

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。今年度は国内から3例の新規症例を解析した。さらに、これまでの症例の解析結果の見直しを進め、合計117例の症例について、まとめることを試みた。

### 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临床上重大な問題となっている。本研究班では日本人ファンコニ貧血症例の原因遺伝子の同定を進め、臨床現場へのフィードバックと、疫学研究を推進してきた。今年度は、これまでの症例の解析結果の見直しを進め、東海大矢部博士、名古屋大小島勢二博士らとの共同研究の結果である合計117例の症例について、まとめることを試みた。

### B．研究方法

ルーチンとして随時受け付けているファンコニ貧血疑い症例の分子診断をFANCAとFANCG遺伝子のコモン変異について施行した。分子診断を施行した過去の記録を見直し、レビューした。遺伝子変異の機能的意義について、実験的に検証した。特に重症な例については、矢部博士に依頼して臨床情報を入力した。日本人FA患者で比較的頻度の高いものについて、健常人における頻度を知るため、東北メガバンクの安田純教授と共同研究を行った。

（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

今年度新規に受け付けた症例の分子診断は、第一例については、片アリル FANCA 2546delC 判明（もう片アリルは MLPA も行ったが不明）、二例目、FANCG c.1066C>T homo。もう一例は、common mutation なく、名古屋大学のターゲットシーケンスに提出した。

現在まで集積した117例（113家系）について、遺伝子の変異と、その効果について解析し、まとめた。同定された変異遺伝子では、FANCAとFANCG変異が58%と24%を占めており、合計で82%の症例で確認された。55種類の異なったバリエーションが68症例のFANCA患者で同定された。内訳は、17種類のヌクレオチド置換変異、16種類の欠失挿入、12種類の巨大欠失、一つの巨大繰り返し挿入9つのスプライス部位変異などであった。FANCA のc.2546delC が最も頻度の高い変異で、32%で認められた。この変異は、日本人集団で頻度が比較的高く、東北メガバンクの健常人データベース3.5KJpnにおいても0.1%程度検出された。28人のFANCG患者において、二つのFANCG mutations（c.307+1G>C and c.1066C>T）変異アレルの88%に相当した。面白いことに、これら3つの変異は韓国のFA患者においてもドミナントに認められており（Clin Genet. 2013;84:271-275）、これらの変異が現代日本人と韓国人の祖先が同一集団であった時代に誕生し、その後日本人の祖先が移動して日本列島に持ち込まれたものと思われる。

FANCAとFANCG以外の稀なタイプの中で、重篤

な奇形をFANCBとFANCIの変異で認めた。また、3例のFANCD1 (BRCA2) と1例のPALB2変異 (FANCN)を同定したが、様々な腫瘍を合併していた。

ごく一部にどうしても既知の原因遺伝子の変異が同定できない症例が存在し、今後の解析が必要である。

#### D . 考察

117例の日本人患者の分子診断をまとめることにより、日本人におけるファンコニ貧血患者の変異スペクトラムを明らかにした。一部の患者で、FANCB、FANCD1など稀な遺伝子型の患者では通常のファンコニ貧血とは違い、重症奇形、低年齢での発がんなどの特殊な病態を呈している。これらの知見は、今後の分子診断を効率よく施行する上での基礎データになるものである。今後、一般の日本人集団での変異頻度のデータの蓄積によって、様々な病態との関連性などが浮かび上がってくる可能性がある。東北メガバンク等のデータベース、バイオバンクの充実により、一般人におけるFA遺伝子の変異頻度についても明確化され、様々な遺伝病のリスクなどについても、より確実な遺伝カウンセリングなどが可能となる時代が近づいていると思われる。

#### E . 結論

多数の症例をまとめることで、日本人ファンコニ貧血原因遺伝子の疫学的特徴を明確化した。今後論文発表の予定である。

#### F . 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Okamoto Y, Iwasaki WM, Kugou K, Takahashi KK, Oda A, Sato K, Kobayashi W, Kawai H, Sakasai R, Takaori-Kondo A, Yamamoto T, Kanemaki MT, Taoka M, Isobe T, Kurumizaka H, Innan H, Ohta K, Ishiai M, Minoru Takata M. Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes. **Nucleic Acid Res.** 2018;46(6):2932-2944. doi:10.1093/nar/gky058.

- 2) Kadoda K, Moriwaki T, Tsuda M, Sasanuma H, Ishiai M, Takata M, Ide H, Masunaga SI, Takeda S, Tano K. Selective cytotoxicity of the anti-diabetic drug, metformin, in glucose-deprived chicken DT40 cells. **PLoS One.** 2017;12(9):e0185141. doi:10.1371/journal.pone.0185141. eCollection 2017.
- 3) Mochizuki AL, Katanaya A, Hayashi E, Hosokawa M, Moribe E, Motegi A, Ishiai M, Takata M, Kondoh G, Watanabe H, Nakatsuji N, Chuma S. PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. **Mol Cell Biol.** 2017;37(23). pii: e00117-17. doi:10.1128/MCB.00117-17.
- 4) Knies K, Inano S, Ramirez MJ, Ishiai M, Surallés J, Takata M, and Schindler D. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase *RFWD3* cause Fanconi anemia. **Journal of Clinical Investigation J Clin Invest.** 2017;127(8):3013-3027. doi:10.1172/JCI92069. Epub 2017 Jul 10. PMID: 28691929.
- 5) Inano S, Sato K, Katsuki Y, Kobayashi W, Tanaka H, Nakajima K, Nakada S, Hiroyuki Miyoshi, Knies K, Takaori-Kondo A, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. RFWD3-mediated ubiquitination promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination. **Mol Cell.** 2017;66(5):622-634.e8. doi:10.1016/j.molcel.2017.04.022. PMID: 28575658.
- 6) Sekinaka Y, Mitsui N, Imai K, Yabe M, Yabe H, Mitsui-Sekinaka K, Honma K, Takagi M, Arai A, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Muramatsu H, Kojima S, Hira A, Takata M, Ohara O, Ogawa S, Morio T, Nonoyama S. Common Variable Immunodeficiency Caused by FANC Mutations. **J Clin Immunol.** 2017;37(5):434-444. doi:10.1007/s10875-017-0396-4. PMID:28493158.

- 7) Ishiai M, Sato K, Tomida J, Kitao H, Kurumizaka H, Takata M. Mutation Research special section "Protein modifications in DNA repair and cancer" Activation of the FA pathway mediated by phosphorylation and ubiquitination. **Mutat Res.** 2017 May 5. pii: S0027-5107(17)30078-7. doi:10.1016/j.mrfmmm.2017.05.003.
- 8) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 胡桃坂仁志, 高田穰. ファンコニ貧血の新規原因遺伝子 *RFWD3/FANCW* の機能解析から明らかになった相同組換え反応制御機構. **生化学**. (印刷中)
- 9) 石合正道, 高田穰. 2.18 放射線応答遺伝子の生物種間の保存・相関. **放射線医科学の事典** 編集 宮川清, 監修 大西武雄.
- 10) 稲野将二郎, 高田穰. 新規 Fanconi anemia 遺伝子 *RFWD3/FANCW* の発見と機能解明. **小児血液がん学会誌** 2017;54(5):287-293.
- 11) 稲野将二郎, 佐藤浩一, 胡桃坂仁志, 高田穰. Fanconi 貧血の新規の原因タンパク質 *RFWD3* による相同組換えの制御. **ライフサイエンス** 新着論文レビュー. <http://first.lifesciencedb.jp/archives/16605>.
- 12) 矢部普正, 高田穰, 村松秀樹. III Fanconi 貧血. **先天性骨髄不全症診療ガイドライン 2017**. 編集 日本小児血液・がん学会 診断と治療社.
2. 学会発表
- 1) 高田穰. 「ファンコニ貧血経路による染色体ストレス応答制御」「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」. **神戸大学大学院講義&セミナー 現代の生物学 II**(招待講演)(2017年12月22日, 神戸).
- 2) Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein *RFWD3/FANCW*. (Invited lecture) (2017年12月14日, 台湾).
- 3) 勝木陽子, 安倍昌子, H. van Attikum, 中田慎一郎, 鐘巻将人, Kim Y, 高田穰. ICL 修復因子 *SLX4* は *RNF168* 依存的なユビキチン化経路を介して損傷部位に集積する(ワークショップ). **ゲノム恒常性維持機構の破綻と疾患発症の分子メカニズム(3PW02)** (招待講演). **2017年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 / 第40回日本分子生物学会年会**(2017年12月6-9日, 神戸).
- 4) 岡本裕介, 岩寄航, 高橋数冴, 久郷和人, 小田有沙, 河合秀彦, 佐藤浩一, 小林航, 逆井良, 高折晃史, 山本卓, 鐘巻将人, 田岡万悟, 磯部俊明, 胡桃坂仁志, 印南秀樹, 太田邦史, 石合正道, 高田穰. 複製ストレスにおける染色体脆弱部位への R-Loop 依存性 *FANCD2* 集積メカニズム. **第40回日本分子生物学会年会** (2017年12月6-9日, 神戸).
- 5) 松井美咲, 木村祐輔, 安倍昌子, 石合正道, 堀利行, 高田穰, Jackson S, 西良太郎. 核内構造体に局在する因子による相同組換え修復制御「遺伝的組換えの分子メカニズムとその生理的機能と技術応用」(ワークショップ). **第40回日本分子生物学会年会** (2017年12月6-9日, 神戸).
- 6) L. Mochizuki A, Katanaya A, Hayashi E, Hosokawa M, Moribe E, Motegi A, Ishiai M, Takata M, Kondoh G, Watanabe H, Nakatsuji N, Chuma S. PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. **日本遺伝学会第89回大会** (2017年9月13-16日, 岡山).
- 7) Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein *RFWD3/FANCW*. **1st International Symposium on Radiation Therapeutics and Biology (isRTB-2017)** (2017年10月31日-11月1日, 中国・深圳).
- 8) 高田穰. ファンコニ貧血とゲノム損傷修復因子: 患者サンプル解析による希少疾患病態解明を目指して. **金沢大学薬学シンポジウム 2017** (2017年10月6日, 金沢).
- 9) 高田穰. 「ファンコニ貧血の原因遺伝子探索と相同組換えの新規メカニズム」. **名古屋大学平成29年度基盤医学特論** (招待講演)(平成29年9月21日, 名古屋).
- 10) Knies K, Inano S, J. Ramirez M, Ishiai M,

Surrallés J, Takata M, and Schindler D. Biallelic mutations in the ubiquitin ligase *RFWD3* cause Fanconi anemia. **29th Annual Fanconi Anemia Scientific Symposium** (2017年9月14-17日, 米国・アトランタ).

- 11) Inano S, Sato K, Katsuki Y, Knies K, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein RFWD3/FANCW. **Center for Genomic Integrity at UNIST invited lecture** (2017年6月27日, 韓国・蔚山).
- 12) Takata M. Regulation of homologous recombination repair by a novel Fanconi anemia E3 ligase RFWD3/FANCW. **6th US-Japan DNA Repair Meeting** (2017年5月17-21日, 米国・パークレー).
- 13) Inano S, Sato K, Katsuki Y, Knies K, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. Regulation of homologous recombination by a novel FA protein RFWD3. **FEBS workshop Nucleotide excision repair and crosslink repair - from molecules to mankind** (2017年5月7-11日, スロバキア).

#### G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし