



Title	HLA リガンドーム解析を用いた膀胱癌cancer stem-like cells / cancer initiating cells (CSCs)に発現する癌抗原の研究
Author(s)	宮田, 遥
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第14618号
Issue Date	2021-06-30
DOI	10.14943/doctoral.k14618
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/88815
Type	theses (doctoral)
Note	配架番号 : 2640
File Information	Haruka_Miyata.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文

HLA リガンドーム解析を用いた膀胱癌
cancer stem-like cells / cancer initiating
cells (CSCs)に発現する癌抗原の研究
(Research of cancer antigens expressed
in bladder cancer stem-like cells / cancer
initiating cells (CSCs) using HLA
ligandome analysis)

2021 年 6 月

北海道大学

宮田 遥

学位論文

HLA リガンドーム解析を用いた膀胱癌
cancer stem-like cells / cancer initiating
cells (CSCs)に発現する癌抗原の研究
(Research of cancer antigens expressed
in bladder cancer stem-like cells / cancer
initiating cells (CSCs) using HLA
ligandome analysis)

2021 年 6 月

北海道大学

宮田 遥

目次

発表論文目録及び学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
方法	10 頁
結果	21 頁
考察	37 頁
結論	40 頁
謝辞	41 頁
利益相反	42 頁
引用文献	43 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は、以下の論文に投稿中である。

Haruka Miyata, Yoshihiko Hirohashi, Shuhei Yamada, Junko Yanagawa, AikoMurai, Shinichi Hashimoto, Serina Tokita, Kanta Hori, Takashige Abe, Terufumi Kubo, Tomohide Tsukahara, Thakayuki Kanaseki, Nobuo Shinohara, Toshihiko Torigoe

GRIK2 is a target for bladder cancer stem-like cell-targeting immunotherapy

Cancer Immunology, Immunotherapy

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Haruka Miyata, Yoshihiko Hirohashi, Junko Yanagawa , Aiko Murai, Serina Tokita, Takayuki Kanaseki, Toshihiko Torigoe
HLA-ligandome analysis of bladder cancer stem cells.
第78回日本癌学会学術総会、2019年9月28日・京都
2. 宮田 遥、廣橋 良彦、金関 貴幸、柳川 純子、村井 愛子、時田 芹奈、鳥越 俊彦
膀胱癌幹細胞に提示される癌抗原の検索
第120回北海道癌談話会例会、2019年10月12日・札幌
3. 宮田 遥、廣橋 良彦、金関 貴幸、鳥越 俊彦
Research of a novel cancer antigen of bladder cancer stem-like cells.
第79回日本癌学会学術総会、2020年10月1～31日（オンデマンド配信）、広島
4. 宮田 遥、廣橋 良彦、金関 貴幸、柳川 純子、村井 愛子、時田 芹奈、鳥越 俊彦
癌幹細胞特異的な癌抗原の検討
第24回日本がん免疫学会総会、2020年10月7～30日（オンデマンド配信）、札幌

要旨

【背景と目的】

癌は heterogeneous な細胞集団から構成されており、自己複製能、造腫瘍能、分化能を持つ癌細胞亜集団は、癌幹細胞様細胞 (cancer stem-like cells / cancer initiating cells (CSCs)) と呼ばれる。CSCs は化学療法や放射線療法など従来の治療に抵抗性を示すことが知られている。進行性膀胱癌は、依然として予後不良の疾患である。治療の主軸となるのは Cisplatin を中心とした化学療法だが、多くの症例で最終的に治療抵抗性となり再発や転移を起こし、その病態には CSCs の存在が関与する可能性がある。CSCs に対する免疫療法の有効性については近年議論が進められているが、CSCs が cytotoxic T-lymphocyte (CTL) の標的となりうるという研究結果が複数の癌腫において見受けられる。CSCs に対する CTL の免疫を惹起するためには CSCs の human leukocyte antigen (HLA) 上に提示される癌抗原を認識することが必要となるが、これまで膀胱癌 CSCs に発現する癌抗原についての明確な報告はない。HLA に提示される抗原を解析する手段として HLA リガンドーム解析という方法があり、遺伝子配列から抗原を予測する従来の方法とは異なり実際に HLA に提示されているペプチドを免疫沈降の原理を用いて網羅的に解析する方法であるが、解析には大量の培養細胞が必要となる。今回我々は、膀胱癌 CSCs の HLA 上に提示される癌抗原を同定する目的で膀胱癌 CSCs クローンの樹立とそのリガンドーム解析を施行し検討を行った。

【材料と方法】

膀胱癌細胞株 UM-UC3 を ALDELUOR kit を用いて aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性の高い 0.9% の細胞、ALDH 活性の低い 0.9% の細胞を各々フローサイトメーターを使用して単細胞ソーティングし、ALDH 活性の高いクローン (H-1, H-6, H-10) と ALDH 活性の低いクローン (L-1, L-3, L-8) を樹立した。H-10, L-3, WT 細胞を用いて Sphere formation assay を施行し、ELDA software を用いて CSCs frequency を算出した。また BALB/c-nu/nu マウス皮下に H-10, L-3 細胞を 10^3 ずつ皮下投与し、1 週間毎に *in vivo* での腫瘍増生能を調べた。H-10, L-3 細胞において Cisplatin 0-3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与、放射線 0-16Gy 後 72 時間での生存率を WST-8 assay で測定し、治療抵抗性について検証した。フローサイトメトリーで H-10, L-3, WT の HLA-A2 発現を確認ののち、各 10^9 細胞ずつ大量培養を行い、HLA-A2 リガンドーム解析を施行して各々に提示されるペプチド配列を同定した。更に Cap analysis gene expression (CAGE) analysis を行い、各クローンの遺伝子発現を網羅的に解析した。H-10 に特異的に発現する CSCs 抗原の候補として絞り込んだ分子 Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein (PIPSL),

C17orf112, Claspin (CLPSN), glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2 (GRIK2) に関しては、RT-PCR、qRT-PCR を施行し正常組織と UM-UC3 各クローンでの遺伝子発現を確認した。また、得られた配列のペプチドを健常人由来の peripheral blood mononuclear cells (PBMC) を 1 週間おきに 3 回刺激し、ペプチド特異的な CTL の誘導が可能か interferon (IFN)- γ ELISPOT assay を用いて検証した。ELISPOT assay で反応の見られた CLSPN, GRIK2 ペプチド刺激 bulk はテトラマーソーティングを行い、テトラマーに親和性を示すリンパ球を単細胞ソーティングした。成長したクローンについてはペプチドを添加された T2 細胞、過剰発現細胞、H-10 細胞をターゲットとした ELISPOT assay を施行して特異的な反応が得られるかを検証した。

【結果】

UM-UC3 を ALDEFLUOR 法により単細胞ソーティングし、ALDH 活性の高い細胞株 (H-1, H-6, H-10) と ALDH 活性の低い細胞株 (L-1, L-3, L-8) を樹立した。ALDH 活性の高い細胞は長期培養にて ALDH 活性の低い細胞に一定の分化傾向は示すものの、1 か月超の培養を経てその性質は比較的安定していた。H-10 は L-3 に比して高い sphere 形成能と、ヌードマウス xenograft モデルにおける高い造腫瘍能、さらに cisplatin, 放射線療法への有意に高い抵抗性を示し、H-10 は膀胱癌 CSCs を高濃度を含む細胞集団と考えられた。HLA リガンドーム解析にて、CSCs 特異的な癌抗原の候補となるペプチドを検索したところ、H-10 で検出されるが L-3 では検出されず、かつ正常組織での発現が低い 8 種のペプチドが同定され、そのうち偽遺伝子の産物である PIPSL、未知の分子である C17orf112、そして他癌において CSCs との関連が報告されている CLSPN に着目した。また CAGE (Cap analysis gene expression) 法により各クローンの遺伝子発現を網羅的に解析し、H-10 で有意に発現が高く、かつ HLA 上に提示される分子を絞り込んだ。結果、過去に膀胱癌 CSCs にて発現が報告されている分子 GRIK2 に由来するペプチドが検出された。健常人ドナーの末梢血単核細胞を PIPSL, C17orf112, CLSPN, GRIK2 由来のペプチドで刺激し、その後に施行した IFN- γ ELISPOT assay にて PIPSL, C17orf112 は反応の見られる bulk は見られなかったが、CLSPN, GRIK2 はペプチドを添加した T2 細胞に反応が見られた bulk があり、ペプチド-テトラマー PE 染色陽性の細胞を単細胞ソーティングした。その結果、GRIK2 ペプチドに特異的に反応する均一な CTL クローンを誘導することに成功した。この CTL クローン (9G23) は、IFN- γ ELISPOT assay にてペプチド添加 T2 細胞のみならず、UM-UC3 GRIK2 過剰発現株、そして H-10 に対しても有意な反応を見せた。

【考察】本研究では ALDEFLUOR 法を用いた単細胞ソーティングにより長期培養においての安定した性質を示す膀胱癌 CSCs クローンを樹立できた。このことは、癌

細胞のうち少数のポピュレーションのみを占める CSCs に関して今後研究を進展させる好材料となると考えられる。CSCs は HLA 発現を低下させることで免疫から逃れることがあるという報告が近年なされているが、今回分離した膀胱癌 CSCs クロームは HLA-A2 発現が認められ、HLA リガンドーム解析で HLA 上に提示されるペプチドを多数同定できたことから、この CSCs クロームは免疫療法のターゲットとなりえると考えられた。GRIK2 ペプチドは膀胱癌 CSCs で遺伝子発現が高く HLA 上にも提示され、ペプチド特異的 CTL を誘導することが可能だった。この結果から GRIK2 は有用な CSCs 抗原と考えられたが、正常な中枢神経組織の一部のニューロンにおいても GRIK2 は発現が見られる。中枢神経組織のニューロンでは HLA は発現しないと言われ、本研究においても健常人ドナーの PBMC から GRIK2 ペプチド特異的 CTL を誘導できたという結果が得られたことは GRIK2 ペプチド特異的 CTL が病原性ではないことを証明している。しかし IFN- γ の刺激にてニューロンにも HLA 発現が見られるという近年の報告もあり、今後 GRIK2 を標的とした免疫療法を臨床応用するためには、GRIK2 ペプチド特異的 CTL の生体内における安全性について更なる慎重な検証が必要である。また今回の検証にて CSCs の候補として挙げられた PIPSL, C17orf112, CLSPN については、ペプチド特異的な CTL の獲得に至らなかったが、それらの免疫原性につき今後更なる検討が望まれる。

【結論】膀胱癌細胞株 UM-UC3 から ALDH 活性により安定した CSCs クロームの樹立に成功した。その細胞の HLA-A2 リガンドーム解析と、CAGE analysis により膀胱癌 CSCs に提示される抗原を数種同定することができた。その中でも GRIK2 のペプチド特異的 CTL は CSCs への反応を確認することができ、膀胱癌 CSCs 抗原として今後免疫療法に応用できる可能性があると考えられた。

略語表

ALDH: aldehyde dehydrogenase
BCG: Bacillus Calmette-Guerin
CAGE: Cap analysis gene expression
cDNA: complementary deoxyribonucleic acid
CLSPN: Claspin
CPM: counts per million
CSCs: Cancer stem-like cells / Cancer initiating cells
CTL: cytotoxic T-lymphocyte
DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium
DNA: deoxyribonucleic acid
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid)
ERCC6 : excision repair cross-complementing rodent repair deficiency,
complementation group 6
FBS: fetal bovine serum
FSHR: Isoform 4 of Follicle-stimulating hormone receptor
GRIK2: glutamate ionotropic receptor kainite type subunit 2
HEPES: hydroxyethylpiperazineethanesulfonic acid
HLA: human leukocyte antigen
HS: human serum
IFN- γ : interferon-gamma
IL-2: interleukin-2
ME: mercaptoethanol
mRNA: messenger ribonucleic acid
P/S: penicillin-streptomycin
PBMC: peripheral blood mononuclear cells
PBS: phosphate-buffered saline
PD-1: programmed cell death protein 1
PD-L1: programmed cell death protein ligand 1
PHA: phyto-hemagglutinin
PIP5K1A: Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 alpha
PIPSL: Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein
PSMD4: Proteasome 26S subunit, Non-ATPase 4
qRT-PCR: Quantitative-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

RIN: RNA integrity number
RNA: ribonucleic acid
rpm: Revolution per minute
RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute medium - 1640
RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction
SCN10A: Sodium channel protein type 10 subunit alpha
SP: side population
TFA: trifluoroacetic acid
TMB: tumor mutational burden
TPM: transcripts per million
WT: wild type
ZNF: Zinc finger protein

緒言

膀胱癌は尿路に発生する癌の中では最多で、全世界で年間 33 万人の新規患者が発生し、3 万人を超える死者と出しているとされる (Witjes et al., 2014)。新規に発生する膀胱癌のうち約 8 割は筋層非浸潤性であり、多くが経尿道的でコントロール可能である反面高確率で再発をきたす。新規膀胱癌のうち残りの 2 割は筋層浸潤癌であり、遠隔転移を伴うものも多い。長年にわたり局所浸潤や遠隔転移を伴う膀胱癌に対する治療の主軸は cisplatin を中心とした化学療法であり、その奏効率はさほど悪くないものの多くが最終的には治療抵抗性を示すようになることから、進行性膀胱癌の予後は依然として不良である (Kamat et al., 2016; Patel et al., 2020; von der Maase et al., 2005)。

癌は heterogenous な細胞集団から成り立ち、自己複製能、造腫瘍能、分化能という性質を持つ細胞群は Cancer stem-like cells / Cancer initiating cells (CSCs) と定義される。(Clevers, 2011) CSCs は高いトランスポーター遺伝子の発現や、抗アポトーシス遺伝子の発現、細胞周期の休止などの理由から、化学療法や放射線療法などの従来の治療に対し抵抗性を持つとされている。(Chen et al., 2012; Park et al., 2009; Zhu and Fan, 2018) 上述のように治療の過程の中で再発や転移、治療への抵抗性を見せる膀胱癌は、その病態に CSCs が関連している可能性が考えられる。実際に膀胱癌において CSCs の存在は 2009 年に細胞表面マーカー CD44 を用いた方法で同定されており、以降も継続的に報告されている (Aghaalikhani et al., 2019; Atlasi et al., 2007; Chan et al., 2009; Chan et al., 2010; Li et al., 2017; Su et al., 2010)。

近年になり膀胱癌に対して免疫チェックポイント阻害薬の使用が承認され本邦でも広く臨床使用されるようになったがその奏効率は 20-30% と、幅広く有効であるとは言い難い (Bellmunt et al., 2017; Felsenstein and Theodoreseu, 2018)。膀胱癌は古くから Bacillus Calmette-Guerin (BCG) 膀胱内注入療法の有効性が確立していることや、tumor mutational burden (TMB) が高いことなどから免疫療法が有効となりうる素因はある。(Alexandrov et al., 2013; Kawai et al., 2013) しかし進行癌においては体内に莫大な数の腫瘍細胞が存在しそれらが常時増殖を続けている一方で、腫瘍免疫の要となる細胞障害性 T リンパ球 (Cytotoxic T lymphocyte; CTL) の数は限定的であることから攻撃が追いつかない状態となることが推測できる。CSCs は莫大な腫瘍細胞の中のごく少数のポピュレーションで、かつ癌の再発や治療抵抗性の要となる細胞であり、CSCs に標的を絞った治療は非常に効率的な方法と言える。膀胱癌において CSCs を標的

とした免疫療法が実現可能となれば、腫瘍量の多い進行癌においても効率的に根治を目的とした治療、あるいは再発予防を実現可能となるかもしれない。CSCs は上述のごとく化学療法、放射線療法に抵抗性を示すが、免疫療法への感受性については検証が進められている。CSCs は HLA クラス I 発現の減少や、IL-4, IL-10, TGF- β など種々の免疫抑制性サイトカインの発現、また PD-L1 の発現等など、免疫を回避する機構を有することが報告されている。(Hirohashi et al., 2016; Lee et al., 2016) 他方で近年、複数の癌腫で CSCs は CTL の攻撃対象となることが報告されてきている (Asano et al., 2016; Horibe et al., 2017; Inoda et al., 2011; Miyamoto et al., 2018; Nishizawa et al., 2012)。よって膀胱癌においても、CSCs をターゲットとした免疫療法の有効性が期待される。

CTL が癌細胞を認識し攻撃するためには、標識となる癌抗原が human leukocyte antigen (HLA) 上に提示されることが必要となる。癌抗原は、変異抗原、癌精巢抗原、分化抗原、過剰発現抗原に分類される。癌精巢抗原はがん組織以外には精巢の胚細胞のみに発現していることから免疫療法の標的としやすく、これまでに NY-ESO-1, MAGE-A3, MAGE-A4 など複数種が報告されている。(Ghafouri-Fard, 2015; Gordeeva, 2018; Salmaninejad et al., 2016) 癌精巢抗原の発現は尿路上皮癌の予後良好因子となることが報告され、中でも NY-ESO-1 は膀胱癌でワクチン療法への応用が試みられてきた。(Sharma et al., 2003; Sharma et al., 2006; Yazarlou et al., 2018) ほか膀胱癌の癌抗原については、1998 年に Gueguen らによりある膀胱がん患者において癌抗原 KIAA0205 の存在を発見し、報告された (Gueguen et al., 1998)。しかしこれは特定の患者においてのみ認められた変異抗原であり、汎用性のある癌抗原とはならなかった。このように膀胱癌抗原は過去に複数報告されているが、CSCs をターゲットとした免疫療法を行うためには CSCs に特異的に発現している抗原の発見が必要となる。膀胱癌 CSCs に提示される癌抗原について明確に報告されているものはない。

上記の背景を踏まえ、本研究は膀胱癌 CSCs に発現する癌抗原を同定することを目的として行った。今回、膀胱癌 CSCs に提示される抗原ペプチドを HLA リガンドーム解析の手法により同定することを試みた。HLA リガンドーム解析は、HLA 上に提示されるペプチドを免疫沈降を利用して回収しマスマスペクトロメトリーにより解析する方法である。(Kochin et al., 2017; Shinkawa et al., 2021)。この方法は遺伝子配列から抗原となるペプチドを推測する従来の方法と異なり、実際に HLA 上に提示される配列を直接調べられるという点で効率の良

い研究手法であるが、解析に大量の細胞を必要とするため、対象となる細胞を安定して培養できることが必要となる。本研究では安定した膀胱癌 CSCs を分離し、HLA リガンドーム解析を行うことにより膀胱癌 CSCs に提示される癌抗原を同定することに成功したため、報告する。

方法

【細胞株と培養条件】

細胞株は膀胱癌細胞株 UM-UC3, 赤白血病細胞株 K562, T2 を用いた。これらはいずれも American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD) より購入した。細胞株は Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM、nacalai tesque), または Roswell Park Memorial Institute medium - 1640, (RPMI-1640, Sigma-Aldrich) に 10% の fetal bovine serum(FBS) と 1% の penicillin-streptomycin(P/S) を添加したものを培養液として、37°C, 5%CO₂ のインキュベーターで培養した。

【ALDEFLUOR assay を用いた癌幹細胞の分離】

原理： Aldehyde dehydrogenase (ALDH)1 は各種組織幹細胞に広く発現しており、CSCs にも高発現であることが報告されている。(Ginestier, 2007; Hess et al., 2004; Keymoosi et al., 2014; Kuroda et al., 2013; Su et al., 2010) ALDEFLUOR assay kit(STEMCELL Technologies) は ALDH の蛍光基質である BODIPY®-amino acetaldehyde(BAAA) を投与し、その産生物 BODIPY®-amino acetate (BAA) が産生されることで ALDH 高活性の細胞内に蛍光物質が蓄積し、フローサイトメトリーによって ALDH 高活性の細胞を分離することができる。

方法：UM-UC3 を 0.05%トリプシン 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1xPBS で剥離し、10⁶細胞ペレットとして回収し半数ずつ2本のチューブに分け、各々を 1.5mM の BAAA を含むバッファー1ml で希釈、37度のインキュベーターで 60 分間培養した。ALDH1 のインヒビターである diethylamino-benzaldehyde(DEAB)を1本のチューブのみに 10µl 投与しこれをネガティブコントロールとした。FACS Area II cell sorter (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリーを行い ネガティブコントロールに比して FITC 陽性となっている細胞の割合を ALDH 活性細胞の割合とした。ALDH 活性が上位 0.9%、下位 0.9%の細胞を 96well プレート(Corning)に単細胞ソーティングした。成長した細胞は T25 培養フラスコに移し、1ヶ月超培養した。

【Sphere formation assay】

原理：CSCs の腫瘍形成能を利用した Sphere formation assay は、Sphere 細胞培養用の培地を用いた培養した際に形成するコロニー (Sphere) 数を持って CSCs を定量化する方法である。

方法：

0.05%トリプシン 0.02%EDTA 1xPBS でUMUC-3 H-10, L-3, WT 細胞を剥離し細胞をペレットにした。これに Sphere 細胞用の無血清培地 (培地の組成は下記に示す) を加え、非接着性の 96well プレート (Corning 社) に 1000 細胞/well、100 細胞/well、10 細胞/well、1 細胞/well の well を各濃度 24well ずつ播種した。37°C で 1 週間培養し、各 well を観察し Sphere 形成を認めた陽性 well 数をカウントした。Sphere は 100 μ m 以上の細胞集塊と定義した。カウントした各濃度での Sphere 陽性 well 数より ELDA 統計サイト (ELDA web site (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda>) Hu Y, et al. , 2009) を用いて CSCs の頻度を統計解析した。

無血清培地の組成 :

DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific)
20 ng/mL basic fibroblast growth factor (R&D Systems)
20 ng/mL epidermal growth factor (R&D Systems)
P/S 1% (Thermo Fisher Scientific)
N2 supplement 1% (Thermo Fisher Scientific)
Sodium Pyruvate 1% (Thermo Fisher Scientific)

【マウスを使用した in vivo での造腫瘍能の検討】

BALB/c-nu/nu マウス (メス、4-6 週齢) に対し 100%イソフルラン (関東化学株式会社) で吸入全身麻酔にて行った。H-10 クローン細胞および L-3 クローン細胞各 1000 個を、100 μ l の PBS および、100 μ l のマトリゲル (Corning) で懸濁し、マウスの背部皮下に注入した。1 週間ごとに腫瘍径の測定を行った。各細胞をマウス 5 匹ずつに注入し、その腫瘍体積の平均値をグラフ化した。細胞数を多段階に振っての造腫瘍能の検討では、H-10 は 1000 細胞, 100 細胞, 10 細胞, 1 細胞、L-3 は 10000 細胞, 1000 細胞, 100 細胞, 10 細胞を同様に 100 μ l の PBS および、100 μ l のマトリゲルで懸濁し、各細胞をマウス 3 匹の背部左右 2 か所ずつ、計 6 か所ずつに皮下投与し、1 週間ごとに腫瘍径の測定を行った。腫瘍体積は、 $\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = (\text{長径 (mm)} \times \text{短径 (mm)}^2) / 2$ で計算しグラフ化した。

本研究に関する実験プロトコールは札幌医科大学における動物実験規定に適合することが倫理委員会により承認された。

【Cisplatin, 放射線感受性の検討】

原理 : Cisplatin, 放射線に対する感受性の検証には WST-8 assay (Dojindo) を用いた。WST-8 は細胞内脱水素酵素により還元され、水溶性のホルマザン

生成する。このホルマザンの 450nm の吸光度を測定することで、生細胞数を算出することができる。

方法：

1. Cisplatin 感受性

96 well プレート (Corning) に H-10 細胞、L-3 細胞を各 well に 10^4 細胞 / DMEM100 μ l ずつ播種し 37°C で一晩培養した。翌日 Cisplatin (Wako、0.9% NaCl 溶液に 0.5mg/ml に溶解) を 0, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 μ g/ml となるよう調整した DMEM を各 well に 50 μ l 加え、0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 μ g/ml ととしたものを各濃度 3well ずつ作成した。再び 37°C で 72 時間培養した後 WST-8 を各 well に 10 μ l ずつ加え、更に 2 時間培養後に iMark マイクロプレートリーダー (BIO-RAD) を用いて 450nm の吸光度を測定した。検体の吸光度を A_s 、Cisplatin 濃度が 0 μ g/ml の well の吸光度を A_c 、培地と WST-8 のみを入れたブランク well の吸光度を A_b とし、細胞生存率は以下の式で求めた。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = ((A_s - A_b) / (A_c - A_b)) \times 100$$

2. 放射線感受性

96well プレート (Corning) に H-10 細胞、L-3 細胞を各 well 10^4 個 / DMEM100 μ l で 12well ずつ 4 枚のプレートに分けて播種し 37°C で一晩培養した。翌日 M100W (SOFTEX Inc., Austin, TX, USA) を用いて各プレートを 4, 8, 16Gy 放射線照射した。その後 37°C で 72 時間で培養し、Cisplatin 感受性と同様に WST-8 assay を施行した。

【フローサイトメトリーによる HLA 発現の確認】

HLA-A2, HLA-class I, HLA-A24 に対する抗体を産生するハイブリドーマを Hybridoma-SFM (Thermo Fisher Scientific) にて培養し、産生されたモノクローナル抗体 BB7.2 (抗 HLA-A2 抗体)、W6/32 (抗 HLA-class I 抗体)、C7709A1 (抗 HLA-A24 抗体) を用意した。H-10, L-3, WT をそれぞれ 5×10^5 ずつ回収しペレットとした。BB7.2, W6/32, C7709A1 をそれぞれ 1xPBS に 100 倍希釈で加えて suspend し、on ice で 30 分反応させた。1xPBS で洗浄ののち、二次抗体である抗マウス IgG 抗体 (FITC 標識) を 1xPBS に 200 倍希釈で加えて suspend し、遮光 on ice で 30 分反応させた。1xPBS で 2 回洗浄し、filtration ののちフローサイトメーター Calibur (BD Biosciences) で解析した。

【HLA リガンドーム解析】

原理：細胞膜上に発現する HLA とそれに提示されるペプチドの複合体を HLA に対するモノクローナル抗体との免疫沈降を用いて回収し、酸分解によってペプ

チドのみを溶出、ペプチドのアミノ酸配列をマスマスペクトロメトリーにより解析することで、HLA 上に提示されるペプチドを解析することが出来る。

方法：H-10, L-3, W/T をそれぞれ培養、細胞をトリプシンで回収、洗浄してペレットにし液体窒素で凍結させることを繰り返し、各細胞 10^9 収集した。この凍結細胞ペレットを、0.25%デオキシコール酸ナトリウム、0.2 mM ヨードアセトアミド、1 mM EDTA、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Sigma-Aldrich) 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、および 1% オクチル- β -D グルコピラノシド (Dojindo) を含むバッファーで融解させた。ペプチドと HLA-A2 の複合体は、臭化シアン活性化セファロース 4B (GE Healthcare) に結合した BB7.2 を使用しアフィニティークロマトグラフィーによって回収した。HLA-A2 に結合したペプチドは、弱酸 (0.2% trifluoroacetic acid, TFA) で溶出し、Sep-Pak tC18 カートリッジ (Waters) および ZipTip U-C18 (Millipore) を使用して脱塩した。真空遠心分離を使用してサンプルを乾燥し、0.1% TFA と 5% アセトニトリルを含むバッファーに再懸濁した。回収されたサンプルはナノフロー液体クロマトグラフィー (Easy-nLC 1000 system, Thermo Fisher Scientific) にかけて、これに結合する Orbitrap マスマスペクトロメトリー装置 (Thermo Fisher Scientific) により解析した。タンパク質のデータベースである Swiss-Prot 上のデータと解析されたペプチド配列を照合し、ペプチドの由来となる分子をリスト化した。

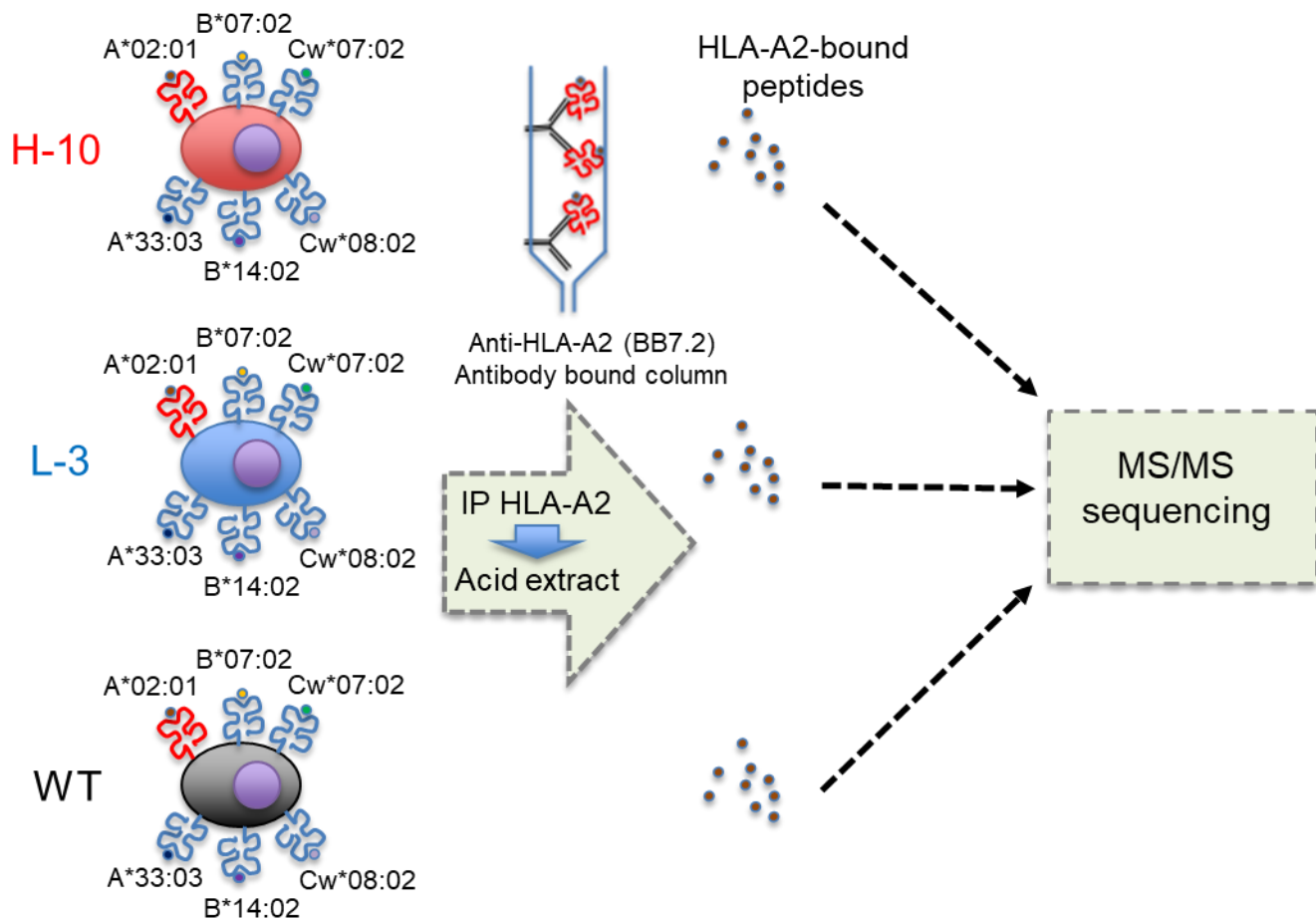


図1：HLA-A2 リガンドーム解析の模式図

【Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)】

・Ribonucleic acid (RNA)の抽出

各細胞におけるRNAを以下の通り、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。

1) 細胞の回収： $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ の細胞を0.05%トリプシン0.02%EDTA 1xPBSで回収し、PBSで洗浄し上清を吸引し、ペレットにした。

2) RNA抽出：RNeasy Mini Kit (QIAGEN)のプロトコールに準じた。詳細を以下に示す。2-mercaptoethanol(2-ME, gibco)を添加したBuffer RLTを各細胞に600 μ l加えホモゲナイザーで250A, 4分ホモゲナイズ。室温、15000rpm, 3分遠心。上清を1.5ml エッペンチューブに移し600 μ lの70%EtOHを加えピペッティング。カラム付き2ml チューブに検体700 μ lを入れて室温、12000rpm, 15秒遠心、これを2回繰り返す、チューブ内廃液を破棄。Buffer RW1を350 μ lカラムに入れて室温、12000rpm, 15秒遠心しチューブ内廃液を破棄。10 μ l DNase I stock solution (QIAGEN)を70 μ lのBudder RDDに加え攪拌し、カラムに入れて室温、

15分静置。350 μ lのBuffer RW1をカラムに加え、室温、12000rpm, 15秒遠心、チューブ内廃液を破棄。500 μ lのBuffer RPEを入れて室温、15000rpm, 15秒遠心、チューブ内廃液を破棄。500 μ lのBuffer RPEを入れ、室温、15000rpm, 2分遠心、チューブ内廃液を破棄。更に室温、15000rpm, 1分遠心。カラムを新しい1.5ml エッペンチューブに設置し、44 μ lのRNAase-free waterを入れ、1分静置ののちに室温、12000rpm, 1分遠心することを2回繰り返す。RNA抽出完了。得られたRNAは分光光度計濃度測定を行った。

・ Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)の合成

抽出したRNA 1 μ gからcDNAを合成した。cDNAの合成にはSuperscript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を使用し、本キットのプロトコールに準じて以下の手順で行った。RNAは1 μ g/11 μ lとなるようにRNase-free waterで希釈。5xReaction Buffer 4 μ l, 10mM dNTP MIX 2 μ l, Random Hexamer primer 1 μ l, RiboLock RNase Inhibitor 1 μ l, ReverAid RT 1 μ lを加えて計20 μ lに調整し、サーマルサイクラーGene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystem)を用いて25 $^{\circ}$ C 5分、42 $^{\circ}$ C 60分、70 $^{\circ}$ C 5分で反応させてcDNAを得た。cDNAのうち必要量以外は-20 $^{\circ}$ Cで保存し、適宜実験に使用した。なおヒト正常組織のcDNAはHuman MTC™ Panel I (タカラバイオ)を用いた。

・ PCR反応

以上で合成した各細胞のcDNAを用いてTaq DNA polymerase kit (Qiagen)を使用しRT-PCRを行った。サーマルサイクラーはGene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystem)を用い、94 $^{\circ}$ C 2分 94 $^{\circ}$ C 15秒、58 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 30秒を35サイクル行った。C17orf112のRT-PCRに関しては、アニーリングの温度を55-62 $^{\circ}$ Cで微調整し反復して実験を行った。内在性コントロールとしてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を使用した。PCRに使用したプライマー情報は下記表に記載する。

表1：プライマー配列

遺伝子名	プライマー長		
PIPSL	186	fw	tgaccccagtttctcacctc
		rv	gtgataaggcccacgttggt
PSMD4	162	fw	caagatgggtgttgaaagca
		rv	gtgataaggcccacgttggt
PIP5K1A	209	fw	tcttcggtcggtttttcatc
		rv	aactggatggcacctttcaa
C17orf112(1)	217	fw	gaatcagctgggaaacatgc
		rv	actgagcaaaagggtgggtg
C17orf112(2)	200	fw	cagcttcagatggtcaagca
		rv	gggccccaatctcatattct
C17orf112(3)	166	fw	ttggcaatggtagaacagaagc
		rv	catcacctccatctgtaacagc
CLSPN	265	fw	ctcaggctctttcccacag
		rv	atcttcgctcccacatcac
FSHR	214	fw	agcctctggaccagtcattc
		rv	ctcagagatttgccgtctcc
SCN10A	260	fw	ctcttcgcaggaagttttg
		rv	cacttgggttgcatgttgac
GAPDH	452	fw	accacagtccatgccatcac
		rv	tccaccaccctgttgctgta

【Quantitative-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)】

GRIK2 probe は Thermo Fisher Scientific 社より購入した (TaqMan Gene expression assays)。cDNA は RT-PCR と同様のものを使用した。ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific 社) を使用し、PCR 反応は 95 °C 15 秒、60 °C 1 分を 45 サイクル行った。各サンプルは triplicate で PCR を行い、内在性コントロールとして GAPDH を使用した。

【Cap analysis of gene expression (CAGE) analysis】

癌幹細胞で特異的に発現が亢進している分子の候補を更に見つけ出すため、CAGE 法を利用して ALDH^{high} クローンと ALDH^{low} クローンにおける messenger ribonucleic acid (mRNA) 発現の網羅的解析を施行した。

原理：CAGE は、RNA ポリメラーゼ II 産物の 5' キャップ構造をビオチン化し、

ビオチン化した 5' 末端を含む RNA のみをストレプトアビジンで回収、5' 末端側の配列のみをシーケンスし、得られた配列がゲノム上のどこの位置に由来するかをマッピングすることによって、転写開始点ごとの発現量を調べることが可能となる。

方法：RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて上述の RT-PCR と同様に施行した。抽出した RNA は Bioanalyzer (Agilent) を用いて RNA integrity number (RIN) が 7.0 超、A260/280, A260/230 比が 1.7 超であることを確認した。CAGE 解析は DNAFORM 社に依頼した。クラスターマップは seaborn モジュール (Python) を用いて描出した。CAGE 解析で得られた counts per million (CPM) 値から各クローン間のユークリッド距離を Ward 法を用いて計算し、樹状図を作成した。各遺伝子の発現量を緑色の濃淡で示した。ボルケーノプロットは解析ソフト R を用いて作成した。点は一つの遺伝子を示し、ALDH^{high} 細胞 3 群 (H-1, H-6, H-10)、ALDH^{low} 細胞 3 群 (L-1, L-3, L-8) の CPM 値の差を横軸 log2fold change, 縦軸を有意差 -log₁₀ P value で示した。

【GRIK2 過剰発現株の作成】

原理：GRIK2 遺伝子をレトロウイルスベクター pMXs-puro に組み込み PLAT-A 細胞に transfection してウイルス液を産生させ、これを目標とする細胞に transfection することで、GRIK2 過剰発現株を作成することができる。

方法：今回の実験では当研究室に過去に在籍していた井上医師が過去に作成し保存されていた GRIK2 過剰発現 UM-UC3 (WT) を使用した。作成方法は以下である。(Inoue et al., 2017)

1. PLAT-A 細胞 (Dr. T. Kitamura, Tokyo, JAPAN より寄贈) を細胞密度 50% 程度になるように播種し、FuGene HD transfection reagent (Promega) 15 μ l + Opti-MEM (Gibco) に pMXs-puro-GRIK2 を加え PLAT-A 細胞に投与する。48 時間の培養後に上清を回収し filtration してウイルス液を回収する。
2. UM-UC3 細胞 5x10⁵ に対しウイルス液 1ml とポリブレン (Sigma-Aldrich) を 8 μ g/ml 加え、over night 培養する。
3. 翌日 1 μ g/ml の puromycin (Sigma-Aldrich 社) を加え transfection 細胞をセレクトする。以降、puromycin 1 μ g/ml 添加下に培養継続する。

【CTL 刺激、ELISPOT assay】

原理：健常人末梢血単核細胞 (PBMC) には少数のナイーブ T 細胞が含まれる。

免疫原性のあるペプチドを抗原提示されると、ナイーブ T 細胞はそのペプチドに特異的に反応する CTL に分化する。実際にペプチド特異的 CTL が得られたかどうかは IFN- γ ELISPOT assay によって確認した。IFN- γ ELISPOT assay は CTL が抗原攻撃の際に IFN- γ を分泌するという現象を利用している。抗 IFN- γ 抗体でコートされたウェル上で CTL と対象細胞を培養し、細胞を除去後に検出用のサイトカイン抗体を添加することで、IFN- γ 分泌細胞数をスポットとして検出することができ、対象細胞に反応する CTL を定量化する。

方法：

健常人検体からの採血は、「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子組換え実験等安全管理規定」に従って実験を行い、札幌医科大学の倫理委員会の承認を得て施行した（承認番号 29-2-69）。HLA-A*02:01 を有する健常人ドナー2名より静脈血 50ml を採取し、LeucoSep リンパ球分離チューブ（グライナー）にリンパ球分離溶液（リンフォプレップ、コスモ・バイオ）15ml を入れ遠心にかけてのもの2本に均等に血液を注ぎ、1000g, 30min, 室温で遠心分離をかけた。血漿成分の下層に浮遊する PBMC を回収し、1xPBS で計4回洗浄した。培地は下に示した組成の添加物を加えた AIM-V を用い、PBMC を約 4×10^6 /ml/well となるように 24well プレートに播いて 37°C で培養した。

1. 刺激に用いたペプチドはコスモ・バイオ社より購入した。使用したペプチドのアミノ酸配列は以下に記す。PBMC に 20 μ g/ml の濃度でペプチドを投与し、1週間毎に3回投与を繰り返した。
2. ELISPOT assay は最終のペプチド投与から1週間後に、Human IFN- γ ELISPOT set (BD Biosciences) を用いて施行した。96well メンブレンプレートに Capture 用の抗 IFN- γ 抗体を 200 倍希釈で播き 4°C で over night 静置した。翌日ブロッキングバッファーを 200 μ /well 入れプレートをブロッキングした。Target 細胞を 5×10^5 /ml に調整しペプチド 20 μ g/ml で刺激して2時間室温で静置した。その後2回洗浄し、AIM-V に 5×10^5 /ml になるよう希釈した。エフェクター CD8 細胞は 5×10^5 /ml に調整した。target 細胞を 100 μ l/well 撒いて 30 分 37°C で培養ののちにエフェクター CD8 細胞を 100 μ l/well で投与した。37°C で over night 培養し、翌日 wash buffer で 3 回洗浄ののちビオチン標識抗体を 250 倍希釈で分注し 2 時間反応させた。Wash buffer で 6 回洗浄し、HRP 標識ストレプトアビジンを 100 倍希釈で分注し、wash buffer で 6 回、1x PBS で 1 回洗浄した。発色試薬を 100 μ l/well 添加し、15 分後に蒸留水を注いで乾燥させ、翌日各 well のスポット数を、ImageJ ソフトを使用してカウントした。

表 2：使用したペプチドのアミノ酸配列

アミノ酸配列	遺伝子名
SLELDPPSL	C17orf112
TLQMLTTSV	PIPSL
SLLNQPKAV	CLSPN
LMYDAVHVV	GRIK2

培地組成：

AIM-V (Thermo Fisher Scientific)

HS 5% (biowest)

P/S 1% (Thermo Fisher Scientific)

HEPES 1% (Thermo Fisher Scientific)

2-Mercaptoethanol 0.01% (Thermo Fisher Scientific)

使用した試薬：

Wash buffer:

1xPBS

Tween20 0.05% (Wako)

Blocking Buffer:

RPMI-1640 (Sigma-Aldrich)

FBS 10% (Sigma-Aldrich)

P/S 1% (Thermo Fisher Scientific)

【IFN- γ 刺激を加えた細胞に対する ELISPOT assay】

原理：IFN- γ 刺激により、HLA-A2 の発現量は増加することが知られている。(Gupta, 1990) これを利用し、ELISPOT assay の感受性を高める目的でターゲット細胞に IFN- γ をあらかじめ投与して実験を行った。

方法：細胞を 10^5 /ml で 6well プレート (Corning) に播き、IFN- γ (P&D SYSTEMS 社) を 10^5 U/ml で添加し、48hr 培養ののちに target 細胞として使用した。ほかの ELISPOT 工程は前述と同様に施行した。

【HLA-A2 テトラマーによる単細胞ソーティング】

原理：CTL は T 細胞受容体により HLA とペプチドの複合体を特異的に認識して活性化する。この原理を利用して、あるペプチド配列に特異的に反応する CTL を検出することが可能であると考えられた。しかし HLA とペプチドの複合体は、単量体の状態では T 細胞受容体に対する親和性が低く、結合は不安定である。そこで HLA とペプチドの複合体をビオチン化し、ストレプトアビジンによりこれを 4 量体（テトラマー）とすることで、T 細胞受容体との安定した結合を維持することが可能となった。テトラマーを蛍光物質で標識することで、フローサイトメーターにより検出し単細胞ソーティングすることができる。

方法：GRIK2(LMYDAVHVV)-HLA-A2-PE テトラマー、CLSPN(SLLNQPKAV)-HLA-A2-PE テトラマーは MBL 社に製造依頼した。

1. 対象となる PBMC の bulk は 2×10^6 細胞に対し PBS100 μ l となるように suspend し、GRIK2-HLA-A2-PE テトラマーまたは CLSPN-HLA-A2-PE テトラマーと、HIV-HLA-A2-FITC テトラマーを各 5 μ l ずつ投与し室温、遮光で 30 分静置した。
2. 1xPBS で 2 回洗浄し、filtration した。
3. フィーダー細胞は、健常ドナーPBMC を先述のごとく採取し、100Gy 放射線照射して作成した。96well プレートにあらかじめ 8 万個/well でフィーダー細胞を撒いておいた。
4. FACS Area II cell sorter (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリーを行い、PE 陽性かつ FITC 陰性の細胞群をあらかじめフィーダー細胞を撒いた 96well プレートに単細胞ソーティングし、2 週間培養した。

培地組成：

AIM-V (Thermo Fisher Scientific)

HS 5% (biowest)

P/S 1% (Thermo Fisher Scientific)

Hydroxyethylpiperazineethanesulfonic acid(HEPES)1% (Thermo Fisher Scientific)

2-Mercaptoethanol 0.01% (Thermo Fisher Scientific)

PHA 0.5%(Wako)

IL-2 0.2%(PEPRO TECH)

【統計解析】

2 群間の比較には Student's t-test を用い、 $P < 0.05$ を有意差とした。

結果

1. ALDEFLUOR 法による膀胱癌 CSCs 株の樹立

膀胱癌細胞株 UM-UC-3 の ALDEFLUOR assay を施行したところ、UM-UC3 のうち ALDH 活性細胞の割合は 12.4% 見られた。ALDH 活性の高い 0.9%、ALDH 活性の低い 0.9% の細胞をそれぞれ単細胞ソーティングし、培養を継続することで ALDH 活性の高い 3 クローン (H-1, H-6, H-10)、ALDH 活性の低い 3 クローン (L-1, L-3, L-8) を樹立した。これらの細胞株を 1 か月間以上培養したうえでそれぞれの ALDH 活性を ALDEFLUOR 法により再検したところ、H-1, H-6, H-10 クローンは ALDH 活性が高い細胞の割合をある程度維持できしており、また L-1, L-3, L-8 クローンは ALDH 活性が低いままであった。以上より、長期の培養でも性質の安定した ALDH 高活性 (ALDH^{high}) 細胞株、ALDH 低活性 (ALDH^{low}) 細胞株の樹立に成功した。ただし、H-1, H-6, H-10 細胞においては培養後の ALDH 高活性細胞の割合は少しずつ低下しており、経時的に ALDH 活性の低い、非癌幹細胞への分化傾向を示すことが伺える。

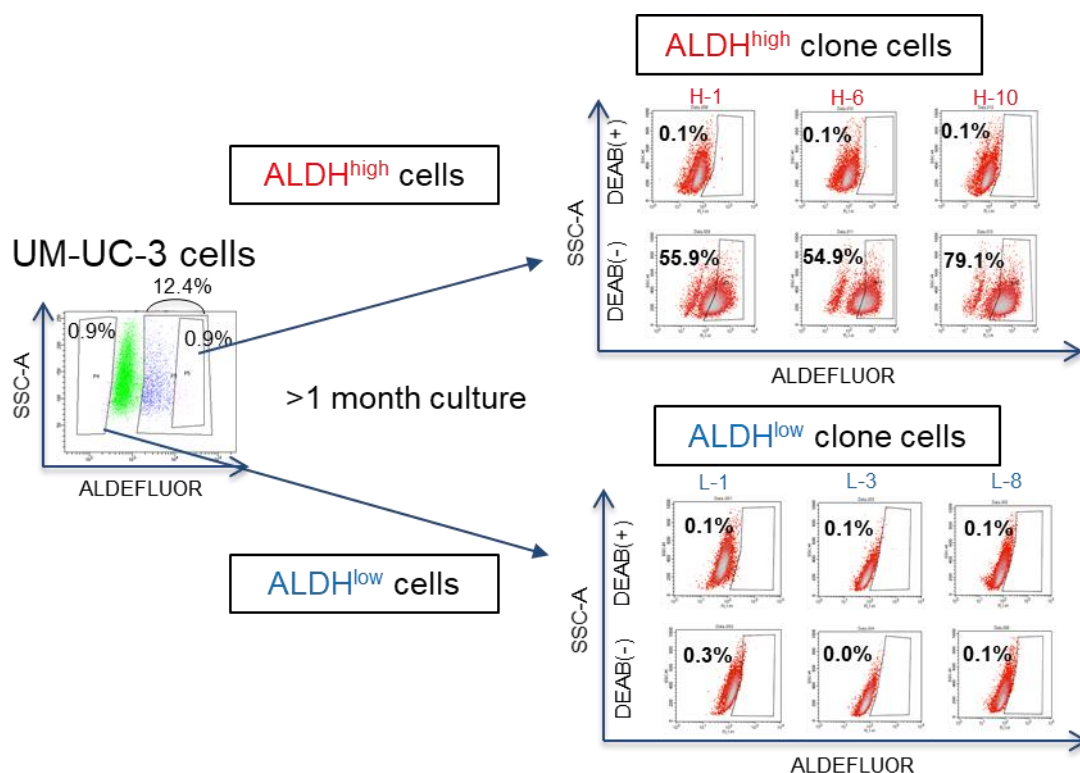


図 2 : ALDEFLUOR assay の結果。ALDH 活性が高い 3 クローンと ALDH 活性が低い 3 クローンを樹立し 1 か月超培養したところ、それぞれの性質を一定以上保持されていた。

次に、この ALDH 活性の高いクローンが実際に癌幹細胞を高濃度に含む細胞集団であることを証明するための実験を行った。まずは ALDH 活性の高い H-10 細胞、ALDH 活性の低い L-3 細胞、に wild type (WT) を加えた 3 クローンにつき、非接着培地における培養下での sphere 形成能について比較したところ、ALDH 活性の高い 3 クローンにおいて sphere 形成能が高い傾向が見られ、中でも H-10 での sphere 形成能の高さは顕著であった。

表 3 : WT, H-10 ,L-3 における sphere 形成数と Stem cell frequency 算出結果

Cells	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	1/Stem cell frequency	95% CI	*P<0.01] *] *
WT	24/24	20/24	6/24	1/24	49.07	31.77-75.9	
H-10	24/24	24/24	16/24	7/24	7.56	4.99-11.6	
L-3	24/24	19/24	3/24	0/24	67.32	43.22-105.0	

この H-10 と、ALDH 活性の低いクローンの代表として L-3 を選択し、ヌードマウスの皮下に腫瘍細胞を移植する Xenograft モデルにおける腫瘍増生能を調べたところ、H-10 のみで著明な腫瘍増生を認めた。(図) 移植する細胞数を多段階に分けてその腫瘍増生を観察すると、ELDA software において計算される H-10 の癌幹細胞含有率は顕著に高値であった。

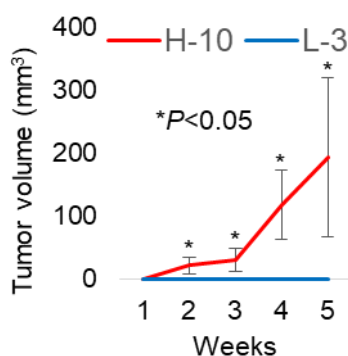


図 3 : 10³ 個の細胞を皮下投与した際の H-10, L-3 腫瘍増殖曲線。H-10 で著明な腫瘍形成が見られる一方、L-3 では腫瘍形成を認めない。

表 4 : マウス皮下に移植する細胞数と腫瘍形成割合、Stem cell frequency 算出結果

Cells	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	1/Stem cell frequency	95% CI
H-10	n.d.	6/6	6/6	2/6	1/6	18.0	6.68-50.3
L-3	6/6	3/6	0/6	0/6	n.d.	1626.8	575.23-4602.3

*P<0.01

以上の結果から H-10 は高い腫瘍増生能、自己複製能、分化能をもち、癌幹細胞を高濃度を含む細胞集団であることが証明された。

2. H-10 の治療抵抗性の証明

H-10 が化学療法や放射線治療に対して治療抵抗性を持っているかについて検証を行った。化学療法に対する抵抗性については、膀胱癌に対して用いられる代表的なプラチナ系抗癌剤である cisplatin を用いた。H-10, L-3 を cisplatin 0-3.2ug/ml 投薬下に 72 時間培養したところ、H-10 で L-3 に比較して明らかな cisplatin への抵抗性が認められた。また放射線照射についても、同様に H-10 で L-3 に比較して明らかな治療抵抗性が認められた。

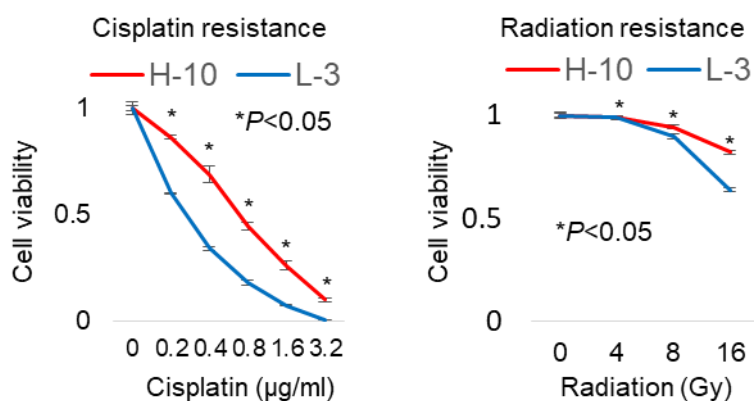


図 4 : Cisplatin と Radiation に対する H-10, L-3 の感受性。いずれも H-10 において有意な抵抗性が認められた。

3. H-10 に対する HLA リガンドーム解析

上述の 1, 2 の結果より、H-10 は高い腫瘍増生能、自己複製能、分化能をもち、かつ化学療法、放射線療法に抵抗性を持つ癌幹細胞を高濃度を含む細胞集団であることが確認できた。この細胞に特異的に発現するペプチドを同定するため、HLA-A2 リガンドーム解析を施行した。あらかじめ HLA-A2 を標識したフローサイトメトリーを施行し、H-10, L-3, WT とも HLA-A2 を発現し

ていることを確認した（ただし、H-10 で軽度 HLA-A2 発現が低かった）。

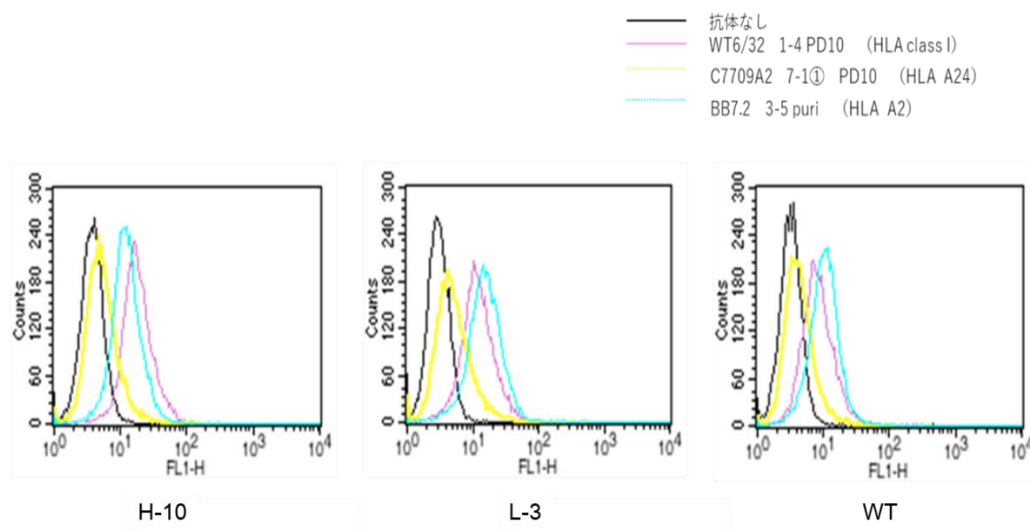


図 5 : 抗 HLA クラス 1 抗体(ピンク色)、抗 HLA-A2 抗体 (水色)、抗 HLA-A24 抗体 (黄色) フローサイトメトリー結果。H-10, L-3, WT いずれも HLA クラス 1 と HLA-A2 が陽性で HLA-A24 は陰性である。

H-10, L-3, WT の 3 つを大量培養し、HLA-A2 に提示されるペプチドを検索した。結果、H-10 に発現する 848 個、L-3 に発現する 1832 個、WT に発現する 1073 個のペプチドを同定した。同定されたペプチドは 8-11 アミノ酸長で占められており、中でも 9 アミノ酸長が最も多かった。また配列は 2 番目にロイシンやメチオニン、4 番目にグルタミン酸やアスパラギン酸、末尾にバリンやロイシンが多いという特徴的なパターンを示していた。

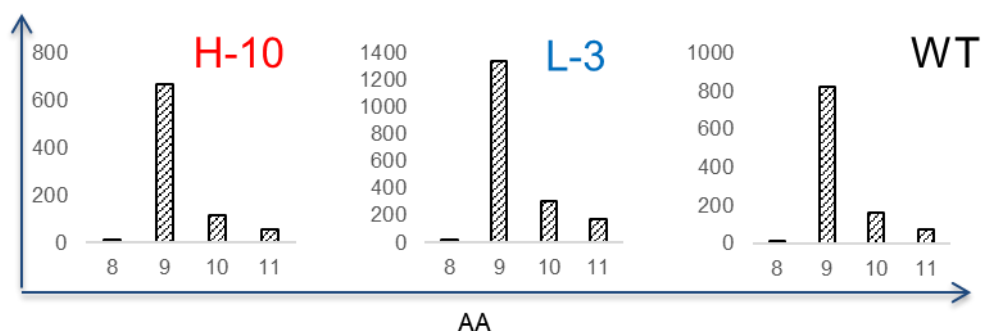


図 6 : HLA リガンドーム解析で各クローンにおいて検出されたペプチドのアミノ酸数。

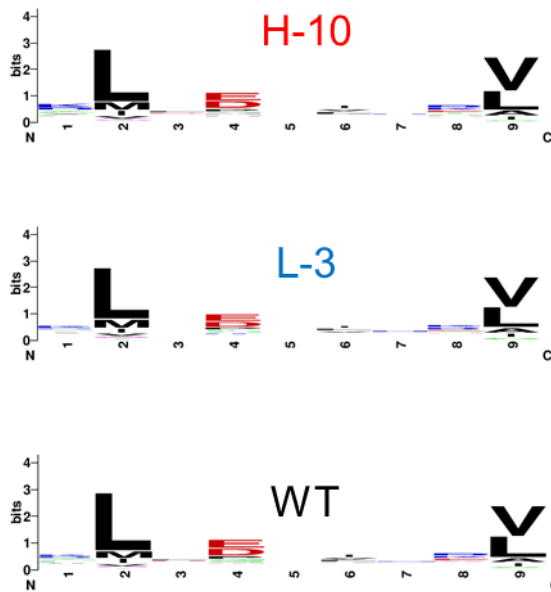


図 7: HLA リガンドーム解析で各クローンにおいて検出されたペプチドの含有アミノ酸の割合を WEB logo にて表した。第 2, 4, 9 番目に配列されるアミノ酸に特徴的なパターンを有することがわかる。

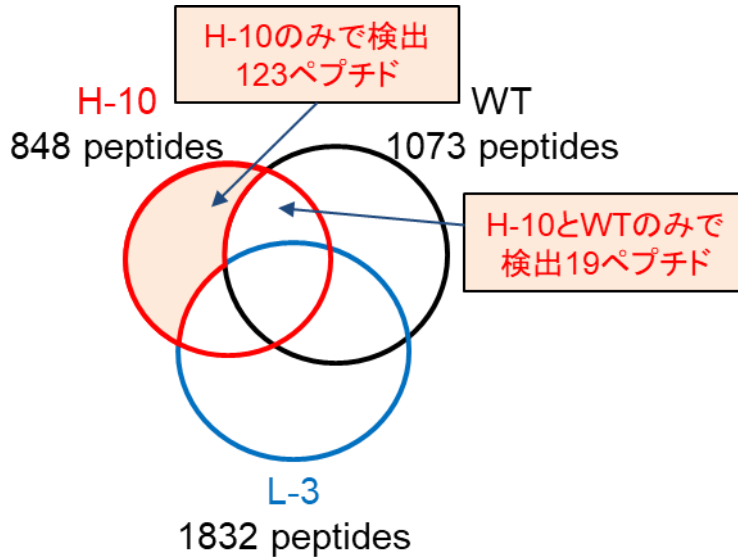


図 8 : HLA リガンドーム解析にて検出されたペプチド数の模式図。H-10

これらのペプチドの中から、H-10 で発現が見られるが L-3 と WT で発現が見られない、あるいは H-10 と WT で発現がみられるが L-3 では見られないペプチドが H-10 特異的な抗原となるペプチドの候補と考えられた。さらに、それらのペプチドのうち正常組織での発現が低い(精巣以外の組織での発現の

平均値 TPM \leq 2 である) ペプチドは 8 個みられ、これらが H-10 特異的な抗原となりうるかについて検証した。候補となるペプチドは、Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein(PIPSL), Zinc finger protein (ZNF)573, ZNF84, excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6(ERCC6L), Claspin(CLSPN), Isoform 4 of Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR), C17orf112, Sodium channel protein type 10 subunit alpha(SCN10A)の 8 種の遺伝子の由来するものであった。

表 5: HLA リガンドーム解析において H-10 で発現がみられ、L-3 で発現がみられないペプチドのうち、精巣以外での組織での発現平均値 TPM \leq 2 であったペプチドの一覧

Sequence	Gene	Protein
RILSKLHTV	PIPSL	Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein (Pseudogene)
YLDPNQRDL	ZNF573	Zinc finger protein 573
RLGEKLYEC	ZNF84	Zinc finger protein 84
KLDEHIAYL	ERCC6L	DNA excision repair protein ERCC-6-like
SLLNQPKAV	CLSPN	Claspin
ILWLNKNGI	FSHR	Isoform 4 of Follicle-stimulating hormone receptor
SLELDPPSL	C17orf112	Uncharacterized protein C17orf112
KVLEHVVRV	SCN10A	Sodium channel protein type 10 subunit alpha

5. UM-UC3 各クローンに対する CAGE analysis による遺伝子発現解析

HLA リガンドーム解析で CSCs 抗原の候補となった上記 8 種の遺伝子の UM-UC3 各クローンでの発現量を検証するため、また更に別の癌幹細胞特異抗原の候補となる分子を特定するため、UM-UC3 各クローン (H-1, H-6, H-10, L-1, L-3, L-8, WT) の網羅的遺伝子解析を CAGE 法により施行した。CAGE による階層的クラスター解析の結果、ALDH 活性の高い 3 群と、ALDH 活性の低い 3 群はそれぞれ遺伝子的に親和性がありクラスターを形成することが証明された。

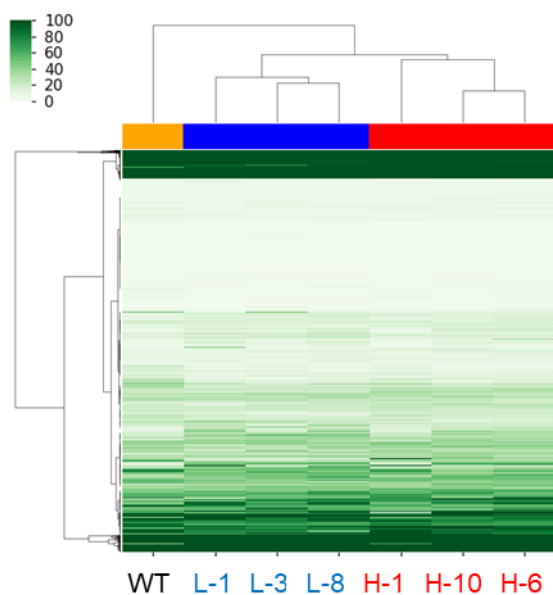


図 9 : CAGE analysis における UM-UC3 各クローンのクラスター解析。L-1, L-3, L-8 と H-1, H-6、H-10 はそれぞれ遺伝子的にクラスターを形成する。

HLA リガンドーム解析で CSCs の候補となった 8 ペプチドの由来遺伝子の CAGE での発現は以下の表の通りとなった。ZNF573、ZNF84、ERCC6L については ALDH^{high} 細胞と ALDH^{low} 細胞の間で発現の差は認められなかった。CLSPN に関しては、 $p=0.07$ と有意差は検出できないものの、H-10 と L-3 の間で CPM 値は約 3 倍の差があった。PIPSL, FSHR, C17orf112, SCN10A については、CAGE での発現はいずれのクローンでも確認できなかった。

表 6: HLA リガンドーム解析にて検出された分子の UM-UC3 各クローンにおける CAGE 解析での遺伝子発現量の比較。

	H1	H6	H10	L1	L3	L8	WT	p値
ENSG00000189144_ZNF573_	2.38	2.3	3	2.44	1.65	2.4	2.24	0.30696
ENSG00000198040_ZNF84_+	12.91	13.13	13.8	9.56	8.8	14	14.75	0.203847
ENSG00000186871_ERCC6L_	27.74	26.68	30.4	29.32	26.52	31.88	14.99	0.638144
ENSG00000092853_CLSPN_	56.98	91.2	98.8	49.96	33.12	56.92	24.22	0.071976

CAGE 解析での ALDH^{high} 細胞、ALDH^{low} 細胞での遺伝子発現と、前述の HLA リガンドーム解析の結果を組み合わせ、以下のボルケーノプロットを作成した。H-10 にて L-3 に比し有意に高発現であり、かつ HLA リガンドーム解析

より H-10 のみで抗原提示されている分子として GRIK2 が浮上した。

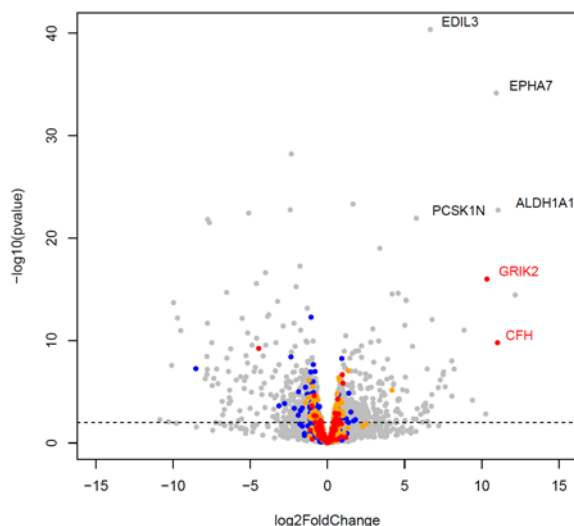


図 10 : CAGE analysis と HLA リガンドーム解析結果を組み合わせたボルケーノプロット。横軸は発現量であり、右に行くほど ALDH high 細胞での発現が、左に行くほど ALDH low 細胞での発現が多くなる。縦軸は統計学的有意差を示し、上に行くほど差が統計学的に有意となる。p=0.05 を点線で示している。

HLA リガンドーム解析において H-10 のみで検出されたものを赤点、L-3 のみで検出されたものを青点、両者で検出されたものをオレンジ点、両者とも検出されなかったものを灰色点で示している。ALDH high 細胞で著明に発現が高く、H-10 細胞にて HLA 提示される分子として GRIK2 に注目された。

6. HLA リガンドーム解析と CAGE 解析から検出された各分子についての検討

6-1. PIPSL

PIPSL は、Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 alpha (PIP5K1A) と Proteasome 26S subunit, Non-ATPase 4 (PSMD4) の遺伝子を基にできた偽遺伝子であり、その産物は前半が PIP5K1A 由来、後半が PSMD4 由来であり、今回検出されたペプチド配列は、PSMD4 由来の部位の一部であった。CAGE 解析は転写開始点の配列を読んでマッピングする手法であるため、PIPSL の構造上、PIP5K1A 発現との区別が困難となり CAGE での検出は不可と考えられる。

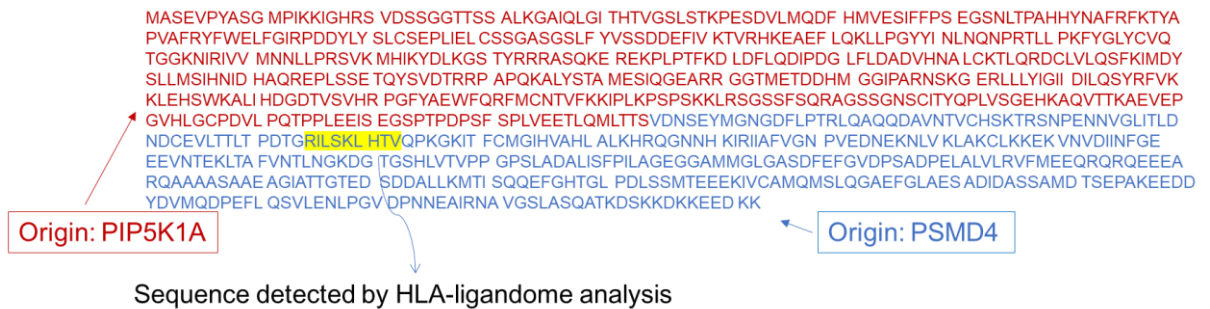


図 11 : PIPSL のアミノ酸配列。前半部が PIP5K1A を鋳型とした配列、後半部が PSMD4 を鋳型とした配列でできている。

HLA リガンドーム解析の結果はペプチド配列をデータベースと照合し由来の遺伝子を特定しており、このペプチド配列は PSMD4 由来の可能性も PIPSL 由来の可能性もいずれも考えられるが、偶然 PIPSL 由来として拾われたためこの偽遺伝子が検出されることになった。しかし PSMD4 は正常組織にも普遍的に発現する物質であるため、今回提示されたペプチドも PSMD4 由来の可能性が圧倒的に高いと考えられたが、PIPSL 独自の遺伝子配列 (PIP5K1A 由来と PSMD4 由来の配列の連結部) を増幅させるようプライマー設計して PCR を施行したところ、ほとんどの正常細胞での発現は見られないが精巣に強発現、また UMUC-3 すべてのクローンに弱いバンド発現が認められ、癌精巣抗原の候補である可能性も考えられた。また、PIP5K1A 由来の配列と PSMD4 由来の配列の連結部には HLA-A2 に親和性があると想定されるペプチド鎖 (TLQMLTTSV) がみられ、これは PIP5K1A, PSMD4 いずれのアミノ酸配列とも異なる PIPSL 独自の配列であるため、この配列は HLA リガンドーム解析で検出された配列ではないが、癌抗原の候補として免疫原性の検証という次の段階へ実験を進めることとした。

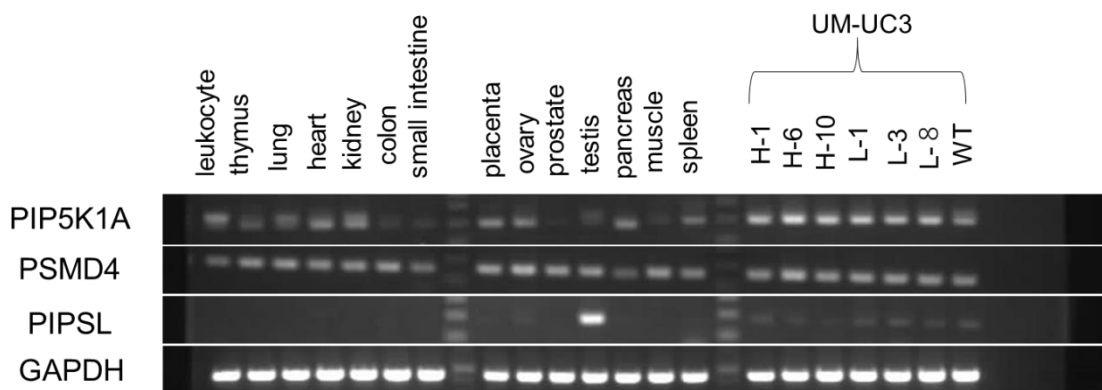


図 12 : 正常組織と UM-UC3 各クローンにおける PIP5K1A, PSMD4, PIPSL の

RT-PCR での発現。PIP5K1A, PSMD4 は正常組織で普遍的に発現が見られる。一方で PIP5K1A は正常組織では精巣のみで発現が確認でき、UM-UC3 の各クローンにおいても淡いバンドが検出される。

6-2. C17orf112

C17orf112 は 17 染色体 open reading frame 112 を意味する。この分子の働きや、そもそも翻訳されているかどうかについても不明であるが、今回 HLA リガンドーム解析でその配列に由来するペプチドが検出されたことは非常に興味深いと考えた。CAGE 解析においてはいずれのクローンにおいても発現が確認できなかったが、未知の分子であるという点に注目し検証を進めた。CAGE 解析は転写開始点の配列を読むため、転写開始部付近が欠落した部分的な転写・翻訳が行われている場合は CAGE 解析で検出できない可能性もあると考え、RT-PCR を繰り返し施行した。正常組織では精巣のみに発現が認められ癌精巣抗原の候補であると期待したものの、プライマーや PCR 条件を変更して複数回の検証を施行したにも関わらず C17orf112 の遺伝子発現の証拠は検出できなかった。

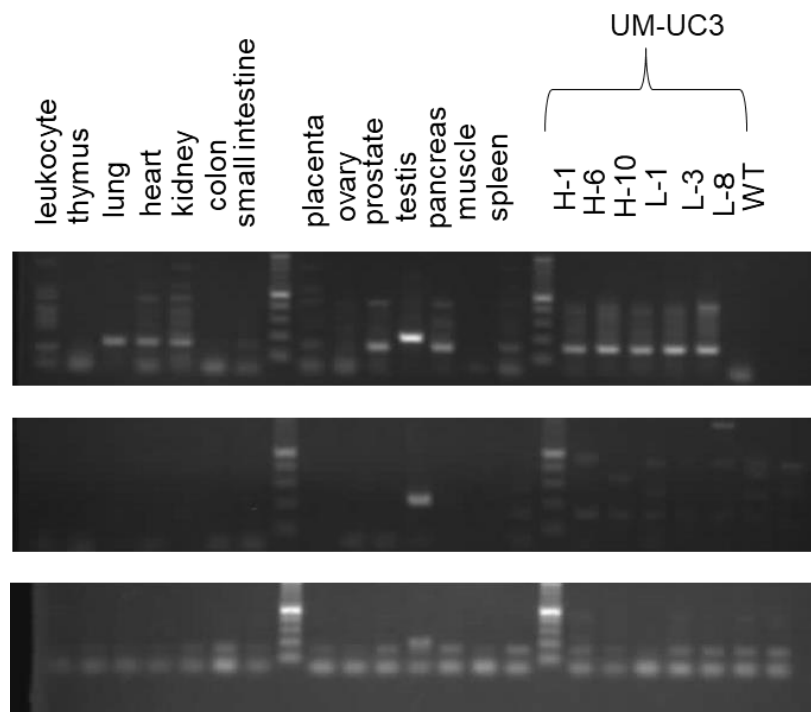


図 13: 正常組織と UM-UC3 各クローンにおける C17orf112 発現。RT-PCR は条件を微調整して複数回施行したが、UM-UC3 各クローンにおいて有意なバンド

ドは確認できなかった。

6-3. CLSPN

CLSPN は、各クローン間でやや発現のばらつきが見られる影響により統計学的に有意ではないもの、ALDH^{high} 細胞で発現が高い傾向が見られた点、また過去の報告にて他癌種において CSCs 機能との関連が報告されている点を重視し更に検証を進めた。RT-PCR においては正常細胞での発現が認められず、UM-UC3 各クローンでは発現が確認された。CSCs 抗原の候補として免疫原性の検証に進んだ。

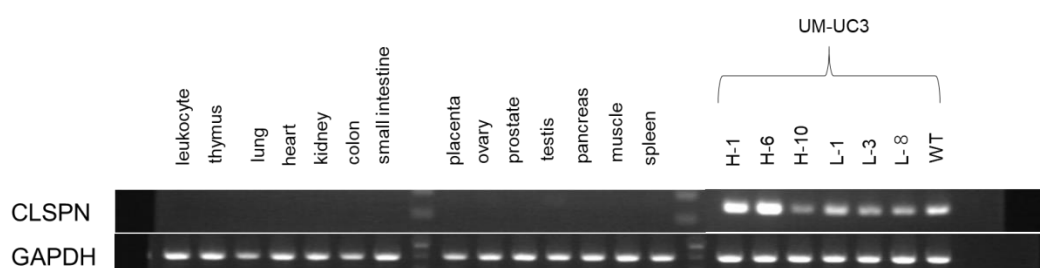


図 14：正常組織と UM-UC3 各クローンにおける CLSPN 発現。癌特異的に発現しており、特に H-1, H-6 で強い発現が見られた。

6-4. GRIK2

GRIK2 (Glutamate ionotropic receptor kainite type subunit 2) 由来のペプチド (LMYDAVHVV) はリガンドーム解析で H-10 のみに発現が認められた。かつ GRIK2 は CAGE で ALDH^{high} 細胞において著明に遺伝子発現が高かった結果から、このペプチドは CSCs 抗原の有力候補と考えられ、免疫原性の検証に進んだ。HLA リガンドーム解析の段階で CSCs 特異抗原の候補分子として挙げられなかった理由は、正常組織の一部においても発現が見られ、正常組織での平均 TPM が ≤ 2 とならなかった点であった。そこで正常組織も含めた発現量を定量するためリアルタイム PCT を施行したところ、ALDH^{high} 細胞において著明な高発現が認められ、正常組織では概して発現は低いものの脳でやや高い発現が認められた。

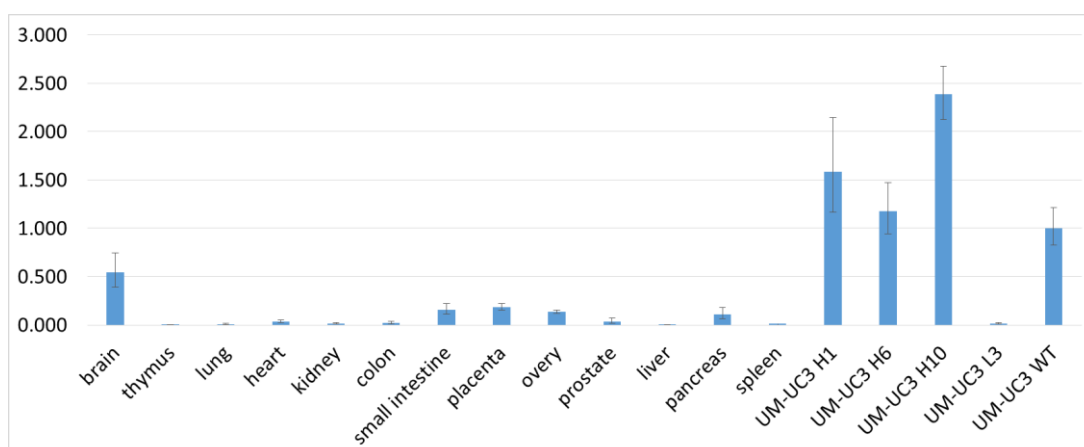


図 15 : GRIK2 の正常組織、UM-UC3 各クローンにおける発現量をリアルタイム PCR で検証。脳で他の正常組織に比してやや高い発現が認められる。

6-5. その他の分子

HLA リガンドーム解析で得られた残りの分子の中で、CAGE での ALDH^{high} 細胞、ALDH^{low} 細胞間での発現がほぼ等しかった ZNF574, ZNF84, ERCC6L は CSCs 特異的な抗原となる可能性は低いと考えられ、候補から除外した。FSHR、SNC10A については CAGE で発現がいずれのクローンにおいても確認できず、RT-PCR を施行しても結果は同様であった。また THE HUMAN PROTEIN ATLAS (<https://www.proteinatlas.org/>) での検索においても尿路上皮癌での発現が確認できなかったため、CSCs 抗原の候補から除外した。

7. ペプチド特異的 CTL 誘導と CTL クローンの樹立

上記工程で膀胱癌 CSCs 特異的抗原となる分子の候補として、PIPSL (TLQMLTTSV)、C17orf112 (SLELDPPSL)、CLSPN(SLLNQPKAV)、GRIK2 (LMYDAVHV) の 4 つが残り、これらに対し特異的に反応する CTL を健常人ドナーの PBMC から誘導できるかどうかを検証した。PIPSL、C17orf112 についてはペプチド刺激後に ELISPOT assay で T2 細胞に提示されるペプチドへの反応性を確認する実験を反復したが、有意な反応は得られなかった。CLSPN、GRIK2 に関しては、ELISPOT assay で反応の見られる bulk を確認することが出来た。

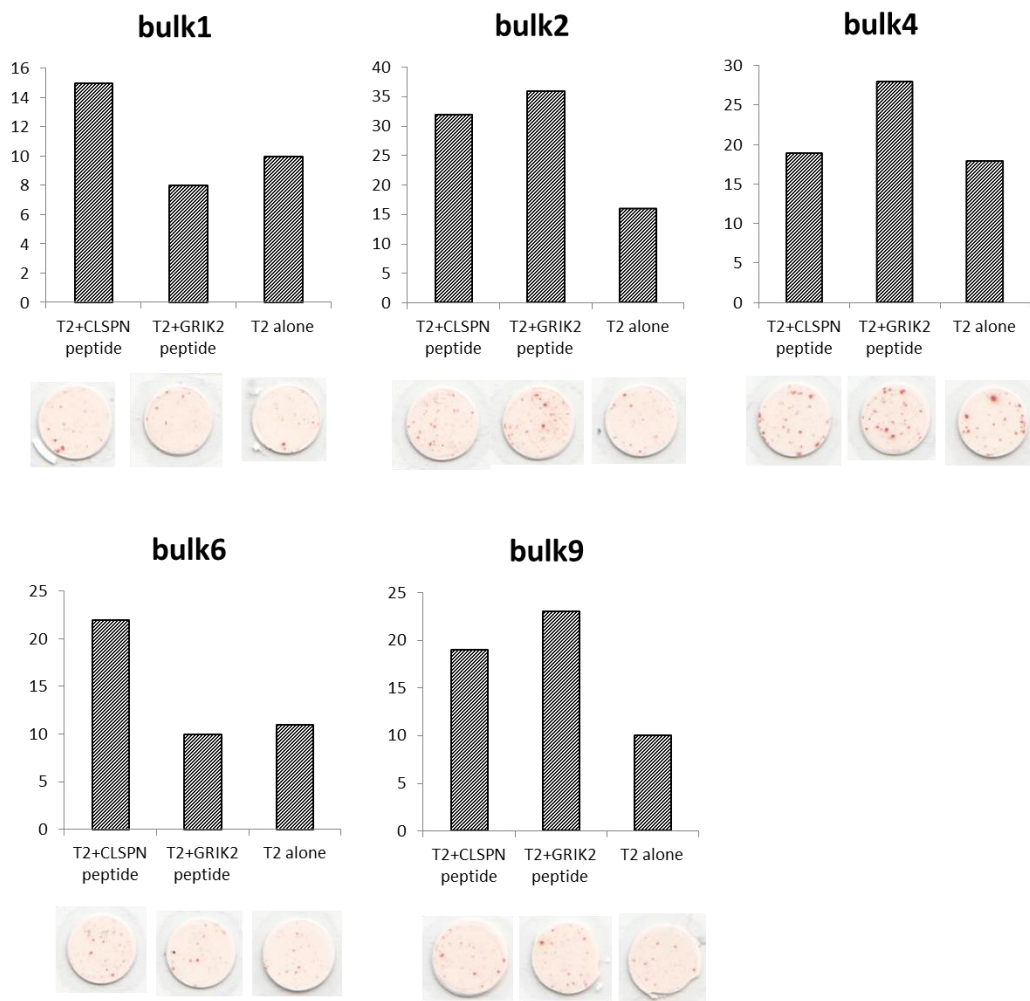


図 16 : ELISPOT assay にて T2 に CLSPN, GRIK2 ペプチドを加えた well と T2 のみの well でスポット数に差が見られた bulk。

上記 5 つの bulk に対し GRIK2, CLSPN テトラマーソーティングを施行した。結果、bulk1 で CLSPN テトラマーに、bulk6, bulk9 で GRIK2 テトラマーに反応する細胞が少数みられたため、この細胞を単細胞ソーティングして培養したところ、一部のクローンの成長が確認できた。

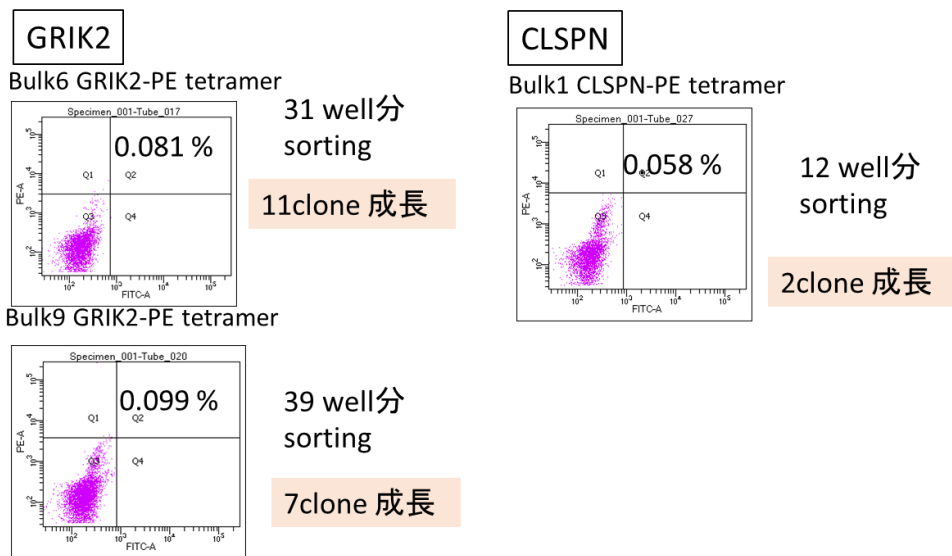


図 17:GRIK2、CLSPN HLA-A2-PE テトラマーによる単細胞ソーティング結果。Bulk6, Bulk9 で GRIK2 テトラマー陽性の細胞、Bulk1 で CLSPN テトラマー陽性の細胞がごく少数認められた。

これらの成長したクローンが、CLSPN, GRIK2 ペプチドを提示する細胞に実際に反応するか ELISPOT assay を行い検証したところ、bulk9 由来のクローンの一つ 9G23 が GRIK2 提示細胞に有意な反応を示した。このクローンの GRIK2 テトラマーへの反応をフローサイトメトリーで確認したところ、99.62%が GRIK2 テトラマーに親和性を示し、均一な GRIK2 特異的な CTL クローンであることが確認できた。

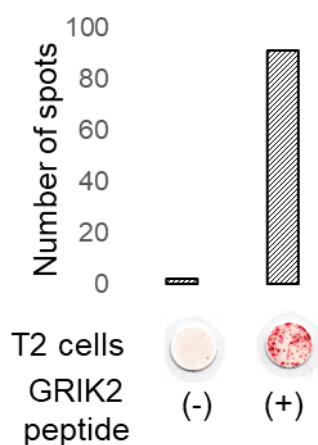


図 18:GRIK2-PE-テトラマーでソーティングした CTL クローンの一つ、9G23 は GRIK2 ペプチドを提示させた T2A24 に ELISPOT assay にて強い反応を示した。

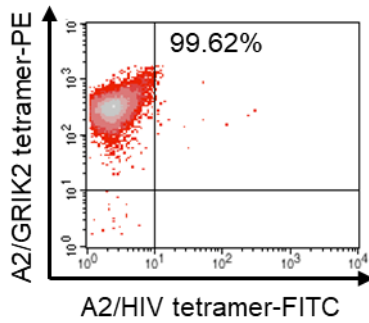


図 19 : CTL クローン 9G23 は 99.62%が GRIK2-PE テトラマーに反応を示す均一なペプチド特異的 CTL 集団であることを確認した。

CLSPN テトラマーソーティングした細胞に関しては、ELISPOT で CLSPN ペプチド提示細胞への有意な反応を確認できなかった。

8. GRIK2 特異的 CTL クローンの内因性 GRIK2 への反応性の確認

GRIK2 特異的 CTL クローン (9G23) が、添付したペプチドのみならず内因性に提示された GRIK2 ペプチドに対しても反応できるかを検証した。GRIK2 を過剰発現させた UM-UC3 WT に 9G23 を反応させて ELISPOT assay を施行したところ、GRIK2 過剰発現株に対し著明なスポットの増加を確認できた。これにより、9G23 は内因性の経路で提示された GRIK2 ペプチドに反応することが証明された。

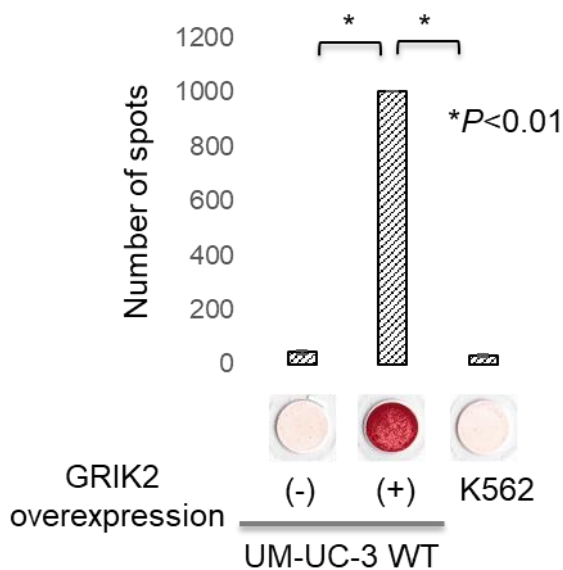


図 20 : UM-UC3 野生株と、UM-UC3 野生株に GRIK2 を過剰発現させた細胞に

9G23 を反応させたところ、GRIK2 過剰発現株に著明な反応が認められた。このことから、外部から添加されたペプチドのみならず内在の機構を経て HLA 上に提示された GRIK2 にも 9G23 は反応することが判明した。

続いて、GRIK2 の発現量が多い H-10 に対し 9G23 が反応するかを検証した。H-10, L-3, WT それぞれに対し 9G23 を反応させて ELISPOT assay を施行したが、H-10 に対する有意なスポット数の増加は確認できなかった。一つの原因として、H-10 の HLA-A2 発現量が減少していることが考えられた。IFN- γ 刺激により、HLA-A2 の発現量は増加することが知られており、IFN- γ 刺激を加えた H-10, L-3, WT を用いて再実験を試みた。結果、H-10 において L-3, WT と比して有意なスポット数の増加が認められ、9G23 の H-10 への反応が確認できた。

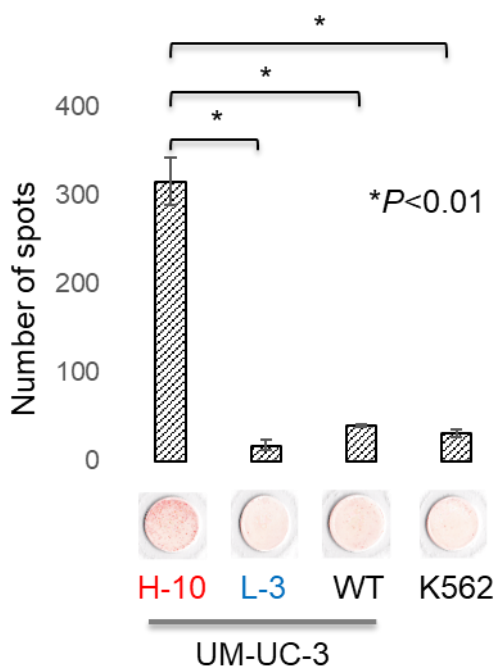


図 21:UM-UC3 H-10, L-3, WT 各クローンに対する 9G23 の反応を検証したところ、9G23 は H-10 に特異的な反応を見せた

考察

本研究は、膀胱癌 CSCs に対する免疫療法を可能とすべく、その特異抗原を同定することを目的に施行した。

CSCs は、自己複製能と造腫瘍能、分化能を備えた癌細胞の亜集団として定義される。結腸癌細胞より side population (SP) 法を用いたクローンの樹立により安定して CSCs クローンを得られ、その抗原を HLA リガンドーム解析により解析した研究は過去に行われているが、今回膀胱癌細胞株 UM-UC3 から単離した ALDH 高活性クローン H-10 が CSCs としての性質を持ち、かつその性質が比較的長期の培養後にも保たれることが証明できた。(Miyamoto et al., 2018) 癌組織のうちごく少数しか含まれず、非 CSCs に分化する性質のある CSCs は多量に入手するのが難しくその実験にはハードルが多いが、本発見により今後の膀胱癌 CSCs の実験はより容易で汎用性の高いものになると期待できる。

CSCs は化学療法、放射線療法に対し抵抗性を示すことは良く知られており、本研究でも同様の結果となった。冒頭で述べた通り CSCs に対し免疫療法が有効である可能性を示唆する実験結果が近年報告されている一方で、CSCs は免疫から逃れるための様々な分子メカニズムを有し、CSCs が免疫療法の標的になりうるか否かについてはこれまで議論がなされてきた。過去の研究では、マウスにおける癌細胞から ALDH 活性により単離された CSCs は非 CSCs に比して tap1, tap2, tapbp といった抗原提示機構関連遺伝子の発現が有意に低かった。(Hirohashi et al., 2016) また CSCs において、HLA クラス I の発現が非 CSCs に比して低下が見られているという報告もある。(Di Tomaso et al., 2010; Morrison et al., 2018) 本研究において ALDH 活性の高い H-10 細胞は HLA クラス I を発現しているものの、L-3 に比してやや発現が低い傾向が認められた。L-3 や WT と比して HLA リガンドーム解析において得られたペプチド数が少ないことの原因としても HLA クラス I 発現の低下が考えられるが、H-10 においても HLA 上に提示されるペプチドを 848 個検出できたという結果から、本研究で使用した膀胱癌細胞株においては CSCs の免疫原性は比較的保たれていたと言える。

本研究で、そのペプチドの一部が CSCs 抗原となることが明らかとなった GRIK2 はカイニン型グルタミン酸受容体の一種である。井上らによる先行研究において、膀胱癌 CSCs における GRIK2 の発現亢進が示され、その高発現が腫瘍浸潤能に関与することが報告されていた(Inoue et al., 2017)。本研究結果においても GRIK2 発現は膀胱癌 CSCs において非 CSCs 細胞に比し著明に発現が増加しており、CSCs にて GRIK2 ペプチドが抗原提示されていることが HLA リガンドーム

解析から明らかとなった。更に GRIK2 ペプチド特異的 CTL が膀胱癌 CSCs を認識したことから、今後膀胱癌において GRIK2 ペプチドによるワクチン療法や抗原特異的 CTL 輸注療法などが GSCs を攻撃する有力な治療法となる可能性がある。今回の結果から GRIK2 は CSCs 抗原と言えるが、GRIK2 は正常組織である大脳皮質および小脳皮質の一部のニューロンでも発現している。これまでに GRIK2 のノックアウトによって躁病のマウスモデルを作成した報告や、GRIK2 の変異が記憶力障害や学習障害に関連するという報告があり、GRIK2 が免疫の標的になることは神経系にダメージを与えるリスクが想定される。(Guzman et al., 2017; Shaltiel et al., 2008) しかし中枢神経系は血液脳関門 (Blood-brain barrier) により守られていることや、ニューロンは HLA クラス 1 を発現しないことから、GRIK2 特異的な CTL による攻撃を免れる可能性がある。実際に、本研究において健常人ドナーの PBMC から GRIK2 ペプチドの刺激により CTL を誘導できた。このことは GRIK2 に特異的な CTL に病原性がないことを示唆している。しかし、最近の研究で一部のニューロンは IFN- γ の刺激等によって MHC クラス 1 を発現することが示されており、免疫療法による影響が神経系に及ぶ可能性は完全には排除できない (Clarkson et al., 2018; Zhang et al., 2015)。本研究の欠点として、生体における GRIK2 ペプチド特異的 CTL の抗癌効果および副作用を確認できていないことが挙げられ、GRIK2 ペプチドを標的とした免疫療法を今後臨床応用に繋げるためには生体における安全性について十分かつ慎重な検討が必須である。

今回 CLSPN、C17orf112、PIPSL ペプチドに関しても膀胱癌 CSCs 特異的な癌抗原の候補に挙げたが、残念ながらこれらの免疫原性は本研究では証明できなかった。C17orf112 については精巣での RT-PCR にて精巣での高発現が確認できたことから、癌精巣抗原である可能性が考えられた。今回 HLA-リガンドーム解析にて H-10 のみにて C17orf112 ペプチドの提示が確認されたものの RT-PCR、CAGE いずれにおいても C17orf112 の発現は確認できず、HLA リガンドーム解析での発現がエラーであった可能性も否定はできない。PIPSL は、もともと PIP5K1A (Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 alpha) と PSMD4 (Proteasome 26S subunit, Non-ATPase 4) という正常組織に普遍的に発現している 2 つの遺伝子のコピーが組み合わさって出来た偽遺伝子であり、その役割は不明である。(Babushok et al., 2007; Ohshima and Igarashi, 2010) 鋳型となった分子の働きを考慮しても癌細胞としての機能に関与するとはあまり考えにくい。本研究の RT-PCR では精巣と UM-UC3 の各クローンのみにおいて偽遺伝子 PIPSL の発現が見られた点は興味深い。本研究においては PIPSL の免

疫原性については確認できなかったが、癌と精巣に特異的に発現する偽遺伝子の存在が示され、新たな癌精巣抗原の発見につながることを期待される。CLSPNは細胞周期チェックポイントに関連し、胃癌においてCSCsの機能と関連することがすでに報告されている分子であり、今回膀胱癌CSCsのHLAリガンドーム解析においてCLSPNペプチドのHLA提示が確認できたことは意義深い。(Bianco et al., 2019; Kobayashi et al., 2019; Lee et al., 2003) CSCsは上述のごとく、免疫系からの攻撃を免れるための様々な工夫をしている。CSCsとしての機能に関連の薄い分子を免疫の標的とした場合、その分子の発現を喪失させるという対抗措置が可能であるが、CSCsがCSCsたる為に必要な分子の発現を喪失させるのは難しいと思われる。CLSPNのようなCSCsの機能に大きく関わる分子をターゲットとすることが出来れば、有効性の高い治療となる可能性が高くなる。本研究においてCLSPNペプチド特異的CTLクローンの樹立には至らなかったが、その疫原性については今後更なる検討が望まれる。

結論

【本研究から得られた新知見】

- ・この研究では、ALDH1L1 法により樹立したクローンを安定した膀胱幹細胞モデルとして初めて確立した。
- ・膀胱癌 CSCs の HLA リガンドーム解析を初めて施行し、膀胱癌 CSCs 抗原の候補となる分子を数種同定した。
- ・GRIK2 特異的な CTL は膀胱癌 CSCs に特異的な反応を示した。

【新知見の意義】

- ・膀胱癌CSCsに特異的に発現する抗原の報告は本研究が初めてであり、今後CSCsを標的とした治療への応用が期待される。

【今後の研究の展開】

本研究では GRIK2 ペプチド特異的 CTL が膀胱癌 CSCs を認識することを発見したが、生体内において実際の腫瘍組織に対する効果を確認すること、GRIK2 ペプチド特異的 CTL の生体における安全性についての実験が求められる。

謝辞

本研究に際して、多くのご支援とご指導を頂きました札幌医科大学医学部病理学第1講座鳥越俊彦教授、北海道大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学教室篠原信雄教授に深く感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、日々の御指導を多岐にわたりいただきました札幌医科大学医学部病理学第1講座廣橋良彦准教授に深く感謝申し上げます。

最後に本研究にあたり御協力頂きました研究者の皆様、研究室スタッフの皆様方に深く感謝申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Aghaalikhani, N., Rashtchizadeh, N., Shadpour, P., Allameh, A., and Mahmoodi, M. (2019). Cancer stem cells as a therapeutic target in bladder cancer. *Journal of cellular physiology* 234, 3197–3206.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Borresen-Dale, A.L., *et al.* (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415–421.
- Asano, T., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Mariya, T., Horibe, R., Kuroda, T., Tabuchi, Y., Saijo, H., Yasuda, K., Mizuuchi, M., *et al.* (2016). Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy. *Oncotarget* 7, 11223–11237.
- Atlasi, Y., Mowla, S.J., Ziaee, S.A., and Bahrami, A.R. (2007). OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. *Int J Cancer* 120, 1598–1602.
- Babushok, D.V., Ohshima, K., Ostertag, E.M., Chen, X., Wang, Y., Mandal, P.K., Okada, N., Abrams, C.S., and Kazazian, H.H., Jr. (2007). A novel testis ubiquitin-binding protein gene arose by exon shuffling in hominoids. *Genome research* 17, 1129–1138.
- Bellmunt, J., de Wit, R., Vaughn, D.J., Fradet, Y., Lee, J.L., Fong, L., Vogelzang, N.J., Climent, M.A., Petrylak, D.P., Choueiri, T.K., *et al.* (2017). Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma. *The New England journal of medicine* 376, 1015–1026.
- Bianco, J.N., Bergoglio, V., Lin, Y.L., Pillaire, M.J., Schmitz, A.L., Gilhodes, J., Lusque, A., Mazieres, J., Lacroix-Triki, M., Roumeliotis, T.I., *et al.* (2019). Overexpression of Claspin and Timeless protects cancer cells from replication stress in a checkpoint-independent manner. *Nature communications* 10, 910.
- Chan, K.S., Espinosa, I., Chao, M., Wong, D., Ailles, L., Diehn, M., Gill, H., Presti, J., Jr., Chang, H.Y., van de Rijn, M., *et al.* (2009). Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America *106*, 14016–14021.

Chan, K.S., Volkmer, J.P., and Weissman, I. (2010). Cancer stem cells in bladder cancer: a revisited and evolving concept. *Current opinion in urology* *20*, 393–397.

Chen, J., Li, Y., Yu, T.S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* *488*, 522–526.

Clarkson, B.D.S., Patel, M.S., LaFrance-Corey, R.G., and Howe, C.L. (2018). Retrograde interferon-gamma signaling induces major histocompatibility class I expression in human-induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Annals of clinical and translational neurology* *5*, 172–185.

Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine* *17*, 313–319.

Di Tomaso, T., Mazzoleni, S., Wang, E., Sovena, G., Clavenna, D., Franzin, A., Mortini, P., Ferrone, S., Doglioni, C., Marincola, F.M., *et al.* (2010). Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *16*, 800–813.

Felsenstein, K.M., and Theodorescu, D. (2018). Precision medicine for urothelial bladder cancer: update on tumour genomics and immunotherapy. *Nat Rev Urol* *15*, 92–111.

Ghafouri-Fard, S. (2015). Expression of Cancer-Testis Antigens in Stem Cells: Is it a Potential Drawback or an Advantage in Cancer Immunotherapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* *16*, 3079–3081.

Ginestier (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*.

Gordeeva, O. (2018). Cancer-testis antigens: Unique cancer stem cell biomarkers and targets for cancer therapy. *Seminars in cancer biology* *53*, 75–89.

Gueguen, M., Patard, J.J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renaud, J.C., Van Cangh, P.J., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (1998). An antigen recognized by autologous CTLs on a human bladder carcinoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* *160*, 6188–6194.

Gupta, S.L. (1990). Regulation of cellular gene expression by interferon-gamma: involvement of multiple pathways. *International journal*

of cell cloning *8 Suppl 1*, 92–102.

Guzman, Y.F., Ramsey, K., Stolz, J.R., Craig, D.W., Huentelman, M.J., Narayanan, V., and Swanson, G.T. (2017). A gain-of-function mutation in the GRIK2 gene causes neurodevelopmental deficits. *Neurology Genetics* *3*, e129.

Hess, D.A., Meyerrose, T.E., Wirthlin, L., Craft, T.P., Herrbrich, P.E., Creer, M.H., and Nolta, J.A. (2004). Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* *104*, 1648–1655.

Hirohashi, Y., Torigoe, T., Tsukahara, T., Kanaseki, T., Kochin, V., and Sato, N. (2016). Immune responses to human cancer stem-like cells/cancer-initiating cells. *Cancer Sci* *107*, 12–17.

Horibe, R., Hirohashi, Y., Asano, T., Mariya, T., Suzuki, T., Takaya, A., Saijo, H., Shionoya, Y., Kubo, T., Nakatsugawa, M., *et al.* (2017). Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is a novel target of lung cancer stem-like cell immunotherapy. *PloS one* *12*, e0171460.

Inoda, S., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Morita, R., Takahashi, A., Asanuma, H., Nakatsugawa, M., Nishizawa, S., Tamura, Y., Tsuruma, T., *et al.* (2011). Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. *The American journal of pathology* *178*, 1805–1813.

Inoue, R., Hirohashi, Y., Kitamura, H., Nishida, S., Murai, A., Takaya, A., Yamamoto, E., Matsuki, M., Tanaka, T., Kubo, T., *et al.* (2017). GRIK2 has a role in the maintenance of urothelial carcinoma stem-like cells, and its expression is associated with poorer prognosis. *Oncotarget* *8*, 28826–28839.

Kamat, A.M., Hahn, N.M., Efsthathiou, J.A., Lerner, S.P., Malmström, P.U., Choi, W., Guo, C.C., Lotan, Y., and Kassouf, W. (2016). Bladder cancer. *Lancet (London, England)* *388*, 2796–2810.

Kawai, K., Miyazaki, J., Joraku, A., Nishiyama, H., and Akaza, H. (2013). Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. *Cancer Sci* *104*, 22–27.

Keymoosi, H., Gheytnchi, E., Asgari, M., Shariftabrizi, A., and Madjd, Z. (2014). ALDH1 in combination with CD44 as putative cancer stem cell

markers are correlated with poor prognosis in urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Asian Pac J Cancer Prev* *15*, 2013–2020.

Kobayashi, G., Sentani, K., Hattori, T., Yamamoto, Y., Imai, T., Sakamoto, N., Kuraoka, K., Oue, N., Sasaki, N., Taniyama, K., *et al.* (2019). Clinicopathological significance of claspin overexpression and its association with spheroid formation in gastric cancer. *Human pathology* *84*, 8–17.

Kochin, V., Kanaseki, T., Tokita, S., Miyamoto, S., Shionoya, Y., Kikuchi, Y., Morooka, D., Hirohashi, Y., Tsukahara, T., Watanabe, K., *et al.* (2017). HLA-A24 ligandome analysis of colon and lung cancer cells identifies a novel cancer-testis antigen and a neoantigen that elicits specific and strong CTL responses. *Oncoimmunology* *6*, e1293214.

Kuroda, T., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Yasuda, K., Takahashi, A., Asanuma, H., Morita, R., Mariya, T., Asano, T., Mizuuchi, M., *et al.* (2013). ALDH1-high ovarian cancer stem-like cells can be isolated from serous and clear cell adenocarcinoma cells, and ALDH1 high expression is associated with poor prognosis. *PloS one* *8*, e65158.

Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2003). Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol Cell* *11*, 329–340.

Lee, Y., Shin, J.H., Longmire, M., Wang, H., Kohrt, H.E., Chang, H.Y., and Sunwoo, J.B. (2016). CD44+ Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Suppress T-Cell-Mediated Immunity by Selective Constitutive and Inducible Expression of PD-L1. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *22*, 3571–3581.

Li, Y., Lin, K., Yang, Z., Han, N., Quan, X., Guo, X., and Li, C. (2017). Bladder cancer stem cells: clonal origin and therapeutic perspectives. *Oncotarget* *8*, 66668–66679.

Miyamoto, S., Kochin, V., Kanaseki, T., Hongo, A., Tokita, S., Kikuchi, Y., Takaya, A., Hirohashi, Y., Tsukahara, T., Terui, T., *et al.* (2018). The Antigen ASB4 on Cancer Stem Cells Serves as a Target for CTL Immunotherapy of Colorectal Cancer. *Cancer immunology research*.

Morrison, B.J., Steel, J.C., and Morris, J.C. (2018). Reduction of MHC-I expression limits T-lymphocyte-mediated killing of Cancer-initiating cells. *BMC Cancer* *18*, 469.

Nishizawa, S., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Takahashi, A., Tamura, Y., Mori, T., Kanaseki, T., Kamiguchi, K., Asanuma, H., Morita, R., *et al.* (2012). HSP DNAJB8 controls tumor-initiating ability in renal cancer stem-like cells. *Cancer Res* *72*, 2844-2854.

Ohshima, K., and Igarashi, K. (2010). Inference for the initial stage of domain shuffling: tracing the evolutionary fate of the PIPSL retrogene in hominoids. *Molecular biology and evolution* *27*, 2522-2533.

Park, C.Y., Tseng, D., and Weissman, I.L. (2009). Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol Ther* *17*, 219-230.

Patel, V.G., Oh, W.K., and Galsky, M.D. (2020). Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020. *CA: a cancer journal for clinicians* *70*, 404-423.

Salmaninejad, A., Zamani, M.R., Pourvahedi, M., Golchehre, Z., Hosseini Bereshneh, A., and Rezaei, N. (2016). Cancer/Testis Antigens: Expression, Regulation, Tumor Invasion, and Use in Immunotherapy of Cancers. *Immunological investigations* *45*, 619-640.

Shaltiel, G., Maeng, S., Malkesman, O., Pearson, B., Schloesser, R.J., Tragon, T., Rogawski, M., Gasior, M., Luckenbaugh, D., Chen, G., *et al.* (2008). Evidence for the involvement of the kainate receptor subunit GluR6 (GRIK2) in mediating behavioral displays related to behavioral symptoms of mania. *Mol Psychiatry* *13*, 858-872.

Sharma, P., Gnjjatic, S., Jungbluth, A.A., Williamson, B., Herr, H., Stockert, E., Dalbagni, G., Donat, S.M., Reuter, V.E., Santiago, D., *et al.* (2003). Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer. *Cancer immunity* *3*, 19.

Sharma, P., Shen, Y., Wen, S., Bajorin, D.F., Reuter, V.E., Old, L.J., and Jungbluth, A.A. (2006). Cancer-testis antigens: expression and correlation with survival in human urothelial carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *12*, 5442-5447.

Shinkawa, T., Tokita, S., Nakatsugawa, M., Kikuchi, Y., Kanaseki, T., and Torigoe, T. (2021). Characterization of CD8(+) T-cell responses to non-anchor-type HLA class I neoantigens with single amino-acid

substitutions. *Oncoimmunology* 10, 1870062.

Su, Y., Qiu, Q., Zhang, X., Jiang, Z., Leng, Q., Liu, Z., Stass, S.A., and Jiang, F. (2010). Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 19, 327-337.

von der Maase, H., Sengelov, L., Roberts, J.T., Ricci, S., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M.J., Zimmermann, A., and Arning, M. (2005). Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol* 23, 4602-4608.

Witjes, J.A., Comperat, E., Cowan, N.C., De Santis, M., Gakis, G., Le Bret, T., Ribal, M.J., Van der Heijden, A.G., Sherif, A., and European Association of, U. (2014). EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol* 65, 778-792.

Yazarlou, F., Kholghi-Oskooei, V., Afsharpad, M., Nekoohesh, L., Moharrami, T., Rad, H.M., Ghafouri-Fard, S., and Modarressi, M.H. (2018). Expression analysis of a panel of cancer-testis antigens in bladder cancer. *Personalized medicine* 15, 511-520.

Zhang, A., Yu, H., He, Y., Shen, Y., Zhang, Y., Liu, J., Fu, B., Lv, D., Miao, F., and Zhang, J. (2015). Developmental expression and localization of MHC class I molecules in the human central nervous system. *Experimental brain research* 233, 2733-2743.

Zhu, P., and Fan, Z. (2018). Cancer stem cells and tumorigenesis. *Biophysics reports* 4, 178-188.