

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金研究報告書

令和 3年 6月 28日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者 (職名)	氏名		所属施設			
	浅岡 真理子 ㊞ (助教)	施設名	東京医科大学病院 乳腺科学分野	所在地	東京都新宿区西新宿6-7-1	電話
研究課題	乳癌における腫瘍免疫応答とAPOBEC3の関連性についての解析					
研究目的	<p>アポリポ蛋白質BmRNA編集触媒ポリペプチド様3 (APOBEC3) ファミリーは、一本鎖DNAまたはRNAを標的としたcytidine deaminase活性を持つ酵素群であり、ヒトでは7つのAPOBEC3群 (A3A, A3B, A3C, A3D, A3F, A3G, A3H) が確認されている。これらは、塩基の脱アミノ化により特有のゲノム編集により、突然変異を引き起こすことが知られている。網羅的ゲノムシーケンス解析により、特に乳癌を含む一部の癌のゲノム変異はC→T変異が圧倒的多数を占めており、その特徴的な遺伝子変異は主にA3Bによって起因されることが明らかとなった。さらに、乳癌腫瘍内のA3B発現量とゲノム不安定性、核Gradeや乳癌サブタイプなどの悪性度や予後にも関連することが示された。このように、乳癌領域におけるA3Bの臨床学的意義について多くの報告があるが、A3B同様にゲノム編集能を持つ他のAPOBEC3群については不明である。そこで、本研究ではAPOBEC3ファミリーの臨床学的意義について着目し、その遺伝子およびタンパク発現を確認する。</p>					
研究方法	<p>先行研究として、Bioinformatic解析を行った。公開データベース (The Cancer Genome Atlas及びCancer Cell Line Encyclopedia) より乳癌細胞55株と治療介入前乳癌手術検体のRNA及びDNA Sequenceデータを引用した。各APOBEC3群発現と、mutationやintratumor heterogeneityなどのゲノム不安定性、および抗腫瘍免疫応答についての関連性を検討した。さらに、当院乳癌患者の未治療手術検体または生検FFPE検体を用いて、腫瘍浸潤リンパ球数とAPOBEC3発現量を比較し、腫瘍内でのAPOBEC3群の発現局在を同定した。通常の免疫染色 (IHC) では個々のAPOBEC3の分子構造が似通っているため、それぞれを別々に認識することができない。そのため、RNAscope®を使用したRNA in situハイブリダイゼーションで蛍光多重染色 (Multiplex Assay) を行い、より高精度のAPOBEC3 mRNAの局在解析を行った。</p>					
研究成果	<p>乳癌細胞55株の観察では、A3Bは約半数の細胞株、A3Cは約30%の細胞株で高発現を認めたが、A3D, A3F, A3G, およびA3Hは低～無発現だった。ヒト乳癌組織内において、A3A及びA3B高発現腫瘍では、mutationやintratumor heterogeneityが優位に増加した一方で、A3C, A3D, A3F, A3G, およびA3H発現とゲノム不安定性には有意差は認めなかった。Gene set enrichment analysisでは、A3C, A3D, A3F, A3G, およびA3H高発現群は、低発現群に比較して癌免疫応答関連遺伝子群が優位に高発現した。</p>					

<p>研 究 成 果</p>	<p>さらに、腫瘍内浸潤リンパ球 (TILs) 特にCD8陽性Tリンパ球の浸潤度、T細胞受容体の多様性 (TCR diversity)、抗腫瘍免疫の活動性 (Cytolytic activity) の比較でも、A3Bよりも優位にA3C, A3D, A3F, A3G, およびA3Hとの強い関連性を見出だした。これらよりA3A及びA3Bと、A3C, A3D, A3F, A3G, A3Hは同一の酵素活性を持つタンパク群でありながら乳癌腫瘍内において異なる生物学的意義を持つ事が示唆された。</p> <p>次にtriple negative乳癌HE染色検体を用いて腫瘍浸潤リンパ球を評価し、腫瘍内リンパ球を十分に含む高浸潤部と腫瘍リンパ球がほとんど見られない低浸潤部を選別し、APOBEC3B及びAPOBEC3G抗体により免疫染色を行った。前研究の結果から、癌細胞内にはAPOBEC3Bが、腫瘍リンパ球にはAPOBEC3Gがそれぞれ高発現することを予想していたが、各タンパク分子の局在に有意差は見られなかった。これはAPOBEC3ファミリーはタンパク分子構造が類似しているため、免疫染色では別々に認識することは困難であるためと考えられ、既報通りの結果となった。そこで、RNAscope®を使用し高精度な局在解析を行った。腫瘍内のうちリンパ球が高浸潤を占めす部分では、低浸潤部に比較しAPOBEC3GのmRNAシグナルが増幅される傾向にあった。一方で、癌細胞内ではAPOBEC3BのmRNAシグナルが確認でき、各mRNA発現の不均一性を証明することができた。しかし、腫瘍内APOBEC3B及びAPOBEC3Gの発現量はいずれも非常に低値であったため、視覚的に存在の有無を証明することはできたが、発現量を定量化し統計的手法により検討するまでには至らなかった。</p>
<p>今 後 の 予 定</p>	<p>通常、triple-negative乳癌に対しては術前化学療法が行われる。本研究では、対象を治療介入前の検体に絞ったため、使用可能な検体が限定された。診断時 (針生検) の検体では、腫瘍一部の観察となり、局在診断には有用ではない。一方で、手術時の検体では腫瘍全体の観察が可能だが、術前化学療法が施行されたものは除外となる。また、個々の検体処理における相違からRNAの保存状態に影響があった可能性も否定できない。今後、研究対象症例数をさらに増やし、triple-negative乳癌以外のサブタイプについても検討する。また、術前化学療法が導入されたものに関しては、薬物治療への反応性とAPOBEC3B及びAPOBEC3Gの発現量及び発現局在を比較検討する。</p>

様式第3号

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金収支決算報告書

令和 3 年 6 月 28 日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者所属施設名 東京医科大学病院乳腺科学分野

氏 名 浅岡 真理子 ㊞

収 支 決 算 書

(単位 円)

交付を受けた助成金額		金		2,000,000
	費 目	明 細	単 価 及 金 額	計 額
支 出 内 訳	設備、備品費	41,503	41,503	41,503
	消耗品費	1,850,235	1,850,235	1,850,235
	計			1,891,738
過 △ 不足額				
備 考	消費税など ¥108,262			
	合計 ¥2,000,000 (領収書及び納品書に詳細記載)			

支 出 費 内 訳

区 分	金 額	根 拠
設備、備品費	2,550	デジタル温度計
	2,850	TPX染色バット
	1,260	アイボーイ フロロテクト 細口 1L
	200	J洗浄瓶 250ml
	675	アイボーイ 細口 500ml
	432	アイボーイ 細口 250ml
	477	ブラシ 洗浄用 2号
	585	ブラシ 洗浄用 5号
	4,860	染色籠
	4,050	TPX染色バット
	3,564	スライドボックス
	20,000	学位審査手数料
		123,000
266,500		BASEscope® Duplex Reagent Kit
18,860		BASEscope® Duplex Control Probe-BA-Hs-1zz
18,860		BASEscope® Duplex Negative Control Probe
26,240		RNAscope® Control slides - Human HeLa Cell
15,580		Vector Labs Vectamount 60ml
4,140		Pen Super liquid blocker
18,400		BASEscope® Duplex Control Probe-BA-Hs-1zz
18,400		BASEscope® Duplex Negative Control Probe
25,600		RNAscope® Control slides - Human HeLa Cell
15,200		RNAscope® Wash Buffer
15,200		RNAscope® Target Retrieval Reagent
24,000		RNAscope® H2O2 and Protease Reagent kit
120,000		BASEscope® Target Probe BA-Hs-APOBEC3G
120,000		BASEscope® Target Probe BA-Hs-APOBEC3B-1z
260,000		BASEscope® Duplex Reagent Kit
123,000		BASEscope® Target Probe BA-Hs-APOBEC3G
78,000		Set up for Base scope new target design

消耗品費	15,580	BASEscope® Prove Diluent
	35,150	Eaststart Essential DNA Green Mastermix
	2,240	2-メルカプトエタノール
	10,115	ART200 フィルターチップ
	49,000	PD-L1 Rabbit mAb
	17,100	RNAscope® Wash Buffer
	1,770	エタノール (特級)
	11,400	0.2ml 8連ストリップチューブ
	6,650	0.2ml 8連ドームキャップ
	1,400	アジ化ナトリウム (特級) 25G
	12,800	antibody-diluent with Background reducin
	8,820	リン酸緩衝生理食塩水
	3,546	マイクロチューブ T7100BK
	432	キムワイブ
	8,910	プラスチックピペット
	9,010	ART200 フィルターチップ
	160,000	Fetal Bovine Serum E.U Origin
	6,720	Barrier Tip
	108,000	ビオラモデイスポピペット 5ml
	5,760	ビオラモデイスポピペット 10ml
	7,920	Vデイスポピペット 25ml
	600	アズワン ペーパータオル
	8,000	TrueLine 遠心チューブ
	3,240	遮光プラスチック遠心管
	49,000	PD-L1 XP Rabbit mAb
	3,192	カバーガラスNeo
11,400	E@syOligo Standard DNA	
1,500	未染標本作成費	

※注意：旅費（出張費、宿泊費、交通費）は研究経費に入りません。