

201135012A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

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

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 勢二

平成 24 (2012) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

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

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 勢二

平成 24 (2012) 年 4 月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
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 (研究総括、中央診断、データ管理) .....	1
名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学	小島 勢二
II. 分担研究報告書	
Fanconi 貧血の診断・遺伝子解析・治療法の開発に関する研究 .....	11
東海大学医学部基盤診療学系 臨床検査学	矢部 みはる
ファンconi貧血の遺伝子解析 .....	16
京都大学放射線生物研究センター DNA 損傷シグナル研究分野	高田 穰
先天性赤芽球癆 (DBA) および一過性骨髄異常増殖症(TAM)の新規遺伝子変異の同定 .....	20
弘前大学大学院医学研究科 小児科学	伊藤 悦郎
先天性溶血性貧血診断システムの構築と診断率向上の取り組み .....	24
東京女子医科大学大学院 遺伝子医学	菅野 仁
九州大学大学院医学研究院 周産期・小児医療学	大賀 正一
DKC の遺伝子解析 .....	27
日本医科大学 血液内科	山口 博樹
先天性好中球減少症 (SCN)の次世代シーケンサーを用いた責任遺伝子同定の試み .....	31
広島大学大学院医歯薬学総合研究科 小児科学	小林 正夫
先天性好中球減少症の遺伝子解析 .....	36
信州大学医学部 小児医学	小池 健一
CDA の臨床データ解析 .....	39
聖路加国際病院 小児科	真部 淳
Shwachman-Diamond 症候群の原因究明及び診断・治療法の開発 .....	42
京都大学大学院医学研究科 発達小児科学	渡邊 健一郎

CD3 抗原発現低下を伴う複合免疫不全症の 1 例 富山大学附属病院 小児科	44	金兼 弘和
遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子の同定 東北大学大学院医学系研究科 血液・免疫病学分野	46	張替 秀郎
先天性顆粒放出異常症の遺伝子異常の探索的研究 愛媛大学大学院医学系研究科 小児科学	48	石井 榮一
毛細血管拡張性運動失調症類縁疾患の責任遺伝子の同定 東京医科歯科大学発生発達病態学	51	水谷 修紀
ダウン症候群で見られる一過性骨髄異常増殖症の網羅的遺伝子解析に関する研究 .....	53	林 泰秀
群馬県立小児医療センター		
先天性血小板減少症の遺伝子解析 名古屋医療センター臨床研究センター 高度診断研究部	59	國島 伸治
稀少小児遺伝性血液疾患の疫学データベース構築 東邦大学医療センター大森病院 輸血部・小児科	62	小原 明
次世代シーケンサーを用いた稀少小児遺伝性血液疾患の原因遺伝子探索 .....	64	小川 誠司
東京大学医学部付属病院 Cancer Board		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	67	
IV. 研究成果の刊行物・別冊	69	

# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
総括研究報告書

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

研究代表者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学 教授

## 研究要旨

小児遺伝性血液疾患については、ここ数年、原因遺伝子の解明が進んだが、未だに多くは原因不明である。本研究班は、Fanconi 貧血(FA)、先天性赤芽球ろう(DBA)、先天性角化不全症(DKC)、遺伝性鉄芽球性貧血(SA)、先天性好中球減少症(SCN)、先天性顆粒放出異常症(HLH)、毛細血管拡張性小脳失調症(AT)、一過性骨髄異常増殖症(TAM)、Congenital dyserythropoietic anemia(CDA)、Shwachman-Diamond syndrome (SBDS)、先天性血小板減少症、先天性溶血性貧血、分類不能骨髄不全症の 13 の疾患別研究班から構成され、各研究班は、臨床データの収集、既知の遺伝子解析、機能解析の他、次世代シーケンサーで同定された候補遺伝子についてサンガー法によるバリデーションを担当する。班員の小川と宮野により、高速リシーケンスとスーパーコンピュータを用いた解析パイプラインが構築され、集中的にリシーケンスする体制が整えられた。2012年2月末現在、倫理委員会で承認された5疾患、221検体につき、すでに東大小川研に送付され、順次、リシーケンスがおこなわれている。研究班で保有している残りも検体についても、倫理委員会で承認され次第、リシーケンスを行う。得られた大量のデータを解析するに必要な効率よく胚細胞変異の絞り込みが可能な解析ソフトウェアが開発されたことより、今後は作業のスピードアップが予想される。

### 研究分担者

矢部 みはる	東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学 准教授
高田 穰	京都大学放射線生物研究センター 教授
伊藤 悦朗	弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授
菅野 仁	東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング科 准教授
山口 博樹	日本医科大学血液内科 講師
小林 正夫	広島大学大学院歯薬学総合研究科小児科学 教授
小池 健一	信州大学医学部小児医学 教授
真部 淳	聖路加国際病院小児科 医長
渡邊 健一郎	京都大学医学研究科発達小児科学 講師
金兼 弘和	富山大学附属病院小児科 講師
張替 秀郎	東北大学大学院医学系研究科血液・免疫病学分野 教授
石井 榮一	愛媛大学大学院医学系研究科小児科学 教授
水谷 修紀	東京医科歯科大学発生発達病態学 教授
林 泰秀	群馬県立小児医療センター 院長
國島 伸二	名古屋医療センター臨床研究センター高度診断研究部 室長
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
小原 明	東邦大学医療センター大森病院輸血部・小児科 教授
小川 誠司	東京大学医学部附属病院 Cancer Board 特任准教授
宮野 悟	東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター 教授

## A. 研究目的

稀少疾患であるがゆえに、わが国における実態が不明であった小児遺伝性血液疾患においても、平成 21 年度以降 10 疾患が厚労省難治性疾患克服研究事業に採択され、全国疫学調査、臨床データの収集、遺伝子解析がおこなわれその実態が明らかにされつつある。さらに、上記の 10 疾患に加え、比較的頻度の高い先天性血小板減少症、溶血性貧血も研究対象に加えて、計 12 疾患について次世代シーケンサーを用いた新規原因遺伝子の探索をおこなう。日本小児血液学会の中央診断事業がうまく機能していることに加え、もともと、各疾患の病態や遺伝子解析について実績のある施設が本研究班に参加していることから、過去 15 年間に把握された各対象疾患発症数の実に 80%の検体が、当研究班内の所属施設に保存されている。収集された 1070 検体のうち 736 検体については、既知の遺伝子解析がおこなわれたが、578 検体では原因遺伝子が不明である。次世代シーケンサーによる新規原因遺伝子の探索にあたって、1)対象となる小児遺伝性血液疾患は単一遺伝子病であり、2)原因遺伝子候補のフィルタリングが比較的容易な家族内発症例の検体を多数保存していることは本研究班の強みである。本研究班は上記の 12 疾患に加え、分類不な遺伝性疾患を加えた 13 のグループから構成され、各疾患別研究班では、新規候補遺伝子のサンガー法によるバリデーション、さらに新たに同定された遺伝子の機能解析もおこなう。

## B. 研究方法

これまでに難治性疾患克服事業により、稀少小児遺伝性血液疾患である DKC(小島)、DBA(伊藤)、SA(張替)、SCN(小林)、HLH(石井)、AT(水谷)、FA(矢部)、CDA(真部)、SBDS(渡邊)、TAM(林)の 10 疾患に関する臨床データと臨床検体を収集してき、先天性血小板減少症(國島)、先天性溶

血性貧血(菅野、大賀)を加えた 12 疾患を対象とする。これまでに収集した臨床検体の約半数に当たる 578 検体は、既知の原因遺伝子に変異が検出されずに原因不明であった。

実際に全エクソンシーケンスを開始するにあたって、各疾患の担当施設と実際にシーケンスをおこなう東京大において研究計画書の策定と倫理委員会の承認を得ることを前提とした。まず、集めた検体について、SNP アレイを用いて片アレル欠失の有無を解析する。この解析によっても、原因遺伝子が不明な臨床検体についてエクソーム解析を行う。すなわち、各症例より抽出したゲノム DNA を超音波破碎により断片化し、試料を識別する 6 塩基の Barcode 配列を付与したのち、12 試料を混合し、常法に従って液相ハイブリダイゼーションにより全エクソン配列を濃縮する。得られた混合試料を Illumina 社 HiSeq2000 シーケンサーにより平均読み取り深度 x200 を目標として全エクソン配列の解析を行う。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基変異(single nucleotide variants; SNVs)および欠失・挿入配列から SNP データベースおよび 1000personal genome データベースに登録済みの SNP を除去したのち、家族内罹患者と陰性コントロール(非罹患同胞や両親)の全エクソン解析データとを比較検討することにより、責任変異の候補となる SNV 原因遺伝子の候補を絞り込み、必要に応じて全ゲノムリシーケンスを併用しつつ、機能的な推定と併せて、新規原因遺伝子を同定する。

班員の小川と宮野により、高速リシーケンスとスーパーコンピューターを用いた解析パイプラインを構築し、集中的にリシーケンス、さらにデータを解析する体制を整える。本研究班の対象疾患は胚細胞変異が考えられるので、膨大なデータから効率的に目的とする胚細胞変異を絞り込む解析ソフトウェアを開発する。

体細胞変異が考えられる TAM の原因遺伝子の検索については、TAM 細胞と寛解期の末梢血から DNA を抽出し、次世代シーケンサーで全エクソーム解析する。両者を比較することで、TAM で特異的に生じた体細胞突然変異を同定する。

#### (倫理面への配慮)

日本小児血液学会としておこなう疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として、すでに学会倫理審査委員会で承認されている。調査にあたっては個人情報守秘を厳守し、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。検体の採取にあたっては患者および家族から事前に十分な説明をおこない、文書による同意を得る。各疾患の遺伝子解析についてはヒトゲノム遺伝子解析研究指針にしたがい、患者および家族に事前に十分な説明をおこない、文書による同意を得たのち連結可能匿名検体として研究を遂行する。患者および家族に対して不利益が生じる場合には、いつでも同意の撤回は可能である。既知の責任遺伝子に関しては、すべての当該遺伝子解析施設の倫理委員会で承認されている。網羅的遺伝子研究についても、一部の施設では、すでに倫理委員会での承認が得られており、残りの施設においても、順次、倫理審査が行われている。また、マウスモデルによる遺伝子組み換え実験をおこなう場合は、当該施設の倫理委員会の承認を得た後に、カルタヘナ議定書および関連する政省令、告示に準拠しておこなう。

### C. 研究結果

東京大学と各疾患担当施設の倫理委員会で承認が得られた遺伝性鉄芽球性貧血、ファンconi貧血(FA)、Diamond-Blackfan 貧血(DBA)、先天性血小板減少症、Ataxia-telangiectasia (AT) については総計 221 検体が全シーケンスの担当施設

である東京大学に送付され順次次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析が始まっている。研究が先行する一過性骨髄異常増殖症 (TAM) 班については、TAM11 例、急性巨核芽球性白血病 (AMKL) 5 例の DNA を用いて、体細胞変異の検討をおこなった結果、TAM では、1 症例あたり平均して 1.5 個、AMKL では平均して 7 個の変異が同定されている。AMKL でみられた変異の多くは、これまで AMKL では報告のない変異であった。

本邦における DBA の発端者 76 例について、ダイレクト・シーケンス法で 8 つの既知の原因遺伝子を解析し、21 例 (27.6%) に変異を見出した。次に、SNP アレイと定量的 PCR 法を用いて、7 例にリボソーム蛋白 (RP) 遺伝子遺伝子の欠失を同定した。これらの解析でも遺伝子変異を同定できない 46 例とその家族 (15 例) の DNA 検体についてエクソーム解析を開始した。

FA 遺伝子のゲノムシーケンスより、17 例の FANCA と 2 例の FANCG 遺伝子の変異を同定した。また multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用いて 15 症例の FA および FA 疑い類縁疾患の検討を行った。11 例が染色体脆弱検査、FANCD2 モノユビキチン化の障害等が陽性であり FA の確定診断がなされた。うち 8 例が FANCA シーケンスで A 群と確定され、そのうちの 5 例が A 群 MLPA 法にて片アレルまたは両アレルの検出が可能であった。MLPA 法での検出はリンパ球、骨髄細胞などの造血細胞だけでなく、皮膚・骨髄線維芽細胞でも同等に検出が可能であった。変異の同定ができていない 32 例に関しては、次世代シーケンサーを用いた FA 遺伝子解析とエクソーム解析を準備中である。遺伝性血小板減少症については、38 家系、117 人分の DNA 検体が、AT についても 10 人分の DNA がすでに東京大学に送られてシーケンスが開始され、解析結果が出始めている。



#### D. 考察

小児遺伝性血液疾患の多くは、年間発症数が10例以下と極めて稀であるが、その多くは適切な治療をうけないと致死的経過をたどる。ここ数年、原因遺伝子の解明が進んだが、いまだに多くの症例では原因遺伝子は不明である。実際に当研究班内で収集された検体の半数では既知の原因遺伝子が検出されていない。本研究班が対象とする小児遺伝性血液疾患は 1) 単一遺伝子病であり、2) 原因遺伝子候補のフィルタリングが比較的容易な家族内発症例の検体を多数保存していることから、次世代シーケンサーによる新規原因遺伝子の探索は極めて有用と考えられる。

シーケンスを担当する東京大学小川研究室では、骨髄異形成症候群を対象に次世代シーケンサーを用いてスプライシングに関与する遺伝子異常をすでに同定している。体細胞変異の検出を目的とする TAM については、同様の手法を用いて TAM で平均 1.5 個、AMKL では平均 7 個の GATA1 以外の変異が同定されている。今回、同定した体細胞変異が TAM および TAM から AMKL に進行する過程で生じる遺伝子変異であれば、ダウン症にみられる白血病のみでなく、白血病全体の発症機構の解明に貢献するであろう。

これまで、遺伝性血液疾患において既知の遺伝子変異の検出率が低い原因のひとつとして、サンガー法では検出できない大欠失が潜んでいる可能性が考えられる。そこで、既知の遺伝子変異がみつかっていない44例のDBA患児について SNP array 解析をおこなったが、RPS19を含む領域の欠失を認めたのは2例のみであった。原因遺伝子を含む領域の欠失を認める症例は少ないことから、次世代シーケンサーによる網羅的な解析が必要であると考えられた。

胚細胞変異を検出するには、体細胞変異の検出とは異なる絞り候補遺伝子の絞り込み方法が必要

である。既に膨大なデータから効率的に目的とする胚細胞変異を絞り込む解析ソフトウェアが開発されたことから、今後は作業がスピードアップするであろう。

#### E. 結論

稀少小児血液疾患を対象に次世代シーケンサーをもちいて新規原因遺伝子を探索するプロジェクトは、半数の疾患で 1) 各参加施設による研究計画書の策定と倫理委員会の承認、2) 検体の送付も終わり、順次エクソーム解析が進みつつある。膨大なデータから効率的に目的とする胚細胞変異を絞り込む解析ソフトウェアが開発されたことから、今後は作業がスピードアップすることが期待できる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshida N, Hirabayashi S, Watanabe S, Zaika Y, Tsuchida M, Yoshimi A, Masunaga A, Otsuka Y, Ito M, Kojima S, Nakahata T, Manabe A. [Prognosis of 75 patients with juvenile myelomonocytic leukemia: prospective study by MDS committee in the Japanese Society of Pediatric Hematology]. *Rinsho Ketsueki*. 2011 Dec;52(12):1853-8. Japanese.
- 2) Ismael O, Shimada A, Hama A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Yoshida N, Ito M, Takahashi Y, Akita N, Sunami S, Ohtsuka Y, Asada Y, Fujisaki H, Kojima S. Mutations profile of polycythemia vera and essential thrombocythemia among Japanese children. *Pediatr Blood Cancer*.

- 2011 Nov 21. doi: 10.1002/pbc.23409. [Epub ahead of print]
- 3) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S, Kikura A, Sawada A, Kawa K, Ohshima K, Nakamura S. Epstein-Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non-immunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood*. 2012 Jan 19;119(3):673-86.
  - 4) Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Sato Y, Hayakawa M, Tsuchiya H, Tainaka T, Ono Y, Kaneko K, Ando H, Sato K, Kojima S. Congenital pancreatoblastoma associated with  $\beta$ -catenin mutation. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 May;58(5):827.
  - 5) Sakaguchi H, Takahashi Y, Watanabe N, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kudo K, Kojima S. Incidence, clinical features, and risk factors of idiopathic pneumonia syndrome following hematopoietic stem cell transplantation in children. *Pediatr Blood Cancer*. *Pediatr Blood Cancer*. 2012 May;58(5):780-4.
  - 6) Hama A, Yoshimi A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Nozawa K, Ito M, Tsuchida M, Manabe A, Ohara A, Kojima S. Bone marrow findings of childhood aplastic anemia: analyses of 140 cases by central reviewers. *Rinsho Ketsueki*. 2011 Aug;52(8):653-8.
  - 7) Ito Y, Kawabe S, Kojima S, Nakamura F, Nishiyama Y, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Identification of Epstein-Barr virus-infected CD27+ memory B cells in patients after transplantation. *J Gen Virol*. 2011 Nov;92(Pt 11):2590-5.
  - 8) Watanabe N, Takahashi Y, Matsumoto K, Horikoshi Y, Hama A, Muramatsu H, Yoshida N, Yagasaki H, Kudo K, Horibe K, Kato K, Kojima S. Total body irradiation and melphalan as a conditioning regimen for children with hematological malignancies undergoing transplantation with stem cells from HLA-identical related donors. *Pediatr Transplant*. *Pediatr Transplant*. 2011 Sep;15(6):642-9.
  - 9) Yagasaki H, Kojima S, Yabe H, Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, Kato S, Kawase T, Morishima Y, Kodera Y. Acceptable HLA-mismatching in unrelated donor bone marrow transplantation for patients with acquired severe aplastic anemia. *Blood*. 2011 Sep 15;118(11):3186-3190.
  - 10) Kojima S, Nakao S, Young N, Bacigalupo A, Gerard G, Hirano N, Maciejewski J, Deeg J, Marsh J, Zhang FK, Lee JW, Ozawa K. The Third Consensus Conference on the treatment of aplastic anemia. *Int J Hematol*. 2011 Jun;93(6):832-7.
  - 11) Nishio N, Takahashi Y, Tanaka M, Xu Y, Yoshida N, Sakaguchi H, Doisaki S, Hama A, Muramatsu H, Shimada A, Kojima S. Aberrant phosphorylation of STAT5 by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in infant cytomegalovirus infection mimicking

- juvenile myelomonocytic leukemia. *Leuk Res.* 2011 Sep;35(9):1261-4.
- 12) Muramatsu H, Takahashi Y, Shimoyama Y, Doisaki S, Nishio N, Ito Y, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Ito M, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphoproliferative disease refractory to rituximab in a patient with severe aplastic anemia. *Int J Hematol.* 2011 Jun;93(6):779-81.
  - 13) Watanabe N, Matsumoto K, Kojima S, Kato K. Invasive Fungal Infections in Pediatric Patients With Hematologic Malignancies Receiving Oral Amphotericin B Solution and Early Intravenous Administration of Fluconazole. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2011 May;33(4):270-5.
  - 14) 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; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica.* 2011 Jun;96(6):814-9.
  - 15) Takamatsu H, Yagasaki H, Takahashi Y, Hama A, Saikawa Y, Yachie A, Koizumi S, Kojima S, Nakao S. Aplastic anemia successfully treated with rituximab: The possible role of aplastic anemia-associated autoantibodies as a marker for response. *Eur J Haematol.* 2011 Jun;86(6):541-545.
  - 16) Ozono S, Inada H, Nakagawa S, Ueda K, Matsumura H, Kojima S, Koga H, Hashimoto T, Oshima K, Matsuishi T. Juvenile myelomonocytic leukemia characterized by cutaneous lesion containing Langerhans cell histiocytosis-like cells. *Int J Hematol.* 2011 Mar;93(3):389-93.
  - 17) Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, Yabe H, Kaneko T, Tsuchida M, Ohara A, Nakahata T, Kojima S. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica.* 2011 May;96(5):771-4.
  - 18) Muramatsu H, Takahashi Y, Sakaguchi H, Shimada A, Nishio N, Hama A, Doisaki S, Yagasaki H, Matsumoto K, Kato K, Kojima S. Excellent outcomes of children with CML treated with imatinib mesylate compared to that in pre-imatinib era. *Int J Hematol.* 2011 Feb;93(2):186-91.
  - 19) Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. *Pediatr Transplant.* 2011 Mar;15(2):161-6.
  - 20) 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 Mar 10;117(10):2887-90.

- 21) 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*. 2011 Mar;17(3):291-9.

## 2. 学会発表

### 海外

- 1) Hama A, Muramatsu H, Ito M, Tsuchida M, Sakaguchi H, Doisaki S, Tanaka M, Shimada A, Takahashi Y, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S. Comparison of clinical outcome between children with aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood who received immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and cyclosporine. 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 11, 2011. San Diego, USA.
- 2) Muramatsu H, Yabe H, Kobayashi R, Kikuchi A, Kudo K, Kawa K, Kato K, Suzui R, Takahashi Y, Inagaki J, Inoue M, Kojima S. Allogeneic bone marrow transplantation from HLA mismatched family donors in children with aplastic anemia. 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 12, 2011. San Diego, USA.
- 3) Kudo K, Kobayashi R, Kosaka Y, Tsuchida M, Mugishima H, Ohara A, Yagasaki H, Yabe H, Morimoto A, Takahashi Y, Phga S, Nakahata T, Kojima S. Antithymocyte Globulin (ATG), Cyclosporine (CyA), and Danazol versus ATG and CyA as treatment for children with aplastic anemia: Result of matched-pair analysis. 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 11, 2011. San Diego, USA.
- 4) Hasegawa D, Chen XJ, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics and treatment outcome of refractory cytopenia of childhood (RCC): A prospective registration through the Japanese Society of Pediatric Hematology. 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 11, 2011. San Diego, USA.
- 5) Yoshida N, Kikuchi A, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. Outcomes in children with severe aplastic anemia receiving bone marrow transplantation from an HLA-matched family donor or intensive immunosuppressive therapy as first-line treatment. 53th Annual Meeting of the American Society of Hematology. Dec. 12, 2011. San Diego, USA.

国内

- 1) Hama A, Manabe A, Nozawa K, Sakaguchi H, Doiaski 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 14-16 日. 名古屋.
- 2) Hasegawa D, Chen XJ, Hirabayashi S, Watanabe S, Zaiki Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Ishida Y, Nakahata T, Manabe A. Refractory Cytopenia of Childhood (RCC): A prospective study using a central review by the JSPH. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.
- 3) Ohba R, Furuyama K, Mnabe A, Ito E, Kojima S, Ozawa K, Harigae H. Characteristics of sideroblastic anemia in Japan – from the analysis of multicenter study. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.
- 4) Shimada A, Goto A, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Noda Y, Kojima S, Ito M. Frequent TP42 mutation in pediatric refractory cytopenia of childhood but rare in aplastic anemia. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.
- 5) Yoshida N, Kikuchi A, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First line treatment for aplastic anemia in children: transplantation vs. immunosuppressive therapy. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.
- 6) Muramatsu H, Yabe H, Kobayashi R, Kikuchi A, Kudo K, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Takahashi Y, Inagaki J, Inoue M, Kojima S. Allogeneic stem cell transplantation from HLA-mismatched family donors in children with AA. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.
- 7) Olfat M.M. Ismael, Shimada A, Hama A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kojima S. Mutation profile of childhood Polycythaemia Vera and Essential Thrombocytosis. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.
- 8) Doisaki S, Muramatsu H, Mori M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Hama A, Shimada A, Takahashi Y, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic G12D NRAS mutation associated with juvenile myelomonocytic leukemia. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.
- 9) Sakaguchi H, Muramatsu H, Doisaki S, Yoshida N, Hama A, Shimada A, Takahashi Y, Atsushi Manabe, Kojima S. Aberrant Dna methylation in juvenile myelomonocytic leukemia. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.
- 10) Bustos I, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Hama A, Kojima S. Immune reconstitution after unmanipulated HLA haploidentical with antithymoglobulin. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.
- 11) 坂口大俊、小島勢二. 造血不全における血球テロメア長の測定. 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.

- 12) 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.
- 13) 嶋田明、Olfat Ismael、濱麻人、坂口大俊、土居崎小夜子、村松秀城、高橋義行、福田実、宮島雄二、堀部敬三、小島勢二. 小児 CMML は稀で、JMML とは異なった遺伝子変異がみられる. 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.
- 14) 後藤綾、嶋田明、徐銀燕、坂口大俊、土居崎小夜子、村松秀城、濱麻人、高橋義行、野田幸弘、伊藤雅文、小島勢二. 小児不応性血球減少症における TP53 遺伝子変異. 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.
- 15) 濱麻人、村松秀城、伊藤雅文、土田昌宏、坂口大俊、土居崎小夜子、田中真己人、嶋田明、高橋義行、小林良二、伊藤悦朗、矢部普正、大賀正一、小原明、小島勢二. 小児再生不良性貧血の骨髓像：117 例のセントラルレビューによる検討. 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.
- 16) Olfat Ismael、嶋田明、徐銀燕、坂口大俊、土居崎小夜子、村松秀城、濱麻人、高橋義行、吉田奈央、秋田直洋、角南勝介、大塚欣也、浅田洋二、藤崎弘之、小島勢二. 小児真性多血症と本態性血小板血症の遺伝子変異プロフィール. 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

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
分担研究報告書

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

Fanconi 貧血の診断・遺伝子解析・治療法の開発に関する研究

研究分担者 矢部みはる（東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学 准教授）

**研究要旨：**末梢血リンパ球へのDNA架橋剤添加による染色体脆弱検査と骨髄不全症を含む臨床症状、および京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室におけるFA遺伝子のゲノムシーケンスより、17例のFANCAと2例のFANCG遺伝子の変異を同定した。このうち2例ではリンパ球にリバージョン・モザイクを認めた。FANCA同定に際しては、Multiplex Ligation-dependent Probe (MLPA)法の導入により3例において、迅速な同定結果が得られた。変異が同定できていない32例に関しては、次世代シーケンサーを用いたFA遺伝子解析とエクソーム解析についての東海大学と京都大学における倫理委員会の承認が得られ準備中である。また、高田穰研究室との共同研究で、アセトアルデヒドの分解酵素であるALDH2遺伝子をこれら19症例のFA患者で検討し、骨髄不全の発症時期がAA群、GA群、GG群の各群で明確な違いがあることが判明した。一方、本邦では体細胞モザイクが欧米諸国に比較して多いことが染色体脆弱試験より確認され、治療法に関しては、高レベルのモザイクFA患者においても、放射線療法を用いないフルダラビンを用いた前処置で安定キメラが得られることが示唆された。

#### A. 研究目的

Fanconi貧血(FA)は染色体不安定性を特徴とする稀な遺伝性骨髄不全症であり遺伝的に異なる15種類以上の群に分類されるが、日本での遺伝子群の疫学や臨床像の実態は明らかではない。次世代シーケンサーを用いたFAの遺伝子解析を併用し、日本人のFA遺伝子群の疫学解析を行い、骨髄異形成症候群・白血病などの血液悪性疾患や固形がん発がんの臨床像やメカニズムについても検討を加える。以上の結果を踏まえて、造血細胞移植の方法や経過観察の方法についても検討を行う。また、FA診断治療の基盤確立を目指して、日本人におけるFAと関連病態が疑われるその類縁疾患の患者の遺伝子解析を行い合わせて検討する。

#### B. 研究方法

FA 遺伝子、FA における ALDH2 遺伝子および FA に対する造血細胞移植につき検討を行った。

##### 1. FA 遺伝子診断

- 1) 末梢血リンパ球への DNA 架橋剤添加による染色体脆弱検査、FANCD2 モノユビキチン化の障害を基本として、新規 FA 患者の各種サンプル（末梢血リンパ球、骨髄および皮膚線維芽細胞、骨髄細胞）につき試料保存を行う。京都大学放射線生物研究センター高田穰研究室にて変異の同定を cDNA レベルとゲノムのレベルで解析を行う。
- 2) Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) の導入を行い、FANCA の変異検出をリンパ球および皮膚・骨髄線維芽細胞にて確認する。
2. FA における ALDH2 遺伝子解析  
京都大学放射線生物研究センター高田穰研究室との共同研究で、アセトアルデヒドの分解酵素である ALDH2 遺伝子解析を Taqman PCR 法による検討を行う。
3. FA に対する造血細胞移植  
DNA 架橋剤添加による末梢リンパ球の染色体脆



弱検査にて体細胞モザイクレベルを欧米諸国の FA 患者と比較した。その上で HLA 一致同胞間造血細胞移植における生着と移植後キメリズム、移植関連毒性等につき、放射線治療を含む前処置と放射線治療を除いたフルダラビンレジメンで比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子研究の実施にあたっては「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を、臨床研究の実施にあたっては「臨床研究に関する倫理指針」を順守し、研究対象者に対する人権擁護を基本とし、インフォームドコンセントに基づいた科学的にも倫理的にも妥当な研究の計画と実施している。説明同意書には提供試料（血液、骨髄、皮膚）の確認項目、検体の使用および保存中止請求書類も加えた。また、平易な文面で記載された小児用の説明書も作成し、家族だけではなく患児の理解や同意を得る努力が行われている。

次世代シーケンサーを用いた FA 遺伝子解析とエクソーム解析および FA における ALDH2 遺伝子解析につき、東海大学医学部で以前から承認されている、「ファンconi貧血とその類縁疾患の原因遺伝子解析および生体試料収集とその利用」に変更申請を提出し、承認が得られた。

## C. 研究結果

上記 1～3 につき結果報告する。

### 1. FA 遺伝子診断

- 1) 新規 FA 患者のサンプルとして新たに皮膚線維芽細胞が 3 症例において保存が可能であった。FA 遺伝子のゲノムシーケンスより、17 例の FANCA と 2 例の FANCG 遺伝子の変異を京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室にて同定した。FANCA 症例の 2 例ではリンパ球にリバージョン・モザイクを認め、骨髄線維芽細胞で FA の確定診断を行った。
- 2) MLPA 法を用いて 15 症例の FA および FA 疑い類縁疾患の検討を行った。11 例が染色体脆弱検査、FANCD2 モノユビキチン化の障害等が陽性であり FA の確定診断がなされた。

うち 8 例が FANCA シーケンスで A 群と確定され、そのうちの 5 例が A 群 MLPA 法にて片アレルまたは両アレルの検出が可能であった。MLPA 法での検出はリンパ球、骨髄細胞などの造血細胞だけでなく、皮膚・骨髄線維芽細胞でも同等に検出が可能であった。MLPA 法は DNA を抽出すれば既知の変異であれば、3 日で同定が可能であり、迅速な診断に期待が持たれる。

- 3) 変異の同定ができていない 32 例に関しては、次世代シーケンサーを用いた FA 遺伝子解析とエクソーム解析についての東海大学と京都大学における倫理委員会の承認が得られ準備中である。

### 2. FA における ALDH2 遺伝子解析

ALDH2 遺伝子解析についても東海大学における倫理委員会の承認が得られた。FA 遺伝子の変異が確認できた 19 症例における ALDH2 遺伝子解析を京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室にて行った。東海大学における臨床データとの解析により骨髄不全は AA 群、GA 群、GG 群の順に早く発症し、明確な差を認めた。一方、合併奇形数や深部臓器の合併奇形、在胎週別出生体重の差は各群で有意差はみられず、胎内における器官発生や成長障害には関与しない可能性が示唆された。

### 3. FA に対する造血細胞移植

末梢リンパ球の染色体脆弱検査で 50%を超える高レベルの体細胞モザイクの頻度は日本人 FA に有意に高かった (30.8%)。高モザイクレベルの患者では造血細胞移植時に使用するアルキル化剤や放射線に正常の感受性を示すリンパ球が多く存在するため生着不全の可能性が高くなると考えられている。HLA 一致同胞間移植を行った 15 症例を検討し、2000 年以降の 7 例の移植では Fludarabine を基本とした一律の非照射レジメンで安定したキメラが得られることが示唆された。

## D. 考察

FA の発症頻度、臨床症状や遺伝子変異は民族によ

り特徴がみられ、日本人におけるデータの集積が必要である。本研究ではFAの日本における疫学の基盤になると推測される。FAではリンパ球にリバージョン・モザイクを起し、遺伝子変異が末梢血では同定不可能な症例もあり、骨髄細胞や皮膚・骨髄線維芽細胞を含む解析を行うことにより、診断精度の向上が期待できる。次世代シーケンスによる解析は今まで日本人FAに報告のないA、G、C群以外の相補群や新規遺伝子の発見にも期待がもたれ、日本人のFA症例解析が新しい知見をもたらす可能性も十分考えられる。さらにFAと関連病態が疑われる類縁疾患の患者の遺伝子解析を行うことにより、FA診断治療の基盤が確立されると思われる。

また、ALDH2などの新しい視点から、骨髄不全や発がんのメカニズムについても検討を加え、造血細胞移植を含む総合的な治療方針が開発されることが望まれる。

## E. 結論

稀少遺伝性疾患であるFAの遺伝子解析の体制が整い、京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室および東京大学医学部附属病院がんセンターの小川誠司研究室との共同研究により原因遺伝子の頻度、遺伝子異常と臨床病態との関連が今後明らかになっていくと思われる。診断、臨床像の把握、治療、さらに生体試料の採取と保存まで一連の作業を同一施設内で行うことにより、解析も効率よく行われ、臨床的な貢献が得られた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Arakawa S, Kato S and Yabe H. Therapy related myelodysplastic syndrome of recipient origin in a juvenile myelomonocytic leukemia patient 17 years after allogeneic SCT. *Bone Marrow Transplantation*, 2011; 46: 1023-1025
- 2) Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Suganuma E, Sugiyama N,

Kato S and Yabe H. Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. *Bone Marrow Transplantation*, 2011; 46: 1148-1150

- 3) Maekawa K, Yoshimitu M, Fujiwara H, Matsushita K, Kawada H, Hamada H, Suzuki S, Uozumi K, Ohtsuka M, Hanada S, Yabe M, Yabe H and Arima N. Successful allo-HSCT with a minimal myeloablative conditioning regimen in an adult patient with Fanconi's anemia. *Bone Marrow Transplantation*, 2012;47: 159-160
- 4) Koike T, Yanagimachi N, Ishiguro H, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Takakura H and Kato S. High incidence of radiation-induced cavernous hemangioma in long-term survivors who underwent hematopoietic stem cell transplantation with radiation therapy during childhood or adolescence. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011 Dec 23 [Epub ahead of print]
- 5) Hyodo H, Ishiguro H, Tomita Y, Takakura h, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Yabe H, Yabe M, Kojima SI, Shiraishi k, Minemura T and Kato S. Decreased serum testosterone levels in long-term adult survivors with fatty liver after childhood stem cell transplant. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2012 Jan 13 [Epub ahead of print]
- 6) Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Tsukamoto H, Muroi K, Oshima K, Asami K, Takata M, Yamashita T, Kato S and Yabe H. Matched sibling donor stem cell transplantation for Fanconi anemia patients with T-cell somatic mosaicism. *Pediatric Transplant*. 2012 in press
- 7) 矢部みはる 難治性貧血の診療ガイド: 先天性

骨髓不全症候群：Fanconi貧血/診療の参照ガイド 南江堂 2011: 205-213

## 2. 学会発表

- 1) Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H and Kato S. Experience with marrow harvesting from paediatric donors at a single center: safety and efficacy. 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, April 2011.
- 2) Korthof ET, van der Zalm WWWJ, Bresters D, Raohael MF, Tolar J, Bekassy A, Guengoer T, Ayas M, Albert M, Touzot F, Bacigalupo A, Fasth A, Diaz MA, Veys p, Cossu F, Yabe M, Oneto R, Perters C, Gaspar H, Dufour C, Mrsh J on behalf of the Working Parties Pediatric Diseases, Inborn Errors and Severe Aplastic Anemia. Dyskeratosis congenital: a literature and database review of immune status and stem cell transplantation data. 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, April 2011.
- 3) Yabe M, Yabe H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Mori T, Yoshida H, Ohtsuka Y, Shiomi M and Kato S. Alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in inherited bone marrow failure syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月.
- 4) Koike T, Yanagimachi N, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Ishiguro H, Takakura H, and Kato S. Radiation induced cavernous hemangioma (RICH) in long term survivors who underwent BMT. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月.
- 5) Ishiguro H, Hyodo H, Tomita Y, Takakura H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Yabe H, Yabe M and Kato S. Decreased testosterone levels in long-term adult survivors with fatty liver after childhood SCT. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月.
- 6) Hasegawa D, Kudo K, Doisaki S, Yoshida N, Yabe M, Astuta Y, Inagaki J, Nishimura R, Inoue M, Yabe H, Kato K, Kawa K and Watanabe K. Impact of treatment with G-CSF after allogeneic HSCT for childhood myelodysplastic syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月.
- 7) Yabe M, Yabe H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Otsubo K and Kato S. Clonal chromosomal aberration in Fanconi anemia patients with myelodysplasia. 23<sup>rd</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. October 2011.
- 8) Yabe H, Koike T, Otsubo K, Morimoto T, Shimizu T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Endocrine function in Japanese Fanconi anemia patients. 23<sup>rd</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. October 2011.
- 9) 矢部みはる、矢部普正. リバージョン・モザイク型 Fanconi 貧血の診断と臨床. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム. 2011 年 11 月
- 10) 大坪慶輔、清水崇史、小林真弓、高倉広充、森本克、松田晋一、神園淳司、矢部みはる、矢部普正、加藤俊一. 著明な心機能低下を認めた再発 AML に対して 2 度の臍帯血移植を施行した一男児例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011 年 11 月
- 11) 木下明俊、宮地隼人、滝智彦、矢部みはる、清河信敬、照井君典、太田秀明、出口隆生、高橋浩之、多賀崇、林泰秀、多和昭雄、足立壮一. JPLSG AML-05 臨床試験における WHO 分類に基づいた小児急性骨髄性白血病の中央診断. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム. 2011 年 11 月
- 12) 小林真弓、高倉広充、大坪慶輔、小池隆志、清水崇史、森本克、矢部みはる、矢部普正、加藤

俊一. Minor bcr-abl が検出された急性巨核球性白血病の一例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム.2011 年 11 月

- 13) 矢部みはる、高橋義行、稲垣二郎、康勝好、遠藤幹也、河敬世、加藤剛二、坂巻壽、熱田由子、矢部普正. TRUMP 登録された Fanconi 貧血に対する造血細胞移植の検討. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会. 2012 年 2 月

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし