

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

### 日本の遺伝性球状赤血球症における遺伝子変異スペクトラム

研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学医学部輸血・細胞プロセッシング科 教授）  
大賀正一（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 教授）  
研究協力者 山本（下島）圭子（東京女子医科大学医学部輸血・細胞プロセッシング科 助教）  
山本俊至（東京女子医科大学医学部ゲノム診療科 教授）  
小倉浩美（東京女子医科大学医学部輸血・細胞プロセッシング科 非常勤講師）  
槍澤大樹（東京女子医科大学医学部輸血・細胞プロセッシング科 講師）  
石村匡崇（九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 助教講師）

研究要旨： 遺伝性球状赤血球症は先天性溶血性貧血の病型として最も頻度の高い赤血球膜異常症である。溶血性貧血の診断基準を満たし、直接抗グロブリン試験陰性でPNH血球を認めない慢性溶血性貧血症例に対して、我々は定量的赤血球浸透圧脆弱性試験（FCM-OF）、赤血球膜表面積定量試験（赤血球 eosin 5'-maleimide 結合能）を実施している。今回、臨床症状、臨床検査所見および上記の赤血球膜異常症スクリーニング検査でHSが疑われる13症例について次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子検査を実施した。その結果、全例をHSと確定診断出来た。

#### A. 研究目的

遺伝性球状赤血球症（hereditary spherocytosis: HS）は先天性溶血性貧血（congenital hemolytic anemia: CHA）の病型として最も頻度の高い赤血球膜異常症である。臨床症状の程度は幅広く、代償性溶血を認める例から頻回輸血を必要とする例まで多岐にわたり、Hb8g/dLを保てない重症慢性溶血性貧血を呈する例では脾摘が選択肢となりうる。我々の研究室において、2016年から2018年の間、臨床症状と一般血液検査結果からCHAが疑われた51例について網羅的遺伝子解析を実施し、HSと診断した13例の変異スペクトラムを先行研究結果と比較検討したので報告する。

#### B. 研究方法

末梢血からDNAを抽出し、Agilent Technologies社からのHaloplex HS Target enrichment systemを用いた74のターゲット遺伝子を対象とした解析パネルを設計し、Illumina社のMiseqを用いて次世代シーケンシング（NGS）解析を行った。得られたデータは、Agilent Technologies社のSureCallによってannotationを行い、wANNOVAR ([http:// wannovar.wglab.org/](http://wannovar.wglab.org/))を用いて病原性予測解析を行った。

フィルタリングは、(1)出現頻度がALL 1000Genomesと1000G\_EAS、HGDV、dbSNPで1%

未満、(2)synonymous variantsを除外、(3)total read depthの30%未満であるvariantsを除外、(4)CADD\_phred valueが20%以上というストラテジーに沿って行った。Variantsを視覚的に確認するために、The Integrative Genomics Viewer (IGV) software (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>)を用いた。また、最終的に得られたバリエーションはAmerican College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)から発表されているガイドラインに沿って評価した。Splicing sitesに存在するvariantsの影響については、Berkeley Drosophila Genome Project ([https://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html))とDTU Bioinformatics (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) databasesを用いて算出した。（倫理面への配慮）

本研究は東京女子医科大学倫理審査委員会にて承認を受け、全例から文書によるインフォームドコンセントを受けた。

#### C. 研究結果

13例全例でHSの原因遺伝子変異が同定できた。13例のうち8例は、臨床症状と検査所見からHSと診断されていた。一方、残りの5例はHSとは疑われていなかった症例であった。7例では新規の変異が同定さ

れた。

NGS解析の普及により、ここ数年の間に世界各国からHSをターゲットとした遺伝学的解析結果の報告が相次いでいる。各国からの報告によると、人種によって原因遺伝子の頻度には違いがあることが明らかになっており、我々の解析結果は中国や韓国といったアジアの国々からの報告と同じ傾向を示し、*ANK1*変異が6例(46%)と最も多く、次に*SPTB*変異が4例(31%)であった。貧血の重症度と原因遺伝子との相関については、他施設からの報告と同様に明らかな傾向は見られなかった。

#### D. 考察

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) によるとHSは原因遺伝子の種類によって5つのサブタイプに分類されている：ankyrin 1 (*ANK1*; MIM #18200 [SPH1])、 $\beta$ -spectrin (*SPTB*; MIM #616649 [SPH2])、 $\alpha$ -spectrin (*SPTA1*; MIM #270970 [SPH3])、band 3 protein (*SLC4A1*; MIM #612653 [SPH4])、and protein 4.2 (*EPB42*; MIM #612690 [SPH5])。SPH1、SPH2、SPH4は常染色体顕性(優性)遺伝形式、SPH3とSPH5は常染色体潜性(劣性)遺伝形式である。それゆえ、適切な遺伝カウンセリングをする上でも遺伝学的診断をすることは非常に重要となる。

現在までに論文発表された日本におけるHSの原因遺伝子解析は3報告存在するが、そのうち2報告はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析法によるもので、最も頻度が多いのはSPH4(*SLC4A1*変異)であった。しかし、2001年にNakanishiらがダイレクトシーケンス法により解析を行い、*ANK1*変異は49例中15例と決して少ない割合ではないということが明らかになっており、本研究結果は先行研究と一致した。

#### E. 結論

HS疑い症例の病因診断には、赤血球浸透圧脆弱性試験や赤血球膜表面積定量検査などが有用であり、HS疑い13症例に対する網羅的遺伝子検査により、全例に赤血球膜骨格蛋白遺伝子変異が同定出来た。

#### 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(1):163-167. doi: 10.1002/jha2.374.

- 2) Ludwig LS, Lareau CA, Bao EL, Liu N, Utsugisawa T, Tseng AM, Myers SA, Verboon JM, Ulirsch JC, Luo W, Muus C, Fiorini C, Olive ME, Vockley CM, Munschauer M, Hunter A, Ogura H, Yamamoto T, Inada H, Nakagawa S, Ohzono S, Subramanian V, Chiarle R, Glader B, Carr SA, Aryee MJ, Kundaje A, Orkin SH, Regev A, McCavit TL, Kanno H, Sankaran VG. Congenital anemia reveals distinct targeting mechanisms for master transcription factor GATA1. **Blood**. 2022 Apr 21;139(16):2534-2546. doi: 10.1182/blood.2021013753.
- 3) Utsugisawa T, Kanno H. Hemoglobinopathies. **Jpn J Transf Cell Ther**. 2022;68(1):3-11.
- 4) 槍澤大樹, 菅野仁. 産科・新生児科で遭遇する先天性溶血性貧血～脱水型遺伝性有口赤血球症と乳児有棘赤血球症～. **日本産婦人科・新生児血液学会誌** 2022;21(2):65-71.
- 5) 槍澤大樹, 菅野仁. 溶血性貧血の分子病態研究の進歩. **血液内科** 2022;84(1):12-17.
- 6) Utsugisawa T, Uchiyama T, Toki T, Shimajima-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) Kobayashi H, Konno M, Utsugisawa T, Tanabe K, Kanno H. Preoperative autologous blood donation for kidney transplant and end-stage renal disease patients: A single-center study. **Transfus Apher Sci**. 2021 Aug;60(4):103-149. doi: 10.1016/j.transci.2021.103149.
- 8) 菅野仁, 小倉浩美. 網羅的遺伝子解析による先天性溶血性貧血診断の意義と課題. **臨床血液** 2021;62(5):472-479.
- 9) 中原衣里菜, 谷ヶ崎博, 菅野仁. 我が国の発作性寒冷ヘモグロビン尿症～文献的考察. **日本輸血細胞治療学会雑誌** 2021;67(6):541-548.

- 10) Shimojima-Yamamoto K, Utsugisawa T, Ogura H, Aoki T, Ohga S, Ohara A, Ito E, Yamamoto T, Kanno H. Clinical and genetic diagnosis for thirteen Japanese patients with hereditary spherocytosis. **Hum Genome Var.** 2022 Jan 12;9(1):1. doi: 10.1038/s41439-021-00179-1.
- 11) Namba T, Ochi M, Ogura H, Kanno H, Higuchi Y. Infantile pyknocytosis with marked hemolytic anemia. **Pediatrics and Neonatology.** 2021;62(5):563-64.
- 12) 上田優果, 松波邦洋, 桑原秀次, 小倉浩美, 菅野仁, 柳貴英, 今村淳. ビリルビン脳症に至った UGT1A1 遺伝子多型を有する乳児濃縮赤血球症. **日本小児科学会雑誌** 2021;125(12):1702-1707.
2. 学会発表
- 1) Paola P, Eduard J, Joan-Lluis V, Bertil G, Andreas G, Kanno H, Kevin H.M K., Carl L, D. Mark L, Dagmar P, Vip V, Jean W, Yan Y, Bryan M, Rachael F G. Baseline Characteristics by age of a global cohort of patients diagnosed with pyruvate kinase deficiency - A descriptive analysis from the peak registry. **EHA2021** (2021年6月9日-17日, Web 開催)。(ポスター)。
- 2) 松田和樹, 岡本好雄, 槍澤大樹, 菅野仁. 低ヘマトクリット値を示す患者からの安全なサイトフェレシス基準についての検討. **第42回日本アフエレシス学会学術大会** (2021年10月16日-17日, 東京 (ハイブリッド開催))。(口演)。
- 3) 久保田友晶, 松田和樹, 守屋友美, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 岡本好雄, 山本圭子, 槍澤大樹, 菅野仁. 皮下注用人免疫グロブリンの在宅自己注射における投与記録管理の問題点. **第69回日本輸血・細胞治療学会総会** (2021年6月4日-6日, 東京 (ハイブリッド開催))。(ポスター)。
- 4) 守屋友美, 松田和樹, 久保田友晶, 千野峰子, 及川美幸, 木下明美, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 岡本好雄, 下島圭子, 槍澤大樹, 菅野仁. 災害時の院内における血液製剤管理と供給体制. **第69回日本輸血・細胞治療学会総会** (2021年6月4日-6日, 東京 (ハイブリッド開催))。(ポスター)。
- 5) 山本圭子, 田村豪良, 澤石由記夫, 岡本伸彦, 豊田敦, 菅野仁, 山本俊至. Inverted-duplication-deletionに不均衡転座が capされた2症例における構造以上の切断点解析. **日本人類遺伝学会第66回大会・第28回日本遺伝子診療学会** (2021年10月13日-16日, 横浜 (ハイブリッド開催))。(ポスター)。
- 6) 田村豪良, 山本(下島)圭子, 谷ヶ崎博, 菅野仁, 岡本伸彦, 豊田敦, 山本俊至. ロングリード・シークエンスによる連続する2つの微細欠失の構造解析. **日本人類遺伝学会第66回大会・第28回日本遺伝子診療学会** (2021年10月13日-16日, 横浜 (ハイブリッド開催))。(ポスター)。
- 7) 中原衣里菜, 山本(下島)圭子, 青木貴子, 小倉浩美, 槍澤大樹, 森岡一朗, 山本俊至, 菅野仁. 先天性溶血性貧血診断における網羅的遺伝子検査の意義. **日本人類遺伝学会第66回大会・第28回日本遺伝子診療学会** (2021年10月13日-16日, 横浜 (ハイブリッド開催))。(ポスター)。
- 8) 田村豪良, 山本(下島)圭子, 山本俊至, 青木貴子, 小倉浩美, 槍澤大樹, 岡部龍太, 亀井美智, 谷ヶ崎博, 森岡一朗, 菅野仁. 網羅的遺伝子解析により診断された band4.2 異常症 (4.2Nippon) 2例の臨床的比較. **第83回日本血液学会学術集会** (2021年9月23日-25日, 仙台 (Web 開催))。(口演)。
- 9) 中原衣里菜, 菅野仁, 山本俊至, 谷ヶ崎博, 森岡一朗. 臍帯血赤血球を用いた赤血球膜異常症のスクリーニング法. **第83回日本血液学会学術集会** (2021年9月23日-25日, 仙台 (Web 開催))。(口演)。
- 10) 中原衣里菜, 山本(下島)圭子, 青木貴子, 小倉浩美, 槍澤大樹, 赤川浩之, 山本俊至, 丸義朗, 中村文彦, 谷ヶ崎博, 伊藤悦朗, 大賀正一, 菅野仁. Efficient Screening Tests and Gene Mutation Spectrum for Hereditary Stomatocytosis in Japan. **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