

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 創薬基盤推進研究事業
(英語) Research on Development of New Drugs

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Single cell analysis of immune response in cancer patient during antiPD-1 antibody therapy.

研究開発担当者： (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院 副院長・先端医療科長
土井俊彦

所属 役職 氏名： (英語) National Cancer Center Hospital East Deputy Director Experimental Therapeutics Chief Toshihiko Doi

実施期間： 平成 29 年 1 月 10 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 臨床研究支援体制の構築
開発課題名： (英語) Management of Clinical trial

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院 臨床研究支援部門長
佐藤暁洋

所属 役職 氏名： (英語) Chief, Office of Clinical Research Support, National Cancer Center Hospital East. Akihiro Sato

分担研究 (日本語) 免疫チェックポイント阻害剤投与患者の 1 細胞免疫解析の実務
開発課題名： (英語) Single cells analyses of patients treated with immune checkpoint inhibitors

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター先端医療開発センター免疫 TR 分野
分野長 西川博嘉

所属 役職 氏名 : (英 語) Director, Division of Cancer Immunology,
Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center (EPOC),
National Cancer Center Hiroyoshi Nisihikawa

分担研究 (日本語) 生検組織検体に応用可能な scRNAseq (単一細胞 RNA シークエンス) 技術基
盤構築

開発課題名 : (英 語) Development and improvement of the procedure of scRNAseq (single
cell RNA sequence) technology for biopsy samples

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター先端医療開発センター ゲノムトラ
ンスレーショナルリサーチ分野 分野長 土原一哉

所属 役職 氏名 : (英 語) Katsuya Tsuchihara, Chief, Division of Translational Genomics,
Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center, National
Cancer Center

分担研究 (日本語) 組織採取の実務

開発課題名 : (英 語) Developing the system of endoscopic target biopsy for GI cancer

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院 消化管内視鏡科長
矢野友規

所属 役職 氏名 : (英 語) National Cancer Center Hospital East Department of Gastroenterology
and Endoscopy, Chief Tomonori Yano

分担研究 (日本語) 病理診断・ゲノム解析の実施

開発課題名 : (英 語) Pathological and genomic analysis

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院 病理・臨床検査科 科長
桑田健

所属 役職 氏名 : (英 語) Department of Pathology and Clinical Laboratories, National Cancer
Center Hospital East. Chief. Takeshi Kuwata

分担研究 (日本語) 介入臨床研究の立案・実施の責務

開発課題名 : (英 語) Planning and conducting of clinical research for tumor sampling

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院 消化管内科 医員
設楽紘平

所属 役職 氏名 : (英 語) National Cancer Center Hospital East Gastrointestinal Oncology /
Staff Kohei Shitara

分担研究 (日本語) 介入臨床研究の立案・実施の責務
開発課題名: (英語) Planning and management of clinical trial

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院 先端医療科 科長
山本昇
所属 役職 氏名: (英語) Chief, Department of Experimental Therapeutics, National Cancer
Center Hospital Noboru Yamamoto

分担研究 (日本語) 介入臨床研究の立案・実施の責務
開発課題名: (英語) Planning and conduct of interventional clinical research

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院 消化管内科 科長
吉野孝之
所属 役職 氏名: (英語) National Cancer Center Hospital East Chief Takayuki Yoshino

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

和文

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、腫瘍においての不均一性のため（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。本年度の目的と成果は、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)システムリリース）を構築することである。

初年度での実施成果の要約

1 細胞 RNA シークエンス解析（single-cell RNA-sequence: scRNAseq）について、機器リリースを行い、1 細胞 RNA シークエンス解析の準備実験を行った。4 検体（細胞株 1 検体、末梢血単核球 3 検体）を解析し、既報と同様のデータを取得することができたことから、臨床検体へ移行することは可能と判断した。同時に、臨床検体を採取・利用するため、研究実施計画書の IRB 対応、Electric Data Capturing (EDC) System の構築などの体制の構築、参画している 3 社の企業の連携体制を整備した。

成果の具体的内容

- ・ 1 細胞 RNA シークエンス解析（single-cell RNA-sequence: scRNAseq）

Multi-color flow-cytometry や CyTOF といった従来からよく使用されてきた 1 細胞レベルでの免疫細胞解析に関して腫瘍浸潤リンパ球で取り組み、解析方法を確立させた。具体的には、10x Genomics 社 Chromium システムを用いた scRNAseq 解析システムをもちいて 4 検体（細胞株 1 検体、末梢血単核球 3 検体）を解析した。末梢血単核球 (PBMC) および培養細胞について、それぞれ 6000-10000 個の細胞をターゲットに、Chromium システムを用いて各 1 細胞の RNA 抽出および cDNA 合成をおこない、scRNAseq のライブラリを調製した。Illumina 社の HiSeq システムでシークエンス解析を行った結果、サンプルあたり約 1 億リードが得られた。得られたシークエンスデータは 10x Genomics 社が配布する解析パイプライン Cell Ranger を用いて解析を行った。検出遺伝子数は、培養細胞では細胞あたり 2000 個程度であった。公開データから想定したとおり、PBMC では細胞あたりの検出遺伝子数が 1000 個未満と少なかったが、10x Genomics 社が配布する解析ソフトウェア Loupe Cell Browser を用いて細胞のクラスタリング結果を可視化したところ、異なる遺伝子発現パターンを有する複数の細胞グループを確認することができた。結果、免疫細胞では 100M 程度のリードで 1 細胞あたり 50K 弱、検出遺伝子数が 600-800 程度と細胞株に比較すると少なめであったが CD3 や CD8 といった遺伝子である程度はクラスタリングできていることが確認でき、手法としての有用性が確認された。

- ・ 解析研究のための基盤整備

次年度の臨床検体を用いた解析を行うことを目的として、胃癌患者を対象として生検組織残余検体を免疫解析研究に用いることを目的とした臨床研究プロトコルを作成し、倫理委員会の承認を得た。臨床、病理、臨床研究支援部門の SOP を整備した。同時に、進捗管理のためワーキンググループわけを行い、定期的な web 会議を開始した。また、3 企業および研究実施施設としての共同研究契約をかわした。

英文

Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) provides the expression profile of individual cells. Through genes clustering analyses in immune monitoring for immune checkpoint therapy including anti-PD1 therapy, 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 scRNA-seq data from clinical immune monitoring in anti-PD-1 therapy for cancer patient.

Summary

We prepared and introduced the scRNA-seq analysis system in National Cancer Center Hospital East collaborating with pharmaceutical companies in this year. Preliminary/pilot analysis for scRNA-seq using Chromium system (10x Genomics) were analyzed in four samples (1 cell line and 3 peripheral blood mononuclear cell; PBMC) and it was possible in both a cell line and PBMC. Populations have been clustered by key gens (CD3, CD8, and etc), indicating that this was a reasonable method for single cell RNA sequencing in immune cells. By those, we would move to start to analyze clinical samples. We also got approval by IRB for immune monitoring and getting clinical tissues and also established EDC system. And we contracted 3 pharmaceutical companies (Takeda, Daiichi-Sankyo, Astellas co) for collaboration.

Specify to result

• Single cell RNA sequencing

For analysis of immune response in patients treated with anti-PD-1 antibody, we aimed to establish the base of single cell analyses for immune cells. We have worked on multi-color flow-cytometry and CyTOF for tumor infiltrating lymphocyte analyses, resulting in establishment of techniques. Chromium system (10x Genomics) was introduced to National Cancer Center Hospital East and pilot scRNAseq analysis was performed. At first, using it, four samples (1 cell line and 3 peripheral blood mononuclear cell; PBMC) were analyzed,

The total read counts were 100,000,000, read counts per single cell were less than 5,000, and detected genes were 600-800 in PBMC, which was smaller compared to a cell line but was similar to previously reported data. Visualization of the clusters of the cells using Loupe Cell Browser (10x Genomics) identified several unique cell groups with different expression patterns (CD3, CD8, and etc.), indicating that this was a reasonable method for single cell RNA sequencing in immune cells.

• Establish for Infrastructure

For next study using clinical samples from cancer patients, we got approval (due to amendment) of immune monitoring research by IRB, and collaborated with Endoscopic, Pathology, Research unit. Also we prepared and established SOP based on protocol. We contracted regarding as collaboration project with three pharmaceutical companies.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）

1. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, Maeda Y, Hamaguchi M, Ohkura N, Sato E, Nagase H, Nishimura J, Yamamoto H, Takiguchi S, Tanoue T, Suda W, Morita H, Hattori M, Honda K, Mori M, Doki Y and Sakaguchi S.: Two FOXP3⁺CD4⁺ T-cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med.* 22(6):679-684 2016 (Corresponding Author).
2. Nagase H, Takeoka T, Urakawa S, Morimoto-Okazawa A, Kawashima A, Iwahori K, Takiguchi S, Nishikawa H, Sato E, Sakaguchi S, Mori M, Doki Y, Wada H.: ICOS⁺ Foxp3⁺ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer.* 2017 Feb 1;140(3):686-695.
3. Kakihana K, Fujioka Y, Suda W, Najima Y, Kuwata G, Sasajima S, Mimura I, Morita H, Sugiyama D, Nishikawa H, Hattori M, Hino Y, Ikegawa S, Yamamoto K, Toya T, Doki N, Koizumi K, Honda K, Ohashi K.: Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant/dependent acute graft-versus-host disease of the gut. *Blood.* 2016 Jul 26. [Epub ahead of print]
4. Haseda F, Imagawa A, Nishikawa H, Mitsui S, Tsutsumi C, Fujisawa R, Sano H, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Sakaguchi S, Hanafusa T.: Antibody to CMRF35-Like Molecule 2, CD300e A Novel Biomarker Detected in Patients with Fulminant Type 1 Diabetes. *PLoS One.* Aug 11;11(8):e0160576 2016.
5. Ureshino H, Shindo T, Nishikawa H, Watanabe N, Watanabe E, Satoh N, Kitaura K, Kitamura H, Doi K, Nagase K, Kimura H, Samukawa M, Kusunoki S, Miyahara M, Shin-I T, Suzuki R, Sakaguchi S, Kimura S.: Effector Regulatory T Cells Reflect the Equilibrium between Antitumor Immunity and Autoimmunity in Adult T-cell Leukemia. *Cancer Immunol Res.* 4(8):644-649 2016.
6. Hayakawa Y, Kawada M, Nishikawa H, Ochiya T, Saya H, Seimiya H, Yao R, Hayashi M, Kai C, Matsuda A, Naoe T, Ohtsu A, Okazaki T, Saji H, Sata M, Sugimura H, Sugiyama Y, Toi M, Irimura T.: Report on the use of non-clinical studies in the regulatory evaluation of oncology drugs. *Cancer Sci.* 107(2):189-202 2016.
7. Takeuchi Y, Nishikawa H.: Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol.* 2016 28(8):401-409 2016 (Corresponding Author).
8. Takeoka T, Nagase H, Kurose K, Ohue Y, Yamasaki M, Takiguchi S, Sato E, Isobe M, Kanazawa T, Matsumoto M, Iwahori K, Kawashima A, Morimoto-Okazawa A, Nishikawa H, Oka M, Pan L, Venhaus R, Nakayama E, Mori M, Doki Y and Wada H.: NY-ESO-1 Protein Cancer Vaccine With Poly-ICLC and OK-432: Rapid and Strong Induction of NY-ESO-1-specific Immune Responses by Poly-ICLC. *J Immunother.* 2017 Mar 23.
9. Hamano Y, Kida H, Ihara S, Murakami A, Yanagawa M, Ueda K, Honda O, Tripathi LP, Arai T, Hirose M, Hamasaki T, Yano Y, Kimura T, Kato Y, Takamatsu H, Otsuka T, Minami T, Hirata H, Inoue K, Nagatomo I, Takeda Y, Mori M, Nishikawa H, Mizuguchi K, Kijima T, Kitaichi M, Tomiyama N, Inoue Y and Kumanogoh A.; *Sci Rep.* 2017 Feb 23;7:43201. doi: 10.1038/srep43201.
10. Okubo K, Wada H, Tanaka A, Eguchi H, Hamaguchi M, Tomokuni A, Tomimaru Y, Asaoka T,

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Targeting immuno-suppressive cancer microenvironment is critical for successful cancer immunotherapy, 口頭, Hiroyoshi Nishikawa, The 5th International Symposium of Training Plan for Oncology Professionals, 2017/3/11, 国内 大阪
2. Targeting FoxP3+ T cells in Cancers; Friends or Foes? 口頭, Hiroyoshi Nishikawa, New York Academy of Science; Frontiers in Cancer Immunotherapy 2017/2/27-28, 海外 ニューヨーク
3. Role of FoxP3+ T cells in cancer immunology, 口頭, Hiroyoshi Nishikawa, International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017, 2017/1/26, 国内 神戸
4. EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌で細胞障害性 T リンパ球浸潤が減少する分子学的機序, ポスター, 竹内美子・富樫庸介・杉山栄里・木島貴志・熊ノ郷淳・新谷康・奥村明之進・青景圭樹・菱田智之・石井源一郎・坪井正博・西川博嘉, 第 57 回日本肺癌学会, 2016/12/20, 国内.
5. Control of regulatory T cells for effective cancer immunotherapy, 口頭, Hiroyoshi Nishikawa, 第 45 回日本免疫学会総会, 2016/12/7, 国内.
6. The next steps of immune checkpoint inhibitors, 口頭, Hiroyoshi Nishikawa, 第 29 回日本放射線腫瘍学会, 2016/11/27, 国内.
7. がん免疫療法における precision medicine, 口頭, 西川博嘉, 第 75 回日本癌学会, 2016/10/8, 国内.
8. Regulatory T-cell induced anergic CD8+ T cells with suppressive function are novel targets of anti-CTLA-4 mAb, 口頭, Danbee Ha, Hiroyoshi Nishikawa, Daisuke Sugiyama, Yuka Maeda, Dennis Adeegbe, Eichi Sato, Atsushi Tanemura, Ichiro Katayama, Shimon Sakaguchi, 第 75 回日本癌学会, 2016/10/8, 国内.
9. Perspective of T cell responses as predictive markers in cancer immunotherapy, 口頭, Yuka Maeda, Hiroyoshi Nishikawa, Hiroyuki Mano, 第 75 回日本癌学会, 2016/10/6, 国内.
10. がん患者における免疫病態の最新知見とがん治療への応用, 口頭, 西川博嘉, 第 44 回日本臨床免疫学会, 2016/9/8, 国内.
11. Regulatory T cells as a target of cancer immunotherapy, 口頭, 西川博嘉, 第 14 回日本臨床腫瘍学会, 2016/7/30, 国内.
12. がん免疫療法でのバイオマーカーとしての免疫抑制細胞, 口頭, 西川博嘉, 第 20 回日本がん免疫学会, 2016/7/29, 国内.
13. Cell-depleting anti-CCR4 mAb therapy, 口頭, 西川博嘉, The 7th JSH International Symposium, 2016/5/13, 国内.
14. Critical Role of Regulatory T cells in Cancer Immunotherapy for Hematologic Malignancies, 口頭, 西川博嘉, The 5th JCA-AACR Special Joint Conference, 2016/7/15, 国内.
15. がん免疫療法で誘導される免疫応答と免疫抑制の関連, 口頭, 西川博嘉, 第 20 回日本がん分子標的治療学会, 2016/5/31, 国内.
16. Cancer Immunotherapy, 口頭, 西川博嘉, 5th Japan Taiwan Oncology Phase I Trial Conference, 2016/4/30, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. がん細胞および免疫応答解析に基づくがん免疫療法効果予測診断法の確立 ジャパン・キャンサーリサーチ・プロジェクト 西川博嘉 企業向け成果発表会 2017/3/3 国内
2. がん免疫療法の効果向上に向けた新たな治療法開発 ジャパン・キャンサーリサーチ・プロジェクト 市民向け成果発表会 西川博嘉 2017/3/4 国内

(4) 特許出願