

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：多層オミックス解析による、がん、精神疾患、腎疾患を対象とした医療技術開発

Medical technology development for cancer, mental illness, and kidney disease based on multi-layered omics analysis.

研究開発実施期間：2015年12月18日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名：清水 孝雄

Takao Shimizu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立研究開発法人国立国際医療研究センター 研究所 前研究所長 脂質シグナリングプロジェクト長

Previous Executive Director, Project Leader, Department of Lipid Signaling, National Center for Global Health and Medicine,

II 研究開発の概要

革新的創薬と治療効果予測のバイオマーカー探索は、現代の医療の大きな課題である。本研究開発課題は、製薬企業の持つ開発能力及び創薬ノウハウと、アカデミアが持つ良質な臨床試料・医療情報や、医療・医学における専門分野の経験知、さらに先進的なオミックス解析技術などを、AMED 発の本格的な産学官共同研究プロジェクトとして統合する試みである。その特徴として、「アカデミックと企業ニーズのマッチング」「研究企画段階からの企業参画」「最先端技術を取り入れた、臨床試料の多層オミックス解析」「企業戦略の機密性に配慮したうえで、アカデミアの全体会議で科学的な情報共有」「ハイブリット型予算による大型予算の確保 (AMED/企業)」などがある。

研究開発代表者は、5つの疾患プロジェクトを統合し、共同研究契約の枠組みの整備、全治班会議の開催、疾患解析会議への参加、企業との意見交換など、各研究の推進を支援し、また成果を最大化するために予算の一部を弾力的に配分した。それぞれのプロジェクトは以下に示すように大きな成果を得て、FIH(first-in-human)試験への足がかりも得たが、多企業が加わり、統合的に運営する産学官プロジェクトの長所と問題も新たに浮彫りとなった。

疾患1：多層オミックスデータベース構築による腫瘍免疫システムの解明と医薬品開発への応用

(国立がん研究センター、中外製薬株式会社)

肺がん・膵がんの外科切除標本を得て、がん組織の多層オミックス解析・免疫解析に基づく、がん免疫微小環境の分子機序の解明とそれに基づく新たな免疫療法のシーズの探索に取り組んだ。本研究のために、国立がん研究センター内に企業のオンサイトラボも設置され本研究に活用された。

肺がん 222 例と膵がん 31 例の外科切除標本（腫瘍と正常組織）を収集し、腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の免疫プロファイル解析、RNA-Seq 解析、全エクソーム解析、親水性メタボローム解析、T 細胞受容体 (TCR) レパートア解析を実施し、臨床病理情報を加えた統合データベースを構築した。ついで、このデータベースを用いて肺がんの免疫微小環境の分子基盤の解明を進め、TIL を用いた肺がんの新たな免疫学的分類を提唱した。

また、膵がんの免疫抑制環境構築に重要な役割を果たしている特定のサイトカインを見出し、国立がん研究センター東病院肝胆膵内科と共同して、化学療法不応性の膵がんを対象に当該サイトカインを標的とする医師主導臨床試験を 10 名の患者に実施した。

疾患 2：臨床試料に基づくがん免疫療法剤の評価システムの構築とその応用

（国立がん研究センター、小野薬品工業株式会社）

本疾患領域では、胃がんや卵巣がんの腹水を用いた多色 FCM やアレイ解析を行うと共に、Ex vivo 免疫応答評価系の構築やニボルマブ投与患者の前向き臨床研究とオミックス解析を行った。その結果、IFN γ 応答遺伝子群が高い症例でニボルマブの効果が期待できる可能性や、PD-1、TIGIT、TIM3 の抗体併用療法の重要性などを示唆した。国立がん研究センター内の企業のオンサイトラボが、研究遂行に有効に活用された。

43 症例の腹水中胃がん細胞と 258 症例の外科切除組織のマイクロアレイデータから、CD274 (PD-L1) mRNA を高発現する症例は双方共通の腫瘍免疫関連遺伝子セットを発現していた。がん細胞と T 細胞を混合培養した時の、T 細胞のがん細胞傷害活性は、がん細胞における腫瘍免疫関連遺伝子セットの発現量と相関しており、Ex vivo 免疫応答評価系の構築に成功した。ニボルマブおよび抗 TIGIT 抗体の併用で効果が期待できる症例について、これらの症例の検体を利用した Ex vivo 免疫応答評価系で、併用効果を確認できた。腹水沈渣を凍結、解凍後のがん細胞と T 細胞でも Ex vivo 免疫応答評価系は働くため、「腹水細胞バンク」構築の有用性を示すことが出来た。

ニボルマブ反応例の治療前生検では、腫瘍免疫関連遺伝子セットが高発現しており、腫瘍免疫が活性化しているものと判定された。19 種の胃がん初代培養細胞株への IFN γ 添加実験によって、新規 IFN γ 誘導遺伝子を数 100 種同定した。さらに、これらの遺伝子の発現を指標にした腫瘍免疫の活性度を判定する方法を開発し、胃がん 60 例の腹水中がん細胞では 8 例 (13%) が高値を示した。65 症例の胃がん患者腹水から樹立した初代培養細胞株のゲノム、トランスクリプトーム統合解析から、約 70% の症例が既存の分子標的薬の対象となり得ることを発見した。

疾患 3：微小環境の解析に基づく新規抗がん剤の開発

（国立がん研究センター、エーザイ株式会社）

新規抗がん剤開発に資する *in vitro* / *in vivo* モデルの構築、および、エーザイ株式会社から供与された新規抗がん剤候補物質の反応性評価に関連した、多層的オミックスデータベースを構築した。具体的には、スフェロイド / オルガノイド、PDX (Patient-derived xenograft) の樹立に用いた大腸がん組織に対する、NCC (国立がん研究センター) オンコパネルを用いる遺伝子変異解析、Infinium アレイを用いる DNA メチル化解析、Agilent 社の DNA マイクロアレイを用いる遺伝子発現解析を行った。*In vitro* / *in vivo* モデルを用いる候補物質の反応性解析では、更に RNA-seq、2D-ICAL および親水性メタボローム解析を行った。新規候補物質は WNT シグナル経路に対する作用を有し、その反応性評価に用いた *in vitro* / *in vivo* モデルについては、WNT 関連遺伝子以外のドライバー遺伝子変異がある症例及びない症例由来の両者を選択した。オミックス解析結果の包括的評価により、新規抗がん剤候補物質の PD (薬力学的) バイオマーカーあるいは奏効性 / 抵抗性に関連するバイオマーカー候補を 5 分子以上見出した。エーザイ化合物の企業治験の付随研究におけるバイオマーカー候補の検証も計画している。

疾患4 精神疾患の治療標的分子の同定と新たな治療法開発

(国立精神・神経医療研究センター、第一三共株式会社)

本研究の第一の目的は、精神疾患患者（統合失調症、大うつ病性障害、双極性障害）と健常者の脳脊髄液・血液等バイオリソースを前向きに収集し、多層オミックス解析を行い、精神疾患の脳内分子病態を解明することにある。国立精神・神経医療研究センターにおいて、これらの精神疾患患者および健常者に対して研究目的の腰椎穿刺を当該研究期間に534件行い、既存試料と合わせて脳脊髄液試料は累計1305検体となった。同時にゲノムDNA・血漿・血清を含む血液試料も収集した。これらの生物試料には症状評価スコア、服薬状況などの詳細な臨床情報が紐づけされている。これらの試料をゲノム、プロテオーム、メタボローム（親水性、疎水性）、メチローム、mRNAトランスクリプトームによる多層オミックス解析を行い（延べ3263件）、合計8億以上のデータが収集された。その結果、多数の精神疾患バイオマーカー／創薬標的分子候補を見出した。脳脊髄液からみた脳内分子の相互関連について、本研究のような詳細な検討はいまだに世界的に例をみない。

第二に、連携企業である第一三共が新しい向精神薬として開発中の化合物やその標的分子の薬理的検討を行い、標的分子の活性化がニューロンの突起伸長を促すことを明らかにするなど、向精神作用をもつことを支持する有力な所見を得た。

疾患5：糖尿病腎症の疾患標的分子の探索と重症化予防を目指した新規治療法、診断法の構築

(国立国際医療研究センター、国立病院機構千葉東病院、アステラス製薬株式会社、協和キリン株式会社)

腎組織のオミックス解析を中心とするパネル1研究では、国立病院機構千葉東病院に通院し、確定診断・治療法選択上等の必要性から腎生検を受けた慢性腎臓病(CKD)患者のうち、病理診断にて糖尿病性腎症(DMN)等の診断がついた106症例をこれまでに登録した。登録症例については試料、臨床検査情報、ならびにDMN病理組織分類等の病理学的指標を収集した。一方、検証用パネル2研究では2016～2017年度に登録した2型糖尿病患者301名を対象に2年度目の収集を実施し、除外対象者118名を除く183名からの試料、および情報を収集した。

パネル1研究における腎組織検体のエピゲノム解析、ならびにトランスクリプトーム解析ではDMNと非糖尿病性CKDの比較によりDMNに特徴的なDNAメチル化プロファイルを明らかにした。さらに臨床情報を加味した統計解析や両解析データの統合解析にてDMNの病態機序解明を試みた。

親水性、ならびに疎水性メタボローム拠点ではパネル1研究における血液および尿検体の親水性、ならびに疎水性メタボローム解析を実施した。DMNと非糖尿病性CKDの比較によりDMNに特徴的な代謝物の探索を行い、同定された一部の代謝物についてはパネル2検体を用いて腎機能推移との関連についても検討した。

プロテオーム解析本研究開発計画にて確立したサンプル調製法を用いパネル1研究試料についてLC-MS/MSデータを取得した。2DICAL法とSWATH法の比較定量解析にてDMN群とCKD群との比較によりDMNを特徴づける尿中マーカー探索を実施した。

This is a new type of industry-academia-public fund collaboration project directed toward innovative drug discovery and establishment of predictive biomarkers of efficacy and safety, which are critical issues of modern medicine. Development capability and know-hows of drug discovery from industry; clinical samples and information of high quality, profound knowledge and expertise of diseases, and multi-layered omics analytical platforms from academia; and the management of different disease projects by AMED (government-sponsored funding agency). Various unique features are: matching schemes between academia and industry, the involvement of industry from the planning stage of each project, multi-layered omics analysis of clinical samples by cutting-edge technologies, academic data sharing with full care of industry's credit, and the hybrid-type large-scale budget. The project leader with the help of two chief coordinators integrated five disease projects and eight core laboratories, and encouraged each project to yield maximal results. The major accomplishments of each project are listed below. We also found a lot of issues and "gaps" to be addressed in such a new project.

Disease 1: Cancer (National Cancer Center; Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.)

In order to elucidate the molecular basis of tumor immunological microenvironment (TME), National Cancer Center and Chugai Pharmaceutical Co., Ltd cooperatively constructed the original integrated database of TIL, omics analyses and clinico-pathological information using surgical specimens from 222 lung cancer and 31 pancreatic cancer patients. On the basis of this database, we demonstrated that lung cancer was immunologically categorized into several types. Furthermore, one specific cytokine which constructed immune-suppressive TME was identified in pancreatic cancer, which has led to an investigator-initiated clinical trial of the cytokine inhibitor.

Disease 2: Cancer (National Cancer Center; Ono Pharmaceutical Co., Ltd.)

In this disease area, we performed cell surface marker analyses by multicolor FCM (flow cytometry) and gene expression analysis using cells derived from the ascites of gastric and ovarian cancer patients. We developed *ex vivo* immune-response evaluation system based on fresh clinical samples, and performed prospective omics analysis of patients treated with nivolumab. As a result, we successfully demonstrated that cases with high levels of expression of IFN γ -responsive genes were suggested to be sensitive to nivolumab, and also found the importance of combination therapy of anti-PD-1, anti-TIGIT, or anti-TIM-3 antibody.

Disease 3: Cancer (National Cancer Center; Eisai Co., Ltd.)

Spheroids / organoids and PDX (Patient-derived xenograft) were established from surgical specimens of colorectal cancers, and an anti-cancer drug under development (provided from Eisai Co., Ltd.) was evaluated using the established models. Genotypes/phenotypes of the original cancer tissues as well as effects of the drug to the *in vitro* / *in vivo* models were characterized by various omics technologies, e.g., NCC oncopanels, Infinium methylationEPIC BeadChip, Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression, RNA-sequencing, 2DICAL and hydrophilic metabolome analysis. For evaluation of the anti-cancer drug, which affects the Wnt signaling pathway, *in vitro* / *in vivo* models derived from cases with and without other driver mutation(s) than Wnt-related genes were selected. Comprehensive analysis using the multi-layered omics data revealed at least 5 candidate PD biomarkers and efficacy/resistance-related biomarkers. We are now planning an accompanying research of corporate clinical trial for the drug candidate, with the aim of validation of the biomarkers.

Disease 4: Psychiatric disorders (National Center of Neurology and Psychiatry; Daiichi-Sankyo Co., Ltd.)

The first aim of the study was to reveal molecular pathology of psychiatric disorders, including schizophrenia, major depressive disorder, and bipolar disorder. To this end, we collected cerebrospinal fluid (CSF) together with blood sample from psychiatric patients and healthy controls, and performed multi-layered omics analyses (genome, proteome, metabolome, methylome, and transcriptome on mRNA). We collected 534 CSF samples during the study period and obtained a total of more than 800 million omics data. Detailed clinical information was also obtained. As a result, we detected promising candidate molecules for biomarker or drug target of the psychiatric disorders. Another aim of the study was to explore actions of candidate chemical compounds provided by Daiichi-Sankyo Co., Ltd. We obtained several lines of evidence that the compounds have a neurite outgrowth-facilitating effect in cultured cortical neurons, suggesting their possible psychotropic efficacy.

Disease 5: Diabetic nephropathy (National Center for Global Health and Medicine, National Hospital Organization Chiba-Higashi National Hospital; Astellas Pharma Inc, Kyowa Kirin Co., Ltd.):

In this study, 106 patients with chronic kidney disease (CKD) who underwent renal biopsy due to the need for definitive diagnosis and treatment were enrolled in the NHO Chiba-Higashi National Hospital, and renal biopsy specimens, plasma and urine were collected (Panel 1 cohort study). As a Panel 2 cohort study, 301 patients with type 2 diabetes mellitus were enrolled, and plasma and urine were also collected once a year from 2016 to 2020. We performed DNA methylation profiling using renal biopsy specimens from Panel 1, and analyzed the differences in methylation variable positions between diabetic nephropathy (DMN) and non-diabetic CKD patients. We also performed transcriptome analysis using renal biopsy specimens and identified differentially expressed genes in the kidney of DMN patients. For metabolome and proteome analyses, we analyzed plasma and/or urine of subjects from Panel 1. We identified differentially excreted metabolites in DMN patients, and also found that some metabolites were associated with a decline in renal function of DMN patients in Panel 2 validation cohort.