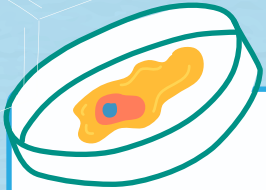
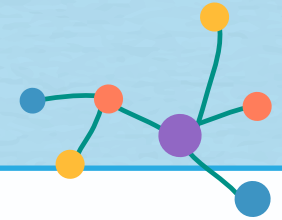
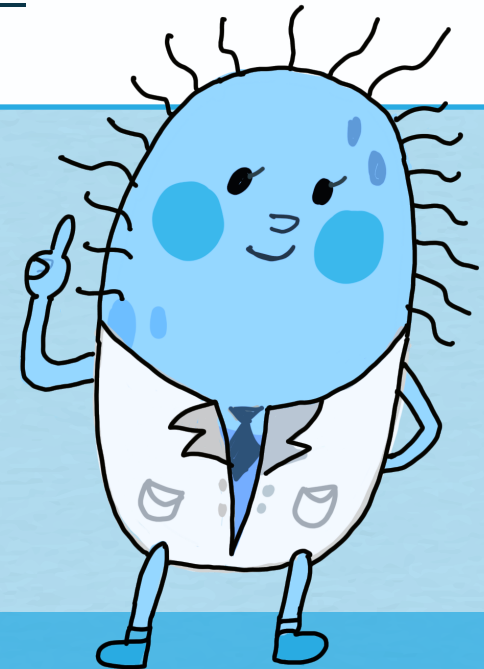
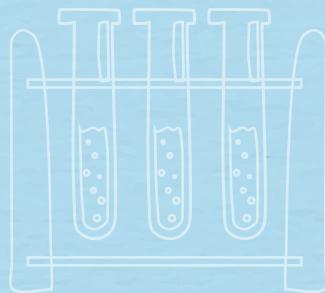
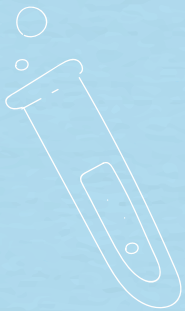
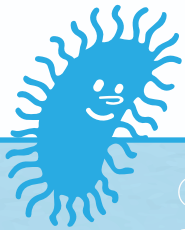


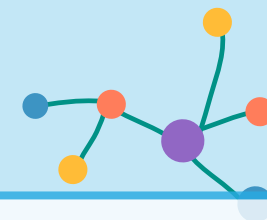
/ ACD Na Li



在非小細胞肺癌石蠟樣本中使用RNAscope®結合 免疫螢光法原位檢測腫瘤浸潤型免疫細胞特殊亞型

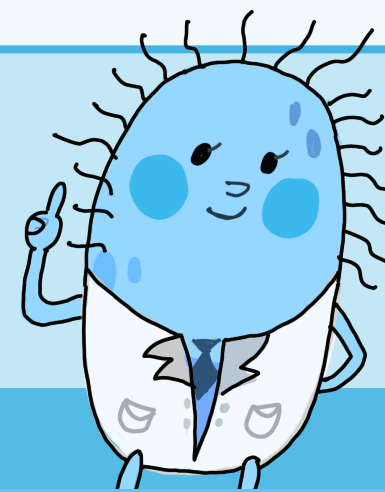
—— 評估NSCLC病人潛在免疫治療反應效果 ——

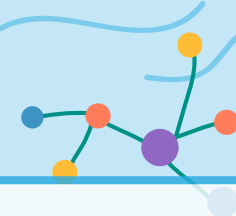




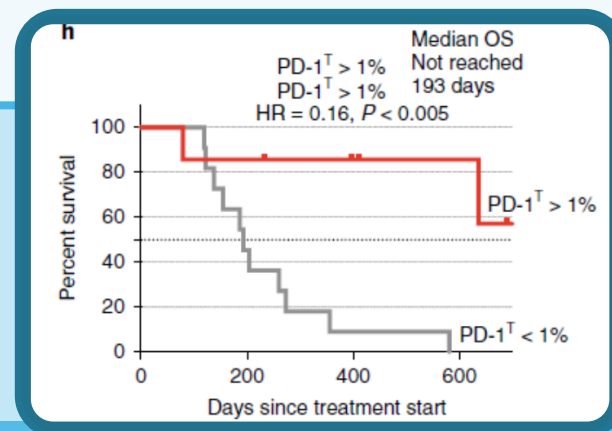
腫瘤免疫治療方法的出現為腫瘤治療帶來新的希望。隨之出現的以PD1/PD-L1抗體治療為主的免疫治療方法已經應用於臨床，並在一部分病人體內顯現正面效果。然而由於免疫治療本身的價格不菲，且並不是所有病人都會對免疫治療產生有效的反應，如何尋找適合免疫治療的病人成為腫瘤治療領域的一個熱門議題。

2019年4月在美國亞特蘭大的AACR 2019年會上，針對這一問題，展開了多場專題報導。這其中腫瘤細胞PD-L1表現量，免疫T細胞浸潤(T immune cell infiltration)，腫瘤突變負荷(tumor mutation burden)， γ 型干擾素基因表現標記(IFN- γ gene expression signature)等都成為預測腫瘤細胞對於PD-1/PD-L1抗體治療較為認可的一些檢測目標。

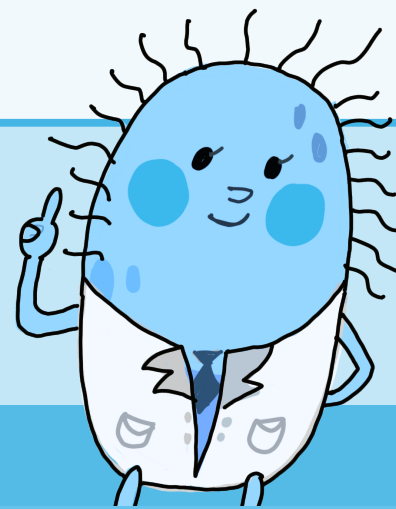
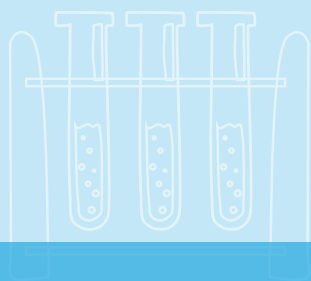


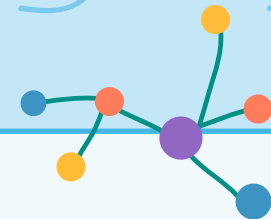


在免疫T細胞浸潤方面，2018年7月發表在Nature medicine上的一篇文章報告發現在非小細胞肺癌病人接受PD-1抗體免疫治療時，病人腫瘤內浸潤的一個特定CD8⁺T細胞亞型，高度表現PD-1的同時分泌CXCL13細胞趨化因子，這一亞型的細胞與免疫治療的效果以及病人的整體存活期有顯著預測關係。在這篇研究報導中，瑞士巴爾的摩大學醫院的生物醫學實驗室對比了病人腫瘤內浸潤的三種CD8⁺毒殺性T細胞，分別為1) 不表現PD-1 (PD-1^{-/-}) 的 CD8⁺毒殺性T細胞，2) 表現量與正常人外周血單核細胞相似的PD-1 (PD-1^N) 陽性CD8⁺殺傷型T細胞 (毒殺性T 細胞) 以及3) 比正常人外周血單核細胞表現的PD-1更高 (PD-1^T) 的CD8⁺毒殺性T細胞。研究結果顯示第三種腫瘤浸潤T細胞的細胞整體轉錄體與前兩者有明顯差異，其中最大的不同就是高度表現CXCL13這個細胞趨化因子。而當腫瘤內該種PD-1^T，分泌CXCL13的CD8⁺細胞大於1%時，病人的整體存活率 (OS) 有顯著提高 (見下圖)。

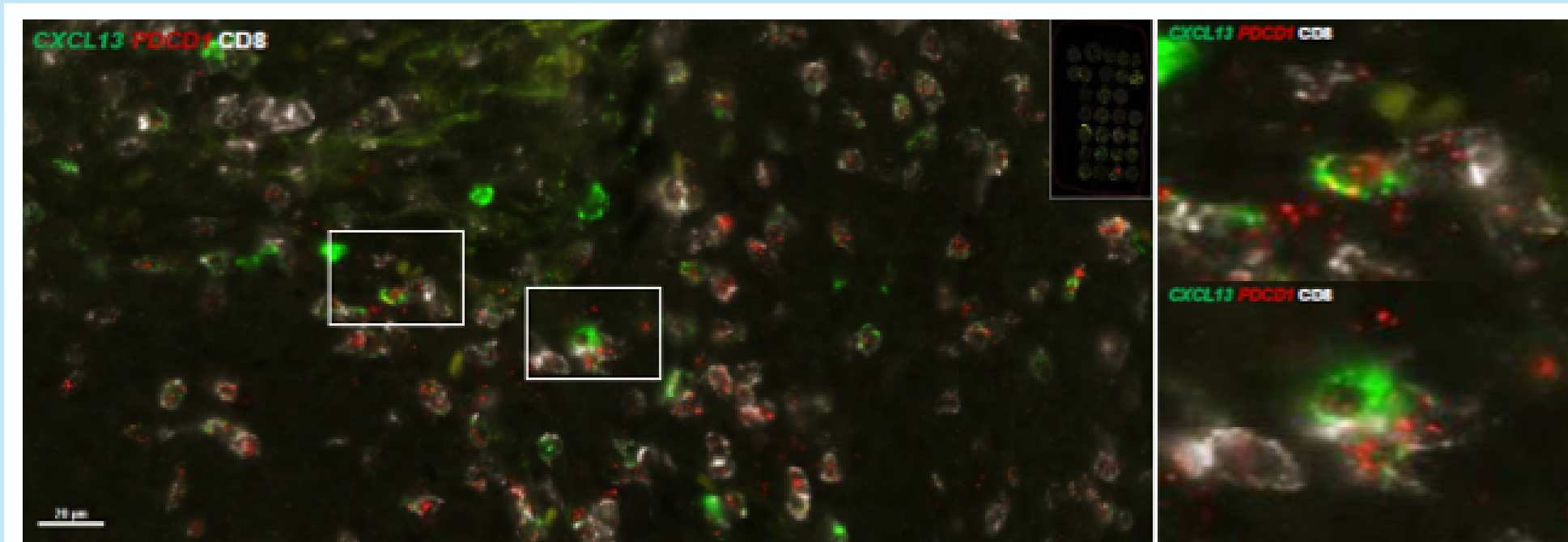


以上研究報導是在流式細胞儀進行的分析。臨床上的腫瘤治療過程中，手術後腫瘤石蠟樣本是常規保存的疾病相關研究分析材料，腫瘤的石蠟樣本便於長期保存，回顧性研究以及反覆多次檢測。與此同時，RNAscope®技術作為美國Advanced Cell Diagnostic (ACD) 公司開發的新一代RNA原位雜交產品，可以在石蠟樣本中對RNA進行原位檢測，對於免疫組織化學染色不適用的標靶，例如分泌型細胞因子（例如CXCL13），長鏈非編碼RNA以及抗體效果不佳的基因產物（例如LGR5, GPCR）等的檢測具有相當的優勢。基於這個原因，ACD美國和中國研發實驗室合作在57例非小細胞肺癌病人石蠟樣本製備成的組織晶片上，結合使用RNAscope®多重螢光技術原位檢測PD-1以及CXCL13的RNA陽性細胞，同時結合免疫螢光（immunofluorescence, IF）的方法原位檢測CD8蛋白表達，分析具有PD-1 mRNA, CXCL13 mRNA以及CD8抗原三重陽性的 CD8+T細胞亞群的定位和分佈情況。

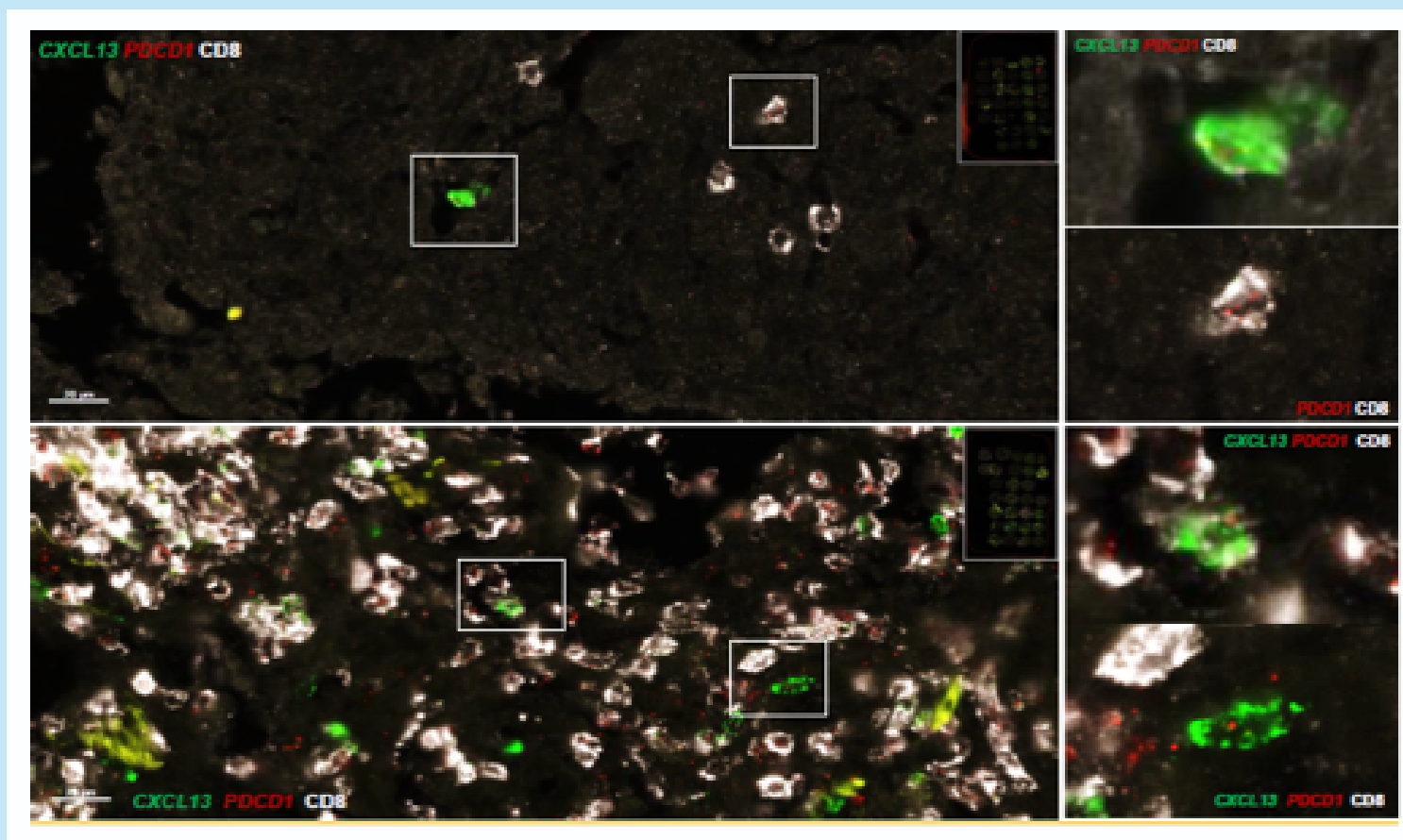
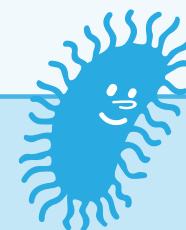




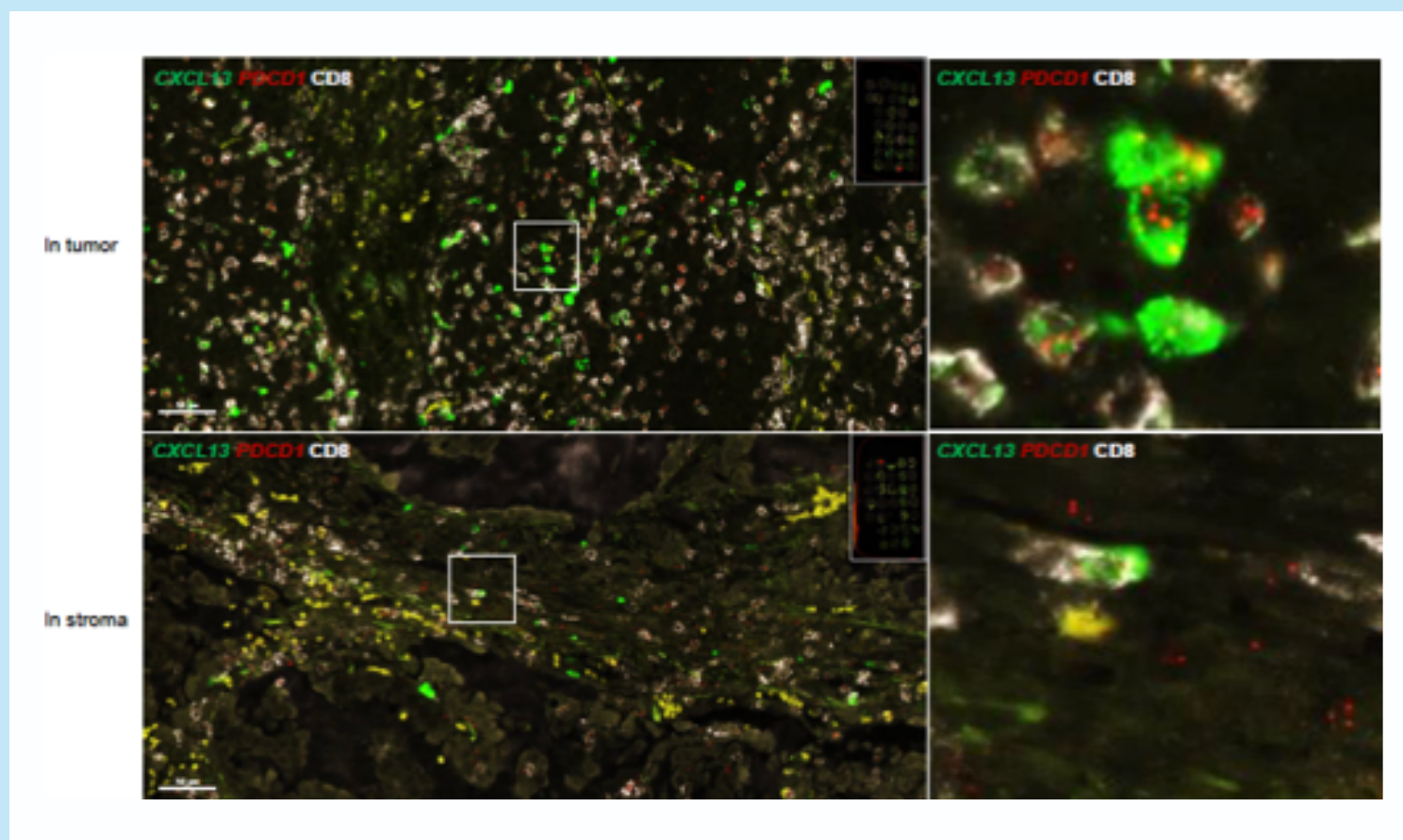
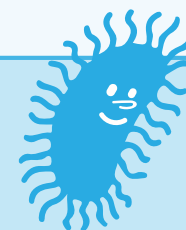
該部分實驗結果寫成的摘要被AACR 2019年年會接受並進行了poster presentation。
實驗結果顯示在非小細胞肺癌的部分病人樣本中觀察到了CXCL13+PDCD1+CD8+的細胞亞群
(PDCD1為PD-1的基因名)(如下圖,右側兩圖為左側白色區域的放大圖片)。



除了含有大量CD8⁺ T細胞的NSCLC腫瘤樣本中具有該類亞群的CD8⁺ T細胞分佈，在少量CD8⁺ T細胞浸潤的腫瘤內，也有該類亞群的分佈（如下圖，右側兩圖為左側白色區域的放大圖片）。



該類CXCL13⁺PDCD1⁺CD8⁺的細胞亞群既分佈在腫瘤內，也在腫瘤的基質內有分佈
(如下圖，右側兩圖為左側白色區域的放大圖片)。



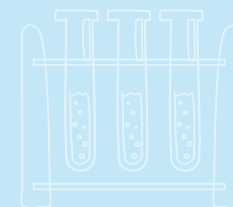
進一步數據分析顯示在57例病人樣本中，有43例NSCLC病人腫瘤石蠟樣本中的CD8⁺T細胞數大於等於20個，其餘14例小於20個。按照 CXCL13⁺PD1⁺CD8⁺ 佔總CD8⁺細胞的比率來看，有5例NSCLC樣本內CXCL13⁺PD1⁺CD8⁺細胞數佔總CD8⁺T細胞的比例大於10%，其餘52例NSCLC病人中CXCL13⁺PD1⁺CD8⁺細胞數不到總體CD8⁺T細胞數的10%。

	>20 cell/sample core	<20 cell/sample core
CD8 ⁺ CTLs	43	14
	>10% of CD8 ⁺ CTLs/sample core	<10% of CD8 ⁺ CTLs/sample core
PD-1 CXCL13 ⁺ CD8 ⁺	5	52

由此可見RNAscope®多重螢光檢測技術結合免疫螢光法可以共定位多個gene的RNA以及蛋白多重陽性的細胞，並同時提供細胞所在的組織空間結構信息。這一方法尤其適用於追蹤那些免疫組織化學技術不適用的分泌特定細胞因子以及表達非編碼RNA的細胞。而本摘要的結果也提示RNAscope®/IF可以幫助檢測評估NSCLC石蠟標本中的特定T細胞亞群，有助於預測不同NSCLC病人對於免疫治療的潛在效果。



RNAscope®技術是由Bio-Techne旗下Advanced Cell Diagnostics (ACD)公司研發的RNA原位雜交產品，在近年來的生物檢測領域發展迅速。與傳統的RNA原位雜交相比，RNAscope®技術屬於新一代RNA原位雜交技術，其特異性的雙Z探針設計避免了傳統長鏈RNA探針的弊端，配以自身級聯(訊號)放大檢測原理，可以高效敏感地檢測到目標RNA。



☆ 該方法的具體優勢如下：

- 1. 應用廣泛：**使用RNAscope®技術，目標RNA為大於等於300個鹼基的特異序列，即可進行探針設計。因而RNAscope®技術可以應用於幾乎所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。
- 2. 特異性強：**RNAscope®獨特的雙Z(ZZ)探針設計有效的防止了探針的非特異性結合，同時降低了背景干擾。由於結合在非特異性位點的單個的Z探針不會產生完整的信號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗掉，從而防止非特異性信號的放大，使得探針的信號具有高度特異性。探針設計合成需要4週時間即可完成。
- 3. 靈敏度高：**RNAscope®方法檢測每個RNA分子時，只需三對雙Z(ZZ)探針即可完成雜交和信號的可視化。



4. 單分子檢測和單細胞定量：使用RNAscope®技術雜交上三對及以上雙Z 探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀信號。ACD公司提供的分析軟件更可以定量每一個單細胞內RNA的表現量。

5. 兼容降解的RNA：由於RNAscope®三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對目標RNA設計的探針為20對雙Z探針，因而即使目標RNA發生部分降解，仍可以穩定有效地檢測到目標RNA。

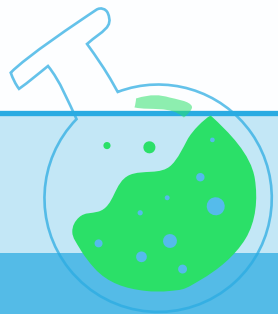
6. 檢測結果穩定一致性：RNAscope®技術用到的探針以及所有檢測試劑全部由工業化合成，且該技術針對不同樣本類型（冰凍切片，石蠟切片，懸浮細胞，貼壁細胞等）已經有成熟的實驗操作流程，故使得RNAscope®技術檢測結果具有穩定性和一致性。除了可以在實驗室進行手工操作外，該產品也可以在Leica以及羅氏Ventana自動平台上運行，為結果的一致性和穩定性提供了可靠的依據。

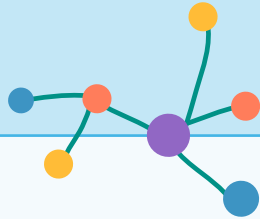
7. 多通道多目標同時檢測：由於RNAscope®技術可以同時進行多通道探針雜交以及信號放大，故在可見光檢測中可以在同一張切片上同時檢測兩個目標；而在螢光檢測過程中，可以在同一張切片上檢測三個或三個以上目標RNA。



BaseScope™技術是由美國Bio-Techne旗下Advanced Cell Diagnostics (ACD)公司研發的RNA原位雜交產品，BaseScope™屬於ACD公司RNAscope®技術基礎上的新一代產品。與傳統的RNA原位雜交相比，RNAscope®技術與BaseScope™技術因其特異性的雙Z探針設計，避免了傳統長鏈RNA探針的弊端，配以自身訊號放大檢測原理，可以高效靈敏地檢測到目標RNA，且不需要像傳統原位雜交那樣要求RNase free的環境。RNAscope®技術可以在高度敏感地原位檢測大於300bp的RNA，而BaseScope則可以實現RNAscope®檢測範圍以外的更短序列的檢測。BaseScope™ assay主要應用於檢測短序列的RNA目標(50-300bp)，例如本文中提到的pre-miRNA；高度同源性序列；RNA點突變，例如EGFR T790M，BRAFV600E，KRAS G12D，PIK3CA H1047R等；外顯子跳躍(Exon Junction)，例如檢測非小細胞肺癌中的METD14，環狀RNA以及基因融合。

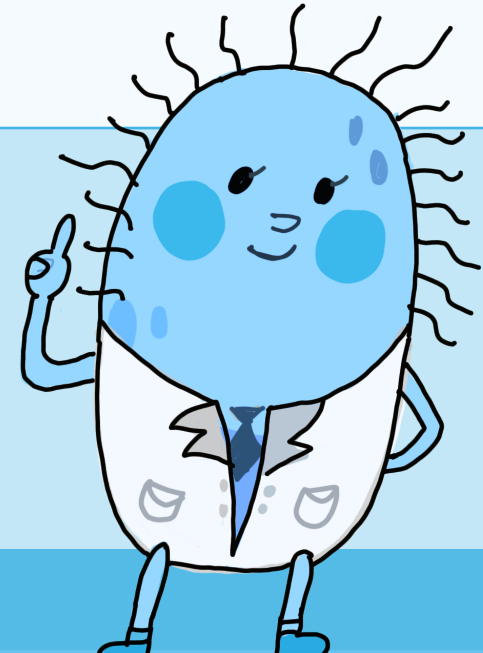
更多RNAscope® 以及BaseScope™相關信息請參見 <https://acdbio.com/products>





Reference:

Nat Med. 2018 Jul;24(7):994–1004. doi: 10.1038/s41591-018-0057-z. Epub 2018 Jun 11. A transcriptionally and functionally distinct PD-1⁺ CD8⁺ T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade.



/ ACD Na Li

在非小細胞肺癌石蠟樣本中
使用RNAscope®結合
免疫螢光法原位檢測腫瘤浸潤型
免疫細胞特殊亞型

—— 評估NSCLC病人潛在免疫治療反應效果 ——