

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の遺伝子型、臨床像および治療反応性に関する研究

研究分担者 大賀正一（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 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）
石村匡崇（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 助教）
江口克秀（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 臨床助教）
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：先天性骨髄不全症に対する診療指針を確立するため、新生児から乳児期早期に貧血または汎血球減少を来す症例を集積し、その遺伝子型、表現型および治療反応性について検討した。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 欠損症と確定診断することができた。Diamond-Blackfan 貧血（DBA）の 3 家系 6 名は赤血球酵素活性スクリーニングの解釈が困難であったが、全エクソーム解析を用いて診断を確定することができた。輸血依存の DBA 2 例に根治療法として造血細胞移植を行い、その時期と方法を検討中である。奇形徴候がなく輸血依存となる重症型 DBA は診断が困難であるのみならず、造血細胞移植の生着不全あるいは臓器障害のリスクも高い。新生児・乳児期に発症する先天性造血障害の病因は多彩であり、Clinical Sequencing の導入、造血細胞移植療法の確立および遺伝子治療開発を行うために疾患ごとの症例集積が重要である。

A．研究目的

新生児は溶血と無効造血の鑑別が難しく、造血不全症の確定診断が難しい。先天性造血不全症には、貧血を主徴とするDiamond-Blackfan貧血（DBA）と汎血球減少に至る多彩で稀少な遺伝性造血不全症がある。いずれの患児もしばしば奇形徴候を有し、TORCHなどの胎児感染症との鑑別も問題となる。新生児期発症の貧血と汎血球減少例の効率的診断法と治療に関して検討した。

B．研究方法

新生児から乳児期早期にかけて貧血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髄像を検討し、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）、hemoglobin遺伝子解析（山城・服部研）、Sanger

法などによるRibosome蛋白（RP）遺伝子解析（伊藤研）を行った。未確定診断例には、可能な限り家族も含め、Illumina社HiSeq2000シーケ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。

造血細胞移植は、DBAではステロイドおよびシクロスポリン療法が奏効せず輸血依存となった例に対して、また他の遺伝性骨髄不全症では感染と出血によるリスクが高い例をその適応とした。稀少疾患で十分な疫学調査による情報がない疾患に対しては、症例報告を集積してその情報から生存曲線を推定することにより、移植時期と方法を決定する資料とした。本人と保護者に十分な説明を行った上、同意を得て造血細胞移植の施行を決定した。

（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) 汎血球減少と免疫不全症の新生児

奇形徴候のない35週の低出生体重男児。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。輸血依存から次第に回復し、約半年で貧血は完全回復した。表現型から全エクソーム解析を行わずに*IKZF1*変異(ヘテロ)を同定して、他のB細胞欠損型Ikaros欠損症とともに報告した(論文1)。本患児と同じ変異は過去に1例のみ報告されているが、汎血球減少のため造血細胞移植を受け死亡している(Pediatr Blood Cancer. 2012;58(4):591-7)。一方、私たちの患児の兄も同じ変異を有したが、これまでに貧血など造血不全症の兆候はない。この遺伝子型と表現型の乖離についてさらに解析中である。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兒は非血縁臍帯血移植にてsplit chimeraを確立したが肝不全で死亡した。現在、網羅的遺伝子解析を進めている。

2) 新生児貧血例の家系解析と造血細胞移植

DBA疑いの非血縁3家系の母から出生した児の貧血を診断するために、母子に赤血球酵素スクリーニングを行ったが、輸血依存などによる影響のためか判別は困難であった。全エクソーム解析を行って、1家系母と2家系母子に既知RP遺伝子変異を同定することができた(論文2)。

*RPS19*変異を同定した輸血依存の3例に対しては除鉄も不良のため、Target BU法を用いて前処置の強度を低減した造血細胞移植を行った。1例は非血縁骨髄が生着、もう1例は非血縁骨髄が生着不全となったあと非血縁臍帯血が完全生着、残りの1例は非血縁骨髄を行ったところである。

D . 考察

先天性造血不全症は新生児期から貧血を主徴とするDBAと免疫不全症を合併する汎血球減少に分けて診断と治療を進めることが重要である。今回、ターゲットシーケンスと全エクソーム解析を行う前に、詳細な表現型と家族歴を評価することにより、遺伝子診断を確定することのできた例を経験した。一方、

貧血外症状に乏しい輸血依存DBAの診断には全エクソーム解析が有用であった。治療法の選択に関しては、さらなる症例の集積が必要である。

E . 結論

先天性造血不全症の診断には、症候分類による効率的スクリーニングと全エクソーム解析を用いたClinical sequencingの有用性が期待される。

F . 研究発表

1. 論文発表

- Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Nakamura H, Kamizono J, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Ueno H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T & Kanegane H. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in humans with germline *IKZF1* mutations. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Dec 1. pii: S0091-6749(16)31273-8.
- Ichimura T, Yoshida K, Yosuke O, Yujiri T, Nagai K, Nishi M, Shiraishi Y, Hiroo U, Toki T, Azuma Y, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Ogawa S, Tanizawa Y, 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):515-20.
- Narumi S, Amano N, Ishii T, Katsumata N, Muroya K, Adachi M, Toyoshima K, Tanaka Y, Fukuzawa R, Miyako K, Kinjo S, Ohga S, Ihara K, Inoue H, Kinjo T, Hara T, Kohno M, Yamada S, Urano H, Kitagawa Y, Tsugawa K, Higa A, Miyawaki M, Okutani T, Kizaki Z, Hamada H, Kihara M, Shiga K, Yamaguchi T, Kenmochi M, Kitajima H, Fukami M, Shimizu A, Kudoh J, Shibata S, Okano H, Miyake N, Matsumoto N, Hasegawa T. *SAMD9* mutations cause a novel multisystem disorder

(MIRAGE syndrome) and are associated with loss of chromosome 7. **Nature Genetics** 2016 Jul;48(7):792-7.

- 4) Utsugisawa T, Uchiyama T, Toki T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Erythrocyte Reduced Glutathione is a Novel Biomarker of Diamond-Blackfan Anemia. **Blood Cell Mol Dis.** 2016 Jul;59:31-6.
- 5) 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):e93-6.
- 6) Ohga S. Genetic diagnosis for congenital hemolytic anemia. **Rinsho Ketsueki** 2016;57(10):1908-12.
- 7) 大賀正一, 山城安啓, 菅野仁. 特集 貧血性疾患診療の進歩. 先天性溶血性貧血の遺伝子診断. **血液内科** 2016;73(2):1-6.
- 8) 市村卓也, 大賀正一. . 原発性免疫不全症候群 5.免疫調節不全症 (1)家族性血球貪食性リンパ組織球 (FHL) 症候群 Perforin欠損症 (FHL2). **日本臨床別冊「免疫症候群(第2版) - その他の免疫疾患を含めて」** 日本臨牀社 2016. (印刷中)
- 9) 市村卓也, 大賀正一. . 原発性免疫不全症候群 5.免疫調節不全症 (1)家族性血球貪食性リンパ組織球 (FHL) 症候群. **UNC13D/Munc13-4欠損症 (FHL3) . 日本臨床別冊「免疫症候群(第2版) - その他の免疫疾患を含めて」** 日本臨牀社 2016. (印刷中)

2. 学会発表

- 1) 江見咲栄, 太田陽香, 河本知恵, 大西佑治, 木村献, 東良紘, 市村卓也, 工藤敬子, 高橋一雅, 楠田剛, 福永真之介, 今井耕輔, 金兼弘和, 大

賀正一. 汎血球減少が自然軽快したikaros欠損症の新生児. **第26回日本産婦人科・新生児血液学会** (2016年7月1-2日, 長崎).

- 2) 市村卓也, 江見咲栄, 東良紘, 飯田恵庸, 太田陽香, 河本友恵, 木村献, 高橋一雅, 楠田剛, 星野顕宏, 金兼弘和, 長谷川俊史, 大賀正一. 造血および免疫不全が自然寛解したIkaros欠損症の新生児例. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月15日-17日, 東京).
- 3) 大賀正一. 先天性溶血性貧血における遺伝子診断. **第78回日本血液学会 (教育講演40)** (2016年10月14日, 横浜).
- 4) 大賀正一. 先天性血液疾患の遺伝子診断~溶血性貧血と血栓症~. **第17回日本検査血液学会学術集会 (ランチョンセミナー13)** (2016年8月7日, 福岡).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし