

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

遺伝子型と表現型に基づいた治療法確立に関する研究

研究分担者 大賀 正一 九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授

研究要旨：先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血: DBA）の早期診断のために、赤血球酵素活性によるスクリーニングの有用性を遺伝子診断確定例と家族解析から検討した。赤血球酵素活性（ADA と GSH）の組み合わせ測定が有用で、さらに疾患対照（溶血性貧血、Fanconi 貧血）と比較検討中である。経口除鉄療法が小児に広がりつつあるが、本症新生児の輸血療法を確立するため、鉄代謝マーカーの動態を明らかにし、輸血による鉄過剰対策の基礎データを集積した。また、DBA 診断ガイドラインをもとに、現在全国 130 例以上の二次調査を進行中である。これにより、本邦 DBA 登録を継続的に検討できるシステムが構築される。

### A. 研究目的

DBAはリボゾーム蛋白（RP）遺伝子のハプロ不全による先天性赤芽球癆である。本症は*RPS19*のほか、12以上のRP遺伝子異常を原因とするヒトリボゾーム病で、RP以外の責任遺伝子はまだ見つかっていない。患児は奇形徴候を有し、新生児期から貧血をきたす。スクリーニング法を開発し、国内登録システムを確立して、本症の早期診断・治療法を確立する。

### B. 研究方法

RP遺伝子解析とADAを含む赤血球酵素活性の結果を併せて検討し、可能な例には家族解析を行った（伊藤・浜口・菅野分担研究協力）。当科で加療中または受診歴のある患児を対象とした。国内DBA130例以上を対象に登録システム確立のため分子疫学二次調査を行った。輸血による新生児鉄過剰症対策のため新生児の血清prohepcidinなどを測定し、鉄制御機構を解析した。全国分子疫学研究と鉄代謝解析は倫理委員会で承認された。家族解析を行ったものには臨床遺伝医療部にて遺伝カウンセリングを行う。

### C. 研究結果

当科と関連施設のDBA11例（男女比は3:8）の酵素活性と遺伝子解析を進めている。*RPS19* 2例（各男女）、*RPL5*と*RPL11*（両女兒）のヘテロ変異に加え、新たに*RPL17*の大欠失（女兒）が同定された。いずれもG-bandingにて染色体異常はない。ADAとGSH活性に

よる検討でADA上昇がない例のスクリーニングも可能であった。赤芽球癆で発症し白血病に進展した2歳男児例（*RPS19*変異なし）は発症時にeADAが2.00 U/gHbと上昇していたが、寛解期には1.10となった（正常値：0.87-1.59）。Fanconi貧血（*FANCA*異常）の女兒はADAは正常であったがGSHが上昇していた。*RPS19*、*RPL11*および*RPL17*異常例の家族解析で、スクリーニングの有用性を確認した。非輸血時の赤芽球癆にはADAとGSHの両活性がDBAスクリーニングに極めて有用であることが示された。

貧血外症候として、*RPS19*変異例は翼状頸、舟底足、多指、心房中隔欠損を呈したが口蓋裂はない。*RPL5*変異例は口蓋裂のほか徴候が顕著である。*RPL11*と*RPL17*欠失例の徴候はごく軽度であった。治療反応性については、*RPS19*と*RPL5*変異例が輸血依存となり除鉄療法中である。新生児期の鉄代謝マーカーとして血清prohepcidinとNGALの生理的動態が類似していることを確認し、さらに検討中である。

全国二次調査は年内に終了予定で、順次解析結果と照合しDBA登録システムを立ち上げる。ホームページ原案も完成した。

### D. 考察

酵素活性によるDBA診断の疑陰性には、輸血が影響する。白血病早期にADA活性が上昇する擬陽性がある。GSHと組み合わせ、登録症例と家族の解析を継続し情報をさらに集積する。新生児は鉄代謝機構

の未熟性から、鉄過剰をおこしにくい輸血至適開始基準を検討しなくてはならない。今後も患者と家族の分子疫学解析を継続し、適正治療の確立をめざす。

## E. 結論

ADAとGSHの活性の組み合わせ測定感度は高く、DBAスクリーニングに有用である。遺伝子解析と合わせ軽症例・非典型例の感度特異度に関する検討を続ける。1か月未満の児に対する輸血は、鉄中毒による組織傷害を考慮する必要がある。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan W, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kitoh T, Sugita K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012;119(10):2376-2384.
- 2) Kamio T, Ito E, Ohara S, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikura A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, tsukimoto I, Kojima S. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica* 96(6):819-9,2011.
- 3) Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusuhara K, Hara T. Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Development Pathol.* 2011 (in press)
- 4) Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T. Serum prohepcidin concentrations at birth and one month

after births in premature infants. *Pediatric Blood & Cancer* 56(2):267-72,2011.

- 5) 伊藤悦朗, 小島勢二, 大賀正一, 小原明「難治性貧血の診療ガイド」編集委員会: VII 先天性骨髄不全症 4. *Diamond-Blackfan 貧血/診療の参照ガイド 難治性貧血の治療ガイド 特発性造血障害の病態・診断・治療の最新動向* pp.220-227 南江堂 2011.
  - 6) 北島順子, 金城唯宗, 大賀正一, 落合正行, 井上晋介, 楠田剛, 井原健二, 原寿郎. 新生児における鉄恒常性とヘプシジン. *産婦人科新生児血液学会雑誌* 20:103-111,2011.
  - 7) 大賀正一. 血液・腫瘍性疾患 鉄欠乏性貧血. 今日の小児治療指針第15版. 医学書院2011(印刷中).
- ### 2. 学会発表
- 1) Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T. Serum prohepcidin levels during the neonatal period of term and preterm newborn. PAS/ASPR 2011 Joint Meeting, April. 30-May, 2011 Denver, Colorado, USA.
  - 2) 大賀正一, 工藤寿子, 足立壮一, 菊地陽. 小児血液疾患の基礎. 第4回研修医(初期・後期)のための血液学セミナー, 2011年7月8-10日. 大津.
  - 3) Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Masumi A, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Ozeki M, Yamaguchi K, Kitoh T, Sugita K, Kudo T, Matsubayashi T, Mizue N, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese Patients with Diamond Blackfan anemia. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
  - 4) Iribe Y, Aoki T, Yamamoto T, Furukawa T, Mitani S, Toki T, Ohga S, Ito E, Ogura H, Fujii H, Kanno H. Mining novel diamond-Blackfan anemia relevant genes from next generation sequencing data. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
  - 5) Kanno H, Iribe Y, Uchiyama T, Aoki T, Ogura H,

Ohga S, Ito E, Fujii H. Elevation of red cell reduced glutathione is a novel biomarker for Diamond-Blackfan anemia. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.

- 6) 伊藤悦朗, 照井君典, 土岐力, 小島勢二, 小原明, 大賀正一, 森尾友宏, 浜口功, 倉光球, 菅野仁, 小川誠司, 佐藤亜以子. 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. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月 25-27 日. 前橋.

#### 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
3. その他  
なし

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

DBAの診断法の開発（マーカー探索）

研究分担者 浜口 功 国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長  
研究協力者 倉光 球 国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員

研究要旨：先天性赤芽球癆(Diamond blackfan anemia (DBA))の原因遺伝子として *RPS19* などのリボソームタンパク質が知られる。近年 DBA の 50%の患者でこれらの遺伝子変異が明らかになってきたことから、DBA の遺伝子変異の同定を DBA の診断のマーカーの1つとして利用することが可能になった。我々は、これまで希少報告であった DBA 遺伝子の片アレル欠失を迅速・簡便に検出することができる検出法を新規に開発し、弘前大学 DBA ゲノムバンクを用い変異同定を試みた。その結果、遺伝子変異未知の 31 例中 7 例で DBA の原因遺伝子の片アレル欠失を検出した。片アレル欠失 6 検体の遺伝的素因を同様の方法で調べたところ、DBA 患者両親には原因遺伝子の欠失は認められなかった。これらのことから、DBA 患者の確定診断のために DBA 原因遺伝子のゲノムコピー数の解析（片アレル欠失の検出）は有用な診断マーカーとなることが示された。

A. 研究目的

先天性赤芽球癆(Diamond Blackfan Anemia(DBA))の原因遺伝子として近年 *RPS19* や *RPL5*, *RPL11*, *RPL35A*, *RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS24*, *RPS26* などのリボソームタンパク質をコードする遺伝子が数多く明らかになった。DBAは100万出生あたり約4人の頻度と稀であり、確定診断が困難な疾患の1つである。DBAの診断マーカーを見つけることは、DBAの診断を正確かつ迅速に行うことができ、患者のその後の治療法選択に多いに役立つと考えられる。近年、上記の原因遺伝子の変異を調べる事によって、欧米ではDBAの約50%まで原因遺伝子の特定が出来るまでになっている。このことは、遺伝子変異の同定がDBAの確定診断のマーカーの1つとして機能することを意味している。

本邦でも遺伝子配列解析によるDBA原因遺伝子の同定がDBA確定診断上の重要な項目の一つとして実施されているものの、同定率は30%と比較的低い。我々は、これまで稀にしか報告のないWhole Allele Loss変異(片アレル欠失変異)をターゲットとすることで、変異同定率の上昇が期待できると考えた。そこで独自に簡便かつ迅速なDBAの遺伝子コピー数解析法(DBA同期的qPCR法)を開発した。

弘前大学小児科(伊藤悦朗教授)で集められた日

本のDBA患者ゲノムバンクを利用し、本解析法を用いてDBA原因遺伝子の欠失変異の同定を試みた。

B. 研究方法

・患者およびゲノムDNA

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

・DBA Gene Copy Number assay

それぞれのリボソームタンパク質遺伝子に対するプライマーセットを準備し、他の遺伝子プライマーセットによるQ-PCRの増幅曲線のCt値との差が1サイクル以内になるようにプライマーセットを選定した。Q-PCRは、以下の条件で行った。Genomic DNA (gDNA) 5ng/ $\mu$ l DWを95°C5minの後、直ちに氷上で急冷し、熱変成させた。変成させたgDNA溶液2  $\mu$ l, 2x SYBR Premix Ex Taq II kit 10  $\mu$ l, ROX dye II 0.4  $\mu$ l, 10pmol/ $\mu$ l Forward primer 0.8  $\mu$ l, 10pmol/ $\mu$ l Reverse primer 0.8  $\mu$ lを混合し、total 20  $\mu$ lになるようにDWを加えた。PCRサイクルは以下のように行った。95°C

30秒の後、95°C5秒-60°C34秒を35サイクル、Applied Biosystems 7500にて行った。

#### ・ Genomic PCR

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

#### ・ シーケンス解析

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

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

#### 遺伝子変異未知DBA患者の遺伝子コピー数解析

DBAで高頻度に変異報告のある遺伝子として、*RPL5*, *L11*, *L35A*, *S7*, *S10*, *S17*, *S19*, *S24*, *S26*の9遺伝子、また、DBAの原因としての重要度は未だ不明であるが、論文や学会等において変異報告のあった遺伝子、*RPL9*, *L19*, *L26*, *L28*, *L36*, *S15*, *S27A*の7遺伝子について遺伝子コピー数測定用のQ-PCRプライマーを設定した。弘前大学においてシーケンス解析の結果、変異未知であった検体について、上記の遺伝子のQ-遺伝子コピー数を測定した。その結果、31例中7例で特定の1遺伝子に対するプライマーセットすべてが他の遺伝子の増殖曲線のCt値から1サイクルの遅れを示した (Fig. 1)。つまりこれら1サイクル遅れた遺伝子は、その他の遺伝子 (2N) のコピー数の半分 (N) であることを示しており、片アレルの欠失が示された。7例の内訳は、*RPS17*欠失 (3例)、*RPS19*欠失 (2例)、*RPL5*欠失 (1例)、*RPL35A*欠失 (1例)であった。

#### *RPS19*遺伝子の遺伝子内相同組換え検体の検出

片アレル欠失検体の内、#24 (*RPS19*の欠失) については、1部のS19のプライマーセットは、正常の遺伝子コピー数を示した。そこで*RPS19*に対するQ-PCRプライマーを増やし、*RPS19*の遺伝子コピー数を詳細に調べた。その結果、*RPS19*の5'UTR領域 (S19-57, -58) およびintron3内部から3'UTR領域に設定したプライマー (S19-28, -62, -65) ではコピー数が正常値を示したのに対して、intron3の内部より上流に設定されたプライマー (S19-36,-24, -40, -44) では片アレルの欠失を示した (Fig. 2B)。このことから*RPS19*遺伝子の片方のアレルのintron3領域付近で小規模な欠失があることが考えられた。そこで、*RPS19*の5'UTRとintron3にプライマーを設定しgenomic PCRを行い、欠失領域の同定を試みた。その結果、#24検体では約7k塩基対の欠失が想定されるバンドが電気泳動上で認められた (Fig. 2C)。シーケンス解析の結果、5'UTRとintron3にある23塩基対の相同配列 (CGGTGGCTCACACCTGTAATCCCAGCA, nt:-1400から-1374およびnt: +5758から+5784) の間で分子内相同組換えが生じ、結果として7157塩基の欠失が同定された (Fig. 2D)。欠失した領域にはプロモーターおよびexon 123が含まれることから、このアレルは正常な*RPS19*タンパク質をコードしないと考えられた。

#### 欠失した患者の遺伝的素因の解析

欠失を示した6検体 (#3, #24, #60, #62, #71, #72) について、両親の欠失を同様にDBA同期qPCR法で調べた。その結果、すべての両親でDBA原因遺伝子の欠失は認められなかった。つまり、片アレルの欠失の場合は、家族性ではなく孤発性の変異タイプである可能性が示唆された。

### D. 考察

本研究によって、DBA31検体から効率的に7検体の片アレルの欠失を同定することが出来た。片アレルの欠失変異は、日本のDBA患者全体の約10%に含まれることが明らかとなった。

我々が開発した片アレル欠失検出方法は、1回の定量PCRで多数の遺伝子についてのコピー数解析が出来る方法であることから、操作面の簡便・迅速性を達成しただけでなく、解析面においてもQ-PCRの結果を目視するだけで遺伝子欠失を検出できるため、

解析のステップが非常に簡便となっている利点がある。実際に我々は、本研究で迅速に7例の片アレル欠失を同定することができた。

我々が同定した7例のDBAの原因遺伝子の片アレル欠失は、その多くがこれまでに報告のないものであった (*RPL5* (1例), *RPS17* (3例))。また、今回の解析では、*RPS17*の遺伝子異常が3例発見され、これまで欧米では少数派とされたが、興味深いことに日本ではむしろ高頻度で*RPS17*に変異があることが明らかになった。また、片アレル欠失を示した6検体に家族性は認められなかったことは、DBAの遺伝的素因を解析する上で有用な情報となることが示唆される。

#### E. 結論

日本のDBA患者で原因遺伝子の欠失解析を行った結果、DBAでは高頻度 (31例中7例) で原因遺伝子の片アレルの欠失が認められた。このことから、DBAの診断では、これまで行われてきたシーケンス解析に加えてコピー数解析を行うといった一連の遺伝子変異解析手順を踏むことでDBAの疾患同定率の向上が可能であることが示された。今後は、DBAの確定診断の一環で遺伝子コピー数解析を行うことでより多くのDBA患者の変異遺伝子を同定するが可能であると考えられる。また、遺伝子変異同定率が上昇することによって日本のDBAの遺伝子型と貧血・奇形等の表現型との相関がより詳しく解析することができるようになることや骨髄移植ドナーの選定の幅が広がることが考えられ、DBA患者の治療面においても、より一層の質の向上が期待できると考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, and Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012;119(10):2376-2384.

##### 2. 学会発表

- 1) Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Masumi A, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond Blackfan anemia. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

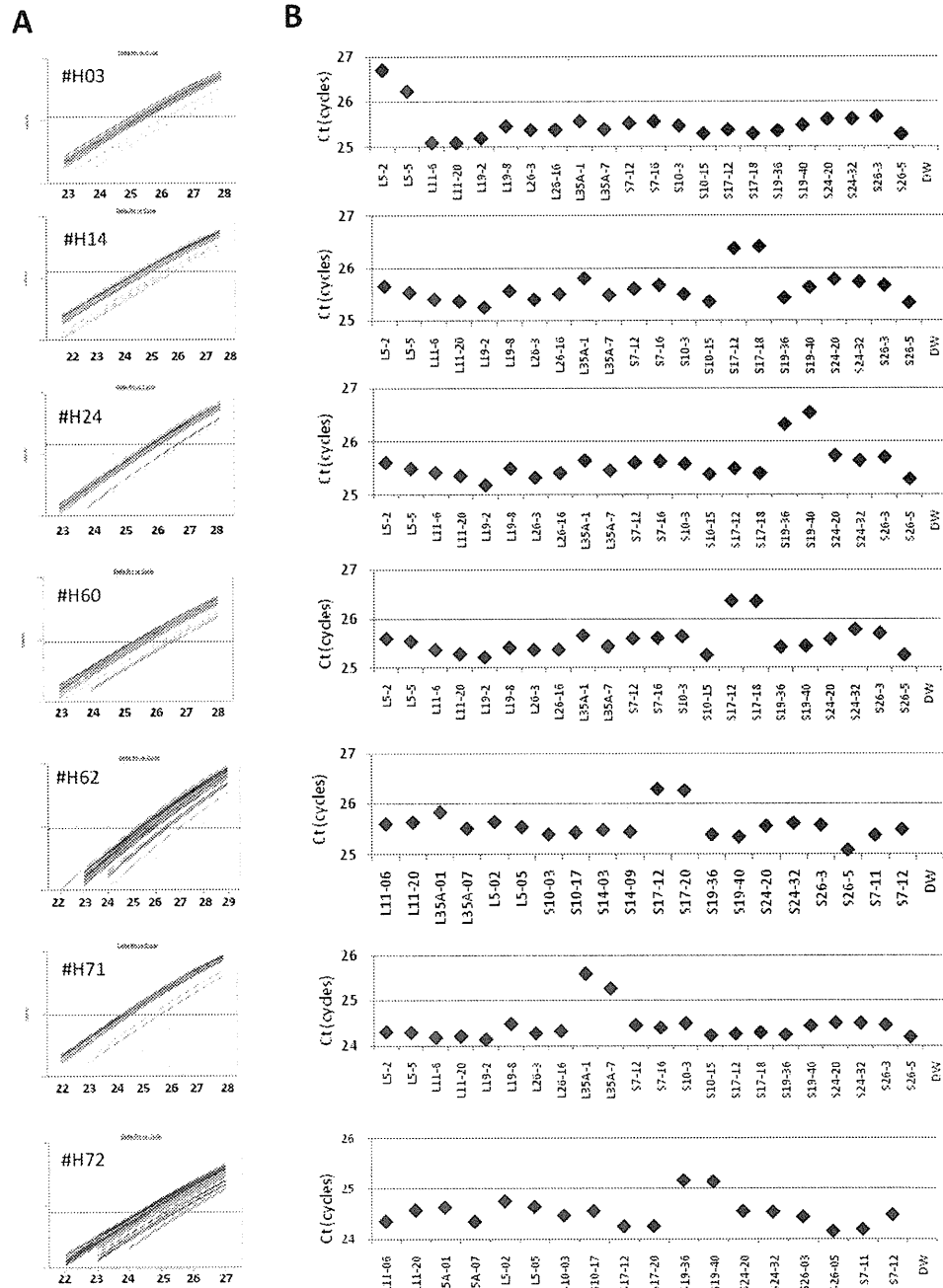
なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

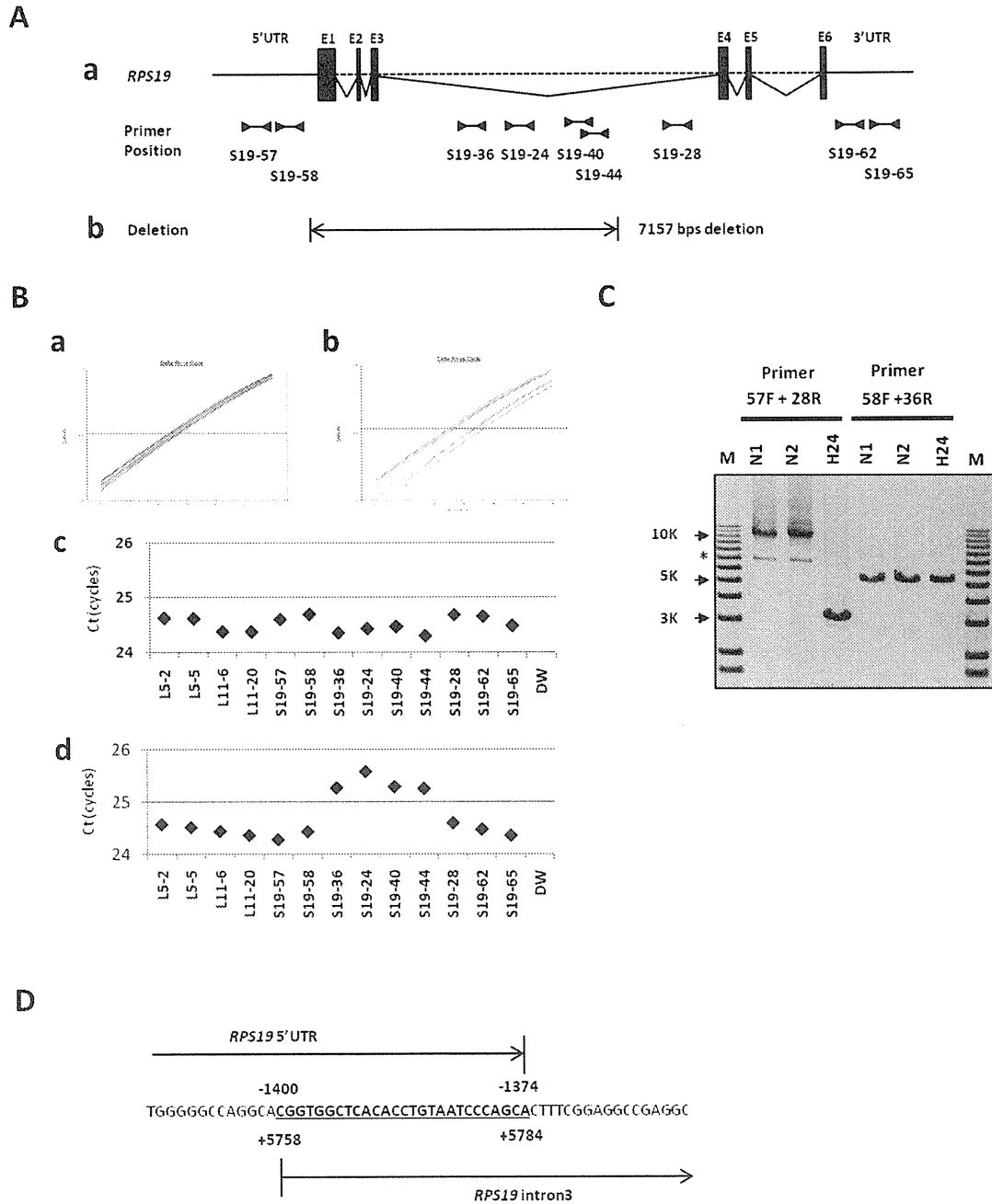
なし



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

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

Patient #H24 with a deletion in RPS19 gene



**Figure 2. RPS19**遺伝子内相同組換えの検出

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



先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

### DBAの診断法の開発（マーカー探索）

研究分担者 森尾友宏 東京医科歯科大学発生発達病態学分野 准教授  
研究協力者 倉光 球 国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員

研究要旨：先天性赤芽球癆(Diamond blackfan anemia (DBA))の原因遺伝子として *RPS19* などのリボソームタンパク質が知られる。近年 DBA の 50%の患者でこれらの遺伝子変異が明らかになってきたことから、DBA の遺伝子変異の同定を DBA の診断のマーカーの1つとして利用することが可能になった。今回、弘前大学のDBA 遺伝子バンクの検体を用いて、SNP アレイを行った。その結果、シーケンス解析では変異未知であった 31 例中 6 例でDBA の原因遺伝子の片アレル欠失が同定した。このことから、DBA 患者の確定診断のためにDBA 原因遺伝子のゲノムコピー数の解析（片アレル欠失の検出）は有用な診断マーカーとなることが示された。

#### A. 研究目的

先天性赤芽球癆(Diamond Blackfan Anemia (DBA))は、100万出生あたり約4人の頻度と非常に稀な貧血で確定診断が困難な疾患の1つである。DBAの原因遺伝子として、*RPS19*や*RPL5*, *RPL11*, *RPL35A*, *RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS24*, *RPS26*などのリボソームタンパク質をコードする遺伝子が近年知られるようになった。DBAの診断マーカーを見つけることは、DBAの診断を正確かつ迅速に行うことができ、患者のその後の治療法選択に多いに役立つと考えられる。欧米では、上記の原因遺伝子の変異を調べる事によって、DBAの約50%まで原因遺伝子の特定が出来るまでになっている。

現在シーケンス解析でDBA患者の変異同定が行われているが、DBAで希少報告である染色体転座などの片アレルの欠失患者が全体のどの程度含まれるかに関しては、これまで十分な情報がなかった。

我々は、弘前大学小児科（伊藤悦朗教授）で集められた日本のDBA患者ゲノムバンクを対象に、SNPアレイを行い、シーケンス解析では同定出来ないアレル欠失変異がDBA患者中にどの程度含まれるか検討を行った。

#### B. 研究方法

##### ・患者及びゲノムDNA

弘前大学小児科にて匿名化されたDBA患者の末梢血より抽出されたゲノムDNAを無作為に抽出し解析に用いた。用いた検体番号は、#3, #5, #14, #15, #21, #24, #26, #33, #36, #45, #50, #60, #61, #62, #63, #68, #69, #70, #71, #72, #76, #77, #83, #90, #91, #92, および#93の27検体。

##### ・SNPアレイ解析

GeneChip Human Mapping 250K Nsp array (Affymetrix社, Santa Clara, CA) を用いて標準プロトコルで解析した。マイクロアレイデータは、CNAGプログラムを使い解析した。

（倫理面への配慮）

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

#### C. 研究結果

##### SNPアレイ解析による片アレル欠失の同定

弘前大学のDBAゲノムバンクの変異未知の27検体についてSNPアレイで片アレル欠失の検出を試みた。その結果、6検体で染色体のコピー数の値が低下した領域があることが明らかとなり、遺伝子欠失が認められた。欠失領域を詳細に解析した結果、それぞれ

の検体の欠失領域には、DBAの原因遺伝子が含まれることが明らかとなった (Fig. 1およびTable 1)。6例の内訳は、*RPS17*欠失 (3例)、*RPS19*欠失 (1例)、*RPL5*欠失 (1例)、*RPL35A*欠失 (1例) であった。変異未知の27検体のうち6検体で片アレル欠失変異が認められたことから、変異未知の約22%、全体では約9%にアレル欠失が認められることが明らかとなった。また、DBAでこれまで報告されていない新規遺伝子の欠失変異は認められなかった。

#### D. 考察

本研究の結果、DBA患者では高頻度 (約10%) で片アレル欠失が認められることが明らかとなった。SNPアレイ解析で全ゲノムをターゲットに解析した結果、既知のDBA原因遺伝子のみでアレルの欠失が認められた。このことから、基本的には既知のDBA原因遺伝子をターゲットとして遺伝子コピー数を解析することで、片アレル欠失の同定に関して、ほぼ全体をカバーできると考えられた。

SNPアレイ解析は、CGHアレイや次世代シーケンサー解析に比べて比較的安価で行うことができる。変異未知の検体に対して、上記のような大規模解析を行うことに加えSNPアレイで一端変異のスクリーニングを行うことは、有意義であると示唆された。

#### E. 結論

本研究で、日本のDBA患者の遺伝子欠失をSNPアレイで解析した結果、DBAでは高頻度 (27例中6例) で片アレルの欠失が認められることが確認出来た。このことから、DBAの診断では、これまで行われてきたシーケンス解析に加えて、既知のDBA原因遺伝子のコピー数解析を行うといった一連の遺伝子変異解析手順を踏むことで、DBAの変異同定率および診断の確定率の向上が期待できると示された。確定診断がより明確に出来るようになることによって、DBA患者の治療面においても、より一層の質の向上が期待できると考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara

A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, and Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012;119(10):2376-2384.

##### 2. 学会発表

- 1) Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Masumi A, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond Blackfan anemia. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

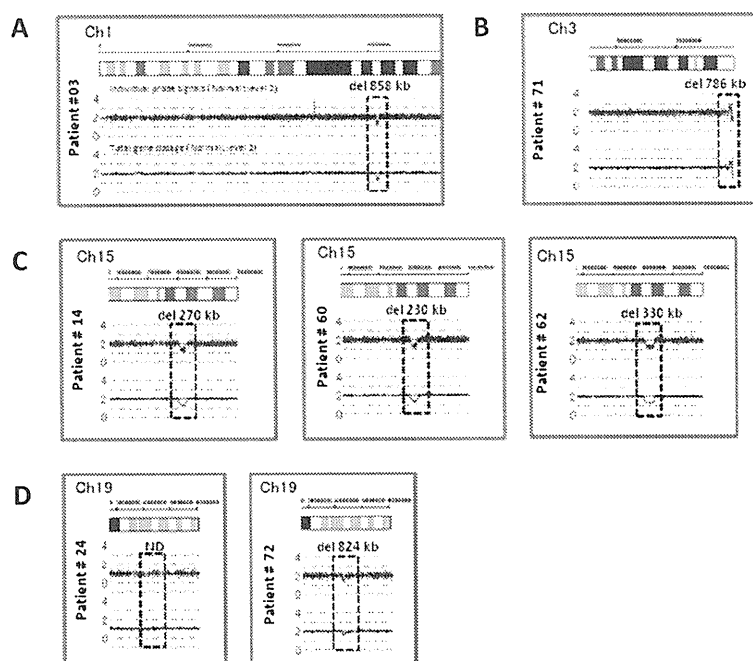
なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



**Figure 1.** Results of single nucleotide polymorphism genomic microarray (SNP-chip) analysis. Genomic DNA of 27 Japanese DBA patients with unknown mutations was examined using a SNP array. Six patients had large deletions in their chromosome (ch), which included one DBA responsible gene. (A) Patient #03 has a large deletion in ch1, (B) Patient #71 has a deletion in ch3, (C) Patients #14, #60, and #62 have deletions in ch15, and (D) Patient #72 has a deletion in ch19.

Patient No.	Large deletion (SNP array)	Deletion length	Mutation	Genes deleted
#3	<i>RPL5</i>	858 kb	whole allele loss	<i>EVI5, RPL5, FAM69A, MTF2, TMED3, CCDC18, DR1</i>
#14	<i>RPS17</i>	270 kb	whole allele loss	<i>RPS17, CPEB1, AP3B2, FSD2, WHDM, HOMER2, FAM103A1, C15orf40, BTBD1, TM63F1, HDGFR3, BNC1, SH3GL3, ADAMTSL3, ZSCAN2, SAND2, WDR73, NMB</i>
#60	<i>RPS17</i>	230 kb	whole allele loss	<i>RPS17, CPEB1, AP3B2, FSD2, WHDM, HOMER2, FAM103A1, C15orf40, BTBD1, TM63F1, HDGFR3, BNC1, SH3GL3, ADAMTSL3, ZSCAN2, SAND2, WDR73, NMB</i>
#62	<i>RPS17</i>	330 kb	whole allele loss	<i>RPS17, CPEB1, AP3B2, FSD2, WHDM, HOMER2, FAM103A1, C15orf40, BTBD1, TM63F1, HDGFR3, BNC1, SH3GL3, ADAMTSL3, ZSCAN2, SAND2, WDR73, NMB, SEC11A, ZNF592, ALPK3, SLC28A1, PDE5A</i>
#71	<i>RPL55A</i>	786 kb	whole allele loss	<i>BDH, FYT1D1, LRCH3, IQCG, RPL33A, LMLN, FAM137A</i>
#72	<i>RPS19</i>	824 kb	whole allele loss	<i>CEACAM5, CEACAM6, CEACAM3, LYPD4, DMR1C2, RPS19, CD79A, ARHGFF1, RABAC1, ATPLA3, GRIK5, ZNF574, POU2F2, DEDD2, ZNF528, GSK3A, ERF, CIC, PAFAH1B3, PRR19, TMEM145, MEGF8, CNFN, LIPE</i>

Table 1. Genes that were found to be deleted using SNP arrays

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

「DBA患者赤血球における還元型グルタチオン濃度上昇のメカニズム」

研究分担者 菅野 仁 東京女子医科大学遺伝子医療センター 准教授

研究要旨：昨年度 Diamond Blackfan 貧血（DBA）症例において赤血球還元型グルタチオン（GSH）がDBA患者で有意に高値であることを発見した。今年度はそのメカニズムを明らかにする目的で、DBA患者赤血球中のGSH生合成系、還元系、五炭糖リン酸経路およびグルタチオンペルオキシダーゼなど6種の酵素活性を検討した。その結果、GSHの増加は生合成系の亢進ではなく、五炭糖リン酸経路の活性化によるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）供給の増加がその要因と考えられた。DBA病態におけるリボソームストレスはp53活性化を促して赤芽球のアポトーシスを誘導すること、遊離ヘムによる細胞内活性酸素種の蓄積を起こすことが知られているが、五炭糖リン酸経路の活性化やグルタチオンペルオキシダーゼ活性の亢進は上記プロセスに対する特徴的な代謝変動であることが示唆された。

## A. 研究目的

DBAはリボソーム機能不全によって発症する先天性赤芽球癆であり、現在まで同定されている13種の原因遺伝子はすべてリボソーム蛋白質遺伝子である。しかし、網羅的な遺伝子検査にもかかわらず、変異が同定されて確定診断に至る症例は全体の50%程度に過ぎない。我々は昨年度、赤芽球系細胞における最も重要な抗酸化物質である赤血球還元型グルタチオン（GSH）がDBAの新規バイオマーカーであることを同定し、赤血球アデノシン・デアミナーゼ活性（eADA）とGSHを同時に検討することで、遺伝子変異が同定されている9家系11例のDBA症例のすべてにおいて生化学的にDBAが診断可能であることを示した。

今年度は、DBA赤血球におけるGSH濃度上昇のメカニズムを明らかにすることを目的として、DBA患者赤血球中のGSH生合成系、還元系、五炭糖リン酸経路およびグルタチオンペルオキシダーゼ（GPX）など6種の酵素活性を検討した。

## B. 研究方法

【対象】既にRPS19ないしRPS17遺伝子変異が同定されていて、GSH上昇を認めたDBA6症例および正常対照10例を対象にして、インフォームド・コンセント

を取得の上、末梢血を得た。

【方法】白血球・血小板・血漿を除去した精製赤血球から溶血液を作製し、以下のように赤血球GSH濃度および7種の酵素活性を測定した。

1) GSH生合成系： $\gamma$ グルタミルシステイン合成酵素（GCS）、グルタチオン合成酵素（GSH-S）

反応系Aではシステインとグルタミン、反応系Bでは $\gamma$ グルタミルシステインとグリシンをATP存在下で溶血液と30分間反応させた後、直ちに反応液をトリクロロ酢酸で除タンパクする。反応に用いられたATPから遊離したリン酸が除タンパク液中に生じるため、Fiske-Subbarow法で定量した。

2) GSH還元系：グルタチオン還元酵素（GR）

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）、酸化型グルタチオン（GSSG）存在下で溶血液を加え、NADPHの消費による340nmの吸光度減少を分光光度計で計測した。

3) 五炭糖リン酸経路：グルコース6-リン酸脱水素酵素（G6PD）、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素（6PGD）

NADP存在下で反応系Aにはグルコース-6-リン酸（G6P）と6-ホスホグルコン酸（6PGA）、反応系Bには6PGAのみを溶血液と反応させ、生じるNADPHによる340nmの吸光度増加を分光光度計で計測する。反応系Bで6PGD活性、反応系AとBの吸光度変化の差で

G6PD活性を測定した。

4) 過酸化水素除去反応：グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX)

tert-ブチルヒドロペルオキシドを基質としてGSHおよびNADPH存在下で溶血液を反応させて、NADPHの消費による340nmの吸光度減少を分光光度計で計測した。

5) アデノシンデアミナーゼ (ADA)

アデノシンを基質として溶血液を加えて265nmにおける吸光度減少により、活性を測定した。

6) 還元型グルタチオン (GSH)

溶血液にメタリン酸を加えて得られる除タンパク抽出液に、5,5'-di-thiobis (2-nitrobenzoic acid) を加え、412nmで定量した。

### C. 研究結果

6例のDBA症例、10例の正常対照に関する測定結果を下表に示す。(mean±SE)

	Control	DBA cases
ADA	1.31±0.20	2.65±0.47*
GSH	79.1±3.8	97.3±4.6*
GCS	1.48±0.05	1.49±0.12
GSH-S	0.75±0.03	0.68±0.06
GR	5.61±0.22	5.24±0.68
GPX	40.4±1.9	50.1±1.4*
G6PD	9.12±0.38	12.0±1.0*
6PGD	10.1±0.4	13.4±1.0*

IU/g Hb (ADA,GCS,GSH-S,GR,GPX,G6PD,6PGD)

mg/dL RBC (GSH)

n=10 (control),6 (DBA cases)

\* significantly increased in DBA cases

(p<0.01, paired T-test)

GSHのde novo生合成経路を触媒する2種の酵素であるGCSおよびGSH-S活性はDBA症例と正常対照との間で有意差を認めなかった。一方、五炭糖リン酸経路を触媒する2種の酵素であるG6PDと6PGD、および過酸化水素除去反応を触媒するGPXの活性は有意に亢進していた。GSSGをGSHに還元するGR活性に関しては有意な上昇を認めなかった。

### D. 考察

昨年度、我々はGSHがDBAの新規バイオマーカーであることを明らかにし、eADA・GSHの同時測定が

DBAの生化学的診断精度を向上し、RPS19およびRPS17遺伝子変異により確定診断されたDBA症例11例を正確に診断出来ることを明らかにした。

GSHは、ATP依存性の2段階反応により生合成され、その初発段階は、グルタミンとシステインからGCSによりγグルタミルシステインが、次の段階は、γグルタミルシステインとグリシンからGSH-SによりGSHが生じる。GSHは、GPXによる過酸化水素除去反応に共役してGSSGとなり、GSSGはGR反応により再びGSHとなる。GR反応の補酵素がNADPHであり、五炭糖リン酸経路のG6PDおよび6PGDによって供給される。

DBA患者赤血球のグルタチオン代謝系・五炭糖リン酸経路の諸酵素活性を検討した今回の研究結果により、DBA患者赤血球中のG6PD、6PGDおよびGPX活性が有意に上昇していることが明らかになった。

DBAは、リボソームサブユニット蛋白質遺伝子変異によって生じる赤芽球におけるp53活性化および遊離ヘムによる細胞内活性酸素種 (ROS) の増加の二つが主要因と考えられている。リボソーム合成障害によって生じる余剰のサブユニット構成蛋白RPL11が核内に移行し、p53の制御因子であるユビキチンリガーゼMDM2を抑制することでp53の活性化が起こる。また赤血球の主要な蛋白質であるグロビンの翻訳障害により、グロビンとヘムの合成不均衡が起こり、余剰となったヘム由来のROSが細胞内に蓄積することが明らかになっている。

p53活性化が起こると解糖系が抑制されることが知られている。p53により発現誘導される遺伝子のひとつにTIGER (TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator) があり、TIGERの発現により細胞内のフルクトース2,6-二リン酸レベルが低下し、解糖系が抑制されることが示された。また、p53はミトコンドリアでの呼吸に必要なシトクロムc酸化酵素複合体の重要な制御因子であるSCO2 (synthesis of cytochrome c oxidase2) の発現を活性化し、ミトコンドリアでの酸素消費量を増加することで解糖系が抑制される。解糖系が抑制することにより、グルコース代謝が五炭糖リン酸経路にシフトし、G6PD・6PGDの活性が亢進して、赤血球内GSH濃度の上昇が起こったことが示唆された。同時にGPX活性亢進はp53によるGPX遺伝子転写活性化、およびROSに応答した生体反応の

両方に依ることが示唆された。

の進歩—遺伝子医療. 東京女子医科大学雑誌.  
2011;81:349-355.

## E. 結論

GSHの増加は生合成系の亢進ではなく、五炭糖リン酸経路の活性化がその要因と考えられた。五炭糖リン酸経路の活性化やGPX活性の亢進はDBA赤芽球で生じるp53活性化によって誘導される特徴的な代謝変動であることが示唆された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Kiyotani C, Maebayashi K, Sakauchi M, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Okada Y. High-dose chemotherapy followed by autologous and allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for recurrent disseminated trilateral retinoblastoma. *Childs Nerv Syst.* 2011;27:1019-24.
- 2) Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Funase M, Murayama T, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Okada Y. Shared molecular targets in pediatric gliomas and ependymomas. *Pediatric Blood & Cancer* 2011;57:1117-23.
- 3) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012;119(10):2376-2384.
- 4) Kanno H, Iribe Y, Aoki T, Ogura H, Fujii H. Pyruvate supplementation enhances vascular endothelial growth factor production of bone marrow-derived mononuclear cells. *Jpn J Transf Cell Ther.* In press, 2012.
- 5) 斎藤加代子, 松尾真理, 菅野仁, 浦野真理, 相楽有規子. 小児科領域における研究と治療

### 2. 学会発表

- 1) 菅野仁, 入部雄司, 内山智貴, 青木貴子, 小倉浩美, 大賀正一, 伊藤悦朗, 藤井寿一. ダイヤモンド・ブラックファン貧血の新規バイオマーカー同定. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14日. 名古屋.
- 2) 入部雄司, 青木貴子, 山本俊至, 古川徹, 三谷昌平, 土岐力, 大賀正一, 伊藤悦朗, 小倉浩美, 藤井寿一, 菅野仁. 次世代シーケンシングデータからのDiamond - Blackfan貧血関連遺伝子の探索. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14日. 名古屋.
- 3) 菅野仁. 先天性溶血性貧血. 教育講演15. 第56回日本未熟児新生児学会学術集会. 2011年11月15日. 東京.
- 4) 内山智貴, 菅野仁, 石谷健, 相崎潤子, 濱田貴子, 藤井寿一, 松井英雄, 斎藤加代子. ドセタキセルによる重症好中球減少症の発症に関わる遺伝子多型探索. 遺伝医学合同学術集会・第18回日本遺伝子診療学会大会. 2011年6月18日. 京都.
- 5) 内山智貴, 菅野仁, 石谷健, 相崎潤子, 青木貴子, 藤井寿一, 松井英雄, 鎌谷直之, 斎藤加代子. ドセタキセルによる薬物動態と重症好中球減少症の発症に関わる遺伝子多型探索. 日本人類遺伝学会第56回大会. 2011年11月10日. 千葉.

## 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
3. その他  
なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

◎は、本研究によることが明記されている論文

○は、本研究に関連する論文

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
◎伊藤悦朗, 小島勢二, 大賀正一, 小原明	VII 先天性骨髄不全症 4. Diamond-Blackfan貧血/診療の参照ガイド	「難治性貧血の診療ガイド」編集委員会	難治性貧血の診療ガイド 特発性造血障害の病態・診断・治療の最新動向	南江堂	東京	2011	220-227
大賀正一	血液・腫瘍性貧血 鉄欠乏性貧血	大関武彦	今日の小児治療指針第15版	医学書院	東京	2011 (印刷中)	
菅野 仁	先天性溶血性貧血	日本血液学会	血液専門医テキスト	南江堂	東京	2011	154-158

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
◎Kuramitsu M, Sata-Otsubo A, Morio T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I.	Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia.	Blood	119(10)	2376-2384	2012



©Kamio T, Ito E, Ohara S, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Mutamatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikura A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S.	Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group.	Haematologica	96(6)	814-9	2011
○Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Park MJ, Kanno Y, Tanaka T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T.	Identification of <i>TRIB1</i> R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia.	Blood	119(11)	2608-2611	2012
○Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuki 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	117(10)	2887-90	2011
Kato K, Yoshimi A, Ito E, Oki K, Hara J, Nagatoshi Y, Kikuchi A, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H, Takanashi M, Isoyama K, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network.	Cord blood transplantation from unrelated donors for children with acute lymphoblastic leukemia in Japan. the impact of methotrexate on clinical outcomes.	Biol Blood Marrow Transplant.	17(12)	1814-21	2011
Kudo K, Terui K, Sasaki S, Kamio T, Sato T, Ito E.	CD7-positive acute myelomonocytic leukemia with tridomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in two adolescents.	Leuk Res.	35(9)	e167-8	2011

Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusahara K, Hara T.	Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection.	Pediatr Development Pathol.			2011 in press
Kiatjima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T.	Serum Prohepcidin Concentrations at Birth and 1 Month After Birth in Premature Infants.	Pediatric Blood & Cancer	56(2)	267-72	2011
Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Kiyotani C, Maebayashi K, Sakauchi M, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Okada Y.	High-dose chemotherapy followed by autologous and allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for recurrent disseminated trilateral retinoblastoma.	Childs Nerv Syst.	27	1019-1024	2011
Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Funase M, Murayama T, Osawa M, Fujii H, Kubo O, and Okada Y.	Shared Molecular Targets in Pediatric Gliomas and Ependymomas	Pediatric Blood & Cancer	57	1117-1123	2011
Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, Hara T.	Genetic variation of vascular endothelial growth factor pathway dose not correlate with the severity of retinopathy of prematurity.	J Perinatol.			2011 (in press)
Kanno H, Iribe Y, Aoki T, Ogura H, and Fujii H	Pyruvate supplementation enhances vascular endothelial growth factor production by bone marrow-derived mononuclear cells	Jpn J Transf Cell Ther.	58(1)		2012
濱麻人, 小島勢二	小児骨髄不全の診断と治療のポイント	血液内科	63(2)	157-165	2011
北島順子, 金城唯宗, 大賀正一, 落合正行, 井上晋介, 楠田剛, 井原健二, 原寿郎	新生児における鉄恒常性とヘプシジン	産婦人科新生児血液学会雑誌	20	103-111	2011
斎藤加代子	小児科領域における研究と治療の進歩 - 遺伝子医療	東京女子医科大学雑誌	81	349-355	2011

#### IV. 研究成果の刊行物・別冊

## Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia

Madoka Kuramitsu,<sup>1</sup> Aiko Sato-Otsubo,<sup>2</sup> Tomohiro Morio,<sup>3</sup> Masatoshi Takagi,<sup>3</sup> Tsutomu Toki,<sup>4</sup> Kiminori Terui,<sup>4</sup> RuNan Wang,<sup>4</sup> Hitoshi Kanno,<sup>5</sup> Shouichi Ohga,<sup>6</sup> Akira Ohara,<sup>7</sup> Seiji Kojima,<sup>8</sup> Toshiyuki Kitoh,<sup>9</sup> Kumiko Goi,<sup>10</sup> Kazuko Kudo,<sup>11</sup> Tadashi Matsubayashi,<sup>12</sup> Nobuo Mizue,<sup>13</sup> Michio Ozeki,<sup>14</sup> Atsuko Masumi,<sup>1</sup> Haruka Momose,<sup>1</sup> Kazuya Takizawa,<sup>1</sup> Takuo Mizukami,<sup>1</sup> Kazunari Yamaguchi,<sup>1</sup> Seishi Ogawa,<sup>2</sup> Etsuro Ito,<sup>4</sup> and Isao Hamaguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Safety Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; <sup>2</sup>Cancer Genomics Project, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; <sup>3</sup>Department of Pediatrics and Developmental Biology, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan; <sup>4</sup>Department of Pediatrics, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Hirosaki, Japan; <sup>5</sup>Department of Transfusion Medicine and Cell Processing, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan; <sup>6</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan; <sup>7</sup>First Department of Pediatrics, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan; <sup>8</sup>Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; <sup>9</sup>Department of Hematology/Oncology, Shiga Medical Center for Children, Shiga, Japan; <sup>10</sup>Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan; <sup>11</sup>Division of Hematology and Oncology, Shizuoka Children's Hospital, Shizuoka, Japan; <sup>12</sup>Department of Pediatrics, Seirei Hamamatsu General Hospital, Shizuoka, Japan; <sup>13</sup>Department of Pediatrics, Kushiro City General Hospital, Hokkaido, Japan; and <sup>14</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Gifu University, Gifu, Japan

**Fifty percent of Diamond-Blackfan anemia (DBA) patients possess mutations in genes coding for ribosomal proteins (RPs). To identify new mutations, we investigated large deletions in the RP genes *RPL5*, *RPL11*, *RPL35A*, *RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, and *RPS26*. We developed an easy method based on quantitative-PCR in which the threshold cycle correlates to gene copy number. Using this approach, we were able to**

**diagnose 7 of 27 Japanese patients (25.9%) possessing mutations that were not detected by sequencing. Among these large deletions, similar results were obtained with 6 of 7 patients screened with a single nucleotide polymorphism array. We found an extensive intragenic deletion in *RPS19*, including exons 1-3. We also found 1 proband with an *RPL5* deletion, 1 patient with an *RPL35A* deletion, 3 with *RPS17* deletions, and 1 with an *RPS19***

**deletion. In particular, the large deletions in the *RPL5* and *RPS17* alleles are novel. All patients with a large deletion had a growth retardation phenotype. Our data suggest that large deletions in RP genes comprise a sizable fraction of DBA patients in Japan. In addition, our novel approach may become a useful tool for screening gene copy numbers of known DBA genes. (*Blood*. 2012;119(10): 2376-2384)**

### Introduction

Diamond-Blackfan anemia (DBA; MIN# 105650) is a rare congenital anemia that belongs to the inherited BM failure syndromes, generally presenting in the first year of life. Patients typically present with a decreased number of erythroid progenitors in their BM.<sup>1</sup> A main feature of the disease is red cell aplasia, but approximately half of patients show growth retardation and congenital malformations in the craniofacial, upper limb, cardiac, and urinary systems. Predisposition to cancer, in particular acute myeloid leukemia and osteogenic sarcoma, is also characteristic of the disease.<sup>2</sup>

Mutations in the *RPS19* gene were first reported in 25% of DBA patients by Draptchinskaia et al in 1999.<sup>3</sup> Since that initial finding, many genes that encode large (RPL) or small (RPS) ribosomal subunit proteins were found to be mutated in DBA patients, including *RPL5* (approximately 21%), *RPL11* (approximately 9.3%), *RPL35A* (3.5%), *RPS7* (1%), *RPS10* (6.4%), *RPS17* (1%), *RPS24* (2%), and *RPS26* (2.6%).<sup>4-7</sup> To date, approximately half of the DBA patients analyzed have had a mutation in one of these genes. Konno et al screened 49 Japanese patients and found that 30% (12 of 49) carried mutations.<sup>8</sup> In addition, our data showed that 22 of 68 DBA patients (32.4%) harbored a mutation in ribosomal protein (RP) genes (T.T., K.T., R.W., and E.I., unpub-

lished observation, April 16, 2011). These abnormalities of RP genes cause defects in ribosomal RNA processing, formation of either the large or small ribosome subunit, and decreased levels of polysome formation,<sup>4-6,9-12</sup> which is thought to be one of the mechanisms for impairment of erythroid lineage differentiation.

Although sequence analyses of genes responsible for DBA are well established and have been used to identify new mutations, it is estimated that approximately half of the mutations remain to be determined. Because of the difficulty of investigating whole allele deletions, there have been few reports regarding allelic loss in DBA, and they have only been reported for *RPS19* and *RPL35A*.<sup>3,6,13</sup> However, a certain percentage of DBA patients are thought to have a large deletion in RP genes. Therefore, a detailed analysis of allelic loss mutations should be conducted to determine other RP genes that might be responsible for DBA.

In the present study, we investigated large deletions using our novel approach for gene copy number variation analysis based on quantitative-PCR and a single nucleotide polymorphism (SNP) array. We screened Japanese DBA patients and found 7 patients with a large deletion in an allele in *RPL5*, *RPL35A*, *RPS17*, or *RPS19*. Interestingly, all of these patients with a large deletion had a phenotype of growth retardation, including short stature and

Submitted July 24, 2011; accepted November 15, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, January 18, 2012; DOI 10.1182/blood-2011-07-368662.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology