

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

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22例中7例（32%）に既報の遺伝子変異を認めた。これまでに249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、141例（56.7%）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、ターゲットシーケンス及びエクソーム解析によっても原因遺伝子を同定することができなかった検体を国土班に依頼して全ゲノムシーケンスを行うため、倫理申請書の改訂を行った。各施設の倫理委員会で改訂版の承認後、両親の再同意取得を進めている。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、DBAのWeb登録を開始した。これまでのデータをもとに、エビデンスに基づいた「DBAの診療ガイドライン」の改訂を行い、日本小児血液・がん学会で承認を受けた。

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3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」の構築を進める。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、5q-症候群の原因遺伝子 *RPS14* および私達が見出した新規原因遺伝子 *TP53* 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。変異が同定されない場合は、両親の検体と一緒にエクソーム解析を行い、原因遺伝子の同定を進めた。

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、解析を行った。本年度は、ターゲットシーケンス及びエクソーム解析によっても原因遺伝子を同定することができなかった検体を、国土班に依頼して全ゲノムシーケンスを行うため、倫理申請書の改訂を行った。各施設の倫理委員会で改訂版の承認後、両親の再同意取得を進めている。

C. 研究結果

新規症例22名の遺伝子診断を行い、7例で既知の原因遺伝子 (*RPS19* 4例、*RPS26* 1例、*RPL11* 1例、*GATA1* 1例) を同定した。これまでに249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、141例 (56.7%) 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改訂を行った。

ターゲットシーケンス及びエクソーム解析によっても原因遺伝子を同定することができなかった検体を国土班に依頼して全ゲノムシーケンスを行うため、倫理申請書の改訂を行った。各施設の倫理委員会で改訂版の承認後、両親の再同意取得を進めた。

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」に中央倫理審査承認後、46施設の施設長の研究実施許可を得た。さらに、中央倫理審査を認めない9施設の倫理審査承認と研究実施許可が得られた。令和3年5月から、疾患数の最も多いDBA症例から登録を開始した。

これまでのデータをもとに、エビデンスに基づいた「DBAの診療ガイドライン」の改訂を行い、日本小児血液・がん学会で承認を受けた。

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。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。

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。本研究班の成果をもとに診療ガイドラインの改訂を行い、日本小児血液・がん学会で承認を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi A, Ohtaka R, Toki T, Hara J, Muramatsu H, Kanazaki R, Takahashi Y, Sato T, Kamio T, Kudo K, Sasaki S, Yoshida T, Utsugisawa T, Kanno H, Yoshida K, Nannya Y, Takahashi Y, Kojima S, Miyano S, Ogawa S, Terui K, Ito E. Dyserythropoietic anaemia with an intronic GATA1 splicing mutation in patients suspected to have Diamond-Blackfan anaemia. **eJHaem**. 2022; 3:163–167. doi: 10.1002/jha2.374.
- 2) Kudo K, Kubota Y, Toki T, Kanazaki R, Kobayashi A, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Shiba N, Tomizawa D, Yoshida K, Ogawa S, Seki M, Takita J, Ito E, Terui K. Childhood acute myeloid leukemia with 5q deletion and HNRNPH1-MLLT10 fusion: The first case report. **Blood Adv**. 2022 Feb 9; bloodadvances. 2021006383. doi: 10.1182/bloodadvances. 2021006383. [Online ahead of print]
- 3) Kudo K, Toki T, Kanazaki R, Tanaka T, Kamio T, Sato T, Sasaki S, Imamura M, Imai C, Ando K, Kakuda H, Doi T, Kawaguchi H, Irie M, Sasahara Y, Tamura A, Hasegawa D, Itakura Y, Watanabe K, Sakamoto K, Shioda Y, Kato M, Kudo K, Fukano R, Sato A, Yagasaki H, Kanegane H, Kato I, Umeda K, Adachi S, Kataoka T, Kurose A, Nakazawa A, Terui K, Ito E. *BRAF*^{V600E}-positive cells as molecular markers of bone marrow disease in pediatric Langerhans cell histiocytosis. **Haematologica**. 2022 Mar 17. doi: 10.3324/haematol.2021.279857. [Online ahead of print]
- 4) Matsumori H, Watanabe K, Tachiwana H, Fujita T, Ito Y, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Osakada H, Haraguchi T, Awazu A, Ochiai H, Sakata Y, Ochiai K, Toki T, Ito E, Goldberg IG, Tokunaga K, Nakao

- M, Saitoh N. Ribosomal protein L5 facilitates rDNA-bundled condensate and nucleolar assembly. **Life Sci Alliance**. 2022 Mar 23;5(7):e202101045. doi: 10.26508/lsa.202101045.
- 5) Takahashi Y, Kudo K, Ogawa K, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Kobayashi A, Ito T, Yamamoto T, Asano K, Ohkuma H, Kurose A, Ito E, Terui K. Isolated Bone Recurrence of Medulloblastoma With MYCN Amplification and TP53 Loss: A Case Report. **J Pediatr Hematol Oncol**. 2022 Mar 1;44(2):e593-e596. doi: 10.1097/MPH.0000000000002234.
 - 6) Utsugisawa T, Uchiyama T, Toki T, Shimojima-Yamamoto K, Ohga S, Ito E, Kanno H. Enzymatic Changes in Red Blood Cells of Diamond-Blackfan Anemia. **Tohoku J Exp Med**. 2021 Sep;255(1):49-55. doi: 10.1620/tjem.255.49.
 - 7) Yamamoto KS, Utshigisawa T, Ogura H, Aoki T, Kawakami T, Ohga S, Ohara A, Ito E, Yamamoto T, Kanno H. Clinical and genetic diagnosis of thirteen Japanese patients with hereditary spherocytosis. **Hum Genome Var**. 2022 Jan 12;9(1):1. doi: 10.1038/s41439-021-00179-1.
 - 8) 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 Sep;35(9):2508-2516. doi: 10.1038/s41375-021-01157-w.
 - 9) 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 May;35(5):1480-1484. doi: 10.1038/s41375-021-01171-y.
 - 10) 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**. 2022 Jan 1;44(1): e250-e252. doi: 10.1097/MPH.0000000000002119.
 - 11) Kudo K, Sato T, Takahashi Y, Yuzawa K, Kobayashi A, Kamio T, Sasaki S, Shimada J, Otani K, Tuszimoto 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 Nov 1;43(8):e1173-e1176. doi: 10.1097/MPH.0000000000002085.
 - 12) 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 Sep;38(6):515-527. doi: 10.1080/08880018.2021.1887984.
 - 13) 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 Nov;63(11):1319-1326. doi: 10.1111/ped.14638.
 - 14) 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 Apr 15;137(15):2021-2032. doi: 10.1182/blood.2020009111.
 - 15) 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.** 2021 May;56(5):1013-1020. doi: 10.1038/s41409-020-01056-1.

- 16) Tanaka Y, Yeoh AEJ, Moriyama T, Li CK, Kudo K, Arakawa Y, Buaboornam 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 Jul 1;106(7):2026-2029. doi: 10.3324/haematol.2020.266320.
- 17) 伊藤悦朗, 土岐力, 神尾卓哉, 照井君典. 遺伝性骨髄不全症候群の新知見. **臨床血液** 2021;62(10):1455-1464.

2. 学会発表

- 1) 伊藤悦朗. (シンポジウム) GATA1 変異による Down 症候群関連急性巨核芽球性白血病発症の仕組み. **第 94 回日本生化学会大会** (2021 年 11 月 3 日-5 日, 横浜 (Web 開催)). (口頭).
- 2) 小林明恵, 大高龍星, 土岐力, 金崎里香, 高橋佑果, 佐藤知彦, 神尾卓哉, 工藤耕, 佐々木伸也, 村松秀城, 原純一, 菅野仁, 照井君典, 伊藤悦朗. Dyserythropoietic anemia with an intronic *GATA1* splicing mutation in patients suspected to have DBA. **第 83 回日本血液学会学術総会** (2021 年 9 月 23 日-25 日, 仙台 (Web 開催)).
- 3) Yamato G, Park MJ, Shimada A, Shiba N, Yamada Y, Terui K, Ito E, Muramatsu H, Watanabe K, Hayashi Y. Cytokine Analysis in 154 Patients with transient abnormal myelopoiesis: JCCG JPLSG TAM-10 clinical study. **The 63th American Society of Hematology** (2021 年 12 月 11 日-14 日, 米国・アトランタ (ハイブリッド開催)). (ポスター).

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし