

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

遺伝性鉄芽球性貧血

研究分担者 張替秀郎（東北大学大学院医学系研究科血液免疫病学分野 教授）

研究要旨： 遺伝性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天的異常により発症する難治性の貧血であり、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする。希少疾患である遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データの解析や遺伝子変異については東北大学が拠点として解析している。最も代表的な遺伝性鉄芽球性貧血は赤血球におけるヘム合成系の初発酵素である赤血球型5-アミノレブリン酸合成酵素（ALAS2）の変異により発症するX連鎖性鉄芽球性貧血（XLSA）であるが、既知の遺伝子に変異が認められない症例も複数存在し、その発症機序は十分に解明されていない。研究期間内に9例の新規症例が登録され、うち5例はALAS2遺伝子の変異が同定された。

A．研究目的

鉄芽球性貧血（sideroblastic anemia）は骨髄に環状鉄芽球が出現することを特徴とする難治性貧血であり、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血の2つに大きく分類される。先天性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天的異常により発症する稀な疾患であるため、その頻度、病態については不明である。本研究では、本邦における遺伝性鉄芽球性貧血の病態、遺伝子異常を明らかにし、鉄芽球性貧血の診断ガイドラインを確立させることを目的とする。

B．研究方法

難治性疾患克服事業「遺伝性鉄芽球性貧血の診断基準と治療法の確立」班から引き続き行っている全国調査で見出された症例・家系について既知の鉄芽球性貧血の原因遺伝子の変異解析を行う。既知の遺伝子変異が認められない家系については、「稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究」班において次世代シーケンサーによる全エクソン解析あるいは全ゲノム解析を行う。この解析において候補遺伝子が見出された場合は、本班でその機能解析を行う。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析研究について所属施設の倫理委員会の承認を得る。主治医に患者本人もしくは保護者への説明・同意の取得がなされた上で、遺伝子解析を行う。

C．研究結果

1例目の新規症例は41歳男性、貧血精査の結果、骨髄異形成症候群（環状鉄芽球を伴う不応性貧血）として赤血球輸血などで加療されていたが、兄弟にも同様の貧血症状を認めることから、遺伝性鉄芽球性貧血の診断依頼目的で紹介となった。データ上、小球性低色素性貧血（Hb 7.4 g/dL, MCV 66fL, MCH 19.9pg）鉄過剰症状（肝腫大、血清フェリチン 2859ng/mL）を認めていた。本人の末梢血液細胞を用いた遺伝子変異解析の結果、ALAS2遺伝子のHemizygous変異（R170L）が同定された。本変異は既報でも同一箇所の変異を認めており（Ohba et al. Ann Hematol 2013）これが原因遺伝子であると考えた。ビタミンB6補充は効果を認めないため、現在5アミノレブリン酸の有効性・安全性をみる臨床試験を施行中である。

2例目は41歳男性、家族歴なし。小球性貧血の精査のため18歳頃に骨髄検査を施行し、鉄芽球性貧血と診断。以後、患者の自己判断で通院はされていな

かった。40歳になり、肝障害・小球性貧血で近医より紹介があり、ヘモクロマトーシスに伴う肝硬変を認めていた。骨髓検査では引き続き環状鉄芽球を認めていたため、遺伝性鉄芽球性貧血の診断依頼目的で紹介となった。本人の末梢血液細胞を用いた遺伝子変異解析の結果、ALAS2遺伝子のHemizygous変異 (R452H) が同定された。本変異は既報でも同一箇所の変異を認めており (Ohba et al. Ann Hematol 2013)、これが原因遺伝子であると考えた。本症例は、ビタミンB6補充の効果認め、現在も引き続き加療中である。

3例目は61歳、女性。貧血、肝硬変、肝ヘモクロマトーシス、胃食道静脈瘤の既往あり。貧血の家族歴は明らかでない。近医にて汎血球減少 (WBC 2400/uL, Hb 7.3g/dL, Plt 8.6×10^4 /uL, MCV 112.8fL) の精査目的で骨髓検査を施行した結果、全赤芽球中の60%に環状鉄芽球を認めた。染色体は正常核型で、MDSを示唆する異形性は認めなかった。遺伝性鉄芽球性貧血の可能性を考慮し遺伝子解析を施行した結果、新規のALAS2遺伝子のヘテロ変異を認めた (ALAS2 c.488 G>A, p.Arg163His)。組換え蛋白質を用いたALAS2活性測定の結果、変異ALAS2蛋白質の活性は野生型に比べ約1/20程度と有意に低下していた。本症例に対しビタミンB6補充を試みたものの不応であった。

4例目の新規症例は3歳男児、小球性貧血 (Hb 7.0g/dL, MCV 58.8 fL) および骨髓における環状鉄芽球の出現あり、末梢血液細胞を用いた遺伝子解析の結果精査の結果、ALAS2遺伝子のHemizygous変異 (p.R170H) が同定された。本変異は既報でも同一箇所の変異を認めており (Ohba et al. Ann Hematol 2013) これが原因遺伝子であると考えた。現在、ビタミンB6補充の有効性を確認中である。

5例目は49歳の女性、家族歴なし。大球性貧血 (Hb 6.3 g/dL, MCV 112.3 fL) と骨髓環状鉄芽球を認める。本人の末梢血液細胞を用いた解析の結果、ALAS2遺伝子のHeterozygous変異 (p.L515F) を認めた。

残りの4例についても全エクソン解析などの網羅的遺伝子解析を施行中である。

D. 考察

本邦における鉄芽球性貧血に関する全国調査の結果、遺伝性鉄芽球性貧血症例は計29例登録され、うち69%と大多数はALAS2の異常を認めた。ALAS2変

異に伴う遺伝性鉄芽球性症例は、男児発症、小球性貧血、鉄過剰症を特徴とするが、調査研究の結果、女性の 大球性鉄芽球性貧血の一部ではALAS2の Heterozygous変異が病因となりうることが示唆された (Fujiwara et al. Ann Hematol 2017)。骨髓異形成症候群に伴う鉄芽球性貧血でも大球性鉄芽球性貧血を呈するため、女性において大球性鉄芽球性貧血を認め、さらに造血細胞の異形成に乏しい場合は本症を念頭に置くことも重要である。本研究結果が今後の診療ガイドラインの改訂に寄与しうるかもしれない。

E. 結論

新たな遺伝性鉄芽球性貧血症例を見出すとともに、先天性骨髓不全症の診断ガイドラインにおける遺伝性鉄芽球性貧血の項の改訂・策定を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakagawa R, Onishi Y, Kawajiri A, Onodera K, Furukawa E, Sano S, Saito K, Ichikawa S, Fujiwara T, Fukuhara N, Harigae H. Preemptive therapy for cytomegalovirus reactivation after daratumumab-containing treatment in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. **Ann Hematol.** 2019. (in press)
- 2) Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Morita M, Ono K, Suzuki C, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Kawamata S, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Generation and molecular characterization of human ring sideroblasts: A key role of ferrous iron in erythroid differentiation and ring sideroblast formation. **Mol Cell Biol.** 2019. (in press)
- 3) Ochi T, Onishi Y, Nasu K, Onodera K, Kobayashi M, Ichikawa S, Fujiwara T, Fukuhara N, Yamada-Fujiwara M, Harigae H. Umbilical Cord Blood Transplantation Using Reduced-intensity Conditioning without Antithymocyte Globulin in Adult Patients with Severe Aplastic Anemia. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2019;25:e55-e59.
- 4) Fujiwara T, Harigae H. Molecular pathophysiology and genetic mutations in

- congenital sideroblastic anemia. **Free Radic Biol Med.** 2019;133:179-185.
- 5) Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Saito K, Kamata M, Tamai Y, Kawamata S, Harigae H. A defined culture method enabling the establishment of ring sideroblasts from induced pluripotent cells of X-linked sideroblastic anemia. **Haematologica** 2018;103:e188-e191.
 - 6) Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators. **Tohoku J Exp Med.** 2018;244:41-52.
 - 7) Kato H, Itoh-Nakadai A, Matsumoto M, Ishii Y, Watanabe-Matsui M, Ikeda M, Ebina-Shibuya R, Sato Y, Kobayashi M, Nishizawa H, Suzuki K, Muto A, Fujiwara T, Nannya Y, Cazzola M, Ogawa S, Harigae H, Igarashi K. Infection perturbs Bach2- and Bach1-dependent erythroid lineage choice to cause anemia. **Nat Immunol.** 2018;19:1059-1070.
 - 8) Ishida H, Imamura T, Morimoto A, Fujiwara T, Harigae H. Five-aminolevulinic acid: New Approach for Congenital Sideroblastic Anemia. **Pediatr Int.** 2018;60:496-497.
 - 9) Kawakami T, Nakazawa H, Kawakami F, Matsuzawa S, Sudo Y, Sakai H, Nishina S, Sendo N, Sendo Y, Komatsu M, Umemura T, Yamaguti T, Kosho T, Fujiwara T, Harigae H, Ishida F. Successful treatment with vitamin B6 for X-linked sideroblastic anemia with ALAS2 R452H mutation. **Rinsho Ketsueki** 2018;59:401-406.
 - 10) Kanehira M, Fujiwara T, Nakajima S, Okitsu Y, Onishi Y, Fukuhara N, Ichinohasama R, Harigae H. An LPA1/3 axis governs cellular senescence of mesenchymal stromal cells and promotes growth and vascularization of multiple myeloma. **Stem Cells.** 2017;35:739-753.
 - 11) Kobayashi M, Kato H, Hada H, Itoh-Nakadai A, Fujiwara T, Inoguchi Y, Ichiyangi K, Muto A, Tomosugi N, Sasaki H, Harigae H, Igarashi K. Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency. **Haematologica** 2017;102:454-465.
 - 12) Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Effects of in vivo deletion of GATA2 in bone marrow stromal cells. **Exp Hematol.** 2017;56:31-45.
 - 13) Fujiwara T, Fukuhara N, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Onishi Y, Furuyama K, Harigae H. A novel heterozygous ALAS2 mutation in a female with macrocytic sideroblastic anemia resembling myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts: A case report and literature review. **Ann Hematol.** 2017;96:1955-1957.
 - 14) Saito K, Fujiwara T, Ota U, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizuka M, Tanaka T, Harigae H. Dynamics of absorption, metabolism, and excretion of 5-aminolevulinic acid in human intestinal Caco-2 cells. **Biochem Biophys Res.** 2017;11:105-111.
 - 15) Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Forced FOG1 expression in erythroleukemia cells: induction of erythroid genes and repression of myelo-lymphoid transcription factor PU.1. **Biochem Biophys Res Commun.** 2017;485:380-387.
 - 16) Inokura K, Fujiwara T, Saito K, Iino T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts. **Exp Hematol.** 2017;49:56-67.
 - 17) Kondo A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K, Harigae H. Identification of a novel putative mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation. **Int J Hematol.** 2016;103:387-395.
 - 18) Sakurai K, Fujiwara T, Hasegawa S, Okitsu

- Y, Fukuhara N, Onishi Y, Yamada-Fujiwara M, Ichinohasama R, Harigae H. Inhibition of human primary megakaryocyte differentiation by anagrelide: A gene expression profiling analysis. **Int J Hematol**. 2016;104:190-199.
- 19) Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Okitsu Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. **Blood** 2016;128:508-518.
2. 学会発表
- 1) Fujiwara T, Saito K, Hatta S, Suzuki C, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Tanaka T, Harigae H. Effect of ALA on in a model of X-linked sideroblastic anemia. **The 6th International ALA and Porphyrin Symposium** (2018年10月27日, 静岡) .
- 2) Fujiwara T, Saito K, Hatta S, Suzuki C, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H. The effect of TET2 disruption in human erythroid cells. **The 9th Japanese Society of Hematology International Symposium** (2018年7月27-28日, 京都) .
- 3) Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H. Characterization of in vitro model of X-linked sideroblastic anemia. **第80回日本血液学会** (2018年10月12-14日, 大阪) .
- 4) Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators. **第80回日本血液学会** (2018年10月12-14日, 大阪) .
- 5) Onishi Y, Fujiwara M, Sano S, Nakagawa R, Kawajiri A, Saito K, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Fujiwara T, Harigae H. Cyclosporine A treatment for T-cell large granular lymphocytic leukemia: a single-center experience. **第80回日本血液学会** (2018年10月12-14日, 大阪) .
- 6) Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H. Generation and molecular characterization of human ring sideroblasts. **The 60th American Society of Hematology** (2018年12月1-4日, 米国・サンディエゴ) .
- 7) Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H. Establishment and characterization of *in vitro* model of X-linked sideroblastic anemia. **The 59th American Society of Hematology** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ) .
- 8) Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Role of GATA2 in the maintenance of bone marrow microenvironment. **The 59th American Society of Hematology** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ) .
- 9) Saito K, Fujiwara T, Morita M, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Shimizu R, Harigae H. Establishment of in vivo and in vitro model of X-linked sideroblastic anemia. **The 22th Congress of European Hematology Association** (2017年6月22-25日, スペイン・マドリード) .
- 10) Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S, Harigae H. GENERATION OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL-DERIVED ERYTHROBLASTS FROM A PATIENT WITH X-LINKED SIDEROBLASTIC ANEMIA. **The 7th International Bioiron Society** (2017年5月7-11日, 米国・ロサンゼルス) .
- 11) Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Exploring the mechanism of FOG1-dependent transcriptional regulation in erythroid cells. **The 22th Congress of European Hematology Association** (2017年6月22-25日, スペイン・マドリード) .
- 12) Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S,

- Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Exploring the mechanism of FOG1-dependent transcriptional regulation in erythroid cells. **第79回日本血液学会**(2017年10月20-22日, 東京).
- 13) Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Role of GATA2 in the maintenance of the bone marrow microenvironment. **第79回日本血液学会**(2017年10月20-22日, 東京).
- 14) Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S, Harigae H. Generation of induced pluripotent stem cell-derived erythroblasts of X-linked sideroblastic anemia. **第79回日本血液学会**(2017年10月20-22日, 東京).
- 15) Saito K, Fujiwara T, Morita M, Hatta S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Shimizu R, Harigae H. Establishment of in vivo and in vitro model of X-linked sideroblastic anemia by CRISPR/Cas9. **第79回日本血液学会**(2017年10月20-22日, 東京).
- 16) Kato H, Itoh A, Matsumoto M, Shibuya R, Sato Y, Kobayashi M, Muto A, Fujiwara T, Harigae H, Igarashi K. Bach1 and Bach2 orchestrate erythro-myeloid differentiation responding to environmental changes. **第79回日本血液学会**(2017年10月20-22日, 東京).
- 17) Kato H, Itoh-Nakadai A, Matsumoto M, Ebina-Shibuya R, Sato Y, Kobayashi M, Muto A, Fujiwara T, Harigae H, Igarashi K. Transcription Factor Bach1 and Bach2 Operate Erythro-myeloid Competitive Differentiation by Responding to Environmental Changes. **The 58th American Society of Hematology**(2016年, 米国・サンディエゴ).
- 18) Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S, Harigae H. Generation of induced pluripotent stem cell-derived erythroblasts from a patient with X-linked sideroblastic anemia. **The 58th American Society of Hematology**(2016年, 米
- 国・サンディエゴ).
- 19) Kondo A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K, Harigae H. Identification of a novel putative mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation. **第78回日本血液学会**(2016年10月, 横浜).
- 20) Saito K, Inokura K, Fujiwara T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts. **第78回日本血液学会**(2016年10月, 横浜).
- 21) Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Okitsu Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. **第78回日本血液学会**(2016年10月, 横浜).
- 22) Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Okitsu Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. **第78回日本血液学会**(2016年10月, 横浜).

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし