

なゲノム欠失は発見できないと危惧していたが、これも奥野博士らによる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、今後の FA の遺伝子診断の進め方に示唆を与えるものと思われる。この先ますます次世代シーケンス法が安価、高効率化することが予想される。FA をはじめとした小児血液疾患、あるいはゲノム不安定性症候群をターゲットにしたカスタム化したエクソン濃縮法を用意することが将来の臨床応用に必要かと考えていたが、全エクソンを対象としたエクソーム解析がよりプラクティカルなのか、今後の状況を見守りたい。

今回の結果から、片方アレルの同定にとどまった症例、ミスセンス変異が同定された症例については、診断が確定したとは言いがたい。FA においては、細胞の表現型が解析しやすいため、重要性の高い遺伝子変異を優先して、変異細胞への相補により機能検索を行うべきであるが、マンパワー不足が問題である。

従来の 15 の FA 遺伝子の同定に至った研究は、欧米の症例を中心に行われており、遺伝的背景の異なる東アジア人においては原因となる遺伝子が異なる可能性が考えられる。実際、今回欧米ではかなり高頻度で同定される FANCC 遺伝子変異は一例もみつかっていない。また、欧米でまれなタイプとされる FANCB が今回初めて日本人で同定され、世界でも一例しか見つかっていない FANCM の変異が、ミスセンス変異かつ片アレルではあるが、同定された。さらに、今回の検討で、1 症例ではあるが、患者変異が未同定の FA 関連分子の変異が発見され、新規の FA 分子である可能性がある。また、佐々木コレクションの兄弟サンプルからも、ある DNA 損傷応答の中心分子の変異が同定され、これも新規の FA 分子の可能性もある。わずか数十例の検索から、興味ある症例が発見されており、さらに症例数を重ねることで新規 FA 分子の同定ができる可能性がある。

E. 結論

エクソーム解析により、従来の研究では不可能な規模の症例数で日本人 FA 患者の分子診断が順調に

進行している。これらの成果がまとめれば、日本人 FA の臨床像疫学がより正確に浮き彫りとなり、今後の診断治療の高度化に貢献できるものと思われる。さらに、従来未知であった病因遺伝子の同定が期待される。

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.

と突然変異誘発機構」2012年12月11日-14日
福岡国際会議場

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

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

2. 学会発表

- 1) Minoru Takata, Asuka Hira, Hiromasa Yabe, Keitaro Matsuo, Miharu Yabe. 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」11月30日-12月2日
- 3) Minoru Takata, Asuka Hira, Naoya Suzuki, Akira Niwa, Tasutoshi Nakahata, Hiromasa Yabe, Megumu K. Saito, Keitaro Matsuo, Miharu Yabe. 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) 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
- 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
- 6) 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

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：Diamond-Blackfan 貧血の網羅的遺伝子解析に関する研究

研究分担者 伊藤 悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）

研究要旨： Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として8種類のリボソームタンパク (RP) 遺伝子が同定されている。しかし、我が国のDBA患者の約50%は、原因遺伝子が不明である。これまでに解析したDBA 94例の内、原因遺伝子の同定されていない46例に対して、全エクソン解析を行った。その結果、新規原因候補遺伝子 *RPS27* および *RPL27* を各1例に見出した。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。しかし、残りの34例はRP遺伝子の変異は認められなかった。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。DBAの責任遺伝子の同定が進めば、診断法の進歩はもちろん、疾患の発症機構の解明が進み、病態を標的とした新規治療法の開発も期待できる。

A. 研究目的

Diamond-Blackfan anemia (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。治療は副腎皮質ステロイドが第一選択であるが、ステロイド依存や輸血依存症例が全体の約40%存在する。難治例には造血幹細胞移植 (HSCT) が行われている。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。平成21年度に難治性疾患克服研究事業「先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan貧血)の効果的診断法の確立に関する研究」班 (研究代表者 伊藤悦朗) が成立し、我が国のDBA患者では、通常のシーケンス解析では検出できないRP遺伝子の片アレルの欠失が約10%存在することが明らかになった。しかし、まだ約50%のDBA患者では、原因遺伝子が不明である。本研究の目的は、次世代シーケンサーにより、新規のDBA原因伝子の探索をすることである。

B. 研究方法

原因遺伝子が不明な臨床検体についてエクソーム解析を行う。ヒト全エクソン領域を target とするベイトと呼ばれる RNA ライブラリーと溶液中でハイブリダイズによりキャプチャし、イルミナ社の高速シーケンサー HiSeq2000 で網羅的な解析を行う。得られた遺伝子異常は、サンガーシーケンスや次世代シーケンサー (MiSeq) を用いてターゲットシーケンスを行い確認する。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基多型 (non-synonymous SNP) が多数見つかりと予想される。このため、発端者に加え、家族内罹患者と陰性コントロール (非罹患同胞や両親) も解析して、シーケンス解析で得られる non-synonymous SNP と家系内罹患者との相関を検討することで原因遺伝子の候補を絞り込み、新規原因遺伝子を同定する。

(倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、弘前大学、東京女子医大、国立感染症研究所、東京大学および東京医科歯科大学の倫理審査会の承認の得た上で患者の同意を得た場合に限り検体を研究に使用する。中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得、患者及び患者保護者の同意を取得した後に行う。

C. 研究結果

これまでに DBA 94 例の臨床検体を用いて、8 例の既知の DBA 原因遺伝子をサンガーシーケンスで解析し、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。病理学的意義は不明であるが、その他に、5 つのミスセンス変異 (*RPL3L*, *RPL8*, *RPL13*, *RPL18A*, *RPL31*) と 2 つの 1 アミノ酸欠失 (*RPL6* と *RPL14*) をそれぞれ 1 例ずつに認めた。しかし、残りの 34 例は RP 遺伝子の変異は認められなかった。

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 novo 変異であり、原因である可能性が高いと思われる。残りの 42 例、少なくとも RP 遺伝子変異が検出されなかった 34 例には、RP 遺伝子以外の原因遺伝子の存在が推定される。

E. 結論

我々はエクソン解析により、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) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan Wang, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. **Blood** 2012;119(10):2376-84.
- 2) Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito

- E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S: Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. **Blood** 2012 (in press).
- 3) Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of *NEMO* in T cells of patients with X-1 linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. **Blood** 2012;119(23):5458-66.
- 4) Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Park MJ, Kanno Y, Tanaka T, Yamazaki Y. Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of *TRIB1* R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. **Blood** 2012;119(11):2608-11.
- 5) Takata K, Sato Y, Nakamura N, Tokunaka M, Miki Y, Yukie Kikuti Y, Igarashi K, Ito E, Harigae H, Kato S, Hayashi E, Oka T, Hoshii Y, Tari A, Okada H, Mohamad AA, Maeda Y, Tanimoto M, Kinoshita T, * Yoshino T. Duodenal follicular lymphoma lacks AID but expresses BACH2 and has memory B-cell characteristics. **Mod Pathol.** 2012. [Epub ahead of print]
- 6) Yazaki M, Kamei M, Ito Y, Konno Y, Wang R, Toki T, Ito E. A novel mutation of ribosomal protein s10 gene in a Japanese patient with diamond-blackfan anemia. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2012; 34(4):293-5.
2. 学会発表
- 1) Ito E, Yoshida K, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Toki T, Miyano S, Shiraishi Y, Chiba K, Terui T, Wang R, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Kudo K, Kamimaki I, Hara J, Sugita K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Kawano Y, Kanno H, Kojima S and Ogawa S. Identification of two new DBA genes, *RPS27* and *RPL27*, by Whole-Exome Sequencing in Diamond-Blackfan Anemia patients. 第54回アメリカ血液学会. 米国・アトランタ. 2012年12月8日～11日.
- 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. 京都. 2012年10月19日～21日.
- 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. 横浜. 2012年11月30日～12月2日.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

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

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：先天性溶血性貧血

研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学医学部 准教授）

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 入部 雄司（東京女子医科大学医学部 非常勤講師）

研究要旨： 原因不明の溶血性貧血患者 42 症例の全エクソーム解析を行い、4 症例に COL4A1、7 症例に PIEZO1 遺伝子の未報告多型を認めた。COL4A1 は裂脳症、孔脳症等の奇形、また、腎症、動脈瘤、筋けいれんを伴う常染色体優性遺伝の血管障害（Hereditary angiodysplasia with nephropathy, aneurysms, and muscle cramps ; HANAC）の原因遺伝子であるが、溶血性貧血を随伴することが近年報告されている。一方、PIEZO1 は常染色体優性遺伝の Dehydrated hereditary stomatocytosis ; DHS の原因遺伝子として昨年同定されている。今回の全エクソーム解析の結果は、血管障害およびイオンチャネル異常による先天性溶血性貧血が少なからぬ頻度で存在することを示唆するものであり、今後の先天性溶血性貧血の診断において、これらの病態を考慮するべきであることが明らかとなった。

A. 研究目的

先天性溶血性貧血においては、いまだ原因遺伝子が未同定の症例が少なからず存在することが知られている。近年、先天性溶血性貧血の原因遺伝子として新たに 2 遺伝子（COL4A1、PIEZO1）が同定された。前者は血管基底膜の主要コラーゲン、後者は機械刺激受容チャネルをコードする遺伝子である。

これにより、先天性溶血性貧血においても① Vasculopathy、② Channelopathy を原因とする病態の存在が明らかになった。

当該研究では、1）これまで原因遺伝子が未同定であった先天性溶血性貧血患者における原因遺伝子の探索（遺伝子検査、疫学調査、変異機能解析）を上記の 2 病態に基づき改めて行ない、新たな機序による先天性溶血性貧血病態概念の構築を行うとともに、2）新規病態生理に即した適切な検査・診断法の開発をも目的とし、先天性溶血性貧血診断の精度向上とより良い治療への貢献を目指すものである。

B. 研究方法

赤血球酵素活性、赤血球 eosin 5'-maleimide（EMA）結合能、イソプロパノール不安定試験に異常を認めなかった原因不明の溶血性貧血（疑い）症例の DNA サンプルを用い Illumina 社 HiSeq2000 シークエンサーにより原因不明溶血性貧血患者の全エクソーム解析を行った。SNP データベースおよび 1000personal genome データベースに登録済みの SNP を除去したのち、責任変異の候補となる SNV 原因遺伝子の候補を絞り込み、サンガー法によるバリデーションを行った。

（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・保護に務める。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する。

C. 研究結果

① Vasculopathy が関与する先天性溶血性貧血 今回の全エクソーム解析により原因不明の溶血性貧血患者 42 症例中 4 症例において COL4A1 の新規多型が同定された。また、今回のプロジェクトにおける他の遺伝性血液疾患の全エクソームデータも参

照し、COL4A1 関連遺伝子の多型を調査したところ、COL4A2、ELN、ATP7A の多型が同定された (表 1)。

② Channelopathy が関与する先天性溶血性貧血 原因不明の溶血性貧血患者 42 症例中 7 症例において PIEZO1 の新規多型が同定された。(表 2)

表 1

ホールエクソーム解析結果	症例数	Vasculopathy 新規多型数			
		COL4A1 (常染色体 優性)	COL4A2 (常染色体 優性?)	ELN (常染色体 優性)	ATP7A (X 染色 体)
原因未同定の溶血性貧血症例	42	4	0	0	1
健常者	56	0	0	0	0
他の稀少小児遺伝性血液疾患症例	95	0	5	2	0
		DBA 3 例 FA 1 例 DBA 2 例 DKC 1 例			

表 2

ホールエクソーム解析結果	症例数	Channelopathy 新規多型数
		PIEZO1 (常染色体優性)
原因未同定の溶血性貧血症例	42	7 (16.7%)
健常者	56	1 (1.8%)
他の稀少小児遺伝性血液疾患症例	95	2 (2.1%)

D. 考察

① Vasculopathy が関与する先天性溶血性貧血

COL4A1 は基底膜を構成する分子であり、その遺伝子変異は裂脳症、孔脳症等の奇形や腎症、動脈瘤、筋けいれんを伴う常染色体優性遺伝の血管障害の原因となることが知られている。近年この疾患群が溶血性貧血を随伴することが臨床的に報告された (Yoneda, Y. et al, Ann Neurol 2012)。このことは、血栓を主体とする微小血管病変とは異なる血管自体の障害が溶血性貧血の原因になることを示唆するものであった。そのため、われわれは基底膜形成に関与する COL4A1 関連分子の遺伝子多型を他の小児

遺伝性血液疾患の全エクソームデータも含め検討した。この検討により、COL4A1 以外に COL4A2、エラスチン (ELN)、ATP7A の多型を抽出した。

ELN は皮膚弛緩症 (常染色体優性遺伝) の原因遺伝子であり、COL4A とクロスリンクする。その架橋には銅依存性酵素のリジルオキシダーゼが必要であり、この酵素活性は銅輸送体 ATP7A と関与することが知られている。ATP7A は Menkes 病 (常染色体優性遺伝) の原因遺伝子である。COL4A2 は COL4A1 とヘテロ重合体を形成する。COL4A2 遺伝子変異もヒトにおいて裂脳症、血管病変の原因となることが報告されており (Verbeek E et al. Eur J

Hum Genet. 2012) 、また動物モデルでは Col4a1 同様、貧血を示すことが報告されている (Favor J et al, Genetics, 2006) 。今回の解析では COL4A1 と ATP7A の新規多型は溶血性貧血症例においてのみ確認され、ELN、COL4A2 の多型は他の骨髄不全疾患においてのみ認められたため、今後詳細な解析を行いこれらの遺伝子と遺伝性血液疾患の病態との関連を検討したい。

② Channelopathy が関与する先天性溶血性貧血

近年、先天性溶血性貧血の原因遺伝子として新たに PIEZO1 が報告された (Zarychanski, R. et al, Blood 2012) 。PIEZO1 は機械刺激受容チャネルであり、これまで特定されていなかった Dehydrated hereditary stomatocytosis (Hereditary xerocytosis, 常染色体優性遺伝) の原因遺伝子であった。このカチオン選択性チャネルは鎌状赤血球症において活性化される赤血球の P-sickle 経路であることも判明しつつある。今回の全エクソーム解析においてはこの遺伝子の新規多型が原因未同定の溶血性貧血症例に高頻度に見出され、原因遺伝子である可能性が示唆された。今後、疫学調査、機能解析検討を予定している。

E. 結論

先天性溶血性貧血において① Vasculopathy、② Channelopathy を原因とする病態の存在が明らかになった。今後これらの病態が先天性溶血性貧血の新規の疾患分類になると考えられる。

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. 58:26-32, 2012
- 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. 69:1617-24, 2012

- 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. 57:580-586, 2012
- 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 dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. Intern Med. 51:917-920, 2012
- 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. 119:2376-2284, 2012

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
 - 7) 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

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

分担家研究項目：DKC の遺伝子解析

研究分担者 山口 博樹（日本医科大学血液内科 講師）

研究要旨：先天性角化不全症(DKC)におけるテロメア関連遺伝子変異は診断に重要である。次世代シーケンサーによる遺伝子変異検索は、正確で効率的にDKCの既知の原因遺伝子変異を同定することができた。また新規遺伝子変異の探索では、ロスモンド・トムソン症候群、毛細血管拡張性運動失調症、Bloom症候群の原因遺伝子であるRECQL4、ATM、BLMのヘテロ変異が高率に認められ、DKCの病態への関与が考えられた。

A. 研究目的

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

テロメラーゼ複合体は細胞分裂によるテロメアの短縮化に対しテロメアの複製、安定の役割をもち、Shelterin複合体はテロメアの先端部位の特異的な構造形成や保護などを行っている。DKCはこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結

果造血幹細胞などの増殖能に障害が起き上記の症候が形成されると考えられている。

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

現在のところDKCや不全型DKCの診断基準は定まっておらず、臨床的には上述の特徴的身体的所見を伴うBMF、テロメア長の短縮、テロメア関連遺伝子の変異の同定によって診断を下している。しかしテロメア関連遺伝子の変異の同定に関しては原因遺伝子だけでも6種類存在し、その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従来のサンガー法による変異のスクリーニングは効率的ではない。また約40%の症例は原因遺伝子が同定されていないことも問題である。

近年次世代高速シーケンサーが登場し、これまでのサンガー法による直接塩基決定法よりより早く効率的に塩基配列の決定が可能となった。本研究は大欠失変異や片アレル欠失に関しては SNP アレイ解析で、一塩基変異に関しては次世代シーケンサーを応用し、効率的に原因遺伝子の変異が同定できるかを検討することを目的としている。また原因遺伝子が同定されていない症例に関しては、全 exon シーケンスを行い、新規原因遺伝子を同定することを目標としている。

B. 研究方法

研究対象は、特徴的身体的所見を伴う DKC 症例、もしくはテロメア長の短縮が認められた不全型 DKC 症例。目標症例数は 20 症例。

既知の遺伝子変異のスクリーニングは、*DKC1*、*TERC*、*TERT*、*NOP10*、*NHP2*、*TINF2* を対象に遺伝子解析を行う。大欠失変異や片アレル欠失のスクリーニングは、東京大学医学部附属病院・がんセンターボードの SNP アレイ解析を用いて行う。一塩基変異などのスクリーニングは、日本医科大学生命科学センターの ABI Ion PGM™ シーケンサーもしくは、従来の direct sequence 法にて行う。

新規遺伝子変異の探索は、上記のスクリーニングにおいて変異が同定出来なかった症例に関して、東京大学医学部附属病院・がんセンターボードの次世代シーケンサー-Illumina 社 GAI, GAIx, HiSeq2000 を用いて全 exon シーケンスを行う。新規遺伝子が同定された場合は、そのバリデーションや機能解析を日本医科大学生命科学センターにて行う。

(倫理面への配慮)

本研究は当施設遺伝子倫理審査委員会において承認が得られており以下の配慮を予定している。生命倫理上の配慮に関しては、患者、及び健康ボランティアの人権、利益の保護について文書にて十分説明をしたうえで同意を得る。また研究への協力に同意した後であってもその同意を取り消すことができること、更に本研究への同意が得られない場合においても今後の治療などにはなんら不利益を被らないこ

とを説明する。個人情報漏洩に対する取り組みとして研究組織とは別に個人情報管理者をおき連結可能匿名化をはかったうえで解析をおこなう。同意が撤回された場合は、検体、診療情報、遺伝情報はすべて匿名化されたまま焼却により破棄する。得られた結果は学会や論文として発表するが個人情報が出ることはない。遺伝子結果の開示を研究対象者が要求する場合は、倫理的問題を考慮し遺伝子カウンセリングを施行し、結果の告知は臨床遺伝専門医(遺伝カウンセラー)により行う。

C. 研究結果

1. 既知の遺伝子変異の次世代高速シーケンサーを用いたスクリーニング

2012 年 12 月現在、既知の原因遺伝子に変異を認めず、テロメア長の短縮が確認された DKC 症例、不全型 DKC 症例 16 症例を集積した。

その中で表 1 に示す様に、5 症例においては、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既知の原因遺伝子の変異を同定することが出来た。

表 1 次世代高速シーケンサーによって同定された既知の遺伝子変異

Pt No.	Gene	Mutation type	Mutation
299	<i>TINF2</i>	nonsynonymous SNV	c.G845A:p.R282H
300	<i>TINF2</i>	frameshift insertion	c.824_825insA:p.T275fs
301	<i>DKC1</i>	nonsynonymous SNV	c.T1193C:p.L398P
303	<i>DKC1</i>	nonsynonymous SNV	c.C91A:p.Q31K
385	<i>TERT</i>	nonsynonymous SNV	c.C1895G:p.P632R

2. 次世代高速シーケンサーを用いた新規遺伝子変異の探索

既知の遺伝子変異がサンガー法や次世代高速シーケンサーにて同定されなかった症例に関して現在新規の遺伝子変異の探索を行っている。現時点では表 2 に示す様な新規遺伝子変異の候補が抽出されている。

表 2 次世代高速シーケンサーによって抽出された新規遺伝子変異候補

Pt No.	Gene	Mutation type	Mutation
378	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.G3313C:p.G1105R
379	<i>HSPBP1</i>	nonsynonymous SNV	c.C92G:p.S31C
379	<i>HSPBP1</i>	nonsynonymous SNV	c.T91G:p.S31A
380	<i>TP53BP1</i>	nonsynonymous SNV	c.C2591G:p.T864R
384	<i>ATM</i>	nonsynonymous SNV	c.G3778A:p.V1260M
384	<i>BLM</i>	nonsynonymous SNV	c.G3385C:p.G1129R
385	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.G1405A:p.V469M
386	<i>BLM</i>	nonsynonymous SNV	c.G2148C:p.L716F
386	<i>TP53BP2</i>	nonsynonymous SNV	c.A1375G:p.K459E
390	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.C1394T:p.T465M
391	<i>RECQL4</i>	nonsynonymous SNV	c.C215T:p.A72V

D. 考察

次世代高速シーケンサーによる遺伝子変異検索は、従来のサンガー法による直接塩基決定法と比較してより正確で効率的に既知の遺伝子変異を同定することができた。DKCのように原因遺伝子が多く、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において、臨床上遺伝子診断をする場合に、次世代高速シーケンサーによるターゲットシーケンスは有用であると考えられる。

新規遺伝子探索に関しては、現在探索中ではあるが、表2に示すように早老症の一つとして考えられているロスモンド・トムソン症候群の原因遺伝子である *RECQL4* のヘテロ変異が高率 (4/11(36.3%)) に抽出された。ロスモンド・トムソン症候群は常染色体劣性遺伝疾患であるので *RECQL4* のヘテロ変異が DKC の病態にどのように関与しているのかは不明である。また症例 384 の様に常染色体劣性遺伝疾患である毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子である *ATM* と毛細血管拡張性運動失調症様疾患である Bloom 症候群の原因遺伝子である *BLM* のヘテロ変異を同時に認める症例があった。*ATM* と *BLM* は遺伝子修復に関与する遺伝子群であり、これらのヘテロ変異の共存がどのように DKC の病態に関与しているのかは不明だが、次世代高速シーケンサーで網羅的遺伝子変異探索をすることによって、既知の常染色体劣性遺伝疾患のヘテロ遺伝子変異の組み合わせによる新たな病態が明らかになるのかもしれない。

E. 結論

次世代高速シーケンサーによる遺伝子変異検索

は、正確で効率的に DKC の既知の原因遺伝子変異を同定することができた。また *RECQL4*、*ATM*、*BLM* といった常染色体劣性遺伝疾患のヘテロ変異が高率に認められ、DKC の病態への関与が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

山口博樹、檀 和夫. 骨髄不全症候群におけるテロメア制御異常. 血液フロンティア. 2012; 22(6): 941-952.

2. 学会発表

山口博樹、檀 和夫. 先天性造血障害の病態解明の進歩. 日本小児血液がん学会学術集会. 2012年12月. 横浜

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：重症先天性好中球減少症の遺伝子解析

研究分担者 小林 正夫（広島大学大学院医歯薬保健学研究院 小児科学）

研究分担者 小池 健一（信州大学医学部 小児医学）

研究協力者 溝口 洋子（広島大学大学院医歯薬保健学研究院 小児科学）

研究要旨： 先天性好中球減少症は慢性好中球減少、生後早期からの重症細菌感染症を反復する難治性遺伝性疾患である。本疾患は同一表現型を呈するheterogenousな疾患群であり、正確な診断には症例の遺伝子診断が必須となる。責任遺伝子として*ELANE*, *HAX1*, *GFI1*, *G6PT*, *WAS*, *CXCR4*, *G6PC3*等が同定されているが、約15%は原因不明である。我々は全国より情報を収集した46人のSCN症例の遺伝子解析に関する検討を行った。46人中29人で遺伝子解析が行われていた。*ELANE*変異が76%、*HAX1*変異が12%であった。原因遺伝子未知の症例5症例のうち当科で3例について次世代シーケンサーを用いて網羅的解析を行った。1例で*WAS*遺伝子の変異を同定した。この遺伝子変異が先天性好中球減少症の責任遺伝子かどうかの解析を行ったが、明確な事実を同定することは出来なかった。他の4例については現在、次世代シーケンサー解析を施行中か今後解析予定としている。

A. 研究目的

先天性好中球減少症（severe congenital neutropenia, SCN）は、乳児期からの慢性好中球減少症(特に末梢血好中球数が 200 /mL 未満)と、骨髄における顆粒球系の成熟障害、生後より反復する重症細菌感染症を臨床的特徴とする疾患である。本研究では本邦における SCN 症例の遺伝子解析に関する検討を目的とした。

B. 研究方法

広島大学ならびに信州大学において診断された 3 症例について家族歴、臨床経過、随伴症状、治療経過などの臨床情報を収集、解析した。これまでに特定されている、*ELANE*, *HAX1*, *GFI1*, *G6PT*, *WAS*, *CXCR4*, *G6PC3* の変異の有無と特定されていない遺伝子変異の探索のために次世代シーケンサーを用いたシーケンスを施行した。

（倫理面への配慮）

本研究は広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会での承認を得た。

C. 結果

1) 診断時年齢、性差

診断時年齢は平均 4.6 ヶ月であり、生直後から 24 ヶ月にわたっていた。90%の患者が 1 歳前に診断されており、約 75%の患者は生後 6 ヶ月以前に診断されていた。24 ヶ月をこえて診断された症例はなかった。男女比は 1:1 であり、性差は認めなかった。

2) 遺伝子解析

46 例中 33 例（72%）に遺伝子解析が行われていた。33 例の内 29 例（88%）に遺伝子異常が同定された。29 例の内訳は、25 例（76%）が *ELANE* 変異、4 例（12%）が *HAX1* 変異であった。

ELANE, *HAX1*, *GFI1*, *G6PT*, *WAS*, *CXCR4*, *G6PC3* の遺伝子変異は認めなかった 5 症例のうち 3

症例について当施設で次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を行った結果、1例で WAS 遺伝子の変異 (P460S) を同定した。本症例は 4 年前に HLA 一致の同胞から骨髄移植を施行し、好中球減少症は完治している。家族のシーケンスを行った結果、母及び移植ドナーである同胞ならびに移植後の本人の白血球にも全く同一の変異を同定した。母、同胞ともに好中球減少の所見はなく、健常である。機能解析としてアクチン重合アッセイを行ったが、本症例の変異ではコントロールとほぼ同様であり、アクチン重合の促進は認めなかった。これらから本症例で認めた WAS 遺伝子 P460S の変異は先天性好中球減少症の責任遺伝子ではないと結論づけた。

D. 考察

本疾患は近年、生命予後が改善してきているが依然として治療に難渋するケースも散見され、効果的な診断方法の確立がよりよい治療の確立につながると考えられる。責任遺伝子の探索は根本的治療の可能性となりうるが、未知の責任遺伝子の同定には直接シーケンス法では限界があると考えられ、次世代シーケンサー (Illumina 社 Genome Analyser 2) を併用した解析が必要である。しかし、本症例のように候補遺伝子を同定するも好中球減少症の責任遺伝子であると同定することは困難であった。今後は次世代シーケンサ解析精度の向上と、候補遺伝子の絞り込みのための遺伝子情報の収集が必須であると思われた。今後、症例を増加するとともに解析技術の向上のうえに解析を継続することで、更なる成果が期待できると考えている。

E. 結論

SCN の新たな責任遺伝子は同定出来ていないが、解析を必要とする症例についての解析をすすめる必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K,

Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous *ELANE* mutation. Proc Natl Acad Sci USA 2013 (in press)

2) Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. Blood. 2012;119(23):5458-66.

3) Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. Br J Haematol. 2012, DOI Dec 17

4) Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong XF, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Alzahrani M, Shehri MA, Elghazali G, Takihara Y, Kobayashi M: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. Human Mutation 2012;33(9):1377-87.

5) Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, Kagami K, Goi K,

- Nakamura K, Kobayashi M, Endo M, Yagita H, Kurosawa H, Thomas Look A, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K: Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. *Leukemia*. 2012;26(12):2483-93
- 6) Ohno N, Kobayashi M, Hayakawa S, Utsunomiya A, Karakawa S: Transient pseudothrombocytopenia in a neonate: Transmission of a maternal EDTA-dependent anticoagulant. *Platelets*. 2012;23(5):399-400.
- 7) Kajiume T, Sera Y, Kawahara Y, Matsumoto M, Fukazawa T, Imura T, Yuge L, Kobayashi M. Regulation of hematopoietic stem cells using protein transduction domain-fused Polycomb. *Exp Hematol*. 2012;40(9):751-760.
- 8) 溝口 洋子, 鎌田 綾, 三木 瑞香, 谷 博雄, 世羅 康彦, 中村 和洋, 小林 正夫: Glanzmann thrombasthenia への遺伝子組み換え活性型第 VII 因子製剤による止血効果. *日本小児血液・がん学会雑誌*. 49(1-2)9: 61-66. 2012.
- 9) 小林 正夫: 輸血後蕁麻疹発症前の末梢血一般検査所見. *アレルギー*. 61(8): 1086-1091. 2012.
- 10) 溝口洋子, 津村弥来, 岡田賢, 小林正夫.慢性性皮膚粘膜カンジダ症と機能獲得性 STAT1 変異. *臨床免疫・アレルギー科*. 57(4): 437-443. 2012.
- 2012.10
- 2) Yoshiyuki Kobayashi, Hirotaka Matsui, Akinori Kanai, Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Mizuka Miki, Kazuhiro Nakamura, Shinji Kunishima, Toshiya Inaba and Masao Kobayashi: Identification of integrin b3 L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant macrothrombocytopenia. The 54th Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta 2012.12
- 3) Rie Onodera, Kazuhiro Nakamura, Kikuyo Taniguchi, Emi Kurita, Asako Hiraoka, Kaduta Yasui, Nobuki Matsuyama, Fumiya Hirayama, and Masao Kobayashi: A novel method using extracted human neutrophil antigens from HNA gene-transfected cell lines for detection of antibodies against human neutrophil antigens. The 54th Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta 2012.12
- 4) 溝口 洋子, 津村 弥来, 平田 修, 峯岸 志津子, 森尾 友宏, 岡田 賢, 小林 正夫: 機能獲得性 *STAT1* 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症の解析. 第 54 回日本小児血液学会 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

2. 学会発表

- 1) Osamu Hirata, Miyuki Tsumura, Yoko Mizoguchi, Satoshi Okada, Shizuko Minegishi, Tomohiro Morio, Masao Kobayashi: Gain-of-function mutations of STAT1 in Japanese patients with CMCD. The 15th European Society for Immunodeficiencies Meeting. Florence, Italy,

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：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しながら、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おこなった 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

わが国でも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なはいまだに不明である。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

わが国の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。

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) Kikuchi A, Hasegawa D, Ohtsuka Y, Hamamoto K, Kojima S, Okamura J, Nakahata T, Manabe A: Outcome of children with Refractory Anaemia with Excess of Blast (RAEB) and RAEB in Transformation (RAEB-T) in the Japanese MDS99 study. *Br J Haematol* 158:657-661, 2012
- 3) 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

- 4) Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer*, in press
- 5) Kato M, Yasui N, Seki M, Kishimoto H, Sato-Otsubo A, Hasegawa D, Kiyokawa N, Hanada R, Ogawa S, Manabe A, Takita J, Koh K: Aggressive transformation of juvenile myelomonocytic leukemia associated with duplication of oncogenic *KRAS* in consequence of acquired uniparental disomy. *J Pediatr*, in press
- 6) 多賀崇、真部淳。Congenital Dyserythropoietic Anemia —現状と今後の課題— *日児誌* 116:1075-1080, 2012

2. 学会発表

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。

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：Shwachman-Diamond 症候群の原因究明及び診断・治療法の開発
研究分担者 渡邊 健一郎（京都大学発達小児科学 講師）

研究要旨： Shwachman-Diamond症候群は、骨髄不全と膵外分泌不全を主徴とする先天性骨髄不全症候群である。本症候群症例で90%にSBDS遺伝子両アレル変異が認められることが報告されているが、SBDS遺伝子変異を認めない症例について新たな疾患関連遺伝子は未だ同定されていない。「Shwachman-Diamond症候群の効果的診断法に関する研究」班で初めての全国調査を行い、本邦での同疾患の実態を明らかにした。その後、本疾患がより広く認知されるようになり、日本小児血液学会中央診断システムに登録される症例も増加している。今後も、本疾患が疑われる症例について遺伝子解析を行い、SBDS遺伝子変異を認めない症例を見出し、新たな遺伝子変異を同定し、病態の解明を行っていく。

A. 研究目的

Shwachman-Diamond 症候群(SDS)では、90%の症例で SBDS 遺伝子の両アレル変異が認められると報告されているが、新たな疾患関連遺伝子は同定されていない。新規遺伝子同定のため、本疾患が疑われる症例について SBDS 遺伝子解析を行い、同遺伝子の変異が同定されない症例を把握する。

B. 研究方法

SDS が疑われる症例から、同意を得て、末梢血単核球を分離し、DNA を抽出する。ダイレクトシーケンス法を用いて SBDS 遺伝子の塩基配列を決定した。Compound heterozygote であった場合には、両親の SBDS 遺伝子のシーケンスを行い、両親がそれぞれの変異アレルをもつことを確認する。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヘルシンキ宣言に従い、京都大学医学部医の倫理委員会の承認を得ている。検体採取の際には、十分な説明を行い、文書による同意を

得ている。遺伝子解析については、ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針に従っている。

C. 研究結果

日本小児血液学会中央診断システムで、2組の兄弟例を含む8例のSDSが診断された。内2例は昨年当科で遺伝子診断を行った症例である。8例の内6例は、発育障害、膵外分泌不全を合併しており、SDSと臨床診断され、SBDS遺伝子解析で確定診断された。2例は、同胞がSDSと診断されたのを契機として、本疾患が疑われ、遺伝子解析にて診断確定した。

D. 考察

SDS の臨床診断例では、約 90%に SBDS の両アレル変異がみつかりと報告されている。本邦でも同様に、SDS 臨床診断例では、SBDS 遺伝子解析により診断を確定することができた。今後も本症候群疑い例について、SBDS 遺伝子解析を行い、診断を行っていくと共に SBDS に変異を認めない症例について、新規遺伝子の検索を行う。

E. 結論

臨床診断例については、ほとんどの場合 *SBDS* 遺伝子解析で診断を確定が可能である。今後も臨床診断例、疑い例について遺伝子解析を行い、*SBDS* 遺伝子変異が認められない症例を見出し、*SBDS* に関連するリボソーム生成に関わる遺伝子を含め、全エクソーム解析で解析を行い、新規遺伝子を同定する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 渡邊健一郎, 森嶋達也, 金兼弘和
Shwachman-Diamond 症候群
別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ
No.21 血液症候群(第2版)p24-27
- 2) 渡邊健一郎, 森嶋達也, 先天性角化不全症
別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ
No.21 血液症候群(第2版)p19-23
2013年1月20日発行

2. 学会発表

Morishima T, Watanabe K, et al. Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. International Society for Stem Cell Research, 10th Annual Meeting, 2012

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：分類不能血液疾患の原因究明ならびに治療法の確立

研究分担者 金兼 弘和（富山大学附属病院小児科 講師）

研究協力者 本間 健一（防衛医科大学校小児科）

研究協力者 今井 耕輔（東京医科歯科大学小児・周産期地域医療学講座 准教授）

研究要旨： 遺伝性血液疾患のなかには原発性免疫不全症とオーバーラップし、従来の疾患群との位置づけが困難なものもある。本研究ではこれらの分類不能血液疾患の原因遺伝子の探索を行うべく、whole exome sequencing を行った。その過程で種々の合併症を伴った分類不能型免疫不全症の女性例で Fanconi 貧血の原因遺伝子のひとつである *FANCE* 変異を有していた。Whole exome sequencing は表現型の異なる疾患において既知遺伝子変異を見出すのに有用な方法であると考えられる。

A. 研究目的

遺伝性血液疾患の一部には、免疫細胞あるいは免疫担当細胞以外の分化異常、さらには悪性腫瘍の合併を伴うものがあり、従来の疾患群との位置づけが困難であり、原発性免疫不全症（PID）ともオーバーラップしている。本研究ではこれらの分類不能血液疾患において、whole exome sequencing（WES）により原因遺伝子の探索を行い、新たな治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

厚生労働省原発性免疫不全症の班会議施設と理化学研究所、かずさ DNA 研究所で運営している PIDJ(<http://pidj.rcai.riken.jp/>)に登録された PID 関連症例のうち、未だ原因不明の症例を対象とした。B 細胞、NK 細胞、樹状細胞に骨髄異形成症候群を合併した GATA2 欠損症類縁疾患が 11 例、PID に悪性腫瘍を合併した症例が 5 例、B 細胞欠損症が 8 例、細胞分化異常を含む PID が 10 例、免疫不全症を伴う外胚葉形成不全が 3 例である。これらの患者家族から文書による同意を得て、末梢血から DNA を抽出し、東京大学小川研にて WES を行ったのち、

候補遺伝子についてサンガー・シーケンス法による validation を行う。

（倫理面への配慮）

本研究はヒト検体を用いて解析を行うものであり、検体量および採取時の苦痛には十分な配慮を行った。遺伝子解析については各種指針を遵守して、患者個人情報の保護について十分な配慮を行った。

C. 研究結果

WES を行った 1 例で候補遺伝子が同定された。症例は 39 歳女性であり、分類不能型免疫不全症（CVID）にてんかん、早発閉経、低身長（ $-2.3SD$ ）、カフェオレ斑を合併していた。免疫学的解析では B 細胞欠損、ナイーブ T 細胞減少を認め、T 細胞ならびに B 細胞の新生を示す TREC ならびに KREC が陰性であった。WES によって Fanconi 貧血（FA）の原因遺伝子である *FANCE* にミスセンス変異と 1 塩基欠失の複合ヘテロ接合が認められ、サンガー・シーケンス法によって同一の変異が確認された。

D. 考察

FA とは染色体の不安定性を背景に、1) 進行性汎