

(倫理面への配慮)

東京女子医科大学の遺伝子解析研究に関する倫理委員会において承認を受け(平成 25 年 5 月 9 日)、文書による同意を得た症例を対象にした。

申請課題名「稀少小児遺伝性血液疾患の遺伝子解析研究」

研究責任者：菅野仁教授

部署名：輸血・細胞プロセッシング科

承認番号 (受付番号)：2 2 3 B。

C. 研究結果

42 症例のうち 7 症例 (約 16%) で赤血球膜遺伝子変異 (*SPTA1* 2 例、*SPTB* 2 例、*ANK1* 3 例、*SLC4A1* 1 例) を同定した。全例が家族歴の無い孤発例であった (表 1)。

| 症例 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------------------|--------------|--------|--------------|-------|------|-------|------|
| 性別 | M | M | M | M | M | F | M |
| 検査時年齢 | 3M | 5M | 1M | 18Y1M | 3M | 2Y11M | 3Y8M |
| 周産期異常 | なし | 低出生体重児 | なし | — | — | — | なし |
| 早発黄疸 | あり | あり | あり | なし | あり | なし | なし |
| 輸血症 | なし | 交換輸血6回 | 輸血依存 | なし | なし | なし | なし |
| 家族歴 | なし | なし | なし | なし | なし | なし | なし |
| Hb (g/dL) | 10.2 | 7.3 | 7.4 | 12.0 | 6.6 | 6.9 | 6.5 |
| MCV (fL) | 67.5 | 85.4 | 82.5 | 96.4 | 75.8 | 82 | 69.8 |
| MCHC (%) | 33.9 | 34.2 | 35.7 | 35.3 | 33.5 | 33.5 | 28.4 |
| Retic (%) | 3.5 | 2.7 | 4.4 | 5.0 | 12.4 | 2.3 | 6.3 |
| 間接Bil (mg/dL) | 0.94 | 4.1 | 1.1 | 2.4 | 6.0 | 0.2 | 0.2 |
| Hp (mg/dL) | — | 10 | <10 | <10 | 3 | 133 | 64 |
| 形態異常 | 大小不同奇形 | 破碎 | 大小不同奇形 | 球状標的 | なし | なし | あり |
| OF | 未施行 | 陰性 | 未施行 | 陰性 | 未施行 | 未施行 | 未施行 |
| EMA (mf) (% of control) | 28.7 (55.4%) | 47.2 | 44.1 (87.6%) | 未施行 | 未施行 | 未施行 | 57.3 |

表 1 遺伝子変異を同定した 7 症例

病型別には、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 例中の 3 例 (10%) [症例 5・6・7]、②小型球状赤血球が認められたが、OF、EMA 共に未施行または結果が正常の 4 例 → 1 例 (25%) [症例 4]、③破碎、奇形赤血球が目立つ 9 例 → 3 例 (33%) [症例 1・2・3] であった。

変異の内訳はフレームシフト変異 2 例、ナンセンス変異 2 例、ミスセンス変異 4 例であり (表 2)、ミスセンス変異部位におけるアミノ酸はすべて進化上 100%保存されていた (表 3)。

| 症例 | 1 | 2 | 3 |
|--------|---------------------|-------------|--------------|
| 遺伝子 | <i>ANK1</i> | <i>SPTB</i> | <i>SPTA1</i> |
| 遺伝子変異 | c.4356_4357 insTGAA | c.C5163G | c.G83A |
| アミノ酸変異 | p.N1452fs | p.D1721E | p.R28H |

| 症例 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--------|--------------|-------------|---------------|-------------|
| 遺伝子 | <i>SPTA1</i> | <i>SPTB</i> | <i>SLC4A1</i> | <i>ANK1</i> |
| 遺伝子変異 | c.C802T | c.C5371T | c.C1721T | c.G2899A |
| アミノ酸変異 | p.R268X | p.Q1791X | p.S574F | p.E967K |

表 2 同定した赤血球膜骨格蛋白遺伝子変異

| | <i>SPTB</i> Asp ¹⁷²¹ | <i>SPTA1</i> Arg ²⁸ | <i>SLC4A1</i> Ser ⁵⁷⁴ | <i>ANK1</i> Glu ⁹⁶⁷ |
|---------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| H.sapiens | D | R | S | E |
| P.troglodytes | NA | R | S | E |
| M.mulatta | D | R | S | E |
| C.lupus | D | R | S | E |
| B.taurus | D | R | S | E |
| M.musculus | D | R | S | E |
| R.norvegicus | D | R | S | E |

表 3 ミスセンス変異を同定したアミノ酸部位

D. 考察

症例 2 は低出生体重児で新生児期に交換輸血を 5 回受けており、赤血球形態は破碎赤血球で、遺伝性球状赤血球症のスクリーニング検査である赤血球 EMA 結合能は基準値内であった。同定した変異は、 α スペクトリン遺伝子 (*SPTA1*) のコドン 28 に生じたミスセンス変異であり、スペクトリン四量体の形成を妨げ、遺伝性楕円赤血球症 (HE) あるいはその重症型の遺伝性熱変形赤血球症 (HPP) の病因となることが明らかになっている。

症例 3 は輸血依存性の重症先天性溶血性貧血症例で、赤血球形態は奇形赤血球であり、典型的な小型球状赤血球を認めなかったが、赤血球 EMA 結合能の低下から HS を疑われた症例である。本例にはコドン 535 におけるフレームシフト変異を同定したが、同様の変異 (Ankyrin Laguna : deletion 535-frameshift c.1603del) は過去に重症 HS の原因遺伝子変異と報告されている。

上記以外は既報の無い新規遺伝子変異であるが、変異重症度、生じた機能ドメインおよび種を超えた保存性などから、溶血性貧血病因遺伝子変異と考えられた。

E. 結論

エクソーム解析は病因未確定の先天性溶血性貧血の診断に極めて有用であり、今後既知の溶血性貧血関連遺伝子を標的にしたNGSを用いた網羅的遺伝子検査の導入が急務と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolueang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Juntharaniyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. *Blood*. 2014; 123(10):1586-95.
- 2) Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno K, Tobe K, Kanno H, Nakagawa T. Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. *J Biol Chem*. 2014; 289(21):14796-811.
- 3) Kobayashi Y, Hatta Y, Ishiwatari Y, Kanno H, Takei M. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature. *BMC Res Notes*. 2014; 11(7):137.
- 4) 守屋 友美(東京女子医科大学 輸血・細胞プロセッシング部)、岡本 好雄、小林 博人、松田 和樹、久保田 友晶、緒方 康貴、及川 美幸、李 舞香、木下 明美、青木 貴子、千野 峰子、岡田 真一、高源 ゆみ、青木 正弘、中林 恭子、今野 マユミ、槍澤 大樹、小倉 浩美、菅野 仁. ABO 血液型不適合腎移植にお

るアルブミン製剤の必要性. 日本輸血細胞治療学会誌 2014; 60(4):521-526

- 5) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Sato-Otubo 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 mutation in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 2014; [Epub ahead of print]
 - 6) 岡本好雄、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、菅野 仁 自己血漿製剤という観点から見た CART. 日本アフェレシス学会 2014; 33(3):178-184
 - 7) 菅野 仁 先天性溶血性貧血の病型および鑑別診断法の進歩と今後の課題 The Japanese Journal of Pediatric Hematology/Oncology 2014;51(5):446-451
- ### 2. 学会発表
- 1) 青木貴子、市東正幸、小倉浩美、高橋秀弘、岩井朝幸、濱端隆行、渡邊健一郎、常松健一郎、奥野友介、村松秀城、吉田健一、宮野悟、大賀正一、小川誠司、小島勢二、菅野 仁 病因未確定の先天性溶血性貧血に対する全エクソーム解析. 日本人類遺伝学会第59回大会 (2014年11月20日)
 - 2) 尾上佳子、石谷健、内山智貴、青木貴子、市東正幸、川上和之、松井英雄、林和彦、斎藤加代子、菅野 仁 イリノテカンによる重症下痢症を予測するPGxバイオマーカーとしてのCYP2F1遺伝子多型. 日本人類遺伝学会第59回大会 (2014年11月20日)
 - 3) 神尾英則、神尾孝子、尾上佳子、市東正幸、

- 青木貴子、内山智貴、亀岡信悟、斎藤加代子、萱野 仁 テガフル・ウラシル投与による肝機能障害を予測する新規PGxバイオマーカーの探索. 日本人類遺伝学会第59回大会(2014年11月20日)
- 4) 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. 56th ASH Annual Meeting & Exposition, *Blood* 2014; 124(21):1342(abstract). (2014年12月6日)
- 5) 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、奥野友介、小島勢二、小川誠司、萱野 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)
- 6) 萱野 仁、青木貴子、市東正幸、槍澤大樹、小倉浩美 わが国におけるG6PD異常症の現状. 第76回日本血液学会学術集会(2014年10月31日)
- 7) 萱野 仁 新生児・乳児期に発症する先天性溶血性貧血の病因と診断. 第24回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会(2014年6月13日)
- 8) 槍澤大樹、岡本好雄、松田和樹、久保田友晶、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、今野マユミ、小林博人、小倉浩美、萱野 仁 安全なCARTの運用と適応拡大への新たな試み. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会(2014年5月15日)
- 9) 岡本好雄、松田和樹、久保田友晶、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、今野マユミ、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、萱野 仁 クリオプレシピテート製剤の院内調製と心臓血管外科手術への応用. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会(2014年5月15日)
- 10) 久保田友晶、松田和樹、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、岡本好雄、今野マユミ、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、萱野 仁 非溶血性輸血副作用発生状況と副作用報告回収率改善への取り組み. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会(2014年5月15日)
- 11) 松田和樹、久保田友晶、守屋友美、及川美幸、李舞香、木下明美、千野峰子、岡田真一、高源ゆみ、青木正弘、中林恭子、岡本好雄、今野マユミ、槍澤大樹、小林博人、小倉浩美、萱野 仁 当院における静注用免疫グロブリン(IVIg)の使用状況について. 第62回日本輸血・細胞治療学会総会(2014年5月15日)
- 12) 槍澤大樹、岡本好雄、萱野 仁 安全なCARTの運用と低温保存腹水を用いた適応拡大への新たな試み. 第35回日本アフェレシス学会学術集会ワークショップ(2014年9月27日)

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：DKCの臨床データ、遺伝子解析

担当責任者 山口 博樹（日本医科大学 血液内科 准教授）

研究要旨：先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita(DKC))は重症型と考えられる Hoyeraal Hreidarsson syndrome (HHS) から軽症型の不全型DKCまでその病態や臨床像が多彩である。これまでアジア人におけるDKCの臨床的特徴や原因遺伝子の頻度を解析した研究はない。本研究は日本人におけるDKCの臨床的特徴、原因遺伝子の頻度などを明らかにすることが目的である。臨床的にDKCの診断となった16症例、HHS3症例、不全型DKC21症例を解析した。本邦のDKCに関しては、発症年齢、性別や特徴的身体所見の頻度などはこれまでの欧米の報告とほぼ同等の結果が得られた。一方でDKC症例は血小板数が白血球数やヘモグロビン値と比べて有意に低値であることが明らかになった。また *TERT* 遺伝子変異の大欠失によるDKC症例をはじめて発見した。本邦のHHSは、DKCの特徴的身体所見の頻度が低く、さらに3つのDKCの特徴的身体所見をすべて認める症例がなかった。また本邦のHHSはDKCの既知の遺伝子変異が認められていない。不全型DKCは11/21(52.4%)症例で既知の遺伝子変異が認められた。既知の遺伝子変異を認めない症例の確定診断は難しい。こうした症例を不全型DKCと確定診断をするためには次世代シーケンサーによる新規の原因遺伝子変異の同定が必要である。

A. 研究目的

先天性角化不全症（Dyskeratosis congenita (DKC)）は網状色素沈着、爪の萎縮、舌などの粘膜白斑症を伴う骨髄不全症（Bone marrow failure: BMF）で10歳前後までに約80%以上の症例にこれらの特徴的身体所見が付随しBMFを発症する。遺伝型式はX連鎖劣性遺伝が約35%、常染色体優性遺伝が約15%、常染色体劣性遺伝が数%に認められるが、残りの約40%近くが型式不明である。

DKCの責任遺伝子としてテロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、*DKC1*、*telomerase RNA component (TERC)*、*telomerase reverse transcriptase (TERT)*、*NOP10*、*NHP2*、Shelterin複合体を構成する *TRF-interacting nuclear protein (TINF2)*、テロメラーゼ複合体を核内のCajalbodyに移行させる *TCAB1* が同定された。

また近年 DNA ヘリカーゼの一つである *Regulator of Telomere Elongation Helicase 1 (RTEL1)* の変異が常染色体劣性遺伝のDKCやその重症型と考えられている Hoyeraal Hreidarsson syndrome (HHS) で発見された。DKCはこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結果造血幹細胞などの増殖細胞に増殖障害が生じ上記の症候が形成されると考えられている。

また成人になって特徴的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型のDKCの存在が明らかになった。不全型のDKCは、臨床的には再生不良性貧血(AA)や骨髄異形成症候群(MDS)などのBMFと診断されていることが多く、BMFの2-5%に末梢血単核球のテロメア長が短縮し、上述のテロメア関連遺伝子異常を認める不全型のDKCが報告されている。

DKC の病態形成には①テロメア関連遺伝子異常による細胞内の分子生物学的変異、②世代促進、③加齢の3つ要因が重要である。不全型 DKC で認められた *TERC*、*TERT* 変異は haploinsufficiency 効果を示し、テロメララーゼ活性の減弱の程度が少なく、DKC の表現型となるにはある程度の世代促進や加齢が必要であると考える。以上のことからテロメア関連遺伝子変異のテロメア補正の障害が軽度で、世代促進や加齢が進んでいない場合は、細胞増殖や分裂が盛んな造血器のテロメア長が他の組織に先行して短縮化し、DKC の特徴的身体所見が出現せずに不全型の DKC となるのではないかと予想する。

DKC は網状色素沈着、爪の萎縮、舌などの粘膜白斑症といった特徴的身体所見、家族歴、テロメア長短縮、上述の原因遺伝子変異の同定などによって診断をする。しかしその重症型と考えられている HHS においては小頭症、小脳低形成、成長発達遅延、顔貌異常、B 細胞と NK 細胞数の低下、細胞性免疫不全などといった多彩な身体異常や免疫異常を認め、さらに DKC の特徴的身体所見を認めない場合もあり診断が難しい場合がある。一方で骨髄不全症以外の明らかな異常を認めない不全型 DKC は AA や MDS などの他の骨髄不全症との鑑別が難しい場合がある。また臨床的に DKC を考えた症例の中にはテロメア長の短縮の程度が軽度の場合や原因遺伝子が同定されない場合などもあり診断に苦慮をすることが少なくない。

このように DKC は重症型と考えられる HHS から軽症型の不全型 DKC までその病態や臨床像が多彩であるが、これまでの DKC の臨床症例の蓄積は主に欧米が中心でアジア人においては少数の症例報告のみである。欧米人以外の人種における DKC の臨床的特徴やその原因遺伝子の頻度などは明らかになっていない。本研究は日本人における DKC の臨床的特徴、原因遺伝子の頻度などを明らかにすることが目的である。

B. 研究方法

本邦における臨床的に DKC が疑われた症例、DKC 以外の先天性骨髄不全症が否定的なテロメア長の短縮化を認めた家族性 BMF、免疫抑制療法に不応性 BMF でテロメア長の著明な短縮化を認めた症例、BMF を合併した家族性肺線維症の症例を対象とした。診断に関しては、皮膚の網状色素沈着、舌白斑症、爪の委縮のいずれかの身体異常とテロメア長の短縮を有する骨髄不全症症例を DKC の疑い症例とし、またそれ以外の症例を不全型 DKC 症例とした。

テロメア長解析はサザンブロット法の TeloTAGGG kit (ロッシュ社)、flow-fluorescence in situ hybridization (flow-FISH)法の Telomere PNA kit (ダコ社)、Real time PCR 法を用いた。既知の遺伝子変異解析は、従来のサンガー法以外に一部の症例に関しては次世代シーケンサーにおける exon シークエンスならびにゲノムコピー数解析を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は当施設遺伝子倫理審査委員会において承認が得られており以下の配慮を予定している。生命倫理上の配慮に関しては、患者、及び健康ボランティアの人権、利益の保護について文書にて十分説明をしたうえで同意を得る。また研究への協力に同意した後であってもその同意を取り消すことができること、更に本研究への同意が得られない場合においても今後の治療などにはなんら不利益を被らないことを説明する。個人情報漏洩に対する取り組みとして研究組織とは別に個人情報管理者をおき連結可能匿名化をはかったうえで解析をおこなう。同意が撤回された場合は、検体、診療情報、遺伝情報はすべて匿名化されたまま焼却により破棄する。得られた結果は学会や論文として発表するが個人情報が出ることはない。遺伝子結果の開示を研究対象者が要求する場合は、倫理的問題を考慮し遺伝子カウンセリングを施行し、結果の告知は臨床遺伝専門医(遺伝カウンセラー)により行う。

C. 研究結果

1. DKC や HHS 症例の臨床的特徴

本邦において臨床的に DKC の診断となった症例は 16 症例、HHS の診断となった症例は 3 症例あった。DKC は HHS と比較して有意に診断時年齢が高かった (DKC 9.484 ± 2.419 vs HHS 0.8333 ± 0.1667 , $p=0.003$)。DKC と HHS は女性が 25% を占めた。家族歴は DKC の診断に重要な因子ではあるが、家族歴を認めた症例は DKC の 2 症例 (12.5%) に認めるのみであった。DKC の特徴的身体所見に関しては、爪の委縮 15/16 (93.75%) 症例、皮膚の網状色素沈着 14/16 (87.5%) 症例、舌白斑症 13/16 (81.3%) 症例に認められ、これら 3 つの身体的異常すべて認める症例は 11/16 (68.8%) 症例であった。一方 HHS の特徴的身体所見に関しては、皮膚の網状色素沈着 3/3 (100%) 症例、爪の委縮 2/3 (66.7%) 症例、舌白斑症 1/3 (33.3%) 症例に認められたが、これら 3 つの身体的異常すべて認める症例は認められなかった。

2. DKC や HHS 症例の血液学的異常

DKC の血液学的異常に関しては、好中球数 $1000/\mu\text{l}$ 以下は 1/16 (6.3%) 症例のみ、ヘモグロビン 7g/dl 以下も 1/16 症例 (6.3%) のみに認められたのに対して、血小板数 $20000/\mu\text{l}$ 以下は 7/16 (43.8%) 症例に認められた。DKC の診断時の血液学検査では 3 系統の血球の中で血小板低下が顕著であった。HHS の血液学的異常に関しては症例数が少ないため明らかな結論は出せないが、好中球数 $1000/\mu\text{l}$ 以下は 1/3 (33.3%) 症例のみ、血小板数 $20000/\mu\text{l}$ 以下も 1/3 (33.3%) 症例のみに認められたのに対して、Hb 7g/dl 以下は 2/3 (66.7%) 症例に認められた。

骨髄検査に関しては、DKC の 1 症例以外で解析が行われ、全症例低形成髄で病的染色体異常は認められなかった。

3. DKC や HHS 症例のテロメア長解析とテロメア長遺伝子変異解析

テロメア長解析は、DKC では 7/16 (43.8%) 症例で解析が行われ、6/7 (85.7%) の症例でテロメア長の短縮が認められた。HHS では 2/3 (66.6%) で解析が行われ、2/2 (100%) の症例でテロメア長の短縮が認められた。

DKC のテロメア制御遺伝子変異に関しては、11/16 (68.7%) 症例に認められた (DKC1 変異が 5 症例、TINF2 変異が 3 症例、TERT 変異が 2 症例、TERC 変異が 1 症例、変異が同定されなかった症例が 5 症例)。一方 HHS に関しては 3 症例ともに原因遺伝子変異は同定されなかった。

この中で、TERT 変異 c.1002_1004del:p.334_335del をホモで認めた症例に関しては、次世代シーケンサーによるゲノムコピー数解析にて染色体 5 番の TERT 遺伝子をコードする領域に片アレルの大欠失を認めた。TERT 遺伝子変異の大欠失の症例ははじめての報告になる。この症例の家族解析を行うと、TERT 変異をホモで認めた症例は、テロメア長の著明な短縮を認め、5 歳児より DKC の表現型で発症し、HHS で認められるような免疫不全の合併により重篤な感染症を繰り返しており DKC の重症型であると診断されている。一方 TERT の片アレルの大欠失のみを認める弟は、テロメア長短縮は認めるが 6 歳時まで DKC の臨床症状や血液学的異常は示していない。また TERTc.1002_1004del:p.334_335del ヘテロ変異を有する母は経度の貧血は認めるが、テロメア長短縮は認めていない。

4. 不全型 DKC の臨床的特徴、血液学的異常、テロメア長解析とテロメア長遺伝子変異解析

不全型 DKC は 21 症例診断された。DKC の診断前の臨床的診断は、11 症例は再生不良性貧血、3 症例は骨髄異形成症候群、3 症例は家族性肺線維症と診断されていた。診断時年齢は 20.50 ± 4.674 で、DKC ($p=0.045$) や HHS ($p<0.001$) と比較して有意に高かった。不全型 DKC は 7/21 (33.3%) 症例が女性であった。家族歴を認めた症例は

6/21(28.6%)とDKCやHHSと比較して多く認められた。BMF以外の合併症としては、肺線維症が3症例、発達障害を2症例、肝障害1症例、腎障害1症例を認めた。診断時血液学的異常に関しては、好中球数1000/ μ l以下は4/21(19.0%)症例、ヘモグロビン7g/dl以下は6/21(28.6%)、血小板数20000/ μ l以下は7/21(33.3%)症例に認め、不全型DKCの診断時血液学検査ではDKCの様に血小板減少を認める症例が顕著に多いということとはなかった。骨髓検査に関しては、19症例で行われ、17症例は低形成髄で、1症例に-10の染色体異常が認められた。

5. 不全型DKCのテロメア長解析とテロメア長遺伝子変異解析

テロメア長解析は全症例で行われ、1症例が正常下限であったが、その他の症例は全例著明なテロメア長の短縮が認められた。テロメア制御遺伝子変異に関しては、11/21(52.4%)症例で遺伝子変異が認められた(*TERT*変異5症例、*TINF2*変異3症例、*RTEL1*変異2症例(1家系)、*TERC*変異1症例)。*RTEL1*変異は両アレル変異、その他の変異はヘテロ変異であった。*RTEL1*変異は常染色体劣性遺伝形式でHHSに多く発見された遺伝子変異ではあるが、この2症例は明らかなDKCの特徴的な身体的異常を認めず、*RTEL1*変異を有する初めての不全型DKCである。またこの2症例の片アレルの*RTEL1*変異を有している両親は身体的異常や血液学的異常を認めないが、テロメア長の著明な短縮を認めている。

D. 考察

本研究によって日本人におけるDKC、HHS、不全型DKCの臨床的特徴や原因遺伝子の頻度などが明らかになった。

DKCに関しては発症年齢、性別や特徴的身体所見の頻度などはこれまでの欧米の報告とほぼ同等の結果が得られた。一方でDKC症例は血小板数が白血球数やヘモグロビン値と比べて有意に低値であることが明らかになった。この結果を反映して

いるのか今回の研究対象症例においてDKCの診断がつく前の臨床的診断は特発性血小板減少性紫斑病が約1/5を占めていた。また遺伝子変異に関しては*TERC*変異がやや少ない傾向があったが、この結果が日本人のDKC症例の遺伝子変異の特徴なのかはさらなる症例の解析が必要であると考えられる。また次世代シーケンサーによるゲノムコピー数解析にて染色体5番の*TERT*遺伝子をコードする領域に片アレルの大欠失と*TERT*変異c.1002_1004del:p.334_335delを認めるDKC症例を発見した。*TERC*遺伝子変異の大欠失の症例ははじめての報告になるが、原因遺伝子変異が発見されないDKC症例の中にはこのような既知の原因遺伝子の欠失が原因の症例が含まれている可能性がある。

HHSに関しては、症例数が少ないため明確な結果を示すことは出来なかった。しかしHHSはDKCの特徴的身体所見の頻度が低く、3つの特徴的身体所見をすべて認める症例はなかった。HHSはDKCに認められる特徴的身体所見がそろわず、DKCに認められない他の身体異常や免疫異常が認められている。また本邦のHHSと診断された症例は、テロメア長解析が行われた症例は100%テロメア長の短縮が認められるが、DKCの既知の遺伝子変異は認められていない。以上よりHHSはDKCの重症型という考えだけでなく、テロメア制御異常によって発症するDKCとは異なる先天性BMFが含まれるのではないかと考える。

不全型DKCに関してはテロメア制御遺伝子変異を認めた不全型DKCに関してはその診断は問題ないと考えられる。しかしテロメア制御遺伝子変異を認めない不全型DKC症例に関しては、はたして不全型DKCと診断していいのか?という疑問が残る。確かに再生不良性貧血の一部の症例ではテロメア長の-2SD以上の短縮を認めるとの報告がある。今回の対象となった21症例の不全型DKC症例は、テロメア長短縮をしたBMFに家族歴がある、家族性肺線維症がある、免疫抑制療法が不応であったなどを認める症例を解析対象としたが、この中にはテロメア長の短縮を認める他のBMFが含まれている可能性も完全には否定でき

ない。こうした症例を不全型 DKC と確定診断をするためには次世代シーケンサーによる新規の原因遺伝子変異の同定が必要である。

E. 結論

本邦のDKCに関しては、発症年齢、性別や特徴的身体所見の頻度などはこれまでの欧米の報告とほぼ同等の結果が得られた。一方でDKC症例は血小板数が白血球数やヘモグロビン値と比べて有意に低値であることが明らかになった。また *TERT* 遺伝子変異の大欠失によるDKC症例をはじめて発見した。

本邦のHHSは、DKCの特徴的身体所見の頻度が低く、さらに3つのDKCの特徴的身体所見をすべて認める症例はなかった。また本邦のHHSはDKCの既知の遺伝子変異が認められていない。以上よりHHSの疾患概念にはDKCの重症型という考え方だけでなく、テロメア制御異常によって発症するDKCとは異なる先天性BMFが含まれるのではないかと考える。

不全型DKCに関しては、既知の遺伝子変異を認めない症例の確定診断は難しい。こうした症例を不全型DKCと確定診断をするためには次世代シーケンサーによる新規の原因遺伝子変異の同定が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tanino Y, Yamaguchi H, Fukuhara A, Munakata M. Pulmonary fibrosis associated with *TINF2* gene mutation: is somatic reversion required? *Eur Respir J*. 2014 Jul;44(1):270-1.

2. 学会発表

Hiroki Yamaguchi, Hirotohi Sakaguchi, Kenichi Yoshida, Miharuru Yabe, Hiromasa Yabe, Yusuke Okuno, Hideki Muramatsu, Shunsuke Yui, Koiti Inokuchi, Etsuro Ito, Seishi Oogawa, Seiji Kojima. The clinical and genetic features of dyskeratosis congenita, cryptic dy

skeratosis congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in Japan. The 56th American society of hematology annual meeting, San Francisco, 2014.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費委託費（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：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

担当責任者 金兼 弘和（富山大学医学部附属病院 小児科 講師）

東京医科歯科大学大学院発生病態学分野 准教授）

研究要旨： X連鎖リンパ増殖症候群（X-linked lymphoproliferative syndrome: XLP）は Epstein-Barr virus（EBV）に対する特異的免疫応答の欠陥を有する原発性免疫不全症であり、責任遺伝子として *SH2D1A* ならびに *XIAP* が同定され、それぞれ XLP1、XLP2 と命名されている。臨床的に XLP と診断困難であった 2 家系を対象に全エクソーム解析を行ったところ、*XIAP* ならびに *SH2D1A* 変異が同定された。家系 1 では X 染色体の不活化が非ランダムに生じ、女性保因者が *XIAP* 欠損症（XLP2）を発症していた。家系 2 ではメモリー T 細胞の一部に *SH2D1A* 体細胞変異が生じ、正常機能を有しており、臨床症状の軽症化に関与しているものと考えられた。全エクソーム解析は非典型的臨床像を呈する原発性免疫不全症の原因遺伝子の探索に非常に有用なツールと思われる。

A. 研究目的

X連鎖リンパ増殖症候群（X-linked lymphoproliferative syndrome: XLP）は Epstein-Barr virus（EBV）に対する特異的免疫応答の欠陥を有する原発性免疫不全症であり、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症（hemophagocytic lymphohistiocytosis: HLH）、悪性リンパ腫、異常ガンマグロブリン血症を臨床的特徴とする。責任遺伝子として *SH2D1A* ならびに *XIAP* が同定され、それぞれ XLP1、XLP2 と命名されている。これまでフローサイトメトリーによるリンパ球内蛋白の発現と遺伝子解析を組み合わせ、わが国において 30 例以上の XLP1、20 例以上の XLP2 を診断してきた。今回、全エクソーム解析によって非典型的な XLP の 2 家系を同定し、その病態を明らかとする。

B. 研究方法

女兒を含む同胞 3 例が HLH を発症したが、パーフォリン欠損症などの家族性 HLH が否定された家系 1 と家系内に 3 例の低ガンマグロブリン血

症の男性を認めたが、B 細胞数は正常であり、X連鎖無ガンマグロブリン血症が否定された家系 2 を対象に、全エクソーム解析を行った。

（倫理面への配慮）

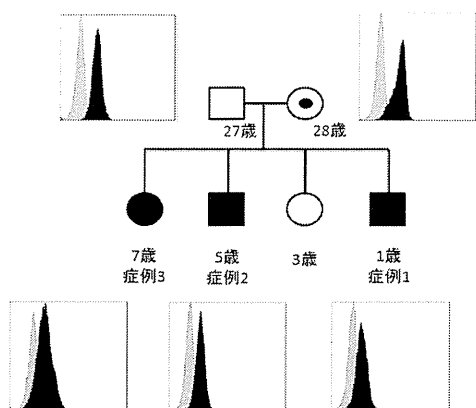
本研究はヒト検体を用いて解析を行うものであり、検体量および採取時の苦痛には十分な配慮を行った。遺伝子解析については各種指針を遵守して、患者個人情報保護について十分な配慮を行った。

C. 研究成果

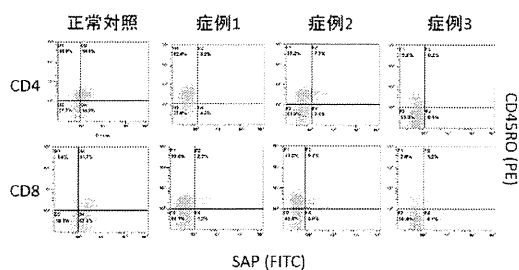
全エクソーム解析を行ったところ、家系 1 では *XIAP* 遺伝子に 1 塩基挿入（c.448_449insC, p.Asp151ArgfxX11）、家系 2 では *SH2D1A* 遺伝子に 1 塩基置換（c.2T>C, p.Met1Thr）が認められ、XLP2、XLP1 と診断された。

家系 1 では症例 3 の女兒例も症例 1,2 の男児例と同様に *XIAP* 蛋白の欠損が認められた（図 1）。メチル化特異的 PCR 法により、X 染色体の不活化を調べたところ、母親の X 染色体はランダムに不活化していたが、症例 3 では不活化が非ランダ

ムであり、母親由来の XIAP 変異のみが活性していた。



家系 2 は XLP1 と診断されたが、XLP1 に特徴的な HLH が 1 例も認められず、いずれも軽症例であった。そこで SAP 蛋白の発現をフローサイトメトリーで調べたところ、症例 1,2,3 では CD45RO+CD8+T 細胞の一部に SAP 陽性細胞が認められ、症例 2 では CD45RO+CD4+T 細胞の一部に SAP 陽性細胞が認められた (図 2)。磁気ビーズ法でソーティングして得られた CD45RO+T 細胞から DNA を抽出して、SH2D1A 遺伝子解析を行ったところ、SAP 陽性細胞の比率に相当する野生型アレルが検出された。EBV でトランスフォームした自己 B 細胞株で刺激培養すると、SAP 陽性細胞は CD157 の発現が認められた。



D. 考察

家系 1 の症例 3 は遺伝学的には保因者である女児であったが、X 染色体の不活化が非ランダムに生じ、XIAP 変異アレルのみが活性化し、同胞男児例と同様に XIAP 欠損症 (XLP2) を発症したものと考えられた。

家系 2 ではメモリー T 細胞の一部に体細胞変異

により SH2D1A 正常クローンが生じ、SAP 陽性細胞が認められるようになった。この SAP 陽性細胞は正常機能を有しており、リンパ球機能を代償して、この家系における XLP1 の軽症化に関与しているものと考えられた。

E. 結論

全エクソーム解析によって非典型的な XLP1 と XLP2 の 2 家系を同定することができた。全エクソーム解析は非典型的な臨床像を呈する原発性免疫不全症の原因遺伝子の探索に有用なツールであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yang X, Hoshino A, Taga T, Kunitsu T, Ikeda S, Yasumi T, Yoshida K, Wada T, Miyake K, Kubota T, Okuno Y, Muramatsu H, Adachi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H. A female patient with incomplete hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by a heterozygous XIAP mutation associated with non-random X-chromosome inactivation skewed towards the wild-type XIAP allele. J Clin Immunol (in press).
- 2) Nishida N, Yang X, Takasaki I, Imai K, Kato K, Inoue Y, Imamura T, Miyashita R, Kato F, Yamaide A, Mori M, Saito S, Hara J, Adachi Y, Miyawaki T, Kanegane H. Dysgammaglobulinemia associated with a hypomorphic Glu349del XIAP mutation. J Investig Allergy Clin Immunol (in press).
- 3) Aguilar C, Lenoir C, Lambert N, Bègue B, Brousse N, Canioni D, Berrebi D, Roy M, Gérard S, Chapel H, Schwerd T, Siproudhis L, Schäppi M, Al-Ahmari A, Mori M, Yamaide A, Galicier L, Neven B, Routes J, Uhlig HH, Koletzko S, Patel S, Kanegane H, Picard C, Fischer A, Bensussan NC,

Ruemmele F, Hugot JP, Latour S. Characterization of Crohn disease in X-linked inhibitor of apoptosis-deficient male patients and female symptomatic carriers. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 134: 1131-41.e9.

- 4) Yabal M, Müller N, Adler H, Knies N, Groß CJ, Damgaard RB, Kanegane H, Ringelhan M, Kaufmann T, Heikenwälder M, Strasser A, Groß O, Ruland J, Peschel C, Gyrd-Hansen M, Jost PJ. XIAP Restricts TNF- and RIP3-Dependent Cell Death and Inflammasome Activation. *Cell Rep* 2014; 7: 1796-808.
- 5) 金兼弘和. 原発性免疫不全症に合併する自己炎症疾患～炎症性腸疾患をモデルとして～. *日本小児科学会雑誌* 2014; 118: 1588-94.

2. 学会発表

- 1) Kanegane H. Whole exome sequencing reveals atypical phenotype of X-linked lymphoproliferative syndrome. A symposium for researchers and clinicians on XLP and WAS 2014 Nov3-4. London, UK.
- 2) Yang X, Nishida N, Hoshino A, Goi K, Kanzaki T, Yoshida K, Muramatsu H, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H. X-linked dysgammaglobulinemia associated with somatically reverted memory T cells in a family with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1. 16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies 2014 Oct.29-Nov.1. Prague, Czech Republic.
- 3) Nishida N, Yang X, Hoshino A, Kanegane H. Inflammatory bowel disease in Japanese patients with XIAP deficiency. 16th

Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies 2014 Oct.29-Nov.1. Prague, Czech Republic.

- 4) Kanegane H. XLP (X-Linked Lymphoproliferative Syndrome) and EB-Virus infection. PAS/ASPR Joint Meeting 2014 May3-6. Vancouver, Canada.
- 5) Yang X, Kunitsu T, Ikeda Y, Taga T, Wada T, Yachie A, Yasumi T, Heike T, Kanegane H. Female patient with X-linked lymphoproliferative syndrome type 2 caused by extremely skewed inactivation of X-chromosome PAS/ASPR Joint Meeting. 2014 May3-6. Vancouver, Canada.
- 6) 金兼弘和. 教育講演「原発性免疫不全症に合併する自己炎症」. 第 117 回日本小児科学会 2014 Apr11-13. 名古屋市.
- 7) 和田泰三, 金兼弘和, 太田和秀, 谷内江昭宏. XIAP 欠損症における血清 IL-18 の持続高値. 第 117 回日本小児科学会 2014 Apr11-13. 名古屋市.
- 8) 國津智彬, 池田勇八, 多賀 崇, 野村明孝, 竹内義博, 松井 潤, 吉田 忍, 八角高裕, 楊曦, 金兼弘和. 女兒例を含む XIAP 欠損症の同胞例第 117 回日本小児科学会 2014 Apr11-13. 名古屋市.

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

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：遺伝性鉄芽球性貧血の新規変異遺伝子の同定

担当責任者 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）

研究要旨： 遺伝性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天的異常により発症する難治性の貧血であり、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする。希少疾患である遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データの解析や遺伝子変異については東北大学が拠点として解析している。最も代表的な遺伝性鉄芽球性貧血は赤血球におけるヘム合成系の初発酵素である赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素(*ALAS2*)の変異により発症する X 連鎖性鉄芽球性貧血(*XLISA*)であるが、既知の遺伝子に変異が認められない症例も複数存在し、その発症機序は十分に解明されていない。今回、新たに 2 例の遺伝性鉄芽球性貧血症例を見出し、新規責任遺伝子の探索を行っている。

A. 研究目的

鉄芽球性貧血(*sideroblastic anemia*)は骨髄に環状鉄芽球が出現することを特徴とする難治性貧血であり、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血の 2 つに大きく分類される。先天性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天的異常により発症する稀な疾患であるため、その頻度、病態については不明である。本研究では、本邦における遺伝性鉄芽球性貧血の病態、遺伝子異常を明らかにし、同疾患の遺伝子診断システム構築を目指す。

B. 研究方法

難治性疾患克服事業「遺伝性鉄芽球性貧血の診断基準と治療法の確立」班から引き続き行っている全国調査で見出された症例・家系について既知の鉄芽球性貧血の原因遺伝子の変異解析を行う。既知の遺伝子変異が認められない家系については、次世代シーケンサーによる全エクソン解析あるいは全ゲノム解析を行う。この解析において候補遺伝子が見出された場合は、本班でその機能解析を行う。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析研究について所属施設の倫理委員

会の承認を得る。主治医に患者本人もしくは保護者への説明・同意の取得がなされた上で、遺伝子解析を行う。

C. 研究結果

本年度の一例目の新規症例は 2012 年生まれの女兒、家族歴なし。生後 3 ヶ月頃より赤血球の系統のみの低下を来しており、赤血球輸血依存状態であった。明らかな外表奇形は認めず。これまでの精査から、①再生不良性貧血は血球形態から否定的、②サラセミア・Diamond-Blackfan 貧血も否定的、③溶血所見無し、④染色体検査は正常核型、であった。さらに末梢血検査から小球性貧血、フェリチン高値、骨髄検査にて環状鉄芽球を認めているため、鉄芽球性貧血の診断目的で、本調査研究に登録された。現在、本人及び両親の末梢血液細胞を用いた遺伝子変異解析を施行中である。2 例目は 2014 年生まれの男児、家族歴なし。出生後より汎血球減少あり、骨髄検査を行ったところ、赤芽球中の環状赤芽球比率 68% を認めたため、Pearson 疑いとして本調査研究に登録となった。登録時点では臍臓症状・神経筋症状無し。本人の末梢血液細胞を用いた解析の結果、従来 Pearson 症候群で報告のある領域のミトコンドリ

ア DNA 欠損を認めたため (GeneBank Accession No. NC_012920 の Position: 8483-13459 に渡る計 4977bp の欠損)、Pearson 症候群に伴う鉄芽球性貧血を考えた。現在、他症状出現の有無も含めて経過観察中である。

D. 考察

本邦における鉄芽球性貧血に関する全国調査の結果、遺伝性鉄芽球性貧血症例は計 19 例登録され、うち 79%は ALAS2 の異常を認め、一方、欧米で多い SLC25A38 遺伝子変異など既知の遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子は認められなかった(Ohba et al. *Ann Hematol* 2013)。従って、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子には人種差・地域差がある可能性が示唆された。しかしながら、症例数が少なくまだ結論は得られていない。2 例目の症例は生後間もなく汎血球減少を認め、Pearson 症候群の診断に至った。遺伝性鉄芽球性貧血は、その原因遺伝子の機能の多様性から、XLSA 以外は幼少児期より貧血以外に神経・筋・内分泌器など他の臓器に異常を認める場合が多く、また貧血自体も重症であることが多いため、実際に遺伝性鉄芽球性貧血であったものの、診断がついていない症例が多く存在する可能性を検証する必要がある。そのためには、小児科医との連携が重要であると考えられた。一方、一例目の症例については責任遺伝子が現在のところ不明であり、全エクソン解析及び全ゲノム解析が進行中である。

E. 結論

今回、新たな遺伝性鉄芽球性貧血症例を見出した。変異未同定の症例については、新規変異遺伝子の解析を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R,

Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H. Effect of 5-aminolevulinic acid on erythropoiesis: a preclinical in vitro characterization for the treatment of congenital sideroblastic anemia. *Biochem Biophys Res Commun*.2014;454:102-108

- 2) Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Kanehira M, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Haematologica*. 2014;99:1686-1696
- 3) Harigae H, Fujiwara T, Furuyama K. Heme metabolism and anemia. *Rinsho Ketsueki*. 2014;55:729-734.
- 4) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in GATA-2 deficiency evolving into myelodysplasia and acute leukemia. *Ann Hematol*. 2014;93:1515-1522.
- 5) Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, Kobayashi M, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferase, promotes erythroid differentiation. *J Biol Chem*. 2014;21:8121-8134.

雑誌 (商業誌、総説)

- 1) 藤原 亨、小林 匡洋、張替 秀郎：血液フロンティア；ヘム合成系の異常と関連疾患(医薬ジャーナル社、2014年4月号、p71-79)
- 2) 藤原 亨、小林 匡洋、張替 秀郎：月刊「血液内科」；赤血球造血における転写制御機構

(科学評論社、2014年、第68巻第5号、
p557-563)

- 3) 藤原 亨、張替 秀郎：プリンシプル血液疾患の臨床 新戦略による貧血治療；鉄芽球性貧血 (中山書店、2014年、p237-239)

2. 学会発表

- 1) Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H. Exploring potential usefulness of 5-aminolevulinic acid for X-linked sideroblastic anemia. 第56回米国血液学会 2014年12月 (サンフランシスコ)
- 2) Inokura K, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythropoiesis: a potential link to ring sideroblast formation. 第56回米国血液学会 2014年12月 (サンフランシスコ)
- 3) Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 REGULATES DIFFERENTIATION OF BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS. 第19回欧州血液学会 2014年6月(ミラノ)
- 4) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. IDENTIFICATION OF ACQUIRED MUTATIONS BY WHOLE-GENOME SEQUENCING IN MONOMAC SYNDROME EVOLVING INTO MYELODYSPLASIA AND ACUTE

LEUKEMIA. 第19回欧州血液学会 2014年6月(ミラノ)

- 5) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole genome sequencing in MonoMAC syndrome evolving into MDS/AML. 第76回日本血液学会 2014年10月 (大阪)
- 6) Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Role of GATA2 in the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. 第76回日本血液学会 2014年10月 (大阪)
- 7) Niikuni R, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Tanaka T, Harigae H. Exploring the potential usefulness of 5-aminolevulinic acid (ALA) for sideroblastic anemia. 第76回日本血液学会 2014年10月 (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：先天性血小板減少症の遺伝子解析

担当責任者 國島伸治（国立病院機構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）

研究要旨： 既知の原因遺伝子に異常を認めない優性遺伝の先天性巨大血小板性血小板減少症（CMTP）家系において次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を施行し、新規 **GFI1b** 遺伝子変異を同定した。この変異は一塩基置換によるスプライス変異であるため、病的変異の可能性が極めて高い。野生型及び変異型 **GFI1b** を **HEK293T** 細胞へ導入し、ルシフェラーゼアッセイを行い、変異型 **GFI1b** の転写抑制機能が低下する結果を得た。現在、レトロウィルスを用いたマウス胎仔肝細胞由来巨核球への遺伝子導入実験により胞体突起形成を解析中である。

A. 研究目的

先天性血小板減少症は病因不明な疾患が多く、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）と診断され不必要な治療を受ける症例も少なくない。本研究は、既知の原因遺伝子に異常を認めない原因不明の先天性血小板減少症において、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を施行することにより新規原因遺伝子を同定、病態を解析し、鑑別診断法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

優性遺伝の先天性巨大血小板性血小板減少症（CMTP）を呈し、既知の原因遺伝子に異常を認めない親子例について、東京大学小川誠司研究室（現京都大学）にて次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を施行した。

サンガーシーケンス法にて **GFI1b** 遺伝子の全ての構造領域の配列を決定した。さらに、遺伝形式の不明な39症例の **CMTP** については次世代シーケンサーを用いたプールシーケンス解析により **GFI1b** 遺伝子の全ての構造領域の配列を決定した。

血小板における **GFI1b** の発現を確認するため、患者家族血小板由来の **cDNA** をクローニングし、発現を確認した。

ルシフェラーゼアッセイによって、**GFI1b** 変異が実際に遺伝子発現制御機能に影響を及ぼすかを検討した。**GFI1b** のターゲット遺伝子として、**GFI1b** 自身のプロモーター配列を、レポーターベクター **pGL4-luc2** に組み込んだ。また、**GFI1b** の野生型配列を **CMK** 細胞からクローニングし、変異型を患者家族血小板及び部位特異的変異導入法によって作製し、**pcDNA3.1** に挿入した。これらのベクターを、コントロールレポーターベクター **pGL4-hRluc/TK** と共に、**HEK293T** 細胞へコトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。

GFI1b の変異型及び野生型 **cDNA** を、レトロウィルスベクターである **pGCDNsam-IRES-EGFP** にサブクローニングし、ウィルスベクターの作製を行った。各ウィルスベクターを、エンベロープである **VSV-G** 発現ベクターと共に、パッケージング細胞である **293gp** 細胞にコトランスフェクションし、レトロウィルス

の作製を行った。293gp 細胞で作製したレトロウイルスを 293gp 細胞に感染させ、レトロウイルス産生細胞を作製した。感染性レトロウイルスを妊娠 13.5 日マウスの胎児肝細胞へ感染させ、トロポポエチン存在下に 2-5 日間培養し、EGFP 陽性の、野生型及び変異型 GFI1b を発現した各巨核球について、経時的に巨核球が数珠状の胞体突起を形成しながら血小板を産生する様子を観察し、産生される血小板数と大きさを定量する。

(倫理面への配慮)

本研究を行なうにあたっては、当施設で施行中の先天性血小板減少症の遺伝子解析に関する研究に、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析方法を追加することを当院ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会に申請し、審査承認を得た。東京大学へ送付する DNA は、匿名化し、罹患の有無、親子関係、性別のみの情報を付与した。DNA 組み換え実験および動物を用いた実験についても審査承認を得た。

C. 研究結果

全エクソン解析の結果、赤芽球系及び巨核球系に特異的な転写因子であり、これまでヒトにおける病因として報告がない新規遺伝子 GFI1b 変異を同定した。サンガーシーケンス法にて GFI1b 遺伝子の全ての構造領域の配列を決定し、今回同定された変異は一塩基置換によるスプライス変異に伴うナンセンス変異であることが示唆された。遺伝形式の不明な 39 症例の CMTP 検体では、GFI1b 変異は同定されなかった。

血小板における GFI1b の発現を確認するため、患者家族血小板由来の cDNA をクローニングし、野生型及び変異型が共に発現していることを確認した。

ルシフェラーゼアッセイによって、GFI1b 変異による遺伝子発現制御機能への影響を検討した。結果、野生型 GFI1b は empty vector と比較し、ルシフェラーゼ活性を 50-60% に抑制したが、変異型 GFI1b ではその抑制が阻害され、100% 以上

の活性を示した。野生型と変異型を様々な割合で同時にトランスフェクションすると、割合に応じた活性率に変化が確認された。このことから、GFI1b 変異によって、GFI1b が本来持っている転写抑制作用が阻害されていることが示唆された。

培養巨核球に変異型及び野生型 GFI1b を発現させ、血小板産生への影響を検討する実験は現在進行中である。

D. 考察

GFI1b はヒトの疾患原因遺伝子として報告がなく、本転写因子が先天性血小板減少症を引き起こすという疾患概念は新規的であったが、近年、先天性血小板減少症の原因遺伝子として報告された (Stevenson J, *Thromb Haemost* 2013、Monteferrario D, *N Engl J Med* 2014)。Stevenson らは、GFI1b の exon7 における一塩基挿入 (c.880-881insC) によるフレームシフト変異に伴い、貧血および巨大血小板性血小板減少を呈した一家系を報告した。Monteferrario らは、exon6 の c.859C>T によるナンセンス変異を伴った Gray Platelet 症候群の一家系を報告した。いずれも、私たちが同定したものと異なる変異部位であった。また、私たちの家系では貧血を認めていないことから赤芽球系の異常はないと考えており、変異部位によっても赤芽球系への影響が異なる可能性が示唆される。これら表現型の違いを含め、本疾患の病因・病態解析が必要である。

E. 結論

転写因子の巨核球系及び赤芽球系における病態への関与については、いまだ不明な部分も多いが、本研究において転写因子による巨核球の分化・成熟や血小板産生、及び赤芽球系への影響を解明する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H: *TUBB1* mutation

- disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol* 92:276-82, 2014.
- 2) Kuzmanović M, Kunishima S, Putnik J, Stajić N, Paripović A, Bogdanović R: Congenital thrombocytopenia with nephritis-the first case of MYH9 related disorder in Serbia. *Vojnosanit Pregl* 71:395-8, 2014.
 - 3) Kunishima S, Kitamura K, Matsumoto T, Sekine T, Saito H: Somatic mosaicism in *MYH9* disorders: the need to carefully evaluate apparently healthy parents. *Br J Haematol* 165:885-7, 2014.
 - 4) Noris P, Biino G, Pecci A, Civaschi E, Savoia A, Seri M, Melazzini F, Loffredo G, Russo G, Bozzi V, Notarangelo LD, Gresele P, Heller P, Pujol-Moix N, Kunishima S, Cattaneo M, Bussel J, De Candia E, Cagioni C, Ramenghi U, Cagioni C, Fabris F, Balduini CL: Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: Analysis of 376 patients with all known disorders. *Blood* 124:e4-e10, 2014.
 - 5) Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, Zieger B, Rand ML, Pujol-Moix N, Caliskan U, Pecci A, Noris P, Srivastava A, Ward C, Kopp MC, Alessi MC, Bellucci S, Beurrier P, de Maistre E, Favier R, Hezard N, Hurtaud-Roux MF, Latger-Cannard V, Lavenu-Bombled C, Meunier S, Negrier C, Nurden A, Proulle V, Randrianaivo H, Fabris F, Platokouki H, Rosenberg H, Gargouri AF, Heller P, Karimi M, Balduini CL, Pastore A, Lanza F: Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. *Hum Mut* 35:1033-45, 2014.
 - 6) Bottega R, Marconi C, Faleschini M, Baj G, Cagioni C, Pecci A, Pippucci T, Ramenghi, U, Pardini S, Ngu L, Baronci C, Kunishima S, Balduini CL, Seri M, Savoia A, Noris P: *ACTN1*-related thrombocytopenia: identification of novel families for phenotypic characterization. *Blood* 125:869-72, 2015.
2. 学会発表
 - 1) Molecular mechanisms for congenital macrothrombocytopenia (シンポジウム): 國島伸治 第36回日本血栓止血学会学術集会 平成26年5月 大阪
 - 2) 巨核球特異的 β 1-tubulin異常は微小管構成障害により胞体突起形成不全を来す: 國島伸治 北村勝誠 西村智 鈴木英紀 今泉益栄 齋藤英彦 第36回日本血栓止血学会学術集会 平成26年5月 大阪
 - 3) α -Storage Pool病の1例: 兼松 毅 岸本磨由子 鈴木伸明 國島伸治 松下正: 第36回日本血栓止血学会学術集会 平成26年5月 大阪
 - 4) Mouse models of MYH9 disorders: Suzuki N, Kunishima S, Matsushita T: 60th Annual Meeting of the SSC, International Society on Thrombosis and Haemostasis, June, 2014, Milwaukee, USA
 - 5) MYH9異常症の体細胞モザイク: 國島伸治 北村勝誠 松本多絵 関根孝司 第15回日本検査血液学会学術集会 平成24年7月 仙台
 - 6) 幹細胞技術の検査医学研究への応用 (シンポジウム): 國島伸治 第33回日本臨床検査医学会東海北陸支部例会 平成26年8月 名古屋
 - 7) Identification of myosin heavy chain 9 (MYH9) disorders in children with macrothrombocytopenia: a result from two institutions in Thailand: Sirachainan N, Komwilaisak P,

Kitamura K, Hongeng S, Sekine T, Kunishima S 8th Congress of the Asian-Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis, October, 2014, Hanoi, Vietnam.

Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y 56th American Society for Hematology Annual Meeting and Exposition, December 2014, San Francisco, CA, USA.

- 8) Differential diagnosis of congenital macrothrombocytopenia (symposium) : Kunishima S 8th Congress of the Asian-Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis, October, 2014, Hanoi, Vietnam.
- 9) GT-like phenotype with macrothrombocytopenia induced by α IIb β 3 activating mutation in mice : Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y 第 76 回日本血液学会総会 平成 26 年 10 月 大阪
- 10) 新規 *ACTN1* 変異による先天性巨大血小板性血小板減少症の 1 例 : 安富素子 國島伸治 岡崎新太郎 土田晋也 鈴木孝二 吉川利英 谷澤昭彦 大嶋勇成 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 平成 26 年 11 月 岡山
- 11) 発熱時の採血を契機として *May-Hegglin* 異常の診断に至った男児例 : 西村美穂 伊藤早織 中川慎一郎 松尾陽子 大園秀一 上田耕一郎 稲田浩子 松石豊次郎 國島伸治 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 平成 26 年 11 月 岡山
- 12) α IIb(R990W), a constitutive activating mutation of integrin α IIb β 3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with impairment of platelet function : Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S,

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅲ. 学会等発表実績

発表実績

委託業務題目：「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」

機関名：国立大学法人名古屋大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

| 発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別） | 発表者氏名 | 発表した場所（学会等名） | 発表した時期 | 国内・外の別 |
|--|---|---|-------------------|--------|
| Allogeneic hematopoietic cell transplantation for Japanese Fanconi anemia patients with myeloid malignancies. (ポスター) | Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Ohtsubo K, Fukumura A, Itosu M, Muroi K, Koh K, Kato S, Yabe H. | 40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation | 2014年4月 | 国外 |
| Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML (ポスター) | Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Ichikawa M, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Mano H, Kurokawa M | AACR Annual Meeting 2014 | 2014年4月5-9日 | 国外 |
| Role of rATG in treatment of AA. | Seiji Kojima | Educational Meeting : Role of Immunosuppressive therapy in treatment of Aplastic Anemia | 2014年4月26日 | 国外 |
| XLP (X-Linked Lymphoproliferative Syndrome) and EB-Virus infection | Kanegane H | PAS/ASPR Joint Meeting | 2014年5月3-6日 | 国外 |
| Female patient with X-linked lymphoproliferative syndrome type 2 caused by extremely skewed inactivation of X-chromosome | Yang X, Kunitsu T, Ikeda Y, Taga T, Wada T, Yachie A, Yasumi T, Heike T, Kanegane H | PAS/ASPR Joint Meeting | 2014年5月3-6日 | 国外 |
| Mouse models of MYH9 disorders (口頭) | Suzuki N, Kunishima S, Matsushita T | Milwaukee (60th Annual Meeting of the SSC, International Society on Thrombosis and Haemostasis) | 2014年6月 | 国外 |
| GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. (ポスター) | 鎌田 真弓、沖津 庸子、藤原 亨、中嶋 真治、高橋 太郎、井上 あい、福原 規子、大西 康、石澤 賢一、清水 律子、山本 雅之、張替 秀郎 | 欧州血液学会 | 2014年6月 | 国外 |
| Recent progress in diagnosis and treatment of aplastic anemia in children. | Kojima S. | Expert Meeting at Wuhan Union Hospital. Wuhan, China | 2014年7月15日 | 国外 |
| Recent progress in diagnosis and treatment of aplastic anemia in children. | Kojima S. | Expert Meeting at Wharton International Hotel. Wharton, China. | 2014年7月16日 | 国外 |
| Recent progress in diagnosis and treatment of aplastic anemia in children. | Kojima S. | Summit. Hematology Expert Meeting. Guangzhou, China. | 2014年7月17日 | 国外 |
| Recent progress in diagnosis and treatment of aplastic anemia in children. | Kojima S. | South China Hematology Summit. Guangzhou, China. | 2014年7月18日 | 国外 |
| Aplastic Anemia : Therapeutic updated in HSCT. | Kojima S. | 2013 International Forum on Bone Marrow Failure. Tianjin, China. | 2014年8月16日 | 国外 |
| Persistent parvovirus B19 infection resulting in donor cell leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a patient with Fanconi anemia. (ポスター) | Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Yabe M | 26th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Bethesda MA, USA | 2014年9月18-21日 | 国外 |
| Infant Japanese Fanconi anemia patients with the ALDH2-AA genotype. (ポスター) | M. Yabe, A. Hira, H. Yabe, T. Morimoto, A. Fukumura, M. Miyashita, K. Ohtsubo, K. Matsuo, M. Takata. | 26th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Bethesda MA, USA | 2014年9月18-21日 | 国外 |
| X-linked dysgammaglobulinemia associated with somatically reverted memory T cells in a family with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 | Yang X, Nishida N, Hoshino A, Goi K, Kanzaki T, Yoshida K, Muramatsu H, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H | 16th Biennial Meeting of the European Society of Immunodeficiencies | 2014年10月29日-11月1日 | 国外 |