

201324063A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業）

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 26（2014）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授)	
II. 分担研究報告書	
1. 遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データ・遺伝子解析	25
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)	
2. Fanconi 貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究	29
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)	
3. Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の臨床データ解析	33
真部 淳 (聖路加国際病院小児科 医長)	
4. Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の遺伝子診断	35
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授)	
土居崎小夜子 (名古屋大学医学部附属病院小児科学)	
5. 重症先天性溶血性貧血の新規病因遺伝子の同定: <i>KLF1</i> 遺伝子	39
菅野 仁 (東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 教授)	
6. ファンconi 貧血の遺伝子解析	43
高田 穰 (京都大学放射線生物研究センター 教授)	
7. Diamond Blackfan 貧血の簡易迅速大欠失解析法の検討	47
浜口 功 (国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長)	
倉光 球 (国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員)	
8. 先天性赤芽球癆家系母子の表現型と遺伝子型に関する研究	49
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)	
菅野 仁 (東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 教授)	
9. 小児期造血障害疾患登録による赤芽球癆など先天性遺伝性貧血の 疫学データベース構築	53
小原 明 (東邦大学医療センター大森病院輸血部 教授)	
10. Diamond Blackfan 貧血の遺伝子解析	55
照井 君典 (弘前大学医学部附属病院小児科 講師)	

1 1. ALAS2 遺伝子の非コード領域の変異による遺伝性鉄芽球性貧血の 発症機構の解明	59
古山 和道 (岩手医科大学学生化学講座分子医化学分野 教授)	
1 2. CDA のデータ管理、診断基準の確立	61
多賀 崇 (滋賀医科大学小児科 講師)	
1 3. Fanconi 貧血の診断・診断ガイドラインの作成	63
矢部 普正 (東海大学医学部基盤診療学系細胞移植再生医療科 准教授)	
1 4. ゼブラフィッシュを用いた DBA の遺伝子解析	67
剣持 直哉 (宮崎大学フロンティア科学実験総合センター 教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	69
IV. 研究成果の刊行物・別冊	77

I . 総括研究報告

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

研究代表者 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:造血不全に伴う主な遺伝性貧血には、Diamond-Blackfan 貧血 (DBA)、Fanconi 貧血 (FA)、遺伝性鉄芽球性貧血 (SA)、congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の 4 疾患があるが、我が国では未だに 50%以上の症例は原因遺伝子が不明である。既知の原因遺伝子が同定されなかった症例においては、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を担当する「稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究」班（小島班）と有機的に連携し、新規遺伝子探索を行った。共通点の多いこれらの 4 疾患の病態解明、診断・治療法の効率的開発を目的として、本年度は以下の研究と診療ガイドの改訂を行った。

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 10 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 110 例のうち、原因遺伝子の同定されていない 50 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。ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析を行い、原因遺伝子であることを明らかにした。さらに、RP 遺伝子以外の新規原因候補遺伝子を同定し、機能解析を進めている。

FA は、染色体不安定性を特徴とする常染色体劣性の先天性再生不良性貧血である。総計 80 例の日本人ファンコニ貧血 (FA) 患者の解析を行った。61 症例では Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) を併用し、FANCA 患者の約 2/3 の症例において片アレルまたは両アレルの検出が可能であった。原因遺伝子を決定した FA 患者 64 例において、アルデヒド代謝酵素である *ALDH2* の多型を調べ、臨床像との強い関連を明らかにした。特に、*ALDH2* 酵素活性の欠損をもたらす多型が骨髄不全の進行を強く促進することが判明した (Blood 2013)。これらの結果は、FA 患者の骨髄における病態の本質に強い示唆を与え、また将来の治療法開発への道を開くものと言える。

SA は、ミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天的異常により発症する難治性の貧血であり、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする。エクソーム解析などによっても原因遺伝子が同定出来ない遺伝性鉄芽球性貧血患者の原因遺伝子を同定するために、*ALAS2* 遺伝子の新たな赤芽球特異的転写調節領域を同定し、その部分に変異を有する症例があるかどうかを検討した。その結果、赤芽球特異的な転写を制御する転写因子である *GATA1* の結合配列を中心としたエンハンサー領域を *ALAS2* の第 1 イントロンに同定し、原因遺伝子が不明であった先天性鉄芽球性貧血患者の 11 例中 5 例で、エンハンサーの機能を低下させる様な変異が存在する事を明らかにした。

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。14 例について遺伝子解析を行い、2 例で *CDANI* 変異が、また 1 例で *SEC23B* の変異が見つかった。この他に、次世代シーケンサーを用いて解析を行ったところ、臨床的に CDA と診断された 1 例において、通常は遺伝性橢円赤血球症でみられる *SPTAI1* 遺伝子の変異がみられた。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。

今後は、「難治性血液・免疫疾患由来の疾患特異的 iPS 細胞の共同研究拠点」(中畑龍俊代表)とも連携し、疾患特異的 iPS 細胞を用いて新規現任候補遺伝子の機能解析と新規治療法の開発を目指す。

【研究分担者氏名】

張替秀郎：東北大学大学院医学系研究科教授
矢部みはる：東海大学医学部准教授
真部 淳：聖路加国際病院医長
小島勢二：名古屋大学大学院医学系研究科教授
菅野 仁：東京女子医科大学准教授
高田 穰：京都大学放射線生物研究センター教授
浜口 功：国立感染症研究所部長
大賀正一：九州大学大学院医学研究院教授
小原 明：東邦大学医療センター大森病院教授
照井君典：弘前大学大学院医学研究科講師
古山和道：岩手医科大学教授
多賀 崇：滋賀医科大学講師
矢部普正：東海大学医学部准教授
剣持直哉：宮崎大学教授

【研究協力者氏名】

土岐 力：弘前大学大学院医学研究科講師
倉光 球：国立感染症研究所研究員
佐藤知彦：弘前大学大学院医学研究科助教

A. 研究目的

わが国における実態が不明であった遺伝性貧血においても、平成21年度以降4疾患（先天性赤芽球癆（DBA）、Fanconi貧血（FA）、遺伝性鉄芽球性貧血（SA）、Congenital dyserythropoietic anemia（CDA））が厚労省難治性疾患克服研究事業に採択され、全国疫学調査、臨床データの収集、遺伝子解析が行われ実態が明らかにされつつある。特に、DBA研究班（伊藤班長）は、本邦におけるDBAは欧米に比べ既知の遺伝子の変異を持つ頻度が低く（Haematologica, 2010）、通常のシークエンス解析では同定出来ない片アレルの欠失が約10%と相当数存在することを世界で初めて明らかにした（Blood 2012）。この発見は、他の3つの遺伝性貧血でも既知の原因遺伝子の欠失が起こっている可能性を強く示唆する。本研究では、これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、今後も継続的にこの稀少疾患の登録・解析事業を行う。現在、遺伝性血液疾患において、原因遺伝子が不明な症例を対象にした次世代シークエンスを用いた新規遺伝子同定プロジェクト（小島勢二班長）

が進行中であるが、本研究班では各分担者がそれぞれの疾患の研究拠点となり、遺伝性貧血の診断・臨床的データ分析と既知の遺伝子解析を受け持ち、既知の遺伝子の変異が同定出来ない症例については、小島班で遺伝子の同定を受け持つという連携システムを構築する。さらに、同定された新規遺伝子の機能解析は各分担者が担当する。この連携は緊密で、2年の研究期間内に成果を上げることが期待出来る。また、小児血液学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行う。さらに、疾患特異的なバイオマーカーの検索と症状に影響するmodifier遺伝子の同定を目指し、病態解明とともに精度の高い診断を目指す。

平成24年度は、疫学調査を続け、検体収集を進める。全疾患で既知の原因遺伝子のシークエンス解析と遺伝子コピー数解析を行う。原因遺伝子が同定されなかった症例においては、小島班と有機的に連携し、新規遺伝子探索と機能解析を行う。

平成25年度は、遺伝子解析とともにさらにデータの収集と観察研究を行うことにより、より正確な遺伝性貧血の実態の把握を行い、診断・治療ガイドラインを策定する。さらに、原因遺伝子が同定されない症例について臨床情報などを再検討することにより、診断基準の妥当性を検証し、診断基準の改定を行う。

B. 研究方法

これまでに難治性疾患克服事業により、稀少小児遺伝性貧血であるDBA、SA、FAとCDAの4疾患に関する疫学調査、臨床データの収集、遺伝子解析が行われてきた。しかし、未だに50%以上の症例は原因遺伝子が不明である。本研究では、発症数が少なく共通点の多いこれらの4疾患の病態解明、診断・治療法の開発をより効率的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進する。本研究班は、4つの疾患別研究拠点から構成され、各研究拠点（DBA（伊藤）、SA（張替）、FA（矢部）、CDA（小島））は、臨床データおよび検体の収集、既知の遺伝子解析および原因遺伝子の機能解析を担当する。既知の原因遺伝子に変異が見つからない検体については、小島班と有機的に連携

し、新規遺伝子探索を行う。研究代表者（伊藤）がDBAの研究を担当するとともに研究全体を統括する。得られた結果は、各研究班の診断システムの構築と治療ガイドラインの作成に役立てる。以下に、具体的な研究計画及び方法を述べる。

1) 疫学調査

本研究班の研究では疫学観察研究として実施し、治療介入は行わない。小児血液・がん学会会員239施設を対象にした全例登録（疾患登録事業）は、前年診断症例を対象にWeb登録にて実施される。構築されるデータベースには小児期発症の造血障害全般を網羅し、遺伝性貧血症例に限定はしない。

昨年度までの検討では赤血球造血不全による遺伝性貧血を主な対象にしたが、今年度は遺伝性溶血性疾患、ヘモグロビン異常症も症例数のみ集計した。

2) 中央診断

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。AA、MDS、あるいはCBFSが疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。以後はその番号でやりとりを行った（匿名化）。中央診断およびそれに伴う検査については患者保護者の同意を取得した後に行った。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設（名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科）で、骨髄病理標本を1施設（名古屋第一赤十字病院病理部）で行った。遺伝性貧血が強く疑われる場合は、各疾患拠点で遺伝子解析を行った。

3) バイオマーカーによるスクリーニング

難治性疾患克服事業のDBA班研究により、DBAの新たなバイオマーカー・赤血球還元グルタチオン（GSH）が見出された。DBA疑い症例については、赤血球アデノシンデアミナーゼ（eADA）活性とGSHの測定し、他の疾患を鑑別した（菅野）。具体的な方法は以下の通りである。

- ① 白血球・血小板・血漿を除去した精製赤血球から溶血液を作製し、以下のように赤血球GSH濃度およびeADA活性を測定する。
- ② 還元型グルタチオン（GSH）

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

③ アデノシンデアミナーゼ（ADA）

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

④ SVM法による判別式

SVM法は、代表的な判別方法の一つであり、マージンを最大とする超平面で分離することで、高い汎化性能を持つことが知られている。そこで本研究では、SMV法を用いて、eADA活性とGSHの2つの変数により、DBA症例と非罹患者を分ける判別式を計算した。実際の解析には、ソフトRのksvm関数で線形カーネルを指定して行う。

4) 既知の遺伝子の解析

既知の原因遺伝子の解析をHigh Resolution Melt 解析と直接シーケンス法を用いて、各疾患の解析拠点において行う。次に、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出来ないため、DBA研究班が開発したDBA同期q-PCR解析とSNPアレイを用いて、片アレル欠失の有無を解析した（浜口および各研究拠点）。

なお、FAの中で最も頻度の高いA群に関しては、*FANCA* 遺伝子のアレル欠失が生じることが知られている。このため、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) の導入を行い、*FANCA* の変異検出を患者リンパ球および皮膚・骨髄線維芽細胞にて確認した（矢部）。

CDAと診断された症例については、名古屋大学小児科において、I型については*CDANI* 遺伝子、II型については*SEC23B* 遺伝子、分類不能型については*KLF1* 遺伝子の変異解析をダイレクトシーケンス法により行った。

5) 症状に影響する modifier 遺伝子の同定

FAが確定された症例について、アセトアルデヒドの分解酵素である *ALDH2* 遺伝子解析をTaqman PCR法による検討を行う（高田、矢部）。なお、*ALDH2* 遺伝子型については、愛知がんセンター疫学研究部の松尾恵太郎博士から、

Taqman PCR 法の試薬供給を受け、real time PCRによって決定した。統計処理などについても、松尾博士の指導を受けた。

6) *ALAS2* 遺伝子における新規赤芽球特異的エンハンサー領域の同定

赤芽球特異的な転写を制御する転写因子として知られる *GATA1* が *ALAS2* 遺伝子の第1イントロンの特定の領域に *in vivo* で結合している事を、抗 *GATA1* 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) と定量PCR法を併用して明らかにした。さらに、その領域における *GATA1* 転写因子の結合配列の重要性と *ALAS2* 遺伝子の赤芽球特異的発現調節における役割を Gel Shift 法やルシフェラーゼをレポーターとしたプロモーターアッセイ法を用いて検討した。

7) 先天性鉄芽球性貧血患者における *ALAS2* 遺伝子非コード領域の変異の同定

次に、エクソームシーケンス法にても原因遺伝子が同定されなかった先天性鉄芽球性貧血症例の genome DNA を解析し、上記 1) で同定した *ALAS2* 遺伝子の転写制御領域 (エンハンサー) に変異を有するかどうかを検討した。最後に、同部における変異が転写制御活性に影響するかどうかを明らかにした。

8) 新規原因遺伝子の同定

遺伝子変異が明らかにならなかった症例に関しては、次世代シーケンサーによるエクソーム解析を行った。すなわち、各症例より抽出したゲノム DNA を超音波破砕により断片化し、試料を識別する 6 塩基の Barcode 配列を付与したのち、12 試料を混合し、常法に従って液相ハイブリダイゼーションにより全エクソン配列を濃縮した。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回数 200 回 を目標として全エクソン配列の解析を行った。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基変異 (single nucleotide variants; SNVs) および欠失・挿入配列から SNP データベースおよび 1000 personal genome データベースに登録済みの SNP を除去

したのち、家族内罹患者と陰性コントロール (非罹患同胞や両親) の全エクソン解析データとを比較検討することにより、責任変異の候補となる SNV 原因遺伝子の候補を絞り込み、必要に応じて全ゲノムリシーケンスを併用しつつ、機能的な推定と併せて、新規原因遺伝子の同定を試みた (小島および各研究拠点)。

9) 新規原因遺伝子の機能解析

同定された新規原因候補遺伝子の機能解析を *in vitro* および *in vivo* の系を用いて各研究拠点で行い、見出された遺伝子変異が真の遺伝性貧血の原因遺伝子であるかどうかを確定する。具体的には、通常分子生物学的解析に加え、遺伝子改変ゼブラフィッシュ (剣持) やマウスを用いて解析を進める。さらに、新規の遺伝子変異が見出された患者さんから疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、原因遺伝子を確定する。既知の遺伝子変異の同定されている患者さんからも疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、貧血の生じる仕組みを解明することにより新規治療法の開発を目指す (各研究拠点)。

10) 診療ガイドラインの作成

得られた情報は、データベースを構築し (小原、大賀)、各疾患の研究班の診断システムの構築および治療ガイドラインの作成に役立てる。移植プロトコルを含む治療ガイドラインの作成する (伊藤、大賀、真鍋、矢部、小島)。

(倫理面への配慮)

日本小児血液・がん学会として行う疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究として、すでに学会倫理審査委員会で承認されている。調査にあたっては個人情報の守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても患者検体の匿名化を図る。検体の採取にあたっては患者および家族から事前に十分な説明を行い、文書による同意を得る。各疾患の遺伝子解析については、ヒトゲノム遺伝子解析研究指針に従い、患者および家族に事前に十分な説明を行い、文書による同意を得たのち連結可能匿名検体として研究を遂行する。患者および家族に対して不利

益が生じる場合には、いつでも同意の撤回は可能である。既知の責任遺伝子に関しては、倫理委員会承認されている。

C. 研究結果

1) 疫学調査と中央診断

2006～2012年診断登録症例数を表に示す(表1)。

a. 疾患登録(一次調査)症例:2012年診断症例は、小児血液学会会員239施設の90.5%に相当する219施設が登録した。非腫瘍性血液疾患は毎年1,200～1,300症例であり、血小板異常症が最多であった。表1に挙げた造血障害疾患は総計647例で、そのうち特発性再不貧は毎年50～56例とほぼ一定した症例数であった。遺伝性溶血性貧血は2010年診断登録から収集し、3年間187例であった。

- ① Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) 症例は7年間で54例、特発性赤芽球癆36例が登録された。
- ② 2008～2012年の期間の鉄芽球性貧血は4例、congenital dyserythropoietic anemia は2例であった。極めて稀である。
- ③ 遺伝性溶血性貧血では球状赤血球症が最多であるが、診断治療共に問題となる赤血球酵素異常症は、いずれも稀であった。ヘモグロビン異常症は見逃されている可能性が高い。
- ④ 本研究班の活動は、2013年小児血液・がん学会総会で発表され、学会員への遺伝性貧血に関する啓発活動も盛んである。

平成21年度に行った一次疫学調査により把握されたDBA132例、CDA22例に対して二次疫学調査を行った。その結果、DBA67名とCDA18例の詳細な臨床情報を収集した。さらに、平成22年以降に発症した症例についても二次疫学調査を進めている。

2) バイオマーカーによるスクリーニング

eADA/GSH活性の上昇をバイオマーカーとしたDBAスクリーニング法は、検討症例を増やし網赤血球数と組み合わせることにより、その鑑別精度の向上が確認された(図1)。しかしながら、輸血依存例では輸血から30日以上経過した輸血直前の全血を使用してもスクリーニングが困難なことが

あることも明らかとなった。

3) 原因不明の先天性溶血性貧血症例の解析

原因不明の先天性溶血性貧血症例についてその病因を検討した結果、8例に赤血球特異的な転写因子である*KLF1*遺伝子の変異を同定した。全例、変異*KLF1*の複合ヘテロ接合体であった。新生児期重症黄疸にて光線療法の既往があり、1歳時までに赤血球輸血が必要であり、8例のうち5例はその後赤血球輸血依存性の重症慢性溶血を認めた。赤血球形態はサラセミア様の小球性低色素性貧血であり、グロビンまたはヘム合成障害が疑われた。網赤血球増加および有核の赤血球が末梢血に出現しており、貧血の主体は溶血と考えられた。赤血球像は多彩であり、著しいhypochromasia、大小不同を伴うpoikilocytosis、標的赤血球、破碎赤血球などが観察された。

等電点電気泳動および異常バンドから抽出したヘモグロビンの質量分析では、Hb Bart's($\gamma 4$)およびHb Portland I($\zeta 2\gamma 2$)を認めた。グロビン遺伝子解析では8例中6例に α サラセミア遺伝子変異を認めたが、家系内・外と同じ遺伝子型の個体と比べて、臨床症状は著しく重症であった(表2)。また、HbFの増加を説明する β サラセミア遺伝子型を保有する個体は一例も無く、また γ グロビン発現異常を説明出来るシス制御領域の変異も同定し得なかった。

赤血球膜異常症のスクリーニング検査であるeosin 5'-maleimide (EMA) 結合能は全例で基準値内であった。赤血球酵素活性のスクリーニングではピルビン酸キナーゼ(PK)活性の低下を全例で認めたが、翻訳領域およびエクソン-イントロン接合部分の遺伝子変異は同定し得なかった。 β グロビンおよび赤血球型PKに同時に発現異常が存在する事実より、両遺伝子に共通のトランス活性化因子である転写因子EKLf (erythroid Krüppel-like factor) の活性低下を疑い、その構造遺伝子である*KLF1*の変異解析を実施したところ、表3に示すような結果を得た。

4) 既知の遺伝子の解析

① DBA疑いもしくは臨床的にDBAとして加療された非血縁3家系の母子の遺伝子解析を行った(表4)。家系1の母は新生児期より貧血を認め、

低身長、翼状頸、拇指球低形成および舌の色素沈着を認めた。染色体不安定性はなく、臨床的にDBAと診断されプレドニゾロン、ダナゾールおよびシクロスポリンにて治療されたが、しばしば輸血を必要とした。33歳の時妊娠し、治療薬を中止して輸血療法の継続後、男児を出産した。児に奇形徴候はなかったが、出生後に貧血を認めた。母は輸血依存のためeADA/GSHが正確に測定出来ないため、全エクソーム解析を行い、母にのみRPL11変異(NM_000975:c.58_59del:p.20_20del[frameshift])を同定した。児の貧血は、その後自然軽快し、再燃はない。

家系2の母に明らかな奇形徴候はなかったが小児期にDBAと診断され、プレドニゾロンをしばしば投与された。25歳の時に出生した男児に新生児貧血を認めた。プレドニゾロン抵抗性で輸血依存となり、eADA/GSH測定が困難なため、母子の全エクソーム解析を行い、いずれにも既報告のRPS19変異(NM_001022:c.G185A:p.R62Q)を同定した。

家系3の母に奇形徴候はなかったが小児期にDBAと診断された。プレドニゾロンに反応後離脱して、無治療となった。24歳の時出生した女兒に新生児貧血を認め、プレドニゾロン依存性となった。eADA/GSHは、母2.51/85.0、児1.64/93.6と母子ともに両酵素活性の高値を認めた。母子の全エクソーム解析を行い、いずれにもRPS7変異(RPS7 NM_001011:exon3:c.76-1G>T [splicing error])を同定した。上記3家系母子の他のRP遺伝子に変異を認めなかった。

② 同期q-PCRによるDBA遺伝子コピー数の解析
ダイレクトシーケンス法による遺伝子配列解析、エキソーム解析、SNPアレイ解析等で原因遺伝子の変異が同定出来なかったDBA患者29検体について、DBAの既知遺伝子をターゲットとして同期増幅Primerによるq-PCR遺伝子コピー数解析を行った。その結果、RPL35A、RPS17、RPS19についてそれぞれ1検体ずつでq-PCRにおけるCt値が1サイクル遅延したことから、29例中の合計3症例でDBAの大欠失が同定出来た。特にRPS19の欠失があった検体では、RPS19のintron3より3'下流の遺伝子コピー数は正常であり、5'UTRか

らexon1,2,3を含む遺伝子領域のみが1サイクル遅延し欠失していることが示された。

③ MLPA法によるFANCA遺伝子コピー数の解析

MLPA法を用いた61症例の検討では、36例がFANCAシーケンスでA群と断定され、そのうちの24例がA群MLPA法にて片アレルまたは両アレルの検出が可能であった(66.3%)。最も頻度が高かったのはExson27の欠失でホモの欠失が2例、ヘテロの欠失が14例に検出され、MLPA-A検出例の2/3を占めた。いずれもc.2546delCの変異が確認され、日本人に高頻度にみられるFA変異と推測される。

④ ALDH2変異のFA表現型への影響

ALDH2は飲酒等の外因性、体内代謝による内因性のアセトアルデヒドを主な基質とし、アルデヒド代謝に関わる重要な酵素である。日本、韓国、中国において高頻度に変異型アレル(ここでは正常活性のものをG型、活性のないものをA型とする)が見出される。すなわち、ホモでA型を持つ個人では酵素活性が消失し、ヘテロのGA型でもドミナントネガティブ効果により活性が10分の1以下に低下し、飲酒後の顔面紅潮、頰脈などの原因となることが知られている。この酵素の活性とFA表現型の関係をヒトにおいて明らかにするため、64例の日本人FA患者において、ALDH2遺伝子型を決定した。GG型、GA型、AA型は、それぞれ36、25、3例であった。半数以上の患者は従来FANCA、FANCGの変異が同定されている。エクソーム解析によって多くの症例の原因遺伝子の診断がついたため、遺伝子変異の未同定の患者は5例のみである。

まず骨髄不全の発症で検討すると、GG型はGA、AA型に比べて、発症時期が遅く、明らかに統計学的に優位な差を認めた(図2)。AA型は生下時あるいは直後に骨髄不全、MDS発症を認めるなど、極度に重症型であった。一方、白血病、MDSの発症においては、有意な差を認めなかった。

FAの重要な症状に発育の遅延、奇形等があげられる。しかし、今回、ALDH2遺伝子型による生下時体重と奇形の数に明確な差は認められなかった。しかし、心臓などの一部臓器でALDH2遺伝子バリエーションによる奇形の出現率の増大が認められた。

⑤ *ALAS2* 遺伝子における新規赤芽球特異的エンハンサー領域の同定

ALAS2 遺伝子の第1イントロンには合計で17のGATA1結合コンセンサス配列が存在するが、K562細胞中においてGATA1が結合していたのは1カ所のみであった。このGATA1結合配列を含む約130bpの領域がエンハンサーとして機能するかどうかをプロモーターアッセイ法を用いて検討したところ、同領域は赤芽球系細胞でのみ*ALAS2*のプロモーター活性を10倍以上も増強する事が明らかとなった。従って、この領域は*ALAS2* 遺伝子の発現を赤芽球特異的に活性化するエンハンサーとして機能するものと考えられた。

⑥ 先天性鉄芽球性貧血患者における *ALAS2* 遺伝子非コード領域の変異の同定

次に、エクソームシーケンス法によっても原因遺伝子が同定出来なかった8家系11例の先天性鉄芽球性貧血患者症例が、上述の赤芽球特異的エンハンサー領域に変異を有するかどうかを検討したところ、3家系5症例において同部に変異が同定された。このうち2家系4症例で同定された変異はGATA1コンセンサス配列のAGATAAがAGGTAAに変異しており、他の1症例ではGATA1コンセンサス配列を含む33bpが欠失していた。いずれの変異によってもエンハンサー領域にはGATA1が結合し得なくなり、さらにはこれらの変異によりエンハンサー活性自体もほぼ消失した。

⑦ SA 症例の解析

本年度の1例目の新規症例は2004年生まれの男児、家族歴なし。生下時より赤血球輸血依存状態で、低身長や他の身体的異常もあり。骨髄検査にてring sideroblastを認め、さらに3系統の異形成あり(染色体異常なし)、血液検査上はMCV 88.1 fl、血清フェリチン 133.8 ng/ml。既知の原因遺伝子の変異は認めなかった。「稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究班(小島班)」と連携し、本人と母親の末梢血液細胞を用いた全エクソン解析を行い、候補遺伝子として*SLC39A8*を同定した。

2例目は2010年生まれの女児、家族歴なし。胎児期から脳室拡大を指摘。出生2週後頃から貧血が進行し(Hb 4.7 g/dl)、赤血球輸血を必要とした。

生後2ヶ月時に骨髄検査にてring sideroblastを15%以上認めたため、鉄芽球性貧血と診断。骨髄検査にて3系統の異形成あり(染色体異常なし)、血液検査上はMCV 88.3 fl、血清フェリチン 307.3 ng/ml。その後、血中・髄液中乳酸の持続高値、乳酸性アシドーシス、体重増加不良、精神運動発達遅滞、てんかんが認められるようになり、Pearson症候群等のミトコンドリア異常症が疑われたものの、皮膚繊維芽細胞を用いた呼吸鎖酵素活性測定、ミトコンドリアDNA欠失解析で明らかな所見は認めず。本人と両親の末梢血液細胞を用いた全エクソン解析を行うも、明らかな候補遺伝子は同定されなかった。

⑧ CDA と診断され同意を得た症例について遺伝子診断を行った。19例中3例に遺伝子変異を確認した。2例は、I型の責任遺伝子*CDAN1*の変異(ex26 c.3503 C>T (p. Pro1129Leu) と ex2 c.552_553insG (P185fs)、ex12 c.A1910G (N598S))、1例はII型の責任遺伝子*SEC23B* ex18 c.2122 A>G (p. Ile708Val) の変異であった。

5) 新規原因遺伝子の同定と機能解析

① DBA

原因遺伝子の同定されない残りの50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例にRP遺伝子の変異(*RPS7*, *RPS27*, *RPL3L*, *RPL6*, *RPL7L1*, *RPL8*, *RPL13*, *RPL14*, *RPL18A*, *RPL27*, *RPL31*, *RPL35A*)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)であり、病因と確定するためには機能解析が必要である。しかし、Y42C変異の2例は非罹患両親に変異はなく、*de novo*変異であり、原因遺伝子であることが強く疑われる。*RPS7*(スプライス変異)は既知の責任遺伝子であるが、最初のスクリーニングに入っていなかったため全エクソン解析で初めて見出された。その他に、新規のRP遺伝子に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例ずつに認めしたが、病理学的意義は不明である。残りの34例はRP遺伝子の変異は認められなかった。

この中で、DBAの病因になると考えられる新規RP遺伝子は*RPL27*と*RPS27*であった。このため、この2遺伝子に焦点を絞って機能解析を行った。*RPS27*のフレームシフト変異(c.90delC, p.Tyr31ThrfsX5)は、2歳の女児(孤発例)に見出された。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。*RPL27*のスプライス変異(c.-2-1G>A)は、1歳女児(孤発例)に検出された。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。

(1) *RPL27*と*RPS27*の発現抑制とrRNAのプロセッシングの異常

赤芽球系細胞株K562に*RPL27*と*RPS27*に対するsiRNAを導入して、*RPL27*と*RPS27*をノックダウンし、ノーザンブロット法で解析した。その結果、*RPS27*はリボソーム小サブユニットを構成する18S rRNAのプロセッシングに、*RPL27*は大サブユニットを構成する28Sと5.8S rRNAのプロセッシングに重要な役割を果たしていることが明らかになった(図3)。

(2) ゼブラフィッシュによる機能解析

(a) ヒトとゼブラフィッシュの*RPL27*遺伝子の構造

これら2種間における*RPL27*遺伝子のエキソン、イントロン構造は同じで、特にエキソンの長さはほぼ同じであった(図4)。また、アラインメントの結果、コーディング領域は84%、アミノ酸は96%が一致していた。

(b) *RPL27*遺伝子の第1イントロンのアクセプター部位に変異を持つ患者では、開始コドンを含む第2エキソンが欠損したmRNAが発現していた。そこで、遺伝子構造が同じであるゼブラフィッシュにおいて造血との関係を調べるために、オーソログである*rpl27*の第1イントロンのアクセプター部位を標的とし、スプライシングを阻害するアンチセンスオリゴ(*rpl27*MO)を設計した(図4、赤の下線部)。

(c) ノックダウン胚における形態形成の観察

rpl27 MOの注入によるスプライシング阻害がゼブラフィッシュの形態形成にどのような影響を

与えるのかを観察した。その結果、受精後25時間では、体長の短縮、不完全な卵黄伸長部の形成、腹側に屈曲した尾部が見られた(図5、中段の赤矢印、破線部)。このような表現型は、*in vitro*転写で合成した*rpl27*mRNAを同時に注入することで回復することを確認した(図5、下段)。

(d) ヘモグロビン染色による造血能の解析

48時間胚での血球数を観察するためにヘモグロビン染色を行った。野生型の心臓と卵黄囊の表面には血球(顆粒状の赤茶色)が多く存在していた(図6、左)。*rpl27* MO注入胚では、顕著な血球の減少がみられた(図6、中央)。*rpl27*mRNAを同時に注入した胚では、62%の胚で血球数の回復がみられた(図6、右)。

② FA

次世代シーケンスによるエクソーム解析を加えた総計80例の日本人FAの解析を行った。東大から京大に移動した小川研におけるエクソーム解析の結果に基づき、検出された遺伝子変異についてゲノムDNAを用いて当該変異部位を増幅し、ダイレクトシーケンス法により変異の確認を行った。合計FA患者サンプル68例を解析し、41例において両アレル、17例において片アレルの変異を見出した。結果として、従来国内で認められたことの無かったFA原因遺伝子の変異を持った症例が相次いで同定された。FA遺伝子のゲノムシーケンスより、35例の*FANCA*と20例の*FANCG*遺伝子の変異を京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室にて同定した。*FANCD1*, *FANCE*, *FANCP*も各1例確認され、既知遺伝子が全く検出されなかった6例を含め、引き続き解析を行っている。欧米諸国に比較的多いとされる*FANCC*は1例も検出されていない。

また、従来のPCRとSanger法によるシーケンス解析で原因遺伝子の同定に至らなかった症例において、次世代シーケンスにより原因遺伝子が判明する例が複数認められた。これらの結果は、今回の方法論が従来の方法に比して非常に強力であることが強く示唆している。

さらに、16遺伝子に変異が認められなかった症例複数例で、FA遺伝子と機能的な関連が示されて

きたいいくつかの遺伝子の変異が同例されたことは特筆に値する。これは、新規のFA遺伝子の同定がなされた可能性を示唆する。現在患者細胞における相補を中心に、機能解析を進めている。

③ CDA

既知の責任遺伝子変異が認められなかった症例について、次世代シーケンスによる新規責任遺伝子の探索を行った。12例中4例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。2例が*SPTA1*の変異 (c.G83A (p.R28H)、c.A6839G (p.Y2280C)、c.G6516A (p.W2172X)) であり、1例が*G6PD*の変異 (c.G1270T (p.V424L)) であり、1例が*ANK1*の変異 (c.C2803T (p.R935X)) であった。

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。学会を中心とした診断の手引きの発行、遺伝子診断の情報発信と啓発、学会の形態中央診断事業などにより、新規診断症例が増加し、さらに診断精度が高まっていることが読み取れる。

DBAとFanconi貧血は最も頻度の高い先天性造血不全症で、その臨床像には幅がある。この2疾患の原因遺伝子群の解析領域は広いため、Sanger法による遺伝子診断には限界がある。私たちは、eADA/GSH活性によるバイオマーカーによるスクリーニング法に、網赤血球数による変化を加味して、精度の高い判別式を確立した(図1)。しかし、輸血依存症例や搬送に伴う検査検体の質が問題となる。新生児の場合は、特に生理的溶血が加わり、酵素活性高い網赤血球数も多いことから、判別の精度に関して慎重に検討する必要がある。

今回、奇形徴候が明らかでなく、酵素活性スクリーニングが難しく、Sanger法で診断されなかった3家系の母子にNGSによる全エクソーム解析から確定診断を得た。家系1と2は従来の解析で変異が同定出来ていなかった。NGSの精度の高さはSanger法を有効にカバーしうることも示された。さらに、NGSでは他の遺伝性造血不全症の既知遺伝子変異が効率的に除外された。DBA診断には解

析すべきRP遺伝子数が多いため、NGSの有用性は高い。一方、欠失が約10%を占めるDBAでは、CGHアレイやMLPAを組み合わせた効率的スクリーニングも必要であろう。

貧血の程度もさまざまなDBAの母が重篤な合併症もなく児を出生したことが確認された。さらに、児1名はDBAではなかった。新生児期から発症する遺伝性貧血の臨床診断にはNGSが極めて有効であり、この活用が期待される。一方、軽症DBAと疑い例の診断は慎重に取り扱う必要がある。患者家族のNGS解析では、目的以外の異常を発見する可能性があり、十分な遺伝カウンセリングが必要である。

早期産児では遺伝性貧血の診断は特に難しい。DBA患児の奇形徴候は、各RP遺伝子の機能からまだ十分に説明できない。表現型と遺伝子型の冗長性を明確にした次世代の診断ガイドライン作成が望まれる。さらに、遺伝子型と治療反応性との関連性も検討し、新生児の鉄代謝や赤芽球の特性を明らかにして、治療ガイドラインを確立する取り組みが必要である。

ダイレクトシーケンス法による遺伝子配列解析、エキソーム解析、SNPアレイ解析等で原因遺伝子の変異が同定出来なかったDBA患者29検体について、DBAの既知遺伝子をターゲットとして同期増幅Primerによるq-PCR遺伝子コピー数解析を行った。その結果、*RPL35A*, *RPS17*, *RPS19*についてそれぞれ1検体ずつでq-PCRにおけるCt値が1サイクル遅延したことから、29例中の合計3症例でDBAの大欠失が同定出来た。特に*RPS19*の欠失があった検体では、*RPS19*のintron3より3'下流の遺伝子コピー数は正常であり、5'UTRからexon1,2,3を含む遺伝子領域のみが1サイクル遅延し欠失していることが示された。

DBA原因遺伝子の大欠失を同定した3症例は、エキソーム解析や、SNPアレイ解析では変異が同定出来なかった検体であることから、患者の欠失領域は、例えば数Mbpsに渡るような大欠失ではなく、数k~数十kbpsの比較的小さい領域の欠失であると想定される。また、今回同定した3例ともダイレクトシーケンス法では、変異を同定出来ない検体であると考えられ、現時点では本解析法

でのみ同定可能な変異であったと考えられる。よって同期増幅する Primer 群を使用した q-PCR コピー数解析法は、様々な解析方法で変異が同定出来なかった患者検体に対しても一定の成果が期待出来る有効な手段であると考えられる。変異同定率は、29 例中 3 例と少数であったが、日本やアジアの DBA の原因遺伝子群のそれぞれの変異の割合は欧米の割合とは異なることが示唆されており、今回のターゲット遺伝子に含まれていない欧米ではマイナーな遺伝子や近年日本で同定された新しい DBA 原因遺伝子等が、未同定検体の中に多く含まれている可能性がある。

FA の発症頻度、臨床症状や遺伝子変異は民族による差がみられ、日本人における疫学解析が必要である。エクソーム解析等を用いた遺伝子解析は従来の方法では検出出来なかった変異確定させることができ、今後も重要な解析法となり、日本における FA の疫学の基盤になると推測される。MLPA 法は線維芽細胞での検出も良好であり、既知の変異のみが対象となるものの、全 FA 患者の約 40% の症例 (A 群では 66%) で *FANCA* の少なくとも片アリル欠失が検出され、極めて有用と考えられた。

日本人 FA 患者における *ALDH2* 遺伝子型の解析から、骨髄不全を中心とした FA の病態にアルデヒド代謝が大きな役割を果たすことを明らかとした。一方、奇形や体全体の発育に関しては、それほど影響がなく、造血幹細胞以外の細胞では他の *ALDH* アイソタイプ、ないしアルデヒド以外の DNA 損傷性物質が重要である可能性がある。また、今回の症例群では、固形がんの発症は全部で 2 例に過ぎず、有効な検討にはならなかった。さらに今後、ヒトの血液幹細胞における *ALDH* サブタイプの発現などを確認していく必要が考えられる。また、他の血液疾患における *ALDH2* 遺伝子型の役割についても検証が必要と思われる。

今回の知見により、造血幹細胞における内因性のアルデヒドが DNA を障害し、その修復が不十分になることで、幹細胞に DNA 障害が蓄積し、p53 発現などの DNA 損傷応答が引き起こされることが浮かびあがってきている。今後、患者の治療への展開として、①食物中のアルデヒド量の管理、②

内因性アルデヒド産生のメカニズム解明、③ *ALDH2* 酵素活性の活性化剤の応用等が考えられる。*ALDH2* 活性化剤はすでに開発が進められており、今後その臨床応用も視野に入ってくるものと思われる。実際、最近、米国でアルデヒドをターゲットに臨床試験の準備中であるという情報を得た。

日本人の FA 患者数十名の解析において同定された原因遺伝子のスペクトラムを見ると、やはり、日本人と欧米人の間には遺伝的バックグラウンドの違いがあり、*FANCA* と *FANCG* が多いという共通性はあるものの、FA 変異遺伝子の広がりにも違いがあるという事がわかった。特に、アシュケナージ系のユダヤ人で後発する *FANCC* 変異が日本人サンプルで全く認められないのは、人種の差が強く反映されたものと言える。

さらに、従来欧米における 1,000 名にも及ぶ詳細な検討でも見出されていない新規遺伝子変異が見つかった可能性がある。今後、今回見出された遺伝子変異が本当に FA 表現型を引き起こしているのかどうか、患者細胞への正常遺伝子導入、該当遺伝子欠損細胞への変異遺伝子の導入により、今回見出された遺伝子変異の機能的な意義を探る必要がある。幸い、FA においては、染色体脆弱性、薬剤処理による細胞周期進行の G2 における長期停止等の測定の容易なパラメータが確立しているので、着実な方法で確認を進めていく予定である。

SA の主な原因遺伝子であるヒト *ALAS2* には以前よりプロモーター領域と第 8 イントロンに赤芽球特異的転写調節領域が存在する事が報告されていたが、今回の検討により新たな転写調節領域が第 1 イントロンに存在する事が明らかになった。また、エクソーム解析によっても原因遺伝子が同定されなかった先天性鉄芽球性貧血症例の約半数においてこれらのエンハンサー領域に複数の異なる変異が同定され、それ等の変異によりエンハンサー活性がほぼ消失した事から、同部における遺伝子変異がこれらの症例における先天性鉄芽球性貧血症の発症原因であるものと考えられた。

本年度新たに解析したいずれの症例も臨床的には遺伝性鉄芽球性貧血症と診断出来る症例であったが、既知の原因遺伝子の変異は認められなかった。

1例目は*SLC39A8*遺伝子に変異を認めたが、この遺伝子が実際に鉄芽球性貧血の責任遺伝子かどうかは今後基礎的解析による裏付けが必要である。一方で、2例目については既知の原因遺伝子の解析だけでなく、全エクソン解析においても変異遺伝子は見出されなかった。近年、我々は*ALAS2*遺伝子のエンハンサー領域の変異による遺伝性鉄芽球性貧血症例を見出しており、全エクソン解析で有意な変異が認められない症例については全ゲノム解析もしくは既知の遺伝子の制御領域の変異解析を行う必要があるかもしれない。

CDA疑いとされた症例は20例中、既知の責任遺伝子の変異を認めた症例は3例のみであった。その原因としては、CDAの鑑別が困難であること、日本人に特有なCDAの病型の存在する可能性が挙げられる。次世代シーケンスによる解析で、溶血性貧血の原因遺伝子の変異を複数例に認めた。この事実は、CDAと溶血性貧血の鑑別が困難であることを示唆し、貧血鑑別における遺伝子診断の重要性が再確認された。

KLF1 遺伝子多型が赤血球内HbF量を増加させる HPFH (hereditary persistence of fetal hemoglobin) と関連することは既に明らかになっている (Borg J, et al. Nat Genet 42:801-805, 2010; Satta S, et al. Haematologica 96:767-770, 2011)。一方、*EKLF*の2つめのzinc fingerにおけるミスセンス変異 (E325K) はヘテロ接合体マウスがCDA (congenital dyserythropoietic anemia) 様の表現型を示すことも最近明らかになった (Esteghamat F, Gillemans N, et al. Blood 121:2553-2562, 2013)。

今回の検討結果から、*KLF1* 遺伝子変異は胎芽～胎児型グロビンの出現およびβグロビン発現低下、赤血球型PK活性の低下という二つの遺伝子異常による赤血球寿命の短縮を来し、重症先天性溶血性貧血を惹起することが明らかになった。

解糖系酵素異常による先天性溶血性貧血で最も頻度の高いPK異常症においては、片アレルに赤血球型PK遺伝子変異を同定出来ない症例が一部に存在する。今後赤血球PK活性の低下を来した先天性溶血性貧血症例では、*PKLR* 遺伝子に加えて*KLF1* 遺伝子変異の解析も必要と考えられた。

E. 結論

DBAの病態解明には、貧血とそれ以外の症候について分子機構を明らかにしていくことが必要である。本研究によりDBAの分子疫学が解明され、日本人患者の表現型と遺伝子型に関する情報が集積されてきた。新生児遺伝性貧血の診断には、表現型、バイオマーカーに全エクソーム解析が極めて有用である。DBA患児には固形腫瘍の発症リスクが高い。多施設共同研究を進めて、診療指針作成の基盤データをさらに集積し、母子から家族を守る包括医療に発展させることが必要である。

同期増幅するPrimerセットを用いたq-PCR遺伝子コピー数解析法は、迅速・簡便であり、様々な遺伝子解析の結果変異が同定出来なかった検体に対して検討する意義は十分にあると考えられる。今後ターゲット遺伝子のレパートリーを増加させより一層効果的に実施出来るよう検討する必要がある。

稀少遺伝性疾患であるFAの遺伝子解析の体制が軌道に乗り、日本人FA患者の原因遺伝子の種類や頻度、遺伝子異常と臨床病態との関連が明らかになりつつある。*ALDH2* 遺伝子型の造血不全の解析からFAの病態にアルデヒド代謝が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、今後白血化やがん発症とのかかわりについても検討を加え、病態解明や新規治療の手がかりになることが望まれる。

ALAS2 遺伝子の第1イントロンに新たな赤芽球特異的転写調節領域を同定した。同領域における変異は転写調節活性を消失させ先天性鉄芽球性貧血の原因となりうると思われる事から、原因遺伝子が明らかではない先天性鉄芽球性貧血の症例においては*ALAS2* 遺伝子のエクソン領域と既知の転写調節領域のみならず、今回同定された第1イントロンの転写調節領域における変異の有無についても検討すべきであると考えられた。

CDAのような稀な疾患は、このような中央診断登録システム、遺伝子変異解析を通して確実に診断がつけられていくと考えられる。また、次世代シーケンスによる解析を進めて行くことで、CDAの鑑別がより確かになるとともに、新たな責

任遺伝子の同定が可能となると考えられる。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida K, Toki T (co-first author), Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sanada M, Park M, Terui K, Kon A, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E*, Ogawa S* (* co-corresponding author). Landscape of gene mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nature Genetics* 2013; 45:1293-9.
- 2) Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, Ito E* (* corresponding author). Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* 2013;121(16):3181-4.
- 3) Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T. Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood* 2013;121(21):4377-87.
- 4) Shiba N, Ohki K, Park MJ, Sotomatsu M, Kudo K, Ito E, Sako M, Arakawa H, Hayashi Y. SETBP1 mutations in juvenile myelomonocytic leukaemia and myelodysplastic syndrome but not in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2013 [Epub ahead of print].
- 5) Takata K, Sato Y, Nakamura N, Tokunaka M, Miki Y, 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.* 2013;26(1):22-31.
- 6) 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; 92(1):1-9.
- 7) 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* 2013;121(5):862-863.
- 8) Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M and Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood* 2013;122:3206-3209.
- 9) Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as

- treatment for fulminant aplastic anemia in children. *Ann Hematol.* 2013 Dec 14. [Epub ahead of print].
- 10) 矢部みはる. 遺伝性骨髄不全症候群における遺伝子解析と倫理的諸問題. *日本小児血液・がん学会雑誌* 2013;50:418-420.
 - 11) 山下孝之, 矢部みはる. 先天性骨髄不全症 血液病学(第2版) 中外医学社 2013;349-353.
 - 12) 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.
 - 13) Fujino H, Doisaki S, Park YD, Hama A, Muramatsu H, Kojima S and Sumimoto S. Congenital dyserythropoietic anemia type 1 with a novel mutation in the CDAN1 gene previously diagnosed as congenital hemolytic anemia. *Int J Hematol.* 2013 May;97(5):650-653.
 - 14) Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet.* 2013 Aug;45(8):942-946.
 - 15) Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S. Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. *Int J Hematol.* 2013 Jan;97(1):20-29.
 - 16) Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013 Aug;45(8):937-941.
 - 17) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet.* 2013 Mar 7;92(3):431-8.
 - 18) 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.* 2013;35:349-55.
 - 19) Tsuzuki S, Akahira-Azuma M, Kaneshige M, Shoya K, Hosokawa S, Kanno H, Matsushita T. A Japanese neonatal case of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency presenting as severe jaundice and hemolytic anemia without apparent trigger. *Springerplus* 2013;2:434.
 - 20) Viprakasit V, Ekwattanakit S, Rioueang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Monthana J, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons R, Philipsen S, Higgs DR. Mutations in Krüppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. *Blood* (in press).
 - 21) 菅野仁. ピリミジン5'-ヌクレオチダーゼ異常症. *日本臨床別冊血液症候群第2版I* 2013;311-313.
 - 22) 菅野仁. アデニル酸キナーゼ異常症. *日本臨床別冊血液症候群第2版I* 2013;308-310.
 - 23) 菅野仁. アデノシンデアミナーゼ過剰産生症. *日本臨床別冊血液症候群第2版I* 2013;306-307.
 - 24) 菅野仁. アルドラーゼA異常症. *日本臨床別冊*

- 血液症候群第2版I 2013;278-281.
- 25) 菅野仁. ヘキソキナーゼ異常症. 日本臨床別冊血液症候群第2版I 2013;274-277.
- 26) 菅野仁. 三炭糖リン酸イソメラーゼ異常症. 日本臨床別冊血液症候群第2版I 2013;271-273.
- 27) Tomida J, Itaya A, Shigechi T, Unno J, Uchida E, Ikura M, Masuda Y, Matsuda S, Adachi J, Kobayashi M, Meetei AR, Maehara Y, Yamamoto KI, Kamiya K, Matsuura A, Matsuda T, Ikura T, Ishiai M, Takata M. A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. *Nucleic Acids Res.* 2013 Aug 1;41(14):6930-6941.
- 28) Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, Takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, Enomoto T. Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan 10. pii: S0167-4889(14)00006-8. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.005.
- 29) Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, Kobayashi R, Ishida H, Harigae H, Shibahara S. Identification of the novel erythroid-specific enhancer for ALAS2 gene and its loss-of-function mutation associated with congenital sideroblastic anemia. *Haematologica* 2013 Aug 9. [Epub ahead of print].
- 30) Fujiwara T, Ikeda T, Nagasaka Y, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Tomosugi N, Harigae H. A low-molecular-weight compound K7174 represses hepcidin: Possible therapeutic strategy against anemia of chronic disease. *PLoS ONE* 2013; 8:e75568.
- 31) Fujiwara T, Harigae H. Pathophysiology and genetic mutations in congenital sideroblastic anemia. *Pediatrics International* 2013;55:675-679.
- 32) Inoue A, Fujiwara T, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Elucidation of the role of LMO2 in human erythroid cells. *Exp Hematol.* 2013;41:1062-1076.
- 33) Fujiwara T, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Expression profiling of ETO2-regulated miRNAs in erythroid cells: possible influence on miRNA abundance. *FEBS Open Bio.* 2013;3:428-432.
- 34) Furuyama K and Yamamoto M. Differential regulation of 5-aminolevulinate synthase isozymes in vertebrates. Ferreira GC, Kadish KM, Smith KM, Guillard R edited, *Handbook of Porphyrin Science* 2013;Vol. 27;p.2-41.
- 35) Horibe K, Saito AM, Takimoto T, Tsuchida M, Manabe A, Shima M, Ohara A, Mizutani S. Incidence and survival rates of hematological malignancies in Japanese children and adolescents (2006-2010): based on registry data from the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Int J Hematol.* 2013;98:74-88.
- 36) 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.* 2013;60: 836-841.
- 37) 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.* 2013;162:1285-1288.

- 38) Inoue H, Ohga S, Kusuda T, Kitajima J, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Early Hum Dev.* 2013;89(6):425-9.
- 39) 井上 普介, 大賀正一. 未熟児貧血. 日本臨床別冊「血液症候群」2013;pp. 401-404.
- 40) 北島 順子, 大賀正一. 新生児鉄過剰症. 日本臨床別冊「血液症候群」2013;pp. 499-502.
- 41) 楠田 剛, 大賀正一. 新生児溶血性貧血. 日本臨床別冊「血液症候群」2013;pp. 364-367.

2. 学会発表

- 1) Wang R, Yoshida K, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Toki T, Kudo K, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Kamimaki I, Hara J, Sugita K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Kawano Y, Kanno H, Kojima S, Sawada T, Uechi T, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Diamond-Blackfan 貧血における新規原因遺伝子 RPL27 の同定. 第75回日本血液学会学術集会 (2013年10月, 札幌).
- 2) Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Ohtsubo K, Okuya M, Fukumura A, Arakawa S, Masukawa M, Gondo K, Tsuchida F, Sugimoto T and Kato S. Frequent chromosomal instability in somatic and tumor cells after hematopoietic cell transplantation. 39th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (April 2013, London, UK).
- 3) Yabe M, Hira A, Yabe H, Yoshida K, Ogawa S, Kojima S, Matsuo K and Takata M. Clinical interaction between Japanese Fanconi anemia patients and aldehydemetabolism. 第75回日本血液学会学術集会 (2013年10月, 札幌).
- 4) Yabe M, Matsushita H, Kinoshita A, Tokumasu M, Shimada A, Taki T, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Adachi S, Miyachi H. Detection of the KIT mutation and treatment response of acute myeloid leukemia associated with mastocytosis: A retrospective study of JPLSG-AML05. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会 (2013年12月, 福岡).
- 5) 高田 穰. プログレス教育講演「ファンconi 貧血とDNAクロスリンク修復の分子機構—最近の進歩—」日本血液学会 (2013年10月11-13日, 札幌).
- 6) Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. FANCD2 in chromatin anchors CtIP and regulates DNA end resection during crosslink repair. 25th Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium (October 24 - 27, 2013, Houston, Texas).
- 7) Kojima S. Clonal Evolution from Aplastic Anemia to Myelodysplastic Syndrome with Monosomy7. 7th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome (Nov. 3-6, 2013, Toronto, Canada).
- 8) Hama A, Muramatsu H, Ito M, Kosaka Y, Tsuchida M, Takahashi Y, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S. Risk Factors For Clonal Evolution Of Acquired Bone Marrow Failure After Immunosuppressive therapy in Children. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition (Dec.7, 2013, New Orleans, USA).
- 9) Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y,

- Kojima S. ALDH2 Polymorphism In Japanese Children With Acquired Aplastic Anemia. **The 55th ASH Annual Meeting and Exposition** (Dec.7, 2013, New Orleans, USA).
- 10) 小島勢二. 先天性血液疾患の病態研究に関する最近の進歩. 第116回日本小児科学会学術集会 (2013年4月19日, 広島).
 - 11) 坂口大俊, 西尾信博, 川島希, 王稀楠, 成田敦, 土居崎小夜子, 村松秀城, 濱麻人, 中西康詞, 高橋義行, 土田昌宏, 小林良二, 伊藤悦朗, 矢部普正, 大賀正一, 小原明, 長谷川大輔, 真部淳, 伊藤雅文, 小島勢二. Telomere length as a predictor for the immunosuppressive therapy in acquired aplastic anemia. 第75回日本血液学会学術集会 (2013年10月12日, 札幌).
 - 12) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Doisaki S, Sakaguchi H, Muramatsu H, Takahashi Y, Ito M, Ohara A, Kojima S. Central review of morphology in childhood aplastic anemia and myelodysplastic syndrome summary of 800 cases. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会 (2013年11月29日, 福岡).
 - 13) 成田敦, 村松秀城, 川島希, 王希楠, 坂口大俊, 土居崎小夜子, 中西康詞, 濱麻人, 高橋義行, 小島勢二. 小児再生不良性貧血からPNHへの移行. Evolution to PNH in children with aplastic anemia. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会 (2013年12月1日, 福岡).
 - 14) Fujiwara T, Saitoh H, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Effect of histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep) on erythropoiesis. 第16回欧州血液学会 (2013年6月, スtockホルム).
 - 15) Kobayashi M, Muto A, Itoh-Nakadai A, Fujiwara T, Harigae H, Igarashi K. Iron deficient anemia involves reconfiguration of erythroid differentiation program orchestrated by heme receptor Bach1. 第16回欧州血液学会 (2013年6月, スtockホルム).
 - 16) Okamoto K, Fujiwara T, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Effect of 5-aminolevulinic acid (ALA) on erythroid cells. 第75回日本血液学会学術集会 (2013年10月, 札幌).
 - 17) Ikeda T, Fujiwara T, Nagasaka Y, Inoue A, Katsuoka Y, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. Regulation of hepcidin transcription by K-7174. 第75回日本血液学会学術集会 (2013年10月, 札幌).
 - 18) Inoue A, Fujiwara T, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Elucidation of the role of LIM domain only 2 (LMO2) in human primary erythroblasts. 第75回日本血液学会学術集会 (2013年10月, 札幌).
 - 19) Fujiwara T, Ikeda T, Nagasaka Y, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Tomosugi N, Harigae H. A low-molecular-weight compound K7174 represses hepcidin: Possible therapeutic strategy against anemia of chronic disease. 第55回米国血液学会 (2013年12月, ニューオリンズ).
 - 20) Inoue A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. Exploring the mechanisms to reveal the contribution of LMO2 to the transcriptional regulation in human erythroblasts. 第55回米国血液学会 (2013年12月, ニューオリンズ).
 - 21) 古山和道. ヘム (鉄-プロトポルフィリンIX) が関与する細胞内クロストーク機構. 第86回日本生化学会大会 シンポジウム「生体金属が関与する細胞内クロストークの新展開」(2013年9月11-13日, 横浜).
 - 22) Hasegawa D, Hama A, Nozawa K,