

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のバイオマーカーの解析

研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学医学部輸血・細胞プロセッシング部 教授）  
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 槍澤大樹（東京女子医科大学医学部輸血・細胞プロセッシング部 助教）  
研究協力者 石村匡崇（九州大学病院総合周産期母子医療センター 助教）

**研究要旨：**我々は今までに先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血；以下 DBA）患者における診断バイオマーカーとして赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）、還元型グルタチオン（GSH）の同時測定が有用であることを明らかにしてきた。今年度は RP 遺伝子変異が認められた 14 症例の DBA 患者を追加解析し、eADA/GSH 同時測定の有用性について検討した。また、過去に報告された DBA 赤血球のプロテオーム解析の結果と我々の赤血球酵素活性のデータを統合して解析し、DBA 赤血球における代謝異常について検討した。

### A. 研究目的

DBAはリボソーム機能不全によって発症する先天性赤芽球癆である。我々は、赤血球における最も重要な抗酸化物質である還元型グルタチオン（GSH）がDBAの新規バイオマーカーとして有用であることを発見し、従来から知られていた赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）と同時に測定することで、遺伝子検査により確定診断されたDBA症例と同一家系内非罹患者の識別が高い精度で可能であることを報告した。今年度は、更に症例数を積み重ねることで判別式の臨床的有用性を再検討するとともに、最近報告されたプロテオームデータ（Pesciottaら2015）と我々が測定した酵素活性データを比較検討し、双方のデータの整合性について統計解析を行ったので報告する。

### B. 研究方法

#### 対象

全国の14医療機関で診断されたRP遺伝子の変異を有する14例のDBA症例からインフォームドコンセントを取得した上で得た末梢血サンプルを用いた。

#### ADAとGSHの測定

血漿、白血球、血小板をセルロースカラムで除去した洗浄赤血球より溶血液を作成し、eADAを測定した。

eADAはアデノシンを基質として溶血液を加え265nmにおける吸光度減少により活性を測定した。また、GSHは溶血後の全血にメタリン酸を加えて得られた除蛋白抽出液に5,5'-di-thiobisを加え、412nmで測定した。

#### 赤血球酵素活性の測定

分光光度計を用いた標準的な方法により、赤血球酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素（G6PD）、ホスホグルコン酸脱水素酵素（PGD）、グルタチオンペルオキシダーゼ（GPX）、ヘキサキナーゼ（HK）、ホスホフルクトキナーゼ（PFK）およびピルビン酸キナーゼ（PK）の酵素活性を測定した。

#### 統計解析

5例のDBA赤血球および6例の正常対象のプロテオーム解析のデータ（Pesciottaら、*PLoS One* 2015）を我々のデータと比較検討し、分析を行った。統計解析にはWilcoxonの順位和検定を用い、 $p$ 値 $<0.001$ を有意差ありとした。

### C. 研究結果

#### 酵素活性とプロテオームデータの比較

14例のRP遺伝子を有するDBA患者と、14例の健康対象者を比較したところ、以前の報告（Utsugisawaraら、2016）と同様にGSH量およびADA、G6PD、PGD、GPX、HKの各活性は有意な上昇、一方、PFKおよびPKの活性は有意な低下を示した。

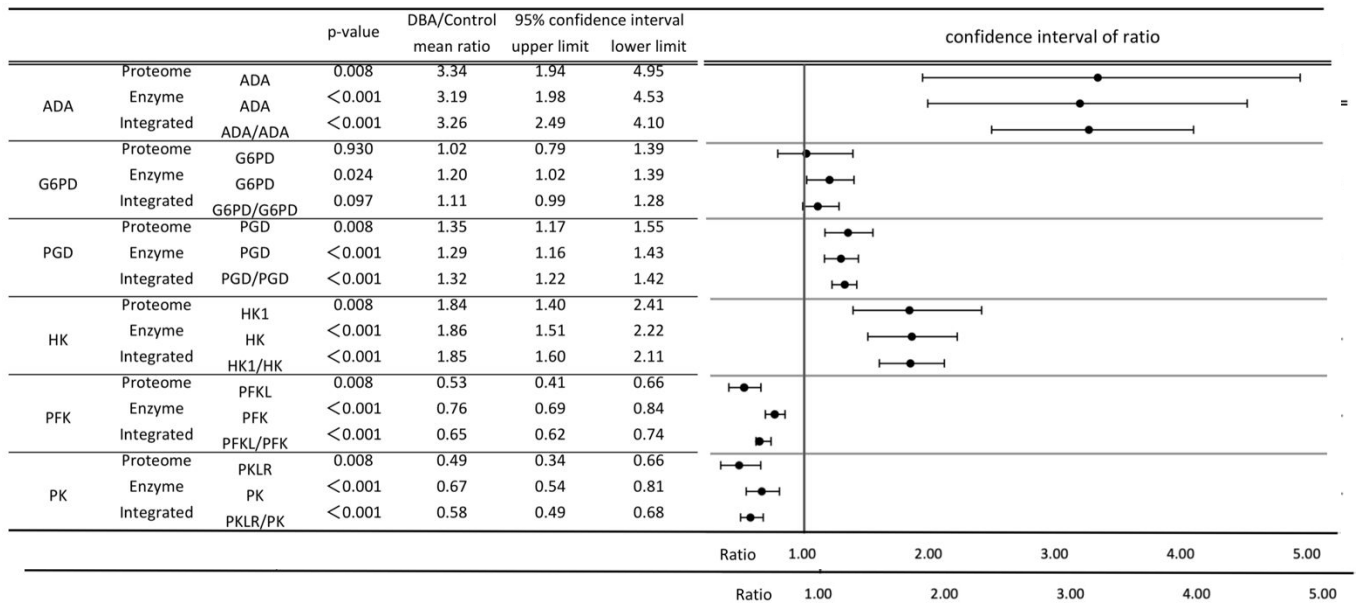


表 1 . DBA 赤血球におけるプロテオームと酵素活性の変化

PesciottaらによるDBA赤血球におけるプロテオーム解析と、酵素活性の変化および両者を統合し解析した結果を表1に示す。正常対象の測定値（平均値）に対するDBA赤血球での測定値（平均値）の比を表した。タンパクレベルと酵素活性はADA、PGD、HKではいずれも増加し、PFKおよびPKではともに低下しており、その程度も類似していた。G6PDの酵素活性は上昇していたが、プロテオーム解析によるタンパクレベルは有意な変化を認めなかった。

#### D . 考察

DBA赤血球におけるADA活性の上昇は、米国のDBAレジストリによって提案された診断基準（Vlachosら、*Br. J. Haematol.* 2008）に採用されており、バイオマーカーとして臨床的に有用であるが、遺伝子変異が同定された症例の約20%には赤血球ADA活性の上昇が認められない。我々は、DBA赤血球においてGSHが有意に増加していることを見出し、さらにADA活性と同時測定することで診断の精度が高まることを報告した（Utsugisawaら、2016）。今回、新たに遺伝子変異が確定したDBA 14症例でADA活性とGSH濃度の測定を行い、その有用性を再確認した。

また、独立した他の研究グループから報告されたDBA赤血球酵素のプロテオーム解析の結果と我々の酵素活性のデータを比較したところ、DBA赤血球酵素の多くが、そのタンパク量と酵素活性の動態に高

い類似性を有することが証明された。一方、G6PDは、その高い酵素活性にも関わらず、タンパク量の変化が認められなかった。更に多くの症例でG6PD活性およびタンパク量を検討する必要があるが、リボソームサブユニット遺伝子の変異によってG6PD遺伝子発現量には変化を来さないが、酵素学的な活性化を受けていることが明らかになった。今回の研究で明らかになったHK、G6PD活性亢進およびPFK、PK活性抑制の結果、DBA赤血球内では正常赤血球に比べ、解糖系よりもペントースリン酸経路によるグルコース利用が相対的に増加し、G6PD反応で生じたNADPHを補酵素として用いるグルタチオン還元酵素（GR）反応が活性化することで赤血球内GSH濃度が上昇することが示唆された。

#### E . 結論

DBA赤血球におけるADA活性の上昇は、診断上重要な所見であるが、我々が見出したGSHの上昇とともに、その意義は解明されていない。今回我々のデータと他の研究結果を比較したところ、DBA患者において赤血球酵素のプロテオームと酵素活性の変化に一貫した傾向が存在することが確認できた。今後はDBA患者由来iPS細胞から分化誘導して得られる赤芽球系前駆細胞を用いて、詳細なメタボローム解析を行い、DBAの発症に関わる代謝経路の異常を捉えていきたいと考えている。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kamatani N, Furihata K, Taniguchi A, Fukuuchi T, Yamaoka N, Kaneko K, Kanno H. In vitro enhancement of ATP in human erythrocytes from a healthy subject and two patients with thalassemia and hemoglobinopathy. **Gout and Nucleic Acid Metabolism** 2018;42(1):59-64. doi: 10.6032/gnam.42.59.
- 2) 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;108(2):228-231. doi: 10.1007/s12185-018-2424-4. Epub 2018 Feb23. PMID: 29476317.
- 3) 井島廣子, 古賀正史, 杉山正悟, 小倉浩美, 菅野仁, 陣内秀昭 .HbA1C が偽低値を示したエノラーゼ、異常症合併 2 型糖尿病の 1 例 . **Diabetes Journal** 2018;46(1):30-34.
- 4) Toki T, Yoshida K, Wang R, Nakamura S, Maekawa T, Goi K, Katoh MC, Mizuno S, Sugiyama F, Kanezaki R, Uechi T, Nakajima Y, Sato Y, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Kataoka K, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Kamio T, Sakaguchi H, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Kanno H, Miyano S, Kojima S, Ishiguro A, Sugita K, Kenmochi N, Takahashi S, Eto K, Ogawa S, Ito E. De Novo Mutations Activating Germline TP53 in an Inherited Bone-Marrow-Failure Syndrome. **Am J Hum Genet.** 2018 Sep 6;103(3):440-447. doi:10.1016/j.ajhg.2018.07.020. Epub 2018 Aug 23. PubMed PMID: 30146126.
- 5) Bianchi P, Elisa Fermo E, Glader B, Kanno H, Agarwal A, Barcellini W, Eber S, Hoyer JD, Kuter DJ, Maia TM, Del Mar Mañu-Pereira M, Kalfa TA, Pissard S, Segovia JC, van Beers E, Gallagher PG, Rees DC, van Wijk R. Addressing The Diagnostic Gaps in Pyruvate Kinase (PK) Deficiency: Consensus Recommendations on the Diagnosis of PK Deficiency. **Am J Hematol.** 2019;94:149-161. doi: 10.1002/ajh.25325. PMID:30358897.
- 6) Hamada M, Doisaki S, Okuno Y, Muramatsu H, Hama A, Kawashima N, Narita A, Nishio N, Yoshida K, Kanno H, Manabe A, Taga T, Takahashi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Whole-exome analysis to detect congenital hemolytic anemia mimicking congenital dyserythropoietic anemia. **Int J Hematol.** 2018 Sep;108(3):306-311. doi: 10.1007/s12185-018-2482-7. PMID: 29936674.
- 7) van Straaten S, Bierings M, Bianchi P, Akiyoshi K, Kanno H, Serra IB, Chen J, Huang X, van Beers E, Ekwattanakit S, Gungör 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 Feb;103(2):e82-e86. doi: 10.3324/haematol.2017.177857. PMID: 29242305.
- 8) 槍澤大樹, 小林良輔, 磯合綾子, 小野寺博和, 松野義弘, 加藤道夫, 菅野仁 . 自己アルブミン製剤としての濾過濃縮腹水の有効性 . **日本輸血細胞治療学会誌** 2018;64(5):631-640. doi: 10.3925/jjtc.64.631.
- 9) 小倉浩美, 菅野仁 . 赤血球酵素とその異常 . 特集 赤血球造血のメカニズムとその異常 最近の進歩 . **血液フロンティア** 2018;28(9): 1333-1341.
- 10) Kamio H, Uchiyama T, Kanno H, Onoe Y, Saito K, Kameoka S, Kamio T, Okamoto T. Association between SLC01B1 rs4149056 and tegafur-uracil-induced hepatic dysfunction in breast cancer. **Pharmacogenomics** 2019;20(5):353-365. doi: 10.2217/pgs-2018-0100. PMID: 30734632.
- 11) Kohara H, Utsugisawa T, Sakamoto C, Hirose L, Ogawa Y, Ogura H, Sugawara A, Liao J, Aoki T, Iwasaki T, Asai T, Doisaki S, Okuno Y, Muramatsu H, Abe T, Kurita R, Miyamoto S, Sakuma T, Shiba M, Yamamoto T, Ohga S, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Kojima

- S, Kanno H, Tani K. KLF1 mutation E325K induces cell cycle arrest in erythroid cells differentiated from congenital dyserythropoietic anemia patient-specific induced pluripotent stem cells. **Exp Hematol**. 2019 Mar 12. doi: 10.1016/j.exphem.2019.03.001. PMID: 30876823.
- 12) 小倉浩美, 菅野仁.【特集 新生児黄疸を再び考える】各論 先天性溶血性疾患. **周産期医学** 2019;49(2):211-216.
2. 学会発表
- 1) 中林恭子, 岡本好雄, 槍澤大樹, 菅野仁. 当院における血液製剤使用状況の実態に関する解析. **第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2018 年 5 月 24-26 日, 宇都宮).
- 2) 千野峰子, 小野慎吾, 松田和樹, 久保田友晶, 守谷友美, 及川美幸, 木下明美, 岡田真一, 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, 菅野仁. 胸水・腹水濾過濃縮静注法における遊離ヘモグロビン検査の重要性. **第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2018 年 5 月 24-26 日, 宇都宮).
- 3) 高源ゆみ, 稲田紹子, 木下明美, 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の臨床研究支援. **第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2018 年 5 月 24-26 日, 宇都宮).
- 4) 菅野仁. (依頼講演: セミナー) 血液製剤使用実態調査で明らかになった血漿分画製剤の使用状況について. **第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2018 年 5 月 24-26 日, 宇都宮).
- 5) 菅野仁, 岡本好雄. (ワークショップ) アンケート調査からみた日本のガンマグロブリン製剤使用実態. **第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2018 年 5 月 24-26 日, 宇都宮).
- 6) 菅野仁, 岡本好雄. (ワークショップ) アンケート調査から見た輸血後感染症検査の実施状況. **第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2018 年 5 月 24-26 日, 宇都宮).
- 7) 菅野仁. (教育講演) 血液製剤使用実態調査から分かること. **第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2018 年 5 月 24-26 日, 宇都宮).
- 8) 平形絢子, 佐藤実紅, 春日夏那子, 橋本真理, 田中健佑, 水野隆久, 河野美幸, 須永康夫, 田代雅彦, 小倉浩美, 菅野仁. 新生児に重症黄疸と溶血性貧血を来した一例. **日本小児科学会群馬地方会** (2018 年 6 月 10 日, 高崎).
- 9) Iwasaki T, Utsugisawa T, Yamamoto T, Ogura H, Aoki T, Okamoto Y, Kawakami T, Ohga S, Ohara A, Ito E, Kanno H. Pyruvate kinase deficiency in Japan: A Summary of clinical feature, laboratory data and enzymatic diagnosis. **23rd Congress of European Hematology Association (EHA 23)** (2018 年 6 月 14-17 日, スウェーデン・ストックホルム).
- 10) 菅野仁. 先天性溶血性貧血の秒型診断と治療～最近のトピックス. **第 4 回北陸小児血液研究会** (2018 年 6 月 30 日, 金沢).
- 11) 菅野仁. (特別講演) 先天性溶血性貧血の疫学と病型診断. **第 17 回日本新生児黄疸管理研究会** (2018 年 10 月 6 日, つくば).
- 12) 鎌谷直之, 降旗謙一, 谷口敦夫, 福内友子, 山岡法子, 金子希代子, 菅野仁. 健常人とサラセミア、異常ヘモグロビン血症患者から得た赤血球における ATP 増強. **日本人類遺伝学会第 63 回大会** (2018 年 10 月 10-13 日, 横浜).
- 13) 青木貴子, 小倉浩美, 槍澤大樹, 山根孝久, 山本俊至, 菅野仁. 遺伝子パネルシーケンスにより脱水型遺伝性有口赤血球 (DHSt) と診断し得た一例. **日本人類遺伝学会第 63 回大会** (2018 年 10 月 10-13 日, 横浜).
- 14) 小倉浩美, 青木貴子, 槍澤大樹, 岡本好雄, 川上高弘, 山本俊至, 大賀正一, 伊藤悦朗, 菅野仁. 乳児期の一過性溶血性貧血を呈する infantile pyknocytosis の臨床像と検査所見. Clinical and laboratory characteristics of neonatal cases suspected with infantile pyknocytosis. **第 80 回日本血液学会** (2018 年 10 月 12-14 日, 大阪).
- 15) 槍澤大樹, 青木貴子, 小倉浩美, 岡本好雄, 川上高弘, 山根孝久, 山本俊至, 菅野仁. 先天性溶血性貧血診断における網羅的遺伝子検査の有用性. Usefulness of comprehensive genetic testing for the diagnosis of congenital hemolytic anemia. **第 80 回日本血液学会** (2018 年 10 月 12-14 日, 大阪).
- 16) 岡本好雄, 槍澤大樹, 中林恭子, 千野峰子, 守屋友美, 松田和樹, 小林博人, 菅野仁. 冷蔵保存腹水による CART の安全性と有効性. **第 39**

回日本アフゼシス学会学術大会 (2018年10月25-27日, 岡山).

- 17) 小林博人, 阿部結貴, 槍澤大樹, 菅野仁. 腹水由来  $\delta$  型 T 細胞を用いた癌免疫細胞療法の開発. **第 39 回日本アフゼシス学会学術大会** (2018年10月25-27日, 岡山).
- 18) 鎌谷直之, 降旗謙一, 谷口敦夫, 福内友子, 山岡法子, 金子希代子, 菅野仁. 健常人とサラセミア、異常ヘモグロビン血症患者から得た赤血球におけるイノシンによる ATP 増強. **第 52 回日本痛風・核酸代謝学会** (2019年2月14-15日, 東京).
- 19) Kanno H. Current Practice of Cell Therapy and Management of the Cellular Products at the Tokyo Women's Medical University Hospital Dept. **Transfusion Medicine and Cell Processing, Faculty of Medicine, Tokyo Women's Medical University (TWMU) The 33rd Transfusion Medicine Conference.** (2019年1月25日, 葉山).

#### G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし