

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、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ス（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、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]）、Sanger 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、Illumina 社 HiSeq2000 シークエンサーを用いて、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。

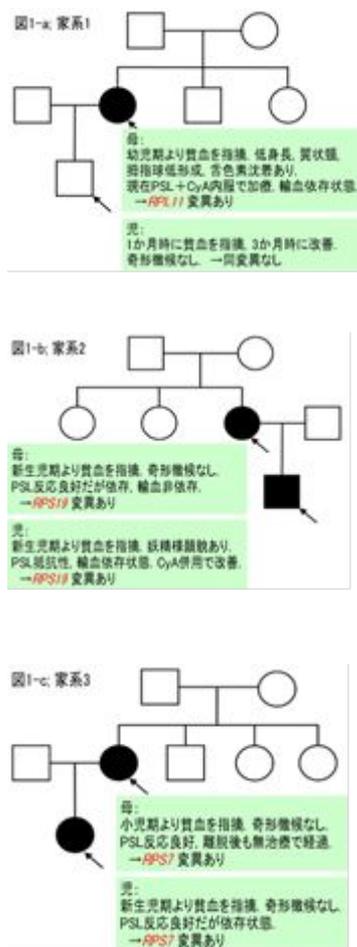


図1 DBA 母子3家系の家系図

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。

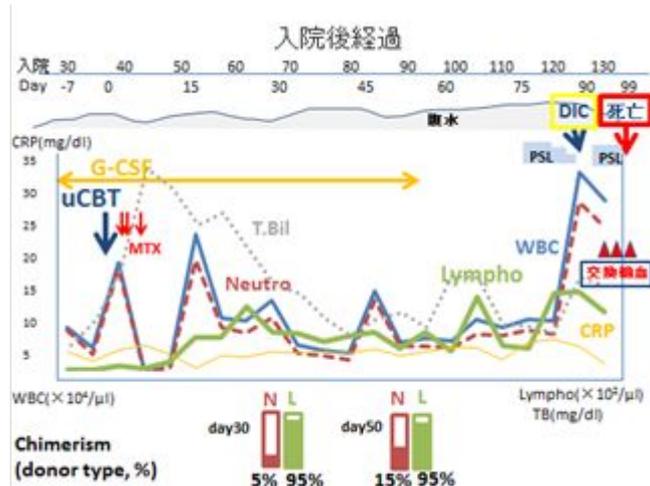


図2 先天性免疫造血不全例の臍帯血移植経過

## 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 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 1-と 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髄不全、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, Kanazaki 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, 檜澤大樹, 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