò M, Schrappe M, Hunger SP, Carroll

WL, Conter V, Galimberti S, Manabe A, Saha V, Baruchel A, Vettenranta K, Horibe K, Benoit Y, Pieters R, Escherich G, Silverman LB, Pui CH, Valsecchi MG. Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005. *J Clin Oncol* 2010;28:4755-61

6) Yoshida K, Hasegawa D, Takusagawa A, Kato I, Ogawa C, Echizen N, Ohkoshi K, Yamaguchi T, Hosoya R, Manabe A. Bullous exudative retinal detachment due to infiltration of leukemic cells in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 2010;92:535-7

7) Kamiya T, Manabe A. Congenital dyserythropoietic anemia. *Int J Hematol* 2010;92:432-438

8) Tsuchida M, Ohara A, Manabe A, Kumagai M, Shimada H, Kikuchi A, Mori T, Saito M, Akiyama M, Fukushima T, Koike K, Shiobara M, Ogawa C, Kanazawa T, Noguchi Y, Oota S, Okimoto Y, Yabe H, Kajiwara M, Tomizawa D, Ko K, Sugita K, Kaneko T, Maeda M, Inukai T, Goto H, Takahashi H, Isoyama K, Hayashi Y, Hosoya R, Hanada R; Tokyo Children's Cancer Study Group. Long-term results of Tokyo Children's Cancer Study Group trials for childhood acute lymphoblastic leukemia, 1984-1999. *Leukemia*. 2010;24:383-96

### 2. 学会発表

- 1) Muramatsu H, Hayashi Y, Kawamura M, Kojima S, Yabe M, Isoyama K, Taki T, Tsuji K, Tsuchida M, Manabe A, Ito E, Iwamoto S, Kato H, Sumie A, Taga T, Nomura K, Hasegawa D, Watanabe K, Kikuchi A: Low-dose cytosine arabinoside therapy for neonates with Down syndrome (DS) and transient leukemia (TL).

Blood 116:469-470, 2010

2) Ohba R, Furuyama K, Tsuchiya S, Manabe  
A, Ito E, Kojima S, Ozawa K, Harigae H:  
Epidemiological and genetic analysis of  
sideroblastic anemia - Multicenter study  
in Japan. Blood 116:1716-1717, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

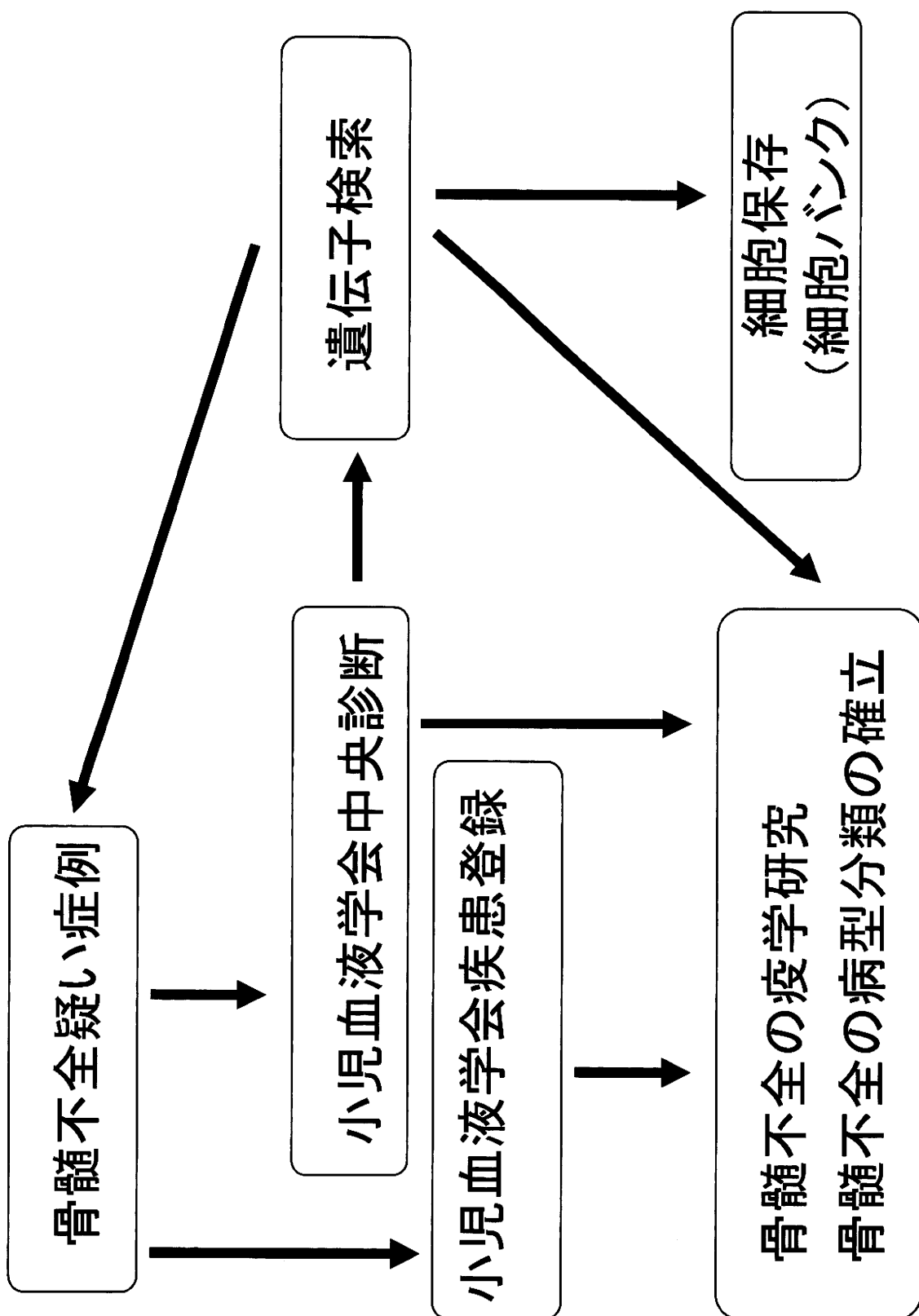
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし





## II 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

有核赤血球の分離・同定法（レクチン法）の適正化  
有核赤血球の診断・精度管理  
PCRプライマー、DNAプローブ開発、管理データ蓄積

研究分担者 北川 道弘・独立行政法人国立成育医療研究センター・副院長  
高林 晴夫・金沢医科大学 FDD-MBセンター・センター長  
鈴木信太郎・関西学院大学理工学部・教授

**研究要旨：**サラセミアなどの遺伝性症候群の効率的なスクリーニング方法ならびに胎児有核赤血球（NRBC）を利用した非侵襲的な出生前診断方法の確立を目的とする。本年度はNRBC効率的に分離・同定するための条件を検討した。その結果母体血からNRBCを同定し、非侵襲的に胎児の遺伝子解析が可能であることが示唆された。また、DNAチップによる $\beta$ サラセミア診断方法確立のための基礎的な条件を整備した。

#### A. 研究目的

サラセミアなどの遺伝性疾患は、スクリーニングによるキャリアの把握、確定診断によるハイリスク患者の同定とそのケアが必要である。アジア圏では、遺伝性疾患のケアが医療経済上の問題となっており、予防プログラムが実施されているが、効率的なスクリーニング方法は確立されていない。

生化学的なスクリーニングの結果ハイリスクと判定された変異キャリアカップルに対しては、胎児の遺伝子解析が行われる。現在は羊水検査や絨毛採取といった侵襲的な方法によって胎児細胞が採取されているが、これらの方法は流産のリスクを伴い、患者の心理的不安が大きい。

本研究では、DNAチップによるサラセミアキャリアの効率的なスクリーニング方法の確立、非侵襲的な胎児診断を行うために、母体血中にごく微量存在する胎児有核

赤血球（NRBC）を用いた遺伝子変異の解析方法を確立することを目的とする。その基礎的段階として、レクチン法により母体血からNRBCを効率的に分離・同定するための方法を確立する。

#### B. 研究方法

1) 男児を妊娠した妊婦 30 名より、母体末梢血を EDTA 加採血管に採取し検体とした。レクチン法により細胞を分離・濃縮し、抗胎児性ヘモグロビン抗体を用いた蛍光免疫染色により NRBC 候補細胞を同定後、Y 染色体特異的プローブを用いた FISH 法を行った。

2) 胎児 NRBC を利用した遺伝子解析を行うため、SRY 遺伝子、アメロゲニン遺伝子、 $\alpha$ サラセミア、 $\beta$ サラセミア検出の PCR 条件の検討を行った。また、臍帯血由来の NRBC を対象に、シングルセル PCR の条件検討を行った。

2) サラセミア患者が多いタイのマヒドン大学・シリラート病院へキャリア DNA の検体提供を依頼した。次に、タイで頻度の高いβサラセミア変異を検出できる DNA チップを作製した。

(倫理面への配慮)

患者検体を用いた研究は、国立成育医療研究センター倫理委員会の承諾を得た上、患者に事前に十分な説明を行い、同意を取得した後に行った。

### C. 研究結果

1) レクチン法により母体末梢血7mLから細胞を分離した。抗胎児性ヘモグロビン抗体陽性かつDAPI陽性細胞をNRBC候補とした。Y染色体特異的プローブを用いたFISH法により候補細胞からシグナルを検出した。また、18トリソミーと疑われる妊婦の母体血から、FISH法により3つの18番染色体のシグナルを検出した。

2) 男児臍帯血DNAを用いて、欠失タイプのαサラセミア (THAI, SEA, 3.7, 4.2, FIL) ならびにSNPタイプのαサラセミア (Hb Constant Spring, HB Pakse) を検出するためのPCR条件を決定した。また、性判定のためのSRY、アメロゲニン遺伝子のPCR条件を決定した。スライドガラス上から臍帯血由来男児NRBCをレーザーマイクロダイセクションにて単離し、8細胞に対してPCRの実施を行ったが、増幅できなかった。

3) J Mol Diagn. 2009. 11(4):334-346 に基づき、タイで多いβサラセミアの変異30タイプの有無を検査できる DNA チップを作製した。

変異名
-87C>A, -31A>G, -30T>C, -28A>G, CD0T>G, CD1T>C, CD6G>A(Hb C), CD6A>T(Hb S), CD6A>C(Hb G Makassar), CD8/9+G, CD15-T, CD17A>T, CD19A>G(Hb Malay), CD26G>A(Hb E), CD27/28+C, IVS1#1G>T, IVS1#5G>C, CD35C>A, CD41/42-TTCT, CD41-C, CD43G>T, CD56G>A(Hb J-Bangkok), CD71/72+A, CD83G>A(Hb Pyrgos), IVS2#654C>T, CD121G>C(Hb DPunjab), CD123/125(-8bp), CD126T>G, CD136G>A, CD147+AC(Hb Tak)

また、DNAチップの反応条件検討のためのモデルDNAとするため、血液より抽出したDNAをもとに正常ヒトβヘモグロビン遺伝子領域1732bpをPCRにて増幅し、pTAベクター上にサブクローニングした。

### D. 考察

レクチン法により母体血に存在するNRBCの同定が可能であり、FISH法による遺伝子解析が可能であることが示唆された。

今後は、単離した細胞に対しての遺伝子解析が可能かどうかを検証していく必要があるが、今回、臍帯血を用いた単離シングルセルではPCR増幅ができなかった。単離された細胞での遺伝子解析では、アレル・ドロップアウトが発生し解析に支障をきたすことが知られており、十分な細胞数を単離する必要があると思われる。引き続き条件を最適化していくことにより、NRBCの分離数・精度を向上させる必要がある。

βサラセミアDNAチップは作製済みであり、次のステップとして、30種類の変異を導入したプラスミドをモデルDNAとして反応条件検討する予定である。また、マ

ヒドン大学・シリラート病院より既知のヒトDNAの提供を受け、反応条件の標準化を行った後、ブラインドテストにより本DNAチップの性能試験を行っていく。

## E. 結論

レクチン法により母体血からNRBCを同定し、非侵襲的に胎児の遺伝子解析が可能であることが示唆された。次年度では、シングルセルでの遺伝子解析の条件を検討していく。また、 $\beta$ サラセミアDNAチップの性能試験を実施し、効率的スクリーニング方法を確立する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Multi-chamber PCR chip with simple liquid introduction utilizing the gas permeability of polydimethylsiloxane, Nguyen Ba Trung, Masato Saito, Haruo Takabayashi, Pham Hung Viet, Eiichi Tamiya and Yuzuru Takamura, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 149(1), 284-290, 2010

### 2. 学会発表

①大坂享史、由良洋文、北川道弘：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 2011年2月5日 先天性造血不全シンポジウム 東京

②財団法人石川県予防医学協会 検査部<sup>1)</sup> 金沢医科大学医動物学<sup>2)</sup> 金沢医科大学 FDD-MB center 伊川和美<sup>1,3)</sup>、市川秀隆<sup>2)</sup>、北美紀子<sup>3)</sup>、Yuditiya Purwosunu<sup>3)</sup>、高林晴

夫<sup>3)</sup>：遺伝子増幅によるSingle CellからのDNA診断

③金沢医科大学 FDD-MB center<sup>1)</sup>、財団法人 石川県予防医学協会<sup>2)</sup>、 FDD-MB Study Group (FDD-MB SG)<sup>3)</sup> 中村豊美<sup>1)</sup>、伊川和美<sup>1,2)</sup>、北美紀子<sup>1,3)</sup>、松本由佳<sup>1)</sup>、Yuditiya Purwosunu<sup>1,3)</sup>、高林晴夫<sup>1,3)</sup>：母体血中胎児有核赤血球 (NRBC)を用いたSingle Cell Sequence

④北陸先端大・マテリアル<sup>1)</sup>、金沢工業大・バイオ・化学部<sup>2)</sup>、金沢医科大 FDD-MB Center<sup>3)</sup> 富澤祐一<sup>1)</sup>、小木美恵子<sup>2)</sup>、北美紀子<sup>3)</sup>、高林晴夫<sup>3)</sup>、高村禪<sup>1)</sup>：高張Percollを用いた遠心分離による白血球除去法

⑤石川県立大学<sup>1)</sup>、金沢医科大学 FDD-MB center<sup>2)</sup>、熊本県城北家畜保健衛生所<sup>3)</sup> 泉徳和<sup>1, 2)</sup>、松本由佳<sup>2)</sup>、北美紀子<sup>2)</sup>、金山泰子<sup>2)</sup>、高林晴夫<sup>2)</sup>、馴松延広<sup>3)</sup>：母ウマ血液中のNRBCの回収・DNA分析に向けて

②～⑤ 2011年2月26日 第14回胎児遺伝子診断研究会 石川

⑥6<sup>th</sup> World Congress of Perinatal Medicine in developing countries. Jakarta, March 9, 2010. Fetal DNA Diagnosis from Maternal Blood 2.0 System Takabayashi H, Kita M, Purwosunu Y, Ikawa K, Yoshimura S. Sekizawa A, Chiba H, Kitagawa M

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

### 分担研究報告書

「Congenital dyserythropoietic anemia (CDA)およびサラセミア貧血の効果的診断法確立に関する研究」

研究分担者 関西学院大学 鈴木信太郎

**研究要旨：** 種々の遺伝的変異を検出する方法としてPCR法に基づく方法の確立を目指し、条件の検討を行った。すでに報告されているプライマーや新規に作製した各種プライマーの使用条件を検討し、使用可能なプライマーリストの作成を試みた。その結果、一定のリストを作ることができた。また、よく言われていることであるが、PCRの条件は試行錯誤を行うことにより検討する必要があることが再確認された。

#### A. 研究目的

PCRの技術は一応確立しているものと考えられているが、実際は目的のDNAを確実に増幅できるかどうかは条件を検討してみなければ必ずしも分からないという問題がある。そこで、各種プライマーを検討し、有効なプライマーおよび使用条件をリストアップすることを目的とする。

#### B. 研究方法

色々なプライマーを合成し、その有効性を実際の検体を用いて種々の条件でPCRを行い検討する。

（倫理面への配慮）

実験方法に関しては倫理委員会の承認のもとに行った。本研究は方法に関する試験研究につき倫理面の問題はほとんど無い。

#### C. 研究結果

既に報告されているプライマーおよび新規作成プライマーの有効性を実際に

PCRを行い、有効なプライマーのリストを作成した。

#### D. 考察

遺伝の変異は必ずしも予想できると限らないので、種々のプライマーを作製し、その有効性を検討し、リストを作成しておくことは十分意味があるものと考えられる。

#### E. 結論

よく言われているように、PCRは実際に行って見ないとうまく働くかどうか分からない場合があるので、実際に試みて条件を整える必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kiyoto Tai, Masaki Kubota, Kohei Shiono, Hitoshi Tokutsu, and Shintaro T. Suzuki.  
Adhesion Properties and Retinofugal Expression of Chicken Protocadherin-19.

Brain Res, 1344(2010) 13-24.

2. 学会発表

p120-catenin regulates classical cadherin-dependent directional cell movement of epithelial cells

Chisa Ozaki, Yoshinori Osaka, Shuichi Obata, Shintaro T. Suzuki

日本細胞生物学会、大阪、2010年、5月

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) およびサラセミア貧血の  
効果的診断法の確立に関する研究

研究分担者 小島 勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授

研究協力者 土居崎小夜子 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学

研究要旨：日本小児血液学会は平成21年2月より再生不良性貧血（AA）、骨髄異形性症候群（MDS）および先天性造血不全症候群（CBFS）を対象とした中央診断を開始した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設（名古屋大学、聖路加国際病院）で、骨髄病理標本を1施設（名古屋第一赤十字病院）で行っている。レビュー開始から16ヶ月間で223例がレビューされ、うち1例がCongenital dyserythropoietic anemia(CDA)と診断された。CDAと診断され同意を得た症例については今後遺伝子診断を行い、9例中1例にI型、1例にII型の責任遺伝子の変異を確認した。稀な血液疾患であるCDAを対象とした中央診断と遺伝子検査を行うことにより、その診断の精度があがっていくと考えられる。

#### A. 研究目的

CDAは先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不应性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う稀な疾患群である。I型からIII型の3病型に分類され、近年I型の責任遺伝子CDAN1と、II型の責任遺伝子SEC23Bが同定された。III型の責任遺伝子は同定されていない。今までCDAに関する知見は主にヨーロッパから報告されており、わが国ではCDAの実態が十分に把握されていない。本研究では、日本小児血液学会の中央診断および疾患登録事業の一環として、本疾患を包括的に登録するとともに、新たに遺伝子検査法を確立する。

#### B. 研究方法

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。AA、MDS、あるいはCBFが疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。以後はその番号でやりとりを行った（匿名化）。中央診断およびそれ

に伴う検査については患者保護者の同意を取得した後に行った。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設（名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科）で、骨髄病理標本を1施設（名古屋第一赤十字病院病理部）で行った。

CDAと診断された症例については、名古屋大学小児科で以下の方法により遺伝子解析を行う。：末梢血リンパ球からDNAを抽出し、I型についてはCDAN1遺伝子、II型についてはSEC23B遺伝子に特異的なプライマーを作成し遺伝子断片を増幅後、ABI3100を用いてコード領域全長の塩基配列を決定する。

#### C. 研究結果

平成21年2月からの1年間に223例がレビューされ、うち1例がCDAと診断された。

CDAと診断され同意を得た症例について遺伝子診断を行った。9例中2例に遺伝子変異を確認した。1例はI型の責任遺伝子CDAN1 ex26c.3503 C>T (p. Pro1129Leu)の変異、1例はII型の責任



遺伝子 SEC23B ex18 c.2122 A>G (p. Ile708Val) の変異であった。

#### D. 考察

CDAは1966年にCrookstonらにより初めて提唱され、1968年にHeimpelとWendtが3病型に分類した。近年I型とII型の責任遺伝子SEC23Bが同定され、ヨーロッパから報告がなされている。しかし、本邦では遺伝子診断を行われた症例はなく、今後の検討により国内発生CDA症例の特徴を明らかにすることができると思われる。

#### E. 結論

稀な血液疾患である CDA を対象とした中央診断と遺伝子検査を行うことにより、診断の精度があがると考えられる。

#### 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 due to uniparental disomy following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2010. Apr 15;115(15):3158-61.
- 2) 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*. 2010 Nov;116(22):4631-4638.

- 3) Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. *Int J Hematol*. 2010 Oct;92(3):419-24.
  - 4) 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]
  - 5) Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Pediatr Transplant*. 2011 Mar;15(2):161-6.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 土居崎小夜子、村松秀城、濱麻人、嶋田明、高橋義行、小島勢二、神谷尚宏、真部淳、多賀崇：本邦におけるCongenital dyserythropoietic anemia (CDA) の責任遺伝子の解析。第52回日本小児血液学会総会、大阪、2010.12.17

## Congenital dyserythropoietic anemia (CDA)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CDA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：Congenital dyserythropoietic anemia (CDA)は極めて稀な疾患であり、研究の基盤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実施し、CDAの症例把握に努めた結果、2006年から2009年に診断されて登録された311例の小児造血障害症例から、新規診断CDA症例は毎年1例、総計3例であった。同じ時期、同じ調査対象施設の特発性再不貧は年間約216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。本研究班のアンケート調査や診断基準の啓発活動により疾患の認知度が高まり、今後診断症例が増加する可能性がある。

#### 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ているがCDA症例の登録はなかった。しかし本研究班分担研究者の多賀らが2006年に改めて登録を呼びかけたところ約25年間に12例の症例が診断されていることが明らかになった。また本研究班発足とその診断基準啓発活動、さらに小児血液学会血液標本中央診断事業、疾患関連遺伝子変異の発見などのポジティブな要因を受けて、新規診断例の掘り起こしが期待されている。

##### 【目的】

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

#### B. 研究方法

本研究班の研究では治療介入を行わない、疫学観察研究として実施する。小児血液学会会員235施設を対象にした全例登録（疾患登録事業）は、前年診断症例を対象にWeb登録にて実施され、およそ診断から1年経過した段階で二次調査（再不貧2005研究・MDS2006研究）が実施した。構築されるデータベースには小児期発症の造血障害全般を網羅し、CDA症例に限定はしない。

（倫理面への配慮）

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

#### C. 研究結果

現在研究は進行中であり、2006、2007、2008、2009年診断症例を対象にすると、疾患登録（一次調査）は、2006、2007、2008、2009年順に163、184、204、212施設から登録された。この期間にCDAと診断された症例は毎年1例、総計3例であった。同じ期間に特発性再生不

良性貧血は58、57、59、51例、代表的な先天性造血障害であるFanconi貧血は5、4、4、1例。Diamond Blackfan貧血(DBA)は10、10、11、11例、総計311例であった。

同時に2009年2月から開始されている血液標本中央診断事業で診断されたCDA症例は1例（Type I）である。

#### 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。本研究班の対象疾患であるCDAは、小児血液専門医でも経験することが極めて稀な疾患であり、これまでの疫学調査ではほとんど把握されていなかった。2006年の多賀らの調査によりCDAへの注意が喚起され、遺伝子診断の報告も相まって、今回の対象期間3年間に3例の症例が登録された。また本研究班発足と診断基準の啓発、全国小児・内科施設へのアンケート調査による未診断新規症例の発掘が期待される。すなわち今後の診断法の確立により、CDA不全型や見逃された原因不明貧血が、今後積極的に診断アプローチされて確定診断される可能性があり、引き続き広く全国に調査を実施する必要がある。

#### E. 結論

今回の疾患登録調査により、およそ日本全国で年間1例ほどの新規診断症例が発生している事が予想された。遺伝子診断など診断法の開発、診断基準の周知啓発により潜在する症例が見いだされる可能性は高く、これを下支えする疫学データベースは今後も必要である。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

研究期間に本研究の成果に関係する論文発表なし

##### 2. 学会発表

研究期間に本研究の成果に関係する論文発表なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

##### 1. 特許取得 なし

##### 2. 実用新案登録 なし

セルバンクの精度管理

研究分担者 藤本純一郎 国立成育医療センター 臨床研究センター長

研究要旨

疾患の病態解明や診断・治療法開発には、患者由来検体の保存と活用が必須である。特に、難病等の希少疾患の場合は、患者由来検体の体系的かつ計画的な保存ならびに分配システムの構築が望まれる。本研究では、Congenital dyserythropoietic anemia (CDA)の病態・診療研究に資する検体保存体制整備として、国立成育医療研究センターにおいて構築しつつある患者由来検体保存体制の活用を提案した。希少疾患の場合、胚細胞系遺伝子の保存が重要であり、1)末血白血球や頬粘膜細胞の保存、2)必要に応じた細胞不死化操作、3)厳重な匿名化による個人情報保護と検体管理、が求められる。現状では、患者由来腫瘍細胞の凍結保存、患者細胞由来 DNA、mRNA ならびに cDNA の保存および配分の実績を有する。また、検体管理については、検体に貼付する匿名化番号を専用の検体管理プログラムから発行するシステムを構築している。

A. 研究目的

極めて希少な難病である Congenital dyserythropoietic anemia (CDA)の病態・診療研究に資する検体保存、精度管理ならびに供給体制の整備を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1) 希少難病患者検体保存に係る留意点

希少難病では胚細胞系遺伝子の保存が必要になる。その際の留意点について考察した。

2) 国立成育医療研究センターにおける患者由来検体の保存体制概略

国立成育医療研究センターでは、国内の小児がん治療研究グループと連携し、患者由来検体保存センターとして機能している。本研究における患者由来検体についてもこの保存システムを提案した。

C. 研究結果

1) 希少難病患者検体保存に係る留意点

希少疾患の場合、胚細胞系遺伝子の保存が重要であり、1)末血白血球や頬粘膜細胞の保存、2)必要に応じた細胞不死化操作、3)厳重な匿名化による個人情報保護と検体管理、が求められる。国立成育医療研究センターにおける検体保存システムの実績としては、細胞の凍結保存、抽出した核酸(DNA, RNA, cDNA)である。個人情報の保護については、後述の匿名化番号発行システムで管理できると考えられる。また、本システムでは、配分に当たり新たな匿名化番号発行も可能であり柔軟に対応できる。患者の個人情報は検体保存センターには収集しない。また、施設も検体保存番号を収集しないことが望ましい。従って研究班あるいはそれに代わる外部機構が患者情報、検体情報のそれぞれにリンクできる研究 ID を発行して管理することが適切と考えられる

(図1、方法1)。なお、保存に当たっては、より管理を厳重にするためには、研究 ID とは別の保存用 ID を発行して保存することも考えられる(図1、方法2)。

2) 国立成育医療研究センターにおける患者由来検体の保存体制

匿名化番号発行、匿名化シール発行ならびに検体管理を行うシステムとして、遺伝子情報提供者匿名化システム SCTS21(三井情報開発株式会社製)およびライフサイエンス研究支援システム「BIOPRISM(バイオプリズム)」(NEC 製)を併用(一部後者のみ)している。本システムでは、最初から検体はアルファベットと数字のランダムな組み合わせによる匿名化番号で保存されるため、本研究でのシステムとして最適と考えられた(図2)。

D. 考察

細胞、抽出した核酸の保存システムは現行のもので実施可能である。今後、不死化した細胞の検体保存システムを構築する必要があると考えられる。

E. 結論

Congenital dyserythropoietic anemia 患者由来検体保存体制は整った。

F. 健康危険情報：該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表：該当なし

2. 学会発表：該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得：該当なし

2. 実用新案登録：該当なし

3. その他：なし

図1. 検体ならびに診療情報の収集に関する体制案

