

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

先天性溶血性貧血の疫学調査・診療ガイドラインの作成

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）  
研究協力者 槍澤大樹（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 助教）  
小倉浩美（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 非常勤講師）  
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）

**研究要旨：** 無効造血を呈する先天性貧血として先天性赤血球形成異常性貧血（CDA）と先天性溶血性貧血の一型であるピルビン酸キナーゼ欠乏性貧血（PK 異常症）はしばしば鑑別が困難である。今回我々は、1972年から2017年の46年間で赤血球酵素活性測定により診断したPK 異常症を集計し、臨床像を解析した。遺伝子検査を実施した症例および家系内保因者について赤血球 PK 活性と遺伝子型（ホモ接合および複合ヘテロ接合、ヘテロ接合）を比較検討したところ、同時測定の成人対照に対する赤血球 PK の相対活性値は、患者が  $38.5 \pm 3.7\%$ 、一方保因者は  $58.5 \pm 3.3\%$ であった（ $\text{mean} \pm \text{SE}$ ）。ROC カーブにおけるカットオフ値は、患者 保因者が  $85.9\%$ で、保因者 正常対照が  $79.8\%$ であった。先天性骨髄不全症の鑑別診断においては、Target-captured sequencing 解析が有用であるが、PK 異常症の確定診断において临床上より迅速な判断が求められる場合には、赤血球中残存 PK 活性の精査が有用であると考えられた。

### A．研究目的

先天性骨髄不全症の鑑別診断目的の全エクソーム解析で、サラセミアや赤血球酵素異常症の病因遺伝子変異が検出されることが明らかになった。無効造血を呈する先天性貧血として先天性赤血球形成異常性貧血（CDA）と先天性溶血性貧血の一型であるピルビン酸キナーゼ欠乏性貧血（PK異常症）はしばしば鑑別が困難である。今年度は我が国の赤血球酵素異常症として頻度の高いPK異常症の日本人症例に関して、赤血球PK活性と遺伝子変異解析結果の関連について検討を加えたので報告する。

### B．研究方法

1972年から2017年の46年間で赤血球酵素活性測定により診断したPK異常症を集計し、臨床像を解析した。遺伝子検査を実施した症例および家系内保因者について赤血球PK活性と遺伝子型（ホモ接合および複合ヘテロ接合、ヘテロ接合）を比較検討した。

### C．研究結果

1972年から2017年の46年間で赤血球酵素活性測

定により診断したPK異常症（ピルビン酸キナーゼ欠乏性貧血）は120例であった。診断時年齢の中央値は10歳（最小0歳、最大72歳）で、男性が52例、女性が68例であった。患者両親の34.7%に血縁があった。臨床経過では、63.6%の症例に交換輸血の既往を認めた。53.1%の症例に脾腫を認め、治療として脾摘術を受けた症例が58.6%に及んでいた。64.6%に赤血球輸血の既往を認め、経過中47.7%が急性溶血発作を経験していた。

診断時血液検査所見では、ヘモグロビン8.8g/dL、網赤血球数13.0%、血清間接ビリルビン3.7mg/dL、LDH 587 IU/L、トランスフェリン飽和率 57%、血清フェリチン497 ng/mLであった。

36症例についてPKLR遺伝子検査を実施し、両アレルに病因遺伝子変異を同定した。また、42例の家族がヘテロ接合体であった。同時測定の成人対照に対する赤血球PKの相対活性値は、患者が  $38.5 \pm 3.7\%$ 、一方保因者は  $58.5 \pm 3.3\%$ であった（ $\text{mean} \pm \text{SE}$ ）。ROC（receiver operator characteristic）カーブにおけるカットオフ値は、患者 保因者が  $85.9\%$ で、保因者 正常対照が  $79.8\%$ であった。

## D . 考察

先天性骨髄不全症の鑑別診断において、次世代シーケンサー (NGS) を用いた全エクソーム解析、関連遺伝子パネルを用いた Target-captured sequencing (TCS) 解析などが導入され、診断率の向上が報告されている。一方で、今までの臨床診断結果からは想定できなかった病因遺伝子変異が同定されるケースも増えてきた。最近、Bianchiらは、赤血球酵素活性測定により、PK異常症と診断した症例に脾摘術を施行したところ、術後重篤な静脈血栓症を来したことを報告した。本例に対してNGS解析を実施したところ、脱水型遺伝性有口赤血球症 (dehydrated hereditary stomatocytosis; DHSt) の病因となる *PIEZO1* 変異を同定し、*PKLR* 遺伝子に関してはヘテロ接合で患者は保因者であることが明らかになった。

今回の研究成果により、赤血球輸血依存性の重症例を除けば、残存赤血球PK活性値を同時測定の正常対照との比較で示すことにより、PK遺伝子変異を両アレルに認めるホモ接合 / 複合ヘテロ接合と片アレルにのみ変異を認めるヘテロ接合を鑑別することが可能であることが示唆された。

PK異常症は赤血球輸血を必要としない症例であっても、無効造血による二次性ヘモクロマトーシスを発症することで、鉄キレート療法の導入が必要な症例も多く、今回の調査においても診断時にトランスフェリン飽和率が50%以上、フェリチン値も約500ng/mLとヘモクロマトーシスが発症していることが明らかになった。PK異常症との鑑別を要する無効造血疾患としては先天性赤血球形成異常性貧血 (CDA)、ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) や骨髄異形成症候群 (MDS) などが挙げられ、今後はより多くの症例を積み重ね、これらの疾患の鑑別におけるTCS解析の臨床的有用性を明らかにする必要があると考えられた。

## E . 結論

赤血球PK活性の低下が明らかになった先天性貧血の確定診断のためには、*PKLR* 遺伝子変異を両アレルに同定することが肝要であるが、赤血球PK活性値を同時測定の正常対照との相対値として表現することで、遺伝子検査結果と高い相関を認めることが明

らかになった。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 西本瑛里, 西久保敏也, 釜本智之, 石原卓, 山口直子, 菅野仁, 高橋幸博. マイクロプレート法による赤血球浸透圧抵抗試験と eosin-5-maleimide を用いた赤血球膜 band3 定量法が診断に有用であった新生児期に重症黄疸を発症した赤血球膜蛋白異常症の1例. **日本産婦人科・新生児血液学会** 2017;26(2):71-76.
- 2) Matsumaru S, Oguni H, Ogura H, Shimojima K, Nagata S, Kanno H, Yamamoto T. A novel PGK1 mutation associated with neurological dysfunction and the absence of episodes of hemolytic anemia or myoglobinuria. **Intractable Rare Diseases Research**. 2017; 6(2):132-136. doi:10.5582/indr.2017.01020.
- 3) 槍澤大樹, 菅野仁. 循環系の基礎と臨床 (2) 血管新生. **東京女子医科大学雑誌** 2017;87(1-2): 5-12.
- 4) 小倉浩美, 菅野仁. 貧血学 最新の診断・治療動向 V溶血性貧血 赤血球酵素異常症・不安定ヘモグロビン症 **日本臨床** 2017;75(増刊号1).
- 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;102(3):e93-e96. doi:10.3324/haematol.2016.153932.
- 6) Noguchi J, Kanno H, Chiba Y, Ito E, Ishiguro A. Discrimination of Diamond-Blackfan anemia from parvovirus B19 infection by RBC glutathione. **Pediatr Int**. 2017;59(7):838-840. doi:10.1111/ped.13284.
- 7) Sakaue S, Kasai T, Mizuta I, Suematsu M, Osone S, Azuma Y, Imamura T, Tokuda T,

- Kanno H, El-Agnaf OMA, Morimoto M, Nakagawa M, Hosoi H, Mizuno T. Early-onset parkinsonism in a pedigree with phosphoglycerate kinase deficiency and a heterozygous carrier: do PGK-1 mutations contribute to vulnerability to parkinsonism? **NPJ Parkinsons Dis.** 2017;3:13. doi: 10.1038/s41531-017-0014-4.
- 8) Ogasawara T, Kawauchi K, Mori N, Sakura H, Katoh F, Kanno H, Ito E. Successful long-term management with low-dose prednisolone in an adult patient with Diamond-Blackfan anemia. **Rinsho Ketsueki.** 2017;58:917-921. doi:10.11406/rinketsu.58.917.
- 9) Niizuma H, Kanno H, Sato A, Ogura H, Imaizumi M. Splenectomy resolves hemolytic anemia caused by adenylate kinase deficiency. **Pediatr Int.** 2017;59(2):228-230. doi:10.1111/ped.13166.
- 10) 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;19(7):796-802. doi:10.1038/gim.2016.197.
- 11) 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;105(4):515-520. doi:10.1007/s12185-016-2151-7.
- 12) Sonoda M, Ishimura M, Ichimiya Y, Terashi E, Eguchi K, Sakai y, Takada H, Hama A, Kanno H, Toki T, Ito E, Ohga S. Atypical erythroblastosis in a patient with Diamond-Blackfan anemia who developed del(20q) myelodysplasia. **Int J Hematol.** 2018. doi:10.1007/s12185-018-2424-4.
- 13) Van Straaten S, Bierings M, Bianchi P, Akiyoshi K, Kanno H, Serra IB, Chan J Huang X, van Beers E, Ekwattanakit S, Güngör T, Kors WA, Smiers F, Raymakers R, Yanez L, Sevilla J, van Solinge W, Segovia JC, van Wijk R. Worldwide study of hematopoietic allogeneic stem cell transplantation in pyruvate kinase deficiency. **Haematologica.** 2018;103(2). doi:10.3324/Haematol.2017.177857.
- 14) 大賀正一, 石村匡崇, 槍澤大樹, 菅野仁. 新生児の遺伝性溶血性貧血～疾患概念の拡張～. **日本産婦人科・新生児血液学会誌** 2018;27(2):41-47.
2. 学会発表
- 1) Iwasaki T, Utsugisawa T, Ogura H, Aoki T, Kinoshita A, Ogata Y, Okamoto Y, Kawakami T, Kanno H. The Flow Cytometric Osmotic Fragility Test is an Effective Screening Test for Red Cell Membrane Disorders, Including Dehydrated Hereditary Stomatocytosis. **ISLH (International Society for Laboratory Hematology)** (2017年5月4-6日, ハワイ・ホノルル).
- 2) 槍澤大樹, 中林恭子, 松田和樹, 守屋友美, 千野峰子, 岡本好雄, 菅野仁. 低温保存腹水を用いた腹水濾過濃縮再静注法(CART)の有用性の検討. **第65回日本輸血・細胞治療学会総会**(2017年6月22-24日, 千葉).
- 3) 高源ゆみ, 木下明美, 小林博人, 菅野仁. 腹水濾過時に得られる単核球を利用したδ型T細胞療法の開発. **第65回日本輸血・細胞治療学会総会**(2017年6月22-24日, 千葉).
- 4) 小野慎吾, 及川美幸, 中林恭子, 岡本好雄, 菅野仁. ABO同型クリオプレシピテート供給体制

の是非に関する考察．第65回日本輸血・細胞治療学会総会（2017年6月22-24日，千葉）．

- 5) 守屋友美，小野慎吾，小林博人，菅野仁．（ポスター）高張アルブミン製剤適正使用の推進．第65回日本輸血・細胞治療学会総会（2017年6月22-24日，千葉）．
- 6) 小倉浩美，槍澤大樹，岩崎拓也，青木貴子，岡本好雄，川上高弘，菅野仁．系統的検査による先天性溶血性貧血80症例の病型診断．第79回日本血液学会学術集会（2017年10月20-22日，東京）．
- 7) 槍澤大樹，小倉浩美，岩崎拓也，青木貴子，岡本好雄，川上高弘，菅野仁．Heterogeneous KCNN4 or PIEZO1 gene mutation cause dehydrated hereditary Stomatocytosis in Japan．第79回日本血液学会学術集会（2017年10月20-22日，東京）．
- 8) Kanno H, Rachael F.Grace, D.Mark Layton, Galacteros F, Rose C, Barcellini W, D.Holmes Morton, Eduard Van Beers, Yaish H, Ravindranath Y, Kevin H.M.Kuo, Sheth S, Janet L.Kwiatkowski, Silver B, Kung C, Cohen M, Yang H, Penelope A. Kosinski, Hua L, Ann J. Barbier, Glader B. AG-348, a pyruvate kinase activator, for pyruvate kinase deficiency: Results the drive PK study. 第79回日本血液学会学術集会（2017年10月20-22日，東京）．
- 9) 村岡倫子，岡本佳子，猪谷元浩，近藤亜矢，坂根朋子，岩瀬瑞恵，藤原倫昌，北田邦美，野島郁子，高橋伸方，荒木徹，菅野仁．KCNN4変異による脱水型遺伝性有口赤血球症の1例．第59回小児血液・がん学会学術集会（2017年11月9-11日，松山）．
- 10) Goto T, Togawa T, Ito T, Kouwaki M, Ogura H, Kanno H, Saitoh S, Koyama N. A patient with hereditary Pyropoikilocytosis caused by a combination of a novel in-frame deletion and a common functional but non-pathogenic allele, αLELY, in SPTA1. American Society of Human Genetics 2017 annual meeting

（2017年10月17-18日，米国・オーランド）．

#### G．知的財産権の出願・登録状況

該当なし