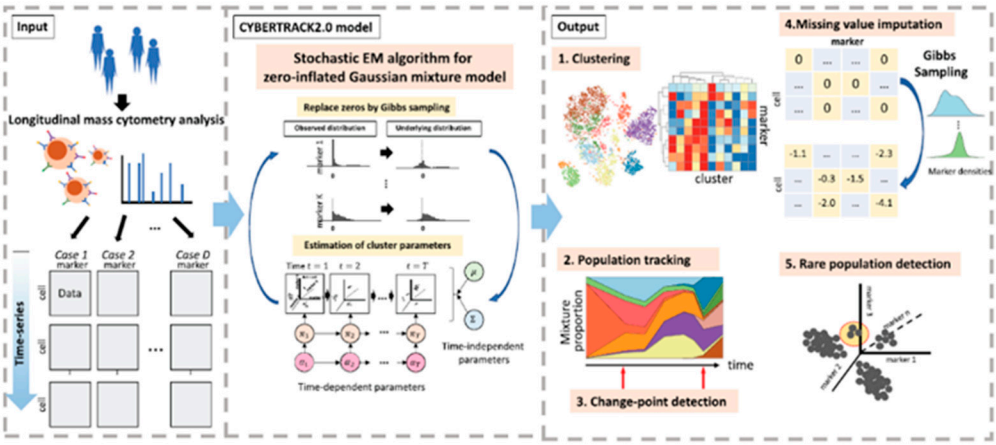
107　がん免疫複雑系ダイナミクスを炙り出す数理モデリング	島村　徹平

【目的】腫瘍微小環境において、がん細胞が形成する生態系は数理科学分野における「複雑系」として定義される。近年、一細胞オミクス測定技術の進歩により、がんの病態解明が進むことが期待されているが、がんの多様性がもたらす治療抵抗性の因果関係に迫るためには、要素還元論に基づく従前のアプローチには限界がある。本研究では、がん免疫複雑系を対象として、一細胞レベルでがん多様性が治療抵抗性を生み出すメカニズムを解明するため、最先端の数理モデリング・人工知能を駆使した一細胞解析基盤を開発することを目的とする。

【方法】マスサイトメトリーデータから臨床情報に関連する細胞集団を同定するための解析手法として、LAMBDA（Latent Allocation Model with Bayesian Data Analysis）と呼ばれる新しい解析手法を開発した。また、未知の細胞集団の同定と、これら細胞集団の経時的ダイナミクスの発見を同時に行うための解析手法として、CYBERTRACK という新しいモデルベースの統計的フレームワークを構築した。

【結果】開発手法の有効性を示すために、ヒト黒色腫腫瘍浸潤 T 細胞集団を包括的にプロファイリングしたマスサイトメトリーデータ、抗 PD-1 免疫療法を受けたメラノーマ患者 10 名（治療反応群：5 名、治療非反応群：5 名）における末梢血生検のマスサイトメトリーデータ、ヒト臍帯血から造血幹細胞および前駆細胞（HSPCs）を精製し、赤血球を促進する環境下で採取した時系列マスサイトメトリーデータにそれぞれ適用し、未知の細胞集団を同定するとともに、抗 PD-1 治療に対する反応性の強力な予測因子となりうる細胞集団や細胞運命決定に関わる細胞集団のダイナミクスを経時的に追跡できることを確認した。これらの結果から、開発手法が細胞集団の時間的ダイナミクスを容易に解釈できるツールとして有用であることが示された。

マスサイトメトリーデータから細胞集団のダイナミクスを同定するベイズモデリング技術



107. がん免疫複雑系ダイナミクスを炙り出す数理モデリング

島村　徹平

名古屋大学 大学院医学系研究科 システム生物学分野

Key words：ベイズモデリング，時系列解析，一細胞解析，マスサイトメトリー，がん免疫

緒　言

腫瘍微小環境において、がん細胞が形成する生態系は数理科学分野における「複雑系」として定義される。近年、一細胞オミクス測定技術の進歩により、がんの病態解明が進むことが期待されているが、がんの多様性がもたらす治療抵抗性の因果関係に迫るためには、要素還元論に基づく従前のアプローチには限界がある。

本研究では、がん免疫複雑系を対象として、一細胞レベルでがん多様性が治療抵抗性を生み出すメカニズムを解明するため、最先端の数理モデリング・人工知能を駆使した一細胞解析基盤を開発する。本研究で推進する情報学、統計科学、工学、医学、生物学などの異分野から構成されるユニークな共同体制により、がん免疫複雑系の解明、さらにはがんの診断、治療、治療効果予測などの臨床応用に向けた強力な研究開発基盤が構築されることが期待される。

方　法

本研究では、がん免疫複雑系を対象として、一細胞レベルでがん多様性が治療抵抗性を生み出すメカニズムを解明するため、最先端の数理モデリング・機械学習技術を駆使した一細胞解析基盤を開発した。主として、下記の 2 つの目標を設定し、これを達成した。

1. マスサイトメトリーデータから臨床情報に関連する細胞集団を同定するベイズモデリング技術の開発［1］

高次元フローサイトメトリーおよびマスサイトメトリーは、単一細胞の解像度で 10 個以上のタンパク質プロファイルの全身レベルの細胞特性評価を可能にし、病気の診断や臨床転帰の予測などの多くの生物学的応用において活用されている。本研究では、未知の細胞集団の同定と、これらの集団と臨床情報との関連性の発見を同時に行うために、LAMBDA（Latent Allocation Model with Bayesian Data Analysis）と呼ばれる新しい解析手法を開発した。LAMBDA はフローサイトメトリーやマスサイトメトリーのデータの特性を表現するために、ゼロ膨張分布などの異なる分布でモデル化していることが特徴である。開発した手法の概念図を図 1A に示す。

2. マスサイトメトリーデータから細胞集団のダイナミクスを同定するベイズモデリング技術の開発［2］

近年、マスサイトメトリーに代表される高次元シングルセル技術の進歩により、経時的実験で細胞集団の動態を追跡することが可能になった。しかし、経時的マスサイトメトリーデータの解析に特化したツールがないことが臨床への応用展開において課題となっている。本研究では、未知の細胞集団の同定と、これら細胞集団の経時的ダイナミクスの発見を同時に行うための解析手法として、CYBERTRACK という新しいモデルベースの統計的フレームワークを構築した。CYBERTRACK は、全人口の 1%未満で構成される希少な細胞集団の動態や細胞集団が大きく変化する変化点を同定できることが特徴である。開発した手法の概念図を図 1B に示す。

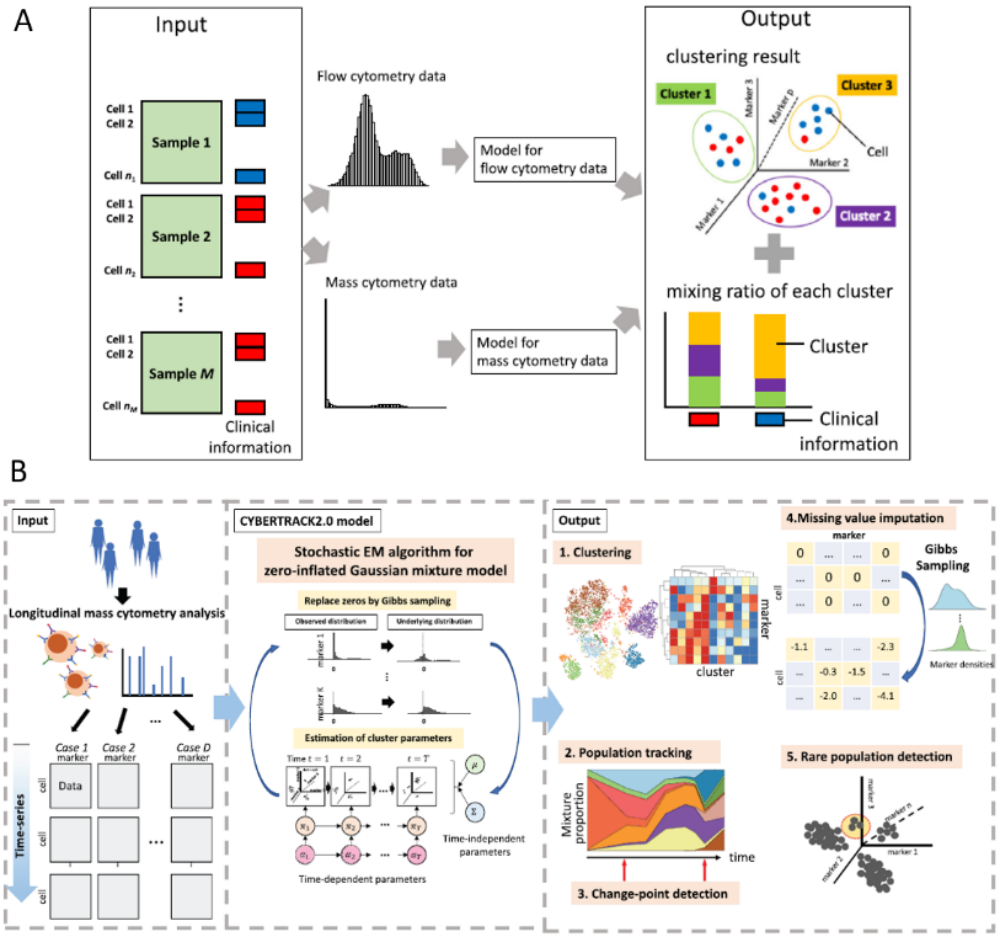


図 1. 開発手法 LAMBDA と CYBERTRACK の概念図

A）開発手法 LAMBDA の概念図。

B）開発手法 CYBERTRACK の概念図。

結果および考察

1. ヒト黒色腫腫瘍における抗 PD-1 免疫療法の臨床反応性に関わる細胞集団の探索

抗 CTLA-4 抗体薬、および抗 PD-1 抗体薬などの免疫チェックポイント阻害剤は、一部の患者に持続的な効果をもたらすことができるが、多くの患者で十分な治療反応性が得られない分子メカニズムについては、十分に理解されていない。そこで、本研究で開発した手法［1］を、ヒト黒色腫腫瘍浸潤 T 細胞集団を包括的にプロファイリングしたマスサイトメトリーデータ［3］に適用し、チェックポイント阻害剤に反応する 11 個の細胞集団を同定した（図 2A）。興味深いことに、チェックポイント阻害剤投与で状態が悪化した（PD：progressive disease）細胞集団では、クラスター2 に相当する細胞集団が多く存在することがわかった（図 2B）。クラスター2 は、$CD8^{+}$、T-bet lo、EOMES hi、PD1hi、Ki67 lo の細胞集団であり（図 2A）、疲弊した T 細胞の特徴を有する。この結果から、PD-1、CTLA-4、TIM-3 などの様々な共抑圧分子が長期的に誘導されることで、T 細胞が機能不全に陥ることでクラスター2 に相当する細胞集団が増加し、免疫チェックポイント阻害剤で PD1／PDL-1 経路をブロックしても治療反応性を示さないことが示唆された。上記の結果は、Blackburn らにおける研究［4］とも一致するものであり、開発手法の有効性が示された。

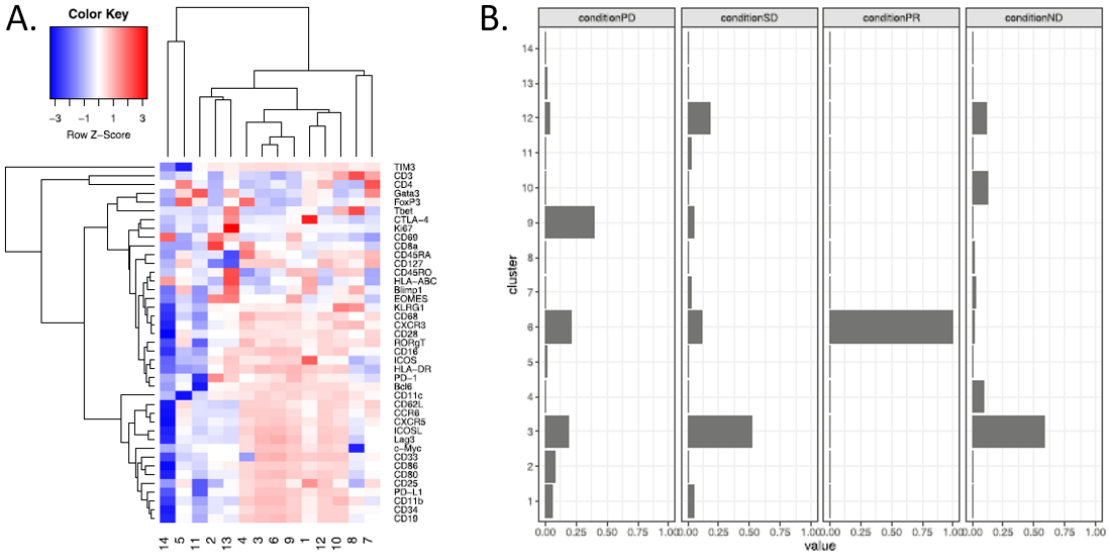


図 2. 開発手法 LAMBDA によるヒト黒色腫腫瘍マスサイトメトリーデータの解析結果

A）同定した 11 個の細胞集団における蛋白の発現プロファイル。

B）同定した 11 個の細胞集団の臨床反応性の異なる患者サンプルに占める割合。

2. ヒト黒色腫腫瘍における抗 PD-1 免疫療法薬治療前後で変化する細胞集団の探索

本研究で開発した手法［2］を、抗 PD-1 免疫療法を受けたメラノーマ患者 10 名（治療反応群：5 名、治療非反応群：5 名）における末梢血生検のマスサイトメトリーデータ［5］に適用し、免疫療法治療前後で変化する 31 個の細胞集団を同定した（図 3A）。解析の結果、$CD3^+$ $CD4^+$ ヘルパーT 細胞（クラスター12、14、16、25、30）、$CD3^+$ $CD8^+$ 細胞傷害性 T 細胞（クラスター4、8、11、18、29）、$CD16^+$ $CD56^+$ NK 細胞（クラスター6、19、24）。$CD3^+$ $CD16^+$ $CD56^+$ NKT 細胞（クラスター27）、γδT 細胞、$CD19^+$ B 細胞（クラスター3、7、17）、$CD19^-$ HLA^- DR^+ 骨髄細胞（クラスター2、5、10、26、28、31）などのよく知られた細胞集団が同定されていることがわかった。また、個々の患者における混合細胞集団の割合の経時的な変化を図 3B に示す。興味深いことに、ほとんどの細胞集団において、治療に伴う移行の方向性は患者間で一貫しており、クラスター2、5、10、31 に属する細胞集団は、非応答者よりも応答者で明らかに多いことがわかった。これらのクラスターでは骨髄細胞が多くを占めており、HLA-DR を高レベルで発現している骨髄細胞の割合が、抗 PD-1 治療に対する反応性の強力な予測因子となる可能性が示された。

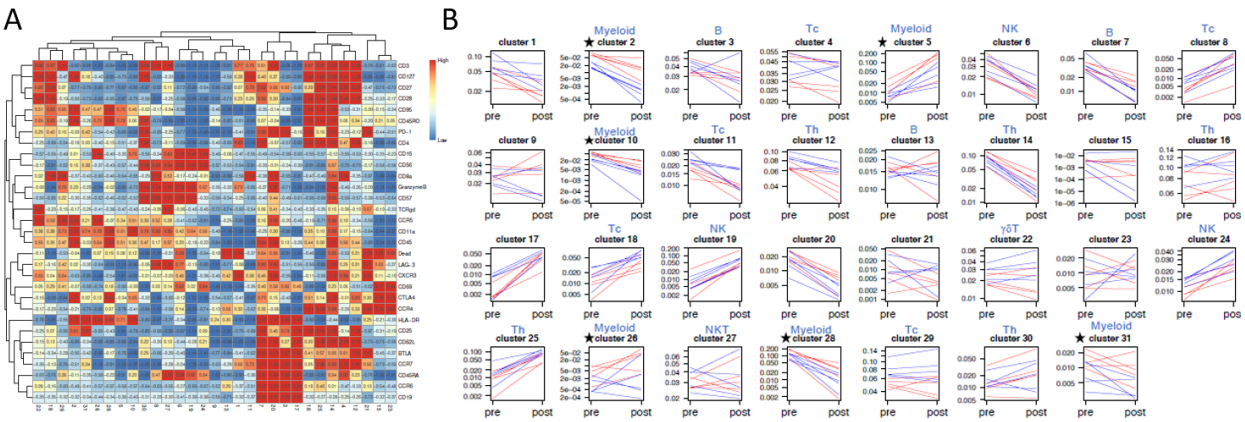


図 3. 開発手法 CYBERTRACK によるヒト黒色腫腫瘍時系列マスサイトメトリーデータの解析結果

A）同定した 31 個の細胞集団における蛋白の発現プロファイル。

B）抗 PD-1 免疫療法前後における同定した 31 個の細胞集団の割合。赤は治療反応群、青は治療非反応群を表す。

3. 細胞運命決定過程における細胞集団の時間的ダイナミクスの解明

本研究で開発した手法［2］を、がん免疫以外の文脈における免疫細胞集団のダイナミクスを捉えることができるかを評価するために、ヒト臍帯血から造血幹細胞および前駆細胞（HSPCs）を精製し、赤血球を促進する環境下で採取した時系列マスサイトメトリーデータ［6］に適用し、ヒト赤血球生成過程の時間経過による細胞集団の系統動態を同定した（図 4A）。データは 8 つの時点（0 日目、4 日目、6 日目、8 日目、10 日目、11 日目、12 日目、14 日目）で採取されており、巨核球を促進する転写因子と考えられる FLI1 が、巨核球系への分化を直接引き起こすかどうかを調べるため、2 日目に Flag タグ付き FLI1（Flag-FLI1）を発現するレンチウイルスを細胞に感染させた。この結果、データには、感染した Flag-FLI1 発現細胞と非感染細胞が混在しており、抗 Flag 抗体を用いて区別することが可能である。解析の結果、$CD34^+$ HSPCs（クラスター12、13）、$CD34^+$ $CD38^+$ $PU.1^+$ $GATA1^+$ common myeloid progenitors （CMPs）（クラスター8）、$CD71^+$ $CD235ab^+$ erythroid （クラスター4、10）、$CD41^+$ $CD49f^+$ $CXCR4^+$ megakaryotic cell（クラスター5、16）、CD44hi GATA2hi basophils （クラスター7）などの細胞系譜が確認された（図 4A）。興味深いことに、今回の解析で検出された 2 つの巨核細胞集団は、異なるレベルの Flag タグを発現しており、クラスター16 では Flag の発現が非常に高かったが、クラスター5 では低～中程度にとどまっていた。このことから、クラスター16 は Flag-FLI1 の異所性発現によって誘導された系譜であり、クラスター5 は内因性の発生によって出現した巨核細胞系譜である可能性が示唆された。また、細胞集団の混合比率の経時的な変化を図 4B に示す。この推定された混合比率は、細胞集団の連続的な出現を示しており、造血中の異なる時点で異なる集団がピークに達することを示している。0 日目には HSPC が主な集団となり、続いて CMP が 4 日目にピークを迎える。続いて、異所性の Flag-FLI1 を持つ巨核細胞集団が急速に増加し、内在性の巨核細胞と好塩基球の数が徐々に増加し、8～11 日目頃にピークを迎える。最後に、赤血球細胞集団は 12 日目頃から拡大し始め、14 日目まで優勢であった。4 日目、12 日目、14 日目には全体の混合比率が劇的に変化したが、6 日目、10 日目、11 日目には安定していたことが推定されていることがわかった。これらの結果から、開発手法が細胞集団の時間的ダイナミクスを容易に解釈できるツールとして有用であることが示された。

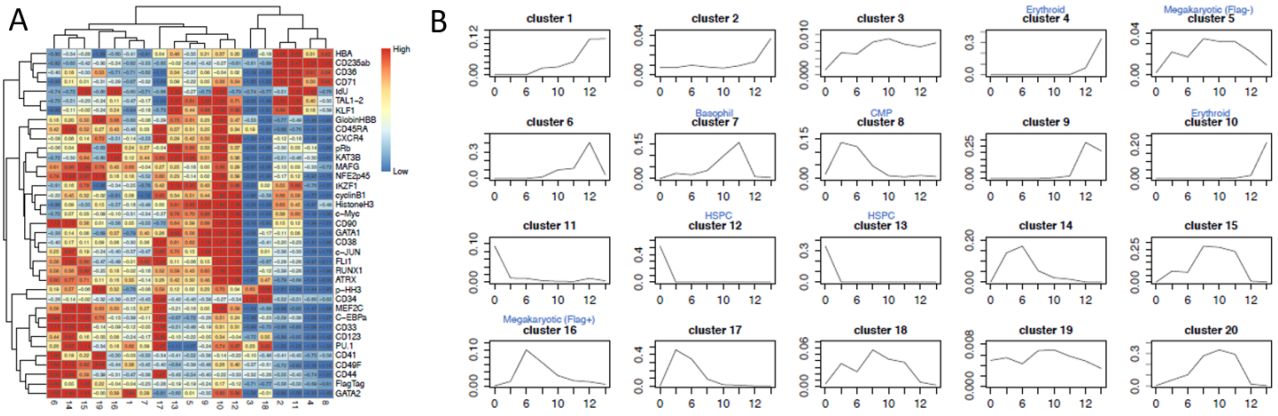


図 4. 開発手法 CYBERTRACK によるヒト赤血球生成過程における時系列マスサイトメトリーデータの解析結果

A） 同定した 20 個の細胞集団における蛋白の発現プロファイル。

B） 細胞運命決定過程における 20 個の細胞集団の割合。

共同研究者

本研究の共同研究者は、神戸薬科大学薬学部薬学科医療統計学研究室の阿部興講師である。

文　献

1) Abe K, Minoura K, Maeda Y, Nishikawa H, Shimamura T. Model-based clustering for flow and mass cytometry data with clinical information. BMC Bioinformatics. 2020 Sep 17;21(Suppl 13):393. doi: 10.1186/s12859-020-03671-7. PMID: 31881827

2) Minoura K, Abe K, Maeda Y, Nishikawa H, Shimamura T. CYBERTRACK2.0: zero-inflated model-based cell clustering and population tracking method for longitudinal mass cytometry data. Bioinformatics. 2020 Oct 14:btaa873. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa873. PMID: 33051653

3) Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, Zhao Y, Anang NAS, Andrews MC, Sharma P, Wang J, Wargo JA, Pe'er D, Allison JP. Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. Cell. 2017 Sep 7;170(6):1120-1133.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.024. Epub 2017 Aug 10. PMID: 28803728

4) Blackburn SD, Shin H, Freeman GJ, Wherry EJ. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by α PD-L1 blockade. Proc Natl Acad Sci. 2008;105(39):15016–21. doi: 10.1073/pnas.0801497105. PMID: 18809920

5) Krieg C, Nowicka M, Guglietta S, Schindler S, Hartmann FJ, Weber LM, Dummer R, Robinson MD, Levesque MP, Becher B. High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. Nat Med. 2018 Feb;24(2):144-153. doi: 10.1038/nm.4466. Epub 2018 Jan 8. PMID: 29309059

6) Palii CG, Cheng Q, Gillespie MA, Shannon P, Mazurczyk M, Napolitani G, Price ND, Ranish JA, Morrissey E, Higgs DR, Brand M. Single-Cell Proteomics Reveal that Quantitative Changes in Co-expressed Lineage-Specific Transcription Factors Determine Cell Fate. Cell Stem Cell. 2019 May 2;24(5):812-820.e5. doi: 10.1016/j.stem.2019.02.006. Epub 2019 Mar 14. PMID: 30880026