

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 我が国における **Fanconi** 貧血の遺伝子解析

指導教官 浅野 茂隆 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 谷ヶ崎 博

背景

**Fanconi** 貧血 (FA) の特徴

遺伝性再生不良性貧血の FA は、100 万人あたり 5 人前後という稀な常染色体劣性遺伝疾患で、遺伝的には異なる 8 群 (A, B, C, D1, D2, E, F, G 群) に分類される。小児期に再生不良性貧血を発症し、その後高率に骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病に移行する。先天的な骨格系の異常や悪性腫瘍の合併など臨床的表現型と mitomycin C (MMC) のような DNA 架橋剤により染色体断裂が著明に誘発されるという細胞表現型により FA と診断される。

FA の分子経路

FA 遺伝子のうち A,C,D2,E,F,G の 6 群は 2001 年までにその責任遺伝子がクローニングされた。これら遺伝子産物は共通の分子経路を形成していると考えられている。経路の下流に位置する FANCD2 は、細胞が DNA 障害を受けると上流の蛋白複合体 (FANCA,C,E,F,G) に依存してユビキチン化により活性化される。活性型 FANCD2 は BRCA1 と相互作用し、相同組み換えによる DNA 修復機構に関与することが示唆されている。ごく最近、FA の D1 群において *BRCA2* の両アリルにおける変異が見い出されたこともこの考えを支持している。

FA 遺伝子変異の民族差と founder 変異

これまで FA 遺伝子変異は欧米を中心に広範に解析され、全体では A 群が 65-70%、C 群が約 15%、G 群が約 10%を占める。各遺伝子で様々な変異が同定されているが、民族によって変異遺伝子の頻度やタイプに特徴が見られる。FA の頻度が高いことで知られる白人系南アフリカ人の集団では、ほとんどすべて

の患者が *FANCA* の 3 種類の変異のどれかを持つと報告されている。また、アメリカに移住した東欧系ユダヤ人(ashkenazi-jewish)では、*FANCC* のイントロン 4 の変異が約 80%を占めている。このような変異は一人の祖先に由来する変異が小さい集団の遺伝子プール内で増幅する現象、すなわち founder 効果として説明されるが、FA 遺伝子変異でそれを証明した研究はまだ少ない。

## 目的

我が国における FA の遺伝的特徴を明らかにするため、既に報告した C 群 8 家系を除く 45 家系について、*FANCA* および *FANCG* 遺伝子変異の解析を行い、この 2 つの遺伝子変異の特徴および起源について新たな知見を得た。

## *FANCA* の解析

*FANCA* は 16 番染色体のテロメア近くに存在し、約 80 kb という大きな遺伝子で、43 のエクソンがある。これまでに *FANCA* の変異は 100 種類以上報告され、日本でも佐々木らのグループから 14 例の報告がある。その特徴は、(1) 変異が遺伝子の全域にわたり、特定の hot spot がない、(2)ミスセンス変異、ナンセンス変異、欠失、挿入、スプライシング変異などの多種多様な変異が認められる、(3)ゲノムの広範な欠失 (large deletion) の頻度が高いことである。

### 解析方法

まずゲノム DNA の各エクソンとその近傍のイントロンを含む断片と 6 つの領域に分けた cDNA 断片を増幅し、ダイレクトシーケンスした。このようなルーチンの解析法では少数の塩基の変化や、スプライシング異常を検出できるが、*FANCA* に多いとされる large deletion を検出するのは困難である。そこで、シーケンシングにより変異が見つからない例では 34 個のエクソン領域と 3' 非翻訳領域に作成した Taqman プローブを用いて、DNA のコピー数を定量的 PCR で測定し、large deletion を検出した。1 アミノ酸の置換を引き起こす変異については良性多型と鑑別するために、機能解析を行った。すなわちこれらの変異 cDNA を作成し、レトロウイルスベクターを用いて *FANCA* を欠損した細胞に発現させ、MMC に対する感受性と *FANCD2* のユビキチン化を測定した。

### 結果と考察

(1) *FANCA* の変異を 45 家系中 26 家系で検出した。2546 del C は 8 家系で検出され、変異アレルの 18 %を占めた。これが立花、佐々木らが報告したように日

本人に特徴的で、頻度の高い変異であることが確認された。しかしその他の変異は極めて多様であり、6種類のミスセンス変異、1種類のナンセンス変異、6種類の1-5塩基の欠失、1種類の1塩基挿入、7種類のスプライス部位の変異、7種類の large deletion であった。検出された変異の50%以上の変異は、世界でもこの一家系でしか検出されていない、‘private mutation’ であった。本研究で同定した新規の変異は22あった。

(2) large deletion が疑われた30アリル中、7アリルで large deletion を検出した。このうち2アリル (FA52, FA25) において、切断点を同定した。定量的PCRにより、FA52はエクソン24からエクソン28までの large deletion と推定されたため、この領域をはさむプライマーで、PCRを行った。シーケンシングした結果、イントロン23とイントロン28における切断点を見出した。その切断部を含む前後約300bpはAlu配列と呼ばれる相同性の極めて高い繰り返し配列であり、この large deletion はAluを介した組み換えによって生じたと推定された。

(3) 4つの変異体 (P1194L, R1055W, T724P, 1339Ldel) を導入した細胞はいずれも細胞表現型を補正せず、病的変異であることが確認された。

(4) FA67において、エクソン37にある5塩基の欠失 (3720-3724 del) をゲノムDNAで検出した。RT-PCR産物の解析より、この変異はエクソン37の skip を引き起こしていた。エクソン内の配列がスプライシングに重要な役割を果たし、その部分の変化がスプライシング異常を引き起こす例の報告が増加している。FA67でも同様のメカニズムが推測される。

### FANCG の解析

FANCGは9番染色体短腕にある、ゲノムで約6kbの遺伝子で、14のエクソンから構成され、これまでに20以上の変異が報告されている。日本では佐々木らのグループから2例のみ報告されている。

#### 解析方法

遺伝子全長のRT-PCR産物をダイレクトシーケンスした。その結果、変異の疑われた領域をさらにゲノムDNAで確認した。FANCGに変異を検出した10家系の患者及びその両親についてハプロタイプ解析を行った。すなわちFANCGの近傍にある9つのマイクロサテライトマーカーを選び、CAリピート数による多型をタイピングし、ハプロタイプを構築した。次に遺伝子変異とハプロタイプとの関連を統計学的に検定した。

## 結果と考察

(1) 非血縁関係にある 10 家系において *FANCG* の変異を認めた。このうち 9 家系でイントロン 3 のスプライス部位の変異 IVS3+1G>C を認め、このうち 4 家系は、ホモ接合体、3 家系は 1066 C>T との複合ヘテロ接合体、2 家系は今回新しく検出した 91 C>T (ナンセンス変異) および 194 del C との複合ヘテロ接合体であった。1 家系で 1066 C>T のホモ接合体を認めたが、興味深いことにその両親とも韓国出身であった。我が国における *FANCG* 変異の大部分が 2 つの特定の変異 (IVS3+1G>C と 1066C>T) で説明できた。

(2) IVS3+1G>C, 1066C>T という変異は欧米では報告されていない。これらが founder 変異であるのか、何らかの原因で hotspot になっているのかを明らかにするために、ハプロタイプ解析を行った。IVS3+1G>C をもつアリルはすべて同じハプロタイプを共有し、一方、1066 C>T を持つアリルではハプロタイプを共有していた。その他の変異はいずれとも異なるハプロタイプのアリル上にあった。IVS3+1G>C、1066 C>T のいずれも持たない日本人対照 78 例 (156 アリル) について同様にハプロタイプを推定したところ、IVS3+1G>C に特徴的なハプロタイプは比較的頻度の高い (2.56 %) タイプだったが、1066 C>T に特徴的なハプロタイプの頻度は (0.64 %以下)、日本人には極めて稀なタイプだった。統計学的にこの 2 つの変異と各々のハプロタイプとの相関は有意であり、founder 変異であることが証明された。以上の結果を総合すると、IVS3+1G>C は比較的古い時代に日本民族の祖先に発生した変異で、一方、1066 C>T は朝鮮民族の祖先に発生し、比較的後期に日本に伝わった変異と推測される。

## 臨床表現型との関連

拇指の異常の割合は G 群で 82%と、A 群の 33%より有意に高率であった ( $P<0.01$ )。低身長も G 群で有意に高率であった ( $P=0.024$ )。発症平均年齢は G 群で 3.3 才と、A 群の 5.4 才より有意に低かった ( $P=0.016$ )。

一方、MDS/AML への移行については、造血幹細胞移植が早期に行われるようになったため、十分な解析ができなかった。また、*FANCA* では 'private mutation' が多く、さらに患者の多くが、複合ヘテロ接合体であることから、各遺伝子型による表現型の比較は困難であった。