

201231126A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 25（2013）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授)	
II. 分担研究報告書	
1. 遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データ・遺伝子解析	21
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)	
2. Fanconi 貧血の病態解明・診断法の開発	23
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)	
3. Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の臨床データ解析	27
真部 淳 (聖路加国際病院小児科 医長)	
4. Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の遺伝子診断	29
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授)	
5. 赤血球還元型グルタチオン濃度とアデノシンデアミナーゼ活性同時測定 による Diamond Blackfan 貧血 (DBA) の生化学的診断法開発	31
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)	
内山 智貴 (東京女子医科大学大学院先端生命医科学系専攻遺伝子医学分野 大学院生)	
入部 雄司 (東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング科 非常勤講師)	
6. ファンconi 貧血の遺伝子解析	35
高田 穰 (京都大学放射線生物研究センター 教授)	
7. 同期 q-PCR による DBA 遺伝子コピー数の解析法の高精度化	39
浜口 功 (国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長)	
森尾 友宏 (東京医科歯科大学発生発達病態学分野 准教授)	
倉光 球 (国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員)	
8. 遺伝子型と表現型に基づく診療ガイドライン作成に関する研究	43
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)	
石村 匡崇 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学 助教)	
瀧本 智仁 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学 特任助教)	
土居 岳彦 (現 国立病院機構福岡東医療センター、九州大学病院小児科)	

9. 小児期造血障害疾患登録による赤芽球癆など先天性遺伝性貧血の 疫学データベース構築	45
小原 明 (東邦大学医療センター大森病院輸血部 教授)	
10. Diamond Blackfan 貧血の遺伝子解析	47
照井 君典 (弘前大学医学部附属病院小児科 講師)	
11. <i>ALAS2</i> 遺伝子変異の評価方法に関する研究	51
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)	
12. CDA のデータ管理、診断基準の確立	55
多賀 崇 (滋賀医科大学小児科 講師)	
13. Fanconi 貧血の診断・診断ガイドラインの作成	57
矢部 普正 (東海大学医学部基盤診療学系細胞移植再生医療科 准教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	61
IV. 研究成果の刊行物・別冊	69

I . 総括研究報告

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

研究代表者 伊藤悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）

研究要旨:造血不全に伴う主な遺伝性貧血には、Diamond-Blackfan 貧血 (DBA)、Fanconi 貧血 (FA)、遺伝性鉄芽球性貧血 (SA)、Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の 4 疾患があるが、我が国では未だに 50%以上の症例は原因遺伝子が不明である。既知の原因遺伝子が同定されなかった症例においては、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を担当する「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）と有機的に連携し、新規遺伝子探索を行った。共通点の多いこれらの 4 疾患の病態解明、診断・治療法の効率的開発を目的として、本年度は以下の研究を行った。

DBA は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として 8 種類のリボソームタンパク (RP) 遺伝子が同定されている。しかし、我が国の DBA 患者の約 50%は、原因遺伝子が不明である。これまでに解析した DBA 94 例の内、原因遺伝子の同定されていない 46 例に対して、全エクソン解析を行った。その結果、新規原因候補遺伝子 *RPS27* および *RPL27* を各 1 例に見出した。さらに、RP 遺伝子以外の新規原因候補遺伝子を同定し、ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析を進めている。

FA は、染色体不安定性を特徴とする常染色体劣性の先天性再生不良性貧血である。FA 患者 55 例において、アルデヒド代謝酵素である *ALDH2* の多型を調べ、臨床像との強い関連を明らかにした。特に、*ALDH2* 酵素活性の欠損をもたらす多型が骨髄不全の進行を強く促進することが判明した。これらの結果は、FA 患者の骨髄における病態の本質に強い示唆を与え、また将来の治療法開発への道を開くものと言える。さらに、エクソーム解析により既知 15 遺伝子に変異がない患者複数例において、FA 関連の機能を持つとされる遺伝子に変異が発見された。今後、これらの変異の機能的意義の検証を進める。

SA 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。最も代表的な遺伝性鉄芽球性貧血は赤血球における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 (*ALAS2*) の遺伝子変異により発症する X 連鎖性鉄芽球性貧血であるが、その他にもいくつかの原因遺伝子が報告されている。今回、SA の全国調査から得られた症例から *ALAS2* 遺伝子の新たな変異を同定した。また、既知の遺伝子変異が認められない家系において、新規の候補遺伝子が発見され、機能解析を進めている。

CDA は、先天性の赤血球系細胞の形成異常により、慢性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う疾患である。CDA 患者 19 例において、遺伝子診断を行い、2 例に I 型、1 例に II 型の責任遺伝子の変異を確認した。遺伝子変異が確認されなかった 12 症例については、1 例で候補遺伝子が明らかとなった。

今後は、「難治性血液・免疫疾患由来の疾患特異的 iPS 細胞の共同研究拠点」（中畑龍俊代表）とも連携し、疾患特異的 iPS 細胞を用いて新規責任候補遺伝子の機能解析と新規治療法の開発を目指す。

【研究分担者氏名】

張替秀郎：東北大学大学院医学系研究科教授
矢部みはる：東海大学医学部准教授
真部 淳：聖路加国際病院医長
小島勢二：名古屋大学大学院医学系研究科教授
菅野 仁：東京女子医科大学准教授
高田 穰：京都大学放射線生物研究センター教授
浜口 功：国立感染症研究所部長
大賀正一：九州大学大学院医学研究院教授
小原 明：東邦大学医療センター大森病院教授
照井君典：弘前大学医学部附属病院講師
古山和道：東北大学大学院医学系研究科准教授
森尾友宏：東京医科歯科大学大学院准教授
多賀 崇：滋賀医科大学教授
矢部普正：東海大学医学部准教授

【研究協力者氏名】

土岐 力：弘前大学大学院医学研究科講師
倉光 球：国立感染症研究所研究員

A. 研究目的

わが国における実態が不明であった遺伝性貧血においても、平成21年度以降4疾患（先天性赤芽球癆（DBA）、Fanconi貧血（FA）、遺伝性鉄芽球性貧血（SA）、Congenital dyserythropoietic anemia（CDA））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、遺伝子解析が行われ実態が明らかにされつつある。特に、DBA研究班（伊藤班長）は、本邦におけるDBAは欧米に比べ既知の遺伝子の変異を持つ頻度が低く（Haematologica, 2010）、通常のシーケンス解析では同定できない片アレルの欠失が約10%と相当数存在することを世界で初めて明らかにした（Blood 2012）。この発見は、他の3つの遺伝性貧血でも既知の原因遺伝子の欠失が起こっている可能性を強く示唆する。本研究では、これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、今後も継続的にこの稀少疾患の登録・解析事業を行う。現在、遺伝性血液疾患において、原因遺伝子が不明な症例を対象にした次世代シーケンスを用いた新規遺伝子同定プロジェクト（小島勢二班長）が進行中であるが、本研究班では各分担者

がそれぞれの疾患の研究拠点となり、遺伝性貧血の診断・臨床的データ分析と既知の遺伝子解析を受け持ち、既知の遺伝子の変異が同定できない症例については、小島班で遺伝子の同定を受け持つという連携システムを構築する。さらに、同定された新規遺伝子の機能解析は各分担者が担当する。この連携は緊密で、2年の研究期間内に成果をあげることが期待できる。また、小児血液学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行う。さらに、疾患特異的なバイオマーカーの検索と症状に影響するmodifier遺伝子の同定を目指し、病態解明とともに精度の高い診断を目指す。

平成24年度は、疫学調査を続け、検体収集を進める。全疾患で既知の原因遺伝子のシーケンス解析と遺伝子コピー数解析を行う。原因遺伝子が同定されなかった症例においては、小島班と有機的に連携し、新規遺伝子探索と機能解析を行う。

平成25年度は、遺伝子解析とともにさらにデータの収集と観察研究を行うことにより、より正確な遺伝性貧血の実態の把握を行い、診断・治療ガイドラインを策定する。さらに、原因遺伝子が同定されない症例について臨床情報などを再検討することにより、診断基準の妥当性を検証し、診断基準の改定を行う。

B. 研究方法

これまでに難治性疾患克服事業により、稀少小児遺伝性貧血であるDBA、SA、FAとCDAの4疾患に関する疫学調査、臨床データの収集、遺伝子解析が行われてきた。しかし、未だに50%以上の症例は原因遺伝子が不明である。本研究では、発症数が少なく共通点の多いこれらの4疾患の病態解明、診断・治療法の開発をより効率的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進する。本研究班は、4つの疾患別研究拠点から構成され、各研究拠点（DBA（伊藤）、SA（張替）、FA（矢部）、CDA（小島））は、臨床データおよび検体の収集、既知の遺伝子解析および原因遺伝子の機能解析を担当する。既知の原因遺伝子に変異が見つからない検体については、小島班と有機的に連携し、新規遺伝子探索を行う。研究代表者（伊藤）

がDBAの研究を担当するとともに研究全体を統括する。得られた結果は、各研究班の診断システムの構築と治療ガイドラインの作成に役立てる。以下に、具体的な研究計画及び方法を述べる。

1) 疫学調査

平成21年度から難治性疾患克服研究事業により、遺伝性貧血の全国疫学調査が行われ、過去10年間にDBA 132例、FA 103例、CDA 22例、CSA 17例が把握された。本年度は、二次疫学調査を行う。さらに、その後の2年間に発症した症例や2000年以前に発症した症例の疫学調査も行う（小原、大賀、真部、多賀）。

2) 中央診断

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。遺伝性貧血が疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行する。以後は、その番号でやりとりする（匿名化）。中央診断およびそれに伴う検査については、患者保護者の同意を取得した後に行う。レビューは、骨髄および末梢血塗抹標本を2施設（名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科）で、骨髄病理標本を1施設（名古屋第一赤十字病院病理部）で行う。遺伝性貧血が強く疑われる場合は、各疾患拠点で遺伝子解析を行う。

3) バイオマーカーによるスクリーニング

難治性疾患克服事業のDBA班研究により、DBAの新たなバイオマーカー・赤血球還元グルタチオン（GSH）が見出された。DBA疑い症例については、赤血球アデノシンデアミナーゼ（eADA）活性とGSHを測定し、他の疾患を鑑別する（菅野）。既に*RPS19*、*RPS17*、*RPS10*、*RPL5*、*RPL35a*、*RPL11* 遺伝子変異が同定され、DBAと確定診断された22症例およびRP遺伝子検査により家系内非罹患者と診断された14例を対象にして、インフォームド・コンセントを取得の上、末梢血を得た。具体的な方法は以下の通りである。

①白血球・血小板・血漿を除去した精製赤血球から溶血液を作製し、以下のように赤血球GSH濃度およびeADA活性を測定する。

②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、412 nmで定量する。

③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、265 nmにおける吸光度減少により活性を測定する。

④SVM法による判別式

SVM法は、代表的な判別方法の一つであり、マージンを最大とする超平面で分離することで、高い汎化性能を持つことが知られている。そこで本研究では、SMV法を用いて、eADA活性とGSHの2つの変数により、DBA症例と非罹患者を分ける判別式を計算した。実際の解析には、ソフトRのksvm関数で線形カーネルを指定して行う。

4) 既知の遺伝子の解析

既知の原因遺伝子の解析を、High Resolution Melt 解析と直接シーケンス法を用いて、各疾患の解析拠点において行う。次に、通常の直接シーケンス法では、既知の原因遺伝子の欠失を検出できないため、DBA研究班が開発したDBA同期q-PCR解析とSNPアレイを用いて、片アレル欠失の有無を解析する（浜口、森尾および各研究拠点）。本年度はさらに、DBA同期q-PCR解析の精度向上を目指して以下の解析を行う。健康人より採取したPBMCからゲノム抽出キット（QIAGEN）を用いてゲノムDNAを採取し、これまでに同定したDBAの原因遺伝子に対する同期増幅PCRプライマーでq-PCRを行う。それぞれのプライマーのCt値について、平均的な増幅効率からの差を算出し、それぞれの増幅効率の傾向を数値化する。数値化した値をもとに増幅効率の差を補正する補正係数を算出する。補正值の計算方法は、補正值＝実測値／補正係数とする（浜口、森尾）。

なお、FAの中で最も頻度の高いA群に関しては、*FANCA* 遺伝子のアレル欠失が生じることが知られている。このため、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) の導入を行い、*FANCA* の変異検出を患者リンパ球および皮膚・骨髄線維芽細胞にて確認する（矢部）。

5) 症状に影響する modifier 遺伝子の同定

FAが確定された症例について、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 法で検討する（高田、矢部）。なお、

ALDH2 遺伝子型については、愛知がんセンター疫学研究部の松尾恵太郎博士から、Taqman PCR法の試薬供給を受け、real time PCRによって決定した。統計処理などについても、松尾博士の指導を受けた。

6) 既知の原因遺伝子の機能解析 (SAの原因遺伝子 *ALAS2* 遺伝子変異の機能解析)

①変異を有する *ALAS2* cDNA の作成

ALAS2 タンパク質のカルボキシル末端の 10、20、33 アミノ酸を欠失するような変異と、XLSA 患者で同定されたカルボキシル末端の 33 アミノ酸領域内のミスセンス変異 (V562A, M567I, S568G) を正常 *ALAS2* cDNA に“PrimeStar Max site directed mutagenesis kit” (Takara Bio 社) を用いて導入し、各変異タンパク質をコードする cDNA を作成する。

②*in vitro* 酵素活性の測定

上記の変異 cDNA を用いて、変異 *ALAS2* タンパク質を組換えタンパク質として大腸菌で発現させ、精製して酵素活性を測定する。本来、*ALAS2* タンパク質は細胞質で前駆体として合成された後にミトコンドリアへ移行し、前駆体からミトコンドリア移行配列が切除されて成熟型となり、ミトコンドリアのマトリクスで機能するミトコンドリアタンパク質である。従って、*ALAS2* タンパク質を組換えタンパク質として大腸菌で発現させる場合、従来は成熟型 *ALAS2* タンパク質のアミノ末端部分にグルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) を精製用の tag として付与し、グルタチオンセファロースを用いて、GST と *ALAS2* との融合タンパク質として精製した後に、必要に応じて GST tag を Factor Xa などの酵素を用いて切除して *ALAS2* タンパク質を精製していた。しかしながら、この方法を用いて精製した *ALAS2* タンパク質はアミノ末端の配列は保存されているものの、カルボキシル末端 (C 末端) 領域については、時に精製過程で限定分解を受けることがあった。本研究は、C 末端に近い領域の機能を明らかにすることが目的であるので、本研究では New England BioLab 社の Impact system を使用する。このシステムでは、目的タンパク質の C 末端側に Intein-tag と Chitin binding domain (CBD) を

融合タンパク質として発現させ、CBD が結合する Chitin カラムを用いて精製した後に、dithiothreitol (DTT) を作用させて Intein の自己切断機能を誘導することにより、目的タンパク質を溶出する。従って、目的タンパク質の C 末端側のアミノ酸配列が保存され、かつ tag を有しない組換えタンパク質を得ることが可能となる。実際には、野生型および変異型の *ALAS2* タンパク質を発現させるためのベクター (野生型酵素の発現ベクターは pTBX-*ALAS2*) を用いて BL21 (DE3) 大腸菌を形質転換し、IPTG を用いて発現誘導をした後に大腸菌を溶菌バッファーの中で超音波を用いて破碎し、遠心して得られた上清 (可溶性画分) を Chitin beads を用いて精製し、10 mM DTT により Intein の自己切断機能を活性化することにより CBD-Intein tag を取り除く。このようにして得た Tag-free の組換え成熟型 *ALAS2* タンパク質を用いて *in vitro* における *ALAS* 酵素活性を測定する。

③*in vivo* における酵素の安定性の検討

次に、*in vivo* における酵素の安定性を評価する実験系を、Invitrogen 社の Flp-In T-Rex system を用いて構築する。これらの細胞を用いて野生型や変異型の *ALAS2* 酵素を発現させた後にシクロヘキシミド (CHX) を培養液中に添加して翻訳を抑制し、その後、経時的に試料を調製して *ALAS2* タンパク質の量がどの様に変化するかを Western blot 法で検出することにより、*ALAS2* タンパク質の細胞内におけるおおよその半減期を測定する。この場合の *ALAS2* タンパク質は、SDS-PAGE/Western blot により検出される signal の泳動度からミトコンドリア内に局在する成熟型タンパク質であると予想される。

7) 新規原因遺伝子の同定

既知の原因遺伝子の検索によっても、原因遺伝子を同定できない臨床検体について次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析を行う。ヒト全エクソン領域を target とするベイトと呼ばれる RNA ライブラリーと溶液中でハイブリダイズによりキャプチャし、イルミナ社の高速シーケンサー HiSeq2000 で網羅的な解析を行う。得られた遺伝子異常は、サンガーシーケンスや次世代シーク

エンサー (MiSeq) を用いてターゲットシーケンスを行い確認する。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基多型 (non-synonymous SNP) が多数見つかりと予想される。このため、発端者に加え、家族内罹患者と陰性コントロール (非罹患者同胞や両親) も解析して、シーケンス解析で得られる non-synonymous SNP と家系内罹患者との相関を検討することで原因遺伝子の候補を絞り込み、新規原因遺伝子を同定する (小島および各研究拠点)。

8) 新規原因遺伝子の機能解析

同定された新規原因候補遺伝子の機能解析を *in vitro* および *in vivo* の系を用いて各研究拠点で行い、見出された遺伝子変異が真の遺伝性貧血の原因遺伝子であるかどうかを確定する (各研究拠点)。

(倫理面への配慮)

日本小児血液学会として行う疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として、既に学会倫理審査委員会で承認されている。中央診断およびそれに伴う検査については、既に名古屋大学医学部倫理委員会の承認されている。患者および患者保護者の同意を取得した後に行う。調査にあたっては、個人情報の守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても、

患者検体の匿名化を図る。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、調査にあたっては個人情報の守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても、患者検体の匿名化を図る。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行い、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従い、患者および家族に事前に十分な説明を行い、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、既に各担当施設で倫理委員会での承認が得られている。また、マウスモデルによる遺伝子組み換え実験を行う場合は、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、告示に準拠して行う。

表 1. 2006～2011 年診断登録症例数

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	201 / 239
(%)	83%	88%	90%	90%	90%	84%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	56
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5
AA / PNH	2	1	1	0	1	0
Fanconi Anemia	5	4	6	1	4	2
Diamond-Blackfan	9	6	9	10	5	8
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7
Schwachman-Diamond	0	1	1	2	0	0
Cong. Dyserythropoietic anemia	No data	No data	1	0	0	1
Sideroblastic anemia	No data	No data	2	1	1	0
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0

C. 研究結果

1) 疫学調査と中央診断

小児血液・がん学会会員 239 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。

2006～2011 年診断登録症例数を表に示す（表 1）。2011 年診断症例は、小児血液学会会員 239 施設の 84% に相当する 209 施設が登録した。非腫瘍性血液疾患は毎年 1,200 から 1,300 症例であり、血小板異常症が最多であった。表に挙げた造血障害疾患は総計 535 例で、そのうち特発性再不貧は毎年 50-56 例とほぼ一定した症例数であった。

DBA 症例は 6 年間で 47 例、特発性赤芽球癆 30 例、FA 症例 22 例が登録された。DBA 診断と区別して、特発性赤芽球癆と診断した症例の詳細は調査途中であるが、殆どが乳幼児期の診断であった。2008 年から 2011 年の期間の鉄芽球性貧血は 4 例、Congenital dyserythropoietic anemia は 2 例であった。本研究班の活動は 2012 年小児血液・がん学会総会でも発表され、学会員への遺伝性貧血に関する啓発活動も盛んである。また、再不貧 MDS 形態中央診断事業と協力し、中央診断による新規診断症例の登録も増加している。

平成 21 年度に行った一次疫学調査により把握された DBA 132 例、CDA 22 例に対して二次疫学調査を行った。その結果、DBA 67 名と CDA 18 例の詳細な臨床情報を収集した。さらに、平成 22 年以降に発症した症例についても二次疫学調査を進めている。

2) バイオマーカーによるスクリーニング

RP 遺伝子変異を同定した 22 症例と家系内の健康者 14 例の eADA 活性と GSH 値を用いて、サポートベクターマシン（SVM）法によって判別式を求め、患者および家系内非罹患者を検討した。SVM 法による DBA 22 症例および家系内非罹患者 14 例の判別結果を図 1 に示す。

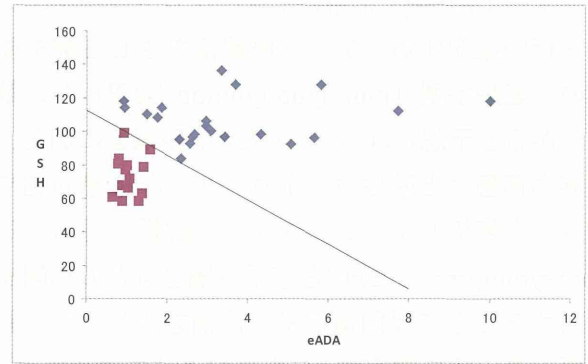


図 1. SVM 法による DBA および家系内非罹患者の判別結果。判別式は、 $0.937 \times eADA(\text{IU/gHb}) + 0.0702 \times GSH(\text{mg/dL RBC}) - 7.9044 > 0$ の時、DBA と判別となった（青菱形：DBA 症例、紫正方形：家系内非罹患者）。

この判別式を用いた DBA 患者 22 症例の結果を示す（表 2）。22 症例中、eADA 活性は 17 例（黄色）、GSH は 21 例（緑色）が陽性となり、判別式では全例が DBA と判定できた。

表 2.

	eADA	GSH	判別式	変異遺伝子
1	4.33	98.3	3.05347	RPS19
2	2.64	96.5	1.34358	RPS19
3	0.95	114	0.98855	RPS19
4	2.35	83.7	0.17329	RPS19
5	2.57	92.4	0.99017	RPS19
6	3.71	127.6	4.52939	RPS19
7	3.36	136.0	4.79112	RPS19
8	3.44	96.7	2.10722	RPS19
9	2.32	94.9	0.93142	RPS19
10	0.93	118	1.25061	RPS19
11	5.66	96.3	4.15928	RPS17欠失
12	2.96	103	2.09972	RPS10
13	1.49	110	1.21373	RPL5
14	5.82	128	6.53454	RPL5
15	5.09	92	3.32333	RPL5
16	2.97	106	2.31969	RPL5
17	3.09	100	2.01093	RPL5
18	1.75	108	1.31695	RPL35a
19	2.67	98.1	1.48401	RPL35a
20	1.87	114	1.85059	RPL35a
21	10	118	9.7492	RPL11
22	7.73	112	7.20101	RPL11

三家系について、eADA 活性、GSH、判別式の結果を表 3 に示した。家系 1 では遺伝子検査の結果、患者、父、姉に *RPL35a* 遺伝子変異が同定されているが、eADA 活性は父のみが陽性であった。一方、GSH は非罹患者である母が偽陽性になった。判別式結果のみ遺伝子検査の結果と一致していた。家系 2 では、患者が *RPS19* の *de novo* 変異を有しており、娘に遺伝していた。eADA 活性および判別式は

両名を陽性としたが、GSHでは父が偽陽性となった。家系3ではGSHおよび判別式は患者を正確に診断し得たが、eADA活性は偽陰性となった。

表3.

Family	eADA	GSH	判別式	患者名	変異遺伝子
1	1.75	108	1.31695	Pt	RPL35a
	2.67	98.1	1.48401	父	RPL35a
	0.95	98.6	-0.0925	母	N
	1.87	114	1.85059	姉	RPL35a
2	3.44	96.7	2.10722	Pt	RPS19
	0.81	83.4	-1.2908	父	N
	0.66	60.5	-3.0389	母	N
	0.98	76.9	-1.5878	姉	N
	2.32	94.9	0.93142	娘	RPS19
3	0.98	118	1.29746	Pt	RPS19
	0.79	80.2	-1.5341	父	N
	1.03	79.2	-1.3795	母	N

PK異常症では10例のうち、GSH陽性例が1例あり、eADA活性、判別式では偽陽性は1例も認めなかった。Fanconi貧血 (FANCA異常) 患者のeADA活性は正常でGSHが上昇していた。他の遺伝性貧血も疾患対照として検討中である。網赤血球数との組み合わせで診断精度がさらに上がること、輸血依存例では酵素活性の判定が困難であることが明らかとなった。

3) 既知の遺伝子の解析

①DBA94例の臨床検体を用いて、8個の既知のDBA原因遺伝子をサンガーシーケンス法で解析し、41例にRP遺伝子の変異を同定した。変異の見つからなかった55例に定量的PCR法を用いたDBA遺伝子コピー数解析とSNPアレイ解析を行い、9例にRP遺伝子の欠失を見出した。

②同期q-PCRによるDBA遺伝子コピー数の解析法の高精度化

健康人PBMC15検体より抽出したgDNAを用いて、同定したプライマーセットで測定したところ、プライマー毎に増幅効率に一定の傾向が認められた (Fig.1)。そこで平均的な増幅値 (Ct値 (cycles)) からの増の差を算出したところ、0.990~1.012倍の間で増幅効率に差があることが明らかになった。これらの数値で各Ct値を補正したところ、各プライマー間のサイクル差が極めて小さくなり、標準偏差が0.126~0.146サイクル (実測データ) から0.03~0.04サイクル (補正後) となった (Fig. 2)。

これらの補正係数をもとにDBA患者の測定結果を補正したところ、補正前は欠失遺伝子と正常遺伝子との有意差が実測値では、 $P=3.5E-4$ であったところ、補正後は $P=1.1E-7$ となり有意差が3ケタ減少し、極めて効果的に判定できるようになることが明らかになった (Fig. 3)。

③FA臨床検体を用いて、FA遺伝子のゲノムシーケンスを行い、24例のFANCA遺伝子と7例のFANCG遺伝子の変異を同定した。FANCA症例の2例ではリンパ球にリバージョン・モザイクを認め検出できなかったが、骨髓線維芽細胞でFAの確定診断を行った。MLPA法を用いて42症例のFA症例の検討を行った。27例がFANCAシーケンスでA群と確定され、そのうちの16例がA群MLPA法にて片アレルまたは両アレル欠失の検出が可能であった (59.3%)。最も頻度が高かったのはExon 27の欠失で、ホモの欠失が2例であり、ヘテロの欠失が8例であった。

一方、ゲノムシーケンスでA群が否定された15例 (FANCG:8例、ほか新規変異例疑いを含む7例) ではA群MLPA法では全例が陰性となり、偽陽性例はなかった。MLPA法での検出はリンパ球、骨髓細胞等の造血細胞だけでなく、皮膚・骨髓線維芽細胞でも同等に検出が可能であった。A群MLPA法はDNAを抽出すれば既知の変異であれば、約60%の症例においては3日間で同定が可能であり、迅速な診断が期待される。

④ALDH2変異のFA表現型への影響

ALDH2は、飲酒等の外因性、体内代謝による内因性のアセトアルデヒドを主な基質とし、アルデヒド代謝に関わる重要な酵素である。日本、韓国、中国において高頻度に変異型アレル (ここでは正常活性のものをG型、活性のないものをA型とする) が見出される。すなわち、ホモでA型を持つ個人では酵素活性が消失し、ヘテロのGA型でもドミナントネガティブ効果により活性が10分の1以下に低下し、飲酒後の顔面紅潮、顔脈などの原因となることが知られている。この酵素の活性とFA表現型の関係をヒトにおいて明らかにするため、55例の日本人FA患者において、ALDH2遺伝子型を決定した。GG型、GA型、AA型は、それぞれ30、23、2例であった。半数以上の患者は従来FANCA、

Figure 1

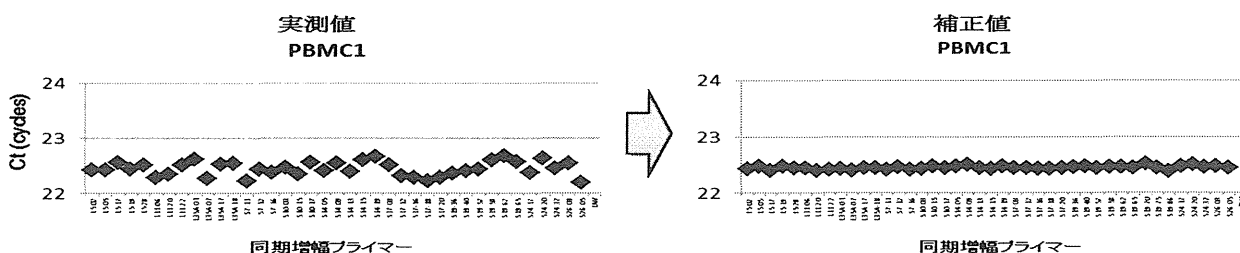


Figure 2 プライマー毎の補正によるCt値の誤差範囲の変化

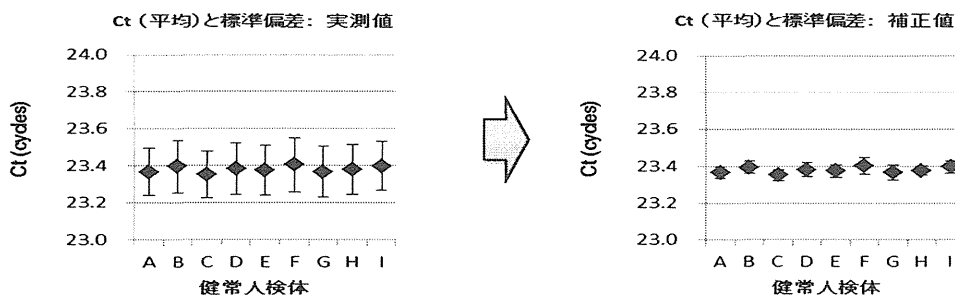
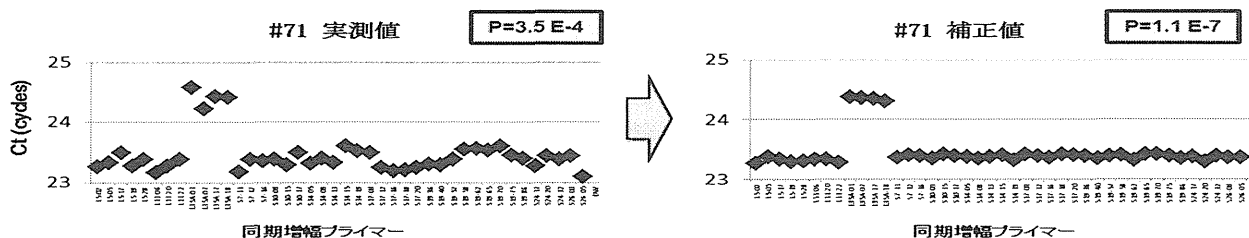


Figure 3 DBA遺伝子欠失検体のCt値データの比較



FANCGの変異が同定されているが、23例はまだ遺伝子変異の未同定の患者である。

まず、骨髄不全の発症で検討すると、GG型はGA、AA型に比べて、発症時期が遅く、明らかに統計学的に優位な差を認めた。AA型は生下時あるいは直後に骨髄不全、MDS発症を認める等、極度に重症型であった。一方、白血病、MDSの発症においては、有意な差を認めなかった。これは、GA型では早期に骨髄移植が行われている傾向があり、そのため白血病発症が効果的に防がれているためかもしれない。あるいは、例数が十分でないため、差の検出に至らなかったという可能性も考えられる。FAの重要な症状に発育の遅延、奇形等が上げられる。しかし今回、ALDH2遺伝子型による明確な差は認められなかった。

⑤新たなSA症例について既知の原因遺伝子の変異解析を行ったところ、ALAS2遺伝子のintron 1の転写調節領域に変異を見出した。この症例での

赤芽球におけるALAS2遺伝子の発現量が低下していたことから、転写活性低下が発症機序として考えられた。

⑥ALAS2遺伝子変異の評価方法に関する研究

大腸菌に発現させ、精製した組換えタンパク質の純度をSDS-PAGE後のアクリルアミドゲルをCoomassie Brilliant Blue R-250を用いて染色する方法により検討したところ、予想される部位にほぼ単一のバンドが検出された。また、その試料の酵素活性を測定したところ、生体組織から抽出された天然型ALASタンパク質とほぼ同等の酵素活性が得られることを確認した。同様にして得られた変異型ALAS2タンパク質の酵素活性を測定したところ、カルボキシル末端の10アミノ酸を欠失した酵素 (Del-C10)、M567I、S568G変異を有する組換えタンパク質の酵素活性は、野生型に比して明らかに低下していたが、カルボキシル末端の20 (Del-C20)、または33アミノ酸 (Del-C33)

を欠失した酵素とV562Aの変異を有する酵素の活性は野生型に比べて同等以上に亢進していた (表4)。カルボキシル末端の33アミノ酸が欠失した変異体 (delC33) とV562A、M567I、およびS568G変異酵素の細胞内における半減期を野生型と比較したところ、delC33、M567I、S568G変異酵素の半減期は野生型と比べて延長していたのに対し、Val562Ala変異酵素の半減期は野生型と比較して短縮していた。

表 4. 変異タンパク質の酵素活性
(野生型に対する比活性)

Recombinant protein	In vitro enzymatic activity (% of wild type)
Wild type	100%
Val562Ala	116.9%
Met567Ile	25.2%
Ser568Gly	31.6%
delC10	18.2%
delC20	181.8%
delC33	192.1%

⑦CDAと診断され同意を得た症例について遺伝子診断を行った。19例中3例に遺伝子変異を確認した。2例は、I型の責任遺伝子 *CDANI* の変異 (ex26 c.3503 C>T (p. Pro1129Leu と ex2 c.552_553insG (P185fs)、ex12 c.A1910G (N598S))、1例はII型の責任遺伝子 *SEC23B* ex18 c.2122 A>G (p. Ile708Val) の変異であった。

4) 新規原因遺伝子の同定と機能解析

① DBA

変異の見つからなかったDBA55例に定量的PCR法を用いたDBA遺伝子コピー数解析とSNPアレイ解析を行い、9例にRP遺伝子の欠失を見出した。原因遺伝子の同定されない残りの46例に対して、全エクソン解析を行った。一部の症例で

は家族の解析も行った。その結果、12例で新規のRP遺伝子の変異 (*RPL35A* 3例を含む) を検出した。*RPL35A* は既知の原因遺伝子であるが、いずれもミスセンス変異 (Y42C, E38G) であった。Y42C変異の2例は非罹患両親に変異はなく、*de novo* 変異であった。

DBAの病因になると考えられる新規RP遺伝子 (*RPL27*, *RPS27*) を持つ2症例を見出した。1症例目は、*RPS27*のフレームシフト変異 (c.90delC, p.Tyr31ThrfsX5) を持つ2歳の女兒 (孤発例) であった。貧血以外の身体異常は伴わず、ステロイドに対する反応は良好であった。2症例目は、*RPL27*のスプライス変異 (c.-2-1G>A) を持つ1歳女兒 (孤発例) であった。先天性心疾患 (ASD, PS) を合併し、ステロイドにはよく反応した。両親に変異はなく、*de novo* 変異であった。病理学的意義は不明であるが、その他に、5つのミスセンス変異 (*RPL3L*, *RPL8*, *RPL13*, *RPL18A*, *RPL31*) と2つの1アミノ酸欠失 (*RPL6* と *RPL14*) をそれぞれ1例ずつに認めた。しかし、残りの34例はRP遺伝子の変異は認められなかった。さらに、RP遺伝子以外の新規原因候補遺伝子を同定し、ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析を進めている。

② FA

全エクソン解析の結果に基づき、検出された遺伝子変異について、ゲノムDNAを用いて当該変異部位を増幅し、ダイレクトシーケンス法により変異の確認を行った。その結果、従来国内で認められたことの無かったFA原因遺伝子の変異を持った症例が相次いで同定された。また、従来のPCRとSanger法によるシーケンス解析で原因遺伝子の同定に至らなかった症例において、次世代シーケンスにより原因遺伝子が判明する例が複数認められた。これらの結果は、今回の方法論が従来の方法に比して非常に強力であることが強く示唆されている。さらに、15遺伝子に変異が認められなかった症例複数例で、FA遺伝子と機能的な関連が示されてきたいくつかの遺伝子の変異が同例されたことは特筆に値する。これは、新規のFA遺伝子の同定がなされた可能性を示唆する。今後、患者細胞における相補を中心に、機能解析を進めていく。

③ SA

既知の原因遺伝子に変異が認められなかった家系について全エクソン解析を行ったところ、2つの候補遺伝子、*APEX2*と*NUDVF1*が同定された。この遺伝子について、ヒトCD34陽性細胞を用いた*in vitro*赤血球分化系にてその発現を解析したところ、赤血球分化に伴いその発現が認められ、赤血球造血に機能していることが示唆された。遺伝子改変マウスなどを用いた機能解析を進めている。

④ CDA

既知の責任遺伝子変異が認められなかった症例について、次世代シーケンスによる新規責任遺伝子の探索を行った。その結果、12例中1例で候補遺伝子*USP42*が明らかとなった。ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析を進めている。

D. 考察

小児血液学会疾患登録事業は2006年に開始され、会員施設において診断された全ての血液疾患を対象にした全数把握疫学研究事業である。また、小児血液学会形態中央診断事業は、診断困難な小児期の造血不全を対象にしており、この中から遺伝性貧血が疑われる症例が毎年発見されている。全数把握疫学研究は、遺伝性貧血以外の疾患も同時に収集しており、これらを統合した疾患データベースを構築することで、各疾患の相対頻度も明らかになる。また、本研究班の成果（遺伝子診断法）が裏打ちされ、精度の高い研究成果となることが期待される。さらに、本研究班の成果は順次日本小児血液・がん学会で発表され、シンポジウムも企画されて啓発活動が盛んである。診断の手引き、遺伝子診断の体制が整い更に潜在性の新規診断症例の増加が予想される。

我が国のDBAは、まだ50%以上が原因遺伝子不明である。これまでに同定されたDBA原因遺伝子はすべてRP遺伝子である。今回の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、原因候補遺伝子として、2つのRP遺伝子(*RPL27*と*RPS27*)を同定した。これらの変異は、いずれも正常の蛋白が発現できない変異であり、特に、*RPL27*は*de novo*変異であった。今後、機能解析が必要であるが、原因遺伝子である可能性が高いと考えられる。

また、2例の患者に検出された*RPL35A*のミスセンス変異(Y42C)は患者に生じた*de novo*変異であり、原因である可能性が高いと思われる。残りの42例、少なくともRP遺伝子変異が検出されなかった34例には、RP遺伝子以外の原因遺伝子の存在が推定される。

同期増幅プライマーを用いたq-PCRによる遺伝子コピー数解析法は、遺伝子コピー数の2倍の差を1サイクルの差として検出するものであるが、今回の補正係数による測定値の補正によって、q-PCRにおいて0.1サイクル程度しかない遺伝子コピー数の僅かな差も検出可能であると考えられた。このことから、本試験法を補正值によって高精度化した場合、正常細胞がある程度混入した検体の場合でも遺伝子コピー数の異常を捉えることができると考えられた。

欧米のグループから提唱されているDBA診断基準(Vlachos A et al, *BJH* 142:859-876, 2008)は、末梢血を用いた血液検査で大球性貧血、網赤血球数減少を認めた場合、特徴的な外表奇形、HbF上昇、eADA活性高値または他の先天性骨髄不全症が否定できることの4項目のうち3項目が証明できれば非古典的DBAと診断できるとしている。eADA活性によるDBA診断はMean+3SDを超えたとき有意に上昇としているが、今回我々が検討したRPサブユニット遺伝子変異が同定されている22症例のDBAにおいて5例はeADA活性がM+3SDを超えておらず、その感度は約77%となり、既報とほぼ同じ結果となった。仮にeADA活性が高値を呈さない場合、患児が1歳未満であること、骨髄中赤血球頸前駆細胞の減少、RP遺伝子変異が同定されること、家族歴の存在等が診断根拠として必要になる。臨床的に1歳を超えたDBA疑い症例は存在し、約半数例にRP遺伝子が同定できないこと、さらに弧発例が3/4近くを占める現状では、骨髄検査が必須となるが骨髄像による他の骨髄不全症候群の否定は専門医によってもしばしば困難である。昨年度我々は、GSHがDBAの新規バイオマーカーであることを明らかにし、eADA活性・GSHの同時測定がDBAの生化学的診断精度を向上させ、*RPS19*および*RPS17*遺伝子変異により確定診断されたDBA症例11例を正確に診断できることを

明らかにした。今年度はSVM法による判別式を得ることができた。今後DBAとの鑑別が臨床的に困難なdisease-controlをさらに検討し、DBAバイオマーカーとしてのGSH測定意義を明らかにしていきたい。

日本人FA患者におけるALDH2遺伝子型の解析から、骨髄不全を中心としたFAの病態にアルデヒド代謝が大きな役割を果たすことが明らかとなった。一方、奇形や体全体の発育に関しては、それほど影響がなく、造血幹細胞以外の細胞では他のALDHアイソタイプ、ないしアルデヒド以外のDNA損傷性物質が重要である可能性がある。また今回の症例群では、固形がんの発症は全部で2例に過ぎず、有効な検討にはならなかった。

今回の55例中、23例はFA原因遺伝子が明らかになっていない。エクソーム解析によりこれらの遺伝子を同定し、今回の知見のバックグラウンドを確立することが今後求められている。解析は進行しており、近日中にまとめることができるはずである。さらに今後、ヒトの血液幹細胞におけるALDHサブタイプの発現などを確認していく必要が考えられる。また、他の血液疾患におけるALDH2遺伝子型の役割についても検証が必要と思われる。

今回の知見により、造血幹細胞における内因性のアルデヒドがDNAを障害し、その修復が不十分になることで幹細胞にDNA障害が蓄積し、p53発現等のDNA損傷応答が引き起こされることが浮かび上がってきている。今後、患者の治療への展開として、①食物中のアルデヒド量の管理、②内因性アルデヒド産生のメカニズム解明、③ALDH2酵素活性の活性化剤の応用等が考えられる。ALDH2活性化剤は既に開発が進められており、今後その臨床応用も視野に入ってくるものと思われる。

日本人のFA患者数十名の解析において、従来欧米における1000名にも及ぶ詳細な検討でも見出されていない新規遺伝子変異が見つかった可能性がある。やはり、日本人と欧米人の間には遺伝的バックグラウンドの違いがあり、FANCAとFANCGが多いという共通性はあるものの、FA変異遺伝子の広がりにも違いがあるということだと考えられ

る。今後、今回見出された遺伝子変異が本当にFA表現型を引き起こしているのかどうか、患者細胞への正常遺伝子導入、該当遺伝子欠損細胞への変異遺伝子の導入により、今回見出された遺伝子変異の機能的な意義を探る必要がある。幸い、FAにおいては、染色体脆弱性、薬剤処理による細胞周期進行のG2における長期停止等の測定の容易なパラメータが確立しているため、着実な方法で確認を進めていく所存である。

近年、SAの原因遺伝子であるALAS2遺伝子の機能獲得型変異が赤芽球性ポルフィリン症発症の原因となり得ることが報告された。従って、ALAS2遺伝子の変異を同定した場合、その変異がALAS2タンパク質の機能を低下させるのか、あるいは機能を亢進させるのかを明らかにすることは、疾患の鑑別診断の上からも重要である。本研究により、カルボキシル末端の少なくとも20アミノ酸から33アミノ酸を欠失している場合には機能獲得型の変異である可能性が高く、10アミノ酸を欠失する場合には機能喪失型の変異となる可能性が高いことが明らかとなった。一方、V562A変異の解析で明らかになったように、*in vitro*における酵素活性が野生型と同等以上である場合でも、*in vivo*におけるタンパク質の半減期が短縮する場合があることも明らかになった。従って、*in vitro*の酵素活性が亢進している場合、当該変異が真に機能獲得型変異であるのか、あるいは機能喪失型変異であるのかを確認するためには、*in vivo*における酵素の半減期を野生型と比較する事は非常に重要であると考えられた。

今年度の研究で、SAの二つの候補遺伝子、APEX2とNUDVF1が同定された。二つの候補遺伝子ともにその発現からミトコンドリアの生理機能にかかわる可能性がある。APEX2については、既に遺伝子改変マウスが作成され、そのノックアウトにより免疫の異常が惹起されることが示唆されている。また、このマウスは貧血を呈することも確認されているが、赤血球造血については十分に解析されていない。現在、同マウスの供与を受け、解析を進めている。また、NUDVF1については、ミトコンドリア膜蛋白質であることが明らかになっているのみであり、その機能は不明である。今

後 *in vitro*での抑制実験等を通じ、造血における役割を明らかにする必要がある。

CDA疑いとされた症例は19例中、既知の責任遺伝子の変異を認めた症例はごく少数であった。その原因としては、CDAの鑑別が困難であること、日本人に特有なCDAの病型の存在する可能性が挙げられる。

遺伝性貧血の国内分子疫学が解明され、表現型と遺伝子型の関連性に関する情報がかなり集積してきた。この解析結果は、効率的な早期診断指針の作成の基盤となる。しかし、小児の遺伝性貧血には造血器以外の様々な遺伝性疾患と関連し、発症には感染症の関与も少なくないため、臨床的にはより包括的な小児遺伝性貧血の診断指針が必要であると考えられる。

E. 結論

我々は全エクソン解析により、DBAの新規原因候補遺伝子 *RPS27* および *RPL27* を見出した。また、DBAの原因となると考えられる *RPL35A* の新規ミスセンス変異 (Y42C) を同定した。これらの結果は、RP遺伝子がDBAに共通の原因遺伝子であるというこれまでの概念を支持するものである。しかし、多くの症例はRP遺伝子に変異が検出されないため、RP遺伝子以外の原因遺伝子が存在することが考えられる。

日本人FA患者の遺伝学的解析により、病態の本質におけるアルデヒドによるDNA損傷の重要性が明らかとなった。また、日本人FA患者に欧米における解析では見出されていない新規遺伝子の変異が存在する可能性がある。今後の詳細な検討が必要である。

FAの発症頻度、臨床症状や遺伝子変異は民族による差がみられ、日本人におけるデータの集積が必要である。本研究では、日本におけるFAの疫学の基盤になると推測される。本邦のFA症例では、高レベルのモザイク症例も多く、特にリンパ球にリバージョン・モザイクを起こし、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。今回導入したMLPA法は線維芽細胞での検出も良好であり、既

知の変異のみが対象となるものの、40%の症例でFANCAの少なくとも片アリル欠失が検出され、A群と絞り込んでダイレクトシーケンス法に持ち込めるなど、診断の迅速化につなげることができ、極めて有用であった。また、*ALDH2*などのFA原因遺伝子とは異なる新しい視点から、骨髄不全や発がんのメカニズムについても解析し、病態の解明につながることを望まれる。

今回、新たな*ALAS2*遺伝子の転写調節領域の変異を見出した。今後、新規症例での解析を進めるとともに、SAの原因遺伝子の候補として新たに見出された二つの候補遺伝子、*APEX2*と*NUDF1*の赤血球造血における機能解析を進める予定である。

CDAのような稀な疾患は、このような中央診断登録システム、遺伝子変異解析を通して確実に診断がつけられていくと考えられる。また、次世代シーケンスによる解析を進めて行くことで、CDAの鑑別がより確かになるとともに、新たな責任遺伝子の同定が可能となると考えられる。

F. 健康危険情報

該当せず

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;119:2376-84.
2. Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S: Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic

- anemia. *Blood* 2013. [Epub ahead of print]
3. Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, Etsuro Ito E. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* 2013. [Epub ahead of print]
 4. Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T. Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood* 2013. [Epub ahead of print]
 5. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of *NEMO* in T cells of patients with X-1 linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood* 2012;119:5458-66.
 6. 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):2608-11.
 7. Takata K, Sato Y, Nakamura N, Tokunaka M, Miki Y, Yukie Kikuti Y, Igarashi K, Ito E, Harigae H, Kato S, Hayashi E, Oka T, Hoshii Y, Tari A, Okada H, Mohamad AA, Maeda Y, Tanimoto M, Kinoshita T, *Yoshino T. Duodenal follicular lymphoma lacks AID but expresses BACH2 and has memory B-cell characteristics. *Mod Pathol*. 2012. [Epub ahead of print]
 8. Yazaki M, Kamei M, Ito Y, Konno Y, Wang R, Toki T, Ito E. A novel mutation of ribosomal protein s10 gene in a Japanese patient with diamond-blackfan anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012;34:293-5.
 9. Sato K, Ishiai M, Toda K, Furukoshi S, Osakabe A, Tachiwana H, Takizawa Y, Kagawa W, Kitao H, Dohmae N, Obuse C, Kimura H, Takata M, Kurumizaka H. Histone chaperone activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair. *EMBO J*. 2012;21:3524-36.
 10. Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, Fukagawa T, Takata M, Takisawa H, Kanemaki MT. Mcm8 and Mcm9 Form a Complex that Functions in Homologous Recombination Repair Induced by DNA Interstrand Crosslinks. *Mol Cell*. 2012;47:511-22.
 11. Yan Z, Guo R, Paramasivam M, Shen W, Ling C, Fox D 3rd, Wang Y, Oostra AB, Kuehl J, Lee DY, Takata M, Hoatlin ME, Schindler D, Joenje H, de Winter JP, Li L, Seidman MM, Wang W. A Ubiquitin-Binding Protein, FAAP20, Links RNF8-Mediated Ubiquitination to the Fanconi Anemia DNA Repair Network. *Mol Cell*. 2012;47:61-75.
 12. Sato K, Toda K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:4553-61.
 13. Ishiai M, Uchida E, Takata M. Establishment of the DNA repair-defective mutants in DT40 cells. *Methods Mol Biol*. 2012;920:39-49.
 14. 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;16:340-345.
15. Yabe M, Masukawa A, Kato S, Yabe H, Nakamura N and Matsushita H. Systemic mastocytosis associated with t(8;21) acute myeloid leukemia in a child: Detection of the D816A mutation of *KIT*. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;59:1313-1316.
 16. Shoji T, Bando T, Fujinaga T, Chen F, Kohno M, Yabe M, Yabe H, Date H. Posterior reversible encephalopathy syndrome due to immunosuppressant after living-donor lobar lung transplantation: report of a case. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2012;60:514-517.
 17. Hatanaka K, Fuji S, Ikegame K, Kato R, Wake A, Hidaka M, Ito T, Inoue M, Nagatoshi Y, Takami A, Uike N, Sakamaki H, Yabe H, Morishima Y, Suzuki R, Atsuta Y, Fukuda T. Low incidences of acute and chronic graft-versus-host disease after unrelated bone marrow transplantation with low-dose anti-T lymphocyte globulin. *Int J Hematol.* 2012;96:773-80.
 18. Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Takakura H, Sawada T, Tanaka T, Otomo T, Ohashi T, Ishige-Wada M, Yabe H, Ohura T, Suzuki N, Kato K, Adachi S, Kobayashi R, Mugishima H, Kato S. Long-term efficacy of hematopoietic stem cell transplantation on brain involvement in patients with mucopolysaccharidosis type II: A nationwide survey in Japan. *Mol Genet Metab.* 2012;12:S1096-7192.
 19. Kobayashi R, Fujita N, Mitsui T, Iwasaki F, Suzumiya J, Kuroda H, Nishimura R, Sasahara Y, Takeshita Y, Kato K, Okumura H, Sakamaki H, Yabe H, Kawa K, Kato K, Suzuki R. Stem cell transplantation for paediatric patients with non-anaplastic peripheral T-cell lymphoma in Japan. *Br J Haematol.* 2012;159:88-93.
 20. 矢部みはる. 新しい診断と治療のABC 72 : 再生不良性貧血 第6章 先天性再生不良性貧血 : Fanconi 貧血 最新医学社 2012:190-197.
 21. 小島勢二, 矢部みはる. 骨髄不全症候群 (特発性造血障害) : 診断と治療の進歩 : 先天性骨髄不全症候群 日本内科学会雑誌 2012; 101:1977-1985.
 22. 矢部みはる Fanconi貧血の診断と治療 日本小児科学会雑誌 2012:116:1205-1212.
 23. 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 日本小児血液・がん学会雑誌 2012;49:251-255.
 24. 矢部みはる. Fanconi貧血 知っておきたい内科症候群 南江堂 2012:113-1104.
 25. 矢部みはる. Fanconi貧血 血液症候群 (第2版) I 日本臨床社 2013:13-17.
 26. Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, O'Keefe C, Takahashi Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Shimada A, Watanabe N, Kato K, Kiyoi H, Naoe T, Kojima S, Maciejewski JP. Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2012;156:316-25.
 27. Kawabata H, Doisaki S, Okamoto A, et al. A case of congenital dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. *Internal medicine.* 2012;51:917-920.
 28. Shimada A, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Ismael O, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Tanaka M, Yoshida N, Matsumoto K, Kato K, Watanabe N, Kojima S. Excellent outcome of allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia

- using fludarabine-based reduced-intensity conditioning regimen. *Int J Hematol.* 2012; 95:675-9.
29. Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 2012; 120:1485-8.
30. 太田宗樹, 多賀崇, 野村明孝, 加藤博文, 竹内義博. 輸血依存性 Congenital Dyserythropoietic Anemia (CDA) に対する同種骨髄移植症例. *日本小児血液・がん学会雑誌* 2012;49(1, 2):133-137.
31. 多賀崇, 真部淳. Congenital Dyserythropoietic Anemia - 現状と今後の課題 -. *日本小児科学会雑誌* 2012;116(7): 1075-1080.
32. Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol.* 2012 Sep 16. [Epub ahead of print]
33. Kadirvel S, Furuyama K, Harigae H, Kaneko K, Tamai Y, Ishida Y, Shibahara S. The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinic synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and protein stability. *Exp Hematol.* 2012;40:477-86.
34. Kanno H, Iribe Y, Aoki T, Ogura H, Fujii H. Pyruvate supplementation enhances vascular endothelial growth factor production by bone marrow-derived mononuclear cells. *Jpn J Transf Cell Ther.* 2012; 58:26-32.
35. Uchiyama T, Kanno H, Ishitani K, Fujii H, Ohta H, Matsui H, Kamatani N, Saito K. An SNP in CYP39A1 is associated with severe neutropenia induced by docetaxel. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012; 69:1617-1624.
36. Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, Matsuda Y, Ohta H, Fujii H, Matsui H, Saito K. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of MYOD1. *Brain Dev.* 2012 (in press).
37. Shimojima K, Inoue T, Imai Y, Arai Y, Komoike Y, Sugawara M, Fujita T, Ideguchi H, Yasumoto S, Kanno H, Hirose S, Yamamoto T. Reduced PLP1 expression in induced pluripotent stem cells derived from a Pelizaeus-Merzbacher disease patient with a partial PLP1 duplication. *J Hum Genet.* 2012;57:580-586.
38. Shiba N, Hasegawa D, Park M-j, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Yagasaki H, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y: *CBL* mutation in familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia (FPD/AML) patient in a Japanese pedigree with *RUNX1* Mutation. *Blood* 2012;119:2612-2614.
39. 真部淳. 本邦における骨髄不全症候群の現況 *小児血液・がん学会雑誌* 2012;49:249-250.
40. 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; 31:103-104.
41. Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusahara K, Hara T: Differential transmission and postnatal

- outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Development Pathol.* 2012;15:151-155.
42. Inoue H, Ohga S, Kusuda T, Kitajima J, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T: Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Early Hum Dev* 2012 (in press).
 43. 北島順子, 大賀正一. 新生児鉄過剰症. 日本臨床別冊「血液症候群 I」 pp.499-502, 日本臨床社 2013.
 44. 楠田剛, 大賀正一. 新生児溶血性貧血. 日本臨床別冊「血液症候群 I」 pp.364-367, 日本臨床社 2013.
 45. Canh Hiep, N., Kinohira S, Furuyama K, Taketani S. Depletion of glutamine enhances sodium butyrate-induced erythroid differentiation of K562 cells. *J Biochem.* 2012;152:p509-519.
 46. Li B, Takeda K, Ishikawa K, Yoshizawa M, Sato M, Shibahara S, Furuyama K. Coordinated Expression of 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase 4 and Heme Oxygenase 2: Evidence for a Regulatory Link between Glycolysis and Heme Catabolism. *Tohoku J Exp Med.* 2012;228:27-41.
 47. Kaneko K, Nishiyama H, Ohba K, Shibasaki A, Hirose T, Totsune K, Furuyama K, Takahashi K. Expression of (pro) renin receptor in human erythroid cell lines and its increased protein accumulation by interferon- γ . *Peptides.* 2012;37:285-289.
 48. Imamura T, Iwamoto S, Kanai R, Shimda A, Terui K, Osugi Y, Kobayashi R, Tawa A, Kosaka Y, Kato K, Hori H, Horibe K, Oda M, Adachi S; Japan Association of Childhood Leukaemia Study. Outcome in 146 patients with paediatric acute myeloid leukaemia treated according to the AML99 protocol in the period 2003-06 from the Japan Association of Childhood Leukaemia Study. *Br J Haematol.* 2012;159:204-10.
 49. Taga T, Saito AM, Kudo K, Tomizawa D, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Tawa A, Shimada A, Taki T, Kigasawa H, Koh K, Adachi S. Clinical characteristics and outcome of refractory/relapsed myeloid leukemia in children with Down syndrome. *Blood* 2012;120:1810-5.
 50. Kanegane H, Yang X, Zhao M, Yamato K, Inoue M, Hamamoto K, Kobayashi C, Hosono A, Ito Y, Nakazawa Y, Terui K, Kogawa K, Ishii E, Sumazaki R, Miyawaki T. Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23:488-493.
2. 学会発表
 1. Ito E, Yoshida K, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Toki T, Miyano S, Shiraishi Y, Chiba K, Terui T, Wang R, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Kudo K, Kamimaki I, Hara J, Sugita K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Kawano Y, Kanno H, Kojima S and Ogawa S. Identification of two new DBA genes, *RPS27* and *RPL27*, by Whole-Exome Sequencing in Diamond-Blackfan Anemia patients. 第54回アメリカ血液学会 (2012年12月8日-11日, アトランタ).
 2. Sato T, Kuramitsu M, Matsubara A, Yoshida K, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Morio T, Ohga S, Ohara A, Kitoh T, Kudo T, Kojima S, Ogawa S, Hamaguchi I, Ito E. Frequent mutations in the *RPS17* gene in Japanese DBA Patients. 第74回日本血液学