

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 高橋義行（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 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、様々な血液疾患症例 738 例に対して遺伝性血液疾患関連遺伝子のターゲットシーケンスを実施し、CDA 5 例 (CDAN1 2 例、SEC23B 2 例、KLF1 1 例)、DKC 15 例 (TINF2 8 例、TERT 4 例、DKC1 2 例、TERC 1 例) など、計 225 例 (32%) を遺伝子診断し得た。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*、*NOPI10*、*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を超音波破碎により断片化し、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。型と診断された症例では骨髄において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。

また、さまざまな血液疾患症例738例に対して遺伝性血液疾患関連遺伝子のターゲットシーケンス

を実施し、CDA 5例(*CDAN1* 2例、*SEC23B* 2例、*KLF1* 1例)、*DKC* 15例(*TINF2* 8例、*TERT* 4例、*DKC1* 2例、*TERC* 1例)など、計225例(32%)を遺伝子診断し得た。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。

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) Kato K, Miya F, Hamada N, Negishi Y, Narumi-Kishimoto Y, Ozawa H, Ito H, Hori I, Hattori A, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Kanemura Y, Kosaki K, Takahashi Y, Nagata KI, Saitoh S. MYCN de novo gain-of-function mutation in a patient with a novel megalencephaly syndrome. *J Med Genet.* 2018 Dec 20. pii: jmedgenet-2018-105487. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105487. [Epub ahead of print]
- 2) Takeichi T, Okuno Y, Kawamoto A, Inoue T, Nagamoto E, Murase C, Shimizu E, Tanaka K, Kageshita Y, Fukushima S, Kono M, Ishikawa J, Ihn H, Takahashi Y, Akiyama M. Reduction of stratum corneum ceramides in Neu-Laxova syndrome caused by phosphoglycerate dehydrogenase deficiency. *J Lipid Res.* 2018 Dec;59(12):2413-2420. doi: 10.1194/jlr.P087536.

- 3) Hayano S, Okuno Y, Tsutsumi M, Inagaki H, Fukasawa Y, Kurahashi H, Kojima S, Takahashi Y, Kato T. Frequent intragenic microdeletions of elastin in familial supravalvular aortic stenosis. **Int J Cardiol.** 2019 Jan 1;274:290-295. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.09.032.
- 4) 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.
- 5) Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Sekiya Y, Suzuki K, Hamada M, Kataoka S, Ichikawa D, Taniguchi R, Murakami N, Kojima D, Nishikawa E, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Development of clinical paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in children with aplastic anaemia. **Br J Haematol.** 2017; 78(6):954-958. doi: 10.1111/bjh.4790.
- 6) 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 Jul;19(7):796-802, doi: 10.1038/gim.2016.197.
- 7) Sekinaka Y, Mitsuiki N, Imai K, Yabe M, Yabe H, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Takagi M, Arai A, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Muramatsu H, Kojima S, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S, Common Variable Immunodeficiency Caused by FANC Mutations. **J Clin Immunol.** 2017;37(5):434-444. doi: 10.1007/s10875-017-0396-4.
- 8) 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, 64(5), doi: 10.1002/pbc.26305.
- 9) 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.
2. 学会発表
- 1) 川島希, 伊藤雅文, 濱麻人, 奥野友介, 村松秀城, 三輪田俊介, 成田幸太郎, 片岡伸介, 濱田太立, 村上典寛, 小島大英, 市川大輔, 鈴木喬悟, 北澤宏展, 西川英里, 谷口理恵子, 成田敦, 西尾信博, 小島勢二, 高橋義行. ファンコニ貧血患者における骨髄の組織病理像とp53発現. **第80回日本血液学会**(2018年10月12-14日, 大阪).
- 2) Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, 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, Takahashi Y. シーケンスによる先天性骨髄不全症の診断. **第60回日本小児血液・がん学会学術集会**(2018年11月14-16日, 京都).
- 3) Muramatsu H, Kojima D, Okuno Y, Kataoka

- S, Nakajima Y, Ito T, Tsuge I, Sakai Y, Kato T, Kojima S, and Takahashi Y. Combination of TREC Measurement and Next-Generation Sequencing in Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency: A Pilot Program in Japan. **The 60th American Society of Hematology** (2018年12月1-4日, 米国・サンディエゴ) .
- 4) Narita A, Zhu X, Muramatsu H, Chen X, Guo Y, Yang W, Zhang J, Liu F, Jang JH, Kook H, Kim H, Usuki K, Yamazaki H, Takahashi Y, Nakao S, Lee JW, and Kojima S on behalf of Aplastic Anemia Working Party of the Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation Group. Randomized Trial of Two Dosages of Rabbit Antithymocyte Globulin in Patients with Aplastic Anemia. **The 60th American Society of Hematology** (2018年12月1-4日, 米国・サンディエゴ) .
- 5) Mutamatsu 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, and Kojima S. Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. **EWOG-S/SAA2017** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ) .
- 6) Narita A, Hideki M, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Kojima D, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Miyano S, Ito M, Ogawa S and Kojima S. Genetic background of idiopathic bone marrow failure syndromes in children. **EWOG-S/SAA2017** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ) .
- 7) 川島希, 奥野友介, 村松秀城, 濱麻人, 片岡伸介, 濱田太立, 市川大輔, 村上典寛, 小島大英, 鈴木喬悟, 西川英里, 成田敦, 西尾信博, 中沢洋三, 小島勢二, 高橋義行. 次世代シーケンスによるファンconi貧血遺伝子診断が可能な時代におけるFANCD2モノユビキチンの意義. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京) .
- 8) Hamada M, Doisaki S, Okuno Y, Muramatsu H, Hama A, Kataoka S, Ichikawa D, Taniguchi E, Suzuki K, Kojima D, Sekiya Y, Kawashima N, Narita A, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Manabe A, Taga T, Takahashi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Congenital hemolytic anaemia mimicking congenital dyserythropoietic anaemia revealed by whole exome analysis. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京) .
- 9) Okuno Y. 遺伝性造血不全疾患群のクリニカルシーケンス. **第79回日本血液学会学術集会** (Symposium 8) (2017年10月20-22日, 東京) .
- 10) 村松秀城. 先天性および後天性造血不全375例に対するクリニカルシーケンス. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京) .
- 11) Hama A, Toki T, Kobayashi A, Muramatsu H, Okuno Y, Hasegawa D, Nozawa K, Takahashi Y, Watanabe KI, Manabe A, Ito M, Ito E, and Kojima S. Correlation of bone marrow morphology with clinical findings and gene alterations in patients with Diamond-Blackfan anemia. **第59回日本小児血液・がん学会** (2017年11月9-11日, 松山) .
- 12) Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Kojima S and Takahashi Y. Germline mutation in pediatric patients with aplastic anemia. **第59回日本小児血液・がん学会** (2017年11月9-11日, 松山) .

- 13) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Xinan Wang, Yinyan Xu, 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 and Kojima S. ターゲットシーケンス解析を施行した小児造血不全移植例の解析．**第40回日本造血細胞移植学会総会**（2018年2月1-3日，札幌）．
- 14) 濱麻人，鈴木喬悟，成田敦，成田幸太郎，北澤宏展，濱田太立，片岡伸介，村上典寛，市川大輔，谷口理恵子，小島大英，西川英里，奥野友介，川島希，村松秀城，西尾信博，小島勢二，高橋義行．Diamond-Blackfan貧血に対するフルダラビンおよびメルファランを用いた同種骨髄移植．**第40回日本造血細胞移植学会総会**（2018年2月1-3日，札幌）．

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし