

総説

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

牟安峰¹⁾、平明日香¹⁾、松尾恵太郎²⁾、高田 穰¹⁾

¹⁾ 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

²⁾ 愛知県がんセンター研究所 がん予防研究分野

Aldehyde Degradation Deficiency (ADD) Syndrome: Discovery of a novel Fanconi anemia-like inherited BMF syndrome due to combined ADH5/ALDH2 deficiency

Anfeng MU¹⁾, Asuka HIRA¹⁾, Keitaro MATSUO²⁾, Minoru TAKATA¹⁾

¹⁾Laboratory of DNA Damage Signaling, Department of Late Effects Studies, Radiation Biology Center, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan.

²⁾Division of Cancer Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan.

Corresponding author: 高田 穰

住所：〒606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町 京都大学

電話：075-753-7563

FAX：075-753-7564

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

Keywords: Aldehyde Degradation Deficiency Syndrome; Fanconi anemia; ADH5; ALDH2

和文抄録

細胞バンクに保存されていた日本人再生不良性貧血患者サンプルのエクソーム解析を発端に、新たな遺伝性骨髄不全症候群が同定された。本疾患は、もともと姉妹染色分体交換 (SCE) が高頻度に認められることから新規疾患として認識されていたが、次世代シーケンサーという新技術開発によって原因遺伝子同定がなされたものである。ADH5 と ALDH2 の 2 つのアルデヒド代謝酵素の同時欠損により、骨髄における血球分化に伴う内因性ホルムアルデヒドが分解されず DNA 修復不能なレベルのゲノム損傷を引き起こし、骨髄不全と MDS 白血病発症に至ると考えられる。本稿では、この疾患の存在が広く認知されるよう、日本の血液分野の臨床家にむけて、この疾患発見にいたる経緯と現在判明している特徴、その病態を概説する。

英文抄録 Abstract

We have recently described the identification of a novel inherited bone marrow failure syndrome (IBMFS). The first set of patients were identified by the exome analysis of cells from Japanese patients with hypoplastic anemia, which have been deposited to the JCRB cell bank some time ago. Originally, these cases were recognized as having a novel disorder based on the increased levels of sister chromatid exchanges (SCE) in lymphocytes, however, the causative genes were clarified only after application of the recently developed next-generation sequencing technology. This disorder, Aldehyde Degradation Deficiency Syndrome (ADDS), is caused by combined defects in two genes, ADH5 and ALDH2, which are critical for degrading endogenously generated formaldehyde. Formaldehyde is highly reactive and toxic to biological molecules including DNA, and its endogenous generation in the absence of the degradation system results in the levels of DNA damage that overwhelms DNA repair capacity, leading to the development of BMF with loss of hematopoietic stem cells as well as progression to MDS/leukemia. In this short review, we would like to summarize what is known today about ADDS for a wide readership of hematology clinicians in Japan.

はじめに

小児、ないし若年者の、再生不良性貧血ないし MDS/急性白血病の臨床において、ファンconi貧血をはじめとした「遺伝性骨髄不全症候群」(Inherited Bone marrow

failure syndrome-IBMFS) (Table 1) の可能性を念頭に置くことは重要である。最近我々は、新規の IBMFS、アルデヒド代謝酵素欠損症 (Aldehyde Degradation Deficiency Syndrome, ADD 症候群) の存在を報告し¹、さらに iPS 細胞による病態モデルを検討し論文発表した²。しかし、現在診断に至っているこの病気の症例数は少数にとどまる。臨床像を明確なものとし、病態を確定させ患者さんの適切な診断治療に結びつけるために、より多くの症例発見が必要である。そこで、本稿では日本の血液学臨床に携わる方々に広くこの疾患の存在を認識していただくため、ADD 症候群について現在判明していることを簡潔にまとめてみたい。

発見の経緯

京都大学放射線生物研究センターの佐々木正夫 前教授 (現: 名誉教授) は、遺伝性骨髄不全症候群である「ファンconi貧血症」を定義づけた「マイトマイシン C 処理時の染色体脆弱性」 (高頻度染色体断裂) の発見者である³。佐々木名誉教授は染色体解析の世界的なエキスパートであり、在職中に全国の医師からの依頼で、診断のため患者細胞の染色体を観察し、サンプルを継続的に多数収集保存した。その過程で原因不明の再生不良性貧血症例で、末梢血リンパ球の姉妹染色分体交換 (Sister chromatid exchanges, SCEs) (Figure 1) 頻度が非常に高いサンプルを複数同定した。興味深いことに、SCE 高値は同じ患者からの線維芽細胞では認められていない。佐々木前教授は、もちろんこれらの症例が新規疾患であることに気づいていたが、当時のテクノロジーの限界でそれ以上の追求ができず、退官のおり (2000 年) 貴重な患者由来サンプル群は、匿名化後、大阪彩都の医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンクに寄託された。現在「高発がん性遺伝病患者由来細胞コレクション」 (<https://cellbank.nibiohn.go.jp/cellinfo/kurb/>) として公開されている。2007 年ごろ著者らは、細胞バンクに保存されたコレクション内のこれらのサンプルの存在に気づき、どのような遺伝子異常が原因になっているのか、研究を開始した。

SCE は、DNA 複製中に停止した複製フォークが再開始する際に、相同組換え修復によって姉妹染色分体の間で起こるクロスオーバーを、顕微鏡下で観察可能な形に可視化したものである。複製フォークを停止させる DNA 損傷の頻度や、修復経路の選択などを反映して、SCE 頻度は決定される。例えば、特定修復経路が欠損するため SCE 高値を伴う疾患として、ブルーム症候群がよく知られてい

る⁴。当時、SCEの上昇を根拠に、ブルーム症候群の原因遺伝子BLMヘリカーゼの関連因子の変異を疑って、検討したが、異常所見を見つけることができなかった。

しかし、2011年ごろから、厚労省研究班「難治疾患実用化研究事業」（研究班代表、名大・小島勢二教授、現名誉教授）で新技術「次世代シーケンサー」が使用できるようになり（京大医学部腫瘍生物学の小川誠司教授らとの共同研究）、エクソーム解析によってこれらの患者でADH5遺伝子とALDH2遺伝子が両方とも変異していることが判明した（Figure 2）。さらに、その後、共同研究者の方々から提供されたサンプルから、追加症例を同定し、全部で7例を同定した¹。興味深いことに、うち2例は「ファンconi貧血」を疑われての紹介であり、また他の2例は、従来どうしても診断がつかなかった症例からの診断であった。匿名化のため、JCRBに寄託された症例の情報は、再生不良性貧血であること、性別・年齢程度しか残されていないが、その後の症例において、生後低身長、低体重、軽度の精神発達遅延が認められ、再生不良性貧血を発症し、やがて骨髄異形成症候群（MDS）や白血病へ進行し、骨髄移植が必要となることなどがおおよそ判明した（Table 2）¹。なお、これまでの症例にほとんど外表および内蔵の先天異常が認められていないのは、ファンconi貧血と異なる点である。

ホルムアルデヒドとその代謝酵素ADH5とALDH2

ホルムアルデヒド（=ホルマリン）は、食品、タバコ、工場などの環境中に存在し、シックハウス症候群などで健康影響が注目されている。シックハウスでは建物に使われる塗料等に含まれる外因性ホルムアルデヒドが問題とされる。しかし、今回の病気で原因となっているホルムアルデヒドは、内因性であり、体内で自然に産生されたものである。ホルムアルデヒドはDNAなどの生体分子を損傷し、DNA鎖間のクロスリンク、DNAタンパク質間のクロスリンク、塩基損傷（アダクト）などのDNA損傷を引き起こし、国際がん研究機関（IARC）の発がん性分類ではGroup 1（発がん性あり）とされている。

ADH5はホルムアルデヒドの主要な分解酵素（Figure 3A）で細胞質に分布する。ADD症候群症候群で発見されたADH5変異は、いまのところ4つあるが、1000人に一人程度以下の保有率であり、非常にまれなものである。一方、ミトコンドリアに局在するALDH2は、飲酒後生成されるアセトアルデヒドを分解する酵素（Figure 3B）であり、その遺伝子は変異によってお酒が飲めない体質となることで

よく知られている。この *ALDH2* の変異ないしバリエント (*ALDH2*2*, rs671) は C 末領域の 1 アミノ酸置換変異 Glu504Lys で、これをヘテロに持つ個人は日本人の 40%にも及び、ホモも 10%程度みられる。前者は、習慣飲酒による食道がんのリスクが非常に高いことが知られており⁵、後者ではそもそもほとんど飲酒ができない。ADD 症候群の *ALDH2* 変異も実はこれであり、したがってこの疾患の発症は東アジア人に限定されているであろう。バリエント型の *ALDH2* は 4 量体で形成されるホロ酵素に組み込まれ、酵素活性を低下させる。結果として、ヘテロ型の細胞でも野生型に比べ酵素活性は 20%程度に低下している（ドミナントネガティブ効果）。

ALDH2 のホルムアルデヒド分解活性については、以前から報告されているが、有意なものとは認識されてこなかったと思われる。我々は、モデル細胞株を用いた研究で、*ALDH2* が、*ADH5* の欠損時にはバックアップとして重要な役割を果たす(Figure 3A)ことを見出した²。また、この所見と一致して、KJ Patel らの測定では、野生型、*aldh2* 欠損、*adh5* 欠損、*adh5/aldh2* ダブル欠損マウスの血中ホルムアルデヒド濃度は、それぞれ 4、9、11、44 μM であった¹。ADD 症候群患者は、全例 *ADH5* 遺伝子が両アレルとも欠損し、一部例外的な症例を除き⁶、*ALDH2* バリエント (rs671) が片アレルに認められ、ホルムアルデヒド分解活性が非常に低下していると考えられる。ADD 症候群患者での血中ホルムアルデヒド濃度が上昇しているのか、今後ぜひ確認していかねばならない。

この *ALDH2* バリエントは、おそらく古代中国にいた祖先の一人で発生した遺伝子変異が広く東アジア諸国に分布するに至ったものであり、なぜこのような広がりを見せているのか、大変興味深い問題である。このバリエントが正の選択をうけており⁷、むしろ長生きできるという研究もあるが⁸、*ALDH2* の変異と様々な疾患リスクについては、今後の十分な研究が必要である。今回の ADD 症候群の発見と *ALDH2* のホルムアルデヒド分解への寄与の明確化は *ALDH2* バリエントの医学的な意義について一石を投じるものであろう。

ADD 症候群の病態

ADD 症候群は、症候の類似するファンconi貧血が DNA 損傷の修復欠損病であるのに対して、細胞内の代謝異常が原因である。ADD 症候群患者では、内因性ホルムアルデヒドによる毒性、特に DNA 損傷が蓄積し、細胞死や細胞増殖停止により造血機能不全を引き起こすと考えられる(Figure 4)。ADD 症候群における

過剰なホルムアルデヒドによる DNA 損傷は、DNA の修復能を飽和するレベルであり、DNA 複製、転写を阻害し、DNA 損傷応答を活性化し、p53 依存的な細胞死や細胞老化を引き起こす。体細胞、神経細胞においてもおそらく DNA 損傷による増殖の低下があり、低身長や小頭症の原因となっているであろう。また、DNA 以外の生体分子の損傷も細胞機能低下をもたらす病態に寄与することも考えられる。

では、これらの DNA 損傷の原因となるホルムアルデヒドは、どのようにして産生されるのであろうか。我々は、iPS 細胞における ADD 症候群のモデル細胞を構築し、血球系への分化誘導によって DNA 損傷（内因性ホルムアルデヒドによるものと考えて良い）が誘導されることを見出した²。この血球分化に伴うホルムアルデヒド産生が、転写誘導によるエピゲノムリプログラミングに伴うヒストン脱メチル化によるものではないかと考え、検討を進めている。最近、他のグループによってこの仮説を強くサポートする結果が報告された⁹。この血球分化中のホルムアルデヒド産生は ADH5/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、損傷修復欠損症であるファンコニ貧血の病態の中心にあると考えられる (Figure 4)。実際、ALDH2 バリエントがホモであるファンコニ貧血患者は、生後すぐに再生不良性貧血や MDS を発症し、重篤であることがわかっている¹⁰。

将来へむけて

本稿では、新規 IBMFS である ADD 症候群について概説した。最後に、今後の展望について、簡単に述べたい。現在、我々が把握した ADD 症候群患者は全例造血幹細胞移植が必要と判断され、実施後血液学的改善をみている。我々は、新規に開発された ALDH2 活性化薬剤を使用し、ADD 症候群 iPS 細胞のインビトロ造血分化が、軽度ではあるが改善することを観察した²。この薬物をシーズに、ADD 症候群のみならず、ファンコニ貧血に有効な治療法が開発できる可能性がある。また、もし ADH5 活性化剤が見いだされれば、ファンコニ貧血に画期的な治療法となるかもしれない。

現在判明している ADD 症候群症例はまだ限られた数であり、まれであることは間違いないが、どの程度の頻度で存在する疾患なのか判然としない。データベース上で、ADD 症候群で最も頻度高く見られた ADH5 c.966delG 変異を検索す

ると、日本人ファンconi貧血で最も高頻度に見られる *FANCA* 遺伝子の c.2546delC 変異の出現頻度に比べて、同程度である^{1,11}。ファンconi貧血では原因遺伝子は 22 種類にも及ぶこともあり、ADD 症候群の頻度がファンconi貧血を上回るとは到底考えられない。今後、横断的なゲノム変異頻度の調査が進み、より正確な見積もりが可能となるであろうし、臨床の現場での認知が進めばより多数の患者が見つかり、疾患の全貌が明らかになってくるであろう。たとえば、ADD 症候群の症例に、悪性腫瘍が発生しないか、嚴重なフォローアップが必要である。我々は、厚労省からのファンconi貧血関連の研究費をうけており、依頼いただければ関連病態である ADD 症候群疑い例に対しての遺伝子診断は喜んで実施させていただく所存である。診断基準の設定、マネジメントガイドラインの策定へと、迅速な進展を期待する。

謝辞

以上述べてきたように、この疾患の本来の発見者は佐々木正夫 京大名誉教授です。今回の論文(Mol Cell, Blood)をまとめるにあたり、佐々木正夫名誉教授には様々な過去データをご提供いただき、また、当時佐々木名誉教授と仕事をされていた現在 JCRB 細胞バンクの平山知子氏、JCRB 細胞バンクの小山有弘博士・研究リーダーには懇切に実験のご指導をうけました。その後の iPS 細胞を用いた解析では、京都大学 iPS 細胞研究所の斎藤潤博士とグループの皆様にご指導、ご協力をいただきました。長期にわたる研究で、矢部みはる博士、矢部普正博士（東海大医学部）には多大なご協力をいただき、臨床現場の先生方、多くの共同研究者の方々にお世話になりました。患者さんのご協力にも心より感謝申し上げます。この研究は、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。

Table 1. Inherited Bone Marrow Failure Syndromes

Disorder	Causative gene	Inheritance	Pathogenesis
Fanconi anemia	22 <i>FANC</i> genes	Mainly AR	DNA crosslink repair defects
Diamond Blackfan Anemia	<i>RPS19, RPL5, etc</i>	Mainly AD	Ribosome function defects
Congenital Dyserythropoietic Anemia	Type I : <i>CDANI, or C15orf41</i> Type II : <i>SEC23B</i> Type III : <i>KIF23</i>	I–II : AR III : AD	Ineffective erythropoiesis
Dyskeratosis Congenita	<i>DKC1, TERT, TERC, RTEL1, etc</i>	AR, AD, XR	Telomere shortening
Schwachman Diamond Syndrome	<i>SBDS</i>	AR	Defects in ribosome biogenesis

AR, autosomal recessive; AD, autosomal dominant; XR, X-linked recessive.

Table 2. Clinical characteristics of Aldehyde Degradation Deficiency Syndrome

Children with hypoplastic anemia (range: 1~19 years old)

Normal MMC-induced chromosome breakage test

Increased SCE

Short stature

Microcephaly

Skin pigmentation and cafe' au lait spots

Mild mental retardation

Progression to myelodysplasia/leukemia

No malformation

Figure legends

Figure 1. Increased spontaneous SCE levels in lymphocytes with defects in ADH5/ALDH2. (A) SCE in lymphocytes carrying variant *ALDH2* treated with ADH5 inhibitor. The two panels show the same metaphase but in the right panel the positions of SCE events are marked with red arrow heads. (B) A schema explaining our hypothesis for increased SCE in ADDS lymphocytes but not in fibroblasts. PHA-stimulated lymphocytes may generate more formaldehyde than fibroblasts since they may undergo epigenetic reprogramming during blastogenesis².

Figure 2. *ADH5* and *ALDH2* mutations found in ADDS patients. The Upper scheme depicts the gene structures and the positions of the mutations. The numbered boxes indicate the exons. The lower scheme represents the *ADH5* or *ALDH2* proteins. c.564+1G>A is a splice site mutation, while c.966delG is a deletion mutation of a single nucleotide, resulting in the frameshift and protein truncation. The other two *ADH5* mutations affect a single amino acid (missense mutations). We have identified all of these four *ADH5* mutations resulted in the loss of protein expression. It is well known that *ALDH2* c.1510G>A(p.E504K) is a missense mutation, which abrogates the enzymatic activity and displays a dominant-negative effect.

Figure 3. Simplified formaldehyde (A) or acetaldehyde (B) degradation pathway. Exogenous or endogenous formaldehyde is spontaneously captured by glutathione (GSH), leading to the formation of S-hydroxymethylglutathione, which is catabolized by *ADH5*. Thus generated S-formylglutathione is further degraded by the enzyme called Esterase D (ESD) (not shown here) to formic acid and GSH. As a back-up, *ALDH2* can also degrade formaldehyde to formic acid. *ALDH2* also catabolizes acetaldehyde to acetic acid. This graphic was created with the BioRender.com website.

Figure 4. A schema of ADDS or FA pathogenesis. HSPC, hematopoietic stem and progenitor cell. we hypothesize that during hematopoietic differentiation, HSPC undergoes epigenetic reprogramming which includes extensive histone demethylation and accompanying formaldehyde generation. In the absence of *ADH5/ALDH2*, formaldehyde induces damages to genome DNA, which overwhelms normal DNA repair capacity. On other hand, the FA DNA repair pathway is compromised in FA, leading to

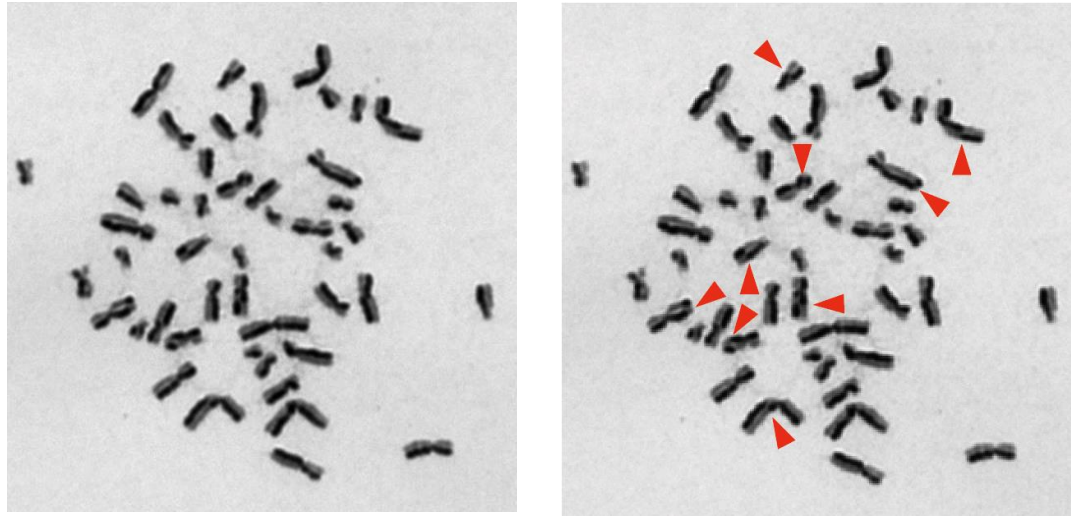
the accumulation of DNA damage, even though endogenous formaldehyde is properly degraded. In the end, HPSCs would be exhausted and accumulate mutations leading to MDS/leukemia. The size of the font suggests the scale of the biological impact.

References

1. Dingler FA, Wang M, Mu A, et al. Two Aldehyde Clearance Systems Are Essential to Prevent Lethal Formaldehyde Accumulation in Mice and Humans. *Mol Cell*. 2020;**80**(6):996–1012.e9.
2. Mu A, Hira A, Niwa A, et al. Analysis of disease model iPSCs derived from patients with a novel Fanconi anemia-like IBMFS ADH5/ALDH2 deficiency. *Blood*. 2021. On line publication as the First edition.
3. Sasaki MS, Tonomura A. A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res*. 1973;**33**(8):1829–1836.
4. Cunniff C, Bassetti JA, Ellis NA. Bloom's Syndrome: Clinical Spectrum, Molecular Pathogenesis, and Cancer Predisposition. *Mol Syndromol*. 2017;**8**(1):4–23.
5. Oze I, Matsuo K, Wakai K, et al. Alcohol drinking and esophageal cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Jpn J Clin Oncol*. 2011;**41**(5):677–692.
6. Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, et al. Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome. *Science Advances*. 2020;**6**(51):eabd7197.
7. Okada Y, Momozawa Y, Sakaue S, et al. Deep whole-genome sequencing reveals recent selection signatures linked to evolution and disease risk of Japanese. *Nat Commun*. 2018;**9**(1):1614.
8. Sakaue S, Akiyama M, Hirata M, et al. Functional variants in ADH1B and ALDH2 are non-additively associated with all-cause mortality in Japanese population. *Eur J Hum Genet*. 2020;**28**(3):1–5.
9. Shen X, Wang R, Kim MJ, et al. A Surge of DNA Damage Links Transcriptional Reprogramming and Hematopoietic Deficit in Fanconi Anemia. *Mol Cell*. 2020;**80**(6):1013–1024.e6.
10. Hira A, Yabe H, Yoshida K, et al. Variant ALDH2 is associated with accelerated

- progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood*. 2013;**122**(18):3206–3209.
11. Mori M, Hira A, Yoshida K, et al. Pathogenic mutations identified by a multimodality approach in 117 Japanese Fanconi anemia patients. *Haematologica*. 2019;**104**(10):1962–1973.

A



B

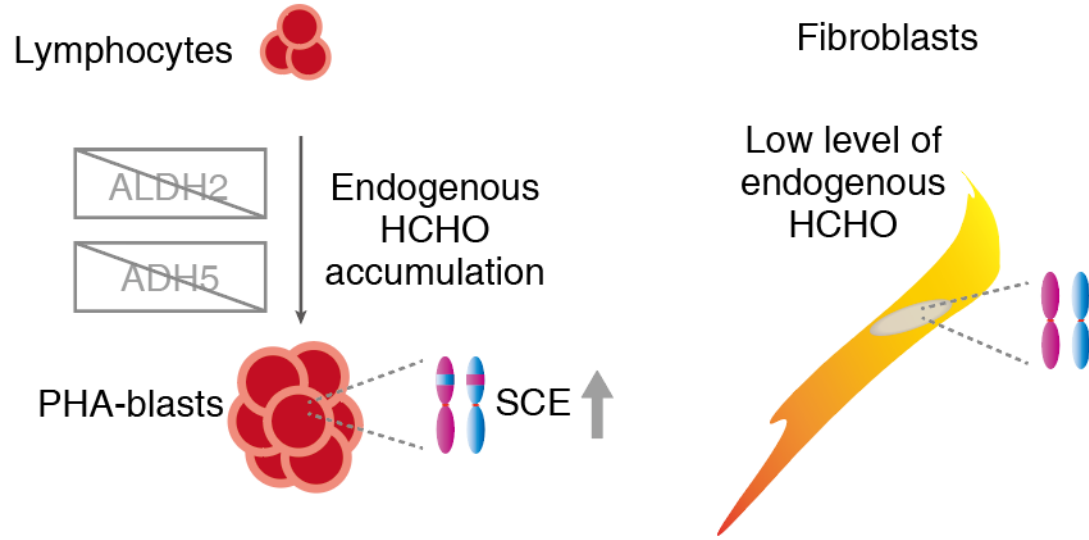


Figure 1

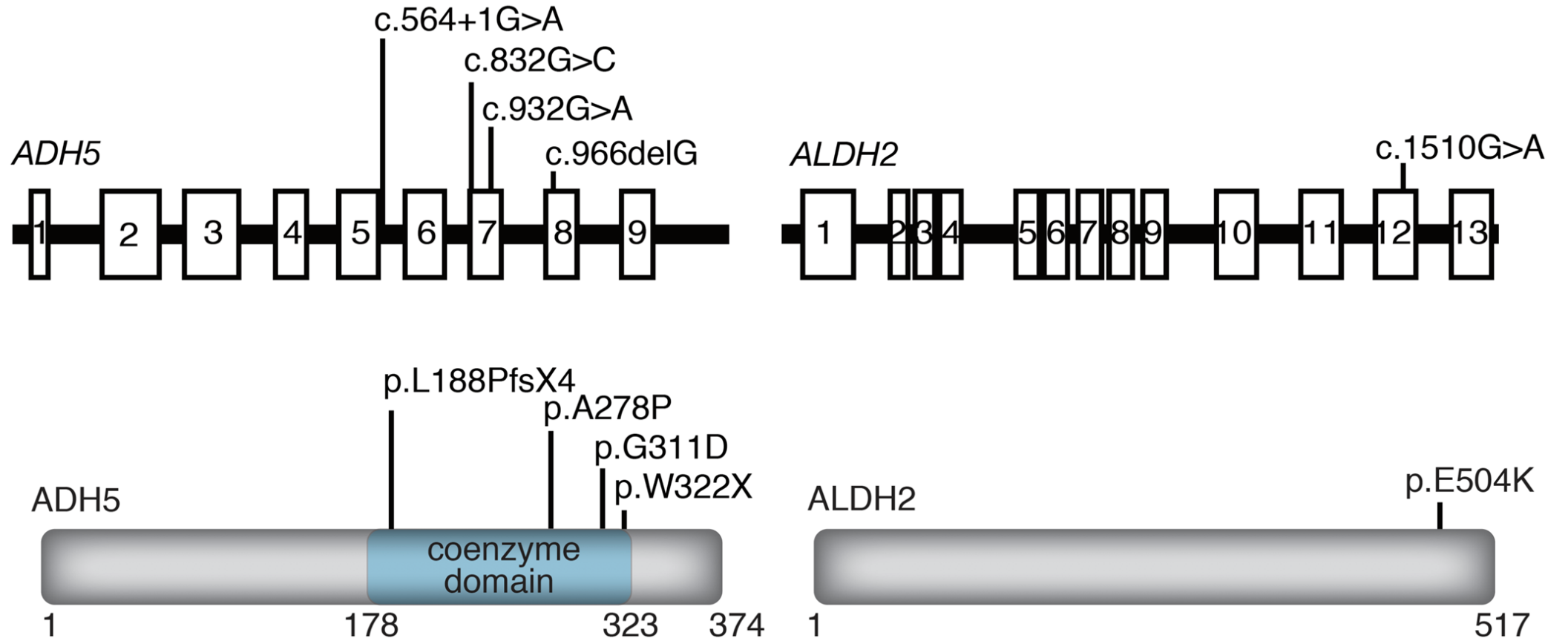
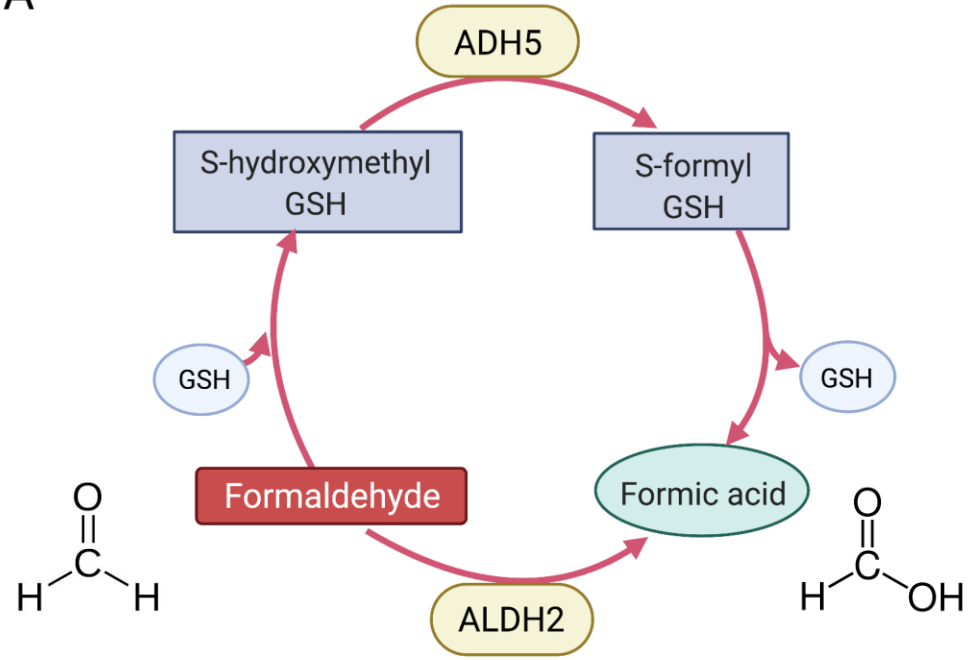


Figure 2

A



B

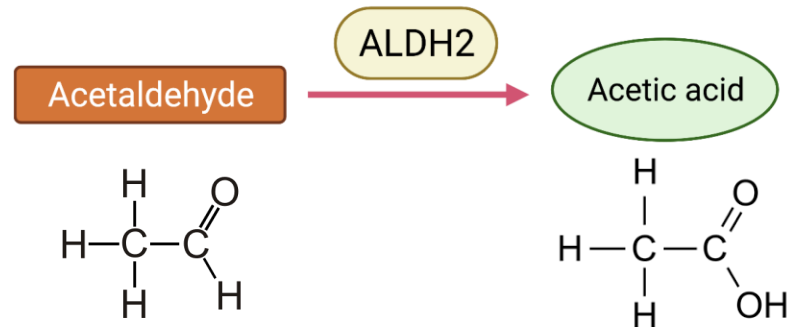
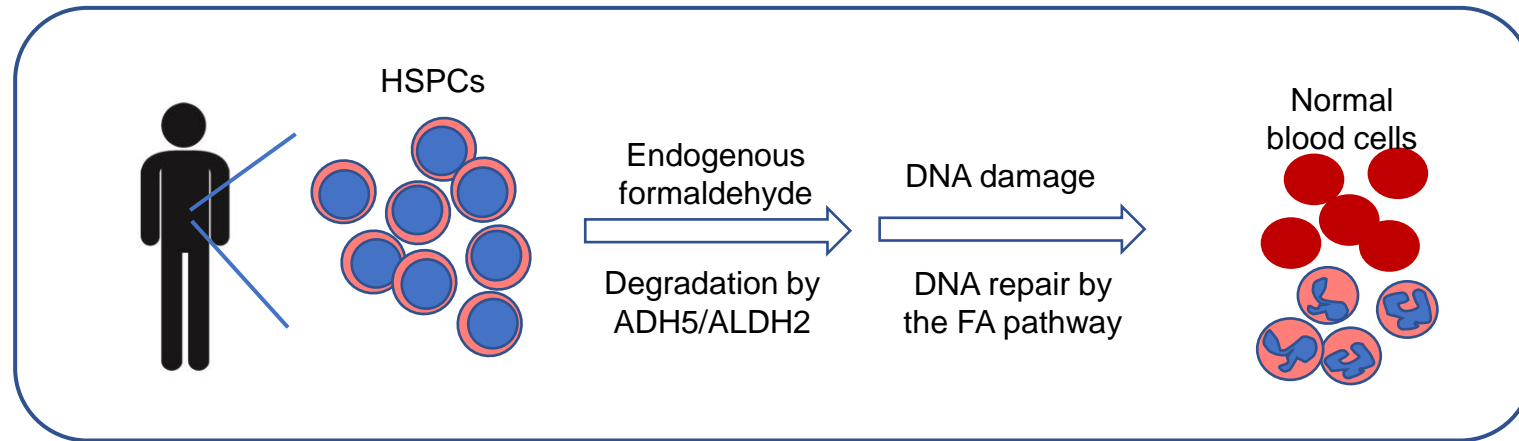
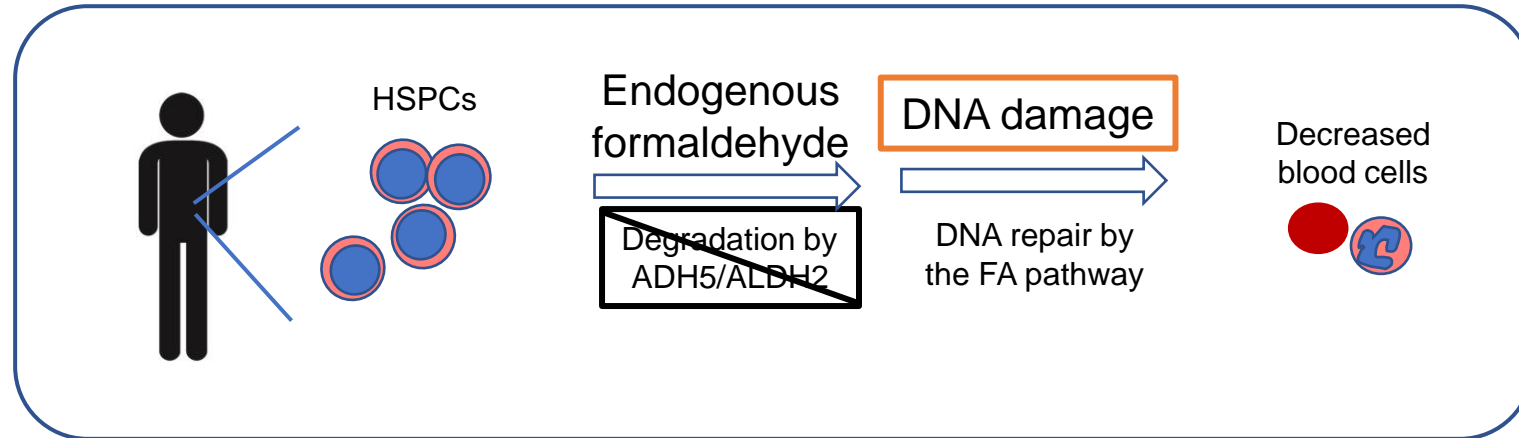


Figure 3

Healthy individual



ADD syndrome



Fanconi anemia

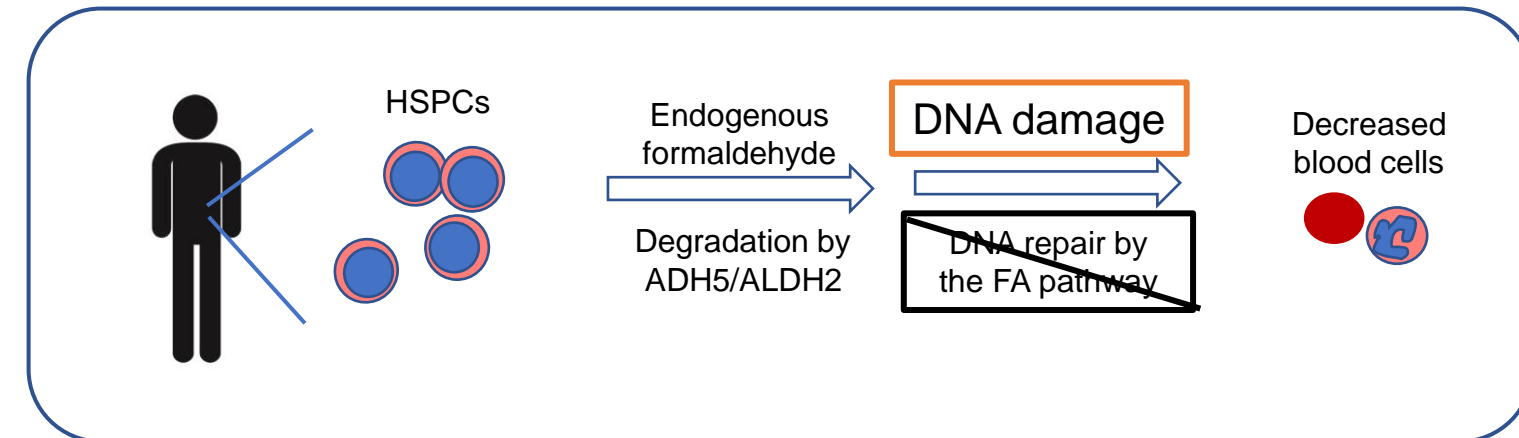


Figure 4