

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	山本 昌代
<p>学位論文題目</p> <p>マウス骨髄細胞における鉄過剰による糖代謝異常とDNAメチル化の亢進</p> <p>北海道医学雑誌 第89巻 平成26年 掲載予定</p> <p>研究目的</p> <p>骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome: MDS) は、造血幹細胞の異常により引き起こされる後天性造血障害である。MDS患者では、頻回の輸血で生じる鉄過剰症が心不全や肝不全などの臓器障害を引き起こし、予後を短縮させる一方、鉄キレート療法 (iron chelation therapy: ICT) でその改善がみられる。更に、ICTがMDSから白血病への進展までの期間を延長させること、MDSや急性白血病に対し抗腫瘍効果を示すとの報告が散見されるが、それらの機序は明らかでない[1]。我々は、TCA回路の酵素で、イソクエン酸をα-ケトグルタル酸 (α-ketoglutarate : α-KG) に変換するイソクエン酸脱水素酵素 (isocitrate dehydrogenase: IDH) の遺伝子変異がMDSや白血病で稀に生じ、メチル化異常による白血病化を引き起こすこと、一般的にMDSでは脱メチル化剤が臨床的に有効である報告に注目した[2, 3]。このTCA回路の中でIDHにイソクエン酸を供給する働きを担っているのが細胞質アコニターゼ/鉄反応性蛋白1 (cytosolic aconitase/ iron responsive protein 1: ACO1/IRP1) で、鉄欠乏時にはIRP1として鉄制御関連遺伝子の発現調節に関与し、鉄過剰時にはACO1としてクエン酸からイソクエン酸への変換酵素としての機能を担う。そこで、鉄過剰が骨髄細胞で代謝酵素遺伝子の発現の変化を引き起こし、その結果、TCA回路を中心としたエネルギー代謝異常がおり、細胞内のエピジェネティクスに影響を与える可能性を考えた。本研究では、まず、鉄過剰モデルマウスを作成し、その骨髄細胞で網羅的遺伝子発現解析を行い、鉄過剰状態で亢進する代謝関連酵素遺伝子を拾い上げた。更に、その中で機能の明らかなTCA回路関連酵素群と、鉄の多寡により活性が変動するACO1mRNA発現とそれらの酵素活性、2-HGの産生とDNAメチル化について、鉄過剰と鉄過剰群、鉄過剰+鉄キレート剤群で検討し、鉄過剰による糖代謝異常とメチル化異常の関連明らかにすることを目的とした。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. 鉄過剰モデルマウス及び鉄キレート療法モデルマウスの作成

12週齢のC57B1/6マウスに鉄デキストラン10 mg/head/dayを5日間腹腔内投与し、鉄過剰モデルを作成した。また、C57B1/6マウスに鉄デキストラン10 mg/head/dayとデフェロキサミン (deferrioxamine: DFO) 100 mg/kg/dayを5日間腹腔内投与し、鉄キレート療法モデルを作成した。6日目に屠殺し、血液と骨髄細胞を回収した。骨髄細胞の一部から塗沫標本を作製しベルリンブルー染色を行った。

2. 原子吸光分析法による骨髄細胞内鉄濃度の測定

骨髄細胞を0.1 Nの硝酸に溶解し、原子吸光光度計により鉄濃度を測定した。

3. 網羅的遺伝子発現解析

マウス骨髄細胞よりRNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成し高出力シークエンサーIron Proton (Life technologies) を用いて全mRNAシークエンス解析を行った。データ解析はClc Genomics Workbench (Clc bio) を用いて個々の遺伝子発現量としてRPKM値 (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads) を算出し、対照群と鉄過剰群、あるいは鉄過剰群と鉄キレート群のRPKM値の比が1.5倍以上であった遺伝子を抽出した

4. Digital PCR法

マウス骨髄細胞より抽出したRNAからcDNAを作成し、TaqManプローブを用いAco1、Idh1、グリコーゲン脱分枝酵素 (Agl)、ホスホグルコムターゼ (Pgm1) のmRNA発現解析をQuantStudio 3D Digital PCR system (Life technologies) を用いて行った。

5. 骨髄細胞内酵素活性の測定

マウス骨髄細胞内のアコニターゼ活性、IDH活性についてそれぞれAconitase Assay Kit (Abcam)、Isocitrate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assai Kit (BioVision) を用いて比色定量法により測定した。

6. 骨髄細胞内total 2-HGの測定

マウス骨髄細胞を0.1 Nの塩酸に溶解し、塩化ナトリウムを加え有機酸を塩析させ、酢酸エチルにより有機酸を抽出した。抽出した有機酸にトリメチルシリル化剤を加えて誘導体化し、ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS法) を行いtotal 2-HGを定量した。

7. DNAメチル化の測定

マウス骨髄細胞からDNAを抽出し、抗メチル化シトシン抗体を用いたELISA法 (Epigenetek) により5-mC%を算出した。

8. 統計処理

有意差検定にはStudent's t-testを行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

成 績

1. 鉄過剰投与および鉄キレートによるマウス骨髄細胞における鉄動態の変化

骨髄塗沫標本のベルリンブルー染色では、鉄過剰群では対照群と比べ著明な鉄沈着を認め、鉄キレート群では鉄沈着を認めなかった。骨髄細胞内鉄濃度は鉄過剰群では対照群に比べ有意に上昇し、鉄キレート群では鉄過剰群と比べ有意に低下していた。

2. 網羅的遺伝子発現の変化

鉄過剰投与および鉄キレート薬投与骨髄細胞の網羅的遺伝子発現解析で、対照群、鉄過剰群の相互で得られたRPKM値の比が1.5倍以上かつ鉄キレート群、鉄過剰群の相互で得られたRPKM値の比が1.5倍以上の条件を満たす遺伝子は14種類であり、糖代謝経路関連酵素は、Agl、Pgm1、Idh1、Idh3aの4遺伝子であった。

3. Digital PCRによる検討

網羅的解析で有意な増加が得られた遺伝子であるAgl、Pgm1、Idh1と、増加率が軽度であったが、鉄過剰で酵素活性が増加する細胞質アコニターゼ/鉄反応性蛋白1 (cytosolic aconitase/iron responsive protein 1:ACO1/IRP1) のmRNA発現をdigital PCRで定量解析した。Idh1とAco1/Irp1 mRNAは鉄過剰群で対照群と比較し有意に発現が上昇し、鉄キレート群は鉄過剰群よりも有意に発現が低下した。Pgm1とAglの発現鉄過剰群鉄過剰群で未処理群より軽度または有意な発現上昇がみられたが、鉄キレート療法群と有意差はなかった。

4. 酵素活性測定による検討

骨髄細胞内アコニターゼ活性と骨髄細胞内IDH活性はいずれも、鉄過剰群で対照群よりも有意に上昇し、鉄キレート群で鉄過剰群よりも有意に低下していた。

5 2-HG産生量およびDNAメチル化の変化による検討

骨髄細胞におけるtotal 2-HG量は、鉄過剰群では対照群よりも有意に増加し、鉄キレート群では鉄過剰群よりも有意に減少していた。DNAのメチル化については、鉄過剰群では対照群よりも有意にDNAメチル化が亢進しており、鉄キレート群では鉄過剰群よりも有意に低下していた。

考 案

本研究は、マウスに鉄を負荷し、骨髄細胞において鉄過剰とそれに対する鉄キレート薬が糖代謝経路とその後の2HGとDNAメチル化にどのような影響を及ぼすか検討したものである。網羅的遺伝子解析で糖代謝関連遺伝子について着目すると4遺伝子が抽出された。そのうち、Pgm1、Aglはグリコーゲン分解を促進する酵素であり、Idh1、Idh3aはTCA回路を構成する酵素であった。このことから骨髄細胞内に蓄積した鉄はグリコーゲン分解促進、TCA回路の活性化させることが示唆された。鉄代謝制御の中心分子でTCA回路にイソクエン酸を供給するACO1/IRP1については鉄過剰により遺伝子発現、酵素活性がともに有意に亢進した。また、その下流のIDHも遺伝子発現、酵素活性ともに有意に亢進した。

IDH1はTCA回路内でイソクエン酸から α -KGを産生する酵素であるが、この遺伝子変異による異常代謝産物2-HGは最終的にTet2 methylcytosine dioxygenase2 (TET2) 活性の阻害を介してDNAのメチル化を亢進、白血病の病態に関与すると考えられている[2]。そこで、鉄過剰によっても2-HGとメチル化DNAの増加をきたすのではないかと予想、本研究を行い、それが裏付けられた。しかし、IDH遺伝子変異を持つ個体で正常群と比べ10~100倍2-HGが増加するのに対し、本研究の鉄過剰群の2-HGの増加の程度は対照群の約2倍であった。すなわち、IDH遺伝子変異を持つ個体ほどの増加がなくても、長期間にわたり骨髄細胞が2-HGに曝露されることでDNAメチル化が蓄積し、白血病化に関与する可能性が示唆された。このことから、IDH変異がないMDS患者あるいは急性白血病患者においても、鉄暴露による2-HG産生量の増加により、さらなるDNAメチル化の亢進が引き起こされる可能性が考えられる。本研究は、MDSでの輸血後鉄過剰による病態悪化の機構、ICTの臨床効果をエピジェネティックな面から理論的に裏付けた初めてのものである。今後、MDSあるいは急性白血病患者で、鉄過剰がどの程度DNAメチル化が助長するのか、ICTが輸血後鉄過剰症自体の治療法としてのみならず、MDSの白血病化そのものに対する治療としてどこまで意義があるかについて、今後さらに検討する必要がある。

結 論

鉄過剰モデルマウスにおいてDNAメチル化が亢進し、ICT療法でそれが回避されることを明らかにした。その機序として、糖代謝関連酵素であるACO1やIDHの活性化による2-HGの増加が関与していると考えられた。今後、ICT療法が、メチル化異常をともなうMDSや急性白血病患者の新たな治療戦略に加えるものと期待される。

引 用 文 献

1. Lyons RM, Marek BJ, Paley C, et al. Comparison of 24-month outcomes in chelated and non-chelated lower-risk patients with myelodysplastic syndromes in a prospective registry. *Leuk Res.* 2014; 38: 1491-54.
2. Rakheja D, Medeiros LJ, Bevan S, et al. The emerging role of d-2-hydroxyglutarate as an oncometabolite in hematolymphoid and central nervous system neoplasms. *Front Oncol* 2013; 3: 169.
3. Jin J, Hu C, Yu M, et al. Prognostic value of isocitrate dehydrogenase mutations in myelodysplastic syndromes: a retrospective cohort study and meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9: e100206.

参 考 论 文

1. Sato K, Torimoto Y, Yamamoto M, et al. Loss of ABCB7 gene: pathogenesis of mitochondrial iron accumulation in erythroblasts in refractory anemia with ringed sideroblast with isodicentric (X)(q13). *Int J Hematol.* 2011; 93: 311-8.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	山本 昌代
審査委員長 <u>平省文隆</u> (印)			
審査委員 <u>東 寛</u> (印)			
審査委員 <u>鳥本悦彦</u> (印)			
学位論文題目			
マウス骨髄細胞における鉄過剰による糖代謝異常と DNA メチル化の亢進			

骨髄異形成症候群（MDS）では、鉄キレート療法（ICT）が白血病への進展までの期間を延長させるが、その機序は不明である。一方、TCA 回路の副産物である 2-ヒドロキシグルタル酸（2-HG）が、DNA 脱メチル化酵素である TET2 を阻害して遺伝子メチル化異常による白血病化を引き起こす。そこで本研究では、TCA 回路の構成酵素であるイソクエン酸脱水素酵素（IDH）と IDH にイソクエン酸を供給する細胞質アコニターゼ/鉄反応性蛋白 1（ACO1/IRP1）に着目し、鉄過剰による糖代謝異常とメチル化異常の関連を明らかにすることを目的とした。

本研究では、まず、鉄過剰モデルマウスを作成し、その骨髄細胞で網羅的遺伝子発現解析と候補遺伝子のデジタル PCR 解析を行い、鉄過剰で発現亢進する糖代謝関連酵素遺伝子を同定した。更に、鉄過剰に伴う、同定酵素の活性、2-HG の産生および DNA メチル化を検討した。その結果、鉄過剰群で IDH と ACO1/IRP1 の発現が有意に亢進していた。また、IDH と ACO1/IRP1 活性も、鉄過剰群で有意に上昇していた。さらに、骨髄細胞内の 2-HG 量は鉄過剰群で有意に増加し、結果、DNA メチル化が有意に亢進していた。

本研究の結果、骨髄細胞において鉄過剰が TCA 回路を活性化させ 2-HG とメチル化 DNA の増加をきたすことが裏付けられた。したがって、MDS 患者では、骨髄細胞の長期間にわたる 2-HG 曝露による DNA メチル化の蓄積が、その白血病化に係わる可能性が示唆される。本研究は、MDS での輸血後鉄過剰による白血病化の機構をエピソード的な面から理論的に裏付けた初めてのものであり、その臨床的意義は大きいと思われる。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。