

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16605

研究課題名(和文) シングルセルRNA解析による間葉系幹細胞のGVHD制御機構とバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Harnessing the single-cell biology and biomarker involving in the therapeutic response of patients with severe acute graft-versus-host disease undergoing mesenchymal stem cell transfusion

研究代表者

横山 和明 (Yokoyama, Kazuaki)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：00647498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：造血幹細胞移植(移植)において、合併症である急性移植片対宿主病(aGVHD)克服は課題である。特に1次治療のステロイド治療への抵抗例は予後不良でありその克服法の確立は急務である。近年、間葉系幹細胞(MSC)療法が注目されているがその生体内での作用機序とバイオマーカーが不明である。そこで本研究では、MSC療法を受けたaGVHD患者を対象とした、治療前後の末梢血免疫細胞の1細胞RNAシーケンス解析を行うことで、MSCが誘導していると考えられる、未知のaGVHD制御に関わる免疫細胞集団候補とバイオマーカー候補としてA,Bを同定した。これによりMSCの治療反応バイオマーカーの確立に繋がる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞移植は、急性白血病などの難治性血液疾患の根治的治療法の一つとして確立されているが、合併症として急性移植片対宿主病(aGVHD)が課題である。を克服する事に繋がり得る。近年、間葉系幹細胞(MSC)療法が注目されているがその生体内での作用機序とバイオマーカーが不明である。そこで本研究では、MSC療法を受けたaGVHD患者を対象とした、治療前後の末梢血免疫細胞の1細胞RNAシーケンス解析を行うことで、MSCが誘導していると考えられる、未知のaGVHD制御に関わる免疫細胞集団候補とバイオマーカー候補としてA,Bを同定した。これによりMSCの治療反応バイオマーカーの確立に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Severe acute graft-versus-host disease (aGVHD) is a life-threatening complication after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloSCT) for treatment of hematological disease. This is true for the patients with steroid-refractory aGVHD. Human mesenchymal stem cells (MSC) transfusion represents one of the most effective salvage therapy for patients with steroid-refractory aGVHD. However, the main problem of MSC therapy is that there is no therapeutic biomarker. To this aim, we performed single cell RNA analysis of the peripheral blood mononuclear cells before and after MSC infusion from patients with aGVHD. As a result, we found the candidate aGVHD-regulatory cells with their transcriptome with putative biomarkers, A and B. This will be able to elucidate aGVHD regulatory cells, which will lead to establishment of therapeutic biomarkers for patients with aGVHD undergoing MSC transfusion.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：造血幹細胞移植 急性移植片対宿主病 1細胞RNAシーケンス解析 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植 (移植) は、急性白血病などの難治性血液疾患の根治的治療法の一つとして確立されている。しかし、移植後生存率は全体で約 4-6 割程度にとどまり、移植成績の向上が課題と言える。そのためには、移植後死亡の主因の一つである、急性移植片対宿主病 (acute graft-versus-host disease: aGVHD) をいかに制御するかが鍵を握る。aGVHD は移植の合併症であり、ドナー由来の T 細胞が患者 (レシピエント) の同種 HLA を非自己として認識して活性化・増殖し、標的臓器に浸潤して障害を起こす病態である。主に皮膚 (皮疹)、肝臓 (黄疸) と腸管 (下痢) 組織が障害される。標準的な aGVHD の第一選択薬はステロイド剤であるが、その奏効率は 30-50% 程度にすぎず、ステロイド抵抗例に対してはこれまで有効な治療法がなく、その 2 年生存率は 10% 程度と予後は極めて不良であった。

近年、ステロイド抵抗性の重症 aGVHD の切り札的治療として間葉系幹細胞 (Mesenchymal stromal cells: MSC) を用いた免疫細胞療法が注目されている。MSC は、骨髄や臍帯などに存在し、3 つの間葉系細胞系列、即ち、脂肪、骨、軟骨細胞に分化する能力を有する細胞である。従来から、組織障害部位や炎症性部位へ遊走して組織修復能や抗炎症・免疫抑制作用を発揮する事は報告されていたが、2004 年に治療抵抗性の重症 aGVHD に対して MSC が著効した症例報告が成された事を契機に研究開発が進み、本邦でも 2015 年にヒト骨髄由来 MSC 製剤が aGVHD に対して製造販売承認された。その奏効率は約 30-80% と高く、ステロイド抵抗性 aGVHD の切り札的治療となりつつある。しかし、aGVHD に対する MSC 療法には以下の致命的な問題がある。1) ヒト生体内で MSC が aGVHD を制御する機序が不明である。2) 治療効果を予測、モニターする適切な治療反応バイオマーカーが存在しない、という点である。

1) については、これまで、*in vitro* の共培養の実験系等において、IFN- $\gamma$  等の炎症性サイトカイン存在下で、MSC がプロスタグランジン E2, インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ等の液性免疫抑制因子発現を介して、T 細胞や樹状細胞などに作用する事が報告され、同様の機序が推察されている (Blazar ら *Blood* 2018)。しかし、*in vitro* で見られる MSC の免疫抑制作用は、マウスモデルでは再現できない事が多く、生体内での MSC の作用機序解明には至っていない。2) については、数個のバイオマーカーの報告があるが、臨床応用可能なものはない。

そこで、MSC 療法を受けた aGVHD 患者を対象とした、治療前後の末梢血免疫細胞のトランスクリプトーム解析が MSC 作用機序解明において有用と考えられるが、従来の細胞をすりつぶした平均値の解析 (通常の RNA-seq) では他の大多数の細胞シグナルに埋もれ、少数の細胞からなる亜集団における発現変化は検出困難である。一方、scRNA-seq は細胞集団の転写産物を 1 細胞ごとに網羅的に解析する新しい技術であり、細胞集団を構成する細胞がどう分類できるかが未知でも、細胞集団を亜集団にクラスタリングして特徴を抽出することが可能である。

## 2. 研究の目的

以上の背景より、本研究では、MSC 療法を受けた aGVHD 患者を対象とした、治療前後の末梢血免疫細胞の 1 細胞トランスクリプトーム解析を行うことで、MSC が誘導していると考えられる、未知の aGVHD 制御に関わる免疫細胞集団を同定し、それにより、1)、2)

の課題を解決する事、3) aGVHD に対するセルフリーセラピー創出に繋げる事、を目的とした。

### 3 . 研究の方法

研究方法：本研究では aGVHD における MSC 療法の、1) 作用機序解明、2) 治療反応バイオマーカー同定、 3) 代替となるセルフリーセラピー創出を目的として以下の STEP(i)-(iv)を行った。

2019 年度：

(i) MSC 投与前後の患者末梢血単核球(PBMNC)検体収集と保存

MSC 投与前後の aGVHD 患者の PBMNC/血漿の凍結保存。

(ii) 末梢血単核球の scRNA-seq (

MSC 奏功例、非奏功例において MSC 投与前、最終投与後の凍結 PBMNC を用いて、1 サンプル当たり 2000 個の scRNA-seq を行う。

PBMNC 解凍後、セルソーター(FACS Aria II、現有機器)で PI 陰性の生細胞分画を 96 well プレートに 5\*(4)個/well で sorting する。その後 Chromium Single Cell controller (10x Genomics 社、現有機器)と専用 kit を用いて、3400 個/sample を input としたライブラリ調整を行い、NextSeq500 (illumina 社、現有機器)で、2000 個/sample の scRNA-seq data を取得した。

2020 年度：

(iii) Bioinformatics 解析

MSC 奏功例において治療後誘導された、未知の aGVHD 制御細胞集団とその特徴的なトランスクリプトームプロファイルを、治療前、MSC 療法無効例との対比する。

スーパーコンピュータ(現有設備)に実装されている Bioinformatics 解析パイプライン Cell Ranger (10x Genomics 社)を用いて、既報に従い、次元削減の統計処理 (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding: t-SNE 法, Lummertz ら Nat Commu 2018) を行い、高次元トランスクリプトーム data を 2 次元 data に変換して一細胞毎に plot する。この処理により、プロファイルの類似性に基づき、細胞集団を判別可能であり、治療後新たに出現し、無効例には見られない aGVHD 制御細胞集団をプロファイルと共に可視化した。

(iv) 治療反応バイオマーカーの探索

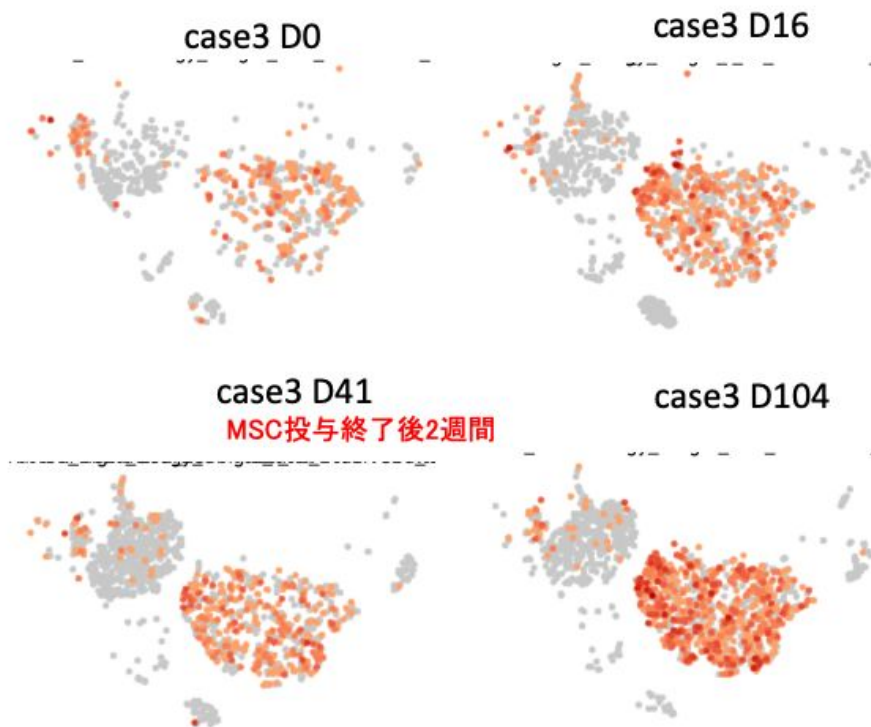
MSC 奏功例において変動した治療反応バイオマーカーを抽出する。

上記(iii)で抽出した MSC 療法後に出現した aGVHD 制御細胞集団のトランスクリプトームプロファイルから、以下を治療反応バイオマーカーの候補として特徴的な表面抗原を抽出した。

### 4 . 研究成果

MSC 投与前後の aGVHD 患者 7 例の PBMNC/血漿の凍結保存を行い、MSC 奏功例、非奏功例において MSC 投与前、最終投与後の凍結 PBMNC を用いて、1 サンプル当たり 2000 個の scRNA-seq を行った。これにより、8 検体 15170 細胞生細胞シングルセルデータを取得した。その後、未知の aGVHD 制御細胞集団の候補とその特徴的なトランスクリプトームプロファイルを、治療前、MSC 療法無効例と比較した。これにより MSC 療法後に出現した aGVHD 制御細胞集団のトランスクリプトームプロファイルから、治療反応バイオマーカーの候補として特徴的な表面抗原として A、B を同定した。CASE3 での発現パターンを図で示す。赤色が濃いところが強い発現をもつ細胞である（図 1）。現在、当該コホートでの細胞表面抗原の検証を、別法としてフローサイトメトリーでのタンパク発現にて確認しているところである。

**図1** バイオマーカー候補 A (細胞表面抗原)



## 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 5件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Heissig B, Salama Y, Heida A, Yokoyama K, Takahashi S, and Koichi Hattori.	4. 巻 4
2. 論文標題 EGFL7-ITGB3-KLF2 axis enhances survival of multiple myeloma in preclinical models.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 1021-1037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2019001002.	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 Hijikata K, Yokoyama K (co-1st and co-corresponding author), Yokoyama N, Matsubara Y, Shimizu E, Nakashima M, Yamagishi M, Ota Y, Lim L, Yamaguchi R, Ito M, Tanaka Y, Denda T, Tani K, Yotsuyanagi H, Imoto S, Miyano S, Uchimaru K, Tojo A.	4. 巻 4
2. 論文標題 Successful clinical sequencing by molecular tumor board in an elderly patient with refractory Sezary syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCO Precis Oncol	6. 最初と最後の頁 534-560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1200/P0.19.00254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeda R, Yokoyama K (corresponding author), Kobayashi S, Kawamata T, S Nakamura, Tomofusa F, Ito M, Yusa N, Shimizu E, Ohno N, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, Uchimaru K, and Tojo A.	4. 巻 epub
2. 論文標題 An Unusually Short Latent Period of Therapy-Related Myeloid Neoplasm Harboring a Rare MLL-EP300 Rearrangement: Case Report and Literature Review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Rep Hematol	6. 最初と最後の頁 4532434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/4532434	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 Nakamura S, Yokoyama K (co-1st and co-corresponding author), Shimizu E, Yusa N, Kondoh K, Ogawa M, Takei T, Kobayashi A, Ito M, Isobe M, Konuma T, Kato S, Kasajima R, Wada Y, Inoue-Nagamura T, Yamaguchi R, Takahashi S, Imoto S, Miyano S, and Tojo A.	4. 巻 133
2. 論文標題 Prognostic impact of circulating tumor DNA status post-allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in AML and MDS.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 2682-2695
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood-2018-10-880690.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeda R, Yokoyama K (corresponding author), Ogawa M, Kawamata T, Tomofusa F, Kondoh K, Tomomi T, Nakamura S, Ito M, Yusa N, Shimizu E, Ohno N, Uchimaru K, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, and Tojo A.	4. 巻 60
2. 論文標題 The first case of elderly TCF3-HLF-positive B-cell acute lymphoblastic leukemia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leuk lymphoma.	6. 最初と最後の頁 2821-2824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2019.1602267.	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 横山和明	4. 巻 61
2. 論文標題 血液がんのプレジジョン・メディスンにおけるAI活用の試み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 横山和明
2. 発表標題 血液がんのプレジジョン・メディスンにおけるAI活用の試み
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会 Presidential シンポジウム (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山和明
2. 発表標題 腫瘍由来循環DNAを用いたAMLおよびMDSの移植後微小残存病変検出に関する後方視的解析
3. 学会等名 神奈川移植Forum (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤 幹也, 横山 和明, 遊佐 希, 伊藤 美香, 清水 英悟, 中村 聡介, 小川 弥穂, 武井 智美, 小林 麻子, 笠島 理加, 和田 結花, 山口 類, 井元 清哉, 長村 登紀子, 内丸 薫, 宮野 悟, 東條 有伸
2. 発表標題 治療関連骨髄系腫瘍15例のゲノム解析と液体生検によるファウンダークロンの後方視的追跡
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川 弥穂, 横山 和明, 塚田 信弘, 余語 孝夫 <sup>3</sup> , 近藤 幹也, 武井 智美, 中村 聡介, 伊藤 美香, 小林 麻子, 遊佐 希, 山本 茉莉, 笠島 理加, 清水 英悟, 山口 類, 井元 清哉, 宮野 悟, 東條 有伸
2. 発表標題 臨床シーケンスにて確定診断に至った慢性好中球性白血病の2例
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会 Presidential シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuaki Yokoyama, Nozomi Yusa, Mika Ito, Miho Ogawa, Kanya Kondoh, Eigo Shimizu, Seiya Imoto, Arinobu Tojo, Satoshi Takahashi
2. 発表標題 Cell free-DNA based detection of minimal residual disease post allogenic-stem cell transplantation in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes
3. 学会等名 7th US-Japan Workshop on Biomarkers for Cancer Early Detection (AMED-NCI) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takei T, Yokoyama K, et al.
2. 発表標題 The utility of exome sequence of circulating tumor DNA in drug-resistant and/or advanced phase chronic myeloid leukemia
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------