

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

## ファンコニ貧血の遺伝子解析

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：**東海大矢部博士らとの共同研究で、日本人ファンコニ貧血（FA）患者の遺伝子解析を進めてきた。原因遺伝子を決定した FA 患者において、アルデヒド代謝酵素である ALDH2 の多型を調べ、ALDH2 バリエーション型では骨髄不全の進行が強く促進されることを明らかにした。特に、ALDH2 酵素活性が完全欠損した ALDH2 バリエーション AA 型（ホモ）FA 患者を合計 5 例見出し、全例出生直後から強い血液学的異常が観察された。これらの結果は、特異な重症型 FA の存在を確立し、FA 患者の骨髄不全における病態の本質に強い示唆を与え、また、将来の治療法開発への道を開くものと言える。また、FA 患者のマネジメントに出生早期の ALDH2 のジェノタイプングが有用である可能性がある。

### A．研究目的

ファンコニ貧血（FA）は骨髄不全、奇形、白血病、固形腫瘍などを呈し、稀ながらその重篤な症状と診断治療法の確立の遅れから、特に小児の临床上重大な問題となっている。典型的な症例では外見上の特徴からも診断が可能な場合もあるが、非典型例、成人発症の軽症例、また遺伝子のリバージョンによるモザイク症例などでは、診断に至らず見逃されて化学療法時に重篤な副作用を発症するなどの可能性も指摘されている。

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 症例においては、現 17 種類におよぶ数多い原因遺伝子の異常により、DNA 損傷応答や修復において重要な機能をもつ FA 経路の機能が欠損し、DNA 障害の蓄積によって造血幹細胞不全、発がんなどの重篤な症状を引き起こすと考えられる。しかし、その病態の詳細はいまだ十分理解されたとは言えず、骨髄移植以外、本質的な治療法の開発には至っていない。

最近 FA 遺伝子とアルデヒド代謝酵素 ALDH2 とのダブルノックアウトマウスにおいて、骨髄不全と白血病の病態が強く促進されることが報告された

（Langevin et al. Nature 2011; Garaycochea et al. Nature 2012）。これは、内因性アルデヒドによる DNA 損傷が FA 遺伝子欠損による DNA 修復機能の対象となることを強く示唆している。さらに、このダブルノックアウトマウスは、母マウスの ALDH2 遺伝子型に大きく成長と血液学的所見が影響されることも報告された（Langevin et al. Nature 2011; Oberbeck et al. Mol Cell 2014）。ALDH2 により分解される内因性アルデヒドが胎児から胎盤を通過し、母体で分解されることが大きな生物学的意義をもつことを示唆する所見である。

これらの報告に基づき、我々は日本人 FA 患者で ALDH2 の遺伝子型を調べ、ALDH2 酵素活性が正常な GG 型に比べて、ヘテロバリエーションの GA 型では軽度、ホモバリエーションの AA 型では強く骨髄不全進行が促進されること、AA 型では MDS の発症も強く促進されることを見出した（Blood 2013）。今年度はさらに、追加症例での ALDH2 遺伝子型検索を行った。また、AA 型 FA 児の母親の遺伝子型も検索の対象とした。

### B．研究方法

東海大学矢部博士からの FA 患者のサンプルからゲノムを分離し、ALDH2 遺伝子型を九州大学医学

部の松尾恵太郎博士から恵与された Taqman PCR 法によって決定した。

(倫理面への配慮)

本研究計画は、「ファンコニ貧血と関連病態の原因遺伝子解析」として京都大学医の倫理委員会に申請し、G434 号として承認を受けている。矢部博士からの検体は京大への送付時にすべて匿名化されている。

## C . 研究結果

ALDH2 は飲酒等の外因性、体内代謝による内因性のアセトアルデヒドを主な基質とし、アルデヒド代謝に関わる重要な酵素である。日本、韓国、中国において高頻度に変異型アレル(ここでは正常活性のものを G 型、活性のないものを A 型とする)が見出される。すなわちホモで A 型を持つ個人では酵素活性が消失し、ヘテロの GA 型でもドミナントネガティブ効果により活性が 2-4 割に低下し、飲酒後の顔面紅潮、頻脈などの原因となることが知られている。この酵素の活性と FA 表現型の関係をヒトにおいて明らかにするため、昨年度 64 例の日本人 FA 患者において、ALDH2 遺伝子型を決定し報告した。GG 型、GA 型、AA 型は、それぞれ 36、25、3 例であった。今年度これに追加して、もう 2 例の AA 型患者がみつきり、合計 5 例となった。

これらの AA 型症例は全例、生下時ないし生後まもなく血液学的異常を認め、GG 型、GA 型とは全く異なる経過をとった。1 例は、重症再生不良性貧血、残り 4 例は MDS として発症した。また、全例臓器の奇形を伴っていた。

5 例のうち 4 例で母親の ALDH2 遺伝子型の検索の同意が得られた。マウスとは全くことなり、2 例の母親は AA 型、2 例は GA 型という結果であった。

## D . 考察

日本人 FA 患者における ALDH2 遺伝子型の解析から、骨髄不全を中心とした FA の病態にアルデヒド代謝が大きな役割を果たすことがますます確実となる結果が得られた。造血幹細胞における内因性のアルデヒドが DNA を障害し、その修復が不十分になることで、幹細胞に DNA 障害が蓄積し、p53 発現な

どの DNA 損傷応答が引き起こされると考えられる。さらに今後、基礎研究としては、ヒトの血液幹細胞における ALDH サブタイプの発現などを確認していく必要が考えられる。また、臨床研究としては他の血液疾患や家族性乳がんにおける ALDH2 遺伝子型の役割についても検証が必要と思われる。

マウスとは違い、FA 児の母親に ALDH2 の AA 型が高頻度に存在することは驚きである。種が異なることによる違いではあるが、これをどう説明するか、今のところ十分な知見はない。ヒトの AA 型はマウスのノックアウトに比せば、いくらかの酵素活性が残るはずであるが、マウスではヘテロでも胎児が維持できない (Mol Cell 2014) ということなので、それでは説明できない。他の ALDH 酵素活性、分布、体内のアルデヒド代謝など様々な要因が寄与する可能性があり、解明には今後の研究が必要である。

今後、患者の治療への展開として、食物中飲料中のアルデヒド量が減らせないか、内因性アルデヒド産生のメカニズム解明と制御法の開発、ALDH2 酵素活性の活性化剤の応用、などが考えられる。ALDH2 活性化剤については、急性アルコール中毒を対象に治験開始が近いと聞いている (私信)。

## E . 結論

これらの結果は、特異な重症型 FA の存在を確立し、FA 患者の骨髄不全における病態の本質に強い示唆を与え、また将来の治療法開発への道を開くものと言える。また、FA 患者のマネジメントに出生早期の ALDH2 のジェノタイプピングが有用である可能性がある。

## F . 研究発表

1. 論文発表
  - 1) Sato K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. Defective FANCI Binding by a Fanconi Anemia-Related FANCD2 Mutant. **PLoS One**. 2014;9(12):e114752.
  - 2) Ishii K, Ishiai M, Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Niwa O, Takata M, and Shinohara T. The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b Pathway Regulates the Radiation Response of Mouse Spermatogonial Stem

- Cells. **Stem Cell Reports**. 2014;3(4):676-89.
- 3) Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M, Kurumizaka H. Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using Escherichia coli cells. **Protein Expr Purif**. 2014;103C:8-15.
  - 4) Huang Y, Leung JW, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X, Huong D, Takata M, Chen J, Li L. Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. **Cell Rep**. 2014;7(6):1849-57.
  - 5) Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugasawa K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, Takata M. FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. **Cell Rep**. 2014;7(4):1039-47.
  - 6) Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, Takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, Enomoto T. Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. **Biochim Biophys Acta**. 2014;1843(5):1002-12.
2. 学会発表
- 1) 高田穰. ファンコニ貧血症と DNA 修復メカニズム. **第 36 回日本光医学・光生物学学会シンポジウム** (招待講演) (2014 年 7 月 25 日, 大阪).
  - 2) 高田穰. 遺伝性 DNA 修復異常疾患: 家族性乳がん と ファンコニ貧血. **日本家族性腫瘍学会 第 17 回家族性腫瘍セミナー** (2014 年 8 月 24 日, 東大阪).
  - 3) 平明日香. 日本人ファンコニ貧血患者では変異型 ALDH2 が骨髄不全の早期発症に関連する. **第 2 回ブルストル血液学アカデミー** (2014 年 9 月 20 日, 京都).
  - 4) 平明日香, 吉田健一, 佐藤浩一, 嶋本顕, 田原栄俊, 胡桃坂仁志, 小川誠司, 高田穰, 矢部普正, 矢部みはる. 日本人ファンコニ貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定. **第 37 回日本分子生物学会年会** (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
  - 5) 高田穰, 勝木陽子, 佐藤浩一, 石合正道, 胡桃坂仁志. ファンコニ貧血経路とそのキータンパク質 FANCD2 の機能解析. **第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ** (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
  - 6) 坂本裕貴, 大川沙織, 穀田哲也, 勅使河原愛, 飯島健太, 高田穰, 小松賢志, 田内広. 相同組換え修復の細胞周期依存性解析. **日本放射線影響学会第 57 回大会** (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島).
  - 7) 秋山 (張) 秋梅, 吉川幸宏, 松井亜子, 細木彩夏. 低線量 (率) 放射線による生物影響研究の新展開. **日本放射線影響学会第 57 回大会** (ワークショップ) (2014 年 10 月 1-3 日, 鹿児島).
  - 8) Takata M, Hira A, Yoshida K, Sato K, Shimamoto A, Tahara H, Kurumizaka H, Ogawa S, Yabe H, Yabe M. UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients. **The 9<sup>th</sup> 3R Symposium** (17-21, November, 2014, Gotemba).
  - 9) Takata M. Comprehensive analysis of Japanese Fanconi anemia (FA) patients has led to the identification of an E2 enzyme UBE2T as a novel FA gene. **日米修復会議** (2014 年 10 月 29 日, 鳴門).
  - 10) 高橋大介, 佐藤浩一, 平山恵美子, 高田穰, 胡桃坂仁志. DNA 鎖間架橋除去における FAN1ヌクレアーゼの役割. **第 87 回日本生化学会大会** (2014 年 10 月 15-18 日, 京都).
  - 11) 久野真央, 平明日香, 高田穰. ゲノム編集酵素によるファンコニ貧血原因遺伝子 FANCA のノックアウト細胞作製の試み. **第 37 回日本分子生物学会年会** (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
  - 12) 平明日香, 吉田健一, 佐藤浩一, 嶋本顕, 田原栄俊, 胡桃坂仁志, 小川誠司, 高田穰, 矢部普正, 矢部みはる. 日本人ファンコニ貧血患者における新規原因遺伝子 UBE2T の同定. **第 37 回日本分子生物学会年会** (2014 年 11 月 25-27 日, 横浜).
  - 13) 高田穰, 勝木陽子, 佐藤浩一, 石合正道, 胡桃坂仁志. ファンコニ貧血経路とそのキータンパク質 FANCD2 の機能解析. **第 37 回日本分子生**

**物学会年** (2014年11月25-27日, 横浜).

- 14) 佐藤浩一, 石合正道, 高田穰, 胡桃坂仁. Fanconi 貧血患者にみられる FANCD2 変異体の機能解析. **第37回日本分子生物学会年会** (2014年11月25-27日, 横浜).
- 15) 平山恵美子, 高橋大介, 佐藤浩一, 高田穰, 胡桃坂仁志. DNA 鎖間架橋修復で働く FAN1ヌクレアーゼの生化学的機能解析. **第37回日本分子生物学会年会** (2014年11月25-27日, 横浜).

**G . 知的財産権の出願・登録状況**

なし