

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 α IIb β 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 α IIb β 3 causing autosomal dominant macrothrombocytopenia with abnormal α IIb β 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兒. **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兒. **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).