

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coni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 教授）

研究要旨：日本人ファンconi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。また、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欠損症を同定し、論文発表した。

### A. 研究目的

ファンconi貧血（FA）は骨髄不全、奇形、白血病、固形腫瘍などを呈し、まれながら、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。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、分子診断結果を臨床現場にフィードバックし、日本人FAと類似疾患の分子疫学を明らかにすることを目的として継続実施した。

### B. 研究方法

日本各地の臨床家から送られたFAを疑われた患者サンプルからゲノムを分離し、必要に応じて、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。また、患者によっては、我々が発見したFA類似症状を示すAldehyde Degradation Deficiency症候群を疑って、同じく既知のADH5変異4種を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。

（倫理面への配慮）

本研究計画は、「ファンconi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 2019年度に4症例、2020年度に5症例、2021年度に2例のFA症例を検索し、FANCA、ないしFANCGの遺伝子変異を同定した。さらにFAの表現型に大きな影響を与えることが我々の過去データから判明しているALDH2について、遺伝子型を検索した。  
② インド人のFA症例の遺伝子変異検索を行い、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FANCL変異c.1092G>Aがインド・パキスタン由来のFA患者では高頻度に認められ、このエスニック集団特異的なファンダー変異と考えられた。  
③ 放射線生物研究センター名誉教授の佐々木正夫博士がかつて発見された姉妹染色分体交換（SCE）頻度の高い小児再生不良性貧血患者サンプルから、アルデヒド分解酵素であるADH5とALDH2の変異を同定した。前者はbiallelic、後者はheterozygousであった。患者細胞からiPS細胞を作成するなどの検討結果、これらの遺伝子異常がSCEの頻度を高め、骨髄への分化中に高頻度のDNA損傷をもたらし、ひいては造血不全と発症されることが判明した。造血分化中のエピゲノムリプログラミングが脱メチル化反応によってホルムアルデヒド産生を引き起こしていることが想定され、FAの病態へも重要な示唆を与える発見となった。これらの結果をまとめ、メカニズムを検討した内容を含めて論文報告した。

### D. 考察

我々は、日本人FA患者の遺伝子変異探索を継続してきており、すでに117例の結果をまとめて発表した（Mori et al. Haematologica 2019）。今回の報告

書におけるFA症例の解析については、その後新規の症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。

このような解析を積み重ねることで、我々は新規の、しかしFAに類似した疾患であるADH5/ALDH2欠損症（現在我々は、この疾患をAldehyde Degradation Deficiency Syndrome, ADDSと呼ぶことを提唱している）を同定することができた。実際、臨床所見でFAと考えられ、解析を依頼された一例が、検索の結果、ADDS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。この発見を切り口に、FA病態についても新たな治療法の検討が可能となるかもしれない。また今後、基礎的な研究のみならず、日本人ADD症候群の疫学をさらに明らかにすることが重要である。まだ確定した症例数も少なく、多数の症例を同定して、臨床像を明確にする努力が必要である。その成果に基づいた診断基準やマネジメントガイドラインの策定が将来の目標である。

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欠損が欧米で稀なため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

このような活動を継続し、より多数の患者への分子診断を提供し、臨床情報を蓄積することで、今後の日本人FAおよび関連病態の疫学を明らかにすることが重要である。そのためには、研究の継続性が重要であり、FAに限ったことではないが、国のレベルで遺伝性疾患のデータとサンプルのRepository体制を整えることが必須と思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Katsuki Y, Abe M, Park SY, Wu W, Yabe H, Yabe M, van Attikum H, Nakada S, Ohta T, Seidman

MM, Kim Y, Takata M. RNF168 E3 ligase participates in ubiquitin signaling and recruitment of SLX4 during DNA crosslink repair. *Cell Rep*. 2021 Oct 26;37(4):109879. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109879.

2) Xu X, Xu Y, Guo R, Xu R, Fu C, Xing M, Sasanuma H, Li Q, Takata M, Takeda S, Guo R, Xu D. Fanconi anemia proteins participate in a break-induced-replication-like pathway to counter replication stress. *Nat Struct Mol Biol*. 2021 Jun;28(6):487-500. doi: 10.1038/s41594-021-00602-9.

3) Mu A, Hira A, Niwa A, Osawa M, Yoshida K, Mori M, Okamoto Y, Inoue K, Kondo K, Kanemaki MT, Matsuda T, Ito E, Kojima S, Nakahata T, Ogawa S, Tanaka K, Matsuo K, Saito MK., Takata M. Analysis of disease model iPSCs derived from patients with a novel Fanconi anemia-like IBMFS ADH5/ALDH2 deficiency. *Blood*. 2021 Apr 15;137(15):2021-2032. doi: 10.1182/blood.2020009111.

4) 牟安峰, 平明日香, 松尾恵太郎, 高田穰. Aldehyde Degradation Deficiency (ADD) 症候群 - アルデヒド代謝酵素欠損によるファンコニ貧血症類似の新たな遺伝性骨髄不全症候群の発見 - . *臨床血液* 2021;62(6):547-553.

5) 牟安峰, 高田穰. Aldehyde Degradation Deficiency (ADD) 症候群: アルデヒド代謝酵素 ADH5/ALDH2 欠損による新規遺伝性再生不良性貧血. *生化学* 2022;94(1):122-127.

6) 牟安峰, 高田穰. iPS 細胞を用いたファンコニ貧血研究の新展開 (解説) . *血液内科* 2021;83(6):824-829.

7) Dingler FA, Wang M, Mu A, Millington CL, Oberbeck N, Watcham S, Pontel LB, Kamimae-Lanning AN, Langevin F, Nadler C, Cordell RL, Monks PS, Yu R, Wilson NK, Hira A, Yoshida K, Mori M, Okamoto Y, Okuno Y, Muramatsu H, Shiraiishi Y, Kobayashi M, Moriguchi T, Osumi T, Kato M, Miyano S, Ito E, Kojima S, Yabe H, Yabe M, Matsuo K, Ogawa S, Göttgens B, Hodskinson MRG, Takata M, Patel KJ. Two aldehyde clearance systems are essential to prevent lethal formaldehyde accumulation in

- mice and humans. **Mol Cell.** 2020 Dec 17;80(6):996-1012.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2020.10.012. PMID: 33147438.
- 8) Sakamoto Y, Kokuta T, Teshigahara A, Iijima K, Kitao H, Takata M, Tauchi H. Mitotic cells can repair DNA double-strand breaks via a homology-directed pathway. **J Radiat Res.** 2021;62(1):25-33. doi: 10.1093/jrr/rraa095. PMID: 33009557.
  - 9) Okamoto Y, Abe M, Mu A, Tempaku Y, Rogers CB, Mochizuki AL, Katsuki Y, Kanemaki MT, Takaori-Kondo A, Sobock AT, Bielinsky AK, Takata M. SLFN11 promotes stalled fork degradation that underlies the phenotype in Fanconi anemia cells. **Blood** 2021 Jan 21;137(3):336-348. doi: 10.1182/blood.2019003782. PMID: 32735670.
  - 10) Nakano T, Shoukamy MI, Tsuda M, Sasanuma H, Hirota K, Takata M, Masunaga SI, Takeda S, Ide H, Bessho T, Tano K. Participation of TDP1 in the repair of formaldehyde-induced DNA-protein cross-links in chicken DT40 cells. **PLoS One** 2020 Jun 26;15(6):e0234859. doi: 10.1371/journal.pone.0234859. eCollection 2020. PMID: 32589683.
  - 11) Matsui M, Sakasai R, Abe M, Kimura Y, Kajita S, Torii W, Katsuki Y, Ishiai M, Iwabuchi K, Takata M, Nishi R. USP42 enhances homologous recombination repair by promoting R-loop resolution with a DNA-RNA helicase DHX9. **Oncogenesis** 2020 Jun 15;9(6):60. doi: 10.1038/s41389-020-00244-4. PMID: 32541651.
  - 12) 望月綾子, 高田穰. 【特集 多様な疾患の原因となるDNA損傷応答不全】ファンconi貧血の原因遺伝子群とクロスリンク修復経路 最近の研究展開 Recent advances on the molecular function exerted by Fanconi anemia genes. **医学のあゆみ** 2021;274(12):1181-1188.
  - 13) Katsuki Y, Jeggo PA, Uchihara Y, Takata M, Shibata A. DNA double-strand break end resection: a critical relay point for determining the pathway of repair and signaling. **Genome Instability & Disease** 2020;1(4):155-171.
  - 14) 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. doi: 10.15252/embr.201948222.
  - 15) 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.
  - 16) 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.
  - 17) 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.
  - 18) 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.
  - 19) 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.
  - 20) 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) Takata M. (invited lecture) SLFN11: a gene that links sensitivities to cancer chemotherapy and degradation of stalled replication forks. **Kyoto University-UCLA online seminar New developments in Cancer Research** (2022年3月23日, Web開催) .
  - 2) Takata M. (invited, Keynote lecture) “Genome Action” Responses to replication stress and human disease mechanisms. **第12回群馬大学未来先端研究機構国際シンポジウム** (2022年3月1日-2日, 前橋 (ハイブリッド開催) ) .
  - 3) Mu A, Hira A, Niwa A, Osawa M, Mori M, Okamoto Y, Saito M. K., Takata M. Discovery of a novel FA-like disorder Aldehyde Degradation Deficiency (ADD) Syndrome caused by ADH5/ALDH2 mutations. Understanding and treating hematopoietic failure and malignant predisposition in Fanconi anemia. **33rd Fanconi anemia Research Fund Scientific Symposium** (2021年7月16日, virtual events) .
  - 4) 岡本裕介, 牟安峰, 望月綾子, 勝木陽子, 高折晃史, 高田穰. (招待講演) SLFN11 promotes stalled fork degradation that underlies the phenotype in Fanconi anemia cells. **第16回血液学若手研究者勉強会 (麒麟塾)** (2021年6月19日, Web開催) .
  - 5) 勝木陽子, 安倍昌子, Park SY, 呉文文, 矢部普正, 矢部みはる, van Attikum H, 中田慎一郎, 太田智彦, Seidman MM, Kim Y, 高田穰. (ワークショップ) RNF168は複製依存的DNAクロスリンク修復因子SLX4のエピキチン化経路を介したリクルートを制御する. **第44回日本分子生物学会年会** (2021年12月1日-3日, 横浜 (ハイブリッド開催) ) . (口演) .
  - 6) 高田穰, Erin A, 小川みのり, 勝木陽子, 岡本祐介, Andres C, 望月綾子, 牟安峰. (ワークショップ) SLFN11 と SLFN ファミリー機能の統一的理解を目指して. **第44回日本分子生物学会年会** (2021年12月1日-3日, 横浜 (ハイブリッド開催) ) . (口演) .
  - 7) 牟安峰, 平明日香, 丹羽明, 大澤光次郎, 森美奈子, 岡本裕介, 齋藤潤, 高田穰. (ワークショップ) 新規遺伝性骨髄不全症アルデヒド分解不全 (ADD) 症候群の発見: 代謝異常によって引き起こされるゲノム不安定性. **第44回日本分子生物学会年会** (2021年12月1日-3日, 横浜 (ハイブリッド開催) ) . (口演) .
  - 8) Okamoto Y, Abe M, Anfeng M, Tempaku Y, Rogers CB, Mochizuki AL, Katsuki Y, Kanemaki MT, Takaori-Kondo A, Sobbeck A, Bielinsky AK, Takata M. Loss of *SLFN11* gene expression rescues the Fanconi anemia phenotype by stabilizing stalled replication forks. **2020 Fanconi Anemia Research Fund** (2020年9月15日-17日, Virtual Scientific Symposia) .
  - 9) Mu A, Hira A, Mori M, Okamoto Y, Takata M. Aldehyde clearance by ADH5 and ALDH2 is essential for human hematopoiesis. **2020 National Taiwan University-Kyoto University-Tsukuba Virtual-Physical students mini-symposium on Cancer Biology and Medicine Program** (2020年12月19日, Invited) .
  - 10) 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日-6日, 福岡) .
  - 11) Takata M. (招待講演) SLFN11 sensitizes cells to DNA damage via degradation of the stalled replication forks. **3rd International Symposium of Radiation therapeutics and Biology** (2019年11月29日-30日, 中国) .
  - 12) 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. **6th Asian Congress on Environmental Mutagens and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (ACEM/JEMS 2019)** (2019年11月18日-20日, 東京) .
  - 13) 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 日-16 日, 京都) .
- 14) 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 日-16 日, 京都) .
- 15) 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 日-28 日, 京都) .
- 16) 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 日-28 日, 京都) .
- 17) 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) .
- 18) 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) .
- 19) 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) .
- 20) 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) .

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし