

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16887

研究課題名（和文）遺伝性骨髄不全症候群の新規原因遺伝子探求を目的とした網羅的遺伝子解析

研究課題名（英文）Comprehensive genetic analysis of unclassified Inherited bone marrow failure syndrome

研究代表者

濱田 太立（Hamada, Motoharu）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：60845171

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝性骨髄不全症候群（IBMFS）は予後不良な遺伝性疾患であるが、半数以上は原因遺伝子が不明であり遺伝的な診断を得ることができないことが課題である。原因遺伝子が不明なIBMFSを対象として、原因遺伝子を特定して遺伝子診断を得ることと、新たな原因遺伝子を特定することを目的として、患者本人およびその両親の網羅的な遺伝子解析（全エクソン解析）を実施した。3年間で37家系を解析し、11例（28%）で原因遺伝子を同定することができた。そのうち1例は、IBMFSの新たな病型のAMeD症候群と診断された。本研究により、IBMFSの遺伝子解析の重要性が示唆されるとともに、疾患の病態理解が進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、疾患の発端者（患者）のみでなく両親の遺伝子解析を行うことで、IBMFSの遺伝子診断効率が向上することが示された。遺伝子パネル検査や発端者の網羅的遺伝子解析でも原因遺伝子が特定されない場合は、両親検体の解析を積極的に検討することが重要である。これにより、正確な遺伝子診断に基づく適切な医療的介入が可能となる。また、遺伝性骨髄不全症候群の新たな病型であるAMeD症候群の発見により、IBMFSの原因となる新たな病態が解明された。

研究成果の概要（英文）：Inherited bone marrow failure syndrome (IBMFS) is an inherited disorder with a poor prognosis, but in over half of cases the causative gene is unknown. In this study of IBMFS with unknown causative genes, a comprehensive genetic analysis (whole exon analysis) of patients and their parents was performed to identify the causative gene and obtain a genetic diagnosis, as well as to identify new causative genes. Thirty-seven families were analyzed, and in 11 cases (28%) the causative gene could be identified. One of these cases was diagnosed with AMeD syndrome, a new form of IBMFS. This study suggests the importance of genetic analysis of IBMFS and contributes to understanding the pathogenesis of the disease.

研究分野：遺伝性骨髄不全症候群

キーワード：遺伝性骨髄不全症候群 全エクソン解析 AMeD症候群

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性骨髄不全症候群 (**inherited bone marrow failure syndrome; IBMFS**) は、先天的な遺伝子異常が原因となり、貧血、血小板減少、顆粒球減少などの造血不全を合併する症候群の総称で、国内での年間発症数が **100** 例以下の希少疾患である。**IBMFS** は、重要臓器の出血や重症感染症による死亡リスクが高いことに加えて、全身臓器の合併症や若年での発がん素因を有するため予後不良である。同種造血幹細胞移植により造血不全は治療し得る一方で、造血不全以外の全身の合併症リスクやがん素因を有するため、生涯にわたる医療的介入が必要である。

**IBMFS** の診断はおもに臨床所見に基づいて行われる。ファンconi貧血に対する染色体脆弱性試験や、先天性角化不全症に対するテロメア長解析が診断に有用な一方で、半数以上の **IBMFS** では診断に有用な臨床検査がないことが問題である。これまでに、**100** 以上の遺伝子が **IBMFS** の原因遺伝子として報告されており、遺伝子解析により原因遺伝子の病的変異を特定することは **IBMFS** において極めて重要である。昨今の遺伝子解析技術の進歩に伴い、**IBMFS** の診断において次世代シーケンサー (**NGS**) を用いた網羅的遺伝子解析の有用性が国内外から報告されている一方で、既知の原因遺伝子の解析を行っても、半数以上の症例では原因遺伝子が不明であり、解決すべき課題である。(Muramatsu H, Okuno Y, Takahashi Y, Genetic in medicine 2017)

## 2. 研究の目的

本研究では、原因遺伝子が不明の **IBMFS** を対象として、発端者とその生物学的父母を合わせたトリオ検体を用いて全エクソン解析を実施し、主に **De novo** 変異の特定により未診断の **IBMFS** 症例の遺伝子診断を得ることと、**IBMFS** の新規の原因遺伝子同定することを目的とする。本研究により、**IBMFS** の遺伝子診断効率の改善と、新たな原因遺伝子の同定により **IBMFS** の病態理解が進むことに貢献することが期待できる。

## 3. 研究の方法

### 患者検体、臨床情報、患者家族検体の収集

名古屋大学医学部小児科において、**IBMFS** の遺伝子パネル解析でも原因遺伝子を特定できなかった **IBMFS** 症例のうち、臨床的に **IBMFS** と診断しうる症例を抽出する。患者およびその父母の臨床検体 (血液、爪、口腔粘膜、皮膚など) が入手できる症例を抽出する。症例の収集は、既に保管してある検体に加えて、前向きな検体収集も行う。

### 次世代シーケンサーによる全エクソン解析

得られた臨床検体から **gDNA** を抽出する。**SureSelect XT Target Enrichment System Kit, SureSelect XT Clinical Research Exome** ベイト (**Agilent**) を用いて全エクソン解析のためのライブラリ調製を行う。ライブラリは **HiSeq2500 (Illumina)** によって、**1** 検体あたり **8GB** のシーケンスを行い塩基配列を決定する。

### 遺伝子変異の検出

決定された塩基配列のデータは、当研究室で構築されている実績のある解析パイプラインを用いて行う。**Burrows-Wheeler aligner** と **Novoalign (Novocraft)** を併用したアラインメント後に、**VarScan** を用いてバリエーションコールを行い、**ANNOVAR** を用いてアノテーションを行う。各バリエーションを **SNP** データベース (**in house SNP** データベース、**HGVD**、**ESP6500**、並びに **ExAC**) と照合して **common SNPs** を除去し、病的変異データベース (**HGMD**、**NCBI ClinVar**) と照合して、既報の病的変異を抽出する。アリル頻度とリファレンスサンプルに基づいて体細胞変異・**germline** 変異を区別する。**American College of Medical Genetics (ACMG)** のガイドラインに従いバリエーションを分類し、病的意義が確実であるもの (**class 1/2**) に基づいて遺伝子診断を検討する。各エクソンのリード数から染色体コピー数変化を検出する。

## 4. 研究成果

(1) 3年間で、原因遺伝子が不明の **IBMFS** 39家系 115検体の全エクソン解析を実施した。解析数のうちわけは、トリオ検体 37家系、デュオ検体 2家系であった。39例のうち 10例 (26%) で原因遺伝子を同定することができた。得られた遺伝子診断 (原因遺伝子) は、先天性赤芽球癆 (**RPL5**、**RPL19**、各 1例)、ファンconi貧血 (**FANCA**、1例)、先天性角化不全症 (**RTEL1**、1例)、家族性血小板異常症 (**RUNX1**、3例)、シュバッハマ ン・ダイヤモンド症候群 (**SBDS**、1例)、先天性奇形症候群 (**NOTCH1**、1例)、原発性免疫不全症 (**TNFRSF13B**、1例) であった。このうち 4例の病的バリエーションは **De novo** 変異であり、トリオ検体の解析によってはじめ

て診断可能であった。

筆者らの先行研究の結果と統合することにより、**IBMFS** に対する遺伝子解析による遺伝子診断効率を検討した。臨床的に **IBMFS** が疑われた **964** 例に対する遺伝子パネル解析では、**295** 例 (**30%**) の遺伝子診断が可能であった。遺伝子診断が得られなかった症例のうち、**208** 例に対して全エクソン解析を実施し、**32** 例 (**15%**) で遺伝子診断を得ることができた。(濱田太立、第**82**回日本血液学会学術集会、**2020**、一部内容更新)本研究においてトリオ検体の全エクソン解析を実施した**39**例(**12**例の発端者解析は先の**208**例に含まれる)のうち、**4**例(**10%**)では、**De novo**変異の特定により遺伝子診断が可能であった。これらの結果から、**IBMFS**に対する遺伝子診断率は、遺伝子パネル解析、全エクソン解析(発端者のみ)、全エクソン解析(トリオ解析)で、それぞれ**30%**、**40.5%**、**47.5%**と見積もることができた。本研究により、**IBMFS**の遺伝子診断におけるトリオ検体での全エクソン解析の有用性が示唆された。

(2)本研究により、**IBMFS**の新たな病型である**AMeD**症候群(**ADH5**、**ALDH2**二遺伝子疾患)の症例を**1**例診断し、新規原因遺伝子発見に寄与した。

(3)本研究で診断された家族性血小板異常症(**familial platelet disorder, FPD**)の症例を含めた**RUNX1**変異症例について、表現型(臨床像、血液象)および遺伝型との関連を詳細に検討し、論文発表した。これにより、**RUNX1**変異**FPD**における、血液細胞の形態学的異常の特徴が明らかになり、新生児期の血小板減少症患者における**RUNX1**の積極的な遺伝子解析の重要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miwata S, Narita A, Okuno Y, Suzuki K, Hamada M, Yoshida T, Imai M, Yamamori A, Wakamatsu M, Narita K, Kitazawa H, Ichikawa D, Taniguchi R, Kawashima N, Nishikawa E, Nishio N, Kojima S, Muramatsu H, Takahashi Y.	4. 巻 106
2. 論文標題 Clinical diagnostic value of telomere length measurement in inherited bone marrow failure syndromes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 2511,2515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2021.278334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村松 秀城
2. 発表標題 骨髄不全症領域における最近の進歩(Genetic diagnosis process for inherited bone marrow failure syndrome)
3. 学会等名 日本血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱田 太立
2. 発表標題 Diagnostic whole exome sequencing for 166 patients with inherited bone marrow failure syndrome
3. 学会等名 The 62nd ASH Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱田 太立
2. 発表標題 Diagnostic whole-exome sequencing for 166 patients with inherited bone marrow failure syndrome
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 濱田 太立	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 16
3. 書名 原発性免疫不全症候群	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------