

- 会 (2012年10月19日-21日, 京都).
3. 伊藤悦朗. Diamond-Blackfan貧血の病態解明と診断法の進歩 (シンポジウム 先天性造血障害の病態解明の進歩). 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 (2012年11月30日-12月2日, 横浜).
 4. Takata M, Hira A, Yabe H, Matsuo K, Yabe M. Genetic interplay between Fanconi anemia and aldehyde metabolism. 第71回日本がん学会学術総会 (2012年9月19日-21日, 札幌).
 5. 高田穰. ファンconi貧血の分子病態の解析. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 シンポジウム「先天性造血障害の病態解明の進歩」(2012年11月30日-12月2日, 横浜).
 6. Takata M, Hira A, Suzuki N, Niwa A, Nakahata T, Yabe H, Saito MK, Matsuo K, Yabe M. Genetic interplay between Fanconi anemia and aldehyde metabolism in humans. The 8th 3R symposium “Molecular mechanisms and pathology of the 3R” 25-28 November, 2012 Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan.
 7. Minoru Takata “Genetic interplay between the Fanconi anemia pathway and aldehyde metabolism in humans” 28th RBC-NIRS International Symposium “Radiation-associated Repair proteins and DNA repair network” November 29-30, 2012 Kyoto.
 8. 高田穰, 平明日香, 鈴木直也, 丹羽明, 中畑龍俊, 矢部普正, 斉藤潤, 松尾恵太郎, 矢部みはる. ファンconi貧血経路とアルデヒド代謝の遺伝的相互作用解析. 第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ「がんゲノミクスからみたDNA修復異常と突然変異誘発機構」(2012年12月11日-14日, 福岡).
 9. 土居崎小夜子, 川島希, 成田敦, 坂口大俊, 村松秀城, 濱麻人, 中西康嗣, 高橋義行, 小島勢二, 神谷尚宏, 真部淳, 多賀崇, 菅野仁. 本邦における Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の責任遺伝子の解析. 第54回日本小児血液学会総会 (2012年11月30日, 横浜).
 10. Inoue A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Expression profilig for discovering the role of LIM domain only 2 (LMO2) in erythroid cells. 第74回日本血液学会学術集会 (2012年10月, 京都).
 11. Saito H, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Regulation of erythropoiesis by histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3 deazaneplanocin A (DZNep). 第74回日本血液学会学術集会 (2012年10月, 京都).
 12. Fujiwara T, Saito H, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Elucidation of the role of LMO2 (LIM-only protein 2) in erythroid cells. 第54回米国血液学会 (2012年12月, アトランタ).
 13. Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Regulation of erythropoiesis by histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3 deazaneplanocin A (DZNep). 第54回米国血液学会 (2012年12月, アトランタ).
 14. 菅野仁. 適正使用評価方法の問題点と血液製剤使用量を減少させるための方策. シンポジウム2「輸血医療 Pros and Cons」III. 輸血管理料. 第19回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム (平成24年11月16日).
 15. 菅野仁. 濾過濃縮後腹水の安全性と有効性～血漿分画製剤としての視点から. 第33回日本アフェレシス学会学術大会 ランチョンセミナー2 (平成24年11月9日).
 16. 菅野仁. PGx検査はどこまで医療に浸透したか～がんPGxの現状と本学会が果たすべき役割～. 日本人類遺伝学会第57回大会 シンポジウム S1-4 (平成24年10月25日).
 17. 菅野仁. 遺伝子情報管理: 薬理遺伝学を含むゲノム診療体制の実際. 第19回日本遺伝子診療学会シンポジウムS2-03 (平成24年7月27日).
 18. 菅野仁. CARTろ過濃縮後保存の新技术につ

- いて、第7回CART研究会 特別講演 I 第17回日本緩和医療学会学術大会（平成24年6月22日）。
19. 宮岡統紀子, 亀井大悟, 木全直樹, 秋葉隆, 新田孝作, 菅野仁, 武市智志, 山本雅一. ビタミンC大量投与により急性溶血発作とAKIを発症したグルコース-6-リン酸脱水酵素 (G6PD) 異常症患者に対しHDFを施行し透析離脱した一例. 日本透析医学会雑誌 45(Suppl 1):902.
 20. Doisaki S, Kasashima N, Narita A, Sakaguchi H, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S, Kamiya T, Manabe A, Taga T, Kanno H. Molecular analysis of Japanese patients with congenital dyserythropoietic anemia (CDA). 第54回小児血液がん学会総会 (2012年11月30-12月2日, 横浜).
 21. 矢部みはる. Fanconi貧血の臨床診断アプローチ 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 (2012年12月, 横浜).
 22. 矢部みはる. 先天性骨髄不全症候群における遺伝子解析と倫理的諸問題 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 (2012年12月, 横浜).
 23. Yabe H. Stem cell transplantation for bone marrow failure syndrome in children. The 54th Annual Meeting of the Japanese Society of Pediatric Hematology and Oncology. (December 2012 Yokohama, Japan).
 24. 矢部普正. 造血細胞移植におけるチーム医療. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 (2012年12月, 横浜).
 25. M Takata, A Hira, N Suzuki, A Niwa, T Nakahata, H Yabe, M Yabe. ファンconi貧血経路とアルデヒド代謝の遺伝的相互作用解析. 第35回日本分子生物学会年会 (2012年12月, 福岡).
 26. Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Otsubo K, Fukumura A, Kato S. Viral monitoring using real-time PCR and virus-specific cellular immunity after stem cell grafting. 第74回日本血液学会学術集会 (2012年10月, 京都).
 27. Yabe M, Ohtsuka Y, Watanabe K, Inagaki J MD, Yoshida N, Sakashita K, Kakuda H, Yabe H, Kurosawa H, Kudo K and Manabe A. The JMML committee of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Allogeneic HSCT for 30 children with juvenile myelomonocytic leukemia using Bu/Flu/L-PAM regimen. 第74回日本血液学会学術集会 (2012年10月, 京都).
 28. Takata M, Hira A, Yabe H, Matsuo K, Yabe M. ファンconi貧血経路とアルデヒド代謝の遺伝的相互作用解析. 第71回日本がん学会学術総会 (2012年9月, 札幌).
 29. Hira A, Yabe H, Matsuo K, Takata M, Yabe M. アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH2) 遺伝子型による日本人ファンconi貧血患者の骨髄不全促進効果. 第71回日本がん学会学術総会 (2012年9月, 札幌).
 30. 矢部普正, 矢部みはる. 移植後にドナータイプの造血不全を呈した再生不良性貧血に対する治療の試み. 特発性造血障害に関する調査研究班 平成24年度 第1回合同班会議総会 (2012年7月).
 31. 矢部普正. Treatment of donor-type bone marrow failure after allogeneic SCT. 第19回小児再生不良性貧血治療研究会 (2012年6月, 名古屋).
 32. Hira A, Yabe H, Matsuo K, Takata M and Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi Anemia patients. 24th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. (September, 2012, Denver, USA).
 33. Yabe M, Takahashi Y, Inagaki J, Koh K, Endo M, Kawa K, Kato K, Sakamaki H, Atsuta Y, Yabe H. Hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi Anemia patients in Japan: An analysis of the registry data. 24th Annual Fanconi

- Anemia Research Fund Scientific Symposium. (September, 2012, Denver, USA).
34. Yabe H, Nagasawa M, Yagasaki H, Horibe K, Tomizawa D, Kikuta A, Cho Y, Goto H, Yabe M. Stem Cell Transplantation Committee of Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG), Isehara, Japan. Recombinant human soluble thrombomodulin is effective in the treatment of early complications after hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents. 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. (April 2012, Geneva, Switzerland).
35. Yabe M, Yabe H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Ohtsubo K, Fukumura A, Morimoto T, Yoshida H, Ohtsuka Y, Shiomi M, Kato S. A fludarabine-based conditioning for alternative donor haematopoietic stem cell transplantation in inherited bone marrow failure syndrome. 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. (April 2012, Geneva, Switzerland).
36. Yabe H, Nagasawa M, Yagasaki H, Horibe K, Tomizawa D, Kikuta A, Cho Y, Goto H, Yabe M. Stem Cell Transplantation Committee of Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG), Isehara, Japan. Recombinant human thrombomodulin is effective in the treatment of early complications after hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents. 23th Annual Meeting of the International BFM Study Group. (April 2012, Santiago Chile).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

II. 分担研究報告

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データ・遺伝子解析

研究分担者 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）

研究要旨：遺伝性鉄芽球性貧血は、ミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天的異常により発症する難治性の貧血であり、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする。希少疾患である遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データの解析や遺伝子変異については東北大学が拠点として解析している。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（XLSA）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。ただし、既知の遺伝子に変異が認められない症例も複数存在し、その発症機序は十分に解明されていない。今回、遺伝性鉄芽球性貧血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の解析から得られた新規の候補遺伝子の機能解析を進めている。

A. 研究目的

鉄芽球性貧血（sideroblastic anemia）は、骨髄に環状鉄芽球が出現することを特徴とする難治性貧血であり、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血の2つに大きく分類される。先天性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天的異常により発症する稀な疾患であるため、その頻度、病態については不明である。本研究では、本邦における遺伝性鉄芽球性貧血の病態、遺伝子異常を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

難治性疾患克服事業「遺伝性鉄芽球性貧血の診断基準と治療法の確立」班から引き続き行っている全国調査で見出された症例・家系について既知の鉄芽球性貧血の原因遺伝子の変異解析を行う。既知の遺伝子変異が認められない家系については、「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」班において次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行う。この解析において候補遺伝子が見出された場合は、本班でその機能解析を行う。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析研究について所属施設の倫理委員会の承認を得る。主治医に患者本人もしくは保護者への説明・同意の取得がなされた上で、遺伝子解析を行う。

C. 研究結果

新たな遺伝性鉄芽球性貧血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 intron1 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、転写活性低下発症機序として考えられた。

また、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、「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」班において次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行ったところ、二つの候補遺伝子、*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。

D. 考察

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、すで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*での抑制実験などを通じ、造血における役割を明らかにする必要がある。

E. 結論

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、遺伝性鉄芽球性貧血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を遺伝子改変マウスなどを用いて、解析していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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]
- 2) Kadirvel S, Furuyama K, Harigae H, Kaneko K, Tamai Y, Ishida Y, Shibahara S. The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and protein stability. *Exp Hematol.* 2012;40(6):477-86.

2. 学会発表

- 1) Inoue A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Expression profilig for discovering the role of LIM domain only 2 (LMO2) in erythroid cells. 第74回日本血液学会学術集会 (2012年10月, 京都).
- 2) Saito H, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Regulation of erythropoiesis by histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3 deazaneplanocin A (DZNep). 第74回日本血液学会学術集会 (2012年10月, 京都).
- 3) Fujiwara T, Saito H, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Elucidation of the role of LMO2 (LIM-only protein 2) in erythroid cells. 第54回米国血液学会 (2012年12月, アトランタ).
- 4) Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y,

Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Regulation of erythropoiesis by histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3 deazaneplanocin A (DZNep). 第54回米国血液学会 (2012年12月, アトランタ).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

Fanconi貧血の病態解明・診断法の開発

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：末梢血リンパ球に対する 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、24 例の *FANCA* と 7 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、骨髄線維芽細胞を用いて変異を検出した。*FANCA* 同定に際しては、Multiplex Ligation-dependent Probe (MLPA) 法の導入により解析 FA 症例 42 検体中 16 例 (38.1%) で陽性を認めた。これはダイレクトシーケンス法で *FANCA* と判明した 27 例中 16 例 (59.3%) で MLPA 法により少なくとも片アリルが検出され、*FANCA* と診断可能であった。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* 遺伝子を計 55 症例の FA 患者で検討し、*ALDH2* 遺伝子型の分布は、健常日本人の分布と差を認めなかった。変異型ホモの 2 名においては、骨髄不全と MDS の発症が極めて早く、さらに *ALDH2* 変異型ヘテロでも骨髄不全の進行が顕著に促進しており FA 患者の造血幹細胞において、アルデヒドによる DNA 傷害が骨髄不全の原因となっていることが強く示唆された。

A. 研究目的

Fanconi貧血 (FA) は染色体不安定性と種々の身体異常と小児期に発症する骨髄不全、白血化や高発がん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。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の臨床像やメカニズムについても検討を加える。

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と臨床症状を基本として、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。新規症例に加え、東海大学に保存されている既知の遺伝子が同定されない FA 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）についても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* の変異検出を上記検体の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

FA が確定された症例で、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。

(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・遺伝子解析研究に関する倫理指針」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。

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

1. FA 遺伝子診断

- 1) FA 遺伝子のゲノムシーケンスより、24 例の *FANCA* と 7 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。
- 2) 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、骨髓細胞など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。

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の高田穰研究室にて解析を行った日本人 FA 患者 55 人における *ALDH2* 遺伝子型の分布は、健常日本人の分布と差を認めなかった。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) を高頻度を持ち、その比率は GG:GA:AA=5:4:1 である。このうち FA 遺伝子の変異が確認できた 32 症例の東海大学における臨床データにおける解析では、骨髓不全は AA 群、GA 群、GG 群の順に早く発症し、有意差を認めた。一方、合併奇形数や一部の合併奇形を除く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。

D. 考察

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、骨髓細胞や皮膚・骨髓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* の少なくとも片アレル欠失が検出され、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がることができ、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髓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ものが望まれる。

E. 結論

稀少遺伝性疾患である FA の遺伝子解析の体制が軌道に乗り、京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室等との共同研究により原因遺伝子の種類や頻度、遺伝子異常と臨床病態との関連が明らかになりつつある。FA の臨床像の把握、染色体脆弱性試験、遺伝子解析、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ができ、解析も効率よく行われた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 小島勢二, 矢部みはる. 骨髓不全症候群 (特発性造血障害) : 診断と治療の進歩 : 先天性骨髓不全症候群. *日本内科学会雑誌* 2012;101:1977-1985.

- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 矢部みはる. Fanconi貧血. 知っておきたい内科症候群 南江堂 2012:13-1104.
- 9) 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.

2. 学会発表

国内学会

シンポジウム

- 1) 矢部みはる. Fanconi貧血の臨床診断アプローチ. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 (2012年12月, 横浜).
- 2) 矢部みはる. 先天性骨髄不全症候群における遺伝子解析と倫理的諸問題. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 (2012年12月, 横浜).

一般口演

- 1) Takata M, Hira A, Suzuki N, Niwa A, Nakahata T, Yabe H, Yabe M. ファンconi貧血経路とアルデヒド代謝の遺伝的相互作用解析. 第35回日本分子生物学会年会 (2012年12月, 福岡).
- 2) Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Otsubo K, Fukumura A, Kato S. Viral monitoring using real-time PCR and virus-specific cellular immunity after stem cell grafting. 第74回日本血液学会学術集会 (2012年10月, 京都).
- 3) Yabe M, Ohtsuka Y, Watanabe K, Inagaki J MD, Yoshida N, Sakashita K, Kakuda H, Yabe H, Kurosawa H, Kudo K and Manabe A. The JMML committee of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Allogeneic HSCT for 30 children with juvenile myelomonocytic leukemia using Bu/Flu/L-PAM regimen. 第74回日本血液学会学術集会 (2012年10月, 京都).
- 4) Takata M, Hira A, Yabe H, Matsuo K, Yabe M. ファンconi貧血経路とアルデヒド代謝の遺伝的相互作用解析. 第71回日本がん学会学術総会 (2012年9月, 札幌).
- 5) Hira A, Yabe H, Matsuo K, Takata M, Yabe M. アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH2) 遺伝子型による日本人ファンconi貧血患者の骨

髄不全促進効果. 第71回日本がん学会学術総会 (2012年9月, 札幌).

班会議その他口演

- 1) 矢部普正, 矢部みはる. 移植後にドナータイプの造血不全を呈した再生不良性貧血に対する治療の試み. 特発性造血障害に関する調査研究班 平成24年度第1回合同班会議総会 (2012年7月).

国際学会

- 1) Hira A, Yabe H, Matsuo K, Takata M and Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi Anemia patients. 24th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium (September, 2012, Denver, USA).
- 2) Yabe M, Takahashi Y, Inagaki J, Koh K, Endo M, Kawa K, Kato K, Sakamaki H, Atsuta Y, Yabe H. Hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi Anemia patients in Japan: An analysis of the registry data. 24th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium (September, 2012, Denver, USA).
- 3) Yabe H, Nagasawa M, Yagasaki H, Horibe K, Tomizawa D, Kikuta A, Cho Y, Goto H, Yabe M. Stem Cell Transplantation Committee of Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG), Isehara, Japan. Recombinant human soluble thrombomodulin is effective in the treatment of early complications after hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents. 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (April 2012, Geneva, Switzerland).
- 4) Yabe M, Yabe H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Ohtsubo K, Fukumura A, Morimoto T, Yoshida H, Ohtsuka Y, Shiomi M, Kato S. A fludarabine-based conditioning for alternative donor haematopoietic stem cell transplantation in inherited bone marrow failure syndrome. 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation

(April 2012, Geneva, Switzerland).

- 5) Yabe H, Nagasawa M, Yagasaki H, Horibe K, Tomizawa D, Kikuta A, Cho Y, Goto H, Yabe M. Stem Cell Transplantation Committee of Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG), Isehara, Japan. Recombinant human thrombomodulin is effective in the treatment of early complications after hematopoietic stem cell transplantation in children and adolescents. 23th Annual Meeting of the International BFM Study Group (April 2012, Santiago Chile).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の臨床データ解析

研究分担者 真部 淳（聖路加国際病院小児科 医長）

研究要旨：本研究の目的は、Congenital dyserythropoietic anemia (CDA：先天性赤血球産生異常性貧血) の疾患像を明らかにすることである。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。平成 21 年度に全国の小児科専門医研修施設（520 施設）等を対象に 2000 年 1 月以降の症例を調査したところ 22 例の CDA 症例が把握された（回答率 69%）。それらの症例を対象として二次調査と遺伝子検索を行った。18 例の検体が集まり、2 例で *CDAN1* 変異が、また 1 例で *SEC23B* の変異が見つかった。残りについて、次世代シーケンサーを用いて新規遺伝子探索を行う予定である。併せて CDA の診療ガイドラインを作成中である。

A. 研究目的

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) は先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不応性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う稀な疾患群である。我が国ではこれまで CDA の実態が十分把握されておらず、本研究により我が国における CDA の実態を明らかにし、最終的に効果的診断法や治療ガイドラインを作成することを目的とする。

B. 研究方法

従来行われている日本小児血液学会疾患登録、中央診断事業をもとに、我が国における CDA の把握ならびに診断を行う。診断を行うための診断基準、中央形態診断、遺伝子診断のシステムを構築する。疾患の把握は、過去に行われた全国調査を参考に、疑い症例を含みアンケート方式で行う。診断基準については既存のものを参考にすが、軽症で診断基準に合致しないものも存在する可能性があるため、独自のものを作成する。調査は血液専門医だけでなく一般小児科医にも協力してもらう。

（倫理面への配慮）

本研究で行われる臨床試験は、

- ① ヘルシンキ宣言に則り、患者の利益を最優先に考えて実施する。
- ② 調査フィールドとなる各施設における倫理委員会で承認を得て実施する。
- ③ 患者および家族に対して面談・介入開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得る。同意説明文では、調査を行う目的、介入・面談

の内容、協力者に起こりうる利益・不利益について、未成年者の場合には年齢に応じた説明をする。

- ④ 協力によって得られたデータは、個人情報保護を厳重に行い、研究目的以外には利用しないことを文書による同意を得て実施する。

C. 研究結果

小児血液学会において多賀崇が以前行った CDA の全国調査ならびに今回の調査で新たに調査された CDA とその疑い症例を対象として 2 次調査と中央遺伝子診断を開始した。現在までに 18 例の検体が集まり、2 例で *CDAN1* の変異が、1 例で *SEC23B* の変異が見つかった。それ以外の例について次世代シーケンサーを用いて新規遺伝子探索を行う予定である。また、本疾患の診療ガイドラインを作成中である。

D. 考察

我が国でも CDA 患者が一定数存在することが明らかになったが、諸外国に比べ稀な疾患なのか、軽症例が多く見逃されているのかは未だに不明である。遺伝子解析を進めるとともにスクリーニングする集団を広げていき、実態を明らかにする必要がある。

E. 結論

我が国の CDA の実態の正確な把握をし、よりよい治療法を開発するため、今度も調査、研究が必要である。

共同研究者：土居崎小夜子、小島勢二（名古屋大小
児科）、多賀崇（滋賀医大小児科）

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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* 119:2612-2614, 2012.
- 2) 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*, in press.
- 3) 多賀崇, 真部淳. Congenital Dyserythropoietic Anemia -現状と今後の課題-. *日児誌* 2012; 116:1075-1080.
- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) Doisaki S, Kasashima N, Narita A, Sakaguchi H, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S, Kamiya T, Manabe A, Taga T, Kanno H. Molecular analysis of Japanese patients with congenital dyserythropoietic anemia (CDA). *小児血液がん学会総会* (2012年11月30-12月2日, 横浜).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の遺伝子診断

研究分担者 小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授）

研究要旨：日本小児血液学会は平成 21 年 2 月より再生不良性貧血（AA）、骨髄異形成症候群（MDS）および先天性造血不全症候群（CBFS）を対象とした中央診断を開始した。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、聖路加国際病院）で、骨髄病理標本を 1 施設（名古屋第一赤十字病院）で行っている。中央診断症例を中心に集積された Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) 19 例において、同意を得た後、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、次世代シーケンサーによる新規責任遺伝子の探索を行い、1 例で候補遺伝子が明らかとなった。遺伝性貧血の診断は必ずしも容易ではなく、中央診断、遺伝子診断を行うことによりその診断の精度が上昇したと考えられる。

A. 研究目的

CDAは先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不応性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う稀な疾患群である。主にI型からIII型の3病型に分類され、近年I型の責任遺伝子 *CDAN1* と、II型の責任遺伝子 *SEC23B* が同定された。III型の責任遺伝子は同定されていない。本研究では、日本小児血液学会の中央診断および疾患登録事業の一環として、本疾患を包括的に登録するとともに、新たに遺伝子検査法による診断精度の向上と、新規責任遺伝子の探索を行う。

B. 研究方法

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。AA、MDS、あるいはCBFS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、登録番号を発行した。以後はその番号でやりとりを行った（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った。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）で行った。

CDA と診断された症例については、名古屋大学小児科において、I 型については *CDAN1* 遺伝子、II 型については *SEC23B* 遺伝子、分類不能型については *KLF1* 遺伝子の変異解析をダイレクトシーケンス法により行う。遺伝子変異が明らかにならなかった症例に関しては、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 を超音波破砕により断片化し、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 1000 personal 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。

（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、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を守秘を厳守し、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、倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

CDA 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 *CDAN1* 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。

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。12例中1例で候補遺伝子 *USP42* が明らかとなった。

D. 考察

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。

E. 結論

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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. *J Haematol.* 2012 Feb;156(3):316-25.
- 2) 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* 2012 Mar 8;119(10):2376-84.

- 3) 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(8):917-920.
- 4) 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 Jun;95(6):675-9.
- 5) 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 Aug 16;120(7):1485-8.

2. 学会発表

- 1) 土居崎小夜子, 川島希, 成田敦, 坂口大俊, 村松秀城, 濱麻人, 中西康嗣, 高橋義行, 小島勢二, 神谷尚宏, 真部淳, 多賀崇, 菅野仁. 本邦における Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の責任遺伝子の解析. 第54回日本小児血液学会総会 (2012年11月30日, 横浜).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

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

研究分担者 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）

研究協力者 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）

研究要旨：我々は Diamond Blackfan 貧血（DBA）診断の新規バイオマーカーとして赤血球還元型グルタチオン（GSH）の測定が有用であることを既に明らかにしている。赤血球アデノシンデアミナーゼ（eADA）活性と GSH の同時測定により、リボソームサブユニット蛋白（RP）遺伝子変異が同定されている DBA 家系内において、GSH と eADA 活性測定値を SVM 法で求めた判別式は感度・特異性共に 100%DBA 患者を診断することを明らかにした。DBA の病態として無効造血が考えられているが、病態の一部に無効造血の関与が明らかになっているピルビン酸キナーゼ（PK）異常症 10 例について GSH・eADA 活性を検討したところ、GSH は 1 例で高値が認められたが、eADA 活性および判別式では全例陰性の結果であった。RP 遺伝子変異による DBA 診断は 40-50%に変異が同定出来ないことから、GSH・eADA 活性に依る DBA 診断法は極めて有用と考えられた。

A. 研究目的

DBA はリボソーム機能不全によって発症する先天性赤芽球癆であり、現在までに同定されている 13 種の原因遺伝子はすべてリボソーム蛋白質（RP）遺伝子である。しかし、網羅的な遺伝子検査にもかかわらず、変異が同定されて確定診断に至る症例は全体の 50%程度に過ぎない。我々は、昨年度までに赤芽球系細胞における最も重要な抗酸化物質である赤血球還元型グルタチオン（GSH）が DBA の新規バイオマーカーであることを同定している。赤血球アデノシンデアミナーゼ（eADA）活性と GSH を同時に検討することで、遺伝子変異が同定されている 9 家系 11 例の DBA 症例のすべてにおいて生化学的に DBA が診断可能であることを示した。

今年度は、RP 遺伝子変異を同定した 22 症例と家系内の健常者 14 例の eADA 活性と GSH 値を用いて、サポートベクターマシン法（SVM）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。また DBA と同様に病因の一部が無効造血によって発症することが明らかになっているピルビン酸キナーゼ（PK）異常症 10 例について検討し、この判別式の感度、特異性を検討した。

B. 研究方法

【対象】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 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。

【方法】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 活性を測定した。

1) 還元型グルタチオン（GSH）

溶血液にメタリン酸を加えて得られる除タンパク抽出液に、5,5'-di-thiobis (2-nitrobenzoic acid) を加え、412nm で定量した。

2) アデノシンデアミナーゼ（ADA）活性

アデノシンを基質として溶血液を加えて 265nm における吸光度減少により、活性を測定した。

3) SVM 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、SVM 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。実際の解析には統計ソフト R の *ksvm* 関数で線形カーネルを指定して行った。

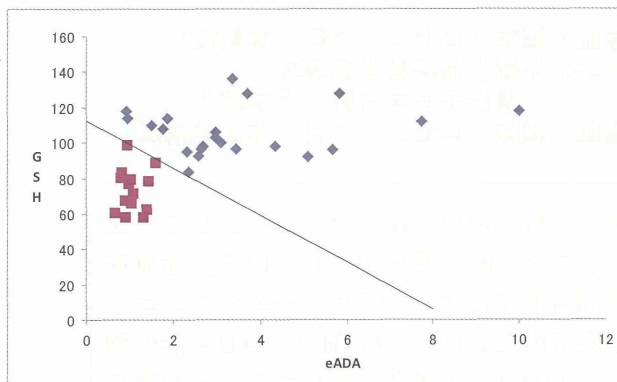
（倫理面への配慮）

個人データは研究実施者以外には知られないように匿名化し、個人データの管理・保護に務めた。また、倫理審査委員会で承認された研究計画書に基づ

き作成された説明文書・同意文書を用いて同意を得た提供者のみを対象とした。

C. 研究結果

SVM 法による DBA22 症例および家系内非罹患者 14 例の判別結果を下図に示す。



判別式は、 $0.937 \times eADA(\text{IU/gHb}) + 0.0702 \times \text{GSH}(\text{mg/dL RBC}) - 7.9044 > 0$ 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) 表1.

	eADA	GSH	判別式	変異遺伝子
1	4.33	98.3	3.05347	RPS19
2	2.64	96.5	1.34368	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

この判別式を用いた DBA 患者 22 症例の結果を示す(表 1)。eADA 活性、GSH と共に 22 症例中、eADA 活性は 17 例、GSH は 21 例が陽性となり、判別式では全例が DBA と判定できた。

表 2.

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

三家系について、eADA 活性、GSH、判別式の結果を表 2 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 denovo 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 および患者を正確に診断し得たが、eADA 活性は偽陰性となった。

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。

D. 考察

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、特徴的な外表面奇形、HbF 上昇、eADA 活性高値または他の先天性骨髄不全症が否定出来ることの 4 項目のうち 3 項目が証明できれば非古典的 DBA と診断出来るとしている。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 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、家族歴の存在など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 遺伝子が同定出来ないこと、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し、RPS19 および RPS17 遺伝子変異により確定診断された DBA 症例 11 例を正確に診断出来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出来た。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。

E. 結論

GSH と赤血球アデノシンデアミナーゼ (eADA) 活性と GSH の同時測定により、リボソームサブユニット蛋白 (RP) 遺伝子変異が同定されている DBA 家系内において、GSH と eADA 活性測定値を SVM 法で求めた判別式は感度・特異性共に 100%DBA 患者を判断することを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Kawabata H, Doisaki S, Okamoto A, Uchiyama T, Sakamoto S, Hama A, Hosoda K, Fujikura J, Kanno H, Fujii H, Tomosugi N, Nakao K, Kojima S, Takaori-Kondo A. A case of congenital dys-erythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. *Intern Med.* 2012;51:917-920.
- 6) 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* 2012;119:2376-2284.

2. 学会発表

- 1) 菅野仁. 適正使用評価方法の問題点と血液製剤使用量を減少させるための方策. シンポジウム 2 「輸血医療 Pros and Cons」 III. 輸血管理料. 第 19 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム (平成 24 年 11 月 16 日).
- 2) 菅野仁. 濾過濃縮後腹水の安全性と有効性～血漿分画製剤としての視点から. 第 33 回日本アフェレシス学会学術大会 ランチョンセミナー 2 (平成 24 年 11 月 9 日).
- 3) 菅野仁. PGx 検査はどこまで医療に浸透したか～がん PGx の現状と本学会が果たすべき役割～. 日本人類遺伝学会第 57 回大会 シンポジウム S1-4 (平成 24 年 10 月 25 日).
- 4) 菅野仁. 遺伝子情報管理: 薬理遺伝学を含むゲノム診療体制の実際. 第 19 回日本遺伝子診療学会シンポジウム S2-03 (平成 24 年 7 月 27 日).
- 5) 菅野仁. CART ろ過濃縮後保存の新技术について. 第 7 回 CART 研究会 特別講演 I 第 17 回日本緩和医療学会学術大会 (平成 24 年 6 月 22 日).
- 6) 宮岡統紀子, 亀井大悟, 木全直樹, 秋葉隆, 新田孝作, 菅野仁, 武市智志, 山本雅一. ビタミン C 大量投与により急性溶血発作と AKI を発症したグルコース・6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 異常症患者に対し HDF を施行し透析離脱した一例. *日本透析医学会雑誌* 45 (Suppl.1): 902.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

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：東海大矢部みはる博士との共同研究で、日本人ファンconi貧血（FA）患者の遺伝子解析を進めている。本年度の研究で、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あたえ、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を検証する必要がある。

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、稀ながら、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。典型的な症例では外見上の特徴からも診断が可能な場合もあるが、非典型例、成人発症の軽症例、また遺伝子のリバージョンによるモザイク症例などでは、診断に至らず見逃されて化学療法時に重篤な副作用を発症するなどの可能性も指摘されている。

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症例においては、15種類におよぶ数多い原因遺伝子の異常により、DNA損傷応答や修復において重要な機能をもつFA経路の機能が欠損し、DNA障害の蓄積によって造血幹細胞不全、発がん等の重篤な症状を引き起こすと考えられる。しかし、その病態の詳細は未だ十分理解されたとは言えず、骨髄移植以外、本質的な治療法の開発には至っていない。

FA遺伝子異常は日本人症例においてはまだあまり解析されておらず、15種の遺伝子異常についてもその相対的頻度等は、FANCAが多数を占めること以外、明らかではない。本研究班では、FA遺伝子とFA症状に影響するmodifier遺伝子の同定をめざして、遺伝学的検索を行い、病態の本質の解明を試みる。すなわち、日本におけるFAと関連病態が疑われる患者の臨床材料の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し、新規遺伝子変異の同定を目指す。

また、最近マウスのFAモデルにおいて、アルデ

ヒド代謝酵素ALDH2とのダブルノックアウトが作製され、白血病の進行が強く促進されるなどの興味深い表現型が報告された。さらに、造血幹細胞において、数多いAldehyde dehydrogenaseの内でも、ALDH2の発現が優位であることも見出され、FAの病態におけるアルデヒド毒性の役割が注目されている。このような疾患病態に対して、遺伝学的知見からの解明を試みる。

最終的には、患者材料を用いて、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す。

B. 研究方法

東海大学矢部みはる博士からのFA患者のサンプルに加え、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）についてもゲノムを分離し、東大小川研究室に送付して次世代シーケンサーによるエクソーム解析を依頼した。

エクソーム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。

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。統計処理等についても、松尾博士の指導を受けた。

（倫理面への配慮）

本研究計画は「ファンconi貧血と関連病態の原因遺伝子解析」として、京都大学医の倫理委員会に申

請し、G434 号として承認を受けている。矢部みはる博士からの検体は、京大・東大への送付時にすべて匿名化され、佐々木コレクションの検体も JCRB へのデポジット時に匿名化を完了している。

C. 研究結果

1. *ALDH2* 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、頻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*、*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、奇形などが上げられる。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。

2. FA 患者の原因遺伝子の解析

東大小川研におけるエクソーム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している。

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。

D. 考察

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 発現などの 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、③ *ALDH2* 酵素活性の活性化剤の応用等が考えられる。*ALDH2* 活性化剤はすで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における長期停止など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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Tsukamoto H, Muroi K, Oshima K, Asami K, Takata M, Yamashita T, Kato S, Yabe H. Matched sibling donor stem cell transplantation for Fanconi anemia patients with T-cell somatic mosaicism. *Pediatr Transplant*. 2012;16:340-5.

- 5) 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.
- 6) Ishiai M, Uchida E, Takata M. Establishment of the DNA repair-defective mutants in DT40 cells. *Methods Mol Biol*. 2012;920:39-49.

2. 学会発表

- 1) Takata M, Hira A, Yabe H, Matsuo K, Yabe M. Genetic interplay between Fanconi anemia and aldehyde metabolism. 第71回日本癌学会学術総会 (2012年9月19日-21日).
- 2) 高田穰. 「ファンconi貧血の分子病態の解析」第54回日本小児血液・がん学会学術集会 シンポジウム「先天性造血障害の病態解明の進歩」(2012年11月30日-12月2日).
- 3) Takata M, Hira A, Suzuki N, Niwa A, Nakahata T, Yabe H, Megumu K, Saito, Matsuo K, Yabe M. Genetic interplay between Fanconi anemia and aldehyde metabolism in humans. The 8th 3R symposium “Molecular mechanisms and pathology of the 3R” (25-28 November, 2012 Awaji Yumebutai International Conference Center, Japan).
- 4) Takata M. “Genetic interplay between the Fanconi anemia pathway and aldehyde metabolism in humans” 28th RBC-NIRS International Symposium “Radiation-associated Repair proteins and DNA repair network” (November 29-30, 2012 Kyoto).
- 5) 高田穰, 平明日香, 鈴木直也, 丹羽明, 中畑龍俊, 矢部普正, 斉藤潤, 松尾恵太郎, 矢部みはる. ファンconi貧血経路とアルデヒド代謝の遺伝的相互作用解析. 第35回日本分子生物学会 年会ワークショップ「がんゲノミクスからみたDNA修復異常と突然変異誘発機構」(2012年12月11日-14日, 福岡国際会議場).

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し