

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

DBAの遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 伊藤悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）

研究協力者 土岐 力（弘前大学大学院医学研究科小児科学 講師）

佐藤知彦（弘前大学大学院医学研究科小児科学 助教）

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15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。しかし、我が国のDBA患者の約半数は原因遺伝子が不明である。本年度も日本小児血液・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い、臨床的にDiamond-Blackfan 貧血と診断された26例中12例（46%）に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに180例のDBAの臨床情報と検体の収集および遺伝子解析を行い、103例（57.2%）に原因となるRP遺伝子変異を見出した。この中には、我々が見出した新規原因遺伝子 *RPL27*, *RPS27* 及び *RPS15A* が含まれている。これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながらエビデンスに基づいた診断基準および診断・治療ガイドラインの小改訂を行った。なお、「2017年度版診療ガイドライン」は日本小児血液・がん学会の認証を受けた後、同学会の編集書籍として平成29年度中に出版する予定である。専門医だけでなく一般小児科医をも読者対象とした実践的な内容となっている。

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15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。また、遺伝子診断により臨床的な診断が誤りであった症例が複数存在することが明らかとなった。本研究の目的は、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ことである。初年度（平成28年度）は、遺伝子診断の結果も含む精度の高い先天性造血不全のデータベースの作成を進め、診療ガイドラインの小改訂を行った。平成29年度以降は、データ収集と観察研究を継続し、正確な先天性造血不全の実態把握を行い、より精度の高い疾患データベースの確立とエビデンスに基づいた診断基

準、重症度分類と診療ガイドラインの改訂を行う。

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*, *RPS27*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL26*, *RPL27*, *RPL35a*）と *GATA1* 遺伝子について、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いてターゲットシーケンスを行った。次に、定量的PCR法とSNPアレイ法によりRP遺伝子の欠失を解析した。

得られたデータベースをもとに、エビデンスに基づいた診断基準の改訂、重症度分類の策定および診断・治療ガイドラインの改訂を行う。

（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27名の遺伝子診断を行い、10例 (*RPS19* 4例、*RPS26* 3例、*RPS7* 2例、*RPL5* 1例)で既知の原因遺伝子を同定した。これまでに遺伝子検査を施行した症例は180例となった。ターゲットシーケンスで原因遺伝子が不明で、かつSNPアレイで解析してもRP遺伝子の欠失が検出されない、14家系(非罹患者も含む)について、全エクソン解析を行った。今回の解析では、DBA以外の先天性造血不全症の原因遺伝子は同定されなかった。これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら、エビデンスに基づいた診断基準および診断・治療ガイドラインの小改訂を行った。これらの成果物を日本小児血液・がん学会の承認を受けて学会公認の診療ガイドラインとする予定である。すでに、DBAと共に他の7疾患の診療ガイドラインの改訂版を日本小児血液・がん学会の認定を受けるために、診断ガイドライン委員会に提出した。なお、「2017年度版診療ガイドライン」は日本小児血液・がん学会の認証を受けた後、同学会の編集書籍として2017年度中に出版する予定である。専門医だけでなく一般小児科医をも読者対象とした実践的な内容とした。

D . 考察

我が国のDBAは、本研究事業により原因遺伝子も含め次第にその実態が明らかになってきた。まだ約40%が原因遺伝子不明であるが、精度の高いデータベースの構築が進んでいると思われる。

本研究事業とAMEDの「稀少小児遺伝性血液疾患研究班」(小島班)の連携研究により、新規原因候補遺伝子*RPS15A*を見出した。本年度は、AMED-DBA研究班(伊藤班)との連携により、*RPS15A*の機能解析をゼブラフィッシュや赤芽球細胞株を用いた系で行い、DBAの原因遺伝子であることを確定し、*RPL27*、*RPS27*に次いで、我が国から新規に発見された3番目の原因遺伝子として報告した(Ikeda F et al, Haematologica 2016)。

平成28年度は、疾患ガイドラインの改訂にあたり、

予め出版社とも協議し、日本小児血液・がん学会編集の書籍として出版することを念頭に改訂作業を行った。最新のデータを含みながらより分かりやすい内容であり、専門医だけでなく一般小児科医の啓蒙活動にも大きく役立つことが期待される。

E . 結論

DBAの遺伝子診断を進め、精度の高いDBAのデータベースが構築されてきた。その成果をもとに診断基準、重症度分類と診療ガイドラインの改訂を行った。本研究班は、DBAの診療の質の向上に大きな貢献をしたと思われる。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuo H, Shiga S, Imai T, Kamikubo Y, Toki T, Terui K, Ito E, Adachi S. Purification of leukemic blast cells from blood smears using laser microdissection. **Int J Hematol.** 2017. [Epub ahead of print]
- 2) Noujima-Harada M, Takata K, Miyata-Takata T, Sakurai H, Igarashi K, Ito E, Nagakita K, Taniguchi K, Ohnishi N, Omote S, Tabata T, Sato Y, Yoshino T. Frequent downregulation of BACH2 expression in Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma. **Cancer Sci.** 2017. [Epub ahead of print]
- 3) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraiishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Md, Miyano S, Kojima S. Clinical Utility of Next-generation Sequencing for Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. **Genet Med.** 2017 [Epub ahead of print]
- 4) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanazaki R, Terui K, Kamio T, Kobayashi A, Fujita T,

- Sato-Otsubo A, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Exome sequencing identified *RPS15A* as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia. **Haematologica**. 2017;102(3):e93-e96.
- 5) Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Okuno Y, Yamato G, Hara Y, Nagata Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Kato M, Park Mj, Ohki K, Shimada A, Takita J, Tomizawa D, Kudo K, Arakawa H, Adachi S, Taga T, Tawa A, Ito E, Horibe K, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**. 2016;175(3):476-489.
- 6) Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Matsuo K, Hira A, Takata M. The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi Anaemia infants is influenced by patient, but not maternal ALDH2 genotype. **Br J Haematol**. 2016;175(3):457-461.
- 7) Utsugisawa T, Uchiyama T, Toki T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Erythrocyte glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. **Blood Cells Mol Dis**. 2016;59:31-6.
- 8) Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, Ozono K. Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities. **Cell Rep**. 2016;15(6):1228-41.
- 9) Yoshimi A, Toya T, Nannya Y, Takaoka K, Kirito K, Ito E, Nakajima H, Hayashi Y, Takahashi T, Moriya-Saito A, Suzuki K, Harada H, Komatsu N, Usuki K, Ichikawa M, Kurokawa M. Spectrum of clinical and genetic features of patients with inherited platelet disorder with suspected predisposition to haematological malignancies: a nationwide survey in Japan. **Annals of Oncology**. 2016;27(5):887-95.
- 10) Ogasawara S, Saito N, Itoga M, Kushibiki M, Nakata R, Ohta E, Fujita E, Kojima K, Terui K, Ito E, Kayaba H. Spurious thrombocytosis caused by tumor cell lysis in a patient with acute monocytic leukemia. **Clin Lab**. 2016;62:1575-7.
- 11) Miura R, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H, Kurose A, Tsuruga K, Sasaki S, Terui K, Ito E. Dysgerminoma developing from an ectopic ovary in a patient with WAGR syndrome: A case report. **Mol Clin Oncol** 2016; 5:503-6.
- 12) Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Preserved High Probability of Overall Survival with Significant Reduction of Chemotherapy for Myeloid Leukemia in Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study in Japan. **Pediatr Blood Cancer** 2016;63:248-54.
- 13) 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.
- 14) 伊藤悦朗, 土岐力, 照井君典. Down症候群. 白血病学(上) 最新の基礎・臨床研究. **日本臨床増刊号** 2016;74:97-102.
- 15) 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗. 一過性異常骨髄増殖症. 小児疾患診療のための病態生理3. **小児内科増刊号** 2016;48:953-6.

- 16) 照井君典, 伊藤悦朗. ダウン症に伴う急性巨核芽球性白血病の分子的理解と臨床応用. **血液フロンティア** 2016;26:1533-40.
- 17) 伊藤悦朗, 土岐力, 照井君典. 遺伝性骨髄不全症研究の最近の進歩. **臨床血液** 2016;57:882-90.
- 18) 新居敏, 藤野寿典, 赤澤嶺, 田尻雄二郎, 高野良彦, 巽亜子, 中道恵里那, 内藤拓人, 安西香織, 杉田亮, 竹川麻衣, 野村安隆, 肥田晋矢, 坂本晴子, 葭井操雄, 土岐力, 照井君典, 伊藤悦朗, 住本真一. 感染を契機に診断に至ったRPL11の遺伝子変異陽性Diamond-Blackfan anemiaの11歳男児例. **小児科臨床** 2016;69:1416-20.
- 19) 照井君典, 伊藤悦朗. 小児急性巨核芽球性白血病の生物学的特性. **血液内科** 2016;72:737-42.

2. 学会発表

国際学会

- 1) Ito E, Yoshida K, Toki T, Saida S, Watanabe K, Nakamura M, Terui K, Nakahata T, Miyano S, Watanabe A, Ogawa S. Genetic and Epigenetic Alterations in Acute Megakaryoblastic Leukemia in Down Syndrome. **Fifth JCA- AACR Special Joint Conference -The Latest Advances in Hematological Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics** (招待講演)(2016年7月15日, 千葉).
- 2) Terui K, Toki T, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Park MJ, Iwamoto S, Taga T, Yanagisawa R, Koh K, M. Saito A, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Watanabe K, Ito E. Analysis of *GATA1* mutations in Down syndrome infants with transient abnormal myelopoiesis and clinical impacts of *GATA1* mutation types: A report from the JPLSG TAM-10 study. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ).
- 3) Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K,

Ito E, Takita J. Gene expression profiles and methylation analysis in Down syndrome related acute lymphoblastic leukemia. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ).

国内学会

- 1) Kanazaki R, Toki T, Terui K, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Sato T, Ikeda F, Ito E. Dysegregation of *KIT* expression by GATA1s in TAM and acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome. **第78回日本血液学会学術集会** (2016年10月15日, 横浜).
- 2) Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. DNA methylation analysis in acute lymphoblastic leukemia of Down syndrome. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月15日, 東京).
- 3) 照井君典, 土岐力, 濱麻人, 村松秀城, 長谷川大輔, 朴明子, 岩本彰太郎, 多賀崇, 柳澤龍, 康勝好, 林泰秀, 足立壯一, 水谷修紀, 渡邊健一郎, 伊藤悦朗. 一過性異常骨髄増殖症におけるGATA1遺伝子変異JPLSG TAM-10登録症例の解析 (GATA1 mutation status in infants with transient abnormal myelopoiesis: A report from the JPLSG TAM-10 study). **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月15日, 東京).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし