

201128034B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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

平成 22 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 24（2012）年 3 月

# 目 次

I. 平成 21～23 年度構成員名簿	1
II. 総合研究報告	
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	3
研究代表者 伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科小児科学・教授) (参照 1) 「平成 21 年度 総括研究報告書」	17
(参照 2) 「平成 22 年度 総括研究報告書」	25
(参照 3) 「平成 23 年度 総括研究報告書」	39
III. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性造血障害に関する調査研究班 特発性造血障害疾患の診療参照ガイド 平成 22 年度改訂版 Diamond Blackfan 貧血 診療の参照ガイド (平成 22 年度版)	49
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
V. 研究成果の刊行物・別冊	75

I . 平成 21～23 年度  
構成員名簿

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

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班  
構成員名簿

区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	伊藤 悦朗	弘前大学大学院医学研究科小児科学	教授
研究分担者	照井 君典	弘前大学医学部附属病院小児科	講師
	小島 勢二	名古屋大学大学院医学系研究科小児科学	教授
	小原 明	東邦大学医療センター大森病院輸血部	教授
	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
	浜口 功	国立感染症研究所血液・安全性研究部	部長
	森尾 友宏	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野	准教授
研究協力者	菅野 仁	東京女子医科大学遺伝子医療センター	准教授
	土岐 力	弘前大学大学院医学研究科小児科学	講師
	倉光 球	国立感染症研究所血液・安全性研究部	研究員

## Ⅱ. 総合研究報告

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

研究代表者 伊藤 悦朗 弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授

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（RP）遺伝子が知られる。海外では、約 50% の DBA 患者に RP 遺伝子の変異が認められているが、本邦では、原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなかった。我々は、これまでに 76 家系（83 例）の DBA を解析し、21 家系（23 例）（27.6%）に RP 遺伝子の変異を検出した。欧米に比して本邦における RP 遺伝子の変異頻度は低く、約 70% の症例では、原因遺伝子が不明であることが明らかになった。そこで、ダイレクト・シーケンス法では検出できない片アレルの欠失を迅速・簡便に検出することができる DBA の遺伝子コピー数解析法（DBA 同期的 qPCR 法）を開発し、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、SNP アレイで欠失を確認した。これらの結果から、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が有用な診断マーカーとなることが示された。我々は、DBA 症例において赤血球還元型グルタチオン（GSH）が有意に高値であることを発見し、DBA のバイオマーカーとして有用であることを見出した。さらに、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であることが明らかになった。平成 21 年度に行った一次疫学調査の結果、132 例の DBA 症例の報告があった。現在、一次調査で把握された症例を対象に二次調査と遺伝子解析が進行中である。

研究分担者氏名

照井君典 弘前大学医学部附属病院講師  
小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科教授  
小原 明 東邦大学医療センター大森病院教授  
大賀正一 九州大学大学院医学研究院教授  
浜口 功 国立感染症研究所部長  
森尾友宏 東京医科歯科大学准教授  
菅野 仁 東京女子医科大学准教授

研究協力者氏名

土岐 力 弘前大学大学院医学研究科講師  
倉光 球 国立感染症研究所研究員

A. 研究目的

Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。

治療は副腎皮質ステロイドが第一選択であるが、ステロイド依存や輸血依存症例が全体の約 40% 存在する。難治例には造血幹細胞移植（HSCT）が行われている。原因遺伝子として、8 種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子が同定されている。海外では、約 50% の DBA 患者に RP 遺伝子の変異が認められている。家族内に発端者と同一の遺伝子異常をもつ貧血のない軽症例が存在する。本症が悪性疾患を合併しやすいことから、造血幹細胞移植のドナーを選択する上で軽症例の診断は重要課題になっている。しかし、本邦では原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなく、家族の解析もほとんど行われていなかった。軽症例も含めた DBA の診断基準の作成は海外でも検討が始まったばかりであり、我が国でも利用できるような診断基準は存在しない。本研究の目的は、DBA の

診断基準を作成し、それに基づいた家族内の軽症例をも含む包括的な疾患登録を行い、本症の全貌を明らかにすることである。中央診断を伴う登録システムを確立することで、我が国における疫学を明らかにすることができると期待できる。さらに、原因遺伝子の解析と疾患特異的なバイオマーカーの検索を行い、病態解明とともに精度の高い診断を目指す。80 個の RP 遺伝子をすべて解析し、新規原因遺伝子を同定する。

また、平成 21 年度に行った一次調査で把握された症例を対象に二次調査、さらに遺伝子解析を行う。

## B. 研究方法

### 1) 疾患登録システムの確立

日本小児血液学会の疾患登録システムの中で DBA の登録システムを立ち上げ、これを用いてオンラインによる登録ができるようにした。オンライン登録ができない場合は、FAX による登録も受け付けた。中央診断は末梢血や骨髄塗抹標本を用いて主に名古屋大学で行い、遺伝子解析は弘前大学、国立感染研究所と東京女子医大で行った。

### 2) 遺伝子解析

これまでに弘前大学小児科が全国から収集した 76 家系 (83 例) の臨床検体の遺伝子解析を行った。

a) 既知の遺伝子解析: 末梢血から DNA を抽出し、昨年と同様に DBA で遺伝子変異が報告されている 8 遺伝子 (*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPS10*, *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。最初に、High resolution melt analysis (HRM) 法で遺伝子変異の有無をスクリーニングし、変異陽性と判定された検体をダイレクト・シーケンス法で解析した。

b) DBA の遺伝子コピー数解析法 (DBA 同期的 qPCR 法): 遺伝子上の複数箇所に、同一条件で増幅反応ができる PCR プライマーを設定した。もし、大きな欠失が存在し、N の状態になっていると正常の 2N に比べ DNA 量が半分になっているため、2N と同じ増幅を得るのに PCR の反応回数が 1 回多く必要になる。それぞれの RP 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定量的 PCR (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。

c) 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。

d) 80 個の RP 遺伝子の網羅的解析: SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムにより RP 遺伝子 80 種の領域を濃縮し、次世代シーケンサー (アプライドバイオシステム社ソリッドシステム) を用い、網羅的な解析を行った。

### 3) DBA 診断のバイオマーカーの探索

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。

a) 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。

b) 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。

c) 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。

d) 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、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。

e) 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。

f) 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。

#### 4) 診断基準の作成

上記の解析結果と臨床情報をもとに、診断基準を作成した。診断基準の立案には、日本小児血液学会再生不良性委員会の有力メンバーである小原と大賀が担当した。また、日本小児血液学会がこれまでに収集した DBA の疫学データも解析し、診断基準の立案に役立てる。

#### 5) 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)

本研究班の研究では、治療介入を行わない疫学観察研究として実施する。小児血液学会会員 236 施設を対象にした全例登録 (疾患登録事業) は、前年診断症例を対象に Web 登録にて実施され、およそ診断から 1 年経過した段階で二次調査 (再不貧 2005 研究・MDS2006 研究) を実施した。構築されるデータベースには小児期発症の造血障害全般を網羅し、DBA 症例に限定はしない。

#### 6) 二次アンケート調査

全国の小児科専門医研修施設 (520 施設) および小児血液学会評議員 (150 名) を対象に、2000 年 1 月以降に把握された症例について、一次疫学調査を行った。平成 23 年度には、把握された症例についてさらに臨床症状、検査所見、治療、予後を含む二次アンケート調査を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種

倫理指針に準拠し、弘前大学、東京女子医大、国立感染症研究所、東京大学および東京医科歯科大学の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。

中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得、患者及び患者保護者の同意を取得した後に行った。

二次疫学調査は、中心となる弘前大学と九州大学の倫理委員会の審査・承認を受けた上で行った。

### C. 研究結果

#### 1) 疾患登録システムの確立

平成 21 年度は、中央診断を伴う日本小児血液学会の DBA 登録システムを確立し、登録を開始した。レビュー開始から 31 ヶ月間で 500 例がレビューされた。レビュー結果は、AA が 246 例、MDS が 53 例 (先天性骨髄不全症候群 (CBFS) 4 例を含む)、JMML が 45 例、CBFS が 45 例、急性白血病が 23 例、その他 137 例であった。CBFS 45 例の中に DBA が 11 例含まれていた。DBA と診断された症例については、弘前大学小児科に遺伝子解析が依頼され、2 例で RP 遺伝子の変異が確認された。

日本小児血液学会疾患登録や日本小児血液学会再生不良性貧血委員会による後方視的調査から、日本において臨床的に発見される DBA の発症数は年間 13 例であると推定された。しかし、これらの情報はいずれも後方視的調査によるものであり、診断の正確性や症例の把握率に関しては不十分なため、中央診断を行った上での前方視的登録による実態把握が不可欠であると考えられた。

#### 2) 遺伝子解析

a) 既知の DBA 遺伝子の塩基配列の解析 : 本研究で解析した症例は 76 家系 (83 例) となった。DBA で遺伝子変異が報告されている 8 遺伝子 (*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPS10*, *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 HRM 解析とダイレクト・シーケンシング法で解析した。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 2 つは新しい遺伝子変異であった。*RPL5* 変異は 6 例、*RPL11* 変異は 4 例、*RPS17*, *RPS10* お



よび *RPS26* 変異はそれぞれ 1 例で検出され、すべて新規の変異であった。*RPS19*, *RPL5* と *RPL11* の遺伝子変異の頻度は、それぞれ 10.5%、7.9% および 5.3% であった。以上、本邦における DBA の発端者 76 例中 21 例 (27.6%) 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、約 70% の症例では原因遺伝子が不明であることが明らかになった。

b) 遺伝子変異未知 DBA 患者の遺伝子コピー数解析: DBA で高頻度に変異の報告のある遺伝子として、*RPL5*, *L11*, *L35A*, *S7*, *S10*, *S17*, *S19*, *S24*, *S26* の 9 遺伝子、また、DBA の原因としての重要度は未だ不明であるが論文や学会等において変異報告のあった遺伝子、*RPL9*, *L19*, *L26*, *L28*, *L36*, *S15*, *S27A* の 7 遺伝子について遺伝子コピー数測定用の Q-PCR プライマーを設定した。弘前大学においてシーケンス解析の結果、変異が同定されなかった検体を用い、上記の遺伝子について Q-PCR で遺伝子コピー数を測定した。その結果、31 例中 7 例で特定の 1 遺伝子に対するプライマーセットすべてが他の遺伝子の増殖曲線の Ct 値から 1 サイクルの遅れを示した (図 1)。つまり、これら 1 サイクル遅れた遺伝子は、その他の遺伝子 (2N) のコピー数の半分 (N) であることを示しており、片アレルの欠失が起きていることが示された (Kuramitsu et al. Blood 2012)。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。

c) SNP アレイによる片アレル欠失の解析: 弘前大学においてシーケンス解析の結果、変異が同定されなかった 31 検体を用いて SNP アレイ (Affymetrix Gene Chip) と CNAG プログラムで遺伝子コピー数を測定した。その結果、31 例中 6 例で RP 遺伝子の片アレル欠損が確認された (図 2)。これらは Q-PCR の結果と一致していたが、Q-PCR 法で検出された *RPS19* 遺伝子の欠失 (#24) は検出されなかった。これは、SNP プロブが欠失領域に存在しないためであった。#24 については、PCR 法とシーケンス解析の結果、*RPS19* 遺伝子の欠失が確認された。

d) 80 個の RP 遺伝子の網羅的解析: 弘前大学においてシーケンス解析の結果、変異が同定されな

かった 11 検体について解析を行った。その内の 1 例に *RPL28* 遺伝子変異が見出された。

### 3) DBA のバイオマーカーの検索

9 家系 11 例の DBA 症例、非罹患両親・同胞 11 名について、eADA と GSH を同時に測定し、平均を比較検討したところ、eADA は患者群で  $3.57 \pm 1.53$  (IU/gHb, M $\pm$ SD)、対照群で  $1.02 \pm 0.26$ 、GSH は患者群で  $103 \pm 18$  (mg/dl RBC, M $\pm$ SD)、対照群で  $70.0 \pm 9.7$  とどちらも有意に患者群で高値を示した。患者 10 例において eADA は 9 例で基準値を超えて高く、また、GSH は 8 例で基準値以上であったが、eADA・GSH の同時測定でどちらも基準値内の例は 1 例も認めないことから、この 2 つの生化学的バイオマーカーの同時測定は、DBA 診断に極めて有用であることが示唆された。

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。

### 4) 小児期造血障害疾患登録による先天性赤芽球癆の疫学データベース

DBA 症例は、5 年間で 65 例登録された。これは、14 歳以下の小児人口 17,294 千人から罹患率を推定すると、14 歳以下小児人口 10 万人に対して 0.32 (95%CI; 0.27-0.37) と推定される。日本全国で年間 13 例ほどの新規診断症例が発生していることが予想された。今後も小児血液学会会員への診断基準啓発や遺伝子診断の開発により症例が掘り起こされる可能性がある。

### 5) 二次アンケート調査

平成 21 年度に行った一次疫学調査の結果、132 例の DBA 症例 (2000 年 1 月以降に把握された症例) の報告があった。平成 23 年度には、弘前大学と九州大学の倫理委員会の承認が得られ、二次調査を開始した。

#### D. 考察

DBA は、軽症例から最重症例まで広範囲な病像を示すことから、臨床所見のみで診断することは容易ではない。診断は各施設に任されていたが、必ずしも正確な診断が行われていなかった。平成 21 年度は、中央診断を伴う DBA 登録システムを立ち上げ、登録を開始した。これにより、本邦における新規発症例の正確な把握が可能となり、本症の全貌を明らかにするための大きな一歩となった。全国レベルでのスクリーニングから確定診断に至るシステムの整備が進んだことで、発症頻度をはじめ原因遺伝子、病型分布などの疫学事項を高い精度で把握することが可能となり、その社会的意義はきわめて高いと思われる。

近年、DBA で RP 遺伝子に変異が多数同定され、欧米では約半数で遺伝子変異が明らかにされるようになった。このことから、これまで DBA の診断は主に臨床像から判断されてきたが、遺伝子変異解析によって原因遺伝子を同定することが確定診断の 1 つの診断マーカーとなりつつある。しかしながら日本では、既知遺伝子変異の同定率は約 30% であることから、変異同定率の向上が期待された。DBA 遺伝子の片アレル欠失は遺伝子転座の解析や CGH アレイ解析などにより、これまで稀に報告があったものの、これらの解析方法は、操作性やコスト面において多検体を処理するには不向きであると考えられる。このため、これまで DBA で片アレル欠失のまとまった解析はされてこなかった。

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

我々が同定した 7 例の DBA の原因遺伝子の片アレル欠失は、その多くがこれまでに報告のないものであった (*RPL5* (1 例), *RPS17* (3 例))。また、今回の解析では、*RPS17* の遺伝子異常が 3

例発見され、これまで欧米では少数派とされていたが、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。

本邦の DBA 患者の RP 遺伝子の頻度は、片アレルの欠失を含めると 76 家系中 28 例 (36.8%) となった。しかし、欧米の約 50% よりもまだ低い傾向がある。特に、本邦では *RPS19* 遺伝子変異の頻度は大欠失を加えても 13.2% と欧米の約 25% に比べて低く、このことが RP 遺伝子変異全体の頻度を下げている大きな要因と考えられた。一方、これまで世界で 3 例しか報告のなかった *RPS17* 異常が 4 例 (5.3%) も見られた。DBA の原因遺伝子の頻度に民族間の差がある可能性が示唆される。

我が国の DBA はまだ 60% が原因遺伝子不明である。遺伝子変異の検出できなかった 11 例の検体で、80 種類の RP 遺伝子をすべて次世代シーケンサーで解析したが、遺伝子変異が見つかったのは 1 例のみであった。今後、新規原因遺伝子を同定するためには、次世代シーケンサーを用い、全エクソンの網羅的な解析を行う必要があると考えられる。効率的に研究を行うために、「稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究」班 (小島班) と協力してエクソーム解析を行う計画予定である。

患者の約半数が何らかの身体的異常を合併しており、全体としてはこれまでの報告とほぼ同様の頻度であった。しかし、*RPS19* あるいは *RPL5* の変異をもつ患者の全例で何らかの身体的異常がみられ、身体的異常を高率に合併する変異であることが示唆された。拇指の異常を認めた 6 例全例が *RPS19* あるいは *RPL5* 変異、口蓋裂を認めた 3 例のうち 2 例が *RPL5* 変異で 1 例が *RPL35a* をもっていたことは、特定の遺伝子変異と臨床像との関連を示唆するものであった。これらの関連を明らかにするためには、さらに多数例を解析する必要がある。

DBA の確定診断には、リボソーム蛋白遺伝子変異の同定が有用だが、原因遺伝子は多数あること、遺伝子変異が同定される症例が未だ 40~50% であることが問題であった。生化学的バイオマーカーとして、eADA の上昇が知られているが、臨床像、血液学的所見で DBA が強く疑われる症例の 10~

20%では eADA が基準値内であり、より高感度に DBA を診断出来る新規バイオマーカーが必要と考えられていた。今回、赤血球 GSH が DBA 患者で有意に高値であることを発見し、eADA と併用することで、検討した 9 家系 11 例の DBA 患者を 100%診断し得た。このことから、GSH は DBA 診断における新規バイオマーカーとして、極めて有用と考えられた。さらに、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 NADPH 供給の増加がその要因であることを明らかにした。

一次疫学調査の結果、2000 年 1 月以降に把握された DBA 症例 132 例が集計された。さらに、詳細な遺伝子診断を含む二次調査を行うことにより、本邦の DBA の全体像が把握されることが期待できる。弘前大学小児科では、既に遺伝子解析のために 76 家系 (83 例) の DBA の臨床検体を全国の小児科施設から収集した。これは、我が国における唯一・最大の DBA 検体バンクであるが、二次疫学調査によって臨床検体をさらに収集することにより、今後このバンクを欧米のレベルまで発展させることが期待できる。

最近、骨髄異形成症候群の 1 つである 5q 欠失症候群の原因が、*RPS14* 遺伝子の欠失であることが明らかになった。また、DBA 以外の天性骨髄不全症候群である Shwachman-Diamond 症候群や先天性角化異常症なども「リボソーム病」のであることが明らかになってきた。本研究は、これらの難病の診断や治療法の開発に貢献する可能性がある。

## E. 結論

欧米では、DBA の登録制度が確立し、検体保存やそれを用いた疾患の研究が行われている。特に、北米の DBA 登録制度は充実しており、米国とカナダの患者登録数は 600 名以上にのぼる。これに対して、日本ではこのような登録制度はなく、本疾患に対する研究は著しく遅れていた。本研究班が中心となり、永続的な制度としての「日本 DBA 登録制度」の確立を目指す。これは、DBA の患者の支援や、DBA の臨床および基礎研究を行うための基盤になり、国際貢献にも繋がると思われる。実際、インドやイランなど海外からの遺伝子解析の

依頼があり、2 家系の遺伝子解析を行った。

片アレル欠失解析のための Q-PCR 法を開発し、通常のシーケンス解析では検出することができなかった RP 遺伝子の欠失を 31 例中 7 例で見出した。このうち 1 例は、SNP アレイでは確認できない比較的小さな *RPS19* の欠失であったことから、我々の開発した DBA 同期的 qPCR 法の有用性が証明された。

DBA の新規バイオマーカーとして赤血球 GSH を同定した。eADA と GSH の同時測定により、検討した 11 例全ての DBA 症例を生化学的に診断可能であった。

## F. 健康危険情報

登録システムを確立しているところであり、健康危険情報はない。本研究は治療介入を伴わない観察研究であるが、有害事象に対して今後も注意を払う必要がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan Wang, 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.
2. 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**. 2011;17(12):1814-21.
3. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T,

- Nagasawa M, Kikuta 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** 2011;96(6):814-819.
4. Kudo K, Terui K, Sasaki S, MD, Kamio T, Sato T, Ito E. CD7-positive acute myelomonocytic leukemia with trisomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in two adolescents. **Leuk Res.** 2011;35(9):e167-8.
  5. Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K. Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia (review). **Int J Hematol.** 2010;92(3):413-8.
  6. Taketani T, Taki T, Nakamura T, Kobayashi Y, Ito E, Fukuda S, Yamaguchi S, Hayashi Y. High frequencies of simultaneous *FLT3*-ITD, *WT1*, and *KIT* mutations in hematologic malignancies with *NUP98*-fusion genes. **Leukemia** 2010;24(11):1975-7.
  7. Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang RN, 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;116(22):4631-8.
  8. Terui K, Takahashi Y, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Ito E. Guillain-Barre Syndrome mimicking acute methotrexate-associated encephalopathy in an adolescent patient with lymphoblastic lymphoma. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2010;32(8):615-6.
  9. Kudo K, Terui K, MD, Sasaki S, Kamio T, Sato T, and Ito E. Voriconazole for both successful treatment of disseminated *Trichosporon asahii* infection and subsequent cord blood transplantation in an infant with acute myelogenous leukemia. **Bone Marrow Transplant.** 2011;46(2):310-1
  10. Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. **Oncogene** 2010;29(25):3723-31.
  11. Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG and Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of *M-CSFR* is critical for MOZ-leukemia stem cell potential. **Nature Medicine** 2010;16(5):580-585.
  12. 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 MJ, Sugita K, and Ito E. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. **Haematologica** 2010;95(8): 1293-9.
  13. Shiba N, Kato NM, Park MJ, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, and Hayashi Y. *CBL* mutations in juvenile myelomonocytic leukemia and pediatric myelodysplastic syndrome. **Leukemia** 2010;24(5):1090-1092.
  14. Oda M, Isoyama K, Ito E, Inoue M, Tsuchida M, Kigasawa H, Kato K, Kato S. Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia. **Int J Hematol.** 2009;89:374-82.
  15. Iida A, Inagaki K, Miyazaki A, Yonemori F, Ito E, Igarashi K. Bach1 deficiency ameliorates hepatic injury in a mouse model. **Tohoku J Exp Med.** 2009; 217: 223-229.
  16. Kitamura H, Kaneko T, Nakano H, Terui K, Ito E, Sawamura D. Juvenile myelomonocytic leukemia presenting multiple painful erythematous lesions diagnosed as Sweet's

- syndrome. **J Dermatol.** 2008;35:368-370.
17. Toki T, Kanezaki R, Adachi S, Fujino H, Xu G, Sato T, Suzuki K, Tauchi H, Endo M and Ito E. The key role of stem cell factor/KIT signaling in the proliferation of blast cells from Down syndrome-related leukemia. **Leukemia** 2009;23:95-103.
  18. Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T: Serum prohepcidin concentrations at birth and one month after birth in premature infants. **Pediatric Blood & Cancer** 2011;56(2):267-72.
  19. Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, Hara T: Genetic variation of vascular endothelial growth factor pathway does not correlate with the severity of retinopathy of prematurity. **J Perinatol.** 2011 (in press).
  20. Ishimura M, Ohga S, Ichiyama M, Kusuhara K, Takada H, Hara T, Takahashi M, Okamoto H: Hepatitis-associated aplastic anemia during a primary infection of genotype 1a torque teno virus. **Eur J Pediatr.** 2010;169(7):899-902.
  21. Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Tabuchi T, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T: Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. **Pediatric Blood & Cancer** 2010;54(2):299-306.
  22. Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. **Blood** 2010 Apr 15;115(15):3158-61.
  23. Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. **Int J Hematol.** 2010 Oct;92(3):419-24. Epub 2010 Oct 1.
  24. Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difronzo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2010 Oct 26. [Epub ahead of print]
  25. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsui 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** 2011;117(10):2887-90.
  26. 菅野仁, 斎藤加代子. 電子カルテによる遺伝子情報管理の実際. **日本遺伝カウンセリング学会誌** 2010;31: 127-129.
  27. 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.
  28. Aihara Y, Tsuruta T, Kawamata T, Kanno H, Maebayashi K, Sakauchi M, Wada E, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Hori T. Double high-dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation for primary disseminated medullo-blastoma: a report of 3 cases. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2010;32:e70-4. PubMed PMID: 20168248.
  29. 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 今野友貴, 土岐力, 伊藤悦朗, 林泰秀. 典型例と異なる緩徐な臨床経過を示し、リボソーム蛋白遺伝子 RPL11 の遺伝子変異により診断した Diamond-Blackfan 貧血の 1 例. **日本小児血液学会雑誌** 2010;24:225-228.
  30. Katsuragi S, Ohga S, horiuchi H, Hara T, Terao

- K, Ikeda T. Neonatal onset hemophagocytic lymphohistiocytosis in a premature infant. **Pediatric Blood & Cancer** 2009;53:244-245.
31. Suzuki N, Morimoto A, Ohga S, Kudo K, Ishida Y, Ishii E. Characteristics in neonates: a nationwide survey in Japan. **J Pediatr**. 2009;155:235-238.
  32. Xu Y, Takahashi Y, Wang Y, Hama A, Nishino N, Muramatsu H, Tanaka M, Yoshida N, Villalobos IB, Yagasaki H, Kojima S. Downregulation of GATA-2 and Overexpression of Adipogenic Gene-PPAR gamma in Mesenchymal Stem Cells from Patients with Aplastic Anemia. **Exp Hematol**. 2009;37(12):1939-9.
  33. Muramatsu H, Makishima H, Cazzoli H, O'keefe C, Yoshida N, Xu Y, Nishino N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP. Mutations on E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. **Blood** 2010;115(10):1969-75.
  34. Ito E. Ribosomal protein in impaired erythropoiesis: Diamond-Blackfan anemia and 5q-syndrome. **Rinsho Ketsueki** 2009;50(10):1539-47.
  35. 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.
  36. 北島順子, 金城唯宗, 大賀正一, 落合正行, 井上普介, 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 卷 103-111, 2011.
  37. 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).
  38. 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
  39. 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.
  40. 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 2011;63(2):157-165.
- ## 2. 学会発表
1. 伊藤悦朗, 照井君典, 小島勢二, 小原明, 大賀正一, 森尾友宏, 浜口功, 倉光球, 菅野仁. 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. 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業研究事業) 小島班「DKC の効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究」伊藤班「DBA の効果的診断法の確立に関する研究」合同班会議. 2010 年 9 月 4 日. 名古屋.
  2. 伊藤悦朗, 照井君典, 小島勢二, 小原明, 大賀正一, 森尾友宏, 浜口功, 倉光球, 菅野仁. 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. 先天性造血不全シンポジウム. 2011 年 2 月 4 日. 浦安.
  3. Ohga S. Hematopoietic stem cell transplantation for HLH/LCH, and a review of neonatal HLH in Japan. The 4th Seminar on Histiocytosis & Pediatric MDS. October 7, 2010 Seoul, Korea (invited speaker).
  4. Ohga S. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Education Session IV ~ HSCT for pediatric malignant diseases ~. The 15th Congress of the Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation. October 29-31, 2010 Phuket, Thailand (invited speaker).
  5. 大賀正一, 工藤寿子, 足立壮一, 菊地陽. 小

- 児血液疾患の基礎. 第3回研修医(初期・後期)のための血液学セミナー. 2010年7月9-11日. 大津.
6. 菅野仁, 山本俊至, 大賀正一, 立石浩, 濱田貴子, 槍澤大樹, 小倉浩美, 藤井寿一. Diamond Blackfan 貧血に関する新規の病因候補遺伝子同定. 第72回日本血液学会. 2010年9月24-26日. 横浜.
  7. 石村匡崇, 大賀正一, 宇都宮里奈, 牧村美佳, 土居岳彦, 井原健二, 原寿郎. ステロイドパルス療法が奏功した Graves 病合併再生不良性貧血の一例. 第52回日本小児血液学会. 2010年12月17-19日. 大阪.
  8. 大賀正一, 小原明, 小島勢二, 菅野仁, 伊藤悦朗. DBA 診療のガイドライン~現況と国際協力の可能性~ 平成22年度厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業研究事業)小島班「DKC の効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究」伊藤班「DBA の効果的診断法の確立に関する研究」合同班会議. 2010年9月4日. 名古屋.
  9. Kuramitsu M, Morio T, Takagi M, Ozeki M, Masumi A, Mizukami T, Momose H, Takizawa K, Ito E, Yamaguchi K, Hamaguchi I. A novel method to analyze genomic copy number of Diamond Blackfan anemia responsible genes. 第72回日本血液学会. 2010年9月24-26日. 横浜.
  10. Kuramitsu M, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang RN, Masumi A, Mizukami T, Momose H, Takizawa K, Yamaguchi K, Ito E, and Hamaguchi I. New Determination Method for Extensive Gene Deletions in Diamond-Blackfan Anemia. Poster III-1010. 第52回アメリカ血液学会. 2010年12月4-7日. 米国・オーランド.
  11. 菅野仁, 石谷健, 相崎潤子, 濱田貴子, 内山智貴, 浦野真理, 近藤恵里, 松井英雄, 藤井寿一, 太田博明, 斎藤加代子. 薬物トランスポーター遺伝子多型を用いた薬理遺伝学的検査~ドセタキセル投与における好中球減少におけるドナー、レシピエント細胞キメリズム解析. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会. 2010年5月30日.
  12. Hama A, Manabe A, Nozawa k, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Ohara A, Ito M, and Kojima S. Central Review of the Morphology in Childhood Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndrome. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14日. 名古屋.
  13. 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.
  14. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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 3, 2011 Denver, Colorado, USA.
  18. 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)のための血液セミナー. 2011年7月8-10日. 大津.
  19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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

なし



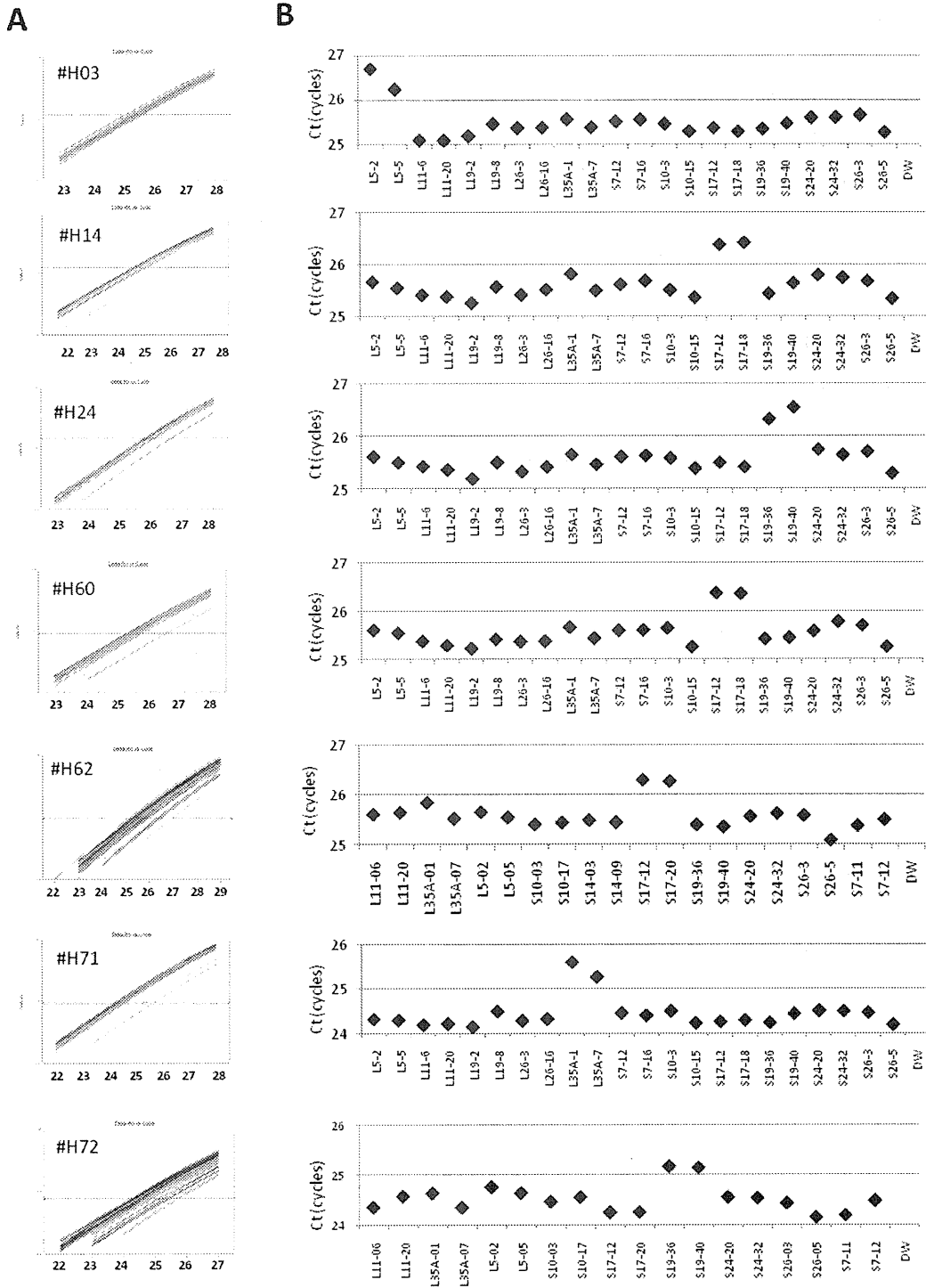


図1. Q-PCRによるDBAの遺伝子コピー数検査

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。

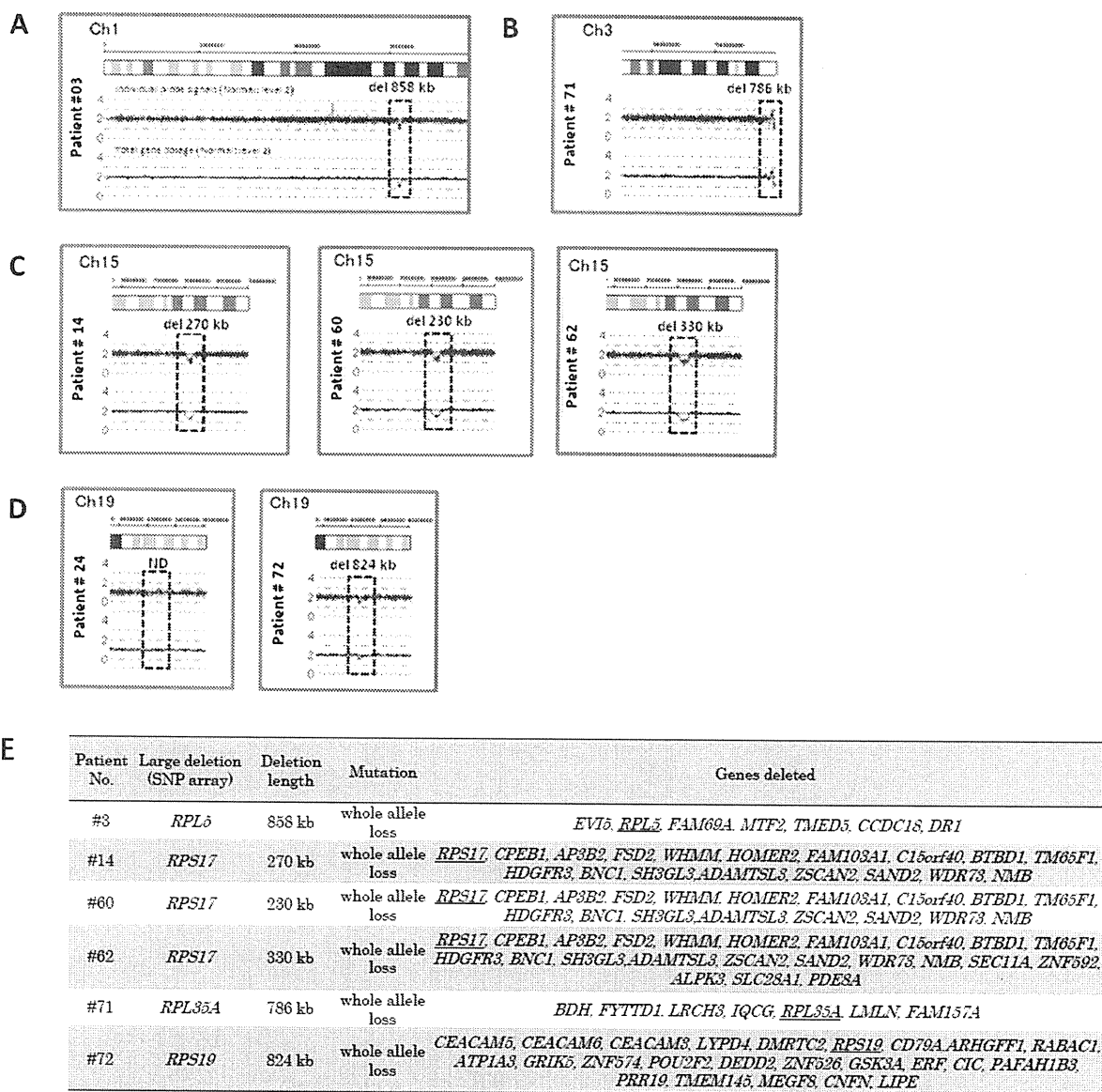


図2. SNP アレイによる片アレル欠失の解析

通常のシーケンス解析では、変異が同定されなかった 31 検体を用いて SNP アレイ (Affymetrix Gene Chip) と CNAG プログラムで遺伝子コピー数を測定した。その結果、31 例中 6 例で RP 遺伝子の片アレル欠損が確認された。(A) 症例#03. *RPL5* を含む一番染色体の大欠失 (B) 症例#71. *RPL35a* を含む 3 番染色体の大欠失 (C) 症例#14, #60, and #62. *RPS17* を含む 15 番染色体の大欠失 (D) 症例#72. *RPS19* を含む 9 番染色体の大欠失。(E) 6 症例の欠失部位に含まれる遺伝子。RP 遺伝子が欠失している。

(参照1)

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

平成21年度 総括研究報告書

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

研究代表者 伊藤 悦朗（弘前大学大学院医学研究科 小児科学 教授）

研究要旨： Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、乳児期に発症する赤血球造血のみが障害される先天性の赤芽球癆である。約40%の例は種々の奇形を合併する。治療は副腎皮質ステロイドが第一選択であるが、ステロイド依存や輸血依存症例が全体の約40%存在する。難治例には造血幹細胞移植（HSCT）が行なわれている。これまでに、原因遺伝子として6種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子が同定されている。海外では約50%のDBA患者にRP遺伝子の変異が認められ、DBAはリボソームの異常に起因した新たな疾患「リボソーム病」の一つであると考えられるようになった。また、家族内に発端者と同一の遺伝子異常をもつ貧血のない軽症例が存在することも明らかになった。本症が悪性疾患を合併しやすいことから、HSCTのドナーを選択する上で軽症例の診断は重要課題になっている。しかし、本邦では原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなく、家族の解析もほとんど行なわれていない。軽症例も含めたDBAの診断基準の作成は海外でも検討が始まったばかりであり、我が国でも利用できるような診断基準は存在しない。我が国では、毎年約7例のDBAが新規に発症していると推定されているが、診断は各施設に任せられており血液標本の中央診断も施行されていなかった。

新たに中央診断された症例とこれまでに弘前大学小児科が全国から収集した49例（45家系）の臨床検体の遺伝子解析を行った。DBAで遺伝子変異が報告されている6遺伝子（*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *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。その結果、*RPS19*遺伝子変異が7例（6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4例、*RPL11*変異は2例、*RPS17*変異は1例で検出された。*RPS19*、*RPL5*、*RPL11*の遺伝子変異の頻度は、それぞれ13%、9%、4%および2%であった。一方、*RPS24*、*RPL35a*および*RPS14*遺伝子には変異を認めなかった。興味深いことに、*RPS19*あるいは*RPL5*の変異をもつ患者は全例とも身体的異常を合併していた。特に、*RPL5*変異をもつ症例の内の2例は、*RPL5*変異を持たない45例では1例のみに認められた口蓋裂を合併していた。以上、本邦におけるDBAの発端者45例中13例（29%）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、70%の症例では原因遺伝子が不明であることが明らかになった。また、DBAの確定診断にリボソームタンパク（RP）の発現量の低下がバイオマーカーとして有用であることを見出した。バイオマーカーとしての有用性について検証を進めている。以上の結果と海外からの報告を参考にして、軽症例を含むDBAの診断基準案を作成した。この診断基準案を含む診断の手引きを添えて、全国の小児科専門医研修施設（520施設）および小児血液学会評議員（150名）を対象に、一次疫学調査を行った。その結果、132例のDBA症例の報告があった。来年度以降さらに詳細に二次調査を行う予定である。

【研究分担者】

照井君典：弘前大学医学部附属病院	助教	大賀正一：九州大学病院総合周産期医療センター	准教授
小島勢二：名古屋大学大学院医学系研究科	教授	浜口 功：国立感染症研究所	部長
小原 明：東邦大学医療センター大森病院	教授	森尾友宏：東京医科歯科大学大学院	准教授

## A. 研究目的

Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。治療は副腎皮質ステロイドが第一選択であるが、ステロイド依存や輸血依存症例が全体の約40%存在する。難治例には造血幹細胞移植 (HSCT) が行なわれている。原因遺伝子として6種類のリボソームタンパク (RP) 遺伝子が同定されている。海外では約40%のDBA患者にRP遺伝子の変異が認められているが、本邦では原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなく、家族の解析も行なわれていない。家族内に発端者と同一の遺伝子異常をもつ貧血のない軽症例が存在する。本症が悪性疾患を合併しやすいことから、造血幹細胞移植のドナーを選択する上で軽症例の診断は重要課題になっている。しかし、本邦では原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなく、家族の解析もほとんど行なわれていない。軽症例も含めたDBAの診断基準の作成は海外でも検討が始まったばかりであり、我が国でも利用できるような診断基準は存在しない。本研究の目的はDBAの診断基準を作成し、それに基づいた家族内の軽症例をも含む包括的な疾患登録を行ない、本症の全貌を明らかにすることである。中央診断を伴う登録システムの確立することで、我が国における疫学を明らかにすることができると期待できる。さらに、原因遺伝子の解析と疾患特異的なバイオマーカーの検索を行ない、病態解明とともに精度の高い診断を目指す。80個のRP遺伝子をすべて解析し、新規原因遺伝子を同定する。

また、小児施設を対象に一次アンケート調査を行い、後方視的に我が国における本症の実態を把握する。一次調査で把握された症例を対象に二次調査、さらに遺伝子解析を行う。

## B. 研究方法

### 1) 疾患登録システムの確立 (図1)

日本小児血液学会の疾患登録システムの中でDBAの登録システムを立ち上げ、これを用いてオンラインによる登録ができるようにする。オンライン登録ができない場合は、FAXによる登録も受け付け

る。中央診断は末梢血や骨髄塗抹標本を用いて主に名古屋大学で行い、遺伝子解析は弘前大学で行う。

### 2) 遺伝子解析

新たに中央診断された症例とこれまでに弘前大学小児科が全国から収集した49例(45家系)の臨床検体の遺伝子解析を行った。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6遺伝子 (*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *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。

### 3) DBA診断のタンパク質バイオマーカーの探索

我々は、DBAの確定診断にリボソームタンパク (RP) の発現量の低下がバイオマーカーとして有用であることを見出した。まず始めに最も変異報告の多い*RPS19*について抗*RPS19*抗体でタンパク質発現量を測定し、バイオマーカーとしての有用性について検証する。*RPS19*に変異のあるDBA患者より採取した血液細胞を用いてウエスタンブロッティング法で*RPS19*の発現量を測定し、*GAPDH*との比較で定量する。健常人の値と比較し、患者で*RPS19*の発現量が有意に減少しているか検討する。この結果より、DBAの確定診断にバイオマーカーとしてRPの発現量測定が有用か検証する。DBAで複数例の変異報告のある遺伝子は、*RPS19*、*RPS24*、*RPS17*、*RPL35a*、*RPL11*、*RPL5*の6遺伝子である。*RPS19*以外の残り5種類のタンパク質についても随時、抗体を入手または作製する。

### 4) 診断基準の作成

上記の解析結果と臨床情報をもとに、診断基準を作成する。診断基準の立案には、日本小児血液学会再生不良性委員会の有力メンバーである小原と大賀が担当する。また、日本小児血液学会がこれまでに収集したDBAの疫学データも解析し、診断基準の立案に役立てる。