



Title	子宮体部上皮性腫瘍ならびに腓癌細胞におけるPSFの発現
Author(s)	朴, 鐘建
Description	配架番号 : 2400
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13021号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13021
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75625
Type	doctoral thesis
File Information	Jongkun_Park.pdf



学 位 論 文

子宮体部上皮性腫瘍ならびに
膵癌細胞における PSF の発現

(PSF expression in uterine endometrial neoplasms
and pancreatic cancer cells)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

朴 鐘建

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	5 頁
第一章	6 頁
緒言	7 頁
研究方法	8 頁
研究結果	10 頁
考察	17 頁
第二章	19 頁
緒言	20 頁
研究方法	21 頁
研究結果	24 頁
考察	29 頁
総括	30 頁
謝辞	31 頁
引用文献	32 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

Jong kun Park, Noriyuki Otsuka, Utano Tomaru, Katsushige Yamashiro, Hiroaki Suzuki, Manabu Azuma, Kazuhira Okamoto, and Masanori Kasahara

Clinicopathological significance of PSF3 expression in uterine endometrial carcinomas. Virchows Archiv, submitted.

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 朴 鐘建, 池下 隼司, 宮武 由甲子, 笠原 正典

血管内皮細胞との共培養によって膵癌細胞はがん幹細胞マーカーを発現する
第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24 日- 4 月 26 日・広島

2. Jong kun Park, Yukiko Miyatake, Masanori Kasahara

Direct coculture with HUVECs induces PSF1 and CD44 variant 9 expression in pancreatic cancer cells

第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日- 9 月 27 日・横浜

3. 池下 隼司, 宮武 由甲子, 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 の発現が亢進する

第 104 回日本病理学会総会, 2015 年 4 月 30 日- 5 月 2 日・名古屋

4. 朴 鐘建, 大塚 紀幸, 外丸 詩野, 山城 勝重, 鈴木 宏明, 東 学, 笠原 正典

子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 発現の臨床病理学的意義

第 50 回北海道病理談話会, 2017 年 10 月 14 日・札幌

緒言

生理的な真核生物の細胞分裂は厳密な制御機構の中で行われるが、悪性腫瘍の本質的な異常は無秩序な細胞増殖であり、細胞分裂の制御機構の破綻にある。細胞分裂の過程では、ゲノム全体を正確に複製する必要がある、DNA 複製の起点で複数のタンパク質アセンブリーを形成し、秩序だった DNA 複製が行われる。この制御システムは種にわたって高度に保存されている¹。

DNA 複製の起点部では、不活性状態で DNA 上に存在する MCM (minichromosome maintenance) と ORC (origin recognition complex) が結合し、引き続き Cdc45, GINS 複合体と結合し、CMG (Cdc45-MCM-GINS) 複合体が形成される。さらに DNA ポリメラーゼ- α が動員されることで DNA 複製が開始される^{2,3} (図 1)。

GINS 複合体は *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究によって同定された DNA 複製因子で、進化的に非常に良く保たれており、Sld5, PSF (Partner of Sld Five) 1, PSF2, PSF3 の 4 つのサブユニットで構成されている。この名称は各分子の日本語数字 5-1-2-3 (Go-Ichi-Ni-San) の頭文字に由来する。GINS 複合体は DNA 複製プロセスの開始と伸長に必須であり、ヘリカーゼとして機能する CMG (Cdc45-MCM-GINS) 複合体の一部として、真核生物の DNA 複製において中心的な役割を果たしている⁴。

生理的には、GINS 複合体は発生の段階において重要な役割を果たしており、GINS 遺伝子の欠損では胚盤胞の内部細胞塊の細胞分裂が障害されるため、胎生 6 日目の段階で致死性である (図 2)。一方、成体において GINS 複合体の発現は骨髄、胸腺、精巣などの限られた臓器と、消化管の粘膜や表皮の基底層など増殖と再生の活発な一部の細胞において観察される。また、造血系前駆細胞等の未熟な細胞の増殖にも必要であり、未成熟造血細胞プールサイズの維持や骨髄の急速な再生に関わっている^{5,6,7}。

最近の報告により、GINS 複合体のサブユニットが結腸癌、乳癌、肝内胆管癌、肺癌などの悪性腫瘍において過剰発現していることが明らかになり、腫瘍細胞の増殖過程に関与している可能性が示唆された⁸⁻¹⁰。さらに、*c-Myc* proto-oncogene (MYC) 過剰発現による DNA 不安定化や腫瘍化において GINS 複合体が重要な

役割を果たしていることが報告された¹¹ (図 3)。

GINS 複合体の腫瘍細胞における発現誘導の分子メカニズムは不明であるが、GINS 複合体の生理的役割を考慮すると、その過剰発現は腫瘍発生や腫瘍増殖に大きな役割を有している可能性が推定される。本研究では、GINS 複合体のうち、PSF1, PSF3 と腫瘍細胞における発現を検討した。第一章では、子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 発現の臨床病理学的意義を明らかにするため、PSF3 発現と子宮体部上皮性腫瘍の組織学的分化度、及び臨床病理学的因子との関連性について解析を行った。第二章では、予後不良な固形癌の 1 つである膵臓癌由来の細胞株を用いて、PSF1 と PSF3 の発現、癌幹細胞マーカーや関連分子の発現について検討を行なった。

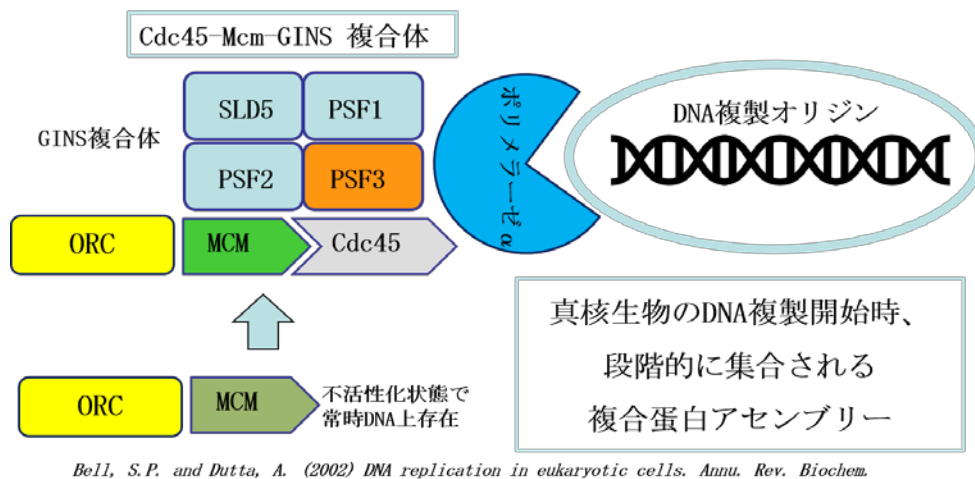


図1 DNA複製開始の為、段階的に集合される複合蛋白アセンブリー

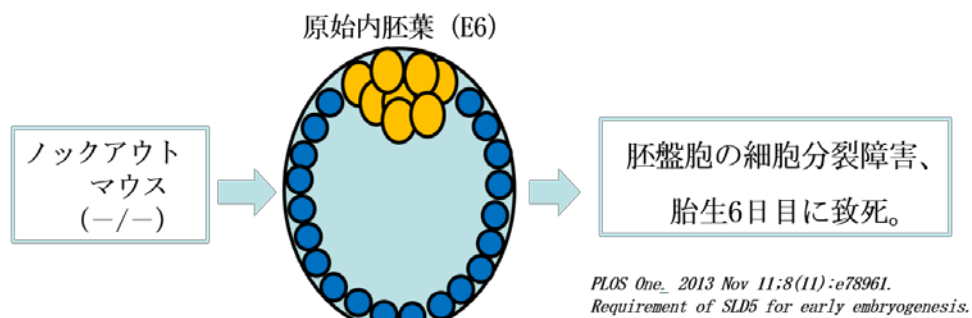


図2 哺乳類の胚発生における GINS 複合体の働き

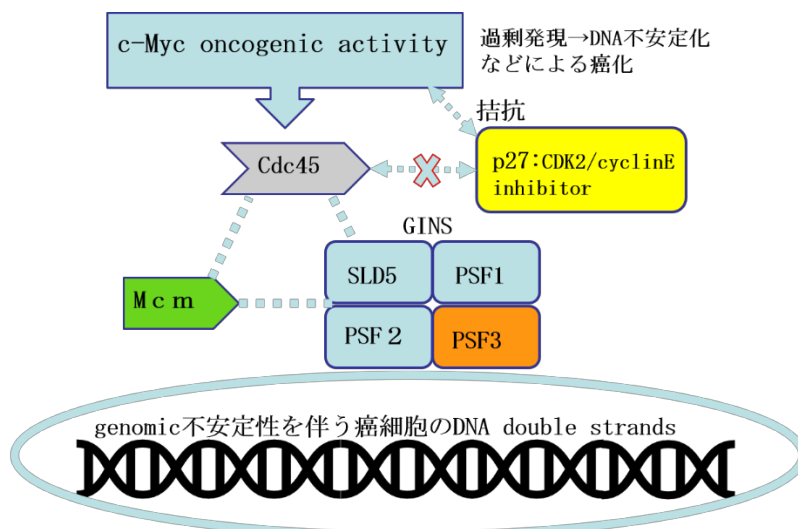


図3 腫瘍細胞における GINS 複合体の役割

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

Cdc45	cell division control protein 45
GIN5	an acronym for go-ichi-ni-san, the Japanese for 5-1-2-3, after the four subunits of the complex Sld5, PSF1, PSF2, and PSF3
HE	hematoxylin and eosin
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
MCM	minichromosome maintenance
MDR	multidrug resistance
MELF	microcystic, elongated and fragmented
MMP	matrix metalloproteinase
MYC	<i>c-Myc</i> proto-oncogene
NHDF	normal human dermal fibroblasts
ORC	origin recognition complex
OS	overall survival
PAX1	paired boxed gene 1
PSF1/2/3	partner of Sld five 1/2/3
RFS	recurrence free survival
Sld5	an acronym for synthetic lethal with <i>dpb11-1</i>
TPS	tumor proportion score
WHO	World Health Organization

第一章

子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 発現の 臨床病理学的研究

緒言

先進国の女性生殖器腫瘍において、子宮体部上皮性腫瘍は子宮頸部の上皮性腫瘍と並び頻度の高い悪性腫瘍である¹²。日本産科婦人科学会の統計によると、1983年に登録された子宮体部上皮性腫瘍は976例であったが、1994年では2115例、2009年では6113例が報告され、近年その発生率が増加傾向にあることが問題となっている¹³。

子宮体部上皮性腫瘍は、1983年 Bokhman によって提案された分類法により、1型または2型に分類される。1型は内膜増殖症を母地として *estrogen* 依存性に発生した腫瘍で、2型は萎縮性内膜の背景に *estrogen* 非依存性に発生した腫瘍として定義されている¹⁴。しかしながら、*p53*, *PTEN*, *MSI*, *POLE* 等、子宮体部上皮性腫瘍の発癌に関与する遺伝子変異に関する研究の進歩により、子宮体部上皮性腫瘍は既存の分類に基づく考え方では必ずしも十分な説明が成し得ないことが明らかになってきた¹⁵。加えて、子宮体部上皮性腫瘍の病理診断では、良悪の判定や組織学的分類において、診断の再現性の面でも多くの課題が残されているのが現状である^{16,17}、子宮体部上皮性腫瘍の病理診断では、客観性のある診断マーカーの確立を目指した研究の進展が望まれている。

本章では、子宮体部上皮性腫瘍における *PSF3* 発現の臨床病理学的検討を行なった。2008-2012年に摘出術が施行された子宮内膜異型増殖症25例、類内膜癌123例、非類内膜癌32例を対象として、*PSF3*の免疫組織化学染色を施行し、臨床病理学的因子と *PSF3* 発現との関連について解析を行った。

研究方法

1. 症例

2008-2012 年に北海道がんセンターにおいて摘出術が施行された子宮内膜異型増殖症 25 例，類内膜癌 123 例，非類内膜癌 32 例（漿液癌 10 例，明細胞癌 8 例，混合癌 14 例），計 180 例を対象とした．検討にあたり，全症例を 3 人の病理医により 2014 年 WHO 分類¹⁸に基づいた評価を行なった．

無再発生存期間（Relapse-free survival：RFS）は手術日から画像診断及び病理学的に再発を認めた日，また再発を認めない場合は最終受診・検査日までの期間とした．全生存率（Overall survival: OS）は，手術日から死亡した日もしくは生存している場合は最終受診・検査日までの期間とした．RFS 及び OS の評価は，標準的治療を受けた症例を対象とし，治験参加症例は除外した．また，病変の完全切除が確認された症例のみを対象とした．尚，ヒト組織切片を用いた検討は北海道がんセンター倫理委員会の承認のもとで施行した．

2. 免疫組織化学染色

パラフィン切片は脱パラ後，CC1 バッファー（Roche, Switzerland）を用い，30 分間加熱（95-99℃）して抗原賦活化を行った．抗 PSF3 抗体（GeneStem, clone# aps3.2, 1:1000 希釈），抗 Ki-67 抗体（Roche, clone 30-9, ready to use），抗 p53 抗体（Roche, clone D0-7, 1:100 希釈）を室温で 30 分間反応し，Roche 社の autostainer，iVIEW DAB 検出キットで免疫組織化学染色を行なった．PSF3 のポジティブコントロールとしてはヒト男性セミノーマ組織切片を用いた（図 4）．また，組織学的検討には hematoxylin&eosin (HE)染色標本を用いた．

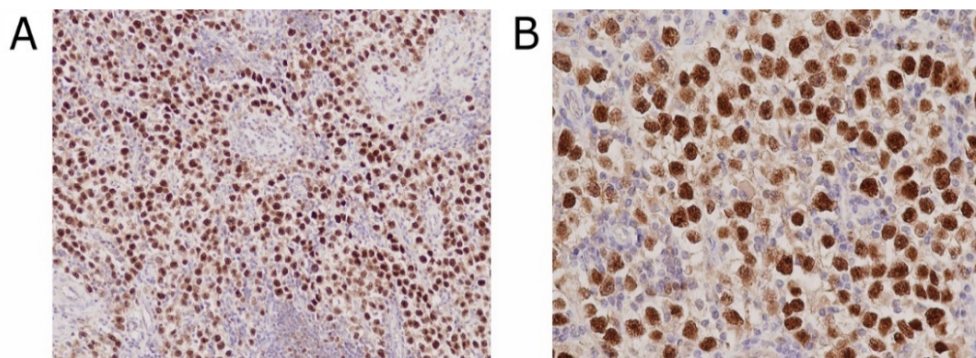


図 4 セミノーマ組織における PSF3 陽性所見 A. ×100, B. ×400

3. 免疫組織化学染色の評価

抗 PSF3 抗体に対する免疫組織化学染色は、核陽性像をもって、陽性と判断した。陽性細胞の割合を、TPS (tumor proportion score: %) で換算し、0-20%をスコア 0, 21-40%をスコア 1, 41-60%をスコア 2, 61%以上をスコア 3 として評価した。

Ki-67 と PSF3 の比較検討については、30 症例を無作為抽出し、連続切片にて免疫組織化学染色を施行した。

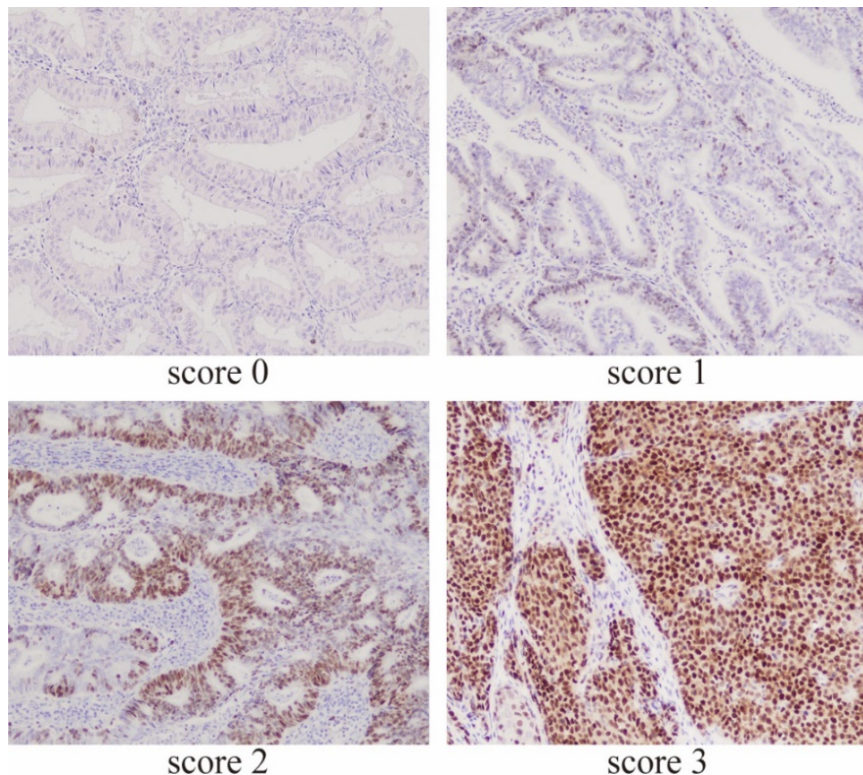


図 5 PSF3 TPS スコア別の代表的染色像

4. 統計解析

Pearson's χ^2 検定, Fisher's exact test, *t*-test, Wilcoxon 符号付き順位検定を解析に応じて使い, *p* 値は<0.05 を有意とした。RFS および OS の解析には, Kaplan-Meier 生存曲線を作成した。統計解析は IBM SPSS ソフトウェアバージョン 24 を用いて行った。

研究結果

1. 異型増殖症と G1 類内膜癌における PSF3 発現

子宮体部における内膜増殖性病変は一般的に過剰な **estrogen** 刺激による過形成性病変として知られ、自然退縮を示すこともあるが、持続また進行すると内膜癌に移行する前駆病変として考えられている^{19, 20}.

PSF3 の発現が、過形成病変と腫瘍性病変で異なるのか、異型増殖症 ($n=25$) と G1 類内膜癌 ($n=69$) の症例において、PSF3 免疫組織化学染色による検討を実施した. 両者に代表的な HE と PSF3 染色像, 両群間の PSF3 TPS を比較した結果を示す (図 6). G1 類内膜癌の症例は平均 PSF3 TPS 値が 30.7% に対して, 異型増殖症の平均 PSF3 TPS 値は 10.4% であり, 両群間の PSF3 TPS 値は統計的に有意差を示した ($p < 0.001$). 以上より, PSF3 の検討は良悪の鑑別に有用な診断マーカーになり得る可能性が示された.

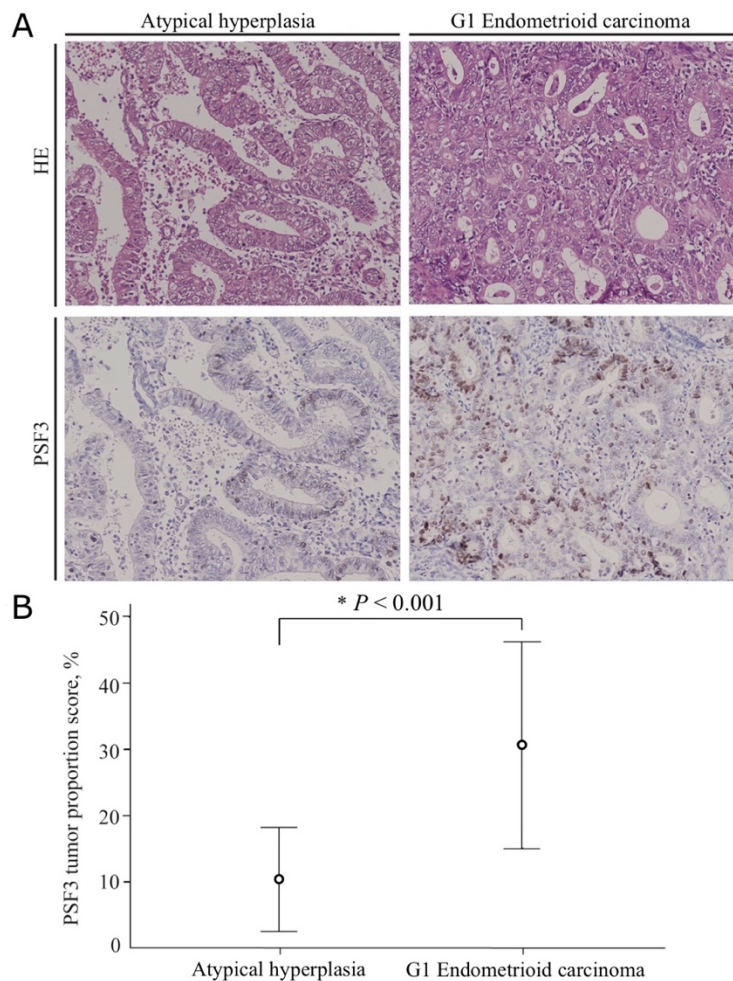


図 6 異型増殖症と G1 類内膜癌における PSF3 発現

A. 代表的 HE と PSF3 染色像

B. 両者の PSF3 TPS 値で, 統計的に有意差を認めた.

2. 類内膜癌および非類内膜癌における PSF3 発現

PSF3 発現が子宮内膜癌の分化度に関与しているのかを確かめるために、類内膜癌 123 例と非類内膜癌 32 例において免疫組織化学染色による検討を行った。

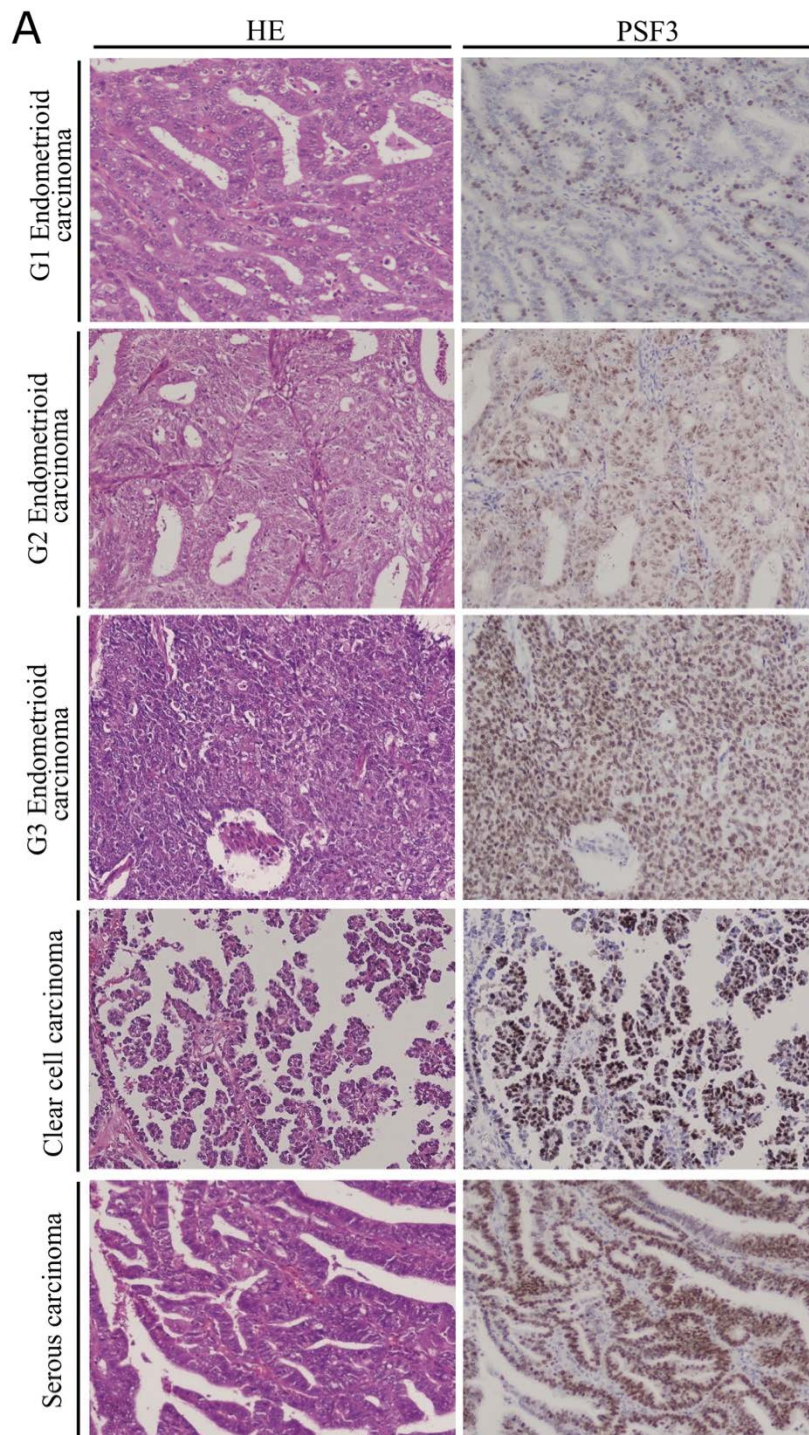


図 7 類内膜癌および非類内膜癌における PSF3 発現

A. 代表的 HE と PSF3 染色像

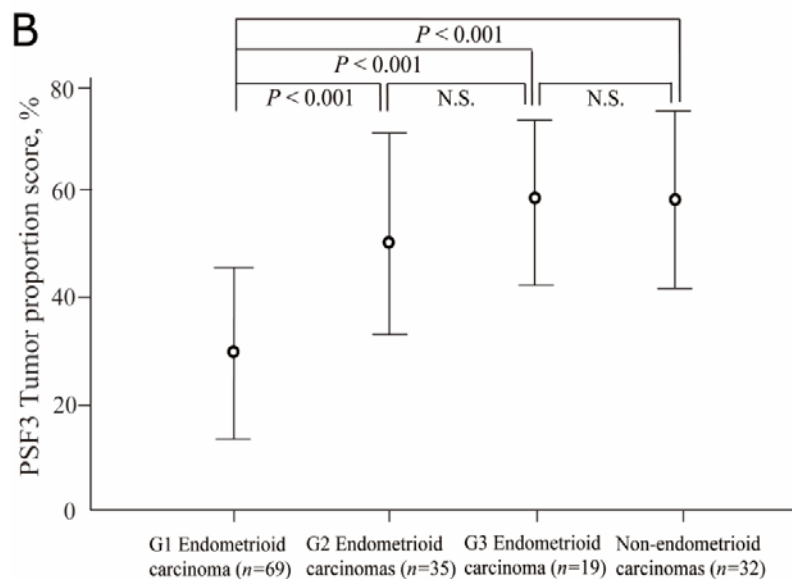


図 7 類内膜癌および非類内膜癌における PSF3 発現
B. 各組織型による PSF3 TPS 値

G2 類内膜癌の症例は PSF3 TPS 平均値 55.0%, G3 類内膜癌では 59.9%を示し, 組織学的分化度に従って PSF3 TPS 値の段階的な上昇が認められた (図 2 A). 尚, 69 例の G1 類内膜癌のうち 55 例 (79.7%) が PSF3 TPS スコアリングで 0, 1 を示したのに対して, G2 と G3 類内膜癌を合わせた 54 例うち 42 例 (77.7%) が PSF3 TPS スコア 2, 3 であった. これらの結果から, PSF3 の過剰発現と子宮内膜癌の組織学的分化度の間には相関があることが示された (図 2B).

3. 子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 と Ki-67 染色性の比較検討

一般的に細胞増殖の指標として使われている Ki-67 index は, 日常の病理診断で非常に有用な増殖マーカーである²¹. 他施設による検討では, Ki-67 と PSF3 は染色パターンに多少の違いがあるものの, 腫瘍細胞において共発現が認められるとの報告がある^{10, 22}. 180 症例より無作為的に 30 例を抽出し, PSF3 と Ki-67 の免疫組織化学染色を連続切片にて施行し, 比較検討を行った. その結果, PSF3 発現は腫瘍細胞では Ki-67 と比較してほぼ同等であった. その一方, 間質細胞では PSF3 陽性細胞は Ki-67 陽性細胞に比して少ない傾向が見られた. 腫瘍細胞と間質細胞における陽性率を比較した結果, 間質細胞では PSF3 陽性細胞が少なく, PSF3 が腫瘍細胞に選択的に発現していることが明らかになった (図 8A-D).

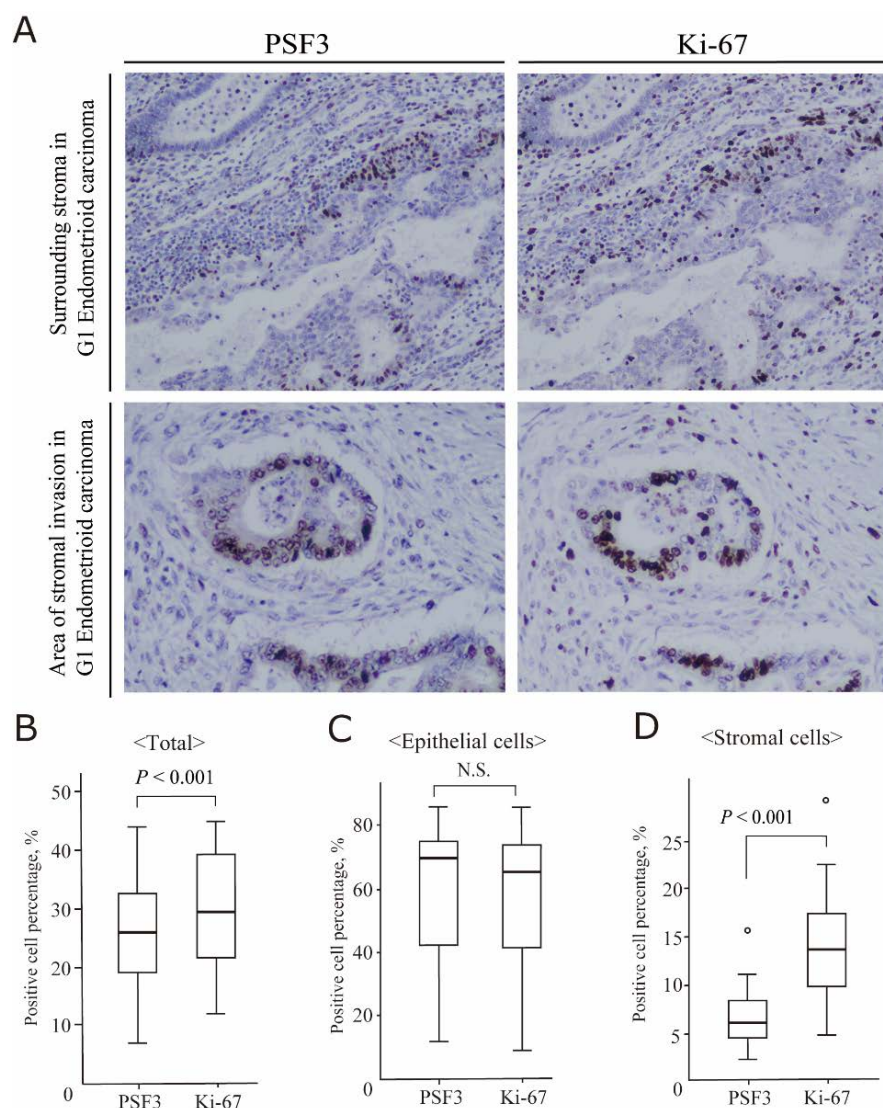


図8 子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 と Ki-67 染色性の比較

A. PSF3 及び Ki-67 の代表的染色像，内膜病変（上段），筋層浸潤部（下段）

B-D. 同一観察領域における PSF3 及び Ki-67 陽性率の比較，両者間の間質細胞での陽性率に有意差がみられた。（Wilcoxon 符号付き順位検定法による検定）

4. G2 と G3 類内膜癌症例における PSF3 発現と *p53* 変異の関連性

非類内膜子宮体癌の代表的な組織型である漿液性癌や高悪性度の子宮内膜癌の一部で *p53* 癌抑制遺伝子の変異を認めることが報告されている^{10,23}。PSF3 と *p53* 変異の関連について，G2 と G3 類内膜癌 54 例を対象として検討を行なった。その結果，54 例の中 5 例で変異型 *p53* 発現が確認されたが，これらの症例の PSF3 スコアに一定の傾向を認めなかった（図 9）。

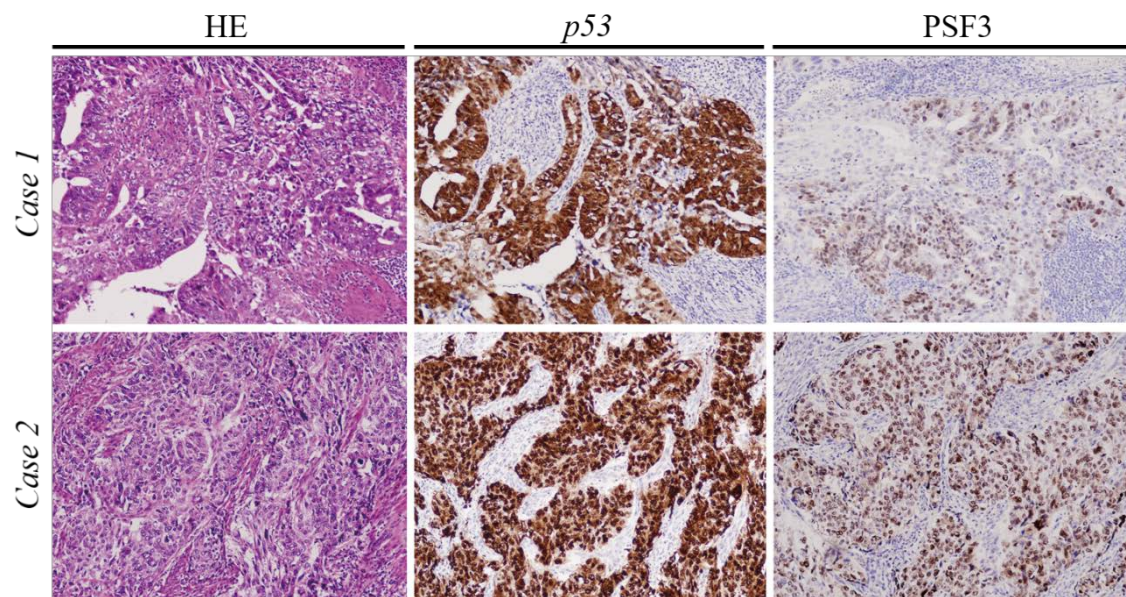


図9 G2 と G3 類内膜癌症例における PSF3 発現と *p53* 変異
代表的な2症例を提示, *p53* 変異と PSF3 陽性率との一定の傾向は見られない.

5. 子宮体部上皮性腫瘍病変における PSF3 TPS スコアの分布

子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 TPS スコアをまとめた結果を表1に示す.
前駆病変である異型増殖症は PSF3 TPS スコア 0 が 88%, G1 類内膜癌は PSF3
TPS スコア 1 が 49.3%, G2 類内膜癌, G3 類内膜癌, 及び非類内膜癌では殆どの
症例が PSF3 TPS スコア 2 以上を示した.

表 1. 子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 TPS の組織型による分布

Score	PSF3 TPS			
	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
TPS (%)	0-20	21-40	41-60	>60
Atypical hyperplasia (AH)	22 (88.0%)	3 (12.0%)	0 (0%)	0 (0%)
G1 Endometrioid carcinoma	21 (30.4%)	34 (49.3%)	8 (11.6%)	6 (8.7%)
G2 Endometrioid carcinoma	1 (2.9%)	9 (25.7%)	9 (25.7%)	16 (45.7%)
G3 Endometrioid carcinoma	0 (0%)	2 (10.5%)	8 (42.1%)	9 (47.4%)
Non-endometrioid carcinomas	0 (0%)	4 (12.5%)	11 (34.4%)	17 (53.1%)

非類内膜癌は漿液性癌 10 例, 明細胞癌 8 例, 混合癌 14 例. 症例数 (%).

6. PSF3 過剰発現と臨床病理学的因子との関連性

PSF3 TPS スコア 0, 1 を PSF3 低発現群, PSF3 TPS スコア 2, 3 を PSF3 高発現群とし, 臨床病理学的因子との関連性を検討した. 全組織型と類内膜癌を抽出して解析した結果を表 2 に示す. PSF3 高発現と統計的に有意な関連性を示した臨床病理学的因子は, 病理学的 T 因子 ($P = 0.000$, $P = 0.001$), リンパ侵襲 ($P = 0.001$, $P = 0.008$) および術後再発率 ($P = 0.000$, $P = 0.002$) であった. 患者の年齢, 病理学的 N 因子, 静脈浸潤との関連性は認めなかった.

表 2. 臨床病理学的因子と PSF3 発現

Factors	PSF3 expression (All histologic types)				PSF3 expression (Endometrioid carcinoma)			
	Patients (n)	Low	High	P	Patients (n)	Low	High	P
Age (y)								
< 60	79	36	43	0.540	67	33	34	0.457
≥ 60	76	35	41		56	32	24	
T								
pT1a/b	140	71	69	† 0.000	115	67	48	† 0.001
pT2	8	0	8		5	0	5	
pT3a/b	7	0	7		3	0	3	
N								
Negative	105	50	55	0.156	89	49	40	0.186
Positive	17	5	12		9	3	6	
Lymphatic invasion								
Negative	91	52	39	0.001	79	50	29	0.008
Positive	64	19	45		44	17	27	
Vascular invasion								
Negative	137	65	72	0.319	110	61	49	0.524
Positive	18	6	12		13	6	7	
Recurrence								
Negative	125	66	59	0.000	107	63	44	0.002
Positive	22	1	21		11	1	11	

N 因子の解析はリンパ節郭清を施行した症例のみを対象とした. † pT1a/b vs. pT2 and pT3a/b 間で検定を施行. Pearson χ^2 検定または Fisher's exact test により解析.

7. PSF3 発現と予後との関連性

PSF3 過剰発現と子宮体部上皮性腫瘍の予後との相関関係を調べる為に、RFS, OS について PSF3 高発現群と低発現群で Kaplan-Meier 生存曲線を作成した。PSF3 高発現群では、全組織型及び類内膜癌抽出群いずれも RFS, OS が有意差をもって短かった (図 10 A-D, $p < 0.05$)。更に、FIGO stage I と II 症例を抽出して解析した結果においても、PSF3 高発現群で予後が不良であった (図 10E, F)。

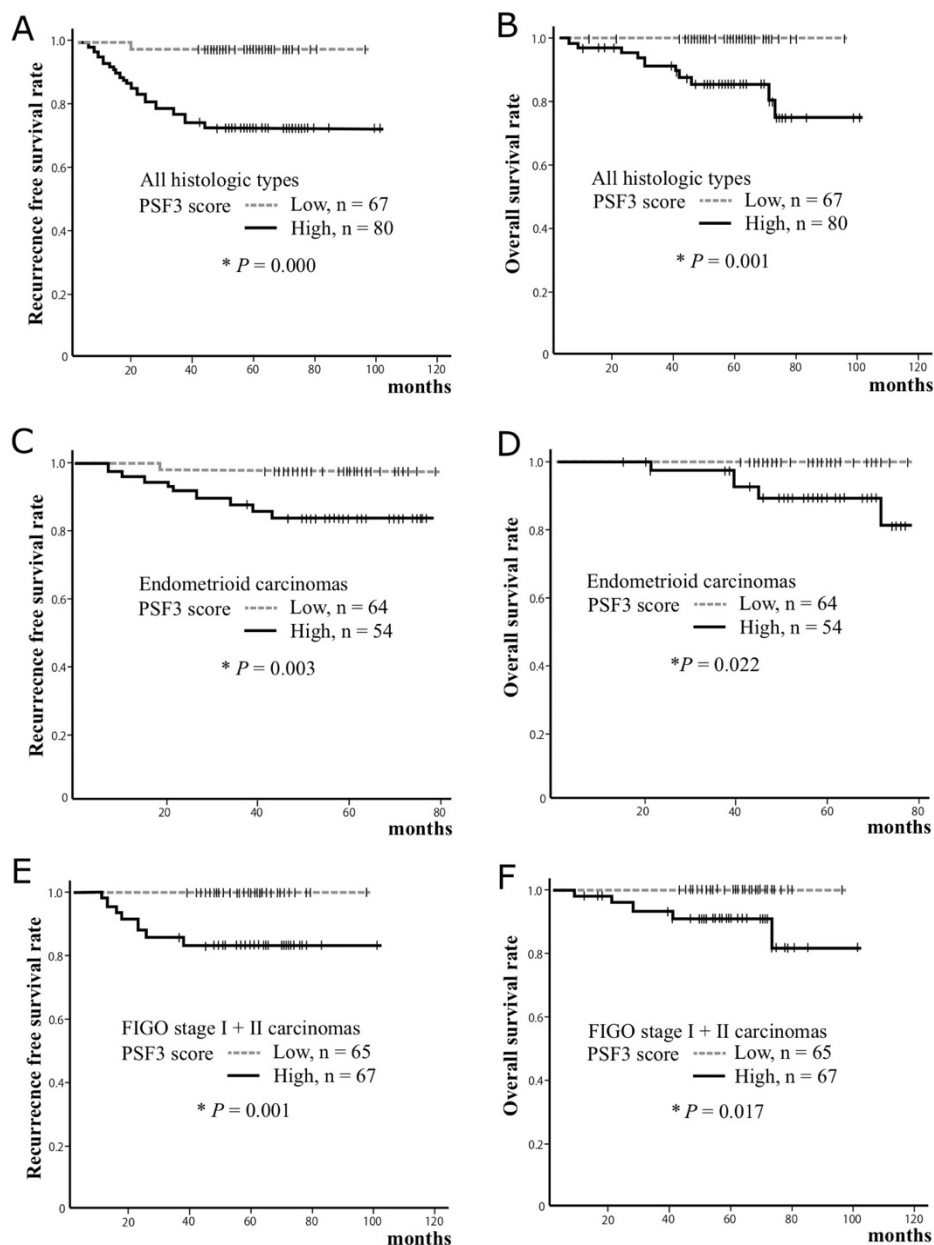


図 10 PSF3 発現と予後との関連性

A-B. 全組織型、C-D. 類内膜癌、E-F. FIGO stage I と II の症例で算出した RFS 及び OS 生存曲線、いずれも PSF3 高発現群で予後不良を呈した。

考察

子宮体部上皮性腫瘍における PSF3 発現を免疫組織化学的に検討した結果、50%以上が PSF3 高発現であり、PSF3 の TPS 値が異型増殖症と G1 類内膜癌の鑑別診断、ならびに類内膜癌の組織学的分化度の評価に有用であることが明らかとなった。また、PSF3 発現の組織型による特異性は見られなかったものの、PSF3 過剰発現は病理学的 T 因子、リンパ管侵襲や術後再発など臨床病理学的因子と関連していることが明らかになった。

前駆病変である異型増殖症の 88%は PSF3 TPS 20%以内であるが、G1 類内膜癌の 69.6%は PSF3 TPS 20%を超えており、PSF3 TPS 20%が両者の鑑別において cut-off 値の参考値となる。しかしながら、G1 類内膜癌の 30.4%は PSF3 TPS 20%以内であり、他の診断マーカーと組み合わせた検討が必要と考えられる。内膜病変における良悪鑑別診断の組織学的マーカーとして、最近 Liu らから PAX1 (Paired boxed gene 1) の報告があった。PAX1 は異型増殖症で 87.5%、G1 類内膜癌で 30.1%の陽性率を示す²⁴。今後、さらに内膜病変の鑑別診断に有用な診断マーカーの検索が進むことが期待される。

早期の子宮体癌の予後は良好であり、進行した子宮体癌においてもアジュバント化学療法により予後が改善されている。しかし、中間群においては、特定のリスク因子（子宮筋層浸潤、特定の組織型（G3 類内膜癌、漿液性癌）、リンパ管侵襲^{25,26}）を伴う症例で手術後の追加加療が考慮されるが、中間群の中には想定より悪い経過をたどる症例が少なからず存在し、治療選択の上で課題が残る部分である^{27,28}。本章では、全組織型、類内膜癌を抽出した群、FIGO stage I-II 群いずれにおいても、PSF3 を過剰発現している症例で予後不良であることが明らかとなった。したがって、子宮体部上皮性腫瘍の治療において、追加加療が考慮される対象の抽出に PSF3 の検討が有用である可能性が示唆された。

p53 関連タンパク質の異常発現は、漿液性癌や一部の高悪性度の類内膜癌において病態的に重要な役割を果たしていることが知られており、p53 突然変異は類内膜癌の予後不良因子の 1 つとして認識されている²⁹。しかし、GINS 複合体と p53 変異との関連性に関しては、一定の見解が得られていない。肺癌細胞株においては PSF1 のノックダウンによる腫瘍細胞の増殖抑制は p53 非依存的であるこ

とが報告されている³⁰。乳癌細胞株では PSF2 が p53 変異と依存的に働く可能性が報告されている³¹。本研究で施行した G2/G3 類内膜癌 54 例における p53 突然変異と PSF3 過剰発現の比較検討でも双方の明らかな相関関係は見いだされなかった。子宮体癌の発癌過程は特定の遺伝子変異に限らず、様々な遺伝子変異の多段階的な蓄積によるとされており³²、PTEN, PIK3CA, CTNNB1 などの遺伝子変異がその過程に関連していることが報告されている³³。前駆病変である異型増殖症から高異型度の内膜癌にかけ、PSF3 陽性細胞の増加を認めることから、PSF3 は発癌と進行の過程で重要な役割を果たしている可能性が考えられ、今後既知の遺伝子変異らと PSF3 の関連性に関するさらなる解析が必要と考えられる。

Ki-67 は、G0 期以外の細胞周期すなわち分裂期にある全ての細胞で陽性になり、腫瘍の増殖性を表わすマーカーとして広く使われている³⁴。一方、子宮体部上皮性腫瘍において、PSF3 がより選択的に腫瘍細胞に発現していることが明らかとなった。PSF3 が DNA 複製に働いているという生理的役割を考慮すると、PSF3 の増殖性マーカーとしての利用を視野においた、多種の癌腫を対象とした検討を進める必要があると考えられた。

第二章

膀胱癌細胞株における PSF1 及び PSF3 の発現に関する研究

緒言

浸潤性膵管癌は、膵管上皮由来の悪性腫瘍であり、原発性膵悪性腫瘍の約 8 割を占める。組織学的には膵管類似の分化型腺癌や分化傾向がはっきりしない低分化型病変まで多彩な組織像を呈する。5 年生存率は 5%程度で、診断後の生存期間の中央値は約 9 ヶ月であり、極めて予後不良な難治性固形癌の 1 つである。現在、浸潤性膵管癌の治療には外科的切除や化学療法が用いられているが、発見時には進行している症例が多く、初診断時に手術可能な症例は 20%程度である³⁵。また、治療技術の向上により、長期生存例も存在するが、治療成績や予後の十分な改善には至っていないのが現状である³⁶。標準的化学療法としては、ゲムシタビン単独または S-1 単独療法が推奨されているが、治療抵抗性を呈する症例も見られ、問題となっている³⁷。

近年のがん研究の進歩により、悪性腫瘍における治療抵抗性の原因の一つとして、癌幹細胞の存在が指摘されている。癌幹細胞は細胞周期静止期を保ちつつ自己複製能を保持する為、化学療法に抵抗性であり、再発や遠隔転移の原因になることが知られている³⁸。様々な癌幹細胞マーカーが報告されているが、癌幹細胞では GINS 複合体のサブユニットである PSF1 と PSF3 の過剰発現が見られ、特に腫瘍細胞の増殖や脈管浸潤に関わることが報告されている³⁹。

本章では、膵癌細胞株を用い、PSF1、PSF3、癌幹細胞マーカー、癌細胞の悪性形質に関わる分子の発現を検討した。腫瘍細胞の幹細胞様形質の獲得には腫瘍微小環境が影響することから、膵癌細胞株と正常ヒト臍帯血管内皮細胞（HUVEC）との直接共培養実験系を構築し、膵癌細胞の性質変化について解析した。

研究方法

1. 材料及び実験モデル

実験には、所属教室で樹立された膵癌細胞株である PCI43, PCI66 に加えて、一般的に広く使われている膵癌細胞株である Mia-PaCa2 を使用した。血管内皮細胞との共培養モデル実験には、正常ヒト臍帯血管内皮細胞株である HUVEC を使用した。

24 時間培養によって monolayer 化した CFSE 標識血管内皮細胞の上に膵癌細胞を蒔き、更に 24 時間共培養を行った。共培養後に FACS Aria III (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) を用いて、CFSE 陰性細胞集団として膵癌細胞を分離し、実験に使用した。コントロール群では細胞条件の一致のため、細胞数を 2 倍にして培養した。

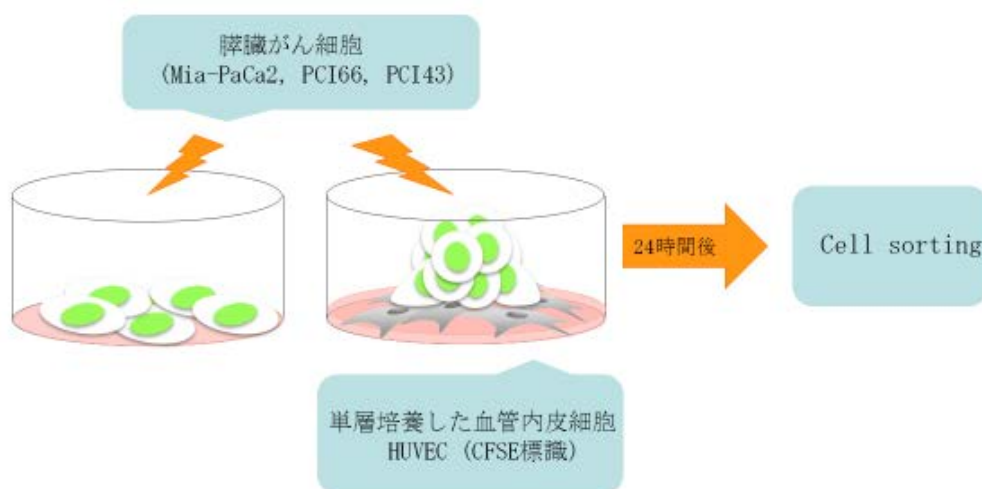


図 11 血管内皮細胞と膵癌細胞の共培養実験モデル

2. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)及び Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

フィーダー細胞との共培養後に分離した膵癌細胞および、単独培養時の膵癌細胞から RNeasy mini kit (QIAGEN, VALENCIA, CA) を用いて RNA を抽出した。得られた RNA 1 μ g に DNase I (Invitrogen) 処理を行い, Go ScriptTM 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°C 15 分の変性後, 95°C 30

秒, 55°C 30 秒, 72°C 30 秒の反応を 35 サイクル行ったのち, 72°C 7 分間の伸長反応を行った. qPCR 反応は Go Taq® qPCR Master Mix (Promega) を用いて, Step One Plus (Thermo Fisher SCIENTIFIC, Massachusetts, USA) にて 95°C 2 分間の反応後, 95°C 15 秒の熱変性, 60°C 60 秒のアニーリング, 伸長反応を 40 サイクル行った. 反応終了後, 内在性コントロールである GAPDH との相対比を $2^{-\Delta Ct}$ 法を用いて算出した. PCR および qPCR に用いたプライマーの塩基配列は表 3 の通りである.

表 3. 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')
CD44v9	Forward	GAATCCCTGCTACCAATATGGAC
	Reverse	TGGAATGTGTCTTGGTCTCCTG
PSF1	Forward	CGCTGCACTGTAGCATACCT
	Reverse	TCGAGGTAAAAAGTGCTGGCT
PSF3	Forward	AGACTGACAACGCGGTCC
	Reverse	CAGGGCTGAAGTGTCTTCGT
MMP14	Forward	GCTCAGCTGCCCTCACATTA
	Reverse	GGTAGCCCGGTTCTACCTTC
HIF1 α	Forward	GGCAGCAACGACACAGAAAC
	Reverse	GTGCAGGGTCAGCACTACTT
GAPDH	Forward	AGCGAGATCCCTCCAAAATC
	Reverse	GGCAGAGATGATGACCCTTT

3. 蛍光免疫染色

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. 免疫蛍光染色にウサギ抗ヒト PSF1 ポリクローナル抗体 (GeneTex, California), ラット抗ヒト CD44v9 抗体

(コスモバイオ, Japan), マウス抗ヒト MDR-1 抗体 (BioLegend, California), ウサギ抗ヒト MMP14 モノクローナル抗体 (Abcam, United Kingdom) を使用した. 細胞ソーティング及び生細胞標識には 5- (and 6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) を使用した. 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.

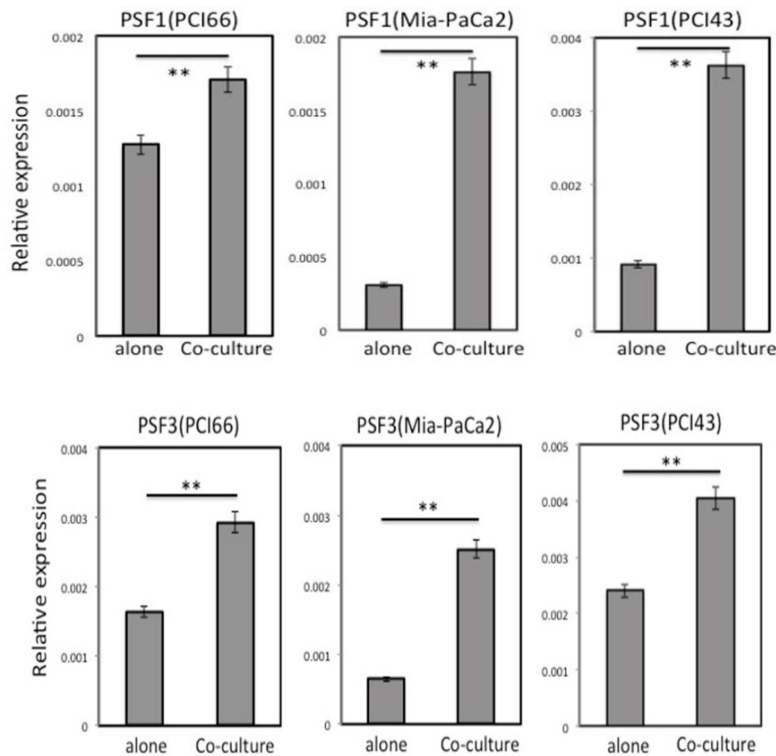
研究結果

1. 膵癌細胞株と HUVEC の共培養による PSF1 と 3 の変化

血管内皮細胞と膵癌細胞との直接共培養を行い、細胞間相互作用による PSF1 と PSF3 の発現を検討した。まず、24 時間共培養後 FACS Aria IIIにて sorting した膵癌細胞において mRNA 発現を RT-PCR で確認し、引き続き、Real time PCR にて共培養した膵癌細胞群と単独培養群のメッセージ発現量の比較検討を行った (図 12A)。検討した三つの膵癌細胞株、いずれでも共培養群で統計的に有意な PSF1 と PSF3 の発現亢進を認めた。

続いて、チャンバースライド上で培養した細胞の蛍光免疫染色を施行した。図 12B に示す様に、膵癌細胞単独培養群 (上段) と比較して、CFSE 標識 HUVEC 共培養群 (下段) において PSF1 (Alexa 594 により赤色に標識) の発現亢進が膵癌細胞の核で認められた (図 12B)。

A.



B.

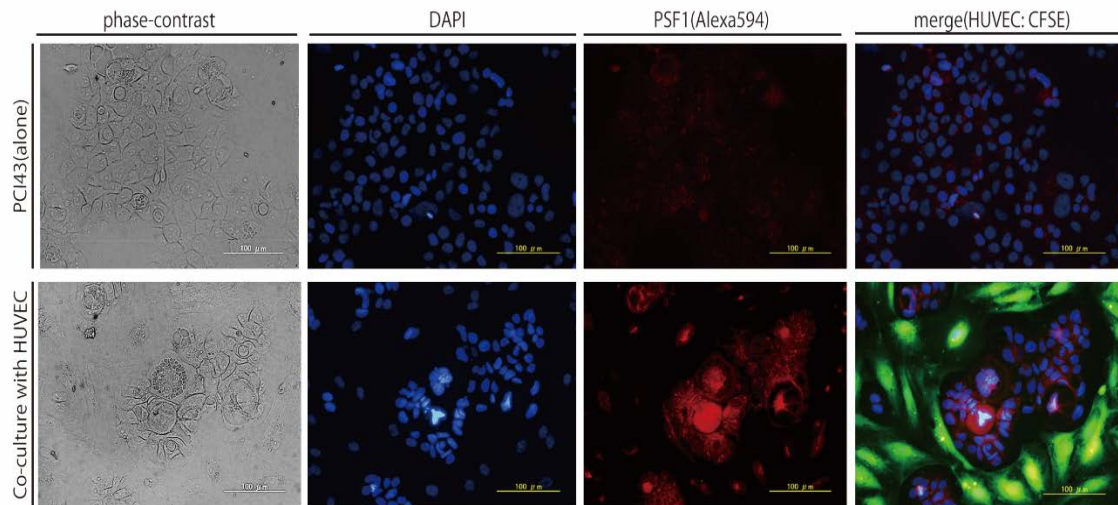
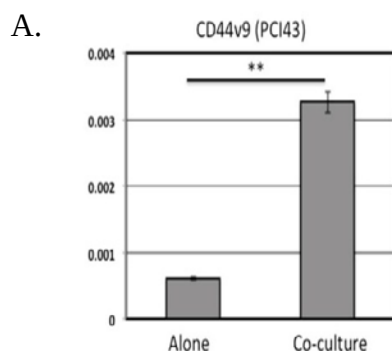


図 12 HUVEC 共培養時の膵癌細胞株における PSF1 と PSF3 の発現
共培養後の PSF1 と PSF3 の発現亢進. A. Real-time PCR, B. 免疫蛍光染色

検討した膵癌細胞株 3 株で同様の結果を認めたため、以下の実験に関しては、E-cadherin を発現し、上皮性性質が保たれている PCI-43 株を用いて検討した⁴⁰。

2. 膵癌細胞株と HUVEC の共培養による癌幹細胞マーカーの変化

CD44 は、膜貫通型糖タンパク質であり、特にそのスプライス変異体である CD44v9 は近年、胃癌や膵臓癌で癌幹細胞マーカーとして報告されている^{40, 41, 42}。共培養による CD44v9 の発現変化について、Real-time PCR により検討したところ、PSF1 及び PSF3 の発現亢進と連動して CD44v9 mRNA の発現の亢進が認められた (図 13A)。蛍光免疫染色による検討では、図 13B に示すように、膵癌細胞単独培養群 (上段) と比較して、CFSE 標識 HUVEC 共培養群 (下段) において CD44v9 の発現亢進が膵癌細胞膜に確認された。以上より、膵癌細胞株と HUVEC の直接共培養により、CD44v9 と PSF1 及び PSF3 の発現は共に亢進していきことが明らかとなった。



B.

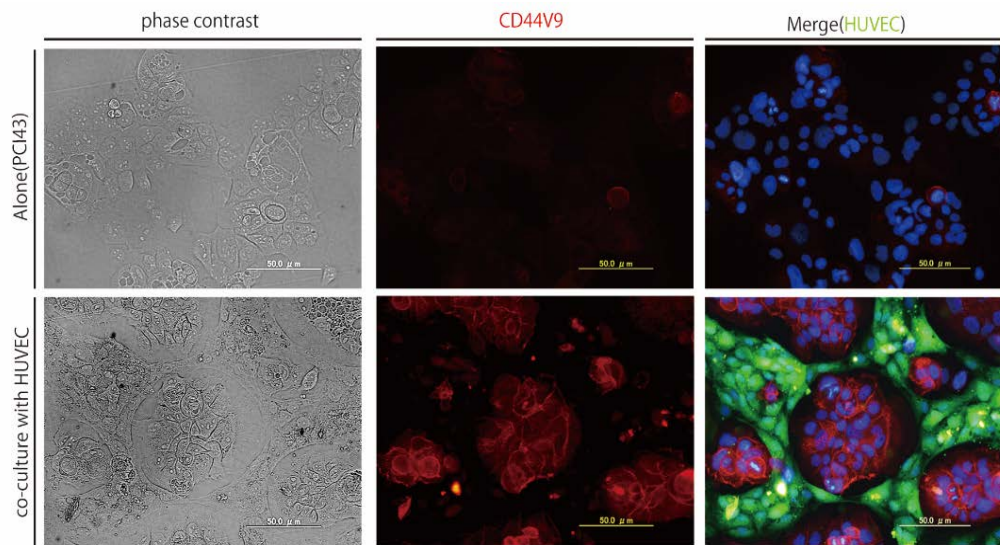


図 13 HUVEC 共培養時の膵癌細胞株における CD44v9 の発現
共培養後の CD44v9 の発現亢進. A. Real-time PCR, B. 免疫蛍光染色

3. 膵癌細胞株と HUVEC の共培養による MMP14 発現の変化

次に、癌浸潤能力の指標となる分子である MMP14 の発現変化について検討した。MMP14 は、pro-MMP-2 の活性化および多数の細胞外マトリックス成分の分解において重要な役割を果たす膜結合型 metalloprotease で、MMP14 の発現亢進は、多くの癌種において観察され、癌浸潤能を推定する指標の 1 つと考えられている^{43, 44}。

Real time PCR にて MMP14 mRNA 発現量を検討した結果、共培養群の膵癌細胞株において有意な発現亢進を認めた。また、蛍光免疫染色による検討では、膵癌細胞単独培養群（上段）と比較して、CFSE 標識 HUVEC 共培養群（下段）において MMP14 の発現亢進が確認された（図 14）。

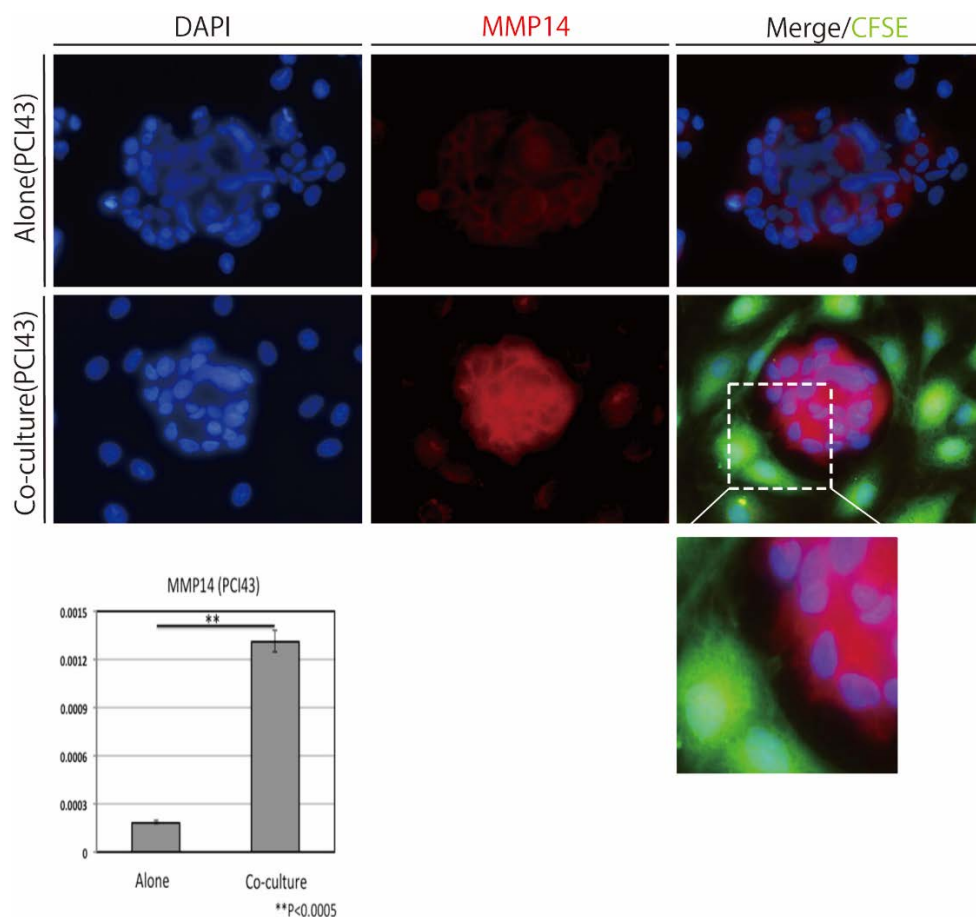


図 14 HUVEC 共培養時の膵癌細胞株における MMP14 発現
Real-time PCR と免疫蛍光染色で、共培養後の MMP14 発現亢進を認めた。

4. 膵癌細胞株と HUVEC の共培養による薬剤耐性能の変化

癌細胞の薬剤耐性機構において、ATP 依存性多剤排出トランスポーターである MDR1 の発現により、薬物の細胞膜外への輸送能が亢進し、多剤耐性能の獲得に関連することが報告されている⁴⁵。先行研究では、CD44 は MDR1 と相互作用し、癌細胞の難治性に寄与するとの報告がある⁴⁶。

MDR1 発現に関して、蛍光免疫染色による検討では、膵癌細胞単独培養群（上段）と比較して、CFSE 標識 HUVEC 共培養群（下段）において MDR1 の発現亢進が認められた（図 15）。

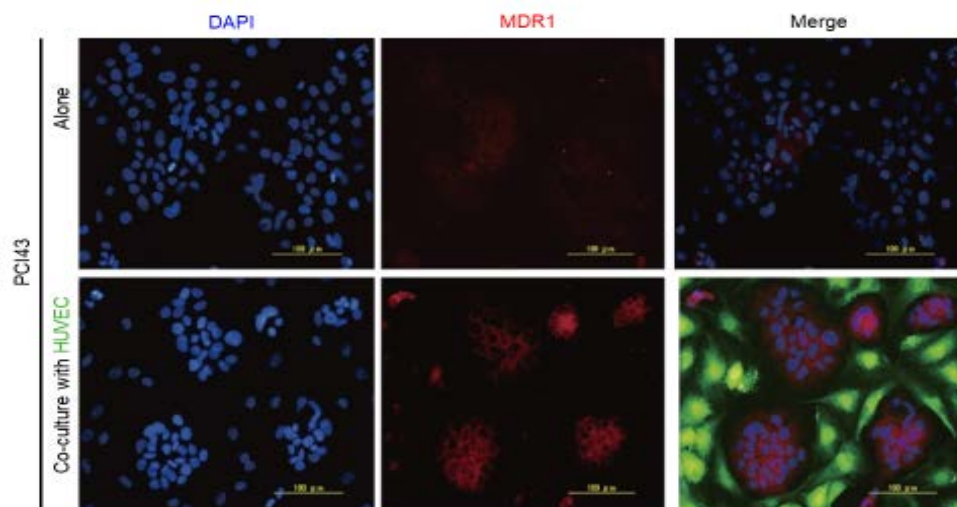


図 15 HUVEC 共培養時の膵癌細胞株における MDR1 発現
HUVEC との共培養群で，MDR1 発現亢進を認めた．

5. 膵癌細胞株における PSF1 発現と共培養細胞種による相違

最後に，共培養時に観察される膵癌細胞株の性質変化が共培養する細胞種による相違があるのか検討を行なった．膵癌細胞株とヒト線維芽細胞株（NHDF）を共培養し，HUVEC 共培養時の PSF1 発現変化と比較した結果，図 16 に示す様に，NHDF との共培養に比べ（下段），HUVEC との共培養を行なった際（上段）に膵癌細胞における PSF1 発現がより亢進することが明らかになった．

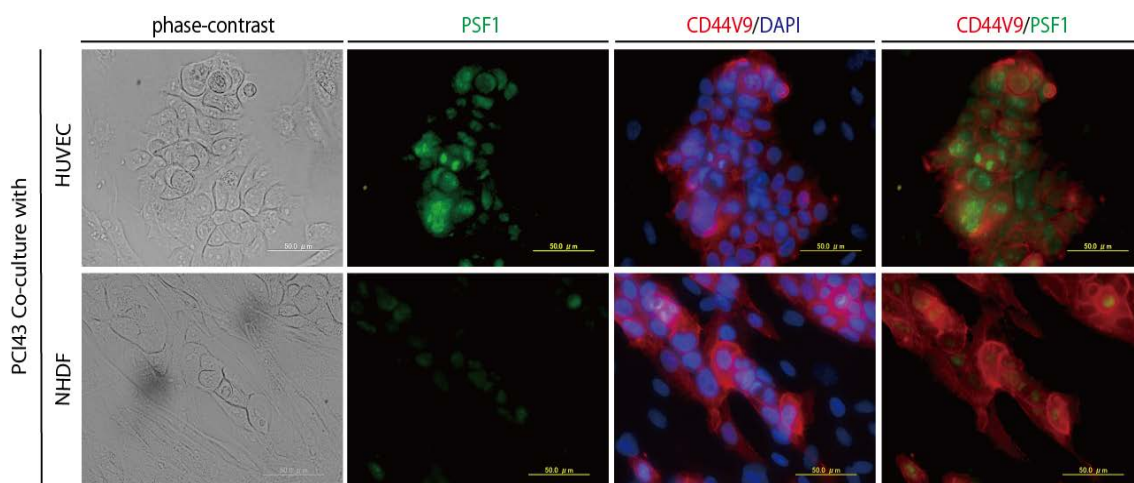


図 16 HUVEC または NHDF 共培養時の膵癌細胞株における PSF1 発現
HUVEC との共培養群で，より著明な PSF1 発現亢進を認めた．

考察

悪性腫瘍において、脈管侵襲や間質浸潤能の獲得は悪性形質を反映する因子であり、診断や治療の両面で癌の生物学的悪性度を理解する上で重要な指標となる。既報の報告では、マウスの Lewis 肺癌モデルの実験系で、脈管侵襲を示す腫瘍細胞において GINS 複合体のサブユニットである PSF1 の発現が亢進しているとの報告がある⁴⁷。また、トリプルネガティブ乳癌細胞株において PSF2 が高発現していること、PSF2 をサイレンシングすることで癌浸潤マーカーの 1 つである MMP9 の発現が低下し、腫瘍浸潤能を抑制することが報告されている⁴⁸。

これまでに浸潤性膵管癌における PSF1 及び PSF3 発現を検討した報告はないが、今回の検討により、血管内皮細胞との共培養を行った膵癌細胞群で PSF1 および PSF3 の発現亢進を認めた。癌細胞単独培養時に比べて、癌幹細胞マーカーである CD44v9 や癌浸潤能を推定する指標である MMP14 の発現亢進を、細胞質には薬剤耐性機構に関わる MDR-1 の発現亢進を認めた。本研究結果により、GINS 複合体サブユニットである PSF は癌細胞における悪性形質に関連する因子と連動して発現が誘導されている可能性が考えられた。

今回の実験では、膵癌細胞株と HUVEC の間接共培養による実験を行っておらず、膵癌細胞株で見られた形質変化に対して HUVEC との cell contact が必要であるのか、HUVEC から産生される何らかの液性因子が関与しているのかが不明であり、引き続き検討する必要があると考えられる。しかしながら、NHDF との共培養より HUVEC と共培養を行った際に PSF1 の発現が亢進したことは、非常に興味深い部分である。今後は、HUVEC と膵癌細胞株の相互作用に着目した詳細な解析を進めることで、癌細胞の幹細胞化を含む悪性形質獲得のメカニズムが明らかになることが期待される。

総括

本研究で得られた知見は以下の通りである。

第1章では、前駆病変を含む180例の子宮体部上皮性腫瘍においてPSF3の免疫組織化学的検討を施行し、PSF3の検討が異型増殖症と高分化型のG1類内膜癌の鑑別に有用なマーカーになりうる可能性を提示した。PSF3の発現は類内膜癌の分化度や臨床病理学的因子と相関していること、予後予測因子になりうることを明らかにした。

第2章では、膀胱癌細胞株を用い、HUVECとの共培養実験を行った。共培養により、膀胱癌細胞株でPSF1及びPSF3の発現誘導を認め、癌幹細胞マーカーであるCD44v9や癌浸潤能を推定する指標であるMMP14、薬剤耐性機構に関わるMDR1の発現増強が認められた。

以上の研究により、生理的にはDNA複製に働くGINS複合体のサブユニットであるPSFの過剰発現が腫瘍増殖や悪性形質と関連している可能性が考えられた。今後の課題としては、より多くの症例や多種の癌腫を対象とした解析を行うことで、臨床病理学的な診断マーカーとしての有用性を確認する必要があると考えられる。また、PSF発現誘導のメカニズムを明らかにすること、発現誘導されたPSFが果たしてGINS複合体を形成し、生理的作用と同等の機能を発揮しているのか、あるいは癌細胞において別機能を発揮しているのか、分子メカニズムの詳細を明らかにしていくことで、将来的には治療ターゲットとして癌の治療戦略に一助となることが期待される。

謝辞

本研究の機会を与えて頂いた，北海道大学大学院医学研究院病理学講座分子病理学教室 笠原正典教授に深く感謝いたします．

また，本研究において直接ご指導頂いた同教室 外丸詩野准教授，大塚紀幸助教，宮武由甲子助教に心から感謝いたします．

最後に，本研究を支えて下さった，分子病理学分野，北海道大学病院病理診断科/病理部，北海道がんセンター病理診断科/腫瘍婦人科の皆様に心よりお礼申し上げます．

引用文献

- 1 Bell, S. P. & Dutta, A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry* **71**, 333-374(2002).
- 2 Gambus, A., Jones, R. C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R. D. & Labib, K. GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nature cell biology* **8**, 358-366(2006).
- 3 Pacek, M., Tutter, A. V., Kubota, Y., Takisawa, H. & Walter, J. C. Localization of MCM2-7, Cdc45, and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Molecular cell* **21**, 581-587(2006).
- 4 Kamada, K., Kubota, Y., Arata, T., Shindo, Y. & Hanaoka, F. Structure of the human GINS complex and its assembly and functional interface in replication initiation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 388-396(2007).
- 5 Ueno, M., Itoh, M., Kong, L., Sugihara, K., Asano, M., & Takakura, N. PSF1 is essential for early embryogenesis in mice. *Molecular and cellular biology* **25**, 10528-10532(2005).
- 6 Han, Y., Ueno, M., Nagahama, Y. & Takakura, N. Identification and characterization of stem cell-specific transcription of PSF1 in spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 609-613(2009).
- 7 Ueno, M., Itoh, M., Sugihara, K., Asano, M. & Takakura, N. Both alleles of PSF1 are required for maintenance of pool size of immature hematopoietic cells and acute bone marrow regeneration. *Blood* **113**, 555-562(2009).
- 8 Nakahara, I., Miyamoto, M., Shibata, T., Akashi-Tanaka, S., Kinoshita, T., Mogushi, K., Oda, K., Ueno, M., Takakura, N., Mizushima, H., Tanaka, H. & Ohta, T. Up-regulation of PSF1 promotes the growth of breast cancer cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **15**, 1015-1024(2010).
- 9 Obama, K., Ura, K., Satoh, S., Nakamura, Y. & Furukawa, Y. Up-regulation of PSF2, a member of the GINS multiprotein complex, in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncology reports* **14**, 701-706(2005).
- 10 Tane, S., Sakai, Y., Hokka, D., Okuma, H., Ogawa, H., Tanaka, Y., Uchino, K., Nishio, W., Yoshimura, M. & Maniwa, Y. Significant role of Psf3 expression in non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* **106**, 1625-1634(2015).
- 11 Srinivasan, S. V., Dominguez-Sola, D., Wang, L. C., Hyrien, O. & Gautier, J.

- Cdc45 is a critical effector of myc-dependent DNA replication stress. *Cell reports* **3**, 1629-1639(2013).
- 12 Wartko, P., Sherman, M. E., Yang, H. P., Felix, A. S., Brington, L. A., & Trabert, B. Recent changes in endometrial cancer trends among menopausal-age U.S. women. *Cancer epidemiology* **37**(2013).
 - 13 Honda, T., Urabe, R., Kurita, T., Kagami, S., Kawagoe, T., Toki. N., Matsuura, Y. & Hachisuga, T. Trends in the demographic and clinicopathological characteristics in Japanese patients with endometrial cancer, 1990-2010. *International journal of women's health* **4**, 207-212(2012).
 - 14 Bokhman, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology* **15**, 10-17(1983).
 - 15 Murali, R., Soslow, R. A. & Weigelt, B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *The Lancet. Oncology* **15**, e268-278(2014).
 - 16 Clarke, B. A. & Gilks, C. B. Endometrial carcinoma: controversies in histopathological assessment of grade and tumour cell type. *Journal of clinical pathology* **63**, 410-415(2010).
 - 17 Gilks, C. B., Oliva, E. & Soslow, R. A. Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **37**, 874-881(2013).
 - 18 Kurman, R. J., Carcangiu, M. L., Herrington, C. S. & Young, R. H. WHO classification of tumours of female reproductive organs. 4th ed edn, *International Agency for Research on Cancer* (2014).
 - 19 Mutter, G. L., Zaino, R. J., Baak, J. P., Bentley, R. C. & Robboy, S. J. Benign endometrial hyperplasia sequence and endometrial intraepithelial neoplasia. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists* **26**, 103-114(2007).
 - 20 Rakha, E., Wong, S. C., Soomro, I., Chaudry, Z., Sharma, A., Deen, S., Chan, S., Abu, J., Nunns, D., Williamson, K., McGregor, A., Hammond, R. & Brown, L. Clinical outcome of atypical endometrial hyperplasia diagnosed on an endometrial biopsy: institutional experience and review of literature. *Am. J. Surg. Pathol.* **36**, 1683-1690(2012).
 - 21 Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q. & Zheng, J. N. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Molecular medicine reports* **11**, 1566-1572(2015).
 - 22 Nagahama, Y., Ueno, M., Haraguchi, N., Mori, M. & Takakura, N. PSF3 marks malignant colon cancer and has a role in cancer cell proliferation. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.* **392**, 150-154(2010).
- 23 Sherman, M. E. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **13**, 295-308(2000).
 - 24 Liu, L. C., Lai, H. C., Chou, Y. C., Huang, R. L., Yu, M. H., Lin, C. P., Tsai, W. C., Chiang, K. J., Wang, Y. C. & Chao, T. K. Paired boxed gene 1 expression: A single potential biomarker for differentiating endometrial lesions associated with favorable outcomes in patients with endometrial carcinoma. *The journal of obstetrics and gynaecology research* **42**, 1159-1167(2016).
 - 25 Fujimoto, T., Nanjyo, H., Fukuda, J., Nakamura, A., Mizunuma, H., Yaegashi, N., Sugiyama, T., Kurachi, H., Sato, A. & Tanaka, T. Endometrioid uterine cancer: histopathological risk factors of local and distant recurrence. *Gynecologic oncology* **112**, 342-347(2009).
 - 26 Rasool, N., Fader, A. N., Seamon, L., Neubauer, N. L., Shahin, F. A., Alexander, H. A., Moore, K., Secord, A. A., Kunos, C., Rose, P. G. & O'Malley, D. M. Stage I, grade 3 endometrioid adenocarcinoma of the endometrium: an analysis of clinical outcomes and patterns of recurrence. *Gynecologic oncology* **116**, 10-14(2010).
 - 27 Hogberg, T., Signorelli, M., de Oliveira, C. F., Fossati, R., Lissoni, A. A., Sorbe, B., Andersson, H., Grenman, S., Lundgren, C., Rosenberg, P., Boman, K., Tholander, B., Scambia, G., Reed, N., Cormio, G., Tognon, G., Clarke, J., Sawicki, T., Zola, P. & Kristensen, G. Sequential adjuvant chemotherapy and radiotherapy in endometrial cancer--results from two randomised studies. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* **46**, 2422-2431(2010).
 - 28 Susumu, N., Sagae, S., Udagawa, Y., Niwa, K., Kuramoto, H., Satoh, S. & Kudo, R. Randomized phase III trial of pelvic radiotherapy versus cisplatin-based combined chemotherapy in patients with intermediate- and high-risk endometrial cancer: a Japanese Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic oncology* **108**, 226-233(2008).
 - 29 Edmondson, R. J., Crosbie, E. J., Nickkho-Amiry, M., Kaufmann, A., Stelloo, E., Nijman, H. W., Leary, A., Auguste, A., Mileschkin, L., Pollock, P., Mackay, H. J., Powell, M. E., Bosse, T., Creutsberg, C. L. & Kitchener, H. C. Markers of the p53 pathway further refine molecular profiling in high-risk endometrial cancer: A TransPORTEC initiative. *Gynecologic oncology* **146**, 327-333(2017).
 - 30 Zhang, J., Wu, Q., Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, G., Fu, J. & Liu, C. Knockdown of PSF1 expression inhibits cell proliferation in lung cancer cells in vitro.

- Tumour biology : the journal of the International Society for Onco developmental Biology and Medicine* **36**, 2163-2168(2015).
- 31 Zheng, M., Zhou, Y., Yang, X., Tang, J., Wei, D., Zhang, Y., Jiang, J. L., Chen, Z. N. & Zhu, P. High GINS2 transcript level predicts poor prognosis and correlates with high histological grade and endocrine therapy resistance through mammary cancer stem cells in breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment* **148**, 423-436(2014).
 - 32 Okuda, T., Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Nagatsuka, M., Morioka, M., Hayashi, M. & Okai, T. Genetics of endometrial cancers. *Obstetrics and gynecology international* **2010**, 984013(2010).
 - 33 Llobet, D., Pallares, J., Yeramian, A., Santacana, M., Eritja, N., Velasco, A., Dolcet, X. & Matias-Guiu, X. Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints. *Journal of clinical pathology* **62**, 777-785(2009).
 - 34 Cattoretti, G., Becker, M. H., Key, G., Duchrow, M., Schluter, C., Galle, J. & Gerdes, J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *The Journal of pathology* **168**, 357-363(1992).
 - 35 Hariharan, D., Saied, A. & Kocher, H. M. Analysis of mortality rates for pancreatic cancer across the world. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* **10**, 58-62(2008).
 - 36 Thota, R., Pauff, J. M. & Berlin, J. D. Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **28**, 70-74(2014).
 - 37 Ueno, H., Ioka, T., Ikeda, M., Ohkawa, S., Yanagimoto, H., Boku, N., Fukutomi, A., Sugimori, K., Baba, H., Yamao, K., Shimamura, T., Sho, M., Kitano, M., Cheng, A. L., Mizumoto, K., Chen, J. S., Furuse, J., Funakoshi, A., Hatori, T., Yamaguchi, T., Egawa, S., Sato, A., Ohashi, Y., Okusaka, T. & Tanaka, M. Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, 1640-1648(2013).
 - 38 Ercan, G., Karlitepe, A. & Ozpolat, B. Pancreatic Cancer Stem Cells and Therapeutic Approaches. *Anticancer research* **37**, 2761-2775(2017).
 - 39 Nagahama, Y., Ueno, M., Miyamoto, S., Morii, E., Minami, T., Mochizuki, N., Saya, H. & Takakura, N. PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. *Cancer*

- research* **70**, 1215-1224(2010).
- 40 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**, 41-46(2015).
 - 41 Lau, W. M., Teng, E., Chong, H. S., Lopez, K. A., Tay, A. Y., Salto-Tellez, M., Shabbir, A., So, J. B. & Chan, S. L. CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells. *Cancer research* **74**, 2630-2641(2014).
 - 42 Sosulski, A., Horn, H., Zhang, L., Coletti, C., Vathipadiekal, V., Castro, C. M., Birrer, M. J., Nagano, O., Saya, H., Lage, K., Donahoe, P. K. & Pepin, D. CD44 Splice Variant v8-10 as a Marker of Serous Ovarian Cancer Prognosis. *PloS one* **11**, e0156595(2016).
 - 43 Poincloux, R., Lizarraga, F. & Chavrier, P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *Journal of cell science* **122**, 3015-3024(2009).
 - 44 Seiki, M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer letters* **194**, 1-11(2003).
 - 45 Mechetner, E., Kyshtoobayeva, A., Zonis, S., Kin, 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 : an official journal of the American Association for Cancer Research* **4**, 389-398(1998).
 - 46 Miletto-Gonzalez, K. E., Chen, S., Mathukumaran, 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).
 - 47 Matsui, T., Kinugasa, Y., Tahara, H., Kanakura, Y. & Takakura, N. Possible role of mural cell-covered mature blood vessels in inducing drug resistance in cancer-initiating cells. *Am. J. Pathol.* **182**, 1790-1799(2013).
 - 48 Peng, L., Song, Z., Chen, D., Linghu, R., Wang, Y., Zhang, X., Kou, X., Yang, J. & Jiao, S. GINS2 regulates matrix metalloproteinase 9 expression and cancer stem cell property in human triple negative Breast cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **84**, 1568-1574(2016).