

血球減少、2) MDS や白血病への移行、3) 身体奇形、4) 固形癌の合併を特徴とし、常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝性骨髄不全症である。H と K を除く A～N までの相補群があり、それぞれ原因遺伝子が同定されている。FA-A, -C, -G は比較的高頻度に認められるが、FA-E は 1% と極めてまれな病型である。今回の症例は低身長とカフェオレ斑は認められたが、汎血球減少や奇形等の合併なく、典型的 FA とは言い難い症例である。またこれまで文献上は低ガンマグロブリン血症を伴った FA が 1 例報告されているのみであるが<sup>1)</sup>、FA では末梢血 B 細胞ならびに NK 細胞の減少を伴うとの報告もあり<sup>2)</sup>、何らかの免疫学的異常を伴うこともありうると考えられる。

#### E. 結論

種々の合併症を伴った CVID 症例において WES の結果、FA の原因遺伝子のひとつである *FANCE* 変異が同定された。現在この症例が FA としての細胞生物学的特徴を有しているかを解析中である。この症例以外にも CVID において ICF 症候群の原因遺伝子である *DNMT3B* 変異、IgA 欠損症において SCID の原因遺伝子である *RAG1* 変異を同定しており、WES は表現型の異なる疾患における既知遺伝子変異を見出すのに有用な方法であると思われる。今後は分類不能血液疾患における未知遺伝子の発見にも努めたいと考えている。

#### 参考文献

- 1) Sarwar UN, Hamadeh R. Presence of hypogammaglobulinemia in a patient with Fanconi anemia: A case report. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009; 19: 335-6.
- 2) Myers KC, et al. Impaired immune function in children with Fanconi anaemia. *Br J Haematol* 2011; 154: 234-40.

#### F. 研究発表

なし。

#### 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：遺伝性鉄芽球性貧血の新規変異遺伝子の同定

研究分担者 張替 秀郎（東北大学大学院医学系研究科血液・免疫病学分野 教授）

**研究要旨：** 鉄芽球性貧血(sideroblastic anemia)は骨髄に環状鉄芽球が出現することを特徴とする難治性貧血であり、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血の2つに大きく分類される。遺伝性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天性異常により発症するが、原因遺伝子が同定されない家系も存在する。本研究では、既知の遺伝子変異が認められない症例の責任遺伝子の同定を目的に次世代シーケンサーを用いた変異解析を行った。その結果、新規原因遺伝子の候補として APEX2 と NUDVF1 を見出した。

#### A. 研究目的

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

#### B. 研究方法

既知の遺伝子変異が認められない遺伝性鉄芽球性貧血家系について、次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、新たな原因遺伝子を同定する。  
(倫理面への配慮)

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

#### C. 研究結果

遺伝性鉄芽球性貧血の既知の原因遺伝子が同定できない家系について解析を行った結果、新規原因遺

伝子の候補としてAPEX2とNUDVF1を見出した。

#### D. 考察

APEX2とはミトコンドリアにおいて遺伝子であり、免疫異常をきたすことが知られているが、赤血球造血についての機能は報告がない。NUDVF1はミトコンドリア膜蛋白であることが報告されているが、その機能については不明である。ただし、いずれもヘム・鉄硫黄クラスターの主要な合成器官であるミトコンドリア蛋白であること、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子の多くが、ミトコンドリアにおける鉄代謝にかかわる遺伝子であることを考慮すると、これらの遺伝子が遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子である可能性は否定できない。今後、遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究班(伊藤班)にて、これらの遺伝子の機能解析を進める予定である。

#### E. 結論

稀少遺伝性疾患の原因遺伝子の同定に次世代シーケンサーを用いた家系解析は有用である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T,

Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, Kojima S, Ogawa S, Harigae H. Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS). *Ann Hematol*. 2013 Jan;92(1):1-9.

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

## 2. 学会発表

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

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：先天性顆粒放出異常症の遺伝子異常の探索的研究  
研究分担者 石井 榮一（愛媛大学大学院医学系研究科小児科学 教授）

**研究要旨：** 先天性顆粒放出異常症は家族性血球貪食性リンパ組織球症（FHL）、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansly-Pudlak 症候群などが含まれ、いずれもリンパ球の分泌顆粒の放出に関わる遺伝子異常が同定されつつある。これまでの解析では日本では FHL と Chediak-Higashi 症候群が存在し、そのうち FHL の約 10% および Chediak-Higashi 症候群の約 1/3 が遺伝子異常不明であった。今後は遺伝子異常不明例における新規遺伝子の同定を行い、その全容を明らかにする必要がある。

#### A. 研究目的

先天性顆粒放出異常症は家族性血球貪食性リンパ組織球症（FHL）、Chediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansly-Pudlak 症候群などが含まれ、いずれもリンパ球の分泌顆粒の放出に関わる遺伝子異常が同定されつつあるが、日本における実態は不明である。本研究の目的は、これら先天性顆粒放出異常症の遺伝子異常の解明を行い、その病態を明らかにすることである。

#### B. 研究方法

小児白血病リンパ腫研究グループ（JPLSG）および小児血液・がん学会に登録された症例を中心に、先天性顆粒放出異常症の既知および未知の遺伝子異常の解明を行いその病態を明らかにする。具体的には各症例の既知の遺伝子（FHL では *PRF1*, *UNC13D*, *STXBP2*、Chediak-Higashi 症候群では *LYST*、Griscelli 症候群では *RAB27a*、Hermansly-Pudlak 症候群では *AP3B1*）の遺伝子異常の有無を解析する。遺伝子異常が同定されなかった患者では、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスを行い新規の原因遺伝子の探索を行う。

#### （倫理面への配慮）

本研究事業で行われる研究は、ヘルシンキ宣言および個人情報保護法に則り、ヒトゲノム遺伝子解析倫理委員会の承認を得て実施する。患者及び患者家族に対しては説明文を用いて文書による同意を得る。

#### C. 研究結果

先天性顆粒放出異常症のうち FHL の日本における各亜型の頻度を解析した。その結果、FHL2 54%、FHL3 34%、FHL4 0%、FHL5 6%、non-FHL2/3/4/5 6% であった。顆粒放出解析ならびに CTL 活性の結果からは未知の遺伝子異常による FHL が約 10% 存在する可能性が示唆された。これらの遺伝子異常不明例は次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスを行い現在のその結果を解析しているところである。一方血族結婚の 1 家系で、葉酸代謝に関連する酵素の遺伝子異常を同定した。これまで報告されていない異常であり、現在その機能解析を進めている。

Chiediak-Higashi 症候群、Griscelli 症候群、Hermansky-Pudlak 症候群の全国調査を行い、Chediak-Higashi 症候群 14 例の存在が確認された。Chediak-Higashi 症候群は、①血球貪食症候群をき

たす症例は 1/3 程度、②長期生存例では消化管合併症および中枢神経合併症が多い、③LYST 遺伝子異常は 1/3 の症例では明らかではない、ことが明らかになった。さらに Chediak-Higashi 症候群における CTL 活性を検討したところ血球貪食症候群をきたす症例では CTL 活性が低下しており、Chediak-Higashi 症候群では CTL 活性の異常が血球貪食症候群合併の予測因子であることが明らかになった。また非 Chediak-Higashi 症候群の 1 家系を同定した。現在その遺伝子異常を同定しているところである。

以上より日本における顆粒放出異常症の実態と問題点が明らかになった。今後は未知遺伝子の同定を進め、全体像を明らかにする予定である。

#### D. 考察

先天性顆粒放出異常症の日本における実態解明を行った。その多くは遺伝子異常が同定されたものの、FHL の約 10%、Chediak-Higashi 症候群の約 1/3 が遺伝子異常が不明でありさらに診断自体も不明な症例が存在していることが明らかになった。今後さらに症例を集積しその新規遺伝子の同定と全容解明が必要と考えられた。

#### E. 結論

先天性顆粒放出異常症の日本における実態が初めて明らかになった。またその多くで遺伝子異常およびリンパ球機能の異常も解析された。今後は新規遺伝子を同定し、その病態を明らかにする必要がある。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yang X, Kanegane H, Nishida N, Imamura T, Hamamoto K, Miyashita R, Imai K, Nonoyama S, Sanayama K, Yamaide A, Kato F, Nagai K, **Ishii E**, van Zelm MC, Latour S, Zhao X-D, Miyawaki T (2012) Clinical and genetic characteristics of XIAP deficiency in Japan. **J Clin Immunol** 32: 411-420

- 2) 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 (2012) Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by a combined use of a flow cytometric assay and genetic analysis. **Pediatr Aller Immunol** 23: 488-493
- 3) Nishi M, Nishimura R, Suzuki N, Sawada A, Okamura T, Fujita N, Kanai R, Yano J, Adachi S, Yasumi T, Sato E, Yasutomo K, **Ishii E**, Ohga S (2012) Reduced intensity conditioning in unrelated donor cord blood transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Am J Hematol** 87: 637-639

##### 2. 学会発表

- 1) **Ishii E** (2012) Congenital lytic granule syndrome, The 6<sup>th</sup> Seminar on Histiocytosis and Pediatrics MDS, January, 2012, Seoul, Korea
- 2) **Ishii E** (2012) Successful treatment of EBV-HLH, VII International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs, February, Tokyo, Japan

#### 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：毛細血管拡張性運動失調症類縁疾患の責任遺伝子の同定  
 研究分担者 水谷 修紀（東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 教授）

**研究要旨：** 毛細血管拡張性運動失調症Ataxia Telangiectasia (AT)は運動失調、免疫不全、毛細血管拡張を主徴とする疾患で、ATMがその責任分子である。ATMはDNA損傷応答反応において中心的な役割を持つ分子である。またこのDNA損傷応答反応に関わる分子の異常でATに類似した症状を示す疾患が発症することが知られている。臨床的にATと診断される、もしくはAT疑いとなった症例のうちATMの変異の認められなかった症例を、全エクソン解析の手法を用いて責任遺伝子の同定を試みた。2例で既知の疾患の責任分子がその発症に関わっていること想定され、1例でATMの変異を1アレルでのみ同定した。

**A. 研究目的**

毛細血管拡張性運動失調症Ataxia Telangiectasia (AT)は運動失調、免疫不全、毛細血管拡張を主徴とする疾患で、ATMが責任分子である。ATMはDNA損傷応答反応において中心的な役割を持つ分子である。またこのDNA損傷応答反応に関わる分子の異常でATに類似した症状を示す疾患が発症することが知られている。臨床的にATと診断されるもATMに異常のなかった疾患から、その責任分子を明らかにすることを本研究の目的とする。

**B. 研究方法**

臨床的にATと診断される、もしくはAT疑いとなった症例のうちATMの変異の認められなかった症例を、全エクソン解析の手法を用いて責任遺伝子を同定する。

（倫理面への配慮）

症例の解析にあたり遺伝子解析を行うことについてのインフォームドコンセントを得た。また、この研究計画は東京医科歯科大学 倫理委員会で承認を得た。

**C. 研究結果**

ATMの変異の認められなかったAT疑い10症例の解析を行った。臨床的表現系を表1に示す。

表1 全エクソン解析を行ったAT疑い症例の臨床的特徴

	性別	年齢	免疫不全	運動失調	毛細血管拡張	AFP
PNGS 272	M	21	あり	あり	なし	?
PNGS 273	F	5	なし	あり	あり	正常
PNGS 274	F	21	軽度	あり	あり	正常
PNGS 275	F	2	あり	あり	なし	軽度上昇
PNGS 276	M	1	あり	あり	なし	正常
PNGS 277	F	1	なし	あり	なし	上昇
PNGS 278	M	12	なし	あり	あり	上昇
PNGS 279	F	11	あり	あり	なし	正常
PNGS 280	F	7	あり	軽微	なし	?
PNGS 281	F	5	あり	軽微	軽微	?

解析の結果、このうち1例でクラススイッチの異常で発症する高IgM症候群の責任分子、1例で塩基除去修復の異常で発症する色素性乾皮症の責任分子が発症に関わっていることが疑われた。また1例でATMの変異が一アレルでのみ認められ、ATが強く

疑われたが、ATは常染色体劣性遺伝で対立する2つの遺伝子の変異により発症するはずであるが、他方のもう一つの変異は見つけることは出来なかった。また残の7例に関しては責任遺伝子の同定へと進めることができなかった。

#### D. 考察

症状的に単一の疾患群でも、複数の遺伝子の異常によってその疾患が発症する。こういった疾患群には全エクソン解析の手法が責任遺伝子の同定に有用であると考えられる。しかし今回の解析を通して、既知疾患の責任分子がこれまで知られていなかった表現系を示す症例を同定することが出来た一方で、新規責任分子の同定には、患者個々の遺伝子解析のみでは不十分であることが明らかとなった。常染色体劣性遺伝病で同時に2つの分子に変異があれば、全エクソン解析を行うことにより、疾患遺伝子の特定につながれると当初想定したが、一つのみしか見つけられない場合や、同一の遺伝子複数のSNVが存在することもあり、疾患の発症に複数の遺伝子が関与していることが想定される場合は、1症例のみの解析では責任遺伝子の同定に至ることが困難であることが明らかとなった。de novoのケースなどは家系解析を行うことにより、その精度を上げられると考えられた。AT類似疾患の責任分子として2つの遺伝子の候補を得ることができた。今後、機能解析を行うことにより、確認していきたい。

#### E. 結論

臨床的にATと診断される、もしくはAT疑いとなった症例のうちATMの変異の認められなかった症例を、全エクソン解析の手法を用いて責任遺伝子を同定を試みた。2例で既知の疾患の責任分子がその発症に関わっていること想定され、1例でATMの変異を1アレルでのみ同定した。疾患の発症に複数の遺伝子が関与していることが想定される場合は、1症例のみの解析では新規責任遺伝子を同定することが困難なことが明らかとなった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Isoda T, Takagi M, Piao J, Nakagama S, Sato M, Masuda K, Ikawa T, Azuma M, Morio T, Kawamoto H, Mizutani S. Process for immune defect and chromosomal translocation during early thymocyte development lacking ATM. *Blood*. 2012;26;120(4):789-99.
- 2) Nakamura K, Du L, Tunuguntla R, Fike F, Cavalieri S, Morio T, Mizutani S, Brusco A, Gatti RA. Functional characterization and targeted correction of ATM mutations identified in Japanese patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mutat*. 2012;33(1):198-208.

##### 2. 学会発表

- 1) Mizutani S. T-cell development failure and chromosome 14 translocation in Ataxia-Telangiectasia. A-T Clinical Research Conference 2012. 21-23 June 2012, Cambridge, UK.
- 2) 磯田健志, 高木正稔, 朴 今花, 増田喬子, 伊川友活, 東 みゆき, 森尾友宏, 河本 宏, 水谷修紀. ATM欠損T細胞分化のDN期におけるTリンパ球減少の原因と染色体転座の関係. 第115回日本小児科学会学術集会 2012.4.20-22 福岡
- 3) 高木正稔, 金子節子, 今井耕介, 小川誠司, 小島勢二, 森尾友宏, 水谷修紀. ATM変異のない毛細血管拡張性運動失調症 Ataxia Telangiectasia 疑い症例のエクソーム解析. 第6回日本免疫不全症研究会 2015,1,26 東京

#### 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：ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の網羅的遺伝子解析に関する研究

研究分担者 林 泰秀（群馬県立小児医療センター 院長）

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：** ダウン症候群では新生児期に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加することがあり、一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)と呼ばれている。最近の多数例の検討で、TAMの死亡例が20~30%みられることが報告された。平成21年度から厚生労働省のTAM班の研究によりTAMの登録と重症例に対する観察研究が始まり、重症例の抽出と病態解明のために、マーカー、染色体、*GATA1*等の解析を開始した。*GATA1*遺伝子について、*GATA1*の高発現と低発現変異群に分類すると低発現変異群が高率に白血病化すること、2種類の*GATA1*内部欠失変異を6例のTAM患者で見出し、これらは43あるいは15アミノ酸の内部欠損が生じ、変異蛋白は正常な赤血球造血に不可欠な*GATA1*のRB結合モチーフを欠いていた。今年度は、TAM、寛解期細胞、急性巨核芽球性白血病（AMKL）を次世代シーケンサーで解析を行った。*GATA1*以外の変異数は平均してTAMでは0.7個、AMKLでは4.8個とAMKLで多い傾向にあった。この中には*NRAS*、*TP53*や*WT1*のようなこれまでに報告されている遺伝子も含まれていたが、新規の遺伝子変異も認められ、特にDNA修復や転写調整に関わる同一経路（pathway X）の分子をコードする遺伝子の変異が64%の症例に繰り返し認められた。興味深いことに、pathway Xの変異は、各症例で重複がほとんど見られなかった。これまで考えられていた trisomy 21、*GATA1*遺伝子変異に加えて新たな遺伝子異常が起こることによりTAMからAMKLを発症するというモデルを裏付ける結果となった。全エクソン解析の結果を確認するために、109例（TAM 41例、AMKL 49例、非ダウン症のAMKL 19例）に患者サンプルを増やしてターゲット・ディープシーケンス解析を行った。その結果、55%のAMKLにpathway Xの遺伝子変異が検出された。一方、TAMでは変異が見つかったのは41例中1例（約2%）のみで、非ダウン症のAMKLでは19例中2例（約10%）であった。Tyrosine kinases あるいはRAS pathwayの遺伝子変異は、AMKLでは41%、非ダウン症のAMKLで32%と両者に有意な差が認められなかった。今回の結果は、TAMでみられる高サイトカイン血症や肝線維症の機序やTAMの分子機構およびモザイク型ダウン症候群や正常児に発生したTAMの機序の解明に役立つ。また、TAMから白血病に進展する機序も明らかになり、ひいては成人のがんの発生と進展機構の解明にも貢献すると思われる。

#### A. 研究目的

ダウン症候群では新生児期に一過性に白血病様芽球が末梢血中に増加することがあり、一過性骨髄異

常増殖症(transient abnormal myelopoiesis, TAM)と呼ばれている。その頻度は約10%（100人/年）とされている。近年の多数例の検討で、死亡例が20~



30%みられることが判明した。これまでの厚生労働省のTAM班の活動により、TAMの登録システムを立ち上げて全数把握ができるようになり、検体保存ができるようになったので、これまでの検体とこの保存検体を用いて次世代シーケンサーにより発症、進展に關与する遺伝子の探索をすることが研究の目的である。

## B. 研究方法

### 1) 細胞保存

マーカー解析後の余剰検体の細胞を保存するために国立成育医療研究センター内に TAM 患児の末梢血由来の余剰検体の保管システムを構築した。これまでの成育の検体保存システムと可能なかぎり統一した手順を採用することにより効率良い検体保存システムを目指して作成した。

### 2) 病態解析

#### ① 染色体・遺伝子・SNP 解析

TAMの経過後に発症した染色体異常を有する急性性核芽球性白血病 (AMKL) 症例と骨髄異形成症候群 (MDS) 症例のDNAを用いて、Affymetrix社のGenome-Wide Human SNP Array 6.0によりゲノムコピー数の増減を検討した。コピー数の変化が生じている部位に存在する遺伝子と融合する遺伝子を、cDNAバブルPCR法、inverse PCR法などを用いて同定を試みる。

#### ② *GATA1* 遺伝子等の解析

これまでに全国から集められた 200 例以上の TAM の臨床検体の遺伝子解析を行った。末梢血から DNA および RNA を抽出し、*GATA1* 遺伝子を解析した。

#### ③ 網羅的ゲノム解析

TAM 11 例および AMKL 5 例の DNA を用いて、ヒト全エクソン領域をターゲットとするビオチン化された cRNA (Agilent 社 SureSelect®) を用いて濃縮したのち、高速シーケンサー (illumina 社 GA IIx, HiSeq 2000) で解析を行った。寛解期に採取した末梢血由来の DNA を自己正常検体として、TAM あるいは AMKL における腫瘍細胞特異的な変異を検出した。

### (倫理面への配慮)

本研究事業で行われる臨床試験は、日本小児血液学会臨床研究審査委員会の承認の後、各施設の倫理委員会の承認を得て実施している。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、参加研究施設の倫理委員会の審査・承認を得て行われた。またJPLSGのもとで行なわれる観察研究は、文書による説明同意を行い、同意の得られた症例のみが観察研究の対象となる。また、連結可能匿名化により、症例の登録・追跡調査を行うことにより、対象症例の個人情報外部に流出する危険を限りなくゼロにする配慮をしている。

## C. 研究結果

我々は寛解時の検体が揃っているダウン症候群の TAM と AMKL の 25 組 (TAM 15 例、AMKL 14 例) の検体を用いて、全エクソンシーケンス解析を行った。今回の解析に用いた検体の内、4 例は TAM と AMKL の両時期の検体が揃っていた。腫瘍 (TAM と AMKL)、正常検体とも target 領域の 80% 以上は 20 回以上読まれていて、解析には十分なデータ量が得られたと考えられた。同一患者の寛解時検体から得られたデータと比較することで腫瘍細胞特異的な変異 (somatic mutation) を同定した。サンガーシーケンスあるいはデープシーケンスで確認できた変異数は 129 個であった。GATA1 以外の変異数は平均して TAM では 0.7 個、AMKL では 4.8 個と AMKL で多い傾向にあった。この中には *NRAS*、*TP53* や *WT1* のようなこれまでに報告されている遺伝子も含まれていたが、新規の遺伝子変異も認められた。注目すべきことに、DNA 修復や転写調整に関わる同一経路 (pathway X) の分子をコードする遺伝子の変異が 64% の症例に繰り返し認められた。興味深いことに、pathway X の変異は、各症例で重複がほとんど見られなかった。

全エクソン解析の結果を確認するために、109 例 (TAM 41 例、AMKL 49 例、非ダウン症の AMKL 19 例) に患者サンプルを増やしてターゲット・デープシーケンス解析を行った。その結果、55% の AMKL に pathway X の遺伝子変異が検出された。一

方、TAMでは変異が見つかったのは41例中1例（約2%）のみで、非ダウン症のAMKLでは19例中2例（約10%）であった。Tyrosine kinases あるいはRas pathwayの遺伝子変異は、AMKLでは41%、非ダウン症の AMKLで32%と両者に有意な差が認められなかった。TAMでは、41例中5例（12%）に変異が検出された。エピジェノム制御に関わる遺伝子変異は、AMKLでも非ダウン症のAMKLでも約20%に認められたが、TAMではほとんど検出されなかった。

#### D. 考察

これまでの保存検体を用いて遺伝子解析を行ってきたが、三年間のTAM研究班の活動によりTAMの全国レベルでの検体保存ができるようになり、今後の遺伝子解析に使えるようになった。

次世代シーケンサーの解析では、サンガーシーケンスあるいはディープシーケンスで確認できた変異数は129個であった。GATA1 以外の変異数は平均してTAMでは0.7個、AMKLでは4.8個とAMKLで多い傾向にあった。その結果、55%のAMKLに pathway X の遺伝子変異が検出された。一方、TAMでは変異が見つかったのは41例中1例（約2%）のみで、非ダウン症のAMKLでは19例中2例（約10%）であった。Tyrosine kinases あるいは Ras pathway の遺伝子変異は、AMKLでは41%、非ダウン症のAMKLで32%と両者に有意な差が認められなかった。TAMでは、41例中5例（12%）に変異が検出された。これまで考えられていた trisomy 21 (first event) に加えて、GATA1 遺伝子変異が起こる (second hit) ことにより TAM を発症し、さらにいくつかの遺伝子変異が蓄積してAMKLを発症するというダウン症候群における TAM-AMKL 発症のモデルを裏付けるものであると考えられた。一方、AMKLではGATA1 遺伝子変異に加えていくつかの変異が同定され、これらの変異はTAM-AMKLの発症にどのように関与しているのか、多数例での頻度や臨床像との関連など、さらに詳細な検討を行う予定である。

GATA1 遺伝子の解析では、GATA1s と IDs に共通して欠損している GATA1 の領域には、正常な赤

血球造血に不可欠な GATA1 の RB 結合モチーフが含まれていた。RB との結合が失われることが TAM の発症に重要であることが示唆された。

検体保存では、TAM の登録システムの末梢血の細胞表面マーカーの余剰分を検体保存を行うことにより、これらの研究が推進されることが期待される。現在、この細胞保存システムを利用して次世代シーケンサーを用いて解析しており、TAM でみられる高サイトカイン血症や肝線維症の機序や TAM の分子機構およびモザイク型ダウン症候群や正常児に発生した TAM の機序の解明に役立ち、TAM から白血病に進展する機序も明らかになり、ひいては成人のがんの発生と進展機構の解明にも貢献すると思われる。

#### E. 結論

今年度はこれまでの検体を用いて全エクソーム解析を行い、候補遺伝子が抽出されたので、ターゲット・ディープシーケンス解析で検証を行っているところである。この研究により近い将来、TAMの病態の解明が期待される。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Gruber TA, Larson Gedman A, Zhang J, Koss CS, Marada S, Ta HQ, Chen SC, Su X, Ogden SK, Dang J, Wu G, Gupta V, Andersson AK, Pounds S, Shi L, Easton J, Barbato MI, Mulder HL, Manne J, Wang J, Rusch M, Ranade S, Ganti R, Parker M, Ma J, Radtke I, Ding L, Cazzaniga G, Biondi A, Kornblau SM, Ravandi F, Kantarjian H, Nimer SD, Döhner K, Döhner H, Ley TJ, Ballerini P, Shurtleff S, Tomizawa D, Adachi S, Hayashi Y, Tawa A, Shih LY, Liang DC, Rubnitz JE, Pui CH, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR. An Inv (16) (p13.3q24.3) - Encoded CBFA2T3- GLIS2 Fusion Protein Defines an Aggressive Subtype of Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia. Cancer

- Cell. 22 : 683-697, 2012
- 2) Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Kanezaki R, Park MJ, Kanno Y, Takahara T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. *Blood* 119 : 2608-2611, 2012
  - 3) Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 26 : 1879-1898, 2012
  - 4) Shiba N, Hasegawa D, Park MJ, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. *CBL* mutation in chronic myelomonocytic leukemia secondary to familial platelet disorder with propensity to develop acute myeloid leukemia. *Blood* 119 : 2612-2614, 2012
  - 5) Shiba N, Taki T, Park MJ, Shimada A, Sotomatsu M, Adachi S, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Arakawa H, Hayashi Y. DNMT3A mutations are rare in childhood acute myeloid leukaemia, myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 413-414, 2012
  - 6) Shiba N, Park MJ, Taki T, Takita J, Hiwatari M, Kanazawa T, Sotomatsu M, Ishii E, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. CBL mutations in infant acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 156 : 672-674, 2012
  - 7) 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*. 120 : 1485-1488, 2012
  - 8) Shimada A, Taki T, Koga D, Tabuchi K, Tawa A, Hanada R, Tsuchida M, Horibe K, Tsukimoto I, Adachi S, Kojima S, Hayashi Y. High WT1 mRNA expression after induction chemotherapy and FLT3-ITD have prognostic impact in pediatric acute myeloid leukemia: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol*. 96 : 469-476, 2012
  - 9) Sano H, Shimada A, Taki T, Murata C, Park MJ, Sotomatsu M, Tabuchi K, Tawa A, Kobayashi R, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. RAS mutations are frequent in FAB type M4 and M5 of acute myeloid leukemia, and related to late relapse: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Int J Hematol* 95 : 509-515, 2012
  - 10) Kawashima N, Shimada A, Taketani T, Hayashi Y, Yoshida N, Matsumoto K, Takahashi Y, Kojima S, Kato K. Childhood acute myeloid leukemia with bone marrow eosinophilia caused by t(16:21)(q24;q22). *Int J Hematol*. 95 : 577-580, 2012
  - 11) Okubo J, Takita J, Chen Y, Oki K, Nishimura R, Kato M, Sanada M, Hiwatari M, Hayashi Y, Igarashi T, Ogawa S. Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene*. 31 : 4667-4676, 2012
  - 12) Inukai T, Kiyokawa N, Campana D, Coustan-Smith E, Kikuchi A, Kobayashi M, Takahashi H, Koh K, Manabe A, Kumagai M,

- Ikuta K, Hayashi Y, Tsuchida M, Sugita K, Ohara A. Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Brit J Haematol* 156 : 358-365, 2012
- 13) Yamada Y, Kato M, Toki F, Watanabe M, Nishi A, Matsushita I, Hirato J, Hayashi Y. Eosinophilic gastrointestinal disorder in an infant with feeding dysfunction. *Int Arch Allergy Immunol.* 158 Suppl 1:83-86, 2012
- ## 2. 学会発表
- 1) 滝田順子, 西村 力, 大久保純, 吉田健一, 星野諭子, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 先端的ゲノムスクリーニングを用いた難治性小児固形腫瘍における標的分子の探索. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 2) 西村 力, 滝田順子, 吉田健一, 白石友一, 大久保純, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 次世代シーケンサーを用いた神経芽腫のエクソーム解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 3) 大久保純, 滝田順子, 西村 力, 星野諭子, 吉田健一, 白石友一, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 五十嵐隆. 次世代シーケンサーを用いた Ewing 肉腫のエクソーム解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 4) 柴 徳生, 市川 仁, 滝 智彦, 朴 明子, 嶋田 明, 田淵 健, 荒川浩一, 足立壮一, 堀部敬三, 林 泰秀. 発現アレイを用いた小児急性骨髄性白血病における、*NUP98-NSD1* 融合遺伝子の解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 5) 大木健太郎, 大喜多肇, 清河信敬, 朴 明子, 康 勝好, 花田良二, 真部 淳, 菊地 陽, 小原 明, 林 泰秀. TCCSG の小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における CRLF2 と IKZF1、JAK 遺伝子解析. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 6) 鮫島希代子, 林 泰秀. ダウン症候群の診断告知に関するアンケート調査. 第115回日本小児科学会学術集会, 福岡, 2012.4.21
- 7) 大木健太郎, 奥野はるな, 柴 徳生, 金澤 崇, 朴 明子, 外松 学, 神谷尚宏, 小川 千登世, 林 泰秀. 第2再発時に初めて MLL-AF4陽性となったB前駆型急性リンパ性白血病1例におけるクローン構造の検討. 第8回来た関東小児がんセミナー, 高崎, 2012.5.19
- 8) 朴 明子, 林 泰秀. TAM に合併する肝機能障害について. 第48回日本周産期・新生児医学会学術集会, さいたま, 2012.7.8
- 9) 三谷幸代, 城 青衣, 嶋田 明, 柴 徳生, 林 泰秀, 市川 仁. 2 遺伝子の発現に基づく高リスク小児急性骨髄性白血病の同定. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.19
- 10) 倉田盛人, 後飯塚僚, 北村大介, 滝田順子, 林 泰秀, 北川正伸, 中村卓郎. BLNK 欠損 preB-ALL と B 細胞分化における C/Ebpb の働き. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20
- 11) 星野諭子, 西村 力, 奥野友介, 樋渡光輝, 永田安伸, 吉田健一, 真田 昌, 白石友一, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 神経芽腫におけるエピジェネティック関連遺伝子の網羅的ゲノム解析. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.20
- 12) 柴 徳生, 吉田健一, 奥野友介, 白石友一, 田中洋子, 永田安伸, 滝田順子, 荒川浩一, 伊藤悦朗, 真田 昌, 宮野 悟, 小川誠司, 林 泰秀. 全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定. 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21

- 13) 関 正史, 西村 力, 奥野友介, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 吉田健一, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーによる再発肺芽腫のエクソーム解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
- 14) 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 千葉健一, 田中洋子, 佐藤悠佑, 真田 昌, 林 泰秀, 宮野 悟, 小川誠司, 滝田順子. SNP アレイをエクソーム解析を用いた横紋筋肉腫の初発・再発/転移巣のクローン比較. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
- 15) 樋渡光輝, 西村 力, 吉田健一, 白石友一, 奥野友介, 大久保淳, 永田安伸, 五十嵐隆, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 次世代シーケンサーを用いたユーイング肉腫発生の分子生物学的検討. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012.9.21
- 16) Kiyokawa N, Matsumoto K, Iijima K, Hasegawa D, Oboki K, Kobayashi K, Okita H, Takada S, Asahara H, Mori T, Fukushima T, Saito M, Koh K, Hanada R, Tsuchida M, Manage A, Kikuchi A, Saito H, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Fusion gene-specific signature of microRNA expression in childhood ALL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
- 17) Iijima K, Hasegawa D, Kiyokawa N, Kobayashi K, Okita H, Miharuru M, Mori, T, Kikuchi A, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A. Gene expression profile related to prognosis of childhood ALL without fusion genes. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
- 18) Park MJ, Oda M, Kobayashi R, Suzuki N, Hara J, Horibe K, Hayashi Y. IL-7R gene mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
- 19) Oki K, Okita H, Kobayashi K, Shiba N, Park MJ, Sotomatsu M, Fukushima T, Koh K, Hanada R, Manabe A, Kikuchi A, Tsuchida M, Ohara A, Kiyokawa N, Hayashi Y. Analysis of CRLF2 and IKZF1, JAK, IL7R genes in pediatric B-precursor ALL treated on TCCSG protocol. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.19
- 20) Shimada A, Olfat I, Xu Y, Goto A, Nagai T, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada Y, Hayashi Y, Ogawa S. JAK2 V617F mutation in pediatric myeloproliferative neoplasm. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
- 21) Shiba N, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Nagata Y, Ohki K, Kato M, Park MJ, Takita J, Kanazawa T, Kudo K, Arakawa H, Ito E, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole exome resequencing reveals novel gene mutations in pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
- 22) Okuno Y, Shiba N, Shiraishi Y, Yoshida K, Nagata Y, Sato Y, Ohki K, Kato M, Park MJ, Kanazawa T, Kudo K, Chiba K, Tanaka H, Ito E, Takita J, Sanada M, Hayashi Y, Miyano S, Ogawa S. Clonal architecture and evolution of pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.20
- 23) Takahashi H, Koh K, Kato M, Fukushima T, Inukai T, Kiyokawa N, Taki T, Saito M, Kajiwara M, Ogawa C, Maeda M, Manabe A, Kikuchi A, Hayashi Y, Hanada R, Tsuchida M, Ohara A. Characteristics and prognostic impacts of structural chromosomal abnormalities in childhood ALL. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.21
- 24) Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, Shimada A, Sotomatsu M, Arakawa H, Tabuchi K, Adachi S, Tawa A,

- Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. NUP98-NSD1 related gene expression signature is associated with a poor prognosis in pediatric AML. 第 74 回日本血液学会学術集会, 京都, 2012.10.21
- 25) 大木健太郎, 柴 徳生, 新井 心, 朴 明子, 外松 学, 清河信敬, 林 泰秀. 小児 B 前駆細胞型急性リンパ性白血病における clonal evolution の解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
- 26) 関 正史, 西村 力, 星野倫子, 奥野友介, 白石友一, 吉田健一, 千葉健一, 田中陽子, 真田 昌, 加藤啓輔, 土田昌宏, 宮野 悟, 林 泰秀, 小川誠司, 滝田順子. 先端的ゲノム解析技術を用いた胸膜肺芽腫における発症分子機構の解明. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
- 27) 朴 明子, 大木健太郎, 新井 心, 外松 学, 清河信敬, 小田 慈, 堀部敬三, 林 泰秀. MLPA 法を用いた T-ALL 遺伝子異常についての解析. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
- 28) 西 眞範, 磯村直子, 野村優子, 柳井文男, 犬飼 岳史, 渡辺 新, 林 泰秀. t(17;19)(q22;p13.3)を含む染色体異常を呈した T 細胞性急性リンパ性白血病の 1 例. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.11.30
- 29) 柴 徳生, 吉田健一, 奥野友介, 白石友一, 加藤元博, 大木健太郎, 朴 明子, 金澤 崇, 工藤寿子, 滝田順子, 加藤啓輔, 荒川浩一, 伊藤悦朗, 花田良二, 真田 昌, 小川誠司, 林 泰秀. 全エクソーム解析による小児急性骨髄性白血病の新規発症原因遺伝子変異の同定. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.1
- 30) 柴 徳生, 大木健太郎, 朴 明子, 市川 仁, 足立壮一, 外松 学, 荒川浩一, 田淵 健, 多和昭雄, 堀部敬三, 土田昌宏, 花田良二, 月本 一郎, 林 泰秀. 小児急性骨髄性白血病における GATA2 遺伝子変異同定. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.1
- 31) 出口隆生, 村松秀城, 林 泰秀, 菊地 陽, 駒田美弘. TAM 芽球における CD117 発現と末梢血中芽球割合の相関. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2
- 32) 村松秀城, 菊地 陽, 林 泰秀, 川村眞智子, 小島勢二, 矢部みはる, 磯山恵一, 滝 智彦, 辻浩一郎, 土田昌宏, 真田 昌. ダウン症候群い合併した一過性骨髄異常増殖症に対する少量シタラビン療法による腫瘍崩壊症候群. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2
- 33) 嶋田 明, Ismael Olfat, 徐 銀燕, 後藤 綾, 永井智子, 成田 敦, 坂口大俊, 土居崎小夜子, 村松秀城, 濱 麻人, 高橋義行, 山田佳之, 林 泰秀, 小島勢二. 小児骨髄増殖疾患における JAK2V617F 遺伝子変異. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会, 横浜, 2012.12.2

#### 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：先天性血小板減少症の遺伝子解析

研究分担者 國島 伸治

(国立病院機構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)

**研究要旨：** 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（CMTP）13家系において次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析およびサンガーシーケンス法によるターゲット解析を施行し、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。ACTN1遺伝子変異は優性遺伝を呈するCMTPの5.5%を占め、日本人CMTPで4番目に高頻度の原因である。

#### A. 研究目的

先天性血小板減少症は病因不明な疾患が多く、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）と診断され不必要な治療を受ける症例も少なくない。本研究は、既知の原因遺伝子に異常を認めない原因不明の先天性血小板減少症において、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を施行することにより新規原因遺伝子を同定、病態を解析し、鑑別診断法を確立することを目的とする。

#### B. 研究方法

優性遺伝の先天性巨大血小板性血小板減少症（CMTP）を呈し、既知の原因遺伝子に異常を認めない親子例6家系について、東京大学小川誠司研究室にて次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を施行した。

同定された遺伝子異常候補のバリデーションのため、新たに優性遺伝を呈する7家系のCMTP家系を追加し、サンガーシーケンス法にてACTN1遺伝子の全ての構造領域の配列を決定した。さらに、遺伝形式の不明な39症例のCMTP、および120例の正常コントロール検体については次世代シーケンサーを用いたプールシーケンス解析により

ACTN1遺伝子の全ての構造領域の配列を決定した。

ACTN1変異の機能解析として、全長ACTN1 cDNAをCHO細胞へ発現させ、ACTN1蛋白およびアクチン繊維の細胞内局在を解析した。

マウス胎児肝細胞へレトロウイルスを用いてACTN1 cDNAを感染させ、巨核球へ分化後、細胞骨格蛋白再構成と胞体突起形成能を解析した。

（倫理面への配慮）

本研究を行なうにあたっては、当施設で施行中の先天性血小板減少症の遺伝子解析に関する研究に、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析方法を追加することを当院ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会に申請し、審査承認を得た。東京大学へ送付するDNAは、匿名化し、罹患の有無、親子関係、性別のみの情報を付与した。DNA組み換え実験および動物を用いた実験についても審査承認を得た。

#### C. 研究結果

6家系のCMTPの全エクソン解析ではNCBI SNPデータベースおよびin-houseデータベースに登録されない3,601個の新規塩基置換が同定された。この内、360個の塩基置換はそれぞれの家系において巨大血

血小板性血小板減少症との連鎖が認められた。統計学的解析により、ACTN1遺伝子に有意に変異があることが判明した。6家系のCMTPの内、3家系において3種類の変異 (c.313G>A (p.Val105Ile)、c.94C>A (p.Gln32Lys)、c.2255G>A (p.Arg752Gln)) がそれぞれの家系で巨大血小板性血小板減少症との連鎖が認められた。追加の7家系の優性遺伝CMTP家系でサンガーシーケンス解析を行ったところ、さらに異なる3種類の変異 (c.137G>A106 (p.Arg46Gln)、c.2212C>T (p.Arg738Trp) 、 c.673G>A (p.Glu225Lys)) が同定された。遺伝形式の不明な39症例のCMTP、および120例の正常コントロール検体ではACTN1遺伝子変異は同定されなかった。同定された変異は保存されたアミノ酸残基に起こり、機能予測プログラムにより機能障害が示唆された。

ACTN1 cDNA を CHO 細胞に発現させたところ、野生型 ACTN1 蛋白はアクチン繊維との共局在を示したが、CMTP 症例で同定された変異を有する ACTN1 cDNA を導入した細胞では ACTN1 蛋白のアクチン繊維との繊細な共局在は観察されなかった。

マウス胎児肝細胞由来培養巨核球での発現実験においては、CHO 細胞と同様に変異型 ACTN1 蛋白がアクチン繊維へ取り込まれなかった。また、巨核球をトロンボポエチン存在下に培養し、胞体突起形成を解析したところ、野生型 ACTN1 cDNA 導入細胞と比較して、変異型を導入した細胞では胞体突起の末端数が少なく、末端サイズは大型で大小不同が観察された。

#### D. 考察

血小板は、骨髄において成熟巨核球から微小管により進展される胞体突起が形成され、個々の胞体突起末端部が流血中に放出されることにより産生されると考えられている。巨核球の分化成熟は転写因子や液性因子により時空間的に制御され、胞体突起形成時には細胞骨格蛋白の再構成が行われる。既知のCMTP 原因遺伝子異常の多くは巨核球特異的細胞骨格蛋白や関連する受容体/信号伝達に起こる。ACTN1 蛋白はアクチンを架橋することによりアクチン繊維の形成に働く。胞体突起はチューブリンか

ら成る微小管により進展され、アクチンにより分岐される。正常な胞体突起分岐が行われないことは胞体突起末端数の低下を来すことが考えられ、実際に変異型 ACTN1 を発現させた培養巨核球では、胞体突起の末端数が少なく、末端サイズは大型で大小不同が観察され、患者で見られる巨大血小板と血小板減少に一致した。

#### E. 結論

次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析およびサンガーシーケンスを用いたターゲット解析により、優性遺伝を呈する CMTP 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。ACTN1 遺伝子変異は優性遺伝を呈する CMTP の 5.5%を占め、日本人 CMTP で4番目に高頻度の原因である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Uyeda T, Echizenya T, Eto S, Otani K, Sato T, Takahashi T, Ito E, Yonesaka S, Kunishima S: Adams-Oliver Syndrome and familial *MYH9* mutation. *Pediatr Int* 54:407-9, 2012.
- 2) Hao J, Kunishima S, Guo X, Hu R, Gao W: A large family with *MYH9* disorder caused by E1841K mutation, suffering from serious kidney and hearing impairment and cataracts. *Ann Hematol* 91:1147-8, 2012.
- 3) Miyawaki Y, Suzuki A, Fujita J, Maki A, Okuyama E, Murata M, Takagi A, Murate T, Kunishima S, Sakai M, Okamoto K, Matsushita T, Naoe T, Saito H, Kojima T: Thrombosis from a prothrombin mutation conveying antithrombin-resistance. *New Engl J Med* 366:2390-6, 2012.
- 4) Kitamura K, Kunishima S, Tahara M, Ogiwara S, Dobata N, Dobata T, Sugihara A, Nakashima T, Sasaki Y, Nagumo K, Kubota



M, Kinugawa Y, Ieko M, Kumaki S: Transient hemiparesis in a 14-year-old boy with MYH9 disorders. *Int J Hematol* 96:376-9, 2012.

- 5) Kunishima S, Tomii T, Kudo K, Saito H: G to T transversion at the first nucleotide of exon 26 of the *MYH9* gene results in a novel missense mutation and abnormal splicing in platelets. *Eur J Med Genet* 55:763-5, 2012.

## 2. 学会発表

- 1) 新規変異を認めた MYH9 遺伝子異常の一例：寺下友佳代 杉山未奈子 大島淳二郎 長 祐子 井口晶裕 佐々木聡 有賀 正 石倉亜矢子 水上晋 國島伸治 第 115 回日本小児科学会学術集会 平成 24 年 4 月 福岡
- 2) MYH9 異常症の一家系：藤本貴美子 中川智博 谷山清己 木村朗子 木戸みき 沖川佳子 伊藤琢生 新美寛正 佐村修 國島伸治 第 13 回日本検査血液学会学術集会 平成 24 年 7 月 高槻
- 3) Transient hemiparesis in a 14-year-old boy with MYH9 disorders : Kitamura K, Tahara M, Ogiwara S, Dobata N, Dobata T, Sugihara A, Nakashima T, Sasaki Y, Nagumo K, Kubota M, Kinugawa Y, Kumaki S, Kunishima S, Ieko M 第 74 回日本血液学会総会 平成 24 年 10 月 京都
- 4) MYH9 遺伝子変異を認めた先天性血小板減少症合併妊娠の 1 例：佐村 修 楠本真也 佐々木晃 山崎友美 中村絃子 竹原和宏 水之江知哉 國島伸治 第 57 回日本人類遺伝学会学術集会 平成 24 年 10 月 東京
- 5) MYH9 遺伝子変異を認めた May-Hegglin 異常の 1 例：富井敏宏 北澤宏展 松岡明 希菜 鈴木喬悟 伊藤理恵子 小倉妙美 堀越泰雄 工藤寿子 國島伸治 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 横浜

- 6) 一過性骨髄異常増殖症と肝線維症に、少量 Ara-C 療法と茵陳蒿湯を用い軽快が得られたダウン症候群の 2 例：高橋幸博 白潤夏 武山雅博 新居育世 金廣裕道 國島伸治 林 環 竹下優美子 山田佳世 片岡美香 倉本智津子 福田和由 釜本智之 村上志穂 内田優美子 西久保敏也 嶋緑倫 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 平成 24 年 11 月 横浜
- 7) Identification of integrin β3 L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant macrothrombocytopenia : Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M 54<sup>th</sup> American Society for Hematology Annual Meeting and Exposition, 8-11 December 2012, Atlanta, GA, USA.

## 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：小児血液疾患登録による稀少小児遺伝性血液疾患のデータベース構築  
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：** 稀少小児遺伝性血液疾患の診断法や治療法開発には疫学データベースの構築が必須である。日本小児血液学会（現 日本小児血液・がん学会）疾患登録事業を一次調査とした疫学観察研究を実施し、2006年から2011年診断の登録症例を検討した。この6年間に180例の稀少小児遺伝性血液疾患が登録されており、DBA症例が最多であった。今後、遺伝子異常の発見に伴う病態解明が進むことにより、潜在する症例や他疾患とoverlapする症例が見出される事が予想される。診断精度が高く、悉皆性のある稀少小児遺伝性血液疾患のデータベースは、この分野の治療や病態研究に益々重要性が高まっている。

## A. 研究目的

### 【背景】

稀少小児遺伝性血液疾患の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、各々の病型で少数例が散発的に診断されてきた。そこで小児血液学会（現日本小児血液・がん学会）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症例把握に努めた。

### 【目的】

本邦の稀少小児遺伝性血液疾患を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・MDS 2006研究）を実施した。本研究班で実施される診断法の開発・確立により、正確な診断、不明であった病態解明による、新規診断症例の発掘が質の高いデータベース構築により、これを基盤とした稀少小児遺伝性血液疾患の診断法・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 登録にて実施される。構築されるデータベースには小児期発症の血液疾患を網羅する。

（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 から 2011 年までの診断登録症例数を表に示す（表）。

a.疾患登録症例：小児血液学会会員 239 施設の 90% に相当する 216 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。表に挙げた稀少小児遺伝性血液疾患 12 疾患は 6 年間に総計 180 例であり、同期間で特発性再不貧は毎年 50-56 例、急性白血病は 650 例とほぼ一定した症例数であった。

b.貧血疾患； Fanconi anemiaとDiamond-Blackfan 貧血, DBAが代表的な疾患である。DBA症例は遺伝子診断の開発により潜在的な症例が確定診断されてい

る。Congenital Dyserythropoietic anemia, Sideroblastic anemiaは小児で極めて稀である。

c. 白血球減少； Severe Congenital Neutropenia, SCNが代表疾患。SCNは臨床症状が明確であり、発見は容易であるが、遺伝異常の背景についての検討が進めば、潜在または他の疾患とoverlapする症例の掘り起こしが期待される。

d. 血小板疾患； May-Hegglin異常が、近年積極的に診断されるようになった。血小板異常（減少）は、他の造血疾患、免疫不全とoverlapする事が多く、新規病態の手がかりとなる症例の存在が予想される。

小児血液学会再生不良性貧血・MDS委員会中央形態診断事業、ならびに本研究班の活動により、新規症例が毎年診断され、多くは遺伝子診断へと繋がっている。

#### 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、この中から稀少小児遺伝

性血液疾患症例が毎年発見されている。本研究班の遺伝子診断の開発により、また新規病態の解明により、新規症例の発掘、overlap病態の解明から潜在する症例の発掘が期待される。これら新規症例を含めて、今後二次調査を実施して詳細な臨床像、家族歴、治療歴を収集する。これらを統合した疾患データベースを構築することは、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。また診断の手引き、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

臨床情報で裏打ちされた稀少小児遺伝性血液疾患の疫学データベース構築が開始された。

#### F. 研究発表

なし。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

(表)

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 Aplastic Anemia	58	62	68	68	55	56
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5
AA / PNH	2	1	1	0	1	0
Fanconi Anemia	5	4	6	1	4	2
Diamond-Blackfan Anemia	9	6	9	10	5	8
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7
Schwachman-Diamond	0	1	1	2	0	0
Cong. Dyserythropoietic Anemia	0	1	1	0	0	1
Sideroblastic Anemia	0	0	2	1	1	0
Severe Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0
May-Hegglin anomalously	3	6	6	3	2	0
Bernard-Soulier syndrome	1	2	2	1	2	0
Glanzmanns Thrombathenia,	1	0	4	3	3	2

As of June 2012

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：次世代シーケンサーを用いた稀少小児遺伝性血液疾患の原因遺伝子探索  
研究分担者 小川 誠司（東京大学医学部附属病院 Cancer Board 特任准教授）

**研究要旨：** 小児遺伝性血液疾患の多くは、年間発症数が10例以下と極めて稀であるが、致死的経過をたどることが少なくない。ここ数年、原因遺伝子の解明が進みつつあるが、いまだ多くは原因不明であり、的確な診断・有効な治療につながる原因遺伝子の発見が求められている。一方、近年多くの遺伝性疾患で次世代シーケンサーを利用した新たな原因遺伝子の発見が報告されており、単一遺伝子病である遺伝性血液疾患は、次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子探索が極めて有用であると考えられている。本研究では、既知の原因遺伝子の異常が同定されなかった小児遺伝性血液疾患症例に対して、家族発症例を中心に次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスによる網羅的な原因検索を行う。

#### A. 研究目的

本研究では、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(CSA)、先天性好中球減少症(SCN)、先天性顆粒放出異常症、毛細血管拡張性小脳失調症 (AT)、一過性骨髄異常増殖症 (TAM)、若年性骨髄単球性白血病 (JMML)、Congenital dyserythropoietic anemia(CDA)、先天性血小板減少症、Shwachman-Diamond syndrome(SBDS)、先天性溶血性貧血、さらにはこれらに分類されない血液疾患を対象に、原因遺伝子が不明な症例について SNP array 解析、次世代シーケンサーを用いて、原因遺伝子を同定することを目的とする。

#### B. 研究方法

昨年度に引き続き本研究の環境整備のため、それぞれの解析対象疾患について当施設での研究のための研究計画書の策定、倫理委員会の申請・承認を継続して行った。

倫理委員会で承認が得られた疾患について SNP アレイ解析および全エクソンシーケンスによる解析を開始した。SNP アレイ解析には Affymetrix 社の

SNP アレイである GeneChip 250K アレイを用い、解析アルゴリズムとして CNAG/AsCNAR を用いた。次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスは、ヒト全エクソン領域をターゲットとするビオチン化された cRNA (Agilent 社 SureSelect®) を用いて濃縮したのち、高速シーケンサー (illumina 社、Hiseq 2000) で解析を行った。データは東京大学医科学研究所のスーパーコンピューターを用いて Genomon-exome というパイプラインを用いて解析した (<http://genomon.hgc.jp/exome/index.html>)。

(倫理面への配慮)

本研究で行った臨床検体を用いた研究は、東京大学の倫理審査委員会で審査され、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(2001年、2008年改訂)」を遵守することを条件に承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

#### C. 研究結果

これまでに 64 例の DBA 症例の SNP アレイ解析を行い、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