

表 4 COL4A1 変異 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)	Hs(mg/dL)
Day81	要 (Day45)	6.7	110	29.9	14	破砕赤血球	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

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る。

表 5 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

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 変異が同定された。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・破砕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 5)。

表 6 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 & β 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 (COL4A1 遺伝子変異)
5) その他

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。

D. 結論

CNSHA の臨床診断には NGS 解析が極めて有用であることが明らかになった。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawabata H, Doisaki S, Okamoto A, Uchiyama T, Sakamoto S, Hama A, Hosoda K, Fujikura J, Kanno H, Fujii H, Tomosugi N, Nakao K, Kojima S, Takaori-Kondo A. A case of congenital dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. Intern Med. 51:917-920, 2012
- 2) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. Blood. 119:2376-2284, 2012
- 3) 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.
- 4) 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*.
2. 著書
- 1) 菅野 仁: 2. 先天性溶血性貧血、VIII章 赤血球系疾患、血液専門医テキスト、日本血液学会編、南江堂、東京、pp.154-158、2011
3. 総説
- 1) 菅野 仁. ピリミジン 5'-ヌクレオチダーゼ異常症. 日本臨床別冊血液症候群第2版I, 311-313, 2013
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 菅野 仁. 三炭糖リン酸イソメラー異常症. 日本臨床別冊血液症候群第2版I, 271-273, 2013
4. 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) 宮岡統紀子, 亀井大悟, 木全直樹, 秋葉 隆, 新田孝作, 菅野 仁, 武市智志, 山本雅一: ビタミンC大量投与により急性溶血発作とAKIを発症したグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD)異常症患者に対しHDFを施行し透析離脱した一例. 日本透析医学会雑誌 45 (Suppl.1): 902, 2013
- 4) 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)
- 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：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(TPPI)*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・がんセンター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ではない。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(TPPI)* 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>TEP1W1079fs</i>		
10 cryptic DKC			
11 cryptic DKC	<i>WRN 3139-1G>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>A</i>	<i>RTEL1 F709L</i>	
15 cryptic DKC	<i>RTEL1 102+1G>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える。

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(TPPI)* 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, 檀 和夫. 骨髄不全症に対する蛋白同化ステロイドホルモンのテロメラーゼ活性化作用. *Annual Review 血液* 2011, p48-54.

- 3) 山口博樹. 病理・病態生理:病因と病型分類. 小澤敬也編, 新しい診断と治療の ABC 72 「再生不良性貧血」最新医学別冊, 最新医学社. 2011; p39-44.
- 4) 山口博樹, 猪口孝一. MDS に対する新規治療薬開発の現状. 血液内科. 2011; 63(2): 195-201.
- 5) 山口博樹. 山川光徳, 猪口孝一, 室井一男編, 血液・造血器疾患のマネージメント. 医薬ジャーナル社. 2011.
- 6) 山口博樹, 檀 和夫. 骨髄不全症候群におけるテロメア制御異常. 血液フロンティア. 2012; 22(6): 941-952.

2. 学会発表

- 1) Takeuchi J, Yamaguchi H, Tamai H, Mitamura Y, Kosaka F, Inokuchi K, Dan K. Telomerase activity is useful for the screening of cryptic and late onset Dyskeratosis Congenita and the evaluation of the treatment response to anabolic steroids for their bone marrow failure. 16th. European Hematology Association. 2011年6月, ロンドン.
- 2) Takeuchi J, Yamaguchi H, Tamai H, Mitamura Y, Kosaka F, Inokuchi K, Dan K. 不全型先天性角化不全症の診断と治療反応性におけるテロメラーゼ活性測定の有用性. 第73回日本血液学会, 2011年9月, 名古屋.
- 3) 山口博樹, 檀 和夫. 先天性造血障害の病態解明の進歩. 日本小児血液がん学会学術集会. 2012年12月. 横浜

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：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： 重症先天性好中球減少症（SCN）は、慢性好中球減少、骨髄での前骨髄球・骨髄球での成熟障害、生後早期からの重症感染症の反復を特徴とする難治性遺伝性疾患である。本疾患は同一表現型を呈するheterogeneousな疾患群であり、責任遺伝子として*ELANE*が最も頻度が高く（約70%）、他に*HAX1*, *GFI1*, *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る。一方で、周期性好中球減少症（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、またその他の分類不能な造血障害症例3症例に対しても対象に網羅的遺伝子解析に着手し、責任遺伝子を同定中である。

A. 研究目的

本研究は、既知の責任遺伝子に異常を認めない好中球減少症症例を対象とした。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対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。具体的な症例は、SCN2 症例、CyN1 症例で、その他分類不能な 3 症例は、骨髄異形成症候

群、先天性血小板減少症、血小板機能異常症であった。

（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

SCN の 1 例で *ELANE* 遺伝子の A50V ヘテロ接合性変異を同定した。健常者である母の解析でも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。その他、稀な疾患群であると推測される骨髄異形成症候群や先天性血小板減少症、血小板機能異常症の症例においても既知の責任遺伝子変異を認めず、現在、未知の候補遺伝子を含め、責任遺伝子候補を同定中である。

D. 考察

責任遺伝子の同定は、効果的な診断法及び治療法の確立につながると考えられる。しかし、未知の遺伝子の同定にはダイレクトシーケンスでは限界があり、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析が有用である。本研究で検討を行った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において、特に家系内発症者がいない場合には、健常者である親族の解析を同時に行っても責任遺伝子単離は困難を極めることが考えられた。

E. 結論

SCN の症例において、健常者である母の解析と併せて、*ELANE* 遺伝子の A50V ヘテロ接合性変異が責任遺伝子候補で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には、責任遺伝子単離がさらに困難を極める。今後、同様の表現型の症例を増やすとともに、特に家系内発症例を検討すること、SNP 機能解析アルゴリズムによる検討を行うことにより、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) Karakawa S, Okada S, Tsumura M, Mizoguchi Y, Ohno N, Yasunaga S, Ohtsubo M, Kawai T, Nishikomori R, Sakaguchi T, Takihara Y, Kobayashi M: Decreased expression in nuclear factor- κ B essential modulator due to a novel-site mutation causes X-linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology* 31: 762-772, 2011.
- 2) Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong XF, Abhyankar A, Heike T, Nakahata

T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, AlZahrani M, Shehri MA, ElGhazali G, Takihara Y, Kobayashi M: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. *Human Mutation*, 33: 1377- 1387, 2012.

- 3) Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin β 3 L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. *British Journal of Haematology* 160: 521-9, 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) 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, Frnch 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.
- 6) 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).
- 7) 慢性皮膚粘膜カンジダ症と機能獲得性 *STAT1* 変異. 溝口洋子, 津村 弥来, 岡田 賢, 小林 正夫. *臨床免疫・アレルギー科* 57(4): 437-443, 2012.
- 8) 新生児同種免疫性好中球減少症. 中村和洋, 小林正夫. *臨床免疫・アレルギー科* 60(1): 78-82, 2013.
- 9) 新しい診断技術で診断可能となった疾患 好中球減少症 遺伝子変異と抗好中球抗体. 唐川 修平, 中村 和洋, 小林 正夫. *小児内科* 45(6): 1131-1133, 2013.
- 10) 原発性免疫不全症に対する造血幹細胞移植. 唐川 修平, 小林 正夫. *小児科診療* 76(3): 476-480, 2013.
2. 学会発表
- 海外
- 1) Suppressed Neutrophil Development in Hematopoiesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From a Severe Congenital Neutropenia Patient with ELA2 Mutation. Takafumi Hiramoto, Yasuhiro Ebihara, Yoko Mizoguchi, Kazuhiro Nakamura, Shinji Mochizuki, Shohei Yamamoto, Emiko Matsuzaka, Sachiyo Hanada, Ryoko Ohnishi, Kenzaburo Tani, Koji Eto, Hiromitsu Nakauchi, Masao Kobayashi, Kohichiro Tsuji. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.
- 2) Yoko Mizoguchi, Kazuhiro Nakamura, Shuhei Karakawa, Satoshi Okada, Hiroshi Kawaguchi, Masao Kobayashi: Clinical and Genetic Characteristics of Patients with Severe Congenital Neutropenia in Japan. 53rd American Society of Hematology Annual Meeting, San Diego, CA, December 10-13, 2011.
- 3) Gain-of-function mutations of *STAT1* in Japanese patients with CMCD. Osamu Hirata, Miyuki Tsumura, Yoko Mizoguchi, Satoshi Okada, Shizuko Minegishi, Tomohiro Morio, Masao Kobayashi. European Society for Immunodeficiency. Florence, Italy, 2012.10
- 4) A Nobel Method using Extracted Human Neutrophil Antigens from HNA gene-transfected cell lines for Detection of Antibodies against Human Neutrophil Antigens. Rie Onodera, Kazuhiro Nakamura, Kikuyo Taniguchi, Emi Kurita, Asako Hiraoka, Kaduta Yasui, Nobuki Matsuyama, Fumiya Hirayama, and Masao Kobayashi. 54th American Society of Hematology. Atlanta, GA, 2012.12
- 5) Genetic characteristic of patients with severe congenital neutropenia in Japan. Masao Kobayashi, Yoko Mizoguchi, Shuhei Karakawa, Satoshi Okada, Hiroshi Kawaguchi, and Kazuhiro Nakamura. 27th International Congress of Pediatrics, August 24-29, Melbourne, Australia
- 国内
- 1) 機能獲得性 *STAT1* 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症の解析. 溝口 洋子, 津村 弥来, 平田 修, 峯岸 志津子, 森尾 友宏, 岡田 賢, 小林 正夫. 日本小児血液・がん学会 2012年11月30日-12月2日, 横浜
- 2) 重症先天性好中球減少症患者由来の iPS 細胞の樹立とその分子生物学的解析. 海老原 康博, 平本 貴史, 山本 将平, 望月 慎史, 辻 浩一郎, 溝口 洋子, 中村 和洋, 小林 正夫. 日本小児科学会 2013年4月19-21日, 広島
- 3) 重症先天性好中球減少症の臨床及び遺伝的特徴に関する全国調査. 溝口 洋子, 岡田 賢, 唐

川 修平, 川口 浩史, 中村 和洋, 高田 英俊,
原 寿郎, 小林 正夫. 日本小児科学会 2013
年 4 月 19-21 日, 広島

- 4) 周期性好中球減少症の家族解析で認めた
ELANE 変異モザイクの検討. 平田 修, 津村
弥来, 唐川 修平, 岡田 賢, 松村 到, 木村 祐
次郎, 小原 収, 小林 正夫. 日本小児科学会
2013 年 4 月 19-21 日, 広島

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： **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： わが国では、従来、疫学情報や遺伝子診断システムが存在しなかった **congenital dyserythropoietic anemia(CDA)** について、遺伝子診断を含めた診断および疾患登録システムを確立した。20例を対象に既知の遺伝子診断をおこない、3例の **CDAN1** 変異を確認した。既知の遺伝子変異が検出されなかった14例を対象に、全エクソーム解析をおこなったところ、1例で **CDAN1** 変異が見つかった他、2例で橢円状赤色球症の原因遺伝子である **SPTA1** の変異、**ANK1** の変異が見つかった。さらに、有力な新規原因遺伝子候補が同定されており、現在機能解析を進めている。本研究を通じて、**CDA** の診断に全エクソン解析の有用性が明らかとなった。

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。骨髄所見をもとにI型からIII型の3病型に分類されており、近年I型の責任遺伝子 **CDAN1** と、II型の責任遺伝子 **SEC23B** と、III型の責任遺伝子 **KIF23** が同定された。本研究では、日本小児血液学会の中央診断および疾患登録事業の一環として、本疾患を包括的に登録するとともに、新たな遺伝子検査法による診断精度の向上と、新規責任遺伝子の探索を行う。

A. 研究方法

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。再生不良性貧血、骨髄異型性症候群、あるいは先天性造血不全症候群が疑われる症例が発

生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。以後はその番号でやりとりを行った（匿名化）。中央診断およびそれに伴う検査については患者保護者の同意を取得した後に行った。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設（名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科）で、骨髄病理標本を1施設（名古屋第一赤十字病院病理部）で行った。

CDA と診断された症例については、名古屋大学小児科において、I型については **CDAN1** 遺伝子、II型については **SEC23B** 遺伝子、分類不能型については **KLFI** 遺伝子の変異解析をダイレクトシーケンシング法により行なった。遺伝子変異が明らかにならなかった症例に関しては、東京大学でエクソーム解析を行なった。すなわち、各症例より抽出したゲノムDNAを超音波破碎により断片化し、試料を識別する6塩基のBarcode配列を付与したのち、12 試料を混合し、常法に従

って液相ハイブリダイゼーションにより全エクソン配列を濃縮した。得られた混合試料を Illumina社HiSeq2000 シークエンサーにより平均読み取り回数200回を目標として全エクソン配列の解析を行う。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基変異(single nucleotide variants: SNVs)および欠失・挿入配列からSNP データベースおよび1000personal genome データベースに登録済みのSNPを除去したのち、家族内罹患者と陰性コントロール(非罹患同胞や両親)の全エクソン解析データとを比較検討することにより、責任変異の候補となるSNVの候補を絞り込み、必要に応じて全ゲノムリシーケンスを併用しつつ、機能的な推定と併せて、新規原因遺伝子の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

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。

B. 研究結果

CDAと診断され同意を得た症例についてサンガー法による遺伝子診断を行った。20例中3例に遺伝子変異を確認し、3例ともI型の責任遺伝子 *CDAN1* の変異 (2例が ex26 c.3503 C>T (p. Pro1129Leu)、1例が ex2 c.552_553insG (P185fs), ex12 c.A1910G (N598S))であった。

既知の責任遺伝子変異が認められなかった症例について、次世代シーケンスによる新規責

任遺伝子の探索を行った。14例中1例で *CDAN1* 変異が見つかった他、2例で橢円状赤色球症の原因遺伝子である *SPTA1* の変異、*ANK1* の変異が見つかった。

C. 考察

CDA疑いとされた症例は20例中、既知の責任遺伝子の変異を認めた症例は3例のみであった。その原因としては、CDAの鑑別が困難で溶血性貧血をはじめほかの疾患が混入している可能性や日本人に特有な遺伝子型の存在する可能性が挙げられる。

次世代シーケンスによる解析で、溶血性貧血の原因遺伝子の変異を複数例に認めた。いっぽう、溶血性貧血と診断されエクソーム解析をおこなった症例から、*CDAN1* 遺伝子変異が見つかった。今回の研究結果は、CDAと溶血性貧血の鑑別は臨床所見や検査所見のみでは困難であることを示唆しており、貧血を鑑別するにたり遺伝子診断の重要性が再確認された。

D. 結論

CDAのようなまれな疾患はこのような中央診断登録システム、遺伝子変異解析を通して確実に診断がつけられていくと考えられる。また、次世代シーケンスによる解析を進めて行くことで、CDAの他の原因による貧血からの鑑別や新たな責任遺伝子の同定が可能となると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawabata H1, Doisaki S, Okamoto A, Uchiyama T, Sakamoto S, Hama A, Hosoda K, Fujikura J, Kanno H, Fujii H, Tomosugi N, Nakao K, Kojima S, Takaori-Kondo A. A case of congenital dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a *CDAN1* gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. Internal medicine.

- 2012;51(8):917-920.
- 2) Fujino H, Doisaki S, Park YD, Hama A, Muramatsu H, Kojima S, Sumimoto S. Congenital dyserythropoietic anemia type 1 with a novel mutation in the CDAN1 gene previously diagnosed as congenital hemolytic anemia. *International journal of hematology*. 2013;97(5):650-653.
 - 3) 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
 - 4) 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
 - 5) 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
 - 6) 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
 - 7) 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
- 1) 本邦における Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の責任遺伝子の解析. 土居崎小夜子、川島希、成田敦、坂口大俊、村松秀城、濱麻人、中西康嗣、高橋義行、小島勢二、神谷尚宏、真部淳、多賀崇、菅野仁. 第54回日本小児血液学会総会 (2012年11月30日 横浜)
- 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：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。本邦において診断例が増加し症例が集積されるようになっており、効果的な診断法、新たな治療法開発の基盤が確立した。

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、DNA を抽出し、ダイレクトシーケンシング法を用いて 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 遺伝子のシーケンシングを行い、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に10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た。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、SBDS に変異を認められなかった 1 例について新規遺伝子の同定が期待される。

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た。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, Fujino H, Matsubara H, Adachi S, Suemori H, Nakahata T, Heike T. Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *J Cell Physiol* 2011; 226(5):1283-91.
- 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.
 - 4) 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.
 - 5) 金兼 弘和, 清水 篤実, 渡邊 健一郎, 種市 尋宙, 宮脇 利男. 【脾臓症候群(第 2 版)-その他の脾臓疾患を含めて-】 先天性脾病変 Shwachman-Diamond 症候群. 日本臨床 別冊 脾臓症候群 2011:65-68.
 - 6) 渡邊 健一郎, 森嶋 達也, 金兼 弘和 Shwachman-Diamond 症候群. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.21 血液症候群(第 2 版)p24-27. 2013 年 1 月 20 日発行
 - 7) 渡邊 健一郎, 森嶋 達也, 先天性角化不全症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.21 血液症候群(第 2 版)p19-23. 2013 年 1 月 20 日発行
- ### 2. 学会発表
- 1) Morishima T, Watanabe K, et al. Reduced production of mature neutrophils from induced pluripotent stem cells derived from a severe congenital neutropenia patient with HAX1 gene deficiency. 53rd ASH annual meeting and exposition, 2011.

- 2) Morishima T, Watanabe K, et al. Induced pluripotent stem cell model of severe congenital neutropenia with HAX1 gene deficiency. International Society for Stem Cell Research, 10th Annual Meeting, 2012
- 3) Watanabe K, Kojima Y, Kudo, K, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with secondary myelodysplastic syndrome after treatment of aplastic anemia in AA-97 study. 6th International Symposium on MDS and Bone Marrow Failure Syndromes in Childhood, 2012

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：分類不能血液疾患の原因究明ならびに治療法の確立

研究分担者 金兼弘和（富山大学附属病院小児科 講師）

研究要旨： 遺伝性血液疾患の中には原発性免疫不全症とオーバーラップし、従来の疾患群との位置づけが困難なものもある。本研究ではこれらの分類不能血液疾患の原因遺伝子の探索を行うべく、**whole exome sequencing (WES)**を行った。これまで**42**例の分類不能血液疾患について**WES**を行ったところ、**8**例で原因遺伝子が同定され、**5**例では新規遺伝子が疑われた。同定された遺伝子はすべて既知のものであり、典型的臨床像ではないものが多く認められた。したがって**WES**は表現型の異なる疾患における既知遺伝子変異を見出すのにきわめて有用な方法であるといえる。

A. 研究目的

遺伝性血液疾患の一部には、免疫担当細胞以外の分化異常、さらには悪性腫瘍の合併を伴うものがあり、従来の疾患群との位置づけが困難であり、原発性免疫不全症（PID）ともオーバーラップしている。本研究ではこれらの分類不能血液疾患において**whole exome sequencing (WES)**を行うことにより原因遺伝子の探索を行い、新たな治療法の開発を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

厚生労働省原発性免疫不全症候群班会議（班長：原 寿郎）、理化学研究所、かずさDNA研究所で運営しているPIDJ (<http://pidj.rcai.riken.jp/>) に登録されたPID関連症例のうち、従来の候補遺伝子解析では原因が不明である**42**例を対象とした。これらの患者家族から文書による同意を得て、末梢血からDNAを抽出し、東京大学（現京都大学）小川研にて**WES**を行った。候補遺伝子のうち原因遺伝子と考えられたものについてサンガー・シーケンス法による**validation**ならびに免疫学的検査を行った。

（倫理面への配慮）

本研究はヒト検体を用いて解析を行うものであり、検体量および採取時の苦痛には十分な配慮を行った。遺伝子解析については各種指針を遵守して、患者個人情報保護について十分な配慮を行った。

C. 研究結果

42例中**8**例（**19%**）で原因遺伝子が同定された。そのうちわけは**39**歳のB細胞欠損分類不能型免疫不全症（CVID）の女性において**Fanconi**貧血（FA）の原因遺伝子の一つである**FANCE**の複合ヘテロ接合体が認められた。抗体産生不全症の**2**例においては**PIK3CD**の**E1021K**変異が片アレルで同定された。この原因遺伝子については最近高IgM症候群の新しい原因遺伝子として報告されたものと同じであり、ヘテロ機能獲得変異である。自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）の**2**歳女児例において**NRAS**変異が同定された。低ガンマグロブリン血症の家族例ではX連鎖リンパ増殖症候群（XLP）タイプ**1**の原因遺伝子である**SH2D1A**変異が同定された。血球貪食性リンパ組織球症の**1**例では**XLP2**の原因遺伝子である**XIAP**変異が同定された。原因不明の複合免疫不

全症の 8 歳男児では *IL2RG* の変異が同定され、遅発発症型の重症複合免疫不全症 (SCID) であることが判明した。新規遺伝子が疑われた症例は 5 例であり、原因遺伝子であるかどうか現在 validation を行っているところである。

D. 考察

本研究では分類不能血液疾患の 19% で原因遺伝子を同定することができた。FA は常染色体劣性の遺伝性骨髄不全症であり、FA-A, -C, -G は比較的多く認められるが、FA-E は極めて稀な病型である。今回の症例は低身長とカフェオレ斑は認められたが、汎血球減少や奇形はなく、典型的 FA とは言い難かった。今回の研究で *PIK3CD* の E1021K 変異が 2 例同定されたのを契機にこの PID に対する認知が高まり、さらに 6 例が同定された。NRAS 変異による ALPS 様疾患においては組織によるモザイク率が異なる体細胞変異であることが判明した。*SH2D1A* 変異が同定されたこの家系ではその後の解析によってメモリー T 細胞に正常細胞が混入するモザイク例であることが判明し、軽微な臨床像との関連が示唆された。*XIAP* 変異が同定された XLP2 家系内に女性 XLP2 が存在することが判明し、世界初の症例と考えられる。*IL2RG* が同定された遅発発症型 X-SCID では CD8+T 細胞に正常クローンが認められ、モザイク例であることが判明し、このことが遅発発症に関係しているかもしれない。

E. 結論

WES は表現型の異なる疾患や非典型的臨床像をとる疾患において既知遺伝子を見出すのにきわめて有用な方法であると言える。今後は分類不能血液疾患における未知遺伝子の発見に努めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) X-linked lymphoproliferative due to *SAP/SH2D1A* deficiency: a multicenter study

on the manifestations, management and outcome of the disease. Booth C., Gilmour K.C., Veys P., Gennery A.R., Slatter M.A., Chapel H., Heath P.T., Steward C.G., Smith O., O'Meara A., Kerrigan H., Mahlaoui N., Cavazzana-Calvo M., Fischer A., Moshous D., Blanche S., Schmid J.P., Latour S., Saint-Basile G., Albert M., Notheis G., Rieber N., Stahm B., Ritterbusch H., Lankester A., Hatwig N.G., Meyts I., Plebani A., Soresina A., Finocchi A., Pignata C., Cirillo E., Bonanomi S., Peters C., Kalwak K., Pasic S., Sedlacek P., Jazbec J., Kanegane H., Nichols K.E., Hanson I.C., Kapoor N., Haddad E., Cowan M., Choo S., Smart J., Arkwright P.D., and Gaspar H.B.: *Blood* 117: 53-62, 2011.

2) Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (*XLP-1/SAP* deficiency) versus type 2 (*XLP-2/XIAP* deficiency). Schmid J.P., Canioni D., Moshous D., Touzot F., Mahlaoui N., Hauck F., Kanegane H., Lopez-Granados E., Mejstrikova E., Pellier I., Galicier L., Galambrun C., Barlogis V., Bordigoni P., Fourmaintraux A., Hamidou M., Dabadie A., Deist F., Haerynck F., Ouachee-Chardin M., Rohrllich P., Stephan J-L., Lenoir C., Rigaud S., Lambert N., Milili M., Schiff C., Chapel H., Picard C., Basile G.S., Blanche S., Fischer A., and Latour S.: *Blood* 117: 1522-1529, 2011.

3) Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (*SAP* deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. Kanegane H., Yang X., Zhao M., Yamato K., Inoue M., Hamamoto K., Kobayashi C., Hosono A., Ito Y., Nakazawa Y., Terui K., Kogawa K., Ishii E.,

- Sumazaki R., and Miyawaki T.: *Pediatr Allergy Immunol* 23: 488-493, 2012.
- 4) Clinical and Genetic Characteristics of XIAP Deficiency in Japan. *J Clin Immunol* 32: 411-420, 2012. Yang X., Kanegane H., Nishida N., Imamura T., Hanamoto K., Miyashita R., Imai K., Nonoyama S., Sanayama K., Yamaide A., Kato F., Nagai K., Ishii E., van Zelm MC., Latour S., Zhao XD., and Miyawaki T.:
 - 5) Allogeneic hematopoietic cell transplantation for XIAP deficiency: an international survey reveals poor outcomes. Marsh RA., Rao K., Satwani P., Lehmborg K., Müller I., Li D., Kim MO., Fischer A., Latour S., Sedlacek P., Barlogis V., Hamamoto K., Kanegane H., Milanovich S., Margolis DA., Dimmock D., Casper J., Douglas DN., Amrolia PJ., Veys P., Kumar AR., Jordan MB., Bleesing JJ., and Filipovich AH.: *Blood* 121: 877-883, 2013.
 - 6) 幼児期に見逃されてしまった X 連鎖無ガンマグロブリン血症の 1 例. 竹綱庸仁, 縣 裕篤, 新川成哲, 石澤 恵, 宮崎良樹, 岩田敦子, 堀壽成, 鶴澤正仁, 安藤郁子, 金兼弘和: *小児科臨床* 64: 61-65, 2011.
 - 7) 抗菌薬投与により治癒し得た再発性肝膿瘍を合併した慢性肉芽腫症の一例. 星野顕宏, 金兼弘和, 西田直徳, 野村恵子, 大賀正一, 宮脇利男: *小児感染免疫* 24: 175-179, 2012.
 - 8) 重症複合免疫不全症 2 例における同種骨髄細胞移植後のキメリズム解析. 道野淳子, 中出祥代, 佐竹伊津子, 西野主眞, 安村 敏, 芳村直樹, 野村恵子, 金兼弘和: *日本輸血細胞治療学会誌* 58: 704-709, 2012.
2. 学会発表
- 海外
- 1) SAP and XIAP deficiency in hemophagocytic lymphohistiocytosis. Kanegane H.: 2011 Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research, 2011, 4, 30-5.1, Denver (U.S.A).
 - 2) Neutropenia and myeloid dysplasia in a patient with late-onset adenosine deaminase deficiency. Kanegane H., Nomura K., Hoshino A., and Miyawaki T.: The 15th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies, 2012, 10, 3-6, Florence, Italy.
 - 3) X-linked dysgammaglobulin caused by hypomorphic XIAP mutation. Kanegane H.: A conference for medical research on X-linked lymphoproliferative disease 2012, 2012, 10, 8, London.
 - 4) Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (SAP deficiency) and type 2 (XIAP deficiency) in Japan. Kanegane H., Yang X., Nishida N., Ishii E., and Miyawaki T.: 28th Annual meeting of the Histiocyte society, 2012, 10, 10-12, London.
- 国内
- 1) X 連鎖リンパ増殖症候群タイプ 1(SAP 欠損症) に対する造血幹細胞移植. 金兼弘和, 倭 和美, 井上雅美, 浜本和子, 小林千恵, 細野亜子, 伊藤能清, 中沢洋三, 照井君典, 子川和宏, 石井榮一, 宮脇利男: 第 34 回日本造血細胞移植学会, 2012, 2, 24-25, 大阪.
 - 2) NRAS 変異を有する自己免疫性リンパ増殖症候群様疾患の一例. 窪川芽衣, 楊 曦, 吉田健一, 高木正稔, 菊地雅子, 横田俊平, 松田和之, 小池健一, 村松秀城, 小島勢二, 小川誠司, 金兼弘和. 第 4 回関東甲越免疫不全症研究会. 2013, 9, 22. 東京都.
 - 3) 抗体不全症と中枢神経感染症. 金兼弘和: 第 18 回日本神経感染症学会, 2013, 10, 11-12, 宮崎.
 - 4) 免疫不全症. 金兼弘和: 第 41 回日本臨床免疫学会 2013, 11, 27-29, 下関.

5) 造血不全を合併する免疫不全症. 金兼弘和: 第
55 回日本小児血液・がん学会, 2013,
11/29-12/1, 福岡.

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし