

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、サンガーシーケンサーや次世代シーケンサーを用いた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 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、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いてターゲットシーケンスを行った。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、次世代シーケ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ケンサー HiSeq2000 で網羅的な解析を行った。得られた遺伝子異常は、サンガーシーケンサーや次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケ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りと予想されるため、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* (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。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。この変異は罹患患者である姉妹と母親に検出され、非罹患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, 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.

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 インフレイム変異. **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

