

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

ファンconi貧血の遺伝子解析

研究分担者 高田 穰（京都大学放射線生物研究センター 教授）

研究要旨： 東大小川研究室で行う予定の既知FA遺伝子15種の次世代シーケンス対象のサンプルを整理収集し、ゲノムを単離し、準備を順調に進めている。また、ファンconi貧血（FA）とその関連が疑われる細胞の解析を進め、既知のFA遺伝子の変異では説明のつかない2例の兄弟例を同定した。さらに、従来解析したFA患者サンプルのアセトアルデヒド分解酵素ALDH2の遺伝子を解析し、骨髄不全と発症とALDH2バリエーションとの間に強い相関を認めた。

A. 研究目的

ファンconi貧血(FA)は骨髄不全、奇形、白血病、固形腫瘍などを呈し、まれながら、その重篤な症状と診断治療法の確立の遅れから特に小児の临床上重大な問題となっている。最近の研究の進展により、FAはDNA損傷への細胞応答欠損を基盤として発症する「ゲノム不安定性症候群」のひとつであることが明らかとなった。FA遺伝子異常は日本人症例においてはまだまだあまり解析されておらず、15種類におよぶ数多い原因遺伝子の異常についてその相対的頻度などは、FANCAが多数を占める事以外、明らかではない。また、FA遺伝子以外の変異においてFA類似の症状を示した症例の報告もあり（ブルーム症候群、ナイミーヘン症候群など）、DNA損傷応答遺伝子の変異と臨床症状との関係は、広いスペクトラムでオーバーラップする可能性が指摘されている。

本研究班では、日本人におけるFAと関連病態が疑われる患者の臨床材料を通常の方法および次世代シーケンサーを用いて解析し、原因遺伝子を同定し、既知の15種のFA遺伝子のいずれが変異しているのかを明らかにする。この解析により、既知遺伝子に変異が存在しない場合、新規病態が考えられ、そういった症例は次世代シーケンサーによるエクソーム解析を行い、原因遺伝子の同定を目指す。さらに、

遺伝学的検索を通じて、病態の本質の解明を試みる。究極的には、これらの努力を通じて、FAの迅速な診断法と治療法の開発に貢献することを目指している。

B. 研究方法

1. ファンconi貧血患者の遺伝子診断

従来主に東海大学矢部みはる博士からのFA患者のサンプルを解析し、変異の同定による分子診断を行ってきた。リンパ球ないし繊維芽細胞の培養細胞、細胞ペレット、ないしすでに単離したRNAとゲノムDNAの提供をうけ、変異の同定をcDNAレベルとゲノムのレベルで、PCR法とサンガー法によるシーケンシングによって行っている。本年度もその努力を継続中である。

2. 佐々木コレクション検体の解析。既知原因遺伝子の異常がみつからない2症例（兄弟例）の発見。

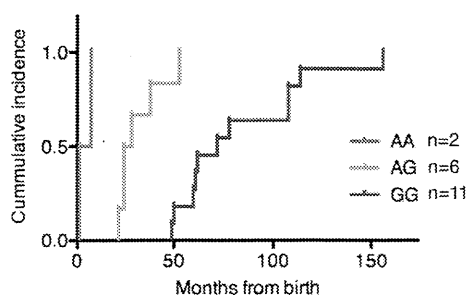
我々は、私の所属する京都大学放射線生物研究センター前教授の佐々木正夫博士が在職中に集められたFA患者培養細胞（佐々木コレクション）の解析を行っている。佐々木博士らは、ファンconi貧血患者でもっとも高頻度に変異が認められるFANCA、FANCG、FANCC遺伝子についてはすでに検索を完了しており、それをひきついでFANCA/G/Cに変異が

みつからず分子レベルでの診断が完了していないサンプルについて解析中である。

興味深いことに、二人（兄弟例）のFA患者培養細胞を、FANCD2モノユビキチン化、Rad51フォーカスについて調べたところ、両方とも正常であった。現在まで判明しているFA原因遺伝子15種のなかで、この表現型を取り得るのはFANCI(=Brip1)とFANCP(=Slx4)の二つのみである。そこで、RT-PCR法によりFANCIとFANCPを増幅してシーケンスしたところ、いずれにも変異を認めなかった。したがって、この2例は新規のFA遺伝子異常を持つ可能性があり、本研究班によるエクソーム解析の良い対象となることが判明した。

3. 矢部博士の検体におけるALDH2の検討

アセトアルデヒドの分解酵素であるALDH2遺伝子は、最近のマウスにおける実験で、FANCD2とのダブルノックアウトでは早期に白血病が発症するなど、FAの表現型を強く修飾することが示され、FA経路はアセトアルデヒドのゲノム毒性を解除する働きを持つことが示唆されている(Nature. 2011 Jul 6;475(7354):53-8.)。ALDH2には、酵素活性が高いGアレルに対して、日本人などの東アジア人では酵素活性を欠失したバリエーション(Aアレル)を高頻度を持つことが知られている(GG:GA:AA≈5:4:1)。そこで、我々は矢部みはる博士から過去に診断依頼され、分子診断が確定した19症例でALDH2の遺伝子型を検討した。アッセイ法としては、愛知がんセンター疫学研究部の松尾恵太郎博士から共同研究で提供されたTaqman PCR法によった。



FA患者19例のバリエーションアレル頻度は健常者と特に違いはないと思われた。しかし、骨髄不全の発症がAA群、GA群、GG群の順に遅くなっており、非常に明確な差を認めた(上図)。一方、外表奇形をはじめとした身体異常については、各群間でその数や重症度に有意な差を認めなかった。MDSと白血病の発症についても、AA群では有意に早期であるものの、GA群とGG群との間には有意な違いを認めなかった。この点については、すでに骨髄移植を受けた例が多く、白血病発症が防がれているため、解釈に注意が必要と考えている。以上の結果は、アセトアルデヒドとFAにおける骨髄幹細胞不全の関係をきわめて明確に示し、ヒトにおいてもFA経路の機能が幹細胞におけるアセトアルデヒドのゲノム毒性解除にあることを強く示唆している(論文準備中)。

4. 15FA遺伝子検索用の検体リスト作成とゲノム単離。

当研究班では、東京大学小川研究室において、以下のような手順でFAサンプルの解析を行うことが計画されている。まず、検体をプール後、既知の15種のFA原因遺伝子の全エクソンをすべてPCR増幅し、ライゲーション後ライブラリーとして次世代シーケンサーでシーケンスする。その後その情報に基づいて、発見された変異のサンガー法によるバリデーションを我々の施設で行う。15FA遺伝子に異常を認めなかった場合、さらに小川研で全エクソンを解析する。

これまで、佐々木コレクションを中心に、24サンプルのゲノムを単離し、名古屋大学の整理番号によってリスト化した(うち矢部みはる先生から8サンプル)。現在、矢部みはる博士からの追加サンプルのゲノムを単離中である。

(倫理面への配慮)

本稿で述べた研究計画はすべて、京都大学の「医の倫理委員会」に研究内容の審査を依頼し、すでに承認を受けた(申請課題:「ファンconi貧血と関連病態の遺伝子解析」)、「ファンconi貧血と関連病態のエ

クソーム解析による原因遺伝子同定』)。実施に際しては、研究計画からの逸脱がないよう最新の注意を払って進めている。

C. 考察

現在までの解析で、諸外国と同様日本人 FA 患者においても、FANCA が最も頻度の高い異常遺伝子で、続いて FANCG の変異が認められている。また、この FANCA 遺伝子の異常は、日本人においては 20-30% 程度のアレルが c.2546delC であること以外、特にホットスポットを認めず、症例ごとにユニーク変異が見出されることが多い。我々の解析結果もこの所見に一致しており、ホットスポットのないこと、異常遺伝子が多岐にわたることが、この疾患の簡便な分子診断法を確立することを困難にしている。本研究班の計画する次世代シーケンサーによる多数症例のすべての既知原因遺伝子にわたる広範な解析により、日本人 FA 患者の遺伝子異常分布を把握することで、迅速に診断を行う方法を工夫していきたい。

さらに、佐々木コレクションから発見された 2 例の既知遺伝子の異常では説明できない症例のように、収集された症例サンプルに新規遺伝子異常が見つかる可能性がある。従来同定された遺伝子異常は多くは欧米人サンプルのものであり、東アジアの遺伝的背景において異なる FA 遺伝子の存在も考えられる。もし、そのような遺伝子が発見されれば、詳細な分子生物学的、細胞生物学的な解析を進めていきたい。

今回の ALDH2 バリエーションの検討により、FA における骨髄不全の進行が細胞内アルデヒド代謝に強く影響されることが明らかとなった。骨髄やがんの幹細胞のマーカーとして ALDH 酵素活性が用いられており、これらの所見は、幹細胞が ALDH の活性により細胞内環境を清浄化し、ゲノム維持を行っていることを示唆している。この発見は、幹細胞維持や FA の病態の基盤にあるアルデヒドによるゲノム毒性の重要性を認識させるのみならず、臨床的にもいくつかの重要な示唆を与えるものである。たとえ

ば、FA 患者はアルコール飲料やアルデヒドを含む食物の摂取を控えるよう指導されるべきであること、さらに予後因子として ALDH2 遺伝子型を検討することに価値がある可能性があること、また、ALDH2 活性増強剤の臨床治験の可能性などである。

D. 結論

次世代シーケンサーによる解析にむけて順調に準備を進めている。さらに日本人 FA 患者の病態を修飾する因子として ALDH2 を同定した。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitao H, Nanda I, Sugino RP, Kinomura A, Yamazoe M, Arakawa H, Schmid M, Innan H, Hiom K, Takata M. FancJ/Brip1 helicase protects against genomic losses and gains in vertebrate cells. *Genes to Cells* 16(6):714-27, 2011
- 2) Yamamoto KY, Kobayashi S, Kurumizaka H, Takata M, Kono K, Jiricny J, Takeda S, Hirota K. The involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108(16):6492-6, 2011
- 3) Guervilly JH, Renaud E, Takata M, Rosselli F. USP1 deubiquitinase maintains phosphorylated CHK1 by limiting its DDB1-dependent degradation. *Hum Mol Genet.* 20(11):2171-81, 2011.
- 4) Matsushita N, Endo Y, Sato K, Kurumizaka H, Yamashita T, Takata M, Yanagi S. Direct Inhibition of TNF- α Promoter Activity by Fanconi Anemia Protein FANCD2. *PLoS One.* 6(8):e23324, 2011.
- 5) Rosado IV, Langevin F, Crossan GP, Takata M, Patel KJ. Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 18(12):1432-4, 2011.

- 6) Kitao H, Takata M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol.* 93(4):417-24, 2011.
- 7) Takata M. Guest editorial: fanconi anemia and the DNA damage response. *Int J Hematol.* 93(4):415-6, 2011
- 8) Shigechi T, Tomida J, Sato K, Kobayashi M, Eykelenboom JK, Pessina F, Zhang Y, Uchida E, Ishiai M, Lowndes NF, Yamamoto K, Kurumizaka H, Maehara Y, Takata M. ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res.* 2012 Jan 18. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 日本分子生物学会第34回年会 指定シンポジウム “Genome Dynamics: molecular network in maintenance and conversion” Takata M オーガナイザー
- 2) 日本放射線影響学会 第54回大会 シンポジウム 「International session for DNA repair and related subjects」 Takata M 招待講演
- 3) 第70回日本癌学会学術総会 シンポジウム がんにおけるゲノム不安定性の分子基盤 「ファンconi貧血コア複合体によるATR-ATRIPキナーゼのクロマチン動態制御」高田 穰、富田純也、板谷亜希子、茂地智子、海野純也、前原喜彦、石合正道

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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

研究分担者 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： 我々は、稀少小児遺伝性血液疾患である先天性赤芽球癆（DBA）と一過性骨髄異常増殖症（TAM）の新規遺伝子変異を次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析によって同定するため、以下の研究を行った。（1）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（リボソーム蛋白遺伝子）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RP遺伝子の欠失を同定した。これらの解析によっても遺伝子変異を同定できない46例とその家族（15例）のDNA検体を小川研に送付し、エクソーム解析を開始した。（2）完全寛解時の検体が入手できた21例のTAMとTAMから進行したと考えられる急性巨核球性白血病（AMKL）の17例の検体を小川研に送付し、エクソーム解析を進めた。これまでに、16例のTAMおよび5例のAMKLのエクソーム解析で同定された変異候補遺伝子（約300遺伝子）をサンガー・シーケンスでvalidationを行った。その結果、TAMでは、GATA1以外の変異が平均0.9個、AMKLでは6個であった。さらに、多数例の検体で解析を進めている。

A. 研究目的

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。本研究の目的は、先天性赤芽球癆（DBA）とダウン症候群に伴う一過性骨髄異常増殖症（TAM）の新規原因遺伝子を同定することである。

B. 研究方法

我々が保有する既知の遺伝子変異が同定されないDBAの検体を、リシーケンス施設である東大小川研に送付し、次世代シーケンサーによるエクソーム解析などによる網羅的遺伝子解析を行う。TAMについては、寛解期の末梢血をコントロールとして用い、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。同定された候補遺伝子については、弘前大学でサンガー・シー

ケンスによるバリデーションを行う。さらに、新規原因遺伝子であることが確定した遺伝子については機能解析を行う。

（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、東京医科歯科大学、東京大学および名古屋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。

C. 研究結果

（1）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（RP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検体を小川研に送付し、エクソーム解析を開始した。

(2) 完全寛解時の検体が入手できた21例のTAMとTAMから進行したと考えられる急性巨核球性白血病 (AMKL) の17例の検体を小川研に送付し、エクソーム解析を進めた。これまでに、16例のTAMおよび5例のAMKLのエクソーム解析で同定された変異候補遺伝子(約300遺伝子)をサンガー・シーケンスでvalidationした。その結果、TAMでは、GATA1以外の変異が平均0.9個、AMKLでは平均6個見出された。

D. 考察

我が国のDBAはまだ60%が原因遺伝子不明である。DBAの確定診断には、リボソーム蛋白遺伝子変異の同定が必要であるため、実際の診断は臨床情報を総合的に判断して行なわれている。したがって、効果的な診断法を確立するためには、次世代シーケンサーを用いた、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。

最近、骨髄異形成症候群の1つである5q欠失症候群の原因が、*RPS14* 遺伝子の欠失であることが明らかになった。また、DBA以外の天性骨髄不全症候群であるShwachman-Diamond症候群や先天性角化異常症なども「リボソーム病」のも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も貢献する可能性がある。

ダウン症候群の新生児には、5~10%にTAMが合併する。ほとんどの症例は自然寛解するが、約20%のTAMは早期死亡する。TAMは、自然寛解する他は、臓器浸潤など白血病としての特徴をすべて有している。さらに、自然寛解しても、生後4年以内に約20%の症例は、白血病 (AMKL) を発症する。白血病は、他の悪性腫瘍と同様に、一つの遺伝子異常によって起こるのではなく、複数の遺伝子異常が積み重なって生じると考えられている。ダウン症候群に合併したTAMやAMKLでは、GATA1 遺伝子

の変異がほとんどの症例で検出されるが、他の遺伝子異常については明らかにされていない。次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析は、TAMおよびTAMからAMKLに進行する過程で生じる遺伝子変異を明らかにし、小児白血病全体や成人の白血病の発症機構の理解に貢献できる可能性がある。

E. 結論

我々は、稀少小児遺伝性血液疾患である先天性赤芽球癆 (DBA) と一過性骨髄異常増殖症 (TAM) の新規遺伝子変異を次世代シーケンサーによるエクソーム解析によって同定するため、以下の研究を行った。(1) 本邦におけるDBAで、既知の遺伝子変異を同定できない46例とその家族(15例)のDNA検体のエクソーム解析を開始した。(2) 16例のTAMおよび5例のAMKLのエクソーム解析を行い、変異候補遺伝子(約300遺伝子)を同定し、サンガー・シーケンスでvalidationを行なった。その結果、TAMでは、GATA1以外の変異が平均0.9個、AMKLでは6個見出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 (in press).
- 2) 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 Jan 18. [Epub ahead of print].
- 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, MD, Kamio T, Sato T, Ito E. CD7-positive acute myelomonocytic leukemia with trisomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in two adolescents. **Leuk Res.** 2011;35(9):e167-8.
- 6) 伊藤悦朗、小島勢二、大賀正一、小原明。「難治性貧血の診療ガイド」編集委員会：Ⅶ 先天性骨髄不全症 4. Diamond-Blackfan 貧血/診療の参照ガイド 難治性貧血の治療ガイド 特発性造血障害の病態・診断・治療の最新動向 pp. 220-227 南江堂 2011.

2. 学会発表

- 1) 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, 名古屋 (2011年10月14~16日).
- 2) 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, 名古屋 (2011年10月14~16日).

- 3) Kuramitsu M, Matsubara 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. 第73回日本血液学会学術集会 (2011年10月~16日).
- 4) Toki T, Kobayashi E, Kanazaki R, Wang RN, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, and Ito E. Novel GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. 第73回日本血液学会学術集会, 名古屋 (2011年10月14~16日).
- 5) 花田勇、照井君典、土岐力、工藤耕、佐藤知彦、神尾卓哉、佐々木伸也、高橋良博、林泰秀、杉田完爾、小島勢二、小池健一、小阪嘉之、小林正夫、伊藤悦朗. ダウン症候群関連 ALL における *JAK2* および *CRLF2* 遺伝子異常の解析. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋市 (2011年11月25~27日).
- 6) 伊藤悦朗、照井君典、土岐力、小島勢二、大賀正一、森尾友宏、浜口功、倉光球、菅野仁、小川誠司、佐藤亜似子. 先天性赤芽球癆 (Diamond-Blackfan 貧血) の効果的診断の確立に関する研究 (シンポジウム). 第53回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋市(2011年11月25~27日).
- 7) 吉田健一、土岐力、朴明子、永田安伸、王汝南、白石友一、真田昌、昆彩菜、佐藤亜衣子、長崎正朗、宮野悟、金兼弘和、川上清、加藤剛二、林泰秀、伊藤悦朗、小川誠司. ダウン症候群に

合併した一過性骨髄増殖症 (TAM) および急性巨核芽球性白血病 (AMKL) の全エクソンシークエンス. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋市 (2011 年 11 月 25~27 日).

- 8) Toki T, Kobayashi E, Kanezaki R, Wang RN, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, and Ito E. GATA1 mutants lacking Rb-binding motif observed in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. 第 53 回アメリカ血液学会, 米国・サンディエゴ (2011 年 12 月 10 日~13 日) .
- 9) Hanada I, Terui T, MD, Toki T, Kudo K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Sugita K, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M and Etsuro Ito E. Lower incidence of *CRLF2* rearrangements in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. 第 53 回アメリカ血液学会, 米国・サンディエゴ (2011 年 12 月 10 日~13 日) .

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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

研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学 准教授）

大賀 正一（九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授）

研究要旨： 赤血球膜異常症、赤血球酵素異常症、ヘモグロビン異常症を対象にした先天性溶血性貧血診断システムにより、一般臨床検査では病因を確定することが出来ない原因不明の溶血性貧血症例の60%に確定診断を得た。浸透圧脆弱性を認めない非典型的な遺伝性球状赤血球症（HS）症例を赤血球eosin 5'-maleimide（EMA）結合能検査で診断し得たことが診断率の向上につながったと考えられた。今後、新生児期以降明らか慢性溶血性貧血が遷延する原因不明の溶血性貧血の小児例42例を対象に次世代シーケンサーを用いたwhole exome解析を実施する予定である。

A. 研究目的

溶血性貧血は赤血球寿命の短縮によって発症する貧血の総称であり、厚生省特発性造血障害に関する調査研究班の1998年の調査結果では、推計受療患者数は、溶血性貧血全体で2,600人(95%信頼区間2,300~2,900人)であり、先天性溶血性貧血はそのうち16.6%を占める。

後天性溶血性貧血の病因が主として免疫学的機序による赤血球の破壊であるのに対し、先天性溶血性貧血は赤血球が約120日間末梢血中で生存するための生理機能に破綻を来した場合に発症し、赤血球膜異常症、赤血球酵素異常症、ヘモグロビン（Hb）異常症に大別される。

我々は一般臨床検査にて診断を確定することが困難な溶血性貧血症例を対象とした診断システムを構築して国内外から検査を受託しているが、今回、先天性溶血性貧血について最近7年間に検討した症例について総括したので報告する。

B. 研究方法

直接抗グロブリン試験陰性で免疫性溶血性貧血が否定的な症例を対象とした。遺伝性球状赤血球症（HS）のスクリーニングとして赤血球 eosin

5'-maleimide(EMA)結合能検査、非球状性溶血性貧血例に対してはインプロパノール不安定性試験、還元型グルタチオン定量と赤血球酵素19種類の活性測定を行なった。一部の症例に対して、酸グリセロール溶血試験、 α ・ β グロビン・赤血球酵素の遺伝子検査を実施した。

（倫理面への配慮）

当院又は検体提供施設の倫理委員会で承認された説明文書、同意書を用い患者又は家族に十分な説明をした上で同意を得た後、連結可能匿名検体として研究を遂行する。遂行に当たりヒトゲノム、遺伝子研究指針に従い個人情報守秘を遵守し、データの取扱いに注意する。

C. 研究結果

原因不明の先天性溶血性貧血として検索の依頼を受けた症例は226例であった。溶血性貧血診断の契機となった主訴としては、慢性溶血（61.4%）、急性溶血発作（46.7%）、新生児溶血性疾患（44.6%）が多く、脾腫（9.8%）や胆石（4.9%）は比較的少なかった。

最終診断はHSが39例、赤血球酵素異常症が79例（G6PD異常症64例）、Hb異常症が20例であり、

依頼された約 61%の症例で確定診断が得られた。この結果、診断率は米国 Beutler らの 28% (Medicine 1988)、2000 年から 2004 年の 25% (自験例) に比して、60%へと向上した。

浸透圧脆弱性や小型球状赤血球が認められない症例の一部に赤血球 EMA 結合能の有意な低下を認め、HS と診断し得た例が散見され、赤血球 EMA 結合能検査の溶血性貧血診断システムへの導入により、今まで見逃されていた HS を診断し得たことが、診断率の向上につながったことが考えられた。

病因を確定出来なかった 76 例のうち、発症時年齢が 20 歳未満で経過観察において明らかな慢性溶血が遷延している症例の症例が 42 例であった。そのうち新生児溶血性疾患の既往があり、生後 1 ヶ月以降に赤血球輸血の適応があった症例については、今後遺伝子解析研究への協力が得られるケースを対象に次世代シーケンサーにより whole exome 解析の対象とする予定である。

D. 考察

非典型的な HS のスクリーニング検査として赤血球 EMA 結合能検査の有用性が確認できた。赤血球形態異常・浸透圧脆弱性のいずれも認めない溶血性貧血例にも EMA 結合能の低下を認める場合があり、我々はこれらの症例を「EMA 陽性非球状性溶血性貧血 (EPNSHA)」として注目している。現在 EMA 結合能検査の特異性を明らかにする目的で EPNSHA 症例を対象にしたアンキリン (*ANK1*) 遺伝子解析を実施中であり、EPNSHA における *ANK1* 遺伝子変異は日本人 HS を対象にした先行研究とほぼ同じ頻度で同定されることを明らかにした。今後はさらに、バンド 3 (*SLC4A1*)、 $\alpha \cdot \beta$ スペクトリン (*SPTA1*, *SPTB*) およびバンド 4.2 (*EPB42*) 遺伝子変異解析を進めていくことが重要と考えている。

現状では解析を受託した溶血性貧血症例の約 40%は未だ病因を確定できていない。今後次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子探索研究により新たな病因を確定することは、迅速かつ正確な診断に有用なバイオマーカーを発見し、さらに病因に即し

た根治療法の開発を可能にすることが期待される。

E. 結論

先天性溶血性貧血の包括的な診断システムを構築し、一般臨床検査では病因を確定することが出来ない原因不明の溶血性貧血症例の 60%を赤血球膜・酵素・ヘモグロビン異常症と診断した。今後、発症時年齢が 20 歳未満で経過観察において明らかな慢性溶血が遷延している 42 症例について、whole exome 解析を実施する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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;57:1117-23.
- 3) 斎藤加代子、松尾真理、菅野 仁、浦野真理、相楽有規子. 小児科領域における研究と治療の進歩—遺伝子医療. 東京女子医科大学雑 2011;81:349-355.
- 4) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, 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* in press, 2012
- 5) Kanno H, Iribe Y, Aoki T, Ogura H, Fujii H.

Pyruvate supplementation enhances vascular endothelial growth factor production of bone marrow-derived mononuclear cells. *Jpn J Transf Cell Ther* in press, 2012.

- 6) Shiraishi A, Hoshina T, Ihara K, Doi T, Ohga S, Hara T. Acute liver failure as the initial manifestation of Wilson disease triggered by human parvovirus B19 infection. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:103-4.

2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) 土居岳彦、大賀正一、瀧本智仁、白石暁、石村匡崇、高田英俊、原寿郎：抗胸腺細胞ウサギ免

疫グロブリンを用いた同種骨髄移植後にウイルス感染症を併発した再生不良性貧血症例.第53回日本小児血液・がん学会学術集会(2011年11月25-27日)

- 7) 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 newborns. Pediatric Academic Societies (PAS) and Asian Society for Pediatric Research (ASPR) 2011 Joint Meeting, April 30-May 3, 2011 Denver, Colorado, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

DKC の遺伝子解析

研究分担者 山口 博樹（日本医科大学血液内科 講師）

研究要旨： 先天性角化不全症(DKC)や不全型DKC の診断は、テロメア長の短縮化を検索することが有用である。テロメア長の短縮化の検索法としてReal time PCR法の有用性を検討した。Real time PCR法は、Southern blotting法やFlow FISH法と同様にテロメア長の短縮を検索することが可能であった。検索に必要なDNA量は、Southern blotting法やFlow FISH法に比べ約1/5~1/10でありBMF症例の臨床検査としては有用であった。

A. 研究目的

先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DKC)は網状色素沈着、爪の萎縮、舌の粘膜白斑症などといった特徴的身体的所見を伴う先天性の骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)である。10歳前後までに約80%以上の症例にこれらの特徴的的身体所見が付随しBMFを発症する。また約8%の症例に皮膚、上咽頭、消化管の扁平上皮癌や腺癌などの悪性腫瘍や、急性白血病などの造血器腫瘍の発生が認められる。遺伝型式はX連鎖劣性遺伝が35%、常染色体優性遺伝が5%、常染色体劣勢遺伝が数%に認められるが、残りの約60%近くが型式不明である。DKCの約60%の症例において原因遺伝子が同定され、テロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、*DKC1*、*telomerase RNA component (TERC)*、*telomerase reverse transcriptase (TERT)*などや、Shelterin複合体を構成する蛋白である*TRF-interacting nuclear protein (TINF2)*に変異が認められている。

テロメラーゼ複合体は細胞分裂によるテロメアの短縮化に対しテロメアの複製、安定の役割をもち、Shelterin複合体はテロメアの先端部位の特異的な構造形成や保護などを行っている。DKC

はこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結果造血幹細胞などの増殖能に障害が起き上記の症候が形成されると考えられている。

これまでに我々はDKCの原因遺伝子である上述のテロメア制御遺伝子の変異が、一部の再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)や骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)に認められ、特徴的的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型DKCの存在が明らかにした(Lancet 2003;362:1628, Blood 2003;102:916, N Engl J Med. 2005 352: 1413)。不全型DKCは臨床的にAAやMDSと診断され、効果が得られない免疫抑制療法(immunosuppressive therapy: IST)が行われることがある。以上よりBMFの臨床診断において不全型DKCを鑑別することは重要である。

DKCや不全型のDKCをスクリーニングする方法として遺伝子変異検索が考えられる。しかしテロメア関連遺伝子変異の検索は煩雑で、実際の臨床でのスクリーニングには不向きである。この理由として、①約1/3のDKCは原因遺伝子が不明であり、既知の遺伝子変異検索では不完全である。②対象となる遺伝子が多く、また遺伝子変異にhot spotがないためこれらの遺伝子の全長を検索

しなくてはならない。③発見された塩基変異がテロメア長制御に影響をあたえる否かは機能解析を行わなければならない。などが考えられた。

現在のところ DKC や不全型 DKC 症例のスクリーニング法としては、テロメア長の短縮化を検索することが実用的であると考えられている。本邦では Southern blotting 法か Flow FISH 法を用いて、テロメア長の短縮化を検索し DKC や不全型 DKC 症例をスクリーニングしている。しかし Southern blotting 法は、DNA が 1ug 以上は必要で、末梢血や骨髄の細胞数の少ない BMF 症例では検体採取が困難な場合がある。Flow FISH 法は Southern blotting 法よりは必要な細胞は少ないが、やはり細胞数が少ないと正確な結果を出すことが困難な場合がある。また解析にはコントロールとなる 1301 細胞株が必要となるため、解析のたびに 1301 細胞を培養しなくてはならない。

Real time PCR 法によるテロメア長測定は、細胞数が少ない BMF が対象であっても簡便で高感度にテロメア長の短縮化を検索することができると考えられた。我々は Real time PCR 法によるテロメア長測定の実験系を確立し、従来の Southern blotting 法や Flow FISH 法と同様に DKC や不全型 DKC 症例をスクリーニングすることが可能かを検討した。

B. 研究方法

対象は DKC1 症例、不全型 DKC2 症例、同世代の健常人 13 人。DNA 検体は 10ng を使用し、各症例 3 回の測定を行い、その平均値を結果として用いた。

テロメア長測定のための Real time PCR 用の primer は、tel1 primer は 3'端より 6、12、18、24、30、32-37 塩基が、tel2 primer は 6、12、18、24、30、34-39 塩基がヒトテロメア TTAGGG 繰り返し配列と mismatches の配列となっている。この mismatches によってそれぞれの primer はヒ

トテロメア配列に annealing することが可能であるが、tel1 primer と tel2 primer はどの様な形で annealing をしても、3'端の塩基が mismatches となり primer dimmer による増幅が起こらない様に工夫をした。

検量線は Flow FISH 法との比較をすることが容易になるように 1301 細胞から抽出した DNA を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は当施設遺伝子倫理審査委員会において承認が得られており以下の配慮を予定している。生命倫理上の配慮に関しては、患者、及び健康ボランティアの人権、利益の保護について文書にて十分説明をしたうえで同意を得る。また研究への協力に同意した後であってもその同意を取り消すことができること、更に本研究への同意が得られない場合においても今後の治療などにはなんら不利益を被らないことを説明する。個人情報漏洩に対する取り組みとして研究組織とは別に個人情報管理者をおき連結可能匿名化をはかったうえで解析をおこなう。同意が撤回された場合は、検体、診療情報、遺伝情報はすべて匿名化されたまま焼却により破棄する。得られた結果は学会や論文として発表するが個人情報が出ることはない。遺伝子結果の開示を研究対象者が要求する場合は、倫理的問題を考慮し遺伝子カウンセリングを施行し、結果の告知は臨床遺伝専門医(遺伝カウンセラー)により行う。

C. 研究結果

1. Southern blotting 法によるテロメア長測定

DKC 症例(22-402)(図 1)と不全型 DKC 症例(J169)(図 2)は age mach コントロールと比較して明らかにテロメア長の短縮を認めた。またもう一例の不全型 DKC 症例(32-266) (図 3)は、age mach コントロールと比較して軽度のテロメア長の短縮を認めた。

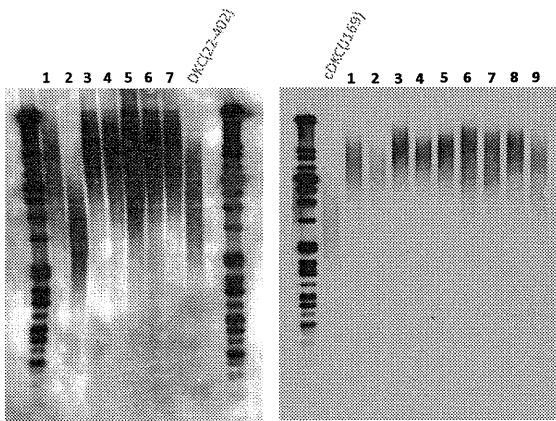


図 1

図 2

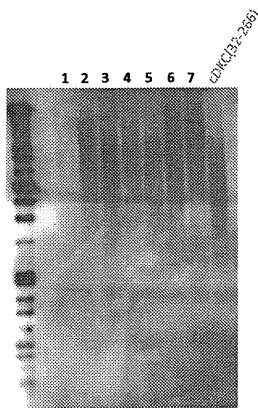


図 3

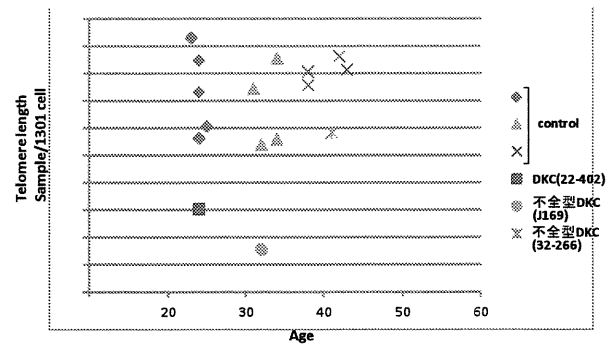
図 1 1, 3-7: age-matched control, 2: テロメア長が短縮したコントロール検体

図 2 1-9: age-matched control

図 3 1-7: age-matched control

2. Real time PCR 法によるテロメア長測定

DKC 症例(22-402)と不全型 DKC 症例(J169)は age mach コントロールと比較して明らかにテロメア長の短縮を認めた (22-402: 41%, J169: 38.1%)。また Southern blotting 法と同様に不全型 DKC 症例(32-266)は、age mach コントロールと比較して軽度のテロメア長の短縮を認めた (32-226: 46.8%)。



D. 考察

Real time PCR 法は、Southern blotting 法や Flow FISH 法と同様にテロメア長の短縮を検索することが可能であった。使用 DNA 量は、テロメア PCR 用に 30ng、補正用の GAPDH の PCR 用に 30ng、計 60ng で、Southern blotting 法の約 1/10、Flow FISH 法の約 1/5 でスクリーニングが可能であった。また今回検索した Southern blotting 法による DKC や不全型 DKC 症例のテロメア長の実測値と Real time PCR 法による 1301 細胞のテロメア長との比較値には関連が認められ、Real time PCR 法は半定量性もあると考えられた。

今後 BMF のテロメア長は、まず Real time PCR 法にてスクリーニングを行い、テロメア長の短縮化が疑われる症例は、Flow FISH 法か Southern blotting 法でテロメア長の短縮化を確定するという方法が良いのではないかと考えられた。

E. 結論

Real time PCR 法は、Southern blotting 法や Flow FISH 法と同様にテロメア長の短縮を検索することが可能であった。検索に必要な DNA 量は、Southern blotting 法や Flow FISH 法に比べ約 1/5~1/10 であり BMF 症例の臨床検査としては有用であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 山口博樹. 病理・病態生理：病因と病型分類.
小澤敬也編, 新しい診断と治療の ABC 72
「再生不良性貧血」最新医学別冊, 最新医学
社. 2011; p39-44.
- 2) 山口博樹, 猪口孝一. MDS に対する新規治
療薬開発の現状. 血液内科. 2011; 63(2):
195-201.
- 3) 山口博樹, 山川光徳, 猪口孝一, 室井一男
編, 血液・造血器疾患のマネージメント. 医
薬ジャーナル社. 2011.

2. 学会発表

- 1) Takeuchi J, Yamaguchi H, Tamai H,
Mitamura Y, Kosaka F, Inokuchi K, Dan
K. Telomerase activity is useful for the
screening of cryptic and late onset
Dyskeratosis Congenita and the
evaluation of the treatment response to
anabolic steroids for their bone marrow
failure. 16th. European Hematology
Association. 2011年6月, ロンドン.
- 2) Takeuchi J, Yamaguchi H, Tamai H,
Mitamura Y, Kosaka F, Inokuchi K, Dan
K. 不全型先天性角化不全症の診断と治療反
応性におけるテロメラーゼ活性測定の有用
性. 第73回日本血液学会, 2011年9月, 名
古屋.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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

研究分担者 小林正夫 （広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学 教授）

研究協力者 小林良行 （広島大学大学院医歯薬学総合研究科小児科学）

金井昭教 （広島大学原爆放射線医科学研究所）

松井啓隆 （広島大学原爆放射線医科学研究所）

稲葉俊哉 （広島大学原爆放射線医科学研究所）

研究要旨： 先天性好中球減少症（SCN）は、慢性好中球減少、骨髄での前骨髄球・骨髄球での成熟障害、生後早期からの重症感染症の反復を特徴とする難治性遺伝性疾患である。本疾患は同一表現型を呈するheterogeneousな疾患群であり、責任遺伝子として*ELA2*が最も頻度が高く（約70%）、他に*HAX1*, *GFI1*, *G6PT*, *WAS*, *CXCR4*, *G6PC3*等が同定されているが、約20%は原因遺伝子が不明である。今回、既知の責任遺伝子に異常がない2症例を対象に、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異解析を行い、症例1では*WAS*のエクソン11領域にヘテロ接合性遺伝子変異 P460Sを同定した。本変異は2009年のBritish Journal of Hematologyで責任遺伝子として報告されたものと同変異であった。しかしながら、両親及び兄(骨髄移植ドナー)の同部位のダイレクトシーケンス、及び機能解析の結果より、本変異のSCNとの関連は否定され、rare-SNPである可能性が高いと考えられた。現在、症例1,2ともに責任遺伝子の同定をすすめている。

A. 研究目的

先天性好中球減少症（SCN）は、慢性好中球減少、前骨髄球・骨髄球での成熟障害、生後早期よりの重症感染症の反復を特徴とする難治性遺伝性疾患である。本邦では正確な症例数は明らかではなく、症例を集積し、責任遺伝子と病態との関連を明らかにする必要がある。

本研究は、既知の責任遺伝子に異常のないSCN症例を対象とし、次世代シーケンサー解析により新規の責任遺伝子を同定するとともに、遺伝子変異と臨床症状との関連について検討し病態解明に結びつけることを目的とする。

B. 研究方法

1) 症例

症例1は22歳の女性で、生後1カ月時より皮膚化膿症を発症し、骨髄検査にてSCNと診断された。以後、反復する皮膚化膿症、蜂窩織炎などの細菌感染症に対して抗生剤とG-CSF投与によるコントロールを受けた。6歳頃より軽度の発達障害を指摘されたが、原因は不明であった。19歳時にHLA完全一致の兄より同種骨髄移植を施行され、現在、完全キメラを維持しており、好中球減少は改善した。症例2は12歳の女児で、生後2カ月時にSCNと診断された。以後、咽頭炎、気管支炎、尿路感染症、中耳炎などを反復した。3歳時に行われた遺伝子検査では*ELA2*遺伝子変異は同定されず、10歳時に

当院でも再度遺伝子検査を受けたが、同様の結果であった。現在、好中球数は約 200-800/ μ l で推移している。

2) 全エクソンシーケンス

患者末梢血より genome DNA を抽出し、Agilent 社の SureSelect Human All Exon Kit によりエクソン配列 (38Mb) を濃縮精製した。次世代シーケンサー (Illumina 社 GAIIX) を用い、リード長 76bp で、Paired end シーケンシングを行った。

3) アクチン重合アッセイ

タンパク質発現用ベクター (pGEX-4T2) に目的遺伝子をサブクローニングし、大腸菌 BL21 株で形質転換を行い、タンパク質を大量発現させた。目的遺伝子は WAS 遺伝子の GBD-VCA ドメインで、それぞれ野生型 (WT)、P459S (表現型: Wiskott-Aldrich 症候群)、P460S (症例 1 で同定された変異: 後述)、L270P (表現型: X 連鎖性好中球減少症) の 4 種類である。この 4 種類より発現させたタンパク質を用い、Cytoskeleton 社 Actin Polymerization Biochem Kit を使用し、アクチンの重合・脱重合に及ぼす影響を定量した。

(倫理面への配慮)

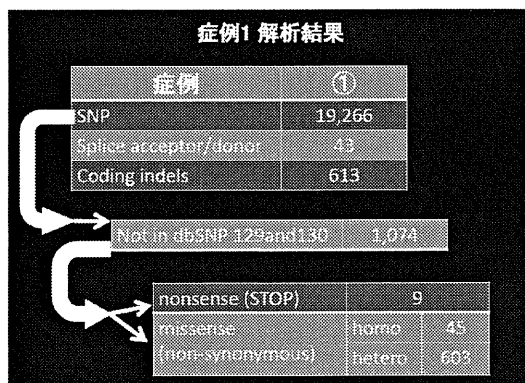
本研究は患者検体を用いて解析を施行するので、検体採取時の苦痛には十分な配慮を行う。また、遺伝子解析については各種指針に則り、患者個人情報の保護について十分な配慮を行う。本研究は広島大学倫理審査委員会の承認を得て行われたものである。

C. 研究結果

1) 全エクソンシーケンス

症例 1 の全エクソンシーケンスの結果、全 SNP 数は 19,266 個、スプライスアクセプタ/ドナーサイトの変異の数は 43 個、コーディング領域の塩基挿入・欠失 (indel) 候補の数は 613 個であった。SNP のうち、データベース dbSNP129,130 に登録されている SNP を除外した数は 1,074 個、そのうちナンセンス変異の数は 9 個、アミノ酸置換を伴うミスセンス変異の数は 648 個であった (図 1)。

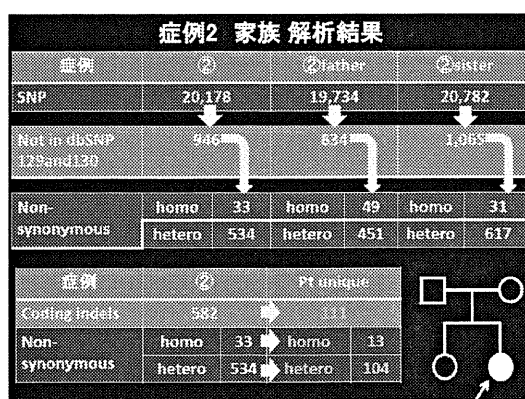
(図 1)



症例 1 のコーディング領域変異のうち、WAS 遺伝子のエクソン 11 にヘテロ接合性遺伝子変異 P460S を同定した。本変異は 2009 年の British Journal of Hematology で責任遺伝子として報告されたものと同変異であった。

より精度の高い責任遺伝子単離を行うべく、症例 2 では健常者である父・姉についても全エクソンシーケンスを行った。症例 2 では、(SNP データベースに登録されていない) アミノ酸置換を伴う SNP は 946 個同定されたが、ここから父・姉と共通の SNP を除外したところ、症例 2 のみが有するアミノ酸置換を伴う変異は 117 個に、indel 候補は 111 個に絞りこまれた (図 2)。

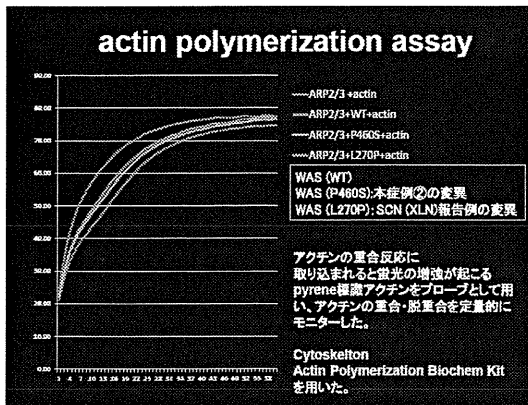
(図 2)



2) アクチン重合アッセイ

SCN の原因のひとつとして報告されている WAS L270P 変異ではアクチン重合の亢進を認めたが、症例 1 で同定された P460S 変異ではアクチン重合能は WT と同程度であり、アクチン重合の亢進は認められなかった (図 3)。

(図 3)



E. 結論

症例 1 において、過去に報告のある WAS 遺伝子の P460S ヘテロ接合性変異と SCN との関連性はないことが判明した。

次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析において、SCN のような heterogeneous な疾患群での責任遺伝子単離は困難であり、家族発症例や同一疾患群での多数症例での検討が必要であることがわかった。現在、症例 1、2 とともに家族の全エクソンシーケンスを施行し、複数の責任遺伝子候補を得た。今後、SNP 機能解析アルゴリズムによる検討を行い、責任遺伝子候補の単離を進めていく。

D. 考察

WAS 遺伝子変異による好中球減少は Wiskott-Aldrich 症候群蛋白質 (WASP) の恒常的活性化により引き起こされると考えられており、これまでにエクソン 9 の GBD ドメインの変異が報告されている。GBD ドメイン変異では、アクチン重合の亢進、細胞分化の抑制、アポトーシスの増加、有糸分裂の遅れ、細胞質分裂の異常などが観察され、病態との関連が示唆されている。自験例 (P460S 変異) はエクソン 11 の VCA ドメインの変異であった。本変異は、2009 年に SCN の責任領域として報告されており、2011 年に Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) の責任領域として報告されている。

しかしながら、症例 1 の兄は WAS 遺伝子 P460S のヘミ接合性変異を有しており、この兄から患者へ骨髄移植を行ったにもかかわらず、移植後に好中球減少は改善した。また、アクチン重合アッセイの結果からも、同部位の変異は WASP の恒常的活性化変異ではないことが判明した。これらの結果より、本変異の SCN との関連は否定された。

そこで本症例に関しても、症例 2 と同様に、健常者である父・母、及び移植後の患者(造血は兄由来)の末梢血 DNA を用い、全エクソンシーケンスを行った。その結果、症例 1 のみに認められるアミノ酸置換を伴う変異は 39 個に、indel 候補は 27 個に絞りこまれた。これらについて、polyphen-2 などの SNP 解析アルゴリズムを駆使し責任遺伝子の同定を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Karakawa S, Okada S, Tsumura M, Mizoguchi Y, Ohno N, Yasunaga S, Ohtsubo M, Kawai T, Nishikomori R, Sakaguchi T, Takihara Y, Kobayashi M: Decreased Expression in Nuclear Factor- κ B Essential Modulator Due to a Novel Splice-Site Mutation Causes X-linked Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 31:762-772,2011
- 2) Liu L, Okada S, Kong XF, Kreins AY, Cypowyj S, Abhyankar A, Toubiana J, Itan Y, Audry M, Nitschke P, Masson C, Toth B, Flatot J, Migaud M, Chrabieh M, Kochetkov T, Bolze A, Borghesi A, Toulon A, Hiller J, Eyerich S, Eyerich K, Gulácsy V, Chernyshova L, Chernyshov V, Bondarenko A, Grimaldo RM, Blancas-Galicia L, Beas IM, Roesler J, Magdorf K, Engelhard D, Thumerelle C, Burgel PR, Hoernes M, Drexel B, Seger R, Kusuma T, Jansson AF, Sawalle-Belohradsky J, Belohradsky B, Jouanguy E, Bustamante J, Bué M, Karin N, Wildbaum G, Bodemer C, Lortholary O, Fischer A, Blanche S, Al-Muhsen S, Reichenbach J, Kobayashi M, Rosales FE,

- Lozano CT, Kilic SS, Oleastro M, Etzioni A, Traidl-Hoffmann C, Renner ED, Abel L, Picard C, Maródi L, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL: Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med.* 208:1635-48, 2011
- 3) Yuge L, Sasaki A, Kawahara Y, Wu SL, Matsumoto M, Manabe T, Kajiume T, Takeda M, Magaki T, Takahashi T, Kurisu K, Matsumoto M: Simulated microgravity maintains the undifferentiated state and enhances the neural repair potential of bone marrow stromal cells. *Stem Cells Dev.* 20:893-900,2011
- 4) Hoshina T, Takada H, Sasaki-Mihara Y, Kusuhara K, Ohshima K, Okada S, Kobayashi M, Ohara O, Hara T: Clinical and host genetic characteristics of Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases in Japan. *J Clin Immunol.* 31:309-14,2011.
- 5) Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsui N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S: Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol.* 128:223-225.e2,2011
2. 学会発表
- 1) Mizoguchi Y, Nakamura K, Karakawa S, Okada S, Kawaguchi H, Kobayashi M: Clinical and genetic characteristics of patients with severe congenital neutropenia in Japan. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, December 10-13, 2011
- 2) Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Mochizuki S, Yamamoto S, Matsuzaka E, Hanada S, Ohnishi R, Tani K, Eto K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Suppressed Neutrophil Development in Hematopoiesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From a Severe Congenital Neutropenia Patient with ELA2 Mutation. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.
- 3) Hanada I, Terui K, Toki T, Kudo K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Sugita K, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Ito E: JAK2 mutations and CRLF2 rearrangements in Down Syndrome-Associated Acute Lymphoblastic Leukemia in Japan. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.
- 4) 岡田 賢, 小林正夫, Luyan Liu, Xiao-Fei Kong, Alexandra Y. Kreins, Sophie Cypowyj, Laurent Abel, Capucine Picard, Stéphanie Boisson-Dupuis, Anne Puel, Jean-Laurent Casanova: 常染色体優性遺伝を呈する慢性皮膚粘膜カンジダ症の責任遺伝子の発見 -STAT1 機能獲得性変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症- 第 39 回日本臨床免疫学会総会 2011 年 9 月 15-17 日
- 5) Tsumura M, Okada S, Sakai H, Nishikomori R, Yasunaga S, Ohtsubo M, Heike T, Nakahata T, Takihara Y, Kobayashi M: Identification of a novel type of AD-STAT1 deficiency with mutations in the SH2 domain 第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月 14-16 日
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

H. 参考文献

- 1) Xia J, Bolyard AA, Rodger E, et al. Prevalence of mutations in *ELANE*, *GFI1*, *HAX1*, *SBDS*, *WAS* and *G6PC3* in patients with severe congenital neutropenia. *Br. J. Haematol.* 2009;147:535-542.
- 2) Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, et al. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet.* 2001;27:313-317.
- 3) Ancliff PJ, Blundell MP, Cory GO, et al. Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood.* 2006;108:2182-2189.
- 4) Beel K, Cotter MM, Blanty J, et al. A large kindred with X-linked neutropenia with an I294T mutation of the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *Br. J. Haematol.* 2008;144:120-126.
- 5) Moulding DA, Blundell MP, Spiller DG, et al. Unregurated acton polymerization by WASp causes defects of mitosis and cytokinesis in X-linked neutropenia. *J.Exp. Med.* 2007;204:2213-2224.
- 6) Westerberg LS, Meelu P, Baptista M, et al. Activating WASP mutations associated with X-linked neutropenia result in enhanced actin polymerization, altered cytoskeletal responses, and genomic instability in lymphocytes. *J.Exp. Med.* 2010;207:1145-1152.
- 7) Gulácsy V, Freiburger T, Shcherbina A, et al. Genetic characteristics of eighty-seven patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Mol. Immunol.* 2011;48:788-792.