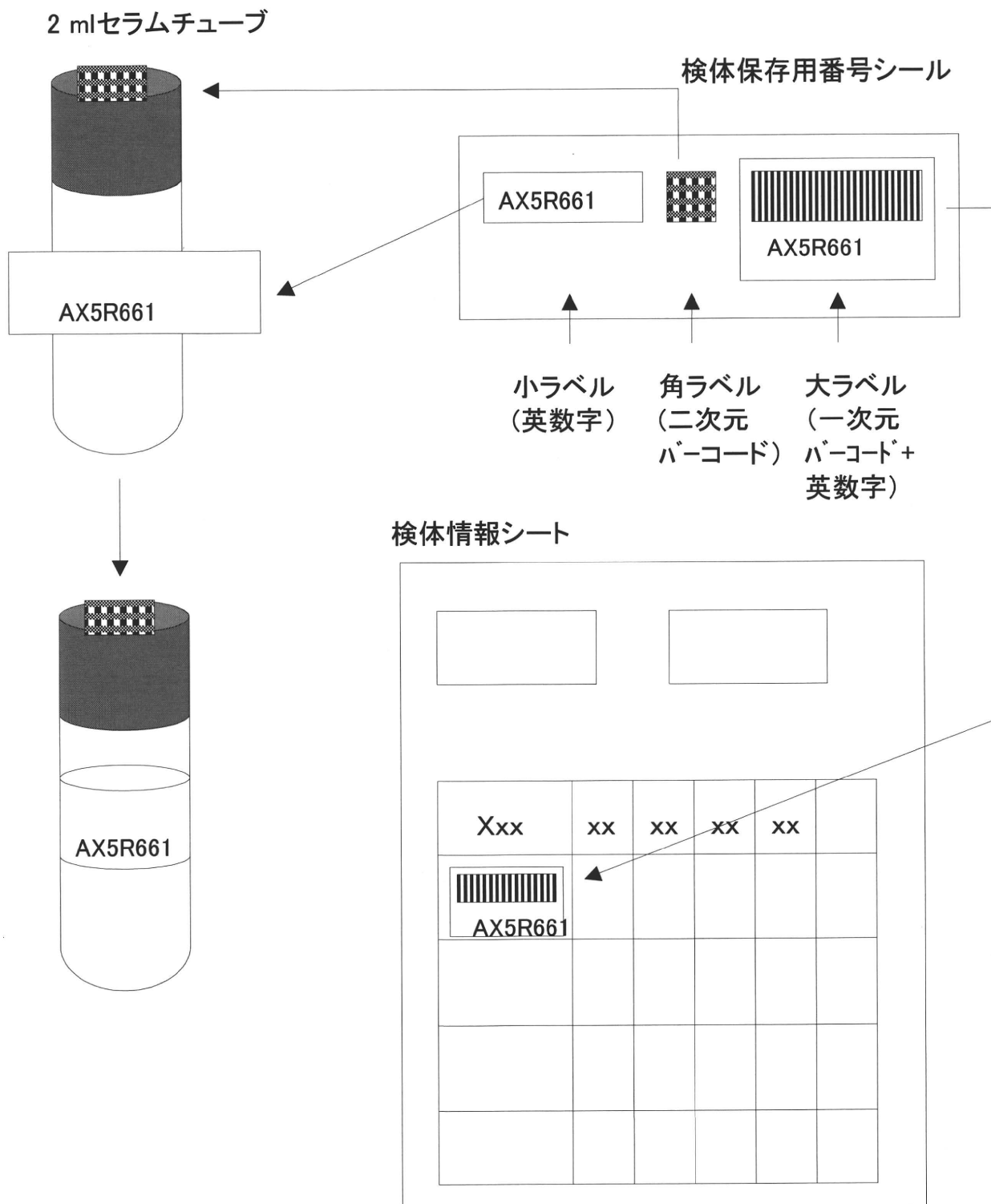


図2. セラムチューブを利用した際の匿名化シールの貼付方法  
 (1.5ml エッペンドルフチューブの場合も同じルールで行う)



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

に係る研究

研究分担者 多賀 崇 滋賀医科大学 小児科 講師

**研究要旨：** 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疾患群である。従来CDAに関する知見は主に西欧から得られているのみで、本邦での実態は明らかにされていなかった。本研究班においてわが国のCDAの実態を把握し、効果的な診断方法、有効な治療法の開発の基盤となる研究を行う。

## A. 研究目的

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。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。

## B. 研究方法

以前から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が、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。

（倫理面への配慮）

調査の基本となる日本小児血液学会の疾患登録事業として、学会倫理審査委員会で承認されている。また、調査に関する倫理審査は、研究代表者の所属する聖路加国際病院、遺伝子診断に関する倫理審査は、検査実施施設である名古屋大学でそれぞれ承認されている。

## C. 研究結果

分担研究者（多賀）が以前おこなったCDAの全国調査を参考に、調査表を作成し、全国の小児施設へCDAとその疑い症例の有無について調査をおこなった。約20名の該当症例に対し、現在2次調査と中央遺伝子診断を行っている。現在成人領域での調査ならびに遺伝子診断を行っている。

また、先天性骨髄不全症候群診療の参照ガイド（特発性造血障害に関する調査研究班：研究代表者小澤敬也）のCDAに関する部分を作成した。

#### D. 考察

調査対象を広げたにも関わらず本邦でのCDA症例は少ない。遺伝子診断においても既知の異常が見られない症例が多く、本邦においては本疾患が少ないか欧米と異なった病型である可能性もある。引き続き詳細な調査・研究が必要である。

#### E. 結論

わが国のCDAの実態の正確な把握と、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。

#### F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

#### 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確立  
に係る研究

研究分担者 渡邊健一郎 京都大学小児科 講師

**研究要旨：**

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疾患群である。本研究班において把握された症例について二次調査と遺伝子検索を行い、疾患像を明らかにする。サラセミア貧血については出生前診断法を確立する。また、これらの希少な遺伝性血液疾患の登録、細胞保存体制の整備を行う。

**A. 研究目的**

CDA 症例について二次調査と遺伝子検索を行い、疾患像を明らかにする。サラセミア貧血については出生前診断法を確立する。また、これらの希少な遺伝性血液疾患の登録、細胞保存体制の整備を行う。

**B. 研究方法**

日本小児血液学会中央診断、疾患登録システムを利用する。また一次調査で把握された症例を含めて、CDAの責任遺伝子の検索を行う。

(倫理面への配慮)

日本小児血液学会疾患登録事業は疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として学会倫理審査委員会で承認されている。患者検体を用いた研究の実施にあたっては、倫理委員会の承認を得た上で、患者及び家族に十分な説明を行い、文書による同意を得る。またヒトゲノム遺伝解析に関する倫理指針に従う。

**C. 研究結果**

一次調査で把握されたCDA症例について二次調査を施行中である。名古屋大学小児科で遺伝子解析が行われ、2例で変異が認められた。

**D. 考察**

二次調査、遺伝子解析の結果が出れば、CDA国内発生例の特徴が明らかになると考えられる。

**E. 結論**

わが国のCDAの実態の正確な把握と、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。

**F. 研究発表**

1. 論文発表 特になし
2. 学会発表 特になし

**G. 知的財産権の出願・登録状況**

特になし

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  
に係る研究

研究分担者 関沢明彦・昭和大学医学部産婦人科学教室・准教授

**研究要旨：** 母体血中に存在する有核赤血球を用いた胎児の遺伝子診断は、母体・胎児に無侵襲な理想的検査法である。我々は、比重遠沈法、レクチン法、有核赤血球自動識別装置、マイクロマニピュレーション、FISH法の組み合わせで胎児染色体診断できることを示した。さらに、比重遠沈法を工夫することで、レクチン法と同等の細胞回収が可能なることも確認し、その診断精度についての検討を継続している。さらに、FISH診断の精度も向上している。

#### A. 研究目的

胎児の染色体異常や遺伝子異常を診断するためには羊水穿刺や絨毛採取などにより胎児細胞を採取する必要がある。しかし、これらの方法には0.5-2%に流産のリスクがあり、より安全な胎児細胞の回収法の開発が期待されている。母体血中に胎児細胞が存在することが最初に報告されたのは19世紀に遡るが(Schmorl, 1893)、母体血中の胎児細胞数が僅かであるため、それを出生前診断に用いる試みはなかった。1980年代後半になり、PCR法やFISH法のような高感度な遺伝子分析法が利用できるようになり、無侵襲的な出生前診断法の標的として、世界中で盛んに研究されるようになった。母体血中胎児細胞の中で有核赤血球は、識別が容易で、前の妊娠の影響を受けないと考えられるため理想的な標的細胞である。母体血中に存在する有核赤血球を用いた胎児の遺伝子診断は、母体・胎児に無侵襲な理想的検査法である。本研究では、母体血中からの有核赤血球の回収方法と分析方法の確立を目標に研究する。

#### B. 研究方法

妊娠10-20週の妊婦を対象に、母体血14mLを採取する。母体血から有核赤血球をパーコール2段階比重遠沈法で濃縮し、自動有核赤血球

識別装置で同定した後、Micromanipulation法で有核赤血球を単離し、X,Y染色体特異的プローブ及び21、18番染色体特異的プローブでFISH解析を行う。今回は、一次分離の段階でより細胞ロスのない分離法の確立のため、比重液の比重、密度、種類などを変化させ、至適な分離条件を検討する。

#### （倫理面への配慮）

本研究では、検体採取に当たっては倫理委員会承認の説明用紙を用いてインフォームド・コンセントを得ている。また、個人情報の管理には十分な配慮を行っている。具体的には、検体と臨床情報は切り離して保管するなど、臨床データ・遺伝子データの情報漏洩がないように最大限の注意を払っている。

#### C. 研究結果

比重遠沈法での有核赤血球回収数は、高比重液ほど多いが、その背景細胞数は著増し、非効率性が際立った。FISH法の細胞の前処理によって有核赤血球へのFISHシグナルの入り方の違いがある。細胞膨化処理として10mM Lithium Diiodosalicylateを用いない場合のFISH(Y-probe)シグナルの入る率は40%であったが、処理により85%に向上した。さらに、蛋

白分解を行うためペプシン処理を行うことで FISH 効率は 90%に向上するなど、数か所のプロトコルの改変を行った。その上で、最適化プロトコルでこれまでに 9 例の検体で分析が終了している。14mL の血液から平均 9 個（最小-最大：1-27）の有核赤血球が回収され、FISH 分析が行われた。症例の中に 4 例の男児妊娠例が含まれていたが、その 4 例は正確に診断され、診断精度は 100%であった。

#### D. 考察

母体血中に確実に有核赤血球が存在することを再確認した。その上で、母体血中有核赤血球を用いた胎児染色体診断法の臨床応用の可能性を証明した。しかし、母体血中の有核赤血球の由来が 40%程度しか胎児由来でないことになると、パーコール法でもレクチン法でも、理論的に 100%胎児細胞を回収できないことになる。正確な胎児診断をおこなうためにはできるだけ多くの有核赤血球を回収する必要がある。

今後、パーコール法の診断精度を更に症例を積み重ねて明らかにするとともに、より回収数を増やす工夫が必要と考える。

#### E. 結論

母体血中に存在する有核赤血球を用いて高い精度で胎児の染色体数の診断が可能なことを証明した。

#### F. 研究発表(学会発表)

1. 6<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
2. 6<sup>th</sup> World Congress of Perinatal Medicine in developing countries. Jakarta, March 8, 2010.  
Recent Advances in Prenatal diagnosis (Special Invited Lecture).  
Sekizawa A

#### G. 知的財産権

なし

Ⅲ 先天性造血不全シンポジウム  
抄録集

---

---

# 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。

## 先天性巨大血小板性血小板減少症

國島伸治

国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター高度診断研究部

日常診療において血小板減少症に遭遇することは少なくない。多くの場合は後天的要因によるものであり、先天性血小板減少症はきわめてまれと考えられてきた。近年になり、先天性血小板減少症は従来考えられていた程まれでなく、特発性血小板減少性紫斑病と診断され不必要な治療を受ける症例が少なくないことも判ってきた。先天性血小板減少症は遺伝的異質性が高く、多くの症例では病因を特定できない。しかし、巨大血小板を呈する先天性巨大血小板症は、病因・病態解明および検査診断において研究が進みつつある。最も代表的な Bernard-Soulier 症候群 (BSS) は、GPIb/IX 欠損が原因であり、症例解析の集積により GPIb/IX 生合成過程が明らかにされた。一世紀も前に報告されながらも最近まで原因が不明であった巨大血小板、血小板減少、顆粒球封入体を呈する May-Hegglin 異常は、ポジショナルクローニングにより原因遺伝子として非筋ミオシン重鎖 IIA をコードする MYH9 が同定された。MYH9 異常は May-Hegglin 異常に加え、Alport 症状を合併する Epstein 症候群や Fechtner 症候群の原因であることも判り、包括した MYH9 異常症が提唱されている。巨核球は骨髄内において分化・成熟するに従い類洞周囲に集族し、伸展させた胞体突起の先端を血小板として放出する。ミオシン IIA は胞体突起形成を負に制御することが明らかにされ、MYH9 異常症では巨核球が十分に分化・成熟する以前に胞体突起が形成されるために、大型の血小板として産生されることが示唆されている。胞体突起形成は微小管により伸展されるが、巨核球特異的チューブリン異常も先天性巨大血小板症の原因となる。血小板 GPIIb/IIIa の先天性欠損は血小板無力症の原因であることは良く知られているが、血小板の数と大きさは正常である。最近、静止期の GPIIb/IIIa 構造維持に重要な部位の異常が先天性巨大血小板症と関連する事が判った。恒常的活性化型 GPIIb/IIIa は巨核球の胞体突起形成に異常を来し、胞体突起先端数の減少と大型化により巨大血小板症の原因となることが解明された。以上、先天性巨大血小板性血小板減少症の病因・病態解析と鑑別診断について概説させていただきます。

## 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

【緒言】 Fanconi 貧血 (FA) は染色体不安定性と進行性骨髄不全、白血化を特徴とする常染色体劣勢遺伝性疾患で *FANCA* から 2010 年 FA 国際シンポジウムで認められた *FANCO* に到る 14 個という多数の遺伝子が報告されている。FA 患者の中には遺伝子の変異配列の野生型配列への復帰や代償性変異により蛋白機能が回復した造血細胞クローンが増大する状態、すなわち「リバージョン・モザイク (reversion mosaicism)」が知られており、リンパ球の染色体断裂が非常に少なく診断が困難な場合が多い。今回リバージョン・モザイク型 FA とと思われる 3 症例につき検討した。

### 【症例】

症例	1	2	3
性別	男	男	女
異常理学所見	皮膚/母指/低身長	皮膚/母指/耳/眼/ 低身長	皮膚/母指/眼/ 消化管/低身長
発症時年齢 (年)	6	6	4
移植時年齢 (年)	7	19	16
移植時病型	重症再不貧	重症再不貧	RAEB-1
リンパ球 DEB 断裂細胞 (%)	6	43	9
リンパ球 FANCD2 モノクビキチン化	正常	発現弱	正常
リンパ球 Mutation	2546delC/変異未検出	検討中	2546delC/-
体細胞 MMC 断裂細胞 (%)	施行せず	施行せず	骨髄 fibroblast 20%
体細胞 FANCD2 モノクビキチン化	頬粘膜異常	施行せず	骨髄 fibroblast 異常
体細胞 Mutation	頬粘膜 2546delC/2546delC	皮膚 fibroblast IVC-2A>T/?	骨髄 fibroblast 3295C<T/2546delC
移植前処置	TAI (3)+CY (40)+ Flu (150)+ATG (5)	TAI (3)+CY (40)+ Flu (150)+ATG (5)	TBI (4.5)+CY (40)+ Flu (150)+ATG (5)
キメラリズム	Mixed キメラ	Mixed キメラ	Complete キメラ

【考察】リバージョン・モザイクを生じた FA では通常のリンパ球の染色体断裂やスクリーニングで用いる FANCD2 モノユビキチン化の異常がみられず、皮膚などの線維芽細胞の検索で初めて確定にいたることが多く、FA の診断が困難である。DEB によるリンパ球の染色体脆弱試験で断裂のない正常な細胞が 50%以上である場合にモザイクと定義されるが、その頻度は本邦 FA 患者では 30%近くにみられ、欧米諸国の 10%に比べ約 3 倍である。リバージョンを生じた細胞はアルキル化剤などの化学療法剤にも抵抗性であるため、前処置を弱めた FA の造血細胞移植に際しては、拒絶やキメラとなる可能性が高く注意が必要である。

## 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<sup>1)</sup>、高橋義行<sup>2)</sup>、濱 麻人<sup>3)</sup>、小島勢二<sup>4)</sup>、小原 明<sup>5)</sup>、中畑龍俊<sup>6)</sup>

<sup>1)2)3)4)</sup>名古屋大学小児科

<sup>5)</sup>東邦大学大森病院輸血部

<sup>6)</sup>京都大学 iPS 細胞研究所

小児期発症造血不全症を対象にリンパ球テロメア長を flow FISH 法で測定し、臨床的意義を検討した。身体的特徴や遺伝子診断で先天性角化不全症 (DKC) と診断された 8 例では、全例において relative telomere length (RTL) は、年齢が一致した健常人の RTL の 5% 以下に短縮していた。この結果に基づき、テロメア長の測定が、身体的特徴を示さない潜在的先天性角化不全症のスクリーニングに有用であるかを検討した。特発性再生不良性貧血と診断されていた症例において、著しいテロメア長の短縮がみられたので、遺伝子検索をおこなったところ、TINF2 遺伝子の変異が発見された。これより、リンパ球テロメア長の測定は不全型先天性角化不全症のスクリーニングに有用と考えられた。さらに、免疫陽性療法開始前に測定した RTL が反応予測因子になりうるかを 40 例の小児再生不良性貧血患児について検討した。反応がみられない患児の RTL は反応がみられた患児の RTL と比較して有意に短縮していた。

さらに、これまで、免疫抑制療法の予測として有用とされてき WBC, Ret, Plt, minor PNH clone 等をふくめて多変量解析をおこなったところ、リンパ球テロメア長の RTL のみが統計学的に有意な因子であった。

今回の研究結果から、リンパ球テロメア長が免疫抑制療法の反応予測に有用である可能性がしめされた。

## 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

先天性骨髄不全症候群は、何らかの遺伝子変異により血球が適切に産生されなくなる疾患群である。近年様々な原因遺伝子が同定されてきているが、それらは必ずしも造血系に特異的なものではなく、むしろ DNA 修復、テロメアの維持、リボソームの生成といった生命維持に重要な役割を果たすものが多いことがわかってきている。

Shwachman-Diamond 症候群 (SDS) は、膵外分泌不全、骨髄不全、骨格異常を主徴とする先天性骨髄不全症候群であり、骨髄異形成症候群、白血病を発症するリスクが高いことが知られている。2003 年に、7 番染色体上に存在する *SBDS* が原因遺伝子であることが報告された。*SBDS* 遺伝子のコードする蛋白は既知のドメイン構造を持っておらず、その機能は不明であった。しかし、様々な種のゲノムの解析から、*SBDS* は種を超えて高度に保存されており、RNA 代謝に関与することが示唆された。さらに *SBDS* ノックアウトマウスが胎生致死になることから、*SBDS* は生命維持に必須の蛋白であると考えられている。実際、SDS 患者の CD34 陽性骨髄細胞では、Fas を介したアポトーシスが亢進していることが報告され、この造血前駆細胞の細胞死が血球減少の原因であることが示唆された (Dror Y et al. Blood, 2001)。また、Hela 細胞で siRNA を用い *SBDS* をノックダウンしても、細胞死が亢進することが報告されている (Watanabe K et al. Haematologica, 2008, Apoptosis, 2008)。

一方で、*SBDS* 蛋白の主な機能はリボソーム生成の制御であることが明らかとなってきた。*SBDS* 蛋白は、細胞周期依存的に核小体に局在し、リボソームの 28S サブユニット、リボソーム生成や白血病発症に関与するヌクレオフォスミンと結合する。酵母では、*SBDS* の相同遺伝子である *Sdo1* を欠失させると、リボソーム生成が阻害される。*Sdo1* は pre-60S リボソームサブユニットからの Tif6 の放出を促進させる働きがあり、その結果 60S サブユニットは他のリボソームサブユニットとの結合が可能となり、リボソームは成熟し翻訳が活性化される。最近 Diamond-Blackfan 貧血等いくつかの骨髄不全の原因遺伝子がリボソーム生成に関与することがわかってきており、リボソーム生成異常がいくつかの骨髄不全に共通する病態である可能性が示唆されている。

他にも *SBDS* は、紡錘糸の安定性、ストレス反応、好中球遊走といった様々な機能をもつことが報告されているが、今後このような知見と臨床症候との関連の解明が期待される。



## 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<sup>2)3)</sup>、由良洋文<sup>2)3)</sup>、北川道弘<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>国立成育医療研究センター周産期診療部

<sup>2)</sup>国立成育医療センター研究所周産期病態研究部

<sup>3)</sup>株式会社ネーテック

サラセミアはヘモグロビン $\alpha$ または $\beta$ 遺伝子の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っているが、羊水検査や絨毛採取といったリスクの高い侵襲的な方法によって胎児細胞が採取されている。

母体血中には微量に胎児有核赤血球 (NRBC) が存在するが、NRBC を濃縮・分離しその遺伝子を分析することで、流産リスクのない非侵襲的なサラセミアの胎児診断が可能となる。そのため、国内外で研究が進められているが、FACS や MACS による分離方法では、遺伝子解析に十分な量と質の NRBC を得られていない。

我々は、レクチン法を用いた NRBC 分離法の確立を目指している。レクチン法は、細胞表面上の糖鎖発現量の多寡を利用したもので、糖鎖を特異的に認識するタンパク質であるレクチンの一種 SBA (soybean agglutinin) を介して、糖鎖発現量の多い細胞を糖鎖含有高分子材でコーティングされたスライドガラス上に選択的に付着させる方法である。これまで、ギムザ染色による形態的な判断により NRBC の同定が行われていたが、画像解析システムによる効率的な NRBC 同定を目的とした分離・同定法の最適化を行った。

男児を妊娠した妊婦の母体末梢血 7mL から、レクチン法によりスライドガラス上に細胞を分離した。蛍光免疫染色により、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。免疫染色後の細胞に対して Y 染色体特異的プローブを用いた FISH を行い、候補細胞からシグナルを検出した。このことから、蛍光免疫染色を用いた方法により、NRBC を同定できることが示唆された。今後、この方法を用いて、胎児サラセミア遺伝子診断の応用への試みを開始した。

## 重症先天性好中球減少症 (Severe congenital neutropenia, SCN)

○中村和洋、小林正夫

広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学

SCNは、乳児期早期からの慢性好中球減少(末梢血好中球数 200/ $\mu$ l 以下)、重症感染症の反復、骨髄顆粒球系細胞の低形成、前骨髄球での成熟障害を特徴とする。欧米では Severe Chronic Neutropenia International Registry が国際的な登録を行っており、本疾患の発症頻度は 1~2/100 万と推定されている。本疾患は同一表現型を呈する異種な疾患群であり、約 60% で常染色体優性遺伝を呈する *ELA2* の変異が、約 20% で Kostmann 症候群として知られる常染色体劣性遺伝を呈する *HAXI* の変異が報告されている。その他 *HASP* の機能獲得型変異や糖代謝に関与する *G6PC3* の変異なども報告されているが、原因不明の症例も存在する。これらの変異により、好中球減少を呈する機序については不明であるが、骨髄前駆細胞におけるアポトーシスの関与が推定されている。当科で遺伝学的検討を実施した本邦 33 家系の解析では、*ELA2* の変異が 24 家系 (73%) に、*HAXI* の変異が 4 家系 (12%) に認められ、*HAXI* 変異例では、精神運動発達遅延、てんかんなどの中枢神経病変の合併が特徴的であった。遺伝的多様性にかかわらず臨床症状はほぼ一定しており、生後早期より気道感染、皮膚感染や肝臓瘍などを繰り返す。本疾患は G-CSF 投与により 90% 以上の症例で好中球増加が認められ、感染予防が可能となっている。しかし G-CSF 長期投与により、約 20% (高用量必要とする例では約 40%) の症例で骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病への移行が認められ、重症感染症とともに生命予後に影響を与えている。唯一の根治療法は造血幹細胞移植であり、主として悪性疾患進展例に対して実施されてきたが、治療関連毒性、再発などにより治療成績は不良である。当院では治療関連毒性軽減による移植成績の向上を目的に悪性疾患進展前の本疾患患者 5 例に reduced intensity regimen による骨髄移植を実施し、4 例で良好な経過を認めている。今後、本疾患の病態解明、診療ガイドラインの作成のために、本邦における症例の集積を施行している。

## Ataxia Telangiectasia と細胞分化、腫瘍化の関連

○高木正稔、磯田健志、佐藤正樹、水谷修紀

東京医科歯科大学大学院発生発達病態学

先天性免疫不全の多くの責任遺伝子が明らかにされていく中で DNA 損傷応答機構にかかわる遺伝子の変異が多く見出されてきている。この DNA 損傷応答機構にかかわる遺伝子は DNA の非相同末端再結合や相同組換えを介して DNA 修復に深くかかわり、免疫グロブリンや T 細胞受容体遺伝子の再構成に重要な役割を担っている。毛細血管拡張性小脳失調症 Ataxia Telangiectasia (A-T) は小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全を主徴とし、20-30%に悪性腫瘍を合併する。また早老症や耐糖能異常を示すことで知られている。ATM はホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) ドメインを持つタンパク質で DNA 障害により活性化されタンパク質キナーゼとして働き、下流に位置する p53 や BRCA1 などをリン酸化し、DNA 損傷応答機構の上で中心的な役割を持つ重要なタンパク質であることが知られている。しかしその機能は多岐にとみ、様々な細胞の発生分化、恒常性維持に重要な役割を担っていることが推測される。これまでの研究から ATM が血液細胞の分化、腫瘍化抑制に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。

骨髄異形成症候群 (MDS) はアポトーシスによる無効造血を特徴とする疾患で 40-50%が白血病 (overt leukemia; OL) に移行することから、白血病発症の前がん段階とも捉えられている。MDS における DNA 損傷応答の役割を明らかにする目的で、免疫組織染色を用いて検討した結果、DNA 損傷応答に関与するタンパク質が MDS の骨髄で活性化していることが明らかとなった。また一部の症例で MDS から OL へ移行した段階で ATM 遺伝子片側のアレルの欠失が起り、さらに p53 を獲得していることが明らかとなった。これら結果から MDS 細胞が OL へ進展するに当たり DNA 損傷応答機構にかかわる ATM と p53 の機能的失活を獲得したことが明らかとなり、MDS で DNA 損傷応答機構の活性化が cancer barrier として機能し、白血病化を抑えていることが明らかとなった。

またリンパ球の分化においても従来から T 細胞受容体  $\alpha$  鎖再構性的の問題から CD4 CD8 Double Positive 期の段階で分化が停滞することが知られていたが、T 細胞の CD4 CD8 Double Negative 期の DN 3 期においても T 細胞受容体  $\beta$  鎖再構性的に障害があり、細胞分化が停滞することが明らかとなった。この時期での細胞分化の障害が T 細胞性白血病発症に関連している可能性が示唆された。

## 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<sup>1)</sup>、照井君典<sup>2)</sup>、土岐 力<sup>3)</sup>、小島勢二<sup>4)</sup>、小原 明<sup>5)</sup>、大賀正一<sup>6)</sup>、森尾友宏<sup>7)</sup>、  
浜口 功<sup>8)</sup>、倉光 球<sup>9)</sup>、菅野 仁<sup>10)</sup>

<sup>1)2)3)</sup>弘前大学小児科、<sup>4)</sup>名古屋大学小児科、<sup>5)</sup>東邦大学小児科、<sup>6)</sup>九州大学小児科、  
<sup>7)</sup>東京医科歯科大学小児科、<sup>8)9)</sup>国立感染症研究所、<sup>10)</sup>東京女子医科大学遺伝医学

Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) は、乳児期に発症する稀な先天性赤芽球癆である。約 40% の患者は種々の先天異常を合併する。最近の研究により、欧米では約 50% の DBA 患者にリボソームタンパク (RP) 遺伝子の変異が認められることが明らかになった。特に最初に報告された *RPS19* 遺伝子は約 25% の症例で変異が報告されている。しかし、本邦を含むアジアの DBA 患者の RP 遺伝子変異の頻度は不明である。我々は、本邦で発症した 68 例の DBA 患者 (64 例の発端者) の末梢血から DNA を抽出し、DBA で遺伝子変異が報告されている 8 遺伝子 (*RPS19*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS24*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*) と 5q-症候群の原因遺伝子として最近同定された *RPS14* を解析した。遺伝子解析は、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、本人あるいは両親の同意の上実施した。その結果、*RPS19* 遺伝子変異が 10 例 (8 家系) で検出され、その内の 3 つは新しい遺伝子変異であった。*RPL5* 変異は 6 例 (6 家系)、*RPL11* 変異は 3 例 (3 家系) で検出された。*RPS10*, *RPS17* と *RPS26* 変異は、それぞれ 1 例 (1 家系) に認められた。*RPS19*, *RPL5*, *RPL11* の遺伝子変異の頻度は、それぞれ 12.5%、9.3% および 4.7% であった。しかし、通常のシーケンス解析では片アレル欠失は検出できないため、定量的 PCR 法を用いた片アレル欠失検出法を開発し、原因遺伝子が不明である 17 症例で解析を行った。その結果、片アレル欠失は *RPS19* と *RPS17* に各 2 例、*RPL5* *RPL35a* に各 1 例、計 35.3% に認めた。興味深いことに、*RPL5* 変異をもつ患者は 7 例とも身体的異常を合併し、その内の 2 例は、口蓋裂を合併していた。この結果より、特に *RPL5* は胎児の発生にも他の RP より重要な役割を果たしていることが示唆された。本邦における DBA の発端者 64 例中 26 例 (40.6%) に RP 遺伝子の変異を認めた。欧米に比して本邦における RP 遺伝子の変異頻度は低く、60% の症例では原因遺伝子が不明である。DBA の病因の理解のためには、新規原因遺伝子の解明が必要である。