

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 照井君典（弘前大学大学院医学研究科小児科学 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。令和元年度～令和3年度の本研究期間内に、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53例中20例（38%）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、138例（55.4%）に原因となるRP遺伝子変異および3例（1.2%）に *GATA1* 遺伝子変異を見出した。これまでのデータをもとに、DBAの診断基準、重症度分類、診療ガイドラインの改訂を行い、令和3年度に日本小児血液・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症とも連携し、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、5q-症候群の原因遺伝子 *RPS14* および我々が見出した新規骨髄不全症の原因遺伝子 *TP53* について、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

令和元年度～令和3年度の本研究期間内に、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53例中20例（38%）に既報の遺伝子変異（*RPS19* 11例、*RPS26* 4例、*RPS17* 1例、*RPL5* 1例、*RPL11* 1例、*GATA1* 2例）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、138例（55.4%）に原因となるRP遺伝子変異および3例（1.2%）に *GATA1* 遺伝子変異を見出した。

これまでのデータをもとに、エビデンスに基づいた「DBAの診断基準、重症度分類、診療ガイドライン」の改訂を行い、令和3年度に日本小児血液・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る。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については、AMED国土班と連携し、全ゲノムシーケンスを行う予定であり、新たな原因遺伝子の発見につながることを期待される。

本邦のDBAの長期予後については、全体像がまだ明らかではない。難病プラットフォームを用いた「先天性骨髄不全症レジストリ」を利用することにより、長期予後を含めた精度の高いデータベースの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。その成果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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kudo K, Toki T, Kanezaki 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]
- 2) Kudo K, Kubota Y, Toki T, Kanezaki 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) 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.
- 4) Karasawa T, Kudo K, Tanita K, Takahashi Y, Kanegane H, Terui K. Epstein-Barr Virus-Negative Granulomatous Disease Due to SAP Deficiency. *J Clin Immunol.* 2021 Aug;41(6):1372-1375. doi: 10.1007/s10875-021-01032-4.
- 5) 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.
- 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 May;35(5):1480-1484. doi: 10.1038/s41375-021-01171-y.
- 7) Kudo K, Sato T, Takahashi Y, Yuzawa K, Kobayashi A, Kamio T, Sasaki S, Shimada J, Otani K, Tsuchimoto 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.

- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Moritake H, Tanaka S, Miyamura T, Nakayama H, Shiba N, Shimada A, Terui K, Yuza Y, Koh K, Goto H, Kakuda H, Saito A, Hasegawa D, Iwamoto S, Taga T, Adachi S, Tomizawa D. The outcomes of relapsed acute myeloid leukemia in children: Results from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group AML-05R study. **Pediatr Blood Cancer**. 2021 Jan;68(1):e28736. doi: 10.1002/pbc.28736.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 神尾卓哉, 照井君典. 遺伝性貧血. **小児内科** 2021;53(7):1065-1068.
- 14) Hasegawa D, Tawa A, Tomizawa D, Watanabe T, Saito AM, Kudo K, Taga T, Iwamoto S, Shimada A, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Takahashi H, Nakayama H, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Miyachi H, Horibe K, Nakahata T, Adachi S. Attempts to optimize postinduction treatment in childhood acute myeloid leukemia without core-binding factors: A report from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). **Pediatr Blood Cancer**. 2020 Dec;67(12):e28692. doi: 10.1002/pbc.28692.
- 15) Aoki T, Takahashi H, Tanaka S, Shiba N, Hasegawa D, Iwamoto S, Terui K, Moritake H, Nakayama H, Shimada A, Koh K, Goto H, Kosaka Y, Saito AM, Horibe K, Kinoshita A, Tawa A, Taga T, Adachi S, Tomizawa D. Predisposition to prolonged neutropenia after chemotherapy for paediatric acute myeloid leukaemia is associated with better prognosis in the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group AML-05 study. **Br J Haematol**. 2021 Apr;193(1):176-180. doi: 10.1111/bjh.16656.
- 16) Yuzawa K, Terui K, Toki T, Kanezaki 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 Apr;67(4):e28188. doi: 10.1002/pbc.28188.
- 17) Yoshida N, Sakaguchi H, Yabe M, Hasegawa D, Hama A, Hasegawa D, Kato M, Noguchi M, Terui K, Takahashi Y, Cho Y, Sato M, Koh K, Kakuda H, Shimada H, Hashii Y, Sato A, Kato K, Atsuta Y, Watanabe K; Pediatric Myelodysplastic Syndrome Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Clinical outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia: A report from the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**. 2020

- May;26(5):902-910. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.11.029.
- 18) 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 Nov;42(8):e756-e758. doi: 10.1097/MPH.0000000000001647.
- 19) Terui K, Toki T, Taga T, Iwamoto S, Miyamura T, Hasegawa D, Moritake H, Hama A, Nakashima K, Kanazaki 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 Mar;59(3):160-167. doi: 10.1002/gcc.22816.
- 20) 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 Jan;67(1):e28033. doi: 10.1002/pbc.28033.
- 21) Nakashima K, Hasegawa D, Tomizawa D, Miyamura T, Hama A, Iwamoto S, Terui K, Adachi S, Taga T. Characteristics and outcomes of children with acute myeloid leukemia and Down syndrome who are ineligible for clinical trials due to severe comorbidities. **Pediatr Blood Cancer.** 2019 Nov;66(11):e27942. doi: 10.1002/pbc.27942.
- 22) Kubota Y, Uryu K, Ito T, Seki M, Kawai T, Isobe T, Kumagai T, Toki T, Yoshida K, Suzuki H, Kataoka K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Ohki K, Kiyokawa N, Kagawa J, Miyano S, Oka A, Hayashi Y, Ogawa S, Terui K, Sato A, Hata K, Ito E, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis revealed heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. **Cancer Sci.** 2019 Oct;110(10):3358-3367. doi: 10.1111/cas.14160.
- 23) Watanabe A, Inukai T, Kagami K, Abe M, Takagi M, Fukushima T, Fukushima H, Nanmoku T, Terui K, Ito T, Toki T, Ito E, Fujimura J, Goto H, Endo M, Look T, Kamps M, Minegishi M, Takita J, Inaba T, Takahashi H, Ohara A, Harama D, Shinohara T, Somazu S, Oshiro H, Akahane K, Goi K, Sugita K. Resistance of t(17;19)-acute lymphoblastic leukemia cell lines to multiagents in induction therapy. **Cancer Med.** 2019 Sep;8(11):5274-5288. doi: 10.1002/cam4.2356.
- 24) Kudo K, Tanaka T, Kobayashi A, Terui K, Ito E. Zoledronic acid for relapsed Langerhans cell histiocytosis with isolated skull bone lesion. **Pediatr Int.** 2019 Mar;61(3):315-317. doi: 10.1111/ped.13774.
2. 学会発表
- 1) 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).
- 2) Matsuo H, Yoshida K, Nannya Y, Ito Y, Saito S, Koga Y, Moritake H, Terui K, Kawaguchi K, Okamoto Y, Nakayama H, Kanno M, Hino M, Akane Y, Inoue A, Shimada A, Goto H, Ueno H, Takita J, Yamato G, Shiba N, Hayashi Y, Shiraishi Y, Miyano S, Kiyokawa N, Tomizawa D, Taga T, Tawa A, Ogawa S, Adachi S. Clonal evolution pattern and prognostic significance of clonal architecture in KMT2A-rearranged acute myeloid leukemia. **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).
- 3) 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)).

- 4) Moritake H, Tanaka S, Miyamura T, Nakayama H, Shiba N, Shimada A, Terui K, Yuza Y, Koh K, Goto H, Kakuda H, Saito AM, Hasegawa D, Iwamoto S, Taga T, Adachi S, Tomizawa D. Etoposide, Cytarabine and Mitoxantrone- or Fludarabine, Cytarabine and Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Based Intensive Reinduction Chemotherapy Is Recommended for Children with Relapsed Acute Myeloid Leukemia: The Results from the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG) AML-05R Study. **American Society of Hematology 62th Annual Meeting** (2020年12月5日-8日, Web開催)。(ポスター)。
- 5) Taga T, Tanaka S, Terui K, Iwamoto S, Hiramatsu H, Miyamura T, Hashii Y, Hasegawa D, Moritake H, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, Ito E, Koh K, Hasegawa D, Hama A, Saito AM, Adachi S, Tomizawa D. Post-induction minimal residual disease measured by flow cytometry and deep sequencing of mutant GATA1 are both significant prognostic factors for children with myeloid leukemia and Down syndrome: a nationwide prospective study of the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. **The 61th American Society of Hematology Annual Meeting** (2019年12月7日-10日, 米国・オーランド)。(ポスター)。
- 6) Yamato G, Muramatsu H, Watanabe T, Deguchi T, Iwamoto S, Hasegawa D, Terui K, Ueda T, Yokosuka T, Toki T, Tanaka S, Yanagisawa R, Koh K, Saito AM, Horibe K, Hayashi Y, Adachi S, Mizutani S, Taga T, Ito E, Watanabe, K. Predictive factors of the development of leukemia in patients with transient abnormal myelopoiesis and Down syndrome: the JCCG study JPLSG TAM-10. **The 61th American Society of Hematology Annual Meeting** (2019年12月7日-10日, 米国・オーランド)。(ポスター)。
- 7) Kudo K, Kanezaki R, Kobayashi A, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Imamura M, Imai C, Irie M, Sasahara Y, Ando K, Kakuda H, Doi T, Kawaguchi H, Kudo K, Kanegane H, Terui K, Toki T, Ito E. BRAF V600E-positive precursors as molecular markers of bone marrow involvement in pediatric langerhans cell histiocytosis **The 61th American Society of Hematology Annual Meeting** (2019年12月7日-10日, 米国・オーランド)。(ポスター)。
- 8) 伊藤悦朗, 照井君典, 土岐力. 新生児・乳児貧血のトピックス Diamond-Blackfan貧血の最近の知見. **第29回日本産婦人科・新生児血液学会** (2019年6月7日-8日, 名古屋) .日本産婦人科・新生児血液学会誌 2019;29(1): S11-S2.
- 9) 松岡正樹, 羽賀洋一, 高橋浩之, 村松秀城, 土岐力, 照井君典, 伊藤悦朗, 小原明. 5歳で顕性化して遺伝子診断した橈尺骨癒合症を伴うDBA男児. **第122回日本小児科学会学術集会** (2019年4月19日-21日, 金沢) . 日本小児科学会雑誌 2019;123(2):491.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし