

- 21) Wang X, Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Narita A, Tsumura Y, Doisaki S, Tanaka M, Ismael O, Shimada A, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Mutation in the c-MPL gene is not associated with aplastic anemia in Japanese children. 第 74 回日本血液学会学術集会. 2012 年 10 月 20 日. 京都.
- 22) 土居崎小夜子、成田 敦、坂口大俊、村松秀城、濱 麻人、中西康詞、高橋義行、小島勢二、神谷尚宏、真部 淳、多賀 崇. Congenital dyserythropoietic anemia における遺伝子診断. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012 年 11 月 30 日. 横浜.
- 23) 濱 麻人. 小児再生不良性貧血、RCC および RCMD の臨床、検査所見の比較:中央診断登録例 219 例の検討. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012 年 12 月 2 日. 横浜.
- 24) 小島勢二. 全エクソン解析による先天性骨髄不全症候群に対する新規原因遺伝子の探索. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012 年 12 月 2 日. 横浜.
- 25) 小島勢二. 先天性血液疾患の病態研究に関する最近の進歩. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 2013 年 4 月 19 日. 広島.
- 26) 坂口 大俊、西尾 信博、川島 希、王 希楠、成田 敦、土居崎 小夜子、村松 秀城、濱 麻人、中西 康詞、高橋 義行、土田 昌宏、小林 良二、伊藤 悦朗、矢部 普正、大賀 正一、小原 明、長谷川 大輔、真部 淳、伊藤 雅文、小島勢二. Telomere length as a predictor for the immunosuppressive therapy in acquired aplastic anemia. 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 12 日. 札幌.
- 27) 川島 希、成田 敦、王 希楠、徐 銀燕、坂口 大俊、土居崎 小夜子、村松 秀城、濱 麻人、中西 康詞、高橋 義行、小島勢二. ALDH2 polymorphism in Japanese children with acquired aplastic anemia. 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 12 日. 札幌.
- 28) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Doisaki S, Sakaguchi H, Muramatsu H, Takahashi Y, Ito M, Ohara A, Kojima S. Central review of morphology in childhood aplastic anemia and myelodysplastic syndrome - summary of 800 cases -. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013 年 11 月 29 日. 福岡.
- 29) 成田 敦、村松 秀城、川島 希、王 希楠、坂口 大俊、土居崎 小夜子、中西 康詞、濱 麻人、高橋 義行、小島勢二. 小児再生不良性貧血から PNH への移行. Evolution to PNH in children with aplastic anemia. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2013 年 12 月 1 日. 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## II. 分担研究報告

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）  
－ 総合研究報告書 －  
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

若年性骨髄単球性白血病における全エクソーム解析

研究分担者 小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授）

研究協力者 村松秀城（名古屋大学医学部附属病院小児科 助教）

**研究要旨：** 若年性骨髄単球性白血病（Juvenile Myelomonocytic Leukemia; JMML）は、年少児に発症する顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）への高感受性を特徴とする骨髄異型性症候群（MDS）/骨髄増殖性疾患（MPN）である。80%以上の症例で、RAS 経路に関連する遺伝子群（*NF1*、*NRAS*、*KRAS*、*PTPN11*、*CBL*）の遺伝子変異が報告されているが、残り 20%の症例では原因となる遺伝子変異が同定されておらず、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子解析が待たれていた。全エクソーム解析およびターゲットディープシーケンス解析により、*SETBP1* と *JAK3* 遺伝子変異がセカンドヒットとして JMML の腫瘍の進展に関与している可能性が明らかとなつ

#### A. 研究目的

若年性骨髄単球性白血病（Juvenile Myelomonocytic Leukemia; JMML）は、年少児に発症する顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）への高感受性を特徴とする骨髄異型性症候群（MDS）/骨髄増殖性疾患（MPN）である。80%以上の症例で、RAS 経路に関連する遺伝子群（*NF1*、*NRAS*、*KRAS*、*PTPN11*、*CBL*）の遺伝子変異が報告されているが、約 20%の症例では原因となる遺伝子変異は不明であった。JMML の分子遺伝学的発症機構の全容を明らかにすることを目的として、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子解析を行った。

#### B. 研究方法

13 例の JMML 症例に対し、骨髄 DNA および CD3 陽性 T 細胞 DNA の全エクソーム解析を行い、生殖細胞系列変異および体細胞変異の網羅的解析を行った。また、全エクソーム解析の結果を確認するため、既知の RAS 経路各遺伝子および新規に変異が同定された各遺伝子に対するターゲ

ットディープシーケンス解析を 92 例の JMML 患者検体を用いて行った。

（倫理面への配慮）

本研究で行った臨床検体を用いた遺伝子解析研究は、名古屋大学医学部倫理委員会で審査され、承認された。検体提供者への人権擁護、個人情報保護に細心の注意を払って本研究を実施した。

#### C. 研究結果

13 例の JMML 症例の骨髄 DNA および CD3 陽性 T 細胞 DNA の全エクソーム解析を行い、生殖細胞系列変異および体細胞変異の網羅的解析を行った。全エクソーム解析で同定された体細胞変異数は JMML 1 症例あたりわずか 0.8 個であり、これは他の様々な腫瘍において全エクソーム解析で同定される体細胞変異数と比較してはるかに少数であった（図 1）。13 例のうち、RAS 経路遺伝子変異が 12 例（生殖細胞系列変異 6 例、体細胞変異 6 例）で確認されるとともに、これまでに報告のない 3 遺伝子（*SETBP1* (p.Asp868Asn)、*JAK3* (p.Arg657Gln)、*SH3BP1* (p.Ser277Leu)

の体細胞変異が 4 例から検出された。

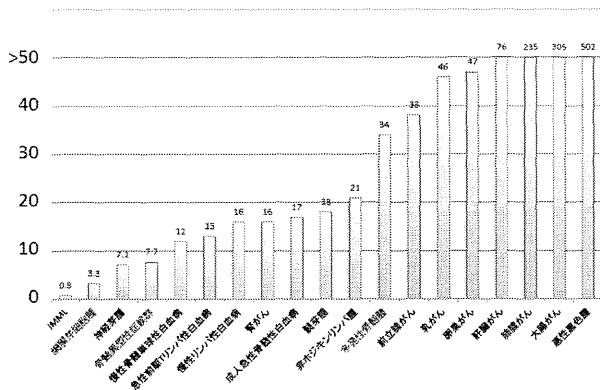


図 1. JMML と各種腫瘍における体細胞遺伝子変異数の比較

全エクソーム解析の結果を確認するため、既知の RAS 経路各遺伝子および新規に変異が同定された各遺伝子に対するターゲットディープシーケンシング解析を 92 例の JMML 患者検体を用いて行った。すなわち、各遺伝子のエクソン領域を増幅する NotI アダプタを付与した PCR プライマーを設計し、PCR 増幅・NotI 制限酵素処理・ライゲーション・超音波処理を経て次世代シーケンサーによる解析を行い、それぞれの PCR 産物の配列を 1,000 回以上読むことに成功した。92 例のうち、RAS 経路の遺伝子変異は 82 例 (89%) に同定され (*PTPN11* (n=39)、*NF1* (n=9)、*NRAS* (n=15)、*KRAS* (n=13)、*c-CBL* (n=14))、ほとんどの症例で相互排他的 (mutual exclusive) であった。これまでの報告と同様に、*CBL* と *NF1* は両アリルに変異が認められることが多かったが、*PTPN11*、*NRAS*、*KRAS* は片アリル変異例がほとんどであった。RAS 経路の遺伝子変異を認められなかった 10 症例については全ゲノム解析 (n=2) ないし全エクソーム解析 (n=8) を行ったが、これらの症例では RAS 経路遺伝子変異は同定されなかった。また、新たに同定された体細胞性遺伝子変異のうち、*SETBP1* 変異 (n=7) および *JAK3* 変異 (n=11) は、16 症例で変異を認めた。これらの変異は、*NRAS*・*KRAS*・*CBL* 変異 JMML と比較して、*PTPN11*・*NF1* 変異 JMML

により集積していた。*SETBP1* 変異はいずれも *SKI* ドメインのヘテロ変異であった。

上記ディープシーケンシングにおいて変異アリルと正常アリルが読まれる割合を計算することで、高い確度でそれぞれの遺伝子変異ごとに変異アリル頻度を算出することが可能であった。RAS 経路遺伝子と新たに同定された *SETBP1* ないし *JAK3* とを同時に有する JMML 症例において、それぞれの遺伝子変異アリル頻度を比較すると、ほとんどの症例で *SETBP1* および *JAK3* 遺伝子のほうが低い変異アリル頻度であった。

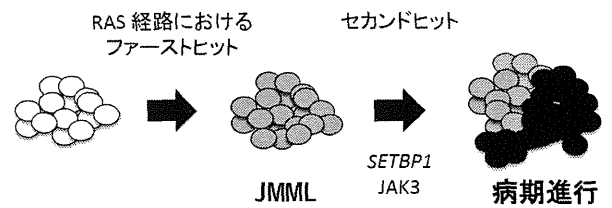


図 2. JMML における *SETBP1* / *JAK3* 変異の意義

実際に、これらの遺伝子変異を有する症例 (n=16) は、有さない症例 (n=76) と比較して 5 年全生存率は低い傾向にあり (Hazard ratio = 1.90, 95% confidence interval (CI) = 0.87-4.19, p=0.10)、5 年無移植生存率は有意に低かった (Hazard ratio = 2.18, 95% confidence interval (CI) = 1.18-4.02, p=0.007) (図 3)。

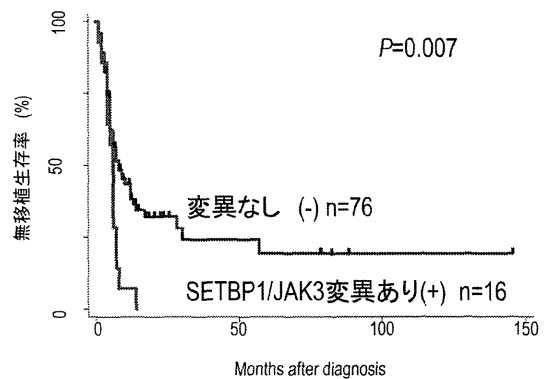


図 3. *SETBP1*、*JAK3* 遺伝子変異が JMML 患者の予後に与える影響



## D. 考察

次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析ならびにターゲットシーケンスを行い、JMMLの約90%にRAS経路遺伝子変異が同定されたとともに、予後不良と関連する *secondary mutation* として、*SETBP1* および *JAK3* 変異を同定することが示され、JMML発症の遺伝学的背景が明らかとなった。

## E. 結論

本研究における次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析により、JMMLにおける遺伝学的発症機構の全容を明らかにすることができた。今後、さらに新規の原因遺伝子の同定を進めるとともに、次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断を行うシステムが構築されることが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 Nov;45(11):1293-1299.
- 2) Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013

Aug;45(8):937-941.

- 3) Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet.* 2013 Aug;45(8):942-946.
- 4) Yoshida N, Doisaki S, Kojima S. Current management of juvenile myelomonocytic leukemia and the impact of RAS mutations. *Paediatr Drugs.* 2012 Jun 1;14(3):157-163.
- 5) Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A, Takahashi Y, Mori-Ezaki M, Sato M, Kawaguchi H, Kinoshita A, Sotomatsu M, Hayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Yamada K, Hoshino H, Kiyoi H, Yoshida N, Sakaguchi H, Narita A, Wang X, Ismael O, Xu Y, Nishio N, Tanaka M, Hama A, Koike K, Kojima S. Somatic mosaicism for oncogenic NRAS mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2012 Aug 16;120(7):1485-1488.
- 6) Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood.* 2011 Mar 10;117(10):2887-2890.

### 2. 学会発表

#### 海外

- 1) Muramatsu H, Sakaguchi H, Xu Y, Yoshida K, Okuno Y, Hama A, Takahashi Y, Makishima H, Maciejewski J.P, Ogawa S,

- Kojima S. Clinical and genetic characterization of 17 Juvenile myelomonocytic leukemia patients with c-CBL mutations. The 12th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. May.10, 2013. Berlin, Germany.
- 2) Muramatsu H. Sequential gain of SETBP1 mutations in severe aplastic anemia evolving into acute myeloid leukemia with monosomy 7. The 12th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes. May.10, 2013. Berlin, Germany.
- 3) Sakaguchi H, Muramatsu H., Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Molecular Spectrum of Juvenile Myelomonocytic Leukemia Identified by Whole exome sequencing. The 18th Congress of EHA. Jun.14, 2013. Stockholm, Sweden.
- 4) Muramatsu H., Sakaguchi H, Wang X, Yoshida K, Okuno Y, Sanada M, Xu Y, Doisaki S, Narita A, Kawashima N, Hama A, Takahashi Y, Yoshida N, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Maciejewski J.P, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Clinical and Genetic Characterization Of Patients With C-CBL Mutated Juvenile Myelomonocytic Leukemia By Whole-Exome/Deep Sequencing. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition. Dec.7, 2013. New Orleans, USA.
- 5) Sakaguchi H, Muramatsu H., Wang X, Xu Y, Hibi Y, Kawashima N, Narita A, Doisaki S, Yoshida N, Hama A, Takahashi Y, Makishima H, Yamada K, Maciejewski JP, Kojima S. Aberrant DNA Methylation Is Associated With Poor Outcomes In Juvenile Myelomonocytic Leukemia. The 55th ASH Annual Meeting and Exposition. Dec.7, 2013. New Orleans, USA.
- 国内
- 1) 村松 秀城、坂口 大俊、王 希楠、吉田 健一、奥野 友介、徐 銀燕、土居崎 小夜子、成田 敦、川島 希、中西 康詞、濱 麻人、高橋 義行、小川 誠司、小島 勢二。Clinical characterization of 17 Juvenile myelomonocytic leukemia patients with c-CBL mutations. 第 75 回日本血液学会学術集会。2013 年 10 月 13 日。札幌。
- 2) Sakaguchi H, Muramatsu H., Wang X, Xu Y, Hibi Y, Kawashima N, Narita A, Doisaki S, Yoshida N, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Makishima H, Maciejewski JP, Yamada K, Kojima S. Aberrant DNA methylation is associated with poor outcomes in juvenile myelomonocytic leukemia. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会。2013 年 11 月 29 日。福岡。
- 3) Wang X, Muramatsu H., Sakaguchi H, Xu Y, Kawashima N, Narita A, Doisaki S, elmadi S, Nakanishi K, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Somatic mosaicism of Ras Pathway gene mutation in juvenile myelomonocytic leukemia. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会。2013 年 11 月 29 日。福岡。
- 4) 村松 秀城。若年性骨髄単球性白血病における全エクソーム解析。Exome sequencing in juvenile myelomonocytic leukemia. 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会。2013 年 12 月 1 日。福岡。
- 5) 村松 秀城、小島 勢二。網羅的遺伝子変異解析を行った若年性骨髄単球性白血病に対する同種移植の成績。第 36 回日本造血細胞移植学会総会。2014 年 3 月 8 日。沖縄。
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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：Fanconi 貧血の診断・遺伝子解析・治療法の開発に関する研究

研究分担者 矢部みはる（東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学 准教授）

**研究要旨：** 次世代シーケンサーを併用したFanconi貧血(FA)の遺伝子解析を小川誠司研究室と高田穰研究室との共同体制で行い、日本人FAの疫学が明らかになりつつある。国内で認められていなかったFA原因遺伝子も複数同定され、既知遺伝子が全く検出されなかった症例は新規遺伝子である可能性もあり、引き続き解析を行っている。FA病態解明として行ってきたacetaldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) の遺伝子型の解析では骨髄不全との強い相関が証明された。FAの移植では、Fludarabineを用いた前処置の5年生存率は約90%と極めて良好な成績を示し非血縁移植においても同胞間移植と同等の成績が得られた。

## A. 研究目的

Fanconi 貧血(FA)は種々の身体異常と小児期に発症する骨髄不全、白血化や高発がんを特徴とする遺伝性疾患で、16 の遺伝子異常が報告されている。日本での遺伝子群の疫学や臨床像の実態は明らかではなく、次世代シーケンサーを用いた FA の遺伝子解析を併用し、日本人の FA 遺伝子群の疫学解析を行う。既知遺伝子の変異が存在しない場合は新規原因遺伝子の同定を試みる。また、骨髄不全、骨髄異形成症候群や急性白血病にいたるメカニズムについても検討し、FA 診断治療の確立を目指す。

## B. 研究方法

(1) FA遺伝子診断：東海大学に保存されている既知の遺伝子が同定されないFA各種サンプル（末梢血リンパ球、骨髄および皮膚線維芽細胞、骨髄細胞）を東京大学（現京都大学）小川誠司研究室に送付し、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行う。同定された候補遺伝子については京都大学高田穰研究室でバリデーションを行いさら

に、新規遺伝子であることが確定した遺伝子については機能解析を行う。東海大学にて遺伝子解析の結果と臨床症状を照合し、日本人のFA遺伝子群の疫学解析を試みる。

(2) Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法にて FANCA の変異検出をリンパ球および皮膚・骨髄線維芽細胞にて確認する。

(3) FAにおけるALDH2遺伝子解析：京都大学放射線生物研究センター高田穰研究室との共同研究で、すでにFAの分子診断が確定された症例でアセトアルデヒドの分解酵素であるALDH2 (acetaldehyde dehydrogenase 2)遺伝子型の検討をTaqman PCR法により行う。ALDH2遺伝子型と造血機能、身体異常等の関連性につき検討する。

(4) FAに対する造血細胞移植：日本造血細胞移植学会の遺伝性疾患ワーキンググループで2010年までに本邦で施行された125例のFA患者のデータ解析を行う。また、HLA一致同胞間移植においてはFludarabineを基本とした非照射レジメンでの

移植方法の評価を行う。骨髄形成症候群や白血病に進展した造血細胞移植についても検討を加える。(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子研究の実施にあたっては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を、臨床研究の実施にあたっては「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を実施している。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

次世代シーケンスによるエクソーム解析 50 例を加えて東海大学では総計 80 例の日本人 FA の解析を行った。リンパ球リバージョン・モザイク疑い例を含む 3 例を除いて、全例に DNA 架橋剤添加により染色体断裂が確認された。FA 遺伝子のゲノムシーケンスより、35 例の FANCA と 20 例の FANCG 遺伝子の変異を京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室にて同定した。FANCD1, FANCE, FANCP も各 1 例確認され、片アレルではあるが、FANCI, FANCM の症例も確認され検討中である。既知遺伝子が全く検出されなかった 6 例は新規遺伝子である可能性もあり、引き続き解析を行っている。欧米諸国に比較的多いとされる FANCC は 1 例も検出されていない。

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の検出が可能であった (66%)。

京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室にて解析を行った日本人 FA 患者 75 人におけるアルデヒド代謝に関わる重要な酵素である ALDH2 遺伝子型の分布は、健常日本人の分布と差を認めず、骨髄不全は AA 群、GA 群、GG

群の順に早く発症し、有意差を認めた。

FA 患者の造血細胞移植に関しては HLA 一致同胞間移植を行った 15 症例を検討し、2000 年以降の 7 例の移植では Fludarabine を基本とした一律の非照射レジメンで安定したキメラが得られることが示唆された。また、2010 年までに TRUMP 登録された本邦における FA 患者の造血細胞移植 125 症例に対する移植後 5 年全生存率は 80% を超えた。FA の移植では、2000 年から Fludarabine を前処置に用いることで拒絶や GVHD の頻度が減少し、5 年生存率は 90% 前後と極めて良好な成績を示し、非血縁移植においても同胞間移植と同等の成績が得られようになった。骨髄形成症候群、急性骨髄性白血病に進展した 33 症例の全体の移植後 3 年生存率は約 68% であったが、白血病 10 症例の移植後 3 年生存率は 30% 以下で極めて不良であった。

### D. 考察

FA の発症頻度や遺伝子変異は民族差がみられ、日本人におけるデータの集積が必要である。今回のエクソーム解析等を用いた FA の遺伝子解析は日本における FA の疫学の基盤になると推測される。本邦の FA 症例では染色体断裂のリバージョン・モザイクを含むモザイク例が多くみられ、遺伝子変異が末梢血では同定不可能な症例もあり、骨髄細胞や皮膚・骨髄線維芽細胞を含む解析を行うことにより、診断精度の向上が期待できる。MLPA 法は線維芽細胞での検出も良好であり、既知の変異のみが対象となるものの、約 40% の症例 (A 群では 66%) で FANCA の少なくとも片アレルが検出され、A 群と絞り込んでダイレクトシーケンス法に持ち込めるなど、診断の迅速化につなげることができ、極めて有用と考えられた。また、ALDH2 などの FA 原因遺伝子とは異なる新しい視点から、骨髄不全との関連が証明され、病態の解明と治療につながることを期待される。FA に対する本邦での fludarabine を前処置に用いた造血細胞移植の成績は良好であるが、今後白血化症例の治療法や固形がんの発症の予測と予



防に関する検討が必要である。

## E. 結論

稀少遺伝性疾患である FA の遺伝子解析の体制が軌道に乗り、小川誠司研究室のエクソーム解析を介して、京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室等との共同研究により日本人 FA 患者の原因遺伝子の種類や頻度、遺伝子異常と臨床病態との関連が明らかになりつつある。また ALDH2 などの FA 原因遺伝子とは異なる新しい視点から、骨髄不全や発がんのメカニズムについても解析が進み、病態や造血細胞移植の適応や時期あるいは新規治療の手がかりになることが望まれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Maekawa K, Yoshimitu M, Fujiwara H, Matushita K, Kawada H, Hamada H, Suzuki S, Uozumi K, Ohtsuka M, Hanada S, Yabe M, Yabe H and Arima N. Successful allo-HSCT with a minimal myeloablative conditioning regimen in an adult patient with Fanconi's anemia. *Bone Marrow Transplantation*, 2012; 47: 159-160.
- 3) Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M and Yabe M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood.* 2013; 122:

3206-3209.

- 4) 矢部みはる 難治性貧血の診療ガイド：先天性骨髄不全症候群：Fanconi 貧血/診療の参照ガイド 南江堂 2011: 205-213
- 5) 矢部みはる Fanconi 貧血の診断と治療 日本小児科学会雑誌 2012 : 116 : 205-1212
- 6) 矢部みはる、矢部普正 リバージョン・モザイク型 Fanconi 貧血の診断と臨床 日本小児血液・がん学会雑誌 2012 : 49 : 251-255
- 7) 矢部みはる 新しい診断と治療の ABC 72 : 再生不良性貧血 第 6 章 先天性再生不良性貧血：Fanconi 貧血 最新医学社 2012 : 190-197
- 8) 小島勢二、矢部みはる 骨髄不全症候群（特発性造血障害）：診断と治療の進歩：先天性骨髄不全症候群 日本内科学会雑誌 2012 : 101 : 1977-1985
- 9) 矢部みはる Fanconi 貧血 知っておきたい内科症候群 南江堂 2012: 113-1104
- 10) 矢部みはる Fanconi 貧血 血液症候群（第 2 版） I 日本臨床社 2013 : 13-17
- 11) 矢部みはる 遺伝性骨髄不全症候群における遺伝子解析と倫理的諸問題 日本小児血液・がん学会雑誌 2013 : 50 : 418-420.

### 2. 学会発表

#### 海外

- 1) Yabe M, Yabe H, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Otsubo K and Kato S. Clonal chromosomal aberration in Fanconi anemia patients with myelodysplasia. 23<sup>rd</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. October 2011.
- 2) Yabe H, Koike T, Otsubo K, Morimoto T, Shimizu T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Endocrine function in Japanese Fanconi anemia patients. 23<sup>rd</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. October 2011.
- 3) 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. 38<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. April 2012, Geneva Switzerland.

- 4) 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. 24<sup>th</sup> Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. September, 2012, Denver, USA

#### 国内

- 1) 矢部みはる、矢部普正. リバージョン・モザイク型 Fanconi 貧血の診断と臨床. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム. 2011 年 11 月
- 2) 矢部みはる、高橋義行、稲垣二郎、康勝好、遠藤幹也、河敬世、加藤剛二、坂巻 壽、熱田由子、矢部普正. TRUMP 登録された Fanconi 貧血に対する造血細胞移植の検討. 第 34 回日本造血細胞移植学会総会. 2012 年 2 月
- 3) 矢部みはる Fanconi 貧血の臨床診断アプローチ 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012 年 12 月 横浜
- 4) 矢部みはる 先天性骨髄不全症候群における遺伝子解析と倫理的諸問題 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012 年 12 月 横浜
- 5) 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

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

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：** 日本人ファンconi貧血（FA）患者の原因遺伝子の同定を、次世代シーケンサーによるエクソーム解析によって行った。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だし、きわめて効率よく診断できることが判明した。また、従来日本人FA患者では見出されていなかったまれなタイプの原因遺伝子変異をみだし、さらに新規遺伝子変異の可能性が示唆される症例の同定に成功した。

#### A. 研究目的

日本人ファンconi貧血（FA）患者の原因遺伝子の同定を行い、診断法・治療法の確立に資することを目的とした。

#### B. 研究方法

東海大学 矢部みはる博士、また名古屋大小児科からのFA患者のサンプルに加え、私の所属する京都大学放射線生物研究センター前教授の佐々木正夫博士が在職中に集められたFA患者培養細胞（佐々木コレクション）についてもゲノムを分離し、東大小川研究室（現在京大に移動）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行った。

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を確認した。

（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ている。東海大、名古屋大からの検体はインフォームドコンセントの上取得され、京大・東大への送付時にす

べて匿名化されている。佐々木コレクションの検体については、JCRBへのデポジット時に匿名化を完了している。

#### C. 研究結果と考察

東大小川研における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。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、繰り返し同定されるファウンダー効果のあるものは少数で、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と考えられた。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、主にアッシュケナー・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。たとえば、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、次世代シーケンスにより原因遺伝子が判明する例が複数認められた。これらの結果は、

今回の方法論が従来の方法に比して非常に強力であることが強く示唆している。

さらに、15 遺伝子に変異が認められなかった症例複数例で、FA 遺伝子と機能的な関連が示されてきたいくつかの遺伝子の変異が同例されたことは特筆に値する。これは、新規の FA 遺伝子の同定がなされた可能性を示唆する。現在、患者細胞における相補を中心に、機能解析をすすめている。

## D. 結論

エクソーム解析により日本人 FA 患者サンプルを解析し、今後の FA 診療と研究の基礎となる重要なデータを得た。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Histone chaperone activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair. Sato K, Ishiai M, Toda K, Furukoshi S, Osakabe A, Tachiwana H, Takizawa Y, Kagawa W, Kitao H, Dohmae N, Obuse C, Kimura H, Takata M, Kurumizaka H. EMBO J. 2012 Jul 24;31(17):3524-36.
- 2) 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.
- 3) 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.

2. 学会発表

- 1) Asuka Hira, Hiromasa Yabe, Keitaro Matsuo, Minoru Takata, Miharu Yabe :  
“ Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients” 24<sup>th</sup> ANNUAL Fanconi Anemia Research Fund SCIENTIFIC SYMPOSIUM September 27-30 2012 Denver, Colorado
- 2) Asuka Hira, Hiromasa Yabe, Keitaro Matsuo, Minoru Takata, Miharu Yabe :  
“Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients” 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 札幌

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし



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、通常のシーケンズ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) が多数見つかりと予想される。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 (非罹患者同胞や両親) も解析して、シーケンズ解析で得られる 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、SNP アレイ解析、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)。

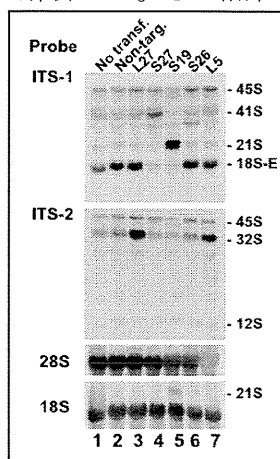


図 2. RPL27 と RPS27 のノックダウンによる rRNA のプロセッシングの障害. ITS-1 と ITS-2 プロブを用いてノーザンブロット法で解析すると、RPS27 をノックダウンした細胞では 41S pre-rRNA が、RPL27 をノックダウンした細胞では、18S-E pre-rRNA が蓄積していることが明らかになった。

#### (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。

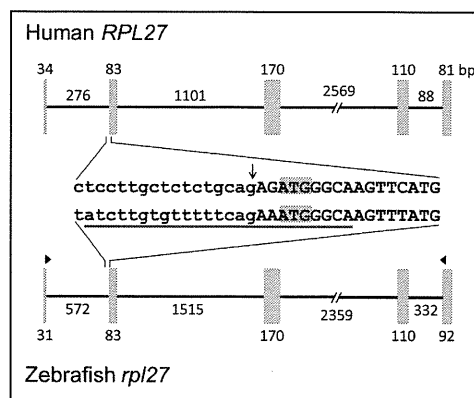


図 3. ヒトとゼブラフィッシュの RPL27 遺伝子の構造. 上段にヒト、下段にゼブラフィッシュの構造を示した。グレーのボックスはエクソン、黒の実線はイントロンを示している。中央には各遺伝子の第 1 イントロン (小文字) と第 2 エクソン (大文字) の配列の一部を示した。矢印はヒトで新たに変異が同定された部位、グレーの網掛けは開始コドンを示している。また、逆転写 PCR で用いたプライマーを矢尻で示した。下線部はスプライシングを阻害するモルフォリノオリゴ (MO) が結合する配列を示す。

(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 (rpl27MO) を設計した (図 3 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)。

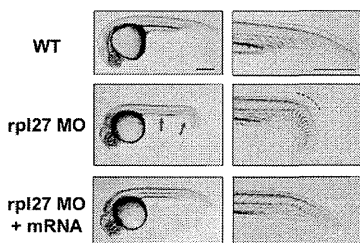


図 4. *rpl27* MO 注入胚、*rpl27* mRNA 同時注入胚の形態形成.受精後 25 時間の野生型(上段)、*rpl27* MO 注入胚(中段)、合成 *rpl27* mRNA 同時注入胚(下段)を胚全体と尾部に分けて示した。矢印と黒の破線は、不完全な卵黄伸長部の形成と尾部の屈曲を示す。これらの表現型は、合成 *rpl27* mRNA を同時に注入することで回復した(下段)。注入した MO の濃度は 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。スケールバーは 250  $\mu\text{m}$ 。

### (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。

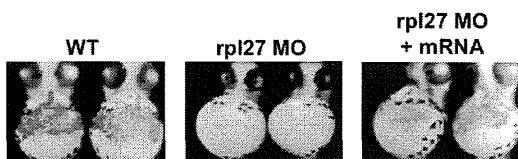


図 5. ヘモグロビン染色による血球の確認.受精後 25 時間の野生型(左)、スプライシング抑制胚(中央)、合成 *rpl27* mRNA 同時注入胚(右)のヘモグロビン染色を示した。スプライシング抑制胚では血球数の顕著な減少が見られたが、合成 *rpl27* mRNA の同時注入により、血球数の回復がみられた。注入した MO の濃度は 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

## 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

- 1) Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. *Haematologica*. 2011;96(6):814-819.

- 2) 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.
- 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: Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. *Blood* 2012;121(5):862-3.
- 4) Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T. Frequent somatic mosaicism of *NEMO* in T cells of patients with X-1 linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood* 2012;119(23):5458-66.
- 5) Yazaki M, Kamei M, Ito Y, Konno Y, Wang R, Toki T, Ito E. A novel mutation of ribosomal protein s10 gene in a Japanese patient with diamond-blackfan anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012; 34(4):293-5.
- 6) 伊藤悦朗、小島勢二、大賀正一、小原明。「難治性貧血の診療ガイド」編集委員会：Ⅶ 先天性骨髄不全症 4. Diamond-Blackfan 貧血/診療の参照ガイド 難治性貧血の治療ガイド 特発性造血障害の病態・診断・治療の最新動向 pp. 220-227 南江堂 2011.
2. 学会発表  
海外
- 1) Ito E, Yoshida K, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Toki T, Miyano S, Shiraishi Y, Chiba K, Terui T, 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, アトランタ) .
- 2) Asahito Hama, Hideki Muramatsu, Masafumi Ito, Yoshiyuki Kosaka, Masahiro Tsuchida, Yoshiyuki Takahashi, Ryoji Kobayashi, Etsuro Ito, Hiromasa Yabe, Shouichi Ohga, Akira Ohara, Seiji Kojima. Risk factors for clonal evolution of acquired bone marrow failure after immunosuppressive therapy in children. The 54th ASH Annual Meeting and Exposition New Orleans, LA, USA, December 7-10, 2013.
- 国内
- 1) 菅野仁, 入部雄司, 内山智貴, 青木貴子, 小倉浩美, 大賀正一, 伊藤悦朗, 藤井寿一:ダイヤモンド・ブラックファン貧血の新規バイオマーカー同定.第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋 (2011 年 10 月 14~16 日).
- 2) 入部雄司, 青木貴子, 山本俊至, 古川徹, 三谷昌平, 土岐力, 大賀正一, 伊藤悦朗, 小倉浩美, 藤井寿一, 菅野仁:次世代シーケンシングデータからの Diamond - Blackfan 貧血関連遺伝子の探索. 第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋 (2011 年 10 月 14~16 日).
- 3) Kuramitsu M, Matsubara 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. 第73回日本血液学会学術集会 (2011年10月～16日).

4) Toki T, Kobayashi E, Kanazaki R, Wang RN, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuochi T, Adachi S, Hayashi Y, Shimizu R, Yamamoto M, and Ito E. Novel GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. 第73回日本血液学会学術集会、名古屋 (2011年10月14～16日).

5) 伊藤悦朗、照井君典、土岐力、小島勢二、小島勢二、大賀正一、森尾友宏、浜口功、倉光球、菅野仁、小川誠司、佐藤亜以子. 先天性赤芽球癆 (Diamond-Blackfan 貧血) の効果的診断の確立に関する研究 (シンポジウム). 第53回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋市 (2011年11月25～27日).

6) 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. 京都. 2012年10月19日～21日.

7) 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)

8) 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)

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）  
－ 総合研究報告書 －  
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学 教授）

**研究要旨：** 原因不明の溶血性貧血46症例の全エクソーム解析を行った。検索対象は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）である。遺伝性球状赤血球症、遺伝性楕円赤血球症などの病因となる赤血球膜骨格蛋白の遺伝子変異が11例に見出され、現行の赤血球膜異常症スクリーニング検査に比して、次世代シーケンシング（NGS）解析の有用性が明らかになった。また1歳未満の診断未確定CNSHA17症例のうち5症例（29%）にCOL4A1変異が同定された。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初めて示唆された。CNSHAとの鑑別のために骨髓検査が必須なCDAについてもNGS解析で1症例を診断することが可能であった。本研究によりCNSHAの鑑別診断にNGS解析は極めて重要であることが明らかになった。

### 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、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。一部の症例については、家系解析を実施した。

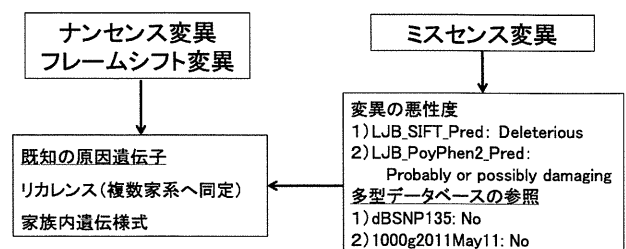


図1 病因候補遺伝子の探索ストラテジー

（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する。

### C. 研究結果と考察

表1に46例についての解析結果を示す。我々の検索対象は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)であるが、遺伝性球状赤血球症(HS)、遺伝性楕円赤血球症(HE)などの病因となる赤血球膜骨格蛋白の遺伝子変異が11例に見出された。

表1 原因不明先天性溶血性貧血症例に対する全エクソーム解析結果

既知赤血球膜蛋白遺伝子	11例
( <i>ANK1</i> , <i>SPTA1</i> , <i>SPTB</i> , <i>EPB41</i> , <i>EPB42</i> , <i>SLC4A1</i> )	
<i>CDAN1</i>	1例
<i>PIGA</i>	1例
<i>COL4A1</i>	5例
新規赤血球膜蛋白遺伝子(3種)	5例
DNA複製関連遺伝子	1例
ミトコンドリアRNA代謝関連遺伝子	1例
<i>FANCI</i> , <i>FANCM</i>	各1例
未同定	20例

赤血球形態で奇形赤血球、破碎赤血球が目立った0歳児に関しては、臨床的に遺伝性熱変形赤血球症(hereditary pyropoikilocytosis; HPP)が疑われたが、結果は*ANK1* p.N1452fs, *SPTB* p.D1721Eという異なる2つの膜骨格遺伝子のフレームシフトおよびミスセンス変異のヘテロ接合体であることが判明した。欧米におけるHPPの病因は $\alpha$ スペクトリン遺伝子の複合ヘテロ接合体の頻度が高いが、今回の結果から異なる膜骨格蛋白遺伝子変異も同様な赤血球形態異常を示すことが明らかになった。

CDA (congenital dyserythropoietic anemia; CDA) が溶血性貧血との鑑別疾患として重要であることは近年我が国でも再認識されている。我々はCDA typeIIの診断に赤血球EMA結合能が有用であることから、CDA 疑い例の病型分類を実施している(図2)。

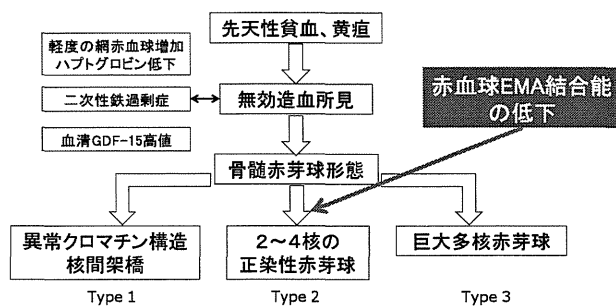


図2 CDAの診断ダイアグラム

また、近年CDA原因遺伝子が次々に同定されており、確定診断における遺伝子検査の重要性がクローズアップされている(表2)。今回の解析でも原因不明の溶血性貧血症例にCDAI型の原因遺伝子である*CDAN1*の一塩基挿入によるフレームシフト変異c.436\_437insG;p.P146fsが同定され、改めて遺伝子検査による溶血性貧血と関連疾患の鑑別診断の重要性が明らかになった。

表2 CDA各病型の特徴と原因遺伝子

	Type 1	Type 2	Type 3
遺伝形式	AR	AR	AD
赤血球像	大小不同、奇形好塩基性斑点、Howell-Jolly小体	大小不同、奇形球状、涙滴、好塩基性斑点	大小不同、奇形
赤芽球形態	分裂赤芽球間の核クロマチン架橋、巨赤芽球様変化	2~4個に分葉した異形核をもった正染性赤芽球	12核におよぶ多核巨赤芽球
病因遺伝子	<i>CDAN1</i> (20%) <i>C15ORF41</i> (3 families)	<i>SEC23B</i>	<i>KIF23</i> (2 families)

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5家系でミスセンス変異が同定された(表3)。

表3 *COL4A1* 異常例の変異

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