

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： 稀な先天性造血不全性貧血や遺伝性貧血の診断法確立や病態解明研究には疫学データベースの構築が必須であるとの観点から、日本小児血液・がん学会疾患登録事業を一次調査とする貧血を主症状とする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 647 例の造血障害症例が診断され、Diamond-Blackfan 貧血症例 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。これまでの研究で登録データ解析をしていなかった遺伝性溶血性貧血は年間 60～80 例であり、予想通り遺伝性球状赤血球症とヘモグロビン異常症が多く、赤血球酵素異常症は稀であった。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。

研究開始 2 年間は、赤血球造血不全による遺伝性貧血を主な対象にしたが、最終年度は遺伝性溶血性疾患、ヘモグロビン異常症も症例数を集計した。

（倫理面への配慮）

学会疾患登録（一次登録）の研究計画は、日本小児血液・がん学会臨床研究審査委員会の審査承認を得た。

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：症例登録は毎年小児血液学会会員 239 施設の約 90% に相当する 210 施設以上が行っている。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。遺伝子検査による確定診断例が増加している事が予想されるが、本調査ではその実数比率がどの様に増加したかは解析出来なかった。

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. 遺伝性溶血性貧血はこれまで集計解析してこなかった。予想通り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、ヘモグロビン異常症はいずれも稀であった。
- 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予想されるが、これらの施策が集計値にどの様に反映されたかは、今回の解析では明らかにできなかった。

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

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. Dyserythropoietic anemia	No data	No data	1	0	0	1	0
Sideroblastic anemia	No data	No data	2	1	1	0	0
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	3
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0
Cong. Spherocytosis	No data	•	•	•	54	45	23
Cong. Elliptocytosis	No data	•	•	•	2	1	1
G6PD deficiency	No data	•	•	•	5	5	3
PK deficiency	No data	•	•	•	0	0	0
other erythrocyte enzyme def.	No data	•	•	•	2	0	0
Sickel cell disease	No data	•	•	•	1	1	0
Unstable hemoglobinopathy	No data	•	•	•	1	0	0
Thalasemia	No data	•	•	•	18	16	9
other hemoglobinopathy	No data	•	•	•	0	0	0

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、12 例で新規の RP 遺伝子の変異（*RPL35A* 3 例を含む）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) であった。Y42C 変異の 2 例は、非罹患両親に変異はなく、*de novo* 変異であった。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 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。*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。病的意義は不明であるが、その他に 6 種類の変異 (*RPL3L*, *RPL7L1*, *RPL8*, *RPL13*, *RPL18A*, *RPL31*) と 2 種類の 1 アミノ酸欠失 (*RPL6* と *RPL14*) を、それぞれ 1 例ずつに認めた。しかし、残りの 38 例には RP 遺伝子の変異は認められなかった。

新規原因候補遺伝子 *RPL27* と *RPS27* について機能解析を行ったところ、*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)。

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。また、2 例の患者に検出された *RPL35A* のミスセンス変異 (Y42C) は、患者に生じた *de novo* 変異であり、原因である可能性が高いと思われる。残りの 46 例、少なくとも RP 遺伝子変異が検出されなかった 38 例には、RP 遺伝子以外の原因遺伝子の存在が推定される。

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。また、DBA の原因となると考えられる *RPL35A* の新規ミスセンス変異 (Y42C) を同定した。これらの結果は、RP 遺伝子が DBA に共通の原因遺伝子であるという、これまでの概念を支持するものである。しかし、同時に RP 遺伝子以外の原因遺伝子が存在することを強く示唆している。

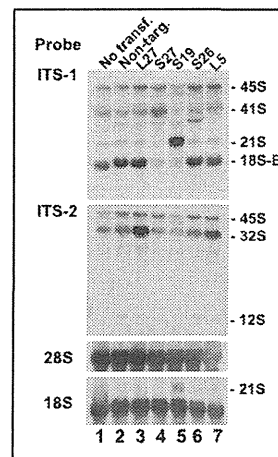


図 1. *RPL27* と *RPS27* のノックダウンによる rRNA のプロセッシングの障害。

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。

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, 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;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.
 - 8) Imamura T, Iwamoto S, Kanai R, Shimada A, Terui K, Osugi Y, Kobayashi R, Tawa A, Kosaka Y, Kato K, Horii H, Horibe K, Oda M, Adachi S; Japan Association of Childhood Leukaemia Study. Outcome in 146 patients with paediatric acute myeloid leukaemia treated according to the AML99 protocol in the period 2003-06 from the Japan Association of Childhood Leukaemia Study. *Br J Haematol.* 2012;159:204-10.
 - 9) Taga T, Saito AM, Kudo K, Tomizawa D, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Tawa A, Shimada A, Taki T, Kigasawa H, Koh K, Adachi S. Clinical characteristics and outcome of refractory/rekapsed myeloid leukemia in children with Down syndrome. *Blood* 2012;120:1810-5.
 - 10) Kanegane H, Yang X, Zhao M, Yamato K, Inoue M, Hamamoto K, Kobayashi C, Hosono A, Ito Y, Nakazawa Y, Terui K, Kogawa K, Ishii E, Sumazaki R, Miyawaki T. Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. *Pediatr Allergy Immunol.*

2012;23:488-493.

11) 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) 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).
- 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).

- 4) Ito E, Yoshida K, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Toki T, Miyano S, Shiraishi Y, Chiba K, Terui K, Wang R, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Kudo K, Kamimaki I, Hara J, Sugita K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Kawano Y, Kanno H, Kojima S and Ogawa S. Identification of two new DBA genes, *RPS27* and *RPL27*, by Whole-Exome Sequencing in Diamond-Blackfan Anemia patients. 第54回アメリカ血液学会 (2012年12月8日-11日).
- 5) Sato T, Kuramitsu M, Matsubara A, Yoshida K, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Morio T, Ohga S, Ohara A, Kitoh T, Kudo T, 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 (2012年10月19日-21日).

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 遺伝子の機能喪失型変異の同定方法の確立

研究分担者 古山和道（岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授）

研究要旨：*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リフェリン症（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第 1 の目的とし、さらには *ALAS2* 遺伝子の赤芽球特異的転写促進領域（エンハンサー）における遺伝子変異が機能喪失型変異として鉄芽球性貧血の原因となりうるかどうかを検討する事を第 2 の目的とした。その結果、一年目においてはミスセンス変異が機能喪失型か機能獲得型かを組み換えタンパク質を利用して判定する方法を確立し、二年目には、*ALAS2* 遺伝子の第 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事を明らかにして報告した。

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リフェリン症:XLDPP）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。従って、その方法を確立する事を第 1 の研究目標と定めた。さらに、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。

B. 研究方法

I-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。

I-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、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。

I-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、その後系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およその半減期を測定した。

II-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。

II-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

I-1) *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。

I-2) *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。

II-1) 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 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所、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。

II-2) 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所、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

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症の発症原因であるものと考えられた。

E. 結論

研究 I により、ALAS2 遺伝子のコード領域の遺伝子変異の表現型を明らかにする方法を確立した。近年、ALAS2 遺伝子の機能獲得型の変異が赤芽球性ポルフィリン症発症の原因となり得る事が報告された。従って、ALAS2 遺伝子の変異を同定した場合、その変異が ALAS2 タンパク質の機能を低下させるのか、あるいは機能を亢進させるのかを明らかにする事は、疾患の鑑別診断の上からも重要である。本研究によ

り、カルボキシル末端の少なくとも 20 アミノ酸から 33 アミノ酸を欠失している場合には機能獲得型の変異である可能性が高く、10 アミノ酸を欠失する場合には機能喪失型の変異となる可能性が高いことがあきらかとなった。一方、V562A 変異の解析で明らかになった様に、*in vitro*における酵素活性が野生型と同等以上である場合でも、*in vivo*におけるタンパク質の半減期が短縮する事もある事も明らかになった。従って、*in vitro*の酵素活性が亢進している場合、当該変異が真に機能獲得型変異であるのか、あるいは機能喪失型変異であるのかを確認するためには、*in vivo*における酵素の半減期を野生型と比較する事は非常に重要であると考えられた。

また、研究 II により、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症の原因となりうると考えられる事から、同部の変異は新たな機能喪失型変異であると考えられる。従って、原因遺伝子が明らかではない先天性鉄芽球性貧血症の症例においては 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) Canh Hiep, N., Kinohira S, Furuyama K, Taketani S. Depletion of glutamine enhances sodium butyrate-induced erythroid differentiation of K562 cells. *J Biochem.* 2012; vol.152:p509-519.
- 2) Kadirvel S, Furuyama K, Harigae H, Kaneko K, Tamai Y, Ishida Y, Shibahara S. The carboxyl-terminal region of erythroid-specific 5-aminolevulinic acid synthase acts as an intrinsic modifier for its catalytic activity and protein stability. *Exp Hematol.* 2012;vol.40:p477-486.
- 3) Li B, Takeda K, Ishikawa K, Yoshizawa M, Sato M, Shibahara S, Furuyama K. Coordinated Expression of 6-Phosphofructo-2-

- kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase 4 and Heme Oxygenase 2: Evidence for a Regulatory Link between Glycolysis and Heme Catabolism. *Tohoku J Exp Med.* 2012; vol. 228:p27-41.
- 4) Kaneko K, Nishiyama H, Ohba K, Shibasaki A, Hirose T, Totsune K, Furuyama K, Takahashi K. Expression of (pro) renin receptor in human erythroid cell lines and its increased protein accumulation by interferon- γ . *Peptides.* 2012;vol.37:p285-289.
- 5) 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; vol.92:p1-9.
- 6) Furuyama K and Yamamoto M. Differential regulation of 5-aminolevulinate synthase isozymes in vertebrates. Ferreira GC, Kadish KM, Smith KM, Guillard Redited, *Handbook of Porphyrin Science* 2013;Vol.27,p.2-41.
- 7) 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. 学会発表
- 1) Furuyama K, Kaneko K, Fujiwara T, Harigae H, Shibahara S. Identification of the Novel Erythroid-Specific Enhancer in the First Intron of Human ALAS2 Gene; Tthe Mutation Disrupting GATA Transcription Factor Binding Site in the Enhancer Causes X-Linked Sideroblastic Anemia. 54th Annual Meeting of American Society of Hematology (2012年12月, Atlanta, U.S.A.).
- 2) 古山和道, 金子桐子, 藤原亨, 張替秀郎, 柴原茂樹. ヒト赤芽球特異的5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子における新たな赤芽球特異的エンハンサーの同定. 第85回日本生化学会大会(2012年12月, 福岡).
- 3) 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, 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、共同研究者である真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

査を参考に作成した調査表をもとに、約 20 名の該当症例に対し、2 次調査を行い、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。

さらに、日本小児科学会雑誌に「Congenital Dyserythropoietic Anemia—現状と今後の課題—」と題する総説を記載し、啓蒙に努めるとともに、自験例の論文化も行った。

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 太田宗樹, 多賀崇, 野村明孝, 加藤博文, 竹内義博. 輸血依存性 Congenital Dyserythropoietic Anemia (CDA) に対する同種骨髄移植症例. 日本小児血液・がん学会雑誌 2012;49(1,2):133-137.
- 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(7):1075-1080.

2. 学会発表

- 1) 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 (平成24年11月30日-12月2日, 横浜).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

Fanconi 貧血の診断・診断ガイドラインの作成

研究分担者 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）

研究要旨：Fanconi 貧血（FA）は種々の身体異常に加え、小児期から進行する骨髄不全、白血化や高発がんを特徴とする極めてまれな遺伝性疾患である。末梢血リンパ球に対する DNA 架橋剤添加による染色体脆弱検査と骨髄不全症を含む臨床症状および FANCD2 のモノユビキチン化や、Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification（MLPA）法と京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室における FA 遺伝子のゲノムシーケンス等により FA 診断を試みた。リンパ球のリバージョン・モザイク例では、末梢血での染色体や FANCD2 のモノユビキチン化検査では診断が困難で、造血細胞以外の検体で解析を行うことにより、診断が可能である。次世代シーケンスの導入により異常遺伝子の解析の精度は飛躍的に向上したが、片アレルのみの検出例や変異が確認出来ない症例もみられ、染色体脆弱性と臨床症状を照合した診断が重要である。

A. 研究目的

Fanconi 貧血（FA）の身体症状、臨床症状は一樣ではなく、原因遺伝子も現在では 16 という多数の遺伝子が同定されている。リンパ球のリバージョン・モザイク例ではスクリーニングとしての染色体断裂試験の機能が働かず、FA の診断が困難な例もある。FA の造血不全の唯一の治療法は造血細胞移植であり、適切な治療法、移植方法を選択するためにも確実な診断が必要である。染色体断裂試験、FANCD2 モノユビキチン化試験、MLPA 法および FA 遺伝子解析に臨床所見を加えて診断の検討を行い、適切な診断ガイドラインの作成することを目的とした。

B. 研究方法

FA の確定診断は以下の方法で試みた。

1. 身体異常および骨髄不全、固形腫瘍の発症の有無と時期
2. DNA 架橋剤添加による染色体断裂の評価
3. FANCD2 産物に対する抗体によるウェスタンブロット法でのモノユビキチン化の確認
4. リンパ球および皮膚・骨髄線維芽細胞における FANCA の MLPA 法を用いた変異検出
5. 京都大学放射線生物研究センター高田穰研究室

にて FA 遺伝子の変異の同定を行う。従来の PCR と Sanger 法によるシーケンス解析に加え、小島班と連携した次世代シーケンスによるエクソーム解析の結果もふまえて診断の確定を行う。

（倫理面への配慮）

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」と「臨床研究に関する倫理指針」を順守し、研究対象者に対する人権擁護を基本とし、インフォームドコンセントに基づいた科学的にも倫理的にも妥当な研究の計画と実施している。説明同意書には検体の使用および保存中止請求書類も加え、遺伝子カウンセリングの体制も整えている。また、平易な文面で記載された小児用の説明書も作成し、家族だけではなく患児の理解や同意を得る努力を行っている。

C. 研究結果

1. 皮膚の異常が約 80% と最も多く、ついで低身長、母指異常の頻度が高く、皮膚異常かつ/または低身長のみでの症例は 20% にみられた。身体異常のみでは他の先天性骨髄不全症との鑑別は困難であった。血液学的には 37 例が骨髄異形成症候群や白血病へ進行しており、移植後も含めて 14 例に固形腫瘍の

発症がみられた。うち、2例は骨髄不全の発症はみられず、乳幼児期に固形腫瘍を発症した。ほか、舌がん、食道がんなどの頭頸部がんが多く、いずれも若年発症であった。また、成人の2例においては、骨髄不全の程度は極めて軽度であり、免疫異常が疑われた。

2. 染色体断裂試験では DEB 添加で正常なリンパ球が 50%以上を占める高レベルの体細胞モザイクは 30% 近くに認められた。リンパ球にリバージョン・モザイクを認めた 3 例とリバージョン疑いの 1 例では非 FA との区別は困難で、骨髄線維芽細胞等の検体を用いて、FA 遺伝子の変異が検出され FA の診断が可能となった。
3. FANCD2 のウェスタンブロット法でのモノユビキチン化検査では高レベルの体細胞モザイク患者では検出が困難であった。
4. 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%)。MLPA 法での検出はリンパ球、骨髄細胞などの造血細胞だけでなく、皮膚・骨髄線維芽細胞でも同等に検出が可能であり、リバージョン・モザイクを認めた例においても骨髄線維芽細胞において両アレルの異常が検出された。
5. 東海大学における総計 80 例の日本人 FA の遺伝子解析では、FA 遺伝子のゲノムシーケンスより 35 例の FANCA と 20 例の FANCG 遺伝子の変異が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された。FANCD1, FANCE, FANCP も各 1 例確認されが、既知遺伝子が全く検出されなかった症例は 6 例 (7.5%) 認められた。

D. 考察

本邦の FA 症例では高レベルのモザイク症例が多く、特にリンパ球のリバージョン・モザイク例では、末梢血での染色体や FANCD2 のモノユビキチン化検査では診断が困難である。造血細胞以外の検体で解析を行うことにより、診断精度の向上が期待できる。特に MLPA 法での検出はリンパ球、骨髄細胞などの造血細胞だけでなく、皮膚・骨髄線維芽細胞でも同等に検出が可能であり、A 群の MLPA 法は DNA

を抽出すれば既知の変異であれば、約 2/3 の症例においては同定が可能であり、迅速な診断が期待される。次世代シーケンス導入により、異常遺伝子の解析の精度は飛躍的に向上したが、片アレルのみの検出例や変異の異常が確認できない症例もみられ、染色体脆弱性と臨床症状を照合した診断が重要である。

E. 結論

臨床像のみあるいは遺伝子解析でのみで本疾患を確定診断するのは困難である。小児期に発症した再生不良性貧血患者や若年発症の頭頸部、婦人科領域の固形がんの患者には、全例に DNA 架橋剤添加による染色体断裂試験を行い、FA を除外することが望まれる。乳幼児期における固形腫瘍の発症で身体異常を有する症例や、骨髄不全が軽度で免疫機能が不良な症例においても FA の可能性があり注意を要する。骨髄不全リバージョン、症例では末梢血リンパ球の染色体脆弱試験がスクリーニング検査としては指標にならず、理学所見、家族歴、既往歴を詳細に検討し、造血細胞以外での染色体検査や遺伝子解析等を考慮すべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M and Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood* 2013;122:3206-3209.
- 2) 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].
- 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, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. *Blood* 2013 Jan 31;121(5):862-3. doi: 10.1182/blood-2012-11-465633.
- 4) 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.
- 5) Maekawa K, Yoshimitu M, Fujiwara H, Matsushita 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.
2. 学会発表
- 1) Yabe M, Yabe H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Ohtsubo k, Fukuura A, Mori T, Yoshida H, Ohtsuka Y, Shiomi M and Kato S. A fludarabine-based conditioning for alternative donor haematopoietic stem cell transplantation in inherited bone marrow failure syndrome. **38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation** (April 2012, Geneva Switzerland).
- 2) Yabe M, Takahashi Y, Inagaki J, Koh K, Kawa K, Kato K, Sakamaki H, Atsuta Y, and Yabe H. Hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia patients in Japan: An analysis of the registry data. **24th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium** (September, 2012, Denver, USA).
- 3) Yabe M, Hira A, Yabe H, Yoshida K, Ogawa S, Kojima S, Matsuo K and Takata M. Clinical interaction between Japanese Fanconi anemia patients and aldehydemetabolism. 第75回日本血液学会学術集会 (2013年10月, 札幌).
- 4) Yabe H, Inoue M, Koh K, Kawa K, Kato K, Sakamaki H, Atsuta Y. The Inborn Errors Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT) Allogeneic stem cell transplantation for Diamond-Blackfan anemia in Japan; A Report from the Inborn Errors Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). **38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation** (April 2013, London, UK).
- 5) 矢部普正, 加藤俊一, 小池隆志, 大坪慶輔, 清水崇史, 森本克, 矢部みはる. 拒絶に対する再移植を施行した非腫瘍性疾患の21例. 第75回日本血液学会学術総会 (2013年10月, 札幌).
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

ゼブラフィッシュを用いた DBA の遺伝子解析

研究分担者 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）

研究要旨: リボソームの生合成に関与する因子の異常と遺伝性貧血との関連が注目されている。ダイヤモンド・ブラックファン貧血の患者で新たに同定されたリボソームタンパク質遺伝子 *RPL27* の変異と疾患発症との関連を調べるために、ゼブラフィッシュで *RPL27* のスプライシングを阻害した。その結果、成長不良や尾部の屈曲などの形態異常および造血的著しい低下が示され、*RPL27* の変異が疾患発症に大きく関わっている可能性が明らかになった。

A. 研究目的

リボソームの生合成には 200 種類以上もの因子が関与し、これらをコードする遺伝子に変異が確認された疾患はリボソーム病と呼ばれる。そのひとつであるダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) の患者では、リボソームタンパク質 (RP) S19 遺伝子の変異が最も多くみられ、その割合は約 25% を占める。さらに、10 種類の RP 遺伝子の変異も報告されているが、未だに 4 割の患者では責任遺伝子が同定されていない。本研究では、DBA 患者のエキソーム解析で新たに発見された DBA 候補遺伝子 *RPL27* について、ゼブラフィッシュを用いた機能解析を行うことで疾患発症との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. *rpl27* 発現抑制胚の作製

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 (MO) を設計した。これを濃度 5.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ で受精卵に注入し、24 時間後に全 RNA を回収して逆転写 PCR を行った。

2. RT-PCR による転写産物の解析

rpl27 のスプライシングを調べるために、受精後 25 時間の正常胚と MO 注入胚から全 RNA を回収して、逆転写 PCR とシーケンシングで *rpl27* の転写産物を解析した。

3. 血球数の観察

造血への影響を観察するためにヘモグロビン染色を行った。49 時間胚を染色液 (0.6 mg/ml σ dianisidine、0.01 M 酢酸ナトリウム pH4.5、0.63% 過酸化水素、40% エタノール) で 7~10 分間静置後、PBS で 5 分間 3 回リンスし、1% メチルセルロース中で実体顕微鏡を用いて心臓部周辺にみられる顆粒状の赤茶色の血球を観察した。

C. 研究結果

1. *RPL27* 遺伝子の構造解析

エキソーム解析で新たに発見された *RPL27* の変異を持つ患者では、開始コドンを含む第 2 エキソンが欠損していた。そこで、*RPL27* と造血との関連をゼブラフィッシュで解析するために、ヒトとゼブラフィッシュの *RPL27* 遺伝子の構造解析を行った。その結果、これらのエキソン・イントロン構造は同じで、特にエキソンの翻訳領域の長さは 411 bp で同一であった。また、翻訳領域とアミノ酸配列のアラインメントを行った結果、それぞれの相同性は 84% と 96% で、非常によく保存されていた。これらの結果から、ゼブラフィッシュにスプライシングを阻害する MO を注入することで患者と同様の異常を再現出来ることが考えられた。

2. 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。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。

3. 赤血球形成における影響

造血への影響を観察するために、受精後 49 時間でヘモグロビン染色を行った。野生型胚の心臓と卵黄囊の表面は血球が高密度に存在していた。これに対し、MO を注入した胚ではほとんど血球を確認することができなかった。しかし、MO と *rpl27* mRNA の混合液を注入すると約 7 割の胚で、血球数の回復が見られた。このことから、ゼブラフィッシュにおいて *rpl27* は、赤血球の形成に必要であることが示唆された。

D. 考察

rpl27 ノックダウン胚で得られた尾部の屈曲や赤血球の減少などの表現型は、DBA の主症状とされる貧血や骨格異常などの特徴に類似している。また、DBA の代表的な原因遺伝子である *rps19* をノックダウンしたゼブラフィッシュで見られる表現型にも類似していた。これらのことから、*rpl27* ノックダウン胚は、DBA の疾患モデルになり得ることが考えられる。しかし、*rpl27* がどのように造血や骨格形成に関与するのかはこれから検証していく必要がある。

E. 結論

ゼブラフィッシュを用いた解析により、DBA 患者で新たに同定された *RPL27* 遺伝子の変異は、DBA 発症の原因であると推測された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 剣持直哉. リボソーム病ーリボソーム合成の異常と疾患ー. 生化学 2013;85(10):909-915.
- 2) Yadav V.G., Chakraborty A, Uechi T and Kenmochi N. Ribosomal protein deficiency causes Tp53-independent erythropoiesis

failure in zebrafish. *Int J Biochem Cell Biol.* (in press).

2. 学会発表

- 1) Uechi T, Nakajima Y, Sonoda H, Ikeda M, Suzuki Y, Sugano S and Kenmochi N. Molecular pathogenesis of ribosomopathies in zebrafish model for Diamond-Blackfan anemia. The 18th Annual Meeting of the RNA Society (2013, Davos, Switzerland).
- 2) Chakraborty A, Uechi T, Gleizes P.E. and Kenmochi N. When p53 senses faulty ribosomes: Induction of Tp53 correlates with enhanced expression of c-Myc target nucleolar proteins in Rpl11-deficient zebrafish. The 18th Annual Meeting of the RNA Society (2013, Davos, Switzerland).
- 3) Uechi T, Nakajima Y, Yadav G, Sawada T, Ikeda M and Kenmochi N. Erythropoiesis failure and ribosomal dysfunction in zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. The 62th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (2013, Boston, USA).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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
- Fanconi 貧血診療の参照ガイド
- 遺伝性鉄芽球貧血診療の参照ガイド
- Congenital Dyserythropoetic Anemia 診療の参照ガイド

Diamond-Blackfan貧血診療の参照ガイド 平成25年度改訂版

厚生労働科学研究費補助金 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班

研究代表者 伊藤悦朗

Diamond-Blackfan貧血診療の参照ガイド作成のための ワーキンググループ

小島勢二	(名古屋大学大学院 小児科)
大賀正一	(九州大学大学院 周産期小児医療学)
小原明	(東邦大学 輸血部)
菅野仁	(東京女子医大 輸血部・細胞プロセッシング科)
矢部普正	(東海大学医学部 細胞移植医療センター)
照井君典	(弘前大学大学院 小児科)