

2015/0024A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）

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

平成 27 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 28（2016）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授)	
II. 分担研究報告書	
1. DBA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	29
伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授)	
土岐 力 (弘前大学大学院医学研究科小児科学 講師)	
2. 遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データ・遺伝子解析	33
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)	
3. ファンconi貧血の臨床データ解析・遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	37
矢部 普正 (東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 准教授)	
4. CDA の臨床データ解析・診療ガイドラインの作成	41
真部 淳 (聖路加国際病院小児科 医長)	
5. 中央診断、DKC と CDA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	45
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授)	
6. 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血) 患者赤血球における eADA と GSH のバイオマーカーとしての有用性	51
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)	
大賀 正一 (山口大学大学院医学系研究科小児科学 教授)	
槍澤 大樹 (東京女子医科大学医学部 助教)	
小倉 浩美 (東京女子医科大学医学部 非常勤講師)	
青木 貴子 (東京女子医科大学病院 臨床検査技師)	
7. ファンconi貧血の遺伝子解析	55
高田 穰 (京都大学放射線生物研究センター 教授)	
8. 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	59
大賀 正一 (山口大学大学院医学系研究科小児科学 教授)	
市村 卓也 (山口大学大学院医学系研究科小児科学 助教)	
東 良紘 (山口大学大学院医学系研究科小児科学 診療助教)	

山城 安啓 (山口大学大学院医学系研究科保健学 准教授)	
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)	
9. 小児期造血障害疾患登録による赤芽球癆など先天性遺伝性貧血の疫学データベース構築	63
小原 明 (東邦大学医学部小児科 教授)	
10. DBA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	67
照井 君典 (弘前大学大学院医学研究科小児科学 准教授)	
11. 遺伝性鉄芽球性貧血の診断確定手技の検討	71
古山 和道 (岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授)	
12. CDA のデータ管理、診断基準の確立	75
多賀 崇 (滋賀医科大学小児科 講師)	
13. 重症先天性好中球減少症の骨髄移植	77
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)	
14. Shwachman-Diamond 症候群の診療ガイドライン作成に関する研究	83
渡邊健一郎 (静岡県立こども病院血液腫瘍科 科長)	
金兼 弘和 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 准教授)	
15. Shwachman-Diamond 症候群に対する造血細胞移植	93
金兼 弘和 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 准教授)	
宮本 智史 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 医員)	
満生 紀子 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 助教)	
渡邊健一郎 (静岡県立こども病院血液腫瘍科 科長)	
16. 先天性血小板減少症のデータ管理・遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	95
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)	
17. DKC の臨床データ、遺伝子解析	99
山口 博樹 (日本医科大学血液内科 准教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	105
IV. 研究成果の刊行物・別冊	119

I. 総括研究報告

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

研究代表者 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：主要な先天性骨髄不全症には、先天性赤芽球癆（DBA）、Fanconi 貧血（FA）、遺伝性鉄芽球性貧血(SA)、congenital dyserythropoietic anemia(CDA)、Shwachman Diamond syndrome(SDS)、先天性角化不全症（DKC）、先天性好中球減少症（SCN）、先天性血小板減少症（CTP）の 8 疾患がある。本研究班は、8 つの疾患別研究拠点から構成され、各研究拠点は疫学調査、臨床データおよび検体の収集、既知の原因遺伝子解析とバイオマーカーなどの特殊検査を担当した。本研究では、発症数が少なく共通点の多いこれらの 8 疾患の医療水準の向上をより効果的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進した。先天性骨髄不全は、稀少疾患であるため、症例を効率的に集積できなければ研究の進展は困難である。このため、海外との共同研究を視野に入れた先天性骨髄不全の WEB 登録システムの構築を行った。これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行った。遺伝子診断を全例に行ったが、原因遺伝子が不明な 20 家系 49 名（非罹患者家族も含む）について全エクソン解析を行った。その結果、臨床診断が DBA であった 2 家系が、他の先天性骨髄不全症と診断された。1 家系 3 症例は *TERT* 遺伝子に変異が認められ、先天性角化不全症(DKC)と診断された。他の 1 家系 2 症例は SBDS 遺伝子に変異を認め、Shwachman Diamond syndrome (SDS) と診断された。FA は、遺伝子診断を行った症例が 106 例となった。日本人に特有であるアルデヒド分解酵素（ALDH2）のバリエーションが FA 患者の骨髄不全の増悪因子であることが確認され、特に AA 群では、生後早期より重症な血球減少と形態異常を呈する症例を認めた。DKC と臨床診断された 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* 遺伝子の大欠失による DKC 症例を初めて発見した。不全型 DKC は、11/21 症例で既知の遺伝子変異が認められた。治療に関しては、10 症例に蛋白同化ステロイドホルモン療法が施行され、3 症例に血液学的データの改善が得られた。また、造血幹細胞移植は 13 症例に行われ、11 症例で長期生存が得られた。CTP は、19 例の先天性血小板減少症を疑う症例について系統的鑑別診断解析を施行した。13 例で原因遺伝子を同定した。ACTN1 異常症の診断に有用なバイオマーカーを見出した。稀少疾患である先天性造血不全症は、診断から治療まで一貫した登録システムの確立、長期フォローアップ体制と最良の治療法の提供までのガイドライン作成が重要である。平成 27 年度は、5 疾患（DBA、FA、SA、CDA、DKC）の診断基準および 3 疾患（DBA、SA、CDA）の重症度分類の改定、さらに 5 疾患（DBA、FA、SA、CDA、DKC）の診療ガイドラインの改定と 3 疾患（SDS、SCN、CTP）の診療ガイドライン策定を行った。

【研究分担者氏名】

張替秀郎：東北大学大学院医学系研究科教授

小島勢二：名古屋大学大学院医学系研究科教授

矢部普正：東海大学医学部准教授

菅野 仁：東京女子医科大学教授

真部 淳：聖路加国際病院院長

高田 穰：京都大学放射線生物研究センター教授

大賀正一：山口大学大学院医学系研究科教授
小原 明：東邦大学医療センター大森病院教授
照井君典：弘前大学大学院医学研究科准教授
古山和道：岩手医科大学教授
多賀 崇：滋賀医科大学講師
小林正夫：広島大学大学院医歯薬保健学研究院教授
渡邊健一郎：静岡県立こども病院科長
金兼弘和：東京医科歯科大学准教授
國島伸治：国立病院機構名古屋医療センター室長
山口博樹：日本医科大学准教授

【研究協力者氏名】

土岐 力：弘前大学大学院医学研究科講師
倉光 球：国立感染症研究所研究員
佐藤知彦：弘前大学医学部附属病院助教
下村麻衣子：山口大学大学院医学系研究科助教
東良 紘：山口大学大学院医学系研究科診療助教
山城安啓：山口大学大学院医学系研究科准教授
市村卓也：山口大学大学院医学系研究科診療助教

A. 研究目的

我が国における実態が不明であった先天性骨髄不全症においても、平成 21 年度以降、8 疾患（先天性赤芽球癆 (DBA)、Fanconi 貧血 (FA)、遺伝性鉄芽球性貧血 (SA)、Congenital dyserythropoietic anemia (CDA)、先天性角化不全症 (DKC)、Shwachman Diamond syndrome (SDS)、先天性好中球減少症 (SCN)、先天性血小板減少症 (CTP)) が、厚労省難治性疾患克服研究事業に採択され、全国疫学調査、臨床データの収集、遺伝子解析が行われ、実態が明らかにされつつある。本研究申請では、共通点の多いこれらの 8 疾患の医療水準の向上をより効果的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進する。これまでの班研究により、DBA では通常のシーケンスでは同定できない既知の原因遺伝子の片アレル欠失が約 10% も存在することを明らかにした (Blood 2012)。新規原因遺伝子 RPS24 と RPL27 も同定した。さらに、新規バイオマーカーとして赤血球還元グルタチオン (GSH) を同定し、赤血球アデノシンデアミナーゼ (eADA) 活性と組み合わせることにより診断精度を向上させることを見出した。FA では、アルデヒド代謝酵素 ALDH2 酵素活性の欠損をもたらす多型が骨髄不全の進行を強く

促進することを明らかにした (Blood 2013)。CTP でも、新規原因遺伝子 ACTN1 の同定に成功した (Am J Hum Genet, 2013)。しかし、DBA、FA、DKC などの約 50% で原因遺伝子が不明である。さらに、DBA と臨床診断された症例が遺伝子解析により DKC と確定診断されるなど、遺伝子診断が正確な診断のために必須な症例が複数存在することが明らかとなった。このため、これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行う。平成 26 年度は、遺伝子診断の結果も含めて、国際共同研究を視野に入れた共通のデータベースを基にした先天性造血不全の WEB 登録システムの構築を行う。平成 27 年度は、データ収集と観察研究を継続し、より正確な先天性造血不全の実態の把握を行い、エビデンスに基づいた診断基準の改定、重症度分類の確立、診断・治療ガイドラインを策定する。

B. 研究方法

本研究申請では、発症数が少なく共通点の多い先天性造血不全症の医療水準の向上をより効果的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進する。本研究班は、8 つの疾患別研究拠点から構成され、各研究拠点 (DBA (伊藤)、SA (張替)、FA (矢部・高田)、CDA (小島・真部)、DKC (小島、山口)、SDS (渡邊)、SCN (小林)、CTP (國島)) は、疫学調査、臨床データおよび検体の収集、遺伝子診断のための既知の原因遺伝子解析とバイオマーカーなどの特殊検査を担当する。研究代表者 (伊藤) が、DBA の研究を担当するとともに研究全体を統括する。平成 26 年度は、遺伝子診断の結果も含めて、国際共同研究を視野に入れた共通のデータベースを基にした先天性造血不全の登録システムの構築を行う。平成 27 年度は、データ収集と観察研究を継続し、より正確な先天性造血不全の実態の把握を行い、エビデンスに基づいた診断基準の改定、重症度分類の確立、診断・治療ガイドラインを策定する。以下に、具体的な研究計画及び方法を述べる。

平成 26 年度

1) 疫学調査と疾患登録データベースの構築

本年度は、先天性造血不全の 8 疾患について治療

成績も含めた疫学調査を行い、詳細な疫学情報を収集する（小原、大賀、張替、矢部、多賀、真部、小島、渡邊、小林、國島）。

得られた症例の臨床情報や遺伝子解析の結果も含めて、共通のデータベースを基にした先天性造血不全の登録システムの構築を行う。海外との共同研究を視野に入れ、中国、韓国、インドの血液専門医とアジアにおける先天性造血不全の WEB 登録システムの構築を計画している。既に、このためのデータシートは作成済みである（小島、小原、大賀、伊藤）。

2) 中央診断

先天性造血不全症の疑い例が発生すると、日本小児血液・がん学会の登録システムを用いて疾患登録が行われる。末梢血や骨髄血塗抹標本を名古屋大学（小島）と聖路加国際病院（真部）で中央診断し、先天性造血不全症が強く疑われる場合は各疾患拠点でさらに詳細な診断（3）、4）を行う。既に、この4年間で 1,000 例の造血不全症の診断が行われ、その 10%以上が先天性造血不全であった。

3) バイオマーカーによるスクリーニング

DBA の疑い症例では、新規バイオマーカーである赤血球 GSH と eADA 活性を同時測定し、SVM 法による判別式による判定を行う（菅野）。DKC の疑い症例では Flow FISH 法による血球テロメア長のスクリーニングを行う（小島）。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 法も用いた（山口）。

4) 遺伝子診断と症状に影響する modifier 遺伝子の同定

遺伝子診断のため、原因遺伝子の解析を直接シーケンス法、あるいは次世代シーケンサーを用いたターゲット・シーケンス法、あるいは全エクソンシーケンシングで行う。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り回数 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 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、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。

DBA 症例では、上記に加え、定量的 PCR 法と SNP アレイで RP 遺伝子の欠失を解析する。

FA 症例については、高レベルのモザイク症例も多く、特にリンパ球にリバージョン・モザイクを起こし、遺伝子変異が末梢血では同定不可能な症例もあるため、変異が同定されない場合は骨髄細胞や皮膚・骨髄線維芽細胞を用いて解析も行う（矢部・高田）。また、通常の直接シーケンス法では、既知の原因遺伝子の欠失を検出できないため、DBA 研究班が開発した定量的 PCR 法と SNP アレイあるいは Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) を用いて片アレル欠失の有無を解析する（各研究拠点）。

SA 症例では、*ALAS2* 遺伝子第 1 イントロンに存在する赤芽球特異的エンハンサーに変異を有する家系が存在することを明らかにした。診断を確定するために、ゲノム編集技術により赤芽球系培養細胞の *ALAS2* 遺伝子のエンハンサー部分に変異を導入し、実際にヘム生合成量が低下するかどうかを解析する。

FA と DBA が確定された症例について、アセトアルデヒドの分解酵素である *ALDH2* 遺伝子解析を Taqman PCR 法による検討を行う（高田、伊藤）。平成 27 年度は、さらに FA 追加症例での *ALDH2* 遺伝子型検索を行った。また、AA 型 FA 児の母親の遺伝子型も検索の対象とした。

5) 診療ガイドラインの作成

得られた情報は、データベースを構築し（小原、大賀）、各疾患の研究班の診断システムの構築および治療ガイドラインの作成に役立てる。移植プロトコールを含む治療ガイドラインを作成する（伊藤、大賀、真鍋、矢部、小島）。

平成 27 年度

正確な診断に基づくデータの収集と観察研究を継続することにより、より正確な先天性造血不全の実態を把握し、先天性造血不全の登録システムに情報を収集する。収集された情報を基に、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS 委員会と連携を取りながら、より多くのエビデンスに基づいた診断基準、重症度分類、診断・治療ガイドラインの策定・改正を行う。なお、治療ガイドラインは造血幹細胞移植のプロトコルを含む実用的なものを策定する（伊藤、張替、大賀、真部、矢部、渡邊、小林、國島、小島）。

（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、個人情報を守秘を厳守し、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

1) 疫学調査と疾患登録データベースの構築

a. DBA

1. 日本小児血液・がん学会疾患登録事業を一次調査とする DBA などの小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築した。日本小児血液・がん学会疾患登録事業の 2006～2014 年診断登録症例数を表に示す（表 1）。
2. 疾患登録（一次調査）症例：2014 年診断症例は、日本小児血液・がん学会会員 232 施設の 74% に相当する 171 施設が登録した。2006～2014 年の新規診断 DBA 症例は 74 例、特発性赤芽球癆は 40 例、2008～2014 年の鉄芽球性貧血は 5 例、

Congenital dyserythropoietic anemia は 3 例であった。

3. 小児慢性疾患医療助成には平成 24 年に 101 件の「先天性赤芽球癆・赤芽球癆」が申請されていた。24 年の新規申請件数は 13 件、そのうち 24 年新規診断症例は 6 件であり、88 件は継続申請であった。この症例数は、疾患登録データと異なっている（表 2）。意見書病名の先天性赤芽球癆、DBA 症例の診断時年齢は乳児期であったが、赤芽球癆病名は 1 歳以上 14 歳までにも分布しており、疾患登録データベース Idiopathic PRCA 症例が少なからず混入している可能性が高い。古典的 DBA 診断基準や、DBA 遺伝子診断に準拠していない、または合致しない症例が病名赤芽球癆として含まれている可能性が高い。小児慢性疾患医療助成の継続申請 88 件の医療状況は、診断時よりも改善が 29 例、寛解 18 例（合計 47 例 53%）、不変 37 例、無記入 4 例であった。不変 37 例では 22 例がステロイド薬投与中で、11 例が除鉄治療中であった。輸血依存性についてはデータが収集されていなかった。

b. DKC

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 症例であった。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%）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/ μ 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/ μ 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/ μ l 以下は 1/3 (33.3%) 症例のみ、血小板数 20000/ μ l 以下も 1/3 (33.3%) 症例のみに認められたのに対して、Hb7g/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初めての報告になる。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、*TERT* c.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 (cryptic DKC : cDKC) 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 症例 (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 のように血小板減少を認める症例が顕著に多いということはなかった。骨髄検査に関しては、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。

6. DKC や不全型 DKC に対しての治療

シクロスポリンやステロイドなどの免疫抑制療法は、4 症例 (DKC 3 症例、cDKC 1 症例) に施行さ

れたが明らかな有効性は得られなかった。蛋白同化ステロイドホルモンに関しては、10 症例 (DKC 5 症例、HHS 2 症例、cDKC 3 症例) に施行されたが、3 (30%) 症例に血液学的データの改善が得られた (DKC : 貧血の軽度改善 1 症例、血小板減少の改善 1 症例、HHS : 血小板減少の軽度改善 1 症例)。造血幹細胞移植は 13 症例 (DKC8 症例、HHS2 症例、cDKC3 症例) に行われ、1 症例は移植後ウイルス性脳炎、1 症例は肺線維症による呼吸不全で死亡しているが、他の 11 症例は長期生存が得られた (移植後 10 年生存率 69.2%)。

c. 重症先天性好中球減少症 (Severe congenital neutropenia, SCN) に対する移植成績

先天性好中球減少症 (Severe congenital neutropenia, SCN) は慢性好中球減少、骨髓像での前骨髓球・骨髓球での成熟障害、生後早期よりの重症細菌感染症の反復を特徴とする難治性遺伝性疾患である。2015 年の原発性免疫不全症の最新分類では、食細胞異常症の中に好中球減少症として SCN1 から SCN5 まで責任遺伝子によって分類されている。G-CSF 製剤の投与により感染症に対しての生命予後は劇的に改善されたが、長期の G-CSF 投与により骨髓異形成症候群 (MDS) や急性骨髓性白血病 (AML) への進展が約 30% に報告されている。近年では、根治療法として造血幹細胞移植が行われる症例の頻度が増加している。しかし、造血幹細胞移植におけるドナーソースの選択、移植時期、前処置法等についての見解は一定ではない。本邦症例の集積では、骨髓破壊的、非破壊的前処置にかかわらず、5 例が拒絶されており、安全な治療に至っていない現状である。今回、広島大学病院で施行した SCN 症例の初回骨髓移植について検討を行った。

7 症例の一覧を表 3 に示す。年齢は 2 歳から 19 歳 (中央値 4 歳) で、症例 2 を除いて *ELANE* 変異例であった。全例で重症細菌感染症を経験していた。全例で G-CSF による治療が行われていた。移植ソースは骨髓を使用し、HLA 一致の血縁者ドナーが 3 例、HLA 一致の非血縁者ドナーが 2 例、HLA1 座不一致の非血縁者ドナーが 1 例であった。前処置は、免疫抑制効果を最大限に発揮できる骨髓非破壊的レジメンを選択し、Flu、CY、Mel、ATG、TBI を使用し

た。当科で移植を開始した当初は、HLA 一致の血縁ドナーでは ATG を使用していなかったが、症例 3 のように混合キメラとなる例を認めたため、ATG が必要と判断した。症例 7 は、ウイルス感染を考慮して ATG を 1/4 量で使用した。表 4 に移植結果を示す。症例 1-6 は全例生着したが、HLA 一致血縁者ドナーの症例 3、4 では、混合キメラとなったために DLI を繰り返し、症例 3 は安定した混合キメラ、症例 4 はほぼ完全キメラ状態となっている。好中球絶対数は十分であり、易感染性なく移植後数年経過している。症例 7 は、移植細胞源の条件、輸注細胞数ともに許容範囲内と判断できるが、早期拒絶であったことは前処置の免疫抑制が不十分と考えられた。症例 4 は、血縁者間で ATG も十分量使用したが、混合キメラ状態だったことは輸注細胞数が若干少なかったことが影響していると考えられた。本症における生着に関しては、前処置での免疫抑制効果を図ること、輸注細胞数は可能な範囲で十分量あることが推測された。いずれの症例に関しても GVHD は軽度、performance status 100% で全例生存していることは、前処置、輸注細胞数を考慮した移植が有効であることを示しているものと思われた。

2) バイオマーカーによるスクリーニング

DBA は、リボゾーム機能不全によって発症する先天性芽球癆である。我々は、平成 22 年度から始まった研究班において、赤芽球系細胞における最も重要な抗酸化物質である赤血球還元型グルタチオン (GSH) が DBA の新規バイオマーカーであることを同定した。赤血球アデノシンデアミナーゼ活性 (eADA) と GSH を同時に検討することで、遺伝子検査により確定診断し得た DBA 症例と同一家系内非罹患者の識別を可能とする判別式を得た。平成 27 年度は、新たに DBA 疑い 5 症例を解析し、従来の診断基準および eADA 単独測定との比較で、eADA/GSH 同時測定の有用性について検討した。古典型 DBA の中で eADA が基準値内である症例が、eADA/GSH 値を用いた判別式により DBA と判定できることを示した。診断基準項目には骨髓所見が含まれており、末梢血を用いて実施可能な eADA/GSH 測定は侵襲性が小さい点で臨床的な有用性があると考えられた。

3) 遺伝子診断

a. DBA

DBAの原因遺伝子として10種類のリボソームタンパク(RP)遺伝子(*RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*, *RPL26*)と*GATA1*遺伝子が知られている。最近我々は、新規原因遺伝子*RPS27*および*RPL27*を同定した(Wang R et al. Br J Haematol 2014)。DBAの遺伝子診断を効率的に行うために、次世代シーケンサー(MiSeq)を用いてこれらの13遺伝子を一度に解析するターゲットシーケンスのシステムを開発した。この方法では、新たな原因遺伝子を容易に追加できる。

本年度は、このシステムを用いて新規症例15名の遺伝子診断を行い、8例(*RPS19*4例、*RPL11*2例、*RPS7*1例、*RPS24*1例)で既知の原因遺伝子を同定した。これまでに遺伝子検査を施行した症例は、163例となった。ターゲットシーケンスで原因遺伝子が不明で、かつSNPアレイで解析してもRP遺伝子の欠失が検出されない20家系49名(非罹患者も含む)について、全エクソン解析を行った。その結果、臨床診断がDBAであった2家系が、他の先天性骨髄不全症と診断された。1家系3症例は*TERT*遺伝子に変異が認められ、先天性角化不全症(DKC)と診断された。他の1家系2症例は*SBDS*遺伝子に変異を認め、Shwachman Diamond syndrome (SDS)と診断された。その他に、RP遺伝子以外の原因候補遺伝子を同定し、解析を進めている。これらのデータを基に、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら、エビデンスに基づいた診断基準および診断・治療ガイドラインの改訂を行った。これらの成果物を日本小児血液・がん学会の承認を受けて、学会公認の診療ガイドラインとする予定である。

b. FA

高田研究室にて、東海大学症例87例、京都大学症例10例、名古屋大学症例9例の総計106例のFA遺伝子解析が行われた。内訳は、*FANCA*: 61例(うち11例は片アレル確認)、*FANCB*: 3例、*FANCD1*: 1例、*FANCE*: 1例、*FANCF*: 1例、*FANCG*: 24例(うち1例は片アレル確認)、*FANCI*: 3例(3例とも片アレル確認)、*FANCP*: 3例(うち1例は片

アレル確認)、*FANCT*: 2例、不明: 7例であった。海外で比較的高頻度にみられる*FANCC*は今回の解析では、1例も検出されなかった。今まで16のFA遺伝子異常が報告されていたが、2015年に3つの新規遺伝子(*FANCR*, *FANCS*, *FANCT*)が報告された。そのうち*FANCT*は、上記に記載した日本人FA患者2例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同定され、日本から初めての新規FA遺伝子である。*FANCA*と*FANCG*の占める割合が多く、臨床データの解析が可能であった東海大学87例のうち、*FANCA*は50例(57%)、*FANCG*は22例(25%)であり、両者における身体異常などの表現型には有意差はみられなかったが、骨髄不全の発症は*FANCG*の患者で有意に早かった。また、*FANCB*の2症例では身体合併奇形が極めて多く、海外報告例と一致した。*ALDH2*の解析は79例に行われ、*ALDH2-AA*: 6例、*ALDH2-GA*: 32例、*ALDH2-GG*: 41例であった。*ALDH2*のバリエーションがFA患者の骨髄不全の増悪因子であることがさらに確認された。

我々の従来の検討で、106例のFA患者の分子診断を試み、うち61例が*FANCA*、24例が*FANCG*の変異が原因であると判断された。欧米でかなりの頻度で認められる*FANCC*の変異は、1例も認めていない。*FANCA*症例のうち、約半数の31例のc.2546delC、*FANCG*症例は、c.307+1G>Cないしc.C1066Tによるものであった。従って、日本のFAの約半数は、この三つの変異のいずれかを持つことが期待され、この三つをテストすれば、半数の患者で一応の分子診断が確定すると考えられる。そこで、新規患者の分子診断の依頼があった場合、まずゲノムからのPCRとシーケンスでこの三カ所の変異の確認をすることにした。

平成27年度、3例の成人FA疑い症例の検査依頼を受けた。3例とも、一週以内に一応の結論に至ることができた。一例では、*FANCA* c.2546cdelCをヘテロで、一例は*FANCG* c.307+1G>Cをホモで認め、それぞれ*FANCA*と*FANCG*変異による症例と考えられた。*FANCA*の変異は片方アレルしか検出できておらず、さらにMLPAも行ったが、欠失はないようである。*FANCA*の遺伝子のどこかにもう片方アレルの変異がある可能性が高いが、アプローチとし

ではターゲットエクソーム解析が正確であり、望ましい。もう一例は、いずれの変異も認めず、FAでないか、他の部位に変異があると考えられる。

以上の結果を踏まえて、Fanconi 貧血の診断基準、重症度基準、診療ガイドラインの作成および改訂を行った。診断基準は血球減少をはじめ、種々の身体異常、染色体不安定性に加えて、新規遺伝子を加えた遺伝学的検査と鑑別診断を総合した判断とした。重症度分類は、再生不良性貧血に関しては後天性再生不良性貧血の重症度分類を用いて評価することとした。ガイドラインは、上記診断基準と重症度分類に加えて、疫学、病因・病態、詳細な臨床症状、造血幹細胞移植を含んだ治療指針、長期フォローアップとマネジメント、問題点と将来展望に至るまで、疾患を網羅できる形で作成した。

c. SA

平成 27 年度に登録された新規症例は、2015 年生まれの女兒、家族歴なし。胎児水腫にて出生し、高度の貧血 (Hb 3.3g/dL) を含む汎血球減少を認めた。骨髓検査を行ったところ、赤芽球中の環状赤芽球比率 30% を認めたため、Pearson 疑いとして本調査研究に登録となった。登録時点では脾臓症状・神経筋症状は明らかでない。本人の末梢血液細胞を用いた解析の結果、Pearson 症候群で高頻度に報告のあるミトコンドリア 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。

また、昨年度に登録された遺伝性鉄芽球性貧血疑いの 2012 年生まれの女兒については、解析の結果、*SLC25A38* 遺伝子の Homozygous 変異 (479_480insT, S160fs) が同定された。本変異は既報と同一箇所の変異であるため (Wong et al. J Clin Pathol 2015)、これが原因遺伝子であると考えた。

ゲノム編集技術を用いて K562 細胞の *ALAS2* 遺伝子の両方のアレルのエンハンサー配列に変異が導入されると、*ALAS2* mRNA の発現は野生型の K562 細胞の 10-20% まで低下した。そのような細胞では、ヘモグロビン産生能も低下していた。また、患者赤芽球で観察されるような典型的な環状鉄芽球は観察

されなかったが、変異導入細胞では細胞内に鉄の沈着が増加しているような像が観察された。さらに、ミトコンドリア型フェリチンの mRNA の発現も増加していたが、その程度は数倍から数百倍の間で大きな開きがあり、ミトコンドリア型フェリチンの発現は、*ALAS2* の発現量以外にも様々な環境要因により変化する可能性が示唆された。また、*CLPX* 遺伝子についても同時に両方のアレルに変異を導入することに成功し、*CLPX* のタンパク質の発現を欠失した細胞を得ることができたが、他の細胞と同様に明らかな形質の変化は認めなかった。

d. CDA

CDA と形態診断され同意を得た症例について遺伝子診断を行った。3 例に遺伝子変異を確認し、すべて I 型の責任遺伝子 *CDAN1* の変異 (P185fs, P293R, R725W, P672L) を認めた。

3 例の臨床的像を示す。3 例ともに女性で、発症は 2 例が生下時から重度の貧血を呈したのに対して、1 例は 12 歳時に胃腸炎の際の血液検査で貧血が確認されている。血液検査値は、Hb が 8.1~10.1g/dL、網状赤血球が 7~27%、MCV が 83~94 であった。骨髓検査では 3 例ともに CDAI 型に特徴的とされる赤芽球の核間架橋を認め、形態学的にも CDAI 型を疑うことは可能であった。

e. SCN

SCN は、慢性好中球減少、骨髓像での前骨髓球・骨髓球での成熟障害、生後早期からの重症細菌感染症の反復を特徴とする遺伝性疾患である。現在までに 10 種類以上の責任遺伝子が同定されているが、欧米、本邦ともに好中球エラスターゼ遺伝子 (*ELANE*) の変異を約 75% に認めている。今回、広島大学小児科にて初回移植を行った SCN 7 例中 6 例が *ELANE* 変異例であった。

f. 先天性血小板減少症

本年度 (平成 27 年 4 月~平成 28 年 1 月現在) は、19 例の先天性血小板減少症を疑う症例を解析し、*MYH9* 異常症 10 例、Bernard-Soulier 症候群ホモ接合体 1 例・ヘテロ接合体 1 例、*ACTN* 異常症 1 例の診断に至り、6 例は確定診断されなかった。

MYH9 異常症については、タイ国との共同研究を進め、研究成果を論文に報告した。

自動血球計数装置による未熟血小板分画測定が、先天性巨大血小板症の鑑別診断に有用であることを報告した。

ACTN1 異常症の診断は、*ACTN1* 遺伝子配列解析により行っていたが、スライドガラス上への進展血小板におけるミオシン局在異常の同定が診断に有用なバイオマーカーになることを見出した。

4) 診断基準と重症度分類の確立・改定

本研究では、平成 26 年度に 3 疾患 (SDS、SCN、CTP) の診断基準の作成および 5 疾患 (DBA、CDA、SDS、SCN、CTP) の重症度分類の作成を行い、平成 27 年度には、5 疾患 (DBA、FA、SA、CDA、DKC) の診断基準および 3 疾患 (DBA、SA、CDA) の重症度分類の改定、さらに 5 疾患 (DBA、FA、SA、CDA、DKC) の診療ガイドラインの改定と 3 疾患 (SDS、SCN、CTP) の診療ガイドライン策定を行った。今年度中に、これらの診断基準、重症度分類と診療ガイドラインの日本小児血液・がん学会での承認を目指す。

D. 考察

日本小児血液・がん学会疾患登録事業は、2006 年に開始され、会員施設において診断された全ての血液疾患を対象にした全数把握疫学研究事業である。このデータベースは基礎情報のみであり、診断方法の開発、適切な診断基準の改正、治療研究の基礎資料に資する為には詳細 (二次) データの収集、症例をコホート化した追跡調査研究が必要である。本研究成果の基礎データベースに基づき、二次データの収集を企画している。

一方、小児慢性特定疾患医療費助成は公的助成事業であり、主治医意見書に基づいて患者自由意思により申請されている。学会疾患登録よりも広い臨床情報収集を期待した。今回の小慢データとの比較検討では、学会疾患登録との病名の不統一、古典的 DBA 診断基準適用の有無、申請者の自由意思などによると想像される年度症例数の違いが明らかになった。一方で、学会疾患登録では把握できていない臨床情報が得られており、今後の疾患データベース構

築の際の必要項目設定の参考になった。また、小慢データは診断後長期になると継続申請症例数が減少するので、長期フォローアップ、コホート研究には不向きであることも明らかであった。

以上の成果を踏まえて次年度は、「小児造血障害」データベース特異的な調査項目を順次整理する。その際には、海外の同様のデータベースと比較検討できる共通基本項目を海外との情報交換で調査整備する必要がある。

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、臨床診断が DBA であった 2 家系が、他の先天性骨髄不全症と診断された。

初年度の研究で新規原因候補遺伝子として見出された *RPS15A* が、AMED-DBA 研究班 (伊藤班) との連携で、新規原因遺伝子として確定した。既に、我々は 2 つの新規原因遺伝子 (*RPS27* と *RPL27*) を見出しているの、この発見により、我が国から新規に発見された DBA 原因遺伝子は 3 個となった。

これまで DBA には重症度分類がなかったが、重症度分類も策定され、診断基準や診療ガイドラインも改定され、大きな研究成果があった。今回検討した 5 症例のうち、家族歴があるのは 1 例、先天奇形を有する症例は 2 例であり、先天性赤芽球癆 (DBA) の定義で古典型 DBA と診断された例は、1 例のみであった。非古典型あるいは非 DBA とされた 4 症例について eADA を検討したところ、症例 1、3、4 に eADA 高値が認められ、DBA バイオマーカーとしての eADA の有用性が再確認できた。症例 5 は、DBA の定義、eADA によって非 DBA と判定されたが、経過観察中に貧血は自然軽快したことから TEC と診断された。

従来の診断基準および eADA 測定に加えて GSH を測定することの意義としては、症例 2 のように古典型 DBA の中で eADA が基準値内である症例に対して eADA/GSH 値を用いた判別式が DBA と判定できることにあると考えられる。診断基準項目には、骨髄所見が含まれており、末梢血を用いて実施可能な eADA/GSH 測定は侵襲性が小さい点で臨床的な有用性があると考えられた。

ファンconi貧血 (FA) の遺伝子変異は、民族による差がみられ、日本人 FA 患者の 100 例を超える疫学

集積が可能であった。エクソーム解析等を用いた遺伝子解析は、従来の方法では検出できなかった *FANCT* 変異を確定することができた。19 におよぶ FA 遺伝子毎の臨床的特徴も徐々に明らかになりつつある。臨床症状や染色体などの機能解析では FA と診断されながら、既知の遺伝子が同定されない症例がみられ、FA の新規遺伝子の可能性があり、今後の解析に期待したい。また日本人では、FA 原因遺伝子とは異なる *ALDH2* のバリエントが FA 患者の骨髄不全の進展に大きく影響する。今後は、再生不良性貧血の重症度だけでなく、*ALDH2* の遺伝子型も含めて、身体異常や骨髄不全の進展、造血器腫瘍や固形がんの発症を加味した重症度も考慮すべきかもしれない。また、今回工夫した方法は、少なくとも半数程度の患者に迅速に分子診断を提供でき、临床上、小島班におけるターゲットエクソーム解析の前段階として、ある程度の有用性があると考えられた。FA の診断、診療に寄与できるものである。

FA 患者の診断は、臨床所見と血液リンパ球における DEB ないし MMC 刺激後の染色体脆弱性試験陽性でもって行われる。さらに、MMC 刺激下の細胞周期の G2 での停止、*FANCD2* 蛋白質のモノユビキチン化の消失(コア複合体成分の変異や *FANCI* 変異ではこの所見が観察される)、*PALB2*(*FANCN*)、*BRCA2*(*FANCD1*)、*RAD51C*(*FANCO*) 変異での *RAD51* フォーカスの低下なども参考所見として有用である。患者の原因遺伝子ごとのサブタイプの違いを観察するという研究的な意味のみならず、異常遺伝子を確定する分子診断は、臨床家に診断への信頼性を上げるという意味でも有用性があると考えられる。しかし、FA の原因遺伝子はしばしば巨大なゲノム領域にわたり、しかも変異の種類が膨大なため、分子診断は困難を極めてきた。この状況を打破する決定打が次世代シーケンサーを使用したエクソーム解析、ターゲットエクソーム解析であるが、費用、手間、かかる時間など、未だ臨床現場からのニーズに十分に答えられる状況にはないと思われる。

今回、100 例を超える日本人 FA 患者の分子診断の蓄積から、半数の患者でしか変異を同定できないが簡便かつ迅速に分子診断結果を提供できるよう工夫してみた。実際に今回施行した 3 例の患者では、非常に短期間に結果を得ることができ、ある程度の有

用性が明らかであった。

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)。しかし、今回の解析を通じてアジア地域にも *SLC25A38* 変異例が存在することが示された。しかしながら、欧米との頻度の差異については症例数が少なく結論が得られていない。本年度に登録された症例は、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。

ミトコンドリア型フェリチンの発現亢進という特徴が観察されたことから、赤芽球系培養細胞の K562 細胞にゲノム編集技術を用いて変異を導入することにより、疾患モデル細胞が比較的簡便に作成できる可能性が示された。さらに、ゲノム編集技術を用いた染色体上の遺伝子への変異の導入は特定の遺伝子に限定されるものではなく、様々な遺伝子で変異の導入が可能であることも明らかとなった。一方で、*ALAS2* 遺伝子の発現を低下させた K562 細胞では、鉄芽球性貧血における最も大きな特徴である環状鉄芽球の観察が困難であったことから、このシステムの限界も明らかになった。環状鉄芽球が観察できない理由については明らかではないが、ミトコンドリア型フェリチンを大過剰に発現させた後に鉄が過剰な環境で K562 細胞を維持した場合には、環状鉄芽球様の細胞が観察されたとの報告があることから、K562 細胞においては *ALAS2* の発現抑制だけではミトコンドリア型フェリチンの発現誘導が十分ではない可能性は否定できない。また、K562 細胞が白血病細胞由来の細胞で、ヘモグロビン合成能は有するが、脱核するまで分化・成熟しないことが影響している可能性もある。従って、現在の変異導入 K562

細胞を用いてさらに検討を進めるのに加えて、iPS細胞などのヒト由来の非腫瘍性培養細胞を用いて同様の検討を進める予定である。

我が国でも CDA 患者が一定数存在することが明らかになったが、諸外国に比べ稀な疾患なのか、軽症例が多く見逃されているのかなは未だに不明である。遺伝子解析を進めるとともにスクリーニングする集団を広げていき、実態を明らかにする必要がある。実際、臨床的に CDA と診断された症例で通常は遺伝性橢円赤血球症でみられる *SPTA* 遺伝子の変異や遺伝性球状赤血球症でみられる *ANK1* 遺伝子の変異が見つかった。

形態学的に CDA が疑われた症例のうち、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。3 例ともに CDA I 型の変異が確認され、骨髓像では I 型に特徴的な赤芽球の核間架橋を認め、CDA I 型の診断には重要な所見と考えられた。II 型や III 型の変異は確認されなかったことから、日本人には I 型が多いのかもしれない。

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える。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。*TERT* 遺伝子変異の大欠失の症例は初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大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できなかった。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揃わず、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える。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。

DKC や cDKC に対しての現在の治療は、蛋白同化ステロイドホルモンを投与するか同種造血幹細胞移植となる。蛋白同化ステロイドホルモンは、細胞内でエストロゲンに変換され、*TERT* の promoter 領域のエストロゲン結合領域を介してテロメララーゼ活性を亢進させると考えられている。これまで DKC の約 2/3 の症例に有効性があると報告されているが、実際にどのくらいの症例に効果があるのかは明確には示されていない。今回の研究において、約 1/3 の症例で何らかの血液学的改善が認められているが、その効果は限局的で DKC や HHS に対しての有望な治療とは言い難い。一方、DKC や HHS の重篤な骨髓不全症に対しては、同種造血幹細胞移植が有効ではあるが、移植後の肺合併症などでその治療成績はそれほど良いものではないと考えられてきた。しかし、今回の研究においては、約 70% の症例が 10 年

生存をしており前処置などに工夫をすることによって有望な治療法となるのではないかと考えられた。

近年、先天性血小板減少症の中で大型／巨大血小板を有する先天性巨大血小板症の病因病態解析は進んでいる。本年度は、我々が独自に確立中である先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断解析により19例を解析し、13例(68.4%)の症例で確定診断が得られた。MYH9異常症は、10例(52.6%)と最も高頻度に診断された。MYH9異常症10例中、3例では白血球封入体を認めず、原因不明の血小板減少症あるいは新生児同種免疫性血小板減少症と診断されていたが、末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析と局在分類により確定診断された。Bernard-Soulier症候群については、フローサイトメトリーにより1例のホモ接合性患者と1例のヘテロ接合性患者が診断された。

末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析は、遠隔地からの解析依頼にも対応可能であるため、タイ国との共同研究を進めてきた。昨年度からの継続した研究において、21症例の塗抹標本を解析し、5例のMYH9異常症を同定した。

2013年に我々が同定したACTN1異常症は、中等度の血小板減少(8-10万/ μ l)と大小不同を伴う大型血小板を呈し、出血症状は軽度である。特異的な検査所見は認められず、診断は遺伝子検査のみで可能であり、簡便な検査診断法の開発が望まれていた。アクチンは細胞内においてミオシンと結合し、細胞の形態変化と移動において挙動を共にするため、アクチニン変異によりアクチンを介してミオシンの局在が異常となる可能性を考えた。正常血小板をスライドガラス上に進展させるとミオシンは血小板辺縁へと移動するが、ACTN1異常症血小板では、一部のミオシンは中心部に残る。すなわち、アクチニン異常の代理マーカーとしてミオシン局在異常を同定することでACTN1異常症を診断できることが明らかとなった。

E. 結論

学会疾患登録事業一次調査情報データベースを小慢データと比較し、詳細な二次データを含む「小児造血障害」データベース構築の基盤が整った。

これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有

し、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行った。

DBAの遺伝子診断を進め、精度の高いDBAのデータベースが構築されてきた。その成果を基に、診断基準と診療ガイドラインの改定を行った。本研究班は、指定難病としてDBAが認められるのに大きな貢献をしたと思われる。

先天性骨髄不全の中で最も症例が多いDBAは、約半数が原因遺伝子不明であるため、遺伝子診断が不可である。このため、新規のバイオマーカーが求められていた。我々は、赤血球還元グルタチオン濃度(GSH)が優れたDBAの新たなバイオマーカーとなり、赤血球アデノシンデアミナーゼ活性値(eADA)を組み合わせることで、診断確度が格段に高まることを明らかにした。eADAとGSHの同時測定結果を用いた判別式は、従来のDBAの定義およびeADA単独測定に比べ、侵襲性が小さく、発症早期にDBAの臨床診断に寄与することが可能であり、臨床的に極めて有用と考えられた。

FAの遺伝子解析が進み、京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室等との共同研究により、日本人FA患者106例の解析が行われ、FA遺伝子の疫学集積が進んでいる。今後は、さらに正確な診断の基に症例を集積し、よりよい治療法開発のためにも、調査と研究の継続が必要である。また、今回工夫した方法は、少なくとも半数程度の患者に迅速に分子診断を提供でき、臨床上、小島班におけるターゲットエクソーム解析の前段階として、ある程度の有用性があると考えられた。FAの診断、診療に寄与できるものである。

CDAのような稀な疾患は、このような形態中央診断システム、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。

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 症例を初めて発見した。

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。

DKC や不全型 DKC の治療に関しては、蛋白同化ステロイドホルモンによる治療の効果は限局的で DKC や HHS に対しての有効な治療とは言い難い。一方、同種造血幹細胞移植は DKC や不全型 DKC の骨髄不全症に対しての根治療法ではあるが、これまで合併症による治療関連死亡率が高いことが問題であった。本邦の DKC や不全型 DKC に対しての同種造血幹細胞移植の成績は、これまでの報告に比べて治療関連死亡率も低く有効な治療である可能性を示した。

SCN に対して、広島大学にて初回移植 7 症例を行った。血縁 4 例、非血縁 3 例で移植ソースは、全例骨髄を使用した免疫抑制効果を最大限とした前処置 (Flu、CY、Mel、TBI、ATG) は、本症の根治療法として有用なものであった。今後、成長や妊孕性などを含めた晩期障害の検討が重要である。

19 例の先天性血小板減少症を疑う症例を解析し、13 例 (68.4%) の症例で確定診断が得られた。

ACTN 異常症診断に有用なバイオマーカーを見出した。

希少疾患である先天性造血不全症は、診断から治療まで一貫した登録システムの確立、長期フォローアップ体制と最良の治療法の提供までのガイドライン作成が重要である。本年度は、5 疾患 (DBA、FA、SA、CDA、DKC) の診断基準および 3 疾患 (DBA、SA、CDA) の重症度分類の改定、さらに 5 疾患 (DBA、FA、SA、CDA、DKC) の診療ガイドラインの改定と 3 疾患 (SDS、SCN、CTP) の診療ガイドライン

策定を行った。今年度中に、これらの診断基準、重症度分類と診療ガイドラインの日本小児血液・がん学会での承認を目指す。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshimi A, Toya T, Nannya Y, Takaoka K, Kirito K, Ito E, Nakajima H, Hayashi Y, Takahashi T, Moriya-Saito A, Suzuki K, Harada H, Komatsu N, Usuki K, Ichikawa M, Kurokawa M. Spectrum of clinical and genetic features of patients with inherited platelet disorder with suspected predisposition to haematological malignancies: a nationwide survey in Japan. *Annals of Oncology*. (in press)
- 2) Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, 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 AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Preserved High Probability of Overall Survival with Significant Reduction of Chemotherapy for Myeloid Leukemia in Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63:248-54.
- 3) Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Terui K, Yoshida K, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Ogawa S, Ito E*. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-Blackfan anemia in Japan. *Int J Hematol*. 2016;103:112-4. (*corresponding author)
- 4) Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Yui S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Inokuchi K, Ito E, Ogawa S, Kojima S. Clinical and genetic features of dyskeratosis congenita, cryptic

- dyskeratosis congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in Japan. *Int J Hematol.* 2015;102:544-52.
- 5) Narita A, Muramatsu H, Sekiya Y, Okuno Y, Sakaguchi H, Nishio N, Yoshida N, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, Hama A, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Kobayashi M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia. *Haematologica.* 2015;100:1546-52.
 - 6) Takahashi T, Inoue A, Yoshimoto J, Kanamitsu K, Taki T, Imada M, Yamada M, Ninomiya S, Toki T, Terui K, Ito E, Shimada A. Transient myeloproliferative disorder with partial trisomy 21. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62:2021-4.
 - 7) Hama A, Takahashi Y, Muramatsu H, Ito M, Narita A, Kosaka Y, Tsuchida M, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S. Comparison of long-term outcomes between children with aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood who received immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and cyclosporine. *Haematologica.* 2015;100(11):1426-33.
 - 8) Hira A, Yoshida K, Sato K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Shimamoto A, Tahara H, Ito E, Kojima S, Kurumizaka H, Ogawa S, Takata M, Yabe H, Yabe M. Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi. *Am J Hum Genet.* 2015;96:1001-7.
 - 9) 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.* 2015;168:854-64. (*corresponding author)
 - 10) Ohguchi H, Hideshima T, Bhasin MK, Gorgun GT, Santo L, Cea M, Samur MK, Mimura N, Suzuki R, Tai YT, Carrasco RD, Raje N, Richardson PG, Munshi NC, Harigae H, Sanda T, Sakai J, Anderson KC. The KDM3A-KLF2-IRF4 axis maintains myeloma cell survival. *Nat Commun.* 2016;7:10258.
 - 11) Nakamura K, Kawakami T, Yamamoto N, Tomizawa M, Fujiwara T, Ishii T, Harigae H, Ogasawara K. Activation of the NLRP3 inflammasome by cellular labile iron. *Exp Hematol.* (in press)
 - 12) Saito Y, Fujiwara T, Ohashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. High-throughput siRNA screening to reveal GATA-2 upstream transcriptional mechanisms in hematopoietic cells. *PLoS ONE.* 2015;10:e0137079.
 - 13) Fujiwara T, Harigae H. Biology of heme in mammalian erythroid cells and related disorders. *BioMed Res Int.* 2015;2015:278536.
 - 14) Ichikawa S, Ichikawa S, Ishikawa I, Takahashi T, Fujiwara T, Harigae H. Successful treatment of acute promyelocytic leukemia with a t(X;17)(p11.4;q21) and BCOR-RARA fusion gene. *Cancer Genet.* 2015;208:162-163.
 - 15) Fujiwara T, Harigae H. Update on the biology of heme synthesis in erythroid cells. *Rinsho Ketsueki.* 2015;56:119-127.
 - 16) 藤原亨, 張替秀郎. 化学・増刊 45 「5-アミノレブリン酸の科学と医学応用」; 赤血球造血細胞への影響 (東京化学同人, 2015年, p144-148).
 - 17) 藤原亨, 張替秀郎. 現代化学・増刊 45 「5-アミノレブリン酸の科学と医学応用」; 鉄芽球性貧血症の治療と予防 (東京化学同人, 2015年, p149-155).

- 18) 藤原亨, 張替秀郎. 鉄剤の適正使用による貧血治療指針【第3版】; 鉄欠乏貧血の診断 (響文社, 2015年, p22-26).
- 19) 藤原亨, 張替秀郎. 鉄剤の適正使用による貧血治療指針【第3版】; 無効造血による貧血と鉄過剰症 (響文社, 2015年, p72-73).
- 20) Kato S, Yabe H, Takakura H, Mugishima H, Ishige M, Tanaka A, Kato K, Yoshida N, Adachi S, Sakai N, Hashii Y, Ohashi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Tabuchi K. Hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of metabolism: A report from the Research Committee on Transplantation for Inborn Errors of Metabolism of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and the Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Pediatr Transplant*. 2016 Jan 25. doi: 10.1111/petr.12672. [Epub ahead of print]
- 21) Taga T, Murakami Y, Tabuchi K, Adachi S, Tomizawa D, Kojima Y, Kato K, Koike K, Koh K, Kajiwara R, Hamamoto K, Yabe H, Kawa K, Atsuta Y, Kudo K. Role of Second Transplantation for Children With Acute Myeloid Leukemia Following Posttransplantation Relapse. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 Dec 16. doi: 10.1002/pbc. 25866. [Epub ahead of print]
- 22) Yabe H, Morimoto T, Takakura H, Okuya M, Ikegaya R, Kato S, Sugimoto T, Tsuchida F, Murakami M, Mochizuki H, Yabe M. Post-transplantation-emerging anti-HLA DQA1/ DQB1 antibody possibly responsible for graft rejection after myeloablative-unrelated marrow grafting. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Dec 7. doi: 10.1038/bmt.2015.292. [Epub ahead of print]
- 23) Umeda K, Adachi S, Horikoshi Y, Imai K, Terui K, Endo M, Mitsui T, Kato K, Koh K, Kajiwara R, Ito R, Otsuka Y, Inoue M, Ishii E, Yabe H. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Chediak-Higashi syndrome. *Pediatr Transplant*. 2015 Oct 29. doi: 10.1111/petr.12626. [Epub ahead of print]
- 24) Yabe M, Yabe H. Diagnosis and management of inherited bone marrow failure syndrome. *Rinsho Ketsueki*. 2015 Oct;56(10):1914-21. doi: 10.11406/rinketsu. 56.1914. Japanese.
- 25) Yabe H, Tanaka A, Chinen Y, Kato S, Sawamoto K, Yasuda E, Shintaku H, Suzuki Y, Orii T, Tomatsu S. Hematopoietic stem cell transplantation for Morquio A syndrome. *Mol Genet Metab*. 2015 Oct 1. pii: S1096-7192(15)30057-3. doi: 10.1016/j. ymgme.2015.09.011. [Epub ahead of print]
- 26) 矢部みはる, 矢部普正. 家族性腫瘍学 家族性腫瘍の最新研究動向 II. 各論 症候群 Fanconi anemia. *日本臨床* 2015;73:120-124.
- 27) Bitan M, van Walraven SM, Worel N, Ball LM, Styczynski J, Torrabadella M, Witt V, Shaw BE, Seber A, Yabe H, Greinix HT, Peters C, Gluckman E, Rocha V, Halter J, Pulsipher MA. Determination of Eligibility in Related Pediatric Hematopoietic Cell Donors: Ethical and Clinical Considerations. Recommendations from a Working Group of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Association. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Aug 22. pii: S1083-8791(15)00546-7. doi:10.1016/j.bbmt.2015. 08. 017. [Epub ahead of print]
- 28) Worel N, Buser A, Greinix HT, Häggglund H, Navarro W, Pulsipher MA, Nicoloso de Faveri G, Bengtsson M, Billen A, Espino G, Fechter M, Giudice V, Hölig K, Kanamori H, Kodera Y, Leitner G, Netelenbos T, Niederwieser D, van Walraven SM, Rocha V, Torosian T, Vergueiro C, Weisdorf D, Yabe H, Halter JP. Suitability Criteria for Adult Related Donors. A Consensus Statement from the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Standing Committee on Donor Issues. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Dec;21(12):2052-60. doi: 10.1016/j.bbmt.

- 2015.08. 009. Epub 2015 Aug 10.
- 29) Tomatsu S, Sawamoto K, Alméciga-Díaz CJ, Shimada T, Bober MB, Chinen Y, Yabe H, Montaña AM, Giugliani R, Kubaski F, Yasuda E, Rodríguez-López A, Espejo-Mojica AJ, Sánchez OF, Mason RW, Barrera LA, Mackenzie WG, Orii T. Impact of enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation in patients with Morquio A syndrome. *Drug Des Devel Ther.* 2015 Apr 1;9:1937-53. doi: 10.2147/DDDT.S68562.
- 30) Ishida H, Adachi S, Hasegawa D, Okamoto Y, Goto H, Inagaki J, Inoue M, Koh K, Yabe H, Kawa K, Kato K, Atsuta Y, Kudo K. Comparison of a fludarabine and melphalan combination-based reduced toxicity conditioning with myeloablative conditioning by radiation and/or busulfan in acute myeloid leukemia in Japanese children and adolescents. *Pediatr Blood Cancer.* 2015 May; 62(5):883-9. doi: 10.1002/pbc.25389. Epub 2014 Dec 24.
- 31) Niemeyer CM, Loh ML, Cseh A, Cooper T, Dvorak CC, Chan R, Xicoy B, Germing U, Kojima S, Manabe A, Dworzak M, De Moerloose B, Stary J, Smith OP, Masetti R, Catala A, Bergstraesser E, Ussowicz M, Fabri O, Baruchel A, Cave H, Zwaan M, Locatelli F, Hasle H, van den Heuvel-Eibrink MM, Flotho C, Yoshimi A. Criteria for evaluating response and outcome in clinical trials for children with juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 2015;100:17-22.
- 32) 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.* 2015;174:525-531.
- 33) Yabe M, Ohtsuka Y, Watanabe K, Inagaki J, Yoshida N, Sakashita K, Kakuda H, Yabe H, Kurosawa H, Kudo K, Manabe A. Transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia. A retrospective study of 30 children treated with a regimen of busulfan, fludarabine, and melphalan. *Int J Hematol.* 2015;101:184-190.
- 34) Elmahdi S, Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Muramatsu H, Narita A, Nishio N, Ismael O, Kawashima N, Okuno Y, Xu Y, Wang X, Takahashi Y, Ito M, Kojima S. A cytokine-based diagnostic program in pediatric aplastic anemia and hypocellular refractory cytopenia of childhood. *Pediatr Blood Cancer.* (in press)
- 35) Elmahdi S, Muramatsu H, Narita A, Ismael O, Hama A, Nishio N, Okuno Y, Xu Y, Wang X, Takahashi Y, Kojima S. Markedly High Plasma Thrombopoietin (TPO) Level is a Predictor of Poor Response to Immunosuppressive Therapy in Children With Acquired Severe Aplastic Anemia. *Pediatr Blood Cancer.* 2015 Nov 17. [Epub ahead of print]
- 36) Elmahdi S, Muramatsu H, Narita A, Torii Y, Ismael O, Kawashima N, Okuno Y, Sekiya Y, Xu Y, Wang X, Hama A, Ito Y, Takahashi Y, Kojima S. Correlation of rabbit antithymocyte globulin serum levels and clinical outcomes in children who received hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor. *Pediatr Transplant.* 2015 Oct 30. [Epub ahead of print]
- 37) Hiramoto R, Imamura T, Muramatsu H, Wang X, Kanayama T, Zuiki M, Yoshida H, Moroto M, Fujiki A, Chiyonobu T, Osone S, Ishida H, Kojima S, Hosoi H. Serial investigation of PTPN11 mutation in nonhematopoietic tissues in a patient with juvenile myelomonocytic leukemia who was treated with unrelated cord blood transplantation. *Int J Hematol.* 2015 Dec; 102(6):719-22.
- 38) Kataoka S, Muramatsu H, Okuno Y, Hayashi