

遺伝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

先天性溶血性貧血の診療ガイドラインの作成・疫学調査

研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学医学部 特任教授）
大賀 正一（九州大学大学院医学研究院成長発達医学 教授）
研究協力者 槍澤 大樹（東京女子医科大学医学部 准教授）
山本（下島）圭子（東京女子医科大学医学部 講師）
小倉 浩美（東京女子医科大学医学部 非常勤講師）
青木 貴子（東京女子医科大学病院 臨床検査技師）

研究要旨：先天性溶血性貧血を正確かつ包括的に診断するためのターゲットキャプチャシーケンス（TCS）検査法を開発し、脱水型遺伝性有口赤血球症（DHS）患者を対象にした変異解析を行った。2015年4月から2021年6月の間に、DHSが疑われた日本人20家系を解析したところ、12家系には、*PIEZO1*または*KCNN4*の病原性バリエーションを同定した。10家系に7種類のヘテロ接合*PIEZO1*バリエーション（1つの挿入、5つのミスセンス、および1つのフレーム内重複変異）を同定した。その中で、2つのバリエーション（p.A427_L428insGMDQSYVCAおよびp.K2323T）は新規変異であった。ヘテロ接合型*KCNN4*バリエーションは、2家系で同定された。p.R352Hは既報告の変異で、p.A279Tが新規病変遺伝子変異として同定された。DHS患者は多くの場合、ほとんど症状を伴わずに溶血が完全または部分的に代償されているが、輸血をしていない患者や散発的な輸血のみを行っている患者であっても、鉄過剰症は普遍的な所見であり、これは進行性の臓器損傷を引き起こす。また、診断時のフェリチンレベルが患者の年齢と相関していることが明らかになっており、病歴、臨床検査所見からDHSが疑われる症例に対してTCS検査を疑うことは、輸血非依存性ヘモクロマトーシス発症前に医療介入を実施し、脾臓摘出後の重篤な静脈血栓症を未然に防ぐ意味で極めて重要である。すべての内科、小児科、産婦人科医師にDHSの病態を周知し、効率的なスクリーニング体制を構築する上で、日本人DHSの疫学調査を実施し、詳細な自然歴の解明が望ましいと考えられた。

A. 研究目的

遺伝性有口赤血球症（HSt）は、赤血球膜の陽イオン透過性が異常に増加することによって引き起こされる先天性溶血性貧血の一型である。HStの最も多いサブタイプ（脱水型遺伝性有口赤血球症 [DHS] または遺伝性乾燥赤血球症 [HX]）は、赤血球形態観察、赤血球膜内外側の陽イオン濃度測定、または浸透圧勾配エクタサイトメーター（DGE）などのスクリーニング検査によって診断される。DHSは常染色体優性遺伝で発症する溶血性貧血で、有病率は1:50,000と推定されている。溶血の程度には多様性が認められ、通常軽度から中等度の溶血を特徴とするため、しばしば鑑別診断で見落とされる可能性がある。血算では網赤血球数増加、MCHCおよびMCH増加が観察される一方で、MCVはわずかに増

加する。既往歴では周産期浮腫の病歴が特徴的とされている。臨床検査所見では、室温で保存された赤血球からのカリウムイオンの損失による偽高カリウム血症を示す可能性が特徴である。さらに、DHSは鉄過剰症と関連していることが多く、肝機能障害、耐糖能異常、下垂体不全、および心不全を発症する可能性がある。

2012年に、DHSはピエゾ型機械刺激感受性カルシウムチャンネル1遺伝子（*PIEZO1*; MIM*611184）の変異に関連していることが初めて特定された。*PIEZO1*は、機械的刺激をカルシウム流入に変換する機械刺激感受性イオンチャンネルをエンコードする。同定されたミスセンスバリエーションは、機能獲得型*PIEZO1*表現型を示し、DHS患者のRBCにおける陽イオンの透過性の増加が説明可能で、偽高カ

リウム血症および/または周産期浮腫を伴うまたは伴わない脱水型遺伝性有口赤血球症-1 (DHS1: OMIM#194380) は、PIEZO1活性亢進によって引き起こされる優性遺伝性の赤血球膜異常症と理解されている。

2015年に、カルシウムイオン依存性カリウム選択的 Gardos チャンネルをコードする別の遺伝子、カリウム中間/小コンダクタンスカルシウム活性化チャンネル サブファミリーNメンバー4遺伝子 (KCNN4; MIM*602754) が、DHSと関連していると特定された。脱水型遺伝性有口赤血球症-2 (DHS2: OMIM#616689) は、KCNN4 のヘテロ接合変異によって引き起こされることが明らかになった。

我々は患者の先天性溶血性貧血を正確かつ包括的に診断するためのターゲットキャプチャシーケンス (TCS) 検査法を開発し、既に遺伝性球状赤血球症 (hereditary spherocytosis; HS) の遺伝的背景を報告した。本研究では、日本人のHS患者、特にDHSに関連する患者で特定されたゲノム変異体を報告する。

B. 研究方法

2015年4月から2021年6月の間に、DHSが疑われた日本人20家系を解析した。まず、AGLT (acidified glycerol lysis test) 法を用いた赤血球膜浸透圧脆弱性試験、フローサイトメトリーによる赤血球浸透圧脆弱性試験 (FCM-OF)、エオジン5'-マレイミド (EMA) 結合試験を実施した。DHSが疑わしい症例としては、先天性溶血性貧血が疑われ、免疫学的溶血性貧血が否定されること、胎児腹水の既往があること、赤血球輸血が原因ではないヘモクロマトーシスを認めること、臨床検査所見では有口赤血球・標的赤血球を認めること、MCV高値、FCM-OFにおける残存赤血球の増加、EMA結合能が正常または増加とした。

末梢血からゲノムDNAをQIAGEN社のQIAamp DNA extraction kitを用いて抽出した。Agilent Technologies社製のHaloplex HS enrichment system を用いて、74の候補遺伝子をターゲットとしたパネルを作成した。Illumina社のMiseq Platformを用いてシーケンシングを行い、データはヒトゲノムデータ GRCh37/hg19 と照合した。FASTQ ファイルはSureCall v3.5を用いてバリエーション解析を行った。フィルタリングの流れは、(1) 1000人ゲノムデータで1%未満、(2) synonymous variantを除く、(3) ア

レル頻度が30%未満やread depthが低いものを除く、(4) CADD_phredが20以上、とした。バリエーションはIntegrative Genomics Viewer (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>) を用いて目視でも確認した。得られたバリエーションはAmerican College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) のガイドラインに則って評価した。バリエーションはダイレクトシーケンシングでも確認した。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言を遵守し、所属研究機関の倫理委員会の承認を得て行った。対象者から書面によるインフォームドコンセントを取得した後、血液サンプルの採取、主治医から病歴や身体所見を含む臨床情報の収集を行った。

C. 研究結果

調査した 20 家系のうち12家系には、ACMG/AMP ガイドラインに従って、PIEZO1またはKCNN4 の病原性または病原性の可能性が高いバリエーションを持っていることが示された (診断率60%)。すべてのバリエーションは、サンガー法による塩基配列決定により確認できた。10家系に7種類のヘテロ接合PIEZO1バリエーション (1つの挿入、5つのミスセンス、および1つのフレーム内重複変異) を同定した。その中で、2つのバリエーション (p.A427_L428insGMDQSYVCAおよびp.K2323T) は新規変異であり、ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) および gnomAD (<http://www.gnomad-sg.org/>) に掲載されていなかった。一症例で同定されたp.A1457Vバリエーションについては、dbSNP データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) に含まれていたが (ID=rs532444891) 日本人集団におけるマイナーアレル頻度は0.00155であり、一般集団では非常に稀であることが明らかになった。ヘテロ接合型 KCNN4 バリエーションは、2家系で同定された。p.R352Hは既報告の変異で、p.A279Tが新規病因遺伝子変異として同定された。

D. 考察

この研究では、DHSの疑いのある12症例のうち、10症例 (83%) がPIEZO1バリエーションを有していた。10症例のうち4人 (40%) にはp.L2495_E2496dupが同定されたが、この変異は日本人以外にも繰り返し同定される変異であった。p.L2495_E2496dupは、 $\alpha 2$

および α 3細胞内COOH末端ドメインの接合部に位置し、イオンチャネルの細孔形成に関与すると予測されていて、変異により親水性に変化を引き起こす可能性が示唆された。先行研究では、DHSの64家系からの126名の被験者を後方視的に検討することで、19家系がPIEZO1バリエントを示し、19家系のうちの10家系（53%）がp.L2495_E2496dupを有していた。他のPIEZO1バリエント（p.V598M、p.T2014I、p.R2488Q）は日本人集団で最初に特定され、そのうちの2つ（p.V598Mおよびp.T2014I）は複数の家系で同定されている。PIEZO1は、機械的刺激をカルシウム流入に変換する機械刺激感受性イオンチャネルをコードし、DHS1関連PIEZO1バリエントの機能研究では、部分的な機能獲得表現型が示され、多くの変異体がチャネルの不活性化の遅延を示した。

DHS患者は多くの場合、ほとんど症状を伴わずに溶血が完全または部分的に代償されているが、輸血をしていない患者や散発的な輸血のみを行っている患者であっても、鉄過剰症は普遍的な所見であり、これは進行性の臓器損傷を引き起こす。診断時のフェリチンレベルが患者の年齢と相関していることが以前に報告されたが、本研究でもPIEZO1変異を有する患者は8歳の小児例を除いてフェリチン値の上昇を示した。Maらは、マウスにおける機能獲得PIEZO1対立遺伝子の構成的な発現、あるいはマクロファージにおける発現が鉄調節因子ヘプシジンのレベルを低下して鉄過剰を引き起こすことを示した。すなわち、PIEZO1がマクロファージの食食活性とそれに続く赤血球代謝回転の重要な調節因子であることを示した。彼らの発見は、DHS1患者の高フェリチン血症を治療するための新しい端緒になる可能性があると考えられた。

一方、KCNN4は、Ca²⁺活性化K⁺チャネルをエンコードする。KCNN4は炎症性腸疾患、クローン病、アルツハイマー病などのいくつかの疾患と関連していると報告されているが、今のところKCNN4の生殖細胞系列の病原性バリエントは、DHS2との関連のみが示されている。現在までに、10種類のKCNN4バリエント（p.V222L、p.V282M、p.V282E、p.S314P、p.A322V、p.H328R、p.H340R、p.H340N、p.R352H、p.V369_Lys373del）がDHS2患者で報告されている。その中で、本研究で同定されたp.R352Hは繰り返して同定されている。本研究で新規に同定されたp.A279Tは、既報告のp.V282Mとp.V282Eの近傍に生じた変異であるが、KCNN4の231番目から289番目

のアミノ酸は、2ポアカリウムチャネルドメインを形成し、304番目から377番目のアミノ酸はカルモジュリン結合ドメインを形成する。これらの領域は高度に保存されており、KCNN4で重要な役割を果たしている。KCNN4変異を持つ患者赤血球では、チャネルコンダクタンスが増加すると考えられた。カリウムチャネル機能亢進につながるにもかかわらず、KCNN4の機能獲得はRBC脱水と体系的に関連しておらず、現在までにルーチンの血液検査ではDHS1を明確に診断できていない。

DHS1をHSと鑑別診断することは極めて重要である。血栓症のリスクを悪化させられると思われるため、DHS1患者の脾臓摘出は避けるべきである。特にDHS1では、脾臓摘出後の血栓性イベントが主要なリスクと呼ばれている。私たちの研究では、DHS1の脾臓摘出患者で血栓性イベントが頻繁に発生した。一方、DHS2を有する脾臓摘出患者では、血栓性イベントは発生していない。この事実は4人のDHS2脾臓摘出患者のいずれも血栓症を経験しなかったという報告と矛盾していなかった。現在までに、DHS2の報告症例数はDHS1よりもかなり少ないため、DHS2に対する脾摘術の是非については決定的な結論を導き出すことは時期尚早と考えられる。症例情報のさらなる評価が必要であり、遺伝子診断を受ける前に脾臓摘出された患者は、長期間注意深く監視する必要がある。

赤血球膜異常症を対象にした赤血球膜機能検査には、赤血球膜表面積の半定量法であるEMA結合能検査とFCM-OF検査がHSの診断に適していることが知られている。我々は、DHS1・2症例に対してEMA結合能検査は正常または増加すること、FCM-OFが有意に上昇（浸透圧抵抗性の低下）することを明らかにしている。本疾患では赤血球からのカリウム漏出を引き起こし、それに伴う水の正味の損失が赤血球の脱水、収縮、脆弱性、および溶血を引き起こすと考えられている。DHS1・2診断におけるFCM-OFの有用性は欧米で繁用されているDGEとの比較検討を実施することで明らかになると考えられた。

E. 結論

DHSの診断において、TCS検査が有用であることが明らかになった。病歴、臨床検査所見からDHSが疑われる症例に対してTCS検査を疑うことは、輸血非依存性ヘモクロマトーシス発症前に医療介入を実施し、脾臓摘出後の重篤な静脈血栓症を未然に防

ぐ意味で極めて重要である。すべての内科、小児科、産婦人科医師にDHSの病態を周知し、効率的なスクリーニング体制を構築する上で、日本人DHSの疫学調査を実施し、詳細な自然歴の解明が望ましいと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Grace RF, van Beers EJ, Vives Corrons JL, Glader B, Glenthøj A, Kanno H, Kuo KHM, Lander C, Layton DM, Pospíšilová D, Viprakasit V, Li J, Yan Y, Boscoe AN, Bowden C, Bianchi P. The pyruvate kinase deficiency global longitudinal (Peak) registry: rationale and study design. **BMJ Open**. 2023 Mar 23;13(3):e063605. doi: 10.1136/bmjopen-2022-063605. PMID: 36958777.
- 2) Nakahara E, Shimajima Yamamoto K, Ogura H, Aoki T, Utsugisawa T, Azuma K, Akagawa H, Watanabe K, Muraoka M, Nakamura F, Kamei M, Tatebayashi K, Shinozuka J, Yamane T, Hibino M, Katsura Y, Nakano-Akamatsu S, Kadowaki N, Maru Y, Ito E, Ohga S, Yagasaki H, Morioka I, Yamamoto T, Kanno H. Variant spectrum of *PIEZO1* and *KCNN4* in Japanese patients with dehydrated hereditary stomatocytosis. **Hum Genome Var**. 2023 Mar 2;10(1):8. doi: 10.1038/s41439-023-00235-y. PMID: 36864026.
- 3) Tamura T, Shimajima Yamamoto K, Imaizumi T, Yamamoto H, Miyamoto Y, Yagasaki H, Morioka I, Kanno H, Yamamoto T. Breakpoint analysis for cytogenetically balanced translocation revealed unexpected complex structural abnormalities and suggested the position effect for MEF2C. **Am J Med Genet A**. 2023 Jun;191(6):1632-1638. doi: 10.1002/ajmg.a.63182. PMID: 36916329.
- 4) Tamura T, Yamamoto Shimajima K, Shiihara T, Sakazume S, Okamoto N, Yagasaki H, Morioka I, Kanno H, Yamamoto T. Interstitial microdeletions of 3q26.2q26.31 in two patients with neurodevelopmental delay and distinctive features. **Am J Med Genet A**. 2023 Feb;191(2):400-407. doi: 10.1002/ajmg.a.63034. PMID: 36345653.
- 5) Imashuku S, Suemori S, Wakamatsu M, Okuno Y, Muramatsu H, Makino S, Miyoshi T, Chonabayashi K, Kanno H. Juvenile hemochromatosis with non-

transfused hemolytic anemia caused by a de novo *PIEZO1* gene mutation. **J Pediatr Hematol Oncol**. 2023 May 1;45(4):e510-e513. doi: 10.1097/MPH.0000000000002639. PMID: 36898020.

- 6) Nato Y, Kageyama Y, Suzuki K, Shimajima Yamamoto K, Kanno H, Miyashita H. A novel *SPTAI1* mutation in a patient with hereditary spherocytosis without a family history and coexisting Gilbert's syndrome. **Intern Med**. 2023 Jan 1;62(1):107-111. doi: 10.2169/internalmedicine.9478-22. PMID: 35650129.
- 7) 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. PMID: 35030251.
- 8) 山本圭子, 槍澤大樹, 青木貴子, 小倉浩美, 山本俊至, 菅野仁. 【血液疾患の診断・治療に有用な新しい検査】網羅的遺伝子解析による先天性溶血性貧血の診断. **血液内科** 2022;84(5):635-640.

2. 学会発表

- 1) 土屋裕美子, 小林博人, 菅野仁, 山本俊至. γ δ T細胞を用いた腫瘍免疫療法に対する培養の改良の可能性. 第26回日本がん免疫学会総会 (2022年7月20日-22日, 松江) .
- 2) 松田和樹, 千野峰子, 久保田友晶, 守屋友美, 及川美幸, 木下明美, 岡田真一, 中林恭子, 岡本好雄, 山本圭子, 槍澤大樹, 菅野仁. 輸血部門における産科危機的出血への対応と今後の課題. 第153回日本輸血・細胞治療学会関東甲信越支部例会 (2022年2月26日, Web開催) .
- 3) 町元菜紗, 鈴木恭子, 阿部華子, 松田明奈, 眞弓怜奈, 深江俊愛, 権田裕亮, 米山俊之, 水谷亮, 嶋泰樹, 西崎直人, 織田久之, 藤村純也,

新妻隆広, 大日方薫, 菅野仁, 清水俊明. 乳児期早期から重症貧血を呈した遺伝性耐熱奇形赤血球症の1例. **第125回日本小児科学会学術集会** (2022年4月15日-17日, Web開催) .

- 4) 久保田友晶, 松田和樹, 守屋友美, 及川美幸, 木下明美, 千野峰子, 岡田真一, 中林恭子, 岡本好雄, 山本圭子, 槍澤大樹, 菅野仁. 当院における交差適合試験不適合供給患者の輸血効果について. **第70回日本輸血・細胞治療学会学術総会** (2022年5月27日-29日, 名古屋 (ハイブリッド開催)) .
- 5) 及川美幸, 松田和樹, 久保田友晶, 守屋友美, 千野峰子, 木下明美, 岡田真一, 中林恭子, 岡本好雄, 山本圭子, 槍澤大樹, 菅野仁. 当院で調製したクリオプレシピテートのフィブリノゲン含有量. **第70回日本輸血・細胞治療学会学術総会** (2022年5月27日-29日, 名古屋 (ハイブリッド開催)) .

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし