

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の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 照井君典（弘前大学大学院医学研究科小児科学 准教授）

**研究要旨：** Diamond Blackfan 貧血（DBA）は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として 15 種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子と *GATA1* 遺伝子が同定されている。しかし、我が国の DBA 患者の約半数は原因遺伝子が不明である。本年度も日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行い、臨床的に DBA と診断された 64 例中 31 例（％）に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに 221 例の DBA の臨床情報と検体の収集および遺伝子解析を行い、128 例（57.9％）に原因となる RP 遺伝子変異を見出した。この中には、我々が見出した新規原因遺伝子 *RPL27*, *RPS27* 及び *RPS15A* が含まれている。さらに、最近、DBA の近縁疾患の中に、がん抑制遺伝子 *TP53* の活性化変異が原因で起こる「新たな先天性骨髄不全症」を発見した（AJHG 2018）。これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS 委員会と連携を取りながらエビデンスに基づいた診断基準および診断・治療ガイドラインの小改訂を行った。さらに、2017 年度は悪性腫瘍の合併を考慮した「DBA の重症度分類」の改訂、2018 年度は「DBA の診断基準および診断・治療ガイドライン」の小改訂を行った。

#### A．研究目的

Diamond-Blackfan 貧血（DBA）は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として 15 種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子と *GATA1* 遺伝子が同定されているが、我が国の DBA 患者の約半数は原因遺伝子が不明である。また、遺伝子診断により臨床的な診断が誤りであった症例が複数存在することが明らかとなった。本研究の目的は、これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行うことである。データ収集と観察研究を継続し、正確な先天性造血不全の実態把握を行い、より精度の高い疾患データベースの確立とエビデンスに基づいた診断基準、重症度分類と診療ガイドラインの改訂を行う。

#### B．研究方法

最初に、DBA で遺伝子変異が報告されている 12 種類の RP 遺伝子（*RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPS27*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL26*,

*RPL27*, *RPL35a*）と *GATA1* 遺伝子について、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いてターゲットシーケンスを行った。次に、定量的 PCR 法と SNP アレイ法により RP 遺伝子の欠失を解析した。

得られたデータベースをもとに、エビデンスに基づいた診断基準の改訂、重症度分類の策定および診断・治療ガイドラインの改訂を行う。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、患者および家族に十分な説明を行い文書による同意を得たのち、検体を連結可能匿名化して解析を行った。

#### C．研究結果

新規症例 64 名の遺伝子診断を行い、31 例（*RPS19* 11 例、*RPL11* 6 例、*RPL5* 5 例、*RPS26* 4 例、*RPS7* 3 例、*RPL35A* 2 例）で既知の原因遺伝子を同定した。これまでに遺伝子検査を施行した症例は 221 例となった。本研究事業と AMED の「稀少小児遺伝

性血液疾患研究班」(小島班)の連携研究により、新規原因候補遺伝子 *RPS15A* を見出した (Haematologica 2016)。さらに、DBAの近縁疾患の中に、がん抑制遺伝子 *TP53* の活性化変異が原因で起こる「新たな先天性骨髄不全症」の2症例を発見した (AJHG 2018)。

これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら、エビデンスに基づいた診断基準および診断・治療ガイドラインの小改訂を行った。さらに、2017年度は悪性腫瘍の合併を考慮した「DBAの重症度分類」の改訂、2018年度は「DBAの診断基準および診断・治療ガイドライン」の小改訂を行った。

#### D . 考察

我が国のDBAは、本研究事業により原因遺伝子も含め次第にその実態が明らかになってきた。まだ約40%が原因遺伝子不明であるが、精度の高いデータベースの構築が進んでいると思われる。

DBAを含めた先天性骨髄不全症7疾患の診療ガイドラインの改訂版について、予め出版社とも協議し、日本小児血液・がん学会編集の書籍として出版することを念頭に改訂作業を行った。先天性骨髄不全症の学会認定のガイドラインはこれまでなく、専門医だけでなく一般小児科医の啓蒙活動にも大きく役立つことが期待される。

#### E . 結論

DBA近縁疾患の中に、がん抑制遺伝子 *TP53* の活性化変異が原因で起こる「新たな先天性骨髄不全症」を発見した。また、DBAの新規原因遺伝子 *RPS15A* を発見し、DBAの研究に大きく貢献した。

DBAの遺伝子診断を進め、精度の高いDBAのデータベースが構築されてきた。その成果のもとに診断基準、重症度分類と診療ガイドラインの改訂を行った。本研究班は、DBAの診療の質の向上に大きな貢献をしたと思われる。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kudo K, Tanaka T, Kobayashi A, Terui K, Ito E. Zoledronic acid for relapsed Langerhans cell histiocytosis with isolated skull bone lesion. **Pediatr Int.** 2019;61(3):315-317. doi: 10.1111/ped.13774.

- 2) Kudo K, Ueno H, Sato T, Kubo K, Kanezaki R, Kobayashi A, Kamio T, Sasaki S, Terui K, Kurose A, Yoshida K, Shiozawa Y, Toki T, Ogawa S, Ito E. Two siblings with familial neuroblastoma with distinct clinical phenotypes harboring an ALK germline mutation. **Genes Chromosomes Cancer.** 2018;57(12):665-669. doi: 10.1002/gcc.22676.
- 3) 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;103(3):440-447. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.07.020.
- 4) Tsujimoto S, Osumi T, Uchiyama M, Shirai R, Moriyama T, Nishii R, Yamada Y, Kudo K, Sekiguchi M, Arakawa Y, Yoshida M, Uchiyama T, Terui K, Ito S, Koh K, Takita J, Ito E, Tomizawa D, Manabe A, Kiyokawa N, Yang JJ, Kato M. Diplotype analysis of NUDT15 variants and 6-mercaptopurine sensitivity in pediatric lymphoid neoplasms. **Leukemia.** 2018;32(12):2710-2714. doi: 10.1038/s41375-018-0190-1.
- 5) Uemura S, Mori T, Nagano C, Takafuji S, Nishimura N, Toki T, Terui K, Ito E, Iijima K. Effective response to azacitidine in a child with a second relapse of myeloid leukemia associated with Down syndrome after bone marrow transplantation. **Pediatr Blood Cancer.** 2018:e27414. doi: 10.1002/pbc.27414.
- 6) Minakawa S, Matsuzaki Y, Terui K, Kayaba H, Sawamura D. Tuberculous granuloma developed 9 years after bacillus Calmette-Guérin vaccination in a patient with immunodeficiency. **J Dermatol.** 2018; 45: e293-5. doi: 10.1111/1346-8138.14468.

- 7) Ito E, Terui K, Toki T. Inherited bone marrow failure syndrome, TAM. In **Hematological Disorders in Children**. edited by Eiichi Ishii, Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2017, pp. 145-170.
- 8) Ikawa Y, Nishimura R, Maeba H, Fujiki T, Kuroda R, Noguchi K, Fukuda M, Mase S, Araki R, Mitani Y, Sato T, Terui K, Ito E, Kitabayashi I, Yachie A. Deep spontaneous molecular remission in a patient with congenital acute myeloid leukemia expressing a novel MOZ-p300 fusion transcript. **Leuk Lymphoma**. 2018;1-3. doi: 10.1080/10428194.2018.1434885.
- 9) Sakamoto K, Imamura T, Kihira K, Suzuki K, Ishida H, Morita H, Kanno M, Mori T, Hiramatsu H, Matsubara K, Terui K, Takahashi Y, Suenobu SI, Hasegawa D, Kosaka Y, Kato K, Moriya-Saito A, Sato A, Kawasaki H, Yumura-Yagi K, Hara J, Hori H, Horibe K. Low Incidence of Osteonecrosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with ALL-97 and ALL-02 Study of Japan Association of Childhood Leukemia Study Group. **J Clin Oncol**. 2018; 36: 900-7.
- 10) Shimada A, Iijima-Yamashita Y, Tawa A, Tomizawa D, Yamada M, Norio S, Watanabe T, Taga T, Iwamoto S, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Saito AM, Kiyokawa N, Horibe K, Hara Y, Oki K, Hayashi Y, Tanaka S, Adachi S. Risk-stratified therapy for children with FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: results from the JPLSG AML-05 study. **Int J Hematol**. 2018; 107: 586-595. doi: 10.1007/s12185-017-2395-x.
- 11) Nakayama H, Tomizawa D, Tanaka S, Iwamoto S, Shimada A, Saito AM, Yamashita Y, Moritake H, Terui K, Taga T, Matsuo H, Kosaka Y, Koh K, Hosoi H, Kurosawa H, Isoyama K, Horibe K, Mizutani S, Adachi S. Fludarabine, cytarabine, G-CSF and idarubicin for children with relapsed AML. **Pediatr Int**. 2017; 59: 1046-52.
- 12) Matsuo H, Shiga S, Imai T, Kamikubo Y, Toki T, Terui K, Ito E, Adachi S. Purification of leukemic blast cells from blood smears using laser microdissection. **Int J Hematol**. 2017;106(1):55-59. doi:10.1007/s12185-017-2227-z.
- 13) Moritake H, Tanaka S, Nakayama H, Miyamura T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Saito A, Shiba N, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Goto H, Hasegawa D, Horibe K, Mizutani S, Adachi S. Outcome of relapsed core binding factor acute myeloid leukemia in children: A result from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05R study. **Pediatr Blood Cancer**. 2017 Oct; 64 (10). doi: 10.1002/pbc.26491.
- 14) 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, Shiraiishi 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.
- 15) Hiyama TY, Utsunomiya AN, Matsumoto M, Fujikawa A, Lin CH, Hara K, Kagawa R, Okada S, Kobayashi M, Ishikawa M, Anzo M, Cho H, Takayasu S, Nigawara T, Daimon M, Sato T, Terui K, Ito E, Noda M. Adipsic Hyponatremia Without Hypothalamic Lesions Accompanied by Autoantibodies to Subfornical Organ. **Brain Pathol** 2017; 27: 323-31.
- 16) Kobayashi R, Mitsui T, Fujita N, Osumi T, Aoki T, Aoki K, Suzuki R, Fukuda T, Miyamoto T, Kato K, Nakamae H, Goto H, Eto T, Inoue M, Mori T, Terui K, Onizuka M, Koh K, Koga Y, Ichinohe T, Sawada A, Atsuta Y, Suzumiya J. Outcome differences between children and adolescents and young adults with non-Hodgkin lymphoma

- following stem cell transplantation. **Int J Hematol.** 2017; 105: 369-76.
- 17) Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Okuno Y, Yamato G, Hara Y, Nagata Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Kato M, Park Mj, Ohki K, Shimada A, Takita J, Tomizawa D, Kudo K, Arakawa H, Adachi S, Taga T, Tawa A, Ito E, Horibe K, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol.** 2016;175(3):476-489. doi: 10.1111/bjh.14247.
  - 18) Ogasawara S, Saito N, Itoga M, Kushibiki M, Nakata R, Ohta E, Fujita E, Kojima K, Terui K, Ito E, Kayaba H. Spurious thrombocytosis caused by tumor cell lysis in a patient with acute monocytic leukemia. **Clin Lab.** 2016;62: 1575-7. doi: 10.7754/Clin.Lab.2016.151218.
  - 19) Miura R, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H, Kurose A, Tsuruga K, Sasaki S, Terui K, Ito E. Dysgerminoma developing from an ectopic ovary in a patient with WAGR syndrome: A case report. **Mol Clin Oncol** 2016; 5:503-6.
  - 20) Takahashi H, Watanabe T, Kinoshita A, Yuza Y, Moritake H, Terui K, Iwamoto S, Nakayama H, Shimada A, Kudo K, Taki T, Yabe M, Matsushita H, Yamashita Y, Koike K, Ogawa A, Kosaka Y, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Miyachi H, Tawa A, Adachi S. High event-free survival rate with minimum-dose-anthracycline treatment in childhood acute promyelocytic leukaemia: a nationwide prospective study by the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group. **Br J Haematol** 2016; 174: 437-43.
  - 21) Umeda K, Adachi S, Horikoshi Y, Imai K, Terui K, Endo M, Mitsui T, Kato K, Koh K, Kajiwara R, Ito R, Otsuka Y, Inoue M, Ishii E, Yabe H. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Chediak-Higashi syndrome. **Pediatr Transplant** 2016; 20: 271-5.
  - 22) Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Preserved High Probability of Overall Survival with Significant Reduction of Chemotherapy for Myeloid Leukemia in Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study in Japan. **Pediatr Blood Cancer** 2016;63:248-54. doi: 10.1002/pbc.25789.
  - 23) Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Terui K, Yoshida K, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Ogawa S, Ito E. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-Blackfan anemia in Japan. **Int J Hematol** 2016;103:112-4. doi: 10.1007/s12185-015-1891-0.
  - 24) 照井君典. 貧血. 小児疾患の診断治療基準. 小児内科増刊号. 2018; 50: 70-1.
  - 25) 伊藤悦朗, 土岐力, 照井君典. Down症候群. 白血病学(上) 最新の基礎・臨床研究. 日本臨床増刊号 2016;74:97-102.
  - 26) 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗. 一過性異常骨髄増殖症. 小児疾患診療のための病態生理3. 小児内科増刊号 2016;48:953-6.
  - 27) 照井君典, 伊藤悦朗. ダウン症に伴う急性巨核芽球性白血病の分子的理解と臨床応用. **血液フロンティア** 2016;26:1533-40.
  - 28) 伊藤悦朗, 土岐力, 照井君典. 遺伝性骨髄不全症研究の最近の進歩. **臨床血液** 2016;57:882-90.
  - 29) 新居敏, 藤野寿典, 赤澤嶺, 田尻雄二郎, 高野良彦, 巽亜子, 中道恵里那, 内藤拓人, 安西香織, 杉田亮, 竹川麻衣, 野村安隆, 肥田晋矢, 坂本晴子, 葭井操雄, 土岐力, 照井君典, 伊藤悦朗, 住本真一. 感染を契機に診断に至ったRPL11の遺伝子変異陽性Diamond-Blackfan anemiaの11歳男児例. **小児科臨床** 2016;69:1416-20.
  - 30) 照井君典, 伊藤悦朗. 小児急性巨核芽球性白血病の生物学的特性. **血液内科** 2016;72:737-42.
2. 学会発表
    - 1) Kubota Y, Uryu K, Ito T, Seki M, Isobe T, Toki

- T, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Hiwatari M, Miyano S, Oka A, Ogawa S, Terui K, Sato A, Ito E, and Takita J. Comprehensive Genomic Analysis Identified Acute Lymphoblastic Leukemia in Down Syndrome Was Highly Heterogeneous with the High Prevalence of Ph-like Signature. **American Society of Hematology 60th Annual Meeting** (2018年12月1-4日, 米国・サンディエゴ).
- 2) Kubota Y, Uryu K, Ito T, Kawai T, Seki M, Isobe T, Toki T, Yoshida K, Kataoka K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis elucidated expression and methylation profiles of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. **The 23<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association** (2018年7月14-17日, スウェーデン・ストックホルム).
  - 3) Kubota Y, Uryu K, Ito T, Kawai T, Seki M, Isobe T, Toki T, Yoshida K, Kataoka K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Integrated genetic/epigenetic analysis revealed high heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
  - 4) Hasegawa D, Miyamura T, Nagai K, Kudo K, Tawa A, Sano H, Fukushima K, Iwamoto S, Kinoshita A, Takahashi H, Terui K, Nakayama H, Arakawa Y, Nakashima K, Yamamoto S, Saito MA, Horibe K, Tomizawa D, Taga T, Adachi S. Effectiveness of Supportive Care Measurements to Reduce Infections during Induction for Children with Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
  - 5) Sakamoto K, Imamura T, Kihira K, Ishida H, Suzuki K, Morita H, Kanno M, Mori T, Hiramatsu H, Matsubara K, Terui K, Takahashi Y, Suenobu S, Hasegawa D, Kosaka Y, Kato K, Saito MA, Sato A, Kawasaki H, Yagi YK, Hara J, Hori H, and Horibe K. Low Incidence of Osteonecrosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with ALL-97 and ALL-02 Study of Japan Association of Childhood Leukemia Study Group. **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
  - 6) Ito E, Yoshida K, Toki T, Saida S, Watanabe K, Nakamura M, Terui K, Nakahata T, Miyano S, Watanabe A, Ogawa S. Genetic and Epigenetic Alterations in Acute Megakaryoblastic Leukemia in Down Syndrome. **Fifth JCA- AACR Special Joint Conference -The Latest Advances in Hematological Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics** (招待講演)(2016年7月15日, 千葉).
  - 7) Terui K, Toki T, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Park MJ, Iwamoto S, Taga T, Yanagisawa R, Koh K, M. Saito A, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Watanabe K, Ito E. Analysis of *GATA1* mutations in Down syndrome infants with transient abnormal myelopoiesis and clinical impacts of *GATA1* mutation types: A report from the JPLSG TAM-10 study. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ).
  - 8) Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Gene expression profiles and methylation analysis in Down syndrome related acute lymphoblastic leukemia. **58th Annual Meeting & Exposition** (招待講演)(2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ).

**Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ) .

- 9) Miyamura T, Tanaka S, Nakayama H, Moritake H, Tomizawa D, Saito A, Tawa A, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Morimoto T, Hayashi Y, Horibe K, Mizutani S, Taga T and Adachi S. Clinical and Biological Features of Pediatric Acute Myeloid Leukemia with Primary Induction Failure in the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 Study. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ) .

#### 国内学会

- 1) 渡辺亮, 才田聡, 中村正裕, 土岐力, 金崎里香, 照井君典, 渡邊健一郎, 伊藤悦朗. ダウン症児に発症する巨核芽球性白血病におけるエピゲノム異常. **第80回日本血液学会学術集会** (2018年10月12-14日, 大阪) .
- 2) Terui K, Toki T, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Park MJ, Iwamoto S, Taga T, Yanagisawa R, Koh K, M. Saito A, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Watanabe K and Ito E. Clinical impact of *GATA1* mutation types in infants with Down syndrome and TAM: JPLSG TAM-10 study. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京) .
- 3) 関戸雄貴, 中館尚也, 石黒精, 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗, 吉田健一, 小川誠司, 小島勢二. Blackfan-Diamond 症候群と鑑別を要した Shwachman-Diamond 症候群の姉弟例. **第59回日本小児血液・がん学会学術集会** (2017年11月9-11日, 松山) .
- 4) Kanazaki R, Toki T, Terui K, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Sato T, Ikeda F, Ito E. Dyregulation of *KIT* expression by *GATA1*s in TAM and acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome. **第78回日本血液学会学術集会** (2016年10月15日, 横浜) .
- 5) Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A,

Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. DNA methylation analysis in acute lymphoblastic leukemia of Down syndrome. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月15日, 東京) .

- 6) 照井君典, 土岐力, 濱麻人, 村松秀城, 長谷川大輔, 朴明子, 岩本彰太郎, 多賀崇, 柳澤龍, 康勝好, 林泰秀, 足立壯一, 水谷修紀, 渡邊健一郎, 伊藤悦朗. 一過性異常骨髄増殖症における *GATA1* 遺伝子変異 JPLSG TAM-10 登録症例の解析 (*GATA1* mutation status in infants with transient abnormal myelopoiesis: A report from the JPLSG TAM-10 study). **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月15日, 東京) .

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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の遺伝子診断

研究分担者 古山和道（岩手医科大学医学部生化学講座分子医化学分野 教授）

**研究要旨：** 遺伝性鉄芽球性貧血は稀な遺伝性貧血症であるが、近年の次世代シーケンサーの性能向上に伴い、エクソームシーケンスが比較的容易に実施されるようになり、多数の新たな原因遺伝子が報告されている。しかしながら、網羅的な遺伝子変異の解析を実施しても原因遺伝子が同定されない患者も少なくない。今後はこれらの患者における原因遺伝子を同定するための方策を考える必要があると思われる。

#### A．研究目的

遺伝性鉄芽球性貧血の診断基準を確定し、さまざま果等を参照して重症度を分類し、それに基づいて治療法を決定するための診療ガイドラインを確立することが本研究の目的である。このうち、当分担研究者の主な役割は、遺伝性疾患の診断基準を確定するための原因遺伝子の同定である。実際、エクソームシーケンスにより、知られている全てのタンパク質をコードする遺伝子のエクソン部分の変異の有無が明らかにされるようになり、その結果、新たな原因遺伝子が次々に報告されている。しかしながら、そのような網羅的な遺伝子解析の方法を用いても未だに原因遺伝子が明らかにならない患者も少なくない。そのような患者ではさらなる解析手段として whole genome sequencing (WGS)による遺伝子解析が想定されるが、これにより網羅的で膨大な情報が得られるものの、その中から疾患の原因となる変異を同定するのは容易ではない。多数の患者を含む家系において解析することが可能な場合には連鎖解析により責任領域を絞り込むことも可能であるが、本疾患の患者数が少ないことや、核家族化の進展に伴う家系内の親族患者についての情報不足などにより、そのような手法の適用は困難な状況となりつつある。一方、既知の原因遺伝子の転写に重要な役割を果たす転写調節領域が存在することが明らかな場合には、当該領域における遺伝子変異の有無を明らかにすることを優先させることにより、効率よく原因遺伝子を明らかにできるのではないかと考えた。

#### B．研究方法

本研究分担者が分担している疾患は遺伝性鉄芽球性貧血である。特に、X染色体連鎖鉄芽球性貧血（XLSA）の原因遺伝子は赤芽球のみで発現する赤芽球特異的5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子（ALAS2）であることが明らかなので、まず、ALAS2の赤芽球特異的転写調節を同定し、次に同領域における遺伝子変異の有無をエクソーム解析によっても原因遺伝子が同定されない男性患者で明らかにし、さらに疾患モデル細胞を用いて、患者で同定された遺伝子発現調節領域の変異により環状鉄芽球が観察されるか否かを確認した。

（倫理面への配慮）

本研究計画は、主たる実施施設である東北大学医学部、および岩手医科大学医学部の倫理委員会の審査を受けて承認された後に、患者およびその家族の個人情報の保護等につき十分に配慮して実施された。

#### C．研究結果

まず、ALAS2遺伝子の赤芽球特異的転写調節領域の同定を試みた。GATA1転写因子はさまざまな遺伝子の赤芽球特異的転写調節に深く関与することが知られている。GATA1に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法（ChIP法）によりGATA1転写因子が結合している赤芽球系培養細胞（K562細胞）の遺伝子断片を濃縮し、次世代シーケンサーにより解析した結果が既に報告されていた（Fujiwara et al., 2009, PMID 2784893）が、標的遺伝子のリストの中にALAS2遺伝子も含まれていた。ALAS2遺伝子におけ

るGATA1の結合部位について詳細に検討したところ、ChIP法でGATA1が結合しているとされた領域はALAS2遺伝子の第1イントロンの中程に存在し、今までALAS2の遺伝子発現調節領域としては未報告の領域であった。このため、赤芽球系培養細胞を用いてChIP法により同領域に特異的にGATA1が結合することを確認し、さらにプロモーターアッセイ法により当該部位がALAS2遺伝子における赤芽球特異的なエンハンサー (ALAS2int1Enh) として機能することを明らかにした。また、エクソーム解析によっても原因遺伝子が同定できなかった遺伝性鉄芽球性貧血患者のALAS2遺伝子について同領域の変異の有無を検索したところ、3家系5人の男性患者で変異を同定し、さらに、いずれの変異によってもGATA1が同部に結合できなくなることを確認した。これらの結果から、原因遺伝子として既知であるALAS2遺伝子の組織特異的発現調節領域の変異が、遺伝性鉄芽球性貧血発症の原因となる可能性が高いことが示された。

さらに、同領域の変異が貧血、および鉄芽球性貧血の代表的な表現型である環状鉄芽球の出現に直接関与するか否かを明らかにするために、疾患モデル細胞の樹立を試みた。モデル細胞の樹立のために赤白血病細胞由来のK562細胞のALAS2int1EnhにGATA1が結合できない欠失変異を導入したところヘモグロビン合成能の低下は確認できたが、環状鉄芽球は観察されなかった。

次に、非腫瘍細胞由来の赤芽球系培養細胞株であるHUDEP2細胞株を用いて同様の検討を実施したところ、ヘモグロビン合成能の低下が観察されたのに加えて、変異を導入した細胞では環状鉄芽球が再現性良く観察されることが明らかになった。

#### D . 考察

既知の原因遺伝子の組織特異的なエンハンサー領域を同定し、次いで同領域における変異の有無を明らかにすることにより、エクソーム解析によっても原因遺伝子が明らかにならなかった遺伝性鉄芽球性貧血の症例において、原因遺伝子の候補を同定することが可能であった。遺伝性鉄芽球性貧血患者におけるALAS2int1Enhの中のGATA1結合領域の変異については海外のグループからも報告されており、自検例も含めこれらの患者では同領域の変異が原因である可能性は極めて高いと考えられる。さらに、疾患モデル細胞を樹立して環状鉄芽球の形成をin

vitroで確認することができたことも、同領域の変異が疾患の原因として重要であることを示唆している。このような結果から、エクソーム解析によっても原因遺伝子が同定できない患者については、本研究で試みた手法の適用についても検討の対象になるものと考えられる。

また、HUDEP2細胞とゲノム編集法を組み合わせた疾患モデル細胞の樹立は、ALAS2遺伝子のみならず、鉄芽球性貧血の原因遺伝子として知られる他の遺伝子の未知の変異や、エクソーム解析等により同定された新たな遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子が、疾患の原因となりうるかどうかを明らかにするためにも有用であると予想されるため、遺伝性鉄芽球性貧血における確定診断に至るためのツールとしても利用可能であると考えられる。

#### E . 結論

エクソーム解析によっても原因遺伝子が同定できない遺伝性鉄芽球性貧血患者において、原因遺伝子を明らかにする方法を検討した。その結果、既知の原因遺伝子の赤芽球特異的エンハンサーを同定し、さらにエクソーム解析によっても原因遺伝子が不明であった遺伝性鉄芽球性貧血患者の同領域に変異を同定した。加えて、培養細胞株とゲノム編集法を用いて疾患モデル細胞を樹立することに成功し、確定診断に至るための方法の一つを示すことができた。

#### F . 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Furuyama K, and Kaneko K. Iron metabolism in erythroid cells and patients with congenital sideroblastic anemia. **Int J Hematol.** 2018;107:44-54.
  - 2) Kaneko K, Kubota Y, Nomura K, Hayashimoto H, Chida T, Yoshino N, Wayama M, Ogasawara K, Nakamura Y, Tooyama I, and Furuyama K. Establishment of a cell model of X-linked sideroblastic anemia using genome editing. **Exp Hematol.** 2018;65:57-68.
  - 3) Fujiwara T, Fukuhara N, Ichikawa ., Kobayashi M, Okitsu Y, Onishi Y, Furuyama K and 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.

- 4) Kaneko K, Ohba K, Hirose T, Totsune K, Furuyama K and Takahashi K. (2017) Expression of (Pro)renin Receptor During Rapamycin-Induced Erythropoiesis in K562 Erythroleukemia Cells and Its Possible Dual Actions on Erythropoiesis. **Tohoku J Exp Med.** 2017;241:35-43.
- 5) Kubota Y, Nomura K, Katoh Y, Yamashita R, Kaneko K, Furuyama K. Novel Mechanisms for Heme-dependent Degradation of ALAS1 Protein as a Component of Negative Feedback Regulation of Heme Biosynthesis. **J Biol Chem.** 2016;291:20516-20529.
- 6) Mu A, Li M, Tanaka M, Adachi Y, Tai TT, Liem PH, Izawa S, Furuyama K, Taketani S. Enhancements of the production of bilirubin and the expression of  $\beta$ -globin by carbon monoxide during erythroid differentiation. **FEBS Lett.** 2016;590:1447-1454.

## 2. 学会発表

- 1) 金子桐子, 久保田美子, 野村和美, 林本遥, 千田大誠, 吉野直人, 和山真里奈, 小笠原勝利, 中村幸雄, 遠山育夫, 古山和道. ALAS2 変異による鉄芽球性貧血のモデル細胞構築. **第 682 回 岩手医学会例会**(平成 30 年 4 月 27 日, 盛岡).
- 2) 金子桐子, 林本遥, 千田大誠, 久保田美子, 野村和美, 小笠原勝利, 和山真里奈, 吉野直人, 中村幸夫, 遠山育夫, 博多修子, 古山和道. 遺伝性鉄芽球性貧血モデル細胞の樹立. **日本生化学会東北支部第 84 回例会シンポジウム**(平成 30 年 5 月 19 日, 盛岡).
- 3) 久保田美子, 草壁香帆里, 久慈強, 金子桐子, 野村和美, 博多修子, 古山和道. ヘム合成経路の律速酵素 ALAS1 の分解経路の抑制によるゲノム不安定性の誘導. **日本生化学会東北支部第 84 回例会シンポジウム**(平成 30 年 5 月 19 日, 盛岡).
- 4) 久保田美子, 久慈強, 古山和道. ヘム合成経路の律速酵素 ALAS1 の分解経路の低下によるゲノム不安定性の誘導. **2017 年度生命科学系学会合同年次大会**(2017 年 12 月 6-9 日, 神戸).

- 5) 金子桐子, 千田大誠, 久保田美子, 野村和美, 古山和道. ALAS2 変異による遺伝性鉄芽球性貧血のモデル細胞樹立. **2017 年度生命科学系学会合同年次大会**(2017 年 12 月 6-9 日, 神戸).
- 6) 野村和美, 北川悠, 大木祐亮, 久保田美子, 金子桐子, 古山和道. ヒト CLPX-CLPP 複合体によるヘム結合型 ALAS1 の認識及び分解メカニズムの解明. **2017 年度生命科学系学会合同年次大会**(2017 年 12 月 6-9 日, 神戸).
- 7) 久保田美子, 野村和美, 蝦名真行, 金子桐子, 加藤恭丈, 古山和道. 非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS1)のCLPXPによる翻訳後修飾. **第89回日本生化学会大会**(2016年9月, 仙台).
- 8) 野村和美, 久保田美子, 金子桐子, 蝦名真行, 古山和道. ヒトCLPX-CLPP複合体によるミトコンドリアマトリクスのタンパク質品質管理機構の解明. **第89回日本生化学会大会**(2016年9月, 仙台).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

### CDAのデータ管理，診断基準の確立

研究分担者 多賀 崇（滋賀医科大学小児科 准教授）

**研究要旨：** Congenital dyserythropoietic anemia (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疾患群である。従来 CDA に関する知見は主に西欧から得られているのみで、本邦での実態は明らかにされていなかった。本研究班において我が国における CDA の実態を把握し、そのデータ管理、診断基準の確立、さらには有効な治療法の開発の基盤となる研究を行う。

#### A．研究目的

Congenital dyserythropoietic anemia (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。我が国ではこれまでCDAの実態が十分把握されておらず、我が国におけるCDAの実態を明らかにし、診断基準の確立、さらには有効な治療法の開発の基盤となる研究を行うことを目的とする。

#### B．研究方法

分担研究者（多賀）が以前行ったCDAの全国調査を参考に作成した調査表をまとめるとともに、中央遺伝子診断への協力、検体送付などを依頼する。小児血液専門医のみならず、新生児科医、一般小児科医、血液内科医などにも学会発表や論文による啓蒙を行い、さらなる症例の蓄積につとめる。

（倫理面への配慮）

調査の基本となる日本小児血液・がん学会の疾患登録事業として、学会倫理審査委員会で承認されている。また、調査に関する倫理審査は、共同研究者である真部淳の所属する聖路加国際病院、遺伝子診断に関する倫理審査は、検査実施施設である名古屋大学でそれぞれ承認されている。

#### C．研究結果

分担研究者（多賀）が以前行ったCDAの全国調査を参考に患者を収集、CDA疑いの症例のうち10例を既知の遺伝子変異の解析と全エクソーム解析

(WES)を共同研究者である名古屋大学で施行した。10例の内訳は、CDA I 3例、CDA II 6例、CDA III 1例で、CDAIは全例で既知のCDAN1遺伝子変異が同定されたが、CDA II / CDA IIIの7例ではCDAの既知及び新規の遺伝子変異は認められなかった。一方、CDA IIと診断された6例のうち2例で先天性溶血性貧血の原因遺伝子（SPTA1,G6PD）変異が同定され、遺伝学的に溶血性貧血と診断された。この結果が英文雑誌に投稿、掲載された（Hamada M, et al, IJH. 2018）。また、この結果を踏まえてCDA診療参照ガイドラインを改訂し、実際、臨床的にCDAと診断された症例の全エクソーム解析ではサンガーシーケンスで診断できなかった症例の変異が見つかる一方、球状赤血球症や遺伝性橢円赤血球症、G6PD欠損症などと診断された症例があり、全エクソーム解析による遺伝子検査も含めた中央診断は的確な診断と症例の把握には必須であると思われる旨を追記した。

#### D．考察

本班研究のサポートをもとに、本邦でのCDAの症例収集、精査を行ってきたが、新規症例は極めて少なく、既知の遺伝子異常を持つ症例は極めて少ない。また、今回の遺伝子解析で判明したように従来診断基準では診断困難な症例もあり、今後CDAが疑われる症例については網羅的遺伝子解析による遺伝学的診断を行うことが必須と考えられる。他の血液疾患と誤診されている症例も相当数あると考えられ、引き続き詳細な調査・研究が必要である。類縁疾患とともにの諸外国とは違う本邦独自の病態

把握を検討する必要がある。

## E . 結論

本班研究のサポートをもとに、本邦でのCDAの症例収集、精査を行ってきたが、新規症例は極めて少なく、既知の遺伝子異常を持つ症例は極めて少ない。また、今回の遺伝子解析で判明したように従来の診断基準では診断困難な症例もあり、今後CDAが疑われる症例については網羅的遺伝子解析による遺伝学的診断を行うことが必須と考えられる。他の血液疾患と誤診されている症例も相当数あると考えられ、引き続き詳細な調査・研究が必要である。類縁疾患ととも諸外国とは違う本邦独自の病態把握を検討する必要がある。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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;108(3):306-31.
- 2) 真部淳 , 長谷川大輔 , 多賀崇 , 小島勢二 . Congenital Dyserythropoietic Anemia (CDA) . **先天性骨髄不全症ガイドライン2017 , 診断と治療社 , pp54-61 .**

### 2. 学会発表

該当なし

## G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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

### 重症先天性好中球減少症 - ガイドライン -

研究分担者 小林正夫（広島大学大学院医歯薬保健学研究科小児科学 教授）

**研究要旨：** 重症先天性好中球減少症（severe congenital neutropenia, SCN）は、慢性好中球減少（末梢血好中球絶対数が200/ $\mu$ l以下）生後早期からの細菌感染症の反復、骨髄像での骨髄顆粒球系細胞の低～正形成と前骨髄球/骨髄球での成熟障害を特徴とする。International Union of Immunological Society, 2017 Primary Immunodeficiency Diseases (IUIS, 2017) 分類では、慢性好中球減少を示す、いわゆる先天性好中球減少症 12 疾患の中に SCN として 1～5 型が分類されている。SCN としては *ELANE* 変異によるものが 75-80%、*HAX1* 変異によるものが 20%弱であり、その他が数%と考えられる。また、SCN と全く同じ *ELANE* 変異を原因とする周期性好中球減少症は SCN とは表現型が異なるが、SCN1 の範疇に分類されている。その他、症候群としての慢性好中球減少を呈する疾患が多いことから、好中球減少以外の他の合併所見は診断、予後には重要となる。本邦での全体の患者数は 100 例程度と推測される。SCN の病因、病態、診断、重症度、治療、予後について概要をまとめる。

#### A．疾患概念と疫学

重症先天性好中球減少症（severe congenital neutropenia, SCN）は末梢血好中球絶対数（absolute neutrophil count, ANC）が200/ $\mu$ l未満の重症慢性好中球減少、骨髄像での骨髄顆粒球系細胞の正形成から低形成と前骨髄球と骨髄球での成熟障害、生後早期から細菌感染症の反復を臨床的特徴とする。骨髄顆粒球系細胞の形態異常は明らかでなく、赤芽球系、巨核球系には異常を認めない。図に先天性好中球減少症診断のためのアルゴリズムを示す。IUIS（2017）分類では、SCN は先天性好中球減少症の一部として SCN を5型に分類している（表）。SCN のタイプによってはそれぞれに特有な合併症状が存在するので診断の参考となる。

発症頻度の確定的な数字はないが、欧米と本邦では発症頻度が異なり、人種間での差が認められている。本邦では100万人に1-2人の発生頻度と推測され、現在までに100例近い患者数が集積されている。SCN で、遺伝子解析が施行されている症例からは、*ELANE* 変異（SCN1）と *HAX1* 変異（SCN3）に限定されていたが、最近 G6PC3 欠損症（SCN4）の本邦第一例目が報告されている。常染色体性優性遺伝形式をとる SCN1（*ELANE* 遺伝子

のヘテロ接合性変異）が最も頻度が高く、75～80%を占めている。*HAX1* 異常による SCN3 は Kostmann 病と呼ばれ、全例が *HAX1* 遺伝子のホモ接合性変異が複合ヘテロ接合性変異で常染色体性劣性遺伝形式をとる。その頻度は約15%である。その他の SCN の頻度は明らかではないが、非常に稀と思われる。

#### B．病因・病態

SCN を含めた先天性好中球減少症において、多くの責任遺伝子が同定、報告されているので、それぞれその病態は異なってくる。細胞レベルで病因を考えると、細胞内小器官ごと（細胞膜受容体、核、小胞体、ミトコンドリア、エンドゾーム、ライソゾーム、リボゾーム、アズール顆粒、細胞骨格等）に責任遺伝子が分布し、分類されている。

1) SCN1：好中球エラスターゼ遺伝子（*ELANE*）変異

好中球エラスターゼ（NE）はセリンプロテアーゼに分類される30kDの糖蛋白であり、成熟骨髄顆粒球系細胞で最も強く発現している。合成された活性型 NE は主に一次顆粒（アズール顆粒）に存在するが、細胞膜や核にも存在が知られている。*ELANE* 変異が好中球減少を引き起こす機序について種々の

説が挙げられているが、その病態の詳細は明らかでない。

#### 2) SCN2 : GF1 欠損症

2003年に *GF1I* ヘテロ接合性変異 (DNA 結合に関与する zinc finger 部位) が同定され、好中球減少、単球増多、CD4 リンパ球の減少、ナイーブ T、B 細胞の減少が認められた。G-CSF に対する反応性の低下や好中球、単球の両方の性質を有する異常細胞の出現も認められた。T、B 細胞に関しては数と活性の低下は認められるものの機能は正常と推察されている。

#### 3) SCN3 : HA1 異常症 (Kostmann 病)

hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 (HCLS1)-associated protein X-1 (HAX1) は、細胞内のシグナル伝達に関与する分子として 1997 年に見出されたが、その後、多くの細胞内蛋白質やウイルス蛋白質と相互作用し、細胞骨格形成やアポトーシスにも関与することが明らかにされている。スプライシングサイトの違いにより、2 種類のアイソフォーム (アイソフォーム a, b) が存在する。HAX1 の欠失は骨髄前駆細胞内にチトクロム C を放出し、前駆細胞ならびに好中球でのアポトーシスを亢進させ、好中球減少が惹起されると考えられている。

現在までに 17 種類の HAX1 遺伝子変異が報告されているが、HAX1 異常症のうち、アイソフォーム a のみに影響する変異が認められる症例とアイソフォーム a と b の両方に影響する変異が認められる症例がおよそ半数ずつである。アイソフォーム a のみに影響する変異を有する群では神経症状はほとんど認められないのに対し、a、b 両方に影響する変異を有する群では 68% に中等度以上の精神発達遅滞、てんかんが認められている。

#### 4) SCN4 : G6PC3 欠損症

グルコース-6-ホスファターゼ (Glucose-6-Phosphatase; G6Pase) の 1 つである Glucose-6-Phosphatase protein 3 (G6PC3) (または Glucose-6-Phosphatase-β; G6Pase-β) の変異により発症する常染色体劣性遺伝性疾患である。

G6Pase は小胞体内の酵素で、グルコース-6-リン酸からリン酸を除去してグルコースを遊離する。ヒトでは G6Pase は *G6PC1*、*G6PC2*、*G6PC3* からなる遺伝子ファミリーによりコードされている。*G6PC1* の両アレル変異は糖原病 Ia 型を発症するが、グルコース-6-リン酸を細胞質から小胞体内に輸送するグルコース-6-リン酸トランスロカーゼ (glucose-6-phosphatase translocase; G6PT) をコードする *SLC37A4* (*G6PT1*) 変異では糖原病 Ib 型を引き起こす。ヒトでは *G6PC3* 遺伝子のホモ接合または複合ヘテロ接合の変異により G6PC3 欠損症

を発症する。また糖原病 b 型でも G6PC3 欠損症と同様に好中球数の減少と機能低下を伴うことが知られている。

#### 5) SCN5 : VPS45 欠損症

VPS45 欠損症は、好中球減少、好中球機能異常、原発性骨髄線維症、腎腫大を特徴とする。エンドソーム系を介した膜輸送を制御するタンパクである VPS45 をコードする遺伝子の変異が原因であり、VPS45 タンパクの発現が低下に基づき、細胞運動能の低下、アポトーシスの増加が引き起こされる。これらが好中球機能低下や好中球減少の原因と考えられているが、病態の詳細は不明である。

### C . 診断

#### 1) 臨床症状

易感染性：皮膚化膿症、慢性歯肉炎、歯周病は高頻度で認められる。咽頭扁桃炎、上気道感染症、時に肺炎、肺膿瘍が認められる。

#### 2) 検査所見

末梢血での慢性好中球減少症 (ほとんど好中球絶対数 200/μl 以下)、末梢血単球数増加、骨髄像：骨髄顆粒球系細胞の低形成～正形成と前骨髄球/骨髄球での成熟障害にあわせ、それぞれの責任遺伝子変異の同定

### D . 重症度分類：重症

継続的な易感染性、慢性歯肉炎 (歯周病)、皮膚感染症、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病への進展。根治療法としての造血幹細胞移植が必要である。特に、G-CSF 使用例では長期の高用量使用での骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病への移行は 40% 以上に認められている。

CN の分類において特徴的な合併所見を呈するものがある。感染症を反復、重症化と MDS/AML への移行は SCN 全体に共通した臨床所見と経過である。SCN3、いわゆる Kostmann 病ではてんかんをはじめとした中枢神経系 (精神運動発達遅滞、高次脳機能障害など) の合併症の頻度が高く、変異の部位によっては必発の症状であることが報告されている。SCN4 は先天性心疾患、泌尿生殖器奇形、内耳性難聴、体幹・四肢の静脈拡張が高率に認められる。SCN5 では腎肥大と骨髄線維化が認められることから、好中球減少に特徴的な合併症から SCN の分類を推測することが可能である。重症度は ANC の程度とは関係なく、感染症の頻度とその重症度による。G-CSF の使用の有無にかかわらず、MDS/AML への移行・進展症例は最重症であり、造血幹細胞移植以外に治療法はない。口内炎、慢性歯肉炎/慢性歯周病

はほぼ必発の所見であり、無治療の患者では歯牙の喪失につながる可能性があることから QOL 低下の要因となる。

## E . 治療の概要

感染症対策としての対症療法と根治療法に分けて治療法を考える必要がある。

### 1) 対症療法

感染症対策が重要であり、Sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) 合剤の定期的投与、必要であれば抗真菌薬投与、歯科医による口腔ケアが必要である。G-CSF 投与で約 90%の患者では好中球増加が認められるので、感染症のコントロールが可能である。ただし、長期間の G-CSF 投与、特に高用量 (8 $\mu$ g/kg 以上) の場合に骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病 (MDS/AML) への進展が高率に認められるので経時的な注意が必要である。SCN での G-CSF 使用に基づいた白血病発症の機序の詳細が明らかにされつつある。G-CSF の長期投与で後天的な CSF3R の切断変異が入るが、そのまま長期間 SCN のままで経過する症例と、一部に第 2 の変異が認められる症例に分けられる。後者が AML に移行していくが、第 2 の変異としては CSF3R-T618I が共通して認められ、G-CSF に依存しない骨髄系細胞の自己増殖が認められるようになる。最終的には RUNX1、ASXL1 などの更なる遺伝子変異を認める AML の発症に至ることが推測されている。従って、G-CSF の長期投与を行う症例では定期的な骨髄検査、染色体検査、上記の内容の遺伝子検査を行っていくことが望ましい。ただし、どの時点で根治療法である造血細胞移植を行うか確定したものはない。

### 2) 根治療法

根治療法は造血幹細胞移植である。適切なドナーがいる場合には骨髄非破壊的前処置での移植が推奨されるが、生着不全には注意が必要である。MDS/AML へ移行後は造血幹細胞移植が唯一の治療法であるが、予後は不良となる。

## F . 予後

重症感染症の程度ならびに MDS/AML への移行が予後を左右する。G-CSF の投与で、感染症 (敗血症) での生命予後は格段に進歩している。G-CSF の投与期間が 10 年以上になる症例で、投与量を 8 $\mu$ g/kg 未満と以上に区分すると、前者での重症敗血症による死亡頻度は 4%、MDS/AML の発症頻度は 11%とされている。一方、後者の場合には重症敗血症による死亡頻度は 14%、MDS/AML の発症頻度は 40% になることが報告されている。SCN 症例が

MDS/AML に移行した場合には化学療法を行うと、好中球の回復はほとんど認められないことから、造血細胞移植の継続が必要となるので、ドナー選択を用意しながらの治療開始が必要である。造血細胞移植が唯一の救命できる治療法となる。

慢性好中球減少のために歯肉炎、歯周病、口内炎は必発の症状であるため、永久歯の維持が困難となる。歯肉が弱いためインプラントも不可能であり、成人期早期から総義歯となる場合があり、QOL はかなり損なわれることとなる。現在、根治療法として造血細胞移植が選択される症例が増えているが、移植時期を小児期と成人に分けた成績の比較では有意に前者が良好である。

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Asano T, Okada S, Tsumura M, Yeh TW, Mitsui-Sekinaka K, Tsujita Y, Ichinose Y, Shimada A, Hashimoto K, Wada T, Imai K, Ohara O, Morio T, Nonoyama S, Kobayashi M. Enhanced AKT Phosphorylation of Circulating B Cells in Patients With Activated PI3K $\delta$  Syndrome. **Frontier in Immunology** 2018;9:568.
- 2) Zhang SY, Clark NE, Freije CA, Pauwels E, Taggart AJ, Okada S, Mandel H, Garcia P, Ciancanelli MJ, Biran A, Lafaille FG, Tsumura M, Cobat A, Luo J, Volpi S, Zimmer B, Sakata S, Dinis A, Ohara O, Garcia Reino EJ, Dobbs K, Hasek M, Holloway SP, McCammon K, Hussong SA, DeRosa N, Van Skike CE, Katolik A, Lorenzo L, Hyodo M, Faria E, Halwani R, Fukuhara R, Smith GA, Galvan V, Damha MJ, Al-Muhsen S, Itan Y, Boeke JD, Notarangelo LD, Studer L, Kobayashi M, Diogo L, Fairbrother WG, Abel L, Rosenberg BR, Hart PJ, Etzioni A, Casanova JL. Inborn Errors of RNA Lariat Metabolism in Humans with Brainstem Viral Infection. **Cell** 2018;172:952-965.
- 3) Yabushita T, Hiramoto N, Ono Y, Yoshioka S, Karakawa S, Kobayashi M, Ishikawa T. Adult-onset primary cyclic autoimmune neutropenia: a case report. **Transfusion** 2018;58:884-890.
- 4) Leiding JW, Okada S, Hagin D, Abinun M, Shcherbina A, Balashov DN, Kim VHD, Ovadia A, Guthery SL, Pulsipher M, Lilic D,

- Devlin LA, Christie S, Depner M, Fuchs S, van Royen-Kerkhof A, Lindemans C, Petrovic A, Sullivan KE, Bunin N, Kilic SS, Arpacı F, Calle-Martin O, Martinez-Martinez L, Aldave JC, Kobayashi M, Ohkawa T, Imai K, Iguchi A, Roifman CM, Gennery AR, Slatter M, Ochs HD, Morio T, Torgerson TR; Inborn Errors Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 mutations. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2018;141:704-717.
- 5) Schwab C, Gabrysch A, Olbrich P, Patiño V, Warnatz K, Wolff D, Hoshino A, Kobayashi M, Imai K, Takagi M, Dybedal I, Haddock JA, Sansom DM, Lucena JM, Seidl M, Schmitt-Graeff A, Reiser V, Emmerich F, Frede N, Bulashevskaya A, Salzer U, Schubert D, Hayakawa S, Okada S, Kanariou M, Kucuk ZY, Chapdelaine H, Petruzalkova L, Sumnik Z, Sediva A, Slatter M, Arkwright PD, Cant A, Lorenz HM, Giese T, Lougaris V, Plebani A, Price C, Sullivan KE, Moutschen M, Litzman J, Freiberger T, van de Veerdonk FL, Recher M, Albert MH, Hauck F, Seneviratne S, Pachlopnik Schmid J, Kolios A, Unglik G, Klemann C, Speckmann C, Ehl S, Leichtner A, Blumberg R, Franke A, Snapper S, Zeissig S, Cunningham-Rundles C, Giulino-Roth L, Elemento O, Dücker G, Niehues T, Fronkova E, Kanderová V, Platt CD, Chou J, Chatila TA, Geha R, McDermott E, Bunn S, Kurzai M, Schulz A, Alsina L, Casals F, Deyà-Martinez A, Hambleton S, Kanegane H, Taskén K, Neth O, Grimbacher B. Phenotype, penetrance, and treatment of 133 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-insufficient subjects. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2018;142:1932-1946.
- 6) Onodera R, Kurita E, Taniguchi K, Karakawa S, Okada S, Kihara H, Fujii T, Kobayashi M. Anti-human neutrophil antigen-1a, -1b, and -2 antibodies in neonates and children with immune neutropenia analyzed by extracted granulocyte antigen immunofluorescence assay. **Transfusion** 2017;57:2586-2594. doi:10.1111/trf.14291.
- 7) Hayakawa S, Ohno N, Okada S, Kobayashi M. Significant augmentation of regulatory T cell numbers occurs during the early neonatal period. **Clin Exp Immunol.** 2017;190:268-279. doi:10.1111/cei.13008.
- 8) Leiding JW, Okada S, Hagin D, Abinun M, Shcherbina A, Balashov DN, Kim VHD, Ovadia A, Guthery SL, Pulsipher M, Lilic D, Devlin LA, Christie S, Depner M, Fuchs S, van Royden-Kerkhof A, Lindemans C, Petrovic A, Sullivan KE, Bunin N, Kilic SS, Arpacı F, Calle-Martin O, Martinez-Martinez L, Aldave JC, Kobayashi M, Ohkawa T, Imai K, Iguchi A, Roifman CM, Gennery AR, Slatter M, Ochs HD, Morio T, Torgerson TR, Inborn Errors Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 mutations. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2018;141:704-717. doi:10.1016/j.jaci.2017.03.049.
- 9) 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. **Genetics in Medicine** 2017;19:796-802.
- 10) Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, El Baghdadi J, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Ailal F, Takada H, Hara T, Pue A, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanovva JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M.

- Alanine-scanning mutagenesis of human signal transducer and activator of transcription 1 to estimate loss- or gain-of-function variants. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2017;140:232-241.
- 11) Fujiki R, Hijikata A, Shirai T, Okada S, Kobayashi M, Ohara O. Molecular mechanism and structural basis of gain-of-function of STAT1 caused by pathogenic R274Q mutation. **Journal of Biological Chemistry** 2017;292:6240-6254.
  - 12) Hoshino a, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Kobayashi M, Nakamura H, Kamizono J, Mitsui-Sekinaka K, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in human subjects with germline IKZF1 mutations. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2017;140: 223-231.
  - 13) Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R, Nishibuchi I, Kawaguchi H, Kolakshyapati M M, Onishi S, Saito T, Sugiyama K, Kobayashi M, Kurisu K. Development of cystic malacia after high-dose cranial irradiation of pediatric CNS tumors in long-term follow-up. **Child's Nervous System** 2017;33:957-964.
  - 14) Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Yeh TW, Mitsuiki N, Asano T, Ohnishi H, Kato Z, Sekinaka Y, Zaha K, Kato T, Okano T, Takashima T, Kobayashi K, Kimura M, Kunitsu T, Maruo Y, Kanegane H, Takagi M, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Ohara O, Okada S, Kobayashi M, Morio T, Nonoyama S. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase syndrome-like immunodeficiency. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2016 Dec;138(6):1672-1680.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.055. [Epub ahead of print]
  - 15) Vijayan D, Mohd Redzwan N, Avery DT, Wirasinha RC, Brink R, Walters G, Adelstein S, Kobayashi M, Gray P, Elliott M, Wong M, King C, Vinuesa CG, Ghilardi N, Ma CS, Tangye SG, Batten M. IL-27 directly enhances germinal center B cell activity and potentiates lupus sanroque mice. **Journal of Immunology** 2016;197:3008-3017.
  - 16) Lévy R, Okada S, Béziat V, Moriya K, Liu C, Chai LY, Migaud M, Hauck F, Al Ali A, Cyrus C, Vatte C, Patiroglu T, Unal E, Ferneiny M, Hyakuna N, Nepesov S, Oleastro M, Ikinçiogullari A, Dogu F, Asano T, Ohara O, Yun L, Della Mina E, Bronnimann D, Itan Y, Gothe F, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tahuil N, Aytekin C, Salhi A, Al Muhsen S, Kobayashi M, Toubiana J, Abel L, Li X, Camcioglu Y, Celmeli F, Klein C, AlKhatir SA, Casanova JL, Puel A. Genetic immune and clinical features of patients with bacterial and fungal infections due to inherited IL-17RA deficiency. **Proc Natl Acad Sci USA** 2016;113:E8277-8285.
  - 17) Ma CS, Wong N, Rao G, Nguyen A, Avery DT, Payne K, Torpy J, O'Young P, Deenick E, Bustamante J, Puel A, Okada S, Kobayashi M, Martinez-Barricarte R, Elliott M, Sebnem Kilic S, El Baghdadi J, Minegishi Y, Bousfiha A, Robertson N, Hambleton S, Arkwright PD, French M, Blincoe AK, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Fulcher DA, Cook MC, Stepensky P, Boztug K, Beier R, Ikinçiogullari A, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Boisson-Dupuis S, Phan TG, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG. Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4+T cells into distinct effector subsets. **Journal of Experimental Medicine** 2016;213:1589-608.
  - 18) Toubiana J, Okada S, Hiller J, Oleastro M, Lagos Gomez M, Aldave Becerra JC, Ouachée-Chardin M, Fouyssac F, Girisha KM, Etzioni A, Van Montfrans J, Camcioglu Y, Kerns LA, Belohradsky B, Blanche S,



- Bousfiha A, Rodriguez-Gallego C, Meyts I, Kisand K, Reichenbach J, Renner ED, Rosenzweig S, Grimbacher B, van de Veerdonk FL, Traidl-Hoffmann C, Picard C, Marodi L, Morio T, Kobayashi M, Lilic D, Milner JD, Holland S, Casanova JL, Puel A. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie and unexpectedly broad clinical phenotype. **Blood** 2016;127:3154-64.
- 19) Hayakawa S, Okada S, Tsumura M, Imai K, Morio T, Ohara O, Chayama K, Kobayashi M. Predisposition to gastric cancer in a patient with autosomal dominant immune dysregulation syndrome associated with CTLA-4 haploinsufficiency. **Journal of Clinical Immunology** 2016;36:28-32.
- 20) Yasumura J, Wago M, Okada S, Nishikomori R, Takei S, Kobayashi M. A 2-year old Japanese girl with TNF receptor-associated periodic syndrome: A case report of the youngest diagnosed proband in Japan. **Mod Rheumatol.** 2016;26:798-801.
- 21) Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R, Kawaguchi H, Sugiyama K, Kobayashi M, Kurisu K. Cavernous angioma after chemotherapy for desmoplastic/nodular medulloblastoma associated with anhidrotic ectodermal dysplasia. **Child Nerv Syst.** 2016;32:395-8.
- 22) Mizoguchi Y, Furue A, Kagawa R, Chijimatsu I, Tomioka K, Shimomura M, Imanaka Y, Nishimura S, Saito S, Miki M, Ono A, Konishi N, Kawaguchi H, Kobayashi M. Early eradication of factor VIII inhibitor in patients with congenital hemophilia A by immune tolerance induction with a high dose of immune. **International Journal of Hematology** 2016;103:473-7.
- 23) Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Kobayashi M. Late-onset epileptic spasms in a patient with 22q13.3 deletion syndrome. **Brain & Development** 2016;38:109-12.
- immunosuppressive conditioning in patients with severe congenital neutropenia. **The 18<sup>th</sup> Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies** (2018年10月24-27日, ポルトガル, リスボン).
- 2) Asano T, Nishimura S, Kobayashi Y, Tsumura M, Ishikawa N, Ohnishi H, Takeda H, Sancho-Shimizu V, Moriya K, Puel A, Picard C, Irani SR, J.L. Casanova JL, S. Okada S, Kobayashi M. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with IRAK4 deficiency. **The 18<sup>th</sup> Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies** (2018年10月24-27日, ポルトガル, リスボン).
- 3) Kobayashi M, Mizoguchi Y, Karakawa S, Miki M, Nishimura S, Okada S, Kawaguchi H. Long-Term Follow-up of Patients with Chronic Granulomatous Disease Receiving Bone Marrow Transplantation Using Immunosuppressive Conditioning Regimen. **The 59<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
- 4) Nishimura S, Tomioka K, Shimomura M, Mizoguchi Y, Kobayashi M. Pharmacokinetics Using myPKFiTR for Personalized Prophylaxis in Children with Severe Hemophilia A. **The 59<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
- 5) Okada S, Kagawa R, Fujiki R, Kato Z, Ohnishi H, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Kobayashi M. Loss-of-function and dominant negative STAT1 coiled-coil domain mutations in MSMD. **Congress of Asia Pacific Society for Immunodeficiencies** (2016年4月30日, 大阪).
- 6) Mizoguchi Y, Karakawa S, Doi T, Shimomura M, Tomioka K, Sakata S, Furue A, Chijimatsu I, Okada S, Miki M, Kawaguchi H, Kobayashi M. Successful hematopoietic stem cell transplantation in ten patients with severe congenital neutropenia using an intensive immunosuppressive conditioning regimen: The results of a single institute. **The 21<sup>st</sup> Congress of European Hematology Association** (2016年6月12日,
2. 学会発表
- 1) Nishimura S, Mizoguchi Y, Asano T, Miki M, Furue a, Kawaguchi H, Okada S, Mochizuki S, Doi T, Kobayashi M. Successful bone marrow transplantation using an

コペンハーゲン・デンマーク)。

- 7) Okada S, Fujiki R, Kagawa R, Tsumura M, Kong X, Sakata S, Nishimura S, Kato Z, Ohnishi H, Itan Y, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Kobayashi M. Alanine-scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate the loss-or gain-of-function nature of variants. **The 17th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies** (2016年9月22日, バルセロナ・スペイン)。
- 8) Asano T, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M. Flow cytometry based simple diagnosis of activated PI3Kδ syndrome by evaluating pAKT in circulating B cells. **The 17th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies** (2016年9月22日, バル

セロナ・スペイン)。

- 9) Mizoguchi Y, Miki M, Furue A, Nishimura S, Shimomura M, Tomioka K, Sakata S, Chijimatsu I, Karakawa S, Okada S, Doi T, Nakamura K, Kawaguchi H, Kobayashi M. Successful Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using an Immunosuppressive Conditioning Regimen in Ten Patients with Severe Congenital Neutropenia. A Single-Institute Experience. **The 58th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (2016年12月3-6日, サンディエゴ)。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

図 小児期好中球減少症の診断アルゴリズム

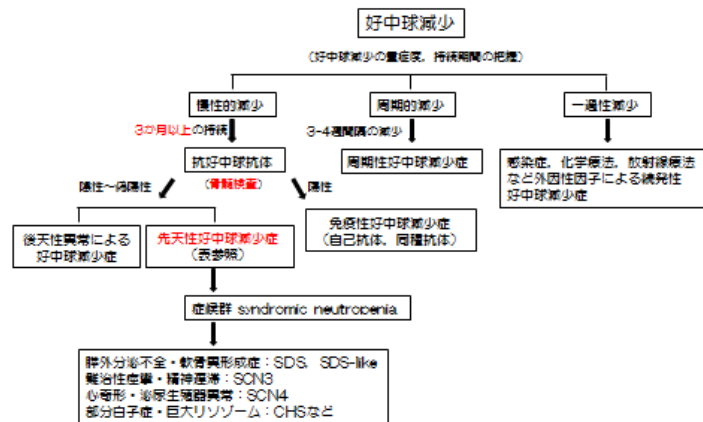


表 先天性好中球減少症の分類 (UIS, 2017)

疾患	変異遺伝子	合併所見
1. 重症先天性好中球減少症 (SCN)		
(a) SCN1 (ELANE異常症)	ELANE	MDS/白血病
周期性好中球減少症	ELANE	MDS/白血病
(b) SCN2 (GFI1欠損症)	GFI1	B/Tリンパ球減少
(c) SCN3 (Kostmann病)	HAXY	高次脳機能・神経学的障害, MDS/白血病
(d) SCN4 (G6PG3欠損症)	G6PG3	先天性心疾患, 泌尿生殖器奇形, 内耳性難聴, 侏儒・四肢の神経根病
(e) SCNS (VPS45欠損症)	VPS45	脾外出血, 骨髄繊維化, 腎肥大
2. 難原形1b型	G6PT1	空腸肺血栓, 尿酸アシドーシス, 高脂血症, 肝肥大
3. X連鎖性好中球減少症	MAS	単球減少
4. P14/LAMTOR2欠損症	ROBLD3/LAMTOR2	低ガンマグロブリン血症, CD8T細胞障害活性低下, 部分白血症, 成長障害
5. Barth症候群	tefazzin (TAZ)	心筋症, 筋萎縮, 成長遅延
6. Cohen症候群	GCHI	網膜症, 発達遅延, 顔面奇形
7. 好中球減少を伴う多形皮膚剥離症	G16ORFS7	皮膚剥離症, 白血球減少, MDS
8. JAGN1変異	JAGN1	骨格系異常 (低身長), 歯牙形成異常
9. 3-Methylglutanic aciduria	GLPB	小脳症, 低血糖, 筋緊張低下, けいれん, 白内障, 子宮内発育遅滞
10. G-CSF受容体 (CSFR3) 異常症	CSFR3	G-CSFに反応なし
11. SMARCD2 deficiency	SMARCD2	発達異常, 骨格異常, MDS
12. HYDU1 deficiency	HYDU1	低血糖

(Picard CA, et al. J Clin Immunol. 2018; 38: 96.)

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

Shwachman-Diamond症候群の診療ガイドライン作成に関する研究

研究分担者 渡邊健一郎（静岡県立こども病院血液腫瘍科 科長）

研究分担者 金兼弘和（東京医科歯科大学大学院小児地域成育医療学講座 寄附講座教授）

**研究要旨：** Shwachman-Diamond 症候群は、膵外分泌異常と造血不全による血球減少を主徴とする先天性骨髄不全症である。骨格異常、肝障害、行動異常を伴うことが多く、15～30%で骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病を発症し、造血細胞移植が行われる。稀少疾患であるため、臨床試験に基づき確立した治療、フォローアップの指針はないが、適切な経過観察と治療介入が患者の QOL 向上、生命予後改善に重要と考えられる。本研究では、本疾患の本邦での診療ガイドラインを作成し、我が国における診療実態について調査を行った。

#### A．研究目的

Shwachman-Diamond症候群（SDS）は、膵外分泌異常と造血不全による血球減少を主徴とする先天性骨髄不全症である。骨格異常、肝障害、行動異常を伴うことが多く、骨髄異形成症候群(MDS)、急性骨髄性白血病（AML）発症のリスクが高い。適切な経過観察と治療介入が患者のQOL向上、生命予後改善に重要と考えられる。そのため、本邦における診療ガイドラインを作成し、それに基づき我が国における診療実態を明らかにすることを目的とする。

#### B．研究方法

本疾患の研究者により提案された国際的なコンセンサスガイドライン案（Dror, et al. Ann N Y Acad Sci, 2011）に基づき、内外の知見を加え、本邦での診療ガイドラインを作成した。

また、これまでに遺伝子解析に基づいてSDSと診断された患者の臨床情報をアンケート形式にて集計し、解析した。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析はヘルシンキ宣言に基づいて、本人または家族から文書による同意を得た上で行った。実態調査は、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に基づいて施行した。

#### C．研究結果

診療ガイドライン2017を作成した。疾患概念、診断基準、病態、治療の他、フォローアップの具体的な指針について示し、本症に特徴的な膵、骨の画像も掲載した。2018年にガイドライン改訂を行い、SDSでは成人期にMDS/AMLに移行することが多いこと、新たに同定された新規遺伝子について追記した。

調査では計47例のSBDS両アリル変異をもつ患者が同定され、年間発症数は2.6例、男女比は2.1：1であった。SBDS変異は183-184TA>CT/258+2T>C変異が72%を占め、次に258+2T>C/258+2T>C変異が6.4%であった。初診時の臨床所見はさまざまであり、血球減少、体重増加不良、脂肪便、肝機能障害、低身長、骨格異常などである。水外分泌不全あるいは画像での膵臓の異常はほとんどの患者で認められた。好中球減少は初診時に約1/3の患者でしか認められなかったが、経過中では89%の患者で認められた。その他の血球異常は貧血、血小板減少、汎血球減少症がそれぞれ66%、68%、40%で認められた。4例（8.5%）がAMLを発症しており、うち3例の発症年齢は18歳以上であった。

#### D．考察

SDSは欧米では先天性骨髄不全症の中ではFanconi貧血、Diamond-Blackfan貧血に次に多いとされているが、我が国における頻度は低いとされていた。しかしながら、本研究によって我が国にお

いてもSDSは少なからず存在することが明らかとなった。また、臨床像、SBDS遺伝子変異のタイプは既報と同様であった。成人期になってAMLに移行する例があり、継続的なフォローアップが必要と考えられた。

## E . 結論

診療ガイドラインに基づいて、広く臨床医がSDSを認知することによって、さらに多くの患者が同定され、適切な治療、フォローアップによって、予後やQOLの改善につながる可能性が示唆された。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kanegane H. Inflammatory bowel diseases and primary immunodeficiency diseases. **Immunol Med.** 2019 Jan;11:1-8. doi: 10.1080/25785826.2018.1556025. [Epub ahead of print]
- 2) Mallick R, Jolles S, Kanegane H. Agbor-Tarh D, Rojavin M. Treatment Satisfaction with Subcutaneous Immunoglobulin Replacement Therapy in Patients with Primary Immunodeficiency: a Pooled Analysis of Six Hizentra® Studies. **J Clin Immunol.** 2018;38(8):886-897.
- 3) Tanaka-Kubota M, Shinozaki K, Miyamoto S, Yanagimachi M, Okano T, Mitsuiki N, Ueki M, Yamada M, Imai K, Takagi M, Agematsu K, Kanegane H. Morio T. Hematopoietic stem cell transplantation for pulmonary alveolar proteinosis associated with primary immunodeficiency disease. **Int J Hematol.** 2018;107(5):610-614.
- 4) Okano T, Tsujita Y, Kanegane H. Mitsui-Sekinaka K, Tanita K, Miyamoto S, Yeh TW, Yamashita M, Terada N, Ogura Y, Takagi M, Imai K, Nonoyama S, Morio T. Droplet Digital PCR-Based Chimerism Analysis for Primary Immunodeficiency Diseases. **J Clin Immunol.** 2018;38(3):300-306.
- 5) Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M,

Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka N, Nakakuma H, Hasegawa D, Manabe A, Fujishima N, Fujii N, Tanimoto M, Morita Y, Matsuda A, Fujieda A, Katayama N, Ohashi H, Nagai H, Terada Y, Hino M, Sato K, Obara N, Chiba S, Usuki K, Ohta M, Imataki O, Uemura M, Takaku T, Komatsu N, Kitanaka A, Shimoda K, Watanabe K. Tohyama K, Takaori-Kondo A, Harigae H, Arai S, Miyazaki Y, Ozawa K, Kurokawa M; for National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes. A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). **Am J Hematol.** 2017;92:1324-1232.

- 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;19:796-802.

### 2. 学会発表

- 1) 濱麻人, 真部淳, 長谷川大輔, 野沢和江, 成田敦, 村松秀城, 高橋義行, 渡邊健一郎, 小原明, 伊藤雅文, 小島勢二. 小児再生不良性貧血および低形成骨髄異形成症候群における臨床的予後の比較. **第78回日本血液学会学術集会**(2016年10月, 横浜).
- 2) Kanegane H. Pancytopenia and primary immunodeficiency diseases. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会**(2016年12月, 東京).
- 3) Watanabe K., Kanegane H., Hamabata T, Kozuki K, Umeda K, Hama A, Okuno, Muramatsu H, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Ohara A, Ito M, Kojima S, Ito E. Establishment of a nationwide cohort for Shwachman-Diamond syndrome in Japan.

**International Meeting on Childhood MDS and SAA** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).

- 4) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Suzuki K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Bone marrow transplantation for children with acquired bone marrow failure. **International Meeting on Childhood MDS and SAA** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).
- 5) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Comparison of Clinical Outcomes Between Pediatric Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. **58<sup>th</sup> ASH Annual Meeting & Exposition** (2016年12月, 米国・サンディエゴ).
- 6) 西村聡, 青木由貴, 石渡泰芳, 松本和明, 廣木遥, 小野真太郎, 岡野翼, 宮本智史, 足洗美穂, 星野顕宏, 田中真理, 宮脇零士, 小林千佳, 手束真理, 大川哲平, 満生紀子, 遠藤明史, 小野敏明, 磯田健志, 宮澤大輔, 長澤正之, 水谷修紀, 安原真人, 梶原道子, 柳町昌克, 高木正稔, 金兼弘和, 今井耕輔, 森尾友宏. 原発性免疫不全症に対するFluBUとFluMelによる前処置法に比較検討. **第40回日本造血細胞移植学会総会** (2018年2月1-3日, 札幌).
- 7) 濱麻人, 真部淳, 長谷川大輔, 野沢和江, 成田敦, 村松秀城, 高橋義行, 渡邊健一郎, 小原明, 伊藤雅文, 小島勢二. 小児再生不良貧血および骨髄異形成症候群の形態中央診断: 1500例のまとめ. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月, 東京).
- 8) Okamoto K, Shigemizu D, Okano T, Yeh TW, Takashima T, Yamashita M, Ono S, Mitsuiki N, Takagi M, Mori M, Kanegane H, Tsunoda T, Imai K, Morio T. Whole exome sequence analysis using the known and candidate genes for primary immunodeficiency diseases. **The 2nd APSID Scientific Congress** (2018 5月7日, 中国・重慶).
- 9) 渡邊健一郎, 金兼弘和, 濱端隆行, 上月景弘,

梅田雄嗣, 浜麻人, 奥野友介, 村松英城, 高橋義行, 上野浩生, 吉田健一, 長谷川大輔, 真部淳, 小野明, 伊藤雅文, 小川誠司, 小島勢二, 伊藤悦朗. 本邦におけるScwachman-Diamond症候群の臨床像. **第2回日本免疫不全・自己炎症学会総会・学術集会** (2019年2月2-3日, 東京).

- 10) Watanabe K, Kanegane H, hamabata T, Kozuki K, Umeda K, Hama A, Okuno Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Ohara A, Masafumi I, Kojima S, Ito E. Establishment of a nationwide cohort for Shwachman-Diamond syndrome in Japan. **第80回日本血液学会学術集会** (2018年10月12-14日, 大阪).
- 11) Watanabe K, Kanegane H, hamabata T, Kozuki K, Umeda K, Hama A, Okuno Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Ohara A, Masafumi I, Kojima S, Ito E. EA nationwide cohort for Shwachman-Diamond syndrome in Japan. **9<sup>th</sup> Internatioal Congress of Shwachman-Diamond Syndrome** (2018年4月8-11日, 米国・ヒューストン).

**G . 知的財産権の出願・登録状況**  
該当なし

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

先天性血小板減少症のデータ管理・遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者（H28-29年度） 國島伸治（国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター高度診断研究部  
分子診断研究室 室長（現 岐阜医療科学大学保健学部 教授））

**研究要旨：** CTP を疑う 28 症例について先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断解析を行い、22 例の症例で確定診断が得られた。MYH9 異常症は 16 例（57.1%）と最も高頻度に診断された。その他は、TUBB1 異常症 1 例、2B 型 von Willebrand 病 1 例、Paris-Trousseau Jacobsen 症候群 1 例、GFI1B 異常症 2 例であった。残りの 7 例は確定診断されなかった。

### A．研究目的

先天性血小板減少症は病因不明な疾患が多く、特発性血小板減少性紫斑病と診断され不必要な治療を受ける症例も少なくない。本研究は、先天性血小板減少症を疑う症例を全国的に収集し、系統的鑑別診断解析による遺伝子診断を行い、臨床情報と検査・解析データを集積し、診断基準、重症度分類、診療ガイドラインの作成を目的とした。

### B．研究方法

先天性血小板減少症を疑う症例の解析依頼に対して、我々が独自に確立中である系統的鑑別診断解析を施行する。

（倫理面への配慮）

本研究は、先天性血小板減少症の診断ガイドライン作成に関する研究として当院ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会による審査承認を得ている。また、DNA組み換え実験および動物実験についても審査承認を得ている。

### C．研究結果

平成28-29年度は、28例の先天性血小板減少症を疑う症例について系統的鑑別診断解析を施行し、MYH9異常症16例、TUBB1異常症1例、2Bvon型Willebrand病1例、Paris-Trousseau Jacobsen症候群1例、GFI1B異常症2例の診断に至り、7例は確定診断されなかった。

また、本研究班と連携する「稀少小児遺伝性血液疾患に対する新規責任遺伝子の探索と遺伝子診断シ

ステムの構築に関する研究」（小島班）で同定された2個のMYH9遺伝子バリエーションの評価を末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析により施行し、ともに良性であることを示した。

### D．考察

先天性血小板減少症を疑う15症例について先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断解析を行い、21例（75%）の症例で確定診断が得られた。MYH9異常症は16例（57.1%）と最も高頻度に診断された。MYH9異常症16例中、2例では白血球封入体を認めず、原因不明の血小板減少症あるいは新生児同種免疫性血小板減少症と診断されていたが、末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析と局在分類により確定診断された。2例のMYH9異常症では新規変異を同定した。

MYH9異常症診断に用いる末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析では、異常局在を認めればMYH9異常症と診断することが可能で、正常局在所見からはMYH9異常症を否定することが可能である。従って、MYH9遺伝子解析により同定されたバリエーションの病原性の判定にも有用であり、本年度には次世代シーケンス解析で同定されたMYH9バリエーションの評価を行った。

### E．結論

先天性血小板減少症を疑う28症例について先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断解析を行い、21例（75%）の症例で確定診断を得た。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kanda K, Kunishima S, Sato A, Abe D, Nishijima S, Ishigami T. A Brazilian case of Bernard-Soulier syndrome with two distinct founder mutations. **Hum Genome Var.** 2017;4:17030.
- 2) Aoki T, Kunishima S, Yamashita Y, Minamitani K, Ota S. Macrothrombocytopenia with congenital bilateral cataracts: a phenotype of *MYH9* disorder with exon 24 indel mutations. **J Pediatr Hematol/Oncol.** 2018;40(1):76-8.
- 3) Ichimiya Y, Wada Y, Kunishima S, Tsukamoto K, Kosaki R, Sago H, Ishiguro A, Ito Y. 11q23 deletion syndrome (Jacobsen syndrome) with severe bleeding: a case report. **J Med Case Rep.** 2018;12:3.
- 4) Hao J, Kada A, Kunishima S. Further classification of neutrophil non-muscle myosin heavy chain IIA localization for efficient genetic diagnosis of MYH9 disorders. **Ann Hematol.** 2018;97(4):709-11.
- 5) Miyashita N, Onozawa M, Hayasaka K, Yamada T, Migita O, Hata K, Okada K, Goto H, Nakagawa M, Hashimoto D, Kahata K, Kondo T, Kunishima S, Teshima T. A novel heterozygous ITGB3 p.T720del inducing spontaneous activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in autosomal dominant macrothrombocytopenia with aggregation dysfunction. **Ann Hematol.** 2018;97(4):629-40.
- 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.
- 7) Sivapalaratnam S, Westbury SK, Stephens JC, Greene D, Downes K, Kelly AM, Lentaigne C, Astle WJ, Huizinga EG, Nurden P, Papadia S, Peerlinck K, Penkett CJ, Perry DJ, Roughley C, Simeoni I, Stirrups K, Hart DP, Tait RC, Mumford AD; NIHR BioResource., Laffan MA, Freson K, Ouwehand WH, Kunishima S, Turro E. Rare variants in GP1BB are responsible for autosomal dominant macrothrombocytopenia. **Blood** 2017;129(4):520-524.
- 8) Ogawa Y, Kunishima S, Yanagisawa K, Osaki Y, Uchiyama Y, Matsumoto N, Tokiniwa H, Horiguchi J, Nojima Y, Handa H. Successful management of perioperative hemostasis in a patient with Glanzmann thrombasthenia who underwent a right total mastectomy. **Int J Hematol.** 2017;105(2):221-225.
- 9) Yamashita Y, Matsuura R, Kunishima S, Oikawa Y, Ariizumi H, Hamada S, Shirato N, Matsuoka R, Ogawa K, Sekizawa A. Perinatal Management for a Pregnant Woman with an MYH9 Disorder. **Case Rep Obstet Gynecol.** 2016;2016:6730174.
- 10) Kitamura K, Okuno Y, Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Muramatsu H, Kobayashi R, Furukawa K, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Kunishima S. Functional characterization of a novel GFI1B mutation causing congenital macrothrombocytopenia. **J Thromb Haemost.** 2016;14(7):1462-9.
- 11) Simeoni I, Stephens JC, Hu F, Deevi SV, Megy K, Bariana TK, Lentaigne C, Schulman S, Sivapalaratnam S, Vries MJ, Westbury SK, Greene D, Papadia S, Alessi MC, Attwood AP, Ballmaier M, Baynam G, Bermejo E, Bertoli M, Bray PF, Bury L, Cattaneo M, Collins P, Daugherty LC, Favier R, French DL, Furie B, Gattens M, Germeshausen M, Ghevaert C, Goodeve AC, Guerrero JA, Hampshire DJ, Hart DP, Heemskerk JW, Henskens YM, Hill M, Hogg N, Jolley JD, Kahr WH, Kelly AM, Kerr R, Kostadima M, Kunishima S, Lambert MP, Liesner R, Lopez JA, Mapeta RP, Mathias M, Millar CM, Nathwani A, Neerman-Arbez M, Nurden AT, Nurden P, Othman M, Peerlinck K, Perry DJ, Poudel P,

- Reitsma P, Rondina MT, Smethurst PA, Stevenson W, Szkotak A, Tuna S, van Geet C, Whitehorn D, Wilcox DA, Zhang B, Revel-Vilk S, Gresele P, Bellissimo DB, Penkett CJ, Laffan MA, Mumford AD, Rendon A, Gomez K, Freson K, Ouwehand WH, Turro E. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. **Blood** 2016;127(23): 2791-803.
- 12) Wasano K, Matsunaga T, Ogawa K, Kunishima S. Late onset and high-frequency dominant hearing loss in a family with MYH9 disorder. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 2016;273(11):3547-3552.
- 13) Yokoi S, Kunishima S, Takahashi Y, Morishita M, Kojima S. A Japanese pedigree with a p.A95V mutation in the MYH9 gene demonstrates inherited macrothrombocytopenia without Alport manifestations. **Ann Hematol.** 2016;95(5): 831-3.
2. 学会発表
- 1) Kunishima S, Uchiyama Y, Ogawa Y, Matsumoto N, Kobayashi R, Ichikawa S. Diagnostic biomarker for GFI1B macrothrombocytopenia. **XXXth International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology** (2017年5月4-6日, ハワイ・ホノルル)
- 2) 國島伸治, 北村勝誠, 小林良二, 市川聡, 内山由理, 小川孔幸, 松本直通. 2GFI1B異常症診断のバイオマーカー. **第39回日本血栓止血学会学術集会** (平成29年6月8日-10日, 名古屋).
- 3) 橋本恵梨華, 高木夕希, 鈴木幸子, 河村奈美, 槇山愛弓, 坂根寛人, 藤岡亮, 田村彰吾, 高木明, 上原貴博, 國島伸治, 小嶋哲人. 新規変異 ITGA2B p.Cys198Serを含む複合ヘテロ変異をもつ血小板無力症の一例. **第39回日本血栓止血学会学術集会** (平成29年6月8日-10日, 名古屋).
- 4) 米野由希子, 國島伸治, 柳富子. RUNX1変異による家族性血小板異常症に発症したMDS (RAEB-2) の症例. **第39回日本血栓止血学会学術集会** (平成29年6月8日-10日, 名古屋).
- 5) 家田大輔, 堀いくみ, 中村勇治, 大下裕法, 根岸豊, 篠原務, 服部文子, 加藤文典, 犬飼幸子, 齋藤伸治, 北村勝誠, 國島伸治, 河合智樹. 脳室周囲異所性灰白質と結合組織症状を示したFLNA遺伝子変異の女兒例. **第59回日本小児神経学会学術集会** (2017年6月15-17日, 大阪).
- 6) Miyashita N, Onozawa M, Hayasaka K, Kunishima S, Teshima T. Novel heterozygous ITGB3 T746del mutation inducing spontaneous activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 causing autosomal dominant macrothrombocytopenia with abnormal  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 localization. **22nd Congress of the European Hematology Association** (2017年6月22-25日, スペイン・マドリード).
- 7) Morel-Kopp MC, Rabbolini D, Chun Y, Fixter K, Kunishima S, Gabrielli S, Chen Q, Stevenson W, Tan P, Radhakrishnan K, Bird R, Paul O, Chew LP, Ward C. MYH9 disorders are the most common cause of macrothrombocytopenia in Australia: importance of mean platelet diameter measurement and Döhle body detection for improved diagnosis. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日, ドイツ・ベルリン).
- 8) Hashimoto E, Kunishima S, Takagi Y, Suzuki S, Makiyama A, Sakane H, Fujioka A, Uehara T, Tamura S, Takagi A, Kojima T. Compound heterozygosity for mutations in ITGA2B including a novel p.Cys198Ser in Glanzmann Thrombasthenia. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日, ドイツ・ベルリン).
- 9) Xu M, Zhu G, Li J, Carrim N, Kunishima S, Ware J, Ruggeri ZM, Freeman J, Ni H. Platelet GPIba is important for liver thrombopoietin (TPO) production. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日, ドイツ・ベルリン).
- 10) 國島伸治, 小林良二, 市川聡, 内山由理, 小川孔幸, 宮崎浩二. GFI1B異常症の新規検査診断



- 法・第18回日本検査血液学会学術集会（平成29年7月22-23日，札幌）。
- 11) Uchiyama Y, Ogawa Y, Kunishima S, Shiina M, Nakashima M, Yanagisawa K Yokohama A, Imagawa E, Miyatake S, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Ogata K, Handa H, Matsumoto N. A novel GFI1B mutation at the first Zinc-Finger Domain causes congenital macrothrombocytopenia. **67th American Society of Human Genetics 2017 Annual Meeting** (2017年10月17-21日，米国・オランダ)。
  - 12) 岩井俊樹，村松彩子，川路悠加，栗山幸大，大城宗生，平川佳子，内山人二，黒田純也，國島伸治．当院で経験したMYH9異常症．**第79回日本血液学会総会**(平成29年10月20-22日，東京)。
  - 13) 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 sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. **第79回日本血液学会総会** (平成29年10月20-22日，東京)。
  - 14) Miyashita N, Onozawa M, Kunishima S, Hayasaka K, Yamada T, Migita O, Hata K, Fujioka Y, Ohba Y, Teshima T. Mechanisms of congenital macrothrombocytopenia induced by a novel ITGB3 T720del mutation. **第79回日本血液学会総会** (平成29年10月20-22日，東京)。
  - 15) 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 sequencing of 347 children with acquired and inherited bone marrow failure syndromes. **59th American Society for Hematology Annual Meeting and Exposition** (2017年12月 9-12日，米国・アトランタ)。
  - 16) 國島伸治．Next-generation sequencingと血栓止血学．**第39回日本血栓止血学会学術集会**（平成29年6月8-10日，名古屋）。
  - 17) 國島伸治．先天性血小板異常症．**日本小児血液・がん学会学術集会教育セミナー**（平成29年6月18日，東京）。
  - 18) Kunishima S. Update on congenital thrombocytopenias. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日，ドイツ・ベルリン)。
  - 19) Kunishima S. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: survey and workshop. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日，ドイツ・ベルリン)。
  - 20) Yamashita Y, Matsuura R, Oikawa Y, Hamada S, Ariizumi H, Odawara K, Koyano M, Nishii S, Muramoto T, Takenaka S, Nakayama K, Matsumoto K, Ichihara M, Sasaki Y, Shiroto N, Matsuoka R, Ogawa K, Kunishima S, Sekizawa A. A case report of management including perinatal genetic counseling for May Hegglin Anomaly in pregnancy that low platelets counts made the opportunity to diagnose. **The 13th International Congress of Human Genetics** (2016年4月，京都)。
  - 21) Kunishima S, Kada A, Hao J. Further classification of neutrophil non-muscle myosin heavy chain IIA localization for efficient genetic diagnosis of *MYH9* disorders. **XXIX International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology** (2016年5月，イタリア・ミラノ)。
  - 22) 福村明子，大坪慶輔，小池隆志，森本克，望月博之，國島伸治．急性虫垂炎を契機に診断に至ったMYH9異常症の男児例．**第119回日本小児科学会学術集会**（2016年5月，札幌）。
  - 23) 青木孝浩，國島伸治，山下晴喜，太田節雄．先天性白内障を呈したMYH9異常症の1例．第119

- 回日本小児科学会学術集会(2016年5月 札幌).
- 24) Kunishima S. Differential diagnosis of congenital macrothrombocytopenia (symposium). **62nd Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2016年5月, フランス・モンペリエ).
- 25) 神田健志, 佐藤彩, 安部大輔, 西島節子, 石上毅, 國島伸治. Bernard-Soulier症候群のブラジル人女児. **第75回日本小児科学会滋賀地方会** (2016年5月, 大津).
- 26) 影山玲子, 植田寛子, 橋爪秀夫, 國島伸治. 臀部の皮疹を契機に確定診断されたEpstein症候群の1例. **第115回日本皮膚科学会総会** (2016年6月, 京都).
- 27) 國島伸治, 嘉田晃子, Hao Jihong, 北村勝誠. *MYH9*異常症遺伝子診断のための好中球ミオシン局在解析の細分類. **第38回日本血栓止血学会学術集会** (2016年6月, 奈良).
- 28) 國島伸治. ITPの鑑別診断と実践的アプローチ (教育講演). **第17回日本検査血液学会学術集会** (2016年8月, 福岡).
- 29) Kunishima S., Saito H. Differential diagnosis of congenital macrothrombocytopenia-12-year experience in Nagoya-Platelets2016. **9th International Symposium** (2016年9月, 米国・ウィルズリー).
- 30) 佐分利能生, 大塚英一, 宮崎泰彦, 河野克也, 國島伸治. May-Hegglin異常. **第30回日本臨床内科医学会** (2016年10月, 東京).
- 31) 國島伸治, 北村勝誠, 山村喜美. 新規検査法により診断された先天性巨大血小板症. **第70回国立病院総合医学会** (2016年11月, 那覇).
- 32) Chu Y, Rabbolini D, Gabrielli S, Kunishima S., Stevenson W, Ward C, Morel-Kopp MC. MYH9 disorders are not uncommon in Australia and New Zealand: results from a platelet next generation sequencing (NGS) project. **Annual Scientific Meetings of the HAA (Haematology Society of Australia and New Zealand, Australian & New Zealand Society of Blood Transfusion and the Australasian Society of Thrombosis and Haemostasis** (2016年11月, オーストラリア・メルボルン).
- 33) 中矢雅治, 時政定雄, 濱崎考史, 村松秀城, 小島勢二, 奥野友介, 吉田健一, 小川誠司, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 宮野悟, 國島伸治. 先天性巨大血小板症の新規病因遺伝子(*PLCB3*)の機能解析. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月, 東京).
- 34) 中館尚也, 石黒精, 小林尚明, 國島伸治, 笹原洋二, 前田尚子, 高橋幸博. 小児期特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の治療に関する疫学調査. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月, 東京).
- 35) 神田健志, 國島伸治, 佐藤彩, 安部大輔, 西島節子, 石上毅. ベルナル・スーリエ症候群のブラジル人女児. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月, 東京).
- 36) 左信哲, 宮下恵実子, 鞍谷沙織, 橋本泰佑, 平野翔堂, 中村千華, 松田百代, 奥廣有喜, 古家信介, 山本浩継, 河津由紀子, 吉川真紀子, 徳永やすゆき, 加藤秀樹, 笹原洋二, 國島伸治, 茶山公祐. 破碎赤血球を伴う溶血性貧血を呈し診断に苦慮した先天性無巨核球性血小板減少症の1例. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月, 東京).
- 37) 川口裕之, 小倉友美, 三井-關中佳奈子, 關中悠仁, 國島伸治, 野々山恵章. Target sequence による先天性血小板減少症のスクリーニング (続報). **第24回小児ITP研究会** (2016年12月, 東京).
- 38) 國島伸治. GFI1B 異常症の病態と検査診断. **第24回小児ITP研究会** (2016年12月, 東京).
- 39) Rabbolini DJ, Morel-Kopp MC, Chen Q, Gabrielli S, Best G, Dunlop L, Chew LP, Blair N, Brighton TA, Singh N, Fixter K, Kunishima S., Ward CM, Stevenson WS. Megakaryocyte and platelet CD34+ surface expression is increased by mutation of the GFI1B transcription factor and is independent of the affected functional domain. **Cell Biology of Megakaryocytes & Platelets, Fundamental Biology and Disorders of the Megakaryocyte Lineage: From Hematopoietic Stem Cell to Hemostasis, Gordon Research Conference** (2017年2月, イタリア・ルッカ).

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

DKCの遺伝子診断

研究分担者 山口博樹（日本医科大学 准教授）

**研究要旨：**先天性角化不全症（Dyskeratosis congenita (DKC)）は重症型と考えられる Hoyerall Hreidarsson syndrome (HHS) から軽症型の不全型 DKC までその病態や臨床像が多彩である。近年次世代シーケンサーによる変異解析技術が発展したため、本邦の先天性骨髄不全症においても遺伝子変異検索が積極的に行われつつあり診断が明確となった症例も多くある。一方で臨床診断と異なる疾患の遺伝子変異が同定されることもあり、遺伝子変異の結果をどのように判断すればよいのか判断が難しい症例もある。また、DKC の約 1/3 の症例では責任遺伝子変異が同定されていないため遺伝子診断ができない場合もある。本研究は、本邦の DKC 症例で発見された責任遺伝子変異に関して *in vitro* にて機能解析を行い、これらがテロメア長制御を障害し DKC の病態に関与しているのか、また、DKC の新規責任遺伝子を明らかにして DKC の遺伝子診断を発展させることが目的である。

本邦で発見された *TERT* 遺伝子変異に関して *TERT* を欠損しテロメラーゼ活性を認めない Saos-2 細胞にこれらの遺伝子変異を導入しテロメラーゼ活性を解析した。DKC 症例で発見された E280K と del334\_335 は、テロメラーゼ活性に障害を与えず、これらの変異が DKC の原因遺伝子であったかは懐疑的であった。DKC の診断において遺伝子変異をその診断の根拠とする場合には注意が必要である。

次に、既知の責任遺伝子に変異を認めない DKC 症例に関して次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異解析を行った結果、*TEP1* 遺伝子変異と *ACD* 遺伝子変異が新規の責任遺伝子変異の候補として発見された。*ACD* 遺伝子変異は *TINF2* との結合領域に認められたため *ACD* と *TINF2* の結合障害によって Shelterin 複合体が不安定化することを予想した。しかし、発見された *ACD* 遺伝子変異は *ACD* と *TINF2* の結合障害を起こさず、Shelterin 複合体が不安定化することはなかった。発見された *ACD* 遺伝子変異は DKC の責任遺伝子変異ではないと考えられた。現在、*TEP1* 遺伝子変異の機能解析を行っている。

**A . 研究目的**

先天性角化不全症（Dyskeratosis congenita (DKC)）は網状色素沈着、爪の萎縮、舌などの粘膜白斑症を伴う骨髄不全症（Bone marrow failure: BMF）で10歳前後までに約80%以上の症例にこれらの特徴的身体所見が付随しBMFを発症する。遺伝型式はX連鎖劣性遺伝が約35%、常染色体優性遺伝が約15%、常染色体劣性遺伝が数%に認められるが、残りの約40%近くが型式不明である。

DKCの責任遺伝子変異としてテロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、*DKC1*、*telomerase RNA component (TERC)*、*telomerase reverse Transcriptase (TERT)*、*NOP10*、*NHP2*、Shelterin

複合体を構成する *TRF-interacting nuclear protein (TINF2)*、テロメラーゼ複合体を核内の Cajalbodyに移行させる *TCAB1*が同定された。また、近年DNAヘリカーゼの一つである *Regulator of Telomere Elongation Helicase 1 (RTEL1)* の変異が常染色体劣性遺伝のDKCやその重症型と考えられている Hoyerall Hreidarsson syndrome (HHS) で発見され、テロメア末端の保護に関わる CST複合体を構成する *CTC1* の変異も発見されている。DKC はこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結果造血幹細胞などの増殖細胞に増殖障害が生じ上記の症候が形成されると考えられている。

また、成人になって特徴的身体所見を伴わず緩徐

に発症する不全型のDKC の存在が明らかになった。不全型のDKCは、臨床的には再生不良性貧血（AA）や骨髄異形成症候群（MDS）などのBMFと診断されていることが多く、BMFの2-5%に末梢血単核球のテロメア長が短縮し、上述のテロメア関連遺伝子異常を認める不全型のDKCが報告されている。

DKCの病態形成には、テロメア関連遺伝子異常による細胞内の分子生物学的変異、世代促進、加齢の3つ要因が重要である。不全型DKCで認められた *TERC*、*TERT* 変異は haploinsufficiency 効果を示し、テロメラーゼ活性の減弱の程度が少なく、DKCの表現型となるにはある程度の世代促進や加齢が必要であると考えられる。以上のことから、テロメア関連遺伝子変異のテロメア補正の障害が軽度で、世代促進や加齢が進んでいない場合は、細胞増殖や分裂が盛んな造血器のテロメア長が他の組織に先行して短縮化し、DKCの特徴的身体所見が出現せずに不全型のDKCとなるのではないかと予想する。

DKCは網状色素沈着、爪の萎縮、舌などの粘膜白斑症といった特徴的身体所見、家族歴、テロメア長短縮、上述の原因遺伝子変異の同定などによって診断をする。しかし、その重症型と考えられているHHSにおいては小頭症、小脳低形成、成長発達遅延、顔貌異常、B細胞とNK細胞数の低下、細胞性免疫不全などといった多彩な身体異常や免疫異常を認め、さらにDKCの特徴的身体所見を認めない場合もあり診断が難しい場合がある。一方で、骨髄不全症以外の明らかな異常を認めない不全型DKCはAAやMDSなどの他の骨髄不全症との鑑別が難しい場合がある。また、臨床的にDKCを考えた症例の中にはテロメア長の短縮の程度が軽度の場合や原因遺伝子が同定されない場合などもあり診断に苦慮をすることが少なくない。

近年次世代シーケンサーによる変異解析技術が発展したため本邦の先天性骨髄不全症においても遺伝子変異検索が積極的に行われつつあり診断が明確となった症例も多くある。一方で臨床診断と異なる疾患の遺伝子変異が同定されることもあり、遺伝子変異の結果をどのように判断すればよいのか判断が難しい症例もある。特に、不全型DKCの場合は他の骨髄不全症との鑑別を遺伝子変異解析によって行っているが、発見された遺伝子変異が本当にテロメア長制御を障害しDKCの病態に

関与しているのかは不明確である。また、DKCの約1/3の症例では責任遺伝子変異が同定されていないため遺伝子診断が出来ない場合もある。

本研究は本邦のDKC症例で発見された責任遺伝子変異に関して *in vitro* にて機能解析を行い、これらがテロメア長制御を障害し、DKCの病態に関与しているのか、またDKCの新規責任遺伝子を明らかにしてDKCの遺伝子診断を発展させることが目的である。

## B. 研究方法

### 1. 本邦で発見された既知の責任遺伝子変異の機能解析

本邦で発見された *TERT* 遺伝子変異（DKC: E280K, del334\_335, cDKC: G106W, P632R, G682D, T726M）及び *TERC* 遺伝子変異（DKC: c.73G>C, cDKC: c.439\_443del）をオリゴ合成により作成し、pCI-neo-flag vectorでクローニングした。野生型の *TERC* を発現し、*TERT* を発現しておらず、テロメラーゼ活性を持たない Saos-2 細胞（Alternative Lengthening of Telomere (ALT) にてテロメアを補正）に *TERT* 野生型及び各変異を発現する pCI-neo-flag vector をそれぞれリン酸カルシウム法で transfection し、48時間後に各細胞を粗抽出し TeloTAGGG Telomerase PCR ELISAPLUS (Roche) により Relative telomerase activity (RTA: 相対的テロメラーゼ活性) を測定した。

また、野生型の *TERT* をオリゴ合成により作成し、pDon-neo-vector でクローニングした。AmphoPack 293細胞を用いてレトロウイルスベクターを作成し、野生型の *TERC*、*TERT* を発現しておらず、テロメラーゼ活性を持たない VA13細胞（ALTにてテロメアを補正）に transduction させ野生型の *TERT* を発現する VA13-*TERT* 細胞を作成した。VA13-*TERT* 細胞に *TERC* 野生型及び各変異を発現する pCI-neo-flag vector をそれぞれリン酸カルシウム法で transfection し、48時間後に各細胞を粗抽出し同様に RTA を測定した。

### 2. DKCの新規責任遺伝子変異候補の機能解析

野生型の *ACD* 遺伝子をオリゴ合成により作成し、pCI-neo-vectorでクローニングした(pCI-neo-*ACD* WT)。更に、pCI-neo-*ACD* WTから、次世代シーケンサーで発見された *ACD* 遺伝子変異 p.F461L を mutagenesis 法により作成した (pCI-neo-*ACD*

p.F461L)。また、*TINF2*遺伝子のC末端にFLAGタグを付与した配列をオリゴ合成により作成し、pCI-neo-flag vector でクローニングした (pCI-neo-TINF2)。野生型のACDを発現していない、HEK293細胞に1. pCI-neo-ACD WTとpCI-neo-FLAG、2. pCI-neo-ACD p.F461LとpCI-neo-FLAG、3. pCI-neo-vectorをそれぞれLipofectamin3000によりトランスフェクションした。48時間後にHEK293細胞のタンパクを抽出し、抗ACD抗体 (AA-2) : sc-100597, 抗FLAG抗体: A8592を用いてACDタンパク, *TINF2*タンパクの発現を確認した。その後、Protein A/G PLUS-Agaroseを用いて抗ACD抗体 (AA-2) : sc-100597で免疫沈降を行った。免疫沈降後のタンパクを用い、抗FLAG抗体: A8592でウェスタンブロットを施行した。

(倫理面への配慮)

機能解析において遺伝子導入を行うため、日本医科大学組換えDNA実験指針に従う。具体的には組換えDNA実験は、P3レベルの研究室で行い、組換えDNAを導入した細胞などの破棄には所定の指示に従う。

## C. 研究結果

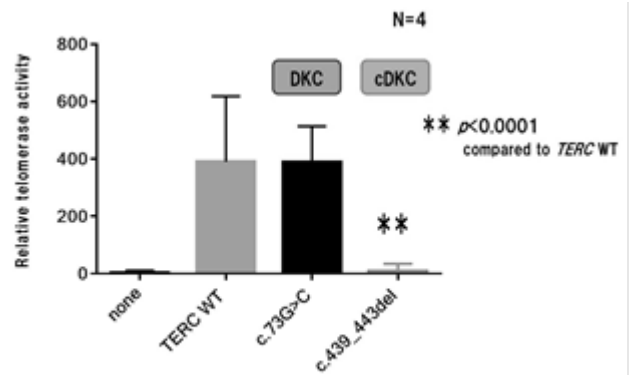
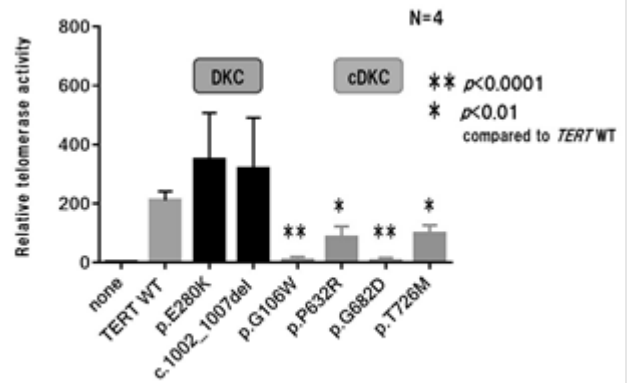
### 1. 本邦で発見された既知の責任遺伝子変異の機能解析

Saos-2細胞及びVA13-TERT細胞はテロメラーゼ活性が認められずALTにてテロメア長を補正している。

DKCで発見された*TERT* E280K, del334\_335は野生型と比較してテロメラーゼ活性の低下は認められなかった (RTA 210.8±17.8 vs. 350.0±78.9, 319.3±85.8  $p=0.2010$ ,  $p=0.3389$ )。一方、不全型DKCで認められた*TERT* G106W, G682Dは野生型と比較し有意にテロメラーゼ活性が低下していた。(RTA 210.8±17.8 vs. 7.4±6.3, 5.9±5.3  $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ )。また、不全型DKCで認められた*TERT* P632R, T726Mは野生型と比較し有意にテロメラーゼ活性が低下しているものの (RTA 210.8±17.8 vs. 84.6±19.4, 97.6±14.7  $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ ) *TERT* G106W, G682Dと比較してテロメラーゼ活性の低下の程度が小さかった (RTA 7.4±6.3 vs. 84.6±19.4, 97.6±14.7  $p<0.01$ ,  $p<0.01$ )。

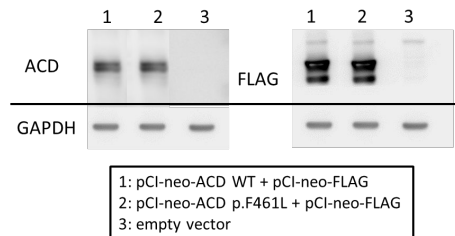
DKCで発見された*TERC* c.73 G>Cは野生型と

比較してテロメラーゼ活性の低下は認められなかった (RTA 390.2 ± 113.9 vs. 388.2 ± 62.80,  $p=0.9881$ )。一方、不全型DKCで認められた*TERC* c.439\_443delは野生型と比較し有意にテロメラーゼ活性が低下していた (RTA 390.2 ± 113.9 vs. 6.780 ± 13.88  $p<0.0001$ )。

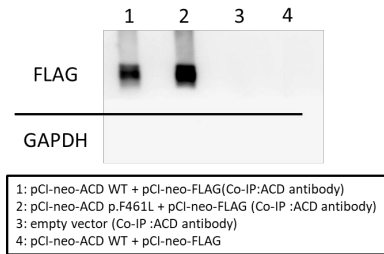


### 2. DKCの新規責任遺伝子変異候補の機能解析

それぞれのプラスミドベクターをHEK293細胞にトランスフェクションし、ACD, FLAGを共発現していることを確認した。



ACD抗体を用いて免疫沈降した結果、野生型のACD, ACD p.F461L変異いずれも*TINF2*と結合していることが明らかとなった。



ACD p.F461L変異はACDのTINF2結合領域に起きる変異であることから、変異の結果ACDとTINF2の結合が阻害されると推察されたが、今回の結果ではACD p.F461L変異はTINF2との結合を阻害しないことが明らかとなった。

#### D . 考察

本邦のDKC症例で発見された *TERT* 変異及び *TERC* 変異のテロメラーゼ活性の障害を *in vitro* で確認をした。不全型DKCで発見された *TERT* G106WとG682D, *TERC* c.439\_443delはテロメラーゼ活性を完全に障害し原因遺伝子変異として間違いないと考えられた。また、不全型DKCで認められた *TERT* P632RとT726Mはテロメラーゼ活性が有意に低下をしているが、その障害の程度は野生型の約50%程度で臨床的に不全型DKCの表現型となった原因をよく示していた。一方、DKC症例で発見された *TERT* E280Kとdel334\_335, *TERC* c.73G>Cはテロメラーゼ活性に障害を与えずこれらの変異がDKCの原因遺伝子であったかは懐疑的である。しかし、Saos-2細胞、VA13細胞がテロメラーゼ活性を介さずALTにてテロメア長補正をしているようにテロメア長制御はテロメラーゼ活性だけがすべてではない。これらの遺伝子変異が別のテロメア制御機構を障害してDKCの病態に関与している可能性は完全には否定できない。

今回の機能解析結果より症例によっては、遺伝子変異のみでDKCを診断するのは難しいことが明らかになった。

責任遺伝子が同定されていないDKC症例に対して次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスによってACD遺伝子変異 p.F461Lが発見された。ACD遺伝子変異はTINF2との結合領域に認められたため ACDとTINF2の結合阻害によってShelterin複合体が不安定化することを予想した。

しかし、発見された ACD遺伝子変異は ACDとTINF2の結合阻害を起こさず、Shelterin複合体が不安定化することはなかった。

発見されたACD遺伝子変異はDKCの責任遺伝子変異ではないと考えられた。しかし、ACDの機能はShelterin複合体だけではない。今回発見された遺伝子変異によってShelterin複合体が不安定化とは別の機序でテロメア長を短縮化させてDKCの病態に関与をしている可能性は否定できなかった。

現在、ACD遺伝子変異と同様に発見されたテロメラーゼ複合体を形成する *TEP1* 遺伝子変異の機能解析を行っている。

#### E . 結論

DKCや不全型DKCで発見された *TERT* 変異、*TERC* 変異の中にはテロメラーゼ活性に障害を与えずDKCの原因遺伝子でない変異が認められることがある。DKCの診断において遺伝子変異をその診断の根拠とする場合には注意が必要である。

ACD遺伝子変異 p.F461LはDKCの責任遺伝子変異ではない。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tachiwada T, Oda K, Tahara M, Sennari K, Nemoto K, Noguchi S, Kawanami T, Kido T, Yamaguchi H, Yatera K. Fatal Acute Exacerbation of Familial Interstitial Pneumonia Complicated with Dyskeratosis Congenita after Influenza Virus B Infection. *Inter Med.* (in press)
- 2) 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. *Genetics in Medicine* 2017;19(7):796-802.
- 3) 山口博樹 . 骨髄不全症におけるテロメア制御異常 . *血液フロンティア* 2017; 27(1):5-9.
- 4) Moriya K, Suzuki T, Watanabe Y, Saito-Nanjo Y, Niizuma H, Onuma M, Rikiishi T, Kakuta F, Abukawa D, Yamaguchi H,

Sasahara Y, Kure S. Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in a patient with novel compound heterozygous RTEL1 gene mutations. **Pediatric Blood & Cancer** 2016 Sep;63(9):1683-4.

2. 学会発表

- 1) Terada K, Yamaguchi H, Miyake K, Miyake N, Osaki Y, Okada T, Kojima S, Ito E, Inokuchi K. Importance of functional analysis of TERT gene mutations in the diagnosis of dyskeratosis congenital. **第79回日本血液学会総会** (平成29年10月20-22日, 東京) .

**G . 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

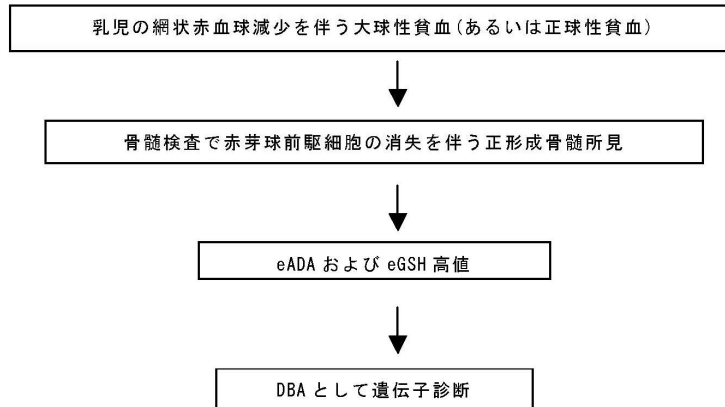
先天性骨髄不全症診療ガイドライン 2017

一般社団法人 日本小児血液・がん学会（編集）



## II Diamond-Blackfan 貧血

### 診断のフローチャート



●DBA には、診断のために有用なスクリーニング法がない。Transient erythroblastopenia of childhood (TEC) との鑑別診断には、赤血球アデノシンデアミナーゼ活性 (eADA) の高値 (mean  $\pm$  3SD 以上) を確認することが有用である。しかし、DBA 症例の約 20% は eADA が有意の上昇を示さない。eADA と赤血球還元型グルタチオン濃度 (eGSH) の同時測定により、遺伝子検査で確定診断し得た DBA 症例は全例が家族内非罹患者と判別が可能である。

●次に確定診断のために遺伝子診断を行う。なお、通常のシークエンス法 (Sanger シークエンス、あるいは次世代シークエンスサーを用いたターゲットシークエンス) で遺伝子変異を同定できない場合は、片アレルの大欠損を解析する必要がある。このような解析を行っても、本邦では原因遺伝子が同定されるのは全体の約 50% にすぎない。

### 診断へのアプローチ

#### ①疾患概念

Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、乳児期に発症する赤血球造血のみが障害される先天性の赤芽球癆である。骨髓は正形成であるが赤血球系細胞のみが著減し、末梢血では網赤血球が減少し、大球性正色素性貧血を呈する。約 40% の症例で様々な奇形を合併することが知られている。大頭、

小頭などの頭部、顔部の異常が最も多く、上肢、眼、泌尿生殖器系、心臓の異常や低身長が見られる。ほとんどが散発例であるが、約 10~20% の症例では家族歴があり、主に常染色体性優性の形式をとる<sup>1)</sup>。1936 年 Josephs により 2 例<sup>2)</sup>、2 年後には Diamond および Blackfan により 4 例が報告され<sup>3)</sup>、独立した疾患概念として確立した。

### III Fanconi 貧血

#### 診断のフローチャート

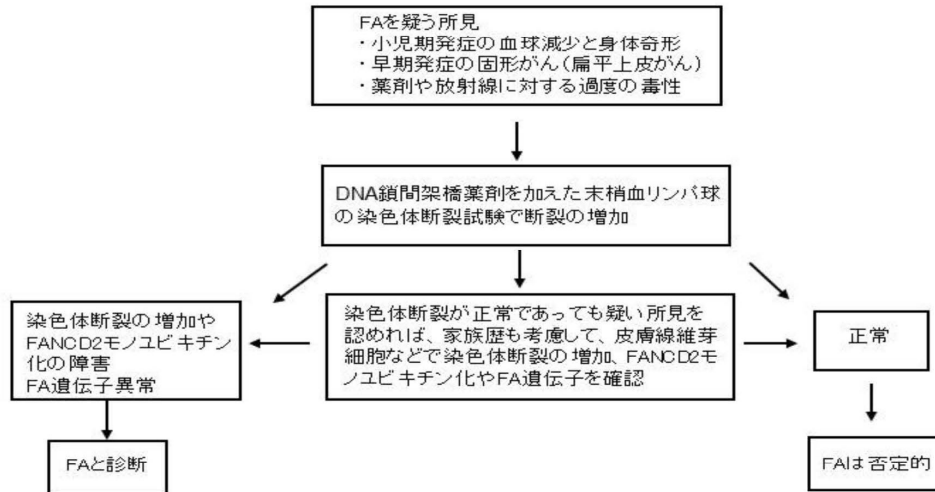


図1. Fanconi貧血診断のフローチャート

●Fanconi 貧血 (Fanconi anemia: FA) を疑った場合には、末梢血リンパ球を用いて mitomycin C (MMC) や diepoxybutane (DEB) などの DNA 架橋剤を添加した染色体断裂試験を行う (図 1)。正常の細胞と比べて多数の染色体断裂と、その結果生じると考えられる染色分体交換が特徴的とされる。また、一部の遺伝子異常ではスクリーニング法として、FANCD2 産物に対する抗体を用いウェスタンブロット法でモノユビキチン化を確認する方法も有用である。

●リンパ球に reversion を起こした細胞が増殖している体細胞モザイクの症例では、染色体脆弱がほとんどみられず判定困難であり、皮膚の線維芽細胞などを用いた染色体断裂検査や遺伝子検査などで初めて確定診断が得られる。FA 以外の染色体不安定性症候群を鑑別するうえで遺伝子検査が有用である。

#### 診断へのアプローチ

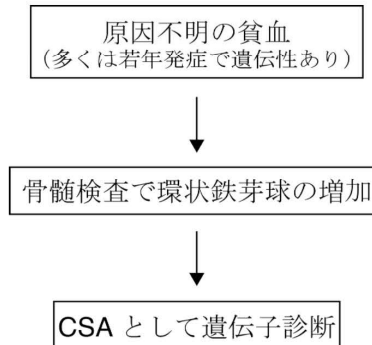
##### ①疾患概念

1927 年に Fanconi は家族性の貧血と身体奇形を特徴とする兄弟例を初めて記載して Fanconi 貧血と命名し<sup>1)</sup>、後年に 1) 汎血球減少、2) 皮膚の色素沈着、3) 奇形、4) 低身長、5) 性腺機能不全、6) 家族発生からなる診断基準を作成した<sup>2)</sup>。

1964 年に、Schroeder らは、FA 患者リンパ球に染色体異常がみられることを発見した<sup>3)</sup>。さらに、Sasaki らは、この染色体異常が mitomycin C (MMC) などの DNA 架橋剤によって著しく増加することを発見し、本疾患の基本病態が染色体不安定性にあることを明らかにした<sup>4)</sup>。最近の 20

## IV 遺伝性鉄芽球性貧血

### 診断のフローチャート



● 遺伝性鉄芽球性貧血 (congenital sideroblastic anemia: CSA) は、まず若年発症かつ遺伝性の原因不明の貧血により疑い、骨髄検査により環状鉄芽球の存在を確認する。

● 最終的には遺伝子解析により診断を確定する。家系の中での遺伝性が明らかでない場合は、造血細胞以外の組織で遺伝子の変異を確認し、胚細胞変異であることを確認することも重要である。

### 診断へのアプローチ

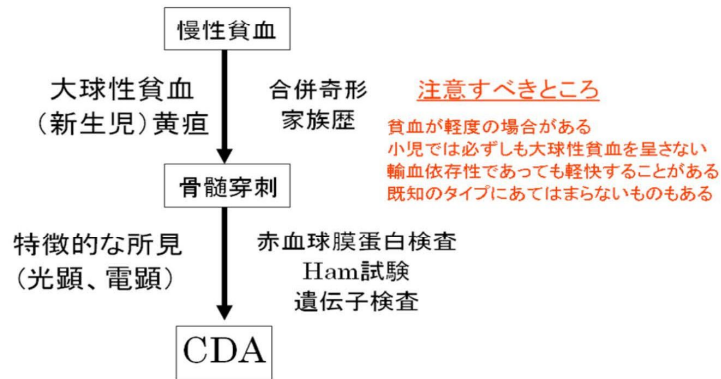
#### ① 疾患概念

鉄芽球性貧血は赤芽球のミトコンドリアに鉄の異常沈着を認める貧血の総称で、遺伝性・後天性の様々な病態が含まれている。遺伝性鉄芽球性貧血については、1945年に Cooley が X連鎖性小球性低色素性貧血を呈する家族性貧血症において赤芽球に鉄顆粒の存在を見出して報告したのが始まりである<sup>1)</sup>。当初報告された X連鎖性小球性低色素性貧血は、後になり赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS2: erythroid specific 5-aminolevulinic acid synthase) をコードする遺伝子の変異による X連鎖性鉄芽球性貧血 (X-linked sideroblastic anemia: XLSA) であることが証明された<sup>2)</sup>。後天性鉄芽球性貧血については、1956年に現在の骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome: MDS) に相当する慢性不応性貧血に

同様な鉄芽球が認められること、薬剤やアルコール常飲者でも本病態がみられることが報告され、1965年に鉄芽球性貧血の概念が確立された<sup>1)</sup>。現在では鉄芽球性貧血は遺伝性のものより後天性つまり MDS に伴うものが多いことが明らかとなっている。遺伝性鉄芽球性貧血の原因として ALAS2 遺伝子の変異が最も多く報告されているが、その他にも鉄-硫黄クラスター合成・輸送に関わる遺伝子、ミトコンドリア DNA 遺伝子、ミトコンドリアトランスポーター遺伝子、ミトコンドリア tRNA 関連遺伝子など複数の遺伝子の変異が報告されている。表 1 に主な遺伝性鉄芽球性貧血とその原因遺伝子を示す。ただし、原因遺伝子が同定されない遺伝性鉄芽球性貧血も多く、既報の遺伝子以外にも原因となる遺伝子が存在すると考えられている。

## V Congenital Dyserythropoietic Anemia (CDA)

### 診断のフローチャート



- 赤血球・赤芽球系の形態異常を伴う慢性貧血の診断に際しては congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の鑑別診断を行う。
- 先天性溶血性貧血と診断されていた症例が後から CDA と診断されることがしばしばあり、他の先天性貧血や dyserythropoiesis を伴う先天異常疾患の除外が必須である。
- 特徴的な形態所見は光顕のみならず電顕でも認められる。II 型においては Ham 試験が陽性となる。
- 最近、各病型の責任遺伝子が次々と明らかになっており、確定診断に有用である。

### 診断へのアプローチ

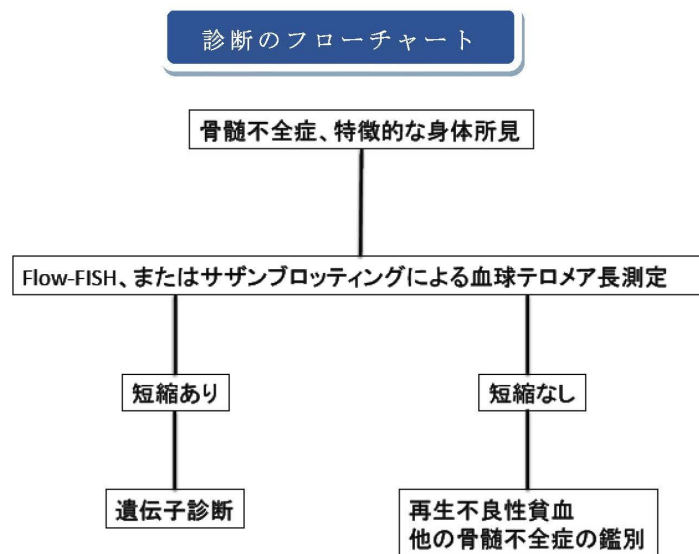
#### ① 疾患概念

CDA は 1966 年に Crookston らによって提唱された赤芽球系細胞の成熟障害と骨髄内溶血による赤芽球系無効造血を呈する先天性疾患群で、慢性貧血、黄疸、胆石、脾腫および続発性ヘモクロマトーシスを来す。赤血球系の障害は赤芽球系前駆細胞レベルから生じ、形態異常は多染性および正染性赤芽球レベルで著明である。1968 年に Heimpel と Wendt が形態異常に基づいてこれらの疾患群を I 型から III 型の 3 病型に分類した(表 1)<sup>1)</sup>。今でもこの分類が広く用いられているが、CDA が疑われながらこの 3 病型に該当しない亜型も散見される(表 2)<sup>2)</sup>。

#### ② 診断基準

診断基準(表 3)にあるような家族歴、既往歴、身体所見、検査所見や、骨髄での赤芽球過形成と形態異常(クロマチン架橋、多核赤芽球、巨赤芽球変化など)<sup>2)</sup>、および末梢血での赤血球形態異常(大小不同、奇形赤血球、多染性、塩基性斑点など)と網赤血球減少などの赤芽球系無効造血を示唆する所見が見られる場合は CDA の可能性を疑い、他疾患(表 4)を除外した上で、遺伝子検査を行い診断確定する。注意すべき点として、貧血は臨床上問題にならないほど軽度の場合があること、輸血依存であっても成長とともに改善することがあること、小児やサラセミア合併例では

## VI 先天性角化不全症



●特徴的な身体的異常、骨髄不全、家族歴などから先天性角化不全症（Dyskeratosis congenita：DC）が疑われる場合には、末梢血を用いてFlow-FISHまたはサザンブロッティングを用いた血球テロメア長測定を行う。

●また、身体的特徴を有さない再生不良性貧血患者の中にも、テロメア長の短縮とテロメア関連遺伝子の異常を有する患者がいることが明らかになっているため、再生不良性貧血患者に対しては、診断時にテロメア長測定を行う事が望ましい。

●我が国では検査会社でこのような検査は行っていないため、検査が行える施設に問い合わせた検査を依頼する。特徴的な身体所見があり、テロメア長の著明な短縮が証明できれば診断が確定する。遺伝子診断は男性であればまずDKC1の変異解析を行う。DKC1に変異がない男性患者、または女性であればそれ以外の遺伝子変異について解析を進めるが、既知の遺伝子異常は約半数にしか見られない。

### 診断へのアプローチ

#### ①疾患概念

DCは、テロメア長の維持機能の障害を背景とし爪の萎縮、口腔内白斑、皮膚色素沈着を3徴とする先天性造血不全症候群である<sup>1)</sup>。DCは古典型DCの他に図に示すような低身長、小脳低形成、小頭症、網膜症、免疫などを伴う重症型であるHoyeraal-Hreidarsson症候群やRevesz症候群の

他、DCに特徴的な身体的異常を伴わず臨床的に再生不良性貧血、骨髄異形性症候群、家族性肺線維症などと鑑別が難しい不全型が存在する（図1）<sup>2-5)</sup>。これらの疾患は病像が異なるものの、共通してテロメア長の短縮や、テロメア関連遺伝子の変異がみられることから、一連の疾患と考えられている<sup>6)</sup>。



## VII Shwachman-Diamond 症候群

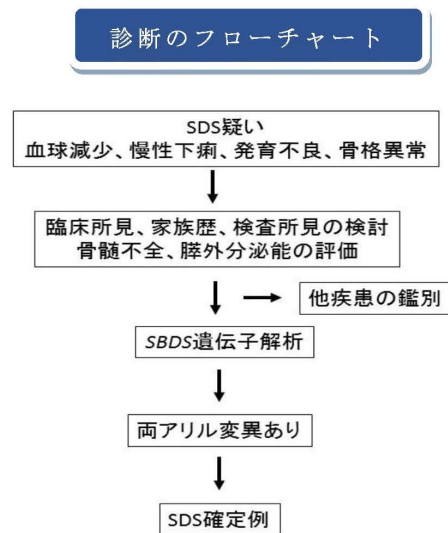


図1 診断フローチャート (SDS, Shwachman-Diamond syndrome)

●血球減少を来した患者で、慢性下痢、発育不良、骨格異常を認めた場合、Shwachman-Diamond 症候群 (Shwachman-Diamond syndrome: SDS) を疑う。血球減少は好中球減少が主体であるが、貧血、血小板減少を認める場合もあり、その程度もさまざまである。慢性下痢は膵外分泌不全による脂肪性下痢であるが、年長になるにつれて軽減し目立たなくなることが多い。低身長もよくみられる所見である。診断の鍵となる症状は、程度がさまざまで、経時的に変化することがあり、必ずしも同時に存在しないため、時間をかけて診断に至る場合もあることに留意する。疑い例では、SDS にみられる臨床所見、検査所見について検索し、家族歴を聴取し、骨髄不全、膵外分泌不全の評価を行う。併せて血球減少の原因となる他疾患の鑑別を行う。

●SDS では特異的なスクリーニング検査がなく、臨床診断例の 90% に *SBDS* 遺伝子の両アリル変異が認められるため、疑い例では *SBDS* 遺伝子解析を行う。*SBDS* 遺伝子の両アレルに変異が認められれば SDS 確定例と診断する。現在のところ *SBDS* 以外の原因遺伝子は報告されておらず、*SBDS* 遺伝子両アリル変異が認められない場合には、その他の骨髄不全の原因を検索しながら SDS 臨床診断例あるいは疑い例としてフォローする。近年、次世代シーケンサーを用いて先天性骨髄不全の原因遺伝子を網羅的に解析するターゲットシーケンス法が他疾患を含めた診断に有用であると報告されている。

### 診断へのアプローチ

#### ① 緒言

SDS は、1964 年に Shwachman らによって初めて記載された、膵外分泌不全、骨髄不全、骨格異常を主徴とし、常染色体劣性の遺伝形式をとる

先天性骨髄不全症候群である<sup>1)</sup>。造血器異常の他、骨格異常、肝障害等多彩な合併症を伴うことも多く、骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome: MDS) および急性骨髄性白血病 (acute

## VIII 先天性好中球減少症

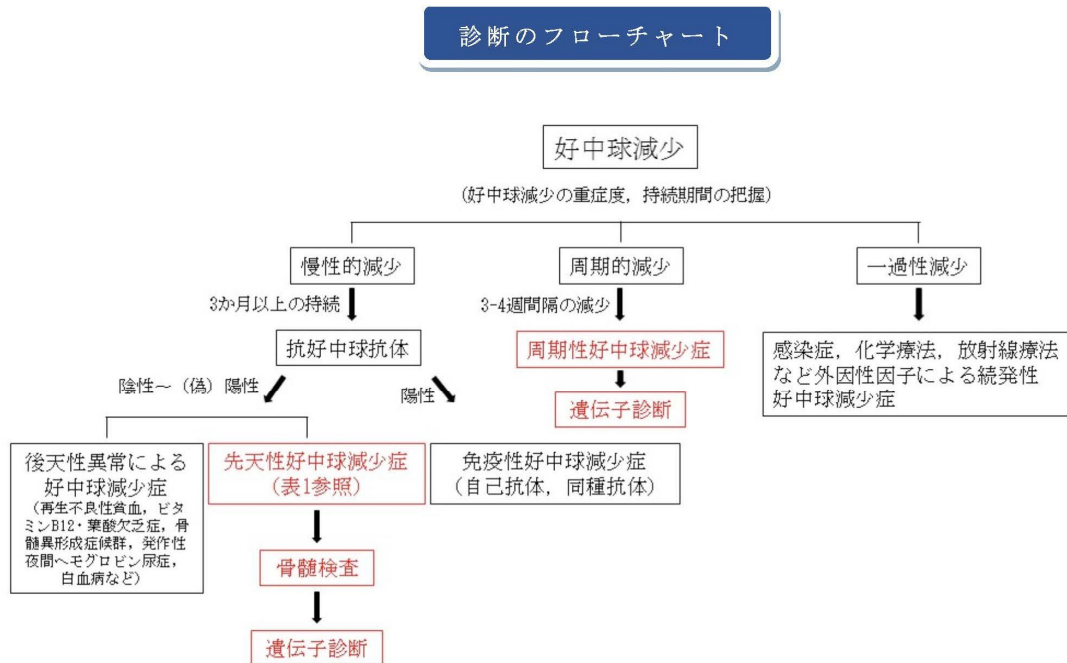


図1 好中球減少症：診断フローチャート

図1 好中球減少症：診断フローチャート（表1参照）

●好中球減少は末梢血好中球の絶対数（absolute neutrophil count, ANC）が  $1,000 \sim 1,500/\mu\text{l}$  以下に減少した状態を定義するが、臨床的に細菌を中心とした病原体に易感染性を呈するのは  $500/\mu\text{l}$  以下である。特に重症感染症の危険性が高くなるのは  $200/\mu\text{l}$  以下の場合である。

●先天性好中球減少症（congenital neutropenia）の多くの場合、ANCは  $500/\mu\text{l}$  以下が持続し、易感染性が認められる。3か月以上にわたる慢性好中球減少（ある程度の間隔で数回の測定が必要）を認めた場合下記のフローチャートに従って診断をすすめていく<sup>1)</sup>。感染症併発時には一時的にANCが増加する場合もあるので、注意が必要である。

### 診断へのアプローチ

#### ①緒言

先天性好中球減少症は3か月以上にわたって、ANCが  $500 \sim 1,000/\mu\text{l}$  以下の慢性好中球減少を認め、何らかの易感染性を呈することを特徴とする。

好中球数は年齢、人種間で差があり、特に乳児期のANCは低めであることの認識が重要である。先天性好中球減少症の多くは遺伝性疾患であり、責任遺伝子が同定されている。2015年の

## IX 先天性血小板減少症

### 診断のフローチャート

フローチャートは図 1・図 2 参照

- 日常診療において血小板減少を見る機会は少なくない。血小板減少をきたす原因は多岐にわたるが、血小板の産生低下、消費あるいは破壊の亢進、脾機能亢進に大別される。多くの場合は後天的要因によるものであり、肝硬変、SLE、特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura: ITP)、急性白血病、再生不良性貧血などが原因にあげられる。
- 先天性血小板減少症はきわめてまれであると考えられてきたが、従来考えられていた程まれではなく、日常診療において十分遭遇する頻度で存在することが明らかになっている。
- また、確定診断がつかないために ITP と診断されステロイドなどによる不必要な治療を受けることも少なくない。慢性 ITP と診断される症例の 10% 程度には先天性血小板減少症が含まれていると考えられる。
- また、汎血球減少を呈する先天性骨髄不全症候群では血小板減少が先行することも多い。先天性血小板減少症の治療は補充療法が中心となるが、不必要な治療を施行しないためにも確定診断は重要である。

### 診断へのアプローチ

#### ① 疾患概念

巨核球の増殖・分化異常、あるいは巨核球からの血小板放出機構の異常により血小板数が減少する先天性疾患である。

#### ② 分類

先天性血小板減少症は単一の疾患ではなく原因は様々である。現在では 20 数種類の原因遺伝子が判明している。遺伝形式や原因遺伝子別により分類可能であるが、臨床的には血小板サイズによる分類が容易で理解しやすく、血小板サイズが

小型である先天性血小板減少症、正常大血小板の先天性血小板減少症、血小板サイズが大型である先天性巨大血小板性血小板減少症に分類される<sup>1,2)</sup>。疾患一覧を表 1 に示す。

血小板サイズの指標となる平均血小板容積 (Mean platelet volume: MPV, 正常値 7-12fl) は自動血球計数装置から算出されるが、大型血小板が存在する場合は不正確になるため MPV 値のみで血小板サイズを評価してはならない。そのため、末梢血塗抹標本上での血小板形態観察と血小板