

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（非罹患者同胞や両親）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の守秘を厳守し、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 *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, 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 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, 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 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-tasnsplant 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