

神経刺激因子を含む幹細胞培地は
膵癌幹細胞を誘導する

氏名 渡邊 裕策

所属 山口大学大学院医学系研究科
応用分子生命科学系専攻
消化器・腫瘍外科学分野

平成 26 年 9 月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	2
3. 目的	2
4. 方法	2
5. 結果	6
6. 考察	8
7. 結語	10
8. 謝辞	10
9. 参考文献	10

1. 要旨

癌幹細胞(CSC)は自己複製能、多能性、抗癌剤からの抵抗性、遠隔臓器への転移能などの観点から注目されている。しかし、CSCは癌組織の中においても非常に少数のポピュレーションであり、CSCを研究するために十分な量を採取してくることは困難である。この問題を解決するため、我々はヒト膵癌細胞株から膵癌幹細胞を多く含むポピュレーションを誘導する方法を開発した。

我々の教室で樹立したヒト膵癌細胞株(YPK)をepidermal growth factor (EGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、leukemia inhibitory factor (LIF)、neural cell survivor factor-1 (NSF-1)、N-acetylcysteineを含む幹細胞培地で培養すると、球状に浮遊したspheroid細胞が得られる。このspheroid細胞を回収し今度はラミニンでコートしたプレートに移しさらに2か月間培養を続けると付着細胞として増殖する。これらの細胞が幹細胞様性質を獲得しているかを、表面マーカー、遺伝子発現、aldehyde dehydrogenase (ALDH)活性、細胞周期、腫瘍形成能で確認した。誘導した細胞は、一般的な膵癌幹細胞の表面マーカーであるCD24、CD44、epithelial specific antigen (ESA)に加え、最近注目されているCSCマーカーのCD44-variant (CD44v)陽性細胞の割合が劇的に増えていた。誘導した細胞の多くはG0/G1期にあり、間葉系関連遺伝子や幹細胞関連遺伝子を発現していた。マウスへの移植実験でも強い腫瘍形成能が確認された。

このように我々は癌幹細胞を豊富に含む集団をヒト膵癌細胞株から誘導する方法を確立できた。この方法ではCSCはおよそ100倍に増やすことができた。我々の方法はCSCのさらなる研究に貢献し、CSCを標的とした治療法の開発に寄与できるものと考えられる。

2. 研究の背景

CSCは自己複製能、多能性、抗癌剤からの抵抗性、遠隔臓器への転移能などの観点から注目されている(1,2)。従来の化学療法や放射線療法は元々癌細胞を標的として開発されたが、これらの治療がCSCには効果がないことは既に報告されている(3-5)。膵癌は日本の癌死亡原因の第5位で、世界的にも5年生存率は10%未満である(6)。そのため膵癌幹細胞に対する新しく効果的な治療法の開発が望まれている。

3. 目的

CSCは表面マーカーやside population、sphere形成能などから分離同定されてきた(7-13)。しかし、癌細胞の中でCSCの割合は非常に少ないため、研究のために十分な量のCSCを採取することは困難である。この問題を解決するため、我々はヒト膵癌細胞株からCSCを多く含む集団を誘導する方法の確立を目的とした。

4. 方法

・ヒト膵癌細胞株の培養：

本実験で用いたヒト膵癌細胞株は当科で樹立したYPK2とYPK5を使用した(14)。親株は10%の非働化ウシ胎児血清(FBS)(Life Technologies, Tokyo, Japan)入りのDMEM-F12(Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)を用い37°C、5%CO₂下で培養した。

・CSCの誘導と培養：

細胞をまず神経幹細胞培地に準じた無血清培地で培養する。sphereを誘導するための培地の基礎となるものはDMEM-F12に10 mM HEPES (Sigma-Aldrich)、1

x antibiotic antimycotic solution (Sigma-Aldrich)、0.6% glucose (Sigma-Aldrich)、1 mg/ml transferrin、250 µg/ml insulin (Sigma-Aldrich)、0.6 mM putrescine (Sigma-Aldrich)、0.3 µM sodium selenite (Sigma-Aldrich)、0.2µM progesterone (Sigma-Aldrich)を混注したものを使用した。さらに2 µg/ml heparin (Sigma-Aldrich)、20 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich)、20 ng/ml bFGF (Merck Millipore, Tokyo, Japan)、10 ng/ml LIF (Merck Millipore)、1/50 vol. NSF-1 (Lonza, Tokyo, Japan)、60 µg/ml N-acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich)を混注したものをCSC誘導培養液として使用した。YPK2から誘導されたsphere細胞をYPK2-Sp、YPK5から誘導されたsphere細胞をYPK5-Spと命名し回収した。YPK2-SpとYPK5-Spは20 µl/ml B27 supplement (Life Technology, Tokyo, Japan)、1 x antibiotic antimycotic solution、75 µg/ml BSA (Sigma-Aldrich)、10 ng/ml EGF、10 ng/ml bFGFを含むCSC維持培養液を入れたラミニンコートシャーレに移し培養を続けた。培養液は1週間ごとに半分交換した。sphere細胞は接着細胞として徐々に分裂・増殖していき、これらの細胞をそれぞれYPK2-Lm、YPK5-Lmと命名した。

・フローサイトメーターとソーティング :

細胞を分離しカウントした後5mlチューブに移し2%の非働化FBS入りのPBSで2回洗浄し、2%FBS入りPBSで 10^6 個/100 µlとなるように再懸濁する。適切な濃度になるよう抗体を加え20分間氷上で培養する。その後サンプルを2%FBS入りPBSで2回洗浄する。抗体はanti-CD44-APC (eBioscience, San Diego, CA)、anti-CD24-PE (Beckman Coulter, Brea, CA)、anti-ESA-FITC (Gene Tex, Irvine, CA)、慶応大学佐谷秀行教授より供与頂いたanti-CD44vを使用した。フローサイトメーターはMACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany)を用い、FlowJo software (Tree Star, Oregon)で結果の解析を行った。FACSAria III (BD Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ)を用いYPK-2Lm、YPL5-Lmより

CD24陽性/CD44陽性細胞をソーティングしたものを、それぞれYPK2-SortLm、YPK5-SortLmと命名した。

・ **ALDH活性の分析：**

細胞のALDH活性測定ためAldefluor assay kit (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada)を使用した。素早く回収した細胞を 1×10^6 /mlとなるようにAldefluor assay bufferに懸濁し、Aldefluorの基質を入れ45分間37°Cで培養する。ネガティブコントロールとして、ALDHに特異的阻害剤である1.5-mM diethylaminobenzaldehyde (DEAB)を用いてALDH活性を抑制する。細胞はMACSQuant analyzerの緑色蛍光チャンネル(FL1)で測定し、結果はFlowJo softwareで解析した。四角で囲まれた細胞がALDH活性の高い集団である。

・ **細胞周期の解析：**

迅速にトリプシン処理した細胞を1500回転で5分間遠心し、PBSで2回洗浄後、70%エタノールで固定する。固定した細胞をPI/RNase Staining Buffer (BD Bioscience)で染色し、15分間室温で培養する。MACSQuant analyzerで測定しFlowJoで解析した。

・ **異種移植モデル：**

Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA)より購入し、オートクレーブ滅菌された環境下で繁殖・飼育したRag-/- IL-2 common gamma chain-/-マウスを使用した。27ゲージ針を用い、それぞれの細胞を 10^3 または 10^4 個ずつマウスの左下腹部皮下に移植した。全ての動物実験は山口大学における動物使用に関する規則の下に実施した。

・ **半定量real-time RT-PCR：**

RT-PCRで幹細胞関連遺伝子(KIT, ALDH1A1, NANOG)、上皮間葉転換(EMT) 関連遺伝子(CDH1, CDH2, VIM, FN1, SNAI1, SNAI2, ZEB1, ZEB2)を測

定した。半定量real-time RT-PCRは以前報告した方法に少し修正を加えて行った(15,16)。RNAはTRIzol reagent (Life Technologies, Tokyo, Japan)を用いて細胞から抽出した。Real-time PCRの増幅はLightCycler System Version 3 (Roche Diagnostics)の中のLightCycler 480 Probe Master (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)とUniversal ProbeLibrary probes (Roche Diagnostics)を用いて行った。primerとprobeはtable1に示した。増幅は95°C、10秒間の変性と、60°C、30秒間のアニーリング/伸長からなる2ステップの手順に従って実施した。mRNAは Δ/Δ threshold cycle (Ct)値から半定量的に測定した。リファレンスとしてGAPDHと β -actin (ACTB)を用いた。結果は親株と比較して表した。

・ サイトカイン・ケモカインの測定 :

YPK2とYPK5をそれぞれ2週間培養しサブコンフルエントの時の上清をSup-YPK2とSup-YPK5として回収した。sphere細胞をラミニンコートしたプレートに移して約1か月してYPK2-LmとYPK5-Lmがサブコンフルエントになった状態の上清をSup-Lm2とSup-Lm5として回収した。Bioplex assay (BioRad, Marne la Coquette, France)を用いて上清のサイトカイン・ケモカインを測定した。サンプルはトリプリケイトで解析した。以下の28種類のサイトカイン・ケモカインのタンパク濃度を測定した。TGF- β 、IL-1b、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、eotaxin、bFGF、G-CSF、GM-CSF、interferon (IFN)- γ 、immune protein (IP)-10、monocyte chemotactic protein (MCP)-1、macrophage inflammatory proteins (MIP)-1 α 、MIP-1 β 、platelet-derived growth factor (PDGF)-BB、regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted (RANTES)、tumor necrosis factor (TNF)- α 、vascular endothelial growth factor (VEGF)。

・ 解析 :

結果は平均値±標準偏差(SD)で提示した。統計にはマンホイットニーU検定を用いた。P<0.05を統計学的に有意とした。

5. 結果

・CSCの誘導

YPK2、YPK5をCSC誘導培地で培養を開始すると、一部の細胞は接着細胞となり、一部の細胞は数時間でspheroid細胞(YPK2-Sp、YPK5-Sp)となる(Fig.1A,D)。これらSpheroid細胞は1週間ほどで大きくなっていく。1週間後YPK2-Sp、YPK5-Spを回収しラミニンコートしたプレートに移すと、数時間で接着細胞となり、徐々に分裂しながら2か月にわたって増殖していく。ここで得られた細胞をYPK2-Lm、YPK5-Lmと命名した(Fig.1B,C,E,F)。3か月以上培養を続けると、増殖せずにアポトーシスになった。Fig.1GとHはそれぞれ親株であるYPK2とYPK5を10%FBS入りのDMEMで培養したもので、すぐに接着し増殖していった。

・細胞表面マーカー

一般的にCD24+/CD44+/ESA+細胞は膀胱癌細胞において幹細胞の性質を有する(7)。本研究においてCD24+/CD44+の割合は、YPK2(Fig.2A)、YPK5(Fig.2D)とも0.1%程度であったが、YPK2-Lmでは $7.5 \pm 2.6\%$ ($P=0.0211$, Fig.2B)、YPK5-Lmでは $11.1 \pm 2.8\%$ ($P=0.0211$, Fig.2E)とそれぞれ明らかに増えた。ESAの発現はYPK2、YPK5とも0.1%程度であるが、YPK2-SortLmでは23.2%、YPK5-SortLmでは36.2%と高かった(Fig.2C,F)。また最近はCSCにおけるCD44vの役割も注目されている(17,18)。Fig.2Gで示すようにYPK2-SortLmではYPK2-LmやYPK2に比べCD44vが高発現していた。YPK2におけるCD44vはわずか0.2%だったが、YPK2-Lmでは16.7%、YPK2-SortLmにおいては99.8%であった。Fig.2Hのよう

にYPK5においても同様の結果であった。CSC誘導培地からNSF-1やLIFを省くと、親株と同様なCD24-/CD44-細胞が豊富な集団となった(Fig2I,J)。

・ ALDH活性と細胞周期

化学療法抵抗性のメカニズムとしてALDH活性が関係している(19)。本研究では、YPK2、YPK5のALDH活性はそれぞれ68.5%、54.5%であったが、YPK2-Lm、YPK5-Lmはそれぞれ93.4%、92.0%と親株に比べ高いALDH活性を示した(Fig.3)。

多くのCSCはG0期にあり細胞周期を標的とした化学療法には影響を受けにくく、幹細胞の静止状態は、治療中止後の再発など癌に対する化学療法抵抗性に大きく関与している(20)。YPK2-LmやYPK5-Lmは親株のYPK2やYPK5に比べると静止期にある細胞が多かったが、統計学的有意差はなかった(Fig.4)。

・ 腫瘍形成能

YPK2細胞を 10^3 個マウスに移植しても腫瘍は形成されなかったが、YPK2-SortLmを 10^3 個マウスに移植したところ3例中3例に腫瘍が形成され、誘導した細胞の親株より強い腫瘍形成能が確認された。

・ 幹細胞と間葉系マーカーのmRNAの発現

癌細胞の遊走能や浸潤能といった転移能力はEMTと関連があるとされており、EMTとCSCの間にも関連があることがうかがわれる(21-25)。そこで我々は誘導した細胞がEMTの性質を持っているかどうかをRT-PCRで確認した(Fig.5)。結果は、KITやALDH1A1といった幹細胞関連遺伝子の発現はYPK2-Lm ($P=0.0095$, $P=0.0022$)、YPK5-Lm ($P=0.0022$, $P=0.0049$)で親株より有意に高かった(Fig. 5A)。NANOGはYPK2-Lm (YPK2-Lm; $P=0.005$, YPK-5Lm; $P=0.9361$)でのみ高かった。CDH2、VIM、SNAI1、SNAI2、ZEB1、ZEB2、FN1といった間葉系マーカーはYPK2よりYPK2-Lmで高かった($P=0.0022$) (Fig. 5C)。YPK5-Lm

ではSNAI1(P=0.026)とZEB2(P=0.0087)がYPK5より高かった。

・上清中のサイトカイン

癌とCSCとの間の微小周辺環境の相互関係を探求するため、それぞれの培養上清を用いてサイトカイン分析を行った(Fig.6)。b-FGF、IL-9、IP-10、RANTESはSup-Lm2、Sup-Lm5においてSup-YPK2、Sup-YPK5より有意に高かった(P<0.05)。G-CSFはSup-Lm2においてのみSup-YPK2より高かった(P=0.02)。TGF-β1、TGF-β3はSup-YPK2、Sup-YPK5においてSup-Lm2、Sup-Lm5より高かった(P<0.01)。IL-5はSup-YPK2においてのみSup-Lm2より高かった(P=0.015)。IL-12とPDGF-BBはSup-YPK5においてのみSup-Lm5より高かった(P=0.04、P=0.0027)。

6. 考察

我々はヒト膵癌細胞株から癌幹細胞豊富な集団を培養する方法を開発した。まず初めに1週間でヒト膵癌細胞株からspheroid細胞を作製する。次にこれらのspheroid細胞をラミニンコートしたプレートに移し、接着細胞として2, 3か月培養する。本研究ではYPK-LmのCD24陽性/CD44陽性細胞の割合は劇的に増え(Fig.2B, E)、それらのほとんどはCD44vやALDH活性を発現していた(Fig.2G, 3)。細胞周期の解析ではほとんどのYPK-LmはG0/G1期にあった(Fig.4)。SNAI1やZEB2といった間葉系関連のmRNAレベルや、KITやALDH1A1といった幹細胞関連のmRNAレベルはYPK-Lmで高く発現しており(Fig.5A, C)、YPK-LmがEMTを介して幹細胞性を獲得していることが示唆された。これらの結果をもって、我々が誘導した細胞は幹細胞性を獲得していると確認した。

CSCの顕著な特徴としては無血清培地で浮遊したsphereを形成することである(26)。CSCが、bFGFやEGFなどの因子を含む無血清培地の中でsphereを形成

して増殖することはいくつか報告されているが(27-30)、sphere環境下での幹細胞分裂に伴う分化と細胞死が問題となる(31)。一方で、接着環境下でのほとんどの細胞は一様に成長因子や酸素にさらされており、CSCは分化や細胞死せずに幹細胞性を失わずに維持できる。ラミニンは生物的に重要な基底層であり、生存はもちろんのこと、細胞分化、遊走、接着に影響を与えると報告されており(32,33)、Pollardらはneurosphere培養方法の制限を克服するため、ラミニンコートしたプレートでグリオーマ幹細胞を接着細胞として培養した(31)。本研究においても誘導した細胞はラミニンコートしたプレートに移すことにより、自己複製能を持ちながら幹細胞性や生存性を維持しながら増殖できた。またNSF-1やLIFを含む改良した幹細胞培地はCSCを豊富に含む集団を誘導したが、NSF-1やLIFを抜くと誘導することができず、CSC誘導にはbFGFやEGFなどに加えて神経刺激因子が重要であることが示唆された。

上清のサイトカインのデータからは、誘導し維持していくうえでCSCと癌細胞の間には大幅な違いが認められた(Fig.6)。典型例として、bFGF、IL-9、IP-10、RANTES、G-CSFはCSCを培養する上清で高く、TGF- β 1、TGF- β 3、IL-5、IL-12、PDGF-BBは癌細胞培養の上清で高かった。これらの相違点に注目していくことで癌とCSCの微小周辺環境を解明していける可能性があるが、言うまでもなくこの点はまだ研究としては未熟であり、培養でCSCを誘導するメカニズムを解明するにはさらなる研究が必要である。

従来癌に対する治療はCSCを標的としていなくCSCには効果がないため、最近CSCを標的とした治療の開発が試みられている(34,35)。しかし、癌組織からCSCの性質を探求するのに問題となるのは、CSCが非常に少数であるということである。本研究で確立した方法を用いると特別な機器を使用せずにCSCを増やすことができる。今回は癌細胞株からのCSCの誘導であったが、この

方法は新鮮な癌組織にも応用できると考えているが、この点についてはさらなる検討が必要である。今後我々はこの誘導した細胞を用いてCSCを標的とした新しい免疫療法の開発につなげたいと考えている。

7. 結語

我々はヒト肺癌細胞株からCSC豊富な集団を誘導する方法を確立した。この方法はCSCの性質を深く分析するのに非常に有用な方法で、CSCを標的とした新たな治療法開発の一助となると考える。

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり直接指導いただきました山口大学大学院医学系研究科 消化器・腫瘍外科学 助教吉村清博士（現 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 免疫療法開発分野 分野長）に感謝いたします。本研究遂行にあたりご指導、ご助言を頂きました山口大学大学院医学系研究科 消化器・腫瘍外科学 岡正朗前教授（現 山口大学学長）に深謝いたします。

9. 参考文献

1. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111, 2001.
2. Visvader JE and Lindeman GJ: Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8: 755-768, 2008.
3. Costello RT, Mallet F, Gaugler B, *et al*: Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res* 60: 4403-4411, 2000.
4. Dean M, Fojo T and Bates S: Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev*

Cancer 5: 275-284, 2005.

5. Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS, *et al* Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 16220-16225, 2002.
6. Siegel R, Naishadham D and Jemal A: Cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin 62: 10-29, 2012.
7. Li C, Heidt DG, Dalerba P, *et al* Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res 67: 1030-1037, 2007.
8. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, *et al* Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell Stem Cell 1: 313-323, 2007.
9. Eramo A, Lotti F, Sette G, *et al* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death Differ 15: 504-514, 2008.
10. Kondo T, Setoguchi T and Taga T: Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 781-786, 2004.
11. Wu C and Alman BA: Side population cells in human cancers. Cancer Lett 268: 1-9, 2008.
12. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, *et al* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature 445: 111-115, 2007.
13. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, *et al* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes Dev 17: 1253-1270, 2003.
14. Yamamoto K, Yahara N, Gondo T, Ishihara T, Oka M.: Establishment and characterization of a new human pancreatic cancer cell line, YPK-1. Bull Yamaguchi Med Sch. 49: 33-42, 2002
15. Tsunedomi R, Iizuka N, Tamesa T, *et al* Decreased ID2 promotes metastatic potentials of hepatocellular carcinoma by altering secretion of vascular endothelial growth factor. Clin Cancer Res 14: 1025-1031, 2008.
16. Tsunedomi R, Iizuka N, Harada S and Oka M: Susceptibility of hepatoma-derived cells to histone deacetylase inhibitors is associated with ID2 expression. Int J Oncol 42: 1159-1166, 2013.
17. Nagano O, Okazaki S and Saya H: Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. Oncogene 2013.
18. Tanabe KK, Ellis LM and Saya H: Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. Lancet 341: 725-726, 1993.
19. Abdullah LN and Chow EK: Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. Clin Transl Med 2: 3, 2013.
20. Dick JE: Stem cell concepts renew cancer research. Blood 112: 4793-4807, 2008.

21. Thiery JP, Acloque H, Huang RY and Nieto MA: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871-890, 2009.
22. Prat A, Parker JS, Karginova O, *et al*: Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res* 12: R68, 2010.
23. Polyak K and Weinberg RA: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9: 265-273, 2009.
24. Mani SA, Guo W, Liao MJ, *et al*: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704-715, 2008.
25. Morel AP, Lievre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S and Puisieux A: Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 3: e2888, 2008.
26. Mor G, Yin G, Chefetz I, Yang Y and Alvero A: Ovarian cancer stem cells and inflammation. *Cancer Biol Ther* 11: 708-713, 2011.
27. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, *et al*: Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 14: 4085-4095, 2008.
28. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, *et al*: Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9: 391-403, 2006.
29. Hueng DY, Sytwu HK, Huang SM, Chang C and Ma HI: Isolation and characterization of tumor stem-like cells from human meningiomas. *J Neurooncol* 104: 45-53, 2011.
30. Zhong Y, Guan K, Guo S, *et al*: Spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line are enriched in cancer stem cells. *Cancer Lett* 299: 150-160, 2010.
31. Pollard SM, Yoshikawa K, Clarke ID, *et al*: Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4: 568-580, 2009.
32. Ziober AF, Falls EM and Ziober BL: The extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma: friend or foe? *Head Neck* 28: 740-749, 2006.
33. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM and Martin GR: Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254: 9933-9937, 1979.
34. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, *et al*: A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11: 69-82, 2007.
35. Takeishi S, Matsumoto A, Onoyama I, Naka K, Hirao A and Nakayama KI: Ablation of Fbxw7 eliminates leukemia-initiating cells by preventing quiescence. *Cancer Cell* 23: 347-361, 2013.

Table 1 Primers and probes

symbol	name	UPL probe #	Seq. (5' → 3')
KIT (C-Kit, CD117)	KIT-S	71	cttcctcgcctccaagaat
	KIT-AS		gtgatccgaccatgagtaagg
ALDH1A1	ALDH1A1-S	14	tttggaggattcaagatgctcg
	ALDH1A1-AS		cactgtgactgttttgacctcg
NANOG	NANOG-S	31	agatgcctcacacggagact
	NANOG-AS		tttgcgacactcttctctgc
CDH1 (E-cadherin)	CDH1-S	35	cccgggacaacgttattac
	CDH1-AS		gctggctcaagtcaaagtc
CDH2 (N-cadherin)	CDH2-S	80	agtatccgggtccgatctgc
	CDH2-AS		ctgtggggctcattgtcagc
VIM (vimentin)	VIM-S	13	tacaggaagctgctggaagg
	VIM-AS		accagagggagtgaatccag
FN1	FN1-S	60	aagagcgagcccctgatt
	FN1-AS		atgaagattgggggtgtggaa
SNAI1	SNAI1-S	10	catgtccggaccacact
	SNAI1-AS		tggcactggtacttcttgaca
SNAI2 (SLUG)	SNAI2-S	7	tggttgcttcaaggacacat
	SNAI2-AS		gttgcagtgagggcaagaa
ZEB1	ZEB1-S	36	cctaaaagagcacttaagaattcacag
	ZEB1-AS		catttcttactgcttatgtgtgagc
ZEB2 (SIP1)	ZEB2-S	68	aagccagggacagatcagc
	ZEB2-AS		ccacactctgtgcattgaact

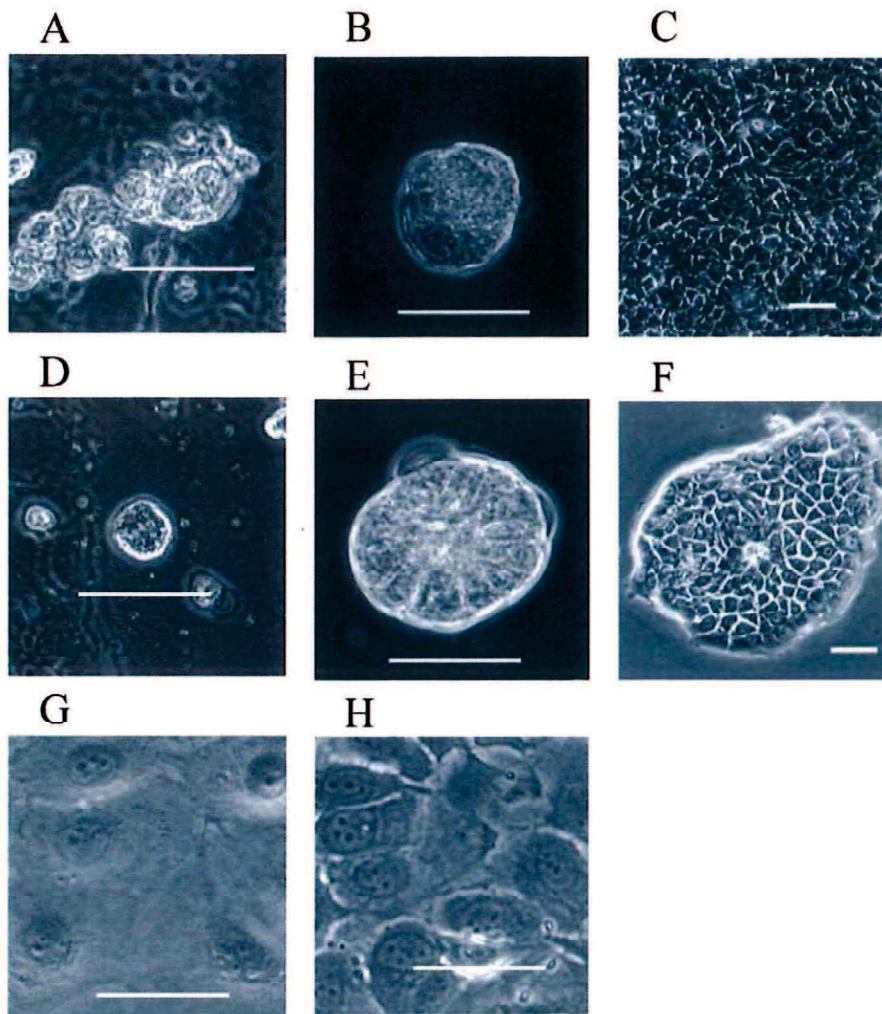


Figure 1 Sphere細胞、CSC豊富な集団、親株の培養写真

YPK2、YPK5をCSC誘導培地で培養を行うと数時間で細胞の一部でsphere細胞が形成される(A:YPK2, D:YPK5)。1週間培養したこのsphere細胞をラミニンコートしたプレートに移すと接着細胞となる(B:YPK2, E:YPK5)。さらに2か月間培養を続けると増殖を続ける(C:YPK2, F:YPK5)。GはYPK2を、HはYPK5を通常の10%FBS入りDMEMで培養を行った状態。scale barは50 μ m。

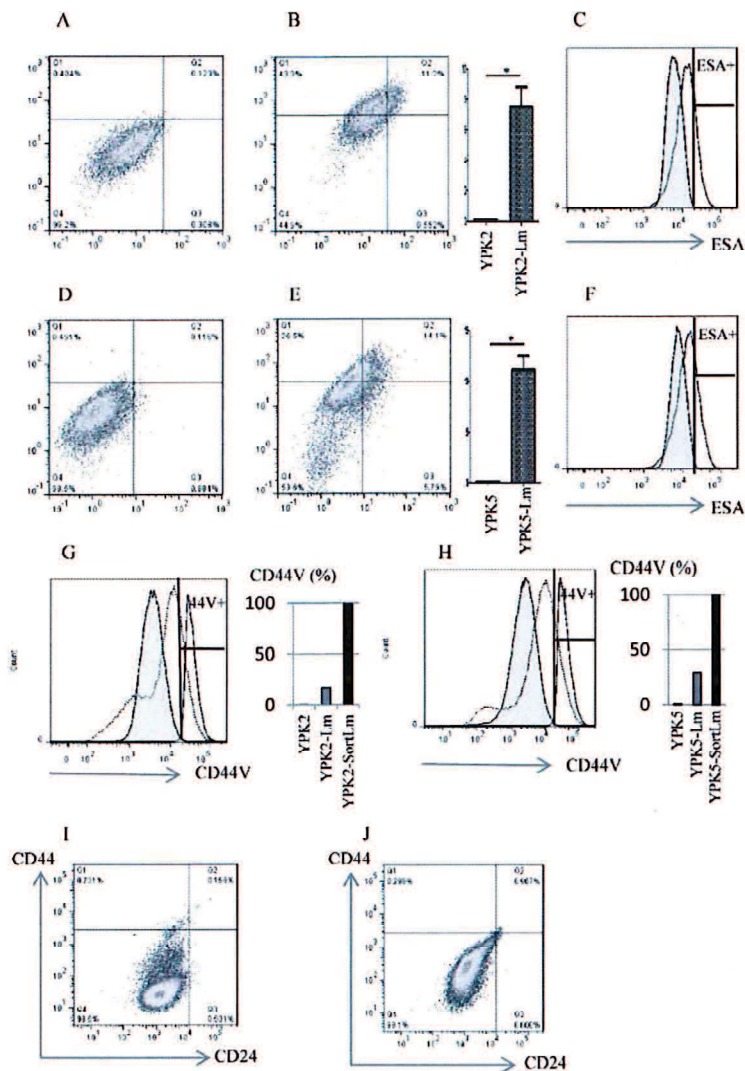


Figure 2 CD24, CD44, CD44v, ESAの発現

CD24+/CD44+の割合はYPK2で0.1% (A)、YPK5でも0.1% (D)だったが、YPK2-Lmでは7.5 ± 2.6% (B)、YPK5-Lmでは11.1 ± 2.8%と有意に増加した(P<0.05)。

YPK2 (Cの実線)ではESAは0.1%しか発現していなかったが、YPK2-SortLm (Cの網掛け線)では23.2%発現していた。同様にYPK5 (Fの実線)においてもESAは0.1%しか発現していなかったが、YPK5-SortLm (Fの網掛け線)では36.2%発現し

ていた。GとHはCD44^vの発現割合を見たもので、YPK2 (Gの網掛け線)とYPK5 (Hの網掛け線)ではほぼ発現していなかったが、YPK2-Lm (Gの点線)、YPK5-Lm (Hの点線)では16.7%の発現があり、YPK2-SortLm (Gの実線)、YPK5-SortLm (Hの実線)では99.8%発現していた。IはYPK2を、NSF-1を抜いたCSC誘導培地で、JはLIFを抜いたCSC誘導培地で培養した細胞のCD24/CD44の発現を見たものだが、いずれも親株と同様CD24/CD44の発現は低かった。

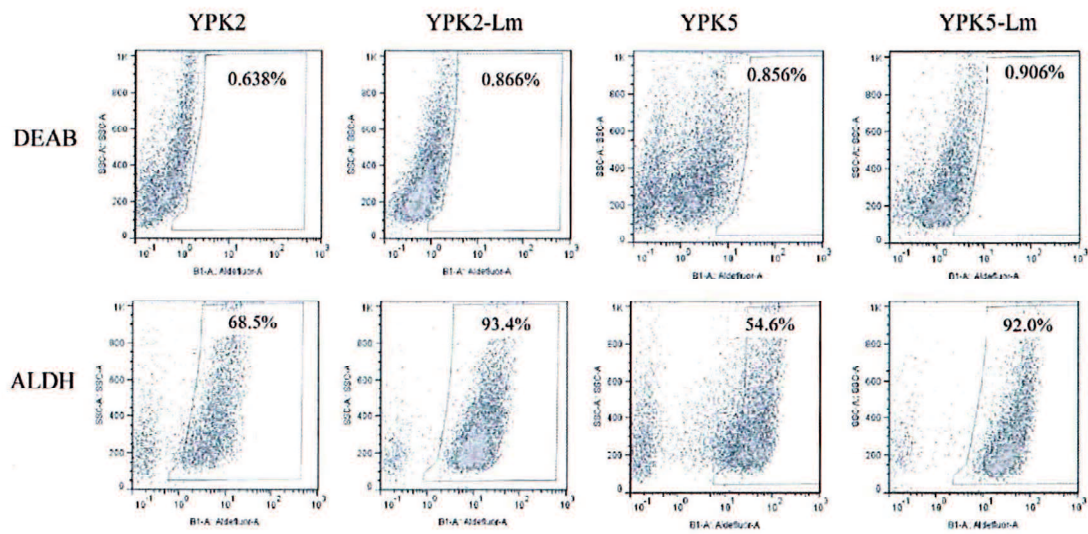


Figure 3 ALDH活性

上段はネガティブコントロールとしてALDHを特異的に拮抗するDEABで処理した細胞である。下段はALDH活性を見たものである。YPK2-Lm、YPK5-LmのALDH活性はそれぞれ93.4%、92.0%と、親株であるYPK2、YPK5の68.5%、54.6%より高い活性を示した。

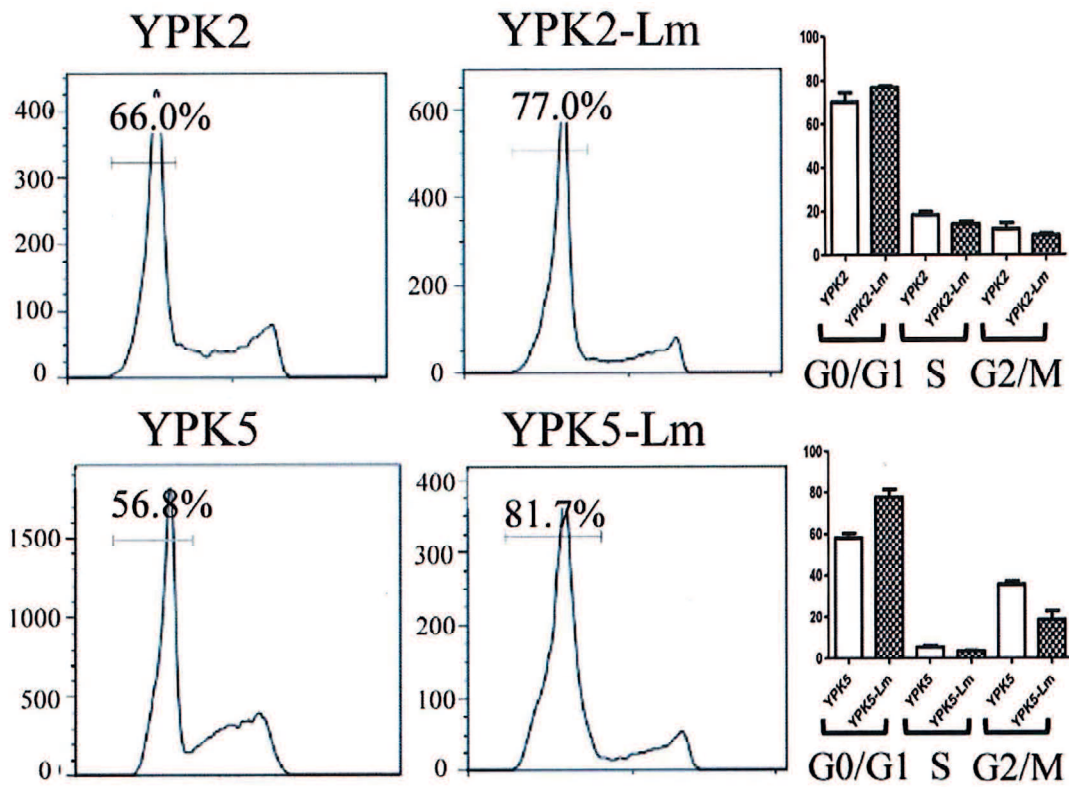


Figure 4 細胞周期

休止期にあるG0/G1細胞の割合は、YPK2-Lm、YPK5-Lmで親株のYPK2、YPK5より多い傾向にあったが統計学的有意差はなかった。

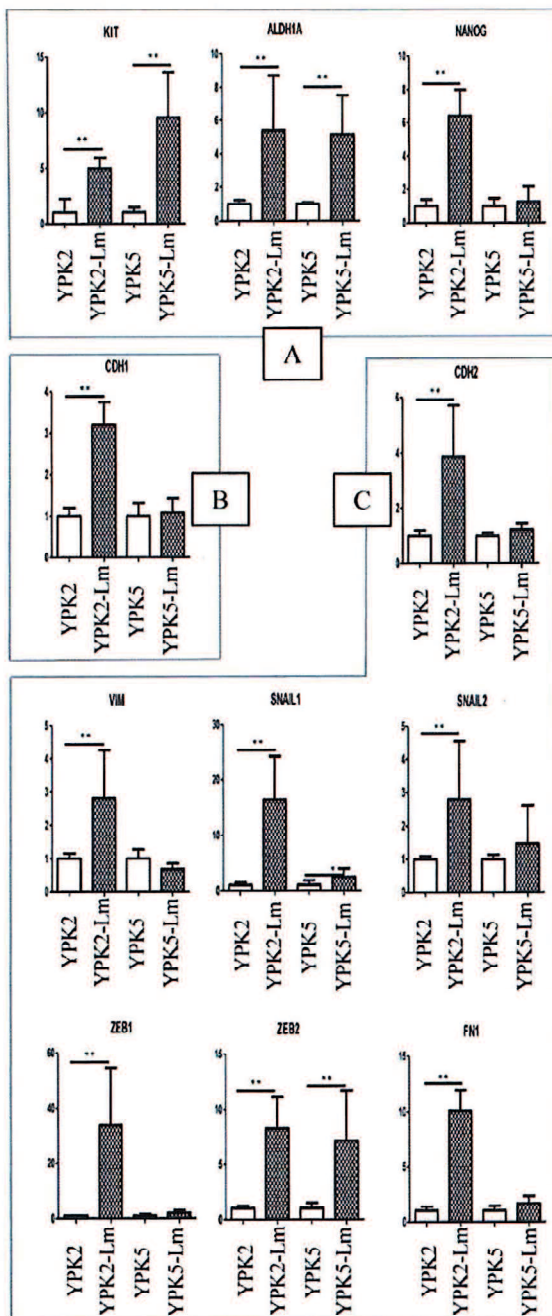


Figure 5 EMT関連遺伝子の発現

Aは幹細胞性関連遺伝子発現を見ており、KITとALDH1A1の発現はYPK2-Lm (P=0.0095, P=0.0022)、YPK5-Lm (P=0.0022, P=0.0049)いずれにおいても親株の

YPK2、YPK5より高かった。

Bは上皮系関連遺伝子の発現を見ており、CDH1はYPK2-LmにおいてYPK2よりも高かった。

Cは間葉系関連遺伝子の発現を見ており、CDH2、VIM、SNAI1、SNAI2、ZEB1、ZEB2、FN1は、YPK2-LmにおいてYPK2より有意に高かった(P=0.0022)。SNAI1とZEB2はYPK5-LmにおいてもYPK5より高かった(P=0.026, P=0.0087)。

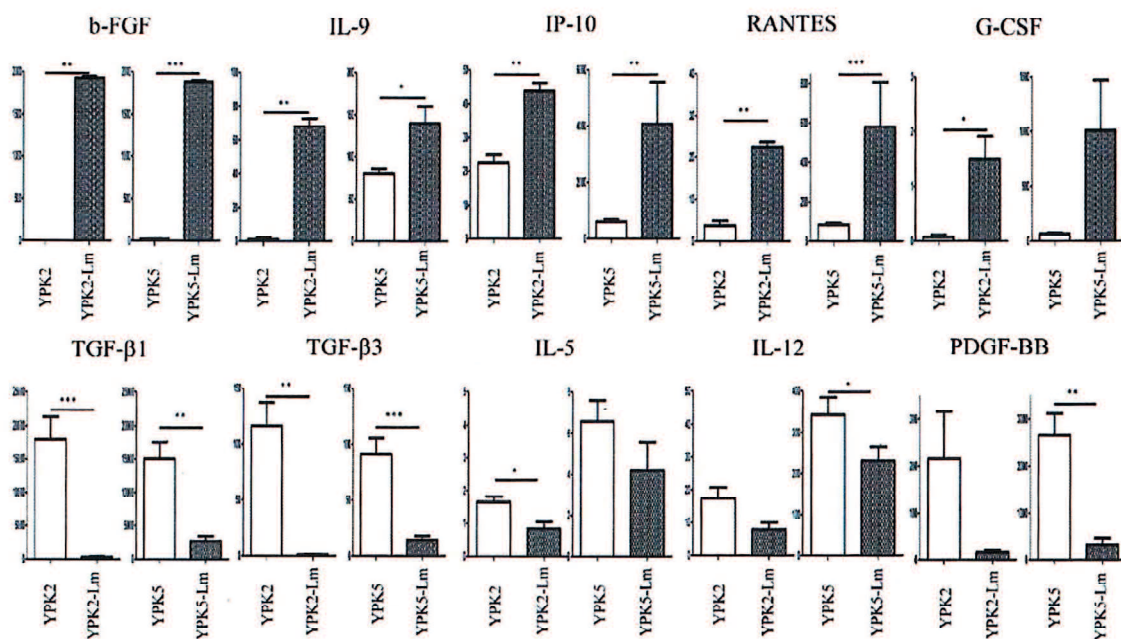


Figure 6 上清中のサイトカイン

b-FGF、IL-9、IP-10、RANTESはCSC培地であるSup-Lm2、Sup-Lm5において親株の培地であるSup-YPK2、Sup-YPK5より有意に高かった。G-CSFにおいても同様の傾向があった。

TGF-β1、TGF-β3は、Sup-YPK2、Sup-YPK5においてSup-Lm2、Sup-Lm5より高く、IL-5においても同様の傾向があった。