

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断基準・重症度分類・診断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：日本人ファンコニ貧血（FA）患者の遺伝子解析を継続実施した。国際共同研究でインドのFA患者におけるFANCL遺伝子変異多発について論文発表した。FAの遺伝子診断の依頼を受けた症例からFAの亜型である新規の造血不全症ADH5/ALDH2欠損症の新規症例同定に成功した。

### 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。典型的な症例では奇形などの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、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。

臨床の現場で発症早期に確実な分子診断を得ることは、その後のフォロー、骨髄移植の実施と使用薬剤等の判断の上で重要と思われる。本研究では、できるだけ多数のFAと関連病態患者の分子診断結果を集積し、日本人FAの疫学を明らかにすることを目的として継続実施している。

### B．研究方法

日本各地の臨床家から送られたFA患者サンプルからゲノムを分離し、日本人FA患者で高頻度であることが判明している変異であるFANCA遺伝子c.2546delC、FANCG遺伝子c.307+1G>Cとc.1066C>Tについて、ゲノムPCRとサンガーシーケンスによる分子診断を施行した。次世代シーケンサーによる検索は、名古屋大小島勢二博士、京都大小川誠司博士らによって行われた。患者によっては、ADH5/ALDH2欠損症を疑い、同じく既知の変異ADH5変異をPCRとシーケンスで検索した。ALDH2遺伝子型は、愛知がんセンターの松尾恵太郎博士から恵与された試薬を用いたTaqman PCR法

によって決定した。インド、ムンバイのNational Institute of ImmunohematologyのBabu Rao Vundinti博士らと共同で、インドの症例も検索を行った。（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

1．日本国内のFA疑い症例4例を検討し、東京1例、京都2例、岡山1例について検討し、FANCA症例を1例、FANCD2症例を1例同定した。FANCD2症例は、60歳代まで生存しており、国内最高齢のFA症例、しかも国内初のFANCD2変異例であり、症例報告を予定している。若年で奇形などからFAを疑われていたが、症状が軽度であったため、ずっとフォローのみされてきた症例である。経過中、子宮がん罹患、最後はMDSから白血病を発症するなど、FAとしてはある意味典型的な合併症を来している。末梢血リンパ球でのウェスタンブロットでFANCD2の発現を認めており、おそらく片方アレル変異がスプライスサイト変異であるため、少量のFANCD2タンパク質が残っており、軽症化したものと考えられる。Reversion mosaicismも考えられるが、頬粘膜と末梢血両方のエクソーム解析ではリバージョンを支持する結果は得られなかった。ALDH2の遺伝子型はG/Gであり、軽症であったことと一致している。

2．FA疑い症例1例がFANCAとFANCGの高頻度変

異を否定した上で、臨床所見を検討したところ、軽度の精神発達遅延がみられるなどADH5/ALDH2欠損症と一致する面があり、検索したところ、実際にADH5の変異のcompoundheterozygous, ALDH2パリアントがヘテロと診断が確定した。両親からそれぞれの変異アレルを受け継いでいることも確定した。

3. インド人のFA症例の遺伝子変異検索を行ってきており、その結果をまとめてHuman Mutation誌に発表した。他のエスニック集団では稀であるFANL変異c.1092G>Aがインド・パキスタンでは高頻度に認められ、ファウンダー変異と考えられた。

#### D. 考察

日本人FA患者の遺伝子変異探索を継続し、すでに117例の結果をまとめて発表した(Mori et al. Haematologica 2019)。その内容については、昨年の報告書に簡潔に記載した。今年度の成果は、主に新規の数例の追加ということになる。遺伝子変異の確定によって、より確実な診断とさらに集積した症例の臨床経過の追跡によって日本人FA患者の臨床像が明確化し、診断治療の最適化に資することを期待している。

日本人で初のFANCD2患者は、意外にもおそらく今まで診断確定したFAで最高齢にまで達した症例である。このような特異な症例に着目し、きちんと解析を加えていくことが病態解明に向けて有効であると思われる。

臨床所見でFAと考えられた1例が、検索の結果、我々が同定した新規のFA類似病態であるADH5/ALDH2欠損症であった。この新規疾患は、FAと症状は類似しているが、DNA修復欠損はないため、MMCによる染色体脆弱化試験は正常である。ADH5/ALDH2欠損によって、造血細胞の分化によって産生されるホルムアルデヒドによるDNA損傷がこの病態を作り出していることが我々の基礎研究で判明しており、現在投稿中の段階となっている。

インドの症例解析では、異なるエスニック集団における異なる原因遺伝子分布が実証された。ある意味、予想通りの当然の結果ではあるが、FANCL欠損が欧米でまれなためFANCL変異が重篤な症状を与えると従来考えられてきたことを考慮すると、こ

ういった解析が与える知見の重要性が示唆される。

#### E. 結論

FAと関連病態の臨床疫学の解明と臨床現場へのフィードバックを目指して、今後も研究継続が必要と考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hotta K, Yanai H, Ohashi K, Ninomiya K, Nakashima H, Kayatani H, Takata M, Kiura K. Pilot evaluation of a HER2 testing in non-small-cell lung cancer. **J Clin Pathol**. 2019 Dec 3. pii: jclinpath-2019-206204. [Epub ahead of print]
- 2) Rossi F, Helbling-Leclerc A, Kawasumi R, Jegadesan NK, Xu X, Devulder P, Abe T, Takata M, Xu D, Rosselli F, Branzei D. SMC5/6 acts jointly with Fanconi anemia factors to support DNA repair and genome stability. **EMBO Rep**. 2020 Feb 5;21(2):e48222.
- 3) Donovan FX, Solanki A, Mori M, Chavan N, George M, C SK, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shimamoto A, Takaori-Kondo A, Yabe H, Ogawa S, Kojima S, Yabe M, Ramanagoudr-Bhojappa R, Smogorzewska A, Mohan S, Rajendran A, Auerbach AD, Takata M, Chandrasekharappa SC, Vundinti BR. A founder variant in the South Asian population leads to a high prevalence of FANCL Fanconi anemia cases in India. **Human Mutat**. 2020 Jan;41(1):122-128.
- 4) 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 Oct;104(10):1962-1973.

- 5) Makimoto G, Ohashi K, Tomida S, Nishii K, Matsubara T, Kayatani H, Higo H, Ninomiya K, Sato A, Watanabe H, Kano H, Ninomiya T, Kubo T, Rai K, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Toyooka S, Takata M, Maeda Y, Kiura K. Rapid Acquisition of Alectinib Resistance in ALK-Positive Lung Cancer With High Tumor Mutation Burden. **J Thorac Oncol.** 2019;14(11):2009-2018. doi: 10.1016/j.jtho.2019.07.017.
- 6) 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, Fujimoto N, Yanai H, Toyooka S, Takata M, Hotta K, Kiura K; HER2-CS Network. A Prospective Cohort Study to Define the Clinical Features and Outcome of Lung Cancers Harboring HER2 Aberration in Japan (HER2-CS STUDY). **Chest.** 2019;156(2):357-366. doi: 10.1016/j.chest.2019.01.011.
- 7) Okamoto Y, Hejna J, Takata M. Regulation of R-loops and genome instability in Fanconi anemia. **J Biochem.** 2019 Jun 1;165(6):465-470.
- 8) 勝木陽子, 高田穰. 複製ストレス応答によるゲノム安定化メカニズム. **遺伝子医学** 2019;30:69-75.
- 9) 森美奈子, 岡本祐介, 高田穰. 【造血不全症の病態解析研究と治療の進歩 update】ファンconi貧血の分子病態. **血液内科** 2019;79(2):140-146.
- 10) 森美奈子, 矢部普正, 矢部みはる, 高田穰. Cancer predisposition and hemato/immunological defect: from children to adults 日本人 Fanconi 貧血患者のゲノム解析から得られた知見. 第 80 回日本血液学会学術集会 Symposium 5. **臨床血液** 2019;60(6):691-701.
2. 学会発表
- 1) Okamoto Y, Yasuko T, L.Mochizuki A, Abe M, Takata M. (ワークショップ「DNA 複製ストレスによるゲノムの不都合な進化と細胞運命の選択」) Disruption of S+DN11 prevents stalled fork degradation and results in phenotypic reversal in Fanconi anemia cells. **第 42 回日本分子生物学会** (2019 年 12 月 3-6 日, 福岡).
- 2) Takata M. (招待講演) SLFN11 sensitizes cells to DNA damage via degradation of the stalled replication forks. 3<sup>rd</sup> International Symposium of Radiation therapeutics and Biology (2019 年 11 月 29-30 日, 中国).
- 3) 高田穰. (シンポジウム 5 ゲノム変異の分子メカニズム) 変異原除去不全による新規ゲノム不安定性疾患の同定と解析. **6<sup>th</sup> Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (ACEM/JEMS 2019)** (2019 年 11 月 18-20 日, 東京).
- 4) Katsuki Y, Abe M, Takata M. (Workshop “New insights into mechanisms of DNA double strand break repair for comprehensive understanding in radiatio biology.”) Elucidation of the ubiquitination pathway mediating recruitment of SLX4 during ICL repair. **日本放射線影響学会第 62 回大会** (2019 年 11 月 14-16 日, 京都).
- 5) Nishi R, Matsui M, Sakasai R, Abe M, Kimura Y, Kajita S, Torii W, Katsuki Y, Ishiai M, Iwabuchi K, Takata M. (一般口演セッション”DNA damage and repair”) Regulatory mechanisms resolving DNA double strand break induced R-loop. DNA 二重鎖切断によって誘発される R-loop 解消メカニズムの解析. **日本放射線影響学会第 62 回大会** (2019 年 11 月 14-16 日, 京都).
- 6) 高田穰. (シンポジウム “Strategies for identification and prevention of cancer high risk group-borderless approach encompassing monogenic and multifactorial diseases”) がんのハイリスク群の捕捉と予防戦略 単一遺伝子疾患から多因子疾患までを包含するボーダーレスなアプローチ. **第 78 回日本癌学会学術総会** (2019 年 9 月 26-28 日, 京都).
- 7) Nishi R, Matsui M, Kimura Y, Abe M, Sakasai R, Kajita S, Torii W, Ishiai M, Iwabuchi K, Takata M. (シンポジウム) Homologous recombination repair regulated by nuclear speckles. **第 78 回日本癌学会学術総会** (2019 年 9 月 26-28 日, 京都).

- 8) Takata M. (招待講演)Endogenous DNA damage as revealed by studying Fanconi anemia. **名古屋大学 大学院基盤医学特論 Cancer Science Course** (2019年5月21日,名古屋).
- 9) Takata M. (招待講演)Endogenous DNA damage as revealed by studying Fanconi anemia. **京都大学大学院医学研究科腫瘍学コース** (2019年6月20日,京都).
- 10) Takata M. Endogenous DNA damage as revealed by studying Fanconi anemia. **The 2<sup>nd</sup> NO-Age Symposium on “Genomic instability in human brain** (2019年6月12日,ノルウェー・オスロ).
- 11) 高田穰. ゲノム不安定性疾患であるファンコニ貧血と関連病態の原因遺伝子探索. 第21回生命科学研究所シンポジウム (2019年7月4日,京都).
- 12) 牟安峰, 平明日香, 岡本祐介, 森美奈子, 高田穰. ホルムアルデヒド代謝酵素 ADH5 と ALDH2 ドミネガ変異によるファンコニ貧血類似のゲノム不安定症候群発症. **第42回日本分子生物学会**(2019年12月3-6日,福岡)(ポスターセッション)

#### G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし