

出國報告(出國類別:進修)

應用 RNA sequencing 建立癌症病患 之精準醫療

服務機關: 國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名職稱: 林柏翰醫師

派赴國家: 美國

出國期間: 111 年 9 月 1 日至 112 年 8 月 31 日

報告日期: 112 年 10 月 30 日

摘要

職林柏翰於 2022 年 9 月 1 日至 2023 年 8 月 31 日，前往美國麻省總醫院 (Massachusetts General Hospital) 進修，學習利用 RNA sequencing 等技術，用於癌症病人的精準醫療。我研究的題目是遺傳性乳癌 *BRCA1/2* 帶因者的癌症生成機轉，從中找出可能的生物標記，藉由生物標記，可以精準預測乳癌發生，來加以預防 *BRCA1/2* 突變帶因者的乳癌。從細胞發生基因體不穩定，到癌變成為癌細胞的過程，利用單細胞 RNA 定序，發現與 *c-KIT* 與相關路徑參與癌變過程，但是仍待後續研究加以釐清，並在臨床上驗證，所找到的路徑，是否可以精準預測與用於預防乳癌。希望將來對於 *BRCA1/2* 突變帶因者，有更好的預防醫療。

目次

目的	p.1
過程	p.1
心得	p.4
建議事項	p.4
附件資料	p.5

壹、目的

學習 RNA sequencing 的方法，用於精準醫療與癌症研究

貳、過程

一、啟程

職林柏翰於 2021 年年底獲得教育部與醫院同意，贊助前往美國麻省總醫院 (Massachusetts General Hospital)。預定的時間是 2022 年 9 月 1 日到 2023 年 8 月 31 日為止。職是全家於 2022 年 8 月中，飛抵美國波士頓。首先需要安頓全家，包含小孩上學的事宜，才能夠前往醫院進修。

二、實驗室介紹

我申請的實驗室是麻省總醫院癌症中心(cancer center)，實驗室的主持人是 Leif Ellisen, MD, PhD，他本身是一位腫瘤科專科醫師，也是一位 cancer geneticist，看診的疾病是乳癌和遺傳性癌症，主要是遺傳性乳癌例如 *BRCA1* 或是 *BRCA2* 基因突變的帶因者，主要的研究也是乳癌發生的成因、*BRCA* 基因和乳癌的免疫治療、antibody-drug conjugate 藥物治療等研究項目。職本身是內科血液科和腫瘤科專科醫師，並在臺大醫院住院醫師時期，接受基因醫學的訓練，目前在臺大醫院的職務，基因醫學部的臨床業務部分負責癌症的基因檢驗，包含遺傳性癌症基因檢驗和腫瘤基因檢驗，臨床病人治療主要也是乳癌病人，同時有一個癌症基因檢驗和諮詢的門診，主要照顧遺傳性乳癌例如 *BRCA* 基因突變帶因者。因此前往 Leif Ellisen, MD, PhD 的實驗室學習。

Ellisen 教授的實驗室，目前有四位博士後研究員、四位研究助理、多位研究護理師和實驗室 manager，我快要離開實驗室的時候，還有一位訪問醫師來自中國加入實驗室。波士頓是一個國際化的城市，實驗室的成員也是如此，有來自世界各國的人員。除了美國本地的博士後研究員和研究助理，有來自中國的博士後研究員(博士是在美國念的)，也有來自南非、緬甸的研究助理。實驗室的 manager 是日本裔的一位女生，顯示各地精英份子齊聚一堂。除了學術活動和研究，Ellisen 教授會與實驗室成員聚餐，去年冬天，大家一起溜冰。實驗室夏天會辦理一個小旅行，今年夏天，實驗室成員搭火車前往 Rockport 的 Singing beach，大家一起聚餐，放鬆心情欣賞美麗的海灘美景。藉由心靈的放鬆，來增強思考和實驗的動力。

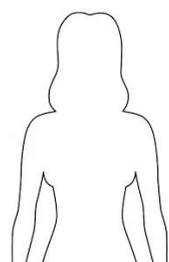
三、研究項目

BRCA1/2 germline 基因突變帶因者，終其一生以極大的機率得到乳癌、卵巢癌和其他癌症例如胰臟癌或是男性攝護腺癌。過去流行病學統計，*BRCA1* 帶因者婦女終其一生有 70%的機率得到乳癌，大約 45-55%的機率得到卵巢癌。*BRCA2* 帶因者婦女終其一生也有 70%的機率得到乳癌，大約 17%的機率得到卵巢癌。目前癌症預防的準則是建議域性手術切除，即所謂的 risk-reducing (bilateral) mastectomy 與 risk-reducing salpingo-oophorectomy。雖然多數西方國家的帶因者能接受這種預防性手術，帶並非全世界帶因者皆能接受，因此，明白致癌的機轉，與找尋罹患乳癌前的生物標記，達到精準預測癌症發生，精準醫療是重要的。

實驗室主要利用 DNA 與 RNA 定序技術，針對乳腺的管腔幹細胞(luminal progenitor cell)，進行全基因體定序和對全轉錄體定序，實驗也進行單細胞定序。過去實驗室已經發現，在組織學下還是正常的乳腺細胞，經過全基因體的定序，可以發現一小部分的乳腺的管腔幹細胞，已經出現了基因體不穩定的現象 (genomic instability)。乳腺的管腔幹細胞，目前被認為是乳癌發生的源頭，因此，而基因體不穩定的現象，將造成突變的累積，最終形成癌細胞。實驗室的這個發現，證實了過去的假說，認為細胞因為帶有 *BRCA1* 或是 *BRCA2* 的 heterozygous mutation，將會發生 *BRCA1* 或是 *BRCA2* haploinsufficiency，這個 haploinsufficiency 無法維持 replication fork，尤其是有 DNA lesion 的情況，導致 replication stress 上升。當 replication stress 上升的時候，細胞無法維持基因體的穩定性，因而會出現大片段的基因斷損缺陷。這些細胞在免疫化學染色發現，與其他正常細胞相比，比較不會出現細胞凋亡的現象。推測背後可能是因為不同的基因表現，造成這些細胞的存活機率上升，之後細胞可能進行複製分裂形成主要的 clone，這個 clone 便會成為癌症的源頭。

如上所述，*BRCA* 的研究，雖然許多實驗室在近幾年同意 replication stress 上升後造成基因體不穩定的假說，但是後續細胞到底發生何種變化，仍然不清楚。目前也無法得知細胞的 *BRCA* 基因何時發生 LOH 的現象，最終變成癌細胞。為了釐清這些細胞的基因表現，因此執行單細胞定序實驗，分為兩種方法學執行，第一是目前較為廣泛使用的單細胞定序實驗方法，我們取得 *BRCA1/2* 突變帶因者的乳腺細胞加以實驗。下圖是整個實驗的 rationale 和 ongoing work。

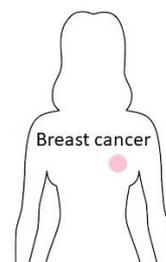
Early pathogenesis mechanisms relevant to near-term risk and prevention remain to be defined.



BRCA1^{mut/+} or *BRCA2*^{mut/+}
mutation carrier

Mammary epithelial cells:

- Uncertain at what step heterozygous mutation switches to LOH of *BRCA1* or *BRCA2*
- Unknown what are associated transcriptomics changes
- Clinically useful biomarkers to identify pre-cancer lesions are needed.



LOH of *BRCA1* or *BRCA2* in
cancer cells



實驗的方法是取得 *BRCA* 突變帶因者的乳腺細胞，由於是研究癌症發生過程，所以必須採用還未發生乳癌前的乳腺細胞，也就是病理組織仍是正常的細胞。這裡也是國內與美國國情差異極大的地方之一。美國麻省總醫院每個月會接到大約 5-10 例 *BRCA1/2* 突變帶因者，前來接受預防性雙側乳房切除手術，在病人同意該研究並且簽屬同意書之後，我們便可以取得檢體。在臺灣，國人普遍無法接受，還未罹會癌症之前，就預防性把雙側乳房切除，若是要在國內進行該研究，檢體取得便是一件相當困難的事情。

當我們取得組織之後，便進行組織分解，最後取得單細胞，單細胞實驗主要有兩種，一個是使用 10X Genomics 的方法與試劑，執行單細胞定序實驗，這部分會得到單細胞 RNA 的資料，用來分析細胞組成。另一個實驗設計，經過流式細胞儀，可以分離得到乳腺管腔幹細胞進行實驗。我們進行單細胞的全基因體定序，挑出帶有 genomic instability 的細胞，同時也抽取 RNA 進行反轉錄成為 cDNA，製備成為次世代定序的 library，上機定序，來分析已經帶有 genomic instability 特徵的細胞，基因表現的變化差異。從單細胞定序的基因表現，初步結果發現，帶有 *BRCA1* 或是 *BRCA2* heterozygous mutation 的乳腺管腔幹細胞，*c-KIT* 與下游的基因，有顯著表現量上升的現象。過去的 *BRCA* 缺陷老鼠實驗，也發現 *BRCA1* mutation 的乳腺幹細胞，*c-KIT* 與相關基因表現量上升，與後續細胞增生腫瘤發展相關。我們也嘗試把經由全基因體定序得知已經帶有 genomic instability 的細胞挑出，抽取 RNA，進行 transcriptome 的定序分析(RNA sequencing)，以便了解 DNA 層次已經發生基因體不穩定後，各個基因表現的差異與細胞傳遞路徑，如何造成後續的細胞癌變，目前該實驗仍在繼續進行中。初步的結果，我也在實驗室的同意之下，投稿 2023 年 AACR 的研討會，前往 AACR 的會場，張貼海報。

參、心得

在 Dr. Ellisen 教授的實驗室一年，美國實驗室非常注重研究思考邏輯的訓練，對於實驗設計十分要求，使我獲益良多。實驗室的管理方面，癌症中心對於實驗室安全與實驗資料的保護，相當重視，所有執行都需要按照標準流程，對於工作同仁的安全，機器設備，資料維護，皆相當有保障。是值得學習的地方。

麻省總醫院和癌症中心的學術活動，相當的多。由於之前疫情的關係，有許多的演講，都是線上執行。在癌症中心，每周一早上，由各個癌症實驗室輪流演講各實驗室的發現，分享實驗成果與技術；週二固定有乳癌的臨床或是基礎研究的演講；每周五的中午，為披薩的時間，由各個實驗室的博士後研究員輪流演講實驗成果。此外，還有多不定期的演講，增廣大家的學識。

癌症中心不定期辦理各種活動，冬天到了還有舊衣 swap；每個月都舉辦博士後研究員的社交活動，大家一起喝啤酒吃披薩或是各種美式食物，不限於學術方面，大家一起交流各種資訊。從學術和非學術活動，都可以增進彼此的學習，拓展人際關係，是一件很棒的事情。

肆、建議事項

一、推廣進修與二次進修的機會

在美國麻省總醫院癌症中心學習一年，學習氣氛十分良好，能不斷接觸各種最新思考，並與多位專家討論實驗，是一件非常愉快、令人回憶的事情。出國學習他人的長處，來提升我們的醫療，值得建議繼續推廣辦理出國訪學的業務。

除了繼續有同仁出國進修之外，建議能夠提供已經出國進修的同仁，能夠二次出國進修的機會，如果考量避免影響院內工作，時間的長短或許是短期數個月，未必是 1 年或是 2 年。二次出國的訪學，可以適時的刺激新思維的想法，也可以保持與國外一流大學研究單位的合作與聯繫。因此建議醫院提供二次短期出國進修的機會。

二、多單位的整合交流平台

一個優良的實驗，需要有個領域的專家，有需要有各種儀器設備，或是設計儀器設備，來符合實驗的目標。波士頓的確是所有高科技的集中之處，能提供各領域的專家，可以經過與專家討論，優化實驗設計，來達成目標。例如本實驗部分，RNA 領域有專家供諮詢，博士後研究員也會彼此討論，雖然我工作的實驗

室位於麻省總醫院，但是經常透過視訊，與 Dana-Fabab 癌症中心、哈佛醫學院、哈佛公衛學院，甚至是麻省理工學院等單位，進行交流討論。定序實驗室需要大數據分析，實驗的生物資訊分析，也是透過生物資訊專家分析，本實驗分別跟兩組生物資訊團隊合作，分別交由這兩組團隊分析。實驗分工非常精細，但是彼此也是配合的常緊密，造就強大的團隊。

個人建議多領域的整合，有其重要性。醫院如能提供平台，協助醫師執行實驗的時候，除了醫院與醫學院之外，有生物資訊專家，或是其他理工系所例如電子、化學工程、材料工程等領域專家的資訊，相信能使大家的研究，有更好的發展。

三、關於現行精準醫療

除了實驗室的研究案，我也前往醫院臨床分子基因檢驗參觀。與麻省總醫院的分子病理醫師討論，得知麻省總醫院提供院內癌症病人的基因檢驗。整個癌症分子基因檢驗實驗室包含兩層樓，分別處於 2 樓與 10 樓，空間動線設計規畫相當完整。麻省總醫院提供新診斷病人，一個小的 panel 大約包含 40 個癌症基因，幾乎都是與現行標靶藥物連結，新診斷病人可以經由該檢驗得知是否有標靶藥物可以使用，同時該檢驗是由機器人製備 library，可以快速提供基因診斷資訊。另外也提供大範圍多基因的檢驗給癌症病人，讓病人在需要的時候，能提供抗藥性機轉，可能的治療方向或是藥物，來幫助病人的精準治療。這些癌症基因檢驗的觀摩學習，對於本院的癌症基因檢驗，有極大的幫助。

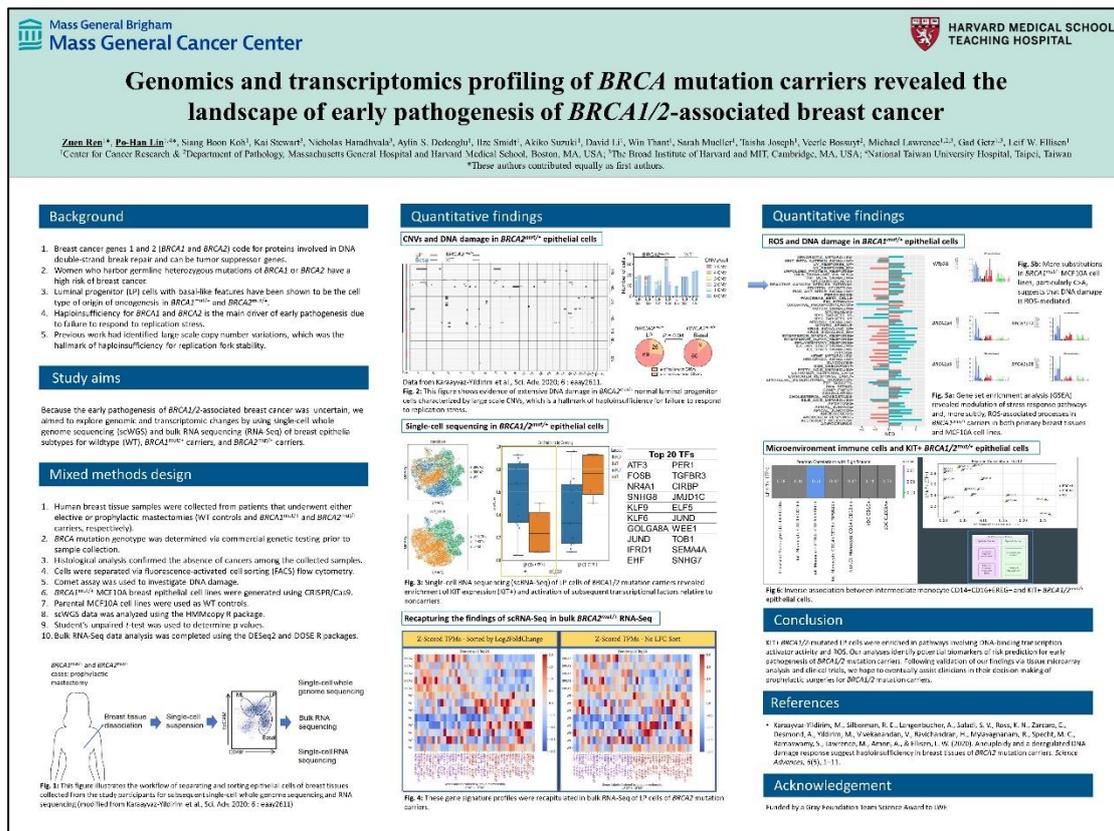
伍、附件資料

2023 AACR abstract and poster

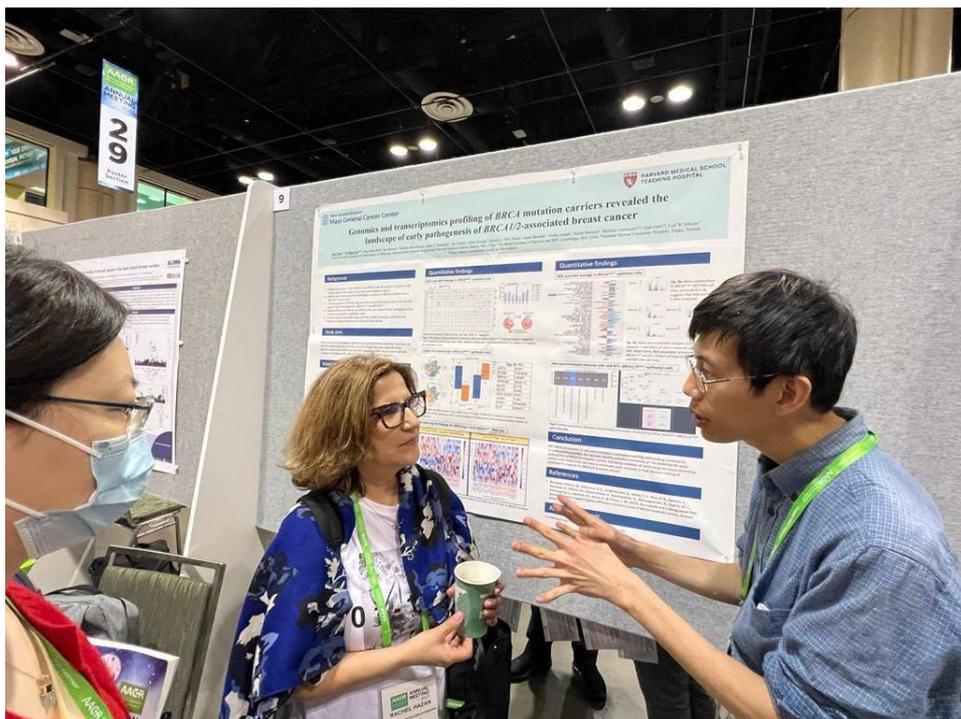
Genomics and transcriptomics profiling of BRCA mutation carriers revealed the landscape of early pathogenesis of BRCA1/2-associated breast cancer

Women who harbor germline heterozygous mutations of BRCA1 or BRCA2 have a high risk of breast cancer. Our previous study showed that patient-derived, ostensibly normal BRCA2mut/+ luminal progenitor (LP) cells are more prone to exhibit sub-chromosomal copy number variations and associated DNA damage relative to non-carriers potentially reflecting early breast tumorigenesis. The clinically assessable biomarkers for early pathological changes of BRCA1/2 mutation in LP cells remain unknown. Single-cell RNA sequencing (scRNAseq) of LP cells of BRCA1/2 mutation carriers revealed enrichment of KIT expression (KIT+) and subsequent transcriptional factor activations were observed in LP cells of BRCA1/2 mutation carriers relative to non-carriers. Moreover, overrepresented pathway analysis uncovered that KIT+

BRCA-mutated LP cells were enriched in pathways involving DNA binding transcription activator activity and oxidative phosphorylation. These gene signature profiles were recapitulated in bulk RNA-seq of BRCA2 mutation carrier LP cells. Collectively, our preliminary data suggest such analyses may identify potential biomarkers of the risk prediction for early pathogenesis of BRCA1/2 mutation carriers. Following validation of our findings via tissue microassay analysis and clinical trials, we hope to eventually assist clinicians in their decision making of prophylactic surgeries for BRCA1/2 mutation carriers.



2023 AACR 的 poster

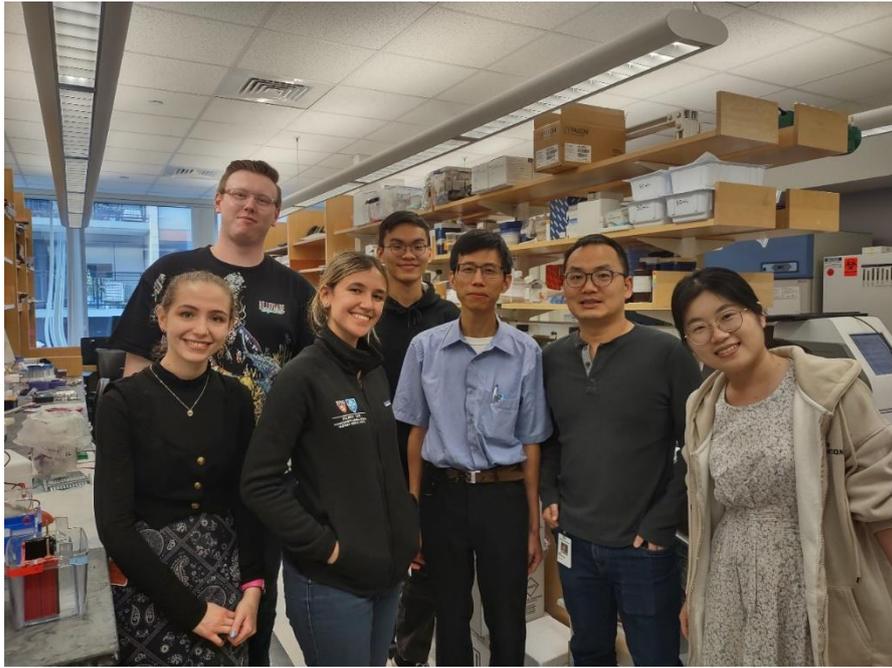


在 2023 AACR 會場，與來自紐約愛因斯坦醫學院的教授討論 BRCA 的研究

實驗室照片



我與 Dr. Ellisen 教授合影



與實驗室博士後研究員和研究助理合影。



實驗室 outing 合影