# Xenium Human Immuno-Oncologyパネルを 用いた腫瘍微小環境の分子的解析

## 要約

がんはクローンとして始まり、多様化して集団を成し、腫 瘍を形成し、正常な組織の形を変化させます。これらの事 象は、転写の変化、細胞の変化、空間的変化によって引き 起こされます。したがって、腫瘍の発生と進行の特徴付け を進め、最終的には治療薬候補に関する知見を深めるため に、これらの変化を理解する必要があります。

この解析では、卵巣、肺、膵臓がんおよび悪性脳腫瘍の サンプルを用いて腫瘍の組織化と腫瘍微小環境(TME) の研究を行うために、380遺伝子を含むXenium Human Immuno-OncologyパネルをXenium In Situプラットフォー ムで使用しました。ここでは、in situデータから健常細胞 集団とがん細胞集団の正確な特徴付けをどのようにして行 えるかを示し、これらの細胞を複雑な腫瘍組織内で空間的 に層別化し、疾患の進行や治療の転帰において重要性を有 すると思われるTME構造を明らかにします。

## はじめに

世界的に、6人に1人ががんが死因で亡くなっており、合計で年間約1000万件の死亡を引き起こしています。この数は近年減少しているという心強い事実がありますが、これは検出法の改善、バイオマーカーの進展、治療薬の改良に負うところが少なくありません。

これらの進歩を支えている共通の側面は、腫瘍発生と腫瘍 微小環境(TME)、がん細胞の発生と拡散の機序、腫瘍が発 達し組織化されて明確な空間的ニッチを形成する機序、 TMEと個々の細胞タイプが影響し合い相互作用する機序に ついて理解が進んだことです。このような変化に基づいて 医薬品開発に使用できるバイオマーカー候補を明らかにで き、がん治療薬を改善する可能性が得られます。したがって、 これらの変化の転写構造と空間的構造が重要となります。

# ハイライト

- Xenium Human Immuno-Oncologyパネルにより、
  細胞タイプと空間的組織を正確に特定できた
- Xenium Immuno-Oncologyパネルは、免疫細胞を 正確に分類し、NK細胞集団と制御性T細胞集団を 特定し、ヒト肺がんにおけるT細胞疲弊の程度を 区別した
- Xenium Immuno-Oncologyパネルを用いた解析で 膵臓がんと神経膠芽腫において三次リンパ構造 と偽柵構造がそれぞれ明らかにされたことから、 この方法でTMEの病理学的および臨床的に重要 な側面を明らかにできることが実証された

このアプリケーションノートでは、Xenium In Situと Human Immuno-Oncologyパネルがこれらの重要な問題を どのように解明できるかを示します。Xeniumの感度と特 異性を活用してヒト卵巣がん組織を検査し、異なる空間的 ニッチに組織された複数の細胞タイプの特徴付けを行いま した。ヒト肺がんにおけるさまざまな免疫細胞タイプを正 確に分類し、T細胞とNK細胞の疲弊のエビデンスを特定し ました。次に、Xenium Human Immuno-Oncologyパネル を用いて、ヒト膵管がんの三次リンパ構造(TLS)を特定し ました。TLSはがん近傍に形成される免疫凝集体で、疾患 の予後や治療反応性に関連します(1)。最後に、Xeniumを 用いて偽柵構造(神経膠芽腫で認められる誘斑 学的特徴)の解析を行い、低酸素部位と腫瘍遊走部位に対 応する空間的近傍の詳細な解像を行いました。





#### 図1.ヒト卵巣がんのFFPEサンプルの近傍空間解析で細胞構成の異なる明確なニッチを確認

A. 近傍を構成する細胞を色分けし、ニッチ解析を可視化。B. グラフのバーはそれぞれニッチを表し、積み重ねた構成要素は各ニッチの細胞タイプ構成を示す。C. 縦に示したグループはランク付け遺伝子解析の結果を示しており、各ニッチ内の細胞タイプを反映する差次的遺伝子発現がみられる。

## 方法

#### サンプルおよびその採取

乳がん(浸潤性乳管がん)、漿液性卵巣がん、非小細胞肺 がん、膵管腺がん、多形神経膠芽腫について、FFPE組織 ブロック1個を使用しました。各タイプのがんについて、 ミクロトームを用いてFFPEブロックから5µmの連続切片 を薄切しました。

#### Xeniumパネルの設計

Xenium Human Immuno-Oncologyパネルは、主要な免疫 細胞タイプマーカー、がんマーカー、チェックポイント阻 害剤などに焦点を当て、380の遺伝子を用いて設計されま した。影響力の高い遺伝子と光学制約とのバランスを取り、 高性能のベースパネルを実現しました。このパネルについ ては、他のカスタマイズは行っていません。

#### XeniumのワークフローとXenium後のH&E染色

Xeniumのワークフローは、Xenium In Situ Gene Expression Probe Hybridization、Ligation & Amplification User Guide (CG000582, Rev F)、Xenium Analyzer User Guide (CG000584, Rev F)の記載に従います。Xenium後H&E染色 は、Demonstrated Protocol (CG000613)に従って実行しま した。

#### 細胞タイプアノテーション

Xeniumで 収 集 し た 画 像 デ ー タ は、Xenium Onboard Analysisを用いて処理しました。教師なしクラスタリング 後、各クラスターについてlog2倍率変化が大きい上位7個 の遺伝子がまとめられました。このクラスター別リスト をAnnotation of Cell Types(ACT)アノテーションツール (2)に入力し、このツールが出力する確率的細胞タイピン グデータを使用してクラスター化された細胞タイプを定 義しました。

#### ニッチ解析

ニッチは、教師なしクラスタリングデータならびに Xenium Onboard Analysisから得られたラベルおよび細胞 空間データに基づいて決定しました。ニッチをSeurat v5 BuildNicheAssay(3)機能で処理した結果、k近傍法でクラ スター化した個々の細胞のニッチラベルが出力され、同 等の細胞構成を有する領域が示されました。

### 結果

#### Xenium In Situによる、がん細胞、免疫細胞、間質細胞 集団間の正確な空間層別化

この研究の目的は、Xenium Human Immuno-Oncologyパネ ルを用いて、さまざまな種類のがんの細胞タイプと細胞の 状態を転写面で、また空間的に特徴付けることでした。こ のパネルから得られたデータを用いて、これらのがんに認 められる特徴の根底を成すと考えられるがんドライバー、 細胞シグナル伝達経路、異常な組織構造などを特定するこ とを目指しました。

まず、ヒト卵巣がんのFFPEサンプルから始めました。近傍 性解析により腫瘍の不均一性が明確になり、9つの空間的 ニッチが明らかになりました(図1)。シングルセルタイピ ング解析(2)により、これらのニッチは異なる細胞構成を有 することが明らかになりました。例えば、空間的クラスター 6および8には線維芽細胞が多く、マクロファージに隣接し ていることが判明しました。 空間的クラスター1、3、5は、主として高密度で腫瘍に富 んだ領域に見られました。これらのニッチに隣接する細胞 タイプは少なく、がん細胞集団がさまざまな割合で豊富に 含まれていました。対照的に、空間クラスター0および4は、 線維芽細胞に隣接する末梢腫瘍領域から得られました。最 後の2つのクラスター(2および7)は、それぞれCD4陽性T細 胞および好中球を多く含んでいました。

このように、Xenium Human Immuno-Oncologyパネルによ る遺伝子の補完により細胞タイプの層別化を正確に行え、 これはがん細胞、免疫細胞、間質細胞集団のTME間に認め られる既知の関係と一致することが確認されました。

#### ヒト肺がんにおける細胞タイプの特徴を明らかにし、 T細胞の疲弊を特定

次に、Xenium Human Immuno-Oncologyパネルを用いて ヒト肺がんのFFPEサンプルを調べました。ACTを用いて、 免疫細胞、がん細胞、線維芽細胞、内皮細胞などさまざ まな細胞タイプを特定できました(図2A)。適応免疫細胞 タイプに焦点を当て、形質細胞、B細胞、T細胞の集団の 解像を行いました。CD4およびCD8Aを調べることでこれ らの細胞系が確認され、CD8AはNK細胞2クラスターにお いてアップレギュレートされていました(図2Aおよび 2B)。



#### 図2.Xenium Human Immuno-Oncologyパネルでヒト肺がんFFPEサンプルの正確な免疫細胞タイピング

A. ACT細胞タイピングベースの手法を用いた Immuno-Oncologyパネルは、細胞タイプの集団を層別化できた。B. T細胞マーカーである*CD*4(マクロファージにも発現)と*CD8A*(一部のNK細胞に発現)の数から、制御性T細胞とNK細胞は細胞タイピングの結果と一致することが確認された。

T細胞疲弊は免疫ベース療法の大きな障害であるため(4)、 次に疲弊T細胞のマーカー(CTLA4、DGKA、GZMK、 LAG3、PDCD1、TIGIT)について組織を調べました。この 際、これらのマーカーが高発現する領域に焦点を当てま した(図3A)。この領域内で、これらのマーカーを発現し

ているNK細胞と制御性T細胞を識別できました。そのう ち1つの集団ではCTLA4が高度に発現しており、疲弊度が 高いことが示されました。この結果は、このパネルは疲 弊したT細胞を区分し、その疲弊レベルを評価できること を示しています。

Α



# 緑色は中発現、青色は低発現を示す。B.この領域を拡大すると、これらのT細胞集団内でT細胞疲弊に関連する遺伝子が強い空間的相関を示してい

4

ることがわかる。

### Xenium Immuno-Oncologyパネルは、膵臓がんと悪性 脳腫瘍の三次リンパ構造を可視化

次に、がんサンプル中の三次リンパ構造(TLS)(腫瘍近傍 を形成する免疫細胞の凝集体)の特定を試みました。まず、 Xenium Immuno-Oncologyパネルを用いてヒト膵管がん FFPEサンプルを調べ、複数のTLS部位を特定しました。 TLS領域はT細胞に囲まれたB細胞の核を特徴とし(図4A)、 サイトカイン、増殖因子およびその他のシグナル伝達分子 が高発現していました(図4B)。

# Xeniumを使用することで、がんにおいて病理学的に重要な空間領域を解析

最後に、Xenium Human Immuno-Oncologyパネルを用い て、ヒト神経膠芽腫組織の偽柵構造を調べました。偽柵 構造は神経膠芽細胞腫の特徴であり、血管動員が異常に 多い、遊走腫瘍細胞の環で囲まれたアポトーシス細胞の 低酸素コアが存在することで、血管閉塞が生じている部 位です。まず、血管・内皮細胞遺伝子(CAV1、VEGFA、 CD44など)の発現が異常に高い組織ニッチ(ニッチ8)を特 定しました(図5)。

この領域に注目し、H&E染色を行うことで、偽柵構造を 可視化できました(図6A)。空間的近接性解析によりこれ を確認した結果、ゾーン2と4では全体的な遺伝子発現が 低く(低酸素コアと一致)、ゾーン3、1、0では血管・内 皮遺伝子が高度に発現していました。このように、 Xeniumは病理的な関心領域を分子的に分離できることが 示されました。



#### 図4. Xeniumで解像したヒト膵管腺がんの三次リンパ構造

A.TLSは膵上皮で認められ、各TLSにはT細胞(赤色)に囲まれたB細胞(緑色)の密なコアが認められた。B.画像Aの囲み領域の拡大図。免疫マーカー CXCL13とCXCL12は両者とも主にB細胞集団で認められ、一方、IL7RとCCL21はT細胞集団で高度に発現していた。







#### 図5.ヒト神経膠芽腫FFPEサンプルの空間的近傍性解析で明らかになった血管遺伝子発現が異常に高い小領域

A. 神経膠芽細胞腫の画像にはニッチ8が認められ、がんの侵襲、浸潤、血管新生の各マーカーであるCD44、CAV1、VEGFAのアップレギュレーションが生じている。B. ニッチ8における遺伝子のアップレギュレーションを示すプロット。ニッチ8における血管新生と侵襲性を示す。C. ニッチ8の細胞タイプ構成の内訳。



#### 図6.ヒト神経膠芽腫における偽柵構造の組織学的解析と空間解析を併用することで、さまざまな遺伝子発現プロファイルを有する異なる空間的 近傍が明確化

A. H&E染色したヒト神経膠芽腫組織には、低酸素性のアポトーシス細胞(青色)の密な核を有し、腫瘍細胞(緑色)に囲まれた偽柵構造が認められる。 B. 同じ偽柵構造のXenium解析により、近傍3、0、1(内皮・血管新生遺伝子の高発現を特徴とする)および近傍2と4の2つの明確なゾーンが明らか になった。

## 考察

本アプリケーションノートに示した結果は、さまざまな複 雑な組織において種々のがんが示す転写構造、細胞構造、 空間構造を分子的に解析するために、Xenium Human Immuno-Oncologyパネルが有用であることを示していま す。Xenium In Situの優れた性能と組み合わせることで、 Immuno-Oncologyパネルで得られた検証済み遺伝子リスト を用いてがんの細胞タイプとその位置について分子的解析 を行い、偽柵構造やTLSなどの病理学的構造を明確に解像 できることがこの研究で示されました。以上のように、こ れらの所見は、がんで観察される病理の根底にある機序や、 近位腫瘍およびTMEに対する免疫細胞の応答に対する理解 を助けるより深い知見を、Xenium Human Immuno-Oncologyパネルが提供できることを示しています。

# 参考文献

- 1. Wang Q, et al. Tertiary lymphoid structures predict survival and response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. *NPJ Precis Oncol* (2024). doi: 10.1038/ s41698-024-00533-w
- 2. Quan F, et al. Annotation of cell types (ACT): a convenient web server for cell type annotation. *Genome Med* (2023). doi: 10.1186/ s13073-023-01249-5
- 3. Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., et al. (2021). Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, 184(13), 3573-3587. doi.org/10.1016/j. cell.2021.04.048
- Chow A, et al. Clinical implications of T cell exhaustion for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* (2022). doi: 10.1038/ s41571-022-00689-z

# リソース

この資料や他の関係資料で使用されているXeniumデータセットは、10xgen.com/xenium\_datasetsでダウンロードできます。

LIT000227-JP\_RevA\_Xenium Human Immuno-Oncology Panel App Note

© 2024 10x Genomics, Inc. FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

