

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15362

研究課題名(和文) 骨髄不全症モデルiPS細胞におけるADH5/ALDH2に着目した病態・治療法検討

研究課題名(英文) Investigation of pathology and therapeutic approaches targeting ADH5/ALDH2 in iPSC models of Bone Marrow Failure Syndrome

研究代表者

牟 安峰 (MU, A)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：20894455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Zebrafish疾患モデルを用いFanconi anemia (FA) 及びAldehyde Dehydrogenase Deficiency Syndrome (ADDS) の病態を解析し、ADH5を高発現させたFAモデルのZebrafishがフェノタイプの改善を示した。これに基づき、ADH5の活性化剤の開発の可能性を提案した。また、ヒストン脱メチル化酵素のインヒビターやホルムアルデヒドのスキャベンジャーを用いて、ADDSおよびFAのiPSモデル細胞における造血分化の有用性を示した。さらに、FAおよびADDSモデルのiPS細胞を用いたゲノム編集技術を通じて、遺伝子治療の可能性についても検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPS細胞モデルによって、Fanconi anemia (FA) 及びAldehyde Dehydrogenase Deficiency Syndrome (ADDS) 両疾患の発症メカニズムの解明およびホルムアルデヒド蓄積をターゲットとした治療法開発を目指した。ADD症候群やFAにおいて、ホルムアルデヒド蓄積を改善することにより、重篤な表現型をリバースし、造血不全の回復を示した。本研究は、造血幹細胞におけるホルムアルデヒド代謝の意義について重要な知見をあたえるものである。

研究成果の概要(英文)：A research paper was published as the lead and corresponding author that analyzed the pathology of Fanconi Anemia (FA) and Aldehyde Dehydrogenase Deficiency Syndrome (ADDS) using zebrafish disease models. The study revealed that zebrafish models of FA with overexpressed ADH5 exhibited phenotypic improvements. Based on these findings, the potential for developing activators of ADH5 was proposed. Additionally, the utility of hematopoietic differentiation in iPSC models of ADDS and FA was demonstrated using inhibitors of histone demethylases and scavengers of formaldehyde. Furthermore, the paper explored the potential for gene therapy through genome editing techniques in iPSC models of FA and ADDS.

研究分野：ゲノム損傷応答学

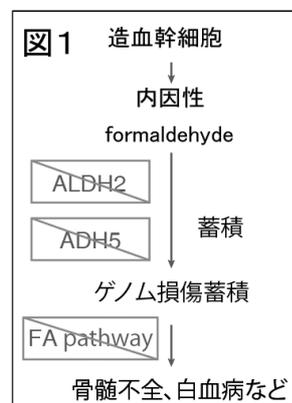
キーワード：Fanconi anemia ADDS ADH5 ALDH2 UBE2T

1. 研究開始当初の背景

我々は、医薬基盤研究所の JCRB 細胞バンクに保管された一群の小児再生不良性貧血症例サンプルのエクソーム解析を発端に、ホルムアルデヒド分解酵素 ADH5 の両アレル変異を持つ 10 代の患者を 7 名見出した。臨床的に奇形はなく、低身長、精神発達遅延、再生不良性貧血、骨髄異型症候群 (MDS)、白血病発症等を示し、造血幹細胞移植を必要とした。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 のヘテロ変異 (E504K, A 型アレル) を伴っていた。この変異はドミナントネガティブ効果を示し、ヘテロ接合体において ALDH2 の酵素活性は 20% 以下に低下しているとされる。その後の検討で、ホルムアルデヒドによる細胞障害への防御は ADH5 が主体だが、その欠損状態では ALDH2 がバックアップとしてホルムアルデヒドを分解することが判明した。これらの結果をまとめて、ADH5/ALDH2 両欠損マウスを解析した英国ケンブリッジ大の KJ Patel らと共同で、白血病へ進展する新規の遺伝性造血不全症候群、ADH5/ALDH2 複合型欠損症 (Aldehyde Degradation Deficiency, ADD 症候群と命名) の発見について論文発表した (Dingler FA, Wang M, Mu A (co-first), et al., Mol Cell.2020)。

ADDS は、奇形が無いこと、精神発達遅延を伴うことを除けば、臨床所見はきわめてファンコニ貧血症 (FA) に類似する。FA は、小児の IBMFS で、ゲノムのクロスリンク損傷修復に関わる遺伝子群の形成する FA 経路の欠損症である。FA の重要な原因遺伝子である FANCD2 と、ALDH2 や ADH5 のダブル欠損マウスは、早期の造血不全や白血病を発症することが報告されている (Langevin F et al., Nature 2011; Pontel LB et al., Mol Cell 2015)。しかし、FA 分子単独の欠損マウスにおいては FA 発症がみられず、マウスにおいては ALDH2 や ADH5 によるホルムアルデヒド分解が高効率でゲノムへの損傷が蓄積しにくいためと考えられる。また、申請者の所属する研究室は、以前、日本人 FA 患者において ALDH2 の変異によって、造血不全が重症化することを報告した (Hira A et al., Blood 2013)。

これらの結果は、造血幹細胞において内因性ホルム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、除去が不十分な場合ゲノム損傷が引き起こされ、FA 経路によって修復されること、これらの防護機構の不全状態では造血幹細胞の障害が惹起されることを示している (図 1)。



本研究では、上記の知見をうけて、FA と ADDS の、それぞれの疾患モデル iPS 細胞を作成し、病態検討と治療法検討を行う。ヒト iPS 細胞の、FA と ADDS モデルにおいて ALDH2 をターゲットとして、化合物投与により酵素活性を引き上げ、ホルムアルデヒド代謝を促進させることで、ゲノム損傷蓄積が低下すると期待され、これら疾患の治療になるかを検討する。さらに、ADH5 の酵素活性を上昇させることによる FA に対する治療効果を検討するため、ADH5 をモデル iPS 細胞に発現させて検討する (図 1)。

2. 研究の目的

新規遺伝性血液疾患である ADD 症候群、およびファンコニ貧血症 (FA) の iPS モデル細胞による病態の分子基盤解明と、治療法開発。

3. 研究の方法

現在所属する研究室が発見した FA の原因遺伝子 UBE2T (FANCT) 欠損患者由来の皮膚繊維芽細胞形態的に iPS と判断できるコロニー樹立に成功した。複数のクローンにおいて、幹細胞マーカー、核型、分化機能などにより質の良い iPS 細胞を選別し、得られた iPS 細胞において、CRISPR/Cas9 法の応用である Prime editing 法を用いて、ゲノム編集し、ミスセンス変異部位をピンポイントに修正し、UBE2T 遺伝子が野生型の iPS 細胞を作成し、コントロールとして用いる。さらに、作成した FA モデル iPS 細胞の造血細胞への分化能をインビトロ造血分化系によって検証する。FA と ADDS のモデル iPS

細胞におけるインビトロ造血分化系において、ALDH2 活性化剤とその他の薬物を用いた治療法を検討する。これまでに既知の ALDH2 活性化剤 C1 について検討し、有効である可能性が示された。また、ホルムアルデヒドのスカルベンジャーである metformin と aminoguanidine などを用いて、両疾患の iPS 細胞モデルで治療効果を確認する。ADDS におけるインビトロ造血分化で、ADH5 の高発現による回復効果が観察されている。FA 患者 iPS モデル細胞のインビトロ造血分化障害への ADH5 強制発現による影響を検討する。Zebrafish 疾患モデルを用い FA 及び ADDS の病態を解析し、ADH5 を高発現させた FA モデルの Zebrafish を作製し、検討する。

4. 研究成果

FA 患者モデル iPS 細胞の作成には、所属する研究室が発見した FA の原因遺伝子 UBE2T(FANCT) 欠損患者由来の皮膚線維芽細胞 (Hira A et al., AJHG. 2015) を選定した。UBE2T は、FA 経路において FANCD2 の活性化に必須のモノユビキチン化を行う E2 酵素であり、由来する患者は典型的 FA 所見を示した。現在までの報告によれば、FA 経路の因子が iPS 細胞の樹立や維持に必要であることが知られている。iPS 化の効率は著しく低かったが、UBE2T(Q2E)をもつ患者皮膚細胞から iPS 細胞の作製に成功した。さらに面白いことに、FANCD2 の発現量が正常人の iPS 細胞より高いことが観察された。野生型 UBE2T の戻し発現により FANCD2 のモノユビキチン化が誘導された。また、正常人 iPS 細胞 201B7 から UBE2T のノックアウト細胞 2 クローンの作製に成功した。FANCD2 のノックアウトも試みたが、FANCD2 をノックアウトするとクローンの同定後すぐ増殖を停止してしまい致死と考えられた。したがって、FANCD2 が iPS 細胞の維持に必要であることが確実となった。これらの細胞を、造血系分化誘導アッセイでテストしたところ、造血コロニーは患者由来 iPS 細胞ではほぼ形成されず、野生型の UBE2T の発現により部分的に回復されることが観察された。つまり、UBE2T は iPS 細胞の維持に必要ではないが、造血分化に必要であることが示された。正常人の iPS 細胞である 201B7 由来の UBE2T 欠損 iPS 細胞においては、細胞増殖の低下が見られず、患者由来 iPS 細胞の結果と一致していた。

FA 及び ADDS 患者由来皮膚細胞から iPS 細胞の作製にヒストン脱メチル化酵素のインヒビター-RN-1 の有用性を示した。

FA や ADDS において、ALDH2 や ADH5 の活性を高めることができれば、表現型をリバースし、造血不全や白血病化を抑制できる可能性がある。これまでに既知の ALDH2 活性化剤 C1 について検討し、有効である可能性を示した。

ヒストン脱メチル化酵素のインヒビター (GSK J1, GSK J4, GSK 467, IOX1, Daminozide) を投与した結果、造血コロニー数が増加することが見られた。

ホルムアルデヒドのスカルベンジャーである metformin と aminoguanidine の FA マウスモデルにおける治療効果が報告されている (Zhang QS et al., Blood 2016)。これらの化合物を用いて、両疾患の iPS 細胞モデルで治療効果を確認した。Aminoguanidine は低濃度でも iPS 細胞に対して毒性があった。Metformin は造血分化中に効果がなかった。

ホルムアルデヒドのスカルベンジャー (Dimedone, 2 - ME, GSH) を用いて、それぞれを投与した結果、両疾患 iPS モデル細胞における造血分化の有用性を示した。

さらに、ヒストン脱メチル化酵素のインヒビター (GSK J1, GSK J4, GSK 467, IOX1, Daminozide) 、ホルムアルデヒドのスカルベンジャー (GSH) および ALDH2 の活性化剤の組み合わせにより、FA および ADDS の iPS モデル細胞における造血分化の更なる有用性を示した。

大阪府立大学の中村純先生により、細胞培養中のホルムアルデヒド濃度の測定が可能となった。ADDS 患者由来の iPS 細胞を造血分化させると、ホルムアルデヒド濃度の上

昇が観察された。また、HAP1 細胞を用いて、ALDH2、ADH5、FANCD2 それぞれの単独欠損細胞、ダブル欠損細胞、およびトリプル欠損細胞を作製した。これらの細胞の培養中の培地のホルムアルデヒド濃度を測定したところ、ALDH2/ADH5 の欠損によりホルムアルデヒド濃度が上昇することが確認された。

ADDS モデルの iPS 細胞を用いたゲノム編集技術を通じて、遺伝子治療の可能性についても検討した。Prime edit により ALDH2 の A 型アレルを wild type へ編集し、ホルムアルデヒドに対する感受性の回復が見られた。また、造血分化においては、ADH5 の過剰発現した患者由来 iPS 細胞と同等レベルの造血コロニーがみられた。

Zebrafish 疾患モデルを用い FA (UBE2T^{-/-}、FANCD2^{-/-}) 及び ADDS (ADH5^{-/-}ALDH2^{-G/A}) モデルを作製した。FA の疾患モデルにおいては、雌から雄への性逆転という顕著な表現型が観察された。さらに、fancd2^{-/-}/adh5^{-/-}ゼブラフィッシュを作製した。fancd2^{-/-}/adh5^{-/-}はシングル欠損 fancd2^{-/-}モデルより体サイズの縮小および成熟精子の数の減少が観察された。また、ヒト ADH5 を高発現させた FA モデルの Zebrafish が精子形成のフェノタイプの改善を示した。これに基づき、ADH5 の活性化剤の開発の可能性を提案する研究論文を筆頭著者および責任著者として発表した ([Mu A](#), et al., *Mol. Bio. Rep.* 2023)。

iPS 細胞以外のがん細胞・正常細胞では、FA 経路は増殖に重要だが決して必須ではない。これは、iPS 細胞における高いレベルの複製ストレスと、FA 経路が複製ストレス解除に必須であるためと解釈されるが、その詳細な分子機構は不明である。今回の研究で作製した多数の細胞株を用いて、さらに研究継続の必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Qi Fei, Alvi Erin, Ogawa Minoru, Kobayashi Junya, Mu Anfeng, Takata Minoru	4. 巻 28
2. 論文標題 The ribonuclease domain function is dispensable for SLFN11 to mediate cell fate decision during replication stress response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 663 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13056	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 -
1. 著者名 Mu Anfeng, Hira Asuka, Mori Minako, Okamoto Yusuke, Takata Minoru	4. 巻 130
2. 論文標題 Fanconi anemia and Aldehyde Degradation Deficiency Syndrome: Metabolism and DNA repair protect the genome and hematopoiesis from endogenous DNA damage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103546 ~ 103546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2023.103546	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 -
1. 著者名 Mu Anfeng, Cao Zimu, Huang Denggao, Hosokawa Hiroshi, Maegawa Shingo, Takata Minoru	4. 巻 50
2. 論文標題 Effects of the major formaldehyde catalyzer ADH5 on phenotypes of fanconi anemia zebrafish model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 8385 ~ 8395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-023-08696-8	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 -
1. 著者名 Alvi Erin, Mochizuki Ayako L., Katsuki Yoko, Ogawa Minoru, Qi Fei, Okamoto Yusuke, Takata Minoru, Mu Anfeng	4. 巻 6
2. 論文標題 Mouse Slfn8 and Slfn9 genes complement human cells lacking SLFN11 during the replication stress response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-05406-9	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 Mori, T., Okamoto, Y., Mu, A., Ide, Y., Yoshimura, A., Senda, N., ... & Takata, M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Lack of impact of the ALDH2 rs671 variant on breast cancer development in Japanese BRCA1/2 mutation carriers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 6594 ~ 6602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5430	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 Mu Anfeng, Hira Asuka, Niwa Akira, Osawa Mitsujiro, Yoshida Kenichi, Mori Minako, Okamoto Yusuke, Inoue Kazuko, Kondo Keita, Kanemaki Masato T., Matsuda Tomonari, Ito Etsuro, Kojima Seiji, Nakahata Tatsutoshi, Ogawa Seishi, Tanaka Keigo, Matsuo Keitaro, Saito Megumu K., Takata Minoru	4. 巻 137
2. 論文標題 Analysis of disease model iPSCs derived from patients with a novel Fanconi anemia like IBMFS ADH5/ALDH2 deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2021 ~ 2032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2020009111	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 -

1. 著者名 Anfeng Mu , Asuka Hira , Keitaro Matsuo , Minoru Takata	4. 巻 62
2. 論文標題 Aldehyde degradation deficiency (ADD) syndrome: discovery of a novel fanconi anemia-like inherited BMF syndrome due to combined ADH5/ALDH2 deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Japanese journal of clinical hematology	6. 最初と最後の頁 547 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11406/rinketsu.62.547	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 -

1. 著者名 牟 安峰, 高田 穰	4. 巻 94
2. 論文標題 aldehyde degradation deficiency (ADD) 症候群 : アルデヒド代謝酵素ADH5/ALDH2欠損による新規遺伝性再生不良性貧血	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 122-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940122	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 牟安峰, 高田 穰	4. 巻 83
2. 論文標題 iPS細胞を用いたファンコニ貧血研究の新展開	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 血液内科	6. 最初と最後の頁 824-829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 牟安峰, 高田 穰
2. 発表標題 SLFN11による複製ストレス調節の分子機構
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Anfeng Mu
2. 発表標題 Fanconi anemia and Aldehyde Degradation Deficiency (ADD) Syndrome: DNA repair and metabolism together protect the genome and hematopoiesis
3. 学会等名 Sussex Japan Genome Stability Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 牟安峰
2. 発表標題 新規骨髄不全症ADDsの発見とモデルiPS細胞による病態・治療法検討
3. 学会等名 第17回血液学若手研究者勉強会 (麒麟塾) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Anfeng Mu
2. 発表標題 Fanconi anemia and Aldehyde Degradation Deficiency (ADD) Syndrome
3. 学会等名 The 19th Ataxia-Telangiectasia workshop (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Anfeng Mu, Asuka Hira, Akira Niwa, Mitsujiro Osawa, Minako Mori, Yusuke Okamoto, Megumu K. Saito, Minoru Takata.
2. 発表標題 Discovery of a novel FA-like disorder Aldehyde Degradation Deficiency (ADD) Syndrome caused by ADH5/ALDH2 mutations.
3. 学会等名 2021Fanconi anemia Research Fund Scientific Symposium. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本祐介、牟安峰、望月綾子、勝木陽子、高折晃史、高田穰
2. 発表標題 SLFN11 promotes stalled fork degradation that underlies the phenotype in Fanconi anemia cells.
3. 学会等名 第16回血液学若手研究者勉強会 (麒麟塾)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 穰, Alvi Erin, 小川 みのり, 勝木 陽子, 岡本 祐介, Canela Andres, 望月 綾子, 牟 安峰
2. 発表標題 SLFN11とSLFNファミリー機能の統一的理解を目指して
3. 学会等名 2021年日本分子生物学会第44回年会 ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牟安峰, 平明日香, 丹羽明, 大澤光次郎, 森美奈子, 岡本裕介, 齋藤潤, 高田穣
2. 発表標題 新規遺伝性骨髄不全症アルデヒド分解不全(ADD)症候群の発見: 代謝異常によって引き起こされるゲノム不安定性
3. 学会等名 2021年日本分子生物学会第44回年会 ワークショップ
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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