

創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

研究開発課題名	抗 PD-1 抗体治療患者における個別免疫担当細胞レベルにおける免疫応答の解析研究
代表機関名	国立研究開発法人国立がん研究センター
職名	副院長・先端医療科長
研究開発代表者名	土井 俊彦
全研究開発期間	平成 28 年度～令和 2 年度

1. 研究開発成果

免疫チェックポイント(IC)阻害剤(抗 PD-1 抗体含む)に対する作用解析は、腫瘍における不均一性のため(がん細胞、免疫担当細胞ともに)、細胞集団での解析の限界が存在する。IC 剤投与前後患者組織の1細胞 RNA シークエンス解析(single-cell RNA-sequence: scRNAseq) プロファイル基盤を用いた reverse-translational(RT)研究を行い、新規創薬、治療開発を目指すことが本研究の目的である。生検組織検体(主に内視鏡生検)に応用可能な scRNAseq 技術基盤(Chromium(10x)、BD Rhapsody システムリース)を構築し、進行胃がん、食道がん患者を対象に、抗 PD1 抗体投与前後の組織で、scRNAseq を測定する。臨床データおよび scRNAseq raw data および解析データ、免疫モニタリングデータにてデータパッケージを作成し、参画した 3 企業に raw data とともに共有する。参画した 3 企業は、competitive に各社のパイプライン構築、臨床開発に利用し、国内治験(特に FIH)の早期開始を試みる。特に抵抗症例に対する IC 阻害剤の最適化に基づかない新たなクラス薬剤の開発を促進することを目標とする。国立がん研究センターにおいては、これらのデータを用いてあらたな TR 研究、医師主導治験の企画や選別を行う。

scRNAseq の手法の validation としてを実際の臨床検体(生検レベル)を用いてシステムを検証した。続いて胃癌手術検体を用いて分散方法を検討した。まず免疫細胞と非免疫細胞を分離する方法を検討した。ビーズを用いた MACS 法や FACS Aria を用いたソートを試みたが、赤血球の混入が問題となり非免疫細胞の収率が低く、かつ scRNAseq 施行時に問題となる凝集が解決できず断念した。酵素処理のための種類や配合の検討、mixing の条件を検討し、免疫細胞と非免疫細胞を分離することに成功し、凝集もなく。検出遺伝子数は 1500-2000 程度、免疫細胞、腫瘍細胞、血管内細胞など各分画にクラスタリングが可能であり、腫瘍組織、生検検体(1 欠片数 mm)で検出遺伝子数は 1500-2000 程度と手術検体と同等の結果であり、生検検体を用いても scRNAseq の測定を可能にする技術を確認した。

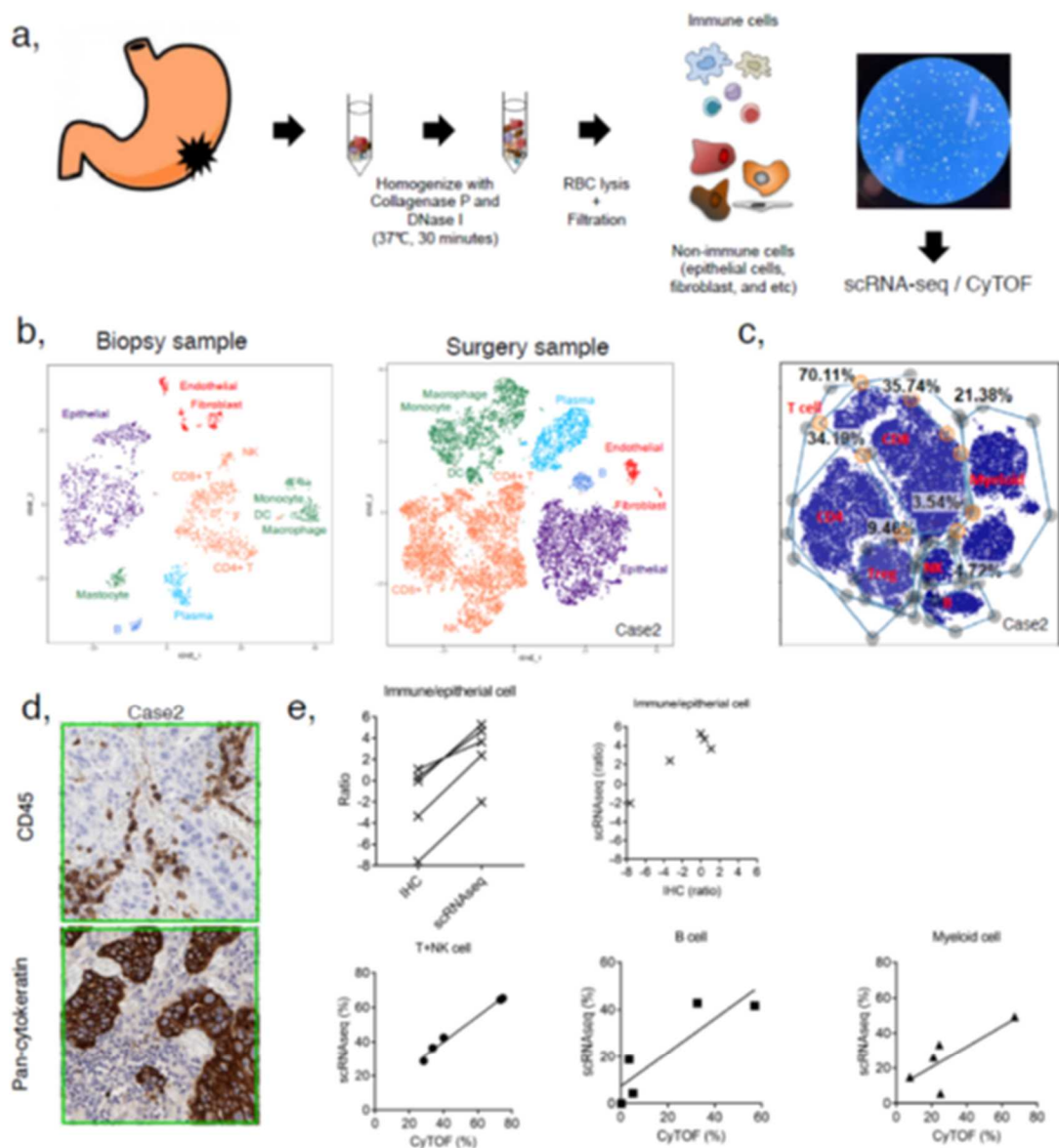
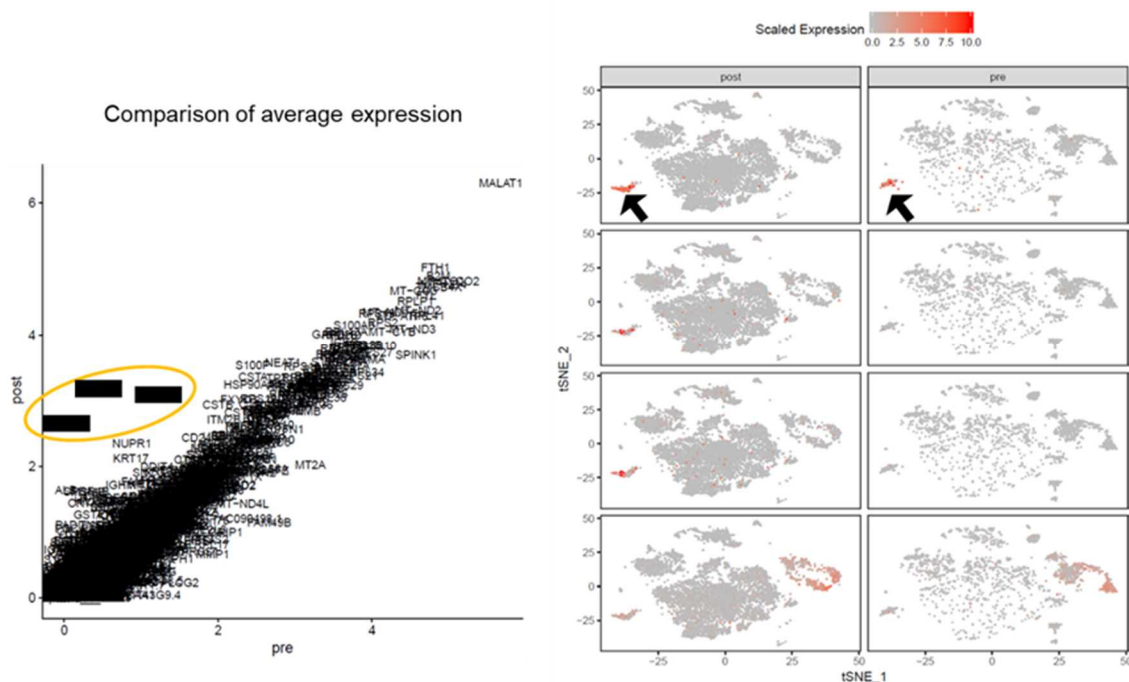


Fig2, Comparison of scRNA-seq, CyTOF and IHC using tumor
 (a) Schematic of biopsy sample processing of cell isolation (b), Comparison of biopsy (left) and surgery (right) sample using scRNA-seq. The t-SNE plots are shown. (c), Clustering based on CyTOF dataset. (d) IHC staining with antibodies specific for CD45 and Pan-cytokeratin. (e), Comparison of three methods based on cell component. IHC v.s. scRNA-seq (top) and scRNA-seq v.s. CyTOF (bottom).

AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Boston, USA, October 26-30, 2019

13 例の胃がん患者の内視鏡組織検体及び PBMC 検体で、抗 PD-1 抗体治療前後の scRNA-seq データの取得が完了した (PR1 例、SD1 例、PD11 例)。通常の解析では注目されないような B 細胞や形質細胞も腫瘍に多く浸潤し PD-1 といったチェックポイント分子を発現していることや、腫

瘍浸潤制御性 T 細胞が複数の詳細分画に分かれ、その中にも従来は注目されていない炎症性制御性 T 細胞や増殖性制御性 T 細胞などが存在することなど臨床検体における新規知見が見つかった。腫瘍細胞においては、細胞周期関連因子など特徴的な表現形質を持つ細胞集団も確認できた。また、線維芽細胞や血管内皮細胞など、がん微小環境を構成する細胞集団もクラスタリングできているため、抗 PD-1 抗体投与に反応する複数の細胞集団のダイナミクスやネットワークを調べる上で、単剤のデータが取れたことは大きな意義を持つと考えられる。



抗 PD - 1 投与後投与前後の遺伝子動態で特徴的な遺伝子と細胞群が存在する

食道がん患者に対しても、胃がんと同様に、手術、生検検体での scRNAseq の解析が可能か否かについて検討を行った。基礎検討として食道がん患者ののべ 46 生検検体について、情報解析を用いた各クラスターのサブ集団解析を進めた。4 検体の平均リード数、平均細胞数、平均リード数/細胞数は、それぞれ 4.7×10^8 、 3.5×10^3 、 1.4×10^5 であった。ミトコンドリア DNA 含む死細胞を除去するなどフィルターをかけ、最終的には 7687 細胞のデータを情報解析に使用した。クラスタリング解析の結果、「2843 細胞からなる癌細胞集団」や「1656 細胞からなる CD8+T 細胞集団」などを含む種々の分画に明確にクラスタリングできることが確認できた。現在、抗 PD1 抗体投与前後の組織についても 1 症例ではあるが検体は採取できている。初発での原発巣と壁内転移巣での遺伝子発現プロファイルの予備比較解析を行ったところ、壁内転移巣の腫瘍細胞では上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) が促進している傾向、一方で原発巣の免疫細胞では CD8+T 細胞の疲弊化がより促進している傾向が観察された。このことから、新規技術での治療戦略で国内での FIH を並走して行うことになった。

各企業は、これらのデータおよび臨床データ並びに当院のインハウスの研究データを加えたデータパッケージを共有し、免疫チェックポイントを標的としないパイプラインを治験実施を行っている

(FIH 3 試験ほか)。今後、構築された基盤で TR 研究を実施する予定である。同時に、我々も、医師主導治験の実施(5 試験)においてこれらの基盤結果を利用することで開発リスクの軽減、TR の充実を行っている。

本研究基盤終了後も、参画企業 2 企業と別途共同研究を継続するほか、データの再解析を企業治験で行っていく予定である。

内視鏡生検組織を用いての高品質の 1 細胞化および Chromium(10x)のシステムでの scRNAseq 解析手法が、確立したことは企業の前臨床および治験 TR へ組み込む結果となり、競合会社との TR における優位点となった。これらの結果は、すでに胃がん組織を用いた基礎検討として発表並びに論文化し公表済みである。

Single-cell RNA sequencing (scRNAseq) provides the expression profile of individual cells. Through gene clustering analyses in immune monitoring for immune checkpoint therapy including anti-PD1 therapy, a small fraction of immune cell types can be identified. Single-cell RNA sequencing on a large number of single cells can also reveal the copy-number distribution of the whole mRNA population in individual cells. Thereby making characterization of the subpopulation structure of a heterogeneous immune cell and cancer cell population become available. Our task of this project is to make the drug discovery, matching/extracting from drug library from collaborating pharmaceutical companies, by using/sharing scRNAseq data from clinical immune monitoring in anti-PD-1 therapy for cancer patients.

We prepared the scRNAseq analysis system in National Cancer Center Hospital East collaborating with pharmaceutical companies. Preliminary/pilot analysis for scRNA-seq using Chromium system (10x Genomics) and BD Rhapsody(BD) were tested, and it showed in a cell line and PBMC, populations have been clustered by key gens (CD3, CD8, etc). After confirming the pilot procedures in the scRNAseq device, surgical samples from gastric cancer and esophageal were evaluated. Our key processes for scRNAseq are 1)Method for single-cell isolation was optimized for gastric cancer sample 2)Reveal the profile of each sample by three methods 3)Compare biopsy and surgery sample using scRNAseq based on cell component 3)Compare IHC and scRNA-seq based on cell component 4)Compare scRNAseq and CyTOF based on cell component. Even in preliminary data, several candidates for“new concept”were speculated , these helped to promote new drug developments.

Based on preceding experience, we evaluated clinical samples of advanced gastric/esophagus cancer patients who were treated by post marketing anti-PD1 antibody. Residual Pre/post endoscopic biopsies for practical diagnosis were used, and evaluated by scRNAseq methods. After applying integrative computational approaches, graph-based clustering and non-linear dimensional reduction was performed.

Immunostainings of the indicated markers were also performed to validate the transcriptomic findings.

Collected cells were subjected to scRNA-seq analysis after quality control. Graph-based clustering analysis demonstrated a number of cell clusters in TME components, covering a broad range of cellular populations; epithelial cells, immune cells (T cells, B cell, macrophage, etc.), fibroblasts, endothelial cells, and others. Immune cells were sub-classified into precise/specific populations and showed new profiling of suppressor cells. Furthermore, the subcluster analysis in the malignant epithelial/stromal cells identified the heterogeneous cancer subpopulations, which are characterized by the enriched gene sets such as DNA repair, G2/M cell-cycle checkpoint, oxidative phosphorylation, and epithelial–mesenchymal transition. More interestingly, the subpopulation spectrums in the epithelial cells were distinct between the untreated and the post-treatment specimens, suggesting the heterogeneous cancer populations could be dynamically changed or not-changed in response to immune checkpoint inhibitors. These result and raw data were shared with collaborating companies, and companies has promoted and accelerated to start/conduct clinical trials and TR study with us.

2. 総合評価

優れている

【評価コメント】

COVID-19 などの影響により臨床研究では十分な症例数が得られなかったが、抗 PD-1 抗体投与前後の患者検体の scRNAseq 解析基盤プラットフォームを構築し、抗 PD-1 抗体に反応する複数の細胞集団のダイナミクスやネットワークを解明した。また、複数の参画企業と連携して、解析結果を創薬に活かしている点も大いに評価できる。

今後、各参画企業とも連携しながら、本プラットフォームを活用した創薬や治療方法の開発に貢献することを期待する。

以上