

学位論文

RAB3B の発現上昇は肝がんの化学療法抵抗性と
転移能に重要な役割を果たす

氏名 恒富 亮一

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器・腫瘍外科学講座

令和4年11月

目 次

1. 要旨	3
2. 背景	4
3. 目的	4
4. 方法	5
5. 結果	9
6. 考察	13
7. 結語	15
8. 謝辞	16
9. 参考文献	17
10. 図表	22

1. 要旨

背景：がん幹細胞 (CSC) は、発がん、再発、転移、治療抵抗性に重要な役割を果たすと考えられている。我々は、化学療法抵抗性と転移能を有するがん幹細胞様スフィア細胞 (CSLC) の誘導に成功した。CSLC に対する標的治療の開発を可能にするため、CSLC のこの表現型の原因となる遺伝子を同定した。

方法：ヒト肝がん細胞株 SK-HEP-1 を用い、独自のスフィア誘導培地を用いて CSLC を誘導し、HuH-7 細胞を非スフィア形成細胞として同条件で使用した。RNA シーケンシングを行った後、定量的 RT-PCR とウェスタンブロッティングで検証した。ノックダウン (KD) 実験は CRISPR-Cas9 によるゲノム編集により行い、レスキュー実験は発現プラスミドベクターを用いて行った。細胞の化学療法抵抗性と肝転移は、MTS アッセイと細胞の重度免疫不全マウスへの脾臓注入後の解析で評価した。培地中のエクソソームの定量は、ELISA 法を用いて行った。

結果：*RAB3B* は、RNA シーケンシングにより CSLC と予後不良の肝細胞がん (HCC) の両方で発現が増加している遺伝子として同定された。*RAB3B*-KD 細胞は、スフィア形成、化学療法抵抗性、転移能などの CSLC 表現型の変化を示し、これらは *RAB3B* の相補化によって回復された。CSLC ではエクソソーム分泌の増加が観察されたが、*RAB3B*-KD 細胞では観察されなかった。また、*RAB3B* の発現は、*ABCG2*、*APOE*、*LEPR*、*LXN*、*TSPAN13* の発現と関連していた。

結論：*RAB3B* のアップレギュレーションは、CSLC の化学療法抵抗性と転移能に重要な役割を担っている可能性がある。

2. 背景

肝細胞がんは、世界中で最も多く発生するがんの一つであり、高い再発率により予後不良ながんである [1]。肝細胞がんに対する外科的切除、移植、アブレーション治療などの根治的治療法の多くは進行期には効果が限られ、これらの患者の約 70%が 5 年以内に転移性再発または *de novo* の肝細胞がんの発生を経験する [2–6]。術後再発は、これらの患者における主要な死亡原因であり [7, 8]、一般的に切除後 2 年以内に発生する [9, 10]。治癒的治療後の様々な種類の術後補助療法の利点は明確には証明されていない。

がん幹細胞 (CSC) は、腫瘍の発生、転移、再発、化学療法抵抗性など、腫瘍の悪性化に潜在的に関与する腫瘍バルク内のがん細胞の小さなサブセットである [11–14]。これらの細胞は、正常な幹細胞における変異の蓄積を介して産生される。一方、がん幹細胞から分化したがん細胞は、上皮間葉系転換 (EMT) により幹細胞様の性質を獲得し、がん幹細胞様細胞 (CSLC) のように振る舞う [15–18]。がんの可塑性に着目し、我々は神経生存因子 1 (NSF-1) を添加した独自の培地を用いて、ヒト肝がんおよび膵がん由来の細胞株から CSLC の誘導に成功した [16, 17]。得られた CSLC スフィアは、いくつかの抗がん剤に対する抵抗性が増大し [16]、転移能亢進を示し [18]、EMT 関連遺伝子セットの発現が増加していた [18]。スフェロイドとも呼ばれる球状細胞は、三次元 (3D) 構造をしているため、従来の二次元 (2D) 培養細胞に比べて、より生体内の腫瘍状態に近い細胞環境である。我々が作製した CSLC は、典型的な肝がん幹細胞とは異なり、CD133⁺/CD44^{high}/CD24^{low} の発現を示した [16]。

3. 目的

本研究では、上述 CSLC の責任遺伝子を明らかにすることで肝がん転移抑制のための治療標的を同定することを目的とし、いくつかの細胞株からの派生株とヒト肝細胞がん (HCC) 切除標本の RNA シーケンシング (RNA-seq) を用いて、CSLC の表現型

と肝細胞がんの予後不良の原因遺伝子を探索した。さらに、興味深い遺伝子である *RAB3B* が細胞のスフィア形成、薬剤耐性、転移能に果たす役割を、ノックダウン (KD) およびレスキュー実験により検討した。*RAB3B* は Rab ファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク (低分子量 G タンパク) の一つであり、小胞輸送の中心的な制御因子として機能する [19]。がんにおける *RAB3B* の役割はほとんど不明であるが、前立腺がん患者の尿中エクソソームには、このタンパクが多量に含まれていたと報告されている [20]。エクソソームは、その内容物であるマイクロ RNA やタンパクなどを通じて、転移を含むがんの悪性化に重要な役割を担う [21]。本研究では、エクソソームが CSLC に及ぼす影響についても検討した。

4. 方法

【細胞株】

ヒト肝がん由来の SK-HEP-1 細胞株は American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) から、HuH-7 細胞株は Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) からそれぞれ購入した。細胞は、10%熱不活性化牛胎児血清 (Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan)、ペニシリン (100 U/mL)、ストレプトマイシン ($\mu\text{g/mL}$)、重炭酸ナトリウム (1.5 g/L) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM ; Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) 中で 37 °Cにて 5 % CO₂ を含む加湿条件で培養した。

【患者】

2002 年 8 月から 2007 年 11 月の間に山口大学大学院医学系研究科消化器・腫瘍外科学講座で肝細胞がんに対する治癒的肝切除術を受けた患者 14 人から、文書によるインフォームドコンセントを得て試料を入手した。研究プロトコルは、1975 年のヘルシンキ宣言の倫理的ガイドラインに準拠し、山口大学医学部附属病院の Institutional Review Board for Human Use の事前承認を受けている。RNA-seq と定量的リアルタイム

ムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) にはそれぞれ 10 症例が使用され、6 症例は両分析に共通であった。

【スフィア細胞の誘導】

神経幹細胞用培地 [16] を基にしたスフィア誘導培地にてスフィア細胞を誘導した。浮遊スフィア細胞の誘導に用いたこの培地は、DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham に 0.6% グルコース、10 mM HEPES、2 μ g/mL ヘパリン、0.1 mg/mL トランスフェリン、25 μ g/mL インスリン、60 μ M プトレシン、30 nM 亜セレン酸ナトリウム、20 nM プロゲステロン、10 ng/mL ヒト組み換え上皮成長因子 (すべて Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan)。10 ng/mL 塩基性線維芽細胞増殖因子 (Merck Millipore, Tokyo, Japan)、10 ng/mL 白血病阻止因子 (Merck Millipore)、60 μ g/mL N-アセチル-L-システイン (Sigma-Aldrich) および 1/50 量 NSF-1 (Lonza, Tokyo, Japan) を含む。

【RNA シーケンシング】

miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いてトータル RNA を単離した。TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold LT Sample Prep kit (Illumina, Tokyo, Japan) を用いて、メーカーの説明書に従ってシーケンスライブラリーを調製した。ペアエンド断片 (75 bp \times 2) の配列決定は、NextSeq 500 配列決定プラットフォーム (Illumina) を用いて実施した。

品質管理ステップの後、フィルタリングされたショートリードは、STAR (version 2.5.1b) [22] を用いて参照ゲノム (hg38) にマッピングされた。各サンプルのフラグメントの鎖別カウントは、RSEM (version 1.3.3) [23] を用いて求め、TCC パッケージ [25, 26] を用いて trimmed mean of M-values 法 [24] で正規化した。edgeR (version 3.28.1) [27, 28] パッケージを使用して、偽発見率 $q < 0.05$ に基づいて、差次的発現遺伝子 (DEGs) を同定した。

【定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR)】

mRNA の発現は、先に述べたように qRT-PCR によって解析した [10]。qRT-PCR は、LightCycler 480 System II (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) に LightCycler 480 Probe Master (Roche Diagnostics) と Universal ProbeLibrary probes (Roche Diagnostics) または LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics) を用いて実行された。使用したプライマーとプローブを補足表 S1 に示す。増幅は 2 段階の手順で行い、mRNA 量は Δ/Δ 閾値サイクル法を用いて定量的に測定した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) およびホスホグリセリン酸キナーゼ 1 (PGK1) をコントロールとして用いた。各アッセイは三重複製にて分析した。

【ウェスタンブロット分析】

細胞を溶解し、タンパク (10 μ g) を 8%ゲル上の SDS-PAGE によって分離し、以前に記載したようにポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Bio-Rad, Tokyo, Japan) に移した [29]。膜を 3%スキムミルクでブロックし、一次抗体、抗 RAB3B (ab55655; Abcam, Tokyo, Japan) および抗 VCP (anti-valosin-containing protein; GTX113030, GeneTex, Alton Pkwy Irvine, CA, USA) で処理した。免疫反応性バンドは ECL Pro (PerkinElmer, Waltham, MA) と Amersham Imager (GE Healthcare, Tokyo, Japan) を用いて可視化し、ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health, USA) で定量化した。VCP は、GAPDH や β -actin などの他のローディングコントロールと比較してレベルが安定しているため、ローディングコントロールとして使用した [29]。

【RAB3B のゲノム編集】

RAB3B の配列を標的とするガイド RNA (gRNA) (5'-GTTTCACCCGCTTCTCGTGA-3') を GeneArt Precision gRNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて *in vitro* 転写により構築した (補足図 S1a)。gRNA 及び Cas9 mRNA (GeneArt CRISPR Nuclease mRNA, Thermo Fisher Scientific) を、Lipofectamine MessengerMAX (Thermo Fisher Scientific) を

用いて細胞にトランスフェクトした。単離したモノクローンのゲノム DNA (gDNA) をサンガーシーケンスに供した (補足図 S1b)。SK-HEP-1 由来の *RAB3B* 編集クローンを *RAB3B-KD* と命名した。この *RAB3B-KD* 細胞に、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、完全長の *RAB3B* cDNA を保持する pcDNA3.1(-) である pRAB3B をトランスフェクトし、*RAB3B* レスキューされた KD/pRAB3B 細胞を作製した。コザック、5'-末端 EcoRI、3'-末端 BamHI 配列を有する完全長 *RAB3B* cDNA (NM_002867.3: 214~873 位) は FASMAC (Kanagawa, Japan) で合成し、これを pcDNA3.1(-) の CMV プロモータ下流の部位に挿入した。

【細胞生存率アッセイ】

テトラゾリウム化合物 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] を含む CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Tokyo, Japan) を製造者の説明に従って使用した。培養液中の細胞を、以下の抗がん剤、10 mM 5-フルオロウラシル (5-FU, Sigma-Aldrich)、250 nM ドセタキセル (Sigma-Aldrich)、2 μ M ドキソルビシン (Sigma-Aldrich)、200 μ M 塩酸イリノテカン (Sigma-Aldrich)、2.5 μ M スベロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA, Cosmo Bio)、75 μ M ソラフェニブトシレート (ChemScene, Monmouth Junction, NJ)、25 μ M レンバチニブメシレート (Carbosynth, Berkshire, UK)、50 μ M レゴラフェニブ (ChemScene) 又は 20 μ M カボザンチニブ S マレート (ChemScene) の 1 つを含み 5% CO₂、37 °C で 24 時間実施した。培養液のみでインキュベートした細胞をコントロールとして使用した。EnVision プレートリーダー (PerkinElmer) を用いて、492 nm および 650 nm における培養液の光学密度を測定した。抗がん剤で処理した細胞の生存率は、抗がん剤非存在下での生存率に対する比率として計算された。各アッセイは三重複製にて分析した。

【腫瘍細胞の脾臓注入】

NOD-Rag1^{null} IL2ry^{null} 二重変異マウス (NRG マウス) は Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入し、オートクレーブ滅菌したケージ、餌、寝床を用いて HEPA フィルター環境で維持した。すべての動物実験は、山口大学の Institutional Animal Care and Use Committee に従い、米国国立衛生研究所 (Bethesda, MD, USA) 発行の Guide for the Care, Use of Laboratory Animals、および ARRIVE ガイドラインに準拠して実施された。

肝臓に腫瘍結節を生成する細胞の能力は、以前に記載したように、8–12 週齢の NRG 雌マウスの脾臓に移植した後に調査された [18]。細胞を注入したマウスを 8 週間後に安楽死させて剖検した。

【エクソソームの定量的解析】

細胞を 24 時間培養した後、疲弊した培養液を新鮮な培養液に交換した。同時に、MTS アッセイを用いて複製プレートから細胞生存率を測定し、エクソソーム定量の正規化に使用した。エクソソームの定量には、回収した条件培養液を CD9/CD63 Exosome ELISA Kit, Human (Cosmo Bio) を用いて、製造者の指示に従って分析した。EnVision プレートリーダー (PerkinElmer) を用いてシグナルを検出した。必要に応じて、細胞播種の翌日にエクソソーム阻害剤として GW4869 塩酸塩水和物 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) を添加した。各アッセイは三重複製にて分析した。

【統計解析】

各実験は少なくとも 3 回繰り返した。データは、平均値 ± 標準偏差で表した。有意差検定は、R version 3.6.3 ソフトウェア (R プロジェクトウェブサイト, <http://www.r-project.org/>) を用いて、Tukey–Kramer 多重比較検定、対応のある *t* 検定、またはフィッシャーの正確確率検定によって評価した。P < 0.05 を統計的に有意とした。

4. 結果

【CSLC 特異的 mRNA 発現のスクリーニング】

定量的 RNA-seq 解析を用いて、スフィア化 SK-HEP-1 細胞と非スフィア化 HuH-7 細胞における網羅的 mRNA 量を比較した (補足図 S3 左)。さらに、ヒト HCC とその周辺肝組織標本における mRNA レベルも比較した。スフィア誘導条件下の SK-HEP-1 細胞と対照条件下の細胞との間でカウントに有意差がある遺伝子は 1,471 個であった (変化倍率 >2.0 ; $q < 0.05$; 図 1a のマゼンタと緑の点)。スフィア形成能を持たない HuH-7 細胞 [16] の mRNA レベルを考慮すると、755 遺伝子がスフィア形成 SK-HEP-1 細胞における特異的 DEG として同定された (図 1a の緑色の点)。

臨床的に重要な遺伝子に焦点を当てるため、DEG はさらに手術後の再発に関してスクリーニングされた (補足図 S3 右)。一つは術後 2 年以内に再発した原発性肝細胞がんと 4 年以上無再発肝細胞がんととの発現差、もう一つは肝細胞がんと対応する隣接肝組織との発現差という二つのスクリーニング基準を適用した。その結果、HCC 標本における再発に関する DEG として 435 遺伝子が同定された (図 1b の緑色の点)。

上記の DEG のうち、7 つの遺伝子 (*ATP6V0D2*, *C5orf30*, *LOC344887*, *PBLD*, *RAB3B*, *STRIP2*, *TKFC*) は、細胞株と HCC 標本のスクリーニングの両方で共通していた (図 1a, b のオレンジ色の菱形)。さらに *RAB3B* に注目したのは、その mRNA レベルがスフィア形成で上昇し、細胞株と臨床サンプルの両方で豊富に見られたからである (補足図 S4)。これらの条件下での *RAB3B* mRNA の発現は、qRT-PCR を用いて確認した (図 1c, d)。

【CSLC 特異的 *RAB3B* のノックダウン】

SK-HEP-1 細胞から CRISPR/Cas9 システムを用いて、*RAB3B*-KD クローンを作製した。この変異はモノアレリックであったが、切断型 *RAB3B* を発現するクローンを得た (補足図 S1, S2)。*RAB3B*-KD 細胞は、スフィア誘導培地においても *RAB3B* mRNA の発現が減少していた (0.3 倍, $P < 0.01$, 図 2a)。さらに、*RAB3B*-KD 細胞における *RAB3B* 発現の低下は、p*RAB3B* のトランスフェクションにより回復した。同様に、スフィア

誘導培地における RAB3B の誘導は、*RAB3B*-KD 細胞で減少し、プラスミドベクターはその発現をレスキューした (図 2b)。用いた抗 RAB3B 抗体は、ゲノム編集によって切断された領域を認識するため、ウェスタンブロット解析で検出された RAB3B は非変異型アレルから発現した RAB3B である。

RAB3B の発現低下に加えて、*RAB3B*-KD 細胞はスフィア形成が不十分であり、これは外来性 *RAB3B* を発現する *RAB3B*-KD 細胞で補強された (図 2c-e)。以前の研究 [16] における我々の観察と同様に、スフィア誘導条件下における SK-HEP-1 細胞は、G0/G1 停止を示した (補足図 S5b の $82.2\% \pm 0.4\%$)。スフィア誘導条件下では、*RAB3B*-KD 細胞は G0/G1 期 $67.3\% \pm 0.5\%$ 、S 期 $3.6\% \pm 0.1\%$ 、G2/M 期 $29.1\% \pm 0.3\%$ として細胞周期分布が見られた (補足図 S5d)。このことから、スフィア誘導条件下の SK-HEP-1 細胞と比較して、同スフィア誘導条件下の *RAB3B*-KD 細胞は G2/M 期にある割合が増加していることが示された。また、スフィア誘導条件下における KD/pRAB3B 細胞の細胞周期分布は、同スフィア誘導条件下における SK-HEP-1 細胞と同様であった (補足図 S5f)。対照培養条件下では、*RAB3B*-KD 細胞は、SK-HEP-1 細胞と比較して S 期集団の増加を示した (補足図 S5a, c)。

【RAB3B 発現の抗がん剤感受性への影響】

スフィア誘導条件下において、SK-HEP-1 細胞は、対照条件下と比較して、試験した抗がん剤存在下での生存率が増加した (図 3)。*RAB3B*-KD 細胞は、スフィア誘導条件下において、いずれの薬剤の存在下でも、SK-HEP-1 細胞および *RAB3B* レスキュー KD/pRAB3B 細胞と比較して生存率が減少した。対照条件下では、5-FU、ドキソルビシン、イリノテカン存在下で、*RAB3B* 編集細胞の生存率の低下と *RAB3B* レスキュー細胞での回復が観察された。

【*RAB3B*-KD 細胞の肝臓への転移能】

RAB3B-KD 細胞の肝臓への転移能を解析した (表 1、補足図 S6)。我々の以前の研究

では、NRG マウスの脾臓に 1×10^3 個のスフィア細胞を注入すると、同数の SK-HEP-1 細胞を注入した場合と比較して、肝腫瘍の発生頻度が増加した (50% vs. 14%, $P < 0.05$)。逆に、スフィア誘導を行った *RAB3B*-KD 細胞は、通常培養した細胞と比較して肝転移能の増加は認められなかった (17% vs. 19%)。

【培地中に放出されたエクソソームの定量と CSLC への影響】

特定の Rab ファミリーが小胞のエキソサイトーシスを制御することから [30]、培地中のエクソソーム量を解析した。SK-HEP-1 細胞では、スフィア誘導培地において、対照培地と比較してエクソソーム量が有意に増加した (2.6 倍, $P < 0.01$) (図 4)。*RAB3B*-KD 細胞では、スフィア誘導培地におけるエクソソーム放出の増加は見られなかった。また、KD/p*RAB3B* 細胞では、対照培地で放出されたエクソソーム量は SK-HEP-1 細胞の場合と同様であったが、スフィア誘導培地におけるエクソソーム放出の増加が認められた (4.2 倍, $P < 0.01$)。エクソソーム阻害剤である GW4869 (最終濃度 5 μ M) の添加により、試験したすべての条件においてエクソソーム放出が抑制された (図 4)。SK-HEP-1 細胞および KD/p*RAB3B* 細胞のスフィアサイズは、GW4869 非存在下に比べ、GW4869 存在下で有意に小さかった (各 0.6 倍, $P < 0.05$) (図 5)。

【*RAB3B* の発現により影響を受ける遺伝子の発現プロファイル】

CSLC 表現型に対する *RAB3B* 発現の影響を網羅的に調べるため、親細胞である SK-HEP-1 に加え、*RAB3B*-KD 細胞および KD/p*RAB3B* 細胞を用いて RNA-seq 解析を行った (補足図 S7)。スクリーニングは、1. スフィア誘導条件下での発現が対照条件下と比較して変化、2. *RAB3B* を構成的に過剰発現している細胞での発現が SK-HEP-1 細胞と比較して変化、3. *RAB3B*-KD 条件下ではスフィア誘導下、対照条件下ともに発現が変化を基準としてスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、スフィア誘導条件下で特異的な発現を示し、その発現が *RAB3B* の発現と関連する 13 遺伝子が得られた。この 13 遺伝子のうち、qRT-PCR による検証を通過したのは 5 遺伝子 (*ABCG2*,

APOE, *LEPR*, *LXN*, *TSPAN13*) であった (図 6)。 *ABCG2* はこの 5 遺伝子のうちの一つであった。スフィア誘導条件下の SK-HEP-1 細胞では、対照条件下と比べて *ABCG2* 発現が増加した (qRT-PCR; 2.3 倍, $P < 0.05$, RNA-seq; 2.9 倍, $q < 0.01$)。一方、*RAB3B*-KD 細胞では、スフィア誘導条件下、対照条件下ともに、*ABCG2* の発現は SK-HEP-1 細胞のそれよりも低かった (qRT-PCR; < 0.4 倍, $P < 0.05$, RNA-seq; < 0.1 倍, $q < 0.01$)。KD/p*RAB3B* 細胞では、その発現減少は回復した。*LXN* と *TSPAN13* の発現傾向は、*ABCG2* の発現傾向と同様であった。*APOE*, *LEPR*, *RAB3B* の発現は、スフィア誘導条件下で有意な差を示したが、対照条件下では有意差を示さなかった。

5. 考察

再発を伴う HCC 検体とスフィア形成細胞株を用いて包括的な RNA 発現プロファイリングを行ったところ、CSLC において 7 つの有意な DEG が検出された (図 1)。これら 7 つの遺伝子のうち、スフィア細胞と無再発期間の短い HCC の両方で発現が上昇し、比較的発現が豊富であった *RAB3B* に注目した (補足図 S4)。 *RAB3B*-KD とその構成的レスキュー細胞を作製し、*RAB3B* が CSLC 表現型に及ぼす影響を検討するために使用した。興味深いことに、*RAB3B*-KD 細胞は親細胞と比較して、スフィアサイズが小さく、抗がん剤に対する感受性が高まっていた。これらの効果は、*RAB3B*-KD 細胞で *RAB3B* を外因性に発現させると回復した (図 2, 3, 5)。 *RAB3B* の誘導機構については、前立腺ではアンドロゲン受容体シグナルを介して *RAB3B* がアップレギュレートされることが知られているが [31]、我々のスフィア誘導培地にはアンドロゲンは補充されていなかった。また、スフィア誘導培地中のアンドロゲン以外のいくつかのホルモンは、スフィア形成に有意な影響を与えなかった (data not shown)。本研究では、*RAB3B*-KD 細胞は、残存する野生型アレルの存在にもかかわらず、スフィア誘導条件下で *RAB3B* の誘導を示さなかった (図 2)。上記のアンドロゲン受容体シグナルによる制御は、NKX3-1 とのフィードフォワード制御ループに従う [32]。したがって、*RAB3B* もループ制御に関与し、モノアレルからの発現は *RAB3B* 誘導に不十分である可能性がある

る。興味深いことに、*RAB3B*-KD 細胞では、ゲノム編集された *RAB3B* を持つリードの頻度が 37%であった (補足図 S2)。一方、RNA-seq では、それらの頻度は対照条件下およびスフィア誘導条件下の両方で *RAB3B*-KD 細胞ではわずか 2%だった (data not shown)。もう一つの可能性は、切断された *RAB3B* が野生型 *RAB3B* の機能を阻害している可能性である。しかしながら、*RAB3B* の誘導機構は依然として不明である。

興味深いことに、*RAB3B* 量はエクソソーム放出量と相関があることが確認された (図 4)。さらに、エクソソーム放出の抑制が細胞のスフィア形成能に及ぼす影響も観察された。エクソソーム放出に関与する Rab ファミリーとしては、*RAB27* がよく知られている [30]。エクソソームはその膜インテグリンや内容物を通じて臓器への転移に重要な役割を果たす [33, 34]。実際、対照条件下で調製した *RAB3B*-KD 細胞とスフィア誘導条件下で調製した *RAB3B*-KD 細胞の肝転移能に差は認められなかった (表 1)。これらのことから、*RAB3B* は転移の際の腫瘍微小環境の調節に関与している可能性が示唆された。本研究で用いたエクソソーム阻害剤 GW4869 は、MVE の内向き出芽を阻害することにより、多胞性エンドソーム (MVE) から放出される成熟エクソソームを抑制する [35]。*RAB27* は、エクソソーム分泌のために MVE が細胞膜にドッキングする役割を担っている [30]。エクソソーム分泌における *RAB27* の役割と同様に、*RAB3* はシナプス小胞のエクソサイトシスに関与している [36]。細胞間情報伝達のためのシグナルを含むエクソソームが *RAB3B* によって腫瘍微小環境中に放出され、それが CSLC 表現型の獲得に必要である可能性が示唆される。しかし、本研究では、そのシグナルを詳細に解明するまでには至っていない。本研究の限界は、*RAB3B* の誘導機構に加え、*RAB3B* を介した CSLC 表現型の獲得に関与する詳細な機構が明らかにされていないことである。

化学療法抵抗性のメカニズムの一つとして、抗がん剤の排出を仲介する ABC トランスポーターのアップレギュレーションがよく知られている [37]。我々は以前、ABC トランスポーターである *ABCG2* が、スフィア誘導条件下で発現上昇することを報告した [16]。ここで、*ABCG2* もスフィア形成と *RAB3B* 発現に関連する特異的な遺伝子

の一つとして同定された (図 6)。これまでの研究結果と同様に、スフィア誘導条件下では、G0/G1 期にある SK-HEP-1 細胞の割合が対照条件下と比較して増加した (補足図 S5)。G0/G1 期で増加した *RAB3B* レスキュー細胞の割合は SK-HEP-1 細胞と同じであったが、*RAB3B*-KD 細胞はスフィア誘導条件下で G2/M 期集団が増加した。

さらに、スフィア形成条件下と *RAB3B* 発現の両方と正の相関を示す 5 つの遺伝子を見出した (図 6)。*ABCG2* に加え、*APOE* と *LFER* もがん幹細胞に参与していることが報告されている [38, 39]。また、*TSPAN13* の発現は、甲状腺乳頭がん、膵がん、肺腺がん、膀胱がんの予後不良と関連することが報告されている [40]。*LXN* の過剰発現が SK-HEP-1 細胞の G0/G1 期での細胞周期停止を促進するという我々の結果と一致する一方、同じ研究では *LXN* の過剰発現が細胞生存率、コロニー形成、腫瘍形成を抑制することが報告されている [41]。これらの先行研究は、細胞外小胞生産における *RAB3B* の機能による CSLC 特性の獲得機構を支持するものである。

HCC のスフィア誘導と予後不良の両方に関連した 7 つの遺伝子のうち、*PBLD*、*STRIP2*、*LOC344887* の発現も HCC、肺腺がん、非小細胞肺がんの予後不良と相関している [42, 43]。さらに、これらの遺伝子は細胞の EMT および浸潤能に関連している [42, 44, 45]。我々の研究で最も高い M 値を示したプロトトランスポーターである *ATP6V0D2* (図 1) は、移動、浸潤、EMT などの発がん機能に参与していることが最近、報告された [46]。したがって、*RAB3B* に加え、これらの遺伝子も CSLC 表現型の獲得に寄与している可能性がある。

6. 結語

結論として、*RAB3B* は CSLC 特性を獲得するために必要である可能性がある。*RAB3B* はエクソソームなどの細胞外小胞の分泌に重要であり、関連遺伝子の発現を制御している可能性がある。今後、細胞間コミュニケーションについて詳細に解析することで、肝がん治療の標的となり得る重要な遺伝子が明らかになると考えられる。

7. 謝辞

本研究にあたり、ご指導いただきました永野浩昭先生、並びに、岡正朗先生、飯塚徳男先生、吉村清先生に深甚なる謝意を表します。また、山口大学消化器・腫瘍外科学の皆様に深謝いたします。最後に、支えてくれた家族に心より感謝します。

8. 参考文献

- 1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394–424.
2. Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa K, Miyagawa S, et al. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* 2003;38:200–207.
3. Ban D, Ogura T, Akahoshi K, Tanabe M. Current topics in the surgical treatments for hepatocellular carcinoma. *Ann Gastroenterol Surg*. 2018;2:137–146.
4. Kokudo N, Takemura N, Hasegawa K, Takayama T, Kubo S, Shimada M, et al. Clinical Practice Guidelines for Hepatocellular Carcinoma: The Japan Society of Hepatology 2017 (4th JSH-HCC Guidelines) a 2019 update. *Hepatol Res*. 2019;49:1109–1113.
5. Ju MR, Yopp AC. Evolving thresholds for liver transplantation in hepatocellular carcinoma: A Western experience. *Ann Gastroenterol Surg*. 2020;4:208–215.
6. Nakajima M, Tokumitsu Y, Shindo Y, Matsui H, Matsukuma S, Iida M, et al. The recent development of the surgical treatment for hepatocellular carcinoma. *Appl. Sci*. 2021;11:2023.
7. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003;362:1907–1917.
8. Bruix J, Llovet JM. Major achievements in hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2009;373:614–616.
9. Sakon M, Umeshita K, Nagano H, Eguchi H, Kishimoto S, Miyamoto A, et al. Clinical significance of hepatic resection in hepatocellular carcinoma: analysis by disease-free survival curves. *Arch Surg*. 2000;135:1456–1459.
10. Tsunedomi R, Iizuka N, Tamesa T, Sakamoto K, Hamaguchi T, Somura H, 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.

11. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011;469:314–322.
12. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 2012;10:717–728.
13. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:133–143.
14. Tsunedomi R, Yoshimura K, Suzuki N, Hazama S, Nagano H. Clinical implications of cancer stem cells in digestive cancers: acquisition of stemness and prognostic impact. *Surg Today* 2020;50:1560–1577.
15. **Mani SA, Guo W**, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704–715.
16. Hashimoto N, Tsunedomi R, Yoshimura K, Watanabe Y, Hazama S, Oka M. 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.
17. Watanabe Y, Yoshimura K, Yoshikawa K, Tsunedomi R, Shindo Y, Matsukuma S, 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.
18. Nishiyama M, Tsunedomi R, Yoshimura K, Hashimoto N, Matsukuma S, Ogihara H, et al. Metastatic ability and the epithelial-mesenchymal transition in induced cancer stem-like hepatoma cells. *Cancer Sci* 2018;109:1101–1109.
19. Lledo PM, Vernier P, Vincent JD, Mason WT, Zorec R. Inhibition of Rab3B expression attenuates Ca(2+)-dependent exocytosis in rat anterior pituitary cells. *Nature*. 1993;364:540–544.
20. Wang L, Skotland T, Berge V, Sandvig K, Llorente A. Exosomal proteins as prostate cancer biomarkers in urine: From mass spectrometry discovery to immunoassay-based validation. *Eur J Pharm Sci*. 2017;98:80–85.

21. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 2012;18:883–91.
22. Wang T, Liu J, Shen L, Tonti-Filippini J, Zhu Y, Jia H, et al. STAR: an integrated solution to management and visualization of sequencing data. *Bioinformatics* 2013;29:3204–3210.
23. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 2011;12:323.
24. Robinson M, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* 2010;11:R25.
25. 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.
26. 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.
27. **Robinson MD, McCarthy DJ**, Smyth GK. “edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.” *Bioinformatics* 2010;26:139–140.
28. McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. “Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation.” *Nucleic Acids Res.* 2012;40:4288–4297.
29. Fujiwara N, Usui T, Ohama T, Sato K. Regulation of beclin 1 protein phosphorylation and autophagy by protein phosphatase 2A (PP2A) and death-associated protein kinase 3 (DAPK3). *J Biol Chem* 2016;291:10858–10866.
30. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol.* 2010;12:19–30.
31. Tan PY, Chang CW, Chang KR, Wansa KD, Sung WK, Cheung E. Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival. *Mol Cell Biol.*

- 2012;32:399–414.
32. Tan PY, Chang CW, Chang KR, Wansa KD, Sung WK, Cheung E. Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival. *Mol Cell Biol.* 2012;32:399–414.
33. **Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL**, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015;527:329–335.
34. Wortzel I, Dror S, Kenific CM, Lyden D. Exosome-Mediated Metastasis: Communication from a Distance. *Dev Cell.* 2019;49:347–360.
35. Essandoh K, Yang L, Wang X, Huang W, Qin D, Hao J, et al. Blockade of exosome generation with GW4869 dampens the sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1852:2362–2371.
36. Lledo PM, Vernier P, Vincent JD, Mason WT, Zorec R. Inhibition of Rab3B expression attenuates Ca(2+)-dependent exocytosis in rat anterior pituitary cells. *Nature.* 1993;364:540–544.
37. Sukowati CH, Rosso N, Crocè LS, Tiribelli C. Hepatic cancer stem cells and drug resistance: Relevance in targeted therapies for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2010;2:114–126.
38. Papi A, Storci G, Guarnieri T, Carolis SD, Bertoni S, Avenia N, et al. Peroxisome proliferator activated receptor- α /hypoxia inducible factor-1 α interplay sustains carbonic anhydrase IX and apolipoprotein E expression in breast cancer stem cells. *PLOS ONE.* 2013;8:e54968.
39. Zheng Q, Banaszak L, Fracci S, Basali D, Dunlap SM, Hursting SD, et al. Leptin receptor maintains cancer stem-like properties in triple negative breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20:797–808.
40. Li P, Dong M, Wang Z. Downregulation of TSPAN13 by miR-369-3p inhibits cell proliferation in papillary thyroid cancer (PTC). *Bosn J Basic Med Sci.* 2019;19:146–154.

41. Ni QF, Tian Y, Kong LL, Lu YT, Ding WZ, Kong LB. Latexin exhibits tumor suppressor potential in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2014;31:1364–1372.
42. **Li A, Yan Q, Zhao X**, Zhong J, Yang H, Feng Z, et al. Decreased expression of PBLD correlates with poor prognosis and functions as a tumor suppressor in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7:524–537.
43. Wu B, Zhang XJ, Li XG, Jiang LS, He F. Long non-coding RNA Loc344887 is a potential prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21:3808–3812.
44. Qiu LM, Sun YH, Chen TT, Chen JJ, Ma HT. STRIP2, a member of the striatin-interacting phosphatase and kinase complex, is implicated in lung adenocarcinoma cell growth and migration. *FEBS Open Bio.* 2020;10:351–361.
45. **Wu XC, Wang SH**, Ou HH, Zhu B, Zhu Y, Zhang Q, et al. The NmrA-like family domain containing 1 pseudogene Loc344887 is amplified in gallbladder cancer and promotes epithelial-mesenchymal transition. *Chem Biol Drug Des.* 2017;90:456–463.
46. Qi M, Liu SM, Ji W, Wang HL. ATP6V0D2, a subunit associated with proton transport, serves an oncogenic role in esophagus cancer and is correlated with epithelial-mesenchymal transition. *Esophagus.* 2020;17:456–467.

9. 図表

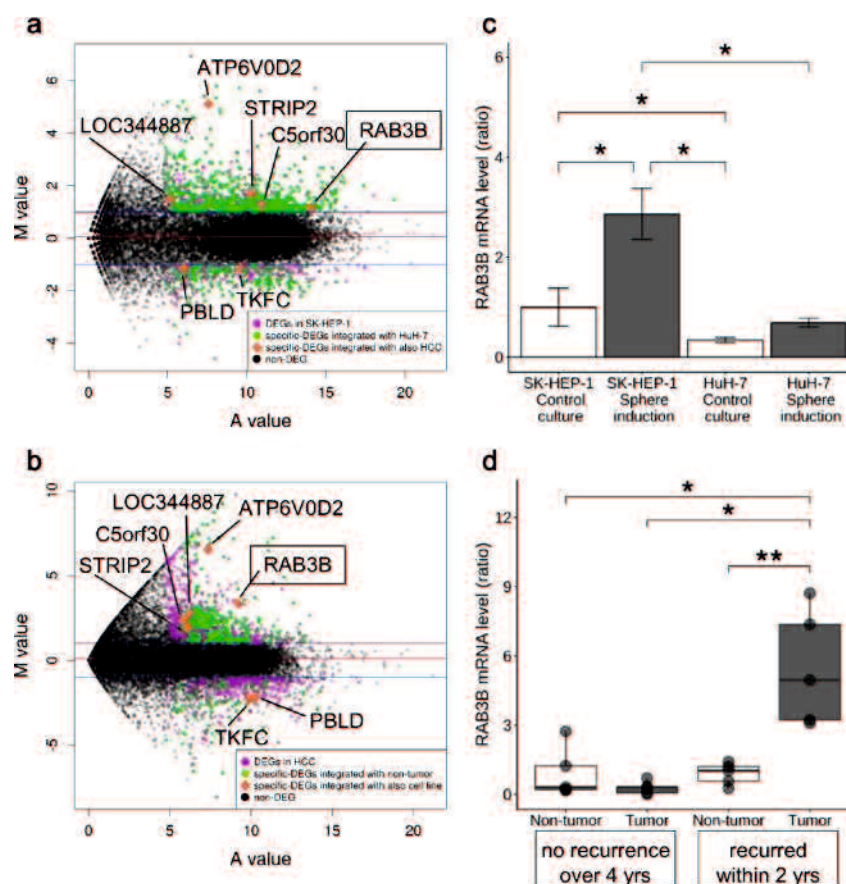


図 1. *RAB3B* mRNA レベル

(a および b) RNA 配列解析から作成した M-A プロット。各遺伝子について、2つのサンプルにおける平均発現量の \log_2 値 (A, x 軸) と 2つのサンプル間の倍率変化の $\log_2 \log_2$ 値 (M, y 軸) をプロットした。(a) マゼンタの点は SK-HEP-1 細胞における有意な発現変動遺伝子 (DEG) を示す。緑色の点は、スフィアを形成しない HuH-7 細胞を用いた解析では有意に変化しないスフィア特異的 DEG を示す。(b) マゼンタ色の点は、再発の有無にかかわらず、原発性 HCC における有意な DEG を示す。また、緑のドットは、隣接非がん肝組織標本と比較して HCC で有意な DEG を表す。オレンジの菱形は a と b で重複する DEG を示す。細胞株 (c) および臨床検体 (d) の *RAB3B* mRNA レベルを qRT-PCR で測定し、SK-HEP-1 細胞または非がん肝組織での発現に対する比率で表した。HCC と隣接する非がん肝組織標本のペアからなる無再発例 ($n=5$) および再発例 ($n=5$) を使用した。* $P < 0.05$ (Tukey-Kramer 多重比較検定)。** $P < 0.05$ (対応のある t 検定)。

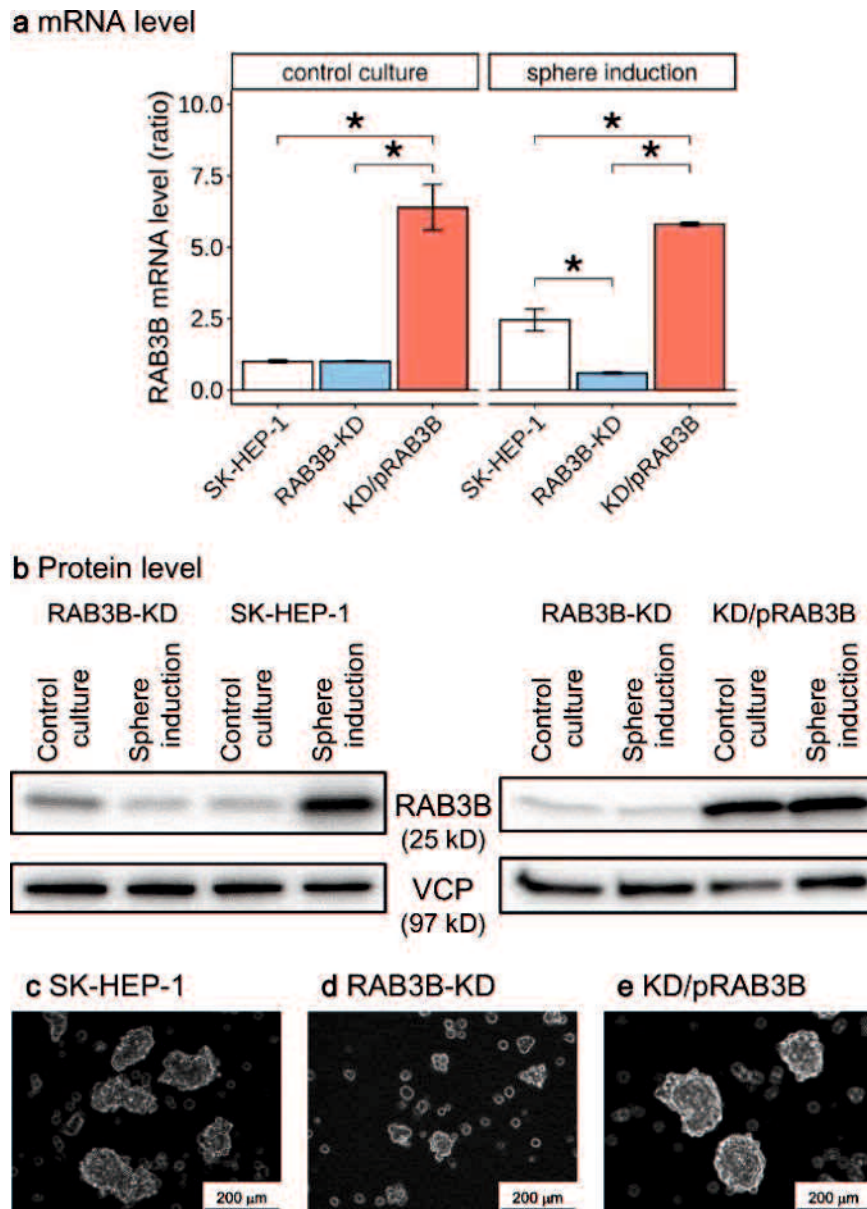


図 2. SK-HEP-1 派生細胞株の *RAB3B* 発現とスフィア形成能

(a) SK-HEP-1 派生細胞株における *RAB3B* mRNA のレベル。*RAB3B* mRNA レベルは qRT-PCR を用いて定量し、参照細胞 (対照培地で培養した SK-HEP-1 細胞) からの値の平均比として値を正規化した。 $*P < 0.05$ (Tukey-Kramer 多重比較検定)。(b) 上下のイムノブロットは同じゲルから作成し、ブロットを表示サイズ付近で分離した後、それぞれ各抗体と反応させた。SK-HEP-1 細胞 (c)、ゲノム編集した *RAB3B* を保有する SK-HEP-1 派生細胞 (d)、*RAB3B* 発現ベクターである p*RAB3B* を保有する *RAB3B* 編集 SK-HEP-1 派生細胞 (e) からのスフィア細胞。

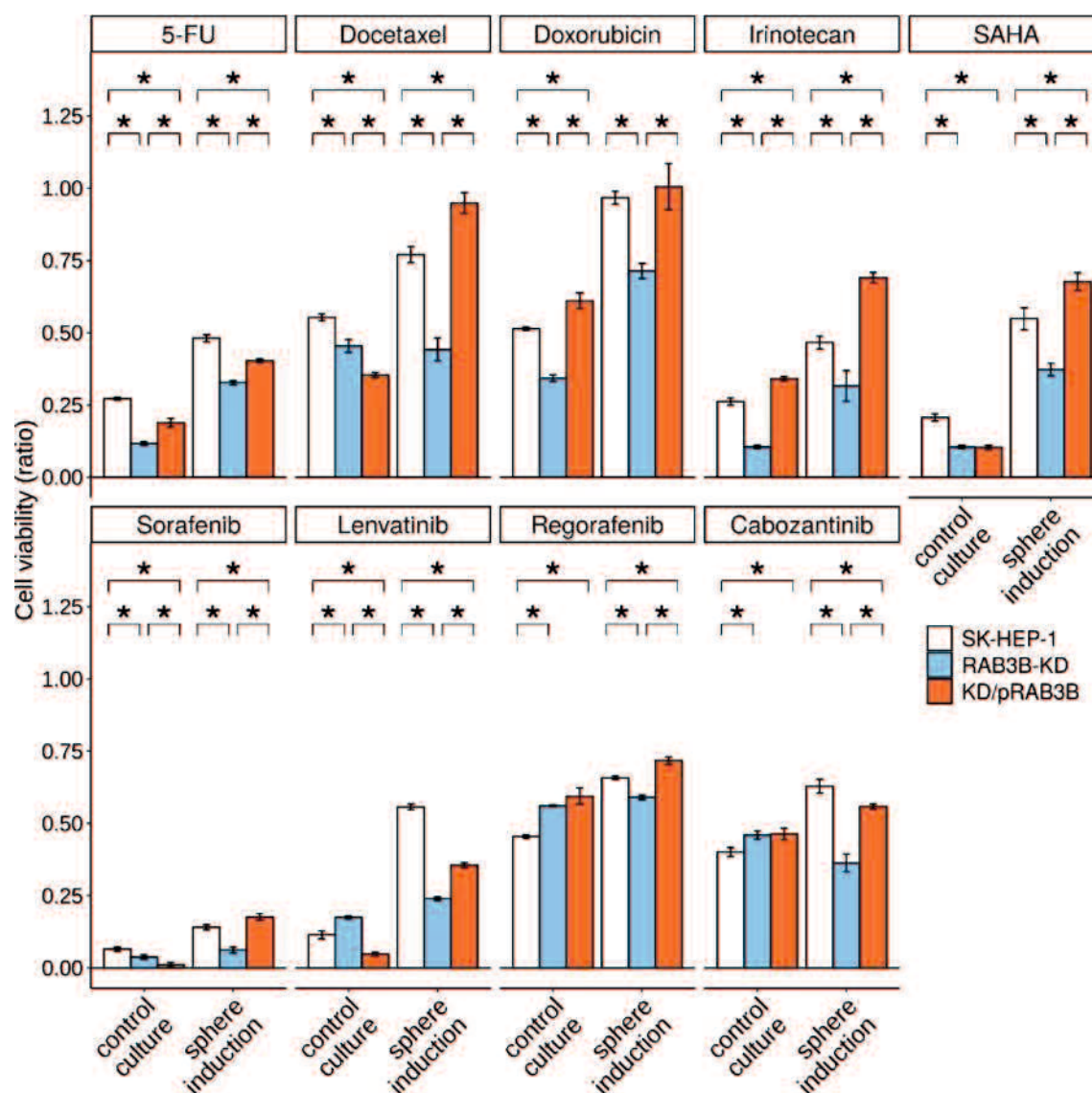


図 3. SK-HEP-1 派生細胞株の抗がん剤に対する感受性

抗がん剤 (5-フルオロウラシル、ドセタキセル、ドキソルビシン、イリノテカン、SAHA、ソラフェニブ、レンバチニブ、レゴラフェニブ、カボザンチニブ) 存在下の SK-HEP-1 (白カラム)、RAB3B-KD (青カラム)、KD/pRAB3B (サーモン色カラム) の生存率を MTS アッセイにて評価した。各抗がん剤について、左右 3 列ずつ対照条件下とスフィア誘導条件下の細胞についてのデータを表している。* $P < 0.05$ (Tukey-Kramer 多重比較検定)。

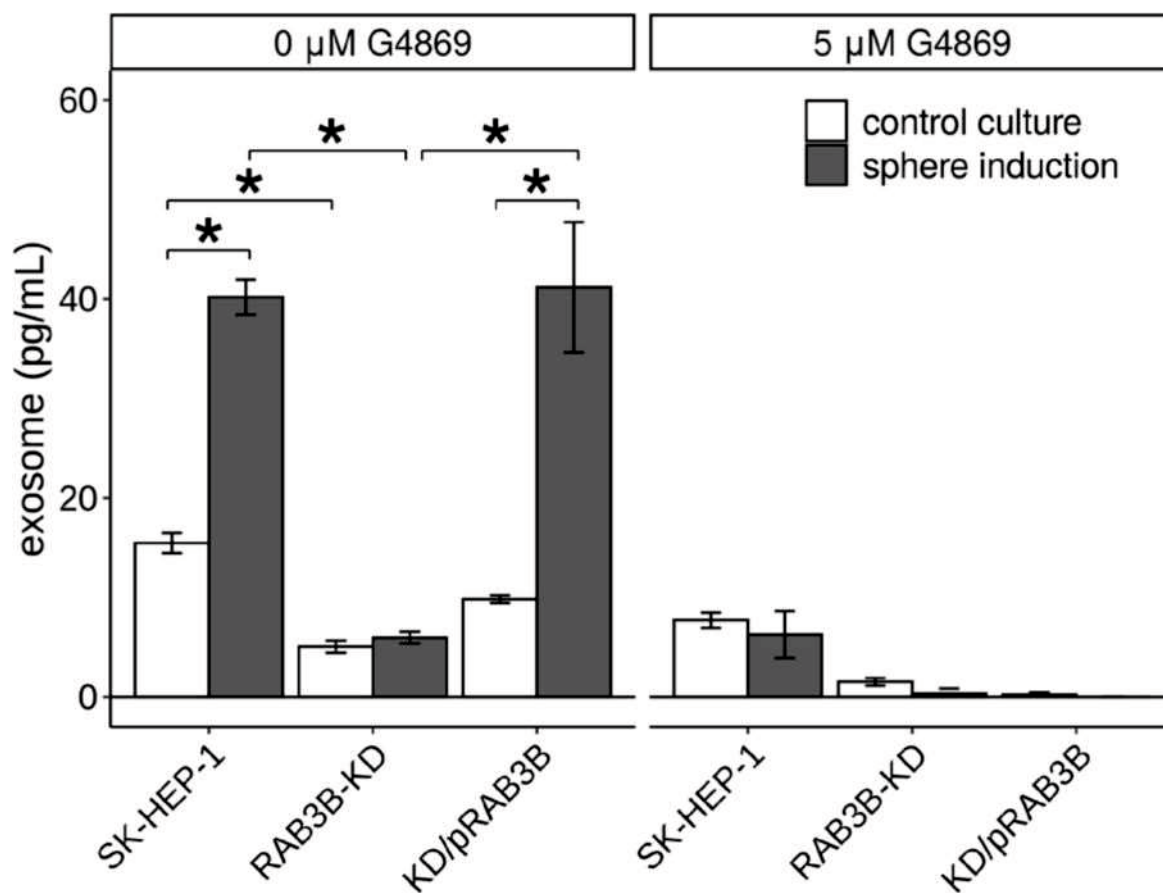


図 4. SK-HEP-1 派生細胞株からのエクソソーム放出量

白色および灰色のカラムは、それぞれ対照培地およびスフィア誘導培地からのエクソソーム定量値を示す。必要に応じて、エクソソーム阻害剤である GW4869 塩酸塩水和物 (最終濃度 5 μM) を添加した。* $P < 0.05$ (Tukey-Kramer 多重比較検定)。

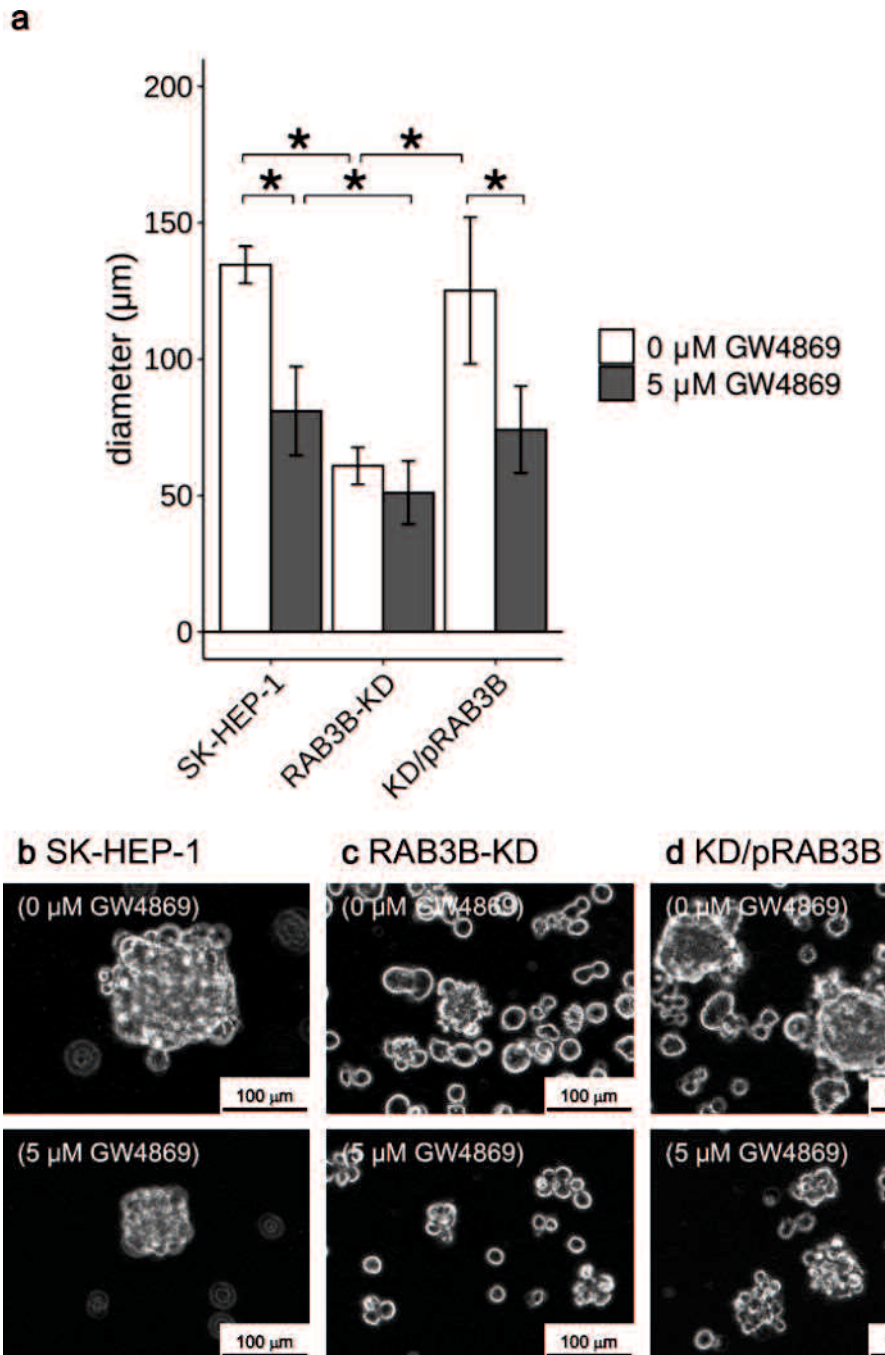


図 5. SK-HEP-1 誘導体細胞のスフィア形成に対するエクソソーム阻害剤の効果

(a) スフィア細胞の大きさ。白色および灰色のカラムは、エクソソーム阻害剤である GW4869 塩酸塩水和物 (最終濃度 5 μM) 非存在下および存在下のスフィア細胞の大きさを示す。* $P < 0.05$ (Tukey-Kramer 多重比較検定)。(b-d) 5 μM GW4869 非存在下 (上段パネル) と存在下 (下段パネル) におけるスフィア細胞の代表像。

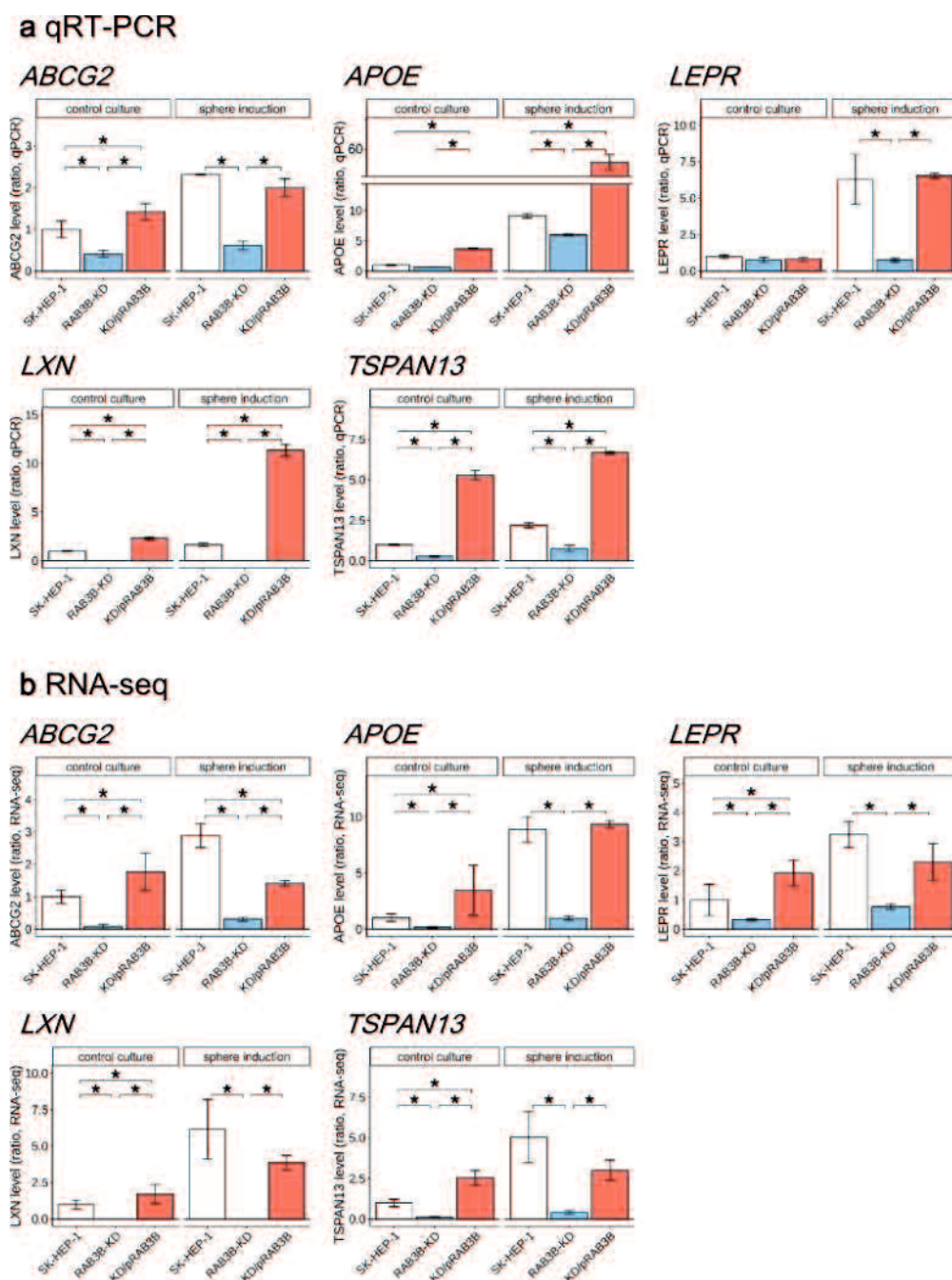


図 6. RAB3B 影響 CSLC 特異的遺伝子発現

(a) RAB3B 影響下 CSLC 特異的遺伝子として 5 つの遺伝子 (*ABCG2*, *APOE*, *LEPR*, *LXN*, *TSPAN13*) が確認された。SK-HEP-1 細胞 (白カラム)、*RAB3B*-KD 細胞 (青カラム)、KD/p*RAB3B* 細胞 (サーモン色カラム) からの各遺伝子の mRNA 発現を qRT-PCR で評価した。* $P < 0.05$ (Tukey–Kramer 多重比較検定)。(b) RNA-seq でカウントした mRNA 発現量。* $q < 0.05$ 。

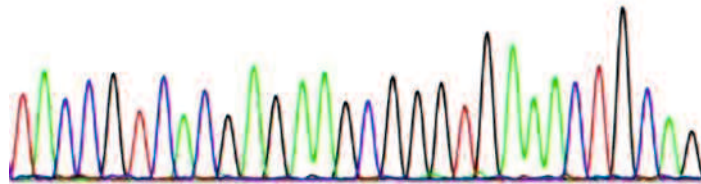
表 1. *RAB3B*-KD 細胞の肝転移能

	10 ³ cells inoculation				10 ⁴ cells inoculation			
	yes	no	(% of yes)	<i>P</i> *	yes	no	(% of yes)	<i>P</i> *
SK-HEP-1[†]								
Control	3	19	(14%)	0.018	7	3	(70%)	0.216
Sphere	9	9	(50%)		8	0	(100%)	
<i>RAB3B</i>-KD								
Control	1	5	(17%)	1.000	6	3	(67%)	1.000
Sphere	4	20	(17%)		5	2	(71%)	

**P* 値 (Fisher's 正確確立検定)。

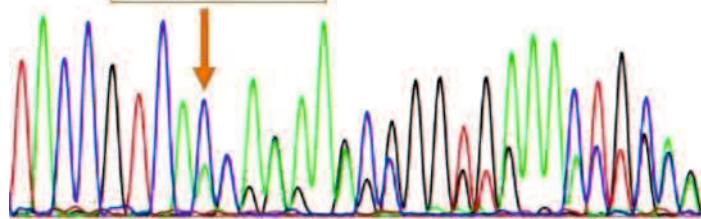
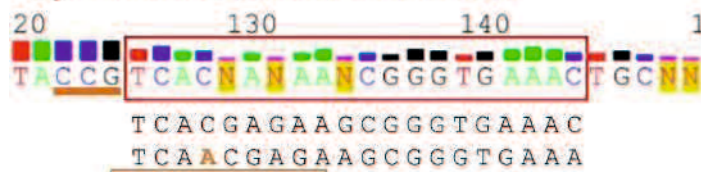
[†]SK-HEP-1 のデータは我々の既報データ [18]。

a) *RAB3B*



10	20	30	40	50	60
MASVTDGKTG	VKDASDQNF	YMKLLIIGN	SSVGKTSFLF	RYADDTFPA	FVSTVGIDFK
70	80	90	100	110	120
VKTVYRHEKR	VKLQIWDTAG	QERYRTITTA	YRGAMGFIL	MYDITNEESF	NAVQDWATQI
130	140	150	160	170	180
KTYSWDNAQV	ILVGNKCDME	EERVVPTEKG	QLLAEQLGFD	FFEASAKENI	SVRQAFERLV
190	200	210	220	230	240
DAICDKMSDS	LTDPSMLGS	SKNTRLSDTP	PLLQNCSC*		

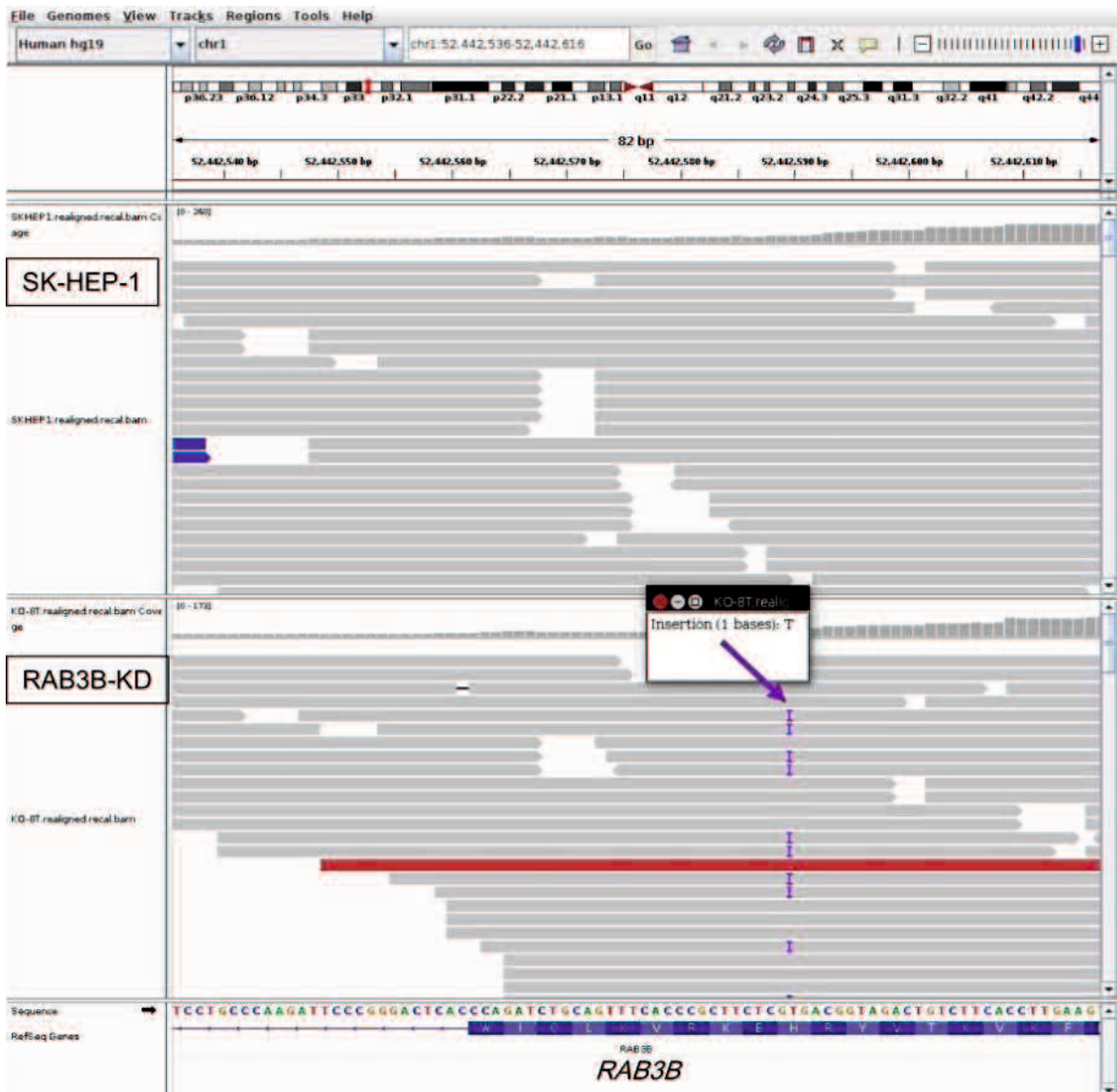
b) *RAB3B_CRISPR/Cas9*



10	20	30	40	50	60
MASVTDGKTG	VKDASDQNF	YMKLLIIGN	SSVGKTSFLF	RYADDTFPA	FVSTVGIDFK
70	80	90	100	110	120
VKTVYR	REA	GETADLGHWS	AGAVPDHNS	LLPWGHLHS	DV*

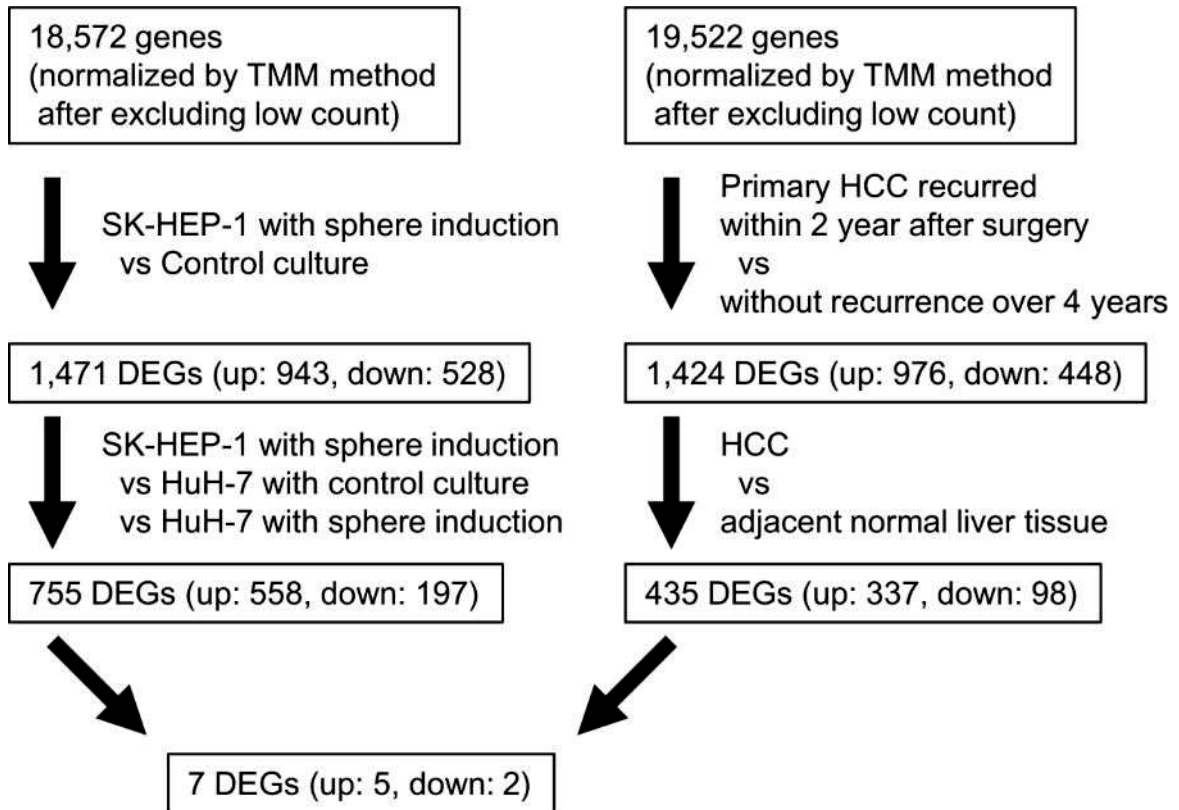
補足図 S1. *RAB3B* のゲノム編集

各パネルにおける上段と下段はサンガーシーケンシングデータと対応する翻訳アミノ酸配列を示す (a) 野生型 *RAB3B* の配列におけるプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) とガイド RNA の配列を示す。(b) ヘテロ変異を伴う *RAB3B* 配列と、その結果生じる切断アミノ酸配列を示す。



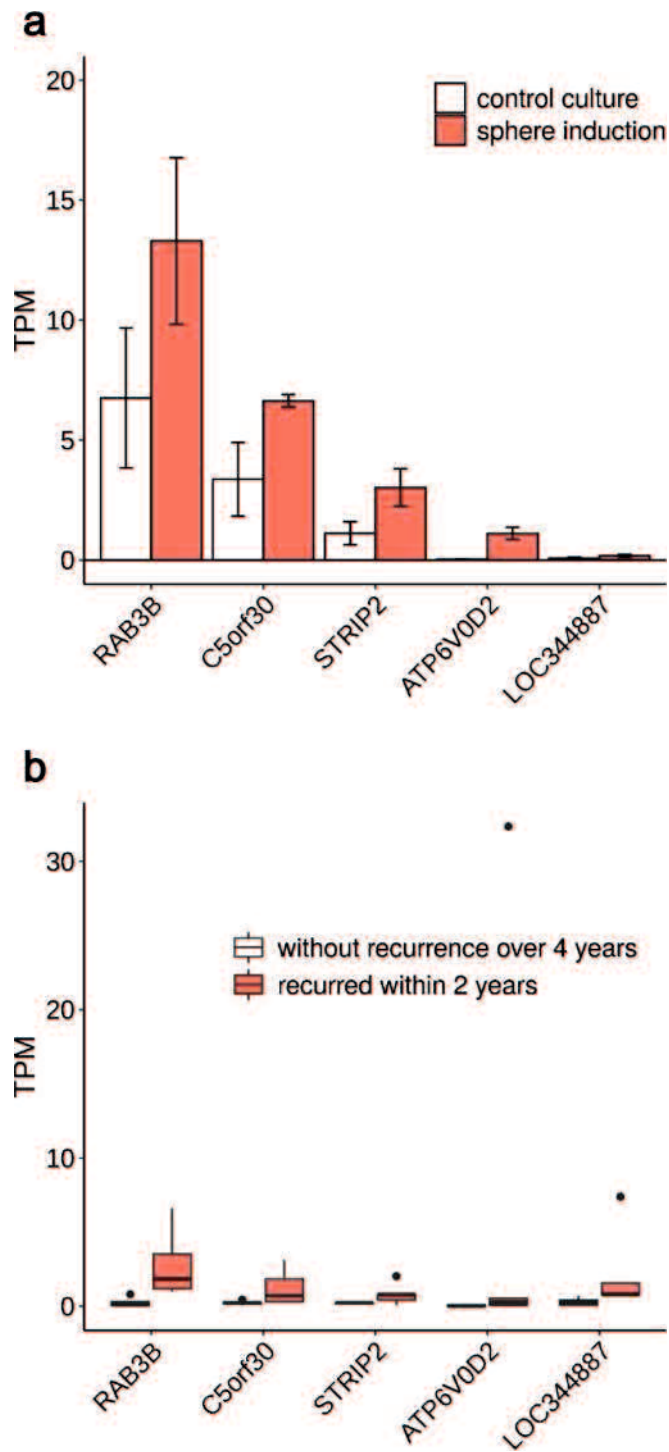
補足図 S2. 編集された RAB3B のゲノム表示

SK-HEP-1 (上図) およびその派生株である *RAB3B*-KD 細胞 (下図) のゲノム DNA を TruSeq Rapid Exome Library Prep Kit および NextSeq 500 (Illumina) を用いて全エクソン配列解析した。フィルタリングしたショートリードは BWA (version 0.7.12) で参照ゲノム (hg19) にマッピングされた。画像は IGV (version 2.9.4) を用いて作成した。*RAB3B*-KD 細胞では、1 番染色体 : 52,442,589 に 37% (11/30 個) の頻度で "T" が挿入されたリードが検出された。Strelka (version 0.4.10.2) を用いた変異解析の結果、ゲノム編集のオフターゲット効果による挿入・欠失の変異は認められなかった。



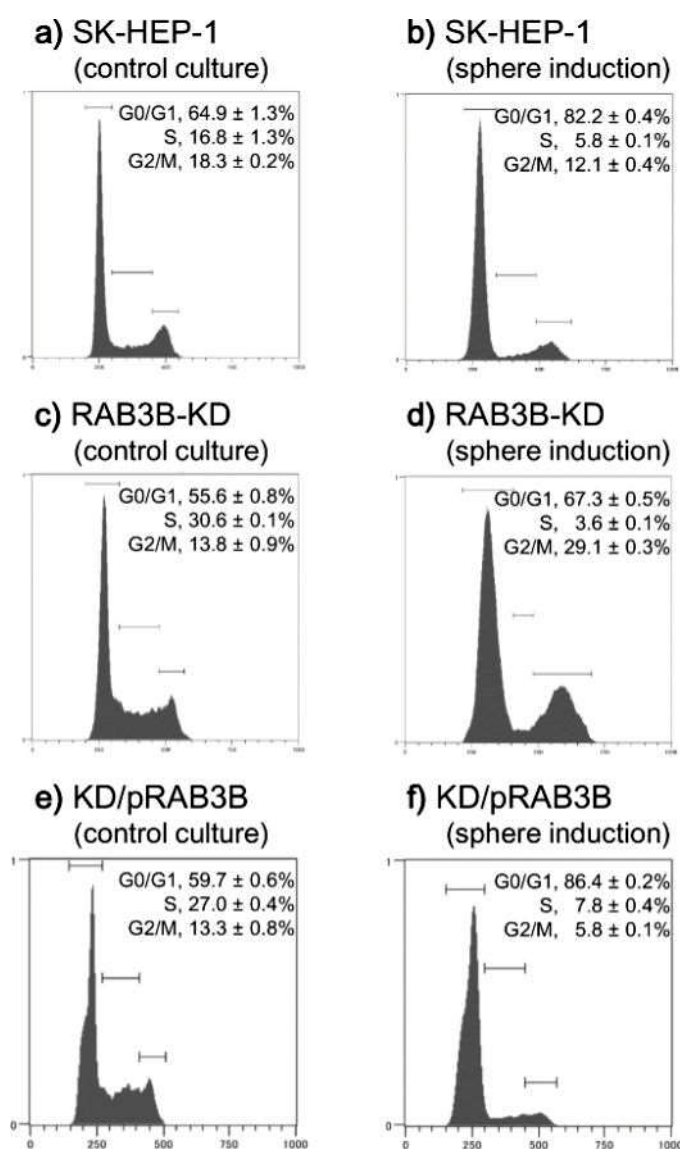
補足図 S3. がん幹細胞や予後不良肝細胞がんの特異的な遺伝子の同定の模式図

左側は SK-HEP-1 細胞のスフィア誘導条件下と対照条件下での比較。右側は HCC 検体の術後再発の有無での比較。スクリーニング開始遺伝子の数は、全サンプルのフラグメント数の合計がサンプル数の半分以上であった遺伝子の数である。DEG は、2 倍以上の発現変化と $q < 0.05$ を示し、高発現群の平均フラグメント数が 50 以上である発現変動遺伝子を意味する。



補足図 S4. RNA-seq 解析を用いて決定した同定遺伝子の mRNA レベル

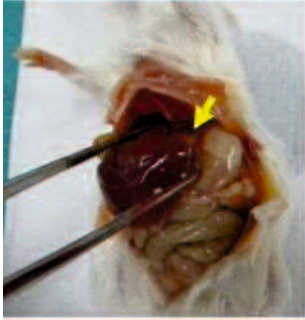
SK-HEP-1 細胞 (a) および臨床検体 (b) において同定された 5 つのがん幹細胞特異的
発現上昇遺伝子の mRNA レベルを TPM (Transcripts per million) として表した。



補足図 S5. 細胞周期解析

SK-HEP-1 (a および b)、RAB3B-KD (c および d)、KD/pRAB3B (e および f) 細胞をそれぞれの対照条件下 (a, c, e) とスフィア誘導条件下 (b, d, f) での細胞周期分布を測定した。培養後、Accumax (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA, USA) を用いて細胞を解離させ、ヨウ化プロピジウム (PI) 染色後に細胞周期の分布をフローサイトメトリーで解析した。細胞は 70%エタノールで固定し、PI/RNase Staining Buffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) に再懸濁した。細胞の DNA 含量は、MACSQuant アナライザー (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて分析した。各パネルは、代表的なヒストグラムを示す。

SK-HEP-1
(normal condition)



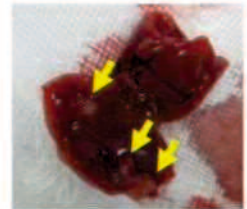
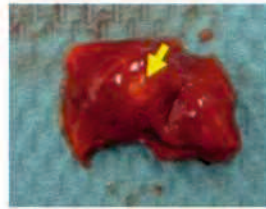
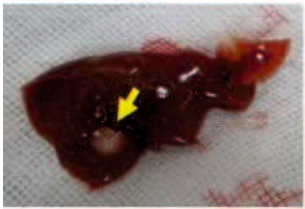
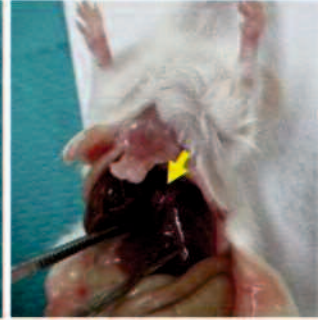
SK-HEP-1
(sphere condition)



RAB3B-KD
(normal condition)

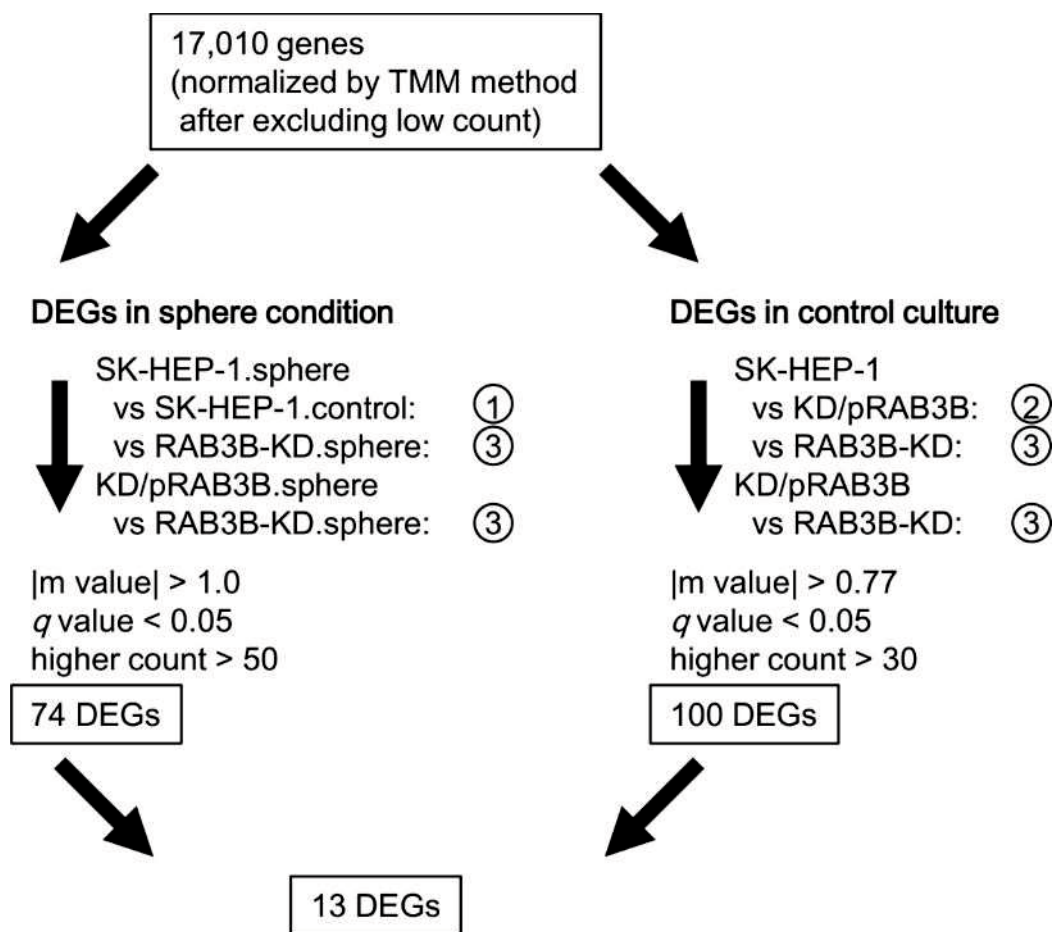


RAB3B-KD
(sphere condition)



補足図 S6. *RAB3B*-KD 細胞の肝転移能

細胞の転移能は、NOD-Rag1^{null} IL2rg^{null} 二重変異体マウスへの脾臓注入により評価した。表 1 と対応する、マウスに 1×10^4 個の細胞を移入した際の代表画像。*RAB3B*-KD は SK-HEP-1 細胞株由来の *RAB3B* 編集クローンである。黄色の矢印は形成された腫瘍を示す。



補足図 S7. RAB3B 影響下のがん幹細胞様細胞 (CSLC) 特異的遺伝子同定の模式図

SK-HEP-1 細胞株、SK-HEP-1 派生細胞株である *RAB3B*-KD および KD/p*RAB3B* を用いて、RNA-seq 解析により *RAB3B* 影響下の CSLC 特異的発現変動遺伝子 (DEG) を同定した。左側はスフィア誘導条件下における DEG を、補足図 S3 記載と同じ基準で同定した。右側は対照条件下における *RAB3B* 影響遺伝子を、1.7 倍以上の発現変化と $q < 0.05$ を示し、高発現群の平均フラグメント数が 30 以上の DEG とした。丸囲み数字は本文に示したスクリーニング基準である。スクリーニング開始遺伝子数の表示は、全サンプルのフラグメント数の合計がサンプル数の半分以上である遺伝子数を示している。

補足表 S1. 本研究で使用したプライマーと加水分解プローブ

Gene	Sequence
<i>RAB3B</i>	
5'-primer	5'-GGTTGTTCCCACTGAGAAGG-3'
3'-primer	5'-TTGCACTGGCTTCAAAGAAA-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #17*
<i>ABCG2</i>	
5'-primer	5'-TTCCACGATATGGATTTACGG-3'
3'-primer	5'-GTTTCCTGTTGCATTGAGTCC-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #29*
<i>APOE</i>	
5'-primer	5'-GGTCGCTTTTGGGATTACCT-3'
3'-primer	5'-CATGGTCTCGTCCATCAGC-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #17*
<i>LEPR</i>	
5'-primer	5'-CATCAGTGACATGTGGTCCTCT-3'
3'-primer	5'-ACCCTCAGCCTCAGAGAAGTT-3'
Hydrolysis probe	none**
<i>LNX</i>	
5'-primer	5'-ACTGTCAAGCAAGTGCAAAGAA-3'
3'-primer	5'-CTTCCTTTGGCAGACGGCTA-3'
Hydrolysis probe	none**
<i>TSPAN13</i>	
5'-primer	5'-GCCATGTGCTCCAATCATAG-3'
3'-primer	5'-GCCAAACACCCAGGATCTC-3'
Hydrolysis probe	UPL Probe #67*
<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*

*Universal ProbeLibrary probes (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) の番号。

**加水分解プローブの代わりに SYBR Green I を使用。