

2015 10024B

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 26～27 年度 総合研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 28（2016）年 3 月

目 次

I. 平成 26 ～ 27 年度構成員名簿	1
II. 総合研究報告書	3
伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授)	
III. 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	47
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. SA の臨床データ解析・遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	51
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	55
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	61
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	65
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	73
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	79
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	85
	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	89
	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	93
	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における遺伝子診断と診断確定手技の検討	97
	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	101
	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	103
	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	111
	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.	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	121
	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)	
16.	DKC の臨床データ、遺伝子解析	127
	山口 博樹 (日本医科大学血液内科 准教授)	
IV.	診療ガイドライン	133
	(Diamond-Black 貧血、Fanconi 貧血、遺伝性鉄芽球性貧血、 Congenital Dyserythropoietic Anemia、先天性角化不全症、 Shwachman-Diamondsh 症候群、先天性好中球減少症、先天性血小板減少症)	
V.	研究成果の刊行に関する一覧表	215

I. 平成 26～27 年度構成員名簿

研究班の構成

	氏名	所属・役職	研究項目
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	研究総括、DBA の臨床データ解析・遺伝子診断・診療ガイドライン作成
研究分担者	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	SA の臨床データ解析・遺伝子診断・診療ガイドライン作成
	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	FA の臨床データ解析・遺伝子診断・診療ガイドライン作成
	真部 淳	聖路加国際病院小児科 医長	CDA の臨床データ解析・診療ガイドライン作成
	小島 勢二	名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学 教授	中央診断、DKC と CDA の遺伝子診断・診療ガイドライン作成
	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	DBA のバイオマーカー
	高田 穰	京都大学放射線生物研究センター 教授	FA の遺伝子診断
	大賀 正一	山口大学大学院医学系研究科 小児科学 教授	DBA の診療ガイドラインの作成・疫学調査
	小原 明	東邦大学医学部小児科 教授	データベースの構築・疫学調査
	照井 君典	弘前大学大学院医学研究科 小児科学 准教授	DBA の遺伝子診断・診療ガイドライン作成
	古山 和道	岩手医科大学生化学講座 分子医化学分野 教授	SA の遺伝子解析
	多賀 崇	滋賀医科大学小児科 講師	CDA の診療ガイドラインの作成
	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	SCN の臨床データ解析・遺伝診断・診療ガイドライン作成

	渡邊健一郎	静岡県立こども病院血液腫瘍科 科長	SDS のデータ管理・遺伝子診断・診療ガイドライン作成
	金兼 弘和	東京医科歯科大学発生発達病態学 准教授	SDS の遺伝子診断
	國島 伸治	国立病院機構名古屋医療センター 臨床研究センター分子病態学 室長	先天性血小板減少症のデータ管理・遺伝子診断・診療ガイドライン作成
	山口 博樹	日本医科大学血液内科学 准教授	DKC の遺伝子診断
	浜口 功 (平成 26 年度)	国立感染症研究所 血液・安全性研究部 部長	DBA の遺伝子診断
	剣持 直哉 (平成 26 年度)	宮崎大学フロンティア科学実験総合センター 教授	DBA の遺伝子診断

II. 総合研究報告

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。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 は、遺伝子診断を行った症例は 163 例となり、90 例で原因遺伝子を同定した。原因遺伝子が不明な 20 家系について全エクソン解析を行い、新規原因遺伝子 *RPS15A* を同定した。日本小児血液・がん学会疾患登録事業を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築した結果、2006～2014 年に新規診断された DBA は 74 例、特発性赤芽球癆は 40 例であることが明らかになった。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。しかし、母親の ALDH2 バリエーションの患児への影響はみられなかった。本邦でのフルダラビンの前処置に用いた造血細胞移植の成績は良好であり、不応性貧血の段階で移植を行えば、再生不良性貧血と同等の成績が得られることが示唆された。SA は、研究期間内に 3 例の新規症例が登録され、いずれも原因遺伝子が同定された。CDA は、22 例に遺伝子診断を行い、6 例で責任遺伝子の変異を確認した。遺伝子変異が確認されなかった 12 症例については、次世代シーケンサーによる新規責任遺伝子の探索を行い、4 例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。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。SCN の治療に関しては、10 例 11 回の骨髄移植が行われた。移植ソースは全例骨髄を使用し、前処置は Flu、CY、Mel、TBI に十分量の ATG を使用した免疫抑制効果の高いレジメンを選択した。生存率 100%であり通常の日常生活を過ごしている。CTP は、34 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。25 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。

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。

【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
矢部普正：東海大学医学部准教授
真部 淳：聖路加国際病院医長
小島勢二：名古屋大学大学院医学系研究科教授
菅野 仁：東京女子医科大学教授
高田 穰：京都大学放射線生物研究センター教授
浜口 功：国立感染症研究所部長（平成 26 年度のみ）
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
剣持直哉：宮崎大学フロンティア科学実験総合
センター教授（平成 26 年度のみ）
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
臨床研究センター室長
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
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 *RPS27* 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。末梢血や骨髓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

クエンス法あるいは、次世代シーケンサーを用いたターゲット・シーケンシング法あるいは、全エクソンシーケンシング法で行う。すなわち、各症例より抽出したゲノムDNAを超音波破砕により断片化し、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(非罹患者同胞や両親)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髓細胞や皮膚・骨髓線維芽細胞を用いて解析も行う(矢部・高田)。また、通常的直接シーケンシング法では、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(浜口および各研究拠点)。

SA症例で、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)。

今年度は、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。移植プロトコルを含む治療ガイドラインを作成する（伊藤、大賀、真部、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。新規診断 DBA 症例は 74 例、特発性赤芽球癆は 40 例、2008 年から 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 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。11 例が徐鉄治療中であった。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%）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/ 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、Hb 7 g/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 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 \pm 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 7 g/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 (cDKC) に対する治療

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 (DKC 8症例、HHS 2症例、cDKC 3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

広島大学で再移植例も含め、10例11回の骨髄移植が行われた。移植ソースは全例骨髄を使用し、前処置はFlu、CY、Mel、TBIに十分量のATGを使用した免疫抑制効果の高いレジメンを選択した。生存率100%であり通常の日常生活を過ごしている。

症例一覧を表3に示す。症例1から7-1までは初回移植、症例7-2から10までは再移植であった。年齢は2歳から19歳 (中央値4歳) 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。症例9以外の3全例でG-CSFによる治療が行われていた。移植ソースは全例骨髄を使用し、HLA一致の血縁者ドナーが5例、HLA一致の非血縁者ドナーが3例、HLA1座不一致の非血縁者ドナーが3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髄非破壊的レジメンを選択した。Flu、CY、Mel、TBIに十分量のATG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、十分量のATGが必要と判断した。移植後のウイルス感染に十分注意した上で、10-12 mg/Kgを使用した。

表4に初回移植の概要を示す。症例7-1は当院、8、

9、10は他院での移植である。拒絶に至った原因は後方視的検討にはなるが、臍帯血移植の2例は移植細胞数の不足が考えられた。症例10はHLAが血清型では1座不一致であったが、アレルでは6/8の一致度であった。輸注細胞数も十分ではなかった。症例7-1については、造血幹細胞源の条件、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8のみ骨髄破壊の前処置が行われていた。症例8と9でDLIが追加されているが無効であった。症例9は同胞の臍帯血を出生時に保存し、HLA一致を確認後に移植を行ったので、DLIが可能であった。

移植結果を表5に示す。10症例とも生着は速やかであり、症例3、4、7-2を除いて、生着後は100%ドナータイプの完全キメラの状態を維持し、以後、制限・服薬もない通常の日常生活を過ごしている。症例7-2は生着後3か月頃からドナータイプ細胞の減少を認めたため、DLIを施行した。4回のDLI後にGrade IIのGVHDを認めたが、免疫抑制剤、レミケード®、リツキサン®の使用でコントロール可能であり、再移植後4年経過した現在、完全キメラの状態での通常の日常生活を過ごしている。症例3、4は現在も混合キメラの状態ではあるが、易感染症なく経過している。経過中症例5、10でEBウイルスによるLPDを合併したが、リツキサンで軽快した。

d. 疾患登録データベースの構築: 共通のデータベースをもとにした先天性造血不全のWEB登録システムの構築を行った。

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26~27年度の2年間にeADA、GSHを測定した11症例について検討した。これらの症例は、RP遺伝子検

査が未検であり、末梢血・骨髓所見と eADA、GSH 測定結果で DBA の定義を用いて得られた診断結果との整合性について考察したところ、古典的 DBA と判定された 3 例、非古典的 DBA と判定された 4 例については、全例 eADA と GSH による判別式で DBA と判別し得た。一方、eADA 陰性の DBA2 症例のうち、1 例は臨床的に古典的 DBA と診断できたが、もう 1 例に関しては、判別式を用いた場合のみ DBA と診断が可能であり、eADA/GSH 同時測定の臨床的有用性が明らかになった。

3) 遺伝子診断と症状に影響する modifier 遺伝子の同定

a. DBA

DBA の原因遺伝子として 12 種類の RP 遺伝子 (*RPS7*、*RPS10*、*RPS17*、*RPS19*、*RPS24*、*RPS26*、*RPS27*、*RPL5*、*RPL11*、*RPL26*、*RPL27*、*RPL35a*) と *GATA1* 遺伝子が知られている。*RPS27* および *RPL27* は、我々が最近同定した新規原因遺伝子である。(Wang 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。本研究では、このシステムを用いて新規症例 41 名の遺伝子診断を行い、21 例で既知の原因遺伝子 (*RPS19* 10 例、*RPL11* 2 例、*RPL5* 2 例、*RPL35A* 2 例、*RPS17* 2 例、*RPS7* 1 例、*RPS24* 1 例、*RPS26* 1 例) を同定した。これまでに遺伝子検査を施行した症例は、160 例となり 90 例 (56.2%) で原因遺伝子を同定した。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 (非罹患家族も含む) について、全エクソン解析を行った。その結果、これまでに報告のない新規原因候補遺伝子 *RPS15A* (スプライス変異: c.G213A) を 1 家 3 症例に見出した。変異のみられた 3 例 (本人、姉、母) はいずれも罹患患者であり、非罹患患者である父には変異は検出されなかった。AMED-DBA 研究班でゼブラフィッシュとヒト赤芽球系細胞株を用いて機能解析を行い、*RPS15A* が DBA の原因遺伝子であることを確定した。また、全エクソン解析により、

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。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。もう 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。

DBA 疑いの 3 家系の母子に赤血球酵素スクリーニングを行ったが、輸血依存で判別困難であった。全エクソーム解析を行い、1 家系母と 2 家系母子に RP 遺伝子変異を同定した。*RPS* と *RPL* 変異を有する残り 2 家系の児は、輸血依存で除鉄も順調とはいえず、血細胞移植の必要性を検討した。貧血外症状に乏しい輸血依存例の診断には全エクソーム解析が有用であった。

DBA と鑑別を要した重症貧血の 3 例は 1) クームス陽性赤芽球癆のダウン症児、2) 寒冷暴露後重度溶血性貧血を発症した新生児、および 3) 新生児期に Hb 5 g/dl で発症した CDA 疑いの新生児、であった。1) および 2) は、ステロイド他に治療抵抗性で、それぞれ Cyclosporine-A (CSA) と Rituximab (Rtx) が奏効した。一方、3) はその後自然軽快した。4) 小球性低色素性貧血 (Hb 7 g/dl、MCV 72 fl) の 3 か月男児はアフリカ人父と日本人母であったことなどから Hb 異常症を疑って解析した。父に貧血は無かったが、 α および β globin 遺伝子解析から、児と父の異常ヘモグロビン症 (HbS、ヘテロ型) と父の無症候性 α サラセミア (-3.7 type α^+ -thalassemia) を診断した。父の HbS 貧血の表現型は、 α サラセミアキャリアによる効果と判断した。

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で見られる 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。FANCA 症例の約 2/3 の症例では、A 群 MLPA 法にて片アレルまたは両アレルの検出が可能であり、極めて有用であった。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。

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。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 3 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、1 週以内に一応の結論に至ることができた。1 例では *FANCA* c.2546cdelC 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、欠失は無いようである。*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。

ALDH2 酵素の活性と FA 表現型の関係をヒトにおいて明らかにするため、合計 84 例の日本人 FA 患者において、*ALDH2* 遺伝子型を決定した。GG 型、GA 型、AA 型は、それぞれ 43、35、6 例であった。

このうち、AA 型 5 例を含む 35 例において、母親の *ALDH2* 遺伝子型も決定することができた。*ALDH2* 遺伝子型の分布は、健常日本人の分布と差を認めなかった。骨髄不全は AA 群、GA 群、GG 群の順に早く発症し、有意差を認めた。特に AA 群の 6 症例では、出生直後から 1 年以内に輸血依存の重症な血球減少が進行し、5 症例では 3 系統血球に顕著な形態異常を認めた。*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確認された。

最近、FA 遺伝子とアルデヒド代謝酵素 *ALDH2* とのダブルノックアウトマウスの胎児は、母マウスの *ALDH2* 遺伝子型に大きく成長と血液学的所見が影響されることも報告された (Langevin et al. Nature 2011; Oberbeck et al. Mol Cell 2014)。*ALDH2* により分解される内因性アルデヒドが胎児から胎盤を通過し、母体で分解されることが大きな生物学的意義を持つことを示唆する所見である。そこで、AA 型 FA 児の母親の遺伝子型も検索の対象とし、母親の *ALDH2* 遺伝子型が FA 患児に及ぼす影響を検討した。6 例の AA 型のうち 5 例で母親の *ALDH2* 遺伝子型の検索の同意が得られた。母親の *ALDH2* 遺伝子型は、マウスとは全く異なり、3 例の母親は AA 型、2 例は GA 型という結果であった。さらに、患児と母親の *ALDH2* 遺伝子型の組み合わせにより、35 例の症例を 7 つのサブグループ分けし、症状所見を比較検討した。生下時体重、奇形の数、骨髄不全の発症時期のいずれも、母親の *ALDH2* 遺伝子型の影響はみられなかった。

骨髄異形成症候群や急性白血病を発症した 33 例の造血幹細胞移植では移植後 3 年生存率は約 68% であった。白血病 10 症例の移植後 3 年生存率は 30% 以下で極めて不良であったが、不応性貧血 12 例では約 90% と再生不良性貧血と同等の成績が得られた。造血細胞移植に関しては、小児ドナーの有効性と安全性の検討を行い、同胞 105 症例のうち FA 患者ドナー 11 例においても有効性と安全性が確認された。

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始め、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

1 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、骨髓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。

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、骨髓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。登録時点では脾臓症状・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。

3 例目は 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 3.3 g/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、2 例目と同様のミトコンドリア DNA 欠損を認めたため、

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。

昨年度は、*ALAS2* 遺伝子第 1 イントロンに赤芽球特異的エンハンサーが存在することを見出し、遺伝性鉄芽球性貧血患者において同部に変異を有する家系が存在することを明らかにして報告した。その際、プロモーターアッセイなどの方法により、エンハンサーの変異が *ALAS2* のプロモーター活性を低下させることを明らかにしたが、診断を確定するためには、同部の変異により実際に赤芽球内におけるヘム合成量が低下することを示す必要がある。本年度は、近年広く用いられつつある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明らかにすることを試みた。さらに、2 年目には遺伝性鉄芽球性貧血における特徴的な表現型の変化が観察されるかどうかについても検討した。

赤芽球系培養細胞である K562 細胞を用い、ゲノム編集技術としては LifeTechnologies 社の GeneArt CRISPR/Cas9 システムを用いた。このシステムは、ガイド RNA と Cas9 nuclease を同じベクターから発現させる方法により、一種類のベクターを細胞内に導入するのみで、ゲノム DNA の目的の部分で切断することができる。その後、切断部の修復が起こる際に同部のゲノム DNA にランダムな欠失や塩基の挿入が起こるため、高頻度に変異が導入されるシステムである。ガイド RNA の配列としては、ヒト *ALAS2* 遺伝子第 1 イントロンのエンハンサー配列、その中心となる GATA1 結合配列の近傍の配列とした。このようにして作成した *ALAS2* intron1 enhancer editing 用ベクター (以下、pCRISPR-*ALAS2*int1GATA) を Nucleofector (ロンザジャパン株式会社) を用いて K562 細胞に導入し、限界希釈法によりクローニングを行った。その後、Survayor Assay (Transgenomic 社) により変異が導入されていると予想されるクローンを選択し、最終的に *ALAS2* エンハンサー部分を PCR 法により増幅した後に塩基配列を決定し、変異が導入されているクローンを選択した。このようにして *ALAS2* エンハンサーに変異が導入されたクローン (変異 K562 細胞) を選別し、それらから total RNA を抽出し、*ALAS2* mRNA の発現量を RealTime PCR 法により野生型 K562 細胞と比較した。また、ヘモグ

ロビン染色によりヘモグロビン陽性細胞の割合を算出した。さらに、鉄染色により鉄芽球性貧血に特徴的な環状鉄芽球が観察されるか否か、あるいは環状鉄芽球で発現が亢進していると言われるミトコンドリア型フェリチンの発現がどのように変化するかについても検討した。並行して、*ALAS2* 遺伝子以外の遺伝子にも効率よく変異の導入が可能かどうかについても、ミトコンドリアに局在するタンパク質分解酵素の一部である *CLPX* 遺伝子を対象として検討を行った。

Nucleofector による K562 細胞への pCRISPR-*ALAS2*int1GATA (プラスミド) 導入高率は非常に良好で、限界希釈によりクローニングした後も約 50%。また、それぞれのクローンの変異導入部位における変異のタイプをシーケンスにより検討したところ、多くは欠失で、数塩基から 30 塩基程のものが大半を占めた。それ以外に一部では数塩基の挿入も認められた。また、今回の検討では過半数の変異導入クローンで両方のアレルに異なる変異が導入されており、変異導入の効率も非常に良好であった。これらのクローンの中から両方のアレルに変異が導入されたクローンを選択して *ALAS2* mRNA 量を RealTime PCR 法により野生型の K562 細胞と比較したところ、比較した全ての変異導入クローンで *ALAS2* mRNA の発現が低下しており、また、これらの変異導入クローンにおいては野生型と比較してヘモグロビン陽性率も低下していた。さらに、環状鉄芽球で特異的に高発現しているとされるミトコンドリア型フェリチンの mRNA の発現も野生型に比較して数倍から数百倍に増加していたが、鉄染色によって観察される鉄芽球性貧血に特徴的な環状鉄芽球の様な細胞は観察されなかった。*ALAS2* 遺伝子とは異なる遺伝子座に存在する ATP 依存性タンパク質分解酵素である *CLPX* についても変異の導入を試みたところ、*ALAS2* 遺伝子で行ったのと遜色のない効率で変異の導入が認められ、1 回のプラスミドの導入により両方のアレルに変異が導入され、その結果、*CLPX* タンパク質の発現が欠失している細胞も得られた。

d. CDA

CDA と診断され同意を得た症例について遺伝子診断を行った。22 例中 6 例に遺伝子変異を確認し、5 例では I 型の責任遺伝子 *CDAN1* の変異 (2 例が

(P1129L)、1 例が (P185fs)、ex12 (N598S)、1 例が P293R、1 例が R725W、P672L) を認めた。1 例では variant 型の責任遺伝子 *KLF1* の変異 (E325K) を認めた。I 型と診断された症例では骨髄において I 型に特徴的とされる核間架橋が確認された。

既知の責任遺伝子変異が認められなかった症例について、次世代シーケンスによるターゲットシーケンスを行った。エクソームシーケンスによる新規責任遺伝子の探索では、12 例中 4 例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。2 例が *SPTA1* の変異 ((R28H)、(Y2280C)、(W2172X)) であり、1 例が *G6PD* の変異 (V424L) であり、1 例が *ANK1* の変異 (R935X) であった。

e. SCN

重症先天性好中球減少症 (Severe congenital neutropenia, SCN) は、慢性好中球減少、骨髄像での前骨髄球・骨髄球での成熟障害、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再移植を含めた SCN 10 例 11 回の骨髄移植症例が行われた。症例 1 から 7-1 までは初回移植、症例 7-2 から 10 までは再移植であった。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 (表 3)。

f. 先天性血小板減少症

本研究 (平成 26 年 4 月から平成 28 年 1 月現在) では、34 例の先天性血小板減少症を疑う症例を解析し、MYH9 異常症 17 例、Bernard-Soulier 症候群ホモ接合体 3 例・ヘテロ接合体 2 例、2B 型 von Willebrand 病 1 例、gray platelet 症候群 1 例、ACTN1 異常症 1 例の診断に至り、9 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。Bernard-Soulier 症候群については、世界的コンソーシアムを結成し、遺伝子異常と臨床症状との関連性を示し、重症度分類を行い、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。この間の臨床背景として、難病情報センター Hp に DBA 診断基準が掲載され、日本小児血液・がん学会中央診断事業が整備され、本班の DBA 遺伝子診断が多数症例に実施されてきた。この学会疾患登録事業に登録された多くの遺伝性貧血疾患は、学会中央診断事業を利用している。

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、二次データの収集し、同時に健康情報、診療情報を収集するコホート研究が必要である。

このデータベースを一般臨床で利用されている小児慢性特定疾患医療費助成事業から検証した。この事業は、公的医療助成事業であり、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が収集されている。しかし、今回の比較検討では、学会疾患登録と小慢データの間での病名の不統一という根本的な問題、古

典的 DBA 診断基準の一般への浸透や適用の有無も問題、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などの問題が明らかになった。しかし一方で、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。

DBA は、まだ約半数が原因遺伝子不明である。今回の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、新規原因候補遺伝子として *RPS15A* (c.G213A) を同定し、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*) を見出しているため、この発見により、我が国で新規に発見された 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。

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。MLPA-A を用いた方法では、既知の変異のみが対象となるものの、極めて有用であった。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。

マウスの FA モデルの検討では、FA 患児の胎内の生存に母親の *ALDH2* の正常アレルが必須である。これは、*ALDH2* の分解ターゲットである内因性のアルデヒド (アセトアルデヒドが考えやすい) が胎盤を通過して母親の胎内で分解されることを示唆し

ている。一方、我々のヒトにおける観察では、FA 患児の生存には母親の *ALDH2* の正常アレルは必須ではない。*ALDH2* の A 型バリエーションも多少の活性を保持している可能性があり、そのため、胎児の生存が保たれる可能性も考えられる。あるいは、他の *ALDH* アイソザイムがヒトでは活性ないし発現が高く、*ALDH2* の活性低下を補っている可能性もあろう。そもそもヒトでは、アルデヒドの産生レベルが低く、母親から供給される *ALDH2* の活性が低くても問題が起こりにくい可能性も否定はできない。しかし、この最後の可能性は、ヒトでは FA 遺伝子欠損単独で骨髄不全が発症し、マウスでは *ALDH2* との二重欠損が必要であることを考えると、ありそうもないと思われる。

AA 型患児のみならず、GA 型あるいは GG 型の患児であっても、母親の遺伝子型の影響を検出できなかった。患児自身の *ALDH2* 遺伝子型が非常に大きな影響を持つことを考えると、母親の遺伝子型の影響がないことは、マウスに比べ、ヒトでは胎盤が内因性アルデヒドに対してより効果的なバリアーとして機能しているのではないかと思われる。さらに、*ALDH2* バリエーションにわずかに残った活性、または、マウス (18 種) よりも一つ多い *ALDH* アイソザイム (ヒトでは 19 種) などが効果的な防御効果を与えている可能性も考えられる。

ファンコニ貧血患者の診断は、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によって行われる。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)、*BRC A2* (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。

骨髄不全に対する治療法では、本邦での fludarabine を前処置に用いた造血細胞移植の成績は良好であり、骨髄形成症候群、急性骨髄性白血病に進展した症例では白血病に移行する前に移植を施行することが重要である。HLA 一致の同胞間移植の成績は良好であるが、同胞の FA を否定することが大切である。

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。さらに、研究期間内に 2 例の Pearson 症候群の症例を同定した。いずれも新生児期よりの高度貧血により本疾患が疑われ、小児科医より登録して頂いた。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、診断がつか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。

コード領域の変異がタンパク質の機能に与える影響を明らかにすることは、そのタンパク質の機能の評価方法が確定している場合にはそれほど困難ではないが、タンパク質の機能が明らかでない場合、あるいは機能が明らかであってもその評価の方法が確立していない場合には、遺伝子変異が同定されたとしても、それが疾患の原因になりうるかどうかを判

定することは困難である。実際、近年の次世代シーケンサーの進歩により全てのタンパク質のコード領域の配列を明らかにするエクソーム解析が盛んに行われるようになり、家族歴などから遺伝性と推定されていても原因が不明であった症例で新たな候補遺伝子が次々に同定されており、現在これらの遺伝子変異がどのように当該疾患の発症に関与するのかについて更なる検討が行われている。また、次世代シーケンサーの更なる改良とコストの低減により、エクソーム解析によっても原因遺伝子が明らかにならない症例については、全ゲノム解析が行われる可能性も高まっている。このような場合、プロモーター部分やイントロン部分の変異なども多数同定されると予想されることから、それらの変異がどのように疾患の発症に関与するのかを明らかにする方法を確立するのは急務であると考えられる。今回の研究では、近年盛んに用いられるゲノム編集システムを用いて培養細胞の染色体上の特定の領域に変異を導入することにより、イントロン領域の変異が当該遺伝子の発現制御に関与している可能性が高いことを細胞レベルで明らかにした。さらに、*ALAS2* 遺伝子とは別の遺伝子座に存在する *CLPX* 遺伝子についても、*ALAS2* と同様の効率で変異の導入が可能であることを示した。これらの結果は、ゲノム編集技術で特定の遺伝子の機能を欠失させることにより、疾患モデル細胞を比較的容易に樹立できる可能性を示すものと考えている。一方で、特定の疾患に特異的な表現型が観察できないなどのモデル細胞としての限界も明らかとなっており、今後は iPS 細胞などの非腫瘍性の正常な機能を持つ細胞を利用して疾患モデル細胞を作成するなどの改善も必要であろう。いずれにしても、内在性の遺伝子の発現調節を細胞レベルで直接観察できるメリットは大きく、今回行ったのと同様の方法は、遺伝性鉄芽球性貧血のみならず、様々な遺伝性疾患において、網羅的な検索により同定された遺伝子変異と疾患との関連を明らかにし、確定診断に至るために有用であると考えられる。

CDA 疑いとされた症例は 22 例中、既知の責任遺伝子の変異を認めた症例は 6 例のみであった。その原因としては、CDA の鑑別が困難であること、日本人に特有な CDA の病型の存在する可能性が挙げられる。また、6 例中 5 例が I 型の責任遺伝子である

CDAN1 の変異を認めたことから、日本人においては I 型の頻度が高い可能性が示唆された。次世代シーケンサーによる解析で、溶血性貧血の原因遺伝子の変異を複数例に認めた。この事実は、CDA と溶血性貧血の鑑別が困難であることを示唆し、貧血鑑別における遺伝子診断の重要性が再確認された。

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。*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全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、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