氏名（本籍）	橋本 幸枝
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第　9947　号
学位授与年月	令和　3　年　3　月　25　日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	乳癌の RNA シークエンスデータを用いたネオ抗原予測手法の検討

主　査	筑波大学教授	博士（医学）	佐藤　豊実
副　査	筑波大学教授	博士（医学）	土屋　尚之
副　査	筑波大学教授	博士（医学）	関根　郁夫
副　査	筑波大学助教	博士（医学）	小田　ちぐさ

論文の内容の要旨

橋本幸枝氏の博士学位論文は、乳癌の RNA シークエンスデータを用いた新しいネオ抗原予測の手法を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

著者は、ネオ抗原は免疫原性の高い抗原として抗腫瘍免疫応答の中心的役割い、免疫療法の治療ターゲットやバイオマーカーとして注目を集めているが、近年の次世代シークエンス（Next generation sequencing: NGS）技術、バイオインフォマティクスの進歩によりネオ抗原予測手法の精度は向上しているものの、偽陽性率が依然として高いことや複数のシークエンスデータを必要とすることからコスト面でも課題が残ると言う背景から、本研究の目的を遺伝子発現情報のみならず塩基配列情報も有する RNA-sequencing（RNA-seq）の特性に着目し、Whole-exome sequencing（WES）データの代わりに RNA-seq データを用いて体細胞変異解析を行うことによりネオ抗原を予測することが可能かを検討することとしている。

（対象と方法）

著者は、筑波大学附属病院で治療を行なったホルモン受容体陽性、HER2 陰性の浸潤性乳癌患者 6 人の乳癌組織と正常検体の NGS データを用いて検討を行っている。解析は（1）腫瘍と正常共に WES データを用いる従来の手法（DNA method: Dm）、（2）腫瘍と正常共に RNA-seq データを用いる手法（RNA method: Rm）、（3）腫瘍部の RNA-seq データと正常部の WES データを組み合わせる手法（Combination method: Cm）の 3 つの手法で行い比較している。著者は、各手法で特異的/共通の体細胞変異およびネオ抗原候補について、NGS データにおけるカバレッジや変異アレル頻度（variant allele frequency: VAF）、遺伝子発現量、塩基置換の種類などの特徴の比較検討を行った。また、本解析の過程で DNA と RNA の VAF が大きく乖離した体細胞変異を認めたため、サンガーシークエンス・パイロシークエンスを用いて NGS データの整合性を確認するとともに、この変異について遺伝子発現解析、免疫組織化学染色（タンパクレベルでの発現の確認）、*in silico* での機能解析を行っている。

（結果）

著者は、Rm の結果は正常組織における転写産物の発現状況に大きく依存し、偽陽性率・偽陰性率ともに高かったことを示している。また、Dm と Cm の結果を比較すると、Dm で検出されたネオ抗原候補のうち 86%（154/180）は Cm で検出されなかったが、これらのネオ抗原候補の大部分は腫瘍 RNA のカバレッジがないか変異アレルリードを認めないものである事を明らかにした。その一方で、著者は、発現量が高く（TPM＞10）、変異転写産物が十分である（RNA の変異アレルリード＞5）ネオ抗原候補に関しては、68%（13/19）を Cm で同定できること、Cm 固有のネオ抗原候補 26 個の中には新規 RNA editing site や真の体細胞変異である可能性が高いものも含まれていることも明らかにした。

著者は、この解析の中で、*MLPH* 遺伝子に DNA の VAF が 17%、RNA の VAF が 99%とアレル頻度が大きく乖離したミスセンス変異（c.644C>T）の存在を確認し、さらにサンガーシークエンスとパイロシークエンスを用いた確認では NGS の結果が追認した。著者は、*MLPH* 遺伝子の発現量（transcripts per million:TPM）は正常部・腫瘍部ともに高く（238.6TPM vs 454.2TPM）、抗 MLPH 抗体による免疫組織化学染色の結果は正常乳管上皮細胞・腫瘍細胞ともに弱陽性で同程度である事は明らかにしたが、機能解析の結果は予測ツールによって異なり、病的変異か否かは確定には至っていない。

（考察）

著者は、本研究により、発現量・変異転写産物が十分あるネオ抗原候補に関しては Cm でも同定することができ、かつ従来法では検出できなかった新規 RNA editing site などによるネオ抗原候補も検出できる可能性を示唆した。腫瘍部の WES を省略することでコストを抑えることもできるため、Cm は従来法に代わる効率的かつ cost-effective なネオ抗原予測手法であると考えている。

著者は、本研究の解析過程で観察された DNA と RNA の VAF が乖離した *MLPH* 遺伝子のミスセンス変異については、腫瘍組織と正常組織の遺伝子・タンパク発現に大きな差は認められず、発現量の違いによるアレル頻度の乖離では説明がつかないと考察している。著者は、機能予測の結果はツールによって異なったが、変異アレル頻度の乖離は腫瘍の生存・増殖に関わる遺伝子で生じやすいと報告されていることから、今回の変異が病的変異である可能性があると考えている。そして、豊富な変異転写産物を有する変異は、機能に関わる情報を与えうるだけでなく、免疫療法の理想的な治療ターゲットとなりうる可能性も高まるため、transcriptome レベルでも変異アレルの存在を確認することは重要なステップであり、新しい手法である Cm はそれも可能にできると考えている。著者は、腫瘍の RNA-seq データと正常の WES データを組み合わせて体細胞変異解析を行う手法（Cm）は、ネオ抗原予測において従来法に代わる効率的かつ費用対効果の高い手法であると結論づけている。

審査の結果の要旨

（批評）

本博士論文は、今後がんに対する個別治療が発展するであろう中で重要な役割を果たすネオ抗原に着目したものである。ネオ抗原は患者毎に異なり、どれがその患者のネオ抗原であるかを予測することは今後の治療成績を左右する。本研究ではそのネオ抗原の候補を、費用対効果を高めて探索する新しい手法が検討され、結果が導き出されている。本論文は現実的に構築可能なネオ抗原候補予測システムに関する研究で、候補が真のネオ抗原である確認システムと連動させれば臨床的に極めて有用な個別治療法選択のツールとなることを明らかにした優れた内容である。

令和 3 年 1 月 13 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。