HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アテローム性動脈硬化症ならびに膵癌における細胞ストレス誘導分子の発現
Author(s)	池下, 隼司
Description	配架番号：2337
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12833号
Issue Date	2017-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12833
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67439
Type	doctoral thesis
File Information	Shunji_Ikeshita.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

アテローム性動脈硬化症ならびに膵癌における細胞ストレス誘導分子の発現

（Expression of cellular stress-induced molecules in atherosclerosis and pancreatic carcinoma）

2017 年 9 月

北　海　道　大　学

池　下　隼　司

学　位　論　文

アテローム性動脈硬化症ならびに膵癌における細胞ストレス誘導分子の発現

（Expression of cellular stress-induced molecules in atherosclerosis and pancreatic carcinoma）

2017 年 9 月

北　海　道　大　学

池　下　隼　司

目　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁
全体の緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁
略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4 頁

第一章：ヒトアテローム性動脈硬化症における NKG2D リガンドの発現
1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・6 頁
2. 実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7 頁
3. 実験結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10 頁
4. 考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14 頁

第二章：膵癌細胞の分裂期における CD44v9 の高発現
1. 緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・16 頁
2. 実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18 頁
3. 実験結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・20 頁
4. 考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・25 頁

総括および結論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・27 頁
謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・29 頁
引用文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・30 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究成果は以下の 2 編の論文として報告した。

1. Ikeshita S, Miyatake Y, Otsuka N, Kasahara M: MICA/B expression in macrophage foam cells infiltrating atherosclerotic plaques. *Experimental and Molecular Pathology*, 97: pp171-175, 2014.

2. Kiuchi S*, Ikeshita S*, Miyatake Y, Kasahara M: Pancreatic cancer cells express CD44 variant 9 and multidrug resistance protein 1 during mitosis. *Experimental and Molecular Pathology*, 98: pp41-46, 2015.
*これらの著者は筆頭著者として同等に貢献した。

本研究の一部は以下の学会において発表した。

1. 池下隼司、宮武由甲子、木内静香、朴鐘建、大塚紀幸、笠原正典 「上皮系フェノタイプを持った膵癌細胞では細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 発現が亢進する」、『第 104 回日本病理学会総会』、2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日、名古屋

2. 池下隼司、宮武由甲子、笠原正典 「上皮系フェノタイプを持った膵癌細胞では細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 の発現が亢進する」、『第 74 回日本癌学会総会』、2015 年 10 月 8 日-10 日、名古屋

3. 池下隼司、宮武由甲子、木内静香、朴鐘建、大塚紀幸、笠原正典 「上皮系形質を持つ膵管腺癌細胞は細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 の発現を亢進させる」、『第 105 回日本病理学会総会』、2016 年 5 月 12 日-14 日、仙台

4. 池下隼司、宮武由甲子、大塚紀幸、笠原正典 「アテローム性動脈硬化症とヒト NKG2D リガンド MICA/B との関わりについての検討」、『第 25 回日本組織適合性学会大会』、2016 年 10 月 22 日-24 日、札幌

全体の緒言

生体を構成する細胞は、常に様々な外因性および内因性ストレスに晒されており、それらに対して適応し恒常性を保つことが重要である。細胞レベルにおける各種ストレスに対する適応反応や防御反応を細胞ストレス応答といい、その破綻が癌や動脈硬化、糖尿病、免疫疾患、神経変性疾患など様々な疾患と関連していることが徐々に明らかとなってきた [1-3]。本研究では、ストレス誘導因子である natural killer（NK）細胞活性化レセプターのリガンドである natural-killer group 2 member D（NKG2D）リガンドと、癌化等のストレスによって特定のアイソフォームが誘導され、現在は癌幹細胞マーカーとしても注目される CD44 分子に焦点を当てた。

第一章では、アテローム性動脈硬化症の病態と NKG2D リガンドの関わりについて検討した。NKG2D は NK 細胞活性化受容体の 1 つであり、細胞ストレスによって発現が誘導された NKG2D リガンドを認識して細胞傷害活性を示す。アテローム性動脈硬化症は低比重リポ蛋白などを貪食して泡沫化したマクロファージが血管内膜に集積し、限局性肥厚をきたす疾患である。アテロームの破綻によって心血管疾患や脳血管疾患などの致死的な疾患を引き起こすため、病態形成に関わる分子メカニズムの理解が重要である。近年の研究で、マウスにおけるアテロームの形成には NKG2D システムが関与している可能性が報告されている。しかし、ヒトでの関与に関しては未だ不明な点が多い。そこで本研究では、ヒトアテローム性動脈硬化症の病態形成に NKG2D リガンドが関与しているかどうか解析を行った。剖検検体を用いて、ヒトアテローム性動脈硬化症のアテローム形成部分における NKG2D リガンドの発現パターンを病理学的に解析した。また、*in vitro* の検討では、健常人末梢血より分化培養したマクロファージが、変性低比重リポ蛋白（変性 LDL）の貪食によって NKG2D リガンドの 1 つである主要組織適合遺伝子複合体クラス I 関連分子 A、B（major histocompatibility complex class I chain-related gene A/B, MICA/B）の発現を亢進させた。一方、変性 LDL を貪食して MICA/B を発現したマクロファージでは、NKG2D 陽性 NK 細胞による細胞傷害が有意に抑制されることを明らかにした。これらの結果より、ヒトアテローム性動脈硬化症の病態には、NKG2D システムの関与が示唆され、本システムの破綻、つまり NKG2D 陽性免疫細胞によって泡沫化マクロファージが適切に排除されないことが、アテローム性病変の進展に寄与している可能性が示唆された。

第二章では、膵癌の難治性病態と CD44 分子の発現の関係性について検討した。膵癌は 5 年生存率が 10%以下と極めて予後不良な悪性腫瘍の 1 つである。その原因には、高い浸潤・転移能や治療抵抗性などが考えられるが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。癌幹細胞マーカーとしても知られる CD44 は選択的スプライシングによって多くのバリアントアイソフォームが形成され、中でも CD44v9 分子には細胞ストレスの大きな要因となる活性酸素の抑制作用があることが明らかとなっている。CD44v9 の発現が大腸癌や胃癌の予後予測マーカーとして有用であることが知られているが、膵癌における CD44v9 発現パターンに関しては不明な点が多い。そこで本研究では、膵癌細胞のサブタイプと CD44v9 発現パターンの関連性について *in vitro* にて検討した。膵癌細胞株のうち上皮間葉転換（epithelial mesenchymal transition, EMT）を起こしていない上皮系形質を保持した膵癌細胞では、細胞分裂時において特異的に CD44v9 や多剤耐性因子 multidrug resistance protein 1（MDR1）の発現が亢進することを明らかにした。さらに、CD44v9 陰性細胞においても細胞分裂時にのみ、CD44v9 が高発現することがわかった。以上の結果から、膵癌細胞は細胞分裂期において特異的に、さらなる強力な細胞ストレス耐性を持つフェノタイプを示すことが明らかとなった。よって、一般に悪性度が低いとされる上皮系形質を保った膵癌細胞においても、細胞分裂時に特異的な細胞ストレス抵抗性を示すことで、分裂期細胞を標的とする現行抗癌剤に対する耐性がより強まっているのではないかと推測された。

本研究によって、アテローム性動脈硬化症および膵癌の病態には、細胞ストレス応答に関わる恒常性の破綻や細胞本来のサバイバル戦略が病態の進展に大きく寄与している可能性が示唆された。細胞ストレス応答は様々な疾患における病態制御に極めて重要であるが、今回得られた成果を新しい治療法開発へと繋げるためには、本研究によって明らかにした新規現象における分子機構の詳細な解析が必要である。

略語表

本文中で使用した略語は以下のとおりである。

AcLDL	acetylated low density lipoprotein
CD44s	CD44 standard
CD44v	CD44 variant
CSC	cancer stem cell
CXCR4	C-X-C chemokine receptor 4
DAB	diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
EMT	epithelial mesenchymal transition
FBS	fetal bovine serum
FCM	flow cytometry
LDL	low density lipoprotein
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MDR1	multidrug resistance protein 1
MHC	major histocompatibility complex
MICA/B	MHC class I chain-related gene A/B
MSR-A	macrophage scavenger receptor-A
NK	natural killer
NKG2D	natural-killer group 2 member D
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
ROS	reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
ULBP	UL16 binding protein

第一章

ヒトアテローム性動脈硬化症における NKG2D リガンドの発現

緒　言

アテローム性動脈硬化症は、低比重リポ蛋白（low density lipoprotein, LDL）などの脂肪性物質を貪食して泡沫化したマクロファージが血管内膜に集積することによってアテロームを形成し、血管内膜の限局性肥厚をきたす疾患である。これまでに NK 細胞や NKT 細胞の異常な血管浸潤がアテローム性動脈硬化症の病態の進展に関与するという報告がなされている[4]。

NK 細胞活性化レセプターの 1 つである NKG2D は、NK 細胞のほかに NKT 細胞、CD8 αβT 細胞、γδT 細胞に発現している。一方、ヒトの NKG2D リガンドには、主要組織適合遺伝子複合体クラスⅠ関連分子 A、B（MICA/B）や UL16 結合蛋白（UL16 binding protein, ULBP）1-6 など多くの種類が存在することが明らかとなっている[5-7]。これらの NKG2D リガンドは、細胞のウイルス感染や腫瘍化などのストレスによって膜表面に発現が誘導され、ストレスを受けた細胞は NKG2D 陽性細胞によって、適切に排除されることが報告されている[8]。また、癌細胞では NKG2D リガンドを発現しているにも関わらず、NKG2D 陽性細胞による細胞傷害が抑制され、排除されないことも知られている[9-11]。最近の研究によると、マウスにおけるアテロームの形成には、NKG2D システムが関与していることが明らかとなっている[12]。しかしながら、ヒトではその関与は未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、ヒトのアテローム性動脈硬化症の病態の制御に NKG2D システムが関与しているかどうかをヒト NKG2D リガンドの 1 つである MICA/B に焦点をあてて検討を行った。その結果、ヒト大動脈剖検検体を用いた免疫組織化学染色によって、高度なアテローム形成部位である不安定プラーク部分の泡沫細胞上に MICA/B の発現が観察された。単球由来マクロファージ（monocyte-derived macrophages, MDMs）を用いて *in vitro* にて検討を行った結果、健常ヒト末梢血単核球より分離培養した MDM に変性 LDL を貪食させることで、その貪食量に比例して MICA/B 発現が亢進することがわかった。加えて、変性 LDL を貪食して MICA/B を発現したマクロファージでは、NKG2D 陽性 NK 細胞による細胞傷害が有意に抑制されていた。

以上の結果から、ヒトアテローム性動脈硬化症では、アテローム部位の泡沫細胞において MICA/B 発現が亢進しているにもかかわらず、泡沫細胞が NKG2D 陽性細胞によって適切に排除されていない可能性が考えられ、そのことがアテローム性動脈硬化症の病態の進展に寄与することが示唆された。

実験方法

対象

アテローム性動脈硬化症を認めた大動脈の剖検検体 7 症例、正常または軽度動脈硬化症を認めた大動脈の剖検検体 5 症例を使用した。患者より採取した臨床検体を使用する実験は、本学医学部における倫理委員会の承認を得て行った。

抗体、試薬

免疫蛍光染色および免疫組織化学染色にマウス抗ヒト MICA/B 抗体（6D4, eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA）、マウス抗ヒト CD68 抗体（KP1, DAKO, Glostrup, Denmark）、マウス抗ヒト macrophage scavenger receptor-A（MSR-A）抗体（SRA-C6, TransGenic, Inc., Kumamoto, Japan）を使用した。免疫蛍光染色にマウス抗ヒト CD80 抗体（2D10, BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA）、マウス抗ヒト CD163 抗体（RM3/1, BioLegend）を使用した。MDM の誘導にヒトマクロファージコロニー刺激因子（macrophage colony-stimulating factor, M-CSF）リコンビナント蛋白（eBioscience, Inc.）を使用した。変性 LDL として Alexa 488 標識アセチル化 LDL（acetylated LDL, AcLDL）（Alexa Fluor® 488 AcLDL, Invitrogen）を使用した。

免疫組織化学染色

ヒト大動脈のホルマリン固定パラフィン包埋組織を 3 μm に薄切し、脱パラフィンした後、オートクレーブにて 121℃、20 分間抗原賦活化を行った。非特異反応抑制のため、3%正常ヤギ血清で 30 分間ブロッキングを行った。内因性ペルオキシダーゼの不活化のため 3%過酸化水素水で 10 分間反応後、一次抗体を室温で 60 分反応させた。その後、ビオチン化二次抗体およびストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ（LSAB2 kit, DAKO）を反応させ、検出には diaminobenzidine（DAB）（DAKO）を使用した。核染色にはマイヤーのヘマトキシリンを使用した。

MDM の分化誘導

本研究では、末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cells, PBMCs）より成長因子等を加えずに MDM への分化を行った。健常人より採取した

末梢血から Ficoll-Paque™ PLUS（GE Healthcare）を用いて 2400 rpm、10 分間遠心して、PBMC を分離した。PBMC を 10% fetal bovine serum（FBS）、penicillin / streptomycin を含む Roswell Park Memorial Institute（RPMI）1640 培地でフィブロネクチンをコートしたカバースリップ（BioCoatTM Cellware, BD, Franklin Lakes, NJ, USA）上に培養した。3 時間後に非接着細胞を回収し、セルカルチャーインサート（pore size; 0.4 μm, Invitrogen, Camarillo, CA, USA）を用いて、接着細胞と間接的に共培養した。5 日後の時点でカバースリップ上に接着している細胞を MDM として使用した。また、本手法との比較のため M-CSF による MDM 培養も行った [13]。方法は、上記と同様に非接着細胞を回収した後、100 ng/mL の M-CSF を加え 3 日間培養し、培養液を交換してさらに 2 日間培養後、接着細胞を MDM として使用した。なお、研究に参加するボランティアに対しては研究の目的、方法、研究に協力することによって起こる利益・不利益について十分な説明を行い、本学における生命倫理委員会にて承認された同意書によるインフォームドコンセントを取り研究を行った。

AcLDL 取り込みと免疫蛍光染色

カバースリップ上に培養した MDM に Alexa 488-AcLDL を 10 μg/mL となるように添加し、37℃で 1 時間貪食させた。その後、PBS で洗浄した MDM を免疫蛍光染色に使用した。MDM を 4%パラホルムアルデヒドで室温、15 分間固定し、細胞内染色のため、0.1% Triton X-100（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany）で 4 分間の細胞膜透過処理を行った。氷冷した 70%メタノールで室温、4 分間固定した後、抗体の非特異反応を抑制するため、0.1%正常ヤギ血清を用いて 10 分間のブロッキングを行った。その後、一次抗体を室温、60 分間反応させ、二次抗体として Alexa Fluor 標識ポリクローナル抗体を室温、45 分間反応させた。染色像の撮影には Olympus DP70 カメラ、Olympus DP controller software version 1.2.1.108（Olympus, Tokyo, Japan）を使用した。

細胞傷害アッセイ

NKG2D 陽性 NK 細胞株である KHYG-1 細胞をエフェクター細胞（E）、PBMC より分化させた MDM をターゲット細胞（T）として使用した。AcLDL 貪食後に E:T 比が 3:1 または 9:1 となるように細胞を混合し、18 時間培養後に CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay kit（Promega）を用いて細胞傷害活性を測定した。

統計解析

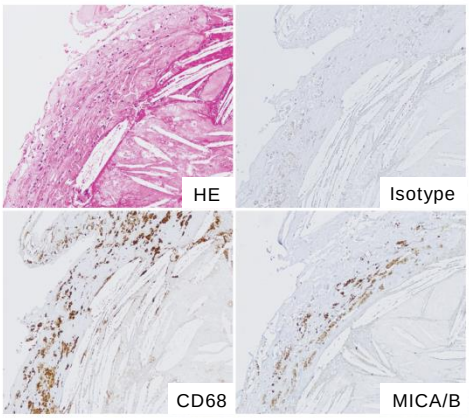
統計解析手法は、Student's *t*-test および反復測定分散分析を用い、*P*値が 0.05 以下を有意差ありとした。

実験結果

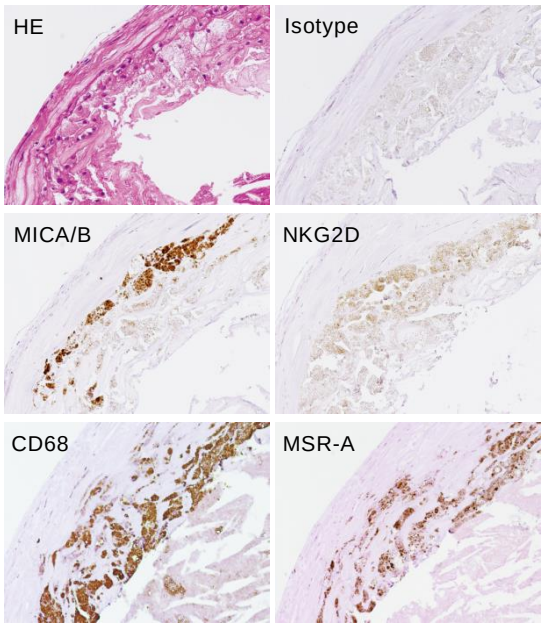
アテローム性動脈硬化症の泡沫化マクロファージでは MICA/B が発現する

アテローム性動脈硬化症を認めた大動脈の剖検検体を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、アテロームを覆う線維性被膜下にマクロファージのマーカーである CD68 陽性細胞が観察された。そしてその一部に MICA/B の陽性像を認めた（図 1A）。次に、MICA/B の受容体である NKG2D に関して同様に免疫組織化学染色にて検討を行ったが、NKG2D 陽性リンパ球の有意な浸潤像は認められなかった。また、アテローム部位の泡沫細胞上には変性 LDL 受容体である MSR-A 発現が認められた（図 1B）。免疫染色の結果をまとめると、アテローム性動脈硬化症の検体ではその一部に MICA/B の発現を認めたが（7 例中 3 例、42.9%）、正常または軽度動脈硬化症の検体においては MICA/B 発現は認められなかった（図 1C）。

A



B



C

	MICA/B発現
アテローム性動脈硬化症 7 検体	3/7 (42.9%)
正常または軽度動脈硬化症 5 検体	0/5 (0%)

図 1. アテローム性動脈硬化症の泡沫化マクロファージでは MICA/B が発現する
(A) アテローム性動脈硬化症を認めた大動脈における免疫染色の組織像。線維性被膜下のマクロファージに CD68 陽性像を認め、その一部に MICA/B 陽性像が観察された。(B) MICA/B の受容体である NKG2D の免疫染色の結果、NKG2D 陽性リンパ球の有意な浸潤像は認められなかった。(C) アテローム性動脈硬化症検体および正常または軽度動脈硬化症検体における MICA/B に対する免疫染色のまとめ。

PBMC から MDM への分化誘導

マクロファージには M1 型と M2 型が存在する[14]。一般に、ヒト末梢血からの MDM への分化誘導には M-CSF などの成長因子が用いられるが[15]、特定の成長因子の使用が特定のフェノタイプを有するマクロファージを分化誘導する可能性が示唆されている[16]。そこで本研究では、特定のマクロファージへの分化を避けるため、成長因子の添加なしで PBMC より MDM への分化誘導を行った。ヒト末梢血より分離した PBMC をプレートへ播種し、非接着細胞を回収して、セルカルチャーインサートを用いて 5 日間の間接共培養を行い、接着細胞を MDM として使用した（図 2A）。接着細胞が MDM へ分化しているか確認するため、免疫蛍光染色法にてマクロファージマーカーである CD68 の発現を検討した。その結果、接着細胞の 99%以上で CD68 陽性像が観察され、MDM への分化誘導が示唆された（図 2B）。次に、MDM のフェノタイプを確認するため、M1 マクロファージマーカーである CD80、M2 マクロファージマーカーである CD163 発現に関して解析を行った。その結果、分化誘導された MDM は CD80 陰性、CD163 弱陽性であり M2 マクロファージのフェノタイプを示した（図 2C）。比較のため、M2 マクロファージの分化誘導に用いられる M-CSF を使用して MDM の分化誘導を行ったところ CD68 陽性、CD80 陰性、CD163 弱陽性と成長因子なしで誘導した場合と同様の染色像を示した（図 2C）。

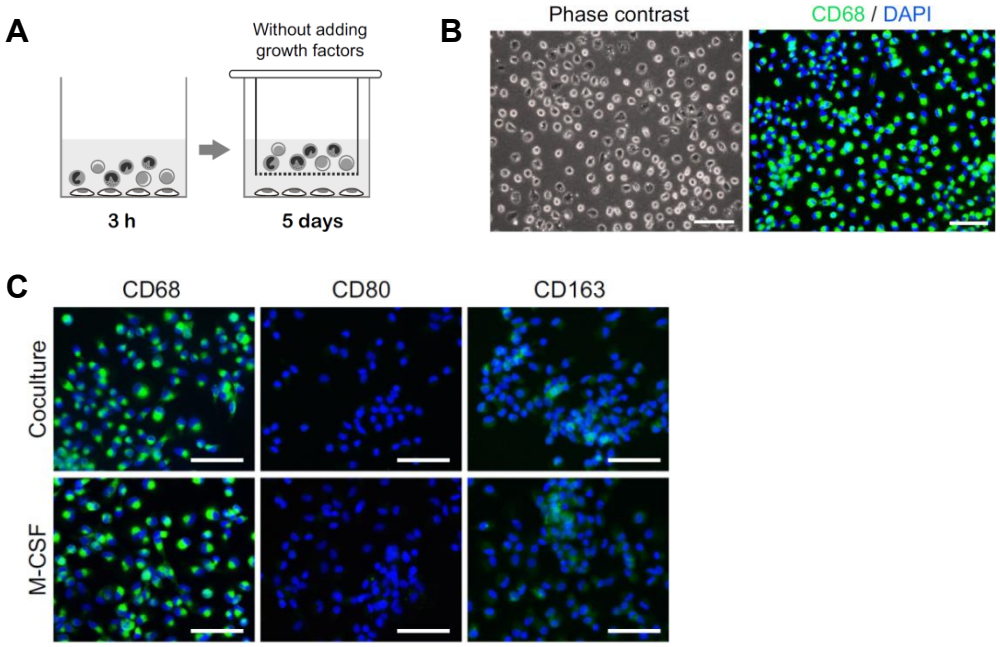


図 2. PBMC から MDM への分化誘導
(A) PBMC から MDM への分化誘導の模式図。PBMC をプレートに播種し 3 時間後に非接着細胞を回収し、5 日間の間接共培養を行った。(B) 分化誘導後の接着細胞に対する CD68 免疫染色。(C) M-CSF による分化誘導との比較。共に M2 マクロファージマーカーである CD163 の弱陽性像が観察された。Bars: 50 μm

変性 LDL を貪食した MDM では MICA/B 発現が亢進する

次に、分化誘導した MDM における変性 LDL の貪食による MICA/B 発現への影響について検討を行った。上述の通り分化誘導した MDM に変性 LDL である Alexa 488 標識 AcLDL を添加して 1 時間培養した後、免疫蛍光染色を行った。その結果、MDM の細胞質に緑色の蛍光が観察され、MDM による AcLDL の貪食が確認された。また、AcLDL 貪食 MDM では MSR-A の高発現も観察された（図 3A)。さらに、AcLDL 貪食 MDM では特に細胞膜表面における MICA/B の発現亢進が観察された(図 3B)。そして、MICA/B の発現強度は AcLDL の貪食量に依存しているような像が確認された（図 3C)。以上の結果より、変性 LDL を貪食して MSR-A 発現が誘導されたマクロファージでは、MICA/B 発現が亢進することが示された。

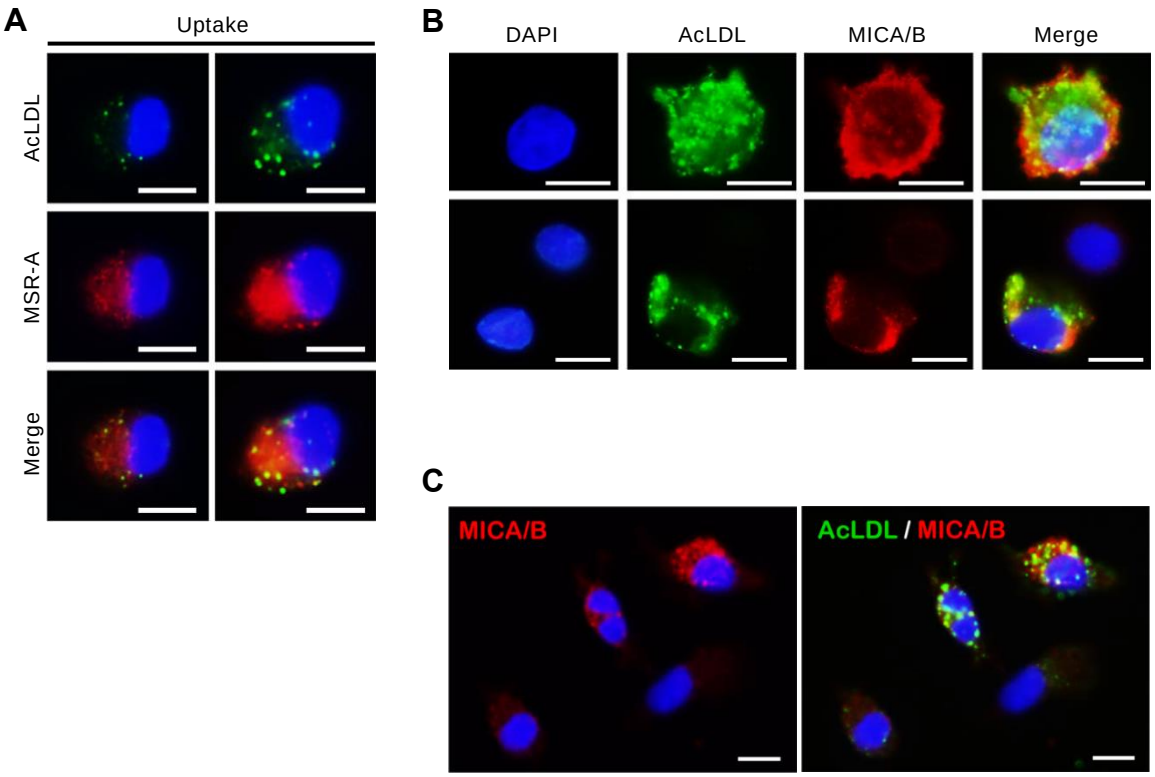


図 3. 変性 LDL を貪食した MDM では MICA/B 発現が亢進する
(A) MDM が Alexa488 標識 AcLDL を貪食する像。(B) AcLDL を貪食した MDM では MICA/B の発現亢進が観察された。(C) MICA/B 発現は AcLDL の貪食量に比例して亢進していた。Bars: 10 μm

変性 LDL を貪食した MDM では NKG2D 陽性 NK 細胞による細胞傷害が低下する

in vitro において、変性 LDL を貪食して泡沫化した MDM では MICA/B の発現亢進が観察されたので、泡沫化 MDM に対する細胞傷害について検討を行った。AcLDL 貪食 MDM をターゲット細胞、NKG2D 陽性 NK 細胞株 KHYG-1 細胞をエフェクター細胞として細胞傷害アッセイを行ったところ、AcLDL 無添加のコントロールと比較して、AcLDL 貪食 MDM では NK 細胞による細胞傷害が有意に低下していることがわかった（図 4)。

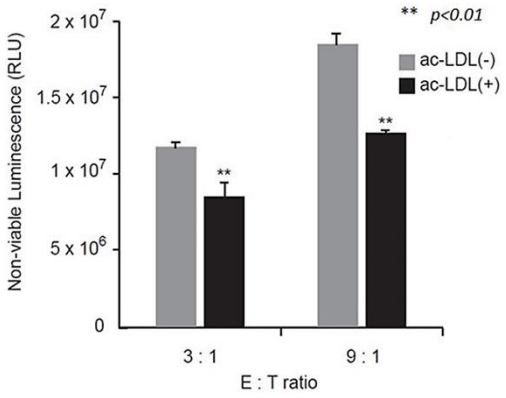


図 4. 変性 LDL を貪食した MDM では NKG2D 陽性 NK 細胞による細胞傷害が低下する
NKG2D 陽性 NK 細胞株 KHYG-1 細胞をエフェクター細胞（E)、AcLDL 貪食 MDM をターゲット細胞（T)として細胞傷害アッセイを行った。

考　察

これまでの研究では、2 型糖尿病患者の動脈硬化部位において、泡沫細胞と血管内皮細胞に MICA/B が発現することが報告されている [12]。本研究では、アテローム性動脈硬化症の泡沫細胞上においてのみ、MICA/B の発現が観察された（図 1)。また *in vitro* において、正常ヒト PBMC より分化誘導したマクロファージでは、AcLDL の貪食によって細胞膜表面に MICA/B の高発現が観察された（図 3)。これらの結果は、アテローム部位の泡沫細胞において、変性 LDL を貪食することが MICA/B 発現を誘導することを示唆している。これまでの報告で、マウス動脈硬化症の進展に NKG2D システムが関与することが明らかにされている [12]。本研究の結果から、MICA/B の発現は、同様にヒト動脈硬化症の進展に関与している可能性が考えられる。一方、MICA/B のレセプターである NKG2D 陽性細胞については、アテローム周囲に有意な浸潤像は認められなかった（図 1)。さらに *in vitro* において、AcLDL を貪食したマクロファージは、MICA/B 発現を亢進しているにもかかわらず、NKG2D 陽性 NK 細胞による細胞傷害が有意に抑制されていた（図 4)。これらの結果から、アテローム性動脈硬化症では泡沫細胞が MICA/B を発現しているにもかかわらず、NKG2D 陽性細胞によって泡沫細胞が適切に排除されていないことが推測され、このことが病態の進展に関与している可能性が考えられた。

また本研究では、正常ヒト PBMC から成長因子を加えることなく MDM を簡単に分化誘導することに成功した（図 2)。近年の報告で、M-CSF や GM-CSF などの成長因子を用いた MDM の誘導は、特定のフェノタイプを有する MDM を分化誘導する可能性が指摘されている [15,16]。さらに、M-CSF がマクロファージにおける MSR-A 発現を亢進させるとの報告もなされている [17]。本研究で用いた手法は、成長因子を使用していないことから、特定のフェノタイプへの誘導を軽減できると考えられる。

結論として、本研究によって、*in vitro* の検討により、変性 LDL を貪食した泡沫細胞が MICA/B の発現を亢進することが明らかとなった。さらに、剖検検体を用いた病理学的解析により、アテローム病変部位では、泡沫細胞上において MICA/B 発現が亢進しているにもかかわらず、NKG2D 陽性細胞によって泡沫細胞が適切に排除されていない可能性が示唆され、このような NKG2D システムの破綻が、アテローム性動脈硬化症の病態の増悪に関与するのではないかと推測された。

第二章

膵癌細胞の分裂期における CD44v9 の高発現

緒　言

膵癌は、ほとんどが膵管上皮から発生する膵管腺癌（pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC）であり、5 年生存率が 10%以下と極めて予後不良な難治性固形癌の代表である。その要因としては、高い浸潤能や早期から転移が起こること、化学療法・放射線療法に抵抗性であることなどが挙げられるが、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない [18]。進行性膵癌に対する標準的な化学療法としてゲムシタビンが用いられることが多いが、あまり生存率が改善されていない [19,20]。さらに、最近の報告ではゲムシタビンが活性酸素（reactive oxygen species, ROS）依存性に C-X-C chemokine receptor 4（CXCR4）の発現を上昇させることによって膵癌細胞の浸潤能を亢進させることが報告されている [21]。

悪性腫瘍組織中には腫瘍の再発・転移のもとになるごく少数の細胞集団、癌幹細胞（cancer stem cells, CSCs）が存在すると考えられており、膵癌でもその存在が指摘されている [22]。CSC は自己複製能や多分化能、治療抵抗性などの性質を有しているうえに、細胞周期静止状態であるという特徴があり、これによって分裂期を標的とするゲムシタビンなどの多くの抗癌剤に耐性になることが明らかになっている [23-26]。

CD44 は元々、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックスと結合する I 型膜貫通型糖蛋白として発見された [27]。CD44 は細胞-細胞間接着、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックス-細胞間接着に関わる接着分子で、細胞の遊走、分化、サバイバルに関与する。また、大腸癌において癌細胞を癌幹細胞へ直接リプログラムすることが報告されており [28]、CD44 は現在、大腸癌や乳癌、前立腺癌や膵癌における重要な CSC マーカーの 1 つとして広く認識されている。CD44 には、正常組織で発現する CD44 スタンダードフォーム（CD44 standard, CD44s）のほかに多くのバリアントフォーム（CD44 variant, CD44v）が選択的スプライシングによって形成され、それぞれが多様な機能をもつことが報告されている [27,29,30]。上皮系癌細胞がもつ細胞極性や周囲細胞との接着能を失い、運動能を亢進し間葉系形質を獲得する一連の過程のことを上皮間葉転換（EMT）と呼ぶ。最近の研究で、EMT の過程において、CD44 の発現が CD44v から CD44s へとスイッチングが起こることが報告された [31]。また、CD44v の中でもバリアントエクソン v8-v10 を有する CD44v8-10（CD44v9）には抗酸化物質であるグルタチオンの合成を促進する働きがあり、これによって CSC における酸化ストレス回避に寄与すると

考えられている[32]。さらにCD44v9は脂質ラフトにおいてFASレセプターと相互作用することでFASシグナルを抑制し、アポトーシス抵抗性に寄与することが明らかになっている[33]。つまり、CD44の発現亢進は、広範な悪性腫瘍における癌幹細胞性と治療抵抗性の両者に深く寄与していると考えられている。臨床的にもCD44v9発現は大腸癌や胃癌の予後予測マーカーとして有用であることが知られている[34,35]。しかしながら、膵癌におけるCD44v8-10発現パターンに関しては不明な点が多いのが現状である。

そこで本研究では、CD44陽性膵癌細胞株5種を用いて、膵癌細胞のサブタイプとCD44v9発現パターンとの関連性について*in vitro*にて検討した。その結果、膵癌細胞株5種のうち、E-cadherin陽性と上皮系形質を示すCD44v^{high}膵癌細胞株3種、vimentin陽性と間葉系形質を示すCD44s^{high}膵癌細胞株2種の2つのフェノタイプの存在が確認された。上皮系形質を示すCD44v^{high}膵癌細胞株では細胞分裂期の前期から終期にかけて細胞膜表面におけるCD44v9の発現亢進が認められた。また、CD44v^{high}膵癌細胞からCD44v9陰性細胞を分離培養したところ、同様のCD44v9発現亢進が分裂前期から終期にかけて観察された。さらにCD44v^{high}膵癌細胞株では、細胞分裂時に、微小管の局在と一致して多剤耐性因子MDR1の発現も観察された。

したがって、上皮系形質を保持している膵癌細胞では、細胞分裂時に細胞膜表面におけるCD44v9の発現および微小管の局在と一致するMDR1の強発現が観察されることから、膵癌細胞は細胞分裂期において、さらなる強力な細胞ストレス抵抗性を持つフェノタイプとなっていることが示唆された。つまり、膵癌細胞は細胞分裂期において特異的に癌幹細胞様特性を示すことで、細胞分裂期を標的とした現行の抗癌剤に対してさらなる治療抵抗性を獲得することが推測された。

実験方法

細胞

ヒト膵癌細胞株として、PCI-24、PCI-43、PCI-55、PANC-1、MIA PaCa-2 の 5 種の細胞株を使用した。このうち、PCI-24、PCI-43、PCI-55 細胞は、北海道大学病院にて外科切除された膵癌原発巣より、細胞株として当研究室で樹立された[36]。MIA PaCa-2 細胞は理研バイオリソースセンターより入手した。これらの細胞株は、10% FBS および penicillin / streptomycin を含む Dulbecco's minimal essential medium（DMEM）培地で継代培養した。

抗体、試薬

免疫蛍光染色にマウス抗ヒト E-cadherin 抗体（NCH-38, DAKO）、ラット抗ヒト/マウス CD44 抗体（IM7, eBioscience）、マウス抗ヒトα-tubulin 抗体（DM1A, eBioscience）、マウス抗ヒト MDR1 抗体（UIC2, eBioscience）を使用した。免疫蛍光染色および細胞ソーティングにラット抗ヒト CD44v9 抗体（RV3, Cosmo Bio, Tokyo, Japan）を使用した。

細胞ソーティング

抗 CD44v9 抗体を用いて PCI-55 細胞を染色した後、FACSAriaⅢ（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）によって解析し、CD44v9 陰性 PCI-55 細胞を分離した。

免疫蛍光染色

チャンバースライド上に培養した細胞を、4%パラホルムアルデヒドで室温、15 分間固定し、0.1% Triton X-100（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany）で 4 分間の細胞透過処理を行った後、70%メタノールで室温、4 分間固定した。抗体の非特異反応抑制のため、0.1%正常ヤギ血清で 10 分間ブロッキングを行った。その後、一次抗体を室温、60 分間反応させ、二次抗体として Alexa Fluor 標識ポリクローナル抗体を室温、45 分間反応させた。染色像の撮影には Olympus DP70 カメラ、 Olympus DP controller software version 1.2.1.108（Olympus, Tokyo, Japan）を使用した。

Reverse transcription polymerase chain reaction（RT-PCR）

膵癌細胞株より RNeasy mini kit（QIAGEN, CA, USA）を用いて RNA を抽出した。得られた RNA のうち 1 μg に DNase I（Invitrogen）処理を行い、Go Script™ Transcriptase & Reverse Transcription System（Promega）によって cDNA を合成した。PCR 反応は Go Taq® Green Master Mix（Promega）を使用し、95℃ 15 分の変性後、95℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒の反応を 35 サイクル行ったのち、72℃ 7 分間の伸長反応を行った。用いたプライマーの塩基配列は表 1 の通りである。

表 1. RT-PCR 法に使用したプライマーの塩基配列

遺伝子名	方向	塩基配列（5'-3'）
E-cadherin	Forward	AATCCCACCACGTACAAGGG
	Reverse	GGAGGTGGTGAGAGAGACCT
Vimentin	Forward	GGCTCGTCACCTTCGTGAAT
	Reverse	GCAGAGAAATCCTGCTCTCCTC
ZEB1	Forward	ATTCACAGTGGAGAGAAGCCA
	Reverse	GGTCGCCCATTCACAGGTAT
pan-CD44	Forward	GCAGTCAACAGTCGAAGAAGG
	Reverse	TGTCCTCCACAGCTCCATT
CD44v	Forward	TCCCAGACGAAGACAGTCCCTGGAT
	Reverse	CACTGGGGTGGAATGTGTCTTGGTC
GAPDH	Forward	AGCGAGATCCCTCCAAAATC
	Reverse	GGCAGAGATGATGACCCTTT

実験結果

PCI-24、PCI-43、PCI-55 細胞は上皮系形質を示し、PANC-1、MIA PaCa-2 細胞は間葉系形質を示す

まず、実験に使用する 5 種の膵癌細胞株のサブタイプを解析するため、EMT マーカーに関して発現の検討を行った。RT-PCR 法による解析の結果、PCI-24、PCI-43、PCI-55 細胞において、上皮系マーカーである E-cadherin[37] の mRNA 発現が認められた。一方、PANC-1、MIA PaCa-2 細胞において、間葉系マーカーである vimentin[38]、ZEB1[39] の mRNA 発現が認められた（図 5A）。これらの結果より、PCI-24、PCI-43、PCI-55 細胞は上皮系形質を有しており、PANC-1、MIA PaCa-2 細胞は間葉系形質を有することが示された。また、RT-PCR 法の結果と一致して、PCI-24、PCI-43、PCI-55 細胞における E-cadherin 発現が免疫蛍光染色によっても確認された（図 5B）。

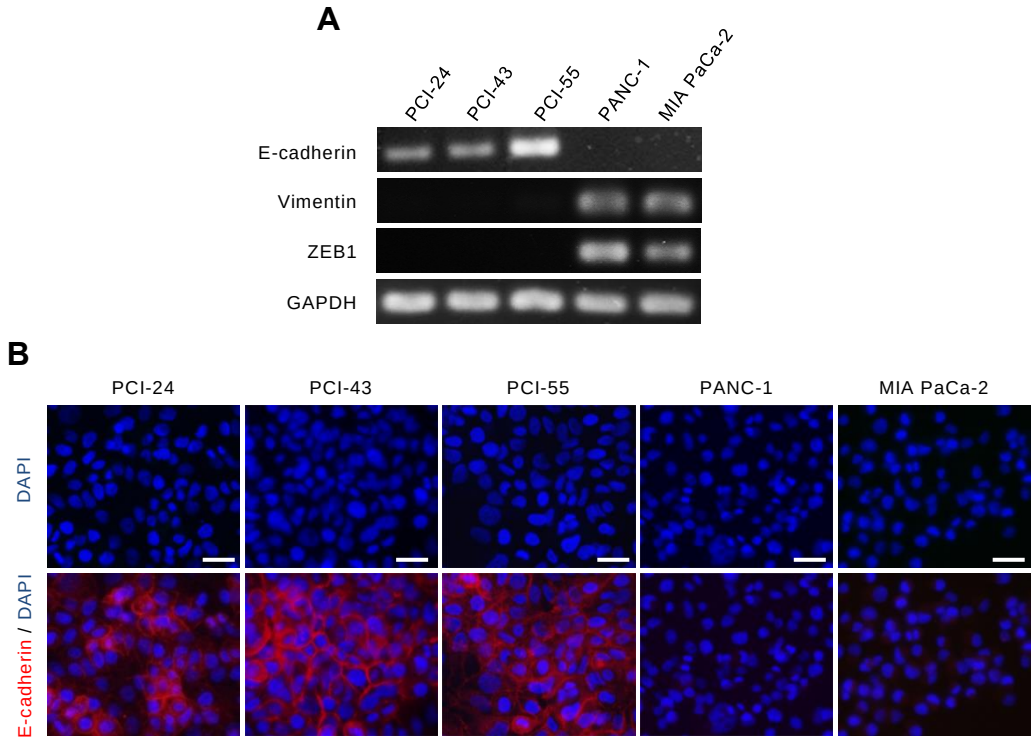


図 5. PCI-24、PCI-43、PCI-55 細胞は上皮系形質を示し、PANC-1、MIA PaCa-2 細胞は間葉系形質を示す
(A) 膵癌細胞株における RT-PCR 法による上皮系および間葉系マーカーの遺伝子発現。
(B) E-cadherin の免疫蛍光染色。PCI-24、PCI-43、PCI-55 細胞では RT-PCR の結果と一致して E-cadherin の発現が確認された。Bars: 50 μm

上皮系形質を示す膵癌細胞株では細胞分裂時に CD44v9 が高発現する

次に、膵癌細胞株における CD44 バリアントアイソフォームの発現パターンについて検討を行った。その結果、上皮系形質を持つ PCI-24、PCI-43、PCI-55 細胞では CD44v の高発現が見られたが、CD44s 発現はほとんど認められず、CD44v^{high} / CD44s^{low} のパターンを示した。一方、間葉系形質を持つ PANC-1、MIA PaCa-2 細胞では CD44v の低発現と CD44s の高発現が観察され、CD44v^{low} / CD44s^{high} のパターンを示した（図 6A）。これらの結果は、EMT の過程において、CD44 の発現が CD44v から CD44s へとスイッチングが起こるという報告 [31] を支持するものである。

全てのアイソフォームを検出可能な抗 pan-CD44 抗体を使用して免疫蛍光染色を行ったところ、すべての細胞株で CD44 発現が確認された（図 6B、左図）。CD44v8-10 を検出可能な抗 CD44v9 抗体を用いた解析により、上皮系形質を持つ CD44v^{high} / CD44s^{low} 膵癌細胞株では、細胞分裂時に細胞膜表面における CD44v9 の高発現が観察された（図 6B、右図）。CD44v^{high} / CD44s^{low} 膵癌細胞である PCI-55 細胞では、分裂期の細胞にのみ CD44v9 の高発現が認められ、それ以外の細胞では弱陽性かほとんど発現が認められなかった（図 6C）。

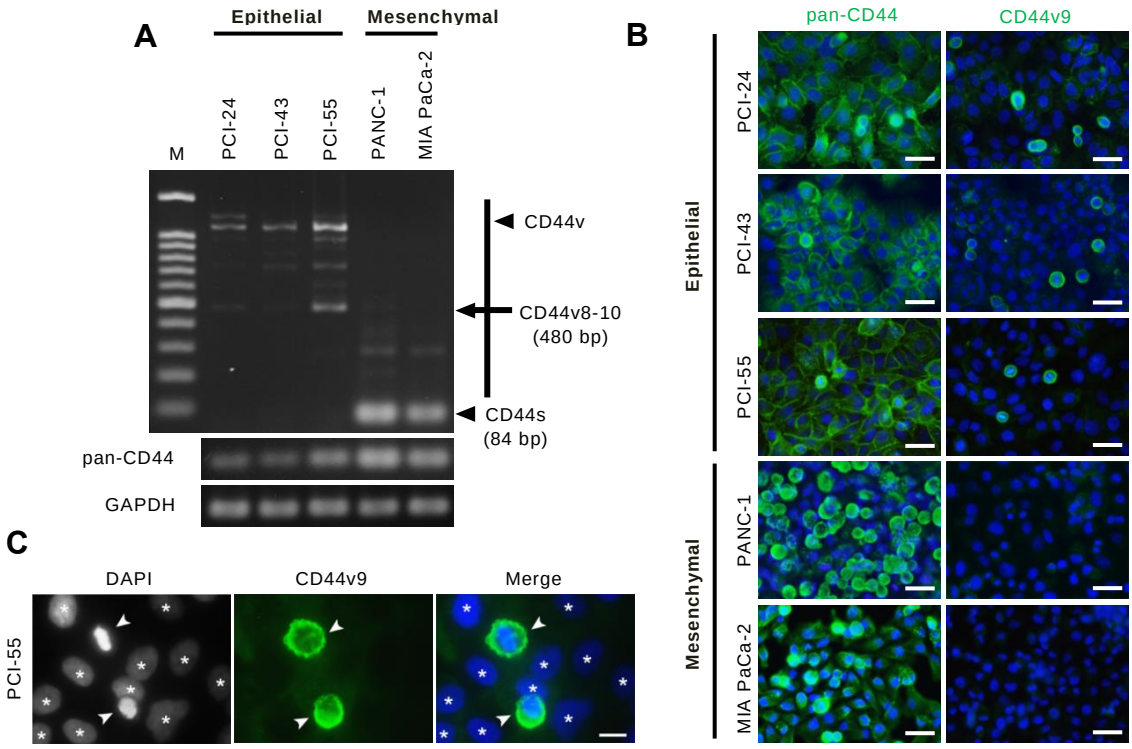


図 6. 上皮系形質を示す膵癌細胞株では細胞分裂時に CD44v9 が高発現する
(A) RT-PCR 法による CD44v 発現パターンの解析。上皮系形質を示す細胞株では CD44v^{high} であり、間葉系形質を示す細胞株では CD44s^{high} であった。(B) CD44 および CD44v9 に対する免疫染色。(C) 上皮系形質を示す PCI-55 細胞における CD44v9 免疫染色。矢頭: 分裂細胞、＊: 非分裂細胞、Bars: 50 μm (B)、10 μm (C)

上皮系形質を示す膵癌細胞株では分裂前期から終期にかけて CD44v9 発現が亢進する

上皮系形質を持つ CD44v^{high} / CD44s^{low} 膵癌細胞株では、細胞分裂時に CD44v9 の高発現が観察されたため、細胞分裂のどの段階で CD44v9 発現亢進が認められるか解析を行った。上皮系形質を持つ CD44v^{high} / CD44s^{low} 膵癌細胞株である PCI-24、PCI-55 細胞を用いてα-tubulin および CD44v9 の免疫蛍光二重染色を施行し、各周期における CD44v9 陽性細胞数を計測した。その結果、分裂前期、中期、後期、終期において CD44v9 の劇的な発現亢進が観察された（図 7A、B）。一方で細胞質分裂期や間期では CD44v9 陽性率が劇的に低下していた（図 7A、B、右図）。なお、PCI-43 についても同様の結果が得られた（データ未表示）。

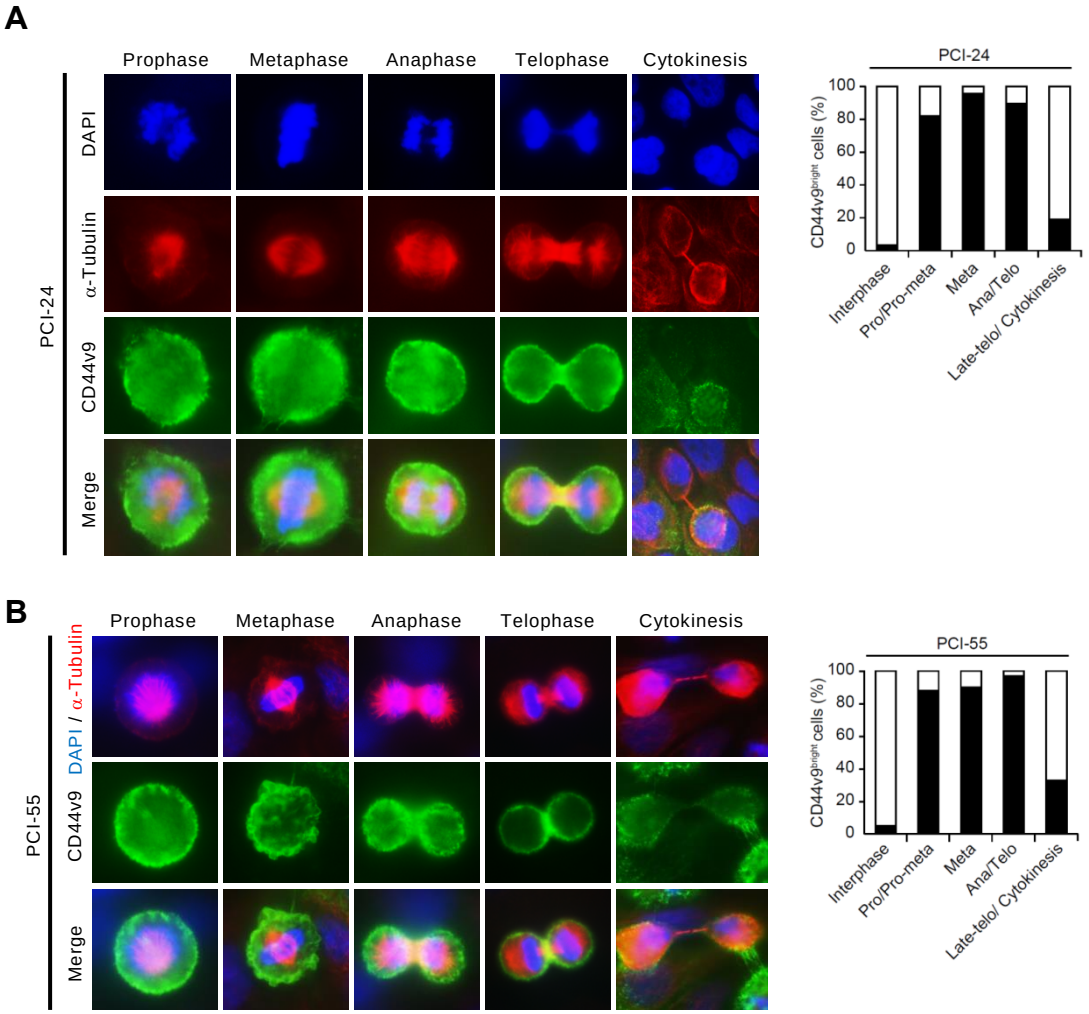


図 7. 上皮系形質を示す膵癌細胞株では分裂前期から終期にかけて CD44v9 発現が亢進する

(A、B) 上皮系形質を示す PCI-24 細胞 (A)、PCI-55 細胞 (B) における CD44v9、α-tubulin の免疫染色（左図）および CD44v9 陽性細胞数（右図）。陽性細胞数は強拡大 (×200) で 20 視野を無作為に抽出し、計測した。

CD44v9 陰性細胞も細胞分裂時に CD44v9 が高発現する

次に、CD44v9 の高発現が細胞周期依存性かどうか確認するため、CD44v9 陰性の PCI-55 細胞を細胞ソーティングによって分離し、再度 CD44v9 発現を解析した。Flow cytometry（FCM）法による解析では CD44v9 陰性細胞は全体の 16.5%を占めていた（図 8A)。この細胞集団をネガティブセレクションによって細胞ソーティングで分離し、24 時間の培養後、再度 FCM 法による解析を行ったところ、CD44v9 陽性細胞集団が確認され、その一部では分離前の細胞よりも CD44v9 発現が亢進していた（図 8B)。分離培養後の細胞を免疫蛍光染色によって解析したところ、CD44v9 陰性細胞であっても細胞分裂期になると CD44v9 発現が亢進することが確認された(図 8C、D)。細胞周期における解析では分離前の細胞と同様に、分裂前期から終期にかけて CD44v9 発現が亢進しており、細胞質分裂期や間期では発現低下が観察された（図 8D)。

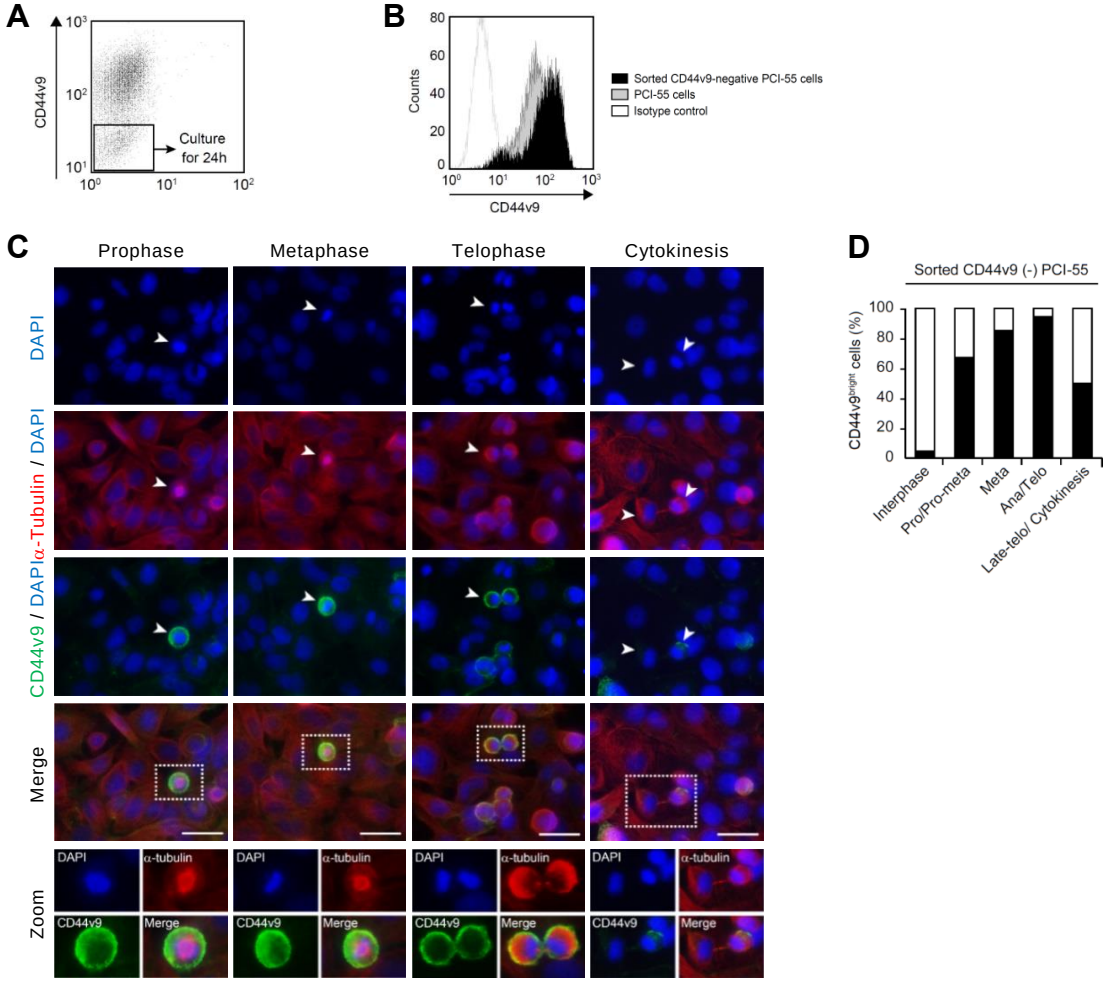


図 8. CD44v9 陰性細胞も細胞分裂時に CD44v9 が高発現する
(A) 細胞ソーティングによる CD44v9 陰性 PCI-55 細胞の分離。(B-D) 分離後 24 時間培養した PCI-55 細胞における FCM 法による CD44v9 発現の解析 (B)、CD44v9、α-tubulin の免疫染色 (C)、および CD44v9 陽性細胞数の計測 (D)。陽性細胞数は強拡大（×200）で 20 視野を無作為に抽出し、計測した。矢頭: 分裂細胞、Bars: 25 μm

膵癌細胞株では細胞分裂時に MDR1 が高発現する

MDR1 は、細胞膜上に発現して ATP 依存性に細胞内の異物を細胞外へと排出するポンプの役割を果たす糖蛋白質であり、癌細胞における薬剤耐性に寄与することが明らかとなっている[40]。CD44 が MDR1 に直接的に作用し、また同時に発現することによって癌の悪性化につながることも報告されている[41]。そこで本研究では、MDR1 が CD44v9 陽性細胞に発現しているかどうか検討を行った。PCI-55 細胞を用いた免疫蛍光染色の結果、分裂前期から終期の細胞の特に細胞質内において MDR1 の高発現が観察された（図 9A、B)。興味深いことに、MDR1 の発現パターンはα-tubulin の局在とほぼ一致していた（図 9A、下図)。なお、PCI-24、PCI-43、PANC-1 細胞でも同様の結果が得られた（データ未表示)。CD44v9 との二重染色では CD44v9 高発現細胞に MDR1 陽性像が観察され、分裂期の細胞に CD44v9 と MDR1 が共発現することが確認された（図 9C)。また PCI-24、PCI-43 細胞においても同様の結果が得られた（データ未表示)。

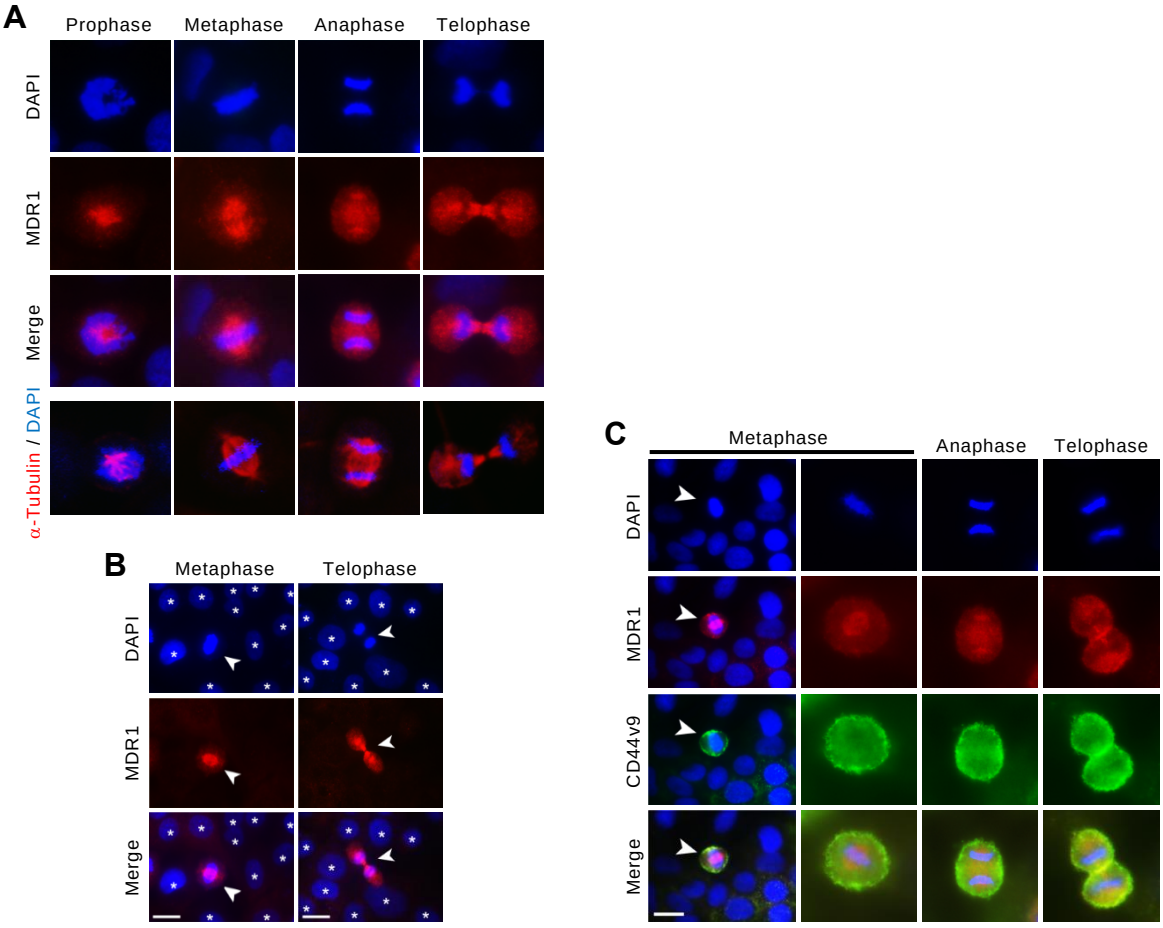


図 9. 膵癌細胞株では細胞分裂時に MDR1 が高発現する
(A、B) PCI-55 細胞における MDR1 および α-tubulin の免疫染色。(B) 分裂期の細胞において MDR1 の高発現が観察される。(C) PCI-55 細胞における CD44v9 および MDR1 の免疫染色。矢頭: 分裂細胞、＊: 非分裂細胞、Bars: 10 μm

考　察

本研究において、上皮系形質を持った膵癌細胞株は、細胞分裂時にCD44v9 を高発現することが示された（図 5-8）。細胞膜表面におけるCD44v8-10 発現は、活性酸素の抑制に関与し、癌幹細胞の生存に寄与することが報告されている[32]。今回の結果より、分裂期の膵癌細胞はさらなる酸化ストレス抵抗性を獲得している可能性が示唆された。膵癌の難治性形質の特徴としては、高い細胞増殖能や浸潤・転移能、治療抵抗性などが挙げられる[18,42]。そのため、今回観察された分裂期における CD44v9 の発現亢進は、膵癌の難治性形質の原因の一端となり得る可能性がある。

癌幹細胞の存在は膵癌における治療抵抗性の要因として極めて重要な問題であるとされる[22,43,44]。癌幹細胞の重要な特性の 1 つとして細胞周期静止状態であることが挙げられ、これによってゲムシタビンのような分裂期の細胞を標的とした多くの抗癌剤に耐性になることが知られている[25]。したがって、休眠状態に陥っている癌細胞をいかにして目覚めさせるかということが癌幹細胞の排除に重要であると考えられてきた。しかしながら、本研究で得られた結果では、上皮系形質を有する膵癌細胞は細胞分裂時に CD44v9 とMDR1 を発現させる能力を持っており、休眠状態以外の細胞においても、ストレス回避機構が存在し、それが癌細胞の生存に有利に働いていると考えられた。

分裂期の膵癌細胞株において、微小管の局在と一致して MDR1 が高発現することが観察された（図 9）。MDR1 は一般に細胞膜上に発現して薬剤放出などに関与することが知られているが[45]、細胞内における MDR1 の重要性についてはあまり知られていない。しかしながら、これまでの研究で、MDR1 が小胞体やゴルジ体、エンドソームやリソソームにも発現することが報告されている[45-47]。さらに、MDR1 が微小管依存的に細胞内輸送され再利用されることも明らかになっている[48,49]。これらの報告は今回観察された MDR1 の細胞内発現と一致するものである。MDR1 の細胞内発現の生理的な機能に関しては不明な点が多いが、細胞小器官を直接的に細胞内ストレスから保護している可能性が考えられる。したがって、上皮系形質を持つ膵癌細胞では細胞分裂時に細胞膜表面に CD44v9、細胞内に MDR1 を発現することで細胞ストレス回避能をさらに高めているのではないかと考えられた。

本研究では CD44v9 陰性細胞を分離し、再度培養した結果、分裂期の細

胞に同様の CD44v9 高発現が観察された（図 8)。現在の世界的な難治性癌の治療戦略として､いかにして癌幹細胞を検出し排除するかということに重点が置かれ､研究が進められてきている。しかし､本研究結果では､CD44v9 陽性細胞を排除した状態でも分裂期になると CD44v9 陽性細胞が誕生しており､たとえ癌幹細胞を排除したとしても､周囲の環境や細胞ストレス等に反応して､再度癌幹細胞が誕生し得る能力を多分に秘めているということが示唆された。そのため、今後の癌幹細胞に対する研究としては、その検出、排除のみならず､発生阻止を標的とした治療戦略の開発が必要であると考えられる。

以上より､本研究において上皮系形質を有する膵癌細胞株では､細胞分裂時に CD44v9 および MDR1 を高発現し、CD44v9 発現には可塑性があることが明らかになった。つまり､分裂期の細胞において、細胞ストレス回避能が特異的に亢進することが示唆された。この結果は､膵癌細胞の難治性形質の獲得に関わる大きな新規要因の 1 つと成り得ると考えられ、革新的な治療戦略開発の鍵となると期待される。

総括および結論

【第一章】

本研究によって得られた新知見は次のとおりである。

- アテローム性動脈硬化症の泡沫化マクロファージでは MICA/B が発現するが、その周囲に NKG2D 陽性リンパ球の有意な浸潤像は認められなかった。
- *in vitro* において PBMC から分化誘導した MDM は、変性 LDL 貪食によって MICA/B を発現するものの、NKG2D 陽性 NK 細胞による細胞傷害が有意に低下する。
- アテローム性動脈硬化症の病態では泡沫化マクロファージが MICA/B を発現するにもかかわらず、NKG2D 陽性細胞による排除が適切に行われていない可能性が示唆され、このことが病態の進展に関与することが推測された。

これまで不明であったヒトアテローム性動脈硬化症における NKG2D システムの関与について、本研究によってその可能性が示された。しかしながら、実際の生体内において、MICA/B 陽性泡沫細胞がどのように NKG2D 陽性細胞からの排除を逃れているかという免疫回避メカニズムについては依然として不明なままである。したがって、MICA/B 陽性細胞による免疫回避メカニズムを詳細に解析することがアテローム性動脈硬化症の病態制御の一助となると思われる。

【第二章】

本研究によって得られた新知見は次のとおりである。

- 上皮系形質を有する膵癌細胞株は細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 を高発現させる。
- たとえ非細胞分裂期に CD44v9 陰性であっても、再度、細胞分裂期に特異的に CD44v9 発現を亢進させる。

これまでの報告で、癌幹細胞は細胞周期静止状態に移行することで分裂期を標的とする抗癌剤に耐性になることが知られている。しかし本研究では、

細胞分裂期にある細胞においても細胞ストレス回避能が特異的に亢進することが示唆された。したがって、今回得られた知見は既存の癌幹細胞に対する治療戦略に対して一石を投じるものであり、今後、癌幹細胞の発生阻止を標的とした新たな治療戦略の開発が望まれる。

【全体の総括および結論】

本研究では、細胞ストレス誘導分子の関わりについて、アテローム性動脈硬化症および膵癌を対象として検討を行った。細胞ストレス応答は、様々な疾患における病態制御に極めて重要である。これらは、網羅的な代謝異常解析や遺伝子解析の技術の進歩により徐々に明らかになりつつあるが、未だ不明な点が多いのが現状である。本研究によって得られた成果を、今後の治療法開発へと繋げていくためには、さらなる詳細な分子機序の解明を行う必要がある。

謝　辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さり御指導と御校閲を賜りました北海道大学大学院医学研究院分子病理学教室　笠原正典教授に深く御礼申し上げます。

また、直接研究の御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究院分子病理学教室　宮武由甲子助教、ならびに分子病理学教室員各位に深く御礼申し上げます。

引用文献

1 Kultz, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annual Review of Physiology* **67**, 225-257 (2005).

2 Kregel, K. C. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology* **92**, 2177-2186 (2002).

3 Finkel, T. & Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247 (2000).

4 Nakai, Y., Iwabuchi, K., Fujii, S., Ishimori, N., Dashtsoodol, N., Watano, K., Mishima, T., Iwabuchi, C., Tanaka, S., Bezbradica, J., Nakayama, T., Taniguchi, M., Miyake, S., Yamamura, T., Kitabatake, A., Joyce, S., Van Kaer, L. & Onoe, K. Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice. *Blood* **104**, 2051-2059 (2004).

5 Raulet, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Reviews Immunology* **3**, 781-790 (2003).

6 Eagle, R. A. & Trowsdale, J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nature Reviews Immunology* **7**, 737-744 (2007).

7 Kasahara, M. & Yoshida, S. Immunogenetics of the NKG2D ligand gene family. *Immunogenetics* **64**, 855-867 (2012).

8 Obeidy, P. & Sharland, A. NKG2D and its ligands. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**, 2364-2367 (2009).

9 Banerjee, S., Lin, C., Skinner, K., Schiffhauer, L., Peacock, J., Hicks, D., Redmond, E., Morrow, D., Huston, A., Shayne, M., Langstein, H., Miller-Graziano, C., Strickland, J., O'Donoghue, L. & De, A. Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Research* **71**, 318-327 (2011).

10 Doubrovina, E., Doubrovin, M., Vider, E., Sisson, R., O'Reilly, R., Dupont, B. & Vyas, Y. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *Journal of Immunology* **171**, 6891-6899 (2003).

11 Coudert, J., Zimmer, J., Tomasello, E., Cebecauer, M., Colonna, M.,

Vivier, E. & Held, W. Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood* **106**, 1711-1717 (2005).

12 Xia, M., Guerra, N., Sukhova, G. K., Yang, K., Miller, C. K., Shi, G. P., Raulet, D. H. & Xiong, N. Immune activation resulting from NKG2D/ligand interaction promotes atherosclerosis. *Circulation* **124**, 2933-2943 (2011).

13 Hashimoto, M., Nasser, H., Chihara, T. & Suzu, S. Macropinocytosis and TAK1 mediate anti-inflammatory to pro-inflammatory macrophage differentiation by HIV-1 Nef. *Cell Death & Disease* **5**, e1267 (2014).

14 Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* **25**, 677-686 (2004).

15 Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A. & Cook, A. D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *Journal of Immunology* **178**, 5245-5252 (2007).

16 Lacey, D. C., Achuthan, A., Fleetwood, A. J., Dinh, H., Roiniotis, J., Scholz, G. M., Chang, M. W., Beckman, S. K., Cook, A. D. & Hamilton, J. A. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *Journal of Immunology* **188**, 5752-5765 (2012).

17 Nikolic, D., Calderon, L., Du, L. & Post, S. R. SR-A ligand and M-CSF dynamically regulate SR-A expression and function in primary macrophages via p38 MAPK activation. *BMC Immunology* **12**, 37 (2011).

18 Li, D., Xie, K., Wolff, R. & Abbruzzese, J. L. Pancreatic cancer. *Lancet* **363**, 1049-1057 (2004).

19 Burris, H., Moore, M., Andersen, J., Green, M., Rothenberg, M., Madiano, M., Cripps, M., Portenoy, R., Storniolo, A., Tarassoff, P., Nelson, R., Dorr, F., Stephens, C. & VanHoff, D. Improvements in

survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *Journal of Clinical Oncology* **15**, 2403-2413 (1997).

20 Lima, C., Green, M., Rotche, R., Miller, W., Jeffrey, G., Cisar, L., Morganti, A., Orlando, N., Gruia, G. & Miller, L. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. *Journal of Clinical Oncology* **22**, 3776-3783 (2004).

21 Arora, S., Bhardwaj, A., Singh, S., Srivastava, S., McClellan, S., Nirodi, C., Piazza, G., Grizzle, W., Owen, L. & Singh, A. An undesired effect of chemotherapy: gemcitabine promotes pancreatic cancer cell invasiveness through reactive oxygen species-dependent, nuclear factor kappa B- and hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated up-regulation of CXCR4. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 21197-21207 (2013).

22 Li, C., Heidt, D., Dalerba, P., Burant, C., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. & Simeone, D. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Research* **67**, 1030-1037 (2007).

23 Huntly, B. & Gilliland, D. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nature Reviews Cancer* **5**, 311-321 (2005).

24 Mani, S., Guo, W., Liao, M., Eaton, E., Ayyanan, A., Zhou, A., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C., Shipitsin, M., Campbell, L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J. & Weinberg, R. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715 (2008).

25 Li, L. & Bhatia, R. Stem Cell Quiescence. *Clinical Cancer Research* **17**, 4936-4941 (2011).

26 Dean, M., Fojo, T. & Bates, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer* **5**, 275-284 (2005).

27 Zoller, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature Reviews Cancer* **11**, 254-267 (2011).

28 Su, Y., Lai, H., Chang, Y., Chen, G. & Lee, J. Direct

reprogramming of stem cell properties in colon cancer cells by CD44. *Embo Journal* **30**, 3186-3199 (2011).

29 Mackay, C., Terpe, H., Stauder, R., Marston, W., Stark, H. & Gunthert, U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *Journal of Cell Biology* **124**, 71-82 (1994).

30 Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 33-45 (2003).

31 Brown, R., Reinke, L., Damerow, M., Perez, D., Chodosh, L., Yang, J. & Cheng, C. CD44 splice isoform switching in human and mouse epithelium is essential for epithelial-mesenchymal transition and breast cancer progression. *Journal of Clinical Investigation* **121**, 1064-1074 (2011).

32 Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., Masuko, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Kai, K., Takahashi, E., Imamura, Y., Baba, Y., Ohmura, M., Suematsu, M., Baba, H. & Saya, H. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* **19**, 387-400 (2011).

33 Mielgo, A., van Driel, M., Bloem, A., Landmann, L. & Gunthert, U. A novel antiapoptotic mechanism based on interference of Fas signaling by CD44 variant isoforms. *Cell Death & Differentiation* **13**, 465-477 (2006).

34 Yamaguchi, A., Urano, T., Goi, T., Saito, M., Takeuchi, K., Hirose, K., Nakagawara, G., Shiku, H. & Furukawa, K. Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* **14**, 1122-1127 (1996).

35 Hirata, K., Suzuki, H., Imaeda, H., Matsuzaki, J., Tsugawa, H., Nagano, O., Asakura, K., Saya, H. & Hibi, T. CD44 variant 9 expression in primary early gastric cancer as a predictive marker for recurrence. *British Journal of Cancer* **109**, 379-386 (2013).

36 Kishimoto, T., Ishikura, H., Kimura, C., Takahashi, T., Kato, H. & Yoshiki, T. Phenotypes correlating to metastatic properties of

pancreas adenocarcinoma in vivo: the importance of surface sialyl Lewis(a) antigen. *International Journal of Cancer* **69**, 290-294 (1996).

37 Zeisberg, M. & Neilson, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Clinical Investigation* **119**, 1429-1437 (2009).

38 Vuoriluoto, K., Haugen, H., Kiviluoto, S., Mpindi, J. P. Nevo, J., Gjerdrum, C., Tiron, C., Lorens, J. B. & Ivaska, J. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene* **30**, 1436-1448 (2011).

39 Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., Brunton, V. G., Morton, J., Sansom, O., Schuler, J., Stemmler, M. P., Herzberger, C., Hopt, U., Keck, T., Brabletz, S. & Brabletz, T. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature Cell Biology* **11**, 1487-1495 (2009).

40 Mechetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis, S., Kim, H., Stroup, R., Garcia, R., Parker, R. J. & Fruehauf, J. P. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clinical Cancer Research* **4**, 389-398 (1998).

41 Miletti-Gonzalez, K. E., Chen, S., Muthukumaran, N., Saglimbeni, G. N., Wu, X., Yang, J., Apolito, K., Shih, W. J., Hait, W. N. & Rodriguez-Rodriguez, L. The CD44 receptor interacts with P-glycoprotein to promote cell migration and invasion in cancer. *Cancer Research* **65**, 6660-6667 (2005).

42 Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Azmi, A. S., Ali, S., Abbruzzese, J. L., Gallick, G. E. & Sarkar, F. H. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Research* **69**, 2400-2407 (2009).

43 Adikrisna, R., Tanaka, S., Muramatsu, S., Aihara, A., Ban, D., Ochiai, T., Irie, T., Kudo, A., Nakamura, N., Yamaoka, S. & Arii, S.

Identification of pancreatic cancer stem cells and selective toxicity of chemotherapeutic agents. *Gastroenterology* **143**, 234-245 (2012).

44 Garcia-Silva, S., Frias-Aldeguer, J. & Heeschen, C. Stem cells & pancreatic cancer. *Pancreatology* **13**, 110-113 (2013).

45 Fu, D. & Arias, I. M. Intracellular trafficking of P-glycoprotein. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **44**, 461-464 (2012).

46 Fu, D., Bebawy, M., Kable, E. P. & Roufogalis, B. D. Dynamic and intracellular trafficking of P-glycoprotein-EGFP fusion protein: Implications in multidrug resistance in cancer. *International Journal of Cancer* **109**, 174-181 (2004).

47 Sai, Y., Nies, A. T. & Arias, I. M. Bile acid secretion and direct targeting of mdr1-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cells. *Journal of Cell Science* **112**, 4535-4545 (1999).

48 Apodaca, G., Gallo, L. I. & Bryant, D. M. Role of membrane traffic in the generation of epithelial cell asymmetry. *Nature Cell Biology* **14**, 1235-1243 (2012).

49 Schiel, J. A., Childs, C. & Prekeris, R. Endocytic transport and cytokinesis: from regulation of the cytoskeleton to midbody inheritance. *Trends in Cell Biology* **23**, 319-327 (2013).