

1. 緒 言
2. 診 断
  - 1) 疾患概念
  - 2) 診断基準
  - 3) 診断のフローチャート
  - 4) 鑑別診断
3. 疫 学
  - 1) 発生頻度
  - 2) 自然歴・予後
4. 病因・病態
5. 臨床症状
  - 1) 身体奇形
  - 2) 悪性腫瘍の合併
1. 治療法・治療指針
  - 1) 輸血
  - 2) 薬物療法
  - 3) 造血幹細胞移植
2. 問題点・将来の展望

## 1. 緒言

Diamond-Blackfan anemia (DBA)は、乳児期に発症する赤血球造血のみが障害される先天性の赤芽球癆である。骨髄は正形成であるが赤血球系細胞のみが著減し、末梢血では網赤血球が減少し、大球性正色素性貧血を呈する。約40%の症例で様々な奇形を合併することが知られている。大頭、小頭などの頭部、顔部の異常が最も多く、上肢、眼、泌尿生殖器系、心臓の異常や低身長が見られる。ほとんどが散発例であるが、約10~20%の症例では家族歴があり、主に常染色体性優性の形式をとる<sup>1)</sup>。

1936年Josephsにより2例<sup>2)</sup>、2年後にはDiamondおよびBlackfanにより4例が報告され<sup>3)</sup>、独立した疾患概念として確立した。その後、この疾患の病因に関する様々な研究が行われてきたが、長らく病因は不明であった。1999年、Draptchinskaiaらは染色体転座をもつDBA患者の遺伝子解析などから病因遺伝子の遺伝子座が第19番染色体長腕(19q13)に存在し、さらに原因遺伝子が80個あるリボソームタンパク(RP)の一つであるRPS19をコードする遺伝子であることを明らかにした<sup>4)</sup>。RPS19遺伝子変異は約25%のDBA患者に認められるが、その後、RPS7、RPS10、RPS17、RPS24、RPS26、RPL5、RPL11、RPL35aおよびRPL26などの遺伝子変異が少数例のDBAで発見された<sup>5)-9)</sup>。さらに最近、X連鎖の遺伝形式を示すDBAの症例に、赤血球・巨核球系転写因子GATA1をコードする遺伝子に変異が同定された<sup>10)</sup>。欧米では約50%<sup>11)</sup>、本邦では約40%<sup>12)</sup>の患者で遺伝子変異が見出されている。これまで発見されたDBA遺伝子はGATA1を除いてRPをコードしていることから、リボソームの機能障害によって生じる翻訳の異常が、本疾患の赤芽球造血障害の中心的なメカニズムであることが明らかになってきた<sup>13)</sup>。

DBAも他の先天性造血不全症と同様に、経過中に骨髄異形成症候群(MDS)や白血病などの血液腫瘍と大腸癌や骨肉腫などの固型癌を合併する頻度が高い<sup>14)</sup>。治療は輸血とステロイド療法が基本である。約80%の例は最初のステロイドに反応するが、60~70%が輸血非依存性になるのみである<sup>11)</sup>。治療抵抗例では、同種骨髄移植の適応がある<sup>11)15)</sup>。DBAは、患者数も限られるため、無作為割付試験を含む前方視的治療研究は少なく、得られている情報は極めて乏しい。よって、わが国や海外に存在する疾患登録事業で得られたデータや文献をもとに専門家が作業をすすめ、わが国のDBAの患者に対し現時点で最も推奨される診療ガイドラインを作成した。

## 2. 診断

### 1) 疾患概念

リボソームの機能不全を背景に、1) 赤芽球癆、2) 身体奇形、3) MDSや白血病への移行や固型癌の合併を特徴とする血液疾患である。

### 2) 診断基準

典型例の臨床像としては、1) 一歳未満の発症、2) 他の2系の血球減少を認めない大球性貧血(あるいは正球性貧血)、3) 網状赤血球減少、4) 赤芽球前駆細胞の消失を伴う正形成骨髄所見を認め、身体奇形を伴う。しかし、その表現型は多様で、家族内に発端者と同一の遺伝子異常をもつ貧血や身体奇形を伴わない軽症例も存在する。したがって、臨床像のみで本疾患を確定診断するのは不可能である。遺伝子変異が確認されれば診断は確定するが、50%以上の患者では、責任遺伝子が同定されていない。本症が悪性疾患を合併しやすいことから、同種骨髄移植のドナーを選択する上で軽症例の診断は重要課題になっている。軽症例の診断も可能な診断基準案を表1に示す。

表 1.先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan貧血：DBA）の定義

**A. 診断基準**

1. 1才未満である。
2. 大球性貧血（あるいは正球性貧血）で他の2系の血球減少を認めない。
3. 網状赤血球減少を認める。
4. 赤芽球前駆細胞の消失を伴う正形成骨髓所見を有する。

**B. 診断を支持する基準**

**大支持基準**

1. 古典的DBAに見られた遺伝子変異を有する。
2. 家族歴を有する。

**小支持基準**

1. 赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）と還元型グルタチオン（eGSH）の高値（注1）
2. 古典的DBAにみられる先天奇形を有する。
3. HbFの上昇。
4. 他の先天性骨髓不全症候群の証拠がない。

古典的DBAは4つの診断基準をすべて満たす。

非古典的DBAは、下記の①～③のいずれかを満たす。

- ① 3つの診断基準と1つの大あるいは2つ小支持基準
- ② 2つの診断基準と2つの大あるいは3つの小支持基準
- ③ 2つの大支持基準

注1)

eADAとeGSHを同時測定し、SVM法による判別式により判定する。

3) 診断のフローチャート（図1）

DBAには、診断のために有用なスクリーニング法がない。Transient erythroblastopenia of childhood（TEC）との鑑別診断には、eADAの高値（mean±3SD以上）を確認することが有用である。しかし、DBA症例の約20%はeADAが有意の上昇を示さない。eADAとeGSHの同時測定により、遺伝子検査で確定診断し得たDBA症例は全例が家族内非罹患者と判別が可能である。確定診断に遺伝子診断は有用であるが、本邦では原因遺伝子が同定されるのは全体の約40%にすぎない。通常のシーケンス法で遺伝子変異を同定できない場合は、片アレルの大欠損を解析する必要がある。

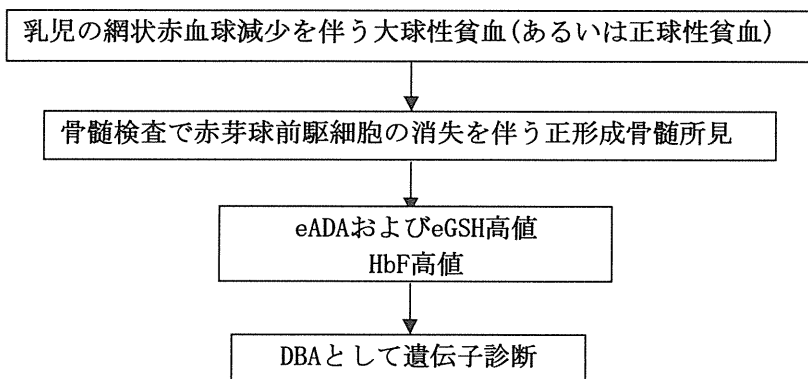


図 1 診断のフローチャート

4) 鑑別診断 (表2)

赤芽球癆を呈する疾患の鑑別診断としては、TECが最も重要である。TECは1歳以上の幼児に好発し、先行するウイルス感染に続発することが多い疾患とされる。ほとんどの症例は無治療で1～2ヶ月以内に自然治癒する。正球性貧血を呈し、DBAと異なりHbFおよび赤血球アデノシンデアミナーゼ活性(eADA)は正常である(表2)<sup>11)</sup>。また、骨髄不全や外表奇形を特徴とする先天性造血不全症候群には、表3に示すように、1) Dyskeratosis congenita, 2) Schwachman-Diamond症候群、3) Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia, 4) Pearson症候群などが知られている。いずれも、稀少疾患ではあるが、それぞれの臨床像が特徴的で鑑別可能である。最近、上記にあげた疾患については、すべて原因遺伝子が同定されたことから、分子病態の解明が進むとともに、遺伝子診断も可能となっている。

表 2. TECとの鑑別診断

	DBA	TEC
赤芽球癆	有	有
年齢	1歳未満	1歳以上
遺伝形式	散発性、優性遺伝	無
先天奇形	有	無
平均赤血球容積	高値	正常
HbF	高値	正常
i RBC抗原	有	無
eADA	高値	正常

表3. 先天性再生不良性貧血

	FA	DKC	SDS	CAMT
報告数	>1000	>225	>300	>45
遺伝形式	AR FANCB:XLR	AR DKC:XLR TERC, TINF2:AD	AR	AR, XL
責任遺伝子	<i>FANCA</i> (57-66%) <i>FANCB</i> (rare) <i>FANCC</i> (10-15%) <i>FANCD1/BRCA2</i> (2-4%) <i>FANCD2</i> (~2%) <i>FANCE</i> (rare) <i>FANCF</i> (2%) <i>FANCG/XRCC9</i> (9%) <i>FANCI/BACH1</i> (稀) <i>FANCL/PHF9/POG</i> (稀) <i>FANCM/Hef</i> (稀) <i>FANCN/PALB2</i> (2%) <i>FANCO/RAD51</i> (稀) <i>FANCP/SLX4</i> (稀)	<i>DKC1</i> (30%) <i>TERC</i> (<5%) <i>TERT</i> (<5%) <i>TINF2</i> (11%) <i>NOP10</i> (稀) <i>NHP2</i> (稀)	<i>SDBS</i> (95%)	<i>c-Mpl</i> (~100%)
平均診断年齢	7.6 歳	5~15 歳	4 ヶ月	9 ヶ月
先天奇形	75%	100%	60%	40%
汎血球減少	90%	50% (up to 10 歳)	95%( 好中球減少症)	40%
MDS/AMLへの移行	>14%	0.4~1.3%	5~33%	5%
発癌	7%	8~12%	0%	0%
染色体不安定性	有	正常	正常	正常
平均余命	30歳	80% が30歳までに 死亡	35 歳	3歳までに50%が死亡

FA: Fanconi anemia, DKC: Dyskeratosis congenita, SDS: Schwachman-Diamond syndrome,

MMC: mitomycin C, CAMT: Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia

DEB: diepoxybutane, AR: autosomal recessive, AD: autosomal dominant, XL: X-linked

### 3. 疫学

#### 1) 発症頻度 (表 4)

家族性に発症し常染色体優性遺伝の形式をとるものが10~20%である。残りは散発例や他の遺伝形式をとる家族内発症である。発症頻度は、出生人口100万人当たり約5~7名と推定されている。日本小児血液学会の全国データによれば、1988~2011年に登録されたDBA患者は特発性赤芽球癆と診断された症例も含め175名であった<sup>16)</sup>。

表4. 日本小児血液学会 再生不良性貧血委員会登録症例

	特発性	肝炎後	その他の二次性	Fanconi 貧血	Diamond- Blackfan 貧血	計
1988	63	6	0	4	6	79
1989	56	6	0	7	3	72
1990	52	5	0	9	3	69
1991	69	11	1	4	4	89
1992	84	8	1	6	4	103
1993	62	6	1	8	9	86
1994	70	8	0	4	6	88
1995	49	8	2	5	9	73
1996	52	12	1	3	4	72
1997	76	5	0	7	6	94
1998	64	7	0	7	8	86
1999	52	5	1	2	7	67
2000	51	11	0	8	7	77
2001	41	11	0	8	7	67
2002	54	7	0	0	5	66
2003	33	1	0	2	4	40
2004	40	8	0	3	4	55
2005	34	4	1	2	2	43
2006	58	5	0	5	10	68
2007	62	8	0	4	10	84
2008	68	11	0	6	14	99
2009	68	7	0	1	18	94
2010	55	13	0	4	10	92
2011	56	5	0	2	15	78
Total	1369	178	8	111	175	1841

注) Diamond-Blackfan貧血：特発性赤芽球癆を含む。

## 2) 自然歴・予後

生命予後は一般的に良好であるが、ステロイド療法および輸血依存症例が約40%ずつ存在しており、上述した副作用および合併症のために、長期にわたり悩まされ、生活の質として高いと言えない<sup>11)</sup>。また、DBAはFanconi貧血より頻度は低いですが、骨髄異形成症候群 (MDS)、白血病、大腸癌、骨肉腫などの悪性疾患を合併しやすい。

これまで、予後因子についての研究がなされてきたが、治療反応性を予測できる初診時の所見は明らかになっていない。我が国における報告からは、発症1年後の貧血の回復が輸血依存性に関連したことから、1年間の治療反応性により造血幹細胞移植を考慮する必要があるかもしれない<sup>17)</sup>。

## 4. 病因・病態 (表5)

近年、病因遺伝子の遺伝子座が第19番染色体長腕に同定され、そこに存在する原因遺伝子がリボソームタンパクの一つであるRPS19をコードする遺伝子であることが明らかにされた。RPS19遺伝子変異はDBA

の約25%に認められる<sup>18)</sup>。さらに、別のリボソームタンパク (RPS7、RPS10、RPS17、RPS24、RPS26、RPL5、RPL11、RPL35aおよびRPL26) の遺伝子変異が発見され、欧米では約50%のDBAの症例において遺伝子異常が明らかにされている (表5)<sup>5-9) 18-22)</sup>。一方、我が国では、既知遺伝子変異の同定率は約30%と欧米より低い傾向であった<sup>23)</sup>。しかし、最近、通常のダイレクトシーケンス法では検出できない既知のDBA原因遺伝子の片アレル欠失が約10%の症例に存在することが明らかになった<sup>12)</sup>。その結果、我が国では約40%の症例で原因遺伝子の同定が可能となった (表5)。

リボソームはmRNAの翻訳を担う細胞内装置であり、4種類のRNAと80種類のリボソームタンパク質からなる巨大な複合体である。ほ乳類のリボソーム(80S)は、大サブユニット (60S) と小サブユニット (40S)から成り、それぞれのサブユニットはリボソームRNA (rRNA) とリボソームタンパク質で構成されている (図2)。小サブユニットを構成するリボソームタンパク質はRPS、大サブユニットを構成する蛋白はRPLと呼ばれる。4種類の成熟したrRNAは、複雑な過程を経て共通の前駆体から成熟する (図3)。小サブユニットを構成するリボソームタンパクRPS19、RPS24、RPS10、RPS26は、18S rRNAの成熟と40Sリボソームサブユニットの組み立てに重要な役割を果たしている<sup>5)、24-27)</sup>。一方、大サブユニットを構成するリボソームタンパクであるRPL35A、RPL5とRPL11は、28Sと5.8S rRNAの成熟と60Sリボソームサブユニットの組み立てに重要な役割を果たしている<sup>6)、7)</sup>。したがって、これらのリボソーム蛋白の欠乏は、相対的な40Sあるいは60Sリボソームの欠乏を招き、翻訳開始能の低下を引き起こすと考えられる。

これまで発見されたDBAの遺伝子変異は、GATA1以外はすべてリボソームタンパク遺伝子のヘテロ変異であった。貧血の起こる仕組みについてはまだ完全に理解されていないが、リボソームの機能障害の結果、p53の活性化が起こることがDBAの中心的な病因と考えられている<sup>28)</sup>。

表5. Diamond-Blackfan貧血の遺伝子型

遺伝子	Gazda <i>et al.</i> (%) (欧米)	Kuramitsu <i>et al.</i> (%) (日本)
RPS19	25	17.6
RPL5	6.6	10.3
RPS10	6.4	1.5
RPL11	4.8	4.4
RPL35A	3.5	1.5
RPS26	2.6	1.5
RPS24	2.0	0
RPS17	1.0	5.9
Total	52.9	42.6

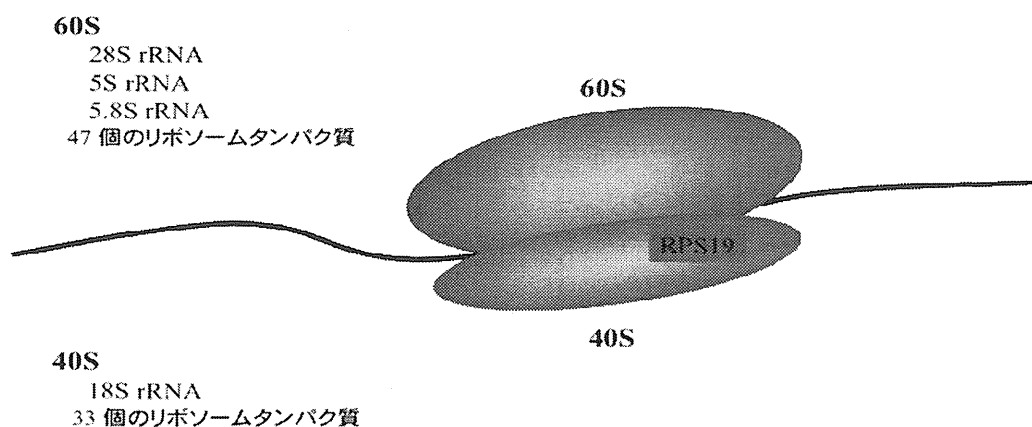


図2 リボソームの構造

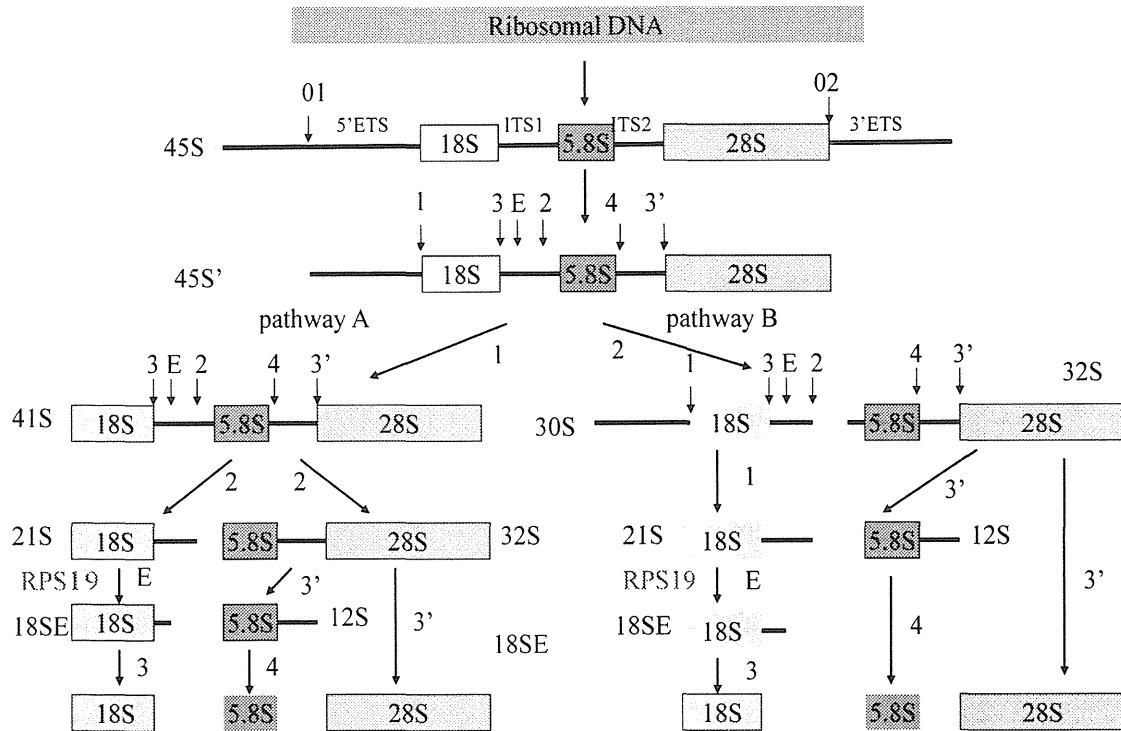


図3 rRNAの成熟とRPS19の役割

成熟した18S, 5.8S, 28S rRNAの塩基配列は、45S 転写産物の中でexternal transcribed spacer (5'-ETSと3'-ETS)が両側面に位置し、internal transcribed spacer (ITS1とITS2)によって隔てられている。45S' に切断点を記載した。最初に5'-ETS上のsite 1でプロセッシングされるpathway AとITS1上のsite 2でプロセッシングされるpathway Bの2つの経路がある。ヒトの細胞における18S rRNAの3' endの成熟は、多段階的に起る。Pathway Aでは、まず、ITS1上のsite 2で開裂が起こり、次にsite E、そして最後にsite 3で切断され、成熟した18S rRNA の3' endが完成する。RPS19の推定される機能を図中に記載した。矢印はcleavage siteを示す。

## 5. 臨床症状

### 1) 貧血

貧血は新生児期から顔色不良で発見されることが多く、6ヶ月までに75%、1歳までに90%が発症する。

### 2) 合併奇形 (表6)

Diamond-Blackfan貧血の臨床像は多様で、約40%の例に種々の奇形を合併するが、全く身体奇形がみられない症例も存在する<sup>11)</sup>。頭部・顔部の異常が最も多く大頭、小頭、大泉門開大、顔貌異常、小顎、口蓋裂、巨舌、兔唇などが約20%に認められる。上肢の異常としては母指球の平坦化、母指骨異常などが9~21%に認められる。腎泌尿器系の奇形や先天性心疾患を約7%に認める。また、知能障害、低身長なども認められることがある。

### 3) 悪性腫瘍の合併

これまでに700例以上のDBA症例から29例(4%)の悪性腫瘍の報告がある<sup>11)</sup>。北米DBAレジストリー(DBAR)に登録されている608例の前方視的解析から、白血病や固形癌を含めた全ての悪性腫瘍の発症率が、一般の集団に比べて有意に高いこと(5.4倍)が明らかになった<sup>14)</sup>。特に、AML/MDS、骨肉腫、大腸癌、女性器腫瘍の発症率が高い。



表6. Diamond-Blackfan貧血にみられる合併奇形の頻度

症状		北米	欧州
患者数		420	229
頭部、顔面、口蓋	両眼隔離症、口蓋裂、高口蓋、 小頭症、小顎症、小耳症、耳低位、 内眼角ぜい皮、眼瞼下垂など	24%	21%
上肢	拇指骨数過多症、重複拇指、 拇指低形成、平坦拇指球、合指症、 橈骨動脈欠損	21%	9%
腎、泌尿器	腎臓欠損、馬蹄腎、腎低形成	19%	7%
心・肺	心室中隔欠損、心房中隔欠損 大動脈縮窄、複雑心奇形	15%	7%
その他			
頸部	短頸、翼状頸	NA	4%
眼	先天性緑内障、斜視、先天性白内障	NA	12%
神経系	学習障害	NA	7%
低身長		NA	30%
合併奇形あり		47%	41%
重複奇形		25%	24%

## 6. 治療法

### 1) 薬物療法

副腎皮質ステロイド療法は約80%の症例で反応が認められる。初期治療としてprednisolone 2 mg/kg/日から投与開始する。約20%の症例はステロイドから離脱可能となる<sup>11)</sup>。副作用として成長障害、骨粗しょう症、肥満、高血圧、糖尿病、白内障、緑内障などに注意が必要で6ヶ月未満の症例において推奨されない<sup>11)</sup>。他の治療薬剤としてシクロスポリン、メトクロプラミド、EPOなどがあげられるが、プレドニゾロン+シクロスポリン併用療法も含め、一定の評価はまだ得られていない。

### 2) 輸血

副腎皮質ステロイド抵抗性である場合には、4～8週毎の輸血が必要となる。ヘモグロビン値は、8 g/dlを維持することが基本であるが長期間の輸血は、鉄過剰によるヘモジデロシスをきたす。鉄沈着による肝障害、糖尿病、心筋障害を避けるため、desferasiroxあるいはdeferoxamineによる除鉄療法の併用が望ましい。しかし、新生児期からの経口除鉄療法は確立していない。

### 3) 造血幹細胞移植

ステロイド不応性の輸血依存例は、造血幹細胞移植の適応となる。本邦の移植成績は海外に比して良好である。これまでに19例の同種移植が行なわれ、骨髄移植を受けた13例（6例：HLA一致同胞、7例：非血縁者ドナー）は全て無病生存している<sup>17)</sup>。しかし、臍帯血移植(CBT)は5例に行なわれ、血縁者間CBTを受けた2例は無病生存しているが、非血縁者間CBTを受けた3例のうち、2例は生着が得られず、1例は生着したがリンパ増殖性疾患で死亡している。したがって、現時点では移植ソースとしてはできるだけ骨髄を選択すべきである。Busulfan（経口で16 mg/kgあるいは560 mg/m<sup>2</sup>）、cyclophosphamide（120～200 mg/kg）を中心とした前処置はHLA一致同胞間移植が中心であるが、良好な成績が得られている。少数例ながらbusulfanを半量にした前処置は非血縁骨髄でも良好な成績だが、busulfanを全く用いない前処置ではやや生着不全が多く、骨髄非破壊的前処置を支持するデータは不十分である<sup>29)</sup>。

## 7. 問題点・将来展望

わが国のDiamond-Blackfan貧血患者は、日本小児血液学会の再生不良性貧血委員会で、毎年新患発生数の把握や患者の追跡調査がおこなわれていたが、診断は各施設にまかされてきた。平成21年度から中央診断を伴う登録システムを確立し、遺伝子診断も開始した。しかし、軽症例まで正確に診断できる診断基準はまだ存在しないため、優れた診断基準の作成が必要である。

DBAは、リボソームタンパクの欠損によって起る唯一のヒトの先天性疾患である。しかし、一群の先天性骨髄不全症（Dyskeratosis Congenitaや Shwachman-Diamond症候群）の原因遺伝子産物も全てリボソーム合成に関与していると考えられている。これらの疾患は、骨髄不全の他に先天奇形や発がん素因を共有しDBAとの類似点が多く、リボソームの機能不全によって起こる骨髄不全症候群であると考えられる。さらに、最近、後天性血液疾患である5q欠失症候群も「リボソーム病」であることが明らかになった。5q欠失症候群は、del (5q)の染色体異常と赤血球系細胞の分化障害を特徴とする骨髄異形成症候群の一つである。この疾患は、中年女性に好発し、大球性貧血、血小板増加、骨髄の芽球は5%未満、単核か低分葉小型巨核球が目立つことなどの特徴がある。多くは赤血球輸血依存性に陥るが、急性白血病への移行は比較的少ない。2008年、Ebertらは、本疾患の原因がリボソームタンパクをコードするRPS14遺伝子であることを明らかにした<sup>30)</sup>。したがって、DBAの研究は後天性造血不全の診断・治療の進歩にも大きな貢献をされると考えられる。

副腎皮質ステロイド療法以外の新規治療法の開発が望まれる。最近、マウスやゼブラフィッシュのDBAモデルを用いて、必須アミノ酸L-ロイシンが貧血を軽減する効果があることが示された<sup>31) 32)</sup>。既に、DBAに対する治療効果をみる臨床試験が米国で始まっている。

既知のDBAの原因遺伝子が同定される割合は半分未満、これらの症例における次世代シーケンサーでの網羅的遺伝子解析は新規原因遺伝子の同定に有用である可能性がある。

## 参考文献

1. Da Costa L, Willig TN, Fixler J, Mohandas N, Tchernia G. Diamond-Blackfan anemia. *Curr Opin Pediatr.* 2001; 13:10-15.
2. Josephs HW: Anaemia of infancy and early childhood. *Medicine* 1936; 15:307.
3. Diamond LK, Blackfan KD: Hypoplastic anemia. *Am J Dis Child* 1938; 56: 464-7.
4. Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet.* 1999; 21: 169-75.
5. Doherty L, Sheen MR, Vlachos A, et al. Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet.* Feb 12 2010;86:222-8.
6. Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet.* Dec 2008;83:769-80.
7. Farrar JE, Nater M, Caywood E, et al. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, Rpl35a, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2008;112:1582-92.
8. Gazda HT, Grabowska A, Merida-Long LB, et al. Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet.* Dec 2006; 79: 1110-8.
9. Gazda HT, Preti M, Sheen MR, et al. Frameshift mutation in p53 regulator RPL26 is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in diamond-blackfan anemia. *Hum Mutat.* 2012; 33: 1037-44.
10. Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, et al. Exome sequencing identifies *GATA1* mutations resulting Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest.* 2012; 122(7): 2439-43.
11. Vlachos A, Ball S, Dahl N, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol.* 2008;142:859-76.
12. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, et al. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2012; 119: 2376-84.
13. Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood.* 2010;115:3196-205.
14. Vlachos A, Rosenberg PS, Atsidaftos E, Alter BP, Lipton JM. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood.* 2012; 119: 3815-9.
15. Ohga S, Mugishima H, Ohara A, Kojima S, Fujisawa K, Yagi K et al. Diamond-Blackfan anemia in Japan: clinical outcomes of prednisolone therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2004; 79:22-30.
16. 小原明: 日本における小児特発性再生不良性貧血など造血障害性疾患の現状。—日本小児血液学会再生不良性貧血委員会疫学調査 1988~2005年— 日小血会誌 2008; 22: 53-62.
17. Mugishima H, Ohga S, Ohara A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for Diamond-Blackfan anemia: a report from the Aplastic Anemia Committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology. *Pediatr Transplant.* 2007;11:601-7.
18. Willig TN, Draptchinskaia N, Dianzani I, et al. Mutations in ribosomal protein S19 gene and diamond blackfan anemia: wide variations in phenotypic expression. *Blood.* 1999 ;94:4294-306.
19. Ramenghi U, Garelli E, Valtolina S, et al. Diamond-Blackfan anaemia in the Italian population. *Br J Haematol.* 1999;104:841-8.
20. Campagnoli MF, Garelli E, Quarello P, et al. Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: new findings from the Italian registry and a review of the literature. *Haematologica.* 2004;89:480-9.
21. Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, et al. Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat.* 2007; 28:1178-82.
22. Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H et al. Identification of mutations in the ribosomal protein L5 (RPL5) and ribosomal protein L11 (RPL11) genes in Czech patients with Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat.* 2009; 30:321-7.
23. Konno Y, Toki T, Tandai S, et al. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 2010;95:1293-9.
24. Leger-Silvestre I, Caffrey JM, Dawaliby R, et al. Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis. *J Biol Chem.* 2005;280:38177-85.
25. Choessel V, Bacquerville D, Rouquette J, et al. Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2007;109:1275-83.
26. Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, et al. Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood.* 2007;109: 980-6.
27. Choessel V, Fribourg S, Aguisa-Touré AH et al. Mutation of ribosomal protein RPS24 in Diamond-Blackfan anemia results in a ribosome biogenesis disorder. *Hum Mol Genet.* 2008; 17: 1253-63.

28. Fumagalli S, Di Cara A, Neb-Gulati A, et al. Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol.* 2009;11:501–8.
29. Yabe H, Inoue M, Koh K, et al. 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). *Bone Marrow Transplant* 2013; 48 (suppl): s152.
30. Ebert BL, Pretz J, Bosco J et al. Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature.* 2008; 451: 335-9.
31. Jaako P, Debnath S, Olsson K, et al. Dietary L-leucine improves the anemia in a mouse model for Diamond-Blackfan anemia. *Blood.* 2012; 120: 2225-8.
32. Payne EM, Virgilio M, Narla A, et al. L-Leucine improves the anemia and developmental defects associated with Diamond-Blackfan anemia and del (5q) MDS by activating the mTOR pathway. *Blood.* 2012; 120: 2214-24.

# Reference guide for the clinical diagnosis and management of Diamond-Blackfan Anemia

Etsuro Ito<sup>1</sup>, Kiminori Terui<sup>1</sup>, Seiji Kojima<sup>2</sup>, Shoichi Oga<sup>3</sup>, Akira Ohara<sup>4</sup>, Hitoshi Kanno<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Hirosaki University Graduate School of Medicine,

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine,

<sup>3</sup>Department of Perinatal and Pediatric Medicine, Kyushu University Graduate School of Medicine,

<sup>4</sup>Department of Transfusion Medicine, Toho University,

<sup>5</sup>Department of Transfusion and Cell Processing, Tokyo Women's Medical University

Introduction

1. Diagnosis

- Definition
- Diagnostic criteria
- Flowchart for diagnosis
- Differential diagnosis

2. Epidemiology

- Incidence
- Prognosis

3. Pathophysiology

4. Clinical and laboratory features

- Anomalies
- Development of malignancies

5. Treatment

- Transfusion
- Drug
- Hematopoietic stem cell transplantation

6. Perspectives

## 1. Introduction

Diamond-Blackfan Anemia (DBA) is a rare congenital inherited bone marrow-failure syndrome (IBMFS) characterized by normochromic macrocytic anemia, reticulocytopenia, and absence or insufficiency of erythroid precursors in normocellular bone marrow [1]. Although macrocytic anemia is a prominent feature of DBA, the disease is also characterized by growth retardation and congenital anomalies, including craniofacial, upper limb/hand, cardiac, and genitourinary malformations, which are present in approximately 40% of patients [4-6]. DBA occurs in both familial and sporadic forms. Most cases of DBA are sporadic, occurring at equal rates in men and women, but at least 10 to 20% of patients have a family history of the disorder, with autosomal dominant being the most frequently observed pattern of inheritance [1].

DBA was first reported by Josephs in 1936 and refined as a distinct clinical entity by Diamond and Blackfan in 1938 [2, 3]. The basic molecular defects behind DBA were unknown until the discovery of the first DBA gene, *RPS19* [4]. Following the observation that a DBA patient had an X;19 chromosomal translocation, a major DBA locus was mapped to chromosomal location 19q13, and the breakpoint was found within the *RPS19* gene, which encodes one of 80 ribosomal proteins [4]. Subsequent large-scale studies established that *RPS19* is mutated in approximately 25% of DBA patients [18]. Mutations in other RP genes are also associated with DBA; these genes include *RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, and *RPS26* (encoding RPs for the small ribosomal subunit) and *RPL5*, *RPL11*, *RPL26*, and *RPL35A* (encoding RPs for the large subunit) [5-9]. Recently, mutations in the gene encoding the erythroid/megakaryocytic transcription factor *GATA1* were identified in cases of DBA exhibiting an X-linked inheritance pattern [10]. These mutations have been reported in about 50% of DBA patients in Europe and the USA [11] and in about 40% of patients in Japan [12]. Except for rare germline *GATA1* mutations reported in two X-linked DBA families [10], all known causative mutations involve ribosomal genes; approximately half of the DBA patients have heterozygous mutations in one of 10 RP genes, suggesting that DBA is caused by ribosome dysfunction [13].

In addition, DBA patients have a predisposition to the development of malignancies (e.g., acute myeloid leukemia (AML), myelodysplastic syndrome (MDS), colon cancer, and osteogenic sarcoma) [14]. Corticosteroids and transfusion are the mainstays of treatment. Approximately 80% of patients respond to an initial course of steroids; however, only 60 to 70% of patients ultimately become transfusion independent [11]. Bone marrow transplantation is the only curative treatment but requires an HLA-matched sibling and is primarily reserved for patients with severe complications [11, 15]. Because of the small number of patients with DBA, randomized prospective clinical trials for DBA are rare, and there is not much information on which to base novel therapies for DBA. Therefore, we have prepared guidelines for DBA patients in Japan based on data from DBA registrations in Japan and outside the country as well as published data.

## 2. Diagnosis

### 1) Etiology

DBA is a hematological disorder caused by ribosomal dysfunction and characterized by pure red cell aplasia, physical abnormalities, and a predisposition to myelodysplastic syndrome (MDS), leukemia, and solid tumors.

### 2) Diagnostic criteria

The diagnostic criteria for "classical" DBA include macrocytic (or normocytic) anemia with no other significant cytopenia presenting prior to the first birthday, reticulocytopenia, and normal marrow cellularity with paucity of erythroid precursors, and is accompanied by congenital anomalies in some cases. However, diagnosis of DBA is often difficult due to the incompleteness of phenotypes and the wide variability in clinical expression [4-6]. Even mutations in individual RP genes lead to widely variable phenotypic expression; family members with the same mutation in an RP gene can present with clinical differences. For example, *RPS19* mutations are found in some first-degree relatives presenting only with isolated high erythrocyte adenosine deaminase activity and/or macrocytosis [18]. Therefore, it is very difficult to make a diagnosis on the basis of clinical phenotype alone. Molecular diagnosis enables the detection of carriers and the avoidance of hematopoietic stem cell transplantation from sibling donors with these mutations. However, about 50% have no known pathogenic mutations. The diagnostic and supporting criteria for diagnosis of DBA, including mild-type, are described in **Table 1**. We have modified the criteria from the international clinical consensus conference [11] based on our results for the novel DBA biomarker reduced glutathione (GSH).

**Table 1. Diagnostic criteria for patients with Diamond-Blackfan Anemia (DBA)**

Diagnostic criteria

- Age less than 1 year
- Macrocytic anemia with no other significant cytopenias
- Reticulocytopenia
- Normal marrow cellularity with paucity of erythroid precursors

Supporting criteria

Major

- Gene mutation described in “classical” DBA
- Positive family history

Minor

- Elevated erythrocyte adenosine deaminase (eADA) activity and erythrocyte reduced glutathione (eGSH)<sup>1</sup>
- Congenital anomalies described in “classical” DBA
- Elevated HbF
- No evidence of other inherited bone marrow failure syndromes

“Classical” DBA fulfill all four diagnostic criteria.

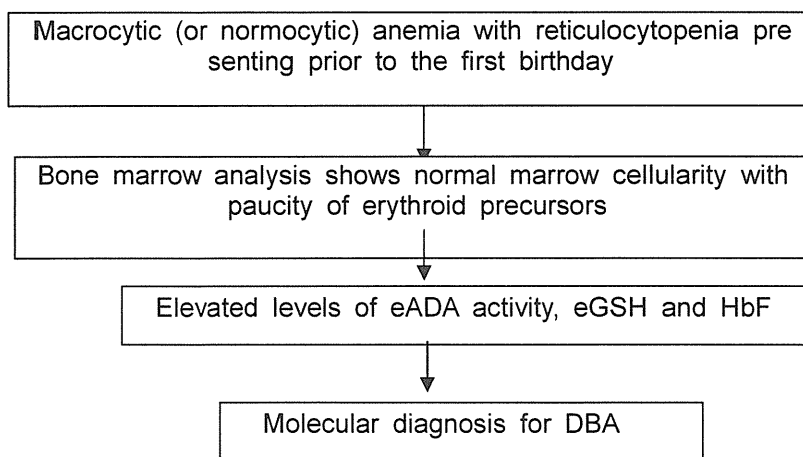
“Non-classical” DBA fulfill one of the following

1. Three of the diagnostic criteria and one major or two minor supporting criteria.
2. Two of the diagnostic criteria and two major or three minor supporting criteria.
3. Two major supporting criteria

<sup>1</sup>eADA activities and eGSH should be measured simultaneously and the data statistically analyzed using linear analysis according to SNV methods to predict DBA.

3) Flowchart for diagnosis of DBA (**Figure 1**)

There have been no reliable methods with which to screen for DBA. It is important to confirm increased eADA activity ( $\geq +3SD$ ); however, eADA activity is not significantly elevated in about 20% of DBA patients. Statistical analysis of eADA activity and eGSH using linear analysis according to SNV methods can distinguish DBA patients with known DBA genes from their healthy family members (Kanno et al. unpublished data). Although genetic screening is the most reliable method for making a diagnosis of DBA, mutations in the known causative genes have been identified in only about 50% of Japanese patients. Gene copy number analysis should be performed in cases where Sanger sequencing does not identify mutations in the known, DBA-associated ribosomal protein genes or *GATA1*.



**Figure 1. Flowchart for diagnosis of DBA**



4) Differential diagnosis

In children, transient erythrocytopenia in childhood (TEC) should be a major consideration [11]. TEC usually presents in children older than 1 year of age following viral infection. Most cases resolve spontaneously within 1 to 2 months. Patients with TEC present with normocytic anemia and, in contrast to those with DBA, their HbF levels and eADA activities are normal (Table 2). Congenital bone marrow failure syndromes accompanied by physical anomalies include Dyskerotosis Congenita, Shwachman-Diamond syndrome, congenital amegakaryocytic thrombocytopenia, and Pearson syndrome, as described in Table 3. Although all of these diseases are extremely rare, it is possible to discriminate them from specific clinical findings. Recently, because the causative genes for all of these diseases have been identified, the molecular etiology may be clarified in the near future, and genetic diagnosis may be possible in many patients.

**Table 2. Differential diagnosis of DBA versus TEC**

	DBA	TEC
Pure red cell anemia	Present	Present
Age	< 1 year	> 1 year
Inheritance	Sporadic and dominant inheritance	Not inherited
Congenital anomalies	Present	Absent
Mean corpuscular volume (MCV)	Elevated	Normal
HbF	Elevated	Normal
iRBC antigen	Present	Absent
eADA activity	Elevated	Normal

**Table 3. Congenital aplastic anemia**

	FA	DKC	SDS	CAMT
Number of cases	>1000	>225	>300	>45
Inheritance	AR FANCB:XLR	AR DKC:XLR TERC, TINF2:AD	AR	AR, XL
Causative genes	<i>FANCA</i> (57-66%) <i>FANCB</i> (rare) <i>FANCC</i> (10-15%) <i>FANCD1/BRCA2</i> (2-4%) <i>FANCD2</i> (~2%) <i>FANCE</i> (rare) <i>FANCF</i> (2%) <i>FANCG/XRCC9</i> (9%) <i>FANCI/BACH1</i> (rare) <i>FANCL/PHF9/POG</i> (rare) <i>FANCM/Hef</i> (rare) <i>FANCN/PALB2</i> (2%) <i>FANCO/RAD51</i> (rare) <i>FANCP/SLX4</i> (rare)	<i>DKC1</i> (30%) <i>TERC</i> (<5%) <i>TERT</i> (<5%) <i>TINF2</i> (11%) <i>NOP10</i> (rare) <i>NHP2</i> (rare)	<i>SDSB</i> (95%)	<i>c-Mpl</i> (~100%)
Mean age at diagnosis	7.6 years	5~15 years	4 months	9 months
Congenital anomalies	75%	100%	60%	40%
Pancytopenia	90%	50% (up to 10 years)	95% (neutropenia)	40%
Transition to MDS/AML	>14%	0.4~1.3%	5~33%	5%
Development of malignancy	7%	8~12%	0%	0%
Chromosomal instability	Present	Absent	Absent	Absent
Average life expectancy	30 years	80% die by 30 years	35 years	50% die by 3 years

FA: Fanconi anemia, DKC: Dyskeratosis congenita, SDS: Shwachman-Diamond syndrome,

MMC: mitomycin C, CAMT: Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia

DEB: diepoxybutane, AR: autosomal recessive, AD: autosomal dominant, XL: X-linked

### 3. Epidemiology

#### 1) Incidence

Ten to 20% of families have more than one affected individual and the majority of these cases appear to be dominantly inherited. The remaining cases are sporadic or familial with other inheritance patterns. The incidence is estimated to be 5 to 7 per million live births. In the Registration of Japanese Society of Pediatric Hematology and Oncology, 175 patients with DBA, including patients diagnosed as idiopathic pure red cell anemia, were reported during the period from 1988 to 2011 (Table 4).

**Table 4. Bone marrow failure syndromes in the Registry for the aplastic anemia committee of the Japanese Society of Hematology**

	Idiopathic	Post-hepatitis	Other secondary	Fanconi anemia	Diamond-Blackfan anemia	Total
1988	63	6	0	4	6	79
1989	56	6	0	7	3	72
1990	52	5	0	9	3	69
1991	69	11	1	4	4	89
1992	84	8	1	6	4	103
1993	62	6	1	8	9	86
1994	70	8	0	4	6	88
1995	49	8	2	5	9	73
1996	52	12	1	3	4	72
1997	76	5	0	7	6	94
1998	64	7	0	7	8	86
1999	52	5	1	2	7	67
2000	51	11	0	8	7	77
2001	41	11	0	8	7	67
2002	54	7	0	0	5	66
2003	33	1	0	2	4	40
2004	40	8	0	3	4	55
2005	34	4	1	2	2	43
2006	58	5	0	5	10	68
2007	62	8	0	4	10	84
2008	68	11	0	6	14	99
2009	68	7	0	1	18	94
2010	55	13	0	4	10	92
2011	56	5	0	2	15	78
Total	1369	178	8	111	175	1841

## 2) Natural history and prognosis

Overall survival for those with DBA is relatively favorable. However, 40% of patients are steroid-therapy dependent and another 40% are transfusion dependent. The quality of life sometimes deteriorates due to side effects of long-term steroid therapy and transfusion. Furthermore, DBA is a cancer predisposition syndrome, although the risk is much lower than for Fanconi Anemia. DBA is associated with increased risk for malignancies such as myelodysplastic syndrome (MDS), leukemia, colon cancer and osteosarcoma [14].

Despite studies on prognostic factors, the therapy-response for specific clinical findings remains unknown. Because our previous study showed that improvement in anemia at one year after onset was associated with transfusion independence, stem cell transplantation should be considered in cases of poor therapy-response after the first year [15].

## 4. Pathophysiology

Recently, following the observation that a DBA patient had an X;19 chromosomal translocation, a major DBA locus was mapped to chromosomal location 19q13, and the breakpoint was shown to occur in the *RPS19* gene, which encodes one of 80 ribosomal proteins [4]. Subsequent large-scale studies

established that *RPS19* is mutated in approximately 25% of DBA patients [18]. Other RP genes found to be mutated in DBA include *RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL26*, and *RPL35A* [5-9]. Approximately 50% of DBA patients in Western countries have a single heterozygous mutation in a gene encoding a ribosomal protein (**Table 5**) [5-9, 18-22]. In contrast, we observed a slightly lower frequency of mutations (about 30%) in ribosomal protein genes in DBA patients in Japan [23]. However, most of the studies did not include methods capable of detecting large deletions. Therefore, cases of DBA resulting from large chromosomal deletions or rearrangements are probably under-diagnosed. Recently, we found large deletions of known DBA genes in about 10% of patients [12]. Consequently, mutations in RP genes may occur in about 40% of Japanese patients (**Table 5**).

The ribosome is an intracellular organelle and is the site of protein synthesis and translation of messenger RNA into continuous chains of amino acids. The mammalian ribosome (80S) consists of a large subunit (60S) and a small subunit (40S), and each subunit is composed of ribosomal RNAs and ribosomal proteins (RPs) (**Figure 2**). RPs of the small and large subunits are called RPS and RPL, respectively. RP19, RPS24, RPS10, and RPS26 play important roles in maturation of the 18S rRNA and assembly of the 40S ribosomal subunit [5, 24-27]. Meanwhile, RPL35A, RPL5, and RPL11 play important roles in the maturation of the 28S and 5.8S rRNAs and assembly of the 60S ribosomal subunit (**Figure 3**) [6, 7]. Therefore, deficiency in RPs leads to relative lack of the 40S or 60S ribosomal subunits and a decline in translation initiation. The fact that all of the causative genes for DBA are ribosomal proteins, except for *GATA1*, suggests that insufficiency in ribosomal function may be the underlying cause of red cell aplasia in patients with DBA. Although the mechanism whereby mutations in the ribosomal protein genes cause specific defects in red cell maturation is not fully understood, many lines of evidence indicate that p53 activation caused by ribosomal dysfunction may be central to DBA pathogenesis [28].

**Table 5. Mutations in ribosomal protein genes in DBA patients (%)**

Genes	Gazda <i>et al.</i> (USA and Europe)	Kuramitsu <i>et al.</i> (Japanese)
<i>RPS19</i>	25	17.6
<i>RPL5</i>	6.6	10.3
<i>RPS10</i>	6.4	1.5
<i>RPL11</i>	4.8	4.4
<i>RPL35A</i>	3.5	1.5
<i>RPS26</i>	2.6	1.5
<i>RPS24</i>	2.0	0
<i>RPS17</i>	1.0	5.9
Total	52.9	42.6