

平成30年6月18日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18394

研究課題名(和文) 過剰鉄が誘導する2-HG・エピジェネティクス異常を介した血液腫瘍の新たな発症機構

研究課題名(英文) The novel mechanism of hematologic malignancy through epigenetic abnormality caused by iron overload

研究代表者

山本 昌代 (Yamamoto, Masayo)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：30596284

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)：鉄短期投与モデルマウスを用いた検討では、網羅的遺伝子発現解析とdigital PCRによる解析で糖代謝関連酵素の発現が亢進していた。そのため、糖代謝の中間産物である2-ヒドロキシグルタル酸を測定したところ鉄過剰群では有意に増加していた。さらに、DNAメチル化も鉄過剰群で有意に増加していた。このことから鉄過剰により糖代謝関連酵素の発現亢進を介してDNAメチル化が起こると考えられた。次に鉄長期投与モデルマウスを作成し検討を行ったが、鉄長期投与群ではDNAメチル化が低下していた。メチル化の低下により造血器腫瘍の発症に関与するとされる遺伝子の発現に有意差は認めず、今後さらに検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：In the study, we found that the enzymes associated with glucose metabolism were increased in the iron overloaded mice that received short-term iron overload. Furthermore, 2-hydroxyglutarate (2-HG), which was aberrant metabolites in the TCA cycle, was increased in the iron overloaded mice. Furthermore, the 2-HG production resulted in upregulation of DNA methylation in the iron overloaded mice. From these results, we considered that DNA methylation were increased by iron overload through enhancement of the abnormal glucose metabolism. On the other hands, when we performed similar analysis using long-term iron overload model mice, DNA methylation were rather decreased in the iron overloaded mice. To know the detailed mechanism during iron overload, we need further analysis by focusing the period of iron overload.

研究分野：血液学

キーワード：鉄過剰 エピジェネティクス DNAメチル化 糖代謝

## 1. 研究開始当初の背景

前白血病病変である骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome : MDS) において、頻回の輸血による輸血後鉄過剰症は様々な臓器障害を引き起こし、予後を短縮させることが知られているが、適切な鉄キレート療法 (iron chelation therapy : ICT) により臓器障害の改善や予後の改善がもたらされる。それに加え、近年、ICT により MDS 患者で leukemia free survival が延長することが報告され、さらに一部の MDS や急性白血病では ICT のみで血液学的効果が得られるとの報告が散見されている。このことから、鉄過剰症と MDS や急性白血病の発症との間には何らかの関連性があることが示唆されるが、明らかとはなっていない。しかし、これらの関連性が明らかとなり、ICT が MDS や急性白血病の病態改善に効果が期待できることが明らかとなれば、臨床的にも意義は大きい。

その一方で、かねてから血液腫瘍を含む悪性腫瘍の発症には嫌氣的解糖系亢進が重要であると考えられており、ワールブルグ効果と呼ばれていた。さらに、ワールブルグ効果には発がんシグナルによる解糖系の亢進が関与していることが明らかとなってきた。他方では、発がんシグナルには関与しないと考えられていた代謝関連酵素の遺伝子異常が発がんに関与するとの報告が散見されるようになってきている。

鉄は生体における代謝関連酵素の補酵素として機能している。特に、鉄代謝関連因子の制御を担う細胞質アコニターゼ/鉄反応性蛋白 1 (cystolic aconitase/iron responsive protein 1 : AC01/IRP1) は、鉄欠乏時には IRP1 として鉄代謝に関与し、鉄過剰時には AC01 として TCA 回路の中でクエン酸をイソクエン酸へと変換する機能を担う。さらに、その下流で働くイソクエン酸脱水素酵素 (isocitrate dehydrogenase : IDH) の遺伝子変異が 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) の増加による DNA メチル化の亢進を介して一部の白血病の発症に関与していると報告されていた。

そこで、鉄過剰によるこれら糖代謝関連酵素への影響の観点から、MDS あるいは急性白血病への発症に関与している可能性がないか検討するに至った。

## 2. 研究の目的

(1) 短期間の鉄過剰状態が糖代謝異常を介して DNA メチル化の亢進を引き起こし、MDS や急性白血病の病態増悪に関与する可能性があるか検討する。

(2) 上記の結果を踏まえ、より臨床的に輸血後鉄過剰症の病態を反映した長期間の鉄過剰状態が糖代謝異常を介して DNA メチル化の亢進を引き起こす可能性があるか検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 短期鉄投与鉄過剰モデルマウスの作成

C57BL/6 マウスに鉄デキストラン 10 mg/head/day を 5 日間腹腔内投与する。その後、骨髄細胞を採取し、骨髄塗抹標本ベルリンブルー染色や原子吸光分析法による骨髄細胞内鉄濃度の測定により、骨髄細胞にて十分に鉄沈着が得られたことを確認して以下の検討を行う。また、鉄キレート群として C57BL/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 100 mg/kg/day を 5 日間腹腔内投与して、同様の検討を行う。

### (2) 長期鉄投与鉄過剰モデルマウスの作成

C57BL/6 マウスに鉄短期投与群と同じく鉄デキストラン 10mg/head/day を週 2 回腹腔内投与し、それを 12 週継続する。その後、骨髄細胞を採取し、骨髄塗抹標本ベルリンブルー染色や血清フェリチンの測定により、骨髄細胞にて十分に鉄沈着が得られたことを確認して以下の検討を行う。

### (3) 網羅的遺伝子解析

上記モデルマウスから採取した骨髄細胞から RNA を抽出し、網羅的遺伝子解析を行い糖代謝関連酵素に変動があるか検討する。

### (4) mRNA 発現解析

採取した骨髄細胞から RNA を抽出し、デジタル PCR 法により(3)で変動が認められた分子を中心に糖代謝関連酵素の mRNA 発現解析を行う。

### (5) 糖代謝関連酵素活性の測定

mRNA 発現解析だけでは生体内での酵素活性の確認には不十分であるため、採取した骨髄細胞から蛋白質を抽出して基質発色法により酵素活性の測定を行う。

### (6) 骨髄細胞内糖代謝中間産物含有量の測定

採取した骨髄細胞を用いてガスクロマトグラフ質量分析 (GS-MC 法) により骨髄細胞内の 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) の含有量を測定する。

### (7) DNA メチル化の測定

採取した骨髄細胞から DNA を抽出し、抗メチルカシトシン抗体を用いた ELISA 法によりメチル化シトシンを定量することで DNA メチル化の程度を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 短期鉄投与鉄過剰モデルマウスにおける検討

#### 網羅的遺伝子解析

骨髄細胞から採取した RNA を用いて検討したところ、対象群と比較して鉄過剰群はグリコーゲン分解にかかわる代謝酵素のグリコーゲン分解酵素 (AgI) およびホスホグルコムターゼ (Pgm1) と Idh1 の発現が亢進し、鉄キレート群では抑制された。このことから、鉄過剰がマウス骨髄細胞においてこれらの酵素の発現を亢進させることが示唆された。

#### mRNA 発現解析

の網羅的遺伝子解析で発現が変動していた *Agl*、*Pgm1*、*Idh1* に加え、鉄過剰状態で活性が亢進することが知られている *Aco1* について検討した。その結果、*Pgm1* および *Agl* は有意差を認めなかったが *Idh1* および *Aco1* の発現が有意に亢進し、鉄キレート群では抑制されていた (図 1)。

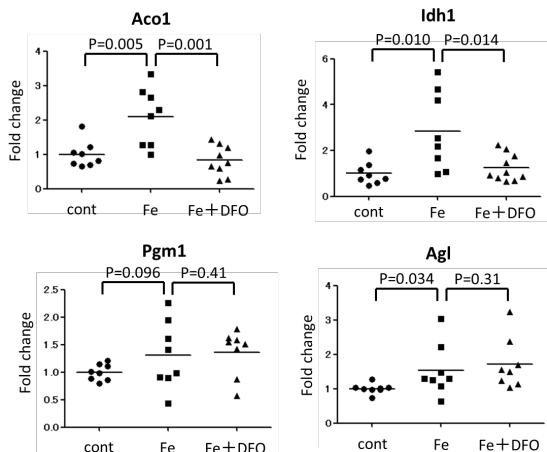


図1. mRNA発現解析

#### 糖代謝関連酵素活性の測定

で *Aco1* の発現が有意に変動していたため、細胞質アコニターゼの酵素活性を測定し、細胞内で変動しているか検討した。その結果、有意差は認めないものの鉄過剰群でアコニターゼ活性が増加し、鉄キレート群で抑制されていた (図 2)。

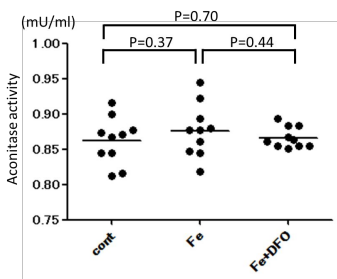


図2. 細胞質アコニターゼ活性

#### 骨髄細胞内糖代謝中間産物含有量の測定

骨髄細胞内での糖代謝中間産物であり、*IDH* 遺伝子変異で変動がみられる 2-HG の測定を行った。その結果、鉄過剰群では有意に増加し、鉄キレート群では抑制されていた (図 3)。

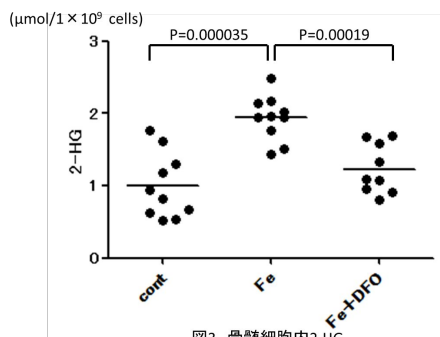


図3. 骨髄細胞内2-HG

#### DNA メチル化の測定

*IDH* 遺伝子変異がある場合は、その異常代謝産物である 2-HG の増加により DNA メチル化が亢進し、白血病等血液腫瘍の発症に関与

することが報告されている。本モデルでも DNA メチル化の亢進が起きている可能性を考え骨髄細胞から抽出した DNA を用いて測定した。その結果、鉄過剰群では有意に DNA メチル化が亢進し、鉄キレート群では抑制されていた (図 4)。

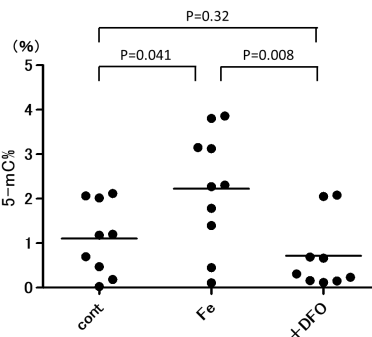


図4. DNAメチル化の測定

以上の結果から、鉄過剰が糖代謝関連酵素の発現亢進を介して遺伝子変異とは無関係に DNA メチル化を亢進させ、MDS や急性白血病の発症に関与し、それらの現象を鉄キレートが抑制する可能性が示唆された。

#### (2) 長期鉄投与鉄過剰モデルマウスにおける検討

上述のとおり、鉄短期投与鉄過剰モデルマウスにおいて鉄過剰が糖代謝関連酵素の亢進を介して DNA メチル化の亢進を引き起こす可能性が示唆された。そのため、より輸血後鉄過剰症に近い鉄長期投与鉄過剰モデルマウスを用いてさらなる検討を行った。

#### 血清フェリチンの測定

これまで鉄長期投与モデルマウスを作成した例はなかったため、鉄投与により鉄過剰状態となっているか確認するため、血清フェリチンを測定した。その結果、鉄過剰群では有意に血清フェリチンが上昇していた (図 5)。

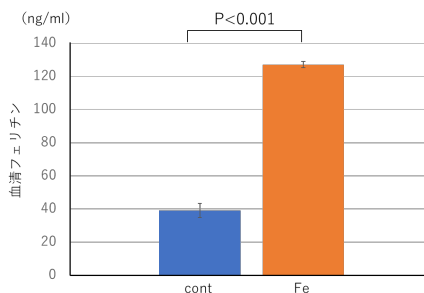


図5. 血清フェリチンの測定

さらに、骨髄塗抹標本を用いてベルリンブルー染色を行ったところ十分な鉄沈着が得られていたため、以後の検討を行った。

#### DNA メチル化の測定

採取した骨髄細胞から DNA を抽出し、DNA メチル化を測定した。その結果、鉄過剰群では対象群よりも有意に DNA メチル化が低下していた (図 6)。

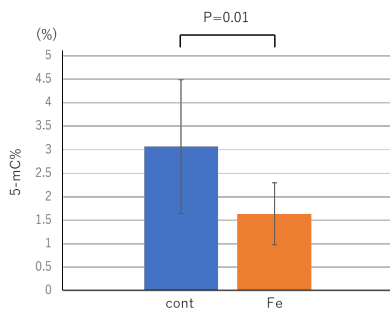


図6. 長期鉄過剰モデルにおけるDNAメチル化の測定

#### RT-PCR 法による遺伝子発現解析

について鉄短期投与モデルと異なる結果が得られたため、再度過去の報告について検討したところ、DNAメチル化の亢進とともに特定の遺伝子のDNAメチル化の低下も造血器腫瘍の発症に関与するという報告も認められた。そのため、それらの報告で造血器腫瘍の発症に関与するとされていた DNMT1 や Set-BP1 について RT-PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行ったが、有意な差は認められなかった。

以上の結果を踏まえ、今後は鉄短期投与モデルと鉄長期投与モデルとで DNAメチル化の動態が異なる要因や、それらが造血器腫瘍の発症にどのように関与しているのかを検討する予定である。

#### <引用文献>

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;38:149-154.

Cairns RA, Mak TW. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discov.* 2013;3:730-741

#### 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1件)

Yamamoto M, Tanaka H, Toki Y, et al (13名中1番目) Iron-induced epigenetic abnormalities of mouse bone marrow through aberrant activation of aconitase and isocitrate dehydrogenase. *Int J Hematol.* 2016 Oct;104(4): 491-501

##### [学会発表](計1件)

Masayo Yamamoto, Hiroki Tanaka, Masatomo Isio, et al. Suppression of erythropoiesis in the mouse model mimicking repeated-transfusion induced iron overload. Seventh Congress of the International Biolron

Society. 2017年5月8日, Los Angeles (America)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山本 昌代 (YAMAMOTO, Masayo)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号: 30596284

##### (4)研究協力者

田中 宏樹 (TANAKA, Hiroki)