

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断基準・重症度分類・診断ガイドラインの確立に関する研究

DBAの遺伝子診断・診療ガイドラインの作成

研究分担者 伊藤悦朗（弘前大学大学院医学研究科地域医療学 特任教授）

研究協力者 土岐 力（弘前大学大学院医学研究科小児科学 講師）

神尾卓哉（弘前大学医学部附属病院小児科 助教）

佐藤知彦（弘前大学医学部附属病院小児科 助教）

小林明恵（弘前大学医学部附属病院小児科 医員）

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 23 種類のリボソームタンパク（RP）遺伝子と *GATA1*、*TSR2*、*EPO* 遺伝子が同定されている。しかし、我が国の DBA 患者の約 40%は原因遺伝子が不明である。本年度も新規症例の把握と検体収集を行い、臨床的に DBA と診断された 16 例中 5 例（31%）に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに 231 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、132 例（57.1%）に原因となる RP 遺伝子および *GATA1* 遺伝子変異を見出した。本年度は、2000～2018 年の間に、我々が遺伝子診断を行った DBA 患者（165 名）の追跡調査を行った。その結果、7 例で悪性腫瘍（骨髄異形成症候群（3）、乳癌（2）、大腸癌（1）、原発不明癌（1））の発症を認め、平均発症年齢は 28 歳であった。本年度の後方視的調査により、悪性腫瘍の合併に関する貴重なデータが集積された。これらのデータをもとに、エビデンスに基づいた「DBA の診療ガイドライン」の小改訂を行った。難病プラットフォーム（AMED 松田班）を用いた「先天性骨髄不全症候群のレジストリ」の構築を進め、患者の Web 登録が可能となった。

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 23 種類のリボソームタンパク

（RP）遺伝子と *GATA1*、*TSR2*、*EPO* 遺伝子が同定されているが、我が国の DBA 患者の約半数は原因遺伝子が不明である。また、遺伝子診断により臨床診断が誤りであった症例が複数存在することが明らかとなった。本研究の目的は、これまでの研究を通じて確立した解析基盤を共有し、オミックス解析拠点（宮野班）、日本小児血液・がん学会の中央診断事業と疾患登録事業や原発性免疫不全班とも連携し、正確な診断に基づいた新規症例の把握と検体収集を行うことである。令和元年度は、難病プラットフォーム（AMED 松田班）を用いた「遺伝子診断の結果も含む精度の高い先天性骨髄不全症候群のレジストリ」の構築を進め、診療ガ

イドラインの小改訂を行う。令和 2～3 年度は、データ収集と観察研究を継続し、正確な先天性骨髄不全症候群の実態把握を行い、より精度の高い疾患データベースの確立とエビデンスに基づいた診断基準、重症度分類と診療ガイドラインの改訂を行う。

B. 研究方法

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

得られたデータベースをもとに、エビデンスに基づいた診断基準の改訂、重症度分類の策定およ

び診療ガイドラインの改訂を行う。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

新規症例16名の遺伝子診断を行い、5例で既知の原因遺伝子 (*RPS19* 3例、*RPS26* 1例、*GATA1* 1例) を同定した。これまでに231例のDBAの臨床情報と検体の収集および遺伝子解析を行い、原因遺伝子変異を見出した症例数は、132例 (57.1%) となった。これらのデータをもとに、日本小児血液・がん学会の再生不良性貧血・MDS委員会と連携を取りながら、エビデンスに基づいた治療ガイドラインの小改訂を行った。

本年度は、2000年～2018年までに遺伝子診断を行った186名のDBA患者の主治医にアンケート調査を行い、165名 (88.7%) について回答が得られた。その結果、7例で悪性腫瘍 (骨髄異形成症候群 (3)、乳癌 (2)、大腸癌 (1)、原発不明癌 (1)) の発症を認め、平均発症年齢は28歳であった。

難病プラットフォーム (AMED 松田班) を用いた「遺伝子診断の結果も含む精度の高い先天性造血不全のレジストリ」の構築を進めるため、京都大学医学部の「医の倫理委員会」に中央倫理審査を依頼し、承認が得られた。本レジストリは将来的に全ての先天性骨髄不全症候群の登録を目指す、レジストリ構築を円滑に進めるため、まず疾患数の最も多いDBA症例から登録を開始する。新規の症例に加え、すでに診断された患者の登録を進めるため、これまでに弘前大学でDBAの遺伝子診断を行った患者の診療を行っている50施設以上が参加する。

D. 考察

我が国のDBAは、本研究事業により原因遺伝子も含め次第にその実態が明らかになってきた。しかし、まだ約40%が原因遺伝子不明であり、長期予後については、全体像が明らかではない。長期予後を含めた精度の高いデータベースの構築が必要であるが、

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

DBAに悪性腫瘍が合併することが知られているが、我が国の実態は不明であった。今回の疫学調査により、初めてDBAに伴う悪性腫瘍の全体像が明らかになった。

E. 結論

DBAの遺伝子診断を進め、精度の高いDBAのデータベースが構築されてきた。難病プラットフォームの利用により、広く利用可能なデータベース構築が可能と思われる。

本年度の疫学調査により、DBAに合併する悪性腫瘍に関する貴重なデータが集積された。

本研究班の成果をもとに診療ガイドラインの小改訂を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mu A, Hira A, Niwa A, Osawa M, Yoshida K, Mori M, Okamoto Y, Inoue K, Kondo K, Kanemaki MT, Matsuda T, Ito E, Kojima S, Nakahata T, Ogawa S, Tanaka K, Matsuo K, Saito MK, Takata M. Analysis of disease model iPSCs derived from patients with a novel Fanconi anemia-like IBMFS ADH5/ALDH2 deficiency. **Blood** 2021;137(15):2021-2032. doi: 10.1182/blood.202009111.
- 2) Kudo K, Sato T, Takahashi Y, Yuzawa K, Kobayashi A, Kamio T, Sasaki S, Shimada J, Otani K, Tusjimoto S, Kato M, Toki T, Terui K, Ito E. Association of Multiple Gene Polymorphisms Including Homozygous NUDT15 R139C With Thiopurine Intolerance During the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol**. 2021. doi: 10.1097/MPH.0000000000002085. [Online ahead of print]
- 3) Tanaka Y, Yeoh AEJ, Moriyama T, Li CK, Kudo K, Arakawa Y, Buaboonnam J, Zhang H, Liu HC, Ariffin H, Chen Z, Kham SKY, Nishii R, Hasegawa D, Fujimura J, Keino D, Kondoh K,

- Sato A, Ueda T, Yamamoto M, Taneyama Y, Hino M, Takagi M, Ohara A, Ito E, Koh K, Hori H, Manabe A, Yang JJ, Kato M. An international retrospective study for tolerability of 6-mercaptopurine on NUDT15 bi-allelic variants in children with acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica** 2021. doi: 10.3324/haematol.2020.266320. [Online ahead of print]
- 4) Takafuji S, Mori T, Nishimura N, Yamamoto N, Uemura S, Nozu K, Terui K, Toki T, Ito E, Muramatsu H, Takahashi Y, Matsuo M, Yamamura T, Iijima K. Usefulness of functional splicing analysis to confirm precise disease pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia caused by intronic variants in *RPS19*. **Pediatr Hematol Oncol**. 2021;1-16. doi: 10.1080/08880018.2021.1887984.
 - 5) Ikeda T, Ito Y, Mikami R, Matsuo K, Kawamura N, Yamoto A, Ito E. Fluctuations in internal cerebral vein and central side veins of preterm infants. **Pediatr Int**. 2021. doi: 10.1111/ped.14638. [Online ahead of print]
 - 6) Yamato G, Deguchi T, Terui K, Toki T, Watanabe T, Imaizumi T, Hama A, Iwamoto S, Hasegawa D, Ueda T, Yokosuka T, Tanaka S, Yanagisawa R, Koh K, Saito AM, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Taga T, Ito E, Watanabe K, Muramatsu H. Predictive factors for the development of leukemia in patients with transient abnormal myelopoiesis and Down syndrome. **Leukemia** 2021;35(5):1480-1484. doi: 10.1038/s41375-021-01171-y.
 - 7) Taga T, Tanaka S, Hasegawa D, Terui K, Toki T, Iwamoto S, Hiramatsu H, Miyamura T, Hashii Y, Moritake H, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Ito E, Hama A, Ito M, Koh K, Hasegawa D, Saito AM, Adachi S, Tomizawa D. Post-induction MRD by FCM and GATA1-PCR are significant prognostic factors for myeloid leukemia of Down syndrome. **Leukemia** 2021. doi: 10.1038/s41375-021-01157-w. [Online ahead of print]
 - 8) Ozono S, Yano S, Oishi S, Mitsuo M, Nakagawa S, Toki T, Terui K, Ito E. A Case of Congenital Leukemia With MYB-GATA1 Fusion Gene in a Female Patient. **J Pediatr Hematol Oncol**. 2021. doi: 10.1097/MPH.0000000000002119. [Online ahead of print]
 - 9) Dingler FA, Wang M, Mu A, Millington CL, Oberbeck N, Watcham S, Pontel LB, Kamimae-Lanning AN, Langevin F, Nadler C, Cordell RL, Monks PS, Yu R, Wilson NK, Hira A, Yoshida K, Mori M, Okamoto Y, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraishi Y, Kobayashi M, Moriguchi T, Osumi T, Kato M, Miyano S, Ito E, Kojima S, Yabe H, Yabe M, Matsuo K, Ogawa S, Göttgens B, Hodskinson MRG, Takata M, Patel KJ. Two Aldehyde Clearance Systems Are Essential to Prevent Lethal Formaldehyde Accumulation in Mice and Humans. **Mol Cell**. 2020;80(6):996-1012.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2020.10.012.
 - 10) Kimura K, Shimazu K, Toki T, Misawa M, Fukuda K, Yoshida T, Taguchi D, Fukuda S, Iijima K, Takahashi N, Ito E, Nanjyo H, Shibata H. Outcome of colorectal cancer in Diamond-Blackfan syndrome with a ribosomal protein S19 mutation. **Clin J Gastroenterol**. 2020;13(6):1173-1177. doi: 10.1007/s12328-020-01176-7.
 - 11) Terada K, Miyake K, Yamaguchi H, Miyake N, Yamanaka K, Kojima S, Ito E, Inokuchi K, Okada T. TERT and TERC mutations detected in cryptic dyskeratosis congenita suppress telomerase activity. **Int J Lab Hematol**. 2020;42(3):316-321. doi: 10.1111/ijlh.13176.
 - 12) Yuzawa K, Terui K, Toki T, Kanazaki R, Kobayashi A, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Endo M, Ozono S, Nomura K, Ito E. Clinical, cytogenetic, and molecular analyses of 17 neonates with transient abnormal myelopoiesis and nonconstitutional trisomy 21. **Pediatr Blood Cancer**. 2020;67(4):e28188. doi: 10.1002/pbc.28188.

- 13) Koyamaishi S, Kamio T, Kobayashi A, Sato T, Kudo K, Sasaki S, Kanezaki R, Hasegawa D, Muramatsu H, Takahashi Y, Sasahara Y, Hiramatsu H, Kakuda H, Tanaka M, Ishimura M, Nishi M, Ishiguro A, Yabe H, Sarashina T, Yamamoto M, Yuza Y, Hyakuna N, Yoshida K, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Miyano S, Ogawa S, Toki T, Terui K, Ito E. Reduced-intensity conditioning is effective for hematopoietic stem cell transplantation in young pediatric patients with Diamond-Blackfan anemia. **Bone Marrow Transplant.** 2020;56(5):1013-1020. doi: 10.1038/s41409-020-01056-1.
- 14) Terui K, Toki T, Taga T, Iwamoto S, Miyamura T, Hasegawa D, Moritake H, Hama A, Nakashima K, Kanezaki R, Kudo K, Saito AM, Horibe K, Adachi S, Tomizawa D, Ito E. Highly sensitive detection of GATA1 mutations in patients with myeloid leukemia associated with Down syndrome by combining Sanger and targeted next generation sequencing. **Genes Chromosomes Cancer.** 2020;59(3):160-167. doi: 10.1002/gcc.22816.
- 15) Nishinaka-Arai Y, Niwa A, Matsuo S, Kazuki Y, Yakura Y, Hiroma T, Toki T, Sakuma T, Yamamoto T, Ito E, Oshimura M, Nakahata T, Saito MK. Down syndrome-related transient abnormal myelopoiesis is attributed to a specific erythro-megakaryocytic subpopulation with *GATA1* mutation. **Haematologica.** 2021; 106(2):635-640. doi: 10.3324/haematol.2019.242693.
- 16) Hirono K, Imaizumi T, Aizawa T, Watanabe S, Tsugawa K, Shiratori T, Kawaguchi S, Seya K, Matsumiya T, Ito E, Tanaka H. Endothelial expression of fractalkine (CX3CL1) is induced by Toll-like receptor 3 signaling in cultured human glomerular endothelial cells. **Mod Rheumatol.** 2020;30(6):1074-1081. doi: 10.1080/14397595.2019.1682768.
- 17) Mori M, Hira A, Yoshida K, Muramatsu H, Okuno Y, Shiraishi Y, Anmae M, Yasuda J, Tadaka S, Kinoshita K, Osumi T, Noguchi Y, Adachi S, Kobayashi R, Kawabata H, Imai K, Morio T, Tamura K, Takaori-Kondo A, Yamamoto M, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S, Matsuo K, Yabe H, Yabe M, Takata M. Pathogenic mutations identified by a multimodality approach in 117 Japanese Fanconi anemia patients. **Haematologica** 2020;105(4):1166-1167. doi: 10.3324/haematol.2019.245720.
- 18) Takahashi Y, Terui K, Chinen Y, Tandai S, Kudo K, Sasaki S, Tono C, Taki T, Ito E. A pediatric case of secondary T-cell acute lymphoblastic leukemia with KMT2A-MAML2 developing after hepatoblastoma treatment. **Pediatr Blood Cancer.** 2020;67(1):e28033. doi: 10.1002/pbc.28033.
- 19) Takahashi N, Kudo K, Tanaka M, Kumagai N, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Terui K, Kurose A, Yanagisawa R, Nakazawa Y, Ito E. A Rapid Cytologic Double Staining of Epstein-Barr Virus-encoded Small RNA and Cell Surface Markers for Diagnosis of Epstein-Barr Virus-associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2020;42(8):e756-e758. doi: 10.1097/MPH.0000000000001647.
2. 学会発表
- 1) 伊藤悦朗. (シンポジウム) ダウン症候群における TAM から急性巨核芽球性白血病への進展の仕組み. **第 82 回日本血液学会学術集会** (2020 年 10 月 10 日-11 月 8 日, WEB) . (口頭) .
- 2) 伊藤悦朗. (シンポジウム) ダウン症の小児における TAM から骨髄性白血病進展の分子機構. **第 30 回日本産婦人科・新生児血液学会** (2020 年 12 月 21-26 日, WEB) . (口頭) .
- 3) 神尾卓哉, 小山石隼, 小林明恵, 佐藤知彦, 工藤耕, 佐々木伸也, 金崎里香, 長谷川大一郎, 村松秀城, 高橋義行, 笹原洋二, 平松英文, 角田治美, 田中美幸, 石村匡崇, 西眞範, 石黒精, 矢部普正, 吉田健一, 菅野仁, 大賀正一, 小原明, 小島勢二, 宮野悟, 小川誠司, 土岐力, 照井君典, 伊藤悦朗. **ダイヤモンドブラックファン貧血に対する骨髄非破壊の前**

処置を用いた同種造血細胞幹移植の有用性.
第 82 回 日本血液学会学術集会 (2020 年 10 月
11 日-11 月 8 日, WEB) . (口頭) .

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし