

タイトルページは以下の要領でお書きください

□みにれびゅう

日本語タイトル : 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

氏名 : 牟安峰 高田穰

所属 : 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 晩発効果研究部門 DNA 損傷シグナル研究分野

住所 : 〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町

Tel : 075-753-7553

Fax : 075-753-7564

E-mail : takata.minoru.8s@kyoto-u.ac.jp

英文タイトル : Aldehyde Degradation Deficiency (ADD) Syndrome: Impaired metabolism due to *ADH5/ALDH2* mutations causes a novel inherited BMF syndrome

英文氏名 : Anfeng Mu, Minoru Takata

英文所属 : Laboratory of DNA Damage Signaling, Department of Late Effects Studies, Radiation Biology Center, Graduate School of Biostudies, Kyoto University

英文住所 : Yoshidakonoecho, Sakyo-ku, Kyoto, Japan 606-8501

和文ダイジェスト (120 字以内, 目次のタイトル下に入ります) :

著者らはファンコニ貧血類似の新規遺伝性骨髄不全症候群である ADD 症候群 (ADH5/ALDH2 欠損症) を同定した。その発見の経緯と、疾患モデル iPS 細胞を用いた病態検討結果について紹介する。

図版 (冊子体の場合) : **モノクロ印刷希望** カラー印刷希望

(どちらかをご指定ください。電子版は無料でカラー掲載いたします。冊子体は原則モノクロ印刷となり、カラー印刷ご希望の場合は規定により実費をご負担いただきます。あらかじめご了承ください)

はじめに

遺伝性骨髄不全症候群 (Inherited Bone Marrow Failure Syndrome, IBMFS) はまれな小児の遺伝性疾患で、白血病や固形がんを伴うことも多く、重篤な難病である。ファンconi貧血症 (Fanconi anemia, FA) は、ゲノムの安定性維持に関わる DNA 損傷修復遺伝子群の形成する FA 経路の欠損により、造血幹細胞不全、白血病や悪性腫瘍などが発生する典型的な IBMFS 疾患である。FA は、細胞レベルでは、mitomycin C (MMC) などの DNA クロスリンカー剤に対する高感受性が特徴的であり、MMC 処理後の染色体断裂が高頻度に観察される。この所見は、著者らが所属する京都大学放射線生物研究センター (現在、大学院生命科学研究科附属) の佐々木正夫前教授 (現在、名誉教授) がかつて報告し、FA を疾患として定義するものであり、現在も「染色体断裂試験」として臨床診断に用いられている¹。

我々は、FA の発症機構に関連する基礎研究をすすめるかたわら、日本人 FA 患者の原因遺伝子診断による分子疫学研究を推し進め²、新規 FA 原因遺伝子のハンティングをおこない、*FANCT/UBE2T*³、*FANCW/RFWD3*^{4,5} 等を同定し報告してきた。こういった研究を進める途上で、医薬基盤研究所 (大阪、彩都) に設置された JCRB 細胞バンクに、原因不明の小児再生不良性貧血で、姉妹染色分体交換 Sister Chromatid Exchange (SCE) 高値を示す一群の症例サンプルが登録保存されていることに気づいた。これらのサンプルのエクソーム解析を発端に検討を行い、ホルムアルデヒド分解酵素 ADH5 の両アレル変異とアセトアルデヒド分解酵素 ALDH2 のヘテロ変異 (E504K、A 型アレル) をあわせ持つ 10 代の患者を合計 7 名見出した (図 1 にその変異を示す)⁶。さらに、これら患児の疾患が ADH5/ALDH2 の変異によって発症することを、モデ

ル iPS 細胞を作成して証明し、疾患概念を確立した⁷。ADH5/ALDH2 の複合型欠損によって発症するこの疾患を Aldehyde Degradation Deficiency (ADD)症候群と呼ぶことを提案する⁸。本稿では、これらの研究成果について簡潔にご紹介する。

ADD 症候群の発見の経緯

上記の JCRB 細胞バンクに保存された症例サンプルは、前述した佐々木名誉教授が在職中に収集し、定年退職時(2000年)に JCRB 細胞バンクに寄託したものである。佐々木らのサンプルは個人情報削除されており、臨床所見については再生不良性貧血であること、性別・年齢程度しか知ることができない。しかし、彼らは症例由来の PHA 刺激リンパ球で SCE のレベルが非常な高値を示すこと、さらに同じ症例由来の線維芽細胞では、この所見が認められないことを記録していた(図 2 A)。高度な熟練を要する SCE 検査を臨床検体で実施することはハードルが高く、容易に実施できるものではないが、彼らは染色体解析のエキスパートであり、この驚くべき所見が残された。この SCE 上昇の程度は、SCE 高値を示す疾患として有名な Bloom 症候群に近いレベルであるが、Bloom 症候群ではないことは確認済みである。しかも、線維芽細胞では SCE 上昇が見られないことから、佐々木前教授らにとって、この時点でこれらの症例が未発見の病態を持つことは明らかであったと思われる。

なんらかの DNA 損傷によって停止した複製フォークは、相同 DNA 組換えの分子機構によって再開始する。SCE は、相同組換えにより形成されたホリデイ構造が解消される際に生じるクロスオーバーイベントを可視化したものである⁹。したがって、SCE イベント数は、(1) DNA 損傷の数、(2) 相同組換えの活性、(3) 相同組換えと拮抗す

る修復経路の活性、(4) 相同組換えのサブ経路選択などによって左右される。Bloom 症候群における SCE 高値は(4)に該当し、BLM ヘリカーゼの欠損によってクロスオーバー無しにホリデイ構造を解消する経路が欠損するためと理解されている¹⁰。一方、これらの症例 (ADD 症候群) における SCE 高値は、DNA 損傷の数を反映すると我々は考えている (後述)。

2007 年ごろ、著者らはこのユニークなサンプルの存在にきづき、解析をスタートした。はじめは BLM ヘリカーゼや FA に関連する FANCM の複合体サブユニット欠損症などを疑ったが、成果を上げることはできなかった。しかし、その後、厚労省の難治疾患克服事業の班研究 (小島班、伊藤班) により、次世代シーケンサーの応用が開始され、これらサンプルをエクソーム解析に供したところ、3 例で *ADH5* 遺伝子の両アレル変異を認めた (図 1)。同じころ、我々は FA 病態における *ALDH2* 遺伝子の役割に注目しており (後述)、*ALDH2* 遺伝子型の決定を行ったところ (エクソーム解析のレポートからは、高頻度の *ALDH2* 遺伝子バリエーションは除外されていた)、驚いたことにすべて GA 型のヘテロであった。したがって、佐々木前教授らの症例が *ADH5/ALDH2* の複合型欠損症である可能性が強く示唆された。

その後、同様の症例を探索するため、FA 症例診療に深い経験をお持ちの東海大附属病院の矢部みはる・矢部普正両博士に協力を求め、診断が未確定 (ただし FA は否定されている) の再生不良性貧血症例サンプルを提供いただいて検索したところ、*ADH5/ALDH2* の変異症例が 2 例、同定された。さらに、その後、臨床像から FA を疑われて紹介されたサンプルから、2 例の *ADH5/ALDH2* 変異症例を追加で発見すること

ができた。これらの患者の臨床所見は、共通して低身長、精神発達遅延、再生不良性貧血、骨髄異型性症候群 (MDS)、白血病発症等を示し、全例造血幹細胞移植を必要としていた⁶。したがって、ADD 症候群患者は、臨床所見からは FA によく似ている。異なる点は、ADD 症候群で見られる軽度の精神発達遅延が、FA ではあまり見られないこと、FA で高頻度の体表奇形が ADD 症候群では観察されていないことである。FA と ADD 症候群の臨床所見上の相違点については、多数の症例を蓄積して検討することが必要である⁸。当然のことながら MMC 添加後の染色体断裂試験は正常であり、ADD 症候群における DNA 修復能は正常である。

ADH5/ALDH2 遺伝子異常と SCE 上昇の関係を明らかにするため、著者らは健常人のリンパ球に ADH5 のインヒビターを加えて SCE を算定した。ALDH2 のヘテロ変異 (E504K、A 型アレル) を持つ個人で ALDH2 野生型の場合に比べ、SCE が上昇することが確認された (図 2)。また、ALDH2 のホモ変異をもつ正常人のリンパ球に ADH5 のインヒビターを添加したところ、細胞の増殖が阻害され SCE は検出不可能であった⁷。

内因性アルデヒド代謝と造血不全

中村純博士ら (当時、米国 North Carolina 大学 Chapel Hill 校所属、現在大阪府立大学) は、FA 細胞がホルムアルデヒドに対して強い感受性を示すことを報告した¹¹。これ以後、FA 発症の原因の一つとして、内因性アルデヒドによるゲノム損傷が注目されてきた。たとえば、FA のマウスモデルは、一般にあまり表現型がないことが知られているが、FA のキー因子 FANCD2 と ALDH2 や ADH5 とのダブルノックアウトマウスは、

早期の造血不全や白血病を発症することが報告されている^{12,13}。ADH5 はホルムアルデヒドの主要な分解酵素である。一方、ALDH2 は飲酒後に生成されるアセトアルデヒドの分解に大きな役割を担っており、日本を含め東アジアにおいては活性を失った変異 (ALDH2*2, rs671, E504K、A 型アレルなどと呼ばれる) を持つ個人が約 4 割存在する。A 型アレルのキャリアーが飲酒後の顔面紅潮、悪酔いなどを来すこと、さらにヘテロ型の個人が習慣飲酒した場合食道がんリスクが非常に高いことは良く知られている。我々は、日本人 FA 患者において ALDH2 の遺伝子型を調べ、バリエーション型アレルの存在によって骨髄不全進行が強く促進されることを報告した¹⁴。この知見は FA 患者における骨髄不全の発症要因として内因性アルデヒドによる DNA 損傷蓄積が大きな役割を果たすことを示唆する。しかし、幼児の FA 患者が飲酒の影響を受けることは考えられない。後述する Aldehyde Degradation Deficiency (ADD) 症候群解析において得られた知見は、ALDH2 がホルムアルデヒドの代謝にも重要な酵素であることを示している。

ALDH2 のホルムアルデヒド分解機能

ALDH2 の分解対象であるアルデヒドについては、アセトアルデヒドや 4-ヒドロキシ-2-ノネナール (4-HNE) など、以前から検討されているが、ホルムアルデヒドに対して重要な役割を果たすことはあまり認識されてこなかったようである。ADH5 は 4-HNE に対する活性の報告はなく、4-HNE が ADD 症候群の原因とは考えにくい。我々は、HAP-1 (慢性骨髄性白血病由来) をはじめとしたいくつかの細胞株 (HCT116, K562 など) で、CRISPR/CAS9 を用いて ADH5/ALDH2 をノックアウト (KO) し、血球由来、非血球由来両方のモデル細胞株を作成しホルムアルデヒド感受性を検討した⁷。

まずはゲノム損傷レベルのマーカーとして、細胞あたりの SCE 数を調べた。非刺激状態での SCE レベルは、KO 細胞と野生型に違いを認めなかった。ところが、ホルムアルデヒドを少量 (0.5 μM) 添加したところ、シングル KO より、ADH5/ALDH2 ダブル KO において著明な SCE 誘導が認められた⁷。過去の報告で、ヒト血中ホルムアルデヒド濃度は 50–100 μM 程度とされている¹¹。この結果から、通常の細胞株の増殖中には、血球由来であったとしてもホルムアルデヒドはほとんど産生されていない、あるいは、産生されていても、ADH5 と ALDH2 以外のマイナーな分解系で十分浄化できる程度の微量が産生されるに過ぎないのではないかと考えられる。Vakoc らは、急性骨髄性白血病 (AML) 由来細胞で ALDH2 が低発現状態であり、細胞の増殖が FA 遺伝子に依存することを観察した¹⁵。これは、ALDH2 ないし FA 経路のいずれかが正常な細胞増殖に必要であることを意味する。この研究が示唆する ALDH2 のターゲットがホルムアルデヒドであるかどうかは、今後の研究を待たねばならない。

さらに、我々はホルムアルデヒドに対する感受性実験において、ADH5 の欠損時には、ALDH2 が、ホルムアルデヒドの分解にバックアップとして重要な役割を果たすことを見出した⁷。精製された ALDH2 は酵素としてホルムアルデヒドを効率よく分解することも示された⁶。細胞内で ADH5 のほうが ALDH2 よりもホルムアルデヒド分解においてドミナントな役割を示すのは、前者が細胞質に、後者がミトコンドリアに分布していることに関連しているかもしれない。また、KJ Patel らによれば、ADH5/ALDH2 欠損モデルマウスの血中ホルムアルデヒド濃度を測定した結果、野生型 : 4 μM 、aldh2 欠損 : 9 μM 、adh5 欠損 : 11 μM 、adh5/aldh2 : 44 μM であった⁶。以上の結果は、ALDH2 もまた重要なホルムアルデヒドの分解酵素であることを示唆している。

iPS モデル細胞による病態再現

ADH5/ALDH2 遺伝子変異が造血不全の原因であるかどうか検討するため、著者らは、ADD 症候群患者 2 名の初代繊維芽細胞から、プラスミドベースのリプログラミングを行い、モデル iPS 細胞を樹立した⁷。さらに、CRISPR/CAS9 によるゲノム編集を用いて、safe harbor ローカスとされる ROSA26 遺伝子座にドキシサイクリン (DOX) 誘導性 ADH5 発現カセットを導入した。これらの細胞を用いて、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) の中畑龍俊・斎藤潤研究室の丹羽明博士らによって開発されたインビトロ造血アッセイ¹⁶を共同研究で導入し実施した。患者由来 iPS 細胞からは、ほとんど造血コロニーが形成されなかったが、DOX の添加による ADH5 の発現によってコロニー数は著明に増加した (図 3)。ALDH2 については、バリエーション型の ALDH2 がドミナントネガティブに作用することを考慮し、我々は、遺伝的な相補ではなく薬物による ALDH2 活性増強の効果をテストすることにした。その結果、新規に開発された ALDH2 活性化剤 C1 の添加により、造血コロニー数がマイルドではあるが改善されることが観察された。また造血分化中 CD34+KDR+によって分離した造血前駆細胞を免疫組織化学的に解析すると、FANCD2 や γ H2AX などの DNA 損傷マーカーの核内ドット状集積 (フォーカス) が認められ、造血分化中の DNA 損傷誘導を反映すると思われた⁷。

さらに、正常人由来 iPS 細胞である 201B7 株を用いて ALDH2 と ADH5 のシングルとダブルの KO を作成した。これらのモデル iPS 細胞を、モノレイヤー培養系で造血系へ分化させたところ、シングル KO や野生型に比べ、ダブル KO では CD34 陽性造血プロジェニター細胞において分化増殖のブロックを認め、CD45 陽性の血球細胞への分

化が低下していた⁷。以上の結果は、ADH5/ALDH2 ダブル KO iPS 細胞は、通常の維持培養条件では増殖に問題ないが、血球系へ分化誘導されると、DNA 損傷を蓄積して増殖を停止することを示している。このときの DNA 損傷のレベルは、正常な FA 経路による DNA 修復では処理できる量を超えていると考えられる。たとえば、ホルムアルデヒド 20 μ M で刺激した HAP1 細胞において、ADH5/ALDH2 ダブル KO 細胞では *FANCD2* 欠損の状態よりも大量の DNA 損傷が蓄積していた⁷。この濃度のホルムアルデヒドに対するゲノム防護は、FA 経路による DNA 修復よりも ADH5/ALDH2 による方がを介した分解経路による寄与のほうが大きいと解釈することができそうである。

ADD 症候群の原因はホルムアルデヒド代謝不全である

残念ながら、我々の実験では造血分化の最中に直接的にホルムアルデヒドそのもの、ないしホルムアルデヒドに特異的な DNA アダクトを検出することには、これまで成功していない。しかし、iPS 細胞の血球分化中に検出される DNA 損傷は、ADH5/ALDH2 により抑制されることから、ホルムアルデヒド産生によるものと考えるのが合理的である。

では、いかなるメカニズムが造血分化中のホルムアルデヒド産生を誘導するのか？

ヒトにおける造血分化中には、遺伝子の転写プログラムに伴うヒストンのメチル化や脱メチル化が頻繁に行われるであろう。我々は、このメチル基 (CH₃-) が脱メチル化によって多量のホルムアルデヒドに変換されると推測している。血球分化中のホルムアルデヒド産生は ADH5 と ALDH2 による分解系が正常なら基本的に分解除去されるが、一部残ったホルムアルデヒドによって起こる DNA 損傷が、FA の発症原因であると考

えられる(図 3 B)。最近発表された Lei Li らの研究では、細胞株の血球系分化誘導に伴った強い転写活性化とホルムアルデヒド産生を検出しており、この仮説を強くサポートする¹⁷。ADD 症候群でリンパ球特異的に見られた SCE 値上昇は、PHA で刺激されたリンパ球が芽球化する過程で転写リプログラミングが強く誘導されることを反映するものと考察している。

おわりに

現在、臨床現場における FA や ADD 症候群の唯一の根治療法は骨髄移植である。しかし、これは造血不全や MDS/白血病に対しては有効であるが、全身の問題を解決するわけではなく、実際 FA では骨髄移植後の発がんが臨床上問題となっている。ADD 症候群の臨床経過においてどのような問題が発生するか、より多数の患者を同定した上で厳重なフォローアップが必須である。これらの疾患に対しては、骨髄ドナーの問題や移植のリスクなどもあり、新規治療法の開発が課題である。我々の研究を含め、この領域研究者の努力で、ホルムアルデヒドが FA と ADD 症候群の主要な造血不全の原因となっているらしいことまでは突き止めた。体内のホルムアルデヒドを効率よく除去することが可能となればよい治療法になることが期待される。

謝辞

残されたサンプルの解析を許していただき、貴重なデータをご提供いただいた佐々木正夫前教授、現在 JCRB 細胞バンクの平山知子氏に感謝いたします。また、本稿で述べた研究は、多くの共同研究者の方々と患者さん・ご家族のご協力の賜物です。深くお礼申し上げます。本稿の **critical reading** をいただいた勝木陽子博士に感謝します。著者ら

の研究は、文科省科学研究費補助金、厚労省難治疾患実用化事業(小島班、伊藤班)、AMED、日本白血病研究基金、武田科学振興財団、上原記念生命科学財団、アステラス病態代謝研究会、京大コアステージバックアップ研究費、学術振興会研究拠点形成事業(生体内の複雑系を対象とする統合放射線科学の国際研究拠点の形成)等のサポートを受けています。

文献

1. Sasaki, M. S. & Tonomura, A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res* **33**, 1829–1836 (1973).
2. Mori, M. *et al.* Pathogenic mutations identified by a multimodality approach in 117 Japanese Fanconi anemia patients. *Haematologica* **104**, 1962–1973 (2019).
3. Hira, A. *et al.* Mutations in the Gene Encoding the E2 Conjugating Enzyme UBE2T Cause Fanconi Anemia. *Am J Hum Genet* **96**, 1001–1007 (2015).
4. Knies, K. *et al.* Biallelic mutations in the ubiquitin ligase RFW3 cause Fanconi anemia. *J Clin Invest* **127**, 3013–3027 (2017).
5. Inano, S. *et al.* RFW3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination. *Mol Cell* **66**, 622–634.e8 (2017).
6. Dingler, F. A. *et al.* Two Aldehyde Clearance Systems Are Essential to Prevent Lethal Formaldehyde Accumulation in Mice and Humans. *Mol Cell* **80**, 996–1012.e9 (2020).
7. Mu, A. *et al.* Analysis of disease model iPSCs derived from patients with a novel Fanconi anemia-like IBMFS ADH5/ALDH2 deficiency. *Blood* **137**, 2021–2032 (2021).
8. 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coni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 62 巻 6 号 p. 547-553 (2021).
9. Sonoda, E. *et al.* Sister chromatid exchanges are mediated by homologous

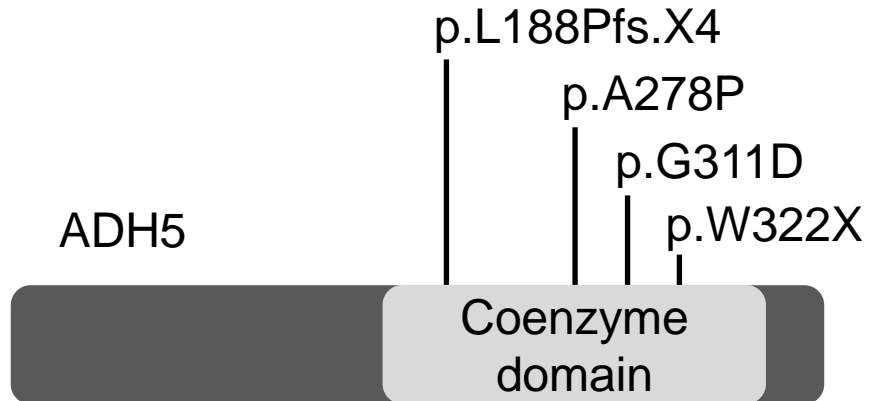
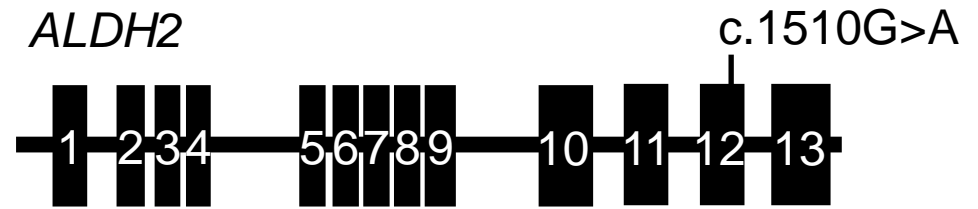
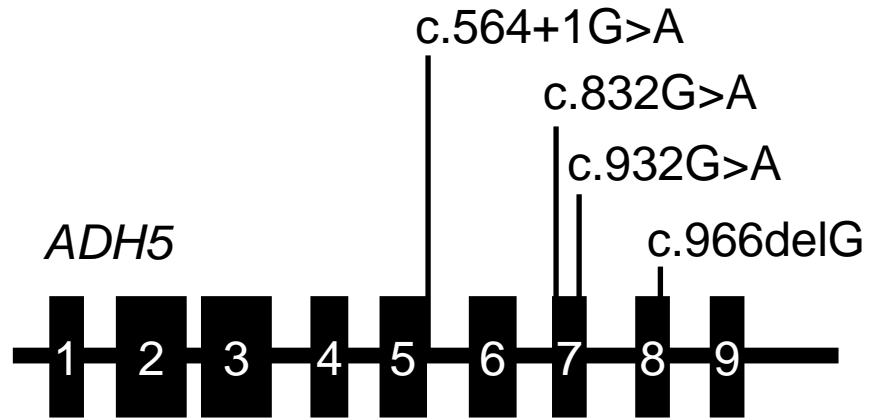
- recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* **19**, 5166–5169 (1999).
10. Wu, L. & Hickson, I. D. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**, 870–874 (2003).
 11. Ridpath, J. R. *et al.* Cells deficient in the FANC/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde. *Cancer Res* **67**, 11117–11122 (2007).
 12. Langevin, F., Crossan, G. P., Rosado, I. V., Arends, M. J. & Patel, K. J. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature* **475**, 53–58 (2011).
 13. Pontel, L. B. *et al.* Endogenous Formaldehyde Is a Hematopoietic Stem Cell Genotoxin and Metabolic Carcinogen. *Mol Cell* **60**, 177–188 (2015).
 14. Hira, A. *et al.* Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood* **122**, 3206–3209 (2013).
 15. Yang, Z. *et al.* Transcriptional silencing of ALDH2 in acute myeloid leukemia confers a dependency on Fanconi anemia proteins. *bioRxiv* **2**, 160–55 (2020).
 16. Niwa, A. *et al.* A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. *PLoS ONE* (2011).
 17. Shen, X. *et al.* A Surge of DNA Damage Links Transcriptional Reprogramming and Hematopoietic Deficit in Fanconi Anemia. *Mol Cell* **80**, 1013–1024.e6 (2020).

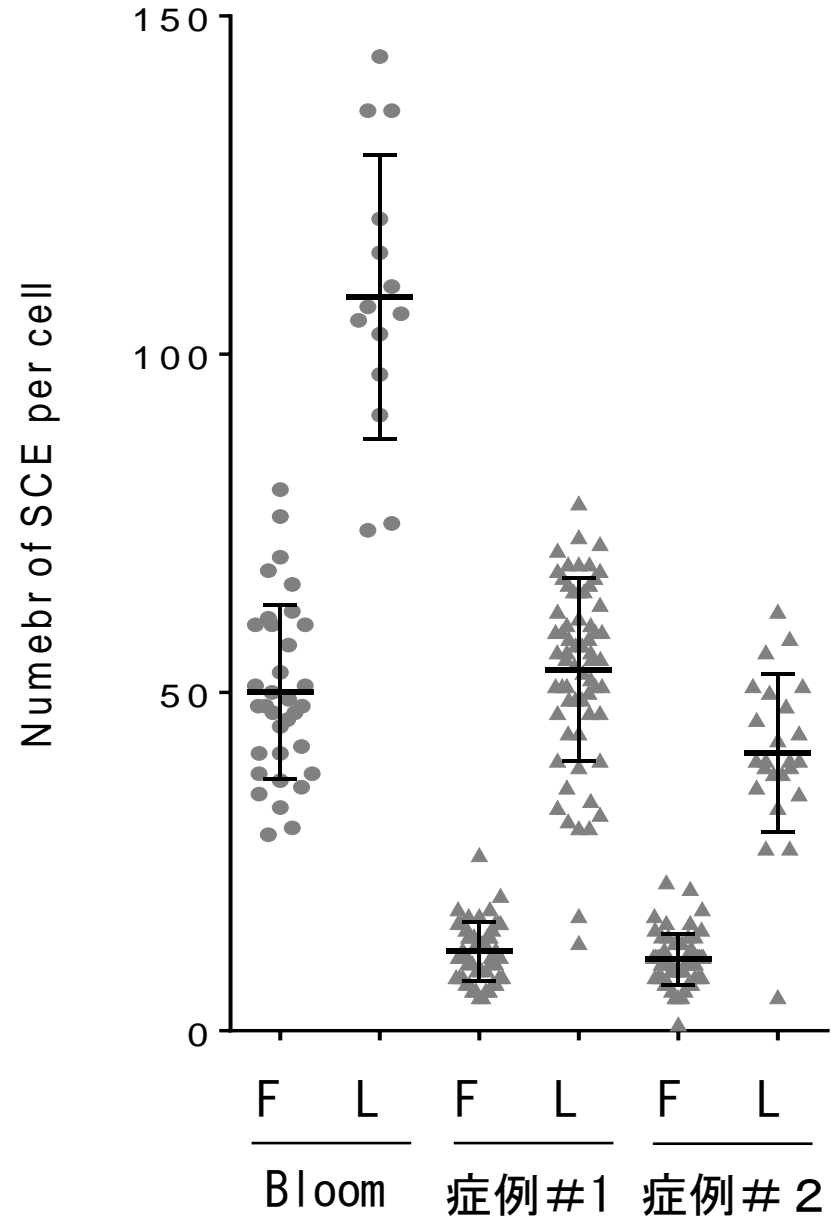
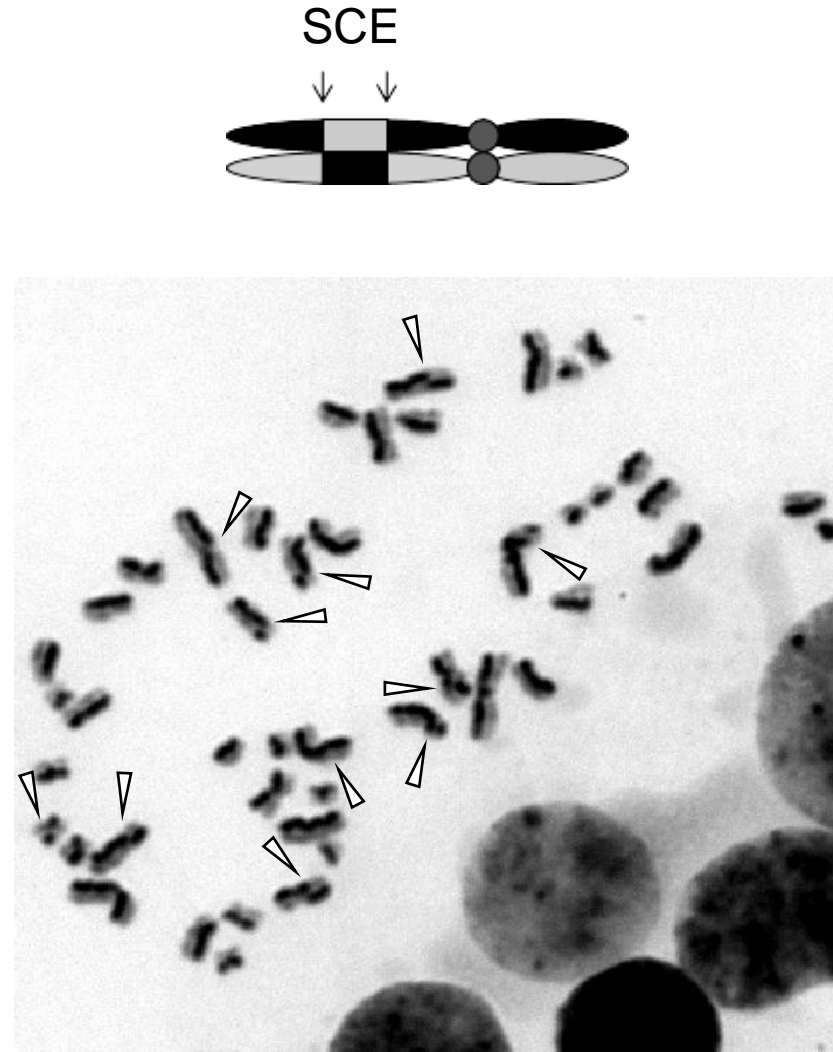
図 1. ADD 症候群において同定された *ADH5* 遺伝子変異と *ALDH2* 遺伝子変異。上段は DNA レベルの、下段はタンパク質レベルの変異を示す。7 名の ADD 症候群症例で、*ADH5* の 4 種類の変異が様々な組み合わせ (homozygous、あるいは compound heterozygous) で同定された。

図 2. *ADH5/ALDH2* 遺伝子欠損と SCE 数の上昇。A. 1 例の Bloom 症候群由来 (Bloom) と 2 例の ADD 症候群患者由来 PHA 刺激リンパ球 (L) と線維芽細胞 (F) において認められた SCE レベル (平均±SD)。B. *ALDH2* バリエント (GA 型) を持つ健常人由来リンパ球は *ADH5* インヒビター (N6022 10 μ M) 刺激によって SCE 数がつよく上昇する。

図 3. A. ADD 症候群患者由来の iPS 細胞からの造血コロニーアッセイ。DOX (1 μ g/ml) の添加により *ADH5* が発現し、造血コロニーの数が大きく増加した。B. ADD 症候群

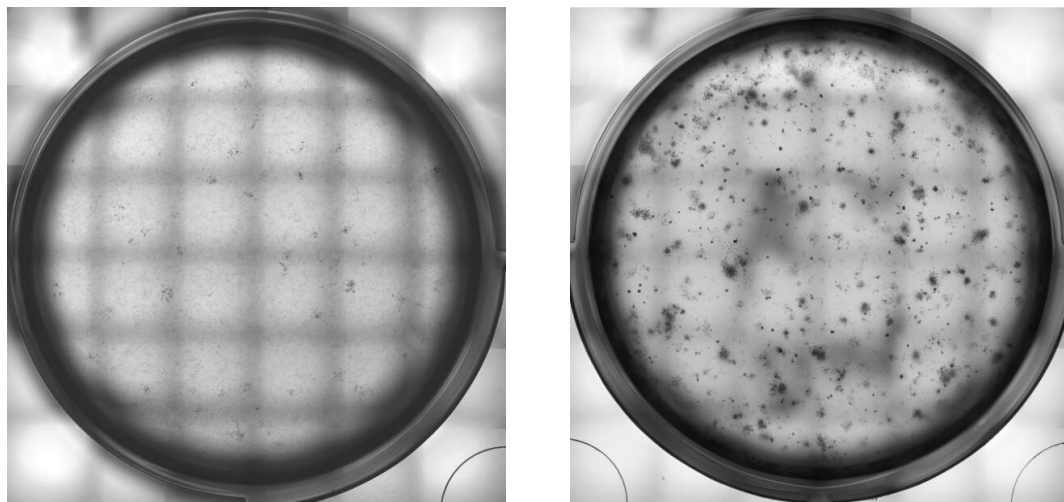
と FA の発症機構模式図。ALDH2 と ADH5 の活性により、内因性ホルムアルデヒドが分解される。残ったホルムアルデヒドによって引き起こされる DNA 損傷は FA 経路によって修復される。これらの機構の欠損により、FA ないし ADD 症候群が発症する。



A**B**

正常人由来のリンパ球 *ALDH2-G/A*
+ADH5インヒビター (10 μ M)

A



-

+DOX

症例由来iPS細胞を用いた
造血コロニーアッセイ

B

