

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 非常勤嘱託医師）
長内 聡子（東京女子医科大学医学部 助教）
青木 貴子（東京女子医科大学病院 臨床検査技師）

研究要旨：先天性溶血性貧血は、赤血球膜・酵素・ヘモグロビンの量的・質的な異常によって発症する疾患群の総称である。我々の施設では従来溶血性貧血関連特殊検査として、赤血球浸透圧脆弱性、赤血球 eosin 5'-maleimide 結合能、赤血球酵素活性（15 種）イソプロパノール不安定性試験などを実施し、一部の症例について遺伝子検査を実施してきた。昨年度後半（令和 4 年 11 月以降）から、検査依頼のあった全ての溶血性貧血疑い症例に溶血性貧血関連遺伝子パネルを用いた遺伝子検査を導入した。今回パネル遺伝子検査を実施した 150 症例について、最終診断結果をまとめたところ、赤血球膜異常症 50%、赤血球酵素異常症 14%、ヘモグロビン異常症が 2%であった。赤血球表面結合 IgG 分子数増加で診断された DAT 陰性 AIHA が 4%、先天性赤血球形成異常性貧血（CDA）が 3%、Gilbert's 症候群が 2%、診断未確定例が 25%であった。従来日本人 CDA は I 型（*CDANI* 変異例）と IV 型（*KLF1*）が知られており、南ヨーロッパで診断される II 型（*SEC23B*）は一例も診断されていない。今回、*C15ORF41* 例が初めて診断されたが、大球性貧血、ペルテス病の合併等、*CDANI* 変異による CDA と臨床像が酷似していた。我々は未報告のバリエーションを同定した場合、上記の溶血性貧血関連特殊検査で病原性バリエーションであることを確認し、必要に応じて家族解析も実施している。治療方針の決定、適切な遺伝カウンセリングを実施するためには、遺伝子検査と共に患者赤血球を用いた総合的検査態勢の構築が重要と考えられる。

A. 研究目的

先天性溶血性貧血の正確かつ効率的な診断法を確立することは、患者へ適切な医療介入を行い、合併症の発症を未然に防ぐために重要である。従来我々の施設では赤血球酵素活性測定、還元型グルタチオン（GSH）濃度測定、フローサイトメトリーを用いた患者赤血球浸透圧脆弱性試験（FCM-OF）、赤血球膜表面積定量検査（赤血球 eosin 5'-maleimide[EMA]結合能定量検査）などの溶血性貧血関連特殊検査（HA-tests）を実施し、必要に応じて遺伝子検査を追加していた。HA-testsは患者赤血球を用いるため、赤血球輸血後4～6週間の間隔を空ける必要がある。また、新生児など十分な採血量を確保できない例では、測定が困難であった。

令和4年11月以降、検査依頼のあった症例に関し

て、まず溶血性貧血関連遺伝子パネルを用いた網羅的遺伝子検査を実施した。既知の病原性バリエーションが同定された症例や輸血依存例・十分量の採血が困難な例を除き、HA-testsを実施する方針に変更した。150症例に遺伝子検査を行い、病型診断結果に関して考察を行ったので報告する。

B. 研究方法

原因未確定の先天性溶血性貧血疑い150症例を解析した。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を用いてバリエント解析を行った。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。バリエントは Integrative Genomics Viewer (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>) を用いて目視でも確認した。得られたバリエントは 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。バリエントはダイレクトシーケンシングでも確認した。

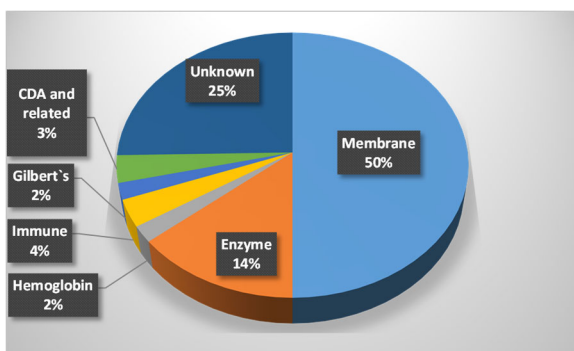
(倫理面への配慮)

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

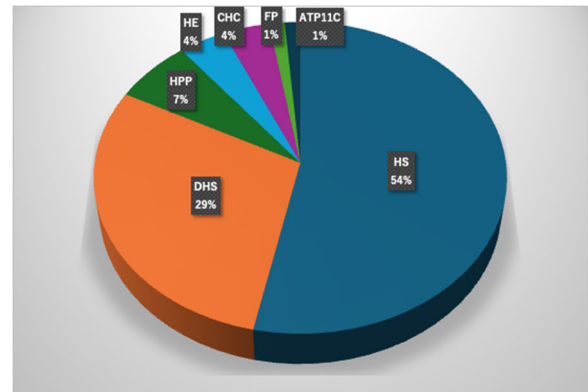
今回パネル遺伝子検査を実施した150症例について、最終診断結果をまとめたところ、赤血球膜異常症50%、赤血球酵素異常症14%、ヘモグロビン異常症が2%であった。赤血球表面結合IgG分子数増加で診断されたDAT陰性AIHAが4%、先天性赤血球形成異常性貧血(CDA)が3%、Gilbert's症候群が2%、診断未確定例が25%であった。

図1 同定した病原性バリエントの内訳 (n=150)



Membrane : 赤血球膜異常症、Enzyme : 赤血球酵素異常症、Hemoglobin : ヘモグロビン異常症、Immune : 直接抗グロブリン試験陰性AIHA、Gilbert's : Gilbert症候群
CDA and related : 先天性赤血球形成異常性貧血及び GATA1遺伝子変異による先天性溶血性貧血、Unknown : 原因未確定例

図2 赤血球膜異常症の診断結果 (n=75)



HS : 遺伝性球状赤血球症
DHS : 脱水型遺伝性有口赤血球症
HPP : 遺伝性熱変形赤血球症
HE : 遺伝性楕円赤血球症
CHC : クリオハイドロサイトーシス
FP : 家族性偽高カリウム血症
ATP11C : フリッパーゼ異常症

赤血球膜異常症と診断した75症例に関して、最も高頻度な病型は従来の調査と同様に遺伝性球状赤血球症 (HS) であった。一方、2014年に病因遺伝子が同定されて以来、遺伝子検査による確定診断が可能になった脱水型遺伝性有口赤血球症 (DHS) に関しては、今回の調査で22症例、膜異常症全体の29%に達していた。また、 α スペクトリン遺伝子 (*SPTA1*) の複合ヘテロ接合体である遺伝性熱変形赤血球症 (Hereditary pyropoikilocytosis; HPP) は破碎赤血球、奇形赤血球と称される特徴的な赤血球形態を呈し、重症例では赤血球輸血依存性の慢性溶血性貧血になるが、この病型も遺伝子検査結果と赤血球像・赤血球EMA結合能の低下などの検査所見によって確定診断が可能になっている。赤血球バンド3をコードする*SLC4A1*の変異はHSの他、低温保存により上清中カリウム濃度上昇を来すクリオハイドロサイトーシス (CHC) の病因となることが知られており、今回の調査でも同定された。また、欧米で赤血球輸血後の高カリウム血症の原因となるため、献血後のスクリーニング検査の必要性が議論されている家族性偽高カリウム血症 (Familial pseudohyperkalemia; FP) 症例も今回の調査により日本人溶血性貧血症例に確認された (表1)。

表1 遺伝性有口赤血球症の病因遺伝子と臨床的特徴

OMIM表記 / #	脱水型遺伝性有口赤血球症		家族性偽高カリウム血症	クリオハイドロサイトーシス	水分過剰型遺伝性有口赤血球症
	DHS1	DHS2	PSHK2	CHC	OHSt
	194380	616689	609153	185020	185000
溶血の程度	軽症~中等症		なし	中等症	中等症~重症
病因遺伝子	<i>PIEZO1</i>	<i>KCNK4</i>	<i>ABCB8</i>	<i>SLC4A1</i>	<i>RHAG</i>
赤血球形態	Stomatocyte/Target cells/Echinocyte		Stomatocyte/Target cells	Stomatocyte	Stomatocyte
MCV (fL)	基準値~軽度増大		基準値~軽度増大	基準値~軽度増大	増大
MCHC(g/dL)	基準値~軽度増加		基準値~軽度増加	基準値~軽度増加	低下
浸透圧抵抗	増加(低浸透圧でも溶血しない)		軽度増加	正常	低下
EMA結合能	基準値~軽度増加		基準値	基準値	増大?
検体溶血	なし		あり(室温)	あり(4℃)	なし
脾摘の効果	禁忌	無効	適応なし	有効だが血栓症合併	あり

D. 考察

平成11年度厚生省特定疾患治療研究事業報告書によれば、先天性溶血性貧血の病型別割合は、HS71%、遺伝性橢円赤血球症 (HE) 2.7%、赤血球酵素異常症5.9%、サラセミア3.5%、不安定ヘモグロビン症が0.8%、病型未確定が16.1%であった。現在、遺伝性有口赤血球症 (口唇赤血球症) (hereditary stomatocytosis ; HST) には4病型、5病因遺伝子が同定され、それぞれの臨床的特徴が明らかになっている。令和3年度報告書に記したように、DHS特にDHS1は赤血球輸血を受けていなくても20歳代以降へモクロマトーシスを発症すること、脾臓摘出により重篤な静脈血栓症を併発することが明らかになっている。

今回の調査では、先天性溶血性貧血との鑑別が困難なCDA症例が遺伝学的検査により診断できた。従来日本人CDAはI型 (*CDANI*変異例) とIV型 (*KLF1*変異例) が知られており、南ヨーロッパで診断されるII型 (*SEC23B*) は一例も診断されていない。今回、*C15ORF41*例が初めて診断されたが、大球性貧血、ペルテス病の合併等、*CDANI*変異によるCDAと臨床像が酷似していた。

赤血球形態で有口赤血球を認めた症例には溶血性貧血関連遺伝子に病的バリエーションを確認できず、赤血球表面IgG分子数測定でDAT (直接抗グロブリン試験) 陰性AIHAと診断し得た症例を経験した。

前述の通り、遺伝子検査で未報告のバリエーションが検出された際にはHA-testsを実施しているが、赤血球酵素異常症では従来から実施していた赤血球酵素活性を測定することが確定診断に必要である。今回、PK (ピルビン酸キナーゼ) 8例、G6PD (グルコース-6-リン酸脱水素酵素) 6例、GPI (グルコースリン酸イソメラーゼ) 5例、PGK (ホスホグリセリン酸キナーゼ)、GCLC (γ -グルタミルシステイン合成酵素) 1例などの赤血球酵素異常症が診断できた。PK異常症に関しては欧米で既に赤血球PK活性を高めるアロステリックエフェクターが臨床応用されており、投与前検査の遺伝子検査が効果予測のために必須となっている。

今後、先天性溶血性貧血の診断システムを日本国内で維持すること、重症例に対して造血細胞移植や新規治療薬などの治療を実施していくための公的支援として先天性溶血性貧血の各病型を難病指定することが必要と考えられた。

E. 結論

我々は未報告のバリエーションを同定した場合、上記の溶血性貧血関連特殊検査で病原性バリエーションであることを確認し、必要に応じて家族解析も実施している。治療方針の決定、適切な遺伝カウンセリングを実施するためには、遺伝子検査と共に患者赤血球を用いた総合的検査態勢の構築が重要と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imashuku E, 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.
- 2) Tamura T, Yamamoto KS, 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.
- 3) Tamura T, Yamamoto KS, Okamoto N, Yagasaki H, Morioka I, Kanno H, Minakuchi Y, Toyoda A, Yamamoto T. Long-read sequence analysis for clustered genomic copy number aberrations revealed architectures of intricately intertwined rearrangements. **Am J Med Genet A**. 2023 Jan;191(1):112-119. doi: 10.1002/ajmg.a.62997. PMID: 36282026.
- 4) Tamura T, Yamamoto Shimojima 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) Nakahara E, Yamamoto KS, 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.
- 6) Nagahama J, Nishikawa T, Nakamura T, Nakagawa S, Kodama Y, Terazono H, Wakamatsu M, Muramatsu H, Yamashiro Y, Kanno H, Okamoto Y. Severe β -thalassemia (Hb Zunyi) mimicking congenital dyserythropoietic anemia. **Pediatr Blood Cancer.** 2023 Dec;70(12):e30706. doi: 10.1002/pbc.30706. PMID: 37794572.
- 7) Ekuni S, Hirayama K, Nagasaka M, Osumi K, Kondo H, Nakahara E, Shimojima Yamamoto K, Kanno H, Katayama Y. Severe hemolytic anemia and metabolic acidosis at birth with glutathione synthetase deficiency and progressive neurological symptoms on follow-up. **Am J Case Rep.** 2023 Apr 13;24:e938396. doi: 10.12659/AJCR.938396. PMID: 37050856.
- 8) Shimojima Yamamoto K, Tamura T, Okamoto N, Nishi E, Noguchi A, Takahashi I, Sawaishi Y, Shimizu M, Kanno H, Minakuchi Y, Toyoda A, Yamamoto T. Identification of small-sized intrachromosomal segments at the ends of INV-DUP-DEL patterns. **J Hum Genet.** 2023 Nov;68(11):751-757. doi: 10.1038/s10038-023-01181-x. PMID: 37423943.
- 9) 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.
- 10) Nato Y, Kageyama Y, Suzuki K, Shimojima Yamamoto K, Kanno H, Miyashita H. A Novel SPTA1 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.
- 11) 槍澤大樹, 小倉浩美, 山本俊至, 菅野仁. 先天性溶血性貧血における転写因子GATA1の標的化機構の解明. **東京女子医科大学総合医科学研究紀要** 2023;42:112-113.
- 12) 長内聡子, 菅野仁. 【血液症候群 (第3版) - その他の血液疾患を含めて -】赤血球の異常 一次性赤血球増加症 ジホスホグリセリン酸ムターゼ異常症. **日本臨床 別冊血液症候群 I** 2023:546-548.
- 13) 菅野仁. 【血液症候群 (第3版) - その他の血液疾患を含めて -】赤血球の異常 貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血 赤血球特異的転写因子異常による溶血性貧血 KLF1異常症. **日本臨床 別冊血液症候群 I** 2023:346-347.
- 14) 菅野仁. 【血液症候群 (第3版) - その他の血液疾患を含めて -】赤血球の異常 貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血 赤血球特異的転写因子異常による溶血性貧血 GATA1異常症. **日本臨床 別冊血液症候群 I** 2023:344-345.
- 15) 小倉浩美, 菅野仁. 【血液症候群 (第3版) - その他の血液疾患を含めて -】赤血球の異常 貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血 赤血球酵素異常による溶血性貧血 ヌクレオチド代謝系 アデニル酸キナーゼ異常症. **日本臨床 別冊血液症候群 I** 2023:306-309.
- 16) 菅野仁. 【血液症候群 (第3版) - その他の血液疾患を含めて -】赤血球の異常 貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血 赤血球酵素異常による溶血性貧血 Embden-Meyerhof回路 アルドラーゼ異常症. **日本臨床 別冊血液症候群 I** 2023:283-284.
- 17) 小倉浩美, 菅野仁. 【血液症候群 (第3版) - その他の血液疾患を含めて -】赤血球の異常 貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血 赤血球酵素異常による溶血性貧血 Embden-Meyerhof回路 ヘキソキナーゼ異常症. **日本臨床 別冊血液症候群 I** 2023:279-282.
- 18) 菅野仁. 【血液症候群 (第3版) - その他の血液疾患を含めて -】赤血球の異常 貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血 赤血球酵素異常による溶血性貧血 Embden-Meyerhof回路 三炭糖リン酸イソメラーゼ異常症. **日本臨床 別冊血液症候群 I** 2023:277-278.
- 19) 伊藤悦朗, 小島勢二, 大賀正一, 菅野仁, 小原明, 矢部普正, 小林明恵, 神尾卓哉, 照井君典, 土岐力, 村松秀城. Diamond-Blackfan貧血. **遺**

伝性骨髄不全症診療ガイドライン2023. 日本小児血液・がん学会編, 診断と治療社(東京), 2023, p4-15.

20) 伊藤悦朗, 小島勢二, 大賀正一, 菅野仁, 小原明, 矢部普正, 小林明恵, 神尾卓哉, 照井君典, 土岐力, 村松秀城. Diamond-Blackfan貧血. **遺伝性骨髄不全症診療ガイドライン2023**. 日本小児血液・がん学会編, 診断と治療社(東京), 2023, p4-15.

21) 槍澤大樹, 菅野仁, 大賀正一. 先天性溶血性貧血. **遺伝性骨髄不全症診療ガイドライン2023**. 日本小児血液・がん学会編, 診断と治療社(東京), 2023, p76-88.

2. 学会発表

1) 伊東貴美, 諸田直哉, 齋藤慧, 八田俊介, 勝岡優奈, 阿部好文, 小山涼子, 和泉透, 菅野仁. 脱水型遺伝性有口赤血球症 (dehydrated hereditary stomatocytosis: DHSt) の一症例. **第24回日本検査血液学会学術集会** (2023年7月29日 - 30日, 名古屋). 日本検査血液学会雑誌 2023:24巻学術集会:S183.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし