

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21542

研究課題名(和文)1細胞バーコード法によるがん免疫逃避機構の解明

研究課題名(英文)Deciphering mechanisms of immune escape by single-cell barcoding

研究代表者

日野原 邦彦(Hinohara, Kunihiro)

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：50549467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、患者組織中のがん細胞は非常に多様性に富むことがわかってきており、この多様性こそが薬剤耐性発生の根幹であると考えられている。本研究では、養子免疫療法に対する耐性化機構の解析を進め、先天的にがん組織中にレアな頻度で存在する耐性細胞と、元々は薬剤感受性であったがん細胞も後天的に耐性を獲得し得るという二つの異なるメカニズムによって治療抵抗性がもたらされることを明らかにした。さらに、個々のがん細胞をバーコード化して1個の細胞レベルで追跡可能な実験系を構築した。今後、薬剤耐性の獲得過程におけるバーコードの種類や数の変化を解析することで、免疫治療に対する薬剤耐性化メカニズムの新たな理解を試みたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療抵抗性の獲得メカニズムに異なるパターンが存在するという事は、それぞれのメカニズムに対して異なる治療アプローチが必要であることを意味している。例えば養子免疫療法に加えて、先天的耐性細胞を狙い撃ちする薬剤と後天的耐性獲得を抑制する薬剤の3者をコンビネーションで投与する治療法などが効果的であることを示している。今後これらの耐性細胞の特徴を明らかにし、効果的な治療薬の開発へと結びつけたい。

研究成果の概要(英文)：Most human tumors are composed of genetically and phenotypically heterogeneous cancer cell populations that pose a major challenge for the clinical management of cancer patients. Here we used mouse model of adoptive T cell transfer (ACT) to investigate the impact of tumor heterogeneity on therapy effectiveness. We found that all tumors underwent regressions after transfer of tumor antigen-specific cytotoxic T cells but eventually some tumors re-start to grow. We observed that resistance can occur either by selection of pre-existing mERK2-negative clones or via evolution from initially mERK2-positive drug-sensitive cells. Also, we developed single-cell lineage tracing system using expressed DNA barcoding technology to further understand evolutionary trajectory of drug-resistant cancer cells. By utilizing this experimental system, we will identify key roles for intratumor heterogeneity and tumor evolution in ACT response.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：養子免疫療法 薬剤耐性 発現型バーコード 1細胞RNAシーケンス 空間トランスクリプトーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

免疫系は自己・非自己を識別し、微生物などの非自己を排除するだけでなく、生体の恒常性を保つ上で極めて重要な役割を担っている。がんに対する新たな治療法として免疫療法が近年実用化されているが、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) が組織に浸潤しているにも関わらず治療効果が弱まっていくケースが存在することから、腫瘍特異的 CTL への獲得耐性機構の存在が想定されている。腫瘍組織は遺伝的・形質的に異なる多様ながん細胞集団により構成されており、このことは CTL 耐性メカニズムにもがん多様性が深く関与している可能性を示唆している。一方で、研究代表者のこれまでの研究から、がん細胞の多様性をエピジェネティックに制御することで薬剤応答性を改善できることや、薬剤耐性化機序にはいくつもの多様なルートが存在することがわかってきた (Hinohara K, et al. Cancer Cell. 2018. PMID: 30753830; Hinohara K, et al. Trends Cell Biol. 2019. PMID: 30987806)。特に 1 細胞 DNA バーコード法を用いたがんの薬剤耐性における進化軌跡の解析からは、薬剤投与前から存在する遺伝子変異に起因する先天的耐性メカニズムや、エピジェネティックな耐性化リプログラミング機構の存在を明らかにしている。このようながんの薬剤耐性化機序は、ダーウィン進化論的に突然変異と自然淘汰を経た適者生存として捉えることができるため、個々のがん細胞が免疫細胞によって排除される過程においても同様の進化原理が働いていることが想定される。

### 2. 研究の目的

本研究では、養子 T 細胞療法 (adoptive T-cell therapy, ACT) のモデルマウスを用いて免疫治療に対する薬剤耐性化メカニズムの理解を試みる。さらに、ACT の実験系に 1 細胞バーコーディングの技術を適用することで、治療抵抗性の獲得過程における多様ながん細胞集団の進化ダイナミクスを解明するための実験基盤を構築することを目的とする。

### 3. 研究の方法

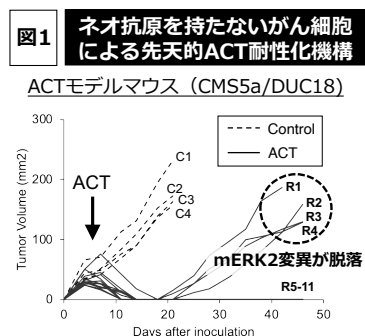
マウスでの CTL 耐性化実験は、ネオ抗原を持つがん細胞株を移植した ACT モデルマウスの系を使用した。抗原特異的な T 細胞受容体を持つトランスジェニックマウスから採取した CTL による免疫療法を行い、治療に対する耐性株を *in vivo* にて樹立した。具体的には、neoantigen として mERK2 を持つマウス繊維細胞肉腫の細胞株 CMS5a と、mERK2 特異的な TCR を持つトランスジェニックマウス DUC18 の組み合わせを用いた。CMS5a をマウスへ移植した後に、DUC18 の CTL を用いて養子免疫療法を実施し、その後に耐性化して再増殖してくる細胞集団の詳細な解析を行うことで治療抵抗性メカニズムの理解を試みた。耐性獲得機構の主要因として先天的な遺伝子変異が存在するかを調べるため、耐性株のエクソームシーケンスおよび蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによる染色体解析を行った。加えて、薬剤耐性化過程におけるがん細胞の進化軌跡を 1 細胞レベルでより詳細に明らかにするため、CMS5a がん細胞株をレンチウイルススペースのバーコードライブラリにより 1 細胞ごとに異なるバーコードでラベルし、バーコード化した細胞株をマウスに移植して解析を行うための実験系を構築した。

### 4. 研究成果

本研究では、マウスでの CTL 耐性進化軌跡の理解に向けた ACT マウスモデルを確立し、その耐性化メカニズムの解明を進めた。mERK2 変異陽性のマウス繊維肉腫の細胞株 CMS5a と mERK2 特異的 TCR を持つトランスジェニックマウス DUC18 の組み合わせを対象とし、がん細胞側の多様性がどのように養子免疫療法に対する耐性化に寄与し得るかを検討するための実験系を構築した。本モデルによる耐性化メカニズムの検証から、養子免疫療法に対する耐性化は (1) mERK2 変異を欠損した pre-existing な耐性細胞に由来し得ること、(2) 後天的にも耐性化を獲得し得ること、の両者によってもたらされることを見出した。さらに、(3) 1 細胞バーコード化技術を利用して個々の細胞を追跡する実験系を確立した。

#### (1) 先天的免疫逃避機構

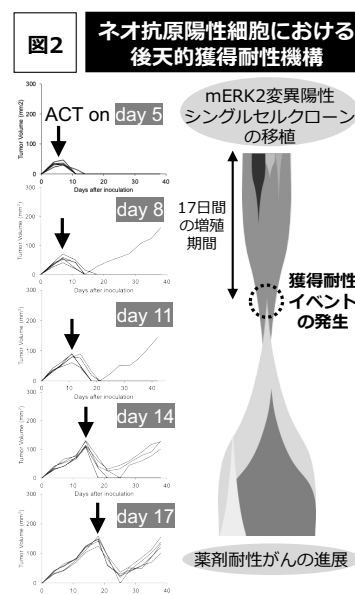
mERK2 特異的な T 細胞療法を CMS5a 移植後 5 日目から始めると、全てのマウスで一旦増殖抑制はかかるものの、約半数のマウスにて最終的には耐性化したがん細胞集団が再増殖してくることがわかった。エクソームシーケンス解析および蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション解析からは、耐性がんが完全に mERK2-negative であることが同定され、ネオ抗原の消失による免疫逃避機構が明らかとなった。この系を用いて、GFP ラベルした耐性がん細胞と DsRed ラベルした感受性がん細胞を混合して移植実験を行ったところ、ACT 後の腫瘍組織が全て GFP-positive となったことから、治療後に増殖してくる集団



は pre-existing かつ genetically distinct な耐性細胞由来であることが示唆された。以上の結果は、ネオ抗原を持たないレアながん細胞集団による先天的な免疫逃避機構の存在を裏付けるものであった (図 1)。

### (2) 後天的獲得耐性機構

上記 (1) では、CMS5a 移植後 5 日目から ACT を始めるという、比較的早期に治療を開始した実験系での評価を進めたが、マウス皮下においてがん細胞が増殖する期間をある程度設けた場合には別の形で薬剤耐性化が獲得される可能性も想定される。そこでネオ抗原陽性がん細胞のシングルセルクローンを樹立し、マウス移植した後に ACT の開始時期を遅らせて複数条件を検討することとした。興味深いことに、ネオ抗原陽性がん細胞のシングルセルから樹立した遺伝的に均一なクローン株をマウスへ移植した後、速やかに治療を開始した場合 (移植後 5 日目に ACT) は腫瘍の完全排除を達成できるが、治療開始を遅らせるに従って耐性化の頻度が上昇し、移植後に十分な増殖期間を設けた後に治療を開始した場合 (移植後 17 日目に ACT) はネオ抗原陽性クローンにも後天的に耐性が獲得されることがわかった。これらの結果から、ネオ抗原を持つがん細胞も後天的に治療抵抗性を獲得し得ること、および後天的な薬剤耐性化の獲得機序は治療開始のタイミングに依存することが明らかとなった (図 2)。

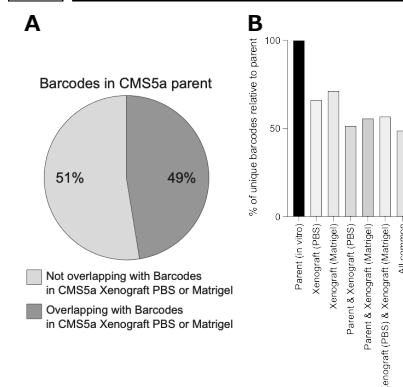


### (3) 1 細胞バーコード化技術を利用した細胞進化軌跡の追跡実験系の確立

以上の研究成果は、ACT 耐性化過程における複雑ながん細胞の進化軌跡を示すものであり、耐性化克服に向けてその分子基盤をより包括的に解明することが求められる。そこで次に、CMS5a がん細胞株の個々細胞のゲノムに DNA レベルで異なるバーコードを挿入し、がんの治療抵抗性獲得過程における進化軌跡を解明するための実験系構築を進めた。研究開発当初に利用を計画していたバーコードライブラリ「ClonTracer」(Shu S, et al. Mol Cell. 2020. PMID: 32416067; Hinohara K, et al. Cancer Cell. 2018. PMID: 30753830) は、レンチウイルスによりゲノムに挿入したランダムバーコード配列をバルク DNA レベルで次世代シーケンス解析する技術だが、最近になってバーコードを発現させることにより RNA レベルでのバーコード解析を可能とする方法論が開発された (Weinreb C, et al. Science. 2020. PMID: 31974159)。DNA 型バーコード法は進化軌跡における個々細胞の同定に関して強力なツールであるものの、特定のバーコードを保有する細胞のトランスクリプトームプロファイルを得ることができないという課題があったが、本発現型バーコード法「LARRY」は 1 細胞 RNA シーケンスにてトランスクリプトーム情報と共にバーコードを読み取ることが可能であることから、特定バーコード保有細胞 (e. g. 薬剤耐性細胞) のトランスクリプトーム情報を取得可能であることが最大の強みとなっている。そこで当初の計画を変更し、LARRY による細胞バーコード化の実験系を確立することとした。

まず、1 細胞に 1 バーコードが導入されるようにするため、MOI = 0.1 (=感染効率 10%) にて標的細胞に感染させることで理論値として 10,000 細胞を 10,000 種類のバーコードで標識し、1 細胞ごとに異なるバーコードを保持する CMS5a 細胞株を樹立した。発現バーコードの complexity を次世代シーケンスにより解析したところ、5,148 種類のバーコードが検出されたことから、理論値として設定した 10,000 種類のバーコードと比較して妥当な数のバーコードが得られたと言える。そこで、これら細胞を in vivo 実験に用いた際に何種類のバーコード化細胞が生着・追跡可能であるかを検討したところ、CMS5a xenograft (PBS) では 3,402 種類、CMS5a xenograft (Matrigel) では 3,671 種類のバーコードが検出され、親株バーコードの 49% が in vivo においても同定された (図 3A)。以上より、バーコード化細胞が in vivo において生着・増殖していることがわかり、十分な数の細胞を追跡可能な実験系を構築することができた (図 3B)。

図 3 LARRY 発現バーコードの多様性解析



ネオ抗原陽性のがん細胞集団に治療抵抗性が獲得される過程では、がん細胞の内在的変化が誘発する免疫抑制性がん微小環境の構築 (Li J, et al. Immunity. 2018. PMID: 29958801) や、がん微小環境におけるがん細胞と免疫細胞の代謝競合状態の変化 (Chang CH, et al. Cell. 2015. PMID: 26321679) など、耐性化を促進する空間的相互作用の存在が想定される。しかしながら、がん細胞集団や腫瘍組織の細胞懸濁液をサンプルとした 1 細胞レベルの解析では空間的位置情報が欠如しているため、腫瘍内の異なる細胞種間の相互作用などを検討することができない。そこで現在、発現型バーコード法と空間トランスクリプトーム解析を組み合わせたアプローチの

検証を進めている。空間トランスクリプトーム解析を1細胞以下の解像度で実施可能な10xVisium HDが本年度後半に登場予定であるため、今後バーコード情報によるFate Mappingをシングルセルレベルの空間的遺伝子発現解析と同時に行うことで、細胞の内的な状態遷移ダイナミクスと、それらの微小環境との相互作用を解き明かしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kunihiko Hinohara
2. 発表標題 Intratumor heterogeneity characterizes immune resistance to adoptive T cell therapy
3. 学会等名 日本癌学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山野 光平、加藤 真一郎、日野原 邦彦、西川 博嘉
2. 発表標題 バーコード技術を用いた免疫チェックポイント阻害剤に対する治療抵抗性を示すがん動態の解明
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------