

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 29 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 30（2018）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）	
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	23
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	27
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	30
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	34
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	37
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. 先天性溶血性貧血の疫学調査・診療ガイドラインの作成	41
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	45
高田 穰（京都大学放射線生物研究センター 教授）	
8. 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	49
小原 明（東邦大学医学部小児科 教授）	
9. DBAの遺伝子診断・診療ガイドラインの作成	52
照井 君典（弘前大学大学院医学研究科小児科学 准教授）	
10. X染色体連鎖鉄芽球性貧血の女性例の検討	55
古山 和道（岩手医科大学生化学講座分子医化学分野 教授）	
11. CDAのデータ管理、診断基準の確立	58
多賀 崇（滋賀医科大学小児科 准教授）	

1 2 . 重症先天性好中球減少症 ガイドライン . . . . .	60
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)	
1 3 . 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)	
1 4 . 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)	
1 5 . DKCの遺伝子診断 . . . . .	70
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、精度の高い疾患データベースの構築を推進した。

DBAは、14例が新規登録され、11例に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに192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、113例（58.9%）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1例において原因遺伝子が同定された。FAは、3例の新規症例を解析した。さらに、これまでの症例の解析結果の見直しを進め、合計117例の症例について解析した。同定された変異遺伝子では、FANCAとFANCG変異が58%と24%を占めており、合計で82%の症例で確認された。55種類の異なったバリエーションが68症例のFANCA患者で同定された。FAの長期生存例における固形がんの発症について調査した。同種造血細胞移植を施行した52例のうち15例に固形がんの発症を認めた。同種造血細胞移植により、骨髄不全発症例の予後は著しく改善されたが、特に成人後に固形がんを発症する例が増加しており、その対策の確立が急務と考えられた。CDAは、22例に遺伝子診断を行い、5例で1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、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や不全型DKCで発見された*TERT*変異、*TERC*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示唆された。SDSは、これまでに計45例の患者が同定され、発症数は2.7例/年、男女比は2.2 : 1であった。最も多い変異は183-184TA>CT/258+2T>C変異が73%を占め、次に258+2T>C/258+2T>C変異が6.6%であった。初診時の臨床所見は様々であり、血球減少、体重増加不良、脂肪便、肝機能障害、低身長、骨格異常などである。膵外分泌不全や画像での膵臓の異常はほとんどの患者で認められた。好中球減少は初診時に約1/3の患者でしか認められなかったが、経過中では89%の患者で認められた。その他の血球異常は貧血、血小板減少、汎血球減少症がそれぞれ64%、69%、40%で認められた。3例（6%）の患者では白血病に進展した。うち2例は18歳以上で白血病を発症していた。CTPでは、15例の先天性血小板減少症を疑う症例について系統的鑑別診断解析を施行し、MYH9異常症8例、2B型von Willebrand病1例、TUBB1異常症1例の診断に至り、5例は確定診断されなかった。

本年度は、研究班で得られたデータをもとに、悪性腫瘍の合併を考慮した重症度分類の改定を行った。「2017年度版診療ガイドライン」を日本小児血液・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10月に診断と治療社より出版した。

## 【研究分担者氏名】

張替秀郎：東北大学大学院医学系研究科教授  
矢部普正：東海大学医学部教授  
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准教授  
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  
矢部みはる：東海大学医学部非常勤医師  
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  
石村匡崇：九州大学大学院医学研究院助教  
長谷川大輔：聖路加国際大学聖路加国際病院副医長

## 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「先天性骨髄不全班」(伊藤班)が発足し、研究を推進してきた。本研究申請では、先天性骨髄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い、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、遺伝子診断の結果も含む精度の高い先天性骨髄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、先天性骨髄不全のより精度の高い疾患データベースの確立を目指す。また、重症度分類の改訂を行う。平成30年度は、データ収集と観察研究を継続し、正確な先天性骨髄不全の実態把握を行い、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と診療ガイドラインの改訂を行う。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や書籍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29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。先天性骨髄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。

## 3) 先天性骨髄不全症の鑑別診断：先天性溶血性貧血の解析

1972年から2017年の46年間で赤血球酵素活性測定により診断したPK異常症を集計し、臨床像を解析した。遺伝子検査を実施した症例および家系内保因者について赤血球PK活性と遺伝子型(ホモ接合および複合ヘテロ接合、ヘテロ接合)を比較検討した(菅野、大賀)。

## 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・NGS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、通常の間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登録し、詳細な疾患データベースを構築する。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骨髄不全のWEB登録システムの構築を計画している。(小島、張替、矢部、真部、小原、小林、國島、大賀、伊藤)。

## 6) 診療ガイドラインの確立

収集された情報を基に、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら、より多くのエビデンスに基づいた診断基準、重症度分類、診断・治療ガイドラインの改正を行う。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。既知の原因遺伝子に関しては、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

2006年から2016年診断登録症例数を表に示す(表1)。

a. 疾患登録(一次調査)症例：2016年診断症例は日本小児血液・がん学会会員236施設の70%に相当する165施設が登録した。表に挙げた溶血性貧血を除く Idiopathic AA から Cong. Thrombocytopenia までの14の造血障害疾患患者数は11年間で総計1,045例である。造血障害の診断は小児血液・がん学会の形態中央診断が貢献している。

2014年頃から Idiopathic AA の症例数が減少している。小児期には中等症 Idiopathic AA と鑑別が困難な Refractory Cytopenia in Childhood, RCC が WHO により定義され、前記中央診断が RCC の中央診断に貢献している。造血障害の病態が疑われる

RCC は、2014 年から 3 年間で 20 例、21 例、15 例であり（表最下段）、これと Idiopathic AA 症例数を合算すると、61 例、75 例、61 例となり、2013 年以前の Idiopathic AA 合計症例数とほぼ同数となる。

b. DBA : DBA 症例は 11 年間で 94 例、これとは別に特発性赤芽球癆 54 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. FA : FA は 11 年間で 44 例、未診断例が残存し成人年齢で白血病等を発症する症例の把握にまでは至っていない。

## 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、あるいは先天性骨髄不全症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。

先天性骨髄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。

## 3) 先天性骨髄不全症の鑑別診断：先天性溶血性貧血の解析

先天性骨髄不全症の鑑別診断目的の全エクソーム解析で、サラセミアや赤血球酵素異常症の病因遺伝子変異が検出されることが明らかになった。無効造血を呈する先天性貧血として CDA と先天性溶血性貧血の一型であるピルビン酸キナーゼ欠乏性貧血（PK 異常症）はしばしば鑑別が困難である。今年度は我が国の赤血球酵素異常症として頻度の高い PK 異常症の日本人症例に関して、赤血球 PK 活性と遺伝子変異解析結果の関連について検討を加えた。

1972 年から 2017 年の 46 年間で赤血球酵素活性測定により診断した PK 異常症（ピルビン酸キナーゼ欠乏性貧血）は 120 例であった。診断時年齢の中央値は 10 歳（最小 0 歳、最大 72 歳）で、男性が 52 例、女性が 68 例であった。患者両親の 34.7% に血縁があった。臨床経過では、63.6% の症例に交換輸血の既往を認めた。53.1% の症例に脾腫を認め、治療として脾摘術を受けた症例が 58.6% に及んでいた。64.6% に赤血球輸血の既往を認め、経過中 47.7% が急性溶血発作を経験していた。

診断時血液検査所見では、ヘモグロビン 8.8g/dL、網赤血球数 13.0%、血清間接ビリルビン 3.7mg/dL、LDH 587 IU/L、トランスフェリン飽和率 57%、血清フェリチン 497 ng/mL であった。

36 症例について *PKLR* 遺伝子検査を実施し、両アレルに病因遺伝子変異を同定した。また、42 例の家族がヘテロ接合体であった。同時測定 of 成人対照に対する赤血球 PK の相対活性値は、患者が  $38.5 \pm 3.7\%$ 、一方保因者は  $58.5 \pm 3.3\%$  であった（ $\text{mean} \pm \text{SE}$ ）。ROC（receiver operator characteristic）カーブにおけるカットオフ値は、患者 保因者が 85.9% で、保因者 正常対照が 79.8% であった。

## 4) 遺伝子診断

### a. DBA

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 14 例中 11 例（78.6%）に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに 192 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、113 例（58.9%）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*および*RPS15A*が含まれている。

#### b. FA

今年度新規に受け付けた症例の分子診断は、第1例については、片アレルFANCA 2546delC判明(もう片アレルはMLPAも行ったが不明)、2例目、FANCG c.1066C>T homo。もう1例は、common mutationなく、名古屋大学のターゲットシーケンスに提出した。

現在まで集積した117例(113家系)について、遺伝子の変異と、その効果について解析し、まとめた。同定された変異遺伝子では、FANCAとFANCG変異が58%と24%を占めており、合計で82%の症例で確認された。55種類の異なったバリエーションが68症例のFANCA患者で同定された。内訳は、17種類のヌクレオチド置換変異、16種類の欠失挿入、12種類の巨大欠失、一つの巨大繰り返し挿入 9つのスプライス部位変異などであった。FANCAのc.2546delCが最も頻度の高い変異で、32%で認められた。この変異は、日本人集団で頻度が比較的高く、東北メガバンクの健常人データベース3.5KJpnにおいても0.1%程度検出された。28人のFANCG患者において、二つのFANCG mutations (c.307+1G>C and c.1066C>T) 変異アレルの88%に相当した。面白いことに、これら3つの変異は韓国のFA患者においてもドミナントに認められており (Clin Genet 2013;84:271-275)、これらの変異が現代日本人と韓国人の祖先が同一集団であった時代に誕生し、その後日本人の祖先が移動して日本列島に持ち込まれたものと思われる。

FANCAとFANCG以外の稀なタイプの中で、重篤な奇形をFANCBとFANCIの変異で認めた。また、3例のFANCD1 (BRCA2) と1例のPALB2変異 (FANCN)を同定したが、様々な腫瘍を合併していた。

ごく一部にどうしても既知の原因遺伝子の変異が同定できない症例が存在し、今後の解析が必要である。

#### c. SA

研究期間内に3例の新規症例が登録され、うち1例において新規のALAS2遺伝子変異が同定された。61歳、女性。貧血、肝硬変、肝ヘモクロマトーシス、胃食道静脈瘤の既往あり。貧血の家族歴は明らかでない。近医にて汎血球減少 (WBC 2400/uL, Hb 7.3g/dL, Plt 8.6 x 10<sup>4</sup>/uL, MCV 112.8fL) の精査目

的で骨髄検査を施行した結果、全赤芽球中の60%に環状鉄芽球を認めた。染色体は正常核型で、MDSを示唆する異形性は認めなかった。遺伝性鉄芽球性貧血の可能性を考慮し遺伝子解析を施行した結果、新規のALAS2遺伝子のヘテロ変異を認めた (ALAS2 c.488 G>A, p.Arg163His)。組換え蛋白質を用いたALAS2活性測定の結果、変異ALAS2蛋白質の活性は野生型に比べ約1/20程度と有意に低下していた。本症例に対しビタミンB6補充を試みたものの不応であった。

#### 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。

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。

また、様々な血液疾患症例 687例に対して遺伝性血液疾患関連遺伝子のターゲットシーケンスを実施し、CDA4例 (CDAN1 2例、SEC23B 1例、KLF1 1例)、DKC 14例 (TINF2 7例、TERT 5例、DKC1 1例、RTEL1 1例)を遺伝子診断し得た。

#### e. DKC

本邦のDKC症例で発見された原因遺伝子変異に関して、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ために、in vitroにて機能解析を行った。

DKCで発見されたTERT E280K, del334\_335は野生型と比較してテロメラーゼ活性の低下は認められなかった (RTA 210.8±17.8 vs. 350.0±78.9, 319.3±85.8 p=0.2010, p=0.3389)。一方、不全型DKC



で認められた *TERT* G106W, G682D は野生型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 *TERT* P632R, T726M は野生型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.  $84.6 \pm 19.4$ ,  $97.6 \pm 14.7$   $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ ) *TERT* G106W, G682D と比較してテロメラーゼ活性の低下の程度が小さかった (RTA  $7.4 \pm 6.3$  vs.  $84.6 \pm 19.4$ ,  $97.6 \pm 14.7$   $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ )。

DKCで発見された *TERC* c.73 G>C は野生型と比較してテロメラーゼ活性の低下は認められなかった (RTA  $390.2 \pm 113.9$  vs.  $388.2 \pm 62.80$ ,  $p = 0.9881$ )。一方、不全型DKCで認められた *TERC* c.439\_443del は野生型に比較し有意にテロメラーゼ活性が低下していた (RTA  $390.2 \pm 113.9$  vs.  $6.780 \pm 13.88$   $p < 0.0001$ )。

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。

#### f. SDS

計45例の患者が同定され、発症数は2.7例/年であった。男女比は2.2:1であった。最も多い変異は183-184TA>CT/258+2T>C変異が73%を占め、次に258+2T>C/258+2T>C変異が6.6%であった。初診時の臨床所見は様々であり、血球減少、体重増加不良、脂肪便、肝機能障害、低身長、骨格異常などである。水外分泌不全あるいは画像での膵臓の異常はほとんどの患者で認められた。好中球減少は初診時に約1/3の患者でしか認められなかったが、経過中では89%の患者で認められた。その他の血球異常は、貧血、血小板減少、汎血球減少症がそれぞれ64%、69%、40%で認められた。3例(6%)の患者では白血病に進展した。うち2例は18歳以上で白血病を発症していた。

#### g. 先天性血小板減少症

本年度(平成29年4月~平成30年3月)は、15例の先天性血小板減少症を疑う症例について系統的鑑別診断解析を施行し、*MYH9*異常症8例、*TUBB1*異常症1例、2Bvon型 Willebrand病1例の診断に至り、5例は確定診断されなかった。また、本研究班と連携する「稀少小児遺伝性血液疾患に対する新規責任遺伝子の探索と遺伝子診断システムの構築に関する研

究」(小島班)で同定された2個の*MYH9*遺伝子バリアントの評価を末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析により施行し、ともに良性であることを示した。

#### D. 考察

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。今回、Idiopathic AA症例数と鑑別が問題となるRCCに注目して症例数を検討した。RCCの診断には学会中央診断事業が貢献している。その結果、Idiopathic AAとRCCの症例数と合算すると、2013年以前のIdiopathic AA年間症例数とほぼ同等になることが観察された。

先天性骨髄不全症の鑑別診断において、次世代シーケンサー(NGS)を用いた全エクソーム解析、関連遺伝子パネルを用いたTarget-captured sequencing(TCS)解析などが導入され、診断率の向上が報告されている。一方で、今までの臨床診断結果からは想定できなかった病因遺伝子変異が同定されるケースも増えてきた。最近、Bianchiらは、赤血球酵素活性測定により、PK異常症と診断した症例に脾摘術を施行したところ、術後重篤な静脈血栓症を来したことを報告した。本例に対してNGS解析を実施したところ、脱水型遺伝性有口赤血球症(dehyd-rated hereditary stomatocytosis; DHSt)の病因となる*PIEZO1*変異を同定し、*PKLR*遺伝子に関してはヘテロ接合で患者は保因者であることが明らかになった。

今回の研究成果により、赤血球輸血依存性の重症例を除けば、残存赤血球PK活性値を同時測定の正常対照との比較で示すことにより、*PK*遺伝子変異を両アレルに認めるホモ接合/複合ヘテロ接合と片アレルにのみ変異を認めるヘテロ接合を鑑別することが可能であることが示唆された。

PK異常症は赤血球輸血を必要としない症例であっても、無効造血による二次性ヘモクロマトーシスを発症することで、鉄キレート療法の導入が必要な症例も多く、今回の調査においても診断時にトランスフェリン飽和率が50%以上、フェリチン値も約

500ng/mLとヘモクロマトーシスが発症していることが明らかになった。PK異常症との鑑別を要する無効造血疾患としては先天性赤血球形成異常性貧血（CDA）、Diamond-Blackfan貧血（DBA）や骨髄異形成症候群（MDS）などが挙げられ、今後はより多くの症例を積み重ね、これらの疾患の鑑別におけるTCS解析の臨床的有用性を明らかにする必要があると考えられた。

117例の日本人患者の分子診断をまとめることにより、日本人におけるファンコニ貧血患者の変異スペクトラムを明らかにした。一部の患者で、FANCB、FANCD1など稀な遺伝子型の患者では通常のファンコニ貧血とは違い、重症奇形、低年齢での発がんなどの特殊な病態を呈している。これらの知見は、今後の分子診断を効率よく施行する上での基礎データになるものである。今後、一般の日本人集団での変異頻度のデータの蓄積によって、様々な病態との関連性などが浮かび上がってくる可能性がある。東北メガバンク等のデータベース、バイオバンクの充実により、一般人におけるFA遺伝子の変異頻度についても明確化され、様々な遺伝病のリスクなどについても、より確実な遺伝カウンセリングなどが可能となる時代が近づいていると思われる。

女性においてALAS2遺伝子のヘテロ変異に伴う大球性鉄芽球性貧血を認めた例は、本症例以外にこれまでに3家系報告されている。貧血の発症機序としては、加齢に伴うSkewed X-chromosome inactivationや変異ALAS2を発現する赤芽球の分化成熟不全などの可能性が示唆されている。骨髄異形成症候群（MDS）では大球性貧血を示しうる点から（Takahashi et al. Int J Hematol. 2016）、女性で大球性鉄芽球性貧血を認めた際は、後天性鉄芽球性貧血の他にALAS2遺伝子のヘテロ変異の可能性も鑑別として考慮する必要がある。

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。

本邦のDKC症例で発見されたTERT変異及び

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TERT G106WとG682D、TERT c.439\_443del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られた。また、不全型DKCで認められたTERT 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た。一方、DKC症例で発見されたTERT E280Kとdel334\_335、TERT c.73G>C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、VA13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全てではない。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。

先天性血小板減少症を疑う15症例について先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断解析を行い、10例（66.7%）の症例で確定診断が得られた。MYH9異常症は8例（53.3%）と最も高頻度に診断された。MYH9異常症8例中、2例では白血球封入体を認めず、原因不明の血小板減少症あるいは新生児同種免疫性血小板減少症と診断されていたが、末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析と局在分類により確定診断された。2例のMYH9異常症では新規変異を同定した。

MYH9異常症診断に用いる末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析では、異常局在を認めればMYH9異常症と診断することが可能で、正常局在所見からはMYH9異常症を否定することが可能である。従って、MYH9遺伝子解析により同定されたバリエーションの病原性の判定にも有用であり、本年度には次世代シーケンス解析で同定されたMYH9バリエーションの評価を行った。

## E．結論

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、先天性骨髄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。遺伝性骨髄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。

本年度は、研究班で得られたデータをもとに、悪性腫瘍の合併を考慮した重症度分類の改訂を行った。

また、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。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10月に診断と治療社より出版した。

しかし、この領域は研究の進歩が日進月歩であるため定期的に診療ガイドラインの改訂が必要である。

診療ガイドラインに基づいて、広く臨床医が先天性骨髄不全症を認知することによって、さらに多くの患者が同定され、早期治療介入によって予後の改善につながる可能性が示唆される。

## F．健康危険情報

該当せず

## G．研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 伊藤悦朗, 大賀正一, 小原明, 金兼弘和, 唐川修平, 菅野仁, 國島伸治, 小島勢二, 小林正夫, 笹原洋二, 多賀崇, 高田穰, 照井君典, 長谷川大輔, 張替秀郎, 藤原亨, 古山和道, 真部淳, 溝口洋子, 村松秀城, 矢部普正, 山口博樹, 渡邊健一郎. Diamond-Blackfan 貧血 / Fanconi 貧血 / 遺伝性鉄芽球性貧血 / Congenital dyserythropoetic anemia / Shwachman-Diamond 症候群 / 先天性好中球減少症 / 先天性血小板減少症. **先天性骨髄不全症診療ガイドライン 2017** 診断と治療社, 2017年10月31日.
- 2) Ito E, Terui K, Toki T. Inherited bone marrow failure syndrome, TAM. In **Hematological Disorders in Children**. edited by Eiichi Ishii, Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2017, pp. 145-170.
- 3) Sonoda M, Ishimura M, Ichimiya Y, Terashi E, Eguchi K, Sakai Y, Takada H, Hama A,

Kanno H, Toki T, Ito E, Ohga S. Atypical erythroblastosis in a patient with Diamond-Blackfan anemia who developed del(20q) myelodysplasia. **Int J Hematol**. 2018 Feb 23. doi: 10.1007/s12185-018-2424-4.

- 4) Noguchi J, Kanno H, Chiba Y, Ito E, Ishiguro A. Discrimination of Diamond-Blackfan anemia from parvovirus B19 infection by RBC glutathione. **Pediatr Int**. 2017;59(7):838-840. doi:10.1111/ped.13284.
- 5) Ogasawara T, Kawauchi K, Mori N, Sakura H, Katoh F, Kanno H, Ito E. Successful long-term management with low-dose prednisolone in an adult patient with Diamond-Blackfan anemia. Successful long-term management with low-dose prednisolone in an adult patient with Diamond-Blackfan anemia. **Rinsho Ketsueki** 2017;58(8):917-921. doi:10.11406/rinketsu.58.917.
- 6) Miot C, Imai K, Imai C, Mancini AJ, Kucuk XY, Kawai T, Nishikomori R, Ito E, Pellier I, Girod SD, Rosain J, Sasaki S, Chandrakasan S, Schmid JP, Okano T, Colin E, Olaya-Vargas A, Yamazaki-Nakashimada M, Qasim W, Padilla SE, Jones A, Krol A, Cole N, Jolles S, Bleesing J, Vraetz T, Gennery AR, Abinun M, Güngör T, Carvalho BC, Condino-Neto A, Veys P, Holland SM, Uzel G, Moshous D, Neven B, Ehl S, Döffinger R, Patel SY, Puel A, Bustamante J, Gelfand EW, Casanova JL, Orange JS, and Picard C. Hematopoietic stem cell transplantation in 29 patients hemizygous for hypomorphic IKBKG / NEMO mutations. **Blood** 2017;130(12):1456-1467. doi:10.1182/blood-2017-03-771600.
- 7) 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;105(4):515-520. doi:10.1007/s12185-016-2151-7.
- 8) 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. doi:10.3324/haematol.2016.153932.
  - 9) 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;19(7):796-802. doi: 10.1038/gim.2016.197.
  - 10) Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Saito K, Kamata M, Tamai Y, Kawamata S, Harigae H. A defined culture method enabling the establishment of ring sideroblasts from induced pluripotent cells of X-linked sideroblastic anemia. **Haematologica** 2018;103:e188-e191.
  - 11) Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators. **Tohoku J Exp Med.** 2018;244:41-52.
  - 12) Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Effects of in vivo deletion of GATA2 in bone marrow stromal cells. **Exp Hematol.** 2017;56:31-45.
  - 13) Fujiwara T, Fukuhara N, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Onishi Y, Furuyama K, Harigae H. A novel heterozygous ALAS2 mutation in a female with macrocytic sideroblastic anemia resembling myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts: A case report and literature review. **Ann Hematol.** 2017;96:1955-1957.
  - 14) Saito K, Fujiwara T, Ota U, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizuka M, Tanaka T, Harigae H. Dynamics of absorption, metabolism, and excretion of 5-aminolevulinic acid in human intestinal Caco-2 cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2017;11:105-111.
  - 15) 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.** 2017;485: 380-387.
  - 16) 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.** 2017;49:56-67.
  - 17) Hoenig M, Lagresle-Peyrou C, Pannicke U, Notarangelo LD, Porta F, Gennery AR, Slatter M, Cowan MJ, Stepensky P, Al-Mousa H, Al-Zahrani D, Pai SY, Al Herz W, Gaspar HB, Veys P, Oshima K, Imai K, Yabe H, Noroski LM, Wulffraat NM, Sykora KW, Soler-Palacin P, Muramatsu H, Al Hilali M, Moshous D, Debatin KM, Schuetz C, Jacobsen EM, Schulz AS, Schwarz K, Fischer

- A, Friedrich W, Cavazzana M. Reticular dysgenesis: international survey on clinical presentation, transplantation and outcome. **Blood** 2017;129:2928-38. doi:10.1182/blood-2016-11-745638. [Epub ahead of print]
- 18) 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;64(5). doi: 10.1002/pbc.26305. Epub 2016 Nov 3.
- 19) Sekinaka Y, Mitsuiki N, Imai K, Yabe M, Yabe H, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Takagi M, Arai A, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Muramatsu H, Kojima S, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S. Common Variable Immunodeficiency Caused by FANC Mutations. **J Clin Immunol**. 2017;37(5):434-44. doi:10.1007/s10875-017-0396-4. Epub 2017 May 11.
- 20) Kubaski F, Yabe H, Suzuki Y, Seto T, Hamazaki T, Mason RW, Xie L, Onsten TGH, Leistner-Segal S, Giugliani R, Dũng VC, Ngoc CTB, Yamaguchi S, Montañõ AM, Orii K, Fukao T, Shintaku H, Orii T, Tomatsu S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Mucopolysaccharidosis II. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2017;23(10): 1795-1803. doi:10.1016/j.bbmt.2017.06.020. Epub 2017 Jul 1.
- 21) Onishi Y, Mori T, Kako S, Koh H, Uchida N, Kondo T, Kobayashi T, Yabe H, Miyamoto T, Kato K, Suzuki R, Nakao S, Yamazaki H; Adult Aplastic Anemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Outcome of Second Transplantation Using Umbilical Cord Blood for Graft Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Aplastic Anemia. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2017;23(12):2137-42. doi: 10.1016/j.bbmt.2017.08.020. [Epub ahead of print]
- 22) Stapleton M, Kubaski F, Mason RW, Yabe H, Suzuki Y, Orii K, Orii T, Tomatsu S. Presentation and Treatments for Mucopolysaccharidosis Type II (MPS II; Hunter Syndrome). **Expert Opin Orphan Drugs**. 2017;5(4):295-307. doi:10.1080/21678707.2017.1296761. Epub 2017 Mar 8. PMID:29158997.
- 23) Morishima Y, Azuma F, Kashiwase K, Matsumoto K, Orihara T, Yabe H, Kato S, Kato K, Kai S, Mori T, Nakajima K, Morishima S, Satake M, Takanashi M, Yabe T; Japanese Cord Blood Transplantation Histocompatibility Research Group. Risk of HLA Homozygous Cord Blood Transplantation: Implications for Induced Pluripotent Stem Cell Banking and Transplantation. **Stem Cells Transl Med**. 2018;7(2):173-79. doi:10.1002/sctm.17-0169. Epub 2017 Dec 23.
- 24) Horikoshi Y, Umeda K, Imai K, Yabe H, Sasahara Y, Watanabe K, Ozawa Y, Hashii Y, Kurosawa H, Nonoyama S, Morio T. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukocyte Adhesion Deficiency. **J Pediatr Hematol Oncol**. 2018; 40(2):137-140. doi:10.1097/MPH.0000000000001028. [Epub ahead of print]
- 25) Oshima K, Saiki N, Tanaka M, Imamura H, Niwa A, Tanimura A, Nagahashi A, Hirayama A, Okita K, Hotta A, Kitayama S, Osawa M, Kaneko S, Watanabe A, Asaka I, Fujibuchi W, Imai K, Yabe H, Kamachi Y, Hara J, Kojima S, Tomita M, Soga T, Noma T, Nonoyama S, Nakahata T, Saito M. Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic

- progenitors. **Biochem Biophys Res Commun.** 2018;497(2):719-25. doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.139. Epub 2018 Feb 17.
- 26) 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.
- 27) Hirabayashi S, Seki M, Hasegawa D, Kato M, Hyakuna N, Shuo T, Kimura S, Yoshida K, Kataoka K, Fujii Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kiyokawa N, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Manabe A. Constitutional abnormalities of IDH1 combined with secondary mutations predispose a patient with Maffucci syndrome to acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer.** (in press)
- 28) Hasegawa D, Manabe A. Myelodysplastic syndrome and JMML. In: Ishii E, editor. **Hematological disorders in children-Pathogenesis and treatment** 2017, p87-108, Springer (Berlin).
- 29) Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Sekiya Y, Suzuki K, Hamada M, Kataoka S, Ichikawa D, Taniguchi R, Murakami N, Kojima D, Nishikawa E, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Development of clinical paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in children with aplastic anaemia. **Br J Haematol.** 2017;78(6):954-958. doi:10.1111/bjh.4790.
- 30) 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;64(5). doi:10.1002/pbc.26305.
- 31) Matsumaru S, Oguni H, Ogura H, Shimojima K, Nagata S, Kanno H, Yamamoto T. A novel PGK1 mutation associated with neurological dysfunction and the absence of episodes of hemolytic anemia or myoglobinuria. **Intractable Rare Diseases Research** 2017; 6(2):132-136. doi:10.5582/indr.2017.01020.
- 32) Sakaue S, Kasai T, Mizuta I, Suematsu M, Osone S, Azuma Y, Imamura T, Tokuda T, Kanno H, El-Agnaf OMA, Morimoto M, Nakagawa M, Hosoi H, Mizuno T. Early-onset parkinsonism in a pedigree with phosphoglycerate kinase deficiency and a heterozygous carrier: do PGK-1 mutations contribute to vulnerability to parkinsonism? **NPJ Parkinsons Dis.** 2017;3:13. doi:10.1038/s41531-017-0014-4.
- 33) Ogasawara T, Kawauchi K, Mori N, Sakura H, Katoh F, Kanno H, Ito E. Successful long-term management with low-dose prednisolone in an adult patient with Diamond-Blackfan anemia. **Rinsho Ketsueki** 2017;58:917-921. doi:10.11406/rinketsu.58.917.
- 34) Niizuma H, Kanno H, Sato A, Ogura H, Imaizumi M. Splenectomy resolves hemolytic anemia caused by adenylate kinase deficiency. **Pediatr Int.** 2017;59(2):228-230. doi:10.1111/ped.13166.
- 35) Van Straaten S, Bierings M, Bianchi P, Akiyoshi K, Kanno H, Serra IB, Chan J Huang X, van Beers E, Ekwattanakit S, G üng ör T, Kors WA, Smiers F, Raymakers R, Yanez L, Sevilla J, van Solinge W, Segovia JC, van Wijk R. Worldwide study of hematopoietic allogenic stem cell transplantation in pyruvate kinase deficiency. **Haematologica** 2018;103(2). doi:10.3324/Haematol.2017.177857.

- 36) Okamoto Y, Iwasaki WM, Kugou K, Takahashi KK, Oda A, Sato K, Kobayashi W, Kawai H, Sakasai R, Takaori-Kondo A, Yamamoto T, Kanemaki MT, Taoka M, Isobe T, Kurumizaka H, Innan H, Ohta K, Ishiai M, Takata M. Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes. **Nucleic Acid Res.** 2018;46(6):2932-2944. doi:10.1093/nar/gky058.
- 37) Kadoda K, Moriwaki T, Tsuda M, Sasanuma H, Ishiai M, Takata M, Ide H, Masunaga SI, Takeda S, Tano K. Selective cytotoxicity of the anti-diabetic drug, metformin, in glucose-deprived chicken DT40 cells. **PLoS One.** 2017;12(9):e0185141. doi:10.1371/journal.pone.0185141. eCollection 2017.
- 38) Mochizuki AL, Katanaya A, Hayashi E, Hosokawa M, Moribe E, Motegi A, Ishiai M, Takata M, Kondoh G, Watanabe H, Nakatsuji N, Chuma S. PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. **Mol Cell Biol.** 2017;37(23). pii:e00117-17. doi:10.1128/MCB.00117-17.
- 39) Knies K, Inano S, Ramírez MJ, Ishiai M, Surallés J, Takata M, and Schindler D. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase *RFWD3* cause Fanconi anemia. **Journal of Clinical Investigation J Clin Invest.** 2017;127(8):3013-3027. doi:10.1172/JCI92069. Epub 2017 Jul 10. PMID:28691929.
- 40) Inano S, Sato K, Katsuki Y, Kobayashi W, Tanaka H, Nakajima K, Nakada S, Hiroyuki Miyoshi, Knies K, Takaori-Kondo A, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. RFWD3-mediated ubiquitination promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination. **Mol Cell.** 2017;66(5):622-634.e8. doi:10.1016/j.molcel.2017.04.022. PMID:28575658.
- 41) Ishiai M, Sato K, Tomida J, Kitao H, Kurumizaka H, Takata M. Mutation Research special section "Protein modifications in DNA repair and cancer" Activation of the FA pathway mediated by phosphorylation and ubiquitination. **Mutat Res.** 2017 May 5. pii: S0027-5107(17)30078-7. doi:10.1016/j.mrfmmm.2017.05.003.
- 42) Hiejima E, Shibata H, Yasumi T, Shimodera S, Hori M, Izawa K, Kawai T, Matsuoka M, Kojima Y, Ohara A, Nishikomori R, Ohara O, Heike T. Characterization of a large UNC13D gene duplication in a patient with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. **Clin Immunol.** 2018;191:63-66.
- 43) Watanabe M, Nishikomori R, Fujimaki Y, Heike T, Ohara A, Saji T. Live-attenuated vaccines in a cryopyrin-associated periodic syndrome patient receiving canakinumab treatment during infancy. **Clin Case Rep.** 2017;5:1750-1755.
- 44) Yusa T, Tateda K, Ohara A, Miyazaki S. New possible biomarkers for diagnosis of infections and diagnostic distinction between bacterial and viral infections in children. **J Infect Chemother.** 2017;23:96-100.
- 45) 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. PMID: 27496948.
- 46) 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. PMID:27087140.

- 47) Onodera R, Kurita E, Taniguchi K, Karakawa S, Okada S, Kihara H, Fujii T, Kobayashi M. Anti-human neutrophil antigen-1a, -1b, -and -2 antibodies in neonates and children with immune neutropenia analyzed by extracted granulocyte antigen immunofluorescence assay. **Transfusion** 2017;57:2586-2594. doi:10.1111/trf.14291.
- 48) Hayakawa S, Ohno N, Okada S, Kobayashi M. Significant augmentation of regulatory T cell numbers occurs during the early neonatal period. **Clin Exp Immunol.** 2017;190:268-279. doi:10.1111/cei.13008.
- 49) Leiding JW, Okada S, Hagin D, Abinun M, Shcherbina A, Balashov DN, Kim VHD, Ovadia A, Guthery SL, Pulsipher M, Lilic D, Dvlin LA, Chritie S, Depner M, Fuchs S, van Royden-Kerkhof A, Lindemans C, Petrovic A, Sullivan KE, Bunin N, Kilic SS, Arpaci F, Calle-Martin O, Martinez-Martinez L, Alddave JC, Kobayashi M, Ohkawa T, Imai K, Iguchi A, Roifman CM, Genney AR, Slatter M, Ochs HD, Morio T, Torgerson TR, Inborn Errors Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 mutations. **J Allergy Clin Immunol.** 2018;141:704-717. doi:10-1016/ j.jaci.2017.03.049.
- 50) Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, El Baghdadi J, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Ailal F, Takada H, Hara T, Pue; A, Boisson-Dupuis S, Bustamate J, Casanovva JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M. Alanine-scanning mutagenesis of human signal transducer and activator of transcription 1 to estimate loss- or gain-of-function variants. **J Allergy Clin Immunol.** 2017;140:232-241.
- 51) Fujiki R, Hijikata A, Shirai T, Okada S, Kobayashi M, Ohara O. Molecular mechanism and structural basis of gain-offunction of STAT1 caused by pathogenic R274Q mutation. **Journal of Biological Chemistry** 2017;292:6240-6254.
- 52) 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 human subjects with germline IKZF1 mutations. **J Allergy Clin Immunol.** 2017;140: 223-231.
- 53) Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R, Nishibuchi I, Kawaguchi H, Kolakshyapati M M, Onishi S, Saito T, Sugiyama K, Koabayashi M, Kurisu K. Development of cystic malacia after high-dose cranial irradiation of pediatric CNS tumors in long-term follow-up. **Child's Nervous System** 2017;33:957-964.
- 54) Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka N, Nakakuma H, Hasegawa D, Manabe A, Fujishima N, Fujii N, Tanimoto M, Morita Y, Matsuda A, Fujieda A, Katayama N, Ohashi H, Nagai H, Terada Y, Hino M, Sato K, Obara N, Chiba S, Usuki K, Ohta M, Imataki O, Uemura M, Takaku T, Komatsu N, Kitanaka A, Shimoda K, Watanabe K, Tohyama K, Takaori-Kondo



A, Harigae H, Arai S, Miyazaki Y, Ozawa K, Kurokawa M; for National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes. A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). **Am J Hematol.** 2017;92:1324-1232.

- 55) Kanda K, Kunishima S, Sato A, Abe D, Nishijima S, Ishigami T. A Brazilian case of Bernard-Soulier syndrome with two distinct founder mutations. **Hum Genome Var.** 2017;4:17030.
- 56) Aoki T, Kunishima S, Yamashita Y, Minamitani K, Ota S. Macrothrombocytopenia with congenital bilateral cataracts: a phenotype of *MYH9* disorder with exon 24 indel mutations. **J Pediatr Hematol/Oncol.** 2018;40(1):76-8.
- 57) Ichimiya Y, Wada Y, Kunishima S, Tsukamoto K, Kosaki R, Sago H, Ishiguro A, Ito Y. 11q23 deletion syndrome (Jacobsen syndrome) with severe bleeding: a case report. **J Med Case Rep.** 2018;12:3.
- 58) Hao J, Kada A, Kunishima S. Further classification of neutrophil non-muscle myosin heavy chain IIA localization for efficient genetic diagnosis of MYH9 disorders. **Ann Hematol.** 2018;97(4):709-11.
- 59) Miyashita N, Onozawa M, Hayasaka K, Yamada T, Migita O, Hata K, Okada K, Goto H, Nakagawa M, Hashimoto D, Kahata K, Kondo T, Kunishima S, Teshima T. A novel heterozygous *ITGB3* p.T720del inducing spontaneous activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in autosomal dominant macrothrombocytopenia with aggregation dysfunction. **Ann Hematol.** 2018;97(4):629-40.

## 2. 学会発表 国際学会

- 1) Kubota Y, Uryu K, Ito T, Kawai T, Seki M,

Isobe T, Toki T, Yoshida K, Kataoka K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Integrated genetic/epigenetic analysis revealed high heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).

- 2) Hideki M, 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, Ogawa S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. **EWOG-S/SAA2017** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).
- 3) Uechi T, Yoshihama M, Nakajima Y, Suzuki Y, Sugano S, Ito E, Kenmochi N. Ribosomal dysfunction and defective erythropoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. **The 22nd Annual Meeting of the RNA Society** (2017年5月30日-6月3日, プラハ・チェコ).
- 4) Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H. Establishment and characterization of *in vitro* model of X-linked sideroblastic anemia. **The 59th American Society of Hematology** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
- 5) Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Role of GATA2 in the maintenance of bone marrow microenvironment. **The 59th American Society of Hematology** (2017年12月9-12日,

- 米国・アトランタ).
- 6) Saito K, Fujiwara T, Morita M, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Shimizu R, Harigae H. Establishment of in vivo and in vitro model of X-linked sideroblastic anemia. **The 22<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association**( 2017年6月22-25日, スペイン・マドリード).
  - 7) 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 7<sup>th</sup> International Bioiron Society**( 2017年5月7-11日, 米国・ロサンゼルス).
  - 8) Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Exploring the mechanism of FOG1-dependent transcriptional regulation in erythroid cells. **The 22<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association**( 2017年6月22-25日, スペイン・マドリード).
  - 9) Tsumanuma R, Omoto E, Kumagai H, Katayama Y, Iwato K, Aoki G, Sato Y, Tsutsumi Y, Miyazaki K, Tsukada N, Iino M, Shinagawa A, Atsuta Y, Kodera Y, Okamoto S, Yabe H. The Efficacy and Safety of Biosimilar Filgrastim in Peripheral Hematopoietic Stem Cell Mobilization Procedures for Related Allogeneic Transplantation. **44<sup>th</sup> Annual Meeting of The European Society for Blood and Marrow Transplantation** ( 2018年3月18-21日, ポルトガル・リスボン).
  - 10) Hasegawa D, Hirabayashi S, Nishimura A, Aiga S, Yamamoto S, Hosoya Y, Fujiwara T, Harigae H, Manabe A. Clonal evolution with monosomy 7 in Pearson syndrome. **International Meeting on childhood MDS and SAA** ( 2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).
  - 11) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Suzuki 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. **International Meeting on childhood MDS and SAA** ( 2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).
  - 12) Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Kojima D, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Miyano S, Ito M, Ogawa S, Kojima S. Genetic background of idiopathic bone marrow failure syndromes in children. **International Meeting on childhood MDS and SAA** ( 2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).
  - 13) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. **International Meeting on childhood MDS and SAA** ( 2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).
  - 14) Narita A, Hideki M, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Kojima D, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Miyano S, Ito M, Ogawa S and Kojima S. Genetic background of idiopathic bone marrow failure syndromes in children. **EWOG-S/SAA2017** ( 2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).

- リア・ローマ) .
- 15) Iwasaki T, Utsugisawa T, Ogura H, Aoki T, Kinoshita A, Ogata Y, Okamoto Y, Kawakami T, Kanno H. The Flow Cytometric Osmotic Fragility Test is an Effective Screening Test for Red Cell Membrane Disorders, Including Dehydrated Hereditary Stomatocytosis. **ISLH (International Society for Laboratory Hematology)** (2017年5月4-6日, ハワイ・ホノルル).
  - 16) Goto T, Togawa T, Ito T, Kouwaki M, Ogura H, Kanno H, Saitoh S, Koyama N. A patient with hereditary Pyropoikilocytosis caused by a combination of a novel in-frame deletion and a common functional but non-pathogenic allele,  $\alpha$ LELY, in SPTA1. **American Society of Human Genetics 2017 annual meeting** (2017年10月17-18日, 米国・オーランド).
  - 17) Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein RFWD3/FANCW. (Invited lecture) (2017年12月14日, 台湾).
  - 18) Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein RFWD3/FANCW. **1<sup>st</sup> International Symposium on Radiation Therapeutics and Biology (isRTB-2017)** (2017年10月31日-11月1日, 中国・深圳).
  - 19) Inano S, Sato K, Katsuki Y, Knies K, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein RFWD3/FANCW. **Center for Genomic Integrity at UNIST invited lecture** (2017年6月27日, 韓国・蔚山).
  - 20) Takata M. Regulation of homologous recombination repair by a novel Fanconi anemia E3 ligase RFWD3/FANCW. **6th US-Japan DNA Repair Meeting** (2017年5月17-21日, 米国・パークレー).
  - 21) Inano S, Sato K, Katsuki Y, Knies K, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein RFWD3. **FEBS workshop Nucleotide excision repair and crosslink repair - from molecules to mankind** (2017年5月7-11日, スロバキア).
  - 22) Kubota Y, Uryu K, Ito T, Kawai T, Seki M, Isobe T, Toki T, Yoshida K, Kataoka K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Integrated genetic/epigenetic analysis revealed high heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
  - 23) Hasegawa D, Miyamura T, Nagai K, Kudo K, Tawa A, Sano H, Fukushima K, Iwamoto S, Kinoshita A, Takahashi H, Terui K, Nakayama H, Arakawa Y, Nakashima K, Yamamoto S, Saito MA, Horibe K, Tomizawa D, Taga T, Adachi S. Effectiveness of Supportive Care Measurements to Reduce Infections during Induction for Children with Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
  - 24) Sakamoto K, Imamura T, Kihira K, Ishida H, Suzuki K, Morita H, Kanno M, Mori T, Hiramatsu H, Matsubara K, Terui K, Takahashi Y, Suenobu S, Hasegawa D, Kosaka Y, Kato K, Saito MA, Sato A, Kawasaki H, Yagi YK, Hara J, Hori H, and Horibe K. Low Incidence of Osteonecrosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with ALL-97 and ALL-02 Study of Japan Association of Childhood Leukemia Study Group. **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017年

- 12月9-12日, 米国・アトランタ).
- 25) Kobayashi M, Mizoguchi Y, Karakawa S, Miki M, Nishimura S, Okada S, Kawaguchi H. Long-Term Follow-up of Patients with Chronic Granulomatous Disease Receiving Bone Marrow Transplantation Using Immunosuppressive Conditioning Regimen. **The 59th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
- 26) Nishimura S, Tomioka K, Shimomura M, Mizoguchi Y, Kobayashi M. Pharmacokinetics Using myPKFiTR for Personalized Prophylaxis in Children with Severe Hemophilia A. **The 59th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
- 27) Watanabe K, Kanegane H, Hamabata T, Kozuki K, Umeda K, Hama A, Okuno Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Ohara A, Ito M, Kojima S, Ito E. Establishment of a nationwide cohort for Shwachman-Diamond syndrome in Japan. **International Meeting on Childhood MDS and SAA** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).
- 28) Kunishima S, Uchiyama Y, Ogawa Y, Matsumoto N, Kobayashi R, Ichikawa S. Diagnostic biomarker for GFI1B macrothrombocytopenia. **XXXth International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology** (2017年5月4-6日, ハワイ・ホノルル).
- 29) Miyashita N, Onozawa M, Hayasaka K, Kunishima S, Teshima T. Novel heterozygous ITGB3 T746del mutation inducing spontaneous activation of integrin  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 causing autosomal dominant macrothrombocytopenia with abnormal  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 localization. **22nd Congress of the European Hematology Association** (2017年6月22-25日, スペイン・マドリード).
- 30) Morel-Kopp MC, Rabbolini D, Chun Y, Fixter K, Kunishima S, Gabrielli S, Chen Q, Stevenson W, Tan P, Radhakrishnan K, Bird R, Paul O, Chew LP, Ward C. MYH9 disorders are the most common cause of macrothrombocytopenia in Australia: importance of mean platelet diameter measurement and Döhle body detection for improved diagnosis. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日, ドイツ・ベルリン).
- 31) Hashimoto E, Kunishima S, Takagi Y, Suzuki S, Makiyama A, Sakane H, Fujioka A, Uehara T, Tamura S, Takagi A, Kojima T. Compound heterozygosity for mutations in ITGA2B including a novel p.Cys198Ser in Glanzmann Thrombasthenia. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日, ドイツ・ベルリン).
- 32) Xu M, Zhu G, Li J, Carrim N, Kunishima S, Ware J, Ruggeri ZM, Freeman J, Ni H. Platelet GPIba is important for liver thrombopoietin (TPO) production. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日, ドイツ・ベルリン).
- 33) Uchiyama Y, Ogawa Y, Kunishima S, Shiina M, Nakashima M, Yanagisawa K, Yokohama A, Imagawa E, Miyatake S, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Ogata K, Handa H, Matsumoto N. A novel GFI1B mutation at the first Zinc-Finger Domain causes congenital macrothrombocytopenia. **67th American Society of Human Genetics 2017 Annual Meeting** (2017年10月17-21日, 米国・オーランド).
- 34) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y,

- Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical sequencing of 347 children with acquired and inherited bone marrow failure syndromes. **59th American Society for Hematology Annual Meeting and Exposition** (2017年12月 9-12日, 米国・アトランタ) .
- 35) Kunishima S. Update on congenital thrombocytopenias. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日, ドイツ・ベルリン) .
- 36) Kunishima S. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: survey and workshop. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日, ドイツ・ベルリン) .
- 4) 上地珠代, 吉浜麻生, 中島由香里, 鈴木穰, 伊藤悦朗, 剣持直哉. リボソーム病モデルにおける mRNA の翻訳制御と疾患発症の分子機構 **第 19 回日本 RNA 学会年会** (2017 年 7 月 19-21 日, 松山) .
- 5) 関戸雄貴, 中館尚也, 石黒精, 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗, 吉田健一, 小川誠司, 小島勢二. Blackfan-Diamond 症候群と鑑別を要した Shwachman-Diamond 症候群の姉弟例. **第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会** (2017 年 11 月 9-11 日, 松山) .
- 6) Hideki M, 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, Ogawa 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 sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndrome. **第 79 回日本血液学会学術集会** (2017 年 10 月 20-22 日, 東京) .
- 7) Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Exploring the mechanism of FOG1-dependent transcriptional regulation in erythroid cells. **第 79 回日本血液学会** (2017 年 10 月 20-22 日, 東京) .
- 8) Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Role of GATA2 in the maintenance of the bone marrow microenvironment. **第 79 回日本血液学会** (2017 年 10 月 20-22 日, 東京) .
- 9) Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S, Harigae H. Generation of induced pluripotent stem cell-derived erythroblasts of X-linked sideroblastic anemia. **第 79 回日本血液学会** (2017 年 10 月 20-22 日, 東京) .

#### 国内学会

- 1) 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 and Ito E. Clinical impact of *GATA1* mutation types in infants with Down syndrome and TAM: JPLSG TAM-10 study. **第 79 回日本血液学会学術集会** (2017 年 10 月 20-22 日, 東京) .
- 2) 土岐力. 本邦における Diamond-Blackfan 貧血の診断的ターゲットおよびエクソームシーケンス(シンポジウム). **第 79 回日本血液学会学術集会** (2017 年 10 月 20-22 日, 東京) .
- 3) Hama A, Toki T, Kobayashi A, Muramatsu H, Okuno Y, Hasegawa D, Nozawa K, Yoshiyuki T, Watanabe K, Manabe A, Ito M, Ito E, Kojima S. ダイヤモンド-ブラックファン貧血の骨髄形態と臨床所見および遺伝子異常の関係. **第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会** (2017 年 11 月 9-11 日, 松山) .

- 10) Saito K, Fujiwara T, Morita M, Hatta S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Shimizu R, Harigae H. Establishment of in vivo and in vitro model of X-linked sideroblastic anemia by CRISPR/Cas9. **第79回日本血液学会** (2017年10月20-22日, 東京).
- 11) Kato H, Itoh A, Matsumoto M, Shibuya R, Sato Y, Kobayashi M, Muto A, Fujiwara T, Harigae H, Igarashi K. Bach1 and Bach2 orchestrate erythro-myeloid differentiation responding to environmental changes. **第79回日本血液学会** (2017年10月20-22日, 東京).
- 12) 矢部普正. バイオシミラーを用いた健常人ドナーからの末梢血幹細胞採取. **第40回日本造血細胞移植学会総会** (2018年2月1-3日, 札幌)
- 13) 川島希, 奥野友介, 村松秀城, 濱麻人, 片岡伸介, 濱田太立, 市川大輔, 村上典寛, 小島大英, 鈴木喬悟, 西川英里, 成田敦, 西尾信博, 中沢洋三, 小島勢二, 高橋義行. 次世代シーケンスによるファンconi貧血遺伝子診断が可能な時代におけるFANCD2モノユビキチンの意義. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京).
- 14) Hamada M, Doisaki S, Okuno Y, Muramatsu H, Hama A, Kataoka S, Ichikawa D, Taniguchi E, Suzuki K, Kojima D, Sekiya Y, Kawashima N, Narita A, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Manabe A, Taga T, Takahashi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Congenital hemolytic anaemia mimicking congenital dyserythropoietic anaemia revealed by whole exome analysis. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京).
- 15) Okuno Y. 遺伝性造血不全疾患群のクリニカルシーケンス. **第79回日本血液学会学術集会** (Symposium 8) (2017年10月20-22日, 東京).
- 16) 村松秀城. 先天性および後天性造血不全375例に対するクリニカルシーケンス. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京).
- 17) Hama A, Toki T, Kobayashi A, Muramatsu H, Okuno Y, Hasegawa D, Nozawa K, Takahashi Y, Watanabe KI, Manabe A, Ito M, Ito E, and Kojima S. Correlation of bone marrow morphology with clinical findings and gene alterations in patients with Diamond-Blackfan anemia. **第59回日本小児血液・がん学会** (2017年11月9-11日, 松山).
- 18) Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Kojima S and Takahashi Y. Germline mutation in pediatric patients with aplastic anemia. **第59回日本小児血液・がん学会** (2017年11月9-11日, 松山).
- 19) 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. ターゲットシーケンス解析を施行した小児造血不全移植例の解析. **第40回日本造血細胞移植学会総会** (2018年2月1-3日, 札幌).
- 20) 濱麻人, 鈴木喬悟, 成田敦, 成田幸太郎, 北澤宏展, 濱田太立, 片岡伸介, 村上典寛, 市川大輔, 谷口理恵子, 小島大英, 西川英里, 奥野友介, 川島希, 村松秀城, 西尾信博, 小島勢二, 高橋義行. Diamond-Blackfan貧血に対するフルグラピンおよびメルファランを用いた同種骨髄移植. **第40回日本造血細胞移植学会総会** (2018年2月1-3日, 札幌).
- 21) 槍澤大樹, 中林恭子, 松田和樹, 守屋友美, 千野峰子, 岡本好雄, 菅野仁. 低温保存腹水を用いた腹水濾過濃縮再静注法(CART)の有用性の検討. **第65回日本輸血・細胞治療学会総会** (2017年6月22-24日, 千葉).
- 22) 高源ゆみ, 木下明美, 小林博人, 菅野仁. 腹水濾過時に得られる単核球を利用した $\delta$ 型T細胞療法の開発. **第65回日本輸血・細胞治療学会総会** (2017年6月22-24日, 千葉).
- 23) 小野慎吾, 及川美幸, 中林恭子, 岡本好雄, 菅

- 野仁．ABO同型クリオプレシピテート供給体制の是非に関する考察．**第65回日本輸血・細胞治療学会総会**（2017年6月22-24日，千葉）．
- 24) 守屋友美，小野慎吾，小林博人，菅野仁．(ポスター)高張アルブミン製剤適正使用の推進．**第65回日本輸血・細胞治療学会総会**（2017年6月22-24日，千葉）．
- 25) 小倉浩美，槍澤大樹，岩崎拓也，青木貴子，岡本好雄，川上高弘，菅野仁．系統的検査による先天性溶血性貧血80症例の病型診断．**第79回日本血液学会学術集会**（2017年10月20-22日，東京）．
- 26) 槍澤大樹，小倉浩美，岩崎拓也，青木貴子，岡本好雄，川上高弘，菅野仁．Heterogeneous KCNN4 or PIEZO1 gene mutation cause dehydrated hereditary Stomatocytosis in Japan．**第79回日本血液学会学術集会**（2017年10月20-22日，東京）．
- 27) Kanno H, Rachael F.Grace, D.Mark Layton, Galacteros F, Rose C, Barcellini W, D.Holmes Morton, Eduard Van Beers, Yaish H, Ravindranath Y, Kevin H.M.Kuo, Sheth S, Janet L.Kwiatkowski, Silver B, Kung C, Cohen M, Yang H, Penelope A. Kosinski, Hua L, Ann J. Barbier, Glader B. AG-348, a pyruvate kinase activator, for pyruvate kinase deficiency: Results the drive PK study. **第79回日本血液学会学術集会**（2017年10月20-22日，東京）．
- 28) 村岡倫子，岡本佳子，猪谷元浩，近藤亜矢，坂根朋子，岩瀬瑞恵，藤原倫昌，北田邦美，野島郁子，高橋伸方，荒木徹，菅野仁．KCNN4変異による脱水型遺伝性有口赤血球症の1例．**第59回小児血液・がん学会学術集会**（2017年11月9-11日，松山）．
- 29) 高田穰．「ファンコニ貧血経路による染色体ストレス応答制御」「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」．**神戸大学大学院講義&セミナー 現代の生物学II**(招待講演)(2017年12月22日 神戸)．
- 30) 勝木陽子，安倍昌子，H. van Attikum，中田慎一郎，鐘巻将人，Kim Y，高田穰．ICL修復因子SLX4はRNF168依存的なユビキチン化経路を介して損傷部位に集積する(ワークショップ)．ゲノム恒常性維持機構の破綻と疾患発症の分子メカニズム(3PW02) (招待講演)．**2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 / 第40回日本分子生物学会年会**(2017年12月6-9日，神戸)．
- 31) 岡本裕介，岩寄航，高橋数冴，久郷和人，小田有沙，河合秀彦，佐藤浩一，小林航，逆井良，高折晃史，山本卓，鐘巻将人，田岡万悟，磯部俊明，胡桃坂仁志，印南秀樹，太田邦史，石合正道，高田穰．複製ストレスにおける染色体脆弱部位へのR-Loop依存性FANCD2集積メカニズム．**第40回日本分子生物学会年会**（2017年12月6-9日，神戸）．
- 32) 松井美咲，木村祐輔，安倍昌子，石合正道，堀利行，高田穰，Jackson S，西良太郎．核内構造体に局在する因子による相同組換え修復制御「遺伝的組換えの分子メカニズムとその生理的機能と技術応用」(ワークショップ)．**第40回日本分子生物学会年会**（2017年12月6-9日，神戸）．
- 33) L. Mochizuki A, Katanaya A, Hayashi E, Hosokawa M, Moribe E, Motegi A, Ishiai M, Takata M, Kondoh G, Watanabe H, Nakatsuji N, Chuma S. PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice．**日本遺伝学会第89回大会**（2017年9月13-16日，岡山）．
- 34) 高田穰．ファンコニ貧血とゲノム損傷修復因子：患者サンプル解析による希少疾患病態解明を目指して．**金沢大学薬学シンポジウム 2017**（2017年10月6日，金沢）．
- 35) 高田穰．「ファンコニ貧血の原因遺伝子探索と相同組換えの新規メカニズム」．**名古屋大学平成29年度基盤医学特論**(招待講演)(平成29年9月21日，名古屋)．
- 36) 関戸雄貴，中舘尚也，石黒精，照井君典，土岐力，伊藤悦朗，吉田健一，小川誠司，小島勢二．Blackfan-Diamond 症候群と鑑別を要したShwachman-Diamond 症候群の姉弟例．**第59**

- 回日本小児血液・がん学会学術集会 (2017年11月9-11日, 松山) .
- 37) 久保田美子, 久慈強, 古山和道 . ヘム生合成経路の律速酵素 ALAS1 の分解経路の低下によるゲノム不安定性の誘導 . **2017年度生命科学系学会合同年次大会**(2017年12月6-9日, 神戸) .
- 38) 金子桐子, 千田大誠, 久保田美子, 野村和美, 古山和道 . ALAS2 変異による遺伝性鉄芽球性貧血のモデル細胞樹立 . **2017年度生命科学系学会合同年次大会**(2017年12月6-9日, 神戸) .
- 39) 野村和美, 北川悠, 大木祐亮, 久保田美子, 金子桐子, 古山和道 . ヒト CLPX-CLPP 複合体によるヘム結合型 ALAS1 の認識及び分解メカニズムの解明 . **2017年度生命科学系学会合同年次大会** (2017年12月6-9日, 神戸) .
- 40) 西村聡, 青木由貴, 石渡泰芳, 松本和明, 廣木遥, 小野真太郎, 岡野翼, 宮本智史, 足洗美穂, 星野顕宏, 田中真理, 宮脇零士, 小林千佳, 手束真理, 大川哲平, 満生紀子, 遠藤明史, 小野敏明, 磯田健志, 宮澤大輔, 長澤正之, 水谷修紀, 安原真人, 梶原道子, 柳町昌克, 高木正稔, 金兼弘和, 今井耕輔, 森尾友宏 . 原発性免疫不全症に対するFluBUとFluMelによる前処置法に比較検討 . **第40回日本造血細胞移植学会総会**(2018年2月1-3日, 札幌) .
- 41) 國島伸治, 北村勝誠, 小林良二, 市川聡, 内山由理, 小川孔幸, 松本直通 . 2GFI1B異常症診断のバイオマーカー . **第39回日本血栓止血学会学術集会** (平成29年6月8日-10日, 名古屋) .
- 42) 橋本恵梨華, 高木夕希, 鈴木幸子, 河村奈美, 横山愛弓, 坂根寛人, 藤岡亮, 田村彰吾, 高木明, 上原貴博, 國島伸治, 小嶋哲人 . 新規変異 ITGA2B p.Cys198Serを含む複合ヘテロ変異をもつ血小板無力症の一例 . **第39回日本血栓止血学会学術集会**(平成29年6月8日-10日, 名古屋) .
- 43) 米野由希子, 國島伸治, 柳富子 . RUNX1変異による家族性血小板異常症に発症したMDS (RAEB-2) の症例 . **第39回日本血栓止血学会学術集会** (平成29年6月8日-10日, 名古屋) .
- 44) 家田大輔, 堀いくみ, 中村勇治, 大下裕法, 根岸豊, 篠原務, 服部文子, 加藤丈典, 犬飼幸子, 齋藤伸治, 北村勝誠, 國島伸治, 河合智樹 . 脳室周囲異所性灰白質と結合組織症状を示した FLNA遺伝子変異の女児例 . **第59回日本小児神経学会学術集会** (2017年6月15-17日, 大阪) .
- 45) 國島伸治, 小林良二, 市川聡, 内山由理, 小川孔幸, 宮崎浩二 . GFI1B異常症の新規検査診断法 . **第18回日本検査血液学会学術集会** (平成29年7月22-23日, 札幌) .
- 46) 岩井俊樹, 村松彩子, 川路悠加, 栗山幸大, 大城宗生, 平川佳子, 内山人二, 黒田純也, 國島伸治 . 当院で経験したMYH9異常症 . **第79回日本血液学会総会**(平成29年10月20-22日, 東京) .
- 47) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S . Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. **第79回日本血液学会総会** (平成29年10月20-22日, 東京) .
- 48) Miyashita N, Onozawa M, Kunishima S, Hayasaka K, Yamada T, Migita O, Hata K, Fujioka Y, Ohba Y, Teshima T. Mechanisms of congenital macrothrombocytopenia induced by a novel ITGB3 T720del mutation. **第79回日本血液学会総会** (平成29年10月20-22日, 東京) .
- 49) 國島伸治 . Next-generation sequencingと血栓止血学 . **第39回日本血栓止血学会学術集会** (平成29年6月8-10日, 名古屋) .
- 50) 國島伸治 . 先天性血小板異常症 . **日本小児血液・がん学会学術集会教育セミナー** (平成29年6月18日, 東京) .
- 51) Terada K, Yamaguchi H, Miyake K, Miyake N, Osaki Y, Okada T, Kojima S, Ito E, Inokuchi K. Importance of functional analysis of TERT gene mutations in the diagnosis of dyskeratosis congenital. **第79回日本血液学会総会** (平成29年10月20-22日, 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	2016
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	216 / 239	219 / 242	212 / 230	171 / 232	158 / 239	165 / 236
( % )	83%	88%	90%	90%	90.3%	90.4%	90.5%	92%	74%	66%	70%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	62	49	58	41	47	46
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5	11	3	5	8	15
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	3
Diamond-Blackfan	9	6	9	10	6	9	6	11	10	12	6
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6	6	1	5	6
Schwachman-Diamond	0	1	1	2	0	0	2	2	0	2	1
Cong. Dyserythropoietic anemia	No data	No data	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Sideroblastic anemia	No data	No data	2	1	1	0	1	0	1	0	1
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4	1	2	1	1
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	5	3	0	・	0
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
Cong. Thrombocytopenia							12	11	19	11	16
Cong. Spherocytosis	No data	・	・	・	54	49	26	48	50	64	48
Cong. Elliptocytosis	No data	・	・	・	2	1	1	2	1	0	1
G6PD deficiency	No data	・	・	・	5	5	3	3	6	7	6
PK deficiency	No data	・	・	・	0	0	0	0	0	3	0
other erythrocyte enzyme def.	No data	・	・	・	2	0	0	0	0	2	・
Sickel cell disease	No data	・	・	・	1	1	0	1	1	0	0
Unstable hemoglobinopathy	No data	・	・	・	1	0	0	0	2	4	1
Thalasemia	No data	・	・	・	18	16	11	8	10	14	16
other hemoglobinopathy	No data	・	・	・	0	0	0	1	0	1	1
Refract.CytopeniaChild.,RCC	No data	・	・	・	・	・	・	・	20	21	15

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14例中11例（78.6%）に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに192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、113例（58.9%）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。研究代表者として、「2017年度版診療ガイドライン」全体の監修を行い、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10月に診断と治療社より出版した。さらに、本年度は悪性腫瘍の合併を考慮したDBAの重症度分類の改定を行った。

#### A．研究目的

Diamond-Blackfan貧血（DBA）は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として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14名の遺伝子診断を行い、11例 (*RPS19* 3例、*RPS26* 1例、*RPS7* 1例、*RPL11* 4例、*RPL5* 1例、*RPL35A* 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192例となった。これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら、エビデンスに基づいた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。DBAを含めた先天性骨髄不全症7疾患の診療ガイドラインの改訂版について、日本小児血液・がん学会での審議とパブリックコメントを終え、理事会において正式の診療ガイドラインとして承認された。同学会の編集書籍として平成29年10月に診断と治療社より出版した。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。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10月に診断と治療社より出版された。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。

DBAを含めた先天性骨髄不全症7疾患の診療ガイドラインの改訂版について、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。先天性骨髄不全症の学会認定のガイドラインはこれまでなく、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) Ito E, Terui K, Toki T. Inherited bone marrow failure syndrome, TAM. In **Hematological Disorders in Children**. edited by Eiichi Ishii, Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2017, pp. 145-170.
- 2) Sonoda M, Ishimura M, Ichimiya Y, Terashi E, Eguchi K, Sakai Y, Takada H, Hama A, Kanno H, Toki T, Ito E, Ohga S. Atypical erythroblastosis in a patient with Diamond-Blackfan anemia who developed del(20q) myelodysplasia. **Int J Hematol**. 2018 Feb 23. doi: 10.1007/s12185-018-2424-4.
- 3) Matsuzaki Y, Rokunohe A, Minakawa S, Nomura K, Nakano H, Ito E, Sawamura D. Incontinentia pigmenti in a male (XY) infant with long-term follow up over 8 years. **J Dermatol**. 2018 Jan;45(1):100-103. doi: 10.1111/1346-8138.14002.
- 4) Ikawa Y, Nishimura R, Maeba H, Fujiki T, Kuroda R, Noguchi K, Fukuda M, Mase S, Araki R, Mitani Y, Sato T, Terui K, Ito E, Kitabayashi I, Yachie A. Deep spontaneous molecular remission in a patient with congenital acute myeloid leukemia expressing a novel MOZ-p300 fusion transcript. **Leuk Lymphoma**. 2018:1-3. doi: 10.1080/10428194.2018.1434885.
- 5) Noguchi J, Kanno H, Chiba Y, Ito E, Ishiguro A. Discrimination of Diamond-Blackfan anemia from parvovirus B19 infection by RBC glutathione. **Pediatr Int**. 2017;59(7):838-840. doi:10.1111/ped. 13284.
- 6) Ogasawara T, Kawachi K, Mori N, Sakura

- H, Katoh F, Kanno H, Ito E. Successful long-term management with low-dose prednisolone in an adult patient with Diamond-Blackfan anemia. Successful long-term management with low-dose prednisolone in an adult patient with Diamond-Blackfan anemia. **Rinsho Ketsueki** 2017;58(8):917-921. doi:10.11406/rinketsu.58.917.
- 7) Miot C, Imai K, Imai C, Mancini AJ, Kucuk XY, Kawai T, Nishikomori R, Ito E, Pellier I, Girod SD, Rosain J, Sasaki S, Chandrakasan S, Schmid, JP, Okano T, Colin E, Olaya-Vargas A, Yamazaki-Nakashimada M, Qasim W, Padilla SE, Jones A, Krol A, Cole N, Jolles S, Bleesing J, Vraetz T, Gennery AR, Abinun M, Güngör T, Carvalho BC, Condino-Neto A, Veys P, Holland SM, Uzel G, Moshous D, Neven B, Ehl S, Döffinger R, Patel SY, Puel A, Bustamante J, Gelfand EW, Casanova JL, Orange JS, and Picard C. Hematopoietic stem cell transplantation in 29 patients hemizygous for hypomorphic *IKBKG/ NEMO* mutations. **Blood** 2017;130(12):1456-1467. doi:10.1182/blood-2017-03-771600.
- 8) 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;106(1):55-59. doi:10.1007/s12185-017-2227-z.
- 9) 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;108(5):1071-1079. doi:10.1111/cas.13213.
- 10) 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;105(4):515-520. doi:10.1007/s12185-016-2151-7.
2. 学会発表
- 1) 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 and Ito E. Clinical impact of *GATA1* mutation types in infants with Down syndrome and TAM: JPLSG TAM-10 study. **第 79 回日本血液学会学術集会** (2017 年 10 月 20-22 日, 東京).
- 2) Kubota Y, Uryu K, Ito T, Kawai T, Seki M, Isobe T, Toki T, Yoshida K, Kataoka K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Integrated genetic/epigenetic analysis revealed high heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017 年 12 月 9-12 日, 米国・アトランタ).
- 3) 土岐力. 本邦における Diamond-Blackfan 貧血の診断的ターゲットおよびエクソームシーケンス (シンポジウム). **第 79 回日本血液学会学術集会** (2017 年 10 月 20-22 日, 東京).
- 4) Hama A, Toki T, Kobayashi A, Muramatsu H, Okuno Y, Hasegawa D, Nozawa K, Yoshiyuki T, Watanabe K, Manabe A, Ito M, Ito E, Kojima S. ダイヤモンド-ブラックファン貧血の骨髄形態と臨床所見および遺伝子異常の関係. **第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会** (2017 年 11 月 9-11 日, 松山).
- 5) 上地珠代, 吉浜麻生, 中島由香里, 鈴木穰, 伊

藤悦朗, 剣持直哉. リボソーム病モデルにおける mRNA の翻訳制御と疾患発症の分子機構. **第 19 回日本 RNA 学会年会**(2017 年 7 月 19-21 日, 松山).

日-6 月 3 日, プラハ・チェコ).

**G . 知的財産権の出願・登録状況**

該当なし

- 6) 関戸雄貴, 中館尚也, 石黒精, 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗, 吉田健一, 小川誠司, 小島勢二. Blackfan-Diamond 症候群と鑑別を要した Shwachman-Diamond 症候群の姉弟例. **第 59 回日本小児血液・がん学会学術集会**(2017 年 11 月 9-11 日, 松山).
- 7) Hideki M, 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, Ogawa 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 sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndrome. **第 79 回日本血液学会学術集会**(2017 年 10 月 20-22 日, 東京).
- 8) Hideki M, 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, Ogawa S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. **EWOG-S/SAA2017**(2017 年 9 月 28-30, イタリア・ローマ).
- 9) Uechi T, Yoshihama M, Nakajima Y, Suzuki Y, Sugano S, Ito E, Kenmochi N. Ribosomal dysfunction and defective erythropoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia. **The 22nd Annual Meeting of the RNA Society**(2017 年 5 月 30

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

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 1 例において新規の *ALAS2* 遺伝子変異が同定された。

#### 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、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、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

61歳、女性。貧血、肝硬変、肝へモクロマトーシス、胃食道静脈瘤の既往あり。貧血の家族歴は明らかでない。近医にて汎血球減少（WBC 2400/uL, Hb 7.3g/dL, Plt  $8.6 \times 10^4$ /uL, MCV 112.8fL）の精査目的で骨髄検査を施行した結果、全赤芽球中の60%に環状鉄芽球を認めた。染色体は正常核型で、MDSを示唆する異形性は認めなかった。遺伝性鉄芽球性貧血の可能性を考慮し遺伝子解析を施行した結果、新規の*ALAS2*遺伝子のヘテロ変異を認めた（*ALAS2* c.488 G>A, p.Arg163His）。組換蛋白質を用いた*ALAS2*活性測定の結果、変異*ALAS2*蛋白質の活性は野生型に比べ約1/20程度と有意に低下していた。本症例に対しビタミンB6補充を試みたものの不応であった。

#### D．考察

女性において *ALAS2* 遺伝子のヘテロ変異に伴う大球性鉄芽球性貧血を認めた例は、本症例以外にこれまでに 3 家系報告されている。貧血の発症機序としては、加齢に伴う Skewed X-chromosome inactivation や変異 *ALAS2* を発現する赤芽球の分化成熟不全などの可能性が示唆されている。

骨髓異形成症候群(MDS)では大球性貧血を示しうる点から(Takahashi et al. Int J Hematol. 2016)、女性で大球性鉄芽球性貧血を認めた際は、後天性鉄芽球性貧血の他にALAS2遺伝子のヘテロ変異の可能性も鑑別として考慮する必要がある。

## E . 結論

新たな遺伝性鉄芽球性貧血症例を見出した。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Saito K, Kamata M, Tamai Y, Kawamata S, Harigae H. A defined culture method enabling the establishment of ring sideroblasts from induced pluripotent cells of X-linked sideroblastic anemia. **Haematologica**. 2018;103:e188-e191.
- 2) Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators. **Tohoku J Exp Med**. 2018;244:41-52.
- 3) Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Effects of in vivo deletion of GATA2 in bone marrow stromal cells. **Exp Hematol**. 2017;56:31-45.
- 4) Fujiwara T, Fukuhara N, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Onishi Y, Furuyama K, Harigae H. A novel heterozygous ALAS2 mutation in a female with macrocytic sideroblastic anemia resembling myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts: A case report and literature review. **Ann Hematol**. 2017;96:1955-1957.
- 5) Saito K, Fujiwara T, Ota U, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizuka M, Tanaka T, Harigae H. Dynamics of absorption,

metabolism, and excretion of 5-aminolevulinic acid in human intestinal Caco-2 cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 2017;11:105-111.

- 6) 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**. 2017;485:380-387.
- 7) 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**. 2017;49:56-67.
2. 学会発表
  - 1) Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H. Establishment and characterization of *in vitro* model of X-linked sideroblastic anemia. **The 59<sup>th</sup> American Society of Hematology** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
  - 2) Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Role of GATA2 in the maintenance of bone marrow microenvironment. **The 59<sup>th</sup> American Society of Hematology**(2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
  - 3) Saito K, Fujiwara T, Morita M, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Shimizu R, Harigae H. Establishment of in vivo and in vitro model of X-linked sideroblastic anemia. **The 22<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association** (2017年6月22-25日, スペイン・マドリード).
  - 4) 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 7<sup>th</sup> International Bioiron Society** (2017年5月7-11日, 米国・ロサンゼルス).

- 5) Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Exploring the mechanism of FOG1-dependent transcriptional regulation in erythroid cells. **The 22<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association**(2017年6月22-25日, スペイン・マドリード).
- 6) Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Exploring the mechanism of FOG1-dependent transcriptional regulation in erythroid cells. **第79回日本血液学会**(2017年10月20-22日, 東京).
- 7) Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. Role of GATA2 in the maintenance of the bone marrow microenvironment. **第79回日本血液学会**(2017年10月20-22日, 東京).
- 8) Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S, Harigae H. Generation of induced pluripotent stem cell-derived erythroblasts of X-linked sideroblastic anemia. **第79回日本血液学会**(2017年10月20-22日, 東京).
- 9) Saito K, Fujiwara T, Morita M, Hatta S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Shimizu R, Harigae H. Establishment of in vivo and in vitro model of X-linked sideroblastic anemia by CRISPR/Cas9. **第79回日本血液学会**(2017年10月20-22日, 東京).
- 10) Kato H, Itoh A, Matsumoto M, Shibuya R, Sato Y, Kobayashi M, Muto A, Fujiwara T, Harigae H, Igarashi K. Bach1 and Bach2 orchestrate erythro-myeloid differentiation

responding to environmental changes. **第79回日本血液学会**(2017年10月20-22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

### 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）は身体異常、小児期発症の骨髄不全、白血病や高発がんを特徴とし、DNA 修復障害を基盤とした遺伝性疾患である。同種造血細胞移植により、骨髄不全発症例の予後は著しく改善されたが、特に成人後に固形がんを発症する例が増加しており、その対策の確立が急務である。固形がん対策としては、造血細胞移植後の生活指導、パピロームウイルスワクチン接種、患者自身のヘルスリテラシーの獲得が必要である。また、複数診療科による定期的フォローアップの経済負担の軽減も検討すべきである。

#### 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、診断基準や重症度基準を見直し、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。骨髄不全が進行し、輸血依存あるいは重症基準を満たすか、骨髄異形成症候群（MDS）あるいは白血病化した場合も同種造血細胞移植を行う。今回は長期生存例における固形がんの発症について調査した。以上の結果を踏まえてFAの重症度基準、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

1987年より2017年までに東海大学小児科において同種造血細胞移植を施行したFAは74例で、再移植、再々移植を含めて81回の同種造血細胞移植が施行された。もっとも最近に固形がんの合併を認めたのは2009年11月の移植例であったため、当院で2012年までに同種造血細胞移植を施行し、5年以上長期生存した例を評価対象とした。対象は52例で、このうち15例に固形がんの発症を認めた。舌がんが5例、上顎など他の口腔がんが3例、咽頭がんが2例、食道がんが5例、肝がんが1例、皮膚がん（ボーエン病）が1例で、家2例は舌がんと食道がんの重複がんを発症した。肝がんの1例はHBV、HCVとも陽性であった。慢性GVHDとの関係は明らかでなかったが、前例が移植前処置に3～8Gyの放射線照射を含んでいた。パピロームウイルスについては一部の例で検査したが、陽性例も陰性例も認められた。

死亡は肝がん1例、舌がん1例、食道がん2例、上顎がん1例で、いずれも2003年までの移植例であった。手術を希望しなかった食道がんの1例を除いて、いずれも固形がんの診断が遅かった例が手術や放射線療法にもかかわらず死亡した。手術を希望せず、放射線療法と化学療法を選択した1例は4年8ヶ月生存した。

10例は固形がんの診断後も外科手術、放射線療法、一部の例では化学療法や分子標的療法を併用して生存中であるが、うち2例は再発を繰り返しており、生命予後は極めて不良である。患者に対する発がんリスクの説明が不十分と思われた時期の症例や定期的なフォローアップから漏れた症例に進行期の固形がんが多い傾向があった。

#### D．考察

FA患者の自然経過は米国の登録データによると、約50%は20歳までに骨髄不全による出血や感染で死亡するか、MDSや白血病に移行するとされており、このような症例には同種造血細胞移植による治療が必須となる。多くは血縁ドナーが得られないために非血縁骨髄ドナーなどの代替ドナー移植となるが、2000年以前の非血縁造血細胞移植の成績は生存率が約30%前後と不良であった。2000年以降、フルダラビンが市販され、少線量の放射線照射や抗胸腺細胞グロブリンや少量のシクロフォスファミドを組み合わせた前処置により、代替ドナー移植の成績も飛躍的に向上した。しかしながら、移植後の長期生存例が増えるに従い、次の大きな障壁として固形がんの発症が待ち受ける年齢を迎えるようになった。

FA患者における移植後の固形がんのリスクとしては、欧米の研究で放射線照射、慢性GVHD、パピロームウイルス、アルコール摂取、喫煙などがあげられている。放射線照射については、現在3Gyまで減量し、さらに甲状腺など感受性の高い臓器は遮蔽しており、またミネソタグループでは1.5Gyまで減量を試みたところ、拒絶頻度の増加を認めて3Gyに戻している。慢性GVHDについては、我が国ではその頻度、重症度が欧米よりも軽く済む可能性があるが、実際に固形がんを認めた症例で、活動性の慢性GVHDががん発症部位に残っていた例はほとんどない。パピロームウイルスについては、欧米では男性を含めてワクチンが推奨されているが、我が国では現在ワクチン接種が滞っている状態であり、早期の改善が期待される。アルコールや喫煙などの生活習慣についての教育の重要性は言うまでもない。

固形がん発症後の経過を見ると、定期的なフォローアップに応じて、発がんのリスクについてもよく理解している患者の場合、固形がんを発症しても比

較的早期に診断され治療されている。固形がんの多くが成人後に発症することから、定期的なフォローアップとともに口腔内の変化や嚥下時の自覚症状など自分の体調に注意し、管理するヘルスリテラシーを身につけるよう指導すべきと考えられる。また、固形がんの発症臓器は様々で、対応する診療科も口腔外科、耳鼻科、消化器内科・外科など多診療科の協力が必要であり、患者の経済的負担を軽減するための方策も必要と考えられる。

#### E．結論

FA患者の生命予後の改善には固形がん対策が必須であり、造血細胞移植後の生活指導、定期的なフォローアップ、パピロームウイルスワクチン接種、ヘルスリテラシーの獲得が必要である。また、複数診療科による定期的フォローアップの経済負担の軽減も検討すべきである。

#### F．研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hoening M, Lagresle-Peyrou C, Pannicke U, Notarangelo LD, Porta F, Gennery AR, Slatter M, Cowan MJ, Stepensky P, Al-Mousa H, Al-Zahrani D, Pai SY, Al Herz W, Gaspar HB, Veys P, Oshima K, Imai K, Yabe H, Noroski LM, Wulffraat NM, Sykora KW, Soler-Palacin P, Muramatsu H, Al Hilali M, Moshous D, Debatin KM, Schuetz C, Jacobsen EM, Schulz AS, Schwarz K, Fischer A, Friedrich W, Cavazzana M. Reticular dysgenesis: international survey on clinical presentation, transplantation and outcome. **Blood** 2017;129:2928-38. doi:10.1182/blood-2016-11-745638. [Epub ahead of print]
- 2) 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;64(5). doi:

- 10.1002/pbc.26305. Epub 2016 Nov 3.
- 3) Sekinaka Y, Mitsuiki N, Imai K, Yabe M, Yabe H, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Takagi M, Arai A, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Muramatsu H, Kojima S, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S. Common Variable Immunodeficiency Caused by FANC Mutations. **J Clin Immunol.** 2017;37(5):434-44. doi:10.1007/s10875-017-0396-4. Epub 2017 May 11.
  - 4) Kubaski F, Yabe H, Suzuki Y, Seto T, Hamazaki T, Mason RW, Xie L, Onsten TGH, Leistner-Segal S, Giugliani R, Dũng VC, Ngoc CTB, Yamaguchi S, Montañõ AM, Orii K, Fukao T, Shintaku H, Orii T, Tomatsu S. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Mucopolysaccharidosis II. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2017;23(10):1795-1803. doi:10.1016/j.bbmt.2017.06.020. Epub 2017 Jul 1.
  - 5) Onishi Y, Mori T, Kako S, Koh H, Uchida N, Kondo T, Kobayashi T, Yabe H, Miyamoto T, Kato K, Suzuki R, Nakao S, Yamazaki H; Adult Aplastic Anemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Outcome of Second Transplantation Using Umbilical Cord Blood for Graft Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Aplastic Anemia. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2017;23(12):2137-42. doi:10.1016/j.bbmt.2017.08.020. [Epub ahead of print]
  - 6) Stapleton M, Kubaski F, Mason RW, Yabe H, Suzuki Y, Orii K, Orii T, Tomatsu S. Presentation and Treatments for Mucopolysaccharidosis Type II (MPS II; Hunter Syndrome). **Expert Opin Orphan Drugs.** 2017;5(4):295-307. doi:10.1080/21678707.2017.1296761. Epub 2017 Mar 8. PMID: 29158997.
  - 7) Morishima Y, Azuma F, Kashiwase K, Matsumoto K, Orihara T, Yabe H, Kato S, Kato K, Kai S, Mori T, Nakajima K, Morishima S, Satake M, Takanashi M, Yabe T; Japanese Cord Blood Transplantation Histocompatibility Research Group. Risk of HLA Homozygous Cord Blood Transplantation: Implications for Induced Pluripotent Stem Cell Banking and Transplantation. **Stem Cells Transl Med.** 2018;7(2):173-79. doi:10.1002/sctm.17-0169. Epub 2017 Dec 23.
  - 8) Horikoshi Y, Umeda K, Imai K, Yabe H, Sasahara Y, Watanabe K, Ozawa Y, Hashii Y, Kurosawa H, Nonoyama S, Morio T. Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukocyte Adhesion Deficiency. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2018;40(2):137-140. doi:10.1097/MPH.0000000000001028. [Epub ahead of print]
  - 9) Oshima K, Saiki N, Tanaka M, Imamura H, Niwa A, Tanimura A, Nagahashi A, Hirayama A, Okita K, Hotta A, Kitayama S, Osawa M, Kaneko S, Watanabe A, Asaka I, Fujibuchi W, Imai K, Yabe H, Kamachi Y, Hara J, Kojima S, Tomita M, Soga T, Noma T, Nonoyama S, Nakahata T, Saito M. Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors. **Biochem Biophys Res Commun.** 2018;497(2):719-25. doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.139. Epub 2018 Feb 17.
  - 10) 小林武, 大橋一輝, 原口京子, 奥山美樹, 日野雅之, 田中淳司, 上田恭典, 西田徹也, 熱田由子, 高梨美乃子, 飯田美奈子, 室井一男, 矢部普正, 宮村耕一. 本邦における血縁者ドナーからの末梢血幹細胞の事前採取と凍結保存の現状. **臨床血液** 2017;58(11):2205-12. doi:10.11406/rinketsu.58.2205.
  - 11) 小池隆志, 矢部普正. ライソゾーム病に対する造血幹細胞移植- ムコ多糖症に対する移植成績の現状と有効性の評価. **医学のあゆみ** 2018;

264:779-784.

2. 学会発表

- 1) Tsumanuma R, Omoto E, Kumagai H, Katayama Y, Iwato K, Aoki G, Sato Y, Tsutsumi Y, Miyazaki K, Tsukada N, Iino M, Shinagawa A, Atsuta Y, Koderu Y, Okamoto S, Yabe H. The Efficacy and Safety of Biosimilar Filgrastim in Peripheral Hematopoietic Stem Cell Mobilization Procedures for Related Allogeneic Transplantation. **44th Annual Meeting of The European Society for Blood and Marrow Transplantation** (2018年3月18-21日, ポルトガル・リスボン) .
- 2) 矢部普正 . バイオシミラーを用いた健常人ドナーからの末梢血幹細胞採取 . **第40回日本造血細胞移植学会総会** (2018年2月1-3日, 札幌)

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。本研究により我が国におけるCDAの実態を明らかにし、最終的に効果的診断法や治療ガイドラインを作成することを目的とする。

### B．研究方法

従来行われている日本小児血液・がん学会疾患登録、中央診断事業をもとに、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、臨床的にCDAと診断された12例について、エクソーム解析の結果と照合させて検討を行った。

臨床的にCDAタイプ1と診断された3例では全例で*CDNA1*遺伝子に変異が検出された。うち2例ではホモ変異がみられ、1例はコンパウンドヘテロ変異であった。

臨床的にCDAタイプ2と診断された6例では、このタイプに特徴的とされる*SEC23B*の変異はみられなかった。その代わりに、1例においてグルコース-6-リン酸脱水酵素 (G6PD) 欠損症の責任遺伝子である*G6PD*の変異がみられ、他の1例において遺伝性球状赤血球症 (HS) の責任遺伝子である*SPTA1* (spectrin鎖) の変異がみられた。ともに先天性の溶血性貧血である。

臨床的にCDAタイプ3と診断された1例では、このタイプに特徴的とされる*KIF23*の変異はみられず、またその他の変異もみられなかった。

## 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と診断された症例において、通常はグルコース-6-リン酸脱水酵素 (G6PD) 欠損症でみられる *G6PD* 遺伝性の変異がみられ、また遺伝性球状赤血球症でみられる *SPTA1* 遺伝子の変異が見つかった。今後、CDAと溶血性疾患の境界例について臨床情報とゲノム情報を統合した解析を行い、新たな診断と治療のガイドラインの作成に繋げる必要がある。

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。

## 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 bone marrow failure syndrome. **Genet Med.** 2017;19:796-802.
- 2) 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.

- 3) Hirabayashi S, Seki M, Hasegawa D, Kato M, Hyakuna N, Shuo T, Kimura S, Yoshida K, Kataoka K, Fujii Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kiyokawa N, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Manabe A. Constitutional abnormalities of *IDFH1* combined with secondary mutations predispose a patient with Maffucci syndrome to acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Blood Cancer.** (in press)
- 4) Hasegawa D, Manabe A. Myelodysplastic syndrome and JMML. In: Ishii E, editor. **Hematological disorders in children -Pathogenesis and treatment 2017**, p87-108, Springer (Berlin).
- 5) 平林真介, 真部淳. 家族性造血器腫瘍. **臨床血液** 2017;58:1878-1883

### 2. 学会発表

- 1) Hasegawa D, Hirabayashi S, Nishimura A, Aiga S, Yamamoto S, Hosoya Y, Fujiwara T, Harigae H, Manabe A. Clonal evolution with monosomy 7 in Pearson syndrome. **International Meeting on childhood MDS and SAA** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).
- 2) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Suzuki 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. **International Meeting on childhood MDS and SAA** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).
- 3) Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Kojima D, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe

A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Miyano S, Ito M, Ogawa S, Kojima S. Genetic background of idiopathic bone marrow failure syndromes in children. **International Meeting on childhood MDS and SAA** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).

- 4) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. **International Meeting on childhood MDS and SAA** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ).

**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、様々な血液疾患症例687例に対して遺伝性血液疾患関連遺伝子のターゲットシーケンスを実施し、CDA4例（CDAN1 2例、SEC23B 1例、KLF1 1例）、DKC 14例（TINF2 7例、TERT 5例、DKC1 1例、RTEL1 1例）を遺伝子診断し得た。

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。

また、様々な血液疾患症例 687 例に対して遺伝性血液疾患関連遺伝子のターゲットシーケンスを実施し、CDA 4 例 (*CDAN1* 2 例、*SEC23B* 1 例、*KLF1* 1 例)、DKC 14 例 (*TINF2* 7 例、*TERT* 5 例、*DKC1* 1 例、*RTEL1* 1 例) を遺伝子診断し得た。

#### 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) Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Sekiya Y, Suzuki K, Hamada M, Kataoka S, Ichikawa D, Taniguchi R, Murakami N, Kojima D, Nishikawa E, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Development of clinical paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in children with aplastic anaemia. **Br J Haematol**. 2017;78(6):954-958. doi: 0./bjh.4790.
- 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 utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes.

- Genet Med.** 2017;19(7):796-802. doi: 10.1038/gim.2016.197.
- 3) Sekinaka Y, Mitsuiki N, Imai K, Yabe M, Yabe H, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Takagi M, Arai A, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Muramatsu H, Kojima S, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S. Common Variable Immunodeficiency Caused by FANC Mutations. **J Clin Immunol.** 2017;37(5):434-444. doi:10.1007/s10875-017-0396-4.
  - 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;64(5). doi: 10.1002/pbc.26305.
  - 5) 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;105(4):515-520. doi:10.1007/s12185-016-2151-7.
2. 学会発表
- 1) Hideki M, 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 sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. **EWOG-S/SAA2017** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ) .
  - 2) Narita A, Hideki M, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Wang X, Kojima D, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Miyano S, Ito M, Ogawa S and Kojima S. Genetic background of idiopathic bone marrow failure syndromes in children. **EWOG-S/SAA2017** (2017年9月28-30日, イタリア・ローマ) .
  - 3) 川島希, 奥野友介, 村松秀城, 濱麻人, 片岡伸介, 濱田太立, 市川大輔, 村上典寛, 小島大英, 鈴木喬悟, 西川英里, 成田敦, 西尾信博, 中沢洋三, 小島勢二, 高橋義行. 次世代シーケンスによるファンconi貧血遺伝子診断が可能な時代におけるFANCD2モノユビキチンの意義. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京) .
  - 4) Hamada M, Doisaki S, Okuno Y, Muramatsu H, Hama A, Kataoka S, Ichikawa D, Taniguchi E, Suzuki K, Kojima D, Sekiya Y, Kawashima N, Narita A, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Manabe A, Taga T, Takahashi Y, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Congenital hemolytic anaemia mimicking congenital dyserythropoietic anaemia revealed by whole exome analysis. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京) .
  - 5) Okuno Y. 遺伝性造血不全疾患群のクリニカルシーケンス. **第79回日本血液学会学術集会** (Symposium 8) (2017年10月20-22日, 東京) .
  - 6) 村松秀城. 先天性および後天性造血不全375例に対するクリニカルシーケンス. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京) .
  - 7) Hama A, Toki T, Kobayashi A, Muramatsu H, Okuno Y, Hasegawa D, Nozawa K, Takahashi Y, Watanabe KI, Manabe A, Ito M, Ito E, and Kojima S. Correlation of bone marrow morphology with clinical findings and gene alterations in patients with

Diamond-Blackfan anemia. **第59回日本小児血液・がん学会** (2017年11月9-11日, 松山) .

- 8) Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Wang X, Xu Y, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Sakaguchi H, Yoshida N, Kato K, Kojima S and Takahashi Y. Germline mutation in pediatric patients with aplastic anemia. **第59回日本小児血液・がん学会**(2017年11月9-11日, 松山) .
- 9) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Xinan Wang, Yinyan Xu, 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. ターゲットシーケンス解析を施行した小児造血不全移植例の解析 . **第40回日本造血細胞移植学会総会** (2018年2月1-3日, 札幌) .
- 10) 濱麻人, 鈴木喬悟, 成田敦, 成田幸太郎, 北澤宏展, 濱田太立, 片岡伸介, 村上典寛, 市川大輔, 谷口理恵子, 小島大英, 西川英里, 奥野友介, 川島希, 村松秀城, 西尾信博, 小島勢二, 高橋義行 . Diamond-Blackfan貧血に対するフルダラビンおよびメルファランを用いた同種骨髄移植 . **第40回日本造血細胞移植学会総会** (2018年2月1-3日, 札幌) .

#### 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

先天性溶血性貧血の疫学調査・診療ガイドラインの作成

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 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）  
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：** 無効造血を呈する先天性貧血として先天性赤血球形成異常性貧血（CDA）と先天性溶血性貧血の一型であるピルビン酸キナーゼ欠乏性貧血（PK 異常症）はしばしば鑑別が困難である。今回我々は、1972年から2017年の46年間で赤血球酵素活性測定により診断したPK異常症を集計し、臨床像を解析した。遺伝子検査を実施した症例および家系内保因者について赤血球PK活性と遺伝子型（ホモ接合および複合ヘテロ接合、ヘテロ接合）を比較検討したところ、同時測定の成人対照に対する赤血球PKの相対活性値は、患者が $38.5 \pm 3.7\%$ 、一方保因者は $58.5 \pm 3.3\%$ であった（ $\text{mean} \pm \text{SE}$ ）。ROCカーブにおけるカットオフ値は、患者 保因者が85.9%で、保因者 正常対照が79.8%であった。先天性骨髄不全症の鑑別診断においては、Target-captured sequencing解析が有用であるが、PK異常症の確定診断において临床上より迅速な判断が求められる場合には、赤血球中残存PK活性の精査が有用であると考えられた。

### A．研究目的

先天性骨髄不全症の鑑別診断目的の全エクソーム解析で、サラセミアや赤血球酵素異常症の病因遺伝子変異が検出されることが明らかになった。無効造血を呈する先天性貧血として先天性赤血球形成異常性貧血（CDA）と先天性溶血性貧血の一型であるピルビン酸キナーゼ欠乏性貧血（PK異常症）はしばしば鑑別が困難である。今年度は我が国の赤血球酵素異常症として頻度の高いPK異常症の日本人症例に関して、赤血球PK活性と遺伝子変異解析結果の関連について検討を加えたので報告する。

### B．研究方法

1972年から2017年の46年間で赤血球酵素活性測定により診断したPK異常症を集計し、臨床像を解析した。遺伝子検査を実施した症例および家系内保因者について赤血球PK活性と遺伝子型（ホモ接合および複合ヘテロ接合、ヘテロ接合）を比較検討した。

### C．研究結果

1972年から2017年の46年間で赤血球酵素活性測

定により診断したPK異常症（ピルビン酸キナーゼ欠乏性貧血）は120例であった。診断時年齢の中央値は10歳（最小0歳、最大72歳）で、男性が52例、女性が68例であった。患者両親の34.7%に血縁があった。臨床経過では、63.6%の症例に交換輸血の既往を認めた。53.1%の症例に脾腫を認め、治療として脾摘術を受けた症例が58.6%に及んでいた。64.6%に赤血球輸血の既往を認め、経過中47.7%が急性溶血発作を経験していた。

診断時血液検査所見では、ヘモグロビン8.8g/dL、網赤血球数13.0%、血清間接ビリルビン3.7mg/dL、LDH 587 IU/L、トランスフェリン飽和率 57%、血清フェリチン497 ng/mLであった。

36症例についてPKLR遺伝子検査を実施し、両アレルに病因遺伝子変異を同定した。また、42例の家族がヘテロ接合体であった。同時測定の成人対照に対する赤血球PKの相対活性値は、患者が $38.5 \pm 3.7\%$ 、一方保因者は $58.5 \pm 3.3\%$ であった（ $\text{mean} \pm \text{SE}$ ）。ROC（receiver operator characteristic）カーブにおけるカットオフ値は、患者 保因者が85.9%で、保因者 正常対照が79.8%であった。

## D . 考察

先天性骨髄不全症の鑑別診断において、次世代シーケンサー (NGS) を用いた全エクソーム解析、関連遺伝子パネルを用いた Target-captured sequencing (TCS) 解析などが導入され、診断率の向上が報告されている。一方で、今までの臨床診断結果からは想定できなかった病因遺伝子変異が同定されるケースも増えてきた。最近、Bianchiらは、赤血球酵素活性測定により、PK異常症と診断した症例に脾摘術を施行したところ、術後重篤な静脈血栓症を来したことを報告した。本例に対してNGS解析を実施したところ、脱水型遺伝性有口赤血球症 (dehydrated hereditary stomatocytosis; DHSt) の病因となる *PIEZO1* 変異を同定し、*PKLR* 遺伝子に関してはヘテロ接合で患者は保因者であることが明らかになった。

今回の研究成果により、赤血球輸血依存性の重症例を除けば、残存赤血球PK活性値を同時測定の正常対照との比較で示すことにより、PK遺伝子変異を両アレルに認めるホモ接合 / 複合ヘテロ接合と片アレルにのみ変異を認めるヘテロ接合を鑑別することが可能であることが示唆された。

PK異常症は赤血球輸血を必要としない症例であっても、無効造血による二次性ヘモクロマトーシスを発症することで、鉄キレート療法の導入が必要な症例も多く、今回の調査においても診断時にトランスフェリン飽和率が50%以上、フェリチン値も約500ng/mLとヘモクロマトーシスが発症していることが明らかになった。PK異常症との鑑別を要する無効造血疾患としては先天性赤血球形成異常性貧血 (CDA)、ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) や骨髄異形成症候群 (MDS) などが挙げられ、今後はより多くの症例を積み重ね、これらの疾患の鑑別におけるTCS解析の臨床的有用性を明らかにする必要があると考えられた。

## E . 結論

赤血球PK活性の低下が明らかになった先天性貧血の確定診断のためには、*PKLR* 遺伝子変異を両アレルに同定することが肝要であるが、赤血球PK活性値を同時測定の正常対照との相対値として表現することで、遺伝子検査結果と高い相関を認めることが明

らかになった。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 西本瑛里, 西久保敏也, 釜本智之, 石原卓, 山口直子, 菅野仁, 高橋幸博. マイクロプレート法による赤血球浸透圧抵抗試験と eosin-5-maleimide を用いた赤血球膜 band3 定量法が診断に有用であった新生児期に重症黄疸を発症した赤血球膜蛋白異常症の1例. **日本産婦人科・新生児血液学会** 2017;26(2):71-76.
- 2) Matsumaru S, Oguni H, Ogura H, Shimojima K, Nagata S, Kanno H, Yamamoto T. A novel PGK1 mutation associated with neurological dysfunction and the absence of episodes of hemolytic anemia or myoglobinuria. **Intractable Rare Diseases Research**. 2017; 6(2):132-136. doi:10.5582/indr.2017.01020.
- 3) 槍澤大樹, 菅野仁. 循環系の基礎と臨床 (2) 血管新生. **東京女子医科大学雑誌** 2017;87(1-2): 5-12.
- 4) 小倉浩美, 菅野仁. 貧血学 最新の診断・治療動向 V溶血性貧血 赤血球酵素異常症・不安定ヘモグロビン症 **日本臨床** 2017;75(増刊号1).
- 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;102(3):e93-e96. doi:10.3324/haematol.2016.153932.
- 6) Noguchi J, Kanno H, Chiba Y, Ito E, Ishiguro A. Discrimination of Diamond-Blackfan anemia from parvovirus B19 infection by RBC glutathione. **Pediatr Int**. 2017;59(7):838-840. doi:10.1111/ped.13284.
- 7) Sakaue S, Kasai T, Mizuta I, Suematsu M, Osone S, Azuma Y, Imamura T, Tokuda T,

- Kanno H, El-Agnaf OMA, Morimoto M, Nakagawa M, Hosoi H, Mizuno T. Early-onset parkinsonism in a pedigree with phosphoglycerate kinase deficiency and a heterozygous carrier: do PGK-1 mutations contribute to vulnerability to parkinsonism? **NPJ Parkinsons Dis.** 2017;3:13. doi: 10.1038/s41531-017-0014-4.
- 8) Ogasawara T, Kawauchi K, Mori N, Sakura H, Katoh F, Kanno H, Ito E. Successful long-term management with low-dose prednisolone in an adult patient with Diamond-Blackfan anemia. **Rinsho Ketsueki.** 2017;58:917-921. doi:10.11406/rinketsu.58.917.
- 9) Niizuma H, Kanno H, Sato A, Ogura H, Imaizumi M. Splenectomy resolves hemolytic anemia caused by adenylate kinase deficiency. **Pediatr Int.** 2017;59(2):228-230. doi:10.1111/ped.13166.
- 10) 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;19(7):796-802. doi:10.1038/gim.2016.197.
- 11) 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;105(4):515-520. doi:10.1007/s12185-016-2151-7.
- 12) Sonoda M, Ishimura M, Ichimiya Y, Terashi E, Eguchi K, Sakai y, Takada H, Hama A, Kanno H, Toki T, Ito E, Ohga S. Atypical erythroblastosis in a patient with Diamond-Blackfan anemia who developed del(20q) myelodysplasia. **Int J Hematol.** 2018. doi:10.1007/s12185-018-2424-4.
- 13) Van Straaten S, Bierings M, Bianchi P, Akiyoshi K, Kanno H, Serra IB, Chan J Huang X, van Beers E, Ekwattanakit S, G üng ör T, Kors WA, Smiers F, Raymakers R, Yanez L, Sevilla J, van Solinge W, Segovia JC, van Wijk R. Worldwide study of hematopoietic allogeneic stem cell transplantation in pyruvate kinase deficiency. **Haematologica.** 2018;103(2). doi:10.3324/Haematol.2017.177857.
- 14) 大賀正一, 石村匡崇, 槍澤大樹, 菅野仁. 新生児の遺伝性溶血性貧血～疾患概念の拡張～. **日本産婦人科・新生児血液学会誌** 2018;27(2):41-47.
2. 学会発表
- 1) Iwasaki T, Utsugisawa T, Ogura H, Aoki T, Kinoshita A, Ogata Y, Okamoto Y, Kawakami T, Kanno H. The Flow Cytometric Osmotic Fragility Test is an Effective Screening Test for Red Cell Membrane Disorders, Including Dehydrated Hereditary Stomatocytosis. **ISLH (International Society for Laboratory Hematology)** (2017年5月4-6日, ハワイ・ホノルル).
- 2) 槍澤大樹, 中林恭子, 松田和樹, 守屋友美, 千野峰子, 岡本好雄, 菅野仁. 低温保存腹水を用いた腹水濾過濃縮再静注法(CART)の有用性の検討. **第65回日本輸血・細胞治療学会総会**(2017年6月22-24日, 千葉).
- 3) 高源ゆみ, 木下明美, 小林博人, 菅野仁. 腹水濾過時に得られる単核球を利用した δ型T細胞療法の開発. **第65回日本輸血・細胞治療学会総会**(2017年6月22-24日, 千葉).
- 4) 小野慎吾, 及川美幸, 中林恭子, 岡本好雄, 菅野仁. ABO同型クリオプレシピテート供給体制

の是非に関する考察．第65回日本輸血・細胞治療学会総会（2017年6月22-24日，千葉）．

- 5) 守屋友美，小野慎吾，小林博人，菅野仁．（ポスター）高張アルブミン製剤適正使用の推進．第65回日本輸血・細胞治療学会総会（2017年6月22-24日，千葉）．
- 6) 小倉浩美，槍澤大樹，岩崎拓也，青木貴子，岡本好雄，川上高弘，菅野仁．系統的検査による先天性溶血性貧血80症例の病型診断．第79回日本血液学会学術集会（2017年10月20-22日，東京）．
- 7) 槍澤大樹，小倉浩美，岩崎拓也，青木貴子，岡本好雄，川上高弘，菅野仁．Heterogeneous KCNN4 or PIEZO1 gene mutation cause dehydrated hereditary Stomatocytosis in Japan．第79回日本血液学会学術集会（2017年10月20-22日，東京）．
- 8) Kanno H, Rachael F.Grace, D.Mark Layton, Galacteros F, Rose C, Barcellini W, D.Holmes Morton, Eduard Van Beers, Yaish H, Ravindranath Y, Kevin H.M.Kuo, Sheth S, Janet L.Kwiatkowski, Silver B, Kung C, Cohen M, Yang H, Penelope A. Kosinski, Hua L, Ann J. Barbier, Glader B. AG-348, a pyruvate kinase activator, for pyruvate kinase deficiency: Results the drive PK study. 第79回日本血液学会学術集会（2017年10月20-22日，東京）．
- 9) 村岡倫子，岡本佳子，猪谷元浩，近藤亜矢，坂根朋子，岩瀬瑞恵，藤原倫昌，北田邦美，野島郁子，高橋伸方，荒木徹，菅野仁．KCNN4変異による脱水型遺伝性有口赤血球症の1例．第59回小児血液・がん学会学術集会（2017年11月9-11日，松山）．
- 10) Goto T, Togawa T, Ito T, Kouwaki M, Ogura H, Kanno H, Saitoh S, Koyama N. A patient with hereditary Pyropoikilocytosis caused by a combination of a novel in-frame deletion and a common functional but non-pathogenic allele, αLELY, in SPTA1. American Society of Human Genetics 2017 annual meeting

（2017年10月17-18日，米国・オーランド）．

#### G．知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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。今年度は国内から3例の新規症例を解析した。さらに、これまでの症例の解析結果の見直しを進め、合計117例の症例について、まとめることを試みた。

### 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。本研究班では日本人ファンコニ貧血症例の原因遺伝子の同定を進め、臨床現場へのフィードバックと、疫学研究を推進してきた。今年度は、これまでの症例の解析結果の見直しを進め、東海大矢部博士、名古屋大小島勢二博士らとの共同研究の結果である合計117例の症例について、まとめることを試みた。

### B．研究方法

ルーチンとして随時受け付けているファンコニ貧血疑い症例の分子診断をFANCAとFANCG遺伝子のコモン変異について施行した。分子診断を施行した過去の記録を見直し、レビューした。遺伝子変異の機能的意義について、実験的に検証した。特に重症な例については、矢部博士に依頼して臨床情報入手した。日本人FA患者で比較的頻度の高いものについて、健常人における頻度を知るため、東北メガバンクの安田純教授と共同研究を行った。

（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

今年度新規に受け付けた症例の分子診断は、第一例については、片アレル FANCA 2546delC 判明（もう片アレルは MLPA も行ったが不明）、二例目、FANCG c.1066C>T homo。もう一例は、common mutation なく、名古屋大学のターゲットシーケンスに提出した。

現在まで集積した117例（113家系）について、遺伝子の変異と、その効果について解析し、まとめた。同定された変異遺伝子では、FANCAとFANCG変異が58%と24%を占めており、合計で82%の症例で確認された。55種類の異なったバリエーションが68症例のFANCA患者で同定された。内訳は、17種類のヌクレオチド置換変異、16種類の欠失挿入、12種類の巨大欠失、一つの巨大繰り返し挿入9つのスプライス部位変異などであった。FANCA のc.2546delC が最も頻度の高い変異で、32%で認められた。この変異は、日本人集団で頻度が比較的高く、東北メガバンクの健常人データベース3.5KJpnにおいても0.1%程度検出された。28人のFANCG患者において、二つのFANCG mutations（c.307+1G>C and c.1066C>T）変異アレルの88%に相当した。面白いことに、これら3つの変異は韓国のFA患者においてもドミナントに認められており（Clin Genet. 2013;84:271-275）、これらの変異が現代日本人と韓国人の祖先が同一集団であった時代に誕生し、その後日本人の祖先が移動して日本列島に持ち込まれたものと思われる。

FANCAとFANCG以外の稀なタイプの中で、重篤



な奇形をFANCBとFANCIの変異で認めた。また、3例のFANCD1 (BRCA2) と1例のPALB2変異 (FANCN)を同定したが、様々な腫瘍を合併していた。

ごく一部にどうしても既知の原因遺伝子の変異が同定できない症例が存在し、今後の解析が必要である。

#### D . 考察

117例の日本人患者の分子診断をまとめることにより、日本人におけるファンコニ貧血患者の変異スペクトラムを明らかにした。一部の患者で、FANCB、FANCD1など稀な遺伝子型の患者では通常のファンコニ貧血とは違い、重症奇形、低年齢での発がんなどの特殊な病態を呈している。これらの知見は、今後の分子診断を効率よく施行する上での基礎データになるものである。今後、一般の日本人集団での変異頻度のデータの蓄積によって、様々な病態との関連性などが浮かび上がってくる可能性がある。東北メガバンク等のデータベース、バイオバンクの充実により、一般人におけるFA遺伝子の変異頻度についても明確化され、様々な遺伝病のリスクなどについても、より確実な遺伝カウンセリングなどが可能となる時代が近づいていると思われる。

#### E . 結論

多数の症例をまとめることで、日本人ファンコニ貧血原因遺伝子の疫学的特徴を明確化した。今後論文発表の予定である。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Okamoto Y, Iwasaki WM, Kugou K, Takahashi KK, Oda A, Sato K, Kobayashi W, Kawai H, Sakasai R, Takaori-Kondo A, Yamamoto T, Kanemaki MT, Taoka M, Isobe T, Kurumizaka H, Innan H, Ohta K, Ishiai M, Minoru Takata M. Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes. **Nucleic Acid Res.** 2018;46(6):2932-2944. doi:10.1093/nar/gky058.

- 2) Kadoda K, Moriwaki T, Tsuda M, Sasanuma H, Ishiai M, Takata M, Ide H, Masunaga SI, Takeda S, Tano K. Selective cytotoxicity of the anti-diabetic drug, metformin, in glucose-deprived chicken DT40 cells. **PLoS One.** 2017;12(9):e0185141. doi:10.1371/journal.pone.0185141. eCollection 2017.
- 3) Mochizuki AL, Katanaya A, Hayashi E, Hosokawa M, Moribe E, Motegi A, Ishiai M, Takata M, Kondoh G, Watanabe H, Nakatsuji N, Chuma S. PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. **Mol Cell Biol.** 2017;37(23). pii: e00117-17. doi:10.1128/MCB.00117-17.
- 4) Knies K, Inano S, Ramirez MJ, Ishiai M, Surallés J, Takata M, and Schindler D. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase *RFWD3* cause Fanconi anemia. **Journal of Clinical Investigation J Clin Invest.** 2017;127(8):3013-3027. doi:10.1172/JCI92069. Epub 2017 Jul 10. PMID: 28691929.
- 5) Inano S, Sato K, Katsuki Y, Kobayashi W, Tanaka H, Nakajima K, Nakada S, Hiroyuki Miyoshi, Knies K, Takaori-Kondo A, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. RFWD3-mediated ubiquitination promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination. **Mol Cell.** 2017;66(5):622-634.e8. doi:10.1016/j.molcel.2017.04.022. PMID: 28575658.
- 6) Sekinaka Y, Mitsui N, Imai K, Yabe M, Yabe H, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Takagi M, Arai A, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Muramatsu H, Kojima S, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S. Common Variable Immunodeficiency Caused by FANC Mutations. **J Clin Immunol.** 2017;37(5):434-444. doi:10.1007/s10875-017-0396-4. PMID:28493158.

- 7) Ishiai M, Sato K, Tomida J, Kitao H, Kurumizaka H, Takata M. Mutation Research special section "Protein modifications in DNA repair and cancer" Activation of the FA pathway mediated by phosphorylation and ubiquitination. **Mutat Res.** 2017 May 5. pii: S0027-5107(17)30078-7. doi:10.1016/j.mrfmmm.2017.05.003.
- 8) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 胡桃坂仁志, 高田穰. ファンコニ貧血の新規原因遺伝子 *RFWD3/FANCW* の機能解析から明らかになった相同組換え反応制御機構. **生化学**. (印刷中)
- 9) 石合正道, 高田穰. 2.18 放射線応答遺伝子の生物種間の保存・相関. **放射線医学の事典** 編集 宮川清, 監修 大西武雄.
- 10) 稲野将二郎, 高田穰. 新規 Fanconi anemia 遺伝子 *RFWD3/FANCW* の発見と機能解明. **小児血液がん学会誌** 2017;54(5):287-293.
- 11) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 胡桃坂仁志, 高田穰. Fanconi 貧血の新規の原因タンパク質 *RFWD3* による相同組換えの制御. **ライフサイエンス** 新着論文レビュー. <http://first.lifesciencedb.jp/archives/16605>.
- 12) 矢部普正, 高田穰, 村松秀樹. III Fanconi 貧血. **先天性骨髄不全症診療ガイドライン 2017**. 編集 日本小児血液・がん学会 診断と治療社.
2. 学会発表
- 1) 高田穰. 「ファンコニ貧血経路による染色体ストレス応答制御」「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」. **神戸大学大学院講義&セミナー 現代の生物学 II**(招待講演)(2017年12月22日, 神戸).
- 2) Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein *RFWD3/FANCW*. (Invited lecture) (2017年12月14日, 台湾).
- 3) 勝木陽子, 安倍昌子, H. van Attikum, 中田慎一郎, 鐘巻将人, Kim Y, 高田穰. ICL 修復因子 *SLX4* は *RNF168* 依存的なユビキチン化経路を介して損傷部位に集積する(ワークショップ). **ゲノム恒常性維持機構の破綻と疾患発症の分子メカニズム(3PW02)** (招待講演). **2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 / 第40回日本分子生物学会年会**(2017年12月6-9日, 神戸).
- 4) 岡本裕介, 岩寄航, 高橋数冴, 久郷和人, 小田有沙, 河合秀彦, 佐藤浩一, 小林航, 逆井良, 高折晃史, 山本卓, 鐘巻将人, 田岡万悟, 磯部俊明, 胡桃坂仁志, 印南秀樹, 太田邦史, 石合正道, 高田穰. 複製ストレスにおける染色体脆弱部位への R-Loop 依存性 *FANCD2* 集積メカニズム. **第40回日本分子生物学会年会** (2017年12月6-9日, 神戸).
- 5) 松井美咲, 木村祐輔, 安倍昌子, 石合正道, 堀利行, 高田穰, Jackson S, 西良太郎. 核内構造体に局在する因子による相同組換え修復制御「遺伝的組換えの分子メカニズムとその生理的機能と技術応用」(ワークショップ). **第40回日本分子生物学会年会** (2017年12月6-9日, 神戸).
- 6) L. Mochizuki A, Katanaya A, Hayashi E, Hosokawa M, Moribe E, Motegi A, Ishiai M, Takata M, Kondoh G, Watanabe H, Nakatsuji N, Chuma S. PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. **日本遺伝学会第89回大会** (2017年9月13-16日, 岡山).
- 7) Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein *RFWD3/FANCW*. **1st International Symposium on Radiation Therapeutics and Biology (isRTB-2017)** (2017年10月31日-11月1日, 中国・深圳).
- 8) 高田穰. ファンコニ貧血とゲノム損傷修復因子: 患者サンプル解析による希少疾患病態解明を目指して. **金沢大学薬学シンポジウム 2017** (2017年10月6日, 金沢).
- 9) 高田穰. 「ファンコニ貧血の原因遺伝子探索と相同組換えの新規メカニズム」. **名古屋大学平成29年度基盤医学特論** (招待講演)(平成29年9月21日, 名古屋).
- 10) Knies K, Inano S, J. Ramirez M, Ishiai M,

Surrallés J, Takata M, and Schindler D. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase *RFWD3* cause Fanconi anemia. **29th Annual Fanconi Anemia Scientific Symposium** (2017年9月14-17日, 米国・アトランタ).

- 11) Inano S, Sato K, Katsuki Y, Knies K, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein RFWD3/FANCW. **Center for Genomic Integrity at UNIST invited lecture** (2017年6月27日, 韓国・蔚山).
- 12) Takata M. Regulation of homologous recombination repair by a novel Fanconi anemia E3 ligase RFWD3/FANCW. **6th US-Japan DNA Repair Meeting** (2017年5月17-21日, 米国・パークレー).
- 13) Inano S, Sato K, Katsuki Y, Knies K, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein RFWD3. **FEBS workshop Nucleotide excision repair and crosslink repair - from molecules to mankind** (2017年5月7-11日, スロバキア).

#### 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年から2016年に診断されて登録された1,542例の造血障害症例から、新規診断Diamond-Blackfan貧血症例は94例、特発性赤芽球癆は54例であった。Idiopathic AA症例数が2014年頃から減少傾向にあったが、WHO分類RCCの症例数と合算すると、2013年以前の年間症例数とほぼ同等になることが観察された。Fanconi貧血は44例集積されたが、小児期末診断症例がどのような経過でその後診断されているのか明らかにすることはできなかった。今回の一次データベースから二次調査を利用した詳細なデータベース構築が必要であるが、研究期間内には達成できなかった。

### A．研究目的

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

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

### B．研究方法

本研究班の研究では疫学観察研究として実施し、治療介入は行わない。小児血液・がん学会会員236施設を対象にした20歳未満全例登録（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対象にし、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年から2016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；2016年診断症例は日本小児血液学会会員236施設の70%に相当する165施設が登録した。表に挙げた溶血性貧血を除くIdiopathic AAからCong. Thrombocytopeniaまでの14の造血障害疾患患者数は11年間で総計1,045例である。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。

2014年頃からIdiopathic AAの症例数が減少している。小児期には中等症Idiopathic AAと鑑別が困難なRefractory Cytopenia in Childhood, RCCがWHOにより定義され、前記中央診断がRCCの中央診断に貢献している。造血障害の病態が疑われるRCCは、2014年から3年間で20例、21例、15例であり（表最下段）これとIdiopathic AA症例数を合算すると、61例、75例、61例となり、2013年以

前の Idiopathic AA 合計症例数とほぼ同数となる。  
b. Diamond-Blackfan 貧血；DBA 症例は11年間で94例、これとは別に特発性赤芽球癆54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. Fanconi 貧血；FA は11年間で44例、未診断例が残存し成人年齢で白血病などで発症する症例の把握にまでは至っていない。

#### 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。今回、Idiopathic AA 症例数と鑑別が問題となる RCC に注目して症例数を検討した。RCC の診断には学会中央診断事業が貢献している。その結果、Idiopathic AA と RCC の症例数と合算すると、2013年以前の Idiopathic AA 年間症例数とほぼ同等になることが観察された。

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) Hiejima E, Shibata H, Yasumi T, Shimodera S, Hori M, Izawa K, Kawai T, Matsuoka M, Kojima Y, Ohara A, Nishikomori R, Ohara O, Heike T. Characterization of a large UNC13D gene duplication in a patient with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3. *Clin Immunol*. 2018;191:63-66.
- 2) Watanabe M, Nishikomori R, Fujimaki Y, Heike T, Ohara A, Saji T. Live-attenuated vaccines in a cryopyrin-associated periodic

syndrome patient receiving canakinumab treatment during infancy. *Clin Case Rep*. 2017;5:1750-1755.

- 3) Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanezaki 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:e93-e96.
- 4) Yusa T, Tateda K, Ohara A, Miyazaki S. New possible biomarkers for diagnosis of infections and diagnostic distinction between bacterial and viral infections in children. *J Infect Chemother*. 2017;23:96-100.
- 5) 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 & Cancer*. 2017;64:e26305. doi: 10.1002/pbc.26305.

##### 2. 学会発表

該当する発表なし

#### 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	2016
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239	216 / 239	219 / 242	212 / 230	171 / 232	158 / 239	165 / 236
( % )	83%	88%	90%	90%	90.3%	90.4%	90.5%	92%	74%	66%	70%
Idiopathic AA	58	62	68	68	55	62	49	58	41	47	46
Hepatitis AA	5	8	11	7	13	5	11	3	5	8	15
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	3
Diamond-Blackfan	9	6	9	10	6	9	6	11	10	12	6
Idiopathic PRCA	1	4	5	8	5	7	6	6	1	5	6
Schwachman-Diamond	0	1	1	2	0	0	2	2	0	2	1
Cong. Dyserythropoietic anemia	No data	No data	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Sideroblastic anemia	No data	No data	2	1	1	0	1	0	1	0	1
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3	4	4	1	2	1	1
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2	3	5	3	0	•	0
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
Cong. Thrombocytopenia							12	11	19	11	16
Cong. Spherocytosis	No data	•	•	•	54	49	26	48	50	64	48
Cong. Elliptocytosis	No data	•	•	•	2	1	1	2	1	0	1
G6PD deficiency	No data	•	•	•	5	5	3	3	6	7	6
PK deficiency	No data	•	•	•	0	0	0	0	0	3	0
other erythrocyte enzyme def.	No data	•	•	•	2	0	0	0	0	2	•
Sickel cell disease	No data	•	•	•	1	1	0	1	1	0	0
Unstable hemoglobinopathy	No data	•	•	•	1	0	0	0	2	4	1
Thalasemia	No data	•	•	•	18	16	11	8	10	14	16
other hemoglobinopathy	No data	•	•	•	0	0	0	1	0	1	1
Refract. Cytopenia Child., RCC	No data	•	•	•	•	•	•	•	20	21	15

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が、我が国の DBA 患者の約半数は原因遺伝子が不明である。本年度は、新規症例 14 例の遺伝子診断を行い、11 例で既知の原因遺伝子の変異を同定した。これまでに 192 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、113 例（58.9%）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。さらに、本年度は悪性腫瘍の合併を考慮した DBA の重症度分類の改定を行った。

#### A．研究目的

Diamond Blackfan 貧血（DBA）は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。原因遺伝子として 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。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、RPL5、RPL11、RPL26、RPL35a）と GATA1 遺伝子について、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いてターゲットシーケンスを行っ

た。次に、定量的 PCR 法と SNP アレイ法により RP 遺伝子の大欠失を解析した。

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

本年度は、新規症例 14 例の遺伝子診断を行い、11 例で既知の原因遺伝子の変異を同定した（RPS19 3 例、RPS26 1 例、RPS7 1 例、RPL11 4 例、RPL5 1 例、RPL35A 1 例）。これまでに遺伝子検査を施行した症例は 192 例となった。これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS 委員会と連携を取りながら、エビデンスに基づいた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。さらに、本年度は悪性腫瘍の合併を考慮した DBA の重症度分類の改定を行った。

## 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。

日本小児血液・がん学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小改訂を行った。先天性骨髄不全症の学会認定のガイドラインはこれまでなく、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) Ito E, Terui K, Toki T. Inherited bone marrow failure syndrome, TAM. In **Hematological Disorders in Children**. edited by Eiichi Ishii, Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2017, pp. 145-170.
- 2) Ikawa Y, Nishimura R, Maeba H, Fujiki T, Kuroda R, Noguchi K, Fukuda M, Mase S, Araki R, Mitani Y, Sato T, Terui K, Ito E, Kitabayashi I, Yachie A. Deep spontaneous molecular remission in a patient with congenital acute myeloid leukemia expressing a novel MOZ-p300 fusion transcript. **Leuk Lymphoma**. 2018;1-3. doi:10.1080/10428194.2018.1434885.
- 3) Sakamoto K, Imamura T, Kihira K, Suzuki K, Ishida H, Morita H, Kanno M, Mori T, Hiramatsu H, Matsubara K, Terui K, Takahashi Y, Suenobu SI, Hasegawa D, Kosaka Y, Kato K, Moriya-Saito A, Sato A, Kawasaki H, Yumura-Yagi K, Hara J, Hori H, Horibe K. Low Incidence of Osteonecrosis in

Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with ALL-97 and ALL-02 Study of Japan Association of Childhood Leukemia Study Group. **J Clin Oncol**. 2018;36:900-7.

- 4) Shimada A, Iijima-Yamashita Y, Tawa A, Tomizawa D, Yamada M, Norio S, Watanabe T, Taga T, Iwamoto S, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Saito AM, Kiyokawa N, Horibe K, Hara Y, Oki K, Hayashi Y, Tanaka S, Adachi S. Risk-stratified therapy for children with FLT3-ITD-positive acute myeloid leukemia: results from the JPLSG AML-05 study. **Int J Hematol**. 2018;107:586-595. doi:10.1007/s12185-017-2395-x.
- 5) Nakayama H, Tomizawa D, Tanaka S, Iwamoto S, Shimada A, Saito AM, Yamashita Y, Moritake H, Terui K, Taga T, Matsuo H, Kosaka Y, Koh K, Hosoi H, Kurosawa H, Isoyama K, Horibe K, Mizutani S, Adachi S. Fludarabine, cytarabine, G-CSF and idarubicin for children with relapsed AML. **Pediatr Int**. 2017;59:1046-52.
- 6) 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; 106(1): 55-59. doi:10.1007/s12185-017-2227-z.
- 7) 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;64 (10). doi:10.1002/pbc.26491.
- 8) 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:e93-e96.

- 9) 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 Hyponatremia Without Hypothalamic Lesions Accompanied by Autoantibodies to Subfornical Organ. **Brain Pathol.** 2017;27: 323-31.
- 10) 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.

## 2. 学会発表

- 1) 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 and Ito E. Clinical impact of *GATA1* mutation types in infants with Down syndrome and TAM: JPLSG TAM-10 study. **第79回日本血液学会学術集会** (2017年10月20-22日, 東京).
- 2) Kubota Y, Uryu K, Ito T, Kawai T, Seki M, Isobe T, Toki T, Yoshida K, Kataoka K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Integrated genetic/epigenetic analysis revealed high

heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).

- 3) Hasegawa D, Miyamura T, Nagai K, Kudo K, Tawa A, Sano H, Fukushima K, Iwamoto S, Kinoshita A, Takahashi H, Terui K, Nakayama H, Arakawa Y, Nakashima K, Yamamoto S, Saito MA, Horibe K, Tomizawa D, Taga T, Adachi S. Effectiveness of Supportive Care Measurements to Reduce Infections during Induction for Children with Acute Myeloid Leukemia: A Report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
- 4) Sakamoto K, Imamura T, Kihira K, Ishida H, Suzuki K, Morita H, Kanno M, Mori T, Hiramatsu H, Matsubara K, Terui K, Takahashi Y, Suenobu S, Hasegawa D, Kosaka Y, Kato K, Saito MA, Sato A, Kawasaki H, Yagi YK, Hara J, Hori H, and Horibe K. Low Incidence of Osteonecrosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with ALL-97 and ALL-02 Study of Japan Association of Childhood Leukemia Study Group. **American Society of Hematology 59th Annual Meeting** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
- 5) 関戸雄貴, 中館尚也, 石黒精, 照井君典, 土岐力, 伊藤悦朗, 吉田健一, 小川誠司, 小島勢二. Blackfan-Diamond 症候群と鑑別を要した Shwachman-Diamond 症候群の姉弟例. **第59回日本小児血液・がん学会学術集会** (2017年11月9-11日, 松山).

## 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

### X染色体連鎖鉄芽球性貧血の女性例の検討

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：** X染色体連鎖鉄芽球性貧血は、X染色体上に存在するALAS2遺伝子の変異により発症する伴性劣性遺伝性の疾患で主に男性が発症する。しかしながら、近年、ALAS2遺伝子の変異により発症し、男性例とは異なる臨床的特徴を呈する女性例が報告されているので、自検例も含めてその特徴をまとめ、さらに診断に際して注意すべき点について検討を行った。

#### A．研究目的

X染色体連鎖鉄芽球性貧血（XLSA）は赤芽球型5-アミノレブリン酸合成酵素遺伝子（ALAS2）の機能欠失型変異により発症する遺伝性鉄芽球性貧血である。ALAS2はXp11にマップされるため、XLSAの遺伝形式は伴性劣性遺伝で、基本的には男性が発症する遺伝性鉄芽球性貧血として知られており、骨髄における環状鉄芽球の出現、小球性貧血、全身性の鉄過剰症が臨床的に主たる特徴である。しかしながら、近年、ALAS2の遺伝子変異により発症する女性例が報告されており、それらの症例では、男性患者と同様の臨床症状を呈する症例と男性患者とは異なる臨床的特徴を有する症例が混在していることが報告されている。このため、今後の診断に資することを目的に、男性例と女性例の症状や検査所見の違いについて既報例も含めて検討を行った。

#### B．研究方法

自検例に加え、公的な文献データベースを検索することによりALAS2遺伝子の機能欠失型変異による女性XLSA患者の報告を抽出し、現在まで報告されている男性患者の特徴と比較した。

（倫理面への配慮）

倫理面への配慮が必要な個人情報は利用していない。また、引用した公表済みの論文にも倫理面への配慮が必要な情報は含まれていない。

#### C．研究結果

女性の場合、変異遺伝子のキャリアであるため、鉄芽球性貧血としては発症しない場合が最も多い。一方、キャリアの女性と同様に野生型と変異型の2つのALAS2遺伝子をそれぞれのX染色体上に保有するにも関わらず発症する女性例では、大きく分けて2種類の発症機序が推定されている。一つは、何らかの理由によりX染色体の不活性化に偏りが生じたことに起因する場合で、もう一方は遺伝子変異の結果として変異ALAS2の機能が著しく低下する場合である。

##### 1) 不均等なX染色体の不活化による場合

女性は父親由来と母親由来の2つのX染色体を有するが、全ての細胞では、分化の過程でどちらか一方のX染色体が細胞ごとにランダムに不活性化され、各細胞ではいずれか一方のX染色体のみから必要な遺伝子を発現していることが知られている。赤芽球も同様で、母親由来のX染色体が不活化されている赤芽球と、父親由来のX染色体が不活化されている赤芽球が通常はほぼ均等に混在している。すなわち、変異ALAS2遺伝子のキャリアである女性では、X染色体の不活化が均等であれば変異ALAS2を発現する赤芽球と正常型ALAS2を発現する赤芽球が同程度に存在するため、ALAS2遺伝子変異に起因する貧血を発症することはないが、この場合でも変異ALAS2遺伝子が発現している赤芽球から産生される赤血球は小球性であるため、末梢血の赤血球は大小の赤血球が混在し、赤血球粒度分布（RDW）は拡大することが多い。

しかしながら、何らかの理由でX染色体のランダムな不活化が一方のX染色体に偏ってしまった場合、あるいは、一方のX染色体が不活化された細胞がクローン化して増殖した場合などには、一方のX染色体からのみ遺伝子を発現する細胞が優勢に増殖する状態となる場合がある。変異ALAS2遺伝子を有するキャリアの女性で、野生型ALAS2遺伝子を有するX染色体が不活化された、すなわち変異型ALAS2遺伝子が発現している赤芽球の増殖が優勢となった場合には、女性でも男性患者と同様のXLSAを発症することが知られている。(参考文献1,2他)加齢に伴いX染色体の不均衡な不活化が起こりやすくなることが知られており、高齢者の女性で発症した場合には骨髄異形成症候群との鑑別診断が重要である。またこのような場合には、当該家系の中に、ALAS2の同じ変異を有する男性患者が同定されることが少なくない。また、PLPの前駆体であるピリドキシン(ビタミンB6)の投与に反応して、貧血が改善する場合がある。

## 2) ALAS2の機能低下が著しい場合

最近、ALAS2遺伝子に変異を有し、大球性の貧血を呈する女性例が相次いで報告された。(参考文献3,4,5)これらの症例で特徴的なのは、大球性貧血を呈するにも関わらずビタミンB12や葉酸などの欠乏は明らかではないこと、家系内に同じALAS2遺伝子変異を持つ男性が同定されないことである。また、末梢血網状赤血球由来のmRNAを調べた結果では、いずれの症例でもゲノムDNAで確認された変異を有するmRNAは検出されず、野生型ALAS2 mRNAのみが検出されている。一方、患者の骨髄中には環状鉄芽球が観察されることから、骨髄中では変異ALAS2タンパク質を発現している赤芽球が存在するものと推察される。そこで、我々が大球性鉄芽球性患者で同定した変異ALAS2遺伝子から発現すると予想される変異酵素を大腸菌で発現・精製して酵素活性を測定したところ、十分な濃度の補酵素(ピリドキサルリン酸, PLP)の存在下でも、野生型の約1/20に酵素活性が低下していた(参考文献5)。一方、参考文献3で報告されたALAS2変異酵素は補酵素であるPLPとの結合性が著明に低下しており、その結果、タンパク質の安定性が低下するものと考えられている。いずれにしても、遺伝子変異によるALAS2

酵素活性の著明な低下は共通の特徴であると考えられる。以上の結果より、酵素活性が極度に低下する変異ALAS2タンパク質を発現する赤芽球は、赤血球への分化に際して十分なヘモグロビンが合成できず、分化の途中のいずれかの時点で、おそらくはアポトーシスにより除去されるものと予想されている。したがって、変異アレルしか持たない男性患者はおそらく強度の貧血のため出生が困難で、女性患者の網状赤血球由来のmRNAには変異型のALAS2 mRNAが検出されないのではないかと予想されている。女性患者の野生型のALAS2を発現している赤芽球が大球性となるメカニズムの詳細は不明だが、通常よりも分化誘導刺激を強く受けることにより大球性の赤血球を産生すると推察されている。しかしながら、産生量が不十分であるために貧血を呈するらしい。

また、いずれの症例でも血清フェリチン値は高値で、全身性の鉄過剰状態が示唆されるのは男性のXLSA症例と同様である。ピリドキシンの投与が行われた症例では効果は認められていない。

## D. 考察

ALAS2遺伝子は赤芽球におけるヘム生合成系の律速酵素であることから、ALAS2遺伝子の機能欠失型変異によるXLSAではヘモグロビンへのヘム供給不足により小球性貧血を呈すると考えられていた。

実際、女性が発症する場合でも、不均等なX染色体の不活化による場合には、変異型ALAS2遺伝子が発現する赤芽球に由来する赤血球は小球性であった。それゆえ家系内に男性患者が同定されず、さらに大球性の貧血を呈する女性の鉄芽球性貧血症例では、XLSAを疑われることは少なく、臨床的に環状鉄芽球を伴う不応性貧血(RARS)と診断される例が多かったと考えられる。本邦で症例数として最も多い鉄芽球性貧血はRARSで、それらの症例ではSF3B1遺伝子の体細胞性変異が非常に高い確率で同定されることが近年報告されている。一方、本邦における遺伝性鉄芽球性貧血の原因として最も高頻度に同定されるのはALAS2遺伝子変異である。従って、鉄芽球性貧血と診断された女性患者で、骨髄細胞の異形成が明らかではなく、SF3B1遺伝子の体細胞性変異も同定されない場合には、ALAS2遺伝子の変異の検索を考慮する必要がありそうである。

## E . 結論

近年、エクソーム解析などにより、遺伝性鉄芽球性貧血の原因遺伝子として、様々な遺伝子が新たに同定されている。しかしながら、本邦においては、ALAS2遺伝子の変異による症例が最も多く報告されており、他の遺伝子の変異の報告は極端に少ない。

このことから、女性の鉄芽球性貧血患者において貧血以外に明らかな症状がなく、SF3B1遺伝子の体細胞変異が同定されない場合には、小球性であっても大球性であっても、ALAS2遺伝子の解析は重要な情報を提供する可能性が高いと思われる。

## 参考文献

1. Cazzola et al. **Blood** 2000;96:4363-4365.
2. Ducamp et al. *Hum Mutat.* 2011;32:590-597.
3. Sankaran et al. **J Clin Invest.** 2015;125:1665-1669.
4. Katsurada et al. **Int J Hematol.** 2016;103:713-717.
5. Fujiwara et al. **Ann Hematol.** 2017;96:1955-1957.

## F . 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Fujiwara T, Fukuhara N, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Onishi Y, Furuyama K and Harigae H. A novel heterozygous ALAS2 mutation in a female with macrocytic sideroblastic anemia resembling myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts: a case report and literature review. **Ann Hematol.** 2017;96:1955-1957.
  - 2) Kaneko K, Ohba K, Hirose T, Totsune K, Furuyama K and Takahashi K. Expression of (Pro)renin Receptor During Rapamycin-Induced Erythropoiesis in K562 Erythroleukemia Cells and Its Possible Dual Actions on Erythropoiesis. **Tohoku J Exp Med.** 2017;241:35-43.
  - 3) Furuyama K, and Kaneko K. Iron metabolism in erythroid cells and patients with congenital sideroblastic anemia. **Int. J. Hematol.**

2018;107:44-54.

2. 学会発表
  - 1) 久保田美子, 久慈強, 古山和道. ヘム生合成経路の律速酵素 ALAS1 の分解経路の低下によるゲノム不安定性の誘導. **2017 年度生命科学系学会合同年次大会**(2017年12月6-9日,神戸).
  - 2) 金子桐子, 千田大誠, 久保田美子, 野村和美, 古山和道. ALAS2 変異による遺伝性鉄芽球性貧血のモデル細胞樹立. **2017 年度生命科学系学会合同年次大会**(2017年12月6-9日,神戸).
  - 3) 野村和美, 北川悠, 大木祐亮, 久保田美子, 金子桐子, 古山和道. ヒト CLPX-CLPP 複合体によるヘム結合型 ALAS1 の認識及び分解メカニズムの解明. **2017 年度生命科学系学会合同年次大会**(2017年12月6-9日,神戸).

## 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 准教授）

**研究要旨：** Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) は先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不応性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う疾患群である。従来 CDA に関する知見は主に西欧から得られているのみで、本邦での実態は明らかにされていなかった。本研究班において我が国における CDA の実態を把握し、そのデータ管理、診断基準の確立、さらには有効な治療法の開発の基盤となる研究を行う。

**A．研究目的**

Congenital dyserythropoietic anemia (CDA) は、先天的に赤血球系細胞に形成異常があり、慢性の不応性貧血、無効造血および続発性ヘモクロマトーシスを伴う稀な疾患群である。我が国ではこれまで CDA の実態が十分把握されておらず、我が国における CDA の実態を明らかにし、診断基準の確立、さらには有効な治療法の開発の基盤となる研究を行うことを目的とする。

**B．研究方法**

分担研究者（多賀）が以前行った CDA の全国調査を参考に作成した調査表をまとめるとともに、中央遺伝子診断への協力、検体送付などを依頼する。

小児血液専門医のみならず、新生児科医、一般小児科医、血液内科医などにも学会発表や論文による啓蒙を行い、さらなる症例の蓄積に努める。

（倫理面への配慮）

調査の基本となる日本小児血液・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集積された CDA 疑いの症例のうち 10 例

を既知の遺伝子変異の解析と全エクソーム解析（WES）を共同研究者である名古屋大学で施行した。10 例の内訳は、CDA I 3 例、CDA II 6 例、CDA III 1 例で、CDA I は全例で既知の CDAN1 遺伝子変異が同定されたが、CDA II / CDA III の 7 例では CDA の既知及び新規の遺伝子変異は認められなかった。

一方、CDA II と診断された 6 例のうち 2 例で先天性溶血性貧血の原因遺伝子（SPTA1, G6PD）変異が同定され、遺伝学的に溶血性貧血と診断された。この 1 例は自験例である。CDA に似た形態異常を示す溶血性貧血症例があり、臨床像 + 形態診断のみでは両者の区別は困難であることが示唆された。

**D．考察**

本班研究のサポートをもとに、本邦での CDA の症例収集、精査を行ってきたが、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、今回の遺伝子解析で判明したように従来の診断基準では診断困難な症例もあり、今後 CDA が疑われる症例については網羅的遺伝子解析による遺伝学的診断を行うことが望ましいと考えられる。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、今後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

## 重症先天性好中球減少症 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 教授）

**研究要旨：**重症先天性好中球減少症（severe congenital neutropenia, SCN）は、慢性好中球減少（末梢血好中球絶対数が $200/\mu\text{l}$ 以下）、生後早期からの反復する細菌感染症、骨髄像での骨髄顆粒球系細胞の低～正形成と前骨髄球/骨髄球での成熟障害を特徴とする。International Union of Immunological Society, 2017 Primary Immunodeficiency Diseases (IUIS, 2017) 分類では、慢性好中球減少を示す、いわゆる先天性好中球減少症 12 疾患の中に、SCN として 1～5 型が分類されている。SCN としては ELANE 変異によるものが 75-80%、HAX1 変異によるものが 20%弱であり、その他が数%と考えられる。症候群としての慢性好中球減少を呈する疾患が多いことから、好中球減少以外の他の合併所見は診断、予後には重要となる。本邦での全体の患者数は 100 例程度と推測される。SCN の病因、病態、診断、重症度、治療、予後について概要をまとめる。

### A．疾患概念と疫学

重症先天性好中球減少症（severe congenital neutropenia, SCN）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、骨髄像での骨髄顆粒球系細胞の正形成から低形成と前骨髄球と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。基本として、骨髄顆粒球系細胞の形態異常は明らかでなく、赤芽球系、巨核球系には異常を認めない。IUIS（2017）分類では、SCN は先天性好中球減少症の一部として SCN を 5 型に分類している。SCN のタイプによってはそれぞれに特有な合併症状が存在するので診断の参考となる。

発症頻度の確定的な数字はないが、本邦では 100 万人に 1～2 人の発生頻度と推測され、現在までに 100 例近い患者数が集積されている。SCN で遺伝子解析が施行されている症例からは、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ている。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 SCN の頻度は明らかではないが、非常に稀と思われる。

### B．病因・病態

SCN を含めた先天性好中球減少症において、多くの責任遺伝子が同定、報告されているので、それぞれその病態は異なってくる。細胞レベルで病因を考えると、細胞内小器官ごと（細胞膜受容体、核、小胞体、ミトコンドリア、エンドゾーム、ライソゾーム、リボゾーム、アズール顆粒、細胞骨格等）に責任遺伝子が分布し、分類されている。

1) SCN1：好中球エラスターゼ（ELANE）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。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 GF11 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 GF11 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 GF11 の結合部位が同定されたことから、ELANE 遺伝子発現が GF11 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。GF11 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 : HA1 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、前駆細胞並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、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 3β 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 gp91phox 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 . 診断

### 1) 臨床症状

易感染性：皮膚化膿症、慢性歯肉炎、歯周病は高頻度で認められる。咽頭扁桃炎、上気道感染症、時に肺炎、肺膿瘍が認められる。

### 2) 検査所見

末梢血での慢性好中球減少症（ほとんど好中球絶対数 200/μl 以下）、末梢血単球数増加、骨髄像：骨髄顆粒球系細胞の低形成～正形成と前骨髄球/骨髄球での成熟障害に合わせ、それぞれの責任遺伝子変異の同定

## D . 重症度分類：重症

継続的な易感染性、慢性歯肉炎（歯周病）、皮膚感染症、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病への進展。根治療法としての造血幹細胞移植が必要である。特に、G-CSF 使用例では長期の高用量使用での骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病への移行は 40%以上に認められている。

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。

## E . 治療の概要

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の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。

## F . 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もあり、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。

## G . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Onodera R, Kurita E, Taniguchi K, Karakawa S, Okada S, Kihara H, Fujii T, Kobayashi M. Anti-human neutrophil antigen-1a, -1b, -and -2 antibodies in neonates and children with immune neutropenia analyzed by extracted granulocyte antigen immunofluorescence assay. **Transfusion** 2017;57:2586-2594. doi: 10.1111/trf.14291.
- 2) Hayakawa S, Ohno N, Okada S, Kobayashi M. Significant augmentation of regulatory T cell numbers occurs during the early neonatal period. **Clin Exp Immunol.** 2017;190:268-279. doi:10.1111/cei.13008.
- 3) Leiding JW, Okada S, Hagin D, Abinun M, Shcherbina A, Balashov DN, Kim VHD, Ovadia A, Guthery SL, Pulsipher M, Lilic D, Dvlin LA, Chrutie S, Depner M, Fuchs S, van Royden-Kerkhof A, Lindemans C, Petrovic A, Sullivan KE, Bunin N, Kilic SS, Arpacı F, Calle-Martín O, Martínez-Martínez L, Alddave JC, Kobayashi M, Ohkawa T, Imai K, Iguchi A, Roifman CM, Genney AR, Slatter

M, Ochs HD, Morio T, Torgerson TR, Inborn Errors Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 mutations. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2018;141:704-717. doi:10.1016/j.jaci.2017.03.049.

- 4) 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. **Genetics in Medicine** 2017;19:796-802.
- 5) Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, El Baghdadi J, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Ailal F, Takada H, Hara T, Pue; A, Boisson-Dupuis S, Bustamate J, Casanovva JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M. Alanine-scanning mutagenesis of human signal transducer and activator of transcription 1 to estimate loss- or gain-of-function variants. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2017;140:232-241.
- 6) Fujiki R, Hijikata A, Shirai T, Okada S, Kobayashi M, Ohara O. Molecular mechanism and structural basis of gain-offunction of STAT1 caused by pathogenic R274Q mutation. **Journal of Biological Chemistry** 2017;292:6240-6254.
- 7) 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 human subjects with germline IKZF1 mutations. **Journal of Allergy & Clinical Immunology** 2017;140: 223-231.

- 8) Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R, Nishibuchi I, Kawaguchi H, Kolakshyapati M M, Onishi S, Saito T, Sugiyama K, Koabayashi M, Kurisu K. Development of cystic malacia after high-dose cranial irradiation of pediatric CNS tumors in long-term follow-up. **Child's Nervous System** 2017;33:957-964.

## 2. 学会発表

- 1) Kobayashi M, Mizoguchi Y, Karakawa S, Miki M, Nishimura S, Okada S, Kawaguchi H. Long-Term Follow-up of Patients with Chronic Granulomatous Disease Receiving Bone Marrow Transplantation Using Immunosuppressive Conditioning Regimen. **The 59th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).
- 2) Nishimura S, Tomioka K, Shimomura M, Mizoguchi Y, Kobayashi M. Pharmacokinetics Using myPKFiTR for Personalized Prophylaxis in Children with Severe Hemophilia A. **The 59th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition** (2017年12月9-12日, 米国・アトランタ).

H. 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

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、昨年度作成された診療ガイドラインに基づいた本邦における診療実態を調査した。

### A．研究目的

Shwachman-Diamond症候群（SDS）は、膵外分泌異常と造血不全による血球減少を主徴とする先天性骨髄不全症である。骨格異常、肝障害、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、昨年度作成された診療ガイドラインに基づいて本邦における診療実態を明らかにすることを目的とする。

### B．研究方法

これまでに遺伝子解析に基づいてSDSと診断された患者の臨床情報をアンケート形式にて集計し、解析した。

（倫理面への配慮）

遺伝子解析はヘルシンキ宣言に基づいて、本人または家族から文書による同意を得た上で行った。実態調査は、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に基づいて施行した。

### C．研究結果

計45例の患者が同定され、年間発症数は2.7例であった。男女比は2.2：1であった。最も多い変異は183-184TA>CT/258+2T>C変異が73%を占め、次に258+2T>C/258+2T>C変異が6.6%であった。初診時

の臨床所見は様々であり、血球減少、体重増加不良、脂肪便、肝機能障害、低身長、骨格異常などである。水外分泌不全あるいは画像での膵臓の異常はほとんどの患者で認められた。好中球減少は初診時に約1/3の患者でしか認められなかったが、経過中では89%の患者で認められた。その他の血球異常は貧血、血小板減少、汎血球減少症がそれぞれ64%、69%、40%で認められた。3例（6%）の患者では白血病に進展した。うち2例は18歳以上で白血病を発症していた。

### D．考察

SDSは、欧米では先天性骨髄不全症の中でFanconi貧血、Diamond-Blackfan貧血に次に多いとされているが、我が国における頻度は低いとされていた。しかしながら、本研究によって我が国においてもSDSは少なからず存在することが明らかとなった。

また、成人期となり白血病に移行する例があり、成人領域を含めた実態の把握が必要と考えられた。

### E．結論

診療ガイドラインに基づいて、広く臨床医がSDSを認知することによって、さらに多くの患者が同定され、早期治療介入によって予後の改善につながる可能性が示唆される。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka N, Nakakuma H, Hasegawa D, Manabe A, Fujishima N, Fujii N, Tanimoto M, Morita Y, Matsuda A, Fujieda A, Katayama N, Ohashi H, Nagai H, Terada Y, Hino M, Sato K, Obara N, Chiba S, Usuki K, Ohta M, Imataki O, Uemura M, Takaku T, Komatsu N, Kitanaka A, Shimoda K, Watanabe K, Tohyama K, Takaori-Kondo A, Harigae H, Arai S, Miyazaki Y, Ozawa K, Kurokawa M; for National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes. A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study). **Am J Hematol.** 2017;92:1324-1232.
- 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 utility of next-generation sequencing for inherited bone marrow failure syndromes. **Genet Med.** 2017;19:796-802.

### 2. 学会発表

- 1) Watanabe K, Kanegane H, Hamabata T, Kozuki K, Umeda K, Hama A, Okuno Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Hasegawa D, Manabe A, Ohara A, Ito M, Kojima S, Ito E.

Establishment of a nationwide cohort for Shwachman-Diamond syndrome in Japan. **International Meeting on Childhood MDS and SAA**(2017年9月28-30日,イタリア・ローマ) .

- 2) Hama A, Manabe A, Hasegawa D, Nozawa K, Suzuki 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. **International Meeting on Childhood MDS and SAA**(2017年9月28-30日,イタリア・ローマ) .
- 3) 西村聡, 青木由貴, 石渡泰芳, 松本和明, 廣木遥, 小野真太郎, 岡野翼, 宮本智史, 足洗美穂, 星野顕宏, 田中真理, 宮脇零士, 小林千佳, 手束真理, 大川哲平, 満生紀子, 遠藤明史, 小野敏明, 磯田健志, 宮澤大輔, 長澤正之, 水谷修紀, 安原真人, 梶原道子, 柳町昌克, 高木正稔, 金兼弘和, 今井耕輔, 森尾友宏. 原発性免疫不全症に対するFluBUとFluMelによる前処置法に比較検討. **第40回日本造血細胞移植学会総会**(2018年2月1-3日, 札幌) .

## 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 分子診断研究室 室長）

**研究要旨：**15例の先天性血小板減少症を疑う症例について系統的鑑別診断解析を施行し、MYH9異常症8例、2B型 von Willebrand病1例、TUBB1異常症1例の診断に至り、5例は確定診断されなかった。

#### A．研究目的

先天性血小板減少症は病因不明な疾患が多く、特発性血小板減少性紫斑病と診断され不必要な治療を受ける症例も少なくない。本研究は、先天性血小板減少症を疑う症例を全国的に収集し、系統的鑑別診断解析による遺伝子診断を行い、臨床情報と検査・解析データを集積し、診断基準、重症度分類、診療ガイドラインの作成を目的とした。

#### B．研究方法

先天性血小板減少症を疑う症例の解析依頼に対して、我々が独自に確立中である系統的鑑別診断解析を施行する。

（倫理面への配慮）

本研究は、先天性血小板減少症の診断ガイドライン作成に関する研究として当院ヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会による審査承認を得ている。また、DNA組み換え実験および動物実験についても審査承認を得ている。

#### C．研究結果

本年度（平成29年4月～平成30年3月）は、15例の先天性血小板減少症を疑う症例について系統的鑑別診断解析を施行し、MYH9異常症8例、TUBB1異常症1例、2Bvon型 Willebrand病1例の診断に至り、5例は確定診断されなかった。

また、本研究班と連携する「稀少小児遺伝性血液疾患に対する新規責任遺伝子の探索と遺伝子診断シ

ステムの構築に関する研究」（小島班）で同定された2個のMYH9遺伝子バリエーションの評価を末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析により施行し、ともに良性であることを示した。

#### D．考察

先天性血小板減少症を疑う15症例について先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断解析を行い、10例（66.7%）の症例で確定診断が得られた。MYH9異常症は8例（53.3%）と最も高頻度に診断された。MYH9異常症8例中、2例では白血球封入体を認めず、原因不明の血小板減少症あるいは新生児同種免疫性血小板減少症と診断されていたが、末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析と同在分類により確定診断された。2例のMYH9異常症では新規変異を同定した。

MYH9異常症診断に用いる末梢血塗抹標本を用いたミオシン免疫蛍光染色解析では、異常局在を認めればMYH9異常症と診断することが可能で、正常局在所見からはMYH9異常症を否定することが可能である。従って、MYH9遺伝子解析により同定されたバリエーションの病原性の判定にも有用であり、本年度には次世代シーケンス解析で同定されたMYH9バリエーションの評価を行った。

#### E．結論

先天性血小板減少症を疑う15症例について先天性巨大血小板症の系統的鑑別診断解析を行い、10例（66.7%）の症例で確定診断を得た。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kanda K, Kunishima S, Sato A, Abe D, Nishijima S, Ishigami T. A Brazilian case of Bernard-Soulier syndrome with two distinct founder mutations. **Hum Genome Var.** 2017;4:17030.
- 2) Aoki T, Kunishima S, Yamashita Y, Minamitani K, Ota S. Macrothrombocytopenia with congenital bilateral cataracts: a phenotype of *MYH9* disorder with exon 24 indel mutations. **J Pediatr Hematol/Oncol.** 2018;40(1):76-8.
- 3) Ichimiya Y, Wada Y, Kunishima S, Tsukamoto K, Kosaki R, Sago H, Ishiguro A, Ito Y. 11q23 deletion syndrome (Jacobsen syndrome) with severe bleeding: a case report. **J Med Case Rep.** 2018;12:3.
- 4) Hao J, Kada A, Kunishima S. Further classification of neutrophil non-muscle myosin heavy chain IIA localization for efficient genetic diagnosis of MYH9 disorders. **Ann Hematol.** 2018;97(4):709-11.
- 5) Miyashita N, Onozawa M, Hayasaka K, Yamada T, Migita O, Hata K, Okada K, Goto H, Nakagawa M, Hashimoto D, Kahata K, Kondo T, Kunishima S, Teshima T. A novel heterozygous *ITGB3* p.T720del inducing spontaneous activation of integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 in autosomal dominant macrothrombocytopenia with aggregation dysfunction. **Ann Hematol.** 2018;97(4):629-40.

### 2. 学会発表

- 1) Kunishima S, Uchiyama Y, Ogawa Y, Matsumoto N, Kobayashi R, Ichikawa S. Diagnostic biomarker for GFI1B macrothrombocytopenia. **XXXth International Symposium on Technical Innovations in Laboratory Hematology** (2017年5月4-6日, ハワイ・ホノルル)
- 2) 國島伸治, 北村勝誠, 小林良二, 市川聡, 内山

- 由理, 小川孔幸, 松本直通. 2GFI1B異常症診断のバイオマーカー. **第39回日本血栓止血学会学術集会** (平成29年6月8日-10日, 名古屋).
- 3) 橋本恵梨華, 高木夕希, 鈴木幸子, 河村奈美, 槇山愛弓, 坂根寛人, 藤岡亮, 田村彰吾, 高木明, 上原貴博, 國島伸治, 小嶋哲人. 新規変異 *ITGA2B* p.Cys198Serを含む複合ヘテロ変異をもつ血小板無力症の一例. **第39回日本血栓止血学会学術集会** (平成29年6月8日-10日, 名古屋).
  - 4) 米野由希子, 國島伸治, 柳富子. *RUNX1*変異による家族性血小板異常症に発症したMDS (RAEB-2) の症例. **第39回日本血栓止血学会学術集会** (平成29年6月8日-10日, 名古屋).
  - 5) 家田大輔, 堀いくみ, 中村勇治, 大下裕法, 根岸豊, 篠原務, 服部文子, 加藤丈典, 犬飼幸子, 齋藤伸治, 北村勝誠, 國島伸治, 河合智樹. 脳室周囲異所性灰白質と結合組織症状を示した *FLNA* 遺伝子変異の女兒例. **第59回日本小児神経学会学術集会** (2017年6月15-17日, 大阪).
  - 6) Miyashita N, Onozawa M, Hayasaka K, Kunishima S, Teshima T. Novel heterozygous *ITGB3* T746del mutation inducing spontaneous activation of integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 causing autosomal dominant macrothrombocytopenia with abnormal  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 localization. **22nd Congress of the European Hematology Association** (2017年6月22-25日, スペイン・マドリッド).
  - 7) Morel-Kopp MC, Rabbolini D, Chun Y, Fixter K, Kunishima S, Gabrielli S, Chen Q, Stevenson W, Tan P, Radhakrishnan K, Bird R, Paul O, Chew LP, Ward C. MYH9 disorders are the most common cause of macrothrombocytopenia in Australia: importance of mean platelet diameter measurement and Döhle body detection for improved diagnosis. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** (2017年7月8-13日, ドイツ・ベルリン).
  - 8) Hashimoto E, Kunishima S, Takagi Y, Suzuki S, Makiyama A, Sakane H, Fujioka A,

- Uehara T, Tamura S, Takagi A, Kojima T. Compound heterozygosity for mutations in ITGA2B including a novel p.Cys198Ser in Glanzmann Thrombasthenia. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**( 2017年7月8-13日 , ドイツ・ベルリン ) .
- 9) Xu M, Zhu G, Li J, Carrim N, Kunishima S, Ware J, Ruggeri ZM, Freeman J, Ni H. Platelet GPIIb/IIIa is important for liver thrombopoietin (TPO) production. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis**( 2017年7月8-13日 , ドイツ・ベルリン ) .
- 10) 國島伸治, 小林良二, 市川聡, 内山由理, 小川孔幸, 宮崎浩二. GFI1B異常症の新規検査診断法. **第18回日本検査血液学会学術集会**(平成29年7月22-23日, 札幌) .
- 11) Uchiyama Y, Ogawa Y, Kunishima S, Shiina M, Nakashima M, Yanagisawa K, Yokohama A, Imagawa E, Miyatake S, Mizuguchi T, Takata A, Miyake N, Ogata K, Handa H, Matsumoto N. A novel GFI1B mutation at the first Zinc-Finger Domain causes congenital macrothrombocytopenia. **67th American Society of Human Genetics 2017 Annual Meeting** ( 2017年10月17-21日 , 米国・オーランド ) .
- 12) 岩井俊樹, 村松彩子, 川路悠加, 栗山幸大, 大城宗生, 平川佳子, 内山人二, 黒田純也, 國島伸治. 当院で経験したMYH9異常症. **第79回日本血液学会総会**(平成29年10月20-22日, 東京) .
- 13) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical sequencing of 375 patients with inherited and acquired bone marrow failure syndromes. **第79回日本血液学会総会** (平成29年10月20-22日, 東京) .
- 14) Miyashita N, Onozawa M, Kunishima S, Hayasaka K, Yamada T, Migita O, Hata K, Fujioka Y, Ohba Y, Teshima T. Mechanisms of congenital macrothrombocytopenia induced by a novel ITGB3 T720del mutation. **第79回日本血液学会総会** (平成29年10月20-22日, 東京) .
- 15) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical sequencing of 347 children with acquired and inherited bone marrow failure syndromes. **59th American Society for Hematology Annual Meeting and Exposition** ( 2017年12月 9-12日 , 米国・アトランタ ) .
- 16) 國島伸治. Next-generation sequencingと血栓止血学. **第39回日本血栓止血学会学術集会**(平成29年6月8-10日, 名古屋) .
- 17) 國島伸治. 先天性血小板異常症. **日本小児血液・がん学会学術集会教育セミナー**(平成29年6月18日, 東京) .
- 18) Kunishima S. Update on congenital thrombocytopenias. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** ( 2017年7月8-13日 , ドイツ・ベルリン ) .
- 19) Kunishima S. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: survey and workshop. **XXVI Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis** ( 2017年7月8-13日 , ドイツ・ベルリン ) .
- G . 知的財産権の出願・登録状況**  
該当なし



## 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)、*TERC* 遺伝子変異 (DKC: c.73G>C, cDKC: c.439\_443del) に関して *TERT* を欠損しテロメラーゼ活性を認めない Saos-2 細胞及び *TERC* を欠損しテロメラーゼ活性を認めない VA13-*TERT* 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、c.439443del 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、c.73G>C 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

ヘリカーゼの一つである *Regulator of Telomere Elongation Helicase 1 (RTEL1)* の変異が常染色体劣性遺伝の DKC やその重症型と考えられている Hoyeraal Hreidarsson syndrome (HHS) で発見され、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られる。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) 及び *TERC* 遺伝子変異 (DKC: c.73G>C, cDKC: c.439\_443del) 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。

また、野生型の *TERT* をオリゴ合成により作成し、pDon-neo-vector でクローニングした。AmphoPack 293細胞を用いてレトロウイルスベクターを作成し、野生型の *TERC*、*TERT* を発現しておらず、テロメラーゼ活性を持たない VA13細胞 (ALT にてテロメアを補正) に transduction させ野生型の *TERT* を発現する VA13-*TERT* 細胞を作成した。VA13-*TERT* 細胞に *TERC* 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同様に RTA 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。

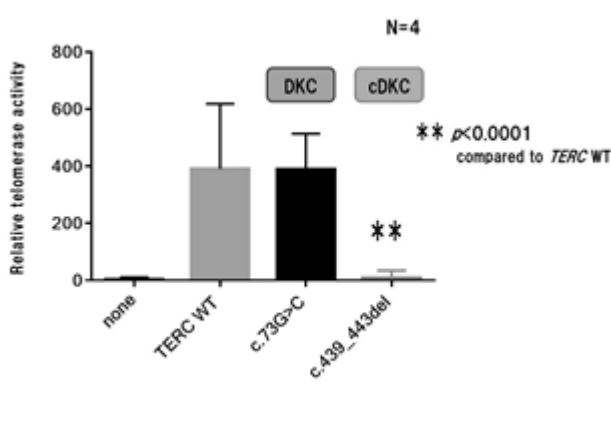
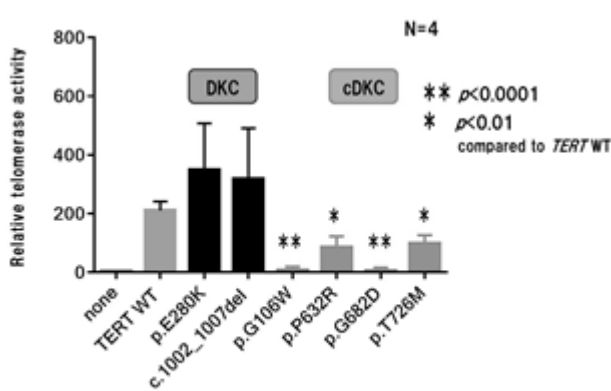
## C．研究結果

Saos-2細胞及びVA13-*TERT*細胞はテロメラーゼ活性が認められずALTにてテロメア長を補正している。

DKCで発見された *TERT* E280K, del334\_335は、野生型と比較してテロメラーゼ活性の低下は認めら

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 *TERT* G106W, G682Dは野生型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 *TERT* P632R, T726Mは野生型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.  $84.6 \pm 19.4$ ,  $97.6 \pm 14.7$   $p<0.0001$ ,  $p<0.0001$ ) *TERT* G106W, G682Dと比較してテロメラーゼ活性の低下の程度が小さかった (RTA  $7.4 \pm 6.3$  vs.  $84.6 \pm 19.4$ ,  $97.6 \pm 14.7$   $p<0.01$ ,  $p<0.01$ )。

DKCで発見された *TERC* c.73 G>Cは野生型と比較してテロメラーゼ活性の低下は認められなかった (RTA  $390.2 \pm 113.9$  vs.  $388.2 \pm 62.80$ ,  $p=0.9881$ )。一方、不全型DKCで認められた *TERC* c.439\_443delは野生型に比較し有意にテロメラーゼ活性が低下していた (RTA  $390.2 \pm 113.9$  vs.  $6.780 \pm 13.88$   $p<0.0001$ )。



## D. 考察

本邦のDKC症例で発見された *TERT* 変異及び *TERC* 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 *TERT* G106WとG682D, *TERC* c.439\_443del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られた。また、不全型DKCで認められた *TERT* 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た。一方、DKC症例で発見された *TERT* E280Kとdel334\_335, *TERC* c.73G>C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、VA13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全てではない。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、*TERC* 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) 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.  
**Genetics in Medicine** 2017;19(7):796-802.

2. 学会発表

- 1) Terada K, Yamaguchi H, Miyake K, Miyake N, Osaki Y, Okada T, Kojima S, Ito E, Inokuchi K. Importance of functional analysis of TERT gene mutations in the diagnosis of dyskeratosis congenital. **第79回日本血液学会総会**（平成29年10月20-22日，東京）。

**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

## 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
伊藤悦朗, 大賀正一, 小原明, 金兼弘和, 唐川修平, 菅野仁, 國島伸治, 小島勢二, 小林正夫, 笹原洋二, 多賀崇, 高田穰, 照井君典, 長谷川大輔, 張替秀郎, 藤原亨, 古山和道, 真部淳, 溝口洋子, 村松秀城, 矢部普正, 山口博樹, 渡邊健一郎	Diamond-Blackfan貧血 / Fanconi貧血 / 遺伝性鉄芽球性貧血 / Congenital dyserythropoietic anemia / 先天性角化不全症 / Shwachman-Diamond症候群 / 先天性好中球減少症 / 先天性血小板減少症	日本小児血液・がん学会	先天性骨髄不全症診療ガイドライン2017	診断と治療社	東京	2017	4-77
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	貧血学 最新の動向・治療動向	日本臨床社	東京	2017	448-452
石合正道, 高田穰	2.18 放射線応答遺伝子の生物種間の保存・相関	宮川清	放射線医科学の事典		東京	2017	
Ito E, Terui K, Toki T.	Inherited bone marrow failure syndrome, TAM.	Eiichi Ishii	In Hematological Disorders in Children.	Springer Natures Singapore Pte Ltd	Shingapore	2017	145-170
Hasegawa D, Manabe A.	Myelodysplastic syndrome and JMML.	Eiichi Ishii	In Hematological Disorders in Children.	Springer Natures Singapore Pte Ltd	Shingapore	2017	87-108

## 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
Sonoda M, Ishimura M, Ichimiya Y, Terashi E, Eguchi K, Sakai Y, Takada H, Hama A, Kanno H, Toki T, Ito E, Ohga S.	Atypical erythroblastosis in a patient with Diamond-Blackfan anemia who developed del(20q) myelodysplasia.	Int J Hematol.			2018

Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Saito K, Kamata M, Tamai Y, Kawamata S, Harigae H.	A defined culture method enabling the establishment of ring sideroblasts from induced pluripotent cells of X-linked sideroblastic anemia.	Haematologica	103	e188-e191	2018
Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H.	Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators.	Tohoku J Exp Med.	244	41-52	2018
Noguchi J, Kanno H, Chiba Y, Ito E, Ishiguro A.	Discrimination of Diamond-Blackfan anemia from parvovirus B19 infection by RBC glutathione.	Pediatr Int.	59(7)	838-840	2017
Morishima Y, Azuma F, Kashiwase K, Matsumoto K, Orihara T, Yabe H, Kato S, Kato K, Kai S, Mori T, Nakajima K, Morishima S, Satake M, Takanashi M, Yabe T; Japanese Cord Blood Transplantation Histocompatibility Research Group.	Risk of HLA Homozygous Cord Blood Transplantation: Implications for Induced Pluripotent Stem Cell Banking and Transplantation.	Stem Cells Transl Med.	7(2)	173-179	2018
Horikoshi Y, Umeda K, Imai K, Yabe H, Sasahara Y, Watanabe K, Ozawa Y, Hashii Y, Kurosawa H, Nonoyama S, Morio T.	Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukocyte Adhesion Deficiency.	J Pediatr Hematol Oncol.	40(2)	137-140	2018
Oshima K, Saiki N, Tanaka M, Imamura H, Niwa A, Tanimura A, Nagahashi A, Hirayama A, Okita K, Hotta A, Kitayama S, Osawa M, Kaneko S, Watanabe A, Asaka I, Fujibuchi W, Imai K, Yabe H, Kamachi Y, Hara J, Kojima S, Tomita M, Soga T, Noma T, Nonoyama S, Nakahata T, Saito M.	Human AK2 links intracellular bioenergetic redistribution to the fate of hematopoietic progenitors.	Biochem Biophys Res Commun.	497(2)	719-725	2018

Van Straaten S, Bierings M, Bianchi P, Akiyoshi K, Kanno H, Serra IB, Chan J Huang X, van Beers E, Ekwattanakit S, G üng ör T, Kors WA, Smiers F, Raymakers R, Yanez L, Sevilla J, van Solinge W, Segovia JC, van Wijk R.	Worldwide study of hematopoietic allogenic stem cell transplantation in pyruvate kinase deficiency.	Haematologica	103(2)	e82-e86	2018
Okamoto Y, Iwasaki WM, Kugou K, Takahashi KK, Oda A, Sato K, Kobayashi W, Kawai H, Sakasai R, Takaori-Kondo A, Yamamoto T, Kanemaki MT, Taoka M, Isobe T, Kurumizaka H, Innan H, Ohta K, Ishiai M, Minoru Takata M.	Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes.	Nucleic Acid Res.	46(6)	2932-2944	2018
Hiejima E, Shibata H, Yasumi T, Shimodera S, Hori M, Izawa K, Kawai T, Matsuoka M, Kojima Y, Ohara A, Nishikomori R, Ohara O, Heike T.	Characterization of a large UNC13D gene duplication in a patient with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 3.	Clin Immunol.	191	63-66	2018
Aoki T, Kunishima S, Yamashita Y, Minamitani K, Ota S.	Macrothrombocytopenia with congenital bilateral cataracts: a phenotype of <i>MYH9</i> disorder with exon 24 indel mutations.	J Pediatr Hematol/Oncol.	40(1)	76-78	2018
Ichimiya Y, Wada Y, Kunishima S, Tsukamoto K, Kosaki R, Sago H, Ishiguro A, Ito Y.	11q23 deletion syndrome (Jacobsen syndrome) with severe bleeding: a case report.	J Med Case Rep.	12	3	2018
Hao J, Kada A, Kunishima S.	Further classification of neutrophil non-muscle myosin heavy chain IIA localization for efficient genetic diagnosis of MYH9 disorders.	Ann Hematol.	97(4)	709-711	2018

Miyashita N, Onozawa M, Hayasaka K, Yamada T, Migita O, Hata K, Okada K, Goto H, Nakagawa M, Hashimoto D, Kahata K, Kondo T, Kunishima S, Teshima T.	A novel heterozygous ITGB3 p.T720del inducing spontaneous activation of integrin $\alpha$ IIb $\beta$ 3 in autosomal dominant macrothrombocytopenia with aggregation dysfunction.	Ann Hematol.	97(4)	629-640	2018
Leiding JW, Okada S, Hagin D, Abinun M, Shcherbina A, Balashov DN, Kim VHD, Ovadia A, Guthery SL, Pulsipher M, Lalic D, Dvlin LA, Chritie S, Depner M, Fuchs S, van Royden-Kerkhof A, Lindemans C, Petrovic A, Sullivan KE, Bunin N, Kilic SS, Arpacı F, Calle-Martin O, Martinez-Martinez L, Alldave JC, Kobayashi M, Ohkawa T, Imai K, Iguchi A, Roifman CM, Genney AR, Slatter M, Ochs HD, Morio T, Torgerson TR, Inborn Errors Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation and the Primary Immune Deficiency Treatment Consortium.	Hematopoietic stem cell transplantation in patients with gain-of-function signal transducer and activator of transcription 1 mutations.	Journal of Allergy & Clinical Immunology	141.e5	704-717	2018
Ogasawara T, Kawauchi K, Mori N, Sakura H, Katoh F, Kanno H, Ito E.	Successful long-term management with low-dose prednisolone in an adult patient with Diamond-Blackfan anemia.	Rinsho Ketsueki	58(8)	917-921	2017



Miot C, Imai K, Imai C, Mancini AJ, Kucuk XY, Kawai T, Nishikomori R, Ito E, Pellier I, Girod SD, Rosain J, Sasaki S, Chandrakasan S, Schmid, JP, Okano T, Colin E, Olaya-Vargas A, Yamazaki-Nakashimada M, Qasim W, Padilla SE, Jones A, Krol A, Cole N, Jolles S, Bleesing J, Vraetz T, Gennery AR, Abinun M, Gungör T, Carvalho BC, Condino-Neto A, Veys P, Holland SM, Uzel G, Moshous D, Neven B, Ehl S, Döffinger R, Patel SY, Puel A, Bustamante J, Gelfand EW, Casanova JL, Orange JS, and Picard C.	Hematopoietic stem cell transplantation in 29 patients hemizygous for hypomorphic IKBKG / NEMO mutations.	Blood	130(12)	1456-1467	2017
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
Ikeda F, Yoshida K, Toki T, Uechi T, Ishida S, Nakajima Y, Sasahara Y, Okuno Y, Kanezaki 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

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.	19(7)	796-802	2017
Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H.	Effects of in vivo deletion of GATA2 in bone marrow stromal cells.	Exp Hematol.	56	31-45	2017
Fujiwara T, Fukuhara N, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Onishi Y, Furuyama K, Harigae H.	A novel heterozygous ALAS2 mutation in a female with macrocytic sideroblastic anemia resembling myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts: A case report and literature review.	Ann Hematol.	96	1955-1957	2017
Saito K, Fujiwara T, Ota U, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizuka M, Tanaka T, Harigae H.	Dynamics of absorption, metabolism, and excretion of 5-aminolevulinic acid in human intestinal Caco-2 cells.	Biochem Biophys Rep.	11	105-111	2017
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.	485	380-387	2017
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.	49	56-67	2017

<p>Hoening M, Lagresle-Peyrou C, Pannicke U, Notarangelo LD, Porta F, Gennery AR, Slatter M, Cowan MJ, Stepensky P, Al-Mousa H, Al-Zahrani D, Pai SY, Al Herz W, Gaspar HB, Veys P, Oshima K, Imai K, Yabe H, Noroski LM, Wulffraat NM, Sykora KW, Soler-Palacin P, Muramatsu H, Al Hilali M, Moshous D, Debatin KM, Schuetz C, Jacobsen EM, Schulz AS, Schwarz K, Fischer A, Friedrich W, Cavazzana M.</p>	<p>Reticular dysgenesis: international survey on clinical presentation, transplantation and outcome.</p>	<p>Blood</p>	<p>129</p>	<p>2928-2938</p>	<p>2017</p>
<p>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.</p>	<p>Long-term outcomes of 95 children with moderate aplastic anemia treated with horse antithymocyte globulin and cyclosporine.</p>	<p>Pediatr Blood Cancer.</p>	<p>64(5)</p>	<p>e26305</p>	<p>2017</p>
<p>Sekinaka Y, Mitsuiki N, Imai K, Yabe M, Yabe H, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Takagi M, Arai A, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Muramatsu H, Kojima S, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S.</p>	<p>Common Variable Immunodeficiency Caused by FANC Mutations.</p>	<p>J Clin Immunol.</p>	<p>37(5)</p>	<p>434-444</p>	<p>2017</p>

Kubaski F, Yabe H, Suzuki Y, Seto T, Hamazaki T, Mason RW, Xie L, Onsten TGH, Leistner-Segal S, Giugliani R, D�ng VC, Ngoc CTB, Yamaguchi S, Monta�o AM, Orii K, Fukao T, Shintaku H, Orii T, Tomatsu S.	Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with Mucopolysaccharidosis II.	Biol Blood Marrow Transplant.	23(10)	1795-1803	2017
Onishi Y, Mori T, Kako S, Koh H, Uchida N, Kondo T, Kobayashi T, Yabe H, Miyamoto T, Kato K, Suzuki R, Nakao S, Yamazaki H; Adult Aplastic Anemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation.	Outcome of Second Transplantation Using Umbilical Cord Blood for Graft Failure after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Aplastic Anemia.	Biol Blood Marrow Transplant.	23(12)	2137-2142	2017
Stapleton M, Kubaski F, Mason RW, Yabe H, Suzuki Y, Orii K, Orii T, Tomatsu S.	Presentation and Treatments for Mucopolysaccharidosis Type II (MPS II; Hunter Syndrome).	Expert Opin Orphan Drugs.	5(4)	295-307	2017
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
Hirabayashi S, Seki M, Hasegawa D, Kato M, Hyakuna N, Shuo T, Kimura S, Yoshida K, Kataoka K, Fujii Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Kiyokawa N, Miyano S, Ogawa S, Takita J, Manabe A.	Constitutional abnormalities of IDFH1 combined with secondary mutations predispose a patient with Maffucci syndrome to acute lymphoblastic leukemia.	Pediatr Blood Cancer.	64(12)		2017

Narita A, Muramatsu H, Okuno Y, Sekiya Y, Suzuki K, Hamada M, Kataoka S, Ichikawa D, Taniguchi R, Murakami N, Kojima D, Nishikawa E, Kawashima N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Kojima S.	Development of clinical paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in children with aplastic anaemia.	Br J Haematol.	78(6)	954-958	2017
Matsumaru S, Oguni H, Ogura H, Shimojima K, Nagata S, Kanno H, Yamamoto T.	A novel PGK1 mutation associated with neurological dysfunction and the absence of episodes of hemolytic anemia or myoglobinuria.	Intractable Rare Diseases Research	6(2)	132-136	2017
Sakaue S, Kasai T, Mizuta I, Suematsu M, Osone S, Azuma Y, Imamura T, Tokuda T, Kanno H, El-Agnaf OMA, Morimoto M, Nakagawa M, Hosoi H, Mizuno T.	Early-onset parkinsonism in a pedigree with phosphoglycerate kinase deficiency and a heterozygous carrier: do PGK-1 mutations contribute to vulnerability to parkinsonism?.	NPJ Parkinsons Dis.	3(1)	13	2017
Niizuma H, Kanno H, Sato A, Ogura H, Imaizumi M.	Splenectomy resolves hemolytic anemia caused by adenylate kinase deficiency.	Pediatr Int.	59(2)	228-230	2017
Kadoda K, Moriwaki T, Tsuda M, Sasanuma H, Ishiai M, Takata M, Ide H, Masunaga SI, Takeda S, Tano K.	Selective cytotoxicity of the anti-diabetic drug, metformin, in glucose-deprived chicken DT40 cells.	PLoS One	12(9)	e0185141	2017
Mochizuki AL, Katanaya A, Hayashi E, Hosokawa M, Moribe E, Motegi A, Ishiai M, Takata M, Kondoh G, Watanabe H, Nakatsuji N, Chuma S.	PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice.	Mol Cell Biol.	37(23)	e00117-17	2017
Knies K, Inano S, Ramírez MJ, Ishiai M, Surallés J, Takata M, and Schindler D.	Biallelic mutations in the ubiquitin ligase <i>RFWD3</i> cause Fanconi anemia.	J Clin Invest.	127(8)	3013-3027	2017

Inano S, Sato K, Katsuki Y, Kobayashi W, Tanaka H, Nakajima K, Nakada S, Hiroyuki Miyoshi, Knies K, Takaori-Kondo A, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M.	RFWD3-mediated ubiquitination promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination.	Mol Cell.	66(5)	622-634	2017
Ishiai M, Sato K, Tomida J, Kitao H, Kurumizaka H, Takata M.	Mutation Research special section "Protein modifications in DNA repair and cancer" Activation of the FA pathway mediated by phosphorylation and ubiquitination.	Mutat Res.	803-805	89-95	2017
Watanabe M, Nishikomori R, Fujimaki Y, Heike T, Ohara A, Saji T.	Live-attenuated vaccines in a cryopyrin-associated periodic syndrome patient receiving canakinumab treatment during infancy.	Clin Case Rep.	5	1750-1755	2017
Yusa T, Tateda K, Ohara A, Miyazaki S.	New possible biomarkers for diagnosis of infections and diagnostic distinction between bacterial and viral infections in children.	J Infect Chemother.	23	96-100	2017
Onodera R, Kurita E, Taniguchi K, Karakawa S, Okada S, Kihara H, Fujii T, Kobayashi M.	Anti-human neutrophil antigen-1a, -and -2 antibodies in neonates and children with immune neutropenia analyzed by extracted granulocyte antigen immunofluorescence assay.	Transfusion	57	2586-2594	2017
Hayakawa S, Ohno N, Okada S, Kobayashi M.	Significant augmentation of regulatory T cell numbers occurs during the early neonatal period.	Clin Exp Immunol.	190	268-279	2017
Fujiki R, Hijikata A, Shirai T, Okada S, Kobayashi M, Ohara O.	Molecular mechanism and structural basis of gain-of-function of STAT1 caused by pathogenic R274Q mutation.	Journal of Biological Chemistry	292	6240-6254	2017
Yamasaki F, Takayasu T, Nosaka R, Nishibuchi I, Kawaguchi H, Kolakshyapati M M, Onishi S, Saito T, Sugiyama K, Koabayashi M, Kurisu K.	Development of cystic malacia after high-dose cranial irradiation of pediatric CNS tumors in long-term follow-up.	Child's Nervous System	33	957-964	2017

<p>Kobayashi T, Nannya Y, Ichikawa M, Oritani K, Kanakura Y, Tomita A, Kiyoi H, Kobune M, Kato J, Kawabata H, Shindo M, Torimoto Y, Yonemura Y, Hanaoka N, Nakakuma H, Hasegawa D, Manabe A, Fujishima N, Fujii N, Tanimoto M, Morita Y, Matsuda A, Fujieda A, Katayama N, Ohashi H, Nagai H, Terada Y, Hino M, Sato K, Obara N, Chiba S, Usuki K, Ohta M, Imataki O, Uemura M, Takaku T, Komatsu N, Kitanaka A, Shimoda K, Watanabe K, Tohyama K, Takaori-Kondo A, Harigae H, Arai S, Miyazaki Y, Ozawa K, Kurokawa M; for National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes.</p>	<p>A nationwide survey of hypoplastic myelodysplastic syndrome (a multicenter retrospective study).</p>	<p>Am J Hematol.</p>	<p>92</p>	<p>1224-1232</p>	<p>2017</p>
<p>Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, El Baghdadi J, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Ailal F, Takada H, Hara T, Pue; A, Boisson-Dupuis S, Bustamate J, Casanovva JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M.</p>	<p>Alanine-scanning mutagenesis of human signal transducer and activator of transcription 1 to estimate loss- or gain-of-function variants.</p>	<p>Journal of Allergy &amp; Clinical Immunology</p>	<p>140</p>	<p>232-241</p>	<p>2017</p>

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 human subjects with germline IKZF1 mutations.	Journal of Allergy & Clinical Immunology	140	223-231	2017
Kanda K, Kunishima S, Sato A, Abe D, Nishijima S, Ishigami T.	A Brazilian case of Bernard-Soulier syndrome with two distinct founder mutations.	Hum Genome Var.	4	17030	2017