

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

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

研究分担者 矢部普正（東海大学医学部基盤診療学系細胞移植再生医療科学 准教授）

**研究要旨：**Fanconi 貧血 (FA) は身体異常と小児期発症の骨髄不全、白血化や高発がんを臨床的な特徴とし、DNA 修復欠損を基盤とする遺伝性疾患である。日本人 FA 患者の関連遺伝子に関する疫学調査を京都大学高田研究室と共同で進め、名古屋大学小島班のエクソーム解析も加えて 106 例をまとめた。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東海大学症例によりさらに確認され、臨床データの解析結果を踏まえて 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。

#### A. 研究目的

Fanconi 貧血 (FA) は、DNA 修復欠損を基盤に種々の身体異常と小児期発症の骨髄不全や白血化を特徴とする遺伝性疾患である。日本人の FA 遺伝子群の疫学解析を行い、骨髄不全症、骨髄異形成症候群・白血病などの造血器腫瘍や固形がんの臨床像に基づき、診断基準、重症度基準および診療ガイドラインの作成を行う。

#### B. 研究方法

DNA 架橋剤添加による末梢血リンパ球における染色体脆弱検査と *FANCA* の multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) を併用し、臨床症状を基本として FA のスクリーニングを行う。FA 遺伝子については、京都大学放射線生物研究センター高田穰研究室にて、京都大学と名古屋大学の日本人 FA 患者も含めて解析を行った。東海大学症例においては、アルデヒド分解酵素 (ALDH2) の変異を解析し、臨床データと合わせて検討した。これらの結果を踏まえて、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。

(倫理面への配慮)

「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指

針」と「臨床研究に関する倫理指針を順守し、インフォームドコンセントに基づいた科学的にも倫理的にも妥当な研究の計画と実施している。「ファンconi貧血とその類縁疾患の原因遺伝子の探索および病態解明の研究」が、東海大学倫理委員会で承認されている。

#### C. 研究結果

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 のバリエントが 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。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。

#### D. 考察

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はなく、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。

#### E. 結論

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もとに症例を集積し、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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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]
- 2) 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]
- 3) 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]

- 4) 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]
- 5) 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.
- 6) 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]
- 7) 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 Nov;102(5):544-52. doi: 10.1007/s12185-015-1861-6. Epub 2015 Sep 2.
- 8) 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.
- 9) 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 Aug 27. pii: haematol.2015.132530. [Epub ahead of print]
- 10) 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]
- 11) 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 Nov;100(11):1426-33. doi: 10.3324/haematol.2015.128553. Epub 2015 Aug 13.
- 12) 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.

- 13) Hira A, Yoshida K, Sato K, Okuno Y, Shiraiishi 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 anemia. *Am J Hum Genet.* 2015 Jun 4;96(6):1001-7. doi:10.1016/j.ajhg.2015.04.022.
- 14) 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.
- 15) 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.

## 2. 学会発表

- 1) Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Tahara H, Kurumizawa H, Ogawa S, Yabe H, Yabe M, Takata M. Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. **27<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund scientific symposium** (2015年9月, カナダ・トロント).
- 2) Yabe M, Yabe H, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno K, Muramatsu H, Kojima S, Hira A,

Takata M. Genetic subtyping of Fanconi anemia in Japanese patients. **Fanconi anemia. 27<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund scientific symposium** (2015年9月, カナダ・トロント).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

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

CDA の臨床データ解析・診療ガイドラインの作成

研究分担者 真部 淳（聖路加国際病院小児科 医長）

**研究要旨：**本研究の目的は、Congenital dyserythropoietic anemia（CDA：先天性赤血球産生異常性貧血）の疾患像を明らかにすることである。CDA は、先天性の赤血球系細胞の形成異常により、慢性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う疾患である。本年度は新たに重症度分類を作成し、また CDA の診療ガイドラインを改訂した。

A. 研究目的

Congenital dyserythropoietic anemia（CDA：先天性赤血球産生異常性貧血）は、先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不応性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う稀な疾患群であるが、我が国ではこれまで CDA の実態が十分把握されていなかった。本研究により、我が国における CDA の実態を明らかにし、最終的に効果的診断法や治療ガイドラインを作成することを目的とする。

B. 研究方法

従来行われている日本小児血液・がん学会疾患登録、中央診断事業を基に、我が国における CDA の把握ならびに診断を行う。診断を行うための診断基準、中央形態診断、遺伝子診断のシステムを構築する。疾患の把握は、過去に行われた全国調査を参考に、疑い症例を含みアンケート方式で行う。診断基準については既存のものを参考にするが、軽症で診断基準に合致しないものも存在する可能性があるため、独自のものを作成する。調査は血液専門医だけでなく、一般小児科医にも協力してもらう。

（倫理面への配慮）

本研究で行われる臨床試験は、

- ① ヘルシンキ宣言に則り、患者の利益を最優先に考えて実施する。
- ② 調査フィールドとなる各施設における倫理委

員会で承認を得て実施する。

- ③ 患者および家族に対して面談・介入開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得る。同意説明文では、調査を行う目的、介入・面談の内容、協力者に起こりうる利益・不利益について、未成年者の場合には年齢に応じた説明をする。

協力によって得られたデータは、個人情報保護を厳重に行い、研究目的以外には利用しないことを文書による同意を得て実施する。

C. 研究結果

毎年、本疾患の診療ガイドラインを改訂している。また、新たに重症度分類を作成した。

**Congenital dyserythropoietic anemia の重症度分類（平成 26 年度作成）**

軽 症 赤血球輸血を受けたことがない

中等症 赤血球輸血を受けたことはあるが、現在は受けていない

重 症 定期的な赤血球輸血を必要とする

注 定期的な赤血球輸血とは、ヘモグロビン濃度 8.0 g/dL を維持するのに 2～8 週毎の輸血が必要な場合とする。

\* 鉄過剰症などの貧血治療に伴う臓器合併症は除く。

## D. 考察

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楕円赤血球症で見られる *SPTA* 遺伝子の変異や遺伝性球状赤血球症で見られる *ANK1* 遺伝子の変異が見つかった。

新たに作成した重症度分類は、今後患者の取扱いに際して有用と考えられる。

## E. 結論

我が国の CDA の実態の正確な把握をし、よりよい治療法を開発するため、今後も調査、研究が必要である。

共同研究者：土居崎小夜子、小島勢二（名古屋大小児科）、多賀崇（滋賀医大小児科）、長谷川大輔、平林真介（聖路加国際病院小児科）

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Ono R, Hasegawa D, Hirabayashi S, Kamiya T, Yoshida K, Yonekawa S, Ogawa C, Hosoya R, Toki T, Terui K, Ito E, Manabe A. Acute megakaryoblastic leukemia with acquired trisomy 21 and GATA1 mutations in phenotypically normal children. *Eur J Pediatr*. 2015;174:525-531.

- 3) 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.
  - 4) 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)
- ### 2. 学会発表
- 1) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Comparison of clinical and laboratory features between pediatric aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood. 第 57 回アメリカ血液学会 (2015 年 12 月, オランダ).
  - 2) Hasegawa D, Hama A, Nozawa K, Hirabayashi S, Watanabe K, Tsuchida M, Ito M, Kojima S, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics of therapy-related myelodysplastic syndrome in childhood. A Prospective Registration through the Japanese Society of Pediatric Hematology/Oncology (JSPHO). *Haematologica* 100 (S2):3, 2015 国際小児 MDS シンポジウム (2015 年 10 月, デンマーク).
  - 3) Yoshimi A, 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, Niemeyer C. Criteria for evaluating response and outcome in clinical trials for children with myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica* 100 (S2):3, 2015 国際小児 MDS シンポジウム (2015 年 10 月, デンマーク).

- 4) Yoshida N, Kato M, Inagaki J, Yabe M, Yabe H, Takahashi Y, Inoue M, Akihisa S, Kato K, Atsuto Y, Manabe A, Koike K, Kojima S, Watanabe K. First allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia: Data from the JSHCT. *Haematologica* 100 (S2):8, 2015 国際小児 MDS シンポジウム (2015 年 10 月, デンマーク).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

中央診断、DKC と CDA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 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：**日本小児血液学会（現日本小児血液・がん学会）は、平成 21 年 2 月より再生不良性貧血（AA）、骨髄異形成症候群（MDS）および先天性造血不全症候群（CBFS）を対象とした形態中央診断を開始した。レビューは、骨髄および末梢血塗抹標本を 2 施設（名古屋大学、聖路加国際病院）で、骨髄病理標本を 1 施設（名古屋第一赤十字病院）で行っている。中央診断症例において形態学的に Congenital dyserythropoietic anemia（CDA）が疑われた症例に対して同意を得た後、遺伝子診断を行い、3 例で I 型の責任遺伝子の変異を同定した。3 例ともに骨髄像において CDA I 型に特徴的とされる赤芽球の核間架橋が確認された。CDA の診断は必ずしも容易ではなく、形態中央診断、遺伝子診断を行うことによりその診断の精度が上昇したと考えられる。

A. 研究の目的

CDA は先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不应性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う稀な疾患群である。I 型、II 型、III 型、variant 型の 4 病型に分類され、近年 I 型が *CDAN1*、II 型が *SEC23B*、III 型が *KIF23*、variant 型が *KLF1* と責任遺伝子が同定された。本研究では、日本小児血液・がん学会の形態中央診断で CDA が疑われた症例に対して、CDA 関連遺伝子解析を行い、変異の確認された症例の臨床像を検討する。

B. 研究方法

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。AA、MDS、あるいは CBFS が疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。以後は、その番号でやりとりを行った（匿名化）。中央診断およびそれに伴う検査については、患者保護者の同意を取得した後に行った。レビューは、骨髄および末梢血塗抹標本を 2 施設（名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科）で、骨髄病理標本を 1 施設（名古屋第一赤十字病院病理部）で行った。

CDA と診断された症例については、名古屋大学小

児科において、次世代シーケンサーによるターゲットシーケンスを行った。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回数 200 回を目標として対象遺伝子領域の解析を行った。

（倫理面への配慮）

日本小児血液・がん学会として行う形態中央診断事業については、患者の匿名化を図る。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。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。既知の責任遺伝子解析に関しては、倫理委員会で承認されている。

## C. 研究結果

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 CDA I 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 CDA I 型を疑うことは可能であった。

## D. 考察

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。

## E. 結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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]
- 2) 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*. 2015 Oct 20. [Epub ahead of print]
- 3) 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]
- 4) 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 Nov;100(11):1426-1433.
- 5) 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 Anemia. *Am J Hum Genet*. 2015 Jun 4;96(6):1001-1007.
- 6) 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.
- 7) 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.
  - 8) Kataoka S, Muramatsu H, Okuno Y, Hayashi Y, Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M, Sano C, Sato H, Oh-Iwa I, Ito M, Kojima D, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Extrapulmonary tuberculosis mimicking Mendelian susceptibility to mycobacterial disease in a patient with signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2015 Aug 1. [Epub ahead of print]
  - 9) Kawashima N, Muramatsu H, Okuno Y, Torii Y, Kawada JI, Narita A, Nakanishi K, Hama A, Kitamura A, Asai N, Nakamura S, Takahashi Y, Ito Y, Kojima S. Fulminant adenovirus hepatitis after hematopoietic stem cell transplant: Retrospective real-time PCR analysis for adenovirus DNA in two cases. *J Infect Chemother*. 2015 Dec;21(12):857-63.
  - 10) Kudo K, Muramatsu H, Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Tabuchi K, Kato K, Koh K, Takahashi Y, Hashii Y, Kawano Y, Inoue M, Cho Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S. Second allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2015 Oct;50(10):1312-5.
  - 11) Miura H, Kawamura Y, Kudo K, Ihira M, Ohye T, Kurahashi H, Kawashima N, Miyamura K, Yoshida N, Kato K, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T. Virological analysis of inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 in three hematopoietic stem cell transplant patients. *Transpl Infect Dis*. 2015 Oct;17(5):728-31.
  - 12) Momota H, Kato S, Fujii M, Tsujiuchi T, Takahashi Y, Kojima S, Wakabayashi T. Primary peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, of the central nervous system in a child. *Brain Tumor Pathol*. 2015 Oct;32(4):281-285.
  - 13) 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; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia. *Haematologica*. 2015 Dec;100(12):1546-52.
  - 14) Okuno Y, Hoshino A, Muramatsu H, Kawashima N, Wang X, Yoshida K, Wada T, Gunji M, Toma T, Kato T, Shiraishi Y, Iwata A, Hori T, Kitoh T, Chiba K, Tanaka H, Sanada M, Takahashi Y, Nonoyama S, Ito M, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanegane H. Late-Onset Combined Immunodeficiency with a Novel IL2RG Mutation and Probable Revertant Somatic Mosaicism. *J Clin Immunol*. 2015 Oct;35(7):610-4.
  - 15) Sakaguchi H, Muramatsu H, Okuno Y, Makishima H, Xu Y, Furukawa-Hibi Y, Wang X, Narita A, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Yoshida N, Hama A, Takahashi Y, Yamada K, Miyano S, Ogawa S, Maciejewski JP, Kojima S. Aberrant DNA Methylation Is Associated with a Poor Outcome in Juvenile Myelomonocytic Leukemia. *PLoS One*. 2015 Dec 31;10(12):e0145394.
  - 16) Shiota M, Yang X, Kubokawa M, Morishima T, Tanaka K, Mikami M, Yoshida K, Kikuchi M, Izawa K, Nishikomori R, Okuno Y, Wang X, Sakaguchi H, Muramatsu H, Kojima S, Miyano S, Ogawa S, Takagi M, Hata D,

- Kanegane H. Somatic Mosaicism for a NRAS Mutation Associates with Disparate Clinical Features in RAS-associated Leukoproliferative Disease: a Report of Two Cases. *J Clin Immunol*. 2015 Apr 21.[Epub ahead of print]
- 17) Suzuki M, Takeda T, Nakagawa H, Iwata S, Watanabe T, Siddiquey MN, Goshima F, Murata T, Kawada J, Ito Y, Kojima S, Kimura H. The heat shock protein 90 inhibitor BIIB021 suppresses the growth of T and natural killer cell lymphomas. *Front Microbiol*. 2015;6:280.
  - 18) Wang X, Muramatsu H, Okuno Y, Sakaguchi H, Yoshida K, Kawashima N, Xu Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Saito S, Nakazawa Y, Masunari T, Hirose T, Elmahdi S, Narita A, Doisaki S, Ismael O, Makishima H, Hama A, Miyano S, Takahashi Y, Ogawa S, Kojima S. GATA2 and secondary mutations in familial myelodysplastic syndromes and pediatric myeloid malignancies. *Haematologica*. 2015 Oct;100(10):e398-401.
  - 19) 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 Nov;102(5):544-52.
  - 20) Yang X, Hoshino A, Taga T, Kunitsu T, Ikeda Y, 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*. 2015 Apr;35(3):244-248.
  2. 学会発表
    - 1) Muramatsu H. Comprehensive Molecular Screening System for Pediatric Bone Marrow Failure Syndromes. **The 6th JSH International Symposium 2015** (2015年4月23日, 軽井沢).
    - 2) Kojima S. Development of successful treatment trials in severe aplastic anemia in Japanese children during the last 2 decades. **Workshop on Pathology and Pathogenesis of Bone Marrow Failure** (2015年6月8日, ドイツ・フライベルク).
    - 3) Narita A. Biology and clinics of bone marrow failure syndromes and PNH. **The 20th EHA Congress** (2015年6月15日, オーストリア・ウィーン).
    - 4) Muramatsu H, Okuno Y, Hama A, Kojima S, et al. Target Capture Next Generation Sequencing as a Molecular Screening System for Pediatric Bone Marrow Failure Syndromes. **the 7th International Symposium on Myelodysplastic syndromes and Bone Marrow Failure** (2015年10月1日, デンマーク).
    - 5) Kojima S. Pediatric Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndrome. 第2回中国小児科国際フォーラム (2015年10月10日, 中国・北京).
    - 6) Kojima S. Recent advance in hematopoietic stem cell transplantation for pediatric bone marrow failure. 第1回中米日小児トランスレーショナル医療フォーラムおよび第4回国際小児腫瘍フォーラム (2015年11月13日, 中国・上海).
    - 7) Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Hama A, Kojima S, et al. Genetic Background of Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes in Children. **57th ASH Annual Meeting and Exposition** (2015年12月7日, 米国・オランダ).
    - 8) Kawashima N, Okuno Y, Muramatsu H,

- Hama A, Kojima S, et al. Correction of Fanconi Anemia Mutation Using the Crispr/Cas9 System. **57th ASH Annual Meeting and Exposition** (2015年12月7日, 米国・オーランド).
- 9) Kojima S. Bone Marrow Failure in Children. **BMT Tandem Meetings 2016** (2016年1月9日, ハワイ・ホノルル).
- 10) 小島勢二. Recent advance in the diagnosis and treatment of childhood bone marrow failure syndrome. 第77回日本血液学会学術集会 (2015年10月16日, 金沢).
- 11) Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Sekiya Y, Chiba K, Tanaka H, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Target gene sequencing for genetic diagnosis of congenital bone marrow failure syndromes. 第77回日本血液学会学術集会 (2015年10月17日, 金沢).
- 12) 村上典寛, 奥野友介, 村松秀城, 王希楠, 小島大英, 鈴木喬悟, 関屋由子, 川島希, 成田敦, 土居崎小夜子, 亀井美智, 入江正寛, 西尾信博, 濱麻人, 高橋義行, 小島勢二, 寺田和樹. 第77回日本血液学会学術集会 (2015年10月18日, 金沢).
- 13) 村松秀城. Genetic predisposition for pediatric myeloid malignancies. 第77回日本血液学会学術集会 (2015年10月19日, 金沢).
- 14) Okuno Y, Wang X, Muramatsu H, Sakaguchi H, Yoshida K, Kawashima N, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Saito S, Nakazawa Y, Xu Y, Masunari T, Hirose T, Narita A, Doisaki S, Hama A, Miyano S, Takahashi Y, Ogawa S, Kojima S. GATA2 and secondary mutations in familial myelodysplastic syndromes and pediatric myeloid malignancies. 第57回日本小児血液・がん学会学術集会 (2015年11月28日, 甲府).
- 15) 小島大英, 奥野友介, 王希楠, 村松秀城, 村上典寛, 鈴木喬悟, 関屋由子, 川島希, 谷口理恵子, 秋田直洋, 成田敦, 亀井美智, 土居崎小夜子, 西尾信博, 濱麻人, 高橋義行, 小島勢二. Utility of targeted next-generation sequencing in diagnosis of primary immunodeficiencies. 第57回日本小児血液・がん学会学術集会 (2015年11月29日, 甲府).
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

先天性赤芽球癆（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

研究分担者 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）  
研究協力者 檜澤大樹（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）

**研究要旨：**我々は今までに先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血）患者におけるバイオマーカーとして還元型グルタチオン（GSH）が有用であることを明らかにした。今年度は、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に対して、eADA/GSH 値を用いた判別式が DBA と判定できることを示すことができた。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。

#### A. 研究目的

DBA は、リボゾーム機能不全によって発症する先天性赤芽球癆である。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。今年度は、更に症例数を積み重ねることで判別式の有用性を再検討したので報告する。

#### B. 研究方法

全国の医療機関において臨床的に DBA が疑われる症例についてインフォームド・コンセントを取得の上、末梢血を得た。血漿、白血球、血小板を除去した洗浄赤血球より溶血液を作成し、eADA を測定した。eADA はアデノシンを基質として溶血液を加え 265nm における吸光度減少により、活性を測定した。

また、GSH は溶血後の全血にメタリン酸を加えて得られた除蛋白抽出液に 5,5'-di-thiobis (2-nitrobenzoic acid) を加え、412nm で定量した。

#### C. 研究結果

##### 【症例 1】1 歳 2 ヶ月男児

身体的所見：漏斗胸、兔唇

輸血歴：なし

赤血球数 181 万/ $\mu$ L、Hb 6.3 g/dL、Ht 20.3%、MCV 112.2、Retics 1.05%、白血球数 16,960/ $\mu$ L、血小板数 40.9 万/ $\mu$ L、末梢血の赤血球形態に異常は認められなかった。骨髄検査は未検査であった。eADA 活性：2.28 IU/gHb、GSH：132 mg/dl RBC 判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  の時 DBA とする場合、DBA と判別された

##### 【症例 2】4 ヶ月性別不明

身体的所見：特記することなし

輸血歴：生後～3 ヶ月

赤血球数 224 万/ $\mu$ L、Hb 6.7 g/dL、Ht 19.3%、MCV 86.2、Retics 0.2%、白血球数 13,300/ $\mu$ L、

血小板数 48 万/ $\mu$ L、末梢血の赤血球形態に異常は認められなかった。骨髓検査は骨髓球系・赤芽球系に低形成を認めた。

eADA 活性 : 0.95 IU/gHb、GSH : 106 mg/dl RBC  
判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【症例 3】2 歳 6 ヶ月男児

身体的所見 : 耳介低位、陰嚢水腫、鼠径ヘルニア、心房中隔欠損

輸血歴 : なし

赤血球数 254 万/ $\mu$ L、Hb 8.3 g/dL、Ht 24.4%、MCV 96.1、Retics 0.86%、白血球数 6,130/ $\mu$ L、血小板数 35.2 万/ $\mu$ L、末梢血に奇形赤血球を認めた。骨髓検査は正形成であった。

eADA 活性 : 4.39 IU/gHb、GSH : 119 mg/dl RBC  
判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【症例 4】41 歳男性

身体的所見 : 特記することなし

輸血歴 : 生後 2 ヶ月 ~ 3 ヶ月

赤血球数 80 万/ $\mu$ L、Hb 2.1 g/dL、Ht 8%、Retics 0.1%、MCV 100.0、白血球数 6,400/ $\mu$ L、血小板数 3.4 万/ $\mu$ L、末梢血の赤血球形態に異常は認められなかった。骨髓検査は低形成であった。

eADA 活性 : 1.83 IU/gHb、GSH : 129 mg/dl RBC  
判別式  $0.937 * eADA + 0.0702 * GSH - 7.9004 > 0$  の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【症例 5】1 歳 3 ヶ月女児

身体的所見 : 特記することなし

輸血歴 : 1 歳 2 ヶ月時

赤血球数 110 万/ $\mu$ L、Hb 2.7 g/d、MCV 24.5、Ht 8.6%、Retics 0.13%、白血球数 6,100/ $\mu$ L、血小板数 30 万/ $\mu$ L、末梢血の赤血球形態に異常は認められなかった。骨髓検査は低形成で赤芽球系の低形成を認めた。

eADA 活性 : 1.38 IU/gHb、GSH : 80.6 mg/dl RBC  
判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  の時 DBA とする場合、非 DBA と判別された。

その後、無治療経過観察にて赤血球数、網状赤血球数の増加を認め TEC 疑いと診断した。

【判定結果】

症例	診断基準	eADA	判別式	最終診断
1	非古典型	高値	DBA	DBA
2	古典型	正常	DBA	DBA
3	非古典型	高値	DBA	DBA
4	非 DBA	高値	DBA	DBA
5	非 DBA	正常	非 DBA	非 DBA

D. 考察

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。

E. 結論

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 菅野仁, 小倉浩美. 【溶血性貧血診療の最前線】日本におけるグルコース-6-リン酸脱水素酵素異常症. 臨床血液 2015;56(7):771-7.
- 2) 菅野仁, 牧野茂義, 北澤淳一, 田中朝志, 紀野修一, 高橋孝喜, 半田誠, 室井一男. 日本にお

- ける輸血管理体制と血液製剤使用実態調査報告. 日本輸血細胞治療学会誌 2015;61(6):529-538.
- 3) 小林博人, 菅野仁.  $\gamma\delta$  型 T 細胞を用いた癌免疫療法. 日本免疫・細胞治療学会誌 2016;61(1). (in press)
- 4) 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(1):112-4.
- 5) 大原有理, 西森美香, 塩田祐也, 山崎美香, 長谷川智子, 門脇桂子, 一圓和宏, 阿部孝典, 品原久美, 鈴江真史, 菅野仁. 早発性黄疸を呈した遺伝性球形赤血球症の 1 例. *こうち* 2015; 44(2): 97-100.
2. 学会発表
- 1) 青木貴子, 岩崎拓也, 小倉浩美, 浅井隆善, 土居崎小夜子, 奥野友介, 村松秀城, 大賀正一, 小川誠司, 小島勢二, 菅野仁. 先天性貧血症の鑑別診断における次世代シーケンスの有用性. 第 60 回日本人類遺伝学会 (2015 年 10 月 16 日, 東京).
- 2) Arashiki N, Takakuwa Y, Ogura H, Utsugisawa T, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Ohga S, Mohandas N, Kanno H. ATP11C Encodes a Major Flippase in Human Erythrocyte and Its Genetic Defect Causes Congenital Non-Spherocytic Hemolytic Anemia. *The 58th ASH Annual Meeting & Exposition* (2015 年 12 月 3-6 日, オランダ). *Blood* 2015 126:2131.
- 3) Ogura H, Ohga S, Aoki T, Utsugisawa T, Takahashi H, Iwai A, Watanabe K, Okuno Y, Yoshida K, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanno H. COL4A1 is a Novel Causative Gene Responsible for Congenital Hemolytic Anemia, Representing Characteristic Clinical Course in Infants. *The 58th ASH Annual Meeting & Exposition* (2015 年 12 月 3-6 日, オランダ). *Blood* 2015 126:934.
- 4) 小倉浩美, 大賀正一, 青木貴子, 槍澤大樹, 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, 小川誠司, 小島勢二, 菅野仁. Significance of gene analysis in a patient with hemolytic anemia in the adulthood. 第 77 回日本血液学会 (2015 年 10 月 17 日, 金沢).
- 5) 神尾英則, 神尾孝子, 内山智貴, 塚田弘子, 野口英一郎, 大地哲也, 斎藤加代子, 菅野仁, 亀岡信悟. ゲノム薬理学検査を応用した乳癌個別化医療テガフル・ウラシルによる肝機能障害の発症予測に関する研究. 第 23 回日本乳癌学会総会 (2015 年 7 月 2 日, 東京).
- 6) 及川美幸, 李舞香, 中林恭子, 岡本好雄, 槍澤大樹, 菅野仁. クリオプレシピテート製剤導入による血液製剤使用量削減の取り組み. 日本輸血細胞治療学会誌 2015;61(2):353.
- 7) 木下明美, 高源ゆみ, 小林博人, 菅野仁. 自己活性化  $\gamma\delta$  型 T 細胞を用いたがん免疫療法. 日本輸血細胞治療学会誌 2015;61(2):295.
- 8) 岡田真一, 千野峰子, 中林恭子, 槍澤大樹, 菅野仁. 新生児・小児の少量輸血における赤血球製剤のシリンジ分割供給体制の構築. 日本輸血細胞治療学会誌 2015;61(2):253.
- 9) 宇佐美郁哉, 窪田博仁, 毎原敏郎, 菅野仁. 診断に苦慮したグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) 異常症の女児例. 日本小児科学会雑誌 2015;19(2):497.
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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

ファンconi貧血の遺伝子解析

研究分担者 高田 穰（京都大学放射線生物研究センター 教授）

**研究要旨：**主に東海大矢部博士らとの共同研究で、日本人ファンconi貧血（FA）患者と関連病態の疫学調査に資するため、FA の既知遺伝子の解析を進めてきた。従来の検討結果から、日本人の FA 患者の半数が FANCA 遺伝子、FANCG 遺伝子の特定部位の変異によることが明らかとなり、これに基づいて、迅速遺伝子診断のシステムを構築した。実際に何例かの新規 FA 症例にこれを応用し、迅速に遺伝子診断を提供することが可能な症例を経験した。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、この方法は一定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。

#### 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。典型的な症例では、外見上の特徴からも診断が可能な場合もあるが、非典型例、成人発症の軽症例、また遺伝子のリバージョンによるモザイク症例などでは、診断に至らず見逃されて化学療法時に重篤な副作用を発症するなどの可能性も指摘されている。

臨床の現場では、発症早期に確実な分子診断を得ることは、その後のフォロー、造血幹細胞移植の実施と使用薬剤等の判断の上で重要と思われる。本年は、従来の日本人 FA 患者の分子診断結果に基づいて、簡便迅速に約半数程度の患者で変異の同定が可能な方法を考案し、実際の患者に応用を試みた。

#### B. 研究方法

東海大学矢部博士からの FA 患者のサンプルからゲノムを分離し、ALDH2 遺伝子型を九州大学医学部の松尾恵太郎博士から恵与された Taqman PCR 法によって決定した。

（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 号として承認を受けている。検体は、京大への送付時に全て匿名化されている。

#### C. 研究結果

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 例は 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。

今年度、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。1 例では FANCA c.2546delC をヘテロで、1 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、アプローチとして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 1 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。

#### D. 考察

ファンconi貧血患者の診断は、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渡り、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。

#### E. 結論

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。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takahashi D, Sato K, Hirayama E, Takata M, Kurumizaka H. Human FAN1 promotes strand incision in 5'-flapped DNA complexed with RPA. *J Biochem.* 2015 Apr 27;158(3):263-70.
- 2) Suzuki NM, Niwa A, Yabe M, Hira A, Okada C, Amano N, Watanabe A, Watanabe K, Heike T, Takata M, Nakahata T, Saito MK. Pluripotent cell models of fanconi anemia identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. *Stem Cells Transl Med.* 2015; Apr;4(4):333-8.
- 3) 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 Anemia. *Am J Hum Genet.* 2015; Jun 4;96(6):1001-7. doi:10.1016/j.ajhg.2015.04.022.
- 4) Schmid M, Smith J, Burt DW, Aken BL, Antin PB, Archibald AL, Ashwell C, Blackshear PJ, Boschiero C, Brown CT, Burgess SC, Cheng HH, Chow W, Coble DJ, Cooksey A, Crooijmans R PMA, Damas J, Davis R VN, Koning D-J, Delany ME, Derrien T, Desta TT, Dunn IC, Dunn M, Ellegren H, Eöry L, Erb I, Farré M, Fasold M, Fleming D, Flicek P, Fowler KE, Frésard L, Froman DP, Garceau V, Gardner PP, Gheyas AA, Griffin DK, Groenen M AM, Haaf T, Hanotte O, Hart A, Häsler J, Hedges SB, Hertel J, Howe K, Hubbard A, Hume DA, Kaiser P, Kedra D, Kemp SJ, Klopp C, Kniel KE, Kuo R, Lagarrigue S, Lamont SJ, Larkin DM, Lawal RA, Markland SM, McCarthy F, McCormack HA, McPherson MC, Motegi A, Muljo SA, Münsterberg A, Nag R, Nanda I, Neuberger M, Nitsche A, Notredame C, Noyes H,

- O'Connor R, O'Hare EA, Oler AJ, Ommeh SC, Pais H, Persia M, Pitel F, Preeyanon L, Barja PP, Pritchett EM, Rhoads DD, Robinson CM, Romanov MN, Rothschild M, Roux P-F, Schmidt CJ, Schneider A-S, Schwartz M, Searle SM, Skinner MA, Smith CA, Stadler PF, Steeves TE, Steinlein C, Sun L, Takata M, Ulitsky I, Wang Q, Wang Y, Warren WC, Wood JMD, Wragg D, Zhou H. Third Report on Chicken Genes and Chromosomes 2015. *Cytogenetic and Genome Research* 2-15;145(2): 78-179.
- 5) Takata KI, Tomida J, Reh S, Swanhart LM, Takata M, Hukriede NA, Wood RD. Conserved overlapping gene arrangement, restricted expression and biochemical activities of DNA polymerase  $\nu$  (POLN). *J Biol Chem*. 2015 Aug 12;290(40): 24278-93.
2. 学会発表
- 1) Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Tahara H, Kurumizaka H, Ogawa S, Takata M, Yabe H, Yabe M. Identification of UBE2T as a novel Fanconi anemia gene. **ICRR2015** (2015年5月25-29日, 京都).
- 2) 高田 穰. (招待講演) シンポ 14. 癌の診断・治療標的としての DNA 修復機構の可能性「ファンコニ貧血と遺伝性乳がん卵巣がん：相同組換え欠損を基盤とした高発がん症候群. 第 74 回日本癌学会学術総会(2015年10月8-10日, 名古屋).
- 3) Takata M. (招待講演) 「がん生物学の展望：ゲノム変異とがん-宿主相互作用」 Perspective in Cancer Biology: Genetic Variations and Host-tumor Interactions. “DNA damage and repair in Fanconi anemia”. 第 2 回 IFOM-京都大学合同シンポジウム (2015年10月6-7日, 京都).
- 4) Hira A, Yoshida K, Sato K, Shiraiishi 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 anemia. **27<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium** (2015年9月17-20日, カナダ・トロント).
- 5) Takata M, Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Kurumizaka H, Ogawa S, Yabe H, Yabe M. UBE2T/FANCT is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients. **16<sup>th</sup> Ataxia-Teleangiectasia Workshop** (2015年10月11-14日, 中国・北京).
- 6) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 石合正道, 勝木陽子, 中田慎一郎, 胡桃坂仁志, 高田 穰. ワークショップ多様な DNA 損傷応答の統合制御機構 2015: ~ゲノム不安定性の病態解明研究~「相同組換えにおける RPA2 のユビキチン化を介した分解」. 第 38 回分子生物学会 (2015年12月1-4日, 神戸).
- 7) 石合正道, 岩寄航, 高橋数冨, 久郷和人, 小田有沙, 大木千夏, 福井哲也, 河合秀彦, 山本卓, 太田邦史, 印南秀樹, 高田 穰. ワークショップ複製フォーク：多様な NA トランスアクションのプラットフォーム「複製ストレスによる FANCD2 集積部位のゲノムワイド解析」. 第 38 回分子生物学会 (2015年12月1-4日, 神戸).
- 8) Yabe M, Yabe H, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Hira A, Takata M. Genetic subtyping of Fanconi anemia in Japanese patients. **27<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium** (2015年9月17-20日, カナダ・トロント).
- 9) Katsuki Y, Takata M. FANCD2-dependent ATM phosphorylation after incision during DNA interstrand crosslink repair. **ICRR2015** (2015年5月25-29日, 京都).
- 10) Ishiai M, Sato K, Takata M, Kurumizaka H. The Role of FANCD2 a central player of the Fanconi anemia pathway in DNA repair. **ICRR2015** (2015年5月25-29日, 京都).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

先天性造血障害の表現型と遺伝子型に応じた治療戦略に関する研究

研究分担者 大賀正一（山口大学大学院医学系研究科小児科学 教授）  
研究協力者 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）  
研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 教授）

研究要旨：先天性骨髄不全と鑑別を要する血球減少の新生児 5 例、乳児 1 例、幼児 1 例を経験した。貧血 4 名、汎血球減少 2 名および血小板減少 1 名であった。Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) との鑑別を必要とした 2 例は、Down 症に合併した赤芽球癆と新生児溶血性貧血でクームス陽性であった。いずれも治療抵抗性で前者はシクロスポリンにより、後者は Rituximab により寛解を得た。重症度の異なる鎌状貧血の父子は  $\alpha$ -globin 遺伝子の変異効果と判定した。汎血球減少と B 細胞欠損を主体とする造血・免疫不全児は出生後自然軽快したため、現在 Ikaros 欠損症モザイクなどを疑い病態解析を進めている。臍帯血移植を必要とした汎血球減少症の新生児は網羅的遺伝子解析中である。先天性造血障害の病因は多彩なため、スクリーニング後の効率的な遺伝子解析の適用が必要である。

A. 研究目的

先天性造血障害には、血球の産生不全（骨髄不全症）と崩壊亢進（溶血性貧血）に分類されるが、新生児は溶血と無効造血の鑑別が困難で診断に苦慮する。Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) 様の赤芽球癆を呈しても、エリスロポエチン産生障害や自己抗体を除外した後に網羅的遺伝子解析が必要となる。新生児・乳児の希少造血障害例から遺伝子解析の効率的適用に関して検討した。

B. 研究方法

過去 2 年間に診療した先天性貧血を疑う新生児および乳児の計 7 名を対象に、汎血球減少群と単一血球減少群に分けて骨髄像を検討の上、①赤血球酵素活性測定スクリーニング（赤血球アデノシンデアミナーゼ活性 (eADA) [IU/gHb]/赤血球還元型グルタチオン濃度 (GSH) [mg/dlRBC])（菅野研）、②hemoglobin 遺伝子解析（山城・服部研）、③Sanger 法などによる Ribosome 蛋白 (RP) 遺伝

子解析（伊藤・浜口研）を行った。さらに、確定診断のつかない患児には、必要に応じて家族も含め、③Illumina 社 HiSeq2000 シークエンサーを用いた全エクソーム解析（小島・小川/吉田研）を実施した。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析は、各共同研究施設の倫理委員会の承認を受け、対象患者とその家族に同意書を取得して行い、必要に応じて遺伝カウンセリングを行った。

C. 研究結果

1) 貧血の新生児・乳児・幼児例

症例 1：赤芽球癆 4 歳の Down 症男児。出生時より低酸素虚血性脳症、十二指腸閉鎖、心室中隔欠損症などで長期 NICU 入院をしていた。NICU 時には貧血はなかったが、4 歳時に顔色不良を主訴に近医総合病院を受診し、Hb 2.8 mg/dl と重症