

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

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 名誉教授）

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。中央診断症例を中心に集積された Congenital dyserythropoietic anemia（CDA）22例において、同意を得た後、遺伝子診断を行い、5例でI型、1例でvariant型の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。また、Dyskeratosis congenita（DKC）13例のうち、5例（38%）で疾患原因遺伝子が同定された（*DKC1*（2例）、*SBDS*（1例）、*TINF2*（2例））。DKC疑いの1例はテロメア長短縮を認めていたが、ターゲットシーケンスにより、Shwachman-Diamond症候群であることが判明した。遺伝性造血不全の診断は必ずしも容易ではなく、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。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。DKCはテロメア長短縮を特徴とする先天性造血不全症候群の一つで、現在までにDCの原因遺伝子としてテロメア長維持に関わる11遺伝子（*DKC1*、*TERT*、*TERC*、*RTEL1*、*NOP10*、*TINF2*、*CTC1*、*NHP2*、*WRAP53*、*ACD*、*PARN*）の異常が見出されている。

本研究では、日本小児血液・がん学会の中央診断および疾患登録事業の一環として、本疾患を包括的に登録するとともに、新たに遺伝子診断法による診断精度の向上と、新規責任遺伝子の探索を行う。

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。先天性造血不全症候群が疑われる症例について、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・エクソーム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関連する181遺伝子ないし全遺伝子の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、責任変異の候補となる SNV 原因遺伝子の候補を絞り込んだ。

(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

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。

Dyskeratosis congenita (DKC) 疑いの 13 例のう

ち、5 例 (38%) *DKC1* (2 例)、*SBDS* (1 例)、*TINF2* (2 例) の変異が認められた。DKC 疑いの 1 例はテロメア長短縮を認めていたが、ターゲットシーケンスにより、Shwachman-Diamond 症候群であることが判明した。

D . 考察

次世代シーケンスによる解析で、臨床的に CDA と診断された症例から、溶血性貧血の原因遺伝子の変異を複数例に認めた。また、DKC と診断された症例に、SDS であることが判明した症例が認められた。この事実は、他の遺伝性血液疾患と CDA・DKC の鑑別診断は困難であることを示唆し、これらの疾患における遺伝子診断の重要性が再確認された。

E . 結論

遺伝性造血不全の診断は必ずしも容易ではなく、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。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi 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, Miyano S, Kojima S. Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes. *Genet Med*. 2017 Jan 19. doi: 10.1038/gim.2016.197. [Epub ahead of print]
- 2) 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 Mar;102(3):e93-e96.
- 3) Ichimura T, Yoshida K, Okuno Y, Yujiri T, Nagai K, Nishi M, Shiraishi Y, Ueno H, Toki T, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Hara T, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Ito E, Ogawa S, Ohga S. Diagnostic challenge of Diamond-Blackfan anemia in mothers and children by whole-exome sequencing. **Int J Hematol**. 2017 Apr;105(4):515-520.
 - 4) Nishikawa E, Yagasaki H, Hama A, Yabe H, Ohara A, Kosaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe KI, Yoshida N, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Long-term outcomes of 95 children with moderate aplastic anemia treated with horse antithymocyte globulin and cyclosporine. **Pediatr Blood Cancer**. 2017 May;64(5).
 - 5) 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 Nov;175(3):457-461.
 - 6) Elmahadi S, Muramatsu H, Kojima S. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for dyskeratosis congenita. **Curr Opin Hematol**. 2016 Nov;23(6):501-507.
 - 7) Kojima D, Wang X, Muramatsu H, Okuno Y, Nishio N, Hama A, Tsuge I, Takahashi Y, Kojima S. Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary immunodeficiencies. **J Allergy Clin Immunol**. 2016 Jul;138(1):303-305.e3.
 - 8) Imashuku S, Muramatsu H, Sugihara T, Okuno Y, Wang X, Yoshida K, Kato A, Kato K, Tatsumi Y, Hattori A, Kita S, Oe K, Sueyoshi A, Usui T, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanno H. PIEZO1 gene mutation in a Japanese family with hereditary high phosphatidylcholine hemolytic anemia and hemochromatosis-induced diabetes mellitus. **Int J Hematol**. 2016 Jul;104(1):125-9.
2. 学会発表
 - 1) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical sequencing of 209 patients with suspected inherited bone marrow failure syndromes. 第78回日本血液学会学術集会 (2016年10月14日, 横浜) .
 - 2) Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Sekiya Y, Nishio N, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, Hama A, Takahashi Y, Miyano S, Ogawa S, Ito M, Kojima S. Genetic background of bone marrow failure syndromes in children. 第78回日本血液学会学術集会 (2016年10月14日, 横浜) .
 - 3) Muramatsu H. Application of next-generation sequencing on bone marrow failure and hematological diseases. 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) .
 - 4) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Bone marrow transplantation for children with acquired bone marrow failure. 第39回日本造血細胞移植学会総会 (2017年3月3日, 松江) .
- G . 知的財産権の出願・登録状況
特になし