

学位論文

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

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

山本 昌代

博士学位論文

表題 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

著者名 山本 昌代

所属機関 旭川医科大学 内科学講座 消化器・血液腫瘍制御内科学分野

主任教授名 高後 裕

原稿総ページ数 16

図および表の総数 5

連絡者氏名 山本 昌代

宛先 旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目 1-1 旭川医科大学 内科学講座
消化器・血液腫瘍制御内科学分野

電話番号 0166-68-2462

FAX 番号 0166-68-2469

電子メールアドレス masa-tin@asahikawa-med.ac.jp

緒言

骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndrome; MDS）は、骨髄の幹細胞異常により引き起こされる後天性造血障害で、最終的に急性白血病に進展する症例が多い。MDS の貧血に対しては、これまでのところ、輸血が生命予後を維持する唯一の手段として使用され、毎月 1～2 回、各 2～4 単位輸血することによりヘモグロビンを維持することで、種々の臓器の虚血からの回避や生活の質の維持・向上、ひいては生命予後の改善に寄与すると考えられている。しかし、我が国で Takatoku らが行った疫学調査により、MDS、再生不良性貧血患者で頻回に輸血を行った患者では、総輸血量が 20 単位以上、血清フェリチンが 1000 ng/ml 以上の鉄過剰状態では、肝機能障害、心拍出量低下、糖尿病の発症など、鉄過剰症による臨床症状が出現するとともに、肝不全、心不全、肺炎などの感染症の増加など、長期輸血による鉄過剰症により生命予後が短縮することが明らかとなった[1]。現在、これらの病態に対して、鉄キレート剤により体内鉄を除去する鉄キレート療法（iron chelation therapy; ICT）が世界的に施行され、MDS で長期輸血を行っている患者では、ICT を行う事により生命予後が延長することが明らかになってきた[2]。

それに加え、近年、ICT が MDS から白血病への進展を延長させるとの報告も出てきており[3]、ICT による MDS の白血化予防と予後改善への寄与が注目されている。さらに、ICT のみで MDS や急性白血病に対する抗腫瘍効果が得られたとの報告が散見され[4-8]、一部の急性白血病の症例では完全寛解が得られたとの報告もある[4]。しかし、ICT が MDS において白血病への進展を予防する機序や、MDS や白血病に対して抗腫瘍効果を発揮する機序については明らかとなっていない。

一方で、近年 TCA 回路の一酵素であり、イソクエン酸を α -ケトグルタル酸（ α -ketoglutarate: α -KG）に変換する役割を担うイソクエン酸脱水素酵素（isocitrate dehydrogenase: IDH）の遺伝子変異が、一部の MDS や白血病の発症に関与するとの報告が散見される[9-13]。

α -KG は TCA 回路での基質としての役割の他に, tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2) の補酵素として働き DNA の脱メチル化に関与する[14][15]. IDH 遺伝子変異が起こると, IDH 野生型と IDH 変異型がヘテロダイマーを形成することで基質との結合部位が変化し, イソクエン酸から α -KG を産生した後さらに NADPH と結合するようになることで 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-hydroxyglutarate: 2-HG) を産生する. そのため, 最終的に α -KG の産生が低下し, 2-HG の産生が増加する[12]. 2-HG は TET2 を競合的に阻害するため DNA 脱メチル化反応が抑制され, 結果的に DNA のメチル化が亢進する. このエピジェネティックな変化が白血病等の発癌に寄与すると考えられている[12][14]. MDS でも近年, IDH 変異や DNA メチル化の亢進が発症に寄与するとの報告なされており[14][16-18], さらには独立した予後不良因子となりうるとの報告もある[16-21]. また, DNA メチル化を標的とした治療薬は MDS の予後を改善することも報告されている[17]. しかし, MDS における IDH の遺伝子変異発現の頻度は散見されるのみ[20]で, MDS における多くのメチル化異常の出現機序は明らかではない.

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) である. ACO1/IRP1 は鉄欠乏時と鉄過剰時で異なる 2 つの機能を担っている. 鉄欠乏時には IRP1 として働き, フェリチンおよびトランスフェリン受容体 mRNA の非翻訳領域に存在する iron responsive element (IRE) に結合して鉄制御関連遺伝子の発現調節に関与する[22]. それに対し, 鉄過剰時には鉄硫黄クラスターが蛋白質活性中心部位に結合し, TCA 回路においてクエン酸からイソクエン酸への反応を触媒する酵素である ACO1 として機能する[22][23]. また, ヒト由来の細胞株である K562 に鉄負荷をすると IDH 等の TCA 回路関連酵素の発現や活性が変化するとの報告もあり[24], 鉄過剰が糖代謝関連酵素に影響を与えることが示唆される.

このようなこれまでの報告から, 我々は骨髄細胞における鉄過剰状

態が代謝酵素の発現，あるいは酵素活性を介したエピジェネティックな異常を引き起こし，その結果 MDS の増悪や白血病への進展に関わっている可能性を考えた．そこで，本研究では，鉄過剰モデルマウスを作成し，その骨髄細胞を用いた遺伝子網羅的解析を行い，鉄負荷に伴う骨髄細胞での遺伝子発現の変化，特に鉄過剰状態の代謝関連酵素への影響と，それに伴って出現する 2-HG の産生や DNA メチル化の変化について検討することとした．また，鉄過剰状態において，鉄キレート剤が遺伝子変化はメチル化にどのような影響を及ぼすかについても検討した．

材料と方法

1. 鉄過剰モデルマウスおよび鉄キレート療法モデルマウスの作成

12 週齢の C57Bl/6 マウス（三協ラボサービス，東京，日本）に鉄デキストラン（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA） 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，C57Bl/6 マウス鉄デキストラン 10 mg/head/day とデフェロキサミン（deferoxamine: DFO） 100 mg/kg/day を 5 日間投与し，鉄キレート療法モデルを作成した．マウスは 6 日目に屠殺し，下大静脈より末梢血を採取し，両大腿骨および両上腕骨より骨髄細胞を採取した．骨髄細胞採取にあたっては，対照群 10 匹，鉄過剰群 10 匹，鉄キレート群 10 匹の計 30 匹を 1 組とし，1 組は DNA および RNA 抽出用と細胞内鉄濃度測定用に，1 組はアコニターゼおよび IDH 酵素活性測定用に，もう 1 組は 2-HG 測定用にそれぞれ骨髄細胞を採取し，合計 3 組に分けて検討を行った．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．これらの動物実験は，旭川医科大学実験委員会の審査・承認を受けて行った．

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（日立 Z-8100，東京，日本）により鉄濃度を測定した．標準液として鉄標準液 100 mg/L

(和光純薬, 大阪, 日本) を用いた.

3. 網羅的遺伝子発現解析

マウス骨髄細胞より PureLink RNA Mini Kit (Life technologies, Carlsbad, CA, USA) を用いて RNA を抽出し, RiboMinus Eukaryote System (Life technologies) を用いてリボソーム RNA を除去した. リボソーム RNA 除去後の RNA から Ion Total RNA-Seq Kit (Life technologies) を用いて cDNA ライブラリーを作成し, 高出力シーケンサー Iron Proton (Life technologies) を用いてシーケンスデータを得た. 網羅的遺伝子発現解析は CLC bio 社 Genomics Workbench (Aarhus, Denmark) を用い, Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads (RPKM 値) を算出しクラスター解析を行った. 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 倍以上の値をとった遺伝子を取り上げた.

4. Digital PCR

網羅的遺伝子解析から糖代謝関連遺伝子群が有意に変動していたため, Aco1, Idh1, グリコーゲン脱分枝酵素 (Glycogen debranching enzyme: Agl), ホスホグルコムターゼ 1 (Phosphoglucomutase 1: Pgm1) について, 更に Digital PCR を用いて定量的解析を行った. マウス骨髄細胞より抽出した RNA から High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて cDNA を作成した. Aco1, Idh1, Agl, Pgm1 の発現は, TaqMan プローブ (Life technologies) を用いて QuantStudio 3D Digital PCR system (Life technologies) にて発現解析を行った.

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, Cambridge, England), Isocitrate

Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision, Mountain View, CA, USA) を用いて測定した。測定には, Multimode plate reader EnsPire (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)を用いた。

6. 骨髄細胞内 total 2-HG の測定

マウス骨髄細胞を 0.1N の塩酸に溶解し, 塩化ナトリウムを加えて有機酸を塩析させ, 酢酸エチルを加えて有機酸を抽出した。抽出した有機酸にトリメチルシリル化剤 (Sigma-Aldrich) を加えて誘導体化し, 質量分析計 JMS-T100GCV (日本電子, 東京, 日本) を用いてガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS 法) を行い total 2-HG を定量評価した。

7. DNA メチル化の測定

マウス骨髄細胞から DNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン, 東京, 日本) を用いて DNA を抽出し, MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit (Epigentek, Farmingdale, NY, USA) を用い全 DNA 量に占めるメチル化シトシンの割合 (5-mC%) を算出した。測定には, Multimode plate reader EnsPire (PerkinElmer)を用いた。

8. 統計処理

本研究では, 対照群対鉄過剰群および鉄過剰群対鉄キレート群の 2 群比較を各々行い, 有意差検定には Student's t-test を用い, $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

結果

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

鉄過剰投与による骨髄細胞での鉄動態の変化の有無を検討した。骨髄塗沫標本のベルリンブルー染色 (図 1A) では, 鉄過剰群 (図 1A-2) では対照群 (図 1A-1) と比べ著明な鉄沈着を認め, 鉄キレート群 (図

1A-3) では鉄沈着を認めなかった. 鉄過剰群において鉄沈着が認められた細胞の核の形態, 大きさは様々であり骨髄内においては様々な系統の細胞に鉄が沈着していることが推察された. 骨髄細胞内鉄濃度(図 1B) (n=10) は, 鉄過剰群では対照群に比べ有意に上昇し ($p=0.0000007$), 鉄キレート群では鉄過剰群と比べ有意に低下していた ($p=0.001$). これらの結果から, 鉄デキストラン投与により骨髄細胞で鉄過剰状態となり, DFO の投与により鉄が除去されたと考えた.

2. 鉄過剰投与および鉄キレート療法による遺伝子発現の変化

網羅的遺伝子発現の結果からクラスター解析を行い, 比較対照群と比較し鉄過剰群で発現亢進し, 鉄過剰群と比較し鉄キレートにより発現低下する遺伝子(表 1-A), 比較対照群と比較し鉄過剰群で発現低下し, 鉄過剰群と比較し鉄キレートにより発現亢進する遺伝子を抽出した(表 1-B). これらの遺伝子の中で機能の明らかなものについて着目するとグリコーゲンの分解に関連する酵素 (Pgm1, Agl), イソクエン酸脱水素酵素 (Idh1, Idh3a) の発現が鉄動態に呼応して変動しており, 骨髄細胞内では過剰な鉄が糖代謝関連酵素の発現に影響を与えていることが示唆された.

3. 鉄過剰投与および鉄キレート療法による糖代謝関連酵素の遺伝子発現の変化

網羅的遺伝子発現解析の結果から, 糖代謝関連酵素の遺伝子発現が鉄動態に呼応して変化していたため, 網羅的遺伝子解析で発現の変化が確認された Agl, Pgm1, Idh1 に加え, 以前より TCA 回路の一酵素として機能し, 鉄過剰により酵素活性が亢進することが知られていた Aco1 [22][23]についても, 鉄動態と糖代謝との関連を検討するのに必要と考え, これら 4 つの遺伝子について digital PCR analysis を用いてさらに詳しく発現の変化を検討した(図 2). Aco1 (図 2A) (n=10) は, 鉄過剰群で対照群と比較し有意に発現が上昇し ($p=0.005$), 鉄キレート群は鉄過剰群よりも有意に発現が低下していた ($p=0.001$).

Idh1 (図 2B) (n=10) も鉄過剰群で対照群と比較し有意に発現が上昇し (p=0.010), 鉄キレート群は鉄過剰群よりも有意に発現が低下していた (p=0.014). Pgm1 (図 2C) (n=8) は, 鉄過剰群では対照群とくらべ軽度の発現の上昇を認めた (p=0.096) が, 鉄キレート群は鉄過剰群の発現と同程度であった (p=0.41). Agl (図 2D) (n=8) は, 鉄過剰群では対照群よりも有意に発現が上昇していた (p=0.034) が, 鉄キレート群の発現は鉄過剰群と同程度であった (p=0.31). 以上の結果から, 糖代謝関連酵素の中でも特に TCA 回路に関わる Aco1 および Idh1 の発現が鉄過剰による影響を受けやすいことが示唆された.

4. 鉄過剰投与および鉄キレート療法による骨髄細胞内アコニターゼ活性と IDH 活性の変化

次に, 骨髄細胞においてアコニターゼおよび IDH の活性そのものに変化があるかどうかを検討した. 骨髄細胞内アコニターゼ活性 (図 3A) (n=10) は, 鉄過剰群にて対照群よりも有意に上昇し (p=0.005), 鉄キレート群では鉄過剰群よりも有意に低下していた (p=0.043). 骨髄細胞内 IDH 活性 (図 3B) (n=10) も, 鉄過剰群で対照群よりも有意に上昇し (p=0.035), 鉄キレート群で鉄過剰群よりも有意に低下していた (p=0.049). これらのことから骨髄細胞における鉄過剰はアコニターゼと IDH の活性そのものを亢進させ, その現象は鉄キレートにより抑制されることが示された.

5. 鉄過剰投与および鉄キレート療法による 2-HG 産生量および DNA メチル化の変化

鉄過剰および鉄キレート療法が 2-HG の産生量に影響を与えるか検討した (図 4A) (n=10). その結果, 鉄過剰群では対照群よりも有意に total 2-HG が増加し (p=0.00004), 鉄キレート群では鉄過剰群よりも有意に減少していた (p=0.00019). さらに, DNA のメチル化の変化についても検討したところ (図 4B) (n=10), 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 (p=0.041), 鉄キレート群では

鉄過剰群よりも有意に低下していた ($p=0.008$).

これらの結果は、鉄過剰により 2-HG の産生が亢進するとともに DNA メチル化の亢進が引き起こされ、鉄キレートにはそれを抑制する作用があることが明らかとなった。

考察

本研究では、鉄過剰による糖代謝関連酵素である ACO1-IDH 経路の活性化が起き、それによる 2-HG の増加により DNA メチル化の亢進が引き起こされ、さらに鉄キレート療法により DNA メチル化の亢進が回避されることを初めて示した。近年、ICT により MDS における leukemia free survival を延長させるとの報告[3]や、ICT のみで MDS あるいは急性白血病に対する治療効果が得られるとの報告[4-8]もあったが、その機序については明らかとなっていなかった。本研究で、鉄過剰モデルでの DNA メチル化が亢進することと、鉄キレート療法により鉄過剰による DNA メチル化の亢進が回避されることが証明された。これまでに、MDS において DNA のメチル化が発症や病態の増悪に関与し、予後不良因子にもなりうると報告されていることから[14][16-21]、ICT による MDS への抗腫瘍効果に ACO1-IDH 経路の活性化を阻止することにより起こる DNA メチル化の改善が関わっていると考えられる。

本研究では、鉄過剰により糖代謝関連酵素のうち、特に TCA 回路に関わる ACO1 と IDH の活性が上昇していた。以前より、ACO1/IRP1 については体内の鉄動態により鉄過剰時には ACO1 として、鉄欠乏時には IRP1 として働くという 2 つの働きを持つとの報告があり[22][23]、鉄過剰により ACO1 の活性が上昇したものと考えられる。IDH に関しても、ヒト由来細胞株への鉄負荷で活性が上昇すると報告されている[24]。ただ、IDH の酵素活性の変化が ACO1 の活性上昇に伴うものなのか、あるいは鉄そのものによるものなのかは明らかになっておらず、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

本研究の検討の結果、鉄過剰群で 2-HG が増加しており、鉄キレー

ト療法により 2-HG の増加が回避されていた (図 4A). IDH 遺伝子変異による 2-HG の産生増加は IDH 変異型が IDH 野生型とヘテロダイマーを形成することによる構造変化により起こると考えられている [12]. IDH 遺伝子変異のない生理的条件下においてもヒドロキシ酸オキソ酸トランスヒドロゲナーゼ (hydroxyacid oxoacid transhydrogenase: HOT) により α -KG から 2-HG が産生される [12][25]. 2-HG は 2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ (2-hydroxyglutarate dehydrogenase: 2-HGDG) の作用により α -KG へと変換されている [12][26]. IDH 遺伝子変異を持つ個体では IDH の産生に対し 2-HGDG による α -KG への変換が追いつかず, 結果的に 2-HG が過剰になると考えられている [12][26]. これまでは IDH 遺伝子変異ともなう白血病や神経膠腫において 2-HG とその発癌機構について注目されてきた. しかし, 本研究の結果から IDH 遺伝子変異を持たない個体であっても, 鉄過剰による ACO1-IDH 経路の活性化により骨髄細胞内で 2-HG が過剰になることが明らかになった. 2-HG が過剰になる機序はいくつか考えられる. まず, ACO1 の活性亢進によるイソクエン酸の増加により α -KG が増加し, α -KG の消費が追いつかず, その代償として HOT を介して 2-HG 産生が亢進する可能性がある. また, イソクエン酸から α -KG への反応には NADP が補酵素となるのに対し [12][26], α -KG やイソクエン酸から 2-HG への反応では NADPH が利用される [9][12][25][26]. 鉄過剰により NADH/NADPH のバランスが崩れ, 過剰となった NADPH を消費するために 2-HG の産生が過剰となる可能性もある. さらに, 鉄過剰により 2-HGDG の活性が低下し, 2-HG から α -KG への変換ができなくなる可能性もある. ただ, いずれの機序が 2-HG の増加に関与しているのかは明らかになっていないため, 今後さらなる検討が必要であると考えられる.

さらに, これまでの報告からは IDH 遺伝子変異を持つ個体においては正常群と比べ 10~100 倍程度 2-HG が増加すると言われているのに対し [9-11][27][28], 本研究の鉄過剰群の 2-HG の増加の程度は対照群の 2 倍程度であった. このことから, 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ことが示唆される。

本研究より、鉄過剰に伴う ACO1-IDH 経路の活性化により 2-HG が増加し、DNA メチル化の亢進が引き起こされることが示された。このことから、IDH 変異の有無にかかわらず MDS 患者あるいは急性白血病患者において、鉄過剰による ACO1-IDH 経路の活性化によりイソクエン酸産生量が増加することで 2-HG 産生量がさらに増加し、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。そのため、ICT により鉄過剰による ACO1-IDH 経路の活性化が抑えられることで DNA メチル化が抑えられ、病態の改善に寄与している可能性がある。ただし、鉄過剰によりどの程度 DNA メチル化が助長されるのかについて明らかではない。さらに、IDH 変異を持たない MDS あるいは急性白血病患者で、実際に鉄過剰により 2-HG 増加あるいは DNA メチル化の亢進が引き起こされるかは明らかではなく、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

また、MDS 患者では長期にわたる輸血依存により鉄過剰状態も長期にわたっている場合が多いのに対し、本研究は短期間の鉄投与による検討であった。そのため、鉄過剰状態が長期にわたった場合に同様の結果が得られるのか、あるいはさらに DNA メチル化の亢進が進行するのかについては、今後さらなる検討が必要であると考えられる。

本研究より、鉄過剰により IDH 変異を持たない個体でも 2-HG の増加を介して DNA のメチル化が引き起こされ、鉄キレートによりその現象は抑制されることが示された。今後、そのメカニズムについてさらに詳細に検討することで、輸血後鉄過剰症のみならず MDS の白血病化そのものに対する治療として ICT が発展することが期待される。

結語

鉄デキストラン投与による鉄過剰モデルマウスにおいて DNA メチル化が亢進し、鉄キレート療法モデルマウスにおいては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 の活性化により 2-HG が増加することが関与していると考えられた。鉄キレート療法モデルマウスの結果からは、鉄過剰による 2-HG の増加と DNA メチル化の亢進は ICT により回避されると考えられる。今後、その作用機序や長期間の鉄過剰による影響を解明していくことで、輸血後鉄過剰症のみならず MDS の白血病化そのものに対する治療として ICT が発展していくことが期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、研究の立案と論文作成にご指導・ご助言を賜りました旭川医科大学医学部内科学講座消化器・血液腫瘍制御内科学分野 高後 裕教授と旭川医科大学病院腫瘍センター 鳥本 悦宏教授に感謝しますとともに、実験に関し直接ご指導を頂きました、旭川医科大学消化管再生修復医学講座 田中 宏樹特任講師に深謝します。

文献

- 1 Takatoku M, Uchiyama T, Okamoto S, Kanakura Y, Sawada K, Tomonaga M, Nakao S, Nakahata T, Harada M, Murate T, Ozawa K. Japanese National Research Group on Idiopathic Bone Marrow Failure Syndromes. Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality. *Eur J Haematol* 2007; **78**: 487-494.
- 2 Neukirchen J, Fox F, Kündgen A, Nachtkamp K, Strupp C, Haas R, Germing U, Gattermann N. Improved survival in MDS patients receiving iron chelation therapy - a matched pair analysis of 188 patients from the Düsseldorf MDS registry. *Leuk Res* 2012; **36**: 1067-1070.
- 3 Lyons RM, Marek BJ, Paley C, Esposito J, Garbo L, DiBella N, Garcia-Manero G. Comparison of 24-month outcomes in chelated

and non-chelated lower-risk patients with myelodysplastic syndromes in a prospective registry. *Leuk Res.* 2014; **38**: 1491-1454.

4 松木絵里, 松本公宏, 中谷綾, 山根明子, 加藤淳, 岡本真一郎. Deferasirox により造血の著名な改善を認めた原発性骨髄線維症および骨髄異形成関連の変化を伴う急性骨髄性白血病. *臨床血液* 2012; **53**: 78-82.

5 岡部寛, 鈴木隆浩, 大森司, 森政樹, 上原英輔, 畑野かおる, 上田真寿, 松山智洋, 外島正樹, 尾崎勝俊, 永井正, 室井一男, 小澤敬也. 輸血後鉄過剰症に対する ICL670 (deferiasirox) 投与により造血能の回復が得られた骨髄異形成症候群. *臨床血液* 2009; **50**: 1626-1629.

6 Oliva EN, Ronco F, Marino A, Alati C, Praticò G, Nobile F. Iron chelation therapy associated with improvement of hematopoiesis in transfusion-dependent patients. *Transfusion* 2010; **50**: 1568-1570.

7 Breccia M, Loglisci G, Salaroli A, Cannella L, Santopietro M, Alimena G. Deferiasirox treatment interruption in a transfusion-requiring myelodysplastic patient led to loss of erythroid response. *Acta Haematol* 2010; **124**: 46-48.

8 Guariglia R, Martorelli MC, Villani O, Pietrantuono G, Mansueto G, D'Auria F, Grieco V, Bianchino G, Lerose R, Bochicchio GB, Musto P. Positive effects on hematopoiesis in patients with myelodysplastic syndrome receiving deferiasirox as oral iron chelation therapy: a brief review. *Leuk Res* 2011; **35**: 566-570.

9 Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, Sasaki M, Jin S, Schenkein DP, Su SM, Dang L, Fantin VR, Mak TW. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. *J Exp Med* 2010; **207**: 339-344.

10 Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, Rabinowitz JD, Carroll M, Su SM, Sharp KA, Levine RL, Thompson CB. The

common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 2010; **17**: 225-234.

11 Andersson AK, Miller DW, Lynch JA, Lemoff AS, Cai Z, Pounds SB, Radtke I, Yan B, Schuetz JD, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Raimondi SC, Zhang J, Mullighan CG, Shurtleff SA, Schulman BA, Downing JR. IDH1 and IDH2 mutations in pediatric acute leukemia. *Leukemia* 2011; **25**: 1570-1577.

12 Rakheja D, Medeiros LJ, Bevan S, Chen W. The emerging role of d-2-hydroxyglutarate as an oncometabolite in hematolymphoid and central nervous system neoplasms. *Front Oncol* 2013; **3**: 169.

13 Chotirat S, Thongnoppakhun W, Promsuwicha O, Boonthimat C, Auewarakul CU. Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients. *J Hematol Oncol* 2012; **5**: 5.

14 Murati A, Brecqueville M, Devillier R, Mozziconacci MJ, Gelsi-Boyer V, Birnbaum D. Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer* 2012; **12**: 304.

15 Solary E, Bernard OA, Tefferi A, Fuks F, Vainchenker W. The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases. *Leukemia* 2014; **28**: 485-496.

16 Zhao X, Yang F, Li S, Liu M, Ying S, Jia X, Wang X. CpG island methylator phenotype of myelodysplastic syndrome identified through genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression. *Br J Haematol* 2014; **165**: 649-658.

17 Yamazaki J, Issa JP. Epigenetic aspects of MDS and its molecular targeted therapy. *Int J Hematol* 2013; **97**: 175-182.

18 Issa JP. Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010; **24**: 317-330.

- 19 Shen L, Kantarjian H, Guo Y, Lin E, Shan J, Huang X, Berry D, Ahmed S, Zhu W, Pierce S, Kondo Y, Oki Y, Jelinek J, Saba H, Estey E, Issa JP. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 605-613.
- 20 Jin J, Hu C, Yu M, Chen F, Ye L, Yin X, Zhuang Z, Tong H. Prognostic value of isocitrate dehydrogenase mutations in myelodysplastic syndromes: a retrospective cohort study and meta-analysis. *PLoS One* 2014; **9**: e100206.
- 21 Calvo X, Nomdedeu M, Navarro A, Tejero R, Costa D, Muñoz C, Pereira A, Peña O, Risueño RM, Monzó M, Esteve J, Nomdedeu B. High levels of global DNA methylation are an independent adverse prognostic factor in a series of 90 patients with de novo myelodysplastic syndrome *Leuk Res* 2014 (in press).
- 22 Hirling H, Henderson BR, Kühn LC. Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase. *EMBO J* 1994; **13**: 453-461.
- 23 Kennedy MC, Emptage MH, Dreyer JL, Beinert H. The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J Biol Chem* 1983; **258**: 11098-11105.
- 24 Oexle H, Gnaiger E, Weiss G. Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1413**: 99-107.
- 25 Struys EA, Verhoeven NM, Ten Brink HJ, Wickenhagen WV, Gibson KM, Jakobs C. Kinetic characterization of human hydroxyacid-oxoacid transhydrogenase: relevance to D-2-hydroxyglutaric and gamma-hydroxybutyric acidurias. *J Inherit Metab Dis* 2005; **28**: 921-930.
- 26 Cairns RA, Mak TW. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer*

Discov 2013; **3**: 730-741.

27 Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; **462**: 739-744.

28 Janin M, Mylonas E, Saada V, Micol JB, Renneville A, Quivoron C, Koscielny S, Scourzic L, Forget S, Pautas C, Caillot D, Preudhomme C, Dombret H, Berthon C, Barouki R, Rabier D, Auger N, Griscelli F, Chachaty E, Leclercq E, Courtier MH, Bennaceur-Griscelli A, Solary E, Bernard OA, Penard-Lacronique V, Ottolenghi C, de Botton S. Serum 2-hydroxyglutarate production in IDH1- and IDH2-mutated de novo acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 297-305.

Figure legend

図 1. 鉄過剰投与および鉄キレート療法による骨髄での鉄動態の変化. A-1 が対照群, A-2 が鉄過剰群, A-3 が鉄キレート群の骨髄塗沫標本のベルリンブルー染色像を示す. 鉄過剰群では対照群に比べ骨髄細胞への鉄沈着 (青色) が著明に増加していた. 鉄キレート群ではほとんど鉄沈着は認められなかった. B は骨髄細胞内鉄濃度であり, 鉄過剰群では対照群よりも有意に増加しており, 鉄キレート群では鉄過剰群よりも有意に低下していた (n=10). **p<0.05.

表 1. 網羅的遺伝子解析にて鉄動態の変化により発現が変化した遺伝子

Pgm1; phosphoglucomutase 1, Agl; glycogen debranching enzyme, Idh; isocitrate dehydrogenase, Fip1l1; factor interacting with PAPOLA and CPSF1, Fancm; Fanconi anemia, complementation group M, Mid1ip1; MID1 interacting protein 1, Lamc1; laminin, gamma 1, Heatr5b; HEAT repeat containing 5B

Ago4; argonaute RISC catalytic component 4, St8sia4; ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4, Hlx; H2.0-like homeobox, Sytl1; synaptotagmin-like 1, Rint1; RAD50 interactor 1

図 2. 糖代謝関連酵素の mRNA 発現量の変化.

Aco1/Irp1 (A, n=10) および Idh1 (B, n=10) は鉄過剰群で有意に発現が増加し, 鉄キレート群では鉄過剰群よりも低下していた. Pgm1 (C, n=8) は鉄過剰群で軽度上昇を認めたが, 鉄キレート群は鉄過剰群と発現量は同程度であった. Agl (D, n=8) は鉄過剰群で有意な上昇を認めたが, 鉄キレート群は鉄過剰群と発現量は同程度であった. *p<0.1, **p<0.05.

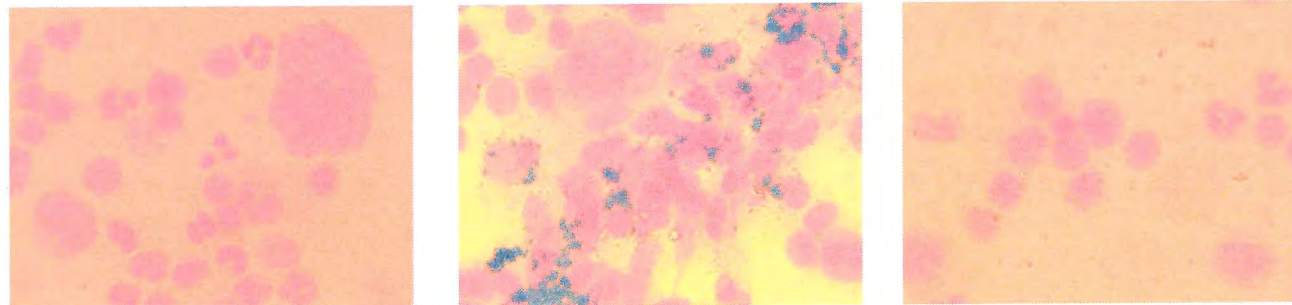
図 3. 骨髄細胞におけるアコニターゼ活性および IDH 活性の変化.

アコニターゼ (A) および IDH (B) いずれも鉄過剰群で有意に活性が

上昇し、鉄キレート群は鉄過剰群に比べ活性が低下していた (n=10).
**p<0.05.

図 4. 骨髄細胞における 2-HG 量および DNA メチル化の変化.
骨髄細胞内 total 2-HG 量 (A, n=10) は、鉄過剰群で有意に増加し、
鉄キレート群では鉄過剰群に比べ有意に減少していた. DNA メチル化
(B, n=10) も、鉄過剰群で有意にメチル化が亢進しており、鉄キレ
ート群では鉄過剰群と比べ有意に低下していた. **p<0.05.

A 骨髓塗沫標本(ベルリンブルー染色, ×400)



A-1:対照群

A-2:鉄過剰群

A-3:鉄キレート群

B 骨髓細胞内鉄濃度

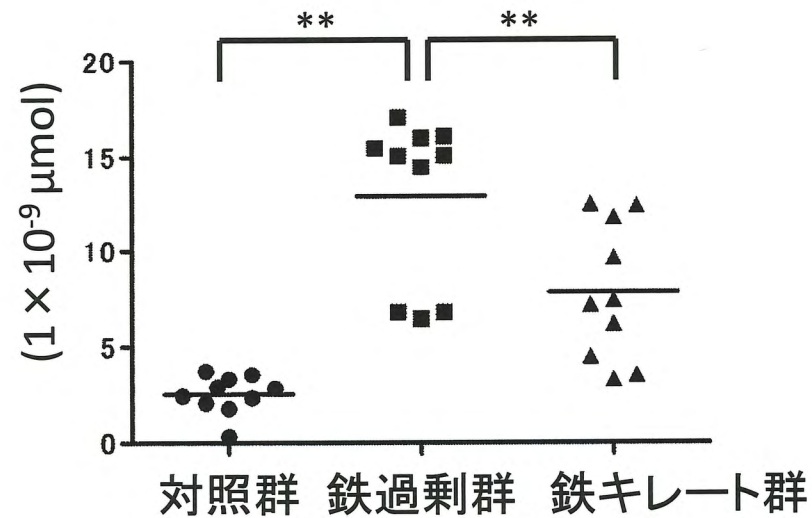


図1

	遺伝子名	対照群 (RPKM値)	鉄過剰群 (RPKM値)	鉄キレート群 (RPKM値)
糖代謝関連酵素	Pgm1	0.09	0.17	0.05
	Agl	0.01	0.07	0.03
	Idh1	0.09	0.32	0.06
	Idh3a	0.05	0.15	0.03
RNAポリアダニル化関連酵素	Fip1l1	0.04	0.09	0.03
DNA修復蛋白	Fancm	0.03	0.16	0.06
脂質合成関連因子	Mid1ip1	0.05	0.25	0.1
細胞骨格蛋白	Lamc1	0.04	0.12	0.07
機能不明	Heatr5b	0.07	0.14	0.02

	遺伝子名	対照群 (RPKM値)	鉄過剰群 (RPKM値)	鉄キレート群 (RPKM値)
RNA干渉関連蛋白	Ago4	0.09	0.02	0.03
タンパク質シアル化酵素	St8sia4	0.02	0.01	0.07
T cell分化制御転写因子	Hlx	0.25	0.14	0.24
小胞体輸送関連因子	Syt1l	0.28	0.03	0.21
細胞増殖抑制因子	Rint1	0.14	0.02	0.07

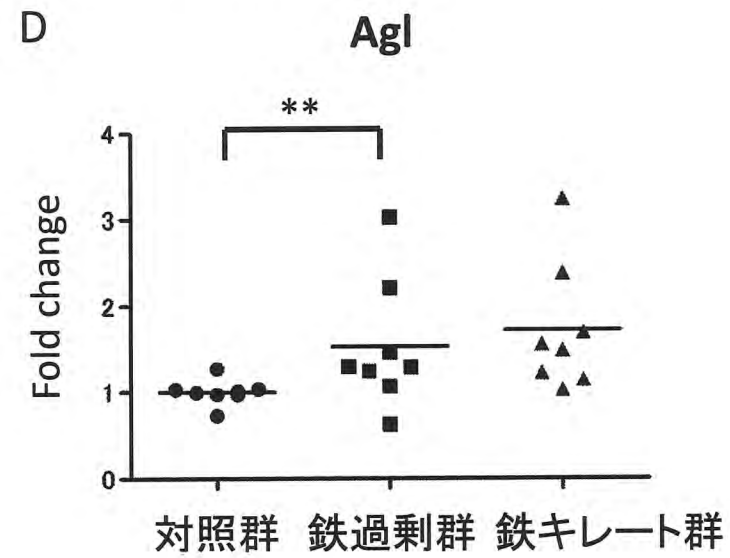
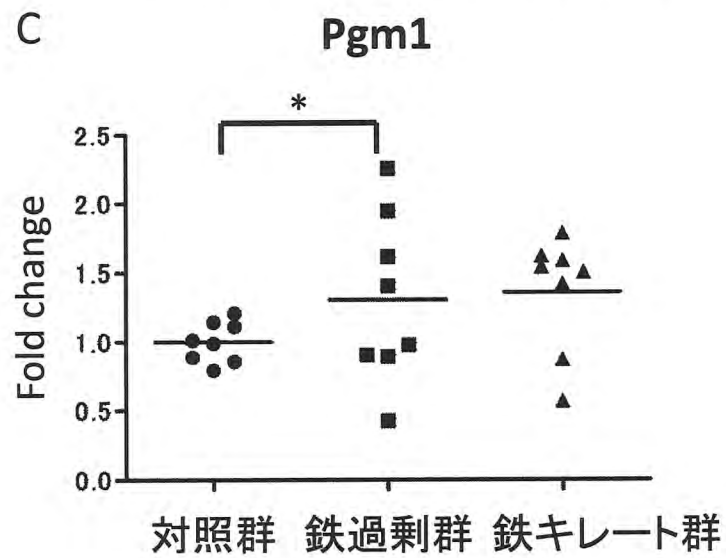
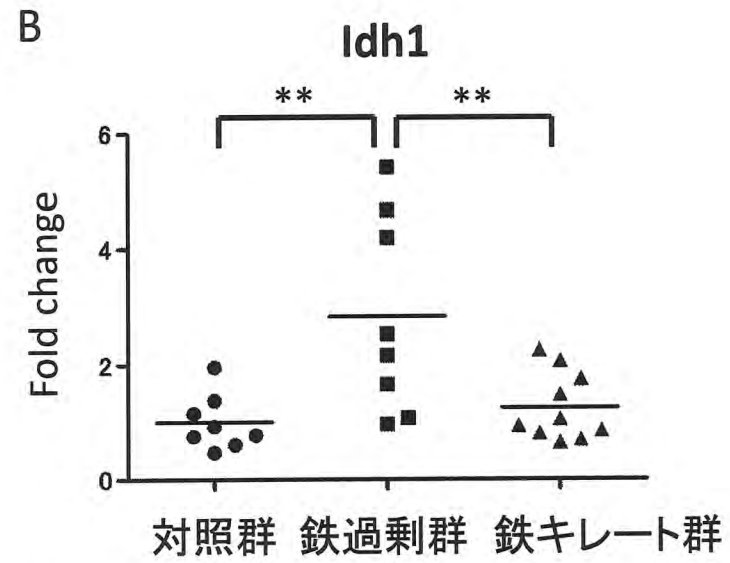
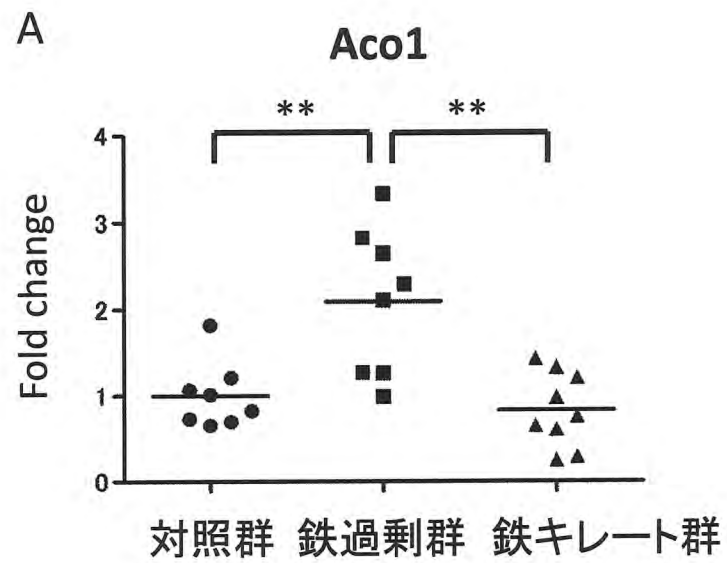


図2

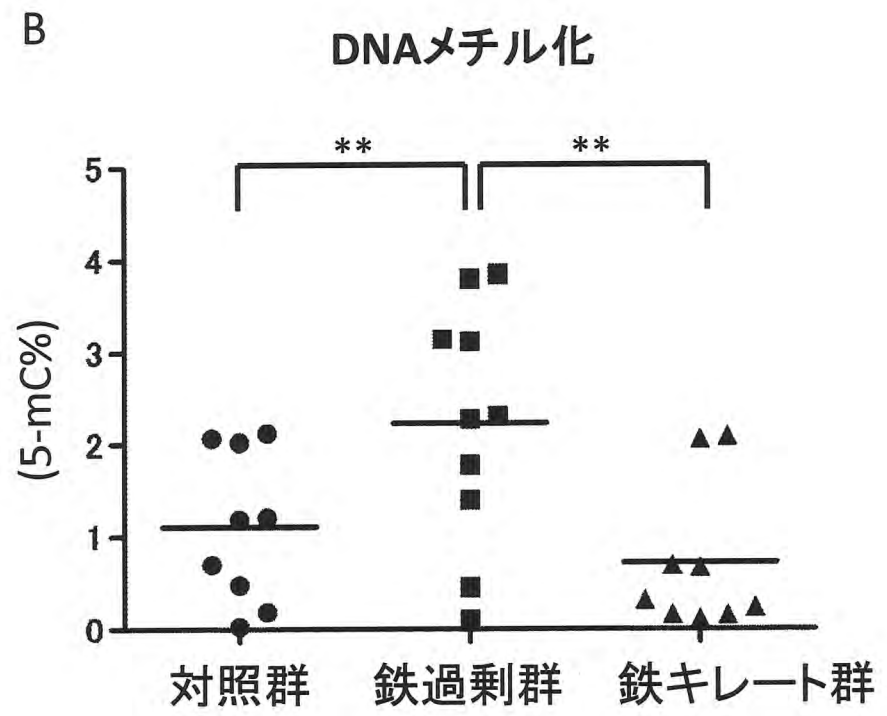
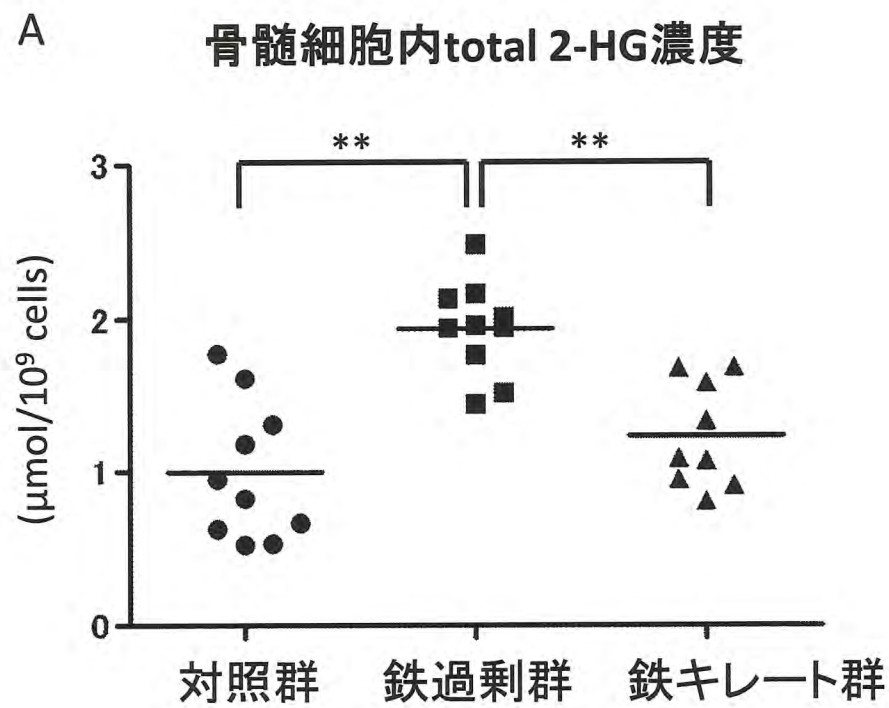


図4