

学 位 論 文

EMT 型口腔扁平上皮癌細胞における癌幹細胞特性の解析

学位申請者 植月 亮

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：菅井基行 教授)

2016 年度

## 目次

I. 緒言	1
II. 実験材料および実験方法	3
1. 細胞株および細胞培養	
2. RNA 抽出および RT-PCR 法	
3. 蛍光免疫細胞染色法	
4. 3次元培養	
5. 抗体試薬	
6. Colony formation assay	
7. Sphere formation assay	
8. Fluorescence activated cell sorting (FACS)	
9. p75 シグナル阻害	
10. 統計解析	
III. 結果	8
IV. 考察	13
V. 結論	19
VI. 謝辞	20
VII. 参考文献	21
VIII. 付図説明	31
IX. 表および図	36

## I. 緒言

口腔癌の多くを占めるのは扁平上皮癌であり<sup>(1)</sup>，その予後は局所浸潤と転移により大きく左右される．したがって，局所浸潤と転移巣形成を制御する分子機構の解明が急務となっている．

上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition, EMT）は上皮性器官形成や上皮創傷治癒において上皮系細胞が間葉様細胞に転換する生理的なプログラムであり<sup>(2)</sup>，癌細胞はこの可逆性プログラム<sup>(3)</sup>を利用して間質内へ播種し，脈管内移動を経て転移巣を形成すると考えられている<sup>(4)</sup>．EMTを誘導する転写因子として知られている Snail は，細胞間接着因子 E-cadherin のプロモーター領域に存在する E-box に結合し，E-cadherin の発現を強力に抑制する<sup>(5)</sup>．本研究室ではこれまでに，上皮形質を維持する口腔扁平上皮癌細胞株における Snail 誘導性の EMT について解析しており<sup>(6)</sup>，その制御機構についての解析もおこなってきた<sup>(7)</sup>．また，口腔扁平上皮癌細胞においてサイトカイン刺激による内因性 Snail の発現亢進を伴う EMT が可逆性であることを報告している<sup>(8)</sup>．

一方で，自己複製能と多分化能の幹細胞特性を併せもつ癌細胞である癌幹細胞が分化階層を構築し，不均一な表現型を持つ細胞から構築される転移巣を形成するという癌幹細胞仮説が注目されている<sup>(9)</sup>．近年，この癌幹細胞が治療抵抗性や再発・転移に関与することが報告されており<sup>(10)</sup>，口腔扁平上皮癌においても，幹細胞形質を持つ癌細胞が抗癌剤によって誘導されるアポトーシスに抵抗性を示すことが報告されている<sup>(11)</sup>．

これら EMT と癌幹細胞仮説は癌の進展過程の一部でオーバーラップすると考えられるが，それらの直接的な関連性は未だ不明な点が多く残されている．その原因として，癌幹細胞の存在と特性は不明瞭であり，そして EMT 表現型癌

細胞における幹性が明確ではないことが挙げられる。そこで本研究は、本研究室が確立した口腔扁平上皮癌細胞の可逆性 EMT 誘導モデルの幹性を解析することで、EMT と癌幹細胞の関連性を明確にすることを目的とした。

## II. 実験材料および実験方法

### 1. 細胞株および細胞培養

本研究では、外陰部扁平上皮癌由来細胞株 A431, 舌扁平上皮癌由来細胞株 OM-1, 口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC-2, 舌扁平上皮癌由来細胞株 HSC-3, 正常ヒト不死化歯肉線維芽細胞 GT-1, 正常ヒト不死化歯肉ケラチノサイト細胞株 RT-7, OM-1 細胞に snail 発現ウイルスベクターを導入し, 恒常的な snail 発現により EMT を誘導させた OM-1\_Snail<sup>(8)</sup> を用いた. RT-7 以外の細胞は, 培養液として 10% 牛胎児血清 (Fatal Bovine Serum: 以下 FBS と略記; Biowest, Nuaille, France), 100 U/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシン (SIGMA, St.Louis, MO, USA) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: 以下 DMEM と略記する; SIGMA) を用い, 5% CO<sub>2</sub> 存在下, 37°C で培養した. RT-7 は, 培養液として KGM-Gold™ Keratinocyte Growth Medium (LONZA, Basel, Switzerland) を用い, 5% CO<sub>2</sub> 存在下, 37°C で培養した. これらの細胞の継代は, 0.05%トリプシン-EDTA (SIGMA) により細胞を剥離, 回収しておこなった.

### 2. RNA 抽出および RT-PCR (Reverse Transcriptional - Polymerase Chain Reaction) 法

細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて Total RNA を抽出した. 逆転写酵素 Rever Tra Ace 1 µl, 5×RT buffer 4 µl, dNTP 20 nM, Random Primer 25 pmol, および Ribonuclease Inhibitor 10U 混合液 (TOYOBO, 大阪) に RNA 1 µg を加え, 30°C 10 分, 42°C 20 分, 99°C 5 分, 4°C 5 分の逆転写反応をおこない, 1 本鎖 cDNA テンプレート溶液 20 µl を得た. PCR 反応

は、cDNA テンプレート 1  $\mu$ l, 標的遺伝子特異的増幅用プライマーセット (各 0.5  $\mu$ M), および Go Taq<sup>®</sup> Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) を用い, 変性 96°C 30 秒, アニーリング 30 秒, エクステンション 72°C 1 分のサイクルを 30 回行い標的遺伝子を増幅した. 各標的遺伝子特異的プライマー配列とアニーリング温度は表 1 に示した.

PCR 産物 8  $\mu$ l を 100 ng/ml Ethidium Bromide (Invitrogen<sup>™</sup>) 含有 2%アガロースゲル (和光, 大阪) に電気泳動し, 紫外線照射下でゲル撮影装置 Printgraph (ATTO, 東京) を用いて半定量的に遺伝子量を記録し, 比較した. 標的遺伝子発現量の定性には, Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (以下 G3PDH と略記) を内部標準として用いた.

### 3. 蛍光免疫細胞染色法

24-well Glass Bottom Plate (IWAKI, 東京) に播種した細胞を, 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて 15 分固定した. 膜透過処理およびブロッキング反応は 0.2% TritonX-100, 5% 牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline ; 以下 PBS と略記) をブロッキングバッファーとして用い 1 時間行った. 1 次抗体反応は各抗体に添付された条件に従い調整した希釈液を用い, 4°C で 8 時間行った. 蛍光標識反応はブロッキングバッファーにて 1000 倍希釈した Alexa Fluor<sup>®</sup> Goat anti-mouse IgG (H+L) または Alexa Fluor<sup>®</sup> Goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen<sup>™</sup>) を反応液として用い, 室温で 1 時間行った. 核染色は Vectashield (フナコシ, 東京) を添加した PBS で行った. 蛍光励起および位相差画像は蛍光顕微鏡 BZ-9000 (KEYENCE, 大阪) を使用して記録した.

### 4. 3 次元培養

12-well 組織培養用プレート (Greiner Bio One) 上に, タイプ I コラーゲン溶液 (高研, 東京) に  $6 \times 10^5$  cells/ml のヒト不死化歯肉線維芽細胞 GT-1 細胞を懸濁した培地を 1ml 加えた. 1 時間静置して, コラーゲンをゲル化させた後,  $1 \times 10^6$  cells/ml の細胞を含む 2 ml の培地をゲル上に重層させ, さらに 1 時間培養した. ゲルをプレートの側面および底面よりはがし, 浮遊させ, 1 週間培養し, 収縮コラーゲンゲルを作製した. 次に, ゲルの表面が空気に曝されるように, 培地をゲル上面よりやや低いレベルに調整して, さらに 1 週間培養した. 培地交換は 2 日ごとに行った. マイルドホルムで固定し, パラフィン (和光) 包埋したゲルより, 6  $\mu$ m 厚の垂直方向の切片を作製し, ヘマトキシリン-エオジン染色を行った.

### 5. 抗体試薬

抗 snail 抗体, 抗 E-cadherin 抗体は Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA) より入手した. 抗 Vimentin 抗体, 抗 p75 抗体は Santa Cruz Technology (Santa Cruz, CA, USA) から, 抗 Cytokeratin 13 抗体, 抗 Cytokeratin 14 抗体, 抗 Nestin 抗体, 抗 Oct4 抗体は abcam (Cambridge, UK) から, 抗 CD133 抗体は Novus Biologicals (Littleton, CO, USA) からそれぞれ入手した.

### 6. Colony formation assay

RT7, OM-1, OM-1\_Snail の各細胞を 200 cells/well にて 24-well プレートに播種して低濃度培養をおこなった. 5% CO<sub>2</sub> 存在下, 37°C で 7 日間培養したのち, 8 つ以上の細胞集団をコロニーと判定した.

## 7. Sphere formation assay

24-well 非接着性プレート (Corning, AZ, USA) に 1well あたり 200 cells を播種し、10 日後のコロニー数をカウントした。この際、直径 70  $\mu\text{m}$  以上の大きさのコロニーのみを sphere としてカウントし、幹性の指標とした。上皮幹細胞増殖培地として、FAD medium<sup>(12)</sup> を、神経幹細胞増殖培地として、StemPro<sup>®</sup> NSC SFM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を、造血幹細胞増殖培地として、StemPro<sup>®</sup> -34 SFM Complete Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

## 8. Fluorescence activated cell sorting (FACS)

Anti-Human p75-PE-conjugated antibody, Anti-Human ESA-APC-conjugated antibody (Becton Dickinson and company, Franklin Lakes, NJ, USA), Anti-Human Nestin-APC-conjugated antibody (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), Anti-Human CD133-APC-conjugated antibody (Bergisch Gladbach, Germany) を用いて染色を行い、コントロールとして IgG isotype (Becton Dickinson and company) を用いた。死細胞を除去するため、7-AAD (Becton Dickinson and company) を使用した。サンプル解析は、Becton Dickinson FACS Caliber<sup>™</sup> (Becton Dickinson and company) を使用し、細胞 sorting は、Becton Dickinson FACS Aria II (Becton Dickinson and company) を使用した。これらの解析には、FACS Diva ソフトウェアを用いた。

## 9. p75 シグナル阻害

p75 シグナルインヒビターとして TAT-Pep5 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)<sup>(13)</sup> を用い、Colony formation assay および Sphere formation assay



を行った。24-well dish に細胞を播種したのち、100 nM の TAT-Pep5 を添加した。7 日後に colony の蛍光免疫細胞染色を、10 日後に sphere 数の計測を行った。

## 10. 統計解析

すべての検定は例数を 6 以上で行い、標準誤差は $\pm$ 、例数は n にて示した。得られたデータの統計的優位性は、2 群間比較に Student's t-test を用いて解析し、 $P$  value $<0.05$  の場合を有意差ありとした。

### Ⅲ. 結果

#### 1. 歯肉由来不死化ケラチノサイト細胞株 RT-7 が示す不完全な重層上皮幹細胞特性

正常歯肉上皮と歯肉由来不死化ケラチノサイト細胞株 RT-7 から採取した mRNA における重層上皮幹細胞マーカー p75 とサイトケラチン 13 (CK13) およびサイトケラチン 14 (CK14) の発現を RT-PCR で確認・比較した (図 1A). RT-7 は強い p75 と CK14 の mRNA 発現を示したが, CK13 の mRNA 発現は認めなかった. RT-7 において, 蛍光免疫細胞染色法で細胞膜に局在する機能的 p75 を発現する細胞を認め (図 1B), さらに CK14 陽性細胞を認めたが, CK13 陽性細胞は存在しなかった (図 1C). 3次元培養法において, RT-7 はコラーゲンゲル上で重層上皮構造を構築しなかった (図 1D). 上皮幹細胞増殖培地における Sphere formation assay では, sphere を形成せず, 幹性は伴わなかった (図 1E).

#### 2. 舌癌由来細胞株 OM-1 における重層上皮幹細胞特性の利用

上皮形質を維持する外陰部扁平上皮癌細胞株 A431 と, 舌癌由来細胞株 OM-1 を含む 4 つの口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC3, HSC2, HOC719-PE) における p75, CK13 および CK14 の発現を RT-PCR で確認・比較した (図 2A). OM-1 において, p75 と CK13 および CK14 の mRNA 発現を認めた. 蛍光免疫細胞染色法で p75 が細胞膜に局在する細胞を認め (図 2B), CK13 陽性細胞および CK14 陽性細胞が混在する像が見られた (図 2C). Colony formation assay で単一細胞からクローナル増殖によって形成されるコロニーでは, p75 陽性かつ CK14 陰性細胞を中心とし, その周囲を p75 陰性かつ CK14 陽性細胞が取り囲

む蛍光免疫細胞染色像を示した (図 2D). また, コロニーの外側には CK14 陽性細胞から CK13 陽性細胞が生じる非対称性分裂像が観察された (図 2E). 3次元培養法において, OM-1 は重層上皮類似構造を構築した (図 2F). 上皮幹細胞増殖培地における Sphere formation assay では, 平均 6.1 個の腫瘍 sphere を形成した (図 2G). 以上の結果から, OM-1 は重層上皮幹細胞特性を保持していることが推察された.

### 3. p75 シグナルインヒビターによる OM-1 の重層上皮幹細胞特性の抑制

培養液中に p75 シグナルインヒビターを添加することより, OM-1 は腫瘍 sphere 形成能の低下を示した (図 3A). また, Colony formation assay により形成されるコロニーでは CK14 陽性細胞は存在するも, CK13 陽性細胞は出現せず (図 3B), 重層上皮幹細胞特性は阻害された.

### 4. p75 陰性 OM-1 における重層上皮幹細胞特性の再発現

フローサイトメトリーにて p75 陰性 OM-1 をソーティングし (図 4A), その重層上皮幹細胞特性を解析した. ソーティング直後に細胞を播種した Colony formation assay で形成されたコロニーには, CK13 陽性細胞は出現しなかった (図 4B). 2 週間の継代の後に, 再度フローサイトメトリーで解析したところ, p75 陽性細胞の再出現を認め (図 4C), 蛍光免疫細胞染色法でもその存在を確認した (図 4D). また, 著明に抑制されていた p75 陰性 OM-1 の腫瘍 sphere 形成能の再発現が見られた (図 4E). 継代 8 週間後には, コロニーにおいて CK13 陽性細胞の再出現を認めた (図 4F). 以上の結果から, OM-1 における可逆的な重層上皮幹細胞特性が確認された.

## 5. Snail 誘導性 EMT 型 OM-1 における p75 依存的重層上皮幹細胞特性の喪失

Snail 誘導性 EMT 型 OM-1 (OM-1\_Snail) において p75, CK13 および CK14 の mRNA 発現量は抑制されていた (図 5A). フローサイトメトリーにおいて, 上皮特異的抗原 ESA の低発現細胞 (EMT 型癌細胞) の出現を伴う p75 陽性細胞の減少が確認された (図 5B). コロニーにおいて, Snail の核内局在 (図 5C), E-cadherin の発現消失および colony 外側の癌細胞における Vimentin の発現 (図 5D), 細胞膜 p75 の発現細胞の不在 (図 5E), CK13 の発現細胞の不在 (図 5F) を示した. 3次元培養法において, コラーゲンゲル内にびまん性に細胞が浸潤する像を示す OM-1\_Snail は (図 5G), 上皮幹細胞増殖培地において腫瘍 sphere を形成しなかった (図 5H). 以上の結果から, OM-1 は Snail によって重層上皮幹細胞特性を失ったと考えられた.

## 6. EMT により誘導される神経幹細胞マーカー Nestin の発現

OM-1\_Snail は神経幹細胞マーカー Nestin の mRNA 発現を示した (図 6A). フローサイトメトリーにおいても Nestin 陽性細胞が分画された (図 6B). コロニーには明瞭な Nestin 中間径線維を示す細胞の出現, さらに Nestin から Vimentin への中間径線維の移行像が観察された (図 6C). しかし, OM-1\_Snail は神経幹細胞増殖培地中でも腫瘍 sphere を形成せず (図 6D), Snail は Nestin の発現を付与するも, 神経幹細胞特性は付与しなかった.

## 7. 造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1 における癌幹細胞マーカー CD133 陽性細胞の出現

OM-1 は DMEM 中における接着培養, 並びに上皮幹細胞増殖培地と神経幹細胞増殖培地における浮遊培養において癌幹細胞マーカー CD133 の mRNA 発現を示さな

いが、造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1 において CD133 mRNA の発現が誘導された(図 7A). CD133 および Snail の mRNA 発現が誘導されたが、Vimentin は発現していなかった(図 7A). フローサイトメトリーにおいて、細胞膜 CD133 陽性細胞のピークが新たに出現した(図 7B). 蛍光免疫細胞染色法において、CD133 が細胞膜に局在する像を認めたが(図 7C), 一方で、共に誘導された Snail の核内局在は不明瞭であり、E-cadherin は細胞膜局在し、EMT は生じていなかった(図 7D). 造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1\_Snail において CD133 の mRNA 発現は誘導されなかった(図 7E).

#### 8. 造血幹細胞増殖培地による多能性幹細胞マーカー Oct4 の発現誘導

造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1 において、癌幹細胞マーカー CD133 の mRNA 発現に伴い、初期外胚葉マーカー PAX6 と初期中胚葉マーカー Brachyury, そして多能性幹細胞マーカー Oct4, Nanog および SOX2 の mRNA 発現が誘導された(図 8A). しかし、蛍光免疫細胞染色法において Oct4 の核内への局在は不明瞭であり、Snail と Oct4 の発現は相反的であった(図 8B). 一方で、造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1\_Snail において、上記の各種マーカーの mRNA 発現は誘導されなかった(図 8C). 蛍光免疫細胞染色法では、Snail の明瞭な核内局在下において Oct4 の核内局在は不明瞭であった(図 8D).

#### 9. CD133 を指標とする癌幹細胞特性の可逆性発現

神経幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1 が形成する腫瘍 sphere を、0.05%トリプシン-EDTA により単一細胞に離散させたのちに、造血幹細胞増殖培地中で再度腫瘍 sphere を形成させると、Snail, CD133, Oct4 の mRNA 発現が誘導された(図 9A). 逆に、造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1 の腫瘍 sphere を、0.05%

トリプシン-EDTAにより単一細胞に分散させたのちに、神経幹細胞増殖培地中で腫瘍 sphere を再形成させると、Snail, CD133, Oct4 の mRNA 発現は抑制された (図 9B)。以上の結果は CD133 を指標とする癌幹細胞特性の可逆性変化を示すものであった。

#### IV. 考察

現在、癌の進展の分子機構は EMT と癌幹細胞仮説を基盤とすると考えられている。癌細胞は EMT プログラムを利用して上皮細胞間接着から解放され、細胞運動能を獲得して間質へ播種（局所浸潤）する。一方で、間質に播種した癌細胞が癌幹細胞特性を有するのであれば、分化階層を形成して二次腫瘍巣（再発巣や転移巣）を形成するという考えが癌幹細胞仮説である。したがって、播種した癌細胞は EMT 形質と癌幹細胞特性を併せ持つと想定されており、癌幹細胞マーカーを用いて細胞をフローサイトメトリーでソーティングしたところ、幹細胞様形質および EMT 形質を示したという報告が多くなされている<sup>(14-18)</sup>。また、EMT 形質を持つ細胞は、幹細胞形質を併せもつという報告もある<sup>(19, 20)</sup>。一方で、癌細胞は EMT プログラムを経験した後に癌幹細胞特性を獲得するという報告がなされている<sup>(21-23)</sup>。しかし、癌細胞集団からそのような特性がどのように出現・消失するのか未だ全貌が明かにされていないため、癌の予後向上や治療戦略の改善にとって大きな研究課題となっている。本研究では、口腔癌細胞の転写因子 Snail 依存性 EMT 誘導モデルを用いて、癌幹細胞特性と EMT との関連性、および癌幹細胞特性の可逆性出現について検討し、解答を得た。

現在広く受け入れられている、アメリカ癌学会が 2006 年に提唱した癌幹細胞の定義では、腫瘍形成能と、自己複製能および多分化能の組織幹細胞類似特性が癌幹細胞特性とされている<sup>(24)</sup>。したがって、重層上皮細胞系統からなる口腔扁平上皮由来の癌において、口腔癌の癌幹細胞は重層上皮幹細胞特性を保持すると考えられる。p75, 別名 CD271 は、細胞膜に存在する低親和性 NGF レセプターで<sup>(25)</sup>、上皮幹細胞・前駆細胞マーカーとして知られている。p75

はヒト食道ケラチノサイトに幹細胞特性を付与すると報告されており<sup>(26)</sup>、口腔粘膜上皮においても **p75** 陽性重層上皮幹細胞が重層上皮細胞系統 (**CK14** 陽性基底細胞, **CK13** 陽性扁平上皮分化細胞) を生み出して重層上皮を構築している<sup>(27, 28)</sup>。そこで、まず正常ヒト不死化歯肉ケラチノサイト細胞株 **RT7** における **p75** 依存的な重層上皮幹細胞特性を検討したところ、単一細胞から増殖して形成されるコロニーにおいて、**p75** がその機能的部位である細胞膜に存在する **p75** 陽性細胞を中心に、その周囲に基底細胞マーカー**CK14** 陽性細胞は存在したが、扁平上皮分化マーカー**CK13** 陽性細胞は出現しなかった。そして 3次元培養法においてコラーゲンゲル上で重層上皮構造を構築せず、上皮幹細胞増殖培地中において **sphere** を形成しなかった。以上の結果から、培養皿の接着培養下で生育する **RT-7** は、**p75** 陽性細胞が存在するも重層上皮幹細胞特性が制限されており、正常な **p75** 依存的重層上皮幹細胞特性の厳密な規定の影響を受けていることが推察された。一方で、舌扁平上皮癌由来細胞株 **OM-1** において、**p75** 陽性細胞の存在とともに、**CK14** 陽性細胞から **CK13** 陽性細胞が非対称性に分裂する像が観察され、3次元培養法ではコラーゲンゲル上で重層上皮類似構造を構築し、上皮幹細胞増殖培地中において腫瘍 **sphere** を形成した。そして腫瘍 **sphere** 形成能および **CK13** 陽性細胞の出現は **p75** シグナル阻害により抑制されたことから、癌細胞は **p75** 依存的な重層上皮幹細胞特性を保持し、正常組織における厳密な規定から解放されていることが考えられた。

さらに、**p75** 陰性 **OM-1** から後天的な **p75** 陽性 **OM-1** の出現が確認され、それら **p75** 陽性 **OM-1** が重層上皮幹細胞特性を現した結果は、**OM-1** が脱分化能を保持すること、すなわち、重層上皮幹細胞特性は後天的に獲得可能であることが示唆された。



以上の OM-1 における組織幹細胞類似癌幹細胞特性の解析結果を踏まえた上で、EMT 誘導時における組織幹細胞類似癌幹細胞特性について解析を進めた。

当研究室ではこれまでに、口腔扁平上皮癌細胞における Snail 誘導性 EMT に伴う高度浸潤能獲得と、EMT の局所浸潤への関与について解析してきた<sup>(6-8, 29-33)</sup>。EMT 誘導性転写因子 Snail を OM-1 にウイルスベクターシステムで強制発現させることにより、細胞遊走スペースの有無やサイトカイン刺激による条件依存性の多段階 EMT 誘導モデル (OM-1\_Snail) を確立している<sup>(8)</sup>。この OM-1\_Snail は 3 次元培養法においてコラーゲン層へびまん性に浸潤し、口腔癌の局所浸潤像を再現する<sup>(8)</sup>。OM-1\_Snail は OM-1 と比較して p75 陽性細胞が著明に減少した。そして、扁平上皮分化マーカー CK13 陽性細胞は出現せず、腫瘍 sphere を形成しなかったことから、重層上皮幹細胞特性は Snail 誘導性 EMT によって失われたと推察された。

分化転換には二つの様式が想定されている<sup>(34)</sup>。細胞が直接異なる分化系統細胞へ転換する様式と、細胞が一旦脱分化を起こし、未分化な細胞が出現してから異なる分化系統の子孫細胞が現れる様式である<sup>(34)</sup>。OM-1 が直接、間葉細胞様細胞に分化転換したのか (すなわち、幹性を伴わない)、あるいは、異なる分化系統の子孫細胞を生み出す幹細胞特性を獲得したのか検討しなければならない。そこで、種々の組織幹細胞マーカーを検索したところ、OM-1 で発現せず、OM-1\_Snail で発現する IV 型中間径フィラメント Nestin を見出した。Nestin は中枢神経幹細胞・前駆細胞のマーカーとして知られており<sup>(35)</sup>、分化が進むにつれて Nestin の発現は消失し、各組織に特異的な中間径フィラメントに置き換わっていくと報告されている<sup>(36)</sup>。フローサイトメトリーおよび蛍光免疫細胞染色法で OM-1\_Snail における Nestin 陽性細胞が確認でき、さらに Nestin

陽性細胞から Vimentin 陽性細胞へ移行する像も観察された。したがって、OM-1 は Snail によって Nestin の発現が誘導され、神経幹細胞特性が付与された可能性が考えられた。そこで OM-1\_Snail を神経幹細胞増殖培地で浮遊させたところ、腫瘍 sphere を形成せず、幹性を示さなかった。Snail は OM-1 に Nestin の発現を付与したが、神経幹細胞特性は付与せず、Snail が誘導する EMT は直接的な分化転換であることが示唆された。OM-1\_Snail から安定した EMT 形質を示す細胞をクローニングした OM-1\_Snail clone では、Nestin の発現は再び消失していた（未発表データ）。今後、EMT における Nestin の発現意義について検討したい。

以上の結果は、癌細胞が利用する体性幹細胞特性について解析したものである。一方で、癌細胞の幹性（癌幹細胞特性）には癌細胞特有の性質が存在すると想定される。そこで、現在癌幹細胞マーカーとして最も信頼できる CD133 に着目した。CD133 は 5 つの細胞膜貫通ドメインを持つ細胞膜タンパク質であり、造血幹細胞マーカーの一つとして知られている<sup>(37)</sup>。そして、大腸癌<sup>(38)</sup>、脳腫瘍<sup>(39)</sup>などの有力な癌幹細胞マーカーとして利用されている。口腔癌細胞においても、CD133 陽性細胞が幹細胞特性を示すという報告や<sup>(40)</sup>、口腔癌細胞株に CD133 を強制発現させることで EMT 形質を示すという報告がある<sup>(41)</sup>。OM-1 を造血幹細胞増殖培地中で浮遊させると細胞膜 CD133 陽性細胞が誘導されることを見いだした。そして、この CD133 の発現に伴って内因性 Snail の発現が誘導された。これら結果は、あたかも CD133 陽性細胞（癌幹細胞）に EMT 形質が生じているように窺わせたが、蛍光免疫細胞染色法で CD133 と Snail の局在を確認すると、Snail は機能的局在部位である核内で不明瞭であり、E-カドヘリンは細胞膜に局在し、Vimentin も発現しておらず、EMT 形質を示さなかった。そして、外因性 Snail が明瞭に核内局在する OM-1\_Snail において CD133

の発現は示さなかった。

さらに、造血幹細胞増殖培地は OM-1 に多能性幹細胞マーカーの発現も誘導した。中でも転写因子 Oct4 は胚性幹細胞のマーカーとして重要視され、細胞分化の調整因子と考えられている<sup>(42)</sup>。Sox2<sup>(43)</sup>、Nanog<sup>(44)</sup>、とともに体細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングを引き起こす因子として知られている<sup>(45)</sup>。頭頸部癌においても Oct4 は幹性の制御因子であると報告されており<sup>(46)</sup>、Oct4 発現と癌幹細胞特性の相関性が報告され<sup>(47)</sup>、癌幹細胞単離におけるマーカーとして利用されている。また、初期外胚葉マーカー PAX6<sup>(48)</sup>、および初期中胚葉マーカー Brachyury<sup>(49)</sup> の発現が共に誘導され、OM-1 は造血幹細胞増殖培地という外的因子によって高位の未分化細胞が制御する細胞分化階層を展開していることが示唆された。そこで、個々の細胞における CD133、Snail および Oct4 の発現を蛍光免疫細胞染色法で観察したところ、CD133 陽性細胞において Oct4 の核内局在は不明瞭であり、また Snail の発現と同調せず、相反的な発現を示した。この結果を反映するように、Oct4 を含む多能性幹細胞マーカーの発現は外因性 Snail が明瞭に核内局在する OM-1\_Snail で誘導されなかった。これらの結果から、一つの OM-1 細胞が Snail 依存的 EMT 形質を示した場合、その細胞は癌幹細胞と等価ではないことが明らかとなった。

最後に、CD133 を指標とする癌幹細胞特性が、前述の重層上皮幹細胞特性と同様に可逆性であるかどうかを検討した。CD133 を発現誘導する造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1 腫瘍 sphere をトリプシン処理で分離・離散させ、OM-1 に CD133、Oct4、および Snail の発現を誘導できない神経幹細胞増殖培地で腫瘍 sphere を再形成させると、予想通り、発現していた CD133、Oct4、および Snail は消失した。逆に、神経幹細胞増殖培地で形成され、CD133、Oct4、および Snail を発現しない腫瘍 sphere を分離・離散させ、造血幹細胞増殖培地で

再度腫瘍 sphere 形成させると、CD133, Oct4, および Snail の発現が誘導された。これらの結果は、CD133 を指標とする癌幹細胞特性が外的因子依存的な可逆性の可能性を示すものであった。

本研究で明らかとなった結果と考察を図示する (図 10)。原発巣から間質に播種し、外科的切除や化学療法を乗り越えた癌細胞は、それら細胞が癌幹細胞特性を保持していなくても外的因子によって後天的に癌幹細胞特性を獲得し、再発巣を形成しうることが考えられた。また、癌細胞に EMT が生じ、脈管内移動を経て原発巣から遠隔部位に播種した場合において、EMT は癌幹細胞特性とは独立した表現型であり、外的因子によって癌細胞は癌幹細胞特性を獲得して転移巣を形成することが推察された。しかし、癌幹細胞が原発巣形成から絶対的に存在し、癌幹細胞に EMT が生じて遠隔播種する可能性も残されている。この場合、間葉上皮移行 (MET)<sup>(50)</sup> が生じると癌幹細胞は再び癌幹細胞特性を示すことが考えられる。本研究では、EMT と癌幹細胞特性は、個々の癌細胞が有する独立した潜在能力であり、そして、外的因子依存的に可逆性であることを示すことで、両者の相対性を否定することができたが、癌幹細胞の絶対的存在については解明できていない。本研究室が以前に報告した局所浸潤における EMT 型癌細胞主導による非 EMT 型癌細胞との並走浸潤<sup>(6)</sup>によって、非 EMT 型癌細胞の脈管内浸潤の可能性も残されている。肺癌の転移過程において、必ずしも EMT が生じた癌細胞だけが転移 (脈管内移動) するわけではないという報告がある<sup>(51)</sup>。癌幹細胞は原発巣から転移巣形成まで、EMT 型癌細胞が産生する液性因子の影響を受けながらも、その一貫した癌幹細胞特性を制御していることも考えられる。今後、可逆性 EMT 誘導モデルを MET 誘導モデルに発展させ、原発巣から二次腫瘍形成まで再現するモデルを確立し、EMT と癌幹細胞特性について更なる解析を進めたい。

## V. 結論

EMT と癌幹細胞特性の関連性を明確にするという目的に対し，口腔扁平上皮癌の可逆性 EMT 誘導モデルにおける癌幹細胞特性を解析することで，以下の解答を得た．

- 一つの癌細胞が **Snail** 依存的 EMT 形質を示した場合，その細胞は癌幹細胞と等価ではない．
- 癌幹細胞特性は EMT 形質と独立しており，単独で後天的に獲得可能である．

## VI. 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究課題を与えて頂くとともに，御指導，御校閲を賜った広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門口腔外科学 故鎌田伸之教授，基礎生命科学部門細菌学 菅井基行教授に深甚なる謝意を表しますとともに，御校閲，御助言賜りました統合健康科学部門公衆口腔保健学 杉山 勝教授，統合健康科学部門国際歯科医学連携開発学 藤井万紀子教授，基礎生命科学部門粘膜免疫学 飛梅 圭准教授，応用生命科学部門口腔外科学 武知正晃准教授に深謝いたします。

また，本研究遂行のために御指導頂いた口腔外科学 東川晃一郎講師を始めとする口腔外科学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に，本研究を陰で支えてくれた両親および家族に心より感謝いたします。

## Ⅶ. 参考文献

1. 日本口腔腫瘍学会・日本口腔外科学会編：口腔癌診療ガイドライン 2013年版 (2013)
2. Kalluri R, Neilson E.G.: Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis.: J. Clin Invest.;112:1776–1784.(2003)
3. Ye X, Weinberg RA.: Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression.: Trends Cell Biol.; 25:675-86.(2015)
4. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA.: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.: Cell.; 139:871-90.(2009)
5. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A.: The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells.: Nat Cell Biol.; 2:84-9.(2000)
6. Tanaka F, Rizqiawan A, Higashikawa K, Tobiume K, Okui G, Shigeishi H, Ono S, Shimasue H, Kamata N.: Snail promotes Cyr61 secretion to prime collective cell migration and form invasive tumor nests in squamous cell carcinoma.: Cancer Lett.; 329:243-52.(2013)
7. Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Taki M, Shigeishi H, Kamata N.: Snail-

- induced down-regulation of DeltaNp63alpha acquires invasive phenotype of human squamous cell carcinoma.: *Cancer Res.*; 67:9207-13.(2007)
8. Okui G, Tobiume K, Rizqiawan A, Yamamoto K, Shigeishi H, Ono S, Higashikawa K, Kamata N.: AKT primes snail-induced EMT concomitantly with the collective migration of squamous cell carcinoma cells.: *J cell Biochem.*; 114:2039-49.(2013)
  9. Li F, Tiede B, Massagué J, Kang Y.: Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis.: *Cell Res.*; 17:3-14.(2007)
  10. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN.: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response.: *Nature.*; 444:756-60.(2006)
  11. Shigeishi H, Biddle A, Gammon L, Rodini CO, Yamasaki M, Seino S, Sugiyama M, Takechi M, Mackenzie IC.: Elevation in 5-FU-induced apoptosis in head and neck cancer stem cells by a combination of CDHP and GSK3 $\beta$  inhibitors.: *J Oral Pathol Med.*; 44:201-7.(2015)
  12. Lamb R, Ambler CA. : Keratinocytes propagated in serum-free, feeder-free culture conditions fail to form stratified epidermis in a reconstituted skin model.: *PLoS One.*; 8(1):e52494.(2013)



13. Yamashita T, Tohyama M.: The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI.: *Nat Neurosci.*; 6:461-7.(2003)
14. Chen C, Wei Y, Hummel M, Hoffmann TK, Gross M, Kaufmann AM, Albers AE.: Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma.: *PLoS One.*; 6:e16466.(2011)
15. Ghuwalewala S, Ghatak D, Das P, Dey S, Sarkar S, Alam N, Panda CK, Roychoudhury S.: CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma.: *Stem Cell Res.*; 16(2):405-17.(2016)
16. Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, Costea DE, Mackenzie IC.: Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative.: *Cancer Res.*; 71(15):5317-26.(2011)
17. Nomura A, Banerjee S, Chugh R, Dudeja V, Yamamoto M, Vickers SM, Saluja AK.: CD133 initiates tumors, induces epithelial-mesenchymal transition and increases metastasis in pancreatic cancer.: *Oncotarget.*; 6(10):8313-22. (2015)
18. Du L, Rao G, Wang H, Li B, Tian W, Cui J, He L, Laffin B, Tian X, Hao C,

- Liu H, Sun X, Zhu Y, Tang DG, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q.: CD44-positive cancer stem cells expressing cellular prion protein contribute to metastatic capacity in colorectal cancer.: *Cancer Res.*; 73(8):2682-94. (2013)
19. Hollier BG, Tinnirello AA, Werden SJ, Evans KW, Taube JH, Sarkar TR, Sphyris N, Shariati M, Kumar SV, Battula VL, Herschkowitz JI, Guerra R, Chang JT, Miura N, Rosen JM, Mani SA.: FOXC2 expression links epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in breast cancer.: *Cancer Res.*; 73(6):1981-92. (2013)
20. Bao B, Wang Z, Ali S, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Li Y, Azmi AS, Miele L, Sarkar FH. Over-expression of FoxM1 leads to epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells.: *J Cell Biochem.*; 112(9):2296-306. (2011)
21. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA.: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.: *Cell.*; 133:704-15.(2008)
22. Scheel C, Weinberg RA.: Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition.: concepts and molecular links.: *Semin Cancer Biol.*; 22:396-403.(2012)

23. Ye X, Tam WL, Shibue T, Kaygusuz T, Reinhardt F, Eaton EN, Weinberg RA.: Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells.: *Nature.*; 525:256–260.(2015)
24. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM.: Cancer stem cells–perspectives on current status and future directions.: AACR Workshop on cancer stem cells.: *Cancer Res.*; 66(19):9339–9344.(2006)
25. Bothwell M.: p75<sup>NTR</sup>: a receptor after all.: *Science.*; 26;272(5261):506-7.(1996)
26. Okumura T, Shimada Y, Imamura M, Yasumoto S.: Neurotrophin receptor p75(NTR) characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro.: *Oncogene.*; 26;22(26):4017-26.(2003)
27. Nakamura T, Endo K, Kinoshita S.: Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling.: *Stem Cells.*; 25(3):628-38.(2007)
28. Dowdall JR, Sadow PM, Hartnick C, Vinarsky V, Mou H, Zhao R, Song PC, Franco RA, Rajagopal J: Identification of distinct layers within the stratified squamous epithelium of the adult human true vocal fold.: *Laryngoscope.*; 125(9):E313-9.(2015)

29. Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N, Fujimoto R, Nagayama M.: Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro.: *Oral Oncol.*; 37(1):65-71.(2001)
30. Yokoyama K, Kamata N, Fujimoto R, Tsutsumi S, Tomonari M, Taki M, Hosokawa H, Nagayama M.: Increased invasion and matrix metalloproteinase-2 expression by Snail-induced mesenchymal transition in squamous cell carcinomas.: *Int J Oncol.*; 22(4):891-8.(2003)
31. Higashikawa K, Yoneda S, Tobiume K, Saitoh M, Taki M, Mitani Y, Shigeishi H, Ono S, Kamata N.: DeltaNp63alpha-dependent expression of Id-3 distinctively suppresses the invasiveness of human squamous cell carcinoma.: *Int J Cancer.*; 124(12):2837-44.(2009)
32. Taki M, Verschueren K, Yokoyama K, Nagayama M, Kamata N.: Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells.: *Int J Oncol.*; 28(2):487-96.(2006)
33. Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S, Nagayama M.: Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells.: *Cancer Sci.*; 94(7):593-7.(2003)

34. Merrell AJ, Stanger BZ.: Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style.: *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 17(7):413-25.(2016)
35. Gilyarov AV.: Nestin in central nervous system cells.: *Neurosci Behav Physiol.*; 38(2):165-9.(2008)
36. Chou YH, Khuon S, Herrmann H, Goldman RD.: Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis.: *Mol Biol Cell.*; 14(4):1468-78.(2003)
37. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW.: AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.: *Blood.*; 15;90(12):5002-12.(1997)
38. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R.: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells.: *Nature.*; 445(7123):111-5.(2006)
39. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB.: Identification of a cancer stem cell in human brain tumors.: *Cancer Res.*; 63(18):5821-8.(2003)

40. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD.: A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy.: *Cancer Lett.*; 289(2):151-60.(2010)
41. Moon Y, Kim D, Sohn H, Lim W.: Effect of CD133 overexpression on the epithelial-to-mesenchymal transition in oral cancer cell lines.: *Clin Exp Metastasis.*; 33(5):487-96.(2016)
42. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG.: Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.: *Nat Genet.*; 24(4):372-6.(2000)
43. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S.: The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.: *Cell.*; 113(5):631-42.(2003)
44. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R.: Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function.: *Genes Dev.*; 17(1):126-40.(2003)
45. Takahashi K, Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.: *Cell.*; 126(4):663-76.(2006)

46. Koo BS, Lee SH, Kim JM, Huang S, Kim SH, Rho YS, Bae WJ, Kang HJ, Kim YS, Moon JH, Lim YC.: Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells.: *Oncogene.*; 34(18):2317-24.(2015)
47. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, Chou SH, Chien CS, Ku HH, Lo JF.: Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma.: *Clin Cancer Res.*; 14(13):4085-95.(2008)
48. Kondoh H, Uchikawa M, Kamachi Y.: Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation.: *Int J Dev Biol.*; 48(8-9):819-27.(2004)
49. Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H.: Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse.: *Nature.*; 343(6259):617-22.(1990)
50. Li B, Zheng YW, Sano Y, Taniguchi H.: Evidence for mesenchymal-epithelial transition associated with mouse hepatic stem cell differentiation.: *PLoS One.*; 6(2):e17092.(2011)
51. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J, Schwabe RF, Vahdat LT, Altorki NK, Mittal V, Gao D.:

Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance.: *Nature.*; 527(7579):472-6. (2015)



## VIII. 付図説明

### 図 1. 歯肉由来不死化ケラチノサイト細胞株 RT-7 における重層上皮幹細胞特性

A. 正常歯肉上皮(normal gingival epithelium)および RT-7 における *p75*, *CK13*, *CK14*, *G3PDH* の mRNA 発現量を RT-PCR 法で検出.

B. RT-7 における細胞膜 *p75* 発現の蛍光免疫染色像 (green: *p75*, blue: DAPI) を示す.

C. RT-7 における *CK14* 陽性および *CK13* 陰性細胞の蛍光免疫染色像 (green: *CK13*, red: *CK14*, blue: DAPI) を示す.

D. 3次元培養法におけるコラーゲンゲル上での RT-7 の単層構造形成を示す HE 染色像.

E. RT-7 の sphere formation assay. 上皮幹細胞増殖培地中の浮遊 RT-7 は sphere を形成しない (位相差顕微鏡像).

### 図 2. 舌扁平上皮癌由来細胞株 OM-1 における重層上皮幹細胞特性

A. 各種扁平上皮癌細胞株における *p75*, *CK13*, *CK14*, *G3PDH* の mRNA 発現量を RT-PCR 法で検出.

B. OM-1 における蛍光免疫染色像 (green: *p75*, blue: DAPI).

C. OM-1 の蛍光免疫染色像 (green: *CK13*, red: *CK14*, blue: DAPI).

D. DMEM 中で低濃度培養し, 単一細胞からのクローナルな増殖によって形成された OM-1 のコロニーの蛍光免疫染色像 (green: *p75*, red: *CK14*, blue: DAPI).

E. OM-1 が形成するコロニーの蛍光免疫染色像 (green: *CK13*, red: *CK14*, blue: DAPI). *CK14* 陽性細胞から *CK13* 陽性細胞が非対称に分裂する像 (矢印) がみ

られる。

F. 3次元培養法によって OM-1 がコラーゲンゲル上で形成する重層上皮類似構造を示す HE 染色像。

G. 上皮幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1 が形成する腫瘍 sphere（位相差顕微鏡像）。

### 図 3. p75 シグナル阻害剤による OM-1 の重層上皮幹細胞特性の抑制

A. 非接着 24-well dish で上皮幹細胞増殖培地中、あるいは p75 シグナル阻害剤を加えた上皮幹細胞増殖培地に浮遊させた OM-1 の、1well あたりの腫瘍 sphere の数をそれぞれ 6 well で計測し、その平均値をグラフ化した。

B. p75 シグナル阻害剤を加えた DMEM 中の接着培養 OM-1 が形成するコロニーの蛍光免疫染色像（green: CK13, red: CK14, blue: DAPI）。

### 図 4. p75 陰性 OM-1 における重層上皮幹細胞特性

A. OM-1 を Becton Dickinson (BD) FACS Aria II で完全な p75 陰性細胞群をソーティングし、ソーティングした p75 陰性細胞は再度 Becton Dickinson FACS Caliber™ で p75 陰性と確認した。

B. ソーティング直後に播種した p75 陰性 OM-1 が形成するコロニーの蛍光免疫染色像（green: CK13, red: CK14, blue: DAPI）。

C. ソーティングして継代 2 週間後の p75 陰性 OM-1 において、フローサイトメトリーで p75 発現 OM-1 の出現が確認された。

D. ソーティングして継代 2 週間後の p75 陰性 OM-1 が形成するコロニーには、蛍光免疫染色で p75 陽性細胞が出現した（green: p75, blue: DAPI）。

E. ソーティング直後、およびソーティング後 2 週間後の p75 陰性 OM-1 を上

皮幹細胞増殖培地へ播種し，24-well dish 1wellあたりの腫瘍 sphere の数をそれぞれ 6 well ずつ計測し，その平均値をグラフ化した．

F. ソーティングして継代 8 週間後の p75 陰性 OM-1 が形成するコロニーにおける CK13 陽性細胞の出現を蛍光免疫染色で確認した (green: CK13, red: CK14, blue: DAPI)．

#### 図 5. Snail 誘導性 EMT 型 OM-1 における重層上皮幹細胞特性

A. OM-1 および OM-1\_Snail における，p75, CK13, CK14, G3PDH の mRNA 発現量を RT-PCR 法で検出．

B. OM-1 および OM-1\_Snail における，ESA と p75 の発現細胞をフローサイトメトリーで解析．

C. DMEM 中で接着 OM-1\_Snail が形成するコロニーにおける Snail の明瞭な核内局在を示す蛍光免疫染色像 (green: Snail, blue: DAPI)．

D. DMEM 中で接着 OM-1\_Snail が形成するコロニーにおける EMT 表現型細胞の蛍光免疫染色像 (green: Vimentin, red: E-cadherin, blue: DAPI)．

E. DMEM 中で接着 OM-1\_Snail が形成するコロニーにおける p75 の局在は，細胞膜から細胞質内へ移動している蛍光免疫染色像 (green: p75, blue: DAPI)．

F. DMEM 中で接着 OM-1\_Snail が形成するコロニーにおいて CK13 陽性細胞は出現しない細胞蛍光免疫染色像 (green: CK13, red: CK14, blue: DAPI)．

G. OM-1\_Snail における 3 次元培養法の HE 染色像を示す．

H. 上皮幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1\_Snail は完全な腫瘍 sphere を形成しない (位相差顕微鏡像)．

#### 図 6. OM-1\_Snail における神経幹細胞マーカー Nestin の発現

- A. OM-1 および OM-1\_Snail における *p75*, *Nestin*, *G3PDH* の mRNA 発現量を RT-PCR 法で検出.
- B. OM-1 および OM-1\_Snail における *Nestin* 陽性細胞をフローサイトメトリーで解析.
- C. DMEM 中で接着 OM-1\_Snail が形成するコロニーにおける線維化した *Nestin* 陽性細胞の蛍光免疫染色像 (green: *Vimentin*, red: *Nestin*, blue: DAPI).
- D. 神経幹細胞増殖培地で浮遊させた OM-1 および OM-1\_Snail の腫瘍 sphere 形成像 (位相差顕微鏡像).

#### 図 7. 癌幹細胞マーカー CD133 の発現

- A. DMEM 中の接着 OM-1, そして, 上皮幹細胞増殖培地 (FAD medium), 神経幹細胞増殖培地 (NSC medium), および造血幹細胞増殖培地 (HSC medium) 中で浮遊させた OM-1 における *CD133*, *Snail*, *E-cadherin*, *Vimentin*, *G3PDH* の mRNA 発現量を RT-PCR 法で検出.
- B. DMEM 中の接着 OM-1 (上段), および造血幹細胞増殖培地中で浮遊させた OM-1 (下段) におけるフローサイトメトリーによる *CD133* 発現細胞の解析.
- C. 造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1 の蛍光免疫染色像 (red: *CD133*, blue: DAPI).
- D. 造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1 の蛍光免疫染色像 (green: *Snail*, red: *E-cadherin*, blue: DAPI) を示す.
- E. DMEM 中の接着 OM-1, DMEM 中の接着 OM-1\_Snail, そして, 上皮幹細胞増殖培地, 神経幹細胞増殖培地, および造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1\_Snail における *CD133*, *G3PDH* の mRNA 発現量を RT-PCR 法で検出.

## 図 8. 多能性幹細胞マーカーOct4 の発現

A. DMEM 中の接着 OM-1, そして, 上皮幹細胞増殖培地, 神経幹細胞増殖培地, 造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1 における *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *PAX6*, *Brachyury*, *CD133*, *G3PDH* の mRNA 発現量を RT-PCR 法で検出.

B. 造血幹細胞増殖培地中で浮遊させた OM-1 の蛍光免疫染色像 (green: Snail, red: Oct4, blue: DAPI).

C. DMEM 中の接着 OM-1, DMEM 中の接着 OM-1\_Snail, そして, 上皮幹細胞増殖培地, 神経幹細胞増殖培地, 造血幹細胞増殖培地中の浮遊 OM-1\_Snail における *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *PAX6*, *Brachyury*, *CD133*, *G3PDH* の mRNA 発現量を RT-PCR 法で検出.

D. 造血幹細胞増殖培地中で浮遊させた OM-1\_Snail の蛍光免疫染色像 (green: Snail, red: Oct4, blue: DAPI).

## 図 9. 癌幹細胞マーカーの可逆的発現

A. 神経幹細胞培地中で形成された OM-1 の腫瘍 sphere と, それらを一旦離散させ, 造血幹細胞増殖培地中で再度形成させた浮遊 OM-1 における *Snail*, *Oct4*, *CD133*, *G3PDH* の mRNA 発現量を RT-PCR 法で比較.

B. 造血幹細胞増殖培地中で形成された浮遊 OM-1 と, それらを一旦離散させ, 神経幹細胞培地中で再度形成させた OM-1 の腫瘍 sphere における *Snail*, *Oct4*, *CD133*, *G3PDH* の mRNA 発現量を RT-PCR 法で比較.

## 図 10. 癌の再発・転移における EMT と癌幹細胞関与の模式図

## Ⅸ. 表および図

表 1. Primer sets for RT-PCR

Gene symbol	primer sequences	annealing Tm.
Snail	5'-AAT CGG AAG CCT AAC TAA CTA CAG-3' 5'-GGA AGA GAC TGA AGT AGA G-3'	60°C
E-cadherin	5'-AGC CAT GGG CCC TTG GAG-3' 5'-CCA GAG GCT CTG TGC ACC TTC-3'	60°C
Vimentin	5'-TGG CAC GTC TTG ACC TTG AA-3' 5'-GGT CAT CGT GAT GCT GAG AA-3'	56°C
p75	5'-TCA GTG GCA TGG CTC CAG TC-3' 5'-GCA GTA TCC AGT CTC AGC CCA AG-3'	58°C
CK13	5'-CCA ACA CTG CCA TGA TTC AG-3' 5'-CGT GTC TTG ATG TCC AGC AG-3'	56°C
CK14	5'-GGA GAT GAT TGG CAG CGT GGA-3' 5'-GGA CCT GCT CGT GGG TGG ACA-3'	58°C
Nestin	5'-CAG CGT TGG AAC AGA GGT TGG-3' 5'-TGG CAC AGG TGT CTC AAG GGT AG-3'	60°C
Oct4	5'-GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG-3' 5'-CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC-3'	65°C
Nanog	5'-CTC TCC TCT TCC TTC CTC CAT-3' 5'-TTG CGA CAC TCT TCT CTG C-3'	56°C
Sox2	5'-CAT GCA CCG CTA CGA CG-3' 5'-CGG ACT TGA CCA CCG AAC-3'	56°C
Pax6	5'-AAT AAC CTG CCT ATG CAA CCC-3' 5'-AAC TTG AAC TGG AAC TGA CAC AC-3'	56°C
CD133	5'-ACC AGG TAA GAA CCC GGA TCA A-3' 5'-CAA GAA TTC CGC CTC CTA GCA CT-3'	60°C
Brachyury	5'-ATC GTG GAC AGC CAG TAC GA-3' 5'-GCC AAC TGC ATC ATC TCC AC-3'	58°C
G3PDH	5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' 5'-CAG CCC CAG CGT CGT CAA AGG TG-3'	58°C