

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18589

研究課題名(和文) 治療抵抗性尿路上皮癌幹細胞標的免疫療法開発

研究課題名(英文) Cancer immunotherapy targeting treatment-resistant urothelial cancer stem cells

研究代表者

村井 愛子 (Murai, Aiko)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10793036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、ヒト膀胱癌幹細胞モデルを作製した。ヒト膀胱癌株 UM-UC-3 細胞から ALDEFUOR 法にて分離した ALDH<sup>high</sup> 細胞は、高い造腫瘍能を示し、膀胱癌幹細胞モデルであることを確認した。当該がん幹細胞モデルを用いて、膀胱癌幹細胞に発現する抗原ペプチドをマスマスペクトロメトリーを用いて網羅的に解析した。その結果、GRIK2 にコードされる抗原ペプチドが発現する事を見出した。GRIK2 ペプチドを認識する CTL は膀胱癌幹細胞を認識し、当該ペプチドは膀胱癌幹細胞治療薬として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌幹細胞は、化学療法や放射線療法といったこれまでのがん治療法に抵抗性を示す。本研究で発見した GRIK2 ペプチドは、ヒト膀胱癌幹細胞に特異的に発現する免疫療法標的であることを見出した。すなわち、GRIK2 ペプチドを用いる事により、治療抵抗性膀胱癌幹細胞を治療できる可能性を示唆する内容であり、膀胱癌治療における新たな方向性を示す内容である。

研究成果の概要(英文)：We established novel bladder cancer stem cell system using human bladder cancer cell line, UM-UC-3. Using bladder cancer stem cells, we screened antigenic peptides that are expressed on bladder cancer stem cells specifically, and we identified an antigenic peptide derived from GRIK2 is expressed in bladder cancer cells. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) specific for GRIK2 peptide could recognize bladder cancer stem cells, indicating that cancer immunotherapy using GRIK2 peptide can target treatment resistant bladder cancer stem cells.

研究分野：免疫学

キーワード：尿路上皮癌 癌幹細胞 免疫療法 GRIK2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、造腫瘍能が高い、自己複製能を有する、分化能を有するがん細胞亜集団と定義される。さらに、アポトーシスインヒビター発現が高い、細胞周期が休止期にある、トランスポーター発現が高いなどの理由により、がん幹細胞は治療抵抗性を示し、治療後の再発に深く関わる。すなわち、がん幹細胞に対する有効な治療法開発が、膀胱がん治療の治療成績を改善する有力な手段となる。

免疫チェックポイント阻害剤を用いた免疫療法は、すでに膀胱癌の第4の治療法として承認されている。免疫チェックポイント阻害剤は、これまでの治療法とは全く異なる機序で作用するため、これまでの治療法で有効な治療効果を得られなかった症例においても、治療効果を得られる事が期待される。一方で、免疫チェックポイント阻害剤による全生存期間の改善はみられるものの、さらなる改善点も期待される。

### 2. 研究の目的

本研究において、治療抵抗性膀胱癌幹細胞に対する治療戦略として、免疫療法の有効性を高める為に、膀胱癌幹細胞に発現する抗原ペプチドを網羅的にスクリーニングし、その有効性を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 膀胱癌幹細胞モデルの作製

ヒト癌幹細胞は、ALDEFLUOR 法、side population (SP) 法、sphere 形成法などにより分離する事が出来る。しかしながら、がん幹細胞は *in vitro* 培養において容易に分化し、不安定である。そこで今回は、ヒト膀胱癌株 UM-UC-3 細胞から ALDEFLUOR 法を用いて aldehyde dehydrogenase (ALDH)-high (ALDH<sup>high</sup>) 細胞として分離された細胞をクローン化し、膀胱癌幹細胞安定株作製を試みた。ALDH<sup>high</sup> 細胞から樹立したクローン(Hクローン)および、比較対象群として、ALDH<sup>low</sup> 細胞からクローン(Lクローン)を樹立した。Hクローン細胞およびLクローン細胞が、癌幹細胞および非癌幹細胞であるか、免疫不全マウスにおける造腫瘍能、治療抵抗性により検討した。

#### (2) 膀胱癌幹細胞に発現する抗原ペプチドの網羅的解析

UM-UC-3 細胞由来 H クローン細胞および L クローン細胞と、比較対象群としての野生型 UM-UC-3 細胞を大量培養し、Hクローン細胞およびLクローン細胞に発現する HLA タイプである、HLA-A2 を免疫沈降にて精製した。精製した HLA-A2 に結合する抗原ペプチドを酸処理にて分離後、マスマスペクトロメトリー解析にて網羅的に解析した。

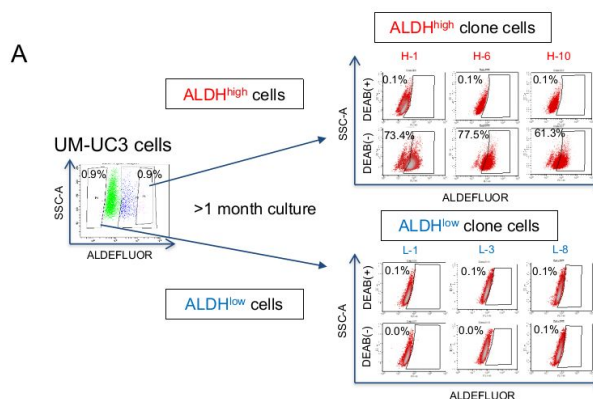
#### (3) 膀胱癌幹細胞に発現する抗原ペプチドを標的とする免疫療法の有効性

Hクローンから単離された抗原ペプチドの抗原性を確認する為に、HLA-A2 陽性ドナーから採取したリンパ球を抗原ペプチドにて複数回刺激し細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導を行った。CTL が Hクローン細胞を特異的に認識出来るか ELISPOT アッセイにて評価した。

### 4. 研究成果

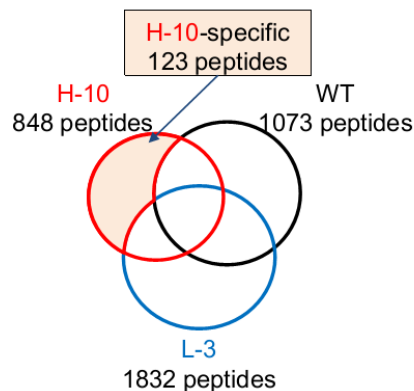
#### (1) 膀胱癌幹細胞モデルの作製

ヒト膀胱癌株 UM-UC-3 細胞から ALDEFLUOR 法を用いて Hクローンおよび、Lクローンを樹立した(右図)。大変興味深い事に、Hクローン細胞 (H-1, H-6, H-10) は、1 カ月以上の *in vitro* 培養を経ても、高い ALDH 活性を示す事が判明し、極めて安定的な癌幹細胞モデルであることが判明した。また、Hクローン細胞は、Lクローン細胞と比較して、シスプラチンに対する治療抵抗性が高く、免疫不全マウスにおける造腫瘍能が高い事も確認した。



#### (2) 膀胱癌幹細胞に発現する抗原ペプチドの網羅的解析

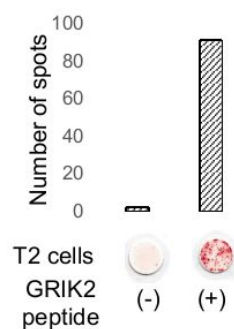
H クローン細胞、L クローン細胞および野生型 UM-UC-3 細胞から、それぞれ HLA-A2 特異的抗体を用いて、HLA-A2 分子を免疫沈降法にて精製した。精製した HLA-A2 分子に提示される抗原ペプチドを、酸抽出にて分離後、マスペクトロメトリー法にて網羅的に解析した。その結果、H クローン細胞からは 848 ペプチド、L クローン細胞からは 1832 ペプチド、野生型からは 1073 ペプチドの同定に成功した。また、多くのペプチドは互いにオーバーラップしていた為、H クローン特異的ペプチドを探索すると、123 個のペプチドが H クローン細胞特異的であることが判明した(右図)。これらの H クローン特異的抗原ペプチドが、ヒト膀胱癌幹細胞標的免疫療法の標的抗原の候補となる。



### (3) 膀胱癌幹細胞に発現する抗原ペプチを標的とする免疫療法の有効性

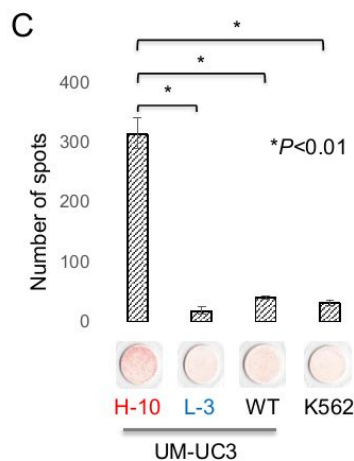
H クローンから単離された抗原ペプチドをコードする遺伝子の正常臓器での発現プロファイルを検索した。その結果、Glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 2 (GRIK2) にコードされる抗原ペプチドが、癌特異性が高く、免疫療法の標的になり得る事がしされた。この結果を背景に、GRIK2 ペプチド特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 誘導を試みた。その結果、GRIK2 ペプチド特異的 CTL 誘導に成功した(右図)。

また、GRIK2 ペプチド特異的 CTL クローンを樹立し、H クローン細胞(H-10)に対する反応性を IFN ELISPOT アッセイにて評価した結果、GRIK2 ペプチド特異的 CTL クローンは H クローン細胞に反応した(下図)。これらの結果は、GRIK2 ペプチドがヒト膀胱癌幹細胞にも提示されており、免疫療法の標的となりうる事が示唆される。



### 謝辞：

本研究遂行におきまして、補助を頂きました日本学術振興会 (JSPS) に厚くお礼申し上げます。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------