

201/28037B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

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

平成22-23年度 総合研究報告書

研究代表者 張替 秀郎

平成24(2012)年 5月

目 次

I. 総合研究報告

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 ----- 1

張替秀郎

II. 分担研究報告

1. 遺伝性鉄芽球性貧血患者で同定されたALAS2変異の表現型の検討 ----- 23

古山和道

2. 成人領域の調査研究（平成22年度） ----- 31

小澤敬也

3. 小児科領域の調査研究 ----- 34

小島勢二、伊藤悦朗

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 39

IV. 研究成果の刊行物、別冊 ----- 42

V. 参考資料 ----- 155

I. 総合研究報告

研究要旨

遺伝性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天的異常により発症する難治性の貧血であり、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする。遺伝性鉄芽球性貧血は、希少疾患であるため、その発症頻度や病態についての詳細な調査・解析がなされてこなかった。そこで、今回、遺伝性鉄芽球性貧血の全国的調査を行い、これまで把握されていないその疫学・病態を明らかにする臨床研究を計画した。まず本邦における鉄芽球性貧血の症例数把握のためにまず予備調査を行ったところ、計298例の鉄芽球性貧血症例が確認された。これらの症例に対し、病態解析のための一次調査を施行し、148例の鉄芽球性貧血症例の臨床データが回収された。このうち、myelodysplastic syndrome (MDS)-refractory anemia with excess blasts (RAEB)、アルコール性をのぞく137例の内訳は、MDS-refractory cytopenia with multilineage dysplasia (MDS-RCMD) 72例、MDS-refractory anemia with ring sideroblast (RARS)47例、遺伝性鉄芽球性貧血18例であった。全国調査と並行し、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として知られている*ALAS2*、*ABC7*、*GLRX5*、*SCL25A38*遺伝子の変異解析のシステムを構築した。このシステムを用い、全国調査で抽出した遺伝性鉄芽球性貧血症例について遺伝子解析を行ったところ、最終的に遺伝性鉄芽球性貧血は、*XLSA10*例、*PMP1*例、原因遺伝子不明7例に分類できた。また、性差、年齢、血液検査などの臨床情報を解析した結果、後天性鉄芽球性貧血群と比較して、遺伝性鉄芽球性貧血群で有意に年齢、MCVが低値で、血清鉄値が高い傾向が認められた。また、遺伝性鉄芽球性貧血確定群は1例を除き全員が男性であった。これらの結果から、遺伝性鉄芽球性貧血の特徴として、男性、小球性貧血、血清鉄高値が抽出され、変異遺伝子は*ALAS2*の変異が最も多いことが示唆された。一方で、後天性鉄芽球性貧血において高頻度で変異が認められるRNAスプライシングコンプレックスの構成分子である*SF3B1*遺伝子の変異は遺伝性鉄芽球性貧血症例では認められず、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血での遺伝的背景は異なることが示唆された。

研究分担者

小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学教授

土屋滋 東北大学大学院医学系研究科小児病態学分野教授（平成 22 年度）

伊藤悦朗 弘前大学大学院医学系研究科小児科学教授

真部淳 聖路加国際病院小児科医長（平成 22 年度）

小澤敬也 自治医科大学内科学部門血液内科学教授（平成 22 年度）

古山和道 東北大学大学院医学系研究科分子生物学分野准教授

A. 研究目的

鉄芽球性貧血は、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする貧血であり、環状鉄芽球はミトコンドリアにおける鉄の異常蓄積により形成される。鉄芽球性貧血は、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血の 2 つに大きく分類される。このうち、後天性鉄芽球性貧血は RCMD および RARS などの骨髄異形成症候群(MDS)と、アルコールや化学物質や薬剤による二次性の鉄芽球性貧血から構成される。

一方で、遺伝性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天性異常により発症する。遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として、ヘム合成、鉄—硫黄クラスター合成に関わる遺伝子、ミトコンドリア遺伝子など複数の遺伝子が報告されている¹⁻⁵（図 1、表 1）。遺伝性鉄芽球性貧血のうち最も解析が進んでいる鉄芽球性貧血は、ヘム合成系の初発酵素である赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS-2)の変異による X 連鎖性鉄芽球性貧血(XLSA)であり、その多くは ALAS-2 の補酵素である Vit.B6 の投与が有効とされている⁶。これまで、申請者らが解析した XLSA の中には、ヘモグロビン値 3.5g/dl の著明な貧血が Vit.B6 の投与にて正常化した症例や⁷、81 歳で発症した症例も含まれており⁸、鉄芽球性貧血の中には適切な診断・治療がなされていれば、貧血の改善が得られる遺伝性鉄芽球性貧血症例が存在するものと推測される。従って、遺伝性鉄芽球性貧血、特に XLSA と後天性鉄芽球性貧血を鑑別することは、適切な治療を行う上で極めて重要であるが、遺伝性鉄芽球性貧血は稀な疾患であるため、大規模な調査研究が行われたことはなく、その頻度、疾患の構成、病態については不明である。例えば、実際に XLSA が最も頻度の高い遺伝性鉄芽球性貧血であるか、原因遺伝子が不明の症例はどのくらい存在するのか、MDS との病態の違いは何かなど明らかにすべき点は数多く存在する。

そこで、今回、臨床データ解析・分子遺伝学的解析からなる調査研究を行うことにより、遺伝性鉄芽球性貧血の発症頻度・病態を明らかにし、遺伝性鉄芽球性貧血の診断および治療指針を確立することを計画した。本研究を遂行するためには、効率的にできるだけ多数例を解析する必要があることから、成人で

は後天性鉄芽球性貧血を含む骨髄異形成症候群を解析対象とする「特発性造血不全症調査研究班」、小児では先天性骨髄不全症である「先天性角化不全症、Diamond Blackfan 貧血、Congenital dyserythropoietic anemia に関する研究班」と共同で、症例数把握のための予備調査を平成 21 年度からすすめた。特に小児血液領域では症例の中央診断システムが確立されている事から、これらの研究班と連携することにより稀少疾患である遺伝性鉄芽球性貧血の症例蓄積が期待できる。この予備調査の結果を踏まえ、把握できた鉄芽球性貧血症例を対象にその病態を明らかにするために臨床情報を回収し、まず本邦における鉄芽球性貧血の病態を明らかにする。さらに得られた臨床情報をもとに遺伝性鉄芽球性貧血症例を抽出し、遺伝子解析を行い、変異遺伝子を同定する。最終的に、臨床情報をもとにした疫学・病態解析、そして遺伝子解析による分子診断の結果をもとに、遺伝性鉄芽球性貧血の診断基準を確立することを目的とする。これまでに、鉄芽球性貧血を一つの疾患単位として捉えた調査研究はなく、また、その調査解析を入り口として症例を絞り、遺伝子解析を行うことで遺伝性鉄芽球性貧血を拾い上げるというアプローチは国内外を通じてない。このアプローチにより、後天性鉄芽球性貧血と遺伝性鉄芽球性貧血の鑑別診断、さらに本邦における遺伝性鉄芽球性貧血の分子病態を明らかにすることができると考えている。さらに、本研究を通じて遺伝性鉄芽球性貧血の複数にわたる原因遺伝子の遺伝子解析基盤を構築することも本研究の重要な一つの目的である。

B. 研究方法

1. 予備調査：まず、遺伝性鉄芽球性貧血の症例把握のために鉄芽球性貧血の全体の症例数を、症例数の有無を簡単に問うアンケート調査により把握した。対象は、成人領域は全国の日本血液学会認定施設および血液学会評議員の所属施設、計493施設、および小児領域は小児科施設、小児血液学会評議員所属施設、計593施設である。この調査は、特発性造血障害調査研究班（班長自治医科大学小澤敬也教授）、先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血：DBA、班長：弘前大学伊藤悦朗教授）、先天性角化不全症（DC、班長：名古屋大学小島勢二教授）、Congenital dyserythropoietic anemia（CDA、班長：聖路加国際病院真部淳医長）と合同で行った。
2. 一次調査：予備調査で鉄芽球性貧血の症例が確認された施設に対し、臨床病態を解析するための一次調査を依頼した。一次調査の調査項目は、発症年齢、性別、家族歴の有無、薬剤服用歴・アルコール摂取などの生活歴、血球計数、鉄関連検査項目（鉄、TIBC、UIBC、フェリチン）を含む生化学検査、骨髄検査所見（染色体分析結果を含む）、治療歴、鉄過剰による臓器障害の有無である。このアンケート調査は後天性の鉄芽球性貧血を含め行った。この調査により、後天性鉄芽球性貧血の病態と遺伝性鉄芽球性貧血の病態の比較が可能となる。
3. 二次調査：家族歴、発症年齢などから遺伝性鉄芽球性貧血が強く疑われる症例、もしくは血球計数で認められる異常が貧血のみで、骨髄所見で異形成や染色体異常がない症例については遺伝性鉄芽球性貧血疑い症例として、これまでに報告されている遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子の変異解析を行い、遺伝性鉄芽球性貧血の診断を確定した。確定した症例について、*ALAS2* の変異の割合、他の原因遺伝子の変異の割合について、その比率を明らかにした。具体的な遺伝子解析の方法は以下の通りである。
 - a) 解析対象とした遺伝子は *ALAS2* 遺伝子に加え、近年、小球性遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として報告された、*ATP binding cassette subfamily B member 7 (ABCB7)*, *Glutaredoxin 5 (GLRX5)*², *Solute Carrier Family 25 member A38 (SLC25A38)* の計 4 遺伝子。全ての症例においてまず *ALAS2* 遺伝子の変異の有無を検索し、*ALAS2* 遺伝子に変異を認めない場合には他の遺伝子の変異の有無について検索をおこなった。
 - b) 遺伝子変異の検索方法
各遺伝子の exon 部分とその近傍を polymerase chain reaction (PCR)法により増幅し、アガロースゲルで電気泳動した後に PCR 産物を精製し、PCR で用いたプライマーを用いて PCR 産物の塩基配列を決定した。(直接塩基

配列決定法) さらに、*ALAS2* 遺伝子については、組織特異的発現制御に関わる事が既に知られている、転写開始点の上流約 200 bp までの近位プロモーター領域と第 8 イントロンのエンハンサー領域についても同様の方法を用いて変異の有無を検討した。用いたプライマーの塩基配列を表 2-5 に示す。近位プロモーター領域、エンハンサー領域およびエクソン領域に変異が同定された場合には、該当変異が single nucleotide polymorphism (SNP)として登録されているかについて National Center for Biotechnology Information が公開している SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) の検索を行なった。

- c) ごく最近RARSにおいて高頻度に変異が認められることが報告されたRNAスプライシング経路の遺伝子である*SF3BI*遺伝子についても変異の有無を解析し、MDSと遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝的背景の相違について検討した⁹。

倫理的配慮

一次調査は、遺伝子検査を含まない診療情報のみの観察研究であるが、二次調査は遺伝子検査を含む介入研究であるため、主治医に患者本人もしくは保護者への説明・同意の取得がなされた上で、申請者が遺伝子解析を行う。申請者の遺伝子解析研究は所属施設の倫理委員会で承認済みであるが、当該研究の参加については主治医が所属するそれぞれの施設の倫理委員会の承認を得る。

C. 結果

1. 遺伝性鉄芽球貧血の疫学

成人領域は日本血液学会認定施設および血液学会評議員の所属施設、計 493 施設、小児領域は小児科施設、小児血液学会評議員所属施設、計 593 施設を対象に、2000 年以降に鉄芽球性貧血と診断した症例の有無について確認する予備調査を行った。

この予備調査で鉄芽球性貧血症例298例が確認された。確認された施設に対し、臨床病態を解析するための一次調査を依頼した。本年度研究終了時点で、148例のデータが回収された。一次調査で得られたデータを解析した結果、後天性鉄芽球性貧血MDS-RCMD72例、MDS-RARS47例、MDS-RAEB10例、アルコール性1例、遺伝性鉄芽球性貧血18例の診断に至った(図2)。遺伝性鉄芽球性貧血は、家族歴、発症年齢などの臨床情報から診断したが、18例の遺伝性鉄芽球性貧血のうち、6例はすでに遺伝子解析により XLSA の確定診断がなされていた。また、1例は臨床的にPMPS (Pearson Marrow-Pancreas Syndrome)と診断されていた。MDS-RAEBの内訳は、RAEB1が5例、RAEB2が5例であった。

2. 鉄芽球貧血の臨床像

遺伝性鉄芽球性貧血とMDSの臨床データを表6, 7に示す。遺伝性鉄芽球性貧血の発症年齢は、RARSやRCMDと比較して有意に若かった(それぞれ18.5, 72.5, 71歳)。ただし、また、MCVの値も、RARSやRCMDと比較して遺伝性鉄芽球性貧血において有意により低かった(それぞれ68.7 fl, 106.8 fl, 106.5 fl)。血清鉄については、RARSやRCMDと比較して遺伝性鉄芽球性貧血において有意により高かった(それぞれ210.7 µg/dl, 162.8 µg/dl, 171.1µg/dl)。また、発症年齢は、遺伝性鉄芽球性貧血確定群で低く、後天性鉄芽球性貧血群では性差が認められなかったのに対し、遺伝性鉄芽球性貧血確定群は男性が圧倒的に多かった。RARSやRCMDについては、異型性の有無、染色体異常についても解析を行った。RCMDについては、染色体異常があり、多系統の細胞に異形成を認めるものもしくは赤血球以外の血球減少を認めるもの27例、染色体異常はないが、多系統の細胞に異形成を認めるものもしくは赤血球以外の血球減少を認めるもの41例、染色体異常の有無は不明だが、多系統の細胞に異形成を認めるもの4例であった。RARSについては、染色体異常があり、異形成を認めるもの13例、染色体異常はないが、異形成を認めるもの20例、染色体異常はあるが、異形成を認めないもの4例、染色体異常、異形成ともに認めないもの8例、染色体異常を認めず異形成の有無が不明であるもの2例であった。これらの結果を表8に示す。RARS、RCMD いずれにおいても最も頻度が高く認められた染色体異常は+8であった

(図3)。予後不良染色体である-7についてはRCMDのみで認められ、RARS では認められなかった。遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子である*ABCB7*が位置する染色体に関連する異常、*idic (X) (q13)*がRCMDの1例で認められた。予後については遺伝性鉄芽球性貧血はMDSと比較して良好であった(表9)。アルコール性鉄芽球性貧血症例の臨床経過を図4に示す。本症例は当初RARSが疑われたが、断酒により肝機能の改善とともに貧血の改善が認められ、アルコール性と診断された。

3. 遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝子解析

これまでの遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝子解析のまとめを表 10, 11 に示す。

18 例の遺伝性鉄芽球性貧血のうち、3 例では DNA 解析が行い得なかった。PMPS が疑われる 1 例については現在解析中である。18 例中 10 例で *ALAS2* 遺伝子の変異が確認された。このうち、3 例において 170 番目のアミノ酸である Arginine 残基の置換が認められた。2 例は R170L、1 例は R170C である。変異蛋白質の活性分析を行ったところ、いずれの変異ともに *in vitro* で活性の低下が認められ、pyridoxal 5-phosphate (PLP)の添加によりその活性が部分的に回復した。この結果からは p.R170 は Vit.B6 反応性変異と考えられたが、興味深いことに R170L については 1 例が Vit.B6 著効例であり、もう一例は無効例であった。411 番目と 452 番目のアミノ酸である Arginine 残基の置換がそれぞれ 2 例ずつで認められた (R411C, R452C)。臨床的に R411C は Vit.B6 反応性変異であり、R452C は Vit.B6 不応性変異であった。本邦における *ALAS2* 蛋白質変異の hot spot は 170 番目、411 番目および 452 番目のアミノ酸である Arginine 残基であることが示唆された。また、XLSA 10 例全体では 6 例が Vit.B6 反応性であり、XLSA においては高率に Vit.B6 治療が有効であることが明らかとなった。また、遺伝子解析が行えなかった症例においても Vit.B6 反応性の症例が複数認められた。これらの症例の多くは臨床所見から XLSA が強く疑われた。一方で、MDS における Vit.B6 反応症例は少数であり、また反応も一時的であった(表 12)

さらに、RARS で高頻度に変異が認められることがごく最近報告された *SF3B1* 遺伝子について解析を行ったが、解析を行った遺伝性鉄芽球性貧血症例においてはその変異は認められなかった(表 10, 11)。一方で、MDS においては既報通り、*SF3B1* 遺伝子の変異が高頻度に認められた(表 13)。*ALAS2*、*ABCB7*、*GLRX5*、*SLC25A38*いずれの遺伝子においても変異が認められなかった 4 例については現在新たな遺伝子の同定を試みている。

これまでの遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝子解析のまとめを図 5 に示す。

D. 考察

今回の調査解析により、148 例の鉄芽球性貧血症例の臨床データが得られた。その結果、後天性鉄芽球性貧血が遺伝性に比べ多かったものの、遺伝性鉄芽球性貧血 18 症例を確認することができた。

臨床情報を解析した結果、後天性鉄芽球性貧血群と比較して、遺伝性鉄芽球性貧血確定群で有意に MCV、ヘモグロビンは低値であり、血清鉄値は高い傾向が認められた。これらの結果から、鉄芽球性貧血の中でも、小球性貧血を呈し、血清鉄値が高い症例は遺伝性鉄芽球性貧血が強く疑われることが明らかとなった。この点についてはサラセミアとの鑑別が必要となるが、本邦においてはサラセミア症例はヘテロ接合体が多く、小球性を呈するものの赤芽球数は正常かむしろ高値であることから鑑別が可能と思われる。貧血が中等度以上の症例の場合、多くは骨髄穿刺がなされるため、サラセミアと遺伝性鉄芽球性貧血の鑑別は確実になされるものと考えられる。予想された通り発症年齢は、遺伝性鉄芽球性貧血確定群で低く、後天性鉄芽球性貧血群では性差が認められなかったのに対し、遺伝性鉄芽球性貧血確定群は 1 例を除き全員が男性であった。この性差については、遺伝性鉄芽球性貧血のほとんどが、*ALAS2* 遺伝子の変異による X-連鎖性鉄芽球性貧血 (XLSA) であったためと思われる。遺伝子解析が行えなかった症例においても Vit.B6 反応性の症例が複数認められた。これらの症例の多くは臨床所見から XLSA が強く疑われる。従って、本邦においては遺伝性鉄芽球性貧血の中で XLSA の頻度が最も高いことは間違いなく、遺伝性と後天性の鑑別、遺伝性とサラセミアとの鑑別において、男性症例、小球性、家族歴の有無は重要な点であると考えられる。

ALAS2 遺伝子の変異について、2 例において 411 番目と 452 番目のアミノ酸である Arginine 残基の置換が、3 例において 170 番目のアミノ酸である Arginine 残基の置換が認められた。従って、変異部位についてはホットスポットが存在することが示唆される。170 番目の Arginine に変異が認められた 3 例のうち、2 例は R170L、1 例は R170C であった。変異蛋白質の活性分析を行ったところ、いずれの変異ともに *in vitro* で活性の低下が認められ、pyridoxal 5-phosphate (PLP) の添加によりその活性が部分的に回復した。この結果からは p.R170 は Vit.B6 反応性変異と考えられたが、興味深いことに R170L については 1 例が Vit.B6 著効例であり、もう一例は無効例であった。従って、発症には遺伝子変異のみで規定されず、患者の臓器障害や栄養状態などの複合的な要因が関与していると考えられた。また、XLSA 10 例全体では 6 例が Vit.B6 反応性であり、XLSA においては高率に Vit.B6 治療が有効であることが明らかとなった。

また、遺伝性鉄芽球性貧血と診断された症例の中には診断時の年齢が 60 歳代の症例が含まれていた。前述の通り、発症は遺伝子変異だけではなく患者の臨

床状態が複合的に関与しており、軽症例では後天的な環境要因が加わり貧血が顕性化する例が存在するものと推測される。従って、成人においても、男性で小球性の鉄芽球性貧血を経験した場合は積極的に遺伝子解析を行うことが推奨される。

欧米からの報告¹⁰によれば、本研究と同様に、遺伝性鉄芽球性貧血症例のうち *ALAS2* 遺伝子の変異が発症原因と考えられる症例が最も多かったものの、グリシンのトランスポーターである *SLC25A38* 遺伝子の変異が比較的高い頻度で認められている。アミノレブリン酸の合成はヘム合成の最初のステップであり、赤血球では *ALAS2* によって、スクシニル CoA とグリシンの重合が触媒され進行する。*SLC25A38* はこのグリシンのトランスポーターであると考えられており、この遺伝子の変異による遺伝性鉄芽球性貧血の病態は *ALAS2* 遺伝子の変異による *XLSA* と類似している。*SLC25A38* 遺伝子の変異は、米国、カナダ、ヨーロッパで報告されており、その他、アジアなどの地域では確認されていない。この結果および欧米の報告から、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子は地域間、人種間で異なることが示唆される。

今回の遺伝性鉄芽球性貧血 18 例のうち、7 例で原因遺伝子が現在のところ同定されていない。これら、原因遺伝子が不明の症例に関しては、小球性ではない遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として報告されている、*Pseudouridine synthase 1 (PUS1)*, *Solute Carrier Family 19 member A2 (SLC19A2)* 遺伝子の変異の有無や、ミトコンドリア DNA の欠失の可能性についても検討する必要があると考えているが、これらの遺伝子変異による鉄芽球性貧血は、神経、筋など他の臓器に障害がある「*syndromic type*」である。今回の調査研究で変異遺伝子が未同定の症例では、これらの多臓器の障害は明らかでないことから、*syndromic type* ではない鉄芽球性貧血の原因となる *ALAS2* や *SLC25A38* 遺伝子の転写調節領域に変異を有する可能性も否定できない。もちろん、新たな原因遺伝子の変異が発症に関わっている可能性についても考慮すべきであり、これらの症例では全エクソンシーケンスなどによる原因遺伝子の同定を試みる必要がある。逆に「*syndromic type*」の遺伝性鉄芽球性貧血を幅広く拾い上げるためには、血液領域以外の学会との連携も考慮すべきかもしれない。

MDS 症例の解析から、後天性鉄芽球性貧血では *RCMD* が最も多く、ついで *RARS* が多いことが明らかとなった。臨床所見では、MDS の発症平均年齢は 70 歳を超えており、また *MCV* も 100fl を超えていた。遺伝性症例とくらべ明らかに対照的な所見である。後天性鉄芽球性貧血の発症に遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子の異常が関与しているかどうかは今のところ明らかではない。ただし、現時点では、後天性鉄芽球性貧血で高頻度に変異が認められる RNA スプライシングコンプレックスの構成分子である *SF3B1* 遺伝子の変異が遺伝性鉄芽球性貧

血症例では認められておらず、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血での遺伝的背景は異なることが示唆される。

E. 謝辞

最後に本研究で貴重な臨床情報、検体をご提供いただいた先生方に深謝申し上げます。また、*SF3B1* 遺伝子変異解析については東京大学がんゲノミクスプロジェクト吉田健一博士、小川誠司博士に多大なる協力をいただいた。改めて深謝申し上げます。

引用論文

1. Guernsey DL, Jiang H, Campagna DR, et al. Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. *Nat Genet.* ;41:651-653. 2009
2. Camaschella C, Campanella A, De Falco L, et al. The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood* **110**: 1353-1358. 2007
3. Shimada Y, Okuno S, Kawai A, et al. Cloning and chromosomal mapping of a novel ABC transporter gene (hABC7), a candidate for X-linked sideroblastic anemia with spinocerebellar ataxia. *J Hum Genet* 43:115-122. 1998
4. Pearson HA, Lobel JS, Kocoshis SA, Naiman JL, Windmiller J, Lammi AT, et al. A new syndrome of refractory sideroblastic anemia with vacuolization of marrow precursors and exocrine pancreatic dysfunction. *J Pediatr.* 1979;95:976-84.
5. Cotter PD, Baumann M, Bishop DF. Enzymatic defect in "X-linked" sideroblastic anemia: molecular evidence for erythroid delta-aminolevulinate synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:4028-4032.
6. May A, Bishop DF. The molecular biology and pyridoxine responsiveness of X-linked sideroblastic anaemia. *Haematologica.* 1998;83:56-70.
7. Harigae H, Furuyama K, Kudo K, et al. A novel mutation of the erythroid-specific delta-Aminolevulinate synthase gene in a patient with non-inherited pyridoxine-responsive sideroblastic anemia. *Am J Hematol.* 1999;62:112-114.
8. Furuyama K, Harigae H, Kinoshita C, et al. Late-onset X-linked sideroblastic anemia following hemodialysis. *Blood.* 2003;101:4623-4624.
9. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* 2011;478:64-69.
10. Bergmann AK, Campagne DR, McLoughlin EM, et al. Systemic molecular genetic

analysis of congenital sideroblastic anemia: evidence for genetic heterogeneity and identification of novel mutations. *Pediatr Blood Cancer*.; 54:271-278. 2010

E. 結論

本邦において、300例に上る鉄芽球性貧血症例が存在することが明らかとなった。このうち遺伝性鉄芽球性貧血は18例が確認され、現時点で確認し得た変異遺伝子は*ALAS2*遺伝子のみであった。従って、本邦の遺伝性鉄芽球性貧血の病態は*ALAS2*遺伝子変異により発症するXLSAの特徴を強く反映しており、本邦において遺伝性と後天性の鑑別する際の基準として、1.小球性、2.男性、3.若年発症、が挙げられる。ただし、同一の*ALAS2*遺伝子変異を有している症例間でもVit.B6に対する反応性が異なっており、発症は遺伝子変異のみで規定されず、患者の臓器障害や栄養状態などの複合的な要因が関与していると考えられた。遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血での遺伝的背景については、後天性鉄芽球性貧血で高頻度に変異が認められるRNAスプライシングコンプレックスの構成分子である*SF3B1*遺伝子の変異が遺伝性鉄芽球性貧血症例では認められないことから、互いに異なることが示唆された。今後、変異遺伝子が不明の症例の解析から、新たな遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子が同定されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 大場理恵、張替秀郎：遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立. 先天性造血不全シンポジウム 千葉浦安市（平成23年2月4日）
 - 2) Ohba R, Furuyama K, Tsuchiya S, Manabe A, Ito E, Kojima S, Ozawa K, Harigae H
Epidemiological and Genetic Analysis of Sideroblastic Anemia --- Multicenter Study In Japan
52nd ASH annual meeting and exposition Dec.4-7 2010 Orland
- ### 2. 論文発表
- 1) Kadirvell S, Furuyama K, Harigae H, Kiriko K, Tamai Y, Ishida Y, Shibahara S.
The carboxyl-terminal region of erythroid-specific
5-aminolevulinate synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and

protein stability

Exp Hematol. Jan 21. [Epub ahead of print]

- 2) Harigae H, Furuyama K.
Hereditary sideroblastic anemia: pathophysiology and gene mutations.
Int J Hematol. 92:425-31. 2010
 - 3) Tahara T, Yamamoto M, Akagi R, Harigae H, Taketani S.
The low expression allele (IVS3-48C) of the ferrochelatase gene leads to low enzyme activity associated with erythropoietic protoporphyria.
Int J Hematol. 92:769-71 2010
 - 4) 張替秀郎.
血小板増多を伴う後天性鉄芽球性貧血
血液フロンティア 第21巻・第7号 5-8. 2011
 - 5) 張替秀郎.
遺伝性鉄芽球性貧血の病態と診断
日本小児血液学会雑誌 第25巻・第3号 118-122. 2011
 - 6) 大場理恵、張替秀郎
鉄過剰症に対するデフェラシロクス治療
検査と技術 第39巻・第3号 168-172.2011
 - 7) 大場理恵、張替秀郎
デフェラシロクスの造血刺激効果
血液フロンティア 第20巻・第5号 725-731.2010
 - 8) 張替秀郎. 鉄と炎症
日本内科学会雑誌
第99巻・第6号 1282-1286. 2010
 - 9) 張替秀郎.
ミトコンドリアの鉄代謝と鉄芽球性貧血
血液フロンティア 第21巻・第6号 47-52. 2010
 - 10) 張替秀郎. 鉄代謝研究の進歩と鉄関連貧血
臨床病理 第58巻・第12号 1211-1218. 2010
 - 11) 張替秀郎. 遺伝性鉄芽球性貧血/診療の参照ガイド
難治性疾患の診療ガイド. 南江堂. 232-236
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表1. 遺伝性鉄芽球性貧血

| | inheritance | chromosome | gene | mutation | treatment | affected organ |
|--------------|-----------------------|--------------|--------------|----------|-----------|------------------|
| XLSA* | X-linked | Xp11.21 | ALAS2 | missense | Vit B6 | — |
| XLSA / A** | X-linked | Xq13.1 | ABC7 | missense | — | Nv |
| SA /GLRX5 | Autosomal recessive ? | 14q32.13 | GLRX5 | missense | ? | L |
| SA /SLC25A38 | Autosomal recessive ? | 3p22.1 | SLC25A38 | missense | ? | — |
| PMPS*** | Maternal | mitochondria | mitochondria | deletion | — | P, L, K M, Nv |
| TRMA**** | Autosomal recessive ? | 1q23.3 | SLC19A2 | missense | Thiamine | P, H, Nv |
| MLASA***** | Autosomal recessive ? | 12q24.33 | PUS1 | missense | — | M |

*X-linked sideroblastic anemia

**X-linked sideroblastic anemia with ataxia

***Pearson Marrow-Pancreas Syndrome

****Thiamine-resposove megaloblastic anemia

*****Mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia

P; pancreas, L; liver, K; kidney, M; muscle, Nv; nerve system

図1. 遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子

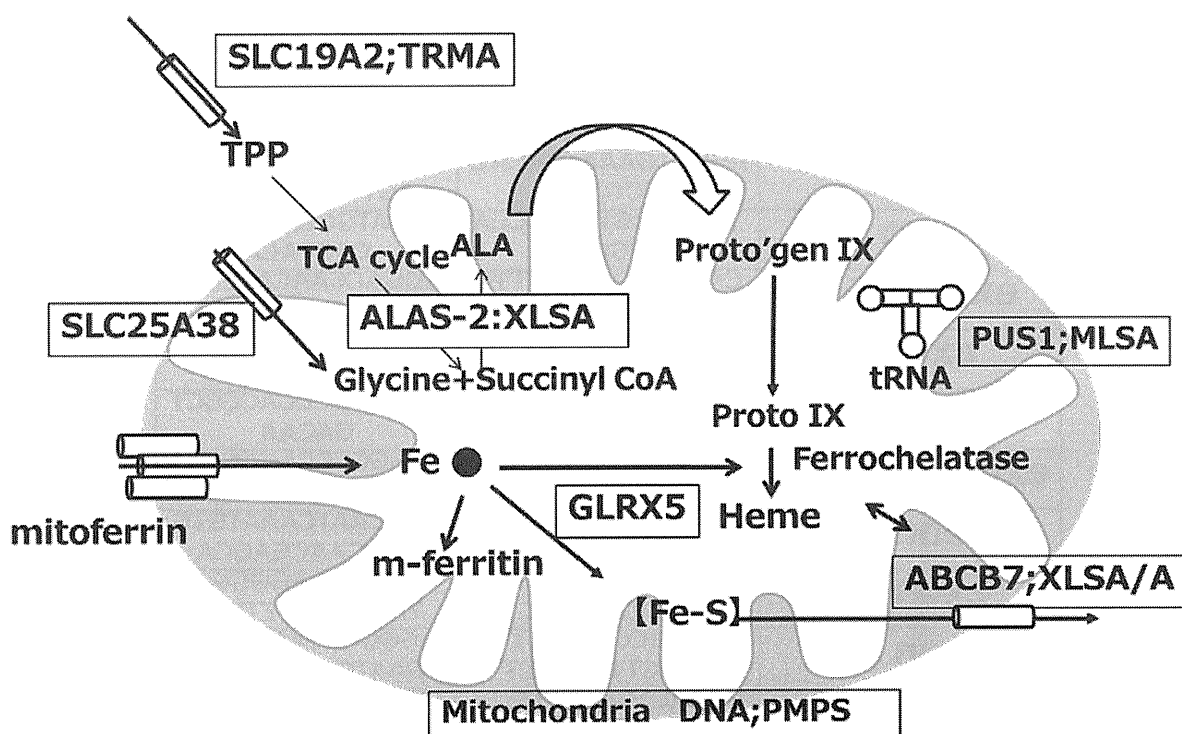


表2 : ALAS2遺伝子の増幅とシーケンスに用いたプライマーの塩基配列

| 増幅領域 | Forward primer | Reverse primer |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Promoter & exon 1 | GATGGTCTGATTCCAAAGCC | TGTGTACAGCCCTGAGAGAC |
| exon 2 | CGAGGATCAAAGGCTTGGCT | GGCCAGTATAACTTGGAACT |
| exon 3 | GGGGTACATTAGATATCAGC | ATTAGAATAGCTCAGGACTG |
| exon 4 | CACATGCTTTCTTTTTCCC | GATGCCTTCCCTATTCCGGT |
| exon 5 | ATACAGACTAGCCAGGGAGA | TCATCTCCTCTGGCCACTGC |
| exon 6 | AACATTGACTCCCATCAAGG | CTGGATGCTGTATTGCAGGA |
| exon 7 | CCAGGTCAAACCTGAAGGTT | TTTTGTGAGACCAACTAG |
| exon 8 | GAAGGTTATGATGTCCTACC | AAGAATTTTGTAAAGGGCCTC |
| exon 9 | CATGATGGTGTTGCTCTGGA | AGCGTGAGGCTCCAGAATA |
| exon 10 | ATCTGCTTAATGGAGCTAGT | AAACTCAGTGGTCTCTGTCC |
| exon 11 | TGGCTCATCTGTACTGTGAC | TGACCAACAAGTGACCTATG |
| intron 8 | GGTACCACTCGCATCCCCTG CAGAG | GGTACCACACAGCCAAAGGC CTTGCC |

表3. ABCB7遺伝子の増幅とシーケンスに用いたプライマーの塩基配列

| 増幅領域 | Forward primer | Reverse primer |
|--------------|---------------------------------|---------------------------------|
| exon 1 | ACAGCTGAAGCCTCC TCCCAGG | CCCCGAGGTCAGGAG GGCAA |
| exon 2 | TGATCCGCCCGCCTT AGCCT | TCTCTGCATTTCAG AAGCAGAAACAT |
| exon 3 | AGTGAATGACACTGG GAAAGCCAG | ACCTTGAAGCACACG CACACACA |
| exon 4 | ACCAAGCCCTCTGCT TTCCTAAAAGG | AGTGATTACACCAG GCCAGGA |
| exon 5 | AGCCTGAAATGACAG CTCTCCA | AACCTCCTTGAAGAA AGTCAACACCTG |
| exon 6 | TCCACAGTAATGCCA TGTGGGCT | CCCATGGGCATGCAA CAGTACA |
| exon 7 & 8 | CACGTACATAACTTC ACGCCACCA | GGGACCAACATCATA GATGCCAAAACA |
| exon 9 | TCAGGGGAAGGCTTT GTGAAGGA | CCAATCAGTGAGTGA GGCAGTGCT |
| exon 10 | GGTGGGTCTTTCCCA TTCCTAACG | AGCACCCCCACCCCT GACAA |
| exon 11 & 12 | CCCTCCCCAACCCCA CCTCA | GAGGCCCCAGGCCAC ACAAC |
| exon 13 | ACCCCTGGGAAGGG AATGGGA | ACCCAATCAAATGTG ACTCAACGAGCA |
| exon 14 | GCCTCATTCTCATTCT TCCCACCTGC | TGGAAAAAGGGGGA TAGGCATTTTGCT |
| exon 15 | AGTTGCCTTCTCTTT TTGCTTTCTCCT | AGGGGCTAAAAACA GAATCGTAACAGG |
| exon 16 | GGCACTGGGTAGCTC AACAGGGA | TGAGCACAACCAGGA CAGTGACA |

表4. GLRX5遺伝子の増幅とシーケンスに用いたプライマーの塩基配列

| 増幅領域 | forward primer | reverse primer |
|--------|------------------------|--------------------------|
| exon 1 | TTGCCGACGACCAATAGTAAGG | ACTCCTCGCCCTAACCCGGCTC |
| exon 2 | GGGAAGCCAGGGAGGGACAGTG | CAGGGCTCCAGAGATAGGCAGGTG |

表5 SLC25A38遺伝子の増幅とシーケンスに用いたプライマーの塩基配列

| 増幅領域 | forward primer | reverse primer |
|--------|---------------------------------|--------------------------------|
| exon 1 | GTCGTCCACGCTGGTCTCCA | CCCCGGCAATTCCGCCCTTT |
| exon 2 | TGAGGCACCACCAGGTAAGTG T | GCTGCTCAGGAACGGACCCC |
| exon 3 | AGGAAGTGTTTGAGTGGGGA ATTGTTT | AGACCACATAGGTACTCCCAC CACT |
| exon 4 | TGGGGTCTTTTGGGAAAACCC AGC | GTGACTCGCATGGAGGCGCT |
| exon 5 | GCCCCATAACCTGCAGTCTGC TT | CACCCTATCCTCACCCCGCCA |
| exon 6 | GGTGGGCAACTTGCAGTACC T | GCCTAGATTTTAACCTGGGCA TGGGG |
| exon 7 | TGGTGGTGGGCGCCTGTAGT | ATCAGTGGTGGCCTGGGGCT |

図2. 一次調査・二次調査のまとめ

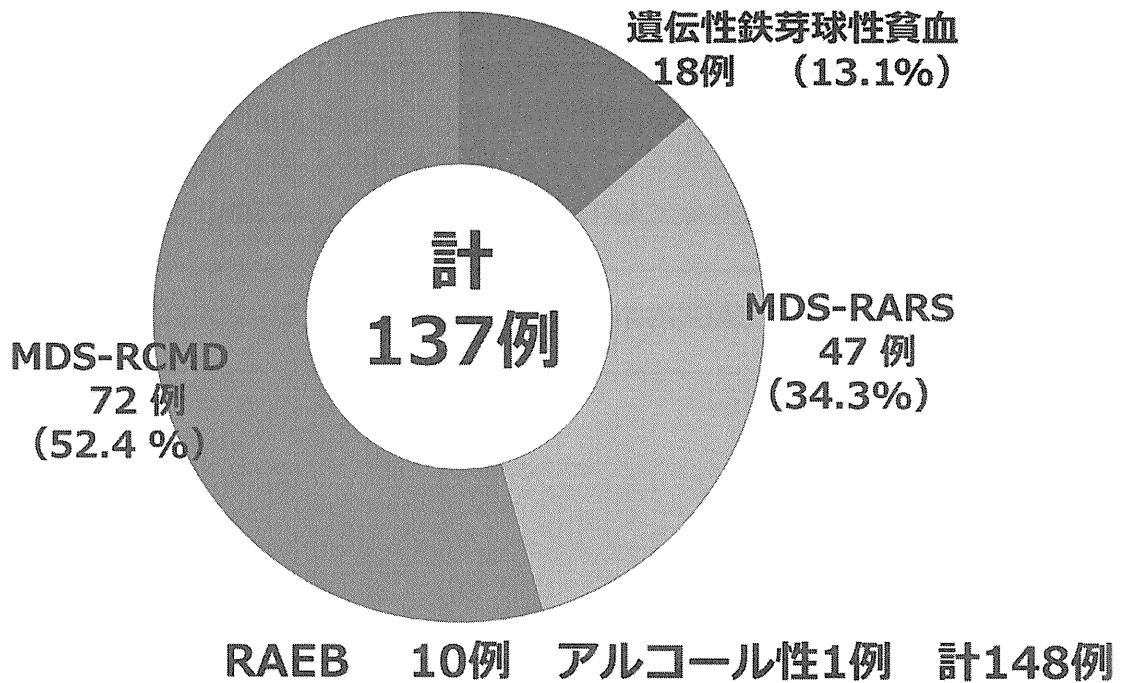


図3. MDSの染色体異常

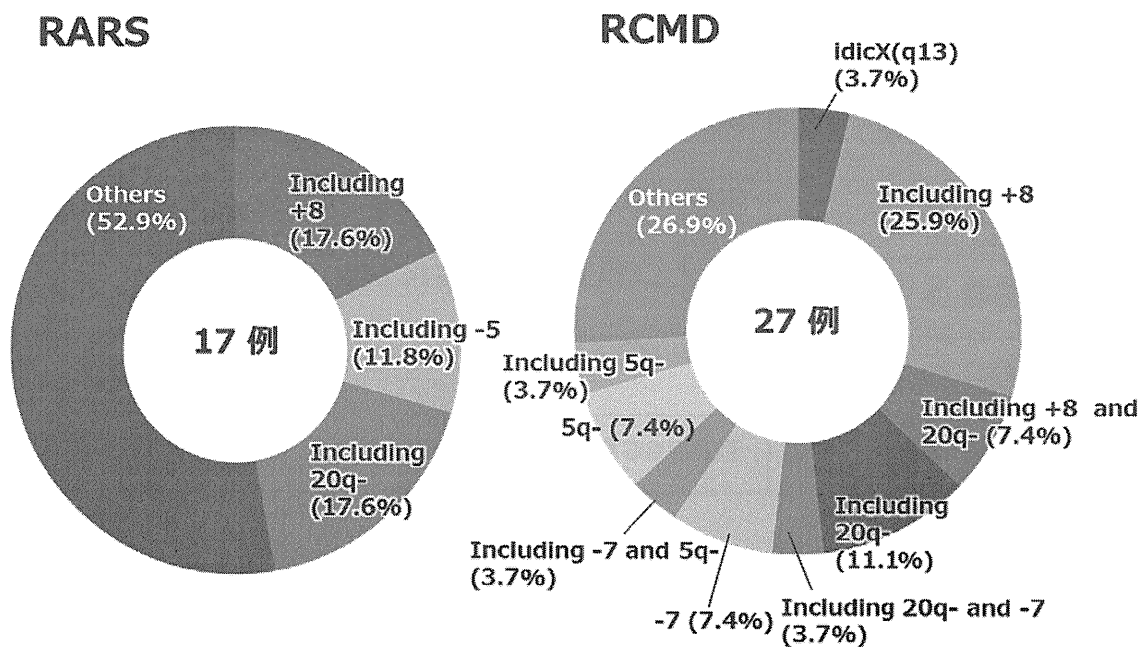


表6. 臨床データ1

| | | 遺伝性(CSA) (18例) | RARS (47例) | RCMD (72例) | P値 (CSA vs RARS) | P値 (CSA vs RCMD) |
|-------------------------------|----|--------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| 性別 | 男性 | 17 | 33 | 44 | | |
| | 女性 | 1 | 14 | 28 | | |
| 発症年齢(歳) | | 19.0 (± 20.2) | 72.5 (± 10.4) | 71.0 (± 13.0) | <0.01 | <0.01 |
| 白血球 (/μl) | | 5547 (± 2022) | 4814 (± 2478) | 4105 (± 1847) | 0.27 | <0.01 |
| 赤血球 (×10 ⁴ /μl) | | 384.3 (± 100.0) | 245.6 (± 45.6) | 239.4 (± 56.4) | <0.01 | <0.01 |
| ヘモグロビン (g/dl) | | 7.1 (± 2.1) | 8.7 (± 1.7) | 8.3 (± 1.8) | <0.01 | 0.02 |
| 平均赤血球容積 (fl) | | 69.0 (± 11.6) | 106.8 (± 9.0) | 106.5 (± 9.2) | <0.01 | <0.01 |
| 血小板 (×10 ⁴ /μl) | | 28.5 (± 12.2) | 25.9 (± 15.5) | 23.9 (± 24.1) | 0.53 | 0.44 |
| 網赤血球 (%) | | 12.1 (± 10.9) | 17.7 (± 10.8) | 21.8 (± 20.0) | 0.07 | 0.05 |

表7. 臨床データ2

| | 遺伝性(CSA) (18例) | RARS (47例) | RCMD (72例) | P値 (CSA vs RARS) | P値 (CSA vs RCMD) |
|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| T-Bil (mg/dl) | 1.1 (± 0.8) | 1.3 (± 0.9) | 1.1 (± 0.7) | 0.47 | 0.78 |
| AST (GOT) (IU/l) | 33.0 (± 24.3) | 24.9 (± 11.7) | 27.9 (± 20.8) | 0.08 | 0.38 |
| ALT (GPT) (IU/l) | 32.3 (± 20.0) | 22.6 (± 15.2) | 26.4 (± 20.0) | 0.04 | 0.28 |
| LDH (IU/l) | 218.3 (± 98.9) | 263.5 (± 119.2) | 246.1 (± 97.7) | 0.16 | 0.28 |
| CRP(mg/dl) | 0.13 (± 0.15) | 0.40 (± 1.16) | 1.17 (± 3.81) | 0.37 | 0.30 |
| Serum iron(mg/dl) | 210.7 (± 75.6) | 162.8 (± 73.6) | 171.1 (± 66.2) | 0.03 | 0.04 |
| UIBC(mg/dl) | 80.4 (± 113.6) | 102.4 (± 82.7) | 78.2 (± 60.7) | 0.48 | 0.93 |
| Ferritin (ng/ml) | 1239.8 (± 1306.8) | 743.4 (± 815.3) | 804.3 (± 990.2) | 0.08 | 0.13 |