

京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室と共同で解析を行った日本人 FA 患者 78 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なかった。

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。特に AA 群の 6 症例では出生直後から 1 年以内に輸血依存の重症な血球減少が進行し、5 症例では 3 系統血球に顕著な形態異常を認めた。

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。

D. 考察

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集積が必要である。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幹細胞移植の成績は良好であり、骨髄形成症候群、急性骨髄性白血病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。

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。

E. 結論

稀少遺伝性疾患である FA の遺伝子解析が進み、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ってきた。FA 患者ではアルデヒドによるゲノム障害が修復できず、骨髄不全が進行する可能性が示唆され病態の解明と新規治療につながる事が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 allogeneic transfusion. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(7):921-6.
- 2) 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):1145-9.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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 Kato K. Allogeneic haematopoietic stem cell Y, 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. doi:10.1111/bjh.13174. [Epub ahead of print]
 - 11) Tanjuakio J, Suzuki Y, Patel P, Yasuda E, Kubaski F, Tanaka A, Yabe H, Mason RW, Montaña 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 ransplantation. *Mol Genet Metab.* 2014 Nov 8. pii: S1096-7192(14)00347-3. doi: 10.1016/ j.ymgme.2014.11.002. [Epub ahead of print]
 - 12) 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]
 - 13) 矢部普正. Fanconi 貧血. *小児科* 2014;55(11): 1559-1564.
2. 学会発表
 - 1) Yabe H, Uchida N, Takahashi S, Ohno Y, Kasai K, Kanamori H, Mori S, Nagamura T, Kato K, Murata M, Suzuki R, Atsuta Y. Comparison of two doses of antithymocyte globulin in pediatric patients with aplastic anemia who received allogeneic bone marrow transplantation. 40th Annual Meeting of the

- | | |
|--|--|
| <p>European Group for Blood and Marrow Transplantation (April 2014, Mirano, Italy).</p> <p>2) <u>Yabe H</u>, Tabuchi K, Takahashi Y, Kudo K, Kato K, Sakamaki H, Kaea K, Kanamori H, Mori S, Nagamura T, Murata M, Suzuki R, Kanda Y. Evaluation of cell dose to achieve engraftment in unrelated cord blood transplantation. 40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (April 2014, Mirano, Italy).</p> <p>3) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Ohtsubo K, Fukumura A, Itosu M, Muroi K, Koh K, Kato S, <u>Yabe H</u>. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for Japanese Fanconi anemia patients with myeloid malignancies. 40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (April 2014, Mirano, Italy).</p> <p>4) Yabe M, Hira A, <u>Yabe H</u>, Morimoto T, Fukumura A, Miyashita M, Ohtsubo K, Matsuo K, Takata M. Infant Japanese Fanconi anemia patients with the ALDH2-AA Genotype. 26th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium (September, 2014, Bethesda, USA).</p> <p>5) <u>Yabe H</u>, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, yabe M. Persistent parvovirus B19 infection resulting in donor cell leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a patient with Fanconi anemia. 26th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium (September, 2014, Bethesda, USA).</p> <p>6) Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Tahara H, Kurumizawa H, Ogawa S, Takata M, <u>Yabe H</u>, Yabe M. Identification of novel UBE2T mutations in Japanese Fanconi anemia patients. 37th Annual meeting of the molecular biology society of Japan (2014年11月, 横浜).</p> | <p>1. 特許取得
該当なし</p> <p>2. 実用新案登録
該当なし</p> <p>3. その他
該当なし</p> |
|--|--|

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

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）

研究要旨：本研究の目的は Congenital dyserythropoietic anemia (CDA：先天性赤血球産生異常性貧血) の疾患像を明らかにすることである。CDA は先天性の赤血球系細胞の形成異常により、慢性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う疾患である。平成 21 年度に行った全国調査により把握された 22 例の CDA 症例を対象として二次調査と遺伝子検索を行った。20 例について遺伝性解析を行い、3 例で CDAN1 変異が、また 1 例で variant 型の責任遺伝子 *KLF1* の変異が見つかった。この他に次世代シーケンサーを用いて解析を行ったところ、臨床的に CDA と診断された 12 例中 4 例で溶血性貧血の原因遺伝子がみられた。すなわち、2 例では遺伝性楕円赤血球症でみられる *SPTA1* 遺伝子の変異が、1 例では *G6PD* 遺伝子の変異が、残りの 1 例では遺伝性球状赤血球症でみられる *ANK1* 遺伝子の変異がみられた。スクリーニングする集団を広げていき、実態を明らかにする必要がある。また、今年度は CDA の診療ガイドラインを改訂した。なお本年度、新たに重症度分類を作成した。

A. 研究目的

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA：先天性赤血球産生異常性貧血) は先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不応性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う稀な疾患群である。我が国ではこれまで CDA の実態が十分把握されておらず、本研究により我が国における CDA の実態を明らかにし最終的に効果的診断法や治療ガイドラインを作成することを目的とする。

B. 研究方法

従来行われている日本小児血液・がん学会疾患登録、中央診断事業を基に、我が国における CDA の把握ならびに診断を行う。診断を行うための診断基準、中央形態診断、遺伝子診断のシステムを構築する。疾患の把握は、過去に行われた全国調査を参考に、疑い症例を含みアンケート方式で行う。診断基準については既存のものを参考にしながら、軽症で診断基準に合致しないものも存在する可能性があるの

で、独自のものを作成する。調査は血液専門医だけでなく、一般小児科医にも協力してもらう。

(倫理面への配慮)

本研究で行われる臨床試験は、

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

C. 研究結果

CDA の全国調査により把握された症例を対象として、二次調査と中央遺伝子診断を開始した。20 例について遺伝性解析を行い、3 例で *CDAN1* 変異 (2 例が (P1129L)、1 例が (P185fs)、ex12 (N598S)) が、また 1 例で variant 型の責任遺伝子 *KLF1* の変異 (E325K) が見つかった。この他に次世代シーケンサーを用いて解析を行ったところ、臨床的に CDA と診断された 12 例中 4 例で溶血性貧血の原因遺伝子がみられた。すなわち、2 例では遺伝性楕円赤血球症でみられる *SPTA1* 遺伝子の変異 ((R28H), (Y2280C), (W2172X)) が、1 例では *G6PD* 遺伝子の変異 (V424L) が、残りの 1 例では遺伝性球状赤血球症でみられる *ANK1* 遺伝子の変異 (R935X) がみられた。本年度は本疾患の診療ガイドラインを改訂した。また、新たに重症度分類を作成した。

Congenital dyserythropoietic anemia の

重症度分類 (平成 26 年度作成)

軽 症：赤血球輸血を受けたことがない

中等症：赤血球輸血を受けたことはあるが、
現在は受けていない

重 症：定期的な赤血球輸血を必要とする

注) 定期的な赤血球輸血とは、ヘモグロビン濃度 8.0 g/dL を維持するのに 2~8 週毎の輸血が必要な場合とする。

*鉄過剰症などの貧血治療に伴う臓器合併症は除く。

D. 考察

わが国でも CDA 患者が一定数存在することが明らかになったが、諸外国に比べ稀な疾患なのか、軽症例が多く見逃されているのかはいまだに不明である。遺伝子解析を進めるとともにスクリーニングする集団を広げていき、実態を明らかにする必要がある。実際、臨床的に CDA と診断された症例で通常は遺伝性楕円赤血球症でみられる *SPTA* 遺伝子の変異や遺伝性球状赤血球症でみられる *ANK1* 遺伝子の変異がみつかった。

新たに作成した重症度分類は今後、患者の取扱いに際して有用となる可能性がある。

E. 結論

わが国の CDA の実態の正確な把握をし、よりよ

い治療法を開発するため、今度も調査、研究が必要である。

共同研究者：土居崎小夜子、小島勢二 (名古屋大小児科)、多賀崇 (滋賀医大小児科)、長谷川大輔、平林真介 (聖路加国際病院小児科)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hasegawa D, Chen X, Hirabayashi H, 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;166:758-766.
- 2) Niemeyer CM, Loh ML, Cseh A, Cooper T, Dvorak CC, Chan R, Xicoy B, Germing U, Kojima S, Manabe A, Dworzak M, De Moerloose B, Stary J, Smith OP, Masetti R, Catala A, Bergstraesser E, Ussowicz M, Fabri O, Baruchel A, Cave H, Zwaan M, Locatelli F, Hasle H, van den Heuvel-Eibrink MM, Flotho C, Yoshimi A. Criteria for evaluating response and outcome in clinical trials for children with juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 100:17-22,2015
- 3) Moriwaki K, Manabe A, Taketani T, Kikuchi A, Nakahata T, Hayashi Y. Cytogenetic and clinical features of pediatric myelodysplastic syndrome in Japan. *Int J Haematol*. (in press)
- 4) 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*. (in press)

2. 学会発表

- 1) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Okuno Y, Irie M, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Central Morphology Review in Childhood Bone Marrow Failure in Japan. 第56回アメリカ血液学会 (2014年12月, サンフランシスコ).
- 2) Hasegawa D, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Refractory Cytopenia of Childhood. 第56回アメリカ血液学会 (2014年12月, サンフランシスコ).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

中央診断、DKC と CDA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

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）

研究要旨：日本小児血液学会（現日本小児血液・がん学会）は平成 21 年 2 月より再生不良性貧血（AA）、骨髄異形成症候群（MDS）および先天性造血不全症候群（CBFS）を対象とした中央診断を開始した。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、聖路加国際病院）で、骨髄病理標本を 1 施設（名古屋第一赤十字病院）で行っている。中央診断症例を中心に集積された congenital dyserythropoietic anemia (CDA) 20 例において、同意を得た後、遺伝子診断を行い、3 例で I 型、1 例で variant 型の責任遺伝子の変異を確認した。遺伝子変異が確認されなかった 12 症例については、次世代シーケンサーによる新規責任遺伝子の探索を行い、4 例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。遺伝性貧血の診断は必ずしも容易ではなく、中央診断、遺伝子診断を行うことによりその診断の精度が上昇したと考えられる。

A. 研究の目的

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。I 型、II 型、III 型、variant 型の 4 病型に分類され、近年 I 型が *CDAN1*、II 型が *SEC23B*、III 型が *KIF23*、variant 型が *KLF1* と責任遺伝子が同定された。本研究では、日本小児血液・がん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、新たに遺伝子診断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。

B. 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。AA、MDS、あるいは CBFS 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、次世代シーケンサーによるエクソーム解析およびターゲットシーケンスを行った。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。

(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

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 *CDANI* 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ターゲットシーケンスを行った。3 例のうち、エクソームシーケンスによる新規責任遺伝子の探索では、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。

D. 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。

E. 結論

CDA のような稀な疾患は、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 の鑑別がより確かになるとともに、新たな責任遺伝子の同定が可能となると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, Muramatsu H, Takahashi Y, Natsume J, Kojima S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saito 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 Apr;164A(4):998-1002.
- 2) 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 J, 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): 902-910.
- 3) 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.
- 4) 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; 340(1-2):86-90.
- 5) 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.
 - 6) 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]
 - 7) 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.
 - 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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]
 - 11) 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]
 - 12) 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.
 - 13) 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;95(4):667-676.
 - 14) 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

- herpesvirus-6. *Sci Rep*. 2014;4:4559.
- 15) 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 G. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 2014; 99(8):1312-1316.
 - 16) 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.
 - 17) 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]
 - 18) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki 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 anaemia. *Br J Haematol*. 2015;168(6):854-864.
 - 19) 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.
 - 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):1784-1791.
2. 学会発表
 - 1) Takahashi Y. Hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor for childhood aplastic anemia: HLA haploidentical family donor vs HLA mismatched unrelated donor. **40th Annual Meeting of the EBMT** (Apr. 9, 2014, Milano, Italia).
 - 2) Hama A. Central Review of morphology in childhood aplastic anemia and myelodysplastic syndrome in Japan-summary of 1,000 cases. **25th Annual Meeting of the International BFM Study Group** (Apr.26, 2014, Czech, Praha).
 - 3) Kojima S. Role of rATG in treatment of AA. Educational Meeting : Role of Immunosuppressive therapy in treatment of Aplastic Anemia (Apr. 26, 2014, Singapore).
 - 4) Takahashi Y. ANR COLOGNE 2014 (May. 13, 2014. Cologne, Germany).
 - 5) Kojima S. Expert Meeting at Wuhan Union Hospital (Jul.15, 2014, Wuhan, China).
 - 6) Kojima S. Expert Meeting at Wharton International Hotel. (Jul.16, 2014, Wharton, China).
 - 7) Kojima S. Hematology Expert Meeting

- (Jul.18, 2014, Guangzhou, China).
- 8) Kojima S. South China Hematology Summit (Jul.19, 2014, Guangzhou, China).
 - 9) Kojima S. Aplastic Anemia : Therapeutic updated in HSCT. 2013 International Forum on Bone Marrow Failure. (Aug.16, 2013, Tianjin, China).
 - 10) Muramatsu H, Takahashi Y, Nishikawa E, Sekiya Y, Kawashima N, Okuno Y, Narita A, Doisaki S, Irie M, Hama A, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr Virus-Associated Post-transplant Lymphoproliferative Disease. **The 19th congress of APBMT** (Oct.16, 2014, Hangzhou, China).
 - 11) Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Yui S, Inokuchi K, Ito E, Ogawa S, Kojima S. The Clinical and Genetic Features of Dyskeratosis Congenita, Cryptic Dyskeratosis Congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome in Japan. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
 - 12) Hasegawa D, Hirabayashi S, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S. Ito M, Manabe A. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Refractory Cytopenia of Childhood. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
 - 13) Hama A, Atsushi M, Hasegawa D, Nozawa K, Okuno Y, Irie M, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Central Morphology Review of Childhood Bone Marrow Failure in Japan. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
 - 14) Patel B, Huang D, Thota S, Przychodzen P, Sakaguchi H, Kojima S. Ogawa S, Sekeres M A, Makishima H, Jaroslaw P. Maciejewski. Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) Can be Categorized By Ancestral Mutational Events. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
 - 15) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara A, Kojima S. Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated Red Cell Reduced Glutathione Is a Novel Biomarker of Diamond-Blackfan Anemia. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
 - 16) Yoshida N, Yabe H, Kudo K, Kobayashi R, Yabe M, Inoue M, Miki M, Sakamaki H, Kato K, Kawa K, Suzuki R, Watanabe K, Kojima S. Outcomes of Stem Cell Transplantation with Fludarabine and Melphalan Conditioning for Children with Acquired Bone Marrow Failure: A Nationwide Retrospective Study. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.7 2014, San Francisco, USA).
 - 17) Okuno U, Atsushi N, Muramatsu H, Yoshida K, Hama A, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Sakaguchi H, Doisaki S, Takahashi Y, Shiraishi, Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Whole-Exome Sequencing Reveals a Paucity of Somatic Gene Mutations in Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.8 2014, San Francisco, USA).
 - 18) Narita A, Sekiya Y, Sakaguchi H, Nishio N, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida N, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, MD1*, Kamei M, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Predicting Response to Immunosuppressive Therapy By the Combination of Minor Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones and Lymphocyte Telomere Length in Children with Aplastic Anemia. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.8 2014, San Francisco, USA).
 - 19) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Doisaki S, Hama A, Wang X, Narita A, Kawashima N,

Xu Y, Sakaguchi H, Takahashi Y, Sanada M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Diagnostic Efficacy of Whole-Exome Sequencing in 250 Patients with Congenital Bone Marrow Failure. 56th ASH Annual Meeting (Dec.8 2014, San Francisco, USA).

- 20) Kawshima N, Okuno Y, Sekiya Y, Wang X, Xu Y, Narita, Doisaki S, Kamei M, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Generation of Cell Lines Harboring SETBP1 Mutations By the Crispr/Cas9 System. 56th ASH Annual Meeting (Dec.8 2014, San Francisco, USA).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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

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部 教授）

研究要旨：先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血）患者におけるバイオマーカーとして赤血球 ADA（eADA）活性と還元型グルタチオン（GSH）が有用であることが明らかになり、判別式を用いて診断することが可能となった。今年度は新たに 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。

A. 研究目的

DBA はリボゾーム機能不全によって発症する先天性赤芽球癆である。我々は H22 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ので報告する。

B. 研究方法

全国の医療機関において臨床的に DBA と診断された症例についてインフォームド・コンセントを取得の上、末梢血を得た。血漿、白血球、血小板を除去した洗浄赤血球より溶血液を作成し、eADA を測定した。eADA はアデノシンを基質として溶血液を加え 265 nm における吸光度減少により、活性を測定した。また GSH は溶血後の全血にメタリン酸を加えて得られた除蛋白抽出液に 5,5'-di-thiobis (2-nitrobenzoic acid) を加え、412 nm で定量した。

C. 研究結果

【症例 1】4 ヶ月、男児

身体的所見：特記することなし

輸血歴：あり（生後 3 ヶ月目より）その後の輸血頻度は不明であった。

赤血球数 88 万/ μ L、Hb 2.6g/dL、Ht 7.5%、MCV 85.2、Retics 0.5%、白血球数 9210/ μ L、血小板数 51.4 万/ μ L、末梢血の赤血球形態は大小不同、奇形を認めた。骨髄検査は著明な赤芽球系低形成を認めた（Myeloid 52.0%、Erythroid 1.8%、Lymphoid 41.8%、Blast 2.2%）。染色体核型は 46XY で異常は認められなかった。

eADA 活性：2.54 IU/gHb、GSH：106.8

判別式 $0.937 * eADA + 0.0702 * GSH - 7.9044 > 0$ の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【症例 2】3 歳 4 ヶ月、男児

身体的所見：特記することなし

輸血歴：あり（2 歳 8 ヶ月時より）その後 2 週間に 1 回輸血施行。

赤血球数 106 万/ μ L、Hb 2.5g/dL、Ht 8.2%、MCV 77.4、Retics 0.02%、白血球数 9600/ μ L、血小板数 18.9 万/ μ L、赤血球形態異常なし。

骨髄検査では M、染色体核型 46XY

eADA 活性：1.47 IU/gHb、GSH：94.8

判別式 $0.937 * eADA + 0.0702 * GSH - 7.9044 > 0$ の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【症例 3】5 ヶ月男児

身体的所見：特記することなし

輸血歴：あり（生後 2 ヶ月目より）その後 2 回輸血施行

赤血球数 233 万/ μ L、Hb 6.9 g/dL、Ht 20.6%、MCV 88.4、Retics 0.45%、白血球数 10960/ μ L、血小板数 59 万/ μ L、赤血球形態では球状赤血球を認めたが、赤血球浸透圧抵抗の低下は認めなかった。

骨髄検査正形成、Mgk140、（Myeloid 46.8%、Erythroid 4.8%、Ly 36.4%、Blast 9.2%）染色体核型 46XY

eADA 活性：2.74 IU/gHb、GSH：104

判別式 $0.937 * eADA + 0.0702 * GSH - 7.9044 > 0$ の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【診断基準】

A：診断基準	
1	1 歳未満
2	大球性貧血で他の血球系に減少を認めない
3	網赤血球数低下
4	骨髄所見は正形成だが赤芽球前駆細胞の減少を伴う

B：診断を支持する基準	
大基準 1	古典的 DBA に見られた遺伝子変異の同定
大基準 2	家族歴の存在
小基準 1	赤血球アデノシンデアミナーゼ活性 (eADA) 高値
小基準 2	古典的 DBA に見られる先天奇形の存在
小基準 3	HbF 上昇
小基準 4	他の先天性骨髄不全症候群が否定できる

【判定】

古典的 DBA	A の 4 個すべて
非古典的 DBA	① A3 個 + B 大基準 1 個 or B 小基準 2 個
	② A2 個 + B 大基準 2 個 or B 小基準 3 個
	③ B 大基準 2 個

	A：診断基準				B：診断を支持する基準					
	1	2	3	4	大基準 1	大基準 2	小基準 1	小基準 2	小基準 3	小基準 4
症例 1	○	×	○	×	△	×	○	×	△	○
症例 2	×	×	○	○	△	×	×	×	△	○
症例 3	○	×	○	○	△	×	○	×	△	○

△：不明・未検査

D. 考察

以上のように従来の診断基準では、症例 1 は A 2 個 + B 小基準 2 個で非古典的 DBA、症例 2 は A 2 個 + B 小基準 1 個で非 DBA、症例 3 は A 3 個 + B 小基準 2 個で非古典的 DBA と判定された。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。症例 2 のように eADA 活性単独では診断基準により DBA が否定されたケースにおいて、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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolueang 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.
- 2) 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;89(21):14796-811.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Sato-Otubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraiishi 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 mutation in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2015;168(6):854-864.
 - 6) 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.
 2. 学会発表
 - 1) 青木貴子, 市東正幸, 小倉浩美, 高橋秀弘, 岩井朝幸, 濱端隆行, 渡邊健一郎, 常松健一郎, 奥野友介, 村松秀城, 吉田健一, 宮野悟, 大賀正一, 小川誠司, 小島勢二, 菅野仁. 病因未確定の先天性溶血性貧血に対する全エクソーム解析. *日本人類遺伝学会第 59 回大会* (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 2) 尾上佳子, 石谷健, 内山智貴, 青木貴子, 市東正幸, 川上和之, 松井英雄, 林和彦, 斎藤加代子, 菅野仁. イリノテカンによる重症下痢症を予測する PGx バイオマーカーとしての CYP2F1 遺伝子多型. *日本人類遺伝学会第 59 回大会* (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 3) 神尾英則, 神尾孝子, 尾上佳子, 市東正幸, 青木貴子, 内山智貴, 亀岡信悟, 斎藤加代子, 菅野仁. テガフル・ウラシル投与による肝機能障害を予測する新規 PGx バイオマーカーの探索. *日本人類遺伝学会第 59 回大会* (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 4) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Ohara A, Ishiguro A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated red cell reduced glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. 56th ASH Annual Meeting & Exposition (2014 年 12 月 6 日, San Francisco, USA).
 - 5) 市東正幸, 青木貴子, 槍澤大樹, 小倉浩美, 大賀正一, 岩井朝幸, 末延聡一, 伊藤悦朗, 奥野友介, 小島勢二, 小川誠司, 菅野仁. 原因不明先天性溶血性貧血症例の全エクソーム解析による膜骨格蛋白遺伝子変異の同定. *第 76 回日本血液学会学術集会* (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
 - 6) 菅野仁, 青木貴子, 市東正幸, 槍澤大樹, 小倉浩美. わが国における G6PD 異常症の現状. *第 76 回日本血液学会学術集会* (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
 - 7) 菅野仁. 新生児・乳児期に発症する先天性溶血性貧血の病因と診断. *第 24 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会* (2014 年 6 月 13 日, 横浜).
 - 8) 槍澤大樹, 岡本好雄, 松田和樹, 久保田友晶,

守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 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, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁.
安全な CART の運用と適応拡大への新たな試み.
第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014 年 5 月 15 日, 奈良).

9) 岡本好雄, 松田和樹, 久保田友晶, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 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, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁.
クリオプレシピテート製剤の院内調製と心臓血管外科手術への応用. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014 年 5 月 15 日, 奈良).

10) 久保田友晶, 松田和樹, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 岡本好雄, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁.
非溶血性輸血副作用発生状況と副作用報告回収率改善への取り組み. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014 年 5 月 15 日, 奈良).

11) 松田和樹, 久保田友晶, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 岡本好雄, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁.
当院における静注用免疫グロブリン (IVIG) の使用状況について. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014 年 5 月 15 日, 奈良).

12) 槍澤大樹, 岡本好雄, 菅野仁. 安全な CART の運用と低温保存腹水を用いた適応拡大への新たな試み. 第 35 回日本アフェレシス学会学術集会ワークショップ (2014 年 9 月 27 日, 東京).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

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：東海大矢部博士らとの共同研究で、日本人ファンconi貧血（FA）患者の遺伝子解析を進めてきた。原因遺伝子を決定した FA 患者において、アルデヒド代謝酵素である ALDH2 の多型を調べ、ALDH2 バリエント型では骨髄不全の進行が強く促進されることを明らかにした。特に、ALDH2 酵素活性が完全欠損した ALDH2 バリエント AA 型（ホモ）FA 患者を合計 5 例見出し、全例出生直後から強い血液学的異常が観察された。これらの結果は、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。

A. 研究目的

ファンconi貧血（FA）は骨髄不全、奇形、白血病、固形腫瘍などを呈し、稀ながらその重篤な症状と診断治療法の確立の遅れから、特に小児の临床上重大な問題となっている。典型的な症例では外見上の特徴からも診断が可能な場合もあるが、非典型例、成人発症の軽症例、また遺伝子のリバージョンによるモザイク症例などでは、診断に至らず見逃されて化学療法時に重篤な副作用を発症するなどの可能性も指摘されている。

最近の研究の進展により、FAはDNA損傷への細胞応答欠損を基盤として発症する「ゲノム不安定性症候群」のひとつであることが明らかとなった。FA症例においては、現 17 種類におよぶ数多い原因遺伝子の異常により、DNA 損傷応答や修復において重要な機能をもつ FA 経路の機能が欠損し、DNA 障害の蓄積によって造血幹細胞不全、発がんなどの重篤な症状を引き起こすと考えられる。しかし、その病態の詳細はいまだ十分理解されたとは言えず、骨髄移植以外、本質的な治療法の開発には至っていない。

最近 FA 遺伝子とアルデヒド代謝酵素 *ALDH2* とのダブルノックアウトマウスにおいて、骨髄不全と白血病の病態が強く促進されることが報告された

(Langevin et al. Nature 2011; Garaycochea et al. Nature 2012)。これは、内因性アルデヒドによる DNA 損傷が FA 遺伝子欠損による DNA 修復機能の対象となることを強く示唆している。さらに、このダブルノックアウトマウスは、母マウスの *ALDH2* 遺伝子型に大きく成長と血液学的所見が影響されることも報告された (Langevin et al. Nature 2011; Oberbeck et al. Mol Cell 2014)。ALDH2 により分解される内因性アルデヒドが胎児から胎盤を通過し、母体で分解されることが大きな生物学的意義をもつことを示唆する所見である。

これらの報告に基づき、我々は日本人 FA 患者で *ALDH2* の遺伝子型を調べ、ALDH2 酵素活性が正常な GG 型に比べて、ヘテロバリエントの GA 型では軽度に、ホモバリエントの AA 型では強く骨髄不全進行が促進されること、AA 型では MDS の発症も強く促進されることを見出した (Blood 2013)。今年度はさらに、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。

B. 研究方法

東海大学矢部博士からの FA 患者のサンプルからゲノムを分離し、*ALDH2* 遺伝子型を九州大学医学

部の松尾恵太郎博士から恵与された Taqman PCR 法によって決定した。

(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号として承認を受けている。矢部博士からの検体は京大への送付時にすべて匿名化されている。

C. 研究結果

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、顔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型患者がみつきり、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。マウスとは全くことなり、2例の母親はAA型、2例はGA型という結果であった。

D. 考察

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(Mol Cell 2014)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、①食物中飲料中のアルデヒド量が減らせないか、②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、③ALDH2酵素活性の活性化剤の応用、などが考えられる。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)。

E. 結論

これらの結果は、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. Defective FANCI Binding by a Fanconi Anemia-Related FANCD2 Mutant. PLoS One. 2014;9(12):e114752.
- 2) Ishii K, Ishiai M, Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Niwa O, Takata M, and Shinohara T. The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b Pathway Regulates the Radiation Response of Mouse Spermatogonial Stem

- Cells. *Stem Cell Reports*. 2014;3(4):676-89.
- 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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.
2. 学会発表
- 1) 高田穰. ファンconi貧血症と DNA 修復メカニズム. 第 36 回日本光医学・光生物学会シンポジウム (招待講演) (2014 年 7 月 25 日, 大阪).
 - 2) 高田穰. 遺伝性 DNA 修復異常疾患: 家族性乳がんとファンconi貧血. 日本家族性腫瘍学会 第 17 回家族性腫瘍セミナー (2014 年 8 月 24 日, 東大阪).
 - 3) 平明日香. 日本人ファンconi貧血患者では変異型 ALDH2 が骨髄不全の早期発症に関連する. 第 2 回ブルストル血液学アカデミー (2014 年 9 月 20 日, 京都).
 - 4) 平明日香, 吉田健一, 佐藤浩一, 嶋本顕, 田原栄俊, 胡桃坂仁志, 小川誠司, 高田穰, 矢部普正, 矢部みはる. 日本人ファンconi貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25 - 27 日, 横浜).
 - 5) 高田穰, 勝木陽子, 佐藤浩一, 石合正道, 胡桃坂仁志. ファンconi貧血経路とそのキータンパク質 FANCD2 の機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
 - 6) 坂本裕貴, 大川沙織, 穀田哲也, 勅使河原愛, 飯島健太, 高田穰, 小松賢志, 田内広. 相同組換え修復の細胞周期依存性解析. 日本放射線影響学会第 57 回大会 (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島).
 - 7) 秋山 (張) 秋梅, 吉川幸宏, 松井亜子, 細木彩夏. 低線量 (率) 放射線による生物影響研究の新展開. 日本放射線影響学会第 57 回大会 (ワークショップ) (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島).
 - 8) Takata M, Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Tahara H, Kurumizaka H, Ogawa S, Yabe H, Yabe M. UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients. *The 9th 3R Symposium* (17-21, November, 2014, Gotemba).
 - 9) Takata M. Comprehensive analysis of Japanese Fanconi anemia (FA) patients has led to the identification of an E2 enzyme UBE2T as a novel FA gene. 日米修復会議 (2014 年 10 月 29 日, 鳴門).
 - 10) 高橋大介, 佐藤浩一, 平山恵美子, 高田穰, 胡桃坂仁志. DNA 鎖間架橋除去における FAN1ヌクレアーゼの役割. 第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15-18 日, 京都).
 - 11) 久野真央, 平明日香, 高田穰. ゲノム編集酵素によるファンconi貧血原因遺伝子 FANCA のノックアウト細胞作製の試み. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
 - 12) 平明日香, 吉田健一, 佐藤浩一, 嶋本顕, 田原栄俊, 胡桃坂仁志, 小川誠司, 高田穰, 矢部普正, 矢部みはる. 日本人ファンconi貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
 - 13) 高田穰, 勝木陽子, 佐藤浩一, 石合正道, 胡桃坂仁志. ファンconi貧血経路とそのキータンパク質 FANCD2 の機能解析. 第 37 回日本分子生

物学会年 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).

- 14) 佐藤浩一, 石合正道, 高田穰, 胡桃坂仁. Fanconi 貧血患者にみられる FANCD2 変異体の機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
- 15) 平山恵美子, 高橋大介, 佐藤浩一, 高田穰, 胡桃坂仁志. DNA 鎖間架橋修復で働く FAN1 スクレアーゼの生化学的機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし