

肝癌由来細胞株から誘導した
癌幹細胞様細胞における転移能
および上皮間葉系転換に関する解析

氏名 西山 光郎

所属 山口大学大学院 医学系研究科

博士後期課程

応用分子生命科学系専攻

平成 30 年 6 月

目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	6
5. 考察	7
6. 謝辞	9
7. 参考文献	9
8. 図表	14

1. 要旨

癌幹細胞(CSC)は腫瘍内に少ない割合で存在しており、腫瘍新生能や転移能、再発、抗がん剤耐性において重要な役割を担っていると考えられている。分化した癌細胞に上皮間葉系転換(EMT)を起こすことで CSC が誘導できることが報告されており、その理論の下に当科では独自の培地を用いて癌幹細胞様細胞(CSLC)の誘導に成功し、抗がん剤耐性について以前に報告した。今回は誘導した CSLC の転移能を調べ、さらに CSLC に対する網羅的発現解析を行った。肝癌由来細胞株である SK-HEP-1 を用いて通常の培地で培養した細胞と NSF-1 などを含む sphere 誘導培地を用いて得た CSLC を超免疫不全マウスの脾臓に注射し、肝転移の形成を比較した。また flow cytometry や RT-PCR によって EMT マーカーや EMT 関連 mRNA の発現を調べた。さらに、次世代シーケンサーを用いて網羅的な解析を行った。CSLC は親株と比較すると 1×10^3 細胞の脾注において肝転移を形成した頻度が有意に高かった。間葉系マーカーである Vimentin の発現は CSLC で発現が亢進しており、EMT 転写促進因子である TWIST1, SNAIL の mRNA 発現も亢進していた。次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq に続く Gene set enrichment analysis にて hypoxia、EMT に関連する遺伝子群の発現が CSLC で有意に亢進していた。最も一般的な CSC マーカーである CD44 について isoform 解析を行ったところ、extra exon を有する CD44v の発現亢進がみられたとともに、CD44-short tail の発現亢進も認めた。誘導した CSLC は抗がん剤耐性に加えて高い転移能を示した。EMT, CD44v, CD44-short tail と癌幹細胞性質の関連が示唆された。

2. 背景

癌幹細胞(CSC)は腫瘍内に少ない割合で存在しており、腫瘍新生能や転移能、再発、抗がん剤耐性において重要な役割を担っていると考えられている(1,2)。CD44, CD133, CD90, CD13, aldehyde dehydrogenase, and epithelial cell adhesion molecules といった CSC マーカーの発現が、近年の様々な固形がんに対する研究から同定されてきており、不良な予後との関連も示唆されている(3-7)。分化した癌細胞に上皮間葉系転換(EMT)を起こすことで CSC の性質を誘導できることが報告されており(8,9)、その理論の下に当科では独自の培地を用いていくつかの細胞株から癌幹細胞様細胞(CSLC)の誘導に成功し(10-12)、抗癌剤耐性について報告した(12)。

癌の転移は癌患者において癌死の原因となる主な病態である。肝臓癌は肝切除術や肝移植のような根治的な治療後でさえも肝内再発のために、予後がきわめて不良である(13-15)。全身をめぐる血液循環内において生存できる一部の癌細胞のみが、臨床的に問題となる転移を引き起こすことができる(16)。これらの細胞が CSC と考えられており、生体外、生体内の実験系で亢進した転移能を有することが報告されている(17-19)。

本研究では、超免疫不全マウスの脾臓に注射する実験系で我々の誘導した CSLC の転移能を評価し、さらに CSLC の転移能と関連する遺伝子等について網羅的な解析を行った。

3. 方法

【細胞株】

ヒト肝癌由来細胞株である SK-HEP-1 および HuH-7 を ATCC (Rockville, MD, USA) およびヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪、日本) より購入した。

SK-HEP-1 は低分化の肝癌由来細胞株、HuH-7 細胞系は高分化の肝癌由来細胞株である。

各細胞株は 10%非働化ウシ胎児血清 (Thermo Fisher Scientific、神奈川、日本) を添加した DMEN 培地 (Nissui Pharmaceutical、東京、日本) にペニシリン (100U / mL)、ストレプトマイシン (100 μ g / mL)、および重炭酸ナトリウムを加えて 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。

【sphere 細胞の誘導】

sphere 誘導培地を用いて各種細胞株より sphere 細胞を誘導した(12)。

sphere 誘導培地は神経幹細胞培地を元に 2 μ g / mL のヘパリン (Sigma-Aldrich Japan、東京、日本)、10ng/ml のヒト組換え epidermal growth factor (Sigma-Aldrich Japan)、10ng/mL の basic fibroblast growth factor (Merck Millipore、東京、日本)、10ng/mL の eukemia inhibitory factor (Merck Millipore)、60 μ g / mL の N-アセチル-L-システイン (Sigma-Aldrich)、および neural survival factor-1 (Lonza、東京、日本) を用いて作成した。

【腫瘍細胞の脾臓注入】

NOD-Rag1 null IL2rc null double mutant mice (NRG マウス) を Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入し、オートクレーブで滅菌したケージ、食物を用いて HEPA フィルター空調管理下で飼育した。

肝臓組織のパラフィン切片を H&E で染色し、その後、BZ-X700 顕微鏡 (Keyence、大阪、日本) を用いて全切片の画像を得た。腫瘍領域の面積割合は、BZ-X アナライザー (Keyence) を用いて計算した。全ての動物実験は山口大学動物使用委員会 (宇部、日本) の規則に基づき実施し、米国 NIH (Bethesda, MD, USA) の実験動物のケアおよび使用ガイドに一致した。

SK-HEP-1 および SK-sphere 細胞の肝転移形成能を、8~12 週齢の雌 NRG マウスの脾臓に注入して評価した。NRG マウスを 2%イソフルランの吸入麻酔下に仰臥位として左腹部に切開をおいて開腹し脾臓を露出した。Hank's 平衡塩溶液 (Thermo Fisher Scientific) 0.1mL 中に含む 1×10^3 の 3 乗もしくは 4 乗の腫瘍細胞を 27 ゲージ針で脾臓に注入し、次いで脾臓を切除した。創部は金属クリップで閉腹した。8 週間後にマウスを剖検し、肝転移の形成を調べた。

【RNA シークエンス】

SK-HEP-1 および SK-sphere 細胞を TRIzol (Thermo Fisher Scientific) を用いて溶解し、全 RNA を miRNeasy Mini Kit (Qiagen、東京、日本) で単離した。バイオアナライザー (Agilent Technologies、東京、日本) により RNA のクオリティコントロールを行った。

シーケン斯拉イブラリは、TruSeq Stranded Total RNA with RiboZero Gold LT Sample Prep キット (Illumina、東京、日本) を用いて調製した。Qubit dsDNA HS Assay キットおよび Qubit 2.0 蛍光光度計 (Thermo Fisher Scientific) を使用して、バイオアナライザならびに蛍光光度法によって定量化した後、ライブラリを保存した。

NextSeq 500 シーケンシングプラットフォーム (Illumina) でペアフラグメント (75bp×2) シーケンスを行った。SK-HEP-1 および SK-sphere 細胞については 3 回シーケンスを行い、1 億 2300 万-1 億 5000 万のペアエンドフラグメントが得られ、HuH-7 細胞について 2 回行い 4200~4600 万のペアエンドフラグメントが得られた。

各サンプルデータを、バーコードの組み合わせを使用して分離し、FASTQ ファイルを作成した。次世代シーケンシングデータは、cutadapt (バージョン 1.8.3) (20) および cmpfastq_pe.pl (http://compbio.brc.iop.kcl.ac.uk/software/cmpfastq_pe.php) を使用してクリーニングした。クオリティコントロールを行った後、STAR (version2.5.1b) 2-パスマッピングを用いて、フィルタリングしたショートリードをヒト参照配列 (hg38) にマッピングした (21)。各サンプルのリードカウント数は、TMM 法(trimmed mean of M value)(22)で TCC パッケージ(23,24)を用いて正規化した。差異的に発現した遺伝子を、false discovery rate を示す q 値が 0.05 未満のもので発現比が 2 倍を超える変化を示す遺伝子とした。gene set enrichment 解析は、Java コマンドラインプログラム GSEA 2 (バージョン 2.2.1) を用いて行った(25)。

【CD44 isoform の定量】

SK-HEP-1 および SK-sphere 細胞の RNA シーケンシングで 1 億以上のペアエンドフラグメントを得たので、CD44 isoform の発現を評価した。isoform の定量化は、Cufflinks (バージョン 2.2.1) の Cuffdiff プログラムによって、STAR プログラムより生成した BAM ファイルを用いて行った(26)。

【フローサイトメトリー】

細胞培養後、SK-HEP-1 および SK-sphere 細胞をそれぞれ Accumax および Accutase (Innovative Cell Technologies、San Diego、CA、USA) で遊離した。遊離した細胞を、死細胞と区別するために、Fixable Viability Dye eFluor 450 (Thermo Fisher Scientific) で染色した。フローサイトメトリーに際して用いた抗体は PE 標識抗ビメンチン抗体 (MAB4527; Abnova、Taipei、Taiwan) および FITC 標識抗 EpCAM 抗体 (130-080-301; Miltenyi Biotec、Tokyo、Japan) を用い、ネガティブコントロールとして、PE 標識および FITC 標識マウス IgG1 抗体 (R&D Systems、Minneapolis、MN、USA) をそれぞれ使用した。CD44 variant を染色するために、抗 CD44v9 (Cosmo Bio、Tokyo、Japan) および FITC 標識マウス抗ラット IgG 抗体(Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ一次抗体および二次抗体として使用した。抗 CD44v9 抗体のネガティブコントロールとしてラット IgG2a アイソタイプコントロール (Thermo Fisher Scientific) を用いた。フローサイトメトリーは、MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec) を用いて行った。

【定量リアルタイム PCR】

EMT 関連遺伝子の発現レベルを、qRT-PCR によって解析した(27)。PCR 増幅は LightCycler System Version 3 (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を用いて行い、LightCycler 480 Probe Master (Roche Diagnostics) および Universal ProbeLibrary Probes (Roche Diagnostics) を用いた。プライマーおよびプローブを表 1 に示す。PCR 反応は二段階サイクル法を用いて、95°C で 10 秒間の変性と 60°C、30 秒間のアニーリングを 45 サイクル行った。mRNA レベルは、 Δ / Δ 閾値サイクル法 (threshold cycle, Ct) 法を用いて解析した。比較対象遺伝子としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)) およびホスホグリセリン酸キナーゼ 1 (Phosphoglycerate kinase1 (PGK1)) をコントロールとして使用した。値は、SK-HEP-1 と比して表記し、各定量は 3 回行った。

【統計解析】

各実験は 3 回以上繰り返し行い、実験データは平均値±標準偏差で表記した。統計学的有意差は、R version 3.4.0 software (R プロジェクトウェブサイト <http://www.r-project.org/>) を使用して、フィッシャーの正確確率検定、スチューデントの t 検定またはウェルチの t 検定を用い、P 値<0.05 を有意差ありとした。

4. 結果

【CSLC の肝転移能】

我々は、誘導した CSLC である SK-sphere 細胞の肝転移能を調べた (図 1)。NRG マウスに 1×10^3 の 3 乗個の細胞を脾注したところ、SK-sphere 細胞は親株の SK-HEP-1 と比較して肝転移を形成する頻度が有意に高かった (P < 0.05)。腹膜播腫の形成は SK-sphere 細胞で 4/18 (22%)、親株で 0/22 (0%) で認められた (P < 0.05)。 1×10^4 の 4 乗個の細胞を脾注した場合は肝転移を形成する頻度は差を認めなかったが、肝臓内に腫瘍が占める面積の割合は有意に SK-sphere 細胞で増加していた ($57 \pm 26\%$ vs $10 \pm 3.4\%$ 、P < 0.05)。

【CSLC における網羅的 mRNA 発現解析】

定量的 RNA-seq 解析を用いて SK-sphere 細胞および SK-HEP-1 における網羅的な mRNA レベルを測定した。正規化後、mRNA 発現プロファイルは、SK-sphere 細胞、親株の SK-HEP-1、および非 sphere 形成株の HuH-7 の間で異なった (図 2A)。SK-sphere 細胞と SK-HEP-1 間でリードカウントに有意差を認める 2067 の遺伝子を検出した (fold change > 2.0; q-value < 0.05 において 1328 の発現亢進した遺伝子および 739 個の発現低下した遺伝子を含めた。) (図 2B、マゼンタの点)。sphere 形成能を持たない HuH-7 細胞の mRNA の発現を考慮すると、SK-sphere 細胞では 657 個の遺伝子 (518 個の上方制御され、139 個の下方制御された遺伝子) が特異的、差次的に発現する遺伝子として残った (図 2B、緑色の点)。SK-sphere 細胞および SK-HEP-1 の mRNA 発現プロファイルを用いた Gene set enrichment 解析では、NF- κ B を介した腫瘍壊死因子- α (TNF- α) シグナル、hypoxia、および EMT に関連する遺伝子群が SK-sphere 細胞で有意に発現亢進していた (図 3; 表 S1)。

【CSLCにおけるEMTに関連する遺伝子の発現】

EMT 関連する遺伝子の発現を、フローサイトメトリーおよび qRT-PCR によって調べた。間葉系マーカービメンチンが陽性であり、上皮マーカーEpCAM が陰性である細胞集団は、SK-HEP-1 では 19.9%であったが、SK-sphere 細胞では 36.3%と増加していた (図 4)。興味深いことに、ビメンチン陽性細胞の 94.9%は CD44v9 も陽性であった (図 S1)。同様に、EMT 転写促進因子のうち、TWIST1 および SNAI1 の mRNA レベルは、SK-HEP-1 と比較して SK-sphere 細胞で 2.2 倍および 60.7 倍高かった ($P < 0.05$; 図 5)。HMGA2 の mRNA レベルもまた SK-sphere 細胞において有意に発現が亢進した ($P < 0.05$; 図 5)。

【CSLCにおけるCD44variant isoform解析】

CD44 にはいくつかの variant isoform が存在し、CSC マーカーであることが知られている (図 6A)。我々は CD44 isoform の発現について詳細に解析した。(図 6B)。SK-sphere 細胞における CD44 standard isoform の遺伝子発現量、FPKM 値は、親細胞と比較して 0.6 倍と発現が低下していた。対照的に、CD44v8-10 の FPKM 値は 2.9 倍と発現が増加した。さらに興味深いことに、短い細胞質領域ドメインを持つ CD44 short-tail variant isoform の FPKM 値は 8.8 倍と CD44v8-10 よりも発現が亢進していた。全 CD44 isoform に対する CD44 short-tail variant isoform の発現割合は、親株の SK-HEP-1 では 1.0%であったが、SK-sphere 細胞では 11.7%と増加しており、CD44v8-10 isoform の発現は、SK-HEP-1 における 0.4%と比較して、SK-sphere 細胞で 1.4%まで増加していた。さらに、肝細胞癌の切除標本から得られた検体では予後不良の症例では、長期無再発の症例に比べて CD44 short-tail isoform の発現割合が増加していた (図 S2)。

5. 考察

我々は今回の研究で肝癌由来の細胞株から誘導した CSLC が、転移能をもつことを調べた。超免疫不全マウスに SK-sphere 細胞を脾注することで、親株の SK-HEP-1 と比較して肝転移が増加するという結果を示した (図 1)。SK-sphere 細胞において EMT と hypoxia に関連した遺伝子の発現亢進が見られることと一致して、EMT マーカーであるビメンチンや EMT 関連の転写因子も同様に発現が増加していた。それに加え、CD44 isoform の発現解析では SK-sphere 細胞で CD44 standard isoform の発現が低下し、一方で CD44 variant isoform の発現は増加していた。

脾注モデルの実験系において、CSLC は血液循環内で生存し、血管内から肝臓へと移行し、臓器内で腫瘍を形成しなければならない(28)。この過程は実臨床における血行性転移に似通っている。一方で、皮下注モデルでの腫瘍新生能においては CSLC と親株との間に差を示すことが出来なかった(未公表データ)。肝癌における CSC のマーカーとして一般的なものは CD133 であり、CD133+の細胞は CD133-の細胞と比較して高い自己複製能と腫瘍形成能を示すと報告されている。(29, 30)。皮下注モデルで示される腫瘍新生能は CSC の一つの性質ではあるが、EMT を引き起こすサイトカインを介して誘導した乳癌の CD44+ /CD24- /low CSLC と親株の間には皮下注モデルでの腫瘍形成能は差がないとの報告もある(31)。

興味深いことに我々の誘導した CSLC は 典型的な肝癌の CSC と異なり、CD133-/CD44high/CD24low の細胞集団であった(12)。

近年の研究知見と一致して、EMT 関連遺伝子の発現は CSLC において増加していた(図 3C)。以前の研究では、EMT の発現亢進が転移能および CSC の性質に関連することが報告されている(32-38)。実際の間葉系マーカーであるビメンチンが陽性である細胞の割合や EMT 転写促進因子である Twist1 および Snail の発現は、CSLC において増加していた(図 4, 5)。let-7a-5p マイクロ RNA の標的である High mobility group AT-hook 2 (HMGA2) は、肝癌を含むいくつかの癌において高い転移能、予後不良、および EMT の誘導と関連している(39-41)。我々は、マイクロアレイおよび TRAQ 標識、二次元液体クロマトグラフィ、タンデム型質量分析により、SK-sphere 細胞における let-7a-5p マイクロ RNA レベルの発現低下および HMGA2 タンパク質レベルの上昇をそれぞれ観察し、(未発表データ) また、上昇した HMGA2 のレベルを qRT-PCR 解析により確認した(図 5)。全体として、我々の行った実験結果は、誘導した CSLC は CD133 の発現および皮下注モデルにおける腫瘍新生能において典型的な肝癌の CSC とは異なるが、EMT が CSC の性質である転移能を増強することを支持する結果であった。

hypoxia は薬物耐性を引き起こすことが報告されている(42, 43)。RNA シークエンスに続いて gene set enrichment 解析を行ったところ、EMT 関連の遺伝子群だけでなく、hypoxia 関連の遺伝子群も有意に高発現であった(図 3B)。この結果は、誘導した CSLC が薬物耐性を持ち、より高い HIF1A mRNA レベルを発現したという我々の以前の報告と一致した(12)。

Gene Set Enrichment 解析は、NF- κ B シグナルを介した TNF- α シグナル伝達に関連する遺伝子群が CSLC において高発現であった。(図 3A)。過去の報告において慢性骨髄性白血病および急性骨髄性白血病の白血病 CSC では、TNF- α 分泌によって NF- κ B 活性が促進したとの報告や(44, 45)。TNF シグナル伝達が亢進した CD24-/CD44+ の乳癌 CSC は、非 CSC と比較してより高い NF- κ B 活性を有していたとの報告がある(46)。また、TNF- α の処置を施すことでいくつかの癌細胞株では NF- κ B 依存性に Snail の発現が安定化し、EMT を引き起こし、細胞侵襲性が増加した(38, 47)。

我々の以前の研究では、CSLC は CD44v9 陽性細胞が増加していた(12)。CD44 variant isoform は、多くの癌の CSC マーカーであると考えられている(48)。CD44v9 のような余剰な細胞外ドメインを有する CD44 variant isoform は、CSC の抗癌剤耐性と機能的に関連していると言われている。CD44 variant isoform は、細胞膜中のシスチントランスポーターである xCT に結合し、安定化する。その結果、抗酸化物質であるグルタチオンが生産され、酸化ストレスに対する抵抗性を高めると言われている(49, 50)。さらに、CD44 variant isoform は、ラットにおいて膵臓癌細胞の転移能を亢進させるとの報告や(51)、CD44v3、v8-10、および MMP9 は、細胞表面上で互いに結合することができ、これらの相互作用が細胞浸潤および移動のプロセスに寄与する ECM の分解をもたらす(52)との報告がある。興味

深いことに、CD44v8-10 isoform に加えて、誘導した CSLC は元々発現の非常に乏しい CD44 short-tail variant isoform の発現が増加していた (図 6)。CD44 short-tail variant isoform は、他の CD44 isoform と比較してその存在量が非常に少ないため、研究対象となることがあまりなかった(53, 54)。したがって、CD44 short-tail variant isoform に関する報告は少なく、癌および CSC におけるその役割はほとんど知られていない。いくつかの既存の報告の中で、CD44 short-tail variant isoform をノックダウンさせると、ヒアルロン酸の内部移行を促進し、特定の軟骨細胞において細胞関連マトリックスを減少させることが示された(55)。さらに、予後が不良な HCC は、予後が良好な HCC と比較して CD44 short-tail variant isoform が高い割合を示した (図 S2)。我々の RNA-seq データではヘキソサミン合成経路律速酵素であるグルタミン-フルクトース-6-リン酸トランスアミナーゼ 1 をコードする GFPT1 (GFAT1 とも言われる) の mRNA レベルが親株と比較して CSLC で (2.2 倍)、また予後良好な HCC と比較して予後不良の HCC で (1.8 倍) 有意に高かった(未公表データ)。アンタゴニストによる GFPT1 の阻害は、ヘキソサミン合成経路依存性のヒアルロン酸産生、HIF1 α シグナル、および CD44 high/ CD24low の乳癌の CSLC を減少させたという報告がある(56)。まとめると、CD44 short-tail variant isoform は、ヒアルロン酸代謝および/またはシグナル伝達を介して CSC の特性に関連している可能性がある。CSC における CD44 short-tail variant isoform の役割を明らかにするために、さらなる研究が必要である。

【結語】

我々の誘導した CSLC は、抗癌剤耐性に加えて高い転移能を示した。EMT および CD44 short-tail variant isoform および v8-10 isoform を含む CD44 variant isoform は CSC の性質と関連する可能性がある。本研究で用いた CSLC は、ヒト肝癌の予後不良の原因である可能性がある。したがって、CSLC および臨床検体を統合してのさらなる詳細な研究が、肝臓癌のための重要な治療標的遺伝子を明らかにできる可能性がある。

6. 謝辞

本研究にあたり、直接ご指導を頂きました恒富亮一 先生、永野浩昭 先生に深く感謝いたします。

また技術的支援をしていただいた佐野晶子さんに深謝します。

本研究は JSPS 科研費 JP16K10574, JP 25861192, JP 24659610 の助成を受けて行われたものです。

7. 参考文献

1. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011;469:314-322.
2. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell*. 2012;10:717-728.

3. Botchkina G. Colon cancer stem cells—from basic to clinical application. *Cancer Lett.* 2013;338:127–140.
4. Yang Z, Ho D, Ng M, et al. Significance of CD90 + cancerstem cells in human liver cancer. *Cancer Cell.* 2008;13:153–166.
5. Brungs D, Aghmesheh M, Vine KL, Becker TM, Carolan MG, Ranson M. Gastric cancer stem cells: evidence, potential markers, and clinical implications. *J Gastroenterol.* 2016;51:313326.
6. Croker AK, Goodale D, Chu J, et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med.* 2009;13:2236–2252.
7. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, et al. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest.* 2010;120:3326–3339.
8. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial–mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133:704–715.
9. Scheel C, Weinberg RA. Phenotypic plasticity and epithelialmesenchymal transitions in cancer – and normal stem cells? *Int J Cancer.* 2011;129:2310–2314.
10. Watanabe Y, Yoshimura K, Yoshikawa K, et al. A stem cell medium containing neural stimulating factor induces a pancreatic cancer stem–like cell–enriched population. *Int J Oncol.* 2014;45:1857–1866.
11. Matsukuma S, Yoshimura K, Ueno T, et al. Calreticulin is highly expressed in pancreatic cancer stem–like cells. *Cancer Sci.* 2016;107:1599–1609.
12. Hashimoto N, Tsunedomi R, Yoshimura K, et al. Cancer stem–like sphere cells induced from de–differentiated hepatocellular carcinoma–derived cell lines possess the resistance to anti–cancer drugs. *BMC Cancer.* 2014;14:722.
13. Bruix J, Gores GJ, Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut.* 2014;63:844–855.
14. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2012;379:1245–1255.
15. Colvin H, Mizushima T, Eguchi H, Takiguchi S, Doki Y, Mori M. Gastroenterological surgery in Japan: the past, the present and the future. *Ann Gastroenterol Surg.* 2017;1:5–10.
16. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 1998;153:865–873.

17. van den Hoogen C, van der Horst G, Cheung H, et al. High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer. *Cancer Res.* 2010;70:5163-5173.
18. Bhagwandin VJ, Bishop JM, Wright WE, Shay JW. The metastatic potential and chemoresistance of human pancreatic cancer stem cells. *PLoS ONE.* 2016;11:e0148807.
19. Pang R, Law W, Chu A, et al. A subpopulation of CD26 + cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell.* 2010;6:603-615.
20. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 2011;17:10-12.
21. Wang T, Liu J, Shen L, et al. STAR: an integrated solution to management and visualization of sequencing data. *Bioinformatics.* 2013;29:3204-3210.
22. Robinson M, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol.* 2010;11:R25.
23. Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K. TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics.* 2013;14:219.
24. Tang M, Sun J, Shimizu K, Kadota K. Evaluation of methods for differential expression analysis on multi-group RNA-seq count data. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:361.
25. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102:15545-15550.
26. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* 2010;28:511-515.
27. 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.* 2008;14:1025-1031.
28. Yoshimura K, Meckel KF, Laird LS, et al. Integrin alpha2 mediates selective metastasis to the liver. *Cancer Res.* 2009;69:7320-7328.
29. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133 + hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;351:820-824.
30. Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells

- possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*. 2007;20:1444-1450.
31. Xie G, Ji A, Yuan Q, et al. Tumour-initiating capacity is independent of epithelial-mesenchymal transition status in breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2014;110:2514-2523.
 32. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006;66:8319-8326.
 33. Moore LD, Isayeva T, Siegal GP, Ponnazhagan S. Silencing of transforming growth factor-beta1 in situ by RNA interference for breast cancer: implications for proliferation and migration in vitro and metastasis in vivo. *Clin Cancer Res*. 2008;14:4961-4970.
 34. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell*. 2009;15:195-206.
 35. Gibbons D, Lin W, Creighton C, et al. Contextual extracellular cues promote tumor cell EMT and metastasis by regulating miR-200 family expression. *Genes Dev*. 2009;23:2140-2151.
 36. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011;331:1559-1564.
 37. Liu X, Fan D. The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: functional and mechanistic links. *Curr Pharm Des*. 2015;21:1279-1291.
 38. Shibue T, Weinberg RA. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14:611-629.
 39. Wu J, Zhang S, Shan J, et al. Elevated HMGA2 expression is associated with cancer aggressiveness and predicts poor outcome in breast cancer. *Cancer Lett*. 2016;376:284-292.
 40. Morishita A, Zaidi MR, Mitoro A, et al. HMGA2 is a driver of tumor metastasis. *Cancer Res*. 2013;73:4289-4299.
 41. Luo Y, Li W, Liao H. HMGA2 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2013;5:1353-1356.
 42. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev*. 2003;29:297-307.
 43. Song X, Liu X, Chi W, et al. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1alpha gene. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;58:776-784.

44. Gallipoli P, Pellicano F, Morrison H, et al. Autocrine TNF- α production supports CML stem and progenitor cell survival and enhances their proliferation. *Blood*. 2013;122:3335-3339.
45. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, et al. Positive feedback between NF- κ B and TNF- α promotes leukemia-initiating cell capacity. *J Clin Invest*. 2014;124:528-542.
46. Murohashi M, Hinohara K, Kuroda M, et al. Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. *Br J Cancer*. 2010;102:206-212.
47. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP. Stabilization of snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*. 2009;15:416-428.
48. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise review: emerging role of CD44 in cancer stem cells: a promising biomarker and therapeutic target. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4:1033-1043.
49. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, et al. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*. 2011;19:387-400.
50. Nagano O, Okazaki S, Saya H. Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene*. 2013;32:5191-5198.
51. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, et al. A new variant of glycoprotein CD 44 confers Metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*. 1991;65:13-24.
52. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD 44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*. 1999;13:35-48.
53. Goldstein LA, Zhou DF, Picker LJ, et al. A human lymphocyte homing receptor, the Hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell*. 1989;56:1063-1072.
54. Goldstein LA, Butcher EC. Identification of mRNA that encodes an alternative form of H-CAM (CD44) in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Immunogenetics*. 1990;32:389-397.
55. Jiang H, Knudson C, Knudson W. Antisense inhibition of CD44 tailless splice variant in human articular chondrocytes promotes hyaluronan internalization. *Arthritis Rheum*. 2001;44:2599-2610.
56. Chanmee T, Ontong P, Izumikawa T, et al. Hyaluronan production

regulates metabolic and cancer stem-like properties of breast cancer cells via hexosamine biosynthetic pathway-coupled HIF-1 signaling.

J Biol Chem. 2016;291:24105-24120.

8. 図表

表 1

Table 1. Primers and hydrolysis probes used in this study

Sequence	
<i>TWIST1</i>	
5'-primer	5'-CGGCCAGGTACATCGACT-3'
3'-primer	5'-CATCTTGGAGTCCAGCTCGT-3'
Hydrolysis probe UPL Probe #65*	
<i>TWIST2</i>	
5'-primer	5'-GCAAGAAGTCGAGCGAAGAT-3'
3'-primer	5'-GCTCTGCAGTCCCTCGAA-3'
Hydrolysis probe UPL Probe #45*	
<i>SNAIL</i>	
5'-primer	5'-CATGTCCGGACCCACACT-3'
3'-primer	5'-TGGCACTGGTACTTCTTGACA-3'
Hydrolysis probe UPL Probe #10*	
<i>SNAI2</i>	
5'-primer	5'-TGGTTGCTTCAAGGACACAT-3'
3'-primer	5'-GTTGCAGTGAGGGCAAGAA-3'
Hydrolysis probe UPL Probe #7*	
<i>SNAI3</i>	
5'-primer	5'-TGCAAGATCTGTGGCAAGG-3'
3'-primer	5'-CAGTGCGAGCAGGCATAG-3'
Hydrolysis probe UPL Probe #80*	
<i>ZEB1</i>	
5'-primer	5'-CCTAAAAGAGCACTTAAGAATTCACAG-3'
3'-primer	5'-CATTTCTTACTGCTTATGTGTGAGC-3'
Hydrolysis probe UPL Probe #36*	
<i>ZEB2</i>	
5'-primer	5'-AAGCCAGGGACAGATCAGC-3'
3'-primer	5'-CCACACTCTGTGCATTTGAACT-3'
Hydrolysis probe UPL Probe #68*	
<i>HMGA2</i>	
5'-primer	5'-TCCCTCTAAAGCAGCTCAAAA-3'
3'-primer	5'-ACTTGTTGTGGCCATTTCCCT-3'
Hydrolysis probe UPL Probe #34*	
<i>GAPDH</i>	
5'-primer	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
3'-primer	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
Hydrolysis probe UPL Probe #60*	
<i>PGK1</i>	
5'-primer	5'-CTGTGGCTTCTGGCATACT-3'
3'-primer	5'-CGAGTGACAGCCTCAGCATA-3'
Hydrolysis probe UPL Probe #42*	

*The number for the Universal ProbeLibrary probes (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)

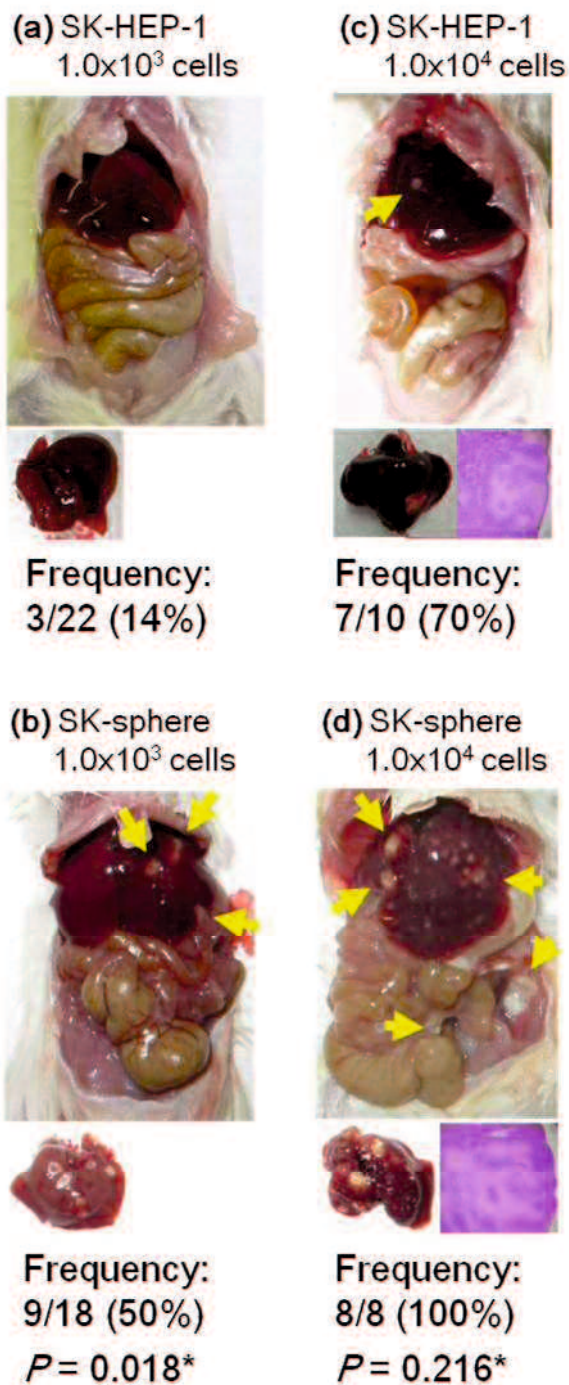


図1 誘導した癌幹細胞様細胞の肝転移能

肝転移能を NRG マウスへの脾臓注射によって評価した。1×10³個の SK-sphere 細胞と SK-HEP-1 を注入したマウスで、それぞれ 9/18 (50%) および 3/22 (14%) の頻度で肝転移を認めた。(P = 0.018) (a,b)。1×10⁴ 個では肝転移の頻度に有意差はなかった (P = 0.216)。しかし、腫瘍面積は SK-HEP-1 よりも SK-sphere 細胞で大きかった(c,d)。黄色の矢印は、形成された肝腫瘍を示している。フィッシャーの正確確率検定により P<0.05 を有意差ありとし、「*」で表記した。

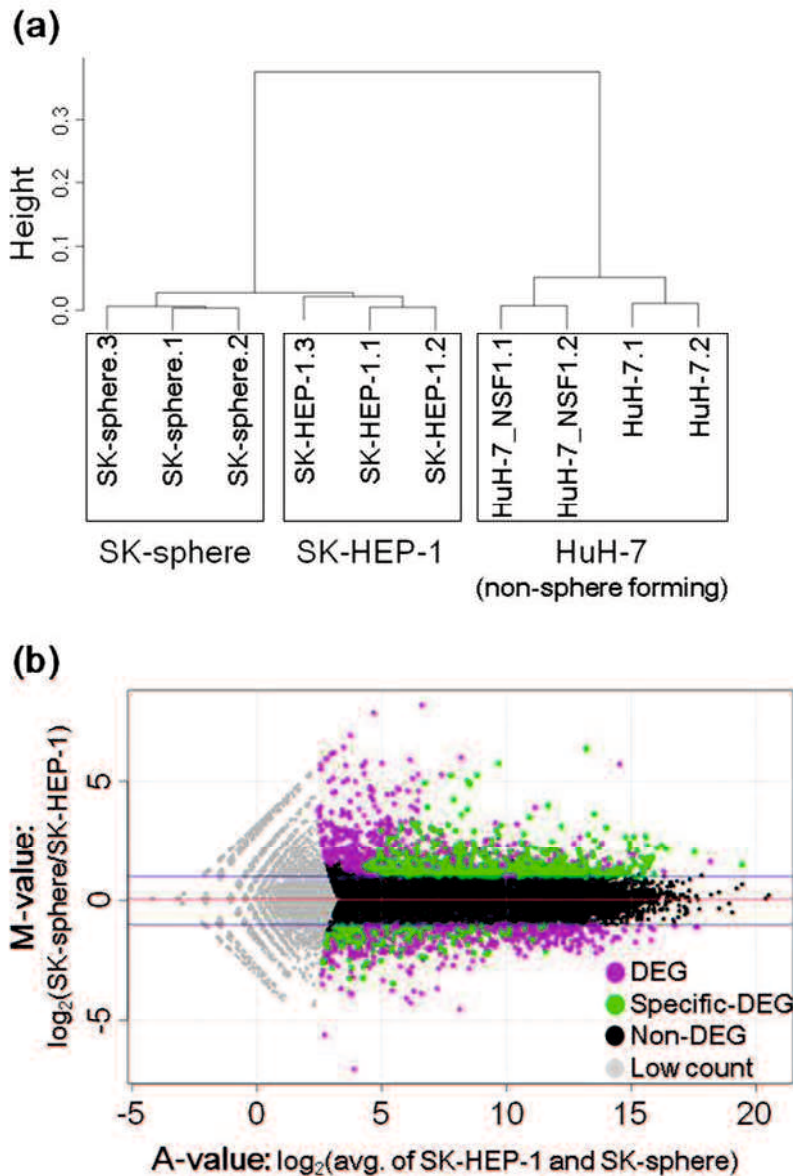


図2 RNA シークエンスから生成したクラスタリング樹状図およびM-Aプロット。

a、細胞の階層的クラスタリング樹状図。

Height は、3つの独立した SK-HEP-1 および S SK-sphere 細胞と通常の培地および neural survival factor-1 を含む sphere 誘導培地で培養した2つの独立した HuH-7 細胞のサンプル間のスピアマン距離を示している。

b、SK-HEP-1 と SK-sphere 細胞の RNA シークエンスのリードカウントデータの比較の M-A プロット。

各遺伝子について、サンプル間の \log_2 (倍率変化) (M、Y 軸) に対する 2つのサンプルの \log_2 (平均発現量) (A、x 軸) をプロットする。マゼンタおよびグリーンの点は、SK-sphere 細胞および SK-HEP-1 の間で有意差を持って発現した遺伝子 (DEG) を表す。グリーンで示した遺伝子は、非 sphere 形成株である HuH-7 細胞では変化せず、sphere 形成に特異的 DEG である。黒の点は、SK-sphere 細胞および SK-HEP-1 間で差がない遺伝子である。灰色の点は、SK-sphere 細胞および SK-HEP-1 において共に発現の少ない遺伝子である。横方向の赤色および青色の線は、M 値の中央値および倍率変化のカットオフをそれぞれ示す。

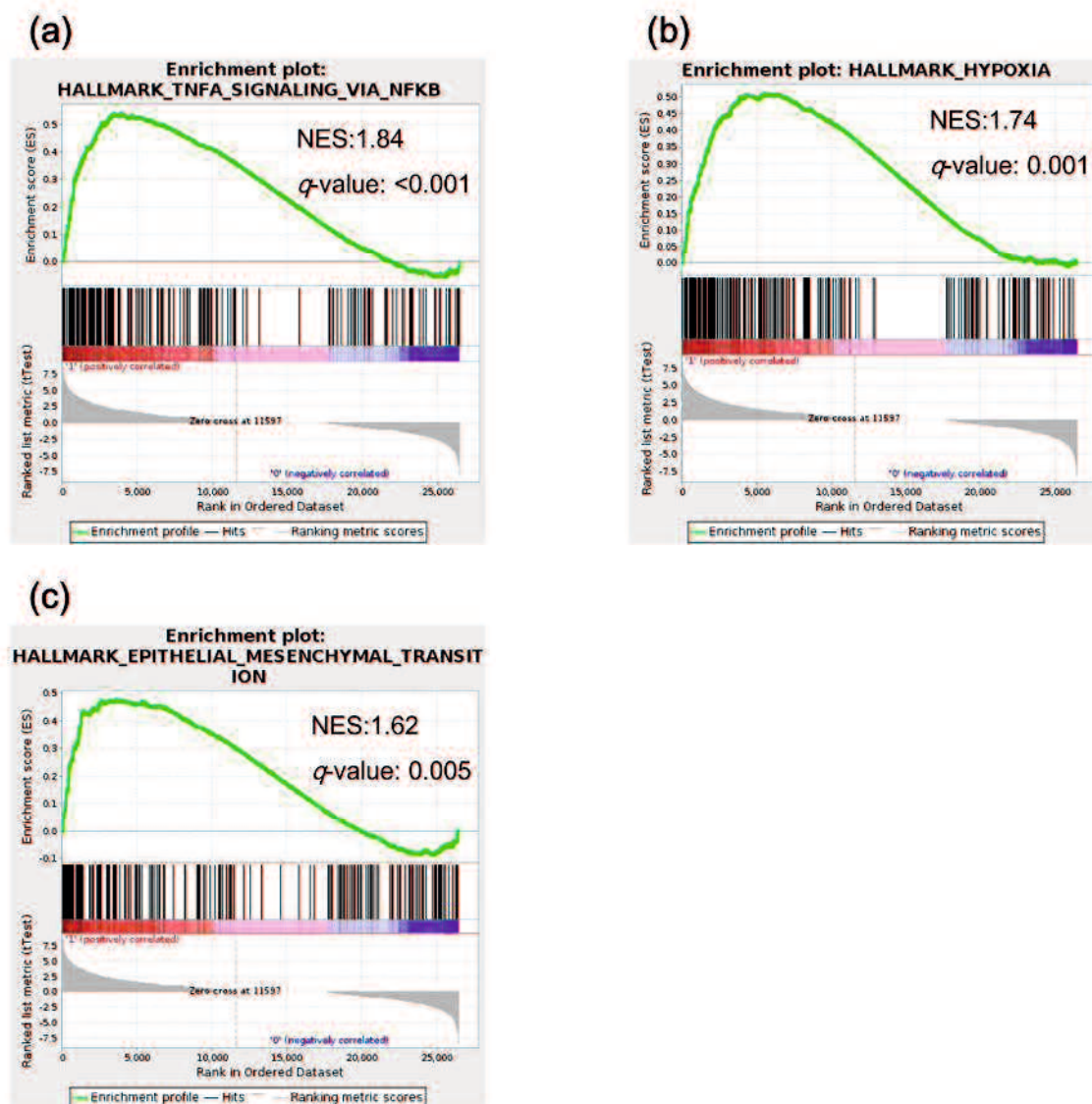


図 3. 癌幹様細胞における発現が亢進した遺伝子の特徴。

SK sphere 細胞および SK-HEP-1 から得られた RNA シークエンスデータを用いて Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行ったところ、SK-HEP-1 と比較して、SK sphere 細胞において NF- κ B を介した TNF- α シグナル伝達 (a)、低酸素症 (b)、および上皮間葉転換 (c) に関連した遺伝子の発現が有意に亢進していた。(q<0.01)。NES : normalized enrichment score。

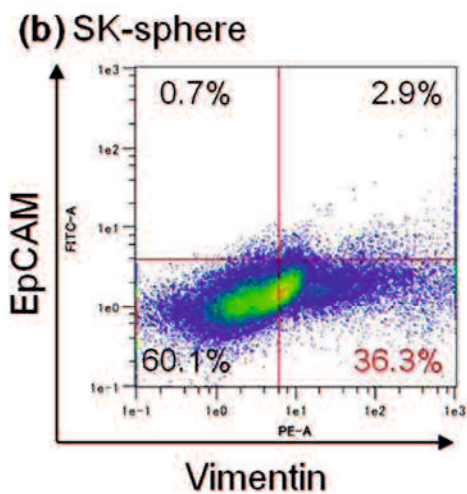
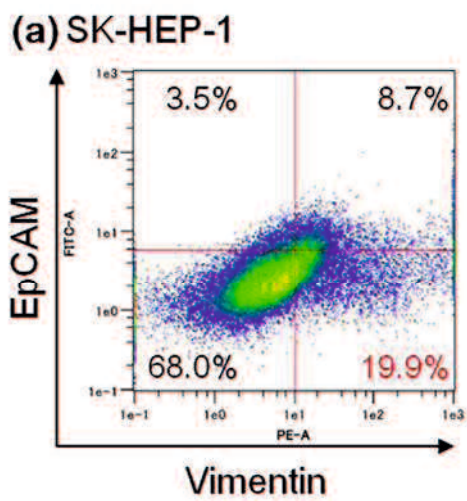


図4. フローサイトメトリーにおけるビメンチンの発現。

各細胞を PE 標識抗ビメンチン抗体および FITC 標識抗 EpCAM 抗体で染色し、フローサイトメトリーを行った。誘導した癌幹細胞様細胞の SK sphere 細胞は、SK-HEP-1 と比較して、ビメンチン陽性および EpCAM 陰性細胞の増加した集団を示した (36.3 対 19.9%)。

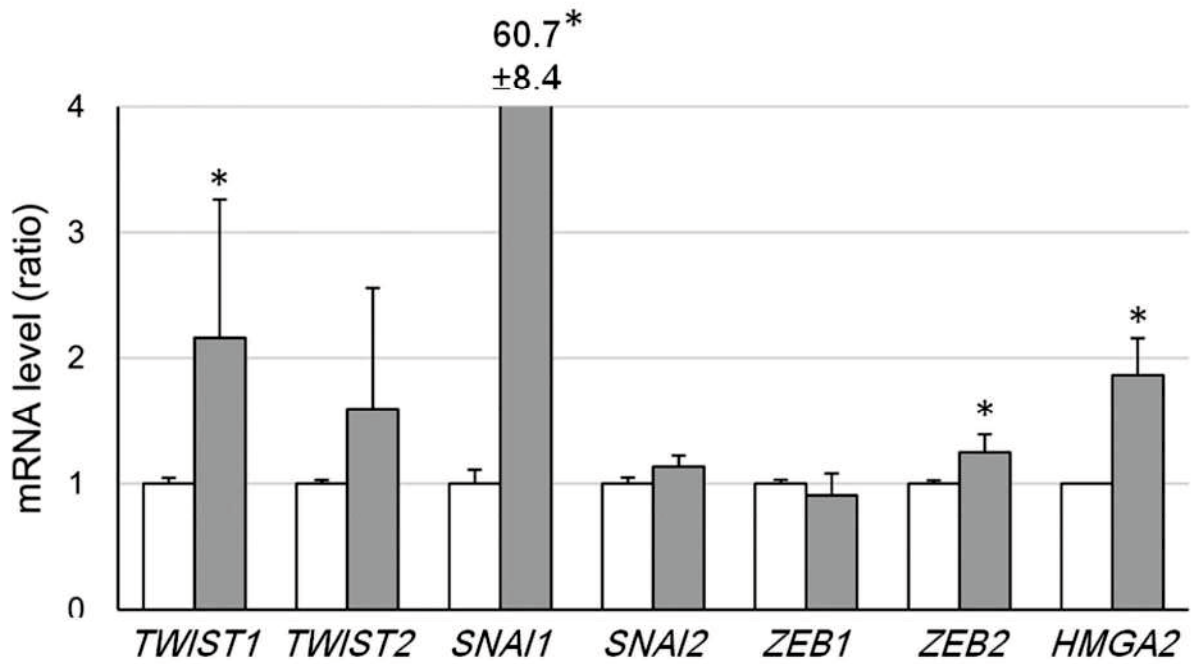


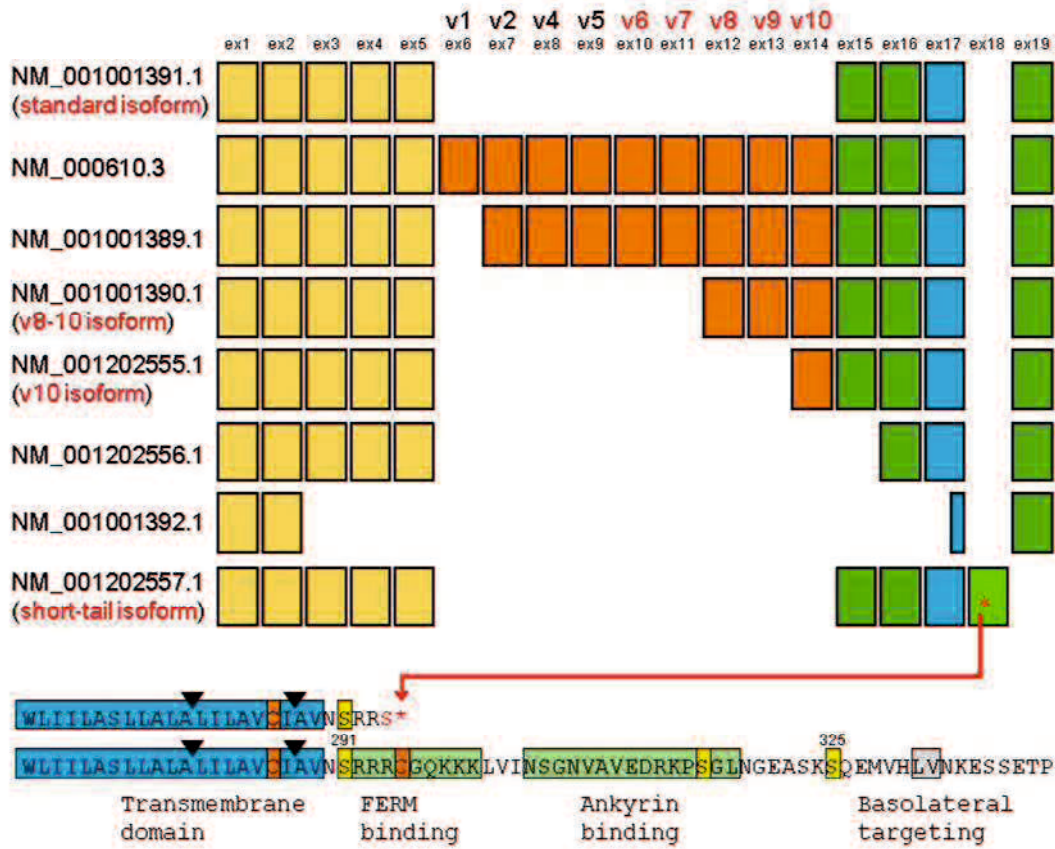
図 5. 上皮間葉転換転写促進因子の mRNA レベル。

TWIST1、TWIST2、SNAI1、SNAI2、ZEB1、ZEB2、および HMGA2 の発現レベルを qRT-PCR で測定した。

SK-HEP-1 細胞における発現レベルに対しての比率として示している。白は SK-HEP-1、灰色は SK-sphere

細胞の値を表す。*はスチューデント t またはウェルチの t 検定で $P < 0.05$ を示す。

(a)



(b)

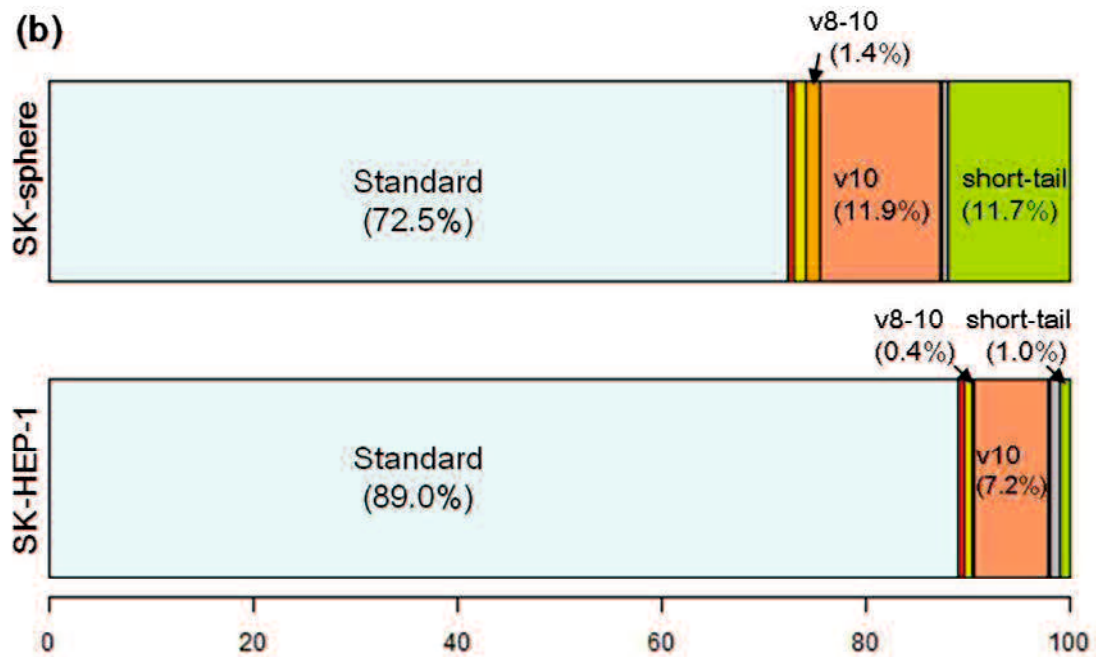


図 6. CD44 isoform の発現解析

a、RefSeq データベースによる mRNA スプライシングパターンにおける CD44 構造を示している。

NM_001001391.1 は CD44 standard isoform である。CD44 variant isoform である CD44v1-10 はオレンジ色のボックスで示したように余剰なエクソンを含んでいる。NM_001202557.1 はエクソン 19 の代わりにエクソン 18 を含み、その結果終止コドンとなるために short-tail isoform が生じる。

下部パネル a、膜貫通ドメインのアミノ酸配列特徴およびいくつかの機能的モチーフを示している。赤い矢印で接続したアスタリスクは、短い尾 isoform のエクソン 18 の終止コドンを示す。これは、配列の下に表している他の isoform のエクソン 19 とは異なる。矢印は膜内切断の部位を表す。リン酸化部位であるセリン残基は黄色、パルミチン酸化が起こるシステイン残基はオレンジ色で示している。

b、棒グラフは SK-HEP-1 および SK-sphere 細胞における CD44 isoform の発現割合を示している。CD44 standard isoform (シアン) は SK-HEP-1 (下部棒グラフ) と比較して SK-sphere 細胞 (上部棒グラフ) において減少した。CD44 standard isoform の有意な減少とは対照的に、SK-sphere 細胞では、CD44v8-10 (オレンジ)、CD44v10 (サーモン) および CD44 short tail (緑) isoform が有意に増加した。