

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

### 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

研究分担者 浜口 功（国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長）  
協力研究者 松岡佐保子（国立感染症研究所血液・安全性研究部 室長）  
協力研究者 倉光 球（国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員）

研究要旨：Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) の発症メカニズムは未だ不明なところが多く、根治の手掛かりがつかめていない。DBA の原因遺伝子の 1 つである *RPS19* を培養細胞株で発現抑制すると、オートファジーの活性化がみられ、赤血球分化異常への関与が示唆された。患者由来 iPS 細胞を用いて発症機序の解析を検討することで精度の高い結果を得られると考え、熊本大学の協力により 3 症例の DBA 由来 iPS 細胞を樹立した。DBA 由来 iPS 細胞の *in vitro* 分化誘導法を構築し、これまで培養細胞株等で得られた成果を確認するため研究環境を整えた。

#### A. 研究目的

これまで本研究班において DBA の原因遺伝子のリボソーム遺伝子の片アレルの大欠失等を同定して来たが、貧血発症のメカニズムの詳細は未だ不明のままであり、治療法開発が遅れている。我々は、これまでにリボソーム遺伝子の発現量の減少によって、細胞内のタンパク質代謝活性が大きく変化することを培養細胞株で見出している。

そこで、shRNA を用いて *in vitro* で作製した DBA の発症モデル系で、さらなる発症メカニズムを探索することとした。さらに、患者と遺伝的背景が完全に一致している患者由来多能性幹細胞 (iPS 細胞) を、熊本大学発生医学研究所 (江良拓実教授) の協力のもと樹立し、これまで得られた知見をもとに解析を行うこととした。

#### B. 研究方法

shRPS19 細胞を用いた DBA 発症メカニズム解析：shRNA で RPS19 を発現抑制した K562 細胞を作製し、オートファジーの活性および赤血球分化異常への影響を検討した。

DBA 患者由来 iPS 細胞の樹立：3 例の DBA 患者から末梢血を採血し、単核球を分離した。患者細胞

へセンダイウイルスベクターを用いた方法で山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞から赤血球分化誘導系を構築した。

(倫理面への配慮)

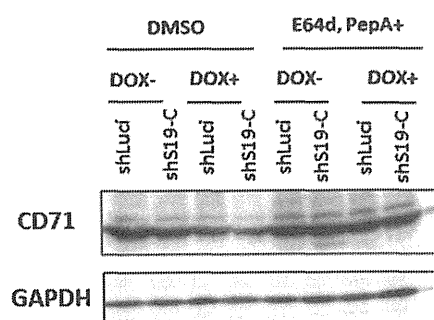
本研究は、熊本大学発生医学研究所 (倫理第 335 号)、および国立感染症研究所 (受付番号 404) におけるそれぞれのヒトを対象とする医学研究倫理審査の承認を得た上で実施した。検体採取においては、DBA 患者 (または患者の両親) へ研究内容について十分に説明し、研究協力への了承を得た場合のみ実施した。

#### C. 研究結果

K562 細胞へ shRNA で DBA の原因遺伝子の 1 つである *RPS19* をレンチウイルスで発現抑制すると、培養後 4 日目以降にオートファジーの活性化を伴いリソソームを介するタンパク質分解系が活性化することを見出した。CD71 (Transferrin receptor) は、細胞膜に発現し、特に赤芽球前駆細胞で高発現し、鉄の取り込みに重要な分子である。CD71 はファゴサイトーシスにより細胞内へ取り込まれるが、再利用され再び細胞膜へ移行する。RPS19 が発現抑制さ

れリソソーム分解が活性化した K562 細胞では CD71 の発現は減少していた。驚いたことに E64d と PepstatinA でリソソームの分解を阻害すると CD71 の発現が回復した (図 1)。しかしながら、細胞表面の CD71 の発現量には変化が無かった。これらのことからリソソームの分解の活性化と赤芽球分化異常が密接に関わっている可能性が示唆された。

図1



そこで、DBA 患者から樹立した iPS 細胞を用いてリソソーム分解活性と赤芽球分化抑制について同時に観察できる評価系を構築することとした。3 例の DBA 患者の末梢血単核球から iPS 細胞を作製した。DBA 患者由来 iPS 細胞は、健康者由来 iPS 細胞と比して、継代時の力学的ストレスによる細胞ダメージを受けやすくアポトーシスに陥る傾向が認められたが、定常状態における未分化性維持や増殖は遜色なく、目的とするアッセイ系に使用可能であることが確認できた。そこで、DBA 患者由来 iPS 細胞から embryoid body 形成法を用いた赤血球への分化誘導系を構築した。現在オートファジーのマーカである LC3 (GFP 融合 : LC3-GFP) をレンチウイルスで iPS 細胞を導入し、薬剤セレクションすることでオートファジーが観察できる DBA 患者由来 iPS 細胞を作製している。LC3-GFP 導入 DBA 由来 iPS 細胞を *in vitro* で赤芽球へ分化誘導することでリソソームの活性化と CD71 のターンオーバーの変化等を観察し、発症メカニズムの解明を目差している。

#### D. 考察

DBA の原因遺伝子の抑制によって培養細胞でリソソームによる分解が活性化し、また赤芽球分化の最も重要な分子の一つである CD71 の発現が減少す

る。CD71 の発現減少はリソソーム分解の阻害によって回復することから、CD71 はリソソームでの分解により減少していることになる。リソソームタンパク質の発現減少が結果的に CD71 のターンオーバー経路を変化させていることが明らかになり非常に興味深い。また DBA では、CD34+造血前駆細胞の段階で CD71 陽性細胞数が顕著に減少していることが知られていることから、DBA の赤芽球分化異常が細胞膜表面の CD71 の発現量コントロールの異常に起因する可能性がある。これらのことから DBA では、細胞内の代謝のドラマチックな変化が起き、このとき細胞飢餓マーカーであるオートファジーが関与しているため、例えばミトコンドリアでの細胞内のエネルギー生産を高く維持させる等、細胞が飢餓状態へ移行することを回避させることが治療法樹立への鍵となる可能性がある。このことは DBA の治療薬の可能性が指摘されている L-ロイシンもエネルギー代謝に深く関与することからも強く示唆される。

#### E. 結論

DBA の発症メカニズムに新たにオートファジーの関与が強く示唆された。これまで培養細胞等で明らかになっている DBA の発症メカニズム仮説について、DBA 患者由来 iPS 細胞を樹立し、患者に最も近い環境で検証することができるようになった。今後、iPS 細胞を用いて DBA 発症の本態を同定する。DBA 由来 iPS 細胞は効果的な DBA の治療薬の開発にも同時に使用できるため、意義深いと考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Wang R, Yoshida K, Toki T, et al. 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.
- 2) 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:p81(591)-p89(599).

##### 2. 学会発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

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

研究分担者 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）

**研究要旨：**先天性造血障害患児の診療における網羅的遺伝子解析の有用性を検討した。先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan 貧血：DBA）を疑った母子 3 組 6 名に赤血球酵素活性と全エクソーム解析を行い、母 3 名と児 2 名に ribosome 蛋白（RP）遺伝子変異から確定診断を得た。貧血外症候は母 1 名（*RPL11* 変異）のみであった。もう 1 家系の母子は先天性赤血球形成異常性貧血（congenital dyserythropoietic anemia: CDA）を疑って解析中である。先天性造血および免疫不全の早期産児に HLA 一致臍帯血移植を行い、split chimera を確立した。児は肝不全と牛眼を合併し、既知の重症複合免疫不全に合致せず網羅的遺伝子解析を予定している。重症度が異なる鎌状貧血父子の hemoglobin 遺伝子解析を行い、 $\alpha$  globin 遺伝子変異による効果を検討中である。先天性造血障害は稀少疾患が多く表現型も多彩であるため次世代シーケンシング（NGS）解析の臨床応用が期待される。

A. 研究目的

先天性造血障害には血球の産生不全（骨髄不全症）と崩壊亢進（溶血性貧血）に分類されるが、新生児期はその診断が困難である。また、先天性赤血球形成異常性貧血（congenital dyserythropoietic anemia: CDA）のように無効造血による稀少で多彩な疾患を含む。赤芽球癆（Diamond-Blackfan 貧血：DBA）などの先天性造血障害の診療における全エクソーム解析による網羅的遺伝子解析を行い、臨床的有用性を検討した。

B. 研究方法

赤芽球癆の非血縁 3 家系母子（山口大湯尻先生、佐賀大西、永井先生）を対象に、①赤血球酵素活性測定スクリーニング（赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）[IU/gHb]/赤血球還元型グルタチオン濃度（GSH）[mg/dlRBC]）、②Sanger 法などによる Ribosome 蛋白（RP）遺伝子解析（伊藤・浜口

研究室）を行い、③Illumina 社 HiSeq2000 シーケンサーを用いて、全エクソーム解析（小島・小川/吉田研究室）を実施した。同様に CDA を疑う 1 家系母子、既知の重症複合免疫不全に合致しない先天性造血・免疫不全の早期産児の家系に網羅的遺伝子解析を行う。重症度の異なる鎌状貧血家系の hemoglobin 遺伝子解析を行う。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析は、各共同研究施設の倫理委員会の承認を受け、対象患者とその家族に同意書を取得して行い、必要に応じて遺伝カウンセリングを行った。

C. 研究結果

1) DBA 疑い家系

DBA 母子 3 家系（図 1）に全エクソーム解析を行い、1 家系母と 2 家系母子に RP 遺伝子変異を同定した。

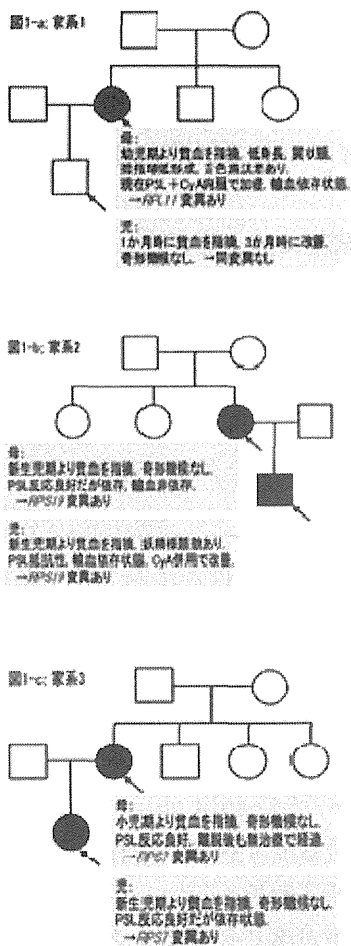


図1 DBA 母子3家系の家系図

輸血依存状態や臨床症状が異なり、貧血外症状に乏しい母子の診断に全エクソーム解析が有用であった。

## 2) CDA 疑い家系

乳児期に CDA を疑われたが、小児期以降、定期受診のない 28 歳女性。第 3 子妊娠時に軽度の貧血と脾腫を指摘され、確定診断のため当科紹介。Hb は正常値だが、大球性で脾腫と軽度の黄疸を認める。実子は現時点で貧血はないが、CDA を疑い確定診断を行う。

## 3) 先天性免疫不全・造血不全例

胎児水腫、汎血球減少を合併した先天性造血不全および重症複合型免疫不全症の女兒。先天性緑内障 (Peters 奇形) を認め、原因不明の腹水貯留、直接ビリルビン上昇、肝不全を発症。極低出生体重児であったため前処置なく HLA 一致非血縁臍帯血移植を行い day30 に生着した。児のリンパ球は donor type、好中球は recipient type で split chimera とな

った。経過中、腸管 GVHD を発症し肝不全が増悪して感染症を契機に DIC に至り死亡した。(図 1) 既知の疾患に合致するものはなく、両親には次子の希望があり、全エクソーム解析を用いた網羅的遺伝子解析を行う。

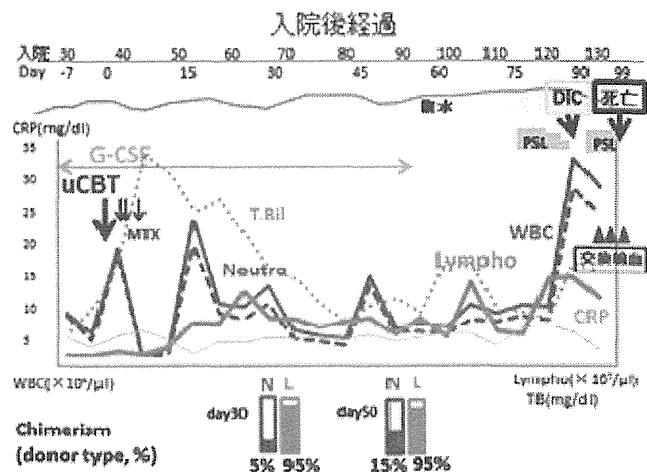


図2 先天性免疫造血不全例の臍帯血移植経過

## 4) 鎌状貧血家系

アフリカ人父と日本人母の生後 5 か月男児。新生児期から黄疸と貧血を認め父が HbS (ヘテロ型) であることから、患児も  $\beta$  globin 遺伝子解析にて HbS (ヘテロ型) と診断がついた。父親に貧血はないが、患児は新生児期からやや強い溶血を認め表現型の違いを解析中である。児の  $\alpha 1$ -と  $\alpha 2$ -globin 遺伝子に異常はないが、現在両親の Hb 遺伝子を解析中である。

## D. 考察

DBA など先天性造血不全症の臨床像には幅があり、原因遺伝子群の解析領域も広いため、Sanger 法による遺伝子診断には限界がある。今回、貧血外の奇形徴候に乏しく輸血依存で酵素活性スクリーニングの難しい家系の母子に NGS による全エクソーム解析を行い、確定診断を得た。RP 遺伝子数が多いため、DBA 診断における NGS の有用性は高い。

CDA も臨床像に幅があり、Biomarker もなく既存の病型に合致しない例も多かった。複数の責任遺伝子が発見され、NGS による診断精度向上が期待される。

新生児期から発症する骨髓不全、遺伝性貧血の診断は難しい。確定診断には網羅的遺伝子解析が必要

であるが、未知の疾患があるため両親を含めた家系解析と遺伝カウンセリングが必要である。

## E. 結論

先天性造血不全症候群の責任遺伝子の機能は不明な点が多い。網羅的な遺伝子解析による責任遺伝子の同定と詳細な分子経路の機能解析結果から新規治療法の開発が期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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):747-52.
2. 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. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of the response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 2014;99(8):1312-6.
3. 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;99:1784-91.
4. Wang R, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Sawada T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S,

Kuramitsu M, Hamaguchi I, 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. *Brit J Haematol*. 2015;168(6):854-864.

5. Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T. Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant. *Pediatr Transplant*. 2014;18(6):E208-11.
6. Maeba S, Hasegawa S, Shimomura M, Ichimura T, Takahashi K, Motoyama M, Fukunaga S, Ito Y, Ichiyama T, Ohga S. Successful treatment of corticosteroid with antiviral therapy for a neonatal liver failure with disseminated herpes simplex virus infection. *Am J Perinatol*. 2015. (in press)

### 2. 学会発表

- 1) Ochiai M, Matsushita Y, Kusuda T, Ichiyama M, Kitajima J, Inoue H, Tanaka K, Ihara K, Ohga S, Hara T. Blood chemistry and hematology reference intervals in preterm or low birth weight infants at birth. *PAS and ASPR Joint Meeting 2014* (May 3-6, 2014, Vancouver, Canada).
- 2) 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. *The 56th Annual Meeting & Exposition, American Society of Hematology 2014* (December 6-9, 2014, Sanfrancisco, CA, USA).
- 3) 大賀正一. 小児の造血および免疫不全症～EBウイルスが関与する免疫異常～. 第16回京阪こどもカンファレンス (特別講演) (2014年10月11日, 大阪).
- 4) 大賀正一. リンパ増殖性疾患～ウイルスの関与する遺伝性素因～. 第76回日本血液学会学術集

- 会（教育講演）（2014年10月31日，大阪）。
- 5) 石村匡崇，土居岳彦，高田英俊，瀧本智仁，山元裕之，吉田健一，小川誠司，小島勢二，大賀正一，原寿郎。Whole exome sequenceにより本邦初の *RTEL1* 変異を同定した Hoyeraal-Hreidarsson 症候群。第10回九州小児免疫フォーラム（2014年3月1日，福岡）。
- 6) 石村匡崇，土居岳彦，高田英俊，瀧本智仁，山元裕之，吉田健一，小川誠司，小島勢二，大賀正一，原寿郎。Whole exome sequenceにより本邦初の *RTEL1* 変異を同定した Hoyeraal-Hreidarsson 症候群。第117回日本小児科学会学術集会（2014年4月11-13日，名古屋）。
- 7) 赤峰哲，加藤稚子，瀧本智仁，石村匡崇，保科隆之，高田英俊，大賀正一，林田真，田口智章，原寿郎。発症時に肝不全を呈した家族性血球貪食性リンパ組織球症（FHL）の2例。第117回日本小児科学会学術集会（2014年4月11-13日，名古屋）。
- 8) 大賀正一，菅野仁，伊藤悦朗，小島勢二。DBAにおける貧血と身体徴候の浸透率に関して。平成26年度厚生労働科学研究委託事業厚生労働科学研究費補助金「稀少小児遺伝性血液疾患に対する新規責任遺伝子の探索と遺伝子診断システムの構築に関する研究」小島班「小児およびAYA世代の増殖性血液疾患の診断精度向上と診療ガイドラインの改訂のための研究」林班「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」伊藤班 3班合同班会議（2014年8月1日，東京）。
- 9) 市村卓也，湯尻俊昭，下村麻衣子，永井功造，西眞範，吉田健一，小川誠司，奥野友介，村松秀城，小島勢二，菅野仁，伊藤悦朗，大賀正一。Diamond-Blackfan 貧血（DBA）母子の診断における全エクソーム解析の有用性。第76回日本血液学会学術集会（2014年10月31日，大阪）。
- 10) 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，奥野裕介，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）。
- 11) Yagasaki H, Yabe H, Ohara A, Kosaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Long-term outcome of 100 children with moderate aplastic anemia. 第76回日本血液学会学術集会（2014年10月31日，大阪）。
- 12) Sekiya Y, Okuno Y, Muramatsu H, Olfat I, Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Hama A, Fujisaki H, Toshihiko I, Hasegawa D, Kosaka Y, Sunami S, Ohtsuka Y, Ohga S, Takahashi Y, Kojima S, Shimada A. JAK2, MPL, and CALR mutations in children with essential thrombocythemia. 第76回日本血液学会学術集会（2014年10月31日，大阪）。
- 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

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

研究分担者 小原 明（東邦大学医学部小児科 教授）

**研究要旨：**先天性造血不全性貧血、遺伝性貧血は稀であり、診断法の確立や病態解明研究には疫学データベースの構築が必要である。これまで小児血液・がん学会疾患登録事業を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築し、遺伝性貧血の症例把握に努めた結果、2006～2013年に診断されて登録された730例の造血障害症例から、新規診断Diamond-Blackfan貧血症例は62例、特発性赤芽球癆は40例であった。また、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。この調査により、診断や治療開発に必要な臨床情報収集（二次調査と追跡調査による詳細情報収集）の基盤が整った。

## A. 研究目的

### 【背景】

遺伝性貧血は稀少疾患であり、診断法や治療開発には疫学データベースの必要性が高い。小児血液・がん学会疾患登録事業調査結果を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築し、DBAをはじめとする小児期造血障害疾患の症例把握に努めた。

### 【目的】

本邦の小児期造血障害疾患症例を悉皆性高く収集して疫学データベース構築する。小児血液学会（現小児血液・がん学会）疾患登録事業を一次調査とした疫学観察研究を基盤とした小児期造血障害疾患の詳細なデータベース構築を目指す。

## B. 研究方法

本研究班の研究では疫学観察研究として実施し、治療介入は行わない。小児血液・がん学会会員240施設を対象にした全例登録（疾患登録事業）は、前年診断症例を対象にWeb登録にて実施される。構築されるデータベースには小児期発症の造血障害全般を網羅し、遺伝性貧血症例に限定はしない。

上記疾患登録事業で収集されている情報は限られており、診断や治療開発に必要な疾患遺伝子診断情

報を含む詳細な情報の収集（二次調査・追跡調査）の体系を構築する。

（倫理面への配慮）

研究計画は、小児血液学会臨床研究審査委員会の倫理審査承認を得た。疾患遺伝子診断情報を含む二次調査は本年度実施していない。倫理審査を承認後に実施する。

## C. 研究結果

2006～2013年診断登録症例数を表に示す（表）。

- 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。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、特発性赤芽球癆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。

#### D. 考察

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。

#### E. 結論

学会疾患登録事業一次調査情報データベースにより、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。

#### F. 研究発表

- 論文発表
- 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;99:664-671.

- 学会発表  
研究期間に本研究に関連する学会発表はない。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得  
なし
- 実用新案登録  
なし
- その他  
なし

表

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	216 / 239	219 / 242	212 / 230
( % )	83%	88%	90%	90%	90.3%	90.4%	90.5%	92%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	62	49	49
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5	11	1
AA / PNH	2	1	1	0	1	0	0	0
Fanconi anemia	5	4	6	1	4	2	6	4
Diamond-Blackfan anemia	9	6	9	10	6	9	6	7
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6	4
Schwachman-Diamond syndrome	0	1	1	2	0	0	2	1
Cong. Dyserythropoietic anemia	No data	No data	1	0	0	1	0	0
Sideroblastic anemia	No data	No data	2	1	1	0	1	0
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4	4
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	5	3
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0	0
Cong. Spherocytosis	No data	•	•	•	54	49	26	32
Cong. Elliptocytosis	No data	•	•	•	2	1	1	2
G6PD deficiency	No data	•	•	•	5	5	3	1
PK deficiency	No data	•	•	•	0	0	0	0
Other erythrocyte enzyme def.	No data	•	•	•	2	0	0	0
Sickel cell disease	No data	•	•	•	1	1	0	0
Unstable hemoglobinopathy	No data	•	•	•	1	0	0	0
Thalasemia	No data	•	•	•	18	16	11	8
Other hemoglobinopathy	No data	•	•	•	0	0	0	1

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

## DBAの遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 照井君典（弘前大学医学部附属病院小児科 講師）

**研究要旨：** Diamond Blackfan 貧血（DBA）は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として 12 種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子と *GATA1* 遺伝子が同定されているが、我が国の DBA 患者の約半数は原因遺伝子が不明である。本年度は、サンガーシークエンスや次世代シークエンサーを用いたターゲットシークエンスを行っても原因遺伝子が不明な 16 家系 28 名（非罹患家族も含む）について全エクソン解析を行った。その結果、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）はいずれも罹患患者であり、非罹患患者である父には変異は検出されなかった。以上の結果から、*RPS15A* が DBA の新規原因遺伝子であることが強く示唆された。RP 遺伝子以外の新規原因候補遺伝子も同定し、解析を進めている。

### A. 研究目的

Diamond Blackfan 貧血（DBA）は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として 12 種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子と *GATA1* 遺伝子が同定されているが、我が国の DBA 患者の約半数は原因遺伝子が不明である。本研究の目的は、既知の原因遺伝子を解析して DBA の遺伝子診断を行うとともに、未知の原因遺伝子を同定して、より正確な遺伝子診断法を確立することである。

### B. 研究方法

最初に、DBA で遺伝子変異が報告されている 12 種類の RP 遺伝子（*RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL26*, *RPL35a*）と *GATA1* 遺伝子について、次世代シークエンサー（MiSeq）を用いてターゲットシークエンスを行った。次に、定量的 PCR 法と SNP アレイ法により RP 遺伝子の欠失を解析した。

この検索によっても原因遺伝子を同定できなかった臨床検体について、次世代シークエンサーを用いた全エクソーム解析を行った。ヒト全エクソン領域

を、ベイトと呼ばれる RNA ライブラリーを用いて溶液中でキャプチャーし、イルミナ社の高速シークエンサー HiSeq2000 で網羅的な解析を行った。得られた遺伝子異常は、サンガーシークエンスや次世代シークエンサーを用いたターゲットシークエンスにより確認した。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基多型が多数見つかることと予想されるため、家族内の罹患患者や非罹患患者も解析し、結果を比較することにより原因遺伝子の候補を絞り込み、新規遺伝子変異の同定を試みた。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、患者および家族に十分な説明を行い文書による同意を得たのち、検体を連結可能匿名化して解析を行った。

### C. 研究結果

これまでに DBA153 例の臨床検体を用いて遺伝子解析を行い、81 例に既知の原因遺伝子の変異あるいは大欠失を見出した。

本年度は、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスや大欠失の解析を行っても原因遺伝子が不明な16家系28名（非罹患者も含む）について全エクソン解析を行った。その結果、これまでに報告のない新規原因候補遺伝子 *RPS15A* (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。なお、発端者は2歳3カ月で貧血を発症し、成長障害、両白蓋形成不全および総肺静脈還流異常を合併し、ステロイドには反応がみられなかった。

また、RP 遺伝子以外の新規原因候補遺伝子も同定した。

#### D. 考察

我が国の DBA は、まだ約半数が原因遺伝子不明である。今回の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、新規原因候補遺伝子として *RPS15A* (c.G213A) を同定した。この変異は罹患者である姉妹と母親に検出され、非罹患者である父親には検出されなかった。この変異はスプライス変異を引き起こすことが mRNA を用いた解析から確認された。以上の結果から、*RPS15A* が DBA の新規原因遺伝子であることが強く示唆された。今後、ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析により、この遺伝子変異が貧血の原因になることを確認する予定である。

また、RP 遺伝子以外の新規原因候補遺伝子も同定し、現在解析を進めているところである。

#### E. 結論

DBA の新規原因候補遺伝子 *RPS15A* を同定した。今後、ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析により、この遺伝子変異が貧血の原因になることを確認する予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi

T, Okuno Y, Sato-Otsubo 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 mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2015;168(6):854-864.

2) 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 Sep 30. [Epub ahead of print]

3) Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T, Kanezaki 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;53:902-10.

4) 王汝南, 金崎里香, 土岐力, 照井君典, 佐々木伸也, 工藤耕, 神尾卓哉, 佐藤知彦, 池田史圭, 荒木亮, 落合英俊, 伊藤悦朗. 非ダウン症小児急性巨核芽球性白血病にみとめられた新規 GATA1 インフレーション変異. *弘前医学* 2014;65:227-237.

5) 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症に合併した骨髄性腫瘍の分子病態. *血液内科* 2014;69:200-206.

##### 2. 学会発表

1) Ikeda F, Toki T, Kanezaki R, Wang RN, Terui K, Sasaki S, Kudo, K, Sato T, Ito E. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-

Blackfan anemia in Japan. 第76回日本血液学会学術集会 (2014年10月31日~11月2日, 大阪).

- 2) 照井君典, 金崎里香, 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症候群に伴う TAM 発症の分子機構. 第24回日本産婦人科・新生児血液学会ワークショップ4 新生児の白血球異常症 (2014年6月13-14日, 横浜).
- 3) Tomizawa D, Watanabe T, Hanada H, Horibe K, Horikoshi Y, Iwamoto S, Kinoshita A, Moritake H, Nakayama H, Shimada A, Taga T, Takahashi H, Tawa A, Terui K, Hori H, Kawano Y, Kikuta A, Manabe A and Adachi S. Outcome of Adolescent and Young Adults with Acute Myeloid Leukemia Treated with Pediatric Protocols: A Report from the 3 Japanese Cooperative Studies. 第56回アメリカ血液学会 (2014年12月6-9日, サンフランシスコ).
- 4) Takahashi H, Watanabe T, Kinoshita A, Yuza Y, Moritake H, Terui K, Iwamoto S, Nakayama H, Shimada A, Kudo K, Taki T, Yabe M, Matsushita H, Yamashita Y, Koike K, Ogawa A, Kosaka Y, Tomizawa D, Taga T, Saito A, Horibe K, Nakahata T, Miyachi H, Tawa A and Adachi S. High Event-Free Survival Rate with Minimum-Dose-Anthracycline Treatment in Childhood Acute Promyelocytic Leukemia: A Nationwide Prospective Study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 第56回アメリカ血液学会 (2014年12月6-9日, サンフランシスコ).
- 5) Taga T, Watanabe T, Kudo K, Tomizawa D, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito A, Horibe K, Nakahata T, Tawa A and Adachi S. Risk-Oriented Therapy for Myeloid Leukemia of Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study By the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). Blood

2014;124:S3668. 第56回アメリカ血液学会 (2014年12月6-9日, サンフランシスコ).

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

### 遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝子型と表現型の関連解析

研究分担者 古山和道（岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授）

**研究要旨:**先天性疾患の多くでは親から子へと受け継がれる遺伝子変異が発症原因である。次世代シーケンサの性能の向上は遺伝子変異の同定を容易にしたが、変異を有する遺伝子が疾患の原因遺伝子である事を明らかにするためには更なる検討が必要である。本研究では近年利用可能になったゲノム遺伝子改変システムを利用し、培養細胞を用いて遺伝子変異が表現型に与える影響を明らかにすることを試みた。

#### A. 研究目的

次世代シーケンサの開発と検出手技の改良により、特定の遺伝子の解析、あるいは網羅的な遺伝子解析が比較的容易となりつつあり、様々な遺伝子変異が患者において同定されるようになってきた。一方で、数多く同定される遺伝子変異のうち、大きなアミノ酸の欠失により明らかにタンパク質の機能が障害されると予想される変異を除くと、多くの遺伝子変異と表現型（疾患）の直接的な関連を確定するのは困難である事が多い。特に、遺伝子発現調節領域であるプロモーター領域やエンハンサー/サプレッサー領域の変異の評価は難しく、野生型と比較してプロモーター活性やエンハンサー活性が低下することを明らかにできても、それが病的な低下と言えるかどうかについては議論の余地がある。

最近、分担研究者の古山は *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、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かどうかについては確証が得られていない。

そこで、本研究では遺伝子変異と表現型の関連を比較的簡便かつ直接的に明らかにする方法を樹立する事を目的に、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。

#### B. 研究方法

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 Life Technologies 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 RealTime 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。

### C. 研究結果

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所、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 細胞と比較した所、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。

### D. 考察

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、家族歴など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様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。

### E. 結論

CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて赤芽球系培養細胞である K562 細胞の *ALAS2* 遺伝子の第 1 イントロンに存在するエンハンサー領域に変異を導入し、これにより内在性 *ALAS2* mRNA の発現が低下し、ヘモグロビン陽性率が低下することを明らかにすることができた。この方法は、特定の遺伝子のコード領域で同定される変異のみならず、今後全ゲノム DNA の解析に伴い増加すると考えられる遺伝子の非コード領域の変異の疾患との関連を評価するためにも有用であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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):729-734.
- 2) 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.

### 2. 学会発表

- 1) 古山和道, 山下莉奈, 野村和美, 加藤恭丈, 久  
保田美子. 非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵  
素 (ALAS1) の新たなヘム依存的分解機構. 第  
87回日本生化学会大会(2014年10月15-18日,  
京都).
- 2) 山下莉奈, 久保田美子, 野村和美, 古山和道.  
非特異的5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS1)  
のミトコンドリア内半減期調節におけるヘム結  
合モチーフの役割. 第 650 回岩手医学会例会  
(2014年7月25日, 盛岡).
- 3) 古山和道, 久保田美子. CRISPR/CAS9 システ  
ムを用いた 5-アミノレブリン酸合成酵素  
(ALAS2) 遺伝子の赤芽球特異的エンハンサー  
の機能解析. 第 650 回岩手医学会例会 (2014年  
7月25日, 盛岡).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし



遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

CDA のデータ管理、診断基準の確立

研究分担者 多賀 崇（滋賀医科大学小児科 講師）

**研究要旨：** 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疾患群である。従来 CDA に関する知見は主に西欧から得られているのみで、本邦での実態は明らかにされていなかった。本研究班において、我が国における CDA の実態を把握し、そのデータ管理、診断基準の確立、さらには有効な治療法の開発の基盤となる研究を行う。

A. 研究目的

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) は、先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不応性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う稀な疾患群である。我が国ではこれまで CDA の実態が十分把握されておらず、我が国における CDA の実態を明らかにし、診断基準の確立、さらには有効な治療法の開発の基盤となる研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

分担研究者（多賀）が以前行った CDA の全国調査を参考に作成した調査表をまとめるとともに、中央遺伝子診断への協力、検体送付などを依頼する。

小児血液専門医のみならず、新生児科医、一般小児科医、血液内科医などにも学会発表や論文による啓蒙を行い、さらなる症例の蓄積に努める。

（倫理面への配慮）

調査の基本となる日本小児血液学会の疾患登録事業として、学会倫理審査委員会で承認されている。

また、調査に関する倫理審査は、共同研究者である真部淳の所属する聖路加国際病院、遺伝子診断に関する倫理審査は、検査実施施設である名古屋大学でそれぞれ承認されている。

C. 研究結果

分担研究者（多賀）が以前行った CDA の全国調査を参考に該当症例に対し、中央遺伝子診断への協力、検体送付などを依頼した。また、成人領域を含む本疾患が疑われる患者相談があった際に、診断支援をするとともに中央診断ならびに遺伝子診断への協力を呼びかけた。遺伝子検査で次世代シーケンサーによる解析がなされた症例で、CDA 以外の症例の可能性が判明した場合は、該当疾患遺伝子の解析も進めた。

当科で follow 中であった CDA 疑いの男性は既知の CDA 関連遺伝子の異常は見られなかったが、次世代シーケンスの結果、先天性溶血性貧血と診断された。

D. 考察

本班研究のサポートをもとに、本邦での CDA の症例収集、精査を行ってきたが、既知の遺伝子異常を持つ症例は極めて少なく、自験例のように他の血液疾患と誤診されている症例も少なくない。引き続き詳細な調査・研究が必要であると同時に本邦の CDA は極めて少ないあるいは既知の病型と異なる可能性もあり、診断方法などを含めて再検討が必要である

E. 結論

我が国の CDA の実態の正確な把握と、よりよい治療法を開発するため、今度も調査、研究が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

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

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）

**研究要旨：**重症先天性好中球減少症（severe congenital neutropenia, SCN）は、慢性好中球減少、骨髓像での前骨髄球・骨髄球での成熟障害、生後早期からの重症細菌感染症の反復を特徴とする食細胞の数的異常による先天性骨髓不全症の一つである。現在までに10種類以上の責任遺伝子が同定されているが、欧米、本邦ともに好中球エラストラーゼ遺伝子（ELANE）の変異を約75%に認めている。根治療法としては造血幹細胞移植が唯一の治療法であるが、その成績、適切な移植時期についての一定の結論はない。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髓移植を施行した4症例について検討を行った。

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。免疫抑制効果を最大限とした本前処置はSCNを含めた食細胞異常症に有効であり、今後は初回移植症例も含めた症例集積と晩期障害を最小限にする造血幹細胞移植を進める必要がある。SCNの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。

#### A. 研究目的

先天性好中球減少症（severe congenital neutropenia, SCN）は慢性好中球減少、骨髓像での前骨髄球・骨髄球での成熟障害、生後早期よりの重症細菌感染症の反復を特徴とする難治性遺伝性疾患である。2011年の原発性免疫不全症の最新分類では、食細胞異常症の中に好中球減少症としてSCN1からSCN5まで、責任遺伝子によって分類されている。G-CSF製剤の投与により感染症に対しての生命予後は劇的に改善されたが、長期のG-CSF投与により骨髓異形成症候群（MDS）や急性骨髄性白血病（AML）への進展が報告されている。近年では根治療法として造血幹細胞移植が行われる症例の頻度が増加している。しかし、造血幹細胞移植における前

処置法、適切な移植時期等についての見解は一定していない。Oshimaらの本邦症例の集積では骨髓破壊的、非破壊的前処置にかかわらず、5例が拒絶されており、安全な治療に至っていない現状である。従って、SCNについて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が必要と思われる。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髓移植を施行した4症例について検討を行った。

#### B. 症例

再移植を施行した4症例の概要を表1に示す。4症例ともELANE変異例で、末梢血液検査、骨髓像

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。

表 1. 再移植症例の概要

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Age	10 m.	2 y	3 y 9 m	1 y 3 m
Sex	male	female	female	male
Etiology	<i>ELANE</i> G185R	<i>ELANE</i> V72M	<i>ELANE</i> 4501-4503 del	<i>ELANE</i> G185R
Pre-transplant status	Otitis media Pneumonia Sinusitis	Perianal abscess Stomatitis	Cellulitis Stomatitis	Cellulitis Sinusitis
G-CSF (µg/kg/d)	8	5	-	5
Duration of G-CSF	9 months	1 year	-	8 months

表 2 に初回移植の概要を示す。拒絶に至った原因は後方視的検討にはなるが、臍帯血移植の 2 例は移植細胞数の不足が考えられた。症例 4 は HLA が血清型では 1 座不一致であったが、アレルでは 6/8 の一致度であった。輸注細胞数も十分ではなかった。症例 2 については、造血幹細胞源の条件、輸注細胞数ともに許容範囲内と判断出来るが、早期拒絶であったことは前処置の免疫抑制が不十分と考えられた。症例 1 のみ骨髄破壊的前処置が行われていた。症例 2 と 3 で DLI が追加されているが無効であった。症例 3 は同胞の臍帯血を出生時に保存し、HLA 一致を確認後に移植を行ったので、DLI が可能であった。

表 2. 初回移植の概要

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Donor	MMUD (HLA 5/6, A)	MURD (HLA 6/6)	MRD (HLA 8/8)	MMUD (HLA 6/8 C, DR)
Source	CB	BM	CB	BM
NCC (x10 <sup>8</sup> /kg)	0.00699	1.9	0.49	1.5
CD34 (x10 <sup>6</sup> /kg)	NA	1.9	0.07	1.1
Conditioning regimen	BU 16 CY 120 Flu 120	Flu 125 CY 140 LPAM 90 TBI 3 ATG 2.5	Flu 120 CY 100 TBI 3 ATG 40	Flu 125 LPAM 140 TBI 2 ATG 5
Results	Rejection (day 72)	Rejection (day 55) DLI 4 times	Rejection (day 14) DLI 3 times	Late rejection (1 year)

(倫理面への配慮)

本研究での遺伝子解析は、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. 研究結果と考察

表 3 に再移植症例のドナー、造血細胞源（すべて骨髄細胞）、前処置ならびに輸注細胞数を示す。血縁 1 例、非血縁 3 例であった。HLA は非血縁で 2 例が A と DR の 1 座不一致であった。移植細胞数はいずれも十分であった。

表 3. 再移植の概要

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Age	7y	3y	9y	5y
Donor	MMUD (HLA 7/8, A)	MURD (HLA 6/6)	MRD (HLA 8/8)	MMUD (HLA 7/8, DR)
Source	BM	BM	BM	BM
NCC (x10 <sup>8</sup> /kg)	3.4	3.14	10.9	8.47
CD34 (x10 <sup>6</sup> /kg)	4.2		11.1	2.32
Conditioning regimen	Flu 125 CY 140 LPAM 90 TBI 3 ATG 10	Flu 125 CY 140 LPAM 90 TBI 3 ATG 10	Flu 100 CY 160 LPAM 90 TBI 3 ATG 12	Flu 100 CY 160 LPAM 90 TBI 3 ATG 12