

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 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 プロー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 ± 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 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ほとんど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 以外の先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。

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

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. 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. Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Park MJ, Kanno Y, Tanaka T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of *TRIB1* R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. **Blood** 2012;119(11):2608-2611.
3. 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.
4. 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.
 5. Kudo K, Terui K, Sasaki S, 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.
 6. 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.
 7. 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).
 8. 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** 2011;117(10):2887-90.
 9. 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.
 10. 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 難治性貧血の診療ガイド 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.
 11. 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 2011;20:103-111.
 12. 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).
 13. 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.
 14. 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.** 2012 (in press).
 15. 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. 先天性造血不全シンポジウム. 2011年2月4日. 浦安.
 2. 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.
3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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-May3, 2011 Denver, Colorado, USA.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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

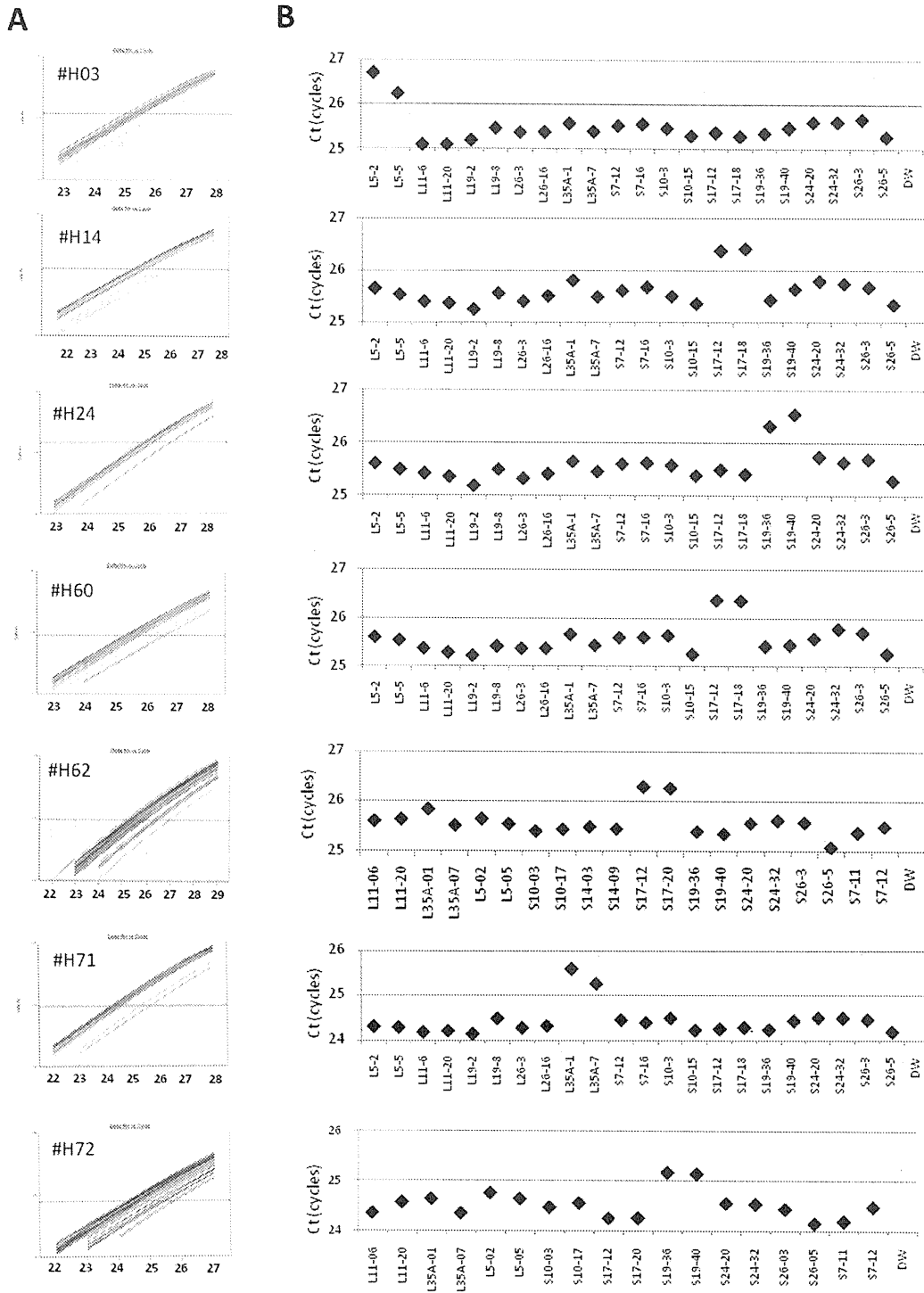


図1. Q-PCRによるDBAの遺伝子コピー数検査

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。

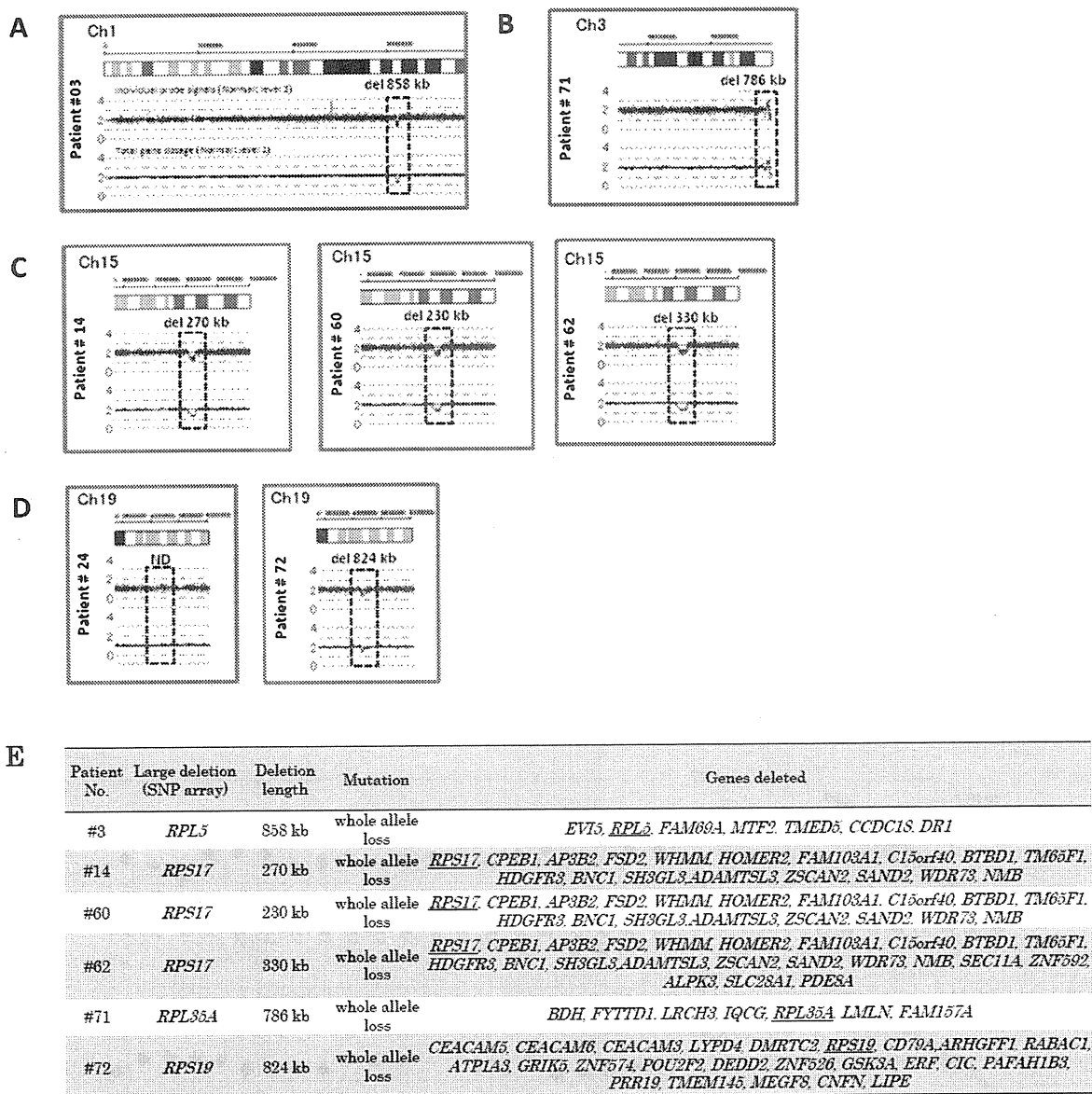


図2. SNP アレイによる片アレル欠失の解析

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。

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)

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 診療の参照ガイド

平成22年度改訂版

編集 小澤 敬也（研究代表者）

再生不良性貧血
赤芽球癆
不応性貧血（骨髄異形成症候群）
発作性夜間ヘモグロビン尿症
自己免疫性溶血性貧血
骨髄線維症
先天性骨髄不全症候群

Diamond-Blackfan 貧血

診療の参照ガイド（平成 22 年度版）

Diamond-Blackfan 貧血の診断基準と診療の参照ガイド 作成のためのワーキンググループ

【メンバー】

伊藤 悦朗	弘前大学医学部附属病院小児科
小島 勢二	名古屋大学大学院医学研究科小児科
大賀 正一	九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野
小原 明	東邦大学医療センター大森病院輸血部

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
研究代表者 伊藤悦朗

平成 23 年（2011 年）3 月

1. 緒 言	241
2. 診 断	241
1) 疾患概念	241
2) 診断基準	241
3) 診断のフローチャート	242
4) 鑑別診断	243
3. 疫 学	244
1) 発生頻度	244
2) 自然歴・予後	244
4. 病因・病態	244
5. 臨床症状	246
1) 貧血	246
2) 合併奇形	246
3) 悪性腫瘍の合併	246
6. 治療法・治療指針	247
1) 薬物療法	247
2) 輸血	247
3) 造血幹細胞移植	247
7. 問題点・将来展望	248
参考文献	248

1. 緒言

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。骨髓は正形成であるが赤血球系細胞のみが著減し、末梢血では網赤血球が減少し、大球性正色素性貧血を呈する。約40%の症例で様々な奇形を合併することが知られている。大頭、小頭などの頭部、顔部の異常が最も多く、上肢、眼、泌尿生殖器系、心臓の異常や低身長が見られる。ほとんどが散発例であるが、約10～20%の症例では家族歴があり、主に常染色体性優性の形式をとる¹⁾。

1936年Josephsにより2例²⁾、2年後にはDiamondおよびBlackfanにより4例が報告され³⁾、独立した疾患概念として確立した。その後、この疾患の病因に関する様々な研究が行われてきたが、長らく病因は不明であった。1999年、Draptchinskaiaらは染色体転座をもつDBA患者の遺伝子解析などから病因遺伝子の遺伝子座が第19番染色体長腕(19q13)に存在し、さらに原因遺伝子が80個あるリボソームタンパク(RP)の一つであるRPS19をコードする遺伝子であることを明らかにした⁴⁾。RPS19遺伝子変異は約25%のDBA患者に認められるが、最近RPS24、RPS17、RPL5、RPL11およびRPL35aなどの遺伝子変異が少数例のDBAで発見された。欧米では約50%、本邦では約30%の患者で遺伝子変異が見出されている⁵⁾⁶⁾。これまで発見されたDBA遺伝子は全てRPをコードしていることから、リボソームの機能障害によって生じる翻訳の異常が、本疾患の赤芽球造血障害の中心的なメカニズムであることが明らかになってきた⁷⁾。

DBAも他の先天性造血不全症と同様に、経過中に骨髓異形成症候群(MDS)や白血病などの血液腫瘍や骨肉腫などの固型癌を合併する頻度が高い。治療は輸血とステロイド療法が基本である。約70～80%の例は最初のステロイドに反応するが、60～70%が輸血非依存性になるのみである⁵⁾。治療抵抗例では、同種骨髄移植の適応がある⁵⁾⁸⁾。DBAは、患者数も限られるため、無作為割付試験を含む前方視的治療研究は少なく、得られている情報は極めて乏しい。よって、わが国や海外に存在する疾患登録事業で得られたデータや文献をもとに専門家が作業をすすめ、わが国のDBAの患者に対し現時点で最も推奨される診療ガイドラインを作成した。

2. 診断

1) 疾患概念

リボソームの機能不全を背景に、1) 赤芽球癆、2) 身体奇形、3) MDSや白血病への移行や固型癌の合併を特徴とする血液疾患である。

2) 診断基準

典型例の臨床像としては、1) 一歳未満の発症、2) 他の2系の血球減少を認めない大球性貧血(あるいは正球性貧血)、3) 網状赤血球減少、4) 赤芽球前駆細胞の消失を伴う正形成骨髓所見を認め、身体奇形を伴う。しかし、その表現型は多様で、家族内に発端者と同一の遺伝子異常をもつ貧血や身体奇形を伴わない軽症例も存在する。したがって、臨床像のみで本疾患を確定診断するのは不可能である。遺伝子変異が確認されれば診断は確定するが、50%以上の患者では、責任遺伝子が同定されていない。本症が悪性疾患を合併しやすいことから、同種骨髄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。軽症例の診断も可能な診断基準案を表1に示す。

表1. 先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan貧血：DBA）の診療基準

A. 診断基準

1. 1才未満である。
2. 大球性貧血（あるいは正球性貧血）で他の2系の血球減少を認めない。
3. 網状赤血球減少を認める。
4. 赤芽球前駆細胞の消失を伴う正形成骨髓所見を有する。

B. 診断を支持する基準

大支持基準

1. 古典的DBAに見られた遺伝子変異を有する。
2. 家族歴を有する。

小支持基準

1. Erythrocyte ADA (eADA) activity高値。
2. 古典的DBAにみられる先天奇形を有する。
3. HbFの上昇。
4. 他の先天性骨髓不全症候群の証拠がない。

古典的DBAは4つの診断基準をすべて満たす。

非古典的DBAは、下記の①～③のいずれかを満たす。

- ① 3つの診断基準と1つの大あるいは2つ小支持基準
- ② 2つの診断基準と2つの大あるいは3つの小支持基準
- ③ 2つの大支持基準

注意) 鑑別診断としては、transient erythroblastopenia of childhood (TEC) が最も重要である。TECは1歳以上の幼児に好発し、先行するウイルス感染に続発することが多い疾患である。ほとんどの症例は無治療で1～2ヶ月以内に自然治癒する。正球性貧血を呈し、HbFおよび赤血球ADAは正常である(表2)。

3) 診断のフローチャート(図1)

DBAには、診断のために有用なスクリーニング法がない。TECとの鑑別診断には、赤血球ADA活性の高値を確認することが有用である。遺伝子診断は有用であるが、本邦では原因遺伝子が同定されるのは全体の約30%にすぎない(表4)。通常のシーケンス法で遺伝子変異を同定できない場合は、片アレルの大欠損を解析する必要がある。

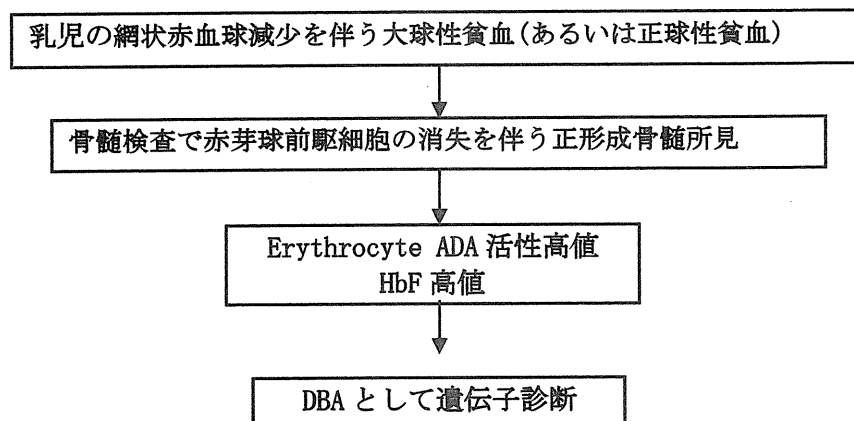


図1 診断のフローチャート

4) 鑑別診断 (表2)

赤芽球癆を呈する疾患の鑑別診断としては、transient erythroblastopenia of childhood (TEC) が最も重要である。TECは1歳以上の幼児に好発し、先行するウイルス感染に続発することが多い疾患です。ほとんどの症例は無治療で1～2ヶ月以内に自然治癒する。正球性貧血を呈し、DBAと異なりHbFおよび赤血球ADAは正常である(表2)⁵⁾。また、骨髓不全や外表奇形を特徴とする先天性造血不全症候群には、表3に示すように、1) Dyskeratosis congenita、2) Schwachman-Diamond症候群、3) Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia、4) Pearson症候群などが知られている。いずれも、稀少疾患ではあるが、それぞれの臨床像が特徴的で鑑別可能である。最近、上記にあげた疾患については、すべて原因遺伝子が同定されたことから、分子病態の解明が進むとともに、遺伝子診断も可能となっている。

表2. TECとの鑑別診断

	DBA	TEC
赤芽球癆	有	有
年齢	一歳未満	一歳以上
遺伝形式	散発性、優性遺伝	無
先天奇形	有	無
平均赤血球容積	高値	正常
HbF	高値	正常
i RBC抗原	有	無
赤血球ADA活性	高値	正常

表3. 先天性再生不良性貧血

	FA	DKC	SDS	CAMT
報告数	>1000	>225	>300	>45
遺伝形式	AR (頻度) FANCBのみ XLR	AR (頻度) DCK1:XLR	AR	AR, XL
責任遺伝子	FANCA (57-66%) FANCB (rare) FANCC (10-15%) FANCD1/BRCA2 (2-4%) FANCD2 (~2%) FANCE (rare) FANCF (2%) FANCG/XRCC9 (9%) FANCI/J/BACH1 (rare) FANCL/PHF9/POG (rare) FANC M/Hef (rare) FANCN/PALB2 (2%)	DKC1 (30%) TERC (<5%) TERT (<5%) TINF2 (11%) NOP10 (rare) NHP2 (rare)	SDBS (95%)	c-Mpl (~100%)
平均診断年齢	7.6歳	5～15歳	4カ月	9カ月
外表奇形	75%	100%	60%	40%
汎血球減少	90%	10歳までに50%	好中球減少95%	40%
MDS/AMLへの移行	>14%	0.4～1.3%	5～33%	5%
発癌	7%	8～12%	0%	0%
染色体不安定性	有	正常	正常	正常
予後	平均余命30歳	30歳までに80%が死亡	平均余命35歳	3歳までに50%が死亡

FA : Fanconi anemia DKC : Dyskeratosis congenita SDS : Schwachman-Diamond syndrome
 MMC : mitomycinC CAMT : Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia
 DEB : diepoxybutane AR : autosomal recessive AD : autosomal dominant XL : X-linked

3. 疫学

1) 発生頻度 (表3)

家族性に発症し常染色体優性遺伝の形式をとるものが10～20%である。残りは散発例や他の遺伝形式をとる家族内発生である。発症頻度は、出生人口100万人当たり約5～7名と推定されている。日本小児血液学会の全国データによれば、1988～2005年に登録されたDBA患者は98名であった⁹⁾。

表3. 日本小児血液学会 再生不良性貧血委員会登録症例

	特発性	肝炎	他の2次性	Fanconi 貧血	Diamond- Blackfan 貧血	合計
1988	63	6	0	4	6	79
1989	56	6	0	7	3	72
1990	52	5	0	9	3	69
1991	69	11	1	4	4	89
1992	84	8	1	6	4	103
1993	62	6	1	8	9	86
1994	70	8	0	4	6	88
1995	49	8	2	5	9	73
1996	52	12	1	3	4	72
1997	76	5	0	7	6	94
1998	64	7	0	7	8	86
1999	52	5	1	2	7	67
2000	51	11	0	8	7	77
2001	41	11	0	8	7	67
2002	54	7	0	0	5	66
2003	33	1	0	2	4	40
2004	40	8	0	3	4	55
2005	34	4	1	2	2	43
計	1002	129	8	89	98	1326

2) 自然歴・予後

生命予後は一般的に良好であるが、ステロイド療法および輸血依存症例が約40%ずつ存在しており、上述した副作用および合併症のために、長期にわたり悩まされ、生活の質として高いといえない⁵⁾。また、DBAはFanconi貧血より頻度は低いが、急性白血病、Hodgkinリンパ腫、肝細胞癌、骨肉腫などの悪性疾患を合併しやすい。

これまで、予後因子についての研究がなされてきたが、治療反応性を予測できる初診時の所見は明らかになっていない。我が国における報告からは、発症1年後の貧血の回復が輸血依存性に関連したことから、1年間の治療反応性により造血幹細胞移植を考慮する必要があるかもしれない¹⁰⁾。

4. 病因・病態

近年、病因遺伝子の遺伝子座が第19番染色体長腕に同定され、そこに存在する原因遺伝子がリボソームタンパクの一つであるRPS19をコードする遺伝子であることが明らかにされた。RPS19遺伝子変異はDBAの約25%に認められる¹¹⁾。さらに、別のリボソームタンパク (RPS24, RPS17, RPS10, RPS26, RPL5, RPL11, RPL35A) の遺伝子変異が発見され、欧米では約50%のDBAの症例において遺伝子異常が明らかにされている

(表4)¹²⁻¹⁹⁾。一方、我が国では約30%の症例に遺伝子変異が検出されている⁶⁾。

リボソームはmRNAの翻訳を担う細胞内装置であり、4種類のRNAと80種類のリボソームタンパク質からなる巨大な複合体である。ほ乳類のリボソーム(80S)は、大サブユニット(60S)と小サブユニット(40S)から成り、それぞれのサブユニットはリボソームRNA(rRNA)とリボソームタンパク質で構成されている(図2)。小サブユニットを構成するリボソームタンパク質はRPS、大サブユニットを構成する蛋白はRPLと呼ばれる。4種類の成熟したrRNAは、複雑な過程を経て共通の前駆体から成熟する(図3)。小サブユニットを構成するリボソームタンパクRPS19、RPS24、RPS10、RPS26は、18S rRNAの成熟と40Sリボソームサブユニットの組み立てに重要な役割を果たしている¹⁹⁻²³⁾。一方、大サブユニットを構成するリボソームタンパクであるRPL35A、RPL5とRPL11は、28Sと5.8S rRNAの成熟と60Sリボソームサブユニットの組み立てに重要な役割を果たしている^{16), 17)}。したがって、これらのリボソーム蛋白の欠乏は、相対的な40Sあるいは60Sリボソームの欠乏を招き、翻訳開始能の低下を引き起こすと考えられる。

これまで発見されたDBAの遺伝子変異は、すべてリボソームタンパク遺伝子のヘテロ変異であった。貧血の起こる仕組みについてはまだ完全に理解されていないが、リボソームの機能障害の結果、p53の活性化が起こることがDBAの中心的な病因と考えられている²⁴⁾。

表4. Diamond-Blackfan貧血の遺伝子型

遺伝子	頻度 (%)	
	欧米	日本
<i>RPS19</i>	25	11
<i>RPL5</i>	6.6	9
<i>RPS10</i>	6.4	ND
<i>RPL11</i>	4.8	4
<i>RPL35A</i>	3.5	0
<i>RPS26</i>	2.6	ND
<i>RPS24</i>	2	0
<i>RPS17</i>	1	2
Total	52.9	27

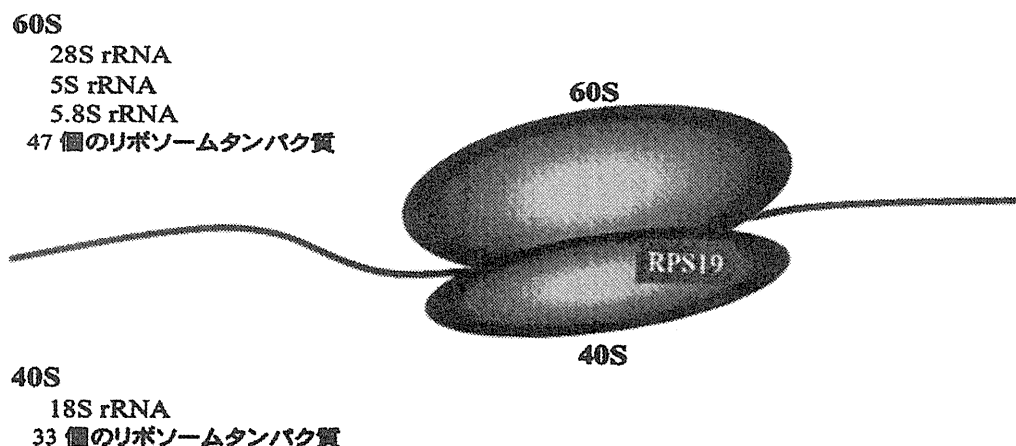


図2 リボソームの構造

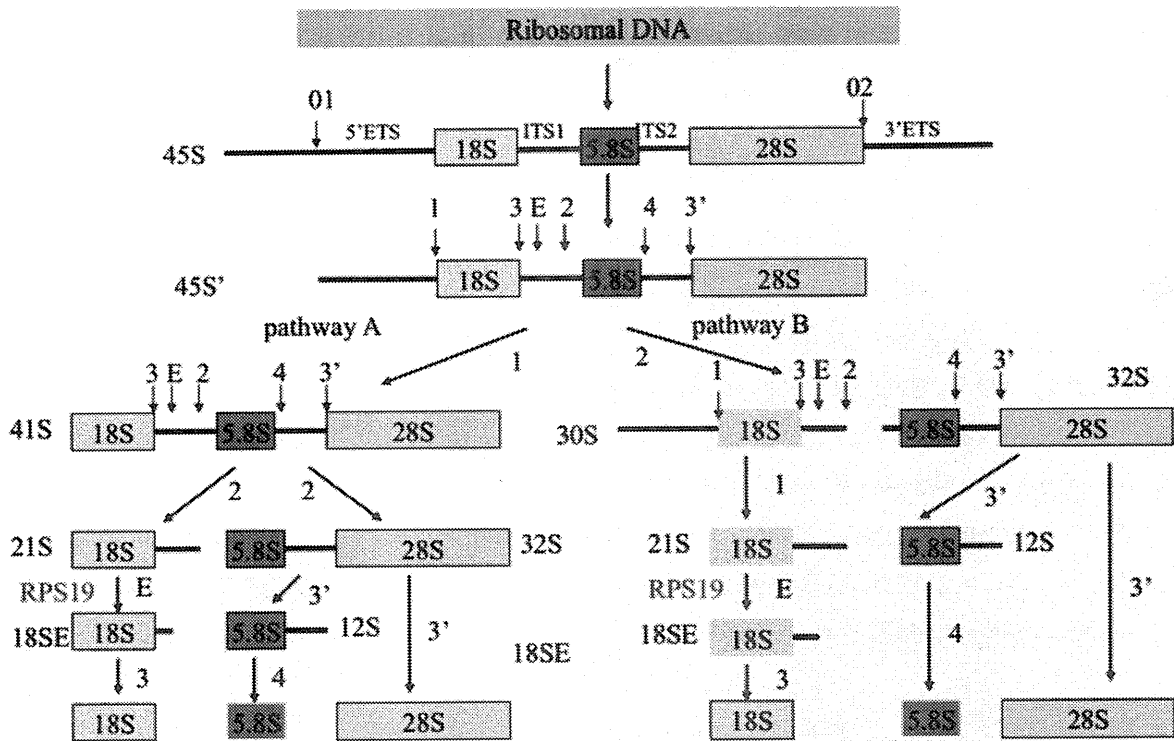


図3 rRNAの成熟とRPS19の役割

成熟した18S, 5.8S, 28S rRNAの塩基配列は、45S 転写産物の中でexternal transcribed spacer (5'-ETSと3'-ETS)が両側面に位置し、internal transcribed spacer (ITS1とITS2) によって隔てられている。45S'に切断点を記載した。最初に5'-ETS上のsite1でプロセッシングされるpathway AとITS1上のsite 2でプロセッシングされるpathway Bの2つの経路がある。ヒトの細胞における18S rRNAの3' endの成熟は、多段階的に起る。Pathway Aでは、まず、ITS 1上のsite 2で開裂が起こり、次にsite E、そして最後にsite 3で切断され、成熟した18S rRNAの3' endが完成する。RPS19の推定される機能を図中に記載した。矢印はcleavage siteを示す。

5. 臨床症状

1) 貧血

貧血は新生児期から顔色不良で発見されることが多く、6ヶ月までに75%、1歳までに90%が発症する。

2) 合併奇形 (表5)

Diamond-Blackfan貧血の臨床像は多様で、約40%の例に種々の奇形を合併するが、全く身体奇形がみられない症例も存在する⁵⁾。頭部・顔部の異常が最も多く大頭、小頭、大泉門開大、顔貌異常、小顎、口蓋裂、巨舌、兔唇などが約50%に認められる。上肢の異常としては母指球の平坦化、母指骨異常などが9～19%に認められる。腎泌尿器系の奇形や先天性心疾患を約7%に認める。また、知能障害、低身長なども認められることがある。

3) 悪性腫瘍の合併

悪性腫瘍を合併しやすい。これまでに700例以上のDBA症例から29例(4%)の悪性腫瘍の報告がある⁵⁾。発症の中央値は15歳で、一般の母集団の中央値が68歳に比べてかなり若年である。特にAML/MDSの頻度が最も高い。その他、骨肉腫、悪性リンパ腫(ホジキン、非ホジキン)ヒヒ、乳癌、肝細胞癌など報告されている。

表5. Diamond-Blackfan貧血にみられる合併奇形の頻度

症状		北米	欧州
患者数		420	229
頭部、顔面、口蓋	両眼隔離症、口蓋裂、高口蓋、小頭症、小顎症、小耳症、耳低位、内眼角ぜい皮、眼瞼下垂など	24%	21%
上肢	拇指骨数過多症、重複拇指、拇指低形成、平坦拇指球、合指症、撓骨動脈欠損	21%	9%
腎、泌尿器	腎臓欠損、馬蹄腎、腎低形成	19%	7%
心・肺	心室中隔欠損、心房中隔欠損、大動脈縮窄、複雑心奇形	15%	7%
その他			
頸部	短頸、翼状頸	NA	4%
眼	先天性緑内障、斜視、先天性白内障	NA	12%
神経系	学習障害	NA	7%
低身長		NA	30%
合併奇形あり		47%	41%
重複奇形		25%	24%

6. 治療法

1) 薬物療法

副腎皮質ステロイド療法は約80%の症例で反応が認められる。初期治療としてプレドニゾロン 2 mg/kg/日から投与開始する。約20%の症例はステロイドから離脱可能となる⁵⁾。副作用として成長障害、骨粗しょう症、肥満、高血圧、糖尿病、白内障、緑内障などに注意が必要で6ヶ月未満の症例において推奨されない⁵⁾。他の治療薬剤としてシクロスポリン、メトクロパミド、EPOなどがあげられるが、プレドニゾロン+シクロスポリン併用療法も含め、一定の評価はまだ得られていない。

2) 輸血

副腎皮質ステロイド抵抗性である場合には、4～8週毎の輸血が必要となる。ヘモグロビン値は、8 g/dlを維持することが基本であるが長期間の輸血は、鉄過剰によるヘモジデロシスをきたす。鉄沈着による肝障害、糖尿病、心筋障害を避けるため、desferasiroxあるいはdeferoxamineによる除鉄療法の併用が望ましい。

3) 造血幹細胞移植

ステロイド不応性の輸血依存例は、造血幹細胞移植の適応となる。本邦の移植成績は海外に比して良好である。これまでに19例の同種移植が行なわれ、骨髄移植を受けた13例（6例：HLA一致同胞、7例：非血縁者ドナー）は全て無病生存している¹⁰⁾。しかし、臍帯血移植（CBT）は5例に行なわれ、血縁者間CBTを受けた2例は無病生存しているが、非血縁者間CBTを受けた3例のうち、2例は生着が得られず、1例は生着したがリンパ球増殖性疾患で死亡している¹³⁾。したがって、現時点では移植ソースとしてはできるだけ骨髄を選択すべきである。

7. 問題点・将来展望

わが国のDiamond-Blackfan貧血患者は、日本小児血液学会の再生不良性貧血委員会で、毎年新患発生数の把握や患者の追跡調査がおこなわれていたが、診断は各施設にまかされてきた。平成21年度から中央診断を伴う登録システムを確立し、遺伝子診断も開始した。しかし、軽症例まで正確に診断できる診断基準はまだ存在しないため、優れた診断基準の作成が必要である。

DBAは、リボソームタンパクの欠損によって起る唯一のヒトの先天性疾患である。しかし、一群の先天性骨髄不全症（Dyskeratosis Congenitaや Shwachman-Diamond症候群）の原因遺伝子産物も全てリボソーム合成に関与していると考えられている。これらの疾患は、骨髄不全の他に先天奇形や発がん素因を共有しDBAとの類似点が多く、リボソームの機能不全によって起こる骨髄不全症候群であると考えられる。さらに、最近、後天性血液疾患である5q欠失症候群も「リボソーム病」であることが明らかになった。5q欠失症候群は、del(5q)の染色体異常と赤血球系細胞の分化障害を特徴とする骨髄異形成症候群の一つである。この疾患は、中年女性に好発し、大球性貧血、血小板増加、骨髄の芽球は5%未満、単核か低分葉小型巨核球が目立つことなどの特徴がある。多くは赤血球輸血依存性に陥るが、急性白血病への移行は比較的少ない。2008年、Ebertらは、本疾患の原因がリボソームタンパクをコードするRPS14遺伝子であることを明らかにした²⁵⁾。したがって、DBAの研究は後天性造血不全の診断・治療の進歩にも大きな貢献をすると考えられる。

参考文献

- 1) Da Costa L, Willig TN, Fixler J, Mohandas N, Tchernia G. Diamond-Blackfan anemia. *Curr Opin Pediatr.* 2001; 13: 10-15.
- 2) Josephs HW: Anaemia of infancy and early childhood. *Medicine* 1936; 15: 307.
- 3) Diamond LK, Blackfan KD: Hypoplastic anemia. *Am J Dis Child* 1938; 56: 464-67.
- 4) Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet.* 1999; 21: 169-175.
- 5) Vlachos A, Ball S, Dahl N, Alter BP, Sheth S, Ramenghi U, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol.* 2008; 142: 859-76.
- 6) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang RN, Terui K, et al. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 2010 [Epub ahead of print].
- 7) Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood.* 2010; 115: 3196-3205.
- 8) Ohga S, Mugishima H, Ohara A, Kojima S, Fujisawa K, Yagi K et al. Diamond-Blackfan anemia in Japan: clinical outcomes of prednisolone therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2004; 79: 22-30.
- 9) 小原明: 日本における小児特発性再生不良性貧血など造血障害性疾患の現状。—日本小児血液学会再生不良性貧血委員会疫学調査 1988～2005年— *日小血会誌*2008; 22: 53-62.
- 10) Mugishima H, Ohga S, Ohara A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for Diamond-Blackfan anemia: a report from the Aplastic Anemia Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Pediatr Transplant.* 2007; 11: 601-607.