



Title	シスプラチン耐性膀胱がんにおけるClaspinの発現とその免疫応答性に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	山田, 修平
Description	配架番号 : 2789
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15471号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90028
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	YAMADA_Shuhei_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 山田 修平

学位論文題名

シスプラチン耐性膀胱がんにおける Claspin の発現とその免疫応答性に関する研究

(Studies on expression of Claspin and its immunoreactivity in cisplatin-resistant urothelial carcinoma)

【背景と目的】膀胱がんは世界で10番目に多いがんであり、全世界で年間55万人が新たに罹患し、20万人以上が死亡している。膀胱がん新規症例の30%は筋層浸潤がんであり、遠隔転移を伴うものも多い。遠隔転移を伴う症例では極めて予後不良であり5年生存率は5%程度にとどまる。長年にわたり局所浸潤や遠隔転移を伴う膀胱がんに対する治療の主軸はcisplatin(CDDP)を中心とした化学療法であるが、多くが最終的には治療抵抗性を示すようになる。ネオアジュバントおよびアジュバントでのCDDPベースの化学療法は、筋層浸潤性膀胱がんの全生存期間を改善するため、特にCDDPに対する治療抵抗性の発現が予後に直接影響する。したがって、CDDPに対する耐性のメカニズムを解析することは、現在の膀胱がん治療の成果を向上させるために不可欠である。近年になり膀胱がん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30%程度と、幅広く有効であるとは言い難い。したがって、膀胱がんにおける抗原特異性の解析は、免疫療法のさらなる発展に不可欠である。本研究では、新規CDDP耐性膀胱がん細胞株を樹立し、新規免疫療法標的であるClaspin(遺伝子名:CLSPN)がCDDP耐性のドライバーであることおよびClaspinが免疫療法のターゲットになりうることを明らかにした。

【材料と方法】ヒト膀胱がん細胞株UM-UC-3親株(WT)からシスプラチン(CDDP)の濃度を段階的に増加させながら連続的に曝露することにより、CDDP耐性細胞株(CR)を樹立した。WT, CRにおいてCDDP 0-16 $\mu\text{mol/L}$ 投与後48時間での生存率をWST-8 assayで測定し、抵抗性について検証した。WT, CRについて遺伝子発現を網羅的に解析し、CRで過剰発現している遺伝子群の中から免疫療法への適応を考え、正常臓器での発現が低く、HLA-A2結合ペプチドの存在がわかっているものを抽出した。WT, CRにshort interfering RNA(siRNA)を用いてCLSPNをノックダウンし、CDDP抵抗性についてWST-8 assayで検討した。WT, CRを用いてSphere formation assayを施行し、がん幹細胞様細胞(CSCs) frequencyを算出し、ALDEFLUOR kitを用いてALDH活性について評価した。CLSPNについて、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)で正常組織とWT, CRでの遺伝子発現を確認し、ウェスタンブロットでタンパク質の発現量を評価した。健康人由来の末梢血単核細胞(PBMC)にCLSPNの抗原ペプチドを1週間おきに5回刺激し、ペプチド特異的なCTLの誘導し、interferon(IFN)- γ ELISPOT assayを用いて検証した。ELISPOT assayで反応の見られたbulkはテトラマーに親和性を示すリンパ球をシングルセルソーティングした。成長したクローン(yc3と命名)についてはペプチドを負荷されたT2, WT, CRおよびCLSPNノックダウン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。yc3の細胞傷害性はMaestro Zインピーダンス assayおよびLDH cytotoxicity assayを用いて検証した。Student's t-test(両側検定)を用い群間に差を認めるか検討した。Sphere形成能の評価はカイ二乗検定を用いて検討した。p < 0.05を有意差ありとした。

【結果】樹立したCRは、WTに比べCDDP抵抗性を得られていることを確認した。CRはALDEFLUOR法によりALDH活性が高い集団を多く含み、高いsphere形成能をもち、CSCsとしての性質をもつ細胞集団であることが証明された。CAGE解析の結果、CRでは2284個の遺伝子がWTより発現していることがわか

った。候補遺伝子を絞り込むために、HLA リガンドーム解析と遺伝子発現の公開データベース (GTExPortal: <https://gtexportal.org>) を参照した。そこで、CR 細胞で発現が上昇し、その産物が HLA リガンドーム解析で同定された HLA-A2 結合抗原ペプチドをコードし、正常臓器での発現が 2 TPM 以下である遺伝子をスクリーニングした。最終的に、CLSPN が抽出され、CLSPN がコードするペプチドの候補配列は SLLNQPKAV であることを明らかにした。正常臓器における CLSPN mRNA の発現を評価したところ、qPCR により CLSPN mRNA の発現は低いか皆無であった。また、CR では、WT に比べて CLSPN mRNA の発現が高く、ウェスタンブロット解析により、CLSPN タンパク質は CR で WT に比べて多く発現していることが明らかになった。siRNA を用いて CLSPN をノックダウンすると WT, CR 共に CDDP 感受性が亢進しており、CDDP 抵抗性に関連するタンパク質と考えられた。健常人ドナーの PBMC を CLSPN 由来のペプチドで刺激し、その後に行なった ELISPOT assay で CLSPN ペプチドを負荷した T2 に反応が見られた bulk があり、CLSPN-テトラマー-PE 染色陽性の細胞をシングルセルソーティングした。その結果 CLSPN ペプチドに特異的に反応する均一な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) クローンを誘導することに成功した。この CTL クローン (yc3) は、IFN- γ ELISPOT assay にて CLSPN ペプチド負荷 T2 細胞のみならず、WT および CR に対しても反応を見せ、CLSPN ノックダウン細胞に対しては反応を示さなかった。細胞傷害性試験においても WT, CR 細胞に反応をみせた。

【考察】本研究では、新規 CDDP 耐性 UM-UC-3 (CR) を樹立し、CR は、ALDH high 細胞の割合が高く、高い sphere 形成能を有する CSCs に富む表現型を示すことを明らかにした。CSCs は、いくつかの機序により化学療法や放射線療法に抵抗性を示すことが報告されている。以前の研究では、化学療法抵抗性の肺がん細胞株は、ALDH high 細胞の割合が高い CSCs 様表現型を示した。このように、治療抵抗性と CSCs は、重複して存在する可能性がある。CSCs は、抗アポトーシス蛋白やトランスポーターの発現により、治療に対して抵抗性を示す。CR もまた、抗アポトーシス蛋白質 BIRC5 やトランスポーター蛋白質 ABCB1、ABCB9、ABCB10、ABCC1 が高値を示していた。以前の報告では、CDDP 耐性あるいはゲムシタビン耐性の膀胱がん株は、ABCB1 の発現が高く、他の化学療法剤に対しても交差耐性を示すことが明らかにされている。このように、CR は CDDP に耐性であり、ABCB1 の高発現により多剤耐性である可能性があるが、CTL には感受性であった。このことから、CR は CTL が細胞傷害に用いる granzyme B や perforin に感受性があると考えられ、CDDP と CTL の耐性に関する分子機構が異なることが示唆された。CLSPN をノックダウンすると CDDP に対する感受性が上昇することから、CLSPN は CDDP 抵抗性のドライバーの一つであることが示唆された。CLSPN は胃がんの CSCs で多く発現していることが、以前の研究で明らかにされている。したがって、CLSPN は CDDP 耐性と CSCs の表現型の両方に関連している可能性がある。しかし、CLSPN をノックダウンしても ALDH high 細胞は減少しなかった。

正常組織では CLSPN タンパク質の発現は非常に低いですが、がん組織では CLSPN タンパク質が高レベルで検出される。これらの知見は、がん細胞における CLSPN タンパク質が正常細胞よりも相対的に安定していることを示唆している。CLSPN は細胞生物学的に共通した分子機能を持つことから、CLSPN を標的とした免疫療法は様々な悪性腫瘍に適用できる可能性がある。また、本研究では、CDDP の刺激で CLSPN の発現が誘導されることを明らかにした。このことは、CLSPN を標的とした免疫療法 (ペプチドワクチン、mRNA ワクチン、人工 T 細胞療法) と CDDP の併用免疫療法の可能性を示唆している。これらの知見を総合すると、CLSPN は CDDP 耐性のドライバーであり、CLSPN は CLSPN ペプチド特異的 CTL によって標的とされ得ることが示唆される。これらの知見は、CDDP 耐性がんを標的とした免疫療法や、CDDP と免疫療法の併用療法への手がかりとなるものである。