

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診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

平成 28 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 29（2017）年 3 月

## 目 次

・総括研究報告	1
先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドライン の確立に関する研究	
伊藤 悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）	
（参考）先天性骨髄不全症診療ガイドライン2017（仮）	
II．分担研究報告	
1．DBAの遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	19
伊藤 悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）	
土岐 力（弘前大学大学院医学研究科小児科学 講師）	
佐藤 知彦（弘前大学大学院医学研究科小児科学 助教）	
2．遺伝性鉄芽球性貧血	23
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）	
3．Fanconi貧血の臨床データの解析・遺伝子診断・ 診療ガイドラインの作成	26
矢部 普正（東海大学医学部基盤診療学系細胞移植再生医療科 教授）	
4．CDAの臨床データ解析・診療ガイドラインの作成	29
真部 淳（聖路加国際大学聖路加国際病院小児科 医長）	
5．中央診断、DKCとCDAの遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	31
小島 勢二（名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 名誉教授）	
6．DBAバイオマーカーの解析 DBAの診療ガイドラインの作成・疫学調査	34
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）	
槍澤 大樹（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 助教）	
小倉 浩美（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 非常勤講師）	
大賀 正一（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 教授）	
7．ファンconi貧血の遺伝子解析	40
高田 穰（京都大学放射線生物研究センター 教授）	
8．DBAの遺伝子型、臨床像および治療反応性に関する研究	44
大賀 正一（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 教授）	
市村 卓也（山口大学大学院医学系研究科小児科学 助教）	
石村 匡崇（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 助教）	
江口 克秀（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 臨床助教）	
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	47
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	50
照井 君典（弘前大学大学院医学研究科小児科学 准教授）	
11．遺伝性鉄芽球性貧血における遺伝子変異と表現型の関連の検討	54
古山 和道（岩手医科大学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	57
多賀 崇（滋賀医科大学小児科 講師）	
13．先天性好中球減少症のガイドライン	59
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症候群の診療ガイドライン作成に関する研究	65
	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	67
	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	DKCの遺伝子診断	71
	山口 博樹（日本医科大学血液内科 准教授）	

III	研究成果の刊行に関する一覧表	74
-----	----------------	----

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））  
総括研究報告書

## 先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

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。日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行い、先天性造血不全のより精度の高い疾患データベースの構築を推進した。

DBAは、27例が新規登録され、10例に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに180例のDBAの臨床情報と検体の収集および遺伝子解析を行い、103例（57.2%）に原因遺伝子の変異を見出した。SAは、3例の新規症例が登録され、うち2例において原因遺伝子が同定された。FAは、これまで日本人に特有であるアルデヒド分解酵素（ALDH2）のバリエーションがFA患者の骨髄不全の増悪因子であることを明らかにしてきたが、マウスとは異なり、母親のALDH2の遺伝子型は患児の表現型に影響を与えることはなかった。また、FANCGの患者では骨髄不全が早く進行し、早期の造血細胞移植が行われており、骨髄染色体核型により予後に影響があることも判明した。従来未解決症例の多くは、既知遺伝子のスプライス異常によりFAを発症していることが明らかとなった。CDAは、遺伝子変異が確認されなかった12症例について、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。DKCは、疑い例も含め13例中4例で既報の原因遺伝子の変異を同定した。DKC疑いの1例はテロメア長短縮を認めていたが、Shwachman-Diamond症候群であることが判明した。本邦のDKC症例で発見された原因遺伝子変異に関して*in vitro*にて機能解析を行い、これらがテロメア長制御を障害しDKCの病態に関与しているのかを解析した。不全型DKCで発見されたG106WとG682Dはテロメラーゼ活性を完全に障害し、P632RとT726Mは約50%の低下が認められた。一方、DKC症例で発見されたE280Kとdel334\_335はテロメラーゼ活性に障害を与えずこれらの変異がDKCの原因遺伝子であったかは懐疑的であった。DKCの診断において遺伝子変異をその診断の根拠とする場合には注意が必要であることが明らかになった。CTPでは、13例の新規登録例に対して系統的鑑別診断解析を施行し、8例がMYH9異常症、1例がParis-Trousseau Jacobsen症候群、2例がGFI1B異常症と診断した。

本年度は、本研究班で得られたデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら診断基準、重症度分類および診療ガイドラインの小改訂を行い、「2017年度版診療ガイドライン」を作成した。なお、「2017年度版診療ガイドライン」は日本小児血液・がん学会の認証を受けた後、同学会の編集書籍として平成29年度中に出版する予定である。専門医だけでなく一般小児科医をも読者対象とした実践的な内容となっている。

#### 【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：東海大学医学部教授  
真部 淳：聖路加国際大学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名誉教授  
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  
大賀正一：九州大学大学院医学研究院教授  
小原 明：東邦大学医学部教授  
照井君典：弘前大学大学院医学研究科准教授  
古山和道：岩手医科大学医学部教授  
多賀 崇：滋賀医科大学医学部講師  
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：日本医科大学医学部准教授

#### 【研究協力者氏名】

土岐 力：弘前大学大学院医学研究科講師  
佐藤知彦：弘前大学大学院医学研究科助教  
土居崎小夜子：名古屋大学大学院医学系研究科医員  
槍澤大樹：東京女子医科大学助教  
小倉浩美：東京女子医科大学非常勤講師  
市村卓也：山口大学大学院医学系研究科助教  
石村匡崇：九州大学大学院医学研究院助教  
江口克秀：九州大学大学院医学研究院臨床助教  
長谷川大輔：聖路加国際大学聖路加国際病院副医長  
平林真介：聖路加国際大学聖路加国際病院常勤嘱託医

#### A . 研究目的

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。平成26年度から、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た厚労省難治性疾患政策研究班「先天性造血不全班」(伊藤班)が発足し、研究を推進してきた。本研究申請では、先天性造血不全班の先行研究を発展させ、より優れた「診断基準・重症

度分類・診断ガイドライン」の確立を目指す。これまでの班研究により、DBAでは既知原因遺伝子の片アレル欠失が約10%も存在することを明らかになり (Blood 2012) 、本邦で初めての新規原因遺伝子 (RPS27とRPL27)も同定された (Br J Haematol 2015) 。さらに、新規バイオマーカーの赤血球還元グルタチオンを同定し、診断精度の向上に成功した (ASH 2014) 。FAでは、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を明らかにし (Blood 2013) 、新規原因遺伝子FANCTも同定した (Am J Hum Genet, 2015) 。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、DKCなどでは、まだ約50%で原因遺伝子が不明である。また、遺伝子診断により臨床的な診断が誤りであった症例が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。共通の基盤で遺伝子診断を含めた中央診断を行い、正確な診断に基づいた疫学調査を行う。平成28年度は、遺伝子診断の結果や治療経過も含む、精度の高い疾患データベースを作成する。

#### 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28年度は、遺伝子診断の結果や治療経過も含む、精度の高い先天性造血不全のデータベースを作成する。平成29年度以降は、我が国における正確な患者数の把握と治療法と予後に関する疫学研究を推進し、先天性造血不全のより精度の高い疾患デ

データベースの確立を目指す。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診断基準、重症度分類と診療ガイドラインの改訂し、確立を行う。得られた最新の成果は、難病情報センターのホームページなどを通じて国民に広く公表する。以下に、具体的な研究計画及び方法を述べる。

平成28年度

#### 1) 疫学調査

本年度は、先天性造血不全の8疾患について成人例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)。

#### 2) 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(3)、4)を行う。すでに、この6年間で1,300例以上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。

#### 3) 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)。

#### 4) 遺伝子診断

遺伝子診断のため、既知の原因遺伝子の解析を直接シーケンス法あるいはターゲット・シーケンス法で、各疾患の解析拠点において行う。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ジョン・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髄細胞や皮膚・骨髄線維芽細胞を用いて解析も行う(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Genomic Copy Number Assay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(各研究拠点)。

#### 5) 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たデータを平成26年度に構築した先天性造血不全のWEB登録システムを用いて登録する。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。(小島、小原、大賀、伊藤)。

6) 収集された情報をもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら、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を守秘を厳守し、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、すべての当該遺伝子解析施設の倫理委員会で承認されている。

## C. 研究結果

#### 1) 疫学調査

日本小児血液・がん学会疾患登録事業を一次調査とする DBA などの小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築した。日本小児血液・がん学会疾患登録事業の 2006 年から 2015 年診断登録症例数を表に示す(表1)。

疾患登録(一次調査)症例:2015年診断症例は日本

小児血液・がん学会会員 239 施設の 66%に相当する 158 施設が登録した。2013 年登録から登録施設が減少傾向にあるが、総患者数に大きな変化はなく、診療集約化が予想される。表に挙げた溶血性貧血を除く特発性再生不良性貧血 (Idiopathic AA) から先天性血小板減少症 (Cong. Thrombocytopenia) までの 14 の造血障害疾患 10 年間では総計 945 例で、そのうち特発性再生不良性貧血は毎年 50~56 例とほぼ一定した症例数であった。学会登録は診断から遅れて 3 年までは登録を受け付けるために、2014 年と 2015 年診断例がやや少なくなっている。造血障害の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。

Diamond-Blackfan 貧血 ; DBA 症例は 10 年間で 88 例、これとは別に特発性赤芽球癆 48 例が登録された。2 疾患の確定診断については精査する必要がある。

*RPS19*変異を同定した輸血依存の3例に対しては除鉄も不良のため、Target BU法を用いて前処置の強度を低減した造血細胞移植を行った。1例は非血縁骨髄が生着、もう1例は非血縁骨髄が生着不全となったあと非血縁臍帯血が完全生着、残りの1例は非血縁骨髄を行ったところである。

2008 年から 2015 年の期間の鉄芽球性貧血は 6 例、Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) は 3 例であった。いずれも極めて稀である。

## 2) 中央診断

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。先天性造血不全症候群が疑われる症例について、名古屋大学小児科において、次世代シーケンサーによるターゲットシーケンス・エクソーム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関連する 181 遺伝子ないし全遺伝子のエクソン配列を濃縮した。得られた混合試料を Illumina 社 HiSeq2000 シークエ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 1000personal genome データベースに登録済みの SNP を除去したのち、責任変異の候補となる SNV 原因遺伝子の候補を絞り込んだ。

## 3) バイオマーカーによるスクリーニング

今までに先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血 ; 以下 DBA) 患者における診断バイオマーカーとして赤血球アデノシンデアミナーゼ活性 (eADA) 、還元型グルタチオン (GSH) の同時測定が有用であることを明らかにしてきた。今年度は新たに DBA 疑い 10 症例を解析し、Vlachos らにより提唱されている従来の診断基準との比較で、eADA/GSH 同時測定の有用性について検討した。10 症例のうち 1 歳未満は 3 例に過ぎないこと、必ずしも大球性貧血を呈さず正球性貧血を呈する例が多いこと、家族歴が認められる症例が 2 例のみだったこと、さらに全員 HbF 測定はしていないことなどから、古典的 / 非古典的 DBA の診断基準を満たしていた症例はそれぞれ 0/1 例に過ぎなかった。一方、網赤血球数減少・骨髄正形成・赤芽球減少を満たす 6 例のうち 5 例が eADA/GSH を用いた判別式で DBA と判定出来た。バイオマーカーの臨床的有用性を追試するために現在これらの症例の遺伝子検査を実施中である。

## 4) 遺伝子診断

### a. DBA

新規症例 27 名の遺伝子診断を行い、10 例 (*RPS19* 4 例、*RPS26* 3 例、*RPS7* 2 例、*RPL5* 1 例) で既知の原因遺伝子を同定した。これまでに遺伝子検査を施行した症例は 180 例となった。ターゲットシーケンスで原因遺伝子が不明で、かつ SNP アレイで解析しても RP 遺伝子の欠失が検出されない、14 家系 (非罹患者家族も含む) について、全エクソン解析を

行った。今回の解析では、DBA以外の先天性造血不全症の原因遺伝子は同定されなかった。

#### b. FA

新規4症例を加え、高田研究室にて、東海大学症例91例のFA遺伝子解析が行われた。内訳は*FANCA*:54例、*FANCB*:3例、*FANCC*:1例、*FANCD1*:1例、*FANCE*:1例、*FANCG*:22例、*FANCI*:2例、*FANCN*:1例、*FANCP*:3例（うち1例は片アレル確認のみ）、*FANCT*:2例、不明：1例であった。今回の解析では*FANCB*の1例、*FANCC*の1例、*FANCI*の2例、*FANCN*の1例が新たに確定され、*FANCP*の片アレル1例と不明1例のみがの不確定例として引き続き解析予定である。海外で比較的高頻度にみられる*FANCC*が今回の解析で初めて検出された。*FANCN*例は骨髄不全がないにも関わらず、乳児期からウィルムス腫瘍を発症し、極めて予後不良であり、海外報告例と一致した症状であった。骨髄不全の発症は*FANCG*の患者で有意に早く、造血幹細胞移植も早期に行われていた。*FANCA*患者は骨髄不全の発症が遅く、造血幹細胞移植の時期も遅い傾向にあるが、その間に白血化を来す症例が多くみられた。白血化例における骨髄染色体核型では複合型に加え、monosomyを呈する症例の予後が不良であった。

全ゲノムシーケンス、RNAシーケンスを行うことで、従来の未解決症例の多くは、既知遺伝子のスプライス異常によりFAを発症していることが明らかとなった。

まず、症例Aであるが、全ゲノムシーケンスによって*FANCL*遺伝子（NM\_018062）に、c.G1092A:p.K369Kをhomozygousで検出した。この変異はcoding内のシノニマス変異であり、エクソームでも捕まっていたが見逃しており、再度の全ゲノムシーケンス等の施行によって見直すことで変異の同定に至った。この変異はエクソン12の端にあり、スプライシングに影響してエクソン13をスキップさせる効果がRT-PCRで確認された。この部分は、E3リガーゼである*FANCL*のリングドメインの主要部分を含んでおり、*FANCL*の機能を消失させると判断できる。同じ変異は、すでにBlood 121: 138, 2013で報告されている。

次に、症例Bであるが、この症例は全ゲノムシーケンスで、*FANCC* NM\_001243743 c. 1154+5G>A

homozygousが確認された。この変異は、エクソームイントロンのジャンクションから5bpイントロンに入った部位の変異で、エクソン12と13の間のイントロンがスプライスされず、そのためにpremature stop codonが現れることが確認された。我々の一連の解析での初めての*FANCC*症例である。

症例Cは、RNAシーケンスにより*FANCB*遺伝子のエクソン7のスキッピングが確認され、エクソーム解析データを見直すと、対応してc.G1497T:p.L499Lのシノニマス変異がエクソームイントロンのジャンクションに発見された。

症例Dは、RNAシーケンスによって*PALB2*/*FANCN*遺伝子のエクソン12のスキッピングが発見され、対応してc.3350+5C>T homozygousが見出された。既報の*FANCB*変異症例における臨床所見と一致して、この症例は小児がんを発症するなど、重症と判断された。

症例Eは、エクソーム解析で、*FANCI*遺伝子のc.158-2A>G heterozygous、c.G288A, p.E96E heterozygousを見出した。前者はイントロンの変異、後者はシノニマス変異であり、共にスプライスの異常を引き起こしていた。

症例Fは、*FANCI*遺伝子のc.3346\_3347insT hetero、c.2826+3A>G heteroであり、前者はフレームシフトだが、後者はやはりスプライス異常であった。

以上の解析によって、未解決と考えていた症例9例中、6例において原因遺伝子が確定した。

*ALDH2*の母児解析を35症例について行った。出生時体重、奇形数、骨髄不全の発症日時を母児各々の*ALDH2*型で検討したところ、マウスとは異なり、母親の*ALDH2*の遺伝子型は患児の表現型や骨髄不全発症に影響を与えないことが判明した。

#### c. SA

研究期間内に3例の新規症例が登録され、うち2例において原因遺伝子が同定された。

1例目の新規症例は41歳男性、貧血精査の結果、骨髄異形成症候群（環状鉄芽球を伴う不応性貧血）として赤血球輸血などで加療されていたが、兄弟にも同様の貧血症状を認めることから、遺伝性鉄芽球性貧血の診断依頼目的で紹介となった。データ上、小球性低色素性貧血（Hb 7.4 g/dL、MCV 66fL、MCH

19.9pg) 鉄過剰症状(肝腫大、血清フェリチン 2859ng/mL)を認めていた。本人の末梢血液細胞を用いた遺伝子変異解析の結果、*ALAS2* 遺伝子の Hemizygous 変異(R170L)が同定された。本変異は既報でも同一箇所の変異を認めており(Ohba et al. Ann Hematol 2013)これが原因遺伝子であると考えた。ビタミン B6 補充は効果を認めないため、現在 5 アミノレブリン酸の有効性・安全性をみる臨床試験を施行中である。

2 例目は 41 歳男性、家族歴なし。小球性貧血の精査のため 18 歳頃に骨髄検査を施行し、鉄芽球性貧血と診断。以後、患者の自己判断で通院はされていなかった。40 歳になり、肝障害・小球性貧血で近医より紹介があり、ヘモクロマトーシスに伴う肝硬変を認めていた。骨髄検査では引き続き環状鉄芽球を認めていたため、遺伝性鉄芽球性貧血の診断依頼目的で紹介となった。本人の末梢血液細胞を用いた遺伝子変異解析の結果、*ALAS2* 遺伝子の Hemizygous 変異(R452H)が同定された。本変異は既報でも同一箇所の変異を認めており(Ohba et al. Ann Hematol 2013)これが原因遺伝子であると考えた。本症例はビタミン B6 補充の効果を認め、現在も引き続き加療中である。

3 例目は 2015 年生まれの男児、家族歴なし。ミトコンドリア(Pearson 症候群)疑いとして本調査研究に登録となった。本人の末梢血液細胞を用いた解析の結果、少なくとも広範囲のミトコンドリア DNA 欠損を認めは明らかでなく、引き続きミトコンドリア DNA の変異の有無も含め解析中である。

また 2016 年度は、2015 年度版の先天性骨髄不全症の診断ガイドラインをもとに、一般臨床医を対象としたガイドラインの作成を行った。

ヒト *ALAS2* 遺伝子の発現制御には、*ALAS2int1Enh*が重要な役割を果たすことが知られており、特に*ALAS2int1Enh*中に存在するGATA1結合配列が重要であることが実験的に示唆されている。一方、エクソーム解析によっても原因遺伝子が不明であった遺伝性鉄芽球性貧血患者の中に、同エンハンサー配列のGATA1結合配列に塩基置換あるいは欠失変異が認められる症例が報告されているが、それらの変異が直接的に疾患発症の原因となるかどうかについては明らかではない。そこで、ゲノム編集

技術であるCRISPR/Cas9システムを用いてヒト由来赤芽球系培養細胞であるK562細胞とHuDEP2のゲノムDNA中の*ALAS2int1Enh*に欠失変異を導入し、内在性のヘム合性能への影響と、ミトコンドリアへの鉄の沈着が観察されるかどうかを検討した。その結果、K562細胞、HuDEP2細胞のいずれにおいても*ALAS2int1Enh*への欠失変異の導入により*ALAS2* mRNAの発現低下とヘモグロビン合成能の低下が認められたが、通常の継代培養の条件下では細胞質に鉄顆粒はほとんど検出されなかった。次に、それぞれの細胞を分化誘導したところ、いずれの細胞でも分化誘導前に比較して分化誘導後にはヘモグロビン合成は亢進したが、K562細胞においては、野生型の細胞も*ALAS2int1Enh*に変異を有する細胞でも、鉄染色で鉄顆粒の存在は明らかではなかった。一方、HuDEP2細胞では、野生型の細胞では分化誘導後も鉄染色により細胞質に少数の細胞で鉄顆粒が認められるのみであったが、*ALAS2int1Enh*に欠失変異を有するHuDEP2細胞では、分化誘導後、鉄染色により細胞質に多数の鉄顆粒を有する細胞が観察された。さらに、同細胞を電子顕微鏡により観察したところ、ミトコンドリア内に電子密度の高い領域が観察され、鉄染色の結果とあわせて、環状鉄芽球として矛盾しない結果であった。

#### 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。22 例中 6 例に遺伝子変異を確認し、5 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)、1 例が P293R、1 例が R725W、P672L)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。I 型と診断された症例では骨髄において I 型に特徴的とされる核間架橋が確認された。

#### e. DKC

Dyskeratosis congenita (DKC) 疑いの 13 例のうち、5 例(38%) DKC1 (2 例)、SBDS (1 例)、TINF2 (2 例) の変異が認められた。DKC 疑いの 1 例はテロメア長短縮を認めていたが、ターゲットシーケンスにより、Shwachman-Diamond 症候群であることが判明した。

本邦で発見された *TERT* 遺伝子変異(DKC: E280K, del334\_335, cDKC: G106W, P632R, G682D,

T726M) をオリゴ合成により作成し、pCI-neo-flag vectorでクローニングした。野生型のTERCを発現し、TERTを発現しておらず、テロメラーゼ活性を持たない Saos-2 細胞 ( Alternative Lengthening of Telomere (ALT) にてテロメアを補正) に *TERT* 野生型及び各変異を発現するpCI-neo-flag vectorをそれぞれリン酸カルシウム法でtransfectionし、48時間後に各細胞を粗抽出し、TeloTAGGG Telomerase PCR ELISAPLUS ( Roche ) により Relative telomerase activity( RTA:相対的テロメラーゼ活性) を測定した。Saos-2細胞はTERTを発現していないためテロメラーゼ活性は認められずALTにてテロメア長を補正している。

野生型のTERTに比較し、DKCで発見された E280K, del334\_335はテロメラーゼ活性に有意差はみられなかった。( RTA  $210.8 \pm 17.8$  vs.  $350.0 \pm 78.9$ ,  $319.3 \pm 85.8$   $p=0.2010$ ,  $p=0.3389$  )。一方、不全型DKCで認められたG106W, G682DはWTに比較し有意にテロメラーゼ活性が低下していた。( RTA  $210.8 \pm 17.8$  vs.  $7.4 \pm 6.3$ ,  $5.9 \pm 5.3$   $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$  )。また、不全型DKCで認められたP632R, T726MはWTに比較し有意にテロメラーゼ活性が低下しているものの ( RTA  $210.8 \pm 17.8$  vs.  $84.6 \pm 19.4$ ,  $97.6 \pm 14.7$   $p=0.0057$ ,  $p=0.0043$  ) G106W, G682Dに比較し有意にテロメラーゼ活性が上昇していた。( RTA  $7.4 \pm 6.3$  vs.  $84.6 \pm 19.4$ ,  $97.6 \pm 14.7$   $p=0.0089$ ,  $p=0.0013$  )

#### f. 先天性血小板減少症

本年度(平成28年4月から平成29年1月現在)は、13例の先天性血小板減少症を疑う症例について系統的鑑別診断解析を施行し、MYH9異常症8例、Paris-Trousseau Jacobsen症候群1例、GFI1B異常症2例の診断に至り、2例は確定診断されなかった。

GFI1B異常症診断のバイオマーカーとして末梢血塗抹標本を用いた血小板CD34局在解析を考案し、系統的鑑別診断解析および保存検体において施行し、GFI1B異常症2例の診断に至った。

#### 5) 診断基準と重症度分類の確立・改定

本年度は、本研究班で得られたデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら診断基準、重症度分類およ

び診療ガイドラインの小改訂を行い、「2017年度版診療ガイドライン」を作成した。なお、「2017年度版診療ガイドライン」は日本小児血液・がん学会の認証を受けた後、同学会の編集書籍として平成29年度中に出版する予定である。専門医だけでなく一般小児科医をも読者対象とした実践的な内容となっている。

#### D. 考察

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)データベース構築による系統的な解析が必要である。本研究班では、初年度に当たる本年度は、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行い、先天性造血不全のより精度の高い疾患データベースの構築を推進した。さらに、本研究班の研究成果を先天性骨髄不全の診療に還元するため、診断基準、重症度分類および診療ガイドラインの小改訂を行った。疾患ガイドラインの改訂にあたり、予め出版社とも協議し、日本小児血液・がん学会編集の書籍として出版することを念頭に改訂作業を行った。最新のデータを含みながらより分かりやすい内容であり、専門医だけでなく一般小児科医の啓蒙活動にも大きく役立つことが期待される。

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

本研究事業とAMEDの「稀少小児遺伝性血液疾患研究班」(小島班)の連携研究により、新規原因候補遺伝子 *RPS15A* を見出した。本年度は、AMED-DBA研究班(伊藤班)との連携により、*RPS15A*の機能解析をゼブラフィッシュや赤芽球細胞株を用いた系で行い、DBAの原因遺伝子であることを確定し、*RPL27*, *RPS27*に次いで、我が国から新規に発見された3番目の原因遺伝子として報告した(Ikeda F et al, Haematologica 2016)。

今年度は新たにDBA 疑い10症例を解析し、Vlachosらにより提唱されている従来診断基準と

の比較で、eADA/GSH同時測定の有用性について検討した。10症例のうち1歳未満は3例に過ぎないこと、必ずしも大球性貧血を呈さず正球性貧血を呈する例が多いこと、家族歴が認められる症例が2例のみだったこと、さらに全員HbF測定はしていないことなどから、古典的/非古典的DBAの診断基準を満たしていた症例はそれぞれ0/1例に過ぎなかった。一方、網赤血球数減少・骨髄正形成・赤芽球減少を満たす6例のうち5例がeADA/GSHを用いた判別式でDBAと判定出来た。非DBAと判定された症例2については頻回輸血症例であり、正常赤血球由来のeADA/GSHが影響した可能性が高い。

家族歴がなく、遺伝子検査結果が未着の場合、先天奇形の有無、網赤血球数減少+骨髄所見と2つのバイオマーカー測定結果を用いた判別式によってDBAを診断することになる。今回検討した10症例のうち、家族歴があるのは2例、先天奇形を有する症例は4例であり、従来のDBA診断基準で古典的/非古典的DBAと診断可能な例はそれぞれ0/1例であった。

注意すべき点として、末梢血白血球数・血小板数が正常で、網赤血球数減少を伴う高度の貧血を有する症例において、骨髄細胞密度が「低形成」と記載されている例が散見された。診断基準としての「赤芽球前駆細胞の消失を伴う正形成骨髄所見を有する」の判定にはより慎重さが必要であると考えられ、将来的には骨髄細胞の表面マーカーを用いたより具体的な診断項目の設定が必要と考えられた。

また、今回はRP遺伝子異常の解析結果が揃わず、2つの大支持基準の一方が欠けていた上に、HbFの測定もほぼ全例で行われなかったため、非古典的DBAの診断基準の判定も困難であった。HbFについては年齢による基準値の変動や、測定の困難さもあり支持基準の1項目としての妥当性に問題があると考えられる。

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25例登録され、うち68%と大多数はALAS2の異常を認めた。ALAS2変異に伴う遺伝性鉄芽球性症例の約半数はALAS2の補酵素であるビタミンB6が有効であるが、不応例においては根治的療法がなく重症な経過をたどりうる。現在、ビタミンB6不応例に対してはALAS2にて触媒・産生される5アミノレブリン酸の内服の有効性・

安全性について臨床研究を行っている。本研究成果が今後の診断ガイドラインの改訂に寄与しうるかもしれない。

今回の検討では、ALAS2int1Enhへの欠失変異の導入により、慢性骨髄性白血病由来のK562細胞でも、ヒト臍帯血由来のHuDEP2細胞でもALAS2 mRNAの発現量は低下し、ヘモグロビン合性能も低下した。すなわち、ALAS2int1Enhの変異が内在性のALAS2遺伝子の発現の制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかしながら、分化誘導なしにはこれらの細胞ではミトコンドリアへの鉄の沈着も明らかではなかった。一方、それぞれの細胞を分化誘導したところ、K562細胞では明らかではなかったが、ALAS2int1Enhに欠失変異を有するHuDEP2細胞でのみ、環状鉄芽球と類似した鉄の沈着が細胞質で観察された。HuDEP2細胞でのみ観察されてK562細胞では観察されなかった理由は明らかではないが、K562細胞では様々な分化誘導によってヘモグロビン合成は増加しても脱核することが無いのに対し、HuDEP2細胞では脱核するまで分化しうるものが大きく影響するのではないかと推察している。すなわち、環状鉄芽球はある特定の分化段階の赤芽球でのみ観察され、K562細胞は既にその分化段階を経過してしまっているか、あるいは分化誘導によってもその分化段階に到達しない可能性が高いのではないかと推察している。遺伝性鉄芽球性貧血症患者の骨髄においても、全ての赤芽球で鉄顆粒の沈着が観察される訳ではないことも、この推察を裏付けると考えているが、詳細は不明である。今後は、HuDEP2細胞を用いて遺伝性鉄芽球性貧血症の原因遺伝子として知られているALAS2以外の遺伝子、例えばSLC25A38やGLRX5、あるいはABCB7などの欠失変異体を作成し、分化誘導により環状鉄芽球が観察されるかどうかを検討する予定である。

FAの遺伝子変異は現時点で21におよび、FA遺伝子毎の臨床的特徴も徐々に明らかになりつつある。わが国のFA遺伝子型による臨床症状も海外とほぼ一致した傾向にあるが、発症の比率は民族による差がみられ、引き続き、日本人における疫学集積が必要である。ALDH2のバリエーションはわが国含む東アジアを中心とした地域にみられ、特に重症病型と関連して重要である。今後は骨髄不全の進行、白血化や

固形がんの発症を加味した重症度分類が必要である。

従来施行したエクソーム解析は、多くのFA症例で原因遺伝子を確定させる非常にパワフルな方法だが、それでも一部に未解決症例が残っていた。今回の解析で、RNAシーケンスなどによってスプライス異常などに気付くことができた。結果としては、見逃されていたシノニマス変異、スプライスサイト変異によることが多く、今後の解析において教訓を与えるものとなった。

我が国でも 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なは未だに不明である。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楕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* 遺伝子の変異が見つかった。次世代シーケンスによる解析で、臨床的に CDA と診断された症例から、溶血性貧血の原因遺伝子の変異を複数例に認めた。また、DKC と診断された症例に、SDS であることが判明した症例が認められた。この事実は、他の遺伝性血液疾患と CDA・DKC の鑑別診断は困難であることを示唆し、これらの疾患における遺伝子診断の重要性が再確認された。

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考えられる。

国際的には毎年、新たな変異遺伝子が同定されている。I型では *CDAN1* に加えて *C15ORF41* 遺伝子の変異が中東と東南アジアの家系で見つかった。なお、II型で報告されている *SEC23B* 変異が多発性過誤腫症候群の原因遺伝子として同定された。今後国内症例を対象に検討する必要がある。

本邦のDKC症例で発見された *TERT* 変異のテロメラーゼ活性の障害を *in vitro* で確認をした。不全型DKCで発見されたG106WとG682Dは、テロメラーゼ活性を完全に障害し原因遺伝子変異として間違いないと考える。また、不全型DKCで認められたP632RとT726Mはテロメラーゼ活性が有意に低下をしているが、その障害の程度は野生型の約50%程度で臨床的に不全型DKCの表現型となった原因をよく示している。一方、DKC症例で発見されたE280Kと

del334\_335はテロメラーゼ活性に障害を与えずこれらの変異がDKCの原因遺伝子であったかは懐疑的である。しかし、Saos-2細胞がテロメラーゼ活性を介さずALTにてテロメア長補正をしているようにテロメア長制御はテロメラーゼ活性だけがすべてではない。これらの遺伝子変異が別のテロメア制御機構を障害してDKCの病態に関与をしている可能性は完全には否定できない。

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

近年、先天性血小板減少症のなかで大型/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13例を解析し、11例(84.6%)の症例で確定診断が得られた。MYH9異常症は8例(61.5%)と最も高頻度に診断された。MYH9異常症8例中、4例では白血球封入体を認めず、原因不明の血小板減少症あるいは新生児同種免疫性血小板減少症と診断されていたが、末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析と局在分類により確定診断された。

2013年に全エクソン解析により同定されたGFI1B異常症は血小板顆粒減少と赤血球形態異常を有する先天性巨大血小板症である。GFI1Bは巨核球赤芽球特異的転写因子であり、ドミナントネガティブ変異により本来転写抑制されるCD34分子が巨核球と血小板に発現することが報告されていた。本研究において考案した末梢血塗抹標本を用いた血小板CD34発現解析は簡便であり、未診断症例の保存標本においても明確な陽性所見を得た。すなわち、GFI1B異常症診断のバイオマーカーとして有用であることが示された。

## E. 結論

日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行い、先天性造血不全のより精度の高い疾患データベースの構築を推進した。遺伝性血液疾患の鑑別診断は臨床診断のみでは困難であるため、次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断を継続した。

本年度は、本研究班で得られたデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら診断基準、重症度分類および診療ガイドラインの小改訂を行い、「2017年度版診療ガイドライン」を作成した。なお、「2017年度版診療ガイドライン」は日本小児血液・がん学会の認証を受けた後、同学会の編集書籍として平成29年度中に出版する予定である。専門医だけでなく一般小児科医をも読者対象とした実践的な内容となっている。

## F . 健康危険情報

該当せず

## G . 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Md, Miyano S, Kojima S. Clinical Utility of Next-generation Sequencing for Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. **Genet Med**. 2017 [Epub ahead of print]
  - 2) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanazaki R, Terui K, Kamio T, Kobayashi A, Fujita T, Sato-Otsubo A, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Exome sequencing identified *RPS15A* as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia. **Haematologica**. 2017;102(3):e93-e96.
  - 3) Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Matsuo K, Hira A, Takata M. The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi Anaemia infants is influenced by patient, but not maternal ALDH2 genotype. **Br J Haematol**. 2016;175(3):457-461.
  - 4) Utsugisawa T, Uchiyama T, Toki T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Erythrocyte glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. **Blood Cells Mol Dis**. 2016;59:31-6.
  - 5) Imai J, Suzuki T, Yoshikawa M, Dekiden M, Nakae H, Nakahara F, Tsuda S, Mizukami H, Koike J, Igarashi M, Yabe H, Mine T. Fatal Hemorrhagic Gastrointestinal Angioectasia after Bone Marrow Transplantation for Dyskeratosis Congenita. **Intern Med**. 2016; 55(23): 3441-3444.
  - 6) Umeda K, Adachi S, Tanaka S, Miki M, Okada K, Hashii Y, Inoue M, Cho Y, Koh K, Goto H, Kajiwara R, Hyakuna N, Kato K, Morio T, Yabe H; Inherited Disease Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Comparison of second transplantation and donor lymphocyte infusion for donor mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation for nonmalignant diseases. **Pediatr Blood Cancer**. 2016 Dec;63(12): 2221-2229. doi: 10.1002/pbc.26141.
  - 7) 矢部みはる, 矢部普正. Fanconi貧血 臨床診断・検査・治療. **日本臨床** 2017;75(増刊1): 414-417.
  - 8) 矢部普正, 矢部みはる. 成人のFanconi貧血の特徴と管理. **日本臨床** 2017;75(増刊1): 418-421.
  - 9) Ichimura T, Yoshida K, Okuno Y, Yujiri T, Nagai K, Nishi M, Shiraishi Y, Ueno H, Toki T, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Hara T, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Ito E, Ogawa S, Ohga S. Diagnostic challenge of Diamond-Blackfan anemia in mothers and children by whole-exome sequencing. **Int J Hematol**. 2017 Apr;105(4):515-520.
  - 10) Elmahadi S, Muramatsu H, Kojima S. Allogeneic hematopoietic stem cell

- transplantation for dyskeratosis congenita. **Curr Opin Hematol.** 2016 Nov;23(6):501-507.
- 11) Imashuku S, Muramatsu H, Sugihara T, Okuno Y, Wang X, Yoshida K, Kato A, Kato K, Tatsumi Y, Hattori A, Kita S, Oe K, Sueyoshi A, Usui T, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanno H. PIEZO1 gene mutation in a Japanese family with hereditary high phosphatidylcholine hemolytic anemia and hemochromatosis-induced diabetes mellitus. **Int J Hematol.** 2016 Jul;104(1):125-9.
  - 12) Sato K, Shimomuki M, Katsuki Y, Takahashi D, Kobayashi W, Ishiai M, Miyoshi H, Takata M, Kurumizaka H. FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex by binding RAD51 and protects the 5'-DNA end. **Nucleic Acids Res.** 2016 Sep 30. pii: gkw876. PMID: 27694619.
  - 13) Katsuki Y, Takata M. Defects in HR repair behind the human diseases: FA and HBOC. **Endocr Relat Cancer.** 2016 Oct;23(10): T19-37.
  - 14) Hashimoto K, Sharma V, Sasanuma H, Tian X, Takata M, Takeda S, Swenberg J and Nakamura J. Poor recognition of O6-isopropyl dG by MGMT triggers double strand break-mediated cell death and micronucleus induction in FANCD1-deficient cells. **Oncotarget** 2016 Jul 29. doi: 10.18632/oncotarget.10928. [Epub ahead of print]
  - 15) Sivapalaratnam S, Westbury SK, Stephens JC, Greene D, Downes K, Kelly AM, Lentaigne C, Astle WJ, Huizinga EG, Nurden P, Papadia S, Peerlinck K, Penkett CJ, Perry DJ, Roughley C, Simeoni I, Stirrups K, Hart DP, Tait RC, Mumford AD; NIHR BioResource., Laffan MA, Freson K, Ouwehand WH, Kunishima S, Turro E. Rare variants in GP1BB are responsible for autosomal dominant macrothrombocytopenia. **Blood** 2017;129(4):520-524.
  - 16) Ogawa Y, Kunishima S, Yanagisawa K, Osaki Y, Uchiyama Y, Matsumoto N, Tokiniwa H, Horiguchi J, Nojima Y, Handa H. Successful management of perioperative hemostasis in a patient with Glanzmann thrombasthenia who underwent a right total mastectomy. **Int J Hematol.** 2017;105(2):221-225.
  - 17) Yamashita Y, Matsuura R, Kunishima S, Oikawa Y, Ariizumi H, Hamada S, Shirato N, Matsuoka R, Ogawa K, Sekizawa A. Perinatal Management for a Pregnant Woman with an MYH9 Disorder. **Case Rep Obstet Gynecol.** 2016;2016:6730174.
  - 18) Kitamura K, Okuno Y, Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Muramatsu H, Kobayashi R, Furukawa K, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Kunishima S. Functional characterization of a novel GFI1B mutation causing congenital macrothrombocytopenia. **J Thromb Haemost.** 2016;14(7):1462-9.
  - 19) Simeoni I, Stephens JC, Hu F, Deevi SV, Megy K, Bariana TK, Lentaigne C, Schulman S, Sivapalaratnam S, Vries MJ, Westbury SK, Greene D, Papadia S, Alessi MC, Attwood AP, Ballmaier M, Baynam G, Bermejo E, Bertoli M, Bray PF, Bury L, Cattaneo M, Collins P, Daugherty LC, Favier R, French DL, Furie B, Gattens M, Germeshausen M, Ghevaert C, Goodeve AC, Guerrero JA, Hampshire DJ, Hart DP, Heemskerk JW, Henskens YM, Hill M, Hogg N, Jolley JD, Kahr WH, Kelly AM, Kerr R, Kostadima M, Kunishima S, Lambert MP, Liesner R, Lopez JA, Mapeta RP, Mathias M, Millar CM, Nathwani A, Neerman-Arbez M, Nurden AT, Nurden P, Othman M, Peerlinck K, Perry DJ, Poudel P, Reitsma P, Rondina MT, Smethurst PA, Stevenson W, Szkotak A, Tuna S, van Geet C, Whitehorn D, Wilcox DA, Zhang B, Revel-Vilk S, Gresele P, Bellissimo DB, Penkett CJ, Laffan MA, Mumford AD, Rendon A, Gomez K, Freson K, Ouwehand WH, Turro E. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited

bleeding, thrombotic, and platelet disorders. **Blood** 2016;127(23): 2791-803.

- 20) Wasano K, Matsunaga T, Ogawa K, Kunishima S. Late onset and high-frequency dominant hearing loss in a family with MYH9 disorder. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 2016;273(11):3547-3552.
- 21) Yokoi S, Kunishima S, Takahashi Y, Morishita M, Kojima S. A Japanese pedigree with a p.A95V mutation in the MYH9 gene demonstrates inherited macrothrombocytopenia without Alport manifestations. **Ann Hematol.** 2016;95(5): 831-3.
- 22) Moriya K, Suzuki T, Watanabe Y, Saito-Nanjo Y, Niizuma H, Onuma M, Rikiishi T, Kakuta F, Abukawa D, Yamaguchi H, Sasahara Y, Kure S. Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in a patient with novel compound heterozygous RTEL1 gene mutations. **Pediatric Blood & Cancer** 2016 Sep;63(9):1683-4.

## 2. 学会発表

### 国際学会

- 1) Ito E, Yoshida K, Toki T, Saida S, Watanabe K, Nakamura M, Terui K, Nakahata T, Miyano S, Watanabe A, Ogawa S. Genetic and Epigenetic Alterations in Acute Megakaryoblastic Leukemia in Down Syndrome. **Fifth JCA-AACR Special Joint Conference -The Latest Advances in Hematological Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics** (招待講演)(2016年7月15日, 千葉).
- 2) Terui K, Toki T, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Park MJ, Iwamoto S, Taga T, Yanagisawa R, Koh K, M. Saito A, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Watanabe K, Ito E. Analysis of *GATA1* mutations in Down syndrome infants with transient abnormal myelopoiesis and clinical impacts of *GATA1* mutation types: A report from the JPLSG TAM-10 study. **58th Annual Meeting &**

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

- 3) Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Gene expression profiles and methylation analysis in Down syndrome related acute lymphoblastic leukemia. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ).
- 4) Kato H, Itoh-Nakadai A, Matsumoto M, Ebina-Shibuya R, Sato Y, Kobayashi M, Muto A, Fujiwara T, Harigae H, Igarashi K. Transcription Factor Bach1 and Bach2 Operate Erythro-myeloid Competitive Differentiation by Responding to Environmental Changes. **The 58th American Society of Hematology** (2016年, 米国・サンディエゴ).
- 5) Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S, Harigae H. Generation of induced pluripotent stem cell-derived erythroblasts from a patient with X-linked sideroblastic anemia. **The 58th American Society of Hematology** (2016年, 米国・サンディエゴ).
- 6) Yabe M, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Shimizu T, Takakura H, Koh K, Ito E, Kojima S, Hira A, Takata M, Yabe H. Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in Japanese Fanconi anemia patients. **28th Annual Fanconi anemia research fund scientific symposium** (September 2016, Seattle, USA).
- 7) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Comparison of Clinical Outcomes between Pediatric Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. **ASH 2016 アメリカ血液学会** (2016年12月, サンディエゴ).

- 8) Kohara H, Ogura H, Aoki T, Sakamoto C, Ogawa Y, Miyamoto S, Kanno H, Tani K. Generation and functional analysis of congenital dyserythropoietic anemia (CDA) patient-specific induced pluripotent stem Cells. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ) .
- 9) Utsugisawa T, Yamamoto T, Ogura H, Aoki T, Iwasaki T, Ondo Y, Kawakami T, Nakagawa S, Ozono S, Inada H, Kanno H. The novel missense mutation of GATA1 caused red cell adenosine deaminase overproduction associated with congenital hemolytic Anemia. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ) .
- 10) Kanno H, Utsugisawa T, Ogura H. Next-generation sequencing in diagnosis of congenital hemolytic anemia. **the 5th TSH International Symposium Red Cell Disorders: From Bench to Bedside** (2016年5月20-22日, タイ・バンコク) .
- 11) Kanno H, Utsugisawa T, Ogura H. Congenital hemolytic anemia due to red cell enzymopathies. **the 5th TSH International Symposium Red Cell Disorders: From Bench to Bedside** (2016年5月20-22日, タイ・バンコク) .
- 12) Takata M. Pathogenesis of Fanconi anemia: an update. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON “REVOLUTION OF LABORATORY MEDICINE IN MODERN BIOLOGY”** (招待講演) (2017年2月15-17日, ムンバイ) .
- 13) Inano S, Sato K, Knies K, Katsuki Y, Nakada S, Takaori-Kondo A, Ishiai M, Schindler D, Kurumizaka H, Takata M. Novel Fanconi anemia E3 ligase RFW3 promotes removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites during ICL repair. **28th Annual Fanconi Anemia research frund Scientific Symposium**. (2016年9月15-18日, ベルビュー・米国) .
- 14) Yabe M, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Shimizu T, Takakura H, Koh K, Ito E, Kojima S, Hira A, Takata M and Yabe H. Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in Japanese Fanconi anemia patients. **28th Annual Fanconi Anemia research frund Scientific Symposium** (2016年9月15-18日, ベルビュー・米国) .
- 15) Okada S, Kagawa R, Fujiki R, Kato Z, Ohnishi H, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Kobayashi M. Loss-of-function and dominant negative STAT1 coiled-coil domain mutations in MSMD. **Congress of Asia Pacific Society for Immunodeficiencies** (2016年4月30日, 大阪) .
- 16) Mizoguchi Y, Karakawa S, Doi T, Shimomura M, Tomioka K, Sakata S, Furue A, Chijimatsu I, Okada S, Miki M, Kawaguchi H, Kobayashi M. Successful hematopoietic stem cell transplantation in ten patients with severe congenital neutropenia using an intensive immunosuppressive conditioning regimen: The results of a single institute. **The 21st Congress of European Hematology Association** (2016年6月12日, コペンハーゲン・デンマーク) .
- 17) Okada S, Fujiki R, Kagawa R, Tsumura M, Kong X, Sakata S, Nishimura S, Kato Z, Ohnishi H, Itan Y, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Kobayashi M. Alanine-scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate the loss-or gain-of-function nature of variants. **The 17th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies** (2016年9月22日, バルセロナ・スペイン) .
- 18) Asano T, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M. Flow cytometry based simple diagnosis of activated PI3K $\delta$  syndrome by evaluating pAKT in circulating B cells. **The 17th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies** (2016年9月22日, バルセロナ・スペイン) .
- 19) Mizoguchi Y, Miki M, Furue A, Nishimura S, Shimomura M, Tomioka K, Sakata S,

- Chijimatsu I, Karakawa S, Okada S, Doi T, Nakamura K, Kawaguchi H, Kobayashi M. Successful Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using an Immunosuppressive Conditioning Regimen in Ten Patients with Severe Congenital Neutropenia. A Single-Institute Experience. **The 58<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (2016年12月3-6日, サンディエゴ).
- 20) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Comparison of Clinical Outcomes Between Pediatric Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. **58<sup>th</sup> ASH Annual Meeting & Exposition** (2016年12月, 米国・サンディエゴ).
- 21) Yamashita Y, Matsuura R, Oikawa Y, Hamada S, Ariizumi H, Odawara K, Koyano M, Nishii S, Muramoto T, Takenaka S, Nakayama K, Matsumoto K, Ichihara M, Sasaki Y, Shiroto N, Matsuoka R, Ogawa K, Kunishima S, Sekizawa A. A case report of management including perinatal genetic counseling for May Hegglin Anomaly in pregnancy that low platelets counts made the opportunity to diagnose. **The 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics** (2016年4月, 京都).
- 22) Kunishima S, Kada A, Hao J. Further classification of neutrophil non-muscle myosin heavy chain IIA localization for efficient genetic diagnosis of *MYH9* disorders. **XXIX International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology** (2016年5月, イタリア・ミラノ).
- 23) Kunishima S. Differential diagnosis of congenital macrothrombocytopenia (symposium). **62nd Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2016年5月, フランス・モンペリエ).
- 24) Kunishima S, Saito H. Differential diagnosis of congenital macrothrombocytopenia-12-year experience in Nagoya-Platelets2016. **9<sup>th</sup> International Symposium** (2016年9月, 米国・ウィルズリー).
- 25) Chu Y, Rabbolini D, Gabrielli S, Kunishima S, Stevenson W, Ward C, Morel-Kopp MC. MYH9 disorders are not uncommon in Australia and New Zealand: results from a platelet next generation sequencing (NGS) project. **Annual Scientific Meetings of the HAA (Haematology Society of Australia and New Zealand, Australian & New Zealand Society of Blood Transfusion and the Australasian Society of Thrombosis and Haemostasis)** (2016年11月, オーストラリア・メルボルン).
- 26) Rabbolini DJ, Morel-Kopp MC, Chen Q, Gabrielli S, Best G, Dunlop L, Chew LP, Blair N, Brighton TA, Singh N, Fixter K, Kunishima S, Ward CM, Stevenson WS. Megakaryocyte and platelet CD34+ surface expression is increased by mutation of the GFI1B transcription factor and is independent of the affected functional domain. **Cell Biology of Megakaryocytes & Platelets, Fundamental Biology and Disorders of the Megakaryocyte Lineage: From Hematopoietic Stem Cell to Hemostasis, Gordon Research Conference** (2017年2月, イタリア・ルッカ).
- 国内学会
- 1) Kanezaki R, Toki T, Terui K, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Sato T, Ikeda F, Ito E. Dysegregation of *KIT* expression by GATA1s in TAM and acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome. **第78回日本血液学会学術集会** (2016年10月15日, 横浜).
- 2) Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. DNA methylation analysis in

- acute lymphoblastic leukemia of Down syndrome. **第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016 年 12 月 15 日, 東京) .
- 3) 照井君典, 土岐力, 濱麻人, 村松秀城, 長谷川大輔, 朴明子, 岩本彰太郎, 多賀崇, 柳澤龍, 康勝好, 林泰秀, 足立壯一, 水谷修紀, 渡邊健一郎, 伊藤悦朗. 一過性異常骨髓増殖症における GATA1 遺伝子変異 JPLSG TAM-10 登録症例の解析(GATA1 mutation status in infants with transient abnormal myelopoiesis: A report from the JPLSG TAM-10 study). **第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016 年 12 月 15 日, 東京) .
  - 4) Kondo A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K, Harigae H. Identification of a novel putative mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation. **第 78 回日本血液学会** (2016 年 10 月, 横浜) .
  - 5) Saito K, Inokura K, Fujiwara T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts. **第 78 回日本血液学会** (2016 年 10 月, 横浜) .
  - 6) Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Okitsu Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. **第 78 回日本血液学会** (2016 年 10 月, 横浜) .
  - 7) 矢部普正. 遺伝性疾患に対する同種造血細胞移植. **第 78 回日本血液学会学術集会**(教育講演) (2016 年 10 月 15 日, 横浜) .
  - 8) Koike T, Ohtsubo K, Fukumura A, Shimizu T, Takakura H, Nakae S, Mochizuki H, Morimoto T, Kato S, Yabe M, and Yabe H. Hematopoietic stem cell transplantation for inherited bone marrow failure syndrome. **第 39 回日本造血細胞移植学会総会**(2017 年 3 月 3 日, 松江) .
  - 9) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraiishi Y, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical sequencing of 209 patients with suspected inherited bone marrow failure syndromes. **第 78 回日本血液学会学術集会** (2016 年 10 月 14 日, 横浜) .
  - 10) Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraiishi Y, Sekiya Y, Nishio N, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, Hama A, Takahashi Y, Miyano S, Ogawa S, Ito M, Kojima S. Genetic background of bone marrow failure syndromes in children. **第 78 回日本血液学会学術集会** (2016 年 10 月 14 日, 横浜) .
  - 11) Muramatsu H. Application of next-generation sequencing on bone marrow failure and hematological diseases. **第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016 年 12 月 15 日, 東京) .
  - 12) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Bone marrow transplantation for children with acquired bone marrow failure. **第 39 回日本造血細胞移植学会総会**(2017 年 3 月 3 日, 松江) .
  - 13) 井島廣子, 古賀正史, 中村倫子, 松下文美, 坂本英美, 岩崎剛, 松本理恵, 陣内富男, 梶原敬三, 稗島州雄, 杉山正悟, 小倉浩美, 菅野仁, 陣内秀昭. HbA1c が偽性低値を示したエノラーゼ異常症の 1 例. **糖尿病** 2016;59(1):S-349.
  - 14) 小林博人, 稲田紹子, 菅野仁. 末梢血ガンマ・デルタ型 T 細胞の及ぼす腎癌予後への影響. **東京女子医科大学総合研究所紀要** 2016; 35:100-1.
  - 15) 北澤淳一, 田中朝志, 牧野茂義, 菅野仁, 高橋孝喜, 半田誠. 平成 26 年度血液管理及び実施体制と血液製剤使用実態調査報告 小規模施設に焦点を当てて(第 3 報). **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):417.
  - 16) 高源ゆみ, 緒方康貴, 小林博人, 菅野仁. 再生医療等安全性確保法に基づく細胞療法実施態勢の確立. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):407.
  - 17) 久保田友晶, 岡本好雄, 槍澤大樹, 小林博人, 菅野仁. 当院における手術準備血の T&S 活用状況. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):393.

- 18) 中林恭子, 松田和樹, 千野峰子, 岡本好雄, 槍澤大樹, 菅野仁. 低温保存した腹水・胸水の濾過濃縮再静注法 (CART) の有効性を検討する臨床研究. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):353.
- 19) 今野マユミ, 小出由美, 岡本好雄, 小野慎吾, 松田和樹, 久保田友晶, 守屋友美, 及川美幸, 千野峰子, 岡田真一, 中林恭子, 槍澤大樹, 小林博人, 菅野仁. 学会認定・臨床輸血看護師としての5年を振り返って. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):335.
- 20) 北澤淳一, 田中朝志, 牧野茂義, 菅野仁, 高橋孝喜, 半田誠. 平成26年度血液管理及び実施体制と血液製剤使用実態調査報告外来輸血に焦点を当てて. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):305.
- 21) 北澤淳一, 田中朝志, 牧野茂義, 菅野仁, 高橋孝喜, 半田誠. 平成26年度血液管理及び実施体制と血液製剤使用実態調査報告 病院外での輸血に焦点を当てて. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):305.
- 22) 大賀正一, 猪股裕紀洋, 菅野仁, 田村正徳, 八重樫伸生. 見過ごせないウイルス感染症ヒトパルボウイルス B19. **Pharma Medica** 2016;34(5):81-90.
- 23) 谷諭美, 花谷あき, 佐原真澄, 松丸重人, 千葉幸英, 鶴田敏久, 菅野仁, 中舘尚也, 永田智. 酸素親和性の上昇を認めた不安定ヘモグロビン症の1例. **日本小児科学会雑誌** 2016;120(1):98.
- 24) 岩崎拓也, 山本俊至, 村松秀城, 奥野友介, 佐藤裕子, 三井哲夫, 小野田正志, 矢野未央, 小松博史, 坂本謙一, 青木貴子, 岡本好雄, 槍澤大樹, 小倉浩美, 小島勢二, 菅野仁. 先天性溶血性貧血の診断におけるターゲットシーケンシングの有用性. **第78回日本血液学会学術集会** (2016年10月14日, 横浜).
- 25) 高田穰. 新規ファンコニ貧血原因遺伝子であるRFWD3/FANCWの相同組換え修復における役割の解明. **第8回群馬大学 Genome Damage Discussion Group セミナー** (招待講演) (2016年12月21日, 前橋).
- 26) Takata M. "Genetic basis for childhood bone marrow failure and malignancies" A novel Fanconi anemia gene regulates ICL repair and homologous recombination. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム** (招待講演) (2016年12月15-17日, 東京).
- 27) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 勝木陽子, 石合正道, 中田慎一郎, 胡桃坂仁志, 高田穰. 新規ファンコニ貧血遺伝子RFWD3による相同組換え修復制御メカニズム. **九州大学薬学部・藤田雅俊研究室研究セミナー** (招待講演).
- 28) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 勝木陽子, 石合正道, 中田慎一郎, 胡桃坂仁志, 高田穰. 相同組換えにおけるRPAおよびRAD51の動態制御はRFWD3によるユビキチン化に依存する. **第75回日本癌学会学術総会 シンポジウム18 がんにおける染色体・ゲノム不安定性の分子基盤** (2016年10月6-8日, 横浜).
- 29) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 勝木陽子, 中田慎一郎, 石合正道, 胡桃坂仁志, 高田穰. An E3 ligase RFWD3 is a critical component that facilitates RPA and RAD51 dynamics in homologous recombination. 放射線・ゲノムストレスに対抗する多彩な生命システムの解明に向けて. **放射線影響学会第59回大会** (ワークショップ) (招待講演) (2016年10月26日, 広島).
- 30) 石合正道. 放射線・ゲノムストレスに対抗する多彩な生命システムの解明に向けて. **放射線影響学会第59回大会** (ワークショップ) (2016年10月26日, 広島).
- 31) 田部井由依, 大橋由佳, 坂本裕貴, 小摩木里奈, 穀田哲也, 勅使河原愛, 飯島健太, 高田穰, 小松賢志, 田内広. 損傷応答キナーゼ活性が相同組換え修復に与える影響. **放射線影響学会第59回大会** (2016年10月26-28日, 広島).
- 32) 江見咲栄, 太田陽香, 河本知恵, 大西佑治, 木村献, 東良紘, 市村卓也, 工藤敬子, 高橋一雅, 楠田剛, 福永真之介, 今井耕輔, 金兼弘和, 大賀正一. 汎血球減少が自然軽快したikaros欠損症の新生児. **第26回日本産婦人科・新生児血液学会** (2016年7月1-2日, 長崎).
- 33) 市村卓也, 江見咲栄, 東良紘, 飯田恵庸, 太田陽香, 河本友恵, 木村献, 高橋一雅, 楠田剛, 星野顕宏, 金兼弘和, 長谷川俊史, 大賀正一.

- 造血および免疫不全が自然寛解した Ikaros 欠損症の新生児例．第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会（2016 年 12 月 15 日-17 日，東京）。
- 34) 大賀正一．先天性溶血性貧血における遺伝子診断．第 78 回日本血液学会（教育講演 40）（2016 年 10 月 14 日，横浜）。
- 35) 大賀正一．先天性血液疾患の遺伝子診断～溶血性貧血と血栓症～．第 17 回日本検査血液学会学術集会（ランチョンセミナー13）（2016 年 8 月 7 日，福岡）。
- 36) 久保田美子，野村和美，蝦名真行，金子桐子，加藤恭丈，古山和道．非特異的 5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS1)の CLPXP による翻訳後修飾．第 89 回日本生化学会大会（2016 年 9 月，仙台）。
- 37) 野村和美，久保田美子，金子桐子，蝦名真行，古山和道．ヒト CLPX-CLPP 複合体によるミトコンドリアマトリクスのタンパク質品質管理機構の解明．第 89 回日本生化学会大会（2016 年 9 月，仙台）。
- 38) 濱麻人，真部淳，長谷川大輔，野沢和江，成田敦，村松秀城，高橋義行，渡邊健一郎，小原明，伊藤雅文，小島勢二．小児再生不良性貧血および低形成骨髄異形成症候群における臨床的予後の比較．第 78 回日本血液学会学術集会（2016 年 10 月，横浜）。
- 39) 濱麻人，真部淳，長谷川大輔，野沢和江，成田敦，村松秀城，高橋義行，渡邊健一郎，小原明，伊藤雅文，小島勢二．小児再生不良背貧血および骨髄異形成症候群の形態中央診断：1500 例のまとめ．第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会（2016 年 12 月，東京）。
- 40) Kanegane H．Pancytopenia and primary immunodeficiency diseases．第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会（2016 年 12 月，東京）。
- 41) 福村明子，大坪慶輔，小池隆志，森本克，望月博之，國島伸治．急性虫垂炎を契機に診断に至った MYH9 異常症の男児例．第 119 回日本小児科学会学術集会（2016 年 5 月，札幌）。
- 42) 青木孝浩，國島伸治，山下晴喜，太田節雄．先天性白内障を呈した MYH9 異常症の 1 例．第 119 回日本小児科学会学術集会（2016 年 5 月 札幌）。
- 43) 神田健志，佐藤彩，安部大輔，西島節子，石上毅，國島伸治．Bernard-Soulier 症候群のブラジル人女児．第 75 回日本小児科学会滋賀地方会（2016 年 5 月，大津）。
- 44) 影山玲子，植田寛子，橋爪秀夫，國島伸治．臀部の皮疹を契機に確定診断された Epstein 症候群の 1 例．第 115 回日本皮膚科学会総会（2016 年 6 月，京都）。
- 45) 國島伸治，嘉田晃子，Hao Jihong，北村勝誠．MYH9 異常症遺伝子診断のための好中球ミオシン局在解析の細分類．第 38 回日本血栓止血学会学術集会（2016 年 6 月，奈良）。
- 46) 國島伸治．ITP の鑑別診断と実践的アプローチ（教育講演）．第 17 回日本検査血液学会学術集会（2016 年 8 月，福岡）。
- 47) 佐分利能生，大塚英一，宮崎泰彦，河野克也，國島伸治．May-Hegglin 異常．第 30 回日本臨床内科医学会（2016 年 10 月，東京）。
- 48) 國島伸治，北村勝誠，山村喜美．新規検査法により診断された先天性巨大血小板症．第 70 回国立病院総合医学会（2016 年 11 月，那覇）。
- 49) 中矢雅治，時政定雄，濱崎考史，村松秀城，小島勢二，奥野友介，吉田健一，小川誠司，白石友一，千葉健一，田中洋子，宮野悟，國島伸治．先天性巨大血小板症の新規病因遺伝子(*PLCB3*)の機能解析．第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会（2016 年 12 月，東京）。
- 50) 中館尚也，石黒精，小林尚明，國島伸治，笹原洋二，前田尚子，高橋幸博．小児期特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の治療に関する疫学調査．第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会（2016 年 12 月，東京）。
- 51) 神田健志，國島伸治，佐藤彩，安部大輔，西島節子，石上毅．ベルナル・スーリエ症候群のブラジル人女児．第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会（2016 年 12 月，東京）。
- 52) 左信哲，宮下恵実子，鞍谷沙織，橋本泰佑，平野翔堂，中村千華，松田百代，奥廣有喜，古家信介，山本浩継，河津由紀子，吉川真紀子，徳永やすゆき，加藤秀樹，笹原洋二，國島伸治，茶山公祐．破碎赤血球を伴う溶血性貧血を呈し診断に苦慮した先天性無巨核球性血小板減少症

の1例. 第58回日本小児血液・がん学会学術集会(2016年12月, 東京).

- 53) 川口裕之, 小倉友美, 三井-關中佳奈子, 關中悠仁, 國島伸治, 野々山恵章. Target sequence による先天性血小板減少症のスクリーニング(続報). 第24回小児ITP研究会(2016年12月, 東京).
- 54) 國島伸治. GFI1B 異常症の病態と検査診断. 第24回小児ITP研究会(2016年12月, 東京).

#### 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  
特記すべきことなし

表1.

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	216 / 239	219 / 242	212 / 230	171 / 232	158 / 239
(%)	83%	88%	90%	90%	90.3%	90.4%	90.5%	92%	74%	66%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	62	49	58	41	47
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5	11	3	4	5
AA / PNH	2	1	1	0	1	0	0	0	0	・
PNH	No data	・	・	・	・	・	・	0	3	0
Fanconi Anemia	5	4	6	1	4	2	6	6	3	4
Diamond-Blackfan	9	6	9	10	6	9	6	11	10	12
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6	6	1	5
Schwachman-Diamond	0	1	1	2	0	0	2	2	0	2
Cong. Dyserythropoietic anemia	No data	No data	1	0	0	1	0	0	1	0
Sideroblastic anemia	No data	No data	2	1	1	0	1	0	1	0
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4	1	2	1
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	5	3	0	・
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1
Cong. Thrombocytopenia							12	11	19	11
Cong. Spherocytosis	No data	・	・	・	54	49	26	48	43	55
Cong. Elliptocytosis	No data	・	・	・	2	1	1	2	1	0
G6PD deficiency	No data	・	・	・	5	5	3	3	6	7
PK deficiency	No data	・	・	・	0	0	0	0	0	3
other erythrocyte enzyme def.	No data	・	・	・	2	0	0	0	0	2
Sickel cell disease	No data	・	・	・	1	1	0	1	1	0
Unstable hemoglobinopathy	No data	・	・	・	1	0	0	0	1	4
Thalasemia	No data	・	・	・	18	16	11	8	10	11
other hemoglobinopathy	No data	・	・	・	0	0	0	1	0	1

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

DBAの遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 伊藤悦朗（弘前大学大学院医学研究科小児科学 教授）

研究協力者 土岐 力（弘前大学大学院医学研究科小児科学 講師）

佐藤知彦（弘前大学大学院医学研究科小児科学 助教）

**研究要旨：**Diamond Blackfan 貧血（DBA）は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として15種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子と *GATA1* 遺伝子が同定されている。しかし、我が国の DBA 患者の約半数は原因遺伝子が不明である。本年度も日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行い、臨床的に Diamond-Blackfan 貧血と診断された26例中12例（46%）に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに180例のDBAの臨床情報と検体の収集および遺伝子解析を行い、103例（57.2%）に原因となるRP遺伝子変異を見出した。この中には、我々が見出した新規原因遺伝子 *RPL27*, *RPS27* 及び *RPS15A* が含まれている。これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながらエビデンスに基づいた診断基準および診断・治療ガイドラインの小改訂を行った。なお、「2017年度版診療ガイドライン」は日本小児血液・がん学会の認証を受けた後、同学会の編集書籍として平成29年度中に出版する予定である。専門医だけでなく一般小児科医をも読者対象とした実践的な内容となっている。

## 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15種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子と *GATA1* 遺伝子が同定されているが、我が国のDBA患者の約半数は原因遺伝子が不明である。また、遺伝子診断により臨床的な診断が誤りであった症例が複数存在することが明らかとなった。本研究の目的は、これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行うことである。初年度（平成28年度）は、遺伝子診断の結果も含む精度の高い先天性造血不全のデータベースの作成を進め、診療ガイドラインの小改訂を行った。平成29年度以降は、データ収集と観察研究を継続し、正確な先天性造血不全の実態把握を行い、より精度の高い疾患データベースの確立とエビデンスに基づいた診断基

準、重症度分類と診療ガイドラインの改訂を行う。

## B．研究方法

最初に、DBAで遺伝子変異が報告されている12種類のRP遺伝子（*RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPS27*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL26*, *RPL27*, *RPL35a*）と *GATA1* 遺伝子について、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いてターゲットシーケンスを行った。次に、定量的PCR法とSNPアレイ法によりRP遺伝子の欠失を解析した。

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

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、患者および家族に十分な説明を行い文書による同意

を得たのち、検体を連結可能匿名化して解析を行った。

### C . 研究結果

新規症例27名の遺伝子診断を行い、10例 (*RPS19* 4例、*RPS26* 3例、*RPS7* 2例、*RPL5* 1例)で既知の原因遺伝子を同定した。これまでに遺伝子検査を施行した症例は180例となった。ターゲットシーケンスで原因遺伝子が不明で、かつSNPアレイで解析してもRP遺伝子の欠失が検出されない、14家系(非罹患者も含む)について、全エクソン解析を行った。今回の解析では、DBA以外の先天性造血不全症の原因遺伝子は同定されなかった。これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら、エビデンスに基づいた診断基準および診断・治療ガイドラインの小改訂を行った。これらの成果物を日本小児血液・がん学会の承認を受けて学会公認の診療ガイドラインとする予定である。すでに、DBAと共に他の7疾患の診療ガイドラインの改訂版を日本小児血液・がん学会の認定を受けるために、診断ガイドライン委員会に提出した。なお、「2017年度版診療ガイドライン」は日本小児血液・がん学会の認証を受けた後、同学会の編集書籍として2017年度中に出版する予定である。専門医だけでなく一般小児科医をも読者対象とした実践的な内容とした。

### D . 考察

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

本研究事業とAMEDの「稀少小児遺伝性血液疾患研究班」(小島班)の連携研究により、新規原因候補遺伝子*RPS15A*を見出した。本年度は、AMED-DBA研究班(伊藤班)との連携により、*RPS15A*の機能解析をゼブラフィッシュや赤芽球細胞株を用いた系で行い、DBAの原因遺伝子であることを確定し、*RPL27*、*RPS27*に次いで、我が国から新規に発見された3番目の原因遺伝子として報告した(Ikeda F et al, *Haematologica* 2016)。

平成28年度は、疾患ガイドラインの改訂にあたり、

予め出版社とも協議し、日本小児血液・がん学会編集の書籍として出版することを念頭に改訂作業を行った。最新のデータを含みながらより分かりやすい内容であり、専門医だけでなく一般小児科医の啓蒙活動にも大きく役立つことが期待される。

### E . 結論

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

### F . 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Matsuo H, Shiga S, Imai T, Kamikubo Y, Toki T, Terui K, Ito E, Adachi S. Purification of leukemic blast cells from blood smears using laser microdissection. *Int J Hematol*. 2017. [Epub ahead of print]
- 2) Noujima-Harada M, Takata K, Miyata-Takata T, Sakurai H, Igarashi K, Ito E, Nagakita K, Taniguchi K, Ohnishi N, Omote S, Tabata T, Sato Y, Yoshino T. Frequent downregulation of BACH2 expression in Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2017. [Epub ahead of print]
- 3) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraiishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Md, Miyano S, Kojima S. Clinical Utility of Next-generation Sequencing for Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. *Genet Med*. 2017 [Epub ahead of print]
- 4) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanazaki R, Terui K, Kamio T, Kobayashi A, Fujita T,

- Sato-Otsubo A, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Exome sequencing identified *RPS15A* as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia. **Haematologica**. 2017;102(3):e93-e96.
- 5) Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Okuno Y, Yamato G, Hara Y, Nagata Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Kato M, Park Mj, Ohki K, Shimada A, Takita J, Tomizawa D, Kudo K, Arakawa H, Adachi S, Taga T, Tawa A, Ito E, Horibe K, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol**. 2016;175(3):476-489.
- 6) Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Matsuo K, Hira A, Takata M. The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi Anaemia infants is influenced by patient, but not maternal ALDH2 genotype. **Br J Haematol**. 2016;175(3):457-461.
- 7) Utsugisawa T, Uchiyama T, Toki T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Erythrocyte glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. **Blood Cells Mol Dis**. 2016;59:31-6.
- 8) Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, Ozono K. Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities. **Cell Rep**. 2016;15(6):1228-41.
- 9) Yoshimi A, Toya T, Nannya Y, Takaoka K, Kirito K, Ito E, Nakajima H, Hayashi Y, Takahashi T, Moriya-Saito A, Suzuki K, Harada H, Komatsu N, Usuki K, Ichikawa M, Kurokawa M. Spectrum of clinical and genetic features of patients with inherited platelet disorder with suspected predisposition to haematological malignancies: a nationwide survey in Japan. **Annals of Oncology**. 2016;27(5):887-95.
- 10) Ogasawara S, Saito N, Itoga M, Kushibiki M, Nakata R, Ohta E, Fujita E, Kojima K, Terui K, Ito E, Kayaba H. Spurious thrombocytosis caused by tumor cell lysis in a patient with acute monocytic leukemia. **Clin Lab**. 2016;62:1575-7.
- 11) Miura R, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H, Kurose A, Tsuruga K, Sasaki S, Terui K, Ito E. Dysgerminoma developing from an ectopic ovary in a patient with WAGR syndrome: A case report. **Mol Clin Oncol** 2016; 5:503-6.
- 12) Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Preserved High Probability of Overall Survival with Significant Reduction of Chemotherapy for Myeloid Leukemia in Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study in Japan. **Pediatr Blood Cancer** 2016;63:248-54.
- 13) Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Terui K, Yoshida K, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Ogawa S, Ito E. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-Blackfan anemia in Japan. **Int J Hematol** 2016;103:112-4.
- 14) 伊藤悦朗, 土岐力, 照井君典. Down症候群. 白血病学(上) 最新の基礎・臨床研究. **日本臨床増刊号** 2016;74:97-102.
- 15) 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗. 一過性異常骨髄増殖症. 小児疾患診療のための病態生理3. **小児内科増刊号** 2016;48:953-6.

- 16) 照井君典, 伊藤悦朗. ダウン症に伴う急性巨核芽球性白血病の分子的理解と臨床応用. **血液フロンティア** 2016;26:1533-40.
- 17) 伊藤悦朗, 土岐力, 照井君典. 遺伝性骨髄不全症研究の最近の進歩. **臨床血液** 2016;57:882-90.
- 18) 新居敏, 藤野寿典, 赤澤嶺, 田尻雄二郎, 高野良彦, 巽亜子, 中道恵里那, 内藤拓人, 安西香織, 杉田亮, 竹川麻衣, 野村安隆, 肥田晋矢, 坂本晴子, 葭井操雄, 土岐力, 照井君典, 伊藤悦朗, 住本真一. 感染を契機に診断に至ったRPL11の遺伝子変異陽性Diamond-Blackfan anemiaの11歳男児例. **小児科臨床** 2016;69:1416-20.
- 19) 照井君典, 伊藤悦朗. 小児急性巨核芽球性白血病の生物学的特性. **血液内科** 2016;72:737-42.

## 2. 学会発表

### 国際学会

- 1) Ito E, Yoshida K, Toki T, Saida S, Watanabe K, Nakamura M, Terui K, Nakahata T, Miyano S, Watanabe A, Ogawa S. Genetic and Epigenetic Alterations in Acute Megakaryoblastic Leukemia in Down Syndrome. **Fifth JCA- AACR Special Joint Conference -The Latest Advances in Hematological Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics** (招待講演)(2016年7月15日, 千葉).
- 2) Terui K, Toki T, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Park MJ, Iwamoto S, Taga T, Yanagisawa R, Koh K, M. Saito A, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Watanabe K, Ito E. Analysis of *GATA1* mutations in Down syndrome infants with transient abnormal myelopoiesis and clinical impacts of *GATA1* mutation types: A report from the JPLSG TAM-10 study. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ).
- 3) Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K,

Ito E, Takita J. Gene expression profiles and methylation analysis in Down syndrome related acute lymphoblastic leukemia. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ).

### 国内学会

- 1) Kanazaki R, Toki T, Terui K, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Sato T, Ikeda F, Ito E. Dysegregation of *KIT* expression by GATA1s in TAM and acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome. **第78回日本血液学会学術集会** (2016年10月15日, 横浜).
- 2) Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. DNA methylation analysis in acute lymphoblastic leukemia of Down syndrome. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月15日, 東京).
- 3) 照井君典, 土岐力, 濱麻人, 村松秀城, 長谷川大輔, 朴明子, 岩本彰太郎, 多賀崇, 柳澤龍, 康勝好, 林泰秀, 足立壯一, 水谷修紀, 渡邊健一郎, 伊藤悦朗. 一過性異常骨髄増殖症におけるGATA1遺伝子変異JPLSG TAM-10登録症例の解析 (GATA1 mutation status in infants with transient abnormal myelopoiesis: A report from the JPLSG TAM-10 study). **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月15日, 東京).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

### 遺伝性鉄芽球性貧血

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的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。希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。研究期間内に 3 例の新規症例が登録され、うち 2 例において原因遺伝子が同定された。

#### 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的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

1 例目の新規症例は 41 歳男性、貧血精査の結果、骨髄異形成症候群 (環状鉄芽球を伴う不応性貧血) として赤血球輸血などで加療されていたが、兄弟にも同様の貧血症状を認めることから、遺伝性鉄芽球性貧血の診断依頼目的で紹介となった。データ上、小球性低色素性貧血 (Hb 7.4 g/dL、MCV 66fL、MCH 19.9pg)、鉄過剰症状 (肝腫大、血清フェリチン 2859ng/mL) を認めていた。本人の末梢血液細胞を用いた遺伝子変異解析の結果、*ALAS2* 遺伝子の Hemizygous 変異 (R170L) が同定された。本変異は既報でも同一箇所の変異を認めており (Ohba et al. Ann Hematol 2013)、これが原因遺伝子であると考えた。ビタミン B6 補充は効果を認めないため、現在 5 アミノレブリン酸の有効性・安全性をみる臨床試験を施行中である。

2 例目は 41 歳男性、家族歴なし。小球性貧血の精査のため 18 歳頃に骨髄検査を施行し、鉄芽球性貧血

と診断。以後、患者の自己判断で通院はされていなかった。40歳になり、肝障害・小球性貧血で近医より紹介があり、ヘモクロマトーシスに伴う肝硬変を認めていた。骨髄検査では引き続き環状鉄芽球を認めていたため、遺伝性鉄芽球性貧血の診断依頼目的で紹介となった。本人の末梢血液細胞を用いた遺伝子変異解析の結果、*ALAS2* 遺伝子の Hemizygous 変異(R452H)が同定された。本変異は既報でも同一箇所の変異を認めており (Ohba et al. *Ann Hematol* 2013)、これが原因遺伝子であると考えた。本症例はビタミン B6 補充の効果を認め、現在も引き続き加療中である。

3例目は2015年生まれの男児、家族歴なし。ミトコンドリア (Pearson 症候群) 疑いとして本調査研究に登録となった。本人の末梢血液細胞を用いた解析の結果、少なくとも広範囲のミトコンドリア DNA 欠損を認めは明らかでなく、引き続きミトコンドリア DNA の変異の有無も含め解析中である。

また2016年度は、2015年度版の先天性骨髄不全症の診断ガイドラインを基に、一般臨床医を対象としたガイドラインの作成を行った。

#### 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25例登録され、うち68%と大多数は*ALAS2*の異常を認めた。*ALAS2*変異に伴う遺伝性鉄芽球性症例の約半数は*ALAS2*の補酵素であるビタミンB6が有効であるが、不応例においては根治的療法がなく重症な経過をたどりうる。現在、ビタミンB6不応例に対しては*ALAS2*にて触媒・産生される5アミノレブリン酸の内服の有効性・安全性について臨床研究を行っている。本研究結果が今後の診断ガイドラインの改訂に寄与しうるかもしれない。

#### E . 結論

新たな遺伝性鉄芽球性貧血症例を見出すとともに、先天性骨髄不全症の診断ガイドラインにおける、遺伝性鉄芽球性貧血の項の改訂・策定を行った

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kondo A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K, Harigae H. Identification of a novel putative mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation. *Int J Hematol*. 2016;103:387-395.
- 2) Sakurai K, Fujiwara T, Hasegawa S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Yamada-Fujiwara M, Ichinohasama R, Harigae H. Inhibition of human primary megakaryocyte differentiation by anagrelide: A gene expression profiling analysis. *Int J Hematol*. 2016;104:190-199.
- 3) Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Okitsu Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. *Blood* 2016;128:508-518.
- 4) Kanehira M, Fujiwara T, Nakajima S, Okitsu Y, Onishi Y, Fukuhara N, Ichinohasama R, Harigae H. An LPA1/3 axis governs cellular senescence of mesenchymal stromal cells and promotes growth and vascularization of multiple myeloma. *Stem Cells* (in press)
- 5) Inokura K, Fujiwara T, Saito K, Iino T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts. *Exp Hematol*. (In press)
- 6) Kobayashi M, Kato H, Hada H, Itoh-Nakadai A, Fujiwara T, Inoguchi Y, Ichianagi K, Muto A, Tomosugi N, Sasaki H, Harigae H, Igarashi K. Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency. *Haematologica*. (in press)
- 7) Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Forced FOG1 expression in erythroleukemia cells: induction of erythroid genes and repression of myelo-lymphoid transcription factor PU.1. *Biochem Biophys Res Commun*. (in press)

## 2. 学会発表

- 1) Kato H, Itoh-Nakadai A, Matsumoto M, Ebina-Shibuya R, Sato Y, Kobayashi M, Muto A, Fujiwara T, Harigae H, Igarashi K. Transcription Factor Bach1 and Bach2 Operate Erythro-myeloid Competitive Differentiation by Responding to Environmental Changes. **The 58<sup>th</sup> American Society of Hematology** (2016年, 米国・サンディエゴ) .
- 2) Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S, Harigae H. Generation of induced pluripotent stem cell-derived erythroblasts from a patient with X-linked sideroblastic anemia. **The 58<sup>th</sup> American Society of Hematology** (2016年, 米国・サンディエゴ) .
- 3) Kondo A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K, Harigae H. Identification of a novel putative mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation. **第78回日本血液学会** (2016年10月, 横浜) .
- 4) Saito K, Inokura K, Fujiwara T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts. **第78回日本血液学会** (2016年10月, 横浜) .
- 5) Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Okitsu Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. **第78回日本血液学会** (2016年10月, 横浜) .

## G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

### Fanconi 貧血の臨床データの解析・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細胞移植再生医療科 教授）

**研究要旨：** Fanconi 貧血（FA）は身体奇形と小児期発症の骨髄不全、白血病や固形がんを臨床的な特徴とし、多くの遺伝子異常の報告がある。京都大学高田研究室と共同で新規症例の遺伝子解析を進めると同時に、不明遺伝子であった症例のさらなる解析を継続している。これまで日本人に特有であるアルデヒド分解酵素（ALDH2）のバリエーションが FA 患者の骨髄不全の増悪因子であることを明らかにしてきたが、マウスとは異なり、母親の ALDH2 の遺伝子型は患児の表現型に影響を与えることはなかった。また *FANCG* の患者では骨髄不全が早く進行し、早期の造血細胞移植が行われており、骨髄染色体核型により予後に影響があることも判明した。これらを踏まえて Fanconi 貧血の診療ガイドラインを作成した。

#### A．研究目的

Fanconi 貧血（FA）は DNA 修復欠損を基盤に、造血不全、身体奇形、白血病、固形がんなどを呈する稀な遺伝性疾患である。本研究では、我が国における FA の病態や遺伝子異常および臨床症状を明らかにし、FA の診療ガイドラインを確立することを目的とする。

#### B．研究方法

末梢血リンパ球における染色体脆弱検査と、*FANCA* の multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) を併用し、臨床症状とあわせて FA の診断を行う。FA 遺伝子については、京都大学放射線生物研究センター高田穰研究室にて、名古屋大学のターゲットシーケンスの結果を合わせて解析が行われた。さらに京都大学にてアルデヒド分解酵素（ALDH2）の変異を解析し、臨床データと合わせて検討した。これらの結果を踏まえて Fanconi 貧血の診断基準、重症度基準、診療ガイドラインの作成および改訂を行った。

（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研究の計画を実施して

いる。「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」が東海大学倫理委員会で承認されている。

#### C．研究結果

新規4症例を加え、高田研究室にて、東海大学症例91例のFA遺伝子解析が行われた。内訳は *FANCA*:54例、*FANCB*:3例、*FANCC*:1例、*FANCD1*:1例、*FANCE*:1例、*FANCG*:22例、*FANCI*:2例、*FANCN*:1例、*FANCP*:3例（うち1例は片アレル確認のみ）、*FANCT*:2例、不明：1例であった。今回の解析では *FANCB* の1例、*FANCC* の1例、*FANCI* の2例、*FANCN* の1例が新たに確定され、*FANCP* の片アレル1例と不明1例のみがの不確定例として引き続き解析予定である。海外で比較的高頻度にみられる *FANCC* が今回の解析で初めて検出された。*FANCN* 例は骨髄不全がないにも関わらず、乳児期からウィルムス腫瘍を発症し、極めて予後不良であり、海外報告例と一致した症状であった。骨髄不全の発症は *FANCG* の患者で有意に早く、造血幹細胞移植も早期に行われていた。*FANCA* 患者は骨髄不全の発症が遅く、造血幹細胞移植の時期も遅い傾向にあるが、その間に白血化を来す症例が多くみられた。白血化例における骨髄染色体核型では複合型に加え、monosomy を呈する症例の予後が不良であった。

ALDH2の母児解析を35症例について行った。出生時体重、奇形数、骨髄不全の発症日時を母児各々のALDH2型で検討したところ、マウスとは異なり、母親のALDH2の遺伝子型は患児の表現型や骨髄不全発症に影響を与えないことが判明した。

以上の結果を考慮して、Fanconi貧血の診断基準、重症度基準、診療ガイドラインの作成および改訂を行った。診断フローチャートや病態は図を用いて分かり易く説明され、症状、治療法なども表にまとめた。診断基準は血球減少をはじめ、種々の身体異常、染色体不安定性に加えて、新規遺伝子を加えた遺伝学的検査と鑑別診断を総合した判断とした。

#### D . 考察

FAの遺伝子変異は現時点で21におよび、FA遺伝子毎の臨床的特徴も徐々に明らかになりつつある。我が国のFA遺伝子型による臨床症状も海外とほぼ一致した傾向にあるが、発症の比率は民族による差がみられ、引き続き、日本人における疫学集積が必要である。ALDH2のバリエーションは我が国を含む東アジアを中心とした地域にみられ、特に重症病型と関連して重要である。今後は骨髄不全の進行、白血化や固形がんの発症を加味した重症度分類が必要である。

#### E . 結論

FAの遺伝子解析が順調に進み、日本人FA患者の原因遺伝子型やその頻度と臨床症状との関連が次第に明らかになってきた。ALDH2バリエーションとの関連も含め今後も症例を集積し、よりよい治療法の開発のためにも調査、研究の継続が必要である。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Shim YJ, Kim HS, Do YR, Ha JS, Yabe H. Sequential strategy for umbilical cord blood transplantation in a Korean Fanconi anemia girl with refractory acute myelomonocytic leukemia and complex karyotype. **Pediatr Transplant.** 2016 Dec 15. doi: 10.1111/petr.12871. [Epub ahead of print]
- 2) Imai J, Suzuki T, Yoshikawa M, Dekiden M,

Nakae H, Nakahara F, Tsuda S, Mizukami H, Koike J, Igarashi M, Yabe H, Mine T. Fatal Hemorrhagic Gastrointestinal Angioectasia after Bone Marrow Transplantation for Dyskeratosis Congenita. **Intern Med.** 2016; 55(23): 3441-3444.

- 3) Nishikawa E, Yagasaki H, Hama A, Yabe H, Ohara A, Kosaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe KI, Yoshida N, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Long-term outcomes of 95 children with moderate aplastic anemia treated with horse antithymocyte globulin and cyclosporine. **Pediatr Blood Cancer.** 2016 Nov 3. doi: 10.1002/pbc.26305. [Epub ahead of print]
- 4) Otsubo K, Yabe M, Yabe H, Fukumura A, Morimoto T, Kato M, Mochizuki H. Successful acute lymphoblastic leukemia-type therapy in two children with mixed-phenotype acute leukemia. **Pediatr Int.** 2016 Oct;58(10): 1072-1076. doi: 10.1111/ped. 13045.
- 5) Yabe H. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for inherited diseases. **Rinsho Ketsueki.** 2016;57(10):2199-2207.
- 6) Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Matsuo K, Hira A, Takata M. The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi Anaemia infants is influenced by patient, but not maternal ALDH2 genotype. **Br J Haematol.** 2016 Nov; 175(3): 457-461. doi: 10.1111/bjh.14243.
- 7) Umeda K, Adachi S, Tanaka S, Miki M, Okada K, Hashii Y, Inoue M, Cho Y, Koh K, Goto H, Kajiwara R, Hyakuna N, Kato K, Morio T, Yabe H. Inherited Disease Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Comparison of second transplantation and donor lymphocyte infusion for donor mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation for

- nonmalignant diseases. **Pediatr Blood Cancer**. 2016 Dec;63(12): 2221-2229. doi: 10.1002/psc.26141.
- 8) Sakaguchi H, Watanabe N, Matsumoto K, Yabe H, Kato S, Ogawa A, Inagaki J, Goto H, Koh K, Yoshida N, Kato K, Cho Y, Kosaka Y, Takahashi Y, Inoue M, Kato K, Atsuta Y, Miyamura K; Donor/Source Working Group of Japan Society of Hematopoietic Cell Transplantation. Comparison of Donor Sources in Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Childhood Acute Leukemia: A Nationwide Retrospective Study. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2016 Dec;22(12): 2226-2234. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.09.020.
- 9) Atsuta Y, Hirakawa A, Nakasone H, Kurosawa S, Oshima K, Sakai R, Ohashi K, Takahashi S, Mori T, Ozawa Y, Fukuda T, Kanamori H, Morishima Y, Kato K, Yabe H, Sakamaki H, Taniguchi S, Yamashita T; Late Effect and Quality of Life Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Late Mortality and Causes of Death among Long-Term Survivors after Allogeneic Stem Cell Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2016 Sep; 22(9): 1702-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2016.05.019.
- 10) Yasuda E, Suzuki Y, Shimada T, Sawamoto K, Mackenzie WG, Theroux MC, Pizarro C, Xie L, Miller F, Rahman T, Kecskemethy HH, Nagao K, Morlet T, Shaffer TH, Chinen Y, Yabe H, Tanaka A, Shintaku H, Orii KE, Orii KO, Mason RW, Montaña AM, Fukao T, Orii T, Tomatsu S. Activity of daily living for Morquio A syndrome. **Mol Genet Metab**. 2016 Jun; 118(2): 111-22. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.04.005.
- 11) Kato S, Yabe H, Takakura H, Mugishima H, Ishige M, Tanaka A, Kato K, Yoshida N, Adachi S, Sakai N, Hashii Y, Ohashi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Tabuchi K. Hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of metabolism: A report from the Research Committee on Transplantation for Inborn Errors of Metabolism of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and the Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. **Pediatr Transplant**. 2016 Mar 20(2): 203-14. doi: 10.1111/petr.12672. 10.1111/petr.12672. [Epub ahead of print]
- 12) 矢部みはる, 矢部普正. Fanconi貧血 臨床診断・検査・治療. **日本臨床** 2017;75 (増刊1): 414-417.
- 13) 矢部普正, 矢部みはる. 成人のFanconi貧血の特徴と管理. **日本臨床** 2017;75 (増刊1): 418-421.
2. 学会発表
- 1) 矢部普正. 遺伝性疾患に対する同種造血細胞移植. **第78回日本血液学会学術集会 (教育講演)** (2016年10月15日, 横浜).
- 2) Yabe M, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Shimizu T, Takakura H, Koh K, Ito E, Kojima S, Hira A, Takata M, Yabe H. Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in Japanese Fanconi anemia patients. **28<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund scientific symposium** (September 2016, Seattle, USA).
- 3) Koike T, Ohtsubo K, Fukumura A, Shimizu T, Takakura H, Nakae S, Mochizuki H, Morimoto T, Kato S, Yabe M, and Yabe H. Hematopoietic stem cell transplantation for inherited bone marrow failure syndrome. **第39回日本造血細胞移植学会総会** (2017年3月3日, 松江).
- G . 知的財産権の出願・登録状況**  
該当なし

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

CDAの臨床データ解析・診療ガイドラインの作成

研究分担者 真部 淳（聖路加国際大学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。本年度は重症度分類を改訂し、また CDA の診療ガイドラインを追補修正した。

## 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が、我が国ではこれまでCDAの実態が十分把握されていなかった。本研究によりわが国における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、中央診断事業をもとに、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るが、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ため、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

毎年、本疾患の診療ガイドラインを改訂している。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 27 年度作成）

Stage 1 軽症

薬物療法なしでヘモグロビン濃度 10g/dL 以上

Stage 2 中等症

薬物療法なしでヘモグロビン濃度 7-10g/dL

Stage 3 やや重症

薬物療法ありでヘモグロビン濃度 7g/dL 以上

Stage 4 重症

薬物療法ありでヘモグロビン濃度 7g/dL 未

注 1)重症度分類の Stage 3 以上が指定難病の対象となる。ただし、薬物療法を行っていてヘモグロビン濃度 10g/dL 以上の場合は対象外となる。

注 2)症状の程度上記の重症度分類等で一定以上に該当しない場合でも、高額な医療を継続することが必要な者については、医療費助成の対象とする。

## D . 考察

我が国でも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なは未だに不明である。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*遺伝子の変異が見つかった。

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考えられる。

国際的には毎年、新たな変異遺伝子が同定されている。I型では*CDAN1*に加えて*C15ORF41*遺伝子の変異が中東と東南アジアの家系で見つかった。なお、II型で報告されている*SEC23B*変異が多発性過誤腫症候群の原因遺伝子として同定された。今後国内症例を対象に検討する必要がある。

## E . 結論

我が国の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

### 1. 論文発表

- 1) Elmahdi,S, Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Muramatsu H, Narita A, Nishio N, Ismael O, Kawashima N, Okuno Y, Xu Y, Wang X, Takahashi Y, Ito M, Kojima S. A cytokine-based diagnostic program in pediatric aplastic anemia and hypocellular refractory cytopenia of childhood. **Pediatr Blood Cancer**. 2016;63:652-658.
- 2) Ishiguro A, Ezinne CC, Michihata N, Nakadate H, Manabe A, Taki M, Shima M. Pediatric Thromboembolism: A National Survey in Japan. **Int J Hematol**.

2017;105:52-58.

- 3) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical utility of next-generation sequencing for bone marrow failure syndrome. **Genet Med**. (in press)
- 4) Kanamitsu K, Shimada A, Nishiuchi R, Shigemura T, Nakazawa Y, Koike K, Kodama Y, Shinkoda Y, Kawano Y, Yasui K, Sasaki K, Kajiwara R, Tsukahara H, Manabe A. Pediatric intestinal Behcet disease complicated by myeloid malignancies. **Int J Hematol**. 2017;105:377-382.

### 2. 学会発表

- 1) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Comparison of Clinical Outcomes between Pediatric Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. **ASH 2016 アメリカ血液学会**（2016年12月，サンディエゴ）.

## G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

### 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 名誉教授）

**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）22例において、同意を得た後、遺伝子診断を行い、5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。また、Dyskeratosis congenita（DKC）13例のうち、5例（38%）で疾患原因遺伝子が同定された（*DKC1*（2例）、*SBDS*（1例）、*TINF2*（2例））。DKC疑いの1例はテロメア長短縮を認めていたが、ターゲットシーケンスにより、Shwachman-Diamond症候群であることが判明した。遺伝性造血不全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。DKCはテロメア長短縮を特徴とする先天性造血不全症候群の一つで、現在までにDCの原因遺伝子としてテロメア長維持に関わる11遺伝子（*DKC1*、*TERT*、*TERC*、*RTEL1*、*NOP10*、*TINF2*、*CTC1*、*NHP2*、*WRAP53*、*ACD*、*PARN*）の異常が見出されている。

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。先天性造血不全症候群が疑われる症例について、名古屋大学小児科において、次世代シーケンサーによるターゲットシーケンス・エクソーム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関連する181遺伝子ないし全遺伝子の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 1000personal genome データベースに登録済みの SNP を除去したのち、責任変異の候補となる SNV 原因遺伝子の候補を絞り込んだ。

(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。22 例中 6 例に遺伝子変異を確認し、5 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)、1 例が P293R、1 例が R725W、P672L)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。I 型と診断された症例では骨髄において I 型に特徴的とされる核間架橋が確認された。

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。

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。

Dyskeratosis congenita (DKC) 疑いの13例のう

ち、5例(38%) *DKC1* (2例)、*SBDS* (1例)、*TINF2* (2例) の変異が認められた。DKC疑いの1例はテロメア長短縮を認めていたが、ターゲットシーケンスにより、Shwachman-Diamond症候群であることが判明した。

### D . 考察

次世代シーケンスによる解析で、臨床的に CDA と診断された症例から、溶血性貧血の原因遺伝子の変異を複数例に認めた。また、DKC と診断された症例に、SDS であることが判明した症例が認められた。この事実は、他の遺伝性血液疾患と CDA・DKC の鑑別診断は困難であることを示唆し、これらの疾患における遺伝子診断の重要性が再確認された。

### E . 結論

遺伝性造血不全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。

### F . 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes. *Genet Med*. 2017 Jan 19. doi: 10.1038/gim.2016.197. [Epub ahead of print]
- 2) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanazaki R, Terui K, Kamio T, Kobayashi A, Fujita T, Sato-Otsubo A, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene for

- Diamond-Blackfan anemia. **Haematologica**. 2017 Mar;102(3):e93-e96.
- 3) Ichimura T, Yoshida K, Okuno Y, Yujiri T, Nagai K, Nishi M, Shiraishi Y, Ueno H, Toki T, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Hara T, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Ito E, Ogawa S, Ohga S. Diagnostic challenge of Diamond-Blackfan anemia in mothers and children by whole-exome sequencing. **Int J Hematol**. 2017 Apr;105(4):515-520.
  - 4) Nishikawa E, Yagasaki H, Hama A, Yabe H, Ohara A, Kosaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe KI, Yoshida N, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Long-term outcomes of 95 children with moderate aplastic anemia treated with horse antithymocyte globulin and cyclosporine. **Pediatr Blood Cancer**. 2017 May;64(5).
  - 5) Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Matsuo K, Hira A, Takata M. The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi Anaemia infants is influenced by patient, but not maternal ALDH2 genotype. **Br J Haematol**. 2016 Nov;175(3):457-461.
  - 6) Elmahadi S, Muramatsu H, Kojima S. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for dyskeratosis congenita. **Curr Opin Hematol**. 2016 Nov;23(6):501-507.
  - 7) Kojima D, Wang X, Muramatsu H, Okuno Y, Nishio N, Hama A, Tsuge I, Takahashi Y, Kojima S. Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary immunodeficiencies. **J Allergy Clin Immunol**. 2016 Jul;138(1):303-305.e3.
  - 8) Imashuku S, Muramatsu H, Sugihara T, Okuno Y, Wang X, Yoshida K, Kato A, Kato K, Tatsumi Y, Hattori A, Kita S, Oe K, Sueyoshi A, Usui T, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanno H. PIEZO1 gene mutation in a Japanese family with hereditary high phosphatidylcholine hemolytic anemia and hemochromatosis-induced diabetes mellitus. **Int J Hematol**. 2016 Jul;104(1):125-9.
2. 学会発表
    - 1) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical sequencing of 209 patients with suspected inherited bone marrow failure syndromes. **第78回日本血液学会学術集会** (2016年10月14日, 横浜) .
    - 2) Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Sekiya Y, Nishio N, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Doisaki S, Hama A, Takahashi Y, Miyano S, Ogawa S, Ito M, Kojima S. Genetic background of bone marrow failure syndromes in children. **第78回日本血液学会学術集会** (2016年10月14日, 横浜) .
    - 3) Muramatsu H. Application of next-generation sequencing on bone marrow failure and hematological diseases. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会**(2016年12月15日, 東京) .
    - 4) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Bone marrow transplantation for children with acquired bone marrow failure. **第39回日本造血細胞移植学会総会** (2017年3月3日, 松江) .
- 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診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

DBAバイオマーカーの解析  
DBAの診療ガイドラインの作成・疫学調査

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）  
研究協力者 檜澤大樹（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 助教）  
小倉浩美（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 非常勤講師）  
研究分担者 大賀正一（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 教授）

**研究要旨：**我々は今までに先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血；以下 DBA）患者における診断バイオマーカーとして赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）、還元型グルタチオン（GSH）の同時測定が有用であることを明らかにしてきた。今年度は新たに DBA 疑い 10 症例を解析し、Vlachos らにより提唱されている従来の診断基準との比較で、eADA/GSH 同時測定の有用性について検討した。10 症例のうち 1 歳未満は 3 例に過ぎないこと、必ずしも大球性貧血を呈さず正球性貧血を呈する例が多いこと、家族歴が認められる症例が 2 例のみだったこと、さらに全員 HbF 測定はしていないことなどから、古典的 / 非古典的 DBA の診断基準を満たしていた症例はそれぞれ 0/1 例に過ぎなかった。一方、網赤血球数減少・骨髄正形成・赤芽球減少を満たす 6 例のうち 5 例が eADA/GSH を用いた判別式で DBA と判定出来た。バイオマーカーの臨床的有用性を追試するために現在これらの症例の遺伝子検査を実施中である。

#### A．研究目的

DBA はリボソーム機能不全によって発症する先天性赤芽球癆である。我々は赤芽球 / 赤血球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臨床的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 が疑われる症例についてインフォームドコンセントを取得した上、末梢血を得た。血漿、白血球、血小板をセルロースカラムで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、265nm 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 を加え、412nm で測定した。

#### C．研究結果

【症例 1】1 歳 4 か月 女児  
身体的所見：特記すべき事はなし  
輸血歴：あり  
赤血球数 123 万/ $\mu$ L、Hb 3.3g/dL、Ht 9.7%、MCV 78.9fl、Retics 0.8%、WBC 13,900/ $\mu$ L、Plt 46.7 万/ $\mu$ L、末梢血の赤血球像：異常なし  
骨髄検査：Cellularity は正常で赤芽球の著明な減少を認めた (Myeloid 69.4%、Erythroid 0%、Ly 27.4% Blast 0.2%)。  
eADA 活性：0.79 IU/gHb、GSH：105.1mg/dL RBC により、判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  となり、DBA と判別した。

【症例2】1歳10か月 女児 DD双胎

身体的所見：カップ状耳介

輸血歴：あり（1回/2～3週）

赤血球数 117万/μL、Hb 3.3g/dL、Ht 10.2%、MCV87.2fl、Retics 0.2%、WBC 13,100/μL、Plt 63.1万/μLと正球性貧血および網赤血球数減少を認めた。

末梢血の赤血球像：異常なし

骨髄検査：Cellularityは正常で、赤芽球数の著明な減少を認めた。（Myeloid 77.2%、Erythroid 0.4%、Ly 19.6% Blast 0%）

eADA活性：0.80 IU/gHb、GSH：103.4mg/dL RBC  
本例は耳介異常、網赤血球数減少、赤芽球癆の骨髄所見を呈しており、非古典的DBAの診断基準を満たしていたが判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  となり、非DBAと判別された。輸血依存状態にあることから、正常赤血球由来のeADA/GSHにより判別結果に影響が出た可能性が示唆された。

【症例3】1か月 男児

身体的所見：特記すべき事なし

家族歴：あり

輸血歴：あり

赤血球数 160万/μL、Hb 6.6g/dL、Ht 19%、MCV 118.8fl、Retics 3.06%、WBC 10,040/μL、Plt 53.3万/μLと大球性貧血は認めたが、網赤血球数減少は認めなかった。

末梢血の赤血球像：大小不同、球状赤血球、破碎赤血球、有口赤血球と形態異常あり

骨髄検査：Cellularityは正常で、赤芽球癆の所見は認めなかった(Myeloid 19.5%、Erythroid 27.0%、Ly 53.5% Blast 4%)ため、DBAは否定的であった。多彩な赤血球形態異常が観察されたため、赤血球膜異常症の可能性が否定できなかった。

【症例4】2歳 男児

身体的所見：右第一指内側に余剰指

輸血歴：あり

赤血球数 122万/μL、Hb 4.7g/dL、Ht 14.5%、MCV 119fl、Retics 11.4%、WBC 8930/μL、Plt 19.1万/μLと網赤血球数の減少を認めなかった。

末梢血の赤血球像：なし

骨髄検査：Cellularityは低形成（Myeloid

36.0%、Erythroid 1.0%、Ly 59.2% Blast 0%）

eADA活性：1.74IU/gHb、GSH：86mg/dL RBC判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  となり、非DBAと判別した。本例については、骨髄像と末梢血中の網赤血球数との間に乖離が認められた。DBAにしばしば認められる母指奇形があることから、今後網赤血球数減少が認められることになった場合には、eADA/GSHの再検査が必要と考えられた。

【症例5】2歳 男児

身体的所見：特記すべき事なし

輸血歴：あり（9回/年）

赤血球数 160万/μL、Hb 4.4g/dL、Ht 13.5%、MCV 84.4fl、Retics 0.2%、WBC 9,500/μL、Plt 43.4万/μLと、正球性貧血および網赤血球数減少を認めた。末梢血の赤血球像：なし

骨髄検査：Cellularityは正常で、赤芽球減少を認めた(Myeloid 48%、Erythroid 4%、Ly 41% Blast 1%)、eADA活性：1.14IU/gHb、GSH：106mg/dL RBC判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  となり、DBAと判別した。

【症例6】4歳11か月 男児

身体的所見：左橈尺骨癒合症

輸血歴：あり

赤血球数 145万/μL、Hb 4.7g/dL、Ht 14.6%、MCV 100fl、Retics 2.8%、WBC 2100/μL、Plt 44万/μLと網赤血球数の減少を認めなかった。

末梢血の赤血球像：楕円赤血球が観察された。

骨髄検査：Cellularityは低形成（Myeloid 13%、Erythroid 14%、Ly 42% Blast 1%）で赤芽球癆の所見を呈しておらず、DBAは否定的であった。

【症例7】1歳6か月 男児

身体的所見：単純性血管腫を認めたが、耳介・母指異常などは認めなかった。

輸血歴：あり

家族歴：あり（DBA罹患者かどうかは不明）

赤血球数 93万/μL、Hb 2.3g/dL、Ht 7.0%、MCV 75.3fl、Retics 0.5%、WBC 6900/μL、Plt 42.1万/μLと、網赤血球数減少を伴うが小球性貧血であった。

末梢血の赤血球像：異常なし

骨髓検査：Cellularityは正常で赤芽球の著明な減少を認めた（Myeloid 15%, Erythroid 0%、Ly 44.0% Blast 0.2%）。

eADA活性：0.93IU/gHb、GSH：127mg/dL RBC  
判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  でDBAと判別した。

#### 【症例8】2か月 女児

身体的所見：特記すべき事はなし

輸血歴：あり

赤血球数 283万/ $\mu$ L、Hb 9.1g/dL、Ht 27.6%、MCV 97.5fl、Retics 0.004%、WBC 7730/ $\mu$ L、Plt 不明で、正球性～大球性貧血で、網赤血球数の著明な減少を認めた。末梢血の赤血球像：異常なし

骨髓検査：Cellularityは正常（その他詳細不明）

eADA活性：1.19IU/gHb、GSH：107mg/dL RBC  
血算・骨髓像などの情報が不完全であったが、判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  で、DBAと判別された。

#### 【症例9】5か月 女児

身体的所見：なし（胆汁排泄障害、眼底出血、胎児水腫）

輸血歴：あり（1回/10日）

赤血球数 266万/ $\mu$ L、Hb 7.6g/dL、Ht 22.4%、MCV 84.2fl、Retics 0.13%、WBC 6,400/ $\mu$ L、Plt 12.1万/ $\mu$ Lと、正球性貧血で網赤血球数は減少していた。末梢血の赤血球像：異常なし

骨髓検査：Cellularityは低形成で赤芽球減少を認めた（Myeloid 51.4%, Erythroid 0%、Ly 43.5% Blast 0%）。

eADA活性：1.32IU/gHb、GSH：101mg/dL RBC  
輸血後17日目の採血であったが、判別式  $1.2448 * eADA + 0.0893 * GSH - 10.3505 > 0$  でDBAと判別された。

#### 【症例10】1歳11か月 女児

身体的所見：完全房室中隔欠損症、腎動脈瘤、鎖骨下動脈異常完全房室ブロック、MS、臍胆管合流異常  
輸血歴：あり

赤血球数 319万/ $\mu$ L、Hb 9.4g/dL、Ht 29.8%、MCV 93.4fl、Retics 1.6%、WBC 5,900/ $\mu$ L、Plt 19.1万/ $\mu$ L、

と網赤血球数の減少を認めなかった。

末梢血の赤血球像：大小不同

骨髓検査：Cellularityは低形成（Myeloid 47.8%、Erythroid 20%、Ly 25.8% Blast 2.8%）だが、赤芽球癆の所見を呈しておらず、DBAは否定的であった。

## D. 考察

今年度は新たにDBA 疑い10症例を解析し、Vlachosらにより提唱されている従来の診断基準との比較で、eADA/GSH同時測定の有用性について検討した。

10症例のうち1歳未満は3例に過ぎないこと、必ずしも大球性貧血を呈さず正球性貧血を呈する例が多いこと、家族歴が認められる症例が2例のみだったこと、さらに全員HbF測定はしていないことなどから、古典的 / 非古典的DBAの診断基準を満たしていた症例はそれぞれ0/1例に過ぎなかった。一方、網赤血球数減少・骨髓正形成・赤芽球減少を満たす6例のうち5例がeADA/GSHを用いた判別式でDBAと判定出来た。非DBAと判定された症例2については頻回輸血症例であり、正常赤血球由来のeADA/GSHが影響した可能性が高い。

家族歴がなく、遺伝子検査結果が未着の場合、先天奇形の有無、網赤血球数減少 + 骨髓所見と2つのバイオマーカー測定結果を用いた判別式によってDBAを診断することになる。今回検討した10症例のうち、家族歴があるのは2例、先天奇形を有する症例は4例であり、従来のDBA診断基準で古典的 / 非古典的DBAと診断可能な例はそれぞれ0/1例であった。

注意すべき点として、末梢白血球数・血小板数が正常で、網赤血球数減少を伴う高度の貧血を有する症例において、骨髓細胞密度が「低形成」と記載されている例が散見された。診断基準としての「赤芽球前駆細胞の消失を伴う正形成骨髓所見を有する」の判定にはより慎重さが必要であると考えられ、将来的には骨髓細胞の表面マーカーを用いたより具体的な診断項目の設定が必要と考えられた。

また、今回はRP遺伝子異常の解析結果が揃わず、2つの大支持基準の一方が欠けていた上に、HbFの測定もほぼ全例で行われなかったため、非古典的DBAの診断基準の判定も困難であった。HbFについては年齢による基準値の変動や、測定の困難さもある。

り支持基準の1項目としての妥当性に問題があると考えられる。

## E . 結論

家族歴、現病歴、現症および末梢血・骨髓所見にeADA/GSH同時測定による判別式結果を加えて、DBAが早期に診断が可能になれば、遺伝子検査結果を待たず、治療方針を決定することが可能である。

今後臨床的にDBAは否定的と考えた症例を含めた10例のRP遺伝子解析の結果を統合し、詳細な臨床情報、骨髓所見等を基に、従来の診断基準に対する判別式の有用性を検討することが極めて重要と考えられた。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Utsugisawa T, Uchiyama T, Toki T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Erythrocyte glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. **Blood Cells Mol Dis**. 2016;59:31-36.
- 2) Ichimura T, Yoshida K, Okuno Y, Yujiri T, Nagai K, Nishi M, Shiraishi Y, Ueno H, Toki T, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Hara T, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Ito E, Ogawa S, Ohga S. Diagnostic challenge of Diamond-Blackfan anemia in mothers and children by whole-exome sequencing. **Int J Hematol**. 2016 Nov 23. [Epub ahead of print] PMID:27882484. DOI:10.1007/s12185-016-2151-7.
- 3) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanazaki R, Terui K, Kamio T, Kobayashi A, Fujita T, Sato-Otubo A, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene for Diamond Blackfan anemia. **Haematologica**. 2016 [Epub ahead of print] PMID:27909223. DOI: 10.3324/Haematol.2016.153932.
- 4) Imashuku S, Muramatsu H, Sugihara T, Okuno Y, Wang X, Yoshida K, Kato A, Kato K, Tatsumi Y, Hattori A, Kita S, Oe K, Sueyoshi A, Usui T, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanno H. PIEZO1 gene mutation in a Japanese family with hereditary high phosphatidylcholine hemolytic anemia and hemochromatosis-induced diabetes mellitus. **Int J Hematol**. 2016;104:125-9.
- 5) Arashiki N, Takakuwa Y, Mohandas N, Hale J, Yoshida K, Ogura H, Utsugisawa T, Ohga S, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanno H. ATP11C is a major flippase in human erythrocytes and its defect causes congenital hemolytic anemia. **Haematologica**. 2016;101:59-65.
- 6) Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Terui K, Yoshida K, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Ogawa S, Ito E. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-Blackfan anemia in Japan. **Int J Hematol**. 2016;103:112-4.
- 7) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Tanaka M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical Utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes. **Genet Med**. 2017 [Epub ahead of print] PMID:28102861. DOI:10.1038/gim.2016.197.
- 8) 小倉浩美, 菅野仁. 【貧血 実地医家に役立つ知識と診療の進めかた】セミナー臨床に役立つ知識と情報 溶血性貧血の鑑別診断の進め方. **Medical Practice** 2016;33(9):1387-91.
- 9) 大賀正一, 山城安啓, 菅野仁. 【貧血性疾患診療の進歩】先天性溶血性貧血の遺伝子診断. **血**

液内科 2016;73(2):149-154.

- 10) 新敷信人, 菅野仁, 高桑雄一. ヒト赤血球膜におけるフリッパーゼ分子の同定とリン脂質非対称性維持のメカニズム. **脂質生化学研究** 2016;58:72-3.
  - 11) 小倉浩美, 菅野仁. 【血球の増加と減少】赤血球 貧血 遺伝性貧血. **小児内科** 2016;48(7):1000-3.
  - 12) 小林博人, 菅野仁.  $\gamma\delta$ 型T細胞を用いた癌免疫療法. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(1):3-12.
2. 学会発表
- 1) 井島廣子, 古賀正史, 中村倫子, 松下文美, 坂本英美, 岩崎剛, 松本理恵, 陣内富男, 梶原敬三, 稗島州雄, 杉山正悟, 小倉浩美, 菅野仁, 陣内秀昭. HbA1cが偽性低値を示したエノラーゼ異常症の1例. **糖尿病** 2016;59(1):S-349.
  - 2) 小林博人, 稲田紹子, 菅野仁. 末梢血ガンマ・デルタ型T細胞の及ぼす腎癌予後への影響. **東京女子医科大学総合研究所紀要** 2016; 35:100-1.
  - 3) 北澤淳一, 田中朝志, 牧野茂義, 菅野仁, 高橋孝喜, 半田誠. 平成26年度血液管理及び実施体制と血液製剤使用実態調査報告 小規模施設に焦点を当てて(第3報). **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):417.
  - 4) 高源ゆみ, 緒方康貴, 小林博人, 菅野仁. 再生医療等安全性確保法に基づく細胞療法実施態勢の確立. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):407.
  - 5) 久保田友晶, 岡本好雄, 槍澤大樹, 小林博人, 菅野仁. 当院における手術準備血のT&S活用状況. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):393.
  - 6) 中林恭子, 松田和樹, 千野峰子, 岡本好雄, 槍澤大樹, 菅野仁. 低温保存した腹水・胸水の濾過濃縮再静注法(CART)の有効性を検討する臨床研究. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):353.
  - 7) 今野マユミ, 小出由美, 岡本好雄, 小野慎吾, 松田和樹, 久保田友晶, 守屋友美, 及川美幸, 千野峰子, 岡田真一, 中林恭子, 槍澤大樹, 小林博人, 菅野仁. 学会認定・臨床輸血看護師としての5年を振り返って. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):335.
  - 8) 北澤淳一, 田中朝志, 牧野茂義, 菅野仁, 高橋孝喜, 半田誠. 平成26年度血液管理及び実施体制と血液製剤使用実態調査報告 外来輸血に焦点を当てて. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):305.
  - 9) 北澤淳一, 田中朝志, 牧野茂義, 菅野仁, 高橋孝喜, 半田誠. 平成26年度血液管理及び実施体制と血液製剤使用実態調査報告 病院外での輸血に焦点を当てて. **日本輸血細胞治療学会誌** 2016;62(2):305.
  - 10) 大賀正一, 猪股裕紀洋, 菅野仁, 田村正徳, 八重樫伸生. 見過ごせないウイルス感染症ヒトパルボウイルス B19. **Pharma Medica** 2016;34(5):81-90.
  - 11) 谷諭美, 花谷あき, 佐原真澄, 松丸重人, 千葉幸英, 鶴田敏久, 菅野仁, 中館尚也, 永田智. 酸素親和性の上昇を認めた不安定ヘモグロビン症の1例. **日本小児科学会雑誌** 2016;120(1):98.
  - 12) Kohara H, Ogura H, Aoki T, Sakamoto C, Ogawa Y, Miyamoto S, Kanno H, Tani K. Generation and functional analysis of congenital dyserythropoietic anemia (CDA) patient-specific induced pluripotent stem Cells. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ).
  - 13) Utsugisawa T, Yamamoto T, Ogura H, Aoki T, Iwasaki T, Ondo Y, Kawakami T, Nakagawa S, Ozono S, Inada H, Kanno H. The novel missense mutation of GATA1 caused red cell adenosine deaminase overproduction associated with congenital hemolytic Anemia. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日, 米国・サンディエゴ).
  - 14) 岩崎拓也, 山本俊至, 村松秀城, 奥野友介, 佐藤裕子, 三井哲夫, 小野田正志, 矢野未央, 小松博史, 坂本謙一, 青木貴子, 岡本好雄, 槍澤大樹, 小倉浩美, 小島勢二, 菅野仁. 先天性溶血性貧血の診断におけるターゲットシーケンシングの有用性. **第78回日本血液学会学術集会** (2016年10月14日, 横浜).

- 15) Kanno H, Utsugisawa T, Ogura H.  
Next-generation sequencing in diagnosis of  
congenital hemolytic anemia. **the 5th TSH  
International Symposium Red Cell Disorders:  
From Bench to Bedside** (2016年5月20-22日,  
タイ・バンコク) .
- 16) Kanno H, Utsugisawa T, Ogura H. Congenital  
hemolytic anemia due to red cell  
enzymopathies. **the 5th TSH International  
Symposium Red Cell Disorders: From Bench  
to Bedside** (2016年5月20-22日, タイ・バン  
コク) .

**G . 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

## 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：**主に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）患者と関連病態の疫学調査に資するため、FA の既知遺伝子の解析を進めてきた。従来のエクソーム解析で不明例とされたものをさらに解析したところ、その多くは、既知遺伝子のシノニマス変異でスプライシング異常を引き起こすものであった。今後の疫学・分子診断において重要な知見と思われた。

### 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、临床上末梢血リンパ球の染色体断裂検査が有用と考えられる。

しかし、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。遺伝子診断は、これらの症例に確実な診断をもたらす、その有用性が期待される。また、FAは、遺伝子の違いによって、その病態が微妙に異なる可能性が考えられ、きちんとした疫学的調査や診療ガイドライン策定においても、原因遺伝子を確定させるべく症例ごとに遺伝子診断を積み重ねていくことが重要と考えられる。

今年度は、従来の検討で原因遺伝子が不明であった症例をゲノムシーケンスやRNAシーケンスで追求し、その多くにおいて確定できたので報告する。

### 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及びRNAを分離し、名古屋大学小島教授のグループ、京大小川教授のグループと共同で全ゲノム

シーケンス、RNAシーケンスを施行し、従来のエクソームのデータを含めて見直しを行った。

（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。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

全ゲノムシーケンス、RNAシーケンスを行うことで、従来の未解決症例の多くは、既知遺伝子のスプライシング異常によりFAを発症していることが明らかとなった。

まず、症例Aであるが、全ゲノムシーケンスによって *FANCL* 遺伝子（NM\_018062）に、c.G1092A:pK369K をhomozygousで検出した。この変異はcoding内のシノニマス変異であり、エクソームでも捕まっていたが、見逃しており再度の全ゲノムシーケンス等の施行によって見直すことで変異の同定に至った。この変異はエクソン12の端にあり、スプライシングに影響してエクソン13をスキップさせる効果がRT-PCRで確認された。この部分は、E3リガーゼであるFANCLのリングドメインの主要部分を含んでおり、FANCLの機能を消失させると判断できる。同じ変異は、すでにBlood 121: 138, 2013で

報告されている。

次に、症例Bであるが、この症例は全ゲノムシーケンスで、FANCC NM\_001243743 c. 1154+5G>A homozygousが確認された。この変異は、エクソ-イントロンのジャンクションから5bpイントロンに入った部位の変異で、エクソン12と13の間のイントロンがスプライスされず、そのためにpremature stop codonが現れることが確認された。我々の一連の解析での初めてのFANCC症例である。

症例Cは、RNAシーケンスによりFANCB遺伝子のエクソン7のスキッピングが確認され、エクソーム解析データを見直すと、対応してc.G1497T:p.L499Lのシノニマス変異がエクソ-イントロンのジャンクションに発見された。

症例Dは、RNAシーケンスによってPALB2/FANCN遺伝子のエクソン12のスキッピングが発見され、対応してc.3350+5C>T homozygousが見出された。既報のFANCB変異症例における臨床所見と一致して、この症例は小児がんを発症するなど、重症と判断された。

症例Eは、エクソーム解析で、FANCI遺伝子のc.158-2A>G heterozygous、c.G288A, p.E96E heterozygousを見出した。前者はイントロンの変異、後者はシノニマス変異であり、共にスプライスの異常を引き起こしていた。

症例Fは、FANCI遺伝子のc.3346\_3347insT hetero、c.2826+3A>G heteroであり、前者はフレームシフトだが、後者はやはりスプライス異常であった。

以上の解析によって、未解決と考えていた症例9例中、6例において原因遺伝子が確定した。

## D . 考察

従来施行したエクソーム解析は、多くのFA症例で原因遺伝子を確定させる非常にパワフルな方法だが、それでも一部に未解決症例が残っていた。今回の解析で、RNAシーケンスなどによってスプライス異常などに気付くことができた。結果としては、見逃されていたシノニマス変異、スプライスサイト変異によることが多く、今後の解析において教訓を与えるものとなった。

## E . 結論

東海大矢部みはる、矢部普正博士らが収集されたFA症例において、従来新規のFA遺伝子FANCTを見出したが、その後の追加解析で、エクソーム解析後の未解決症例は、多くが既知遺伝子の変異見逃しによるものであることが判明した。今後の疫学・分子診断において重要な知見と思われた。これらの知見は矢部博士らと作成した診療ガイドライン作成の基盤となるものである。もう数例は未解決であり、今後も解決へ向けて努力を継続する。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, and Kojima S. Clinical Utility of Next-generation Sequencing for Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. **Genet Med.** 2017 Jan 19. doi: 10.1038/gim.2016.197.
- 2) Ling C, Huang J, Yan Z, Li Y, Ohzeki M, Ishiai M, Xu D, Takata M, Seidman M, and Wang W. Bloom syndrome complex promotes FANCM recruitment to stalled replication forks and facilitates both repair and traverse of DNA interstrand crosslinks. **Cell Discov.** 2016 Dec 20;2:16047. doi: 10.1038/celldisc.2016.47.
- 3) Tian X, Patel K, Ridpath JR, Chen Y, Zhou YH, Neo D, Clement J, Takata M, Takeda S, Sale J, Wright FA, Swenberg JA, Nakamura J. Homologous recombination and translesion DNA synthesis play critical roles on tolerating DNA damage caused by trace levels of hexavalent chromium. **pLOSOne** 2016 Dec 1;11(12):e0167503.

- 4) Sato K, Shimomuki M, Katsuki Y, Takahashi D, Kobayashi W, Ishiai M, Miyoshi H, Takata M, Kurumizaka H. FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex by binding RAD51 and protects the 5'-DNA end. **Nucleic Acids Res.** 2016 Sep 30. pii: gkw876. PMID: 27694619.
- 5) Katsuki Y, Takata M. Defects in HR repair behind the human diseases: FA and HBOC. **Endocr Relat Cancer.** 2016 Oct;23(10): T19-37.
- 6) Hashimoto K, Sharma V, Sasanuma H, Tian X, Takata M, Takeda S, Swenberg J and Nakamura J. Poor recognition of O6-isopropyl dG by MGMT triggers double strand break-mediated cell death and micronucleus induction in FANCD1-deficient cells. **Oncotarget** 2016 Jul 29. doi: 10.18632/oncotarget.10928. [Epub ahead of print]
- 7) Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Matsuo K, Hira A, Takata M. The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi Anaemia infants is influenced by patient, but not maternal ALDH2 genotype. **Br J Haematol.** 2016 Nov;175(3):457-461. doi: 10.1111/bjh.14243.
2. 学会発表
- 1) Takata M. Pathogenesis of Fanconi anemia: an update. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON "REVOLUTION OF LABORATORY MEDICINE IN MODERN BIOLOGY"** (招待講演)(2017年2月15-17日, ムンバイ).
- 2) 高田 穰. 新規ファンコニ貧血原因遺伝子である RFWD3/FANCD1の相同組換え修復における役割の解明. **第8回群馬大学 Genome Damage Discussion Group セミナー** (招待講演)(2016年12月21日, 前橋).
- 3) Takata M. "Genetic basis for childhood bone marrow failure and malignancies" A novel Fanconi anemia gene regulates ICL repair and homologous recombination. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム** (招待講演)(2016年12月15-17日, 東京).
- 4) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 勝木陽子, 石合正道, 中田慎一郎, 胡桃坂仁志, 高田 穰. 新規ファンコニ貧血遺伝子RFWD3による相同組換え修復制御メカニズム. **九州大学薬学部・藤田雅俊研究室研究セミナー** (招待講演).
- 5) Inano S, Sato K, Knies K, Katsuki Y, Nakada S, Takaori-Kondo A, Ishiai M, Schindler D, Kurumizaka H, Takata M. Novel Fanconi anemia E3 ligase RFWD3 promotes removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites during ICL repair. **28th Annual Fanconi Anemia research frund Scientific Symposium.** (September 15-18 2016, Bellevue, WA USA).
- 6) Yabe M, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Shimizu T, Takakura H, Koh K, Ito E, Kojima S, Hira A, Takata M and Yabe H. Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in Japanese Fanconi anemia patients. **28th Annual Fanconi Anemia research frund Scientific Symposium.** (September 15-18 2016, Bellevue, WA USA).
- 7) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 勝木陽子, 石合正道, 中田慎一郎, 胡桃坂仁志, 高田 穰. 相同組換えにおけるRPAおよびRAD51の動態制御はRFWD3によるユビキチン化に依存する. **第75回日本癌学会学術総会 シンポジウム18 がんにおける染色体・ゲノム不安定性の分子基盤** (2016年10月6-8日, 横浜).
- 8) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 勝木陽子, 中田慎一郎, 石合正道, 胡桃坂仁志, 高田 穰. An E3 ligase RFWD3 is a critical component that facilitates RPA and RAD51 dynamics in homologous recombination. **放射線・ゲノムストレスに対抗する多彩な生命システムの解明に向けて. 放射線影響学会第59回大会 (ワークショップ)** (招待講演)(2016年10月26日, 広島).
- 9) 石合正道. **放射線・ゲノムストレスに対抗する多彩な生命システムの解明に向けて. 放射線影**

**響学会第59回大会（ワークショップ）**（2016年10月26日，広島）。

- 10) 田部井由依，大橋由佳，坂本裕貴，小摩木里奈，穀田哲也，勅使河原愛，飯島健太，高田穰，小松賢志，田内広．損傷応答キナーゼ活性が相同組換え修復に与える影響．**放射線影響学会第59回大会**（2016年10月26-28日，広島）。

**G . 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

DBAの遺伝子型、臨床像および治療反応性に関する研究

研究分担者 大賀正一（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 教授）  
研究協力者 市村卓也（山口大学大学院医学系研究科小児科学 助教）  
石村匡崇（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 助教）  
江口克秀（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 臨床助教）  
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：**先天性骨髄不全症に対する診療指針を確立するため、新生児から乳児期早期に貧血または汎血球減少を来す症例を集積し、その遺伝子型、表現型および治療反応性について検討した。汎血球減少と免疫不全症を呈した新生児2例のうち奇形徴候のない例は Ikaros 欠損症と確定診断することができた。Diamond-Blackfan 貧血（DBA）の3家系6名は赤血球酵素活性スクリーニングの解釈が困難であったが、全エクソーム解析を用いて診断を確定することができた。輸血依存の DBA2 例に根治療法として造血細胞移植を行い、その時期と方法を検討中である。奇形徴候がなく輸血依存となる重症型 DBA は診断が困難であるのみならず、造血細胞移植の生着不全あるいは臓器障害のリスクも高い。新生児・乳児期に発症する先天性造血障害の病因は多彩であり、Clinical Sequencing の導入、造血細胞移植療法の確立および遺伝子治療開発を行うために疾患ごとの症例集積が重要である。

**A . 研究目的**

新生児は溶血と無効造血の鑑別が難しく、造血不全症の確定診断が難しい。先天性造血不全症には、貧血を主徴とするDiamond-Blackfan貧血（DBA）と汎血球減少に至る多彩で稀少な遺伝性造血不全症がある。いずれの患児もしばしば奇形徴候を有し、TORCHなどの胎児感染症との鑑別も問題となる。新生児期発症の貧血と汎血球減少例の効率的診断法と治療に関して検討した。

**B . 研究方法**

新生児から乳児期早期にかけて貧血または汎血球減少を呈した症例を対象に、汎血球減少群と単一血球減少群に分けて骨髄像を検討し、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]）（菅野研）、hemoglobin遺伝子解析（山城・服部研）、Sanger

法などによるRibosome蛋白（RP）遺伝子解析（伊藤研）を行った。未確定診断例には、可能な限り家族も含め、Illumina社HiSeq2000シーケンサーを用いた全エクソーム解析（小島・小川/吉田研）を実施した。

造血細胞移植は、DBAではステロイドおよびシクロスポリン療法が奏効せず輸血依存となった例に対して、また他の遺伝性骨髄不全症では感染と出血によるリスクが高い例をその適応とした。稀少疾患で十分な疫学調査による情報がない疾患に対しては、症例報告を集積してその情報から生存曲線を推定することにより、移植時期と方法を決定する資料とした。本人と保護者に十分な説明を行った上、同意を得て造血細胞移植の施行を決定した。

（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) 汎血球減少と免疫不全症の新生児

奇形徴候のない35週の低出生体重男児。出生時より汎血球減少とB細胞欠損を認め、3生日に頭蓋内出血を来した。輸血依存から次第に回復し、約半年で貧血は完全回復した。表現型から全エクソーム解析を行わずにIKZF1変異(ヘテロ)を同定して、他のB細胞欠損型Ikaros欠損症とともに報告した(論文1)。本患児と同じ変異は過去に1例のみ報告されているが、汎血球減少のため造血細胞移植を受け死亡している(Pediatr Blood Cancer. 2012;58(4):591-7)。一方、私たちの患児の兄も同じ変異を有したが、これまでに貧血など造血不全症の兆候はない。この遺伝子型と表現型の乖離についてさらに解析中である。胎児水腫、牛眼に汎血球減少、進行性肝不全を合併した極低出生体重児の女兒は非血縁臍帯血移植にてsplit chimeraを確立したが肝不全で死亡した。現在、網羅的遺伝子解析を進めている。

### 2) 新生児貧血例の家系解析と造血細胞移植

DBA疑いの非血縁3家系の母から出生した児の貧血を診断するために、母子に赤血球酵素スクリーニングを行ったが、輸血依存などによる影響のためか判別は困難であった。全エクソーム解析を行って、1家系母と2家系母子に既知RP遺伝子変異を同定することができた(論文2)。

RPS19変異を同定した輸血依存の3例に対しては除鉄も不良のため、Target BU法を用いて前処置の強度を低減した造血細胞移植を行った。1例は非血縁骨髄が生着、もう1例は非血縁骨髄が生着不全となったあと非血縁臍帯血が完全生着、残りの1例は非血縁骨髄を行ったところである。

## D . 考察

先天性造血不全症は新生児期から貧血を主徴とするDBAと免疫不全症を合併する汎血球減少に分けて診断と治療を進めることが重要である。今回、ターゲットシーケンスと全エクソーム解析を行う前に、詳細な表現型と家族歴を評価することにより、遺伝子診断を確定することのできた例を経験した。一方、

貧血外症状に乏しい輸血依存DBAの診断には全エクソーム解析が有用であった。治療法の選択に関しては、さらなる症例の集積が必要である。

## E . 結論

先天性造血不全症の診断には、症候分類による効率的スクリーニングと全エクソーム解析を用いたClinical sequencingの有用性が期待される。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Nakamura H, Kamizono J, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Ueno H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T & Kanegane H. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in humans with germline IKZF1 mutations. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Dec 1. pii: S0091-6749(16)31273-8.
- Ichimura T, Yoshida K, Yosuke O, Yujiri T, Nagai K, Nishi M, Shiraishi Y, Hiroo U, Toki T, Azuma Y, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Ogawa S, Tanizawa Y, Hara T, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Ito E, Ogawa S, Ohga S. Diagnostic challenge of Diamond-Blackfan anemia in mothers and children by whole-exome sequencing. *Int J Hematol*. 2017 Apr;105(4):515-20.
- Narumi S, Amano N, Ishii T, Katsumata N, Muroya K, Adachi M, Toyoshima K, Tanaka Y, Fukuzawa R, Miyako K, Kinjo S, Ohga S, Ihara K, Inoue H, Kinjo T, Hara T, Kohno M, Yamada S, Urano H, Kitagawa Y, Tsugawa K, Higa A, Miyawaki M, Okutani T, Kizaki Z, Hamada H, Kihara M, Shiga K, Yamaguchi T, Kenmochi M, Kitajima H, Fukami M, Shimizu A, Kudoh J, Shibata S, Okano H, Miyake N, Matsumoto N, Hasegawa T. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder

(MIRAGE syndrome) and are associated with loss of chromosome 7. **Nature Genetics** 2016 Jul;48(7):792-7.

- 4) Utsugisawa T, Uchiyama T, Toki T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Erythrocyte Reduced Glutathione is a Novel Biomarker of Diamond-Blackfan Anemia. **Blood Cell Mol Dis.** 2016 Jul;59:31-6.
- 5) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanazaki R, Terui K, Kamio T, Kobayashi A, Fujita T, Sato-Otsubo A, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia. **Haematologica.** 2017 Mar;102(3):e93-6.
- 6) Ohga S. Genetic diagnosis for congenital hemolytic anemia. **Rinsho Ketsueki** 2016;57(10):1908-12.
- 7) 大賀正一, 山城安啓, 菅野仁. 特集 貧血性疾患診療の進歩. 先天性溶血性貧血の遺伝子診断. **血液内科** 2016;73(2):1-6.
- 8) 市村卓也, 大賀正一. 原発性免疫不全症候群 5.免疫調節不全症 (1)家族性血球貪食性リンパ組織球 (FHL) 症候群 Perforin欠損症 (FHL2). **日本臨床別冊「免疫症候群(第2版) - その他の免疫疾患を含めて」** 日本臨牀社 2016. (印刷中)
- 9) 市村卓也, 大賀正一. 原発性免疫不全症候群 5.免疫調節不全症 (1)家族性血球貪食性リンパ組織球 (FHL) 症候群. **UNC13D/Munc13-4欠損症 (FHL3) . 日本臨床別冊「免疫症候群(第2版) - その他の免疫疾患を含めて」** 日本臨牀社 2016. (印刷中)

## 2. 学会発表

- 1) 江見咲栄, 太田陽香, 河本知恵, 大西佑治, 木村献, 東良紘, 市村卓也, 工藤敬子, 高橋一雅, 楠田剛, 福永真之介, 今井耕輔, 金兼弘和, 大

賀正一. 汎血球減少が自然軽快したikaros欠損症の新生児. **第26回日本産婦人科・新生児血液学会** (2016年7月1-2日, 長崎).

- 2) 市村卓也, 江見咲栄, 東良紘, 飯田恵庸, 太田陽香, 河本友恵, 木村献, 高橋一雅, 楠田剛, 星野顕宏, 金兼弘和, 長谷川俊史, 大賀正一. 造血および免疫不全が自然寛解したIkaros欠損症の新生児例. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月15日-17日, 東京).
- 3) 大賀正一. 先天性溶血性貧血における遺伝子診断. **第78回日本血液学会 (教育講演40)** (2016年10月14日, 横浜).
- 4) 大賀正一. 先天性血液疾患の遺伝子診断~溶血性貧血と血栓症~. **第17回日本検査血液学会学術集会 (ランチョンセミナー13)** (2016年8月7日, 福岡).

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

先天性骨髄不全症の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。これまで日本小児血液・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一次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 から 2015 年に診断されて登録された 945 例の造血障害症例から、新規診断 Diamond-Blackfan 貧血症例は 88 例、特発性赤芽球癆は 48 例であった。また、2008 年から 2015 年の期間の鉄芽球性貧血は 6 例、Congenital dyserythropoietic anemia は 3 例であった。

### 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。日本小児血液・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。日本小児血液学会（現 日本小児血液・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。日本小児血液・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、日本小児血液・がん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 から 2015 年診断登録症例数を表に示す（表）。  
a．疾患登録（一次調査）症例：2015 年診断症例は日本小児血液・がん学会会員 239 施設の 66%に相当する 158 施設が登録した。2013 年登録から登録施設が減少傾向にあるが、総患者数に大きな変化はなく、診療集約化が予想される。表に挙げた溶血性貧血を除く特発性再生不良性貧血（Idiopathic AA）から先天性血小板減少症（Cong. Thrombocytopenia）までの 14 の造血障害疾患 10 年間では総計 945 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。学会登録は診断から遅れて 3 年までは登録を受け付けるために、2014 年と 2015 年診断例がやや少なくなっている。造血障害の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 10 年間で 88 例、これとは別に特発性赤芽球癆 48 例が登録された。2 疾患の確定診断については精査する必要がある。

c. 2008年から2015年の期間の鉄芽球性貧血は6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2016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。

#### 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。遺伝子診断が可能な疾患については、中央診断から促されて遺伝し確定診断症例が増加している。

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）データベース構築による系統的な解析が必要である。

#### 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

##### 1. 論文発表

- 1) Nishikawa E, Yagasaki H, Hama A, Yabe H, Ohara A, Kosaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe K-I, Yoshida N, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Long-term outcomes of 95 children with moderate aplastic anemia treated with horse antithymocyte globulin and cyclosporine. **Pediatric Blood and Cancer**. 2016. doi :10.1002/pbc.26305.
- 2) Utsugisawa T, Uchiyama T, Toki T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Erythrocyte glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. **Blood Cells**

**Mol Dis**. 2016;59:31-36.

- 3) Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Terui K, Yoshida K, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Ogawa S, Ito E. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-Blackfan anemia in Japan. **Int J Hematol**. 2016;103:112-114.

##### 2. 学会発表

研究期間に本研究に関連する学会筆頭演者発表はない。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 .

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	216 / 239	219 / 242	212 / 230	171 / 232	158 / 239
( % )	83%	88%	90%	90%	90.3%	90.4%	90.5%	92%	74%	66%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	62	49	58	41	47
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5	11	3	4	5
AA / PNH	2	1	1	0	1	0	0	0	0	•
PNH	No data	•	•	•	•	•	•	0	3	0
Fanconi Anemia	5	4	6	1	4	2	6	6	3	4
Diamond-Blackfan	9	6	9	10	6	9	6	11	10	12
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6	6	1	5
Schwachman-Diamond	0	1	1	2	0	0	2	2	0	2
Cong. Dyserythropoietic anemia	No data	No data	1	0	0	1	0	0	1	0
Sideroblastic anemia	No data	No data	2	1	1	0	1	0	1	0
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4	1	2	1
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	5	3	0	•
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1
Cong. Thrombocytopenia							12	11	19	11
Cong. Spherocytosis	No data	•	•	•	54	49	26	48	43	55
Cong. Elliptocytosis	No data	•	•	•	2	1	1	2	1	0
G6PD deficiency	No data	•	•	•	5	5	3	3	6	7
PK deficiency	No data	•	•	•	0	0	0	0	0	3
other erythrocyte enzyme def.	No data	•	•	•	2	0	0	0	0	2
Sickel cell disease	No data	•	•	•	1	1	0	1	1	0
Unstable hemoglobinopathy	No data	•	•	•	1	0	0	0	1	4
Thalasemia	No data	•	•	•	18	16	11	8	10	11
other hemoglobinopathy	No data	•	•	•	0	0	0	1	0	1

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

DBAの遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 照井君典（弘前大学大学院医学研究科小児科学 准教授）

**研究要旨：** Diamond Blackfan 貧血 (DBA) は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として 15 種類のリボソームタンパク (RP) 遺伝子と *GATA1* 遺伝子が同定されている。しかし、我が国の DBA 患者の約半数は原因遺伝子が不明である。本年度も日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行い、臨床的に Diamond-Blackfan 貧血と診断された 27 例中 10 例 (37%) に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに 180 例の DBA の臨床情報と検体の収集および遺伝子解析を行い、103 例 (57.2%) に原因となる RP 遺伝子変異を見出した。この中には、我々が見出した新規原因遺伝子 *RPL27*, *RPS27* 及び *RPS15A* が含まれている。これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS 委員会と連携を取りながらエビデンスに基づいた診断基準および診断・治療ガイドラインの小改訂を行った。

## A . 研究目的

Blackfan貧血 (DBA) は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として15種類のリボソームタンパク (RP) 遺伝子と *GATA1* 遺伝子が同定されているが、我が国のDBA患者の約半数は原因遺伝子が不明である。また、遺伝子診断により臨床的な診断が誤りであった症例が複数存在することが明らかとなった。本研究の目的は、これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行うことである。初年度(平成28年度)は、遺伝子診断の結果も含む精度の高い先天性造血不全のデータベースの作成を進め、診療ガイドラインの小改訂を行った。平成29年度以降は、データ収集と観察研究を継続し、正確な先天性造血不全の実態把握を行い、より精度の高い疾患データベースの確立とエビデンスに基づいた診断基準、重症度分類と診療ガイドラインの改訂を行う。

## B . 研究方法

最初に、DBAで遺伝子変異が報告されている12種

類のRP遺伝子 (*RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPS27*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL26*, *RPL27*, *RPL35a*) と *GATA1* 遺伝子について、次世代シーケンサー (MiSeq) を用いてターゲットシーケンスを行った。次に、定量的PCR法とSNPアレイ法によりRP遺伝子の欠失を解析した。

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

(倫理面への配慮)

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

## C . 研究結果

新規症例27名の遺伝子診断を行い、10例 (*RPS19* 4例、*RPS26* 3例、*RPS7* 2例、*RPL5* 1例) で既知の原因遺伝子を同定した。これまでに遺伝子検査を施行した症例は180例となった。ターゲットシー

ケンスで原因遺伝子が不明で、かつSNPアレイで解析してもRP遺伝子の欠失が検出されない、14家系（非罹患家族も含む）について、全エクソン解析を行った。今回の解析では、DBA以外の先天性造血不全症の原因遺伝子は同定されなかった。これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながらエビデンスに基づいた診断基準および診断・治療ガイドラインの小改訂を行った。これらの成果物を日本小児血液・がん学会の承認を受けて学会公認の診療ガイドラインとする予定である。既に、DBAと共に他の7疾患の診療ガイドラインの改訂版を日本小児血液・がん学会の認定を受けるために、診断ガイドライン委員会に提出した。なお、「2017年度版診療ガイドライン」は日本小児血液・がん学会の認証を受けた後、同学会の編集書籍として2017年度中に出版する予定である。専門医だけでなく一般小児科医をも読者対象とした実践的な内容とした。

#### D . 考察

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

本研究事業とAMEDの「稀少小児遺伝性血液疾患研究班」（小島班）の連携研究により、新規原因候補遺伝子 *RPS15A* を見出した。本年度は、AMED-DBA研究班（伊藤班）との連携により、*RPS15A*の機能解析をゼブラフィッシュや赤芽球細胞株を用いた系で行い、DBAの原因遺伝子であることを確定し、*RPL27*, *RPS27*に次いで、我が国から新規に発見された3番目の原因遺伝子として報告した（Ikeda F et al, *Haematologica* 2016）。

平成28年度は、疾患ガイドラインの改訂にあたり、予め出版社とも協議し、日本小児血液・がん学会編集の書籍として出版することを念頭に改訂作業を行った。最新のデータを含みながらより分かりやすい内容であり、専門医だけでなく一般小児科医の啓蒙活動にも大きく役立つことが期待される。

#### E . 結論

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

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsuo H, Shiga S, Imai T, Kamikubo Y, Toki T, Terui K, Ito E, Adachi S. Purification of leukemic blast cells from blood smears using laser microdissection. *Int J Hematol*. 2017. [Epub ahead of print]
- 2) Moritake H, Tanaka S, Nakayama H, Miyamura T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Saito A, Shiba N, Hayashi Y, Tomizawa D, Taga T, Goto H, Hasegawa D, Horibe K, Mizutani S, Adachi S. Outcome of relapsed core binding factor acute myeloid leukemia in children: A result from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05R study. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Feb 24. [Epub ahead of print]
- 3) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanazaki R, Terui K, Kamio T, Kobayashi A, Fujita T, Sato-Otsubo A, Shiraiishi Y, Tanaka H, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E. Exome sequencing identified *RPS15A* as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica*. 2017;102(3):e93-e96.
- 4) Kobayashi R, Mitsui T, Fujita N, Osumi T, Aoki T, Aoki K, Suzuki R, Fukuda T, Miyamoto T, Kato K, Nakamae H, Goto H, Eto T, Inoue M, Mori T, Terui K, Onizuka M, Koh K, Koga Y, Ichinohe T, Sawada A, Atsuta Y, Suzumiya J. Outcome differences between children and adolescents and young adults with non-Hodgkin lymphoma following stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2017; 105:

- 369-76.
- 5) Hiyama TY, Utsunomiya AN, Matsumoto M, Fujikawa A, Lin CH, Hara K, Kagawa R, Okada S, Kobayashi M, Ishikawa M, Anzo M, Cho H, Takayasu S, Nigawara T, Daimon M, Sato T, Terui K, Ito E, Noda M. Adipsic Hypernatremia Without Hypothalamic Lesions Accompanied by Autoantibodies to Subfornical Organ. **Brain Pathol** 2017; 27: 323-31.
  - 6) Ikeda F, Toki T, Kanazaki R, Terui K, Yoshida K, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Ogawa S, Ito E. ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-Blackfan anemia in Japan. **Int J Hematol** 2016; 103: 112-4.
  - 7) Shiba N, Yoshida K, Shiraishi Y, Okuno Y, Yamato G, Hara Y, Nagata Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Kato M, Park Mj, Ohki K, Shimada A, Takita J, Tomizawa D, Kudo K, Arakawa H, Adachi S, Taga T, Tawa A, Ito E, Horibe K, Sanada M, Miyano S, Ogawa S, Hayashi Y. Whole-exome sequencing reveals the spectrum of gene mutations and the clonal evolution patterns in paediatric acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol.** 2016; 175(3):476-489.
  - 8) Ogasawara S, Saito N, Itoga M, Kushibiki M, Nakata R, Ohta E, Fujita E, Kojima K, Terui K, Ito E, Kayaba H. Spurious thrombocytosis caused by tumor cell lysis in a patient with acute monocytic leukemia. **Clin Lab.** 2016; 62: 1575-7.
  - 9) Miura R, Yokoyama Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H, Kurose A, Tsuruga K, Sasaki S, Terui K, Ito E. Dysgerminoma developing from an ectopic ovary in a patient with WAGR syndrome: A case report. **Mol Clin Oncol** 2016; 5: 503-6.
  - 10) Takahashi H, Watanabe T, Kinoshita A, Yuza Y, Moritake H, Terui K, Iwamoto S, Nakayama H, Shimada A, Kudo K, Taki T, Yabe M, Matsushita H, Yamashita Y, Koike K, Ogawa A, Kosaka Y, Tomizawa D, Taga T, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Miyachi H, Tawa A, Adachi S. High event-free survival rate with minimum-dose-anthracycline treatment in childhood acute promyelocytic leukaemia: a nationwide prospective study by the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group. **Br J Haematol** 2016; 174: 437-43.
  - 11) Umeda K, Adachi S, Horikoshi Y, Imai K, Terui K, Endo M, Mitsui T, Kato K, Koh K, Kajiwara R, Ito R, Otsuka Y, Inoue M, Ishii E, Yabe H. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Chediak-Higashi syndrome. **Pediatr Transplant** 2016; 20: 271-5.
  - 12) Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Goto H, Koh K, Saito AM, Horibe K, Nakahata T, Tawa A, Adachi S. Preserved High Probability of Overall Survival with Significant Reduction of Chemotherapy for Myeloid Leukemia in Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study in Japan. **Pediatr Blood Cancer** 2016; 63: 248-54.
  - 13) 伊藤悦朗, 土岐力, 照井君典. Down症候群. 白血病学(上) 最新の基礎・臨床研究. **日本臨床増刊号** 2016;74:97-102.
  - 14) 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗. 一過性異常骨髄増殖症. 小児疾患診療のための病態生理3. **小児内科増刊号** 2016;48:953-6.
  - 15) 照井君典, 伊藤悦朗. ダウン症に伴う急性巨核芽球性白血病の分子的理解と臨床応用. **血液フロンティア** 2016;26:1533-40.
  - 16) 伊藤悦朗, 土岐力, 照井君典. 遺伝性骨髄不全症研究の最近の進歩. **臨床血液** 2016;57:882-90.
  - 17) 新居敏, 藤野寿典, 赤澤嶺, 田尻雄二郎, 高野良彦, 巽亜子, 中道恵里那, 内藤拓人, 安西香織, 杉田亮, 竹川麻衣, 野村安隆, 肥田晋矢, 坂本晴子, 葭井操雄, 土岐力, 照井君典, 伊藤悦朗, 住本真一. 感染を契機に診断に至った

RPL11の遺伝子変異陽性Diamond-Blackfan anemiaの11歳男児例．小児科臨床 2016;69:1416-20.

- 18) 照井君典，伊藤悦朗．小児急性巨核芽球性白血病の生物学的特性．血液内科 2016;72:737-42.

## 2. 学会発表

### 国際学会

- 1) Ito E, Yoshida K, Toki T, Saida S, Watanabe K, Nakamura M, Terui K, Nakahata T, Miyano S, Watanabe A, Ogawa S. Genetic and Epigenetic Alterations in Acute Megakaryoblastic Leukemia in Down Syndrome. **Fifth JCA-AACR Special Joint Conference -The Latest Advances in Hematological Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics**(招待講演) (2016年7月15日，千葉) .
- 2) Terui K, Toki T, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Park MJ, Iwamoto S, Taga T, Yanagisawa R, Koh K, M. Saito A, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Watanabe K, Ito E. Analysis of *GATA1* mutations in Down syndrome infants with transient abnormal myelopoiesis and clinical impacts of *GATA1* mutation types: A report from the JPLSG TAM-10 study. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日，米国・サンディエゴ) .
- 3) Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Gene expression profiles and methylation analysis in Down syndrome related acute lymphoblastic leukemia. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日，米国・サンディエゴ) .
- 4) Miyamura T, Tanaka S, Nakayama H, Moritake H, Tomizawa D, Saito A, Tawa A, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Morimoto T, Hayashi Y, Horibe K, Mizutani S, Taga T and Adachi S. Clinical and Biological Features of

Pediatric Acute Myeloid Leukemia with Primary Induction Failure in the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05 Study. **58th Annual Meeting & Exposition** (2016年12月3-6日，米国・サンディエゴ) .

### 国内学会

- 1) Kanezaki R, Toki T, Terui K, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Sato T, Ikeda F, Ito E . Dysegregation of *KIT* expression by GATA1s in TAM and acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome. **第78回日本血液学会学術集会** (2016年10月15日，横浜) .
- 2) Kubota Y, Uryu K, Kawai T, Ito T, Hanada I, Toki T, Seki M, Yoshida K, Sato Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. DNA methylation analysis in acute lymphoblastic leukemia of Down syndrome. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月15日，東京) .
- 3) 照井君典，土岐力，濱麻人，村松秀城，長谷川大輔，朴明子，岩本彰太郎，多賀崇，柳澤龍，康勝好，林泰秀，足立壯一，水谷修紀，渡邊健一郎，伊藤悦朗．一過性異常骨髄増殖症におけるGATA1遺伝子変異JPLSG TAM-10登録症例の解析(GATA1 mutation status in infants with transient abnormal myelopoiesis: A report from the JPLSG TAM-10 study). **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月15日，東京) .

## G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

### 遺伝性鉄芽球性貧血における遺伝子変異と表現型の関連の検討

研究分担者 古山和道（岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授）

**研究要旨：**近年、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として様々な遺伝子の変異が同定されているが、実際にそれらの遺伝子変異が疾患発症の原因となるかどうかを検討する方法は確立されていない。そこで、赤芽球系培養細胞とゲノム編集技術を利用して、疾患モデル細胞を作成する事により、遺伝子変異と疾患との関連を明らかにする事が出来るかどうかについて検討した。

#### A．研究目的

近年の遺伝子解析技術の進歩に伴い、以前は原因不明であった様々な遺伝性疾患で原因遺伝子の候補が次々に同定されている。遺伝性鉄芽球性貧血についても例外ではなく、以前から知られていた*ALAS2*、*ABCB7*、*GLRX5*や*SLC25A38*に加え、さらに新たな遺伝子の変異が発症原因として報告されている。しかしながら、それらの新たに同定された原因遺伝子の変異が実際に疾患の原因となるかどうかを明らかにするのは困難で、多くの場合、それぞれの遺伝子産物の発現量の減少あるいは機能低下を証明するに留まるか、疾患モデル動物を作成する事により裏付けされている。そこで、より簡便に原因遺伝子となりうるかどうかを明らかにする方法を樹立するために、本研究では、近年盛んに利用されつつあるゲノム編集技術とヒト由来培養細胞を用いて、疾患モデル細胞を作成する方法の確立を試みた。

#### B．研究方法

遺伝性鉄芽球性貧血の診断には骨髄における環状鉄芽球の確認が必須である。従って、特定の遺伝子の遺伝子産物の発現量あるいは機能の異常により、環状鉄芽球が出現する事が明らかにできれば、その遺伝子が遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として矛盾しないものと考えた。そこでまず、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として知られる*ALAS2*遺伝子に機能喪失型変異を導入して*ALAS2*遺伝子の発現

を抑制し、鉄芽球が観察されるかどうかの検討を行った。遺伝子変異を導入する培養細胞として、慢性骨髄性白血病患者由来の赤芽球系培養細胞であるK562細胞と臍帯血由来の非腫瘍性培養細胞株であるHuDEP2細胞を選択し、CRISPR/Cas9システムを用いてそれぞれの培養細胞の*ALAS2*遺伝子の第1イントロンに存在する赤芽球特異的エンハンサー（以下、*ALAS2int1Enh*）に欠失変異を導入した。*ALAS2*遺伝子の発現が低下している事を確認した後、鉄染色により細胞質に鉄顆粒が認められるかどうかの検討を行った。また、K562細胞は酪酸ナトリウムやTGF-β1の培養液中への添加により、HuDEP2細胞は分化用培養液（*PLoS ONE* 8, e59890）に置換することにより分化を誘導してから、同様の検討を行い、さらに必要に応じて電子顕微鏡を用いた観察も行った。

（倫理面への配慮）

本研究には倫理的な配慮が必要な研究は含まれない。

#### C．研究結果

ヒト*ALAS2*遺伝子の発現制御には、*ALAS2int1Enh*が重要な役割を果たすことが知られており、特に*ALAS2int1Enh*中に存在するGATA1結合配列が重要であることが実験的に示唆されている。一方、エクソーム解析によっても原因遺伝子が不明

であった遺伝性鉄芽球性貧血患者の中に、同エンハンサー配列のGATA1結合配列に塩基置換あるいは欠失変異が認められる症例が報告されているが、それらの変異が直接的に疾患発症の原因となるかどうかについては明らかではない。そこで、ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムを用いてヒト由来赤芽球系培養細胞であるK562細胞とHuDEP2のゲノムDNA中のALAS2int1Enhに欠失変異を導入し、内在性のヘム合性能への影響と、ミトコンドリアへの鉄の沈着が観察されるかどうかを検討した。その結果、K562細胞、HuDEP2細胞のいずれにおいてもALAS2int1Enhへの欠失変異の導入によりALAS2 mRNAの発現低下とヘモグロビン合成能の低下が認められたが、通常の継代培養の条件下では細胞質に鉄顆粒はほとんど検出されなかった。次に、それぞれの細胞を分化誘導したところ、いずれの細胞でも分化誘導前に比較して分化誘導後にはヘモグロビン合成は亢進したが、K562細胞においては、野生型の細胞もALAS2int1Enhに変異を有する細胞でも、鉄染色で鉄顆粒の存在は明らかではなかった。一方、HuDEP2細胞では、野生型の細胞では分化誘導後も鉄染色により細胞質に少数の細胞で鉄顆粒が認められるのみであったが、ALAS2int1Enhに欠失変異を有するHuDEP2細胞では、分化誘導後、鉄染色により細胞質に多数の鉄顆粒を有する細胞が観察された。さらに、同細胞を電子顕微鏡により観察したところ、ミトコンドリア内に電子密度の高い領域が観察され、鉄染色の結果とあわせて、環状鉄芽球として矛盾しない結果であった。

#### D . 考察

今回の検討では、ALAS2int1Enhへの欠失変異の導入により、慢性骨髄性白血病由来のK562細胞でも、ヒト臍帯血由来のHuDEP2細胞でもALAS2 mRNAの発現量は低下し、ヘモグロビン合性能も低下した。すなわち、ALAS2int1Enhの変異が内在性のALAS2遺伝子の発現の制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかしながら、分化誘導なしにはこれらの細胞ではミトコンドリアへの鉄の沈着も明らかではなかった。一方、それぞれの細胞を分化誘導したところ、K562細胞では明らかではなかったが、ALAS2int1Enhに欠失変異を有するHuDEP2細胞で

のみ、環状鉄芽球と類似した鉄の沈着が細胞質で観察された。HuDEP2細胞でのみ観察されてK562細胞では観察されなかった理由は明らかではないが、K562細胞では様々な分化誘導によってヘモグロビン合成は増加しても脱核することが無いのに対し、HuDEP2細胞では脱核するまで分化しうることが大きく影響するのではないかと推察している。すなわち、環状鉄芽球はある特定の分化段階の赤芽球でのみ観察され、K562細胞は既にその分化段階を経過してしまっているか、あるいは分化誘導によってもその分化段階に到達しない可能性が高いのではないかと推察している。遺伝性鉄芽球性貧血患者の骨髄においても、全ての赤芽球で鉄顆粒の沈着が観察される訳ではないことも、この推察を裏付けると考えているが、詳細は不明である。今後は、HuDEP2細胞を用いて遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として知られているALAS2以外の遺伝子、例えばSLC25A38やGLRX5、あるいはABCB7などの欠失変異体を作成し、分化誘導により環状鉄芽球が観察されるかどうかを検討する予定である。

#### E . 結論

ゲノム編集技術を用いて赤芽球系培養細胞の内在性ALAS2遺伝子の発現を低下させ、更に同細胞を分化誘導することにより、環状鉄芽球と同様の表現型を呈する細胞を樹立した。この細胞は遺伝性鉄芽球性貧血のモデル細胞として利用可能である可能性が高い。このような方法は、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子の候補として新たに同定された遺伝子が、実際に原因遺伝子として矛盾しないかどうかを明らかにするために有用であると予想される。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Kubota Y, Nomura K, Katoh Y, Yamashita R, Kaneko K, Furuyama K. Novel Mechanisms for Heme-dependent Degradation of ALAS1 Protein as a Component of Negative Feedback Regulation of Heme Biosynthesis. *J Biol Chem*. 2016;291(39):20516-29. doi: 10.1074/jbc.M116.719161. Epub 2016 Aug 5. PubMed PMID: 27496948.

- 2) Mu A, Li M, Tanaka M, Adachi Y, Tai TT, Liem PH, Izawa S, Furuyama K, Taketani S. Enhancements of the production of bilirubin and the expression of  $\beta$ -globin by carbon monoxide during erythroid differentiation. **FEBS Lett.** 2016 May;590(10):1447-54. doi: 10.1002/1873-3468.12178. Epub 2016 May 18. PubMed PMID:27087140.

2. 学会発表

- 1) 久保田美子, 野村和美, 蝦名真行, 金子桐子, 加藤恭丈, 古山和道. 非特異的5-アミノレブリン酸合成酵素(ALAS1)のCLPXPによる翻訳後修飾. **第89回日本生化学会大会** (2016年9月, 仙台).
- 2) 野村和美, 久保田美子, 金子桐子, 蝦名真行, 古山和道. ヒトCLPX-CLPP複合体によるミトコンドリアマトリクスのタンパク質品質管理機構の解明. **第89回日本生化学会大会** (2016年9月, 仙台).

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

### CDAのデータ管理，診断基準の確立

研究分担者 多賀 崇（滋賀医科大学小児科 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つとめる。

（倫理面への配慮）

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

#### C．研究結果

分担研究者（多賀）が以前行った CDA の全国調

査を参考に該当症例に対し、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。

本疾患が疑われ最終的に G6PD 欠損症と診断された当科の症例については、骨髄標本など CDA が疑われた経緯を日本小児血液・がん学会の造血不全症の中央形態診断を行っていた名古屋大学小児科グループと再検討している。

また、他の担当者と協力して先天性骨髄不全症診療ガイドライン 2017 (CDA) の作成と、CDA 診療の参照ガイドの改訂を行った。

#### D．考察

本班研究のサポートをもとに、本邦での CDA の症例収集、精査を行ってきたが、新規症例は極めて少なく、既知の遺伝子異常を持つ症例は極めて少ない。また、自験例のように、他の血液疾患と誤診されている症例も相当数あると考えられ、引き続き詳細な調査・研究が必要である。類縁疾患とともに諸外国とは違う本邦独自の病態把握を検討する必要がある。

#### E．結論

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、今度も継続的な研究が必要である。

#### **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  
先天性骨髄不全症ガイドライン 2017  
Congenital Dyserythropoietic Anemia (CDA)  
(診断と治療社)班員である真部淳、長谷川大輔とともに執筆した。

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

## 先天性好中球減少症のガイドライン

研究分担者 小林 正夫（広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学）

**研究要旨：**先天性好中球減少症（congenital neutropenia, CN）は末梢血好中球絶対数（absolute neutrophil count, ANC）が  $200/\mu\text{l}$  未満の重症慢性好中球減少、骨髄像で前骨髄球、骨髄球での成熟障害、生後早期から反復する細菌感染症を臨床的特徴とする遺伝性疾患である。2015年のInternational Union of Immunological Societies Expert Committeeが提案した先天性好中球減少症の分類から17の疾患が分類されている。本疾患群は慢性好中球減少症を共通所見とするが、病因、病態、臨床症状は多様であり、それぞれの疾患で特徴ある臨床所見があるので、合併する臨床症状を考慮する必要がある。1990年代にgranulocyte colony-stimulating factor（G-CSF）が治療に使用されるようになり、感染症による生命予後は劇的に改善したが、国際先天性好中球減少症の登録事業（severe chronic neutropenia international registry, SCNIR）からは長期間のG-CSF使用により骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病（myelodysplastic syndromes/acute myeloid leukemia, MDS/AML）に進展する症例の増加が報告されている。従って、感染症対策としてのG-CSFの使用は有用ではあるが、MDS/AMLへの進展を考慮したフォローが必要となる。唯一の根治療法は造血幹細胞移植であるが、その適応、移植時期、移植方法等に一定したものはない。

### A．疾患概念と疫学

先天性好中球減少症（congenital neutropenia, CN）は末梢血好中球絶対数（absolute neutrophil count, ANC）が  $200/\mu\text{l}$  未満の重症慢性好中球減少、骨髄像で前骨髄球、骨髄球での成熟障害、生後早期から反復する細菌感染症を臨床的特徴とする。CNのタイプによっては特徴的な合併所見があるので、それぞれに特有な合併症状は診断の参考となる。末梢血血液検査では好中球減少、特に末梢血でのANCが  $200/\mu\text{l}$  以下が持続し、単球増加、好酸球増加が認められることが多い。ただし、周期性好中球減少症の場合には3週間隔で好中球減少（ANCが  $150/\mu\text{l}$  以下）と単球増加が相反してみられるので、両者の鑑別は必要である。骨髄像では多くが骨髄顆粒球系細胞は正形成から低形成であり、前骨髄球あるいは骨髄球での成熟障害が認められる。明らかな形態異

常はみられない。赤芽球系、巨核球系には異常を認めない。最終的な確定診断には責任遺伝子の変異の同定が必要である。

発症頻度の確定的な数字はないが、本邦例の集積から100万人に1-2人の発生頻度と推測される。本邦では現在までに80例近い患者数が集積されている。遺伝子解析が施行されている症例の集計から、*ELANE* 変異（SCN1）と *HAX1* 変異（SCN3）に限定されていたが、最近G6PC3欠損症（SCN4）の本邦第一例目が報告された。常染色体性優性遺伝形式をとるSCN1（*ELANE* 遺伝子のヘテロ接合性変異）が最も頻度が高く、75～80%を占めている。HAX1異常によるSCN3はKostmann病と呼ばれ、全例が *HAX1* 遺伝子のホモ接合性変異か複合ヘテロ接合性変異で、常染色体性劣性遺伝形式をとる。その頻度は約15%である。その他のCNの頻度は明ら

かではないが、非常に稀と思われる。

## B．病因と病態

重症先天性好中球減少症の 5 型について病因・病態を概説する。

### 1) SCN1：好中球エラスターゼ変異

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

SCN1 における NE の mislocalization 説では、NE が顆粒内へと輸送される際に、変異 NE と adaptor protein complex 3 (AP3) との結合障害により、NE の細胞内輸送異常が起こり、集積した NE が骨髄顆粒球系前駆細胞でアポトーシスを誘導し、骨髄顆粒球系細胞の成熟障害に結びついている可能性を示している。

異常 NE 蛋白が細胞内に蓄積することによるフォールディング病としての概念が提唱されている。小胞体ストレスのマーカーである BiP mRNA 発現が wild type に比し 2~6 倍であったこと、実際に患者骨髄系細胞でも高値が認められたことを示し、NE の細胞内局在の異常と併せてフォールディング病の可能性を示唆している。実際に小胞体ストレスセンサーとして機能する *EIF2AK3* 変異により発症する Wolcott-Raillon 症候群において、多くの患者が好中球減少を合併することが報告されている。しかし、必ずしも BiP mRNA の発現上昇は有意ではないことが示されており、フォールディング病としての結論は不明である。

SCN 患者では C/EBP- $\alpha$  の発現を制御する LEF-1 mRNA 発現の低下がみられることが報告され、LEF1 の発現低下は SCN の本態と考えられる病因の下流に共通した異常と考えられている。また、SCN において G-CSF 受容体下流の転写因子である STAT5 活性が亢進し、LEF-1 のユビキチン化に関与していることが示された。プロテアソームインヒビターである Bortezomib が LEF-1 mRNA レベルを

回復し、顆粒球分化を促したと報告されている。さらに別の報告で NE のインヒビターである secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) が骨髄細胞の増殖、分化、細胞周期を制御していることが示され、患者の骨髄細胞や血漿中における SLPI の低下が報告された<sup>24)</sup>。また NE 自体が増殖抑制物質として作用し、好中球産生の制御を行っているとの報告もあり、*ELANE* 異常症の病態形成には様々な要因が関与している可能性がある。

### 2) SCN2：GF1 欠損症

2003 年に *GFI1* ヘテロ接合性変異 (DNA 結合に関与する zinc finger 部位) が同定され、好中球減少、単球増多、CD4 リンパ球の減少、ナイーブ T、B 細胞の減少が認められた。G-CSF に対する反応性の低下や、好中球、単球の両方の性質を有する異常細胞の出現も認められた。T、B 細胞に関しては数と活性の低下は認められるもの、機能は正常と推察されている。Cell line を用いた *in vitro* の検討では変異型は野生型に対し *GFI1* の抑制活性を dominant negative に抑制した。*ELANE* 遺伝子のプロモーター領域に *GFI1* の結合部位が同定されたことから *ELANE* 遺伝子発現が *GFI1* により抑制されることがレポーターアッセイで証明された。*GFI1* 変異は *ELANE* 遺伝子の過剰発現を誘導し、産生された過剰な NE が細胞内に蓄積する結果、細胞死が誘導されることが示されている。

### 3) SCN3：HAX1 異常症 (Kostmann 病)

hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 (HCLS1)-associated protein X-1 (HAX1) は、細胞内のシグナル伝達に関与する分子として 1997 年に見出されたが、その後多くの細胞内蛋白質やウイルス蛋白質と相互作用し、細胞骨格形成やアポトーシスにも関与することが明らかにされている。スプライシングサイトの違いにより、2 種類のアイソフォーム (アイソフォーム a, b) が存在する。スプライシングによりアイソフォーム b はエクソン 2 が短い構造となる。興味深いことに HAX1 異常症では後述するように、この 2 種類のアイソフォームの存在形式の違いにより臨床病型が異なる。HAX1 の欠失は骨髄前駆細胞内にチトクロム C を放出し、前駆細胞

胞ならびに好中球でのアポトーシスを亢進させ、好中球減少が惹起される。また、転写因子である LEF1 とその下流遺伝子群の発現低下が認められていることから、HAX1 の欠失が、HCLS1 のリン酸化を抑制し LEF1 の発現を低下させることにより、G-CSF を介した骨髄造血の抑制も示唆されている。

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

#### 4) SCN4 : G6PC3 欠損症

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

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

G6PC3 欠損症患者における好中球数減少・機能低下の機序としては、前骨髄球中の小胞体分子シャペロンの増加により小胞体ストレス反応が生じて RRNA-dependent protein kinase-like ER kinase pathway が活性化することや、加えて細胞内グルコースの濃度低下により Glycogen synthase kinase

3B が活性化することにより、好中球アポトーシスが亢進する。その結果、骨髄で前骨髄球、骨髄球での成熟障害が生じ、好中球減少が生じる。また、機能低下について不明な点もあるが、グルコース-6-リン酸の蓄積により、UDP-ガラクトースの生成が抑制される結果、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase の構成要素である gp91<sup>phox</sup> のグリコシル化が阻害され、呼吸バーストが消失し殺菌能の低下を生じることが想定される。

#### 5) SCN5 : VPS45 欠損症

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

### C . 合併症と重症度

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

## D . 治療

感染症対策としての対症療法と根治療法に分けて治療法を考える必要がある。

### 1) 対症療法

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

### 2) 根治療法

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

## E . 予後

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

亡頻度は 14%、MDS/AML の発症頻度は 40%になることが報告されている。SCN 症例が MDS/AML に移行した場合には化学療法を行うと、好中球の回復はほとんど認められないことから、造血細胞移植の継続が必要となるので、ドナー選択を用意しながらの治療開始が必要である。造血細胞移植が唯一の救命できる治療法となる。

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

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, Baghdadi JE, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Aillal F, Takada H, Hara T, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M. Alanine scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate loss- or gain-of-function variants. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2016 Dec 14. pii: S0091-6749(16)31281-7. doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.035. [Epub ahead of print]
- 2) Hoshino A, Okada S, Yoshida K, Nishida N, Okuno Y, Ueno H, Yamashita M, Okano T, Tsumura M, Nishimura S, Sakata S, Kobayashi M, Nakamura H, Kamizono J, Mitsui-Sekinaka K, Ichimura T, Ohga S, Nakazawa Y, Takagi M, Imai K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Nonoyama S, Morio T, Kanegane H. Abnormal hematopoiesis and autoimmunity in humans with germline IKZF1 mutations.

- Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2016 Dec 1. pii: S0091-6749(16)31273-8. doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.029. [Epub ahead of print]
- 3) Lévy R, Okada S, Béziat V, Moriya K, Liu C, Chai LY, Migaud M, Hauck F, Al Ali A, Cyrus C, Vatte C, Patiroglu T, Unal E, Ferneiny M, Hyakuna N, Nepesov S, Oleastro M, Ikinçiogullari A, Dogu F, Asano T, Ohara O, Yun L, Della Mina E, Bronnimann D, Itan Y, Gothe F, Bustamante J, Boisson-Dupuis S, Tahuil N, Aytekin C, Salhi A, Al Muhsen S, Kobayashi M, Toubiana J, Abel L, Li X, Camcioglu Y, Celmeli F, Klein C, AlKhater SA, Casanova JL, Puel A. Genetic immune and clinical features of patients with bacterial and fungal infections due to inherited IL-17RA deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: E8277-8285, 3016.
  - 4) Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, Yeh TW, Mitsuiki N, Asano T, Ohnishi H, Kato Z, Sekinaka Y, Zaha K, Kato T, Okano T, Takashima T, Kobayashi K, Kimura M, Kunitsu T, Maruo Y, Kanegane H, Takagi M, Yoshida K, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Ohara O, Okada S, Kobayashi M, Morio T, Nonoyama S. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase syndrome-like immunodeficiency. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2016 Dec;138(6):1672-1680.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.055. [Epub ahead of print]
  - 5) Vijayan D, Mohd Redzwan N, Avery DT, Wirasinha RC, Brink R, Walters G, Adelstein S, Kobayashi M, Gray P, Elliott M, Wong M, King C, Vinuesa CG, Ghilardi N, Ma CS, Tangye SG, Batten M. IL-27 directly enhances germinal center B cell activity and potentiates lupus sanroque mice. **Journal of Immunology** 2016;197:3008-3017.
  - 6) Ma CS, Wong N, Rao G, Okada S, Kobayashi M, Casanova JL, Tangye SG, et al. Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4+T cells into distinct effector subsets. **Journal of Experimental Medicine** 2016;213:1589-608.
  - 7) Toubiana J, Okada S, Hiller J, Oleastro M, Lagos Gomez M, Aldave Becerra JC, Ouachée-Chardin M, Fouyssac F, Girisha KM, Etzioni A, Van Montfrans J, Camcioglu Y, Kerns LA, Belohradsky B, Blanche S, Bousfiha A, Rodriguez-Gallego C, Meyts I, Kisand K, Reichenbach J, Renner ED, Rosenzweig S, Grimbacher B, van de Veerdonk FL, Traidl-Hoffmann C, Picard C, Marodi L, Morio T, Kobayashi M, Lilic D, Milner JD, Holland S, Casanova JL, Puel A. Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie and unexpectedly broad clinical phenotype. **Blood** 2016;127:3154-64.
  - 8) Hayakawa S, Okada S, Tsumura M, Imai K, Morio T, Ohara O, Chayama K, Kobayashi M. Predisposition to gastric cancer in a patient with autosomal dominant immune dysregulation syndrome associated with CTLA-4 haploinsufficiency. **Journal of Clinical Immunology** 2016;36:28-32.
  - 9) Yasumura J, Wago M, Okada S, Nishikomori R, Takei S, Kobayashi M. A 2-year old Japanese girl with TNF receptor-associated periodic syndrome: A case report of the youngest diagnosed proband in Japan. **Mod Rheumatol.** 2016;26:798-801.
  - 10) Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R, Kawaguchi H, Sugiyama K, Kobayashi M, Kurisu K. Cavernous angioma after chemotherapy for desmoplastic/nodular medulloblastoma associated with anhidrotic ectodermal dysplasia. **Child Nerv Syst.**

2016;32:395-8.

2. 学会発表

- 1) Okada S, Kagawa R, Fujiki R, Kato Z, Ohnishi H, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Kobayashi M. Loss-of-function and dominant negative STAT1 coiled-coil domain mutations in MSMD. **Congress of Asia Pacific Society for Immunodeficiencies**( 2016 年 4 月 30 日 大阪 ).
- 2) Mizoguchi Y, Karakawa S, Doi T, Shimomura M, Tomioka K, Sakata S, Furue A, Chijimatsu I, Okada S, Miki M, Kawaguchi H, Kobayashi M. Successful hematopoietic stem cell transplantation in ten patients with severe congenital neutropenia using an intensive immunomyelosuppressive conditioning regimen: The results of a single institute. **The 21<sup>st</sup> Congress of European Hematology Association** ( 2016 年 6 月 12 日 , コペンハーゲン・デンマーク ) .
- 3) Okada S, Fujiki R, Kagawa R, Tsumura M, Kong X, Sakata S, Nishimura S, Kato Z, Ohnishi H, Itan Y, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Kobayashi M. Alanine-scanning mutagenesis of human STAT1 to estimate the loss-or gain-of-function nature of variants. **The 17<sup>th</sup> Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies** ( 2016 年 9 月 22 日 , バルセロナ・スペイン ).
- 4) Asano T, Tsumura M, Okada S, Kobayashi M. Flow cytometry based simple diagnosis of activated PI3K $\delta$  syndrome by evaluating pAKT in circulating B cells. **The 17<sup>th</sup> Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies** ( 2016 年 9 月 22 日 , バルセロナ・スペイン ).
- 5) Mizoguchi Y, Miki M, Furue A, Nishimura S, Shimomura M, Tomioka K, Sakata S, Chijimatsu I, Karakawa S, Okada S, Doi T, Nakamura K, Kawaguchi H, Kobayashi M.

Successful Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using an Immunosuppressive Conditioning Regimen in Ten Patients with Severe Congenital Neutropenia. A Single-Institute Experience. **The 58<sup>th</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** ( 2016 年 12 月 3-6 日 , サンディエゴ ).

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診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

Shwachman-Diamond症候群の診療ガイドライン作成に関する研究

研究分担者 渡邊健一郎（静岡県立こども病院血液腫瘍科 科長）  
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し、造血細胞移植が行われる。稀少疾患であるため、臨床試験に基づき確立した治療、フォローアップの指針はないが、適切な経過観察と治療介入が患者の QOL 向上、生命予後改善に重要である。本研究では、本疾患の研究者により提案された国際的な診療ガイドライン案に基づき、本邦での診療ガイドラインを作成した。

#### A．研究目的

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、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病発症のリスクが高い。適切な経過観察と治療介入が患者のQOL向上、生命予後改善に重要である。そのため本研究では本邦での診療ガイドライン作成を目的とする。

#### B．研究方法

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

（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

診療ガイドライン2017を作成した。疾患概念、診断基準、病態、治療の他、フォローアップの具体的な指針についても示した。また、本症に特徴的な膵、骨の画像を提示し、診療に携わる医師が使用しやすいよう配慮した。

#### D．考察

本疾患は本邦では稀とされてきたが、認知度の高まりと共に診断例が増加してきた。乳児期より好中球減少による易感染性、膵外分泌異常による慢性下痢、体重増加不良、低身長、骨格異常など多彩な症状がみられる。また、白血病を発症すると、造血細胞移植を行っても予後は不良である。症状や重症度は多様で、経時的にも変化するため、診断は必ずしも容易ではない。本研究で作成したガイドラインは、本疾患患者の診療を行う際の有効な指針となり、QOL向上、予後の改善に寄与すると期待される。

#### E．結論

Shwachman-Diamond症候群の診療ガイドラインを作成した。本ガイドラインにより同疾患の本邦における診断、治療状況の向上に寄与できると考えられる

#### F．研究発表

1. 論文発表
- 1) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E,

Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes. **Genet Med**. 2017 Jan .

- 2) Nishikawa E, Yagasaki H, Hama A, Yabe H, Ohara A, Kosaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe K, Yoshida N, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S. Long-term outcomes of 95 children with moderate aplastic anemia treated with horse antithymocyte globulin and cyclosporine. **Pediatr Blood Cancer**. 2016 Nov.

## 2. 学会発表

- 1) 濱麻人, 真部淳, 長谷川大輔, 野沢和江, 成田敦, 村松秀城, 高橋義行, 渡邊健一郎, 小原明, 伊藤雅文, 小島勢二. 小児再生不良性貧血および低形成骨髄異形成症候群における臨床的予後の比較. **第78回日本血液学会学術集会**(2016年10月, 横浜) .
- 2) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Narita A, Muramatsu H, Takahashi Y, Watanabe K, Ohara A, Ito M, Kojima S. Comparison of Clinical Outcomes Between Pediatric Aplastic Anemia and Refractory Cytopenia of Childhood. **58<sup>th</sup> ASH Annual Meeting & Exposition** (2016年12月, 米国・サンディエゴ) .
- 3) 濱麻人, 真部淳, 長谷川大輔, 野沢和江, 成田敦, 村松秀城, 高橋義行, 渡邊健一郎, 小原明, 伊藤雅文, 小島勢二. 小児再生不良性貧血および骨髄異形成症候群の形態中央診断: 1500例のまとめ. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月, 東京) .
- 4) Kanegane H. Pancytopenia and primary immunodeficiency diseases. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会**(2016年12月, 東京) .

## G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

## 先天性血小板減少症のデータ管理・遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 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：**13例の先天性血小板減少症を疑う症例について系統的鑑別診断解析を施行し、MYH9異常症8例、Paris-Trousseau Jacobsen症候群1例、GFI1B異常症2例の診断に至り、2例は確定診断されなかった。GFI1B異常症診断のバイオマーカーとして末梢血塗抹標本を用いた血小板CD34局在解析を考案した。臨床情報と検査・解析データの集積により、先天性血小板減少症の診断基準、重症度分類、診療ガイドラインの作成および改訂を行った。

### A．研究目的

先天性血小板減少症は病因不明な疾患が多く、特発性血小板減少性紫斑病と診断され不必要な治療を受ける症例も少なくない。本研究は、先天性血小板減少症を疑う症例を全国的に収集し、系統的鑑別診断解析による遺伝子診断を行い、臨床情報と検査・解析データを集積し、診断基準、重症度分類、診療ガイドラインの作成を目的とした。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28年4月から平成29年1月現在）は、13例の先天性血小板減少症を疑う症例について系統的鑑別診断解析を施行し、MYH9異常症8例、

Paris-Trousseau Jacobsen症候群1例、GFI1B異常症2例の診断に至り、2例は確定診断されなかった。

GFI1B異常症診断のバイオマーカーとして末梢血塗抹標本を用いた血小板CD34局在解析を考案し、系統的鑑別診断解析および保存検体において施行し、GFI1B異常症2例の診断に至った。

臨床情報と検査・解析データ結果を踏まえ、先天性血小板減少症の診断基準、重症度分類、診療ガイドラインの作成および改訂を行った。

### D．考察

近年、先天性血小板減少症のなかで大型/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13例を解析し、11例（84.6%）の症例で確定診断が得られた。MYH9異常症は8例（61.5%）と最も高頻度に診断された。MYH9異常症8例中、4例では白血球封入体を認めず、原因不明の血小板減少症あるいは新生児同種免疫性血小板減少症と診断されていたが、末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析と局在分類により確定診断された。

2013年に全エクソン解析により同定されたGFI1B異常症は血小板顆粒減少と赤血球形態異常を有する先天性巨大血小板症である。GFI1Bは巨核球赤芽球特異的転写因子であり、ドミナントネガティブ変異により本来転写抑制されるCD34分子が巨核球と血小板に発現することが報告されていた。本研究に

において考案した末梢血塗抹標本を用いた血小板CD34発現解析は簡便であり、未診断症例の保存標本においても明確な陽性所見を得た。すなわち、GFI1B異常症診断のバイオマーカーとして有用であることが示された。

## E . 結論

13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、11例(84.6%)の症例で確定診断を得た。GFI1B異常症診断のバイオマーカーを考案した。先天性血小板減少症の診断基準、重症度分類、診療ガイドラインの作成および改訂を行った。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes. **Genet Med**. 2017.
- 2) Sivapalaratnam S, Westbury SK, Stephens JC, Greene D, Downes K, Kelly AM, Lentaigne C, Astle WJ, Huizinga EG, Nurden P, Papadia S, Peerlinck K, Penkett CJ, Perry DJ, Roughley C, Simeoni I, Stirrups K, Hart DP, Tait RC, Mumford AD; NIHR BioResource., Laffan MA, Freson K, Ouwehand WH, Kunishima S, Turro E. Rare variants in GP1BB are responsible for autosomal dominant macrothrombocytopenia. **Blood** 2017;129(4):520-524.
- 3) Ogawa Y, Kunishima S, Yanagisawa K, Osaki Y, Uchiyama Y, Matsumoto N, Tokiniwa H, Horiguchi J, Nojima Y, Handa H. Successful management of perioperative hemostasis in a

patient with Glanzmann thrombasthenia who underwent a right total mastectomy. **Int J Hematol**. 2017;105(2):221-225.

- 4) Yamashita Y, Matsuura R, Kunishima S, Oikawa Y, Ariizumi H, Hamada S, Shirato N, Matsuoka R, Ogawa K, Sekizawa A. Perinatal Management for a Pregnant Woman with an MYH9 Disorder. **Case Rep Obstet Gynecol**. 2016;2016:6730174.
- 5) Kitamura K, Okuno Y, Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Muramatsu H, Kobayashi R, Furukawa K, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Kunishima S. Functional characterization of a novel GFI1B mutation causing congenital macrothrombocytopenia. **J Thromb Haemost**. 2016;14(7):1462-9.
- 6) Simeoni I, Stephens JC, Hu F, Deevi SV, Megy K, Bariana TK, Lentaigne C, Schulman S, Sivapalaratnam S, Vries MJ, Westbury SK, Greene D, Papadia S, Alessi MC, Attwood AP, Ballmaier M, Baynam G, Bermejo E, Bertoli M, Bray PF, Bury L, Cattaneo M, Collins P, Daugherty LC, Favier R, French DL, Furie B, Gattens M, Germeshausen M, Ghevaert C, Goodeve AC, Guerrero JA, Hampshire DJ, Hart DP, Heemskerk JW, Henskens YM, Hill M, Hogg N, Jolley JD, Kahr WH, Kelly AM, Kerr R, Kostadima M, Kunishima S, Lambert MP, Liesner R, Lopez JA, Mapeta RP, Mathias M, Millar CM, Nathwani A, Neerman-Arbez M, Nurden AT, Nurden P, Othman M, Peerlinck K, Perry DJ, Poudel P, Reitsma P, Rondina MT, Smethurst PA, Stevenson W, Szkotak A, Tuna S, van Geet C, Whitehorn D, Wilcox DA, Zhang B, Revel-Vilk S, Gresele P, Bellissimo DB, Penkett CJ, Laffan MA, Mumford AD, Rendon A, Gomez K, Freson K, Ouwehand WH, Turro E. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. **Blood** 2016;127(23):2791-803.

- 7) Wasano K, Matsunaga T, Ogawa K, Kunishima S. Late onset and high-frequency dominant hearing loss in a family with MYH9 disorder. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 2016;273(11):3547-3552.
- 8) Yokoi S, Kunishima S, Takahashi Y, Morishita M, Kojima S. A Japanese pedigree with a p.A95V mutation in the MYH9 gene demonstrates inherited macrothrombocytopenia without Alport manifestations. **Ann Hematol.** 2016;95(5): 831-3.
2. 学会発表
- 1) Yamashita Y, Matsuura R, Oikawa Y, Hamada S, Ariizumi H, Odawara K, Koyano M, Nishii S, Muramoto T, Takenaka S, Nakayama K, Matsumoto K, Ichihara M, Sasaki Y, Shioto N, Matsuoka R, Ogawa K, Kunishima S, Sekizawa A. A case report of management including perinatal genetic counseling for May Hegglin Anomaly in pregnancy that low platelets counts made the opportunity to diagnose. **The 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics** (2016年4月, 京都) .
- 2) Kunishima S, Kada A, Hao J. Further classification of neutrophil non-muscle myosin heavy chain IIA localization for efficient genetic diagnosis of *MYH9* disorders. **XXIX International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology** (2016年5月, イタリア・ミラノ) .
- 3) 福村明子, 大坪慶輔, 小池隆志, 森本克, 望月博之, 國島伸治. 急性虫垂炎を契機に診断に至ったMYH9異常症の男児例. **第119回日本小児科学会学術集会** (2016年5月, 札幌) .
- 4) 青木孝浩, 國島伸治, 山下晴喜, 太田節雄. 先天性白内障を呈したMYH9異常症の1例. **第119回日本小児科学会学術集会**(2016年5月 札幌) .
- 5) Kunishima S. Differential diagnosis of congenital macrothrombocytopenia (symposium). **62nd Annual SSC Meeting of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2016年5月, フランス・モンペリエ) .
- 6) 神田健志, 佐藤彩, 安部大輔, 西島節子, 石上毅, 國島伸治. Bernard-Soulier症候群のブラジル人女児. **第75回日本小児科学会滋賀地方会** (2016年5月, 大津) .
- 7) 影山玲子, 植田寛子, 橋爪秀夫, 國島伸治. 臀部の皮疹を契機に確定診断されたEpstein症候群の1例. **第115回日本皮膚科学会総会** (2016年6月, 京都) .
- 8) 國島伸治, 嘉田晃子, Hao Jihong, 北村勝誠. *MYH9*異常症遺伝子診断のための好中球ミオシン局在解析の細分類. **第38回日本血栓止血学会学術集会** (2016年6月, 奈良) .
- 9) 國島伸治. ITPの鑑別診断と実践的アプローチ (教育講演). **第17回日本検査血液学会学術集会** (2016年8月, 福岡) .
- 10) Kunishima S, Saito H. Differential diagnosis of congenital macrothrombocytopenia-12-year experience in Nagoya-Platelets2016. **9<sup>th</sup> International Symposium** (2016年9月, 米国・ウィルズリー) .
- 11) 佐分利能生, 大塚英一, 宮崎泰彦, 河野克也, 國島伸治. May-Hegglin異常. **第30回日本臨床内科医学会** (2016年10月, 東京) .
- 12) 國島伸治, 北村勝誠, 山村喜美. 新規検査法により診断された先天性巨大血小板症. **第70回国立病院総合医学会** (2016年11月, 那覇) .
- 13) Chu Y, Rabbolini D, Gabrielli S, Kunishima S, Stevenson W, Ward C, Morel-Kopp MC. MYH9 disorders are not uncommon in Australia and New Zealand: results from a platelet next generation sequencing (NGS) project. **Annual Scientific Meetings of the HAA (Haematology Society of Australia and New Zealand, Australian & New Zealand Society of Blood Transfusion and the Australasian Society of Thrombosis and Haemostasis** (2016年11月, オーストラリア・メルボルン) .

- 14) 中矢雅治, 時政定雄, 濱崎考史, 村松秀城, 小島勢二, 奥野友介, 吉田健一, 小川誠司, 白石友一, 千葉健一, 田中洋子, 宮野悟, 國島伸治. 先天性巨大血小板症の新規病因遺伝子(*PLCB3*)の機能解析. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月, 東京).
- 15) 中館尚也, 石黒精, 小林尚明, 國島伸治, 笹原洋二, 前田尚子, 高橋幸博. 小児期特発性血小板減少性紫斑病(ITP)の治療に関する疫学調査. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月, 東京).
- 16) 神田健志, 國島伸治, 佐藤彩, 安部大輔, 西島節子, 石上毅. ベルナル・スーリエ症候群のブラジル人女兒. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月, 東京).
- 17) 左信哲, 宮下恵実子, 鞍谷沙織, 橋本泰佑, 平野翔堂, 中村千華, 松田百代, 奥廣有喜, 古家信介, 山本浩継, 河津由紀子, 吉川真紀子, 徳永やすゆき, 加藤秀樹, 笹原洋二, 國島伸治, 茶山公祐. 破砕赤血球を伴う溶血性貧血を呈し診断に苦慮した先天性無巨核球性血小板減少症の1例. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会** (2016年12月, 東京).
- 18) 川口裕之, 小倉友美, 三井-關中佳奈子, 關中悠仁, 國島伸治, 野々山恵章. Target sequence による先天性血小板減少症のスクリーニング (続報). **第24回小児ITP研究会** (2016年12月, 東京).
- 19) 國島伸治. GFI1B 異常症の病態と検査診断. **第24回小児ITP研究会** (2016年12月, 東京).
- 20) Rabbolini DJ, Morel-Kopp MC, Chen Q, Gabrielli S, Best G, Dunlop L, Chew LP, Blair N, Brighton TA, Singh N, Fixter K, Kunishima S, Ward CM, Stevenson WS. Megakaryocyte and platelet CD34+ surface expression is increased by mutation of the GFI1B transcription factor and is independent of the affected functional domain. **Cell Biology of Megakaryocytes & Platelets, Fundamental Biology and Disorders of the Megakaryocyte Lineage: From Hematopoietic Stem Cell to Hemostasis, Gordon Research**

Conference (2017年2月, イタリア・ルッカ).

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

## DKC の遺伝子診断

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。近年次世代シーケンサーによる変異解析技術が発展したため本邦の先天性骨髄不全症においても遺伝子変異検索が積極的に行われつつあり診断が明確となった症例も多くある。一方で臨床診断と異なる疾患の遺伝子変異が同定されることもあり遺伝子変異の結果をどのように判断すればよいのか判断が難しい症例もある。本研究は本邦の DKC 症例で発見された原因遺伝子変異に関して *in vitro* にて機能解析を行い、これらがテロメア長制御を障害し DKC の病態に関与しているのかを明らかにすることが目的である。本邦で発見された *TERT* 遺伝子変異 (DKC: E280K, del334\_335, cDKC: G106W, P632R, G682D, T726M) に関して *TERT* を欠損しテロメラーゼ活性を認めない Saos-2 細胞にこれらの遺伝子変異を導入しテロメラーゼ活性を解析した。不全型 DKC で発見された G106W と G682D はテロメラーゼ活性を完全に障害し、P632R と T726M は約 50% の低下が認められた。一方、DKC 症例で発見された E280K と del334\_335 はテロメラーゼ活性に障害を与えずこれらの変異が DKC の原因遺伝子であったかは懐疑的であった。DKC の診断において遺伝子変異をその診断の根拠とする場合には注意が必要である。

### 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。遺伝型は X 連鎖劣性遺伝が約 35%、常染色体優性遺伝が約 15%、常染色体劣性遺伝が数%に認められるが、残りの約 40% 近くが型式不明である。

DKC の責任遺伝子変異としてテロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、*DKC1*、*telomerase RNA component (TERC)*、*telomerase reverse transcriptase (TERT)*、*NOP10*、*NHP2*、Shelterin 複合体を構成する *TRF-interacting nuclear protein (TINF2)*、テロメラーゼ複合体を核内の Cajalbody に移行させる *TCAB1* が同定された。また近年 DNA へ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、テロメア末端の保護に関わる CST 複合体を構成する *CTC1* の変異も発見されている。DKC はこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結果造血幹細胞などの増殖細胞に増殖障害が生じ上記の症候が形成されると考えられている。

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

DKC の病態形成には テロメア関連遺伝子異常による細胞内の分子生物学的変異、世代促進、加齢の 3 つ要因が重要である。不全型 DKC で認められた *TERC*、*TERT* 変異は haploinsufficiency 効

果を示し、テロメラーゼ活性の減弱の程度が少なく、DKCの表現型となるにはある程度の世代促進や加齢が必要であると考え。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。近年次世代シーケンサーによる変異解析技術が発展したため本邦の先天性骨髄不全症においても遺伝子変異検索が積極的に行われつつあり診断が明確となった症例も多くある。一方で臨床診断と異なる疾患の遺伝子変異が同定されることもあり遺伝子変異の結果をどのように判断すればよいのか判断が難しい症例もある。特に不全型DKCの場合は、他の骨髄不全症との鑑別を遺伝子変異解析によって行っているが、発見された遺伝子変異が本当にテロメア長制御を障害しDKCの病態に関与しているのかは不明確である。

本研究は本邦のDKC症例で発見された原因遺伝子変異に関してin vitroにて機能解析を行いこれらがテロメア長制御を障害しDKCの病態に関与しているのかを明らかにすることが目的である。

## B．研究方法

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

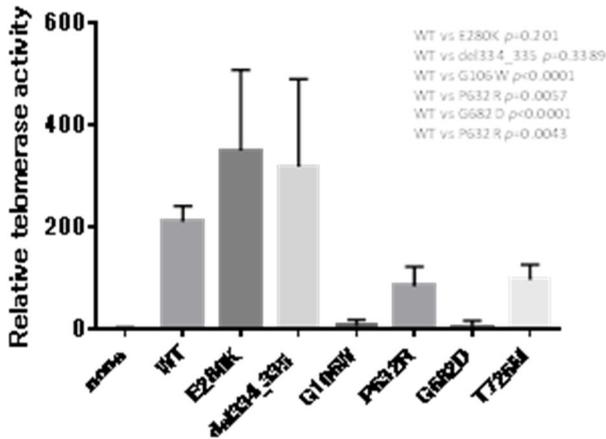
(倫理面への配慮)

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

## C．研究結果

Saos-2細胞は*TERT*を発現していないためテロメラーゼ活性は認められずALTにてテロメア長を補正している。

野生型の*TERT*に比較し、DKCで発見されたE280K, del334\_335はテロメラーゼ活性に有意差はみられなかった。(RTA  $210.8 \pm 17.8$  vs.  $350.0 \pm 78.9$ ,  $319.3 \pm 85.8$   $p=0.2010$ ,  $p=0.3389$ )。一方、不全型DKCで認められたG106W, G682DはWTに比較し有意にテロメラーゼ活性が低下していた。(RTA  $210.8 \pm 17.8$  vs.  $7.4 \pm 6.3$ ,  $5.9 \pm 5.3$   $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ )。また、不全型DKCで認められたP632R, T726MはWTに比較し有意にテロメラーゼ活性が低下しているものの(RTA  $210.8 \pm 17.8$  vs.  $84.6 \pm 19.4$ ,  $97.6 \pm 14.7$   $p=0.0057$ ,  $p=0.0043$ ) G106W, G682Dに比較し有意にテロメラーゼ活性が上昇していた。(RTA  $7.4 \pm 6.3$  vs.  $84.6 \pm 19.4$ ,  $97.6 \pm 14.7$   $p=0.0089$ ,  $p=0.0013$ )。



#### D . 考察

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

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

#### E . 結論

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

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Moriya K, Suzuki T, Watanabe Y, Saito-Nanjo Y, Niizuma H, Onuma M, Rikiishi T, Kakuta F, Abukawa D, Yamaguchi H, Sasahara I Y, Kure S. Hoyerall-Hreidarsson syndrome in a patient with novel compound heterozygous RTEL1 gene mutations. **Pediatric Blood & Cancer** 2016 Sep;63(9):1683-4.
- 2) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical application of Capture-based Target Sequencing for Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. **Genetics in Medicine** (In press)
- 3) 山口博樹 . 骨髄不全症におけるテロメア制御異常 . **血液フロンティア** 2017;27(1):5-9.

##### 2. 学会発表

該当なし

#### G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

## 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
藤原亨, 張替秀郎	鉄芽球性貧血 疾患概念・病因・病態	谷脇雅史	日本臨床(増刊号)貧血学	日本臨床社	東京	2017	442
小倉浩美, 菅野仁	先天性貧血	神田善伸	血液科研修ノート	診断と治療社	東京	2016	462-465

## 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
Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanazaki R, Terui K, Kamio T, Kobayashi A, Fujita T, Sato-Otsubo A, Shiraishi Y, Tanaka H, Chiba K, Muramatsu H, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kenmochi N, Miyano S, Ogawa S, Ito E.	Exome sequencing identified RPS15A as a novel causative gene for Diamond-Blackfan anemia.	Haematologica.	102(3)	e93-e96.	2017
Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Matsuo K, Hira A, Takata M.	The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi Anaemia infants is influenced by patient, but not maternal ALDH2 genotype.	Br J Haematol.	175	457-461	2016
Utsugisawa T, Uchiyama T, Toki T, Ogura H, Aoki T, Hamaguchi I, Ishiguro A, Ohara A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H.	Erythrocyte glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia.	Blood Cells, Molecules and Diseases	59	31-36	2016
Ichimura T, Yoshida K, Okuno Y, Yujiri T, Nagai K, Nishi M, Shiraishi Y, Ueno H, Toki T, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Hara T, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Ito E, Ogawa S, Ohga S.	Diagnostic challenge of Diamond-Blackfan anemia in mothers and children by whole-exome sequencing.	Int J Hematol.	105(4)	515-520	2017

Kubota Y 他	Novel Mechanisms for Heme-dependent Degradation of ALAS1 Protein as a Component of Negative Feedback Regulation of Heme Biosynthesis.	J Biol Chem.	291	20516-29	2016
Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S.	Clinical utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes.	Genet Med.			2017 [Epub ahead of print]
Ikeda F, Toki T, Kanezaki R, Terui K, Yoshida K, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Ogawa S, Ito E.	ALDH2 polymorphism in patients with Diamond-Blackfan anemia in Japan.	Int J Hematol.	103(1)	112-4	2016
Shim YJ, Kim HS, Do YR, Ha JS, Yabe H.	Sequential strategy for umbilical cord blood transplantation in a Korean Fanconi anemia girl with refractory acute myelomonocytic leukemia and complex karyotype.	Pediatr Transplant.	doi: 10.1111/petr.12871		2016 [Epub ahead of print]
Inokura K, Fujiwara T, Saito K, Iino T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H.	Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts	Exp Hematol.			In press
矢部みはる, 矢部普正	Fanconi貧血 臨床診断・検査・治療	日本臨床	75(増刊1)	414-417	2017
矢部普正, 矢部みはる	成人のFanconi貧血の特徴と管理	日本臨床	75(増刊1)	418-421	2017
Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Matsuo K, Hira A, Takata M.	The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi Anaemia infants is influenced by patient, but not maternal ALDH2 genotype.	Br J Haematol.	175(3)	457-461	2016

Sivapalaratnam S, Westbury SK, Stephens JC, Greene D, Downes K, Kelly AM, Lentaigine C, Astle WJ, Huizinga EG, Nurden P, Papadia S, Peerlinck K, Penkett CJ, Perry DJ, Roughley C, Simeoni I, Stirrups K, Hart DP, Tait RC, Mumford AD; NIHR BioResource., Laffan MA, Freson K, Ouwehand WH, Kunishima S, Turro E.	Rare variants in GP1BB are responsible for autosomal dominant macrothrombocytopenia.	Blood	129(4)	520-524	2017
Ogawa Y, Kunishima S, Yanagisawa K, Osaki Y, Uchiyama Y, Matsumoto N, Tokiniwa H, Horiguchi J, Nojima Y, Handa H.	Successful management of perioperative hemostasis in a patient with Glanzmann thrombasthenia who underwent a right total mastectomy.	Int J Hematol.	105(2)	221-225	2017
Yamashita Y, Matsuura R, Kunishima S, Oikawa Y, Ariizumi H, Hamada S, Shirato N, Matsuoka R, Ogawa K, Sekizawa A.	Perinatal Management for a Pregnant Woman with an MYH9 Disorder.	Case Rep Obstet Gynecol.	2016	6730174	2016
Kitamura K, Okuno Y, Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Muramatsu H, Kobayashi R, Furukawa K, Miyano S, Kojima S, Ogawa S, Kunishima S.	Functional characterization of a novel GF11B mutation causing congenital macrothrombocytopenia.	J Thromb Haemost.	14(7)	1462-9	2016
Wasano K, Matsunaga T, Ogawa K, Kunishima S.	Late onset and high-frequency dominant hearing loss in a family with MYH9 disorder.	Eur Arch Otorhinolaryngol	273(11)	3547-3552	2016
Yokoi S, Kunishima S, Takahashi Y, Morishita M, Kojima S.	A Japanese pedigree with a p.A95V mutation in the MYH9 gene demonstrates inherited macrothrombocytopenia without Alport manifestations.	Ann Hematol.	95(5)	831-3	2016

Simeoni I, Stephens JC, Hu F, Deevi SV, Megy K, Bariana TK, Lentaigne C, Schulman S, Sivapalaratnam S, Vries MJ, Westbury SK, Greene D, Papadia S, Alessi MC, Attwood AP, Ballmaier M, Baynam G, Bermejo E, Bertoli M, Bray PF, Bury L, Cattaneo M, Collins P, Daugherty LC, Favier R, French DL, Furie B, Gattens M, Germeshausen M, Ghevaert C, Goodeve AC, Guerrero JA, Hampshire DJ, Hart DP, Heemskerk JW, Henskens YM, Hill M, Hogg N, Jolley JD, Kahr WH, Kelly AM, Kerr R, Kostadima M, Kunishima S, Lambert MP, Liesner R, López JA, Mapeta RP, Mathias M, Millar CM, Nathwani A, Neerman-Arbez M, Nurden AT, Nurden P, Othman M, Peerlinck K, Perry DJ, Poudel P, Reitsma P, Rondina MT, Smethurst PA, Stevenson W, Szkotak A, Tuna S, van Geet C, Whitehorn D, Wilcox DA, Zhang B, Revel-Vilk S, Gresele P, Bellissimo DB, Penkett CJ, Laffan MA, Mumford AD, Rendon A, Gomez K, Freson K, Ouwehand WH, Turro E.	A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders.	Blood	127(23)	2791-803	2016
Kondo A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K, Harigae H.	Identification of a novel putative mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation.	Int J Hematol.	103	387-395	2016
Sakurai K, Fujiwara T, Hasegawa S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Yamada-Fujiwara M, Ichinohasama R, Harigae H.	Inhibition of human primary megakaryocyte differentiation by anagrelide: A gene expression profiling analysis.	Int J Hematol.	104	190-199	2016

Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Okitsu Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H.	GATA2 regulates dendritic cell differentiation	Blood	128	508-518	2016
Kanehira M, Fujiwara T, Nakajima S, Okitsu Y, Onishi Y, Fukuhara N, Ichinohasama R, Harigae H.	An LPA1/3 axis governs cellular senescence of mesenchymal stromal cells and promotes growth and vascularization of multiple myeloma.	Stem Cells.			In press
Kobayashi M, Kato H, Hada H, Itoh-Nakadai A, Fujiwara T, Inoguchi Y, Ichiyangi K, Muto A, Tomosugi N, Sasaki H, Harigae H, Igarashi K.	Iron-heme-Bach1 axis is involved in erythroblast adaptation to iron deficiency.	Haematologica.			In press
Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H.	Forced FOG1 expression in erythroleukemia cells: induction of erythroid genes and repression of myelo-lymphoid transcription factor PU.1.	Biochem Biophys Res Commun.			In press
Imai J, Suzuki T, Yoshikawa M, Dekiden M, Nakae H, Nakahara F, Tsuda S, Mizukami H, Koike J, Igarashi M, Yabe H, Mine T.	Fatal Hemorrhagic Gastrointestinal Angioectasia after Bone Marrow Transplantation for Dyskeratosis Congenita.	Intern Med	55	3341-3444	2016
Otsubo K, Yabe M, Yabe H, Fukumura A, Morimoto T, Kato M, Mochizuki H.	Successful acute lymphoblastic leukemia-type therapy in two children with mixed-phenotype acute leukemia.	Pediatr Int.	58	1072-1076	2016
Yabe H.	Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for inherited diseases.	Rinsho Ketsueki	57	2199-2207	2016
Umeda K, Adachi S, Tanaka S, Miki M, Okada K, Hashii Y, Inoue M, Cho Y, Koh K, Goto H, Kajiwara R, Hyakuna N, Kato K, Morio T, Yabe H; Inherited Disease Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation.	Comparison of second transplantation and donor lymphocyte infusion for donor mixed chimerism after allogeneic stem cell transplantation for nonmalignant diseases.	Pediatr Blood Cancer.	63	2221-2229	2016

Sakaguchi H, Watanabe N, Matsumoto K, Yabe H, Kato S, Ogawa A, Inagaki J, Goto H, Koh K, Yoshida N, Kato K, Cho Y, Kosaka Y, Takahashi Y, Inoue M, Kato K, Atsuta Y, Miyamura K; Donor/Source Working Group of Japan Society of Hematopoietic Cell Transplantation.	Comparison of Donor Sources in Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Childhood Acute Leukemia: A Nationwide Retrospective Study.	Biol Blood Marrow Transplant.	22	2226-2234	2016
Atsuta Y, Hirakawa A, Nakasone H, Kurosawa S, Oshima K, Sakai R, Ohashi K, Takahashi S, Mori T, Ozawa Y, Fukuda T, Kanamori H, Morishima Y, Kato K, Yabe H, Sakamaki H, Taniguchi S, Yamashita T; Late Effect and Quality of Life Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation.	Late Mortality and Causes of Death among Long-Term Survivors after Allogeneic Stem Cell Transplantation.	Biol Blood Marrow Transplant.	22	1702-1709	2016
Yasuda E, Suzuki Y, Shimada T, Sawamoto K, Mackenzie WG, Theroux MC, Pizarro C, Xie L, Miller F, Rahman T, Kecskemethy HH, Nagao K, Morlet T, Shaffer TH, Chinen Y, Yabe H, Tanaka A, Shintaku H, Orii KE, Orii KO, Mason RW, Montaña AM, Fukao T, Orii T, Tomatsu S.	Activity of daily living for Morquio A syndrome.	Mol Genet Metab.	118	111-22	2016
Kato S, Yabe H, Takakura H, Mugishima H, Ishige M, Tanaka A, Kato K, Yoshida N, Adachi S, Sakai N, Hashii Y, Ohashi T, Sasahara Y, Suzuki Y, Tabuchi K.	Hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of metabolism: A report from the Research Committee on Transplantation for Inborn Errors of Metabolism of the Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare and the Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation.	Pediatr Transplant.	20	203-214	2016

Elmahdi,S, Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Muramatsu H, Narita A, Nishio N, Ismael O, Kawashima N, Okuno Y, Xu Y, Wang X, Takahashi Y, Ito M, Kojima S.	A cytokine-based diagnostic program in pediatric aplastic anemia and hypocellular refractory cytopenia of childhood.	Pediatr Blood Cancer.	63	652-658	2016
Kanamitsu K, Shimada A, Nishiuchi R, Shigemura T, Nakazawa Y, Koike K, Kodama Y, Shinkoda Y, Kawano Y, Yasui K, Sasaki K, Kajiwara R, Tsukahara H, Manabe A.	Pediatric intestinal Behcet disease complicated by myeloid malignancies.	Int J Hematol.	105	377-382	2017
Ishiguro A, Ezinne CC, Michihata N, Nakadate H, Manabe A, Taki M, Shima M.	Pediatric Thromboembolism: A National Survey in Japan.	Int J Hematol.	105	52-58	2017
Nishikawa E, Yagasaki H, Hama A, Yabe H, Ohara A, Kosaka Y, Kudo K, Kobayashi R, Ohga S, Morimoto A, Watanabe KI, Yoshida N, Muramatsu H, Takahashi Y, Kojima S.	Long-term outcomes of 95 children with moderate aplastic anemia treated with horse antithymocyte globulin and cyclosporine.	Pediatr Blood Cancer.	64(5)		2017
Elmahadi S, Muramatsu H, Kojima S.	Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for dyskeratosis congenita.	Curr Opin Hematol.	23(6)	501-507	2016
Kojima D, Wang X, Muramatsu H, Okuno Y, Nishio N, Hama A, Tsuge I, Takahashi Y, Kojima S.	Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary immunodeficiencies.	J Allergy Clin Immunol.	138(1)	303-305.e3	2016
Imashuku S, Muramatsu H, Sugihara T, Okuno Y, Wang X, Yoshida K, Kato A, Kato K, Tatsumi Y, Hattori A, Kita S, Oe K, Sueyoshi A, Usui T, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanno H.	PIEZO1 gene mutation in a Japanese family with hereditary high phosphatidylcholine hemolytic anemia and hemochromatosis-induced diabetes mellitus.	Int J Hematol.	104(1)	125-129	2016
Arashiki N, Takakuwa Y, Mohandas N, Hale J, Yoshida K, Ogura H, Utsugisawa T, Ohga S, Miyano S, Ogawa S, Kojima S, Kanno H.	ATP11C is a major flippase in human erythrocytes and its defect causes congenital hemolytic anemia.	Haematologica.	101(5)	59-65	2016

小倉浩美, 菅野仁	【貧血 実地医家に役立つ知識と診療の進めかた】セミナー臨床に役立つ知識と情報 溶血性貧血の鑑別診断の進め方	MedicalPractic	33(9)	1387-1391	2016
大賀正一, 山城安啓, 菅野仁	【貧血性疾患診療の進歩】先天性溶血性貧血の遺伝子診断	血液内科	73(2)	149-154	2016
新敷信人, 菅野仁, 高桑雄一	ヒト赤血球膜におけるフリッパーゼ分子の同定とリン脂質非対称性維持のメカニズム	脂質生化学研究	58	72-73	2016
小倉浩美, 菅野仁	【血球の増加と減少】赤血球 貧血 遺伝性貧血	小児内科	48(7)	1000-3	2016
小林博人, 菅野仁	型T細胞を用いた癌免疫療法	日本輸血細胞治療学会誌	62(1)	3-12	2016
Ling C, Huang J, Yan Z, Li Y, Ohzeki M, Ishiai M, Xu D, Takata M, Seidman M, and Wang W.	Bloom syndrome complex promotes FANCM recruitment to stalled replication forks and facilitates both repair and traverse of DNA interstrand crosslinks.	Cell Discov.	2	16047	2016
Tian X, Patel K, Ridpath JR, Chen Y, Zhou YH, Neo D, Clement J, Takata M, Takeda S, Sale J, Wright FA, Swenberg JA, Nakamura J.	Homologous recombination and translesion DNA synthesis play critical roles on tolerating DNA damage caused by trace levels of hexavalent chromium.	pLOS One	11(12)	e0167503	2016
Sato K, Shimomuki M, Katsuki Y, Takahashi D, Kobayashi W, Ishiai M, Miyoshi H, Takata M, Kurumizaka H.	FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex by binding RAD51 and protects the 5'-DNA end.	Nucleic Acids Res.	44	10758-10771	2016
Katsuki Y, Takata M.	Defects in HR repair behind the human diseases: FA and HBOC.	Endocrine Related Cancer.	23	T19-37	2016
Hashimoto K, Sharma V, Sasanuma H, Tian X, Takata M, Takeda S, Swenberg J and Nakamura J.	Poor recognition of O6-isopropyl dG by MGMT triggers double strand break-mediated cell death and micronucleus induction in FANC-deficient cells.	Oncotarget	7	59795-59808	2016
Mu A 他	Enhancements of the production of bilirubin and the expression of $\beta$ -globin by carbon monoxide during erythroid differentiation.	FEBS Lett.	590	1447-54	2016
Moriya K, et al.	Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in a patient with novel compound heterozygous RTEL1 gene mutations.	Pediatric Blood & Cancer	63(9)	1683-4	2016
山口博樹	骨髄不全症におけるテロメア制御異常	血液フロンティア	27(1)	5-9	2017