

令和 5 年 4 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20859

研究課題名（和文）ネオ抗原の質的評価を通じた抗腫瘍免疫応答の解明

研究課題名（英文）Elucidation of anti-tumor immune response through qualitative evaluation of neoantigens

研究代表者

石野 貴雅（ISHINO, Takamasa）

千葉大学・大学院医学研究院・特任研究員

研究者番号：90907792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：大腸癌のゲノム解析を通じてRNF43のフレームシフト変異に由来するネオ抗原を患者間に広く同定した。しかし、そのネオ抗原を有する大腸癌でも免疫応答が低い症例があり、遺伝子機能の変化を通じて質的に抗腫瘍免疫応答を抑制していることが示唆された。実験的にもRNF43の機能喪失が逆説的にnon-inflamedな腫瘍微小環境をもたらすことを立証した。さらに、oncogenicな機能を持つdriver変異に由来するネオ抗原はpassenger変異程は抗腫瘍免疫応答を誘導しないことを明らかにした。本研究を通じてネオ抗原を質・量の両面から評価し免疫チェックポイント阻害剤奏功を予測する重要性を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤は様々な癌腫で有効性が示され、化学療法の内を大きく変えたものの、その奏効率は未だ満足いくものではなく、効果予測のバイオマーカーや耐性機序の解明が必要である。本研究では、これまでの体細胞変異数の量的な評価だけでは抗腫瘍免疫応答の予測は不十分で、遺伝子自体の機能といった質的な部分まで踏み込んだ解析の必要性を新たに提唱した点に意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We identified a shared neoantigen derived from a loss-of-function frameshift mutation in RNF43 through analysis of 88 colorectal cancers. However, patients with the mutated RNF43 did not have inflamed tumor microenvironment (TME). We revealed that loss of RNF43 function could paradoxically induce a non-inflamed TME leading to suppression of anti-tumor immunity. In addition, we demonstrated that passenger rather than driver gene mutations were related to the inflamed TME in diverse cancer types.

Our research propose the need to assess the qualities as well as the quantities of neoantigenic gene mutations, particularly driver gene mutations, as predictive biomarkers for ICI response.

研究分野：消化器内科学

キーワード：腫瘍免疫 免疫チェックポイント阻害剤 ネオ抗原 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1/PD-L1 抗体を始めとした免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は登場以来、消化器癌を含む様々な癌種で有効性が示され、化学療法の在り方を大きく変えた。一方で、その奏効率は未だ満足のいくものではなく、効果予測のバイオマーカーや耐性機序の解明が必要である。抗腫瘍免疫応答の主役であるエフェクターT 細胞の活性化には、腫瘍に特有で非自己として認識され強い免疫応答を起こすことが出来る体細胞変異に由来するネオ抗原が重要であり、効果予測バイオマーカーの 1 つに「体細胞変異数」がある。しかしながら、バイオマーカーとして期待され大規模に検証されたものの、それだけで完璧には ICI 奏功を予測出来なかった。腫瘍は体細胞変異が積み重なる過程でも、抗腫瘍免疫から逃避することも知られてきている。これらを踏まえると、体細胞変異の量的な評価だけでは不十分で質的な部分まで踏み込んだ解析が必要と考えられるが、そのような知見は乏しい。

## 2. 研究の目的

本研究は、ネオ抗原となり得る遺伝子変異に着目し、その遺伝子が本来担う役割から腫瘍が免疫系から逃避する方向にも作用している可能性を考え、その機序を明らかにすることを目的とした。

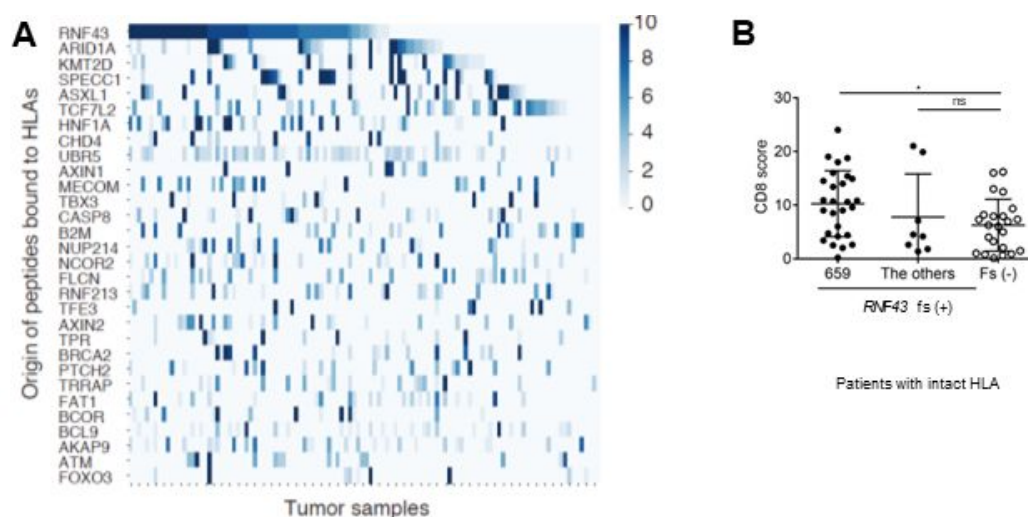
## 3. 研究の方法

大腸癌検体のゲノム解析を行い、ネオ抗原となり得る遺伝子変異由来のペプチドを同定した。また、その腫瘍浸潤リンパ球を免疫染色で解析し、ネオ抗原となるペプチドと腫瘍微小環境の関係を明らかにした。更に、得られたデータで立てた仮説を実験系でも検証した。

## 4. 研究成果

高頻度マイクロサテライト不安定性を有する大腸癌のゲノム解析を通じて、患者間で共通する変異由来のネオ抗原を複数同定し、RNF43 のフレームシフト(fs)変異に由来するネオ抗原が最も高頻度に見られていた(図 1A)。しかし、RNF43 fs 変異由来のネオ抗原を持つ症例の中で、659fs 変異を持つ症例はT細胞浸潤の多いinflamedな腫瘍微小環境を有していた一方で、117fs 変異をはじめとした659fs 以外の変異を持つ症例では体細胞変異数は同程度にもかかわらず必ずしも十分な T 細胞浸潤を認めていなかった(図 1B)。

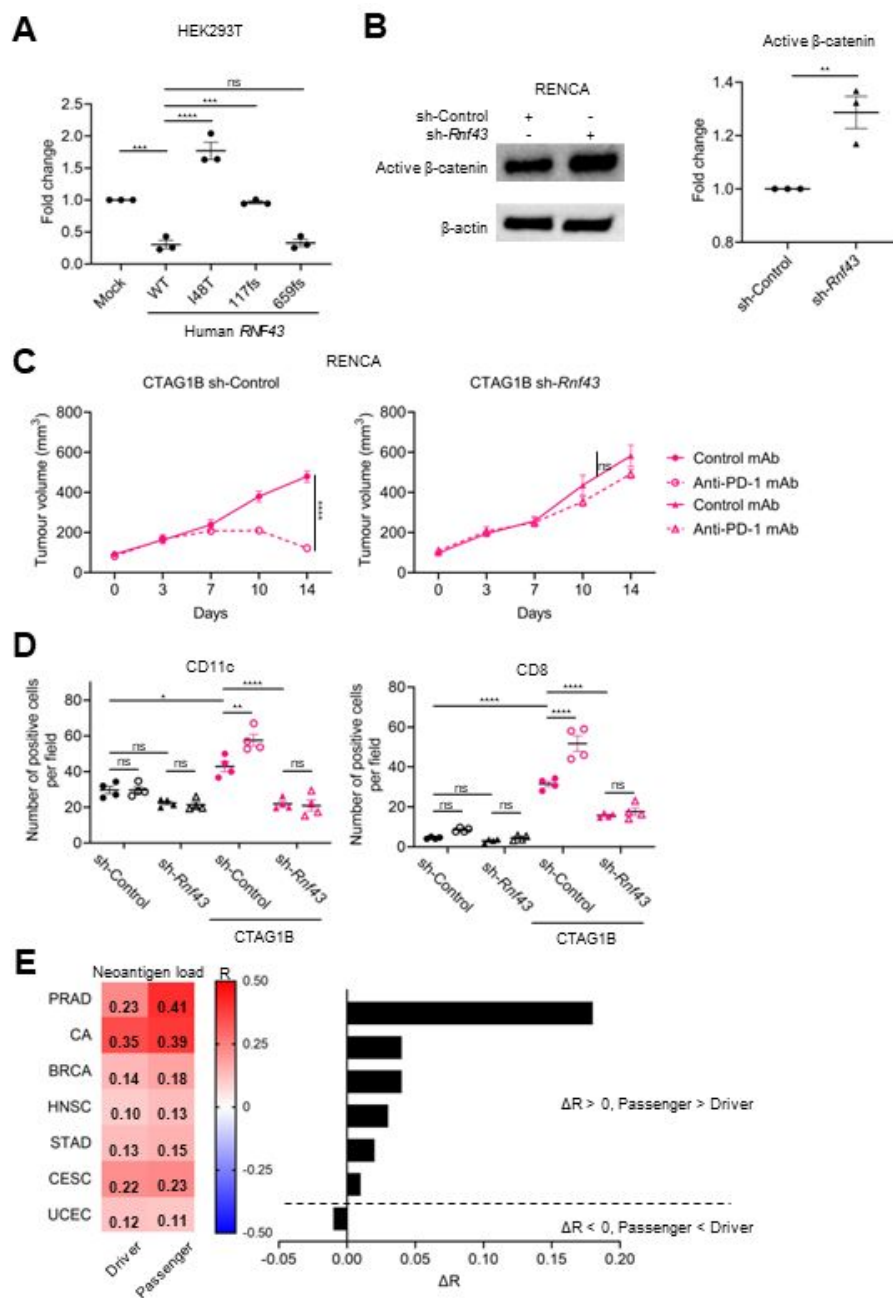
図 1



RNF43 は WNT/  $\beta$ -catenin 経路を抑制する遺伝子であるが、WNT 経路が樹状細胞・T 細胞浸潤を

阻害して non-inflamed な腫瘍微小環境を誘導することが既報で知られていることから (Spranger S, et al. Nature 2015)、RNF43 の fs 変異の部位による機能の差異が腫瘍微小環境の差異の原因になっているのではないかと考えた。そこで、細胞株に RNF43 野生型・659fs 変異・117fs 変異をそれぞれ強制発現させて機能を比較したところ、659fs 変異は野生型と同様に WNT 経路を抑制していた一方で、117fs 変異は機能喪失変異で WNT 経路の抑制が解除されていたことが分かった (図 2A)。遺伝子ノックダウンの実験系でも RNF43 の機能喪失が WNT 経路を活性化させることを証明した (図 2B)。実際に in vivo の実験系で RNF43 が機能喪失した腫瘍では、ネオ抗原が豊富であったとしても十分な樹状細胞・T 細胞浸潤が見られず、ICI にも抵抗性を示しており (図 2C・D)、ネオ抗原になりながら機能喪失を通じて逆説的に non-inflamed な腫瘍微小環境をもたらさうる遺伝子変異の存在を明らかにした。更に、TCGA データセットを用いて oncogenic な機能を持つ driver 変異に由来するネオ抗原が passenger 変異程は抗腫瘍免疫応答を誘導しないことを示した (図 2E)。

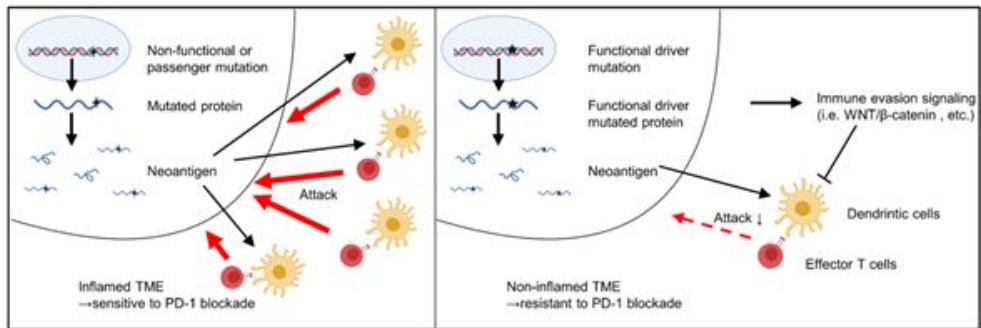
図 2



本研究を通じて我々はネオ抗原になりながら機能変化に伴って逆説的に non-inflamed な腫瘍微小環境をもたらさうる遺伝子変異の存在を明らかにし (図 3)、ネオ抗原を質・量の両面から正確に評価し

免疫チェックポイント阻害剤奏功を予測する重要性を提唱した。今後は従来とは異なる方法での質的な評価も加味したネオ抗原同定方法を目指し、免疫チェックポイント阻害剤奏功に有用なバイオマーカーの構築を試みたいと考えている。

図 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishino Takamasa, Kawashima Shusuke, Tanji Etsuko, Ueno Toshihide, Ueda Youki, Ogasawara Sadahisa, Sato Kazuhito, Mano Hiroyuki, Ishihara Soichiro, Kato Naoya, Kawazu Masahito, Togashi Yosuke	4. 巻 128
2. 論文標題 Somatic mutations can induce a noninflamed tumour microenvironment via their original gene functions, despite deriving neoantigens	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1166 ~ 1175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-023-02165-6	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 -

1. 著者名 Nagasaki Joji, Ishino Takamasa, Togashi Yosuke	4. 巻 113
2. 論文標題 Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3303 ~ 3312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15497	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 -

1. 著者名 Watanabe Tomofumi, Ishino Takamasa, Ueda Youki, Nagasaki Joji, Sadahira Takuya, Dansako Hiromichi, Araki Motoo, Togashi Yosuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Activated CTLA 4 independent immunosuppression of Treg cells disturbs CTLA 4 blockade mediated antitumor immunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15756	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takamasa Ishino, Toshihide Ueno, Youki Ueda, Hiroyuki Mano, Soichiro Ishihara, Naoya Kato, Masahito Kawazu, Yosuke Togashi
2. 発表標題 Paradoxical neoantigens; neoantigenic mutations can paradoxically induce a noninflamed tumor microenvironment via their original functions
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takamasa Ishino, Shusuke Kawashima, Etsuko Tanji, Toshihide Ueno, Youki Ueda, Sadahisa Ogasawara, Kazuhito Sato, Soichiro Ishihara, Naoya Kato, Masahito Kawazu, Yosuke Togashi
2. 発表標題 Neoantigen paradox; neoantigen do not always induce an inflamed tumor microenvironment
3. 学会等名 第12回日米癌合同会議
4. 発表年 2022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