

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

日本における先天性溶血性貧血の病型別頻度と 脱水型遺伝性有口赤血球症（遺伝性乾燥赤血球症）の迅速診断法確立

研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学 教授）
研究協力者 小倉浩美（東京女子医科大学 非常勤講師）
槍澤大樹（東京女子医科大学 講師）
山本俊至（東京女子医科大学 教授）

研究要旨：2014 から 2019 年の 5 年間に溶血性貧血 319 例を解析し、全体の 72.1% に病型を確定した。遺伝性球状赤血球症が 34.5%、脱水型遺伝性有口赤血球症（DHS_t）が 7.5%、次いでグルコース-6-リン酸脱水素酵素欠乏症の順で頻度が多いことがわかった。遺伝子パネル検査の導入により赤血球膜・酵素の複合異常症例も同定可能になった。DHS_t 症例は輸血非依存性ヘモクロマトーシス発症例が男性例に多く、特に *PIEZO1* 変異例では脾臓摘出術後の重篤な静脈血栓症が惹起するため、今後溶血性貧血の鑑別診断において必ず DHS_t の可能性を否定する必要があると考えられた。

A．研究目的

先天性溶血性貧血は主として赤血球膜、酵素およびヘモグロビンの異常によって赤血球寿命が短縮することで発症する単一遺伝子疾患である。厚生労働省平成10年度疫学調査班（大野班）による調査研究では1998（平成10）年までに発症した溶血性貧血397症例を対象にした場合、先天性は66例（16.6%）となっているが、0～9歳に発症した先天性溶血性貧血は一例も登録されていなかった。2004～2008年に東京女子医大で解析した先天性溶血性貧血症例全182例のうち72%が0～9歳で発症しており、日本小児血液・がん学会が2016年5月にまとめた2012～2014年の溶血性貧血登録数では、病型が確定した先天性溶血性貧血症例は毎年平均70例余りとなっている。本研究では、先天性溶血性貧血の病因別症例数を解析し、国内で2番目に高頻度であることが明らかになった脱水型遺伝性有口赤血球症（DHS_t）の迅速診断方法の臨床的有用性について報告する。

B．研究方法

図1 先天性溶血性貧血の診断フローチャート

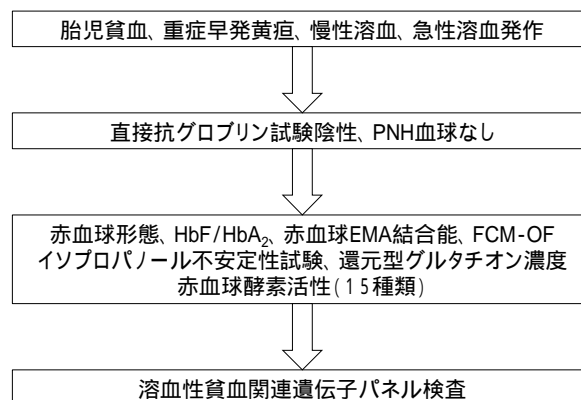


図1に先天性溶血性貧血の診断フローチャートを示す。直接抗グロブリン試験で抗赤血球自己抗体を認めず、CD55/CD59二重陰性赤血球の増加が無い場合、図の流れにしたがって溶血性貧血関連特殊検査を実施する。赤血球膜異常症、酵素異常症の確定診断および生化学的・細胞生物学的な諸検査にて病型診断が困難であった症例に関しては、表1の標的遺伝子に関するTarget-captured sequencing（TCS）解析を実施した。

表1 溶血性貧血関連74遺伝子パネル

1	ADA	20	SPTA1	39	TFR2	58	PIGA
2	ALDOA	21	SPTB	40	SLC40A1	59	UGT1A1
3	AK1	22	ANK1	41	FTH1	60	ABCG8
4	ENO1	23	GYPC	42	ADAMTS13	61	ATP7A
5	G6PD	24	EPB41	43	C3	62	ATP7B
6	GPI	25	STOM	44	CD46	63	GATA1
7	GPX1	26	RHAG	45	CFH	64	ADORA2B
8	GSR	27	PIEZO1	46	CFI	65	ULK1
9	GSS	28	SLC2A1	47	CFHR1	66	BECN1
10	GCLC	29	KCNN4	48	CFHR3	67	PIK3C3
11	HK1	30	ABCG5	49	CFB	68	AMBRA1
12	NT5C3A	31	SEC23B	50	THBD	69	PRKAA1
13	PFKM	32	CDAN1	51	CFHR2	70	ATG9A
14	PGD	33	C15orf41	52	CFHR4	71	TBC1D5
15	PGK1	34	KLF1	53	CFHR5	72	BNIP3L
16	PKLR	35	KIF23	54	DGKE	73	BNIP3
17	TP11	36	HFE	55	PLG	74	FUNDC1
18	EPB42	37	HFE2	56	ATP11C		
19	SLC4A1	38	HAMP	57	COL4A1		

(倫理面への配慮)

東京女子医科大学遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て解析を行った(承認番号284D)。

C. 研究結果

表2に2014から2019年の5年間における東京女子医科大学での溶血性貧血病因解析結果を示す。合計319例を解析し、全体の72.1%に病型を推定し得た。次世代型シーケンサー(NGS)を用いた解析では複数の病因遺伝子変異が同定出来た例があり、赤血球酵素(エノラーゼ)異常症として経過観察していた症例のNGS解析で脱水型遺伝性有口赤血球症(DHSt)の既知遺伝子変異が確認された例を経験した(1)。

表2 過去5年間で検討した先天性溶血性貧血症例の病型別症例数

		2015	2016	2017	2018	2019	合計	病型別頻度
酵素異常症	G6PD	6	5	4	2	4	21	6.6%
	PK	2	0	0	0	3	5	1.6%
	GPI	0	0	1	1	0	2	0.6%
	その他	0	2	0	0	0	2	0.6%
膜異常	HS	16	30	17	24	23	110	34.5%
	HE	0	6	0	2	2	10	3.1%
	HPP	0	1	0	0	0	1	0.3%
	HSst	1	4	7	5	7	24	7.5%
	その他	8	4	3	1	4	20	6.3%
Hb異常症	0	5	3	3	0	11	3.4%	
CDA	1	0	0	0	0	1	0.3%	
酵素・Hb複合異常	0	1	0	0	0	1	0.3%	
酵素・膜複合異常	3	0	1	1	1	6	1.9%	
その他	5	2	5	1	3	16	5.0%	
診断未確定	22	20	16	13	18	89	27.9%	
合計		64	80	57	53	65	319	

G6PD: グルコース-6-リン酸脱水素酵素欠乏症
 PK: ビルビン酸キナーゼ欠乏性貧血
 GPI: グルコースリン酸イソメラーゼ異常症
 HE: 遺伝性楕円赤血球症
 HPP: 遺伝性熱変形赤血球症
 HSst: 遺伝性有口赤血球症
 Hb異常症: 不安定ヘモグロビン症、サラセミア
 CDA: 先天性赤血球形成異常性貧血

5年間で検討した先天性溶血性貧血の病型では、遺伝性球状赤血球症(HS)が最も多く、全体の34.5%を占めていたが、平成10年度報告の71.0%に比べて比率の減少が明らかであった。全体で二番目に高頻度であった病型は脱水型遺伝性有口赤血球症(別名 遺伝性乾燥赤血球症(DHStまたはHx))であり、2012-3年に本症の原因遺伝子が確定したことにより遺伝子解析による診断が可能になったことが背景にあると考えられた(2,3)。前述の平成10年度報告では赤血球酵素異常症、ヘモグロビン異常症がそれぞれ5.9%、4.3%を占めていたが、今回の調査では9.4%、3.4%と全体に対する病型頻度では赤血球酵素異常症の割合が上昇していた。まとめるとDHStは全体、膜異常症の両方で二番目に頻度の高い病型であることが判明した。

表3 1歳未満と1歳以上症例の病型別頻度比較

	1歳以上		1歳未満	
G6PD	18	8.0%	3	3.2%
PK	4	1.8%	1	1.1%
HS	86	38.2%	24	25.5%
HE	8	3.6%	2	2.1%
HSst	24	10.7%	0	0.0%
Hb	12	5.3%	2	2.1%
診断未確定	42	18.7%	47	50.0%
その他	31	13.8%	15	16.0%
合計	225		94	

現在の病型診断システムにおいて診断未確定例は全体の28%程度であるが、検査実施時年齢で1歳未満と1歳以上に分けると、1歳以上では診断未確定例は18.7%、1歳未満では50%に及んでいた(表3)。1歳未満例の一部は新生児期に濃縮赤血球、破碎赤血球、奇形赤血球などの明らかな赤血球形態異常を認め、生後6ヶ月以降に自然軽快する例が含まれている。臨床像、赤血球形態から乳児濃縮赤血球症(infantile pyknocytosis; IP)に類似した病態が考えられた。

表4にDHSt症例の臨床データをまとめた。上から年齢別に並べ、男性例の行はブルーで示した。貧血は軽度ないし中等度であるが、男性例では20歳代から高フェリチン血症を呈して、ヘモクロマトーシス発症が示唆されており、最近海外から発表された総説(4)と同様の傾向を認めた。自験例のなかには2型糖尿病、不妊症などヘモクロマトー

シスによる臓器障害が診断の結果となった例やヘモクロマトーシスによる死亡事例が含まれている。

また、DHS_tにはPIEZO1およびKCNN4 という二つの病因遺伝子が同定されているが、PIEZO1変異例では診断未確定のまま脾臓摘出術を施行されたのちに重篤な静脈血栓症が引き起こされることが明らかになっており、溶血性貧血の鑑別診断において必ずDHS_tの可能性を否定する必要があることが必要と考えられた。

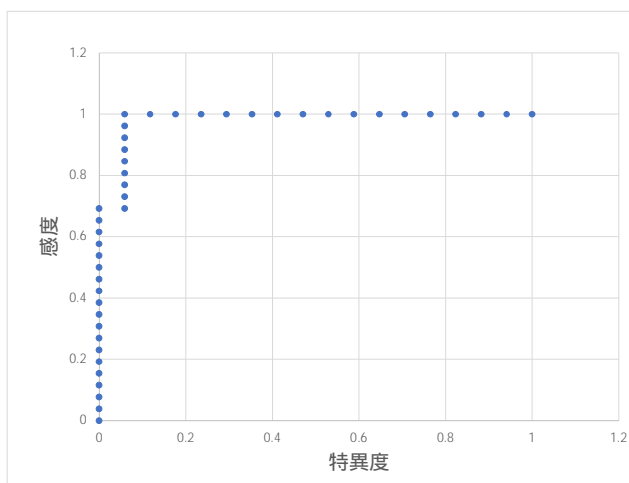
表4 DHS_t症例の臨床像、血液・生化学検査データ

性別	診断時年齢	輸血型	Hb g/dL	Ret %	RPI	I-Bil mg/dL	LDH IU/L	Ferritin ng/mL	HbA _{1c} %	
1	M	7	1ヶ月時	10.1	6.4	2.7	4.8	239	87.1	-
2	F	14	交換輸血	10.7	23.9	11.3	6.3	191	-	-
3	F	16	6歳時	11.0	6.7	3.2	6.7	142	305.1	-
4	F	19	-	15.6	13.8	14.9	0.9	144	108.7	4.1
5	F	22	-	10.4	9.6	4.7	4.5	219	158	-
6	M	28	25歳時	10.1	11.5	4.9	6.8	175	1663	-
7	F	32	4歳時	10.4	11.2	5.6	4.3	138	1450	-
8	M	39	輸血依存	8.4	12.6	3.4	15.7	284	2537.3	4.8
9	F	42	-	12.8	5.5	3.2	0.3	NT	8.1	4.7
10	M	69	59歳時	13.5	7.1	5.9	2.6	157	649.5	3.6

RPI: 網赤血球産生指数 (RPI) ; 網赤血球 (%) * 患者Ht / 正常Ht (40) * 1 / 網赤血球成熟日数
 正常: 1, AIHA (中央値): 2.8, 無効造血: 2未満

DHS_tの診断は臨床像、血液所見および表1に示した溶血性貧血関連遺伝子パネルを用いたTCS解析結果を総合して判断することが肝要であるが、TCS解析データ解析は時間が掛かり、特に新規の塩基変化が検出された場合、その臨床的意義付けはしばしば困難である(1)。我々はこの数年間、患者赤血球を用いた定量的浸透圧脆弱性試験 (FCM-OF)がDHS_t症例の鑑別に有用であることを示してきた。今回DHS_t33症例に対してFCM-OFにおける残存赤血球率 (%RRC)を正常対照と比較し、2群のExact Wilcoxon rank sum testを行った結果、(p-value = 0.004662)、AUC=0.9819、Cut-off値87.7~98.4)と有意な結果を得た(図2)。

図2 ROC曲線 DHS_t vs 正常対照



%RRCによるDHS_t診断において注意すべきことは、鉄欠乏性貧血やサラセミアなどの小球性貧血における%RRC上昇例の除外である。今回の検討で、MCV > 90例を対象にした場合、上記疾患における偽陽性が排除できることが明らかになった。FCM-OFはHSやHEの診断のみならず、DHS_tの診断に極めて有用と考えられた。

D. 考察

PIEZO1、KCNN4という二つの病因遺伝子が明らかになった2012-2013年以降、DHS_tの確定診断に遺伝子解析が有用であることが示された。しかし、実臨床ではより迅速かつ簡便なスクリーニング法が必要であり、欧米ではOsmotic-gradient ektacytometry (OGE)を用いた検査が赤血球膜異常症のスクリーニングに用いられており、OGEをDHS_t診断に用いることが試行されている。しかし、OGEはPIEZO1変異によるDHS_t症例の検出は可能だが、KCNN4変異によるDHS_tでは対照との間に差異は認められず、別のスクリーニング方法の開発が必要と考えられる。

今回単一施設での検討であるが、日本における先天性溶血性貧血の病因としてDHS_tがHSについて高頻度であることが明らかになり、病型診断結果を待たずに脾摘を受けた患者において重篤な静脈血栓症が起きていることが判明した。加えてDHS_t症例では10代以降鉄過剰傾向が明らかになり、特に月経による生理的な鉄喪失が生じない男性では血清フェリチン値が20歳代から1000以上となり、高率にヘモクロマトーシスが発症していることが分かった。

日本では小児慢性特定疾病として、HS、口唇赤血球症 (DHS_tを含む)、鎌状赤血球症、不安定ヘモグロビン症、サラセミア、グルコース-6-リン酸脱水素酵素欠乏症、ピルビン酸キナーゼ欠乏性貧血およびその他の溶血性貧血が指定されているが、未だ先天性溶血性貧血の各病型は指定難病になっていない。DHS_t以外の病型についてもG6PDやPKなどの赤血球酵素異常症、重症HSやHEの重症型としてのHPPなどの赤血球膜異常症、不安定ヘモグロビン症などの症例は慢性溶血性貧血や急性溶血発作時に必要な赤血球輸血依存性のヘモクロマトーシスだけでなく溶血・無効造血に基づくヘモクロマトーシス発症例が散見されていて、現状では赤血球輸血に

よるヘモクロマトーシスのみが適応が認められている経口鉄キレート剤が使用出来ない状況がある。

E . 結論

今後、日本に於ける先天性溶血性貧血の詳細な疫学調査を実施するとともに、各病型の診断基準・重症度分類および診療ガイドラインの策定が必要と考えられる。

【参考文献】

- 1: 槍澤大樹, 他. 先天性溶血性貧血診断における網羅的遺伝子検査の有用性. 臨床血液 59:1497, 2018.
- 2: Zarychanski R, et al. Mutations in the mechanotransduction protein PIEZO1 are associated with hereditary xerocytosis. *Blood*. 2012;120:1908-1915.
- 3: Albuissou J, et al. Dehydrated hereditary stomatocytosis linked to gain-of-function mutations in mechanically activated PIEZO1 ion channels. *Nat Commun*. 2013;4:1884.
- 4: Picard V, et al. Clinical and biological features in *PIEZO1*-hereditary xerocytosis and Gardos channelopathy: a retrospective series of 126 patients. *Haematologica*. 2019;104:1554-1564.
- 5: Andolfo I, et al. Gain-of-function mutations in *PIEZO1* directly impair hepatic iron metabolism via the inhibition of the BMP/SMADs pathway. *Am J Hematol*. 2020;95:188-197.
- 6: Llaudet-Planas E, et al. Osmotic gradient ektacytometry: A valuable screening test for hereditary spherocytosis and other red blood cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol*. 2018;40:94-102.
- 7: Kwon G, Okahashi A, Nagano N, Nozaki C, Nakahara E, Fuwa K, Yagasaki H, Kanno H, Morioka I. Unexplained late-onset hemolytic jaundice preceded by high fetal hemoglobin level in an extremely low birth weight infant. *Clin Lab*. 2020;66(1). doi: 10.7754/Clin.Lab.2019.190625.
- 2) Tanaka J, Tanaka N, Wang YH, Mitsuhashi K, Ryuzaki M, Iizuka Y, Watanabe A, Ishiyama M, Shinohara A, Kazama H, Hagiwara S, Yoshinaga K, Kougen Y, Kobayashi H, Kanno H, Shiseki M. Phase I study of cellular therapy using ex vivo expanded NK cell from autologous peripheral blood mononuclear cells combined with rituximab-containing chemotherapy for relapsed CD20-positive malignant lymphoma patients. *Haematologica*. 2019;105:e190-e193.
- 3) 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.
- 4) Kamio H, Uchiyama T, Kanno H, Onoe Y, Saito K, Kameoka S, Kamio T, Okamoto T. Association between *SLCO1B1* rs4149056 and tegafur-uracil-induced hepatic dysfunction in breast cancer. *Pharmacogenomics* 2019;20:353-365.
- 5) Bianchi P, Fermo E, Glader B, Kanno H, Agarwal A, Barcellini W, Eber S, Hoyer JD, Kuter DJ, Maia TM, Mañu-Pereira MDM, Kalfa TA, Pissard S, Segovia JC, van Beers E, Gallagher PG, Rees DC, van Wijk R. Addressing the diagnostic gaps in pyruvate kinase deficiency: Consensus recommendations on the diagnosis of pyruvate kinase deficiency. *Am J Hematol*. 2019;94:149-161.
- 6) Yamamoto-Shimajima K, Imaizumi T, Akagawa H, Kanno H, Yamamoto T. Primrose syndrome associated with unclassified immunodeficiency and a novel *ZBTB20* mutation. *Am J Med Genet A*. 2020;182:521-526.
- 7) 羽賀洋一, 高橋浩之, 三井一賢, 中村俊紀, 松

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kwon G, Okahashi A, Nagano N, Nozaki C, Nakahara E, Fuwa K, Yagasaki H, Kanno H, Morioka I. Unexplained late-onset hemolytic jaundice preceded by high fetal hemoglobin level in an extremely low birth weight infant. *Clin Lab*.

岡正樹, 小嶋靖子, 小倉浩美, 菅野仁, 服部幸夫, 小原明. 遺伝性メトヘモグロビン血症I型の兄弟例. **日本小児科学会雑誌** 2019;123: 861-865.

2. 学会発表

- 1) 青木貴子, 小倉浩美, 槍澤大樹, 山本俊至, 中原衣里菜, 谷ヶ崎博, 森岡一朗, 菅野仁. 先天性溶血性貧血関連遺伝子パネルを用いた新生児溶血性疾患の病因解明. **日本人類遺伝学会第64回大会** (2019年11月6-9日, 長崎).
- 2) 鎌谷直之, 降旗謙一, 谷口敦夫, 福内友子, 山岡法子, 金子希代子, 菅野仁. 健常人とサラセミア、異常ヘモグロビン血症患者から得た赤血球におけるイノシンによるATP増強. **第52回日本痛風・核酸代謝学会総会** (2019年2月14-15日, 東京). **痛風と尿酸・核酸** 2019;43:82-83.
- 3) 菅野仁. 難病血液疾患の病態、診断、治療(輸血を含む)溶血性貧血. **第67回日本輸血・細胞治療学会学術総会** (2019年5月23-25日, 熊本). **日本輸血細胞治療学会誌** 2019;65: 289.
- 4) 豊間優里子, 鶴田敏久, 谷諭美, 金子裕貴, 花谷あき, 千葉幸英, 中舘尚也, 山城安啓, 服部幸夫, 菅野仁, 永田智. パルスオキシメーターにて酸素飽和度異常低値を示した不安定ヘモグロビン症の2例. **第122回日本小児科学会学術集会** (2019年4月19-21日, 金沢). **日本小児科学会雑誌** 2019;123:493.
- 5) 金子裕貴, 鶴田敏久, 杉本圭, 平澤恭子, 菅野仁, 永田智. 2歳以降に輸血依存性になった赤芽球癆の1例. **第122回日本小児科学会学術集会** (2019年4月19-21日, 金沢). **日本小児科学会雑誌** 2019;123:492.
- 6) Nishimura A, Miyakawa Y, Murakoshi M, Shimbo A, Ishiguro R, Kajiwara M, Shibuya A, Ogura H, Kanno H, Koh K, Minosaki Y, Nishioka M, Shimohira M. A case of hereditary spherocytosis with *ANK1* mutation and *SLC4A1* variant with persistent severe anemia. **第61回日本小児血液・がん学会** (2019年11月14-16日, 広島). **日本小児血液・がん学会雑誌** 2019;56:280.

- 7) Bianchi P, Glader B, Grace R, Kanno H, Layton DM, Beers EJ, Corrons JL, Hua L, Jones B. A global longitudinal observational study of patients with pyruvate kinase deficiency. **The 2019 American Society of Pediatric Hematology/Oncology Conference (ASPHO)** (2019年5月1-4日, 米国・ニューオーリンズ).
- 8) Ogura H, Utsugisawa T, Aoki T, Kinoshita A, Okamoto Y, Kawakami T, Yamamoto T, Kanno H. Differential diagnosis of congenital hemolytic anemia of neonates and infants in Japan. **The 24th European Hematology Association (EHA) congress** (2019年6月13-16日, オランダ・アムステルダム).
- 9) Utsugisawa T, Uchiyama T, Aoki T, Kinoshita A, Okamoto Y, Kawakami T, Ogura H, Toki T, Yamamoto T, Ohara A, Ohga S, Ito E, Kanno H. Meta-analysis using data of red blood cell enzyme assay and proteome in patients with Diamond-Blackfan anemia. **The 24th European Hematology Association (EHA) congress** (2019年6月13-16日, オランダ・アムステルダム).
- 10) 菅野仁. (依頼講演) 先天性溶血性貧血～新生児期における鑑別診断の重要性. **第125回東京新生児研究会** (2019年9月, 東京).
- 11) Hagiwara S, Wang Y, Kobayashi H, Kato Y, Tanaka N, Iizuka Y, Watanabe A, Ishiyama M, Shinohara A, Kazama H, Yoshinaga K, Shiseki M, Kanno H, Tanaka J. Ex-vivo expanded NK cell therapy combined with Elotuzumab for MRD after autologous stem cell transplantation: A Phase I/II clinical trial in progress. **The 61th American Society of Hematology Annual Meeting** (2019年12月7-10日, 米国・オーランド).

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし