

5) 一次アンケート調査

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。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う。

（倫理面への配慮）

小児血液学会として行う疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として、既に学会倫理審査委員会の承認を受けている。調査にあたっては、個人情報の守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても、患者検体の匿名化を図る。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、弘前大学医学部の倫理委員会の審査・承認を得て行われた。

C. 研究結果

1) 疾患登録システムの確立（図 1）

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。平成21年度は4名のDBA症例の末梢血や骨髄血塗抹標本を名古屋大学小児科で中央診断した（図 1）。中央診断を開始してから12ヶ月間で186例がレビューされた。レビュー結果はAAが75例、MDSが25例、JMMLが20例、CBFSが11例、急性白血病が14例、その他41例であった。CBFS11例の中にDBAが4例含まれていた。DBAと診断された4例の詳細は以下のとおりである。

症例1：生後2ヶ月女児。外表奇形なし。WBC 5,300/ μ l、RBC 68万/ μ l、Hb 2.4 g/dl、Ht 6.5%、MCV 96 fl、Ret 0%、Plt 56万/ μ l。骨髄像：赤芽球は全体の3%で前赤芽球までは観察された。

症例2：生後3ヶ月女児。外表奇形なし。WBC 10,500/ μ l、RBC 79万/ μ l、Hb 2.3 g/dl、Ht 7.8%、MCV 99fl、Ret 15.9%、Plt 61.2万/ μ l。骨髄像：赤芽球は全体の1.5%で前赤芽球までは観察された。*RPL5*変異が確認された。

症例3：生後5ヶ月女児。外表奇形なし。WBC

3,500/ μ l、Hb 5.4 g/dl。骨髄像：赤芽球は全体の0.5%で前赤芽球までは観察された。

症例4：生後0ヶ月女児。胎児水腫、重症仮死で出生。右拇指多指症あり。WBC 3,500/ μ l、RBC 186万/ μ l、Hb 5.1 g/dl、Ht 14.8%、MCV 80fl、Ret 1%、Plt 4.2万/ μ l。骨髄像：赤芽球は全く観察されなかった。DBAの4症例は、いずれも生後5ヶ月未満の発症で著明な貧血を呈していた。外表奇形の合併が知られているが、実際に確認されているのは1例のみであった。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を依頼しているが、1例で*RPL5*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、日本において臨牀的に発見されるDBAの発症数は年間7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

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。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。

3) DBA のバイオマーカーの検索

遺伝子として近年 *RPS19* や *RPL11* などのリボソームタンパク質の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 人の頻度と非常に稀であり、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。これまでに報告された DBA の変異タンパク質を *in vitro* で発現させると極めて不安定であることから、DBA 患者では一方の正常アレルからのタンパク質のみが発現していると考えられる。よって、DBA の原因遺伝子のタンパク質の発現量の減少を検知することが DBA の診断マーカーとなる可能性があると考えられた。

そこで、DBA 診断法の開発を目的としてヒト *RPS19* や *RPL11* などに対する抗体を用いて siRNA で発現抑制した培養細胞や DBA 患者末梢血単核球 (MNC) を用いてタンパク質発現の減少の検出系の構築を試みた。

DBA の診断マーカーとして DBA の原因遺伝子の発現量の減少を指標にできるかどうか、培養細胞を用いた遺伝子発現抑制系と MNC で解析した。培養細胞において DBA の原因遺伝子発現を抑制した場合、タンパク質量の顕著な減少が観察され、DBA の培養モデル系において発現量の減少の検出は可能であると考えられた。

しかしながら、Primary 細胞において DBA の原因遺伝子産物のうち *RPS19* タンパク質は、採血後の時間経過に伴って発現量の低下が認められた。このことから、実際に患者から採血された検体が検査機関に送られてくるまでの保存期間の差によって *RPS19* の発現量が大きく左右されることが考えられた。

また、*RPL11* 欠損のある DBA 患者全血から分離

した MNC からすぐにタンパク質抽出した場合には、健常人検体と比べ *RPL11* のタンパク質量の減少は認められなかった。これは、MNC のほとんどが基本的に G0 期 (休止期) にあり細胞の遺伝子発現全体が低下していること、また遺伝子変異による発現量の低下の影響が正常アレルによって十分に補われている可能性があることが原因と考えられた。このため、患者の MNC で原因遺伝子のタンパク質発現の減少を解析するには、培養細胞のように細胞周期を増殖期へと移行させる必要があると考えられた。

これらの結果から、患者の血液細胞で解析するには、MNC を IL-3 や IL-2 などのサイトカインを添加した培地で細胞増殖を促しながら数日間培養することで採血後の保存による細胞ストレスを除去し、また細胞周期を増殖期に移行させた状態で原因遺伝子タンパク質量の減少を検出する必要があると考えられた。現在 MNC の増殖期の細胞での発現量解析を進めている。

4) 一次アンケート調査

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、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。その結果、539 施設から回答が得られ、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。

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 登録システムを確立し、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いた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。

本邦の DBA 患者における RP 遺伝子変異の頻度は 29%であり、欧米の約 50%よりも低いことが明らかとなった。特に、本邦では *RPS19* 遺伝子変異の頻度が 13%と欧米の約 25%に比べて明らかに低く、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。我が国の DBA はまだ 70%が原因遺伝子不明である。平成 22 年から 2 年間で残りの 74 種類の RP 遺伝子をすべて解析する予定であるが、リボソームの機能にはさらに多くの遺伝子が関わっている。80 種類の RP 遺伝子に変異の認められない DBA については、次世代シーケンサーを用い、全ゲノムの網羅的な解析を行い、新規原因遺伝子を同定する必要があると考えられる。

患者の約半数が何らかの身体的異常を合併しており、全体としては欧米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*、口蓋裂を認めた 3 例のうち 2 例が *RPL5*変異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。

本年度施行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約 50 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

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。

F. 健康危険情報

今年度は登録システムを確立しているところであり、健康危険情報は無い。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) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang RN, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park M-J, Sugita K, Ito E: Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan Anemia. *Haematologica* 2010 (in press)
- 2) 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 (in press)
- 3) Katsuragi S, Ohga S, Horiuchi H, Hara T, Terao K, Ikeda T: Neonatal onset hemophagocytic

- lymphohistiocytosis in a premature infant. *Pediatr Blood Cancer* 53: 244-245, 2009.
- 4) Suzuki N, Morimoto A, Ohga S, Kudo K, Ishida Y, Ishii E: Characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis in neonates: a nationwide survey in Japan. *J Pediatr* 155: 235-238, 2009.
 - 5) Xu Y, Takahashi Y, Yoshimi A, Tanaka M, Yagasaki H, Kojima S. Immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells is not decreased in children with aplastic anemia. *Int J Hematol.* 2009;89(1):126-7.
 - 6) Xu Y, Takahashi Y, Wang Y, Hama A, Nishio N, Muramatsu H, Tanaka M, Yoshida N, Villalobos IB, Yagasaki H, Kojima S. Downregulation of GATA-2 and Overexpression of Adipogenic Gene-PPARgamma in Mesenchymal Stem Cells from Patients with Aplastic Anaemia. *Exp Hematol.* 2009; 37(12): 1393-9.
 - 7) Muramatsu H, Makishima H, 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.* 2010; 115(10): 1969-75.
 - 8) 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; 115(15): 3158-61.
 - 9) Ito E. Ribosomal protein in impaired erythropoiesis: Diamond-Blackfan anemia and 5q- syndrome. *Rinsho Ketsueki.* 2009;50(10):1539-47.
- 2009.10.23-25.
- 2) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Terui K, Ohga S, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Kanei R, Imai T, Hongo T, Park M-J, Yanagisawa R, Koike K, Ito E: Mutations in ribosomal protein genes of Diamond-Blackfan anemia patients in Japan. 51st ASH Annual Meeting and Exposition December 5-8, 2009 New Orleans, LA.
 - 3) 今野友貴, 丹代論, 徐剛, 土岐力, 工藤耕, 照井君典, 大賀正一, 小島勢二, 長谷川大二郎, 青木由貴, 金井理恵, 今井剛, 本郷輝明, 朴明子, 柳沢龍, 伊藤悦朗: 本邦のDiamond-Blackfan貧血患者におけるリボゾーム蛋白遺伝子の変異. 第71回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25.
 - 4) 浜口功: Ribosomal proteinと造血障害(シンポジウム). 第71回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25.
 - 5) 槍澤大樹, 濱田貴子, 小倉浩美, 村野一郎, 大賀正一, 菅野仁, 藤井寿一: Diamond-Blackfan貧血に対するリボゾーム蛋白遺伝子検査システムの構築. 第71回日本血液学会, 京都, 2009.10.23-25.
 - 6) 秋原美華, 松本隼人, 福田美和子, 白川嘉継, 大賀正一: 重症新生児仮死で出生し、出生時に発症した血球貪食症候群の1例. 第455回日本小児科学会福岡地方会, 福岡, 2009.6.27.
 - 7) 石村匡崇, 大賀正一, 西山慶, 市山正子, 守川尚子, 土居岳彦, 高田英俊, 原寿郎: 肝炎関連最重症再生不良性貧血の2例～病態と治療選択～ 第51回日本小児血液学会, 第25回日本小児がん学会, 東京, 2009.11.27-30.
 - 8) 濱 麻人, 小島 勢二: 小児再生不良性貧血の中央診断. 第51回日本小児血液学会総会, 千葉, 2009.11.27.

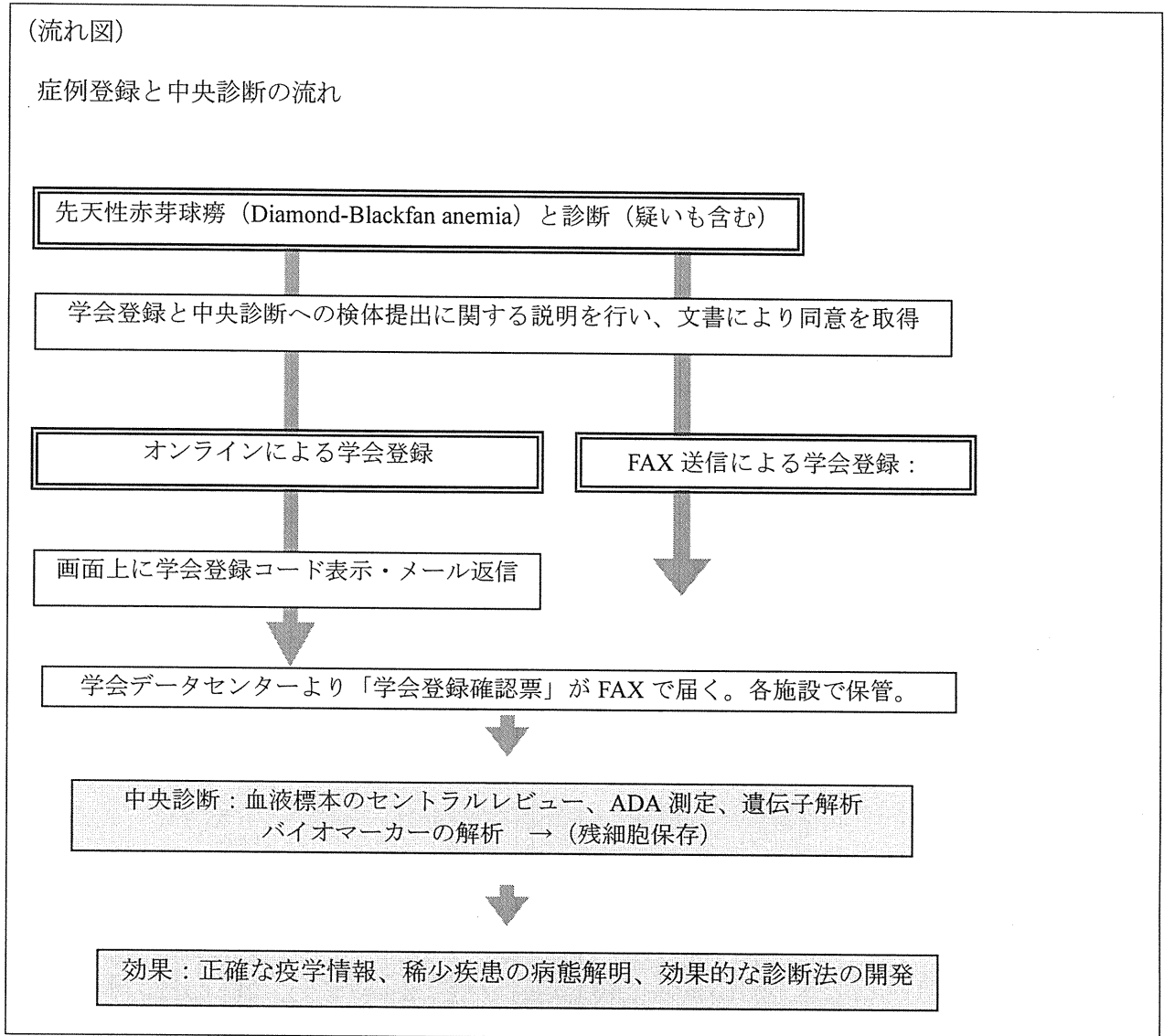
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

2. 学会発表

- 1) 伊藤悦朗: Ribosomal protein と赤血球産生障害 (Diamond-Blackfan anemia と 5q 欠失症候群) (教育講演). 第 71 回日本血液学会, 京都,

(図1)



(参照 2)

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 22 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が行われている。これまでに原因遺伝子として、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。平成 22 年度には新たに 19 例の遺伝子解析を行い、本研究で解析した症例は 68 例 (64 家系) 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* をダイレクト・シークエンス法で解析した。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 3 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*, *RPL11* の遺伝子変異の頻度は、それぞれ 12.5%、9.3%、4.7%であった。以上、本邦における DBA の発端者 64 例中 20 例 (31.3%) 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。そこで、ダイレクト・シークエンス法では検出できない片アレルの欠失を定量的 PCR 法と SNP アレイ法を用いて解析した。その結果、変異が検出されなかった 28 例中 7 例に RP 遺伝子の欠失を見出した。驚いたことに、これまで世界で 3 例しか報告がなかった *RPS17* 遺伝子異常が 3 例も含まれていた。欠失を含めた RP 遺伝子の異常は、DBA 発端者 64 例中 27 例 (42.1%) にみられた。*RPS19* 変異をもつ DBA の 12 例中 10 例に身体的異常を合併し、その内の 6 例は拇指の異常を有していた。口蓋裂が 3 名にみられ、2 例で *RPL5* 変異、1 例は *RPL35a* 変異を有していた。赤血球還元型グルタチオン (GSH) の増加が DBA の 10 例中 7 例に見られ、バイオマーカーとして有用であることを見出した。注目すべきことに、解析した全ての DBA 症例で赤血球アデノシン・デアミナーゼ活性 (eADA) が GSH が高値であった。この結果を踏まえ、我々が作成した軽症例も含めた DBA 診断基準案の改定を進めている。我が国では、毎年約 10 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。平成 21 年より中央診断を伴う DBA の登録を開始した。これまでに 6 例の登録があり、その内 1 例で *RPL5* の遺伝子異常を認めた。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。さらに遺伝子解析を含めた詳細な二次調査を行うため、準備を進めている。疫学調査について弘前大学の倫理委員会の審査を受け、承認が得られた。九州大学の倫理委員会の承認を待つて二次調査を開始する予定である。

【研究分担者】

照井君典：弘前大学医学部附属病院	講師	森尾友宏：東京医科歯科大学大学院	准教授
小島勢二：名古屋大学大学院医学系研究科	教授	菅野 仁：東京女子医科大学	准教授
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	【研究協力者】	
浜口 功：国立感染症研究所	部長	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髓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う。

2) 遺伝子解析

本年度は19例の新規症例を加え、これまでに弘前大学小児科が全国から収集した68例(64家系)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。本年度はさらに新たに報告されたDBA原因遺伝子である*RPS10*, *RPS26*を解析に加えた。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、異常の検出された検体をダイレクト・シーケンス法で解析した。

b) DBA Gene Copy Number assay: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) 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、網羅的な解析を行う。

3) DBA診断のバイオマーカーの探索

既に*RPS19*ないし*RPS17*遺伝子変異が同定されている9例およびDBA診断基準により、古典的DBAと診断することが出来る2例を対象にして、インフォームド・コンセントを取得の上、赤血球アデノシン・デアミナーゼ活性(eADA)と赤血球還元型グルタチオン(GSH)の測定を実施した。

eADAは白血球・血小板・血漿を除去した精製赤血球から溶血液を作製し、アデノシンを基質として265nmにおける吸光度変化により、活性を測定した。

GSHの測定は以下の様に行った。20µlのヘパリン加全血に180µlの蒸留水を加えて溶血させたのち、メタリン酸により得られる除タンパク抽出液に、5,5'-di-thiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)を加え、412nmで定量した。

4) 血清 prohepcidin を測定

患児の輸血療法の問題点を明らかにするため新生児の血清 prohepcidin を測定し、鉄制御機構を解析した。鉄代謝解析については倫理委員会で承認を受け、同意書を取得して行った。

5) 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。

6) 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。

7) 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。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う。

（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う。

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。中央診断を開始してから 16 ヶ月間で 223 例がレビューされた。レビュー結果は AA が 95 例、MDS が 20 例（CBFS3 例を含む）、JMML が 27 例、CBFS が 20 例、急性白血病が 16 例、その他 48 例であった（表 1）。CBFS 20 例の中に DBA が 6 例含まれていた。平成 22 年に DBA と新規診断された 2 例の詳細は以下のとおりである。

症例 1：2 歳カ 5 月女児。28 週、770 g 超低出生体重児として出生。外表奇形なし。WBC 6,000 / μ l、RBC 135 万/ μ l、Hb 3.6 g/dl、Ht 10.8%、MCV 80 fl、Ret 0%、Plt 23 万/ μ l。骨髓像：赤芽球は全体の 1.5%で好塩基性赤芽球までは観察された。

症例 2：生後 9 ヶ月女児。外表奇形なし。WBC 7,900 / μ l、Hb 3.0 g/dl、Ht 9.4%、MCV 76 fl、Ret 2%、Plt 18.8 万/ μ l。骨髓像：赤芽球は全く観察されなかった。

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を依頼しているが、1 例で *RPL5* 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 11 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

平成 22 年度には新たに 19 例の遺伝子解析を行い、本研究で解析した症例は 68 例（64 家系）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* をダイレクト・シーケンス法で解析した。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 3 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 12.5%、9.3% および 4.7% であった。以上、本邦における DBA の発端者 64 例中 20 例 (31.3%) 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。

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て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、28 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。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) *RPS19* 遺伝子の遺伝子内相同組換え検体の検出

片アレル欠失を示した検体の内、#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、遺伝子全体をカバーするように 9 セット設定し、#24 検体

の *RPS19* の遺伝子コピー数を詳細に調べた (図 2A)。その結果、*RPS19* の 5'UTR 領域 (S19-57, -58) および intron 3 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、intron 3 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 (図 2B)。このことから *RPS19* 遺伝子の片方のアレルの intron 3 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 intron 3 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ところ、#24 検体では健常人とは異なり約 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 (図 2C)。Genomic PCR 産物をシーケンス解析した結果、5'UTR と intron3 にある 23 塩基対の相同配列 (CGGTGGCTCACACC TGTAATCCCAGCA, nt:1400--1374 および nt:+5758--5784) の間で分子内相同組換えが生じ、結果として 7157 塩基の欠失が起きたことが明らかになった (図 2D)。欠失した領域にはプロモーターおよび exon 1, 2, 3 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。

d) 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 27 検体を用いて上記の遺伝子について 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、27 例中 6 例で RP 遺伝子の片アレル欠損を認めた。3 例に見られた *RPS17* 遺伝子の欠失を図 3 に示した。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* の大欠失 (#24) は検出されなかった。これは、SNP プローブが欠失領域に存在しないためであった。

e) 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。その内の一例に *RPL28* の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 ± 1.53 (IU/gHb, M \pm SD)、対照群で 1.02 ± 0.26 、GSH は患者群で 103 ± 18 (mg/dl RBC, M \pm SD)、対照群で 70.0 ± 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一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。

4) 新生児の鉄代謝マーカー (hepcidin) の生理的動態

新生児期から輸血を受ける患児の輸血開始時期を検討するため、血清 prohepcidin 値を測定し生理的動態を検討した。出生時には低く、生後 1 か月までに増加することを確認した。

5) 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 4 年間で 55 例登録された (表 1)。これは、14 歳以下の小児人口 17294 千人から罹患率を推定すると、14 歳以下小児人口 10 万に対して 0.32 (95%CI; 0.27-0.37) と推定される。およそ日本全国で年間 11 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ている可能性がある。

6) 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。さらに遺伝子解析を含めた詳細な二次調査を行うため、準備を進めている。弘前大学の倫理委員会の審査を受け、承認が得られた。九州大学の倫理委員会の承認を待って二次調査を開始する予定である。

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 でリボソームタンパク質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 64 家系中 7 例 (42.1%) 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 15.6% 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 (6.3%) 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。これまで見られた平成 22 年から 2 年間で残りの 74 種類の RP 遺伝子をすべて解析する予定であるが、リボソームの機能にはさらに多くの遺伝子が関わっている。本年度 RP 遺伝子の網羅的解析を行ったが、即知の遺伝子異常が検出されない 6 例の中で、遺伝子変異が見つかったのは 1 例のみであった。80 種類の RP 遺伝子に変異の認められない DBA については、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い、新規原因遺伝子を同定する必要があると考えられる。効率的に研究を行うために「遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立に関する研究班」(代表研究者 張替秀郎教授) と協力してエクソーム解析を行う予定である。

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、リボソームタンパク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。しかし、GSH 濃度の上昇のメカニズムについて未だ不明である。赤血球にはグルタチオン生合成系、還元系およびグルタチオン還元酵素の補酵素である NADPH の産生系の代謝が発達しており、それらの代謝系に属する、 γ グルタミルシステイン合成酵素、グルタチオン合成酵素、グルタチオン還元酵素、そしてグルコース-6-リン酸脱水素酵素などの活性が DBA 患者で亢進しているかどうか現在検討中である。

本年度施行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約 70 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」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。

本年度は、新たに 19 例の DBA 症例の遺伝子解析を行い、*RPS10* と *RPS26* 変異を本邦で初めて見出した。さらに、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から RP 遺伝子の欠失を 28 例中 7 例で見出した。この内 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、Q-PCR 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 濃度の同時測定により、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

今年度は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) Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K. Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Int J Hematol.* 92(3):413-18,2010. Epub 2010 Oct 1.
- 2) Kanazaki 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.* 116:4631-4638,2010.

- 3) 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.
- 4) 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.* 16(5):580-585,2010.
- 5) 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.* 95(8):1293-9,2010.
- 6) 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.* 24(5):1090-1092,2010.
- 7) 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.* 56(2):267-72, 2011.
- 8) 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).
- 9) 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.* 169(7):899-902, 2010.
- 10) 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.* 54(2):299-306, 2010.
- 11) 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.
- 12) Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. *Int J Hematol.* 2010 Oct;92(3):419-24. Epub 2010 Oct 1.
- 13) 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]
- 14) 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]
- 15) 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.* 31: 127-129, 2010.
- 16) 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. *Pediatr Blood Cancer.* 2011. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21298772.
- 17) 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.* 32:e70-4, 2010. PubMed PMID: 20168248.
- 18) 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 今野友貴, 土岐力, 伊藤悦朗, 林泰秀. 典型例とは異なる緩徐な臨床経過を示し, リボソームタンパク遺伝子 *RPL11* の変異の検出により診断した Diamond-Blackfan 貧血の 1 例. *日本小児血液学会雑誌.* 24:225-228, 2010.
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, 名古屋, 2010.9.4.
- 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, 浦安市, 2011.2.4.
- 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, 大津, 2010.7.9-11.
- 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, 横浜, 2010.9.24-26.
- 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, 大阪, 2010.12.17-19.
- 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, 名古屋, 2010.9.4.
- 9) 'A novel method to analyze genomic copy number of Diamond Blackfan anemia responsible genes.' Madoka Kuramitsu, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi, Michio Ozeki, Atsuko Masumi, Takuo Mizukami, Haruka Momose, Kazuya Takizawa, Ito Etsuro, Kazunari Yamaguchi, Isao Hamaguchi. 第72回日本血液学会, 横浜, 2010.9.24-26.
- 10) New Determination Method for Extensive Gene Deletions in Diamond -Blackfan Anemia' Madoka Kuramitsu, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi, Tsutomu Toki, Kiminori Terui, RuNan Wang, Atsuko Masumi, Takuo Mizukami, Haruka Momose, Kazuya Takizawa, Kazunari Yamaguchi, Etsuro Ito, and Isao Hamaguchi. Poster III-1010. 第52回アメリカ血液学会, 米国・オーランド, 2010.12.4-7.
- 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1法におけるドナー、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, 名古屋, 2010.5.30.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 本邦における Diamond-Blackfan 貧血の発症頻度

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236
(%)	83%	88%	90%	90%
Idiopathic AA	58	57	59	51
Hepatitis AA	5	8	11	6
AA / PNH	2	1	1	0
Fanconi Anemia	5	4	4	1
Diamond-Blackfan	11	14	12	13
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3
Schwachman-Diamond	0	1	0	1
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1

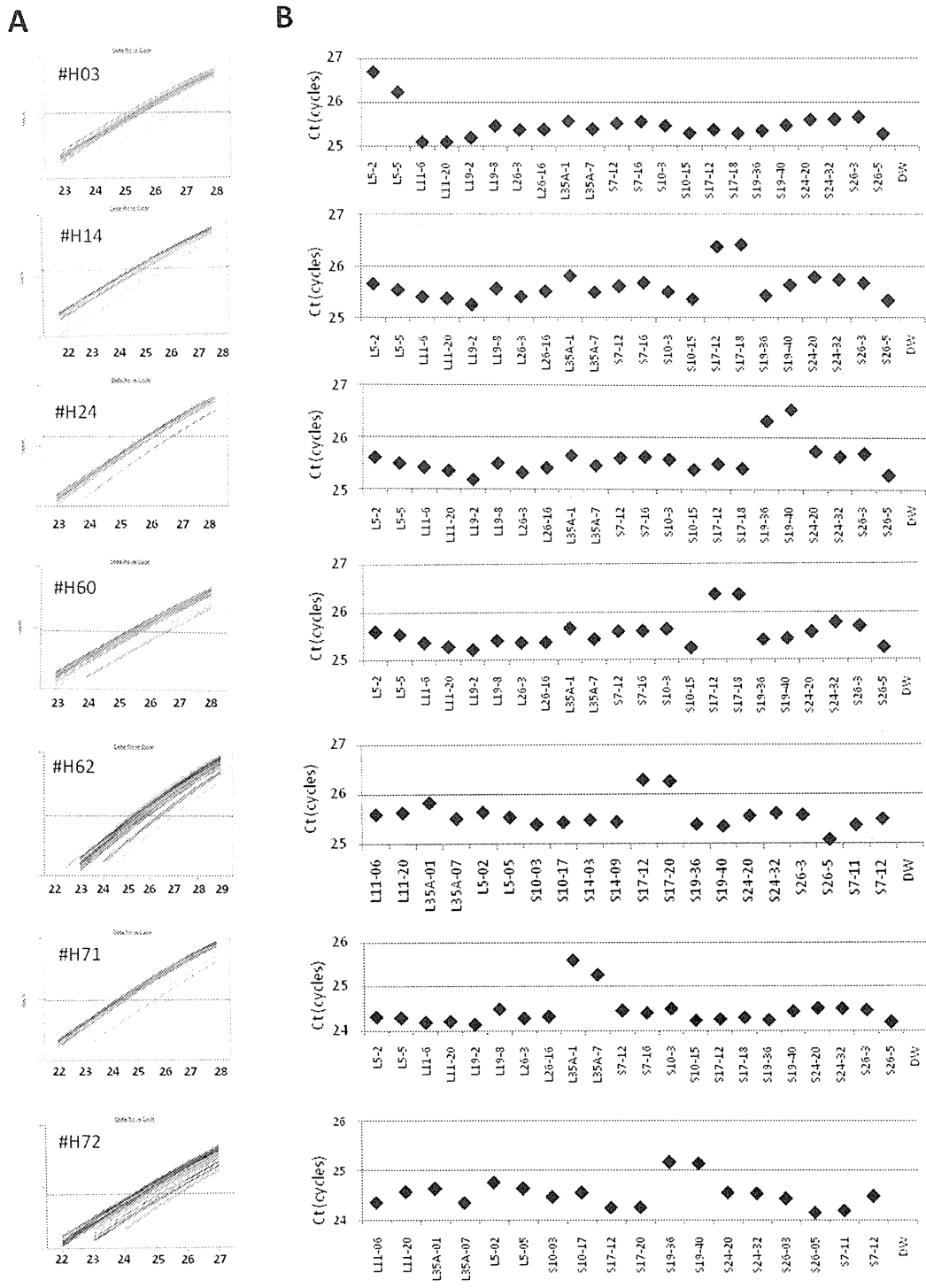


図1. Q-PCRによるDBAの遺伝子コピー数検査

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。

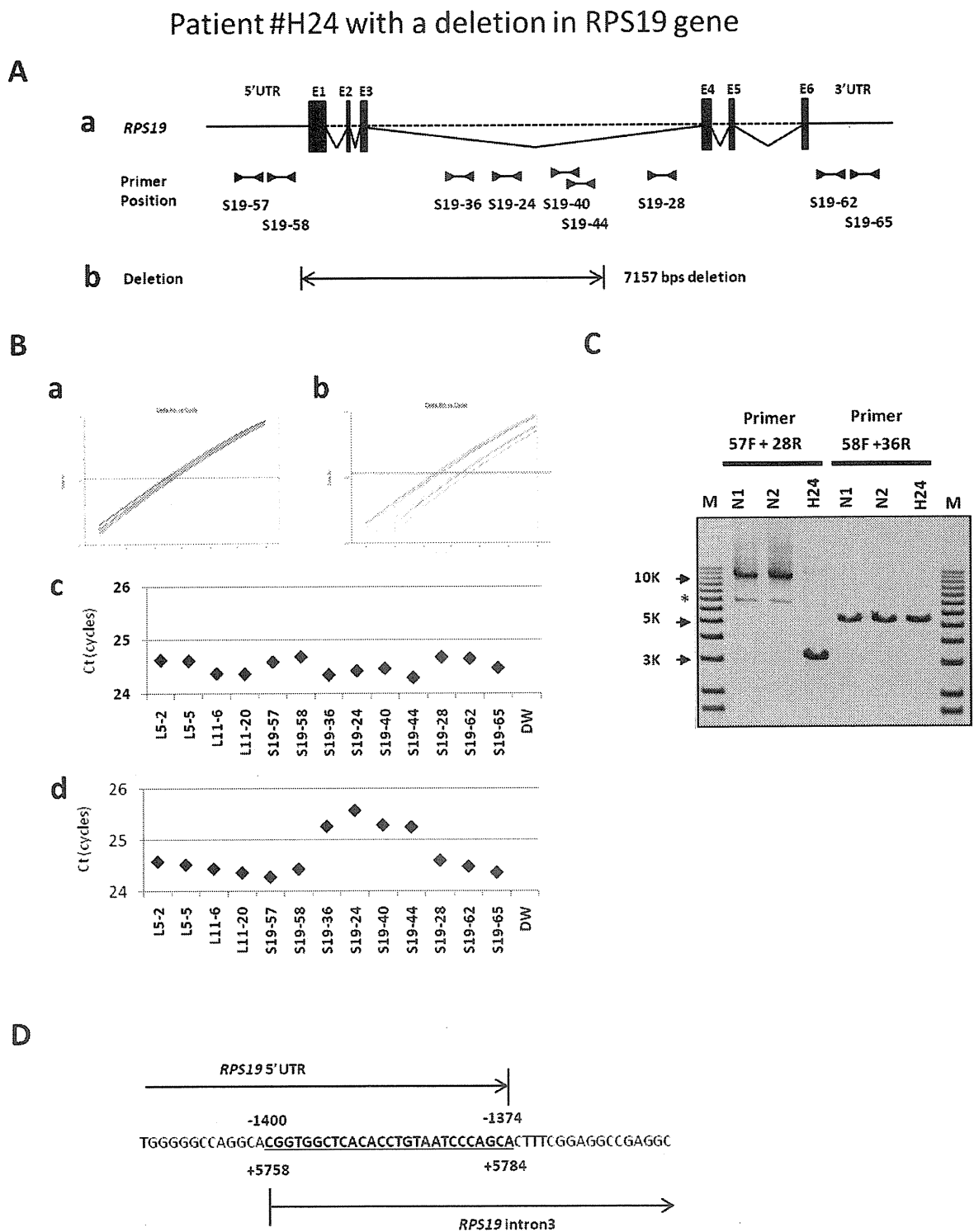
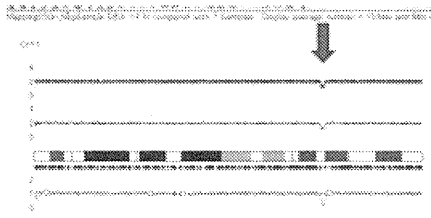


図 2. *RPS19* 遺伝子内相同組換えの検出

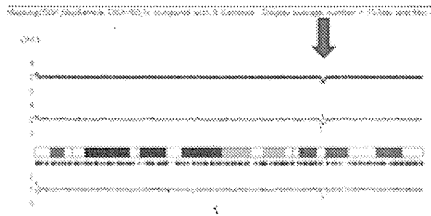
A. *RPS19* プライマーセットのゲノム上の位置 (a), 検出された欠失領域 (b)。 B. Q-PCR による遺伝子コピー数解析結果。 a, c: 健常人、b, d, DBA 患者#24 検体。 C. genomic PCR 産物の電気泳動結果。 N1, N2: 健常人検体、H24: DBA 患者#24 検体。 D. シーケンス解析によって明らかになった 23 塩基の *RPS19* の遺伝子内相同組換え領域。

Chr 15 欠失

Case 14



Case 60



Case 62

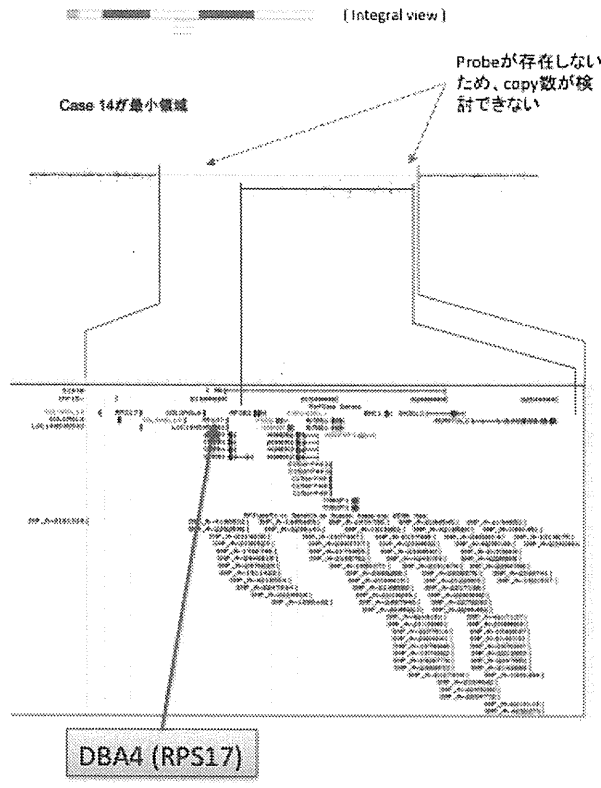
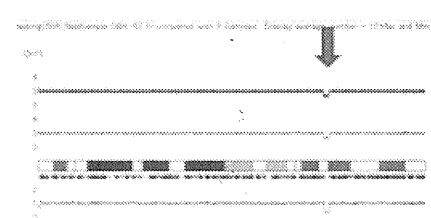


図 3. SNP アレイによる片アレル欠失の解析

Q-PCR 法で検出された *RPS17* 遺伝子の欠失が症例 14, 60, 62 で確認された。

(参照 3)

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 23 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：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・シークエ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： γ 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 γ 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