

201324063B

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 24～25 年度 総合研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 26（2014）年 3 月

# 目 次

I. 平成 24 ～ 25 年度構成員名簿	1
II. 総合研究報告書	
遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究	3
伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授)	
III. 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	29
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	33
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	37
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	41
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. ファンconi 貧血の遺伝子解析	45
高田 穰 (京都大学放射線生物研究センター 教授)	
6. Diamond Blackfan 貧血の簡易迅速大欠失解析法の検討	51
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)	
7. 新生児に発症する先天性貧血の病態と診断に関する研究	53
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)	
石村 匡崇 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学 助教)	
滝本 智仁 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学 特任助教)	
原 寿郎 (九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授)	

8. 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 . . . . .	61
小原 明 (東邦大学医療センター大森病院輸血部 教授)	
9. Diamond Blackfan 貧血の遺伝子解析 . . . . .	65
照井 君典 (弘前大学医学部附属病院小児科 講師)	
10. ALAS2 遺伝子の機能喪失型変異の同定方法の確立 . . . . .	69
古山 和道 (岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授)	
11. CDA のデータ管理、診断基準の確立 . . . . .	73
多賀 崇 (滋賀医科大学小児科 講師)	
12. Fanconi 貧血の診断・診断ガイドラインの作成 . . . . .	75
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)	
13. ゼブラフィッシュを用いた DBA の遺伝子解析 . . . . .	79
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)	
 IV. 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性造血障害に関する調査研究班 特発性造血障害疾患の診療参照ガイド 平成 25 年度改訂版 Diamond-Blackfan 貧血診療の参照ガイド . . . . .	       81
Fanconi 貧血診療の参照ガイド . . . . .	109
遺伝性鉄芽球貧血診療の参照ガイド . . . . .	133
Congenital Dyserythropoetic Anemia 診療の参照ガイド . . . . .	155
 V. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	175
 VI. 研究成果の刊行物・別冊 . . . . .	189

# I . 平成 24～25 年度構成員名簿

## 研究班の構成

	氏 名	所属・役職	研究項目
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	研究総括, DBA の臨床データ・遺伝子解析
研究分担者 (五十音順)	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	SA の臨床データ・遺伝子解析
	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	FA の臨床データ解析
	真部 淳	聖路加国際病院小児科 医長	CDA の臨床データ解析
	小島 勢二	名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授	中央診断、CDA のデータ管理
	高田 穰	京都大学放射線生物研究センター 教授	FA の遺伝子解析
	浜口 功	国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長	DBA の遺伝子解析
	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	ガイドラインの作成、疫学調査
	小原 明	東邦大学医療センター大森病院輸血部 教授	データベースの構築、疫学調査
	照井 君典	弘前大学医学部附属病院小児科 講師	DBA の遺伝子解析
	古山 和道	岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授	SA の遺伝子解析
	多賀 崇	滋賀医科大学小児科 講師	CDA のデータ管理、診断基準の確立
	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	FA の診断・診断ガイドラインの作成
	森尾 友宏 (平成 24 年度)	東京医科歯科大学発生発達病態学分野 准教授	DBA の診断法の開発
	剣持 直哉 (平成 25 年度)	宮崎大学フロンティア科学実験総合センター 教授	DBA の遺伝子解析

## Ⅱ. 総合研究報告



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。また、診療ガイドラインの改訂を行った。主な成果は以下の通りである。

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。総計80例の日本人ファンconi貧血（FA）患者の解析を行った。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検出された。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。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。全エクソン解析などによっても原因遺伝子が同定出来ないSA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変異が存在する事を明らかにした。20例のCDAについて遺伝子解析を行い、3例ともI型の責任遺伝子 *CDAN1* 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12例中5例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。そのうち、3例において通常は遺伝性楕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。

平成22年度に作成した診療ガイドを本研究の成果をもとに平成25年度に改定した。さらに、アジアを含む海外との共同研究を視野に、各疾患診療ガイドの英語版を作成した。

【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：弘前大学医学部附属病院講師

古山和道：岩手医科大学教授

森尾友宏：東京医科歯科大学大学院准教授

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：弘前大学医学部附属病院助教

### 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）、通常のシーケ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ケ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あげることが期待できる。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ケ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つ。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。レビューは骨髓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、骨髓病理標本を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濃度を測定し、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）。また、DBA同期q-PCR解析の精度向上を目指して各プライマーの補正係数の算出を試みた。

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・骨髓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*CDAN1* 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) SAの原因遺伝子*ALAS2*の解析

### ① 変異を有する*ALAS2* cDNAの作成

*ALAS2* タンパク質のカルボキシル末端の33アミノ酸を欠失するような変異と*XLSA*患者で同定されたカルボキシル末端の33アミノ酸領域内のミスセンス変異（V562A, M567I, S568G）を正常*ALAS2* cDNAに“PrimeStar Max site directed mutagenesis kit” (Takara Bio社)を用いて導入し、各変異タンパク質をコードするcDNAを作成した。

### ② *in vitro* 酵素活性の測定

上記の変異cDNAを用いて、変異*ALAS2* タンパク質のC末端側にIntein-tagとChitin binding domain (CBD)を融合タンパク質として発現させ、CBDが結合するChitinカラムを用いて精製した後

に、dithiothreitol (DTT) を作用させて Intein の自己切断機能を誘導する事により、目的タンパク質を溶出した。

### ③ *in vivo*における酵素の安定性の検討

次に、*in vivo*における酵素の安定性を評価する実験系を、Invitrogen 社の Flp-In T-Rex system を用いて構築した。これらの細胞を用いて野生型や変異型の ALAS2 酵素を発現させた後にシクロヘキシミド (CHX) を培養液中に添加して翻訳を抑制し、その後経時的に試料を調製して ALAS2 タンパク質の量がどの様に変化するかを Western blot 法で検出する事により、ALAS2 タンパク質の細胞内におけるおよその半減期を測定した。

### ④ 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。

### ⑤ 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④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。

### 7) 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 (小島および各研究拠点)。

### 8) 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、通常の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)。

### 9) 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。移植プロトコー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、倫理委員会で承認されている。

## C. 研究結果

### 1) 疫学調査

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症例であった。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。

DBA；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。DBAと区別して、特発性赤芽球癆と診断した症例の詳細は調査途中であるが、殆どが乳幼児期の診断であった。

2008～2012年の期間のFAは27例、鉄芽球性貧血は4例、CDAは2例であった。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。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。

### 2) 中央診断

先天性造血不全症の疑い例が発生すると日本小児血液がん学会の登録システムを用いて疾患登録が行われる。末梢血や骨髓血塗抹標本を名古屋大学（小島）と聖路加国際病院（真部）で中央診断し、先天性造血不全症が強く疑われる場合は各疾患拠点でさらに詳細な診断を行う。既に、この4年間で1000例の造血不全症の診断が行われ、その10%以上が先天性造血不全であった（表1）。

表1. 造血不全症の中央診断（2009～2013）

疾患名	症例数
Diamond-Blackfan 貧血	28
Fanconi 貧血	21
鉄芽球性貧血	3
Shwachman-Diamond 症候群	12
先天性角化不全症	8
Congenital dyserythropoietic 貧血	8
先天性血小板減少症	11
先天性好中球減少症	7
先天性骨髓不全症疑い	17
AA/RCC/RCMD/hepatitis related	514
Advance MDS/AML	97
MPD	116
その他	158
計	1000

### 3) バイオマーカーの解析

RP遺伝子変異を同定した22症例と家系内の健常者14例のeADA活性とGSH値を用いて、サポートベクターマシン（SVM）法によって判別式を求め、患者および家系内非罹患者を検討した。SVM法によるDBA22症例および家系内非罹患者14例の判別結果を図1に示す。

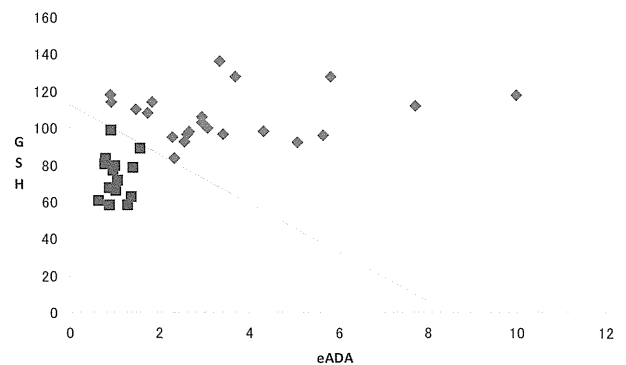


図1. SVM法によるDBAおよび家系内非罹患者の判別結果。判別式は、 $0.937 \times eADA(\text{IU/gHb}) + 0.0702 \times GSH(\text{mg/dL RBC}) - 7.9044 > 0$  の時、DBAと判別となった（青菱形：DBA症例、紫正方形：家系内非罹患者）。

この判別式を用いて、遺伝子変異が同定されているDBA患者22症例を解析したところ、eADA活性は17例、GSHは21例が陽性となり、判別式では全例がDBAと判定出来た。

### 4) 既知の遺伝子の解析及び新規原因遺伝子の機能解析

各研究拠点（DBA（伊藤）、FA（矢部）、SA（張

替)、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行った。既に、DBA 110 検体、SA 14 検体、FA 109 検体、CDA 18 検体を収集した。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、「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、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を進めた。これまでに、家族を含めて 100 検体以上の全エクソンシーケンス解析を行い、新規の原因候補遺伝子が各疾患で複数見出された。

#### ① DBA

健常人検体を用いてそれぞれの Primer の増幅効率がより一致するように Primer 毎の補正係数を算出した。算出した補正係数で欠失検体の PCR 結果を補正したところ、DBA の欠失検体では補正前の欠失遺伝子の Primer のサイクル数の 1 サイクルのずれの有意差が  $1 \times 10^{-3}$  であったところ補正後には  $1 \times 10^{-7}$  と P 値で 4 桁程度の特異性が上昇した。

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 intron 3 より 3' 下流の遺伝子コピー数は正常であり、5'UTR から exon 1,2,3 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。

変異の見つからなかった DBA 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、上記の 3 例も加えて、計 12 例に RP 遺伝子の大欠失を見出した (Kuramitsu et al. Blood 2012)。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 例で 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 6 つのミスセンス変異 (*RPL3L*, *RPL7L1*, *RPL8*, *RPL13*, *RPL18A*, *RPL31*) と 2 つの 1 アミノ酸欠失 (*RPL6* と *RPL14*) をそれぞれ 1 例ずつに認めたが、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、明らかに 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 遺伝子に焦点を絞り機能解析を行った。*RPS27* のフレームシフト変異 (c.90delC, p.Tyr31ThrfsX5) は、2 歳の女兒 (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 歳女兒 (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 2)。

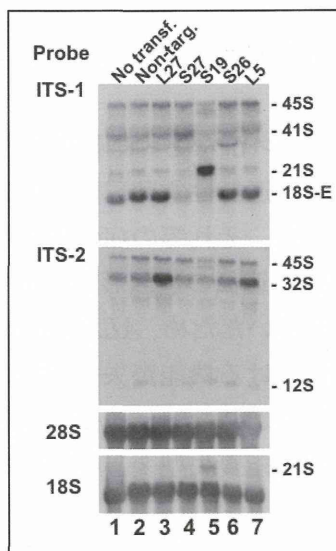


図 2. *RPL27* と *RPS27* のノックダウンによる rRNA のプロセッシングの障害. ITS-1 と ITS-2 プローブを用いてノーザンブロット法で解析すると、*RPS27* をノックダウンした細胞では 41S pre-rRNA が、*RPL27* をノックダウンした細胞では、32S pre-rRNA が蓄積していることが明らかになった。

## (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 3)。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。

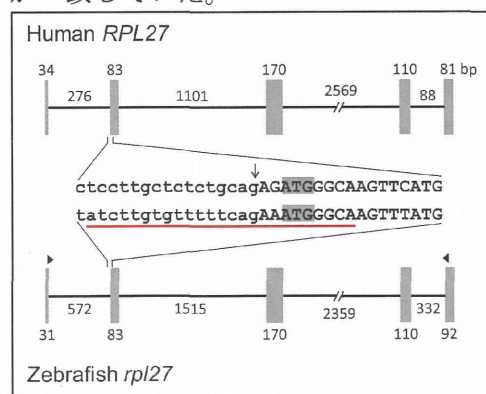


図 3. ヒトとゼブラフィッシュの *RPL27* 遺伝子の構造. 上段にヒト、下段にゼブラフィッシュの構造を示した。グレーのボックスはエキソン、黒の実線はイントロンを示している。中央には各遺伝子の第 1 イントロン (小文字) と第 2 エキソン (大文字) の配列の一部を示した。矢印はヒトで新たに変異が同定された部位、グレーの網掛けは開始コドンを示している。また、逆転写 PCR で用いたプライマーを矢尻で示した。赤の下線部はスプライシングを阻害するモルフォリノオリゴ (MO) が結合する配列を示す。

### (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 3. 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 4. 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 4. 下段)。

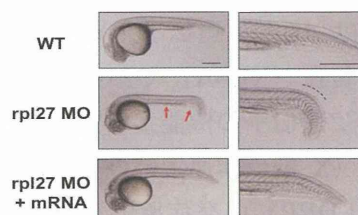


図 4. *rpl27* MO 注入胚、*rpl27* mRNA 同時注入胚の形態形成. 受精後 25 時間の野生型 (上段)、*rpl27* MO 注入胚 (中段)、合成 *rpl27* mRNA 同時注入胚 (下段) を胚全体と尾部に分けて示した。赤の矢印と黒の破線は、不完全な卵黄伸長部の形成と尾部の屈曲を示す。これらの表現型は、合成 *rpl27* mRNA を同時に注入することで回復した (下段)。注入した MO の濃度は 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。スケールバーは 250  $\mu\text{m}$ 。

### (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 5. 左)。*rpl27* MO 注入胚では、顕著な血球の減少がみられた (図 5. 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 5. 右)。

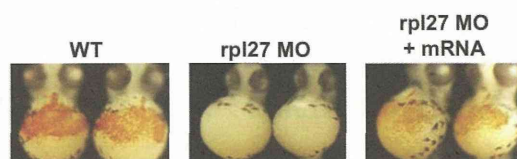


図 5. ヘモグロビン染色による血球の確認. 受精後 48 時間の野生型 (左)、スプライシング抑制胚 (中央)、合成 *rpl27* mRNA 同時注入胚 (右) のヘモグロビン染色を示した。スプライシング抑制胚では血球数の顕著な減少が見られたが、合成 *rpl27* mRNA の同時注入により、血球数の回復がみられた。注入した MO の濃度は 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。



## ② SA

(1) 既知の原因遺伝子に変異が認められなかった家系について全エクソン解析を行ったところ、2つの候補遺伝子、*APEX2*と*NUDVF1*が同定された。この遺伝子について、ヒトCD34陽性細胞を用いた*in vitro*赤血球分化系にてその発現を解析したところ赤血球分化に伴いその発現が認められ、赤血球造血に機能していることが示唆された。遺伝子改変マウスなどを用いた機能解析を進めている。さらに、既知の原因遺伝子の変異を認めなかった新規症例（孤発例、男児）の全エクソン解析から候補遺伝子として*SLC39A8*を同定した。

(2) 遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として現在までに7つの遺伝子が報告されているが、そのうち最も頻度が高いのは*ALAS2*遺伝子変異によるX染色体連鎖鉄芽球性貧血(XLSA)である。しかしながら、近年、*ALAS2*遺伝子の機能獲得型変異がXLSAとは異なる疾患(X染色体連鎖優性発症型プロトポルフィリン症:XLDP)の発症原因となる事が報告され、さらには鉄芽球性貧血症例において組換えタンパク質の酵素活性を上昇させるような遺伝子変異が同定された。すなわち、*ALAS2*遺伝子に変異が同定された場合には、それが機能喪失型変異なのか、あるいは機能獲得型変異なのかを鑑別する方法を確立する必要が生じた。

### (a) *in vitro*における酵素活性の測定

変異型*ALAS2*タンパク質の酵素活性を測定したところ、カルボキシル末端の10アミノ酸を欠失した酵素(Del-C10)、M567I、S568G変異を有する組換えタンパク質の酵素活性は、野生型に比して明らかに低下していたが、カルボキシル末端の20(Del-C20)、または33アミノ酸(Del-C33)を欠失した酵素とV562Aの変異を有する酵素の活性は野生型に比べて同等以上に亢進していた。

### (b) *in vivo*における*ALAS2*タンパク質の半減期の測定

カルボキシル末端の33アミノ酸が欠失した変異体(delC33)とV562A、M567I、およびS568G変異酵素の細胞内における半減期を野生型と比較したところ、delC33、M567I、S568G変異酵素の半減期は野生型と比べて延長していたのに対し、Val562Ala

変異酵素の半減期は野生型と比較して短縮していた。

(3) エクソームシーケンス法などの網羅的方法で原因遺伝子を同定出来ない遺伝性鉄芽球性貧血患者が少なからず存在する事と、それ等の症例の中には伴性劣性(X染色体連鎖)遺伝の遺伝形式を示すと考えられる家系も存在していたため、*ALAS2*遺伝子の未知の発現制御領域における機能喪失型変異の存在を想定し、それに関わる新たな遺伝子発現調節領域の同定と同部における機能喪失型変異の検索を行った。

### (a) ヒト*ALAS2*遺伝子の新規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。

### (b) 遺伝性鉄芽球性貧血の症例における*ALAS2*新規エンハンサー領域の遺伝子変異の同定

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。さらに、検討可能であった症例では患者赤芽球中の*ALAS2* mRNAレベルが低下していた事などから、*ALAS2* int1GATAにおける変異はCSA発症の原因となるものと推察された(Kaneko K et al. Haematologica 2013)。



### ③ FA

皮膚異常かつ/または低身長のための症例は 20% に見られ、他の先天性骨髄不全症との鑑別は困難であった。染色体断裂試験ではリンパ球のリバージョン・モザイク例を含む体細胞モザイク例が 30% 近くに見られた。

次世代シーケンスによるエクソーム解析を行った 46 例を加えて、東海大学では総計 80 例の日本人 FA の解析を行った。2 例のリンパ球リバージョン・モザイク例を除いて、全例に DNA 架橋剤添加により染色体断裂が確認された。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 例確認されたが、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。さらに、15 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定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。

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欠失の検出が可能であった (66.3%)。

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 (図 6)。特に、AA 群の 5 症例では生後早期より重症な血球減少と形態異常を呈した。一部の深部臓器奇型 (心、腎) の合併は有意に AA 群、GA 群に多かった (Hira et al. Blood 2013)。

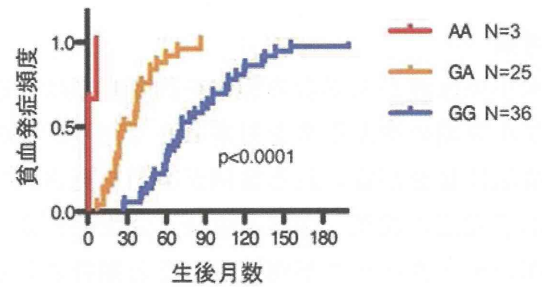


図 6. アルデヒド分解酵素遺伝子と FA の進行. アルデヒド分解が出来ないタイプ (AA 型、GA 型) の患者は、分解出来るタイプ (GG 型) に比べて、貧血 (骨髄不全) 発症が早く、特に AA 型患者は、生まれてすぐに貧血と白血病の前段階の状態がみられた。

### ④ CDA

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ところ 12 例中 5 例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。3 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。新規候補遺伝子として、12 例中 1 例で *USP42* が同定された。ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析を進めている。

### 5) 診療ガイドラインの作成

本研究班で得られた極めて精度の高い臨床情報に基づいて、各疾患の診療ガイドの改定を行った。また、DBA では新規バイオマーカーである GSH を加えた診断基準を作成し、これまで以上に精度の高い診断基準に改定した。症例数の多い DBA と FA については、推奨すべき移植プロトコールを含む治療ガイドラインを作成した。さらに、アジアを含む海外との共同研究を視野に、各疾患ガイドの英語版と共通のデータベースを構築するための登録シートを作成した。

#### D. 考察

日本小児血液がん学会形態中央診断事業は、診断困難な小児期の造血不全を対象にしており、この中から遺伝性貧血が疑われる症例が毎年発見されている。本研究班の成果（遺伝子診断）により、より精度の高いデータベースが構築されると期待される。さらに、本研究班の成果は順次日本小児血液・がん学会で発表され、シンポジウムも企画されて啓発活動が盛んである。診断の手引き、遺伝子診断の体制が整い更に潜在性の新規診断症例の増加が予想される。

しかし、遺伝子診断により確定診断出来た症例は、遺伝性貧血では50%以下であった。例えば、我が国のDBAは、まだ約50%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、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*変異であり、いずれも正常の蛋白が発現出来ない変異であった。今回、ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析により、その発現低下は貧血の原因になることが確認された。

同期増幅プライマーを用いたq-PCRによる遺伝子コピー数解析法は、遺伝子コピー数を2倍の差を1サイクルの差として検出する方法として開発されたものであるが、今回の補正によって、0.1サイクル程度のコピー数の僅かな差も検出可能であると考えられた。このことから本試験法を今回算出した補正值によって高精度化した場合、コピー数が正常である細胞がある程度混入しても遺伝子コピー数異常を捉えることが出来ると考えられる。よって、末梢血に正常細胞と疾患細胞が混在する疾患やその他の後天性の遺伝子異常が関与する疾患にも本試験法は応用可能であると考えられる。

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Mbに渡るような大欠失ではなく、数k~数十kb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。これまでの研究成果を総合すると、日本人のDBAの約10%に既知のRP遺伝子の欠失が存在すると考えられる。

欧米のグループから提唱されているDBA診断基準は、末梢血を用いた血液検査で大球性貧血、網赤血球数減少を認めた場合、特徴的な外表面奇形、HbF上昇、eADA活性高値または他の先天性骨髄不全症が否定出来ることの4項目のうち3項目が証明出来れば非古典的DBAと診断出来るとしている。eADA活性によるDBA診断はMean+3SDを超えたとき有意に上昇としているが、今回我々が検討したRPサブユニット遺伝子変異が同定されている22症例のDBAにおいて5例はeADA活性がM+3SDを超えておらず、その感度は約77%となり、既報とほぼ同じ結果となった。仮にeADA活性が高値を呈さない場合、患児が1歳未満であること、骨髄中赤血球頸前駆細胞の減少、RP遺伝子変異が同定されること、家族歴の存在などが診断根拠として必要になる。臨床的に1歳を超えたDBA疑い症例は存在し、約半数例にRP遺伝子が同定出来ないこと、さらに、弧発例が3/4近くを占める現状では、骨髄検査が必須となるが骨髄像による他の骨髄不全症候群の否定は専門医によってもしばしば困難である。昨年度我々は、GSHがDBAの新規バイオマーカーであることを明らかにし、eADA活性・GSHの同時測定がDBAの生化学的診断精度を向上させ、DBAを正確に診断出来ることを明らかにした。今後、DBAとの鑑別が臨床的に困難なdisease-controlをさらに検討し、DBAバイオマーカーとしてのGSH測定意義を明らかにしていきたい。

*ALAS2* 遺伝子はX染色体連鎖鉄芽球性貧血(XLSA)の最も頻度が高い原因遺伝子であるが、近

年、*ALAS2* 遺伝子の機能獲得型変異は X 染色体連鎖優性遺伝型プロトポルフィリン症 (XLDPP) の原因となる事が報告された。従って、本研究では機能喪失型変異と機能獲得型変異を鑑別する方法を確立する事を目的として研究を行った。今回の *in vitro* における酵素活性の測定結果から、*ALAS2* タンパク質のカルボキシル末端の 20~33 アミノ酸の欠失は、酵素活性を上昇させることが明らかとなった。また、V562A 変異体の酵素活性も上昇したことから、*ALAS2* タンパク質のカルボキシル末端は *ALAS2* の酵素活性を抑制する機能を有するものと考えられる。一方、M567I および S568G 変異は酵素活性を低下させることから、この部分の変異が全て酵素活性を上昇させる訳ではなく、*ALAS2* タンパク質のカルボキシル末端による酵素活性の制御機構はそれほど単純なものではないことが推察された。ただし、欠失に限定して考えると、カルボキシル末端の 20 アミノ酸を欠失させた場合でも、33 アミノ酸を欠失させた場合でも酵素活性は上昇することから、カルボキシル末端から数えて 20 アミノ酸以上 33 アミノ酸までの間でそれ以降を欠失する場合には、欠失開始部位に関係なく酵素活性は上昇するものと予想された。一方、細胞内における酵素の半減期は、V562A 変異でのみ短縮していたが、M567I、S568G および delC33 変異ではいずれも延長していた。半減期の延長又は短縮の機構については現在のところ明らかではないが、ミトコンドリア移行の阻害やミトコンドリア内における分解の亢進は半減期の短縮につながるものと考えられるので、その様な点も含めて更なる検討が必要と考えられる。

また、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。さらに、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。この結果は、全エクソン解析で有意な変異が認

められない遺伝性貧血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ことを示唆している。

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、日本人におけるデータの集積が必要である。本邦の FA 症例では染色体断裂のリバージョン・モザイクを含むモザイク例が多く遺伝子変異が末梢血では同定不可能な症例もあり、骨髓細胞や皮膚・骨髓線維芽細胞を含む解析を行うことにより、診断精度の向上が期待出来る。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、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、A 群と絞り込んでダイレクトシーケンス法に持ち込めるなど、診断の迅速化に繋げることができ、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、骨髓不全を中心とした FA の病態にアルデヒド代謝が大きな役割を果たすことが明らかとなった。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、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。

CDA と確定診断がついた症例は 20 例中、既知の責任遺伝子変異を認めた 3 例のみであった。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 5 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しており、貧血鑑別における遺伝子診断の重要性が再認識された。

## E. 結論

稀少遺伝性疾患である遺伝性貧血の遺伝子解析を含めた中央診断の体制が軌道に乗り、日本における遺伝性貧血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。特に、CDA のような極めて稀な疾患は中央診断登録システム、遺伝子変異解析システムを整備することで、初めて確定診断がつけられることが明らかになった。

DBA で既知の遺伝子の欠失が約 10% も存在す

ることを世界で初めて発見した。さらに、新規の DBA 原因遺伝子として、*RPL27* および *RPS27* を発見した。

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。

SA の最も頻度が高い原因遺伝子 *ALAS2* の第 1 イントロンに新たなエンハンサーを同定して、同部に機能喪失型の変異を有する遺伝性鉄芽球性貧血の家系が存在することを明らかにして報告した。

次世代シーケンサーによる解析を進めて行くことで遺伝性貧血の鑑別がより確かになるとともに、新たな責任遺伝子の発見が可能となった。

本邦における遺伝性貧血 (DBA、CSA、FA、CDA) について、これまでに類をみない大規模な解析結果が得られた。DBA で既知の遺伝子の欠失が約 10% も存在し、新規の原因遺伝子も同定した。さらに、*ALDH2* 遺伝子型と FA における骨髄不全症の発症との関連も証明され、非常に大きな成果があった。診療ガイドラインの作成については、DBA の新規バイオマーカーを加えた診断基準を作成することができ、大きな進歩があった。

## F. 健康危険情報

該当なし

## 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) Horino S, Sasahara Y, Sato M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Sato A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S. Selective expansion of donor-derived regulatory T cells after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. *Pediatr Transplant.* 2014; 18(1):E25-30.
- 6) Takata K, Sato Y, Nakamura N, Tokunaka M, Miki Y, Yukie Kikuti Y, Igarashi K, Ito E, Harigae H, Kato S, Hayashi E, Oka T, Hoshii Y, Tari A, Okada H, Mohamad AA, Maeda Y, Tanimoto M, Kinoshita T, Yoshino T. Duodenal follicular lymphoma lacks AID but expresses BACH2 and has memory B-cell characteristics. *Mod Pathol.* 2013;26(1):22-31.
- 7) Katayama K, Asano K, Ohkuma H, Terui K, Sasaki S, Sato T, Ito E, Komori T. A case of

- pediatric optic pathway oligodendroglioma presenting widespread invasion and dissemination in the cerebrospinal fluid. *Brain Tumor Pathol.* 2013. [Epub ahead of print].
- 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nuno H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of *NEMO* in T cells of patients with X-1 linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood* 2012; 119(23):5458-66.
  - 11) Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Kanazaki R, Park MJ, Kanno Y, Tanaka T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of *TRIB1* R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. *Blood* 2012;119(11):2608-11.
  - 12) 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.
  - 13) 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.
  - 14) 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].
  - 15) Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Tsukamoto H, Muroi K, Oshima K, Asami K, Takata M, Yamashita T, Kato S and Yabe H. Matched sibling donor stem cell transplantation for Fanconi anemia patients with T-cell somatic mosaicism. *Pediatric Transplant.* 2012;16:340-345.
  - 16) Maekawa K, Yoshimitu M, Fujiwara H, Matushita K, Kawada H, Hamada H, Suzuki S, Uozumi K, Ohtsuka M, Hanada S, Yabe M, Yabe H and Arima N. Successful allo-HSCT with a minimal myeloablative conditioning regimen in an adult patient with Fanconi's anemia. *Bone Marrow Transplantation* 2012; 47:159-160.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) 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.
  - 20) 矢部みはる. Fanconi貧血の診断と治療. 日本小



- 児科学会雑誌 2012;116:205-1212.
- 21) 矢部みはる, 矢部普正. リバージョン・モザイク型Fanconi貧血の診断と臨床. 日本小児血液・がん学会雑誌 2012;49:251-255.
- 22) 矢部みはる. 第6章 先天性再生不良性貧血: Fanconi 貧血. 新しい診断と治療のABC72/血液8 再生不良性貧血 最新医学社 2012;190-197.
- 23) 小島勢二, 矢部みはる. 骨髄不全症候群 (特発性造血障害): 診断と治療の進歩: 先天性骨髄不全症候群. 日本内科学会雑誌 2012;101:1977-1985
- 24) 矢部みはる. Fanconi貧血. 知っておきたい内科症候群 南江堂 2012;113-1104.
- 25) 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.
- 26) 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;45(8):942-946.
- 27) Sakaguchi H, Nakanishi K, Kojima S. Inherited bone marrow failure syndromes in 2012. *Int J Hematol.* 2013;97(1):20-29.
- 28) 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.
- 29) 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;92(3):431-8.
- 30) Kojima S. Treatment of acquired aplastic anemia in children. *Hematology* 2012;17 (Suppl 1):S11-14.
- 31) Kawabata H, Doisaki S, Okamoto A, Uchiyama T, Sakamoto S, Hama A, Hosoda K, Fujikura J, Kanno H, Fujii H, Tomosugi N, Nakao K, Kojima S, Takaori-Kondo A. A case of congenital dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. *Intern Med.* 2012 Apr; 51(8):917-920.
- 32) Shimada A, Takahashi Y, Muramatsu H, Hama A, Ismael O, Narita A, Sakaguchi H, Doisaki S, Nishio N, Tanaka M, Yoshida N, Matsumoto K, Kato K, Watanabe N, Kojima S. Excellent outcome of allogeneic bone marrow transplantation for Fanconi anemia using fludarabine - based reduced - intensity conditioning regimen. *Int J Hematol.* 2012; 95(6):675-679.
- 33) Yang W, Zhang P, Hama A, Ito M, Kojima S, Zhu X. Diagnosis of acquired bone marrow failure syndrome during childhood using the 2008 World Health Organization classification system. *Int J Hematol.* 2012; 96(1):34-38.
- 34) Asai D, Osone S, Imamura T, Sakaguchi H, Nishio N, Kuroda H, Kojima S, Hosoi H. Allo-SCT in a patient with CRMCC with aplastic anemia using a reduced intensity