

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月15日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591228

研究課題名（和文）先天性赤芽球癆の診断及び重症度判定のためのバイオマーカーの確立

研究課題名（英文） Development of the biomarker for the clinical diagnosis of Diamond-Blackfan Anemia

研究代表者 浜口 功 (HAMAGUCHI ISAO)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・部長

研究者番号：90348780

研究成果の概要（和文）：

先天性赤芽球癆(Diamond blackfan anemia (DBA))の原因遺伝子として RPS19 などのリボソームタンパク質が知られる。本研究課題では、リボソームタンパク質遺伝子の変異の種類と DBA 患者の身体への影響を解析するために、これまで希少報告であった DBA 遺伝子の片アレル欠失を迅速・簡便に検出することができる検出法を新規に開発し、DBA ゲノムバンクからの患者サンプルについて変異同定を試みた。その結果、遺伝子変異未知の DBA 様の症状を示す患者 31 例のうち 7 例で DBA の原因遺伝子の片アレル欠失を検出した。片アレル欠失 6 検体の遺伝的素因を同様の方法で調べたところ、DBA 患者両親には原因遺伝子の欠失は認められなかった。さらに、7 例全例において、成長発育不全等の身体異常が高率に発生していることを見だし、本試験法が DBA 患者の原因遺伝子のゲノムコピー数の解析（片アレル欠失の検出）に有用であるとともに、発育異常をきたすマーカーとなることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Some of Diamond-Blackfan anemia (DBA) patients possess mutations in genes coding for ribosomal proteins (RPs). To identify new mutations, we investigated large deletions in the Ribosomal Protein genes. We developed an easy method based on quantitative-PCR in which the threshold cycle correlates to gene copy number. Using this approach, we were able to diagnose 7 of 27 Japanese patients possessing mutations that were not detected by sequencing. All patients with a large deletion had a growth retardation phenotype. Our study data suggest that large deletions in RP genes comprise a sizable fraction of DBA patients in Japan. In addition, our novel approach may become a useful tool for screening gene copy numbers of known DBA genes and biomarker of severe phenotype.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：先天性赤芽球癆、バイオマーカー、リボソームタンパク質、アレル欠失

1. 研究開始当初の背景

先天性赤芽球癆は 1938 年に Diamond と Blackfan によって提唱された疾患で、赤血球系細胞が特異的に産生障害を示す。発症頻度は、出生 100 万人に対して 5、6 人と稀であり、疾患発症当初はステロイドが奏功する患者も認められるが、患者の 4 割が重症貧血に陥る。しかもこれらの患者の多くが輸血療法の副作用で肝機能障害となる。これまで多くの治療法が提唱されてきたが、輸血療法依存となった患者に対しての有効な治療法は骨髄移植以外にない。DBA は致死性の疾患ではないが、多くの患者が輸血療法依存となり、長期にわたり QOL が著しく低下する。1998 年に Dahl らにより、DBA の原因遺伝子の一つであるリボゾーム蛋白 S19(RPS19)が同定された。RPS19 は 79 種類あるリボゾーム蛋白の一つであるが、どのようなメカニズムで赤芽球癆を発症させるのか不明であった。これまで申請者が解析を行ってきた RPS19 遺伝子の異常は全 DBA 患者の 25%を占めるが、近年報告された RPS19 以外の RPS24、RPL35a、RPS17 の遺伝子異常によっても DBA が発症している。

2. 研究の目的

本邦でも、リボゾーム蛋白遺伝子配列解析によるDBA原因遺伝子の同定がDBA確定診断上の重要な項目の一つとして実施されつつあるものの、同定率は30%と比較的低い。また臨床症状も様々で、原因遺伝子との関連性も明らかでなかった。そこで本研究では、これまで稀にしか報告のないWhole Allele Loss変異(片アレル欠失変異)をターゲットとすることで、変異同定率の上昇が期待できると考えた。そこで独自に簡便かつ迅速なDBAの遺伝子コピー数解析法(DBA同期的qPCR法)を新規に開発するとともに、遺伝子異常と患者症状との関連性を解析する。

3. 研究の方法

DBAゲノムバンク(弘前大学)を用い、匿名化されたDBA患者の末梢血より抽出されたゲ

ノムDNAを無作為に抽出し解析に用いた。それぞれのリボソームタンパク質遺伝子 (PRS7、RPS10、RPS14、RPS15、RPS17、RPS19、RPS24、RPS26、RPS27A) に対するプライマーセットを準備し、他の遺伝子プライマーセットによるQ-PCRの増幅曲線のCt値との差が1サイクル以内になるようにプライマーセットをそれぞれ2~9セット選定した。Q-PCRは、以下の条件で行った。Genomic DNA (gDNA) 5ng/ μ l DWを95°C5minの後、直ちに氷上で急冷し、熱変成させた。変成させたgDNA溶液2 μ l, 2x SYBR P remix Ex Taq II kit 10 μ l, ROX dye II 0.4 μ l, 10pmol/ μ l Forward primer 0.8 μ l, 10pmol/ μ l Reverse primer 0.8 μ lを混合し、total 20 μ lになるようにDWを加えた。PCRサイクルは以下のように行った。95°C30秒の後、95°C5秒-60°C34秒を35サイクル、Applied Biosystems 7500にて行った。さらに、Genomic PCR産物をGenElute PCR&Gel Clean Upキット(sigma)を用いて精製し、BigDye Terminator ver3.1 cycle sequencing kit (BD)のプロトコルに従ってシーケンシングPCRを行った。BigDye Xterminator kitで精製後、Applied Biosystems 3130xジェネティックアナライザーで解析した。

4. 研究成果

これまで希少報告であったDBA遺伝子の片アレル欠失を迅速・簡便に検出することができる検出法を新規に開発し、弘前大学DBAゲノムバンクを用い変異同定を試みた。その結果、遺伝子変異未知の31例中7例でDBAの原因遺伝子の片アレル欠失を検出した。内訳は、その多くがこれまでに報告のないものであった(RPL5(1例)、RPS17(3例))。また今回の解析では、RPS17の遺伝子異常が3例発見され、これまで欧米では少数派とされたが、興味深いことに日本ではむしろ高頻度でRPS17に変異があることが明らかになった。また片アレル欠失6検体の遺伝的素因を同様の方法で調べたところ、DBA患者両親には原

因遺伝子の欠失は認められなかった。これらのことから、DBA 患者の確定診断のために DBA 原因遺伝子のゲノムコピー数の解析（片アレル欠失の検出）は有用な診断マーカーとなることを明らかにし、平成 24 年 3 月に Blood 誌に報告した。原因遺伝子の片アレル欠失のあった 7 例すべての患者において、発育遅延等の異常を認めた。従って、本試験法が DBA 患者の原因遺伝子のゲノムコピー数の解析（片アレル欠失の検出）に有用であるとともに、発育異常をきたすマーカーとなることを示した。

本検出方法は、1 回の定量 PCR で多数の遺伝子についてのコピー数解析が出来る方法であることから、操作面の簡便・迅速性を達成しただけでなく、解析面においても Q-PCR の結果を目視するだけで遺伝子欠失を検出できるため、解析のステップが非常に簡便となっている利点がある。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, and Hamaguchi I: Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 査読有, 119, 2376-2384, 2012. (*corresponding author)

浜口 功 : Ribosomal protein と造血障害. 臨床血液、査読有、第 51 巻 8 号、638-645、2010.

浜口 功、倉光 球 : Diamond-Blackfan 貧血の分子異常、細胞、査読無、第 42 巻 7 号、16-19、2010.

〔学会発表〕（計 6 件）

Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M,

Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Masumi A, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I: Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond Blackfan anemia. 第 73 回日本血液学会、名古屋、2011 年 10 月 14 日

Kuramitsu M, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Masumi A, Mizukami T, Momose H, Takizawa K, Yamaguchi K, Ito E, Hamaguchi I: New Determination Method for Extensive Gene Deletions in Diamond-Blackfan Anemia. 52nd ASH[®] Annual Meeting and Exposition, Orlando, Dec 7th, 2010

Kuramitsu K, Kasai M, Masumi A, Mizukami T, Momose H, Takizawa K, Yamaguchi K, Hamaguchi I : Deficiency of Ribosomal protein associated with Diamond Blackfan anemia induces autophagy. 第 72 回日本血液学会、横浜、2010 年 9 月 24 日

Kuramitsu M, Morio T, Takagi M, Ozeki M, Masumi A, Mizukami T, Momose H, Takizawa K, Etsuro I, Yamaguchi K, Hamaguchi I : A novel method to analyze genomic copy number of Diamond Blackfan anemia responsible genes. 第 72 回日本血液学会、横浜、2010 年 9 月 24 日

浜口 功 : Ribosomal protein と造血障害. 第 71 回日本血液学会、京都、2009 年 10 月 24 日

倉光 球、水上 拓郎、益見 厚子、百瀬 暖佳、滝沢 和也、笠井 道行、山口 一成、浜口 功 : 先天性赤芽球癆(Diamond blackfan anemia)原因遺伝子によるオートファジー活性化の解析. 第 71 回日本血液学会、京都、2009 年 10 月 24 日

〔図書〕（計 1 件）

倉光 球、浜口 功 : Diamond-Blackfan 貧血におけるリボソーム機能異常、血液診療エキス

パート、p212-214、中外医学社、2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

国立感染症研究所ホームページ

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/basic-science.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜口 功 (HAMAGUCHI ISAO)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・
部長

研究者番号：90348780

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：