HOKKAIDO UNIVERSITY

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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	宮田, 遥
Description	配架番号：2640
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14618号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82966
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Haruka_Miyata_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　　氏 名　宮田　遥

学 位 論 文 題 名

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

【背景と目的】

癌は heterogenous 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 Cisplatin0-3.2μg/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 kainite 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。ELSPOT 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 を高濃度に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 クローンは 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 クローン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、GRIK 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 の候補として挙がった 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 クローンの樹立に成功した。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。