

学位論文

Diagnostic challenge of Diamond-Blackfan anemia
in mothers and children by whole-exome
sequencing.

(全エクソーム解析を用いた
ダイヤモンド・ブラックファン貧血母子例の診断)

氏名 市村 卓也

所属 山口大学大学院医学系研究科医学専攻
小児科学講座

令和 3 年 10 月

目次

1.	要旨	3
2.	研究の背景	3
3.	対象と方法	4
	1) 患者	
	2) 赤血球酵素活性測定	
	3) WES と生殖細胞変異の検出	
4.	結果	5
	1) 臨床所見と治療経過	
	2) 赤血球酵素活性スクリーニングと遺伝子診断	
5.	考察	6
6.	結語	8
7.	参考文献	10

1. 要旨

ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (Diamond-Blackfan anemia : DBA) は、リボソーム蛋白異常によって生じる赤芽球癆で、新生児期の貧血および一部で身体奇形を合併する。臨床的特徴が多様で、原因となるリボソーム蛋白遺伝子も多数存在するため、新生児期に DBA と確定診断し、適切な治療を行うことが困難である。本研究では、全エクソーム解析 (whole-exome sequencing; WES) を用いて最終診断した 3 組の母子例について報告する。貧血の重症度や治療反応性は各母子間で異なり、低身長、翼状頸、母指球形成不全などの特徴的な身体奇形を認めた症例は、母 1 名のみだった。この母は *RPL11* (exon 2, c.58_59del) のフレームシフト変異があり、子は一過性の新生児貧血を認めたがリボソーム蛋白遺伝子の変異はなかった。他の 2 組の母子では、それぞれ *RPS19* (exon 4, c.185G>A) のミスセンス変異と *RPS7* のスプライシング変異 (exon 3, c.76-1G>T) を同定した。それぞれの変異と別に、貧血を来し得る遺伝子変異はなかった。本研究は、WES がヒトリボソーム病の迅速かつ正確な診断を得るために有用であることを示唆した。

2. 研究の背景

ダイヤモンド・ブラックファン貧血 (Diamond-Blackfan anemia; DBA) は乳児期に発症する先天性赤芽球癆であり [1, 2]、リボソーム蛋白質遺伝子のハプロ不全によって発症する。骨髄所見で赤芽球低形成を認め、約半数の症例で低身長や頭部・顔面、上肢、心臓、腎・泌尿器系の身体奇形を合併する。また、急性骨髄性白血病や骨肉腫などの悪性腫瘍を合併することがある [3]。DBA の原因遺伝子として、リボソーム蛋白の大サブユニット (ribosomal protein large subunit; RPL) を構成する *RPL5*, *RPL11*, *RPL27*, *RPL35A*, 小サブユニット (ribosomal protein small subunit; RPS) を構成する *RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24*, *RPS26*, *RPS27A* といった遺伝子変異が明らかになっている [4-13]。また、これらの遺伝子を含む大欠失を認めた症例も報告されている [14]。遺伝子変異によって、リボソーム RNA 前駆体から成熟リボソーム RNA へのプロセッシングや、大サブユニット・小サブユニットの構造および mRNA との複合体であるポリソームの構造に関与する機能が欠損し、赤血球低形成が生じると考えられて

いる。また、赤芽球減少症を発症した一部の患者には、GATA1 遺伝子の変異または発現低下を認めたという報告もある [15, 16]。また、DBA の主要な発症機序として、マウス二重微小染色体 2 (ヒトでは HDM2) の抑制による p53 の活性化が病因であると考えられている [17, 18]。一部の患者で認める身体奇形の発症機序は不明であり、リボソームの蛋白質合成以外の機能によって説明される可能性がある。遺伝子型と表現型との関連について、DBA レジストリに登録された情報はあがるが、DBA 患者の出産や浸透率についてはわかっていない。本研究では、DBA が疑われる 3 組の母子について全エクソーム解析 (whole-exome sequencing; WES) を用いて診断した。6 名中 5 名は特徴的な身体奇形を認めなかった。6 名中 5 名で *RPL11*, *RPS7*, *RPS19* のヘテロ接合性変異を認め、一過性新生児貧血を認めた乳児は変異を認めなかった。

3. 対象と方法

3-1) 患者

乳児期早期に赤芽球癆を発症し治療を受けた日本人の母親 3 名と、その子 3 名を対象とした。子 3 名はいずれも新生児期に貧血を認めた。母親にインフォームド・コンセントを得た後に WES を行った。本研究は、九州大学病院の倫理審査委員会 (441-00, 488-00 九州大学) の承認を得て行った。

3-2) 赤血球酵素活性測定

赤血球酵素活性および解糖中間体は、国際血液学標準化委員会 (International Committee for Standardization in Haematology) によって標準化された方法で測定した [19]。

3-3) WES と生殖細胞変異の検出

末梢血からの DNA 抽出には GenElute Blood Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich 社, ミズーリ州セントルイス, アメリカ合衆国) を用いた。エクソンシーケンスに関しては、SureSelect Human All Exon V5 Kit (Agilent Technologies 社, カリフォルニア州サンタクララ, アメリカ合衆国) を用いて、ゲノム DNA のエクソン領域のみを濃縮した。その後、100 bp ペアエンドリードによる HiSeq2000 プラットフォーム (Illumina 社, カリフォルニア州サンディエゴ, アメリカ合衆国) を使

用し大規模並列処理シーケンス (massively parallel sequencing) を行った。生殖細胞変異の検出に、以前別の遺伝子変異を検出した際に用いた解析手順 [21] を一部改訂したものをを用いた。データ解析プログラムには Burrows-Wheeler Aligner を用いて、得られた配列データとリファレンスゲノム配列 (hg19) を照合した。PCR 由来の重複配列を除去した後、アレル頻度が 0.25 を超える一塩基多型およびアレル頻度が 0.2 を超える挿入・欠失を病的変異として検出した。平均カバレッジ (得られた配列データの 1 塩基につきリファレンス配列と照合した回数の平均値) は $109\times(87\times-123\times)$ で、全体の 96% を超える塩基がリファレンス配列と 10 回以上照合した。

4. 結果

4-1) 臨床所見と治療経過

3 家族の家系図を図 1 に示す。3 家族とも子は 1 名で、母子 6 名全員が乳児期初期に貧血を発症した。貧血、身体奇形、悪性腫瘍の家族歴はなく、血族婚もなかった。6 名の臨床症状と治療反応を表 1 に示す。Mother-1 は、赤芽球減少症に加えて低身長、翼状頸、母指球形形成不全、舌の色素沈着を認めた。2 歳時に DBA と臨床的に診断され、プレドニゾロン (prednisolone; PSL) 経口投与を継続していた。以降、シクロスポリン-A (cyclosporine-A; CSA) とダナゾールを追加することで貧血が改善し、PSL の減量が可能となったが離脱することはできなかった。服薬遵守が不十分であったため、成人になるまで時折赤血球輸血が必要であった。妊娠を契機に CSA とダナゾールを中止し、PSL 療法と定期的な赤血球輸血および除鉄療法によって貧血の経過は安定していた。妊娠経過良好であり、身体奇形のない健康な満期産児 (Child-1) を出産した。Child-1 は生後 1 か月時に貧血と網状赤血球減少症を認めたが、その後ヘモグロビン濃度は生後 6 か月時には標準範囲まで上昇した。Family-2, Family-3 については、いずれも身体奇形は認めなかったが難治性貧血を認めた (表 1)。Mother-2 は輸血非依存状態ながら PSL 依存性の貧血があり、一度 PSL を中止したが妊娠後から貧血の進行を抑制するために PSL を再開した。妊娠経過良好で、身体奇形のない満期産児 (Child-2) を出産した。Child-2 は新生児期に貧血を発症し、PSL 療法に反応せず輸血依存状態となった。Mother-3 は乳児期初期に貧血を認め、PSL 療法によって貧血の進行はなく最終的に PSL を中止できた。妊娠後も無治療で貧血の進行な

く、満期産児 (Child-3) を出産した。Child-3 は新生児期に貧血を発症し、PSL 療法によって貧血は改善し輸血非依存状態であるが、PSL 依存状態であった。

4-2) 赤血球酵素活性スクリーニングと遺伝子診断

赤血球アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase; ADA) 活性と還元型グルタチオン (glutathione; GSH) 値が DBA 患者に特異的な所見を示したという報告がある [19]。しかし、Family-1, Family-2 は赤血球輸血を複数回施行していたため、正確な赤血球酵素活性を測定できなかった。赤血球輸血歴のない Family-3 のみ赤血球 ADA 活性および還元型 GSH が高値であり、DBA と診断できた (表 1)。また、Mother-2 から採取した DNA を用いた Sanger 法によるシーケンスでは *RPS19* の変異を確認できず、Family-3 については *RPL14*, *RPL17*, *RPL35A*, *RPS10*, *RPS14*, *RPS24* についても解析したが変異は確認できなかった。しかし、WES によって Mother-1 に *RPL11* (exon 2, c.58_59del, p.20_20del [frameshift]) のヘテロ接合性変異を、Child-1 には同変異がなかったことを同定できた。また、Family-2 では *RPS19* (exon 4, c.G185A:p.R62Q [missense]) のヘテロ接合性変異を、Family-3 では *RPS7* (exon 3, c.76-1G>T [splicing error]) のヘテロ接合性変異を同定した。そして Child-3 以外の症例について、Sanger 法によるシーケンスで各変異を確認した。また、その他の遺伝性骨髄不全症候群の原因となり得る変異は認めなかった。

5. 考察

本研究では、臨床症状や治療反応性がさまざまであった母子に対して、WES を用いることで一度に DBA の診断を行うことができた。また、身体奇形の無い 2 名の母 (Mother-2, 3) から出生した子 (Child-2, 3) は同じ変異を有していた。一方、身体奇形のある母 (Mother-1) から出生した子 (Child-1) は一過性貧血を認めたものの変異はなかった。赤血球酵素活性スクリーニング検査については、繰り返し赤血球輸血を施行している患者ではしばしば偽陰性となるため [22]、今回は Family-3 の母子にのみ有用であった。WES は、DBA の診断に非常に有用な方法であった。

新生児貧血は周産期感染症、遺伝性骨髄不全症候群およびその他の母体または胎盤の状態に関連して発症する。また、新生児期は髄外造血であるため、無効

造血と新生児期の生理的溶血を鑑別することが困難であり、新生児期初期に DBA を診断することは困難である [23]。乳児期の代表的な赤芽球癆として一過性小児赤芽球癆 (transient erythroblastopenia of childhood; TEC) があり、DBA との鑑別が必要となる [24]。TEC は診断確定のための検査はなく除外診断となり、発症後数か月以内に自然寛解する。DBA 患者の赤血球 ADA 活性値は TEC 患者より高値 [22] であることから、赤血球 ADA 活性の測定は DBA との鑑別において有用な指標となり得る。一方、網状赤血球の酵素活性値は成熟赤血球と比較して生理学的に高値であり、赤血球輸血を施行した新生児には適用できない。Child-1 は生後 1 か月で一過性貧血を認めたが、Mother-1 で認めた *RPL11* 変異はなかった。その後、Child-1 の貧血は自然軽快し正常な成長と発達が確認された。この一連の経過において、多様な遺伝子型-表現型関係を示す DBA と TEC との鑑別に WES が有用であった。

WES を用いた診断方法では、その特異性と実現可能性が主な懸念事項である。DBA 患者の約 60% がリボゾーム蛋白遺伝子のヘテロ接合性変異を有している。最近の研究では、DBA の主な原因は *RPS19* 遺伝子の変異であり、人種差なく 20~25% を占めるということがわかった [25]。しかし、他のリボゾーム蛋白遺伝子変異については集団間で発生率が異なり、ほとんどの DBA 症例は孤発例で、*de novo* リボゾーム蛋白遺伝子変異を認めている [2, 13]。原因となるリボゾーム蛋白遺伝子の数が増加していくことを考慮すると、80 のリボゾーム蛋白遺伝子を全て調べることは、典型的な型を持たない DBA 患者の診断に有用となり得る [13, 26]。また、リボゾーム以外の遺伝子である *GATA1* 遺伝子の変異を有する患者で、DBA の表現型を示した症例が報告されている [15]。リボゾーム蛋白遺伝子に *GATA1* 遺伝子を含む検査セットは、WES よりも DBA の診断に有用な可能性がある。WES を実施するための費用は低くなっているが、現時点では費用対効果の問題は無視できない。DBA 患者の 30~40% は、既知の原因遺伝子は検出されない。他の遺伝性骨髄不全症候群の除外は、正確な診断のために必須である [27]。骨髄不全症候群の原因となる新規遺伝子の数は増加傾向である。最も一般的な先天性貧血である Fanconi 貧血は、多数の関連分子によって Fanconi 遺伝子という複合体を形成する。したがって、ターゲットシーケンスのパネルは急速に改訂され続けている。Family-2 の *RPS19* 変異は、従来のスクリーニング検査では同定できなかったが、WES によって同定することができた。Sanger 法によるシーケンスを用いたリボゾーム蛋白遺伝子の研究では偽遺伝子

がしばしば問題となる。本研究の解析の精度は、DBA などのリボソモパシーの遺伝子診断に十分であることがわかった。本研究の成果から、WES は DBA の診断を決定するための強力な手段であることが明らかになった。WES を用いた DBA 診断の限界の 1 つに、逆位や大きな欠失といった構造異常を見落としてしまう可能性がある。なお、大きな欠失については日本のコホートではほとんど報告されていない。

DBA 患者のステロイド治療に対する反応を評価するには数週間が必要である。患者の 60%以上が PSL および赤血球輸血に依存するようになる [29]。乳児期初期の PSL 長期投与はニューモシスチス肺炎の致命的な合併症を引き起こす。DBA の臨床診断のみで高用量のステロイド療法を長期継続する可能性がある。また、ステロイド治療が長期化することでステロイド累積投与量が増加するだけでなく、重症感染症のリスクや乳児期初期の生ワクチン接種の必要性についても懸念される。免疫不全を伴う他の骨髄不全症が除外され、DBA と正確に診断できるのであれば、麻疹・水痘・BCG などの免疫を獲得するための生ワクチン接種を可能にするため、早期に一時的にステロイド療法から赤血球輸血と除鉄療法に切り替えることが可能となる。これらのワクチンは、高用量のステロイド療法が必要な乳児に致命的な感染症を引き起こす。骨髄不全症の乳児に対して最適な個別化医療を実現するために、早期の遺伝子診断が必要である。

6. 結語

本研究では、DBA の母親と、新生児期に貧血を認めた子の遺伝子診断に WES が有用であることが示唆される。今後、DBA 患者の家族に対して WES を用いた研究を進めることで、貧血や身体奇形の浸透率や母子の最適な治療管理の検討につながっていくことが期待される。

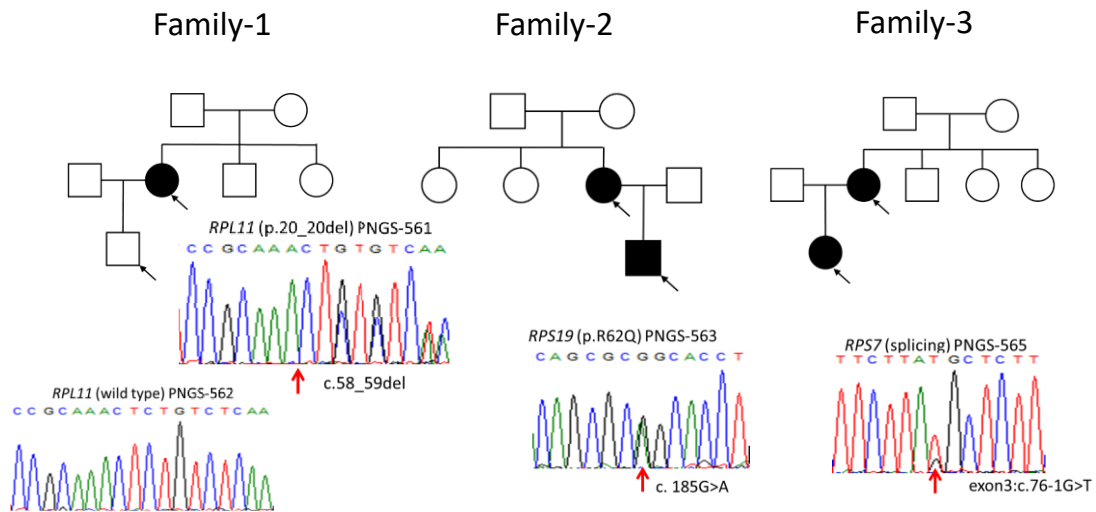


図 1. 3組の母子の家系図

母はそれぞれ乳児期早期に発症した貧血が遷延した状態で 1 人の子を出産した。WES で同定した各リボソーム蛋白遺伝子変異は、子 3 以外は Sanger 法によるシーケンスで確認した。

	母1	子1	母2	子2	母3	子3
年齢 (歳)	38	3	38	3	28	3
性別	女	男	女	男	女	女
身体的特徴						
低身長 ^a	あり	なし	あり	なし	あり	なし
奇形	あり	なし	なし	なし	なし	なし
貧血						
発症時期	乳児期早期	新生児期	乳児期早期	新生児期	乳児期早期	新生児期
治療反応	輸血依存	自然寛解	ステロイド依存	輸血依存	ステロイド離脱	ステロイド依存
ADA/GSH活性 ^b	nt	nt	nt	nt	2.51/85.0	1.64/93.6
遺伝子変異	<i>RPL11</i>	なし	<i>RPS19</i>	<i>RPS19</i>	<i>RPS7</i>	<i>RPS7</i>
	Exon 2, c.58_59del;p.20_20del		Exon 4, c.G185A;p.R62Q		Exon 3, c.76-1G>T	

表 1. 3組の母子の臨床症状, 治療経過および検査所見

a) 低身長の定義: 同年齢の日本人の身長^aの-2.5SD 未満を示した場合

b) 各検査の基準範囲: ADA 0.87-1.59 U/gHb, 還元型 GSH 65.9-88.5 mg/dl RBC

nt: 未検査

7. 参考文献

- [1] Lipton JM, Atsidaftos E, Zyskind I, Vlachos A. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: An update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:558–64.
- [2] Vlachos A, Ball S, Dahl N, Alter BP, Sheth S, Ramenghi U, et al. Diagnosing and treating Diamond Blackfan anaemia: results of an international clinical consensus conference. *Br J Haematol* 2008;142:859–76.
- [3] Vlachos A, Rosenberg PS, Atsidaftos E, Alter BP, Lipton JM. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood* 2012;119:3815-9.
- [4] Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 1999;21:169-75.
- [5] Gazda HT, Grabowska A, Merida-Long LB, Latawiec E, Schneider HE, Lipton JM, et al. Ribosomal protein S24 gene is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet* 2006;79:1110-8.
- [6] Cmejla R, Cmejlova J, Handrkova H, Petrak J, Pospisilova D. Ribosomal protein S17 gene (*RPS17*) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 2007; 28:1178–82.
- [7] Farrar JE, Nater M, Caywood E, McDevitt MA, Kowalski J, Takemoto CM, et al. Abnormalities of the large ribosomal subunit protein, *RPL35a*, in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2008;112:1582–92.
- [8] Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choemsel V, O'Donohue MF, Schneider H, et al. Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet* 2008;83:769-80.
- [9] Doherty L, Sheen MR, Vlachos A, Choemsel V, O'Donohue MF, Clinton C, et al. Ribosomal protein genes *RPS10* and *RPS26* are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet* 2010; 86:222-8.
- [10] Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, et al. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 2010; 95:1293-9.

- [11] Gazda HT, Preti M, Sheen MR, O'Donohue MF, Vlachos A, Davies SM, et al. Frameshift mutation in p53 regulator *RPL26* is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in Diamond-Blackfan anemia. *Hum Mutat* 2012;33:1037-44.
- [12] Gerrard G, Valgañón M, Foong HE, Kasperaviciute D, Iskander D, Game L, et al. Target enrichment and high throughput sequencing of 80 ribosomal protein genes to identify mutations associated with Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 2013; 162:530-6.
- [13] Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Okuno Y, et al. Loss of function mutations in *RPL27* and *RPS27* identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 2015;168:854–64.
- [14] Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, et al. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012;119: 2376–84.
- [15] Sankaran VG, Ghazvinian R, Do R, Thiru P, Vergilio JA, Beggs AH, et al. Exome sequencing identifies *GATA1* mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J Clin Invest* 2012;122:2439–43.
- [16] Bibikova E, Youn MY, Danilova N, Ono-Uruga Y, Konto-Ghiorghi Y, Ochoa R, et al. TNF-mediated inflammation represses *GATA1* and activates p38 MAP kinase in *RPS19*-deficient hematopoietic progenitors. *Blood* 2014;124:3791-8.
- [17] Dutt S, Narla A, Lin K, Mullally A, Abayasekara N, Megerdichian C, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* 2011;117:2567-76.
- [18] Torihara H, Uechi T, Chakraborty A, Shinya M, Sakai N, Kenmochi N. Erythropoiesis failure due to *RPS19* deficiency is independent of an activated Tp53 response in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 2011; 152:648-54.
- [19] Minakami S, Suzuki C, Saito T, Yoshikawa H. Studies on erythrocyte glycolysis. I. Determination of the glycolytic intermediates in human erythrocytes. *J Biochem* 1965; 58:543-50.
- [20] Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*

- 2011;478(7367):64–9.
- [21] Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, et al. *ACTN1* mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet* 2013; 92:431-8.
- [22] Fargo JH, Kratz CP, Giri N, Savage SA, Wong C, Backer K, et al. Erythrocyte adenosine deaminase: diagnostic value for Diamond-Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 2013;160:547–54.
- [23] Iolascon A1, Heimpel H, Wahlin A, Tamary H. Congenital dyserythropoietic anemias: molecular insights and diagnostic approach. *Blood* 2013;122:2162-6.
- [24] van den Akker M1, Dror Y, Odame I. Transient erythroblastopenia of childhood is an underdiagnosed and self-limiting disease. *Acta Paediatr* 2014;103:e288-94.
- [25] Ohga S, Mugishima H, Ohara A, Kojima S, Fujisawa K, Yagi K, et al. Diamond-Blackfan anemia in Japan: clinical outcomes of prednisolone therapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2004;79:22-3.
- [26] Huh WW, Gill J, Sheth S, Buchanan GR. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with Diamond-Blackfan anemia receiving high-dose corticosteroids. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:410-2.
- [27] Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K. Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Int J Hematol* 2010;92:413–8.
- [28] Mirabello L, Macari ER, Jessop L, Ellis SR, Myers T, Giri N, et al. Whole-exome sequencing and functional studies identify *RPS29* as a novel gene mutated in multicase Diamond-Blackfan anemia families. *Blood* 2014;124:24–32.
- [29] Giri G, Kang E, Tisdale JF, Follman D, Rivera M, Schwartz GN, et al. Clinical and laboratory evidence for a trilineage haematopoietic defect in patients with refractory Diamond–Blackfan anaemia. *Br J Haematol* 2000;108:167–75.
- [30] Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 2010;115:3196–205.

この学位論文は, Ichimura T, Yoshida K, Okuno Y, Yujiri T, Nagai K, Nishi M, Shiraishi Y, Ueno H, Toki T, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Hara T, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Ito E, Ogawa S, Ohga S: Diagnostic challenge of Diamond-Blackfan anemia in mothers and children by whole-exome sequencing. *Int J Hematol.* 105(4):515-520 (Apr.2017) に原著論文として発表したものから, データを引用して作成しました.