

201442016A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患実用化研究事業

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

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 小島 勢二

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の難治性疾患実用化研究事業による委託業務として、国立大学法人名古屋大学が実施した平成26年度「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」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患実用化研究事業

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

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 小島 勢二

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）		
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	1
名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学		小島 勢二
II. 委託業務成果報告（業務項目）		
ファンconi貧血の遺伝子解析	7
京都大学放射線生物研究センター DNA 損傷シグナル研究分野		高田 穰
Diamond-Blackfan 貧血の網羅的遺伝子解析に関する研究	11
弘前大学大学院医学研究科 小児科学		伊藤 悦郎
先天性溶血性貧血・DBA の遺伝子解析	14
東京女子医科大学大学院 輸血・細胞プロセッシング科		菅野 仁
先天性角化不全症の臨床データ、遺伝子解析	18
日本医科大学 血液内科		山口 博樹
X連鎖リンパ増殖症候群の臨床データならびに遺伝子解析	23
富山大学附属病院 小児科		金兼 弘和
遺伝性鉄芽球性貧血の新規変異遺伝子の同定	26
東北大学大学院医学系研究科 血液・免疫病学分野		張替 秀郎
先天性血小板減少症の遺伝子解析	29
名古屋医療センター臨床研究センター 高度診断研究部		國島 伸治
III. 学会等発表実績	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	41

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）

委託業務成果報告書（総括）

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

業務主任者 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

本研究班では平成 23 年度から 3 年間継続した稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明および診断・治療法の開発に関する研究班（小島班）を発展させ、1) 小児血液・がん学会における小児血液疾患中央診断事業へのターゲットシーケンスの導入、2) 新規原因遺伝子の発見を目的とした。今年度は、遺伝子診断が確定済みの保存検体を用いてターゲットシーケンスの精度を検討した。180 の小児遺伝性血液疾患の原因遺伝子を含むターゲットシーケンスによって 99 検体について遺伝子診断を試みたところ、43 検体において Pubmed で報告のある既知の遺伝子変異が検出された。この結果をもって、中央診断にターゲットシーケンスを組み込み、全国の施設からの遺伝子診断の受け付けを開始した。また各疾患の研究班で、エクソーム解析で同定された候補遺伝子の機能解析が進められ、Diamond-Blackfan 貧血では RPS15A が、Fanconi 貧血では UBE2T が、先天性巨大血小板減少症では GF11 b が新規原因遺伝子であることを発見した。また、わが国で蓄積された各疾患の検体について遺伝子診断をおこなうことにより、Fanconi 貧血、先天性角化不全症、Diamond-Blackfan 貧血などの代表的な遺伝性骨髄不全症の分子疫学情報を得ることができた。しかし、研究班には、エクソーム解析をもってしても、原因遺伝子が同定されていない遺伝性血液疾患の検体を多数保有しており、今後は全ゲノム解析を含む網羅的遺伝子解析をおこなうことで新規原因遺伝子の発見が期待される。

業務項目担当責任者

矢部 普正	東海大学医学部 准教授
高田 穰	京都大学放射線生物研究センター 教授
伊藤 悦朗	弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授
菅野 仁	東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング科 教授
山口 博樹	日本医科大学血液内科 准教授
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
真部 淳	聖路加国際病院小児科 医長
渡邊 健一郎	京都大学大学院医学研究科発達小児科学 講師 (静岡県立こども病院血液腫瘍科 科長)
金兼 弘和	富山大学附属病院小児科 講師 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 准教授)
張替 秀郎	東北大学大学院医学系研究科血液・免疫病学分野 教授
石井 榮一	愛媛大学大学院医学系研究科小児科学 教授
高木 正稔	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 講師
林 泰秀	群馬県立小児医療センター 顧問
國島 伸二	名古屋医療センター臨床研究センター高度診断研究部 室長
大賀 正一	山口大学大学院医学系研究科 教授
小原 明	東邦大学医学部小児科 教授
森本 哲	自治医科大学とちぎ子ども医療センター 教授
嶋田 明	岡山大学病院小児科 講師
小川 誠司	京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 教授
宮野 悟	東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター 教授

A. 研究目的

日本小児血液・がん学会による稀少小児血液疾患を対象にした中央診断事業でこれまで4年間にレビューした症例数は1,100例に達し、わが国で発症するほぼ全例を網羅していると考えられる。小児血液疾患の正確な診断には遺伝子診断を必要とするが、従来の遺伝子診断では半数以上の症例で原因遺伝子が不明であった。そこで、中央診断にターゲットシーケンスを利用した遺伝子診断システムの導入を計画する。また、本研究班においては、1) 先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診療ガイドラインの作成に関する研究班（伊藤班）、2) 小児およびAYA世代の増殖性血液疾患の診断基準、重症度分類と診療ガイドラインの作成班（林班）と協力し、既知の責任遺伝子が同定されない症例を対象に全エクソーム解析を担当することで、新規原因遺伝子の発見をめざす。

B. 研究方法

本研究班は 1) 先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診療ガイドラインの作成に関する研究班（伊藤班）、2) 小児およびAYA世代の増殖性血液疾患の診断基準、重症度分類と診療ガイドラインの作成班（林班）において既知の責任遺伝子が同定されない症例を対象に全エクソーム解析を担当する。伊藤班に所属する先天性赤芽球癆(DBA、伊藤、大賀)、Fanconi 貧血(FA、矢部、高田)、遺伝性鉄芽球性貧血 (SA、張替)、Congenital dyserythropoietic anemia(CDA、小島、真部)、Shwachman Diamond syndrome (SDS、渡邊)、先天性角化不全症(DKC、山口、小島)、先天性好中球減少症(SCN、小林)、先天性血小板減少症(CTP、國島)の8班、林班に所属する一過性骨髄異常増殖症 (TAM、林)、血球貪食症候群 (HLH、石井)、ランゲルハンス細胞組織球症 (LCH、森本)、自己免疫性リンパ球増殖症候群(ALPS、高木)および類縁疾患(RALD、高木)、X連鎖リンパ増殖症(XLP、金兼)と小児骨髄増殖症(MPD、嶋田)の6班、さらに先天性溶血貧血(菅野)を加えて計15班から構成される。なお、研究代表者の小島と真部は日

本小児血液・がん学会の中央診断、小原は疾患登録事業を担当する。次世代シーケンサーによるターゲットシーケンス、全エクソーム解析は京都大学医学系研究科腫瘍生物学(小川)と東大医科研ヒトゲノム解析センター(宮野)が担当する。ターゲットシーケンスは、標的として選定した180の遺伝子をコードする領域を完全にカバーできるように、十分な深度でシーケンスを行う。変異遺伝子候補を抽出し、ミスセンス変異においてはヒト疾患の原因となる変異を網羅したデータベース (Human Genome Mutation Database; HGMD) と照合して、その変異が既報であるかを確認する。ターゲットシーケンスによる遺伝子診断の結果は、その診断の妥当性を各疾患の担当施設で検討した後に依頼施設に報告される。原因遺伝子が不明な検体については、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を行う。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する。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り深度 x200 を目標として全エクソン配列の解析を行う。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 データベースと1000personal 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、候補となるSNV原因遺伝子を絞り込む。絞られた候補遺伝子について各疾患担当施設がサンガー法でバリデーションをおこない、細胞レベルや動物実験で機能解析をおこない、原因遺伝子であるかどうかを確定する。

(倫理面への配慮)

日本小児血液学会としておこなう疾患登録事業は、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おこない、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に関する倫理指針にしたがい、患者および家族に事前に十分な説明をおこない、文書による同意を得た後で研究を遂行する。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。既知の責任遺伝子および網羅的遺伝子研究についても、東京大学、名古屋大学をはじめ研究班に所属する各施設において倫理委員会での承認が得られている。また、マウスモデルによる遺伝子組み換え実験をおこなう場合は、当該施設の倫理委員会の承認を得た後に、カルタヘナ議定書および関連する政省令、告示に準拠しておこなう。

不明な 16 家系について全エクソーム解析をおこなった。その結果、これまでに報告のない新規原因候補遺伝子 RPS15A を発見した。Fanconi 貧血については、現在までに 17 種類の原因遺伝子が発見されているが、今回、エクソーム解析で、2 例において新規原因遺伝子と考えられる UBE2T 遺伝子の変異を発見し、FA-T と命名した。UBE2T は FA 経路において重要な FANCD2 モノユビキチン化に機能する E2 酵素であるが、従来 UBE2T 変異による Fanconi 貧血の発症は報告がなかったが、今回の発見により、UBE2T 変異により Fanconi 経路の機能が低下し、Fanconi 貧血の発症に至ることが示された。先天性巨大血小板減少症について、本研究班では新規原因遺伝子として ACTN1 変異をしめす 6 家系を報告した (Am J Hum Genet 2013)。今回、優性遺伝形式を示す先天性巨大血小板減少症の親子例において、新規原因候補遺伝子として GPI1b のスプライス変異を同定した。野生型および変異型 GPI1b を HEK293T 細胞へ導入し、ルシフェラーゼアッセイをおこない、変異型 GPI1b の転写抑制機能が低下することを確認した。

図1 次世代シーケンサーによる稀少小児遺伝性血液疾患の病態解明と遺伝子診断ネットワークの形成

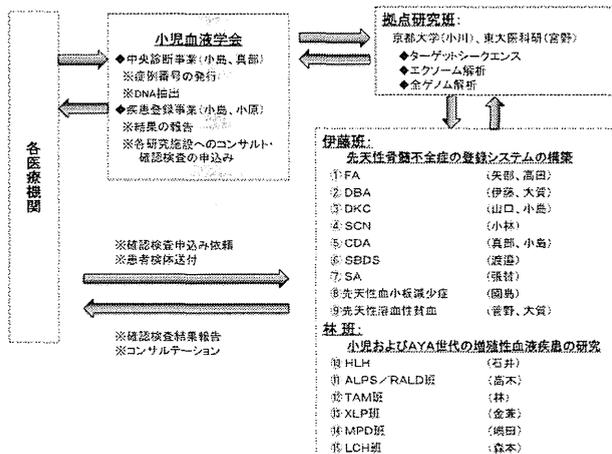


表1. 遺伝性血液疾患に対するターゲットシーケンスの結果

Clinical Dx	n	with Genetic Dx	Rate of Genetic Dx	Identified gene mutations (n)
Total cohort	99		43%	
Anemia	13	3	23%	ALAS2 (1), SLC25A38 (1), KLF1 (1)
DBA	14	4	29%	RPL5 (2), RPS19 (2)
DC	12	6	50%	TINF2 (2), DKC1 (2), TERT (1), SBDS (1)
FA	18	15	83%	FANCA (11), FANCF (1), FANCG (3)
HLH	3	1	33%	XIAP (1)
Immunodeficiency	4	2	50%	ATM (1), WAS (1)
MPD / MDS	6	2	33%	PTPN11 (1), NF1 + SETBP1 (1)
Neutropenia	5	2	40%	VWF (1), HBB (1)
Other BMFs	2	0	0%	
SDS	6	4	67%	SBDS (4)
SCN	7	2	29%	ELANE (1), HAX1 (1)
Thrombocytopenia	9	2	22%	RUNX1 (2)

C. 研究結果

(1) 新規原因遺伝子の探索

Diamond-Blackfan 貧血については、原因遺伝子として 10 種類以上のリボソーム蛋白が同定されている。本研究班ではこれまでに、153 例の臨床検体を収集し、81 例で既知の原因遺伝子の変異や欠失を発見した。さらに、RPS27 と RPL27 の変異が本症の原因遺伝子であることを発見し、すでに報告済みである (Br J Haematol 2014)。本年度は、サンガー法による検討では原因遺伝子が

(2) ターゲットシーケンスによる遺伝子診断効率の検討

180 種類の遺伝性血液疾患原因遺伝子をカバーするターゲットシーケンスを用いて、遺伝性血液疾患が疑われた 99 検体について、その診断効率を検討した。その結果 43 検体について既知の原因遺伝子の同定が可能であった。とりわけ、原因遺

伝子の種類が多くて、これまで我が国では十分な遺伝子診断がおこなわれていなかった **Fanconi** 貧血において 15/18 (83%) と効率に遺伝子診断が可能であった。この結果から、ターゲットシーケンスを中央診断に組み込み、依頼施設からの検体の受け付けも開始した。依頼施設への結果の報告にあたっては、検体の取り違えを避けるために、サンガー法で結果を確認した後に結果を報告している。

D. 考察

本研究班の昨年度までの研究で、従来のサンガー法では遺伝子診断ができなかった遺伝性血液疾患の 250 サンプルを対象にエクソーム解析をおこない、68 例 (27.2%) に遺伝子診断が可能であった。今回はエクソーム解析よりも検査価格が安価なターゲットシーケンスによる診断効率を検討した。本研究班で設計した遺伝性血液疾患を対象にしたターゲットシーケンスは、遺伝性骨髄不全症候群の原因遺伝子を網羅するほかに、一部の溶血性貧血や先天性免疫不全症の原因遺伝子の同定が可能である。その結果、43/99 (43%) で既知の遺伝子変異の同定が可能であった。とりわけ、対象となる遺伝子の種類が多く、従来、わが国では十分な遺伝子診断がおこなわれていなかった **Fanconi** 貧血においても 15/18 (83%) と高率に変異遺伝子の検出が可能であった。ターゲットシーケンスが遺伝性血液疾患の診断に有用であることが確認されたので、ターゲットシーケンスによる遺伝子診断を中央診断の一貫として開始した。網羅的遺伝子診断を含む小児遺伝性血液疾患の中央診断は国際的にもおこなわれておらず、この分野においては世界のトップランナーである。本年度は、3 つの疾患で新規責任遺伝子を発見したが、ほかにも候補遺伝子が同定され、機能解析や動物モデルの作成を試みている疾患が複数みられる。しかし、網羅的なエクソーム解析をもってしても、原因遺伝子が確定されていない症例も多く、今後は全ゲノム解析を含む新たな研究が必要であろう。

E. 結論

本年度の目標として掲げた遺伝性血液疾患に対するターゲットシーケンスの臨床的有用性を確認するほか、3 疾患において新規責任遺伝子の同定が可能であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Sep;166(5):758-766.
- 2) 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 May 15;340(1-2):86-90.
- 3) 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 Jun;165(5):682-687.
- 4) 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. doi: 10.1002/pbc.25271. [Epub ahead of print]
- 5) 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 Feb;99(2):169-174.
 - 6) 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 Apr;99(4):664-671.
 - 7) 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.
 - 8) 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 Aug;99(8):1312-1316.
 - 9) 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.
 - 10) 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*. 2014. [Epub ahead of print]
 - 11) 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 May;93(5):747-752.
 - 12) 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 Sep 5.

2. 学会発表

海外

- 1) Kojima S. Role of rATG in treatment of AA. Educational Meeting : Role of Immunosuppressive therapy in treatment of Aplastic Anemia. Parkroyal on Pickering, Singapore. Apr. 26, 2014. Singapore.
- 2) Kojima S. Recent progress in diagnosis and treatment of aplastic anemia in children. Expert Meeting at Wuhan Union Hospital Jul.15, 2014. Wuhan, China.
- 3) Kojima S. Recent progress in diagnosis and treatment of aplastic anemia in children. Expert Meeting at Wharton International Hotel. Jul.16, 2014. Wharton, China.
- 4) Kojima S. Recent progress in diagnosis and treatment of aplastic anemia in children. Hematology Expert Meeting Jul.18, 2014. Guangzhou, China.
- 5) Kojima S. Recent progress in diagnosis and treatment of aplastic anemia in children. South China Hematology Summit Jul.19, 2014. Guangzhou, China.
- 6) Kojima S. Aplastic Anemia : Therapeutic updated in HSCT. 2013 International Forum on Bone Marrow Failure. Aug.16, 2014. Tianjin, China.

国内

- 1) 小島 勢二. 小児における血液疾患の診断. 第15回日本検査血液学会学術集会. 2014年7月20日. 仙台.
- 2) 小島 勢二. 小児がん診療、集約化への道筋. 第52回日本癌治療学会学術集会. 2014年8月28日. 横浜.
- 3) 小島 勢二. 小児再生不良性貧血の治療. 第76回日本血液学会学術集会. 2014年11月2日. 大阪.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

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

業務課題：FA の遺伝子解析

担当責任者 高田 穰（京都大学 放射線生物研究センター 教授）

研究要旨：稀少小児遺伝性血液疾患であるファンconi貧血（FA）の原因遺伝子は、現在論文となって報告されているだけで17種類にのぼる。日本人FA患者のゲノムをエクソーム解析等の手段で解析し、新たにUBE2T遺伝子変異によると考えられる症例を2例同定した。UBE2Tは、FA経路において重要なFANCD2モノユビキチン化に機能するE2酵素であるが、従来UBE2T変異による発症は報告されておらず、今回の発見により、HUGO Gene Nomenclature Committeeによって新規FA相補群FA-Tと命名された。UBE2T/FANCTは、日本発、アジア発として初めてのFA遺伝子である。

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、まれながら、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。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いえず、骨髄移植以外、本質的な治療法の開発には至っていない。FAの病態の理解をより深めるため、新規FA遺伝子の同定は重要な課題である。

小島班において、エクソーム解析、MLPA等の手段により、日本人のFA症例の遺伝子解析を行い、日本においてどのような遺伝子変異がFA発症を引き起こしているか、検討を重ねてきた。この中で、既知の遺伝子変異が見つからない分類不

能の患者が同定されている。そのうち二例はエクソーム解析でUBE2T遺伝子の変異が発見され、これによる発症が疑われた。検討の結果、UBE2T変異によるFA発症であることが確定したので報告する。

B. 研究方法

東海大学矢部博士からのFA患者PNGS-252、PNGS-255のサンプルからゲノムを分離し、エクソーム解析（京大医学部小川研において吉田健一博士が中心となって解析）、MLPA（東海大矢部博士が検討）、カスタムアレイCGH（Agilent社において作成し、タカラ社において実施）等をおこなった。また、AP65P繊維芽細胞株（JCRBから供与）からのゲノムもエクソーム解析した。AP65P細胞にヒトTERT遺伝子を導入して安定な細胞株を作成した（広島大薬学部田原研究室嶋本博士と共同研究）。さらに、野生型と変異型のUBE2T遺伝子をレンチウイルスでAP65P細胞に導入し、細胞の表現型を解析した（京大放射線研平明日香大学院生担当）。変異型UBE2Tのリコンビナント蛋白質を精製し、インビトロの実験系でその性質を調べた（早稲田大胡桃坂研究室佐藤浩一博士と共同研究）。

(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号として承認をうけている。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

リンパ球の染色体断裂試験、臨床所見から、これらの症例は典型的FAと考えられた。

PNGC-252はエクソーム解析でUBE2T遺伝子のホモ変異c.C4>Gをみとめ、これは蛋白レベルではp.Gln2Glu(Q2E)のミスセンス変異であった。開始コドンの次のグルタミン残基は進化上保存されており、SIFT、PolyPhen2ではdamagingと判定された。この残基はUBE2TのN末端に存在する α ヘリックスのさらにN末端に存在し、E2リガーゼであるFANCLとの会合表面近傍にある。この症例は、エクソームリード数、アレイCGHの検討により、実はQ2E変異はヘテロサイガスで、もう一つのアレルに23kbにおよぶ巨大ゲノム欠失がみとめられた。

PNGS-255症例は、252とは親戚ではないが、共通のQ2E変異をヘテロで検出した。さらに、エクソームで、スプライドナーサイト変異であるc.180+5G>Aを見だし、患者細胞のRT-PCRでフレームシフトを伴うエクソン2のスキッピングを見いだした。これら二つの異常は、別の染色体上にあることがゲノムPCRで確認された。

かつて京大放生研にて佐々木正夫博士が収集されたFA患者由来の細胞株が多数JCRB細胞バンクに保管されている。このうちAP65P細胞のエクソーム解析で、Q2E変異が見いだされ多数のSNPが一致したのでこの細胞の由来がPNGS-252と同一であることが判明した。

そこで、AP65P細胞をTERT遺伝子導入によって安定化し、さらにレンチウイルスによって、UBE2T遺伝子を導入した。ウェスタンブロッティングにより検討すると、この細胞ではUBE2Tタンパク質は正常レベルとそれほど変化なく、モ

ノユビキチン化UBE2Tレベルも同様であった。UBE2T遺伝子導入によって、低下していたFANCD2モノユビキチン化は正常化し、さらにFANCD2フォーカスも形成されるようになった。また、この細胞におけるMMC刺激後の染色体断裂は、亢進していたが、UBE2T遺伝子を導入すると、正常レベルまで低下することがわかった。これらの結果は、UBE2T遺伝子のQ2E変異がFANCD2モノユビキチン化機能を低下させていることを示しており、この変異がFA発症の原因であることが確認された。

Q2E変異により、UBE2T機能がどのように変化するのか調べるため、UBE2Tの組換えタンパク質を精製し、インビトロのアッセイ系で検討した。Q2E変異によりFANCLとの会合が強く低下していることが判明した。さらに、FANCD2のユビキチン化アッセイでは、野生型に比較して活性がおよそ3分の1に低下していた。面白いことに、FANCLのユビキチン化、UBE2Tの自己ユビキチン化、FANCL非依存的なFANCIユビキチン化はいずれも低下しておらず、Q2E変異はUBE2T機能のFANCLとの会合を特異的に低下させ、その結果としてFANCD2モノユビキチン化を低下させていることがわかった。

D. 考察

ユビキチンE2酵素はヒトゲノムに38程度あるが、一方、E3酵素は600-1000におよぼほど多数存在しているとされている。したがって、通常E2は単一のE3とのみ会合して機能するとは考えにくい。従来E2酵素の変異によるヒト疾患発症はあまり知られておらず、これは、E2欠損によって、広範なユビキチン化反応が低下することにより致死表現型になる場合が多いことを示唆している。UBE2Tの変異が従来の欧米を中心としたFA患者検索でみつかっていないため、UBE2T変異は致死になる可能性も考えられていた。我々の二例の検討によって、UBE2T変異によりFA経路の機能が特異的に低下し、FA発症にいたることが確認された。しかし、今回のいずれの症例

もが持っていた Q2E 変異は、UBE2T の機能をすべて低下させてはならず、もし UBE2T 機能をノックアウトした場合、ヒト表現型がどのようになるのかはまだ不明である。マウス、ゼブラフィッシュなどのモデル生物における検討が望まれる。

E. 結論

UBE2T 変異によって発症した二例の FA 患者を同定した。これらの症例は新規 FA 相補群 FA-T を構成し、UBE2T は新規 FA 遺伝子 FANCT の別名を与えられた。これは日本、アジアからの初めての FA 遺伝子同定である。欧米での検索はすでにかなり徹底的に行われている。日本を含め、欧米以外のヒト集団で FA 患者の遺伝子診断を行うことで、新規 FA 遺伝子発見に結びつく可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Defective FANCI Binding by a Fanconi Anemia-Related FANCD2 Mutant. Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. PLoS One. 2014 Dec 9;9(12):e114752.
- 2) The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b Pathway Regulates the Radiation Response of Mouse Spermatogonial Stem Cells. Kei Ishii, Masamichi Ishiai, Hiroko Morimoto, Mito Kanatsu-Shinohara, Ohtsura Niwa, Minoru Takata, and Takashi Shinohara. Stem Cell Reports. 2014 Oct 14;3(4):676-89.
- 3) Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using Escherichia coli cells. Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H. Protein Expr Purif. 2014 Aug 26;103C:8-15.
- 4) Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. Huang Y, Leung JW, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X,

Huong D, Takata M, Chen J, Li L. Cell Rep. 2014 Jun 26;7(6):1849-57.

- 5) FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugasawa K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. Cell Rep. 2014 May 22;7(4):1039-47.
- 6) Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, Takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, Enomoto T. Biochim Biophys Acta. 2014 May;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 大阪大学銀杏会館 2014 年 7 月 25 日 (招待講演)
- 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 近畿大学・東大阪キャンパス 2014 年 8 月 24 日
- 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 京都市
- 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 横浜市
- 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

2013年11月25-27日 横浜市

- 6) Minoru Takata, Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Hiromasa Yabe, and Miharu Yabe 「UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients」 The 9th 3R Symposium 17-21, November, 2014 Gotemba Kogen Hotel
- 7) Minoru Takata. 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 エクシブ鳴門 10月29日
- 8) 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 10月15-18日京都市
- 9) 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 2013年11月25-27日 横浜市
- 10) 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 2013年11月25-27日 横浜市
- 11) 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 2013年11月25-27日 横浜市
- 12) 佐藤 浩一, 石合 正道, 高田 穰, 胡桃坂 仁志 「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 2013年11月25-27日 横浜市
- 13) 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 ヌ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 2013年11月25-27日 横浜市

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

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

業務課題：Diamond-Blackfan 貧血の網羅的遺伝子解析に関する研究

担当責任者 伊藤 悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）

研究要旨： Diamond-Blackfan anemia (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。しかし、我が国の DBA 患者の約 60%は、原因遺伝子が不明である。本年度は、サンガーシーケンスや次世代シーケンサー (MiSeq) 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 家系の解析を行った。非罹患家族も含めた 28 例に対して、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遺伝子候補も同定し、解析を進めている。

A. 研究目的

Diamond-Blackfan anemia (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。治療は副腎皮質ステロイドが第一選択であるが、ステロイド依存や輸血依存症例が全体の約40%存在する。難治例には造血幹細胞移植 (HSCT) が行われている。原因遺伝子として10種類以上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。しかし、我が国のDBA患者では、まだ約45%は原因遺伝子が不明である。本研究の目的は、次世代シーケンサーにより、新規のDBA原因遺伝子の探索をすることである。

B. 研究方法

原因遺伝子が不明な臨床検体についてエクソーム解析を行う。ヒト全エクソン領域を target とするベイトと呼ばれる RNA ライブラリーと溶液中でハイブリダイズによりキャプチャし、イルミナ社の高速シーケンサー HiSeq2000 で網羅的な解析を行う。得られた遺伝子異常は、サンガーシーケンスや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い確認す

る。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基多型 (non-synonymous SNP) が多数見つかりと予想される。このため、発端者に加え、家族内罹患患者と陰性コントロール (非罹患同胞や両親) も解析して、シーケンス解析で得られる non-synonymous SNP と家系内罹患患者との相関を検討することで原因遺伝子の候補を絞り込み、新規原因遺伝子を同定する。

(倫理面への配慮)

本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、弘前大学、京都大学、東京女子医大、国立感染症研究所、および東京大学の倫理審査会の承認の得た上で患者の同意を得た場合に限り検体を研究に使用する。中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得、患者及び患者保護者の同意を取得した後に行う。

C. 研究結果

これまでに DBA 153 例の臨床検体および臨床情報を収集し、81 例で既知の原因遺伝子の変異あるいは大欠失を見出した。さらに、新規原因遺伝

子 *RPS27* (フレームシフト変異) と *RPL27* (スプライス変異) を各 1 例に見出した (Wang et al, Br J Haematol. 2014)。

本年度は、サンガーシーケンスや次世代シーケンサー (MiSeq) 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 家系の解析を行った。非罹患者家族も含めた 28 例に対して、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 ヶ月で貧血を発症で、成長障害、両臼蓋形成不全および総肺静脈還流異常 (TAPVC: IIa) を合併し、ステロイドには反応がみられなかった。

D. 考察

我が国の DBA は、まだ約 46% 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、原因候補遺伝子として、RP 遺伝子 (*RPS15A*) 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。*RPS15A* (c.G213A) 変異は、スプライシング異常を引き起こすことが mRNA を用いた解析から確認された。以上から、*RPS15A* が新規原因遺伝子である可能性が極めて高いと考えられる。今後、ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析により、この遺伝子の変異が貧血の原因になることを確認する予定である。

RP 遺伝子以外の新規原因遺伝子候補も同定し、解析を進めている。

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、この遺伝子の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 Y, 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 Anemia. Br J Haematol. 2014. [Epub ahead of print] (* corresponding author)
- 2) Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H, Kurokawa M. Recurrent *CDC25C* mutations drive malignant transformation in FPD/AML. Nat Commun. 2014;5:4770.
- 3) 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. [Epub ahead of print]
- 4) 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 JI, 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):902-10.
- 5) Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. *Leukemia* 2014;28(12):2344-54.
- 6) 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.
- 7) Horino S, Sasahara Y, Sato M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Sato A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S. Selective expansion of donor-derived regulatory T cells after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. *Pediatr Transplant.* 2014 Feb;18(1):E25-30.
2. 学会発表
- 1) 伊藤悦朗. Diamond-Blackfan 貧血の病態と診断 (ワークショップ). 第 24 回日本産婦人科新生児血液学会 (2014 年 6 月 13~14 日, 横浜).
- 2) 伊藤悦朗. ダウン症候群の造血異常 (教育講演). 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).
- 3) 土岐力, 伊藤悦朗. Insight into molecular mechanisms of pathology in Diamond-Blackfan Anemia (シンポジウム : Recent advance in genetic abnormalities of hereditary hematologic disorders). 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).
- 4) Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Wang RN, Terui T, 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).
- G. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

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

業務課題：先天性溶血性貧血・DBA の遺伝子解析

担当責任者 菅野 仁（東京女子医科大学 輸血・細胞プロセッシング科 教授）

研究要旨： 病因未確定の溶血性貧血症例を対象として次世代型シーケンサーを用いたエクソーム解析により病因候補遺伝子同定を試みた。非免疫性溶血性貧血のうち、小型球状赤血球が認められるが浸透圧抵抗試験や赤血球EMA結合能のいずれかが正常な非典型HS症例を含む診断未確定の非球状赤血球性溶血性貧血症例の計42症例を対象にした。全エクソーム解析後、既報のSNPsのデータベース等を用い候補遺伝子変異を同定したところ、7症例で赤血球膜骨格蛋白遺伝子（*ANK1* 3例、*SPTA1* 2例、*SPTB* 2例、*SLC4A1* 1例）変異を同定した。今回の結果から、赤血球膜異常症のスクリーニング検査に異常所見を認めない症例について、赤血球膜骨格蛋白遺伝子の網羅的な遺伝子解析による診断方法の確立が必要と考えられた。

A. 研究目的

我々は一般臨床検査にて診断を確定することが困難な溶血性貧血症例を対象としたスクリーニング検査を実施している（図1）。2004-2011年における総括では、検査の対象とした291例の最終診断は、G6PD異常症24.7%、赤血球膜異常症21.8%、ヘモグロビン異常症6.5%、ピルビン酸キナーゼ（PK）異常症4.1%、その他が6.0%であり、全体の67%に確定診断を得ることが出来た。今回病因未確定の42症例を対象に、次世代型シーケンサー（NGS）を用いたエクソーム解析により病因候補遺伝子同定を試みた。

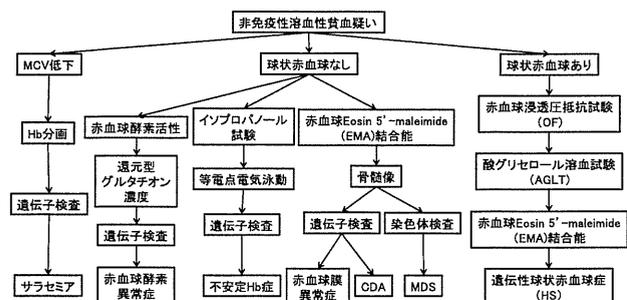


図1 先天性溶血性貧血の診断チャート

B. 研究方法

非免疫性先天性溶血性貧血のうち、

- ①球状・破碎・奇形などの特徴的な赤血球形態異常が認められなかった 29例
- ②小型球状赤血球が認められたが、赤血球浸透圧抵抗試験（OF）、赤血球 eosin 5'-maleimide（EMA）結合能検査共に未施行または結果が正常の4例
- ③破碎、奇形赤血球が目立つ9例を対象にした。

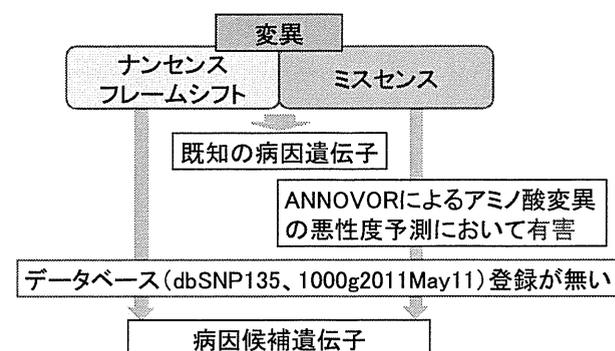


図2 病因候補遺伝子探索ストラテジー

サンプルはイルミナ社 HiSeq2000 で全エクソーム解析後、*in silico*で ANNOVAR、既報のSNPsデータベース等を用い候補遺伝子変異を同定した（図2）。