

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03502

研究課題名(和文) APOBEC3によるゲノム変異導入と癌のクローン進化の病態解明

研究課題名(英文) APOBEC3B-induced genome mutations and its contribution to clonal evolution in cancers

研究代表者

高折 晃史 (Takaori-Kondo, Akifumi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：20324626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：1. 骨髄腫臨床検体を用いたシングルセル解析からA3Bが細胞周期依存性に一部の腫瘍細胞で一過性に過剰発現することを発見した(Hirabayashi, BBRC, 2021)。2. 骨髄腫細胞株中の内在性A3Bの結合蛋白群を質量分析で同定した。これらはスプライシング複合体の構成因子であり、そのうち転写因子であるILF2がA3Bと結合し脱アミノ化酵素活性を正に制御していることを発見した(Kazuma, Sci Rep 2022)。3. CAGE法による骨髄腫細胞株、骨髄腫臨床検体16例の転写ネットワーク解析を行い、3237の新規エンハンサーを含む6735のエンハンサーを同定した(未発表)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

APOBEC3Bの過剰発現は多くのがんで共通しており、APOBEC3Bの酵素活性がその遺伝子変異の根源にあることから、本研究で得られた知見は多くのがんで共通のメカニズムである可能性がある。さらに、その活性阻害により、多くのがんのクローン進化を抑制することができれば、APOBEC3B脱アミノ化酵素阻害剤を従来の化学療法と併用することにより、治療抵抗性や遠隔転移を抑制し、従来の抗がん剤の成績を向上させる新たな治療法の開発につながる可能性があり臨床的にも極めて重要である。

研究成果の概要(英文)：1. Single cell RNA sequencing revealed that APOBEC3B is preferentially expressed in G2/M cell cycle (Hirabayashi et al., BBRC 2021). 2. We employed mass spectrometry to identify interacting proteins of endogenous APOBEC3B in myeloma cell lines. We detected 30 interacting proteins and among these, ILF2 enhanced APOBEC3B deaminase activities (Kazuma et al., Sci Rep 2022). 3. We identified 6735 enhancers including 3237 novel enhancer sequences in clinical myeloma samples and are investigating their physiological roles in myeloma progression and chemotherapy resistance. (Unpublished data)

研究分野：血液学

キーワード：APOBEC がん クローン進化 ゲノム変異 シチジン脱アミノ化 C-to-T変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

APOBEC は、APOBEC1, AID, APOBEC2, APOBEC3A-H, APOBEC4 の 11 のファミリーからなるシトシン脱アミノ化酵素である。標的一本鎖 DNA あるいは RNA 中のシトシン (C) を脱アミノ化しウラシル (U) に変異させる (C → U 変異) 活性を有する。興味深いことに、APOBEC1 や AID のトランスジェニック (Tg) マウスはがんを発症し、また、APOBEC 遺伝子の多型によりヒトでも発がんリスクが上昇する (Nik-Zainal et al. Nature Genet 2014)。

当研究室では、APOBEC のうち特に核内に局在する APOBEC3B (A3B) がヒトゲノムに変異を導入し、B 細胞リンパ腫におけるがん遺伝子変異のソースであることを世界に先駆けて証明した (Shinohara et al. Sci Rep 2012)。その後さらに乳がんなどのがん腫において、A3B の有意な発現上昇と APOBEC3 に特徴的なゲノム変異パターンが報告され、A3B が乳がんにおける主な変異原であることが示された (Burns et al. Nature 2013, Alexandrov et al. Nature 2013, Roberts et al. Nat genet 2013)。

造血器腫瘍、特にリンパ系腫瘍においては頻繁に APOBEC パターンのゲノム変異を認め、多発性骨髄腫ではその臨床経過中に APOBEC パターンの変異の増加することが知られている (Walker et al. Nat Commun 2015)。我々は骨髄腫患者のうち、診断時に A3B を過剰発現する群で予後が不良であることを発見した (Yamazaki et al, Sci Rep 2020)。

従って APOBEC パターンの遺伝子変異が腫瘍の特性を増悪させる因子である可能性があり、さらに A3B の酵素活性を阻害することで従来の化学療法の成績を向上させる可能性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では多発性骨髄腫をモデルとして、再発・治療抵抗性獲得への A3B の役割を検討するため、(1) 臨床検体のシングルセル解析及び CAGE 解析による転写ネットワーク解析、(2) 相互作用蛋白による A3B 機能調節、(3) A3B 過剰発現マウスの作製と TP53 ヘテロ欠損マウスの A3B 過剰発現への影響を解析した。包括的に骨髄腫における A3B ゲノム変異導入機序と治療抵抗性への影響を検討し、最終的に A3B 活性阻害による新規治療開発の基盤とすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 臨床検体のシングルセル解析及び CAGE 解析による転写ネットワーク解析

京都大学病院に通院する骨髄腫患者より文書による同意 (G0697 研究) を得て骨髄の提供を受け、シングルセル RNA シークエンス及び CAGE 解析 (Hirabayashi et al., Nature Genet, 2019) を行う。

### (2) 相互作用蛋白による A3B 機能調節

骨髄腫細胞株 AM01 および RPMI8226 の A3B 遺伝子 C 末端に CRISPR/Cas9 で FLAG タグを挿入した。抗 FLAG 抗体で免疫沈降した内在性 A3B に結合する因子を質量分析で同定する。

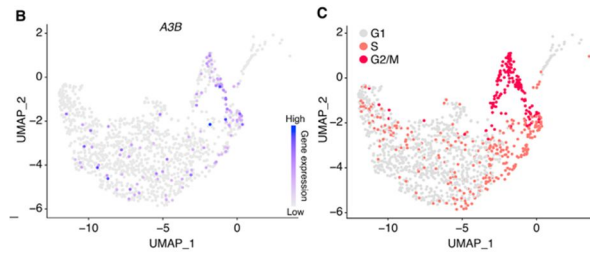
### (3) A3B 過剰発現マウスの作製と TP53 ヘテロ欠損マウスの A3B 過剰発現への影響

全身で A3B を過剰発現するマウスを TP53 欠損マウスと交配し、ヘテロ TP53 欠損に由来するリンパ腫、骨肉腫などのがんの発生頻度、時期、遺伝子異常を解析する。

#### 4. 研究成果

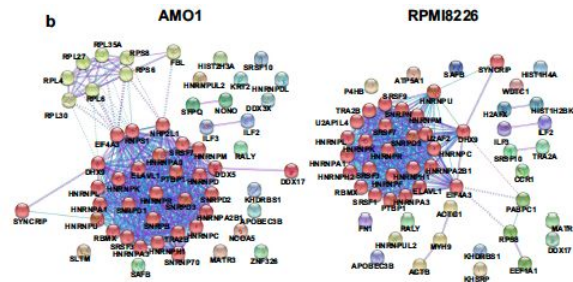
##### (1) 臨床検体のシングルセル解析および CAGE 解析による転写ネットワーク解析

患者骨髄を用いてシングルセルトランスクリプトーム解析から A3B が細胞周期依存性に一部の腫瘍細胞で一過性に過剰発現することを発見した(右図、Hirabayashi et al., BBRC, 2021)。  
CAGE 解析では 3237 の新規エンハンサーを含む 6735 のエンハンサーを同定した。



##### (2) 相互作用蛋白による A3B 機能調節

質量分析の結果、両細胞株に共通する 30 の A3B 相互作用蛋白を同定した。これらはスプライシング複合体の構成因子であり(右図、Kazuma et al., Scientific Reports 2022)、A3B と共に核内で高分子複合体を形成することをショ糖濃度勾配法で明らかにした。そのうち転写因子である ILF2 が A3B と結合しそのシトシン脱アミノ化酵素(CDA)活性を正に制御していることを発見した。



##### (3) A3B 過剰発現マウスの作製と TP53 ヘテロ欠損マウスの A3B 過剰発現への影響

A3B 過剰発現マウスを作製し、骨肉腫やリンパ腫などを自然発症する TP53 ヘテロ欠損マウスと交配した。A3B 過剰発現により p53 ヘテロ欠損により発生する骨肉腫細胞内での A3B 過剰発現、CDA 活性を確認できたが、マウスの腫瘍発生率が時期、頻度に影響は見られなかった。(未発表データ)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Hirabayashi Shigeki, Shirakawa Kotaro, Horisawa Yoshihito, Matsumoto Tadahiko, Matsui Hiroyuki, Yamazaki Hiroyuki, Sarca Anamaria Daniela, Kazuma Yasuhiro, Nomura Ryosuke, Konishi Yoshinobu, Takeuchi Suguru, Stanford Emani, Kawaji Hideya, Murakawa Yasuhiro, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 546
2. 論文標題 APOBEC3B is preferentially expressed at the G2/M phase of cell cycle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 178 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.008	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 Yamazaki Hiroyuki, Shirakawa Kotaro, Matsumoto Tadahiko, Kazuma Yasuhiro, Matsui Hiroyuki, Horisawa Yoshihito, Stanford Emani, Sarca Anamaria Daniela, Shirakawa Ryutaro, Shindo Keisuke, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 15
2. 論文標題 APOBEC3B reporter myeloma cell lines identify DNA damage response pathways leading to APOBEC3B expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0223463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0223463	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 Takei Hisashi, Fukuda Hirofumi, Pan Gilbert, Yamazaki Hiroyuki, Matsumoto Tadahiko, Kazuma Yasuhiro, Fujii Masanori, Nakayama Sohei, Kobayashi Ikei S., Shindo Keisuke, Yamashita Riu, Shirakawa Kotaro, Takaori-Kondo Akifumi, Kobayashi Susumu S.	4. 巻 112
2. 論文標題 Alternative splicing of APOBEC3D generates functional diversity and its role as a DNA mutator	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 395 ~ 408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02904-y	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 Yamazaki Hiroyuki, Shirakawa Kotaro, Matsumoto Tadahiko, Hirabayashi Shigeki, Murakawa Yasuhiro, Kobayashi Masayuki, Sarca Anamaria Daniela, Kazuma Yasuhiro, Matsui Hiroyuki, Maruyama Wataru, Fukuda Hirofumi, Shirakawa Ryutaro, Shindo Keisuke, Ri Masaki, Iida Shinsuke, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Endogenous APOBEC3B Overexpression Constitutively Generates DNA Substitutions and Deletions in Myeloma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43575-y	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 Matsumoto Tadahiko, Shirakawa Kotaro, Yokoyama Masaru, Fukuda Hirofumi, Sarca Anamaria Daniela, Koyabu Sukenao, Yamazaki Hiroyuki, Kazuma Yasuhiro, Matsui Hiroyuki, Maruyama Wataru, Nagata Kayoko, Tanabe Fumiko, Kobayashi Masayuki, Shindo Keisuke, Morishita Ryo, Sato Hironori, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 9
2. 論文標題 Protein kinase A inhibits tumor mutator APOBEC3B through phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44407-9	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 Hirabayashi Shigeki, Bhagat Shruti, Matsuki Yu, Takegami Yujiro, Uehata Takuya, Kanemaru Ai, Itoh Masayoshi, Shirakawa Kotaro, Takaori-Kondo Akifumi, Takeuchi Osamu, Carninci Piero, Katayama Shintaro, Hayashizaki Yoshihide, Kere Juha, Kawaji Hideya, Murakawa Yasuhiro	4. 巻 51
2. 論文標題 NET-CAGE characterizes the dynamics and topology of human transcribed cis-regulatory elements	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1369 ~ 1379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-019-0485-9	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 Nagata Kayoko, Shindo Keisuke, Matsui Yusuke, Shirakawa Kotaro, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 527
2. 論文標題 Critical role of PP2A-B56 family protein degradation in HIV-1 Vif mediated G2 cell cycle arrest	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 257 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.04.123	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 Kazuma Yasuhiro, Shirakawa Kotaro, Tashiro Yusuke, Yamazaki Hiroyuki, Nomura Ryosuke, Horisawa Yoshihito, Takeuchi Suguru, Stanford Emani, Konishi Yoshinobu, Matsui Hiroyuki, Matsumoto Tadahiko, Tanabe Fumiko, Morishita Ryo, Ito Shinji, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 12
2. 論文標題 ILF2 enhances the DNA cytosine deaminase activity of tumor mutator APOBEC3B in multiple myeloma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06226-3	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 Sarca Anamaria D., Sardo Luca, Fukuda Hirofumi, Matsui Hiroyuki, Shirakawa Kotaro, Horikawa Kazuki, Takaori-Kondo Akifumi, Izumi Taisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 FRET-Based Detection and Quantification of HIV-1 Virion Maturation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 647452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.647452	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 Matsui Hiroyuki, Shirakawa Kotaro, Konishi Yoshinobu, Hirabayashi Shigeki, Sarca Anamaria Daniela, Fukuda Hirofumi, Nomura Ryosuke, Stanford Emani, Horisawa Yoshihito, Kazuma Yasuhiro, Matsumoto Tadahiko, Yamazaki Hiroyuki, Murakawa Yasuhiro, Battivelli Emilie, Verdin Eric, Koyanagi Yoshio, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 95
2. 論文標題 CAGE-Seq Reveals that HIV-1 Latent Infection Does Not Trigger Unique Cellular Responses in a Jurkat T Cell Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e02394-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.02394-20	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 Radwan Mohamed O., Takaya Daisuke, Koga Ryoko, Iwamaru Kana, Tateishi Hiroshi, Ali Taha F.S., Takaori-Kondo Akifumi, Otsuka Masami, Honma Teruki, Fujita Mikako	4. 巻 28
2. 論文標題 Interruption of Vif/Elongin C interaction: In silico and experimental elucidation of the underlying molecular mechanism of benzimidazole-based APOBEC3G stabilizers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115409 ~ 115409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2020.115409	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 Fukuda Hirofumi, Li Songling, Sardo Luca, Smith Jessica L., Yamashita Kazuo, Sarca Anamaria D., Shirakawa Kotaro, Standley Daron M., Takaori-Kondo Akifumi, Izumi Taisuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural Determinants of the APOBEC3G N-Terminal Domain for HIV-1 RNA Association	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2019.00129	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 Yoshinaga Noriyoshi, Shindo Keisuke, Matsui Yusuke, Takiuchi Yoko, Fukuda Hirofumi, Nagata Kayoko, Shirakawa Kotaro, Kobayashi Masayuki, Takeda Shunichi, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 513
2. 論文標題 A screening for DNA damage response molecules that affect HIV-1 infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 93 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.03.168	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 -

[学会発表] 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本忠彦, 白川康太郎, 小藪助直, 数馬安浩, 山崎寛章, 松井宏行, 高折晃史
2. 発表標題 がんの内在性変異源APOBEC3Bの非コードRNAに結合能力はレトロエレメントを阻害に必要である.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 数馬安浩, 白川康太郎, 松井宏行, 山崎寛章, 松本忠彦, 伊藤慎二, 高折晃史
2. 発表標題 シトシン脱アミノ化酵素APOBEC3Bの相互作用蛋白の同定と機能的解析.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本忠彦, 白川康太郎, 小薮助直, Sarca AD, Stanford E, 福田寛文, 松井宏行, 山崎寛章, 数馬安浩, 堀澤欣史, 高折晃史
2. 発表標題 Tumor mutaor APOBEC3B binds to cellular non-coding RNAs to inhibit retroelements.
3. 学会等名 第33回日本エイズ学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 数馬安浩, 白川康太郎, 小西義延, 松井宏行, 松本忠彦, 高折晃史
2. 発表標題 シトシン脱アミノ化酵素APOBEC3Bの活性はILF2とhnRNP A1により亢進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院医学研究科 血液・腫瘍内科学  <a href="https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/">https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~hemonc/</a></p>
---

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
研究分担者	村川 泰裕  (Murakawa Yasuhiro)  (50765469)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー   (82401)	



6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	白川 康太郎  (Shirakawa Kotaro)  (80728270)	京都大学・医学研究科・助教     (14301)	

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