

201238012A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び

診断・治療法の開発に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 勢二

平成 25 (2013) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び  
診断・治療法の開発に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小島 勢二

平成 25 (2013) 年 4 月

# 目 次

I. 総括研究報告書		
稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究 (研究総括、中央診断、データ管理) .....	1	
名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学		小島 勢二
II. 分担研究報告書		
Fanconi 貧血の診断・遺伝子解析・治療法の開発に関する研究 .....	9	
東海大学医学部基盤診療学系 臨床検査学		矢部 みはる
ファンconi貧血の遺伝子解析 .....	13	
京都大学放射線生物研究センター DNA 損傷シグナル研究分野		高田 穰
Diamond-Blackfan 貧血の網羅的遺伝子解析に関する研究 .....	17	
弘前大学大学院医学研究科 小児科学		伊藤 悦郎
先天性溶血性貧血 .....	20	
東京女子医科大学大学院 遺伝子医学		菅野 仁
九州大学大学院医学研究院 周産期・小児医療学		大賀 正一
DKC の遺伝子解析 .....	24	
日本医科大学 血液内科		山口 博樹
重症先天性好中球減少症の遺伝子解析 .....	27	
広島大学大学院医歯薬学総合研究科 小児科学		小林 正夫
信州大学医学部 小児医学		小池 健一
Congenital dyserythropoietic anemia(CDA)の臨床データ解析 .....	30	
聖路加国際病院 小児科		真部 淳
Shwachman-Diamond 症候群の原因究明及び診断・治療法の開発 .....	32	
京都大学大学院医学研究科 発達小児科学		渡邊 健一郎
分類不能血液疾患の原因究明ならびに治療法の確立 .....	34	
富山大学附属病院 小児科		金兼 弘和



# I. 総括研究報告

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

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

研究代表者 小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学 教授

## 研究要旨

小児遺伝性血液疾患については、ここ数年、原因遺伝子の解明が進んだが、未だに原因遺伝子が不明な症例も多い。本研究班は、Fanconi 貧血(FA)、先天性赤芽球ろう(DBA)、先天性角化不全症(DKC)、遺伝性鉄芽球性貧血(SA)、先天性好中球減少症(SCN)、先天性顆粒放出異常症(HLH)、毛細血管拡張性小脳失調症(AT)、一過性骨髄異常増殖症(TAM)、Congenital dyserythropoietic anemia (CDA)、Shwachman-Diamond syndrome (SBDS)、先天性血小板減少症、先天性溶血性貧血、若年性骨髄単球性白血病(JMML)、分類不能骨髄不全症の14の疾患別研究班から構成され、各研究班は、臨床データの収集、既知の遺伝子解析を担当する。既知の原因遺伝子が同定されない検体については、全エクソーム解析をおこない、新規原因遺伝子の発見を試みる。現在までにすでに345検体についてエクソーム解析が終了し、いくつかの疾患において新規候補遺伝子が発見されている。リシーケンスで同定された候補遺伝子については各疾患担当施設でのバリデーション、さらには機能解析がおこなわれている。すでに、先天性血小板減少症では13家系の常染色体優性遺伝家系のうち6家系でACTIN1遺伝子の変異が同定され機能解析の結果を含め報告済みである。

### 研究分担者

矢部 みはる	東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学	准教授
高田 穰	京都大学放射線生物研究センター	教授
伊藤 悦朗	弘前大学大学院医学研究科小児科学	教授
菅野 仁	東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング科	准教授
山口 博樹	日本医科大学血液内科	講師
小林 正夫	広島大学大学院歯薬学総合研究科小児科学	教授
小池 健一	信州大学医学部小児医学	教授
真部 淳	聖路加国際病院小児科	医長
渡邊 健一郎	京都大学医学研究科発達小児科学	講師
金兼 弘和	富山大学附属病院小児科	講師
張替 秀郎	東北大学大学院医学系研究科血液・免疫病学分野	教授
石井 榮一	愛媛大学大学院医学系研究科小児科学	教授
水谷 修紀	東京医科歯科大学発生発達病態学	教授
林 泰秀	群馬県立小児医療センター	院長
國島 伸二	名古屋医療センター臨床研究センター高度診断研究部	室長
大賀 正一	九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学	教授
小原 明	東邦大学医療センター大森病院輸血部・小児科	教授
小川 誠司	東京大学医学部附属病院 Cancer Board	特任准教授
宮野 悟	東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター	教授

## A. 研究目的

“厚労省難治性疾患克服研究事業”に採択された10種類の小児遺伝性血液疾患については、全国疫学調査、臨床データの収集、遺伝子解析がおこなわれ実態が明らかにされつつある。さらに、日本小児血液学会の中央診断事業への登録症例は年間300例に達し、診断が確実な各々の疾患の発症数が全国レベルで正確に把握されている。また、中央診断の登録症例のなかには、既存の疾患に合致しない症例もあることから、分類不能血液疾患班をあらたにたちあげた。よって、本研究班は先に述べた10の研究班に加え、先天性溶血性貧血、先天性血小板減少症、若年型骨髄単球性白血病、分類不能血液疾患を含む14の疾患別研究班から構成されることとなった。先行研究の結果、対象となる遺伝性血液疾患の多くは、既知の遺伝子変異が同定されないことが多く、正確な診断を得るにあたっての障害となっている。本研究班では、新規原因遺伝子の発見をめざし、各研究班が保有する既知の遺伝子変異が同定されない検体をリシーケンス施設である東大小川研に送付し、順次、新規候補遺伝子の検索を行なう。本研究班の対象疾患の多くは胚細胞における変異が考えられるので、膨大なデータから効率的に目的とする変異を検出するプログラムを独自に開発する。小川研で同定された候補遺伝子については、各疾患の担当施設でバリデーション、機能解析をおこなう。さらに、本研究班で発見した新規原因遺伝子を含む診断パネルを作成し、次世代シーケンサーを用いた稀少小児血液疾患の診断システムの開発をおこなう。また、遺伝子解析の結果を含め、共通のデータベースをもちた疾患登録システムを構築する。

## B. 研究方法

本研究班はDKC、DBA、SA、SCN、HLH、AT、FA、CDA、SBDS、TAM、JMML、先天性血小板減少症、先天性溶血性貧血、分類不能骨髄不全症と14の疾患を担当する18施設と次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析を担当する東大がんゲノムプロジェクトと東大医科研ヒトゲノム解析センターから構成されている。各疾患については、

それぞれの疾患担当施設で直接シーケンス法を用いて、既知の原因遺伝子の解析をおこなう。症例数が多い疾患や解析予定領域が長い場合には、次世代シーケンサーを用いたキャプチャー・シーケンスまたはプール・シーケンスを活用する。さらに、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ので、SNPアレイを用いて片アレル欠失の有無を検討する。

原因遺伝子が不明な検体については、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を行う。すなわち、各症例より抽出したゲノムDNAを超音波破碎により断片化し、試料を識別する6塩基のBarcode配列を付与したのち12試料を混合し、常法に従って液相ハイブリダイゼーションにより全エクソン配列を濃縮する。得られた混合試料をIllumina社HiSeq2000シーケンサーにより平均読み取り深度x200を目標として全エクソン配列の解析を行う。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基変異(single nucleotide variants; SNVs)、および、欠失・挿入配列から、SNPデータベースと1000personal genomeデータベースに登録済みのSNPを除去したのち、家族内罹患者と陰性コントロール(非罹患同胞や両親)の全エクソン解析データとを比較検討することにより、候補となるSNV原因遺伝子を絞り込む。絞られた候補遺伝子について各疾患担当施設がサンガー法でバリデーションをおこない、細胞レベルや動物実験で機能解析をおこない、原因遺伝子であるかどうかを確定する。

(倫理面への配慮)

日本小児血液学会としておこなう疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として、すでに学会倫理審査委員会で承認されている。調査にあたっては個人情報を守秘を厳守し、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おこない、文書による同意を得る。各疾患の遺伝子解析についてはヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針(2001年、

2008年)にしたいが、患者および家族に事前に十分な説明をおこない、文書による同意を得た後で研究を遂行する。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、東京大学、名古屋大学をはじめ研究班に所属する施設において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おこなう場合は、当該施設の倫理委員会の承認を得た後に、カルタヘナ議定書および関連する政省令、告示に準拠しておこなう。

### C. 研究結果

これまでに、先天性血小板減少症 99例(32家系)、DBA 77例(52家系)、溶血性貧血 37例(35家系)、FA 34例(33家系)、DKC 17例、分類不能疾患 17例(12家系)、CDA 16例(5家系)、遺伝性鉄芽球形貧血 15例(5家系)、AT 10例、HLH 10例、JMML13例、TAM/AMKL 25例の全エクソンシーケンスを行った。全エクソンシーケンスでは症例あたり平均 20,000 個のヒトゲノムレファレンス配列と異なる塩基配列が見つかり、このうち dbSNP131、in-house SNP データにあるものを SNP として除き、最終的に症例あたり 300 個の候補となる変異が同定された。これらのなかから家系の情報、遺伝形式などを考慮して候補遺伝子の絞り込みを行った。下記に、これまで得られたおもな研究成果を示す。

既知の原因遺伝子に異常を認めない優性遺伝の先天性巨大血小板性血小板減少症 13家系のうち6家系において新規 ACTN1 遺伝子変異を同定した。変異型 ACTN1 蛋白は正常なアクチン繊維形成に影響を与え、巨核球からの胞体突起形成を阻害した。

JMML では従来から知られていた RAS パスウェイの変異が 90%の症例にみられることに加え、*SETBP1* 遺伝子が secondary mutation として病勢の進行に関わり、予後不良因子であることを発見した。

DBA では、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

規原因候補遺伝子である RPS27 および RPL27 を各 1 例に見出した。また、DBA の原因と考えられる RPL35A の新規ミスセンス変異 (Y42C) を 2 症例で同定した。その他に、その病理学的意義は不明であるが、ミスセンス変異 (RPL3L, RPL8, RPL13, RPL18A, RPL31) と 1 アミノ酸欠失 (RPL6 と RPL14) をそれぞれ 1 例ずつに認められた。

FA では、FANCA9 例、FANCG5 例、FANCB1 例において両アレル変異を認めた。さらに、4 例において既知 15 遺伝子の片アレル変異が同定された。これらはそれぞれ、FANCG、FANCI、FANCM、FANCP であった。このほか、1 例において、従来 FA と密接な関連が指摘されており、しかも患者における変異が同定されていないことから、FA 関連遺伝子とされてきた遺伝子に両アレル変異が発見された。

DKC 班では、5 症例において、サンガー法による直接塩基決定法では原因遺伝子が同定できなかったが、次世代高速シーケンサーによって、DKC1、2 例、TINF2、2 例、TERT、1 例と既知の原因遺伝子の変異を同定することが出来た。

### D. 考察

小児遺伝性血液疾患の多くは、年間発症数が 10 例以下と稀であるが、その多くは適切な治療をうけないと致死的経過をたどる。臨床症状のみでは、診断がつかない場合も多く、遺伝子診断は、診断を確定するうえで有用である。ここ数年、原因遺伝子の解明が進んだが、いまだに多くの症例では原因遺伝子は不明である。それゆえ、本研究班で新規原因遺伝子を発見することは、今後の遺伝性血液疾患患者の診療にとっては、極めて重要である。

今回の研究で得られたエクソーム解析の結果をみると、ほとんど場合バリデーションにおいて確認されており、非常に正確な結果が得られていると評価できる。従来のサンガー法による直接塩基決定法で見逃された遺伝子変異が繰り返し同定されている。一方、エクソーム解析では大きなゲノム欠失は発見できないと思われたが、これもリード数を用いたコピー数解析で少なくともある程度は発見できること



が示された。原因遺伝子が多く、変異も一塩基変異から大欠失変異や片アレル欠失まで多彩である疾患を対象に遺伝子診断をする場合に、次世代シーケンサーによるターゲットシーケンスは臨床においても有用であると考えられた。

すでに、先天性血小板減少症や DBA において新規原因遺伝子が発見されており、そのほかのいくつかの疾患においても候補遺伝子がみつき、現在、機能解析を進めている。今回発見された遺伝子を含む遺伝性血液疾患の候補遺伝子パネルを作成し、次世代シーケンサーによる診断システムを構築できれば、この分野の診断に大きな利益をもたらすことが期待できる。

一方、今回の研究対象となった JMML、TAM/AMKL などの腫瘍性疾患では、病勢にかかわる新規遺伝子が発見された。JMML で発見された SETBP1 変異は、JMML のほか、予後不良な成人の骨髄異形性症候群や骨髄増殖性疾患からも検出されており、本遺伝子の変異を標的にした新規治療法の開発が望まれる。

ダウン症患者に発症する AMKL においては、64% に DNA 修復や転写調整にかかわる同一経路の分子をコードする遺伝子変異が発見されており、同様に、これらの分子を標的にした新規治療法の開発もあらたな目標である。

## E. 結論

臨床的特徴が明らかな稀少疾患のサンプルを収集、保存するシステムと次世代シーケンサーによる網羅的全エクソンシーケンスのような新規技術を結合を図る本研究班の試みは、新規原因遺伝子の発見に有用なシステムと考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S,

Kikura A, Sawada A, Kawa K, Ohshima K, Nakamura S. Epstein-Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non-immunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood*. 2012 Jan 19;119(3):673-86.

2) 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 Feb;156(3):316-25.

3) 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.

4) Matsuda K, Yoshida N, Miura S, Nakazawa Y, Sakashita K, Hyakuna N, Saito M, Kato F, Ogawa A, Watanabe A, Sotomatsu M, Kobayashi C, Ito T, Ishida F, Manabe A, Kojima S, Koike K. Long-term haematological improvement after non-intensive or no chemotherapy in juvenile myelomonocytic leukaemia and poor correlation with adult myelodysplasia spliceosome-related mutations. *Br J Haematol*. 2012 Jun;157(5):647-50.

5) Yoshida N, Doisaki S, Kojima S. Current Management of Juvenile Myelomonocytic Leukemia and the Impact of RAS Mutations. *Paediatr Drugs*. 2012 Jun 1;14(3):157-63.

6) Asai D, Osone S, Imamura T, Sakaguchi H, Nishio N, Kuroda H, Kojima S, Hosoi H.

- Allo-SCT in a patient with CRMCC with aplastic anemia using a reduced intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*. 2012 Aug;47(8):1126-7.
- 7) 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 dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. *Intern Med*. 2012;51(8):917-20.
  - 8) Kojima S. Treatment of acquired aplastic anemia in children. *Hematology*. 2012 Apr;17 Suppl 1:S11-4.
  - 9) 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.
  - 10) Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, Verma A, Jankowska AM, Przychodzen B, Visconte V, Tiu RV, O'Keefe CL, Mohamedali AM, Kulasekararaj AG, Pellagatti A, McGraw K, Muramatsu H, Moliterno AR, Sekeres MA, McDevitt MA, Kojima S, List A, Boulwood J, Mufti GJ, Maciejewski JP. Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood*. 2012 Jun 21;119(25):6109-17.
  - 11) Yang W, Zhang P, Hama A, Ito M, Kojima S, Zhu X. Diagnosis of acquired bone marrow failure syndrome during childhood using the 2008 World Health Organization classification system. *Int J Hematol*. 2012 Jul;96(1):34-8.
  - 12) Ismael O, Shimada A, Hama A, Elshazley M, Muramatsu H, Goto A, Sakaguchi H, Tanaka M, Takahashi Y, Yinyan X, Fukuda M, Miyajima Y, Yamashita Y, Horibe K, Hanada R, Ito M, Kojima S. De novo childhood myelodysplastic/myeloproliferative disease with unique molecular characteristics. *Br J Haematol*. 2012 Jul;158(1):129-37.
  - 13) Wang X, Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Narita A, Tsumura Y, Doisaki S, Tanaka M, Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Mutation in the THPO gene is not associated with aplastic anaemia in Japanese children. *Br J Haematol*. 2012 Aug;158(4):553-5.
  - 14) 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.
  - 15) Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S. Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. *Int J Hematol*. 2013 Jan;97(1):20-9.
  - 16) 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 KI, Ohga S, Kojima S; on behalf of the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children

with acquired aplastic anemia. *Blood*. 2013 Jan 31;121(5):862-863.

## 2. 学会発表 海外

- 1) Kojima S. Treatment of Acquired Aplastic Anemia in Children. 34th International Society of Hematology. Apr. 28, 2012. Cancun, Mexico.
- 2) Kojima S. Treatment of Acquired Aplastic Anemia in Children. Asia Pacific Transplant and Hematology Forum 2012. May. 12, 2012. Taipei, Taiwan.
- 3) Kojima S. Therapeutic Advances in Treatment of Aplastic Anemia. 2nd Annual Updates on Breakthrough in Hematology. Sep. 1, 2012. Bangkok, Thailand.
- 4) Kojima S. Asian Experience in Treatment of Aplastic Anemia. Aplastic Anemia Advisory Board Meeting. Oct. 4, 2012. Cambridge, USA.
- 5) Kojima S. Unrelated donor transplant vs Immunosuppressive therapy in patients with severe aplastic anemia. 17th Meeting of the APBMT Group. Oct. 27, 2012. Hyderabad, India.
- 6) Sakaguchi H, Muramatsu H, Wang X, Narita A, Doiaski S, Yoshida N, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Manabe A, Kojima S. Clinical significance of aberrant DNA methylation in juvenile myelomonocytic leukemia. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic.
- 7) Sakaguchi H, Hama A, Wang X, Narita A, Doiaski S, Muramatsu H, Nakanishi K, Takahashi Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Hasegawa D, Manabe A, Ito M, Kojima S. Lymphocyte Telomere Length in Pediatric Aplastic Anemia, Refractory Cytopenia of Childhood, and Refractory Cytopenia with Multi-lineage Dysplasia. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic.
- 8) Hama A, Manabe A, Ito M, Hasegawa D, Nozawa K, Kawashima N, Narita A, Sakaguchi H, Doiaski S, Muramatsu H, Nakanishi K, Takahashi Y, Ohara A, Kojima S. A comparison of clinical and laboratory findings among aplastic anemia, RCC and RCMD in 219 cases registered to the central review system. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic.
- 9) Muramatsu H, Doiaski S, Shimada A, Takahashi Y, Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, 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. Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic.
- 10) Muramatsu H, Sakaguchi H, Koike K, Sanada M, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doiaski S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Comprehensive genetic analysis by deep sequencing in juvenile myelomonocytic leukemia. Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic.
- 11) Hama A, Takahashi Y, Yoshida N, Ito M, Kawashima N, Narita A, Sakaguchi H,

- Doiaski S, Muramatsu H, Nakanishi K, Matsumoto K, Kato K, Kojima S. Risk factors for Donor-Type aplasia after bone marrow transplant in children with acquired bone marrow failure syndrome. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood. Nov. 8, 2012. Prague, Czech Republic.
- 12) Kojima S. Diagnosis and treatment of aplastic anemia in children. Asian aplastic anemia expert meeting. Dec. 9, 2012. Atlanta, USA.
- 13) Muramatsu H, Okuno Y, Sakaguchi H, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doiaski S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski J.P, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Whole exome analysis reveals spectrum of gene mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. Dec. 9, 2012. Atlanta, USA.
- 14) Takahashi Y, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Yagasaki H, Morimoto A, Watanabe K, Ito E, Kudo K, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M, Nakazawa A, Kojima S. Expression of human leukocyte antigen B61 is associated with idiopathic aplastic anemia, hepatitis-associated Aplastic Anemia and Fulminant Hepatic Failure in Children. Dec. 10, 2012. Atlanta, USA.
- 15) Hama A, Takahashi Y, Yoshida N, Ito M, Narita A, Sakaguchi H, Doiaski S, Muramatsu H, Nakanishi K, Matsumoto K, Kato K, Kojima S. Risk factors for Donor-Type aplasia after bone marrow transplant in children with acquired bone marrow failure syndrome. Dec. 10, 2012. Atlanta, USA.
- 16) Kojima S. Upfront Transplant Strategies in Aplastic Anemia. BTG2013. Feb. 23, 2013. Hong Kong, China.
- 国内
- 1) Takahashi Y, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Yagasaki H, Morimoto A, Watanabe K, Ohga S, Ito E, Kudo K, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M, Nakazawa A, Kojima S. HLA-B61 is associated with idiopathic AA, hepatitis associated AA and fulminant hepatic failure in children. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月19日. 京都.
- 2) Hama A, Ito M, Hasegawa D, Nozawa K, Narita A, Sakaguchi H, Doiaski S, Muramatsu H, Takahashi Y, Ohara A, Manabe A, Kojima S. Characteristics of bone marrow findings in children with post-hepatitis bone marrow failure. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月19日. 京都.
- 3) Sakaguchi H, Hama A, Muramatsu H, Narita A, Doiaski S, Takahashi Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Hasegawa D, Manabe A, Ito M, Kojima S. Telomere Length of Lymphocyte in Pediatric Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月19日. 京都.
- 4) Shimada A, Olfat A, Xu Y, Goto A, Nagai T, Narita A, Sakaguchi H, Doiaski S, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada Y, Hayashi Y, Kojima S. JAK2 V617F mutation in pediatric myeloproliferative neoplasm. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月20日. 京都.
- 5) Wang X, Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Narita A, Tsumura Y, Doiaski S, Tanaka M, Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Mutation in the c-MPL gene is not

associated with aplastic anemia□in Japanese children. 第74回日本血液学会学術集会. 2012年10月20日. 京都.

- 6) 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 dyserythropoitic 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. 2012年11月30日. 横浜.
- 7) 濱 麻人. 小児再生不良性貧血、RCC および RCMD の臨床、検査所見の比較:中央診断登録例 219 例の検討. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012年12月2日. 横浜.
- 8) 小島勢二. 全エクソン解析による先天性骨髄不全症候群に対する新規原因遺伝子の探索. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012年12月2日. 横浜.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## Ⅱ. 分担研究報告

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

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：Fanconi 貧血の診断・遺伝子解析・治療法の開発に関する研究  
研究分担者 矢部みはる（東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学 准教授）

**研究要旨：** 次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析によるFA遺伝子解析の倫理委員会の承認が東海大学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いて得られた。変異が同定できていない35例の検体を東京大学小川誠司研究室に送付し、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を施行後、京都大学高田穰研究室にて候補遺伝子のバリデーション解析を行っている。解析された20例中12例に両アレルの変異が同定され、片アレルの変異は4例にみられた。4例は変異遺伝子の候補がみつからず、うち1例の新規変異の可能性症例を検証中である。

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遺伝子の解析を継続しており、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。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されることが判明した。

治療法に関しては、日本造血細胞移植学会の遺伝性疾患ワーキンググループで2010年までに本邦で施行された125例のFA患者の移植成績の解析を行い、Fludarabineレジメンの移植成績が極めて良好であることが示された。

## A. 研究目的

Fanconi貧血(FA)は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遺伝性疾患で、15の遺伝子異常が報告されている。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く、次世代シーケンサーを用いたFAの遺伝子解析を併用し、日本人のFA遺伝子群の疫学解析を行う。既知遺伝子の変異が存在しない場合は新規原因遺伝子の同定を試みる。また、骨髄不全、骨髄異形成症候群や急性白血病にいたるメカニズムについても検討し、FA診断治療の確率を目指す。

## B. 研究方法

FA 遺伝子、FA 患者の ALDH2 遺伝子および造血細胞移植につき以下の方法で検討を行った。

### 1. FA 遺伝子診断

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）を東京大学小川誠司研究室に送付し、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行う。同定された候補遺伝子については京都大学高田穰研究室でバリデーションを行いさらに、新規遺伝子であることが確定した遺伝子については機能解析を行う。東海大学にて遺伝子解析の結果と臨床症状を照合し、日本人の FA 遺伝子群の疫学解析を行う。

### 2. FA における ALDH2 遺伝子解析

FA 細胞はホルムアルデヒドに強い感受性を示し、また FA 遺伝子 FANCD2 と、ALDH2(acetaldehyde dehydrogenase 2) のダブルノックアウトマウスにより、両遺伝子間の強度の遺伝的相互作用が示され、

アセトアルデヒドが FA 症状の原因物質である可能性が報告された。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、すでに FA の分子診断が確定された症例でアセトアルデヒドの分解酵素である ALDH2 遺伝子型の検討を Taqman PCR 法により行う。ALDH2 遺伝子型と造血機能、身体異常等の関連性につき検討する。

### 3. FA に対する造血細胞移植

日本造血細胞移植学会の遺伝性疾患ワーキンググループで 2010 年までに本邦で施行された 125 例の FA 患者のデータ解析を行う。

(倫理面への配慮)

次世代シーケンサーを用いた FA 遺伝子解析とエクソーム解析および FA における ALDH2 遺伝子解析につき、東海大学医学部で以前から承認されている「ファンconi貧血とその類縁疾患の原因遺伝子解析および生体試料収集とその利用」に変更申請を提出し、承認が得られている。患者および家族には十分な説明をし、同意を得た上で計画に沿った研究を遂行している。また、日本造血細胞移植学会ワーキンググループを通して、学会データセンターに申請を行い、「Fanconi 貧血に対する同種造血細胞移植の成績」の研究課題が承認された。東海大学医学部臨床研究審査委員会にても「Fanconi 貧血に対する同種造血細胞移植の検討：日本造血細胞移植学会移植登録一元管理プログラム (TRUMP) の解析」の承認が得られた。

## C. 研究結果

上記 1~3 につき結果報告する。

### 1. FA 遺伝子診断

変異の同定ができていない 35 例のサンプルの次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を東京大学にて行い、20 例のバリデーション解析が京都大学にて終了した。12 例に両アレルの変異が同定され、FANCA 7 FANCG 5 例で新規変異は 4 例に認めた。片アレルの変異は 4 例にみられ (FANCG、FANCI、FANCM、FANCP 各 1 例) 検討中である。4 例は

変異遺伝子の候補がみつかっておらず、うち 1 例の新規変異の可能性症例を検証中である。欧米諸国で約 15%みられる FANCC は検出されなかった。

### 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。すなわち、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) を高頻度にもちその比率は 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髄不全は AA 群、GA 群、GG 群の順に早く発症し、有意差を認めた。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事が強く示唆された。

### 3. FA に対する造血細胞移植

2010 年までに TRUMP 登録された本邦における FA 患者の造血細胞移植 125 症例に対する移植時病態、移植時年齢、移植年代、ドナーおよび前処置別の移植成績と合併症を検討した。移植後 5 年全生存率は 81%であり、FA の移植では、2000 年から Fludarabine を前処置に用いることで拒絶や GVHD の頻度が減少し、5 年生存率は約 90%と極めて良好な成績を示し、非血縁移植においても同胞間移植と同等の成績が得られようになった。

## D. 考察

FA の遺伝子変異は民族により特徴がみられ、日本人におけるデータの集積が必要である。現在までの解析では FANCC の変異は検出されず、FANCA、FANCG が大半を占めるものの、稀な相補群も検出できる可能性がでてきた。また、新規遺伝子候補の症例もあり家族検索を含めて検証中である。本研究では FA の日本における疫学の基盤になることが推測され、次世代シーケンスによる解析は今まで日本人 FA に報告のない A、G、C 群以外の相補群や新規遺伝子の発見にも期待がもたれる。



また、ALDH2 といった FA 原因遺伝子以外の別の視点から、骨髄不全のメカニズムについても検討が可能となり、新規治療法が開発されることが望まれる。造血細胞移植に関しては、二次がんを中心とした予防や対策についても検討を行いたい。

## E. 結論

稀少遺伝性疾患である FA の遺伝子解析が、京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室および東京大学医学部附属病院がんセンターの小川誠司研究室との連携により進められている。東海大学における臨床病態と照合し、原因遺伝子や ALDH2 の遺伝子型との関連が今後明らかになっていくと思われる。免疫不全症や別の造血不全形態を呈する FA 症例の遺伝子解析もあわせて計画中である

## 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) 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
- 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: 113-1104
- 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) 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
- 2) H Yabe, M Yabe, T Morimoto, T Shimizu, T Koike, K Otsubo, A Fukumura, S Kato. 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) M Yabe, Y Ohtsuka, K Watanabe, J Inagaki MD, N Yoshida, K Sakashita. H Kakuda, H Yabe, H Kurosawa, K Kudo and A Manabe.

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) M Takata, A Hira, H Yabe, K Matsuo, 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71回日本がん学会学術総会 2012年9月 札幌
- 5) A Hira, H Yabe, K Matsuo, M Takata, M Yabe. 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. 24<sup>th</sup> 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. 24<sup>th</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. September, 2012, Denver, USA.
- 3) H. Yabe, 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) M Yabe, H Yabe, T Shimizu, T Morimoto, T Koike, H Takakura, K Ohtsubo, A Fukumura, T Morimoto, H Yoshida, Y Ohtsuka, M Shiomi, S Kato. 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) H. Yabe, M Nagasawa, H Yagasaki, K Horibe, D Tomizawa, A Kikuta, Y Cho, H Goto, M Yabe. 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

なし。

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

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：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：** 東京大学小川誠司研究室において、ファンconi貧血（FA）とその関連病態が疑われる患者サンプル（東海大矢部博士由来、加えて京都大学放射線生物研究センター佐々木前教授らによって収集されたもの）のエクソーム解析が進行している。2012年12月の時点で、合計33例のエクソームデータを得、さらにサンガー法によるバリデーションを20例で行った。多くはFANCA、FANCGを中心に、既知のファンconi貧血遺伝子の変異が同定されたが、まれなタイプで日本人では第一例となる遺伝子変異の発見がいくつかあった。また、新規遺伝子によるファンconi貧血症例一例が同定された可能性があり、今後の検討が必要である。

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

本研究班では、遺伝学的検索を通じて、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を、次世代シーケンサーを中心とした方法を用いて解析し、原因遺

伝子を同定し、既知の15種のFA遺伝子のいずれが変異しているのかを明らかにする。さらに、新規遺伝子変異による未同定の病態が発見される可能性がある。究極的には、これらの努力を通じて、FAの迅速な診断法と治療法の開発に貢献することを目指す。

研究班の立ち上げ後もテクノロジーの進展は急速で、次世代シーケンサーにより全ゲノムにわたってエクソーム解析を行い、原因遺伝子の同定を目指すという方針に方法論が変更となった。これに伴い、各施設の倫理委員会に変更申請を行い、承認を得て研究を進めている。

## 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もとづき、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おこなった。

(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 号として承認をうけた。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. 結果

### 1. 東海大からのサンプルの解析結果

20 例のバリデーションを完了し、FANCA7 例、FANCG5 例において両アレル変異を認めた。この 11 例は、FA の分子診断が完了したとあってよいと思われる。さらに、4 例において既知 15 遺伝子の片アレル変異が同定された。これらはそれぞれ、FANCG、FANCI、FANCM、FANCP であった。前 2 例は変異により蛋白質がトランケートされるのに対し、あとの 2 例はミスセンス変異であり、必ずしも機能低下を伴うかどうか、明らかではない。これらの症例が本当に同定された変異遺伝子によって発症しているのかどうか、今後の検討がさらに必要である。なお、FANCI、FANCM、FANCP の変異が日本人 FA 患者で同定されたのは、これが初である。

4 例においては、既知の FA 遺伝子変異の同定にいたらなかった。1 例は、おそらく DKC 症例である可能性が高く、1 例は結局 FA ではないものと考えられる。しかし、1 例において、従来 FA と密接な関連が指摘されており、しかも患者における変異が同定されていないことから、FA 関連遺伝子とされてきた遺伝子に両アレル変異が発見された。したがって、この遺伝子は新規の FA 遺伝子である可能性がある。幸い、この症例は、矢部みはる博士によって皮膚繊維芽細胞の培養に成功しており、今後、この細胞の不死化、さらにレンチウイルスなどの方法による当該遺伝子の発現により表現型（染色体脆弱性、マイトマイシン C 処理による G2 期細胞停止、細胞死など）が相補されるかどうか、検討を進めて

いる。

### 2. 京大からのサンプルの解析結果

13 例のバリデーションを完了し、2 例で FANCA の両アレル変異が同定された。さらに 1 例で FANCB の変異が両アレル変異として同定されたが、FANCB は X 染色体上にあり、症例は男児なので、実際には単一アレルの変異である。なお、日本人 FA 患者で FANCB 変異が同定されたのはこれが初である。

さらに 2 例において、FANCA の片アレル変異が同定された。このうち 1 例は、東大小川研究室奥野博士らによって、エクソーム解析における各エクソンのリード数によるコピー数解析が行われ、FANCA のエクソン 1-5 のコピー数低下が示唆された。したがって、この例も両アレルの FANCA 変異の同定にいたったとしてよいと思われる。

残りの 8 例のうち、5 例は染色体断裂試験では FA とは診断できなかったが、姉妹染色分体交換 (SCE) 上昇を伴うことから FA 関連病態を疑って解析に供したものである。これらの症例においては、FA 遺伝子、関連遺伝子に変異は見当たらなかったが、今後同定された変異遺伝子群について検討を進めたい。

さらに残りの 3 例のうち 2 例は、染色体脆弱性試験では FA と診断された兄弟例である。15 の既知 FA 遺伝子に変異はなかったが、DNA 損傷応答に重要な役割をはたすことがわかっているある遺伝子に両アレルミスセンス変異が共通して発見された。これも新規の FA 遺伝子である可能性があり、今後の検討が必要である。

## D. 考察

現在までのエクソーム解析の結果をみると、ほとんど場合バリデーションにおいて確認されており、非常に正確な結果が得られていると評価できる。従来、RNA から cDNA を合成して PCR し、ダイレクトシーケンスによって遺伝子変異の探索を行ってきたが、その方法で見逃された遺伝子変異が繰り返し同定されている。一方、エクソーム解析では大き