

201415064A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と
診断ガイドラインの作成に関する研究

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 27（2015）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授)	
II. 分担研究報告書	
1. 遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データ・遺伝子解析	33
張替 秀郎 (東北大学大学院医学系研究科血液免疫病学分野 教授)	
2. ファンconi貧血の臨床データ解析・遺伝子診断・診断ガイドラインの作成	37
矢部 普正 (東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 准教授)	
3. Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の臨床データ解析	41
真部 淳 (聖路加国際病院小児科 医長)	
4. 中央診断、DKC と CDA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	45
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授)	
5. 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血) 患者赤血球における eADA と GSH のバイオマーカーとしての有用性	51
菅野 仁 (東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 教授)	
6. ファンconi貧血の遺伝子解析	55
高田 穰 (京都大学放射線生物研究センター 教授)	
7. DBA の患者由来多能性幹細胞の樹立と発症メカニズム解析	59
浜口 功 (国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長)	
松岡佐保子 (国立感染症研究所血液・安全性研究部 室長)	
倉光 球 (国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員)	
8. 先天性造血障害の表現型と遺伝子型に応じた治療戦略に関する研究	63
大賀 正一 (山口大学大学院医学系研究科小児科学 教授)	
下村麻衣子 (山口大学大学院医学系研究科小児科学 助教)	
市村 卓也 (山口大学大学院医学系研究科小児科学 診療助教)	
菅野 仁 (東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 教授)	

9. 小児期造血障害疾患登録による赤芽球癆など先天性遺伝性貧血の疫学データベース構築	67
小原 明 (東邦大学医学部小児科 教授)	
10. DBA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	71
照井 君典 (弘前大学医学部附属病院小児科 講師)	
11. 遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝子型と表現型の関連解析	75
古山 和道 (岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授)	
12. CDA のデータ管理、診断基準の確立	79
多賀 崇 (滋賀医科大学小児科 講師)	
13. 重症先天性好中球減少症の造血幹細胞移植：再移植症例の検討	81
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)	
14. Shwachman-Diamond 症候群の診断基準作成に関する研究	87
渡邊健一郎 (静岡県立こども病院血液腫瘍科 科長)	
金兼 弘和 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 准教授)	
15. 先天性血小板減少症のデータ管理・遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	89
國島 伸治 (国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター高度診断研究部 室長)	
16. 本邦における先天性角化不全症の臨床的遺伝学的特徴	93
山口 博樹 (日本医科大学血液内科 准教授)	
17. DBA の遺伝子診断	99
剣持 直哉 (宮崎大学フロンティア科学実験総合センター 教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	101
IV. 研究成果の刊行物・別冊	113

I. 総括研究報告

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

研究代表者 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： 主要な先天性骨髄不全症には、先天性赤芽球癆（DBA）、Fanconi 貧血（FA）、遺伝性鉄芽球性貧血（SA）、congenital dyserythropoietic anemia（CDA）、Shwachman-Diamond syndrome（SDS）、先天性角化不全症（DKC）、先天性好中球減少症（SCN）、先天性血小板減少症（CTP）の 8 疾患がある。本研究班は、8 つの疾患別研究拠点から構成され、各研究拠点は疫学調査、臨床データおよび検体の収集、既知の原因遺伝子解析とバイオマーカーなどの特殊検査を担当した。本研究では、発症数が少なく共通点の多いこれらの 8 疾患の医療水準の向上をより効果的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進した。先天性骨髄不全は、稀少疾患であるため、症例を効率的に集積できなければ研究の進展は困難である。このため、海外との共同研究を視野に入れた先天性骨髄不全の WEB 登録システムの構築を行った。これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行った。先天性骨髄不全の中で最も症例が多い DBA は、約半数が原因遺伝子不明であるため、遺伝子診断が不可である。このため、新規のバイオマーカーが求められていた。我々は、赤血球還元グルタチオン濃度が優れた DBA の新たなバイオマーカーとなり、赤血球アデノシンデアミナーゼ活性値を組み合わせることで、診断確度が格段に高まることを明らかにした。アルデヒド代謝酵素である *ALDH2* の多型が、FA の臨床像との強い関連がみられることを見出した。特に、*ALDH2* 酵素活性の欠損をもたらす多型が骨髄不全の進行を強く促進した。これらの結果は、FA 患者の骨髄における病態の本質に強い示唆を与え、また、将来の治療法開発への道を開くものと言える。稀少疾患である先天性造血不全症は、診断から治療まで一貫した登録システムの確立、長期フォローアップ体制と最良の治療法の提供までのガイドライン作成が重要である。本年度は、これまで診断基準が未策定であった 3 疾患（SDS、SCN、CTP）の診断基準の作成および重症度分類がなかった 5 疾患（DBA、CDA、SDS、SCN、CTP）の重症度分類を作成した。

【研究分担者氏名】

張替秀郎：東北大学大学院医学系研究科教授
矢部普正：東海大学医学部准教授
真部 淳：聖路加国際病院医長
小島勢二：名古屋大学大学院医学系研究科教授
菅野 仁：東京女子医科大学教授
高田 穰：京都大学放射線生物研究センター教授
浜口 功：国立感染症研究所部長
大賀正一：山口大学大学院医学系研究科教授
小原 明：東邦大学医療センター大森病院教授
照井君典：弘前大学医学部附属病院講師
古山和道：岩手医科大学教授
多賀 崇：滋賀医科大学講師

小林正夫：広島大学大学院医歯薬保健学研究院教授
渡邊健一郎：静岡県立こども病院科長
金兼弘和：東京医科歯科大学准教授
國島伸治：国立病院機構名古屋医療センター室長
山口博樹：日本医科大学准教授
剣持直哉：宮崎大学教授

【研究協力者氏名】

土岐 力：弘前大学大学院医学研究科講師
倉光 球：国立感染症研究所研究員
佐藤知彦：弘前大学医学部附属病院助教
下村麻衣子：山口大学大学院医学系研究科助教
市村卓也：山口大学大学院医学系研究科診療助教

A. 研究目的

わが国における実態が不明であった先天性骨髄不全症においても、平成 21 年度以降、8 疾患（先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan anemia:DBA）、Fanconi 貧血（FA）、遺伝性鉄芽球性貧血（SA）、congenital dyserythropoietic anemia（CDA）、先天性角化不全症（DKC）、Shwachman-Diamond syndrome（SDS）、先天性好中球減少症（SCN）、先天性血小板減少症（CTP））が、厚労省難治性疾患克服研究事業に採択され、全国疫学調査、臨床データの収集、遺伝子解析が行われ、実態が明らかにされつつある。本研究申請では、共通点の多いこれらの 8 疾患の医療水準の向上をより効果的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進する。これまでの班研究により、DBA では通常のシーケンスでは同定出来ない既知の原因遺伝子の片アレル欠失が約 10%も存在することが明らかになった（Blood 2012）。新規原因遺伝子 *RPS24* と *RPL27* も同定した。さらに、新規バイオマーカーとして赤血球還元グルタチオン（GSH）を同定し、赤血球アデノシンデアミナーゼ（eADA）活性と組み合わせることにより診断精度を向上させることを見出した。FA では、アルデヒド代謝酵素 ALDH2 酵素活性の欠損をもたらす多型が骨髄不全の進行を強く促進することが明らかになった（Blood 2013）。CTP でも、新規原因遺伝子 *ACTN1* の同定に成功した（Am J Hum Genet, 2013）。しかし、DBA、FA、DKC などの約 50%で原因遺伝子が不明である。さらに、DBA と臨床診断された症例が遺伝子解析により DKC と確定診断されるなど遺伝子診断が正確な診断のために必須な症例が複数存在することが明らかとなった。このため、これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行う。平成 26 年度は、遺伝子診断の結果も含めて、国際共同研究を視野に入れた共通のデータベースを基にした先天性造血不全の WEB 登録システムの構築を行う。平成 27 年度は、データ収集と観察研究を継続し、より正確な先天性造血不全の実態の把握を行い、エビデンスに基づいた診断基準の改定、重症度分類の確立、診断・治療ガイドラインを策定する。

B. 研究方法

本研究申請では、発症数が少なく共通点の多い先天性造血不全症の医療水準の向上をより効果的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進する。本研究班は、8 つの疾患別研究拠点から構成され、各研究拠点（DBA（伊藤）、SA（張替）、FA（矢部・高田）、CDA（小島・真部）、DKC（小島、山口）、SDS（渡邊）、SCN（小林）、CTP（國島））は、疫学調査、臨床データおよび検体の収集、遺伝子診断のための既知の原因遺伝子解析とバイオマーカーなどの特殊検査を担当する。研究代表者（伊藤）が、DBA の研究を担当するとともに研究全体を統括する。平成 26 年度は、遺伝子診断の結果も含めて、国際共同研究を視野に入れた共通のデータベースを基にした先天性造血不全の登録システムの構築を行う。平成 27 年度は、データ収集と観察研究を継続し、より正確な先天性造血不全の実態の把握を行い、エビデンスに基づいた診断基準の改定、重症度分類の確立、診断・治療ガイドラインを策定する。以下に、具体的な研究計画及び方法を述べる。

平成 26 年度

a. 疫学調査

本年度は、先天性造血不全の 8 疾患について治療成績も含めた疫学調査を行い、詳細な疫学情報を収集する（小原、大賀、張替、矢部、多賀、真部、小島、渡邊、小林、國島）。

b. 中央診断

先天性造血不全症の疑い例が発生すると、日本小児血液・がん学会の登録システムを用いて疾患登録が行われる。末梢血や骨髄血塗抹標本を名古屋大学（小島）と聖路加国際病院（真部）で中央診断し、先天性造血不全症が強く疑われる場合は各疾患拠点でさらに詳細な診断を行う。既に、この 4 年間で 1,000 例の造血不全症の診断が行われ、その 10%以上が先天性造血不全であった。

c. バイオマーカーによるスクリーニング

DBA の疑い症例では、新規バイオマーカーである赤血球 GSH と eADA 活性を同時測定し、SVM 法による判別式による判定を行う（菅野）。DKC の疑い症例では Flow FISH 法による血球

テロメア長のスクリーニングを行う（小島）。

d. 遺伝子診断

遺伝子診断のため、原因遺伝子の解析を直接シーケンス法あるいは次世代シーケンサーを用いたターゲット・シーケンス法あるいは全エクソンシーケンスで行う。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 シーケンサーにより平均読み取回数 200 回を目標として全エクソン配列、対象遺伝子領域の解析を行った。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 1000 personal 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 原因遺伝子の候補を絞り込み、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。

DBA 症例では、上記に加え、定量的 PCR 法と SNP アレイで RP 遺伝子の欠失を解析する。

FA 症例については、高レベルのモザイク症例も多く、特にリンパ球にリバージョン・モザイクを起こし、遺伝子変異が末梢血では同定不可能な症例もあるため、変異が同定されない場合は骨髓細胞や皮膚・骨髓線維芽細胞を用いた解析も行う（矢部・高田）。また、通常の直接シーケンス法では既知の原因遺伝子の欠失を検出できないため、DBA 研究班が開発した定量的 PCR 法と SNP アレイあるいは Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) を用いて片アレル欠失の有無を解析する（浜口および各研究拠点）。

SA 症例で、*ALAS2* 遺伝子第 1 イントロンに存在する赤芽球特異的エンハンサーに変異を有する家系が存在することを明らかにした。診断

を確定するためにゲノム編集技術により赤芽球系培養細胞の *ALAS2* 遺伝子のエンハンサー部分に変異を導入し、実際にヘム生合成量が低下するかどうかを解析する。

e. 症状に影響する modifier 遺伝子の同定

FA と DBA が確定された症例について、アセトアルデヒドの分解酵素である *ALDH2* 遺伝子解析を Taqman PCR 法による検討を行う（高田、伊藤）。今年度はさらに、FA 追加症例での *ALDH2* 遺伝子型検索を行った。また、AA 型 FA 児の母親の遺伝子型も検索の対象とした。

f. 疾患登録データベースの構築

得られた症例の臨床情報や遺伝子解析の結果も含めて、共通のデータベースを基にした先天性造血不全の登録システムの構築を行う。海外との共同研究を視野に入れ、中国、韓国、インドの血液専門医とアジアにおける先天性造血不全の WEB 登録システムの構築を計画している。既に、このためのデータシートは作成済みである（小島、小原、大賀、伊藤）。

g. 診療ガイドラインの作成

得られた情報は、データベースを構築し（小原、大賀）、各疾患の研究班の診断システムの構築および治療ガイドラインの作成に役立てる。移植プロトコールを含む治療ガイドラインを作成する（伊藤、大賀、真鍋、矢部、小島）。

平成 27 年度

正確な診断に基づくデータの収集と観察研究を継続することにより、より正確な先天性造血不全の実態を把握し、先天性造血不全の登録システムに情報を収集する。収集された情報を基に、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS 委員会と連携を取りながら、より多くのエビデンスに基づいた診断基準、重症度分類、診断・治療ガイドラインの策定・改正を行う。なお、治療ガイドラインは造血幹細胞移植のプロトコールを含む実用的なものを策定する（伊藤、張替、大賀、真部、矢部、渡邊、小林、國島、小島）。

(倫理面への配慮)

日本小児血液・がん学会として行う疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究としてすでに学会倫理審査委員会で承認されている。調査にあたっては個人情報守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても、患者検体の匿名化を図る。検体の採取にあたっては、患者および家族から事前に十分な説明を行い、文書による同意を得る。各疾患の遺伝子解析については、ヒトゲノム遺伝子解析研究指針に従い、患者および家族に事前に十分な説明を行い、文書による同意を得たのち連結可能匿名検体として研究を遂行する。患者および家族に対して不利益が生じる場合には、いつでも同意の撤回は可能である。既知の責任遺伝子に関しては、倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

1) 疫学調査と中央診断

2006～2013年診断登録症例数を表に示す(表1)。

- a. 疾患登録(一次調査)症例: 2013年診断症例は小児血液学会会員 230 施設の 92%に相当する 212 施設が登録した。非腫瘍性血液疾患は毎年 1,200～1,300 症例であり、血小板異常症が最多であった。表に挙げた造血障害疾患(溶血性貧血を除く)は総計 730 例で、そのうち特発性再不貧は毎年 50～56 例とほぼ一定した症例数であった。診断は日本小児血液・がん学会の形態中央診断が貢献している。
- b. Diamond-Blackfan 貧血: DBA 症例は 7 年間で 62 例、特発性赤芽球ろう 40 例が登録された。
- c. 2008～2013 年の期間の鉄芽球性貧血は 5 例、congenital dyserythropoietic anemia は 3 例であった。いずれも極めて稀である。
- d. 本研究班の活動は 2014 年日本小児血液・がん学会総会で発表され、学会員への小児期造血障害疾患に関する啓発活動も盛んである。
- e. Fanconi 貧血に対する造血幹細胞移植の成績
骨髄異形成症候群や急性白血病を発症した 33 例の造血幹細胞移植では、移植後 3 年生存率は約 68%であった。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が、不応性貧血 12 例では約 90%と再生不良性貧血と同等

の成績が得られた。造血細胞移植に関しては、小児ドナーの有効性と安全性の検討を行い、同胞 105 症例のうち FA 患者ドナー 11 例においても有効性と安全性が確認された。

- f. 疾患登録データベースの構築: 共通のデータベースを基にした先天性造血不全の WEB 登録システムの構築を行った。

2) バイオマーカーによるスクリーニング

DBA はリボソーム機能不全によって発症する先天性芽球癆である。我々は、平成 22 年度から始まった研究班において、赤芽球系細胞における最も重要な抗酸化物質である赤血球還元型グルタチオン(GSH)が DBA の新規バイオマーカーであることを同定した。赤血球アデノシンデアミナーゼ活性(eADA)と GSH を同時に検討することで、遺伝子検査により確定診断し得た DBA 症例と同一家系内非罹患者の識別を可能とする判別式を得た。今年度は更に、症例数を積み重ねることで判別式の有用性を再検討した。また、新たに DBA 疑い 3 症例を検討し、臨床診断および従来の診断基準との相関について検討を加えた。その結果、eADA/GSH を用いた判別式結果は eADA 単独の評価に比して、家族歴・先天奇形を伴わない DBA 症例の診断率を向上することが明らかになった。

3) 遺伝子診断

a. DBA

DBA の原因遺伝子として 10 種類のリボソームタンパク(RP)遺伝子(*RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*, *RPL26*)と *GATA1* 遺伝子が知られている。最近我々は、新規原因遺伝子 *RPS27* および *RPL27* を同定した(Wang et al. Br J Haematol 2014)。DBA の遺伝子診断を効率的に行うために、次世代シーケンサー(MiSeq)を用いてこれらの 13 遺伝子を一度に解析するターゲットシーケンスのシステムを開発した。この方法では、新たな原因遺伝子を容易に追加できる。

本年度は、このシステムを用いて新規 32 家系の遺伝子診断を行った。この結果、16 例に RP

遺伝子の変異を検出した。次に、ターゲットシーケンスを行っても原因遺伝子が不明な 16 家系について、SNP アレイで RP 遺伝子の欠失を検索した後、他の先天性骨髄不全症候群を除外するために全エクソン解析を行った。SNP アレイ解析では、今回検索した症例には、RP 遺伝子の欠失は検出されなかった。また、Fanconi 貧血等の他の先天性造血不全を示唆する遺伝子変異も検出されなかった。しかし、これまでに報告のない新規原因候補遺伝子 *RPS15A* (スプライス変異: c.G213A) を 1 家系 3 例に見出した。変異のみられた 3 例 (本人、姉、母) はいずれも罹患者であり、非罹患者である父には変異は検出されなかった。次に、末梢血単核球より total RNA を抽出し、それを鋳型として cDNA を合成して RT-PCR を行い、*RPS15A* (c.G213A) がスプライス変異であることを確認した。

b. FA

東海大学における次世代シーケンスによるエクソーム解析を加えた総計 82 例の日本人 FA の解析を行った。FA 遺伝子のゲノムシーケンスより、37 例の *FANCA* と 20 例の *FANCG* 遺伝子の変異を京都大学放射性生物研究センターの高田穰研究室にて同定した。*FANCB*, *FANCD1*, *FANCE*, *FANCP* の変異も確認され、既知遺伝子が全く検出されなかった症例のうち、2 例において新規原因候補遺伝子が見つかり、解析中である。

MLPA 法を用いた 63 症例の検討では、38 例が *FANCA* シーケンスで A 群と断定され、そのうちの 26 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 (68%)。

ALDH2 は、飲酒等の外因性、体内代謝による内因性のアセトアルデヒドを主な基質とし、アルデヒド代謝に関わる重要な酵素である。日本、韓国、中国において高頻度に変異型アレル (ここでは正常活性のものを G 型、活性のないものを A 型とする) が見出される。すなわち、ホモで A 型を持つ個人では酵素活性が消失し、ヘテロの GA 型でもドミナントネガティブ効果により活性が 2~4 割に低下し、飲酒後の顔面紅潮、

頻脈などの原因となることが知られている。この酵素の活性と FA 表現型の関係をヒトにおいて明らかにするため、昨年度 64 例の日本人 FA 患者において、*ALDH2* 遺伝子型を決定し報告した。GG 型、GA 型、AA 型は、それぞれ 36、25、3 例であった。今年度これに追加して、もう 2 例の AA 型患者が見つかり、合計 5 例となった。

これらの AA 型症例は全例、生下時ないし生後まもなく血液学的異常を認め、GG 型、GA 型とは全く異なる経過をとった。1 例は、重症再生不良性貧血、残り 4 例は MDS として発症した。また、全例臓器の奇形を伴っていた。5 例のうち 4 例で母親の *ALDH2* 遺伝子型の検索の同意が得られた。マウスとは全く異なり、2 例の母親は AA 型、2 例は GA 型という結果であった。

骨髄異形成症候群や急性白血病を発症した 33 例の造血幹細胞移植では移植後 3 年生存率は約 68% であった。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が、不応性貧血 12 例では約 90% と再生不良性貧血と同等の成績が得られた。造血細胞移植に関しては小児ドナーの有効性と安全性の検討を行い、同胞 105 症例のうち FA 患者ドナー 11 例においても有効性と安全性が確認された。

c. SA

本年度の 1 例目の新規症例は 2012 年生まれの女兒、家族歴なし。生後 3 ヶ月頃より赤血球の系統のみの低下を来しており、赤血球輸血依存状態であった。明らかな外表奇形は認めなかった。これまでの精査から、再生不良性貧血は血球形態から否定的、サラセミア・Diamond-Blackfan 貧血も否定的、溶血所見無し、染色体検査は正常核型であった。さらに、末梢血検査から小球性貧血、フェリチン高値、骨髄検査にて環状鉄芽球を認めているため、鉄芽球性貧血の診断目的で、本調査研究に登録された。現在、本人及び両親の末梢血液細胞を用いた遺伝子変異解析を施行中である。

2 例目は 2014 年生まれの男児、家族歴なし。出生後より汎血球減少あり、骨髄検査を行ったところ、赤芽球中の環状赤芽球比率 68% を認め

たため、Pearson 疑いとして本調査研究に登録となった。登録時点では脾臓症状・神経筋症状無し。本人の末梢血液細胞を用いた解析の結果、従来 Pearson 症候群で報告のある領域のミトコンドリア DNA 欠損を認めたため (GeneBank Accession No. NC_012920 の Position: 8483-13459 に渡る計 4977bp の欠損)、Pearson 症候群に伴う鉄芽球性貧血を考えた。現在、他症状出現の有無も含めて経過観察中である。

昨年度は、*ALAS2* 遺伝子第 1 イントロンに赤芽球特異的エンハンサーが存在することを見出し、遺伝性鉄芽球性貧血患者において同部に変異を有する家系が存在することを明らかにして報告した。その際、プロモーターアッセイなどの方法により、エンハンサーの変異が *ALAS2* のプロモーター活性を低下させることを明らかにしたが、診断を確定するためには、同部の変異により実際に赤芽球内におけるヘム合成量が低下することを示す必要がある。本年度は、近年広く用いられつつあるゲノム編集技術により赤芽球系培養細胞の *ALAS2* 遺伝子のエンハンサー部分に変異を導入し、実際にヘム生合成量が低下するかどうかを明らかにすることを試みた。

赤芽球系培養細胞である K562 細胞を用い、ゲノム編集技術としては LifeTechnologies 社の GeneArt CRISPR/Cas9 システムを用いた。このシステムはガイド RNA と Cas9 nuclease を同じベクターから発現させる方法により、一種類のベクターを細胞内に導入するのみで、ゲノム DNA の目的部分を切断することができる。その後、切断部の修復が起こる際に同部のゲノム DNA にランダムな欠失や塩基の挿入が起こるため、高頻度に変異が導入されるシステムである。ガイド RNA の配列としては、ヒト *ALAS2* 遺伝子第 1 イントロンのエンハンサー配列、その中心となる GATA1 結合配列の近傍の配列とした。このようにして作成した *ALAS2* intron1 enhancer editing 用ベクター (以下、pCRISPR-*ALAS2*int1GATA) を Nucleofector (ロンザジャパン株式会社) を用いて K562 細胞に導入し、限界希釈法によりクローニングを

行った。その後、Survayor Assay (Transgenomic 社) により変異が導入されていると予想されるクローンを選択し、最終的に *ALAS2* エンハンサー部分を PCR 法により増幅した後に塩基配列を決定し、変異が導入されているクローンを選択した。このようにして *ALAS2* エンハンサーに変異が導入されたクローン (変異 K562 細胞) を選別し、それらから total RNA を抽出し、*ALAS2* mRNA の発現量を Real Time PCR 法により野生型 K562 細胞と比較した。また、ヘモグロビン染色によりヘモグロビン陽性細胞の割合を算出した。Nucleofector による K562 細胞への pCRISPR-*ALAS2*int1GATA (プラスミド) 導入高率は非常に良好で、限界希釈によりクローニングした後も約 50% 程度のクローンで目的の部位の変異が確認された。また、それぞれのクローンの変異導入部位における変異のタイプをシーケンスにより検討したところ、多くは欠失で、数塩基から 30 塩基程のものが大半を占めた。それ以外に一部では数塩基の挿入も認められた。また、今回の検討では過半数の変異導入クローンで両方のアレルに異なる変異が導入されており、変異導入の効率も非常に良好であった。これらのクローンの中から両方のアレルに変異が導入されたクローンを選択して *ALAS2* mRNA 量を Real Time PCR 法により野生型の K562 細胞と比較したところ、比較した全ての変異導入クローンで *ALAS2* mRNA の発現が低下しており、また、これらの変異導入クローンにおいては野生型と比較してヘモグロビン陽性率も低下していた。以上の結果より、*ALAS2* 遺伝子第 1 イントロンの赤芽球特異的エンハンサーの変異が、SA の原因であることが明らかになった。

d. CDA

CDA と診断され同意を得た症例について遺伝子診断を行った。20 例中 4 例に遺伝子変異を確認し、3 例では I 型の責任遺伝子 *CDAN1* の変異 (2 例が (P1129L)、1 例が (P185fs)、ex12 (N598S)) を認めた。1 例では variant 型の責任遺伝子 *KLF1* の変異 (E325K) を認めた。

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エクソームシーケンスを行った。その結果、12例中4例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。2例が *SPTA1* の変異 ((R28H)、(Y2280C)、(W2172X)) であり、1例が *G6PD* の変異 (V424L) であり、1例が *ANK1* の変異 (R935X) であった。

e. SCN

今回、初回の造血幹細胞移植で拒絶され、広島大学病院で再移植として骨髄移植を施行した4症例について検討を行った。

4症例とも *ELANE* 変異例で、末梢血液検査骨髄像所見から診断がなされ、一部重症感染症を経験していた。3例がすでに G-CSF による治療が行われていたため、MDS/AML への進展前に造血幹細胞移植が必要と判断され、移植が施行されていた。すべての症例が拒絶されたために、当院紹介時には慢性好中球減少症を呈していた。再度遺伝子検査を行い、*ELANE* 変異を確認した。

血縁1例、非血縁3例で前処置は Flu、CY、Mel、TBI に十分量の ATG を使用した免疫抑制効果の高いレジメンを選択した。4症例とも生着は速やかであり、症例2を除いて、生着後は100%ドナータイプの完全キメラの状態を維持し、移植後1~6年経過するが通常の日常生活を過ごしている。症例2は、生着後3か月頃からドナータイプ細胞の減少を認めたため、DLI を施行した。4回の DLI 後に Grade II の GVHD を認めたが、免疫抑制剤と生物学的製剤の使用でコントロール可能であった。

f. 先天性血小板減少症

本年度(平成26年4月~平成27年1月現在)は、15例の先天性血小板減少症を疑う症例を解析し、MYH9 異常症7例、Bernard-Soulier 症候群ホモ接合体2例・ヘテロ接合体1例、2B型 von Willebrand 病1例、gray platelet 症候群1例が診断に至り、3例は確定診断されなかった。

MYH9 異常症についてはタイ国との共同研究を進め、多数の症例収集を行っている。Bernard-Soulier 症候群については、世界的コン

ソーシアムを結成し、遺伝子異常と臨床症状との関連性を示し、重症度分類を行った。

4) 診断基準と重症度分類の確立・改定

本年度は研究計画に従って、診断基準と重症度分類の確立・改訂を行った。以下に、今後の目標と達成状況を記載した。

I. 目標

(1) 先天性赤芽球癆 (Diamond-Blackfan 貧血)

1. 診断基準の改訂 (平成27年10月まで)
2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認 (平成28年3月まで)
3. 重症度分類の策定 (平成26年12月まで)
4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認 (平成28年3月まで)
5. 診療ガイドラインの改訂 (平成27年10月まで)
6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認 (平成28年3月まで)

(2) Fanconi 貧血

1. 診断基準の改訂 (平成27年10月まで)
2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認 (平成28年3月まで)
3. 重症度分類の改訂 (平成27年10月まで)
4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認 (平成28年3月まで)
5. 診療ガイドラインの改訂 (平成27年10月まで)
6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認 (平成28年3月まで)

(3) 遺伝性鉄芽球性貧血

1. 診断基準の改訂 (平成27年10月まで)
2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認 (平成28年3月まで)
3. 重症度分類の改訂 (平成27年10月まで)
4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認 (平成28年3月まで)
5. 診療ガイドラインの改訂 (平成27年10月まで)
6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認 (平成28年3月まで)

(4) Congenital dyserythropoietic anemia

1. 診断基準の改訂 (平成27年10月まで)

2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 3. 重症度分類の策定（平成26年12月まで）
 4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 5. 診療ガイドラインの改訂（平成27年10月まで）
 6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
- (5) 先天性角化不全症
1. 診断基準の改訂（平成27年10月まで）
 2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 3. 重症度分類の改訂（平成27年10月まで）
 4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 5. 診療ガイドラインの改訂（平成27年10月まで）
 6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
- (6) Shwachman Diamond syndrome
1. 診断基準の策定（平成26年12月まで）
 2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 3. 重症度分類の策定（平成26年12月まで）
 4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 5. 診療ガイドラインの策定（平成27年10月まで）
 6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
- (7) 先天性好中球減少症
1. 診断基準の策定（平成26年12月まで）
 2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 3. 重症度分類の策定（平成26年12月まで）
 4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 5. 診療ガイドラインの策定（平成27年10月まで）
 6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
- (8) 先天性血小板減少症
1. 診断基準の策定（平成26年12月まで）
 2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 3. 重症度分類の策定（平成26年12月まで）
 4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 5. 診療ガイドラインの策定（平成27年10月まで）
 6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
- II. 達成状況
- (1) 先天性赤芽球癆 (Diamond-Blackfan 貧血)
1. 達成見込み（平成27年10月）
 2. 達成見込み（平成28年3月）
 3. 達成済み（平成26年12月）（表2）
 4. 達成見込み（平成28年3月）
 5. 達成見込み（平成27年10月）
 6. 達成見込み（平成28年3月）
- (2) Fanconi 貧血
1. 達成見込み（平成27年10月）
 2. 達成見込み（平成28年3月）
 3. 達成見込み（平成27年10月）
 4. 達成見込み（平成28年3月）
 5. 達成見込み（平成27年10月）
 6. 達成見込み（平成28年3月）
- (3) 遺伝性鉄芽球性貧血
1. 達成見込み（平成27年10月）
 2. 達成見込み（平成28年3月）
 3. 達成見込み（平成27年10月）
 4. 達成見込み（平成28年3月）
 5. 達成見込み（平成27年10月）
 6. 達成見込み（平成28年3月）
- (4) Congenital dyserythropoietic anemia
1. 達成見込み（平成27年10月）
 2. 達成見込み（平成28年3月）
 3. 達成済み（平成26年12月）（表3）
 4. 達成見込み（平成28年3月）
 5. 達成見込み（平成27年10月）
 6. 達成見込み（平成28年3月）
- (5) 先天性角化不全症
1. 達成見込み（平成27年10月）

2. 達成見込み (平成28年3月)
3. 達成見込み (平成27年10月)
4. 達成見込み (平成28年3月)
5. 達成見込み (平成27年10月)
6. 達成見込み (平成28年3月)

(6) Shwachman Diamond syndrome

1. 達成済み (平成26年12月) (表4)
2. 達成見込み (平成28年3月)
3. 達成済み (平成26年12月) (表5)
4. 達成見込み (平成28年3月)
5. 達成見込み (平成27年10月)
6. 達成見込み (平成28年3月)

(7) 先天性好中球減少症

1. 達成済み (平成26年12月) (表6)
2. 達成見込み (平成28年3月)
3. 達成済み (平成26年12月) (表7)
4. 達成見込み (平成28年3月)
5. 達成見込み (平成27年10月)
6. 達成見込み (平成28年3月)

(8) 先天性血小板減少症

1. 達成済み (平成26年12月) (表8)
2. 達成見込み (平成28年3月)
3. 達成済み (平成26年12月) (表9)
4. 達成見込み (平成28年3月)
5. 達成見込み (平成27年10月)
6. 達成見込み (平成28年3月)

D. 考察

日本小児血液・がん学会疾患登録事業は2006年に開始され、会員施設において診断された全ての血液疾患を対象にした全数把握疫学研究事業である。また、同学会形態中央診断事業は、診断困難な小児期の造血不全を対象にして、高い精度で新規症例が診断されている。全数把握疫学研究は、遺伝性貧血以外の疾患も同時に収集しており、これらを統合した疾患データベースを構築することで、各疾患の相対頻度も明らかになる。

小児期造血障害疾患の病態解明、診断法や治療開発には疾患遺伝子情報や詳細な臨床情報、追跡情報の収集(二次調査・追跡調査)が必要である。今回、学会疾患登録事業で収集された一次調査情報データベースが整った事で詳細データを含む「小児造血障

害」データベース構築の基盤が整った。次年度は、「小児造血障害」データベース特異的な調査項目を順次整理する。その際には、海外の同様のデータベースと比較検討できる共通基本項目を海外との情報交換で調査整備する必要がある。

臨床的に使用しやすい診断基準・重症度分類が作成できたと考えられる。この診断基準により、本邦での先天性造血不全症の診断率が向上し、より多くの患者が正確な診断を受けることが期待される。

従来診断基準では、今回解析した3例中1例は非DBA、2例は非古典的DBAと診断された。いずれも家族歴が無く、先天奇形の存在も無いことから、eADA活性が診断に重要な症例と考えられる。しかし、eADA活性単独では診断基準によりDBAが否定された今回のようなケースにおいて、新規バイオマーカーであるGSHを併用した判別式はDBAの診断に極めて有用と考えられる。この結果が新規バイオマーカーによる偽陽性結果で無いことを明らかにするためには、網羅的な遺伝子検査結果を用いたDBAの診断および他の骨髄不全症候群の否定が極めて重要と考えられた。

FAの発症頻度、臨床症状や遺伝子変異は民族による差がみられ、日本人における疫学解析が必要である。エクソーム解析等を用いた遺伝子解析は従来の方法では検出できなかった変異確定させることができ、今後も重要な解析法となり、日本におけるFAの疫学の基盤になると推測される。MLPA-Aを用いた方法は、既知の変異のみが対象となるものの、極めて有用であった。

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り、骨髄形成症候群に進展した症例では白血病に移行する前に移植を施行することが重要である。HLA一致の同胞間移植の成績は良好であるが、同胞のFAを否定することが大切である。

日本人FA患者におけるALDH2遺伝子型の解析から、骨髄不全を中心としたFAの病態にアルデヒド代謝が大きな役割を果たすことがますます確実となる結果が得られた。造血幹細胞における内因性のアルデヒドがDNAを障害し、その修復が不十分になることで、幹細胞にDNA障害が蓄積し、p53発現などのDNA損傷応答が引き起こされると考えられる。

さらに今後、基礎研究としては、ヒトの血液幹細胞における ALDH サブタイプの発現などを確認していく必要が考えられる。また、臨床研究としては他の血液疾患や家族性乳がんにおける *ALDH2* 遺伝子型の役割についても検証が必要と思われる。

マウスとは違い、FA 児の母親に *ALDH2* の AA 型が高頻度に存在することは驚きである。種が異なることによる違いではあるが、これをどう説明するか、今のところ十分な知見はない。ヒトの AA 型はマウスのノックアウトに比せば、いくらかの酵素活性が残るはずであるが、マウスではヘテロでも胎児が維持できないということなので、それでは説明できない。他の *ALDH* 酵素活性、分布、体内のアルデヒド代謝など様々な要因が寄与する可能性があり、解明には今後の研究が必要である。

今後、患者の治療への展開として、食物中飲料中のアルデヒド量が減らせないか、内因性アルデヒド産生のメカニズム解明と制御法の開発、*ALDH2* 酵素活性の活性化剤の応用等が考えられる。*ALDH2* 活性化剤については、急性アルコール中毒を対象に治験開始が近いと聞いている（私信）。また、FA 原因遺伝子とは異なる新しい視点から *ALDH2* 遺伝子型による骨髄不全症の重症度の検討も必要と思われる。我々の解析結果は特異な重症型 FA の存在を確立し、FA 患者の骨髄不全における病態の本質に強い示唆を与え、また、将来の治療法開発への道を開くものと言える。また、FA 患者のマネジメントに出生早期の *ALDH2* のジェノタイプングが有用である可能性がある。

コード領域の変異がタンパク質の機能に与える影響を明らかにすることは、そのタンパク質の機能の評価方法が確定している場合にはそれほど困難ではないと考えられる。一方、タンパク質の機能が明らかでない場合、あるいは機能が明らかであってもその評価の方法が確立していない場合には、遺伝子変異が同定されたとしても、それが疾患の原因になりうるかどうかを判定することは非常に困難である。実際、近年の次世代シーケンサーの進歩により全てのタンパク質のコード領域の配列を明らかにするエクソーム解析が盛んに行われるようになり、家族歴等から遺伝性と推定されていても原因が不明であった症例で新たな候補遺伝子が次々に同定されつつあ

り、現在これらの遺伝子変異がどのように当該疾患の発症に関与するのかについて更なる検討が行われている。また、次世代シーケンサーの更なる改良とコストの低減により、エクソーム解析によっても原因遺伝子が明らかにならない症例については全ゲノム解析が行われる可能性も高まっている。このような場合、プロモーター部分やイントロン部分の変異、さらには遺伝子と遺伝子の間の領域における変異なども多数同定される様になると予想されることから、バイオインフォマティクスを駆使して候補となる変異を絞り込んだとしても、その候補の変異がどのように疾患の発症と関与するのかを明らかにするのは非常に困難であると予想される。今回我々は、近年盛んに用いられるようになりつつあるゲノム編集システムを用いて培養細胞のゲノムの特定の領域に変異を導入することにより、イントロン領域の変異が内在性遺伝子の発現制御に関与している可能性が高いことを示した。今回導入し得たのは、非特異的な欠失・挿入変異であり、患者のゲノム DNA で同定された変異とは異なる点や、ゲノム編集システムにより他の遺伝子へ非特異的な変異が導入された可能性など、今後解決して行かなければならない問題は多数存在しているが、内在性の遺伝子の発現調節を直接観察できるメリットは大きいと思われる。従って、今回行ったのと同様の方法は、遺伝性鉄芽球性貧血のみならず、様々な遺伝性疾患家系において、網羅的な検索により同定された遺伝子変異と疾患との関連を明らかにするために有用である可能性は高いと考えられる。

本邦における鉄芽球性貧血に関する全国調査の結果、遺伝性鉄芽球性貧血症例は計 19 例登録され、うち 79% は *ALAS2* の異常を認め、一方、欧米で多い *SLC25A38* 遺伝子変異など既知の遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子は認められなかった (Ohba et al. *Ann Hematol* 2013)。従って、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子には人種差・地域差がある可能性が示唆された。しかしながら、症例数が少なくまだ結論は得られていない。2 例目の症例は生後間もなく汎血球減少を認め、Pearson 症候群の診断に至った。遺伝性鉄芽球性貧血は、その原因遺伝子の機能の多様性から、*XLSA* 以外は幼少児期より貧血以外に神経・筋・内分泌器など他の臓器に異常を認める場合が多

く、また、貧血自体も重症であることが多いため、実際に遺伝性鉄芽球性貧血であったものの、診断がついていない症例が多く存在する可能性を検証する必要がある。そのためには、小児科医との連携が重要であると考えられた。

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 の鑑別が困難であること、日本人に特有な CDA の病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。この事実は、CDA と溶血性貧血の鑑別が困難であることを示唆し、貧血鑑別における遺伝子診断の重要性が再確認された。

近年、先天性血小板減少症の中で大型／巨大血小板を有する先天性巨大血小板症の病因病態解析は進んでいる。本年度は、我々が独自に確立中である先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断解析により 15 例を解析し、12 例（80%）の症例で確定診断が得られた。MYH9 異常症は 7 例（46.7%）と最も高頻度に診断された。MYH9 異常症の診断率は末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色の確立により向上した。MYH9 異常症 7 例中、1 例では難聴を、3 例では腎炎の合併を認めた。Bernard-Soulier 症候群については、2 例のホモ接合性患者では重度の血小板減少症と重篤な出血症状を認めたが、ヘテロ接合性患者では中等度の血小板減少症を認めたのみであった。高頻度の MYH9 異常症と Bernard-Soulier 症候群では、今までに集積した遺伝子解析データと臨床情報を共に解析することにより重症度分類の確立と診療ガイドライン作成策定が可能であり、他の頻度の低い疾患については来年度も症例収集を重ねることで疾患の把握を目指す。

E. 結論

先天性骨髄不全は、稀少疾患であるため、症例を効率的に集積できなければ研究の進展は困難である。このため、海外との共同研究を視野に入れた先天性骨髄不全の WEB 登録システムの構築を行った。

これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症

例の把握と検体収集を行った。

先天性骨髄不全の中で最も症例が多い DBA は、約半数が原因遺伝子不明であるため、遺伝子診断が不可能である。このため、新規のバイオマーカーが求められていた。我々は、赤血球還元グルタチオン濃度が優れた DBA の新たなバイオマーカーとなり、赤血球アデノシンデアミナーゼ活性値を組み合わせることで、診断確度が格段に高まることを明らかにした。

アルデヒド代謝酵素である *ALDH2* の多型が、FA の臨床像との強い関連がみられることを見出した。特に、*ALDH2* 酵素活性の欠損をもたらす多型が骨髄不全の進行を強く促進した。これらの結果は、FA 患者の骨髄における病態の本質に強い示唆を与え、また、将来の治療法開発への道を開くものと言える。

稀少疾患である先天性造血不全症は、診断から治療まで一貫した登録システムの確立、長期フォローアップ体制と最良の治療法の提供までのガイドライン作成が重要である。本年度は、これまで診断基準が未策定であった 3 疾患（SDS、SCN、CTP）の診断基準の作成および重症度分類が無かった 5 疾患（DBA、CDA、SDS、SCN、CTP）の重症度分類を作成した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang R, Yoshida Y, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanazaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E*. Loss of function mutations in *RPL27* and *RPS27* identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan Anemia. *Br J Haematol.* 2015;168(6):854-864.
- 2) Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T,

- Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H, Kurokawa M. Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. *Nat Commun*. 2014;5:4770.
- 3) Ono R, Hasegawa D, Hirabayashi S, Kamiya T, Yoshida K, Yonekawa S, Ogawa C, Hosoya R, Toki T, Terui K, Ito E, Manabe A. Acute megakaryoblastic leukemia with acquired trisomy 21 and GATA1 mutations in phenotypically normal children. *Eur J Pediatr*. 2014. [Epub ahead of print]
- 4) Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Imaizumi M, Mitsui T, Hori H, Hara J, Horibe K, Nagai JI, Goto H, Ito E. Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. *Genes Chromosomes Cancer* 2014;53(11):902-10.
- 5) Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 2014;99(8):1312-6.
- 6) Horino S, Sasahara Y, Sato M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Sato A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S. Selective expansion of donor-derived regulatory T cells after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. *Pediatr Transplant*. 2014 Feb;18(1):E25-30.
- 7) Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia* 2014;28(12):2344-54.
- 8) Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, Kobayashi R, Ishida H, Harigae H, Shibahara S. Identification of the novel erythroid-specific enhancer for ALAS2 gene and its loss-of-function mutation associated with congenital sideroblastic anemia. *Haematologica* 2014;99(2):252-61.
- 9) 張替秀郎, 藤原亨, 古山和道. ヘム代謝と貧血. *臨床血液* 2014;55(7):p729-734.
- 10) Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H. Effect of 5-aminolevulinic acid on erythropoiesis: a preclinical in vitro characterization for the treatment of congenital sideroblastic anemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;454:102-108.
- 11) Kamata, Okitsu Y, Fujiwara T, Kanehira M, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates differentiate on of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Haematologica* 2014;99:1686-1696.
- 12) Harigae H, Fujiwara T, Furuyama K. Heme metabolism and anemia. *Rinsho Ketsueki* 2014;55:729-734.
- 13) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima

- K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in GATA-2 deficiency evolving into myelodysplasia and acute leukemia. *Ann Hematol*. 2014;93:1515-1522.
- 14) Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, Kobayashi M, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferase, promotes erythroid differentiation. *J Biol Chem*. 2014;21:8121-8134.
- 15) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Ohtsubo K, Fukumura A, Kato S, Yabe H. Feasibility of marrow harvesting from pediatric sibling donors without hematopoietic growth factors and allotransfusion. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(7):921-6.
- 16) Nakayama H, Tabuchi K, Tawa A, Tsukimoto I, Tsuchida M, Morimoto A, Yabe H, Horibe K, Hanada R, Imaizumi M, Hayashi Y, Hamamoto K, Kobayashi R, Kudo K, Shimada A, Miyamura T, Moritake H, Tomizawa D, Taga T, Adachi S. Outcome of children with relapsed acute myeloid leukemia following initial therapy under the AML99 protocol. *Int J Hematol*. 2014;100(2):171-9.
- 17) Kato M, Yoshida N, Inagaki J, Maeba H, Kudo K, Cho Y, Kurosawa H, Okimoto Y, Tauchi H, Yabe H, Sawada A, Kato K, Atsuta Y, Watanabe K. Salvage allogeneic stem cell transplantation in patients with pediatric myelodysplastic syndrome and myeloproliferative neoplasms. *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(10):1860-6.
- 18) Patel P, Suzuki Y, Tanaka A, Yabe H, Kato S, Shimada T, Mason RW, Orii KE, Fukao T, Orii T, Tomatsu S. Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Therapy on Growth in Patients with Hunter Syndrome. *Mol Genet Metab Rep*. 2014;1:184-196.
- 19) Sato Y, Kurosawa H, Fukushima K, Okuya M, Yabe H, Arisaka O. Necessary stem cell transplantation using myeloablative therapy for myelodysplastic syndrome with progression of genotypic abnormalities and TP53 dysfunction in a young adult. *Pediatr Transplant*. 2014;18(7):E255-7.
- 20) Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe KI, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor vs. immunosuppressive therapy. *Haematologica* 2014;99(12):1784-91.
- 21) Goto H, Kaneko T, Shioda Y, Kajiwara M, Sakashita K, Kitoh T, Hayakawa A, Miki M, Kato K, Ogawa A, Hashii Y, Inukai T, Kato C, Sakamaki H, Yabe H, Suzuki R, Kato K. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia and Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(1):148-52.
- 22) Kato M, Hasegawa D, Koh K, Kato K, Takita J, Inagaki J, Yabe H, Goto H, Adachi S, Hayakawa A, Takeshita Y, Sawada A, Atsuta Y, Kato K. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for infant acute lymphoblastic leukaemia with KMT2A (MLL) rearrangements: a retrospective study from the paediatric acute lymphoblastic leukaemia working group of the Japan Society for Haematopoietic Cell Transplantation. *Br J Haematol*. 2014 Oct 10. [Epub ahead of print]
- 23) Tanjuakio J, Suzuki Y, Patel P, Yasuda E, Kubaski F, Tanaka A, Yabe H, Mason RW, Montañó AM, Orii KE, Orii KO, Fukao T, Orii

- T, Tomatsu S. Activities of daily living in patients with Hunter syndrome: Impact of enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Mol Genet Metab.* 2014 Nov 8. [Epub ahead of print]
- 24) Yabe M, Ohtsuka Y, Watanabe K, Inagaki J, Yoshida N, Sakashita K, Kakuda H, Yabe H, Kurosawa H, Kudo K, Manabe A; Japanese Pediatric Myelodysplastic Syndrome Study Group. Transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia: a retrospective study of 30 children treated with a regimen of busulfan, fludarabine, and melphalan. *Int J Hematol.* 2014 Dec 11. [Epub ahead of print]
- 25) 矢部 普正. Fanconi貧血. *小児科* 2014;55(11): 1559-1564.
- 26) Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, Muramatsu H, Takahashi Y, Natsume J, Kojima S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N. A novel WTX mutation in a female patient with osteopathia striata with cranial sclerosis and hepatoblastoma. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(4):998-1002.
- 27) Hasegawa D, Chen X, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification. *Br J Haematol.* 2014; 166(5):758-766.
- 28) Hasegawa S, Imai K, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Whole-exome sequence analysis of ataxia telangiectasia-like phenotype. *J Neurol Sci.* 2014 15;340 (1-2):86-90.
- 29) Honda Y, Tsuchida M, Zaike Y, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukaemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Paediatric Haematology/Oncology. *Br J Haematol.* 2014;165(5):682-687.
- 30) Hyakuna N, Muramatsu H, Higa T, Chinen Y, Wang X, Kojima S. Germline mutation of CBL is associated with moyamoya disease in a child with juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome-like disorder. *Pediatr Blood Cancer.* 2014 Oct 4. [Epub ahead of print]
- 31) Ismael O, Shimada A, Elmahdi S, Elshazley M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada M, Yamashita Y, Horide K, Kojima S. RUNX1 mutation associated with clonal evolution in relapsed pediatric acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). *Int J Hematol.* 2014;99(2):169-174.
- 32) Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S. Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children. *Haematologica* 2014; 99(4):664-671.
- 33) Kato M, Imamura T, Manabe A, Hashii Y, Koh K, Sato A, Takahashi H, Hori H, Taki T, Inoue M, Hayashi Y, Horibe K, Tsuchida M, Kojima S, Oda M, Ohara A. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study. *Br J Haematol.* 2014;166(2):295-298.
- 34) Kawashima N, Ito Y, Sekiya Y, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Choreito formula for

- BK virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Oct 23. [Epub ahead of print]
- 35) Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S. Aldehyde dehydrogenase-2 polymorphism contributes to the progression of bone marrow failure in children with idiopathic aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2014 Sep 11. [Epub ahead of print]
- 36) Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S. Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20(8):1145-1149.
- 37) 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, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *J Leukoc Biol.* 2014 Apr;95(4):667-676.
- 38) Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, Yagasaki H, Niizuma T, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T, Kurahashi H. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human
- 39) Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S. Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2014;36(1):e65-68.
- 40) Ueda S, Sakata N, Muramatsu H, Sakaguchi H, Wang X, Xu Y, Kojima S, Yamaguchi T, Higa T, Takemura T. Clinical course of juvenile myelomonocytic leukemia in the blast crisis phase treated by acute myeloid leukemia-oriented chemotherapy and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2014 Jul 22. [Epub ahead of print]
- 41) Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children. *Ann Hematol.* 2014;93(5):747-752.
- 42) Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolveang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Juntharaniyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. *Blood* 2014;123(10):1586-95.
- 43) Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno K, Tobe K, Kanno H, Nakagawa T. Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. *J Biol Chem.* 2014;289(21):14796-811.
- 44) Kobayashi Y, Hatta Y, Ishiwatari Y, Kanno H, Takei M. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes.* 2014;11(7):137.

- 45) 守屋友美 (東京女子医科大学 輸血・細胞プロセシング部), 岡本好雄, 小林博人, 松田和樹, 久保田友晶, 緒方康貴, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 青木貴子, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小倉浩美, 菅野仁. ABO血液型不適合腎移植におけるアルブミン製剤の必要性. *日本輸血細胞治療学会誌* 2014;60(4):521-526.
- 46) 岡本好雄, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. 自己血漿製剤という観点から見たCART. *日本アフェレシス学会* 2014;33(3):178-184.
- 47) Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. Defective FANCI binding by a Fanconi anemia-related FANCD2 mutant. *PLoS One*. 2014;9(12):e114752.
- 48) Ishii K, Ishiai M, Morimoto H, Mito-Shinohara K, Niwa O, Takata M, Shinohara T. The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b pathway regulates the radiation response of mouse spermatogonial stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014;3(4):676-89.
- 49) Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H. Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using *Escherichia coli* cells. *Protein Expr Purif*. 2014;103C:8-15.
- 50) Huang Y, Leung JW, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X, Huong D, Takata M, Chen J, Li L. Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. *Cell Rep*. 2014;7(6):1849-57.
- 51) Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugasawa K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. *Cell Rep*. 2014;7(4):1039-47.
- 52) Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, Takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, Enomoto T. Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(5):1002-12.
- 53) 倉光球, 浜口功. 8.リボソーム異常症と関連疾患. *血液フロンティア 特集 赤血球造血の基礎と臨床* 2014;24(4):p81(591)-p89(599).
- 54) 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; 99:19-27.
- 55) Fujii Y, Ishikawa N, Kobayashi Y, Kobayashi M, Kato M. Compound heterozygosity in GPR56 with bilateral frontoparietal polymicrogyria. *Brain & Development* 2014; 36:528-31.
- 56) Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Tajima G, Kobayashi M. Ictal electroencephalography and electromyography features in symptomatic infantile epileptic encephalopathy with late-onset spasms. *Neuropediatrics* 2014;45:36-41.
- 57) Kobayashi Y, Ishikawa N, Fujii Y, Nakamura K, Kobayashi M. A case of trisomy 18 with exacerbation of seizures triggered by administration of valproic acid. *Am J Med Genet A*. 2014;164A:285-6.
- 58) 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, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of Leukocyte Biology* 2014;95:667-676.
- 59) Joichi Y, Chijimatsu I, Yarita K, Kamei K, Miki M, Onodera M, Harada M, Yokozaki M,