

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H00629

研究課題名（和文）環境ストレス応答・ゲノム修復システムの破綻により発症する疾患の病態解明

研究課題名（英文）Molecular pathogenesis of human disorders associated with deficiencies in the DNA repair and environmental stress response systems

研究代表者

萩 朋男（OGI, Tomoo）

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：80508317

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,900,000円

研究成果の概要（和文）：生体内外の環境に由来する様々なストレスに対して、生物が適切な遺伝子発現の制御と遺伝情報の恒常性を維持するために必要となる、「環境ストレス応答・ゲノム修復システム」の理解と、その破綻により発症するヒト疾患の病態解明に取り組んだ。AMeD症候群という造血不全・知的障害/神経症状・低身長や小頭症を示す新たな遺伝性疾患の発症メカニズムとAMeD症候群で異常をきたしている環境ストレス応答について解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境ストレス応答・ゲノム修復システムの分子メカニズムの理解や、これらの破綻によって発症するヒト遺伝性疾患の病態解明を行い、遺伝子発現の制御機構やゲノムの安定性維持に関連する様々な科学的知見を蓄積することで、関係する遺伝性疾患だけでなく、ゲノムの不安定化が関与する、がん、老化、代謝異常などの、より一般的な疾患についても、将来的な治療法・予防法開発につながってゆくと期待される。

研究成果の概要（英文）：We studied the mechanisms by which organisms maintain proper regulation of gene expression and genomic stability in response to various types of endogenous and exogenous stresses. This research focused on understanding the 'environmental stress response / repair systems' and elucidating the pathogenesis of human disorders that arise from their dysfunction. We studied the pathogenesis of AMeD syndrome, a previously unclassified genetic disorder characterized by aplastic anemia, mental retardation, and dwarfism. Our findings reveal the mechanisms underlying the development of AMeD syndrome and the abnormalities in the environmental stress response associated with this condition.

研究分野：人類遺伝学、分子生物学、DNA修復学

キーワード：環境ストレス・環境変異原 DNA修復・転写共役修復 ゲノムインスタビリティ DNA修復欠損性疾患  
がん・老化関連疾患

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

環境ストレスの多くは、生物の遺伝情報が格納されるゲノム DNA に損傷を誘発する。DNA 損傷は適切な遺伝子の発現を妨げることで、細胞機能の維持に障害をきたすと同時に、DNA 合成を阻害し遺伝情報の劣化をもたらす。このため、環境ストレスへの過度な曝露は、老化や発がんを含む様々な疾患の発症と密接に関係する。

これら種々の DNA 損傷に対して、様々な環境ストレス応答・ゲノム修復システムが機能することで、遺伝情報の維持と生体の恒常性が保たれている。一方、先天的に環境ストレス応答・ゲノム修復システムが欠損した場合、ゲノム不安定性を示す遺伝性疾患を発症することが知られる。ゲノム不安定性疾患群には、ゲノムの不安定化に起因する好発がん性、早期老化、進行性の神経変性、免疫不全、発育発達異常、奇形など様々な病態を示す多数の疾患が含まれる。

### 2. 研究の目的

本研究では、生体内外の環境に由来する様々なストレスに起因する DNA 損傷に対する、DNA 修復機構や環境ストレス応答機構の分子メカニズムの作動原理と、これらが障害されることで生じる生体影響について、トランスオミクス解析 (ゲノム/遺伝子発現/モデル動物/ヒト疾患症例) を用いた横断的な研究により理解を深め、関連するゲノム不安定性を示すヒト疾患の病態解明を目指した。

### 3. 研究の方法

再生不良性貧血 (AA: aplastic anemia)、ファンコニ貧血 (FA: Fanconi anemia)、ブルーム症候群 (BS: Bloom syndrome)、デュボヴィッツ症候群 (DS: Dubowitz syndrome) などの診断を受けたものの、疾患原因遺伝子変異が不明であった複数の症例について、次世代ゲノム解析による疾患原因の同定を試みた。患者由来細胞のほか、モデル細胞やモデルマウスを作製し詳細な解析を実施することで、疾患原因変異の真偽判定、疾患発症メカニズムの解明、分子病態究明に取り組んだ。次世代ゲノム解析によるゲノム配列調査や遺伝子発現評価、患者由来細胞やモデル細胞による分子細胞生物学的調査、モデル動物の表現型および分子病態解析、ヒト疾患症例の詳細な臨床情報解析などのデータを併せて評価するトランスオミクス解析を活用した。

### 4. 研究成果

再生不良性貧血 (AA)、ファンコニ貧血 (FA)、ブルーム症候群 (BS)、デュボヴィッツ症候群 (DS) などの診断を受けたものの疾患原因遺伝子変異が不明であった症例で、顕著な低身長や小頭症、知的障害・神経症状、造血不全など、いくつかの共通した臨床症状を示す 10 症例 8 家系について、全エキソーム解析を実施したところ、*ADH5* と *ALDH2* の 2 遺伝子が同時に機能欠損することにより発症する希な新規遺伝性疾患を特定した。本疾患は、aplastic anemia, mental retardation, short stature and microcephaly (dwarfism) という症状を共通して示すことから、AMeD 症候群 (AMeDS) として新規疾患概念を提唱した。

当初、通常のエキソーム解析にて、*ADH5* 遺伝子の異常が疾患原因として候補にあがった。患者由来細胞を調べたところ、*ADH5* 蛋白質および mRNA の発現低下が認められた。*ADH5* は内在性のアルデヒドの代謝に関与しており、*ADH5* の機能欠損・低下は、アルデヒド由来の DNA 損傷の増加につながる事が予想される。そこで、患者由来細胞にホルムアルデヒド処理を実施し、細胞生存率を確認したところ、健常人由来細胞と比較して優位に生存率が低下することが確認された。

一方で、日本人の大規模コホートゲノムデータを調査したところ、*ADH5* 遺伝子に変異を持つ健常人が抽出された。そこで、本健常人が持つ *ADH5* 遺伝子変異を導入したモデル細胞を作製し解析したところ、*ADH5* 蛋白質の発現が減少しており、ホルムアルデヒド処理による細胞生存率の低下も認められた。このことから、*ADH5* 遺伝子の変異単独では、疾患発症には至らないと考えられた。

これらの結果から、我々は、2 遺伝子同時欠損による疾患発症の可能性に着目した。*ADH5* 遺伝子がアルデヒド代謝に関わること、アルデヒド類は ICL (interstrand cross-links) や DPC (DNA-protein cross-links) などの DNA 損傷誘発に関与すること、対象患者が全て日本人であること、先行研究の結果などから、*ALDH2* 遺伝子の特に rs671 変異に焦点を当てた。*ALDH2* は四量体を形成し機能するため、*ALDH2* rs671 が両アリルとも野生型である場合と比較して、ヘテロ接合に変異を持つ場合には酵素活性が極めて低下し、ホモ接合に変異を持つ場合にはほとんど活性が認められない。AMeD 症候群患者の *ALDH2* rs671 を調査したところ、10 症例全員が少なくとも 1 コピーの変異アリルを保有していた。また、*ADH5* 遺伝子に変異を持つ健常者は *ALDH2* rs671 が両アリルとも野生型であった。さらに、AMeD 症候群患者で、*ALDH2* rs671 が両アリルとも変異型のケースでは、より重篤な症状 (重度の運動機能低下や早期の死亡) が認められた。これらのことから、AMeD 症候群では、*ADH5* と *ALDH2* の 2 遺伝子の異常が同時に生じることで、疾患を発症し、さらに *ALDH2* rs671 の遺伝子型が病態の重篤度に関与する可能性が示唆された。

さらに詳細に調査するため、ADH5 欠損細胞、ALDH2 E504K (rs671 変異型)細胞、ADH5 欠損かつ ALDH2 E504K 保有細胞を作製し、ホルムアルデヒド処理を実施したところ、ADH5 欠損細胞、ALDH2 E504K 細胞で複製阻害が確認され、ADH5 欠損かつ ALDH2 E504K 保有細胞ではその阻害がより顕著に現れた。このホルムアルデヒド処理による複製阻害は、患者由来細胞でも確認された。加えて、患者由来細胞に対してホルムアルデヒド処理を実施した後、DNA 損傷のマーカーである H2AX の量を調べたところ、健康人由来細胞と比べて患者由来細胞では H2AX が増加すること、また、この増加は、患者由来細胞に野生型 ADH5 あるいは ALDH2 を強制発現させることで、ホルムアルデヒド非処理のレベルまで低下することが確認された。以上のことから、ホルムアルデヒド処理には、ADH5 と ALDH2 の両方が関与し、二重変異細胞では、細胞増殖およびゲノムの安定性維持に異常をきたすことが示唆された。

また、ADH5 と ALDH2 の同時欠損が造血機能に影響を与えるかを調査するため、日本人臍帯血由来の CD34<sup>+</sup> 前駆細胞 (CD34<sup>+</sup> HSPCs) を用いて評価した。CD34<sup>+</sup> HSPCs 細胞について、CRISPR-Cas9 技術を用いて ADH5 を欠損させ、ALDH2 rs671 野生型群と片アリル変異型群に分類し、それぞれのコロニー形成能を調べた。その結果、ADH5 欠損かつ ALDH2 rs671 片アリル変異型群では、ALDH2 rs671 片アリル変異型のみを有する群と比較して、有意にコロニー形成能が低下した。ALDH2 rs671 野生型群では、ADH5 の欠損の有無に関わらず、コロニー形成能に有意な変化は無かった。これらのことから、ADH5 と ALDH2 の両者によるホルムアルデヒド代謝の異常は、造血機能に影響を及ぼすことが示唆された。

次に、ADH5 と ALDH2 の同時異常が、AmEd 症候群で見られるような全身性の症状を誘発するのかを検討するため、AmEdS 症例で同定された病的変異に相当する遺伝子変異を導入した疾患モデルマウスを作製した。Adh5<sup>-/-</sup> Aldh2<sup>K1/K1</sup> モデルマウスは、ヒト AmEdS 症例と同様に出生前には成長障害などは観察されなかった。しかし、出生 1-2 週間後には、全ての Adh5<sup>-/-</sup> Aldh2<sup>K1/K1</sup> モデルマウスで、顕著な成長障害、体重増加不全などが認められた。加えて、小動物用 CT での観察や解剖学的解析により、小さな骨格、筋肉量の低下、脂肪量の低下、臓器萎縮、造血異常など全身性の異常が認められた。さらに、離乳前の生後 4 週間以内に全ての Adh5<sup>-/-</sup> Aldh2<sup>K1/K1</sup> モデルマウスが死亡したが、Adh5<sup>-/-</sup> あるいは Aldh2<sup>K1/K1</sup> 単独変異のモデルマウスでは、特徴的な発育異常も早期死亡も確認されなかった。一方、6 週齢以降の Adh5<sup>-/-</sup> Aldh2<sup>+/-</sup> モデルマウスでは、Adh5<sup>-/-</sup> Aldh2<sup>K1/K1</sup> モデルマウスと比較して、きわめて軽症ではあるものの小柄な体格や造血異常など同様の症状が認められた。加えて、8-9 ヶ月齢の Adh5<sup>-/-</sup> Aldh2<sup>+/-</sup> モデルマウスでは、尾部の色素沈着も確認された。

以上の結果から、本 AmEd 症候群は ADH5 および ALDH2 の 2 遺伝子同時機能欠損を要因としたアルデヒド代謝異常により誘発されることが示された。また、疾患モデルマウスの解析とヒト症例の検討から、ALDH2 rs671 の変異アレルの数により表現型の重篤度が規定されることが示唆された。つまり、AmEd 症候群では、ホルムアルデヒドの分解異常により生じた ICL や DPC などに対応する DNA 修復経路が過負荷状態となり、多様な臨床症状を示しているのではないかと考えられるが、その詳細な疾患発症機序は明らかになっていない。

ICL や DPC はその損傷の形状から、転写を阻害すると予想される。転写阻害を引き起こしている DNA 損傷を除去するメカニズムとして、転写共役修復 (TCR) が知られており、これまで我々は TCR の分子メカニズムについて研究を行ってきた。そこで、これまでの経験を活かし、アルデヒド代謝異常と転写阻害の関係について調査を進めた。まず、アルデヒド代謝異常を示すモデルマウス (Adh5<sup>-/-</sup> Aldh2<sup>+/-</sup>) と TCR 因子の CSB を欠損させたモデルマウス (Csb<sup>-/-</sup>) を用いて解析したところ、Adh5<sup>-/-</sup> Aldh2<sup>+/-</sup> モデルマウスと比較して、Adh5<sup>-/-</sup> Aldh2<sup>+/-</sup> Csb<sup>-/-</sup> モデルマウスでは、表現型がより重篤になることが判明した。

アルデヒド代謝異常と TCR の関係について、より詳細な検討を進めるため、DPC の発生と修復をゲノムワイドに検出する新たな技術として DPC-seq を構築した。ホルムアルデヒド処理後に DPC-seq 解析を実施したところ、転写が活発に行われているゲノム領域では、転写が活発ではない領域と比較して、DPC の除去が多く行われていることが確認された。また、この DPC 除去は、RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) の阻害剤により減少した。さらに、遺伝子の発現レベルや長さに着目して比較検討したところ、発現レベルの高い遺伝子ほど DPC 除去が活発に行われること、遺伝子サイズが小さいほど DPC の除去が進行すること、サイズの長い遺伝子では、転写開始点と比べて転写終結点での DPC 除去が遅れることなどが確認された。また、精密質量分析による相互作用解析の結果、ホルムアルデヒド処理後の RNAPII と TCR 因子の CSA、CSB、UVSSA が相互作用することが確認された。そこで、TCR 関連因子を欠損あるいは変異させたモデル細胞を用いて、ホルムアルデヒド処理後の分子応答を検討したところ、CSB に依存して RPB1 K1268 残基がユビキチン化されることが示されるなど、UV 照射後に見られる TCR 反応と類似した応答が確認された。これらの結果から、転写が活発に行われているゲノム領域の DPC 除去に TCR が関与することが示唆された。

今後も引き続き、アルデヒド代謝異常と TCR、DPC の関係について、より綿密な解析を進めることで、環境ストレス応答・ゲノム修復システムの詳細 (転写共役 DPC 修復機構のメカニズム) と、その破綻により発症する疾患の病態 (AmEdS の発症機構と分子病態の詳細) 解明が進むと期待される。

<引用文献>

Y. Oka *et al.*, Digenic mutations in *ALDH2* and *ADH5* impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome. *Science Advances* 6, eabd7197 (2020).

Y. Oka *et al.*, Endogenous aldehyde induced DNA-protein crosslinks are resolved by transcription-coupled repair. *Nature Cell Biology* 26, 784-796 (2024).

Y. Nakazawa *et al.*, Ubiquitination of DNA damage-stalled RNAPII promotes transcription-coupled repair. *Cell* 180, 1228-1244 (2020).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計27件（うち査読付論文 27件/うち国際共著 10件/うちオープンアクセス 17件）

1. 著者名 Oka Y, Nakazawa Y, Shimada M, Ogi T (責任著者).	4. 巻 26
2. 論文標題 Endogenous aldehyde-induced DNA-protein crosslinks are resolved by transcription-coupled repair	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 784 ~ 796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-024-01401-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Senju C, Nakazawa Y, Oso T, Shimada M, Kato K, Matsuse M, Tsujimoto M, Masaki T, Miyazaki Y, Fukushima S, Tateishi S, Utani A, Murota H, Tanaka K, Mitsutake N, Moriwaki S, Nishigori C, Ogi T (責任著者).	4. 巻 120
2. 論文標題 Deep intronic founder mutations identified in the ERCC4/XPF gene are potential therapeutic targets for a high-frequency form of xeroderma pigmentosum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2217423120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2217423120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Senju C, Nakazawa Y, Shimada M, Iwata D, Matsuse M, Tanaka K, Miyazaki Y, Moriwaki S, Mitsutake N, Ogi T (責任著者).	4. 巻 10
2. 論文標題 Aicardi-Goutieres syndrome with SAMHD1 deficiency can be diagnosed by unscheduled DNA synthesis test	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pediatrics	6. 最初と最後の頁 1048002 ~ 1048002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fped.2022.1048002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jia N, Guo C, Nakazawa Y, van den Heuvel D, Luijsterburg MS, Ogi T (責任著者).	4. 巻 106
2. 論文標題 Dealing with transcription-blocking DNA damage: Repair mechanisms, RNA polymerase II processing and human disorders. DNA Repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103192 ~ 103192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2021.103192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Oka Y, Hamada M, Nakazawa Y, 他37名, Ogi T (責任著者).	4. 巻 6
2. 論文標題 Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd7197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd7197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計17件(うち招待講演 12件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 荻朋男
2. 発表標題 DNA損傷に対する生体内防御機構の理解とその破綻による疾患の分子病態
3. 学会等名 令和5年度 国立大学附置研究所・センター会議 第2部会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荻朋男
2. 発表標題 DNA修復機構の異常により発症する光線過敏を伴う遺伝性皮膚疾患の分子病態
3. 学会等名 第74回日本皮膚科学会中部支部学術大会(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nakazawa Y, Senju C, Oso T, Kato K, Shimada M, Ogi T.
2. 発表標題 Deep intronic mutations identified in XP-F cases are potential therapeutic targets for xeroderma pigmentosum
3. 学会等名 The EXPS Annual Symposium(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 萩朋男
2. 発表標題 Digenic inheritanceにより発症するゲノム不安定性疾患の分子病態 -内因性アルデヒドによるDNA損傷と転写障害-
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogi T
2. 発表標題 RNA polymerase II ubiquitination regulates transcription-coupled repair
3. 学会等名 The 29th Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists Conference & the 2022 Chinese Society of Biochemistry and Molecular Biology Online Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogi T
2. 発表標題 Genetic Diagnosis of Cockayne Syndrome
3. 学会等名 Amy and Friends (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogi T
2. 発表標題 Ubiquitination of RNA polymerase II and transcription-coupled repair
3. 学会等名 Webinar for the IBS Center for Genomic Integrity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩朋男
2. 発表標題 転写共役修復とヒトの疾患
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩朋男
2. 発表標題 ゲノム安定維持機構の分子メカニズムとその破綻により発症する疾患の病態解明
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogi T
2. 発表標題 Ubiquitination of RNA polymerase II and transcription-coupled repair
3. 学会等名 11th quinquennial conference on DNA repair(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 萩朋男
2. 発表標題 RNA polymerase II のユビキチン化修飾と転写共役修復の制御
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 中沢由華, 岡泰由, 小峯起, 原雄一郎, Diana van den Heuvel, 郭朝万, 磯野真由, 真下知士, 山中宏二, Martijn S. Luijsterburg, 荻朋男.
2. 発表標題 RPB1-K1268とUVSSA-K414位でのユビキチン化修飾は転写と共役したヌクレオチド除去修復機構に必要
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荻朋男, 村井純子.
2. 発表標題 「ゲノムの安定性維持機構の破綻による細胞影響から病態理解へ」ストレスの多さはゲノムから: 複製ストレス、転写ストレス、DNAダメージ
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 造血不全、発育遅滞、高発がん性、精神機能障害のモデル動物	発明者 荻 朋男、岡 泰由	権利者 東海国立大学機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-166756	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 色素性乾皮症 F 群治療薬 (日本にのみ移行済み)	発明者 荻朋男、中沢由華、 小泉誠、小路貴生	権利者 東海国立大学機構、第一三共株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/044768	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

名古屋大学環境医学研究所HP <a href="http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/index.html">http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/index.html</a> 名古屋大学環境医学研究所 発生遺伝分野HP <a href="http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/genetics/index.html">http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/genetics/index.html</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	光武 範史  (MITSUTAKE Norisato)  (50404215)	長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授    (17301)	
研究分担者	真下 知士  (MASHIMO Tomoji)  (80397554)	東京大学・医科学研究所・教授    (12601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岡 泰由  (OKA Yasuyoshi)		
研究協力者	中沢 由華  (NAKAZAWA Yuka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Sussex Univ.	GDSC		
オランダ	LUMC			
イタリア	CNR			