

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断基準・重症度分類・診断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 伊藤悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）  
研究協力者 土岐 力（弘前大学大学院医学研究科小児科学 講師）  
神尾卓哉（弘前大学医学部附属病院小児科 助教）  
佐藤知彦（弘前大学医学部附属病院小児科 助教）  
小林明恵（弘前大学大学院医学研究科 大学院生）

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19種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子と *GATA1*、*TSR2*、*EPO* 遺伝子が同定されている。しかし、我が国のDBA患者の約40%は原因遺伝子が不明である。本年度も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15例中8例（60%）に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに215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、127例（59.1%）に原因となるRP遺伝子変異を見出した。本年度は、2000～2018年の間に、我々が遺伝子診断を行ったDBA患者（165名）の追跡調査を行った。その結果、27例が造血幹細胞移植を受けていたことが明らかになった。3年全生存率は95.2%、3年無治療生存率は88.4%と極めて治療成績が良好であった。さらに、骨髄破壊的前処置と強度減弱前処置の間で治療成績に有意差が認められなかった。本年度の後方視的調査により、DBAの移植前処置に関する貴重なデータが集積された。これらのデータをもとに、エビデンスに基づいた「DBAの診療ガイドライン」の小改訂を行った。また、難病プラットフォーム（AMED 松田班）を用いた「遺伝子診断の結果も含む精度の高い先天性骨髄不全症候群のレジストリ」の構築を進めた。

#### 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19種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子と *GATA1*、*TSR2*、*EPO* 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、オミックス解析拠点（宮野班）日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業や原発性免疫不全班とも連携し、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。本年度は、難病プラットフォーム（AMED 松田班）を用いた「遺伝子診断の結果も含む精度の高い先天性骨髄不全

症候群のレジストリ」の構築を進め、診療ガイドラインの小改訂を行う。2020～2021年度は、データ収集と観察研究を継続し、正確な先天性骨髄不全症候群の実態把握を行い、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、解析を行った。

### C . 研究結果

新規症例15名の遺伝子診断を行い、8例で既知の原因遺伝子 (*RPS19* 4例、*RPS26* 2例、*RPL5* 1例、*RPS17* 1例) を同定した。これまでに215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、原因となるRP遺伝子変異を見出した症例数は、127例 (59.1%) となった。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治療ガイドラインの小改訂を行った。

本年度は、2000年～2018年までに遺伝子診断を行った186名のDBA患者の主治医にアンケート調査を行い、165名 (88.7%) について回答が得られた。同種造血幹細胞移植 (HSCT) を受けた時の平均年齢は3.6歳で、HSCT後の平均経過観察期間は40ヶ月であった。幹細胞ソースは、骨髄血が25例 (HLA一致同胞  $n = 5$ 、HLA不一致血縁者  $n = 2$ 、HLA一致非血縁者  $n = 12$ 、HLA不一致非血縁者  $n = 6$ )、臍帯血 (HLA不一致非血縁者) が2例であった。前処置は、骨髄破壊的 (MAC) が12例で、強度減弱 (RIC) が15例であった。RICのうち、ブスルファンを含むものは2例のみであった。移植を受けた27例全例で生着が得られ、25例は治療が不要となった。MACで移植を受けた3症例で、肝中心静脈閉塞症を合併した。3年全生存率 (OS) は95.2%、3年無治療生存率 (FFS) は88.4%と極めて治療成績は良好であった。さらに、MACとRICの間で治療成績に有意差を認めなかった。

難病プラットフォーム (AMED 松田班) を用いた「遺伝子診断の結果も含む精度の高い先天性造血不全のレジストリ」の構築を進めるため、研究計画書を作成し、京都大学医学部の「医の倫理委員会」に中央倫理審査を依頼した。

### 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。しかし、まだ約40%が原因遺伝子不明であり、長期予後については、全体像が明らかではない。長期予後を含めた精度の高いデータベースの構築が必要であるが、難病プラットフォームの利用により、広く利用可能なデータベース構築が可能と思われる。

HSCTは、DBAの造血障害に対する唯一の根治療法である。しかし、DBA患者に対する最適の前処置に関するデータはわずかしかない。我々は、MACあるいはRICでHSCTを受けたDBA症例の予後を後方視的に比較した。その結果、RICで行ったHSCTもDBAに対して有効であり、良好なOSとFFSが得られることが明らかとなった。

### E . 結論

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。難病プラットフォームの利用により、広く利用可能なデータベース構築が可能と思われる。

本年度の疫学調査により、DBAに対する移植前処置に関する貴重なデータが集積された。最適な移植前処置を検討するための重要なデータが集積しつつある。

本研究班の成果にもとに診療ガイドラインの小改訂を行った。

### F . 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Mori M, Hira A, Yoshida K, Muramatsu H, Okuno Y, Shiraishi Y, Anmae M, Yasuda J, Tadaka S, Kinoshita K, Osumi T, Noguchi Y, Adachi S, Kobayashi R, Kawabata H, Imai K, Morio T, Tamura K, Takaori-Kondo A, Yamamoto M, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S, Matsuo K, Yabe H, Yabe M, Takata M. Pathogenic mutations identified by a multimodality approach in 117 Japanese Fanconi anemia patients. **Haematologica**. 2020;105(4):1166-1167. doi: 10.3324/haematol.2019.245720.
- 2) Takahashi N, Kudo K, Tanaka M, Kumagai N,

- Sato T, Kamio T, Sasaki S, Terui K, Kurose A, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Ito E. A Rapid Cytologic Double Staining of Epstein-Barr Virus-encoded Small RNA and Cell Surface Markers for Diagnosis of Epstein-Barr Virus-associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2019. doi: 10.1097/MPH.0000000000001647. [Epub ahead of print]
- 3) Terui K, Toki T, Taga T, Iwamoto S, Miyamura T, Hasegawa D, Moritake H, Hama A, Nakashima K, Kanezaki R, Kudo K, Saito AM, Horibe K, Adachi S, Tomizawa D, Ito E. Highly sensitive detection of GATA1 mutations in patients with myeloid leukemia associated with Down syndrome by combining Sanger and targeted next generation sequencing. **Genes Chromosomes Cancer.** 2019 Oct 13. doi: 10.1002/gcc.22816. [Epub ahead of print]
  - 4) Takahashi Y, Terui K, Chinen Y, Tandai S, Kudo K, Sasaki S, Tono C, Taki T, Ito E. A pediatric case of secondary T-cell acute lymphoblastic leukemia with KMT2A-MAML2 developing after hepatoblastoma treatment. **Pediatr Blood Cancer.** 2019:e28033. doi: 10.1002/pbc.28033.
  - 5) Kedar PS, Harigae H, Ito E, Muramatsu H, Kojima S, Okuno Y, Fujiwara T, Dongerdiye R, Warang PP, Madkaikar MR. Study of pathophysiology and molecular characterization of congenital anemia in India using targeted next-generation sequencing approach. **Int J Hematol.** 2019;110(5):618-626. doi: 10.1007/s12185-019-02716-9.
  - 6) Kubota Y, Uryu K, Ito T, Seki M, Kawai T, Isobe T, Kumagai T, Toki T, Yoshida K, Suzuki H, Kataoka K, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Ohki K, Kiyokawa N, Kagawa J, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis revealed heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. **Cancer Sci.** 2019;110(10):3358-3367. doi: 10.1111/cas.14160.
  - 7) Watanabe A, Inukai T, Kagami K, Abe M, Takagi M, Fukushima T, Fukushima H, Nanmoku T, Terui K, Ito T, Toki T, Ito E, Fujimura J, Goto H, Endo M, Look T, Kamps M, Minegishi M, Takita J, Inaba T, Takahashi H, Ohara A, Harama D, Shinohara T, Somazu S, Oshiro H, Akahane K, Goi K, Sugita K. Resistance of t(17;19)-acute lymphoblastic leukemia cell lines to multiagents in induction therapy. **Cancer Med.** 2019;8(11):5274-5288. doi: 10.1002/cam4.2356.
  - 8) Labuhn M, Perkins K, Matzk S, Varghese L, Garnett C, Papaemmanuil E, Metzner M, Kennedy A, Amstislavskiy V, Risch T, Bhayadia R, Samulowski D, Hernandez DC, Stoilova B, Iotchkova V, Oppermann U, Scheer C, Yoshida K, Schwarzer A, Taub J, Crispino JD, Weiss MJ, Hayashi A, Taga T, Ito E, Ogawa S, Reinhardt D, Yaspo ML, Campbell PJ, Roberts I, Constantinescu S, Vyas P, Heckl D, Klusmann JH. Mechanisms of Progression of Myeloid Preleukemia to Transformed Myeloid Leukemia in Children with Down Syndrome. **Cancer Cell.** 2019;36(2):123-138.e10. doi: 10.1016/j.ccell.2019.06.007.
  - 9) Miura F, Shimada J, Kitagawa Y, Otani K, Sato T, Toki T, Takahashi T, Yonesaka S, Mizukami H, Ito E. MYH7 mutation identified by next-generation sequencing in three infant siblings with bi-ventricular noncompaction presenting with restrictive hemodynamics: A report of three siblings with a severe phenotype and poor prognosis. **J Cardiol Cases.** 2019;19(4):140-143. doi: 10.1016/j.jccase.2018.12.017.
  - 10) Kohara H, Utsugisawa T, Sakamoto C, Hirose L, Ogawa Y, Ogura H, Sugawara A, Liao J, Aoki T, Iwasaki T, Asai T, Doisaki S, Okuno Y, Muramatsu H, Abe T, Kurita R, Miyamoto S, Sakuma T, Shiba M, Yamamoto T, Ohga S, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Kojima S, Kanno H, Tani K. KLF1 mutation E325K induces cell cycle arrest in erythroid cells differentiated from congenital dyserythropoietic

anemia patient-specific induced pluripotent stem cells. **Exp Hematol.** 2019;73:25-37 2019;73:2.e8. doi: 10.1016/j.exphem.2019.03.001.

## 2. 学会発表

- 1) Taga T, Tanaka S, Terui K, Iwamoto S, Hiramatsu H, Miyamura T, Hashii Y, Hasegawa D, Moritake H, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, to E, Koh K, Hasegawa D, Hama A, M. Saito A, Adachi S, Tomizawa D: Post-induction minimal residual disease measured by flow cytometry and deep sequencing of mutant *GATA1* are both significant prognostic factors for children with myeloid leukemia and Down syndrome: a nationwide prospective study of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. **The 61<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting**( 2019 年 12 月 7-10 日 ,米国・オーランド ). ( ポスター )
- 2) Kudo K, Kanezaki R, Imamura M, Imai C, Irie M, Sasahara Y, Ando K, Kakuda H, Doi T, Kawaguchi H, Kudo K, Kanegane H, Toki T, Ito E. *BRAF<sup>V600E</sup>-POSITIVE PRECURSORS AS MOLECULAR MARKERS OF BONE MARROW INVOLVEMENT IN PEDIATRIC LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS.* **The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the Histiocyte Society** ( 2019 年 11 月 3-5 日 ,米国・メンフィス ). ( ポスター )

## G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし