

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

同期q-PCRによるDBA遺伝子コピー数の解析法の高精度化

研究分担者 浜口 功（国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長）  
研究分担者 森尾友宏（東京医科歯科大学発生発達病態学分野 准教授）  
協力研究者 倉光 球（国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員）

研究要旨：これまで同期増幅プライマーを用いて新規 DBA 原因遺伝子コピー数の迅速・簡易解析法 (S-q-PCR) を開発し、日本の DBA 患者の遺伝子変異には通常のシーケンス解析では発見できない大欠失がそれなりの割合で存在することを明らかにした。本研究では、プライマー毎の補正係数を算出し、解析法の高感度、高精度化を目指した。コピー数解析結果を係数で補正したところ欠失遺伝子の特異性が有意差検定において 3 ケタが減少し、検出能力が著しく改善した。

A. 研究目的

これまでの厚生労働科学研究難治性疾患等克服研究事業・伊藤班の研究において、新規開発した同期的に増幅するq-PCR primerセットでのDBAの遺伝子コピー数解析によって、DBAの遺伝子欠失を簡易・迅速に同定し、日本のDBAでは既知の原因遺伝子の欠失が約10%で認められることが明らかにした。

本研究では、DBA同期q-PCR解析の精度向上を目指して各プライマーの補正係数の算出を試みた。

B. 研究方法

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を行った。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した。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した。補正値の計算方法は、補正値＝実測値/補正係数とした。

(倫理面への配慮)

患者検体を用いた解析については、国立感染症研究所のヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会の承認の上で実施した。健康人PBMCは、AllCells社より購入したものを使用した。

C. 研究結果

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)。

D. 考察

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値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。

E. 結論

本研究により、DBAの遺伝子コピー数解析のため新規開発した同期primerを用いたq-PCR法は、単に遺伝子数の2倍の差を検出できるのみではなく、測定値の補正によって正常細胞中に存在する染色体異常細胞の微細な量的変化を検出することが可能であることが判明した。よって末梢血に正常細胞と疾患細

胞が混在する5q-症候群やモザイク変異、またその他の後天的な遺伝子異常が関与する疾患にも応用可能であると考えられ、本試験法は遺伝子コピー数の異常に関連する様々な疾患の診断に非常に有用であると期待できる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) Etsuro Ito, Kenichi Yoshida, Yusuke Okuno, Aiko Sato-Otsubo, Tsutomu Toki, Satoru Miyano, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Kiminori Terui, RuNan Wang, Tomohiko Sato, Yuji Iribe, Shouichi Ohga, Madoka Kuramitsu, Isao Hamaguchi, Akira Ohara, Kazuko Kudo, Isamu Kamimaki, Junichi Hara, Kanji Sugita, Kousaku Matsubara, Kenichi Koike, Akira Ishiguro, Yoshifumi Kawano, Hitoshi Kanno, Seiji Kojima, and Seishi Ogawa. #984 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, Atlanta).

#### 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

Figure 1

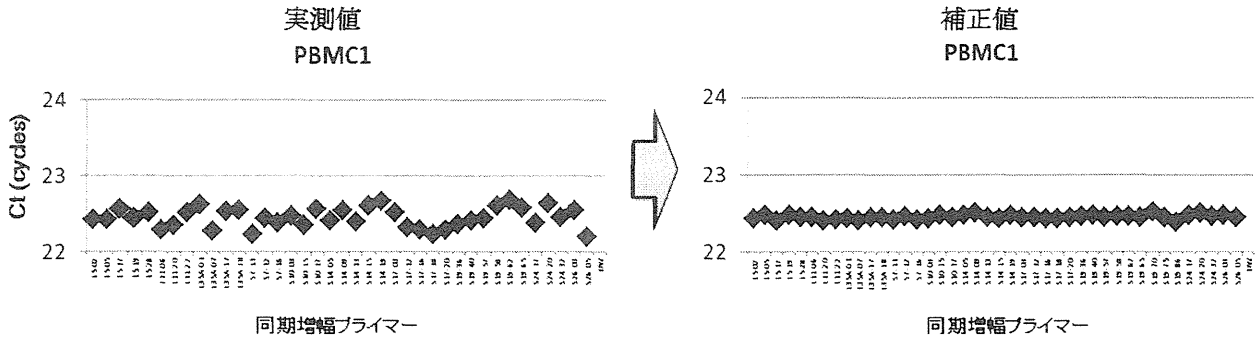


Figure 2 プライマー毎の補正によるCt値の誤差範囲の変化

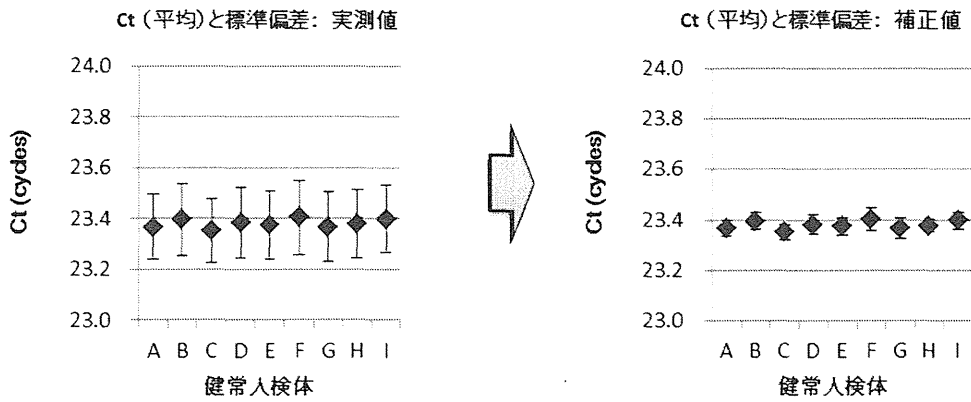
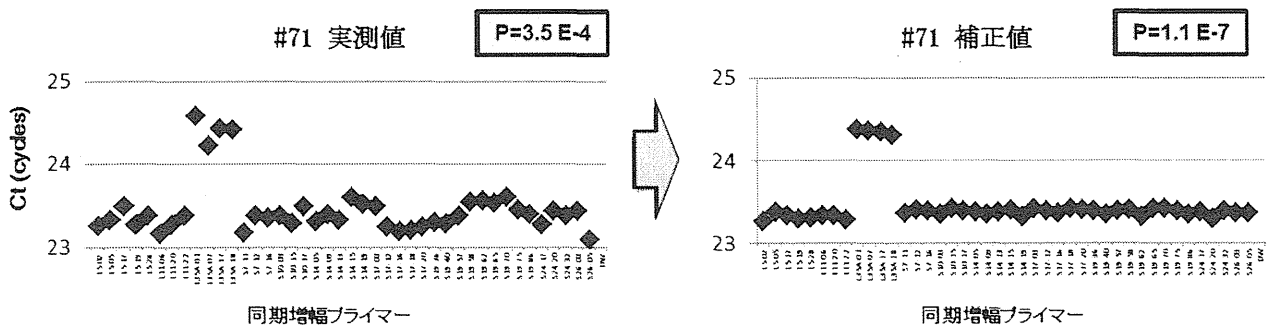


Figure 3 DBA遺伝子欠失検体のCt値データの比較



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

研究分担者 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）  
研究協力者 石村匡崇（九州大学大学院医学研究院成長発達医学 助教）  
研究協力者 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）  
研究協力者 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）

研究要旨：遺伝性貧血の早期診断と治療法確立を目指して、先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan 貧血: DBA）の ribosome 蛋白遺伝子変異症例の家族解析を進め、赤血球酵素活性と網赤血球数による診断の有用性を確認した。原因不明の溶血性貧血の患者群から、家族性楕円赤血球症、神経症状を伴う球状赤血球症および Wilson 病を診断し、原因遺伝子解析および病因・病態解析を進めた。遺伝性貧血に対する輸血療法確立のため、新生児における鉄代謝関連分子 NGAL（Lipocalin 2）の動態を解析し、鉄過剰対策の基礎データを集積した。遺伝性貧血の臨床病型から、診断と治療に関する包括的ガイドライン作成のためデータを集積中である。

A. 研究目的

本研究班では、遺伝性貧血を Diamond-Blackfan 貧血 (DBA)、鉄芽球性貧血、Fanconi 貧血、先天性赤血球異形成貧血の 4 群に分類し、病態解明と診断法の確立を目指している。これ以外にも、奇形徴候などを有し、新生児期から貧血を来す稀少で異質な疾患群が存在する。これを包括的にスクリーニングし、効率的な早期診断と治療法を確立するため、遺伝性貧血を疑う患児の臨床病型に関する情報を集積する。

B. 研究方法

DBA については、ribosome 蛋白 (RP) 遺伝子解析と赤血球酵素活性 (eADA と GSH) 測定を用いて、家族解析を進め表現型と遺伝子型の比較を検討した (伊藤・浜口・菅野分担研究協力)。非定型溶血性貧血症例の原因遺伝子検索をエクソーム解析にて検討中である。輸血による鉄過剰症対策のため新生児の血清における好中球 Gelatinase 関連 lipocalin (NGAL) 濃度を ELIA 法にて測定し、その動態を解析した。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析は倫理委員会承認の同意書を取得して行った。分子疫学研究と鉄代謝解析は倫理委員会承認された。家族解析例には、臨床遺伝医療部にて遺伝カウンセリングを行った。

C. 研究結果

当科と関連施設の DBA13 名の酵素活性と遺伝子解析を進めた。*RPS19* 変異 2、*RPL5* 変異 1、*RPL11* 変異 2、及び *RPL17* 欠失 1 が同定された。それ以外は遺伝子解析を継続中である。他に DBA と診断された 2 名の女性 (1 名は PSL 療法で寛解、1 名は輸血依存) が長期観察後に、いずれも妊娠出産に至ったこと確認した。3 家系の家族解析から、eADA 活性および GSH 活性によるスクリーニングの有用性を確認した。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。

新生児期に輸血を必要とする溶血性貧血を呈し、その後軽度の溶血が持続して次第に楕円赤血球が出現してきた姉妹例、ジスキネジアを伴った球状赤血球症の孤発例などの原因遺伝子解析を継続している。肝障害と溶血性貧血 (Hb 7.5 g/dl) を来した 15 歳の女兒は、低補体血症と低尿酸血症などからパルボウイルス B19 初感染を契機に発症した Wilson 病と診断することができ、保存的治療により肝移植を回避できた。

経口除鉄療法が造血細胞移植の困難な輸血依存の新生児・小児に応用され始めた。新生児期の鉄代謝マーカーとして血清 NGAL の生理的動態が prohepcidin と類似していることを確認した。

#### D. 考察

DBA 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

DBA をモデルとして、表現型、バイオマーカー、家系を対象とした遺伝子解析から、効率的な早期診断指針作成を目指す。稀少で多様な遺伝性疾患を多施設共同で解析することにより、診療指針作成のための基盤データを継続して集積することが重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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(10):2376-84.
- 2) Shiraiishi 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(1):103-104.
- 3) Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusuhara K, Hara T. Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Development Pathol.* 2012;15(2):151-155.
- 4) 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).
- 5) 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, 日本臨牀社

2013.

- 6) 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, 日本臨牀社 2013.

##### 2. 学会発表

- 1) Sato T, Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Yoshida K, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Morio T, Ohga S, Ohara A, Kitoh T, Kudo K, Kojima S, Ogawa S, Hamaguchi I, Ito E. Frequent mutations in the RPS17 gene in Japanese DBA patients. 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012 年 10 月 19-21 日, 京都).

#### 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

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

研究分担者 小原 明（東邦大学医療センター大森病院輸血部 教授）

**研究要旨：**先天性造血不全性貧血、遺伝性貧血は稀であり、診断法の確立や病態解明研究には疫学データベースの構築が必要である。これまで小児血液学会疾患登録事業を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築し、遺伝性貧血の症例把握に努めた結果、2006 から 2011 年に診断されて登録された 535 例の造血障害症例から、新規診断 Diamond-Blackfan 貧血症例は 47 例、特発性赤芽球癆は 30 例であった。また 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。本研究班の活動は小児血液・がん学会総会でも毎年発表され、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。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。

## A. 研究目的

### 【背景】

遺伝性貧血は稀少疾患であり、診断法や治療法開発には疫学データベースの構築が欠かせない。これまでの小児血液学会の調査では、遺伝性貧血の代表的疾患である Diamond-Blackfan 貧血、DBA は小児期造血障害の約 7% の頻度であった。そこで、小児血液学会疾患登録事業を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築し、DBA をはじめとする遺伝性貧血の症例把握に努めた。

### 【目的】

本邦の遺伝性貧血症例を悉皆性をもって収集する疫学データベース構築を目的に、小児血液学会疾患登録事業（全数把握）を一次調査とした疫学観察研究（小児血液再不貧 2005 研究・MDS2006 研究）を実施した。質の高いデータベース構築により、これを基盤とした遺伝性貧血の診断法・治療法開発を目指す。また一次調査を元にした二次調査を実施することによって、更に詳細な臨床病態解明を目指す。

## B. 研究方法

本研究班の研究では治療介入を行わない、疫学観察研究として実施する。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）が実施した。構築されるデータベースには小児期発症の造血障害全般を網羅し、遺伝性貧血症例に限定はしない。

今回の検討では赤血球造血不全による遺伝性貧血

を主な対象にし、遺伝性溶血性疾患、ヘモグロビン異常症は対象にしなかった。

（倫理面への配慮）

研究計画は、疾患登録事業、小児血液再不貧 2005 研究・MDS2006 研究により構成され、いずれも小児血液学会臨床研究審査委員会の科学倫理審査承認を得た。

## C. 研究結果

2006 年から 2011 年診断登録症例数を表に示す（表）。

- a. 疾患登録（一次調査）症例：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。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。
- b. Diamond-Blackfan 貧血：DBA 症例は 6 年間で 47 例、特発性赤芽球癆 30 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、ほとんどが乳幼児期の診断であった。
- c. 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。
- d. 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。

#### 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事が期待される。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。

#### E. 結論

悉皆性をもち、臨床情報で裏打ちされた遺伝性貧血の疫学データベースが構築された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

研究期間に本研究の成果に関する論文発表なし。

##### 2. 学会発表

研究期間に本研究の成果に関する学会発表なし。

#### 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

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
<b>Diamond-Blackfan</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>8</b>
<b>Idiopathic PRCA</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
<b>Schwachman-Diamond</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Cong. Dyserythropoietic anemia</b>	No data	No data	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Sideroblastic anemia</b>	No data	No data	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
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

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

Diamond Blackfan貧血の遺伝子解析

研究分担者 照井君典（弘前大学医学部附属病院小児科 講師）

研究要旨：Diamond Blackfan 貧血（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が、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 例のうち、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、今後ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析を行う予定である。

A. 研究目的

Diamond Blackfan 貧血（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が、我が国の DBA 患者の約 50%は、原因遺伝子が不明である。本研究の目的は、本邦の DBA 患者の原因遺伝子を明らかにし、病態を解明することである。

B. 研究方法

末梢血から DNA を抽出し、DBA で遺伝子変異が報告されている 8 遺伝子（*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*, *RPS10*, *RPS26*）と 5q-症候群の原因遺伝子 *RPS14* を解析した。最初に high resolution melt（HRM）解析で遺伝子変異の有無をスクリーニングし、異常の検出された検体を直接シーケンス法で解析した。

この検索によっても原因遺伝子を同定できなかった臨床検体について、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析を行った。ヒト全エクソン領域を、ベイトと呼ばれる RNA ライブラリーを用いて溶液中でキャプチャーし、イルミナ社の高速シーケンサー HiSeq2000 で網羅的な解析を行った。得られた遺伝子異常は、サンガーシーケンスにより確認した。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、患者および家族に十分な説明を行い、文書による同意を得たのち、検体を連結可能匿名化して解析を行った。

C. 研究結果

DBA94 例の臨床検体を用いて 8 個の既知の DBA 原因遺伝子を HRM 解析と直接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。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 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。病的意義は不明であるが、その他に 5 種類のミスセンス変異（*RPL3L*, *RPL8*, *RPL13*, *RPL18A*, *RPL31*）と 2 種類の 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 例には 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、今後ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析を行う予定である。



#### D. 考察

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 no 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。

#### E. 結論

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、同時に RP 遺伝子以外の原因遺伝子が存在することを強く示唆している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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 (in press).
- 2) 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 (in press).
- 3) Imamura T, Iwamoto S, Kanai R, Shimada 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.

- 4) 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.
  - 5) 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.
  - 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(10):2376-84.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Ito E, Yoshida K, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Toki T, Miyano S, Shiraishi Y, Chiba K, Terui K, 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回日本血液学会 (2012年10月19日-21日, 京都).

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

ALAS2 遺伝子変異の評価方法に関する研究

研究分担者 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）

研究要旨：赤芽球特異的アミノレブリン酸合成酵素(ALAS2)の機能欠失型変異は X 染色体連鎖鉄芽球性貧血 (XLSA) の原因となる事が以前より知られていたが、近年、ALAS2 遺伝子の機能獲得型の変異が X 染色体優性遺伝型プロトポルフィリン症 (XLDPP) の原因となることが報告された。今のところ、機能獲得型の ALAS2 変異についての報告は多くはないが、今後 ALAS2 遺伝子に変異が同定された場合、その変異が機能喪失型であるのか、機能獲得型の変異であることを明らかにすることは鑑別診断の上からも重要である。XLDPP で同定された遺伝子変異がカルボキシル末端における frame-shift 変異であることに着目し、本研究では、ALAS2 のカルボキシル末端の欠失やミスセンス変異が ALAS2 の発現や機能にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的に行われた。

#### A. 研究目的

アミノレブリン酸合成酵素 (5-aminolevulinate synthase; ALAS) は、ヘム生合成系の初発反応を触媒する酵素で、ヒトでは全ての細胞で発現する非特異的 ALAS (ALAS1 または ALAS-N) と、赤芽球にのみ特異的に発現し赤血球におけるヘモグロビン合成に必要なヘムを供給する役割を担う赤芽球特異的 ALAS (ALAS2 または ALAS-E) の 2 種類のアイソザイムが存在する。ヒトの ALAS1 遺伝子は三番染色体に、また ALAS2 遺伝子は X 染色体上に map されており、それぞれのアイソザイムは異なる発現調節を受ける事が知られている。疾患に関連しては、ALAS1 遺伝子の遺伝的変異により発症する疾患は報告されていないが、ALAS2 遺伝子の異常は X 染色体連鎖鉄芽球性貧血 (X-linked sideroblastic anemia; XLSA) の原因となることが知られていた。しかしながら、近年、ALAS2 遺伝子の変異が伴性優性の遺伝形式をとる骨髄性プロトポルフィリン症 (X-linked dominant protoporphyria; XLDPP) の原因となることが報告された。XLSA は ALAS2 の機能喪失型の変異、XLDPP は ALAS2 の機能獲得型の変異により発症すると考えられ、今のところ、XLDPP で同定された ALAS2 変異は frame-shift 変異のみであり、カルボキシル末端の欠失は機能獲得型の変異となる可能性が高いが、明らかでは無い部分が多い。従って、本研究では、ALAS2 遺伝子の変異が機能喪失型の変異であるのか、あるいは機能獲得型の変異である

のかを明らかにする方法を確立することを目的とした。

#### B. 研究方法

##### 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 を作成した。

##### 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した。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 トラंसフェラーゼ (GST) を精製用の tag として付与し、グルタチオンセフェアロースを用いて、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 を使用した。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 を取り除いた。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 酵素活性を測定した。

### 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 を用いて構築した。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、その後系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した。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た。

(倫理面への配慮)

本研究には倫理面への配慮が必要な研究内容を含まない。

## C. 研究結果

### 1. 大腸菌を用いた組換えタンパク質の精製

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 1)。

### 2. *in vivo* における ALAS2 タンパク質の半減期の測定

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 (図 1)。

表 1. 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%

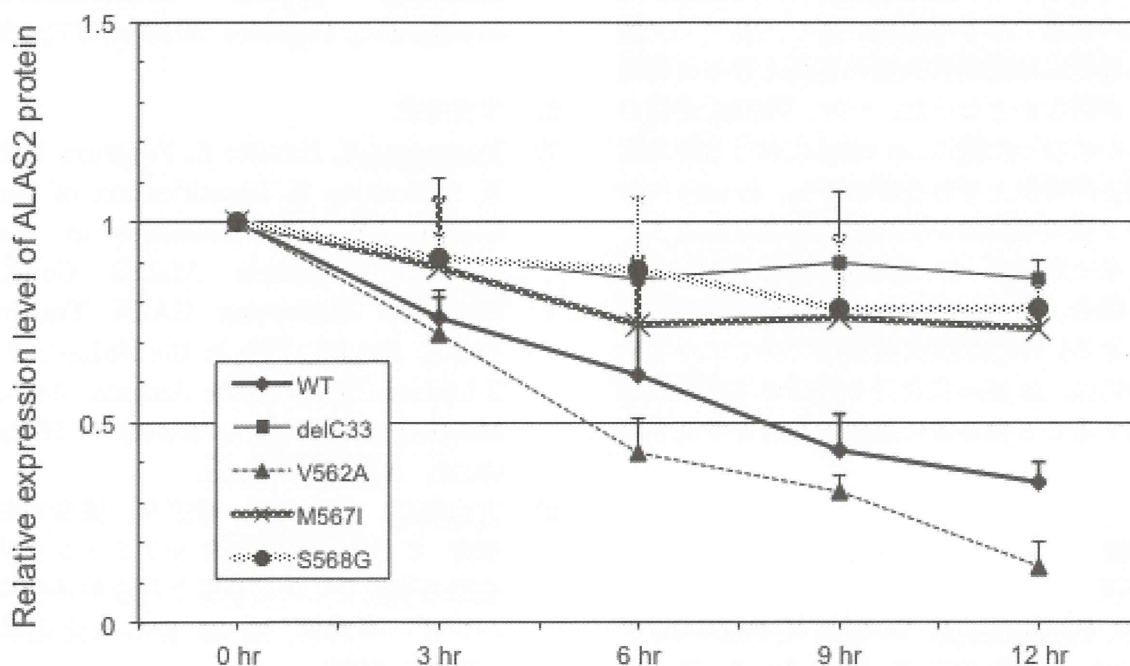


図 1. シクロヘキシミド添加後の ALAS2 発現レベルの系時的変化

#### D. 結論

今回の *in vitro* における酵素活性の測定結果から、ALAS2 タンパク質のカルボキシル末端の 20~33 アミノ酸の欠失は、酵素活性を上昇させることが明らかとなった。また、V562A 変異体の酵素活性も上昇したことから、ALAS2 タンパク質のカルボキシル末端は ALAS2 の酵素活性を抑制する機能を有するものと考えられる。一方、M567I および S568G 変異

は酵素活性を低下させることから、この部分の変異が全て酵素活性を上昇させる訳ではなく、ALAS2 タンパク質のカルボキシル末端による酵素活性の制御機構はそれほど単純なものではないことが推察された。ただし、欠失に限定して考えると、カルボキシル末端の 20 アミノ酸を欠失させた場合でも、33 アミノ酸を欠失させた場合でも酵素活性は上昇することから、カルボキシル末端から数えて 20 アミノ酸以

上 33 アミノ酸までの間でそれ以降を欠失する場合には、欠失開始部位に関係なく酵素活性は上昇するものと予想された。一方、細胞内における酵素の半減期は、V562A 変異でのみ短縮していたが、M567I、S568G および delC33 変異ではいずれも延長していた。半減期の延長又は短縮の機構については現在のところ明らかではないが、ミトコンドリア移行の阻害やミトコンドリア内における分解の亢進は半減期の短縮につながるものと考えられるので、その様な点も含めて更なる検討が必要と考えられる。

## E. 考察

近年、ALAS2 遺伝子の機能獲得型の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様に、*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ことは非常に重要であると考えられた。

## 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.* 2013; vol.92:p1-9.
- 2) Canh Hiep, N., Kinohira S, Furuyama K, Taketani S. Depletion of glutamine enhances sodium butyrate-induced erythroid differentiation of K562 cells. *J Biochem.* 2012; vol.152:p509-519

- 3) 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;vol.40: p477-486.
- 4) 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; vol. 228:p27-41.
- 5) 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- $\gamma$ . *Peptides.* 2012;vol.37:p285-289.

### 2. 学会発表

- 1) Furuyama K, Kaneko K, Fujiwara T, Harigae H, Shibahara S. Identification of the Novel Erythroid-Specific Enhancer in the First Intron of Human ALAS2 Gene; The Mutation Disrupting GATA Transcription Factor-Binding Site in the Enhancer Causes X-Linked Sideroblastic Anemia. 54<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society of Hematology (2012, Atlanta U.S.A.).
- 2) 古山和道, 金子桐子, 藤原亨, 張替秀郎, 柴原茂樹. ヒト赤芽球特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子における新たな赤芽球特異的エンハンサーの同定. 第 85 回日本生化学会大会 (2012, 福岡).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

CDAのデータ管理、診断基準の確立

研究分担者 多賀 崇（滋賀医科大学小児科 講師）

**研究要旨：** 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疾患群である。従来CDAに関する知見は主に西欧から得られているのみで、本邦での実態は明らかにされていなかった。本研究班においてわが国におけるCDAの実態を把握し、そのデータ管理、診断基準の確立、さらには有効な治療法の開発の基盤となる研究を行う。

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、我が国におけるCDAの実態を明らかにし、診断基準の確立、さらには有効な治療法の開発の基盤となる研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

分担研究者（多賀）が以前行ったCDAの全国調査を参考に作成した調査表をまとめるとともに、中央遺伝子診断への協力、検体送付などを依頼する。小児血液専門医のみならず、新生児科医、一般小児科医、血液内科医等にも学会発表や論文による啓蒙を行い、さらなる症例の蓄積につとめる。

（倫理面への配慮）

調査の基本となる日本小児血液学会の疾患登録事業として、学会倫理審査委員会で承認されている。また、調査に関する倫理審査は、共同研究者である真部淳の所属する聖路加国際病院、遺伝子診断に関する倫理審査は、検査実施施設である名古屋大学でそれぞれ承認されている。

C. 研究結果

分担研究者（多賀）が以前行ったCDAの全国調査を参考に作成した調査表をもとに、約20名の該当症例に対し、2次調査を行い、中央遺伝子診断への協力、検体送付等を依頼した。また、成人領域を含む本疾患が疑われる患者相談があった際に、診断支援をするとともに中央診断ならびに遺伝子診断への協力を呼びかけた。さらに、日本小児科学会雑誌に

「Congenital Dyserythropoietic Anemia-現状と今後の課題-」と題する総説を記載し、啓蒙に努めるとともに、自験例の論文化も行った。

D. 考察

調査対象を広げたにも関わらず本邦でのCDA症例は少ない。遺伝子診断においても既知の異常が見られない症例が多く、本邦においては本疾患が少なか欧米と異なった病型である可能性もある。引き続き詳細な調査・研究が必要である。

E. 結論

わが国のCDAの実態の正確な把握と、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.

2. 学会発表

- 1) 土居崎小夜子, 成田敦, 坂口大俊, 村松秀城, 濱麻人, 中西康詞, 高橋義行, 小島勢二, 神谷尚宏, 真部淳, 多賀崇. Congenital dyserythropoietic anemiaにおける遺伝子診断. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会(平成24年11月30日-12月2日, 横浜).

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

Fanconi貧血の診断・診断ガイドラインの作成

研究分担者 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）

研究要旨：Fanconi 貧血（FA）は種々の身体異常に加え、小児期から進行する骨髄不全、白血化や高発がんを特徴とするまれな遺伝性疾患である。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 FANCD2 のモノユビキチン化と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等により 2012 年 12 月までに 100 例が FA と診断された。このうち 3 例ではリンパ球にリバージョン・モザイクを認め、骨髄線維芽細胞等の造血細胞以外の検体を用いて FA 遺伝子の変異が検出された。身体異常の表現型は多様で、汎血球減少のみで身体異常を伴わない場合もあり、特に成人例では血球減少が先行することなく、MDS や白血病あるいは固形がんを初発症状とすることもあり、臨床像のみで本疾患を確定診断するのは困難である。小児や青年期に発症した再生不良性貧血や若年発症の頭頸部、婦人科領域の固形がんの発生がみられた場合には、全例に DNA 架橋剤添加による染色体断裂試験を行い、FA を除外することが望まれる。

A. 研究目的

Fanconi 貧血（FA）の身体症状、臨床症状は一樣ではなく、原因遺伝子も現在では 15 という多数の遺伝子が同定されており、新規遺伝子の報告もある。リンパ球のリバージョン・モザイク例ではスクリーニングとしての染色体断裂試験が有用でない場合もある。FA の造血不全の唯一の治療法は造血細胞移植であり、適切な治療法、移植方法を選択するためにも確実な診断が必要である。複数の DNA 架橋剤添加による染色体断裂試験、FANCD2 モノユビキチン化試験、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) 法および FA 遺伝子解析に臨床所見を加えて診断の検討を行う。

B. 研究方法

以下の方法を用いて FA の確定診断を試みた。

1. 身体異常：小児期・青年期発症の骨髄不全症および FA 疑い症例の外表面異常、内臓異常、成長発達所見を評価する。
2. 上記症例に各種 DNA 架橋剤添加による染色体断裂試験を行い薬剤別の評価を試みる。
3. 日本における FA 患者の多くは FA コアである FA-A, G, C 群に属しているため、FANCD2 産物に対する抗体を用い、ウェスタンブロット法でモノユビキチン化を確認する。
4. MLPA 法にて 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。

5. 京都大学放射線生物研究センター高田穰研究室にて FA 遺伝子の変異の同定を cDNA レベルとゲノムのレベルで解析を行う。

（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を実施している。説明同意書には検体の使用および保存中止請求書類も加え、遺伝子カウンセリングの体制も整えている。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を行っている。

C. 研究結果

1. FA と診断された 100 症例で皮膚の異常が 80% と最も多く、ついで低身長 70%、母指異常 55% で身体異常を伴わない症例は 7% であった。皮膚異常かつ／または低身長のみ症例は 20% にみられ、他の先天性骨髄不全症との鑑別は困難であった。血液学的には 34 例が MDS や白血病へ進行しており、移植後も含めて 13 例に固形がんの発症がみられた。

2. 染色体断裂試験では DEB 添加で正常なリンパ球が 50%以上を占める高レベルの体細胞モザイクの頻度は本邦では 30%近くに認め、欧米諸国の 10%に比べて約 3 倍であった。リンパ球にリバージョン・モザイクを認めた 3 例では非 FA との区別は不可能で、骨髓線維芽細胞等の造血細胞以外の検体を用いて FA 遺伝子の変異や染色体断裂が検出され FA の診断が可能となった。これら 3 例では特徴のある FA の身体異常を呈していた。
3. FANCD2 のウェスタンブロット法でのモノユビキチン化検査では、高レベルの体細胞モザイク患者では検出が困難でリンパ球にリバージョン・モザイクを認めた 3 例では異常がみられなかった。
4. FANCA の 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%)。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り、リバージョン・モザイクを認めた 1 例においても骨髓線維芽細胞において両アレルの異常が検出された。
5. FA 遺伝子のゲノムシーケンスより、24 例の FANCA と 7 例の FANCG 遺伝子の変異が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された。リンパ球にリバージョン・モザイクを認めた 2 例では骨髓線維芽細胞で両アレルの変異を確認し FA の確定診断を行った。

#### D. 考察

本邦の FA 症例では高レベルのモザイク症例が多く、特にリンパ球にリバージョン・モザイク例では、末梢血での染色体をはじめとした検査では同定不可能な症例もあり、造血細胞以外の検体で解析を行うことにより、診断精度の向上が期待できる。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る。A 群 MLPA 法は DNA を抽出すれば既知の変異であれば、約 60%の症例においては同定が可能であり、迅速な診断が期待される。

#### E. 結論

臨床像のみで本疾患を確定診断するのは困難なため、小児期に発症した再生不良性貧血患者や若年発症の頭頸部、婦人科領域の固形がんの患者には、全

例に DNA 架橋剤添加による染色体断裂試験を行い、FA を除外することが望まれる。リバージョン症例では末梢血リンパ球の染色体脆弱試験がスクリーニング検査としては指標にならず、理学所見、家族歴、既往歴を詳細に検討し、造血細胞以外での染色体検査や遺伝子解析等を考慮すべきである。

#### 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) 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 Dec;96(6):773-80. doi: 10.1007/s12185-012-1209-4. Epub 2012 Nov 7.
- 5) 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 Sep 7. pii: S1096-7192(12)00342-3. doi:

- 10.1016/j.ymgme.2012.09.004. [Epub ahead of print].
- 6) 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 Oct;159(1):88-93. doi: 10.1111/bjh.12001. Epub 2012 Aug 9.
  - 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.
2. 学会発表
- 国内学会  
シンポジウム
- 1) Yabe H. Stem cell transplantation for bone marrow failure syndrome in children. The 54<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Pediatric Hematology and Oncology (December 2012 Yokohama, Japan).
  - 2) 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).
- 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 (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 anabeA M. 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) A Hira, H Yabe, 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).
  - 2) 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).
- 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. 24<sup>th</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium (September, 2012, Denver, U.S.A.).
  - 2) Yabe M, Takahashi Y, Inagaki J, Koh K, Endo M, Kawa, Kato K, Sakamaki H, Atsuta Y, Yabe H. Hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi Anemia patients in Japan: An analysis of the registry data. 24<sup>th</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium (September, 2012, Denver, U.S.A.).
  - 3) Yabe H, M Nagasawa, H Yagasaki, K Horibe, D Tomizawa, A Kikuta, Y Cho, H Goto, 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. 38<sup>th</sup> 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. 38<sup>th</sup> 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. 23<sup>th</sup> 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