

平成30年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15243

研究課題名(和文) フォルムアルデヒド分解酵素ADH5遺伝子欠損による再生不良性貧血—高SCE症候群

研究課題名(英文) Identification of a novel childhood hematopoietic failure syndrome caused by combined mutations in ADH5 and ALDH2 that function in aldehyde metabolism.

研究代表者

平 明日香 (HIRA, Asuka)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号：30772777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄不全を発症した日本人小児症例において、フォルムアルデヒド分解酵素であるADH5 (Alcohol dehydrogenase 5, ClassIII)の両アレル変異とアセトアルデヒド分解酵素ALDH2 (Aldehyde dehydrogenase2)の機能欠損ヘテロ変異をもつ6名を見出した。造血幹細胞において内因性アルデヒドが産生され、ADH5とALDH2が協調してその除去を行っていることが示唆される。本研究は、原因不明であった小児骨髄不全の一群の患者の存在を証明し、その病態の本質を明らかにし、その診断と治療開発への第一歩となる研究である。

研究成果の概要(英文)： Here we report a set of Japanese children (total six cases) with hypoplastic anemia and MDS who carried biallelic ADH5 gene mutations and monoallelic ALDH2\*504Lys. Hematologically they were similar to FA but they displayed neither overt physical malformation nor increased levels of MMC-induced chromosome breakages.

To test the requirements of these genes for hematopoiesis in vitro, we destroyed these genes in human iPS cells derived from a healthy individual. The iPS cells lacking either ADH5 or ALDH2 showed normal in vitro differentiation potential into hematopoietic lineages, while drastic reduction was observed in ADH5-/-ALDH2+/- iPS cells. Furthermore, the patient derived iPS cells showed decreased colony numbers in clonogenic progenitor assay, which was reversed by exogenous expression of ADH5 or by treatment of cells with ALDH2 agonist drug Alda-1. These results prove the digenic origin of this disorder, and provide a potential therapeutic means for these patients.

研究分野：発癌機構

キーワード：アルデヒド ADH5 ALDH2 小児骨髄不全

1. 研究開始当初の背景

京都大学名誉教授の佐々木正夫博士による医薬基盤研(JCRB)細胞バンク内「高発がん性遺伝病由来細胞コレクション」は、日本人の遺伝病の解析において貴重な研究リソースである。私は、その中から小児再生不良性貧血患者で姉妹染色分体交換(SCE)高値を示す5例をエクソーム解析し、3例においてフォルムアルデヒド分解酵素であるADH5遺伝子の両アレル変異を見出した。これらの結果は、ADH5欠損による新規の遺伝性血液疾患の存在を強く示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、病態モデルにより、ADH5 遺伝子とSCE高値の関係を明らかにし、骨髄不全病態のインビボ、インビトロ再現を試みる。

3. 研究の方法

(1) ADH5 欠損の患者繊維芽細胞をウェスタン等にて解析する。ADH5の発現と活性について検討する。

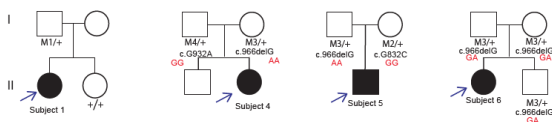
(2) ADH5遺伝子をリンパ球系の細胞株で破壊し、モデル細胞作成し、SCE レベルについて検討。リンパ球でのみADH5 欠損がSCE 上昇をもたらす原因を同定する。

(3) 患者繊維芽細胞をリプログラムしiPS細胞を作成し、インビトロ造血分化系においてADH5の造血における機能を検索する。

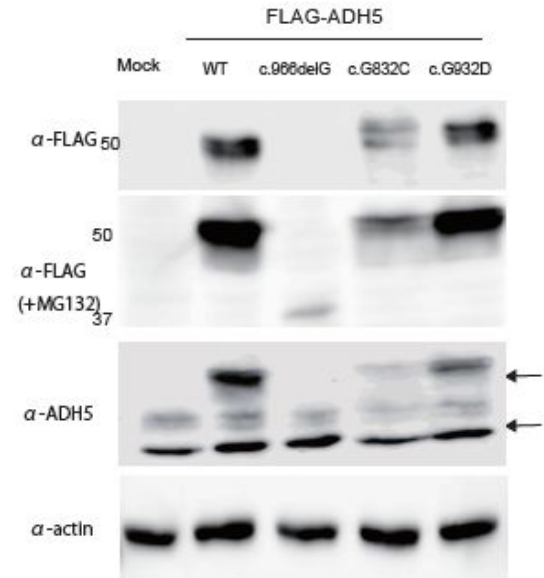
4. 研究成果

(1)

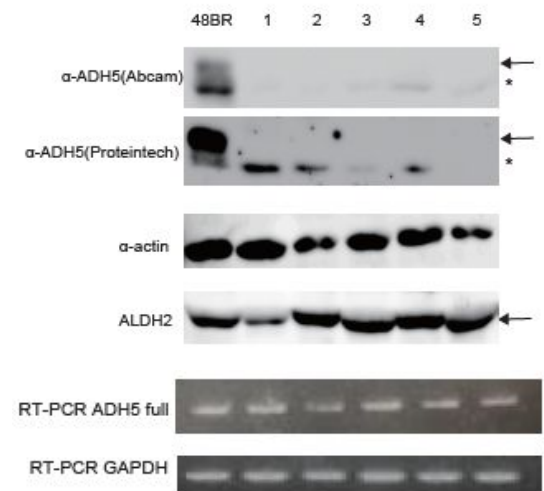
ホルムアルデヒド分解酵素であるADH5の変異を有する患者は今日までで計7例見出している。うち4名は家族についても評価できており、下に家系図を示す。赤字はアセトアルデヒド分解酵素ALDH2のジェノタイプであり、GGに対してGAは50%以下の弱い分解活性をもつ。ALDH2 GAジェノタイプとアセトアルデヒド分解酵素の不活性型の保持者であり、ADH5のみでなく、ALDH2のこの病態への関与を疑った。



また主要な変異として3種類があり、それらの変異は全て東南アジア人にもみられる稀少な変異であることを確認している。3種類の変異について、FLAGタグを付加してHEC293T細胞に強制発現させたところ、以下のような結果となった。



患者のうち骨髄移植前の皮膚繊維芽細胞の入手が可能であった5例の細胞を、ADH5 発現(蛋白質、RNA)を評価し、タンパク量は全ての患者において低下し、mRNAの量は保持されていることを確認した。ウエスタンブロット、RT-PCRの結果を下に示す。



活性(フォルムアルデヒドによるアダクト量)については確認できていない。

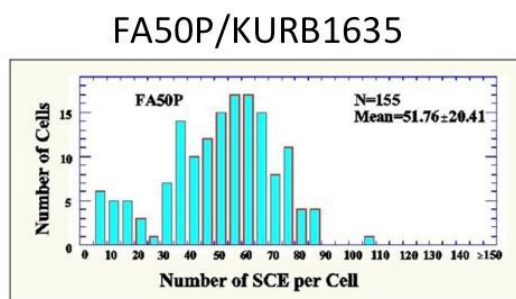
次の表に患者6例のまとめを記す。

6例は10-19歳の若年男女であり、共通する臨床症状として、奇形はなく、軽度の精神発達遅滞、低身長、また骨髄不全を認めた。

症例番号	ID	JCRB (Sasaki collection)	ALDH2	ADH5	Phenotype
症例1	PN65-236 Female, 10 yo	AP39P (KURB1642)	GA	Comp. heterozygous: Splice site mutation Exon6 c.684+1G>C Missense c.6832Cp>A:79P	High SCE in lymphocytes (5.3.SCE/cell) No ADH5 protein expression
症例2	PN65-238 Male 13 yo	AP57P (KURB1653)	GA	Comp. heterozygous: Stop gain c.956delGp>W322X Missense c.6832Cp>A:79P	Lymphocyte is High SCE (41.15SCE/cell) Fibroblast is normal SCE (10.75SCE/cell) 46 XY No ADH5 protein expressed
症例3	PN65-239 Female 19 yo	FA50P (KURB1635)	GA	Comp. heterozygous: Stop gain c.956delGp>W322X large deletion	High SCE MMC sensitivity (-)(lymphocyte) No ADH5 protein expression
症例4	TKFA-18	Not applicable (Tokai case)	GA	Comp. Heterozygous: Stop gain c.956delGp>W322X Missense c.6932A>G:931D	奇形はなく低身長、精神発達遅延、色素沈着（カフェオレ色）、骨髄不全は1歳3ヶ月くらいから軽度、11歳3ヶ月でMDS (RCMD) で緊急体の骨髄異変を併発。造血幹細胞移植施行。染色体異常なし。兄は健康。母に家系歴なし。 No ADH5 protein expression
症例5	TKFB-09 Male	Not applicable (Tokai case)	GA	Comp. Heterozygous: Stop gain c.956delGp>W322X Missense c.6832Cp>A:79P	奇形はなく低身長、精神発達遅延、15歳発症の汎血球減少、FAS症にて造血幹細胞移植施行。兄弟に症状なし。 No ADH5 protein expression
症例6	KDFA-08 Female	Not applicable	GA	Homozygous: Stop gain c.956delGp>W322X	奇形不全、精神発達遅滞、遺伝性の左第4趾の奇形、17歳でMDS。造血幹細胞移植施行。 血腫結核あり（祖父母が従兄弟様）

(2)

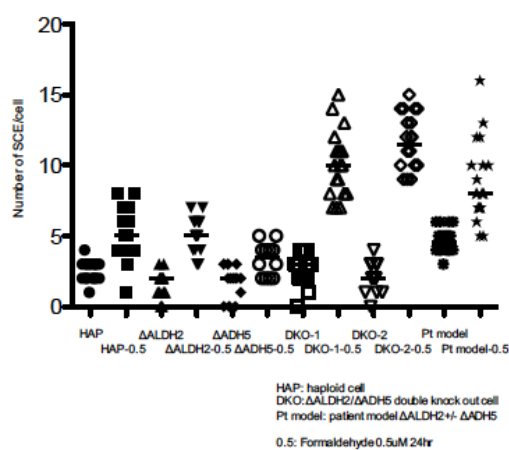
佐々木博士によるJCRB の細胞リストの説明によれば、ADH5 欠損症例では、リンパ球ではSCE が細胞あたり50 程度と高値であるが、線維芽細胞では正常であった。図に、1例のSCEの結果を示す。



SCE 上昇がリンパ球に限られる理由を検討しようとした。健常ヒト末梢血リンパ球と線維芽細胞でSCEを評価した。興味深いことに、SCEは健常ヒト末梢血リンパ球でのみ上昇を認めた。さらにADH5 のリンパ球におけるSCE抑制機能を確認するため、リンパ系の細胞株を使用してCRISPR-CAS によるADH5 ノックアウト細胞を作成し、フォルムアルデヒド感受性とSCE に及ぼす影響を検討した。フォルムアルデヒド感受性はリンパ球でのみみられ、線維芽細胞ではみられなかった。このこととSCE上昇がリンパ球のPHA添加下での分化の途中でしか見られなかったことは、内因性フォルムアルデヒドの産生とSCEの上昇が、分化の

盛んな過程でのみ見られる現象であることを示唆していると考えた。まだ検証には至っていないが、内因性フォルムアルデヒドの発生源として、DNAのメチル化におけるところを最も疑っている。

複数の細胞種でADH5, ALDH2 遺伝子のノックアウト細胞樹立を行なった。その細胞を用いてSCEを評価し、フォルムアルデヒド負荷によるSCEの増大、特に、ADH5とALDH2のダブルノックアウトおよびADH5とALDH2の不活性型変異の細胞においては、単独遺伝子のノックアウトと比較してSCEが優位に上昇することを確認した。このことは、病態において、SCEの上昇が、アルデヒドに対するDNA損傷応答を反映して上昇することを意味し、またこの疾患に見られるSCEの上昇が、ADH5,ALDH2単独の遺伝子欠損よりもむしろADH5とALDH2の2つの遺伝子欠損の相乗効果によってもたらされるものであることを示唆していると考えた。

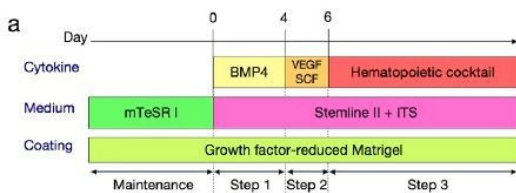


(3)

JCRB から入手した2名のADH5 欠損患者の線維芽細胞をリプログラムして、iPS (induced pluripotent stem)細胞化を行なった。Neon Electroporator を使用し、患者皮膚線維芽細胞に、初期化因子であるOCT3/4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC をコードしたエプゾーマルベクターを導入した。体細胞のiPS化において、OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28に加えて、TP53 のshRNA を組み合わせて初

期化をはかると、その効率が比較的良好なことが知られている。さらに EBNA1 を追加することによってより効率的な iPS 化が可能となる (K.Okita et al, Stem Cells2013)。また、ヒトの初代線維芽細胞や血液細胞の効率的な iPS 化のためには、feeder-free(Ff), xeno-free(Xf)のメディウムである StemFit を用いると、核型に異常をきたす細胞の出現を抑制し、長期にわたって培養が可能であることが報告されている (M.Nakagawa et al, Scientific reports 2014)。そこで我々はこれらの方法を用いてフィーダーフリーでのヒト iPS 細胞の樹立と維持を行った。次に樹立した iPS 細胞を用いて、インビトロ造血分化系による ADH5 機能の評価を行った。

樹立した ADH5 欠損 iPS 細胞にレンチウイルスを用いて ADH5 遺伝子を導入し、相補された iPS 細胞、コントロールとして健常人から作成された iPS 細胞、そして ADH5 欠損 iPS 細胞を、インビトロ血球分化系においてテストした。以下に、我々が行ったインビトロにおける造血分化の具体的な方法を説明する (A.Niwa et al, PloS One 2011)。



iPS 細胞は、mTeSR1 serum-free medium の中に growth factor-reduced Matrigel を入れて維持培養する。連日のメディウム交換後、iPS 細胞は5 コロニー以下の状態に希釈して、6-well dish で培養を開始する。コロニー径が約500 μm に成長したら、mTeSR1 serum-free medium をStemlineII serum-free medium に交換し、造血系への分化誘導を開始する。初めの4 日間はBMP4 を添加し、day4 でVEGF165 とSCF に置き換える。Day6 で、サイトカインは再び

hematopoietic cocktail を含むメディウムへと置き換える。骨髄球系の誘導には SCF, TPO, IL3, FLT-3 ligand, G-CSF を含む培地、赤芽球系の分化誘導には SCF, TPO, IL3, FP6, EPO を含む培地を用いる。これより先は5 日毎の培地交換とする。コロニーは初めロザリー状、小嚢状の形態で、数日間生育する。Hematopoietic cell clusters はこの構造辺縁よりday10-12 付近で生じる。またその数日後からはfloating blood cells がみられる。5 日毎のメディウム交換を行っている場合は、day50までには血液細胞産生を得ることができた。Floating cells は遠心してスライドガラス上に落とし、ギムザ染色やミエロペルオキシダーゼ染色を行って、顕微鏡下で解析した。分化誘導した細胞の分離にはフローサイトメトリーAriaIIを用いて免疫染色した細胞を解析した。day18で、CD34/CD45を用いて評価した。ホモADH5 欠損 + ヘテロALDH2 患者由来の iPS 細胞が、コントロール細胞に比して明確に造血分化が低下していることを確認した。またMethocultを用いて造血幹細胞コロニー形成アッセイを行い、各系統の造血細胞への分化を現在解析中である。さらに今後、細胞内のフォルムアルデヒドアダクトの測定などを試みる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平 明日香 (HIRA, Asuka)  
京都大学・放射線生物研究センター・研究  
員  
研究者番号：30772777

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

斎藤 潤 (SAITO, Megumu)  
京都大学・iPS細胞研究所・准教授  
研究者番号：90535486

##### (4) 研究協力者

( )