

ファンコニ貧血の遺伝子解析

研究分担者 高田 穰（京都大学大学院生命科学研究科附属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。本年は、昨年度にまとめた日本人ファンコニ貧血患者、合計 117 例の症例の解析結果について、論文化した。また、国内 FA 症例について、少数であるが、検討を行った。インドの研究者と共同研究を行い、インドにおける FA 症例を解析し、FANCL 変異例が高頻度で存在することを発見した。

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。本研究班では日本人ファンコニ貧血と関連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する。

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。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。また、インド、ムンバイの研究者らと共同でインドのFA症例の遺伝子診断を進めた。

（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

今年度は、これまでの症例の解析結果の見直しを

進め、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、解析し論文化した（Mori et al. Haematologica 2019）。東海大矢部博士、弘前大伊藤博士、名古屋大小島勢二博士らとの共同研究の結果である。

内容は、昨年度の報告にも部分的にはあるので、簡潔に記述する。日本人FA患者117人のゲノム解析を行い、欧米とは異なる日本人における原因遺伝子、その変異の特徴、さらに原因遺伝子と表現型との関連を明らかにした。日本人FAの原因遺伝子としてFANCAが58%、FANCGが25%であり、最も頻度の高いFANCA遺伝子における変異パターンは多彩で、高頻度な変異としてc.2546delCが同定された。一方、FANCG遺伝子における変異パターンは少なく、2つの変異（c.307+1G>Cとc.1066C>T）でFANCG原因遺伝子の86%を占めていた。FANCB、FANCIを原因遺伝子とする症例では極めて重症な先天異常を有し、FANCD1、FANCNを原因遺伝子とする症例では骨髄不全を呈さず、若年で悪性腫瘍を合併し予後不良であった。

インドでのFA遺伝子検索の結果、FANCL遺伝子の変異FANCL c.1092G>Aを高頻度に認め、論文提出中である。最終的に、インド人症例12例、パキスタン人1例にこの変異を同定した。この変異はアミノ酸レベルでの変化を伴わないsynonymous変異（p.K364K）であるが、ちょうどエクソン-イントロンの境界にあり、スプライシングに影響してエクソン13のスキッピングを起こす。このため、FANCL

蛋白質のリングドメインに部分的な欠失を生じ (p.W341_K364del)、機能的にはヌルとなると考えられる。実際、患者由来の線維芽細胞ではキー蛋白質であるFANCD2のモノユビキチン化とフォーカス形成を認めることができず、細胞もクロスリンク剤に感受性を示した。

D . 考察

117例の日本人FA患者の分子診断結果をまとめ、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。いまだかつて、これだけの規模の日本人FA患者の分子診断(タイプ分類)の結果がまとめられたことはない。これらの知見は、今後のFA患者の臨床的マネジメントや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。

今回合わせて、東北メガバンクのデータベースによって、日本人におけるFA遺伝子異常の頻度も算定し、~2.6%と算定された。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、家族性乳がん卵巣がんなど、さまざま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。インドでは全く違うスペクトルのFA遺伝子変異が高頻度に認められている。エスニック集団の過去の歴史がこれらの頻度に反映すると考えられ、さらに多数の疾患患者と健常人のデータが揃うことで、FAのみならず、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

多数の症例の分子診断結果にもとづき、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、論文発表した。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okamoto Y, Hejna J, Takata M. Regulation of R-loops and genome instability in Fanconi anemia. **J Biochemistry Tokyo**. 2019. (in press)
- 2) Ninomiya K, Hata T, Yoshioka H, Ohashi, K, Bessho A, Hosokawa S, Ishikawa N,

Yamasaki M, Shibayama T, Aoe K, Kozuki T, Harita S, Ueda Y, Murakami T, Nobukazu F, Yanai H, Toyooka S, Takata M, Hotta K, Kiura K. A prospective cohort study to define the clinical features and outcome of lung cancers harboring HER2 aberration (HER2-CS STUDY) in Japan". **Chest** 2019. (in press)

- 3) Mori M, Hira A, Yoshida K, Muramatsu H, Okuno Y, Shiraishi Y, Anmae M, Yasuda J, Tadaka S, Kinoshita K, Osumi T, Noguchi Y, Adachi S, Kobayashi R, Kawabata H, Imai K, Morio T, Tamura K, Takaori-Kondo A, Yamamoto M, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S, Matsuo K, Yabe H, Yabe M, Takata M. Pathogenic mutations identified by a multimodality approach in 117 Japanese Fanconi anemia patients. **Haematologica** 2019. (in press)
- 4) Okamoto Y, Abe M, Itaya A, Tomida J, Ishiai M, Takaori-Kondo A, Taoka M, Isobe T, and Takata M. FANCD2 protects genome stability by recruiting RNA processing enzymes to resolve R-loops during mild replication stress. **FEBS J**. 2019. (in press)
- 5) Yabe M, Koike T, Keisuke Ohtsubo, Eri Imai, Morimoto T, Takakura H, Koh K, Yoshida K, Ogawa S, Ito E, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S, Matsuo K, Mori M, Hira A, Takata M and Yabe H. Associations of complementation group, *ALDH2* genotype, and clonal abnormalities with hematological outcome in Japanese patients with Fanconi anemia. **Ann Hematol**. 2018;98(2):271-280. doi: 10.1007/s00277-018-3517-0.
- 6) Abe T, Ooka M, Kawasumi R, Miyata K, Takata M, Hirota K, Branzei D. Warsaw Breakage Syndrome DDX11 helicase acts jointly with RAD17 in the repair of bulky lesions and replication through abasic sites. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2018 Aug

- 14;115(33):8412-8417. doi: 10.1073/pnas.1803110115. Epub 2018 Jul 30.
- 7) Higgs MR, Sato K, Reynolds JJ, Begum S, Bayley R, Goula A, Vernet A, Paquin KL, Skalnik DG, Kobayashi W, Takata M, Howlett NG, Kurumizaka H, Kimura H, Stewart GS. Histone Methylation by SETD1A Protects Nascent DNA through the Nucleosome Chaperone Activity of FANCD2. **Mol Cell**. 71(1);25-41.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.018. PMID: 29937342.
 - 8) 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, Takata M. Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes. **Nucleic Acids Res**. 2018 Apr 6;46(6):2932-2944. doi: 10.1093/nar/gky058. PMID: 29394375.
 - 9) 森美奈子, 矢部普正, 矢部みはる, 高田穰. 日本人ファンコニ貧血患者のゲノム解析から得られた知見. **臨床血液**. (in press)
 - 10) 高田穰. ファンコニ貧血の新規原因遺伝子 RFWD3 の同定とその機能解. **医学のあゆみ** 2018;266(6/7):545-546.
 - 11) 稲野将二郎, 高田穰. ファンコニ貧血の新規原因遺伝子 RFWD3/FANCD2 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** 2018;90(3):371-380.
2. 学会発表
- 1) Takata M. Analysis of DNA damage repair by homologous recombination and the Fanconi anemia pathway. **International Particle Medicine Research Symposium IPMRS-2018-Takasaki** (2018年10月30日, 高崎).
 - 2) Takata M. Chromosome stress due to endogenous DNA damage and Fanconi anemia. Symposium "Cancer predisposition and hemato/immunological defect: from children to adults (招待講演)". **第80回日本血液学会** (2018年10月12-14日, 大阪).
 - 3) Katsuki Y, Abe M, Attikum HV, Kim Y, Takata M. The ubiquitination pathway that recruits the Fanconi anemia nuclease scaffold SLX4/FANCP. **International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology. Symposium "Molecular Mechanisms to preserve Genomic Integrity."** (2018年9月17-19日, 韓国・ソウル).
 - 4) 高田穰. 家族性のがんの話. **京都大学研究連携基盤丸の内セミナー**(2018年9月7日, 京都).
 - 5) Takata M. RNF168 mediates the recruitment of SLX4 via ubiquitination during ICL repair (招待講演). **2018 IBS CONFERENCE IBS-KSMCB Conference on Genomic Integrity & Cell Cycle** (2018年6月17-19日, 韓国・慶州).
 - 6) 勝木陽子, 安倍昌子, Attikum HV, 中田慎一郎, 鐘巻将人, Kim Y, 矢部みはる, 矢部普正, 高田穰. DNA クロスリンク切断酵素 SLX4 のユビキチン化による制御機構 (ワークショップ). **第41回日本分子生物学会年会** (2018年11月28-30日, 横浜).
 - 7) 勝木陽子, 安倍昌子, 中田慎一郎, 鐘巻将人, 矢部みはる, 矢部普正, 高田穰. DNA クロスリンク修復因子 SLX4 のユビキチン化による制御機構 (ワークショップ). **日本放射線影響学会第61回大会** (2018年11月7-9日, 長崎).
 - 8) 勝木陽子, 安倍昌子, 中田慎一郎, 鐘巻将人, 矢部みはる, 矢部普正, 高田穰. DNA クロスリンク修復因子 SLX4 のユビキチン化による制御機構 (ワークショップ). **日本遺伝学会第90回大会** (2018年9月19-22日, 奈良).
 - 9) Katsuki Y, Abe M, Attikum HV, Kanemaki M, Nakada S, Yabe M, Yabe H, Yonghwan Kim, Takata M. RNF168 mediates the recruitment of SLX4 via ubiquitination during ICL repair. **The 2nd International Symposium on Radiation Therapeutics and Biology "Molecular Targets and Precision Cancer**

Medicine: From basic research toward translation” (34th Radiation Biology Center International Symposium)(2018年11月10-12日 , 京都).

- 10) 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. **The 2nd International Symposium on Radiation Therapeutics and Biology**“Molecular Targets and Precision Cancer Medicine: From basic research toward translation” (34th Radiation Biology Center International Symposium) (2018年11月10-12日 , 京都).
- 11) Katsuki Y, Abe M, Attikum HV, Kanemaki MT, Nakada S, Yabe M, Yabe H, Kim Y, Takata M. RNF168 mediates the recruitment of SLX4 via ubiquitination during ICL repair. **2018 Gordon Research Conference Genomic Instability** (2018年7月22-27日 , 香港).
- 12) Katsuki Y, Abe M, Attikum HV, Kanemaki MT, Nakada S, Yabe M, Yabe H, Kim Y, Takata M. RNF168 mediates the recruitment of SLX4 via ubiquitination during ICL repair. **3rd DNA Replication/Repair Structures and Cancer Conference** (2018年2月11-15日 , メキシコ・カンクン).

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし