



Title	チロシンキナーゼ阻害薬を用いた食道扁平上皮癌がん幹細胞を標的とした治療法の開発
Author(s)	佐藤, 史幸
Description	配架番号 : 2209
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12105号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12105
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61629
Type	doctoral thesis
File Information	Fumiyuki_Sato.pdf



学 位 論 文

チロシンキナーゼ阻害薬を用いた食道扁平上皮癌
がん幹細胞を標的とした治療法の開発
(Development of treatment against cancer stem-like cells in
esophageal squamous cell carcinoma
by tyrosine kinase inhibitors)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

佐藤 史幸

学 位 論 文

チロシンキナーゼ阻害薬を用いた食道扁平上皮癌

がん幹細胞を標的とした治療法の開発

(Development of treatment against cancer stem-like cells in
esophageal squamous cell carcinoma
by tyrosine kinase inhibitors)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

佐藤 史幸

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	15 頁
実験方法	16 頁
実験結果	28 頁
考察	47 頁
総括	50 頁
謝辞	51 頁
引用文献	52 頁

発表論文目録および学会発表目録

行った研究の一部は以下の論文に発表した

1. Fumiyuki Sato, Yoshimasa Kubota, Mitsuteru Natsuizaka, Osamu Maehara, Yutaka Hatanaka, Katsuji Marukawa, Katsumi Terashita, Goki Suda, Shunsuke Ohnishi, Yuichi Shimizu, Yoshito Komatsu, Shinya Ohashi, Shingo Kagawa, Hideaki Kinugasa, Kelly A Whelan, Hiroshi Nakagawa & Naoya Sakamoto

EGFR inhibitors prevent induction of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma by suppressing epithelial-mesenchymal transition

Cancer Biology & Therapy 16:933-940 (2015 年 4 月)

2. Osamu Maehara*, Fumiyuki Sato*, Mitsuteru Natsuizaka, Ayaka Asano, Yoshimasa Kubota, Jun Itoh, Seiji Tsunematsu, Katsumi Terashita, Yoko Tsukuda, Masato Nakai, Takuya Sho, Goki Suda, Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, Makoto Chuma, Koji Nakagawa, Shunsuke Ohnishi, Yoshito Komatsu, Kelly A Whelan, Hiroshi Nakagawa, Hiroshi Takeda & Naoya Sakamoto
(* contributed equally)

A pivotal role of Krüppel-like factor 5 in regulation of cancer stem-like cells in hepatocellular carcinoma

Cancer Biology & Therapy 16:1453-1461 (2015 年 7 月)

行った研究の一部は以下の学会に発表した

1. Fumiyuki Sato , Mitsuteru Natsuizaka , Shinya Ohashi , Shingo Kagawa ,
Masaki Kuwatani , Hiroshi Kawakami , Shunsuke Ohnishi , Yoshito
Komatsu , Mototsugu Kato , Naoya Sakamoto

EGFR inhibitors suppress epithelial-mesenchymal transition and diminish
cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma (日本語口演)

第 73 回日本癌学会学術総会
2014 年 9 月 25 日~9 月 27 日
パシフィコ横浜(横浜市)

2. Fumiyuki Sato, Mitsuteru Natsuizaka, Osamu Maehara, Ayaka Asano,
Yoshimasa Kubota, Jun Itoh, Seiji Tsunematsu, Yoko Tsukuda,
Katsumi Terashita, Masato Nakai, Takuya Sho, Goki Suda,
Kenichi Morikawa, Koji Ogawa, Shunsuke Ohnishi, Naoya Sakamoto

KLF5 promotes tumorigenicity of hepatocellular carcinoma by up-regulation of
cancer stem-like cells (英語口演)

Digestive Disease Week 2015
2015 年 5 月 17 日~5 月 19 日
Walter E. Washington Convention Center (Washington,D.C.)

緒言

食道扁平上皮癌(Esophageal Squamous Cell Carcinoma ; ESCC)は世界的に部位別死亡数で 6 番目，部位別罹患率では 8 番目の致死的な癌種として知られている¹。ごく早期のものであれば内視鏡的治療²⁻⁵，局所進行性であれば化学放射線療法や手術が適応となるが⁶，進行した食道癌はその治療法が限られており，生物学的悪性度が高い事から未だに予後不良である。

癌幹細胞は近年多くの癌種で同定されており，その癌の悪性度に深く寄与している事が明らかとなってきた。癌幹細胞とは，腫瘍内において自己複製能と腫瘍を構成する様々な分化系統の癌細胞を生み出す能力を併せ持つ細胞である⁷。幹細胞の性質を持った細胞から癌が起源しているという考え方は 1850 年代後半頃より存在しており⁸，1952 年には吉田らにより実験に発生したラット肉腫が各腫瘍特異的に少数存在する幹細胞の性質を持った細胞，いわゆる癌幹細胞に由来する可能性を言及した⁹。癌幹細胞は 1997 年に急性骨髄性白血病において初めて同定され¹⁰，その後種々の癌種において特定されてきた^{11,12}。

癌幹細胞の特徴としては前述の如く，自らと同じ細胞を作り出す自己複製能と，多種類の癌を構成する細胞に分化しうる多分化能を有するのと共に，一度分化した細胞からも上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition ; EMT)を起こす事により，再度間葉系の性質を獲得し癌幹細胞化する事が言われている^{7,13-15}。また，治療抵抗性も特徴の一つであり，その原因として薬剤排出能が高い事や DNA 損傷における修復が優れている事，活性酸素除去能が高い事などが報告されており，また癌周囲の微小環境を構成するニッチ細胞と相互作用することによって細胞周期を G0 期に保つことも要因の一つとして知られている^{13,16}。よって，既存の化学療法や放射線療法などを行っても治療抵抗性の高い癌幹細胞は遺残し，そこから腫瘍が形成され再発する。また，EMT により間葉系の性質を獲得した癌幹細胞は高い浸潤能，遊走能を有しており，遠隔臓器への転移の原因となる。

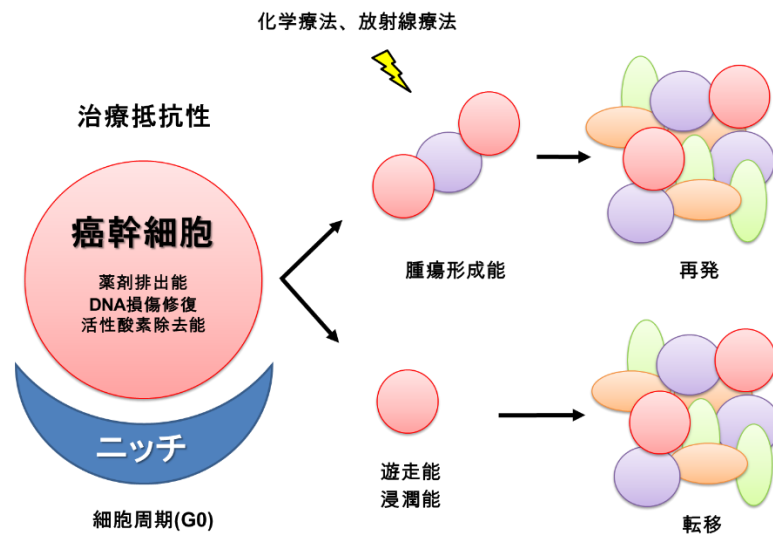


Fig. A.1 癌幹細胞の治療抵抗性と再発・転移

癌幹細胞は薬剤排出能が高い事や DNA 損傷に対する修復能が高い事, 活性酸素除去能が高いことに加え, 癌微小環境であるニッチ細胞と相互作用する事により治療抵抗性を有し, 既存の治療を施行しても治療抵抗性の高い癌幹細胞が残存してしまう事で再発や転移の原因となる。

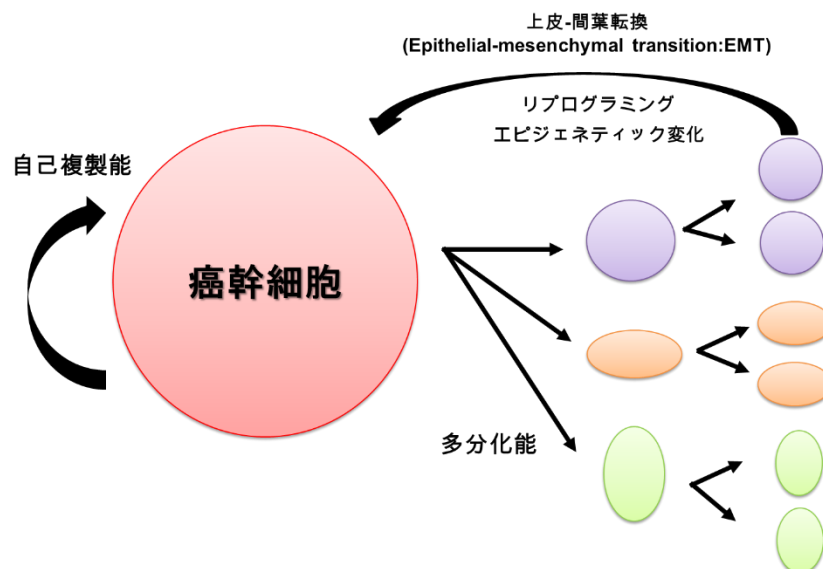


Fig. A.2 癌幹細胞の特徴

癌幹細胞は自己複製能と多分可能を有しており, また一度分化した細胞も上皮間葉転換を介して間葉系の性質を再獲得する事により癌幹細胞化する。

癌幹細胞の表面マーカーとしては、各癌種において報告があり¹¹、ヒト急性骨髄性白血病では CD34⁺/CD38⁻⁷、ヒト乳癌で CD24⁻/CD44⁺/epithelial specific antigen⁺¹⁷、ヒト脳腫瘍や大腸癌及び前立腺癌で CD133⁺¹⁸⁻²⁰、ヒト頭頸部扁平上皮で CD44⁺²¹、ヒト肝細胞癌で EpCAM⁺, CD44⁺, CD133⁺, CD90⁺, sidepopulation, ヒト膵癌で CD24⁺/CD44⁺/epithelial specific antigen⁺などが報告されている²²⁻²⁶.

<Nature medicine, 2011, vol.17, p.316. より抜粋>

Marker	Expression in healthy tissue	Marks cancer stem cells in
CD19	Broadly on B lymphocytes	B cell malignancies
CD20	Broadly on B lymphocytes	Melanoma
CD24	Broadly on B cells; neuroblasts	Pancreas/lung cancer, negative on breast cancer
CD34	Hematopoietic and endothelial progenitors	Hematopoietic malignancies
CD38	Multiple stages of B and T cells	Negative on AML
CD44	Broadly on many tissues	Breast/liver/head and neck/pancreas cancer
CD90	T cells, neurons	Liver cancer
CD133	Proliferative cells in multiple organs	Brain/colorectal/lung/liver cancer
EpCAM/ESA	Panepithelial marker	Colorectal cancer, pancreatic cancer
ABCB5	Keratinocyte progenitors	

* ABCB5, ATP-binding cassette transporter B5; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; ESA, epithelial-specific antigen.

癌幹細胞は周囲の炎症性細胞や内皮細胞，線維芽細胞などの間質細胞から構成される癌微小環境（ニッチ）と相互作用する事で，増殖や分化が制御されている¹³。

<Cell, 2011, vol.144, p.662. より抜粋 >

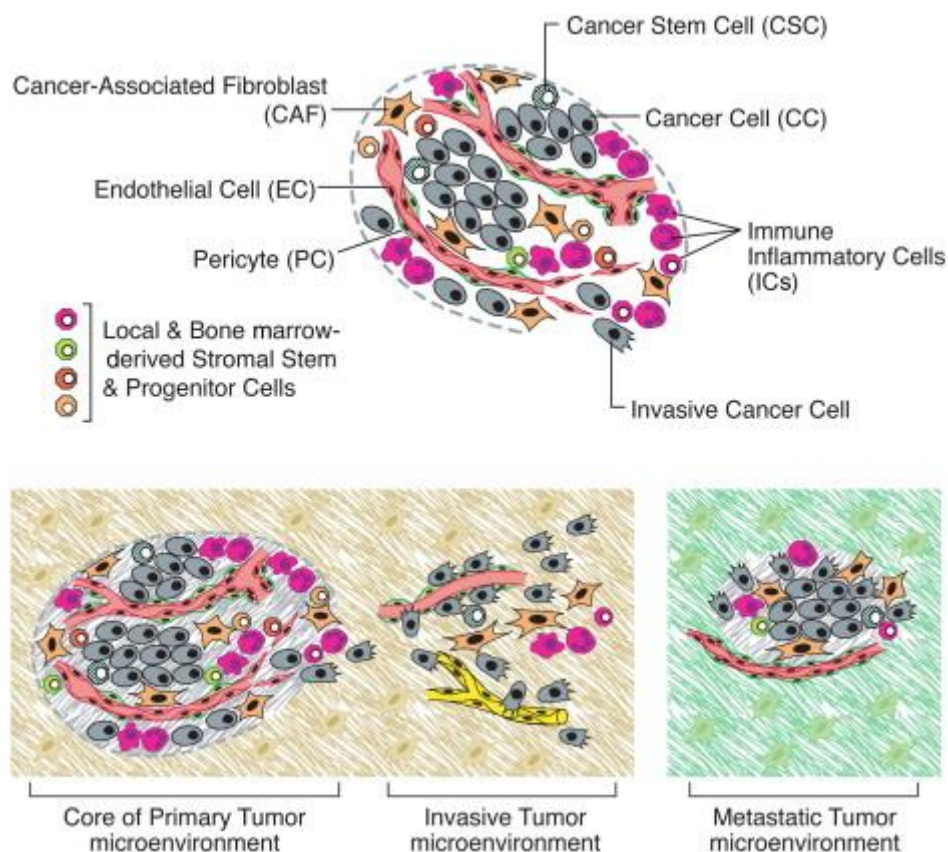


Fig. B 癌微小環境

（上段）固形腫瘍を構成する細胞集団を表す．腫瘍の実質及び間質は腫瘍の増生及び進展に寄与する様々なタイプの細胞を含んでいる．特に炎症細胞は腫瘍細胞のサブクラスを消滅させる反面サイトカインなどを分泌させ腫瘍促進にも寄与する．

（下段）癌微小環境を表す．多数の間質細胞は浸潤や転移を可能にする癌微小環境を作り出している．間質細胞や細胞外マトリックスは浸潤や転移に寄与している．

その癌幹細胞の自己複製増殖と分化の制御は、その癌微小環境からの外来性シグナルから主に影響を受けており、receptor tyrosine kinase (RTK) シグナル、Wnt/ β -catenin シグナル、Notch シグナル、bone morphogenetic protein (BMP) シグナル、TGF- β シグナル、LIF シグナル、Hedgehog シグナルなどが関与していると知られている²⁷。

<Cell, 2011, vol.144, p.662. より抜粋 >

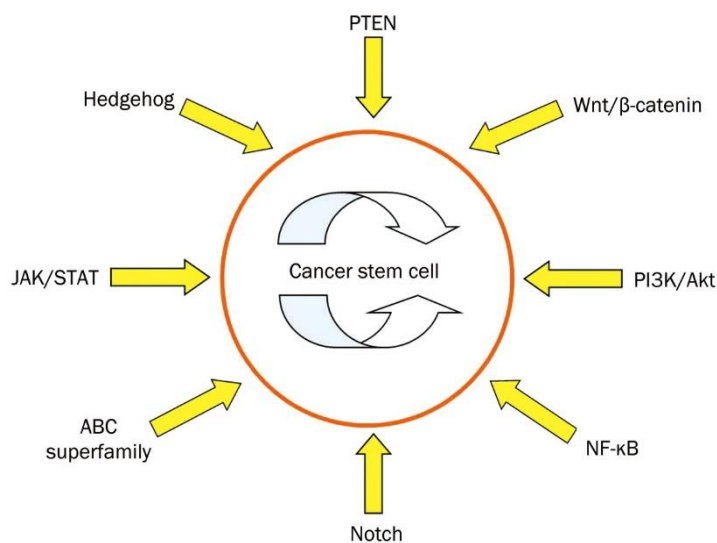


Fig. C 癌幹細胞におけるシグナル

癌幹細胞関係のあるシグナルを示す。PTEN, Wnt/ β -catenin, PI3K/Akt, NF- κ B, Notch, ABC superfamily, JAK/STAT, Hedgehog などのシグナルネットワークの制御不全が癌幹細胞の維持には重要である。

また癌が存在する環境は低酸素環境であり癌幹細胞も低酸素状態に置かれている。このため低酸素応答性転写因子である HIF などの低酸素シグナルも Oct4 や Nanog, Sox2 などの幹細胞マーカーや Notch シグナル因子の活性化を介して癌幹細胞の維持や増殖, 及び転移などにも影響を及ぼしている事も報告されている²⁸⁻³¹。

これらから、癌幹細胞は癌腫の起源とも考えられ癌を根絶する上で、この癌幹細胞は鍵となり得るものであり、進行した食道癌に対する治療も含め、今後は癌の新たな治療として、この癌幹細胞を標的とした治療の確立が必要と考えられる。

上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition ; EMT)は 1982 年に Elizabeth Hay らにより提唱された、上皮系細胞から間葉系細胞に形態変化する現象である³²。

<Journal of Clinical Investigation, 2009, vol.119, p.1421. より抜粋 >

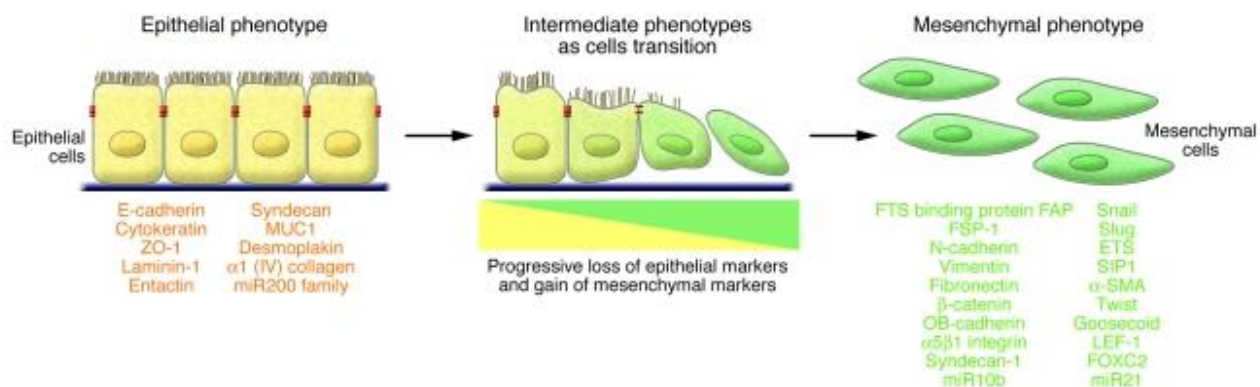


Fig. D 上皮-間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition ; EMT)

EMT は分化した上皮系細胞が間葉系細胞に脱分化する事を意味する。EMT における研究では、上皮系及び間葉系のマーカーとして図内に示すマーカーを使用する事が一般的である。両方のマーカーを持つものは中間的な表現型を有しており、一部 EMT を起こしている事などが示唆される。

* ZO-1, zona occludens 1; MUC1, mucin 1, cell surface associated; miR200, microRNA 200; SIP1, survival of motor neuron protein interacting protein 1; FOXC2, forkhead box C2.

EMT は発生のプロセスにおいて重要な役割を果たしているだけではなく，創傷治癒と組織の線維化，癌の浸潤や転移において出現しており，成長・発育における EMT を type I，創傷治癒・組織線維化における EMT を type II，癌における EMT を type III と分類される³³。

EMT では TGF- β ，EGF，FGF，Wnt/ β -カテニン，NOTCH シグナルなどが関与している事が知られているが³⁴，TGF- β シグナルが EMT の誘導に重要である事が知られており³⁵，TGF- β ホモ二量体を受容体に結合する事で受容体ヘテロ四量体の会合とそれに続くキナーゼ活性により細胞質タンパク質 Smad がリン酸化を受ける．そしてリン酸化 Smad は核内に移行し，続いてこれが転写因子として作用し EMT 関連転写因子の発現を誘導する．EMT 関連転写因子には zinc-finger 型転写因子である Snail1 や Snail2(Slug)，ZEB1 や ZEB2，並びに basic helix-loop-helix 型転写因子の Twist や E47 などがあり^{34,36}，これらが

E-cadherin 遺伝子の転写を抑制し cadherin 同士の細胞接着の消失により，アクチンは細胞-細胞接着の構成配列から，細胞-細胞外マトリクスの接着点につながるアクチンストレスファイバーへと再構成され細胞は上皮としての形態を失い EMT が誘導される^{37,38}。

<Developmental Cell, 2008, vol.14, p.824. より抜粋 >

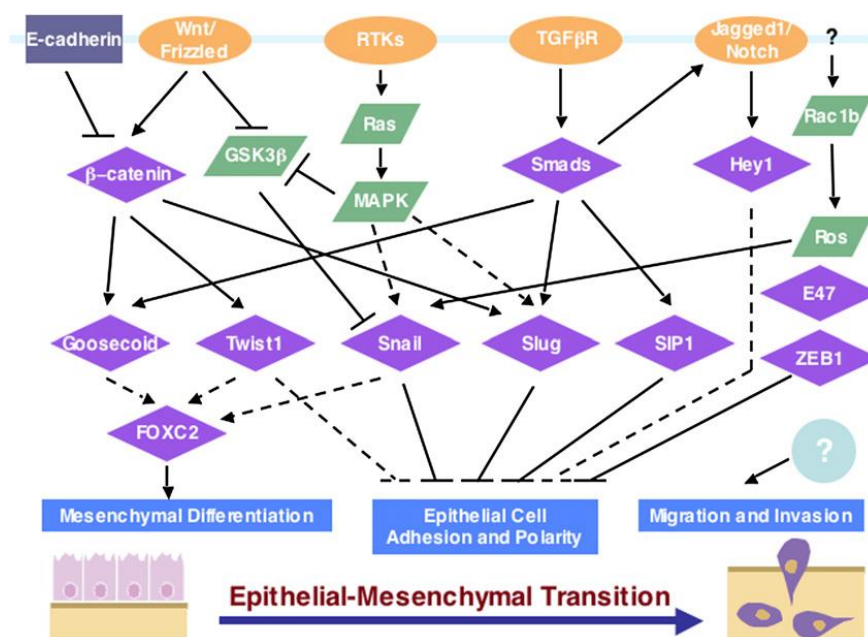


Fig. E EMTにおけるシグナル

TGF- β シグナルは Smads を介して Slug, SIP1 などの多数の EMT 関連転写因子を誘導する。Wnt シグナル及び E-cadherin の欠失は β -catenin を介して同様に EMT 関連転写因子である Slug, Twist1 などを誘導する。tyrosine kinase receptor シグナルも Ras/MAPK シグナルを介して Slug, Snail などの EMT 関連転写因子を誘導する。また Wnt シグナル及び tyrosine kinase receptor シグナルは GSK3 β を抑制する事で Snail の核移行を促進させ EMT を誘導する。Notch シグナルは TGF- β シグナルのもとで EMT に寄与する。実線は直接の作用を表し、点線は間接的な関与を表す。

癌においては EMT を起こした細胞は、幹細胞様の性質を獲得し、また EMT により癌幹細胞を生じる事も示唆されており、癌の浸潤及び転移や癌幹細胞の維持にも EMT が重要であると言われている¹⁴。

Epidermal Growth Factor Receptor(EGFR)は、チロシンキナーゼ (protein tyrosine kinase (PTK))であり、ヒト EGFR 遺伝子は 7 番染色体短腕(7p12)に存在する³⁹。全長は約 200kb であり、28 のエクソンと 27 のイントロンから構成される⁴⁰。1 から 16 のエクソンで細胞外領域、17 は膜貫通領域、18-28 は細胞外領域をコードしている。また細胞内領域のうちチロシンキナーゼ部位は 18-24 にコードされている。

まず PTK は多細胞性生物に固有の酵素であり、タンパク質のチロシン残基を特異的にリン酸化する酵素である。PTK は 1980 年 Hunter, T らの報告により、ラウス肉腫ウイルスの癌遺伝子産物である v-src のもつ酵素活性として同定され⁴¹、その後さまざまな増殖因子受容体にこの酵素活性が認められた。

PTK はチロシンリン酸化を介して細胞の増殖、分化、生存、死などの細胞運命を決定する上で重要な働きをしている。

また PTK は構造の違いより 2 種類の型に大別される。一つは細胞膜貫通型の糖蛋白質である受容体型チロシンキナーゼであり、もう一つは細胞外ドメインを持たない非受容体型チロシンキナーゼである。ヒトゲノムには 90 種類あまりのチロシンキナーゼが存在し、32 種類が非受容体型、58 種が受容体型に分類されている。

EGFR は後者のチロシンキナーゼ型受容体で⁴²、細胞膜を貫通して存在する分子量 170kDa の糖蛋白で⁴³、上皮系や間葉系など多彩な細胞で発現が認められている。

EGFR は Carpenter らにより 1975 年に線維芽細胞表面上に EGF に対する特異的受容体が報告され⁴⁴, 1978 年同氏らにより、ヒト上皮癌細胞株である A-431 cell line において 170kDa の糖蛋白として同定された⁴⁵.

構造的には, 21 アミノ酸の細胞外領域, 23 アミノ酸の細胞膜貫通領域, 542 アミノ酸の細胞内領域の 3 つのドメインを持ち⁴⁶, 細胞外領域にリガンド結合部を有し同部にリガンドが結合する事により活性化する. リガンドとしてはインスリン, epidermal growth factor(EGF), insulin-like growth factor2(IGF2), NGF(nerve growth factor), platelet-Derived growth factor(PDGF), transforming growth factor- α (TGF- α)など多数の増殖因子があり⁴², リガンドが結合すると EGFR の構造変化が惹起され, 細胞膜上を移動し, 他の EGFR(ErbB1)もしくは ErbB ファミリーと二量体を形成し⁴⁷, それに伴い細胞内領域同士も相互作用するが, 非対称な相互となり片方がアロステリックに作用して他方を活性化させる. その後アデノシン三リン酸を利用し細胞内領域のチロシン残基 (Tyr845)が自己リン酸化される事により活性化がロックされ, さらに C 末端領域の複数個所(Tyr1068/1086)がリン酸化される事により, 種々のアダプターやエフェクタータンパク質をリクルートし下流のシグナルカスケードを活性し細胞応答を引き出すことで作用する⁴⁸. シグナルとしては①MAPK カスケード, ②PI3K/Akt, ③Jak/STAT が主であり MAPK カスケードは主に細胞増殖や生存, PI3K/Akt は細胞成長や抗アポトーシス, 浸潤, 遊走などに関与する⁴⁹.

<Nat Rev Cancer, 2004, vol.4, p.364. より抜粋 >

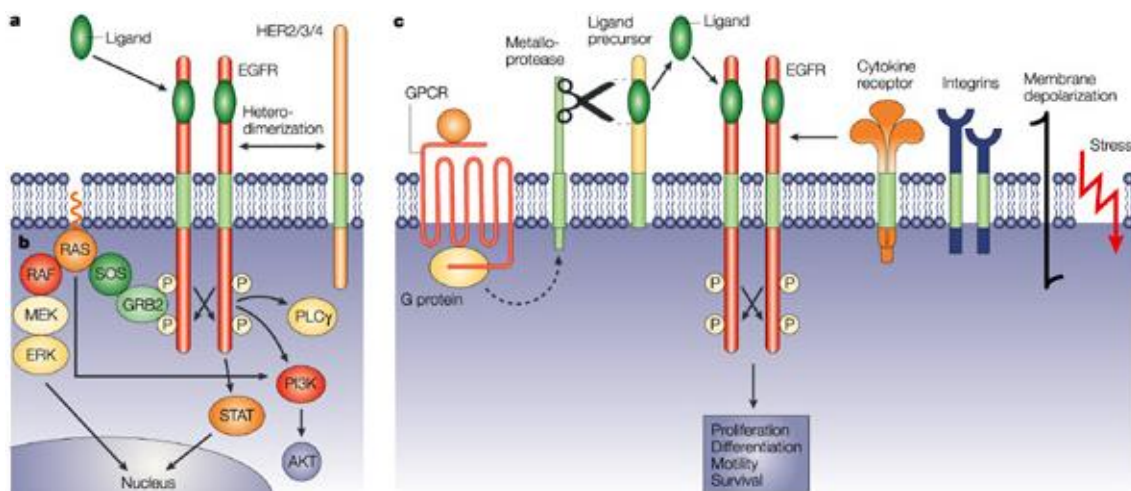


Fig. F EGFR シグナルネットワーク

- (a) 細胞外領域にリガンド結合部にリガンドが結合する事により活性化し、リガンドが EGFR の構造変化が惹起され、他の EGFR(ErbB1)もしくは ErbB ファミリーと二量体を形成する。
- (b) 二量体の形成は結果的にアデノシン三リン酸を利用し細胞内領域のチロシン残基(Tyr845)が自己リン酸化される事により活性化がロックされ、さらに C 末端領域の複数個所(Tyr1068/1086)がリン酸化される事により、RTK-GRB2-SOS-RAS-RAF-MEK-ERK, PI3K/Akt, PLC γ , STAT シグナルを活性し細胞応答を引き出す事で作用する。
- (c) EGFR は G-protein-coupled-receptors(GPCRs)やサイトカインレセプター、インテグリン、膜の脱分極、細胞ストレスにより誘導される因子などの刺激によっても作動する。これより EGFR は増殖、分化、運動性、生存などの重要な細胞反応を決定する。

* ERK, extracellular-signal-regulated kinase; GEF, guanine-nucleotide-exchange factor; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLC γ , phospholipase γ ; STAT, signal transducer and activator of transcription.

悪性腫瘍と EGFR の関係については、1984 年に鳥赤芽球症ウイルスのもつ oncogene である v-erbB⁵⁰ と EGFR の遺伝子配列が類似している事が報告され、がん遺伝子 erbB の遺伝子産物と EGFR が同一のものであることが明らかにされた⁵¹。また V-erbB に相当するヒト遺伝子は HER2 遺伝子もある事がわかり⁵²、EGFR は ErbB1 と呼ばれる事となった。

EGFR は悪性腫瘍にしばしば過剰発現が認められ⁵²、また過剰発現は予後不良因子としても報告されている^{53,54}。また、細胞外領域の変異なども悪性化にかかわっており⁵⁵、このように EGFR は癌遺伝子としても作用し増幅や変異などが起こると発癌や癌の増殖、浸潤、転移などに関与する事が知られている。

特に EGFR は癌幹細胞に対して TGF- β シグナルと相乗的に作用する事が言われており⁵⁶⁻⁶²、特に EGF シグナルは EMT で重要な転写因子である ZEB に対して抑制の方向に働く miRNA-200 を抑制する事で寄与する事が報告されている⁶³。

また ZEB を発現増加する事で EMT に寄与する Fra-1 を RAS-MEK-ERK pathway が制御する事や⁶⁴、RAS が TGF- β 1 の分泌を促進させる事^{63,64}、加えて Snail を抑制する方向に働く β -catenin のサプレッサーでもある GSK-3 β を

抑制する事も言われており⁶⁵，これらを通して癌幹細胞に作用すると考えられる。

CD44 はヒトの扁平上皮癌においては食道，頭頸部，肺，子宮頸部において癌幹細胞のマーカーとして使用されている^{21,66-68}。我々は CD44 の発現の高い食道扁平上皮癌細胞が高い腫瘍形成能を有する事を *in vivo* で明らかにしている⁶⁹。また興味深い事に，種々の癌種において CD44 高発現によって定義される癌幹細胞は間葉系の表現型を持っており，癌幹細胞の維持においては EMT が重要な役割を担っている^{14,70,71}。これらの報告と同様に，我々は TGF- β 1 が誘導する EMT により，CD44 高発現の癌幹細胞が維持，増幅される事を示し，さらに我々は食道扁平上皮癌の臨床検体を用いて腫瘍浸潤部で腫瘍細胞が EMT を起こしており，EMT は腫瘍の進行や予後不良に寄与している事を報告してきた。

<Cancer Res, 2011, vol.71, p.6839. より引用し改変 >

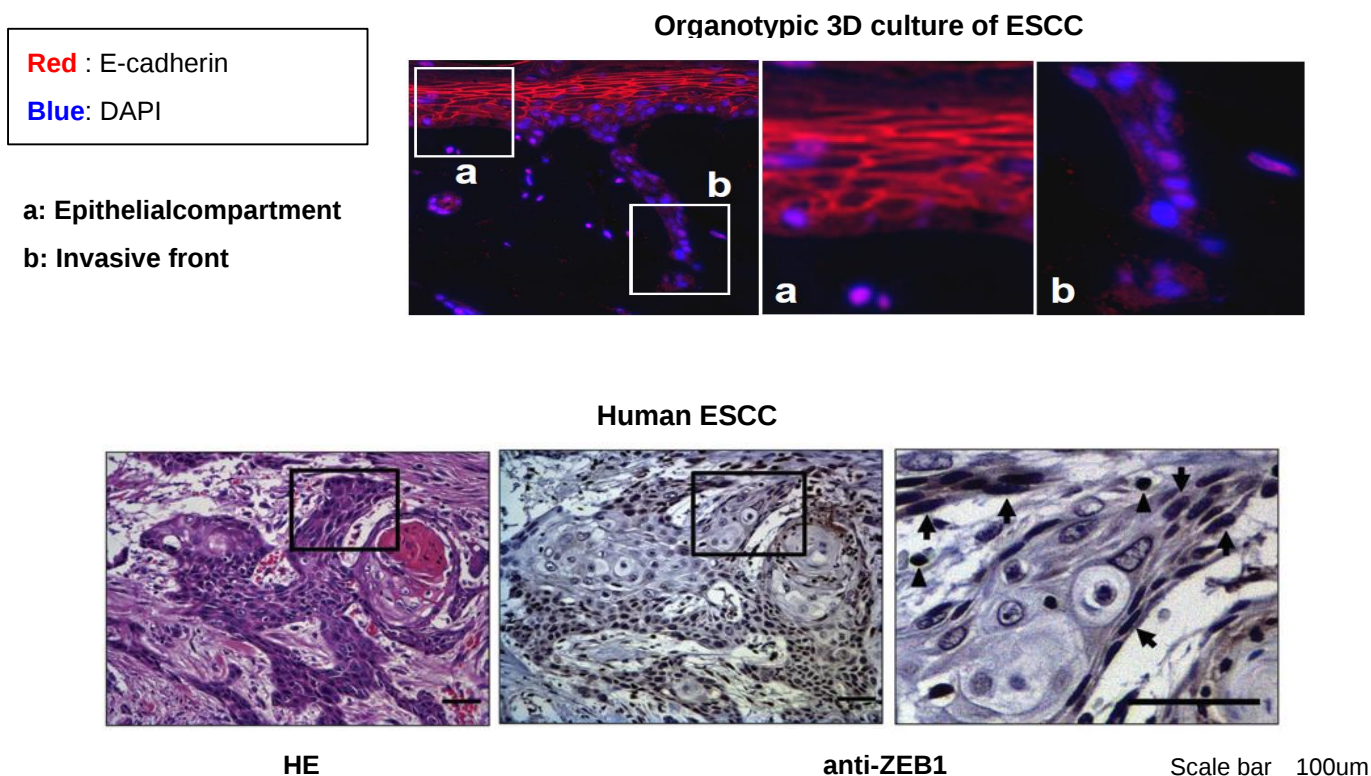


Fig. G 3次元培養と手術病理検体での食道扁平上皮癌浸潤部

(上段) 3次元培養における食道扁平上皮癌の上皮部(a)と浸潤部(b)を示してり，上皮部分の腫瘍には上皮系マーカーの E-cad が発現しているのに対し，腫瘍浸潤部では E-cad の発現が著明に低下している。

(下段) 実際の手術検体の腫瘍浸潤部の写真であり、実際の検体の標本でも腫瘍浸潤部の標本では **EMT** における重要な転写因子の一つである **ZEB1** の抗体を用いた免疫染色にて陽性を示す細胞が認められ、浸潤部において **EMT** が認められる。

また、**EGFR** は食道扁平上皮癌において過剰発現しており⁷²、**TGF- β** によって誘導される **EMT** において **EGFR** は必須である⁷³。また先述の通り、食道扁平上皮癌では腫瘍浸潤部における **EMT** が **CD44** 高発現の癌幹細胞の維持、増幅に重要な役割を担っている。よって、**EGFR** はその食道扁平上皮癌の癌幹細胞に対する新たな治療標的となり得ると考えられる。しかしながら食道扁平上皮癌における癌幹細胞に対する **EGFR** 阻害薬の効果は現在まで十分に検証されておらず、その有効性を示した明らかな報告は未だ認められていない。

これらの理由から食道扁平上皮癌の癌幹細胞に対する **EMT** を介した **EGFR** 阻害薬の効果について注目し、今回の研究の目標とした。

今回我々は 3 次元培養システムを用いて食道扁平上皮癌における癌幹細胞に対する **EGFR** 阻害薬の効果について検証した。

略 語 表

APC : Allophycocyanin
BPE : Bovine Pituitary Extract
CD : Cluster of differentiation
CDH1 : Cadherin-1
CK13 : Cytokeratin 13
cDNA : Complementary DNA
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
D-MEM : Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO : Dimethyl sulfoxide
DNA : Deoxyribonucleic acid
DTT : Dithiothreitol
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR : Epidermal growth factor receptor
EMEM : Eagle's minimal essential medium
EMR : Endoscopic mucosal resection
EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition
ESD : Endoscopic submucosal dissection
FACS : Fluorescence activated cell sorter
FBS : Fetal bovine serum
HE : Hematoxylin and eosin
ITES : Insulin, Transferrin, Ethanolamine, Selenium
KSFM : Keratinocyte serum-free medium
miR : microRNA
PBS : Phosphate-buffered saline
PE/Cy7 : Phycoerythrin/Cyanine7
RNA : Ribonucleic acid
RT-PCR : Reverse-transcription polymerase chain reaction
STI : soybean trypsin inhibitor
TGF : Transforming growth factor
ZEB : Zinc finger E-box-binding homeobox
7-AAD : 7-Amino-Actinomycin D

実験方法

1. Cell lines 及び培養

Cell lines

EPC2T

OKF6T

試薬及び材料

Keratinocyte-SFM (1X), Liquid (Life Technologies)

human recombinant Epidermal Growth Factor 1-53 (Life Technologies)

BPE (Life Technologies)

PBS (Life Technologies)

Trypsin inhibitor from Glycine max (soybean) (SIGMA-ALDRICH, Tokyo, Japan)

penicillin (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)

streptomycin (Wako Pure Chemical Industries)

0.5% trypsin–EDTA (Life Technologies)

各 Cell line の培養条件及び継代条件

1-1. EPC2T

EPC2T は正常ヒト食道上皮細胞を retrovirus vector にてヒト telomerase (hTERT), EGFR, 変異型 p53(p53^{R175H})を導入し形質転換させ, G418(300 μ g/ml)と puromycin(1 μ g/ml)で 7 日間選択培養を行い作成された stable cell line であり⁷³, human recombinant Epidermal Growth Factor 1-53, BPE, 100mU/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin を添加した Keratinocyte-SFM を用いて 37°C, 5%CO₂ の条件下にて培養した. プラスチック接着細胞が 80%になるまで 2–3 日おきに Keratinocyte-SFM を交換し, 接着していない浮遊細胞を除いた. 継代は 0.5% trypsin–EDTA を用いて接着細胞を剥離し, 新たな培養皿で培養を継続した.

1-2. OKF6T

OKF6T は正常口腔上皮細胞を retrovirus vector にて hTERT, EGFR と変異型 p53(p53^{R175H})を導入し形質転換させ, puromycin(1 μ g/ml)で 7-14 日間選択培養を行い作成された stable cell line であり⁷⁴, human recombinant Epidermal Growth Factor 1-53, BPE, 100mU/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin を添加した Keratinocyte-SFM を用いて 37°C, 5%CO₂ の条件下にて培養した. プラスチック接着細胞が 80%になるまで 2-3 日おきに Keratinocyte-SFM を交換し, 接着していない浮遊細胞を除いた. 継代は 0.5% trypsin-EDTA を用いて接着細胞を剥離し, 新たな培養皿で培養を継続した.

2. Real-time RT-PCR

試薬及び材料

PBS	(Life Technologies)
SYBR Green	(Qiagen)
RNase free water	(Millipore)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen)
2-Mercaptoethanol	(SIGMA-ALDRICH, Tokyo, Japan)
Oligo dT	(Invitrogen)
dNTP	(Promega)
5xFS buffer	(Invitrogen)
MgCl ₂	(Invitrogen)
0.1M DTT	(Invitrogen)
SuperScrip II	(Lifetechnologies)

RNA の抽出は RNeasy Mini Kit を用いて添付のプロトコール通りに行った. 濃度測定は分光高度計(Nano Drop 2000, Thermo Scientific)を用いて行った. 抽出した RNA は Superscript II を用いて添付のプロトコール通りに cDNA を作成した.

Real-time RT-PCR は SYBR Green を用いて行った. 50°C 2 分間, 95°C 2 分間の後, 95 °C 15 秒間・60°C 30 秒間を 40 サイクルの条件にて, 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems)を用いて解析した. 遺伝子発現レベルは β -actin を内因性コントロールとして用いて, comparative threshold cycle

(ddCt) method で計算した。データは Sequence Detection Systems software (Applied Biosystems)を用いて解析した。Real time PCR には以下のプライマーを使用した。

<real-time RT-PCR に使用した primer 一覧>

ZEB1	Forward primer : 5'-CTGAGGCACCTGAAGAGGAC-3'
	Reverse primer : 5'-TTGTGAAAATGCATCTGGTG-3'
ZEB2	Forward primer : 5'-AACAAGCCAATCCCAGGAG-3'
	Reverse primer : 5'-CTGTTTCAGAACCTGTGTCCA-3'
Notch1	Forward primer : 5'-GACAGCCTCAACGGGTACAA-3'
	Reverse primer : 5'-CACACGTAGCCACTGGTCAT-3'
Notch3	Forward primer : 5'-GGCCACTATGTGAGAACCCC-3'
	Reverse primer : 5'-TCTGACCCTCAAACCCAGGA-3'
CK13	Forward primer : 5'-GACGCCAAGAAGCGTCAGC-3'
	Reverse primer : 5'-GACATCAGAAGTGCGGCGA-3'
IVL	Forward primer : 5'-AGCCTTACTGTGAGTCTGGTTG-3'
	Reverse primer : 5'-GGAGGAGGAACAGTCTTGAGG-3'
CDH1	Forward primer : 5'-GAATGACAACAAGCCCGAAT-3'
	Reverse primer : 5'-ACCTCCATCACAGAGGTTCC-3'
β -actin	Forward primer : 5'-TTGCCGACAGGATGCAGAA-3'
	Reverse primer : 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'

3. Drug sensitivity assay (MTS assay)

試薬及び材料

CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay	(Promega)
5-FU	(SIGMA-ALDRICH, Tokyo, Japan)
CDDP	(SIGMA-ALDRICH)
Erlotinib	(Santa Cruz)
Cetuximab	(Bristol-Myers, New York, USA)
DMSO	(Wako)

1 ウェル当たり 5×10^4 個の細胞を 96 ウェルプレートに播き, 37°C, 5%CO₂ の環境下にて培養した. 24 時間後に各濃度の薬剤入りの上清に交換した.

薬剤添加後 72 時間培養し, CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent を用いて細胞増殖を解析した. 490nm の吸光度(リファレンス波長:630nm)を Sunrise plate reader(F039302, TECAN)を用いて測定した.

4. Flow cytometry and Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

緩衝液の組成

FACS Buffer 1% BSA+Hank's balanced salt solution

試薬及び材料

BSA	(SIGMA-ALDRICH, Tokyo, Japan)
Hank's balanced salt solution	(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
0.5% trypsin-EDTA	(Life Technologies)
Keratinocyte-SFM (1X), Liquid	(Life Technologies)
human recombinant Epidermal Growth Factor 1-53	(Life Technologies)
BPE	(Life Technologies)
Trypsin inhibitor from Glycine max (soybean)	(SIGMA-ALDRICH)
PBS	(Life Technologies)
penicillin	(Wako Pure Chemical Industries)
streptomycin	(Wako Pure Chemical Industries)

抗体

APC-anti-CD44	(BD, Franklin Lakes, NJ, USA)
PE/Cy7-anti-CD24	(BD Biosciences)
7-AAD	(Life Technologies)

対象の細胞を培養している培養皿を PBS で洗浄後, 0.5% trypsin-EDTA を添加し, 37°C 下で 5 分間インキュベートし, STI を加え trypsin を不活性化させた. その懸濁液を BD フェルコン細胞ストレーナー40µm (BD Biosciences)に通した後, 1000 rpm 5 分間遠心し上清を吸引除去し FACS buffer で洗浄した. 濃

度が 0.1-1 Million cells/100µl になるよう FACS buffer で調整し, microtube に分注した. 抗体を各 microtube に加え, 氷上, 暗条件で 30 分間冷却した後, FACS buffer 2-4 ml で 2 度洗浄し, 最終的に最大 10 million cells/ml の濃度で FACS buffer で再懸濁し調整して, Flow cytometer (FACS Canto II, BD), FlowJo(Tree Star)で解析, もしくは Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS AriaIII, BD) を用いて目的細胞を分離した.

また, 抗癌剤投与後の Flow cytometry には最終的に試料を FACS buffer で調整した後 7-AAD を加え, 死細胞を除いて解析を行った.

上記抗体を以下の希釈濃度で使用した.

CD44 (dilution, 1:21)

CD24 (dilution, 1:21)

7-AAD(dilution, 1:101)

5. Western blotting

試薬および材料

50×Lysis Buffer	(Cell Signaling Technology)
200mM PMSF	(Cell Signaling Technology)
Bolt™ 4×LDS Sample Buffer	(novex)
Bolt™ Sample Reducing Agent	(novex)
Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus (SDS-PAGE)	(novex)
Mini Format, 0.2µm PVDF	(BIO-RAD)
Blocking One	(nakalai tesque)
Tween 20	(Kanto Chemical)
Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	(GE Healthcare)

Lysis Buffer の組成

10×Lysis Buffer	50 µl
200mM PMSF	2.5 µl
DDW	447.5 µl
total	500 µl

Washing Buffer の組成

Blocking One	50ml
Tween20	1.5ml
DDW	450ml
total	500ml

使用抗体

β -actin : Mouse monoclonal anti- β -actin antibody AC-74

(Sigma Aldrich), Cat# A5316, (1:30,000)

ZEB1 : Rabbit monoclonal anti-ZEB1 antibody D80D3

(Cell Signaling), Cat#3396, (1:1000)

ZEB2 : Rabbit polyclonal anti-ZEB2 antibody H-260

(Santa Cruz), Cat# sc-48789, (1:200)

E-cadherin : Mouse monoclonal anti-E-cadherin antibody Clone36

(BD Transduction Laboratories, San Jose, CA), Cat#610181, 1:3000

N-cadherin : Mouse monoclonal anti-N-cadherin antibody Clone 32

(BD Transduction Laboratories), Cat#610920, 1:250

CD44^{High}/CD24^{Low} と CD44^{Low}/CD24^{High} の細胞間での遺伝子のタンパクレベルでの発現の違いを確かめるために Western blotting を行い検討した. FACS にて CD44^{High}/CD24^{Low} と CD44^{Low}/CD24^{High} に分離した後, PBS で洗浄し, 氷上で lysis buffer100 μ l を加え融解させセルスクレイパーを用いて回収した. 回収したサンプルを 12000rpm, 4°C で 30 分間遠心し上清を回収した. 得られたタンパクは Qubit®2.0 で濃度を測定し-80°C で保管した.

タンパクは最終タンパク濃度が 0.5 μ g/ μ l となるよう DDW 適量, 4×Sample Buffer 25 μ l, Reducing Agent 10 μ l を添加し, 70°C で 10 分間熱した. SDS-PAGE (165V, 45 分間)にてマーカーとともに展開し, PVDF に転写させた.

続いて Blotting One で振盪しながら室温で 30 分間インキュベートした. 1 次抗体を加え 4°C で一晩静置した. Washing Buffer で 5 分間 3 回洗浄した後, 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた.

Washing Buffer で 15 分間 2 回洗浄し ECL™ Western Blotting Analysis System、LAS1000(FUJIFILM)を用いて検出した.

6. Colony formation assay

緩衝液の組成

2x DMEM

→DMEM powder 6.75g + NaHCO₃ + KSFM 500ml + BPE(25mg, final 30µg/ml)
+ EGF(500ng, final 0.5ng/ml) + FBS 50ml(final 5%) + 100xPenicillin-
streptomycin 10ml

試薬及び材料

Keratinocyte-SFM (1X), Liquid	(Life Technologies, Carlsbad, MD, USA)
human recombinant Epidermal Growth Factor 1-53	(Life Technologies)
BPE	(Life Technologies)
FBS	(Life Technologies)
DMEM	(nacalai tesque)
DMEM powder (cat.#12800-058)	(Gibco)
PBS	(Life Technologies)
penicillin	(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)
streptomycin	(Wako Pure Chemical Industries)
NaHCO ₃	(Wako Pure Chemical Industries)
LMP agarose	(Invitrogen)

細胞株における CD44^{High}/CD24^{Low} と CD44^{Low}/CD24^{High} の細胞における非足場依存性腫瘍形成能を検討する目的で施行した.

40°Cのウォーターバスで 1xDMEM, 2xDMEM を温めた. 次に LMT agarose 1.6g と H₂O 90ml を十分に混合した後, 40°Cウォーターバスに 30 分浸し 2xDMEM を 90ml 加え(溶液①)1well 当たり 350µl ずつ 24well plate に分注し室温で 25 分程度置いて Bottom gel を作成した. 次に FACS にてソートしてきた CD44^{High}/CD24^{Low} と CD44^{Low}/CD24^{High} の細胞をカウントし 1xDMEM 5ml に 5x10⁴ となる様調整した.

その後 Bottom gel で使用した溶液①を 10ml 加えて転倒混和し, 細胞を含む top gel として各 well 300µl ずつ bottom gel の上に播種し(CD44^{High}/CD24^{Low} : 6well, CD44^{Low}/CD24^{High} : 6well), 室温で 30 分置いた後 37°C, 5%CO₂ の環境下にて培養した. 翌日 DMEM を 500µl ずつ各 well に分注し, その後は週 2 回程度で medium change を行い培養した. 1-2week 後に目視下で cell カウントを行い評価した.

7. Organotypic 3D culture of ESCC

試薬及び材料

DMEM (-)	(nacalai tesque)(4°C)
Ham's F12	(Gibco #11765-054 or Mediatech 10-080-CV)(4°C)
10x EMEM	(BioWhittaker #12-684F)(room temperature)
7.5% Na-Bicarbonate	(BioWhittaker #17-613E)(room temperature)
FBS	(Life Technologies)(stored as an ~10 ml aliquot, -20°C)
L-Glutamine	(Cellgro #25-005CI)(-20°C)
Collagen I	(BD Biosciences #354236)(Stored as ~50 ml aliquots at 4°C)
Matrigel	(BD Biosciences #354234)(-20°C)
Hydrocortisone	(Sigma #H0888): MW = 362.46 Dissolve 0.0269 g in 2.5 ml EtOH Add into 97.5 ml DMEM (-) : 0.74 mM Filter-sterilize, dispense into aliquots and store at -20°C
ITES	(BioWhittaker #17839Z)(-20°C)
O-phosphorylethanolamine	(Sigma #P0503) MW = 141.06 Dissolve 0.705 g in 100 ml DMEM (-) : 50 mM Filter-sterilize, dispense into aliquots and store at -20°C
Adenine	(Sigma #A9795) MW = 171.59 Dissolve 1.55 g in 100 ml warm (37°C) ddH ₂ O: 0.09 M Filter-sterilize, dispense into aliquots and store at -20°C
Progesterone	(Sigma #P8783) MW = 314.46 Dissolve 1 mg in 1 ml ETOH Add 14.7 ml ddH ₂ O Dilute 1ml of that in 100ml DMEM (-) : 2.0 µM Filter-sterilize, dispense into aliquots and store at -20°C.
Triiodothyronine	(Sigma #T5516) MW = 672.96 Dissolve 1 mg in 1 ml 1N NaOH Add 19 ml of DMEM (-) Dilute 4 µl of that in 31 ml plain DMEM (-) : 1 nM Filter-sterilize, dispense into aliquots and store at -20°C
Newborn Calf Serum	(Hyclone #SH 3011802)
Gentamycin, 50 µg/ml	(Cellgro #MT30-00050CR)
6-well Transwell Carrier	(Organogenesis, TS01-001)

Corning Costar Transwell 3414

(24 mm diameter inserts, 3.0 µm pore size)(6 per plate)

*** Pennsylvania university による Organotypic 3D culture (OTC) protocol を参考にした ⁷⁵.**

(文献 75 : Kalabis, J. *et al.* Isolation and characterization of mouse and human esophageal epithelial cells in 3D organotypic culture. *Nat Protoc* **7**, 235-246, doi:10.1038/nprot.2011.437 (2012). を参照)

従来の 2 次元培養と比較しより生体内での細胞増殖の形態に近づけて実験を行うため、食道扁平上皮癌の三次元培養を利用した。まずは、線維芽細胞、マトリジェル、I 型コラーゲンを含む細胞層を作成し、day7 に 0.5×10^6 個の腫瘍細胞(EPC2T, OKF6T)を細胞層の上に播種した。その後 day11 までは medium 内で培養し(day9 まで EP1 medium, day11 まで EP2 medium), day11 からは表面は培養液に浸さず空気中にさらし底部にのみ EP3 medium を用いて培養した。なお EGFR 阻害薬は day9 より 5µM の濃度で培養液とともに投与とした。Day14 に腫瘍の評価を HE 染色やその他免疫染色にて評価した。

参照)

* Organotypic 3D culture (OTC) protocol (抜粋 <http://www.med.upenn.edu/>) .

* 文献 75 : Kalabis, J. *et al.* Isolation and characterization of mouse and human esophageal epithelial cells in 3D organotypic culture. *Nat Protoc* **7**, 235-246, doi:10.1038/nprot.2011.437 (2012).

acellular layer	1 plate	2 plates
10x EMEM	690 µl (x 1)	690 µl (x 2)
FBS	700 µl (x 1)	700 µl (x 2)
L-Glutamine	60 µl (x 1)	120 µl (x 1)
Na-bicarbonate	140 µl (x 1)	280 µl (x 1)
Type I collagen	5.6 ml (x 1)	11.2 ml (x 1)

x2, Take twice using P-1000 Pipetman

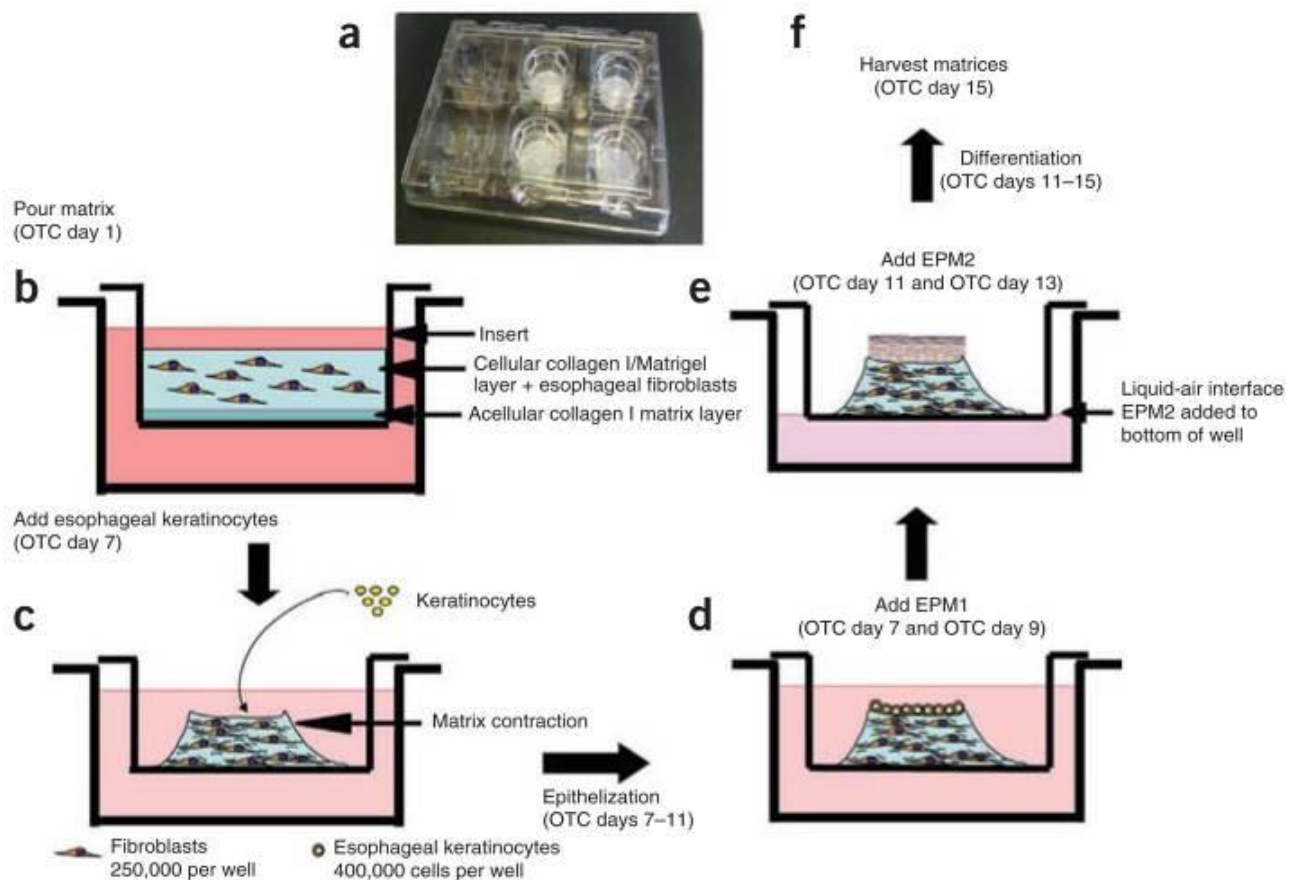
cellular layer	1 plate	2 plates
10x EMEM	1.8 ml (x 1)	3.6 ml (x 1)
FBS	2 ml (x 1)	4 ml (x 1)
L-Glutamine	160 µl (x 1)	320 µl (x 1)
Na-bicarbonate	380 µl (x 1)	760 µl (x 1)
Type I collagen	11.4 ml (x 1)	11.4 ml (x 2)
Matrigel	3.8 ml (x 1)	7.6 ml (x 1)
6x10 ⁵ /ml fibroblasts [*]	1.6 ml (x 1)	3.2 ml (x 1)

x2, Take twice using P-1000 Pipetman.

For two plates	EP2 (300ml)/4°C 24 ml/well, 72 ml/plate for 2 plates
DMEM (-)	218 ml
F12	72 ml
L-Glutamine (LQ)	6 ml
Hydrocortisone (H)	600 µl
ITES	600 µl
O-phosphorylethanolamine (O)	600 µl
Adenine (A)	600 µl
Progesterone (P)	600 µl
Triiodothyronine (T)	600 µl
Newborn Calf Serum (NBCS)	300µl
Gentamycin	300µl

* EP1 も同様の組成.

For two plates	EP3 (200ml) 15 ml/well, 90 ml/plate for 2 plates
DMEM (-)	95 ml
F12	95 ml
L-Glutamine (LQ)	4 ml
Hydrocortisone (H)	400 µl
ITES	400 µl
O-phosphorylethanolamine (O)	400 µl
Adenine (A)	400 µl
Triiodothyronine (T)	400 µl
Newborn Calf Serum (NBCS)	4 ml
Gentamycin	200 µl



8. FACS with organotypic 3D culture samples

試薬及び材料

Collagenase I

(SIGMA-ALDRICH, Tokyo, Japan)

Dispase

(BD Bioscience)

DNase I

(Roche, Indianapolis)

* その他試薬及び材料は 4. Flow cytometry and Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS), 7. Organotypic 3D culture of ESCC の項を参照.

マトリックスなども含む organotypic 3D culture にて培養した組織全体を 1mm³ 程度にきざみ, 1mg/ml の濃度で collagenase I が混合されている DMEM と共に 37°C, 90 分間インキュベートした. 遠心し上清を廃棄した後 0.05% trypsin/EDTA で 37°C, 10 分間インキュベートした. その後 Dispase(1U/ml)と DNase I (100µg/ml)と共に 37°C, 10 分間インキュベートし 40µm の BD ファルコン細胞ストレーナーに通した後, DMEM にて洗浄した. その後, APC-anti-CD44 及び PE/Cy7-anti-CD24 にて染色をし, 最後に死細胞を除外する目的で 7-AAD を加え FACS Canto II にて細胞分布を検討した.

9. Immunohistochemistry

試薬及び材料

Antigen retrieval solution	(Target Retrieval Solution, pH9.0; Dako)
Anti-Ki-67 polyclonal antibody	(Novocastra)
Anti-phospho EGFR monoclonal antibody (D7A5 ; Cell signalling technologies)	
Anti-E-cadherin monoclonal antibody	(4A2C7 ; Lifetechnologies)
Anti-CD44 monoclonal antibody	(Abcam)

Organotypic 3D culture system で培養した腫瘍の状態や免疫化学的な精査を行うため, HE 染色及び免疫染色を行った. 脱パラフィン過程は antigen retrieval solution を用いて Dako PT Link system を使用し 95°C20 分間で行われた. その後 anti-Ki-67 polyclonal antibody, anti-phospho EGFR monoclonal antibody, anti-E-cadherin monoclonal antibody, anti-CD44 monoclonal antibody にて 4°Cの環境下で一晩インキュベートし染色を行った. 検出は EnVision Flex system(Dako)にて行った.

10. Statistical analysis

3 回行った実験からのデータは標準偏差で示され, 2-tailed Student's t test で解析した. $p < 0.05$ を統計的有意差があると判断した.

結果

1.1 $CD44^{High}/CD24^{Low}$ 細胞のタンパク発現

EPC2 細胞を CD24, CD44 で染色を行い flow cytometry で細胞分布を調べたところ、 $CD44^{Low}/CD24^{High}$ の細胞集団と $CD44^{High}/CD24^{Low}$ の細胞集団の二つの集団が認められた。この 2 つの細胞集団における発現タンパクを Western blotting で検討したところ、上皮系マーカーである E-cadherin は $CD44^{Low}/CD24^{High}$ の細胞集団で発現しているのに対し、間葉系マーカーの N-cadherin や EMT において重要な転写因子の一つである ZEB1 は $CD44^{High}/CD24^{Low}$ の細胞集団で高く発現していることがわかり、 $CD44^{High}/CD24^{Low}$ の細胞集団は間葉系の性質をっており、またその維持には EMT が必要であると考えられた(Fig. 1.1).

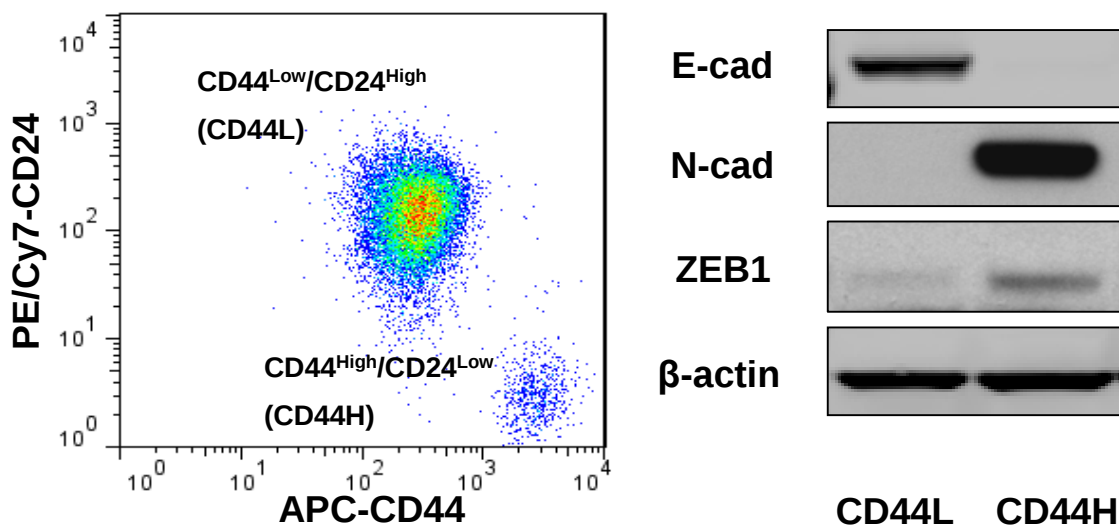


Fig 1.1 $CD44^{High}/CD24^{Low}$ 細胞のタンパク発現

EPC2T 細胞を APC-anti-CD44, PE/Cy7-anti-CD24 で染色を行い flow cytometry で細胞分布を調べると左図の通り $CD44^{Low}/CD24^{High}$ の細胞集団と $CD44^{High}/CD24^{Low}$ の細胞集団の二つの集団に分けられた。この二つの細胞間でのタンパク発現の違いを検証したところ右図の如く、E-cadherin は $CD44^{Low}/CD24^{High}$ の細胞集団で有意に発現しているのに対し、N-cadherin や ZEB1 は $CD44^{High}/CD24^{Low}$ の細胞集団で高く発現していた。

1.2 CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞の遺伝子発現

CD44^{Low}/CD24^{High} と CD44^{High}/CD24^{Low} の 2 つの細胞集団における遺伝子発現を real-time RT-PCR にて検討したところ、CD44^{High} /CD24^{Low} の細胞は CD44^{Low}/CD24^{High} の細胞に比べて上皮系マーカーが低く、また間葉系マーカーが高く発現していた(Fig. 1.2).

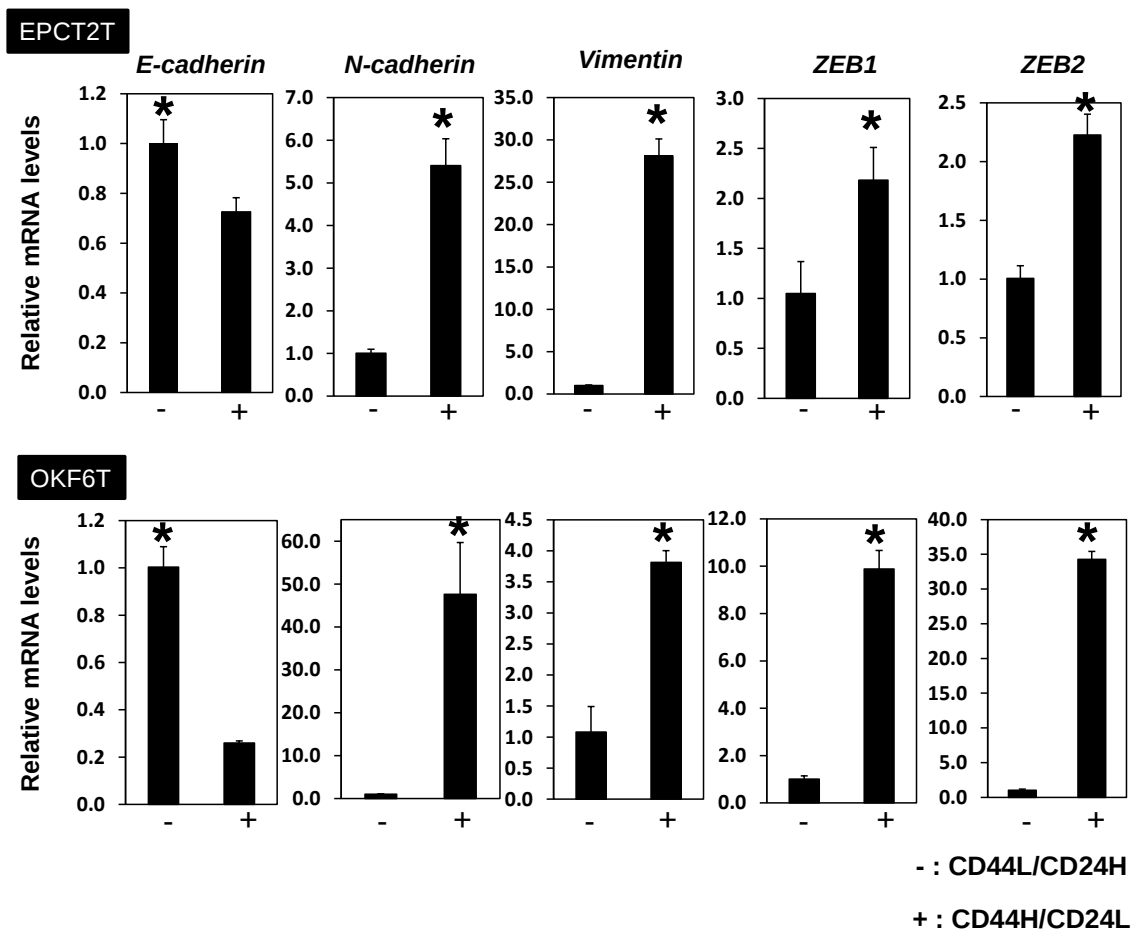


Fig 1.2 CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞の遺伝子発現

CD44^{High} /CD24^{Low} の細胞は CD44^{Low}/CD24^{High} の細胞に比べて上皮系マーカーである E-cadherin が低く、また間葉系マーカーとして知られている N-cadherin や vimentin, EMT に重要な転写因子である ZEBs が高く発現していた。

(* $P < 0.05$ Student's t test)

1.3 CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞の薬剤抵抗性についての解析

MTS assay にて薬剤抵抗性を, CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞と CD44^{Low}/CD24^{High} 細胞の 2 つの細胞集団で比較した. 間葉系の腫瘍細胞である CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞で薬剤抵抗性が高い結果であった(Fig. 1.3).

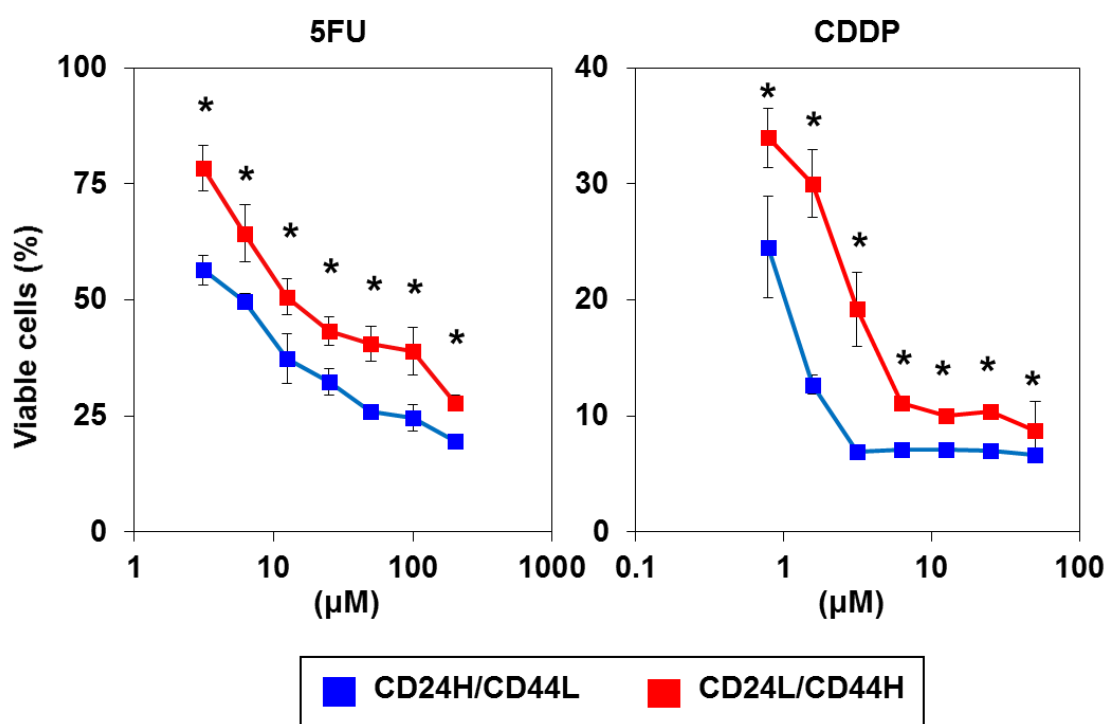


Fig 1.3 CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞と CD44^{Low}/CD24^{High} 細胞の薬剤抵抗性の比較

CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞と CD44^{Low}/CD24^{High} 細胞の薬剤抵抗性を MTS assay にて検討した. 5-FU 若しくは CDDP を投与し 72 時間後に MTS assay を行ったところ, CD44^{Low}/CD24^{High} 細胞に比べて CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞は, 有意に 5-FU と CDDP に対して薬剤抵抗性を示した.

(* $P < 0.05$ Student's t test)

1.4 CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞の非足場依存性腫瘍形成能についての

解析

CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞と CD44^{Low}/CD24^{High} 細胞の 2 つの細胞集団で、非足場依存性の腫瘍形成能を評価するために colony formation assay を行ったところ、CD44^{High}/CD24^{Low} の細胞集団で高いコロニー形成能を有している結果が得られた (Fig. 1.4).

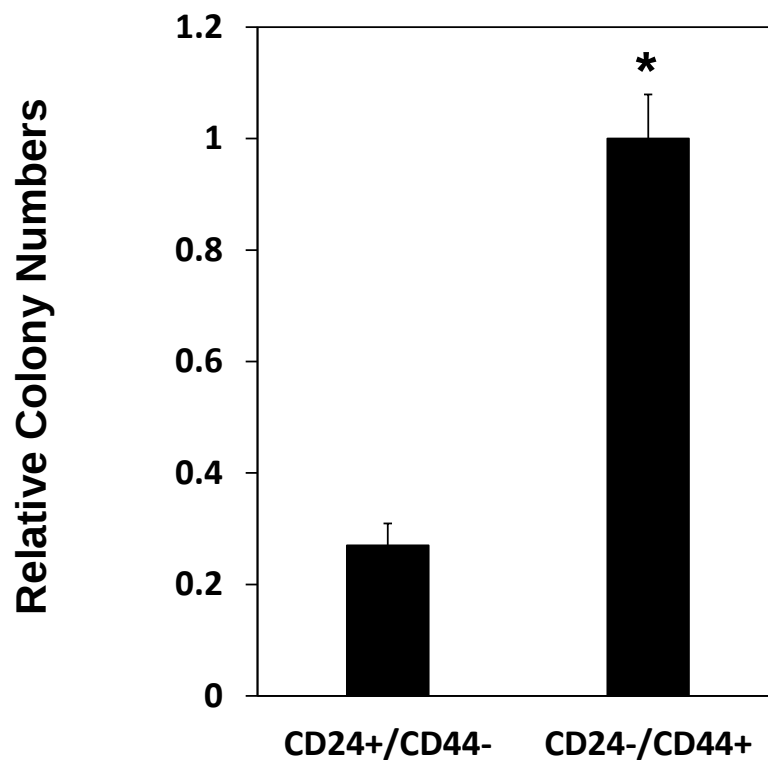


Fig. 1.4 CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞の非足場依存性腫瘍形成能についての解析
OKF6T を CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞と CD44^{Low}/CD24^{High} 細胞に FACS で分離し colony formation assay を施行したところ、CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞は CD44^{Low}/CD24^{High} 細胞と比較し有意に足場依存性に腫瘍形成能が高かった.
(* $P < 0.05$ Student's t test)

以上の結果より $\text{CD44}^{\text{High}}/\text{CD24}^{\text{Low}}$ の細胞集団は間葉系の性質を示し，薬剤抵抗性や非足場依存性の腫瘍形成能を有している結果であり，これらは癌幹細胞として矛盾のない結果であった．

2.1 癌幹細胞に対する EGFR 阻害薬の効果についての検討

EPC2T と OKF6T 細胞において、TGF- β 1 によって EMT を生じさせると^{73,76}, CD44 高発現及び CD24 低発現で定義される癌幹細胞集団 (CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞集団) は著明に増加した(Fig. 2.1A and 2.1B).

次に TGF- β 1 と EGFR 阻害薬の一つである erlotinib を併用投与すると、CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞集団は TGF- β 1 単独投与群と比較し減少を認め、TGF- β 1 が誘導する EMT による癌幹細胞の増加を抑制する事が明らかとなった(Fig. 2.1A). また、もう一つの EGFR 阻害薬である cetuximab でも同様の結果であり、いずれの細胞株でも EGFR 阻害薬は EMT による癌幹細胞の増加を抑制する結果であった(Fig. 2.1B).

しかしながら、erlotinib 若しくは cetuximab の単独投与群では control 群と比較すると CD44^{High}/CD24^{Low} 細胞集団に差がなく、いずれの EGFR 阻害薬も既存の癌幹細胞に対する減少効果は認めなかった(Fig. 2.1A, 2.1B).

また、興味深い事に EGFR 阻害薬で処理することにより CD24 の発現が非癌幹細胞の集団 (CD44^{Low}/CD24^{High} cells) において上昇する傾向があり、CD24 は分裂後の分化したケラチノサイトで発現するケラチノサイトの分化マーカーであることから²⁰, EGFR 阻害薬は分化を誘導する可能性を示唆すると考えられた.

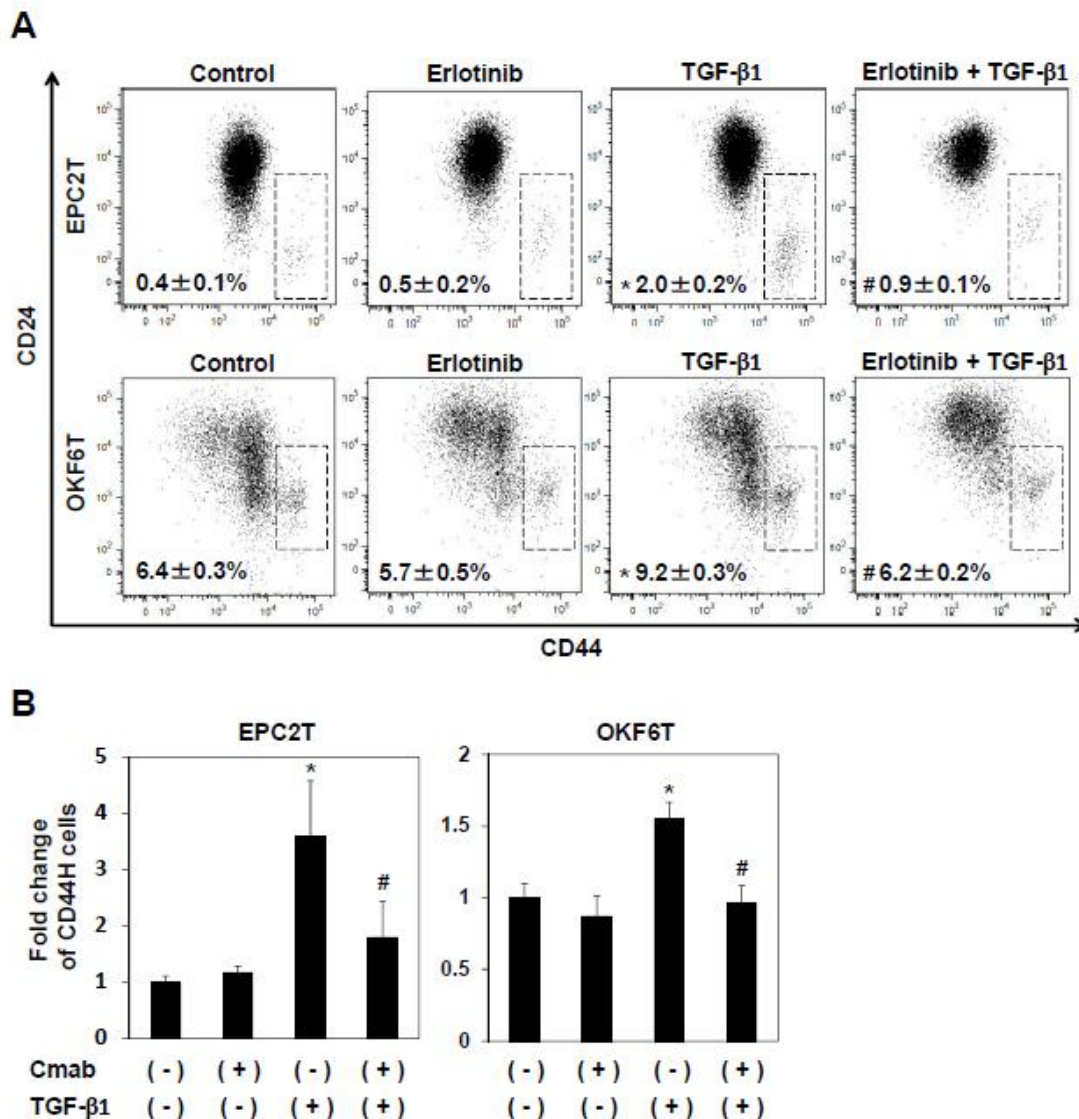


Fig. 2.1A, 2.1B EGFR 阻害薬は TGF-β1 によって誘導される癌幹細胞を抑制する。

(A)EPC2T 及び OKF6T をコントロールとして DMSO とその他 erlotinib 単独投与(2.5μM), TGF-β1 単独投与(5ng/ml), erlotinib と TGF-β1 併用の 4 種類で 72 時間培養し FACS にて細胞分布の変化を検討した。TGF-β1 は CD44 高発現の癌幹細胞を増加誘導させ, erlotinib は TGF-β1 によって誘導される癌幹細胞を抑制した。(*P<0.05 vs. DMSO control, #P<0.05 vs. TGF-β1)

(B) EPC2T 及び OKF6T をコントロールとして DMSO とその他 cetuximab 単独投与(10μg/ml), TGF-β1 単独投与(5ng/ml), erlotinib と TGF-β1 併用の 4 種類で 72 時間培養し FACS にて細胞分布の変化を検討した。erlotinib の場合と同様

に TGF- β 1 は CD44 高発現の癌幹細胞を増加誘導させ, cetuximab は TGF- β 1 によって誘導される癌幹細胞を抑制した. (*P<0.05 vs. DMSO control, #P<0.05 vs. TGF- β 1)

2.2 既存癌幹細胞に対する EGFR 阻害薬の薬剤抵抗性についての

検討

EPC2T および OKF6T を $CD44^{\text{High}}/CD24^{\text{Low}}$ 細胞と $CD44^{\text{Low}}/CD24^{\text{High}}$ 細胞に FACS にて分離し erlotinib の薬剤抵抗性を MTS assay にて検証したが、やはり $CD44^{\text{High}}/CD24^{\text{Low}}$ で著明な薬剤抵抗性が示された(Fig.2.2).

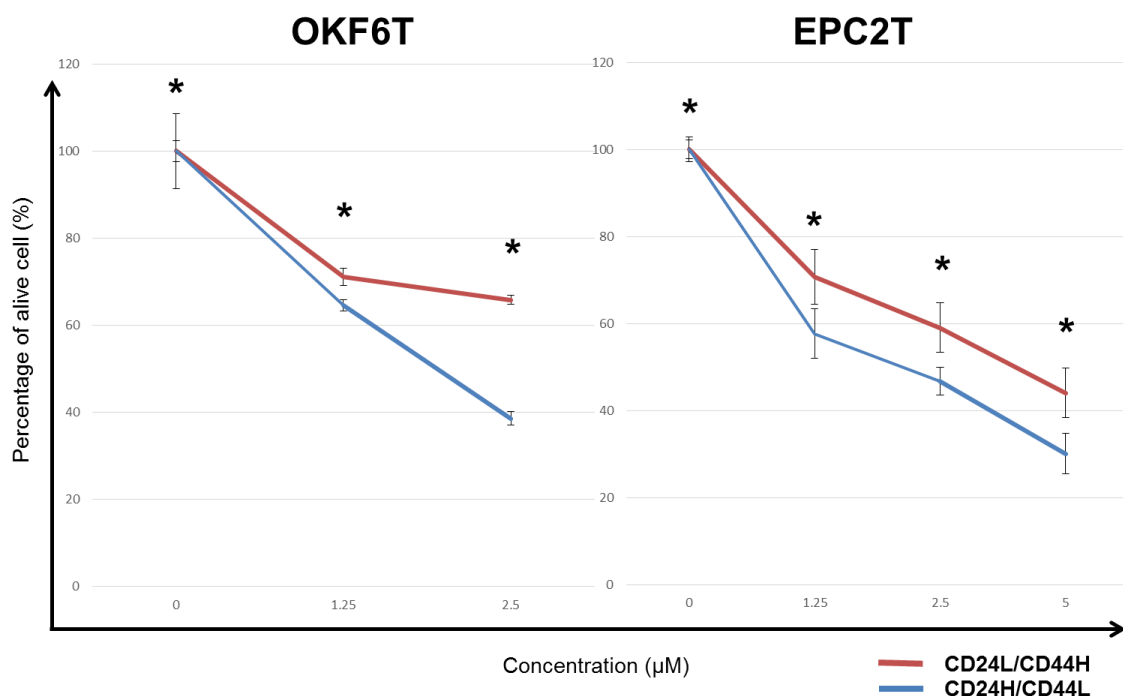


Fig. 2.2 $CD44^{\text{High}}/CD24^{\text{Low}}$ 細胞は erlotinib に対し薬剤抵抗性を有している. EPC2T 及び OKF6T を FACS にて $CD44^{\text{High}}/CD24^{\text{Low}}$ 細胞と $CD44^{\text{Low}}/CD24^{\text{High}}$ 細胞に分離し, 96well plate に 1well あたり 5000 個の割合で細胞を播種させ, 24 時間後に erlotinib を 0μM, 1.25μM, 2.5μM, 5μM に 6well 毎に濃度をわけて投与し 72 時間後に MTS assay を施行した. $CD44^{\text{High}}/CD24^{\text{Low}}$ 細胞は erlotinib に対し $CD44^{\text{Low}}/CD24^{\text{High}}$ 細胞に比較し有意に薬剤抵抗性を認めた.

(* $P < 0.05$ Student's t test)

2.3 非癌幹細胞に対する EGFR 阻害薬の分化誘導作用についての

検討

EPC2T の cell line を用いて CD44^{Low}/CD24^{High} の非癌幹細胞を FACS で分離し、DMSO, erlotinib, cetuximab, TGF- β 1 を用いて細胞の分布の変化を検証した。TGF- β 1 単独投与群では EMT により CD44^{High}/CD24^{Low} の細胞集団が増加を示したが、TGF- β 1 と EGFR 阻害薬を同時に投与した群では CD44^{High}/CD24^{Low} の細胞集団への再分布を抑制した。

これらの結果は、EGFR 阻害薬は TGF- β 1 によって誘導される EMT を妨害し、分化を誘導する可能性を支持する結果であった(Fig. 2.3)。

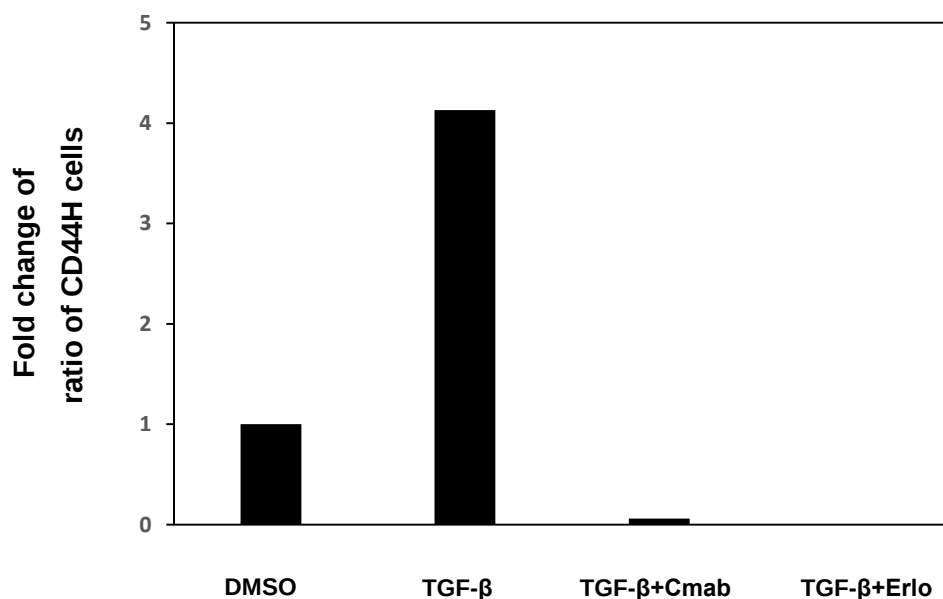


Fig. 2.3 非癌幹細胞に対する EGFR 阻害薬の分化誘導作用についての検討

EPC2T の CD44^{Low}/CD24^{High} に、コントロールとして DMSO とその他 cetuximab 単独投与(10 μ g/ml), erlotinib 単独投与(2.5 μ M), TGF- β 1 単独投与(5ng/ml)、cetuximab と TGF- β 1 併用, erlotinib と TGF- β 1 併用の 6 種類で 72 時間培養し FACS にて細胞分布の変化を検討した。

これらの結果より **EGFR** 阻害薬は非癌幹細胞集団において分化を誘導する事によって **EMT** をブロックし, **EMT** による癌幹細胞の増加を抑制する事が示唆された.

3.1 食道扁平上皮癌における EGFR 阻害薬の ZEBs に対する効果の検討

我々は食道扁平上皮癌において zinc finger E-box binding proteins (ZEBs) が EMT における重要な転写因子であることを報告した⁷³。このため今回我々は EGFR 阻害剤の ZEBs の発現へ及ぼす影響を検討した。

erlotinib 及び cetuximab を投与し 72 時間培養後、real-time RT-PCR で ZEB1 と ZEB2 の発現を調べたところ、いずれの発現も著明に抑制された (Fig. 3.1A and 3.1B)。

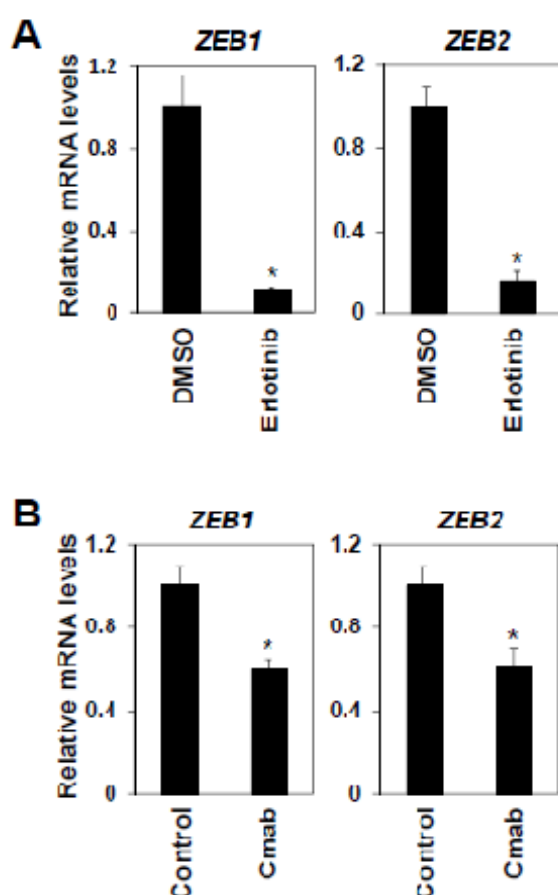


Fig. 3.1A, 3.1B EGFR 阻害薬は ZEB1 及び ZEB2 の発現を抑制する。

(A)EPC2T に erlotinib を投与し 72 時間後に real-time RT-PCR を施行し ZEBs の発現を検討した。erlotinib 投与群で ZEBs の発現は抑制されていた。

(*P<0.05 vs. DMSO control)

(B)EPC2T に cetuximab を投与し 72 時間後に real-time RT-PCR を施行し ZEBs の発現を検討した。(A)と同様に cetuximab 投与群で ZEBs の発現は抑制されていた。(*P<0.05 vs. DMSO control)

3.2 食道扁平上皮癌における EGFR 阻害薬の分化マーカーに対する影響についての検討

EGFR 阻害剤投与後の扁平上皮の分化マーカーである CK13 や involucrin, 食道の扁平分化に重要な転写因子である Notch1 と Notch3 の発現の変化について検討した. EPC2T 及び OKF6T を erlotinib 投与下で 72 時間培養し real-time RT-PCR を行い発現調べた結果, いずれの細胞株でもこれらの分化マーカーの発現が上昇している事がわかった. これらの結果はケラチノサイトの分化マーカーである CD24 の発現上昇を支持するものと考えられた(Fig. 3.2). また広く知られている上皮系マーカーである CDH1 もまた EGFR を阻害する事により明らかな発現上昇を認めた(Fig. 3.2).

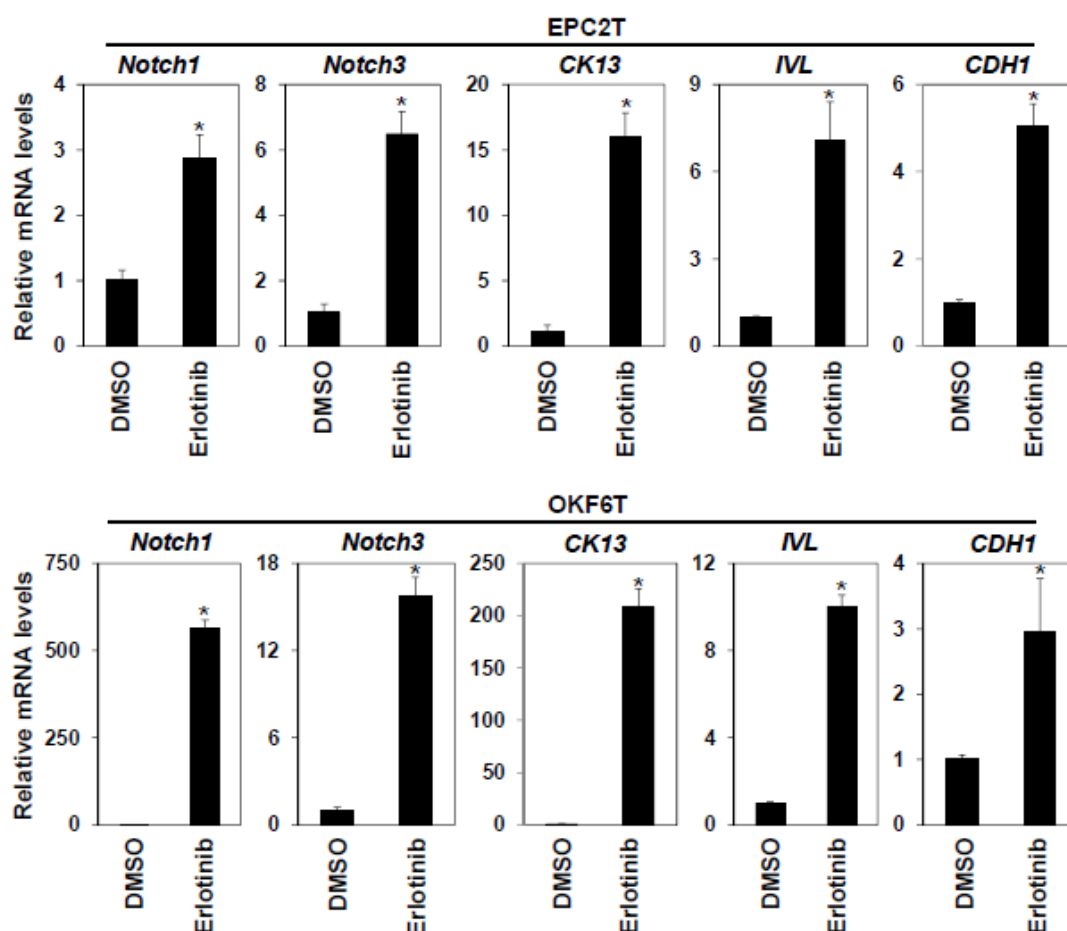


Fig. 3.2 erlotinib は分化マーカーの発現を上昇させる.

EPC2T 及び OKF6T を erlotinib(2.5 μ M)投与下で 72 時間培養し, その後 real-time RT-PCR で遺伝子発言を検索した. ケラチノサイトの分化において重要な転写因子である NOTCH1 と NOTCH3 は erlotinib 投与によって発現が上昇しており, その他分化マーカーである CK13, involucrin(IVL), CDH1 の発現も上昇を認めた. (*P<0.05 vs. DMSO control)

4.1 organotypic 3-D culture での腫瘍に対する EGFR 阻害の効果についての検討

我々は、より生体内での EGFR 阻害剤の効果を検討するために、食道扁平上皮癌 3 次元培養モデルを作成し実験を行った。

3 次元培養は 1 型コラーゲンやマトリジェル、フィーダーとして繊維芽細胞を混合しマトリックスを作成したものの上に腫瘍細胞を培養し、従来の 2 次元細胞培養と比較しより生体内での細胞増殖の形態に近づけて実験できるモデルである。コントロール群では、EPC2T 及び OKF6T 細胞はマトリックス上では上皮系の性質をもった腫瘍細胞の増殖と、一部 EMT を介した間質への腫瘍細胞の浸潤が認められた(Fig. 4.1)。

抗 EGFR 抗体を使用し免疫組織染色にて検討したところ、EGFR は多くの腫瘍細胞で活性化されていたが、erlotinib で処理したものでは EGFR 活性が妨げられていた(Fig. 4.1)。

また、erlotinib は上皮部のコンパートメントにおける腫瘍増生を抑制し、マトリックスへの浸潤もまた抑制した(Fig. 4.1)。3 次元培養での E-cadherin の発現の変化を免疫染色にて検討したところ、erlotinib により E-cadherin の発現は上昇を認めた(Fig. 4.1)。cetuximab でも同様の結果であり 3 次元培養においても腫瘍増殖、マトリックスへの腫瘍浸潤を抑制した。

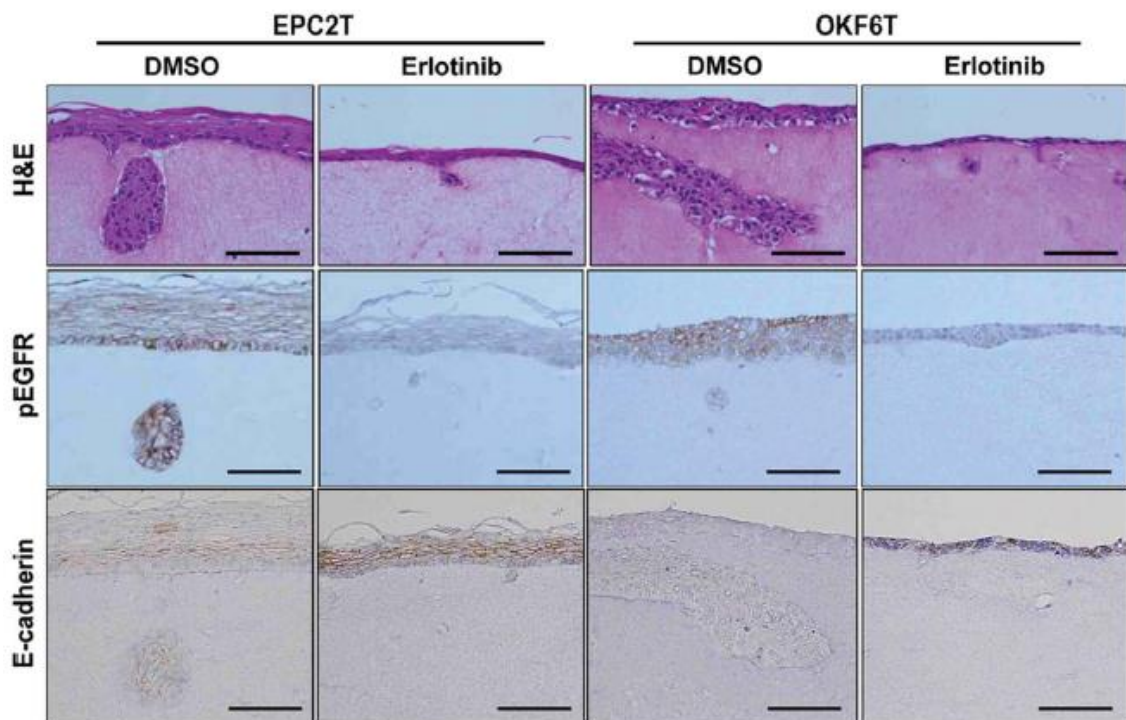


Fig. 4.1 erlotinib は organotypic 3-D culture において腫瘍発育及び腫瘍浸潤を，癌幹細胞を抑制するのと同様に抑制する．

3次元培養において erlotinib(5 μ M)投与し，HE 染色，抗 EGFR 抗体，抗 E-cadherin 抗体を用いて免疫染色を行った．（Scale bar：100 μ m）

4.2 EGFR 阻害薬の腫瘍増殖能に対する効果についての検討

細胞増殖能を Ki67 を用いた免疫染色で検討したところ、コントロール群では上皮部のコンパートメントでは基底層部分の増殖能が高く、erlotinib 投与により Ki67 陽性細胞は著明に減少した(Fig. 4.2).

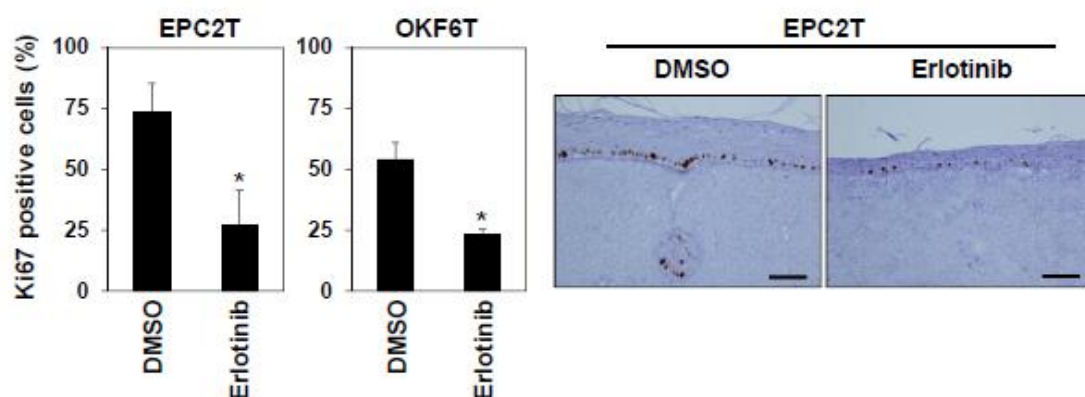


Fig. 4.2 erlotinib は腫瘍増殖能を抑制する.

腫瘍増殖能を Ki-67 染色により解析した. ヒストグラムは基底層の Ki67 陽性細胞の割合を示す. erlotinib 投与により Ki67 陽性細胞は減少する結果であった.

(Scale bar は 100 μ m. *P<0.05 vs. DMSO control)

4.3 organotypic 3-D culture における EGFR 阻害薬の CD44 発現に対する効果についての検討

3次元培養での腫瘍部の CD44 の発現について免疫染色にて検討したところ、コントロールの EPC2T では上皮部のコンパートメントの基底層部分の腫瘍細胞と浸潤部で発現が高く、OKF6T では腫瘍細胞のほとんどで高発現を示していた。一方で erlotinib を投与する事で CD44 の発現はいずれの細胞株でも著明に抑制された(Fig. 4.3).

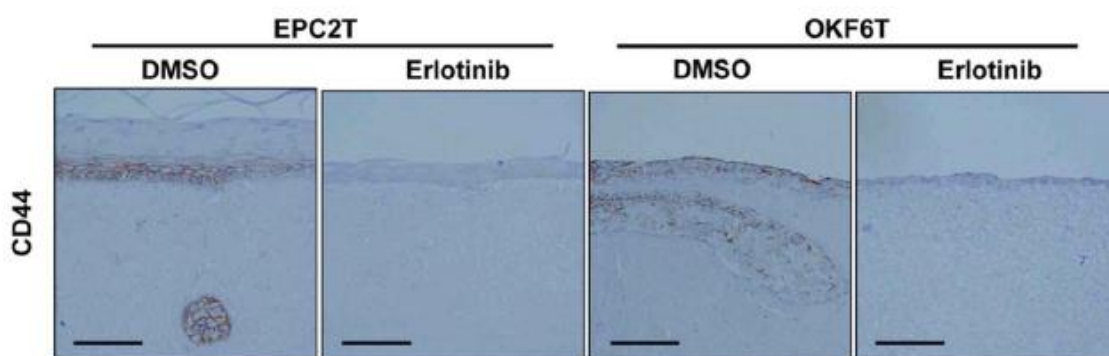


Fig. 4.3 erlotinib は CD44 発現を抑制する.

3次元培養検体を抗 CD44 抗体で染色し、CD44 の発現を検討した
(Scale bar : 100 μ m).

4.4 EGFR 阻害薬による organotypic 3-D culture における腫瘍の CD44 発現についての flow cytometry を用いた検討

さらに 3 次元培養組織から腫瘍細胞を分離し，FACS にて CD44 の発現を評価した．先の CD44 の免疫染色の結果と同様に，erlotinib 投与群で 3 次元培養にて培養した EPC2T(Fig. 4.4A)及び OKF6T(Fig. 4.4B)のいずれの細胞株でも CD44^{High}/CD24^{Low} の細胞集団は減少しており，癌幹細胞の維持及び増幅を抑制する結果であった．

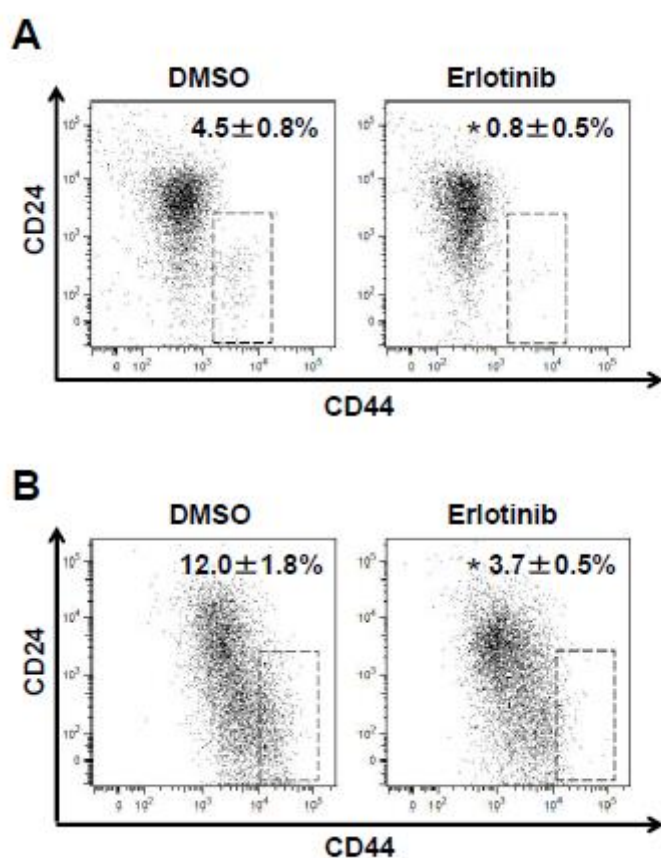


Fig. 4.4A, 4.4B CD44 高発現癌幹細胞は organotypic 3-D culture で erlotinib 投与により減少する．

EPC2T と OKF6T を erlotinib(5 μ M)投与下で 3 次元培養にて培養し，その後腫瘍細胞を 3 次元培養組織より分離し，APC-anti-CD44，PE/Cy7-anti-CD24 で染色を行い FACS にて検討した．(*P<0.05 vs. DMSO control)

以上の結果より，EGFR 阻害薬は EMT やそれにより 維持，増幅される CD44 高発現の癌幹細胞を抑制できる可能性が示唆された．

考察

我々は TGF- β 1 によって誘導される EMT は食道扁平上皮癌の浸潤部先端において認められ、腫瘍の進展に寄与している事を報告している^{73,76,77}。EGFR はしばしば食道扁平上皮癌で過剰発現しており、EGFR は EMT の過程で重要である。特に EGFR は、食道扁平上皮癌において TGF- β 1 によって誘導される EMT の最も重要な因子の一つである⁷³。

さらに様々な癌種において EMT によって間葉様に変化した癌細胞が癌幹細胞である事が報告されている。Mani SA らにより、CD44^{High}/CD24^{Low} の癌幹細胞は乳腺上皮細胞において、TGF- β 1 によって誘導される EMT により著明に増加する事が報告されている¹⁴。この報告と同様に、今回の研究でも癌幹細胞は TGF- β 1 によって誘導される EMT を経て著明に増加した。

EMT は食道扁平上皮癌において癌幹細胞の発生及び維持の重要なステップでもある。これらの研究により我々は食道扁平上皮癌における癌幹細胞に対して EGFR が治療標的となりうるのではないかと仮定した(Fig. 2.1A and 2.1B)。本研究では EMT を防ぐことにより癌幹細胞の維持及び増加は EGFR 阻害薬により抑制できる結果を得たが、しかしながら、既存の癌幹細胞に対しては、EGFR 阻害薬は大きな効果は認められず、既存の癌幹細胞は EGFR の阻害に対して治療抵抗性であると考えられた。実際今回の実験で OKF6T および EPC2T を CD44^{High}/CD24^{Low} の癌幹細胞と CD44^{Low}/CD24^{High} の非癌幹細胞に FACS で分離し EGFR 阻害薬の薬剤抵抗性を MTS assay にて検証したところ CD44^{High}/CD24^{Low} で著明な薬剤抵抗性を認め、これを支持するがごとく Basu D らは、間葉様癌幹細胞は EGFR には非依存的であり EGFR 阻害薬に対して抵抗性を示すことを報告した。EGFR 阻害は TGF- β 1 など周囲の微小環境からの分泌因子による癌幹細胞の増加に対して効果的であることが示されたが、一方で進行食道扁平上皮癌の根治には既存の間葉様癌幹細胞を標的としたさらなる治療戦略の確立が必要と考えられた。

EGFR 阻害薬は本研究で ZEB1 及び ZEB2 の発現を抑制する事がわかった(Fig. 3.1A and 3.2B)。ZEBs は EMT を促進する重要な役割を果たす転写因子である。ZEBs は直接 E-cadherin のプロモーター領域に結合し、その転写活性を抑制するとともにいくつかの EMT 関連遺伝子を制御する miRNA である miR-200 ファミリーを誘導する^{78,79}。ZEB1 は特に食道扁平上皮癌の EMT に対して重要であり、我々は以前食道扁平上皮癌において EGFR は ZEB1 を活性化する事により EMT を促進させ、逆に ZEB1 をノックダウンする事により TGF- β 1 が誘導する EMT を抑制する事を示した。この研究結果と同様に、今回の研究結果でも EGFR 阻害薬は ZEB1 の転写活性を抑制する事により EMT を抑制し、

CD44 高発現癌幹細胞の発生を抑制すると考えられた。

扁平上皮由来の細胞では EMT は脱分化のプロセスであり、EMT により間葉系の性質を獲得すると同時に扁平分化マーカーは著明に抑制される。近年 Lee B らによると、Ovol1/Ovol2 欠損の扁平上皮細胞は最終分化が起こらず逆に EMT が生じるが、ZEB1 をノックダウンする事により再度分化の方向に戻すことができるとの報告がある⁸⁰。私たちもまた本研究において、ZEB1 が過剰発現している食道扁平癌の癌幹細胞は CK13 や involucrin などのケラチノサイトの分化マーカーを抑制し、一方で EGFR 阻害薬により ZEB1 が抑制されるとこれらの分化マーカーは上昇する結果であった。このように EGFR 阻害薬は癌幹細胞を抑制すると同時に ZEB1 を抑制することによりケラチノサイトの分化を誘導するものと考えられた(Fig. 3.2)。

本研究では、従来の 2 次元培養と比較しより生体内での細胞増殖の形態に近づけて組織培養を可能にする食道扁平上皮癌の 3 次元培養を利用した。この 3 次元培養を用いることで、生体内に近い不均質な腫瘍細胞の分析をより正確にできる⁷⁵。食道扁平上皮癌の EMT において最も重要な制御因子の一つである ZEB1 は、食道扁平上皮癌の外科的切除検体では腫瘍の浸潤部に強く発現しており⁷⁶、この所見と一致する様に、CD44 も 3 次元培養において EMT が生じている腫瘍浸潤部に強く発現していた(Fig.4.3)^{76,77}。我々の以前および今回の研究結果では、癌幹細胞の増幅及び維持に適した環境を与えるのに、食道扁平上皮癌の浸潤部においてニッチが組織されている可能性が示唆された。さらにこの癌幹細胞ニッチは癌幹細胞の治療標的となりうる可能性も考えられる。本研究では我々は腫瘍細胞に存在する腫瘍促進因子の一つである EGFR に注目したが、癌幹細胞ニッチを形成する様々な細胞から分泌されるその他の分泌因子も新たな治療標的となりえる可能性もある。例えば、3 次元培養では使用する線維芽細胞の種類により腫瘍浸潤の程度は著しく異なり、HGF (hepatocyte growth factor: 肝細胞増殖因子) が腫瘍浸潤を増加させることが報告されている⁸¹。ただし 3 次元培養の限界の一つとして、このシステムには炎症細胞や血管内皮細胞などは含まれていない事が挙げられ、これらは腫瘍進展、生物学的悪性度、癌幹細胞ニッチの構成にも重要である。また、癌幹細胞は低酸素環境に存在しており⁸²、細胞内低酸素状態の環境下で癌幹細胞ニッチと相互作用する事で HIF (hypoxia-inducible factor) などのシグナル伝達経路の活性により、細胞周期を静止期にとどめ個体恒常性の維持や薬剤抵抗性に寄与すると同時に、EMT や癌の進行などにも重要である⁸³⁻⁸⁶。このため、癌幹細胞ニッチのさらなる再現を可能にするような新たな 3 次元培養システムの開発や *in vivo* での食道扁平上皮癌モデルを用いたさらなる研究が、癌幹細胞及び癌幹細胞ニッチをさらに正確に理解するために必要と考える。

最近では癌幹細胞から様々な **subclone** が創出されるとされる古典的 **CSC** 仮説は固形癌においては適さず、癌幹細胞性を有する細胞が **plasticity** を示し動的に移行する、いわゆる **Dynamic stemness model** も提唱されており⁸⁷、癌幹細胞を標的にする治療のみではなくこの **plasticity** そのものを標的にするような治療法の確立などの検討など、従来の癌幹細胞の観点を越えた癌幹細胞のさらなる本態を解明する事が重要と考える。本研究でも **EMT** を介して非癌幹細胞が癌幹細胞様の性質を再獲得する事が示されており、**EMT** を抑制する事はこの **plasticity** に対する治療の一つとなり得る事も考えられた。

さらには癌幹細胞のみではなく、加えて全癌的な治療の併用も重要と考えられ、最近の研究では低酸素下での適応に **Na⁺/H⁺ exchangers** が寄与する事や⁸⁸、**p53** の腫瘍形成抑制作用について従来提唱されているアポトーシスや細胞周期停止の他 **GLS2**, **TIGAR**, **GLUT3** などに作用し代謝を介して寄与する事⁸⁹、腸管細菌叢が腫瘍微小環境を調整する事により抗腫瘍薬の反応を増強する事などが報告されており⁹⁰、癌根治という目標に対し、今後癌幹細胞を含め多面的かつ包括的な治療の開発及び研究を進めていかなければならないと考える。

本研究では **EMT** は癌幹細胞の増幅及び維持に重要な過程であり、**EMT** が生じている食道扁平上皮癌の腫瘍浸潤部は癌幹細胞ニッチを形成していると考えられた。**EGFR** 阻害薬はこの浸潤部での **EMT** を抑制し、食道扁平上皮癌の癌幹細胞を標的とした一つの治療オプションとなり得ると考えられた。

総括

本研究において、以下の知見が得られた。

1. 食道扁平上皮癌において、**EGFR** を阻害する事で **TGF- β 1** によって惹起される **EMT** を抑制し、癌幹細胞の増幅を抑制する。
2. 食道扁平上皮癌において **EGFR** を阻害する事で **EMT** に重要な転写因子の **ZEB1** を抑制し、分化を誘導する。
3. 食道扁平上皮癌 3次元培養において、**EGFR** 阻害剤は **EMT** を抑制し **CD44** 高発現の癌幹細胞の増幅を抑制する事により、腫瘍の増殖や浸潤を抑制することが可能であった。

以上の知見から **EGFR** 阻害薬は、扁平分化を誘導し **EMT** を抑制する事で癌幹細胞の増幅を抑制する事が明らかとなった。食道扁平上皮癌の癌幹細胞に対する一つの治療オプションとなりえると考えられる。

今回の研究では **EGFR** 阻害薬は上皮系癌細胞からの **EMT** による癌幹細胞の発生を抑制する事は示されたが、既存の間葉系癌幹細胞に対する効果は期待できない。今後はこの既存の間葉系癌幹細胞に対する治療法のさらなる探索が必要である。また、今回使用した 3次元培養では癌幹細胞ニッチの重要な構成細胞である炎症細胞や内皮細胞などは含まれていないため、新たな 3次元培養モデルの構築、*in vivo* での食道扁平上皮癌モデルを用いたさらなる検討が必要と考える。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、有益な御指導・御助言を頂きました北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 坂本直哉教授に深く感謝いたします。

また、一から研究に対する考え方、実験方法、データ解釈、論文作成など様々な面において終始御指導・御援助頂きました北海道大学大学院医学研究科内科学講座消化器内科学分野 夏井坂光輝助教（現客員研究員）には感謝の念に堪えません。誠に厚く御礼申し上げます。

人員不足の中、研究室での研究に御助力頂いた北海道大学医学研究科内科学講座消化器内科学分野の皆様には深く感謝いたします。

最後に、研究生活を支えてくれた妻と息子達、及び両親、親族に感謝します。

2016 年 3 月

佐藤 史幸

引用文献

- 1 Pennathur, A., Gibson, M. K., Jobe, B. A. & Luketich, J. D. Oesophageal carcinoma. *The Lancet* **381**, 400-412, (2013).
- 2 Oyama, T. *et al.* Endoscopic submucosal dissection of early esophageal cancer. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 67-70, (2005).
- 3 Shimizu, Y. *et al.* Long-term outcome after endoscopic mucosal resection in patients with esophageal squamous cell carcinoma invading the muscularis mucosae or deeper. *Gastrointestinal. Endoscopy* **56**, 387-390, (2002).
- 4 Shaheen, N. J. *et al.* Radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2277-2288 (2009).
- 5 Bergman, J. J. *et al.* Outcomes from a prospective trial of endoscopic radiofrequency ablation of early squamous cell neoplasia of the esophagus. *Gastrointest. Endosc.* **74**, 1181-1190, (2011).
- 6 Fokas, E., Weiss, C. & Rodel, C. The role of radiotherapy in the multimodal management of esophageal cancer. *Dig. Dis.* **31**, 30-37, (2013).
- 7 Clarke, M. F. *et al.* Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* **66**, 9339-9344, (2006).
- 8 Wicha, M. S., Liu, S. & Dontu, G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* **66**, 1883-1890; discussion 1895-1886, (2006).
- 9 Yoshida, T. Studies on an ascites (reticuloendothelia cell?) sarcoma of the rat. *J. Natl. Cancer Inst.* **12**, 43-65, (1952).
- 10 Bonnet, D., Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3**, 730-737, (1997).
- 11 Clevers, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.* **17**, 313-319, (2011).
- 12 Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* **10**, 717-728, (2012).
- 13 Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674, (2011).
- 14 Mani, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715, (2008).

- 15 Radisky, D. C. & LaBarge, M. A. Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype. *Cell Stem Cell* **2**, 511-512, (2008).
- 16 Guzman, M. L. *et al.* Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 16220-16225, (2002).
- 17 Al-Hajj, M. *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 3983-3988, (2003).
- 18 Sheila, K. Singh. *et al.* Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res.* **63**, 5821-5828, (2003).
- 19 Gavin, D. Richardson. *et al.* CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J. Cell Sci.* **117**, 3539-3545, (2004).
- 20 Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-115, (2007).
- 21 Prince, M. E. *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**, 973-978, (2007).
- 22 Yang, Z. F. *et al.* Identification of local and circulating cancer stem cells in human liver cancer. *Hepatology* **47**, 919-928, (2008).
- 23 Zhu, Z. *et al.* Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133+CD44+ population in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* **126**, (2010).
- 24 Yamashita, T. *et al.* EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* **136**, 1012-1024, (2009).
- 25 Ma, S. *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* **132**, 2542-2556, (2007).
- 26 Chiba, T. *et al.* Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology* **44**, 240-251, (2006).
- 27 Chen, K., Huang, Y. H. & Chen, J. L. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta. Pharmacol. Sin.* **34**, 732-740, (2013).
- 28 Simon, M. C. & Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 285-296, (2008).
- 29 Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T. & Quinones-Hinojosa, A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* **7**, 150-161, (2010).

- 30 Forristal, C. E., Wright, K. L., Hanley, N. A., Oreffo, R. O. & Houghton, F. D. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction* **139**, 85-97, (2010).
- 31 Ezashi, T., Das, P. & Roberts, R. M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**, 4783-4788, (2005).
- 32 Greenburg, G. & Hay, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* **95**, 333-339, (1982).
- 33 Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420-1428, (2009).
- 34 Yang, J. & Weinberg, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell.* **14**, 818-829, (2008).
- 35 Sabe, H. Cancer early dissemination: cancerous epithelial-mesenchymal transdifferentiation and transforming growth factor beta signalling. *J. Biochem.* **149**, 633-639, (2011).
- 36 Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-890, (2009).
- 37 Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **7**, 131-142, (2006).
- 38 Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**, 156-172, (2009).
- 39 PubMed.gov. Entrez Gene.
- 40 Reiter, J. L. *et al.* Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* **71**, 1-20, (2001).
- 41 Hunter, T. & Sefton, B. M. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 1311-1315, (1980).
- 42 Gschwind, A., Fischer, O. M. & Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 361-370, (2004).

- 43 Chen, D. J. & Nirodi, C. S. The epidermal growth factor receptor: a role in repair of radiation-induced DNA damage. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6555-6560, (2007).
- 44 Carpenter, G., Lembach, K. J., Morrison, M. M. & Cohen, S. Characterization of the binding of 125-I-labeled epidermal growth factor to human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **10**, 4297-4304, (1975).
- 45 Carpenter, G., King, L. Jr. & Cohen, S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* **276**, 409–410, (1978).
- 46 Gullick, W.J. *et al.* The structure and function of the epidermal growth factor receptor studied by using antisynthetic peptide antibodies. *Proc. R Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **226**, 127-134, (1985).
- 47 Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127–137, (2001).
- 48 山本 雅, 仙波 憲太郎, 山梨 裕司. イラストで徹底理解する シグナル伝達キーワード事典. 羊土社, 東京都千代田区神田小川町 2-5-1, 2012, 21-24, 142-144.
- 49 Scaltriti, M & Baselga, J. The epidermal growth factor receptor pathway. a model for targeted therapy. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5268-5272, (2006).
- 50 Yamamoto, T. *et al.* A new avian erythroblastosis virus, AEV-H, carries erbB gene responsible for the induction of both erythroblastosis and sarcomas. *Cell* **34**, 225-232, (1983).
- 51 Downward, J. *et al.* Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* **307**, 521-527, (1984).
- 52 Normanno, N., Maiello, M. R. & De Luca, A. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action? *J Cell Physiol* **194**, 13-19, (2003).
- 53 Selvaggi, G. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology* **15**, 28-32, (2004).
- 54 Hirsch, F. R. *et al.* Epidermal growth factor receptor in non-small cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology* **21**, 3798-3807, (2003).

- 55 Pedersen, M. W., Meltorn, M., Damstrup, L. & Poulsen, H. S. The type III epidermal growth factor receptor mutation. *Annals of Oncology* **12**, 745-760, (2001).
- 56 Weinberg, R. A., the biology of cancer second edition. Garland Science, New York, 2013.
- 57 Jia, M. & Souchelnytskyi, S. Comments on the cross-talk of TGF β and EGF in cancer. *Exp. Oncol.* **33**, 170-173, (2011).
- 58 ten Dijke, P. & Hill, C. S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* **29**, 265-273, (2004).
- 59 Massague, J. TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**, 215-230, (2008).
- 60 Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massagué, J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* **13**, 804-816, (1999).
- 61 Grände, M. *et al.* Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. *J. Cell Sci.* **115**, 4227-4236, (2002).
- 62 Uttamsingh, S. *et al.* Synergistic effect between EGF and TGF-beta1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells. *Oncogene* **27**, 2626-2634, (2008).
- 63 Xue, L. *et al.* miR-200 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Anaplastic Thyroid Cancer via EGF/EGFR Signaling. *Cell Biochem Biophys* **72**, 185-190, (2014).
- 64 Hill, L., Browne, G. & Tulchinsky, E. ZEB/miR-200 feedback loop: at the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer* **132**, 745-754, (2013).
- 65 Xiao, D. & He, J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *J Thorac Dis* **2**, 154-159, (2010).
- 66 Zhao, J. S. *et al.* Tumor initiating cells in esophageal squamous cell carcinomas express high levels of CD44. *PLoS One* **6**, (2011).
- 67 Ling. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncology Reports* **22**, (2009).
- 68 Zoller, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* **11**, 254-267, (2011).

- 69 Natsuizaka, M. *et al.* IGFBP3 promotes esophageal cancer growth by suppressing oxidative stress in hypoxic tumor microenvironment. *Am. J. Cancer Res.* **4**, 29-41, (2014).
- 70 Bao, B. *et al.* Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* **307**, 26-36, (2011).
- 71 Chen, C. *et al.* Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* **6**, (2011).
- 72 Itakura, Y. *et al.* Epidermal growth factor receptor overexpression in esophageal carcinoma. An immunohistochemical study correlated with clinicopathologic findings and DNA amplification. *Cancer* **74**, 795-804, (1994).
- 73 Ohashi, S. *et al.* Epidermal growth factor receptor and mutant p53 expand an esophageal cellular subpopulation capable of epithelial-to-mesenchymal transition through ZEB transcription factors. *Cancer Res* **70**, 4174-4184, (2010).
- 74 Dickson, M. A. *et al.* Human keratinocytes that express hTERT and also bypass ap16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1436-1447, (2000).
- 75 Kalabis, J. *et al.* Isolation and characterization of mouse and human esophageal epithelial cells in 3D organotypic culture. *Nat Protoc* **7**, 235-246, (2012).
- 76 Ohashi, S. *et al.* A NOTCH3-mediated squamous cell differentiation program limits expansion of EMT-competent cells that express the ZEB transcription factors. *Cancer Res* **71**, 6836-6847, (2011).
- 77 Natsuizaka, M. *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein-3 promotes transforming growth factor- β 1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and motility in transformed human esophageal cells. *Carcinogenesis* **31**, 1344-1353, (2010).
- 78 Brabletz, S. *et al.* The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J* **30**, 770-782, (2011).

- 79 Vandewalle, C., Van Roy, F. & Berx, G. The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cell Mol Life Sci* **66**, 773-787, (2009).
- 80 Lee, B. *et al.* Transcriptional mechanisms link epithelial plasticity to adhesion and differentiation of epidermal progenitor cells. *Dev Cell* **29**, 47-58, (2014).
- 81 Riquelme, I. *et al.* Molecular classification of gastric cancer: Towards a pathway-driven targeted therapy. *Oncotarget* **22**, 24750-24779, (2015).
- 82 Harris, A. L. *et al.* Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**, 38-47, (2002).
- 83 Forristal, C. E. *et al.* Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction* **139**, 85-97, (2010).
- 84 Comerford, K. M. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res* **62**, 3387-3394, (2002).
- 85 Heddlestone, J. M. *et al.* Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. *Br J Cancer* **102**, 789-795, (2010).
- 86 Higgins, D. F. *et al.* Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **117**, 3810-3820, (2007).
- 87 Roesch, A. *et al.* A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* **141**, 583-594, (2010).
- 88 Gatenby, R. A. *et al.* Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *Br J Cancer* **97**, 646-653, (2007).
- 89 Li, T. *et al.* Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell* **149**, 1269-1283, (2012).
- 90 Iida, N. *et al.* Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* **342**, 967-970, (2013).