

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0053

研究課題名(和文) 治験患者の医療情報とTCRレパトリーの解析連携による癌の病態と治療反応性予測

研究課題名(英文) Prediction of the effect of cancer treatment based on TCR repertoire and patient information

研究代表者

金田 安史 (Kaneda, Yasufumi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10177537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：TCR解析のためのライブラリー作製法を改良し、腫瘍から回収できる極少数のT細胞を用いてライブラリーを作製する手法を開発した。この手法により、腫瘍内浸潤T細胞をフローサイトメーターで回収し、TCR解析ライブラリーを作製した。このライブラリーを次世代シーケンシングにより解析し、データの解析を進めている。同時に、腫瘍内浸潤T細胞からRNAseqのライブラリーを作製した。回収できる細胞の数が数千個であり、シングルセルRNAseqで行うには多い。そこで、シングルセルRNAseqのキットを用いて、数千個の細胞からライブラリーを作製する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HVJ-Eの腫瘍内投与が全身性のT細胞にどのような影響を与えるか、RNAseqと我々が開発した簡便なTCRseq法を組み合わせて解析するデータを基に、ヒトにHVJ-Eを投与した時の免疫細胞の応答を予測できるようになる。そのため、脾臓だけでなく、腫瘍や所属リンパ節も採取し、T細胞の遺伝子発現とTCRレパトアを解析することで全身のT細胞動態にHVJ-E腫瘍内投与が与える影響を明らかにする。今後、HVJ-Eの第II相試験で得られる末梢血中のCD8+細胞、CD4+細胞の解析を行い、マウスで得られたデータと比較することで、HVJ-Eによる抗腫瘍効果の機序が明らかになり、さらに癌治療効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：To analyze TCR-beta chain using small number of T cells from tumor tissue, we improved the method of TCR library. Using this method, we prepared TCR genome library by collecting tumor infiltrating T cells using flow cytometer. We are analyzing TCR-beta chain information by reading genome information using new generation genome sequencer. We prepared RNA seq. library of tumor-infiltrating T cells and employed single cell RNA seq. kit to establish RNA seq. library. For the analysis of various clinical trial data, mixed heterogeneous data mining technology is necessary. Phase II clinical trials to treat cancer patients using HVJ-E was delayed because of the conflict of study design between PMDA and the company providing with anti-PD-1 antibody. As the cancer patient samples were not obtained, we used Alzheimer's disease patient data and established the data mining technology.

HVJ-E was effective in PDX mice transplanted with anti-PD-1 antibody resistant melanoma.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：癌 TCR HVJ-E

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

わが国における癌による死亡率は増加の一途をたどっているが、最近、免疫治療剤や分子標的薬のような新たな治療薬も開発され、特に免疫チェックポイント阻害剤は有望な結果が得られつつある。しかしその治療法に抵抗性の癌患者や癌種も多く、癌は依然として難治性疾患である。一方、我々は、不活性化センダイウイルス粒子である HVJ-E に抗腫瘍免疫の活性化による抗腫瘍作用があることを見出し、現在までに、メラノーマ、去勢抵抗性前立腺癌と悪性胸膜中皮腫患者への投与が行われている。対象患者の多くは、免疫チェックポイント阻害抗体を含む様々な標準治療に抵抗性の患者であるが、HVJ-E 投与により有効性が認められる症例と抵抗性の症例が存在する。マウスの癌治療モデルでは、抗 PD-1 抗体と HVJ-E の併用は相乗的に癌を抑制できる。しかしこれら 2 つの治療を受けた患者の治療反応性は症例ごとに異なる。その原因は全く不明である。これこそマウスの実験や机上の理論が通用しないヒト腫瘍免疫の複雑性を示す貴重な証拠である。これまでの知見を総合すると免疫療法を受ける患者の T 細胞全体の状態が、その治療法の成否を大きく左右する。その T 細胞全体の状態は T 細胞の特徴を決める T 細胞受容体(T cell receptor: TCR)の発現パターン (TCR レパートリー) に反映される。

そこで本研究では、T 細胞の性質を決定する TCR の発現を T 細胞 1 つ 1 つにおいて解析する方法を導入する。TCR は胸腺中での遺伝子組換えにより 1 細胞ごとに異なる発現をし、T 細胞全体として様々な多様性を持つようになり、どのような TCR を持つ T 細胞が生体で増えて機能するかが個体の免疫状態を反映する指標になる。

癌免疫治療によって T 細胞全体の TCR 発現パターンが変動することから多様性のある TCR レパートリーの形成は、生体が受ける様々な刺激に依存する。そこで本研究のもう 1 つの解析法として、患者の医療情報を治療反応性を指標に解析する。

### 2. 研究の目的

TCR レパートリーの解析と多重ロジスティック回帰分析法を駆使し、免疫チェックポイント阻害抗体療法や HVJ-E に対する治療反応性を指標に、得られたデータの関連性を解析することにより、T 細胞全体の多様な TCR レパートリーの形成に関連する因子を特定できる。それをできる限りマウスの実験系で検証する。その研究成果によって、治療効果や病態進行の予測や新たな治療法の提唱、さらには癌発症の予防、最適な治療法選択を可能にするとともに、ヒト腫瘍免疫の複雑性の解明に貢献することを目指す。

### 3. 研究の方法

1) TCR のレパートリーを解析するために、遺伝子組換えが起こり TCR の多様性を生み出す TCR $\beta$  の可変領域の配列をシークエンスする。具体的な手法として、T 細胞の RNA を回収し、逆転写した後、可変領域を複数のプライマーを用いて網羅的に増幅する。この増幅した DNA を基にシーケンシングライブラリーを作製し、次世代シーケンサーで解析する。T 細胞を Th1, Th2, Th17, Treg., CTL などの各機能ごとに分画して TCR の解析も試みる。HVJ-E で治療した患者の腫瘍組織を入手し、その腫瘍組織での網羅的な遺伝子発現を特に T 細胞マーカーに限定して RNA seq. により解析する。

2) 研究分担者を中心として、医療情報部の協力を得て、3 種類の癌(メラノーマ、前立腺癌、悪性胸膜中皮腫)の患者で標準療法感受性、抵抗性の症例の医療情報を解析するデータ解析法を開発する。工学系ではデータマイニング手法として様々なものが開発されているので、多重

ロジスティック以外での解析法が必要とされる可能性があるが、データマイニング手法は、医学系ではまだ認知度が低いので、まずは多重ロジスティック解析手法をとることとする。

3) 上記医療情報から得られた因子のうち、マウスの実験系に落とし込めるものについては、担癌マウスを用いて検証実験を行う。

#### 4. 研究成果

1) メラノーマ細胞を移植したマウスを用いて、HVJ-E の腫瘍内投与により、全身性の T 細胞にどのような変化が生じるか解析した。まず、B16-F10 メラノーマ細胞を C57BL/6 マウスに移植した。5 日後に直径がおおよそ 5mm の腫瘍に成長してから、HVJ-E を 2 日ごとに 3 回投与した。3 回投与して 24 時間後に脾臓を採取し、フローサイトメトリーを用いて、CD3/CD8 共陽性細胞と、CD3/CD4 共陽性細胞をソーティングした。これらの細胞の遺伝子発現パターンを RNA seq によって解析した。また、コントロールとして HVJ-E に不応性の癌細胞を用いて腫瘍を形成させたマウスの脾臓を用いた。その結果、HVJ-E に応答する B16-F10 メラノーマ細胞で形成した腫瘍に HVJ-E を腫瘍内投与した場合、CD8<sup>+</sup>細胞、CD4<sup>+</sup>細胞の両者とも活性化し、大きく遺伝子発現パターンが変化することがわかった。一方、HVJ-E に不応性の癌細胞で形成した腫瘍の場合、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>細胞の両者とも、ウイルス感染応答に関する遺伝子発現は増加したが、全体として大きく遺伝子発現パターンが変化することはなかった。このことから、HVJ-E によって全身性の免疫系を活性化させるためには腫瘍が HVJ-E にまず応答することが必須であることが新規にわかった。この RNA seq のデータを用いて TCR レパトア解析を行ったが、30M reads 程度のデータからは 2000 個程度の TCR しか検出されず、TCR レパトアの全体像を明らかにするためには、TCR seq を行う必要があることがわかった。

2) TCR は T 細胞の膜上に発現し、MHC 分子に提示された抗原分子を認識する。TCR の中でも TCR α 鎖を持つ T 細胞が末梢血中の T 細胞の大部分を占める。TCR α 鎖は VDJ 間での組み換えにより、抗体の可変部位と同様に多様性を獲得する。そのため、TCR α 鎖の VDJ の接合した配列である CDR3 領域を解読することにより、活性化した T 細胞のクローン性増殖や、体内での移動、分布を解析することが可能になる。CDR3 配列を解析する手法は多くの研究グループによって開発されてきたが、数千個程度しか回収できない腫瘍浸潤 T 細胞から効率よく CDR3 を解析するための手法はこれまでに確立されていなかった。今回、私達は template switch 反応を利用し、cDNA を増幅することで、効率よく CDR3 領域を増幅する手法を開発した。その結果、3000 個相当分の RNA もしくは、3000 個の T 細胞から 3000~6000 個の TCR α を検出できた。これまでに、腫瘍、所属リンパ節、脾臓から CD4 もしくは CD8 陽性細胞をフローサイトメーターで回収し、TCR α の CDR3 配列の解読を行った。現在、そのデータの解析を行っているところである。

3) TCR の解析をシーケンシングで行うための簡便な TCR seq ライブラリー作製法の開発を行った。TCR seq は様々な方法で解析されているが、本研究を完成させるためには多くの TCR seq ライブラリーを解析する必要がある、低コストでシーケンシングを行うことが必要である。現在の TCR seq は 1 ライブラリーあたりのコストが高く、ライブラリー作製も煩雑である。そこで、我々は簡単にライブラリーを作製でき、かつシーケンシングを低コストで行える手法の開発を行った。この手法を用いることで、腫瘍内浸潤 T 細胞をフローサイトメーターで回収し、TCRβ 解析ライブラリーを作製することができた。現在、このライブラリーを次世代シーケンサーにより解読し、データの解析を進めている。

4) HVJ-E を用いたメラノーマの第 2 相治験は、抗体提供企業である MSD 社が提唱する治験

デザイン ( Placebo control は置かない one arm とし、免疫チェックポイント阻害抗体の感受性は historical data との比較とする ) と PMDA の推奨する治験デザイン ( Placebo control を置いた two arm とする ) との間での交渉が難航し約 1 年遅れて 2019 年 2 月からのスタートとなった。また最初の 3 例は Phase Ib として安全性を確保 ( DLT を評価 ) することが求められ、2019 年 11 月より Phase II に入っている。2019 年度末の時点で 6 例に投与が行われているが、まだ評価には至らず、本研究のための TCR 解析は本研究終了後になる予定である。

### 5) 癌患者の治療感受性、抵抗性の予測に向けた異種混合学習モデルの構築

3 種類の癌 ( メラノーマ、前立腺癌、悪性胸膜中皮腫 ) の患者で治療感受性、抵抗性の予測するためには、本研究で取得される患者データ ( 病歴、検査値など ) を説明変数とし、説明変数の選択にはステップワイズ法の変数増加法を用い、多重ロジスティック解析を用いて行うことが想定される。実臨床から得られる患者データは、異なるパターンや規則性に従っているデータが混在するため解析が難しいことがある ( データの異種混合性 )。この問題に対し、観測データ中に混在する複数の規則性を、自動的に分割・抽出、高い精度と解釈性を両立する「異種混合学習」手法が知られる。本研究では、「異種混合学習」手法を用いたモデルの構築を試みた。

異種混合学習のモデル検証として、Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative ( ADNI ) に登録されている健常者、軽度認知障害 ( MCI: Mild cognitive impairment ) 患者、アルツハイマー病 ( AD: Alzheimer's Disease ) 患者のデータを用い、MCI の AD への移行予測を行った。判別に用いる臨床指標はバイオマーカー 4 種 ( 髄液バイオマーカー ) と画像解析データ ( MRI による脳容積データ ) を用いた。

最初に健常者と AD 患者のデータセットを学習用データとして用い、異種混合学習により決定木モデルおよびモデルパラメータを決定した。作製された決定木を図 1 に示す。次に、MCI の患者を作成した決定木で AD 群、正常群に分類し、3 年度に AD に移行したか否かで決定木の判別能を評価した。本法の判別能を、多変量の二項ロジスティック回帰モデル、決定木モデルとして用いられる CART 法と比較した。

異種混合学習では Sensitivity:0.71、Specificity:0.81、Precision:0.60、Accuracy:0.78、ロジスティック回帰モデルでは Sensitivity:0.69、Specificity:0.78、Precision:0.63、Accuracy:0.75、CART 法では、Sensitivity:0.74、Specificity:0.73、Precision:0.59、Accuracy:0.73 と異種混合学習モデルが最も精度良く MCI の AD への移行を予測できた。

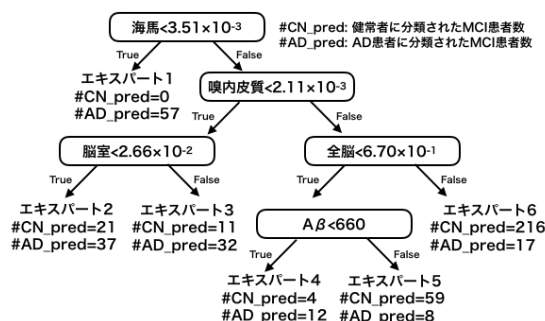


図 1 . 判別に用いた決定木

異種混合学習では 6 つのエキスパートに分類され、それぞれのエキスパート内でロジスティック回帰により AD への移行を予測した。AD と予測された MCI 患者は 60.1% (=98 人/163 人) が 3 年以内に AD へ移行していた。一方、健常者に予測された MCI 患者の AD 移行率は 13.2% (41 人/311 人) だった。各エキスパートに分類された MCI 患者の移行率を図 2 に示す。すべての工

キスパートを通して AD と予測された MCI 患者の移行率は健常者と分類された MCI 患者よりも高く、エキスパート 2, 5, 6 では統計的に有意な差を示した。

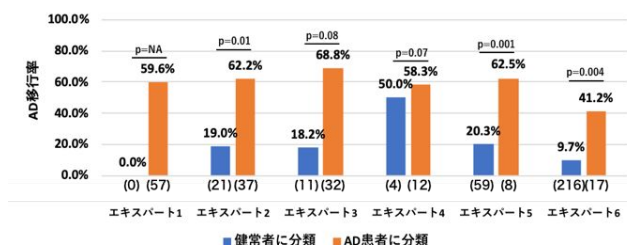


図2 . 各エキスパートの AD 移行率

多くの機械学習ではブラックボックス化され、判別理由が分からないことが問題となるが、異種混合学習はホワイトボックス型であり、判別ルールが確認できることに大きな利点がある。今回のモデル検証を例にとると、異種混合学習により MCI はエキスパート 1~6 の 6 つのサブクラスに分類された。エキスパート 1 は海馬容積が低い群として分類されるが、そのすべての MCI 患者は AD と予測された。海馬は記憶を司り、AD 初期で萎縮が観察されるためこの結果は妥当である。さらにこの MCI 患者群は 3 年以内に 59.6% が AD へ移行した。一方、海馬、嗅内皮質、全脳が相対的に高いグループとして同定されたエキスパート 6 は多くが健常者として予測され AD 移行率は 9.7% と低かった。エキスパート 4 は海馬や嗅内皮質といった AD 初期に影響を受ける脳部位のダメージはそれほど進行していないものの、髄液中 Aβ が低下しており AD 病理に近い。AD への移行は脳萎縮に先駆けて髄液中の Aβ 量の低下が観察されることが報告されている。このことからエキスパート 4 は健常者から AD へ移行し始めている MCI 患者群と考えられる。一方、エキスパート 5 は Aβ 量がエキスパート 4 と比べ高く、健常者に近いグループである。そのため多くの MCI 患者は健常者に分類されており妥当である。

以上のように、MCI 患者の AD への移行予測を例として、異種混合学習の有効性を評価した。異種混合学習は、ある疾患群の患者を、説明変数として複数の臨床データを用いてアウトカムに応じた適切なサブタイプに分類し、さらに、アウトカムを高い精度で予測できることを示すことができた。本手法を癌患者に適用させると、臨床で取得される患者データを説明変数とし、治療感受性/抵抗性をアウトカムとして学習させることで、癌患者を複数のサブタイプに分類し、患者の治療感受性あるいは抵抗性の予測が可能になると期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Shimbo, T., Endo, M., Iwai, S., Kitayama, T., Ouchi, Y., Yamamoto, R., Takaki, E., Yamazaki, S., Nishida, M., Wang, X., Kikuchi, Y., Tomimatsu, T., Kaneda, Y., Kimura, T. Tamai, K	4. 巻 pii: S0006-291X(19)
2. 論文標題 Transcriptionally distinct mesenchymal stem/stromal cells circulate in fetus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 30410-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bbrc.2019.03.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mitsuda Y, Morita K, Kashiwazaki G, Taniguchi J, Bando T, Obara M, Hirata M, Kataoka TR, Muto M, Kaneda Y, Nakahata T, Liu PP, Adachi S, Sugiyama H, Kamikubo Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 RUNX1 positively regulates the ErbB2/HER2 signaling pathway through modulating SOS1 expression in gastric cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 6423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-018-24969-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ho YT, Shimbo T, Wijaya E, Ouchi Y, Takaki E, Yamamoto R, Kikuchi Y, Kaneda Y, Tamai K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Chromatin accessibility identifies diversity in mesenchymal stem cells from different tissue origins.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 17765
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-018-36057-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Simin, L., Nishikawa, T., Kaneda, Y.	4. 巻 108
2. 論文標題 Inactivated Sendai Virus Particles upregulate cancer cell ICAM-1 expression with enhancing NK cell sensitivity on cancer cell.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2333-2341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lee C-H, Nishikawa, T., Kaneda, Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Salmonella mediated the hemagglutinating virus of Japan-envelope transfer suppresses tumor growth.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 35048-35060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.17037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujita, K., Nakai, Y., Kawashima, A., Ujike, T., Nagahara, A., Uemura, M., Miyagawa Y., Lee, C-M., Inoue, T., Kaneda, Y., Nonomura, I.	4. 巻 24
2. 論文標題 Phase I/II clinical trial to assess safety and efficacy of intratumoral and subcutaneous injection of HVJ-E to castration resistant prostate cancer patients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 277-281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/cgt.2017.15	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 金田安史
2. 発表標題 Development of a novel anti-cancer immunotherapy using HVJ-E
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金田安史
2. 発表標題 HVJエンペロープベクターを用いたがん免疫治療法の開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaneda, Y.
2. 発表標題 Clinical trials for the treatment of intractable cancers using HVJ envelope (HVJ-E).
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kaneda, Y.
2. 発表標題 Current status and future prospect of gene therapy in Japan.
3. 学会等名 第23回日本遺伝子細胞治療学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kaneda, Y.
2. 発表標題 Current status and future prospect of human gene therapy.
3. 学会等名 国際胎児新生児治療学会2017（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金田安史
2. 発表標題 世界の遺伝子治療の現状と展望
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第62回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 武田理宏
2. 発表標題 構造化データ登録を誘導するための仕掛けとデータ再利用 テンプレートによる構造化データ取得を促進するための取り組み
3. 学会等名 第39回医療情報学連合大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeda, T., Zhang D, Wada S, Nakagawa A, Sugimoto K, Manabe S, Matsumura Y.
2. 発表標題 The Acquisition of Structured Clinical Data from a Document-based Electronic Medical Record System.
3. 学会等名 MEDINF02019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 HVJ-Eおよび免疫チェックポイントタンパク質の阻害物質を含む抗がん剤	発明者 金田安史、西川智之、李千萬、中島俊洋	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/039568	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	武田 理宏  (Takeda Toshihiro)  (70506493)	大阪大学・医学部附属病院・准教授    (14401)	