京都大学	博士（医学）	氏　名	松　島　慎　吾
論文題目	Chemical induction of splice-neoantigens attenuates tumor growth in a preclinical model of colorectal cancer（スプライスネオ抗原の化学誘導は大腸がん前臨床モデルにおいて腫瘍増殖を抑制する）		

（論文内容の要旨）

Programmed cell death 1（PD-1）阻害剤に代表される免疫チェックポイント療法は、癌細胞に対する免疫機能を増強し、末期がん患者をも救済する画期的な治療法である。しかしながら未だ半数以上の患者は不応答性であり、治療効果を予測しうるバイオマーカーの同定や効果を増強する新規治療薬の開発が急務である。癌細胞に特異的なネオ抗原の産生は細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞による免疫監視に必須の機構であるが、近年のメタゲノム解析により、ネオ抗原を生じうる遺伝子変異の数が PD-1 阻害剤の治療効果と正の相関を示すことが明らかとなり、ネオ抗原が有望なバイオマーカーの一つであるとともに、新たながん免疫療法の標的として期待されている。これまで、ネオ抗原はタンパク質翻訳領域の遺伝子変異に伴う非同義置換が主要な産生源であると考えられてきたが、ゲノムシークエンス技術の進歩により、癌細胞に特異的な RNA スプライシングがネオ抗原産生に大きく寄与することが明らかとされ始めた。複雑な RNA スプライシング調節機構において、Serine/arginine-rich splicing factors（SRSFs）は選択的 RNA スプライシングに重要な役割を有する RNA 結合タンパク質であり、SRSFs の生理活性は CDC-like kinases（CLKs）によるリン酸化の制御を受ける。そこで、CLK-SRSF 経路を標的とする低分子化合物により、癌細胞内の RNA スプライシングを意図的に変調させることで多様なネオ抗原産生を促し、がん免疫機能が増強できる可能性に着目した。

まずマウス大腸癌細胞株 MC38 を用いた免疫応答性担癌モデルにおいて、CLK 活性化剤である RECTAS が腫瘍増殖を抑制し生存期間を延長させることを明らかとし、さらに PD-L1 中和抗体の抗腫瘍効果に対する増強作用が確認された。この抗腫瘍効果は、CD8 陽性 T 細胞及び癌細胞の MHC class I に依存的であったことから、RNA スプライシングの変化に伴うネオ抗原「スプライスネオ抗原」の産生を介する可能性が示唆された。そこで、RNA シークエンス法を用い、癌細胞内で RECTAS により誘導されたスプライシングイベント及びそこから翻訳されるアミノ酸配列を網羅的に探索し、その中から MHC class I と結合しうる候補配列を in silico algorithm NetMHCpan により絞り込んだ。Ensembl や UniProt database に登録されていないスプライシングバリアントから産生されるネオ抗原候補が 22 種類同定され、これらの免疫原性を ELISpot assay にて検証したところ、6 種類が実際に T 細胞を活性化するネオ抗原であることを見出した。興味深いことに、MC38 で同定されたスプライスネオ抗原は、他の複数のマウス癌種においても RECTAS により誘導されることも明らかとなった。次に、同定されたスプライスネオ抗原に対する特異的な細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞を免疫誘導し、癌細胞に対する殺傷能力を co-culture assay にて評価したところ、予想通り、対応するスプライスネオ抗原を癌細胞に提示させた場合にのみ癌細胞は殺傷され、MHC class I 欠損下でその反応は消失した。さらに、癌細胞に RECTAS を処理しスプライシングを変調させた場合にも同様の細胞死が誘導された。最後に、免疫応答性担癌モデルマウスに、スプライスネオ抗原ペプチドを免疫した後、RECTAS を投与したところ、単独投与と比較して強力な腫瘍増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。

本研究の結果は、「スプライスネオ抗原の化学誘導にって癌細胞の免疫原性を高めることができる」というコンセプトに基づく新規がん免疫療法の可能性を示唆しており、現行の治療法で効果を得られないがん患者においても抗腫瘍効果を期待できることから、本コンセプトによるがん免疫増強薬が実用化できれば、次世代がん免疫療法の核となると考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

PD-1 阻害抗体を中心とした免疫チェックポイント阻害療法が、がん治療戦略の中心的存在となりつつあるが、未だ半数以上の患者は不応答性であり、がん免疫療法の効果を改善するためには、不応答性の原因を克服することが課題である。とりわけ、T 細胞が認識するネオ抗原が、がん細胞に十分発現していない場合は、免疫チェックポイント阻害療法不応答性になると考えられる。本研究は、がん特異的な RNA スプライシングがネオ抗原の産生源になり得ることに着目し、serine/arginine-rich splicing factors（SRSFs）依存的な RNA スプライシング制御化合物「RECTAS」を用いてスプライスネオ抗原を化学誘導し、抗腫瘍効果を発揮するという仮説の検証を目的に行われた。マウス大腸癌細胞株 MC38 を用いた免疫応答性担癌モデルにおいて、RECTAS は腫瘍増殖を抑制し生存期間を延長させることが明らかとされ、これらの抗腫瘍効果は CD8 陽性 T 細胞及びがん細胞の MHC class I に依存的であることが確認された。さらに、RECTAS により誘導されたスプライシング産物から翻訳されるスプライスネオ抗原候補の少なくとも一部が、抗腫瘍活性を有する細胞傷害性 CD8 陽性 T 細胞を惹起できることが示された。上記メカニズムから、RECTAS の処置によりがん細胞の免疫原性が向上することが期待され、実際に RECTAS は PD-1 阻害剤の抗腫瘍効果を増強し、スプライシング制御化合物の新規がん免疫療法としての有用性が示された。

以上の研究は、SRSFs 依存的な RNA スプライシング制御化合物の抗腫瘍メカニズムの解明に貢献し、新たながん免疫療法の切り口として治療薬開発に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和６年１月１２日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降