48　アルデヒド代謝酵素欠損によるゲノム損傷と造血不全

高田　穣

【目的】我々は、造血幹細胞不全と MDS（Myelodysplasia）を発症した日本人若年の患者 6 例において、アセトアルデヒド分解酵素である *ALDH2*（ヘテロ）とフォルムアルデヒド分解酵素 *ADH5*（ホモ）の遺伝子欠損を同定した。我々が従来解析してきた同様の造血不全・MDS を発症するファンコニ貧血（FA）は、*ALDH2* のバリアント型（Lys504 アレル）をホモで持つ場合著しく重症化するため、内因性アルデヒドによるゲノム損傷の修復不全と考えられる（Hira et al. Blood 2013）。一方、今回発見したこれらの患者は FA 遺伝子異常を持っておらず、細胞内代謝によって産生されるアルデヒド分解浄化機能の低下によるゲノム損傷蓄積（修復可能なレベルを超えた蓄積）によって発症すると理解され、FA とは鏡像的な位置づけとなる可能性がある（表 1）。本研究の目的は、このアルデヒド分解酵素遺伝子欠損による小児遺伝性血液疾患の病態解析と、アルデヒド分解酵素群のゲノム維持における分子機構の解明にある。

【方法】同定した患者 2 名の初代繊維芽細胞から倫理委員会の承認を得て iPS 細胞化を行い、疾患 iPS 細胞を樹立し、*ADH5* 遺伝子で相補した。健常人 iPS 細胞からのゲノム編集による iPS ノックアウトも試みた。これらの細胞を用いて *in vitro* コロニー法によって造血系へ分化誘導を行った（京大 CiRA、中畑研究室、斉藤准教授に指導を受けた）。リンパ球由来細胞株やがん細胞株を用いて、ゲノム編集による *ALDH2* および *ADH5* の遺伝子破壊を行いモデル系として解析した。

【結果】同定された 6 例の患者は *ALDH2*Lys504 アレルを必ず伴っており、本症は *ADH5* 単独欠損によるものではなく、複合型欠損症であることが示唆される。*ADH5* 単独変異による発症も完全には否定できないが、ADH5 単独で変異を持った個人は今まで発見できず、本疾患の発症メカニズムを確立するには、インビトロでの病態再現が必須である。そこで、患者由来 iPS 細胞をインビトロで造血系へと分化させたところ、*ADH5* の相補によって、コロニー形成能が著しく改善した。また、健常人由来 iPS 細胞から作成した ADH5 と ALDH2 の単独ノックアウトでは CD45 陽性細胞への分化に問題なく、$ALDH2^{+/-}ADH5^{-/-}$および $ALDH2^{-/-}ADH5^{-/-}$では低下が観察された。我々は、B 細胞株 BL2、大腸がん細胞株 HCT116、白血病細胞株 K562、ハプロイド細胞株 HAP1 等を用いて、$ALDH2^{-/-}ADH5^{-/-}$ダブルノックアウト細胞を作成した。いずれにおいても増殖の低下や細胞周期停止などは見られず、強いホルムアルデヒド感受性が認められた。HAP1 細胞において、姉妹染色分体交換（SCE）を測定したところ、通常培養条件で野生型、$ADH5^{-/-}$、$ALDH2^{-/-}ADH5^{-/-}$を比較して SCE レベルの上昇はなく、0.5 μM のフォルムアルデヒド添加によって $ALDH2^{-/-}ADH5^{-/-}$において明確な SCE 上昇を認めた。正常人血液中のフォルムアルデヒド濃度が 50～100 μM と報告されていることを考えると、培養細胞ではほとんどフォルムアルデヒドの産生は起こっておらず、造血細胞への分化などの状況で初めて *ADH5* と *ALDH2* の要求性が生じると考えられる。これらの結果は、今回発見された患者の造血不全が ALDH2 の Lys504 アレルとの複合によって発症していることをサポートしている。今後、ADH5 と ALDH2 をはじめとしたアルデヒド分解酵素群が、造血分化などの状況下で発生するアルデヒドを分解して造血幹細胞を維持する分子機構を明らかにしていきたい。

遺伝子型と表現型の関係

FA遺伝子	ALDH2	ADH5	表現型
-/-			ファンコニ貧血（FA）
-/-	AA		重症型FA
	AA		健常 (エタノール不耐性)
		-/-	健常？(症例発見できず)
	AA	-/-	症例発見できず
	GA	-/-	BMF/MDS, 精神発達遅延
	AA	+/-	健常

空欄は遺伝子が野生型であることを示す。
G, Glu504 allele; A, Lys504 allele;
BMF, bone marrow failure; MDS, myelodysplasia

48. アルデヒド代謝酵素欠損によるゲノム損傷と造血不全

高田　穣

京都大学 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

Key words： hematopoietic stem cell，Fanconi anemia，aldehyde metabolism，ALDH2，ADH5

緒　言

ファンコニ貧血症（Fanconi anemia: FA）は、まれな小児の遺伝性骨髄不全疾患で、ゲノムの安定性維持に関わる遺伝子群の形成する FA 経路の欠損症である。 FA には、最近我々が同定し報告した *FANCT/UBE2T* ［1］、*RFWD3/FANCW* ［2，3］等を含めて現在 22 の原因遺伝子が知られている。FA は、造血幹細胞不全、高発がん性等の臨床症状を特徴とし、細胞レベルでは、mitomycin C（MMC）などの DNA クロスリンカー剤やアルデヒドに対する高感受性が特徴的である［4］。

一方、アルデヒド分解酵素 ALDH2（Aldehyde dehydrogenase 2）は主に体内で生成されるアセトアルデヒドの分解を担っており、日本をはじめ東アジアの国々において活性を失った A 型アレル（Lys504）を持つ頻度が高く、飲酒後の顔面紅潮、悪酔いなどを来すことは良く知られている ［5］。我々は、日本人 FA 患者において *ALDH2* の遺伝子型を調べ、A 型アレル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［6］。これは FA の病態における内因性アルデヒドによる DNA 損傷蓄積の重要性を強く示唆する知見である。

医薬基盤研究所の JCRB 細胞バンクに、小児再生不良性貧血で、姉妹染色分体交換 SCE（Sister Chromatid Exchange）高値を示す一群の症例サンプルが登録保存されている（京大放生研・前教授、佐々木正夫博士による）。我々はこれらのサンプルをエクソーム解析に附し（京大小川研、名大小島研との共同研究）、ADH5 の両アレル変異を 3 名に見出した。さらに、東海大矢部博士から提供された分類不能の小児骨髄不全症例 6 例のうち 2 例からも、さらに京大関連病院の不明症例 1 例にも同様の所見を認めた。いまのところ合計 6 例となる（未発表）。臨床的に、奇形はなく、低身長、精神発達遅延、10 代における再生不良性貧血、MDS 発症等を認めている。臨床所見が判明している 3 名においては、造血幹細胞移植が施行されている。発がんは今のところ、認められていない。面白いことに、これらの症例は、全例、アセトアルデヒド分解酵素 *ALDH2* の機能欠損ヘテロ変異（A 型アレル、Lys504）を伴っていた。以上の結果は、*ADH5* と *ALDH2* の複合型欠損による新規の遺伝性血液疾患の存在を強く示唆する。FA とアルデヒド代謝酵素の遺伝子型と表現型について表 1 にまとめた。*ALDH2* ヘテロ変異＋*ADH5* ホモ変異の組み合わせで造血障害をはじめとする症状が顕著となると考えられる。以上、本疾患は、二つのアルデヒド分解酵素遺伝子が両方とも機能低下して始めて発症するとの仮説がなりたち、検証する必要がある。

方法および結果

1. 患者線維芽細胞からの iPS 細胞の作成・インビトロ造血分化系による *ALDH2/ADH5* 機能の評価

本疾患の発症メカニズムを確立するには、インビトロでの病態再現が必須である。そこで、これらの欠損症患者 2 名の初代繊維芽細胞から、倫理委員会の承認を受けて、プラスミドベースのリプログラミングを行い、iPS 細胞を樹立した。増殖については問題なく、核型分析を行なったが、正常核型とされた。これらの細胞を *ADH5* 遺伝子で相補するため、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誘導プロモータにつないだ ADH5 発現プラスミドをノックインし、ウェスタンによってドキシサイクリン添加時の *ADH5* 発現を確認した。また、正常人由来 iPS 細胞である 201B7 株を RIKEN 細胞バンクから入手し、

CRISPR/CAS9 によるゲノム編集によって *ALDH2* と *ADH5* のシングルとダブルのノックアウトを行った。これらの細胞を用いて、京都大学 iPS 細胞研究センター・中畑研究室の斎藤潤博士、丹羽明博士らによって開発されたモノレイヤー培養系による造血系分化誘導アッセイ［7］、さらに造血支持細胞 OP9 細胞上での造血コロニーアッセイ［8］を行った。*ADLH2* と *ADH5* のシングルとダブルノックアウト細胞を、モノレイヤー培養系でアッセイしたところ、CD45 陽性の血球細胞への分化が、シングルノックアウトは野生型とかわりなかったが、ダブルノックアウトでははっきりとした低下を認めた。また、ADH5 の発現によって症例から樹立した iPS 細胞からの造血コロニー数は著明に増加した（図 1）。

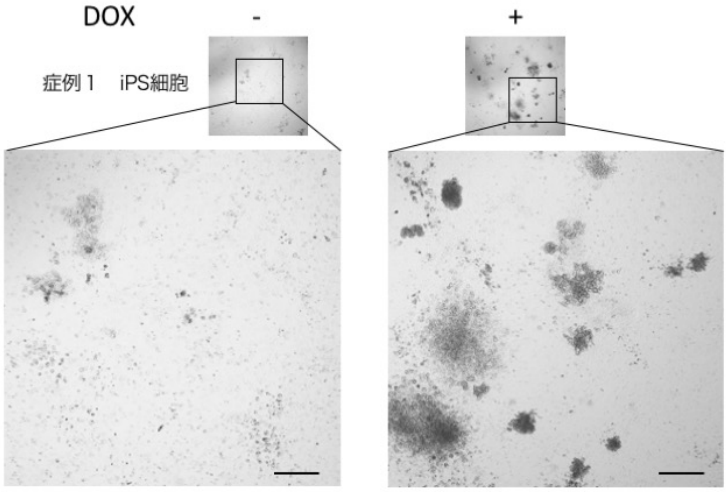


図 1. ALDH2/ADH5 複合欠損症患者由来 iPS 細胞の造血コロニー形成能

症例 1 から樹立した iPS 細胞を造血コロニー法によって血球系に分化させた。ADH5 遺伝子発現コンストラクトをゲノム編集によって ROSA26 遺伝子座にノックインし、ドキシサイクリン（DOX）添加によって発現誘導した。スケールバーは 500 μm。

2. ゲノム編集による患者病態を反映したモデル系の作成による SCE 上昇メカニズム解明

佐々木博士は軽度の SCE レベルの上昇（正常人で細胞あたり 10 程度、本症では細胞あたり 50 程度）をこれらの患者由来 PHA 刺激リンパ球で認めたが、同じ患者由来の繊維芽細胞では正常レベルであった。アルデヒドの過剰によるゲノム損傷が SCE の原因と思われるが、なぜリンパ球でのみゲノム損傷レベルが高値となるのか不明である。そこで、B 細胞株 BL2、大腸がん細胞株 HCT116、白血病細胞株 K562、ハプロイド細胞株 HAP1 等を用いて、ゲノム編集による *ALDH2* や *ADH5* の遺伝子破壊を行い、解析を行った。これらの全ての細胞で（前述の iPS 細胞を含めて）細胞増殖は野生型と比べて同等であった（図 2）。そこで、ゲノム損傷レベルのマーカーとして、SCE を HAP1 由来の *ADH5* ノックアウト、*ADH5/ALDH2* ダブルノックアウト細胞で調べた。非刺激状態での SCE レベルは、これらの細胞と野生型に違いを認めなかった。ところが、フォルムアルデヒドを少量（0.5 μM）添加したところ、*ADH5/ALDH2* ダブルノックアウトにおいて著明な SCE 誘導が認められた。健常人血液中のフォルムアルデヒド濃度が 50～100 μM と報告されている［9］ことを考えると、通常の細胞株の増殖中にはフォルムアルデヒドはほとんど産生されていないのではないか、あるいは、産生されていても、ADH5 以外の他の分解系で十分浄化できる程度の少量が産生されるに過ぎないのではないかと考えられる。

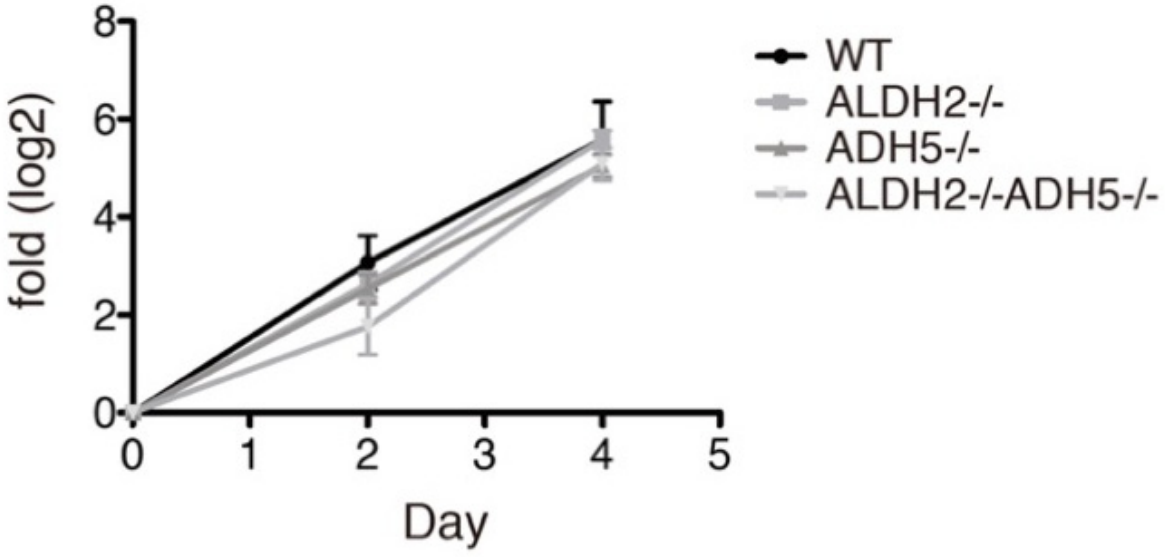


図2. HCT116細胞由来の*ADH5/ALDH2*ノックアウト細胞の増殖能

HCT116細胞において、ゲノム編集を行い、各種遺伝子型の変異株を作成し、増殖を細胞数のカウントによって調べた。

考　察

我々が同定したアルデヒド複合型欠損症患者からiPS細胞を樹立し、インビトロの造血分化系によって分化能をテストしたところ、予想通り、分化能の低下が*ADH5*遺伝子の再発現導入によって正常化する結果を得た。今後は、*ALDH2*遺伝子を再導入する実験が必要と考えられる。しかし、これらの患者細胞では片方アレルがドミナントネガティブ効果を示すとも言われているバリアント（Lys504）であり、むしろ、我々はALDH2活性化剤の添加を試すのが良いのではないかと考えている。もしこれが造血分化を正常化するのに有効であれば、それは直ちにALDH2活性化剤がこの疾患の造血不全の治療薬として有望であることを示唆する。ALDH2活性化剤は、Alda-1という名称で開発報告されており［9］、実験用にすでに入手した。

この疾患が、*ADH5*の変異のみで発症しているのか、それとも、*ALDH2*のバリアントが本当に病態に関与しているのかは、重要なポイントである。6例全てが*ALDH2*遺伝子型がGAのヘテロ型で、日本人は半数がGGの野生型であることを考えると、確率的にはALDH2活性の低下が関与していることが考えやすい。さらに、我々のiPS細胞のノックアウトを利用したインビトロの造血分化系では、*ADH5*のシングルノックアウトは特に分化低下を示していない。また、マウスの系でも、ヒトとの違いの可能性もあるが、*ADH5*のノックアウトは血液などに目立った問題は生じていないようでもある。今後、iPS細胞のインビトロ造血分化系で得られる細胞を利用して、細胞のゲノムにアルデヒドによるDNA損傷が生じているかどうかを、DNA損傷応答の検出、アダクトの検出などによって、確認することが必要である。それによって、FAにおいてDNA損傷蓄積による幹細胞不全が生じているように、この疾患においても同様のメカニズムが働いているかどうか、確認することが重要であると考えられる。

さらに、なぜ血球分化においてはっきりとした表現型が出るのにも関わらず、通常の静的な培養条件では増殖に問題なく、SCEも上昇してこないのかが問題である。分化の最中にアルデヒドの産生が高まっている可能性が考えられる。アルデヒドのソースとして、ヒストンやDNAのメチル基を仮定すると、理解しやすいように思われる。分化中に脱メチル化がゲノムのあちこちで進み、そのメチル基がフォルムアルデヒドに変換され、分化中のゲノム損傷の原因になっている可能性が考えられる。FAで修復不全の状況下ではアルデヒド代謝酵素が浄化しきれなかったゲノム損傷が蓄積し、アルデヒド代謝酵素が複合欠損した場合、修復系で扱いきれない量のゲノム損傷が蓄積することが考えられる。FAとアルデヒド代謝酵素複合欠損症の関係やヒトゲノムに19種類もコードされている*ALDH*ファミリー群の役割など、iPS

細胞を利用した遺伝学的解析で、よりはっきりと解明することが重要と考えている。

共同研究者・謝辞

本研究は、牟安峰・平明日香・岡本裕介・森美奈子（京都大学、放射線生物研究センター）、岡泰由・荻朋男（名古屋大学環境医学研究所）、小川誠司・吉田健一（京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学）、斎藤潤・丹羽明・大沢光治郎（京都大学 CiRA）、奥野友介・村松秀城・小島勢二（名古屋大学医学部小児科）、鐘巻将人（国立遺伝学研究所）、小原有弘・平山知子（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所）、松尾恵太郎（愛知県がんセンター研究所）、松田知成（京都大学大学院工学研究科附属流域圏総合環境質研究センター）、矢部みはる・矢部普正（東海大学医学部附属病院）、小林正行（京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学）の各氏との共同研究です。上原財団のサポートに心より感謝申し上げます。

文　献

1） Hira A, Yoshida K, Sato K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Shimamoto A, Tahara H, Ito E, Kojima S, Kurumizaka H, Ogawa S, Takata M, Yabe H, Yabe M. Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. Am J Hum Genet. 2015 Jun 4;96(6):1001-7. PMID: 26046368　doi: 10.1016/j.ajhg.2015.04.022.

2） Biallelic mutations in the ubiquitin ligase *RFWD3* cause Fanconi anemia. Kerstin Knies, Shojiro Inano, María J. Ramírez, Masamichi Ishiai, Jordi Surallés, Minoru Takata, and Detlev Schindler. J Clin Invest. 2017 Aug 1;127(8):3013-3027. doi: 10.1172/JCI92069. Epub 2017 Jul 10. PMID: 28691929

3） RFWD3-mediated ubiquitination promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination. Shojiro Inano, Koichi Sato, Yoko Katsuki, Wataru Kobayashi, Hiroki Tanaka, Kazuhiro Nakajima, Shinichiro Nakada, Hiroyuki Miyoshi, Kerstin Knies, Akifumi Takaori-Kondo, Detlev Schindler, Masamichi Ishiai, Hitoshi Kurumizaka, Minoru Takata. Mol Cell. 2017 Jun 1;66(5):622-634.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.022. PMID: 28575658

4） The Fanconi anaemia pathway: new players and new functions. Ceccaldi R, Sarangi P, D'Andrea AD. Nat Rev Mol Cell Biol. 2016 Jun;17(6):337-49. doi: 10.1038/nrm.2016.48. Epub 2016 May 5. Review. PMID: 27145721

5） Aldehyde dehydrogenase 2 in aplastic anemia, Fanconi anemia and hematopoietic stem cells. Van Wassenhove LD, Mochly-Rosen D, Weinberg KI. Mol Genet Metab. 2016 Sep;119(1-2):28-36. doi: 10.1016/j.ymgme.2016.07.004. Epub 2016 Jul 15. Review. PMID: 27650066

6） Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe M. Blood. 2013 Oct 31;122(18):3206-9. doi: 10.1182/blood-2013-06-507962. Epub 2013 Sep 13.PMID: 24037726

7） A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors. Niwa A, Heike T, Umeda K, Oshima K, Kato I, Sakai H, Suemori H, Nakahata T, Saito MK. PLoS One. 2011;6(7):e22261. doi: 10.1371/journal.pone.0022261. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21818303

8） Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. Niwa A,Umeda K, Chang H,Saito M,Okita K, Takahashi K,Nakagawa M, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. J Cell Physiol. 2009 Nov;221(2):367-77. doi: 10.1002/jcp.21864. PMID: 19562687

9) Formaldehyde (CH2O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH2O under controlled conditions. Heck HD, Casanova-Schmitz M, Dodd PB, Schachter EN, Witek TJ, Tosun T. Am Ind Hyg Assoc J. 1985 Jan;46(1):1-3. PMID: 4025145

10) Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. Science. 2008 Sep 12;321(5895):1493-5. doi: 10.1126/science.1158554. PMID: 18787169