

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06968

研究課題名(和文) ラット腹膜中皮腫検体でのマイクロサテライトマーカーを用いるゲノム欠失解析

研究課題名(英文) An analysis of genomic deletion in rat malignant peritoneal mesothelioma by microsatellite markers

研究代表者

岡崎 泰昌 (OKAZAKI, Yasumasa)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30403489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト悪性中皮腫で高頻度に見られる遺伝子異常は、CDKN2A/2B(Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2B)、NF2(neurofibromatosis type 2)、BAP1(BRCA1-associated protein 1)が知られている。そのため、Cdkn2a/2b領域やNf2領域が存在する染色体を中心にPCR法によるF1 hybrid rat [Brown-Norway (BN), Fischer344 (F344)]由来悪性中皮腫のマイクロサテライト解析を行い、アスベスト線維や多層カーボンナノチューブにより異なるゲノム欠失パターンが見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中皮腫は工業製品や建築材の原料として使用されてきたアスベスト線維により生じる。現在ではアスベスト線維の商業利用は禁止されているものの、輸入量から中皮腫患者数の推測が可能であり、本邦では2025-2030年が患者数のピークで徐々に漸減することが推測されている。中皮腫は疾患特異的な症状に乏しく早期発見が困難であるため、しばしば進行期で発見され、中皮腫を主因として死亡される方が多い。そのため、今後数十年にわたり中皮腫の発症と死去が危惧されており、基礎研究も必要性がある。本研究計画では鉄化合物や線維状物質を用いて誘発したラット中皮腫検体を用い、マイクロサテライトマーカーを用いてゲノム欠失の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Frequent genetic alterations in malignant mesothelioma (MM) are detected in CDKN2A/2B (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2B), NF2 (neurofibromatosis type 2) and BAP1 (BRCA1-associated protein 1). Among them, CDKN2A/2B and NF2 are frequently deleted and NF2 and BAP1 are frequently mutated in MM genome. In the animal model, Fischer 344 (F344) strain develops spontaneous MM at tunica vaginalis, while Brown Norway (BN) strain rarely develops spontaneous MM. To find predisposing genetic locus that differs from Cdkn2a/2b, Nf2 and Bap1, microsatellite analyses are performed, using iron saccharate, crocidolite, chrysotile or multi-walled carbon nanotubes-induced malignant peritoneal mesothelioma in F1 hybrid rats (Father; BN, Mother; F344). In this grant, microsatellite analyses of rat MM are performed in chromosome 5, which harbor Cdkn2a/2b, 14, which harbor Nf2. The analyses revealed that the deviation of microsatellite loss in genome from father or mother was detected at a few loci.

研究分野：実験病理学

キーワード：悪性中皮腫 動物発がんモデル マイクロサテライト

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アスベストは、高い耐久性と保温性などから建築用資材として大量に使用されて来た産業用素材であるが、現在では高い発がん性から商業利用が原則禁止されている。アスベストには6種類あり、クリソタイル、アモサイト、クロシドライト、アンソフィライト、トレモライト、アクチノライトである。

	石綿名／鉱物名	化学組成式	
蛇紋石族 Serpentines	白色綿／ Chrysotile	$Mg_3Si_2O_5(OH)_2$	かんらん岩が変質してできた主成分である蛇紋岩に含まれる。蛇紋岩は断層帯や沈み込み帯などのプレート境界部に大量に出現するが、白石綿成分はごく少量に留まる。タルク(滑石： $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$ )に混入することがある。
角閃石族 Amphiboles	青石綿・クロシドライト／リーベック閃石	$Na_2(Fe^{2+}, Mg)_3(Fe^{3+})_2Si_8O_{22}(OH)_2$	結晶片岩や火成岩にリーベック閃石が含まれることがあるが、本邦では産出しない。
角閃石族は種類が多く、極めて普遍的な造岩鉱物で、日本国内にも多い。	茶石綿・アモサイト／グリユネ閃石	$(Fe, Mg)_7Si_8O_{22}(OH)_2$	鉄に富んだ堆積岩起源の変成岩から採掘され、本邦では産出しない。アンソフィライトを含むことがある。
以下、商業利用は少ないアスベスト線維であるが、タルクに混入していることがある。	アンソフィライト石綿／直閃石	$(Mg, Fe)_7Si_8O_{22}(OH)_2$	紀元前からフィンランドで採掘され、少量が熊本県松橋で採掘されていた。
	トレモライト石綿／透閃石	$Ca_2(Mg, Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$	鉄含有量が高くなると緑色を呈し、トレモライト／アクチノライトと一括されることが多い。熊本県山鹿、ソウル郊外の広川、台湾の花蓮など、本邦を含む東アジアでも採掘されていた。クリソタイルに混入することがある。
	アクチノライト石綿／緑閃石	$Ca_2(Mg, Fe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$	

日本にはアスベストの産出鉱山は少なく、商業利用されてきたアスベストは輸入に依存し、主にクリソタイル、アモサイト、クロシドライトの3種類が使用され、クリソタイルが9割を占める。アスベストは1970年から1990年初頭までに毎年約30万トンが本邦に輸入されて来た(環境省 環境再生



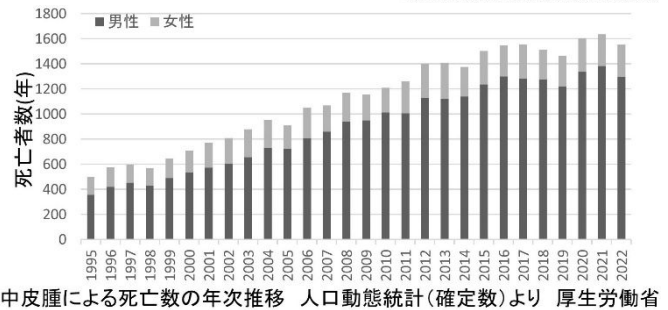
商業利用が行われてきたアスベスト鉱山の位置



世界で消費されたアスベストの九割以上はクリソタイルである。現在でも、クリソタイルはロシア、中国、ブラジルなどで採掘され、商業利用が行われている。

保全機構より)。アスベスト線維は、びまん性胸膜肥厚、アスベスト肺、肺癌、中皮腫の原因となることが知られ、肺癌は喫煙や空気中の微粒子などが誘因となることが知られ、アスベスト曝露が関連する肺癌は5%未満であるが、中皮腫はほぼ全症例がアスベスト曝露と関係することが知られており、中皮腫の確定診断が労災認定の根拠となっている。疫学的に、アスベスト曝露から30-40年後に悪性中皮腫を発症することが知られているため、国内への輸入統計から本邦では2025-30年頃が悪性中皮腫の発症ピークであることが危惧されており、近年では一年当たり1,500人が中皮腫を発症され(厚生労働省人口動態統計(確定

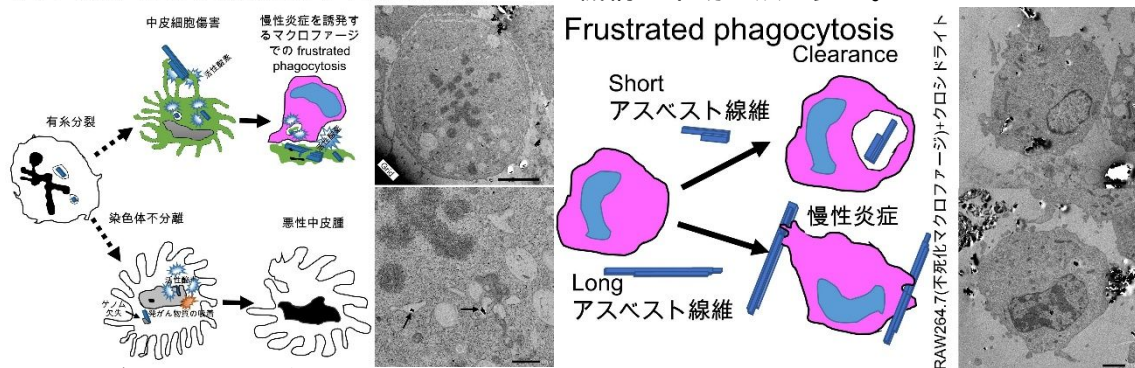
石綿輸入量の推移と法規制の歴史



数)より) 今後も数十年にわたる中皮腫の発症が懸念されている。ロシア、中国、インドなどではクリソタイルを中心に現在でもアスベストの商業利用が継続されており、世界的に悪性中皮腫の患者数の増加が危惧されているが、本邦ではびまん性胸膜肥厚がアスベスト曝露から早期に形成されることから、職歴を含め、高リスクな方にはスクリーニングによる早期発見と早期治療が試みられ、根治手術が可能な患者さんも見られるが、依然として、5年以内に80%以上の患者が中皮腫を原因として永眠される予後不良な疾患であり、病態の解明に基づく治療法の開発が期待されている。



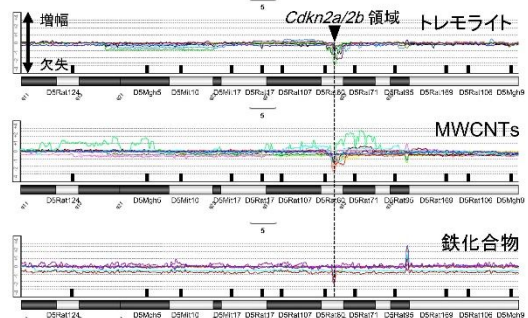
アスベスト曝露後に胸腔内に遊出したアスベスト線維は 酸化ストレス、**染色体不分離**、**発がん物質の吸着**、線維状物質による frustrated phagocytosis を介する慢性炎症といった病因が合わさって悪性中皮腫に至ると考えられているが、**中皮細胞傷害** アスベストにより誘発される中皮細胞傷害 機構は不明な点が多い。



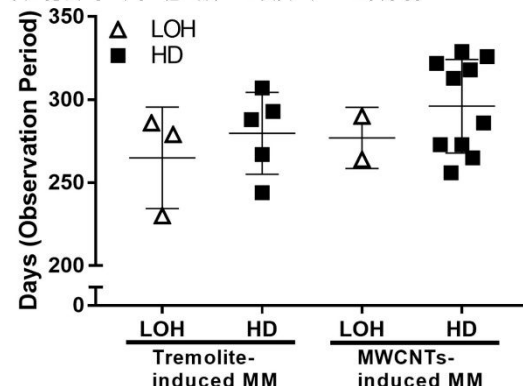
応募者が所属する研究室では F1 hybrid ラット (父: Brown-Norway (BN)、母: F344) を作成し、ラットにクロシドライトやクリソタイト、MWCNTs (multi-walled carbon nanotubes) といった線維状物質や鉄化合物を腹腔内投与し、腹膜中皮腫を誘発して中皮腫の研究を行っている。ラット中皮腫のゲノム変化を aCGH 法で検索を行った。aCGH (array-based comprehensive genomic hybridization) 解析で最も共通して見られたゲノム変化は 5 番染色体の *Cdkn2a/2b* 領域のホモ欠失や LOH (loss of heterozygosity) であった。鉄化合物誘発中皮腫はラットの生存期間が長く、*Cdkn2a/2b* 領域の欠損は肉腫型にのみ検出可能であったため比較が困難であるが、トレモライトや MWCNTs で誘発した中皮腫の生存日数と LOH やホモ欠失を比較すると、LOH 群に生存日数が短い傾向があったが、有意差はなかった。

## 2. 研究の目的

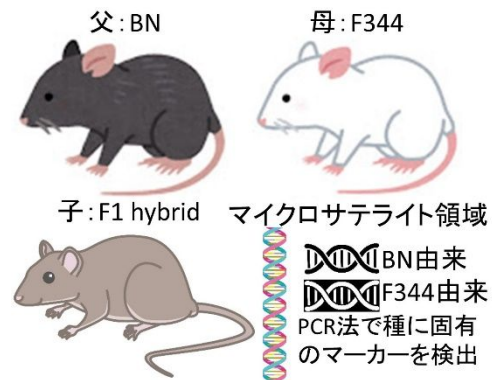
BN と F344 はそれぞれの種に固有のマイクロサテライトマーカーを持つため、マーカーが位置する染色体領域を PCR で増幅して可視化することが可能であり、LOH を起こしている場合、欠失部位が父由来か母由来か検討することが可能である。F344 は数%の割合で腹膜中皮腫を自然発症することが知られており、線維状発がん物質による中皮腫の発症に感受性が高い。一方、BN には中皮腫の自然発症は少なく、**ラット種による LOH の起き方に違いがある可能性**が推察される。マイクロサテライト解析は、1990 年代からがん研究で利用されてきた古典的な技術であるが、現在ではラットゲノムデータベース (rgd.mcw.edu) として整備され、ラット種毎のマーカーを検出するためのプライマー配列も公開されている。線維状物質により誘発した腹膜中皮腫でのマイクロサテライト解析は為されておらず、応募者が所属する研究室では多種類の線維状発がん物質で誘発したラット腹膜中皮腫の詳細な解析を行っているため、学術的に独自性が高い研究成果を挙げることが期待できる。前述のように、細胞分裂時の染色体不分離がアスベストによる中皮腫発がんの原因の一つと考えられており、線維状物質による LOH が異なる可能性が考えられる。そのため、中皮腫発症率が異なるラット種を用いるマイクロサテライトマーカーによる腹膜中皮腫のゲノム欠失の起き方を検索することは、**新しい疾患感受性領域の推定につながる知見を創造**することが期待できる。



トレモライト、MWCNTs、鉄化合物に共通して *Cdkn2a/2b* 領域の LOH やホモ欠失が見られるが、その他の部位では欠失パターンは異なる。



トレモライト、MWCNTs 誘発中皮腫において、LOH は HD よりも生存期間が短いラットに検出されたが、有意な偏りはなかった。



F344 は精巣鞘膜周囲に中皮腫を自然発症するので、遺伝的に中皮腫発がん感受性が高いことが考えられる。

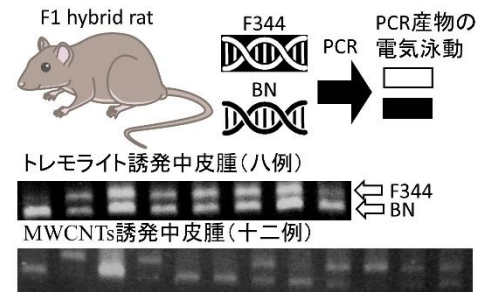
そのため、中皮腫発症率が異なるラット種を用いるマイクロサテライトマーカーによる腹膜中皮腫のゲノム欠失の起き方を検索することは、**新しい疾患感受性領域の推定につながる知見を創造**することが期待できる。

### 3. 研究の方法

凍結検体では線維芽細胞や血管内皮細胞などの非腫瘍性細胞を一定の割合で含み、PCR サイクル数を増やすと非腫瘍性細胞由来 DNA から BN, F344 の両方のシグナルが検出できることが考えられる。aCGH を行った中皮腫検体に予備 DNA が残っているため、この試料を用い、検討を行った。また、血性腹水から樹立した株化中皮腫細胞株を用いた。

### 4. 研究成果

Cdkn2a/2b 領域がある 5 番染色体、Nf2 領域がある 14 番染色体、X 染色体について解析を行った。5 番染色体では、トレモライトと MWCNTs 誘発中皮腫で比較を行うと、トレモライトでは F344 由来ゲノムが欠失する領域だけではなく、BN 由来ゲノムが欠失する領域も多数見られた。また特定のマイクロサテライトでは、トレモライトや MWCNTs に共通して F344 由来ゲノムが欠失する部位が見られた。一方、14 番染色体でも、トレモライトと MWCNTs で発生する LOH はばらばらであったが、特定のマイクロサテライトでは BN 由来ゲノムに偏って欠失する部位が見られた。F344 で精巢鞘膜周囲中皮腫を自然発症することから、F344 由来ゲノム欠失が中皮腫の発症に関連すると考えて研究を開始したが、BN 由来ゲノム欠失に偏る領域が見られたことは予想外であった。また、非腫瘍性 F1 ラットゲノムを用いて PCR 条件検討を行っているので、PCR エラーの可能性は低いと考えるが、マイクロサテライトは数 Mb 以上離れた領域で行っているため、なぜ特定のマイクロサテライトには種の偏りが生じているのかという、生物学的な意義の解析には追加検討が必要である。



5番染色体のマイクロサテライト解析で、トレモライトとMWCNTsでLOHパターンは異なる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Okazaki Yasumasa, Ito Nanami, Tanaka Hiromasa, Hori Masaru, Toyokuni Shinya	4. 巻 56
2. 論文標題 Non-thermal plasma elicits ferrous chloride-catalyzed DMPD-OH	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 595 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2022.2157272	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 Tanaka Hiromasa, Mizuno Masaaki, Ishikawa Kenji, Miron Camelia, Okazaki Yasumasa, Toyokuni Shinya, Nakamura Kae, Kajiyama Hiroaki, Hori Masaru	4. 巻 57
2. 論文標題 Plasma activated Ringer 's lactate solution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 14 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2023.2182663	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 Toyokuni Shinya, Zheng Hao, Kong Yingyi, Sato Kotaro, Nakamura Kae, Tanaka Hiromasa, Okazaki Yasumasa	4. 巻 57
2. 論文標題 Low-temperature plasma as magic wand to differentiate between the good and the evil	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 38 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2023.2190860	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 Okazaki Yasumasa, Hino Keisuke	4. 巻 15
2. 論文標題 Iron and Cancer: A Special Issue	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2097 ~ 2097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15072097	査読の有無 無
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 Okazaki Yasumasa	4. 巻 14
2. 論文標題 The Role of Ferric Nitritotriacetate in Renal Carcinogenesis and Cell Death: From Animal Models to Clinical Implications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14061495	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 Okazaki Yasumasa, Sasaki Kanako, Ito Nanami, Tanaka Hiromasa, Matsumoto Ken-Ichiro, Hori Masaru, Toyokuni Shinya	4. 巻 56
2. 論文標題 Tetrachloroaurate (III)-induced oxidation increases non-thermal plasma-induced oxidative stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 17 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2022.2026348	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 Okazaki Yasumasa	4. 巻 72
2. 論文標題 Asbestos induced mesothelial injury and carcinogenesis: Involvement of iron and reactive oxygen species	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 83 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13196	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 Yogosawa Satomi, Ohkido Makiko, Horii Takuro, Okazaki Yasumasa, Nakayama Jun, Yoshida Saishu, Toyokuni Shinya, Hatada Izuho, Morimoto Mitsuru, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 4
2. 論文標題 Mice lacking DYRK2 exhibit congenital malformations with lung hypoplasia and altered Foxf1 expression gradient	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02734-6	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 Tanaka Hiromasa, Hosoi Yugo, Ishikawa Kenji, Yoshitake Jun, Shibata Takahiro, Uchida Koji, Hashizume Hiroshi, Mizuno Masaaki, Okazaki Yasumasa, Toyokuni Shinya, Nakamura Kae, Kajiyama Hiroaki, Kikkawa Fumitaka, Hori Masaru	4. 巻 11
2. 論文標題 Low temperature plasma irradiation products of sodium lactate solution that induce cell death on U251SP glioblastoma cells were identified	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98020-w	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 Okazaki Yasumasa, Tanaka Hiromasa, Matsumoto Ken-Ichiro, Hori Masaru, Toyokuni Shinya	4. 巻 705
2. 論文標題 Non-thermal plasma-induced DMP0-OH yields hydrogen peroxide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108901
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2021.108901	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 Iqbal Mohammad, Shah Muhammad Dawood, Vun-Sang Senty, Okazaki Yasumasa, Okada Shigeru	4. 巻 139
2. 論文標題 The therapeutic potential of curcumin in alleviating N-diethylnitrosamine and iron nitritotriacetate induced renal cell tumours in mice via inhibition of oxidative stress: Implications for cancer chemoprevention	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2021.111636	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡崎泰昌、田中宏昌、堀勝、豊国伸哉
2. 発表標題 鉄イオンは低温プラズマによる酸化ストレスを増大する
3. 学会等名 第75回日本酸化ストレス学会 学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡崎泰昌、田中宏昌、堀勝、豊国伸哉
2. 発表標題 鉄イオンは低温プラズマによる酸化ストレスを増大する
3. 学会等名 第46回日本鉄バイオサイエンス学会 学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------