

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	成育科学領域小児病態学教育研究分野 氏名 小林 明恵
<p>(論文題目)</p> <p>Dyserythropoietic anaemia with an intronic <i>GATA1</i> splicing mutation in patients suspected to have Diamond-Blackfan anaemia</p> <p>(ダイヤモンド・ブラックファン貧血と考えられた患者における <i>GATA1</i> イントロンのスプライシング変異を伴う赤血球形成異常性貧血)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景】</p> <p>ダイヤモンド・ブラックファン貧血(DBA)は乳児期発症の赤血球低形成を伴う大球性貧血と奇形、発がん素因を特徴とする先天性骨髄不全症候群(IBMFS)の 1 つであり、胎児ヘモグロビン(HbF)や赤血球アデノシンデアミナーゼ活性(eADA)の上昇を示す先天性貧血である。IBMFS は疾患間で臨床所見が重複するため、遺伝子解析が診断確定に有用である。DBA の約 70%では 22 のリボソーム蛋白遺伝子や <i>GATA1</i>, <i>TSR2</i> の変異が同定され、<i>GATA1</i> 変異による DBA では、N 末端の 83 アミノ酸を欠失した <i>GATA1s</i> 蛋白を生じる。最近、Abdulhay らが <i>GATA1</i> イントロン変異(chrX:48,652,176 in hg19; c.871-24 C>T)を伴う赤血球形成異常性貧血の孤発 2 男児例を見出した。この変異により正規スプライシングの減少と選択的(異常)スプライシングの増加を来し、5 アミノ酸が付加され転写活性を失った変異 <i>GATA1</i> 蛋白が発現する。これらの症例は早期発症の網赤血球低値の大球性貧血、HbF と eADA の増加など DBA 類似の表現型を示した。そこで我々は、DBA と臨床診断され原因遺伝子未同定の患者の中に、同様の <i>GATA1</i> 変異を有する例が含まれている可能性があると考え、DBA と臨床診断された患者の独自コホートをを用いて同変異を検索した。</p> <p>【結果と考察】</p> <p>215 名(うち男児 109 名)の DBA コホートのうち、ターゲットシーケンス及び全エクソームシーケンスで原因遺伝子未同定の 79 名(うち男児 47 名)を対象とし、ゲノム DNA を用いてサンガーシーケンス法により、<i>GATA1</i> c.871-24 を含む領域を解析した。その結果、母方従兄弟である男児 2 名(#35, 36)に既報と同一の変異が同定された。本家系には 3 名 (#35, 36 の曾祖母, 祖父, 叔祖母)の再生不良性貧血(AA)診断例も含まれたため、検体を入手できた 4 名(#35 の母, #36 の両親と妹)について c.871-24 C>T を検索し、両症例の母と#36 の妹に同変異をヘテロ接合性に認めた。</p> <p>本 2 例(#35, 36)は若年発症の網赤血球低値の大球性貧血、HbF 増加、3 系の異形成、血小板機能異常、感染を契機とした貧血の増悪など既報と類似する臨床所見を示した。注目すべきことに、2 症例とも同胞男児が胎児水腫で死亡しており、既報例の一人も胎児水腫に対し子宮内輸血を要したことから、この変異を有する男児への慎重な周産期管理の必要性が示唆された。また、機序は不明ながら 2 症例ともステロイド療法が有効であり、試行価値のある治療法と考えられた。更に本疾患の寛解後も感染症を契機に骨髄不全に陥る可能性が示唆された。</p> <p>#35 と母の末梢血から RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR 法で同変異の転写産物への影響を確認した。同変異をヘミ接合性に有する#35 では既報同様のイントロンリテンションを来した異常転写産物が <i>GATA1</i> 総転写産物の 43%を占め、正常転写産物は 57% (コ</p>	

ントロールは概ね 100%)であった。同変異をヘテロ接合性に有する母では異常転写産物は約 20%と予測されたが実際は 2.7%であり、母の造血系での変異アレルを発現するクローンの抑制が示唆された。

イントロンの塩基置換によるスプライシング異常の予測は困難であり、c.871-24 周辺の塩基置換による影響についてスプライスサイト予測ソフト(NetGene2)を用いて検討した。その結果、予測スコアは野生型 0.054, c.871-24 C>T 0.067, c.871-23 A>T 0.100, c.871-25 A>T 0.100 であった。これより既報以外の塩基置換もスプライシング異常を来す可能性が示唆されたため、変異を導入した *GATA1* ミニジーンコンストラクトを BHK 細胞へ導入し、RT-PCR 法で転写産物を解析した。低効率ながら c.871-23 A>T でも同様の異常転写産物を認め、c.871-24 C>T 同様にスプライシング異常を生じ、原因遺伝子変異になり得ることが示唆された。

本家系内で AA と診断された 3 名は既に死亡しており、更なる検索は困難であったが、いずれも c.871-24 C>T をヘミまたはヘテロ接合性に有すると考えられた。IBMFS では AA や骨髄異形成症候群などの血液悪性疾患への進展が知られている。今回 c.871-24 C>T はヘテロ接合性でも将来的に AA や骨髄異形成症候群へ進展する可能性が示唆された。

【結論】

本研究では DBA コホートから *GATA1* イントロン変異を有する 2 人の男児例を見出した。2 例は複数の AA 症例を含む同一家系に属し、既報と類似する臨床的特徴を示した。変異と表現型の連鎖性はこの変異の病原性を裏付けるとともに、疾患概念の独立性を支持すると考えられ、先天性貧血の評価における *GATA1* イントロン変異のスクリーニングの有用性を示した。