HOKKAIDO UNIVERSITY

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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15471
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90061
Type	doctoral thesis
File Information	YAMADA_Shuhei.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

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)

2023 年 3 月

北　海　道　大　学

山　田　修　平

学 位 論 文

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)

2023 年 3 月

北　海　道　大　学
山　田　修　平

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
材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　９頁
結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　19 頁
考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　35 頁
結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　37 頁
謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　38 頁
利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　39 頁
引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　40 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。

1. 山田修平、宮田遥、磯野誠、堀寛太、柳川純子、村井愛子、箕輪智幸、水江由佳、佐々木健太、村田憲治、 時田芹奈、中津川宗秀、岩淵 禎弘、橋本真一、久保輝文、金関貴幸、塚原智英、安部崇重、篠原信雄、廣橋良彦、鳥越俊彦
シスプラチン耐性ドライバー遺伝子である Claspin は、尿路上皮がんにおける免疫療法のターゲットとなる(Cisplatin resistance driver claspin is a target for immunotherapy in urothelial carcinoma)
Cancer Immunology, Immunotherapy

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 山田修平、廣橋良彦、柳川純子、村井愛子、時田芹奈、金関貴幸、鳥越俊彦
膀胱癌細胞株における癌幹細胞特異的な癌抗原に関する研究
第 110 回日本病理学会総会、2021/4/22-24、東京 (Web)

2. 山田修平、廣橋良彦、柳川純子、村井愛子、時田芹奈、金関貴幸、鳥越俊彦
膀胱癌細胞株における癌幹細胞特異的な癌抗原の解析(Analysis of cancer stem cellspecific cancer antigens in bladder cancer cell lines)
the 39th Sapporo International Cancer Symposium, 2021/7/5-7, 札幌(web)

要旨

【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 μmol/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、ウエスタンブロットでタンパク質の発現量を評価した。健常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。ELSPOT 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、その後に施行した 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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ALDH: aldehyde dehydrogenase
CR: Cisplatin-resistant
cDNA: complementary deoxyribonucleic acid
CDDP: cisplatin
CSCs: Cancer stem-like cells / Cancer initiating cells
CTL: cytotoxic T-lymphocyte
DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium
DNA: deoxyribonucleic acid
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
FBS: fetal bovine serum
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
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
qPCR: Quantitative polymerase chain reaction
RNA: ribonucleic acid
rpm: Revolution per minute
RPMI-1640: Roswell Park Memorial Institute medium - 1640
RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction
SD: standard deviation
siRNA: short-interfering RNA
TPM: transcripts per million

WT: wild type

緒言

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 万人の新規患者が発生し、20 万人を超える死者と出している(Saginala et al., 2020)。新規に発生する膀胱がんのうち約 7 割は筋層非浸潤性であり、多くが経尿道的手術でコントロール可能であるが高頻度で再発をきたす。新規膀胱がんのうち残りの 3 割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、進行性膀胱がんの予後は依然として不良である(Patel et al., 2020; Saginala et al., 2020)。

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(Bellmunt et al., 2017; Powles et al., 2020)。膀胱がんは 50 年ほど前から Bacillus Calmette-Guerin 膀胱内注入療法の有効性が確立していることや、腫瘍遺伝子変異量が高いことなどから免疫療法が奏功する下地はあると考えられる(Alexandrov et al., 2013; Guallar-Garrido and Julián, 2020)。

細胞傷害性 T 細胞(CTL)ががん細胞を認識し攻撃するためには、標識となるがん抗原が human leukocyte antigen (HLA)上に提示されることが必要となる。がん抗原は、変異抗原(neoantigen)、がん精巣抗原、分化抗原、過剰発現抗原に分類される。がん精巣抗原はがん組織および精巣の胚細胞のみに発現するため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)。 がん精巣抗原の発現は尿路上皮がんの予後良好因子となることが報告され、中でも NY-ESO-1 は膀胱がん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)。 膀胱がんのがん抗原については、1998 年に膀胱がん患者においてがん抗原 KIAA0205 (変異抗原) の存在が報告された (Gueguen et al., 1998)。このように膀胱がんにおけるがん抗原は過去に複数報告されているが、膀胱がん CR に提示されるがん抗原について明確に報告されているものはない。

CR に対する免疫学的標的を明らかにするために、CR 細胞で WT 細胞に比べて過剰発現している遺伝子を網羅的遺伝子解析を行った。以前、当教室で UM-UC-3

細胞を用いてHLAリガンドーム解析を行い、HLA-A2結合抗原性ペプチドを同定している(Miyata et al., 2022)。そのデータおよび遺伝子発現の公開データベース（GTExPortal: https/gtexportal.org）を参照し候補遺伝子を絞り込んだ。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抽出し、CDDP耐性のメカニズム分子としてClaspin（遺伝子名：CLSPN）に着目した。

ClaspinはDNA損傷・DNA複製ストレスに関与する蛋白質であり、Claspinの過剰発現細胞株の異種移植モデルにおいて放射線耐性を獲得し、Claspin のノックダウンにより異種移植モデルにおいて放射線後の生存期間が延長したと報告している(Choi et al., 2014)。そのほかに、CDDPによるDNA損傷応答にClaspinが関与していると報告されている(Rosell and Karachaliou, 2019)。

上記の背景を踏まえ、今回、CDDP耐性UCモデル(CR)を樹立し、Claspinペプチド特異的CTLのCR細胞への反応を確認することができ、Claspinが免疫療法のターゲットとなりうることを示たため、報告する。

材料と方法

【細胞株と培養条件】

細胞株はヒト膀胱がん細胞株 UM-UC-3, ヒト赤白血病細胞株 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℃, 5%CO2 のインキュベーターで培養した。

【CDDP 耐性株(CR)の樹立】

CDDP 耐性細胞株 (CR) は、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、UM-UC-3 親細胞株 (WT) から誘導した。初めは WT が対数増殖期に 0.5μmol/l の CDDP (Selleck) に曝露させ、10%FBS と 1%ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したシスプラチン含有 DMEM で維持し、70～80%のコンフルエントに達した時点で継代した。継代後にシスプラチン濃度を約 1.5 倍に上げ、上記のプロセスを繰り返した。この樹立までの期間は約半年間であった。シスプラチンの最終濃度は 5μmol/l であった。

【Cap analysis of gene expression (CAGE) analysis】

CR で発現が亢進している分子の候補を見つけ出すため、CAGE 法を利用して WT と CR におけるメッセンジャーRNA(mRNA)発現の網羅的解析を施行した。

CAGE 法は、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クエンスし、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手法である。RNA 抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて後述の 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。CAGE タグカウントは、CAGEr(Haberle et al., 2015) で Paraclu アルゴリズム (Frith et al., 2008)を用い、デフォルトのパラメータでクラスタリングした。差次的遺伝子発現は DESeq2 パッケージ (バージョン 1.20.0) を用いて検出した。CAGEr で検出された差次的遺伝子発現リスト (count per million(CPM) >1 かつ fold-

change <0.25、またはCPM>1かつfold-change >4）は、clusterProfilerパッケージによる遺伝子オントロジーエンリッチメント解析に使用した(Yu et al., 2012)。

【ALDEFLUOR assayを用いたALDH活性の評価】

Aldehyde dehydrogenase （ALDH)1は各種組織幹細胞に広く発現しており、がん幹細胞様細胞（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。diethylamino-benzaldehyde(DEAB)は ALDH1 阻害剤であり、DEABを加えた細胞をcontrolとして用いる。

UM-UC-3 WT, CR細胞を 0.05%トリプシン0.02% ethylenediaminetetraacetic acid （EDTA)1xPBSで剥離し、10^6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、ALDH1のインヒビターである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。37度のインキュベーターで30分間培養し、FACS Canto(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。

【Sphere formation assay】

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。

0.05%トリプシン0.02%EDTA 1xPBSでUM-UC-3 WT, CR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）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℃, 5% CO2のインキュベーターで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100µm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 website （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)

【CDDP 感受性の検討】

CDDP 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を生成する。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。96 well プレート(Corning)に標的細胞を各 well に $1x10^4$ 細胞/100µl ずつ播種し 37℃, 5% CO2 のインキュベーターで一晩培養した。翌日 CDDP (Selleck)を最終濃度 0, 1, 2, 4, 8, 16µmol/L となるよう調整した DMEM を各 well に 10µl 加え、各濃度 3well ずつ作成した。再び 37℃, 5% CO2 のインキュベーターで 72 時間培養した後 WST-8 を各 well に 10µl 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 As, CDDP 濃度が 0µg/ml の well の吸光度を Ac, 培地と WST-8 のみを入れたブランク well の吸光度を Ab とし、細胞生存率は以下の式で求めた。
細胞生存率(%)=((As-Ab)/(Ac-Ab))x 100

【ウエスタンブロット】

ウエスタンブロットは、Target となる 5×10^5 細胞を 100µL の Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) バッファーを用いて on ice 10 分で溶解させ、15000rpm, 20 分, 4℃で遠心しタンパク質を抽出した。Heat block で 100℃, 5 分でボイルし、サンプルを得た。10µL のサンプルをスーパーセップ TM エース、5-20%ゲル(Wako)にサプライし、SDS-PAGE で分離した。分離された蛋白を polyvinylidene fluoride (PVDF)メンブレン(Bio-Rad, Inc.)にトランスブロット Turbo(Bio-Rad, Inc.)を用いて転写した。メンブレンは、TBS-T [25 mM Tris (pH 7.4), 125mM NaCl, 0.05% Tween 20] に溶解した 5%スキムミルクを用いて、1 時間室温にてブロッキングを行った。TBS-T を用いてメンブレンを 3 回洗った後に、一次抗体と 4℃でオーバーナイトで反応させた。翌日、TBS-T を用いてメンブレンを 3 回洗った後に、1:2000 の濃度の二次抗体と 60 分反応

させ、TBS-T を用いてメンブレンを 3 回洗った後に、Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) で膜を可視化し, Odyssey Fc imaging System (LI-COR, Lincoln, NE, USA) で撮影した。
一次抗体は Anti-Claspin ウサギポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) または抗β-actin マウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) を 1000 倍希釈で使用した。抗マウス IgG および抗ラビット IgG 二次抗体 (KPL、Gaithersburg、MD、USA) を 2000 倍希釈で使用した。

【RNA 干渉を利用した Claspin ノックダウン】

RNA 干渉とは, 細胞に導入された 2 本鎖 RNA が, 相同な塩基配列をもつメッセンジャーRNA (mRNA) を特異的に切断することによって遺伝子発現を抑制する現象である。細胞内に導入された dsRNA は, Dicer によって 21〜23 塩基対の短い RNA (short-interfering RNA; siRNA) に分解される(Ketting et al., 2001)。siRNA は数種類のタンパク質と複合体を形成し, この複合体が標的 mRNA を認識し切断する. 合成 siRNA を哺乳類細胞に導入することにより、標的 mRNA を認識しそのタンパク質合成を阻害することが可能となる。
24 well プレート(Corning)に WT、CR 細胞を各 well に $1x10^5$ 細胞ずつ播種し 37℃, 5%CO2 のインキュベーターで一晩培養した。翌日 Claspin siRNA (Thermo Fischer Scientific) 1μL を Opti-MEM(Gibco)50μL で希釈し、lipofectamine RNAi MAX reagent (Thermo Fischer Scientific) 50μL と混合し 5 分間室温で静置後、各 well に 50μL ずつ投与することでトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間後の細胞を各実験に使用した。非標的 siRNA(Thermo Fischer Scientific) をネガティブコントロールとして使用した。Claspin ノックダウンは、qPCR で確認した (後述)。

【逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(Reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)および定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(Quantitative polymerase chain reaction: qPCR)】

・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。RNeasy Mini Kit (QIAGEN)のプロトコールに準じて以下の手順で行った。
１）細胞の回収：$1x10^5$〜$1x10^7$ 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： 2-mercaptoethanol(2-ME, gibco)を添加した Buffer RLT を各細胞に 600µl 加え 20G の注射針中にライセートを少なくとも 5 回通してホモジナイズ。室温、15000rpm で 3 分遠心。上清を 1.5ml エッペンチューブに移し 600µl 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 700µl を入れて室温、12000rpm で 15 秒遠心、これを 2 回繰り返し、チューブ内廃液を破棄。Buffer RW1 を 350µl カラムに入れて室温、12000rpm で 15 秒遠心しチューブ内廃液を破棄。10µl DNase Ⅰ stock solution(QIAGEN)を 70µl の Buffer RDD に加え攪拌し、カラムに入れて室温、15 分静置。350µl の Buffer RW1 をカラムに加え、室温、12000rpm で 15 秒遠心、チューブ内廃液を破棄。500µl の Buffer RPE を入れて室温、15000rpm, 15 秒遠心、チューブ内廃液を破棄。500µl の Buffer RPE を入れ、室温、15000rpm で 2 分遠心、チューブ内廃液を破棄。更に室温、15000rpm で 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 µl の RNAase-free water を入れ、1 分静置ののちに室温、12000rpm で 1 分遠心することを 2 回繰り返し、RNA 抽出過程終了。得られた RNA は NanoDrop One(Thermo Fisher Scientific)を用いて分光光度計濃度測定を行った。

・相補的 DNA(Complementary deoxyribonucleic acid: cDNA)の合成
抽出した RNA 1µg 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 1µg/11 µl となるように RNase-free water で希釈。5xReaction Bufer 4µl, 10mMdNTP MIX 2µl、Random Hexamer primer 1µl、RiboLock RNase Inhibitor 1µl、ReverAid RT 1µl を加えて計 20µl 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℃5 分、42℃60 分、70℃5 分で反応させて cDNA を得た。cDNA のうち必要量以外は-20℃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,II(タカラバイオ)を用いた。

・定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qPCR）
以上で合成した各細胞の cDNA を用いて qPCR を行なった。PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher)、ターゲットの primer(forward, reverse)および cDNA 1µl を使用した。ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific 社)を使用し、PCR 反応は 95 ℃ 15 秒、60 ℃ 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 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 1 に記載する。

表 1：qPCR に使用したプライマー配列

CLSPN-fw	ctcaggctcttttcccacag
CLSPN-rv	atcttcgcttcccacatcac
GAPDH-fw	accacagtccatgccatcac
GAPDH-rv	tccaccaccctgttgctgta

【細胞傷害性 T 細胞誘導、ELISPOT assay】

健常人の末梢血単核細胞（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細胞から抗原提示されると、そのペプチドに特異的に反応するナイーブ T 細胞はそのエフェクターT 細胞に分化する。実際にペプチド特異的な細胞傷害性 T 細胞(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 が抗原認識の際に 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 を定量化できる。

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 282-134）。HLA-A*02:01 を有する健常人ドナーより静脈血 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（Lymphoprep、コスモ・バイオ）15ml を入れ遠心にかけたもの 2 本に均等に血液を注ぎ、1000g, 20min, 室温で遠心分離をかけた。血漿成分の下の層に浮遊する 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 $4x10^6$/ml/well となるように 24well プレート(Corning)に播いて 37℃で培養した。

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[SLLNQPKAV]の 9mer である。PBMC に 10μg/ml の濃度でペプチドを投与し、1 週間毎に 3-5 回投与を繰り返した。人工抗原提示細胞（aAPC）は、K562 に CD80、CD83、HLA-A*02:01 cDNA を導入して樹立したものである。

ELISPOT assay は最終のペプチド投与から 1 週間後に、Human IFN- gamma 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 1xPBS を用いて 200 倍希釈で播き 4℃で over night 静置した。翌日ブロッキングバッファーを 200μ/well 入れプレートをブ

ロッキングした。Positive control として T2 細胞を $5x10^5$/ml に調整しペプチド 20μg/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 $5x10^5$/ml になるよう希釈した。同様に Negative contorol としてペプチド刺激を行わない T2 細胞を用いた。T2 細胞は抗原処理関連トランスポーターを欠損しており、内在性の抗原を提示することができないため、negative control としてよく用いられる。また、MHC class1 は欠損していないため外因性のペプチドは MHC class1 上に提示され、positive control としてもよく用いられる。CTL は $5x10^5$/ml に調整した。target 細胞を 100μl/well 撒いて 30 分 37℃で培養ののちに CTL を 100μl/well で投与した。37℃で over night 培養し、翌日 wash バッファーで 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 バッファーで 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 バッファーで 6 回、1x PBS で 1 回洗浄した。発色試薬を 100μl/well 添加し、15 分後に蒸留水を注いで洗浄して反応を停止された。室温で乾燥させ、翌日各 well のスポット数を、ImageJ ソフト(https://imagej.nih.gov/ij/download.html)を使用してカウントした。

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)
IL-2 10U/mL (PeproTech, Cranbury, NJ)
IL-15 10ng/mL (PeproTech, Cranbury, NJ)

使用した試薬：
wash バッファー:
1xPBS
Tween20 0.05% (Wako)

ブロッキングバッファー:
RPMI-1640(Sigma-Aldrich)
FBS 10%(Sigma-Aldrich)
P/S 1%(Thermo Fisher Scientific)

【HLA-A2 テトラマーによるシングルセルソーティング】

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。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シングルセルソーティングすることができる。

Claspin(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 $2x10^6$ 細胞に対し PBS100µl となるように調整し、Claspin-HLA-A2-PE テトラマーと、HIV－HLA-A2-FITC テトラマーを各 5µl ずつ投与し室温、遮光で 30 分静置した。
2. 1xPBS で 2 回洗浄し、フィルターを通した。
3. フィーダー細胞は、健常ドナー3 名の 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 10 万個/well でフィーダー細胞を撒いておいた。
4. FACS AreaⅡ 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 プレートにシングルセルソーティングし、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)

【細胞傷害性試験：インピーダンス assay および LDH cytotoxicity assay】

・インピーダンス assay

Maestro Z(Axion BioSystems, Atlanta, GA, USA)は well 表面に細胞が接着す

ることでインピーダンスが変化することを感知し、細胞が障害を受けて well から剥がれた際のインピーダンスの変化で細胞傷害性を評価することができる。細胞を播種する前に、CytoView-Z 96 ウェル電極プレート（Axion BioSystems）を 1μg/mL ヒトフィブロネクチン（Corning）で 37℃、1 時間コートした。コーティング後、フィブロネクチンを除去し、10%FBS を含む 100μL の DMEM を各ウェルに添加した。その後、プレートを Maestro Z 装置にドッキングさせ、インピーダンス電極のベースラインを測定した。次に、WT および CR 細胞を CytoView-Z プレート（1 x 10^5 cells/well）に播種し、室温で 1 時間放置して 37℃、5% CO2 の Maestro Z で 24 時間インキューベーションさせて細胞を付着させて安定化させた。その後、CTL クローン yc3 をエフェクター：ターゲット比 9，3 または 1：1 で加え、WT および CR 細胞と共培養を行った。その後インピーダンス測定を連続的に記録した。培地のみ、完全溶解、未処理の UM-UC-3 コントロールの well もインピーダンスを測定した。障害率の計算のために、各ウェルのインピーダンスを以下の式を用いて計算した。障害率＝100＊（1-（1-ターゲット細胞の平均値）／（1-未処理コントロールの平均値））。

・LDH cytotoxicity assay

LDH cytotoxicity assay は、細胞から培地中に放出された乳酸脱水素酵素(LDH)活性を測定することにより細胞傷害を測定する。LDH は細胞質に存在する酵素で、通常は細胞質に留まっているが、細胞膜が傷害を受けると培地中に放出される。放出された LDH は安定なので、死細胞または細胞膜に傷害を受けた細胞数を測る指標として広く測定されている。LDH は、NAD（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）を補酵素として乳酸の脱水素化を触媒し、ピルビン酸と NADH を生成する。生じた NADH は、電子メディエーターを介してテトラゾリウム塩（無色）をホルマザン（橙色）に還元する。生成したホルマザンの量は、放出された LDH 活性に比例するため、傷害を受けた細胞数の指標となる。

CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いた。WT および CR 細胞を、10% FBS を含む DMEM を用いて 2 x 10^4 細胞/well の密度で 96 ウェルプレート(Corning)に播種した。37℃、5% CO2 で一晩インキュベーションし、接着させた。その後、ウェル培地をコントロール（無血清 AIM-V）または CTL クローン yc3 をエフェクター：ターゲット比 9，3 または 1：1 で加え、WT および CR 細胞と共培養し、8 時間インキュベートし、LDH の細胞放出量を測定した。ポジティブコントロールには 10x Lysis Buffer 10uL/well 加える、45 分インキュベートし各 well から 50μL 回収、新しい well に入れ、全ての well に Reaction mixture 50μL/well 加え、30min 室温暗闇で

静置し Stop solution 50uL/well 加え、iMark マイクロプレートリーダー(BIO-RAD)で吸光度測定(490,680nm)を行い、細胞傷害性を評価した。

【統計解析】

CDDP 抵抗性、Claspin 発現量、ELISPOT assay における spot 数、インピーダンス assay・LDH cytotoxicity assay における細胞傷害性の評価について、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。統計分析は JMP Pro version16.0、CSCs 頻度は ELDA web site (http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda) を用いて解析した。$p < 0.05$ を有意差とした。

結果

1.　膀胱がん CDDP 耐性細胞株(CR)の樹立

膀胱がん細胞株 UM-UC-3 親株(WT)に 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）を誘導した。初めは WT が対数増殖期に 0.5μmol/l の CDDP（Selleck）に曝露させ、10%FBS と 1%ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したシスプラチン含有 DMEM で維持し、70～80%のコンフルエントに達した時点で継代した。継代後にシスプラチン濃度を約 1.5 倍に上げ、上記のプロセスを繰り返した。この樹立までの期間は約半年間であった。シスプラチンの最終濃度は 5μmol/l であった。ここで得られた細胞を CR 株とした。

CR が WT に比べ CDDP 抵抗性が得られているかどうかを WST-8 assay を用いて確認したところ、CR では WT に比して有意に CDDP 抵抗性を示した（図 1）。この結果から CR 株が樹立できたと考えた。

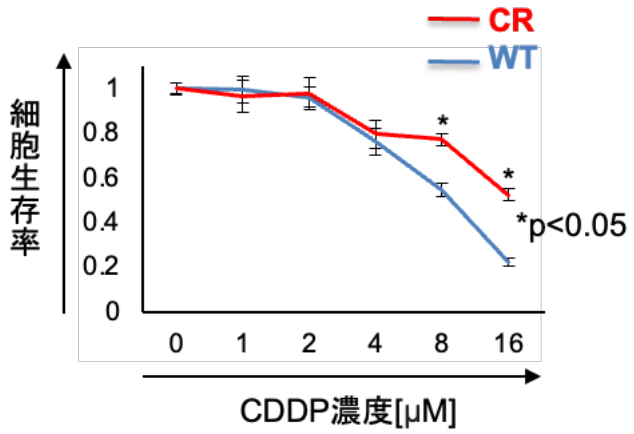

図 1：CR は WT に比べ CDDP 耐性を示す

規定量の CDDP を含む培地で 48 時間培養し、WT、CR の WST-8 assay で細胞生存率を評価した結果を図に示す。グラフは平均値±標準偏差（SD）で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。縦軸が細胞生存率、横軸が CDDP 濃度を表している。CR では WT に比して有意に CDDP 抵抗性を示した($p<0.05$)。

次に、この CDDP 抵抗性を示す CR 株ががん幹細胞(CSCs)を高濃度に含む細胞集団であることを確認するための実験を行った。WT、CR 細胞に ALDEFLUOR assay を施行したところ、WT のうち ALDH 活性細胞の割合は 6.4%見られ、CR では ALDH 活性細胞は 60%で認め差を認めた（図 2）。

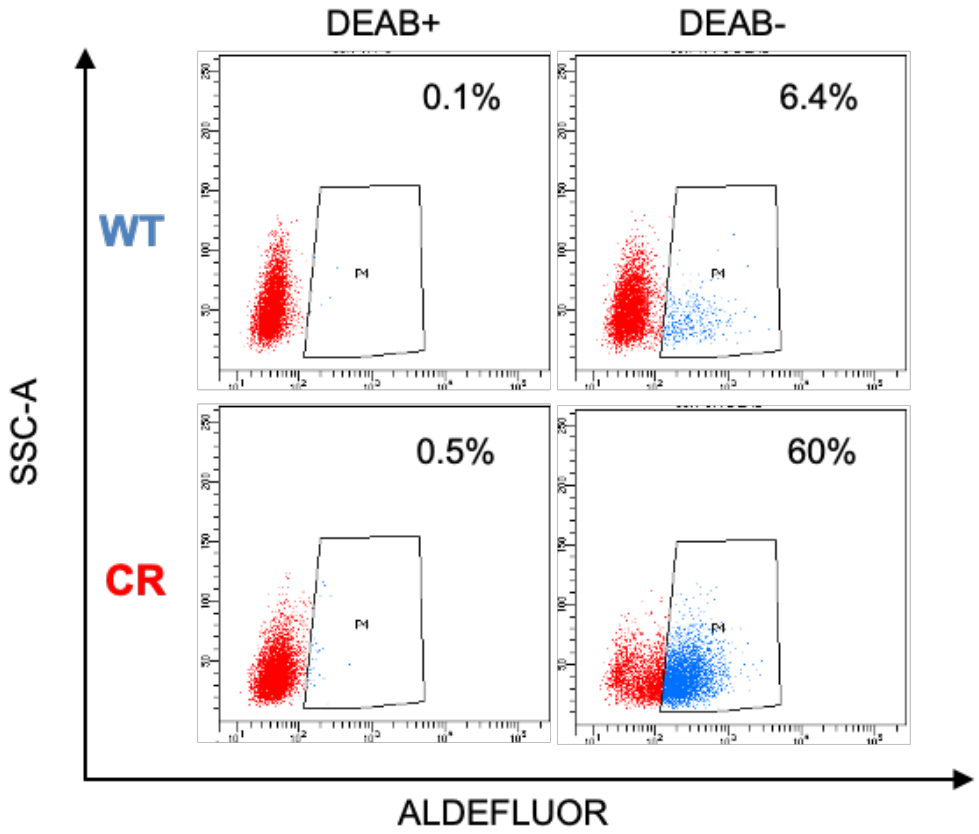

図 2：CR では WT に比べ ALDH 活性が高い
WT および CR は BODIPY®-aminoacetaldehyde で染色し、FACS で解析した。ALDH1 阻害剤 DEAB で処理したサンプルで ALDH high 陽性ゲートを定義した。数値データは ALDH high の割合を示している。統計解析は Student's t-test を用いて行った。CR（ALDH 陽性 60%）では WT(ALDH 陽性 6.4%)に比べ有意に ALDH 高活性の割合が高かった($p<0.05$)。

次にそれぞれのクローンにつき、非接着性プレートによる培養下での sphere 形成能について比較したところ、CR では WT に比して sphere 形成能が高い傾向が見られた（表 2)。

表 2：WT, CR 細胞の sphere 形成能を評価した。1.0×10^3, 10^2, 10^1, 10^0 cells/well で非接着性プレートに播種し、1 週間培養を行った。Sphere 形成したウェルの数をカウントした。CSCs 頻度は、ELDA web site (http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda) を用いてカイ二乗検定を用いて解析した。CR では WT に比して sphere 形成能が有意に高かった($p<0.05$)。

Group	細胞/well				CSCs 頻度	95% CI
	10^0	10^1	10^2	10^3		
CR	2/24	6/24	15/24	24/24	1.33%	0.85-2.08%
WT	0/24	2/24	7/24	24/24	0.45%	0.27-0.74%

以上の結果から CR は CDDP 抵抗性を持ち、ALDEFLUOR 陽性で sphere 形成能も高く、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。

2. CLSPN は CR で発現増加

免疫学的なターゲットとなりうる遺伝子を明らかにするために、CR で WT に比べて発現量の多い遺伝子をスクリーニングした。CAGE 解析の結果、CR では cut off >1.5 で測定すると 2284 個の遺伝子が WT 細胞に比べ過剰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。以前、UM-UC-3 細胞を用いて HLA リガンドーム解析を行い、HLA-A2 結合抗原性ペプチドを同定した(Miyata et al., 2022)。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、3 つの条件を満たすものとして CLSPN 遺伝子を同定し、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（図 3)。

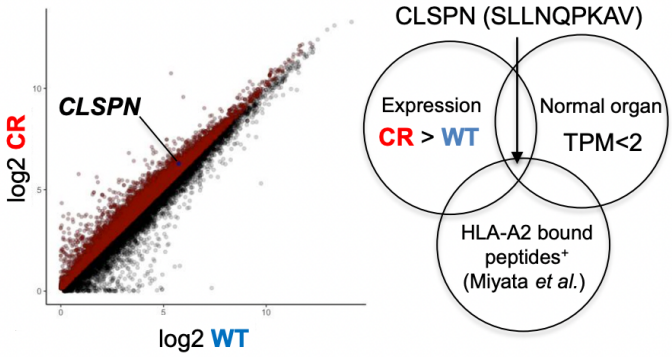

図 3： UM-UC-3 WT と CR の CAGE 解析

CR 細胞における遺伝子発現を CAGE 法により評価した。WT と CR の mRNA 発現を二重解析し、その倍率変化を散布図にプロットし（左図)、CLSPN プロットを示す。候補遺伝子の絞り込みには、(1)CR で過剰発現している遺伝子、(2)正常臓器での発現＜2（TPM)、(3)HLA-A2 結合ペプチドの存在をフィルターとして使用

した。最終的に、CLSPN とそのコード抗原ペプチド SLLNQPKAV が挙がった。

3. Claspin 発現量

まずは正常組織の CLSPN 発現量を qPCR を用いて評価した。正常組織の cDNA は Human MTC™ Panel I, II(タカラバイオ)を用いた。WT では高発現している一方で、正常組織にはほとんど発現していないことが示された（図 4）。これは免疫療法のターゲットとしては都合の良い条件である。

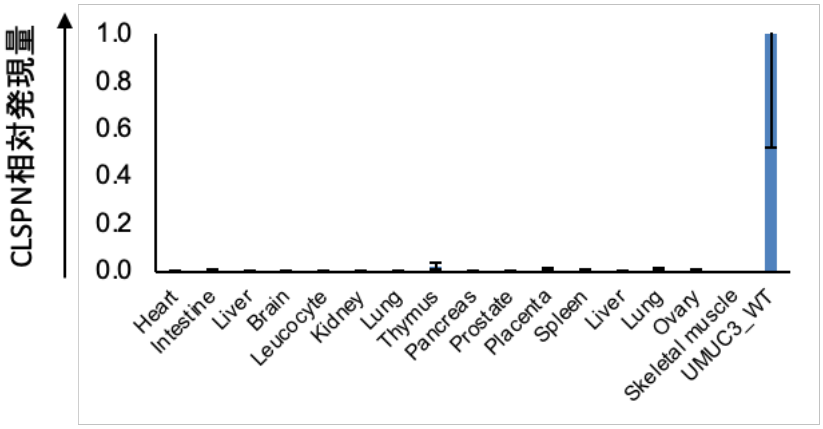

図 4：正常組織での CLSPN 発現は低い

WT の cDNA と正常臓器での CLSPN 発現を Human MTC Panel 由来の cDNA を用いて qPCR で評価した。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。グラフは UM-UC-3 の WT の発現量を 1 とした相対発現量を平均値±標準偏差（SD）で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。正常臓器では WT に比して CLSPN 発現量が低かった。

また、WT と CR での CLSPN 発現量を同様に qPCR で評価すると、CR で有意に高発現であった（図 5)。タンパク質レベルでの発現をウエスタンブロットで評価した。CR では WT より濃いバンドが得られておりタンパク質レベルでも Claspin が高発現していた(図 6)。ウエスタンブロットは当初はなかなかうまく Claspin のバンドがみえず、gel の平衡化時間の延長や抗体濃度の optimization を行い最終的に図のバンドを得ることができた。

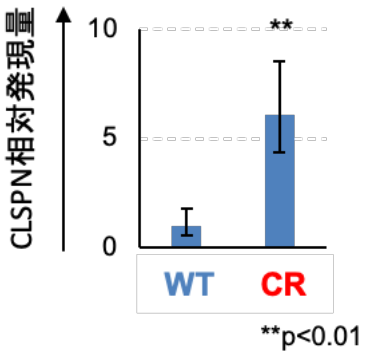

図 5：CR では WT に比べ CLSPN が高発現
WT, CR での CLSPN の mRNA 発現を qPCR で評価した図を示す。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。グラフは WT の発現量を 1 とした相対発現量を平均値±標準偏差（SD）で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。CR では WT に比べ CLSPN が高発現していた(p<0.01)。

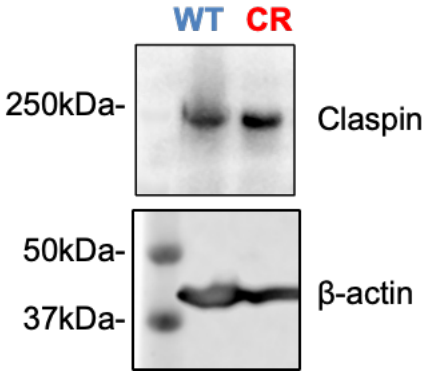

図 6：CR では WT に比べ Claspin タンパク質が高発現
WT, CR での Claspin タンパク質発現量をウエスタンブロットで評価した図を示す。内在性コントロールとしてβ-actin を用いた。CR では WT に比べタンパク質レベルでも Claspin が高発現していた。

CDDP 耐性に Claspin が関与しているのであれば、CDDP 投与に伴い Claspin 発現は上昇すると仮説をたて、検証した。6 well plate に WT, CR 細胞を $2x10^5$ 細胞を播種し、37℃, 5%CO2 のインキュベーターで一晩培養、翌日最終濃度 0-16μmol/l となるよう CDDP (Selleck)を加え、37℃, 5%CO2 のインキュベーターで 48 時間培養した。48 時間経過した段階で RNA 抽出、cDNA 合成を行い qPCR を行なった。CDDP 濃度依存的に Claspin の発現が上昇しており、その程度は CR に比べ WT でより大きかった（図 7)。

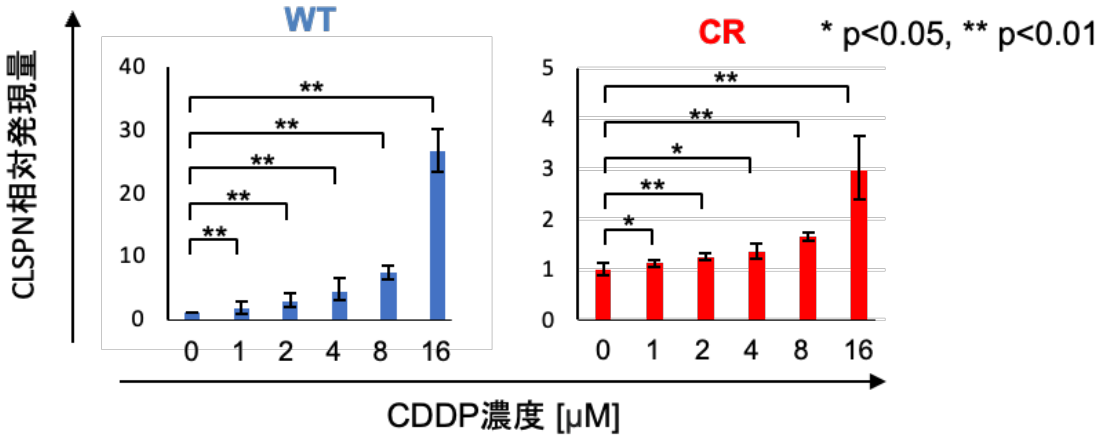

図 7: WT, CR での CDDP 暴露後 48 時間後における CLSPN の mRNA 発現を qPCR で評価した図を示す。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。グラフは平均値±標準偏差（SD）で示している。統計解析は Student's t-test を用いて行った。縦軸が CLSPN 発現量(CDDP 0 との比較)、横軸が CDDP 濃度を表している。WT、CR 両群とも CDDP 濃度依存的に CLSPN 発現量が増加した(p<0.05 または p<0.01)。

4. Claspin ノックダウン

Claspin siRNA(siCLSPN)を用いて Claspin を WT, CR 細胞からノックダウンした。ノックダウンの確認は qPCR を用いて行なった(図 8)。ノックダウンした各細胞群で CDDP 感受性の変化を WST-8 assay を用いて確認した。両群でノックダウン細胞では有意に CDDP 感受性が亢進しており（図 9)、Claspin は CDDP 抵抗性メカニズムに寄与している可能性が示唆された。WT、WT ノックダウン細胞の ALDH 活性は ALDEFLUOR assay を用いて評価したが、両者に差を認めなかった（図 10)。

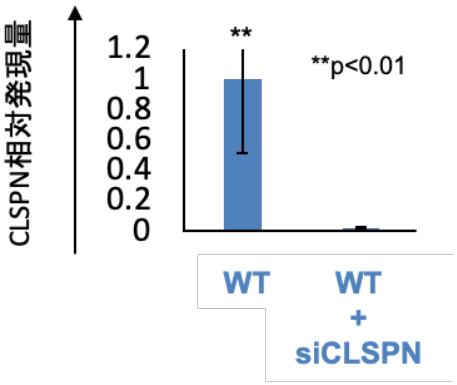

図 8：siRNA により CLSPN はノックダウンされている

WT と WT に対して siCLSPN（siRNA による CLSPN ノックダウン）処理後(WT+siCLSPN)の CLSPN の mRNA 発現を qPCR で評価した図を示す。内在性コントロールとして GAPDH を用いた。グラフは平均値±標準偏差（SD）で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。WT+siRNA 細胞では WT 細胞に比べ Claspin が 1.7%まで有意に低下していることを確認した(p<0.01)。

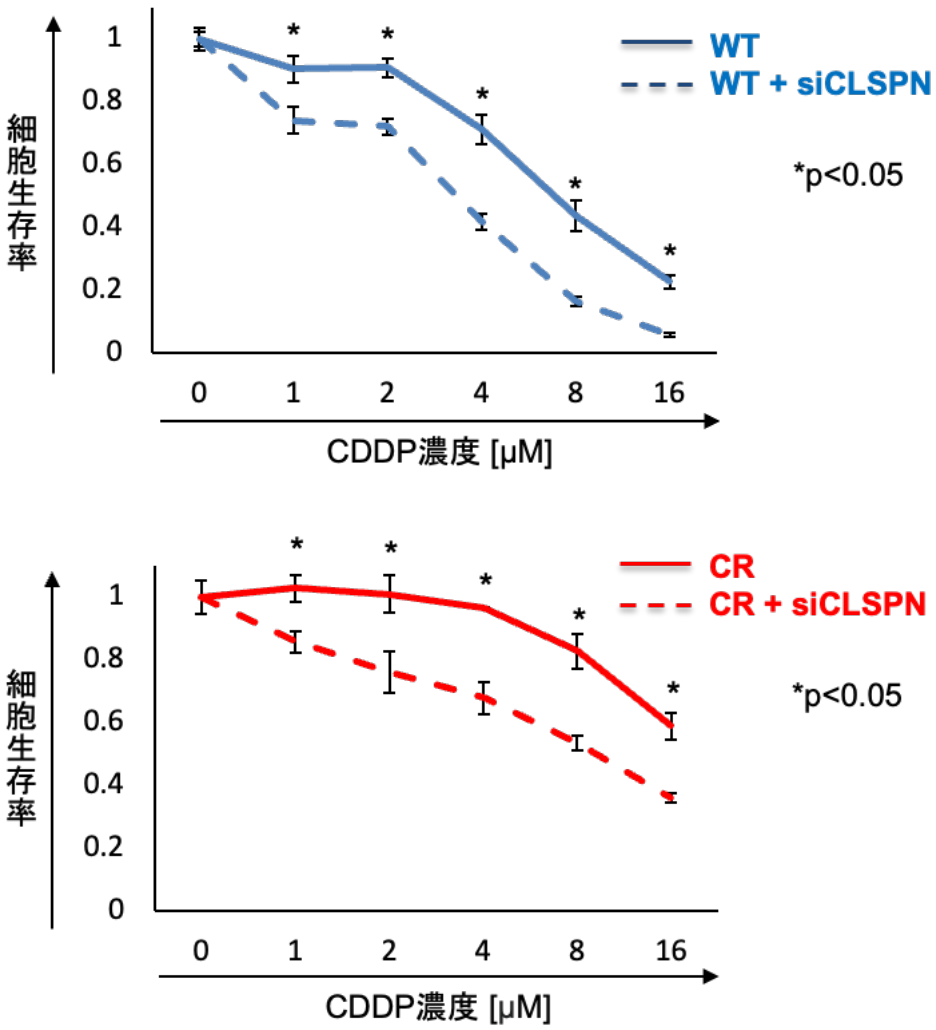

図 9：CLSPN ノックダウンにより CDDP 感受性が亢進

WT, CR および、siRNA による CLSPN ノックダウン処理した WT, CR(WT+siCLSPN, CR+siCLSPN)に規定量の CDDP を含む培地で 48 時間培養し、WST-8 assay で細胞生存率を評価した結果を示す。グラフは平均値±標準偏差（SD）で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。縦軸が細胞生存率、横軸が CDDP 濃度を表している。WT, CR 両群ともに CLSPN ノックダウン細胞で CDDP 感受性が有意に亢進した(p<0.05)。

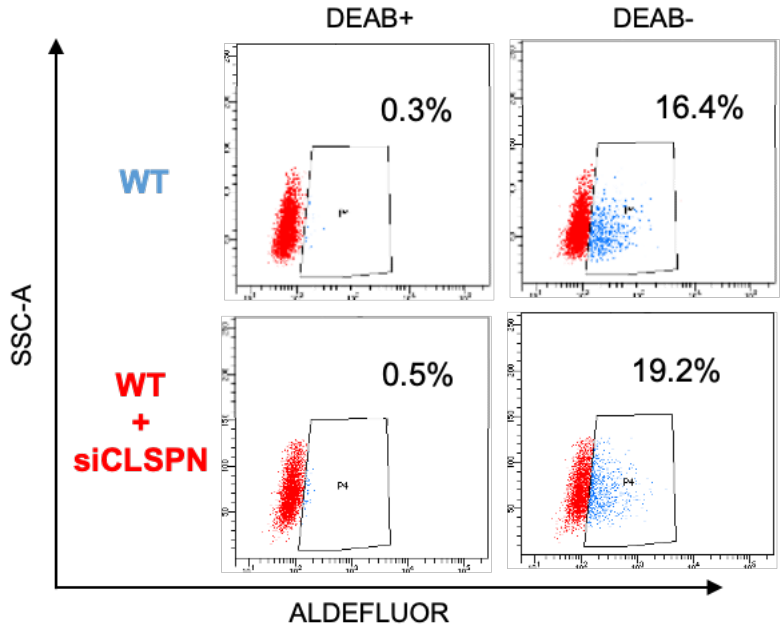

図 10：CLSPN ノックダウンでは ALDH 活性に差を認めなかった
WT および WT に siRNA による CLSPN ノックダウン(WT+siCLSPN)をそれぞれ BODIPY®-aminoacetaldehyde で染色し、FACS で解析した。ALDH1 阻害剤 DEAB で処理したサンプルで ALDH high 陽性ゲートを定義した。数値データは ALDH high の割合を示している。WT(ALDH 陽性 16.4%)および WT+siCLSPN(ALDH 陽性 19.2%)の両群で ALDH 活性に差を認めなかった。

5. Claspin ペプチド特異的 CTL 誘導と CTL クローンの樹立

Claspin ペプチド(SLLNQPKAV)に対し特異的に反応する CTL を健常人 HLA-A*02:01 ドナーの PBMC から誘導できるかどうかを検証した。当初はなかなか ELISPOT assay で反応のみられる bulk を得ることができなかったが、Hirano らの報告(Hirano et al., 2006)を参考にペプチド刺激の回数を 3 回から 5 回に増やしたところ、ELISPOT assay で反応の見られる bulk を確認することが出来た（図 11)。上記 bulk に対し Claspin テトラマーソーティングを施行した。Claspin テトラマー陽性細胞が少数みられたため、この細胞をシングルセル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。
これらの成長したクローンが、Claspin 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、クローンの一つが Claspin 提示細胞に有意な反応を示した。このクローンの Claspin 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、99.4%が Claspin テトラマーに親和性を

示し、均一なClaspin特異的なCTLクローンであることが確認できこれを”yc3”と命名した(図12,13)。

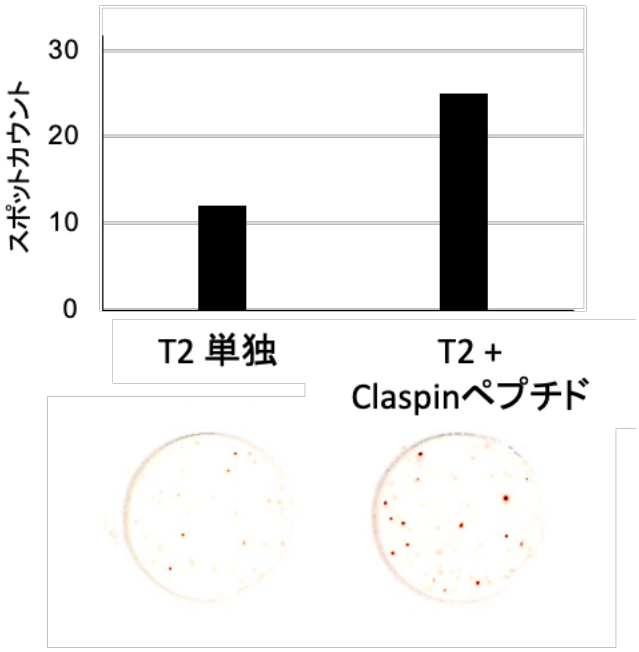

図11：Claspinペプチド刺激により反応のあるCTLを誘導できた
Claspinペプチドで5回刺激した後のCTLがClaspinペプチドを認識するかELISPOT assayにて評価した。ペプチド刺激後のCTLをエフェクターとし、ターゲットにClaspinペプチドを加えたT2細胞(T2 + Claspinペプチド)とnegative controlとしてペプチド負荷なしのT2細胞(T2単独)でELISPOT assayを行なった。グラフ下方の円が実際のwellであり、これをImageJソフトを用いてスポットを定量化し、カウントしたものが上の棒グラフである。T2 + Claspin peptideでnegative controlに比べスポット数に差があるように見えた（それぞれ1検体のみであり有意差検定は未試行)。

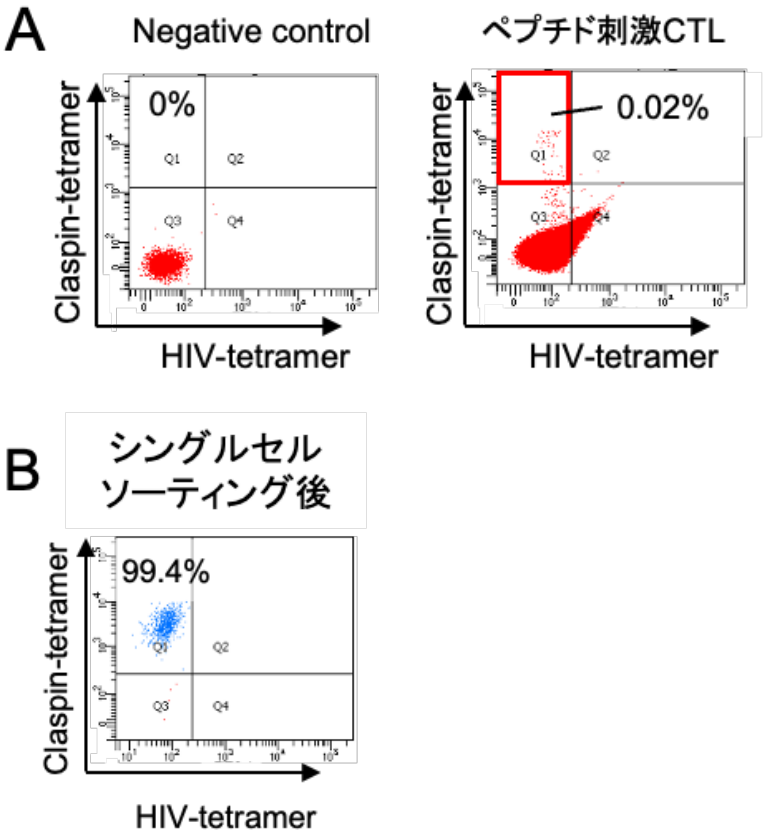

図 12：Claspin テトラマー陽性細胞を同定し、シングルセルソーティングに成功

A：Claspin HLA-A2-PE テトラマーによる FACS 解析結果を図に示す。CD8 陽性細胞でゲーティングしている。Negative control はペプチド刺激をしていない CTL であり、Claspin ペプチドで 5 回刺激した後の CTL(ペプチド刺激 CTL)を評価した。FACS 解析では、横軸に HIV-A2-FITC テトラマーの FITC、縦軸に Claspin-A2-PE テトラマーの PE を表記している。HIV に反応せず Claspin に反応する左上の細胞集団が目的の CTL 細胞群である。Claspin ペプチド刺激をうけた CTL は、目的の細胞集団がごく少数(0.02%)認められた。この細胞集団をシングルセルソーティングし、培養した。

B：シングルセルソーティング後に培養できた CTL の FACS で Claspin テトラマー陽性率 99.4%の CTL クローンを確認し、yc3 と命名した。

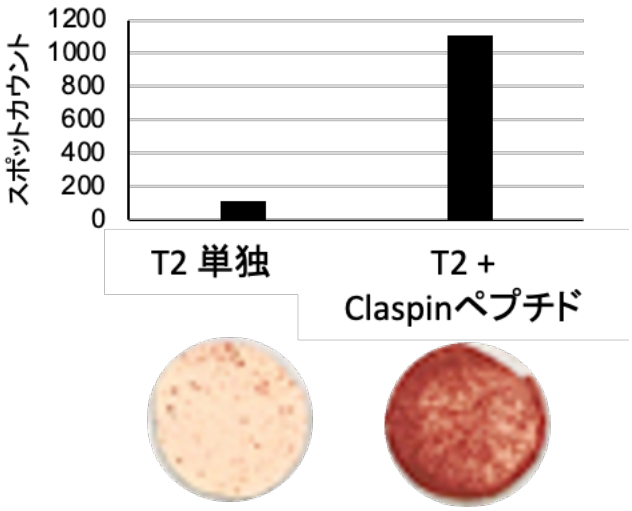

図 13：yc3(claspin テトラマー陽性 CTL)は Claspin ペプチド負荷した T2 細胞を認識した

yc3 が Claspin ペプチドを認識するか ELISPOT assay にて評価した。yc3 をエフェクターとし、ターゲットに Claspin ペプチドを加えた T2 細胞(T2 + Claspin ペプチド)と negative control としてペプチド負荷なしの T2 細胞(T2 単独)で ELISPOT assay を行なった。グラフ下方の円が実際の well であり、これを ImageJ ソフトを用いてスポットを定量化し、カウントしたものが上の棒グラフである。T2 + Claspin peptide で negative control に比べスポット数に差を認めた（それぞれ 1 検体のみであり有意差検定は未試行)。

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

Claspin 特異的 CTL クローン（yc3）が、負荷したペプチドのみならず内因性に提示された Claspin ペプチドに対しても反応できるかを検証した。

WT, CR 細胞それぞれに対し yc3 を反応させて ELISPOT assay を施行し、WT, CR ともに T2 細胞に比して有意なスポットの増加を認めた(図 14)。これにより、yc3 は内因性の経路で提示された Claspin ペプチドに反応することが証明された。

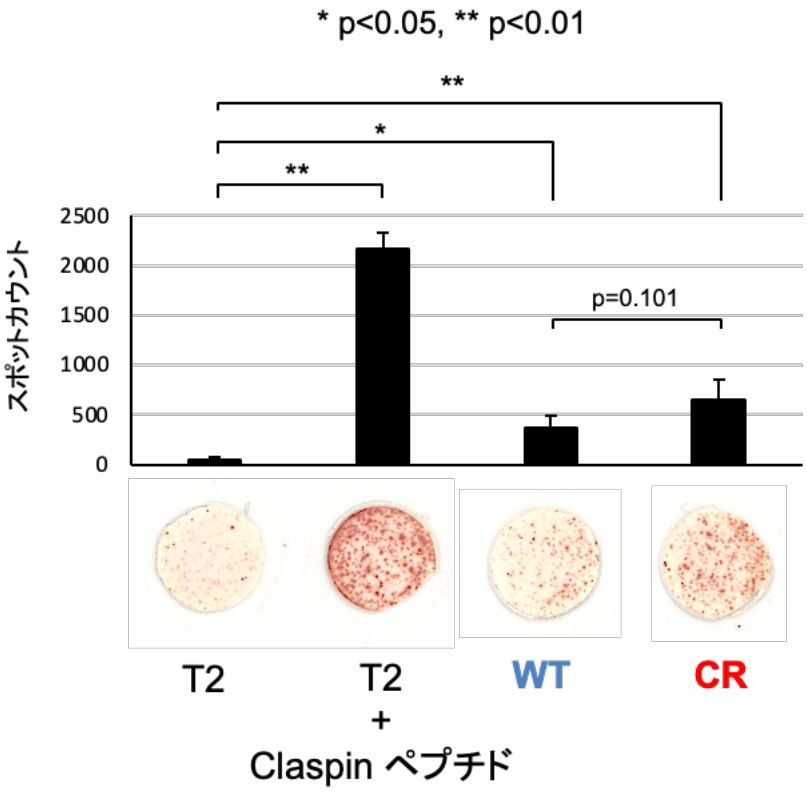

図 14：yc3(claspin テトラマー陽性 CTL)は WT, CR を認識した
yc3 が WT,CR を認識するか ELISPOT assay にて評価した。yc3 をエフェクターとし、positive contorol として Claspin ペプチドを加えた T2 細胞(T2 + Claspin ペプチド)、negative control としてペプチド負荷なしの T2 細胞(T2)、ターゲットとして WT, CR を用いて ELISPOT assay を行なった。グラフ下方の円が実際の well であり、これを ImageJ ソフトを用いてスポットを定量化し、カウントしたものが上の棒グラフである。グラフは平均値±標準偏差（SD）で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。T2 に比べ、WT, CR でそれぞれ有意にスポット数の増加を認め、yc3 は WT, CR に反応していることがわかった。WT に比べ CR でスポットの増加している印象はあったが、有意差は認めなかった（p=0.101)。

CDDP 暴露により Claspin 発現が亢進することが予備実験で確認できたため、CDDP 暴露により yc3 の反応性が亢進するかと検証した。
6 well plate に WT 細胞を $2x10^5$ 細胞を播種し、37℃, 5%CO2 のインキュベーターで一晩培養、翌日最終濃度 0 または 5μmol/l となるよう CDDP (Selleck)を加え、37℃, 5%CO2 のインキュベーターで 48 時間培養した。48 時間経過した段階で ELISPOT assay を行なった。WT に比べ CDDP 暴露した WT が有意なスポットの

増加を認めた(図 15)。

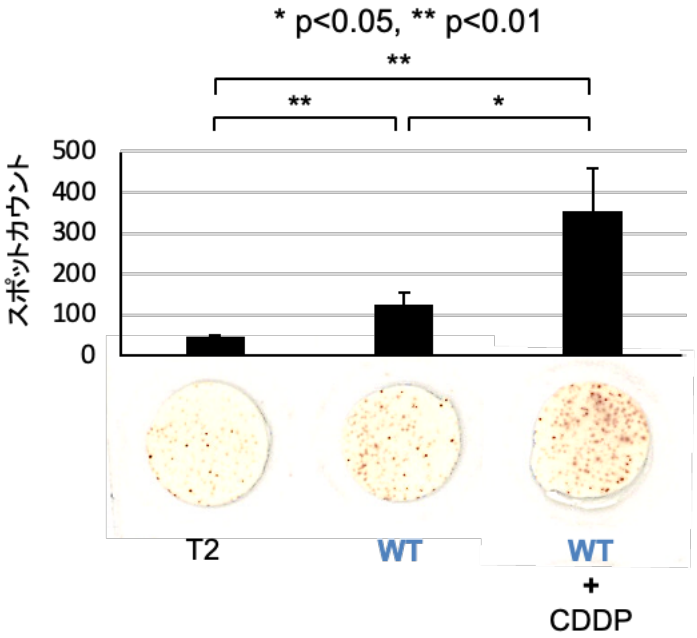

図 15：yc3(claspin テトラマー陽性 CTL)は CDDP 処理後の WT を強く認識した
yc3 が WT に CDDP を暴露させた細胞をより強く認識するか ELISPOT assay にて評価した。yc3 をエフェクターとし、negative control としてペプチド負荷なしの T2 細胞(T2)、ターゲットとして WT および WT に CDDP 5μmol/L で 48 時間培養後の細胞(WT+CDDP)を用いて ELISPOT assay を行なった。グラフ下方の円が実際の well であり、これを ImageJ ソフトを用いてスポットを定量化し、カウントしたものが上の棒グラフである。グラフは平均値±標準偏差（SD）で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。WT に比べ、WT+CDDP で有意にスポット数の増加を認め($p<0.05$)、yc3 は WT+CDDP により強く反応していることがわかった。

さらに、Claspin をノックダウンすることで yc3 からの免疫逃避を起こすか検証した。WT の Claspin ノックダウン細胞(WT+siCLSPN)では WT 細胞に比べスポット数が減少しており、yc3 は Claspin を特異的に認識していることが証明された（図 16)。

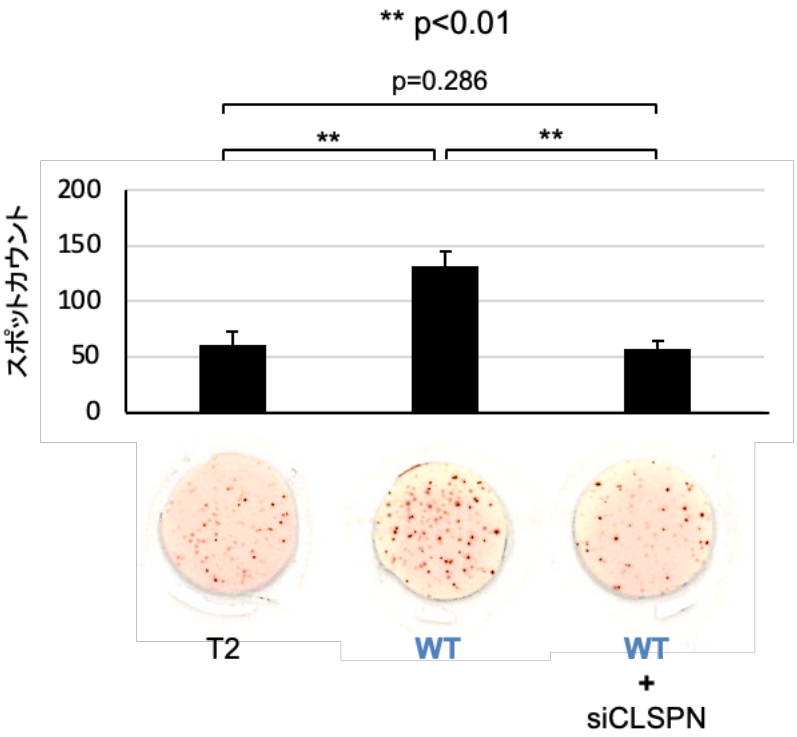

図 16：yc3(claspin テトラマー陽性 CTL)は Claspin ノックダウン細胞を認識しなかった

yc3 が Claspin ノックダウンした WT を認識するか ELISPOT assay にて評価した。yc3 をエフェクターとし、negative control としてペプチド負荷なしの T2 細胞(T2 alone)、ターゲットとして WT および siRNA を用いて Claspin をノックダウンした WT(WT+siCLSPN) を用いて ELISPOT assay を行なった。グラフ下方の円が実際の well であり、これを ImageJ ソフトを用いてスポットを定量化し、カウントしたものが上の棒グラフである。グラフは平均値±標準偏差(SD)で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。T2 に比べ、WT で有意なスポット数の増加を認め($p<0.05$)た。一方 WT+siCLSPN では有意なスポット数の増加を認めず($p=0.286$)、yc3 が Claspin を特異的に認識していることを示唆する結果である。

7. Claspin 特異的 CTL クローンの細胞傷害性の確認

yc3 が Claspin ペプチドを同定し、IFN-γを放出することは前述の ELISPOT assasy で確認できた。実際に細胞傷害性を有しているかどうか、インピーダンス assay と LDH cytotoxicity assay を用いて評価した。

インピーダンス assay ではエフェクター：ターゲット比(E:T 比)が 9:1 の状況において、yc3 は CR をより強く障害することが示された（図 17)。

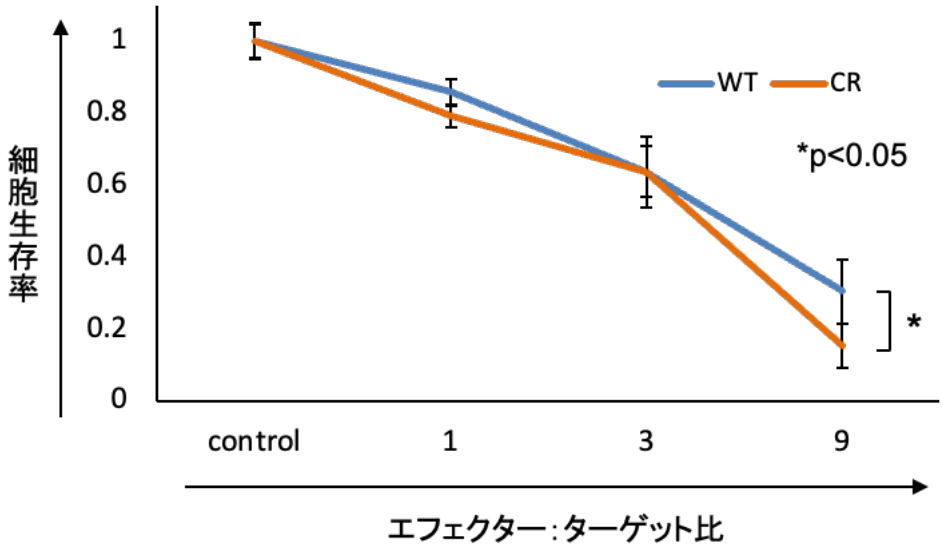

図 17：yc3(claspin テトラマー陽性 CTL)は WT, CR に対する細胞傷害性を発揮した

yc3 の WT,CR に対する細胞傷害性をインピーダンス assay にてを評価した。Maestro Z は well 表面に細胞が接着することでインピーダンスが変化することを感知し、細胞が障害を受けて well から剥がれた際のインピーダンスの変化で細胞傷害性を評価することができる。WT および CR を CytoView-Z プレート（1 x 10^5 cells/well）に播種し、室温で 1 時間放置して 37℃、5% CO2 の Maestro Z で 24 時間インキューベーションさせて細胞を付着させて安定化させた。その後、CTL クローン yc3 をエフェクター：ターゲット比 9, 3 または 1：1 で加え、WT および CR と共培養を行った。その後インピーダンス測定を連続的に記録し、細胞障害率を計算のした。グラフは平均値±標準偏差（SD）で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。

Control に比べ、yc3 と共培養した群では細胞傷害性が示されており、特にエフェクター：ターゲット比(E:T 比)が 9:1 の状況において、yc3 は CR をより強く障害することが示された($p<0.05$)。

また、LDH cytotoxicity assay では、T2 細胞に Claspin ペプチドを負荷したものを顕著に障害し（図 18A)、また、CR を有意に障害することが示された（図 18B)。

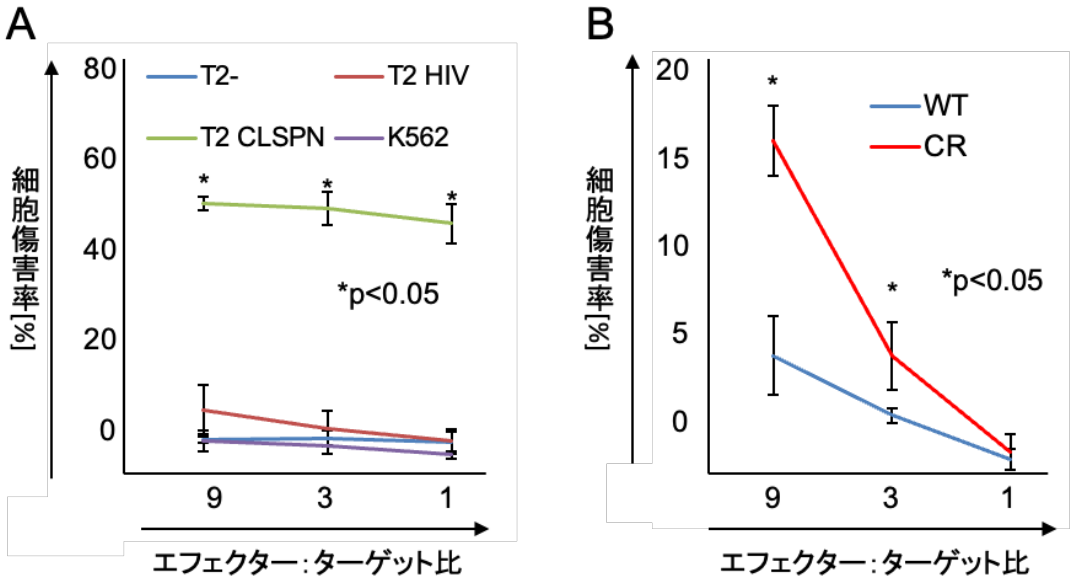

図 18：yc3(claspin テトラマー陽性 CTL)は WT, CR に対する細胞傷害性を発揮した

yc3 の細胞傷害性を LDH cytotoxicity assay にてを評価した。

A：ターゲットとして T2 細胞のみ(T2-)、T2 細胞に Claspin ペプチドを負荷した群(T2 CLSPN)、negative contorol として HIV ペプチドを負荷した群(T2 HIV)およびとして K562 細胞を用いた。K562 細胞は HLA を欠損しており、negative contorol としてしばしば用いられる。エフェクターとして CTL クローン yc3 を用いてエフェクター：ターゲット比 9, 3 または 1：1 で加えて共培養し、8 時間インキュベートし、LDH の細胞放出量を測定した。グラフは平均値±標準偏差（SD）で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。

T2-および negative contorol には反応は認められず、yc3 は Claspin ペプチドを負荷した群のみ有意に細胞傷害性を発揮しており($p<0.05$)、HLA と Claspin ペプチド複合体を特異的に認識し、細胞傷害性を示すことが示唆された。

B：ターゲットとして WT, CR を用いた。エフェクターとして CTL クローン yc3 を用いてエフェクター：ターゲット比 9, 3 または 1：1 で加えて共培養し、8 時間インキュベートし、LDH の細胞放出量を測定した。グラフは平均値±標準偏差（SD）で示した。統計解析は Student's t-test を用いて行った。

yc3 は E/T 比 1:1 では両群に差を認めないが、9:1, 3:1 では WT に比べ CR に対して有意に細胞傷害性を発揮している($p<0.05$)。

考察

本研究では、UM-UC-3 における新規 CDDP 耐性株(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(Prager et al., 2019; Zhang et al., 2012)。化学療法抵抗性の肺がんで、ALDH high 細胞の割合が高く、CSCs 様表現型を示していると報告されている(Barr et al., 2013)。このように、治療抵抗性と CSCs は、さまざまながん種において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(Park et al., 2009)。以前の研究では、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(Vallo et al., 2015)。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。このように、CR は 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。

抗アポトーシス蛋白やトランスポーター蛋白と CDDP 抵抗性の関係については言及していない。しかし、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 で優先的に発現していることが、以前の研究で明らかにされている (Kobayashi et al., 2019)。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。

CLSPN は、ATR による CHK1 リン酸化を仲介し、細胞周期の S 期における DNA 複製ストレス時に活性化することが報告されている(Peschiaroli et al., 2006)。また、p38-stress activated kinase が CLSPN をリン酸化し、S 期の DNA 損傷から細胞を保護することが報告されている(Ulsamer et al., 2022)。しかし、CLSPN は DNA 複製ストレスに関係し、ATR-CHK1 チェックポイントとは独立した経路でがん細胞を保護することが報告されている(Bianco et al., 2019)。他の研究では、CLSPN は胃がん、腎細胞がん、前立腺がん、膀胱がん、低悪性度グリオーマで過剰発現していることが報告されている (Babasaki et al., 2021; Jia et al., 2022; Kobayashi et al., 2022; Kobayashi et al., 2020; Kobayashi et al., 2019)。CLSPN の発現は S 期で最も高く、G2/M 期では PLK1

によってリン酸化され、ユビキチン-プロテアソーム系による蛋白分解が誘導される (Peschiaroli et al., 2006; Smits et al., 2019)。この発現制御機構に関して、正常組織では CLSPN タンパク質の発現は非常に低いが、がん組織では CLSPN タンパク質が高レベルで検出される(Babasaki et al., 2021; Kobayashi et al., 2022; Kobayashi et al., 2020; Kobayashi et al., 2019)。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。
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、CDDP と 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）の併用免疫療法の可能性を示唆している。さらに、CDDP 刺激は口腔扁平上皮がん細胞において免疫チェックポイント分子である PD-L1 の発現を誘導する(Sasaya et al., 2022)。したがって、CDDP との併用免疫療法には、PD-1/PD-L1 遮断の併用も有効かもしれない。

CLSPN は CDDP 耐性のドライバー遺伝子であり、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た。これらの知見は、CDDP 耐性例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。

結論

・本研究から得られた新知見
CR は CSCs としての特徴を強く有していた。
CDDP 耐性メカニズムに Claspin が関与していた。
CDDP 暴露により Claspin 発現量が誘導された。
Claspin 特異的な CTL は膀胱がん CR に強く反応を示し、CTL により細胞障害が誘導された。

・新知見の意義
膀胱がんCRに反応する特異的なCTLの報告、および、Claspinをターゲットとした免疫療法の初めての報告である。
CDDPとClaspinに対する免疫療法の複合療法の可能性を示唆する結果となった。
今後CR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 Claspin ペプチド特異的 CTL が膀胱がん CR を強く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、Claspin 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。
CDDP 投与前後の臨床検体を用いて Claspin の発現が実際に増加しているか免疫染色を用いて評価したい。

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

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.

Babasaki, T., Sentani, K., Sekino, Y., Kobayashi, G., Thang Pham, Q., Katsuya, N., Akabane, S., Taniyama, D., Hayashi, T., Shiota, M.*, et al.* (2021). Overexpression of claspin promotes docetaxel resistance and is associated with prostate-specific antigen recurrence in prostate cancer. Cancer Med. *10*, 5574-5588.

Barr, M.P., Gray, S.G., Hoffmann, A.C., Hilger, R.A., Thomale, J., O'Flaherty, J.D., Fennell, D.A., Richard, D., O'Leary, J.J., and O'Byrne, K.J. (2013). Generation and characterisation of cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell lines displaying a stem-like signature. PLoS One *8*, e54193.

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. N. Engl. J. Med. *376*, 1015-1026.

Bianco, J.N., Bergoglio, V., Lin, Y.L., Pillaire, M.J., Schmitz, A.L., Gilhodes, J., Lusque, A., Mazières, 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. Nat. Commun. *10*, 910.

Choi, S.H., Yang, H., Lee, S.H., Ki, J.H., Nam, D.H., and Yoo, H.Y. (2014). TopBP1 and Claspin contribute to the radioresistance of lung cancer brain metastases. Mol. Cancer *13*, 211.

Frith, M.C., Valen, E., Krogh, A., Hayashizaki, Y., Carninci, P., and Sandelin, A. (2008). A code for transcription initiation in mammalian genomes. Genome Res. *18*, 1-12.

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 *1*, 555-67.

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

Guallar-Garrido, S., and Julián, E. (2020). Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Therapy for Bladder Cancer: An Update. Immunotargets Ther. *9*, 1-11.

Gueguen, M., Patard, J.J., Gaugler, B., Brasseur, F., Renauld, 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.

Haberle, V., Forrest, A.R., Hayashizaki, Y., Carninci, P., and Lenhard, B. (2015). CAGEr: precise TSS data retrieval and high-resolution promoterome mining for integrative analyses. Nucleic Acids Res. *43*, e51.

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.

Hirano, N., Butler, M.O., Xia, Z., Berezovskaya, A., Murray, A.P., Ansén, S., and Nadler, L.M. (2006). Efficient presentation of naturally processed HLA class I peptides by artificial antigen-presenting cells for the generation of effective antitumor responses. Clin. Cancer Res. *12*, 2967-2975.

Jia, Y., Cheng, X., Liang, W., Lin, S., Li, P., Yan, Z., Zhang, M., Ma, W., Hu, C., Wang, B.*, et al.* (2022). CLSPN is a potential biomarker associated with poor prognosis in low-grade gliomas based on a multi-database analysis. Curr. Res. Transl. Med. *70*, 103345.

Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans. Genes Dev. *15*, 2654-2659.

Keymoosi, H., Gheytanchi, 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., Hayashi, T., Sentani, K., Babasaki, T., Sekino, Y., Inoue, S., Uraoka, N., Hanamoto, M., Nose, H., Teishima, J.*, et al.* (2022). Clinicopathological significance of claspin overexpression and its efficacy as a novel biomarker for the diagnosis of urothelial carcinoma. Virchows Arch. *480*, 621-633.

Kobayashi, G., Sentani, K., Babasaki, T., Sekino, Y., Shigematsu, Y., Hayashi, T., Oue, N., Teishima, J., Matsubara, A., Sasaki, N.*, et al.* (2020). Claspin overexpression is associated with high-grade histology and poor prognosis in renal cell carcinoma. Cancer Sci. *111*, 1020-1027.

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. Hum. Pathol. *84*, 8-17.

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.

Miyata, H., Hirohashi, Y., Yamada, S., Yanagawa, J., Murai, A., Hashimoto, S., Tokita, S., Hori, K., Abe, T., Kubo, T.*, et al.* (2022). GRIK2 is a target for bladder cancer stem-like cell-targeting immunotherapy. Cancer Immunol. Immunother. *71*, 795-806.

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 Cancer J. Clin. *70*, 404-423.

Peschiaroli, A., Dorrello, N.V., Guardavaccaro, D., Venere, M., Halazonetis, T., Sherman, N.E., and Pagano, M. (2006). SCFbetaTrCP-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. Mol. Cell *23*, 319-329.

Powles, T., Park, S.H., Voog, E., Caserta, C., Valderrama, B.P., Gurney, H., Kalofonos, H., Radulović, S., Demey, W., Ullén, A.*, et al.* (2020). Avelumab Maintenance Therapy for Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. N. Engl. J. Med. *383*, 1218-1230.

Prager, B.C., Xie, Q., Bao, S., and Rich, J.N. (2019). Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem. Cell Stem Cell *24*, 41-53.

Rosell, R., and Karachaliou, N. (2019). Disulfide isomerase family-6 mediates cisplatin resistance by interfering with apoptosis and autophagy. EBioMedicine *42*, 20-21.

Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J.S., Rawla, P., Padala, S.A., and Barsouk, A. (2020). Epidemiology of Bladder Cancer. Med. Sci. (Basel) *8*.

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.

Sasaya, T., Kubo, T., Murata, K., Mizue, Y., Sasaki, K., Yanagawa, J., Imagawa, M., Kato, H., Tsukahara, T., Kanaseki, T.*, et al.* (2022). Cisplatin-induced HSF1-HSP90 axis enhances the expression of functional PD-L1 in oral squamous cell carcinoma. Cancer Med.

Sharma, P., Gnjatic, 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. Clin. Cancer Res. *12*, 5442-5447.

Smits, V.A.J., Cabrera, E., Freire, R., and Gillespie, D.A. (2019). Claspin - checkpoint adaptor and DNA replication factor. Febs j. *286*, 441-455.

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 Epidemiol. Biomarkers Prev. *19*, 327-337.

Ulsamer, A., Martínez-Limón, A., Bader, S., Rodríguez-Acebes, S., Freire, R., Méndez, J., de Nadal, E., and Posas, F. (2022). Regulation of Claspin by the p38 stress-activated protein kinase protects cells from DNA damage. Cell Rep. *40*, 111375.

Vallo, S., Michaelis, M., Rothweiler, F., Bartsch, G., Gust, K.M., Limbart, D.M., Rödel, F., Wezel, F., Haferkamp, A., and Cinatl, J., Jr. (2015). Drug-Resistant Urothelial Cancer Cell Lines Display Diverse Sensitivity Profiles to Potential Second-Line Therapeutics. Transl. Oncol. *8*, 210-216.

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.

Yu, G., Wang, L.G., Han, Y., and He, Q.Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. OMICS *16*, 284-287.

Zhang, Y., Wang, Z., Yu, J., Shi, J., Wang, C., Fu, W., Chen, Z., and Yang, J. (2012). Cancer stem-like cells contribute to cisplatin resistance and progression in bladder cancer. Cancer Lett. *322*, 70-77.