

厚生労働省科学研究費補助金（難治疾患克服事業）

分担研究報告書

ファンconi貧血とその類縁疾患の生体試料収集に関する研究

分担研究課題：ファンconi貧血とその類縁疾患の原因遺伝子解析に関する研究

研究分担者

高田 穰

京都大学 放射線生物研究センター 教授

研究要旨

ファンconi貧血患者由来細胞の原因遺伝子解析の方法を確立し、研究代表者である東海大矢部みはる博士が収集された培養細胞サンプル数例について、原因遺伝子とその変異の検索を行った。欧米からの報告、国内の少数例の報告と同様に、FANCA 遺伝子の変異が同定されたが、一部新規の変異も同定された。今後、さらにサンプル数を増やして解析を進めて行く。

A. 研究目的

ファンconi貧血(FA)は骨髄不全、奇形、白血病、固形腫瘍などを呈し、まれながら、その重篤な症状と診断治療法の確立の遅れから特に小児の臨床で重大な問題となっている。最近の研究の進展により、FAはDNA損傷への細胞応答欠損を基盤として発症する「ゲノム不安定性症候群」のひとつであることが明らかとなった。FA 遺伝子異常は日本人症例においてはまだまだあまり解析されておらず、13種類におよぶ数多い原因遺伝子の異常について

その相対的頻度などは、FANCA が多数を占める事以外、明らかではない。また、FA 遺伝子以外の変異においてFA 類似の症状を示した症例の報告もあり（ブルーム症候群、ナイミーヘン症候群など）、DNA 損傷応答遺伝子の変異と臨床症状との関係は、広いスペクトラムでオーバーラップする可能性が指摘されている。これらの疾患の診断治療の基盤確立を目指して、日本人におけるFAと関連病態が疑われる患者の臨床材料を解析する。

B. 研究方法

矢部准教授より送付された初代繊維芽細胞を増殖させ、ゲノム、RNA を通常の分子生物学的方法により抽出し、さらにタンパク質解析用のライセートを作成した。まず RNA から cDNA を合成し、FANCA 全長を PCR 増幅し、direct sequencing で全長配列を検索して変異を同定した。さらにゲノムから変異に該当する部分を増幅しゲノムレベルで変異の確認を行った。症例によっては FANCA、FANCD2 のウェスタンブロットティングを行った。FANCC、FANCG 遺伝子についても検索可能な様にプライマーを用意した。

倫理面への配慮

東海大と京大、両者の倫理委員会に申請し、倫理面に問題がないことを確認して実施への許可を得た。具体的には、サンプルの取得法、解析予定の遺伝子を確定し、インフォームドコンセントの実施、サンプルの連結可能匿名化による個人情報保護を中心に、適切に原因遺伝子解析を行うものとした。

C. 研究結果

現在までに合計 3 例 (TokaiFA46、TKFA02、TKFA03) の解析をおこない、3 例ともで FANCA 遺伝子の変異を同定した。同定した遺伝子異常の一覧を Table 1 に示す。現在 TKFA05 症例の解析が進行中である。

症例	変異	産物	変異タイプ	変異部位	
TokaiFA46	c.3295C>T	p.Q1099X	Nonsense	Exon 33	新規
	c.2546delC	p.S849fsX40	Frameshift	Exon 27	
TKFA02	c.3931-3932del	p.S1311fsX0	Frameshift	Exon 39	新規
	c.2546delC	p.S849fsX40	Frameshift	Exon 27	
TKFA03	IVC-2A>T	p.868_869delFQ	Inframe del	Intron27	

Table 1. 今回同定した FANCA 遺伝子異常

TKFA03 症例については、片方アレルの変異は確実だが、これはヘテロであり、もう片方のアレルについては現時点では結論をだすことができていな

い。アミノ酸変異を伴う SNP がいく

つか同定されたが、これらの病原性を明らかにするには、FANCA 患者細胞への遺伝子導入による検討などを行う

必要がある。

現在解析中の TKFA05 症例は、矢部研究代表者からは臨床症状、染色体断裂試験で FA と考えられるとのコメントをいただいている。しかし、FANCA mRNA に特に病原性があきらかな変異を認めることができなかった。しかし、この例にも多数の SNP があり、この中に病原性のあるものが含まれている可能性は否定できない。今後ウェスタブロットティングで、FANCA 発現と FANCD2 モノユビキチン化を検索し、その結果によっては FANCC、FANCG 遺伝子変異の検索を行う予定としている。

矢部研究代表者から、さらに過去の DNA サンプル 10 例分の送付を受けており、順次解析を進める予定である。

D. 考察

今年度の解析で、ファンconi貧血患者材料からの遺伝子解析の方法を確立し、十分な経験とノウハウを蓄積できた。今後、より効率的に解析を進めることができると考えられる。今回は FANCA の変異しか同定されていないが、これは従来の諸外国と本邦からの報告で FANCA が 60-80% の FA 症例の原因であることと一致している。面白いことに、FANCA の変異は新規のものである割合が非常に高く、我々の少数のシリーズでもすでに2例の新規の変異が同定されている。これは FANCA の

遺伝子座が不安定で、新規の変異が獲得されやすいことを示唆している。今後多数の変異が同定されることで、日本人患者における原因遺伝子の頻度、遺伝子異常と臨床症状との関連などについてよりしっかりとした基盤で議論することが可能になると思われる。

E. 結論

FA 遺伝子の解析をスタートし、FANCA 遺伝子変異を数例で同定した。矢部研究代表者により多数の関連疾患サンプルが収集されつつある。今後協力して研究目標の達成に努力したい。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohashi K, Takigawa N, Osawa M, Ichihara E, Takeda H, Kubo T, Hirano S, Yoshino T, Takata M, Tanimoto M, Kiura K. Chemopreventive effects of gefitinib on nonsmoking-related lung tumorigenesis in activating epidermal growth factor receptor transgenic mice. *Cancer Res.* 2009 Sep 1;69(17):7088-95.

Takata M, Ishiai M, Kitao H. The Fanconi anemia pathway: Insights from somatic cell genetics using DT40 cell line. Invited review. *Mutat Res.* 2009 Jul 31;668(1-2):92-102. Epub 2009 Jan 17. Review.

茂地 智子、高田 穰 「ファンconi貧血原因遺伝子群の機能と調節機構」

『G. I. Research (Journal of Gastrointestinal Research)』2010年4月号 特集/DNA修復機能異常と疾患 掲載予定

富田純也、高田 穰 「DNAクロスリンク損傷修復の分子機構」細胞工学特集号 29 (1), 36-41, 2010

板谷亜希子、高田 穰 「ファンconi貧血の分子メカニズム」『血液診療エキスパート:貧血』中外医学社 掲載予定

石合正道. DNA鎖間架橋(ICL)の修復機構, 生化学, 81(11), 998-1004, 2009

松下暢子、北尾洋之、石合正道、高田 穰 「ファンconi貧血とDNA損傷応答ネットワーク」蛋白質核酸酵素 2009年3月増刊 染色体サイクルゲノムの恒常性維持、継承とダイナミクス 編集 正井久雄 舛方久夫 釣本敏樹 篠原彰 共立出版 580-585

2. 学会発表

Minoru Takata, Junya Tomida, Tomoko Shigechi, Hiroyuki Kitao, Akiko Itaya, Masamichi Ishiai, A novel role of the FA core complex in FANCI phosphorylation, an important switch in the FA pathway. Oral presentation. Twenty-first Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium (Baltimore USA, Oct 1-4, 2009)

Minoru Takata, Junya Tomida, Akiko Itaya, Tomoko Shigechi, Masamichi Ishiai REGULATION OF CROSS-LINK

REPAIR THROUGH THE FANCONI ANEMIA PATHWAY. The Fortieth International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (Tokyo, Nov 10-12, 2009)

高田 穰 「高発がん遺伝病ファンconi貧血の分子メカニズム」第71回日本血液学会学術集会 シンポジウム「小児血液腫瘍の発症リスクと先天異常」(京都、10月23-25日、2009)

Minoru Takata. 「DNA damage signaling in the Fanconi anemia pathogenesis」第51回小児血液学会血液プレジデンシャルシンポジウム「DNA damage response and hematological disorder」(千葉 東京ベイホテル東急 11月27-29日 2009年)

Ishiai M., Takata M.: FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. Global COE international meeting of Graduate School of Medicine, Kyoto University, 2009年11月6-8日、兵庫県淡路島

石合正道, 島弘季, 田代聡, 高田穰: Artemisの動態制御におけるリン酸化の役割. 日本放射線影響学会第52回大会 講演要旨集p79 2009年11月11-13日 広島市. 口頭発表

石合正道: 細胞周期によるFancD2・FancIモノユビキチン化の分子制御機構. 国立遺伝学研究所 研究集会「ユビキチン・SUMOによるDNA複製およびDNA修復系の制御」要旨集, 2009

年10月7-8日 静岡県三島市. 口頭発表.

病態」 第32回日本分子生物学会年会
プログラムp62, 2009年12月9-12日
横浜市.

石合正道, 富田純也, 板谷亜希子, 高田穰: 細胞周期によるファンconi貧血経路の活性化制御. 「ゲノム不安定性」第68回日本癌学会学術総会 講演要旨集 p378, 2009年10月1-3日 横浜市. 口頭発表

H. 知的財産権の出願・登録状況
特にありません。

Junya Tomida, Akiko Itaya, Tomoko Shigechi, Masamichi Ishiai, and Minoru Takata. Interaction between Phospho-mimic FANCI and FANCL E3 ligase in the activation of Fanconi anemia pathway. 第68回 日本癌学会学術総会 2009年10月1-3日 横浜市. ポスター

Minoru Takata, Akiko Itaya, Tomoko Shigechi, Junya Tomida, Masamichi Ishiai. Analysis of the activation mechanism of the Fanconi anemia pathway. シンポジウム 「New horizons of chromosome dynamics study」 日本分子生物学会 第32回年会 横浜 2009年12月9-12日

富田純也 板谷亜希子 茂地智子
石合正道 高田穰 FANCIリン酸化によるファンconi貧血コア複合体ユビキチンリガーゼの活性化 第32回日本分子生物学会年会 第32回年会 横浜 2009年12月9-12日 ポスター

石合正道, 富田純也, 板谷亜希子, 茂地智子, 高田穰: 細胞周期によるファンconi貧血経路の活性化制御. ワークショップ「ゲノム不安定性疾患の分子

III. 會議記錄

III. 会議記録

平成 21 年度 難治性疾患克服 研究事業

ファンconi貧血とその類縁疾患の生体試料収集に関する研究班会議プログラム

平成 21 年 11 月 29 日 (日)

場所：第 51 回小児血液学会会場 (東京ベイホテル東急会議室 4)

13:00 - 14:00

1. ファンconi貧血患者の生体資料収集に関する進捗状況
2. ファンconi貧血患者の細胞保存マニュアル作成について
3. 外部機関への細胞送付の状況について
4. 臨床研究「造血細胞移植後の体細胞における染色体解析に関する研究」の申請

東海大学臨床検査学・細胞移植科
矢部みはる

5. ファンconi貧血遺伝子解析の結果 (中間報告)

TKFA-02 (皮膚線維芽細胞)

Tokai FA-46 (骨髄線維芽細胞)

TKFA-03 (皮膚線維芽細胞)

京都大学放射線生物研究センター
高田穰

ファンconi貧血とその類縁疾患の生体資料収集に関する研究会議（第1回）
議事録

日時：平成21年11月29日（日）13:00 - 14:00

於：第51回小児血液学会会場（東京ベイホテル東急会議室4）

出席者（敬称略）：高田穰、加藤俊一、矢部普正、矢部みはる

【研究分担者あいさつ】

矢部みはるより研究分担者の紹介ならびにあいさつがなされた。

【議題1：ファンconi貧血患者の生体資料収集に関する進捗状況】

東海大学医学部の医の倫理委員会より「ファンconi貧血とその類縁疾患の原因遺伝子解析および生体資料収集とその利用」の研究申請が2009年8月18日付けで承認された。京都大学物質-細胞統合システム拠点iPS細胞研究センターへの細胞提供は京都大学倫理委員会に変更申請手続き後承認となる予定である。なお、2005年に東海大学医学部医の倫理委員会承認された、課題名「ファンconi貧血における遺伝子解析」によって保存されている細胞についても解析、資料収集の対象であることが報告された。

2009年11月29日時点で5症例のファンconi貧血患者の同意が得られ、骨髄有核細胞、骨髄線維芽細胞、皮膚線維芽細胞の保存が行われている。B細胞割合が少ない症例が多く、EBウイルストランスフォームB細胞株の作成は困難であり、何らかの工夫が必要である。

【議題2：ファンconi貧血患者の細胞保存マニュアル作成について】

専用の液体窒素保存タンクも確保され、東海大学で「ファンconi貧血とその類縁疾患の生体資料収集のための指針」を作成し、細胞保存の手順と管理責任者および作業員の確認を行っている旨報告された。

【議題3：外部機関への細胞送付の状況について】

2009年11月29日時点で3症例3細胞が京都大学放射線生物研究センター高田穰教授に送付され解析が行われている。

独立行政法人医薬基盤研究所難治性疾患研究資源バンクへの細胞提供に関しては、先方のバンク体制が不明瞭であり、またホームページ上でも設立されてい

ないため今後問い合わせを行った上で、寄託予定である。

【議題 4: 臨床研究「造血細胞移植後の体細胞における染色体解析に関する研究」の申請】

保存された生体試料の利用の試みとして、東海大学臨床研究審査委員会に上記臨床研究の申請を行っていることが矢部みはるより説明された。

【議題 5: ファンconi貧血遺伝子解析の結果（中間報告）】

3 症例のファンconi貧血遺伝子解析の結果、中間報告が高田穰よりされた。

3 症例とも A 群に属しており、うち 1 例は末梢血リンパ球ではモザイクズム（復帰変異）のため、ファンconi貧血の診断が確定できなかった症例であり、骨髄線維芽細胞などの体細胞解析の有用性が示された。また世界で初めての変異を認めた症例が 2 例あり、日本人の症例解析が新しい知見をもたらす可能性を示唆しており、さらなる解析結果に期待がもたれる。

ファンconi貧血類似疾患では、放射線感受性の有無の検索が必要であり、今後京都大学放射線生物研究センターにて方法論を検討していただくこととした。

ファンconi貧血の遺伝子変異が確定されていない症例については、今後順次保存されている DNA, RNA 試料等も含めて検討に入る予定である。

以上

(文責: 矢部みはる)

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

VI. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
矢部みはる	Fanconi貧血	小林登ほか	小児疾患診療のための病態生理	東京医学社	東京	2009年	1178-1182
矢部みはる	急性骨髄性白血病WHO分類	五十嵐隆 菊地陽	小児科診療ビジュアル小児白血病	中山書店	東京	2009年	82-87
矢部普正	移植後リンパ増殖症		白血病治療マニュアル改訂第3版	南江堂	東京	2009年	275-277
加藤俊一	日本移植学会の倫理指針.	高橋公太	腎移植のすべて	泰山堂	東京	2009年	506-507
加藤俊一、 矢部普正	小児の造血細胞移植	加藤俊一、 矢部普正	小児の造血細胞移植	医薬ジャーナル社	東京	2010年	1-107
松下暢子、北尾洋之、石合正道、高田穰	ファンconi貧血とDNA損傷応答ネットワーク	正井久雄 舩方久夫 釣本敏樹 篠原彰	蛋白質核酸酵素	共立出版	東京	2009年	580-585

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yabe H, Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Kato S.	Rapid improvement of life-threatening capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab.	Blood (in press)			2010
Yabe H, Koike T, Shimizu T, Ishiguro H, Morimoto T, Hyodo H, Akiba T, Kato S and Yabe M.	Natural pregnancy and delivery after unrelated bone marrow transplantation using fludarabine-based regimen in a Fanconi anemia patient.	Int J Hematol (in press)			2010
Oshima K, Kikuchi A, Mochizuki S, Toyama D, Uchisaka N, Yabe M, Hanada R	Fanconi anemia in infancy: report of hematopoietic stem cell transplantation to a 13-month-old patient.	Int J Hematol	89	722-723	2009

Matsushita H, Masukawa A, Arakawa S, Ogawa Y, Asai S, <u>Yabe M</u> , Ando K, Miyachi H.	Persistence of derivative chromosome 22 after achieving a major molecular response in chronic myeloid leukemia with a cryptic BCR-ABL1 fusion gene.	Int J Hematol	90	623-626	2009
Yoshida H, Hashii Y, Okuda T, Kusui S, Satoh E, Inoue A, Kawakami C, <u>Yabe M</u> , Ohta H and Ozono K.	A case of congenital bone marrow failure with radio-ulnar synostosis	Int J Hematol (in press)			2010
Yagasaki H, Kojima S, <u>Yabe H</u> , Kato K, Kigasawa H, Sakamaki H, Tsuchida M, <u>Kato S</u> , Kawase T, Muramatsu H, Morishima Y, Kikuchidera Y.	Tacrolimus/Methotrexate versus cyclosporine/methotrexate as graft-versus-host disease prophylaxis in patients with severe aplastic anemia who received bone marrow transplantation from unrelated donors: results of matched pair analysis	Biol Blood Marrow Transplant.	15	1603-1608	2009
Tsukimoto I, Tawa A, Horibe K, Tabuchi K, Kigasawa H, Tsuchida M, <u>Yabe H</u> , Nakayama H, Kudo K, Kobayashi R, Hamamoto K, Imaizumi M, Morimoto A, Tsuchiya S, Hanada R	Risk-stratified therapy and the intensive use of cytarabine improves the outcome in childhood acute myeloid leukemia: the AML99 trial from the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group.	J Clin Oncol	27	4007-4013	2009
Oda M, Isoyama K, Ishimoto E, Inoue M, Tsuchida M, Kigasawa H, Kikuchi K, <u>Kato S</u> .	Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia	Int J Hematol	89	374-382	2009
Yazaki M, Atsuta Y, Kato K, <u>Kato S</u> , Taniguchi S, Takahashi S, Ogawa H, Kouzai Y, Kobayashi T, Inoue M, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Azuma H, Takanashi M, Kai S, Nakabayashi M, Saito H;	Incidence and risk factors of early bacterial infections after unrelated cord blood transplantation	Biol Blood Marrow Transplant	15	439-446	2009
Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimura J, Inoue M, Kikuchi A, <u>Kato S</u> .	Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan	Bone Marrow Transplant.	45	69-77	2010
Kudo K, Ohga S, Morimoto A, Ishida Y, Suzuki N, Hasegawa D, Nagatoshi Y, <u>Kato S</u> , Ishii E.	Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan.	Bone Marrow Transplant (in press)			2010

Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T.	Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan.	Pediatr Blood Cancer	54	299-306	2010
Ohashi K, Takigawa N, Osawa M, Ichihara E, Takeda H, Kubo T, Hirano S, Yoshino T, Takata M, Tanimoto M, Kiura K.	Chemopreventive effects of gefitinib on nonsmoking-related lung tumorigenesis in activating epidermal growth factor receptor transgenic mice.	Cancer Res	69	7088-7095	2009
Takata M, Ishiai M, Kitao H.	The Fanconi anemia pathway: Insights from somatic cell genetics using DT40 cell line. Invited review.	Mutat Res.	668	92-102	2009
矢部みはる	Fanconi貧血の造血幹細胞移植	分子細胞治療	8	7-13	2009
田渕 健、気賀沢寿人、吉見礼美、熱田由子、足立壮一、磯山恵一、井上雅美、加藤剛二、河野嘉文、菊地陽、小林良二、土屋滋、堀越泰雄、矢部普正、渡辺 新、加藤俊二	小児期造血幹細胞移植全国集計（1983～2005）－細胞源ドナー別移植成績	日本小児血液学会雑誌	23	142-154	2009
矢部普正	再生不良性貧血の治療－造血幹細胞移植	小児科診療	72	295-301	2009
矢部普正	小児再生不良性貧血に対する同種造血幹細胞移植	日本小児血液学会雑誌	23	236-243	2009
矢部普正	遺伝病とターナー症候群；ファンconi貧血	ビジュアル疾患解説	4	4-5	2009
加藤俊一	小児期に造血幹細胞移植を受けた長期生存者におけるQOL評価法ガイドライン作成に向けて	日本小児血液学会雑誌	23	161-164	2009

渡辺 新、掛江直子、坂本なほ子、加藤俊二	同胞小児ドナーになることの正確な理解に役立つ年齢群別パンフレットの作成	日本小児血液学会雑誌	23	155-160	2009
富田純也、高田 穰	DNAクロスリンク損傷修復の分子機構	細胞工学	29	36-41	2009
茂地 智子、高田 穰	ファンconi貧血原因遺伝子群の機能と調節機構	『G. I. Research (Journal of Gastrointestinal Research)』2010年4月号 特集/DNA修復機能異常と疾患 (掲載予定)			2010
板谷亜希子、高田 穰	「ファンconi貧血の分子メカニズム」 『血液診療エキスパート：貧血』	中外医学社 (掲載予定)			2010

V. 研究成果の刊行物・印刷



Natural pregnancy and delivery after unrelated bone marrow transplantation using fludarabine-based regimen in a Fanconi anemia patient

Hiromasa Yabe · Takashi Koike · Takashi Shimizu ·
Hiroyuki Ishiguro · Tsuyoshi Morimoto · Hiromi Hyodo ·
Takeshi Akiba · Shunichi Kato · Miharuru Yabe

Received: 31 October 2009 / Revised: 7 January 2010 / Accepted: 12 January 2010
© The Japanese Society of Hematology 2010

Fanconi anemia (FA) patients frequently suffer from progressive bone marrow failure and may evolve to myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia. Allogeneic stem cell transplantation (SCT) is the only curative treatment for the hematological complications of FA; however, graft rejection is a major cause of treatment failure after SCT from unrelated donors [1]. Intensification of the preparative regimen to overcome graft rejection is necessary in alternative donor transplants [2], but the addition of conditioning agents often adversely affects quality of life after SCT. FA is known to reduce fertility, and only a few cases of successful pregnancy after HLA-identical sibling transplants have been reported in the literature [3–5]. Even use of an attenuated preparative regimen may lead to persistent ovarian failure, because in FA the gonadal cells are highly sensitive to irradiation or alkylating agents. We report the case of an FA patient who conceived and delivered a healthy baby after unrelated donor SCT with an intensified preparative regimen.

H. Yabe (✉) · S. Kato
Department of Cell Transplantation and Regenerative Medicine,
Tokai University School of Medicine, 143, Shimokusuya,
Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan
e-mail: yabeh@is.icc.u-tokai.ac.jp

T. Koike · T. Shimizu · H. Ishiguro · T. Morimoto · H. Hyodo
Specialized Clinical Science, Pediatrics,
Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

T. Akiba
Department of Radiation Oncology,
Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

M. Yabe
Department of Cell Transplantation and Laboratory Medicine,
Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

An 11-year-old girl was referred to Tokai University Hospital because of skin pigmentation, polydactyly, short stature and pancytopenia and was diagnosed with FA by chromosomal fragility test. She was dependent on both RBC and platelet transfusions despite androgen administration, and the decision was made for her to undergo SCT at age 12 years. She received a marrow graft from an HLA-identical unrelated donor following cytoreduction with lung and ovary shielded thoracoabdominal irradiation (4.5 Gy, in 3 fractions), fludarabine (180 mg/m² total dose, over 6 days), cyclophosphamide (40 mg/kg total dose, over 4 days) and antithymocyte globulin (Thymoglobulin, Genzyme) (10 mg/kg total dose, over 4 days). Both short-term methotrexate (15 mg/m² on day 1, 10 mg/m² on day 3, 6, and 11) and tacrolimus (0.03 mg/kg daily as continuous infusion) were administered for prophylaxis of graft-versus-host disease. Total nucleated cells were infused at 4.97×10^8 /kg; they comprised 2.61×10^6 CD34⁺ cells/kg recipient body weight. Granulocyte colony-stimulating factor at 7 µg/kg daily was started 5 days after the transplant. Engraftment was observed on day 14 and FISH analysis showed 100% donor chimerism. The patient entered puberty spontaneously at age 13 years (11 months after SCT) and achieved normal menstrual cycles by age 19 years (84 months after SCT). She became pregnant naturally and at age 20 years (93 months after SCT), at 38 weeks of gestation, she delivered a 2828-g normal male after an uncomplicated pregnancy.

This is the first report of successful pregnancy in a patient with FA who received a transplant from an unrelated donor after a fludarabine-based preparative regimen. This report adds to the few reports of successful pregnancy in FA after SCT. The patient was one of recipients of HLA-identical sibling grafts who had been conditioned mainly with 20 mg/kg cyclophosphamide, antithymocyte globulin, and 4 or 5 Gy of

irradiation. The case reported here suggests that intensification of the preparative regimen by adding fludarabine at 180 mg/m² does not affect fertility in FA patients.

References

1. Wagner JE, Eapen M, MacMillan ML, Harris RE, Pasquini R, Boulad F, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood*. 2007;109:2256–62.
2. Yabe H, Inoue H, Matsumoto M, Hamanoue S, Koike T, Ishiguro H, et al. Allogeneic haematopoietic cell transplantation from

- alternative donors with a conditioning regimen of low-dose irradiation, fludarabine and cyclophosphamide in Fanconi anaemia. *Br J Haematol*. 2006;13:208–12.
3. Dalle JH, Huot C, Duval M, Rousseau P, Francoeur D, Champagne J, et al. Successful pregnancies after bone marrow transplantation for Fanconi anemia. *Bone Marrow Transplant*. 2004;34:1099–100.
4. Goi K, Sugita K, Nakamura M, Inukai T, Honna H, Hirose K, et al. Natural pregnancy and delivery after allogeneic bone marrow transplantation in a Fanconi anaemia patient. *Br J Haematol*. 2006;135:410–1.
5. Morris ES, Darbyshire P, Fairlie F, Dalley CD, Snowden JA. Two natural pregnancies following allogeneic transplantation for Fanconi anaemia. *Br J Haematol*. 2008;140:113.



Fanconi anemia in infancy: report of hematopoietic stem cell transplantation to a 13-month-old patient

Koichi Oshima · Akira Kikuchi · Shinji Mochizuki ·
Daisuke Toyama · Naoki Uchisaka ·
Miharu Yabe · Ryoji Hanada

Received: 19 January 2009 / Revised: 14 April 2009 / Accepted: 20 April 2009 / Published online: 19 May 2009
© The Japanese Society of Hematology 2009

1 Introduction

The most important clinical features of Fanconi anemia (FA) are hematologic disorders and these are responsible for high incidence of morbidity and mortality. During birth, the blood count is usually normal and macrocytosis is often the first detected abnormality. This is typically followed by thrombocytopenia and anemia; then, progresses to pancytopenia. The majority of patients develop progressive bone marrow failure or acute myelogenous leukemia, both of which are diagnosed with peak frequencies at the age of 7 and 10–15 years, respectively [1, 2]. The disease has generally been managed by the administration of blood products, treatment of infections, and prolonged administration of androgens and hematopoietic growth factors. However, the only curative treatment for the bone marrow failure is hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). We describe a patient demonstrating pancytopenia from birth, who received HSCT at the age of 13 months.

The patient showed a tendency toward intrauterine growth retardation on ultrasonographic examination at 29 weeks of gestation. He was delivered by cesarean section at 36 weeks and 6 days of gestation because of fetal distress. Birth weight was 2070 g, and 1- and 5-min Apgar

score were 6 and 8, respectively. He was referred to the neonatal intensive care unit in our hospital for respiratory distress and cardiac murmur on the day of birth. On admission, white blood cell count was $2.8 \times 10^9/L$, hemoglobin 5.1 g/dL, platelet count $95 \times 10^9/L$. Congenital abnormalities suggestive of FA were bilateral radial hypoplasia, bilateral defective thumbs, defect of the left kidney and L-form fused kidney on the right side, and small patent ductus arteriosus. Bone marrow showed a hypo cellular picture, being comprised mainly of lymphocytes. Karyotyping of 20 cells that were in metaphase exclusively showed 46, XY. A diagnosis of FA was established at the age of 3 months based on the increased chromosomal breakage induced by mitomycin C. The rate of chromosomal breakage in him was increased (443/100 cells) compared with control cells (18/100 cells). Levels of FANCA and monoubiquitinated and non-ubiquitinated forms of FANCD2 were determined using immunoblotting analyses of whole cell extracts with anti-FANCA and anti-FANCD2 antibodies, and he lacked FANCA protein expression and FANCD2 monoubiquitination. For about a year before transplant, he became progressively dependent on red blood cell and platelet concentrate transfusion and the absolute neutrophil count was $0.05\text{--}0.65 \times 10^9/L$. He was not treated with any growth factors or androgens. He developed severe sepsis twice at the ages of 9 and 12 months, respectively. Bone marrow at the age of 12 months was hypo cellular with dysplastic features suggesting myelodysplastic syndrome (MDS) and the percentage of myeloblasts was $<5\%$. That indicated refractory cytopenias with multilineage dysplasia. Karyotyping of 20 cells exclusively showed 46, XY with abnormality of add(2)(q33). Before transplant, he had been transfused with red blood cells 18 times and platelet

K. Oshima (✉) · A. Kikuchi · S. Mochizuki ·
D. Toyama · N. Uchisaka · R. Hanada
Division of Hematology/Oncology,
Saitama Children's Medical Center, 2100 Magome,
Iwatsuki-ku, Saitama 339-8551, Japan
e-mail: oshima-k@umin.ac.jp

M. Yabe
Department of Cell Transplantation,
Tokai University School
of Medicine, Isehara, Japan

concentrates 21 times. When he was 13-month-old, he underwent allogeneic bone marrow transplantation (BMT) from his HLA-identical 2-year-old sister whose chromosomal analysis was normal. The conditioning regimen consisted of fludarabine 0.83 mg/kg/day for six doses (days -7 to -2) and cyclophosphamide 10 mg/kg/day for four doses (days -5 to -2) and lymphoglobulin (Pasteur Merieux, Lyon, France) 15 mg/kg/day for four doses (days -5 to -2). Only cyclosporine A was given as a prophylaxis for acute graft-versus-host disease (GVHD). On the day of transplant, he received 7.8×10^8 nucleated cells/kg without manipulation. Regimen-related toxicities were confined to grade III febrile neutropenia, grade III stomatitis, and grade II hypertension. A neutrophil count of $>0.5 \times 10^9/L$ was achieved on day 9, the platelet count was $>50 \times 10^9/L$ without transfusion on day 17 and the reticulocyte count was $>1\%$ on day 15. He was discharged at day 65 and was followed as an outpatient. There was no evidence of acute or chronic GVHD. He is now 17 months post-transplant in very good general condition with normal blood counts and evidence of full-donor chimerism on repeated FISH studies.

Pancytopenia from birth is extremely rare in FA patients [2]. There is a case report of an Indian FA patient who had thrombocytopenia at birth [3]. However, the parents refused any treatment and the patient was not followed after. Therefore, the appropriate management for such patients has not yet been established. Our patient underwent BMT from an HLA-identical sibling donor after fludarabine based, non-irradiation conditioning regimen due to severe pancytopenia at 13 months of age. Recently, the favorable role played by fludarabine in FA patients has been described in some reports, even if a sibling donor is unavailable [4–6]. We determined the dose of fludarabine and cyclophosphamide with reference to previous reports [5, 6].

The clinical course of FA patients with pancytopenia from birth is not yet well known. It is possible that those

patients tend to develop leukemia/MDS earlier. A genotype–phenotype study of 245 FA patients found that patients with FANCG mutations had more severe cytopenia and a higher incidence of leukemia, and patients with FANCA null mutations showed earlier onset of anemia and a higher incidence of leukemia [7]. Our patient had FANCA mutations and the rare clinical course might be associated with the mutation. Even for FA patients in early childhood, whether with FANCA or FANCG mutations, it may be better to perform HSCT, especially from an HLA-identical sibling, if available.

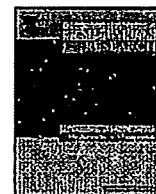
References

1. Fanconi G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (FA) I. Clinical aspects. *Semin Hematol.* 1967;4:233–40.
2. Butturini A, Gale RP, Verlander PC, Aldler-Bricner B, Gillio AP, Auerbach AD. Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry Study. *Blood.* 1994;84:1650–5.
3. Parikh TB, Udani RH, Nanavati RN, Rao B. Fanconi's anemia in newborn. *Indian Pediatr.* 2005;42:285–7.
4. Wagner JE, Eapen M, MacMillan ML, Harris RE, Pasquini R, Boulad F, et al. Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood.* 2007;109:2256–62. doi:10.1182/blood-2006-07-036657.
5. de la Fuente J, Reiss S, McCloy M, Vulliamy T, Roberts IA, Rahemtulla A, et al. Non-TBI stem cell transplantation protocol for Fanconi anaemia using HLA-compatible sibling and unrelated donors. *Bone Marrow Transplant.* 2003;32:653–6. doi:10.1038/sj.bmt.1704219.
6. Yabe H, Inoue H, Matsumoto M, Hamanoue S, Koike T, Ishiguro H, et al. Allogeneic haematopoietic cell transplantation from alternative donors with a conditioning regimen of low-dose irradiation, fludarabine and cyclophosphamide in Fanconi anaemia. *Br J Haematol.* 2006;134:208–12. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06128.x.
7. Faivre L, Guardiola P, Lewis C, Dokal I, Ebell W, Zatterale A, et al. Association of complementation group and mutation type with clinical outcome in Fanconi anemia. European Fanconi Anemia Research Group. *Blood.* 2000;96:4064–70.



Contents lists available at ScienceDirect
**Mutation Research/Fundamental and Molecular
 Mechanisms of Mutagenesis**

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/molmut
 Community address: www.elsevier.com/locate/mutres



Review

The Fanconi anemia pathway: Insights from somatic cell genetics using DT40 cell line

Minoru Takata*, Masamichi Ishiai, Hiroyuki Kitao¹

Laboratory of DNA Damage Signaling, Department of Late Effect Studies, Radiation Biology Center, Kyoto University, Yoshida-konoe, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 October 2008

Received in revised form 15 December 2008

Accepted 24 December 2008

Available online 17 January 2009

Keywords:

Fanconi anemia
 Interstrand crosslink
 DNA repair
 Translesion synthesis
 Homologous recombination
 DT40 cell line

ABSTRACT

The Fanconi anemia (FA) pathway is a complex phosphorylation–ubiquitination network in the DNA damage signaling, which is still poorly understood. Defects in the “FA pathway” or in the related DNA repair proteins cause FA, a hereditary disorder that accompanies compromised DNA crosslink repair, poor hematopoietic stem cell survival, genomic instability, and cancer. For molecular dissection of the FA pathway, we have been using chicken B cell line DT40 as a model system. In this review, we will summarize our current understanding of the pathway, and discuss how studies using DT40 have contributed to this rapidly evolving field.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	93
2. FA is a disorder defective in DNA damage response/DNA repair	93
3. Studying FA gene function in the Ig diversification	94
4. Epistasis analysis using FA/HR double knockouts	95
5. The FA-TLS connection	95
6. Spontaneous SCEs levels are increased in DT40 FA mutants	95
7. Monoubiquitination of FANCD2 is critical for DNA repair function of the FA pathway	96
8. Breast cancer genes: down stream or parallel effectors of the FA pathway?	96
9. Monoubiquitin functions as an attachable localization tag for FancD2	97
10. Testing function of the core complex independent of FANCD2 monoubiquitination	97
11. FAAP100	98
12. Fanci: the newest member of the FA pathway	98
13. Fanci phosphorylation as a molecular switch in the FA pathway activation	98
14. More unanswered questions	99
14.1. What is the main biochemical activity of FANCD2 (and FANCI)?	99
14.2. How does FANCI get phosphorylated? How the phosphorylation activates the core complex to monoubiquitinate FANCD2/FANCI?	99
14.3. What is the role of FANCI in ICL repair? Why are FA-J cells ICL sensitive?	99
14.4. What is the endogenous DNA damage the FA pathway is coping with?	99
Conflict of interest	99
Acknowledgments	99
References	100

* Corresponding author. Tel.: +81 75 753 7563; fax: +81 75 753 7564.

E-mail address: mtakata@house.rbc.kyoto-u.ac.jp (M. Takata).

¹ Present address: Department of Molecular Oncology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.