

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。実際、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 *SPTA1* 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) Shiba N, Hasegawa D, Park M-j, Murata C, Matsubara A, Ogawa C, Yagasaki H, Manabe A, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y. *CBL* mutation in familial platelet disorder with propensity to acute myeloid leukemia (FPD/AML) patient in a Japanese pedigree with *RUNX1* Mutation. *Blood* 2012;119:2612-2614.
- 2) 多賀崇, 真部淳. Congenital Dyserythropoietic Anemia—現状と今後の課題—。日本小児科学会雑誌 2012;116: 1075-1080.
- 3) 真部淳. 本邦における骨髄不全症候群の現況。小児血液・がん学会雑誌 2012;49:249-250.
- 4) 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.

- 5) 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.
  - 6) 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.
  - 7) 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) Doisaki S, Kasashima N, Narita A, Sakaguchi H, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S, Kamiya T, Manabe A, Taga T, Kanno H. Molecular analysis of Japanese patients with congenital dyserythropoietic anemia (CDA). 小児血液・がん学会総会 (2012年11月30-12月2日, 横浜).
  - 2) 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). 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）  
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**

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。I型からIII型の3病型に分類され、近年I型の責任遺伝子 *CDAN1* と、II型の責任遺伝子 *SEC23B* と、III型の責任遺伝子 *KLF1* が同定された。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、症例の集積を図るとともに、責任遺伝子の探索をその目的とした。

**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。再生不良性貧血、骨髄異型性症候群、あるいは先天性造血不全症候群が疑われる症例が発生した場合は、研究参加施設から事務局に症例の登録が行われ、事務局からは各施設に登録番号を発行した。以後は、登録番号でやりとりを行い、匿名化を図った。中央診断およびそれに伴う検査については患者本人あるいは保護者の同意を取得した後に行った。骨髄および末梢血塗抹標本のレビューは名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科で、骨髄病理標本のレビュー

は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 *CDAN1* 遺伝子、II型については *SEC23B* 遺伝子、III型および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シング法により行った。既知の遺伝子変異がみつか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い、新規遺伝子の発見を目指した。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り回数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1000personal 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

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。

#### D. 考察

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

CDA のような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、始めて確定診断がつけられると考えられる。また、次世代シーケンサー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発見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, Kanazaki 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.
- 9) Kojima S. Treatment of acquired aplastic anemia in children. *Hematology* 2012 Apr;17 Suppl 1:S11-14.
- 10) 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.
- 11) 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 Jun;95(6):675-679.
- 12) 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 Jul;96(1):34-38.
- 13) 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 conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant* 2012 Aug;47(8):1126-1127.
- 14) 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 III-7. 先天性骨髄不全症候群. *日本内科学会雑誌* 2012;101(7):1977-1985.

## 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).
- 4) Kojima S. Therapeutic Advances in Treatment of Aplastic Anemia. **2nd Annual Updates on Breakthrough in Hematology** (Sep. 1, 2012. Bangkok, Thailand).
- 5) Sakaguchi H, Hama A, Wang X, Narita A, Doisaki S, Muramatsu H, Nakanishi K, Takahashi Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Hasegawa D, Manabe A, Ito M, Kojima S. Lymphocyte Telomere Length in Pediatric Aplastic Anemia, Refractory Cytopenia of Childhood, and Refractory Cytopenia with Multi-lineage Dysplasia. **6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood** (Nov. 7, 2012. Prague, Czech Republic).

#### 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, 王希楠, 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).
- 5) Sakaguchi H, Hama A, Muramatsu H, Narita A, Doisaki S, Takahashi Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Hasegawa D, Manabe A, Ito M, Kojima S. Telomere Length of Lymphocyte in Pediatric Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. **第74回日本血液学会学術集会** (2012年10月19日, 京都).
- 6) 土居崎小夜子, 成田敦, 坂口大俊, 村松秀城, 濱麻人, 中西康詞, 高橋義行, 小島勢二, 神谷尚宏, 真部淳, 多賀崇. Congenital dyserythropoietic anemiaにおける遺伝子診断. **第54回日本小児血液・がん学会学術集会** (2012年11月30日, 横浜).
- 7) 小島勢二. 全エクソン解析による先天性骨髄不全症候群に対する新規原因遺伝子の探索. **第54回日本小児血液・がん学会学術集会** (2012年12月2日, 横浜).

#### 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。3年間の研究で、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、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。さらに、矢部博士の症例を中心に京大小川研において行われたエクソーム解析のバリデーションを行い、日本人FA患者の分子疫学の一端を明らかにした。

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临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、発がん等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、明らかではない。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すこととした。

B. 研究方法

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、東大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、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。

(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・東大への送付時に全て匿名化されている。

## 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上がってきている。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。

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、アッ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ため、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 患者における分子疫学の一端を明らかにした。さらに、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。現在詳細な検討を進めている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Sato K, Ishiai M, Toda K, Furukoshi S, Osakabe A, Tachiwana H, Takizawa Y, Kagawa W, Kitao H, Dohmae N, Obuse C, Kimura H, Takata M, Kurumizaka H. Histone chaperone activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair. *EMBO J*.

2012 Jul 24;31(17):3524-36.

- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Sato K, Toda K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. *Nucleic Acids Res*. 2012 May 1;40(10):4553-61.
- 5) Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Tsukamoto H, Muroi K, Oshima K, Asami K, Takata M, Yamashita T, Kato S, Yabe H. Matched sibling donor stem cell transplantation for Fanconi anemia patients with T-cell somatic mosaicism. *Pediatr Transplant*. 2012 Jun;16(4):340-5.
- 6) Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, Fukagawa T, Takata M, Takisawa H, Kanemaki MT. Mcm8 and Mcm9 Form a Complex that Functions in Homologous Recombination Repair Induced by DNA Interstrand Crosslinks. *Mol Cell*. 2012 Aug 24;47(4):511-22.
- 7) Yan Z, Guo R, Paramasivam M, Shen W, Ling C, Fox D 3rd, Wang Y, Oostra AB, Kuehl J, Lee DY, Takata M, Hoatlin ME, Schindler D, Joenje H, de Winter JP, Li L, Seidman MM, Wang W. A ubiquitin-binding protein,

- FAAP20, links RNF8-mediated ubiquitination to the Fanconi anemia DNA repair network. *Mol Cell*. 2012 Jul 13;47(1):61-75.
- 8) Minami D, Takigawa N, Takeda H, Takata M, Ochi N, Ichihara E, Hisamoto A, Hotta K, Tanimoto M, Kiura K. Synergistic Effect of Olaparib with Combination of Cisplatin on PTEN-Deficient Lung Cancer Cells. *Mol Cancer Res*. 2013 Feb;11(2):140-8.
  - 9) Kobayashi M, Hayashi N, Takata M, Yamamoto K. NBS1 directly activates ATR independently of MRE11 and TOPBP1. *Genes Cells*. 2013 Mar;18(3):238-46.
  - 10) Ishiai M, Uchida E, and Takata M. Establishment of the DNA repair-defective mutants in DT40 cells. *Methods Mol Biol*. 2012;920:39-49.
  - 11) Kitao H, Nanda I, Sugino RP, Kinomura A, Yamazoe M, Arakawa H, Schmid M, Innan H, Hiom K, Takata M. FancJ/Brip1 helicase protects against genomic losses and gains in vertebrate cells. *Genes to Cells* 2011 Jun;16(6):714-27.
  - 12) Yamamoto KY, Kobayashi S, Kurumizaka H, Takata M, Kono K, Jiricny J, Takeda S, Hirota K. The involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011 Apr 19;108(16):6492-6.
  - 13) Guervilly JH, Renaud E, Takata M, Rosselli F. USP1 deubiquitinase maintains phosphorylated CHK1 by limiting its DDB1-dependent degradation. *Hum Mol Genet*. 2011 Jun 1;20(11):2171-81.
  - 14) Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Takata M, Enomoto T, Seki M. The role of SNM1 family nucleases in etoposide-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jul 8;410(3):568-73.
  - 15) Bell DW, Sikdar N, Lee KY, Price JC, Chatterjee R, Park HD, Fox J, Ishiai M, Rudd ML, Pollock LM, Fogoros SK, Mohamed H, Hanigan CL; NISC Comparative Sequencing Program, Zhang S, Cruz P, Renaud G, Hansen NF, Cherukuri PF, Borate B, McManus KJ, Stoepel J, Sipahimalani P, Godwin AK, Sgroi DC, Merino MJ, Elliot G, Elkahloun A, Vinson C, Takata M, Mullikin JC, Wolfsberg TG, Hieter P, Lim DS, Myung K. Predisposition to cancer caused by genetic and functional defects of Mammalian atad5. *PLoS Genet*. 2011 Aug;7(8):e1002245.
  - 16) Matsushita N, Endo Y, Sato K, Kurumizaka H, Yamashita T, Takata M, Yanagi S. Direct Inhibition of TNF- $\alpha$  Promoter Activity by Fanconi Anemia Protein FANCD2. *PLoS One*. 2011;6(8):e23324.
  - 17) Rosado IV, Langevin F, Crossan GP, Takata M, Patel KJ. Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Nov 13;18(12):1432-4.
  - 18) Fujinaka Y, Matsuoka K, Iimori M, Tuul M, Sakasai R, Yoshinaga K, Saeki H, Morita M, Kakeji Y, Gillespie DA, Yamamoto KI, Takata M, Kitao H, Maehara Y. ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity. *DNA Repair (Amst)*. 2012 Mar 1;11(3):247-58.
  - 19) Shigechi T, Tomida J, Sato K, Kobayashi M, Eykelenboom JK, Pessina F, Zhang Y, Uchida E, Ishiai M, Lowndes NF, Yamamoto K, Kurumizaka H, Maehara Y, Takata M. ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res*. 2012 Mar 1;72(5):1149-1156.
  - 20) Kitao H, Takata M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol*. 2011 Apr;93(4):417-24.
  - 21) Takata M. Guest editorial: fanconi anemia

and the DNA damage response. *Int J Hematol.* 2011 Apr;93(4):415-6.

2. 学会発表

- 1) Hira A, Yabe H, Matsuo K, Takata M, Yabe M. “Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients” 24<sup>th</sup> ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM (September 27-30, 2012 Denver, Colorado).
- 2) 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—. 第75回日本血液学会 プログレス教育講演 (2013年10月11~13日, 札幌).
- 3) Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. FANCD2 in chromatin anchors CtIP and regulates DNA end resection during crosslink repair. 25<sup>th</sup> 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

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

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を同定する q-PCR による簡易迅速法をこれまで伊藤班において構築してきた。本研究では、①Primer 毎の増幅効率を補完する補正值を導入することで、欠失の同定の精度を P 値における 3 桁程度の上昇が可能であることを示し特異性を向上させた。②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 欠失解析を行い、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%で認められることを明らかにした（Blood 2012）。

本研究では、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。

また、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

##### ・補正係数の算出

健常人より採取した PBMC からゲノム抽出キット（QIAGEN）を用いてゲノム DNA を採取し、これまでに同定した DBA の原因遺伝子に対する同期

増幅 PCR プライマーで q-PCR を行った。それぞれのプライマーの Ct 値について、平均的な増幅効率からの差を算出し、それぞれの増幅効率の傾向を数値化した。数値化した値をもとに増幅効率の差を補正する補正係数を算出した。算出法は、補正值 = 実測値 / 補正係数とした。

##### ・変異未知検体からの DBA 欠失同定

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

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 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

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できると考えられる。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 Mbps に渡るような大欠失ではなく、数 kb ~ 数十 kbps の比較的小さい領域の欠失であると想定される。

また、今回同定した 3 例ともダイレクトシーケンス法では、変異を同定出来ない検体であると考えられ、現時点では本解析法でのみ同定可能な変異であったと考えられる。

よって、同期増幅する Primer 群を使用した q-PCR

コピー数解析法は、様々な解析方法で変異が同定出来なかった患者検体に対しても一定の成果が期待出来る有効な手段であると考えられる。

変異同定率は 29 例中 3 例と少数であったが、日本やアジアの DBA の原因遺伝子群のそれぞれの変異の割合は欧米の割合とは異なることが示唆されており、今回のターゲット遺伝子に含まれていない欧米ではマイナーな遺伝子や近年日本で同定された新しい DBA 原因遺伝子等が、未同定検体の中に多く含まれている可能性がある。

#### 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、特異性が高いことに加えて、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ートリーを増加させより一層効果的に実施できるように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. 21-造血不全、Diamond Blackfan 貧血の分子病態. 第 13 回血液フォーラム招待講演 (2013 年 5 月 18 日, 東京).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

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）  
研究協力者 石村匡崇（九州大学大学院医学研究院成長発達医学 助教）  
瀧本智仁（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）

研究要旨：先天性貧血の診断と治療法の確立を目指して、母子の貧血3家系を含む患者群に赤血球酵素活性と遺伝子解析を行い、新生児貧血の病態生理を検討した。原因不明の先天性貧血の母子3組6名に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）と確定した。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名のみであった。他に、家族性橢円赤血球症、ジスキネジア合併球状赤血球症および鉄芽球性貧血の遺伝子診断を得た。新生児の鉄代謝と赤芽球の特性について、関連分子の動態と遺伝子発現を解析した。本研究により、新生児貧血の診断に赤血球酵素活性スクリーニングと全エクソーム解析が有用であることが示された。新生児の造血特性に応じた遺伝性貧血治療の確立が望まれる。

#### A. 研究目的

新生児には、母体の影響による多彩な造血不全症が存在する。TORCH などの胎内感染を除外しても、貧血が主徴となる稀少で異質な造血障害が存在し、その診断と治療は困難である。本研究では、出生後早期に発症する遺伝性貧血の診断と治療を確立するため、赤血球酵素活性スクリーニングと全エクソーム解析を用いて、これら新生児遺伝性貧血の診断における有用性を検討した。さらに、生理的黄疸と溶血のため貧血の鑑別が難しい新生児における鉄代謝と赤芽球特性を検討して、遺伝性貧血の診断と治療に有用な基礎データを集積した。

#### B. 研究方法

確定診断に至っていない先天性貧血の患者を A：先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan 貧血：DBA）疑いもしくはその臨床診断群、と B：溶血などを呈するそれ以外の先天性貧血群に分けて、①赤血球酵素活性測定、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の全エクソーム解

析（小島・小川／吉田研究室協力）を実施した。可能な症例には家族解析を進め、その表現型（症候・検査成績）と遺伝子型について比較検討した。鉄代謝マーカーである好中球 Gelatinase 関連 lipocalin（NGAL）の血清濃度を ELISA 法にて評価し、新生児・未熟児における生理的動態を検討した。また、新生児・未熟児の有核赤血球における免疫関連分子/遺伝子の発現と刺激応答性についてその特性を解析した。

（倫理面への配慮）

先天性貧血の遺伝子解析による研究は、各共同研究施設の倫理委員会の承認を受け、対象患者とその家族に同意書を取得して行った。家族解析例には、必要に応じて九州大学病院小児科および臨床遺伝医療部、東京女子医科大学病院臨床遺伝医療部にて遺伝カウンセリングを行った。

#### C. 研究結果

- 1) 原因不明の貧血症例の家族解析
- A. DBA 疑いまたは臨床診断群

当科と関連施設において、新生児または生後 3 か月以内に DBA を疑われたか、またはその臨床診断を受けた 19 名に酵素活性測定と遺伝子解析を行った。*RPS19* 変異 4、*RPL11* 変異 3、*RPL5* 変異 1、*RPS7* 変異 2 および *RPL17* 欠失 1 を同定した。他 2 名のうち、1 名は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) の上昇から DBA がほぼ確定的で遺伝子解析を準備中、もう 1 名は酵素活性スクリーニング中である。上記のうち血縁関係にあったものは、母子各 1 名の 3 家系 6 名であった。この 6 名に全エクソーム解析を行った (表 1)。

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、この母子に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 [frame-shift]) 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新生児期に DBA と診断され、その後プレドニゾロンがしばしば投与されていた。25 歳の時出生した男児にも奇形徴候はなかったが、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、新生児期に DBA と診断され、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 家系母子には、他の RP 遺伝子に変異を認めなかった。

表 1 DBA の遺伝子診断が確定した 3 家系

患者	臨床診断	奇形徴候	治療	eADA*	GSH*	確定変異
家系1 母	DBA	あり	PSL+CSA依存	輸血依存のため不能		RPL11
家系1 男児	DBA疑い	明らかでない	なし	未検査		変異なし
家系2 母	DBA	明らかでない	PSLしばしば	未検査		RPS19
家系2 男児	DBA	あり	輸血依存	輸血依存のため不能		RPS19
家系3 母	DBA	明らかでない	PSL離脱	2.51	85.0	RPS7
家系3 女児	DBA	明らかでない	PSL依存	1.64	93.6	RPS7

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

eADA 活性は著明な貧血の発症前急性リンパ性白血病、eGSH 活性は Fanconi 貧血 (*FANCA* 異常) 患者にそれぞれ上昇を確認し、疑陽性が問題となった。eADA/GSH に網赤血球数を組み合わせれば、診断精度が上がることを示された。家系 1 の母の臨床像に酷似し DBA との鑑別を要した患者は、 $\delta$  アミノレブリン酸脱水素酵素 (5-ALA) 活性の低下と骨髓鉄芽球から鉄芽球性貧血と臨床診断されていた。この患者に全エクソーム解析を行ったところ、RP 遺伝子変異はなく、*ALAS2* 変異 (p.R181C) が同定され、遺伝子診断が確定した。

## B. それ以外の先天性貧血群

新生児期に輸血が必要な溶血性貧血を呈し、その後軽度の溶血が持続して次第に楕円赤血球が出現した同胞例は、臨床的に遺伝性熱変形赤血球症 (hereditary pyropoikilocytosis; HPP) が疑われた。しかし、全エクソーム解析により、*ANK1* p.N1452fs、*SPTB* p.D1721E という異なる 2 つの膜骨格遺伝子のフレームシフトおよびミスセンス変異のヘテロ接合体であることが判明した。 $\beta$  スペクトリンは N 末端 (CD1-301)、反復配列 (106 アミノ残基\*17 回) および C 末端 (CD2104-2137) で構成される。17 回の反復配列のうち、14-15 番目 (CD1667-1876) がアンキリンとの結合ドメインを構成する (Ipsaro JJ, et al. Blood. 2010;115:4093-101.)。  $\beta$  スペクトリン変異の遺伝子型と表現型の関連については現在までに以下の事実が判明している。すなわち、C 末端および C 末端に近い部分のミスセンス変異 (Ala2053Pro、Arg2064Pro) やフレームシフト変異 (fs2077X) などは遺伝性楕円赤血球症 (HE)、Arg1756X は遺伝性球状赤血球症 (HS)、Ala2018Gly や Leu2025Arg など第 17 番目の反復配列に生じる変異が遺伝性熱変形赤血球症 (HPP) として最重症型になる。また、反復配列の境界付近 (linker) の変異

は  $\beta$  スペクトリンの立体構造に重大な影響を与えるため、より重症になる (Johnson CP, et al. Blood. 2007;109: 3538-43.)。今回同定した *SPTB* p.D1721E は  $\beta$  スペクトリン-アンキリン結合を障害し、さらにアンキリン自体の大きな構造変化を伴うため、赤血球膜の安定性を著しく損ない、HPP 様の臨床症状をきたしたと考えられた。

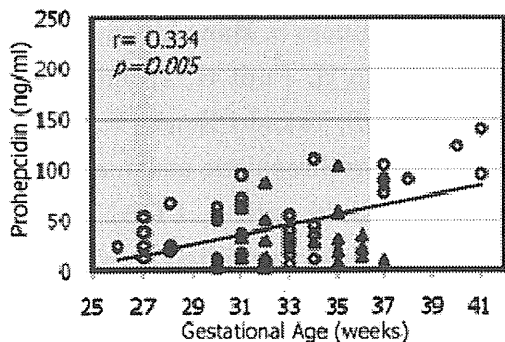
ジスキネジアを伴った球状赤血球症の孤発例に *SPTB* と *VPS13C* 多型などを確認したが、臨床像との関連については検討を続けている。溶血性貧血と肝障害の女兒は、パルボウイルス B19 初感染を契機に発症した Wilson 病として遺伝子診断も確定した。

## 2) 新生児の鉄代謝と赤芽球の特性に関する研究

### A. 鉄代謝マーカー

経口除鉄療法が造血細胞移植の困難な輸血依存の新生児・小児に応用され始めた。プレドニゾロン±シクロスポリン療法に抵抗性の DBA 患者も、輸血と経口除鉄療法により造血細胞移植を回避出来るようになってきた。新生児の除鉄療法の標準化を目指して、出生後の鉄代謝マーカーの生理的動態を検討した。健常新生児および早期産児の血清 NGAL が、週数とともに増加することを初めて明らかにした。この動態はプロヘプシジンと類似し有意な相関 (相関係数 0.009,  $p=0.009$ ) を認めた。

#### ① プロヘプシジン



#### ② NGAL

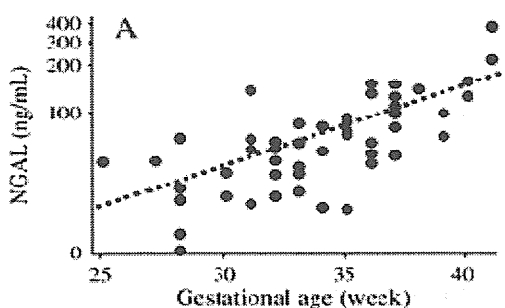


図1 新生児の①プロヘプシジンと②NGALの動態

### B. 新生児赤芽球特性の解析

臍帯血単核球から、CD36 陽性 GlycophorinA 陽性赤芽球分画細胞を磁気ビーズとセル・ソーターを用いて 98–99% の高純度で単離した。この細胞集団を外來抗原、低酸素などによる刺激培養後、反応性と各種サイトカイン関連分子の発現を解析した。新生児の赤芽球は成人赤芽球とは異なる遺伝子発現プロファイルを示唆する結果を得て、解析を継続中である。

### D. 考察

先天性造血不全症の原因遺伝子が近年次々に同定され、遺伝子診断が可能となった。一方、DBA や Fanconi 貧血のように、頻度が高く多彩な臨床像を呈し、さらに確認する解析領域の広い原因遺伝子群による疾患については、Sanger 法による遺伝子診断に限界がある。本研究により、出生後に貧血単独で発症する患児は先天感染を除外して、非溶血群 (DBA 疑い) と溶血群に分け、全エクソーム解析に進めることが効率的であることが明らかになった。

DBA に対しては、eADA/GSH/網赤血球数を組み合わせたバイオマーカーによるスクリーニングを行い、全エクソーム解析に進めれば、早期診断が可能で鑑別すべき他の先天性貧血の除外も確定する。欠失の少ない 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る。Congenital Dyserythropoietic Anemia (CDA) のように溶血と無効造血が混在する遺伝性貧血のスクリーニングは検討課題であろう。

今回、奇形徴候が明らかでなく、輸血依存のため酵素活性スクリーニングが難しく、さらに Sanger 法で診断されなかった 3 家系の母子の遺伝子診断が全エクソーム解析にて明らかになった。精度の高さは Sanger 法の見逃しを有効にカバーしうることも示された。臨床的には貧血の程度も様々な DBA の母が、分娩も可能で健常児の出生も確認された。新生児期から発症する遺伝性貧血の臨床診断には全エクソーム解析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。全エクソーム解析による家族解析を行う場合、目的以外の変異を同定する可能性があるため、十分な説明と遺伝カウンセリングが必要である。



新生児期に発症する溶血性貧血は、赤血球酵素活性、赤血球 eosin-5-maleimide (EMA) 結合能、Hb 分画などによるスクリーニングが有効であるが、わが国では溶血性貧血の遺伝的背景が明らかでなく、診断不能例も少なくない。Neuroacanthocytosis など神経疾患との合併例、あるいは赤血球特異的分子の異常によらない新たな溶血性貧血も全エクソーム解析から明らかになりつつある。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。遺伝子型と治療反応性との関連性を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発展させる取り組みが望まれる。

## E. 結論

遺伝性貧血の診断と治療には、造血器以外の様々な症候を説明しうる分子遺伝学的基盤を個々の疾患単位で明らかにしていく必要がある。また、発症には感染症の関与ほか、epigenetic な要因の解明も今後の課題である。DBA の分子疫学が解明され、表現型と遺伝子型に関する情報が集積されてきた。新生児遺伝性貧血は、DBA (非溶血群) と溶血性貧血 (溶血群) をモデルとして、表現型、バイオマーカーに全エクソーム解析法を取り入れた診断体制が望ましい。稀少で多様な新生児遺伝性貧血の多施設共同を進め、診療指針作成の基盤データを継続して集積することにより、母子 2 世代を守る包括的診療法に展開していくことが必要であろう。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, 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):2376-2384.
- 2) 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.

- 3) 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.
- 4) 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).
- 5) Shiraishi A, Hoshina T, Ihara K, Doi T, Ohga S, Hara T. Acute liver failure as the initial manifestation of Wilson disease triggered by human parvovirus B19 infection. *Pediatr Infect Dis.* 2012;J 31(1):103-4.
- 6) 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;51: 917-920.
- 7) Kanno H, Iribe Y, Aoki T, Ogura H, Fujii H. Pyruvate supplementation enhances vascular endothelial growth factor production by bone marrow-derived mononuclear cells. *Jpn J Transf Cell Ther.* 2012;58:26-32.
- 8) Uchiyama T, Kanno H, Ishitani K, Fujii H, Ohta H, Matsui H, Kamatani N, Saito K. An SNP in CYP39A1 is associated with severe

- neutropenia induced by docetaxel. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012;69:1617-24.
- 9) 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.
  - 10) Shimojima K, Inoue T, Imai Y, Arai Y, Komoike Y, Sugawara M, Fujita T, Ideguchi H, Yasumoto S, Kanno H, Hirose S, Yamamoto T. Reduced PLP1 expression in induced pluripotent stem cells derived from a Pelizaeus-Merzbacher disease patient with a partial PLP1 duplication. *J Hum Genet.* 2012; 57:580-586.
  - 11) 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.
  - 12) 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).
  - 13) 大賀正一. 特集／小児診療のピットフォールII 貧血. *臨床と研究* 2012;89(5):582-587.
  - 14) 大賀正一. 血液・腫瘍性疾患 鉄欠乏性貧血. 今日の小児治療指針 第15版 医学書院 2012; pp.510-511.
  - 15) 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」日本臨床社 2013;pp.401-404.
  - 16) 楠田剛, 大賀正一. 新生児溶血性貧血 日本臨床別冊「血液症候群I」日本臨床 2013;pp. 364-367.
  - 17) 北島順子, 大賀正一. 新生児鉄過剰症 日本臨床別冊「血液症候群I」日本臨床 2013;pp.499-502.
  - 18) 菅野仁. 2. 先天性溶血性貧血 VIII章 赤血球系疾患. 血液専門医テキスト 日本血液学会 編, 南江堂, 東京, 2011;pp.154-158.
  - 19) 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」日本臨床社 2013;pp.311-313.
  - 20) 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」日本臨床社 2013;pp. 308-310.
  - 21) 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」日本臨床社 2013;pp.306-307.
  - 22) 菅野仁. アルドラーゼA異常症. 日本臨床別冊「血液症候群I」日本臨床社 2013;pp.278-281.
  - 23) 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」日本臨床社 2013;pp.274-277.
  - 24) 菅野仁. 三炭糖リン酸イソメラー異常症. 日本臨床別冊「血液症候群I」日本臨床社 2013;pp. 271-273.
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) 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, Seiji S, on behalf of the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia (AA) Study Group. The 6th International Symposium on MDS and bone marrow failure syndrome in childhood. EWOG MDS (Nov 7-9, 2012, Prague, Czech Republic).
  - 4) Watanabe K, Kojima Y, Kudo K, Hyakuna N, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki E, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Ohga S, Nakahata T, Kojima S, on behalf of the Japan Childhood Aplastic Anemia study group. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with secondary myelodysplastic syndrome after treatment of aplastic anemia in AA-97 study. The 6th International Symposium on MDS and bone marrow failure syndrome in childhood. EWOG MDS (Nov 7-9, 2012, Prague, Czech Republic).
  - 5) Inoue H, Ohga S, Kusuda T, Kitajima J, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels in preterm infants with chronic lung disease. The 8th Asian Society for Pediatric Research (May 17-19, 2012, Seoul, Korea).
  - 6) 大賀正一. 小児の造血・免疫不全症に対する移植療法. 小児感染症記念講演会 特別講演1 (2012年7月12日, 鹿児島).
  - 7) 大賀正一. 感染症と造血・免疫不全症～免疫制御か、造血細胞移植か?～. 北海道小児感染症セミナー 特別講演2 (2012年7月27日, 札幌).
  - 8) 大賀正一. 免疫・造血不全症と感染症. 第74回日本血液学会 コーポレートセミナー (2012年10月20日, 京都).
  - 9) 大賀正一. 小児の再生不良性貧血～診断と治療の考え方～. 第22回クリニカル・ヘマトオンロジー・セミナー 特別講演 (2012年10月26日, 折尾).
  - 10) 大賀正一. 造血不全症: 感染症治療のポイント. 第54回日本小児血液がん学会 ランチョンセミナー (2012年11月30日-12月2日, 横浜).
  - 11) 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).
  - 12) 大賀正一. 小児再生不良性貧血の治療の進歩. 再生つばさの会福岡医療講演会 (2013年3月30日, 福岡).
  - 13) 菅野仁. 適正使用評価方法の問題点と血液製剤使用量を減少させるための方策. 第19回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム シンポジウム2「輸血医療 Pros and Cons」Ⅲ. 輸血管理料 (平成24年11月16日, 岡山).
  - 14) 菅野仁. 濾過濃縮後腹水の安全性と有効性～血漿分画製剤としての視点から. 第33回日本アフェレンシス学会学術大会 ランチョンセミナー2 (平成24年11月9日, 長崎).
  - 15) 菅野仁. PGx検査はどこまで医療に浸透したか～がんPGxの現状と本学会が果たすべき役割～. 日本人類遺伝学会第57回大会 シンポジウムS1-4 (平成24年10月25日, 東京).
  - 16) 菅野仁. 遺伝子情報管理: 薬理遺伝学を含むゲノム診療体制の実際. 第19回日本遺伝子診療学会 シンポジウムS2-03 (平成24年7月27日, 千葉).
  - 17) 菅野仁. CARTろ過濃縮後保存の新技術について. 第7回CART研究会 特別講演 I, 第17回日本緩和医療学会学術大会 (平成24年6月22日, 神戸).
  - 18) 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.
  - 19) 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回日本小児科学会学術集会 (平成25年4月19-21日) 日本小児科学会雑誌2013;117:431.
- 20) 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.
- 21) 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).
- 22) Hama A, Muramatsu H, Ito M, Kosaka Y, Tsuchida M, Takahashi Y, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S. Long-term outcomes of AA or hypoplastic MDS children who received the same immunosuppressive therapy. 第75回日本血液学会学術集会 (2013年10月, 札幌).
- 23) Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Muramatsu H, Nakanishi K, Takahashi Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Hasegawa D, Manabe A, Ito M, Kojima S. 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, 札幌).
- 24) 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, 札幌).
- 25) 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, 京都).
- 26) Takahashi Y, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Yagasaki H, Morimoto A, Watanabe K, Ohga S, Ito E, Kudo K, Fukuda A, Sakamoto S, Kasahara M, Nakazawa A, Kojima S. Expression of the human leukocyte antigen HLA-B\*61:01 is associated with susceptibility to idiopathic aplastic anemia, hepatitis associated aplastic anemia and fulminant hepatic failure in children with HLA-B\*61. 第74回日本血液学会学術集会 (2012年10月, 京都).
- 27) Sakaguchi H, Hama A, Muramatsu H, Narita A, Doisaki S, Takahashi Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Hasegawa D, Manabe A, Ito M, Kojima S. Telomere length of lymphocyte in pediatric aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood. 第74回日本血液学会学術集会 (2012年10月, 京都).
- 28) 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た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).
- 29) 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  
なし