

新たな大腸癌幹細胞モデルCD44陽性COL0 201細胞の 同定ならびにその性質解析

奥山, 裕久

<https://doi.org/10.15017/4060097>

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

**新たな大腸癌幹細胞モデル CD44 陽性 COLO 201 細胞
の同定ならびにその性質解析**

2020 年

奥山 裕久

目次

略語	3
要約	4
序論	5
実験方法	9
結果	18
考察・展望	73
参考文献	80
謝辞	95

略語

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
CBDCA	carboplatin
MMC	mitomycin
CPT-11	irinotecan
PTX: Tx1	paclitaxel
GEM	gemcitabine
5-FU	fluorouracil
OX	oxaliplatin
EGFR	epidermal growth factor receptor
HER2/ <i>neu</i>	epidermal growth factor receptor 2
H&E	Hematoxylin-Eosin
siRNA	small interfering RNA
shRNA	small hairpin RNA
MTD	maximum tolerated dose
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean

要約

目的：抗癌剤治療後の再発の主な原因の一つには、癌幹細胞の存在が明らかになりつつある。癌幹細胞を単離し特徴づけることができれば、癌患者へ新たな治療方法を開発することにつながると考えられている。本研究目的は、ヒト大腸癌細胞株から癌幹細胞を単離することであった。

方法：潜在的な癌幹細胞マーカー（CD44, CD133, CD166）の発現レベルを指標に、20 種の大腸癌細胞株をスクリーニングした。次に、潜在的な癌幹細胞マーカー陽性細胞を免疫不全マウスを用いた腫瘍形成能試験でそれらのカウンターパートと比較した。In vitro における幹細胞性や分化能、抗癌剤に対する感受性についても調べ、これらの癌幹細胞の性質を理解するためにマイクロアレイ解析を行った。

結果：COLO 201 細胞は CD44 の発現が異なる 2 つのポピュレーションに分かれ、CD44 陽性細胞は CD44 陰性細胞に比べて免疫不全マウスにおける腫瘍形成能が有意に高かった。CD44 陽性細胞は in vitro では幹細胞性の特徴を示し、5-FU に対して耐性であった。さらに癌幹細胞の性質に関連する遺伝子（CXCR4, ALDH1A1, ALDH3A1, WNT5A）の mRNA 発現が CD44 陽性細胞で亢進していた。

結論：CD44 陽性 COLO 201 細胞が癌幹細胞の特徴を保持していると結論付けた。

CD44 陽性 COLO 201 細胞の分子メカニズムを解明することで、癌幹細胞を標的とした新たな治療方法の開発に繋がる可能性が期待される。

序論

世界中で癌は主な死因の上位疾患である。その中でも大腸癌は世界中で最も罹患患者が多い癌種の一つであり、癌種の中でも二番目に高い死因である（1, 2）。そのため、新たな大腸癌治療法の確立は人類における喫緊の課題である。近年、腫瘍生物学の発展により、癌は不均一な細胞から構成され、癌幹細胞と呼ばれる微小集団の存在が報告されるようになってきた（3-5）。癌幹細胞は自己複製能および分化能を有しており、癌の増殖と維持に必要不可欠な存在である。また、非癌幹細胞に比べて化学療法や放射線療法、免疫療法に対して感受性が低いことが報告されている（6-10）。したがって、癌幹細胞は癌治療によって完全寛解には至らず、癌の再発をもたらす原因の一つであると考えられている。もし、癌幹細胞を根絶することができれば、腫瘍組織は維持することができなくなり退縮すると考えられている（図1）。

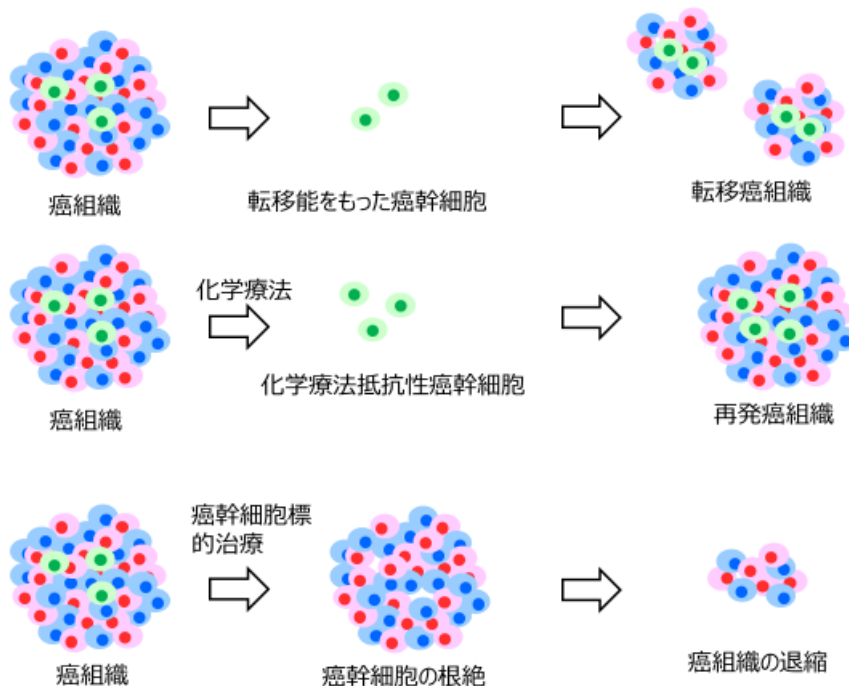


図1. 癌幹細胞仮説

これまでに、多くの研究者によって、急性骨髄性白血病（11, 12）, 乳癌（13, 14）, 子宮頸癌（15, 16）および膀胱癌（17, 18）などの様々な癌腫において複数の分子の表面マーカーを指標に腫瘍組織から癌幹細胞が同定されてきた（表 1, 19）. 大腸癌では CD44 や CD133, CD166, LGR5 が癌幹細胞マーカーとして報告されている（20-23）. これらのマーカーを使って臨床の腫瘍組織から癌幹細胞が単離され、機能的な分子およびパスウェイが抽出されてきたが、未だ癌幹細胞を標的にした治療法の確立には成功していない.

Cell type	Markers	Reference
急性骨髄性白血病	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	11, 12, 19
乳癌	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} /ESA ⁺	13, 19
子宮頸癌	CD44 ⁺ /CD117 ⁺	15, 16, 19
膀胱癌	CD44 ⁺ , EpCAM ⁺ , CD24 ⁺ , CD133 ⁺	17, 18, 19
大腸癌	CD133 ⁺ , CD44 ⁺ , CD166 ⁺ , EpCAM ⁺ , CD24 ⁺	19-23
脳腫瘍	CD133 ⁺	19
肺癌	CD133 ⁺	19

表 1. 癌腫における癌幹細胞マーカー

癌幹細胞の選抜は、腫瘍組織から細胞表面マーカーを使って亜集団を分離し、*in vitro* におけるスフェア形成能試験や免疫不全マウスを用いた腫瘍形成能試験が行われることがほとんどであった（20-24）. しかし、安定して腫瘍組織を入手することや十分な数の癌幹細胞を分離することが難しく、正確な結果を得ることが難しかった. その点、細胞株から単離した癌幹細胞は、培養方法が確立され、容易に必要な細胞数を確保できることから、安定した結果を得られるだけでなく、薬剤スクリーニング試験に加え、遺伝子をノックアウトあるいは高発現させるような遺伝子操作も可能である. また、臨床の腫瘍組織に比

べて、株化細胞株は不均一性が低いため、同一細胞株内で非癌幹細胞と比較することで、癌幹細胞の機能に関わっている明確な分子やパスウェイを見出しやすい利点もある。

これまでに様々な癌腫由来のヒト癌細胞株から幹細胞性の特徴を有した亜集団が見出されており、大腸癌細胞株では、HCT116, HT29 および HCT-15 などが報告されている (25-30)。しかしながら、以下のような課題点も見受けられた。第一に、既報論文を再現することが困難であった (27)。その理由として、論文では癌幹細胞として分離している表面マーカーの発現がわずかな差であったり、全体の 1%以下の極僅かな亜集団であったりして、正確に癌幹細胞を分離することが難しい。また、癌幹細胞と結論づけているような免疫不全マウスの造腫瘍性の結果がはっきりした差ではないことや、細胞の継代数を重ねるにつれて施設間で細胞の特徴が変わってしまったりすることが原因だと考えられる。第二に、単離された癌幹細胞が増腫瘍性や自己複製能、転移といった性質が多く報告されているが、治療抵抗性に関する詳細な検討を行っている論文は少なかった。そのため、その細胞集団が臨床で大きな課題となっている治療抵抗性の癌細胞や治療後の再発に寄与しているのか判断できなかった。

このような背景を踏まえ、本研究は、癌患者への新たな治療方法の開発に向けた基盤的研究として、ヒト大腸癌細胞株から癌幹細胞を単離することを目的とした。癌細胞株から癌幹細胞を同定することは、癌幹細胞の分子メカニズムを解明するためだけでなく、治療抵抗性メカニズム研究や引いては癌幹細胞を標的にした創薬開発の有用のツールと成りえる。

本研究では、主に世界最大の細胞株バンクである ATCC (American Type Culture Collection) から購入した 20 種の大腸癌細胞株を若い継代数で使用して、癌幹細胞マーカー (CD44, CD133, CD166) の発現を調べたところ、複数の細胞株には明確に発

現異なる亜集団が存在することを見出した。特に COLO 201 細胞は CD44 の発現が異なる 2 つのポピュレーションで構成され、CD44 陽性細胞は癌幹細胞の特徴を示し、抗癌剤耐性であったことから、この細胞は癌幹細胞を標的とした創薬研究に有用なモデルになりえることが示唆された。

本論文内容の一部については、Anticancer Research 誌に公表された。

Okuyama H, Nogami W, Sato Y, Yoshida, Tona Y, Tanaka Y: Characterization of CD44-positive Cancer Stem-like Cells in COLO 201 Cells. Anticancer Res 40(1):169-176, 2020. PMID: 31892565, DOI: 10.21873/anticancerres.13938

実験方法

細胞培養

17 種のヒト大腸癌細胞株 (LS1034, LS513, SK-CO-1, SW620, COLO 205, SW480, HCT 116, DLD-1, NCI-H747, SW48, WiDr, LS180, LS411N, HT-29, COLO 201, COLO 320DM, HCT15) を American Type Culture Collection から, 2 種のヒト大腸癌細胞株 (COLO 741, HT115) を European Collection of Authenticated Cell Cultures, 1 種のヒト大腸癌細胞株 (C-1) を Immuno-Biological Laboratories から購入した. 全ての細胞を DMEM (Wako) に 10% FBS (Hyclone) , 100 units/ml penicillin (Gibco) , 100 µg/ml streptomycin (Gibco) , 25 µg/ml amphotericin B (Gibco) を加えた培養液 (10%FBS/DMEM) で維持した. 0.05% Trypsin/0.53mM EDTA 溶液 (Nacalai) を用いて接着細胞を剥離し, 継代は 1 週間に 2 もしくは 3 回行った. スフェア培養による影響を調べるために, Knockout DMEM/F-12 (Gibco) に B27 without Vitamin A (Thermo Fisher Scientific), 20 ng/ml EGF (Peprotech) , 20 ng/ml bFGF (Peprotech) , 2 µg/ml Heparin (STEMCELL) を加えた培養液を用いて超低吸着プレート (CORNING) で培養した. インキュベーター (Thermo Fisher Scientific) を用いて全ての培養を 37 °C, 5% CO₂ の条件で行った. 細胞保存は, 細胞を回収し遠心操作後に CELLBANKER1 (ZENOAQ) で懸濁し 2-5x10⁶ cells/tube に分注した. 短期保存する場合は -80°C, 長期保存する場合は液体窒素タンクで保存した. 細胞を起こすときは, 凍結チューブを保存場所から取り出し, 37°C に設定した温浴槽で溶解した.

フローサイトメトリー解析とセルソーティング

培養細胞を, 0.05% Trypsin/0.53mM EDTA 溶液を用いて剥離し回収した. 一方, 担癌マウスから採取した腫瘍をハサミで細かく刻んだ後, 10 µg/mL DNase (Roche) を含む 1 mg/mL コラゲナーゼ溶液 (Wako) で 37°C, 20 分間処理し, 70µm セルストレイナーで細胞を回収した. 細胞回収後に遠心操作 (1,000rpm, 5 分) を行い, HBSS (Wako) に 2% FBS (HyClone) , 5mM HEPES (SIGMA) , 5mM EDTA (Nacalai) を含む 2% FBS/HBSS に置き換え, 細胞懸濁液を 0.5% Trypan blue (Nacalai) と等量加えて, 血球計算盤を用いて目視で細胞数を測定した. 少なくとも 10 万個の細胞をチューブに分取し, 蛍光標識されたモノクローナル抗体もしくは, アイソタイプコントロールを暗所, 4°C, 35 分の条件で抗体反応させた. 使用したモノクローナル抗体とアイソタイプコントロールは下表の通りである. アイソタイプコントロールをネガティブコントロールとして使用した. 測定直前に DAPI 溶液 (Dojindo) を加えてフローサイトメトリーを用いて測定した. 生細胞かつ単一の細胞にゲーティングした細胞について分子の発現を解析した. フローサイトメトリーとして, MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec) もしくは, FACSAria II (BD Biosciences) を使用した. 細胞のソーティングとして, BD FACSAria II を使用した. データ解析用のソフトウェアとして, Flowlogic Software (Miltenyi Biotec) もしくは, BD FACSDiva™ software (BD Biosciences) を使用した.

分子名	蛍光	クローン	販売
CD44	PE	G44-26	BD Biosciences
CD44	APC	G44-26	BD Biosciences
CD133	APC	AC133	Miltenyi Biotec
CD166	PE	3A6	Biolegend
HER2	APC	24.7	BD Biosciences

CD24	PE	ML5	BD Biosciences
CXCR4	PE	12G5	Biolegend
H2Kd	FITC	SF1-1.1	Biolegend
アイソタイプコントロール	蛍光	クローン	販売
mouse IgG2b	PE	27-35	BD Biosciences
mouse IgG2b	APC	27-35	BD Biosciences
mouse IgG1	PE	MOPC-21	BD Biosciences

***In vitro* における増殖評価**

COLO 201 細胞および、単離した CD44 陽性細胞、CD44 陰性細胞を細胞数カウント後に、96 well plate に 3×10^3 cells/well で播種し培養を開始した。3 もしくは 4 日後にプレート培養器から取り出し、WST-8 (Kishida Chemical) を 20uL/well で加えてプレートミキサーを用いて混和した。培養器の中で 3 時間インキュベートした後に、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定しウェル当たりの細胞数を算出した。

コロニー形成能評価

単離した CD44 陽性細胞もしくは CD44 陰性細胞を細胞数カウント後に、Matrigel GFR (CORNING) と 10%FBS/DMEM を等量の溶液で細胞数を懸濁し、24 well plate に 100 cells/well で培養を開始した。12 日後に各 well におけるコロニー数を目視で測定した。

マウスモデルにおける腫瘍形成能評価

全ての実験は塩野義製薬の動物委員会によって承認され、委員会のガイドラインに従って実験を行った。ヌードマウスもしくは NOD/SCID マウスは CLEA Japan から購入し、塩野義の動物飼育施設で特定の細菌、ウイルス、寄生虫等の病原生物が存在しない環境で

飼育された。単離した細胞もしくは、培養細胞を、DMEM と growth factor-reduced Matrigel matrix (BD Biosciences) を 1:1 の等量の溶液で懸濁し、総 50 μ L を麻酔下のマウスに背部皮下移植した。腫瘍体積はノギスを用いて週に 2 回もしくは 3 回測定した。腫瘍体積は計算式(長径 \times 短径²)/2 で計算された。マウスは腫瘍体積が 2, 000 立方ミリメートル以上に到達すると安楽死処分した。In vivo における殺細胞性抗癌剤評価は、移植後 8 日目に群分けを行い、それぞれの殺細胞性抗癌剤を下表の投与方法で実施した。予め設定した MTD を最大投与量に設定した。

抗癌剤	投与量 (mg/kg)	投与経路	投与日
CBDCA	114 もしくは 57	尾静注	9
MMC	6.7 もしくは, 3.35	尾静注	9
CPT-11	100 もしくは, 50	尾静注	9, 13, 17
Txl	40 もしくは, 20	尾静注	9, 13, 17
5-FU	30 もしくは, 15	腹腔	9, 10, 11, 12, 13, 14

免疫染色

腫瘍組織を 4%パラホルムアルデヒド (Wako) を用いて一晩固定処理し、パラフィンで包埋された組織はスライドに取り付けた。脱パラフィンと親水化後に 20 分間 TE 溶液 (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA, pH 9.0) で抗原不活化処理を行い、3%過酸化水素でインキュベートした。1% BSA を含む PBS 溶液を用いてブロッキング処理後に 1 次抗体として CD44 抗体 (clone:156-3C11, Cell Signaling) もしくは、Ki-67 抗体 (clone:SP6, abcam) を 4°C で一晩インキュベートした。その後、2 次抗体として BrightVision poly-HRPconjugated anti-mouse IgG (ImmunoLogic) を室温で 30 分間インキュベート

した。続けて、シンプルステイン MAX-PO (Nichirei) を用いて30分間染色し、DABキット (VECTOR) を用いて発色させた。カウンターステイニングはヘマトキシンを実施した。染色後、DP71 デジタルカメラ (Olympus) を用いて写真を撮影した。

自己複製能と分化能評価

CD44 陽性細胞もしくは CD44 陰性細胞の出現頻度を指標に評価をおこなった。BD FACSAria II によって単離した CD44 陽性もしくは CD44 陰性の単一細胞を、96 ウェルプレートに播種し3週間培養した。1週間に1-2回、半量の培地を交換した。各々ウェルの細胞は上述の[フローサイトメトリー解析とセルソーティング]に従って、抗 CD44 抗体で染色し、MACSQuant を用いて測定した。

RNA 抽出と遺伝子解析

腫瘍組織、培養細胞および、単離された細胞の RNA は RNeasy plus mini kit (Qiagen) を使って メーカーのマニュアルに従って分離された。RNA 濃度を Nano Drop ND-1000 spectrophotometer (Nano-Drop Technologies)を用いて測定した。cDNA を High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems)を使ってマニュアルに従って合成した。リアルタイム PCR を行うために、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いてマニュアルに従って、TaqMan Gene Expression Assay, cDNA template, 滅菌水を加えて総 20 uL にした。下表に示す各々の TaqMan Gene Expression Assay を Applied Biosystems から購入した。ACTB を内在性コントロールとして使用した。リアルタイム PCR 装置は QuantStudio 3 Real Time PCR System (Applied Biosystems) もしくは、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) 。各々の相対的な遺伝子発現は $\Delta\Delta CT$ 方法によって決定された。マイクロ

アレイ解析は SurePrint G3 Human GE microarray 8x60K Ver. 3.0 (Agilent Technologies)によって行った. no coding RNA と miRNA は解析対象から除外した.

分子名	Assay ID
CD44	Hs01075864_m1
CXCR4	Hs00607978_s1
Nanog	Hs02387400_g1
Sox2	Hs01053049_s1
Psfl	Hs01040835_m1
ALDH1A1	Hs00946916_m1
ALDH3A1	Hs00964880_m1
WNT5A	Hs00998537_m1
ANXA1	Hs00167549_m1
FMOD	Hs05632658_s1
GZMA	Hs00989184_m1
MUCL1	Hs00536495_m1
PLA2G2A	Hs00179898_m1
ACTNB	Hs01060665_g1

***In vitro* における抗癌剤感受性評価**

各種殺細胞性抗癌剤 (PTX, GEM, 5-FU, CBDCA, MMC) および, 各種分子標的薬 (erlotinib, gefitinib, afatinib, everolimus, trastuzumab, T-DM-1, pertuzumab, neratinib, lapatinib) における COLO 201 細胞の容量曲線を測定した. COLO 201 細胞 (6×10^3 cells/well) を 96 ウェルプレートに播種し, 段階希釈した各種殺細胞性抗癌剤を加えてトータル 200 uL/well にして培養を開始した. 4 日後にプレートを培養器から取り出し, WST-8 (Kishida Chemical) を 20 uL/well で加えてプレートミキサーを用いて混和した. 3 時間インキュベート後に吸光マイクロプレートリーダー (Molecular

Devices) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

次に CD44 陽性細胞と陰性細胞における感受性を評価するために、COLO 201 細胞 (3×10^4 cells/well) を 24 ウェルプレートに播種し、各種殺細胞性抗癌剤および、各種分子標的薬を異なる濃度を加えて培養した。4 日後に細胞を回収し上述の「フローサイトメトリー解析とセルソーティング」に従って CD44 抗体で染色した後に、Annexin V Apoptosis Detection Kit APC (eBioscience) をマニュアルに従って Annexin V-APC と DAPI で染色し、各々のサンプルの CD44 陽性率を MACSQuant を用いて測定した。各々のサンプルを単一の細胞にゲーティングし、死細胞 (DAPI 陽性細胞) およびアポトーシス細胞 (Annexin V 陽性細胞) を除外した後に CD44 の発現を測定し、CD44 陽性細胞率を解析した。

5-FU, PTX および GEM の CD44 陽性細胞および CD44 陰性細胞に対するアポトーシス誘導能について評価した。BD FACSAria II を用いて COLO 201 から単離した CD44 陽性細胞と CD44 陰性細胞を 24 well plate に 3×10^4 cells/well で播種した。5-FU, PTX および GEM を加えて、それぞれ終濃度 200 nM, 10 nM, 20 nM の存在下で培養した。4 日後に細胞を Annexin V と DAPI で染色し、死細胞およびアポトーシス細胞の割合 (Annexin V と DAPI の両方、またはいずれか一方が染まっている細胞の割合) を MACSQuant で測定した。

遺伝子導入

単離された細胞および、培養細胞を Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) に置き換え、各々の分子に対する siRNA を終濃度 1 μ M になるように加えた。siRNA は全て Thermo Fisher Scientific から silencer select siRNA タイプを購入した。細胞と siRNA を

加えた懸濁液 1×10^6 cells/100 uL をキュベット電極用チャンバーに加えて, NEPA21 (Nepa Gene) を用いて以下の条件でエレクトロポレーションを行った. その後すぐに抗生物質を含まない 10% FBS/DMEM に置き換えて培養を開始した.

分子名	siRNA ID
Control siRNA	Negative control#1
CD44	s2681, s2683, s2682
CXCR4	s15412, s15413, s15414, s532662, s532663
ALDH1A1	s1237, s1236
ALDH3A1	s1242, s1243
WNT5A	s14871, s14872
ANXA1	s1381, s1382
FMOD	s5313, s5312
GZMA	s6384, s6386
HBA2	s22960, s22959
KIF11	s7904
MUCL1	s42201, s42203
PLA2G2A	s224271, s10590, s10589, s10591
SYNGR1	s17479, s194989

porning pulse (Pp)						transfer pulse (Tp)					
電圧	パルス幅	パルス間隔	回数	減衰率	極性	電圧	パルス幅	パルス間隔	回数	減衰率	極性
V	ms	Ms		%		V	Ms	ms		%	
125	7.5	50	2	10	+	20	50	50	5	40	+/-

統計解析

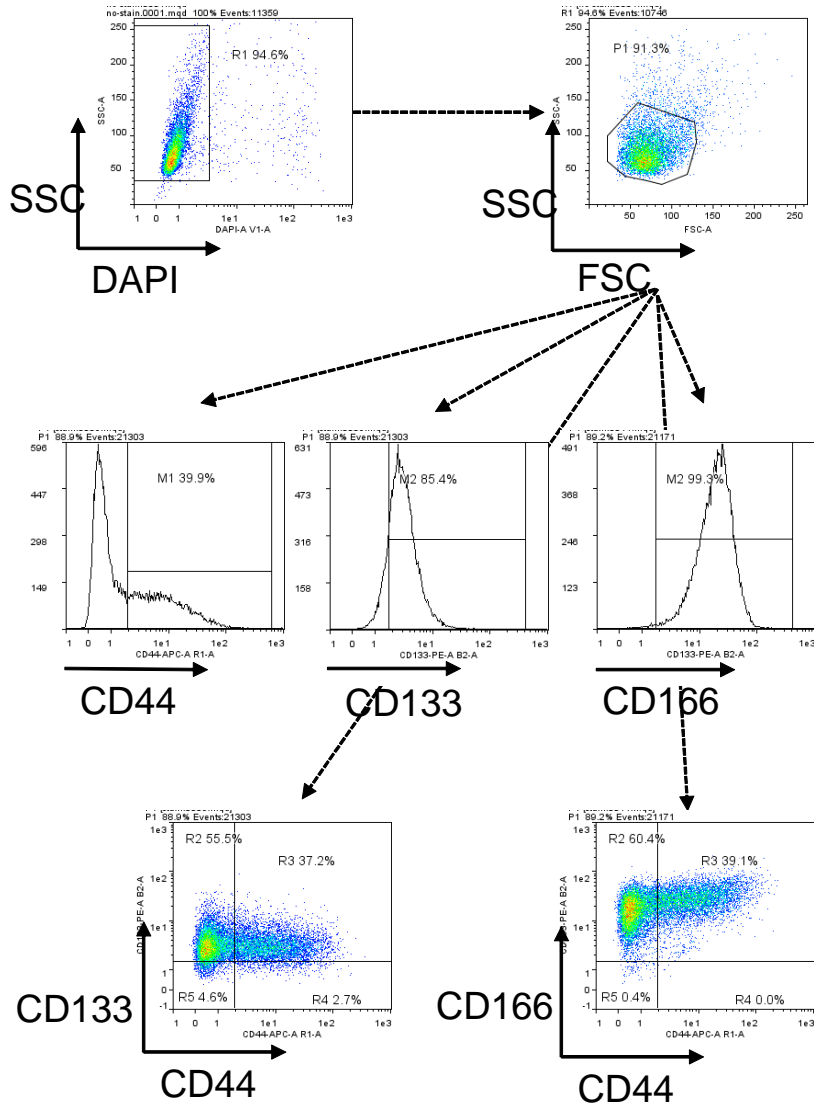
統計解析は GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software) によって実施された。グループ間の有意差検定は、Student's t-test もしくは Welch's t-test が使われた。統計学的有意差は $P < 0.05$ として扱った。結果のそれぞれのマークは* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$ を示す。

結果

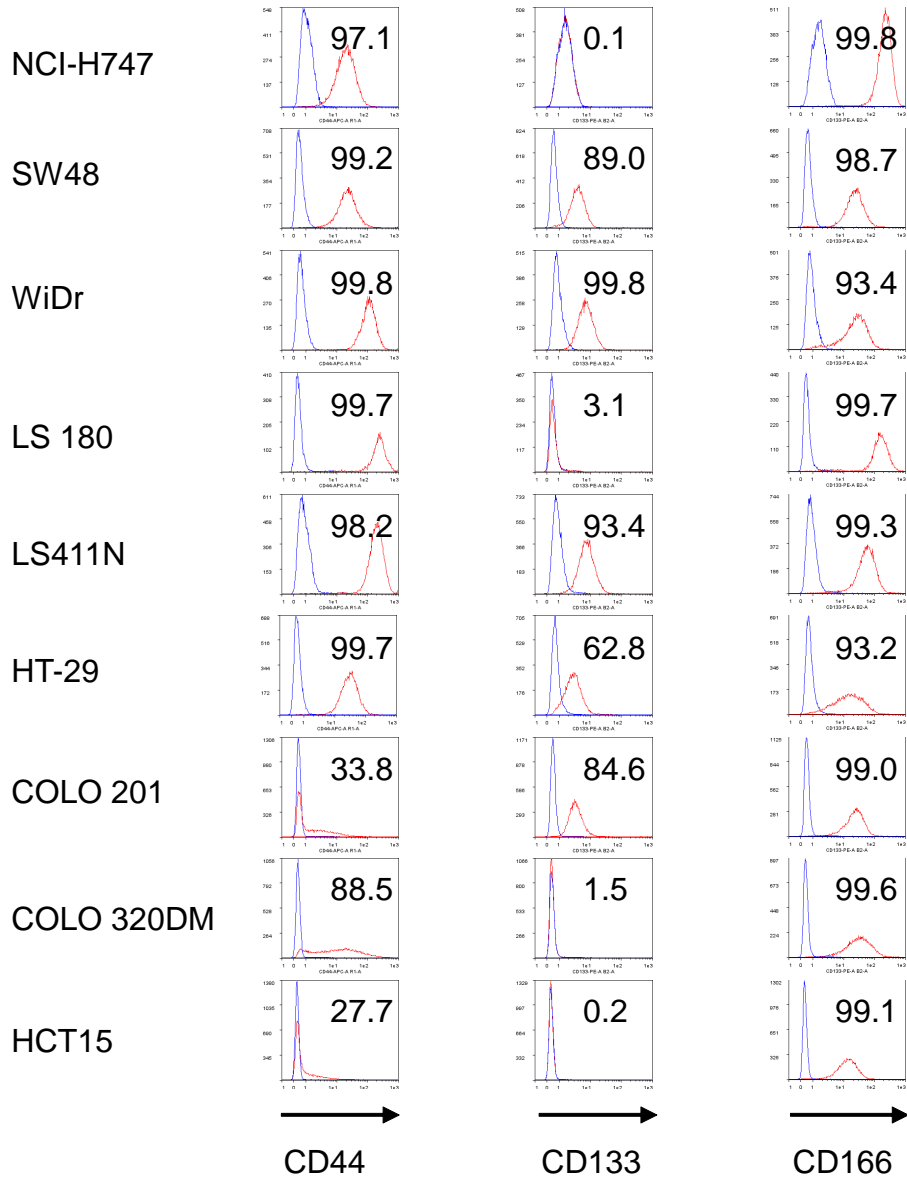
大腸癌細胞株における癌幹細胞マーカーの発現解析

潜在的な癌幹細胞を含む大腸癌細胞株を同定するために、フローサイトメトリーを用いて臨床で大腸癌幹細胞マーカーとして報告されている表面分子（CD44，CD133，CD166）の発現を測定した。細胞株によって、これらのマーカーは不均一に発現していた（図 2）。ほとんどの細胞株では全ての細胞で CD44 を発現していたが、LS1034，COLO 201，COLO 320DM および HCT-15 細胞では陰性と陽性の 2 集団に分かれた。LS1034，COLO 201，COLO 320DM，HCT-15 細胞の CD44 陽性細胞の割合はそれぞれ 25.7%，33.8%，88.5%，27.7%であった。CD133 の発現は、細胞株によって全ての細胞が陰性，全ての細胞が陽性もしくは、陰性と陽性の両方の細胞の 3 つのパターンに分かれた。陰性細胞と陽性細胞を含む細胞株は LS1034，SW620，C-1，HT115，HCT 116，DLD-1 細胞であり，陽性割合はそれぞれ 15.4%，46.5%，46%，34.6%，85.2%，11.0%であった。CD166 はほとんどの細胞株で全ての細胞で発現していたが，SK-CO-1，SW620，SW480 および COLO 741 細胞では陰性と陽性の 2 集団に分かれた。それぞれの陽性細胞の割合は 18.3%，22.4%，10.4%，65.4%。このように，癌幹細胞マーカーの発現が明確に分かれる亜集団を含む細胞株を複数同定した。

A



B



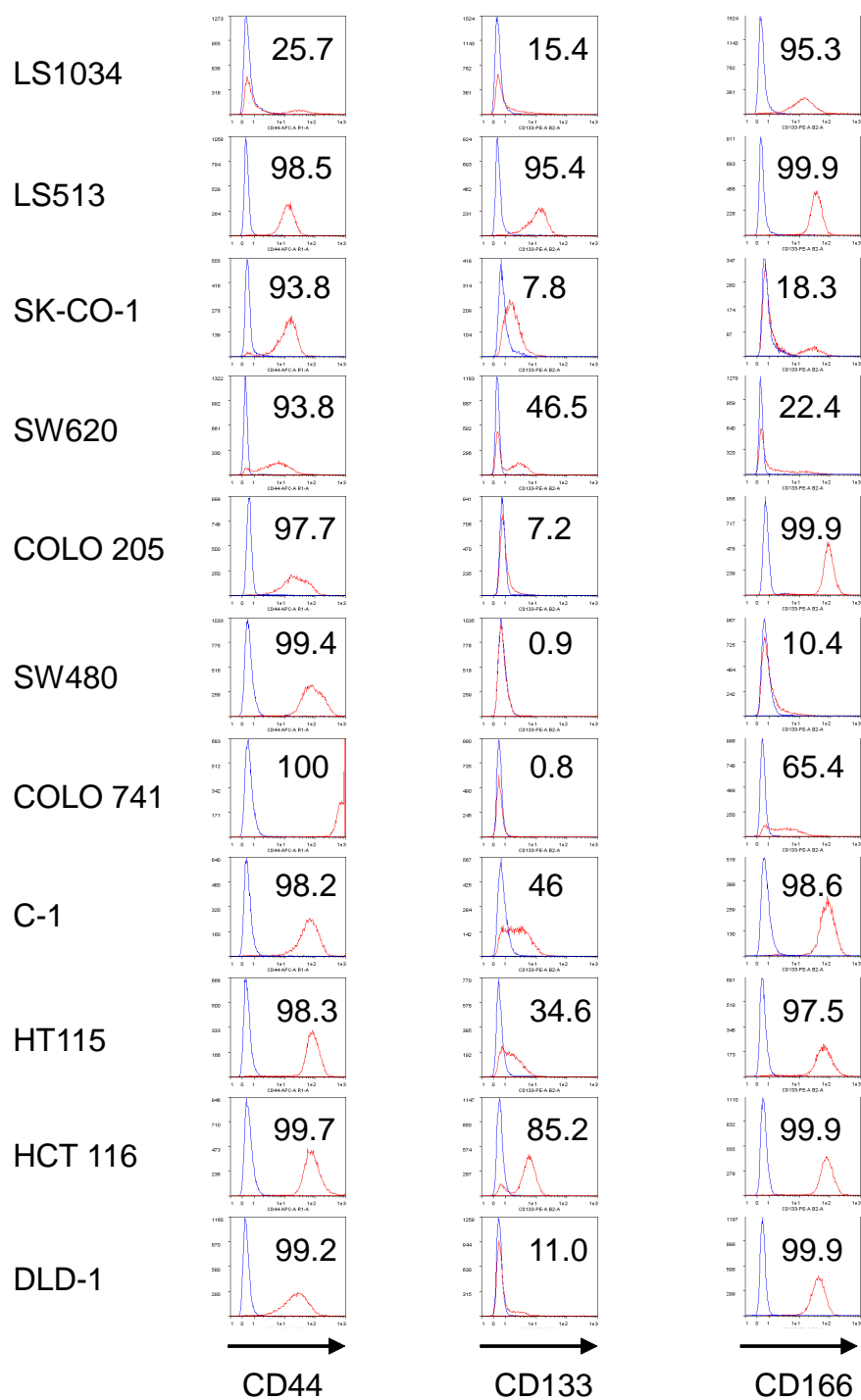


図 2. フローサイトメトリーを用いた 20 種の大腸癌細胞株における癌幹細胞マーカー (CD44, CD133, CD166) 発現解析

(A) 代表的なフローサイトメトリーの展開図を示す。SSC x DAPI でゲーティングした生細胞を、さらに SSC x FSC でゲーティングした癌細胞株集団について、CD44, CD133 およ

び CD166 の発現について測定した。(B) 各細胞株の癌幹細胞マーカー (CD44, CD133, CD166) の発現について解析し, 青色のヒストグラムはアイソタイプコントロールで染色した細胞, 赤色のヒストグラムはそれぞれの抗体で染色した細胞を示す。図表中の数値は各分子の陽性率 (%) を示す。SSC : side scatter (側方散乱), FSC : Forward Scatter (前方散乱) を示す。

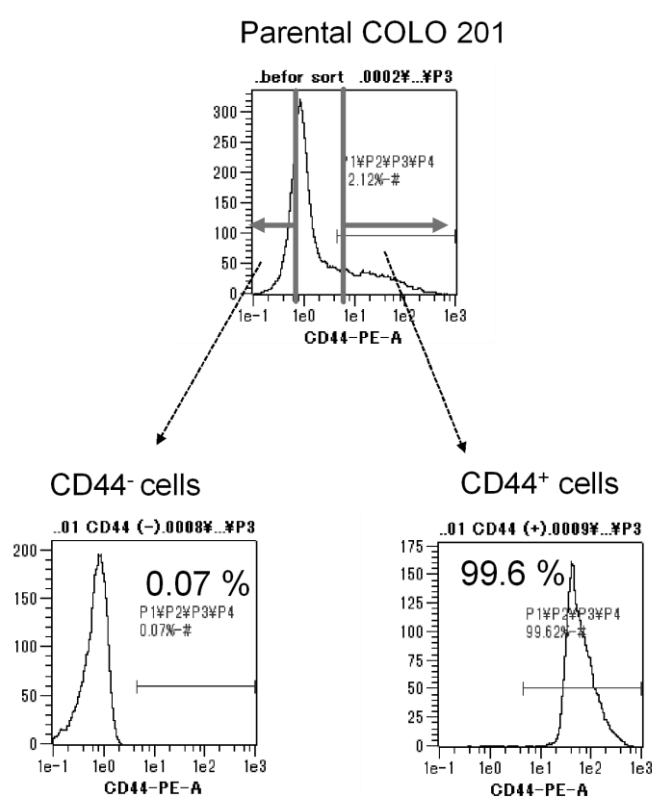


図 3. CD44 陽性細胞および CD44 陰性細胞の純度

COLO 201 細胞についてソーティング後に, フローサイトメトリーを用いて CD44 陽性細胞および陰性細胞の純度を解析した。図表中の数値は CD44 陽性細胞の陽性率 (%) を示す。CD44⁻ cells : CD44 陰性細胞, CD44⁺ cells : CD44 陽性細胞を示す。

免疫不全マウスによる腫瘍形成能試験

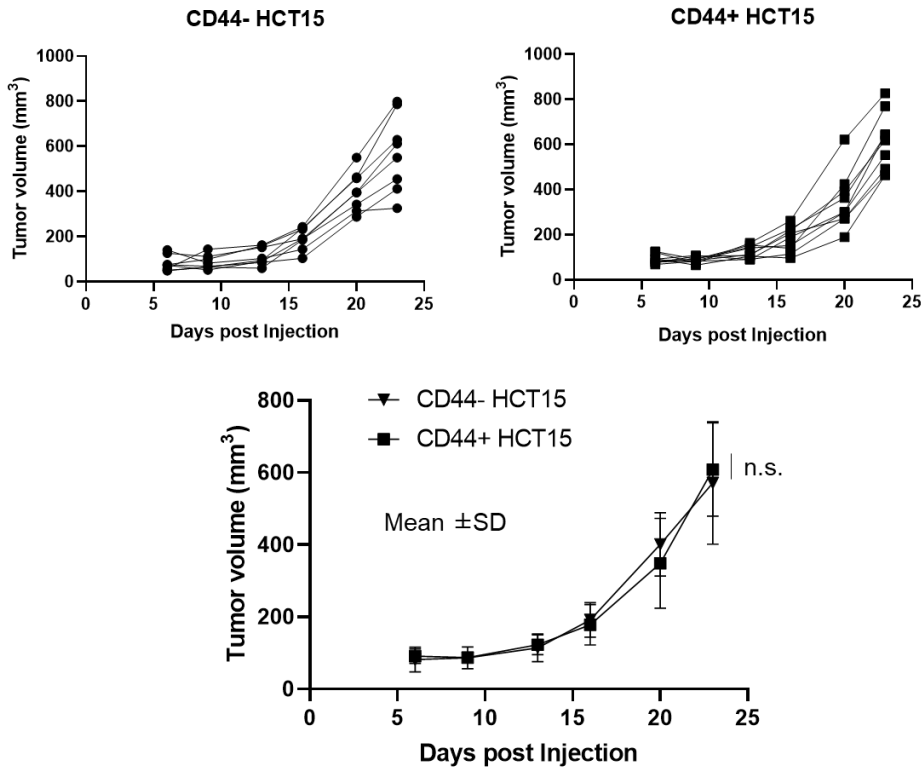
次に潜在的な癌幹細胞集団について、免疫不全マウスにおける腫瘍形成能を評価した。潜在的な癌幹細胞集団を持つ細胞株のうち、HCT-15、COLO 320DM、COLO 201 および SW620 細胞を優先して検討を行った。セルソーティングによって、HCT-15、COLO 320DM および COLO 201 細胞について、CD44 陽性細胞と陰性細胞を分離した。それぞれの純度はほぼ 100 %であった（図 3）。SW620 細胞についても同様の方法で CD133 陽性細胞と陰性細胞に分離した。これらの分離した細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍増殖を経時的にモニタリングした。COLO 320DM、HCT-15 細胞における CD44 陽性細胞と陰性細胞との間には増腫瘍性には大きな差異はなかった（図 4 A, B）。COLO 201 細胞では、CD44 陽性細胞は腫瘍を形成し緩やかに増大したのに対して、CD44 陰性細胞は腫瘍の生着は認められたものの増大は示さなかった（図 4 D, $p < 0.01$, Welch's t test）。CD44 陽性細胞は親株の COLO 201 細胞に比べても増腫瘍性が有意に高いことを確認した（未記載）。また、SW620 細胞では、CD133 陽性細胞は陰性細胞に比べて腫瘍の増殖速度が有意に遅かった（図 4 C, $p < 0.01$, Welch's t test）。

明確な増腫瘍差があった COLO 201 細胞に注目して、CD44 陽性 COLO 201 細胞が癌幹細胞の重要な特徴を有しているかを見極めるために、それぞれの移植細胞数を減らして腫瘍形成能を評価した。セルソーティングで分離した CD44 陽性細胞と陰性細胞を NOD/SCID マウスに移植し、49 日目まで腫瘍の形成能をモニタリングした。CD44 陽性細胞では、 3×10^3 個を移植した群では 10 例中 3 例、 3×10^4 個を移植した群では 10 例中 7 例のマウスで腫瘍の形成に成功した。一方、CD44 陰性細胞を 3×10^3 個を移植した群と 3×10^4 個を移植した群ともに、腫瘍が形成したマウスは現れなかった（表 2）。したがって、CD44 陽性細胞は少ない細胞数でも腫瘍を形成する能力を保持していることから、

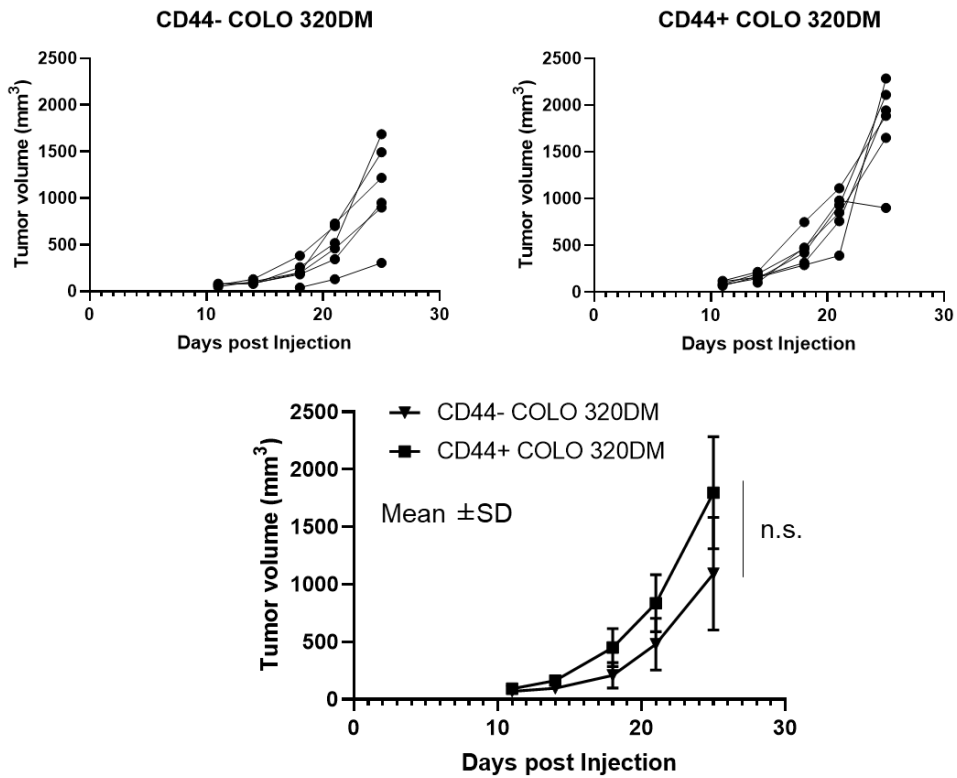
癌幹細胞の特徴を有していることが明らかになった。

既に、SW620 細胞については癌幹細胞の特徴を有する亜集団が存在し、CD133 陽性細胞の方が高い増腫瘍性を示すという報告があるが（31）、本研究では反対の結果になった。この原因については、序論における既報論文の再現性困難の理由について記載した。一方、COLO 201 細胞については新たな知見であり、CD44 陽性細胞と陰性細胞の間で増腫瘍能に明確な差があり、CD44 陽性細胞は腫瘍形成能力が高いことから、COLO 201 細胞についてさらに詳しく研究を進めることに決めた。

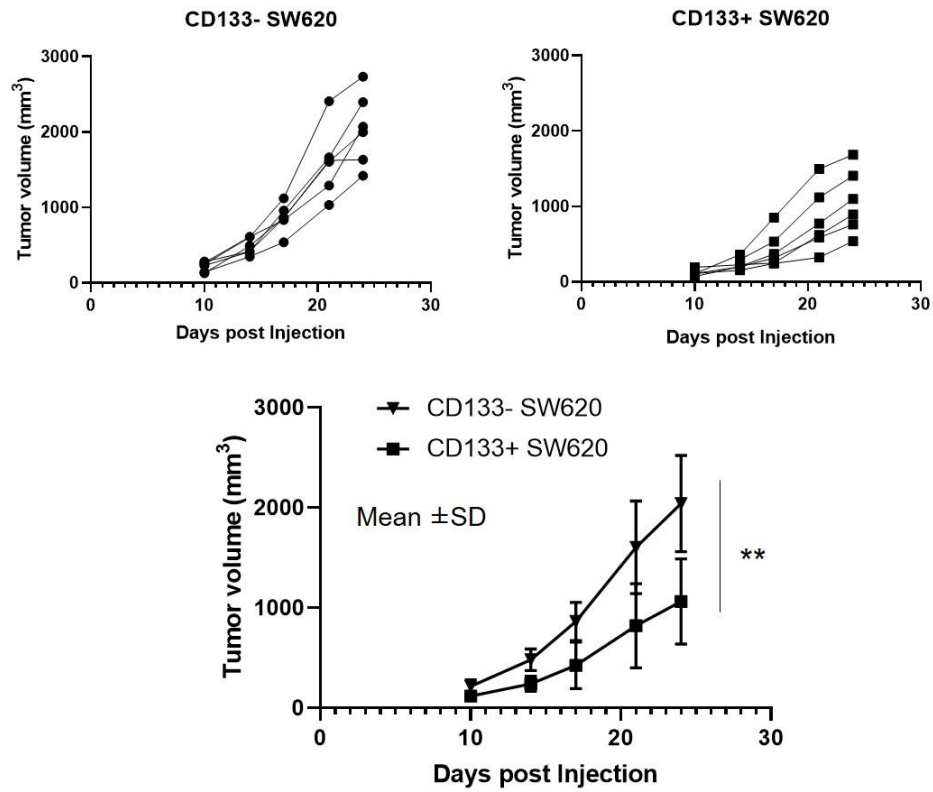
A HCT15



B COLO 320DM



C SW620



D COLO 201

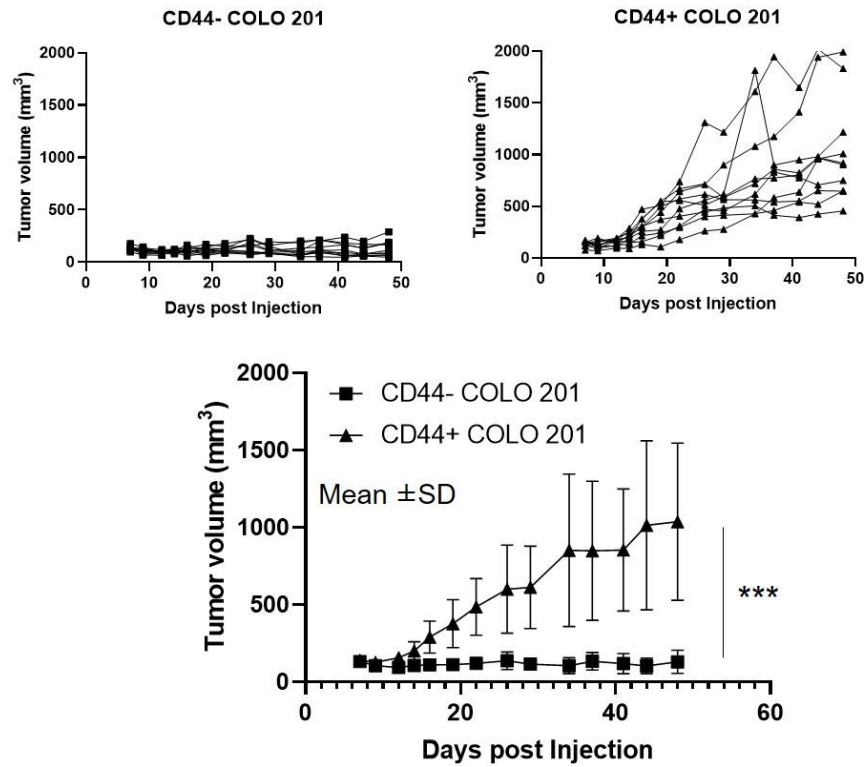


図 4. 4 種の細胞株 (HCT15, COLO 320DM, SW620, COLO 201) における癌幹細胞マーカー陽性細胞と陰性細胞の増殖評価

HCT15 (A) , COLO 320DM (B) , SW620 (C) および COLO 201 (D) を癌幹細胞マーカー陽性細胞と陰性細胞に単離し, それぞれ 2×10^4 , 3×10^4 , 1×10^5 および 5×10^4 個をヌードマウスに移植し, 腫瘍の増殖をモニタリングした. それぞれ群における各個体の腫瘍増殖曲線および, 平均腫瘍増殖曲線を示す. 平均腫瘍増殖曲線のグラフは平均値 \pm SDを示す. CD44⁻ cells : CD44 陰性, CD44⁺ cells : CD44 陽性, CD133⁻ cells : CD133 陰性, CD133⁺ cells : CD133 陽性を示す.

Subpopulation	Cell number injected	
	3×10^3	3×10^4
CD44 ⁻ COLO201	0/10	0/10
CD44 ⁺ COLO201	3/10	7/10

表 2. COLO 201 における CD44 陽性細胞および陰性細胞の腫瘍生着能評価

CD44 陽性細胞および陰性細胞を異なる細胞数で NOD/scid マウスの背部皮下に移植し, 49 日までモニターした. データは移植した例数当たりの生着した例数を示す. CD44⁻ COLO 201 : CD44 陰性 COLO 201 細胞, CD44⁺ COLO 201 : CD44 陽性 COLO 201 細胞を示す.

COLO 201 CD44 陽性細胞における *in vitro* の特徴

CD44 陽性細胞と陰性細胞の表面分子の違いを比較するため、CD44、CD133 および CD166 の他に、大腸癌の悪性度のマーカーとして報告されている HER2 (32, 33) , CD24 (34) および CXCR4 (35, 36) についてフローサイトメトリーを用いて測定した。HER2 は CD44 の発現に関わらず全ての細胞で発現していたが、CD24 は全ての細胞で陽性であるものの、特に CD44 陽性細胞では CD24 の発現が高い細胞しか存在しなかった (図 5) 。 CXCR4 は CD44 陽性細胞の中でも 4%程度の細胞で発現していた。CD44 陽性細胞は CD24 が強陽性であり、CXCR4 陽性亜集団を含むことが確認された。

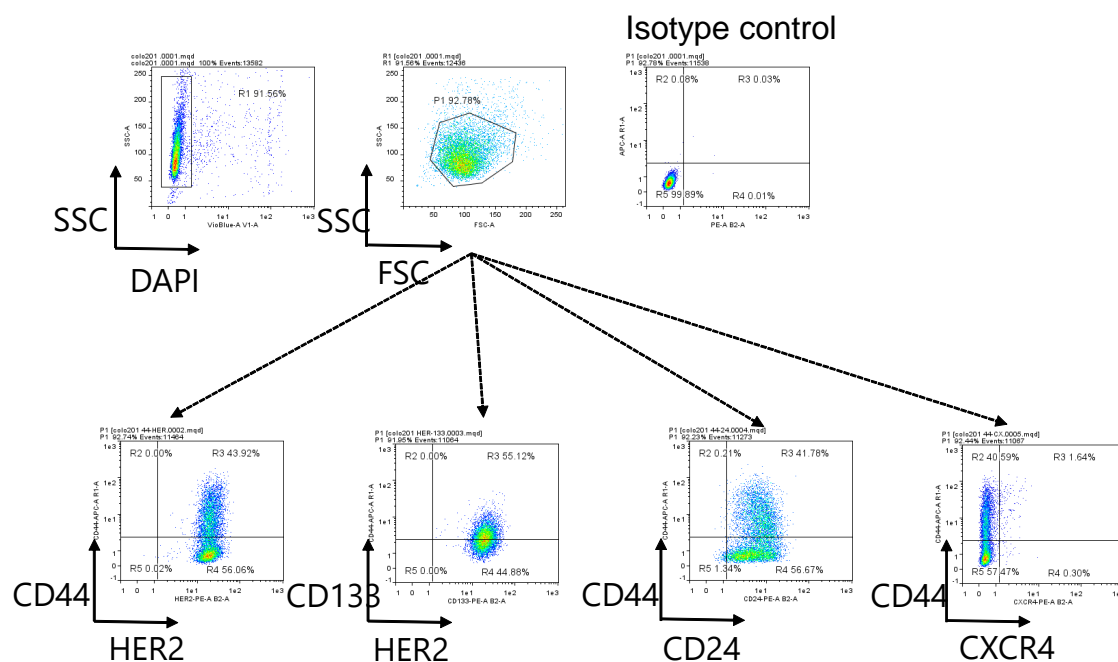


図 5. COLO 201 細胞の癌幹細胞に関わる表面分子の発現評価

COLO 201 細胞について、フローサイトメトリーを用いて癌幹細胞マーカー (CD44, CD133, HER2, CD24, CXCR4) の発現を解析した。

CD44 陽性細胞および陰性細胞の *in vitro* における増殖能を比較するために、セルソーティングで分離されたそれぞれの細胞を FBS 濃度が異なる条件 (serum free, 0.5%, 2%, 10%) で培養し、3 日後に細胞数を測定した。全ての FBS 条件下で、CD44 陽性細胞と陰性細胞の間には、細胞数に違いはなかった (図 6)。 *In vitro* の通常培養において、CD44 陽性細胞と陰性細胞とでは増殖能に差がないことが確認された。

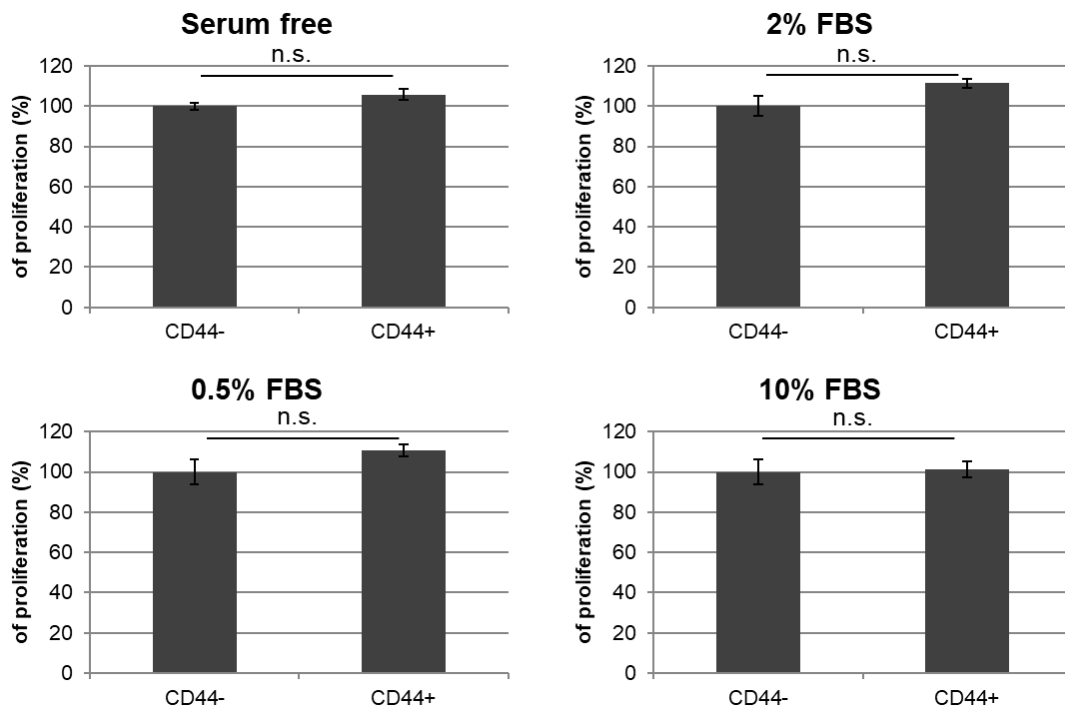


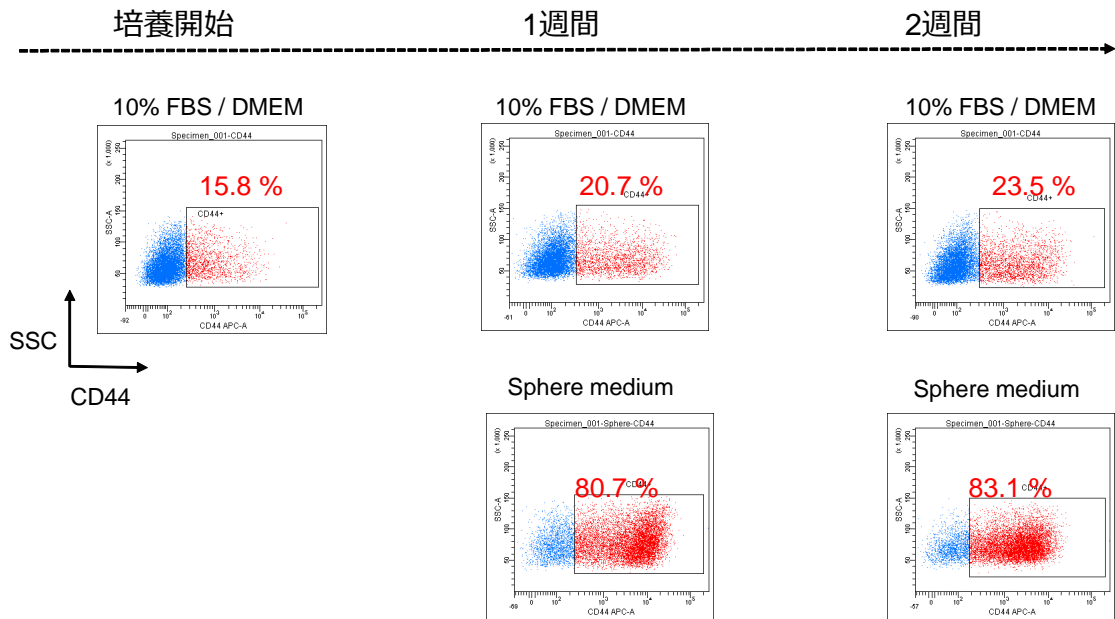
図 6. CD44 陽性細胞および陰性細胞の *in vitro* における増殖評価

COLO 201 細胞から CD44 陽性細胞と陰性細胞を単離し、異なる FBS 濃度で 3 日間培養し生細胞数を WST-8 を用いて測定した。グラフは 3 回の独立した実験の平均値±SD を示す。CD44⁻ : CD44 陰性細胞, CD44⁺ : CD44 陽性細胞を示す。

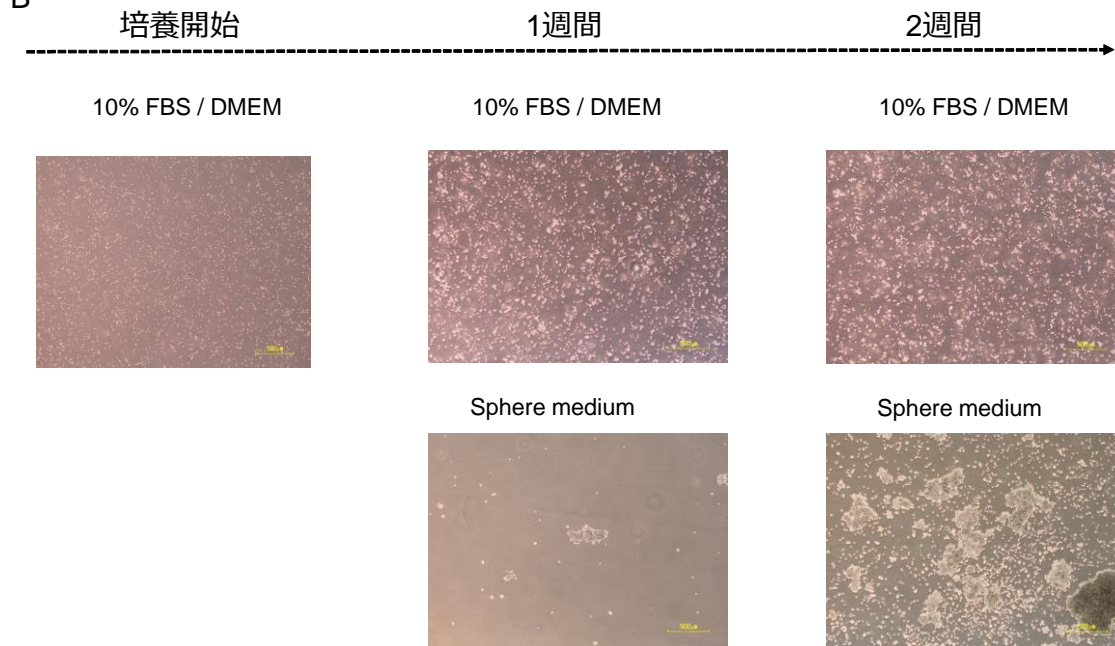
次に、スフェア培養は正常細胞や癌細胞の幹細胞性を同定・濃縮させるために汎用される方法であることから (23, 37-39) , COLO 201 細胞のスフェア培養を行い, フローサイトメトリーを用いて CD44 陽性細胞が濃縮されるかについて検討した. 本試験で採用したスフェア培養は低吸着プレートを用いて無血清培地で培養し, スフェアを形成させる方法である. その結果, 通常培養では, CD44 陽性細胞率が 15.8%, 1 週間後には 20.7%, 2 週間後には 23.5%とほとんど変化しなかったのに対して, スフェア培養では 1 週間後には 80.7%, 2 週間後には 83.1%と CD44 陽性細胞の比率が上昇した (図 7) . スフェア培養によって CD44 陽性細胞の濃縮が認められた.

Nanog や sox2 の転写因子は幹細胞性に関わる分子の発現を調節することから, 幹細胞の特徴を説明する時に頻繁に使用される分子である (40-46) . Psf1 は一部の研究者によって, マウスにおける癌細胞の造腫瘍能に寄与し, psf1 高発現細胞は浸潤能や転移能が高いと報告されている (47-48) . 前述のスフェア培養 2 週間後の細胞と通常培養した細胞について, nanog, sox2 および psf1 の発現を定量 PCR で発現を測定したところ, スフェア培養によって nanog の発現が通常培養している時より 2 倍程度高かった (図 7 C) . sox2 は検出限界以下の発現であった. また, psf1 は通常培養している時に比べてスフェア培養することで発現が減弱した (図 7 C) . スフェア培養によって CD44 陽性細胞が濃縮され, nanog の発現が上昇したことから, CD44 陽性細胞は幹細胞の特徴を保持していることが示された.

A



B



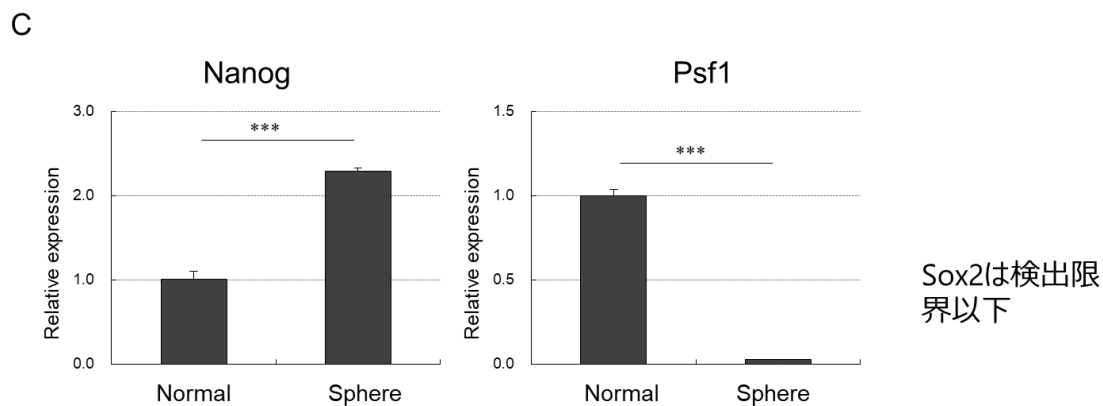


図 7. スフェア培養による幹細胞評価

(A) COLO 201 細胞を無血清培地でスフェア培養し、1 週間および 2 週間後に CD44 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて解析した。(B) COLO 201 細胞を無血清培地でスフェア培養し、1 週間および 2 週間後に細胞の状態を顕微鏡下で写真撮影した。(C) 通常培養した COLO201 細胞と無血清培地で 2 週間スフェア培養した COLO 201 細胞について、幹細胞マーカー (nanog, psf1, sox) の発現を定量 PCR で測定した。グラフは平均値±SD を示す。

癌幹細胞研究において、*in vivo* における腫瘍形成能試験の代わりに、*in vitro* におけるコロニー形成能評価が頻繁に使用される (29, 30)。CD44 陽性細胞と陰性細胞のコロニー形成能を比較するために、セルソーティングによって分離された CD44 陽性細胞と陰性細胞をそれぞれ 100 個/ウェルに播種し、専用培地で 12 日間培養後に、コロニー形成数を測定した。CD44 陽性細胞はウェル当たり平均 15 コロニーであったのに対して、CD44 陰性細胞ではウェル当たり平均 8.8 コロニーであった。CD44 陽性細胞の方がコロニー形成能が 2 倍程度高かったが有意な差ではなかった (図 8, $p > 0.05$, student's t-test)。つまり、コロニー形成能の結果は *in vivo* の腫瘍形成能とは相関しない結果となった。

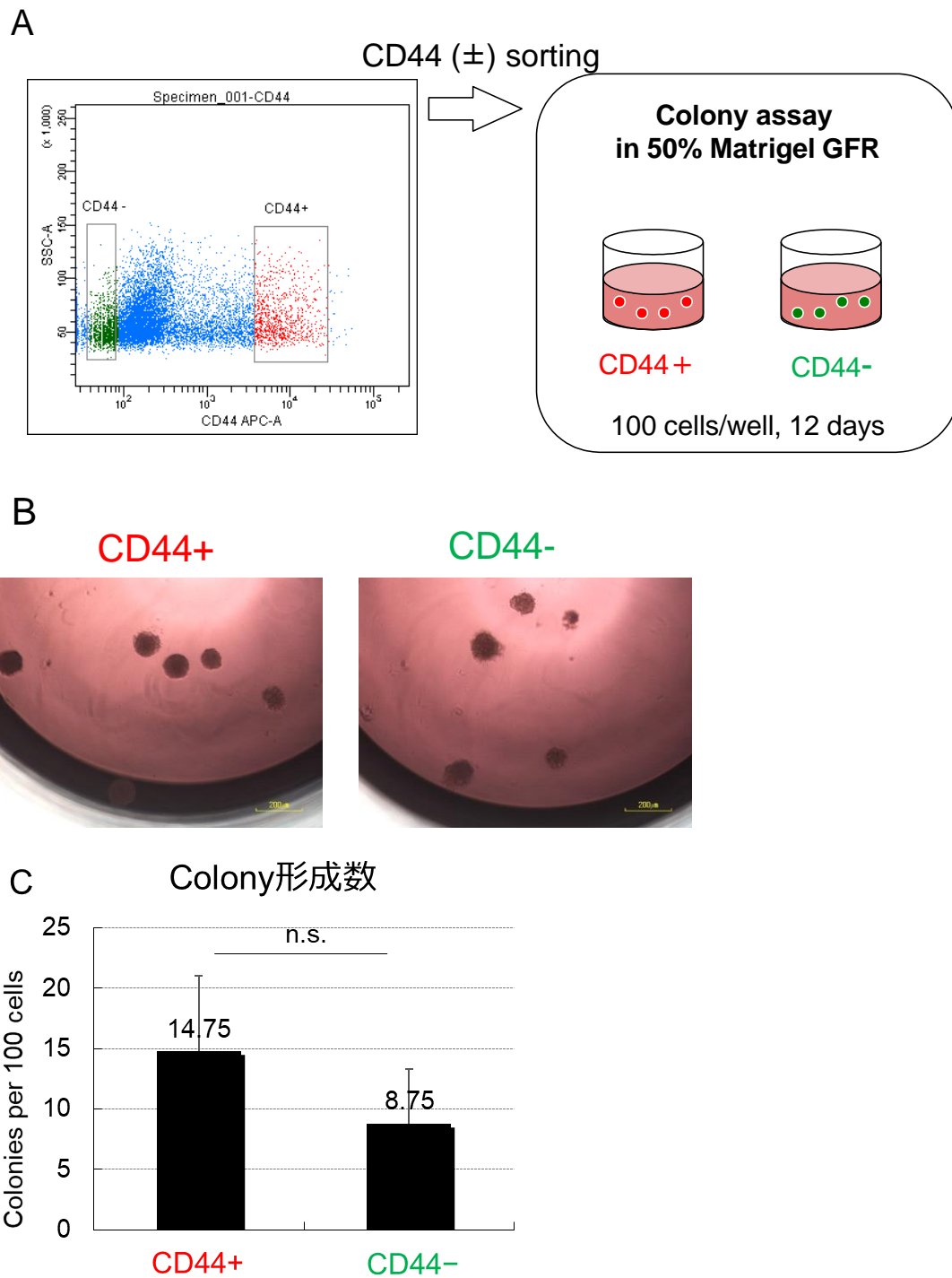


図 8. CD44 陽性細胞および陰性細胞のコロニー形成能評価

(A) コロニー形成能評価方法の模式図を示す。COLO 201 細胞から CD44 陽性細胞および陰性細胞を単離し、それぞれスフェア培養を行った。(B) 培養 12 日目にコ

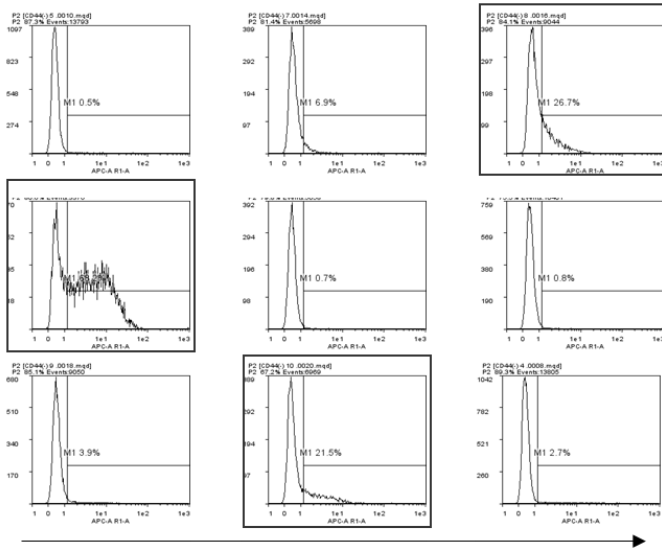
コロニー形成能の状態を顕微鏡下で写真撮影した。(C) コロニー形成数を目視で測定し、100 細胞当たりのコロニー数を算出した。グラフは平均値±SD を示す。

CD44+ : CD44 陽性細胞, CD44- : CD44 陰性細胞を示す。

次に、幹細胞は自己複製能と多分化能を持ち合わせている細胞であることから、CD44 陽性細胞と陰性細胞の自己複製能と分化能を比較解析した。96 well plate の各ウェルにシングルセルソーティングした CD44 陽性細胞と陰性細胞を通常培養で 3 週間培養し、各ウェルの細胞について CD44 陽性および陰性細胞の存在比率をフローサイトメトリーを用いて測定した。CD44 陰性細胞は全てのウェルで陰性細胞を生み出し、9 ウェル中 3 ウェルで陽性細胞を生み出せなかったのに対して、CD44 陽性細胞は 9 ウェル全てで CD44 陽性細胞と陰性細胞を生み出した (図 12)。したがって、CD44 陽性細胞は陰性細胞への分化能が高いことが示された。

以上の結果より、CD44 陽性細胞は陰性細胞に比べて、幹細胞性と分化能が高いことが明らかになった。

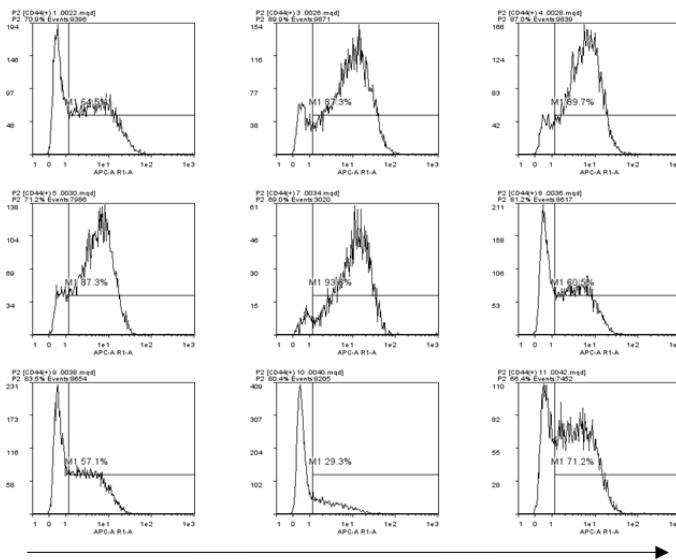
CD44⁻ COLO 201



CD44

CD44⁻ ⇒ CD44⁻ 9/9 wells
 CD44⁺ 3/9 wells

CD44⁺ COLO 201



CD44

CD44⁺ ⇒ CD44⁻ 9/9 wells
 CD44⁺ 9/9 wells

図 9. CD44 陽性細胞及び陰性細胞の自己複製能と分化能評価

COLO 201 細胞から CD44 陽性細胞および陰性細胞を単離し、96well plate に single cell/well で 3 週間培養し、その後、各 well をフローサイトメトリーを用いて CD44 陽性細胞の割合を測定した。データはそれぞれの細胞の出現頻度を示す。赤の四角マークは CD44 陰性細胞から陽性細胞が産生された well を示す。CD44⁻ : CD44 陰性細胞, CD44⁺ : CD44 陽性細胞を示す。

CD44 陽性細胞から形成された腫瘍の特徴

CD44 陽性細胞および陰性細胞から形成された腫瘍組織の形態を調べるために、ヌードマウスに移植した 18 日目と 23 日目の腫瘍切片を H&E 染色で観察したところ、CD44 陽性細胞から形成された腫瘍組織には細胞実質を多く含んでいた (図 10 A)。一方、CD44 陰性細胞から形成された腫瘍組織は実質が少なく粘液が溜まっており、23 日目では腫瘍組織内の細胞が崩壊し粘液が多く溜まってきている様子が観察された。CD44 陰性細胞から形成された腫瘍組織では維持・増殖できなくなり、腫瘍が増大できていないことが示唆された。また、CD44 陽性細胞から形成された腫瘍組織について、CD44 と細胞増殖マーカーである Ki-67 (49-52) の発現を確かめるために免疫染色を行った。腫瘍組織内には CD44 を発現した細胞が不均一に存在することから、CD44 陽性細胞と陰性細胞の両方から構成されていた (図 10 B)。Ki-67 の発現は CD44 陽性細胞と陰性細胞に関わらず、腫瘍組織に存在するほとんどの細胞で発現していた。免疫染色だけでなく、腫瘍組織を分散してフローサイトメトリーを用いて癌細胞の表面発現分子を調べた結果でも、CD44 陽性細胞と陰性細胞が存在することが確認された (図 11)。

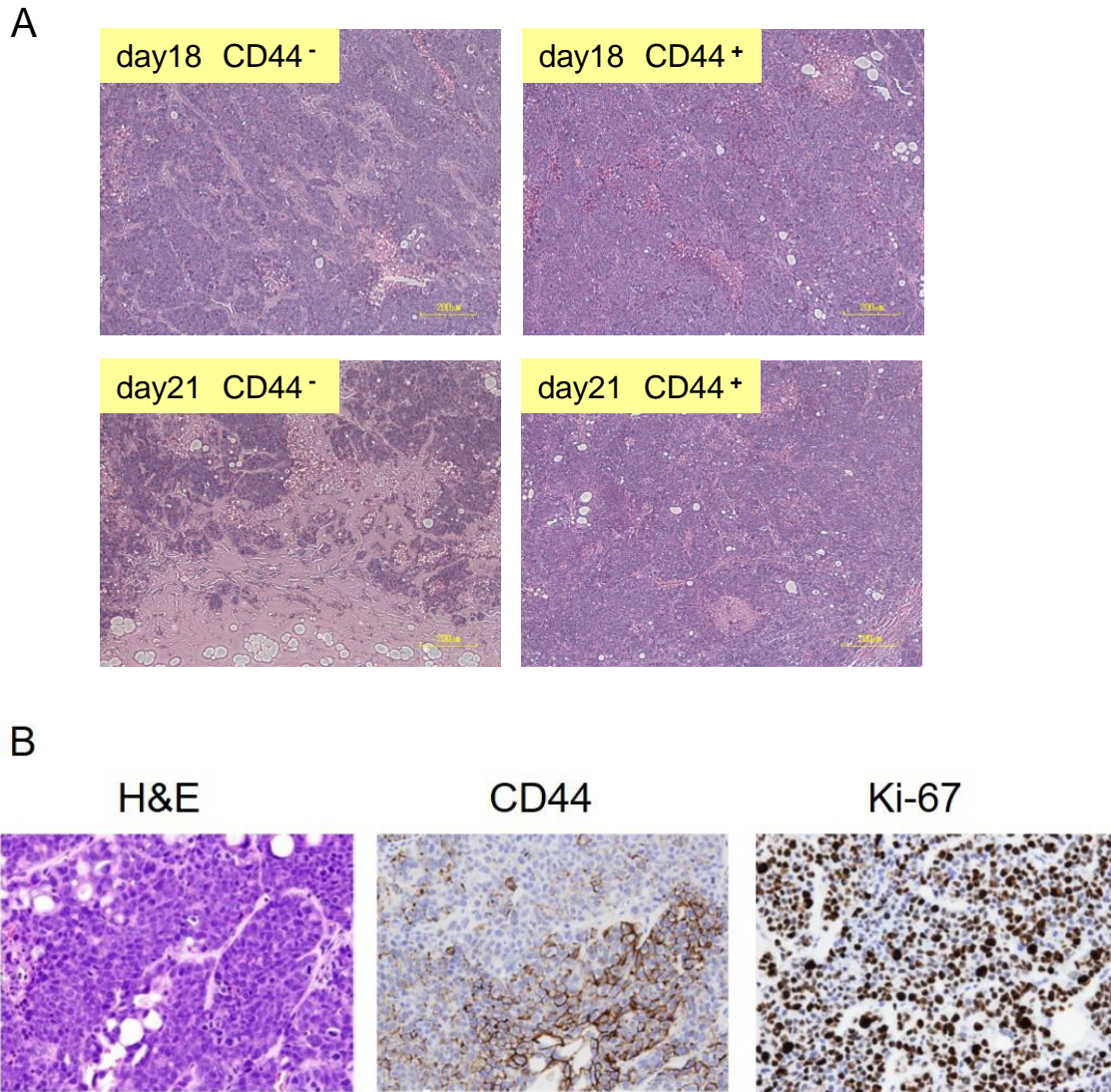


図 10. COLO 201 腫瘍における組織評価

(A) CD44 陽性細胞および陰性細胞をヌードマウスに移植し、18 日目と 23 日目に腫瘍を採取し H&E 染色した。対物レンズ 4 x で撮影した像を示す。CD44⁻ : CD44 陰性細胞, CD44⁺ : CD44 陽性細胞を示す。(B) CD44 陽性細胞をヌードマウスに移植し、21 日後に腫瘍を採取し、CD44 抗体および Ki-67 抗体で染色した。対物レンズ 20 x で撮影した像を示す。H&E 染色は、ヘマトキシリン (hematoxylin) とエオジン (eosin) の 2 種類の色素を用いて、細胞核と核以外の組織成分を青藍色と赤色に染め分ける染色法である。

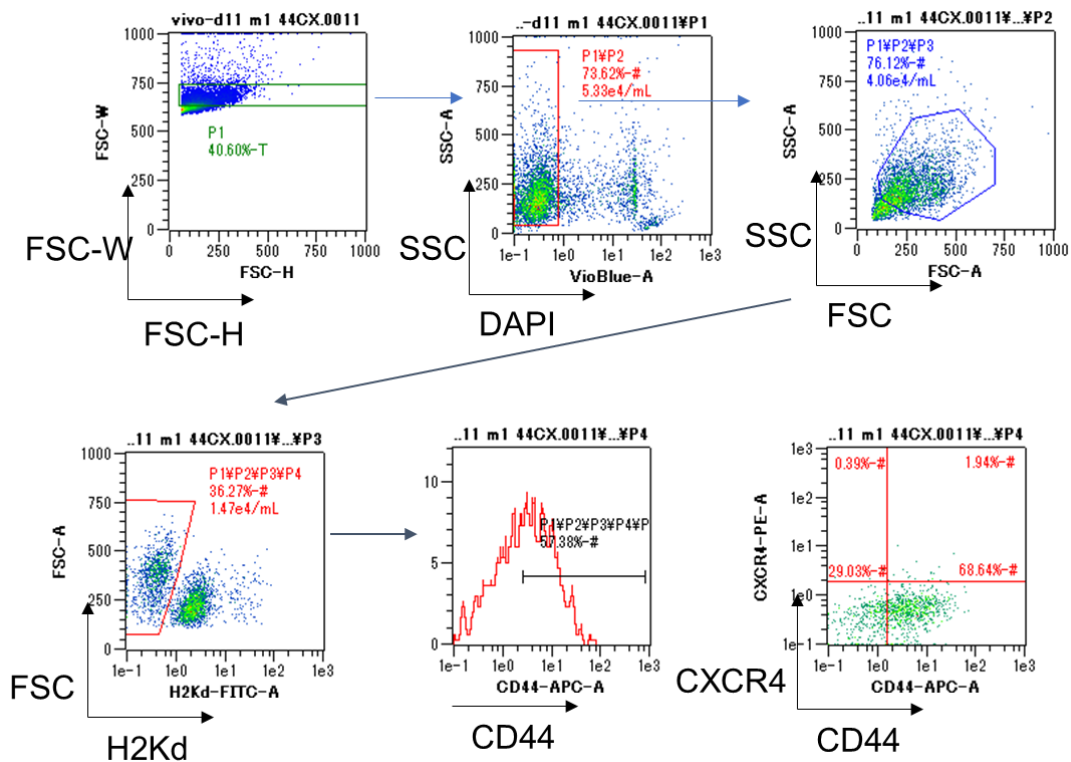


図 11. CD44 陽性細胞から形成された腫瘍の CD44 および CXCR4 の発現評価

CD44 陽性細胞および陰性細胞をヌードマウスに移植し 21 日後に腫瘍を採取し、分散後に CD44 および CXCR4 の発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。FSC-W x FSC-H でダブルレットを除去し、SSC x DAPI で生細胞にゲーティングし、SSC x FSC でゲーティングした COLO 201 細胞を、さらにマウス由来の細胞を除去するために H2Kd 陰性細胞にゲーティングした細胞について、CD44 および CXCR4 の発現について測定した。SSC : side scatter (側方散乱) , FSC : Forward Scatter (前方散乱) を示す。

次に、CD44 陽性細胞から形成された腫瘍組織と陰性細胞から形成された腫瘍組織における、幹細胞調節遺伝子 (nanog, sox2, psf1) の発現について比較するために、

腫瘍組織から RNA を抽出し、定量 PCR で各調節遺伝子の発現量を測定した。CD44 陽性細胞から形成された腫瘍の方が陰性細胞から形成された腫瘍に比べて、nanog と sox2 とともに発現が高い傾向であった。特に、sox2 の発現は平均値 4 倍高かったが、腫瘍におけるマウス個体差が大きかったため、有意な差は認められなかった（図 12）。Psf1 の発現は両方の腫瘍で差はなかった。

以上の結果から、CD44 陽性細胞は *in vivo* においても幹細胞の特徴を保持しているため、腫瘍を形成能が高いことが示唆された。

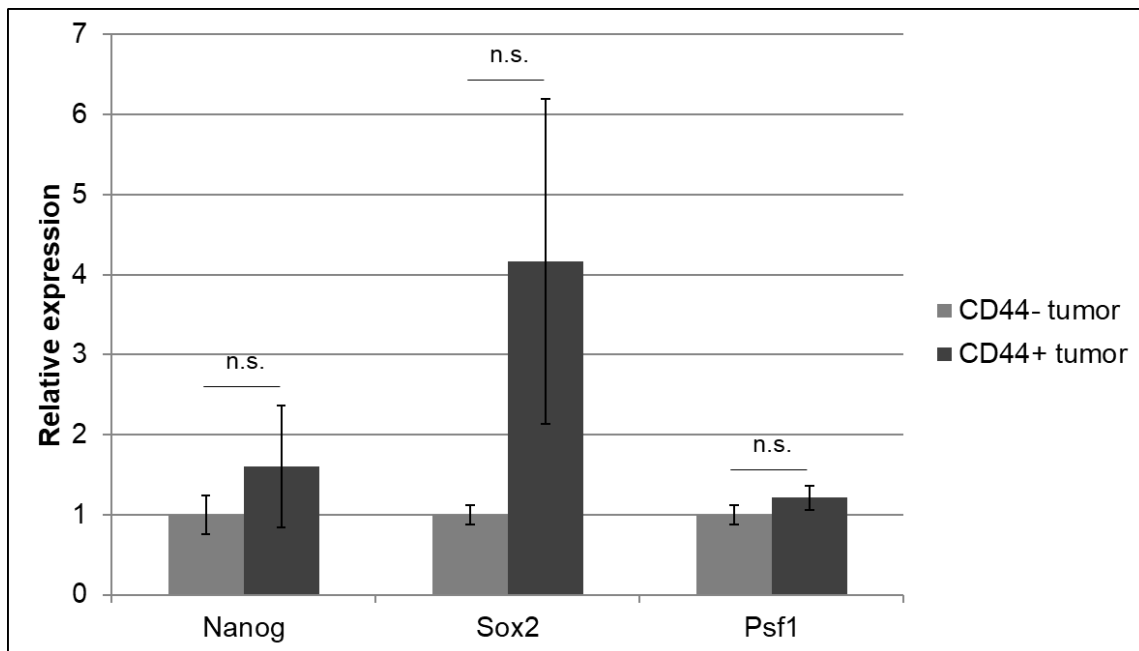


図 12. CD44 陽性細胞および陰性細胞から形成された腫瘍における幹細胞調節分子の発現評価

CD44 陽性細胞および陰性細胞をヌードマウスに移植し 18 日後に腫瘍を採取し、幹細胞調節遺伝子（nanog, sox2, psf1）の発現を定量 PCR を用いて解析した。グラフは 3 回の独立した実験の平均値±SD を示す。CD44- tumor：CD44 陰性細胞から形成された腫瘍，CD44+ tumor：CD44 陽性細胞から形成された腫瘍を示す。

殺細胞性抗癌剤の感受性評価.

COLO 201 細胞の殺細胞性抗癌剤に対する感受性を評価した. 殺細胞性抗癌剤はタキサン系薬剤である PTX (53), 白金製剤である CBDCA (54, 55), 代謝拮抗薬である 5-FU (56) と GEM (57), アルキル化剤である MMC (58) といった様々な癌腫で汎用されている異なる作用機序の薬剤を選択した. まず, COLO 201 細胞に対する PTX, 5-FU, MMC, GEM および CBDCA の 5 種の殺細胞性抗癌剤における容量曲線を決定するため, 段階希釈した殺細胞抗癌剤で COLO 201 細胞を暴露 4 日後に細胞数を測定し, IC_{50} 値を換算した. PTX, 5-FU, MMC, GEM および CBDCA の IC_{50} 値はそれぞれ 6.2 nM, 32 μ M, 43 nM, 55 nM, 19 μ g/mL であった (図 13).

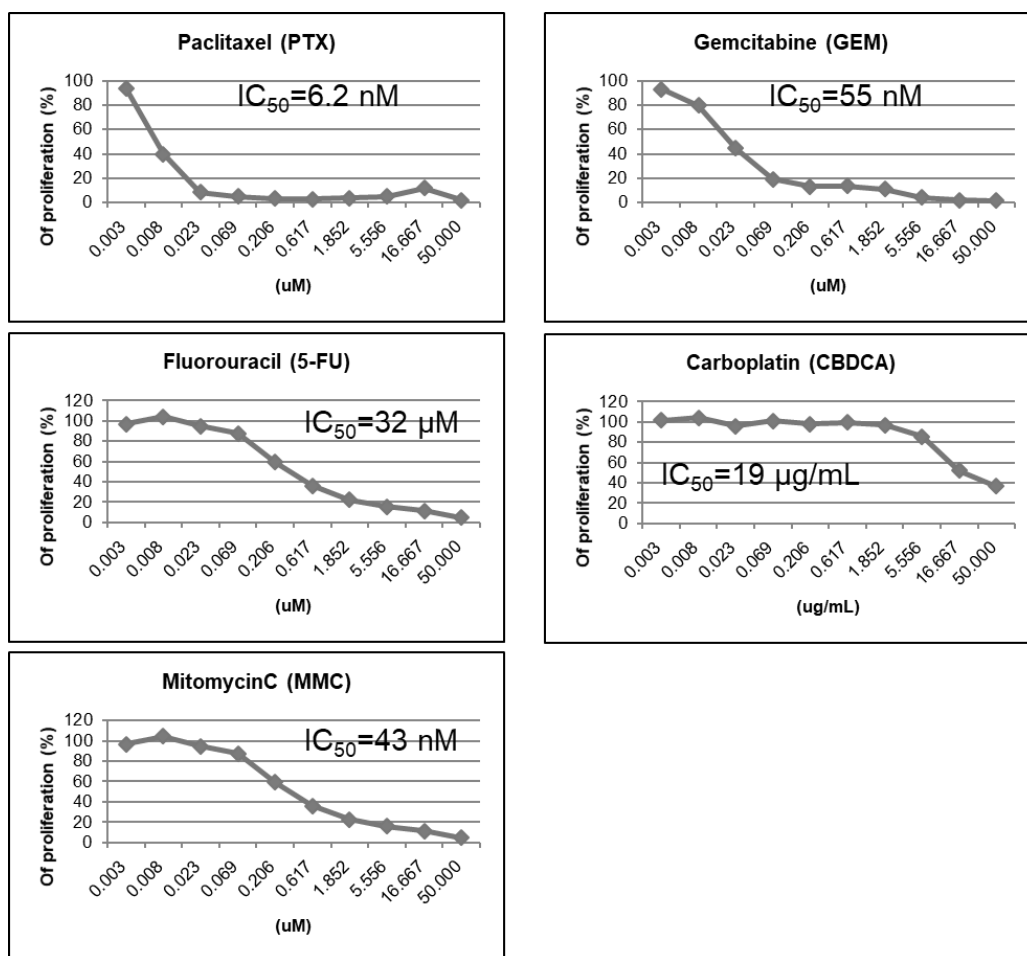
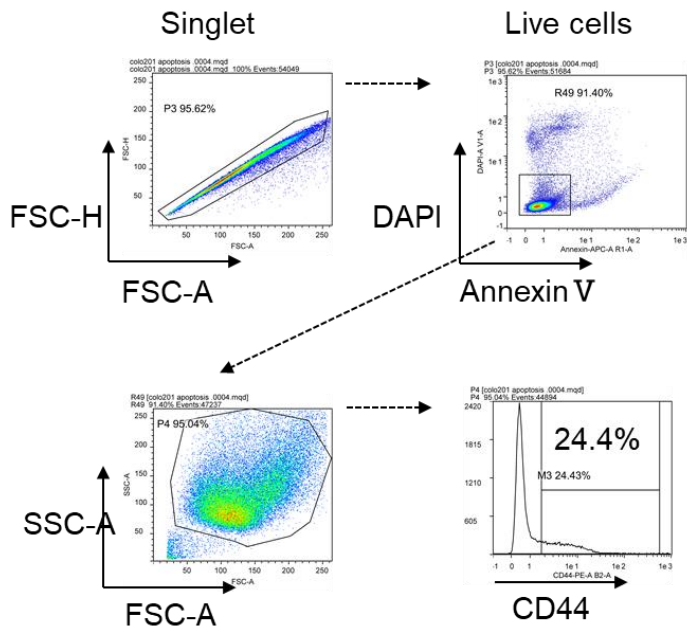


図 13. 各種殺細胞性抗癌剤の容量反応曲線

段階的に 3 倍希釈した各種殺細胞性抗癌剤存在下で COLO 201 細胞を 4 日間培養し、WST-8 assay で生細胞数を測定し、それぞれの IC₅₀ 値を算出した。

次に COLO 201 細胞を殺細胞性抗癌剤の異なる濃度で 4 日間暴露し、CD44 陽性細胞と陰性細胞との存在比率をフローサイトメトリーを用いて測定した。アポトーシス初期の細胞を除外するために DAPI 陰性かつ Annexin V 陰性の生細胞にゲーティングし、陽性率を解析した（図 14A）。Control(抗癌剤未処理)では CD44 陽性細胞率は 24.4%であった。PTX におけるそれぞれの陽性率は 10 nM 8.6%, 5 nM 14.1%, 2.5 nM 21.3%となり、濃度が高くなるにつれて CD44 陽性細胞率が低下した（図 14B）。GEM におけるそれぞれの陽性率は 20 nM 11.5%, 10 nM 14.7%, 5 nM 18.3%となり、PTX 同様、濃度が高くなるにつれて CD44 陽性細胞率が低下した。5-FU におけるそれぞれの陽性率は 60 μM 35.4%, 30 μM 37.5%, 15 μM 35.6%, 3 点ともに CD44 陽性細胞率が上昇した。MMC におけるそれぞれの陽性率は 30 nM 13.1%, 15 nM 19.1%, 7.5 nM 21.3%, CBDCA におけるそれぞれの陽性率は 40 μg/mL 21.7%, 20 μg/mL 19.1%, 10 μg/mL 13.6%であった。このように、5-FU のみ CD44 陽性細胞の存在比率が上昇したことから、濃度依存的に CD44 陽性細胞が濃縮されるのかについてより詳細に検討した。5-FU 20 μM から 10 倍希釈で 4 点、4 日間暴露して、CD44 陽性細胞の存在比率をフローサイトメトリーを用いて測定した。無処理、20 nM, 200 nM, 2 μM および 20 μM のそれぞれの平均値は、14.6%, 18.6%, 29.8%, 54.0%, 54.3%となり、濃度依存的に CD44 陽性細胞の存在比率が有意な上昇が認められた（図 15, $p < 0.001$, student's t test）。

A



B

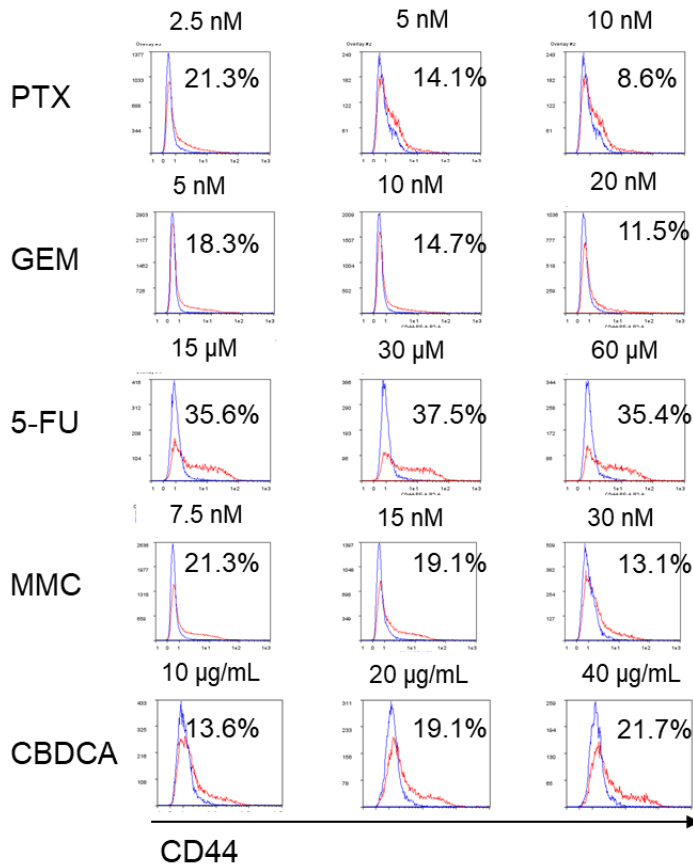
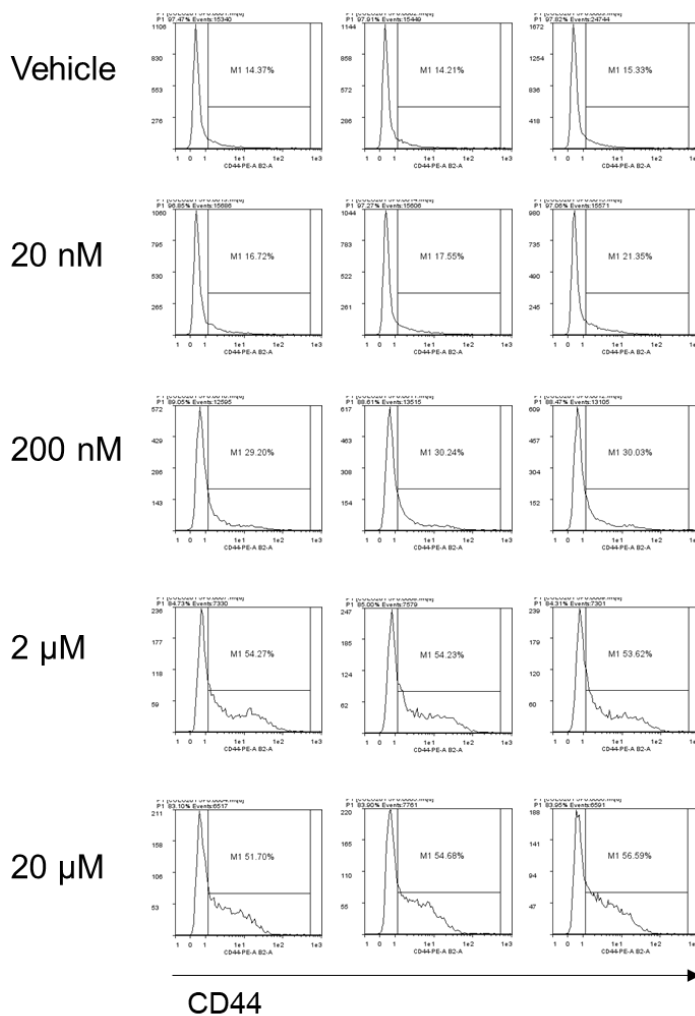


図 14. 各種殺細胞性抗癌剤処理後の CD44 陽性率評価

COLO 201 細胞を各種抗癌剤下で培養 4 日後に、フローサイトメトリーを用いて CD44 陽性細胞の陽性率を解析した。(A) 代表的なフローサイトメトリーの展開図を示す。(B) 各種抗癌剤を異なる濃度で処理した時のそれぞれの CD44 陽性率を示す。青色のヒストグラムはアイソタイプ、赤色のヒストグラムは CD44 抗体を染色した細胞を示す。SSC : side scatter (側方散乱), FSC : Forward Scatter (前方散乱) を示す。

A



B

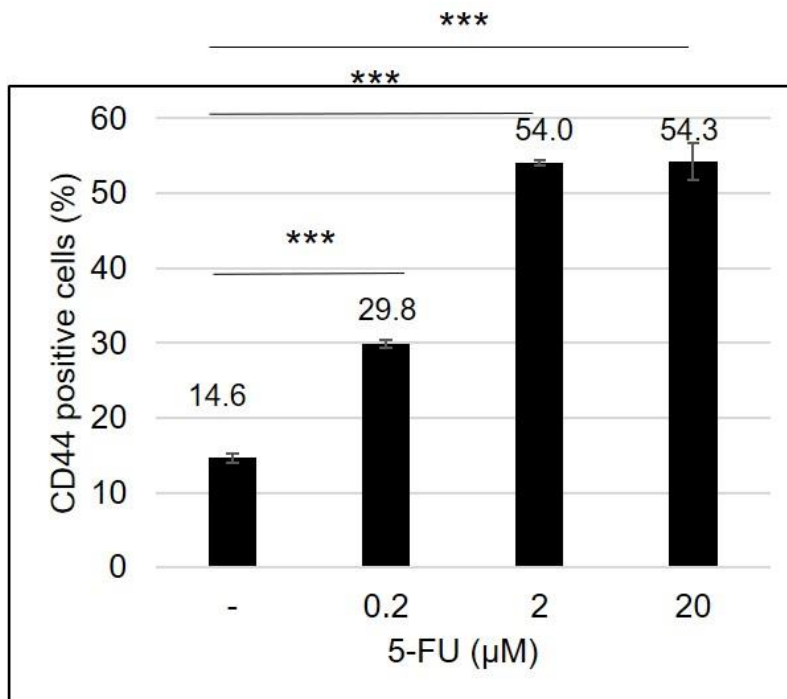


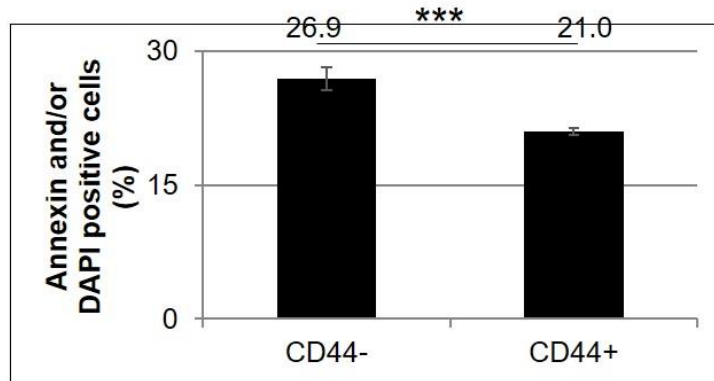
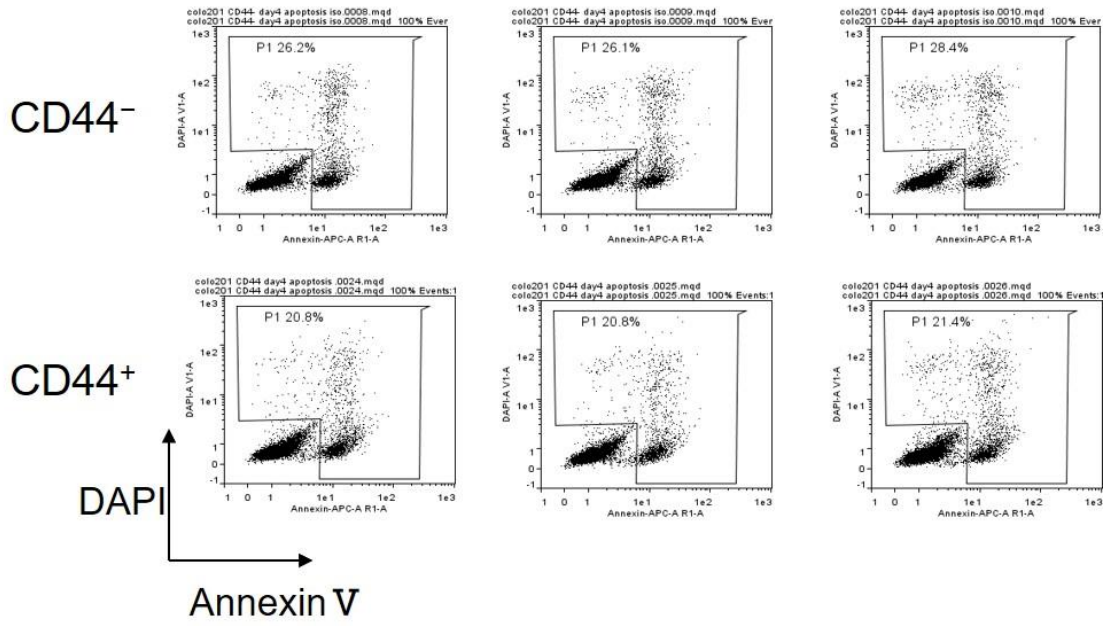
図 15. 5-FU 処理後の CD44 陽性率評価

(A) COLO 201 細胞を異なる 5-FU 濃度で培養 4 日後にフローサイトメトリーを用いて CD44 陽性細胞の陽性率を解析した。(B) グラフは 3 回の独立した実験の平均値±SD を示す。

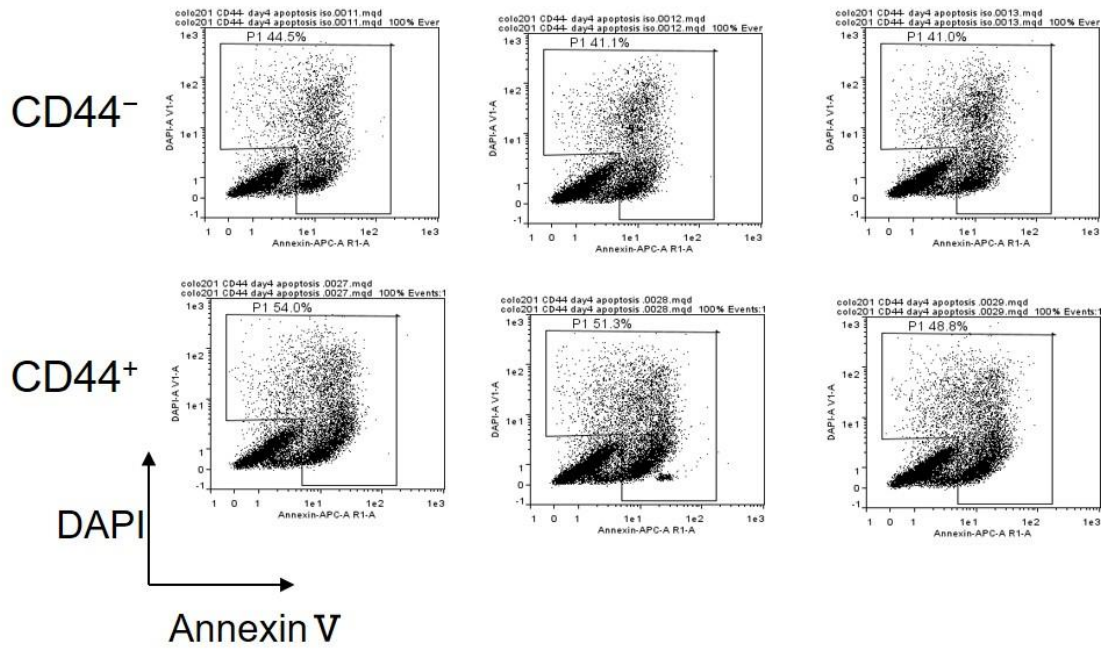
次に、CD44 陽性細胞と陰性細胞におけるそれぞれの 5-FU に対するアポトーシスおよびネクローシス誘導能を比較するために、セルソーティングで分離した両方の細胞を 200nM の 5-FU の存在下で 4 日間培養し、フローサイトメトリーを用いて測定した (図 16A)。アポトーシスおよびネクローシス細胞は DAPI 陽性もしくは Annexin V 陽性、両方陽性の細胞を合算したものとした。CD44 陽性細胞では 21.0% だったのに対して、CD44 陰性細胞では 26.9% となり、CD44 陽性細胞は陰性細胞に比べてアポトーシスおよびネクローシスした割

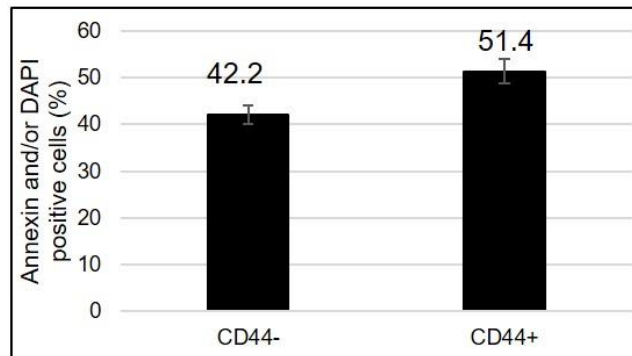
合が有意に低かった（図 16B）．同様に，PTXとGEMに対するアポトーシスおよびネクローシス誘導能についても比較した．PTX は CD44 陽性細胞では 51.4%だったのに対して CD44 陰性細胞では 42.2%となり，CD44 陽性細胞はアポトーシスおよびネクローシスした割合が有意に高かった（図 16B）．GEMは CD44 陽性細胞では 21.9%だったのに対して CD44 陰性細胞では 22.4%となり，両細胞間のアポトーシスおよびネクローシスした割合には有意差が認められなかった（図 16C）．したがって，*in vitro*において CD44 陽性細胞は 5-FU に対して抵抗性を示すことが明らかになった．

A 5-FU



B PTX





C GEM

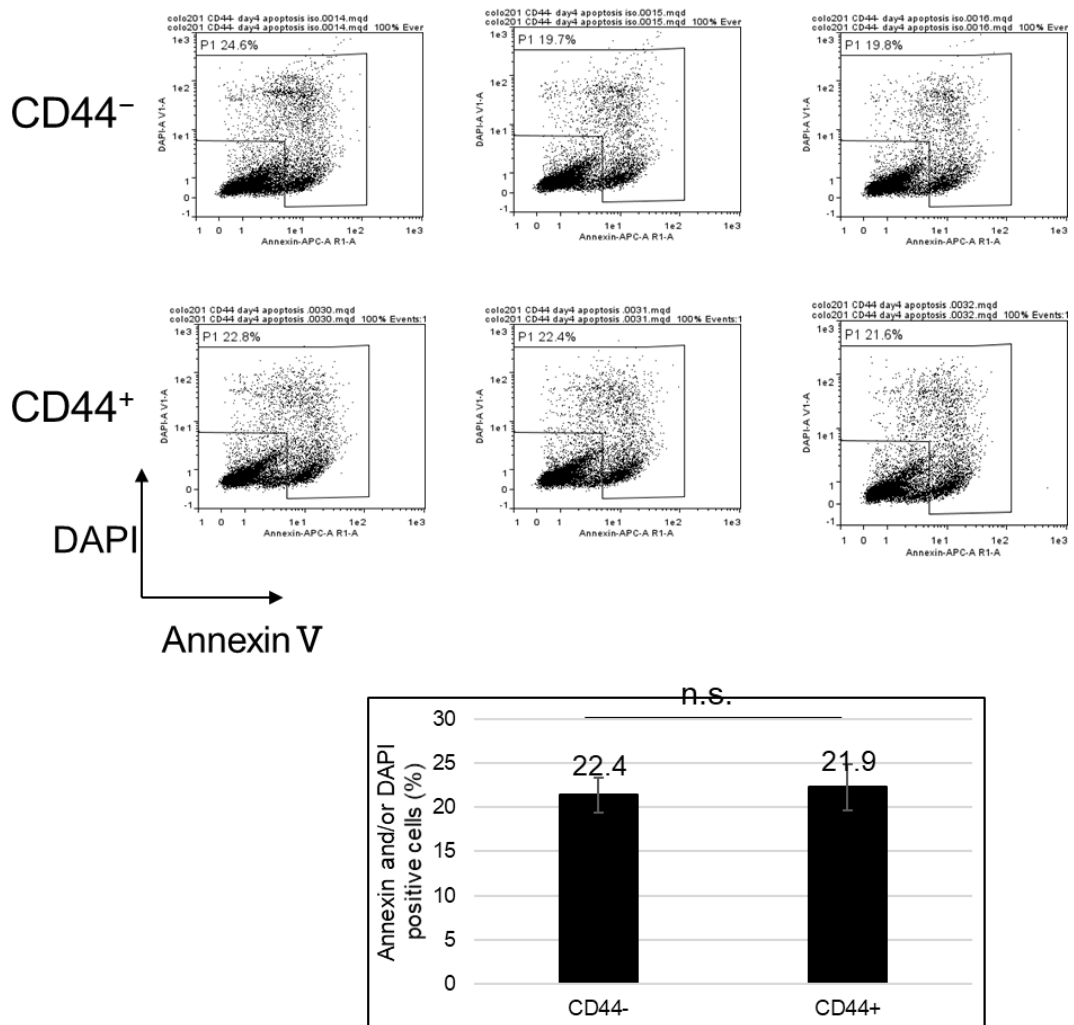


図 16. CD44 陽性細胞および陰性細胞の殺細胞性抗癌剤の感受性評価

CD44 陽性細胞および陰性細胞を 200nM 5-FU (A) , 10nM PTX (B) および 20nM GEM (C) 存在下で培養し, 4 日後に AnnexinV と DAPI の両方, またはいずれか一方が染まっている細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した. グラフは 3 回の独立した実験の平均値±SD を示す. CD44⁻ : CD44 陰性細胞, CD44⁺ : CD44 陽性細胞を示す.

また、親株の COLO 201 細胞から形成された腫瘍に対して、様々な癌腫の治療に使われている殺細胞性抗癌剤（CBDCA, MMC, CPT-11, Tx1, 5-FU）に対する感受性を *in vivo* において評価した。予めそれぞれの殺細胞性抗癌剤の MTD を決定し、2 倍段階希釈の容量を用いて検討を行った。Tx1 40mg/kg ではマウスに死亡例が出現したため試験途中で取りやめた。Vehicle 同様に、CBDCA 114 mg/kg および 57 mg/kg, 5-FU 30 mg/kg および 15 mg/kg は緩やかに腫瘍が増殖するのに対して、MMC 6.7 mg/kg および 3.35 mg/kg, CPT-11 100 mg/kg および 50 mg/kg (59) , Tx1 20 mg/kg では腫瘍の退縮が認められた (図 5, $P < 0.01$, welch's t test) 。 *In vivo* においても、COLO 201 細胞が 5-FU や CBDCA に対して低感受性であることが示された。

以上の結果から、CD44 陽性細胞が 5-FU に対して耐性であることが示された。

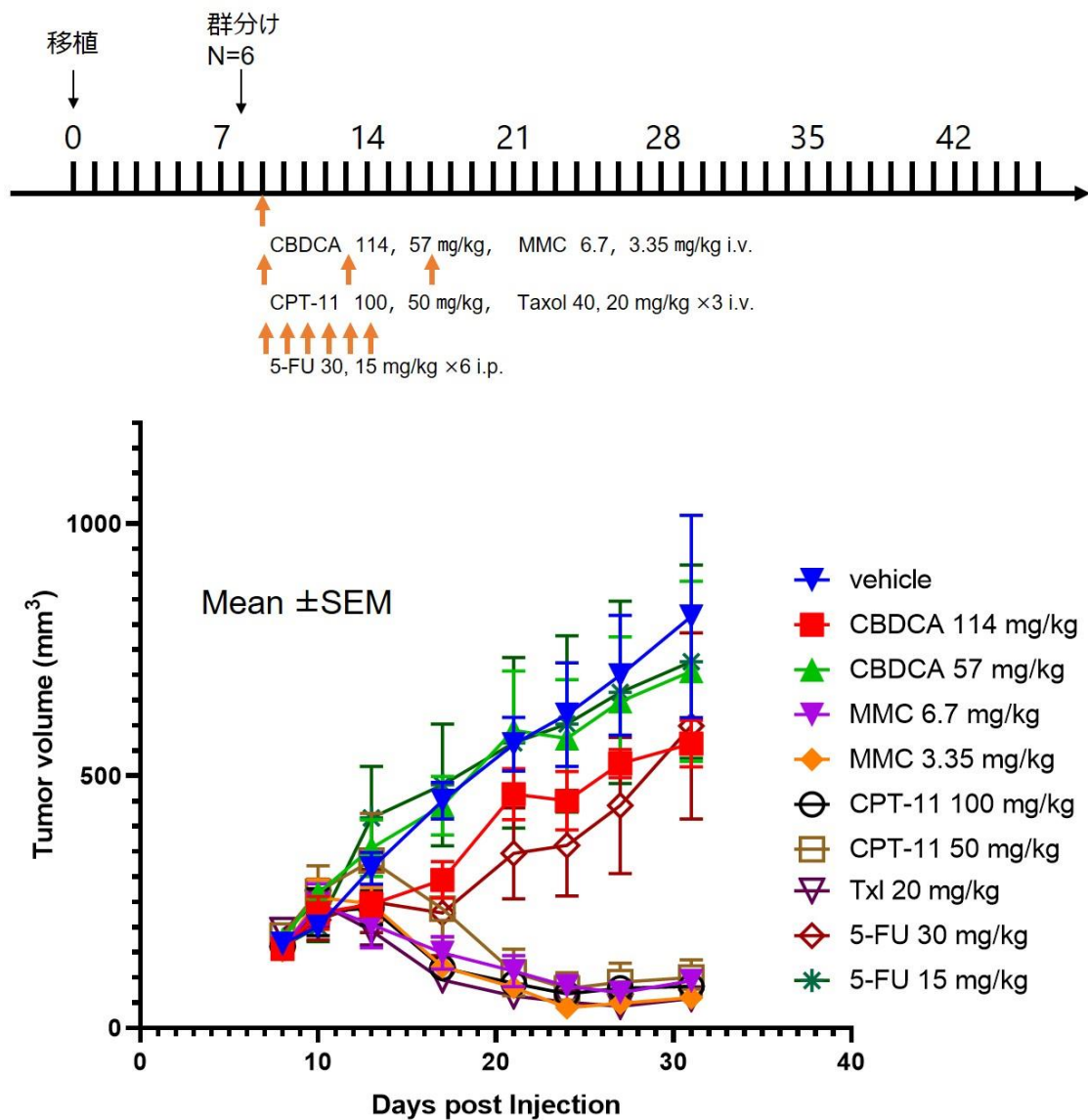


図 17. COLO 201 細胞から形成された腫瘍に対する各種殺細胞性抗癌剤の感受性評価

COLO 201 細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、上図のスケジュールと用量でそれぞれの殺細胞性抗癌剤を投与した。グラフはそれぞれの群の平均腫瘍体積±SEM を示す。Vehicle はコントロールとして生理食塩水を投与した。

分子標的薬の感受性評価

4 種の分子標的薬 (erlotinib, gefetinib, afatinib, everolimus) における容量曲線を決定するため段階希釈した分子標的薬を用いて COLO 201 細胞を処理し, 4 日後に細胞数を測定し, IC_{50} 値を換算した. Erlotinib と gefetinib は EGFR を標的にしたプロテインキナーゼ阻害剤 (60, 62) , afatinib は EGFR と HER2 の 2 分子を阻害するプロテインキナーゼ阻害剤である (63, 64) . Everolimus は mTORC1 (mammalian target of rapamycin) を阻害する (65, 66) . Erlotinib, gefetinib, afatinib, それぞれの IC_{50} 値は 23 nM, 17 nM, 3.8 nM であった (図 18) . Everolimus はどの希釈ポイントでも 50%前後の増殖阻害が認められ IC_{50} 値は求められなかった. 次に COLO 201 を分子標的薬の異なる濃度で 4 日間処理した後に, CD44 陽性細胞と陰性細胞との存在比率をフローサイトメトリーを用いて測定した. アポトーシス初期の細胞を除外するために DAPI 陰性かつ Annexin V 陰性の生細胞にゲーティングし陽性率を解析した. CD44 陽性細胞率は, control (未処理)33.8%, erlotinib 20 μ M 31.1%, 13 μ M 30.1%, gefetinib 25 μ M 38.6%, 13 μ M 32.4%, afatinib 3.2 μ M 40.9%, 1.5 μ M 42.6%, everolimus 25 μ M 23.9%, 13 μ M 24.3%であった. Afatinib のみ暴露した時に CD44 陽性細胞の存在比率が上昇した (図 18) .

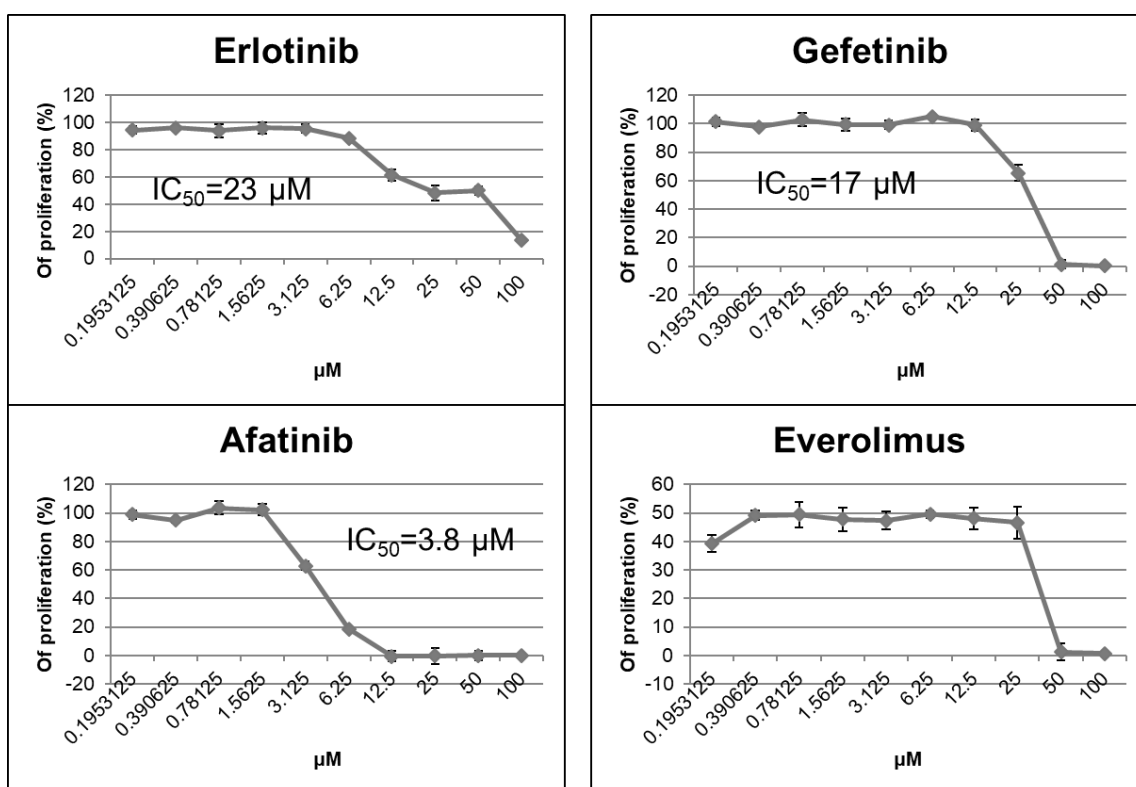


図 18. 各種分子標的薬の容量反応曲線

段階的に 2 倍希釈した各種分子標的薬(erlotinib, gefetinib, afatinib, everolimus) 存在下で COLO 201 細胞を培養し, 4 日後に WST-8 assay で生細胞数を測定し, それぞれの IC_{50} 値を算出した。

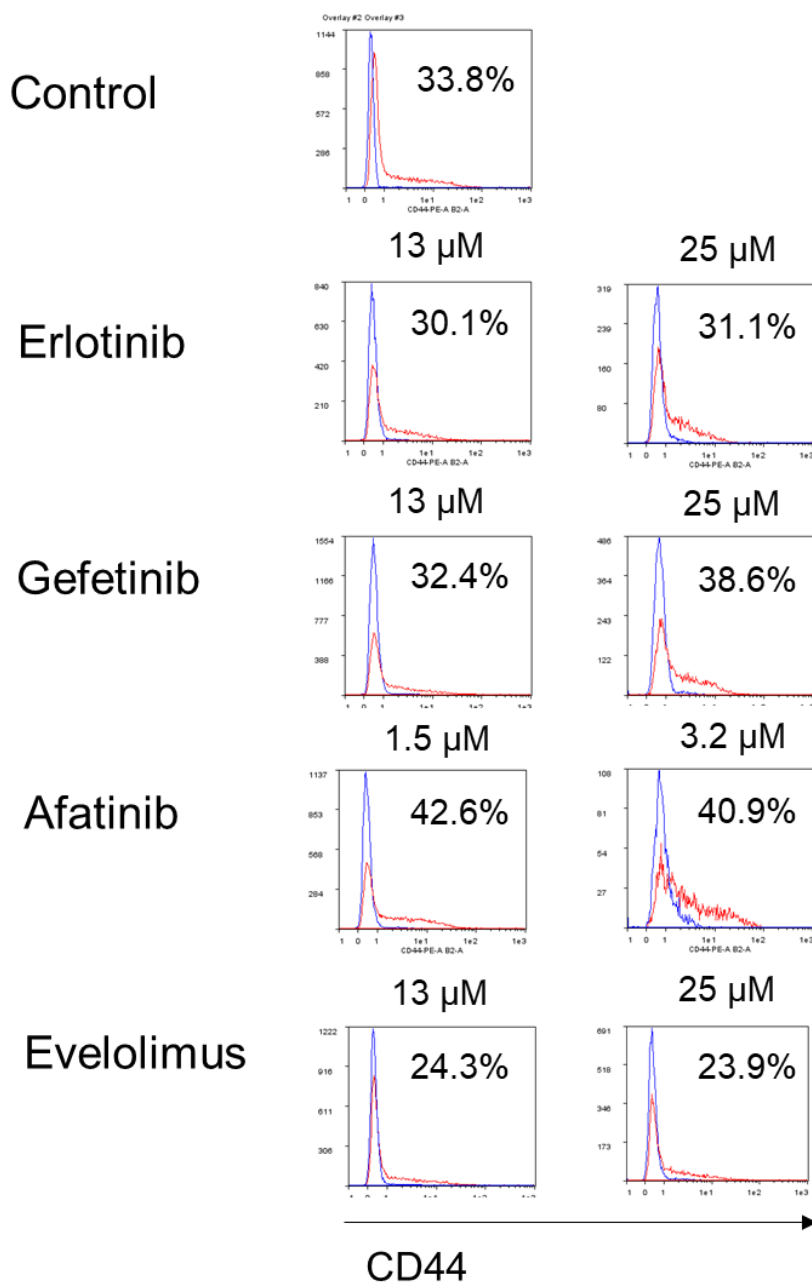


図 19. 各種分子標的薬処理による CD44 陽性率の変動評価

異なる濃度の各種分子標的薬存在下で COLO 201 細胞を培養し 4 日後にフローサイトメトリーを用いて CD44 陽性細胞の陽性率を解析した。青色のヒストグラムはアイソタイプ、赤色のヒストグラムは CD44 抗体を染色した細胞を示す。図表中の数字は CD44 陽性細胞の割合を示す。

そこで、afatinibの他に5種のHER2阻害剤（trastuzumab, T-DM1, pertuzumab, neratinib, lapatinib）についても検討した。まず、それぞれの容量曲線を決定するため段階希釈したHER2阻害剤でCOLO 201細胞を4日間処理した後、細胞数を測定し、 IC_{50} 値を換算した。Trastuzumab（67）、T-DM1（68, 69）およびpertuzumab（70, 71）はHER2阻害抗体であり、neratinib（72, 73）およびlapatinib（74, 75）はafatinibと同じHER2とEGFRの2分子の阻害剤である。T-DM1, neratinib, lapatinibそれぞれの IC_{50} 値は10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.72 μM , 11 μM であった（図20）。Trastuzumabとpertuzumabは増殖阻害活性が弱く IC_{50} 値が求められなかった。次にCOLO 201をHER2阻害剤の異なる濃度で4日間処理した後に、CD44陽性細胞とCD44陰性細胞との存在比率を解析した。CD44陽性細胞率は、Control（未処理）31%, trastuzumab 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 32%, pertuzumab 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 30%, T-DM1 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 43%, neratinib 1 μM 67%, neratinib 500 nM 47%, lapatinib 10 μM 90%, lapatinib 5 μM 31%であった。T-DM1, neratinibおよびlapatinibで暴露した時にCD44陽性細胞の存在比率が上昇した（図21）。

以上の結果から、CD44陽性細胞がHER2阻害剤に対して感受性が低い可能性が示唆された。

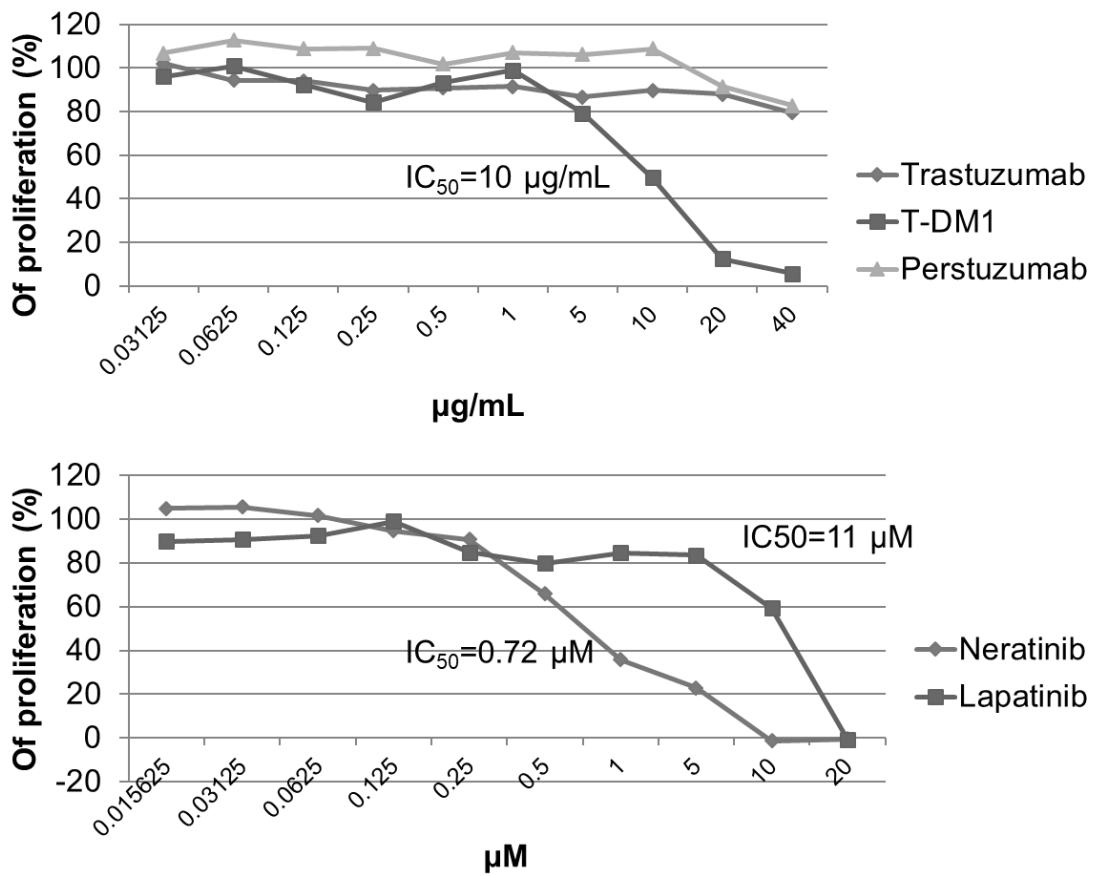


図 20.各種 HER2 阻害剤の容量反応曲線

段階的に 2 倍希釈した HER2 阻害剤(trastuzumab, T-DM1, perstuzumab, neratinib, lapatinib) 存在下で COLO 201 細胞を培養し、4 日後に WST-8 assay で生細胞数を測定し、 IC_{50} 値を算出した。

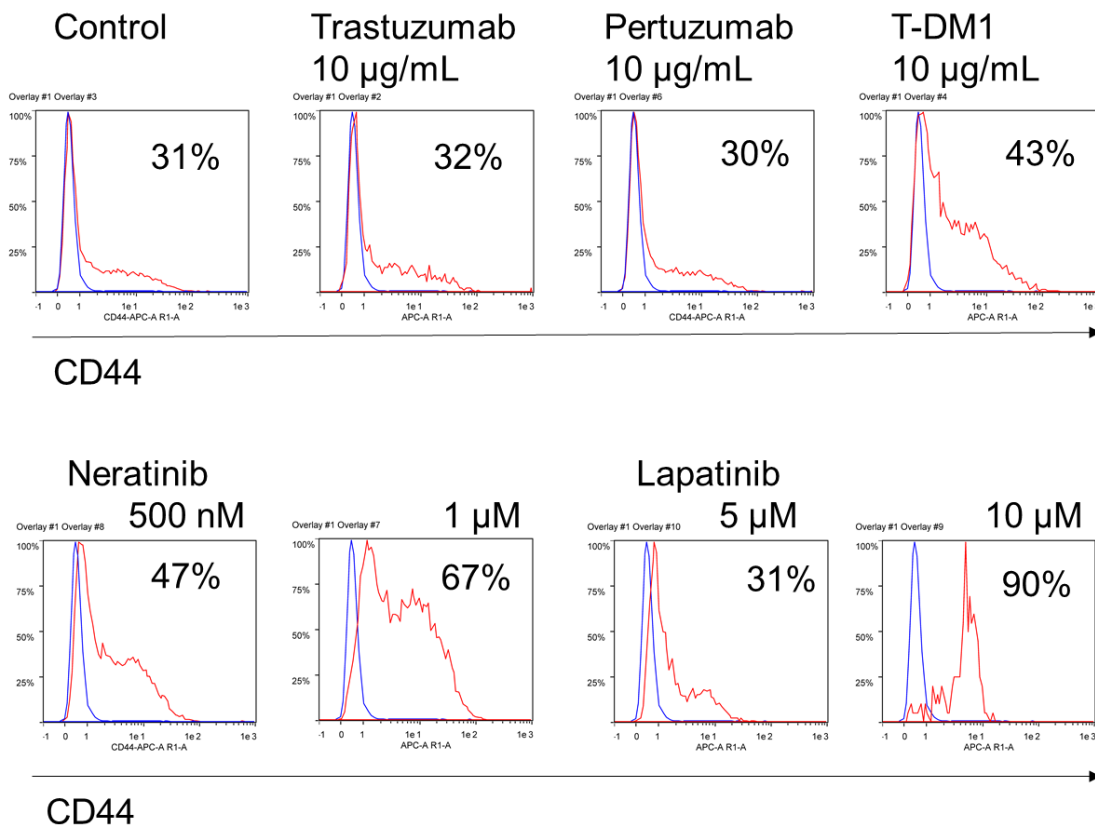


図 21.各種 HER2 阻害剤暴露による CD44 陽性率の変動評価

異なる濃度の各種 HER2 阻害剤存在下で COLO 201 細胞を培養し、4 日後にフローサイトメトリーを用いて CD44 陽性細胞の陽性率を解析した。青色のヒストグラムはアイソタイプ、赤色のヒストグラムは CD44 抗体を染色した細胞を示す。図表中の数字は CD44 陽性細胞の割合を示す。

CD44 陽性細胞と陰性細胞のマクロアレイ解析

CD44 陽性細胞の特徴を理解するために、マイクロアレイを用いて CD44 陽性細胞と陰性細胞における遺伝子発現を網羅的に解析した。表 3 は CD44 陽性細胞で発現が上昇していた上位 20 分子のリストを示す。CD44 陽性細胞では陰性細胞より CD44 の発現が 70 倍高いことから CD44 陽性細胞と陰性細胞が正しく分離できていることが確認できた。発現差 2 倍以上かつ p 値 0.05 未満のクライテリアに基づいて、上昇していた 191 遺伝子と低下していた 216 遺伝子を含む合計 407 遺伝子を抽出した(図 22A)。CXCR4, ALDH1A1, ALDH3A1 および WNT5A のような癌幹細胞や薬剤抵抗性に関連する遺伝子発現が CD44 陽性細胞で高く発現していた (76-77)。マイクロアレイ解析が正しく評価できているのかを確認するために、定量 PCR 法を用いてそれらの分子の発現について測定した。CD44 陽性細胞では、CXCR4 は 5 倍、ALDH1A1 は 2.5 倍、ALDH3A1 は 2 倍、WNT5A は 3 倍ほど亢進していた (図 22B, $p < 0.001$, student's t test)。定量 PCR の結果はマイクロアレイ解析の結果とも相関することから、マイクロアレイ解析が正しく評価できていたことが確認された。さらに、CD44 陽性細胞の特徴に CXCR4, ALDH1A1, ALDH3A1 および WNT5A が寄与している可能性が示唆された。

Description	CD44+ / CD44-	T-TEST(P)
Homo sapiens CD44 molecule (Indian blood group) (CD44), transcript variant 1, mRNA [NM_000610]	70.72	1.25E-04
Homo sapiens proline rich 9 (PRR9), mRNA [NM_001195571]	27.63	2.30E-05
Homo sapiens mucin like 1 (MUCL1), mRNA [NM_058173]	14.44	9.82E-04
Homo sapiens phospholipase A2 group IIA (PLA2G2A), transcript variant 1, mRNA [NM_000300]	14.31	1.07E-03
Homo sapiens fibromodulin (FMOD), transcript variant 1, mRNA [NM_002023]	11.67	2.62E-03
Homo sapiens annexin A1 (ANXA1), mRNA [NM_000700]	10.89	8.90E-03
Homo sapiens hemoglobin subunit alpha 2 (HBA2), mRNA [NM_000517]	9.71	2.18E-02
Homo sapiens small proline rich protein 3 (SPRR3), transcript variant 1, mRNA [NM_005416]	9.63	3.00E-02
Homo sapiens ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6GALNAC1), transcript variant 1, mRNA [NM_018414]	7.66	1.88E-02
Homo sapiens lipase C, hepatic type (LIPC), mRNA [NM_000236]	7.64	1.83E-05
Homo sapiens ATP binding cassette subfamily A member 12 (ABCA12), transcript variant 1, mRNA [NM_173076]	7.16	2.55E-02
Homo sapiens myomixer, myoblast fusion factor (MYMX), transcript variant 2, mRNA [NM_001347931]	6.91	5.26E-03
Homo sapiens lysozyme like 4 (LYZL4), transcript variant 1, mRNA [NM_144634]	6.74	3.33E-03
Homo sapiens calcium voltage-gated channel subunit alpha1 E (CACNA1E), transcript variant 1, mRNA [NM_001205293]	6.69	2.42E-03
Homo sapiens proline rich protein BstNI subfamily 2 (PRB2), mRNA [NM_006248]	6.51	2.35E-04
Homo sapiens granzyme A (GZMA), mRNA [NM_006144]	6.31	2.53E-02
Homo sapiens glycine-N-acyltransferase like 1 (GLYATL1), transcript variant 1, mRNA [NM_080661]	6.09	2.86E-02
Homo sapiens IGF like family member 1 (IGFL1), mRNA [NM_198541]	6.09	1.77E-03
Homo sapiens UDP glucuronosyltransferase family 2 member B11 (UGT2B11), mRNA [NM_001073]	5.84	4.36E-03
Homo sapiens nitric oxide synthase trafficking (NOSTRIN), transcript variant 1, mRNA [NM_052946]	5.84	4.58E-03

表 3. マイクロアレイ解析を用いた CD44 陽性細胞で発現が上昇していた上位 20 遺伝

子リスト

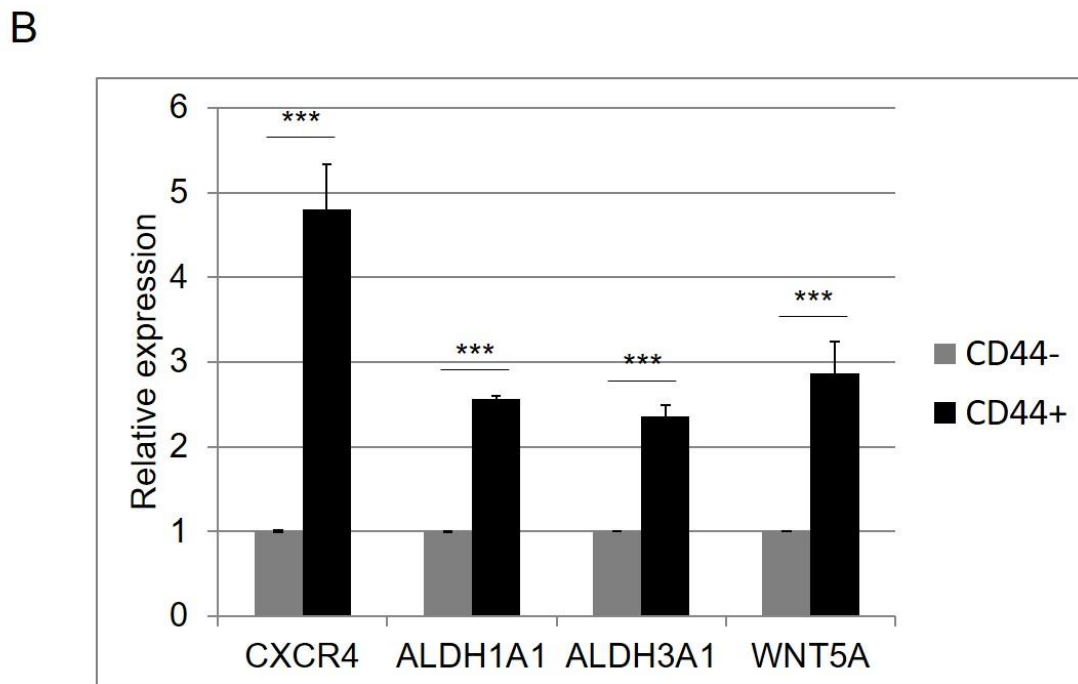
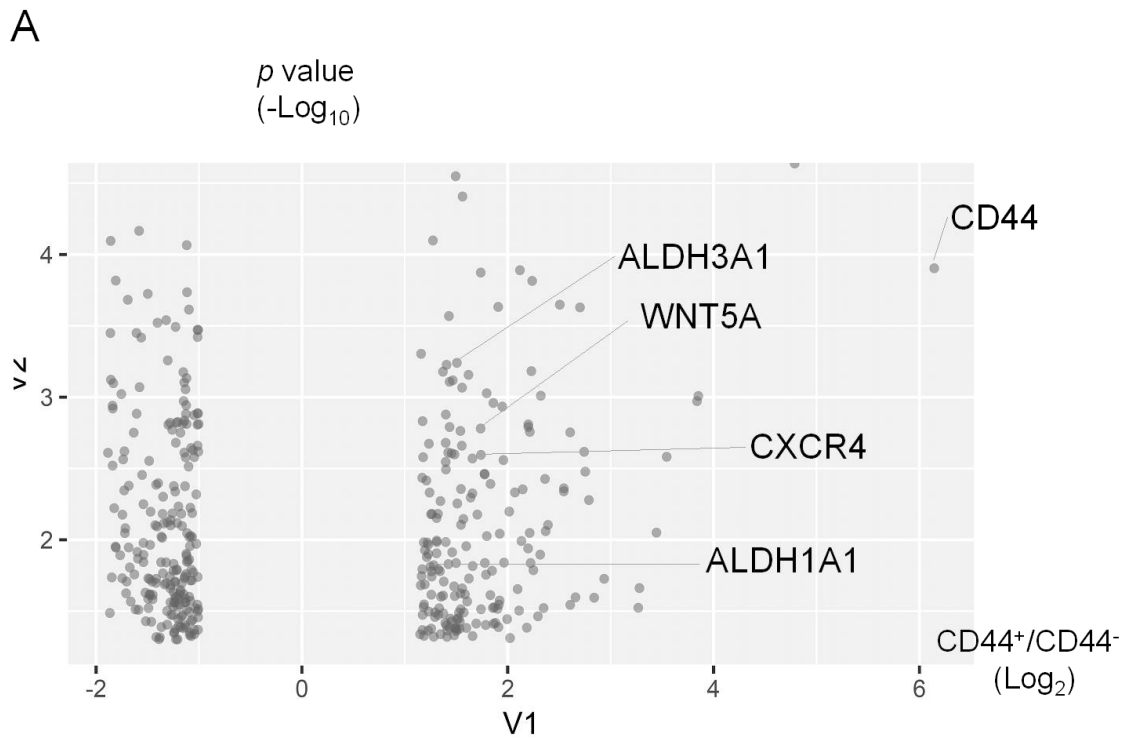


図 22. マイクロアレイを用いた CD44 陽性細胞および陰性細胞の網羅的発現解析

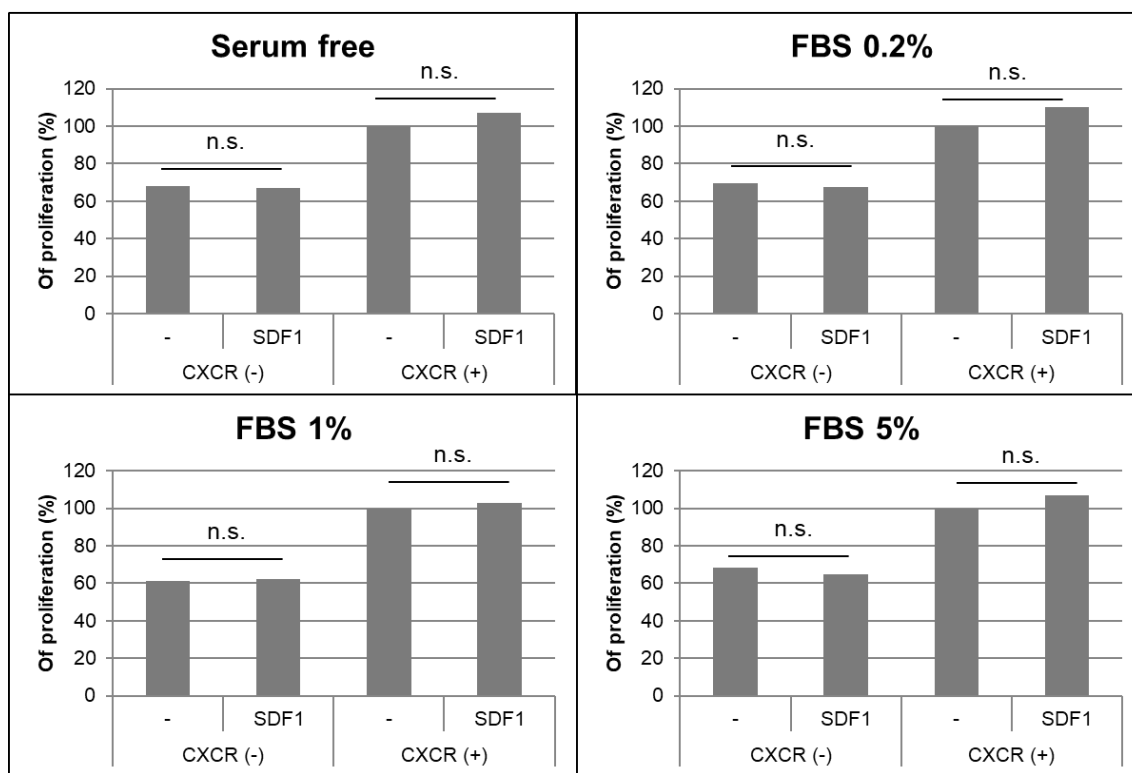
(A) 各プロットは CD44 陽性細胞で発現が亢進している 191 遺伝子と低下している 206 遺伝子 (genes with a fold change ≥ 2 and a P-value (t-test) < 0.05) を示す。 (B)

CD44 陽性細胞および陰性細胞について、癌幹細胞関連分子（CXCR4, ALDH1A1, ALDH3A1 および WNT5A）の発現を qPCR を用いて解析した。グラフは 3 回の独立した実験の平均値±SDを示す。CD44+：CD44 陽性細胞，CD44-：CD44 陰性細胞を示す。

***In vitro* における CD44 陽性細胞の癌幹細胞性質に対する CXCR4 の関与**

前記の 4 遺伝子（ALDH1A1, CXCR4, ALDH3A1 および WNT5A）の中でも特に CXCR4 は CD44 陽性細胞で発現が 5 倍近く上昇していた。CXCR4 は、増殖，転移，抗癌剤抵抗性および幹細胞性に関与し，様々な癌腫で予後マーカーとして数多く報告されていることから（78-82），CXCR4 が CD44 陽性細胞の癌幹細胞性質に関与しているのかを検証した。まず，CD44 陽性細胞で CXCR4 パスウェイが機能しているのかを確かめるために，CD44 陽性 COLO 201 細胞からセルソーティングを用いて単離した CXCR4 陽性細胞と陰性細胞を無血清培地で 24 時間 starvation 処理した後，異なる濃度の FBS を含んだ培養液に CXCR4 のリガンド（CXCL12/SDF-1）を添加し，培養 4 日後に細胞数を測定した。全ての FBS の条件（serum free, 0.2%, 1%, 5%）でも，CXCR4 陰性細胞は SDF-1 の有無による増殖差がなく，CXCR4 陽性細胞でも SDF-1 の有無による増殖差がなかった（図 23）。

CXCR4 +/- sorting ⇒ Starvation 24hr ⇒ Culture day4



CXCL12/SDF-1:200ng/mL

図 23. CXCR4 リガンド (SDF-1) 添加による増殖評価

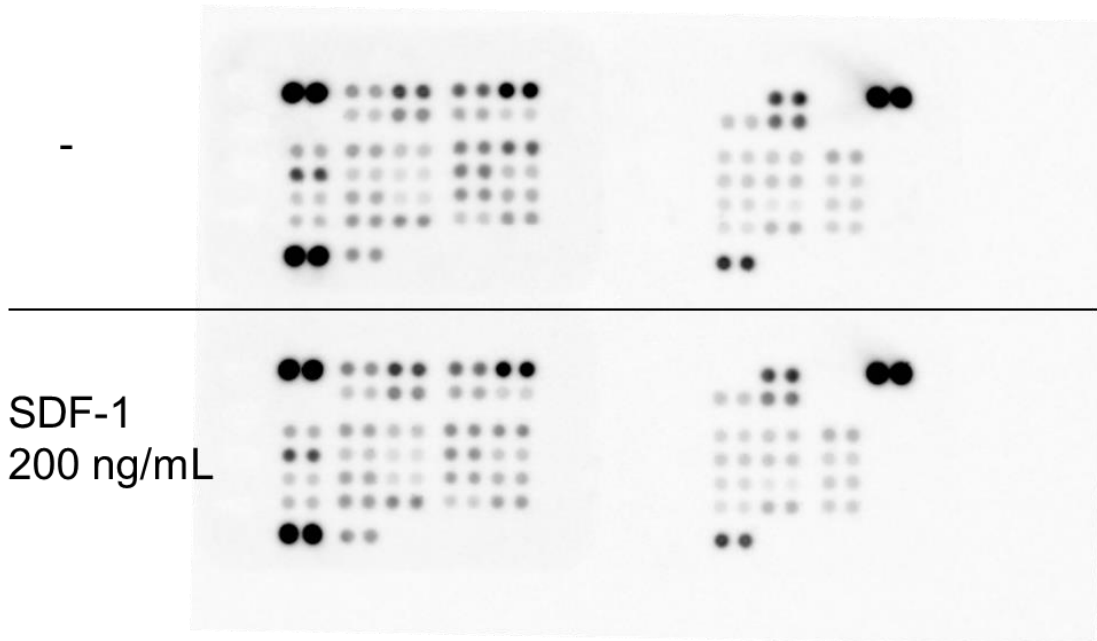
CXCR4 陽性細胞および陰性細胞を単離し 24 時間 starvation を行った後に 4 日間通常培養し, WST-8 を用いて生細胞数を測定した. CXCR4 陽性細胞の SDF-1 添加無群を 100%として, それぞれの群の細胞数を算出した. グラフはそれぞれの平均値を示す.

CXCR4(-) : CXCR4 陰性細胞, CXCR4(+): CXCR4 陽性細胞を示す.

CD44 陽性細胞では SDF-1 刺激によって CXCR4 下流のシグナル伝達が働いているのかを確かめるために, CXCR4 陽性細胞を多く含む COLO 201 細胞を無血清培地で 24 時間 starvation した後に SDF-1 を添加し, 1 時間後にシグナルの増強を Phospho-Kinase

Array Kit を用いて測定した。 使用した COLO 201 細胞は CD44 陽性かつ CXCR4 陽性細胞をセルソーティングによって分離後、1 週間かけて通常培養して増やした CXCR4 陽性率が 40%の細胞であった。 CXCR4 下流には様々なシグナル経路が報告されており、代表的なものに ERK1/2 や Akt などが知られている (図 30) 。 SDF-1 処置を無処置と比較したところ、リン酸化が増幅した分子は認められなかったことから、CD44 陽性細胞では CXCR4-SDF-1 を介したシグナル経路が活性化されていないと結論付けた (図 24) 。 以上の結果から、*in vitro* の環境において、CD44 陽性細胞の癌幹細胞性質に CXCR4 が関与している可能性は低いことが示唆された。

CXCR4⁺ sorting ⇒ Culture 1 week ⇒ Starvation 24hr ⇒ SDF-1 1hr
 CXCR4陽性率40%



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
A	Reference		p38 α	ERK1/2			JNK1/2/3	SK-3 α / β					p53				Reference	
B			EGFR	MSK1/2			AMPK α 1	Akt			Akt		p53				PBS	
C	TOR		CREB	HSP27			AMPK α 2	β-Catenin			p70		p53				c-Jun	
D	Src		Lyn	Lck			STAT2	STAT5a			p70		RSK1/2/3				eNOS	
E	Fyn		Yes	Fgr			STAT6	STAT5b			STAT3		p27				PLC-γ 1	
F	Hck		Chk-2	FAK			PDGF	STAT5a/b			STAT3		WNK1				PYK2	
G	Reference		PRAS40					PBS			HSP60							

Human Phospho-Kinase Array Kit R & D systems

図 24. CXCR4 のリガンド (SDF-1) 添加した時のシグナル発現評価

COLO 201 細胞から単離した CXCR4 陽性細胞を 1 週間培養後に、無血清培地に置き換えて 24 時間培養した。その後、200 ng/mL SDF-1 で処理し 1 時間後に細胞を回収し、Human Phospho-Kinase Array Kit を用いて、各分子におけるリン酸化の強弱を測定した。

COLO 201 細胞に対して CXCR4 siRNA を用いてエレクトロポレーション法でノックダウンを行った。Negative control siRNAと比較して CXCR4 のノックダウン率は 90%であった。また、CD44 陽性細胞で発現が亢進している上位分子について mRNA の発現を評価した。CXCR4 のノックダウンによって、ANXA1 のように mRNA 発現が変化しない分子が観察された一方、GZMA や MUCL1, PLA2G2A, FMOD, CD44 の mRNA 発現が抑制された (図 24) 。 CXCR4 が CD44 陽性細胞と陰性細胞との間の遺伝子発現の違いをコントロールしている可能性が考えられた。 CXCR4⁺ : CXCR4 陽性細胞を示す。

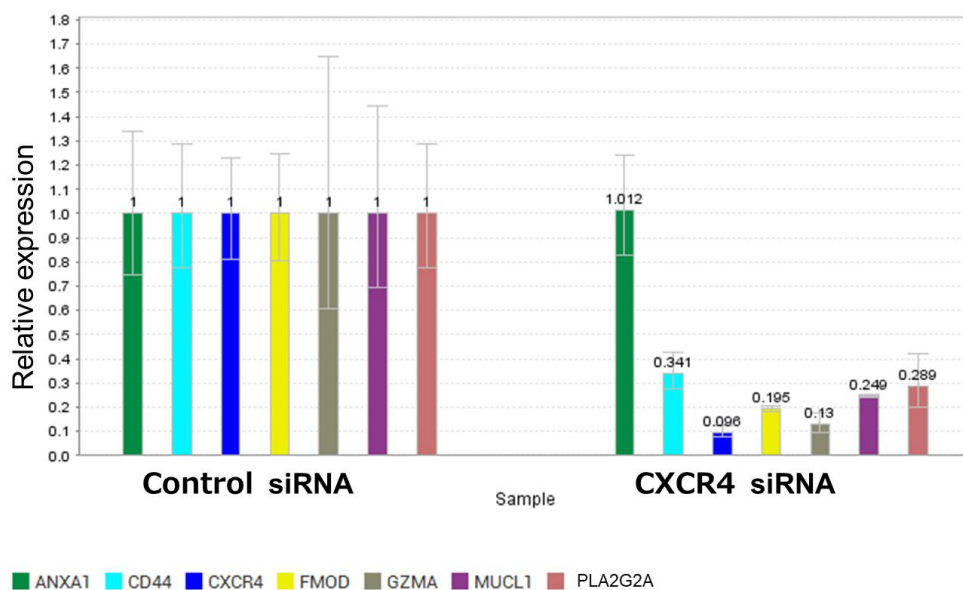


図 25. CXCR4 ノックダウンによる亢進分子の発現変動評価

COLO 201 細胞に対して CXCR4 でノックダウンし、3 日後に CD44 陽性細胞で亢進している遺伝子 (ANXA1, CD44, CXCR4, FMOD, GZMA, MUCL1, PLA2G2A) の発現を qPCR で測定した。グラフはそれぞれの群の平均値±SD を示す。

***In vivo* における CD44 陽性細胞の癌幹細胞性質に対する CXCR4 の関与**

CD44 陽性細胞の腫瘍形成能に CXCR4 が関与しているのかを検証するために、セルソーティングで分離した CD44 陽性かつ CXCR4 陽性細胞および、CD44 陽性かつ陰性細胞をそれぞれヌードマウスに移植し、腫瘍の増殖性を評価した。両群ともに全てのマウスで生着を示し、腫瘍が緩やかに増大することが確認された。しかし、腫瘍増殖スピードには差が認められなかった（図 26）。

また、CD44 陽性細胞を移植した担癌マウスに対して、CXCR4 阻害剤である AMD3100 治療（83-85）における抗腫瘍効果を検討した。AMD3100 治療群は vehicle 群と同じ腫瘍の増殖スピードを示し、抗腫瘍効果は認められなかった（図 27）。

さらに、CD44 陽性細胞から形成された腫瘍に CXCR4 陽性細胞が濃縮されているか否かを明らかにするため、腫瘍を分散して癌細胞の CXCR4 の発現をフローサイトメトリーを用いて測定した。ダブレット細胞を除いた生細胞にゲーティングし、COLO 201 細胞の大きさと H2Kd 陰性細胞集団にゲーティングすることで、腫瘍組織の間質を形成しているマウス由来の細胞を除き、癌細胞（COLO 201 細胞）の CD44 と CXCR4 の発現を正確に評価した。その結果、腫瘍組織を形成している癌細胞には CD44 陽性と陰性細胞が存在したが、CXCR4 陽性細胞はほとんど存在しなかった（図 11）。

以上の結果から、CXCR4 は CD44 陽性細胞の腫瘍形成能に寄与していないことが示唆された。

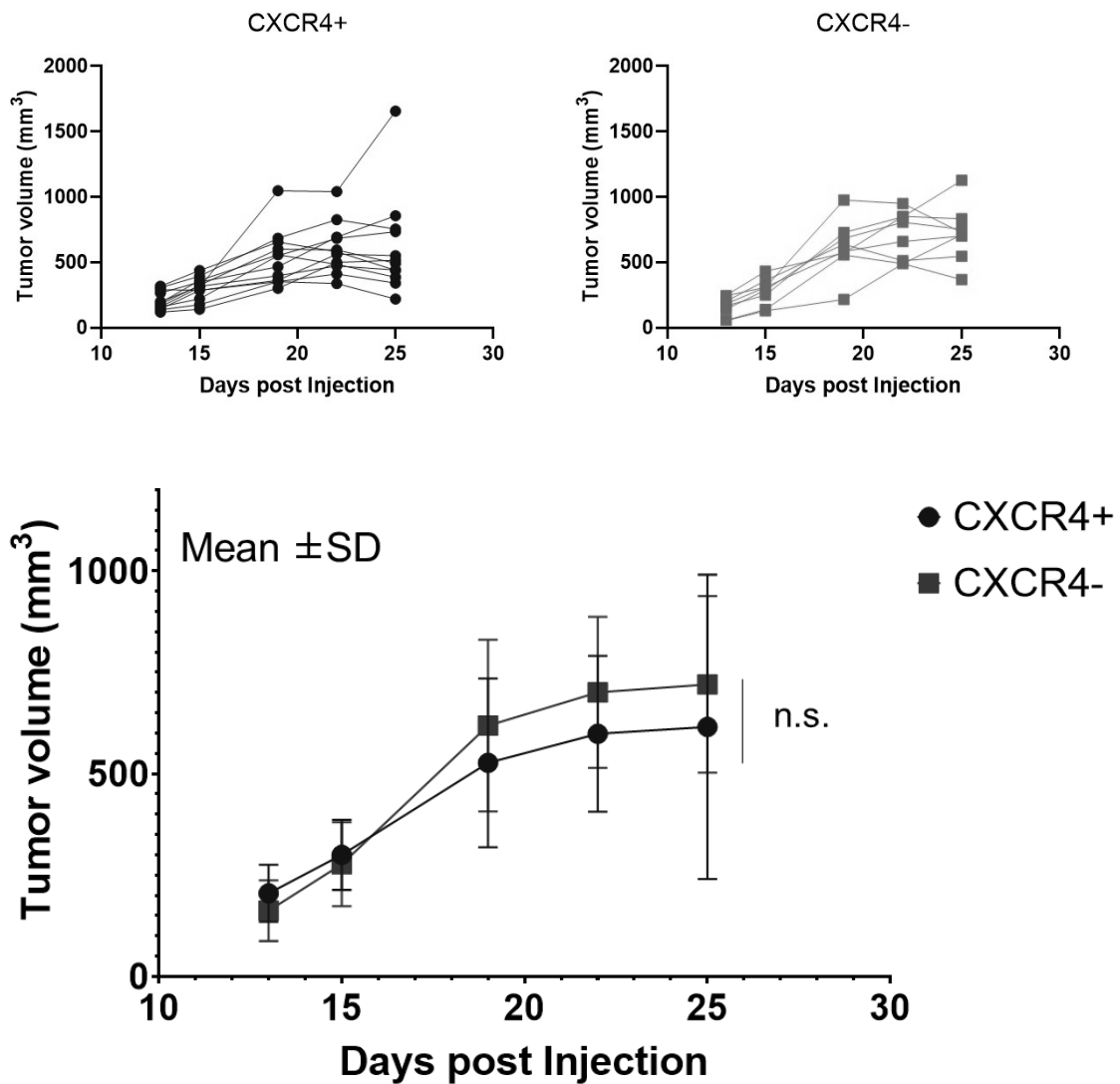


図 26. CD44 陽性 COLO 201 細胞における CXCR4 陽性細胞及び陰性細胞の増腫瘍能評価

CD44 陽性 COLO 201 細胞を CXCR4 陽性細胞と陰性細胞に単離し、それぞれ 5×10^4 個をヌードマウスに移植し、腫瘍の増殖をモニタリングした。グラフは平均腫瘍体積値 \pm SD を示す。CXCR4+ : CXCR4 陽性細胞, CXCR4- : CXCR4 陰性細胞を示す。

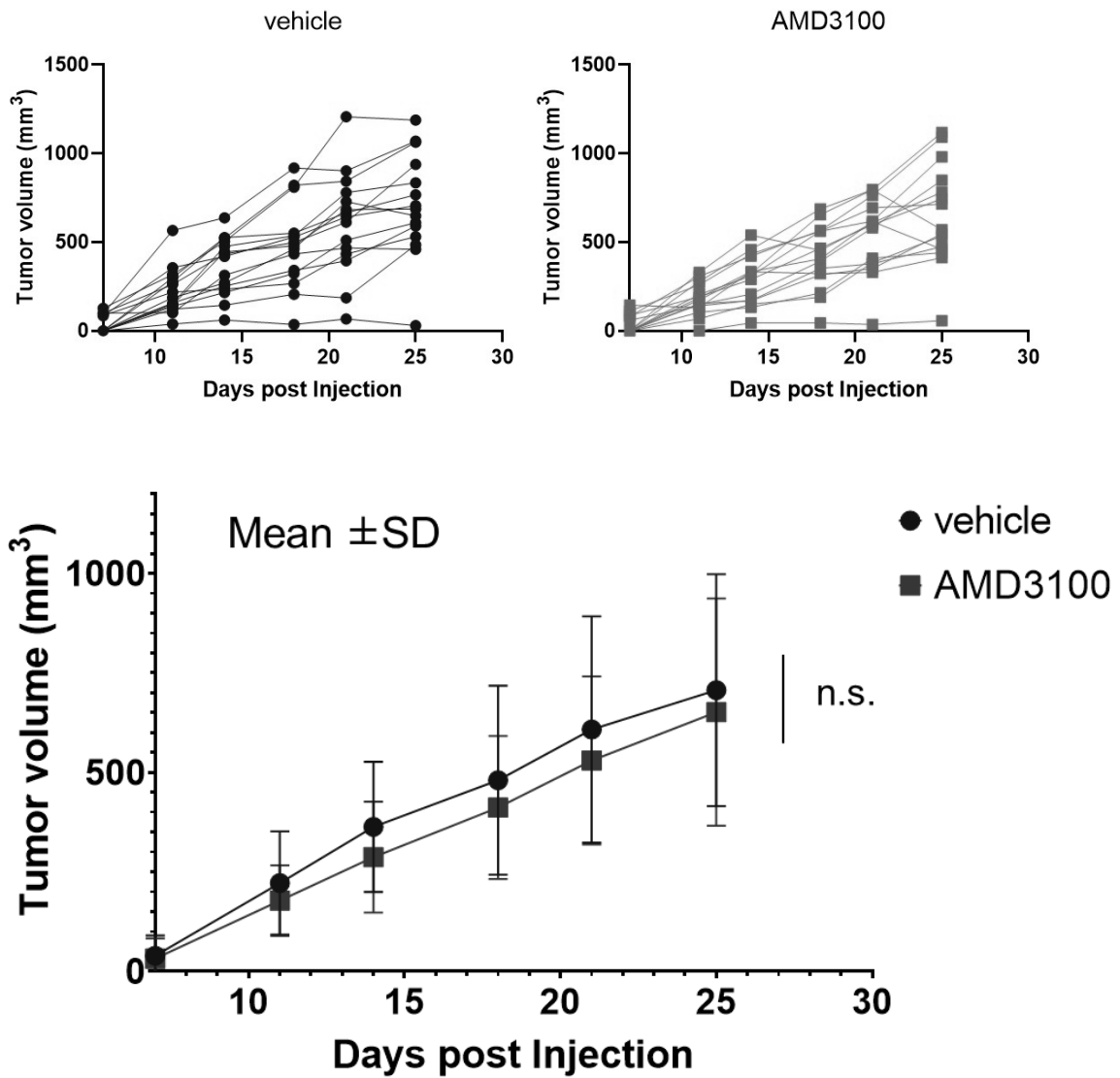


図 27. CXCR4 阻害剤 AMD3100 の抗腫瘍評価

CD44 陽性細胞をヌードマウスに 5×10^4 移植し, 3 日後から週に 5 回 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ AMD3100 を腹腔内投与した. グラフは平均腫瘍体積値 \pm SD を示す.

CD44 陽性細胞の癌幹細胞性質に影響を与えている分子の探索

CXCR4 を含む抗癌剤抵抗性に関わると報告されている遺伝子（ALDH1A1, ALDH3A1, WNT5A）が CD44 陽性細胞の 5-FU 抵抗性に影響を与えているのかを検討した。それぞれの分子をノックダウンした COLO 201 細胞を 2 μ M および 20 μ M の 5-FU で暴露し、3 日後に CD44 陽性細胞率をフローサイトメトリーを用いて測定した。Negative control siRNA をトランスフェクションした COLO 201 の無処理（control）では CD44 細胞陽性率が 18%、2 μ M 5-FU では 31%、20 μ M 5-FU では 52%となり、5-FU の濃度依存的に CD44 陽性細胞が濃縮されることが確認された（図 28）。一方、各遺伝子に対する siRNA をトランスフェクションした COLO 201 細胞を 5-FU で暴露した場合でも、negative control とほぼ同じ CD44 陽性細胞率を示したことから、各遺伝子ノックダウンが CD44 陽性細胞の濃縮率には影響を与えないことが明らかになった。したがって、これらの分子単独では、CD44 陽性細胞の 5-FU 耐性機序に関与している可能性が低いことが示唆された（図 28）。

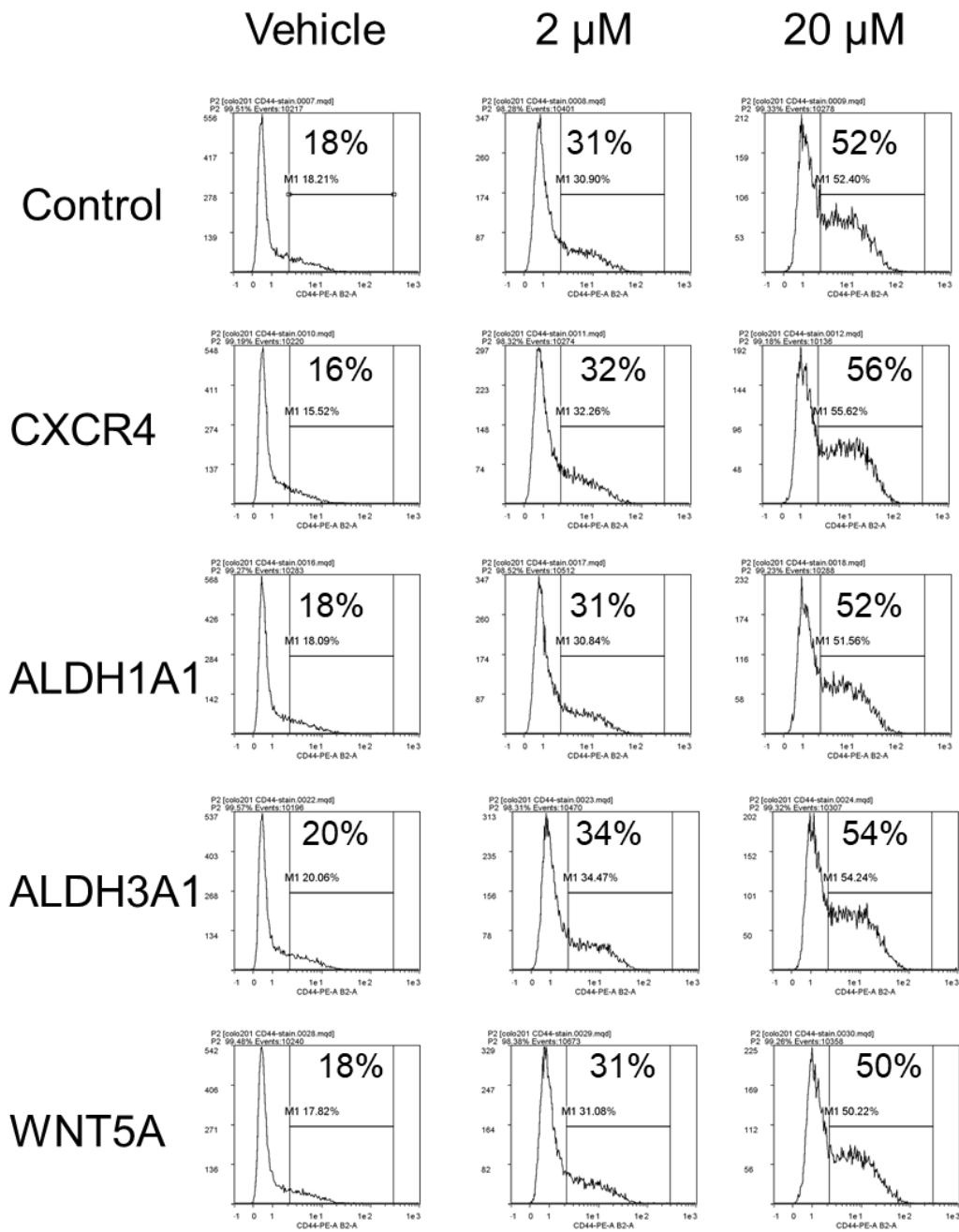


図 28. 各種 siRNA でノックダウンした時の 5-FU 感受性評価

各種 siRNA でノックダウンした COLO 201 細胞を 5-FU で培養し、3 日後にフローサイトメトリーで CD44 陽性細胞の割合を測定した。図表中の数字は CD44 陽性細胞の割合を示す。

次に、CD44 陽性細胞で発現が亢進している分子の腫瘍形成能への関与について検討した。それぞれの分子（negative control, CD44, KIF11, ANXA1, FMOD, GZMA, HBA2, HER2, MUCL1, PLA2G2A）の siRNA を用いて CD44 陽性細胞をエレクトロポレーションし、それぞれの分子をノックダウンした細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍体積をモニタリングした。KIF11 は細胞分裂する際の微小管を形成するために必須分子であることから、腫瘍の増殖抑制を示す陽性コントロールとして使用した（86, 87）。Negative control siRNA をトランスフェクションした腫瘍に比べて、KIF11 siRNA をトランスフェクションした腫瘍は有意に増殖が抑制された。一方、CD44 陽性細胞で亢進していた分子の siRNA をトランスフェクションした腫瘍では、腫瘍の増殖スピードが negative control とほぼ同程度であったことから、これらの分子が腫瘍形成能および、増腫瘍能には関与していない可能性が示唆された。

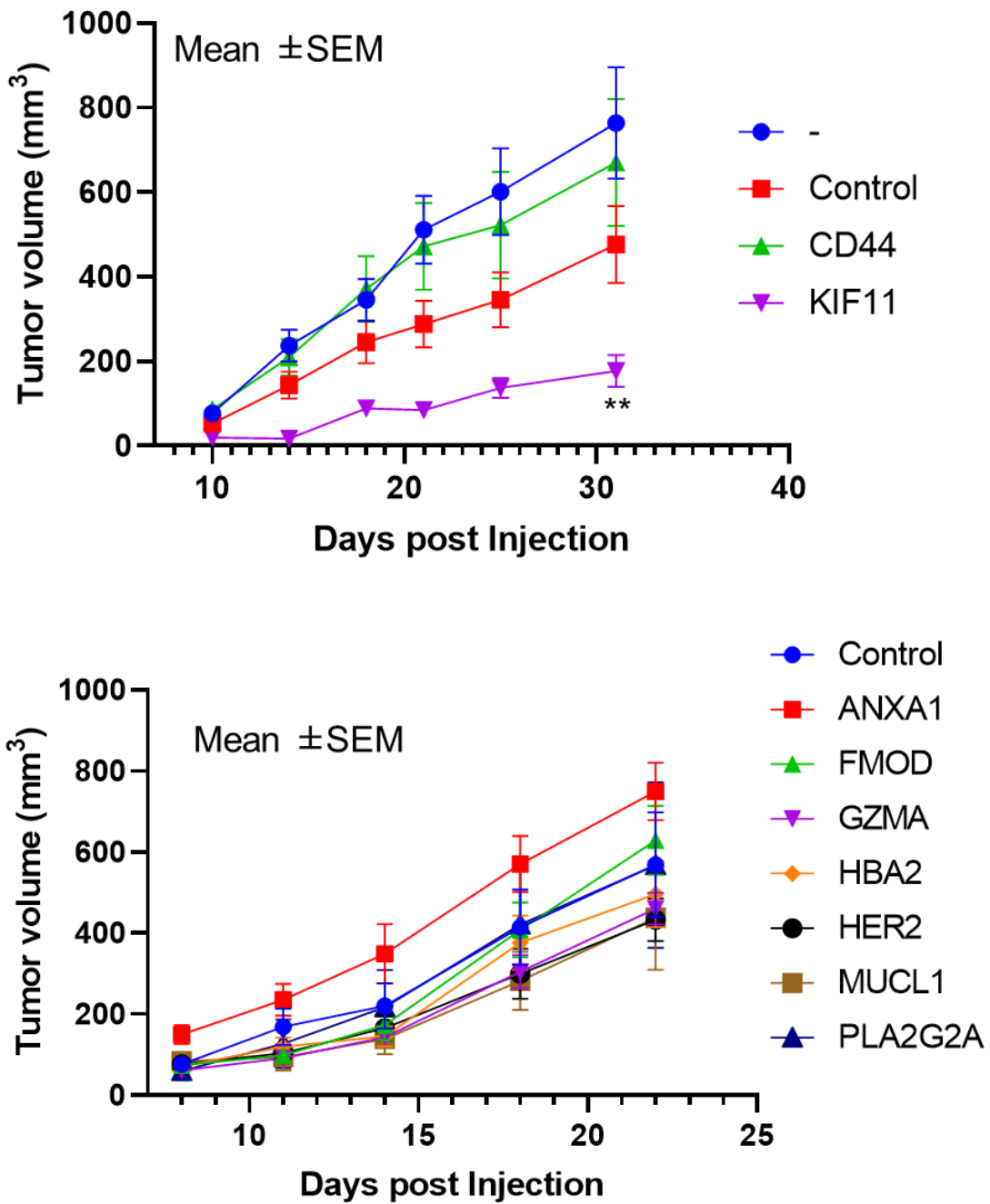


図 29. *In vivo* siRNA スクリーニング

各々の分子の siRNA を用いてノックダウンした CD44 陽性細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍の増殖をモニタリングした。グラフは平均腫瘍体積値 \pm SD を示す。

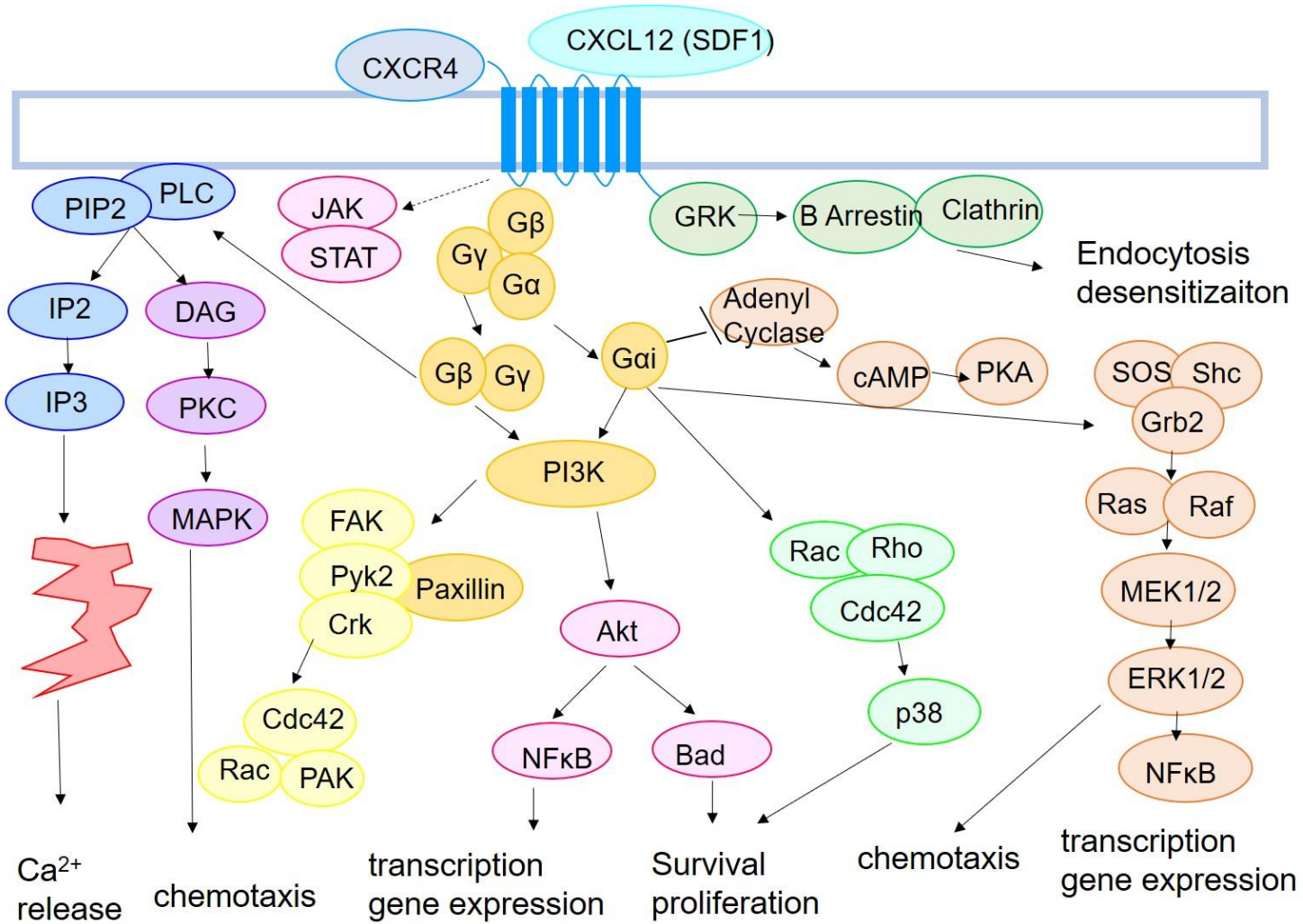


図 30. CXCR4-CXCL12/SDF-1 パスウェイ

考察・展望

先行研究と異なる COLO 201 の CD44 陽性率について

本研究では、COLO 201 細胞の 10–35%が CD44 を細胞表面に発現していたが、先行研究では CD44 陽性細胞は COLO 201 細胞全体の 0.5%程度と報告されており (30) , COLO 201 細胞における CD44 の発現レベルが一致しなかった。本研究で使用した COLO 201 細胞は、ATCC から購入し若い継代数で使用したことや、マイコプラズマ陰性であることを確認しただけでなく、short tandem repeat 解析からも COLO 201 細胞であることが認証された (88, 89) 。細胞の継代を重ねるにつれて遺伝子発現に影響を与えることから、同一細胞名であっても施設間で細胞の性質が異なることが知られている (90, 91) 。また、CD44 は、転写制御、翻訳後修飾、スプライシングといった様々なステップによってコントロールされていることから (92-96) , これらのステップにおける変化が細胞表面上の CD44 の発現レベルに影響を与えていると考察することができる。

癌幹細胞の同定方法における提言

幹細胞性の評価において、*in vitro* におけるコロニー形成能には CD44 陽性細胞と CD44 陰性細胞とでは有意な差がなかった (図 8) 。最近の研究では、コロニー形成能が *in vivo* における幹細胞の頻度と一致しないことや、コロニーのサイズが *in vivo* における幹細胞の数と一致しないことが示されている (30, 39) 。本研究からも癌幹細胞の同定にはコロニー形成能試験ではなく、*in vivo* における腫瘍形成能試験が適切であると提案できる。

CD44 陽性 COLO 201 細胞は癌幹様細胞と結論付けた理由

COLO 201 細胞のスフェア培養によって CD44 陽性細胞は濃縮され、nanog の発現が亢進していることが確認された (図 7) . また, CD44 陽性細胞から形成された腫瘍では, 幹細胞制御分子 (nanog と sox2) の発現が CD44 陰性細胞から形成された腫瘍に比べて発現が高い傾向を示した (図 12) . CD44 陽性細胞は *in vitro* だけでなく *in vivo* でも幹細胞性質を保持していることで, 陰性細胞に比べて高い腫瘍形成能を発揮していると考えられる. さらに, CD44 陽性細胞は *in vitro* において陽性細胞と陰性細胞を効率良く生み出しただけでなく (図 9) , CD44 陽性細胞から形成された腫瘍には CD44 陰性細胞も含んでいたことから (図 10B) , CD44 陽性細胞は *in vivo* においても効率良く陰性細胞を生み出している可能性が示唆された. つまり, CD44 陽性細胞は多分化能と自己複製能を有していることから, *in vivo* において少ない細胞数からでも腫瘍を形成することができ, 高い増腫瘍性を持つと考えられる. したがって, 癌幹細胞の特徴である 幹細胞性, 自己複製能および多分化能を保持していることから, CD44 陽性 COLO 201 細胞を癌幹細胞と結論づけた.

CD44 陽性細胞の抗癌剤耐性能について

In vitro における殺細胞性感受性評価から, CD44 陽性 COLO 201 細胞が 5-FU 治療に対して耐性であることが明らかになった (図 15, 16) . さらに, CD44 陽性細胞は, 親株の COLO 201 細胞から形成された腫瘍でも, 5-FU の他に様々な癌腫で使用されている CBDCA 治療に対しても耐性であった (図 17) . 本研究で使用した COLO 201 細胞は, 先行研究に比べて CD44 陽性細胞を多く含むことから, この薬剤耐性は CD44 陽性細胞に起因することが示唆された. さらに, epidermal growth factor receptor (HER/EGFR/ERBB) family のメンバーである HER2 が, COLO 201 細胞で発現している

(図 5) . 最近では有効な HER2 阻害剤を用いた治療法が確立され、元来予後不良因子であった HER2 の遺伝子増幅が起きている乳癌患者の生存期間は延長された (97-99) . 大腸癌などでも HER2 陽性患者の存在が報告されており、HER2 阻害剤を用いた治療の可能性が検討されている (100-103) . CD44 陽性細胞と陰性細胞との間には HER2 発現に差はなかったが (図 5) , COLO 201 細胞は afatinib, lapatinib あるいは neratinib などの HER2 阻害剤の暴露によって CD44 陽性細胞が濃縮されることが判明した (図 21) . この結果は、CD44 陽性細胞が HER2 阻害剤に対しても感受性が低いことを示唆する。したがって、これらの結果は、CD44 陽性細胞が高い腫瘍形成能だけでなく、抗癌剤耐性といった初代大腸癌幹細胞の特徴を有する悪性度の高い癌細胞であることを強く支持する。

CXCR4 が癌幹細胞性に関与している可能性について

マイクロアレイ解析から、CD44 陽性細胞と CD44 陰性細胞の遺伝子発現パターンが非常によく似ており、Gene Ontology Analysis や Gene Set Enrichment Analysis では機能的な遺伝子アノテーションや遺伝子セットを見出すことができなかった。しかし、癌の悪性化に関与する分子として報告されている CXCR4 (78-82) , ALDH1A1 (76, 104-107) , ALDH3A1 (76, 105, 107) および WNT5A (77, 108-109) の発現が CD44 陽性細胞で亢進していた (図 22) . 特に CXCR4 は、転移、抗癌剤耐性および幹細胞性に関与し、様々な癌腫で予後不良マーカーとして知られている。CXCR4 とリガンドである SDF-1 (CXCL12) の結合は、多彩なシグナル経路を通して、細胞内カルシウム濃度の増加、遺伝子発現、遊走、細胞の生存増殖を引き起こし (78-82) , これらが癌の悪性化に関与すると考えられている (図 30) . 本研究において、COLO 201 細胞では

CXCR4-CXCL12 経路が亢進している証拠を得られなかった。しかし、最近、CXCR4 のリガンドとして MIF (macrophage migration inhibitory factor) が報告されたことや、細胞の種類や環境によって関わっているシグナル経路が大きく異なるなど、CXCR4 の関与を否定することはできない (78, 110, 111) 。興味深いことに、フローサイトメトリー解析から CD44 陽性細胞の約 4% が CXCR4 陽性の細胞であったことや (図 5) , COLO 201 陽性細胞に対して siRNA を用いて CXCR4 をノックダウンしたところ、MUCL1 や PLA2G2A のようなマイクロアレイから見出された複数の上位分子が発現抑制された (図 25) 。異なる配列の CXCR4 siRNA を使用しても同じように上位分子の発現を抑制したことからオフターゲットではないと考えられた。1 つの可能性として、CXCR4 が CD44 陽性細胞と陰性細胞間の遺伝子発現の違いをコントロールすることで、癌幹細胞の性質に関与しているのかもしれない (図 30) 。

メカニズム解析の課題

CD44 陽性細胞において *in vivo* の腫瘍の増腫瘍能に寄与している分子を明らかにするために、CD44 細胞で発現が亢進している上位分子 (CD44, ANXA1, FMOD, GZMA, MUCL1, PLA2G2A) について各々の siRNA を用いてノックダウンを行った細胞を免疫不全マウスに移植し、腫瘍の増腫瘍能を比較したが、増腫瘍性を抑制する分子を見出すことはできなかった (図 29) 。当初、siRNA のトランスフェクション試薬に汎用されるリポフェクション試薬を使用したが無効であったため、エレクトロポレーションに変更して siRNA のノックダウンを行った。しかし、エレクトロポレーション法でも目的遺伝子の発現抑制効率は最大約 80%にとどまり、加えて長期間にわたり分子をノックダウンできなかったことが、原因遺伝子の同定ができなかった理由とも考えられた。siRNA を用いた一時

的なノックダウンではなく、shRNAを用いたノックダウン安定細胞株やCRISPR-Cas9を用いたノックアウト細胞株の樹立も検討したが、CD44陽性細胞は多分化能を有しており、遺伝子操作を用いたクローニングで評価をすることは難しいと判断し、細胞株の樹立を中止した。今後、ノックダウンの効率および持続性を向上させる方法が開発することができれば、CD44陽性細胞の特徴に関与している明確なメカニズムを見出すことができるかもしれない。

化学療法抵抗性メカニズムの考察

CD44陽性細胞で発現が亢進していたALDH1A1、ALDH3A1およびWNT5A1は化学療法抵抗性を導くことが報告されている(76, 77, 104-109)。ALDH1A1やALDH3A1といったアルデヒドデハイドロゲナーゼはレチノイン酸、活性酸素種およびアルデヒドの代謝に関わり、腫瘍増殖や薬剤耐性能の獲得をもたらす(76, 104-107)。一方、WNTシグナリングはFGF、Notch、HedgehogやTGF β /BMPカスケードがクロストークすることで幹細胞性や薬剤耐性能をもたらす(77, 108-109)。しかし、CXCR4に加えてそれぞれのsiRNAを用いて各々ノックダウンしたが、5-FUに対する感受性に変化は認められなかった(図29)。その原因として、ノックダウン効率が80%程度という原因の他に、抗癌剤抵抗性には複数の分子やパスウェイが関わっていることや、一つの分子を阻害しても他の分子が機能を補うという報告があることから(112-114)、これらの分子単独のノックダウンでは、CD44陽性細胞における5-FUに対する感受性には影響を与えなかったと考えられた。今後、ALDH1A1、ALDH3A1、WNT5A1およびCXCR4が5-FU抵抗性に寄与しているかについてより詳細な解析が必要であると考えられる。

CD44 陽性細胞が周辺細胞へ与える影響について

CD44 陰性細胞を移植した腫瘍は増腫瘍能が欠落しているにもかかわらず，CD44 陽性細胞から形成された腫瘍内には CD44 陰性細胞が存在し，細胞増殖マーカーKi-67 が陽性であったことから，陰性細胞も陽性細胞が近位に存在すれば *in vivo* の環境でも生存・増殖できることが示唆された．CD44 陽性細胞が陰性細胞に対して何らかの因子を与えて生存増殖をサポートしている可能性が考えられた．つまり，CD44 陽性細胞を根絶することができれば周辺の CD44 陰性細胞は生存できなくなり，腫瘍組織自体が維持できなくなるので，CD44 陽性細胞を標的にした治療方法を確立する意義は大きいと考えられる．

癌幹細胞を根絶する方法について

CD44 陽性細胞は 5-FU や CBDCA に対しては抵抗性を示したが，他の殺細胞性抗癌剤に対しては感受性を示すことが明らかになった．抗癌剤治療の主流となっている異なるメカニズムの抗癌剤を用いた併用治療によって，CD44 陽性細胞のような癌幹細胞も根絶できる可能性を示唆するものである．CD44 陽性細胞は陰性細胞に比べて PTX に対しては若干であるが感受性が高かった（図 16 B）．現在，大腸癌に対する抗癌剤治療の主流は FOLFOX（OHP，5-FU，leucovorin）や FOLFIRI（CPT-11，5-FU，leucovorin）の 3 剤併用治療であるが（115-118），PTX のようなタキサン系薬剤を加えた治療方法の確立によって，治療効果が改善されることが期待される．

CD44 の機能的な役割について

最近，CD44 陽性細胞は癌幹細胞のマーカーだけでなく，抗癌剤抵抗性や癌の発生にも重要な働きをしていると報告が増えている（119-121）．例えば，HCT-15 細胞にお

いて癌幹細胞の特性を維持するためには、CD44 が EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) 誘導分子 (bmi1, twist, snail) の発現を調節することが重要であると報告されている (27) . *In vitro* の条件下では、COLO 201 細胞ではマイクロアレイ解析から EMT 活性化分子が亢進しているわけではないが、*in vivo* では CD44 が腫瘍の生着、発生に関わっている可能性も考えられる。

本研究の意義と今後の展望

本研究で初めて、COLO 201 細胞には CD44 の発現が明確に分かれる 2 つの細胞集団から構成され、CD44 陰性細胞は増腫瘍性を持たないにも関わらず、CD44 陽性細胞は高い増腫瘍能力を持っていることを見出した。これまでに報告されている他の癌幹細胞モデルに比べて (25, 26) , 本モデルにおける増腫瘍性は明確な差であった。CD44 陽性細胞は *in vitro* および *in vivo* において、幹細胞性や多分化能を保持しており癌幹細胞の特徴を有しているだけでなく、5-FU に対して抵抗性を示したことから、臨床で問題となっている悪性度の高い細胞集団に似た特徴を持っている。今後、このモデルを用いてより詳細な分子メカニズムを解明することができれば、癌幹細胞を標的とした新たな治療方法に開発につながることを期待される。

参考文献

1. Rebecca L. Siegel, Kimberly D, Miller and Ahmedin Jemal: Cancer Statistic, 2019. *CA Cancer J Clin* 69: 7-34, 2019. PMID: 30207593, DOI: 10.3322/caac.21492
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A: Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 68: 394-424, 2018. PMID: 30207593, DOI: 10.3322/caac.21492
3. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414: 105-111, 2001. PMID: 11689955, DOI: 10.1038/35102167
4. Beck B and Blanpain C: Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer* 13(10):727-38, 2013. PMID: 24060864, DOI: 10.1038/nrc3597
5. Visvader JE and Lindeman GJ: Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8(10):755-68, 2008. PMID: 18784658, DOI: 10.1038/nrc2499
6. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD and Rich JN: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444(7120): 756–760, 2006. PMID: 17051156, DOI: 10.1038/nature05236
7. Prieto-Vila M, Takahashi RU, Usuba W, Kohama I and Ochiya T: Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci* 18(12), 2017. PMID: 29194401, PMCID: PMC5751177, DOI: 10.3390/ijms18122574
8. Phi LTH, Sari IN, Yang YG, Lee SH, Jun N, Kim KS, Lee YK and Kwon HY: Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. *Stem Cells Int* 2018:5416923, 2018. PMID: 29681949, PMCID: PMC5850899, DOI: 10.1155/2018/5416923
9. Keshet GI, Goldstein I, Itzhaki O, Cesarkas K, Shenhav L, Yakirevitch A, Treves AJ, Schachter J, Amariglio N and Rechavi G: MDR1 expression identifies human melanoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 368: 930-936, 2008. PMID: 18279661 DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.02.022
10. Yang T, Rycaj K, Liu ZM and Tang DG: Cancer stem cells: constantly evolving and

- functionally heterogeneous therapeutic targets. *Cancer Res* 74(11):2922-2927, 2014. PMID: 24713433, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0266
11. Bonnet D and Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3(7): 730-737, 1997. PMID: 9212098
 12. Blair A, Hogge DE and Sutherland HJ: Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo have the phenotype CD34(+)/CD71(-)/HLA-DR-. *Blood* 92(11):4325-35, 1998. PMID: 9834239
 13. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 3983-3988, 2003. PMID: 12629218, DOI: 10.1073/pnas.0530291100
 14. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA and Daidone MG: Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65(13):5506-11, 2005. PMID: 15994920, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0626
 15. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH and Nephew KP: Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 68(11):4311-4320, 2008. PMID: 18519691, PMCID: PMC2553722, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0364
 16. Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z: Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncol Rep* 22(5):1129-34, 2009. PMID: 19787230, DOI: 10.3892/or_00000545
 17. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF and Simeone DM: Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67(3):1030-7, 2007. PMID: 17283135, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2030
 18. Huang P, Wang CY, Gou SM, Wu HS, Liu T and Xiong JX: Isolation and biological analysis of tumor stem cells from pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 14(24):3903-7, 2008. PMID: 18609717, PMCID: PMC2721450, DOI: 10.3748/wjg.14.3903
 19. Dawood S, Austin L and Cristofanilli M: Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncology (Williston Park)* 28(12): 1101-1107, 2014. PMID: 25510809

20. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C and De Maria R: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445(7123): 111-115, 2006. PMID: 17122771, DOI: 10.1038/nature05384
21. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S and Dick JE: A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 4;445(7123):106-10, 2007. PMID: 17122772, DOI: 10.1038/nature05372
22. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C and Clarke MF: Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10158-10163, 2007. PMID: 17548814, DOI: 10.1073/pnas.0703478104
23. Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ and Clevers H: Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature* 449(7165):1003-1007, 2007. PMID: 17934449, DOI: 10.1038/nature06196
24. Weiswald LB, Bellet D and Dangles-Marie V: Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 17(1): 1-15, 2015. PMID: 25622895, DOI: 10.1016/j.neo.2014.12.004
25. Chiodi I, Belgiovine C, Donà F, Scovassi AI and Mondello C: Drug treatment of cancer cell lines: a way to select for cancer stem cells? *Cancers(Basel)* 4;3(1): 1111-1128, 2011. PMID: 24212655, DOI: 10.3390/cancers3011111
26. Zhou JY, Chen M, Ma L, Wang X, Chen YG and Liu SL: Role of CD44(high)/CD133(high) HCT-116 cells in the tumorigenesis of colon cancer. *Oncotarget*. 7(7): 7657-7666, 2016. PMID: 26840024, DOI: 10.18632/oncotarget.7084
27. Munakata K, Uemura M, Tanaka S, Kawai K, Kitahara T, Miyo M, Kano Y, Nishikawa S, Fukusumi T, Takahashi Y, Hata T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikenaga M, Kato T, Murata K, Carethers JM, Yamamoto H, Doki Y and Mori M: Cancer Stem-like Properties in Colorectal Cancer Cells with Low Proteasome Activity. *Clin Cancer Res* 22(21):5277-5286, 2016. PMID: 27166395, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1945
28. Ju SY, Chiou SH and Su Y: Maintenance of the stemness in CD44(+) HCT-15 and HCT-116 human colon cancer cells requires miR-203 suppression. *Stem Cell Res*

- 12(1):86-100, 2014. PMID: 24145190, DOI: 10.1016/j.scr.2013.09.011
29. Ieta K, Tanaka F, Haraguchi N, Kita Y, Sakashita H, Mimori K, Matsumoto T, Inoue H, Kuwano H and Mori M: Biological and genetic characteristics of tumor-initiating cells in colon cancer. *Ann Surg Oncol* 15(2):638-48, 2008. PMID: 17932721, DOI: 10.1245/s10434-007-9605-3
 30. Muraro MG, Mele V, Däster S, Han J, Heberer M, Cesare Spagnoli G and Iezzi G: CD133+, CD166+CD44+, and CD24+CD44+ phenotypes fail to reliably identify cell populations with cancer stem cell functional features in established human colorectal cancer cell lines. *Stem Cells Transl Med* 1(8):592-603, 2012. PMID: 23197865, DOI: 10.5966/sctm.2012-0003
 31. Wang C, Xie J, Guo J, Manning HC, Gore JC and Guo N: Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncol Rep* 28(4):1301-8. 2012. PMID: 22895640 PMCID: PMC3981033 DOI: 10.3892/or.2012.1951
 32. Bertotti A, Migliardi G, Galimi F, Sassi F, Torti D, Isella C, Corà D, Di Nicolantonio F, Buscarino M, Petti C, Ribero D, Russolillo N, Muratore A, Massucco P, Pisacane A, Molinaro L, Valtorta E, Sartore-Bianchi A, Risio M, Capussotti L, Gambacorta M, Siena S, Medico E, Sapino A, Marsoni S, Comoglio PM, Bardelli A and Trusolino L: A molecularly annotated platform of patient-derived xenografts ("xenopatients") identifies HER2 as an effective therapeutic target in cetuximab-resistant colorectal cancer. *Cancer Discov* 1(6):508-23, 2011. PMID: 22586653, DOI: 10.1158/2159-8290.CD-11-0109
 33. Richman SD1, Southward K1, Chambers P1, Cross D2, Barrett J3, Hemmings G1, Taylor M1, Wood H, Hutchins G, Foster JM, Oumie A, Spink KG, Brown SR, Jones M, Kerr D, Handley K, Gray R, Seymour M and Quirke P: HER2 overexpression and amplification as a potential therapeutic target in colorectal cancer: analysis of 3256 patients enrolled in the QUASAR, FOCUS and PICCOLO colorectal cancer trials. *J Pathol* 238(4):562-70, 2016. PMID: 26690310, PMCID: PMC4785607, DOI: 10.1002/path.4679
 34. Jaggupilli A and Elkord E: Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol* 2012:708036, 2012. PMID: 22693526, PMCID: PMC3369436, DOI: 10.1155/2012/708036
 35. Wu W, Cao J, Ji Z, Wang J, Jiang T and Ding H: Co-expression of Lgr5 and

- CXCR4 characterizes cancer stem-like cells of colorectal cancer. *Oncotarget* 6;7(49):81144-81155. 2016. PMID: 27835894, PMCID: PMC5348382, DOI: 10.18632/oncotarget.13214
36. Zhang SS, Han ZP, Jing YY, Tao SF, Li TJ, Wang H, Wang Y, Li R, Yang Y, Zhao X, Xu XD, Yu ED, Rui YC, Liu HJ, Zhang L and Wei LX: CD133(+)CXCR4(+) colon cancer cells exhibit metastatic potential and predict poor prognosis of patients. *BMC Med* 7;10:85, 2012. PMID: 22871210, PMCID: PMC3424958, DOI: 10.1186/1741-7015-10-85
37. Lim YC, Oh SY, Cha YY, Kim SH, Jin X and Kim H: Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 47(2):83-91, 2011. PMID: 21167769, DOI: 10.1016/j.oraloncology.2010.11.011
38. Fan X, Liu S, Su F, Pan Q and Lin T: Effective enrichment of prostate cancer stem cells from spheres in a suspension culture system. *Urol Oncol* 30(3):314-8, 2012. PMID: 20843707, DOI: 10.1016/j.urolonc.2010.03.019
39. Pastrana E, Silva-Vargas V and Doetsch F: Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8(5):486-498, 2011. PMID: 21549325, DOI: 10.1016/j.stem.2011.04.007
40. Torres-Padilla ME and Chambers I: Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage. *Development* 141(11):2173-81, 2014. PMID: 24866112, DOI: 10.1242/dev.102624
41. Pan G and Thomson JA: Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 17(1):42-9, 2007. PMID: 17211451, DOI: 10.1038/sj.cr.7310125
42. Jeter CR, Yang T, Wang J, Chao HP, Tang DG: Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. *Stem Cells* 33(8):2381-90, 2015. PMID: 25821200, PMCID: PMC4509798, DOI: 10.1002/stem.2007
43. Ahmed S, Gan HT, Lam CS, Poonepalli A, Ramasamy S, Tay Y, Tham M, Yu YH: Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. *Cell Adh Migr* 3(4):412-24, 2009. PMID: 19535895, PMCID: PMC2802757, DOI: 10.4161/cam.3.4.8803

44. Takeda K, Mizushima T, Yokoyama Y, Hirose H, Wu X, Qian Y, Ikehata K, Miyoshi N, Takahashi H, Haraguchi N, Hata T, Matsuda C, Doki Y, Mori M, Yamamoto H: Sox2 is associated with cancer stem-like properties in colorectal cancer. *Sci Rep* 5;8(1):17639, 2018. PMID: 30518951, PMCID: PMC6281572, DOI: 10.1038/s41598-018-36251-0
45. Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, Delatte B, Caauwe A, Lenglez S, Nkusi E, Brohée S, Salmon I, Dubois C, del Marmol V, Fuks F and Beck B, Blanpain C: SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature* 10;511(7508):246-50, 2014. PMID: 24909994, DOI: 10.1038/nature13305
46. Sarkar A and Hochedlinger K: The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* 3;12(1):15-30, 2013. PMID: 23290134, PMCID: PMC3608206, DOI: 10.1016/j.stem.2012.12.007
47. Nagahama Y, Ueno M, Miyamoto S, Morii E, Minami T, Mochizuki N, Saya H and Takakura N: PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. *Cancer Res* 1;70(3):1215-24, 2010. PMID: 20103637, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3662
48. Kimura T, Cui D, Kawano H, Yoshitomi-Sakamoto C, Takakura N, Ikeda E: Induced expression of GINS complex is an essential step for reactivation of quiescent stem-like tumor cells within the peri-necrotic niche in human glioblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 145(2):363-371, 2019. PMID: 30465075, PMCID: PMC6373247, DOI: 10.1007/s00432-018-2797-z
49. Gerdes JI: Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1(3):199-206, 1990. PMID: 2103495
50. Starborg M, Gell K, Brundell E, Höög C: The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 109 (Pt 1):143-53, 1996. PMID: 8834799
51. Sun X, Kaufman PD: Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* 127(2):175-186, 2018. PMID: 29322240, PMCID: PMC5945335, DOI: 10.1007/s00412-018-0659-8

52. Cidado J, Wong HY, Rosen DM, Cimino-Mathews A, Garay JP, Fessler AG, Rasheed ZA, Hicks J, Cochran RL, Croessmann S, Zabransky DJ, Mohseni M, Beaver JA, Chu D, Cravero K, Christenson ES, Medford A, Mattox A, De Marzo AM, Argani P, Chawla A, Hurley PJ, Lauring J, Park BH: Ki-67 is required for maintenance of cancer stem cells but not cell proliferation. *Oncotarget* 2;7(5):6281-93, 2016. PMID: 26823390, PMCID: PMC4868756, DOI: 10.18632/oncotarget.7057
53. Spencer CM and Faulds D: Paclitaxel. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer. *Drugs* 48(5):794-847, 1994. PMID: 7530632, DOI: 10.2165/00003495-199448050-00009
54. Wagstaff AJ, Ward A, Benfield P and Heel RC: Carboplatin. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the treatment of cancer. *Drugs* 37(2):162-90, 1989. PMID: 2649354, DOI: 10.2165/00003495-198937020-00005
55. Go RS and Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol* 17(1):409-22, 1999. PMID: 10458260 DOI: 10.1200/JCO.1999.17.1.409
56. Longley DB, Harkin DP and Johnston PG: 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3(5):330-8, 2003. PMID: 12724731, DOI: 10.1038/nrc1074
57. Noble S and Goa KL. Gemcitabine. A review of its pharmacology and clinical potential in non-small cell lung cancer and pancreatic cancer. *Drugs* 54(3):447-72, 1997. PMID: 9279506, DOI: 10.2165/00003495-199754030-00009
58. Crooke ST and Bradner WT: Mitomycin C: a review. *Cancer Treat Rev* 3(3):121-39. 1976. PMID: 786455
59. Wiseman LR and Markham A. Irinotecan. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the management of advanced colorectal cancer. *Drugs* 52(4):606-23, 1996. PMID: 8891470, DOI: 10.2165/00003495-199652040-00013
60. Iyer R and Bharthuar A. A review of erlotinib--an oral, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Expert Opin Pharmacother* 11(2):311-20.

2010. PMID: 20088749, DOI: 10.1517/14656560903551283
61. Culy CR and Faulds D: Gefitinib. *Drugs* 62(15):2237-48; discussion 2249-50, 2002. PMID: 12381224 DOI: 10.2165/00003495-200262150-00008
 62. Zhao C, Han SY and Li PP: Pharmacokinetics of Gefitinib: Roles of Drug Metabolizing Enzymes and Transporters. *Curr Drug Deliv* 14(2):282-288, 2017. PMID: 27396387 DOI: 10.2174/1567201813666160709021605
 63. Solca F, Dahl G, Zoepfel A, Bader G, Sanderson M, Klein C, Kraemer O, Himmelsbach F, Haaksma E, Adolf GR: Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther* 343(2):342-50, 2012. PMID: 22888144, DOI: 10.1124/jpet.112.197756
 64. Wind S, Schnell D, Ebner T, Freiwald M and Stopfer P: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Afatinib. *Clin Pharmacokinet* 56(3):235-250, 2017. PMID: 27470518, PMCID: PMC5315738, DOI: 10.1007/s40262-016-0440-1
 65. Gurk-Turner C, Manitpisitkul W and Cooper M: A comprehensive review of everolimus clinical reports: a new mammalian target of rapamycin inhibitor. *Transplantation* 94(7):659-68, 2012. PMID: 22986894, DOI: 10.1097/TP.0b013e31825b411c
 66. Hasskarl J: Everolimus. *Recent Results Cancer Res* 201:373-92, 2014. PMID: 24756805, DOI: 10.1007/978-3-642-54490-3_23
 67. McKeage K and Perry CM: Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs* 62(1):209-43, 2002. PMID: 11790161, DOI: 10.2165/00003495-200262010-00008
 68. Dhillon S: Trastuzumab emtansine: a review of its use in patients with HER2-positive advanced breast cancer previously treated with trastuzumab-based therapy. *Drugs* 74(6):675-86, 2014. PMID: 24659374, DOI: 10.1007/s40265-014-0201-0
 69. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh DY, Diéras V, Guardino E, Fang L, Lu MW, Olsen S and Blackwell K; EMILIA Study Group: Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 367(19):1783-91, 2012. PMID: 23020162 PMCID: PMC5125250, DOI: 10.1056/NEJMoa1209124
 70. McCormack PL: Pertuzumab: a review of its use for first-line combination

- treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. *Drugs* 73(13):1491-502, 2013. PMID: 23982598, DOI: 10.1007/s40265-013-0109-0
71. Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM and Sliwkowski MX: Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell* 5(4):317-28, 2004. PMID: 15093539
 72. Rabindran SK, Discafani CM, Rosfjord EC, Baxter M, Floyd MB, Golas J, Hallett WA, Johnson BD, Nilakantan R, Overbeek E, Reich MF, Shen R, Shi X, Tsou HR, Wang YF and Wissner A: Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res* 64(11):3958-65, 2004. PMID: 15173008 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2868
 73. Kourie HR, Chaix M, Gombos A, Aftimos P and Awada A: Pharmacodynamics, pharmacokinetics and clinical efficacy of neratinib in HER2-positive breast cancer and breast cancer with HER2 mutations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 12(8):947-57, 2016. PMID: 27284682, DOI: 10.1080/17425255.2016.1198317
 74. Cameron D, Casey M, Press M, Lindquist D, Pienkowski T, Romieu CG, Chan S, Jagiello-Gruszfeld A, Kaufman B, Crown J, Chan A, Campone M, Viens P, Davidson N, Gorbounova V, Raats JI, Skarlos D, Newstat B, Roychowdhury D, Paoletti P, Oliva C, Rubin S, Stein S and Geyer CE. *Breast Cancer Res Treat* 112(3):533-43. 2008. PMID: 18188694 DOI: 10.1007/s10549-007-9885-0
 75. Ryan Q, Ibrahim A, Cohen MH, Johnson J, Ko CW, Sridhara R, Justice R and Pazdur R: FDA drug approval summary: lapatinib in combination with capecitabine for previously treated metastatic breast cancer that overexpresses HER-2. *Oncologist* 13(10):1114-9, 2008. PMID: 18849320, DOI: 10.1634/theoncologist.2008-0816
 76. Januchowski R, Wojtowicz K and Zabel M: The role of aldehyde dehydrogenase (ALDH) in cancer drug resistance. *Biomed Pharmacother* 67(7):669-680, 2013. PMID: 23721823, DOI: 10.1016/j.biopha.2013.04.005
 77. Asem MS, Buechler S, Wates RB, Miller DL and Stack MS: Wnt5a Signaling in Cancer. *Cancers (Basel)* 26;8(9), 2016. PMID: 27571105, DOI: 10.3390/cancers8090079
 78. Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG and Walenkamp AM: A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no

- place to hide. *Eur J Cancer* 49(1):219-230, 2013. PMID: 22683307, DOI: 10.1016/j.ejca.2012.05.005
79. Tu Z, Xie S, Xiong M, Liu Y, Yang X, Tembo KM, Huang J, Hu W, Huang X, Pan S, Liu P, Altaf E, Kang G, Xiong J and Zhang Q: CXCR4 is involved in CD133-induced EMT in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol* 50(2):505-514, 2017. PMID: 28000861, DOI: 10.3892/ijo.2016.3812
80. Murakami T1, Kawada K, Iwamoto M, Akagami M, Hida K, Nakanishi Y, Kanda K, Kawada M, Seno H, Taketo MM and Sakai Y: The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis: *Int J Cancer* 132(2):276-87, 2013. PMID: 22689289, DOI: 10.1002/ijc.27670
81. Wang X, Cao Y, Zhang S, Chen Z, Fan L, Shen X, Zhou S and Chen D: Stem cell autocrine CXCL12/CXCR4 stimulates invasion and metastasis of esophageal cancer. *Oncotarget* 8(22):36149-36160, 2017. PMID: 28193907, DOI: 10.18632/oncotarget.15254
82. Busillo JM1 and Benovic JL: Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768(4):952-63, 2007. PMID: 17169327, PMCID: PMC1952230, DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.11.002
83. Cho KS1, Yoon SJ, Lee JY, Cho NH, Choi YD, Song YS and Hong SJ: Inhibition of tumor growth and histopathological changes following treatment with a chemokine receptor CXCR4 antagonist in a prostate cancer xenograft model. *Oncol Lett* 6(4):933-938, 2013. PMID: 24137439 PMCID: PMC3796427 DOI: 10.3892/ol.2013.1515
84. Zhou KX, Xie LH, Peng X, Guo QM, Wu QY, Wang WH, Zhang GL, Wu JF, Zhang GJ and Du CW: CXCR4 antagonist AMD3100 enhances the response of MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells to ionizing radiation. *Cancer Lett* 1;418:196-203, 2018. PMID: 29317253 DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.009
85. Jung YH, Lee DY, Cha W, Kim BH, Sung MW, Kim KH and Ahn SH: Antitumor effect of CXCR4 antagonist AMD3100 on the tumorigenic cell line of BHP10-3 papillary thyroid cancer cells. *Head Neck* 38(10):1479-86, 2016. PMID: 27061747, DOI: 10.1002/hed.24461
86. Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL and Mitchison TJ: Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a

- phenotype-based screen. *Science* 286(5441):971-4, 1999. PMID: 10542155, DOI: 10.1126/science.286.5441.971
87. Sawin KE, LeGuellec K, Philippe M and Mitchison TJ: Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* 359(6395):540-3, 1992. PMID: 1406972, DOI: 10.1038/359540a0
88. Nims RW, Sykes G, Cottrill K, Ikonomi P and Elmore E: Short tandem repeat profiling: part of an overall strategy for reducing the frequency of cell misidentification. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46(10):811-9, 2010. PMID: 20927602, PMCID: PMC2995877, DOI: 10.1007/s11626-010-9352-9
89. Barallon R, Bauer SR, Butler J, Capes-Davis A, Dirks WG, Elmore E, Furtado M, Kline MC, Kohara A, Los GV, MacLeod RA, Masters JR, Nardone M, Nardone RM, Nims RW, Price PJ, Reid YA, Shewale J, Sykes G, Steuer AF, Storts DR, Thomson J, Taraporewala Z, Alston-Roberts C and Kerrigan L. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46(9):727-32, 2010. PMID: 20614197, PMCID: PMC2965362, DOI: 10.1007/s11626-010-9333-z
90. Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H and Gelber C: The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques* 43(5):575, 577-578, 581-582, 2007. PMID: 18072586, DOI: 10.2144/000112598
91. Chang-Liu CM and Woloschak GE: Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Lett* 113(1-2):77-86, 1997. PMID: 9065805
92. Chen C, Zhao S, Karnad A and Freeman JW: The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *J Hematol Oncol* 11(1):64, 2008. PMID: 29747682, DOI: 10.1186/s13045-018-0605-5
93. Smith SM, Lyu YL and Cai L: NF- κ B affects proliferation and invasiveness of breast cancer cells by regulating CD44 expression. *PLoS One* 3;9(9):e106966, 2014. PMID: 25184276, PMCID: PMC4153718, DOI: 10.1371/journal.pone.0106966
94. Tiwari N, Meyer-Schaller N, Arnold P, Antoniadis H, Pachkov M, van Nimwegen E and Christofori G: Klf4 is a transcriptional regulator of genes critical for EMT, including Jnk1 (Mapk8). *PLoS One* 8(2):e57329, 2013. PMID: 23451207, PMCID:

PMC3581489, DOI: 10.1371/journal.pone.0057329

95. Lou W, Krill D, Dhir R, Becich MJ, Dong JT, Frierson HF Jr, Isaacs WB, Isaacs JT and Gao AC. Methylation of the CD44 metastasis suppressor gene in human prostate cancer. *Cancer Res* 15;59(10):2329-31, 1999. PMID: 10344738
96. Todaro M, Gaggianesi M, Catalano V, Benfante A, Iovino F, Biffoni M, Apuzzo T, Sperduti I, Volpe S, Cocorullo G, Gulotta G, Dieli F, De Maria R and Stassi G: CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell* 6;14(3):342-56, 2014. PMID: 24607406 DOI: 10.1016/j.stem.2014.01.009
97. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A and McGuire WL: Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 9;235(4785):177-82, 1987. PMID: 3798106, DOI: 10.1126/science.3798106
98. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ and Press M: Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1;20(3):719-26, 2002. PMID: 11821453, DOI: 10.1200/JCO.2002.20.3.719
99. Welslau M, Diéras V, Sohn JH, Hurvitz SA, Lalla D, Fang L, Althaus B, Guardino E and Miles D: Patient-reported outcomes from EMILIA, a randomized phase 3 study of trastuzumab emtansine (T-DM1) versus capecitabine and lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Cancer* 1;120(5):642-51, 2014. PMID: 24222194, DOI: 10.1002/cncr.28465
100. Jørgensen JT and Hersom M. HER2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer - A Systematic Analysis of Data from the Literature: *J Cancer* 3:137-44. 2012. PMID: 22481979, PMCID: PMC3319979, DOI: 10.7150/jca.4090
101. Boku N: HER2-positive gastric cancer. *Gastric Cancer* 17(1):1-12, 2014. PMID: 23563986, PMCID: PMC3889288, DOI: 10.1007/s10120-013-0252-z
102. Siena S, Sartore-Bianchi A, Marsoni S, Hurwitz HI, McCall SJ, Penault-Llorca F, Srock S, Bardelli A and Trusolino L: Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene in colorectal cancer. *Ann Oncol* 1;29(5):1108-1119,

2018. PMID: 29659677, PMCID: PMC5961091, DOI: 10.1093/annonc/mdy100
- 103.Greally M, Kelly CM and Cercek A: HER2: An emerging target in colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 42(6):560-571, 2018. PMID: 30100092, DOI: 10.1016/j.currprobcancer.2018.07.001
- 104.Tomita H, Tanaka K, Tanaka T and Hara A: Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 8;7(10):11018-32, 2016. PMID: 26783961, PMCID: PMC4905455, DOI: 10.18632/oncotarget.6920
- 105.Hilton J: Role of aldehyde dehydrogenase in cyclophosphamide-resistant L1210 leukemia. *Cancer Res* 44(11):5156-60, 1984. PMID: 6488175
- 106.Xu X, Chai S, Wang P, Zhang C, Yang Y, Yang Y and Wang K: Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Lett* 1;369(1):50-7, 2015. PMID: 26319899, DOI: 10.1016/j.canlet.2015.08.018
- 107.Kim J, Shin JH, Chen CH, Cruz L, Farnebo L, Yang J, Borges P, Kang G, Mochly-Rosen D and Sunwoo JB1: Targeting aldehyde dehydrogenase activity in head and neck squamous cell carcinoma with a novel small molecule inhibitor. *Oncotarget* 10;8(32):52345-52356, 2017. PMID: 28881734, PMCID: PMC5581033, DOI: 10.18632/oncotarget.17017
- 108.Zhou Y, Kipps TJ and Zhang S: Wnt5a Signaling in Normal and Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int* 2017:5295286, 2017. PMID: 28491097, PMCID: PMC5405594, DOI: 10.1155/2017/5295286
- 109.Anastas JN, Kulikauskas RM, Tamir T, Rizos H, Long GV, von Euw EM, Yang PT, Chen HW, Haydu L, Toroni RA, Lucero OM, Chien AJ and Moon RT: WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *J Clin Invest* 124(7):2877-90, 2014. PMID: 24865425, PMCID: PMC4071371, DOI: 10.1172/JCI70156
- 110.Lourenco S, Teixeira VH, Kalber T, Jose RJ, Floto RA and Janes SM: Macrophage migration inhibitory factor-CXCR4 is the dominant chemotactic axis in human mesenchymal stem cell recruitment to tumors. *J Immunol* 194(7):3463-74, 2015. PMID: 25712213, PMCID: PMC4374168, DOI: 10.4049/jimmunol.1402097
- 111.Tomiyasu M, Yoshino I, Suemitsu R, Okamoto T and Sugimachi K: Quantification of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *Clin Cancer Res* 8(12):3755-60, 2002.

PMID: 12473586

112. Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M and Stainier DY: Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 13;524(7564):230-3, 2015. PMID: 26168398, DOI: 10.1038/nature14580
113. El-Brolosy MA and Stainier DYR: Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet* 13;13(7):e1006780, 2017. PMID: 28704371, PMCID: PMC5509088, DOI: 10.1371/journal.pgen.1006780
114. Yoon YK, Kim HP, Han SW, Hur HS, Oh DY, Im SA, Bang YJ and Kim TY: Combination of EGFR and MEK1/2 inhibitor shows synergistic effects by suppressing EGFR/HER3-dependent AKT activation in human gastric cancer cells. *Mol Cancer Ther* 8(9):2526-36, 2009. PMID: 19755509, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0300
115. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I and de Gramont A: Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350(23):2343-51, 2004. PMID: 15175436, DOI: 10.1056/NEJMoa032709
116. André T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F and de Gramont A: Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 27(19):3109-16, 2009. PMID: 19451431, DOI: 10.1200/JCO.2008.20.6771
117. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, Topham C, Tabernero J, André T, Sobrero AF, Mini E, Greil R, Di Costanzo F, Collette L, Cisar L, Zhang X, Khayat D, Bokemeyer C, Roth AD and Cunningham D: Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol* 27(19):3117-25, 2009. PMID: 19451425, DOI: 10.1200/JCO.2008.21.6663
118. Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll HJ, Tveit KM and Gibson F: A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 14(1):1-10, 2015. PMID:

25579803, DOI: 10.1016/j.clcc.2014.11.002

119. Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y and Chen Q. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 14(21):6751-60, 2008. PMID: 18980968, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1034
120. 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 and Yang J, Weinberg RA: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133(4):704-15, 2008. PMID: 18485877 PMCID: PMC2728032 DOI: 10.1016/j.cell.2008.03.027
121. Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR and Ghatak S: Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J* 278(9):1429-43, 2011. PMID: 21362138, PMCID: PMC3166356, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x

謝辞

本研究は九州大学薬学研究院細胞生物薬学分野教室で行ったものであります。本研究を遂行するにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました田中嘉孝 教授に、ここにおいて深甚なる謝意を表します。この 4 年間の経験は製薬会社で働く身として、新薬の開発研究に活用していく所存です。

本研究の遂行にあたり、日頃より有益な御討論と御助言を賜りました塩野義製薬株式会社 野上涉 博士、佐藤勇次 博士および、十名由美 博士に心より感謝いたします。

最後に、本論文の作成の機会をいただき、御指導と御鞭撻を賜りました塩野義製薬株式会社 田中秀和 博士および、桑原憲司 博士に心から感謝いたします。