

学 位 論 文

A study of rBC2LCN as a novel cancer stem cell marker of oral
squamous cell carcinoma cells

(口腔扁平上皮癌細胞の新たな癌幹細胞マーカーとしての糖
鎖認識 レクチン rBC2LCN に関する研究)

学位申請者 中峠洋隆

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

主指導教員：岡本 哲治 教授

(応用生命科学部門 分子口腔医学顎顔面外科学)

平成 28 年度

第1章 緒言

癌組織は一様な細胞集団ではなく、多様な細胞集団から構成され、その中でも細胞周期の遅い細胞群は、ごく少数でも癌を生体内に再構築でき、放射線療法や化学療法に対して抵抗性を示すことから、癌における幹細胞(癌幹細胞)である可能性が示唆されていた (Reya, et al, 2001). 近年、癌は幹細胞能力と癌形成能を併せ持つ少数の癌細胞群と、同細胞に由来した幹細胞の特性を持たない細胞群により形成、維持されていることが示され、癌幹細胞は癌治療における新たな標的細胞として注目されてきている (Tan, et al, 2006; Ailles, et al, 2007; Kvinlaug, et al, 2007; Lobo, et al, 2007).

癌幹細胞の特徴として正常幹細胞と同様に、① 未分化な表面形質を示す (Gilbert, et al, 2009), ② 自己複製能により癌幹細胞集団を維持する (Schatton, et al, 2009), ③ 多分化能を有し多様な癌細胞に分化する (Gupta PB, et al, 2009), ④ 高い薬剤耐性を示す (Hermann, et al, 2007), ⑤ 高い腫瘍形成能を示す (Folkins, et al, 2009), などがあげられている. そのため、癌幹細胞は癌の発生・進展のみならず再発、転移および治療抵抗性にも深く関与していると考えられている (Dalerba, et al, 2007; Trumpp, et al, 2008; Visvader, et al, 2008; Jones, et al, 2009).

癌幹細胞研究においては、他の細胞集団から幹細胞群を正確に分離・同定することが重要である. 現在までに癌幹細胞の特徴を利用した色々な分離方法が報告されている. まず、正常幹細胞の機能的特徴を利用した方法として、ABC トランスポーター分子 (Zhou, et al, 2001; Huls, et al, 2008) による色素や薬剤排出能力を利用した方法

である。つまり幹細胞では、その生存のため非幹細胞と比較して ABC トランスポーターが高発現されているため、DNA 結合蛍光色素 Hoechst33342 (Goodell, et al, 1996) で処理すると、ABC トランスポーター高発現細胞は Hoechst33342 を排出するという染色抵抗性を利用したもので、UV 光で励起すると大部分の Hoechst33342 による蛍光強度の高い細胞集団 (main population) よりも蛍光強度の低い細胞群つまり side population (SP) 細胞群がフローサイトメトリーで分離されるが、この SP 細胞群には高頻度に癌幹細胞が存在するといわれ、乳癌、肺癌および脳腫瘍でがん幹細胞として報告されている (Hirschmann-Jax, et al, 2004; Kondo, et al, 2004; Hadnagy, et al, 2006; Ho, et al, 2007; Wu, et al, 2008; Charafe-Jauffret, et al, 2009)。次に、細胞表面マーカーを利用して分離する方法がある。急性骨髄性白血病 (AML) の癌幹細胞が CD34 陽性/CD38 陰性細胞群により濃縮されることが報告されて (Lapidot, et al, 1994) 以来、色々な分子が癌幹細胞で特異的に発現する細胞表面マーカーとして検討されている (Deonarain, et al, 2009)。このような癌幹細胞表面マーカーの発現パターンの同定は、癌幹細胞を検出する有効な手段および抗体治療の標的となると考えられ、最近最も広く認識されている細胞表面マーカーとしては、組織幹細胞マーカーである CD44, CD133 (prominin 1), CD34 等が有力である (Major et al. 2013)

1875 年、Cohnheim は癌幹細胞が組織幹細胞から発生するという説 (コーンハイム仮説) をすでに提唱しており、正常幹細胞と癌幹細胞の関係の重要性を示唆した。

近年 induced pluripotent stem (iPS) 細胞に代表されるような、幹細胞研究の進展により、多能性幹細胞に関連した知見が集積されてきて

おり，多能性幹細胞としての特徴を備えた細胞が癌幹細胞となり得る可能性，すなわち共通性が考えられている．(Lessard, J ら 2003, Barker ら 2009)

未分化多能性幹細胞マーカーとして SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 が用いられているがこれらのエピトープは糖鎖であり，糖鎖構造の特異性を認識する抗体が広く用いられ，組織幹細胞マーカーとは性質が異なっている．(Adewumi ら 2007, Wright ら 2009) 特定の糖鎖構造を認識結合するタンパク質の総称としてレクチンが存在し，これら，未分化多能性幹細胞の表面上の特異的な糖鎖構造を認識，結合できるレクチンの存在が想定された．2013 年，レクチンアレイより *Burkholderia cenocepacia* (バークホルデリア・セノセパシア菌) に由来するリコンビナントレクチン rBC2LCN はこの未分化多能性幹細胞の特異的な糖鎖構造を認識し，かつ分化した体細胞では糖鎖構造の変化からその結合は失われる事が報告された．(Tateno ら 2013) さらに，蛍光色を結合させた rBC2LCN を用いる事で，未分化多能性幹細胞を生存状態のままで標識することや，再生医療に腫瘍化の問題となる未分化多能性幹細胞の残存を効果的に検出・除去する事への有効性が示された．(Tateno ら 2013) このことから，未分化多能性幹細胞は rBC2LCN 認識糖鎖を発現しているが，一方で癌細胞集団内においてその糖鎖発現細胞が存在するのか，また，発現細胞が存在する場合，未分化多能性幹細胞の持つ特徴を有する細胞であるのか，癌幹細胞としての特徴を有するか否かは一切報告がない．

本研究では，ヒト口腔扁平上皮癌 (OSCC) における癌幹細胞を標的とした新しい診断・治療法を開発することを目指し，未分化多能性幹細胞

胞の細胞表面上に発現する特異的な糖鎖構造を認識するレクチンである rBC2LCN を利用し，ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株より分離した rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞群の細胞・分子生物学的特性の解析を行った．

第2章 材料と方法

第1節 細胞培養法と細胞の調整

1) 基礎栄養培地の調整

DMEM (Sigma-Aldrich) と Nutrient Mixture Ham F-12 (Sigma-Aldrich) (Ham, 1963) を 1:1 に混合した培地を Milli-Q 水に溶解し, 90mg/L ペニシリン G ナトリウム, 90mg/L カナマイシン, 165mg/L ピルビン酸ナトリウム, 20mM N-2 ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸 (HEPES) 及び 2.0g/L 重炭酸ナトリウムを添加後, pH. 7.4 に調整し, PVDF メンブレンフィルター (孔径 $0.25\mu\text{m}$) で濾過滅菌し, DF 培地とした (Barnes and Sato, 1980; Darmon, et al, 1981).

2) 血清添加培地の調整

DF 基礎栄養培地に 5%ウシ血清 (SH30072.03, AQC23417, Hyclone) を添加し, DF5%CS 培地とした.

3) 無血清培地の調整

DF 基礎栄養培地に, human transferrin ($5\mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich), ヒトリコンビナント insulin ($10\mu\text{g/ml}$) (0105, KSK), $10\mu\text{M}$ 2-mercaptoethanol, $10\mu\text{M}$ 2-aminoethanol, 10nM sodium selenite (以上, 片山化学, 大阪), oleic acid ($4\mu\text{g/ml}$) (oleic acid と fatty acid-free bovine serum albumin を 2:1 のモル比で混合させた FAF-BSA-oleic) (以上 Sigma-Aldrich) の 6 種類の因子 (6F) を加えた

無血清培地を，DF6F 培地とした (Sato, et al, 1987; Myoken, et al, 1989).

4) 細胞株と培養方法

OSCC 由来細胞株として，著者の所属する研究室で樹立し，細胞バンクに登録されている以下の2細胞株を用いた．UE (HO-1-U-1) 細胞株 (Miyuchi, et al, 1985) ，NA (HO-1-N-1) 細胞株 (Miyuchi, et al, 1988) ，を用いた．扁平上皮細胞株として A431 外陰部由来扁平上皮癌細胞株 (Giard DJ, et al. 1973) を用いた．これらの細胞株を DF6F 培地にて，100mm 径培養皿 (Beckton Dickinson Falcon, USA) 上で，37°C，5%CO₂ 気相下で培養した．継代培養は各細胞の増殖飽和前に以下の方法で行った．細胞を 0.05% trypsin (Sigma-Aldrich) と 0.04% エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA ; 同仁化学) を含む Dulbecco' s Ca²⁺，Mg²⁺-free phosphate-buffer saline (PBS(-)) (Trypsin/EDTA) で分散後，trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich) で trypsin を中和後，継代培養を行った．

第2節 各細胞株における rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞群の存在の有無の検討

1) rBC2LCN-FITC によるフローサイトメトリーおよびセルソーティング

各細胞株を増殖飽和前まで培養し，継代培養法に準じて Trypsin/EDTA にて細胞を分散後，Trypsin inhibitor で中和し，単一細胞とした．これらの細胞を Running buffer に浮遊させた．Running

buffer は PBS(-)に 0.5% BSA と EDTA(2mM)を加え作製した. 続いて, 40 μ m 径のフィルターを通過させた細胞懸濁液に 1:100 の濃度で rBC2LCN-FITC (Wako Japan) 添加し, 1 時間室温でインキュベートした. 生細胞と死細胞を判定するため propidium iodine(PI)(Invitrogen USA) を 2 μ g/ml で添加し 30 分室温でインキュベートした. 次に, この細胞懸濁液を SH800 セルソーター (SONY Japan) にてフローサイトメトリー解析及び, セルソーティングを行い, これら癌細胞株においても rBC2LCN が認識する糖鎖を発現しているか否かを検討した.

2) rBC2LCN-FITC を用いたライブセルイメージング

セルソーティングにて, rBC2LCN 認識糖鎖陽性, 及び陰性細胞を分離後, それぞれ 6cm 径細胞培養皿 (Beckton Dickinson Falcon, USA) に DF6F 無血清培地を用いて播種し, 約 60%コンフルエント状態まで 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 気相下で培養した. 続いて, rBC2LCN-FITC (Wako Japan) を 1:1000 の濃度で加えた DF6F 培地に交換し, 1 時間 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 気相下で培養後, 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, LSM700, Jena, Germany) を用いて観察した.

3) rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞の無血清单層培養系における細胞増殖能の検討

セルソーティングにより, rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞を分離し, 24 穴マルチプレート(16mm 径)(Beckton Dickinson Falcon USA) に, 各ウェルあたり 2×10^3 /ml の細胞密度で DF6F 無血清培地を用いて播種し無血清单層培養を行い, 6 日間継日的にコールターカウンターにて細胞数を計測し, 細胞増殖能を検討した.

4) rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞の無血清浮遊培養系における浮遊細胞塊 (sphere) 形成能の比較

セルソーティングで分離した rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞を、超親水性処理低吸着性細胞培養皿 Prime Surface (Sumitomo Bakelite Japan) (35mm 径) 上に $5.0 \times 10^2/\text{ml}$ の細胞密度で 2 ml の DF6F を用いて播種し培養した。播種直後に全ての細胞が単一であることを確認した。1, 3, 5, 7 日後に位相差顕微鏡 ECLIPSE TE300 (Nikon, Japan) 下で sphere 数および sphere 形態を計測・評価した。さらに 2 週間後に rBC2LCN-FITC (Wako Japan) を 1:1000 の濃度で加えた DF6F 培地に交換し、1 時間 37°C, 5%CO₂ 気相下で培養後、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて sphere 細胞塊中における rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞の存在様態を観察した。

第 3 節 DNA マイクロアレイによる rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞及び陰性細胞における遺伝子発現の解析

1) Total RNA の抽出と定量

Ho-1-U-1 細胞株よりセルソーターを用いて rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ分離後、6cm 径細胞培養皿 (Beckton Dickinson Falcon) に播種し DF6F 無血清培養にて増殖飽和前まで増殖させた。Total RNA は Trizol reagent (Invitrogen USA) を用いて抽出し、分光光度計 (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, (株)エル・エス・エス, 東京) にて total RNA 量を定量した。さらにバイオアナライザー

(Agilent USA) を用いて total RNA integrity number (分解程度) を確認・評価した.

2) cRNA のラベル化, ハイブリダイゼーション, スキャン及び定量化

Agilent ラベル化キット (Agilent USA) を用いてラベル化 cRNA を合成し, 56°C, 17 時間ハイブリダイズさせた. スキャニングと定量化は agilent スキャナを用いて行った (Agilent USA). 得られたデータは Excel (Microsoft USA) にて解析した.

第 4 節 rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞における IGF-2 発現の定量とその機能評価

1) Droplet digital PCR 法を用いた rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞および陰性細胞における IGF-2 mRNA 発現量の定量

第 3 節 (1) に準じて精製した total RNA をテンプレートに, SuperScript® VILO (Invitrogen USA) を用いて cDNA を合成した. 得られた cDNA を 1:100 に Nuclease-Free water で希釈し, QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad US) を用いた droplet digital PCR 法にて IGF-2 mRNA の発現を絶対定量した. Droplet digital PCR は以下の方法で行った. QX100 droplet generator (Bio-Rad USA) によりおよそ 2 万個の droplet (21 μ l) に cDNA, IGF-2 特異配列プライマー (F: GCTGGCAGAGGAGTGTCC R: GATTCCCATTGGTGTCTGGA), ユニバーサルプローブ #10 (Roche Germany), 2XddPCR master mix (Bio-Rad USA) を分配した. 続いて, C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad USA)

により,ディネイチャー 94℃, 30 秒,アニーリング及び伸長反応 54℃, 1分30秒のサイクルを40サイクル行い, droplet 中でPCR反応を行った. 反応後の droplet は, QX100 droplet リーダーにてポジティブ droplet とネガティブ droplet 数を計測することで, IGF-2 mRNA のコピー数を定量した. 対照として, Universal Probe Library Human GAPD Gene Assay (Roche Germany) キットを用いて GAPDH mRNA コピー数を測定し, IGF-2 mRNA コピー数÷GAPDH mRNA コピー数により, IGF-2 の relative expression を求めた.

2) ウェスタンブロット法による rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞および陰性細胞における IGF-2 発現の検討

セルソーティングによって分離した rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ 60mm 径細胞培養皿に DF6F 無血清培地を用いて播種し増殖飽和前まで培養後に, PBS(-)にて3回洗浄し RIPA バッファー (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% TritonX-100, pH7.4) に protease inhibitor cocktail P8340 (Sigma-Aldrich USA) を 1:100 濃度で添加した cell lysis buffer で細胞を回収した. 続いて, 遠心 (13,000g, 10 分間) 後上清を回収し, Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific USA) にてタンパク量を定量した. 次に, 10µg の各サンプルを 12% SDS-PAGE 法にて電気泳動後, PVDF メンブレン (Bio-Rad USA) 上に転写した. メンブレンを 5% スキムミルク (雪印, 群馬) にて室温 30 分浸漬しブロッキングを行った. 一次抗体として抗 IGF-2 抗体 0.125µg/ml (ab9574 rabbit polyclonal, abcam), 抗 β -actin 抗体 0.5µg/ml (017-24551 mouse monoclonal, Wako) を

TBS-T wash buffer (0.1%Tween20) にて希釈し, 4°C下 overnight 処理した. メンブレンを TBS-T wash buffer にて 5 分間, 3 回洗浄後, HRP ラベル化抗ウサギ IgG 抗体 57.5ng/ml (GTX221666-01 GeneTex) 及び HRP ラベル化マウス IgG 抗体 0.2µg/ml (GTX221667-01 GeneTex) を TBS-T wash buffer にて希釈し室温下 30 分間処理した. メンブレンを TBS-T wash buffer にて 5 分間, 3 回洗浄後, ECL 試薬(Bio-Rad USA) を用いて化学発光させ, デジタル検出システム ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad USA) にて検出した.

3) rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞における Akt-Pathway 分子のリン酸化の検討

レクチン陽性及び陰性細胞を DF6F 培地を用いて培養後, phosphatase 及び protease inhibitor 含有 RIPA cell lysis Buffer にて細胞を溶解し, 13,000g, 10 分間遠心後, 上清を回収した. BCA Protein Assay Kit によりタンパク濃度を定量した. 総タンパク 20µg に IRS-1 (Ser636/Ser639) , PTEN (Ser380) , Akt (Ser473) , GSK-3alpha/beta (Ser21/Ser9) , BAD (Ser136) , mTOR (Ser2448) , p70 S6Kinase (Thr389) , S6Ribosome Protein (Ser235/Ser236) の各リン酸化認識抗体結合ビーズを加え, 16 時間室温下反応させた. これにビオチン化標識検出抗体を加え 30 分反応させた後, さらにストレプトアビジン結合 PE(phycoerythrin)を加え, 10 分間反応させ, BioPlex200 システム(Bio-Rad USA)にて Akt-Pathway 分子のリン酸化を解析した.

4) IGF-2 及び IGF-2 中和抗体の rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞及び陰性細胞の sphere 形成能に及ぼす影響

第 2 節 (4) の方法に準じて, rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞及び陰性細胞を分離後, 細胞低吸着性ディッシュ (Sumitomo Bakelite Japan) (35mm 径) へ播種し, ヒトリコンビナント IGF-2 (rhIGF-2) (R&D USA) を 0, 1, 5, 10, 50ng/ml の各濃度で添加し, DF6F を用いて無血清浮遊培養を行い, sphere 形成能を評価した. また, IGF-2 中和抗体 (ab9574 rabbit polyclonal, abcam UK) を 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5µg/ml の濃度で添加後, 同様に sphere 能を検討した.

5) IGF-2 及び IGF-2 中和抗体の rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞及び陰性細胞における rBC2LCN 認識糖鎖の発現に及ぼす影響

各細胞を rhIGF-2 (R&D USA) (0, 1, 5, 10, 50ng/ml) 及び IGF-2 中和抗体 (ab9574 rabbit polyclonal, abcam UK) (0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5µg/ml) をそれぞれ含む DF6F 培地で, 48 時間 37°C, 5%CO₂ 気相下で培養した. 続いて, 第 4 節 2) の方法に準じてタンパク抽出, 定量を行い, 各サンプル (10µg) を 10% SDS-PAGE により電気泳動後, PVDF メンブレンに転写した. 次に, 一次抗体として rBC2LCN-FITC (1:2000 濃度) (Wako Japan) 及び抗 β -actin 抗体 (0.5µg/ml) (017-24551 mouse monoclonal, Wako) を TBS-T wash buffer に希釈し 4°C 下 overnight 処理した. 続いて, TBS-T wash buffer で洗浄し, 二次抗体として HRP ラベル化抗 FITC 抗体 (1:2000 濃度) (P5100 Dako Denmark) 及び HRP ラベル化抗マウス IgG 抗体 (0.2µg/ml) (GTX221667-01 GeneTex) を 30 分間, 室温で処理した. TBS-T wash buffer で洗浄後 ECL 試薬によ

り化学発光させ，デジタル検出システム ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad USA) にて検出した．バンドの強度は Bio-Rad Image Lab software (Bio-Rad USA) を用いて定量し，rBC2LCN 認識糖鎖発現量を β -actin 発現量で割ったものを relative expression として算出した．

第 5 節 rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞及び陰性細胞の培養上清 (conditioned medium:CM) からの exosome の精製とその評価

1) 各細胞株の CM からの exosome の精製

A431, Ho-1-N-1, Ho-1-U-1 細胞株を 100mm 径細胞培養皿 (Beckton Dickinson Falcon) に DF6F 培地を用いて播種し，増殖飽和状態の細胞を PBS (-) にて 2 回洗浄後，DF 基礎栄養培地に交換した．48 時間 37°C，5 % CO₂ 気相下で培養し，培養上清を conditioned medium (CM) として回収した．CM を 1800rpm, 15 分間遠心後，0.45 μ m フィルターでろ過した．続いて，total exosome isolation® kit (invitrogen USA) を用いて CM 中の exosome を精製した．タンパク定量は Qubit® Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) にて測定した．

2) ウエスタンブロット法による exosome の品質評価

Exosome (1 μ g) を 10% あるいは 12% SDS-PAGE にて電気泳動・分離後，PVDF メンブレンに転写した．5% スキムミルクにてブロッキングを行い，一次抗体として Cytochrome C (556433 mouse monoclonal, Becton Dickinson 0.5 μ g/ml), CD9 (sc-59140 Santa Cruz 0.5 μ g/ml), CD63 (353013 mouse monoclonal, BioLegend 5 μ g/ml), CD81 (sc-23962 mouse monoclonal, Santa Cruz 1 μ g/ml) を 4°C 下，一昼夜処理した．TBS-T

にて洗浄後, 2次抗体として HRP ラベル化抗マウス IgG 抗体(0.2 μ g/ml) (GTX221667-01 GeneTex) を処理し, 室温下 30 分間インキュベートした. TBS-T にて洗浄し, ECL 試薬にて化学発光させ, デジタル検出システム ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad USA) にて検出した.

3) 精製 Exosome の細胞内再取り込み能の検討

第 5 節 (1) で得られた exosome 10 μ g を, 等量の PKH26 (mini26-1KT sigma-aldrich 4 μ M) と混和し 5 分間室温にて反応し, exosome を標識した. 限外ろ過フィルター Amicon Ultra 0.5ml 100K (Merck USA) (14000g, 2 分間 4 回遠心して, 未反応 PKH26 を除去後, PBS(-) に懸濁し, PKH26 標識 exosome とした. PKH26 標識 exosome (PKH26-exosome) を 0, 250, 500, 1000ng/ml の濃度で培養細胞に添加し. 同時に Hoechst33342 (H3570 invitrogen USA 1:100000) にて核染色を行って上で. 12 時間 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 気相下でインキュベート後, 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, LSM700, Jena, Germany) で観察した.

4) 各細胞由来 exosome の sphere 形成に及ぼす影響

rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞及び陰性細胞を分取し, 第 5 節 (1) の方法に準じて CM から exosome を精製した. 第 5 節 (2) の方法により CD9 発現評価を行い, rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞に陰性細胞由来 exosome を, 陰性細胞に陽性細胞由来 exosome を, 0, 250, 500, 1000 ng/ml 濃度条件で添加し, Sphere 形成能を第 2 節 (4) の方法に従って検討した.

5) 各細胞由来 exosome の rBC2LCN 認識糖鎖発現に及ぼす影響

rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞，陰性細胞を分取し，第 5 節（1）及び（2）の方法に従い exosome を精製し，さらに CD9 発現の評価を行った後，rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞に陰性細胞由来 exosome を，また陰性細胞に陽性細胞由来 exosome を，0, 250, 500, 1000 ng/ml の濃度で 48 時間 DF6F で培養後，rBC2LCN 認識糖鎖発現に及ぼす各 exosome の影響を第 4 節（5）の方法に準じてウエスタンブロット法で検討した．

第3章 結果

1. 各細胞株における rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞群の同定とその細胞特性

1) 各種癌細胞株における rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞の存在とその存在比

A431, Ho-1-U-1, Ho-1-N-1 細胞株を DF5%CS 培地での培養条件下で維持培養し, フローサイトメトリーにて rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞の存在の有無を検討した. その結果, これらの細胞株には rBC2LCN 認識糖鎖を発現する陽性細胞が存在することが明らかとなった. またその全細胞中における存在比は, Ho-1-N-1 細胞株では 1.5%, Ho-1-U-1 株では 2.0%, A431 株では 1.3%であった (図2). また, これらの細胞株を DF6F 無血清培地を用いた培養条件下で20継代後にフローサイトメトリーにて rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞の存在比を検討したところ, A431 細胞株, Ho-1-U-1 細胞株においては陽性細胞の顕著な増加を認められた. 一方, Ho-1-N-1 細胞株ではほとんど差を認めなかった (図3).

2) ソーティング後の rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞のライブセルイメージングと継代培養後の陽性及び陰性細胞率の変化の検討

A431, Ho-1-U-1, Ho-1-N-1 細胞株よりセルソーターによって rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞の分離を行い, 無血清单層培養状態でライブセルイメージングにて rBC2LCN 認識糖鎖の発現状態の確認を行うと陽性細胞は陰性細胞と比較して強い蛍光が見られた. (図4)

一継代後に， rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞率をセルソーターを用いて検討した結果， わずか一継代で， 陽性細胞群からは陰性細胞群が， また陰性細胞群からは陽性細胞群が出現していた（図5）．

3) rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞における無血清单層培養系での増殖能

Ho-1-U-1 細胞株を rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞に分離し， DF6F を用いた無血清单層培養系にて増殖能を比較したところ， 各群の増殖能に有意な差は認められなかった（図6）．

4) rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞における無血清浮遊培養系での sphere 形成能

rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞における sphere 形成能は陰性細胞のそれと比較し， 早期に大きな多数の sphere を形成した（図7）． また， sphere 数は有意に陽性細胞で亢進していた（図8）．

5) Sphere 細胞塊中における rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞の存在動態

rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞及び陰性細胞由来 sphere における rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞を， ライブセルイメージングで検討した結果， 陽性細胞由来 sphere 及び陰性細胞由来 sphere のいずれにおいても， rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞が存在している事が明らかになった（図9）．

2. DNA マイクロアレイによる rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞及び陰性細胞における遺伝子発現及びその比較検討解析

1) rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞における DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の差異

DNA マイクロアレイの解析の結果, rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞において陰性細胞と比較して 20 倍以上の発現亢進を示した遺伝子は 7 種類認めた. 中でも IGF-2 の発現は, 陽性細胞において陰性細胞と比較して 60 倍以上亢進していた (表 1) .

3. rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞における IGF-2 遺伝子及びタンパク発現の定量

1) droplet digital PCR による IGF-2 mRNA 発現量の定量

Droplet digital PCR 法による rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞における IGF-2 mRNA 発現量比較では陽性細胞は陰性細胞と比較して約 20 倍発現が亢進していた. (図 10)

2) ウェスタンブロット法による IGF-2 発現量の比較

ウェスタンブロット法による解析では rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞では陰性細胞と比較して細胞内における IGF-2 タンパク発現量が亢進していた. (図 10)

4. rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞における Akt-Pathway 分子のリン酸化

1) rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞における Akt-Pathway リン酸化の検討結果

rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞では陰性細胞と比較して IRS-1 (Ser636/Ser639) , PTEN (Ser380), Akt (Ser473), GSK-3alpha/beta (Ser21/Ser9) , BAD (Ser136), mTOR (Ser2448), p70 S6Kinase (Thr389) , S6Ribosome Protein (Ser235/Ser236)リン酸化サイトでのリン酸化が亢進していた。(図 1 1)

これらの結果から rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞では IGF-Akt Pathway の機能亢進性のリン酸化亢進状態であることが示唆された。(図 1 2)

5. IGF-2 及び IGF-2 中和抗体の各細胞における sphere 形成及び rBC2LCN 認識糖鎖発現に及ぼす影響

1) IGF-2 及び IGF-2 中和抗体の sphere 形成に及ぼす影響

IGF-2 および, IGF-2 中和抗体の, rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞の sphere 形成能に及ぼす影響を検討した.

IGF-2 は 1, 5, 10, 50ng/ml 濃度で検討した結果, 濃度依存的に陰性細胞における sphere 形成能を促進した. 一方, IGF-2 中和抗体は 0.1, 0.5, 1.0, 2.5µg/ml の濃度で検討した結果, 陽性細胞の sphere 形成能を低下させることが示された (図 13) .

2) IGF-2 及び IGF-2 中和抗体の rBC2LCN 認識糖鎖発現に及ぼす影響

IGF-2 及び IGF-2 中和抗体の各細胞における rBC2LCN 認識糖鎖発現への影響をウエスタンブロット法にて検討した。IGF-2 は 1, 10, 50ng/ml 濃度で検討した結果、濃度依存的に rBC2LCN 認識糖鎖陰性細胞における糖鎖の発現を上昇させた。一方で、IGF-2 中和抗体は 0.5, 1.0, 2.5µg/ml の濃度で、rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞における糖鎖発現を低下させた (図 14)。

6. rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞における exosome の細胞生物学的差異の検討

1) 各細胞株由来 CM からの exosome 精製とその評価

A431, Ho-1-N-1, Ho-1-U-1 細胞株由来 CM からそれぞれ exosome を精製し、評価した。得られた exosome は、ウエスタンブロットにて cytochrome C の発現を認めなかったことから、細胞成分のコンタミネーションは無いことが示された (図 15)。さらに、exosome マーカーとして知られている CD9, CD63, 及び CD81 の精製 exosome における発現を検討した結果、これらのマーカーは細胞分画において発現を認めたが、精製 exosome では CD9 のみが発現されている事が明らかとなった (図 15)。精製 exosome が細胞に再取り込みされるか否かについて、PKH26 にて標識した exosome を用いて検討したところ、exosome の濃度依存的に赤色の蛍光小胞が標的細胞内に確認されたことから、精製 exosome は細胞内への再取り込み能を有していることが明らかとなった (図 16)。

2) rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞及び陰性細胞由来 exosome の各細胞における sphere 形成能に及ぼす影響

rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞由来 exosome は、陰性細胞の sphere 形成能を促進し、sphere 数の増加と大きさの著しい亢進が認められた。特に、500, 1000ng/ml の濃度で有意にスフェア形成能を促進した。またさらに、陰性細胞由来の exosome は、陽性細胞の sphere 形成能を抑制する傾向を示し、特に 250ng/ml の exosome 濃度では有意にスフェア形成を低下させた。(図 17, 18)。

3) rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞及び陰性細胞由来 exosome の各細胞における rBC2LCN 認識糖鎖発現に及ぼす影響

(2)と同様に、陽性及び陰性細胞由来 exosome の、それぞれ陰性細胞及び陽性細胞における rBC2LCN 認識糖鎖発現に及ぼす影響を検討した結果、陽性細胞由来 exosome は濃度依存的に陰性細胞における rBC2LCN 認識糖鎖発現を亢進させた(図 19)。

第4章 考察

悪性腫瘍が幹細胞を起源とする仮説は、First formulated in 1875, Julius Cohnheim, proposed that stem cell misplaced during embryonal development were the source of tumors later in the life <embryonal-rest theory >, Bruce ら (Bruce, et al, 1963) が、悪性腫瘍内の少数の細胞のみが腫瘍形成能を有することから、悪性腫瘍は自己複製能を有する少数の特別な癌細胞により維持されているという仮説を報告したことに端を発する。しかしながら、この仮説は広く受け入れられず、悪性腫瘍は均一な癌細胞集団と、これら細胞集団が巻き込んだ正常細胞から構成されるヘテロ細胞集団と考えられ、悪性腫瘍の大部分を占めるいわゆる癌細胞（非癌幹細胞）を対象とした研究が精力的に進められてきた。しかし 1994 年に、急性骨髄性白血病 (AML) において癌幹細胞様の細胞集団が同定され (Lapidot, et al, 1994), それ組織幹細胞の細胞生物学的特性と類似しており、CD34+CD38- の表現型を持つ白血病幹細胞のみが免疫不全マウスでの造腫瘍性を有する事が示され、造血幹細胞としての表現型と類似していることが証明された。以来、さまざまな固形腫瘍にも幹細胞が存在し、腫瘍の発生・進展・維持に重要な役割を果たしている可能性が明らかにされつつある。つまり、癌組織には自己複製能を有し、半永久的に娘細胞を生み続ける少数の細胞群と、高い増殖能を持つが、最終的には分化や老化により増殖能を失う大多数の細胞群からなることが明らかになってきた。このことは、正常の組織幹細胞とそれから生じた分化細胞のような関係が癌組織にも存在していることを示唆している。このような幹細胞

胞様の癌細胞つまり癌幹細胞は、放射線や抗癌剤に対する抵抗性も高いことが予想されている。事実、化学療法、放射線療法や手術療法後、臨床的に CR を示した症例が数年後に再発する事はよく経験するが、これら治療抵抗性や再発例に癌幹細胞が関与していると考えられる。

(Dalerba, et al, 2007; Trumpp, et al, 2008; Visvader, et al, 2008; Jones, et al, 2009)

癌幹細胞は、正常組織幹細胞そのものに遺伝子変化が蓄積した細胞なのか、あるいは正常幹細胞から分化方向へ トランジット中の細胞に遺伝子変化が蓄積し癌化した細胞なのか、あるいは 変異が蓄積したトランジット細胞に何らかのリプログラミングが起これり幹細胞機能を再獲得した細胞なのか不明であるが、癌の起源となる細胞と考えられており、癌幹細胞と組織幹細胞との間には、その自己複製能や分化能の制御機構に多くの共通性があることが予想される。(Lessard, Jら 2003, Barker ら 2009)

人工多能性幹 (iPS) 細胞は (Takahashi ら 2007), エピジェネティックな変化が起こっている分化した体性細胞に、oct3/4, sox2, klf4, c-Myc の 4 種類の遺伝子を導入することにより、自己複製能と多分化能を再獲得した細胞であるが、これら遺伝子のうち、c-myc は癌遺伝子であり klf4 は癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子としても機能することから、iPS 細胞の誘導機構に類似した機構が癌幹細胞の誘導にも関与している可能性が考えられている。一方、組織幹細胞などの正常幹細胞が未分化性と多分化能を維持するためには、それを可能にする微小環境(ニッチ)が必要と考えられており、ニッチ内で幹細胞の数や細胞分裂、分化が制御されている可能性が高い。したがって、癌幹細胞においても、正常組織幹細胞と類似した自己複製能と分化能を維持す

る機構すなわちニッチが存在している可能性が高い（図1）。

そこで私は、ES/iPS細胞などの未分化な多能性幹細胞が特異的に発現する糖鎖構造を認識するレクチンである rBC2LCN の口腔扁平上皮癌細胞の幹細胞マーカーとしての可能性を検討し、その腫瘍形成のメカニズムとがん微小環境（ニッチ）の維持メカニズムを解明し、放射線感受性や腫瘍発生メカニズムを明らかにすることを目指した。

rBC2LCN 認識糖鎖は未分化多能性幹細胞の細胞表面上に発現する糖タンパクのポドカリクシンに付加される特異的な糖鎖構造を認識していると考えられている（Tateno ら 2013）。この糖鎖抗原はES細胞やiPS細胞などの未分化多能性幹細胞にのみ発現し、ES細胞やiPS細胞から分化した細胞や体性細胞では発現しない（Tateno ら 2013）。糖鎖発現状態は糖転位酵素によりコントロールされていると考えられているが、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い（Kizuka ら 2014）。rBC2LCN 認識糖鎖は機能的な側面は未だ不明であるが、未分化多能性幹細胞における機能維持に関連して発現しているものと考えられている（Tateno ら 2013）。

rBC2LCN 認識糖鎖発現細胞は口腔扁平上皮癌細胞株 Ho-1-U-1 細胞株及び Ho-1-N-1 細胞株でそれぞれ 2.0% 及び 1.5% 存在した。また、外陰部扁平上皮癌細胞株である A431 細胞株においても 1.3% の陽性細胞の存在が認められた。これら細胞は無血清浮遊培養系で陰性細胞に比較して高い sphere 形成能を示したことから、癌幹細胞としての特徴を持つことが明らかとなった。このことから、未分化多能性幹細胞に特異的な糖鎖抗原と、癌幹細胞における糖鎖抗原の発現が共通である可能性が示唆された。

陽性細胞と陰性細胞の特性を明らかにするために、各細胞をセルソ

ーターにより分離し，無血清单層培養系で継代をすると，わずか1継代後でも陽性細胞群から陰性細胞群が，陰性細胞群から陽性細胞が出現したこと，さらに，陽性細胞由来 sphere 及び陰性由来 sphere のいずれにも陽性細胞が含まれていたことから，陽性細胞と陰性細胞は互いにトランジットする関係にあると考えられた．さらに，血清培養系から無血清培養系への変更によってこれらの変化が生じたことから，これらの発現は，何らかの因子によって制御されている事が強く示唆された．

DNA マイクロアレイを用いた解析では陽性細胞において陰性細胞と比較し IGF-2 の発現が 60 倍以上亢進しており，droplet digital PCR 及びウエスタンブロットの結果からも，陽性細胞において IGF-2 の mRNA とタンパクレベルでの発現亢進が認められる事が明らかになった．このことから，陽性細胞の機能維持において IGF-2 が重要な機能を担っている可能性が考えられた．各細胞における IGF-2 に関わる細胞シグナル伝達 pathway を明らかにするため，IGF-Akt pathway 分子のリン酸化について検討したところ，陽性細胞では陰性細胞に比較して，一様に Akt-Pathway 分子のリン酸化が促進している事が明らかになった．Akt-Pathway は細胞の生存，増殖，分化，糖代謝，タンパク質合成の機能を担う重要なシグナル伝達系であり，癌幹細胞としての機能維持に重要な機能を果たしていると考えられた．

IGF-2 が糖鎖発現に重要な機能を果たしている可能性は，リコンビナント IGF-2 が陰性細胞の sphere 形成能を濃度依存的に促進したこと，また rBC2LCN 認識糖鎖の発現を亢進した事，さらには IGF-2 中和抗体が陽性細胞の sphere 形成や rBC2LCN 認識糖鎖の発現を低下させたことから強く裏付けられた．

近年、IGF-2 及びそのシグナル分子をターゲットとした分子標的治療薬のいくつかは臨床試験段階にあることが報告されている (Helen ら 2013) . これらは IGF-2 をターゲットとした中和抗体, IGF-2 のレセプターである IGF-1R に対する競合抗体, IGF-1R のチロシンキナーゼ活性阻害剤等である. これら薬剤を用いることで, 本研究において明らかになった幹細胞における機能維持に重要な IGF-2 の機能阻害を行うという, 癌幹細胞をターゲットとした治療戦略の展開が期待される (図 20) .

rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞における exosome の生物活性の差異を検討することで, 各細胞間の相互作用, ニッチ形成についてのメカニズムを明らかにした. Exosome は直径 40nm~150nm 程度の細胞外小胞であり, Johnstone らにより命名された (Johnstone ら 1983). Exosome 小胞中にはタンパク質, mRNA, miRNA 等の情報伝達物質が内包されている. このため, 細胞間の情報伝達に関わり, 形質の伝播や癌細胞ニッチ形成に関わっていることが考えられる. 本研究ではまず, 扁平上皮細胞株 A431, Ho-1-N-1, Ho-1-U-1 細胞株よりポリマー沈殿法にて exosome の精製を行った. 精製した exosome にはミトコンドリア内膜成分である cytochrome C は検出されず, 細胞成分のコンタミネーションが無いことが確認された. また, 本精製 exosome は exosome マーカーとしてテトラスパニンファミリーである CD9 を発現している事が明らかになった. CD9 は肺がん細胞由来 exosome 等においても発現の見られる exosome マーカーである (Yoshioka ら 2013) . また, exosome は精製過程で exosome の細胞再取り込み機能が低下する可能性が報告されているため, PKH26 標識 exosome による細胞内再取り込み能を検討した結果, 濃度依存的に exosome の細胞内取り込みが確認

されたことから、本精製 exosome のクオリティーが担保されていることが確認された。今回、無血清培養系で長期間培養している細胞の CM から精製した精製した exosome は CD9 のみを発現していることが明らかとなった。腫瘍細胞由来 exosome では、CD9 に加えて CD63 及び CD81 が発現されていることが報告されている (Yoshioka ら 2013)。これは exosome の精製方法にも依存している可能性は否定できないものの、これらの報告は血清添加培地を用いて培養した細胞から精製した exosome の解析であることから、CD63 や CD81 発現 exosome は血清由来のものである可能性が考えられた。

rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞の CM から精製した exosome を、それぞれ陰性細胞及び陽性細胞に 0, 250, 500, 1000ng/ml の濃度で処理し、rBC2LCN 認識糖鎖の発現及び sphere 形成能を検討したところ、陽性細胞由来の exosome は陰性細胞における rBC2LCN 認識糖鎖の発現及び sphere 形成能を濃度依存的に亢進した。一方、陰性細胞由来 exosome は陽性細胞における sphere 形成能を低下させる傾向を認め、250ng/ml の濃度では有意に低下させた。このことから、陽性細胞由来の exosome には陰性細胞を陽性細胞へトランジットさせる活性を有している事が考えられた。このことは、陽性細胞と陰性細胞は exosome を介して communicate し、癌細胞ニッチ形成において重要な機能を果たしていると考えられた。陽性細胞由来 exosome が、陰性細胞から陽性細胞へのトランジションを引き起こす機構は不明であるが、exosome 内に含まれる細胞増殖因子、miRNA やその他の活性物質の存在が単独あるいは連携してその機能を果たしているものと考えられた。したがって、rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞由来 exosome は、癌幹細胞を含む扁平上皮癌の診断・治療のターゲットとなり得る可能性が示された (図

21) .

Tateno ら, 及び Hirabayashi らは, 細胞障害性毒素結合 rBC2LCN を用いて, ES 細胞や iPS 細胞由来分化細胞による再生医療時において発がん性などの問題となる残存した未分化幹細胞を効果的に除去することができることを報告している (Tateno ら 2015, Hirabayashi ら 2015) . 本研究では未分化多能性幹細胞に発現し rBC2LCN に認識される糖鎖抗原が扁平上皮癌細胞株においても発現し, かつ癌幹細胞としての特徴を有していたことから, 同様の戦略により, 選択的・効果的に rBC2LCN 認識糖鎖発現癌幹細胞を殺滅できる可能性が考えられた.

以上のことから, 未分化な ES/iPS 細胞が特異的に発現する, rBC2LCN レクチンで認識される糖鎖構造を有する細胞が, 各種扁平上皮癌細胞株においても存在し, 同細胞が癌幹細胞として機能している可能性が示されたことから, 糖鎖発現細胞は癌化に深く関わっていることが考えられた.

また, IGF-2 及び exosome は癌幹細胞ニッチの機能維持に重要な機能を果たしていることが考えられ, rBC2LCN 認識糖鎖発現細胞, IGF-Akt Pathway 及び exosome を標的とした口腔扁平上皮癌細胞の診断・治療への応用が考えられた.

総括

本研究では，ヒト口腔扁平上皮癌における癌幹細胞を標的とした新しい診断・治療法を開発することを目指し，ヒト口腔扁平上皮癌細胞株より分離した rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞群の細胞・分子生物学的特性解析を，無血清培養系を用いて行った．その結果以下の事が明らかとなった．

- 1) rBC2LCN が認識する，未分化な ES/iPS 細胞が特異的に発現する糖鎖構造を有する細胞が，各種扁平上皮癌細胞株においても存在していることが明らかとなり，その存在比率は 1.5%~2.0% であった
- 2) rBC2LCN 認識糖鎖を発現する扁平上皮癌細胞（レクチン陽性細胞）はがん幹細胞としての性質を有している可能性が示された
- 3) レクチン陽性細胞では陰性細胞と比較して，IGF-2 遺伝子・タンパク発現の亢進，及び IGF-Akt pathway の活性化を認め，IGF-2 は陰性細胞の陽性細胞へのトランジットを促進した．
- 4) 陽性細胞由来 exosome は陰性細胞の陽性細胞へのトランジットを促進した

以上のことから，未分化な ES/iPS 細胞が特異的に発現する糖鎖構造を有する細胞が，各種扁平上皮癌細胞株においても存在し，同細胞が幹細胞として機能している可能性が示されたことから，糖鎖発現細胞は癌化に深く関わっていることが考えられた．

IGF-2 及び exosome はがん幹細胞ニッチの機能維持に重要な機能を果たしていることが考えられ，rBC2LCN 認識糖鎖発現細胞，IGF-Akt

Pathway 及び exosome を標的とした口腔扁平上皮癌細胞の診断・治療への応用が考えられた。

参考文献

Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, Bello PA, Benvenisty N, Berry LS, Bevan S, Blum B, Brooking J, Chen KG, Choo AB, Churchill GA, Corbel M, Damjanov I, Draper JS, Dvorak P, Emanuelsson K, Fleck RA, Ford A, Gertow K, Gertsenstein M, Gokhale PJ, Hamilton RS, Hampl A, Healy LE, Hovatta O, Hyllner J, Imreh MP, Itskovitz-Eldor J, Jackson J, Johnson JL, Jones M, Kee K, King BL, Knowles BB, Lako M, Lebrin F, Mallon BS, Manning D, Mayshar Y, McKay RD, Michalska AE, Mikkola M, Mileikovsky M, Minger SL, Moore HD, Mummery CL, Nagy A, Nakatsuji N, O'Brien CM, Oh SK, Olsson C, Otonkoski T, Park KY, Passier R, Patel H, Patel M, Pedersen R, Pera MF, Piekarczyk MS, Pera RA, Reubinoff BE, Robins AJ, Rossant J, Rugg-Gunn P, Schulz TC, Semb H, Sherrer ES, Siemen H, Stacey GN, Stojkovic M, Suemori H, Szatkiewicz J, Turetsky T, Tuuri T, van den Brink S, Vintersten K, Vuoristo S, Ward D, Weaver TA, Young LA, Zhang W. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol.* 2007 Jul;25(7):803-16. Epub 2007 Jun 17.

Ailles LE, Weissman IL, Cancer stem cells in solid tumors, *Curr Opin Biotechnol*, 18: 460-466, 2007.

Al-Nedawi K1, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by

microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):619-24. doi: 10.1038/ncb1725. Epub 2008 Apr 20.

Barker N1, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, Clarke AR, Sansom OJ, Clevers H. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature.* 2009 Jan 29;457(7229):608-11. doi: 10.1038/nature07602. Epub 2008 Dec 17.

Barnes D, and Sato HG., Serum-free cell culture: a unifying approach, *Cell*, 22: 649-55, 1980.

Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Birnbaum D., Breast cancer stem cells: tools and models to rely on, *BMC Cancer*,

Chen HX, Sharon E. IGF-1R as an anti-cancer target--trials and tribulations. *Chin J Cancer.* 2013 May;32(5):242-52. doi: 10.5732/cjc.012.10263. Epub 2013 Apr 19.

Dalerba P, Clarke MF, Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory, *Cell Stem Cell*, 1: 241-2, 2007.

Darmon M, Serrero G, Rizzino A, Sato G, Isolation of myoblastic, fibro-adipogenic, and fibroblastic clonal cell lines from a common precursor and study of their requirements for growth and

differentiation, *Exp Cell Res*, 132: 313-27, 1981.

Deonarain MP, Kousparou CA, Epenetos AA, Antibodies targeting cancer stem cells: a new paradigm in immunotherapy?, *MAbs*, 1: 12-25, 2009.

Folkens C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, Hoffman RM, Kerbel RS, Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1, *Cancer Res*, 69:7243-7251, 2009.

Giard DJ, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51: 1417-1423, 1973. PubMed: 4357758

Gilbert CA, Ross AH, Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies, *J Cell Biochem*, 108: 1031-1038, 2009.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC, Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo, *J Exp Med*, 183:1797-1806, 1996.

Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA, Cancer stem cells: mirage or reality?, *Nat Med*, 15: 1010-1012, 2009.

Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D, SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations, *Exp Cell*, 312 : 3701-3710, 2006.

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C, Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer, *Cell Stem Cell*, 1: 313-23, 2007.

Hirabayashi J, Tateno H, Onuma Y, Ito Y. A Novel Probe as Surface Glycan Marker of Pluripotent Stem Cells: Research Outcomes and Application to Regenerative Medicine. *Adv Healthc Mater*. 2015 Nov 18;4(16):2520-9. doi: 10.1002/adhm.201400837. Epub 2015 Apr 14.

Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell MA, Brenner MK, A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells, *PNAS*, 101: 14228-14233, 2004.

Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY, Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells, *Cancer Res*, 67: 4827-4833, 2007.

Huls M, Russel FG, Masereeuw R, The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration, *J Pharmacol*

Exp Ther, 328: 3-9, 2008.

Jones RJ, Cancer stem cells-clinical relevance, J Mol Med, 87: 1105-1110, 2009.

Julius Cohnheim, proposed that stem cell misplaced during embryonal development were the source of tumors later in the life <embryonal-rest theory> First formulated in 1875

Kondo T, Setoguchi T, Taga T, Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line, PNAS, 101: 781-786, 2004.

Kvinlaug BT, Huntly BJ, Targeting cancer stem cells, Expert Opin Ther Targets, 11:915-927, 2007

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice, Nature, 367: 645-648, 1994.

Lessard J, Sauvageau G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. Nature. 2003 May 15;423(6937):255-60. Epub 2003 Apr 20.

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF, The biology of cancer stem cells, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23: 675-99, 2007.

Major AG, Pitty LP, Farah CS. Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Stem Cells Int*. 2013;2013:319489. doi: 10.1155/2013/319489. Epub 2013 Mar 3.

Miyauchi S, Moroyama T, Sakamoto T, Okamoto T, Takada K. Establishment of human tumor cell line (Ueda-1) derived from squamous cell carcinoma of the floor of the mouth, *Jpn. J. Oral. Maxillofac. Surg*, 31: 1347-1351, 1985

Miyauchi S, Moroyama T, Kyoizumi S, Asakawa J, Okamoto T, Takada K, Malignant tumor cell line produced interleukin-1-like factor, *In Vitro cell*, 24: 753-758, 1988.

Nishii T, Yashiro M, Shinto O, Sawada T, Ohira M, Hirakawa K, Cancer stem cell-like SP cells have a high adhesion ability to the peritoneum in gastric carcinoma, *Cancer Sci*, 100:1397-1402, 2009.

Okamoto T, Tani R, Yabumoto M, Sakamoto A, Tanaka K, Sato GH, Sato JD, Effect of insulin and transferin on the generation of lymphokine-activated killer cells in serum-free medium, *J Immunol Methods*, 195: 7-14, 1996.

Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*. 1983 Jul;33(3):967-78.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL, Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*, 414: 105-111, 2001.

Sato JD, Kawamoto T, Okamoto T, Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-Ag8, 653 mouse myeloma cells for growth in vitro, *J Exp Med*, 165: 1761-6, 1987.

Schatton T, Frank NY, Frank MH, Identification and targeting of cancer stem cells, *Bioessays*, 31: 1038-1049, 2009

Tan BT, Park CY, Ailles LE, Weissman IL, The cancer stem cell hypothesis: a work in progress, *Lab Invest*, 86:1203-1207, 2006.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Tateno H, Onuma Y, Ito Y. Live-cell imaging of human pluripotent stem cells by a novel lectin probe rBC2LCN. *Methods Mol Biol*. 2014;1200:313-8. doi: 10.1007/978-1-4939-1292-6_26.

Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med.* 2013 Apr;2(4):265-73. doi: 10.5966/sctm.2012-0154. Epub 2013 Mar 22.

Tateno H, Onuma Y, Ito Y, Minoshima F, Saito S, Shimizu M, Aiki Y, Asashima M, Hirabayashi J. Elimination of tumorigenic human pluripotent stem cells by a recombinant lectin-toxin fusion protein. *Stem Cell Reports.* 2015 May 12;4(5):811-20. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.02.016. Epub 2015 Apr 9.

Trumpp A, Wiestler OD, Mechanisms of Disease: cancer stem cells--targeting the evil twin, *Nat Clin Pract Oncol*, 2008 5 : 337-47, 2008.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9. Epub 2007 May 7.

Visvader JE, Lindeman GJ, Cancer stem cells in solid tumors: accumulating evidence and unresolved questions, *Nat Rev Cancer*,

8: 755-768, 2008.

Walter JD, Hunter M, Cobb M, Traeger G, Spiegel PC. Thiostrepton inhibits stable 70S ribosome binding and ribosome-dependent GTPase activation of elongation factor G and elongation factor 4. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jan;40(1):360-70. doi: 10.1093/nar/gkr623. Epub 2011 Sep 9.

Wright AJ, Andrews PW. Surface marker antigens in the characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* 2009 Jul;3(1):3-11. doi: 10.1016/j.scr.2009.04.001. Epub 2009 Apr 8.

Wu C, Alman BA, Side population cells in human cancers, *Cancer Lett*, 268: 1-9, 2008.

Yasuhiko Kizuka, Shinobu Kitazume, Kyohei Okahara, Alejandro Villagra, Eduardo M. Sotomayor and Naoyuki Taniguchi. "Epigenetic regulation of a brain-specific glycosyltransferase N-acetylglucosaminyltransferase-IX (GnT-IX) by specific chromatin modifiers". *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.554311

Yoshioka Y, Konishi Y, Kosaka N, Katsuda T, Kato T, Ochiya T.

Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *J Extracell Vesicles*. 2013 Jun 18;2. doi: 10.3402/jev.v2i0.20424. eCollection 2013.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP, The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype, *Nat Med*, 7: 1028-34, 2001.

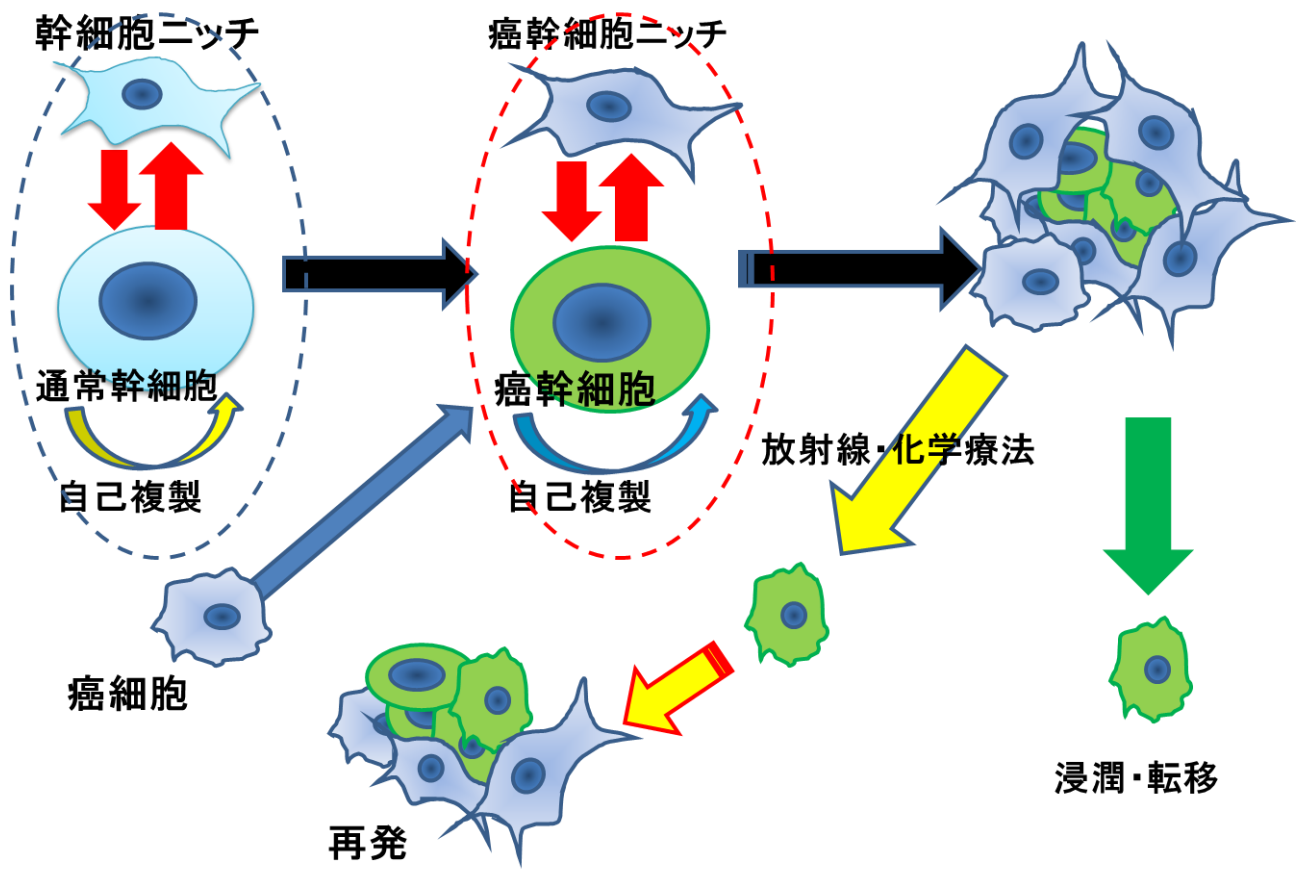


図 1 : がん幹細胞仮説

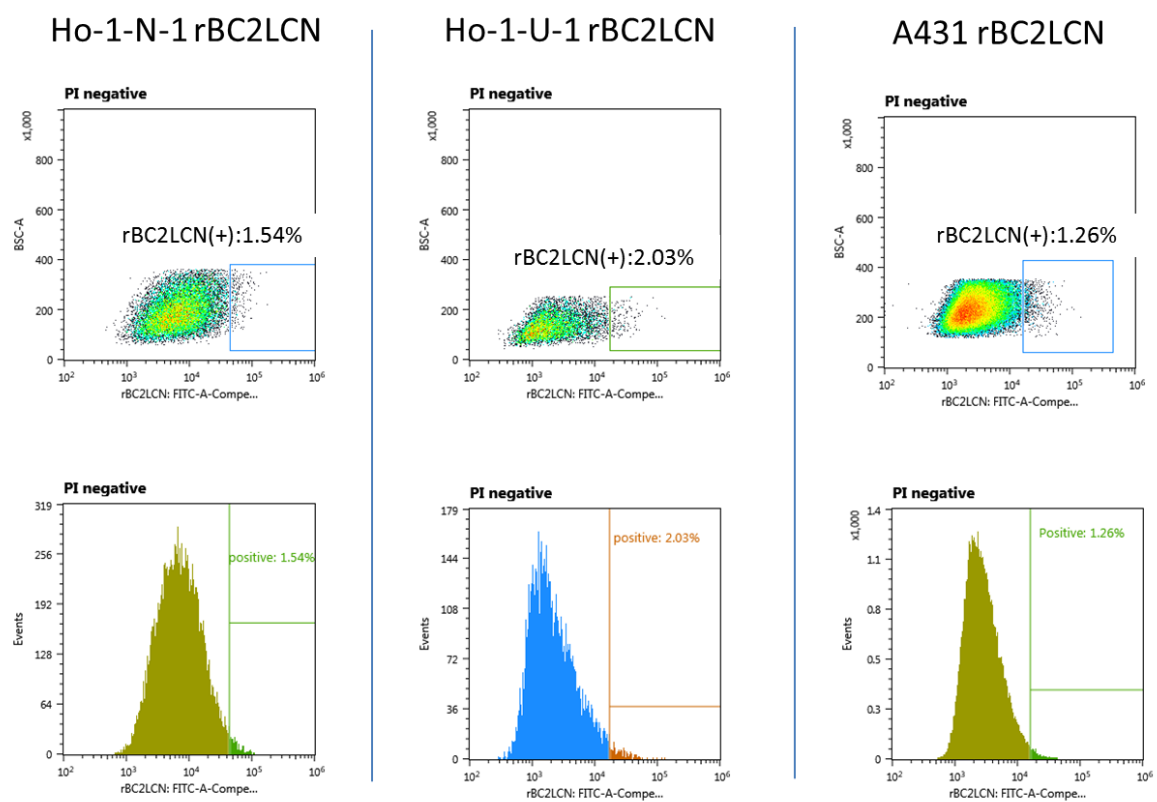
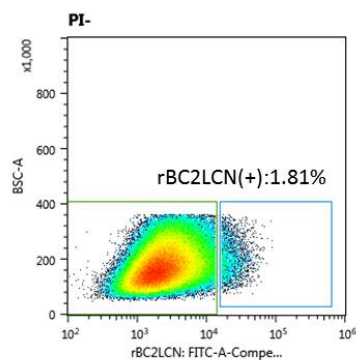
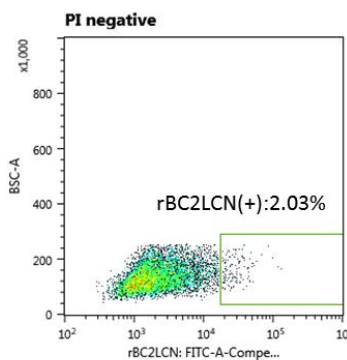
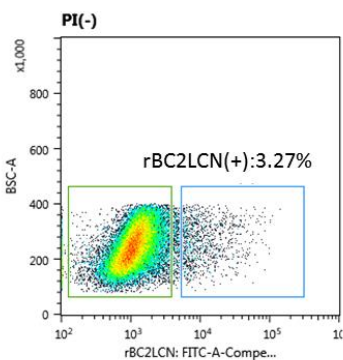


図 2 : 各種癌細胞株における rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞の存在率

DF6F
Serum-free
culture
Passage 1



A431

Ho-1-U-1

Ho-1-N-1

DF6F
Serum-free
culture
Passage 20

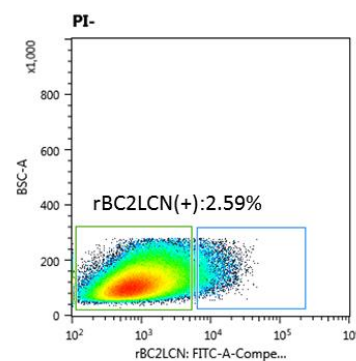
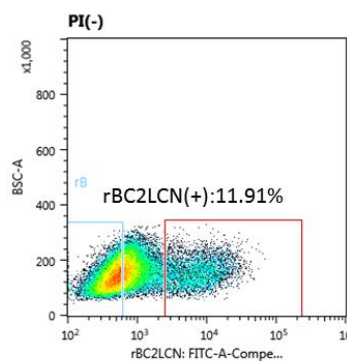
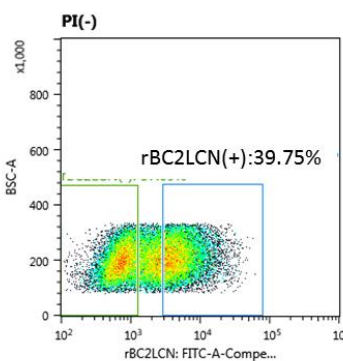


図 3 : 無血清培養下における各種癌細胞株における rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞存在率

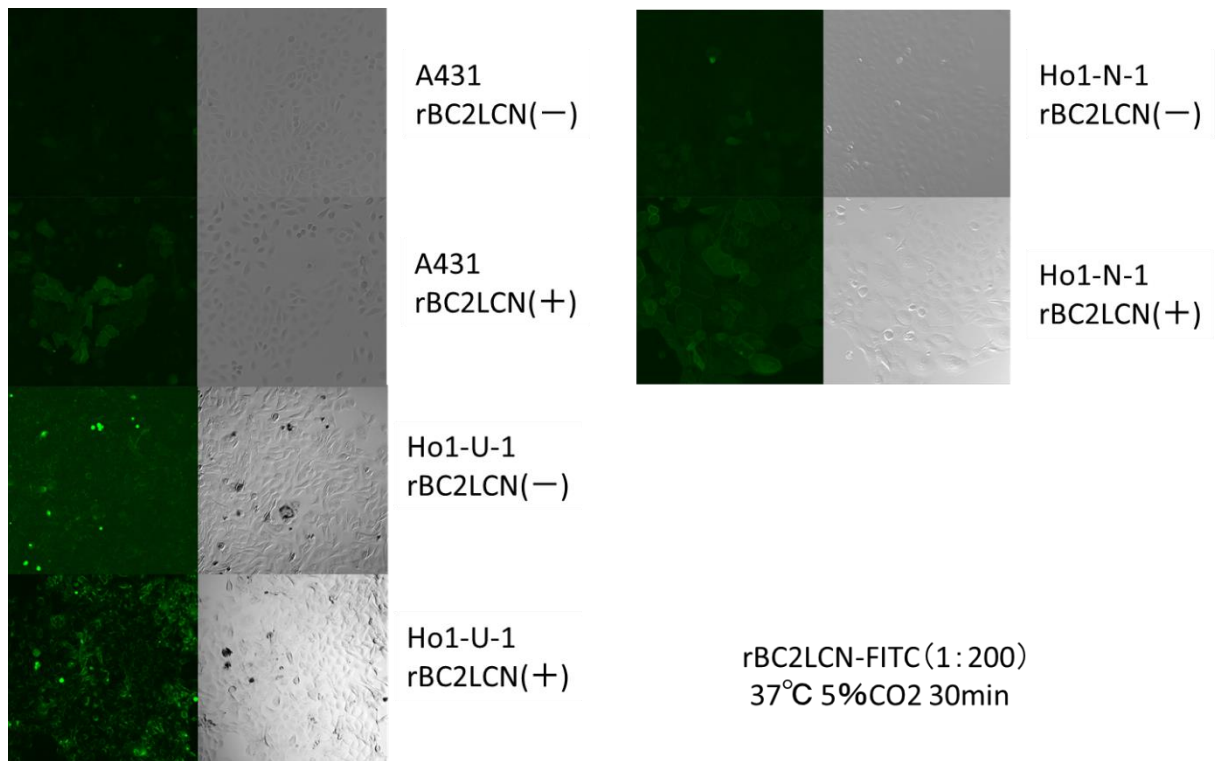
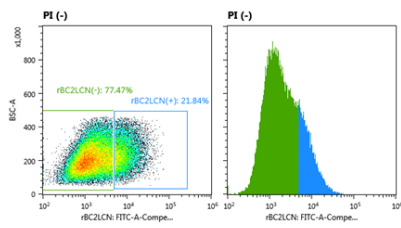
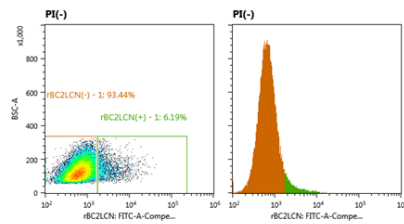


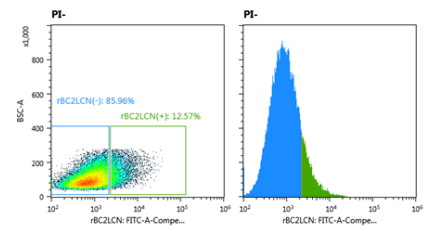
図 4 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞ソーティング後にライブセルイメージングにて rBC2LCN 認識糖鎖の発現状態を検討



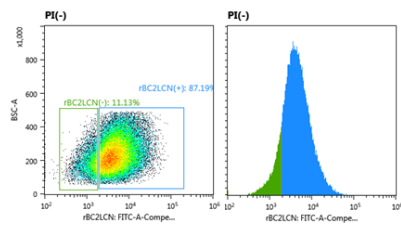
A431
rBC2LCN(-) p.1



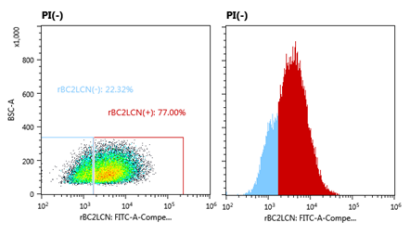
Ho-1-U-1
rBC2LCN(-) p.1



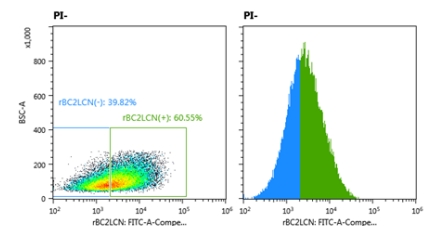
Ho-1-N-1
rBC2LCN(-) p.1



A431
rBC2LCN(+) p.1



Ho-1-U-1
rBC2LCN(+) p.1



Ho-1-N-1
rBC2LCN(+) p.1

図5：rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞をソーティング後に一継代した際の rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞存在比の検討

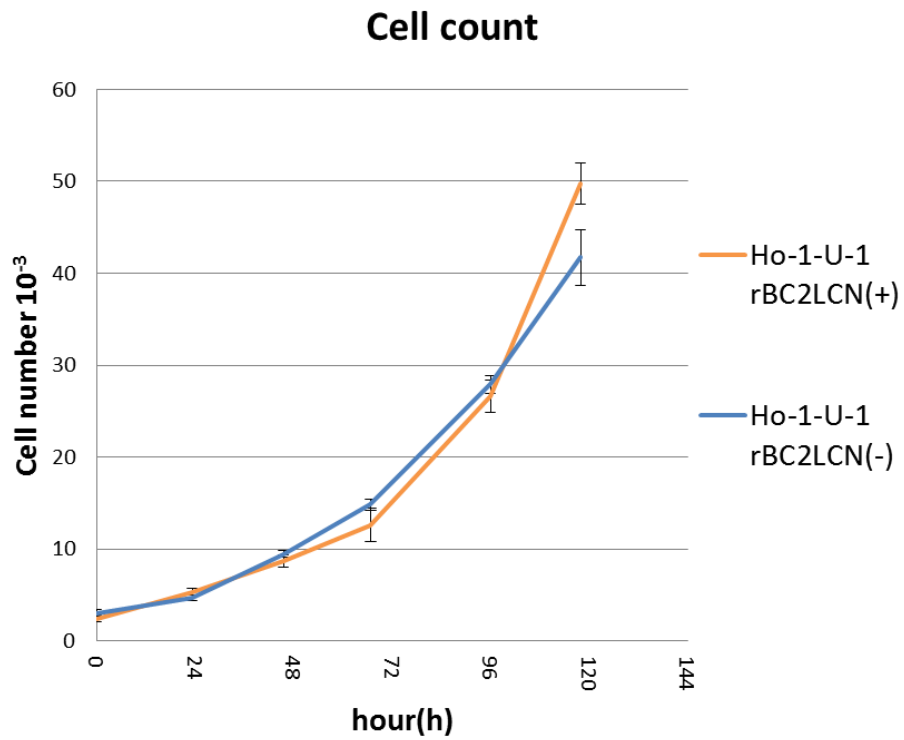


図 6 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞の無血清单層培養系における増殖能

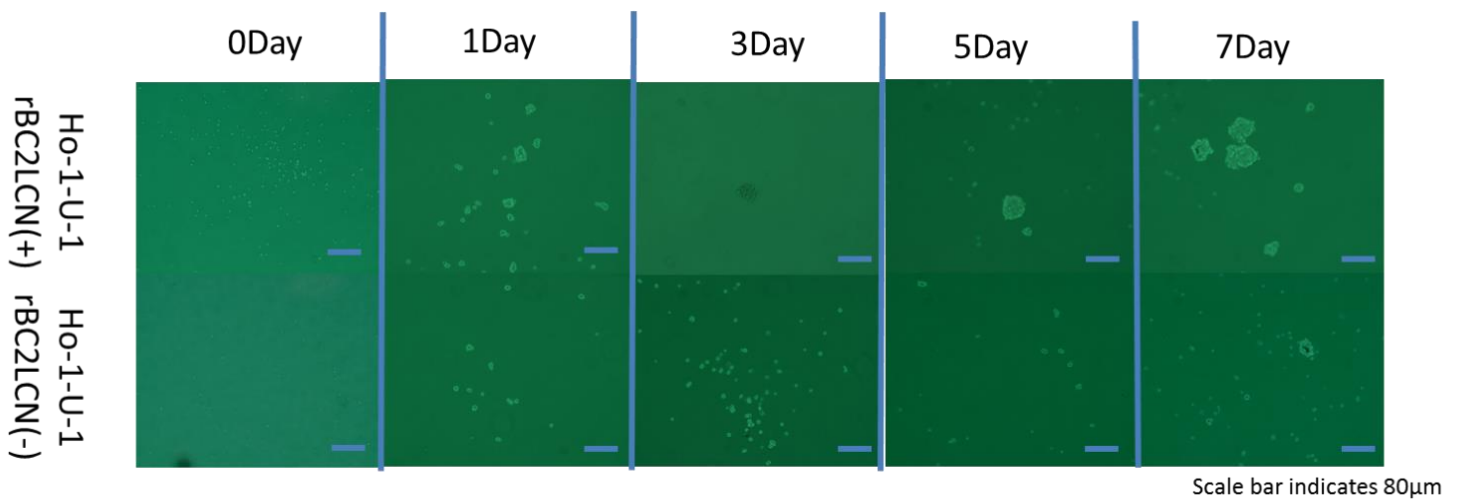
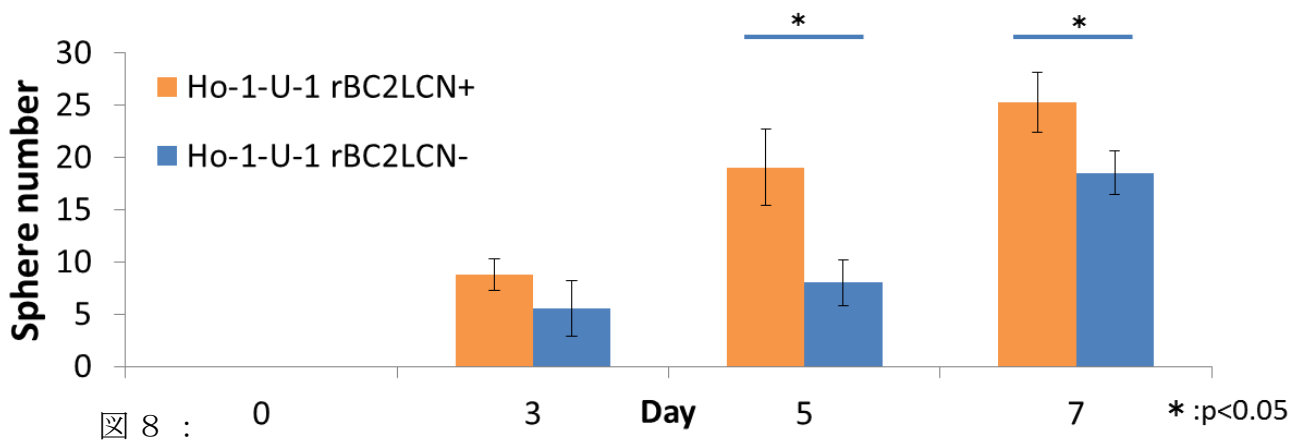
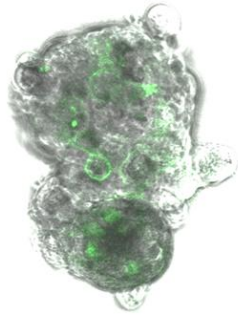


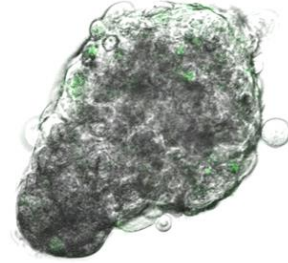
図 7 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞における sphere 形成能検討



rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞における sphere 形成数



rBC2LCN認識糖鎖陽性陽性由来
sphere



rBC2LCN認識糖鎖陽性陰性細胞由
来sphere

図 9 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞由来 sphere 中における
rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞存在動態

発現上昇20倍以上遺伝子		Ho-1-U-1 rBC2LCN(-)		Ho-1-U-1 rBC2LCN(+)		Fold Change
GeneName	Description	Normalized	Raw	Normalized	Raw	
IGF2	insulin-like growth factor 2 (IGF2), transcript variant 1, mRNA [NM_000612]	1.60628659	7668	98.21486	39937.3	61.14429
KRT34	keratin 34, type I (KRT34), mRNA [NM_021013]	0.10397142	70528	3.117873	1267.827	29.98789
IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27 (IFI27), transcript variant 2, mRNA [NM_005532]	0.65957327	0.9143	18.01657	7326.111	27.31551
SPINK7	serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (putative) (SPINK7), mRNA [NM_032566]	0.32673113	4.2023	7.118162	2894.472	21.78598
LCE3D	late cornified envelope 3D (LCE3D), mRNA [NM_032563]	1.27073252	1.9429	26.37129	10723.4	20.75284
CRCT1	cysteine-rich C-terminal 1 (CRCT1), mRNA [NM_019060]	0.481217	197.656	9.786962	3979.691	20.33795
LCE3E	late cornified envelope 3E (LCE3E), mRNA [NM_178435]	0.26588310	9.2092	5.328543	2166.756	20.04095

表 1 : DNA マイクロアレイにより rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞において
陰性細胞に比較して 20 倍以上発現亢進の見られた遺伝子群

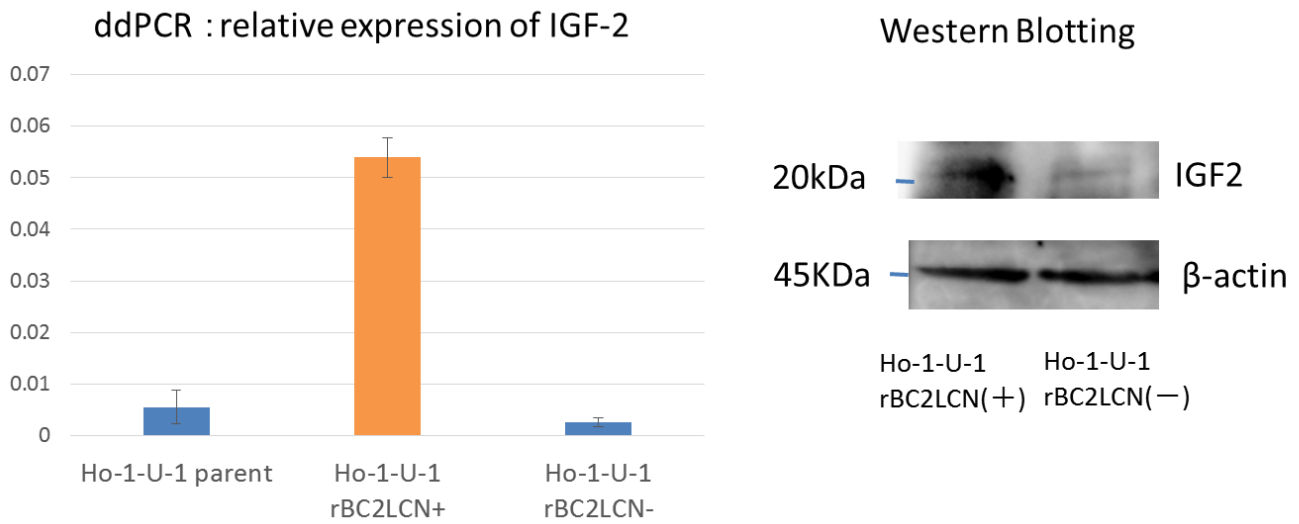


図 10 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性における IGF-2 発現の検討
 (左 : droplet digital PCR 法による解析, 右 : ウェスタンブロット
 法による解析)

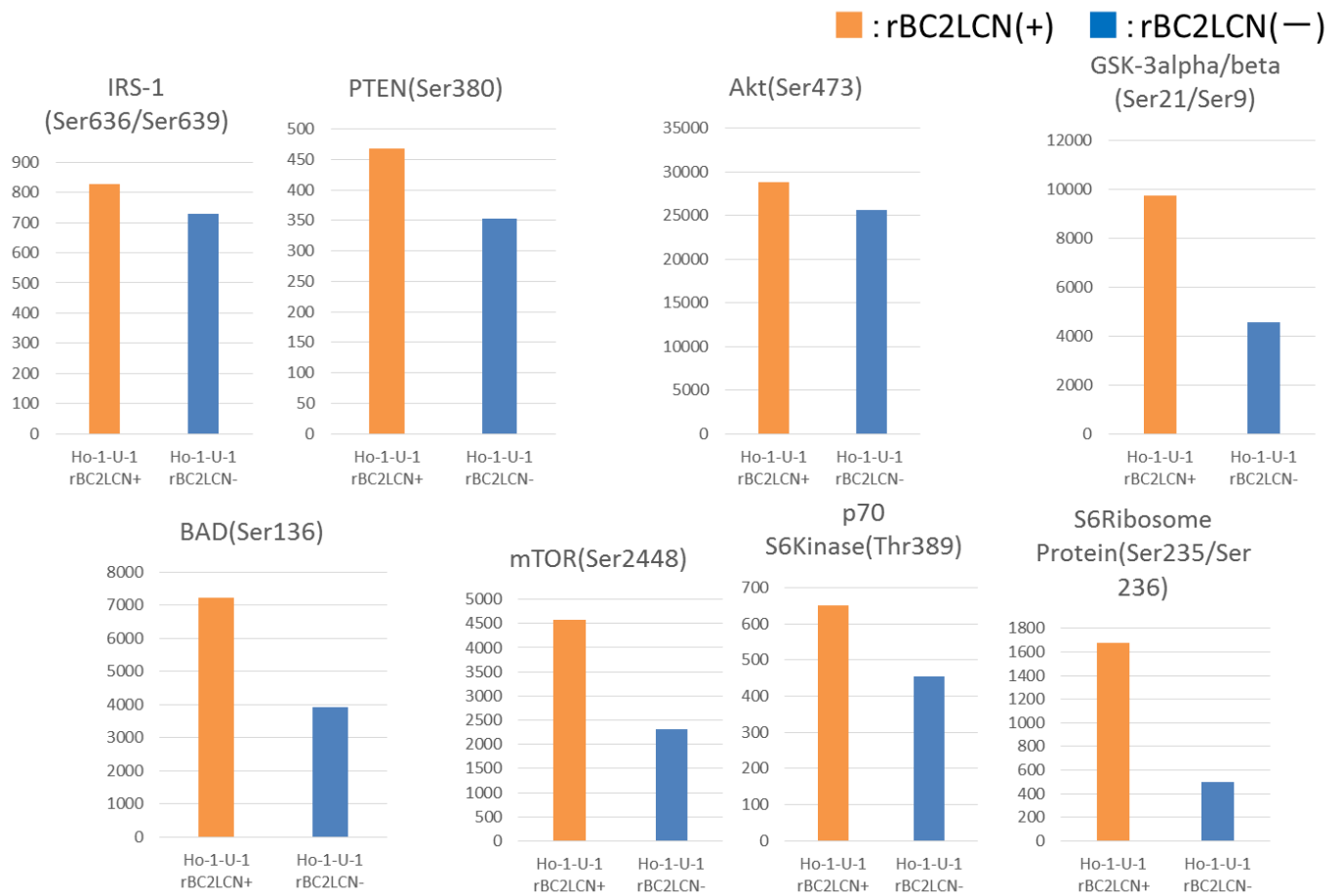


図 1 1 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞および陰性細胞における IGF-Akt pathway のリン酸化状態評価

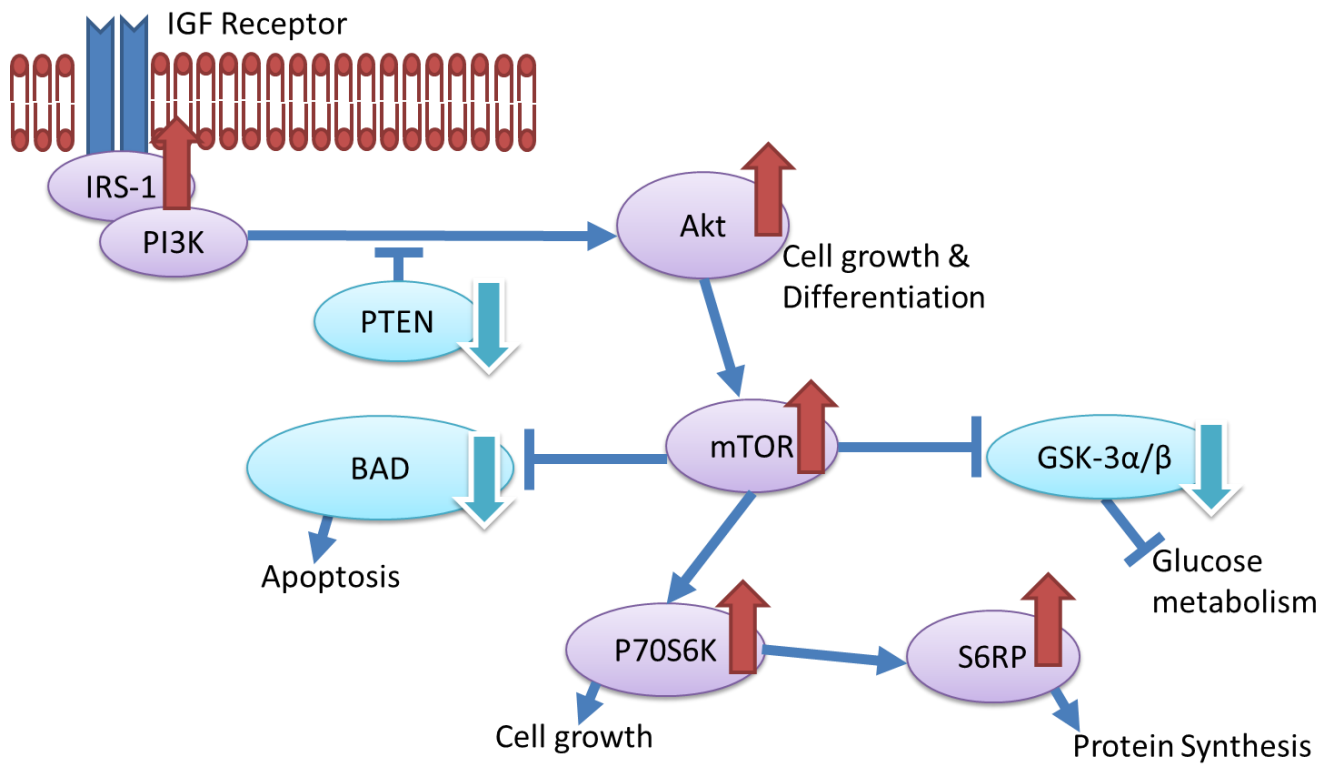


図 1 2 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞および陰性細胞における IGF-Akt pathway のリン酸化状態評価

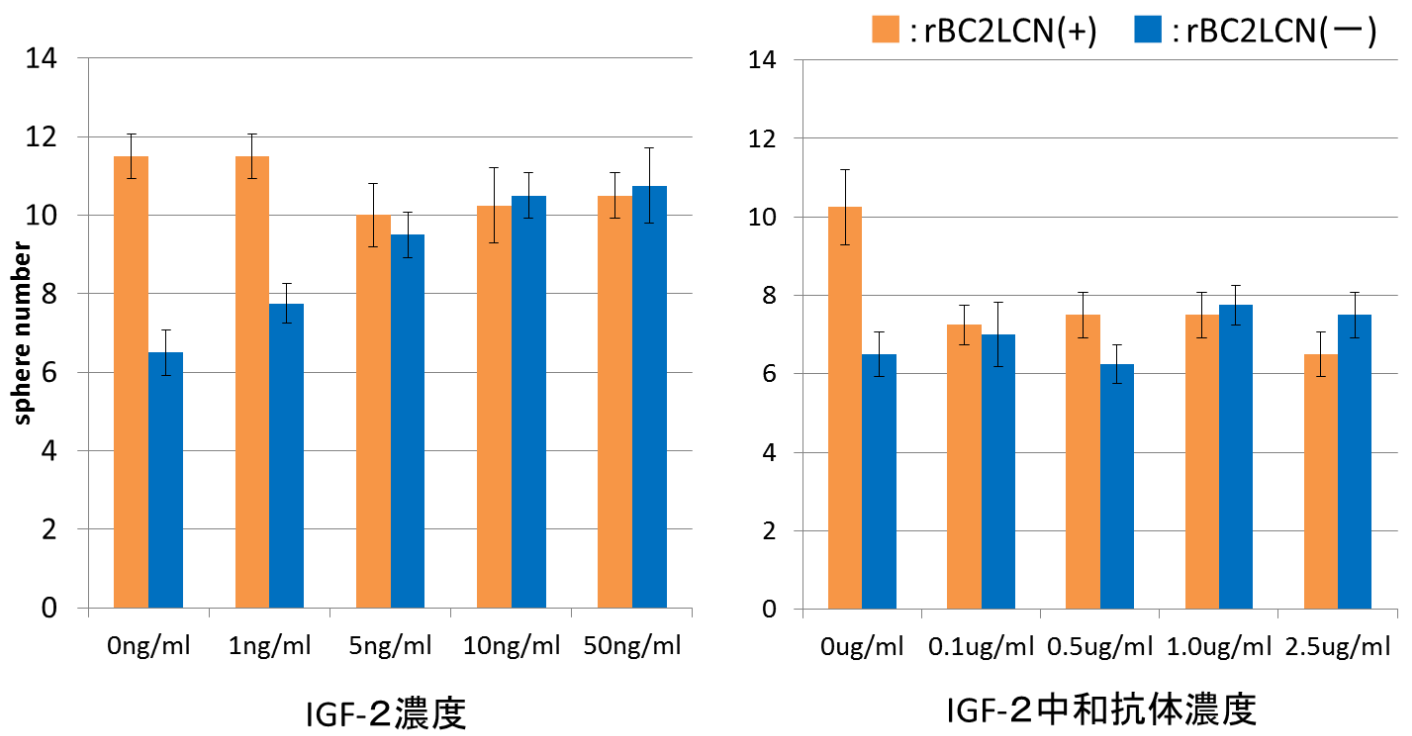


図 1 3 : IGF-2 及び IGF-2 中和抗体の rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞の sphere 形成数に及ぼす影響

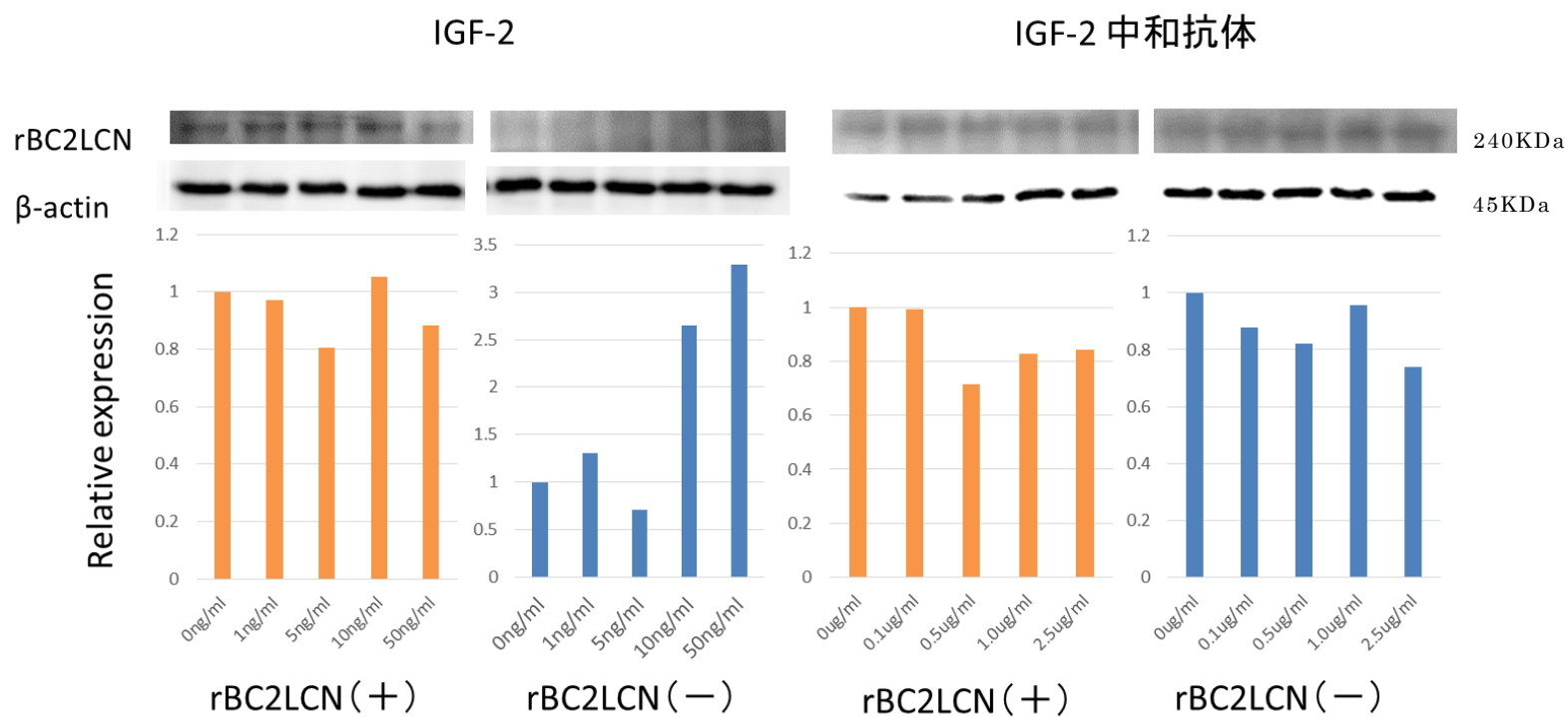


図 1 4 : IGF-2 及び IGF-2 中和抗体の rBC2LCN 認識糖鎖陽性及び陰性細胞の rBC2LCN 認識糖鎖の発現に及ぼす影響

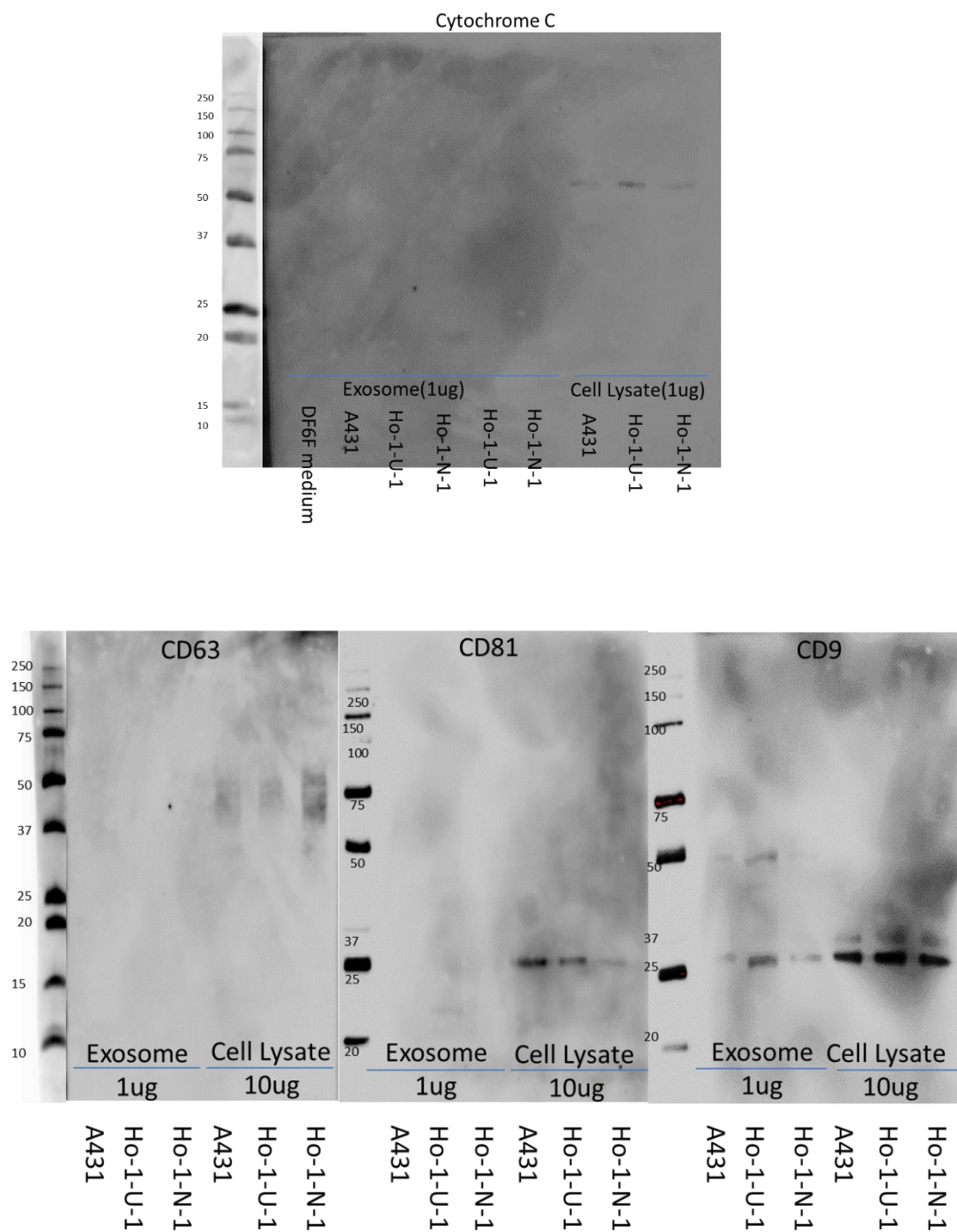


図 1 5 : 各細胞分画及び各細胞由来 exosome 分画における Cytochrome C, CD9, CD63, CD81 の発現

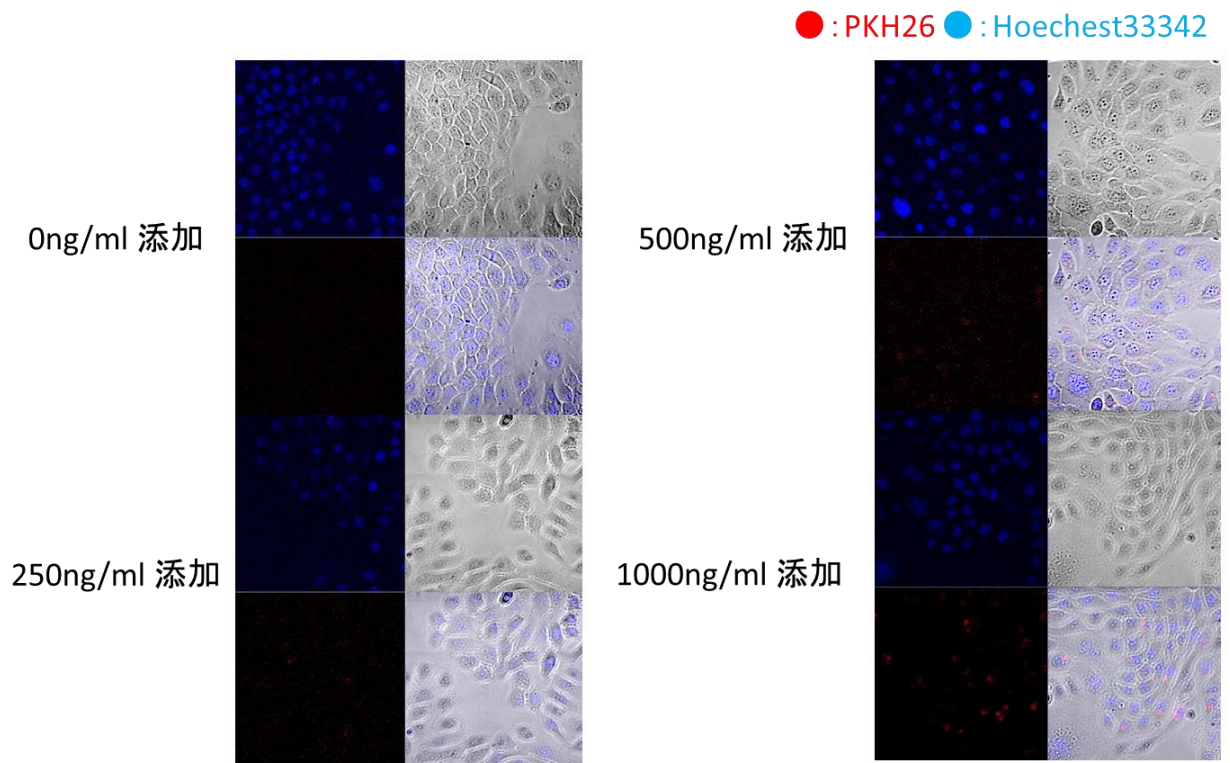
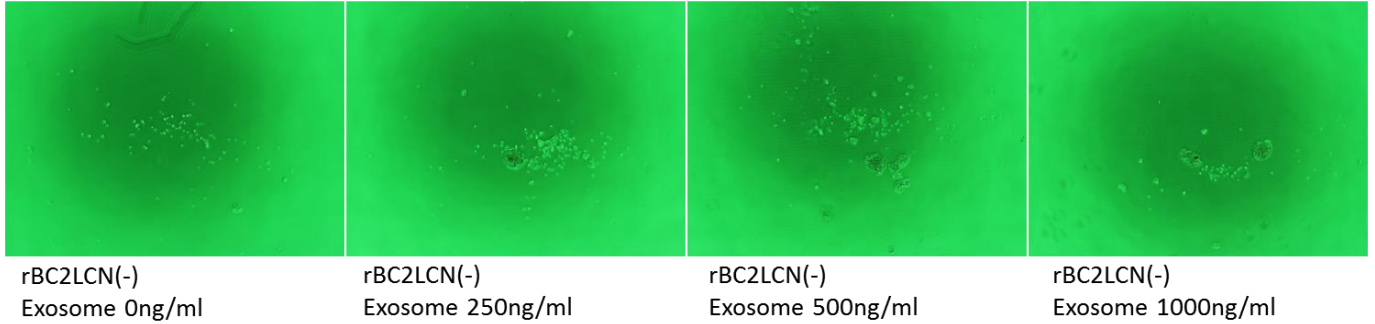


図 1 6 : PKH26 標識 exosome の細胞への取り込み

陽性由来exosome→陰性細胞



陰性由来exosome→陽性細胞

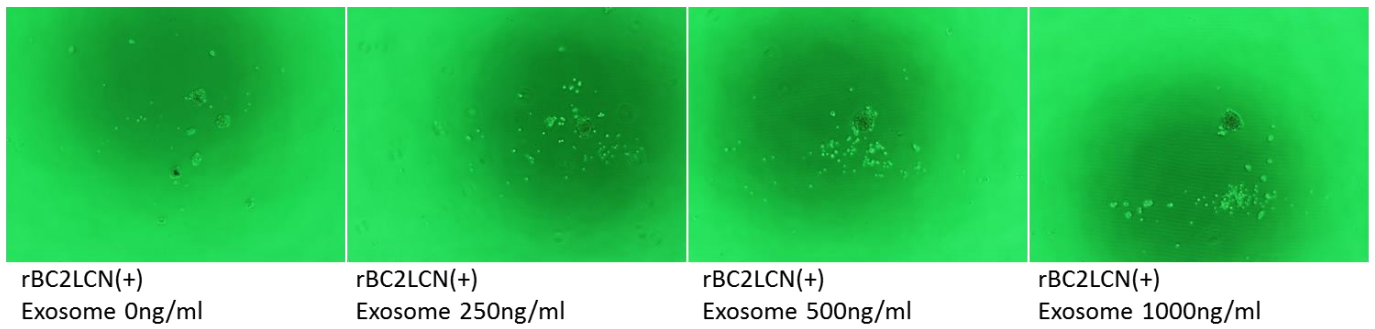


図 1 7 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞陰性細胞の sphere 形成に及ぼす各細胞由来 exosome の影響

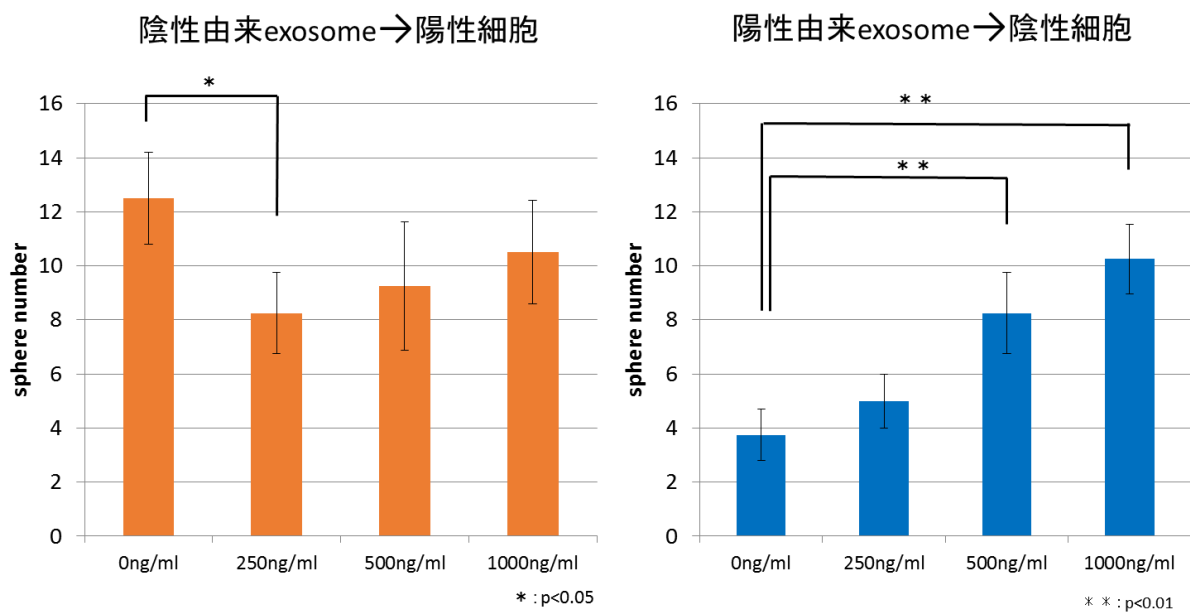


図 1 8 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞陰性細胞の sphere 形成数に及ぼす
各細胞由来 exosome の影響

陰性由来exosome → 陽性細胞

陽性由来exosome → 陰性細胞

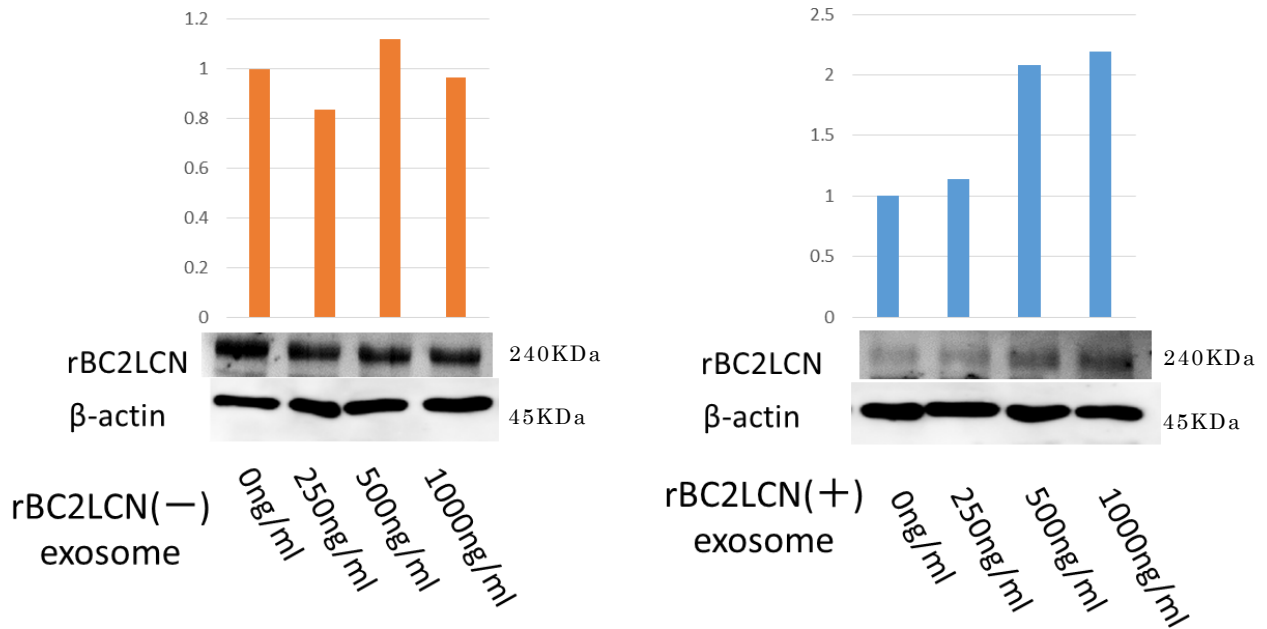
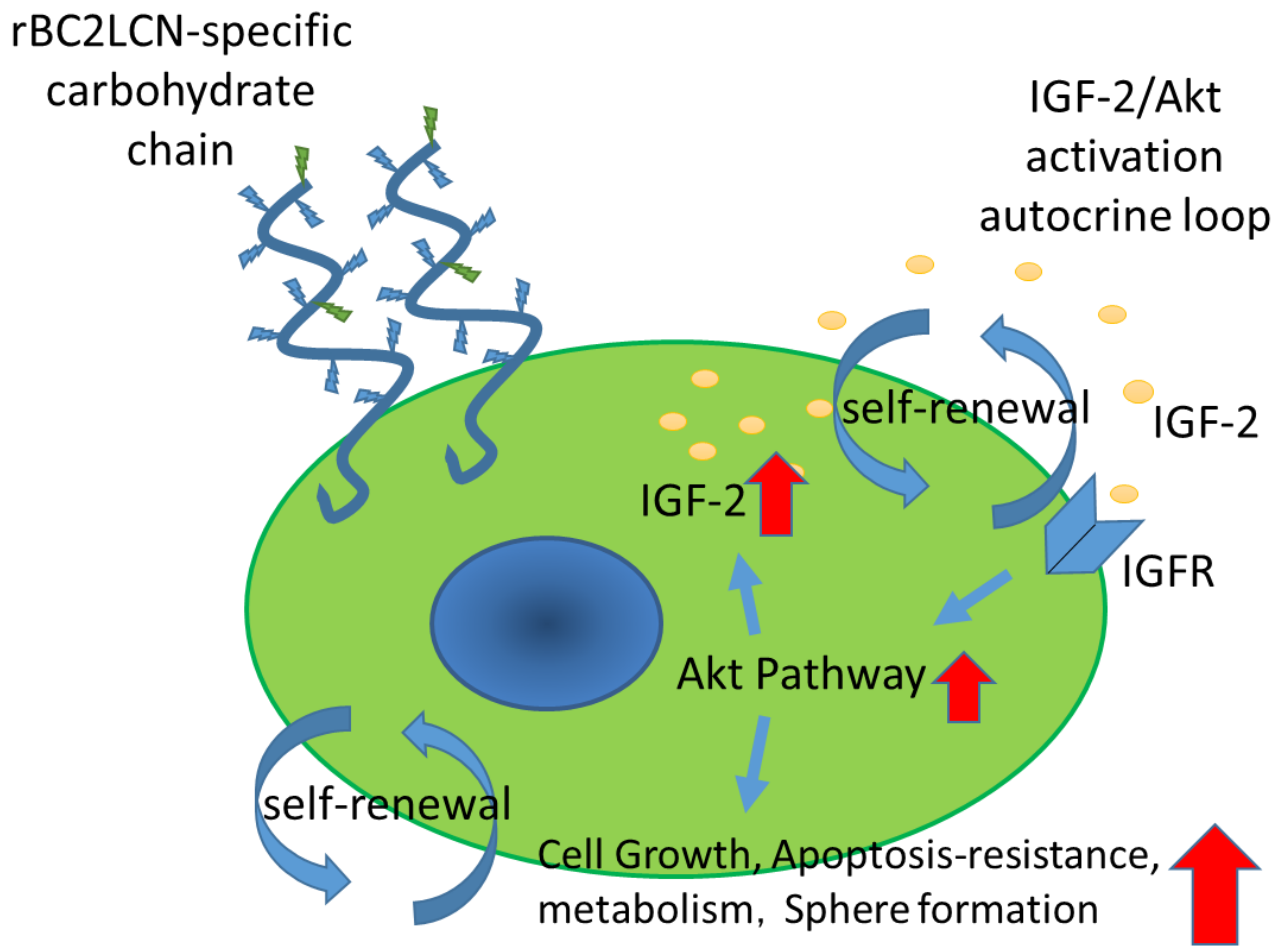


図 19 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞陰性細胞の rBC2LCN 認識糖鎖発現に及ぼす各細胞由来 exosome の影響



rBC2LCN認識糖鎖発現細胞

図 2 0 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞における IGF-2 の機能

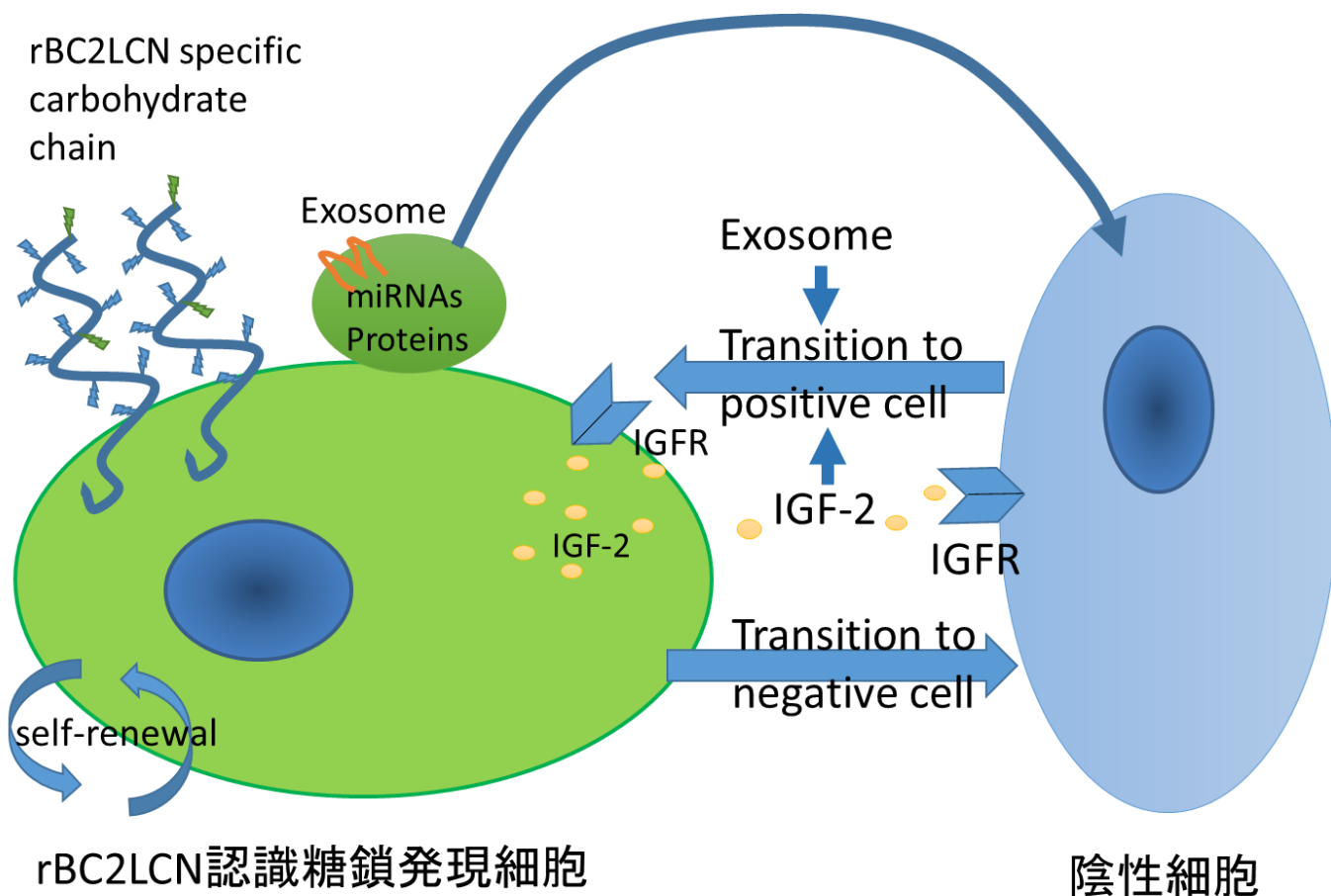


図 2 1 : rBC2LCN 認識糖鎖陽性細胞と陰性細胞間におけるトランジションと癌幹細胞ニッチ形成