

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：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：** ファンconi貧血（FA）とその関連病態が疑われる患者サンプルのエクソーム解析が、京都大学小川誠司研究室において進行している。2014年度には、主に東海大矢部博士からの新規症例9例が追加解析され、2015年度1月の時点で、FA症例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みいだし、サンガー法によるバリデーションを完了した。FANCA、FANCGを中心に、既知のファンconi貧血遺伝子の変異が同定され、候補遺伝子が同定されない症例も発見されている。さらに、今年度初めて家族性乳がん遺伝子でもあるBRCA2の両アレル変異の症例が同定された。

#### 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臨床重大な問題となっている。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遺伝子異常は日本人症例においては解析不十分であり、16種類におよぶ数多い原因遺伝子の異常についてその相対的頻度などは、FANCAが多数を占める事以外、明らかではなかった。また、FA遺伝子以外の変異においてFA類似の症状を示した症例の報告もあり（ブルーム症候群、ナイミーヘン症候群など）、DNA損傷応答遺伝子の変異と臨床症状との関係は、広いスペクトラムでオーバーラップする可能性が指摘されている。

本研究班では、遺伝学的検索を通じて、病態の本質の解明を試みる。すなわち、日本におけるFAと関連病態が疑われる患者の臨床材料を、次世代シーケンサーを中心とした方法を用いて解析し、原因遺伝子を同定し、既知の16種のFA遺伝子

のいずれかが変異しているのかを明らかにする。さらに、新規遺伝子変異による未同定の病態が発見される可能性がある。究極的には、これらの努力を通じて、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。

#### B. 研究方法

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

エクソーム解析の結果にもとづき、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おこなった。

（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号として承認をうけた。矢部みはる博士からの検体は京大への送付時にすべて匿名化されている。

## C. 結果

前年度までに東海大と京大に保存されていた症例サンプルの解析はかなり完了しており、今年度は、東海大の主に新規サンプルを中心に 9 検体の解析が行われた。現在までの結果を統合すると、FA 患者細胞のエクソーム解析とバリデーションが 3 年間に合計 77 症例行われたこととなる。その結果、FA の臨床診断が確定していた 68 症例のうち、41 症例で両アレル変異が確定し、片アレルが判明したものも 17 例に昇った。原因遺伝子の候補の同定に至らなかった症例は、10 例であった。

変異遺伝子の内訳としては、FANCA（片アレル例も含めて 41.1%）が最も高頻度で、次いで FANCG（同じく 29.4%）であった。特に FANCA については、多数の変異が同定された。繰り返し同定されるファウンダー効果のあるものはむしろ少数で、新規症例に変異部位を絞って解析を効率化することは困難で、エクソーム解析のようなすべての FANCA エクソンをシーケンスする方法でないと、見逃しが多いと予想される。

今回の解析では FANCC 変異として確定する例は一例もなく（一例 FANCC のミスセンス変異が認められたが、機能的には正常のバリエーションと考えられる）、ヨーロッパ系の FA 患者での状況と対象的であった。ヨーロッパ系 FA では、主にアシケナー・ジュダヤ人で FANCC が高頻度に認められるので、日本の状況とは異なっていると考えられる。

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（FANCP、FANCM、FANCF 等）が相次いで同定された。FANCP などは、海外ではまれであるが、日本では比較的高頻度である可能性も考えられる。また、FANCM については、この遺伝子による発症が確定した FA 患者は一例も報告されておらず、今回見つかった例が FANCM であることを細胞レベルの機

能アッセイで確定できれば、意義ある発見となる可能性がある。

今回同定されたなかには、家族性乳がん卵巣がん (Hereditary breast and ovarian cancer; HBOC) の原因でもある BRCA2、PALB2、BRIP1、RAD51C の変異はほとんどみつからず、一例に BRCA2 の両アレル変異、一例に PALB2 の片アレル変異が見つかったに過ぎない。HBOC の原因となる FA 遺伝子の変異は、もともと欧米でもまれなタイプではあるが、日本にも HBOC の患者が乳がんの 5% 程度は存在し、その頻度は欧米と同等と考えられる。この結果は、日本人の HBOC の原因となる BRCA2 などの変異がホモとなった場合、致死となって生まれてこなかった可能性も考えられる。東海大からの症例に両親が血族である例を含まないことから、現在日本での血族結婚の頻度はかなり低下しているものと推察している。より症例数を拡大し、家族内の HBOC 発生との関係にも留意しつつ、検討を今後も継続し正確な頻度を確定させることが望まれる。

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、次世代シーケンサー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。引き続き、患者細胞における遺伝子相補を中心に、機能解析をすすめている。

## D. 考察

現在までのエクソーム解析の結果をみると、ほとんどの場合サンガー法によるバリデーションにおいて確認されており、非常に正確な結果が得

られている。従来、RNA から cDNA を合成して PCR し、ダイレクトシーケンスによって遺伝子変異の探索を行ってきたが、その方法で見逃された遺伝子変異が繰り返し同定され、正確性・効率性も高いと評価される。一方、エクソーム解析では大きなゲノム欠失は発見できないことが危惧される。特に FANCA 遺伝子には、比較的大きなゲノム欠失が高頻度にみられ、この点がエクソーム解析の唯一の問題点であり、リード数を用いたコピー数解析の精度をあげてカバーできれば理想的である。そのためには、おそらくリード数自体を多めにとることが必要で、費用との兼ね合いが問題となる。一方、MLPA により検体をプレスクリーニングすることが有効と思われる。現在商業的に利用できる MLPA は FANCA と FANCD1、FANCN であり、オプションとして他の遺伝子の MLPA 検査が可能となることが望まれる。

今回の結果から、片方アレルの同定にとどまった症例、ミスセンス変異が同定された症例については、診断が確定したとは言いがたい。これらの症例において、ゲノム欠失がもう一方のアレルに起こっている可能性を否定するため、現在カスタムアレイによる CGH を計画しており年度内に結果を得ることを予定している。

## E. 結論

エクソーム解析により、従来の研究では不可能な規模の症例数で日本人 FA 患者の分子診断が順調に進行している。これらの成果がまとまれば、日本人 FA の臨床像疫学がより正確に浮き彫りとなり、今後の診断治療の高度化に貢献できるものと思われる。さらに、従来未知であった病因遺伝子の同定が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP

kinase during DNA cross-link repair. 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. *Nucleic Acids Res.* 2013 Aug 1;41(14):6930-6941.

2) Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. 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. *Blood.* 2013 Oct 31;122(18):3206-9.

3) Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, Takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, Enomoto T. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan 10. pii: S0167-4889(14)00006-8. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.005.

## 2. 学会発表

1) 日本血液学会 札幌 10月11~13日 プログレス教育講演 「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-」ロイトン札幌

2) FANCD2 in chromatin anchors CtIP and regulates DNA end resection during crosslink repair. J. Unno, A. Itaya, M. Taoka, K. Sato, J. Tomida, W. Sakai, T. Ikura, T. Isobe, H. Kurumizaka, M. Takata 25<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium October 24<sup>th</sup>-27, 2013 Houston, Texas

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：Diamond-Blackfan 貧血の網羅的遺伝子解析に関する研究

研究分担者 伊藤悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）

**研究要旨：** Diamond-Blackfan anemia (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。しかし、我が国の DBA 患者の約 60%は、原因遺伝子が不明である。これまでに解析した DBA 120 例の内、原因遺伝子の同定されていない 70 例に対して、全エクソン解析を行った。その結果、既知の RP 遺伝子の変異を 22 例に検出した。さらに、新規原因候補遺伝子 *RPS27* のフレームシフト変異と *RPL27* のスプライス変異を各 1 例に見出した。*RPS27* と *RPL27* の発現を *in vitro* でノックダウンすると、リボソーム RNA のプロセッシング異常が認められ、*rpl27* 変異のゼブラフィッシュモデルでは赤血球造血の障害と尾の発生異常が認められた。以上の結果から、*RPS27* と *RPL27* が DBA の新規原因遺伝子であることが強く示唆された。RP 遺伝子以外の新規原因遺伝子候補も同定し、解析を進めている。

## A. 研究目的

Diamond-Blackfan anemia (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。治療は副腎皮質ステロイドが第一選択であるが、ステロイド依存や輸血依存症例が全体の約40%存在する。難治例には造血幹細胞移植 (HSCT) が行われている。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。平成21年度に難治性疾患克服研究事業「先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血)の効果的診断法の確立に関する研究」班 (研究代表者 伊藤悦朗) が成立し、我が国のDBA患者では、通常のシーケン解析では検出できないRP遺伝子の片アレルの欠失が約10%存在することが明らかになった。しかし、まだ約60%のDBA患者では、原因遺伝子が不明である。本研究の目的は、次世代シーケンサーにより、新規のDBA原因伝子の探索をすることである。

## B. 研究方法

原因遺伝子が不明な臨床検体についてエクソーム解析を行う。ヒト全エクソン領域を target

とするベイトと呼ばれる RNA ライブラリーと溶液中でハイブリダイズによりキャプチャし、イルミナ社の高速シーケンサーHiSeq2000 で網羅的な解析を行う。得られた遺伝子異常は、サンガーシーケンスや次世代シーケンサー (MiSeq) を用いてターゲットシーケンスを行い確認する。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基多型 (non-synonymous SNP) が多数見つかる予想される。このため、発端者に加え、家族内罹患者と陰性コントロール (非罹患同胞や両親) も解析して、シーケン解析で得られる non-synonymous SNP と家系内罹患者との相関を検討することで原因遺伝子の候補を絞り込み、新規原因遺伝子を同定する。

(倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、弘前大学、東京女子医大、国立感染症研究所、東京大学および東京医科歯科大学の倫理審査会の承認の得た上で患者の同意を得た場合に限り検体を研究に使用する。中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得、患者及び患者保護者

の同意を取得した後に行う。

### C. 研究結果

これまでに解析した DBA 120 例の内、原因遺伝子の同定されていない 70 例に対して、全エクソン解析および s-qPCR を行った。その結果、既知の RP 遺伝子の変異を 22 例 (*RPS7*: 3 例、*RPS17*: 1 例 (大欠失)、*RPS19*: 5 例、*RPS26*: 3 例、*RPL5*: 2 例、*RPL11*: 1 例、*RPL35A*: 7 例) に検出した。

さらに、これまでに報告のない新規原因候補遺伝子 *RPS27* (フレームシフト変異) と *RPL27* (スプライス変異) を各 1 例に見出した。今年度は、この 2 遺伝子に焦点を絞り機能解析を行った。

*RPS27* のフレームシフト変異 (c.90delC, p.Tyr31ThrfsX5) は、2 歳の女兒 (孤発例) に見出された。貧血以外の身体異常は伴わず、ステロイドに対する反応は良好であった。*RPL27* のスプライス変異 (c.-2-1G>A) は、1 歳女兒 (孤発例) に検出された。先天性心疾患 (ASD, PS) を合併し、ステロイドにはよく反応した。両親に変異はなく、*de novo* 変異であった。

#### (1) *RPL27* と *RPS27* の発現抑制と rRNA のプロセッシングの異常.

赤芽球系細胞株 K562 に *RPL27* と *RPS27* に対する siRNA を導入して、*RPL27* と *RPS27* をノックダウンし、ノーザンブロット法で解析した。その結果、*RPS27* はリボソーム小サブユニットを構成する 18S rRNA のプロセッシングに、*RPL27* は大サブユニットを構成する 28S と 5.8S rRNA のプロセッシングに重要な役割を果たしていることが明らかになった (図 2)。

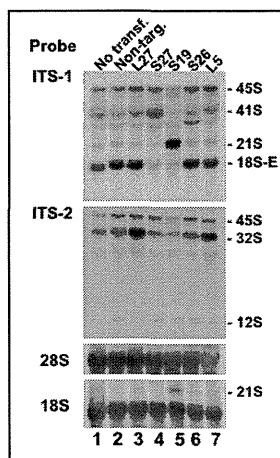


図 2. *RPL27* と *RPS27* のノックダウンによる rRNA のプロセッシングの障害. ITS-1 と ITS-2 プローブを用いてノーザンブロット法で解析すると、*RPS27* をノックダウンした細胞では 41S pre-rRNA が、*RPL27* をノックダウンした細胞では、18S-E pre-rRNA が蓄積していることが明らかになった。

#### (2) ゼブラフィッシュによる機能解析.

宮崎大学の剣持直哉博士との共同研究で進められた。

(a) ヒトとゼブラフィッシュの *RPL27* 遺伝子の構造. これら 2 種間における *RPL27* 遺伝子のエクソンとイントロン構造は同じで、特にエクソンの長さはほぼ同じであった (図 3)。また、アラインメントの結果、コーディング領域は 84%、アミノ酸は 96% が一致していた。

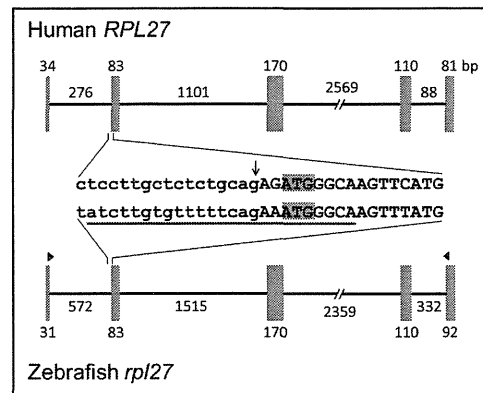


図 3. ヒトとゼブラフィッシュの *RPL27* 遺伝子の構造. 上段にヒト、下段にゼブラフィッシュの構造を示した。グレーのボックスはエクソン、黒の実線はイントロンを示している。中央には各遺伝子の第 1 イントロン (小文字) と第 2 エクソン (大文字) の配列の一部を示した。矢印はヒトで新たに変異が同定された部位、グレーの網掛けは開始コドンを示している。また、逆転写 PCR で用いたプライマーを矢尻で示した。下線部はスプライシングを阻害するモルフォリノオリゴ (MO) が結合する配列を示す。

(b) *RPL27* 遺伝子の第 1 イントロンのアクセプター部位に変異を持つ患者では、開始コドンを含む第 2 エクソンが欠損した mRNA が発現していた。そこで、遺伝子構造が同じであるゼブラフィッシュにおいて造血との関係を調べるために、オーソログである *rpl27* の第 1 イントロンのアクセプター部位を標的とし、スプライシングを阻害するアンチセンスオリゴ (*rpl27*MO) を設計した (図 3 赤の下線部)。

### (3) ノックダウン胚における形態形成の観察.

*rpl27* MO の注入によるスプライシング阻害がゼブラフィッシュの形態形成にどのような影響を与えるのかを観察した。その結果、受精後 25 時間では、体長の短縮、不完全な卵黄伸長部の形成、腹側に屈曲した尾部が見られた(図 4.中段の矢印、破線部)。このような表現型は、*in vitro* 転写で合成した *rpl27* mRNA を同時に注入することで回復することを確認した(図 4.下段)。

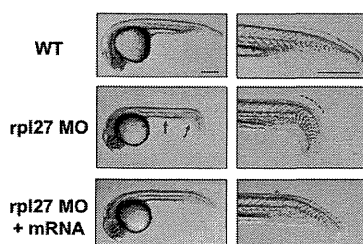


図 4. *rpl27* MO 注入胚、*rpl27* mRNA 同時注入胚の形態形成.受精後 25 時間の野生型(上段)、*rpl27* MO 注入胚(中段)、合成 *rpl27* mRNA 同時注入胚(下段)を胚全体と尾部に分けて示した。矢印と黒の破線は、不完全な卵黄伸長部の形成と尾部の屈曲を示す。これらの表現型は、合成 *rpl27* mRNA を同時に注入することで回復した(下段)。注入した MO の濃度は 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。スケールバーは 250  $\mu\text{m}$ 。

### (4) ヘモグロビン染色による造血能の解析.

48 時間胚での血球数を観察するためにヘモグロビン染色を行った。野生型の心臓と卵黄囊の表面には血球(顆粒状の赤茶色)が多く存在していた(図 6.左)。*rpl27* MO 注入胚では、顕著な血球の減少がみられた(図 5.中央)。*rpl27* mRNA を同時に注入した胚では、62%の胚で血球数の回復がみられた(図 5.右)。以上の結果は、*RPS27* と *RPL27* は DBA の新規原因遺伝子であることを強く示唆している。

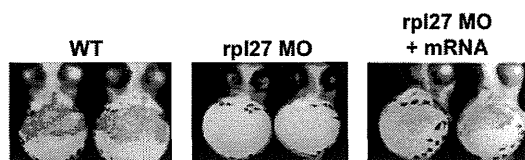


図 5. ヘモグロビン染色による血球の確認.受精後 25 時間の野生型(左)、スプライシング抑制胚(中央)、合成 *rpl27* mRNA 同時注入胚(右)のヘモグロビン染色を示した。スプライシング抑制胚では血球数の顕著な減少が見られたが、合成 *rpl27* mRNA の同時注入により、血球数の回復がみられた。注入した MO の濃度は 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

## D. 考察

我が国の DBA は、まだ約 60%が原因遺伝子不明であった。今回の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、既知の RP 遺伝子の変異を 22 例に検出した。さらに原因候補遺伝子として、2 つの RP 遺伝子 (*RPL27* と *RPS27*) を同定した。これらの変異は *de novo* 変異であり、いずれも正常の蛋白が発現できない変異であった。今回、ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析により、これらの遺伝子の変異が貧血の原因になることが確認された。RP 遺伝子以外の新規原因遺伝子候補も同定し、解析を進めている。

## E. 結論

1. DBA 120 例の内、原因遺伝子の同定されていない 70 例に対して、全エクソン解析を行い、既知の RP 遺伝子の変異を 22 例に検出した。
2. DBA の新規原因候補遺伝子 *RPS27* と *RPL27* を同定した。機能解析の結果、*RPS27* と *RPL27* は、rRNA のプロセッシングに重要な働きをしていることが明らかになった。さらに、*rpl27* 変異をもつゼブラフィッシュモデルでは赤血球造血の障害が認められた。以上の結果より、*RPS27* と *RPL27* は DBA の新規原因遺伝子であることが強く示唆された。
3. RP 遺伝子以外の新規原因遺伝子候補も同定し、解析を進めている。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

- 1) RuNan Wang, Kenichi Yoshida, Yusuke Okuno, Aiko Sato-Otsubo, Tsutomu Toki, Kazuko Kudo, Rika Kanazaki, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Kiminori Terui, Tomohiko Sato, Yuji Iribe, Shouichi Ohga, Madoka Kuramitsu, Isao Hamaguchi, Akira Ohara, Isamu Kamimaki, Junichi Hara, Kanji Sugita, Kousaku Matsubara,

Kenichi Koike, Akira Ishiguro, Yoshifumi Kawano, Hitoshi Kanno, Seiji Kojima, Sawada Takafumi, Uechi Tamayo, Naoya Kenmochi, Satoru Miyano, Seishi Ogawa, Etsuro Ito. Identification of a novel causative gene, RPL27, in Diamond-Blackfan Anemia (Diamond-Blackfan 貧血における新規原因遺伝子 RPL27 の同定). 第 75 回日本血液学会学術集会 (2013 年 10 月 11 日—13 日、札幌)

- 2) 伊藤悦朗. Diamond-Blackfan 貧血の病因研究の最近の進歩. 第 116 回日本小児科学会学術集会シンポジウム「先天性血液疾患の病態研究に関する最近の進歩」(2013 年 4 月 19 日-21 日、広島)

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：血管基底膜異常による先天性溶血性貧血の新規病型の同定  
研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング科 教授）  
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）

**研究要旨：** 免疫学的機序による溶血が否定され、赤血球形態異常を認めない先天性非球状性溶血性貧血（CNSHA）を対象にした全エクソーム解析を実施したところ、1歳未満の診断未確定先天性溶血性貧血17症例のうち5症例（29%）にCOL4A1変異を同定した。COL4A1はIV型コラーゲンのアイソフォーム1型遺伝子であり、この異常が基底膜障害による微小血管障害を介して先天性溶血性貧血の病因となることが示唆された。本研究によりCNSHAの鑑別診断に次世代シーケンシング解析の有用性が明らかになった。

**A. 研究目的**

原因不明の先天性溶血性貧血の全エクソーム解析を実施した。候補遺伝子について、① 既知の溶血性貧血原因遺伝子変異、② 既知の先天性溶血性貧血の病因解析において赤血球機能維持に重要と判明した遺伝子変異、および③赤血球を取り巻く微小循環系の遺伝子変異という3つの観点から絞り込みを行なった。

**B. 研究方法**

赤血球酵素活性、赤血球 eosin 5' -maleimide (EMA) 結合能、イソプロパノール不安定試験に異常を認めなかった原因不明の溶血性貧血（疑い）症例の DNA サンプルを用い Illumina 社 HiSeq2000 シーケンサーにより原因不明溶血性貧血患者の全エクソーム解析を行った。

フレームシフト変異、ナンセンス変異および non-synonymous SNP のうち、図1に示す条件を満たす変異候補を絞り込んだ。

（倫理面への配慮）

個人データは研究実施者以外には知られないように匿名化し、個人データの管理・保護に務める。また、倫理審査委員会で承認された研究計画

書に基づき作成された説明文書・同意文書を用いて同意を得た提供者のみを対象とした。

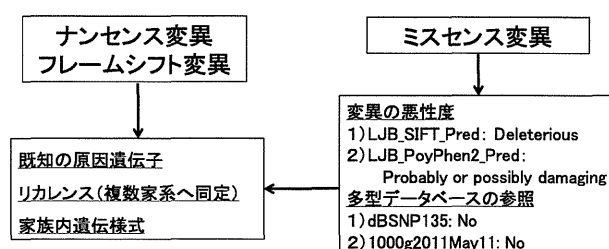


図1 病因候補遺伝子の探索ストラテジー

**C. 研究結果**

IV型コラーゲンのアイソフォーム1型遺伝子である、COL4A1に関しては1歳未満の耐症症例17家系のうちの5家系でミスセンス変異を同定した（表1）。

表1 同定した COL4A1 異常例の合併症と変異

年齢	性別	合併症	Gene	塩基置換:アミ/酸置換
0	M	小頭症、脳室周囲石灰化、白内障	COL4A1	c.G2354T.p.G785V
3M	F	水頭症、先天性表皮水疱症	COL4A1	c.G2843A.p.G948D
2M	F	脳室周囲石灰化、側脳室拡大、小頭症	COL4A1	c.G2788A.p.G930S
4M	M	脳室拡大、小脳低形成	COL4A1	c.G3245A.p.G1082E
3M	F	裂脳症、白内障	COL4A1	c.G2537A.p.G846E



*COL4A1* 変異例は *de novo* 発症のヘテロ接合体であり、子宮内あるいは出生直後に先天性の中樞神経奇形の合併に気付かれる。新生児早発黄疸と生後 1~2 ヶ月の間、赤血球輸血を必要とするが、その後は輸血から離脱するものの慢性溶血性貧血が続くという経過を辿っていた (表 2)。

表 2 *COL4A1* 4 例の臨床像

検査日	赤血球輸血(最終)	Hb(g/dL)	MCV(fL)	MCHC(%)	Retic(%)	赤血球形態	LD(U/L)	Hp(mg/dL)
Day81	要 (Day45)	6.7	110	29.9	14	破碎赤血球	242	7.1以下
Day88	要 (Day50)	6.8	99	31.9	9.2	大小不同、奇形赤血球	234	10未満
Day128	要 (Day30)	5.2	109	29.9	3.3	大小不同	302	10以下
Day149	要 (Day51)	7.4	90	32.7	ND	大小不同	ND	10以下

#### D. 考察

IV 型コラーゲン異常による先天性疾患としては、表 3 に掲げるように **Alport** 症候群や孔脳症・裂脳症などが知られている。

表 3 IV 型コラーゲンの 6 つのアイソフォーム遺伝子と発現臓器および疾患

	Locus	Tissues	Diseases
COL4A1	13q34	Ubiquitous	Porencephaly
COL4A2			Schizencephaly Hemolytic anemia
COL4A3	2q36-q37	Kidney, Eye, Lung, Testis	Alport syndrome, recessive
COL4A4			
COL4A5	Xq22	Kidney, Skin, Smooth muscle	Alport syndrome, X-linked
COL4A6			Diffuse leiomyomatosis with Alport syndrome, X-linked

基底膜は臓器構造形成・再生に重要であり、IV 型コラーゲンは、ヘテロ三量体 ( $\alpha 1-1-2$ ,  $\alpha 3-4-5$ ,  $\alpha 5-5-6$ ) 同士がネットワークを形成し、ラミニンと共に基底膜を構成する主要な蛋白質である。*COL4A1* 変異症例の赤血球形態観察で、奇形・破碎赤血球が観察されることから、本遺伝子変異は先天性の微小血管障害による機械的な溶血を来すことが考えられ、赤血球に発現していない遺伝子の変異による新規病因による先天性溶血性貧血と考えられた (表 4)。

表 4 先天性溶血性貧血の病因による新分類

1) 赤血球膜異常症: アンキリン、スペクトリン、バンド3、4、1&4、2蛋白異常症など 複合膜タンパク異常症(例: アンキリン & $\beta$ スペクトリン)
2) 赤血球酵素異常症: G6PD、PK、GPI異常症など
3) ヘモグロビン異常症: 鎌状赤血球症 不安定ヘモグロビン症 サラセミア
4) 血管基底膜異常症: IV型コラーゲン異常症 ( <i>COL4A1</i> 遺伝子変異)
5) その他

#### E. 結論

今回の検討で、1 歳未満の診断未確定先天性溶血性貧血 17 症例のうち 5 症例 (29%) に *COL4A1* 変異を同定した。

今後は特徴的な臨床像および遺伝子検査による迅速な確定診断態勢の確立および長期の経過観察に基づく適切な遺伝カウンセリングの実施が肝要となると考えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tsuzuki S, Akahira-Azuma M, Kaneshige M, Shoya K, Hosokawa S, Kanno H, Matsushita T. A Japanese neonatal case of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency presenting as severe jaundice and hemolytic anemia without apparent trigger. Springerplus. 2013; 2: 434.
- 2) 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*.
- 3) 萱野 仁. ピリミジン 5'-ヌクレオチダーゼ異常症. 日本臨床別冊血液症候群第 2 版 I, 311-313, 2013

- 4) 菅野 仁. アデニル酸キナーゼ異常症. 日本臨床別冊血液症候群第 2 版 I, 308-310, 2013
- 5) 菅野 仁. アデノシンデアミナーゼ過剰産生症. 日本臨床別冊血液症候群第 2 版 I, 306-307, 2013
- 6) 菅野 仁. アルドラーゼ A 異常症. 日本臨床別冊血液症候群第 2 版 I, 278-281, 2013
- 7) 菅野 仁. ヘキソキナーゼ異常症. 日本臨床別冊血液症候群第 2 版 I, 274-277, 2013
- 8) 菅野 仁. 三炭糖リン酸イソメラーゼ異常症. 日本臨床別冊血液症候群第 2 版 I, 271-273, 2013

## 2. 学会発表

- 1) 古賀 木綿子、野口 磨依子、大園 秀一、中川 慎一郎、上田 耕一郎、稲田 浩子、松石 豊次郎、財津 亜友子、横地 一興、大賀 正一、菅野 仁、伊藤 悦郎. 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) 日本小児科学会雑誌 117:1346, 2013
- 2) 羽賀洋一、三井一賢、小嶋靖子、佐藤真理、松裏裕行、関根孝司、舘野昭彦、菅野 仁、小原 明、佐地 勉. アスコルビン酸とリボフラビンとの併用療法が有効であった遺伝性メトヘモグロビン血症. 第 116 回日本小児科学会学術集会 (平成 25 年 4 月 19-21 日) 日本小児科学会雑誌 117:431, 2013
- 3) 菅野 仁. 先天性溶血性貧血およびダイヤモンド・ブラックファン貧血の診断法の進歩. 第 55 回 日本小児血液・がん学会 学術集会. 教育セッション 3 赤血球系疾患 (平成 25 年 11 月 29 日)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：先天性角化不全症における新規遺伝子変異の探索

研究分担者 山口博樹（日本医科大学 血液内科 講師）

**研究要旨：** 先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DKC)の約40%の症例は原因遺伝子変異が同定されていない。我々は次世代シーケンサーを用いてDKCや不全型DKCにおける新規の原因遺伝子変異の探索を行った。現在までに既知の遺伝子変異を認めないHoyeraal-Hreidarsson syndrome 1症例、DKC4症例、不全型DKC13症例に対して新規遺伝子変異探索の検討を行った。DNAヘリカーゼ遺伝子群では**RTEL1**変異などが、テロメラーゼ複合体遺伝子群では**TEP1**変異が、Shelterin複合体遺伝子群では**ACD(TPP1)**変異が新規の原因遺伝子変異の候補として発見された。今後これらの遺伝子変異の機能解析を行う予定である。

#### A. 研究目的

先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DKC)は網状色素沈着、爪の萎縮、舌の粘膜白斑症などといった特徴的身体的所見を伴う先天性の骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)である。10歳前後までに約80%以上の症例にこれらの特徴的的身体所見が付随しBMFを発症する。また約8%の症例に皮膚、上咽頭、消化管の扁平上皮癌や腺癌などの悪性腫瘍や、急性白血病などの造血器腫瘍の発生が認められる。遺伝型式はX連鎖劣性遺伝が35%、常染色体優性遺伝が5%、常染色体劣勢遺伝が数%に認められるが、残りの約60%近くが型式不明である。DKCの約60%の症例において原因遺伝子が同定され、テロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、**DKC1**、**telomerase RNA component (TERC)**、**telomerase reverse transcriptase (TERT)**などや、Shelterin複合体を構成する蛋白である**TRF-interacting nuclear protein (TINF2)**に変異が認められている。

テロメラーゼ複合体は細胞分裂によるテロメアの短縮化に対しテロメアの複製、安定の役割をもち、Shelterin複合体はテロメアの先端部位の

特異的な構造形成や保護などを行っている。DKCはこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結果造血幹細胞などの増殖能に障害が起き上記の症候が形成されると考えられている。

これまでに我々はDKCの原因遺伝子である上述のテロメア制御遺伝子の変異が、一部の再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)や骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome: MDS)に認められ、特徴的的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型DKCの存在が明らかにした(Lancet 2003;362:1628, Blood 2003;102:916, N Engl J Med. 2005 352: 1413)。不全型DKCは臨床的にAAやMDSと診断され、効果が得られない免疫抑制療法(immunosuppressive therapy: IST)が行われることがある。以上よりBMFの臨床診断において不全型DKCを鑑別することは重要である。

現在のところDKCや不全型DKCの診断基準は定まっておらず、臨床的には上述の特徴的身体的所見を伴うBMF、テロメア長の短縮、テロメア関連遺伝子の変異の同定によって診断を下している。しかしテロメア関連遺伝子の変異の同定に関しては原因遺伝子だけでも7種類存在し、そ

の変異も一塩基変異から大欠失変異や片アレル欠失まで多彩で従来のサンガー法による変異のスクリーニングは効率的ではない。また約 40%の症例は原因遺伝子が同定されていないことも問題である。

近年次世代高速シーケンサーが登場し、これまでのサンガー法による直接塩基決定法よりより早く効率的に塩基配列の決定が可能となった。本研究は原因遺伝子が同定されていない症例に関して、次世代シーケンサーを用いて全 exon シーケンスを行い、新規原因遺伝子変異を同定することを目標としている。

## B. 研究方法

研究対象は、原因遺伝子が同定されていない特徴的身体的所見を伴う Hoyeraal-Hreidarsson syndrome(HHS)症例、DKC 症例、もしくはテロメア長の短縮が認められた不全型 DKC 症例。目標症例数は 20 症例。

これらの症例に対して *DKC1*、*TERC*、*TERT*、*NOP10*、*NHP2*、*TINF2*、*TCAB1* といった既知の遺伝子変異のスクリーニングを日本医科大学生命科学センターの ABI Ion PGM™ シーケンサーもしくは、従来の direct sequence 法にて遺伝子解析を行う。

新規遺伝子変異の探索は、上記のスクリーニングにおいて変異が同定出来なかった症例に対して、東京大学医学部附属病院・キャンサーボードの次世代シーケンサー Illumina 社 GAI, GAIx, HiSeq2000 を用いて全 exon シーケンスを行う(2013年7月より京都大学腫瘍生物学講座)。新規遺伝子が同定された場合は、そのバリデーションや機能解析を日本医科大学生命科学センターにて行う。

(倫理面への配慮)

本研究は当施設遺伝子倫理審査委員会において承認が得られており以下の配慮を予定している。生命倫理上の配慮に関しては、患者、及び健康ボランティアの人権、利益の保護について文書にて十分説明をしたうえで同意を得る。また研究

への協力に同意した後であってもその同意を取り消すことができること、更に本研究への同意が得られない場合においても今後の治療などにはなんら不利益を被らないことを説明する。個人情報漏洩に対する取り組みとして研究組織とは別に個人情報管理者をおき連結可能匿名化をはかったうえで解析をおこなう。同意が撤回された場合は、検体、診療情報、遺伝情報はすべて匿名化されたまま焼却により破棄する。得られた結果は学会や論文として発表するが個人情報が出ることはない。遺伝子結果の開示を研究対象者が要求する場合は、倫理的問題を考慮し遺伝子カウンセリングを施行し、結果の告知は臨床遺伝専門医(遺伝カウンセラー)により行う。

## C. 研究結果

### 次世代高速シーケンサーを用いた新規遺伝子変異の探索

既知の遺伝子変異がサンガー法や次世代高速シーケンサーにて同定されなかった症例に関して現在新規の遺伝子変異の探索を行っている。現時点では表 1 に示す新規遺伝子変異の候補が抽出されている。

#### 1. DNA ヘリカーゼ遺伝子群の変異

DNA ヘリカーゼ遺伝子である *WRN* 変異を 1 症例に、*RECQL4* 変異を 3 症例に、*PIF1* 変異を 2 症例に、*BLM* 変異を 2 症例に、*RTEL1* 変異を 3 症例に認めた。*RTEL1* 変異の 2 症例(症例 14、15)は、母に *RTEL1* 102+1G>A のヘテロ変異が認められ、症例においては 102+1G>A と F709L の両アレルに変異があると考えた。その他の変異はすべてヘテロ変異であった。しかし症例 6 に関してはヘテロの *BLM* 変異と *PIF1* 変異を、症例 11 に関してはヘテロの *WRN* 変異と *RECQL4* 変異を認めている。

#### 2. テロメラーゼ複合体遺伝子群の変異

テロメラーゼ複合体遺伝子群のひとつである *TEP1* 変異を 2 症例に認めた。1 症例は nonsense mutation で 1 症例は frameshift mutation であった。

### 3. Shelterin 複合体遺伝子群の変異

Shelterin 複合体遺伝子群のひとつである *ACD(TPP1)* に変異を認めた。変異部位は Shelterin 複合体を形成し DKC の原因遺伝子変異である *TINF2* との結合ドメインであった。

### 4. その他

毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子で DNA 損傷修復反応の重要な機能を有する *ATM* のヘテロ変異を 1 症例に、顔面の奇形、免疫不全、網状皮斑、低身長を症候とする *FILS syndrome* の原因遺伝子として同定された DNA ポリメラーゼの機能をもつ *POLE* のヘテロ変異を 1 症例に認めた。

表 1 次世代高速シーケンサーによって抽出された新規遺伝子変異候補

Clinical Daiganosis	Mutation 1	Mutation 2	Mutation 3
1 HHS	<i>PIF1 P109S</i>		
2 DKC			
3 DKC	<i>ACD F461L</i>	<i>RECQL4 G1105R</i>	
4 DKC			
5 DKC			
6 cryptic DKC	<i>BLM G1129R</i>	<i>PIF1 P109S</i>	<i>ATM V1260M</i>
7 cryptic DKC	<i>BLM L716F</i>		
8 cryptic DKC			
9 cryptic DKC	<i>TEP1 W1079fs</i>		
10 cryptic DKC			
11 cryptic DKC	<i>WRN 3139-1G&gt;C</i>	<i>RECQL4 T465M</i>	
12 cryptic DKC		<i>RECQL4 A72V</i>	
13 cryptic DKC	<i>TEP1 R1237X</i>		
14 cryptic DKC	<i>RTEL1 102+1G&gt;A</i>	<i>RTEL1 F709L</i>	
15 cryptic DKC	<i>RTEL1 102+1G&gt;A</i>	<i>RTEL1 F709L</i>	
16 cryptic DKC	<i>POLE R266X</i>		
17 cryptic DKC			
18 cryptic DKC	<i>RTEL1 V643G</i>		

### D. 考察

次世代高速シーケンサーによる新規遺伝子変異探索は、DNA ヘリカーゼ遺伝子群、テロメラーゼ複合体遺伝子群、Shelterin 複合体遺伝子群に新規の遺伝子変異の候補が発見された。

その中でも DNA ヘリカーゼ遺伝子群の *RTEL1* 変異は、我々と同様に次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子変異探索によって 2013 年にいくつかのグループから DKC の重症型である HHS の原因遺伝子として報告がなされたばかりである。これらの報告では *RTEL1* 変異は常染色体劣性遺伝形式の HHS 症候群の原因遺伝子と考えられている。今回の我々が発見した 2 症例(症例 14、15)に関しては 102+1G>A と F709L の両アレルに変異があり原因遺伝子の可能性が高い。しかしこれまでの *RTEL1* 変異を認めた症例の大多数は DKC の重症型である HHS であるのに対

して、今回我々が発見した症例 14、15 はともに不全型 DKC の臨床像を示している。現時点では明らかになっていないが、*RTEL1* の変異部位による機能差が臨床像の違いに関与をしている可能性があり今後の機能解析の結果が待たれるところである。

また 9/18 症例(50%)に DNA ヘリカーゼ遺伝子群の変異が認められ、症例 6 や 11 に関しては異なる DNA ヘリカーゼ遺伝子群のヘテロ変異を 2 つ認めている。これらが DKC の病態にどのように関与をしているのかは明らかではないが、大変興味深い結果であると考えられる。

新規の原因遺伝子として有望と考えられるテロメラーゼ複合体遺伝子群の *TEP1* 変異、Shelterin 複合体遺伝子群の *ACD(TPP1)* 変異が発見された。今後機能解析を行い原因遺伝子変異として確定をする予定である。

### E. 結論

現在既知の遺伝子変異を認めない HHS、DKC、や不全型 DKC に対して次世代高速シーケンサーを用いて新規遺伝子変異探索を行い、DNA ヘリカーゼ遺伝子群、テロメラーゼ複合体遺伝子群、Shelterin 複合体遺伝子群に新規の遺伝子変異の候補を発見した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Fukuhara A, Tanino Y, Ishii T, Inokoshi Y, Saito K, Fukuhara N, Sato S, Saito J, Ishida T, Yamaguchi H, Munakata M. Pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita with *TINF2* gene mutation. *Eur Respir J.* 2013; 42: 1757-1759.
- 2) 山口博樹. テロメア病. 血液フロンティア. 2013; 23(6): 816-820.

#### 2. 学会発表 なし

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：先天性好中球減少症の遺伝子解析

研究分担者 小林正夫（広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学 教授）

研究分担者 小池健一（信州大学医学部小児医学 教授）

**研究要旨：** 小児期の内因性好中球減少症として代表的な疾患には、重症先天性好中球減少症 (*severe congenital neutropenia, SCN*)、周期性好中球減少症 (*cyclic neutropenia, CyN*) があげられる。*SCN* は難治性遺伝性疾患であり感染症の反復と同時に感染の重症化、慢性化が認められ、治療に難渋する場合もある。責任遺伝子として *ELANE* の頻度が最も高く、他に *HAX1, GF11, G6PT, WAS, CXCR4, G6PC3* 等が同定されているが約20%は原因遺伝子が不明であり、*SCN* は種々の原因によってもたらされる疾患群と考えられている。一方で、*CyN* は約21日の周期で好中球が減少する疾患であり同時期に一致して感染を反復し3~5日で回復する。約1/3が家族歴を有しているとされており、常染色体優性遺伝形式をとるが責任遺伝子としてほぼ全例で *ELANE* の変異が認められる。本研究では既存の責任遺伝子に異常が同定されない *SCN* の2症例、及び *CyN* の1症例を対象に次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行った。*SCN* の1症例で *ELANE* のヘテロ接合性変異を同定していたが家族（両親）の解析も同時に行い、本変異の *SCN* との関連は否定されたが、現在責任遺伝子を同定中である。また、その他の分類不能な造血障害症例3症例に関しても同様に網羅的遺伝子解析に着手し、遺伝子解析と機能解析を進行中である。

## A. 研究目的

好中球減少症は小児期より細菌や真菌に対する易感染性の原因となり、特に重症先天性好中球減少症 (*SCN*) では感染症の反復と同時に感染の重症化、慢性化が認められ、治療に難渋する場合もある。*G-CSF* 製剤の投与により感染症に対しての生命予後は改善されたが、長期の *G-CSF* 投与により骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病 (*MDS/AML*) の合併が報告されており、近年では根治療法として造血幹細胞移植が行われている。本研究では、既知の責任遺伝子に異常のない好中球減少症症例を対象とし、次世代シーケンサー解析により新規の責任遺伝子を同定し遺伝子変異と臨床症状との関連について検討し、病態解明に結びつけることにより診断法、治療法に寄与

することを目的とした。

また、併せてその他の分類不能な造血障害症例に関しても同様の目的で網羅的解析を施行した。

## B. 研究方法

検体提供を受けた症例について家族歴、経過、随伴症状、治療経過などの臨床情報を収集した。これまでに特定された責任遺伝子の機能解析、及び特定されていない遺伝子変異の探索のために次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を施行した。具体的に、網羅的解析を施行した好中球減少症は3症例で、【症例1】生後4か月時に *SCN* の診断を受けた1歳男児、及びその両親（健常者）【症例2】生後2か月時に *SCN* と診断された14歳女児、【症例3】5歳時に *CyN* と診断された19

歳男性であった。その他の分類不能な造血障害症例も3症例であり、【症例4】新生児期より道化師様魚鱗癬を指摘され、生後8か月時より骨髓異形成症候群の診断が疑われた3歳男児、【症例5】生下時より血小板減少を指摘されている2歳女児、【症例6】血小板数は正常であるが、繰り返す皮下出血を認める4歳男児、及びその母（健常者）であった。

（倫理面への配慮）

本研究は、広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会での承認を得た。

### C. 研究結果

症例1では、*ELANE* 遺伝子の A50V ヘテロ接合性変異を同定した。健常者である両親についても全エクソンシーケンスを行った結果、父では認められなかったが、母では同部位の変異を認めたため、本変異と *SCN* との関連性は否定的で rare-SNP である可能性が高いと考えられた。

症例6では、臨床上、明らかな出血傾向を認めたが、血小板凝集能検査（ADP 刺激及びコラーゲン刺激）で明らかな凝集能低下を認めず、血小板表面の GPIIb/IIIa の発現量をフローサイトメトリーで解析した結果、コントロールと比し軽度の低下を認めた。一方で末梢血塗抹標本（ギムザ染色）では正常色調の血小板と灰色血小板の混在を認めたため、thrombospondin と  $\beta 1$  tubulin の二重染色を行い、コントロールに比し顆粒が少なめで染まらない血小板も散見された。結果、血小板 $\alpha$ 顆粒の形成、あるいは貯蔵に問題があると考えられ、狭義の Gray platelet syndrome に近い病態と考えられたが、*NBEAL2*、*ANKRD26* などの稀であるが既知の責任遺伝子変異を認められず、現在責任遺伝子を同定中である。

### D. 考察

*ELANE* は *SCN* の主要な責任遺伝子であると同時に明らかに表現型の異なる *CyN* の責任遺伝子でもある。症例1において、*SCN* を発症している症例が *ELANE* 遺伝子のヘテロ接合性変異を

有しているが、発症に関与していないことは非常に興味深い事象であり、今後更なる検討が必要である。また、その他の症例に関しても引き続き責任遺伝子の同定を検討していくが、同様の症例を集積し解析を継続していく必要がある。症例6は、血小板 $\alpha$ 顆粒の異常と考えられるが稀な疾患群であり、同様の症例の集積は困難であることから、家系内における情報を集積し、解析を進めていく必要がある。

### E. 結論

症例1において、*ELANE* 遺伝子の A50V ヘテロ接合性変異と *SCN* との関連性はないことが明らかとなった。次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子変異解析において、*SCN* のような種々の原因によってもたらされる疾患群や分類不能である稀な造血障害症例では特に家系内発症例でない場合は、責任遺伝子単離がさらに困難を極める。今後、SNP 機能解析アルゴリズムによる検討を行い、責任遺伝子候補の単離を進めていく。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant V, Kong X, Crypwy S, Dupuis S, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M: Simple diagnosis of *STAT1* gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Leukocyte Biology*, 2013 (in press).
- 2) Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin  $\beta 3$  L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. *British Journal of*

Haematology 160: 521-9, 2013.

- 3) Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous *ELANE* mutation. Proc Natl Acad Sci USA 110: 3023-8, 2013.
  - 4) Hirata O, Okada S, Tsumura M, Kagawa R, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Takihara Y, Kobayashi M: Heterozygosity for the Y701C *STAT1* mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis. Haematologica 98:1641-9, 2013.
  - 5) Deenick EK, Avery DT, Chan A, Berglund LJ, Ives ML, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tsumura M, Kobayashi M, Arkwright PD, Averbuch D, Engelhard D, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Klein C, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Ma CS, Tangye SG: Naïve and memory human B cells have distinct requirements for STAT3 activation to differentiate into antibody-secreting plasma cells. Journal of Experimental Medicine 210: 2739-53, 2013.
  - 6) Ives ML, Ma CS, Palendira U, Chan A, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Arkwright PD, Engelhard D, Averbuch D, Magdorf K, Roesler J, Peake J, Wong M, Adelstein S, Choo S, Smart JM, French MA, Fulcher DA, Cook MC, Picard C, Durandy A, Tsumura M, Kobayashi M, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG, Deenick EK: Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mutations underlying autosomal dominant hyper-IgE syndrome impair human CD8(+) T-cell memory formation and function. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 132: 400-11, 2013.
  - 7) Berglund LJ, Ma CS, Avery DT, Moens L, Deenick EK, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Wong M, Adelstein S, Arkwright PD, Fulcher DA, Ziegler JB, Smart JM, Kobayashi M, Casanova JL, Cook MC, Uzel G, Tangye SG: IL-21 signalling via STAT3 primes human naïve B cells to respond to IL-2 to enhance their differentiation into plasmablasts. Blood 122: 3940-50, 2013.
  - 8) Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito M, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T: Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. Haematologica, Epub ahead of print Aug 23, 2013.
- ## 2. 学会発表
- 1) Masao Kobayashi, Yoko Mizoguchi, Shuhei Karakawa, Satoshi Okada, Hiroshi Kawaguchi, Kazuhiro Nakamura: Genetic characteristic of patients with severe congenital neutropenia in Japan. 27<sup>th</sup> International Congress of Pediatrics, August 24-29, Melbourne, Australia
- ## G. 知的財産権の出願・登録状況
- なし



厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：Congenital dyserythropoietic anemia（CDA）の臨床データ解析

研究分担者 真部 淳（聖路加国際病院小児科 医長）

研究協力者 長谷川大輔（聖路加国際病院小児科）

研究協力者 土居崎小夜子（名古屋大学小児科）

研究協力者 多賀 崇（滋賀医科大学小児科）

研究要旨：本研究の目的は Congenital dyserythropoietic anemia(CDA：先天性赤血球産生異常性貧血)の疾患像を明らかにすることである。CDA は先天性の赤血球系細胞の形成異常により、慢性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う疾患である。平成 21 年度に行った全国調査により把握された 22 例の CDA 症例を対象として二次調査と遺伝子検索を行った。14 例について遺伝性解析を行い、2 例で CDAN1 変異が、また 1 例で SEC23B の変異が見つかった。この他に次世代シーケンサーを用いて解析を行ったところ、臨床的に CDA と診断された 1 例において通常は遺伝性橢円赤血球症でみられる SPTA1 遺伝子の変異がみられた。スクリーニングする集団を広げていき、実態を明らかにする必要がある。

## 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、本研究により我が国におけるCDAの実態を明らかにすることを目的とする。

## B. 研究方法

従来行われている日本小児血液・がん学会疾患登録、中央診断事業をもとに、我が国におけるCDAの把握ならびに診断を行う。診断を行うための診断基準、中央形態診断、遺伝子診断のシステムを構築する。疾患の把握は、過去に行われた全国調査を参考に、疑い症例を含みアンケート方式で行う。診断基準については既存の

ものを参考にすが、軽症で診断基準に合致しないものも存在する可能性があるため、独自のものを作成する。調査は血液専門医だけでなく一般小児科医にも協力してもらう。

（倫理面への配慮）

本研究で行われる臨床試験は、

- ① ヘルシンキ宣言に則り、患者の利益を最優先に考えて実施する。
- ② 調査フィールドとなる各施設における倫理委員会で承認を得て実施する。
- ③ 患者および家族に対して面談・介入開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得る。同意説明文では、調査を行う目的、介入・面談の内容、協力者に起こりうる利益・不利益について、未成年者の場合には年齢に応じた説明をする。
- ④ 協力によって得られたデータは、個人情報保

護を厳重に行い、研究目的以外には利用しないことを文書による同意を得て実施する。

## C. 研究結果

CDAの全国調査により把握された症例を対象として2次調査と中央遺伝子診断を開始した。14例について遺伝子解析を行い、2例でCDAN1の変異が、1例でSEC23Bの変異が見つかった。なお、次世代シーケンサーを用いた解析により、臨床的にCDAと診断された1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。

## 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なはいまだに不明である。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SPTA遺伝子の変異がみつかった。

## 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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Urayama K, Chokkalingam AP, Manabe A, Mizutani S. Current evidence for an inherited genetic basis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 97:3-19, 2013
- 2) 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* 162:1285-1288, 2013

- 3) Kasai-Yoshida E, Ogihara M, Ozawa M, Nozaki T, Morino M, Manabe A, Hosoya R: Temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatrics* 132:e252-256, 2013
- 4) 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* 98:74-88, 2013
- 5) Buitenkamp TD, Izraeli S, Zimmermann M, Forestier E, Heerema NA, van den Heuvel-Eibrink MM, Pieters R, Korbijn CM, Silverman LB, Schmiegelow K, Liang DC, Horibe K, Arico M, Biondi A, Basso G, Rabin KR, Schrappe M, Cario G, Mann G, Morak M, Panzer-Grumayer R, Mondelaers V, Lammens T, Cave H, Stark B, Ganmore I, Moorman AV, Vora A, Hunger SP, Pui CH, Mullighan CG, Manabe A, Escherich G, Kowalczyk JR, Whitlock JA, Zwaan CM: Acute lymphoblastic leukemia in children with Down syndrome: a retrospective analysis from the Ponte di Legno study group. *Blood* 123:70-77, 2014

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）  
分担研究報告書

稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究

分担研究項目：Shwachman-Diamond 症候群の原因究明及び診断・治療法の開発  
研究分担者 渡邊健一郎（京都大学大学院医学研究科発達小児科学 講師）

**研究要旨：** Shwachman-Diamond症候群は、骨髄不全と膵外分泌不全を主徴とする先天性骨髄不全症候群である。本症候群症例の90%にSBDS遺伝子両アリル変異が認められるが、SBDS遺伝子変異を認めない症例について新たな疾患関連遺伝子は未だ同定されていない。「Shwachman-Diamond症候群の効果的診断法に関する研究」班による全国調査以後、本疾患がより広く認知されるようになり、日本小児血液学会中央診断システムに登録される症例も増加し10例を数えている。骨髄所見では異形成を認め、形態的に骨髄異形成症候群の範疇に入る症例が多かった。今後も症例を集積し、未診断例の遺伝子解析を行い、本邦における本疾患の診断法、新たな治療法の開発をめざす。

#### A. 研究目的

Shwachman-Diamond 症候群(SDS)では、90%の症例で SBDS 遺伝子の両アリル変異が認められると報告されているが、新たな疾患関連遺伝子は同定されていない。新規遺伝子同定のため、本疾患が疑われる症例について SBDS 遺伝子解析を行い、同遺伝子の変異が同定されない症例について新規遺伝子の探索を行う。また、日本小児血液・がん学会中央診断システムに登録された症例を集積し、臨床像を把握する。

#### B. 研究方法

SDS が疑われる症例から、同意を得て、末梢血単核球を分離し、DNA を抽出する。ダイレクトシーケンス法を用いて SBDS 遺伝子の塩基配列を決定した。Compound heterozygote であった場合には、両親の SBDS 遺伝子のシーケンスを行い、両親がそれぞれの変異アリルをもつことを確認する。また、日本小児血液・がん学会中央診断システムに登録された症例について、臨床情報を収集し、末梢血・骨髄標本の形態中央診断を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヘルシンキ宣言に従い、京都大学医学部医の倫理委員会の承認を得ている。検体採取の際には、十分な説明を行い、文書による同意を得ている。遺伝子解析については、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針に従っている。

#### C. 研究結果

日本小児血液・がん学会中央診断システムで、昨年度までの8例に加え、新たに2例のSDS症例が登録された。10例の内8例は、発育障害、膵外分泌不全を合併しており、SDSと臨床診断され、SBDS遺伝子解析で確定診断された。2例は、同胞がSDSと診断されたのを契機として、本疾患が疑われ、遺伝子解析にて診断確定した。末梢血・骨髄の血球形態では異形成が認められる症例が多く、refractory cytopenia of childhood3例、refractory cytopenia with multilineage dysplasia5例と10例中8例が骨髄異形成症候群の範疇に入り、他に急性骨髄性白血病を発症した症例が1例あった。10例中1例においてSBDS遺伝子変異が同定されておらず、現在解析中である。

## D. 考察

SDS は、欧米では Fanconi 貧血、Diamond-Blackfan 貧血について頻度の高い先天性骨髄性症候群であるが、本邦では稀とされてきた。しかし SDS の認知度が上がるとともに、診断例が増加し、日本小児血液・がん学会中央診断システムに登録される症例も増えている。典型例については SDS を疑い SBDS 遺伝子解析で確定診断する流れが本邦でも確立していると考えられる。一方、SDS の臨床像、重症度は多様であり未診断例も存在すると考えられ、今後このような診断困難例の把握が課題である。また、末梢血・骨髄で異形成がしばしば認められることがわかってきたが、今後はその意義について明らかにする必要がある。SDS 症例ではほとんど SBDS 遺伝子変異が同定されるが、今後も SBDS に変異を認めない症例があれば、新規遺伝子の検索を行う。

## E. 結論

本邦でも SDS の正確な診断が可能となり、症例を集積するシステムが確立してきている。これを基盤として、新規遺伝子を同定、効果的な診断法、新たな治療法の開発を行っていく。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. *Haematologica*. 2014 Jan;99(1):19-27.
- 2) Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, Wang R, Shiraishi Y, Miyano S, Kato I, Morishima T, Fujino H, Umeda K, Hiramatsu H, Adachi S, Ito E, Ogawa S, Ito M, Nakahata T, Heike T.

Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood* 2013 121(21): 4377-4387.

- 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 G. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. *Blood*. 2013 Jan 31;121(5):862-863.

### 2. 学会発表

なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし