

- 正幸, 川上和之, 松井英雄, 林和彦, 斎藤加代子, 菅野仁. イリノテカンによる重症下痢症を予測する PGx バイオマーカーとしての CYP2F1 遺伝子多型. 日本人類遺伝学会第 59 回大会 (2014 年 11 月 20 日, 東京).
- 3) 神尾英則, 神尾孝子, 尾上佳子, 市東正幸, 青木貴子, 内山智貴, 亀岡信悟, 斎藤加代子, 菅野仁. テガフル・ウラシル投与による肝機能障害を予測する新規 PGx バイオマーカーの探索. 日本人類遺伝学会第 59 回大会 (2014 年 11 月 20 日, 東京).
- 4) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Ohara A, Ishiguro A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated red cell reduced glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. 56th ASH Annual Meeting & Exposition (2014 年 12 月 6 日, サンフランシスコ). Blood 2014;124(21):1342(abstract).
- 5) 市東正幸, 青木貴子, 槍澤大樹, 小倉浩美, 大賀正一, 岩井朝幸, 末延聡一, 伊藤悦朗, 奥野友介, 小島勢二, 小川誠司, 菅野仁. 原因不明先天性溶血性貧血症例の全エクソーム解析による膜骨格蛋白遺伝子変異の同定. 第 76 回日本血液学会学術集会 (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
- 6) 菅野仁, 青木貴子, 市東正幸, 槍澤大樹, 小倉浩美. わが国における G6PD 異常症の現状. 第 76 回日本血液学会学術集会 (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
- 7) 菅野仁. 新生児・乳児期に発症する先天性溶血性貧血の病因と診断. 第 24 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会 (2014 年 6 月 13 日, 横浜).
- 8) 槍澤大樹, 岡本好雄, 松田和樹, 久保田友晶, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 今野マユミ, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. 安全な CART の運用と適応拡大への新たな試み. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014 年 5 月 15 日, 奈良).
- 9) 岡本好雄, 松田和樹, 久保田友晶, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. クリオプレシピテート製剤の院内調製と心臓血管外科手術への応用. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014 年 5 月 15 日, 奈良).
- 10) 久保田友晶, 松田和樹, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 岡本好雄, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. 非溶血性輸血副作用発生状況と副作用報告回収率改善への取り組み. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014 年 5 月 15 日, 奈良).
- 11) 松田和樹, 久保田友晶, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 岡本好雄, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. 当院における静注用免疫グロブリン (IVIG) の使用状況について. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014 年 5 月 15 日, 奈良).
- 12) 槍澤大樹, 岡本好雄, 菅野仁. 安全な CART の運用と低温保存腹水を用いた適応拡大への新たな試み. 第 35 回日本アフェレシス学会学術集会ワークショップ (2014 年 9 月 27 日, 東京).
- 13) 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 (2015.10.16, 東京).
- 14) 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).
- 15) 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).

- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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。また、アルデヒド分解酵素ALDH2のバリエーションがFAの骨髄不全の悪化因子であることを明らかにしてきた。本研究では、(1) 母親のALDH2の遺伝子型のFA患者への影響を解明し、(2) 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。これらは、今後の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、稀ながら、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。

最近の研究の進展により、FAはDNA損傷への細胞応答欠損を基盤として発症する「ゲノム不安定性症候群」の一つであることが明らかとなった。FA症例においては、現在19種類におよぶ数多い原因遺伝子の異常により、DNA損傷応答や修復において重要な機能をもつFA経路の機能が欠損し、DNA障害の蓄積によって造血幹細胞不全、発がんなどの重篤な症状を引き起こすと考えられる。しかし、その病態の詳細は未だ十分理解されたとはいえず、骨髄移植以外、本質的な治療法の開発には至っていない。

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において、骨髄不全と白血病の病態が強く促進されることが報告された（Langevin et al. Nature 2011; Garaycochea et

al. Nature 2012）。ALDH2は、飲酒等の外因性、体内代謝による内因性のアセトアルデヒドを主な基質とし、アルデヒド代謝に関わる重要な酵素である。日本、韓国、中国において高頻度に変異型アレル（ここでは正常活性のものをG型、活性のないものをA型とする）が見出される。すなわち、ホモでA型を持つ個人では酵素活性が消失し、ヘテロのGA型でもドミナントネガティブ効果により活性が2-4割に低下し、飲酒後の顔面紅潮、頻脈などの原因となることが知られている。

上記のマウスでの結果は、内因性アルデヒドによるDNA損傷がFA遺伝子欠損によるDNA修復機能の対象となることを強く示唆している。さらに、このダブルノックアウトマウス胎児は、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もつことを示唆する所見である。

これらの報告に基づき、我々は日本人FA患者でALDH2の遺伝子型を調べ、ALDH2酵素活性が正常なGG型に比べて、ヘテロバリエーションのGA型では軽度に、ホモバリエーションのAA型では強く骨髄不全進行が促進されること、AA型ではMDSの発症も強

く促進されることを見出した (Blood 2013)。平成 26 年度は、さらに追加症例での *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、母親の *ALDH2* 遺伝子型が FA 患児に及ぼす影響を検討した。

また、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、骨髄移植の実施と使用薬剤等の判断の上で重要と思われる。平成 27 年度は、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。さらに、念のため *ALDH2* のゲノム領域を PCR で増幅しサンガー法でバリエーションを確認した。同様に、*FANCA* や *FANCG* の変異についても PCR とシーケンスで確認を行った。

(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

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-AA 型症例は全例、生下時ないし生後まもなく血液学的異常を認め、GG 型、GA 型とは全く異なる経過をとった。1 例は、重症再生不良性貧血、残り 4 例は MDS として発症した。また、全例臓器の奇形を伴っていた。これらの AA 例の母親の *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。

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。

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。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

我々の従来の検討で、FA 患児における骨髄不全の進行が患児自身の *ALDH2* 遺伝子型の影響を強く受けていることを報告してきた。特に、*ALDH2*-AA 型の患児は血液学的に非常に重症であることが示されていた。さらに、今回追加の AA 症例を得て、その結論が再検証され、さらに確証を得ることができた。

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りうる。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*)、*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、未だに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。

E. 結論

FA の血液学的病態、重症度などにおよぼす患児本人の *ALDH2* 遺伝子型の明らかな重要性に比して、母親の *ALDH2* 遺伝子型は、胎児の発達が行われる環境にそれほど影響を与えていないと思われる。また、日本人 FA 患者の分子診断に迅速簡便な方法を考案し、実際に有用であると考えられた。これらの知見は今後の 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) Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. Defective FANCI Binding by a Fanconi Anemia-Related FANCD2 Mutant. *PLoS One*. 2014;9(12):e114752.
- 2) Ishii K, Ishiai M, Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Niwa O, Takata M, and Shinohara T. The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b Pathway Regulates the Radiation Response of Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2014;3(4):676-89.
- 3) Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H. Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using *Escherichia coli* cells. *Protein Expr Purif*. 2014;103C:8-15.
- 4) Huang Y, Leung JW, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X, Huong D, Takata M, Chen J, Li L. Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. *Cell Rep*. 2014;7(6):1849-57.

- 5) Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugasawa K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. *Cell Rep*. 2014;7(4):1039-47.
- 6) Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, Takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, Enomoto T. Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(5):1002-12.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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 ν ; (POLN). *J Biol Chem*. 2015 Aug 12;290(40): 24278-93.
2. 学会発表
- 1) 高田穰. (招待講演) ファンconi貧血症とDNA修復メカニズム. 第36回日本光医学・光生物学会シンポジウム (2014年7月25日, 大阪).
- 2) 高田穰. 遺伝性DNA修復異常疾患: 家族性乳がんとファンconi貧血. 日本家族性腫瘍学会第17回家族性腫瘍セミナー (2014年8月24日, 東大阪).
- 3) 平明日香. 日本人ファンconi貧血患者では変異型ALDH2が骨髄不全の早期発症に関連する. 第2回ブルストル血液学アカデミー (2014年9月20日, 京都).
- 4) 平明日香, 吉田健一, 佐藤浩一, 嶋本顕, 田原

- 栄俊, 胡桃坂仁志, 小川誠司, 高田穰, 矢部普正, 矢部みはる. 日本人ファンconi貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
- 5) 高田穰, 勝木陽子, 佐藤浩一, 石合正道, 胡桃坂仁志. ファンconi貧血経路とそのキータンパク質 FANCD2 の機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
- 6) 坂本裕貴, 大川沙織, 穀田哲也, 勅使河原愛, 飯島健太, 高田穰, 小松賢志, 田内広. 相同組換え修復の細胞周期依存性解析. 日本放射線影響学会第 57 回大会 (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島).
- 7) 秋山 (張) 秋梅, 吉川幸宏, 松井亜子, 細木彩夏. 低線量 (率) 放射線による生物影響研究の新展開. 日本放射線影響学会第 57 回大会 (ワークショップ) (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島).
- 8) Takata M, Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Tahara H, Kurumizaka H, Ogawa S, Yabe H, Yabe M. UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients. **The 9th 3R Symposium** (2014 年 11 月 17-21 日, 御殿場).
- 9) Takata M. Comprehensive analysis of Japanese Fanconi anemia (FA) patients has led to the identification of an E2 enzyme UBE2T as a novel FA gene. 日米修復会議 (2014 年 10 月 29 日, 鳴門).
- 10) 高橋大介, 佐藤浩一, 平山恵美子, 高田穰, 胡桃坂仁志. DNA 鎖間架橋除去における FAN1ヌクレアーゼの役割. 第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15-18 日, 京都).
- 11) 久野真央, 平明日香, 高田穰. ゲノム編集酵素によるファンconi貧血原因遺伝子 FANCA のノックアウト細胞作製の試み. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
- 12) 平明日香, 吉田健一, 佐藤浩一, 嶋本顕, 田原栄俊, 胡桃坂仁志, 小川誠司, 高田穰, 矢部普正, 矢部みはる. 日本人ファンconi貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
- 13) 高田穰, 勝木陽子, 佐藤浩一, 石合正道, 胡桃坂仁志. ファンconi貧血経路とそのキータンパク質 FANCD2 の機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
- 14) 佐藤浩一, 石合正道, 高田穰, 胡桃坂仁志. Fanconi 貧血患者にみられる FANCD2 変異体の機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
- 15) 平山恵美子, 高橋大介, 佐藤浩一, 高田穰, 胡桃坂仁志. DNA 鎖間架橋修復で働く FAN1ヌクレアーゼの生化学的機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
- 16) 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).
- 17) 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coni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).
- 18) 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).
- 19) Hira A, Yoshida K, Sato K, 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. **27th Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium** (2015 年 9 月 17-20 日, カナダ・トロント).
- 20) 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. 16th Ataxia-Teleangiectasia Workshop (2015年10月11-14日, 中国・北京).

- 21) 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).
- 22) 石合正道, 岩寄航, 高橋数冴, 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).
- 23) 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. 27th Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium (2015年9月17-20日, カナダ・トロント).
- 24) 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).
- 25) 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：先天性骨髄不全症の登録と診療指針作成を目指して、新生児から乳児期早期に貧血と汎血球減少を来す例を集積し、その表現型・遺伝子診断および治療反応性について検討した。Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) は 5 家系 8 名、先天性骨髄不全と鑑別を要する血球減少例は 7 名を解析した。DBA は、輸血依存例が多く赤血球酵素スクリーニングが困難で網羅的遺伝子解析を必要とした。DBA との鑑別を必要とした 2 例は、赤芽球癆の Down 症児と新生児溶血性貧血でクームス陽性でいずれも治療抵抗性であった。重症度の異なる鎌状貧血の父子は、 α -globin 遺伝子変異の修飾と判断した。汎血球減少と免疫不全症を呈した新生児 2 例のうち奇形徴候のない例は、Ikaros 欠損症を疑い解析中だが、もう 1 例は確定診断に至っていない。新生児および乳児期早期に発症する先天性造血障害の病因は多彩なため、適切なスクリーニング後に遺伝子解析を効率的に適用することが重要である。

A. 研究目的

新生児は溶血と無効造血の鑑別が困難で造血障害の診断が難しい。先天性造血障害は血球の産生不全（骨髄不全症）と崩壊亢進（溶血性貧血）に分けられ、胎児感染と遺伝性疾患が主因となる。患児はしばしば奇形徴候を有し、赤芽球癆や汎血球減少を呈する疾患の診断と治療は容易でない。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

新生児から乳児期早期にかけて先天性貧血 (Diamond-Blackfan 貧血:DBA を含む) または、汎血球減少を呈した症例を対象に、汎血球減少群と単一血球減少群に分けて骨髓像を検討の上、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。未確定診断例には、可能な限り家族も含め、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) DBA および DBA と鑑別が必要な新生児・乳児例

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、造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 5g/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。

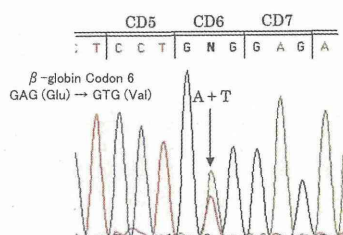


図 1. 貧血児と貧血のない α サラセミア父の HbS

2) 汎血球減少と免疫不全症新生児

1 例は、35 週で出生した奇形徴候のない低出生体重の男児。出生時より汎血球減少と B 細胞欠損を認め、3 生日に頭蓋内出血を来した。輸血依存となったが、10 生日頃よりしだいに回復し、生後 4 か月時に血球数はほぼ正常化した。IKZF1 変異を確認中である。もう 1 例は、胎児水腫、牛眼に汎血球減少、進行性肝不全を合併した極低出生体重児の女児。HLA 一致非血縁臍帯血移植を行い、day30 に split chimera となった。既知の疾患に合致するものはなく、網羅的遺伝子解析を進めている。

D. 考察

DBA と鑑別を要する疾患は多様で、特に新生児から乳児早期に発症する例は、無効造血と溶血の鑑別が難しい。クームス陽性の赤芽球癆も存在する。DBA にみられる deletion などの構造異常や原因遺伝子の変異以外の modifier が表現型に影響することもあり、ターゲットリシーケンスと全エクソーム解析を行う前の臨床的評価が必須である。

E. 結論

DBA を含む先天性造血不全症の確定診断には、症候分類による効率的スクリーニングと網羅的遺伝子解析の組み合わせを臨床応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T. Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant. *Pediatr Transplant.* 2014;18(6): E208-11.
- 2) Wang R, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Sawada T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanazaki R, Shiraiishi Y, Chiba K, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, 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;168:854-864.
- 3) Maeba S, Hasegawa S, Shimomura M, Ichimura T, Takahashi K, Motoyama M, Fukunaga S, Ito Y, Ichiyama1 T, Ohga S. Successful treatment of corticosteroid with antiviral therapy for a neonatal liver failure with disseminated herpes simplex virus infection. *Am J Perinatol.* 2015;5(2):e089-92.
- 4) Okada S, Hasegawa S, Suzuki Y, Ichimura T, Kaneyasu H, Shimomura M,

Wakabayashi-Takahara M, Nakamura K, Kobayashi M, Ohga S. Remission of autoimmune neutropenia after the development of Kawasaki disease. *Pediatr Int*. 2015;57(5):1012-4.

日, 金沢).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

いずれもなし

2. 学会発表

- 1) 市村卓也, 湯尻俊昭, 下村麻衣子, 永井功造, 西眞範, 吉田健一, 小川誠司, 奥野友介, 村松秀城, 小島勢二, 菅野仁, 伊藤悦朗, 大賀正一. Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) 母子の診断における全エクソーム解析の有用性. 第 76 回日本血液学会学術集会 (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
- 2) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Ohara A, Ishiguro A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated red cell reduced glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. **The 56th Annual Meeting & Exposition, American Society of Hematology 2014**. (2014 年 12 月 6-9 日, 米国・サンフランシスコ).
- 3) 太田陽香, 市村卓也, 下村麻衣子, 飯田恵庸, 寺地真一, 大賀正一. Rituximab により寛解に至った難治性自己免疫性溶血性貧血の乳児例. 第 126 回日本小児科学会山口地方会 (2015 年 7 月 12 日, 宇部).
- 4) 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. 日本人類遺伝学会第 60 回大会 (2015 年 10 月 14-17 日, 東京).
- 5) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Kanazaki R, Terui K, Sasahara Y, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Shiraiishi Y, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Uechi T, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene in a Diamond-Blackfan anemia family. 第 77 回日本血液学会学術集会 (2015 年 10 月 16-18

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

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

研究分担者 小原 明（東邦大学医学部小児科 教授）

研究要旨：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、遺伝性貧血の症例把握に努めた結果、2006～2014年に新規診断DiamondBlackfan貧血症例は74例、特発性赤芽球癆は40例であった。また、2008年～2014年の期間の鉄芽球性貧血は5例、Congenital dyserythropoietic anemiaは3例であった。この間に、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。このデータベースの検証と、適切な二次情報の収集項目を求めることを目的に、本研究2年目のH27年度は、小児慢性特定疾患医療費助成意見書データを参照して、「先天性赤芽球癆・赤芽球癆」診断で申請した症例を検討した。2つのデータベース間には、症例数の違いがあり、病名の不統一、診断基準適用の問題などが明らかとなったが、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いた。この成果を踏まえて、「小児造血障害」データベースの精度向上と、先天性遺伝性貧血の啓発活動が可能になる。

A. 研究目的

【背景】

稀少疾患である遺伝性貧血は、診断法や治療開発に疫学データベースの必要性が高い。日本小児血液・がん学会疾患登録事業調査結果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、Diamond Blackfan (DBA) を始めとする小児期造血障害疾患の症例把握に努めた。また、平成27年度は小児慢性特定疾患医療費助成データ（以下、小慢データ）を参照した。

【目的】

本邦の小児期造血障害疾患症例を悉皆性高く収集して疫学データベース構築する。日本小児血液・がん学会疾患登録事業を一次調査とした疫学観察研究を基盤とした小児期造血障害疾患の詳細なデータベース構築を目指す。同時に、本データベースの検証と適切なデータベース収集項目を探索的に求めることを目的に、同時期の小慢データを検討した。

B. 研究方法

本研究班の研究では疫学観察研究として実施し、治療介入は行わない。日本小児血液・がん学会会員240施設を対象にした全例登録（疾患登録事業）は、前年診断症例を対象にWeb登録にて実施される。構築されるデータベースには、小児期発症の造血障害全般を網羅し、遺伝性貧血症例に限定はしない。学会では、中央診断システムが活動し診断困難例の確定診断に用いられている。

今回は、許諾を得て小慢データを利用し、同助成意見書病名「先天性赤芽球癆・赤芽球癆」データと本データベースを比較検討し、小慢データの利用可能性について試験的に検討した。

（倫理面への配慮）

疾患登録事業研究計画は、小児血液学会臨床研究審査委員会の倫理審査承認を得た。疾患遺伝子診断情報を含む二次調査は本年度実施していない。倫理審査を承認後に実施する。

小慢データは、主治医意見書を基にしており、患

者自由意思により申請される。患者は、意見書作成時に研究資料提供に同意している。また、本研究者には匿名化されて提供された。

C. 研究結果

2006～2014年診断登録症例数を表に示す(表1)。

- a. 【H26、27年度】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、2008～2014年の鉄芽球形貧血は5例、Congenital dyserythropoietic anemiaは3例であった。
- b. 【H27年度】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、又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。
- c. 【H27年度】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なかった。

D. 考察

1. データベースの背景：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。

2. データベースの質と限界：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。
3. データベースの検証、小慢データとの違い：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。

E. 結論

学会疾患登録事業を一次調査情報とする疾患データベースが構築された。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。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe K, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line

- treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor versus immunosuppressive therapy. *Haematologica*. 2014;99(12):1784-1791.
- 2) Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica*. 2014;99(8):1312-1316.
 - 3) Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children. *Ann Hematol*. 2014;93(5):747-752.
 - 4) Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S. Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children. *Haematologica*. 2014; 99(4):664-671.
 - 5) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol*. 2015;168(6):854-864.
 - 6) 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.
 - 7) 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;100(12):1546-1552.
 - 8) Ikeda F, Toki T, Kanezaki 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):112-114.
2. 学会発表
研究期間に本研究に関連する学会発表はない。
- 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

表 1.

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	216 / 239	219 / 242	212 / 230	171 / 232
(%)	83%	88%	90%	90%	90.3%	90.4%	90.5%	92%	74%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	62	49	49	38
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5	11	1	3
AA / PNH	2	1	1	0	1	0	0	0	0
Fanconi Anemia	5	4	6	1	4	2	6	5	3
Diamond-Blackfan	9	6	9	10	6	9	6	10	9
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6	4	0
Schwachman-Diamond	0	1	1	2	0	0	2	2	0
Cong. Dyserythropoietic anemia	No data	·	1	0	0	1	0	0	1
Sideroblastic anemia	No data	·	2	1	1	0	1	0	0
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4	1	2
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	5	3	0
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0	0	1
Cong. Thrombocytopenia	No data	·	·	·	·	·	12	11	16
Idiopathic Thrombocytopenia	No data	·	·	·	·	·	406	348	316
Cong. Spherocytosis	No data	·	·	·	54	49	26	32	37
Cong. Elliptocytosis	No data	·	·	·	2	1	1	2	1
G6PD deficiency	No data	·	·	·	5	5	3	1	5
PK deficiency	No data	·	·	·	0	0	0	0	0
other erythrocyte enzyme def.	No data	·	·	·	2	0	0	0	0
Sickel cell disease	No data	·	·	·	1	1	0	0	1
Unstable hemoglobinopathy	No data	·	·	·	1	0	0	0	0
Thalasemia	No data	·	·	·	18	16	11	8	7
other hemoglobinopathy	No data	·	·	·	0	0	0	1	0

表 2.

診断年	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
日本小児血液・がん学会疾患登録に基づく症例数 (登録症例数)									
Diamond-Blackfan	9	6	9	10	6	9	6	10	9
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6	4	0
小児慢性疾患医療費助成制度に基づく症例数 (助成申請症例の診断年度別症例数)									
先天性赤芽球癆・赤芽球癆	8	7	6	9	5	6	8	No data	No data

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

DBA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 照井君典（弘前大学大学院医学研究科小児科学 准教授）

研究要旨： Diamond Blackfan 貧血 (DBA) は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として 12 種類のリボソームタンパク (RP) 遺伝子と *GATA1* 遺伝子が同定されているが、我が国の DBA 患者の約半数は原因遺伝子が不明である。今回の研究期間内に新規症例 41 例の遺伝子診断を行い、21 例で既知の原因遺伝子の変異を同定した。また、サンガーシークエンスや次世代シークエンサーを用いたターゲットシークエンスを行っても原因遺伝子が不明な 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、これまでに報告のない新規原因遺伝子 *RPS15A*（スプライス変異：c.G213A）を同定した。また、臨床的に DBA と診断されていた 2 家系が、他の先天性骨髄不全症であることが判明した。1 家系では *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 家系では *SBDS* 遺伝子に変異が認められ、Schwachman-Diamond 症候群 (SDS) と診断された。先天性骨髄不全症では臨床的に診断困難な症例が存在するため、正確な遺伝子診断法を確立することが重要である。そのためには、今後も新規原因遺伝子の解析を進めていく必要がある。

A. 研究目的

Diamond Blackfan 貧血 (DBA) は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として 12 種類のリボソームタンパク (RP) 遺伝子と *GATA1* 遺伝子が同定されているが、我が国の DBA 患者の約半数は原因遺伝子が不明である。本研究の目的は、既知の原因遺伝子を解析して DBA の遺伝子診断を行うとともに、未知の原因遺伝子を同定して、より正確な遺伝子診断法を確立することである。

B. 研究方法

最初に、DBA で遺伝子変異が報告されている 12 種類の RP 遺伝子 (*RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL26*, *RPL35A*) と *GATA1* 遺伝子について、次世代シークエンサー (MiSeq) を用いてターゲットシークエンスを行った。次に、定量的 PCR 法と SNP アレイ法により RP 遺伝子の大欠失を解析した。

この検索によっても原因遺伝子を同定できなかつ

た臨床検体について、次世代シークエンサーを用いた全エクソーム解析を行った。ヒト全エクソン領域を、ベイトと呼ばれる RNA ライブラリーを用いて溶液中でキャプチャーし、イルミナ社の高速シークエンサー HiSeq2000 で網羅的な解析を行った。得られた遺伝子異常は、サンガーシークエンスや次世代シークエンサーを用いたターゲットシークエンスにより確認した。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基多型が多数見つかる予想されるため、家族内の罹患者や非罹患者も解析し、結果を比較することにより原因遺伝子の候補を絞り込み、新規遺伝子変異の同定を試みた。

(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に従い、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、患者および家族に十分な説明を行い、文書による同意を得たのち、検体を連結可能匿名化して解析を行った。

C. 研究結果

新規症例 41 例の遺伝子診断を行い、21 例で既知の原因遺伝子の変異を同定した (*RPS19* 10 例、*RPL11* 2 例、*RPL5* 2 例、*RPL35A* 2 例、*RPS17* 2 例、*RPS7* 1 例、*RPS24* 1 例、*RPS26* 1 例)。

また、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスや大欠失の解析を行い、原因遺伝子が不明な 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、これまでに報告のない新規原因候補遺伝子 *RPS15A* (c.G213A) を 1 家系 3 例に見出した。変異のみられた 3 例 (本人、姉、母) はいずれも罹患者であり、非罹患者である父には変異は検出されなかった。次に、末梢血単核球より total RNA を抽出し、それを鋳型として cDNA を合成して RT-PCR を行い、*RPS15A* (c.G213A) がスプライス変異であることを確認した。また、臨床的に DBA と診断されていた 2 家系が他の先天性骨髄不全症であることが判明した。1 家系 3 症例では *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 症例では *SBDS* 遺伝子に変異が認められ、Schwachman-Diamond 症候群 (SDS) と診断された。

また、RP 遺伝子以外の新規原因候補遺伝子も同定した。

D. 考察

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、新規原因候補遺伝子として *RPS15A* (c.G213A) を同定した。この変異は、罹患者である姉妹と母親に検出され、非罹患者である父親には検出されなかった。この変異はスプライス変異を引き起こすことが mRNA を用いた解析から確認された。以上の結果から、*RPS15A* が DBA の新規原因遺伝子であることが強く示唆された。また、臨床的に DBA と診断されていた 2 家系が、他の先天性骨髄不全症であることを判明した。先天性骨髄不全症では、臨床的に診断困難な症例が存在するため、正確な遺伝子診断法を確立することが重要である。

また、RP 遺伝子以外の新規原因候補遺伝子も同定し、現在解析を進めているところである。

E. 結論

DBA の新規原因候補遺伝子 *RPS15A* を同定した。先天性骨髄不全症では臨床的に診断困難な症例が存在するため、正確な遺伝子診断法を確立することが重要である。そのためには、今後も新規原因遺伝子の解析を進めていく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. [Epub ahead of print]
- 2) 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.
- 3) Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Md SI, Md HN, Md HT, Md AS, 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.
- 4) Ishida H, Kato M, Kudo K, Taga T, Tomizawa D, Miyamura T, Goto H, Inagaki J, Koh K, Terui K, Ogawa A, Kawano Y, Inoue M, Sawada A, Kato K, Atsuta Y, Yamashita T, Adachi S. Comparison of Outcomes for Pediatric Patients With Acute Myeloid Leukemia in Remission and Undergoing Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation With Myeloablative Conditioning Regimens Based on Either Intravenous Busulfan or Total Body

- Irradiation: A Report From the Japanese Society for Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015;21:2141-7.
- 5) 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.
 - 6) Tomizawa D, Watanabe T, Hanada R, Horibe K, Horikoshi Y, Iwamoto S, Kinoshita A, Moritake H, Nakayama H, Shimada A, Taga T, Takahashi H, Tawa A, Terui K, Hori H, Kawano Y, Kikuta A, Manabe A, Adachi S. Outcome of adolescent patients with acute myeloid leukemia treated with pediatric protocols. *Int J Hematol.* 2015;102:318-26.
 - 7) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol.* 2015; 168:854-64.
 - 8) 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;174:525-31.
 - 9) Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T, Kanezaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Imaizumi M, Mitsui T, Hori H, Hara J, Horibe K, Nagai J, Goto H, Ito E. Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. *Genes Chromosomes Cancer* 2014;53:902-10.
 - 10) 照井君典, 金崎里香, 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症候群に伴う TAM 発症の分子機構. *日本産婦人科・新生児血液学会誌* 2015;25:49-54.
 - 11) 野村優子, 宮内潤, 太田栄治, 柳井文男, 宮下俊之, 照井君典, 伊藤悦朗, 廣瀬伸一. 2ヵ月後に芽球が再増加した一過性骨髄異常増殖症の超早産児例. *日本小児血液・がん学会雑誌* 2015; 52: 36-39.
 - 12) 王汝南, 金崎里香, 土岐力, 照井君典, 佐々木伸也, 工藤耕, 神尾卓哉, 佐藤知彦, 池田史圭, 荒木亮, 落合英俊, 伊藤悦朗. 非ダウン症小児急性巨核芽球性白血病にみとめられた新規 GATA1 インフレーム変異. *弘前医学* 2014;65: 227-237.
 - 13) 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症に合併した骨髄性腫瘍の分子病態. *血液内科* 2014;69: 200-206.
2. 学会発表
 - 1) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Kanezaki R, Terui K, Sasahara Y, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Shiraishi Y, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara Aa, Kojima S, Uechi T, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene in a Diamond-Blackfan anemia family. 第 77 回日本血液学会学術集会 (2015 年 10 月 16 - 18 日, 金沢).
 - 2) Terui K, Hanada I, Ikeda F, Ito T, Toki T, Kanezaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Hori H, Ito E. Gene alterations in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. 第 77 回日本血液学会学術集会 (2015 年 10 月 16 - 18 日, 金沢).
 - 3) Saida S, Nakamura M, Toki T, Nishinaka-Arai Y, Terui K, Yoshida K, Ogawa S,

- Nakahata T, Heike T, Watanabe K, Watanabe A, Ito E. Dysregulation of DNA Methylation Involves in Progression of Myeloid Leukemia in Down Syndrome. *Blood* 2015;126:S89. 第57回アメリカ血液学会 (2015年12月5-8日, 米国・サンディエゴ).
- 4) Muramatsu H, Watanabe T, Hasegawa D, Park MJ, Iwamoto S, Taga T, Ito E, Toki T, Terui K, Yanagisawa R, Koh K, Saito AM, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Watanabe K. Prospective Study of 168 Infants with Transient Abnormal Myelopoiesis with Down Syndrome: Japan Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group, TAM-10 Study. *Blood* 2015;126:S1311. 第57回アメリカ血液学会 (2015年12月5-8日, 米国・サンディエゴ).
- 5) Moritake H, Tanaka S, Nakayama H, Miyamura T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Saito AM, Shiba N, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Goto H, Manabe A, Horibe K, Mizutani S, Adachi S. The Outcome of Relapsed Childhood Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: A Report from the JPLSG AML-05R Study. *Blood* 2015;126:S2516. 第57回アメリカ血液学会 (2015年12月5-8日, 米国・サンディエゴ).
- 6) Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Wang RN, Terui K, Sasaki S, Kudo K, Sato T, Ito E. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-Blackfan anemia in Japan. 第76回日本血液学会学術集会 (2014年10月31日-11月2日, 大阪).
- 7) 照井君典, 金崎里香, 土岐力, 伊藤悦朗. (ワークショップ4 新生児の白血球異常症) ダウン症候群に伴う TAM 発症の分子機構. 第24回日本産婦人科・新生児血液学会 (2014年6月13-14日, 横浜).
- 8) Tomizawa D, Watanabe T, Hanada H, Horibe K, Horikoshi Y, Iwamoto S, Kinoshita A, Moritake H, Nakayama H, Shimada A, Taga T, Takahashi H, Tawa A, Terui K, Hori H, Kawano Y, Kikuta A, Manabe A and Adachi S. Outcome of Adolescent and Young Adults with Acute Myeloid Leukemia Treated with Pediatric Protocols: A Report from the 3 Japanese Cooperative Studies. 第56回アメリカ血液学会 (2014年12月6-9日, 米国・サンフランシスコ).
- 9) Takahashi H, Watanabe T, Kinoshita A, Yuza Y, Moritake H, Terui K, Iwamoto S, Nakayama H, Shimada A, Kudo K, Taki T, Yabe M, Matsushita H, Yamashita Y, Koike K, Ogawa A, Kosaka Y, Tomizawa D, Taga T, Saito A, Horibe K, Nakahata T, Miyachi H, Tawa A and Adachi S. High Event-Free Survival Rate with Minimum-Dose-Anthracycline Treatment in Childhood Acute Promyelocytic Leukemia: A Nationwide Prospective Study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). 第56回アメリカ血液学会 (2014年12月6-9日, 米国・サンフランシスコ).
- 10) Taga T, Watanabe T, Kudo K, Tomizawa D, 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 A, Horibe K, Nakahata T, Tawa A and Adachi S. Risk-Oriented Therapy for Myeloid Leukemia of Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study By the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). *Blood* 2014;124:S3668. 第56回アメリカ血液学会 (2014年12月6-9日, 米国・サンフランシスコ).
- 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

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

研究分担者 古山和道（岩手医科大学大学生化学講座分子医化学分野 教授）

研究要旨：遺伝性鉄芽球性貧血は比較的稀な疾患で、原因遺伝子が不明な症例も少なくなく、そのような症例を対象に次世代シーケンサを用いた網羅的な遺伝子解析が行われ、成果を挙げてきた。一方、同定された遺伝子変異が実際に疾患の原因になるか否かについての判断は、困難な場合が少なくない。そこで、本研究では最近利用が可能になったゲノム編集技術を用いて、特定の遺伝子に変異を導入することにより疾患モデル細胞を作成し、確定診断に役立つかどうかを検討し、有用である可能性を見出した。

A. 研究目的

次世代シーケンサの開発に伴い、網羅的な遺伝子解析が容易となり、原因遺伝子が不明であった患者において様々な遺伝子の変異が同定されている。一方で、同定された多くの遺伝子変異と表現型（疾患）の直接的な関連を確定するのは困難であることが少なくない。特に、遺伝子発現調節領域であるプロモーター領域やエンハンサー／サプレッサー領域の変異の評価は難しく、野生型と比較してプロモーター活性やエンハンサー活性が低下することを明らかにできても、それが病的な低下と言えるかどうかについては議論の余地が残る。最近、分担研究者の古山は、*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、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のかどうかについては確証が得られなかった。そこで、本研究では遺伝子変異と表現型の関連を比較的簡便かつ直接的に明らかにする方法を樹立することを目的に、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。これらの検討により、ゲノム編集技術を用いて疾患モデル細胞を樹立することが可能かどうか、さらにはその様な細胞が疾患の確定診断のために利用可能かどうかを明らかにすることを研究の目標とした。

B. 研究方法

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 の目的の部分を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