

- Sakaguchi H, Yabe M, Ito E, Ito M, Kojima S, Nakahata T, Manabe A. Hematological and morphological characteristics of inherited bone marrow failure syndromes (IBMFS). 第75回日本血液学会総会 (2013年10月11-13日, 札幌).
- 23) 古賀木綿子, 野口磨依子, 大園秀一, 中川慎一郎, 上田耕一郎, 稲田浩子, 松石豊次郎, 財津亜友子, 横地一興, 大賀正一, 菅野仁, 伊藤悦朗. 心不全を伴う危急的貧血で発症したDiamond-Blackfan貧血の乳児例. 第116回日本小児科学会学術集会(平成25年4月19-21日, 東京). 日本小児科学会雑誌 2013;117:1346.
- 24) 羽賀洋一, 三井一賢, 小嶋靖子, 佐藤真理, 松裏裕行, 関根孝司, 舘野昭彦, 菅野仁, 小原明, 佐地勉. アスコルビン酸とリボフラビンとの併用療法が有効であった遺伝性メトヘモグロビン血症. 第116回日本小児科学会学術集会 (平成25年4月19-21日, 東京). 日本小児科学会雑誌2013;117:431.
- 25) 菅野仁. 先天性溶血性貧血およびダイヤモンド・ブラックファン貧血の診断法の進歩. 第55回日本小児血液・がん学会学術集会 教育セッション3 赤血球系疾患 (平成25年11月29日, 福岡).
- 26) 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. The 24th Fukuoka International Symposium on Pediatric / Maternal-Child Health Research (FISP/M) (August 31, 2013, Fukuoka, Japan).
- 27) 大賀正一. 感染症と貧血～小児の貧血A to Z～. 第351回福岡東部地区小児科医会 (2013年1月10日, 福岡).
- 28) 大賀正一. 小児再生不良性貧血の治療の進歩. 再生つばさの会講演会 (2013年3月30日, 福岡).
- 29) 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. 日本透析医学会雑誌 2013; 45(Suppl.1):902.
- 30) 野口磨依子, 大園秀一, 中川慎一郎, 上田耕一郎, 稲田浩子, 松石豊次郎, 大賀正一, 菅野仁, 伊藤悦朗. 重度の貧血で救急搬送されDiamond-Blackfan貧血の診断に至った1か月男児例. 第19回九州山口小児血液・腫瘍研究会 (2013年6月15日, 福岡).
- 31) 古賀木綿子, 野口磨依子, 大園秀一, 中川慎一郎, 上田耕一郎, 稲田浩子, 松石豊次郎, 財津亜友子, 横地一興, 大賀正一, 菅野仁, 伊藤悦朗. 心不全を伴う危急的貧血で発症したDiamond-Blackfan貧血乳児例. 第475回日本小児科学会福岡地方会 (2013年6月8日, 福岡).
- 32) 倉光球. 造血不全、Diamond Blackfan貧血の分子病態 (招待講演) 第13回血液フォーラム 21 (2013年5月18日, 東京).
- 33) Yabe H, Inoue M, Koh K, Kawa K, Kato K, Sakamaki H, Atsuta Y. The Inborn Errors Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT) Allogeneic stem cell transplantation for Diamond-Blackfan anemia in Japan：A Report from the Inborn Errors Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (April 2013, London, UK).
- 34) 矢部普正, 加藤俊一, 小池隆志, 大坪慶輔, 清水崇史, 森本克, 矢部みはる. 拒絶に対する再移植を施行した非腫瘍性疾患の21例. 第75回日本血液学会学術総会 (2013年10月, 札幌).
- 35) 澤田尚史, 上地珠代, 土岐力, 王汝南, 吉田健一, 小川誠司, 伊藤悦朗, 剣持直哉. ダイヤモンド・ブラックファン貧血の新たな責任

遺伝子の同定：ゼブラフィッシュモデルを用いた解析．第36回日本分子生物学会年会（2013年12月3-6日，神戸）．

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 該当なし
2. 実用新案登録
 該当なし
3. その他
 該当なし

表1. 2006～2012年診断登録症例数

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	216 / 239	219 / 242
(%)	83%	88%	90%	90%	90.3%	90.4%	90.5%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	61	45
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5	11
AA / PNH	2	1	1	0	1	0	0
Fanconi Anemia	5	4	6	1	4	2	5
Diamond-Blackfan	9	6	9	10	6	8	6
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6
Schwachman-Diamond	0	1	1	2	0	0	2
Cong. Dyserythropoietic anemia	No data	No data	1	0	0	1	0
Sideroblastic anemia	No data	No data	2	1	1	0	0
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	3
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0
Cong. Spherocytosis	No data	•	•	•	54	45	23
Cong. Elliptocytosis	No data	•	•	•	2	1	1
G6PD deficiency	No data	•	•	•	5	5	3
PK deficiency	No data	•	•	•	0	0	0
other erythrocyte enzyme def.	No data	•	•	•	2	0	0
Sickel cell disease	No data	•	•	•	1	1	0
Unstable hemoglobinopathy	No data	•	•	•	1	0	0
Thalasemia	No data	•	•	•	18	16	9
other hemoglobinopathy	No data	•	•	•	0	0	0

表 2. 8 症例のグロビン遺伝子型

Pt#	Alpha globin	Beta globin
1	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	β/β
2	--SEA/ $\alpha\alpha$	β^E/β
3	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	β^E/β^E
4	--SEA/ $\alpha^{-3.7}$	β^E/β
5	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	β/β
6	$\alpha^{CS}\alpha/\alpha\alpha$	β/β
7	$\alpha^{-3.7}/\alpha\alpha$	β/β
8	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	β^E/β

表 3. 同定した *KLF1* 遺伝子変異、アミノ酸置換

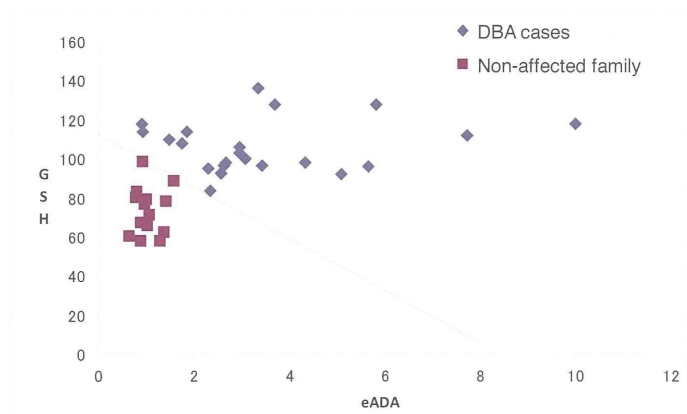
Pt#	Allele 1	Allele 2
1	R331W	G335R
2	G176RfsX179	R301H
3	-154C/T	A298P
4	Q58X	A298P
5	G176RfsX179	A298P
6	G176RfsX179	A298P
7	G176RfsX179	A298P
8	G176RfsX179	A298P

表 4. DBA3 家系母子の臨床像と確定変異遺伝子

家系	1		2		3	
	母	児	母	児	母	児
発症性	乳児早期女	新生児男	乳児早期女	新生児男	乳児早期女	新生児女
治療歴*	輸血依存	自然軽快	PSL依存	輸血依存	PSL離脱	PSL依存
eADA/GSH活性	不能	未検	未検	不能	2.51/85.0	1.64/93.6
貧血外DBA徴候	あり	なし	なし	あり	なし	なし
全エクソーム解析	RPL11	変異なし	RPS19	RPS19	RPS7	RPS7

* 母は妊娠期における治療の状況

* 基準値±SD: eADA 0.87-1.59 (UgHb), GSH 65.9-88.5 (mg/dlRBC)



$$0.937 \times eADA + 0.0702 \times GSH - 7.9044 > 0 \text{ のとき DBA と判別}$$

図 1. eADA/GSH 活性による DBA の鑑別と判別式

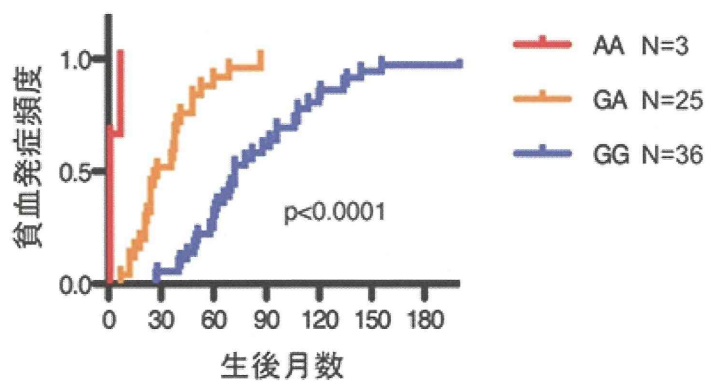


図 2. アルデヒド分解酵素遺伝子と FA の進行

アルデヒド分解ができないタイプ (AA型、GA型) の患者は、分解できるタイプ (GG型) に比べて、貧血 (骨髓不全) 発症が早く、特にAA型患者は、生まれてすぐに貧血と白血病の前段階の状態がみられた。

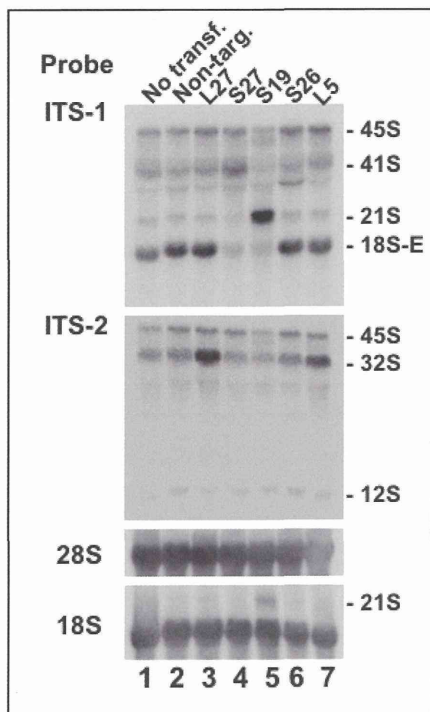


図3. RPL27とRPS27のノックダウンによるrRNAのプロセッシングの障害

ITS-1とITS-2プローブを用いてノーザンブロット法で解析すると、*RPS27*をノックダウンした細胞では41S pre-rRNAが、*RPL27*をノックダウンした細胞では、18S-E pre-rRNAが蓄積していることが明らかになった。

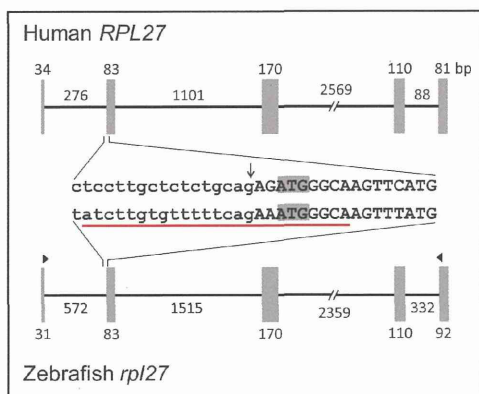


図4. ヒトとゼブラフィッシュの *RPL27* 遺伝子の構造

上段にヒト、下段にゼブラフィッシュの構造を示した。グレーのボックスはエキソン、黒の実線はイントロンを示している。中央には各遺伝子の第1イントロン（小文字）と第2エキソン（大文字）の配列の一部を示した。矢印はヒトで新たに変異が同定された部位、グレーの網掛けは開始コドンを示している。また、逆転写PCRで用いたプライマーを矢尻で示した。赤の下線部はスプライシングを阻害するモルフォリノオリゴ（MO）が結合する配列を示す。

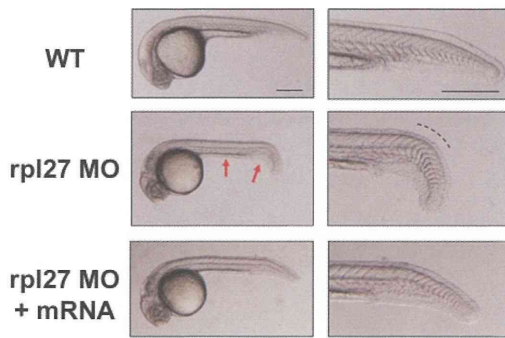


図 5. *rpl27* MO 注入胚、*rpl27* mRNA 同時注入胚の形態形成

受精後 25 時間の野生型（上段）、*rpl27* MO 注入胚（中段）、合成 *rpl27* mRNA 同時注入胚（下段）を胚全体と尾部に分けて示した。赤の矢印と黒の破線は、不完全な卵黄伸長部の形成と尾部の屈曲を示す。これらの表現型は、合成 *rpl27* mRNA を同時に注入することで回復した（下段）。注入した MO の濃度は 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。スケールバーは 250 μm 。

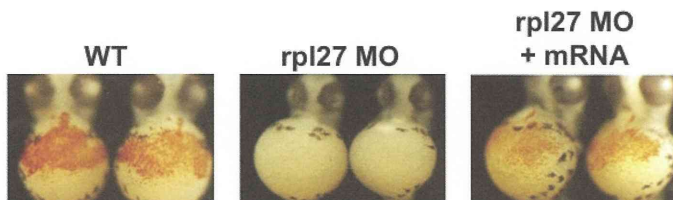


図 6. ヘモグロビン染色による血球の確認

受精後 25 時間の野生型（左）、スプライシング抑制胚（中央）、合成 *rpl27* mRNA 同時注入胚（右）のヘモグロビン染色を示した。スプライシング抑制胚では血球数の顕著な減少が見られたが、合成 *rpl27* mRNA の同時注入により、血球数の回復がみられた。注入した MO の濃度は 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

Ⅱ. 分担研究報告

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データ・遺伝子解析

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： 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。希少疾患である遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データの解析や遺伝子変異については、東北大学が拠点として解析している。最も代表的な遺伝性鉄芽球性貧血は、赤血球におけるヘム合成系の初発酵素である赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素（*ALAS2*）の変異により発症する X 連鎖性鉄芽球性貧血（*XLSA*）であるが、既知の遺伝子に変異が認められない症例も複数存在し、その発症機序は十分に解明されていない。今回、新たに 2 例の遺伝性鉄芽球性貧血症例を見出し、登録・解析を行った。

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。先天性鉄芽球性貧血は、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的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

難治性疾患克服事業「遺伝性鉄芽球性貧血の診断基準と治療法の確立」班から引き続き行っている全国調査で見出された症例・家系について既知の鉄芽球性貧血の原因遺伝子の変異解析を行う。既知の遺伝子変異が認められない家系については、「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」班において次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行う。この解析において候補遺伝子が見出された場合は、本班でその機能解析を行う。

（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

本年度の一例目の新規症例は、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。

二例目は 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。

D. 考察

いずれの症例も臨床的には遺伝性鉄芽球性貧血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。一例目は 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、二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。

E. 結論

今回、新たな遺伝性鉄芽球性貧血症例を見出した。今後、新規変異遺伝子の解析を進める予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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].
- 2) 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.

- 3) Fujiwara T, Harigae H. Pathophysiology and genetic mutations in congenital sideroblastic anemia. *Pediatrics International* 2013;55:675-679.
- 4) 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.
- 5) 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.

2. 学会発表

- 1) 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, ストックホルム).
- 2) 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, ストックホルム).
- 3) 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).
- 4) 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).

- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

Fanconi 貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

研究分担者 矢部みはる（東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学 准教授）

研究要旨：DNA 架橋剤添加による染色体脆弱検査と骨髄不全症を含む臨床症状および京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室における FA 遺伝子のゲノムシーケンスより、東海大学における総計 80 例の日本人 FA 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。京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室にて解析を行った日本人 FA 患者 75 人の ALDH2 (アセトアルデヒドの分解酵素) 遺伝子解析の結果、骨髄不全は AA 群、GA 群、GG 群の順に早く発症し、特に AA 群では生後早期より重症な血球減少と形態異常を呈する症例を認めた。

A. 研究目的

Fanconi 貧血 (FA) は、染色体不安定性と種々の身体異常と小児期に発症する骨髄不全、白血化や高発がんを特徴とする稀な遺伝性骨髄不全症であり、遺伝的に異なる 16 種類の群に分類されるが、日本での遺伝子群の疫学データはほとんどない。日本人の FA 遺伝子群の疫学解析を行い、骨髄不全症、骨髄異形成症候群・白血病などの血液悪性疾患や固形がんの臨床像やメカニズムについても検討を加える。

B. 研究方法

末梢血リンパ球への DNA 架橋剤添加による染色体脆弱検査、FANCD2 モノユビキチン化の障害と臨床症状を基本としてスクリーニングを行い、新規 FA 患者の各種サンプル (末梢血リンパ球、骨髄および皮膚線維芽細胞、骨髄細胞) につき可能な限り試料保存を行う。

1. 遺伝子解析

1) 既知の遺伝子が同定されない FA 各種サンプル (末梢血リンパ球、骨髄および皮膚線維芽細胞、骨髄細胞) については、小島班と連携した次世代シーケンスによるエクソーム解析を行い、京都大学放射線生物研究センター高田穰研究室にて変異の同定を行う。

2) Multiplex Ligation-dependent Probe

Amplification (MLPA) を用いて、FANCA の変異検出を上記検体のリンパ球および皮膚・骨髄線維芽細胞にて確認する。

2. ALDH2 遺伝子解析

FA が確定された症例で、京都大学放射線生物研究センター高田穰研究室との共同研究で、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 法により行い、臨床症状との照合解析を行う。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」を順守し、研究対象者に対する人権擁護を基本とし、インフォームドコンセントに基づいた科学的にも倫理的にも妥当な研究の計画と実施している。説明同意書には提供試料 (血液、骨髄、皮膚) の確認項目、検体の使用および保存中止請求書類も加えた。また、平易な文面で記載された小児用の説明書も作成し、家族だけではなく患児の理解や同意を得る努力が行われている。

C. 研究結果

東海大学における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。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。

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Exon27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。

京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室にて解析を行った日本人FA患者75人におけるアルデヒド代謝に関わる重要な酵素であるALDH2遺伝子型の分布は、健常日本人の分布と差を認めなかった。骨髄不全はAA群、GA群、GG群の順に早く発症し、有意差を認めた。特に、AA群の5症例では出生直後から1年以内に輸血依存の重症な血球減少が進行し、3症例では3系統血球に顕著な形態異常を認めた。一部の深部臓器(心、腎)の合併は有意にAA群、GA群に多かった。

D. 考察

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出来、今後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の少なくとも片アレルが検出され、極めて有用と考えられた。

また、ALDH2などのFA原因遺伝子とは異なる新しい視点から、骨髄不全との関連が証明され、病態の解明と新規治療につながることを期待される。

E. 結論

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、京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室等との共同研究により日本人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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.

2. 学会発表

- 1) 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).*
- 2) Yabe M, Hira A, YabeH, 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).

- 3) 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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

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 年度に行った全国調査により把握された 22 例の CDA 症例を対象として二次調査と遺伝子検索を行った。14 例について遺伝性解析を行い、2 例で CDAN1 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 SPTA1 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。また、今年度は CDA の診療ガイドラインを作成した。

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するが、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

CDA の全国調査により把握された症例を対象として二次調査と中央遺伝子診断を開始した。14 例について遺伝子解析を行い、2 例で CDAN1 の変異が、1 例で SEC23B の変異が見つかった。なお、次世代シーケンサーを用いた解析により、臨床的に CDA と診断された 1 例において SPTA1 遺伝子の変異がみられた。これは通常、遺伝性橢円赤血球症でみられる異常であり、興味深い。

本年度は本疾患の診療ガイドラインを作成した(別紙)。

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未だに不明である。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。現に、臨床的に CDA と診断された症例で通常は遺伝性橢円赤血球症でみられる SPTA 遺伝子の変異が見つかった。

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。

共同研究者：土居崎小夜子、小島勢二(名古屋大小児科)、多賀崇(滋賀医大小児科)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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; 92:1-9.
- 3) 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.

- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) Hasegawa D, Hama A, Nozawa K, Sakaguchi H, Yabe M, Ito E, Ito M, Kojima S, Nakahata T, Manabe A. Hematological and morphological characteristics of inherited bone marrow failure syndromes (IBMFS). 第75回日本血液学会総会(2013年10月11-13日, 札幌).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の遺伝子診断

研究分担者 小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授）

研究協力者 土居崎小夜子（名古屋大学医学部附属病院小児科学）

研究要旨：日本小児血液学会（現日本小児血液・がん学会）は、平成 21 年 2 月より、再生不良性貧血（AA）、骨髄異形成症候群（MDS）および先天性造血不全症候群（CBFS）を対象とした中央診断を開始した。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、聖路加国際病院）で、骨髄病理標本を 1 施設（名古屋第一赤十字病院）で行っている。中央診断症例を中心に集積された Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) 20 例において、同意を得た後、遺伝子診断を行い、3 例に I 型の責任遺伝子の変異を確認した。遺伝子変異が確認されなかった 12 症例については、次世代シーケンサーによる新規責任遺伝子の探索を行い、4 例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。遺伝性貧血の診断は必ずしも容易ではなく、中央診断、遺伝子診断を行うことによりその診断の精度が上昇したと考えられる。

A. 研究目的

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。I型、II型、III型、分類不能型の4病型に分類され、近年I型の責任遺伝子*CDANI*と、II型の責任遺伝子*SEC23B*が同定された。III型の責任遺伝子は同定されていない。本研究では、日本小児血液・がん学会の中央診断および疾患登録事業の一環として、本疾患を包括的に登録するとともに、新たに遺伝子診断法による診断精度の向上と、新規責任遺伝子の探索を行う。

B. 研究方法

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。

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。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を超音波破碎により断片化し、試料を識別する6塩基のBarcode配列を付与したのち、12試料を混合し、常法に従って液相ハイブリダイゼーションにより全エクソン配列を濃縮した。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。

(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を守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても患者検体の匿名化を図る。検体の採取にあたっては、患者および家族から事前に十分な説明を行い、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、倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

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。20例中3例に遺伝子変異を確認し、3例ともI型の責任遺伝子 *CDAN1* の変異 (2例が ex26 c.3503 C>T (p. Pro1129Leu)、1例が ex2 c.552_553insG (P185fs)、 ex12 c.A1910G (N598S)) であった。

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

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。

E. 結論

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. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S. Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. *Int J Hematol*. 2013 Jan;97(1):20-29.
- 4) 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.
- 5) 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, Japan Childhood Aplastic Anemia Study G. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. *Blood* 2013 Jan 31;121(5):862-863.
 - 6) 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.
 - 7) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, 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. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet.* 2013 Nov;45(11):1293-9.
 - 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, Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood* 2013 Oct 31;122(18):3206-9.
2. 学会発表
海外
- 1) 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).
 - 2) 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).
 - 3) 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).
- 国内
- 1) 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).
 - 2) 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).
 - 3) 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).

- 4) 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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし