

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550026

研究課題名(和文) アルデヒド分解酵素の組織特異的発現解析とファンコニ貧血細胞における機能の解明

研究課題名(英文) Analysis of tissue-specific distribution and function of ALDH isoforms in Fanconi anemia pathway

研究代表者

高田 穰 (Takata, Minoru)

京都大学・放射線生物研究センター・教授

研究者番号：30281728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本人ファンコニ貧血(FA)患者においてアセトアルデヒド分解酵素ALDH2の遺伝子型は、骨髓不全に進行に重大な影響を持ち、特に活性のないIAA型においては極度に重症である。これはFA病態におけるアルデヒドの中心的役割を示唆するものである。しかし、アルデヒド分解酵素は19種類と数多く、ALDH2以外のこれらの酵素のFA病態における役割はよくわかっていない。本研究では、ALDH2以外のアルデヒド分解酵素の組織特異的発現をしらべた。また、ファンコニ貧血類似だが、染色体脆弱性を示さない症例5例に、あらたにあるアルデヒド分解酵素のbiallelic変異を見出した。新規病態と考え検討中である。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that Fanconi anemia (FA) patients with variant alleles of ALDH2 gene encoding an acetaldehyde-catalyzing enzyme display accelerated progression of bone marrow failure, indicating that endogenous aldehydes damage DNA in hematopoietic stem cells and FA pathway is counteracting them. In this study, we have determined tissue specific mRNA expression of 19 ALDH isozymes in CD34+ progenitor cells, liver cells, and placenta cells. We also identified a set of Japanese patients who displayed bone marrow failure and had biallelic mutations in one of the aldehyde-catalyzing enzyme genes. This is probably a new syndrome that is caused by accumulated DNA damage due to lower catabolism of endogenous aldehydes.

研究分野：分子生物学、分子放射線生物学

キーワード：アルデヒド ALDH ファンコニ貧血

## 1. 研究開始当初の背景

我々はファンコニ貧血(FA)の分子機構の解析で様々な成果を上げてきた。FAは現在20種類同定されているFA原因遺伝子のいずれかの変異によって発症し、ほぼ同様の臨床症状を示すことから、これらの遺伝子は単一の細胞内生化学的経路(FA経路と呼ばれる)において機能すると考えられる。FA患者の細胞は、マイトマイシンC(MMC)などのDNAクロスリンク薬剤に非常に感受性が高く、したがってFA経路はDNAクロスリンク損傷の修復に機能するとされてきた。しかし、小児の体内にMMCなどが存在するはずもなく、何らかの内因性物質が骨髄でDNA損傷を引き起こしているはずである。

アルデヒド分解酵素ALDH2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、日本人において活性を失ったA型アレルを持つ頻度が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、アルデヒド分解活性の低いAA型、GA型の患者が、活性の高いGG型に比べて、骨髄不全の進行が早く、特にAA型においては生後一年以内にMyelodysplasia syndromeを発症するなど、極度に重症であることを報告した(Hira et al. Blood 2013; Yabe et al. Br J Hematol 2016)。この結果は、FA患者の内因性DNA損傷レベル制御にALDH2が寄与することを強く示唆し、ALDH2はFAの新たな治療ターゲットになり得ると思われる。しかし、ALDH2が正常でもFA発症は避けられないし、ALDH2が分解に関与しDNAを損傷する可能性のある体内アルデヒドは、その分子実態が不明である。また、ALDHはヒトにおいて19種類ものアイソフォームが存在し、どのアルデヒドがどの酵素で分解されるかも定かではない。アセトアルデヒド以外のアルデヒドがFAの病態形成により重要で、その分解酵素がALDH2以外に存在する可能性も想定される。

## 2. 研究の目的

各種アルデヒド分解酵素の造血プロジェニターを中心とした各種細胞における発現を検討する。さらに発現している酵素のFA表現型への影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

アルデヒド分解に関わることが想定される酵素の発現を、CD34陽性のヒト造血プロジェニター、血球系の細胞株、繊維芽細胞等の各種細胞において、Real time PCRを用いて検討する。陽性コントロールとして肝細胞をおく。これらの遺伝子をFAモデル細胞においてノックダウンないし強制発現し、表現型

に及ぼす影響を調べる。表現型は主に細胞増殖をテストすることになるので、実験系の高精度化、効率化を計るため、ノックダウン実験においてはGFPとRFPでそれぞれラベルしたFA細胞とその相補した細胞のペアを用意し、実験に使用する予定とした。

## 4. 研究成果

(1) 東海大矢部博士らとの共同研究で、ファンコニ貧血患者の母親のALDH2の遺伝子型を調べたところ、ALDH2-AAの患児の母親と同じくALDH2-AA型が複数例認められた(Yabe et al. Br J Hematol 2016)。マウスにおける検討では、ALDH2/FAダブルノックアウトマウスの母マウスは少なくとも一つの健常ALDH2健常アレルをもっていないと胎児が致死となることがわかっており、ヒトでは全く状況が違っていることが判明した。

(2) ALDH酵素群の転写レベルの発現を、Real time PCRによって、各種細胞で検討した。CD34陽性の造血プロジェニター細胞、胎盤細胞、ヒト成人肝細胞、胎児肝細胞を用いた。様々なパターンでの発現が認められた。まとめると、CD34陽性細胞で発現が高いのは、ALDH1A2/1A3であり、ALDH1A1も発現がみられる。特に1A3はCD34できわめて発現が高い。ALDH1B1, 2は成人の肝臓で最も高く、胎盤でもわずかに発現していた。

(3) ファンコニ貧血類似だが、染色体脆弱性を示さない症例5例に、あらたにアルデヒド分解酵素のbiallelic変異を見出した(本報告書では分子名については控えさせていただく)。新規の再生不良性貧血の病態と考えられ、今後の検討が必要である。この酵素がファンコニ貧血の病態に最も関係が深い可能性がある。

(4) FA患者由来細胞株と原因遺伝子で相補した細胞株にそれぞれ、GFPとmCherryを発現させ、混合してsiRNAスクリーニングの準備をすすめたが、マイトマイシンCの刺激下での細胞の挙動が予想と異なり、FA細胞よりも相補細胞がより強く増殖抑制される結果となった。この細胞においてはチェックポイントがキチンと働かない可能性がある。現在、この系でスクリーニングが可能か、検討中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計14件)

1. Human FAN1 promotes strand incision in 5'-flapped DNA complexed with RPA. Takahashi D, Sato K, Hirayama E, Takata M, \*Kurumizaka H. *J Biochem.* 2015 Apr 27. 158(3):263-70. doi: 10.1093/jb/mvv043 (査読あり)

2. Pluripotent cell models of fanconi anemia identify the early pathological defect in human hemoangiogenic progenitors. Suzuki NM, Niwa A, Yabe M, Hira A, Okada C, Amano N, Watanabe A, Watanabe K, Heike T, Takata M, Nakahata T, \*Saito MK. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Apr;4(4):333-8. doi: 10.5966/sctm.2013-0172. ( 査読あり )
3. Mutations in the Gene Encoding the E2 Conjugating Enzyme UBE2T Cause Fanconi Anemia. 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. *Am J Hum Genet*. 2015 Jun 4;96(6):1001-7. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.04.022. ( 査読あり )
4. Third Report on Chicken Genes and Chromosomes 2015. \*Michael Schmid, Jacqueline Smith, David W Burt, Bronwen L Aken, Parker B Antin, Alan L Archibald, Chris Ashwell, Perry J Blackshear, Clarissa Boschiero, C Titus Brown, Shane C Burgess, Hans H Cheng, William Chow, Derrick J Coble, Amanda Cooksey, Richard PMA Crooijmans, Joana Damas, Richard VN Davis, D-J de Koning, Mary E Delany, Thomas Derrien, Takele T Desta, Ian C Dunn, Matthew Dunn, Hans Ellegren, Lél Eöry, Ionas Erb, Marta Farré, Mario Fasold, Damarius Fleming, Paul Flicek, Katie E Fowler, Laure Frésard, DP Froman, Valerie Garceau, PP Gardner, Almas A Gheyas, Darren K Griffin, Martien AM Groenen, T Haaf, Olivier Hanotte, Alan Hart, J Häsler, SB Hedges, Jana Hertel, Kerstin Howe, Allen Hubbard, David A Hume, Pete Kaiser, Darek Kedra, Stephen J Kemp, Christophe Klopp, Kalmia E Kniel, Richard Kuo, Sandrine Lagarrigue, SJ Lamont, Denis M Larkin, Raman A Lawal, Sarah M Markland, F McCarthy, Heather A McCormack, Marla C McPherson, Akira Motegi, Stefan A Muljo, Andrea Münsterberg, R Nag, I Nanda, Michael Neuberger, Anne Nitsche, Cedric Notredame, Harry Noyes, Rebecca O' Connor, Elizabeth A O' Hare, Andrew J Oler, Sheila C Omneh, Helio Pais, Michael Persia, Frederique Pitel, Likit Preeyanon, Pablo Prieto Barja, Elizabeth M Pritchett, Douglas D Rhoads, Charmaine M Robinson, Michael N Romanov, Max Rothschild, P-F Roux, Carl J Schmidt, A-S Schneider, Matt Schwartz, Steve M Searle, Michael A Skinner, Craig A Smith, PF Stadler, TE Steeves, Claus Steinlein, Liang Sun, Minoru Takata, Igor Ulitsky, Qing Wang, Ying Wang, Wesley C Warren, JMD Wood, David Wragg, Huaijun Zhou. *Cytogenetic and Genome Research* 145(2): 78-179, 2015 doi: 10.1159/000430927.( 査読あり )
5. Conserved overlapping gene arrangement, restricted expression and biochemical activities of DNA polymerase  $\gamma$  (POLN). Takata KI, Tomida J, Reh S, Swanhart LM, Takata M, Hukriede NA, Wood RD. *J Biol Chem*. 2015 Aug 12. 290(40):24278-93. doi: 10.1074/jbc.M115.677419. ( 査読あり )
6. Fanconi貧血 - DNAクロスリンク損傷修復の分子機構から臨床まで- 平明日香、稲野将二郎、高田 穰 遺伝子医学MOOK別冊 シリーズ：最新遺伝医学研究と遺伝カウンセリング シリーズ1 「最新遺伝性腫瘍・家族性腫瘍研究と遺伝カウンセリング」 [編集：三木義男先生]
7. 家族性腫瘍学 -家族性腫瘍の最新研究動向- II.各論 原因遺伝子 Fanconi anemia 経路によるDNA鎖間結合の修復メカニズム 稲野将二郎、平明日香、高田 穰 日本臨床 73間 増刊号6 305-310 項
8. 生体の科学 増大特集 細胞シグナル操作法 「DNA修復」 石合正道、高田 穰 466-467項 Vol. 66 No.5 2015
9. Defective FANCI Binding by a Fanconi Anemia-Related FANCD2 Mutant. Sato K, Ishiai M, Takata M, \*Kurumizaka H. *PLoS One*. 2014 Dec 9;9(12):e114752. doi: 10.1371/journal.pone.0114752. ( 査読あり )
10. The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b Pathway Regulates the Radiation Response of Mouse Spermatogonial Stem Cells. Kei Ishii, Masamichi Ishiai, Hiroko Morimoto, Mito Kanatsu-Shinohara, Ohtsura Niwa, Minoru Takata, and \*Takashi Shinohara. *Stem Cell Reports*. 2014 Oct 14;3(4):676-89. doi: 10.1016/j.stemcr.2014.08.006. ( 査読あり )
11. Expression and purification of human FANCI and FANCD2 using Escherichia coli cells. Takahashi D, Sato K, Shimomuki M, Takata M, \*Kurumizaka H. *Protein Expr Purif*. 2014 Nov;103:8-15. doi: 10.1016/j.pep.2014.08.012. ( 査読あり )

12. Modularized functions of the Fanconi anemia core complex. Huang Y, Leung JW, Lowery M, Matsushita N, Wang Y, Shen X, Huong D, Takata M, Chen J, \*Li L. *Cell Rep.* 2014 Jun 26;7(6):1849-57. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.029. Epub 2014 Jun 5. (査読あり)
13. FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA interstrand crosslink repair. Unno J, Itaya A, Taoka M, Sato K, Tomida J, Sakai W, Sugawara K, Ishiai M, Ikura T, Isobe T, Kurumizaka H, \*Takata M. *Cell Rep.* 2014 May 22;7(4):1039-47. *Cell Rep.* 2014 May 22;7(4):1039-47. (査読あり)
14. Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. Hosono Y, Abe T, Ishiai M, Islam MN, Arakawa H, Wang W, Takeda S, Ishii Y, Takata M, Seki M, \*Enomoto T. *Biochim Biophys Acta.* 2014 May;1843(5):1002-12. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.005. (査読あり)

〔学会発表〕(計 23 件)

1. Identification of UBE2T as a novel Fanconi anemia gene. Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Minoru Takata, Hiromasa Yabe, Miharu Yabe. ICRR2015, Kyoto Japan May 25-29, 2015
2. Mutations in the gene encoding the E2 conjugating enzyme UBE2T cause Fanconi anemia. A. Hira, K. Yoshida, K.Sato, Y. Shiraishi, K. Chiba, H. Tanaka, S. Miyano, A. Shimamoto, H.Tahara, E.Ito, S.Kojima, H. Kurumizaka, S.Ogawa, M.Takata, H.Yabe, M. Yabe. 27<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium. Toronto, Canada. September 17-20, 2015
3. UBE2T/FANCT is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients. Minoru Takata, Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akira Shimamoto, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Hiromasa Yabe, and Miharu Yabe. 16<sup>th</sup> Ataxia-Teleangiectasia Workshop. Beijing, China, October 11-14<sup>th</sup>, 2015
4. Genetic subtyping of Fanconi anemia in Japanese patients. Miharu Yabe,

Hiromasa Yabe, Kenichi Yoshida, Seishi Ogawa, Etsuro Ito, Yusuke Okuno, Hideki Muramatsu, Seiji Kojima, Asuka Hira, Minoru Takata. 27<sup>th</sup> Annual Fanconi anemia research fund Scientific Symposium. Toronto, Canada. September 17-20, 2015

5. Minoru Takata, Asuka Hira, Kenichi Yoshida, Koichi Sato, Akira Shimamoto, Hidetoshi Tahara, Hitoshi Kurumizaka, Seishi Ogawa, Hiromasa Yabe, and Miharu Yabe 「UBE2T is a novel FA gene identified in Japanese Fanconi anemia patients」 The 9<sup>th</sup> 3R Symposium, 17-21, November, 2014 Gotemba Kogen Hotel 静岡県御殿場市
6. Minoru Takata. Comprehensive analysis of Japanese Fanconi anemia (FA) patients has led to the identification of an E2 enzyme UBE2T as a novel FA gene. 日米修復会議 エクシブ鳴門 2014年10月29日 徳島県鳴門市(招待講演)

〔図書〕(計 3 件)

ゲノムを司るインターメア 非コードDNAの新たな展開 小林武彦編 化学同人 11章 「ゲノム脆弱部位の維持と機能」 高田 穰 2015年

The Fanconi Anemia Pathway and Interstrand Cross-Link Repair. Masamichi Ishiai, Junya Tomida, Akiko Itaya, James Hejna, \*Minoru Takata. *DNA Replication, Recombination, and Repair*. pp 175-210. Edited by Fumio Hanaoka and Kaoru Sugawara. Springer Japan. 2015年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホ - ム ベ - ジ 等  
<http://house.rbc.kyoto-u.ac.jp/late-effect>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 穰 (Takata Minoru)

京都大学・放射線生物研究センター・教授  
 研究者番号: 30281728

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし