

主論文の要旨

**BRCA1 haploinsufficiency impairs iron metabolism
to promote chrysotile-induced mesothelioma via
ferroptosis-resistance**

BRCA1ハプロ不全は細胞内の鉄代謝の変化とフェロトーシス抵抗性を誘導し、クリソタイル誘発性中皮腫の発生を促進する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病理病態学講座 生体反応病理学分野

(指導：豊國 伸哉 教授)

罗 亚光

【緒言】

職業性アスベスト曝露による悪性中皮腫(Malignant mesothelioma)は、近年社会問題となっている。アスベストによる中皮腫の発生には、鉄過剰、活性酸素種(ROS: Reactive oxygen species)の産生、それに続く DNA 二本鎖切断(DSB: Double-strand break)などが重要である。BRCA1 は相同組み換え(HR: Homologous recombination)修復の重要な因子であり、その生殖細胞変異は乳がんおよび卵巣がんのリスクとして確立されているが、中皮腫との関連はまだ解明されていない。本研究は BRCA1 生殖細胞変異と中皮腫の発生の関与を評価することを目的とした。

【対象及び方法】

私は、*Brcal* 変異(Mut ; L63X/+)と野生型の Sprague Dawley(SD)ラットを使用し、クロシドライト(青石綿)またはクリソタイル(白石綿)の腹腔内注射で、中皮腫を誘導した。ラットの *Brcal* 遺伝子型の判定は PCR で行った。中皮腫の発がん実験により獲得した中皮腫を分析するために、凍結試料と FFPE(ホルマリン固定パラフィン包埋)スライドを用いて検討を行った。アレイ CGH(Array-based comparative genomic hybridization)解析、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)を行い、DNA コピー数の変化や *Cdkn2a* 遺伝子の欠失を評価した。また、リアルタイム PCR、ウェスタンブロット、免疫組織化学染色などを用い、鉄代謝やフェロトシス関連の mRNA やタンパク質の発現を定量した。さらに、BRCA1 ハプロ不全における中皮腫発がんの途中に生じた変化を解明するために、同 *Brcal* Mut ラットモデルを用い、亜急性炎症期中の中皮細胞、初代培養の中皮細胞を使用したアスベスト繊維への反応も評価した。

【結果】

中皮腫の発がん実験において、クリソタイルを注射した *Brcal* Mut 雄ラットは、野生型と比較して早期に中皮腫が発生することが明らかとなった(図 1A)。また、*Brcal* Mut の中皮腫において、悪性度の高い肉腫型(SM)がより多い割合を占めること(図 1BC)、細胞増殖能を反映する Ki-67 の陽性率(図 1D)が高く、盛んに細胞増殖することが示唆された。中皮腫細胞の悪性度を示す核グレードを分析した結果、中皮腫による生存率の変化と一致し、クリソタイルを注射した *Brcal* Mut 雄ラットで野生型より有意に高かった(図 1E)。

次に、*Brcal* Mut 中皮腫および亜急性期中の中皮細胞を使用し、中皮腫発がんのメカニズムを検討した。中皮腫のアレイ CGH 解析(GEO accession: GSE210598)では、*Cdkn2a/2b* がん抑制遺伝子の欠損が *Brcal* Mut 中皮腫に多いことが確認された(図 1F)。*Cdkn2a* の FISH 分析により、*Brcal* Mut の中皮腫 [9/12(75%)] において野生型 [5/13(38.5%)] よりも多くの *Cdkn2a* 欠失を確認した。さらに、クリソタイル誘発中皮腫の *Cdkn2a* の欠失率は、クロシドライト群 ($p=0.9157$) と異なり、*Brcal* Mut と野生型 ($p=0.0012$) の間に有意差があった(図 1G)。

次に、BRCA1 ハプロ不全下で中皮腫発がんにおける様々な時点での BRCA1 の発現

量を定量化した。その結果、*Brcal* Mut 中皮腫では、総 BRCA1 の発現量は野生型と有意差はなく(図 2A)、pBRCA1 の発現は *Brcal* Mut 中皮腫において著しく減少していた(図 2B)。しかしながら、総 BRCA1 の発現は、ラットの生存期間と正の相関を(図 2C)、そして中皮腫の核グレードとは負の相関(図 2D)を示した。アスベスト曝露後の亜急性期には、*Brcal* Mut 中皮細胞において、野生型より有意に総 BRCA1 と pBRCA1 の発現低下を認めた。

BRCA1 ハプロ不全により中皮腫の発がん過程において細胞内の鉄代謝に変化が観察された。鉄代謝関連遺伝子のコピー数変化に対する階層クラスタリングを行った結果、*Brcal* Mut と野生型との間に全般的にコピー数変化に相違を認めた(図 3A)。特に、*Tfr2* のコピー数変化は顕著で、クリソタイルで誘発された *Brcal* Mut 中皮腫は(3/6)、野生型(1/6)に比して増幅がみられた(図 1F)。クロシドライトは鉄を含有し、クリソタイルは溶血を誘発することで鉄を放出するため、中皮細胞は過剰な鉄にさらされる。野生型と比べ *Brcal* Mut の中皮腫はトランスフェリン受容体の発現が有意に上昇し(図 3B)、細胞内二価鉄も有意な増加を認めた(図 3C)。一方、IRP1 の発現が低下し(図 3D)、過剰な細胞内二価鉄は、細胞内鉄監視機構である IRE/IRP システムを不活性化することが示された。また、FTL および FTH の発現レベルの低下(図 3D)も、*Brcal* Mut 中皮腫における三価鉄の貯蔵の低下を示した。中皮発がんの亜急性期にも、同様の変化が見られた。

最後に、中皮腫におけるフェロトーシス経路の変化を検討したところ、がん抑制遺伝子である BAP1 の発現低下に加え、xCT や GPX4 の発現上昇を確認した(図 4A)。同時に、フェロトーシスマーカー(HNEJ-1 や PTGS2)の発現が減少し、*Brcal* Mut 中皮腫においてフェロトーシス抵抗性が形成されやすいことが判明した(図 4BC)。亜急性炎症実験と細胞実験の結果は上記の所見を裏付けるものであった。

【考察】

本研究においては、クリソタイル腹腔内投与の *Brcal* L63X 変異の雄ラットで、野生型と比較して早期に腹膜悪性中皮腫が発生することを明らかにした。これは、クリソタイルはクロシドライトよりも弾力性があり、溶血を起こしやすいという物理的特性に関連していると考えられる。中皮腫のアレイ CGH 解析では、*Cdkn2a/2b* ががん抑制遺伝子の欠損は *Brcal* 変異体により多いことが確認された。*Brcal* Mut 中皮腫において、悪性度の高い肉腫型(SM)がより多くを占め、盛んに細胞増殖することが示唆された。これにより、細胞内が鉄過剰になり、IRP1 の低下や *Tfr2* の上昇などの鉄制御タンパク質の調節により、最終的に鉄代謝が変化した。さらに、フェロトーシス経路の変化を調べたところ、がん抑制遺伝子である BAP1 の発現低下に加え、xCT や GPX4 の発現上昇を確認し、フェロトーシス抵抗性を認めた(図 5)。ただし、中皮腫の発症には、雌雄差があることが明らかとなり、性ホルモンの観点から今後さらなる検討が必要である。また、私はこの発がん過程をラットモデルでのみ解析しており、ヒトで同じ結論が得られるかどうかはさらなる検討が必要である。

【結語】

本研究により、*BRCA1* 生殖細胞変異は、ラットモデルにおいてクリソタイル(白石綿)による中皮腫の発生を促進することが確認できた。また、ゲノムの不安定性、細胞内鉄環境の変化とフェロトーシス抵抗性を誘導することが発がんメカニズムである可能性が示唆された。*BRCA1*^{L63X/+}生殖細胞変異を持つ男性保因者に対し、クリソタイルは中皮腫の重要かつ回避可能な発がんリスクである可能性がある。

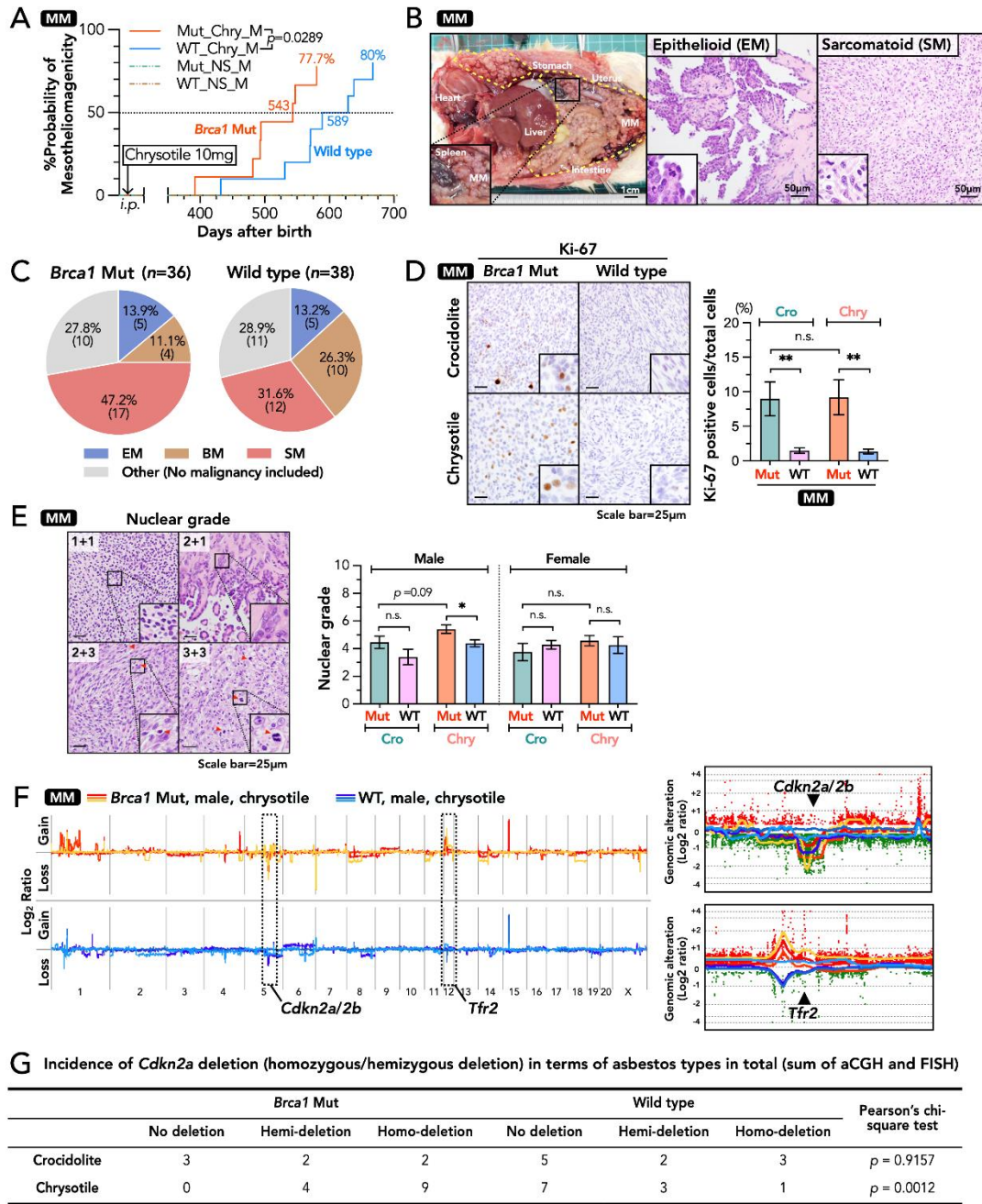


Figure 1 BRCA1 haploinsufficiency promotes chrysotile-induced malignant mesothelioma (MM) in males.

(A) Probability of MM development in *Brca1* (L63X/+) (Mut; N = 7) and *wild-type* (WT; N = 8) male rats injected with chrysotile (*Brca1* Mut vs. *wild-type*; $p = 0.0289$, χ^2 test). Untreated *Brca1* Mut (N = 10) and *wild-type* (N = 10) rats are shown as dotted lines. (B) Representative case of MMs in macroscopic image (bar = 1 cm), H&E staining of epithelioid (EM) and sarcomatoid (SM) subtypes (bar = 50 μ m). (C) Proportions of various subtypes in MM of *Brca1* Mut and *wild-type*, irrespective of asbestos and sex. (D) IHC analysis of Ki-67 on MM samples (bar = 25 μ m; N \geq 7). (E) Representative nuclear grade images, and nuclear grades of each group in carcinogenesis experiment. (F) Array-based CGH analysis of MMs induced from *Brca1* Mut or *wild-type* male rats by chrysotile (N = 3). Gains or losses are expressed as the logarithm of base 2. Callouts show *Cdkn2a/2b* deletion and *Tfr2* amplification, respectively. (G) Summary of FISH analysis on *Cdkn2a* deletion in crocidolite or chrysotile-induced MMs. CGH, comparative genomic hybridization; Cro, crocidolite; Chry, chrysotile.

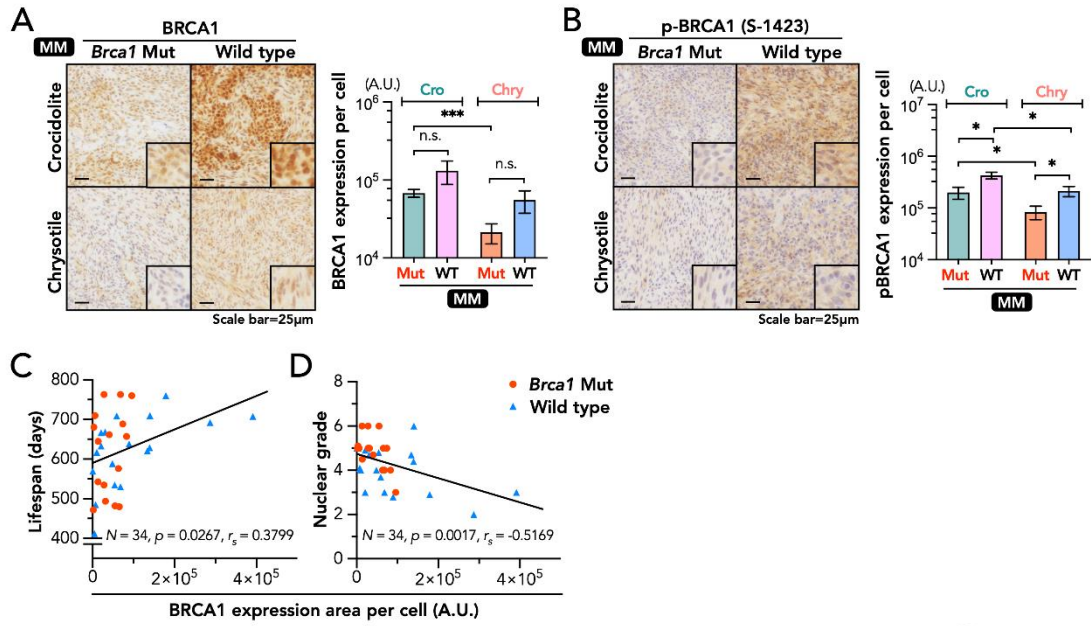


Figure 2 Chrysolite-induced MMs present lower expression of Brca1.

(A, B) IHC staining of total BRCA1 and p-BRCA1 (Ser1423) on MM samples (bar = 25 µm; $N \geq 7$). (C) Correlation between expression of total BRCA1 and survival probability ($N = 34$; $p = 0.0267$, *Pearson's* rank correlation coefficient = 0.3799). (D) Correlation between BRCA1 expression and nuclear grade ($N = 34$; $p = 0.0017$, *Pearson's* rank correlation coefficient = -0.5169). IHC, immunohistochemistry.

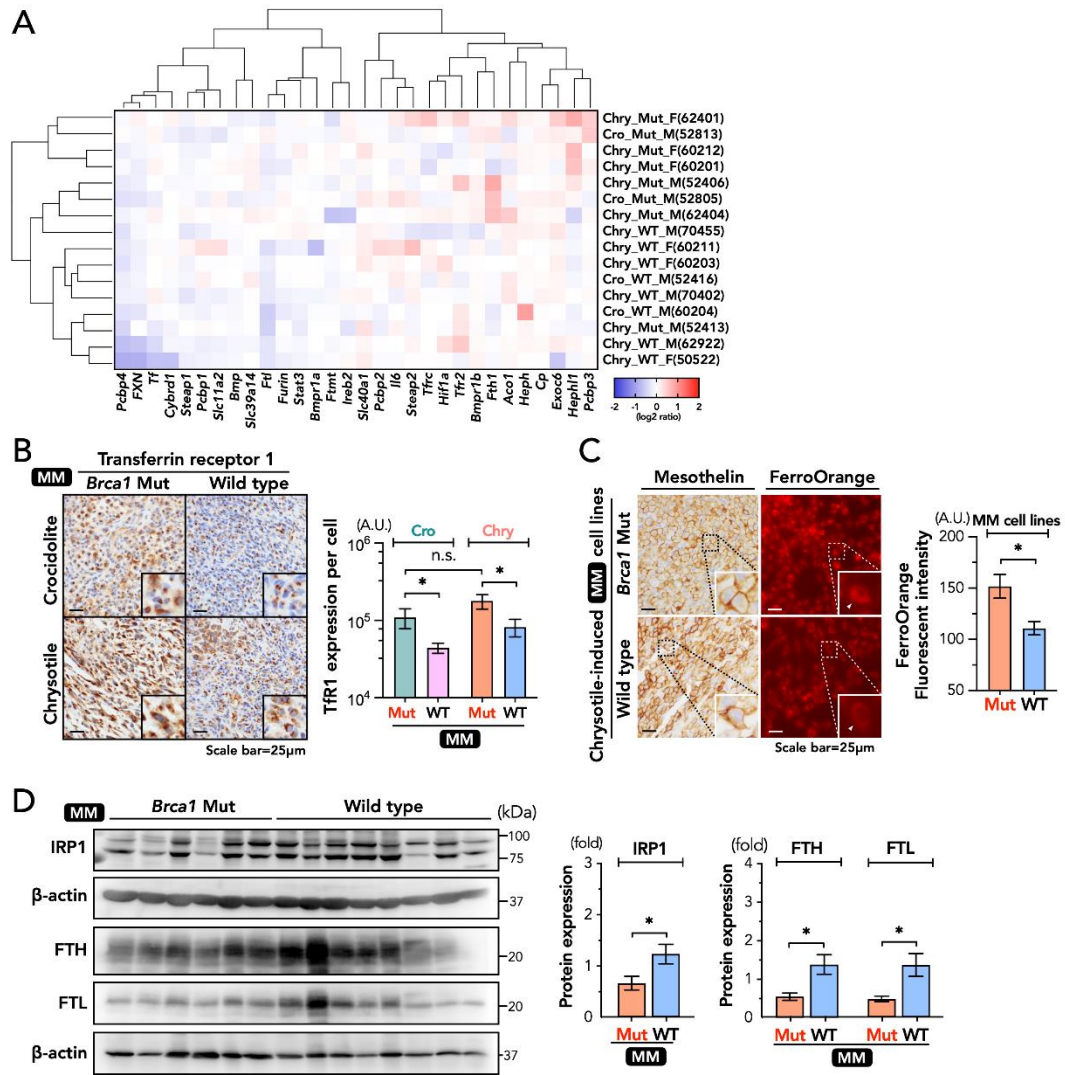


Figure 3 BRCA1 haploinsufficiency alters iron metabolism to cause an increase in Fe(II) and a decrease in Fe(III) in asbestos-induced MMs.

(A) Heat-map and hierarchical clustering of aCGH results regarding iron metabolism-related genes. (B) IHC staining of transferrin receptor 1 (Tfr1) on MM samples (bar = 25 μ m; $N \geq 7$). (C) Mesothelin IHC and RhoNox-4 (FerroOrange) fluorescent staining of chrysotile-induced mesothelioma cell lines ($N = 4$). (D) Immunoblot analysis of iron metabolism-related proteins (IRP1, FTH, and FTL) expression on MM samples ($N \geq 6$). Tfr1/2, transferrin receptor 1/2; IRP1, iron-regulatory protein 1; FTH/FTL, ferritin heavy/light chain.

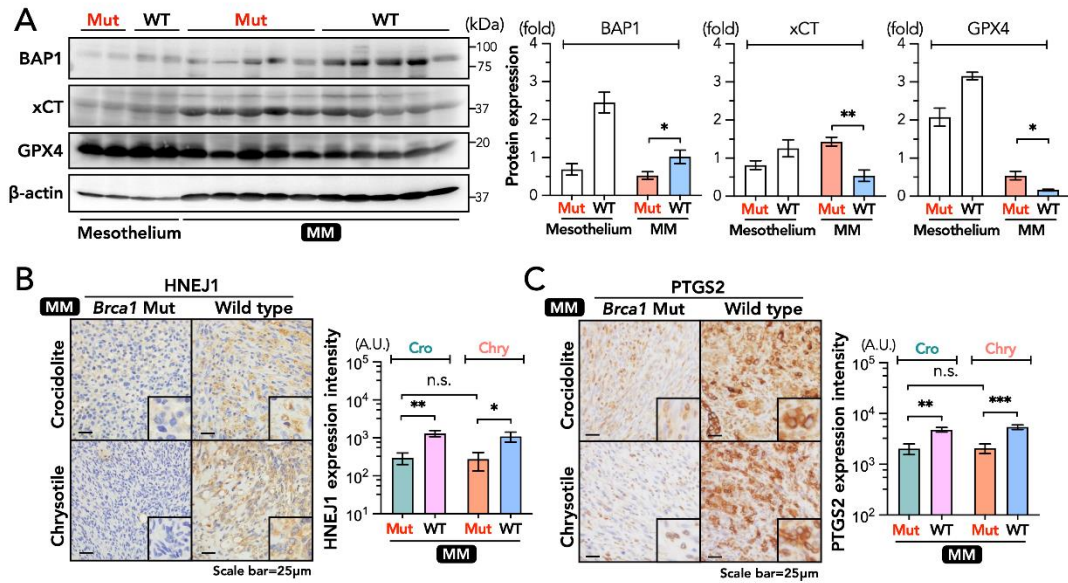


Figure 4 High oxidative stress with ferroptosis-resistance in asbestos-induced *Brca1* Mut MMs.

(A) Immunoblot analysis of ferroptosis-related proteins (BAP1, xCT, and GPX4) expression in mesothelium and MM samples (bar = 25 μ m). (B, C) IHC of HNEJ-1 and PTGS2 on MM samples (N \geq 7). BAP1, BRCA1-associated protein 1; xCT, cystine/glutamate transporter; GPX4, glutathione peroxidase 4; PTGS2, prostaglandin-endoperoxide synthase 2.

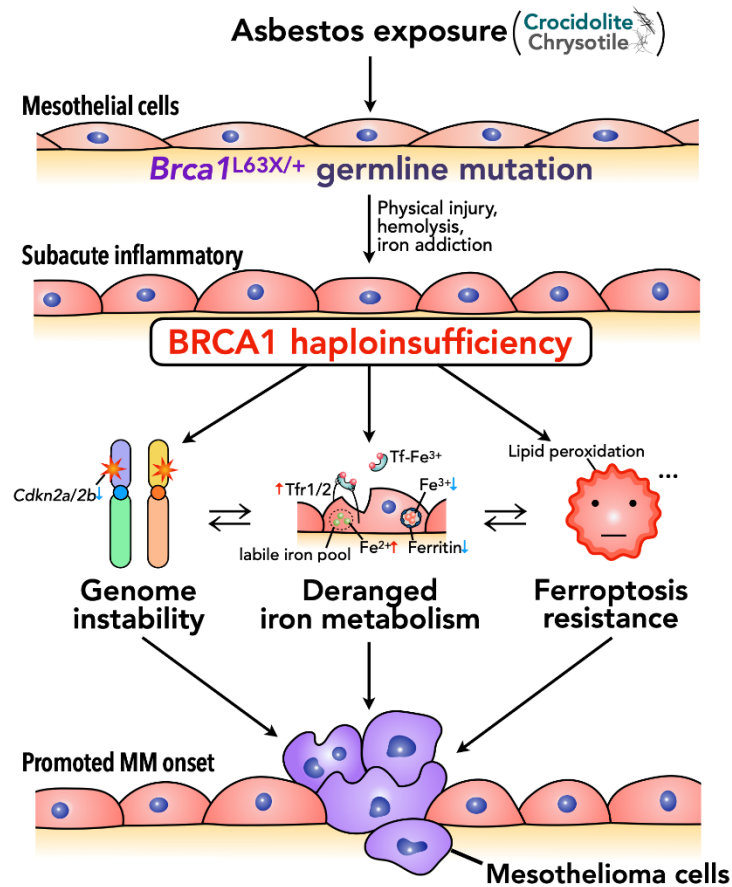


Figure 5 Overview schema of how BRCA1 haploinsufficiency influences development of MMs.