

先天性骨髄不全症の診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの確立に関する研究

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：主に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）患者と関連病態の疫学調査に資するため、FA の既知遺伝子の解析を進めてきた。従来のエクソーム解析で不明例とされたものをさらに解析したところ、その多くは、既知遺伝子のシノニマス変異でスプライシング異常を引き起こすものであった。今後の疫学・分子診断において重要な知見と思われた。

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臨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、臨床上末梢血リンパ球の染色体断裂検査が有用と考えられる。

しかし、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。遺伝子診断は、これらの症例に確実な診断をもたらす、その有用性が期待される。また、FAは、遺伝子の違いによって、その病態が微妙に異なる可能性が考えられ、きちんとした疫学的調査や診療ガイドライン策定においても、原因遺伝子を確定させるべく症例ごとに遺伝子診断を積み重ねていくことが重要と考えられる。

今年度は、従来の検討で原因遺伝子が不明であった症例をゲノムシーケンスやRNAシーケンスで追求し、その多くにおいて確定できたので報告する。

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及びRNAを分離し、名古屋大学小島教授のグループ、京大小川教授のグループと共同で全ゲノム

シーケンス、RNAシーケンスを施行し、従来のエクソームのデータを含めて見直しを行った。

（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。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

全ゲノムシーケンス、RNAシーケンスを行うことで、従来の未解決症例の多くは、既知遺伝子のスプライシング異常によりFAを発症していることが明らかとなった。

まず、症例Aであるが、全ゲノムシーケンスによって *FANCL* 遺伝子（NM_018062）に、c.G1092A:pK369K をhomozygousで検出した。この変異はcoding内のシノニマス変異であり、エクソームでも捕まっていたが、見逃しており再度の全ゲノムシーケンス等の施行によって見直すことで変異の同定に至った。この変異はエクソン12の端にあり、スプライシングに影響してエクソン13をスキップさせる効果がRT-PCRで確認された。この部分は、E3リガーゼであるFANCLのリングドメインの主要部分を含んでおり、FANCLの機能を消失させると判断できる。同じ変異は、すでにBlood 121: 138, 2013で

報告されている。

次に、症例Bであるが、この症例は全ゲノムシーケンスで、FANCC NM_001243743 c. 1154+5G>A homozygousが確認された。この変異は、エクソ-イントロンのジャンクションから5bpイントロンに入った部位の変異で、エクソン12と13の間のイントロンがスプライスされず、そのためにpremature stop codonが現れることが確認された。我々の一連の解析での初めてのFANCC症例である。

症例Cは、RNAシーケンスによりFANCB遺伝子のエクソン7のスキッピングが確認され、エクソーム解析データを見直すと、対応してc.G1497T:p.L499Lのシノニマス変異がエクソ-イントロンのジャンクションに発見された。

症例Dは、RNAシーケンスによってPALB2/FANCN遺伝子のエクソン12のスキッピングが発見され、対応してc.3350+5C>T homozygousが見出された。既報のFANCB変異症例における臨床所見と一致して、この症例は小児がんを発症するなど、重症と判断された。

症例Eは、エクソーム解析で、FANCI遺伝子のc.158-2A>G heterozygous、c.G288A, p.E96E heterozygousを見出した。前者はイントロンの変異、後者はシノニマス変異であり、共にスプライスの異常を引き起こしていた。

症例Fは、FANCI遺伝子のc.3346_3347insT hetero、c.2826+3A>G heteroであり、前者はフレームシフトだが、後者はやはりスプライス異常であった。

以上の解析によって、未解決と考えていた症例9例中、6例において原因遺伝子が確定した。

D . 考察

従来施行したエクソーム解析は、多くのFA症例で原因遺伝子を確定させる非常にパワフルな方法だが、それでも一部に未解決症例が残っていた。今回の解析で、RNAシーケンスなどによってスプライス異常などに気付くことができた。結果としては、見逃されていたシノニマス変異、スプライスサイト変異によることが多く、今後の解析において教訓を与えるものとなった。

E . 結論

東海大矢部みはる、矢部普正博士らが収集されたFA症例において、従来新規のFA遺伝子FANCTを見出したが、その後の追加解析で、エクソーム解析後の未解決症例は、多くが既知遺伝子の変異見逃しによるものであることが判明した。今後の疫学・分子診断において重要な知見と思われた。これらの知見は矢部博士らと作成した診療ガイドライン作成の基盤となるものである。もう数例は未解決であり、今後も解決へ向けて努力を継続する。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, and Kojima S. Clinical Utility of Next-generation Sequencing for Inherited Bone Marrow Failure Syndromes. **Genet Med.** 2017 Jan 19. doi: 10.1038/gim.2016.197.
- 2) Ling C, Huang J, Yan Z, Li Y, Ohzeki M, Ishiai M, Xu D, Takata M, Seidman M, and Wang W. Bloom syndrome complex promotes FANCM recruitment to stalled replication forks and facilitates both repair and traverse of DNA interstrand crosslinks. **Cell Discov.** 2016 Dec 20;2:16047. doi: 10.1038/celldisc.2016.47.
- 3) Tian X, Patel K, Ridpath JR, Chen Y, Zhou YH, Neo D, Clement J, Takata M, Takeda S, Sale J, Wright FA, Swenberg JA, Nakamura J. Homologous recombination and translesion DNA synthesis play critical roles on tolerating DNA damage caused by trace levels of hexavalent chromium. **pLOSOne** 2016 Dec 1;11(12):e0167503.

- 4) Sato K, Shimomuki M, Katsuki Y, Takahashi D, Kobayashi W, Ishiai M, Miyoshi H, Takata M, Kurumizaka H. FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex by binding RAD51 and protects the 5'-DNA end. **Nucleic Acids Res.** 2016 Sep 30. pii: gkw876. PMID: 27694619.
- 5) Katsuki Y, Takata M. Defects in HR repair behind the human diseases: FA and HBOC. **Endocr Relat Cancer.** 2016 Oct;23(10): T19-37.
- 6) Hashimoto K, Sharma V, Sasanuma H, Tian X, Takata M, Takeda S, Swenberg J and Nakamura J. Poor recognition of O6-isopropyl dG by MGMT triggers double strand break-mediated cell death and micronucleus induction in FANCD1-deficient cells. **Oncotarget** 2016 Jul 29. doi: 10.18632/oncotarget.10928. [Epub ahead of print]
- 7) Yabe M, Yabe H, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Matsuo K, Hira A, Takata M. The phenotype and clinical course of Japanese Fanconi Anaemia infants is influenced by patient, but not maternal ALDH2 genotype. **Br J Haematol.** 2016 Nov;175(3):457-461. doi: 10.1111/bjh.14243.
2. 学会発表
- 1) Takata M. Pathogenesis of Fanconi anemia: an update. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON "REVOLUTION OF LABORATORY MEDICINE IN MODERN BIOLOGY"** (招待講演)(2017年2月15-17日, ムンバイ).
- 2) 高田 穰. 新規ファンコニ貧血原因遺伝子である RFWD3/FANCD1の相同組換え修復における役割の解明. **第8回群馬大学 Genome Damage Discussion Group セミナー** (招待講演)(2016年12月21日, 前橋).
- 3) Takata M. "Genetic basis for childhood bone marrow failure and malignancies" A novel Fanconi anemia gene regulates ICL repair and homologous recombination. **第58回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム** (招待講演)(2016年12月15-17日, 東京).
- 4) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 勝木陽子, 石合正道, 中田慎一郎, 胡桃坂仁志, 高田 穰. 新規ファンコニ貧血遺伝子RFWD3による相同組換え修復制御メカニズム. **九州大学薬学部・藤田雅俊研究室研究セミナー** (招待講演).
- 5) Inano S, Sato K, Knies K, Katsuki Y, Nakada S, Takaori-Kondo A, Ishiai M, Schindler D, Kurumizaka H, Takata M. Novel Fanconi anemia E3 ligase RFWD3 promotes removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites during ICL repair. **28th Annual Fanconi Anemia research frund Scientific Symposium.** (September 15-18 2016, Bellevue, WA USA).
- 6) Yabe M, Morimoto T, Fukumura A, Ohtsubo K, Koike T, Shimizu T, Takakura H, Koh K, Ito E, Kojima S, Hira A, Takata M and Yabe H. Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in Japanese Fanconi anemia patients. **28th Annual Fanconi Anemia research frund Scientific Symposium.** (September 15-18 2016, Bellevue, WA USA).
- 7) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 勝木陽子, 石合正道, 中田慎一郎, 胡桃坂仁志, 高田 穰. 相同組換えにおけるRPAおよびRAD51の動態制御はRFWD3によるユビキチン化に依存する. **第75回日本癌学会学術総会 シンポジウム18 がんにおける染色体・ゲノム不安定性の分子基盤** (2016年10月6-8日, 横浜).
- 8) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 勝木陽子, 中田慎一郎, 石合正道, 胡桃坂仁志, 高田 穰. An E3 ligase RFWD3 is a critical component that facilitates RPA and RAD51 dynamics in homologous recombination. **放射線・ゲノムストレスに対抗する多彩な生命システムの解明に向けて. 放射線影響学会第59回大会 (ワークショップ)** (招待講演)(2016年10月26日, 広島).
- 9) 石合正道. **放射線・ゲノムストレスに対抗する多彩な生命システムの解明に向けて. 放射線影**

響学会第59回大会（ワークショップ）（2016年10月26日，広島）。

- 10) 田部井由依，大橋由佳，坂本裕貴，小摩木里奈，穀田哲也，勅使河原愛，飯島健太，高田穰，小松賢志，田内広．損傷応答キナーゼ活性が相同組換え修復に与える影響．**放射線影響学会第59回大会**（2016年10月26-28日，広島）。

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし