



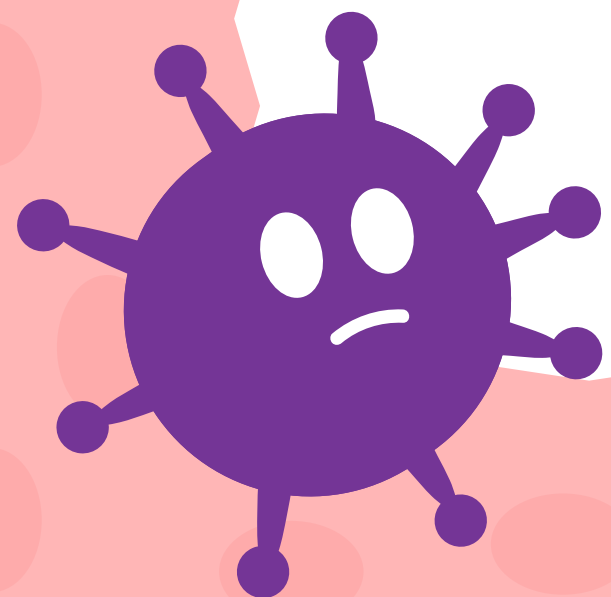
RNAscope在開發TCR-T細胞 反應生物標誌物中的應用



弘晉有限公司
Hong Jing Co., Ltd.



嵌合抗原受體(CAR) T細胞療法已經徹底改變了血液系統惡性腫瘤的治療，但在實體腫瘤中的療效是比較受限的。T細胞受體(TCR)修飾的免疫細胞在包括轉移性HPV相關癌、黑色素瘤、滑膜肉瘤(Synovial Sarcoma, SS)和黏液/圓細胞脂肪肉瘤(Myxoid/Round Cell Liposarcoma, MRCLS)在內的實體瘤臨床治療中表現出很强的活性。SS的特徵是在t[X,18][p11;q11]染色體易位形成SS18-SSX 1、2或4融合蛋白，在適當的細胞環境下，通過SWI/SNF複合物的表觀遺傳干擾驅動惡性轉化。與其他軟組織肉瘤(STS)亞型相比，SS腫瘤的特徵是免疫細胞浸潤異常低，巨噬細胞是其主要的浸潤細胞，這與SS的預後不良密切相關。免疫細胞浸潤不良，加上腫瘤組織中人類白血球抗原(HLA)表達低可能使SS對非細胞免疫治療不敏感，同時免疫檢查點抑制劑也很少有反應，從而強調了TCR-T細胞療法在臨床反應中的重要性。這種易位還會導致NY-ESO-1(紐約食管鱗狀細胞癌1)異常上調，約80%的SS腫瘤表達NY-ESO-1。





nature communications



Article

<https://doi.org/10.1038/s41467-022-32491-x>

Biomarker correlates with response to NY-ESO-1 TCR T cells in patients with synovial sarcoma

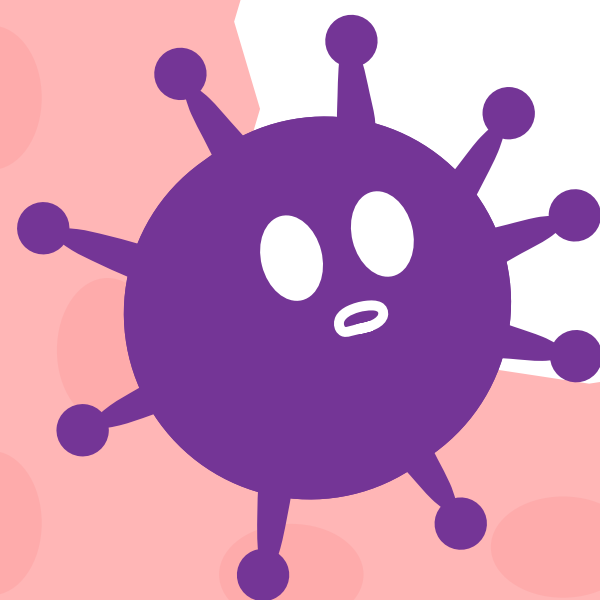
Received: 10 August 2021

Accepted: 1 August 2022

Published online: 08 September 2022

 Check for updates

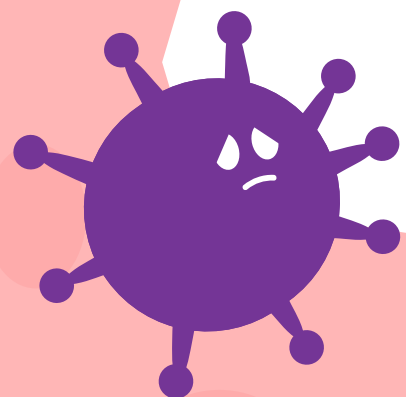
Alexandra Gyurdieva¹, Stefan Zajic¹, Ya-Fang Chang¹, E. Andres Houseman¹, Shan Zhong ¹, Jaegil Kim¹, Michael Nathenson¹, Thomas Faitg¹, Mary Woessner¹, David C. Turner¹, Aisha N. Hasan¹, John Glod², Rosandra N. Kaplan ², Sandra P. D'Angelo ^{3,4}, Dejka M. Araujo⁵, Warren A. Chow⁶, Mihaela Druta⁷, George D. Demetri⁸, Brian A. Van Tine ⁹, Stephan A. Grupp ¹⁰, Gregg D. Fine¹ & Ioanna Eleftheriadou ¹ 





與識別細胞表面抗原的CAR-T細胞不同，TCR-T細胞被改造成具有TCR特異性肽的細胞內腫瘤抗原，這些抗原是由HLA分子呈遞。近期，一項由葛蘭素史克的科學家發表在Nature Communications上的“Biomarker correlates with response to NY-ESO-1 TCR-T cells in patients with synovial sarcoma”的文章，對其NCT01343043項臨床試驗進行了事後分析，確定了lete-cel的反應與清除淋巴細胞化療方案(Lymphodepleting chemotherapy regimen, LDR)、產品屬性、細胞擴增、細胞因子和腫瘤基因表達的關係。轉導表達NY-ESO-1特異性高親和力T細胞受體的自體T細胞(letetreresgene autoleucel, lete-cel；GSK3377794)，由識別NY-ESO-1抗原的高親和力TCR與特異性HLA-A*02等位基因複合物轉導的自體CD4+和CD8+T細胞組成，在轉移性SS的治療中顯示出很好的療效。一項逆轉錄病毒轉導NY-ESO-1 TCR-T細胞與白細胞介素(IL)-2治療的臨床試驗(NCT00670748)顯示，61%的SS患者有客觀臨床反應，而另一項研究(NCT01343043)發現，接受lete-cel治療的晚期SS患者有高達50%的腫瘤免疫反應。

爲了進一步提高治療效果，有必要確定預測反應的細胞產物特性和生物標誌物。在血液系統惡性腫瘤中，輸注當日 and 輸注後的峰值細胞擴增和細胞因子水平與CAR-T細胞的反應和緩解有關。然而，很少有確定的TCR-T細胞治療實體瘤相關的生物標誌物。本研究報告了NCT01343043的分析結果，確定了影響體內細胞擴增和與臨床反應相關的清除淋巴細胞化療方案(LDRs)、細胞劑量和細胞產物的特定屬性。文章還報導了細胞治療誘導的巨噬細胞基因表達降低腫瘤微環境(TME)的初步趨勢。這些發現有助於逐步理解SS(實體瘤模型)對TCR-T細胞治療的反應和藥物耐受性機制，並爲進一步的免疫治療發展提供思路。





本文中展示了一個有趣的病例，強調了scRNAseq分析的必要性。該病例在輸注TCR-T細胞後919天的活檢組織中發現了細胞腫瘤浸潤的證據，並且T細胞在血液中持續了超過1500天(如圖1)。作者進一步使用ACD公司的RNAscope技術和免疫組化分析TCR-T細胞和CD3 mRNA的分布，顯示了NY-ESO-1(90%陽性)以及PDL1和LAG-3在相同組織區域的表達(如圖2)。

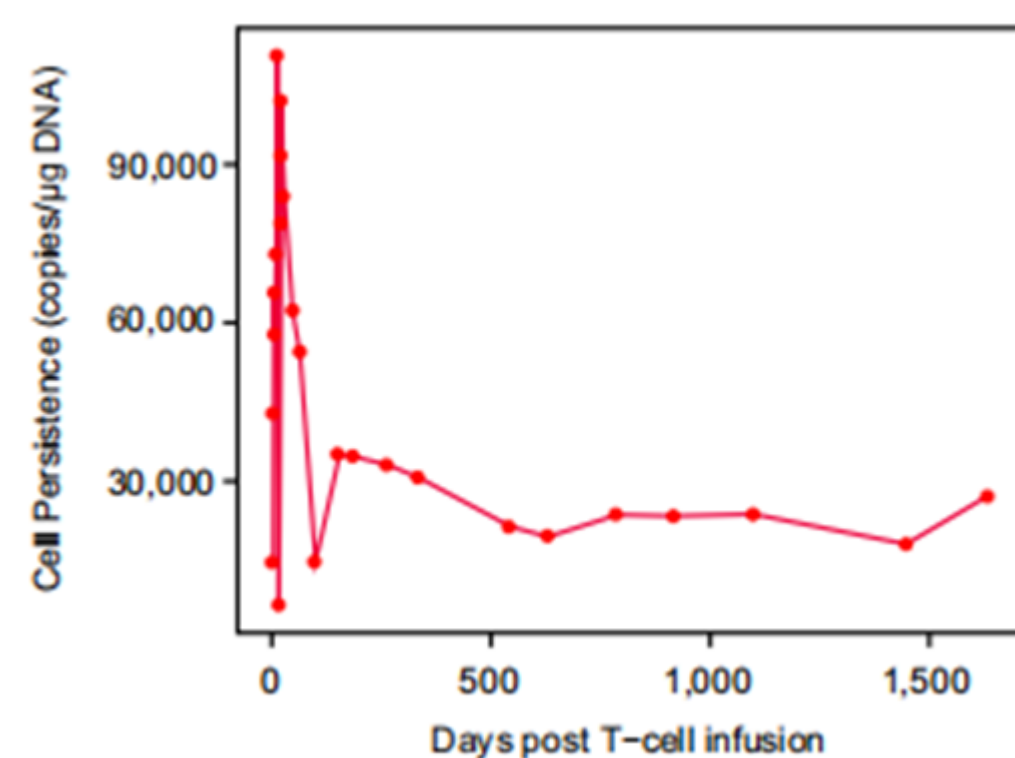
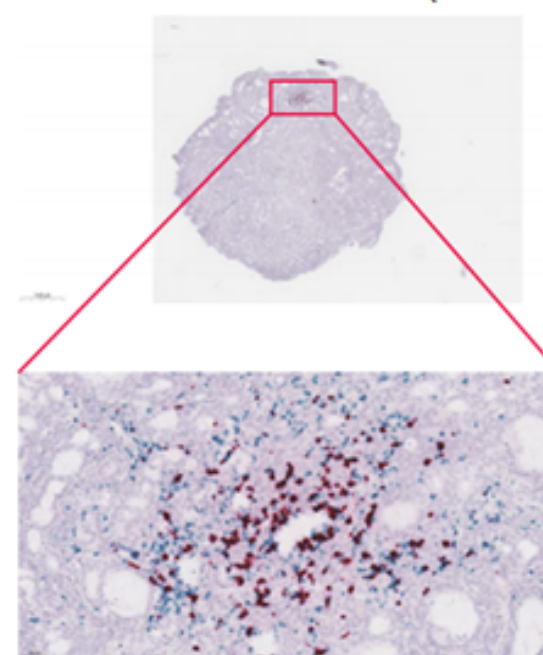
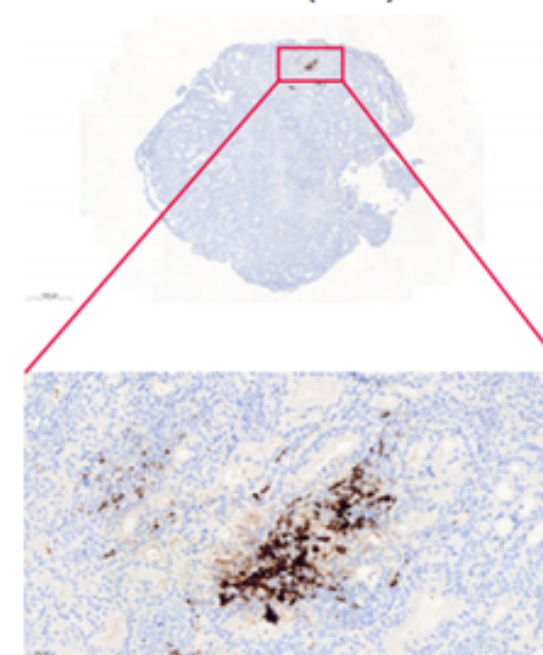


圖1 病人血液內藥物隨時間的變化量。

CD3 and lete-cel infiltration (RNAscope)



PDL1 (IHC)



LAG3 (IHC)

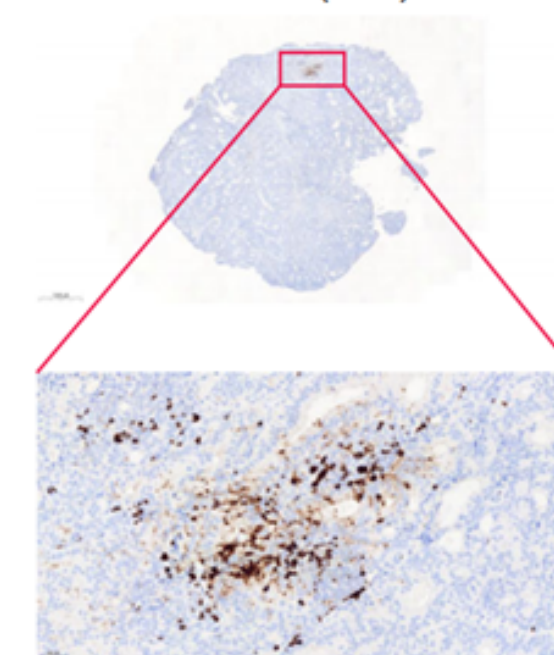
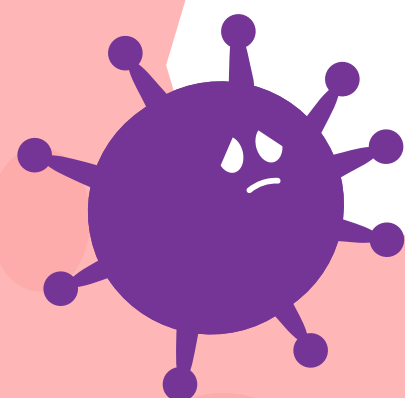
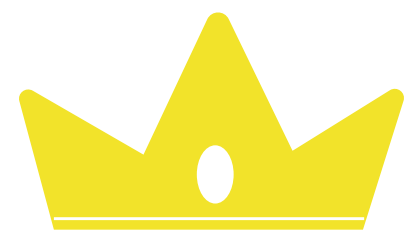
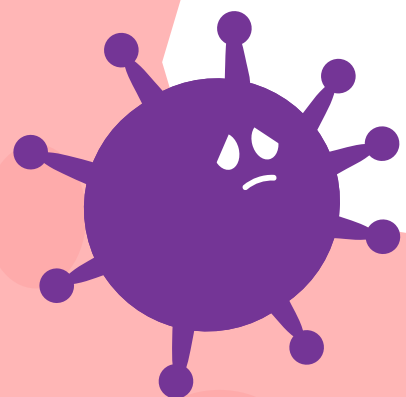


圖2病人在輸液後919天活檢的特徵。RNAscope結果顯示CD3細胞呈藍色，lete-cel細胞呈紅色（左）（IHC染色組織的代表性區域）。PDL1和LAG3通過IHC以棕色染色（中間和右側圖像）。





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，RNA-scope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：

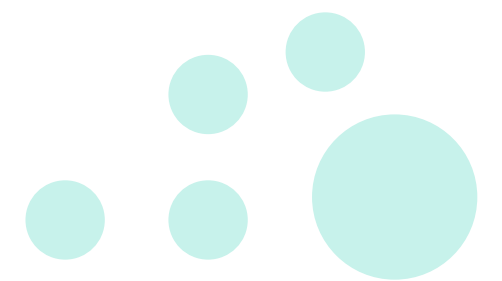
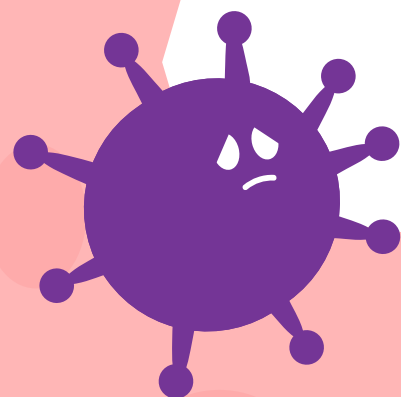


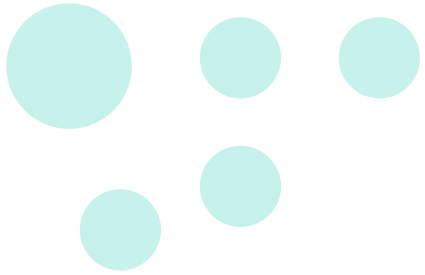
1. 應用廣泛：

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訊號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗脫掉，從而防止非特異性訊號的放大，使得探針的訊號具有高度特異性。探針設計合成需要2~4週時間即可完成。





3.靈敏度高：

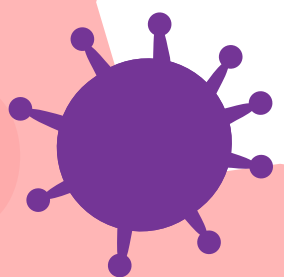
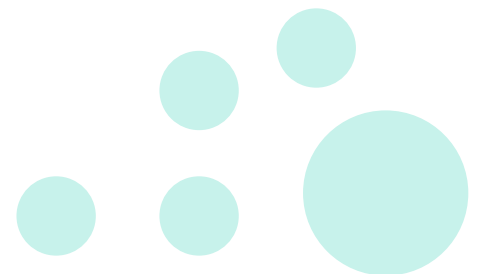
RNAscope方法檢測每個RNA分子時，只需三對雙Z（ZZ）探針即可完成雜交和訊號的檢測。

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訊號。ACD公司提供的分析軟體更可以定量每一個單細胞內RNA的表達量。

5.相容降解的RNA：

由於RNAscope三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對靶點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。



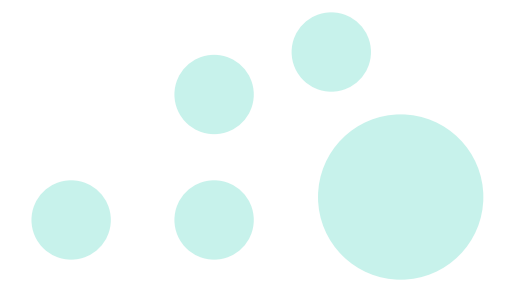
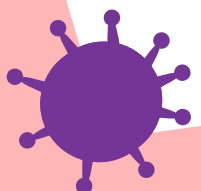


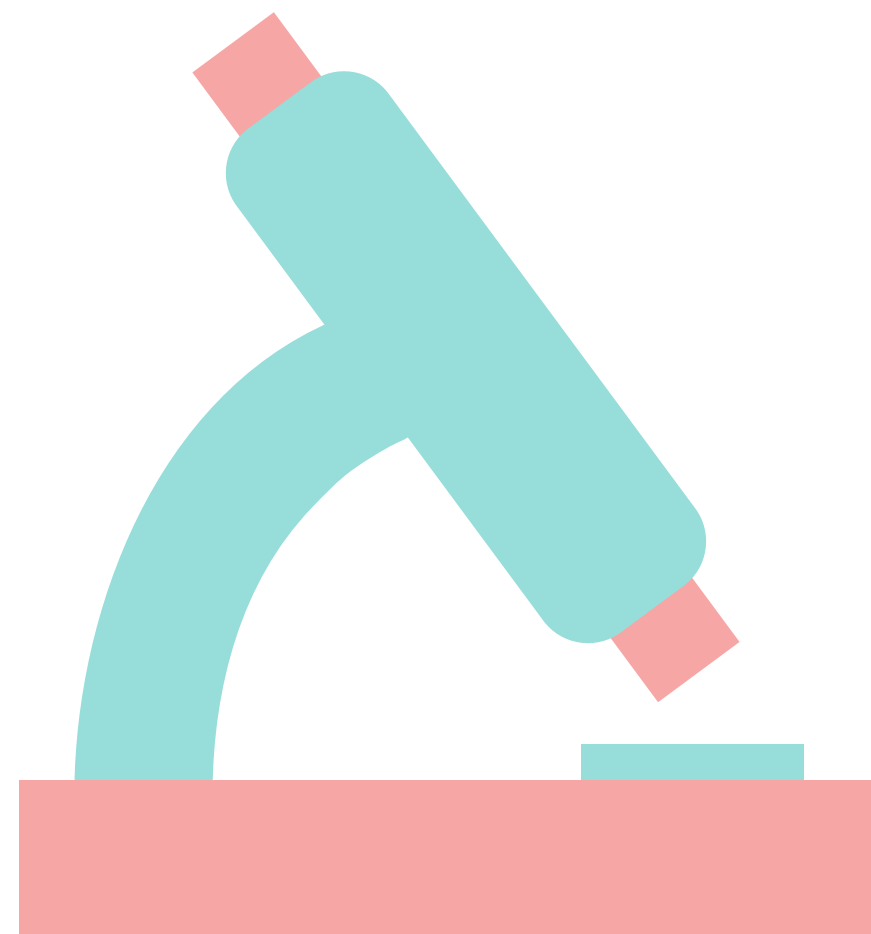
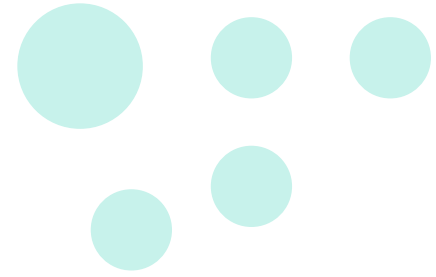
6. 檢測結果穩定一致性：

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（冷凍切片、石蠟切片、懸浮細胞、貼附細胞等）已經有成熟的實驗操作流程，故使得RNA-scope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自動平臺上運行，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訊號放大，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。





在RNAscope技術的基礎上，ACD公司旗下的Basescope技術可以檢測RNA層面的外顯子跳躍，點突變，環狀RNA等；miRNAscope可以原位對小RNA，包括miRNA, siRNA, ASO進行追蹤定位；而近年來推出的RNAscope HiPlex技術則可以在一張石蠟切片上同時檢測最多12個RNA目標的分佈定位，成為神經科學，腫瘤微環境研究以及單細胞定序後驗證等領域的常用檢測方法。

