

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）

**先天性骨髄不全症の登録システムの構築と
診断ガイドラインの作成に関する研究**

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

・ 総括研究報告書	1
伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授)	
・ 分担研究報告書	
1 . 遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データ・遺伝子解析	33
張替 秀郎 (東北大学大学院医学系研究科血液免疫病学分野 教授)	
2 . ファンconi貧血の臨床データ解析・遺伝子診断・診断ガイドラインの作成	37
矢部 普正 (東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 准教授)	
3 . Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の臨床データ解析	41
真部 淳 (聖路加国際病院小児科 医長)	
4 . 中央診断、DKC と CDA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	45
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授)	
5 . 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血) 患者赤血球における eADA と GSH のバイオマーカーとしての有用性	51
菅野 仁 (東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 教授)	
6 . ファンconi貧血の遺伝子解析	55
高田 穰 (京都大学放射線生物研究センター 教授)	
7 . DBA の患者由来多能性幹細胞の樹立と発症メカニズム解析	59
浜口 功 (国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長)	
松岡佐保子 (国立感染症研究所血液・安全性研究部 室長)	
倉光 球 (国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員)	
8 . 先天性造血障害の表現型と遺伝子型に応じた治療戦略に関する研究	63
大賀 正一 (山口大学大学院医学系研究科小児科学 教授)	
下村麻衣子 (山口大学大学院医学系研究科小児科学 助教)	
市村 卓也 (山口大学大学院医学系研究科小児科学 診療助教)	
菅野 仁 (東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 教授)	

9 . 小児期造血障害疾患登録による赤芽球癆など先天性遺伝性貧血の疫学データベース構築	67
小原 明 (東邦大学医学部小児科 教授)	
10 . DBA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	71
照井 君典 (弘前大学医学部附属病院小児科 講師)	
11 . 遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝子型と表現型の関連解析	75
古山 和道 (岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授)	
12 . CDA のデータ管理、診断基準の確立	79
多賀 崇 (滋賀医科大学小児科 講師)	
13 . 重症先天性好中球減少症の造血幹細胞移植：再移植症例の検討	81
小林 正夫 (広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学 教授)	
14 . Shwachman-Diamond 症候群の診断基準作成に関する研究	87
渡邊健一郎 (静岡県立こども病院血液腫瘍科 科長)	
金兼 弘和 (東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 准教授)	
15 . 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	89
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 室長)	
16 . 本邦における先天性角化不全症の臨床的遺伝学的特徴	93
山口 博樹 (日本医科大学血液内科 准教授)	
17 . DBA の遺伝子診断	99
剣持 直哉 (宮崎大学フロンティア科学実験総合センター 教授)	
. 研究成果の刊行に関する一覧表	101
. 研究成果の刊行物・別冊	113

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

研究代表者 伊藤悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）

研究要旨： 主要な先天性骨髄不全症には、先天性赤芽球癆（DBA）、Fanconi 貧血（FA）、遺伝性鉄芽球性貧血（SA）、congenital dyserythropoietic anemia（CDA）、Shwachman-Diamond syndrome（SDS）、先天性角化不全症（DKC）、先天性好中球減少症（SCN）、先天性血小板減少症（CTP）の 8 疾患がある。本研究班は、8 つの疾患別研究拠点から構成され、各研究拠点は疫学調査、臨床データおよび検体の収集、既知の原因遺伝子解析とバイオマーカーなどの特殊検査を担当した。本研究では、発症数が少なく共通点の多いこれらの 8 疾患の医療水準の向上をより効果的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進した。先天性骨髄不全は、稀少疾患であるため、症例を効率的に集積できなければ研究の進展は困難である。このため、海外との共同研究を視野に入れた先天性骨髄不全の WEB 登録システムの構築を行った。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った。先天性骨髄不全の中で最も症例が多い DBA は、約半数が原因遺伝子不明であるため、遺伝子診断が不可である。このため、新規のバイオマーカーが求められていた。我々は、赤血球還元グルタチオン濃度が優れた DBA の新たなバイオマーカーとなり、赤血球アデノシンデアミナーゼ活性値を組み合わせることで、診断確度が格段に高まることを明らかにした。アルデヒド代謝酵素である ALDH2 の多型が、FA の臨床像との強い関連がみられることを見出した。特に、ALDH2 酵素活性の欠損をもたらす多型が骨髄不全の進行を強く促進した。これらの結果は、FA 患者の骨髄における病態の本質に強い示唆を与え、また、将来の治療法開発への道を開くものと言える。稀少疾患である先天性造血不全症は、診断から治療まで一貫した登録システムの確立、長期フォローアップ体制と最良の治療法の提供までのガイドライン作成が重要である。本年度は、これまで診断基準が未策定であった 3 疾患（SDS、SCN、CTP）の診断基準の作成および重症度分類がなかった 5 疾患（DBA、CDA、SDS、SCN、CTP）の重症度分類を作成した。

【研究分担者氏名】

張替秀郎：東北大学大学院医学系研究科教授
矢部普正：東海大学医学部准教授
真部 淳：聖路加国際病院医長
小島勢二：名古屋大学大学院医学系研究科教授
菅野 仁：東京女子医科大学教授
高田 穰：京都大学放射線生物研究センター教授
浜口 功：国立感染症研究所部長
大賀正一：山口大学大学院医学系研究科教授
小原 明：東邦大学医療センター大森病院教授
照井君典：弘前大学医学部附属病院講師
古山和道：岩手医科大学教授
多賀 崇：滋賀医科大学講師

小林正夫：広島大学大学院医歯薬保健学研究院教授
渡邊健一郎：静岡県立こども病院科長
金兼弘和：東京医科歯科大学准教授
國島伸治：国立病院機構名古屋医療センター室長
山口博樹：日本医科大学准教授
剣持直哉：宮崎大学教授

【研究協力者氏名】

土岐 力：弘前大学大学院医学研究科講師
倉光 球：国立感染症研究所研究員
佐藤知彦：弘前大学医学部附属病院助教
下村麻衣子：山口大学大学院医学系研究科助教
市村卓也：山口大学大学院医学系研究科診療助教

A . 研究目的

わが国における実態が不明であった先天性骨髄不全症においても、平成 21 年度以降、8 疾患（先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan anemia:DBA）、Fanconi 貧血（FA）、遺伝性鉄芽球性貧血（SA）、congenital dyserythropoietic anemia（CDA）、先天性角化不全症（DKC）、Shwachman-Diamond syndrome（SDS）、先天性好中球減少症（SCN）、先天性血小板減少症（CTP））が、厚労省難治性疾患克服研究事業に採択され、全国疫学調査、臨床データの収集、遺伝子解析が行われ、実態が明らかにされつつある。本研究申請では、共通点の多いこれらの 8 疾患の医療水準の向上をより効果的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進する。これまでの班研究により、DBA では通常のシーケンスでは同定出来ない既知の原因遺伝子の片アレル欠失が約 10%も存在することが明らかになった（Blood 2012）。新規原因遺伝子 *RPS24* と *RPL27* も同定した。さらに、新規バイオマーカーとして赤血球還元グルタチオン（GSH）を同定し、赤血球アデノシンデアミナーゼ（eADA）活性と組み合わせることにより診断精度を向上させることを見出した。FA では、アルデヒド代謝酵素 ALDH2 酵素活性の欠損をもたらす多型が骨髄不全の進行を強く促進することが明らかになった（Blood 2013）。CTP でも、新規原因遺伝子 *ACTN1* の同定に成功した（Am J Hum Genet, 2013）。しかし、DBA、FA、DKC などの約 50%で原因遺伝子が不明である。さらに、DBA と臨床診断された症例が遺伝子解析により DKC と確定診断されるなど遺伝子診断が正確な診断のために必須な症例が複数存在することが明らかとなった。このため、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。平成 26 年度は、遺伝子診断の結果も含めて、国際共同研究を視野に入れた共通のデータベースを基にした先天性造血不全の WEB 登録システムの構築を行う。平成 27 年度は、データ収集と観察研究を継続し、より正確な先天性造血不全の実態の把握を行い、エビデンスに基づいた診断基準の改定、重症度分類の確立、診断・治療ガイドラインを策定する。

B . 研究方法

本研究申請では、発症数が少なく共通点の多い先天性造血不全症の医療水準の向上をより効果的に進めるために、一つの研究班に統合して研究を推進する。本研究班は、8 つの疾患別研究拠点から構成され、各研究拠点（DBA（伊藤）、SA（張替）、FA（矢部・高田）、CDA（小島・真部）、DKC（小島、山口）、SDS（渡邊）、SCN（小林）、CTP（國島））は、疫学調査、臨床データおよび検体の収集、遺伝子診断のための既知の原因遺伝子解析とバイオマーカーなどの特殊検査を担当する。研究代表者（伊藤）が、DBA の研究を担当するとともに研究全体を統括する。平成 26 年度は、遺伝子診断の結果も含めて、国際共同研究を視野に入れた共通のデータベースを基にした先天性造血不全の登録システムの構築を行う。平成 27 年度は、データ収集と観察研究を継続し、より正確な先天性造血不全の実態の把握を行い、エビデンスに基づいた診断基準の改定、重症度分類の確立、診断・治療ガイドラインを策定する。以下に、具体的な研究計画及び方法を述べる。

平成 26 年度

a. 疫学調査

本年度は、先天性造血不全の 8 疾患について治療成績も含めた疫学調査を行い、詳細な疫学情報を収集する（小原、大賀、張替、矢部、多賀、真部、小島、渡邊、小林、國島）。

b. 中央診断

先天性造血不全症の疑い例が発生すると、日本小児血液・がん学会の登録システムを用いて疾患登録が行われる。末梢血や骨髄血塗抹標本を名古屋大学（小島）と聖路加国際病院（真部）で中央診断し、先天性造血不全症が強く疑われる場合は各疾患拠点でさらに詳細な診断を行う。既に、この 4 年間で 1,000 例の造血不全症の診断が行われ、その 10%以上が先天性造血不全であった。

c. バイオマーカーによるスクリーニング

DBA の疑い症例では、新規バイオマーカーである赤血球 GSH と eADA 活性を同時測定し、SVM 法による判別式による判定を行う（菅野）。DKC の疑い症例では Flow FISH 法による血球

テロメア長のスクリーニングを行う(小島)。

d. 遺伝子診断

遺伝子診断のため、原因遺伝子の解析を直接シーケンス法あるいは次世代シーケンサーを用いたターゲット・シーケンス法あるいは全エクソンシーケンスで行う。すなわち、各症例より抽出したゲノム DNA を超音波破砕により断片化し、試料を識別する 6 塩基の Barcode 配列を付与したのち、12 試料を混合し、常法に従って液相ハイブリダイゼーションにより全エクソン配列を濃縮した。得られた混合試料を Illumina 社 HiSeq2000 シーケンサーにより平均読み取回数 200 回を目標として全エクソン配列、対象遺伝子領域の解析を行った。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基変異 (single nucleotide variants; SNVs) および欠失・挿入配列から SNP データベースおよび 1000 personal genome データベースに登録済みの SNP を除去したのち、家族内罹患者と陰性コントロール(非罹患同胞や両親)の全エクソン解析データとを比較検討することにより、責任変異の候補となる SNV 原因遺伝子の候補を絞り込み、必要に応じて全ゲノムリシーケンスを併用しつつ、機能的な推定と併せて、新規原因遺伝子の同定を試みた。

DBA 症例では、上記に加え、定量的 PCR 法と SNP アレイで RP 遺伝子の欠失を解析する。

FA 症例については、高レベルのモザイク症例も多く、特にリンパ球にリバーション・モザイクを起こし、遺伝子変異が末梢血では同定不可能な症例もあるため、変異が同定されない場合は骨髓細胞や皮膚・骨髓線維芽細胞を用いた解析も行う(矢部・高田)。また、通常の直接シーケンス法では既知の原因遺伝子の欠失を検出できないため、DBA 研究班が開発した定量的 PCR 法と SNP アレイあるいは Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) を用いて片アレル欠失の有無を解析する(浜口および各研究拠点)。

SA 症例で、ALAS2 遺伝子第 1 イントロンに存在する赤芽球特異的エンハンサーに変異を有する家系が存在することを明らかにした。診断

を確定するためにゲノム編集技術により赤芽球系培養細胞の ALAS2 遺伝子のエンハンサー部分に変異を導入し、実際にヘム生合成量が低下するかどうかを解析する。

e. 症状に影響する modifier 遺伝子の同定

FA と DBA が確定された症例について、アセトアルデヒドの分解酵素である ALDH2 遺伝子解析を Taqman PCR 法による検討を行う(高田、伊藤)。今年度はさらに、FA 追加症例での ALDH2 遺伝子型検索を行った。また、AA 型 FA 児の母親の遺伝子型も検索の対象とした。

f. 疾患登録データベースの構築

得られた症例の臨床情報や遺伝子解析の結果も含めて、共通のデータベースを基にした先天性造血不全の登録システムの構築を行う。海外との共同研究を視野に入れ、中国、韓国、インドの血液専門医とアジアにおける先天性造血不全の WEB 登録システムの構築を計画している。既に、このためのデータシートは作成済みである(小島、小原、大賀、伊藤)。

g. 診療ガイドラインの作成

得られた情報は、データベースを構築し(小原、大賀)、各疾患の研究班の診断システムの構築および治療ガイドラインの作成に役立てる。移植プロトコールを含む治療ガイドラインを作成する(伊藤、大賀、真鍋、矢部、小島)。

平成 27 年度

正確な診断に基づくデータの収集と観察研究を継続することにより、より正確な先天性造血不全の実態を把握し、先天性造血不全の登録システムに情報を収集する。収集された情報を基に、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、より多くのエビデンスに基づいた診断基準、重症度分類、診断・治療ガイドラインの策定・改正を行う。なお、治療ガイドラインは造血幹細胞移植のプロトコールを含む実用的なものを策定する(伊藤、張替、大賀、真部、矢部、渡邊、小林、國島、小島)。

(倫理面への配慮)

日本小児血液・がん学会として行う疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究としてすでに学会倫理審査委員会で承認されている。調査にあたっては個人情報の守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても、患者検体の匿名化を図る。検体の採取にあたっては、患者および家族から事前に十分な説明を行い、文書による同意を得る。各疾患の遺伝子解析については、ヒトゲノム遺伝子解析研究指針に従い、患者および家族に事前に十分な説明を行い、文書による同意を得たのち連結可能匿名検体として研究を遂行する。患者および家族に対して不利益が生じる場合には、いつでも同意の撤回は可能である。既知の責任遺伝子に関しては、倫理委員会で承認されている。

C. 研究結果

1) 疫学調査と中央診断

2006～2013年診断登録症例数を表に示す(表1)。

- a. 疾患登録(一次調査)症例:2013年診断症例は小児血液学会会員230施設の92%に相当する212施設が登録した。非腫瘍性血液疾患は毎年1,200～1,300症例であり、血小板異常症が最多であった。表に挙げた造血障害疾患(溶血性貧血を除く)は総計730例で、そのうち特発性再不貧は毎年50～56例とほぼ一定した症例数であった。診断は日本小児血液・がん学会の形態中央診断が貢献している。
- b. Diamond-Blackfan 貧血:DBA症例は7年間で62例、特発性赤芽球ろう40例が登録された。
- c. 2008～2013年の期間の鉄芽球性貧血は5例、congenital dyserythropoietic anemiaは3例であった。いずれも極めて稀である。
- d. 本研究班の活動は2014年日本小児血液・がん学会総会で発表され、学会員への小児期造血障害疾患に関する啓発活動も盛んである。
- e. Fanconi 貧血に対する造血幹細胞移植の成績
骨髄異形成症候群や急性白血病を発症した33例の造血幹細胞移植では、移植後3年生存率は約68%であった。白血病10症例の移植後3年生存率は30%以下で極めて不良であったが、不応性貧血12例では約90%と再生不良性貧血と同等

の成績が得られた。造血細胞移植に関しては、小児ドナーの有効性と安全性の検討を行い、同胞105症例のうちFA患者ドナー11例においても有効性と安全性が確認された。

- f. 疾患登録データベースの構築:共通のデータベースを基にした先天性造血不全のWEB登録システムの構築を行った。

2) バイオマーカーによるスクリーニング

DBAはリボソーム機能不全によって発症する先天性芽球癆である。我々は、平成22年度から始まった研究班において、赤芽球系細胞における最も重要な抗酸化物質である赤血球還元型グルタチオン(GSH)がDBAの新規バイオマーカーであることを同定した。赤血球アデノシンデアミナーゼ活性(eADA)とGSHを同時に検討することで、遺伝子検査により確定診断し得たDBA症例と同一家系内非罹患者の識別を可能とする判別式を得た。今年度は更に、症例数を積み重ねることで判別式の有用性を再検討した。また、新たにDBA疑い3症例を検討し、臨床診断および従来の診断基準との相関について検討を加えた。その結果、eADA/GSHを用いた判別式結果はeADA単独の評価に比して、家族歴・先天奇形を伴わないDBA症例の診断率を向上することが明らかになった。

3) 遺伝子診断

- a. DBA
DBAの原因遺伝子として10種類のリボソームタンパク(RP)遺伝子(*RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*, *RPL26*)と*GATA1*遺伝子が知られている。最近我々は、新規原因遺伝子*RPS27*および*RPL27*を同定した(Wang et al. Br J Haematol 2014)。DBAの遺伝子診断を効率的に行うために、次世代シーケンサー(MiSeq)を用いてこれらの13遺伝子を一度に解析するターゲットシーケンスのシステムを開発した。この方法では、新たな原因遺伝子を容易に追加できる。

本年度は、このシステムを用いて新規32家系の遺伝子診断を行った。この結果、16例にRP

遺伝子の変異を検出した。次に、ターゲットシーケンスを行っても原因遺伝子が不明な 16 家系について、SNP アレイで RP 遺伝子の大欠失を検索した後、他の先天性骨髄不全症候群を除外するために全エクソン解析を行った。SNP アレイ解析では、今回検索した症例には、RP 遺伝子の大欠失は検出されなかった。また、Fanconi 貧血等の他の先天性造血不全を示唆する遺伝子変異も検出されなかった。しかし、これまでに報告のない新規原因候補遺伝子 *RPS15A* (スプライス変異: c.G213A) を 1 家系 3 例に見出した。変異のみられた 3 例 (本人、姉、母) はいずれも罹患者であり、非罹患者である父には変異は検出されなかった。次に、末梢血単核球より total RNA を抽出し、それを鋳型として cDNA を合成して RT-PCR を行い、*RPS15A* (c.G213A) がスプライス変異であることを確認した。

b. FA

東海大学における次世代シーケンスによるエクソーム解析を加えた総計 82 例の日本人 FA の解析を行った。FA 遺伝子のゲノムシーケンスより、37 例の *FANCA* と 20 例の *FANCG* 遺伝子の変異を京都大学放射性生物研究センターの高田穰研究室にて同定した。*FANCB*, *FANCD1*, *FANCE*, *FANCP* の変異も確認され、既知遺伝子が全く検出されなかった症例のうち、2 例において新規原因候補遺伝子が見つかり、解析中である。

MLPA 法を用いた 63 症例の検討では、38 例が *FANCA* シーケンスで A 群と断定され、そのうちの 26 例が A 群 MLPA 法にて片アレルまたは両アレルの検出が可能であった (68%)。

ALDH2 は、飲酒等の外因性、体内代謝による内因性のアセトアルデヒドを主な基質とし、アルデヒド代謝に関わる重要な酵素である。日本、韓国、中国において高頻度に変異型アレル (ここでは正常活性のものを G 型、活性のないものを A 型とする) が見出される。すなわち、ホモで A 型を持つ個人では酵素活性が消失し、ヘテロの GA 型でもドミナントネガティブ効果により活性が 2~4 割に低下し、飲酒後の顔面紅潮、

頻脈などの原因となることが知られている。この酵素の活性と FA 表現型の関係をヒトにおいて明らかにするため、昨年度 64 例の日本人 FA 患者において、*ALDH2* 遺伝子型を決定し報告した。GG 型、GA 型、AA 型は、それぞれ 36、25、3 例であった。今年度これに追加して、もう 2 例の AA 型患者が見つかり、合計 5 例となった。

これらの AA 型症例は全例、生下時ないし生後まもなく血液学的異常を認め、GG 型、GA 型とは全く異なる経過をとった。1 例は、重症再生不良性貧血、残り 4 例は MDS として発症した。また、全例臓器の奇形を伴っていた。5 例のうち 4 例で母親の *ALDH2* 遺伝子型の検索の同意が得られた。マウスとは全く異なり、2 例の母親は AA 型、2 例は GA 型という結果であった。

骨髄異形成症候群や急性白血病を発症した 33 例の造血幹細胞移植では移植後 3 年生存率は約 68% であった。白血病 10 症例の移植後 3 年生存率は 30% 以下で極めて不良であったが、不応性貧血 12 例では約 90% と再生不良性貧血と同等の成績が得られた。造血細胞移植に関しては小児ドナーの有効性と安全性の検討を行い、同胞 105 症例のうち FA 患者ドナー 11 例においても有効性と安全性が確認された。

c. SA

本年度の 1 例目の新規症例は 2012 年生まれの女児、家族歴なし。生後 3 ヶ月頃より赤血球の系統のみの低下を来しており、赤血球輸血依存状態であった。明らかな外表奇形は認めなかった。これまでの精査から、再生不良性貧血は血球形態から否定的、サラセミア・Diamond-Blackfan 貧血も否定的、溶血所見無し、染色体検査は正常核型であった。さらに、末梢血検査から小球性貧血、フェリチン高値、骨髄検査にて環状鉄芽球を認めているため、鉄芽球性貧血の診断目的で、本調査研究に登録された。現在、本人及び両親の末梢血液細胞を用いた遺伝子変異解析を施行中である。

2 例目は 2014 年生まれの男児、家族歴なし。出生後より汎血球減少あり、骨髄検査を行ったところ、赤芽球中の環状赤芽球比率 68% を認め

たため、Pearson 疑いとして本調査研究に登録となった。登録時点では膝臓症状・神経筋症状無し。本人の末梢血液細胞を用いた解析の結果、従来 Pearson 症候群で報告のある領域のミトコンドリア DNA 欠損を認めたため (GeneBank Accession No. NC_012920 の Position: 8483-13459 に渡る計 4977bp の欠損) Pearson 症候群に伴う鉄芽球性貧血を考えた。現在、他症状出現の有無も含めて経過観察中である。

昨年度は、*ALAS2* 遺伝子第 1 イントロンに赤芽球特異的エンハンサーが存在することを見出し、遺伝性鉄芽球性貧血患者において同部に変異を有する家系が存在することを明らかにして報告した。その際、プロモーターアッセイなどの方法により、エンハンサーの変異が *ALAS2* のプロモーター活性を低下させることを明らかにしたが、診断を確定するためには、同部の変異により実際に赤芽球内におけるヘム合成量が低下することを示す必要がある。本年度は、近年広く用いられつつあるゲノム編集技術により赤芽球系培養細胞の *ALAS2* 遺伝子のエンハンサー部分に変異を導入し、実際にヘム合成量が低下するかどうかを明らかにすることを試みた。

赤芽球系培養細胞である K562 細胞を用い、ゲノム編集技術としては LifeTechnologies 社の GeneArt CRISPR/Cas9 システムを用いた。このシステムはガイド RNA と Cas9 nuclease を同じベクターから発現させる方法により、一種類のベクターを細胞内に導入するのみで、ゲノム DNA の目的部分を切断することができる。その後、切断部の修復が起こる際に同部のゲノム DNA にランダムな欠失や塩基の挿入が起こるため、高頻度に変異が導入されるシステムである。ガイド RNA の配列としては、ヒト *ALAS2* 遺伝子第 1 イントロンのエンハンサー配列、その中心となる GATA1 結合配列の近傍の配列とした。このようにして作成した *ALAS2* intron1 enhancer editing 用ベクター (以下、pCRISPR-*ALAS2*int1GATA) を Nucleofector (ロンザジャパン株式会社) を用いて K562 細胞に導入し、限界希釈法によりクローニングを

行った。その後、Survayor Assay (Transgenomic 社) により変異が導入されていると予想されるクローンを選択し、最終的に *ALAS2* エンハンサー部分を PCR 法により増幅した後に塩基配列を決定し、変異が導入されているクローンを選択した。このようにして *ALAS2* エンハンサーに変異が導入されたクローン (変異 K562 細胞) を選別し、それらから total RNA を抽出し、*ALAS2* mRNA の発現量を Real Time PCR 法により野生型 K562 細胞と比較した。また、ヘモグロビン染色によりヘモグロビン陽性細胞の割合を算出した。Nucleofector による K562 細胞への pCRISPR-*ALAS2*int1GATA (プラスミド) 導入高率は非常に良好で、限界希釈によりクローニングした後も約 50% 程度のクローンで目的の部位の変異が確認された。また、それぞれのクローンの変異導入部位における変異のタイプをシーケンスにより検討したところ、多くは欠失で、数塩基から 30 塩基程のものが大半を占めた。それ以外に一部では数塩基の挿入も認められた。また、今回の検討では過半数の変異導入クローンで両方のアレルに異なる変異が導入されており、変異導入の効率も非常に良好であった。これらのクローンの中から両方のアレルに変異が導入されたクローンを選択して *ALAS2* mRNA 量を Real Time PCR 法により野生型の K562 細胞と比較したところ、比較した全ての変異導入クローンで *ALAS2* mRNA の発現が低下しており、また、これらの変異導入クローンにおいては野生型と比較してヘモグロビン陽性率も低下していた。以上の結果より、*ALAS2* 遺伝子第 1 イントロンの赤芽球特異的エンハンサーの変異が、SA の原因であることが明らかになった。

d. CDA

CDA と診断され同意を得た症例について遺伝子診断を行った。20 例中 4 例に遺伝子変異を確認し、3 例では型の責任遺伝子 *CDAN1* の変異 (2 例が (P1129L) 1 例が (P185fs) ex12 (N598S)) を認めた。1 例では variant 型の責任遺伝子 *KLF1* の変異 (E325K) を認めた。

既知の責任遺伝子変異が認められなかった症例について、次世代シーケンスによるエクソームシーケンスを行った。その結果、12例中4例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。2例が *SPTA1* の変異((R28H)(Y2280C)(W2172X))であり、1例が *G6PD* の変異(V424L)であり、1例が *ANK1* の変異(R935X)であった。

e. SCN

今回、初回の造血幹細胞移植で拒絶され、広島大学病院で再移植として骨髄移植を施行した4症例について検討を行った。

4症例とも *ELANE* 変異例で、末梢血液検査骨髄像所見から診断がなされ、一部重症感染症を経験していた。3例がすでにG-CSFによる治療が行われていたため、MDS/AMLへの進展前に造血幹細胞移植が必要と判断され、移植が施行されていた。すべての症例が拒絶されたために、当院紹介時には慢性好中球減少症を呈していた。再度遺伝子検査を行い、*ELANE* 変異を確認した。

血縁1例、非血縁3例で前処置はFlu、CY、Mel、TBIに十分量のATGを使用した免疫抑制効果の高いレジメンを選択した。4症例とも生着は速やかであり、症例2を除いて、生着後は100%ドナータイプの完全キメラの状態を維持し、移植後1~6年経過するが通常の日常生活を過ごしている。症例2は、生着後3か月頃からドナータイプ細胞の減少を認めたため、DLIを施行した。4回のDLI後にGrade IIのGVHDを認めたが、免疫抑制剤と生物学的製剤の使用でコントロール可能であった。

f. 先天性血小板減少症

本年度(平成26年4月~平成27年1月現在)は、15例の先天性血小板減少症を疑う症例を解析し、MYH9異常症7例、Bernard-Soulier症候群ホモ接合体2例・ヘテロ接合体1例、2B型von Willebrand病1例、gray platelet症候群1例が診断に至り、3例は確定診断されなかった。

MYH9異常症についてはタイ国との共同研究を進め、多数の症例収集を行っている。Bernard-Soulier症候群については、世界的コン

ソーシアムを結成し、遺伝子異常と臨床症状との関連性を示し、重症度分類を行った。

4) 診断基準と重症度分類の確立・改定

本年度は研究計画に従って、診断基準と重症度分類の確立・改訂を行った。以下に、今後の目標と達成状況を記載した。

・目標

(1) 先天性赤芽球癆(Diamond-Blackfan 貧血)

1. 診断基準の改訂(平成27年10月まで)
2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認(平成28年3月まで)
3. 重症度分類の策定(平成26年12月まで)
4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認(平成28年3月まで)
5. 診療ガイドラインの改訂(平成27年10月まで)
6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認(平成28年3月まで)

(2) Fanconi 貧血

1. 診断基準の改訂(平成27年10月まで)
2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認(平成28年3月まで)
3. 重症度分類の改訂(平成27年10月まで)
4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認(平成28年3月まで)
5. 診療ガイドラインの改訂(平成27年10月まで)
6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認(平成28年3月まで)

(3) 遺伝性鉄芽球性貧血

1. 診断基準の改訂(平成27年10月まで)
2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認(平成28年3月まで)
3. 重症度分類の改訂(平成27年10月まで)
4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認(平成28年3月まで)
5. 診療ガイドラインの改訂(平成27年10月まで)
6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認(平成28年3月まで)

(4) Congenital dyserythropoietic anemia

1. 診断基準の改訂(平成27年10月まで)

2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 3. 重症度分類の策定（平成26年12月まで）
 4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 5. 診療ガイドラインの改訂（平成27年10月まで）
 6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
- (5) 先天性角化不全症
1. 診断基準の改訂（平成27年10月まで）
 2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 3. 重症度分類の改訂（平成27年10月まで）
 4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 5. 診療ガイドラインの改訂（平成27年10月まで）
 6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
- (6) Shwachman Diamond syndrome
1. 診断基準の策定（平成26年12月まで）
 2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 3. 重症度分類の策定（平成26年12月まで）
 4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 5. 診療ガイドラインの策定（平成27年10月まで）
 6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
- (7) 先天性好中球減少症
1. 診断基準の策定（平成26年12月まで）
 2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 3. 重症度分類の策定（平成26年12月まで）
 4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 5. 診療ガイドラインの策定（平成27年10月まで）
 6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
- (8) 先天性血小板減少症
1. 診断基準の策定（平成26年12月まで）
 2. 診断基準の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 3. 重症度分類の策定（平成26年12月まで）
 4. 重症度分類の小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
 5. 診療ガイドラインの策定（平成27年10月まで）
 6. 診療ガイドラインの小児血液・がん学会での承認（平成28年3月まで）
- 達成状況
- (1) 先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan 貧血）
1. 達成見込み（平成27年10月）
 2. 達成見込み（平成28年3月）
 3. **達成済み（平成26年12月）（表2）**
 4. 達成見込み（平成28年3月）
 5. 達成見込み（平成27年10月）
 6. 達成見込み（平成28年3月）
- (2) Fanconi 貧血
1. 達成見込み（平成27年10月）
 2. 達成見込み（平成28年3月）
 3. 達成見込み（平成27年10月）
 4. 達成見込み（平成28年3月）
 5. 達成見込み（平成27年10月）
 6. 達成見込み（平成28年3月）
- (3) 遺伝性鉄芽球性貧血
1. 達成見込み（平成27年10月）
 2. 達成見込み（平成28年3月）
 3. 達成見込み（平成27年10月）
 4. 達成見込み（平成28年3月）
 5. 達成見込み（平成27年10月）
 6. 達成見込み（平成28年3月）
- (4) Congenital dyserythropoietic anemia
1. 達成見込み（平成27年10月）
 2. 達成見込み（平成28年3月）
 3. **達成済み（平成26年12月）（表3）**
 4. 達成見込み（平成28年3月）
 5. 達成見込み（平成27年10月）
 6. 達成見込み（平成28年3月）
- (5) 先天性角化不全症
1. 達成見込み（平成27年10月）

2. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
3. 達成見込み (平成 27 年 10 月)
4. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
5. 達成見込み (平成 27 年 10 月)
6. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
- (6) Shwachman Diamond syndrome
 1. **達成済み (平成 26 年 12 月) (表 4)**
 2. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
 3. **達成済み (平成 26 年 12 月) (表 5)**
 4. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
 5. 達成見込み (平成 27 年 10 月)
 6. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
- (7) 先天性好中球減少症
 1. **達成済み (平成 26 年 12 月) (表 6)**
 2. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
 3. **達成済み (平成 26 年 12 月) (表 7)**
 4. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
 5. 達成見込み (平成 27 年 10 月)
 6. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
- (8) 先天性血小板減少症
 1. **達成済み (平成 26 年 12 月) (表 8)**
 2. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
 3. **達成済み (平成 26 年 12 月) (表 9)**
 4. 達成見込み (平成 28 年 3 月)
 5. 達成見込み (平成 27 年 10 月)
 6. 達成見込み (平成 28 年 3 月)

D. 考察

日本小児血液・がん学会疾患登録事業は 2006 年に開始され、会員施設において診断された全ての血液疾患を対象にした全数把握疫学研究事業である。また、同学会形態中央診断事業は、診断困難な小児期の造血不全を対象にして、高い精度で新規症例が診断されている。全数把握疫学研究は、遺伝性貧血以外の疾患も同時に収集しており、これらを統合した疾患データベースを構築することで、各疾患の相対頻度も明らかになる。

小児期造血障害疾患の病態解明、診断法や治療開発には疾患遺伝子情報や詳細な臨床情報、追跡情報の収集 (二次調査・追跡調査) が必要である。今回、学会疾患登録事業で収集された一次調査情報データベースが整った事で詳細データを含む「小児造血障

害」データベース構築の基盤が整った。次年度は、「小児造血障害」データベース特異的な調査項目を順次整理する。その際には、海外の同様のデータベースと比較検討できる共通基本項目を海外との情報交換で調査整備する必要がある。

臨床的に使用しやすい診断基準・重症度分類が作成できたと考えられる。この診断基準により、本邦での先天性造血不全症の診断率が向上し、より多くの患者が正確な診断を受けることが期待される。

従来診断基準では、今回解析した 3 例中 1 例は非 DBA、2 例は非古典的 DBA と診断された。いずれも家族歴が無く、先天奇形の存在も無いことから、eADA 活性が診断に重要な症例と考えられる。しかし、eADA 活性単独では診断基準により DBA が否定された今回のようなケースにおいて、新規バイオマーカーである GSH を併用した判別式は DBA の診断に極めて有用と考えられる。この結果が新規バイオマーカーによる偽陽性結果で無いことを明らかにするためには、網羅的な遺伝子検査結果を用いた DBA の診断および他の骨髄不全症候群の否定が極めて重要と考えられた。

FA の発症頻度、臨床症状や遺伝子変異は民族による差がみられ、日本人における疫学解析が必要である。エクソーム解析等を用いた遺伝子解析は従来の方法では検出できなかった変異確定させることができ、今後も重要な解析法となり、日本における FA の疫学の基盤になると推測される。MLPA-A を用いた方法は、既知の変異のみが対象となるものの、極めて有用であった。

FA に対する本邦での fludarabine を前処置に用いた造血細胞移植の成績は良好であり、骨髄形成症候群に進展した症例では白血病に移行する前に移植を施行することが重要である。HLA 一致の同胞間移植の成績は良好であるが、同胞の FA を否定することが大切である。

日本人 FA 患者における ALDH2 遺伝子型の解析から、骨髄不全を中心とした FA の病態にアルデヒド代謝が大きな役割を果たすことがますます確実となる結果が得られた。造血幹細胞における内因性のアルデヒドが DNA を障害し、その修復が不十分になることで、幹細胞に DNA 障害が蓄積し、p53 発現などの DNA 損傷応答が引き起こされると考えられる。

さらに今後、基礎研究としては、ヒトの血液幹細胞における ALDH サブタイプの発現などを確認していく必要が考えられる。また、臨床研究としては他の血液疾患や家族性乳がんにおける *ALDH2* 遺伝子型の役割についても検証が必要と思われる。

マウスとは違い、FA 児の母親に *ALDH2* の AA 型が高頻度に存在することは驚きである。種が異なることによる違いではあるが、これをどう説明するか、今のところ十分な知見はない。ヒトの AA 型はマウスのノックアウトに比せば、いくらかの酵素活性が残るはずであるが、マウスではヘテロでも胎児が維持できないということなので、それでは説明できない。他の *ALDH* 酵素活性、分布、体内のアルデヒド代謝など様々な要因が寄与する可能性があり、解明には今後の研究が必要である。

今後、患者の治療への展開として、食物中飲料中のアルデヒド量が減らせないか、内因性アルデヒド産生のメカニズム解明と制御法の開発、*ALDH2* 酵素活性の活性化剤の応用等が考えられる。*ALDH2* 活性化剤については、急性アルコール中毒を対象に治験開始が近いと聞いている（私信）。また、FA 原因遺伝子とは異なる新しい視点から *ALDH2* 遺伝子型による骨髄不全症の重症度の検討も必要と思われる。我々の解析結果は特異な重症型 FA の存在を確立し、FA 患者の骨髄不全における病態の本質に強い示唆を与え、また、将来の治療法開発への道を開くものと言える。また、FA 患者のマネジメントに出生早期の *ALDH2* のジェノタイピングが有用である可能性がある。

コード領域の変異がタンパク質の機能に与える影響を明らかにすることは、そのタンパク質の機能の評価方法が確定している場合にはそれほど困難ではないと考えられる。一方、タンパク質の機能が明らかでない場合、あるいは機能が明らかであってもその評価の方法が確立していない場合には、遺伝子変異が同定されたとしても、それが疾患の原因になりうるかどうかを判定することは非常に困難である。実際、近年の次世代シーケンサーの進歩により全てのタンパク質のコード領域の配列を明らかにするエクソーム解析が盛んに行われるようになり、家族歴等から遺伝性と推定されていても原因が不明であった症例で新たな候補遺伝子が次々に同定されつつあ

り、現在これらの遺伝子変異がどのように当該疾患の発症に関与するのかについて更なる検討が行われている。また、次世代シーケンサーの更なる改良とコストの低減により、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い症例については全ゲノム解析が行われる可能性も高まっている。このような場合、プロモーター部分やイントロン部分の変異、さらには遺伝子と遺伝子の間の領域における変異なども多数同定される様になると予想されることから、バイオインフォマティクスを駆使して候補となる変異を絞り込んだとしても、その候補の変異がどのように疾患の発症と関与するのかを明らかにするのは非常に困難であると予想される。今回我々は、近年盛んに用いられるようになりつつあるゲノム編集システムを用いて培養細胞のゲノムの特定の領域に変異を導入することにより、イントロン領域の変異が内在性遺伝子の発現制御に関与している可能性が高いことを示した。今回導入し得たのは、非特異的な欠失・挿入変異であり、患者のゲノム DNA で同定された変異とは異なる点や、ゲノム編集システムにより他の遺伝子へ非特異的な変異が導入された可能性など、今後解決して行かなければならない問題は多数存在しているが、内在性の遺伝子の発現調節を直接観察できるメリットは大きいと思われる。従って、今回行ったのと同様の方法は、遺伝性鉄芽球性貧血のみならず、様々な遺伝性疾患家系において、網羅的な検索により同定された遺伝子変異と疾患との関連を明らかにするために有用である可能性は高いと考えられる。

本邦における鉄芽球性貧血に関する全国調査の結果、遺伝性鉄芽球性貧血症例は計 19 例登録され、うち 79% は *ALAS2* の異常を認め、一方、欧米で多い *SLC25A38* 遺伝子変異など既知の遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子は認められなかった（Ohba et al. *Ann Hematol* 2013）。従って、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子には人種差・地域差がある可能性が示唆された。しかしながら、症例数が少なくまだ結論は得られていない。2 例目の症例は生後間もなく汎血球減少を認め、Pearson 症候群の診断に至った。遺伝性鉄芽球性貧血は、その原因遺伝子の機能の多様性から、*XLISA* 以外は幼少児期より貧血以外に神経・筋・内分泌器など他の臓器に異常を認める場合が多

く、また、貧血自体も重症であることが多いため、実際に遺伝性鉄芽球性貧血であったものの、診断がついていない症例が多く存在する可能性を検証する必要がある。そのためには、小児科医との連携が重要であると考えられた。

CDA 疑いとされた症例は 20 例中、既知の責任遺伝子の変異を認めた症例は 3 例のみであった。その原因としては、CDA の鑑別が困難であること、日本人に特有な CDA の病型の存在する可能性が挙げられる。次世代シーケンスによる解析で、溶血性貧血の原因遺伝子の変異を複数例に認めた。この事実は、CDA と溶血性貧血の鑑別が困難であることを示唆し、貧血鑑別における遺伝子診断の重要性が再確認された。

近年、先天性血小板減少症の中で大型 / 巨大血小板を有する先天性巨大血小板症の病因病態解析は進んでいる。本年度は、我々が独自に確立中である先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断解析により 15 例を解析し、12 例 (80%) の症例で確定診断が得られた。MYH9 異常症は 7 例 (46.7%) と最も高頻度に診断された。MYH9 異常症の診断率は末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色の確立により向上した。MYH9 異常症 7 例中、1 例では難聴を、3 例では腎炎の合併を認めた。Bernard-Soulier 症候群については、2 例のホモ接合性患者では重度の血小板減少症と重篤な出血症状を認めたが、ヘテロ接合性患者では中等度の血小板減少症を認めたのみであった。高頻度の MYH9 異常症と Bernard-Soulier 症候群では、今までに集積した遺伝子解析データと臨床情報を共に解析することにより重症度分類の確立と診療ガイドライン作成策定が可能であり、他の頻度の低い疾患については来年度も症例収集を重ねることで疾患の把握を目指す。

E . 結論

先天性骨髄不全は、稀少疾患であるため、症例を効率的に集積できなければ研究の進展は困難である。このため、海外との共同研究を視野に入れた先天性骨髄不全の WEB 登録システムの構築を行った。

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った。

先天性骨髄不全の中で最も症例が多い DBA は、約半数が原因遺伝子不明であるため、遺伝子診断が不可能である。このため、新規のバイオマーカーが求められていた。我々は、赤血球還元グルタチオン濃度が優れた DBA の新たなバイオマーカーとなり、赤血球アデノシンデアミナーゼ活性値を組み合わせることで、診断確度が格段に高まることを明らかにした。

アルデヒド代謝酵素である ALDH2 の多型が、FA の臨床像との強い関連がみられることを見出した。特に、ALDH2 酵素活性の欠損をもたらす多型が骨髄不全の進行を強く促進した。これらの結果は、FA 患者の骨髄における病態の本質に強い示唆を与え、また、将来の治療法開発への道を開くものと言える。

稀少疾患である先天性造血不全症は、診断から治療まで一貫した登録システムの確立、長期フォローアップ体制と最良の治療法の提供までのガイドライン作成が重要である。本年度は、これまで診断基準が未策定であった 3 疾患 (SDS、SCN、CTP) の診断基準の作成および重症度分類が無かった 5 疾患 (DBA、CDA、SDS、SCN、CTP) の重症度分類を作成した。

F . 健康危険情報

該当せず

G . 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Wang R, Yoshida Y, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanazaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E *. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan Anemia. **Br J Haematol**. 2015;168(6):854-864.
 - 2) Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T,

- Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H, Kurokawa M. Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML. **Nat Commun.** 2014;5:4770.
- 3) Ono R, Hasegawa D, Hirabayashi S, Kamiya T, Yoshida K, Yonekawa S, Ogawa C, Hosoya R, Toki T, Terui K, Ito E, Manabe A. Acute megakaryoblastic leukemia with acquired trisomy 21 and GATA1 mutations in phenotypically normal children. **Eur J Pediatr.** 2014. [Epub ahead of print]
 - 4) Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Imaizumi M, Mitsui T, Hori H, Hara J, Horibe K, Nagai JI, Goto H, Ito E. Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. **Genes Chromosomes Cancer** 2014;53(11):902-10.
 - 5) Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. **Haematologica** 2014;99(8):1312-6.
 - 6) Horino S, Sasahara Y, Sato M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Sato A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S. Selective expansion of donor-derived regulatory T cells after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. **Pediatr Transplant.** 2014 Feb;18(1):E25-30.
 - 7) Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H. Impaired hematopoietic differentiation of RUNX1-mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients. **Leukemia** 2014;28(12):2344-54.
 - 8) Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, Kobayashi R, Ishida H, Harigae H, Shibahara S. Identification of the novel erythroid-specific enhancer for ALAS2 gene and its loss-of-function mutation associated with congenital sideroblastic anemia. **Haematologica** 2014;99(2):252-61.
 - 9) 張替秀郎, 藤原亨, 古山和道. ヘム代謝と貧血. **臨床血液** 2014;55(7):p729-734.
 - 10) Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H. Effect of 5-aminolevulinic acid on erythropoiesis: a preclinical in vitro characterization for the treatment of congenital sideroblastic anemia. **Biochem Biophys Res Commun.** 2014;454:102-108.
 - 11) Kamata, Okitsu Y, Fujiwara T, Kanehira M, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates differentiate on of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Haematologica** 2014;99:1686-1696.
 - 12) Harigae H, Fujiwara T, Furuyama K. Heme metabolism and anemia. **Rinsho Ketsueki** 2014;55:729-734.
 - 13) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima

- K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in GATA-2 deficiency evolving into myelodysplasia and acute leukemia. **Ann Hematol.** 2014;93:1515-1522.
- 14) Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, Kobayashi M, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferase, promotes erythroid differentiation. **J Biol Chem.** 2014;21:8121-8134.
- 15) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Ohtsubo K, Fukumura A, Kato S, Yabe H. Feasibility of marrow harvesting from pediatric sibling donors without hematopoietic growth factors and allotransfusion. **Bone Marrow Transplant.** 2014;49(7):921-6.
- 16) Nakayama H, Tabuchi K, Tawa A, Tsukimoto I, Tsuchida M, Morimoto A, Yabe H, Horibe K, Hanada R, Imaizumi M, Hayashi Y, Hamamoto K, Kobayashi R, Kudo K, Shimada A, Miyamura T, Moritake H, Tomizawa D, Taga T, Adachi S. Outcome of children with relapsed acute myeloid leukemia following initial therapy under the AML99 protocol. **Int J Hematol.** 2014;100(2):171-9.
- 17) Kato M, Yoshida N, Inagaki J, Maeba H, Kudo K, Cho Y, Kurosawa H, Okimoto Y, Tauchi H, Yabe H, Sawada A, Kato K, Atsuta Y, Watanabe K. Salvage allogeneic stem cell transplantation in patients with pediatric myelodysplastic syndrome and myeloproliferative neoplasms. **Pediatr Blood Cancer.** 2014;61(10):1860-6.
- 18) Patel P, Suzuki Y, Tanaka A, Yabe H, Kato S, Shimada T, Mason RW, Orii KE, Fukao T, Orii T, Tomatsu S. Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Therapy on Growth in Patients with Hunter Syndrome. **Mol Genet Metab Rep.** 2014;1:184-196.
- 19) Sato Y, Kurosawa H, Fukushima K, Okuya M, Yabe H, Arisaka O. Necessary stem cell transplantation using myeloablative therapy for myelodysplastic syndrome with progression of genotypic abnormalities and TP53 dysfunction in a young adult. **Pediatr Transplant.** 2014;18(7):E255-7.
- 20) Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe KI, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor vs. immunosuppressive therapy. **Haematologica** 2014;99(12):1784-91.
- 21) Goto H, Kaneko T, Shioda Y, Kajiwara M, Sakashita K, Kitoh T, Hayakawa A, Miki M, Kato K, Ogawa A, Hashii Y, Inukai T, Kato C, Sakamaki H, Yabe H, Suzuki R, Kato K. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia and Down syndrome. **Pediatr Blood Cancer.** 2015;62(1):148-52.
- 22) Kato M, Hasegawa D, Koh K, Kato K, Takita J, Inagaki J, Yabe H, Goto H, Adachi S, Hayakawa A, Takeshita Y, Sawada A, Atsuta Y, Kato K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infant acute lymphoblastic leukaemia with KMT2A (MLL) rearrangements: a retrospective study from the paediatric acute lymphoblastic leukaemia working group of the Japan Society for Haematopoietic Cell Transplantation. **Br J Haematol.** 2014 Oct 10. [Epub ahead of print]
- 23) Tanjuakio J, Suzuki Y, Patel P, Yasuda E, Kubaski F, Tanaka A, Yabe H, Mason RW, Montaña AM, Orii KE, Orii KO, Fukao T, Orii

- T, Tomatsu S. Activities of daily living in patients with Hunter syndrome: Impact of enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation. **Mol Genet Metab.** 2014 Nov 8. [Epub ahead of print]
- 24) Yabe M, Ohtsuka Y, Watanabe K, Inagaki J, Yoshida N, Sakashita K, Kakuda H, Yabe H, Kurosawa H, Kudo K, Manabe A; Japanese Pediatric Myelodysplastic Syndrome Study Group. Transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia: a retrospective study of 30 children treated with a regimen of busulfan, fludarabine, and melphalan. **Int J Hematol.** 2014 Dec 11. [Epub ahead of print]
- 25) 矢部普正 . Fanconi貧血 . 小児科 2014;55(11): 1559-1564.
- 26) Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, Muramatsu H, Takahashi Y, Natsume J, Kojima S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N. A novel WTX mutation in a female patient with osteopathia striata with cranial sclerosis and hepatoblastoma. **Am J Med Genet A.** 2014;164A(4):998-1002.
- 27) Hasegawa D, Chen X, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification. **Br J Haematol.** 2014; 166(5):758-766.
- 28) Hasegawa S, Imai K, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Morio T, Mizutani S, Takagi M. Whole-exome sequence analysis of ataxia telangiectasia-like phenotype. **J Neurol Sci.** 2014 15;340 (1-2):86-90.
- 29) Honda Y, Tsuchida M, Zaike Y, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukaemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Paediatric Haematology/Oncology. **Br J Haematol.** 2014;165(5):682-687.
- 30) Hyakuna N, Muramatsu H, Higa T, Chinen Y, Wang X, Kojima S. Germline mutation of CBL is associated with moyamoya disease in a child with juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome-like disorder. **Pediatr Blood Cancer.** 2014 Oct 4. [Epub ahead of print]
- 31) Ismael O, Shimada A, Elmahdi S, Elshazley M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada M, Yamashita Y, Horide K, Kojima S. RUNX1 mutation associated with clonal evolution in relapsed pediatric acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). **Int J Hematol.** 2014;99(2):169-174.
- 32) Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S. Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children. **Haematologica** 2014; 99(4):664-671.
- 33) Kato M, Imamura T, Manabe A, Hashii Y, Koh K, Sato A, Takahashi H, Hori H, Taki T, Inoue M, Hayashi Y, Horibe K, Tsuchida M, Kojima S, Oda M, Ohara A. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study. **Br J Haematol.** 2014;166(2):295-298.
- 34) Kawashima N, Ito Y, Sekiya Y, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Choreito formula for

- BK virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2014 Oct 23. [Epub ahead of print]
- 35) Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S. Aldehyde dehydrogenase-2 polymorphism contributes to the progression of bone marrow failure in children with idiopathic aplastic anaemia. **Br J Haematol.** 2014 Sep 11. [Epub ahead of print]
- 36) Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S. Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2014;20(8):1145-1149.
- 37) Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **J Leukoc Biol.** 2014 Apr;95(4):667-676.
- 38) Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, Yagasaki H, Niizuma T, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T, Kurahashi H. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human
- 39) Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S. Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2014;36(1):e65-68.
- 40) Ueda S, Sakata N, Muramatsu H, Sakaguchi H, Wang X, Xu Y, Kojima S, Yamaguchi T, Higa T, Takemura T. Clinical course of juvenile myelomonocytic leukemia in the blast crisis phase treated by acute myeloid leukemia-oriented chemotherapy and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Int J Hematol.** 2014 Jul 22. [Epub ahead of print]
- 41) Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children. **Ann Hematol.** 2014;93(5):747-752.
- 42) Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolueang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Juntharaniyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. **Blood** 2014;123(10):1586-95.
- 43) Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno K, Tobe K, Kanno H, Nakagawa T. Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenyltransferase 3 (nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. **J Biol Chem.** 2014;289(21):14796-811.
- 44) Kobayashi Y, Hatta Y, Ishiwatari Y, Kanno H, Takei M. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature. **BMC Res Notes.** 2014;11(7):137.

- 45) 守屋友美 (東京女子医科大学 輸血・細胞プロセス シング部), 岡本好雄, 小林博人, 松田和樹, 久保田友晶, 緒方康貴, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 青木貴子, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小倉浩美, 菅野仁. ABO血液型不適合腎移植におけるアルブミン製剤の必要性. **日本輸血細胞治療学会誌** 2014;60(4):521-526.
- 46) 岡本好雄, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. 自己血漿製剤という観点から見たCART. **日本アフェレシス学会** 2014;33(3):178-184.
- 47) Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. Defective FANCI binding by a Fanconi anemia-related FANCD2 mutant. **PLoS One**. 2014;9(12):e114752.
- 48) Ishii K, Ishiai M, Morimoto H, Mito-Shinohara K, Niwa O, Takata M, Shinohara T. The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b pathway regulates the radiation response of mouse spermatogonial stem cells. **Stem Cell Reports**. 2014;3(4):676-89.
- 49) Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H. Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using Escherichia coli cells. **Protein Expr Purif**. 2014;103C:8-15.
- 50) Huang Y, Leung JW, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X, Huong D, Takata M, Chen J, Li L. Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. **Cell Rep**. 2014;7(6):1849-57.
- 51) Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugasawa K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. **Cell Rep**. 2014;7(4):1039-47.
- 52) Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, Takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, Enomoto T. Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. **Biochim Biophys Acta**. 2014;1843(5):1002-12.
- 53) 倉光球 浜口功. リボソーム異常症と関連疾患. **血液フロンティア 特集 赤血球造血の基礎と臨床** 2014;24(4):p81(591)-p89(599).
- 54) Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. **Haematologica** 2014; 99:19-27.
- 55) Fujii Y, Ishikawa N, Kobayashi Y, Kobayashi M, Kato M. Compound heterozygosity in GPR56 with bilateral frontoparietal polymicrogyria. **Brain & Development** 2014; 36:528-31.
- 56) Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Tajima G, Kobayashi M. Ictal electroencephalography and electromyography features in symptomatic infantile epileptic encephalopathy with late-onset spasms. **Neuropediatrics** 2014;45:36-41.
- 57) Kobayashi Y, Ishikawa N, Fujii Y, Nakamura K, Kobayashi M. A case of trisomy 18 with exacerbation of seizures triggered by administration of valproic acid. **Am J Med Genet A**. 2014;164A:285-6.
- 58) Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **Journal of Leukocyte Biology** 2014;95:667-676.
- 59) Joichi Y, Chijimatsu I, Yarita K, Kamei K, Miki M, Onodera M, Harada M, Yokozaki M,

- Kobayashi M, Ohge H. Detection of *Mucor velutinosus* in a blood culture after autologous peripheral blood stem cell transplantation: a pediatric case report. **Medical Mycology Journal** 2014;55:E43-48.
- 60) 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. **Modern Rheumatology** 2014.
- 61) Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Samukawa M, Kusunoki S, Kobayashi M. A pediatric case of peripheral polyneuropathy with IgM anti-GM1 antibody associated with a group A beta-hemolytic streptococcus infection. **Pediatric Neurology**. 2014;51:441-3.
- 62) Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Kobayashi M. Increased interleukin-6 high-sensitivity C-reactive protein levels in pediatric epilepsy patients with frequent, refractory generalized motor seizures. **Seizure** 2014. [Epub ahead of print]
- 63) 小林正夫, 川口浩史 . 自己免疫性好中球減少症 . **日本内科学会雑誌** 2014;103:1639-1644.
- 64) 溝口洋子, 小林正夫 . 重症先天性好中球減少症の病態解析研究の進歩 . **血液内科** 2014;68: 676-81.
- 65) 土居岳彦, 小林正夫 . 小児血液疾患 よくわかる最新知見 好中球異常症の概要と診断の進め方 . **小児科** 2014;55:1577-1583.
- 66) 岡田賢, 小林正夫 . IL-21 シグナルはナイーブB細胞を IL-2 感受性にして形質細胞に分化させる **血液内科** 2014;69:405-409.
- 67) 川口晃司, 内田佳子, 齋藤敦郎, 宮田憲二, 長谷川大一郎, 小坂嘉之, 岩田あや, 仁紙宏之, 小林正夫 . 同種骨髄移植が奏功した新規ELANE遺伝子変異を有する重症先天性好中球減少症 . **臨床血液** 2014;55:2294-2299.
- 68) Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. *TUBB1* mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. **Eur J Haematol**. 2014;92:276-82.
- 69) Kuzmanović M, Kunishima S, Putnik J, Stajić N, Paripović A, Bogdanović R. Congenital thrombocytopenia with nephritis-the first case of MYH9 related disorder in Serbia. **Vojnosanit Pregl**. 2014;71:395-8.
- 70) Abe Y, Kobayashi S, Wakusawa K, Tanaka S, Inui T, Yamamoto T, Kunishima S, Haginoya K. Bilateral periventricular nodular heterotopia with megalencephaly: a case report. **J Child Neurol**. 2014;29:818-22,2014.
- 71) Kunishima S, Kitamura K, Matsumoto T, Sekine T, Saito H. Somatic mosaicism in *MYH9* disorders: the need to carefully evaluate apparently healthy parents. **Br J Haematol**. 2014;165:885-7.
- 72) Noris P, Biino G, Pecci A, Civaschi E, Savoia A, Seri M, Melazzini F, Loffredo G, Russo G, Bozzi V, Notarangelo LD, Gresele P, Heller P, Pujol-Moix N, Kunishima S, Cattaneo M, Bussel J, De Candia E, Cagioni C, Ramenghi U, Cagioni C, Fabris F, Balduini CL. Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: Analysis of 376 patients with all known disorders. **Blood** 2014;124:e4-e10.
- 73) Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, Zieger B, Rand ML, Pujol-Moix N, Caliskan U, Pecci A, Noris P, Srivastava A, Ward C, Kopp MC, Alessi MC, Bellucci S, Beurrier P, de Maistre E, Favier R, Hezard N, Hurtaud-Roux MF, Latger-Cannard V, Lavenu-Bombled C, Meunier S, Negrier C, Nurden A, Proulle V, Randrianaivo H, Fabris F, Platokouki H, Rosenberg H, Gargouri AF, Heller P, Karimi M, Balduini CL, Pastore A, Lanza F. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. **Hum Mut**. 2014;35:1033-45.
- 74) Abe Y, Kikuchi A, Kobayashi S, Wakusawa K, Tanaka S, Inui T, Kunishima S, Kure S, Haginoya K. Xq26.1-26.2 gain identified on

array comparative genomic hybridization in bilateral periventricular nodular heterotopia with overlying polymicrogyria. **Dev Med Child Neurol.** 2014;56:1221-4.

- 75) Sirachainan N, Komwilaisak P, Kitamura K, Hongeng S, Sekine T, Kunishima S. The first two cases of *MYH9* disorders in Thailand: An international collaborative study. **Ann Hematol.** (in press)
- 76) Bottega R, Marconi C, Faleschini M, Baj G, Cagioni C, Pecci A, Pippucci T, Ramenghi, U, Pardini S, Ngu L, Baronci C, Kunishima S, Balduini CL, Seri M, Savoia A, Noris P. *ACTN1*-related thrombocytopenia: identification of novel families for phenotypic characterization. **Blood** (in press)

2. 学会発表

- 1) 伊藤悦朗 . Diamond-Blackfan 貧血の病態と診断 (ワークショップ) . **第 24 回日本産婦人科新生児血液学会** (2014 年 6 月 13-14 日, 横浜) .
- 2) 伊藤悦朗 . ダウン症候群の造血異常 (教育講演) . **第 76 回日本血液学会学術集会** (2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日, 大阪) .
- 3) 土岐力, 伊藤悦朗 . Insight into molecular mechanisms of pathology in Diamond-Blackfan Anemia (シンポジウム: Recent advance in genetic abnormalities of hereditary hematologic disorders). **第 76 回日本血液学会学術集会** (2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日, 大阪) .
- 4) Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Wang RN, Terui K, Sasaki S, Kudo, K, Sato T, Ito E. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-Blackfan anemia in Japan. **第 76 回日本血液学会学術集会** (2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日, 大阪) .
- 5) Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H. Exploring potential usefulness of 5-aminolevulinic acid for X-linked sideroblastic anemia. **第 56 回米国血液学会**(2014 年 12 月, サンフランシスコ).
- 6) Inokura K, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythropoiesis: a potential link to ring sideroblast formation. **第 56 回米国血液学会** (2014 年 12 月, サンフランシスコ).
- 7) Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **第 19 回欧州血液学会** (2014 年 6 月, ミラノ).
- 8) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in monomac syndrome evolving into myelodysplasia and acute leukemia. **第 19 回欧州血液学会** (2014 年 6 月, ミラノ).
- 9) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole genome sequencing in MonoMAC syndrome evolving into MDS/AML. **第 76 回日本血液学会** (2014 年 10 月, 大阪).
- 10) Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Role of GATA2 in the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **第 76 回日本血液学会** (2014 年 10 月, 大阪).
- 11) Niikuni R, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Tanaka T, Harigae H. Exploring the potential usefulness of 5-aminolevulinic acid (ALA) for

- sideroblastic anemia. **第 76 回日本血液学会** (2014 年 10 月, 大阪).
- 12) Yabe H, Uchida N, Takahashi S, Ohno Y, Kasai K, Kanamori H, Mori S, Nagamura T, Kato K, Murata M, Suzuki R, Atsuta Y. Comparison of two doses of antithymocyte globulin in pediatric patients with aplastic anemia who received allogeneic bone marrow transplantation. **40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation** (April 2014, Mirano Italy).
 - 13) Yabe H, Tabuchi K, Takahashi Y, Kudo K, Kato K, Sakamaki H, Kaea K, Kanamori H, Mori S, Nagamura T, Murata M, Suzuki R, Kanda Y. Evaluation of cell dose to achieve engraftment in unrelated cord blood transplantation. **40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation** (April 2014, Mirano Italy).
 - 14) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Ohtsubo K, Fukumura A, Itosu M, Muroi K, Koh K, Kato S, Yabe H. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for Japanese Fanconi anemia patients with myeloid malignancies. **40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation** (April 2014, Mirano Italy).
 - 15) Yabe M, Hira A, Yabe H, Morimoto T, Fukumura A, Miyashita M, Ohtsubo K, Matsuo K, Takata M. Infant Japanese Fanconi anemia patients with the ALDH2-AA Genotype. **26th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium** (September 2014, Bethesda, USA).
 - 16) Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, yabe M. Persistent parvovirus B19 infection resulting in donor cell leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a patient with Fanconi anemia. **26th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium** (September 2014, Bethesda, USA).
 - 17) Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Tahara H, Kurumizawa H, Ogawa S, Takata M, Yabe H, Yabe M. Identification of novel UBE2T mutations in Japanese Fanconi anemia patients. **37th Annual meeting of the molecular biology society of Japan** (2014年11月, 横浜).
 - 18) 高田穰. ファンコニ貧血症と DNA 修復メカニズム. **第 36 回日本光医学・光生物学会シンポジウム** (招待講演) (2014 年 7 月 25 日, 大阪).
 - 19) 高田穰. 遺伝性 DNA 修復異常疾患: 家族性乳がんとファンコニ貧血. **日本家族性腫瘍学会 第 17 回家族性腫瘍セミナー** (2014 年 8 月 24 日, 東大阪).
 - 20) 平明日香. 日本人ファンコニ貧血患者では変異型 ALDH2 が骨髄不全の早期発症に関連する. **第 2 回ブルストル血液学アカデミー** (2014 年 9 月 20 日, 京都).
 - 21) 平明日香, 吉田健一, 佐藤浩一, 嶋本顕, 田原栄俊, 胡桃坂仁志, 小川誠司, 高田穰, 矢部普正, 矢部みはる. 日本人ファンコニ貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定. **第 37 回日本分子生物学会年会** (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
 - 22) 高田穰, 勝木陽子, 佐藤浩一, 石合正道, 胡桃坂仁志. ファンコニ貧血経路とそのキータンパク質 FANCD2 の機能解析. **第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ** (2013 年 11 月 25-27 日, 横浜).
 - 23) 坂本裕貴, 大川沙織, 穀田哲也, 勅使河原愛, 飯島健太, 高田穰, 小松賢志, 田内広. 相同組換え修復の細胞周期依存性解析. **日本放射線影響学会第 57 回大会** (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島).
 - 24) Takata M, Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Tahara H, Kurumizaka H, Ogawa S, Yabe H, Yabe M. UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients. **The 9th 3R Symposium** (17-21, November 2014, Gotemba).
 - 25) Takata M. Comprehensive analysis of Japanese Fanconi anemia (FA) patients has

- led to the identification of an E2 enzyme UBE2T as a novel FA gene. **日米修復会議** (2014年10月29日, 鳴門).
- 26) 高橋大介, 佐藤浩一, 平山恵美子, 高田穰, 胡桃坂, 仁志. DNA鎖間架橋除去におけるFAN1ヌクレアーゼの役割. **第87回日本生化学会大会** (2014年10月15-18日, 京都).
- 27) Kojima S. Role of rATG in treatment of AA. Educational Meeting : Role of Immunosuppressive therapy in treatment of Aplastic Anemia. (Apr. 26, 2014, Singapore).
- 28) Kojima S. Expert Meeting at Wuhan Union Hospital (Jul.15, 2014., Wuhan, China).
- 29) Kojima S. Expert Meeting at Wharton International Hotel (Jul.16, 2014, Wharton, China).
- 30) Kojima S. Hematology Expert Meeting (Jul.18, 2014, Guangzhou, China).
- 31) Kojima S. South China Hematology Summit (Jul.19, 2014, Guangzhou, China).
- 32) Kojima S. Aplastic Anemia : Therapeutic updated in HSCT. **2013 International Forum on Bone Marrow Failure** (Aug.16, 2013, Tianjin, China).
- 33) Muramatsu H, Takahashi Y, Nishikawa E, Sekiya Y, Kawashima N, Okuno Y, Narita A, Doisaki S, Irie M, Hama A, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr Virus-Associated Post-transplant Lymphoproliferative Disease. **The 19th congress of APBMT** (Oct.16, 2014, Hangzhou, China).
- 34) Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Yui S, Inokuchi, K, Ito E, Ogawa S, Kojima S. The Clinical and Genetic Features of Dyskeratosis Congenita, Cryptic Dyskeratosis Congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome in Japan. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
- 35) Hasegawa D, Hirabayashi S, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Manabe A. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Refractory Cytopenia of Childhood. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
- 36) Hama A, Atsushi M, Hasegawa D, Nozawa K, Okuno Y, Irie M, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Central Morphology Review of Childhood Bone Marrow Failure in Japan. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
- 37) Patel B, Huang D, Thota S, Przychodzen P, Sakaguchi H, Kojima S, Ogawa S, Sekeres M A, Makishima H, Jaroslaw P. Maciejewski. Chronic myelomonocytic leukemia (CMML) can be categorized by ancestral mutational events. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
- 38) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated red cell reduced glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
- 39) Yoshida N, Yabe H, Kudo K, Kobayashi R, Yabe M, Inoue M, Miki M, Sakamaki H, Kato K, Kawa K, Suzuki R, Watanabe K, Kojima S. Outcomes of Stem Cell Transplantation with Fludarabine and Melphalan Conditioning for Children with Acquired Bone Marrow Failure: A Nationwide Retrospective Study. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.7 2014, San Francisco, USA).
- 40) Okuno U, Atsushi N, Muramatsu H, Yoshida K, Hama A, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Sakaguchi H, Doisaki S, Takahashi Y, Shiraishi, Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Whole-exome sequencing reveals a paucity of somatic gene mutations in aplastic anemia and refractory cytopenia of childhood. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.8 2014, San

- Francisco, USA).
- 41) Narita A, Sekiya Y, Sakaguchi H, Nishio N, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida N, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, MD1*, Kamei M, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Predicting response to immunosuppressive therapy by the combination of minor paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones and lymphocyte telomere length in children with aplastic anemia. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.8 2014 , San Francisco, USA).
 - 42) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Doisaki S, Hama A, Wang X, Narita A, Kawashima N, Xu Y, Sakaguchi H, Takahashi Y, Sanada M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Diagnostic Efficacy of Whole-exome sequencing in 250 patients with congenital bone marrow failure. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.8 2014 , San Francisco, USA).
 - 43) Kawshima N, Okuno Y, Sekiya Y, Wang X, Xu Y, Narita, Doisaki S, Kamei M, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Generation of cell lines harboring SETBP1 Mutations By the Crispr/Cas9 System. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.8 2014 , San Francisco, USA).
 - 44) 古山和道, 山下莉奈, 野村和美, 加藤恭丈, 久保田美子. 非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) の新たなヘム依存的分解機構. **第 87 回日本生化学会大会** (2014 年 10 月 15-18 日, 京都).
 - 45) 山下莉奈, 久保田美子, 野村和美, 古山和道. 非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) のミトコンドリア内半減期調節におけるヘム結合モチーフの役割. **第 650 回岩手医学会例会** (2014 年 7 月 25 日, 盛岡).
 - 46) 古山和道, 久保田美子. CRISPR/CAS9 システムを用いた 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS2) 遺伝子の赤芽球特異的エンハンサーの機能解析. **第 650 回岩手医学会例会** (2014 年 7 月 25 日, 盛岡).
 - 47) 青木貴子, 市東正幸, 小倉浩美, 高橋秀弘, 岩井朝幸, 濱端隆行, 渡邊健一郎, 常松健一郎, 奥野友介, 村松秀城, 吉田健一, 宮野悟, 大賀正一, 小川誠司, 小島勢二, 菅野仁. 病因未確定の先天性溶血性貧血に対する全エクソーム解析. **日本人類遺伝学会第 59 回大会** (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 48) 尾上佳子, 石谷健, 内山智貴, 青木貴子, 市東正幸, 川上和之, 松井英雄, 林和彦, 斎藤加代子, 菅野仁. イリノテカンによる重症下痢症を予測する PGx バイオマーカーとしての CYP2F1 遺伝子多型. **日本人類遺伝学会第 59 回大会** (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 49) 神尾英則, 神尾孝子, 尾上佳子, 市東正幸, 青木貴子, 内山智貴, 亀岡信悟, 斎藤加代子, 菅野仁. テガフル・ウラシル投与による肝機能障害を予測する新規 PGx バイオマーカーの探索. **日本人類遺伝学会第 59 回大会** (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 50) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Ohara A, Ishiguro A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated red cell reduced glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. **56th ASH Annual Meeting&Exposition** (2014 年 12 月 6 日, San Francisco, USA).
 - 51) 市東正幸, 青木貴子, 槍澤大樹, 小倉浩美, 大賀正一, 岩井朝幸, 末延聡一, 伊藤悦朗, 奥野友介, 小島勢二, 小川誠司, 菅野仁. 原因不明先天性溶血性貧血症例の全エクソーム解析による膜骨格蛋白遺伝子変異の同定. **第 76 回日本血液学会学術集会** (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
 - 52) 菅野仁, 青木貴子, 市東正幸, 槍澤大樹, 小倉浩美. わが国における G6PD 異常症の現状. **第 76 回日本血液学会学術集会** (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
 - 53) 菅野仁. 新生児・乳児期に発症する先天性溶血性貧血の病因と診断. **第 24 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会** (2014 年 6 月 13 日, 横浜).
 - 54) 槍澤大樹, 岡本好雄, 松田和樹, 久保田友晶,

- 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 今野マユミ, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. 安全な CART の運用と適応拡大への新たな試み. 第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会 (2014 年 5 月 15 日, 奈良).
- 55) 岡本好雄, 松田和樹, 久保田友晶, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美コナン間菅野仁. クリオプレシピテート製剤の院内調製と心臓血管外科手術への応用. **第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2014 年 5 月 15 日, 奈良).
- 56) 久保田友晶, 松田和樹, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 岡本好雄, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. 非溶血性輸血副作用発生状況と副作用報告回収率改善への取り組み. **第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2014 年 5 月 15 日, 奈良).
- 57) 松田和樹, 久保田友晶, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 岡本好雄, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. 当院における静注用免疫グロブリン (IVIg) の使用状況について. **第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会** (2014 年 5 月 15 日, 奈良).
- 58) 槍澤大樹, 岡本好雄, 菅野仁. 安全な CART の運用と低温保存腹水を用いた適応拡大への新たな試み. **35 回日本アフェシス学会学術集会ワークショップ** (2014 年 9 月 27 日, 東京).
- 59) Utsunomiya A, Tsumura M, Ohno N, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kobayashi M. Excessive Nitric Oxide production of CGD neutrophils induces the down-regulation of *NOS3* and *EDN1* expression in human endothelial cells. **The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (Dec 6 - 9, 2014, San Francisco, USA).
- 60) Mizoguchi Y, Okada S, Tsumura M, Hirata O, Minegishi S, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. *STAT1* gain-of-function in patients with chronic mucocutaneous candidiasis can be detected by the excessive phosphorylation of STAT1 in peripheral blood monocytes. **The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition**, (Dec 6 - 9, 2014, San Francisco).
- 61) Hayakawa S, Maeno S, Ohno N, Okada S, Nishimura Y, Hayashidani M, Kobayashi M. Significant augmentation of regulatory T cells in early neonatal period. **16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies** (Oct 29 to Nov 1, 2014, Prague, Czech).
- 62) Mizoguchi Y, Furue A, Chijimatsu I, Miki M, Tomioka K, Konishi N, Ono A, Kawaguchi H, Nakamura K, Kobayashi M. Early elimination of Factor VIII inhibitor by ITI with high dose immunoglobulin in hemophilia A children. **WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA**(May 11-15, 2014, 2014 World Congress, Melbourne).
- 63) 遣田美貴, 菅野直希, 古谷麻衣子, 坪井伸夫, 宮崎陽一, 小倉誠, 徳留悟朗, 細谷龍男, 横尾隆, 海渡健, 國島伸治. 腎障害の経過が緩徐な Epstein 症候群の 1 例. **第 111 回日本内科学会総会** (平成 26 年 4 月, 東京).
- 64) 國島伸治. 学術推進委員会 (SPC) シンポジウム 1 血小板減少の病態と分子メカニズム~最新の知見 Molecular mechanisms for congenital macrothrombocytopenia. **第 36 回日本血栓止血学会学術集会** (平成 26 年 5 月, 大阪).
- 65) 國島伸治, 北村勝誠, 西村智, 鈴木英紀, 今泉益栄, 齋藤英彦. 巨核球特異的 1-tubulin 異常は微小管構成阻害により胞体突起形成不全を来す. **第 36 回日本血栓止血学会学術集会** (平成 26 年 5 月 29, 大阪).
- 66) 兼松毅, 岸本磨由子, 鈴木伸明, 國島伸治, 松下. α -Storage Pool 病の 1 例. **第 36 回日本血栓止血学会学術集会** (平成 26 年 5 月, 大阪).
- 67) 岸本磨由子, 松田剛典, 築瀬正吾, 鈴木伸明, 池尻誠, 高木明, 國島伸治, 小嶋哲人, 直江知

- 樹，丸山光生，勝見章，松下正．遺伝子改変マウスを用いた small GTPase RhoF の機能解析．**第 36 回日本血栓止血学会学術集会**（平成 26 年 5 月，大阪）．
- 68) 小林宣彦，小川孔幸，柳澤邦雄，林俊誠，三原正大，合田史，内海英貴，時庭英彰，堀口淳，國島伸治，野島美久．HLA 抗体を有する血小板無力症の周術期止血管理．**第 36 回日本血栓止血学会学術集会**（平成 26 年 5 月 29，大阪）．
- 69) 松本多絵，柳原剛，吉崎薫，土屋正巳，高瀬真人，益田幸成，清水章，國島伸治，前田美穂，伊藤保彦．学校検尿を契機として MYH9 異常症の診断に至った一男児例．**第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会**（平成 26 年 6 月，秋田）．
- 70) 岡野聡美，高瀬雅史，井関憲一，鳥海尚久，金田眞，國島伸治．R1165C 変異を確認した MYH9 異常症の 1 家系．**日本小児科学会北海道地方会第 290 回例会**（平成 26 年 6 月，旭川）．
- 71) Suzuki N, Kunishima S, Matsushita T. Mouse models of MYH9 disorders. **60th Annual Meeting of the SSC, International Society on Thrombosis and Haemostasis** (June 2014, Milwaukee).
- 72) 國島伸治，北村勝誠，松本多絵，関根孝司．MYH9 異常症の体細胞モザイク．**第 15 回日本検査血液学会学術集会**（平成 26 年 7 月，仙台）．
- 73) 國島伸治．幹細胞技術の検査医学研究への応用．**第 33 回日本臨床検査医学会東海北陸支部例会**（平成 26 年 8 月，名古屋）．
- 74) Sirachainan N, Komwilaisak P, Kitamura K, Hongeng S, Sekine T, Kunishima S. Identification of myosin heavy chain 9 (MYH9) disorders in children with macrothrombocytopenia: a result from two institutions in Thailand. **8th Congress of the Asian-Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis** (October 2014, Hanoi, Vietnam).
- 75) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y. GT-like phenotype with macrothrombocytopenia induced by α IIB β 3 activating mutation in mice. **第 76 回日本血液学会総会**（平成 26 年 10 月，大阪）．
- 76) Kishimoto M, Matsuda T, Yanase S, Katsumi A, Suzuki N, Ikejiri M, Takagi A, Ikawa M, Kojima T, Kunishima S, Kiyoi H, Naoe T, Matsushita T, Maruyama M. RhoF promotes murine late B cell development: RhoF promotes murine marginal zone B cell development. **第 76 回日本血液学会総会**（平成 26 年 10 月，大阪）．
- 77) 安富素子，國島伸治，岡崎新太郎，土田晋也，鈴木孝二，吉川利英，谷澤昭彦，大嶋勇成．新規 ACTN1 変異による先天性巨大血小板性血小板減少症の 1 例．**第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会**（平成 26 年 11 月，岡山）．
- 78) 西村美穂，伊藤早織，中川慎一郎，松尾陽子，大園秀一，上田耕一郎，稲田浩子，松石豊次郎，國島伸治．発熱時の採血を契機として May-Hegglin 異常の診断に至った男児例．**第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会**（平成 26 年 11 月，岡山）．
- 79) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y. α IIB(R990W), a constitutive activating mutation of integrin α IIB β 3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with impairment of platelet function. **56th American Society for Hematology Annual Meeting and Exposition** (December 2014, San Francisco, USA).

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

表1. 2006 ~ 2013年診断登録症例数

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	216 / 239	219 / 242	212 / 230
(%)	83%	88%	90%	90%	90.3%	90.4%	90.5%	92%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	62	49	49
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5	11	1
AA / PNH	2	1	1	0	1	0	0	0
Fanconi anemia	5	4	6	1	4	2	6	4
Diamond-Blackfan anemia	9	6	9	10	6	9	6	7
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6	4
Schwachman-Diamond syndrome	0	1	1	2	0	0	2	1
Cong. Dyserythropoietic anemia	No data	No data	1	0	0	1	0	0
Sideroblastic anemia	No data	No data	2	1	1	0	1	0
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4	4
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	5	3
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0	0
Cong. Spherocytosis	No data	•	•	•	54	49	26	32
Cong. Elliptocytosis	No data	•	•	•	2	1	1	2
G6PD deficiency	No data	•	•	•	5	5	3	1
PK deficiency	No data	•	•	•	0	0	0	0
Other erythrocyte enzyme def.	No data	•	•	•	2	0	0	0
Sickel cell disease	No data	•	•	•	1	1	0	0
Unstable hemoglobinopathy	No data	•	•	•	1	0	0	0
Thalasemia	No data	•	•	•	18	16	11	8
Other hemoglobinopathy	No data	•	•	•	0	0	0	1

1. (1)-3 先天性赤芽球癆 (Diamond-Blackfan 貧血) の重症度分類

先天性赤芽球癆 (Diamond-Blackfan 貧血) の重症度分類 (平成 26 年度作成)

軽 症	輸血非依存性で薬物療法を必要としない
やや軽症	輸血非依存性だが、ステロイド以外の薬物療法を必要とする
中等症	ステロイド依存性
重 症	定期的な赤血球輸血を必要とする

注1 薬物療法とは、ステロイドの他シクロスポリンなどを含む。

注2 ステロイド依存性とは、ヘモグロビン濃度 8.0 ~10.0 g/dL を維持するのにステロイドの連日あるいは隔日投与が必要な場合とする。

注3 定期的な赤血球輸血とは、ヘモグロビン濃度 8.0 g/dL を維持するのに 2~8 週毎の輸血が必要な場合とする。

* 鉄過剰症などの貧血治療に伴う臓器合併症は除く。

* DBAの症候としての奇形徴候に伴う臓器合併症は除く。

2. (4)-3 Congenital dyserythropoietic anemia の重症度分類

Congenital dyserythropoietic anemia の重症度分類 (平成 26 年度作成)

軽 症	赤血球輸血を受けたことがない
中等症	赤血球輸血を受けたことはあるが、現在は受けていない
重 症	定期的な赤血球輸血を必要とする

注1 定期的な赤血球輸血とは、ヘモグロビン濃度 8.0 g/dL を維持するのに 2~8 週毎の輸血が必要な場合とする。

* 鉄過剰症などの貧血治療に伴う臓器合併症は除く。

3. (6)-1 Shwachman-Diamond 症候群 (SDS) の診断基準

Shwachman-Diamond 症候群 (SDS) の診断基準 (平成 26 年度作成)

1. 臨床所見としては、好中球を主体とした血球減少、慢性下痢、発育不良を認める。
2. 骨髄不全を認め、以下の一つ以上を満たす。
 - 1) 絶対数 1500/mL 未満の好中球減少 (間欠的あるいは慢性的; 少なくとも 3 ヶ月間隔で 2 回)
 - 2) 血球産生低下による血球減少 (貧血、血小板減少、汎血球減少; 少なくとも 3 ヶ月間隔で 2 回)
3. 膵外分泌不全を認め、以下の一つ以上を満たす。
 - 1) 膵外分泌酵素低値
 - 3 歳未満でトリプシノーゲン低値
かつ / または
 - 3 歳以上で膵型アミラーゼ低値
 - 2) 画像 (超音波、CT、MRI) で小型あるいは脂肪の多い膵を認める。
 - 3) 便中脂質の増加 (72 時間収集)
4. 膵外分泌不全と骨髄不全の原因となる他疾患を除外する。^{注1)}
5. 以下の所見があれば確実性が増す。
 - 1) 一等親に本症候群と診断された家族がいる。
 - 2) 骨格異常
 - 3) 行動異常
 - 4) 年齢別正常値と比較した MCV 高値 (ただし溶血や栄養不良等による他の原因によらない)
 - 5) ヘモグロビン F 高値
 - 6) 骨髄検査で白血病、骨髄異形成症候群、染色体異常のうち一つ以上に該当する。
 - 7) SBDS 遺伝子変異を両アリルに認める。
6. 診断に際しては、1、2 および 3 によって本症を疑い、4 によって他の疾患を除外し、5 によって診断をさらに確実なものとする。

注 1 膵外分泌不全と骨髄不全がみられる Pearson 症候群や Fanconi 貧血などの他の先天性骨髄不全症候群、嚢胞線維症といった膵外分泌不全の原因となる他の疾患を鑑別診断する。

4. (6)-3 Shwachman-Diamond 症候群の重症度分類

重症度分類 (平成 26 年度作成)

SDS では膵外分泌不全による症状は年齢が上がるにつれ改善することが多く、生命予後に最も関連するのは、骨髄不全の程度と骨髄異形成症候群・白血病への移行である。骨髄不全の重症度については、再生不良性貧血の重症度分類 (表) に準じる。また、骨髄異形成症候群から白血病に移行すると、非常に予後不良であるため、白血症を発症した場合、最も重症であるとする。

表. 再生不良性貧血の重症度分類

最重症	重症	やや重症	中等症	軽症
重症でかつ 好中球 < 200/ μ L	好中球 < 500/ μ L	好中球 < 1000/ μ L	好中球 < 1000/ μ L	
	血小板 < 2 万/ μ L	血小板 < 5 万/ μ L	血小板 < 5 万/ μ L	
	網赤血球 < 2 万/ μ L	網赤血球 < 6 万/ μ L	網赤血球 < 6 万/ μ L	
	上記 2 つ以上を満たし、 最重症でない	上記 2 つ以上を満たし、 定期的な輸血必要	上記 2 つ以上を満たし、 最重症、重症でない	中等症～ 最重症で ない

5. (7)-1 先天性好中球減少症の診断基準

先天性好中球減少症の診断基準（平成 26 年度作成）

1. 臨床所見としては、易感染性を認める。生後早期から化膿性感染症を反復し、重症・遷延化を示す。
 2. 生後早期から好中球絶対数（ANC）の減少（500/mL 以下）が持続しているか、ANC の減少が 3 か月以上観察される。多くは ANC が 200/mL 以下であり、単球増加、好酸球増加が認められることがある。ただし、周期性の場合には 3 週間隔で好中球減少（ANC 200/mL 以下）と単球増加がみられる。
 3. 好中球減少症を来たし得る他の疾患を否定できる。^{注1)}
 4. 以下の所見があれば確実性が増す。
 - 1) 家族歴を有する。
 - 2) 骨髄像は、前骨髄球あるいは骨髄球での成熟障害が認められる。全体的に顆粒球系細胞は低形成で、赤芽球系、巨核球系には異常を認めない。
 - 3) 先天性好中球減少症にみられる遺伝子変異を有する（別表）。
 5. 診断に際しては、1 および 2 によって先天性好中球減少症を疑い、3 によって他の疾患を除外し、4 によって診断をさらに確実なものとする。
-

注 1)

- (i) 主として破壊の亢進によるもの：新生児同種免疫性好中球減少症、自己免疫性好中球減少症、脾機能亢進など
- (ii) 主として産生低下によるもの：薬剤または放射線障害、ビタミン B12・葉酸欠乏、再生不良性貧血、白血病、骨髄異形成症候群、癌の骨髄転移など
- (iii) 産生の低下と破壊の亢進がともに関与しているもの：重症感染症など
- (iv) 他の先天性骨髄不全症：Shwachman-Diamond 症候群、先天性角化不全症など

別表 先天性好中球減少症の分類

疾患	障害細胞	機能障害	合併所見	遺伝形式	変異遺伝子	OMIM番号
(a) 重症先天性好中球減少症 1型 (SCN1) (ELANE変異)	好中球	骨髄細胞分化	MDS/白血病	AD	ELANE	202700
(b) SCN2 (GFI1欠損症)	好中球	骨髄細胞分化	B/Tリンパ球減少	AD	GFI1	613107
(c) SCN3 (Kostmann病)	好中球	骨髄細胞分化	高次脳機能・神経学的障害、MDS/白血病	AR	HAX1	610738
(d) SCN4 (G6PC3欠損症)	好中球、線維芽細胞	骨髄細胞分化、 酸素産生	走化、活性 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	AR	G6PC3	612541
(e) SCN5	好中球、線維芽細胞	骨髄細胞分化、 シヨン	マイグレーション 髄外造血、骨髄線維化、腎肥大	AR	IFP545	615285
糖原病1b型	好中球、単球・マクロファージ	骨髄細胞分化、 酸素産生	走化、活性 空腹時血糖、乳酸アシドーシス、 高脂血症、肝腫大	AR	G6PT1	232220
周期性好中球減少症	好中球	分化	他の白血球、血小板の周期性変動	AD	ELANE	162800
X連鎖性好中球減少症/骨髄異形成症候群	好中球、単球・マクロファージ	有糸分裂	単球減少	XL, gain of function	WAS	300299
P14/LAMTOR2欠損症	好中球、リンパ球、メラニン産生細胞	核内体生成	低ガンマグロブリン血症、CD8T細胞障害 活性低下、部分白子症、成長障害	AR	ROBLD3/LAMTOR2	610389
Barth症候群	好中球	骨髄細胞分化	心筋症、筋疾患、成長遅延	XL	tafazzin (TAZ)	302060
Cohen症候群	好中球	骨髄細胞分化	網膜炎、発達遅延、顔面奇形	AR	COHI	216550
好中球減少を伴う多形皮膚萎縮症	好中球	骨髄細胞分化	皮膚萎縮症、白血球減少、MDS	AR	C16ORF57	613276
CSF3R変異	好中球 (好中球減少は軽度)	骨髄系細胞の成熟障害なし	G-CSFに反応なし	AR	CSF3R	
JAGNI変異	好中球	骨髄細胞分化	骨格系異常 (低身長)、歯牙形成異常	AR	JAGNI	

6. (7)-1 先天性好中球減少症の重症度分類

先天性好中球減少症の重症度分類（平成 26 年度作成）

軽 症から中等症	皮膚感染症、咽頭扁桃炎、口内炎、リンパ節炎、 歯肉炎/歯周病、肛門周囲膿瘍、蜂窩織炎
重 症	肺炎、肺膿瘍、肝膿瘍、脾膿瘍、敗血症、 中枢神経系感染症（比較的稀）

* 好中球絶対数（ANC）の程度とは関係なく、感染症の頻度とその重症度が先天性好中球減少症の重症度となる。

* 慢性好中球減少時に骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病への移行・進展は最重症合併症であり、造血幹細胞移植が必須となる。

* 口内炎、歯肉炎/歯周病は、慢性感染症としてみられることが多い。

7. (8)-1 先天性血小板減少症の診断基準

先天性血小板減少症の診断基準（平成 26 年度作成）

1. 臨床所見として、出血症状を認める。出血症状は点状出血や紫斑などの粘膜出血が主であり、通常関節内出血は認めない。
 2. 生後早期から血小板数の減少（10 万/mL 以下）が持続する。ただし、10～14 万/mL と血小板減少が軽度のこともある。
 3. 血小板減少を来し得る他の疾患を否定できる。^{注1)}
 4. 以下の所見があれば確実性が増す。
 - 1) 家族歴を有する。
 - 2) 各疾患特異的な特徴や検査所見を有する（別表）。
 - 3) 先天性血小板減少症にみられる遺伝子変異を有する（別表）。
 5. 診断に際しては、1 および 2 によって先天性血小板減少症を疑い、3 によって他の疾患を除外し、4 によって診断をさらに確実なものとする。
-

注 1)

- (i) 主として破壊の亢進によるもの：特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、SLE およびその類縁疾患、抗リン脂質抗体症候群、DIC、溶血性尿毒症症候群(HUS)、血栓性血小板減少症(TTP)、血球貪食症候群、HIV 感染症、Kasabach-Merritt症候群など
- (ii) 主として産生低下によるもの：薬剤または放射線障害、再生不良性貧血、白血病、骨髄異形成症候群、癌の骨髄転移など
- (iii) 産生の低下と破壊の亢進がともに関与しているもの：重症感染症など
- (iv) 他の先天性骨髄不全症：Fanconi 貧血、Shwachman-Diamond 症候群、先天性角化不全症など

別表1 先天性血小板減少症の分類

血小板サイズ	疾患	特徴	検査所見	遺伝形式	原因遺伝子	OMIM番号	
小型血小板	Wisnott-Aldrich症候群	免疫不全、湿疹	白血球WASP低下	X連鎖性	WAS	301000	
	X連鎖性血小板減少症	免疫不全を伴わない	白血球WASP低下	X連鎖性	WAS	313900	
	常染色体優性遺伝性血小板減少症 (THC2)	急性白血病へ移行	血小板α顆粒減少		常染色体優性 ANKRD26	188000	
	急性骨髄性白血病を伴う家族性血小板減少症	急性骨髄性白血病へ移行	血小板ミオシンIIB蛋白発現		常染色体優性 RDN1	601399	
	先天性無巨核球性血小板減少症	巨核球減少、骨髄不全症へ移行	MPL遺伝子解析		常染色体優性 MPL	604498	
	橈骨欠損を伴う血小板減少症	橈骨欠損、成長に従い血小板数正常化	橈骨欠損		常染色体優性 RBM84	274000	
	橈骨尺骨癒合を伴う血小板減少症	橈骨尺骨癒合	橈骨尺骨癒合		常染色体優性 ROR11	605432	
	チトクロームC異常症 (THC4)	巨核球/血小板のアポトーシス	CYCS遺伝子解析		常染色体優性 CYCS	612004	
	大型血小板	MYH9異常症	白血球封入体、アルポート症状	白血球ミオシンIIA蛋白局在異常、腎炎、難聴、白内障		常染色体優性 MYH9	155100
		May-Hegglin異常	明瞭な白血球封入体、アルポート症状合併は低頻度				605249
Sebastian症候群		不明瞭な白血球封入体、アルポート症状合併は低頻度				153640	
Fechtner症候群		明瞭な白血球封入体、アルポート症状を合併				153650	
Epstein症候群		不明瞭な白血球封入体、アルポート症状を合併				231200	
Bernard-Soulier症候群		出血傾向	リストセチン凝集欠如、血小板GPIb/IX発現欠如		常染色体優性 GPIBA, GPIBB, GP9	189400/192430	
DiGeorge症候群/口蓋心顔面症候群		副甲状腺機能低下、低カルシウム血症、先天性新奇形	FISHによる22q11.2欠失		常染色体優性 22q11.2欠失 (GPIBB)	187800	
GPIIb/IIIa異常症		軽度出血傾向	血小板GPIIb/IIIa発現低下、恒常的活性型GPIIb/IIIa		常染色体優性 ITGA2B, ITGB3	615193	
ACTN1異常症		出血傾向	血小板大小不同、ACTN1遺伝子解析		常染色体優性 ACTN1		
2B型 von Willebrand病		骨髄維症へ移行	マール欠如、血小板凝集塊		常染色体優性 VWF	613554	
灰色血小板症候群	灰色血小板を伴う	血小板電子顕微鏡解析		常染色体優性 NBEAL2	139090		
関節拘縮-腎機能障害-胆汁鬱滞症候群	灰色血小板、貧血を伴うことがある			常染色体優性 PPS3B, WFPAS39	208085		
GFLB異常症	巨核球胞体突起形成不全	GPIIb遺伝子解析		常染色体優性 GFLB	187900		
TUBB1異常症		血小板β1-tubulin局在		常染色体優性 TUBB1	613112		
Paris-Trousseau/Jacobsen症候群		巨大血小板α顆粒、FISHによる11q23欠失		常染色体優性 11q23欠失 (FLI1)	188025/147791		
X連鎖性巨大血小板性血小板減少症	脳室周囲異所性灰白質	赤血球造血異常 (オラセミア線貧血)		X連鎖性 GATH1	300367/314040		
FLNA異常症	脳室周囲異所性灰白質	血小板filanin A発現		X連鎖性 FLNA	300049		
シトステロール血症	黄色腫、動脈硬化	有口赤血球、血清脂質異常		常染色体優性 ABCG5, ABCG8	210250		

8. (8)-3 先天性血小板減少症の重症度分類

重症度分類（平成 26 年度作成）

軽 症	血小板数 5 万/mL 以上
やや軽症	血小板数 2 万/mL 以上 5 万/ml 未満
中等症	血小板数 2 万/mL 未満
重 症	血小板数 1 万/mL 未満

*ただし、出血症状は血小板減少の程度とは必ずしも一致せず、疾患によっては血小板数の低下が軽度あるいは正常でも重篤な出血症状を呈することがある。

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データ・遺伝子解析

研究分担者 張替秀郎（東北大学大学院医学系研究科血液免疫病学分野 教授）

研究要旨：遺伝性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天性異常により発症する難治性の貧血であり、骨髄における環状鉄芽球の出現を特徴とする。稀少疾患である遺伝性鉄芽球性貧血の臨床データの解析や遺伝子変異については、東北大学が拠点として解析している。最も代表的な遺伝性鉄芽球性貧血は、赤血球におけるヘム合成系の初発酵素である赤血球型 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS2) の変異により発症する X 連鎖性鉄芽球性貧血 (XLSA) であるが、既知の遺伝子に変異が認められない症例も複数存在し、その発症機序は十分に解明されていない。今回、新たに 2 例の遺伝性鉄芽球性貧血症例を見出し、登録・解析を行った。

A．研究目的

鉄芽球性貧血 (sideroblastic anemia) は骨髄に環状鉄芽球が出現することを特徴とする難治性貧血であり、遺伝性鉄芽球性貧血と後天性鉄芽球性貧血の 2 つに大きく分類される。先天性鉄芽球性貧血はミトコンドリアにおける鉄の代謝に関わる遺伝子の先天性異常により発症する稀な疾患であるため、その頻度、病態については不明である。本研究では、本邦における遺伝性鉄芽球性貧血の病態、遺伝子異常を明らかにし、鉄芽球性貧血の診断ガイドラインを確立させることを目的とする。

B．研究方法

難治性疾患克服事業「遺伝性鉄芽球性貧血の診断基準と治療法の確立」班から引き続き行っている全国調査で見出された症例・家系について既知の鉄芽球性貧血の原因遺伝子の変異解析を行う。既知の遺伝子変異が認められない家系については、「稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究」班において次世代シーケンサーによる全エクソン解析あるいは全ゲノム解析を行う。この解析において候補遺伝子が見出された場合は、本班でその機能解析を行う。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析研究について所属施設の倫理委員会の承認を得る。主治医に患者本人もしくは保護者への説明・同意の取得がなされた上で、遺伝子解析を行う。

C．研究結果

本年度の一例目の新規症例は 2012 年生まれの女児、家族歴なし。生後 3 ヶ月頃より赤血球の系統のみの低下を来しており、赤血球輸血依存状態であった。明らかな外表奇形は認めず。これまでの精査から、再生不良性貧血は血球形態から否定的、サラセミア・Diamond-Blackfan 貧血も否定的、溶血所見無し、染色体検査は正常核型、であった。さらに、末梢血検査から小球性貧血、フェリチン高値、骨髄検査にて環状鉄芽球を認めているため、鉄芽球性貧血の診断目的で本調査研究に登録された。現在、本人及び両親の末梢血液細胞を用いた遺伝子変異解析を施行中である。

二例目は 2014 年生まれの男児、家族歴なし。出生後より汎血球減少あり、骨髄検査を行ったところ、赤芽球中の環状赤芽球比率 68% を認めたため、Pearson 疑いとして本調査研究に登録となった。登録時点では脾臓症状・神経筋症状無し。本人の末梢

血液細胞を用いた解析の結果、従来 Pearson 症候群で報告のある領域のミトコンドリア DNA 欠損を認めため (GeneBank Accession No. NC_012920 の Position: 8483-13459 に渡る計 4977bp の欠損) Pearson 症候群に伴う鉄芽球性貧血を考えた。現在、他症状出現の有無も含めて経過観察中である。

D . 考察

本邦における鉄芽球性貧血に関する全国調査の結果、遺伝性鉄芽球性貧血症例は計 19 例登録され、うち 79%は ALAS2 の異常を認め、一方、欧米で多い SLC25A38 遺伝子変異など既知の遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子は認められなかった (Ohba et al. Ann Hematol 2013)。従って、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子には人種差・地域差がある可能性が示唆された。しかしながら、症例数が少なくまだ結論は得られていない。二例目の症例は生後間もなく汎血球減少を認め、Pearson 症候群の診断に至った。遺伝性鉄芽球性貧血は、その原因遺伝子の機能の多様性から、XLSA 以外は幼少児期より貧血以外に神経・筋・内分泌器など他の臓器に異常を認める場合が多く、また、貧血自体も重症であることが多いため、実際に遺伝性鉄芽球性貧血であったものの、診断がついていない症例が多く存在する可能性を検証する必要がある。そのためには、小児科医との連携が重要であると考えられた。

E . 結論

今回、新たな遺伝性鉄芽球性貧血症例を見出した。変異未同定の症例については、新規変異遺伝子の解析を進めている。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H. Effect of 5-aminolevulinic acid on erythropoiesis: a preclinical in vitro characterization for the treatment of congenital sideroblastic anemia. **Biochem Biophys Res Commun.**

2014;454:102-108.

- 2) Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Kanehira M, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Haematologica** 2014;99:1686-1696.
- 3) Harigae H, Fujiwara T, Furuyama K. Heme metabolism and anemia. **Rinsho Ketsueki** 2014;55:729-734.
- 4) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in GATA-2 deficiency evolving into myelodysplasia and acute leukemia. **Ann Hematol.** 2014;93:1515-1522.
- 5) Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, Kobayashi M, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferase, promotes erythroid differentiation. **J Biol Chem.** 2014;21:8121-8134.

2. 学会発表

- 1) Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H. Exploring potential usefulness of 5-aminolevulinic acid for X-linked sideroblastic anemia. **第 56 回米国血液学会** (2014 年 12 月, サンフランシスコ).
- 2) Inokura K, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythropoiesis: a potential link to ring sideroblast formation. **第 56 回米国血液**

学会 (2014年12月, サンフランシスコ).

該当なし

- 3) Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **第19回欧州血液学会** (2014年6月, ミラノ).
- 4) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in monomac syndrome evolving into myelodysplasia and acute leukemia. **第19回欧州血液学会** (2014年6月, ミラノ).
- 5) Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole genome sequencing in MonoMAC syndrome evolving into MDS/AML. **第76回日本血液学会** (2014年10月, 大阪).
- 6) Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Role of GATA2 in the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **第76回日本血液学会** (2014年10月, 大阪).
- 7) Niikuni R, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Tanaka T, Harigae H. Exploring the potential usefulness of 5-aminolevulinic acid (ALA) for sideroblastic anemia. **第76回日本血液学会** (2014年10月, 大阪).

3. その他
該当なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

ファンconi貧血の臨床データ解析・遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 矢部普正（東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学 准教授）

研究要旨：Fanconi 貧血（FA）は DNA 修復欠損を基盤に、種々の身体異常と小児期発症の骨髄不全や白血化を特徴とする遺伝性疾患である。DNA 架橋剤添加による染色体脆弱検査と骨髄不全症を含む臨床症状および京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室における FA 遺伝子のゲノムシーケンスにより、東海大学における総計 82 例の日本人 FA につき検討した。同時に日本人 FA 患者 78 人の ALDH2（アセトアルデヒドの分解酵素）遺伝子解析も共同で行い、骨髄不全は AA 群、GA 群、GG 群の順に早く発症し、特に AA 群は生後早期より重症な血球減少と形態異常を呈した。33 例の MDS / 白血化 FA の移植症例について解析し、不応性貧血の段階で移植を行えば、再生不良性貧血と同等の成績が得られることが示唆された。

A . 研究目的

Fanconi 貧血（FA）は染色体不安定性と種々の身体異常と小児期に発症する骨髄不全、白血化や高発がんを特徴とする稀な遺伝性骨髄不全症である。臨床症状は一様ではなく、原因遺伝子も現在では 16 という多数の遺伝子が同定されている。日本人の FA 遺伝子群の疫学解析を行い、骨髄不全症、骨髄異形成症候群・白血病などの造血器腫瘍や固形がんの臨床像に基づき診療ガイドラインの作成を行う。

B . 研究方法

末梢血リンパ球への DNA 架橋剤添加による染色体脆弱検査と、日本人に最も高頻度に検出される FANCA の Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) を併用し、臨床症状を基本として FA のスクリーニングを行い、新規 FA 患者の各種サンプル（末梢血リンパ球、骨髄および皮膚線維芽細胞、骨髄細胞）につき試料保存を行う。京都大学放射線生物研究センター高田穰研究室にて解析された FA 遺伝子と ALDH2(アセトアルデヒドの分解酵素) の遺伝子変異を合わせて検討した。

（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」と「臨床研究に関する倫理指針」を順守し、インフォームドコンセントに基づいた倫理的にも科学的にも妥当な研究計画として実施した。「ファンconi貧血とその類縁疾患の原因遺伝子の探索および病態解明の研究」が継続申請として承認されている。

C . 研究結果

東海大学における次世代シーケンスによるエクソーム解析を加えた総計 82 例の日本人 FA の解析を行った。FA 遺伝子のゲノムシーケンスより、37 例の FANCA と 20 例の FANCG 遺伝子の変異を京都大学放射性生物研究センターの高田穰研究室にて同定した。FANCB, FANCD1, FANCE, FANCP も確認され、既知遺伝子が全く検出されなかった症例のうち、2 例において新規遺伝子である可能性があり、解析中である。

MLPA 法を用いた 63 症例の検討では、38 例が FANCA シーケンスで A 群と断定され、そのうちの 26 例が A 群 MLPA 法にて片アレルまたは両アレルの検出が可能であった（68%）。

京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室と共同で解析を行った日本人 FA 患者 78 人におけるアルデヒド代謝に関わる重要な酵素である *ALDH2* 遺伝子型の分布は、健常日本人の分布と差を認めなかった。

骨髄不全は AA 群、GA 群、GG 群の順に早く発症し、有意差を認めた。特に AA 群の 6 症例では出生直後から 1 年以内に輸血依存の重症な血球減少が進行し、5 症例では 3 系統血球に顕著な形態異常を認めた。

骨髄異形成症候群や急性白血病を発症した 33 例の造血幹細胞移植では移植後 3 年生存率は約 68%であった。白血病 10 症例の移植後 3 年生存率は 30%以下で極めて不良であったが、不応性貧血 12 例では約 90%と再生不良性貧血と同等の成績が得られた。造血細胞移植に関しては小児ドナーの有効性と安全性の検討を行い、同胞 105 症例のうち FA 患者ドナー 11 例においても有効性と安全性が確認された。

D . 考察

FA の発症頻度、臨床症状や遺伝子変異は民族による差がみられ、日本人における疫学集積が必要である。エクソーム解析等を用いた遺伝子解析は従来の方法では検出できなかった変異確定させることができ、今後も重要な解析法となり、日本における FA の疫学の基盤になると推測される。MLPA-A を用いた方法は、既知の変異のみが対象となるものの、極めて有用であった。

FA に対する本邦での fludarabine を前処置に用いた造血細胞移植の成績は良好であり、骨髄形成症候群、急性骨髄性白血病に進展した症例では白血病に移行する前に移植を施行することが重要である。HLA 一致の同胞間移植の成績は良好であるが、同胞の FA を否定することが大切である。

また、FA 原因遺伝子とは異なる新しい視点から *ALDH2* 遺伝子型による骨髄不全症の重症度の検討も必要と思われる。

E . 結論

稀少遺伝性疾患である FA の遺伝子解析が進み、京都大学放射線生物研究センターの高田穰研究室等との共同研究により日本人 FA 患者の原因遺伝子の

種類や頻度、遺伝子異常と臨床病態との関連が明らかになってきた。FA 患者ではアルデヒドによるゲノム障害が修復できず、骨髄不全が進行する可能性が示唆され病態の解明と新規治療につながる事が期待される。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Ohtsubo K, Fukumura A, Kato S, Yabe H. Feasibility of marrow harvesting from pediatric sibling donors without hematopoietic growth factors and allotransfusion. **Bone Marrow Transplant.** 2014;49(7):921-6.
- 2) Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S. Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2014;20(8):1145-9.
- 3) Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. **Haematologica** 2014; 99(8):1312-6.
- 4) Nakayama H, Tabuchi K, Tawa A, Tsukimoto I, Tsuchida M, Morimoto A, Yabe H, Horibe K, Hanada R, Imaizumi M, Hayashi Y, Hamamoto K, Kobayashi R, Kudo K, Shimada A, Miyamura T, Moritake H, Tomizawa D, Taga T, Adachi S. Outcome of children with relapsed acute myeloid leukemia following initial therapy under the

- AML99 protocol. **Int J Hematol.** 2014; 100(2):171-9.
- 5) Kato M, Yoshida N, Inagaki J, Maeba H, Kudo K, Cho Y, Kurosawa H, Okimoto Y, Tauchi H, Yabe H, Sawada A, Kato K, Atsuta Y, Watanabe K. Salvage allogeneic stem cell transplantation in patients with pediatric myelodysplastic syndrome and myeloproliferative neoplasms. **Pediatr Blood Cancer.** 2014;61(10):1860-6.
 - 6) Patel P, Suzuki Y, Tanaka A, Yabe H, Kato S, Shimada T, Mason RW, Orii KE, Fukao T, Orii T, Tomatsu S. Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Therapy on Growth in Patients with Hunter Syndrome. **Mol Genet Metab Rep.** 2014;1:184-196.
 - 7) Sato Y, Kurosawa H, Fukushima K, Okuya M, Yabe H, Arisaka O. Necessary stem cell transplantation using myeloablative therapy for myelodysplastic syndrome with progression of genotypic abnormalities and TP53 dysfunction in a young adult. **Pediatr Transplant.** 2014;18(7):E255-7.
 - 8) Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe KI, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor vs. immunosuppressive therapy. **Haematologica** 2014;99(12):1784-91.
 - 9) Goto H, Kaneko T, Shioda Y, Kajiwara M, Sakashita K, Kitoh T, Hayakawa A, Miki M, Kato K, Ogawa A, Hashii Y, Inukai T, Kato C, Sakamaki H, Yabe H, Suzuki R, Kato K. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia and Down syndrome. **Pediatr Blood Cancer.** 2015;62(1):148-52.
 - 10) Kato M, Hasegawa D, Koh K, Kato K, Takita J, Inagaki J, Yabe H, Goto H, Adachi S, Hayakawa A, Takeshita Y, Sawada A, Atsuta Kato K. Allogeneic haematopoietic stem cell Y, transplantation for infant acute lymphoblastic leukaemia with KMT2A (MLL) rearrangements: a retrospective study from the paediatric acute lymphoblastic leukaemia working group of the Japan Society for Haematopoietic Cell Transplantation. **Br J Haematol.** 2014 Oct 10. doi:10.1111/bjh.13174. [Epub ahead of print]
 - 11) Tanjuakio J, Suzuki Y, Patel P, Yasuda E, Kubaski F, Tanaka A, Yabe H, Mason RW, Montañó AM, Orii KE, Orii KO, Fukao T, Orii T, Tomatsu S. Activities of daily living in patients With Hunter syndrome: Impact of enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell ransplantation. *Mol Genet Metab.* 2014 Nov 8. pii: S1096-7192 (14)00347-3. doi: 10.1016/ j.ymgme.2014.11.002. [Epub ahead of print]
 - 12) Yabe M, Ohtsuka Y, Watanabe K, Inagaki J, Yoshida N, Sakashita K, Kakuda H, Yabe H, Kurosawa H, Kudo K, Manabe A; Japanese Pediatric Myelodysplastic Syndrome Study Group. Transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia: a retrospective study of 30 children treated with a regimen of busulfan, fludarabine, and melphalan. **Int J Hematol.** 2014 Dec 11. [Epub ahead of print]
 - 13) 矢部普正 . Fanconi 貧血 . **小児科** 2014;55(11): 1559-1564.
2. 学会発表
 - 1) Yabe H, Uchida N, Takahashi S, Ohno Y, Kasai K, Kanamori H, Mori S, Nagamura T, Kato K, Murata M, Suzuki R, Atsuta Y. Comparison of two doses of antithymocyte globulin in pediatric patients with aplastic anemia who received allogeneic bone marrow transplantation. **40th Annual Meeting of the**

- | | |
|---|--|
| <p>European Group for Blood and Marrow Transplantation (April 2014, Mirano, Italy).</p> <p>2) <u>Yabe H</u>, Tabuchi K, Takahashi Y, Kudo K, Kato K, Sakamaki H, Kaea K, Kanamori H, Mori S, Nagamura T, Murata M, Suzuki R, Kanda Y. Evaluation of cell dose to achieve engraftment in unrelated cord blood transplantation. 40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (April 2014, Mirano, Italy).</p> <p>3) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, OhtsuboK, Fukumura A, Itosu M, Muroi K, Koh K, Kato S, <u>Yabe H</u>. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for Japanese Fanconi anemia patients with myeloid malignancies. 40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (April 2014, Mirano, Italy).</p> <p>4) Yabe M, Hira A, <u>Yabe H</u>. Morimoto T, Fukumura A, Miyashita M, Ohtsubo K, Matsuo K, Takata M. Infant Japanese Fanconi anemia patients with the ALDH2-AA Genotype. 26th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium (September, 2014, Bethesda, USA).</p> <p>5) <u>Yabe H</u>, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, yabe M. Persistent parvovirus B19 infection resulting in donor cell leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a patient with Fanconi anemia. 26th Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium (September, 2014, Bethesda, USA).</p> <p>6) Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Tahara H, Kurumizawa H, Ogawa S, Takata M, <u>Yabe H</u>, Yabe M. Identification of novel UBE2T mutations in Japanese Fanconi anemia patients. 37th Annual meeting of the molecular biology society of Japan(2014 年 11 月 , 横浜).</p> | <p>1. 特許取得
該当なし</p> <p>2. 実用新案登録
該当なし</p> <p>3. その他
該当なし</p> |
|---|--|

G . 知的財産権の出願・登録状況

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) の臨床データ解析

研究分担者 真部 淳（聖路加国際病院小児科 医長）

研究要旨：本研究の目的は Congenital dyserythropoietic anemia (CDA：先天性赤血球産生異常性貧血) の疾患像を明らかにすることである。CDA は先天性の赤血球系細胞の形成異常により、慢性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う疾患である。平成 21 年度に行った全国調査により把握された 22 例の CDA 症例を対象として二次調査と遺伝子検索を行った。20 例について遺伝性解析を行い、3 例で CDAN1 変異が、また 1 例で variant 型の責任遺伝子 *KLF1* の変異が見つかった。この他に次世代シーケンサーを用いて解析を行ったところ、臨床的に CDA と診断された 12 例中 4 例で溶血性貧血の原因遺伝子がみられた。すなわち、2 例では遺伝性楕円赤血球症でみられる *SPTA1* 遺伝子の変異が、1 例では *G6PD* 遺伝子の変異が、残りの 1 例では遺伝性球状赤血球症でみられる *ANK1* 遺伝子の変異がみられた。スクリーニングする集団を広げていき、実態を明らかにする必要がある。また、今年度は CDA の診療ガイドラインを改訂した。なお本年度、新たに重症度分類を作成した。

A．研究目的

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA：先天性赤血球産生異常性貧血) 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、本研究により我が国における CDA の実態を明らかにし最終的に効果的診断法や治療ガイドラインを作成することを目的とする。

B．研究方法

従来行われている日本小児血液・がん学会疾患登録、中央診断事業を基に、我が国における CDA の把握ならびに診断を行う。診断を行うための診断基準、中央形態診断、遺伝子診断のシステムを構築する。疾患の把握は、過去に行われた全国調査を参考に、疑い症例を含みアンケート方式で行う。診断基準については既存のものを参考にすが、軽症で診断基準に合致しないものも存在する可能性があるの

で、独自のものを作成する。調査は血液専門医だけでなく、一般小児科医にも協力してもらう。

(倫理面への配慮)

本研究で行われる臨床試験は、

ヘルシンキ宣言に則り、患者の利益を最優先に考えて実施する。

調査フィールドとなる各施設における倫理委員会で承認を得て実施する。

患者および家族に対して面談・介入開始時に統一した説明文を用いて文書による同意を得る。同意説明文では、調査を行う目的、介入・面談の内容、協力者に起こりうる利益・不利益について、未成年者の場合には年齢に応じた説明をする。

協力によって得られたデータは、個人情報保護を厳重に行い、研究目的以外には利用しないことを文書による同意を得て実施する。

C．研究結果

CDA の全国調査により把握された症例を対象として、二次調査と中央遺伝子診断を開始した。20 例について遺伝性解析を行い、3 例で *CDAN1* 変異 (2 例が (P1129L)、1 例が (P185fs)、ex12 (N598S) が、また 1 例で variant 型の責任遺伝子 *KLF1* の変異 (E325K) が見つかった。この他に次世代シーケンサーを用いて解析を行ったところ、臨床的に CDA と診断された 12 例中 4 例で溶血性貧血の原因遺伝子がみられた。すなわち、2 例では遺伝性橢円赤血球症でみられる *SPTA1* 遺伝子の変異 ((R28H), (Y2280C), (W2172X)) が、1 例では *G6PD* 遺伝子の変異 (V424L) が、残りの 1 例では遺伝性球状赤血球症でみられる *ANK1* 遺伝子の変異 (R935X) がみられた。本年度は本疾患の診療ガイドラインを改訂した。また、新たに重症度分類を作成した。

Congenital dyserythropoietic anemia の 重症度分類 (平成 26 年度作成)

軽 症：赤血球輸血を受けたことがない
中等症：赤血球輸血を受けたことはあるが、
現在は受けていない
重 症：定期的な赤血球輸血を必要とする

注) 定期的な赤血球輸血とは、ヘモグロビン濃度 8.0 g/dL を維持するのに 2~8 週毎の輸血が必要な場合とする。

* 鉄過剰症などの貧血治療に伴う臓器合併症は除く。

D . 考察

わが国でも CDA 患者が一定数存在することが明らかになったが、諸外国に比べ稀な疾患なのか、軽症例が多く見逃されているのかはいまだに不明である。遺伝子解析を進めるとともにスクリーニングする集団を広げていき、実態を明らかにする必要がある。実際、臨床的に CDA と診断された症例で通常は遺伝性橢円赤血球症でみられる *SPTA* 遺伝子の変異や遺伝性球状赤血球症でみられる *ANK1* 遺伝子の変異がみつかった。

新たに作成した重症度分類は今後、患者の取扱いに際して有用となる可能性がある。

E . 結論

わが国の CDA の実態の正確な把握をし、よりよ

い治療法を開発するため、今度も調査、研究が必要である。

共同研究者：土居崎小夜子、小島勢二 (名古屋大小児科)、多賀崇 (滋賀医大小児科)、長谷川大輔、平林真介 (聖路加国際病院小児科)

F . 研究発表

- 論文発表
- Hasegawa D, Chen X, Hirabayashi H, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification. **Br J Haematol**. 2014;166:758-766.
- Niemeyer CM, Loh ML, Cseh A, Cooper T, Dvorak CC, Chan R, Xicoy B, Germing U, Kojima S, Manabe A, Dworzak M, De Moerloose B, Stary J, Smith OP, Masetti R, Catala A, Bergstraesser E, Ussowicz M, Fabri O, Baruchel A, Cave H, Zwaan M, Locatelli F, Hasle H, van den Heuvel-Eibrink MM, Flotho C, Yoshimi A. Criteria for evaluating response and outcome in clinical trials for children with juvenile myelomonocytic leukemia. **Haematologica** 100:17-22,2015
- Moriwaki K, Manabe A, Taketani T, Kikuchi A, Nakahata T, Hayashi Y. Cytogenetic and clinical features of pediatric myelodysplastic syndrome in Japan. **Int J Haematol**. (in press)
- Ono R, Hasegawa D, Hirabayashi S, Kamiya T, Yoshida K, Yonekawa S, Ogawa C, Hosoya R, Toki T, Terui K, Ito E, Manabe A. Acute megakaryoblastic leukemia with acquired trisomy 21 and GATA1 mutations in phenotypically normal children. **Eur J Pediatr**. (in press)

2. 学会発表

- 1) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Okuno Y, Irie M, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Central Morphology Review in Childhood Bone Marrow Failure in Japan. **第56回アメリカ血液学会**(2014年12月, サンフランシスコ).
- 2) Hasegawa D, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Refractory Cytopenia of Childhood. **第56回アメリカ血液学会**(2014年12月, サンフランシスコ).

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

中央診断、DKC と CDA の遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 小島勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授）

研究要旨：日本小児血液学会（現日本小児血液・がん学会）は平成 21 年 2 月より再生不良性貧血（AA）、骨髄異形成症候群（MDS）および先天性造血不全症候群（CBFS）を対象とした中央診断を開始した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を 2 施設（名古屋大学、聖路加国際病院）で、骨髄病理標本を 1 施設（名古屋第一赤十字病院）で行っている。中央診断症例を中心に集積された congenital dyserythropoietic anemia (CDA) 20 例において、同意を得た後、遺伝子診断を行い、3 例で I 型、1 例で variant 型の責任遺伝子の変異を確認した。遺伝子変異が確認されなかった 12 症例については、次世代シーケンサーによる新規責任遺伝子の探索を行い、4 例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。遺伝性貧血の診断は必ずしも容易ではなく、中央診断、遺伝子診断を行うことによりその診断の精度が上昇したと考えられる。

A . 研究の目的

CDA は先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不応性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う稀な疾患群である。I 型、II 型、III 型、variant 型の 4 病型に分類され、近年 I 型が *CDAN1*、II 型が *SEC23B*、III 型が *KIF23*、variant 型が *KLF1* と責任遺伝子が同定された。本研究では、日本小児血液・がん学会の中央診断および疾患登録事業の一環として、本疾患を包括的に登録するとともに、新たに遺伝子診断法による診断精度の向上と新規責任遺伝子の探索を行う。

B . 研究方法

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。AA、MDS、あるいは CBFS が疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。以後はその番号でやりとりを行った（匿名化）。中央診断およびそれに伴う検査については患者保護者の同意を取得した後に行った。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を 2 施設（名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科）で、骨髄病理標本を 1 施設（名古屋第一赤十字病院病理部）で

行った。

CDA と診断された症例については、名古屋大学小児科において、次世代シーケンサーによるエクソーム解析およびターゲットシーケンスを行った。すなわち、各症例より抽出したゲノム DNA を超音波破碎により断片化し、試料を識別する 6 塩基の Barcode 配列を付与したのち、12 試料を混合し、常法に従って液相ハイブリダイゼーションにより全エクソン配列を濃縮した。得られた混合試料を Illumina 社 HiSeq2000 シーケンサーにより平均読み取回数 200 回を目標として全エクソン配列、対象遺伝子領域の解析を行った。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基変異（single nucleotide variants; SNVs）および欠失・挿入配列から SNP データベースおよび 1000 personal genome データベースに登録済みの SNP を除去したのち、家族内罹患者と陰性コントロール（非罹患者同胞や両親）の全エクソン解析データとを比較検討することにより、責任変異の候補となる SNV 原因遺伝子の候補を絞り込み、必要に応じて全ゲノムリシーケンスを併用しつつ、機能的な推定と併せて、新規原因遺伝子の同定を試みた。

(倫理面への配慮)

日本小児血液・がん学会として行う疾患登録事業は、疫学研究倫理指針に準拠した臨床研究としてすでに学会倫理審査委員会で承認されている。調査にあたっては個人情報の守秘を厳守し、データの取り扱いに注意する。中央診断事業についても、患者検体の匿名化を図る。検体の採取にあたっては、患者および家族から事前に十分な説明を行い、文書による同意を得る。各疾患の遺伝子解析についてはヒトゲノム遺伝子解析研究指針に従い、患者および家族に事前に十分な説明を行い、文書による同意を得たのち連結可能匿名検体として研究を遂行する。患者および家族に対して不利益が生じる場合には、いつでも同意の撤回は可能である。既知の責任遺伝子に関しては、倫理委員会で承認されている。

C . 研究結果

CDA と診断され同意を得た症例について遺伝子診断を行った。20 例中 4 例に遺伝子変異を確認し、3 例では I 型の責任遺伝子 *CDAN1* の変異 (2 例が (P1129L)、1 例が (P185fs)、ex12 (N598S)) を認めた。1 例では variant 型の責任遺伝子 *KLF1* の変異 (E325K) を認めた。

既知の責任遺伝子変異が認められなかった症例について、次世代シーケンスによるターゲットシーケンスを行った。3 例のうち、エクソームシーケンスによる新規責任遺伝子の探索では、12 例中 4 例で溶血性貧血の原因遺伝子の変異を確認した。2 例が *SPTA1* の変異 (R28H)、(Y2280C)、(W2172X)) であり、1 例が *G6PD* の変異 (V424L) であり、1 例が *ANK1* の変異 (R935X) であった。

D . 考察

CDA 疑いとされた症例は 20 例中、既知の責任遺伝子の変異を認めた症例は 3 例のみであった。その原因としては、CDA の鑑別が困難であること、日本人に特有な CDA の病型の存在する可能性が挙げられる。

次世代シーケンスによる解析で、溶血性貧血の原因遺伝子の変異を複数例に認めた。この事実は、CDA と溶血性貧血の鑑別が困難であることを示唆し、貧血鑑別における遺伝子診断の重要性が再確認

された。

E . 結論

CDA のような稀な疾患は、このような中央診断登録システム、遺伝子変異解析を通して確実に診断がつけられていくと考えられる。また、次世代シーケンスによる解析を進めて行くことで、CDA の鑑別がより確かになるとともに、新たな責任遺伝子の同定が可能となると考えられる。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujita A, Ochi N, Fujimaki H, Muramatsu H, Takahashi Y, Natsume J, Kojima S, Nakashima M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N. A novel *WTX* mutation in a female patient with osteopathia striata with cranial sclerosis and hepatoblastoma. **Am J Med Genet A**. 2014 Apr;164A(4):998-1002.
- 2) Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Imaizumi M, Mitsui T, Hori H, Hara J, Horibe K, Nagai J, Goto H, Ito E. Gene alterations involving the *CRLF2*-*JAK* pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. **Genes Chromosomes Cancer** 2014;53(11): 902-910.
- 3) Hasegawa D, Chen X, Hirabayashi S, Ishida Y, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S, Ito M, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics and treatment outcome in 65 cases with refractory cytopenia of childhood defined according to the WHO 2008 classification. **Br J Haematol**. 2014; 166(5):758-766.
- 4) Hasegawa S, Imai K, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Morio T,

- Mizutani S, Takagi M. Whole-exome sequence analysis of ataxia telangiectasia-like phenotype. **J Neurol Sci.** 2014; 340(1-2):86-90.
- 5) Honda Y, Tsuchida M, Zaike Y, Masunaga A, Yoshimi A, Kojima S, Ito M, Kikuchi A, Nakahata T, Manabe A. Clinical characteristics of 15 children with juvenile myelomonocytic leukaemia who developed blast crisis: MDS Committee of Japanese Society of Paediatric Haematology/Oncology. **Br J Haematol.** 2014;165(5):682-687.
- 6) Hyakuna N, Muramatsu H, Higa T, Chinen Y, Wang X, Kojima S. Germline mutation of CBL is associated with moyamoya disease in a child with juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan syndrome-like disorder. **Pediatr Blood Cancer.** 2014 Oct 4. [Epub ahead of print]
- 7) Ismael O, Shimada A, Elmahdi S, Elshazley M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Yamada M, Yamashita Y, Horide K, Kojima S. RUNX1 mutation associated with clonal evolution in relapsed pediatric acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). **Int J Hematol.** 2014;99(2):169-174.
- 8) Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S. Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children. **Haematologica** 2014; 99(4): 664-671.
- 9) Kato M, Imamura T, Manabe A, Hashii Y, Koh K, Sato A, Takahashi H, Hori H, Taki T, Inoue M, Hayashi Y, Horibe K, Tsuchida M, Kojima S, Oda M, Ohara A. Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study. **Br J Haematol.** 2014; 166(2):295-298.
- 10) Kawashima N, Ito Y, Sekiya Y, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Choreito formula for BK virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2014 Oct 23. [Epub ahead of print]
- 11) Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S. Aldehyde dehydrogenase-2 polymorphism contributes to the progression of bone marrow failure in children with idiopathic aplastic anaemia. **Br J Haematol.** 2014 Sep 11. [Epub ahead of print]
- 12) Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S. Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2014;20(8):1145- 1149.
- 13) Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **J Leukoc Biol.** 2014;95(4):667-676.
- 14) Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, Yagasaki H, Niizuma T, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T, Kurahashi H. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human

- herpesvirus-6. **Sci Rep.** 2014;4:4559.
- 15) Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Japan Childhood Aplastic Anemia Study G. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. **Haematologica** 2014; 99(8):1312-1316.
- 16) Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S. Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2014;36(1):e65-68.
- 17) Ueda S, Sakata N, Muramatsu H, Sakaguchi H, Wang X, Xu Y, Kojima S, Yamaguchi T, Higa T, Takemura T. Clinical course of juvenile myelomonocytic leukemia in the blast crisis phase treated by acute myeloid leukemia-oriented chemotherapy and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Int J Hematol.** 2014 Jul 22. [Epub ahead of print]
- 18) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanazaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. **Br J Haematol.** 2015;168(6):854-864.
- 19) Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children. **Ann Hematol.** 2014;93(5):747-752.
- 20) Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe KI, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor vs. immunosuppressive therapy. **Haematologica** 2014;99(12):1784-1791.
2. 学会発表
- 1) Takahashi Y. Hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor for childhood aplastic anemia: HLA haploidentical family donor vs HLA mismatched unrelated donor. **40th Annual Meeting of the EBMT** (Apr. 9, 2014, Milano, Italia).
- 2) Hama A. Central Review of morphology in childhood aplastic anemia and myelodysplastic syndrome in Japan-summary of 1,000 cases. **25th Annual Meeting of the International BFM Study Group** (Apr.26, 2014, Czech, Praha).
- 3) Kojima S. Role of rATG in treatment of AA. Educational Meeting : Role of Immunosuppressive therapy in treatment of Aplastic Anemia (Apr. 26, 2014, Singapore).
- 4) Takahashi Y. ANR COLOGNE 2014 (May. 13, 2014. Cologne, Germany).
- 5) Kojima S. Expert Meeting at Wuhan Union Hospital (Jul.15, 2014, Wuhan, China).
- 6) Kojima S. Expert Meeting at Wharton International Hotel. (Jul.16, 2014, Wharton, China).
- 7) Kojima S. Hematology Expert Meeting

- (Jul.18, 2014, Guangzhou, China).
- 8) Kojima S. South China Hematology Summit (Jul.19, 2014, Guangzhou, China).
 - 9) Kojima S. Aplastic Anemia : Therapeutic updated in HSCT. 2013 International Forum on Bone Marrow Failure. (Aug.16, 2013, Tianjin, China).
 - 10) Muramatsu H, Takahashi Y, Nishikawa E, Sekiya Y, Kawashima N, Okuno Y, Narita A, Doisaki S, Irie M, Hama A, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr Virus-Associated Post-tasnsplant Lymphoproliferative Disease. **The 19th congress of APBMT**(Oct.16, 2014, Hangzhou, China).
 - 11) Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Yui S, Inokuchi K, Ito E, Ogawa S, Kojima S. The Clinical and Genetic Features of Dyskeratosis Congenita, Cryptic Dyskeratosis Congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome in Japan. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
 - 12) Hasegawa D, Hirabayashi S, Watanabe S, Zaike Y, Tsuchida M, Masunaga A, Yoshimi A, Hama A, Kojima S. Ito M, Manabe A. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Refractory Cytopenia of Childhood. **56th ASH Annual Meeting**(Dec.6 2014, San Francisco, USA).
 - 13) Hama A, Atsushi M, Hasegawa D, Nozawa K, Okuno Y, Irie M, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Central Morphology Review of Childhood Bone Marrow Failure in Japan. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
 - 14) Patel B, Huang D, Thota S, Przychodzen P, Sakaguchi H, Kojima S. Ogawa S, Sekeres M A, Makishima H, Jaroslaw P. Maciejewski. Chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) Can be Categorized By Ancestral Mutational Events. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
 - 15) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara A, Kojima S. Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated Red Cell Reduced Glutathione Is a Novel Biomarker of Diamond-Blackfan Anemia. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.6 2014, San Francisco, USA).
 - 16) Yoshida N, Yabe H, Kudo K, Kobayashi R, Yabe M, Inoue M, Miki M, Sakamaki H, Kato K, Kawa K, Suzuki R, Watanabe K, Kojima S. Outcomes of Stem Cell Transplantation with Fludarabine and Melphalan Conditioning for Children with Acquired Bone Marrow Failure: A Nationwide Retrospective Study. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.7 2014, San Francisco, USA).
 - 17) Okuno U, Atsushi N, Muramatsu H, Yoshida K, Hama A, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Sakaguchi H, Doisaki S, Takahashi Y, Shiraishi, Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Whole-Exome Sequencing Reveals a Paucity of Somatic Gene Mutations in Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. **56th ASH Annual Meeting**(Dec.8 2014, San Francisco, USA).
 - 18) Narita A, Sekiya Y, Sakaguchi H, Nishio N, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida N, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, MD1*, Kamei M, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Predicting Response to Immunosuppressive Therapy By the Combination of Minor Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones and Lymphocyte Telomere Length in Children with Aplastic Anemia. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.8 2014, San Francisco, USA).
 - 19) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Doisaki S, Hama A, Wang X, Narita A, Kawashima N,

Xu Y, Sakaguchi H, Takahashi Y, Sanada M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Diagnostic Efficacy of Whole-Exome Sequencing in 250 Patients with Congenital Bone Marrow Failure. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.8 2014, San Francisco, USA).

20) Kawshima N, Okuno Y, Sekiya Y, Wang X, Xu Y, Narita, Doisaki S, Kamei M, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Generation of Cell Lines Harboring SETBP1 Mutations By the Crispr/Cas9 System. **56th ASH Annual Meeting** (Dec.8 2014, San Francisco, USA).

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血）患者赤血球における eADA と GSH の バイオマーカーとしての有用性

研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 教授）

研究要旨：先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血）患者におけるバイオマーカーとして赤血球 ADA（eADA）活性と還元型グルタチオン（GSH）が有用であることが明らかになり、判別式を用いて診断することが可能となった。今年度は新たに DBA 疑い 3 症例を検討し、臨床診断および従来の診断基準との相関について検討を加えた。

A . 研究目的

DBA はリボゾーム機能不全によって発症する先天性赤芽球癆である。我々は H22 年度から始まった研究班において赤芽球系細胞における最も重要な抗酸化物質である赤血球還元型グルタチオン（GSH）が DBA の新規バイオマーカーであることを同定した。赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）と GSH を同時に検討することで、遺伝子検査により確定診断し得た DBA 症例と同一家系内非罹患者の識別を可能とする判別式を得た。今年度は更に症例数を積み重ねることで判別式の有用性を再検討したので報告する。

B . 研究方法

全国の医療機関において臨床的に DBA と診断された症例についてインフォームド・コンセントを取得の上、末梢血を得た。血漿、白血球、血小板を除去した洗浄赤血球より溶血液を作成し、eADA を測定した。eADA はアデノシンを基質として溶血液を加え 265 nm における吸光度減少により、活性を測定した。また GSH は溶血後の全血にメタリン酸を加えて得られた除蛋白抽出液に 5,5'-di-thiobis（2-nitrobenzoic acid）を加え、412 nm で定量した。

C . 研究結果

【症例 1】4 ヶ月、男児
身体的所見：特記することなし

輸血歴：あり（生後 3 ヶ月目より）その後の輸血頻度は不明であった。

赤血球数 88 万/ μ L、Hb 2.6g/dL、Ht 7.5%、MCV 85.2、Retic 0.5%、白血球数 9210/ μ L、血小板数 51.4 万/ μ L、末梢血の赤血球形態は大小不同、奇形を認めた。骨髄検査は著明な赤芽球系低形成を認めた（Myeloid 52.0%、Erythroid 1.8%、Lymphoid 41.8%、Blast 2.2%）。染色体核型は 46XY で異常は認められなかった。

eADA 活性：2.54 IU/gHb、GSH：106.8

判別式 $0.937 \cdot eADA + 0.0702 \cdot GSH - 7.9044 > 0$ の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【症例 2】3 歳 4 ヶ月、男児

身体的所見：特記することなし

輸血歴：あり（2 歳 8 ヶ月時より）その後 2 週間に 1 回輸血施行。

赤血球数 106 万/ μ L、Hb 2.5g/dL、Ht 8.2%、MCV 77.4、Retic 0.02%、白血球数 9600/ μ L、血小板数 18.9 万/ μ L、赤血球形態異常なし。

骨髄検査では M、染色体核型 46XY

eADA 活性：1.47 IU/gHb、GSH：94.8

判別式 $0.937 \cdot eADA + 0.0702 \cdot GSH - 7.9044 > 0$ の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【症例 3】5 ヶ月男児

身体的所見：特記することなし

輸血歴：あり（生後 2 ヶ月目より）その後 2 回輸血施行

赤血球数 233 万/ μ L、Hb 6.9 g/dL、Ht 20.6%、MCV 88.4、Retics 0.45%、白血球数 10960/ μ L、血小板数 59 万/ μ L、赤血球形態では球状赤血球を認めたが、赤血球浸透圧抵抗の低下は認めなかった。

骨髓検査正形成、Mgk140、（Myeloid 46.8%、Erythroid 4.8%、Ly 36.4%、Blast 9.2%）染色体核型 46XY

eADA 活性：2.74 IU/gHb、GSH：104

判別式 $0.937 * eADA + 0.0702 * GSH - 7.9044 > 0$ の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【診断基準】

A：診断基準	
1	1 歳未満
2	大球性貧血で他の血球系に減少を認めない
3	網赤血球数低下
4	骨髓所見は正形成だが赤芽球前駆細胞の減少を伴う

B：診断を支持する基準	
大基準 1	古典的 DBA に見られた遺伝子変異の同定
大基準 2	家族歴の存在
小基準 1	赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）高値
小基準 2	古典的 DBA に見られる先天奇形の存在
小基準 3	HbF 上昇
小基準 4	他の先天性骨髓不全症候群が否定できる

【判定】

古典的 DBA	A の 4 個すべて
非古典的 DBA	A 3 個 + B 大基準 1 個 or B 小基準 2 個
	A 2 個 + B 大基準 2 個 or B 小基準 3 個
	B 大基準 2 個

	A：診断基準				B：診断を支持する基準					
	1	2	3	4	大基準 1	大基準 2	小基準 1	小基準 2	小基準 3	小基準 4
症例 1	○	×	○	×	△	×	○	×	△	○
症例 2	×	×	○	○	△	×	×	×	△	○
症例 3	○	×	○	○	△	×	○	×	△	○

△：不明・未検査

D．考察

以上のように従来の診断基準では、症例 1 は A 2 個 + B 小基準 2 個で非古典的 DBA、症例 2 は A 2 個 + B 小基準 1 個で非 DBA、症例 3 は A 3 個 + B 小基準 2 個で非古典的 DBA と判定された。いずれも家族歴が無く、先天奇形の存在も無いことから、eADA 活性が診断に重要な症例と考えられる。症例 2 のように eADA 活性単独では診断基準により DBA が否定されたケースにおいて、新規バイオマーカーである GSH を併用した判別式は DBA の診断に極めて有用と考えられる。

この結果が新規バイオマーカーによる偽陽性結果で無いことを明らかにするためには、網羅的な遺伝子検査結果を用いた DBA の診断および他の骨髓不全症候群の否定が極めて重要と考えられた。

E．結論

eADA / GSH を用いた判別式結果は、eADA 単独の評価に比して、家族歴・先天奇形を伴わない DBA 症例の診断率を向上することが明らかになった。

F．研究発表

- 論文発表
 - Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolveang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Juntharaniyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause

- transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. **Blood** 2014;123(10):1586-95.
- 2) Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno K, Tobe K, Kanno H, Nakagawa T. Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. **J Biol Chem.** 2014;89(21):14796-811.
 - 3) Kobayashi Y, Hatta Y, Ishiwatari Y, Kanno H, Takei M. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature. **BMC Res Notes.** 2014;11(7):137.
 - 4) 守屋友美 (東京女子医科大学 輸血・細胞プロセシング部), 岡本好雄, 小林博人, 松田和樹, 久保田友晶, 緒方康貴, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 青木貴子, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小倉浩美, 菅野仁. ABO 血液型不適合腎移植におけるアルブミン製剤の必要性. **日本輸血細胞治療学会誌** 2014;60(4):521-526.
 - 5) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Sato-Otubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutation in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. **Br J Haematol.** 2015;168(6):854-864.
 - 6) 岡本好雄, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. 自己血漿製剤という観点から見た CART. **日本アフェレシス学会** 2014;33(3):178-184.
 2. 学会発表
 - 1) 青木貴子, 市東正幸, 小倉浩美, 高橋秀弘, 岩井朝幸, 濱端隆行, 渡邊健一郎, 常松健一郎, 奥野友介, 村松秀城, 吉田健一, 宮野悟, 大賀正一, 小川誠司, 小島勢二, 菅野仁. 病因未確定の先天性溶血性貧血に対する全エクソーム解析. **日本人類遺伝学会第 59 回大会** (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 2) 尾上佳子, 石谷健, 内山智貴, 青木貴子, 市東正幸, 川上和之, 松井英雄, 林和彦, 斎藤加代子, 菅野仁. イリノテカンによる重症下痢症を予測する PGx バイオマーカーとしての CYP2F1 遺伝子多型. **日本人類遺伝学会第 59 回大会** (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 3) 神尾英則, 神尾孝子, 尾上佳子, 市東正幸, 青木貴子, 内山智貴, 亀岡信悟, 斎藤加代子, 菅野仁. テガフル・ウラシル投与による肝機能障害を予測する新規 PGx バイオマーカーの探索. **日本人類遺伝学会第 59 回大会** (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 4) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Ohara A, Ishiguro A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated red cell reduced glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. 56th ASH Annual Meeting & Exposition (2014 年 12 月 6 日, San Francisco, USA).
 - 5) 市東正幸, 青木貴子, 槍澤大樹, 小倉浩美, 大賀正一, 岩井朝幸, 未延聡一, 伊藤悦朗, 奥野友介, 小島勢二, 小川誠司, 菅野仁. 原因不明先天性溶血性貧血症例の全エクソーム解析による膜骨格蛋白遺伝子変異の同定. **第 76 回日本血液学会学術集会** (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
 - 6) 菅野仁, 青木貴子, 市東正幸, 槍澤大樹, 小倉浩美. わが国における G6PD 異常症の現状. **第 76 回日本血液学会学術集会** (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
 - 7) 菅野仁. 新生児・乳児期に発症する先天性溶血性貧血の病因と診断. **第 24 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会** (2014 年 6 月 13 日, 横浜).
 - 8) 槍澤大樹, 岡本好雄, 松田和樹, 久保田友晶,

守屋友美，及川美幸，李舞香，木下明美，千野峰子，岡田真一，高源ゆみ，青木正弘，中林恭子，今野マユミ，小林博人，小倉浩美，菅野仁．安全な CART の運用と適応拡大への新たな試み．**第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会**（2014 年 5 月 15 日，奈良）．

- 9) 岡本好雄，松田和樹，久保田友晶，守屋友美，及川美幸，李舞香，木下明美，千野峰子，岡田真一，高源ゆみ，青木正弘，中林恭子，今野マユミ，槍澤大樹，小林博人，小倉浩美，菅野仁．クリオプレシピテート製剤の院内調製と心臓血管外科手術への応用．**第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会**（2014 年 5 月 15 日，奈良）．
- 10) 久保田友晶，松田和樹，守屋友美，及川美幸，李舞香，木下明美，千野峰子，岡田真一，高源ゆみ，青木正弘，中林恭子，岡本好雄，今野マユミ，槍澤大樹，小林博人，小倉浩美，菅野仁．非溶血性輸血副作用発生状況と副作用報告回収率改善への取り組み．**第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会**（2014 年 5 月 15 日，奈良）．
- 11) 松田和樹，久保田友晶，守屋友美，及川美幸，李舞香，木下明美，千野峰子，岡田真一，高源ゆみ，青木正弘，中林恭子，岡本好雄，今野マユミ，槍澤大樹，小林博人，小倉浩美，菅野仁．当院における静注用免疫グロブリン（IVIG）の使用状況について．**第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会**（2014 年 5 月 15 日，奈良）．
- 12) 槍澤大樹，岡本好雄，菅野仁．安全な CART の運用と低温保存腹水を用いた適応拡大への新たな試み **第 35 回日本アフェレシス学会学術集会ワークショップ**（2014 年 9 月 27 日，東京）．

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

ファンコニ貧血の遺伝子解析

研究分担者 高田 穰（京都大学放射線生物研究センター 教授）

研究要旨：東海大矢部博士らとの共同研究で、日本人ファンコニ貧血（FA）患者の遺伝子解析を進めてきた。原因遺伝子を決定した FA 患者において、アルデヒド代謝酵素である ALDH2 の多型を調べ、ALDH2 バリエーション型では骨髄不全の進行が強く促進されることを明らかにした。特に、ALDH2 酵素活性が完全欠損した ALDH2 バリエーション AA 型（ホモ）FA 患者を合計 5 例見出し、全例出生直後から強い血液学的異常が観察された。これらの結果は、特異な重症型 FA の存在を確立し、FA 患者の骨髄不全における病態の本質に強い示唆を与え、また、将来の治療法開発への道を開くものと言える。また、FA 患者のマネジメントに出生早期の ALDH2 のジェノタイプングが有用である可能性がある。

A．研究目的

ファンコニ貧血（FA）は骨髄不全、奇形、白血病、固形腫瘍などを呈し、稀ながらその重篤な症状と診断治療法の確立の遅れから、特に小児の临床上重大な問題となっている。典型的な症例では外見上の特徴からも診断が可能な場合もあるが、非典型例、成人発症の軽症例、また遺伝子のリバージョンによるモザイク症例などでは、診断に至らず見逃されて化学療法時に重篤な副作用を発症するなどの可能性も指摘されている。

最近の研究の進展により、FA は DNA 損傷への細胞応答欠損を基盤として発症する「ゲノム不安定性症候群」のひとつであることが明らかとなった。FA 症例においては、現 17 種類におよぶ数多い原因遺伝子の異常により、DNA 損傷応答や修復において重要な機能をもつ FA 経路の機能が欠損し、DNA 障害の蓄積によって造血幹細胞不全、発がんなどの重篤な症状を引き起こすと考えられる。しかし、その病態の詳細はいまだ十分理解されたとは言えず、骨髄移植以外、本質的な治療法の開発には至っていない。

最近 FA 遺伝子とアルデヒド代謝酵素 ALDH2 とのダブルノックアウトマウスにおいて、骨髄不全と白血病の病態が強く促進されることが報告された

（Langevin et al. Nature 2011; Garaycochea et al. Nature 2012）。これは、内因性アルデヒドによる DNA 損傷が FA 遺伝子欠損による DNA 修復機能の対象となることを強く示唆している。さらに、このダブルノックアウトマウスは、母マウスの ALDH2 遺伝子型に大きく成長と血液学的所見が影響されることも報告された（Langevin et al. Nature 2011; Oberbeck et al. Mol Cell 2014）。ALDH2 により分解される内因性アルデヒドが胎児から胎盤を通過し、母体で分解されることが大きな生物学的意義をもつことを示唆する所見である。

これらの報告に基づき、我々は日本人 FA 患者で ALDH2 の遺伝子型を調べ、ALDH2 酵素活性が正常な GG 型に比べて、ヘテロバリエーションの GA 型では軽度、ホモバリエーションの AA 型では強く骨髄不全進行が促進されること、AA 型では MDS の発症も強く促進されることを見出した（Blood 2013）。今年度はさらに、追加症例での ALDH2 遺伝子型検索を行った。また、AA 型 FA 児の母親の遺伝子型も検索の対象とした。

B．研究方法

東海大学矢部博士からの FA 患者のサンプルからゲノムを分離し、ALDH2 遺伝子型を九州大学医学

部の松尾恵太郎博士から恵与された Taqman PCR 法によって決定した。

(倫理面への配慮)

本研究計画は、「ファンコニ貧血と関連病態の原因遺伝子解析」として京都大学医の倫理委員会に申請し、G434 号として承認を受けている。矢部博士からの検体は京大への送付時にすべて匿名化されている。

C . 研究結果

ALDH2 は飲酒等の外因性、体内代謝による内因性のアセトアルデヒドを主な基質とし、アルデヒド代謝に関わる重要な酵素である。日本、韓国、中国において高頻度に変異型アレル(ここでは正常活性のものを G 型、活性のないものを A 型とする)が見出される。すなわちホモで A 型を持つ個人では酵素活性が消失し、ヘテロの GA 型でもドミナントネガティブ効果により活性が 2-4 割に低下し、飲酒後の顔面紅潮、頻脈などの原因となることが知られている。この酵素の活性と FA 表現型の関係をヒトにおいて明らかにするため、昨年度 64 例の日本人 FA 患者において、ALDH2 遺伝子型を決定し報告した。GG 型、GA 型、AA 型は、それぞれ 36、25、3 例であった。今年度これに追加して、もう 2 例の AA 型患者がみつきり、合計 5 例となった。

これらの AA 型症例は全例、生下時ないし生後まもなく血液学的異常を認め、GG 型、GA 型とは全く異なる経過をとった。1 例は、重症再生不良性貧血、残り 4 例は MDS として発症した。また、全例臓器の奇形を伴っていた。

5 例のうち 4 例で母親の ALDH2 遺伝子型の検索の同意が得られた。マウスとは全くことなり、2 例の母親は AA 型、2 例は GA 型という結果であった。

D . 考察

日本人 FA 患者における ALDH2 遺伝子型の解析から、骨髄不全を中心とした FA の病態にアルデヒド代謝が大きな役割を果たすことがますます確実となる結果が得られた。造血幹細胞における内因性のアルデヒドが DNA を障害し、その修復が不十分になることで、幹細胞に DNA 障害が蓄積し、p53 発現な

どの DNA 損傷応答が引き起こされると考えられる。さらに今後、基礎研究としては、ヒトの血液幹細胞における ALDH サブタイプの発現などを確認していく必要が考えられる。また、臨床研究としては他の血液疾患や家族性乳がんにおける ALDH2 遺伝子型の役割についても検証が必要と思われる。

マウスとは違い、FA 児の母親に ALDH2 の AA 型が高頻度に存在することは驚きである。種が異なることによる違いではあるが、これをどう説明するか、今のところ十分な知見はない。ヒトの AA 型はマウスのノックアウトに比せば、いくらかの酵素活性が残るはずであるが、マウスではヘテロでも胎児が維持できない (Mol Cell 2014) ということなので、それでは説明できない。他の ALDH 酵素活性、分布、体内のアルデヒド代謝など様々な要因が寄与する可能性があり、解明には今後の研究が必要である。

今後、患者の治療への展開として、食物中飲料中のアルデヒド量が減らせないか、内因性アルデヒド産生のメカニズム解明と制御法の開発、ALDH2 酵素活性の活性化剤の応用、などが考えられる。ALDH2 活性化剤については、急性アルコール中毒を対象に治験開始が近いと聞いている (私信)。

E . 結論

これらの結果は、特異な重症型 FA の存在を確立し、FA 患者の骨髄不全における病態の本質に強い示唆を与え、また将来の治療法開発への道を開くものと言える。また、FA 患者のマネジメントに出生早期の ALDH2 のジェノタイプピングが有用である可能性がある。

F . 研究発表

- 論文発表
 - Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. Defective FANCI Binding by a Fanconi Anemia-Related FANCD2 Mutant. **PLoS One**. 2014;9(12):e114752.
 - Ishii K, Ishiai M, Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Niwa O, Takata M, and Shinohara T. The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b Pathway Regulates the Radiation Response of Mouse Spermatogonial Stem

- Cells. **Stem Cell Reports**. 2014;3(4):676-89.
- 3) Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H. Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using Escherichia coli cells. **Protein Expr Purif**. 2014;103C:8-15.
 - 4) Huang Y, Leung JW, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X, Huong D, Takata M, Chen J, Li L. Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. **Cell Rep**. 2014;7(6):1849-57.
 - 5) Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugawara K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. **Cell Rep**. 2014;7(4):1039-47.
 - 6) Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, Takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, Enomoto T. Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. **Biochim Biophys Acta**. 2014;1843(5):1002-12.
2. 学会発表
- 1) 高田穰. ファンコニ貧血症と DNA 修復メカニズム. **第 36 回日本光医学・光生物学学会シンポジウム** (招待講演) (2014 年 7 月 25 日, 大阪).
 - 2) 高田穰. 遺伝性 DNA 修復異常疾患: 家族性乳がんとファンコニ貧血. **日本家族性腫瘍学会第 17 回家族性腫瘍セミナー** (2014 年 8 月 24 日, 東大阪).
 - 3) 平明日香. 日本人ファンコニ貧血患者では変異型 ALDH2 が骨髄不全の早期発症に関連する. **第 2 回ブルストル血液学アカデミー** (2014 年 9 月 20 日, 京都).
 - 4) 平明日香, 吉田健一, 佐藤浩一, 嶋本顕, 田原栄俊, 胡桃坂仁志, 小川誠司, 高田穰, 矢部普正, 矢部みはる. 日本人ファンコニ貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定. **第 37 回日本分子生物学会年会** (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
 - 5) 高田穰, 勝木陽子, 佐藤浩一, 石合正道, 胡桃坂仁志. ファンコニ貧血経路とそのキータンパク質 FANCD2 の機能解析. **第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ** (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
 - 6) 坂本裕貴, 大川沙織, 穀田哲也, 勅使河原愛, 飯島健太, 高田穰, 小松賢志, 田内広. 相同組換え修復の細胞周期依存性解析. **日本放射線影響学会第 57 回大会** (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島).
 - 7) 秋山 (張) 秋梅, 吉川幸宏, 松井亜子, 細木彩夏. 低線量 (率) 放射線による生物影響研究の新展開. **日本放射線影響学会第 57 回大会** (ワークショップ) (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島).
 - 8) Takata M, Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Tahara H, Kurumizaka H, Ogawa S, Yabe H, Yabe M. UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients. **The 9th 3R Symposium** (17-21, November, 2014, Gotemba).
 - 9) Takata M. Comprehensive analysis of Japanese Fanconi anemia (FA) patients has led to the identification of an E2 enzyme UBE2T as a novel FA gene. **日米修復会議** (2014 年 10 月 29 日, 鳴門).
 - 10) 高橋大介, 佐藤浩一, 平山恵美子, 高田穰, 胡桃坂仁志. DNA 鎖間架橋除去における FAN1ヌクレアーゼの役割. **第 87 回日本生化学会大会** (2014 年 10 月 15-18 日, 京都).
 - 11) 久野真央, 平明日香, 高田穰. ゲノム編集酵素によるファンコニ貧血原因遺伝子 FANCA のノックアウト細胞作製の試み. **第 37 回日本分子生物学会年会** (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
 - 12) 平明日香, 吉田健一, 佐藤浩一, 嶋本顕, 田原栄俊, 胡桃坂仁志, 小川誠司, 高田穰, 矢部普正, 矢部みはる. 日本人ファンコニ貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定. **第 37 回日本分子生物学会年会** (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
 - 13) 高田穰, 勝木陽子, 佐藤浩一, 石合正道, 胡桃坂仁志. ファンコニ貧血経路とそのキータンパク質 FANCD2 の機能解析. **第 37 回日本分子生**

物学会年 (2014年11月25-27日, 横浜).

- 14) 佐藤浩一, 石合正道, 高田穰, 胡桃坂仁. Fanconi 貧血患者にみられる FANCD2 変異体の機能解析. **第37回日本分子生物学会年会** (2014年11月25-27日, 横浜).
- 15) 平山恵美子, 高橋大介, 佐藤浩一, 高田穰, 胡桃坂仁志. DNA 鎖間架橋修復で働く FAN1ヌクレアーゼの生化学的機能解析. **第37回日本分子生物学会年会** (2014年11月25-27日, 横浜).

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

DBA の患者由来多能性幹細胞の樹立と発症メカニズム解析

研究分担者 浜口 功（国立感染症研究所血液・安全性研究部 部長）
協力研究者 松岡佐保子（国立感染症研究所血液・安全性研究部 室長）
協力研究者 倉光 球（国立感染症研究所血液・安全性研究部 研究員）

研究要旨：Diamond-Blackfan 貧血 (DBA) の発症メカニズムは未だ不明なところが多く、根治の手掛かりがつかめていない。DBA の原因遺伝子の 1 つである *RPS19* を培養細胞株で発現抑制すると、オートファジーの活性化がみられ、赤血球分化異常への関与が示唆された。患者由来 iPS 細胞を用いて発症機序の解析を検討することで精度の高い結果を得られると考え、熊本大学の協力により 3 症例の DBA 由来 iPS 細胞を樹立した。DBA 由来 iPS 細胞の *in vitro* 分化誘導法を構築し、これまで培養細胞株等で得られた成果を確認するため研究環境を整えた。

A . 研究目的

これまで本研究班において DBA の原因遺伝子のリボソーム遺伝子の片アレルの大欠失等を同定して来たが、貧血発症のメカニズムの詳細は未だ不明のままであり、治療法開発が遅れている。我々は、これまでにリボソーム遺伝子の発現量の減少によって、細胞内のタンパク質代謝活性が大きく変化することを培養細胞株で見出している。

そこで、shRNA を用いて *in vitro* で作製した DBA の発症モデル系で、さらなる発症メカニズムを探索することとした。さらに、患者と遺伝的背景が完全に一致している患者由来多能性幹細胞 (iPS 細胞) を、熊本大学発生医学研究所 (江良拓実教授) の協力のもと樹立し、これまで得られた知見をもとに解析を行うこととした。

B . 研究方法

shRPS19 細胞を用いた DBA 発症メカニズム解析：shRNA で RPS19 を発現抑制した K562 細胞を作製し、オートファジーの活性および赤血球分化異常への影響を検討した。

DBA 患者由来 iPS 細胞の樹立：3 例の DBA 患者から末梢血を採血し、単核球を分離した。患者細胞

へセンダイウイルスベクターを用いた方法で山中 4 因子を遺伝子導入し、iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞から赤血球分化誘導系を構築した。

(倫理面への配慮)

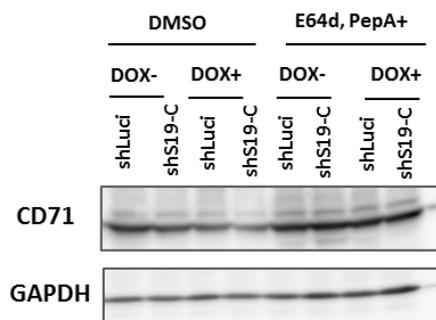
本研究は、熊本大学発生医学研究所 (倫理第 335 号)、および国立感染症研究所 (受付番号 404) におけるそれぞれのヒトを対象とする医学研究倫理審査の承認を得た上で実施した。検体採取においては、DBA 患者 (または患者の両親) へ研究内容について十分に説明し、研究協力への了承を得た場合のみ実施した。

C . 研究結果

K562 細胞へ shRNA で DBA の原因遺伝子の 1 つである *RPS19* をレンチウイルスで発現抑制すると、培養後 4 日目以降にオートファジーの活性化を伴いリソソームを介するタンパク質分解系が活性化することを見出した。CD71 (Transferrin receptor) は、細胞膜に発現し、特に赤芽球前駆細胞で高発現し、鉄の取り込みに重要な分子である。CD71 はファゴサイトーシスにより細胞内へ取り込まれるが、再利用され再び細胞膜へ移行する。RPS19 が発現抑制さ

れリソソーム分解が活性化した K562 細胞では CD71 の発現は減少していた。驚いたことに E64d と PepstatinA でリソソームの分解を阻害すると CD71 の発現が回復した (図 1)。しかしながら、細胞表面の CD71 の発現量には変化が無かった。これらのことからリソソームの分解の活性化と赤芽球分化異常が密接に関わっている可能性が示唆された。

図1



そこで、DBA 患者から樹立した iPS 細胞を用いてリソソーム分解活性と赤芽球分化抑制について同時に観察できる評価系を構築することとした。3 例の DBA 患者の末梢血単核球から iPS 細胞を作製した。DBA 患者由来 iPS 細胞は、健常者由来 iPS 細胞と比して、継代時の力学的ストレスによる細胞ダメージを受けやすくアポトーシスに陥る傾向が認められたが、定常状態における未分化性維持や増殖は遜色なく、目的とするアッセイ系に使用可能であることが確認できた。そこで、DBA 患者由来 iPS 細胞から embryoid body 形成法を用いた赤血球への分化誘導系を構築した。現在オートファジーのマーカである LC3 (GFP 融合: LC3-GFP) をレンチウイルスで iPS 細胞を導入し、薬剤セレクションすることでオートファジーが観察できる DBA 患者由来 iPS 細胞を作製している。LC3-GFP 導入 DBA 由来 iPS 細胞を *in vitro* で赤芽球へ分化誘導することでリソソームの活性化と CD71 のターンオーバーの変化等を観察し、発症メカニズムの解明を目差している。

D . 考察

DBA の原因遺伝子の抑制によって培養細胞でリソソームによる分解が活性化し、また赤芽球分化の最も重要な分子の一つである CD71 の発現が減少す

る。CD71 の発現減少はリソソーム分解の阻害によって回復することから、CD71 はリソソームでの分解により減少していることになる。リボソームタンパク質の発現減少が結果的に CD71 のターンオーバー経路を変化させていることが明らかになり非常に興味深い。また DBA では、CD34+造血前駆細胞の段階で CD71 陽性細胞数が顕著に減少していることが知られていることから、DBA の赤芽球分化異常が細胞膜表面の CD71 の発現量コントロールの異常に起因する可能性がある。これらのことから DBA では、細胞内の代謝のドラマチックな変化が起き、このとき細胞飢餓マーカーであるオートファジーが関与しているため、例えばミトコンドリアでの細胞内のエネルギー生産を高く維持させる等、細胞が飢餓状態へ移行することを回避させることが治療法樹立への鍵となる可能性がある。このことは DBA の治療薬の可能性が指摘されている L-ロイシンもエネルギー代謝に深く関与することからも強く示唆される。

E . 結論

DBA の発症メカニズムに新たにオートファジーの関与が強く示唆された。これまで培養細胞等で明らかになっている DBA の発症メカニズム仮説について、DBA 患者由来 iPS 細胞を樹立し、患者に最も近い環境で検証することができるようになった。今後、iPS 細胞を用いて DBA 発症の本態を同定する。DBA 由来 iPS 細胞は効果的な DBA の治療薬の開発にも同時に使用できるため、意義深いと考えられる。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wang R, Yoshida K, Toki T, et al. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. **Br J Haematol.** 2015;168(6):854-864.
- 2) 倉光球 浜口功 .リボソーム異常症と関連疾患 . **血液フロンティア** 特集 赤血球造血の基礎と臨床 2014;24:p81(591)-p89(599).

2. 学会発表

特になし

G . 知的財産権の出願・登録状況

特になし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

先天性造血障害の表現型と遺伝子型に応じた治療戦略に関する研究

研究分担者 大賀 正一（山口大学大学院医学系研究科小児科学 教授）
下村麻衣子（山口大学大学院医学系研究科小児科学 助教）
市村 卓也（山口大学大学院医学系研究科小児科学 診療助教）
菅野 仁（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 教授）

研究要旨：先天性造血障害患児の診療における網羅的遺伝子解析の有用性を検討した。先天性赤芽球癆（Diamond-Blackfan 貧血：DBA）を疑った母子 3 組 6 名に赤血球酵素活性と全エクソーム解析を行い、母 3 名と児 2 名に ribosome 蛋白（RP）遺伝子変異から確定診断を得た。貧血外症候は母 1 名（*RPL11* 変異）のみであった。もう 1 家系の母子は先天性赤血球形成異常性貧血（congenital dyserythropoietic anemia: CDA）を疑って解析中である。先天性造血および免疫不全の早期産児に HLA 一致臍帯血移植を行い、split chimera を確立した。児は肝不全と牛眼を合併し、既知の重症複合免疫不全に合致せず網羅的遺伝子解析を予定している。重症度が異なる鎌状貧血父子の hemoglobin 遺伝子解析を行い、globin 遺伝子変異による効果を検討中である。先天性造血障害は稀少疾患が多く表現型も多彩であるため次世代シーケンス（NGS）解析の臨床応用が期待される。

A . 研究目的

先天性造血障害には血球の産生不全（骨髄不全症）と崩壊亢進（溶血性貧血）に分類されるが、新生児期はその診断が困難である。また、先天性赤血球形成異常性貧血（congenital dyserythropoietic anemia : CDA）のように無効造血による稀少で多彩な疾患を含む。赤芽球癆（Diamond-Blackfan 貧血：DBA）などの先天性造血障害の診療における全エクソーム解析による網羅的遺伝子解析を行い、臨床的有用性を検討した。

B . 研究方法

赤芽球癆の非血縁 3 家系母子（山口大湯尻先生、佐賀大西、永井先生）を対象に、赤血球酵素活性測定スクリーニング（赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）[IU/gHb]/赤血球還元型グルタチオン濃度（GSH）[mg/dlRBC]）、Sanger 法などによる Ribosome 蛋白（RP）遺伝子解析（伊藤・浜口

研究室）を行い、Illumina 社 HiSeq2000 シークエンサーを用いて、全エクソーム解析（小島・小川/吉田研究室）を実施した。同様に CDA を疑う 1 家系母子、既知の重症複合免疫不全に合致しない先天性造血・免疫不全の早期産児の家系に網羅的遺伝子解析を行う。重症度の異なる鎌状貧血家系の hemoglobin 遺伝子解析を行う。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析は、各共同研究施設の倫理委員会の承認を受け、対象患者とその家族に同意書を取得して行い、必要に応じて遺伝カウンセリングを行った。

C . 研究結果

1) DBA 疑い家系

DBA 母子 3 家系（図 1）に全エクソーム解析を行い、1 家系母と 2 家系母子に RP 遺伝子変異を同定した。

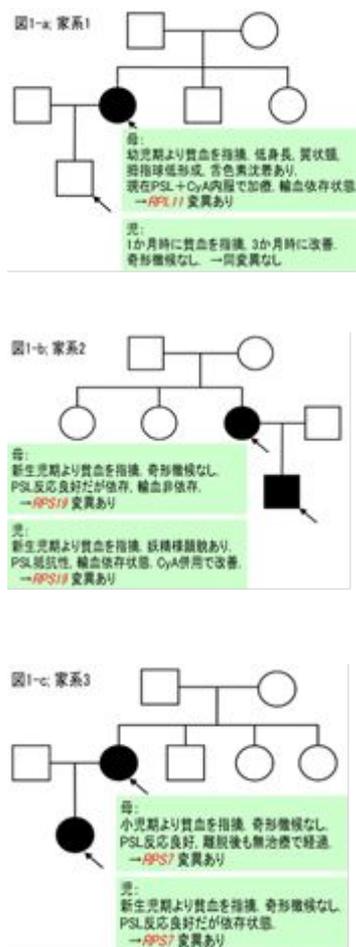


図1 DBA 母子3家系の家系図

輸血依存状態や臨床症状が異なり、貧血外症状に乏しい母子の診断に全エクソーム解析が有用であった。

2) CDA 疑い家系

乳児期に CDA を疑われたが、小児期以降、定期受診のない 28 歳女性。第 3 子妊娠時に軽度の貧血と脾腫を指摘され、確定診断のため当科紹介。Hb は正常値だが、大球性で脾腫と軽度の黄疸を認める。実子は現時点で貧血はないが、CDA を疑い確定診断を行う。

3) 先天性免疫不全・造血不全例

胎児水腫、汎血球減少を合併した先天性造血不全および重症複合型免疫不全症の女兒。先天性緑内障 (Peters 奇形) を認め、原因不明の腹水貯留、直接ビリルビン上昇、肝不全を発症。極低出生体重児であったため前処置なく HLA 一致非血縁臍帯血移植を行い day30 に生着した。児のリンパ球は donor type、好中球は recipient type で split chimera とな

った。経過中、腸管 GVHD を発症し肝不全が増悪して感染症を契機に DIC に至り死亡した。(図 1) 既知の疾患に合致するものはなく、両親には次子の希望があり、全エクソーム解析を用いた網羅的遺伝子解析を行う。

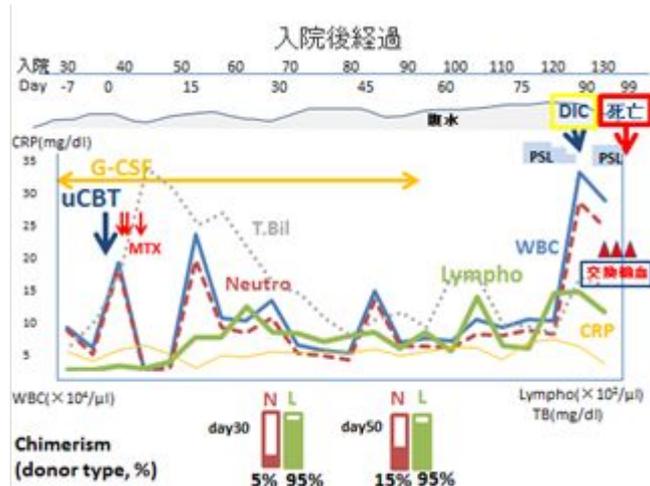


図2 先天性免疫造血不全例の臍帯血移植経過

4) 鎌状貧血家系

アフリカ人父と日本人母の生後 5 か月男児。新生児期から黄疸と貧血を認め父が HbS (ヘテロ型) であることから、患児も globin 遺伝子解析にて HbS (ヘテロ型) と診断がついた。父親に貧血はないが、患児は新生児期からやや強い溶血を認め表現型の違いを解析中である。児の 1-と 2-globin 遺伝子に異常はないが、現在両親の Hb 遺伝子を解析中である。

D. 考察

DBA など先天性造血不全症の臨床像には幅があり、原因遺伝子群の解析領域も広いため、Sanger 法による遺伝子診断には限界がある。今回、貧血外の奇形徴候に乏しく輸血依存で酵素活性スクリーニングの難しい家系の母子に NGS による全エクソーム解析を行い、確定診断を得た。RP 遺伝子数が多いため、DBA 診断における NGS の有用性は高い。

CDA も臨床像に幅があり、Biomarker もなく既存の病型に合致しない例も多かった。複数の責任遺伝子が発見され、NGS による診断精度向上が期待される。

新生児期から発症する骨髄不全、遺伝性貧血の診断は難しい。確定診断には網羅的遺伝子解析が必要

であるが、未知の疾患があるため両親を含めた家系解析と遺伝カウンセリングが必要である。

E . 結論

先天性造血不全症候群の責任遺伝子の機能は不明な点が多い。網羅的な遺伝子解析による責任遺伝子の同定と詳細な分子経路の機能解析結果から新規治療法の開発が期待される。

F . 研究発表

1. 論文発表

1. Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children. **Ann Hematol**. 2014;93(5):747-52.
2. Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S. Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of the response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. **Haematologica** 2014;99(8):1312-6.
3. Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe KI, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S. First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor vs. immunosuppressive therapy. **Haematologica** 2014;99:1784-91.
4. Wang R, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Sawada T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanazaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S,

Kuramitsu M, Hamaguchi I, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan Anemia. **Brit J Haematol**. 2015;168(6):854-864.

5. Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T. Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant. **Pediatr Transplant**. 2014;18(6):E208-11.
6. Maeba S, Hasegawa S, Shimomura M, Ichimura T, Takahashi K, Motoyama M, Fukunaga S, Ito Y, Ichiyama T, Ohga S. Successful treatment of corticosteroid with antiviral therapy for a neonatal liver failure with disseminated herpes simplex virus infection. **Am J Perinatol**. 2015. (in press)

2. 学会発表

- 1) Ochiai M, Matsushita Y, Kusuda T, Ichiyama M, Kitajima J, Inoue H, Tanaka K, Ihara K, Ohga S, Hara T. Blood chemistry and hematology reference intervals in preterm or low birth weight infants at birth. **PAS and ASPR Joint Meeting 2014** (May 3-6, 2014 , Vancouver, Canada).
- 2) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Ohara A, Ishiguro A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated red cell reduced glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. **The 56th Annual Meeting & Exposition, American Society of Hematology 2014** (December 6-9, 2014 , Sanfrancisco, CA, USA).
- 3) 大賀正一 . 小児の造血および免疫不全症～EBウイルスが関与する免疫異常～ . **第16回京阪こどもカンファレンス** (特別講演)(2014年10月11日 , 大阪).
- 4) 大賀正一 . リンパ増殖性疾患～ウイルスの関与する遺伝性素因～ **第76回日本血液学会学術集**

- 会(教育講演)(2014年10月31日,大阪).
- 5) 石村匡崇, 土居岳彦, 高田英俊, 瀧本智仁, 山元裕之, 吉田健一, 小川誠司, 小島勢二, 大賀正一, 原寿郎. Whole exome sequence により本邦初の *RTEL1* 変異を同定した Hoyeraal-Hreidarsson 症候群. **第10回九州小児免疫フォーラム**(2014年3月1日,福岡).
- 6) 石村匡崇, 土居岳彦, 高田英俊, 瀧本智仁, 山元裕之, 吉田健一, 小川誠司, 小島勢二, 大賀正一, 原寿郎. Whole exome sequence により本邦初の *RTEL1* 変異を同定した Hoyeraal-Hreidarsson 症候群. **第117回日本小児科学会学術集会**(2014年4月11-13日,名古屋).
- 7) 赤峰哲, 加藤稚子, 瀧本智仁, 石村匡崇, 保科隆之, 高田英俊, 大賀正一, 林田真, 田口智章, 原寿郎. 発症時に肝不全を呈した家族性血球貪食性リンパ組織球症(FHL)の2例. **第117回日本小児科学会学術集会**(2014年4月11-13日,名古屋).
- 8) 大賀正一, 菅野仁, 伊藤悦朗, 小島勢二. DBAにおける貧血と身体徴候の浸透率に関して. **平成26年度厚生労働科学研究委託事業厚生労働科学研究費補助金「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「小児およびAYA世代の増殖性血液疾患の診断精度向上と診療ガイドラインの改訂のための研究」林班「先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究」伊藤班3班合同班会議**(2014年8月1日,東京).
- 9) 市村卓也, 湯尻俊昭, 下村麻衣子, 永井功造, 西眞範, 吉田健一, 小川誠司, 奥野友介, 村松秀城, 小島勢二, 菅野仁, 伊藤悦朗, 大賀正一. Diamond-Blackfan 貧血(DBA)母子の診断における全エクソーム解析の有用性. **第76回日本血液学会学術集会**(2014年10月31日,大阪).
- 10) 市東正幸, 青木貴子, 檜澤大樹, 小倉浩美, 大賀正一, 岩井朝幸, 未延聡一, 伊藤悦朗, 奥野裕介, 小島勢二, 小川誠司, 菅野仁. 原因不明先天性溶血性貧血症例の全エクソーム解析による膜骨格蛋白遺伝子変異の同定. **第76回日本血液学会学術集会**(2014年10月31日,大阪).
- 11) Yagasaki H, Yabe H, Ohara A, Kosaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Long-term outcome of 100 children with moderate aplastic anemia. **第76回日本血液学会学術集会**(2014年10月31日,大阪).
- 12) Sekiya Y, Okuno Y, Muramatsu H, Olfat I, Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Hama A, Fujisaki H, Toshihiko I, Hasegawa D, Kosaka Y, Sunami S, Ohtsuka Y, Ohga S, Takahashi Y, Kojima S, Shimada A. JAK2, MPL, and CALR mutations in children with essential thrombocythemia. **第76回日本血液学会学術集会**(2014年10月31日,大阪).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

小児期造血障害疾患登録による赤芽球癆など先天性遺伝性貧血の疫学データベース構築

研究分担者 小原 明（東邦大学医学部小児科 教授）

研究要旨：先天性造血不全性貧血、遺伝性貧血は稀であり、診断法の確立や病態解明研究には疫学データベースの構築が必要である。これまで小児血液・がん学会疾患登録事業を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築し、遺伝性貧血の症例把握に努めた結果、2006～2013年に診断されて登録された730例の造血障害症例から、新規診断Diamond-Blackfan貧血症例は62例、特発性赤芽球癆は40例であった。また、2008～2013年の期間の鉄芽球性貧血は5例、congenital dyserythropoietic anemiaは3例であった。この調査により、診断や治療開発に必要な臨床情報収集（二次調査と追跡調査による詳細情報収集）の基盤が整った。

A．研究目的

【背景】

遺伝性貧血は稀少疾患であり、診断法や治療開発には疫学データベースの必要性が高い。小児血液・がん学会疾患登録事業調査結果を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築し、DBAをはじめとする小児期造血障害疾患の症例把握に努めた。

【目的】

本邦の小児期造血障害疾患症例を悉皆性高く収集して疫学データベース構築する。小児血液学会（現小児血液・がん学会）疾患登録事業を一次調査とした疫学観察研究を基盤とした小児期造血障害疾患の詳細なデータベース構築を目指す。

B．研究方法

本研究班の研究では疫学観察研究として実施し、治療介入は行わない。小児血液・がん学会会員240施設を対象にした全例登録（疾患登録事業）は、前年診断症例を対象にWeb登録にて実施される。構築されるデータベースには小児期発症の造血障害全般を網羅し、遺伝性貧血症例に限定はしない。

上記疾患登録事業で収集されている情報は限られており、診断や治療開発に必要な疾患遺伝子診断情

報を含む詳細な情報の収集（二次調査・追跡調査）の体系を構築する。

（倫理面への配慮）

研究計画は、小児血液学会臨床研究審査委員会の倫理審査承認を得た。疾患遺伝子診断情報を含む二次調査は本年度実施していない。倫理審査を承認後に実施する。

C．研究結果

2006～2013年診断登録症例数を表に示す（表）。

- 疾患登録（一次調査）症例：2013年診断症例は小児血液学会会員230施設の92%に相当する212施設が登録した。非腫瘍性血液疾患は毎年1,200～1,300症例であり、血小板異常症が最多。表に挙げた造血障害疾患（溶血性貧血を除く）は総計730例で、そのうち特発性再不貧は毎年50～56例とほぼ一定した症例数であった。診断は小児血液・がん学会の形態中央診断が貢献している。
- Diamond-Blackfan貧血：DBA症例は7年間で62例、特発性赤芽球癆40例が登録された。
- 2008～2013年の期間の鉄芽球性貧血は5例、congenital dyserythropoietic anemiaは3例で

あった。いずれも極めて稀である。

- d. 本研究班の活動は 2014 年小児血液・がん学会総会で発表され、学会員への小児期造血障害疾患に関する啓発活動も盛んである。

D . 考察

小児血液・がん学会疾患登録事業は 2006 年に開始され、会員施設において診断された全ての血液疾患を対象にした全数把握疫学研究事業である。また、同学会形態中央診断事業は、診断困難な小児期の造血不全を対象にして、高い精度で新規症例が診断されている。全数把握疫学研究は、遺伝性貧血以外の疾患も同時に収集しており、これらを統合した疾患データベースを構築することで、各疾患の相対頻度も明らかになる。

小児期造血障害疾患の病態解明、診断法や治療開発には疾患遺伝子情報や詳細な臨床情報、追跡情報の収集(二次調査・追跡調査)が必要である。今回、学会疾患登録事業で収集された一次調査情報データベースが整った事で詳細データを含む「小児造血障害」データベース構築の基盤が整った。次年度は、「小児造血障害」データベース特異的な調査項目を順次整理する。その際には、海外の同様のデータベースと比較検討できる共通基本項目を海外との情報交換で調査整備する必要がある。

E . 結論

学会疾患登録事業一次調査情報データベースにより、詳細データを含む「小児造血障害」データベース構築の基盤が整った。

F . 研究発表

- 論文発表
- Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S. Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children. **Haematologica** 2014;99:664-671.

- 学会発表
研究期間に本研究に関連する学会発表はない。

G . 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし
- その他
なし

表

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	216 / 239	219 / 242	212 / 230
(%)	83%	88%	90%	90%	90.3%	90.4%	90.5%	92%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	62	49	49
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5	11	1
AA / PNH	2	1	1	0	1	0	0	0
Fanconi anemia	5	4	6	1	4	2	6	4
Diamond-Blackfan anemia	9	6	9	10	6	9	6	7
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6	4
Schwachman-Diamond syndrome	0	1	1	2	0	0	2	1
Cong. Dyserthropoietic anemia	No data	No data	1	0	0	1	0	0
Sideroblastic anemia	No data	No data	2	1	1	0	1	0
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4	4
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	5	3
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0	0
Cong. Spherocytosis	No data	•	•	•	54	49	26	32
Cong. Elliptocytosis	No data	•	•	•	2	1	1	2
G6PD deficiensy	No data	•	•	•	5	5	3	1
PK deficiency	No data	•	•	•	0	0	0	0
Other erythrocyte enzyme def.	No data	•	•	•	2	0	0	0
Sickel cell disease	No data	•	•	•	1	1	0	0
Unstable hemogrobinopathy	No data	•	•	•	1	0	0	0
Thalasemia	No data	•	•	•	18	16	11	8
Other hemogrobinopathy	No data	•	•	•	0	0	0	1

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

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（弘前大学医学部附属病院小児科 講師）

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 12 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。本年度は、サンガーシーケンサーや次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスを行っても原因遺伝子が不明な 16 家系 28 名（非罹患家族も含む）について全エクソン解析を行った。その結果、これまでに報告のない新規原因候補遺伝子 *RPS15A*（スプライス変異：c.G213A）を 1 家系 3 例に見出した。変異のみられた 3 例（本人、姉、母）はいずれも罹患患者であり、非罹患患者である父には変異は検出されなかった。以上の結果から、*RPS15A* が DBA の新規原因遺伝子であることが強く示唆された。RP 遺伝子以外の新規原因候補遺伝子も同定し、解析を進めている。

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 12 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。本研究の目的は、既知の原因遺伝子を解析して DBA の遺伝子診断を行うとともに、未知の原因遺伝子を同定して、より正確な遺伝子診断法を確立することである。

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*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL26*, *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。

この検索によっても原因遺伝子を同定できなかった臨床検体について、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析を行った。ヒト全エクソン領域

を、ベイトと呼ばれる RNA ライブラリーを用いて溶液中でキャプチャーし、イルミナ社の高速シーケンサー HiSeq2000 で網羅的な解析を行った。得られた遺伝子異常は、サンガーシーケンサーや次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスにより確認した。アミノ酸置換を生じる翻訳領域の一塩基多型が多数見つかりと予想されるため、家族内の罹患患者や非罹患患者も解析し、結果を比較することにより原因遺伝子の候補を絞り込み、新規遺伝子変異の同定を試みた。

（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

これまでに DBA153 例の臨床検体を用いて遺伝子解析を行い、81 例に既知の原因遺伝子の変異あるいは欠失を見出した。

本年度は、次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスや大欠失の解析を行っても原因遺伝子が不明な16家系28名（非罹患者家族も含む）について全エクソン解析を行った。その結果、これまでに報告のない新規原因候補遺伝子 *RPS15A* (c.G213A) を1家系3例に見出した。変異のみられた3例（本人、姉、母）はいずれも罹患者であり、非罹患者である父には変異は検出されなかった。次に、末梢血単核球より total RNA を抽出し、それを鋳型として cDNA を合成して RT-PCR を行い、*RPS15A* (c.G213A) がスプライス変異であることを確認した。なお、発端者は2歳3カ月で貧血を発症し、成長障害、両白蓋形成不全および総肺静脈還流異常を合併し、ステロイドには反応がみられなかった。

また、RP 遺伝子以外の新規原因候補遺伝子も同定した。

D . 考察

我が国の DBA は、まだ約半数が原因遺伝子不明である。今回の次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、新規原因候補遺伝子として *RPS15A* (c.G213A) を同定した。この変異は罹患者である姉妹と母親に検出され、非罹患者である父親には検出されなかった。この変異はスプライス変異を引き起こすことが mRNA を用いた解析から確認された。以上の結果から、*RPS15A* が DBA の新規原因遺伝子であることが強く示唆された。今後、ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析により、この遺伝子変異が貧血の原因になることを確認する予定である。

また、RP 遺伝子以外の新規原因候補遺伝子も同定し、現在解析を進めているところである。

E . 結論

DBA の新規原因候補遺伝子 *RPS15A* を同定した。今後、ゼブラフィッシュなどを用いた機能解析により、この遺伝子変異が貧血の原因になることを確認する予定である。

F . 研究発表

1. 論文発表

1) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi

T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutations in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. **Br J Haematol**. 2015;168(6):854-864.

2) Ono R, Hasegawa D, Hirabayashi S, Kamiya T, Yoshida K, Yonekawa S, Ogawa C, Hosoya R, Toki T, Terui K, Ito E, Manabe A. Acute megakaryoblastic leukemia with acquired trisomy 21 and GATA1 mutations in phenotypically normal children. **Eur J Pediatr**. 2014 Sep 30. [Epub ahead of print]

3) Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T, Kanezaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Imaizumi M, Mitsui T, Hori H, Hara J, Horibe K, Nagai J, Goto H, Ito E. Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. **Genes Chromosomes Cancer** 2014;53:902-10.

4) 王汝南, 金崎里香, 土岐力, 照井君典, 佐々木伸也, 工藤耕, 神尾卓哉, 佐藤知彦, 池田史圭, 荒木亮, 落合英俊, 伊藤悦朗. 非ダウン症小児急性巨核芽球性白血病にみとめられた新規 GATA1 インフレイム変異. **弘前医学** 2014;65: 227-237.

5) 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症に合併した骨髄性腫瘍の分子病態. **血液内科** 2014;69: 200-206.

2. 学会発表

1) Ikeda F, Toki T, Kanezaki R, Wang RN, Terui K, Sasaki S, Kudo, K, Sato T, Ito E. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-

Blackfan anemia in Japan. **第76回日本血液学会学術集会** (2014年10月31日～11月2日, 大阪).

- 2) 照井君典, 金崎里香, 土岐力, 伊藤悦朗. ダウン症候群に伴う TAM 発症の分子機構. **第24回日本産婦人科・新生児血液学会ワークショップ4** 新生児の白血球異常症 (2014年6月13-14日, 横浜).
- 3) Tomizawa D, Watanabe T, Hanada H, Horibe K, Horikoshi Y, Iwamoto S, Kinoshita A, Moritake H, Nakayama H, Shimada A, Taga T, Takahashi H, Tawa A, Terui K, Hori H, Kawano Y, Kikuta A, Manabe A and Adachi S. Outcome of Adolescent and Young Adults with Acute Myeloid Leukemia Treated with Pediatric Protocols: A Report from the 3 Japanese Cooperative Studies. **第56回アメリカ血液学会** (2014年12月6-9日, サンフランシスコ).
- 4) 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 A, Horibe K, Nakahata T, Miyachi H, Tawa A and Adachi S. High Event-Free Survival Rate with Minimum-Dose-Anthracycline Treatment in Childhood Acute Promyelocytic Leukemia: A Nationwide Prospective Study by the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). **第56回アメリカ血液学会** (2014年12月6-9日, サンフランシスコ).
- 5) Taga T, Watanabe T, Kudo K, Tomizawa D, 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 A, Horibe K, Nakahata T, Tawa A and Adachi S. Risk-Oriented Therapy for Myeloid Leukemia of Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study By the Japanese Pediatric Leukemia / Lymphoma Study Group (JPLSG). Blood

2014;124:S3668. **第56回アメリカ血液学会** (2014年12月6-9日, サンフランシスコ).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

遺伝性鉄芽球性貧血の遺伝子型と表現型の関連解析

研究分担者 古山和道（岩手医科大学大学生化学講座分子医化学分野 教授）

研究要旨:先天性疾患の多くでは親から子へと受け継がれる遺伝子変異が発症原因である。次世代シーケンサの性能の向上は遺伝子変異の同定を容易にしたが、変異を有する遺伝子が疾患の原因遺伝子である事を明らかにするためには更なる検討が必要である。本研究では近年利用可能になったゲノム遺伝子改変システムを利用し、培養細胞を用いて遺伝子変異が表現型に与える影響を明らかにすることを試みた。

A . 研究目的

次世代シーケンサの開発と検出手技の改良により、特定の遺伝子の解析、あるいは網羅的な遺伝子解析が比較的容易となりつつあり、様々な遺伝子変異が患者において同定される様になってきた。一方で、数多く同定される遺伝子変異のうち、大きなアミノ酸の欠失により明らかにタンパク質の機能が障害されると予想される変異を除くと、多くの遺伝子変異と表現型（疾患）の直接的な関連を確定するのは困難である事が多い。特に、遺伝子発現調節領域であるプロモーター領域やエンハンサー/サプレッサー領域の変異の評価は難しく、野生型と比較してプロモーター活性やエンハンサー活性が低下することを明らかにできても、それが病的な低下と言えるかどうかについては議論の余地がある。

最近、分担研究者の古山は *ALAS2* 遺伝子第1イントロンに赤芽球特異的エンハンサーが存在することを見出し、遺伝性鉄芽球性貧血患者において同部に変異を有する家系が存在することを明らかにして報告した。その際、プロモーターアッセイなどの方法により、エンハンサーの変異が *ALAS2* のプロモーター活性を低下させることを明らかにしたが、同部の変異により実際に赤芽球内におけるヘム合成量が低下するかどうかについては確証が得られていない。

そこで、本研究では遺伝子変異と表現型の関連を比較的簡便かつ直接的に明らかにする方法を樹立する事を目的に、近年広く用いられつつあるゲノム編

集技術により赤芽球系培養細胞の *ALAS2* 遺伝子のエンハンサー部分に変異を導入し、実際にヘム合成量が低下するかどうかを明らかにすることを試みた。

B . 研究方法

赤芽球系培養細胞である K562 細胞を用い、ゲノム編集技術としては Life Technologies 社の GeneArt CRISPR/Cas9 システムを用いた。このシステムは、ガイド RNA と Cas9 nuclease を同じベクターから発現させる方法により、一種類のベクターを細胞内に導入するのみで、ゲノム DNA の目的の部分切断することができる。その後、切断部の修復が起こる際に同部のゲノム DNA にランダムな欠失や塩基の挿入が起こるため、高頻度に変異が導入されるシステムである。ガイド RNA の配列としては、ヒト *ALAS2* 遺伝子第1イントロンのエンハンサー配列、その中心となる GATA1 結合配列の近傍の配列とした。このようにして作成した *ALAS2* intron1 enhancer editing 用ベクター（以下、pCRISPR-*ALAS2*int1GATA）を Nucleofector（ロンザジャパン株式会社）を用いて K562 細胞に導入し、限界希釈法によりクローニングを行った。その後、Survayor Assay（Transgenomic 社）により変異が導入されていると予想されるクローンを選択し、最終的に *ALAS2* エンハンサー部分を PCR 法により増幅した後に塩基配列を決定し、変異が導入されてい

るクローンを選択した。このようにして *ALAS2* エンハンサーに変異が導入されたクローン(変異 K562 細胞)を選別し、それらから total RNA を抽出し、*ALAS2* mRNA の発現量を RealTime PCR 法により野生型 K562 細胞と比較した。また、ヘモグロビン染色によりヘモグロビン陽性細胞の割合を算出した。

C . 研究結果

Nucleofector による K562 細胞への pCRISPR-*ALAS2*int1GATA (プラスミド) 導入高率は非常に良好で、限界希釈によりクローニングした後も約 50% 程度のクローンで目的の部位の変異が確認された。また、それぞれのクローンの変異導入部位における変異のタイプをシーケンスにより検討した所、多くは欠失で、数塩基から 30 塩基程のものが大半を占めた。それ以外に一部では数塩基の挿入も認められた。また、今回の検討では過半数の変異導入クローンで両方のアレルに異なる変異が導入されており、変異導入の効率も非常に良好であった。これらのクローンの中から両方のアレルに変異が導入されたクローンを選択して *ALAS2* mRNA 量を Real Time PCR 法により野生型の K562 細胞と比較した所、比較した全ての変異導入クローンで *ALAS2* mRNA の発現が低下しており、また、これらの変異導入クローンにおいては野生型と比較してヘモグロビン陽性率も低下していた。

D . 考察

コード領域の変異がタンパク質の機能に与える影響を明らかにすることは、そのタンパク質の機能の評価方法が確定している場合にはそれほど困難ではないと考えられる。一方、タンパク質の機能が明らかでない場合、あるいは機能が明らかであってもその評価の方法が確立していない場合には、遺伝子変異が同定されたとしても、それが疾患の原因になりうるかどうかを判定することは非常に困難である。実際、近年の次世代シーケンサの進歩により全てのタンパク質のコード領域の配列を明らかにするエクソーム解析が盛んに行われるようになり、家族歴などから遺伝性と推定されていても原因が不明であった症例で新たな候補遺伝子が次々に同定されつつあり、現在これらの遺伝子変異がどのように当該疾患

の発症に関与するののかについて更なる検討が行われている。また、次世代シーケンサの更なる改良とコストの低減により、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い症例については、全ゲノム解析が行われる可能性も高まっている。このような場合、プロモーター部分やイントロン部分の変異、さらには遺伝子と遺伝子の間の領域における変異なども多数同定される様になると予想されることから、バイオインフォマティクスを駆使して候補となる変異を絞り込んだとしても、その候補の変異がどのように疾患の発症と関与するのかを明らかにするのは非常に困難であると予想される。

今回我々は、近年盛んに用いられる様になりつつあるゲノム編集システムを用いて培養細胞のゲノムの特定の領域に変異を導入することにより、イントロン領域の変異が内在性遺伝子の発現制御に関与している可能性が高いことを示した。今回導入し得たのは非特異的な欠失・挿入変異であり、患者のゲノム DNA で同定された変異とは異なる点や、ゲノム編集システムにより他の遺伝子へ非特異的な変異が導入された可能性など、今後解決して行かなければならない問題は多数存在しているが、内在性の遺伝子の発現調節を直接観察できるメリットは大きいと思われる。従って、今回行ったのと同様の方法は、遺伝性鉄芽球性貧血のみならず、様々な遺伝性疾患家系において、網羅的な検索により同定された遺伝子変異と疾患との関連を明らかにするために有用である可能性は高いと考えられる。

E . 結論

CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて赤芽球系培養細胞である K562 細胞の *ALAS2* 遺伝子の第 1 イントロンに存在するエンハンサー領域に変異を導入し、これにより内在性 *ALAS2* mRNA の発現が低下し、ヘモグロビン陽性率が低下することを明らかにすることができた。この方法は、特定の遺伝子のコード領域で同定される変異のみならず、今後全ゲノム DNA の解析に伴い増加すると考えられる遺伝子の非コード領域の変異の疾患との関連を評価するためにも有用であると考えられる。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) 張替秀郎, 藤原亨, 古山和道 . ヘム代謝と貧血 . **臨床血液** 2014;55(7):729-734.
- 2) Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, Kobayashi R, Ishida H, Harigae H, Shibahara S. Identification of the novel erythroid-specific enhancer for ALAS2 gene and its loss-of-function mutation associated with congenital sideroblastic anemia. **Haematologica** 2014;99(2):252-61.

2. 学会発表

- 1) 古山和道, 山下莉奈, 野村和美, 加藤恭丈, 久保田美子 . 非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) の新たなヘム依存的分解機構 . **第 87 回日本生化学会大会** (2014 年 10 月 15-18 日, 京都).
- 2) 山下莉奈, 久保田美子, 野村和美, 古山和道 . 非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS1) のミトコンドリア内半減期調節におけるヘム結合モチーフの役割 . **第 650 回岩手医学会例会** (2014 年 7 月 25 日, 盛岡).
- 3) 古山和道, 久保田美子 . CRISPR/CAS9 システムを用いた 5-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS2) 遺伝子の赤芽球特異的エンハンサーの機能解析 . **第 650 回岩手医学会例会** (2014 年 7 月 25 日, 盛岡).

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法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 講師）

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努める。

（倫理面への配慮）

調査の基本となる日本小児血液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該当症例に対し、中央遺伝子診断への協力、検体送付などを依頼した。また、成人領域を含む本疾患が疑われる患者相談があった際に、診断支援をするとともに中央診断ならびに遺伝子診断への協力を呼びかけた。遺伝子検査で次世代シーケンサーによる解析がなされた症例で、CDA 以外の症例の可能性が判明した場合は、該当疾患遺伝子の解析も進めた。

当科で follow 中であった CDA 疑いの男性は既知の CDA 関連遺伝子の異常は見られなかったが、次世代シーケンスの結果、先天性溶血性貧血と診断された。

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、既知の遺伝子異常を持つ症例は極めて少なく、自験例のように他の血液疾患と誤診されている症例も少なくない。引き続き詳細な調査・研究が必要であると同時に本邦の CDA は極めて少ないあるいは既知の病型と異なる可能性もあり、診断方法などを含めて再検討が必要である

E . 結論

我が国の CDA の実態の正確な把握と、よりよい治療法を開発するため、今度も調査、研究が必要である。

F . 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

遺伝性貧血の病態解明と診断法の確立に関する研究

重症先天性好中球減少症の造血幹細胞移植：再移植症例の検討

研究分担者 小林正夫（広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学 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、骨髓像での前骨髄球・骨髄球での成熟障害、生後早期からの重症細菌感染症の反復を特徴とする食細胞の数的異常による先天性骨髓不全症の一つである。現在までに10種類以上の責任遺伝子が同定されているが、欧米、本邦ともに好中球エラストラーゼ遺伝子（ELANE）の変異を約75%に認めている。根治療法としては造血幹細胞移植が唯一の治療法であるが、その成績、適切な移植時期についての一定の結論はない。今回、初回の造血幹細胞移植で拒絶され、広島大学病院で再移植として骨髓移植を施行した4症例について検討を行った。

血縁1例、非血縁3例で前処置はFlu, CY, Mel, TBIに十分量のATGを使用した免疫抑制効果の高いレジメンを選択した。4症例とも生着は速やかであり、症例2を除いて、生着後は100%ドナータイプの完全キメラの状態を維持し、移植後1~6年経過するが通常の日常生活を過ごしている。症例2は生着後3か月頃からドナータイプ細胞の減少を認めたため、DLIを施行した。4回のDLI後にGrade IIのGVHDを認めたが、免疫抑制剤と生物学的製剤の使用でコントロール可能であった。免疫抑制効果を最大限とした本前処置はSCNを含めた食細胞異常症に有効であり、今後は初回移植症例も含めた症例集積と晩期障害を最小限にする造血幹細胞移植を進める必要がある。SCNの診断から治療まで一貫した登録システムの確立、長期フォローアップ体制と最良の治療法の提供までのガイドライン作成が重要である。

A．研究目的

先天性好中球減少症（severe congenital neutropenia, SCN）は慢性好中球減少、骨髓像での前骨髄球・骨髄球での成熟障害、生後早期よりの重症細菌感染症の反復を特徴とする難治性遺伝性疾患である。2011年の原発性免疫不全症の最新分類では、食細胞異常症の中に好中球減少症としてSCN1からSCN5まで、責任遺伝子によって分類されている。G-CSF製剤の投与により感染症に対する生命予後は劇的に改善されたが、長期のG-CSF投与により骨髓異形成症候群（MDS）や急性骨髄性白血病（AML）への進展が報告されている。近年では根治療法として造血幹細胞移植が行われる症例の頻度が増加している。しかし、造血幹細胞移植における前

処置法、適切な移植時期等についての見解は一定していない。Oshimaらの本邦症例の集積では骨髓破壊的、非破壊的前処置にかかわらず、5例が拒絶されており、安全な治療に至っていない現状である。従って、SCNについては診断から治療まで一貫した登録システムの確立、長期フォローアップ体制と最良の治療法の提供までのガイドラインが必要と思われる。今回、初回の造血幹細胞移植で拒絶され、広島大学病院で再移植として骨髓移植を施行した4症例について検討を行った。

B．症例

再移植を施行した4症例の概要を表1に示す。4症例ともELANE変異例で、末梢血液検査、骨髓像

所見から診断がなされ、一部重症感染症を経験していた。3例がすでに G-CSF による治療が行われていたため、MDS/AML への進展前に造血幹細胞移植が必要と判断され、移植が施行されていた。すべての症例が拒絶されたために、当院紹介時には慢性好中球減少症を呈していた。再度遺伝子検査を行い、ELANE 変異を確認した。

表 1. 再移植症例の概要

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Age	10 m.	2 y	3 y 9 m	1 y 3 m
Sex	male	female	female	male
Etiology	ELANE G185R	ELANE V72M	ELANE 4501-4503 del	ELANE G185R
Pre-transplant status	Otitis media Pneumonia Sinusitis	Perianal abscess Stomatitis	Cellulitis Stomatitis	Cellulitis Sinusitis
G-CSF (µg/kg/d)	8	5	-	5
Duration of G-CSF	9 months	1 year	-	8 months

表 2 に初回移植の概要を示す。拒絶に至った原因は後方視的検討にはなるが、臍帯血移植の 2 例は移植細胞数の不足が考えられた。症例 4 は HLA が血清型では 1 座不一致であったが、アリルでは 6/8 の一致度であった。輸注細胞数も十分ではなかった。症例 2 については、造血幹細胞源の条件、輸注細胞数ともに許容範囲内と判断出来るが、早期拒絶であったことは前処置の免疫抑制が不十分と考えられた。症例 1 のみ骨髄破壊的前処置が行われていた。症例 2 と 3 で DLI が追加されているが無効であった。症例 3 は同胞の臍帯血を出生時に保存し、HLA 一致を確認後に移植を行ったので、DLI が可能であった。

表 2. 初回移植の概要

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Donor	MMUD (HLA 5/6, A)	MURD (HLA 6/6)	MRD (HLA 8/8)	MMUD (HLA 6/8 C, DR)
Source	CB	BM	CB	BM
NCC (x10 ⁸ /kg)	0.00699	1.9	0.49	1.5
CD34 (x10 ⁶ /kg)	NA	1.9	0.07	1.1
Conditioning regimen	BU 16 CY 120 Flu 120	Flu 125 CY 140 LPAM 90 TBI 3 ATG 2.5	Flu 120 CY 100 TBI 3 ATG 40	Flu 125 LPAM 140 TBI 2 ATG 5
Results	Rejection (day 72)	Rejection (day 55) DLI 4 times	Rejection (day 14) DLI 3 times	Late rejection (1 year)

(倫理面への配慮)

本研究での遺伝子解析は、広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会での承認を得た。

C. 研究結果と考察

表 3 に再移植症例のドナー、造血細胞源(すべて骨髄細胞) 前処置ならびに輸注細胞数を示す。血縁 1 例、非血縁 3 例であった。HLA は非血縁で 2 例が A と DR の 1 座不一致であった。移植細胞数はいずれも十分であった。

表 3. 再移植の概要

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Age	7y	3y	9y	5y
Donor	MMUD (HLA 7/8, A)	MURD (HLA 6/6)	MRD (HLA 8/8)	MMUD (HLA 7/8, DR)
Source	BM	BM	BM	BM
NCC (x10 ⁸ /kg)	3.4	3.14	10.9	8.47
CD34 (x10 ⁶ /kg)	4.2		11.1	2.32
Conditioning regimen	Flu 125 CY 140 LPAM 90 TBI 3 ATG 10	Flu 125 CY 140 LPAM 90 TBI 3 ATG 10	Flu 100 CY 160 LPAM 90 TBI 3 ATG 12	Flu 100 CY 160 LPAM 90 TBI 3 ATG 12

前処置は免疫抑制効果を最大限に発揮できる骨髄非破壊的レジメンを選択した。Flu, CY, Mel, TBI に十分量の ATG を使用した。本症の免疫抑制には、以前の拒絶例の経験から十分量の ATG が必要と判断したため、移植後のウイルス感染に十分注意したうえで、10-12 mg/Kg を使用した。

移植結果を表 4 に示す。4 症例とも生着は速やかであり、症例 2 を除いて、生着後は 100% ドナータイプの完全キメラの状態を維持し、以後、制限・服薬もない通常の日常生活を過ごしている。症例 4 で EB ウイルスによる LPD を合併したが、リツキサンで軽快した。症例 2 は生着後 3 か月頃からドナータイプ細胞の減少を認めたため、DLI を施行した。4 回の DLI 後に Grade II の GVHD を認めたが、免疫抑制剤、レミケード[®]、リツキサン[®] の使用でコントロール可能であり、再移植後 3 年経過した現在、完全キメラの状態での通常の日常生活を過ごしている。

表 4 . 移植結果

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Engraftment (Neu> 500 / μ l)	Day 16	Day 21	Day 14	Day 19
Donor chimerism	100% (day 28)	92.8% (day 28)	100% (day 21)	100% (day 19)
Acute GVHD	Skin grade I	Skin, gut grade II	-	Skin grade I
Chronic GVHD	-	Limited	-	-
DLI (times)	0	4	0	0
PS (%)	100%	100%	100%	100%
infection	-	-	-	EBV-LPD (day 40)
outcome	Alive	Alive Donor chimerism 100% (2.5 years)	Alive	Alive
Follow up (months)	6 years	3 years	15 months	13 months

D . 結論

当科に紹介された SCN の初回移植での生着不全 4 例に対して、再移植として骨髄移植を施行した。前処置には高用量 ATG を含む免疫抑制効果の強いレジメンを選択し、速やかな生着を認めた。これでも 1 例は混合キメラ状態となり DLI を必要としたが、十分量の移植細胞数の確保とウイルス感染の合併症への注意をすればこの前処置は有用と考えられる。今後、SCN 初回移植症例も含めた同様なレジメンで症例集積と晩期障害を最小限にした造血幹細胞移植を進めて行く予定である。

E . 研究発表

- 論文発表
 - Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T. Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis. **Haematologica** 2014;99:19-27.
 - Fujii Y, Ishikawa N, Kobayashi Y, Kobayashi M, Kato M. Compound heterozygosity in GPR56 with bilateral frontoparietal polymicrogyria. **Brain & Development** 2014;36:528-31.
 - Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Tajima G, Kobayashi M. Ictal electroencephalography and electromyography features in symptomatic infantile epileptic encephalopathy with late-onset spasms. **Neuropediatrics** 2014;45:36-41.
 - Kobayashi Y, Ishikawa N, Fujii Y, Nakamura K, Kobayashi M. A case of trisomy 18 with exacerbation of seizures triggered by administration of valproic acid. **Am J Med Genet A**. 2014;164A:285-6.
 - Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S,

- Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. **Journal of Leukocyte Biology** 2014;95:667-676.
- 6) Joichi Y, Chijimatsu I, Yarita K, Kamei K, Miki M, Onodera M, Harada M, Yokozaki M, Kobayashi M, Ohge H. Detection of *Mucor velutinosus* in a blood culture after autologous peripheral blood stem cell transplantation: a pediatric case report. **Medical Mycology Journal** 2014;55:E43-48.
- 7) 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. **Modern Rheumatology** 2014.
- 8) Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Samukawa M, Kusunoki S, Kobayashi M. A pediatric case of peripheral polyneuropathy with IgM anti-GM1 antibody associated with a group a beta-hemolytic streptococcus infection. **Pediatric Neurology** 2014;1:441-3.
- 9) Ishikawa N, Kobayashi Y, Fujii Y, Kobayashi M. Increased interleukin-6 high-sensitivity C-reactive protein levels in pediatric epilepsy patients with frequent, refractory generalized motor seizures. **Seizure** 2014. 10.007. (Epub ahead of print)
- 10) 小林正夫, 川口浩史 . 自己免疫性好中球減少症 . **日本内科学会雑誌** 2014;103:1639-1644.
- 11) 溝口洋子, 小林正夫 . 重症先天性好中球減少症の病態解析研究の進歩 . **血液内科** 2014;68:676-81.
- 12) 土居岳彦, 小林正夫 . 小児血液疾患 よくわかる最新知見 好中球異常症の概要と診断の進め方 . **小児科** 2014;55:1577-1583.
- 13) 岡田賢, 小林正夫 . IL-21 シグナルはナイーブ B 細胞を IL-2 感受性にして形質細胞に分化させる . **血液内科** 2014;69:405-409.
- 14) 川口晃司, 内田佳子, 齋藤敦郎, 宮田憲二, 長谷川大一郎, 小坂嘉之, 岩田あや, 仁紙宏之, 小林正夫 . 同種骨髄移植が奏功した新規 ELANE 遺伝子変異を有する重症先天性好中球減少症 . **臨床血液** 2014;55:2294-2299.
2. 学会発表
- 1) Utsunomiya A, Tsumura M, Ohno N, Miki M, Kawaguchi H, Nakamura K and Kobayashi M. Excessive Nitric Oxide production of CGD neutrophils induces the down-regulation of *NOS3* and *EDN1* expression in human endothelial cells. **The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (Dec 6-9, 2014 , San Francisco, CA).
- 2) Mizoguchi M, Okada S, Tsumura N, Hirata O, Minegishi S, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M. *STAT1* gain-of-function in patients with chronic mucocutaneous candidiasis can be detected by the excessive phosphorylation of STAT1 in peripheral blood monocytes. **The 56th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (Dec 6-9, 2014 , San Francisco, CA).
- 3) Hayakawa S, Maeno S, Ohno N, Okada S, Nishimura Y, Hayashidani M, Kobayashi M. Significant augmentation of regulatory T cells in early neonatal period. **16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies** (Oct 29 to Nov 1, 2014 , Prague, Czech).
- 4) Mizoguchi Y, Furue A, Chijimatsu I, Miki M, Tomioka K, Konishi N, Ono A, Kawaguchi H, Nakamura K and Kobayashi M. Early elimination of Factor VIII inhibitor by ITI with high dose immunoglobulin in hemophilia A children. **WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA** (May

11-15, 2014 , 2014 World Congress,
Melbourne).

F . 知的財産権の出願・登録状況

特になし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

Shwachman-Diamond 症候群の診断基準作成に関する研究

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）
金兼 弘和（東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 准教授）

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する。90%で SBDS 遺伝子の両アリル変異を認める。症状、臨床所見は多様であり、重症度も症例により異なるため、診断は容易でない場合があり、本研究では診断基準・重症度分類の作成を行った。

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、精神発達遅滞を伴うことが多く、15～30%で骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病を発症する。90%で SBDS 遺伝子の両アリル変異を認めるため遺伝子診断が可能である。しかし、症状、臨床所見は多様であり、重症度も症例により異なるため、診断は必ずしも容易ではない。本症候群の正確な診断、適切な治療を行うため、診断基準・重症度分類の作成を本研究の目的とする。

B．研究方法

本症候群を対象として、コンセンサスガイドラインを中心とした文献、平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業「Shwachman-Diamond 症候群の効果的診断法の確立に関する研究」の結果を参考として診断基準・重症度分類を作成した。

（倫理面への配慮）

本研究はヒトを対象とするものではないため、倫理面の配慮は特に必要としない。

C．研究結果

Shwachman-Diamond 症候群 (SDS) の診断基準 （平成 26 年度作成）

1. 臨床所見としては、好中球を主体とした血球減少、慢性下痢、発育不良を認める。
2. 骨髄不全を認め、以下の一つ以上を満たす。
 - 1) 絶対数 1500/ μ L 未満の好中球減少（間欠的あるいは慢性的；少なくとも 3 ヶ月間隔で 2 回）
 - 2) 血球産生低下による血球減少（貧血、血小板減少、汎血球減少；少なくとも 3 ヶ月間隔で 2 回）
3. 膵外分泌不全を認め、以下の一つ以上を満たす。
 - 1) 膵外分泌酵素低値
3 歳未満でトリプシノーゲン低値
かつ / または
3 歳以上で膵型アミラーゼ低値
 - 2) 画像（超音波、CT、MRI）で小型あるいは脂肪の多い膵を認める。
 - 3) 便中脂質の増加（72 時間収集）
4. 膵外分泌不全と骨髄不全の原因となる他疾患を除外する。^{注1)}
5. 以下の所見があれば確実性が増す。
 - 1) 一等親に本症候群と診断された家族がいる。
 - 2) 骨格異常
 - 3) 行動異常
 - 4) 年齢別正常値と比較した MCV 高値（ただし、溶血や栄養不良等による他の原因によらない）

- 5) ヘモグロビンF 高値
 - 6) 骨髄検査で白血病、骨髄異形成症候群、染色体異常のうち一つ以上に該当する。
 - 7) SBDS 遺伝子変異を両アリルに認める。
6. 診断に際しては、1、2 および 3 によって本症を疑い、4 によって他の疾患を除外し、5 によって診断をさらに確実なものとする。

注 1)

腭外分泌不全と骨髄不全がみられる Pearson 症候群や Fanconi 貧血などの他の先天性骨髄不全症候群、嚢胞線維症といった腭外分泌不全の原因となる他の疾患を鑑別診断する。

重症度分類 (平成 26 年度作成)

SDS では腭外分泌不全による症状は年齢が上がるにつれ改善することが多く、生命予後に最も関連するのは、骨髄不全の程度と骨髄異形成症候群・白血病への移行である。骨髄不全の重症度については、再生不良性貧血の重症度分類(表)に準じる。また、骨髄異形成症候群から白血病に移行すると、非常に予後不良であるため、白血病を発症した場合、最も重症であるとする。

表．再生不良性貧血の重症度分類

最重症	重症	やや重症	中等症	軽症
重症でかつ好中球 < 200/ μ L	好中球 < 500/ μ L	好中球 < 1000/ μ L	好中球 < 1000/ μ L	
	血小板 < 2万/ μ L	血小板 < 5万/ μ L	血小板 < 5万/ μ L	
	網赤血球 < 2万/ μ L	網赤血球 < 6万/ μ L	網赤血球 < 6万/ μ L	
	上記 2 つ以上を満たし、最重症でない	上記 2 つ以上を満たし、定期的な輸血必要	上記 2 つ以上を満たし、最重症、重症でない	中等症 ~ 最重症でない

D . 考察

臨床的に使用しやすい診断基準・重症度分類が作成できたと考えられる。この診断基準により、本邦での SDS の診断率が向上し、より多くの患者が正確な診断を受けることが期待される。

E . 結論

SDS の診断基準・重症度分類を作成した。他の先天性骨髄不全症候群の診断基準とともに、稀少疾患症例の把握、実態の解明、治療の開発へ貢献できると考えられる。

F . 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 渡邊健一郎 IV Shwachman-Diamond 症候群 . **別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.29 神経症候群 (第 2 版)** 2014 年 9 月 20 日発行, 681-684.
 - 2) 渡邊健一郎, 森嶋達也, 金兼弘和 . I Shwachman-Diamond 症候群 . **別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.21 血液症候群 (第 2 版)** 2013 年 1 月 20 日発行, 24-27.
2. 学会発表

特になし

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし
2. 実用新案登録

なし
3. その他

なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

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 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 室長）

研究要旨：15 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た。MYH9 異常症 7 例、Bernard-Soulier 症候群ホモ接合体 2 例・ヘテロ接合体 1 例、2B 型 von Willebrand 病 1 例、gray platelet 症候群 1 例の診断に至り、3 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（ITP）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、臨床情報と検査データを集積し、重症度分類の確立と診療ガイドライン作成を目的とした。また、既知の原因遺伝子に異常を認めない原因不明の先天性血小板減少症については、新規原因遺伝子を同定、病態を解析し、鑑別診断法を確立することを目指す。

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

本年度（平成 26 年 4 月～平成 27 年 1 月現在）は、15 例の先天性血小板減少症を疑う症例を解析し、MYH9 異常症 7 例、Bernard-Soulier 症候群ホモ接

合体 2 例・ヘテロ接合体 1 例、2B 型 von Willebrand 病 1 例、gray platelet 症候群 1 例の診断に至り、3 例は確定診断されなかった。

MYH9 異常症についてはタイ国との共同研究を進め、多数の症例収集を行っている。Bernard-Soulier 症候群については世界的コンソーシアムを結成し、遺伝子異常と臨床症状との関連性を示し、重症度分類を行った。

D．考察

近年、先天性血小板減少症の中で大型 / 巨大血小板を有する先天性巨大血小板症の病因病態解析は進んでいる。本年度は、我々が独自に確立中である先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断解析により 15 例を解析し、12 例（80%）の症例で確定診断が得られた。MYH9 異常症は 7 例（46.7%）と最も高頻度に診断された。MYH9 異常症の診断率は末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色の確立により向上した。MYH9 異常症 7 例中、1 例では難聴を、3 例では腎炎の合併を認めた。Bernard-Soulier 症候群については、2 例のホモ接合性患者では重度の血小板減少症と重篤な出血症状を認めたが、ヘテロ接合性患者では中等度の血小板減少症を認めたのみであった。高頻度の MYH9 異常症と Bernard-Soulier 症候群では、今までに集積した遺伝子解析データと臨床情報を共に解析することにより重症度分類の確立と診療ガイドライン作成策定が可能であり、他の頻度の低い疾患については来年度も症例収集を重ねることで

疾患の把握を目指す。

E . 結論

15 例の先天性血小板減少症を疑う症例を解析し、12 例 (80%) の症例で確定診断が得られた。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. *TUBB1* mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. **Eur J Haematol.** 2014;92:276-82.
 - 2) Kuzmanović M, Kunishima S, Putnik J, Stajić N, Paripović A, Bogdanović R. Congenital thrombocytopenia with nephritis-the first case of MYH9 related disorder in Serbia. **Vojnosanit Pregl.** 2014;71:395-8.
 - 3) Abe Y, Kobayashi S, Wakusawa K, Tanaka S, Inui T, Yamamoto T, Kunishima S, Haginoya K. Bilateral periventricular nodular heterotopia with megalencephaly: a case report. **J Child Neurol.** 2014;29:818-22.
 - 4) Kunishima S, Kitamura K, Matsumoto T, Sekine T, Saito H. Somatic mosaicism in *MYH9* disorders: the need to carefully evaluate apparently healthy parents. **Br J Haematol.** 2014;165:885-7.
 - 5) Noris P, Biino G, Pecci A, Civaschi E, Savoia A, Seri M, Melazzini F, Loffredo G, Russo G, Bozzi V, Notarangelo LD, Gresele P, Heller P, Pujol-Moix N, Kunishima S, Cattaneo M, Bussel J, De Candia E, Cagioni C, Ramenghi U, Cagioni C, Fabris F, Balduini CL. Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: Analysis of 376 patients with all known disorders. **Blood** 2014;124:e4-e10.
 - 6) Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, Zieger B, Rand ML, Pujol-Moix N, Caliskan U, Pecci A, Noris P, Srivastava A, Ward C, Kopp MC, Alessi MC, Bellucci S, Beurrier P, de Maistre E, Favier R, Hezard N, Hurtaud-Roux MF, Latger-Cannard V, Lavenu-Bombled C, Meunier S, Negrier C, Nurden A, Proulle V, Randrianaivo H, Fabris F, Platokouki H, Rosenberg H, Gargouri AF, Heller P, Karimi M, Balduini CL, Pastore A, Lanza F. Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome. **Hum Mut.** 2014;35:1033-45.
 - 7) Abe Y, Kikuchi A, Kobayashi S, Wakusawa K, Tanaka S, Inui T, Kunishima S, Kure S, Haginoya K. Xq26.1-26.2 gain identified on array comparative genomic hybridization in bilateral periventricular nodular heterotopia with overlying polymicrogyria. **Dev Med Child Neurol.** 2014;56:1221-4.
 - 8) Sirachainan N, Komwilaisak P, Kitamura K, Hongeng S, Sekine T, Kunishima S. The first two cases of *MYH9* disorders in Thailand: An international collaborative study. **Ann Hematol.** (in press)
 - 9) Bottega R, Marconi C, Faleschini M, Baj G, Cagioni C, Pecci A, Pippucci T, Ramenghi, U, Pardini S, Ngu L, Baronci C, Kunishima S, Balduini CL, Seri M, Savoia A, Noris P. *ACTN1*-related thrombocytopenia: identification of novel families for phenotypic characterization. **Blood** (in press)
- ### 2. 学会発表
- 1) 遣田美貴, 菅野直希, 古谷麻衣子, 坪井伸夫, 宮崎陽一, 小倉誠, 徳留悟朗, 細谷龍男, 横尾隆, 海渡健, 國島伸治. 腎障害の経過が緩徐な Epstein 症候群の 1 例. **第 111 回日本内科学会総会** (平成 26 年 4 月, 東京).
 - 2) 國島伸治. 血小板減少の病態と分子メカニズム ~ 最新の知見 Molecular mechanisms for congenital macrothrombocytopenia **第 36 回日本血栓止血学会学術集会** (学術推進委員会 (SPC) シンポジウム 1) (平成 26 年 5 月, 大阪).
 - 3) 國島伸治, 北村勝誠, 西村智, 鈴木英紀, 今泉益栄, 齋藤英彦. 巨核球特異的 1-tubulin 異常

は微小管構成阻害により胞体突起形成不全を来す．**第 36 回日本血栓止血学会学術集会**（平成 26 年 5 月 29，大阪）．

- 4) 兼松毅，岸本磨由子，鈴木伸明，國島伸治，松下正．**-Storage Pool 病の 1 例**．**第 36 回日本血栓止血学会学術集会**（平成 26 年 5 月，大阪）．
- 5) 岸本磨由子，松田剛典，築瀬正吾，鈴木伸明，池尻誠，高木明，國島伸治，小嶋哲人，直江知樹，丸山光生，勝見章，松下正．**遺伝子改変マウスを用いた small GTPase RhoF の機能解析**．**第 36 回日本血栓止血学会学術集会**（平成 26 年 5 月，大阪）．
- 6) 小林宣彦，小川孔幸，柳澤邦雄，林俊誠，三原正大，合田史，内海英貴，時庭英彰，堀口淳，國島伸治，野島美久．**HLA 抗体を有する血小板無力症の周術期止血管理**．**第 36 回日本血栓止血学会学術集会**（平成 26 年 5 月 29，大阪）．
- 7) 松本多絵，柳原剛，吉崎薫，土屋正巳，高瀬真人，益田幸成，清水章，國島伸治，前田美穂，伊藤保彦．**学校検尿を契機として MYH9 異常症の診断に至った一男児例**．**第 49 回日本小児腎臓病学会学術集会**（平成 26 年 6 月，秋田）．
- 8) 岡野聡美，高瀬雅史，井関憲一，鳥海尚久，金田眞，國島伸治．**R1165C 変異を確認した MYH9 異常症の 1 家系**．**日本小児科学会北海道地方会第 290 回例会**（平成 26 年 6 月，旭川）．
- 9) Suzuki N, Kunishima S, Matsushita T. Mouse models of MYH9 disorders. **60th Annual Meeting of the SSC, International Society on Thrombosis and Haemostasis**（June 2014, Milwaukee）．
- 10) 國島伸治，北村勝誠，松本多絵，関根孝司．**MYH9 異常症の体細胞モザイク**．**第 15 回日本検査血液学会学術集会**（平成 24 年 7 月，仙台）．
- 11) 國島伸治．**幹細胞技術の検査医学研究への応用**．**第 33 回日本臨床検査医学会東海北陸支部例会**（平成 26 年 8 月，名古屋）．
- 12) Sirachainan N, Komwilaisak P, Kitamura K, Hongeng S, Sekine T, Kunishima S. Identification of myosin heavy chain 9 (MYH9) disorders in children with macrothrombocytopenia: a result from two

institutions in Thailand. **8th Congress of the Asian-Pacific Society of Thrombosis and Hemostasis**（October, 2014, Hanoi, Vietnam）．

- 13) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y. GT-like phenotype with macrothrombocytopenia induced by α IIb β 3 activating mutation in mice. **第 76 回日本血液学会総会**（平成 26 年 10 月，大阪）．
- 14) Kishimoto M, Matsuda T, Yanase S, Katsumi A, Suzuki N, Ikejiri M, Takagi A, Ikawa M, Kojima T, Kunishima S, Kiyoi H, Naoe T, Matsushita T, Maruyama M. RhoF promotes murine late B cell development : RhoF promotes murine marginal zone B cell development. **第 76 回日本血液学会総会**（平成 26 年 10 月，大阪）．
- 15) 安富素子，國島伸治，岡崎新太郎，土田晋也，鈴木孝二，吉川利英，谷澤昭彦，大嶋勇成．**新規 ACTN1 変異による先天性巨大血小板性血小板減少症の 1 例**．**第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会**（平成 26 年 11 月，岡山）．
- 16) 西村美穂，伊藤早織，中川慎一郎，松尾陽子，大園秀一，上田耕一郎，稲田浩子，松石豊次郎，國島伸治．**発熱時の採血を契機として May-Hegglin 異常の診断に至った男児例**．**第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会**（平成 26 年 11 月，岡山）．
- 17) Kiyomizu K, Kashiwagi H, Kunishima S, Banno F, Kato H, Morikawa Y, Tadokoro S, Kokame K, Honda S, Miyata T, Kanakura Y, Tomiyama Y. α IIb(R990W), a constitutive activating mutation of integrin α IIb β 3, knock-in mice show macrothrombocytopenia with impairment of platelet function. **56th American Society for Hematology Annual Meeting and Exposition**（December 2014, San Francisco, CA, USA）．

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

本邦における先天性角化不全症の臨床的遺伝学的特徴

研究分担者 山口博樹（日本医科大学血液内科 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 Hoyeraal 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。これまでアジア人におけるDKCの臨床的特徴や原因遺伝子の頻度を解析した研究はない。本研究は日本人におけるDKCの臨床的特徴、原因遺伝子の頻度などを明らかにすることが目的である。臨床的にDKCの診断となった16症例、HHS3症例、不全型DKC21症例を解析した。本邦のDKCに関しては、発症年齢、性別や特徴的身体所見の頻度などはこれまでの欧米の報告とほぼ同等の結果が得られた。一方で、DKC症例は血小板数が白血球数やヘモグロビン値と比べて有意に低値であることが明らかになった。また、*TERT* 遺伝子変異の大欠失によるDKC症例を初めて発見した。本邦のHHSは、DKCの特徴的身体所見の頻度が低く、さらに3つのDKCの特徴的身体所見をすべて認める症例がなかった。また、本邦のHHSはDKCの既知の遺伝子変異が認められていない。不全型DKCは11/21(52.4%)症例で既知の遺伝子変異が認められた。既知の遺伝子変異を認めない症例の確定診断は難しい。こうした症例を不全型DKCと確定診断をするためには次世代シーケンサーによる新規の原因遺伝子変異の同定が必要である。

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Cajal body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Hoyeraal Hreidarsson syndrome(HHS)で発見された。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。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。

このように DKC は重症型と考えられる 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が、これまでの DKC の臨床症例の蓄積は主に欧米が中心でアジア人においては少数の症例報告のみである。欧米人以外の人種における DKC の臨床的特徴やその原因遺伝子の頻度などは明らかになっていない。本研究は日本人における DKC の臨床的特徴、原因遺伝子の頻度などを明らかにすることが目的である。

B . 研究方法

本邦における臨床的に DKC が疑われた症例、DKC 以外の先天性骨髄不全症が否定的なテロメア長の短縮化を認めた家族性 BMF、免疫抑制療法に不応性 BMF でテロメア長の著明な短縮化を認めた症例、BMF を合併した家族性肺線維症の症例を対象とした。診断に関しては、皮膚の網状色素沈着、舌白斑症、爪の萎縮のいずれかの身体異常とテロメア長の短縮を有する骨髄不全症症例を DKC の疑い症例とし、またそれ以外の症例を不全型 DKC 症例とし

た。

テロメア長解析はサザンプロット法の TeloTAGGG kit(ロッシュ社)、flow-fluorescence in situ hybridization (flow-FISH) 法の Telomere PNA kit (ダコ社)、Real time PCR 法を用いた。既知の遺伝子変異解析は、従来のサンガー法以外に一部の症例に関しては次世代シーケンサーにおける exon シーケンスならびにゲノムコピー数解析を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は、当施設遺伝子倫理審査委員会において承認が得られており、以下の配慮を予定している。生命倫理上の配慮に関しては、患者、及び健康ボランティアの人権、利益の保護について文書にて十分説明をした上で同意を得る。また、研究への協力に同意した後であってもその同意を取り消すことができること、更に本研究への同意が得られない場合においても今後の治療などには何ら不利益を被らないことを説明する。個人情報漏洩に対する取り組みとして、研究組織とは別に個人情報管理者を置き、連結可能匿名化をはかった上で解析を行う。同意が撤回された場合は、検体、診療情報、遺伝情報はすべて匿名化されたまま焼却により破棄する。得られた結果は、学会や論文として発表するが個人情報が出ることはない。遺伝子結果の開示を研究対象者が要求する場合は、倫理的問題を考慮し遺伝子カウンセリングを施行し、結果の告知は臨床遺伝専門医 (遺伝カウンセラー) により行う。

C . 研究結果

1. DKC や HHS 症例の臨床的特徴

本邦において臨床的に DKC の診断となった症例は 16 症例、HHS の診断となった症例は 3 症例あった。DKC は HHS と比較して有意に診断時年齢が高かった (DKC 9.484 ± 2.419 vs HHS 0.8333 ± 0.1667 , $p=0.003$)。DKC と HHS は女性が 25% を占めた。家族歴は DKC の診断に重要な因子ではあるが、家族歴を認めた症例は DKC の 2 症例 (12.5%) に認めるのみであった。DKC の特徴的身体所見に関しては、爪の萎縮 15/16 (93.75%) 症例、皮膚の網状色素沈着 14/16 (87.5%) 症例、舌白斑症 13/16 (81.3%)

症例に認められ、これら 3 つの身体的異常すべて認める症例は 11/16 (68.8%) 症例であった。一方、HHS の特徴的身体所見に関しては、皮膚の網状色素沈着 3/3 (100%) 症例、爪の委縮 2/3 (66.7%) 症例、舌白斑症 1/3 (33.3%) 症例に認められたが、これら 3 つの身体的異常すべて認める症例は認められなかった。

2. DKC や HHS 症例の血液学的異常

DKC の血液学的異常に関しては、好中球数 1000/ μ l 以下は 1/16 (6.3%) 症例のみ、ヘモグロビン 7g/dl 以下も 1/16 症例 (6.3%) のみに認められたのに対して、血小板数 20000/ μ l 以下は 7/16 (43.8%) 症例に認められた。DKC の診断時の血液学検査では 3 系統の血球の中で血小板低下が顕著であった。HHS の血液学的異常に関しては症例数が少ないため明らかな結論は出せないが、好中球数 1000/ μ l 以下は 1/3 (33.3%) 症例のみ、血小板数 20000/ μ l 以下も 1/3 (33.3%) 症例のみに認められたのに対して、Hb7g/dl 以下は 2/3 (66.7%) 症例に認められた。

骨髓検査に関しては、DKC の 1 症例以外で解析が行われ、全症例低形成髄で病的染色体異常は認められなかった。

3. DKC や HHS 症例のテロメア長解析とテロメア長遺伝子変異解析

テロメア長解析は、DKC では 7/16 (43.8%) 症例で解析が行われ、6/7 (85.7%) の症例でテロメア長の短縮が認められた。HHS では 2/3 (66.6%) で解析が行われ、2/2 (100%) の症例でテロメア長の短縮が認められた。

DKC のテロメア制御遺伝子変異に関しては、11/16 (68.7%) 症例に認められた (*DKC1* 変異が 5 症例、*TINF2* 変異が 3 症例、*TERT* 変異が 2 症例、*TERC* 変異が 1 症例、変異が同定されなかった症例が 5 症例)。一方、HHS に関しては 3 症例ともに原因遺伝子変異は同定されなかった。

この中で、*TERT* 変異 c.1002_1004del:p.334_335del をホモで認めた症例に関しては、次世代シーケンサーによるゲノムコピー数解析にて染色体 5 番の *TERT* 遺伝子をコードする領域に片アレルの大欠失を認めた。*TERT* 遺伝子変異の大欠失の症例は

初めての報告になる。この症例の家族解析を行うと、*TERT* 変異をホモで認めた症例は、テロメア長の著明な短縮を認め、5 歳児より DKC の表現型で発症し、HHS で認められるような免疫不全の合併により重篤な感染症を繰り返しており、DKC の重症型であると診断されている。一方、*TERT* の片アレルの大欠失のみを認める弟は、テロメア長短縮は認めるが 6 歳時まで DKC の臨床症状や血液学的異常は示していない。また *TERT*c.1002_1004del:p.334_335del ヘテロ変異を有する母は経度の貧血は認めるが、テロメア長短縮は認めていない。

4. 不全型 DKC の臨床的特徴、血液学的異常、テロメア長解析とテロメア長遺伝子変異解析

不全型 DKC は 21 症例診断された。DKC の診断前の臨床的診断は、11 症例は再生不良性貧血、3 症例は骨髓異形成症候群、3 症例は家族性肺線維症と診断されていた。診断時年齢は 20.50 ± 4.674 で、DKC ($p=0.045$) や HHS ($p<0.001$) と比較して有意に高かった。不全型 DKC は 7/21 (33.3%) 症例が女性であった。家族歴を認めた症例は 6/21 (28.6%) と DKC や HHS と比較して多く認めた。BMF 以外の合併症としては、肺線維症が 3 症例、発達障害を 2 症例、肝障害 1 症例、腎障害 1 症例を認めた。診断時血液学的異常に関しては、好中球数 1000/ μ l 以下は 4/21 (19.0%) 症例、ヘモグロビン 7g/dl 以下は 6/21 症例 (28.6%)、血小板数 20000/ μ l 以下は 7/21 (33.3%) 症例に認め、不全型 DKC の診断時血液学検査では DKC の様に血小板減少を認める症例が顕著に多いということにはなかった。骨髓検査に関しては、19 症例で行われ、17 症例は低形成髄で、1 症例に -10 の染色体異常が認められた。

5. 不全型 DKC のテロメア長解析とテロメア長遺伝子変異解析

テロメア長解析は全症例で行われ、1 症例が正常下限であったが、その他の症例は全例著明なテロメア長の短縮が認められた。テロメア制御遺伝子変異に関しては、11/21 (52.4%) 症例で遺伝子変異が認められた (*TERT* 変異 5 症例、*TINF2* 変異 3 症例、*RTEL1* 変異 2 症例 (1 家系)、*TERC* 変異 1 症例)、*RTEL1* 変異は両アレル変異、その他の変異はヘテロ

変異であった。*RTEL1* 変異は常染色体劣性遺伝形式で HHS に多く発見された遺伝子変異ではあるが、この 2 症例は明らかな DKC の特徴的な身体的異常を認めず、*RTEL1* 変異を有する初めての不全型 DKC である。また、この 2 症例の片アレルの *RTEL1* 変異を有している両親は身体的異常や血液学的異常を認めないが、テロメア長の著明な短縮を認めている。

D . 考察

本研究によって日本人における DKC、HHS、不全型 DKC の臨床的特徴や原因遺伝子の頻度などが明らかになった。

DKC に関しては、発症年齢、性別や特徴的身体所見の頻度などはこれまでの欧米の報告とほぼ同等の結果が得られた。一方で DKC 症例は、血小板数が白血球数やヘモグロビン値と比べて有意に低値であることが明らかになった。この結果を反映しているのか今回の研究対象症例において DKC の診断がつく前の臨床的診断は、特発性血小板減少性紫斑病が約 1/5 を占めていた。また、遺伝子変異に関しては、*TERC* 変異がやや少ない傾向があったが、この結果が日本人の DKC 症例の遺伝子変異の特徴なのかはさらなる症例の解析が必要であると考えられる。また、次世代シーケンサーによるゲノムコピー数解析にて染色体 5 番の *TERT* 遺伝子をコードする領域に片アレルの大欠失と *TERT* 変異 c.1002_1004del;p.334_335del を認める DKC 症例を発見した。*TERT* 遺伝子変異の大欠失の症例は初めての報告になるが、原因遺伝子変異が発見されない DKC 症例の中にはこのような既知の原因遺伝子の大欠失が原因の症例が含まれている可能性がある。

HHS に関しては、症例数が少ないため明確な結果を示すことは出来なかった。しかし、HHS は DKC の特徴的身体所見の頻度が低く、3 つの特徴的身体所見をすべて認める症例はなかった。HHS は DKC に認められる特徴的身体所見がそろわず、DKC に認められない他の身体異常や免疫異常が認められている。また、本邦の HHS と診断された症例は、テロメア長解析が行われた症例は 100% テロメア長の短縮が認められるが、DKC の既知の遺伝子変異は認められていない。以上より、HHS は DKC の重症型という考

え方より、テロメア制御異常によって発症する DKC とは異なる先天性 BMF が含まれるのではないかと考える。

テロメア制御遺伝子変異を認めた不全型 DKC に関してはその診断は問題ないと考えられる。しかし、テロメア制御遺伝子変異を認めない不全型 DKC 症例に関しては、はたして不全型 DKC と診断していいのか？という疑問が残る。確かに再生不良性貧血の一部の症例では、テロメア長の $-2SD$ 以上の短縮を認めるとの報告がある。今回の対象となった 21 症例の不全型 DKC 症例は、テロメア長短縮をした BMF に家族歴がある、家族性肺線維症がある、免疫抑制療法が不応であったなどを認める症例を解析対象としたが、この中にはテロメア長の短縮を認める他の BMF が含まれている可能性も完全には否定できない。こうした症例を不全型 DKC と確定診断をするためには次世代シーケンサーによる新規の原因遺伝子変異の同定が必要である。

E . 結論

本邦の DKC に関しては、発症年齢、性別や特徴的身体所見の頻度などはこれまでの欧米の報告とほぼ同等の結果が得られた。一方で、DKC 症例は血小板数が白血球数やヘモグロビン値と比べて有意に低値であることが明らかになった。また、*TERT* 遺伝子変異の大欠失による DKC 症例を初めて発見した。

本邦の HHS は、DKC の特徴的身体所見の頻度が低く、さらに 3 つの DKC の特徴的身体所見をすべて認める症例はなかった。また、本邦の HHS は DKC の既知の遺伝子変異が認められていない。以上より、HHS の疾患概念には DKC の重症型という考え方だけでなく、テロメア制御異常によって発症する DKC とは異なる先天性 BMF が含まれるのではないかと考える。

不全型 DKC に関しては、既知の遺伝子変異を認めない症例の確定診断は難しい。こうした症例を不全型 DKC と確定診断をするためには、次世代シーケンサーによる新規の原因遺伝子変異の同定が必要である。

F . 研究発表

1. 論文発表

1) Tanino Y, Yamaguchi H, Fukuhara A, Munakata M. Pulmonary fibrosis associated with TINF2 gene mutation: is somatic reversion required? **Eur Respir J**. 2014 Jul;44(1):270-1.

2. 学会発表

1) Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Yui S, Inokuchi K, Ito E, Ogawa S, Kojima S. The clinical and genetic features of dyskeratosis congenita, cryptic dyskeratosis congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in Japan. **The 56th American society of hematology annual meeting** (2014 , San Francisco).

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
 該当なし
2. 実用新案登録
 該当なし
3. その他
 該当なし

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

DBA の遺伝子診断

研究分担者 剣持直哉（宮崎大学フロンティア科学実験総合センター 教授）

研究要旨：DBA 患者のエクソーム解析により、これまでに 13 種類のリボソームタンパク質遺伝子に変異が同定された。しかし、約半数の患者ではいまだに原因遺伝子は明らかになっていない。本研究では、リボソームタンパク質遺伝子の DNA 配列等の情報を収集し、データベースとして整備した。本データベースを活用することで、より正確な DBA の遺伝子診断が期待できる。

A . 研究目的

DBA の原因遺伝子として、これまでに 13 種類のリボソームタンパク質 (RP) 遺伝子および *GATA1* 遺伝子が同定されている。しかし、半分近くの患者で遺伝子の変異は同定されていない。リボソームタンパク質は約 80 種類もあり、他のリボソームタンパク質遺伝子が原因遺伝子である可能性も高い。そこで、本研究ではリボソームタンパク質遺伝子の配列情報を整備することで、正確な DNA 診断の基盤とすることを目的とする。

B . 研究方法

公共のデータベースよりヒトリボソームタンパク質遺伝子のゲノム配列、cDNA 配列、アミノ酸配列、染色体マップなどの情報を収集し、整理する。また、その他の生物のリボソームタンパク質遺伝子の情報も収集し、比較解析を可能とする。得られた情報をデータベースとして整備し、これを共有する。

C . 研究結果

ヒトおよび他種生物のリボソームタンパク質遺伝子のゲノム配列、cDNA 配列、アミノ酸配列、染色体マップなどの情報を収集しデータベースとして整備した。

* リボソームタンパク質遺伝子データベース
(RPG: <http://ribosome.med.miyazaki-u.ac.jp/>)



D . 考察

リボソームタンパク質は多数の偽遺伝子を有しており、種類も多いことから、遺伝情報の利用に際して特段の注意が必要である。本データベース (RPG) を活用することで、より正確な DBA の遺伝子診断が期待される。また、他種生物との遺伝子配列の比較により、重要な機能ドメインの推定も可能となり、疾患発症との関連を明らかにする手がかりになる。

E . 結論

リボソームタンパク質遺伝子の配列情報を収集し、データベースとして整備した。本データベースは DBA の正確な診断に資するものと思われる。

F . 研究発表

- 論文発表
- 1) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanazaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga

S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutations in *RPL27* and *RPS27* identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan Anemia. **Br J Haematol.** 2015;168(6):854-864.

- 2) Yadav VG, Chakraborty A, Uechi T, Kenmochi N. Ribosomal protein deficiency causes Tp53-independent erythropoiesis failure in zebrafish. **Int J Biochem Cell Biol.** 2014;49:1-7.

2. 学会発表

- 1) Uechi T, Nakajima Y, Yadav G, Yoshihama M, Suzuki Y, Sugano S, Kenmochi N. Studying the molecular pathogenesis of Diamond-Blackfan anemia using zebrafish as a model system. **The 14th Conference on Translational Control** (2014. 9 , Cold Spring Harbor, NY, USA).
- 2) Yoshihama M, Nakao A, Kamada S, Kenmochi N. RPG and snOPY: Databases for ribosomal protein genes and small nucleolar RNA genes. **The 19th Annual Meeting of the RNA Society**(2014. 6 ,Quebec City, Canada).
- 3) Uechi T, Nakajima Y, Yadav G, Suzuki Y, Sugano S, Kenmochi N. Ribosome dysfunction and erythroid failure: Analyzing the zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. **The 19th Annual Meeting of the RNA Society**(2014. 6 ,Quebec City, Canada).

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

は、本研究よることが明記されている論文

は、本研究に関連する論文

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
矢部普正	Fanconi貧血		小児科			2014	1559-64
菅野仁	【検査で切り込む溶血性貧血】非免疫性溶血性貧血と対象とした診断システムの構築		臨床検査	医学書院	東京	2014	327-355
國島伸治	先天性血小板減少症	富山佳昭	血栓・止血異常の診療	中山書店	東京	2014	105-12
兼松毅, 國島伸治	灰色血小板とNBEAL2	高久史磨, 小澤敬也, 坂田洋一, 金倉讓, 小島勢二	Annual Review 2015 血液	中外医学社	東京	2015	211-7

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Wang R, Yoshida Y, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, Sato-Otsubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraiishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno J, Kojima S, Miyano S, kenmochi N, Ogawa S, Ito E.	Loss of function mutations in <i>RPL27</i> and <i>RPS27</i> identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anemia.	Br J Haematol.	168(6)	854-864	2015
Yoshimi A, Toya T, Kawazu M, Ueno T, Tsukamoto A, Iizuka H, Nakagawa M, Nannya Y, Arai S, Harada H, Usuki K, Hayashi Y, Ito E, Kirito K, Nakajima H, Ichikawa M, Mano H, Kurokawa M.	Recurrent CDC25C mutations drive malignant transformation in FPD/AML.	Nat Commun.	5	4770	2014

Ono R, Hasegawa D, Kirabayashi S, Kamiya T, Yoshida K, Yonekawa S, Ogawa C, Hosoya R, Toki T, Terui K, Ito E, Manabe A.	Acute megakaryoblastic leukemia with acquired trisomy 21 and GATA1 mutations in phenotypically normal children.	Eur J Pediatr.			2014 [Epub ahead of print]
Hanada I, Terui K, Ikeda F, Toki T, Kanezaki R, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Takahashi Y, Hayashi Y, Inukai T, Kojima S, Koike K, Kosaka Y, Kobayashi M, Imaizumi M, Mitsui T, Hori H, Hara J, horibe K, Nagai J, Goto H, Ito E.	Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan.	Genes Chromosomes Cancer	53(11)	902-910	2014
Sakaguchi H, Nishio N, Hama A, Kawashima N, Wang X, Narita A, Doisaki S, Xu Y, Muramatsu H, Yoshida N, Takahashi Y, Kudo K, Moritake H, Nakamura K, Kobayashi R, Ito E, Yabe H, Ohga S, Ohara A, Kojima S; Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group.	Peripheral blood lymphocyte telomere length as a predictor of response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia.	Haematologica	99(8)	1312-1316	2014
Horino S, Sasahara Y, Sato M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Sato A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S.	Selective expansion of donor-derived regulatory T cells after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome.	Pediatr Transplant.	18(1)	E25-30	2014
Sakurai M, Kunimoto H, Watanabe N, Fukuchi Y, Yuasa S, Yamazaki S, Nishimura T, Sadahira K, Fukuda K, Okano H, Nakauchi H, Morita Y, Matsumura I, Kudo K, Ito E, Ebihara Y, Tsuji K, Harada Y, Harada H, Okamoto S, Nakajima H.	Impaired hematopoietic differentiation of <i>RUNX1</i> -mutated induced pluripotent stem cells derived from FPD/AML patients.	Leukemia	28	2344-2354	2014
藤原亨, 小林匡洋, 張替秀郎	ヘム合成系の異常と関連疾患	血液フロンティア	24(4)	581-589	2014
藤原亨, 小林匡洋, 張替秀郎	赤血球造血における転写制御機構	血液内科	68(5)	557-563	2014

藤原亨, 小林匡洋, 張替秀郎	鉄芽球性貧血	新戦略による貧血治療プリンシプル血液疾患の臨床		237-239	2014
Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H.	Effect of 5-aminolevulinic acid on erythropoiesis: a preclinical in vitro characterization for the treatment of congenital sideroblastic anemia.	Biochemical and Biophysical Research Communications	454(1)	102-108	2014
Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Kanehira M, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H.	GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.	Haematologica	99(11)	1686-1696	2014
Harigae H, Fujiwara T, Furuyama K.	Heme metabolism and anemia.	Rinsho Ketsueki	55(7)	729-734	2014
Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariiai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H.	Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in GATA-2 deficiency evolving into myelodysplasia and acute leukemia.	Annals of Hematology	93(9)	1515-1522	2014
Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, Kobayashi M, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Harigae H.	3-Deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferase, promotes erythroid differentiation.	The Journal of Biological Chemistry	289(12)	8121-8134	2014
Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Ohtsubo K, Fukumura A, Kato S, Yabe H.	Feasibility of marrow harvesting from pediatric sibling donors without hematopoietic growth factors and allotransfusion.	Bone Marrow Transplant.	49	921-926	2014
Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, Takahashi Y, Inoue K, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S.	Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia.	Biol Blood Marrow Transplant.	20	1145-1149	2014

Nakayama H, Tabuchi K, Tawa A, Tsukimoto I, Tsuchida M, Morimoto A, Yabe H, Horibe K, Hanada R, Imaizumi M, Hayashi Y, Hamamoto K, Kobayashi R, Kudo K, Shimada A, Miyamura T, Moritake H, Tomizawa D, Taga T, Adachi S.	Outcome of children with relapsed acute myeloid leukemia following initial therapy under the AML99 protocol.	Int J Hematol.	100	171-179	2014
Kato M, Yoshida N, Inagaki J, Maeba H, Kudo K, Cho Y, Kurosawa H, Okimoto Y, Tauchi H, Yabe H, Sawada A, Kato K, Atsuta Y, Watanabe K.	Salvage allogeneic stem cell transplantation in patients with pediatric myelodysplastic syndrome and myeloproliferative neoplasms.	Pediatr Blood Cancer	61	1860-1866	2014
Patel P, Suzuki Y, Tanaka A, Yabe H, Kato S, Shimada T, Mason RW, Orii KE, Fukao T, Orii T, Tomatsu S.	Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Therapy on Growth in Patients with Hunter Syndrome.	Mol Genet Metab Rep.	1	184-196	2014
Sato Y, Kurosawa H, Fukushima K, Okuya M, Yabe H, Arisaka O.	Necessary stem cell transplantation using myeloablative therapy for myelodysplastic syndrome with progression of genotypic abnormalities and TP53 dysfunction in a young adult.	Pediatr Transplant.	18	E255-257	2014
Yoshida N, Kobayashi R, Yabe H, Kosaka Y, Yagasaki H, Watanabe KI, Kudo K, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Takahashi Y, Kato K, Suzuki R, Ohara A, Kojima S.	First-line treatment for severe aplastic anemia in children: bone marrow transplantation from a matched family donor vs. immunosuppressive therapy.	Haematologica	99	1784-1791	2014
Goto H, Kaneko T, Shioda Y, Kajiwara M, Sakashita K, Kitoh T, Hayakawa A, Miki M, Kato K, Ogawa A, Hashii Y, Inukai T, Kato C, Sakamaki H, Yabe H, Suzuki R, Kato K.	Hematopoietic stem cell transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia and Down syndrome.	Pediatr Blood Cancer	62	148-152	2014

Kato M, Hasegawa D, Koh K, Kato K, Takita J, Inagaki J, Yabe H, Goto H, Adachi S, Hayakawa A, Takeshita Y, Sawada A, Atsuta Y, Kato K.	Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for infant acute lymphoblastic leukaemia with KNT2A (MLL) rearrangements: a retrospective study from the paediatric acute lymphoblastic leukaemia working group of the Japan Society for Haematopoietic Cell.	Br J Haematol.	doi:10.1111/bjh.13174.		2014 [Epub ahead of print]
Tanjuakio J, Suzuki Y, Patel P, Yasuda E, Kubaski F, Tanaka A, Yabe H, Mason RW, Montaña AM, Orii KE, Orii KO, Fukao T, Orii T, Tomatsu S.	Activities of daily living in patients with Hunter syndrome: Impact of enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation.	Mol Genet Metab.	doi:10.1016/j.ymgme.2014.11.002.		2014 [Epub ahead of print]
Yabe M, Ohtsuka Y, Watanabe K, Inagaki J, Yoshida N, Sakashita K, Kakuda H, Yabe H, Kurosawa H, Kudo K, Manabe A; Japanese Pediatric Myelodysplastic Syndrome Study Group.	Transplantation for juvenile myelomonocytic leukemia: a retrospective study of 30 children treated with a regimen of busulfan, fludarabine, and melphalan.	Int J Hematol.	doi:10.1007/s12185-014-1715-7		2014
Jeong DC, Chung NG, Cho B, Zou Y, Ruan M, Takahashi Y, Muramatsu H, Ohara A, Kosaka Y, Yang W, Kim HK, Zhu X, Kojima S.	Long-term outcome after immunosuppressive therapy with horse or rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia in children.	Haematologica	99(4)	664-671	2014
Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Kojima S.	Aldehyde dehydrogenase-2 polymorphism contributes to the progression of bone marrow failure in children with idiopathic aplastic anaemia.	Br J Haematol.			2014 (in press)

Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolueang S, Chalaow N, Fisher C, Lowe K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachanda S, Saipin J, Juntharaniyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VTS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR.	Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression.	Blood	123(10)	1586-95	2014
Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kasuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno K, Tobe K, Kanno H, Nakagawa T.	Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes.	J Biol Chem.	289(21)	14796-811	2014
Kobayashi Y, Hatta Y, Ishiwatari Y, Kanno H, Takei M.	Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature.	BMC Res Notes.	11(7)	137	2014
守屋友美, 岡本好雄, 小林博人, 松田和樹, 久保田友晶, 緒方康貴, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 青木貴子, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小倉浩美, 菅野仁	ABO 血液型不適合腎移植におけるアルブミン製剤の必要性	日本輸血細胞治療学会誌	60(4)	521-526	2014
岡本好雄, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁	自己血漿製剤という観点から見た CART	日本アフェレシス学会雑誌	33(3)	178-184	2014
Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H.	Defective FANCI Binding by a Fanconi Anemia-Related FANCD2 Mutant.	PLoS One	doi:10.1371/journal.pone.0114752		2014
Ishii K, Ishiai M, Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Niwa O, Takata M, Shinohara T.	The Trp-Trp53inp1-Tnfrsf10b Pathway Regulates the Radiation Response of Mouse Spermatogonial Stem Cells.	Stem Cell Reports.	3(4)	676-89	2014
Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H.	Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using Escherichia coli cells.	Protein Expr Purif.	103	8-15	2014

Huang Y, Leung JW, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X, Huong D, Takata M, Chen J, Li L.	Modularized functions of the Fanconi anemia core complex.	Cell Rep.	7(6)	1849-57	2014
Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugawara K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M.	FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair.	Cell Rep.	7(4)	1039-47	2014
Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, Enomono T.	Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents.	Biochim Biophys Acta.	1843(5)	1002-12	2014
倉光球, 浜口功	特集 赤血球造血の基礎と臨床 8. リボソーム異常症と関連疾患	血液フロンティア	24(4)	81(591)-89(599)	2014
Yagasaki H, Shichino H, Ohara A, Kobayashi R, Yabe H, Ohga S, Hamamoto K, Ohtsuka Y, Shimada H, Inoue M, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S.	Immunosuppressive therapy with horse anti-thymocyte globulin and cyclosporine as treatment for fulminant aplastic anemia in children.	Ann Hematol.	93	747-752	2014
Koga Y, Takada H, Suminoe A, Ohga S, Hara T.	Successful treatment of non-Hodgkin's lymphoma using R-CHOP in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome followed by a reduced-intensity stem cell transplant.	Pediatr Transplant.	18	E208-211	2014
Kiyokawa N, Iijima K, Tomita O, Miharuru M, Hasegawa D, Kobayashi K, Okita H, Kajiwara M, Shimada H, Inukai T, Makimoto A, Fukushima T, Nanmoku T, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Sugita K, Fujimoto J, Hayashi Y, Ohara A.	Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia.	Leuk Res.	38	42-48	2014
Kato M, Koh K, Manabe A, Saito T, Hasegawa D, Isoyama K, Kinoshita A, Maeda M, Okimoto Y, Kajiwara M, Kaneko T, Sugita K, Kikuchi A, Tsuchida M, Ohara A.	No impact of high-dose cytarabine and asparaginase as early intensification with intermediate-risk paediatric acute lymphoblastic leukaemia: results of randomized trial TCCSG study L99-15.	Br J Haematol.	164	376-383	2014

Kato M, Imamura T, Manabe A, Hashii Y, Koh K, Sato A, Takahashi H, Hori H, Taki T, Inoue M, Hayashi Y, Horibe K, Tsuchida M, Kojima S, Oda M, Ohara A.	Prognostic impact of gained chromosomes in high-hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia: a collaborative retrospective study of the Tokyo Children's Cancer Study Group and Japan Association of Childhood Leukaemia Study.	Br J Haematol.	166	295-298	2014
Kato M, Manabe A, Koh K, Inukai T, Kiyokawa N, Fukushima T, Goto H, Hasegawa D, Ogawa C, Koike K, Ota S, Noguchi Y, Kikuchi A, Tsuchida M, Ohara A.	Treatment outcomes of adolescent acute lymphoblastic leukemia treated on Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) clinical trials.	Int J Hematol.	100	180-187	2014
王汝南, 金崎里香, 土岐力, 照井君典, 佐々木伸也, 工藤耕, 神尾卓哉, 佐藤知彦, 池田史圭, 荒木亮, 落合英俊, 伊藤悦朗	非ダウン症小児急性巨核芽球性白血病にみとめられた新規 GATA1 インフレーション変異	弘前医学	65	227-237	2014
照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗	ダウン症に合併した骨髄性腫瘍の分子病態	血液内科	69	200-206	2014
Kaneko K, Furuyama K, Fujiwara T, Kobayashi R, Ishida H, Harigae H, Shibahara S.	Identification of a novel erythroid-specific enhancer for the ALAS2 gene and its loss-of-function mutation which is associated with congenital sideroblastic anemia.	Haematologica	99(2)	252-261	2014
Morishima T, Watanabe K, Niwa A, Hirai H, Saida S, Tanaka T, Kato I, Umeda K, Hiramatsu H, Saito MK, Matsubara K, Adachi S, Kobayashi M, Nakahata T, Heike T.	Genetic correction of HAX1 in induced pluripotent stem cells from a patient with severe congenital neutropenia improves defective granulopoiesis.	Haematologica	99(1)	19-27	2014
Mizoguchi Y, Tsumura M, Okada S, Hirata O, Minegishi S, Imai K, Hyakuna N, Muramatsu H, Kojima S, Ozaki Y, Imai T, Takeda S, Okazaki T, Ito T, Yasunaga S, Takihara Y, Bryant VL, Kong XF, Cypowyj S, Boisson-Dupuis S, Puel A, Casanova JL, Morio T, Kobayashi M.	Simple diagnosis of STAT1 gain-of-function alleles in patients with chronic mucocutaneous candidiasis.	Journal of Leukocyte Biology	95	667-676	2014

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.	Modern Rheumatology	doi:10.3109/14397595.2014.924894		2014
小林正夫, 川口浩史	自己免疫性好中球減少症	日本内科学会雑誌	103(7)	1639-1644	2014
溝口洋子, 小林正夫	重症先天性好中球減少症病態解析研究の進歩	血液内科	68(5)	676-681	2014
土居岳彦, 小林正夫	小児血液疾患 よくわかる最新知見 好中球異常症の概要と診断の進め方	小児科	55(11)	1577-1583	2014
岡田賢, 小林正夫	IL-21 シグナルはナイーブB細胞をIL-2感受性にして形質細胞に分化させる	血液内科	69(3)	405-409	2014
川口晃司, 松原康策, 内田佳子, 齋藤敦郎, 宮田憲二, 長谷川大一郎, 小阪嘉之, 岩田あや, 仁紙宏之, 小林正夫	同種骨髄移植が奏功した新規 ELANE 遺伝子変異を有する重症先天性好中球減少症	臨床血液	55(11)	2294-2299	2014
Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H	<i>TUBB1</i> mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia.	Eur J Haematol.	92	276-82	2014
Kuzmanović M, Kunishima S, Putnik J, Stajić N, Paripović A, Bogdanović R.	Congenital thrombocytopenia with nephritis-the first case of MYH9 related disorder in Serbia.	Vojnosanit Pregl.	71(4)	395-398	2014
Kunishima S, Kitamura K, Matsumoto T, Sekine T, Saito H.	Somatic mosaicism in <i>MYH9</i> disorders: the need to carefully evaluate apparently healthy parents.	Br J Haematol.	165	885-7	2014
Noris P, Biino G, Pecci A, Civaschi E, Savoia A, Seri M, Melazzini F, Loffredo G, Russo G, Bozzi V, Notarangelo LD, Gresele P, Heller P, Pujol-Moix N, Kunishima S, Cattaneo M, Bussel J, De Candia E, Cagioni C, Ramenghi U, Cagioni C, Fabris F, Balduini CL.	Platelet diameters in inherited thrombocytopenias: Analysis of 376 patients with all known disorders.	Blood	124	e4-10	2014

Savoia A, Kunishima S, De Rocco D, Zieger B, Rand ML, Pujol-Moix N, Caliskan U, Pecci A, Noris P, Srivastava A, Ward C, Kopp MC, Alessi MC, Bellucci S, Beurrier P, de Maistre E, Favier R, Hezard N, Hurtaud-Roux MF, Latger-Cannard V, Lavenu-Bombled C, Meunier S, Negrier C, Nurden A, Proulle V, Randrianaivo H, Fabris F, Platokouki H, Rosenberg H, Gargouri AF, Heller P, Karimi M, Balduini CL, Pastore A, Lanza F.	Spectrum of the mutations in Bernard-Soulier syndrome.	Hum Mut.	35	1033-45	2014
Abe Y, Kikuchi A, Kobayashi S, Wakusawa K, Tanaka S, Inui T, Kunishima S, Kure S, Haginoya K.	Xq26.1-26.2 gain identified on array comparative genomic hybridization in bilateral periventricular nodular heterotopia with overlying polymicrogyria.	Dev Med Child Neurol.	56	1221-4	2014
Sirachainan N, Komwilaisak P, Kitamura K, Hongeng S, Sekine T, Kunishima S.	The first two cases of <i>MYH9</i> disorders in Thailand: An international collaborative study.	Ann Hematol.			2015 (in press)
Bottega R, Marconi C, Faleschini M, Baj G, Cagioni C, Pecci A, Pippucci T, Ramenghi, U, Pardini S, Ngu L, Baronci C, Kunishima S, Balduini CL, Seri M, Savoia A, Noris P.	<i>ACTN1</i> -related thrombocytopenia: identification of novel families for phenotypic characterization.	Blood			2015 (in press)
國島伸治	先天性巨大血小板症の病因解明と鑑別診断の進歩	日産婦新生児血会誌	23	19-23	2014
國島伸治	先天性血小板減少症の診断と分子病態	臨床血液	55	882-92	2014
Tanino Y, Yamaguchi H, Fukuhara A, Munakata M.	Pulmonary fibrosis associated with <i>TINF2</i> gene mutation: is somatic reversion required?	Eur Respir J.	44(1)	270	2014

Yadav VG, Chakraborty A, Uechi T, Kenmochi N.	Ribosomal protein deficiency causes Tp53-independent erythropoiesis failure in zebrafish.	Int J Biochem Cell Biol.	49	1-7	2014
--	---	-----------------------------	----	-----	------