

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

重症先天性溶血性貧血の新規病因遺伝子の同定：*KLF1* 遺伝子

研究分担者 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）

研究要旨：原因不明の先天性溶血性貧血 8 症例についてその病因を検討した結果、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。全例とも変異 *KLF1* の複合ヘテロ接合体であった。*KLF1* 異常症の臨床像は新生児期重症早発黄疸および赤血球輸血を必要とする新生児溶血性疾患であり、半数以上がその後赤血球輸血依存性の重症慢性溶血性貧血を呈した。今後、上記の病態を呈する症例には、*KLF1* 遺伝子検査が診断に肝要と考えられた。

A. 研究目的

著明なHbFの増加、赤血球ピルビン酸キナーゼ（PK）活性の低下を伴う原因不明の先天性溶血性貧血 8 症例について病因解析を行った。

B. 研究方法

免疫学的機序による先天性溶血性貧血が否定されたタイ人 8 症例について、以下の検査方法を用いて赤血球寿命短縮の原因を解析した。

- 1) Eosin 5'-maleimide (EMA) 結合能
- 2) 赤血球酵素活性測定
- 3) Hb分画および等電点電気泳動
- 4) サラセミア遺伝子検査 (Gap PCR)
- 5) *KLF1* 遺伝子解析

(倫理面への配慮)

個人データは生体試料を採取した共同研究機関であるタイMahidol大学医学部小児科学教室において、検体研究実施者以外には知られないように匿名化し、個人データの管理・保護に務めた。また、倫理審査委員会で承認された研究計画書に基づき作成された説明文書・同意文書を用いて同意を得た提供者のみを対象とした。

C. 研究結果

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網赤血が必要であり、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。初診時の血液所見を表1に示す。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。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。

表1 8例の血液所見とHb分画

| Pt# | Hb (g/dl) | MC V(fl) | MCH (pg) | Ret (%) | HbF (%) | HbA ₂ (%) |
|-----|--------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------------------|
| 1 | 3.0 | 80.1 | 28.1 | 6.0 | 16.2 | 3.1 |
| 2 | 5.9 | 65.9 | 21.4 | 5.0 | 16.6 | 3.0 |
| 3 | 5.2 | 74.0 | 21.0 | 11.0 | ND | ND |
| 4 | 6.5 | 70.6 | 21.7 | 10.0 | 5.5 | 7.3 |
| 5 | 3.4 | 81.0 | 24.8 | 10.0 | 29.0 | 4.6 |
| 6 | 6.6 | 71.0 | 22.3 | 10.1 | 49.8 | 2.4 |
| 7 | 5.7 | 67.0 | 21.2 | 11.0 | 54.6 | 2.2 |
| 8 | 5.4 | 75.0 | 24.7 | 10.0 | 19.0 | 10.0 |

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 (γ4) および Hb Portland I (ζ2γ2) 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ましたが、家系内・外の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の増加を説明しうる 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。

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 |

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。

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 |

D. 考察

*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の二つめの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

先天性溶血性貧血の新規病因遺伝子として、*KLF1*遺伝子を同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) Viprasakit V, Ekwattanakit S, Riolueang 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].

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.

2. 学会発表

- 1) 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, 広島). 日本小児科学会雑誌 2013;117:1346.
- 2) 羽賀洋一, 三井一賢, 小嶋靖子, 佐藤真理, 松裏裕行, 関根孝司, 館野昭彦, 菅野仁, 小原明, 佐地勉. アスコルビン酸ト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, 広島). 日本小児科学会雑誌 2013;117:431.
- 3) 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).

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

ファンconi貧血の遺伝子解析

研究分担者 高田 穰（京都大学放射線生物研究センター 教授）

研究要旨：東海大矢部みはる博士との共同研究で、日本人ファンconi貧血（FA）患者の遺伝子解析を進めた。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、今年度、論文発表した。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。

A. 研究目的

ファンconi貧血（FA）は、骨髄不全、奇形、白血病、固形腫瘍などを呈し、まれながら、その重篤な症状と診断治療法の確立の遅れから、特に小児の臨床上重大な問題となっている。典型的な症例では外見上の特徴からも診断が可能な場合もあるが、非典型例、成人発症の軽症例、また遺伝子のリバージョンによるモザイク症例などでは、診断に至らず見逃されて化学療法時に重篤な副作用を発症するなどの可能性も指摘されている。

最近の研究の進展により、FAはDNA損傷への細胞応答欠損を基盤として発症する「ゲノム不安定性症候群」のひとつであることが明らかとなった。FA症例においては、16種類におよぶ数多い原因遺伝子の異常により、DNA損傷応答や修復において重要な機能をもつFA経路の機能が欠損し、DNA障害の蓄積によって造血幹細胞不全、発がんなどの重篤な症状を引き起こすと考えられる。しかし、その病態の詳細は未だ十分理解されたとはいえず、骨髄移植以外、本質的な治療法の開発には至っていない。

FA遺伝子異常は、日本人症例においてはまだあまり解析されておらず、16種の遺伝子異常についてもその相対的頻度などは、FANCAが多数を占める事以外、明らかにされていない。本研究班では、日本におけるFAと関連病態が疑われる患者の臨床材料の原因遺伝子を同定し、既知の16種のFA遺伝子のいずれが変異しているのかを明らかにし、新規遺伝子変異の同定を目指すこととした。

また、最近マウスのFAモデルにおいて、アルデヒド代謝酵素ALDH2とのダブルノックアウトが作製され、白血病の進行が強く促進されるなどの興味深い表現型が報告された。さらに、造血幹細胞において、数多いAldehyde dehydrogenaseの内でも、ALDH2の発現が優位であることも見出され、FAの病態におけるアルデヒド毒性の役割が注目されている。このような疾患病態に対して、遺伝学的知見からの解明を試みた。

最終的には、患者材料を用いて、FAの迅速な診断法と治療法の開発に貢献することを目指した。

B. 研究方法

今年度は、主に東海大学矢部みはる博士からのFA患者のサンプルからゲノムを分離し、京都大学小川研究室に送付して次世代シーケンサーによるエクソーム解析を依頼した。

エクソーム解析の結果に基づき、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。

ALDH2遺伝子型については、九州大学医学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。

（倫理面への配慮）

本研究計画は、「ファンconi貧血と関連病態の原

因遺伝子解析」として京都大学 医の倫理委員会に申請し、G434 号として承認を受けている。矢部みはる博士からの検体は京大・東大への送付時にすべて匿名化され、佐々木コレクションの検体も JCRB へのデポジット時に匿名化を完了している。

C. 研究結果

1. 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、頻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ので、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。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、奇形などが挙げられる。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。

2. FA 患者の原因遺伝子の解析

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。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。

D. 考察

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、③ALDH2 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 における長期停止などの測定が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所存である。

E. 結論

日本人 FA 患者の遺伝学的解析により、病態の本質におけるアルデヒドによる DNA 損傷の重要性が明らかとなった。また、日本人 FA 患者に欧米における解析では見出されていない新規遺伝子の変異が存在する可能性がある。今後の詳細な検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.

- 2) 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.
- 3) 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.

2. 学会発表

- 1) 高田 穰. 「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—」. 日本血液学会プロGRESS教育講演 (2013年10月11-13日, 札幌).
- 2) J Unno, A Itaya, M Taoka, K Sato, J Tomida, W Sakai, T Ikura, T Isobe, H Kurumizaka, M Takata. 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).

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

Diamond Blackfan 貧血の簡易迅速大欠失解析法の検討

研究分担者 浜口 功（国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長）

協力研究者 倉光 球（国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員）

研究要旨：Diamond-Blackfan 貧血（DBA）の原因遺伝子の欠失の q-PCR による簡易迅速同定法をこれまで伊藤班において構築してきた。本年度では、ダイレクトシーケンス法、SNP アレイ、次世代シーケンサーによる解析でも依然として変異不明の DBA 検体について q-PCR 欠失解析を行った。その結果、29 例中の 3 症例（それぞれ RPL35A が 1 例、RPS17 が 1 例、RPS19 が 1 例）で DBA 原因遺伝子の欠失が同定出来た。このことから本法のような 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た。

A. 研究目的

これまでの厚生労働科学研究・伊藤班において、新規に開発した同期的に増幅する q-PCR primer セットでの DBA の遺伝子コピー数解析法により、DBA の原因遺伝子の欠失を簡易・迅速に同定し、日本の DBA では既知の原因遺伝子の欠失が約 10% で認められることが明らかにした（Blood 2012）。

近年、ゲノム配列解析技術が急速に発展し、日本の DBA 患者検体においても同様に伊藤班においてエキソーム解析や SNP アレイ等のゲノム解析が勢力的に進められているところである。

我々は、次世代シーケンサー等で DBA 遺伝子変異が不明のままである DBA 患者検体について、q-PCR で遺伝子コピー数解析を行うことで、全ゲノム解析で取りこぼしている可能性のある比較的小さい遺伝子領域の欠失の同定を試みた。

B. 研究方法

DBA 患者ゲノム DNA は、弘前大学小児科伊藤悦朗教授により患者末梢血から精製・収集された検体を使用した。

同期 q-PCR は、PCR サイクルで同期増幅する Primer セットを用い、RPL5, L11, L35A, RPS7, S10, S14, S17, S19, S24, S26 について遺伝子コピー数解析を実施した。

（倫理面への配慮）

DBA 患者の原因遺伝子解析に関する研究は、国立感染症研究所の倫理審査委員会の承認の上で実施した。

C. 研究結果

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。

D. 考察

DBA 原因遺伝子の欠失を同定した 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シング法では、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。

E. 結論

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検討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トリーを増加させより一層効果的に実施できるよう検討する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan Wang, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012;119(10):2376-84.

2. 学会発表

- 1) 倉光球. Diamond Blackfan 貧血の分子病態. 第 13 回血液フォーラム 21-造血不全 招待講演 (2013 年 5 月 18 日, 東京).

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

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

研究分担者 大賀正一（九州大学大学院医学研究院周産期・小児医療学 教授）
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）

研究要旨：原因不明の先天性貧血の母子 3 組 6 名に赤血球酵素活性と遺伝子解析（Sanger 法および全エクソーム解析）を行い、5 名に ribosome 蛋白遺伝子変異を同定して、先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan 貧血：DBA）の確定診断を得た。貧血児の 2 名には、それぞれ母と同じ RP 遺伝子変異を確認した。このうち DBA を疑う貧血外症候を有したのは、貧血が最重症の母 1 名（*RPL11* 変異）のみであった。DBA の遺伝子診断が確定した母 2 名（*RPS19* および *RPS7*）は、新生児貧血とプレドニゾロンの反応性から同疾患が臨床的に疑われていたが明らかな奇形徴候を認めていなかった。本研究により、DBA の母に同変異による DBA 児と変異のない健常児を確認することが出来た。次世代シーケンス（NGS）解析が、ヒトリボゾーム病の診断に有用であることが示された。

A. 研究目的

先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan 貧血 DBA）のほとんどは 3 か月までに臨床診断されるが、特徴的な奇形徴候のない例は確定診断が難しい。さらに、プレドニゾロンの反応性も様々で、日本の疫学調査では約 1/3 が治療依存または抵抗性となる（Int J Hematol 79(1): 22-30, 2004）。幼少期に本症として加療され成人した母の次世代に関する情報は極めて少ない。臨床的に DBA として治療された 3 家系の母子に全エクソーム解析を行い、その診断における有用性を検討した。

B. 研究方法

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（山口大 湯尻先生、佐賀大 西先生、永井先生担当）を対象に、①赤血球酵素活性測定スクリーニング（赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）[IU/gHb]/赤血球還元型グルタチオン濃度（GSH）[mg/dlRBC]）、②Sanger 法などによる Ribosome 蛋白（RP）遺伝子解析（伊藤・浜口研究室協力）を行い、さらに、③原因遺伝子検索のため、母子の末梢血より高分子 DNA を抽出し、Illumina 社 HiSeq2000 シーケンサーを用いて、

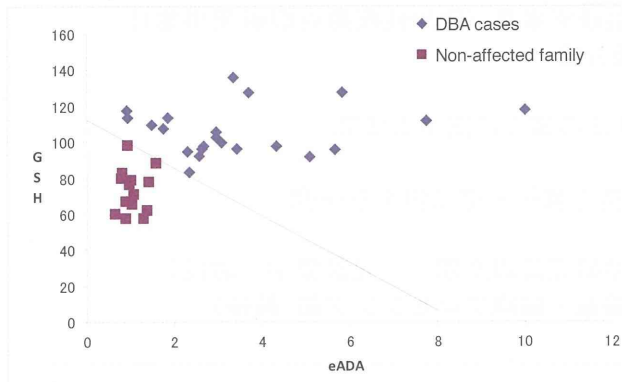
全エクソーム解析（小島・小川/吉田研究室協力）を実施した。母子の表現型（症候、検査成績および臨床経過）と遺伝子型について比較検討した。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析は、各共同研究施設の倫理委員会の承認を受け（九州大学 488-00）、対象患者とその家族に同意書を取得して行った。必要に応じて、臨床遺伝医療部において遺伝カウンセリングを行った。

C. 研究結果

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。



0.937 × eADA + 0.0702 × GSH - 7.9044 > 0 のとき DBAと判別

図1 eADA/GSH 活性による DBA の鑑別と判別式

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。

表1 DBA 3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)

D. 考察

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5%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。

今回、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出来ない。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。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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 (in press).
- 3) Akizawa Y, Kanno H, Kawamichi Y, Matsuda Y, Ohta H, Fujii H, Matsui H, Saito K. Enhanced expression of myogenic differentiation factors and skeletal muscle proteins in human amnion-derived cells via the forced expression of MYOD1. *Brain Dev.*

2013;35:349-55.

- 4) 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.
 - 5) Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolueang 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).
 - 6) 井上普介, 大賀正一. 未熟児貧血 日本臨床別冊「血液症候群 I」 2013;pp. 401-404.
 - 7) 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 I」2013;pp.311-313.
 - 8) 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 I」 2013;pp.308-310.
 - 9) 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 I」2013;pp.306-307.
 - 10) 菅野仁. ヘキソキナーゼ異常症. 日本臨床別冊「血液症候群 I」2013;pp.274-277.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 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).
 - 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 54th ASH Annual Meeting and Exposition (December 7-10, 2013, New Orleans, LA, USA).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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 (2013 年 4 月 19-21 日, 広島).
- 6) 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 (2013 年 4 月 19-21 日, 広島).
- 7) 宮岡統紀子, 亀井大悟, 木全直樹, 秋葉隆, 新田孝作, 菅野仁, 武市智志, 山本雅一. ビタミン C 大量投与により急性溶血発作と AKI を発症したグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 異常症患者に対し HDF を施行し透析離脱した一例. 日本透析医学会雑誌 2013;45 (Suppl.1) : 902.
- 8) 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 教育セッション 3 赤血球系疾患 (2013 年 11 月 29 日, 福岡).
- 9) Wang R, Yoshida K, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Toki T, Kudo K, Kanazaki 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 11-13 日, 札幌).
- 10) Sato T, Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Yoshida K, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Morio T, Ohga S, Ohara A, Kitoh T, Kudo K, Kojima S, Ogawa S, Hamaguchi I, Ito E. Frequent mutations in the RPS17 gene in Japanese DBA patients. 第 74 回日本血液学会学術集会 (2012 年 10 月 19-21 日, 京都).
- 11) 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).
- 12) 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).
- 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

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

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：先天性造血不全性貧血、遺伝性貧血は稀であり、診断法の確立や病態解明研究には疫学データベースの構築が必要である。これまで小児血液・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、遺伝性貧血の症例把握に努めた結果、2006～2012年に診断されて登録された647例の造血障害症例から、新規診断Diamond-Blackfan貧血症例は54例、特発性赤芽球癆は36例であった。また2008年～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。遺伝性溶血性貧血は年間60～80例であり、遺伝性球状赤血球症とヘモグロビン異常症が多い。また、学会の再不貧MDS形態中央診断事業と協力し、中央診断による新規診断症例の登録も増加している。本研究班により診断の手引きが整備され情報が発信されていること、遺伝子診断の体制が整い潜在性の新規診断症例の増加が予想される。

A. 研究目的

【背景】

遺伝性貧血は稀少疾患であり、診断法や治療開発には疫学データベースの必要性が高い。小児血液・がん学会疾患登録事業調査結果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、DBAを始めとする遺伝性貧血の症例把握に努めた。

【目的】

本邦の遺伝性貧血症例を悉皆性高く収集して疫学データベース構築する。小児血液学会（現 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た。これを基盤とした遺伝性貧血の診断法・治療法開発を目指す。

B. 研究方法

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。

（倫理面への配慮）

研究計画は、小児血液学会臨床研究審査委員会の倫理審査承認を得た。

C. 研究結果

2006～2012年診断登録症例数を表に示す（表）。

- 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。表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例である。
- b. 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。
- c. 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。
- d. 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。
- e. 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。

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。

今年は、初めて遺伝性溶血性貧血の登録数を収集した。赤血球酵素異常症は診断検査が困難な場合が多く、また、ヘモグロビン異常症は見逃されている可能性がある。外国人居住者や外国人との婚姻が増加するに従い、従来日本には稀であった遺伝性溶血性疾患が、今後増加する可能性がある。

E. 結論

悉皆性をもち、臨床情報で裏打ちされた遺伝性貧血の疫学データベースが構築された。

F. 研究発表

1. 論文発表

研究期間に本研究の成果に関する論文発表なし。

2. 学会発表

研究期間に本研究の成果に関する学会発表なし。

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

(表)

| 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. Dyserthropoietic 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 |
| Thalassemia | No data | . | . | . | 18 | 16 | 9 |
| other hemoglobinopathy | No data | . | . | . | 0 | 0 | 0 |

As of June 2013

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

Diamond Blackfan 貧血の遺伝子解析

研究分担者 照井君典（弘前大学医学部附属病院小児科 講師）

研究要旨：Diamond Blackfan 貧血（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が、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。機能解析の結果、*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り、これらの遺伝子の変異が DBA の原因になっていることが示唆された。

A. 研究目的

Diamond Blackfan 貧血（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が、我が国の DBA 患者の約 50%は、原因遺伝子が不明である。本研究の目的は、本邦の DBA 患者の原因遺伝子を明らかにし、病態を解明することである。

B. 研究方法

末梢血から DNA を抽出し、DBA で遺伝子変異が報告されている 8 遺伝子（*RPS19*、*RPS24*、*RPS17*、*RPL5*、*RPL11*、*RPL35a*、*RPS10*、*RPS26*）と 5q-症候群の原因遺伝子 *RPS14* を解析した。最初に high resolution melt（HRM）解析で遺伝子変異の有無をスクリーニングし、異常の検出された検体を直接シーケンス法で解析した。

この検索によっても原因遺伝子を同定出来なかった臨床検体について、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析を行った。ヒト全エクソン領域をベイトと呼ばれる RNA ライブラリーを用いて溶液中でキャプチャーし、イルミナ社の高速シーケンサー HiSeq2000 で網羅的な解析を行った。得られた遺伝子異常は、サンガーシーケンスにより確認した。

リボソーム RNA（rRNA）のプロセッシングにおける新規原因候補遺伝子の役割を明らかにするために、赤芽球系細胞株 K562 に siRNA を導入して当該遺伝子をノックダウンし、pre-rRNA の発現に対する影響をノーザンブロット法で解析した。

（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に従い、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、患者および家族に十分な説明を行い文書による同意を得たのち、検体を連結可能匿名化して解析を行った。

C. 研究結果

DBA110 例の臨床検体を用いて 8 個の既知の DBA 原因遺伝子を HRM 解析と直接シーケンス法で解析し、48 例に RP 遺伝子の変異を同定した。変異の見つからなかった 62 例に定量的 PCR 法を用いた DBA 遺伝子コピー数解析と SNP アレイ解析を行い、12 例に RP 遺伝子の欠失を見出した。

原因遺伝子の同定されない残りの 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、DBA の病因になると考えられる新規 RP 遺伝子（*RPL27*、*RPS27*）を持つ 2 症例を見出した。1 症例目は、*RPS27* のフレームシフト変

異 (c.90delC, p.Tyr31ThrfsX5) を持つ 2 歳の女兒 (孤発例) であった。貧血以外の身体異常は伴わず、ステロイドに対する反応は良好であった。2 症例目は、*RPL27* のスプライス変異 (c.-2-1G>A) を持つ 1 歳女兒 (孤発例) であった。先天性心疾患 (ASD, PS) を合併し、ステロイドにはよく反応した。両親に変異はなく、de novo 変異であった。機能解析の結果、*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 1)。

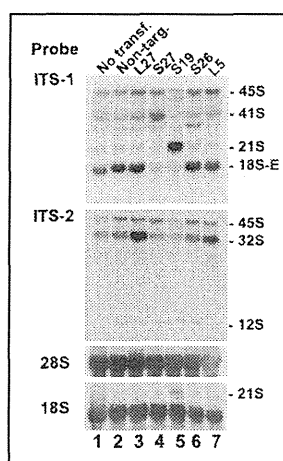


図 1. *RPL27* と *RPS27* のノックダウンによる rRNA のプロセッシングの障害。

ITS-1 と ITS-2 プロブを用いてノーザンプ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、32S pre-rRNA が蓄積していることが明らかになった。

D. 考察

我が国の DBA は、まだ 50%以上が原因遺伝子不明である。今回の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、新規原因候補遺伝子として 2 つの RP 遺伝子 (*RPL27* と *RPS27*) を同定した。これらの変異は de novo 変異で、いずれも正常の蛋白が発現出来ない変異であった。機能解析の結果、これらの変異が 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り、これらの遺伝子の変異が DBA の原因になっていることが示唆された。

E. 結論

全エクソン解析により、DBA の新規原因候補遺伝子 *RPS27* および *RPL27* を見出した。機能解析の結

果から、これらの遺伝子の変異が DBA の原因になっていることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Coenen EA, Zwaan CM, Reinhardt D, Harrison CJ, Haas OA, de Haas V, Mihál V, De Moerloose B, Jeison M, Rubnitz JE, Tomizawa D, Johnston D, Alonzo TA, Hasle H, Auvrignon A, Dworzak M, Pession A, van der Velden VH, Swansbury J, Wong KF, Terui K, Savasan S, Winstanley M, Vaitkeviciene G, Zimmermann M, Pieters R, van den Heuvel-Eibrink MM. Pediatric acute myeloid leukemia with t(8;16)(p11;p13), a distinct clinical and biological entity: a collaborative study by the International Berlin-Frankfurt-Munster AML-study group. *Blood* 2013;122:2704-13.
- 2) Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Kigasawa H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Excess treatment reduction including anthracyclines results in higher incidence of relapse in core binding factor acute myeloid leukemia in children. *Leukemia* 2013;12:2413-6.
- 3) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraiishi 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;45:1293-9.
- 4) Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A,

- Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Kiyokawa N, Isoyama K, Mizutani S, Hara J, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Appropriate dose reduction in induction therapy is essential for the treatment of infants with acute myeloid leukemia: a report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. *Int J Hematol.* 2013;98:578-88.
- 5) Nagai K, Ochi F, Terui K, Maeda M, Ohga S, Kanegane H, Kitoh T, Kogawa K, Suzuki N, Ohta S, Ishida Y, Okamura T, Wakiguchi H, Yasukawa M, Ishii E. Clinical characteristics and outcomes of chédiak-Higashi syndrome: A nationwide survey of Japan. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60:1582-6.
- 6) 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;121:4377-87.
- 7) 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. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* 2013;121:3181-4.
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) Yoshida K, Shiba N, Shiraishi Y, Shimada A, Terui K, Kato M, Okuno Y, Nagata Y, Kon A, Yoshizato T, Matsunawa M, Chiba K, Tanaka H, Sanada M, Miyano S, Ito E, Hayashi Y and Ogawa S. Whole exome sequencing reveals clonal evolution pattern and driver mutations of relapsed pediatric AML. 第55回アメリカ血液学会 (2013年12月7日-10日, 米国・ニューオーリンズ).
- 3) Shimada A, Yamashita Y, Tomizawa D, Tawa A, Watanabe T, Yokozawa T, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Moriya Saito A, Fujimoto J, Horibe K, Oki K, Hayashi Y and Adachi S. Poor prognosis with different induction rate was observed in children with acute myeloid leukemia and FLT3-ITD according to the ITD/WT allelic ratio: a result from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. 第55回アメリカ血液学会 (2013年12月7日-10日, 米国・ニューオーリンズ).
- 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

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

研究分担者 古山和道（岩手医科大学大学生化学講座分子医化学分野 教授）

研究要旨：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 遺伝子の第 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。

A. 研究目的

遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として、現在まで 7 つの遺伝子が同定されているが、先天性鉄芽球性貧血のうち約 4 分の 1 の症例では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。本研究では、このような症例では特定の遺伝子の発現制御領域の異常が発症原因となるのではないかと仮定し、実際にその様な機序で発症する可能性の有無につき検討する事を目的とした。

B. 研究方法

1) 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。

2) 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。

(倫理面への配慮)

東北大学医学部倫理委員会で承認された実験計画に基づいて患者およびその家族に対する説明を行い、書面で対象者の了解を得た後に採血を行った。

C. 研究結果

1) 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 130 bp 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。

2) 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。

D. 考察

ヒトALAS2遺伝子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の発症原因であるものと考えられた。

E. 結論

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考えられる事から、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。

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* (in press).

- 2) Furuyama K and Yamamoto M. Differential regulation of 5-aminolevulinic acid synthase isozymes in vertebrates. Ferreira GC, Kadish KM, Smith KM, Guillard R edited, *Handbook of Porphyrin Science* 2013; 27:p.2-41.

2. 学会発表

- 1) 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).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

CDAのデータ管理、診断基準の確立

研究分担者 多賀 崇（滋賀医科大学小児科 講師）

研究要旨：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疾患群である。従来 CDA に関する知見は主に西欧から得られているのみで、本邦での実態は明らかにされていなかった。本研究班においてわが国における CDA の実態を把握し、そのデータ管理、診断基準の確立、さらには有効な治療法の開発の基盤となる研究を行う。

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、我が国における CDA の実態を明らかにし、診断基準の確立、さらには有効な治療法の開発の基盤となる研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

分担研究者（多賀）が以前行ったCDAの全国調査を参考に作成した調査表をまとめるとともに、中央遺伝子診断への協力、検体送付などを依頼する。小児血液専門医のみならず、新生児科医、一般小児科医、血液内科医等にも学会発表や論文による啓蒙を行い、さらなる症例の蓄積に努める。

（倫理面への配慮）

調査の基本となる日本小児血液学会の疾患登録事業として、学会倫理審査委員会で承認されている。また、調査に関する倫理審査は、共同研究者である眞部淳の所属する聖路加国際病院、遺伝子診断に関する倫理審査は、検査実施施設である名古屋大学でそれぞれ承認されている。

C. 研究結果

分担研究者（多賀）が以前行った CDA の全国調

査を参考に該当症例に対し、中央遺伝子診断への協力、検体送付等を依頼した。また、成人領域を含む本疾患が疑われる患者相談があった際に、診断支援をするとともに中央診断ならびに遺伝子診断への協力を呼びかけた。遺伝子検査で次世代シーケンサーによる解析がなされた症例で、CDA 以外の症例の可能性が判明した場合は、該当疾患遺伝子の解析も進めた。

当科で follow 中であった CDA 疑いの男性は既知の CDA 関連遺伝子の異常は見られなかったが、次世代シーケンスの結果、先天性溶血性貧血が疑われ、現在精査中である。

D. 考察

本班研究のサポートをもとに、本邦での CDA の症例収集、精査を行ってきたが、既知の遺伝子異常を持つ症例は極めて少ない。

自験例のように、他の血液疾患と誤診されている症例も相当数あると考えられ、引き続き詳細な調査・研究が必要である。

E. 結論

わが国のCDAの実態の正確な把握と、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。