



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハイドロゲルを用いた中皮腫幹細胞の創出および機能解析
Author(s)	加藤, 万里絵
Description	配架番号 : 2890
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16398号
Issue Date	2025-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16398
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95866
Type	doctoral thesis
File Information	KATO_Marie.pdf



学 位 論 文

ハイドロゲルを用いた中皮腫幹細胞の創出
および機能解析

(Development of mesothelioma stem cells using
hydrogel and functional analysis)

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

加藤 万里絵

学 位 論 文

ハイドロゲルを用いた中皮腫幹細胞の創出
および機能解析

(Development of mesothelioma stem cells using
hydrogel and functional analysis)

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

加藤 万里絵

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
方法	13 頁
結果	25 頁
考察	56 頁
結論	61 頁
謝辞	62 頁
利益相反	63 頁
引用文献	64 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雑誌に掲載予定である。

Marie Kato-Shinomiya, Hirokazu Sugino, Masumi Tsuda, Lei Wang, Yusuke Saito, Jintao He, Zen-ichi Tanei, Yoshitaka Oda, Satoshi Tanikawa, Mishie Tanino, Jian Ping Gong, Shinya Tanaka

SLC13A5 plays an essential role in the energy shift to oxidative phosphorylation in cisplatin-resistant mesothelioma stem cells.

Pathology International, in press

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 加藤万里絵、杉野弘和、津田真寿美、王 磊、種井善一、小田義崇、谷川聖、龔 劍萍、田中伸哉

ハイドロゲルを用いた中皮腫幹細胞の創出および治療標的分子の探索

第 112 回日本病理学会総会 2023.4.13-15、下関

2. 加藤万里絵、杉野弘和、津田真寿美、王 磊、種井善一、小田義崇、谷川聖、龔 劍萍、田中伸哉

ハイドロゲルを用いた中皮腫幹細胞の創出およびその発現遺伝子の検討

第 40 回分子病理学研究会クラークシンポジウム 2023.7.14-15、札幌

要旨

【背景と目的】

中皮腫は悪性度の高い腫瘍で、予後改善のためには新規治療法の開発が望まれる。がんの再発や薬剤抵抗性に関与するがん幹細胞（CSCs）は、がん組織内に僅かしか存在せず、これまで CSCs を標的とした治療法の開発は困難であった。最近、我々はハイドロゲルを用いて CSCs を迅速に誘導する技術を開発した。そこで本研究は、当該技術を用いて中皮腫幹細胞（MSC）を誘導し、その性状を解析して、新たな治療法確立のための端緒とすることを目的した。

【材料と方法】

5 種類のヒト中皮腫細胞株（MESO4、211H、H2452、H2052、H28）を DN ゲル上で 2 日間培養し、幹細胞マーカー（*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*）の発現を real-time PCR で解析した。次に、培養期間を変化させ幹細胞マーカーの発現変動を解析した。さらにゲル上で 21 日間培養した細胞を PS ディッシュに播き直し、幹細胞性の可塑性について検討した。In vivo 腫瘍形成能は、DN ゲル上培養 MESO4 細胞をヌードマウスに皮下移植して検討した（n=2）。MSC で発現亢進する遺伝子を同定するため、DN ゲル上で 3 日間培養した MESO4 細胞を用いてマイクロアレイ解析およびエンリッチメント解析を実施し、膜蛋白コード遺伝子 *SLC13A5*、*TMEM151B*、*HCRT2* を抽出した。各実験において、ポリスチレン（PS）ディッシュ、あるいは超低接着（ULA）ディッシュで培養した細胞をコントロールとして使用した。

次に、培養器材として PCDME ゲルと PNaSS ゲルを追加し、MESO4 細胞の形態観察と上記 3 遺伝子の発現解析を行った。3 遺伝子と幹細胞性との関連は、一般的幹細胞マーカーと既知の MSC 関連遺伝子（*CD9*、*CD24*、*CD26*、*CD44*、*ALDH1A2*、*ALDH1A3*）の発現を比較して評価した。抽出した 3 遺伝子のうち、*SLC13A5* のタンパク発現について、ウエスタンブロッティング（WB）、免疫細胞化学、免疫蛍光染色を実施した。生体内腫瘍形成能の評価のために、tdTOMATO-Luc2 を発現させた MESO4 細胞および 211H 細胞を PNaSS ゲル上で培養後、ヌードマウスの腹壁に移植して腫瘍形成能を評価した（n=4）。*SLC13A5* の機能評価のため、HEK293T、211H 細胞に *SLC13A5* を一過性に過剰発現させ、WB、代謝解析、CCK-8 アッセイを実施した。更に、211H 細胞の *SLC13A5* をノックダウンし、幹細胞性やエネルギー産生の変動を解析した。

臨床検体における *SLC13A5* 発現の意義を検討するため、TCGA データベース 87 症例と Bueno らのコホート研究 211 症例で生存解析を行った。更に、scRNA-seq データセットでクラスター分類を行い、マーカー遺伝子の発現を評価した。

最後に、中皮腫患者 FFPE 検体における SLC13A5 の遺伝子発現を解析した。

【結果】

DN ゲル上で培養した中皮腫細胞株 4 種において、汎幹細胞マーカー (SOX2、*Nanog*、*Oct3/4*) の遺伝子発現量が亢進した。この亢進は培養後 3 日目を頂点とし、次第に低下し 28 日目には PS ディッシュと同程度となった。DN ゲル上で 21 日間培養した MESO4 細胞を PS ディッシュ上に播き直すと、幹細胞マーカーの発現は有意に減少した。In vivo 皮下移植モデルでは、PS ディッシュ 1 個体、DN ゲル 2 個体に腫瘍形成を認めた。マイクロアレイ解析では DN ゲル上で *SLC13A5*、*TMEM151B*、*HCRTR2* の発現が有意に増加した。エンリッチメント解析では糖原性アミノ酸の代謝亢進および上 (中) 皮間葉移行の亢進を認めた。

MESO4 細胞は PCDME、PNaSS ゲル上に接着し、DN ゲル上ではスフェロイドを形成した。*SLC13A5*、*TMEM151B*、*HCRTR2* 遺伝子は、3 種のゲル上で有意に上昇し、幹細胞マーカーの発現パターンと強い相関を示した。WB では、3 種のゲル上で SLC13A5 蛋白発現量が増加し、免疫蛍光染色および免疫細胞化学でも各ゲル上で染色強度が増強した。In vivo 腹壁移植モデルでは、MESO4 細胞の PS ディッシュ 2 個体と PNaSS ゲル 3 個体、および 211H 細胞の PNaSS ゲル 2 個体で発光増強を認めた。SLC13A5 過剰発現 HEK293T 細胞では SOX2 発現、及び ERK1/2 と YAP のリン酸化が亢進し、代謝解析では酸化的リン酸化が亢進した。CCK-8 アッセイでは SLC13A5 過剰発現 211H 細胞の生存率が上昇し、シスプラチン抵抗性が亢進した。

生存解析では、3 遺伝子と全生存期間との間に相関はなかったが、scRNA-seq データベースによるクラスタリングでは、*SLC13A5* を発現する亜集団を少数認めた。臨床検体から抽出した RNA は、経年劣化の影響が real-time PCR による評価は困難であった。臨床検体の免疫組織化学では、1 例のみ腫瘍の細胞膜に SLC13A5 部分陽性像を認めたが、大半の症例は陽性判定が困難であった。

【考察】

本研究により、ハイドロゲルを用いた CSCs 誘導技術で、ヒト中皮腫細胞株から MSC と極めて相同性の高い細胞が誘導されることが示された。この技術は従来法と比較し簡便性に優れるが、中皮腫細胞系で誘導される幹細胞マーカーの発現には可塑性があるため、長期間維持するには今後培養条件を工夫していく必要がある。

今回同定された SLC13A5、TMEM151B、HCRTR2 は幹細胞マーカーの発現と強い相関を示し、MSC との関連が示唆された。このうち SLC13A5 は蛋白発現も増加したが、遺伝子発現の増加量に比べて 1/10 以下に収斂しており、厳密な翻

訳制御下にあると推察される。SLC13A5 過剰発現 HEK293T 細胞の代謝が酸化的リン酸化にシフトしたこと、ゲル上で誘導された MSC 様細胞はクエン酸代謝を細胞生存に利用している可能性が示唆された。また、SLC13A5 の過剰発現により、ERK-SOX2 経路や ERK-YAP 経路が活性化する可能性が示唆され、これが MSC 様細胞の幹細胞性に関与していると推察される。

SLC13A5 の発現と生存曲線の間に相関がなかったのは、scRNA-seq データベースによるクラスタリングから、SLC13A5 発現細胞が非常に少ないことが示されたためと考えられる。一方 scRNA-seq データベースでは *SLC13A5* 発現細胞と *SOX2* や *Oct4* 発現細胞が同じクラスターに属することから、ゲル上で誘導した MSC 様細胞と同様の性質を有する中皮腫細胞が臨床検体中にも少数存在することが確認された。

【結論】

中皮腫細胞株をハイドロゲル上で培養すると、中皮腫幹細胞様細胞が誘導され、この細胞に特異的に発現する SLC13A5 が同定された。SLC13A5 蛋白は ERK を活性化することで幹細胞性に関与し、更に、酸化的リン酸化を刺激してエネルギー代謝に寄与し、薬剤感受性も低下させた。以上の結果より、SLC13A5 は中皮腫幹細胞においてもその生存維持に寄与していることが示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ALDH	aldehyde dehydrogenase
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATP	adenosine tri phosphate
BAP1	BRCA1 associated protein 1
BSA	bovine serum albumin
CIC	citrate/isocitrate carrier
CSCs	cancer stem cells
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DN	double-network
ECAR	extracellular acidification rate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMT	epithelial mesenchymal transition
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
EtBr	ethidium bromide
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
FCCP	carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HCRTR2	hypocretin receptor type 2
HE	hematoxylin & eosin
HEPES	4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
Indy	I'm not dead yet
iPS	induced pluripotent stem
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
MSigDB	Molecular Signatures Database
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NaCT	sodium-dependent citrate transporter

NAD	nicotinamide adenine diphosphate
NaDC1/3	sodium-dependent dicarboxylate transporter 1/3
NF2	neurofibromatosis 2
OCR	oxygen consumption rate
Oct3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4
OPN	osteopontin
OXPHOS	oxidative phosphorylation
PAMPS	poly (2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid)
PBS	phosphate-buffered saline
PCA	principal component analysis
PCDME	poly (N- (Carboxymethyl) -N,N'-dimethyl-2-(methacryloyloxy) ethanaminium, inner salt)
PCR	polymerase chain reaction
PDMAAm	poly (N,N'- dimethyl acrylamide)
PFK	phosphofructokinase
PK	pyruvate kinase
PNaSS	poly (p-styrenesulfonic acid sodium salt)
PS	polystyrene
PVDF	polyvinylidene difluoride
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SLC13A5	solute carrier family 13 member 5
SLC25A1	solute carrier family 25 member 1
SN	single network
SOX2	SRY-box transcription factor 2
SP	side population
TAE	Tris Acetate EDTA
TCA	tricarboxylic acid
TMEM151B	transmembrane protein 151B
ULA	ultra-low attachment
UMP	uniform manifold approximation and projection
YAP	Yes-associated protein

緒言

中皮腫の疫学と治療の現状

中皮腫は胸膜や腹膜、心膜、精巣鞘膜を含む体腔を覆う中皮に発生する悪性度の高い腫瘍である。アスベストの暴露や *BAP1* (*BRCA1 associated protein 1*) 遺伝子変異などがリスク因子として報告されており (Yates et al, 1997; Walpole et al, 2018)、最初の暴露から数十年の潜伏期間を経て発症する (Scherpereel et al, 2010)。ヨーロッパ諸国の中には既に患者数がピークアウトしている国もあり、アメリカでは 2040 年までに中皮腫症例はすべてリスク因子によらない自然発生的な腫瘍形成の結果生じたもののみになるだろうと予測する報告もある (Price, 2022)。しかし、世界的に見ると、絶対数は 1990 年以降年々増加傾向にあり (Han et al, 2022)、本邦でもいまだに増加している (日本癌治療学会, 2020)。治療法は外科的切除が第一選択であるが、中皮腫は複雑な解剖学的構造をもつため完全切除が困難であり、最大 75% の患者は局所再発に至る (Baldini et al, 2015)。再発例や切除不能例には化学療法 (Nakagawa et al, 2008; Van Meerbeeck et al, 2011) や放射線療法 (Schumann et al, 2021)、免疫療法 (Cornedine J. de Gooijer et al, 2020; Hu et al, 2021; Tagliamento et al, 2022) が行われるが、いずれも臨床成績は低く、根治は困難である。5 年生存率は 0~15.8% と極めて予後不良であり (日本癌治療学会, 2020)、その改善には早急な新規治療法の開発が望まれている。

がん幹細胞

がんの根治が難しい原因の一つに、がん幹細胞 (CSCs : cancer stem cells) の存在があげられる。近年、がん組織は性質の異なる多様なサブクローンの集合体で、その不均一性 (heterogeneity) は CSCs を頂点とする細胞階層性によってもたらされることが明らかになってきた (Valent et al, 2012)。また、CSCs は自己複製能と多分化能を有する細胞と定義され、癌の転移 (Li et al, 2007) や薬剤抵抗性 (Dean et al, 2005) に関与することが報告されている。CSCs を根絶することが可能になれば癌治療が飛躍的に進歩すると考えられるが、そのためにはがん組織から CSCs を分取し、その性質を解明することが不可欠である。従来の CSCs の誘導法には、CSC 特異的な細胞表面抗原を標的としてフローサイトメトリー (FACS : fluorescence activated cell sorting) により CSCs を分取する方法や (Bonnet and Dick, 1997)、CSCs の高い薬剤排泄能を利用し、色素 Hoechst33342 (Wu and Alman, 2008) や細胞毒性薬 Mitoxantrone (Hirschmann-Jax et al, 2004) を添加後にそれらを排出した細胞を CSCs として分取する方法、CSCs に高発現する薬物代謝マーカーの aldehyde dehydrogenase (ALDH) に着目し、ALDH に対する基質を添加後、反応

した細胞を CSCs として分取する Aldefluor assay (Alison et al, 2010) が実施されている。しかし、これらの方法は使用する試薬が高価であり、操作手順も多く、誘導可能な CSCs の数も少数に限られる。近年では CSCs は低酸素ニッチや血管周囲ニッチなど周囲の微小環境との相互作用によりその幹細胞性を維持しているとの報告もあり (Das et al, 2008; 石本ほか, 2010)、フィブリンマトリックス中の 3 次元培養 (Liu et al, 2012) のような生体に近い環境を模倣する培養基材を用いた CSC 誘導法も開発されている。

がん幹細胞と代謝

生物が生命を維持するための一連の化学反応を代謝と呼ぶが、細胞レベルでは解糖系やクエン酸回路、酸化リン酸化 (OXPHOS : oxidative phosphorylation) の反応により、エネルギーであるアデノシン三リン酸 (ATP : adenosine triphosphate) が合成されている。正常細胞では有酸素環境で進むクエン酸回路や OXPHOS (ミトコンドリア内で行われる) が主な供給源であるのに対し、無秩序な細胞増殖により低酸素環境に陥りやすいがん細胞では、低酸素環境でも進む解糖系 (細胞質で行われる) に偏った ATP 産生が行われると考えられてきた (ワールブルグ効果)。しかし近年、複数の癌種の CSCs において、ミトコンドリアの代謝を阻害することにより活動性が低下することが報告され、CSCs は OXPHOS に依存したエネルギー代謝を行っていることが明らかにされた (Sancho et al, 2016; Jones et al, 2021)。

ハイドロゲルと医療応用

ハイドロゲルとは水を内部に含む物質の総称で、水溶性の高分子が架橋により三次元の網目構造を形成することで不溶化し、その網目構造の内部に多くの水を含んだ膨潤体を表す (田畑, 2012)。豆腐や寒天、蒟蒻、ゼリーといった食べ物のほかに、コンタクトレンズやオムツ、止血剤など、医療や衛生分野においても多数使用されている。近年では、ハイドロゲルの持つ高い含水率が生体軟組織の組成に類似していることから、生体環境下で用いる医用材料としても注目されている。引っ張ると頑丈になる自己補強ゲル (Liu et al, 2021) や水中でも膨張・形崩れしないハイドロゲル (Kamata et al, 2014)、骨に接着可能な HAp/DN ゲル (Nonoyama et al, 2016; Wada et al, 2016) が次々と開発されており、人工軟骨や人工椎間板としての応用が期待されている。当教室の先行研究においても、HAp/DN ゲル表面が骨髄由来造血幹細胞を骨系統細胞へ分化誘導させることを報告している (Kaibara et al, 2022)。

ハイドロゲルを用いたがん幹細胞誘導法

マウス iPS (induced pluripotent stem) 細胞をハイドロゲル上で培養することで幹細胞性が維持されるという報告があることから (Yang et al, 2015)、我々のグループでは、本学生命科学院で開発された新規培養基材、PAMPS/PDMAAm-Double Network (DN) ゲルによる幹細胞性の維持培養について検討を重ねてきた。PAMPS/PDMAAm-DN ゲルは 1st ネットワークとして poly (2-acrylamide-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS)、2nd ネットワークとして poly (N, N'-dimethylacrylamide) (PDMAAm) を段階的に重合して創出されたハイドロゲルである (Gong et al, 2003; Haas et al, 2014)。PAMPS は硬くてもろい性質であるのに対し、PDMAAm は軟らかく伸縮性を持つ。物理的特性の対照的な 2 種類のポリマーネットワークを重合させることで、弾性力に優れ (300 kPa)、かつ水分を 90% 以上含む生体適合性に優れた DN ゲルが合成される。これまで、膠芽腫、子宮頸癌、肺癌、大腸癌、膀胱癌、滑膜肉腫の細胞株を PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で培養することにより、迅速なスフェロイド形成と、一般的な幹細胞マーカーである SOX2、Nanog、Oct3/4 の発現誘導に成功した (Suzuka et al, 2021)。膠芽腫細胞株においては PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養細胞の 47.3% に SOX2 蛋白の発現を認め、これらの *in vivo* での高い腫瘍形成能も確認した。一方、当教室では、PCDME (poly (N- (Carboxylmethyl) -N,N'-dimethyl-2- (methacryloyloxy)) -Single Network (SN) ゲルと PNaSS (poly (p-styrenesulfonic acid sodium salt) -SN ゲルが、多種類の悪性腫瘍細胞株の幹細胞マーカーの発現を効率的に亢進させることを明らかにしている (未報告データ)。PCDME ゲルは、PAMPS ゲルに近い弾性率を有しており (Yin et al, 2013)、生体親和性が高く、閉鎖床への応用が期待されている (Kaneko and Mikoya, 2017)。PNaSS ゲルはヒト冠動脈内皮細胞の培養に適しており (Yang et al, 2010)、臨床では陽イオン交換樹脂として使用され、高い生体親和性が評価されている。

従来の中皮腫幹細胞誘導法とその性状

中皮腫幹細胞は、FACS により SOX2 および Oct4 高発現細胞を分取する方法 (Hotta et al, 2009) や上述した色素 Hoechst33342 を用いた分取法、Aldefluor assay などにより、side population (SP) 画分として分離されてきた。しかし、回収後の幹細胞性を有する細胞の割合は、細胞株による多少の差異はあるものの、それぞれ 4.86% (Hotta et al, 2009)、1.0-21.9% (Blum et al, 2017)、0.5-19.98% (Ghani et al, 2011) と多くはない。十分な細胞数を得るには上述の通り、試薬費や煩雑な手技が課題となる。そこで、当グループのこれまでの研究成果を基盤に、ハイドロゲルにより簡便・迅速・効率的に中皮腫幹細胞性を創出できるかを検討することとした。

SP 画分の中皮腫幹細胞は CD9、CD24、CD26 を発現し、かつ CD24/CD26 共発現は肉腫様組織型と有意に相関し、CD9/CD24 共発現は腫瘍形成能と相関することが報告されている (Ghani et al, 2011)。また CD24 と CD26 のサイレンシングは増殖速度と侵襲性に影響する (Yamazaki et al, 2012)。一方、腹膜中皮腫患者由来細胞をマトリゲルで培養すると Nanog、SOX2、Oct4、c-MYC、KLF4 が発現し、神経や血管、脂肪への分化が認められた (Varghese et al, 2012)。ALDH 高発現細胞も多系統分化を示し、CD44 発現や薬剤耐性と関連する (Cortes-Dericks et al, 2014; Chew et al, 2017)。なお、中皮腫においてしばしば変異・消失する腫瘍抑制因子 NF2 (neurofibromatosis 2 ; merlin) の過剰発現は、Oct4/SOX2 陽性細胞の増殖や生存率には影響しない一方、陰性細胞の生存率は有意に低下する (Blum et al, 2017)。

中皮腫の組織学的特徴およびハイドロゲルを用いたがん幹細胞誘導法の適用可能性

先行研究で幹細胞性の誘導が確認された細胞株は、間葉系細胞由来の滑膜肉腫 (Fuji)、膠芽腫 (KMG4) および上皮系細胞由来の子宮頸癌 (HeLa)、肺癌 (A549)、膀胱癌 (J28)、大腸癌 (WiDr) の 6 種である。滑膜は中胚葉、脳は外胚葉に由来し、子宮頸部、肺、膀胱、大腸の上皮はいずれも内胚葉に由来する。中皮細胞は側板中胚葉の内部に形成された体腔に面する中胚葉細胞が上皮化することで生じる (Thomason et al, 2012; Prummel et al, 2020)。すなわち、中皮腫は上皮細胞でありながら中胚葉由来という、間葉系細胞と上皮系細胞の間のような発生学的背景をもつ。そのため、組織像も上皮型、二相型、肉腫型と多彩であり、また、他の固形癌と異なり膜状に進展し、腫瘍を形成することは少ない。このように、中皮腫は他の悪性腫瘍とは発生学的、解剖学的、組織学的に性質を異にする細胞である。PAMPS/PDMAAm-DN ゲルは、細胞表面の接着因子であるインテグリンを介してソニックヘッジホッグシグナルを活性化し、それにより発現増加したオステオポンチン (OPN : osteopontin) が細胞内チロシンキナーゼのシグナル伝達を活性化することで、CSC の発現を促進すると考えられている (Suzuka et al, 2021)。インテグリンは人体を構成するあらゆる細胞に広範に発現している細胞接着因子であり、ヒト中皮腫細胞株においても良好な反応が期待できる。さらに、Hippo 経路の抑制により幹細胞性が抑制されるとの報告もあり (Kandasamy et al, 2020)、中皮腫細胞株は細胞接触や機械刺激に対する応答性を十分有していることが示唆される。また、中皮腫細胞において OPN は CD44 のヒアルロン酸への接着を亢進させ、CD44 を介して AKT 経路を活性化させて抗癌剤多剤耐性に関与するとの報告もある (Rina Ohashi et al, 2009; Tajima et al, 2010)。以上より、他の癌腫と同様に中皮腫においてもハイドロゲルを用いて幹細胞性を誘導できる

ことが予測された。

SLC13A5 とクエン酸輸送

クエン酸は、tricarboxylic acid (TCA) 回路の構成要素であり、解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ (PFK : phosphofructokinase) やピルビン酸キナーゼ (PK : pyruvate kinase) を阻害するなど、エネルギー産生において重要な役割を果たしている (Iacobazzi and Infantino, 2014)。また、クエン酸は脂肪酸合成の基質として脂質合成を促進するほか、糖新生の促進にも関与する (Icard et al, 2012)。このように様々な代謝経路において基質や制御因子として利用されるクエン酸は、ミトコンドリアの TCA 回路で生成されるか、細胞外から取り込まれる (Sun et al, 2010)。クエン酸は脂質二重膜を透過できないため、クエン酸の輸送にはトランスポーターが関与する。TCA 回路で生成されたクエン酸は、*SLC25A1* (solute carrier family 25 member 1) にコードされるミトコンドリアクエン酸輸送体 (CIC : citrate/isocitrate carrier) によってミトコンドリアから細胞質に輸送される (Mosaoa et al, 2021)。一方、血中に存在するクエン酸 (~135 μ M) は、*SLC13A5* (solute carrier family 13 member 5) にコードされるナトリウム依存性クエン酸輸送体 (NaCT : sodium-dependent citrate transporter) によって細胞質に輸送される (Inoue et al, 2002)。

SLC13A5 はハエで初めて同定された長寿遺伝子 *Indy* (*I'm not dead yet*) の哺乳類相同体である。2000 年代に入り、*Indy* 遺伝子の突然変異が、生殖能力や身体機能を損ねることなく、成虫の平均寿命をほぼ 2 倍にすることや (Rogina et al, 2000)、INDY 蛋白が細胞膜を貫通し、コハク酸やクエン酸に高い親和性を有するトランスポーターであることが明らかになった (Knauf et al, 2002; Knauf et al, 2006)。ヒトにおいては、*SLC13A5* は肝臓や脳、精巣に発現が認められ、NaCT はそれ以前に同定されていたナトリウム依存性ジカルボン酸共輸送体 (NaDC : sodium-dependent dicarboxylate transporter) と異なり、クエン酸に特異的に高い親和性を示す (Inoue et al, 2002)。

SLC13A5 の変異は新生児期にてんかんを引き起こす (Yang et al, 2020)。また、2 型糖尿病モデルラットの肝臓において NaCT の発現増加と細胞内脂質蓄積量の増大を認めることから、2 型糖尿病や非アルコール性脂肪肝疾患に対する治療標的候補として注目されている (Neuschäfer-Rube et al, 2014)。悪性腫瘍と *SLC13A5* の関連性を検討した報告は少ないが、肝細胞癌において、*SLC13A5* のノックダウンにより AMP 活性化蛋白質キナーゼ (AMPK : AMP-activated protein kinase) が活性化し、mTOR (mechanistic target of rapamycin) シグナル伝達を介した細胞増殖が抑制されることから、肝細胞癌の進行との関連が示唆されている (Li et al, 2017)。また、淡明細胞型腎細胞癌や膠芽腫においては、*SLC13A5* のメ

チル化が高率に認められる (Etcheverry et al, 2010; Arai et al, 2012; Tian et al, 2014)。しかし、中皮腫や CSCs における *SLC13A5* の関連性についてはいまだ明らかになっていない。

本研究の重要性と意義

本研究では、3 種類のハイドロゲルを用いてヒト中皮腫細胞株を培養することにより幹細胞性を誘導し、それらに普遍的に発現する分子を探索することで中皮腫幹細胞の性質を解明し、新たな治療法確立のための端緒を探ることとした。

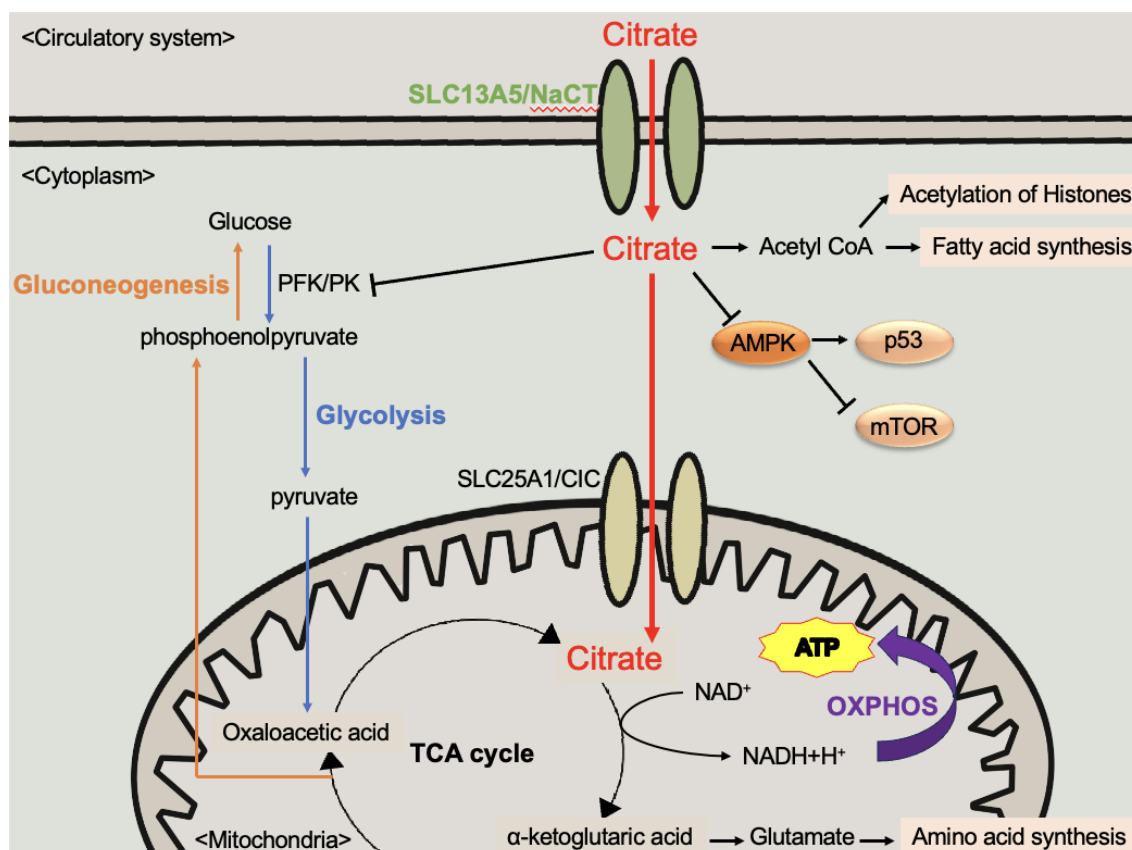


図1 肝臓における *SLC13A5*/NaCT のシグナル伝達経路およびエネルギー産生におけるクエン酸の働き

(Li and Wang, 2021) より改変
NAD, nicotinamide adenine diphosphate.

方法

1. 中皮腫細胞株

ヒト中皮腫細胞株 ACC-MESO-4 (Usami et al, 2006)、およびヒト胎児腎細胞株 HEK293T は理化学研究所バイオリサーチセンター (Tsukuba, Japan) より購入した。また、4 種のヒト中皮腫細胞株 MSTO-211H、NCI-H2052、NCI-H2452、NCI-H28、ヒト肝細胞癌細胞株 HepG2、ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 および NCI-H1975 は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入した。中皮腫細胞株の組織型と BAP1 変異状況について表 1 に示す。

表 1 本研究で使用したヒト中皮腫細胞株の一覧

Cell line	Morphology	BAP1 mutation
ACC-MESO-4	Epithelial mesothelioma	p.Tyr724* (c.2172delC)
MSTO-211H	Biphasic mesothelioma	wild type
NCI-H2452	Epithelial mesothelioma	p.Ala95Asp (c.284C>A)
NCI-H2052	Epithelial mesothelioma	wild type
NCI-H28	Epithelial/sarcomatoid (Ghani et al, 2011) mesothelioma	p.Arg146Alafs*48 (c.438-24_438-2del23)

2. 細胞培養

5 種類のヒト中皮腫細胞株と NCI-H1975 細胞は、10%のウシ胎児血清 (FBS : fetal bovine serum, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、ペニシリン-ストレプトマイシン (100 U/mL ペニシリンおよび 0.1 mg/mL ストレプトマイシン、Sigma-Aldrich)、および L-グルタミン (2 mM, Sigma-Aldrich) を添加した Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) 培地 (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) で培養した。HEK293T 細胞、HepG2 細胞、A549 細胞は、10% FBS、ペニシリン-ストレプトマイシン、L-グルタミンを添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (Nissui Pharmaceutical) で培養した。いずれの細胞株も 5%二酸化炭素 (CO₂) 存在下、湿潤状態の 37°C インキュベータ内でハイドロゲルまたはポリスチレン (PS : polystyrene) ディッシュ上で培養した。

ゲル上培養細胞は、基本的に 1×10^5 個/mL の密度でハイドロゲル上に播種してから 2 日もしくは 3 日間培養した。培養期間や幹細胞性の可塑性に関する検討では、 1×10^5 個/mL の密度で 1、3、7、14、21、および 28 日間培養した。また、免疫細胞化学と免疫蛍光染色の検討では、 0.5×10^4 個/mL の密度で 10 日間培養した。コントロールには、PS ディッシュ上で同様の条件で培養した細胞を用いた。

3. tdTOMATO-Luc2 を安定発現した ACC-MESO-4 細胞と MSTO-211H 細胞の樹立

発光酵素 Luc2、赤色蛍光タンパク質 tdTOMATO の共発現ベクター pCSII-CMV-tdTOMATO-Luc2 を、Opti-MEM® I Reduced Serum Media (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) および FuGENE® HD transfection reagent (Promega, Madison, WI, USA) を用いて ACC-MESO-4 細胞と MSTO-211H 細胞に遺伝子導入後、200 ng/mL Zeocin (Thermo Fischer Scientific) にて薬剤選択を実施した。tdTOMATO-Luc2 の安定発現を確認するために、倒立顕微鏡 (IX73, Olympus, Co., Tokyo, Japan) にて赤色蛍光タンパク質の発現が十分であることを確認した。

4. SLC13A5 の一過性過剰発現実験

SLC13A5 過剰発現ベクター pRP[Exp]-EGFP/Puro-EF1A>3xFLAG/ hSLC13A5 [NM_177550.5]、および EGFP control vector である pRP[Exp]-EGFP/Puro-CAG>ORF_stuffer はベクタービルダー株式会社 (Chicago, IL, USA) より購入した。ACC-MESO-4 細胞を 1.0×10^5 個/mL、MSTO-211H 細胞、HEK293T 細胞を 2.5×10^5 個/mL の密度で PS ディッシュ上に播種した。24 時間培養後、2000 μ g の SLC13A5 過剰発現ベクターもしくは empty control vector を Opti-MEM® I Reduced Serum Media (Thermo Fischer Scientific) および FuGENE® HD transfection reagent (Promega) を用いて導入した。48 時間培養後、倒立顕微鏡 (IX73, Olympus, Co.,) にて緑色蛍光蛋白の発現をもって各種細胞株のトランスフェクション効率を評価した。

5. SLC13A5 の一過性ノックダウン実験

SLC13A5 の siRNA は FlexiTube GeneSolution siRNA (No. 1027416, Qiagen, Valencia, CA) を使用した。MSTO-211H 細胞を 2.5×10^5 個/mL の密度で PS ディッシュ上に播種し、24 時間培養後、5 nM の FlexiTube GeneSolution siRNA を Opti-MEM® I Reduced Serum Media (Thermo Fischer Scientific) および HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) を用いて遺伝子導入した。48 時間培養後に RNA を回収、cDNA を合成して real-time PCR による遺伝子発現量の検討を行った。コントロールには、AllStars Neg. Control siRNA (No. 1027281, Qiagen) を使用した。

5.1 最も効果的な siRNA の選択

FlexiTube GeneSolution siRNA (No. 1027416, Qiagen) に含まれる 4 種の siRNA (Hs_SLC13A5_7, Hs_SLC13A5_8, Hs_SLC13A5_9, Hs_SLC13A5_10) の遺伝子配列を示す (表 2)。最適な siRNA の配列を同定するため、MSTO-211H 細胞に各

siRNA (5 nM) を単独、あるいは4種類すべてを混合して遺伝子導入し、real-time PCR によりノックダウン効率を検討した。

表 2 SLC13A5 のノックダウンに使用した siRNA の一覧

Product name	Catalog no.	Target sequence
Hs_SLC13A5_7	SI04183704	5'-AGGAGTCATAATGAACATAAT-3'
Hs_SLC13A5_8	SI04212530	5'-CTCCAGTTTGTTCATGAGA-3'
Hs_SLC13A5_9	SI04286114	5'-CAGGTGTGCCTACGTCATCAT-3'
Hs_SLC13A5_10	SI04345194	5'-CCGTGGGCCAATCTACTTGAA-3'

5.2 siRNA の至適濃度の検討

上記 5.1 によりノックダウン効率の良好な siRNA を選択後、至適濃度の検討を行った。PS ディッシュ上で培養した MSTO-211H 細胞に Hs_SLC13A5_9 を 0 μ M (通常培養)、10 μ M、20 μ M、30 μ M 添加して 48 時間培養し、形態観察および real-time PCR にてノックダウン効率を検討した。コントロールには、AllStars Neg. Control siRNA (No. 1027281, Qiagen) を使用した。

6. ハイドロゲルの合成

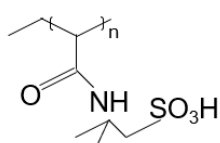
6.1 ハイドロゲルの試薬

ハイドロゲルのモノマーとして、2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS, Toagosei Co. Ltd., Tokyo, Japan)、N,N'-dimethylacrylamide (DMAAm, FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Osaka, Japan)、N- (Carboxymethyl) -N,N'-dimethyl-2- (methacryloyloxy) ethanaminium, inner salt (CDME, Osaka Organic Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan)、p-styrenesulfonic acid sodium salt (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) を購入した。架橋剤には N,N'-methylenebisacrylamide (MBAA, FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.)、重合開始剤には 2-oxoglutaric acid (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) を使用した。DMAAm 以外の薬剤は追加の精製を行わずに使用した。DMAAm は真空蒸留後に使用した。

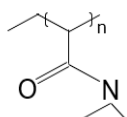
6.2 PAMPS/PDMAAm-DN ゲル

PAMPS/PDMAAm-Double Network (DN) ゲルは、APMS、DMAAm、MBAA、2-oxoglutaric acid を用いて、以前に報告された 2 段階逐次重合法に従って合成した (Gong et al, 2003)。PAMPS と PDMAAm の構造式を図 2 に示す。まず、1st ネットワークである PAMPS ハイドロゲルを合成するために、1 M の AMPS に 4 mol% の MBAA、0.1 mol% の 2-oxoglutaric acid を加えた前駆水溶液を調整した。

この前駆水溶液を、0.5 mm 厚のシリコーンゴムで仕切られた一対のガラス板からなるセルに注入した。このセルにアルゴンガス中で UV ランプ (波長 365 nm) を約 8 時間照射すると、ラジカル重合によって PAMPS ゲルが合成される。次に PAMPS ゲルを 0.1 mol% MBAA および 0.1 mol% 2-oxoglutaric acid を含む 2 M の DMAAm 溶液に平衡に達するまで 1 日浸漬した。その後、このゲルを 2 枚のガラス板で挟み、アルゴンガス中で UV ランプ (波長 365 nm) を約 8 時間照射した。これにより 1st ネットワークゲル (PAMPS) の存在下で 2nd ネットワーク (PDMAAm) を重合させ、DN ゲルを完成させた (Haas et al, 2014)。



PAMPS: poly (2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)



PDMAAm: poly (N,N'-dimethylacrylamide)

図 2 PAMPS/PDMAAm-DN ゲルを構成する 2 種類のポリマー PAMPS と PDMAAm の化学構造式

6.3 PCDME-SN ゲル

PCDME-Single Network (SN) ゲルは 1 M の CDME、4 mol% の MBAA、0.1 mol% の 2-oxoglutaric acid を加えた前駆水溶液をラジカル重合することにより合成した。前駆水溶液をシリコーンゴムで仕切られた一対のガラス板からなるセルに注入し、アルゴンガス中で UV ランプ (波長 365 nm) を約 8 時間照射した (Yin et al, 2013)。

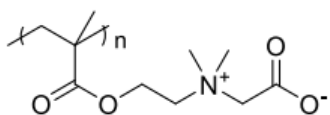


図 3 PCDME-SN ゲル: poly (N- (Carboxymethyl) -N,N'-dimethyl-2-(methacryloyloxy) ethanaminium, inner salt) の化学構造式

6.4 PNaSS-SN ゲル

PNaSS-Single Network (SN) ゲルは、1 M の p-styrenesulfonic acid sodium salt、4 mol% の MBAA、0.1 mol% の 2-oxoglutaric acid を加えた前駆水溶液をラジカル重合することにより合成した。前駆水溶液をシリコンゴムで仕切られた一対のガラス板からなるセルに注入し、アルゴンガス中で UV ランプ (波長 365 nm) を約 9 時間照射した (Yang et al, 2010)。

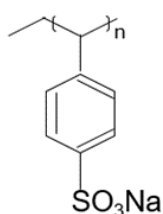


図 4 PNaSS-SN ゲル: poly (p-styrenesulfonic acid sodium salt) の化学構造式

重合後、未反応物を除去するために 各種ハイドロゲルを 0.9 wt% の NaCl 溶液に浸漬し、さらに 4- (2-HydroxyEthyl) -1-Piperazine Ethane Sulfonic acid (HEPES, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 緩衝液 [1.55×10^{-2} M NaHCO₃, 0.14 M NaCl, 5×10^{-3} M HEPES, pH7.4] にも浸漬した。HEPES 緩衝液を 1 週間毎日交換し、平衡状態に達したものを細胞培養に用いた。

7. 細胞培養のためのハイドロゲルの調整

シート状に合成された 3 種のハイドロゲルは、HEPES Buffer に浸漬して 4°C で保存した。このシートを円盤状 (直径 35 mm、厚さ 1.2 mm) に型抜きし、HEPES Buffer 中でオートクレーブ滅菌した。細胞の播種前日に、滅菌後のハイドロゲルを培養用の 35 mm PS ディッシュに移し、2 mL の RPMI 培地に置換して 37°C、5% CO₂ 環境下で一晩インキュベーションした。細胞播種時には RPMI 培地を取り除き、細胞を新しい RPMI 培地 2 mL に懸濁して播種した。

8. RNA 抽出および遺伝子発現解析

培養した中皮腫細胞の総 RNA は RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて抽出し、その後 Superscript VILO (Thermo Fischer Scientific) を用いて cDNA に逆転写した。Real-time PCR は、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により実施した。プライマーの配列を表 3 に記す。総 RNA の相対的発現量は、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) を内因性コント

ロールとし、 $\Delta\Delta C_t$ 法で正規化された。

表 3 Real-time PCR に使用したプライマーの一覧

Gene		Primer
GAPDH	Forward	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	Reverse	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
Sox2	Forward	5'-AGTCTCCAAGCGACGAAAAA-3'
	Reverse	5'-GGAAGTTGGGATCGAACAA-3'
Nanog	Forward	5'-TGCAATGTCTTCTGCTGAGAT-3'
	Reverse	5'-GTTTCAGGATGTTGGAGAGTTC-3'
Oct3/4	Forward	5'-CGACCATCTGCCGCTTTGAG-3'
	Reverse	5'-CCCCCTGTCCCCCATTCTTA-3'
SLC13A5	Forward	5'-AGGGCTCTGGTTTTCACTCG-3'
	Reverse	5'-CTCAAGACCAGGCATTCCGT-3'
TMEM151B	Forward	5'-CTACCAGGGCAACAGCCTCAT-3'
	Reverse	5'-GTGCGGCGGACATAGTGGTA-3'
HCRTR2	Forward	5'-CCGGAAGTCCTTGACCACTC-3'
	Reverse	5'-AGTTTTACTCAGGTATCCTTGTCA-3'
CD9	Forward	5'-CATCTGCCCAAGAAGGA-3'
	Reverse	5'-GCGGATAGCACAGCACAA-3'
CD24	Forward	5'-TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC-3'
	Reverse	5'-GAAACTGAATCTCCATTCCACAA-3'
CD26	Forward	5'-AAGTGGCGTGTTCAGTGTG-3'
	Reverse	5'-GGAGTTGGGAGACCCATGTA-3'
CD44	Forward	5'-TGTCAACCGTGATGGTACTCGC-3'
	Reverse	5'-GTATCCTGATCTCCAGTAGGC-3'
ALDH1A2	Forward	5'-GATGCTGACTTGGACTATGCTGT-3'
	Reverse	5'-CTGTTTCTTATCAATCTGGGGAC-3'
ALDH1A3	Forward	5'-TCTCGACAAAGCCCTGAAGT-3'
	Reverse	5'-GTCCGATGTTTGAGGAAGGA-3'

9. *In vivo* 腫瘍形成能の評価実験

全ての動物実験は、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り、医学研究科付属動物実験施設にて行った。

皮下移植モデルには、7 週齢の雌ヌードマウス Balb/cA Jcl nu/nu (Clea Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いた。予備実験として、PS ディッシュ上で培養した MSTO-211H 細胞を 5×10^4 個、 1×10^4 個、 5×10^3 個、 1×10^3 個、ACC-MESO-4 細胞を 1×10^6 個、 5×10^5 個、 1×10^5 個、 5×10^4 個ずつヌードマウスの背部皮下に移植し、腫瘍形成を検討した（各群 $n=1$ ）。次に、ACC-MESO-4 細胞を PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で 1.0×10^5 個/mL の密度で 3 日間培養し、 1.0×10^5 個、 1.0×10^4 個、 1.0×10^3 個の細胞をそれぞれ粉砕した粒子状ゲルと混合し、ヌードマウスの背部皮下に移植した（各群 $n=2$ ）。細胞は 100 μ L の RPMI 培地に懸

濁し、30Gの針と使い捨て注射器を用いて移植した。腫瘍の形成は、外表から触知することで評価した。

腹壁移植モデルには、7週齢の雌ヌードマウス Balb/cA Jcl nu/nu (Clea Japan, Inc.) を使用した。tdTOMATO-Luc2 を安定発現させた ACC-MESO-4 細胞および MSTO-211H 細胞を、PS ディッシュまたは PNaSS-SN ゲル上に 1.0×10^5 個/mL の密度で播種し、3日間培養後、0.25%トリプシン-EDTA 溶液 (Sigma-Aldrich) を用いてゲルから細胞を剥離した。MSTO-211H 細胞 1.0×10^3 個、ACC-MESO-4 細胞 5.0×10^4 個 (各群 $n=4$) を 50 μ L の RPMI 培地に懸濁してマウスの腹壁に移植した。マウスは 1.75%イソフルラン (60 mg/kg) 吸入により麻酔した。腹部正中を切開して腹膜下に細胞を注入後、腹膜と皮膚をそれぞれ 3-5 針ずつ縫合して閉腹した (図 5)。IVIS Spectrum imaging system (Summit Pharmaceuticals International Corporation, Tokyo, Japan) による bioluminescence imaging を行った。マウスの腹腔内に VivoGlo Luciferin, In Vivo Grade (Promega Corporation, Wisconsin, USA) を注射し、腹部からの生物発光シグナルを解析した。



図 5 腹壁移植モデルマウスへの細胞移植

イソフルランによる吸入麻酔およびアルコール消毒を行った後、ヌードマウスの腹部正中の皮膚および腹膜を切開し、腹腔内に細胞が離散しないよう腹膜直下の間質内にドーム状に細胞を注入した。

10. DNA マイクロアレイ法による遺伝子解析とエンリッチメント解析

ACC-MESO-4 細胞を PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で 3日間培養し、コントロールとして、PS ディッシュ上、ultra-low attachment (ULA) ディッシュ上で 3日間培養した。これらの細胞の総 RNA は RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて抽出した。マイクロアレイ解析は、SurePrint G3 Human Gene Expression $8 \times 60K$ v3.0 (Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った。データは、MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) ガイドラインで確

立されたプロセスを用いて標準化され、解析された。遺伝子発現レベルは、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上の発現と PS ディッシュ、ULA ディッシュ上の発現を比較し、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で 20 倍以上の発現増加を認めた遺伝子 23 個を抽出した。なお、Log2FC (fold change) が 0.6 を超える発現増加遺伝子 101 個を用いて、キュレーションされた遺伝子セットの包括的なリソースである Enrichr (URL : <https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) を利用してエンリッチメント解析を行った。

11. ウェスタンブロッティング

ACC-MESO-4 細胞を PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上で 1.0×10^5 個/mL の密度で 3 日間培養後、ライセートを調整した。また、*SLC13A5* を一過性過剰発現させた HEK293T 細胞と、empty control vector を導入した HEK293T 細胞からライセートを調整した。Lysis buffer として、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer [10mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA、150 mM NaCl、10% glycerol、1% Triton X-100、1% sodium deoxcholate、0.1% SDS、50 mM NaF、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 mM sodium orthovanadate (Na_3VO_4)、protease inhibitor mixture: Complete (EDTA-free) protease inhibitor (Roche, Basel, Switzerland)]を使用した。得られたライセートを SDS-ポリアクリルアミドゲル (7-12%) で電気泳動して展開し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。転写後の膜は TBS-T で希釈した 2% BSA もしくは 5% スキムミルク溶液を用いてブロッキングした。一次抗体および horseradish peroxidase (HRP) 標識二次抗体でインキュベートした後、Cytiva Amersha ECL Western Blotting Detection Reagents (Leicestershire, England) を用いて現像した。ルミノイメーリアナライザー (ImageQuant LAS 4000mini システム, GE Healthcare) を用いて可視検出、解析した。

一次抗体は、抗 SOX2 抗体 (#3579)、抗 AKT 抗体 (#9272)、抗 phospho-AKT (S473) (#4060) 抗体、YAP/TAZ 抗体 (#8418)、抗 phospho-YAP 抗体 (S127) (#13008)、抗 FAK 抗体 (#3285)、抗 phospho-FAK 抗体 (Y397) (#8556)、ERK1/2 抗体 (#9102)、抗 phospho-ERK1/2 抗体 (T202/Y204) (#9101)、抗 mTOR 抗体 (#2983)、抗 phospho-mTOR 抗体 (S2481) (#2974)、抗 phospho-p38MAPK (T180/Y182) (#9211)、抗 p53 抗体 (#2524)、抗 AMPK-alpha 抗体 (#5831)、抗 phospho-AMPK-alpha 抗体 (T172) (#2535) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、抗 Actin 抗体 (MAB1501, Millipore)、抗 SLC13A5 抗体 (sc-293277, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA)、抗 TMEM151B 抗体 (MBS9204525, myBioSource)、抗 HCRTR2 抗体 (AOR-002, Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel)、抗 FLAG M2 抗体-HRP 標識抗体 (A8592, Sigma-Aldrich) を使用した。

12. 免疫細胞化学および免疫組織化学

PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上に ACC-MESO-4 細胞を 0.5×10^4 個/mL の密度で播種し、10 日間培養後にセルブロックを作製した。細胞は 0.25%トリプシン-EDTA 溶液 (Sigma-Aldrich) を用いて剥離し、1.5 mL チューブに回収・遠心分離後に上清を除去した後、細胞のペレットをホルマリンで一晩固定した。固定後にペレットを半割してパラフィン包埋 (FFPE : formalin-fixed paraffin-embedded) することによりセルブロックを作製した。また、2008 年から 2023 年までの自施設に保管されている中皮腫剖検症例 5 例の FFPE 検体を収集した。

これらを薄切後、HE 染色および抗 SLC13A5 抗体 (sc-293277, Santa Cruz Biotechnology) を用いた免疫細胞化学もしくは免疫組織化学を施行した。染色行程は Envision FLEX システムに従って実施した (Dako, Agilent Technologies Japan, Ltd.)。脱パラフィン処理後、前処理システム PT Link (Dako) にて抗原賦活化処理を行った (97°C、20 分、pH9.0)。次に、自動免染装置 Autostainer Link 48 (Dako) 内で EnVision FLEX peroxidase Blocking 試薬を 5 分間処理後、抗 SLC13A5 抗体 (20 倍希釈) を 30 分間反応させた。さらに EnVision FLEX/HRP を 30 分間反応後に洗浄し、EnVision FLEX ベンジジンと発色基質を 10 分添加した。核染色にはヘマトキシリンを用い、その後脱水、封入した。抗 SLC13A5 抗体の条件検討には、陽性コントロールとして HepG2 細胞のセルブロックを、陰性コントロールとして NCI-1975、A549 細胞のセルブロックを使用した。

13. 免疫蛍光染色

コントロールとして、Type I-C セルマトリックス (Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan) でコーティングしたガラスベースディッシュ上で培養した細胞を用いた。PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で培養した細胞は、形成したスフェロイドが崩れないよう慎重に吸引し、ガラスベースディッシュへ移した。PCDME-SN ゲル上および PNaSS-SN ゲル上の細胞は接着した状態のまま、ゲルの一部を切り取ってガラスベースディッシュに移した。一次抗体には抗 SLC13A5 抗体 (sc-293277, Santa Cruz Biotechnology) を、二次抗体には Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG 抗体 (A11209, Thermo Fischer Scientific) を用いて、免疫蛍光染色を行った。

Flag タグ付き *SLC13A5* の一過性過剰発現細胞の染色では、発現ベクターが緑色蛍光蛋白 EGFP の発現配列を含むため、一次抗体に抗 Flag M2 抗体 (F3165, Sigma-Aldrich) を、二次抗体に Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG 抗体 (A11032, Thermo Fischer Scientific) を使用した。観察には、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV3000, Olympus) を使用した。

14. SLC13A5 阻害剤を用いた実験

SLC13A5 阻害剤 BI01383298: 1-(3,5-Dichlorophenylsulfonyl)-N-(4-fluorobenzyl)piperidine-4-carboxamide (SML2214, Sigma-Aldrich) 分子量 445.34 (Higuchi et al, 2020) を購入し、Dimethyl sulfoxide (DMSO, FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) に溶解した。ACC-MESO-4 細胞、MSTO-211H 細胞を PS ディッシュ、PNaSS-SN ゲル上に 1.0×10^5 個/mL の密度で播種し、0 μM (0.1% DMSO)、5 μM 、10 μM の BI01383298 を添加した。MSTO-211H 細胞は 48 時間、ACC-MESO-4 細胞は 72 時間処理後に総 RNA を抽出し、real-time PCR による遺伝子発現解析を行った。

15. 代謝解析

代謝解析には、PS ディッシュ、PNaSS-SN ゲル上で 3 日間培養した ACC-MESO-4 細胞および MSTO-211H 細胞 (500 μM クエン酸 (#83273, Sigma-Aldrich) 存在下あるいは非存在下)、SLC13A5 一過性過剰発現 HEK293T 細胞およびコントロール細胞、*SLC13A5* ノックダウン MSTO-211H 細胞およびコントロール細胞を使用した。酸素消費速度 (OCR: oxygen consumption rate) および細胞外酸性化速度 (ECAR: extracellular acidification rate) は、Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer (Agilent Technologies Japan, Ltd.) を用いて測定した。具体的には、各細胞 (1×10^4 個/well) を 10 mM グルコース、1 mM ピルビン酸、2 mM グルタミン含有 XF アッセイ培地に懸濁後、Cell-Tak (ThermoFisher Scientific) でコーティングした培養プレートに播種した。プレートを遠心後、0% CO_2 、37°C のインキュベータで 45 分間平衡化させた。その後、Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer に移し、Mito stress test を行った。まず、基礎呼吸を XF アッセイ培地 (1 mM ピルビン酸ナトリウム、10 mM グルコース、2 mM グルタミン) 中で測定後、オリゴマイシン (1 μM) を添加し、ATP 産生関連呼吸を測定した。続いて、結合阻害剤 Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, 1 μM) を添加し、最大呼吸を測定した。最後に、ロテノンとアンチマイシン A (各 0.5 μM) を併用し、非ミトコンドリア呼吸を測定した。

16. 抗腫瘍薬の感受性試験

抗腫瘍薬に対する感受性を調べるため、細胞生存率を CCK-8 アッセイキット (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co.) で評価した。*SLC13A5* を一過性に過剰発現させた MSTO-211H 細胞とコントロール細胞を 96 well ディッシュに 1×10^4 個/well で播種した。24 時間培養後、シスプラチンを 0、0.1、1、10、50、100 μM 投与した (各 $n=6$)。さらに 24 時間後、CCK-8 アッセイを行い、450 nm の吸光度を測定した。

17. 統計解析

グラフデータは平均値と標準偏差で示した。比較には Student's t-test を用い、P 値が 0.05 未満となる場合を有意とした。F-検定は、サンプルが等分散または等分散でないかを調べるために使用された。スフェロイドの形態計測や細胞の免疫染色陽性面積の算出には ImageJ-software を用いた。

18. 公開データセット

18.1 生存解析

解析には2種類のデータセットを用いた。まず、オンラインツール GEPIA (Tang et al, 2017) を用いて TCGA データベースから 87 名の中皮腫患者の生存解析を行った。次に、211 人の中皮腫患者を含む Bueno コホート (Bueno et al, 2016) を用いて組織型で層別化した生存解析を行った。pyEGA3 を使用して EGA データベースに格納されている raw Fastq ファイルをダウンロードし (EGAD 00001001915)、Trim Galore v 0.6.3 を使用してアダプターを削除した後、Fastq ファイルを Salmon v 1.10.1 (Patro et al, 2017) にて直接定量化した (参照ゲノム: GRCh38)。生カウントデータを R 環境 (R 4.3) にインポートして以降の解析を行い、R パッケージ「DESeq2」(Love et al, 2014) を用いてデータフィルタリングと正規化を行い、R パッケージ「Survival」を用いて生存解析を行った。

18.2 scRNA-seq データ解析

中皮腫 scRNA-seq データセット (GSE201925) は、Gene Expression Omnibus データベースからダウンロードした (Knelson et al, 2022)。Cellranger 7.1.0 (10x Genomics, USA) を用いて発現マトリックス (参照ゲノム: GRCh38) を算出した。その後の分析は主に R パッケージ「Seurat v 4」(Hao et al, 2021) に基づいて行った。細胞の品質は、以下の基準を満たすものに限定した: 遺伝子 (最小:300、最大:1 万)、ミトコンドリア遺伝子パーセント (<20%)、分子バーコード (<8 万)。3 個以下の細胞で発現している遺伝子も除去した。R パッケージ「Tricycle」(Zheng et al, 2022) を用いて細胞周期の状況を推測し、細胞周期がその後の解析に与える影響を回避した。その後、CCA アルゴリズムを使用してサンプルを統合し、バッチ効果を除去した。続いて、R パッケージ「Seurat v 4」の *FindVariableFeatures* ()関数を使用し、3000 個の variable 遺伝子を抽出した。次に、Principal component analysis (PCA) 次元削減およびクラスタリング操作 (PCs=1:40、解像度=0.5) を行い、すべての細胞を 15 のクラスターに分割した。その後、uniform manifold approximation and projection (UMP) アルゴリズムを使用して視覚化した。最後に、各クラスターのマーカー遺伝子を *FindAllMarkers* ()関数によって計算し、細胞種

に手動で注釈を付けた。

19. 臨床検体における *SLC13A5* の発現解析

ヒト中皮腫組織は、2008 年から 2023 年に北海道大学腫瘍病理学教室にて診断された病理解剖症例 5 例の FFPE 検体を用いた（表 4）。検体は剖検同意書に記載されている医学研究に関する項目に同意頂いたものを使用した。まず、FFPE 検体を 10 μ m 厚で中皮細胞の含有率に応じて 10～50 枚薄切し、未染標本を作製した。顕微鏡下で非腫瘍性中皮および中皮腫領域をトリミングし、1.5 mL チューブに分取後、RNeasy FFPE Kit (Qiagen) を用いて総 RNA を抽出した。Real-time PCR には、細胞株を用いた実験系で使用した *SLC13A5* のプライマー①に加えて、プライマーデザインツール Primer-BLAST ([URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)) を用いて、PCR product サイズが 70 bp 以下となるように設計したプライマーセット②、③、④も使用した（表 5）。設計通りの PCR product が増幅されているかを確認するために、2.5%アガロースゲル (Agarose L03, 5003, Takara Bio, Shiga, Japan) で電気泳動を行った。

表 4 当教室の中皮腫症例 5 例の背景と RNA 抽出に用いた FFPE 検体の部位

Case no.	検体採取年	Age/Sex	Histological diagnosis	非腫瘍部	腫瘍部
1	2021	86/M	Epithelioid mesothelioma	腸管漿膜	胸膜
2	2017	52/M	Biphasic mesothelioma	腸管漿膜	肺
3	2013	67/M	Biphasic mesothelioma	心膜	胸膜
4	2009	78/F	Biphasic mesothelioma	腸管漿膜	肺
5	2008	46/M	Biphasic mesothelioma	胸膜	肺

表 5 Real-time PCR に使用した 4 組の *SLC13A5* のプライマー

no.	Length	Primer
①	184 bp	Forward: 5'-AGGGCTCTGGTTTTCACTCG-3' Reverse: 5'-CTCAAGACCAGGCATTCCGT-3'
②	56 bp	Forward: 5'-GTGCCTCCTTTGCCTTCATGT-3' Reverse: 5'-GAACACGATGGCATTGGAGG-3'
③	63 bp	Forward: 5'-ACGGAATGCCTGGTCTTGAG-3' Reverse: 5'-AGGAGGCTCTGATTCCCACT-3'
④	68 bp	Forward: 5'-CAGGTGTGCCTACGTCATCA-3' Reverse: 5'-TGACAGCCAGAGGGATGACT-3'

結果

【1】 PAMPS/PDMAAm-DN ゲルによる中皮腫の幹細胞性誘導に関する検討

1. PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養による形態変化の観察

まず、中皮腫において PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で培養することにより幹細胞性を誘導できるかについて検討した。5 種のヒト中皮腫細胞株 (MSTO-211H、ACC-MESO-4、NCI-H2052、NCI-H2452、NCI-H28) を、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上でそれぞれ 2 日間培養し、形態観察を行った。対照には PS ディッシュを用いた。5 種類の中皮腫細胞株は PS ディッシュ上ではいずれも接着したのに対し、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上ではスフェロイドを形成し浮遊した (図 6)。PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上のスフェロイドの形状は細胞により異なり、MSTO-211H 細胞では細胞同士が強固に接着し最も球形に近い形状を示した。これに対し、他の細胞は球形ではなく、細胞間の境界を識別できる緩い凝集体を形成した。実際に、ACC-MESO-4 細胞では 10-20 個程度の小さな集塊を形成し、NCI-H2052 と NCI-H2452 細胞では 50 個程度の大きな凝集体と個細胞で浮遊する 2 種類のパターンが認められた。NCI-H28 細胞の凝集体は細胞数 100 個以上と大きい上、棒状または索状の細長い形態を示した。各細胞株で形成された凝集体のうち、上位 10 個の短径を計測すると、いずれの細胞株も平均 80-120 μm であった (図 7)。このことから、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養により、従来法で抽出された中皮腫幹細胞にも共通するスフェロイドを形成するが、ゲルに対する反応性は細胞株によって異なることが示唆された。

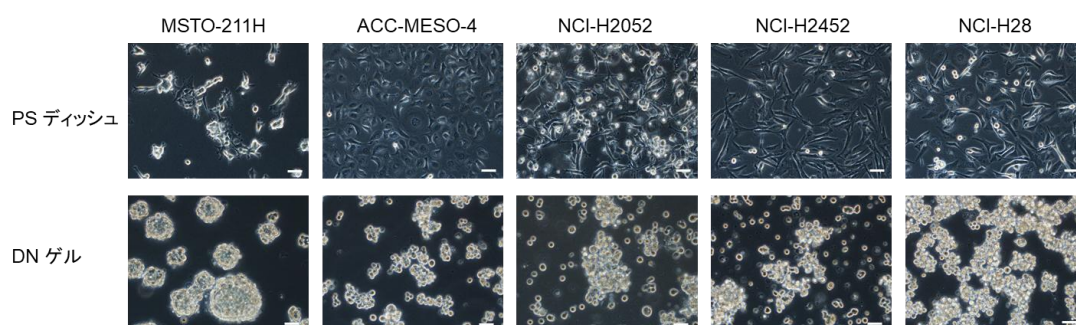


図 6 PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養での形態変化

PS ディッシュ上および PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で 2 日間培養した 5 種類のヒト中皮腫細胞株 (MSTO-211H、ACC-MESO-4、NCI-H2052、NCI-H2452、NCI-H28) の位相差顕微鏡での観察像を示す。Scale : 50 μm 。

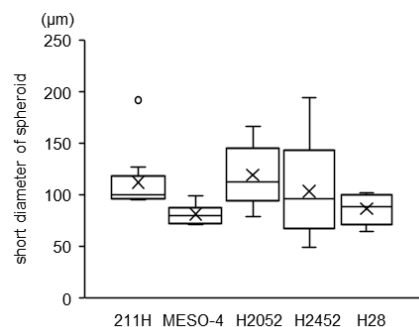


図 7 PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で形成された各スフェロイドの短径の分布
横軸は PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で培養した 5 種のヒト中皮腫細胞を示す。

2. PAMPS/PDMAAm-DN ゲルによる幹細胞マーカーの誘導

次に、5 種のヒト中皮腫細胞株において、一般的な幹細胞マーカーである *SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4* の相対的遺伝子発現量を real-time PCR にて解析した。NCI-H28 細胞を除く 4 種の細胞株において、PS ディッシュ上に対して PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で発現増加が認められた (図 8)。これらの実験を 3 回繰り返した結果、遺伝子の相対的発現量は PAMPS/PDMAAm-DN ゲルのロットや細胞の状態によって 1.2 倍程度から 100 倍以上までのばらつきが認められたが、比較的再現性の高い結果が得られた。NCI-H28 細胞は試行回によっては PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で発現増加を認めたが、信頼性のある再現性は得られなかった。なお、スフェロイドの大きさと幹細胞マーカーの相対的発現量との間に相関は認められなかった (スピアマンの順位相関係数にて *SOX2*: $\rho=-0.4$, *Nanog*: $\rho=-0.4$, *Oct3/4*: $\rho=0.5$)。このことから、5 種類中 4 種の中皮腫細胞株において、PAMPS/PDMAAm-DN ゲルが幹細胞マーカーの発現増強に有効であることが示唆された。このうち ACC-MESO-4 細胞で最も発現増加が顕著に見られたため、他の細胞株よりも効率的に HARP 現象が起きている可能性を考え、以降の実験には ACC-MESO-4 細胞を主に使用することにした。

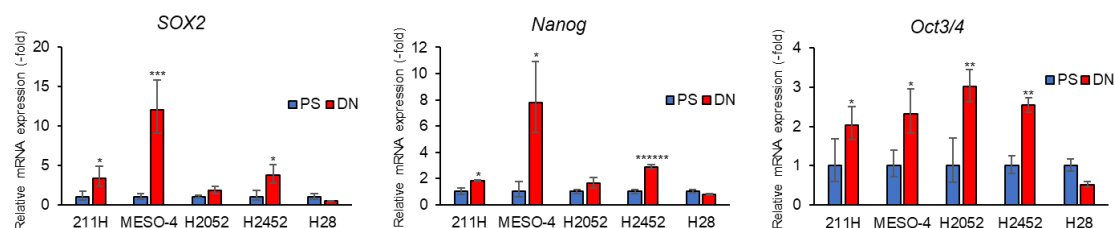


図 8 Real-time PCR による幹細胞マーカーの発現変動の評価

PS ディッシュ上および PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で 2 日間培養した 5 種類のヒト中皮腫細胞（MSTO-211H、ACC-MESO-4、NCI-H2052、NCI-H2452、NCI-H28）の幹細胞マーカー遺伝子（SOX2、Nanog、Oct3/4）の発現量の変化。2 群間の比較は PS ディッシュをコントロールとして t 検定を行った。横軸は PS ディッシュと PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で培養したヒト中皮腫細胞を示す。* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$ 、*** : $P < 0.005$ 、**** : $P < 0.0001$ 、***** : $P < 0.00001$ 。

3. PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養細胞の *in vivo* 腫瘍形成能の評価

次に PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養中皮腫細胞の腫瘍形成能を確認するため、マウスのがん細胞株移植モデルを作製した。5 種の中皮腫細胞株のうち、NCI-H2052、NCI-H2452、NCI-H28 細胞は 1×10^7 個をヌードマウスに移植しても腫瘍を形成しないことが報告されている（Lam et al, 2017）。予備実験として腫瘍形成に必要な最低細胞数を調べるために、PS ディッシュ上で 2 日間培養した MSTO-211H、ACC-MESO-4 細胞をヌードマウスの背部皮下に移植した。MSTO-211H 細胞（ 5×10^4 個、 1×10^4 個、 5×10^3 個、 1×10^3 個）、ACC-MESO-4 細胞（ 1×10^6 個、 5×10^5 個、 1×10^5 個、 5×10^4 個）を 100 μ L の RPMI 培地に懸濁して移植した（各群 n=1）。その結果、移植後 37 日目の時点で ACC-MESO-4 細胞を 1×10^6 個、 5×10^5 個、 1×10^5 個移植したマウスで腫瘍の形成が確認された。がん幹細胞はより少ない細胞数で腫瘍を形成することが想定されることから、ACC-MESO-4 細胞（ 1×10^5 個、 1×10^4 個、 1×10^3 個）を 3 日間 PS ディッシュあるいは PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で培養後、粉碎した PAMPS/PDMAAm-DN ゲルとともに 100 μ L の RPMI 培地に懸濁し、ヌードマウスの背部皮下に移植した（各群 n=2）。その結果、移植後 69 日目で PS ディッシュ上培養細胞 1×10^5 個を移植した 1 個体と、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養細胞 1×10^5 個を移植した 2 個体に腫瘍の形成を認め、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養細胞において腫瘍形成能の優位性が示唆された。

4. ハイドロゲル上長期培養による幹細胞性の可塑性に関する検討

当教室の先行研究では、膠芽腫細胞株を 3 日間 PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で培養後マウス脳内に移植する際は、particle PAMPS/PDMAAm-DN ゲルを共移植しなければ有意な腫瘍形成を示さなかったが、14 日間 DN ゲル上で培養した場合は、particle PAMPS/PDMAAm-DN ゲル非存在下でも腫瘍形成を示した (Suzuka et al, 2021)。このことは、ゲル上で誘導された幹細胞性が長期間培養することにより可逆的なものから不可逆的なものに変化していることを示唆しており、これにはヒストンのアセチル化が関与することが明らかになっている。そこで、中皮腫においてもハイドロゲルで誘導された幹細胞性が、長期間培養により可逆的から不可逆的な状態に変化するかどうか検討した。ACC-MESO-4 細胞を PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で、短期間 (1、3、7 日) および長期間 (14、21、28 日) 培養し、幹細胞マーカー (*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*) の相対的発現量を調べたところ、3 日目まで増加し、その後は次第に低下して 28 日目には PS ディッシュとほぼ同程度の発現量にまで低下することが明らかとなった (図 9)。なお、ACC-MESO-4 細胞を 21 日間 PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で培養してから PS ディッシュに移して 1 週間培養した場合、*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4* の発現は PS ディッシュ上で 28 日間通常培養した場合と同程度まで低下した (図 10)。このことから、マウスに移植した ACC-MESO-4 細胞は結果的に最も高く幹細胞マーカーが誘導された状態であったことが確認された。一方で PAMPS/PDMAAm-DN ゲルに接し続けた場合も、PS ディッシュに移した場合も、幹細胞マーカーの発現は可逆的であることが示唆された。ゲル上培養した中皮腫細胞株の幹細胞性を維持するには、既報告 (Suzuka et al, 2021) の膠芽腫細胞株と異なり、幹細胞用培地など培養条件を追加する必要があると考えられる。従来法で抽出された中皮腫幹細胞の可塑性について検討した報告はないため比較はできないが、本研究の培養法では少なくとも 3 日目までは中皮腫幹細胞と非常に相同性の高い細胞が誘導されることが示唆された。なお、その後追加検討にて長期培養に伴う細胞密度の増加が遺伝子発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。そこで最初に少ない細胞数を播種して長期培養後、改めて PS ディッシュに播き直して再検したが、その場合も幹細胞マーカーの発現は著しく低下した。

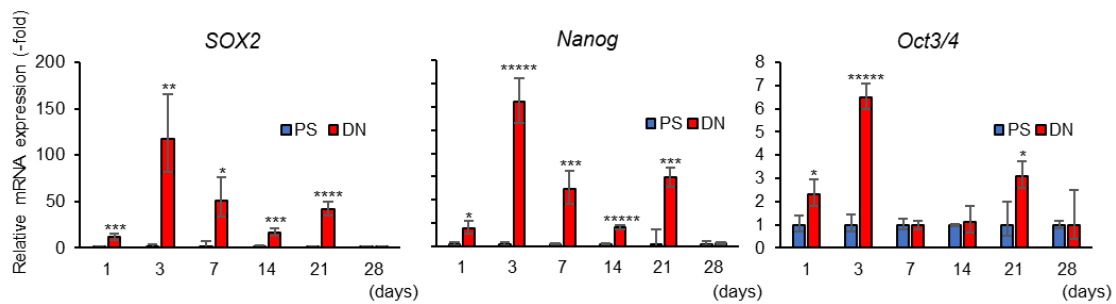


図 9 Real-time PCR による短期、長期ゲル上培養細胞の幹細胞マーカーの発現変動の評価

PS ディッシュ上および PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で 1 日から 28 日間まで培養した ACC-MESO-4 細胞の幹細胞マーカー遺伝子 (SOX2、Nanog、Oct3/4) の発現量の変化。2 群間の比較は PS ディッシュをコントロールとして t 検定を行った。横軸は培養期間を示す。* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$ 、*** : $P < 0.005$ 、**** : $P < 0.001$ 、***** : $P < 0.0005$ 。

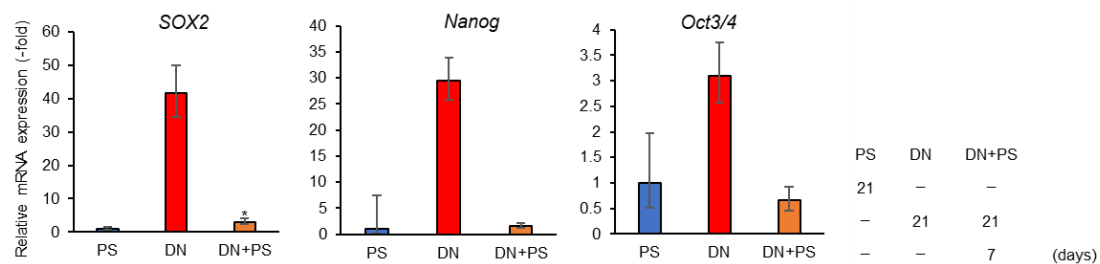


図 10 Real-time PCR による長期ゲル上培養細胞の幹細胞マーカーの発現可塑性の評価

PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で 21 日間培養した ACC-MESO-4 細胞と、その後 PS ディッシュに播き直して 1 週間培養した細胞の幹細胞マーカー遺伝子 (SOX2、Nanog、Oct3/4) の発現量の変化。2 群間の比較は PS ディッシュをコントロールとして t 検定を行った。横軸は PS : PS ディッシュ上で 21 日間培養、DN : DN ゲル上で 21 日間培養、DN+PS : DN ゲル上で 21 日間培養後 PS ディッシュ上に播き直して 7 日間培養したものを示す。* : $P < 0.05$ 。

5. PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で培養した ACC-MESO-4 細胞のマイクロアレイ解析

ハイドロゲルで誘導された中皮腫幹細胞様細胞の性質を調べるため、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で 3 日間培養した ACC-MESO-4 細胞を用いてマイクロアレイ解析を実施した。まず PS ディッシュおよび従来のスフェロイド形成法である ultra-low attachment (ULA) ディッシュ上で 3 日間培養した細胞をコントロールとし、これらと比較して PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養細胞で 20 倍以上の発現増加を認めた 23 遺伝子を抽出した (図 11)。この内、薬剤標的とな

りやすい膜蛋白質をコードする 8 遺伝子 (*HCRT2*、*PLB1*、*PTGFR*、*RXFPI*、*SEMA4G*、*SLC13A5*、*SLC6A11*、*TMEM151B*) を選出した (図 11)。他の中皮腫細胞株においても real-time PCR を行い、これら 8 遺伝子の発現を調べたところ、*HCRT2*、*SLC13A5*、*TMEM151B* の 3 遺伝子は、PAMPS/PDMAAm-DN ゲルによる幹細胞マーカーの発現増加を認めた 4 種の中皮腫細胞株 (MSTO-211H、ACC-MESO-4、NCI-H2052、NCI-H2452) において発現増加を認めたため、中皮腫幹細胞マーカーの新規候補分子とした (図 12)。これらの実験は 3 回反復し、良好な再現性が得られた。一方、NCI-H28 細胞は試行回によっては発現増加を認めたが、確実な再現性は確認できなかった。

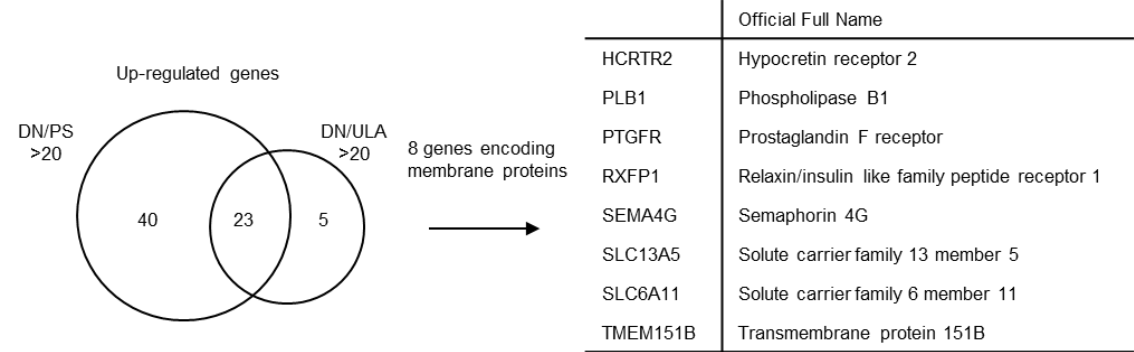


図 11 マイクロアレイ解析による PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞の性状解析

ACC-MESO-4 細胞において、PS ディッシュ、ULA ディッシュ上培養に対して、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養で 20 倍以上の発現増加が見られた遺伝子はそれぞれ 63 個、28 個で、このうち共通して発現増加が見られたものは 23 遺伝子あった。このうち、膜タンパクをコードする遺伝子 8 個を選出した。

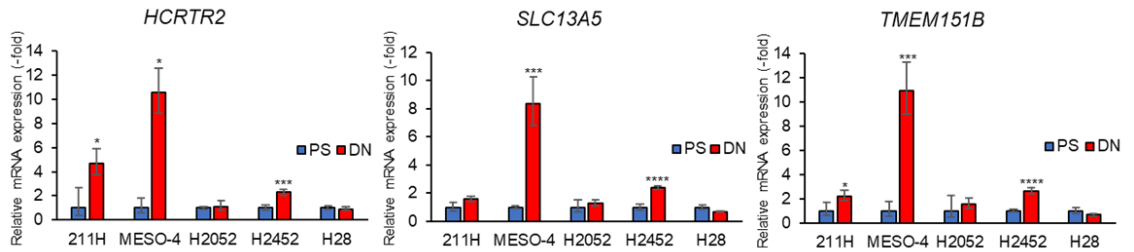


図 12 Real-time PCR による新規中皮腫幹細胞マーカー候補分子の遺伝子発現

PS ディッシュ上および PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で 3 日間培養した 5 種類のヒト中皮腫細胞 (MSTO-211H、ACC-MESO-4、NCI-H2052、NCI-H2452、NCI-H28) における候補分子 (*HCRT2*、*SLC13A5*、*TMEM151B*) の発現量の変化。2 群間の比較は PS ディッシュをコントロールとして t 検定を行った。横軸は PS ディッシュと PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で培養したヒト中皮腫細胞を示す。* : $P < 0.05$ 、*** : $P < 0.005$ 、**** : $P < 0.001$ 。

6. 遺伝子発現が増加した分子のエンリッチメント解析

マイクロアレイ解析により mRNA 発現増加を確認した遺伝子について、Enrichr (URL : <https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) を用いてエンリッチメント解析を行った。その結果、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway database にて、アルギニンやプロリン、ヒスチジンなど糖原性アミノ酸の代謝が亢進していることが分かった (図 13)。これらは TCA サイクルを介して糖新生系に入ることから、TCA サイクルも亢進していると示唆される。今回同定した 3 分子のうち、*SLC13A5* は細胞外クエン酸をナトリウムイオンとともに細胞質へ輸送するナトリウム依存性クエン酸共輸送体 (NaCT) をコードする (Gopal et al, 2007)。細胞質のクエン酸の一部は、*SLC25A1* にコードされるミトコンドリアクエン酸輸送体 (CIC) の逆輸入活性を通じて、細胞質からミトコンドリアへ流入し、TCA 回路に合流することが報告されている (Mosaoa et al, 2021)。このことから、ハイドロゲルで誘導された中皮腫幹細胞様細胞ではクエン酸回路が亢進している可能性が示唆された。

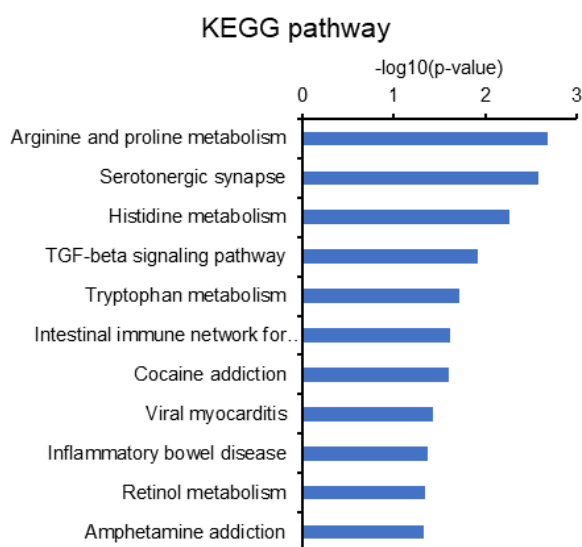


図 13 マイクロアレイ解析により発現増加を確認した遺伝子のエンリッチメント解析
糖原性アミノ酸の代謝の亢進を認める KEGG pathway database による解析結果を示す。
横軸は P 値の常用対数にマイナスをかけ正の値にしたものを示す。

【2】ハイドロゲルで誘導された中皮腫幹細胞様細胞の遺伝子発現に関する検討

1. PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上培養による形態変化の観察

次に、当教室において他の癌種を用いた先行研究により、幹細胞性を誘導することが明らかになっている PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲルによって創出された中皮腫幹細胞が、同様に *HCRTR2*、*SLC13A5*、*TMEM151B* を発現誘導するかを

検討した。まず、ACC-MESO-4 細胞を PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上で 1.0×10^5 個/mL の密度で播種し、3 日間培養後に形態を観察した。PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上細胞は PS ディッシュと類似する接着した形態を示し、スフェロイドは形成しなかった。PCDME-SN ゲル上細胞、PNaSS-SN ゲル上細胞はいずれも PS ディッシュ上細胞に比べて突起が長い双極性または芒星状の形態を示した (図 14)。このことから、各ハイドロゲルの物性の違いにより、PAMPS/PDMAAm-DN ゲルとは異なる CSC の微小環境が模倣された可能性が考えられた。スフェロイドの形成は CSC の表現型の一つであり、従来法による中皮腫幹細胞との相同性という点では異なるが、すべての CSC が必ずしもスフェロイドを形成するわけではないことも報告されている。

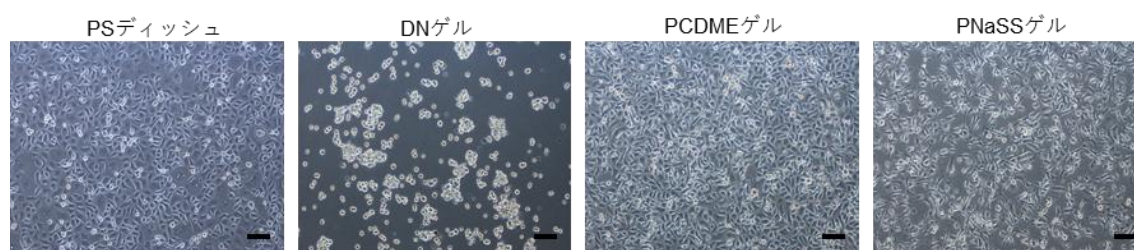


図 14 PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上培養による形態の変化

PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上で 3 日間培養した ACC-MESO-4 細胞の位相差顕微鏡での観察像を示す。Scale : 100 μ m。

2. PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上培養による中皮腫幹細胞関連遺伝子および候補分子の発現誘導

次に、PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上で ACC-MESO-4 細胞を培養し、候補分子の発現を調べた。その結果、これらの 3 分子は PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲルのいずれのゲル上でも有意な発現増加を認めた (図 15)。中皮腫幹細胞の発現遺伝子に関して、これまで報告されている *SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*、*ALDH1A2*、*ALDH1A3*、*CD44*、*CD24*、*CD26*、*CD9* の発現を調べた (Ghani et al, 2011; Varghese et al, 2012; Yamazaki et al, 2012; Cortes-Dericks et al, 2014; Chew et al, 2017; Blum et al, 2017)。本実験では、*CD24* を除き、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲルおよび PNaSS-SN ゲルの 3 種のハイドロゲルのいずれにおいてもこれらの遺伝子の発現増加を認めた (図 15)。したがって、いずれのゲルにおいても幹細胞マーカーの発現を誘導することができ、なおかつ *HCTRT2*、*SLC13A5*、*TMEM151B* の 3 遺伝子はハイドロゲルで誘導した中皮腫幹細胞様細胞に共通して発現する遺伝子であることが示唆さ

れた。汎幹細胞マーカーである *SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4* の相対的発現量は PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PNaSS-SN ゲル、PCDME-SN ゲルの順に高く、この発現パターンと候補分子の発現パターンは極めて類似しており、3 分子と幹細胞性との関連性が強いことが示唆される。

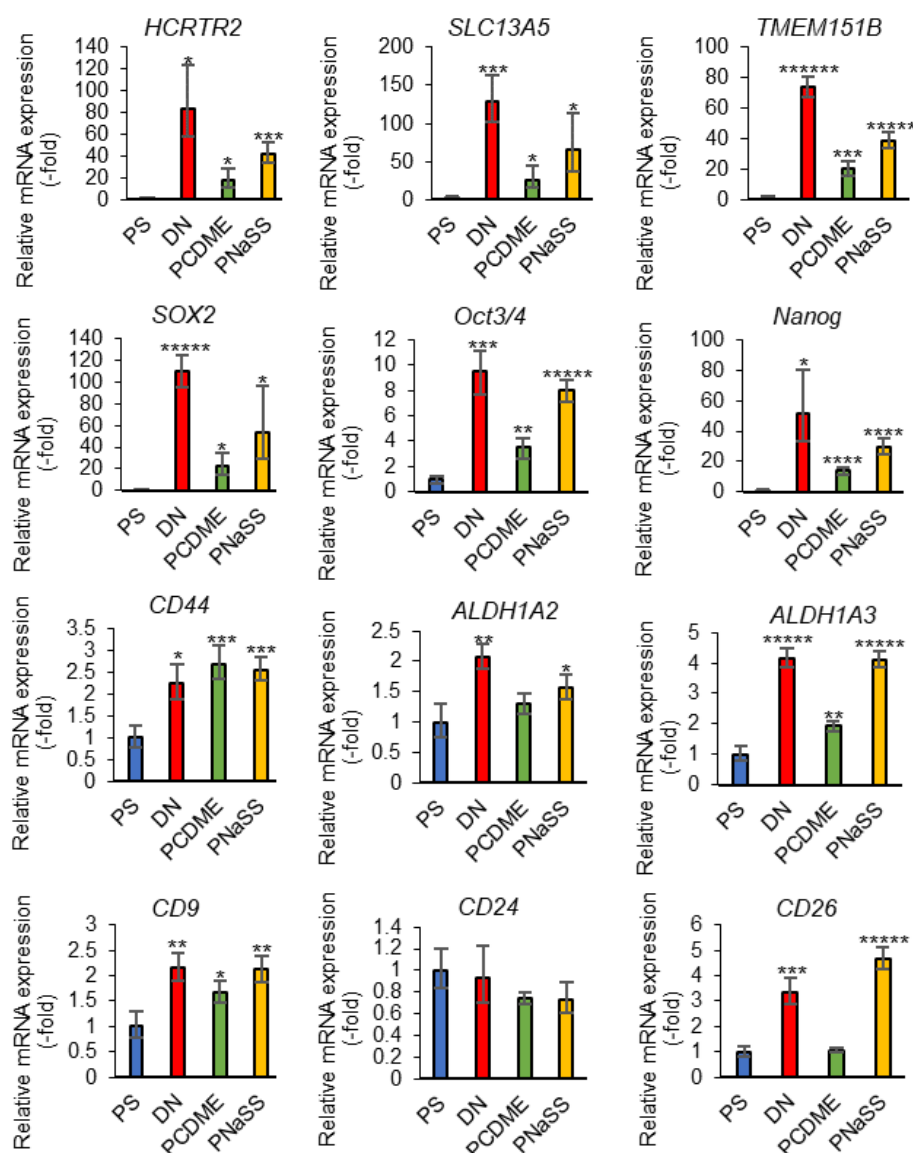


図 15 Real-time PCR による候補分子と中皮腫幹細胞関連分子の遺伝子発現

PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上で 3 日間培養した ACC-MESO-4 細胞における候補分子(*HCRTR2*、*SLC13A5*、*TMEM151B*)と中皮腫幹細胞関連分子(*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*、*CD44*、*ALDH1A2*、*ALDH1A3*、*CD9*、*CD24*、*CD26*)の発現量の変化。2 群間の比較は PS ディッシュをコントロールとして t 検定を行った。横軸は培養基材の種類 (PS ディッシュと 3 種のハイドロゲル) を示す。*: $P < 0.05$ 、*: $P < 0.01$ 、***: $P < 0.005$ 、****: $P < 0.001$ 、*****: $P < 0.0005$ 、*****: $P < 0.0001$ 。

3. 候補分子のタンパク発現解析

3 候補分子について、各種ゲル上で 1×10^5 個/mL の密度で 3 日間培養した ACC-MESO-4 細胞のウェスタンブロッティングを行ったところ、SLC13A5 のみ蛋白発現の増加を認めた。TMEM151B、HCRTR2 については非特異的バンドが多く出現し、PS ディッシュ上細胞と各種ゲル上細胞との間に明らかな変化は認めなかった。SLC13A5 は、55 kDa 付近のバンドにおいて、PS ディッシュ上細胞と比べて PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上細胞で 4.7 倍、PCDME-SN ゲル上で 4.6 倍、PNaSS-SN ゲル上細胞で 7.4 倍の発現増加が見られた（図 16）。

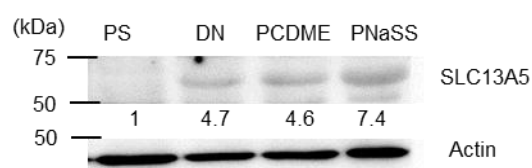


図 16 ゲル上培養細胞のウェスタンブロッティング

PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上で 3 日間培養した ACC-MESO-4 細胞での SLC13A5 蛋白の発現を示す。Actin は loading control。

次に、ACC-MESO-4 細胞のセルブロックを作製し、SLC13A5 の免疫細胞化学を行った。予備実験において、ゲル上に播く細胞数を減らして長期間培養すると候補分子の発現がより多く誘導されたことから、 0.5×10^4 個/mL の密度で 10 日間培養した。PS ディッシュに対して PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上培養細胞において、細胞膜および細胞質に SLC13A5 の染色性増強を認めた（図 17、18）。染色強度の評価は、画像解析ソフト「imageJ」

（URL: <https://imagej.net/software/fiji/>）を用いて対物レンズ 40 倍視野の画像における陽性部分の面積割合を算出し、合計 6 視野の平均をとって比較した。

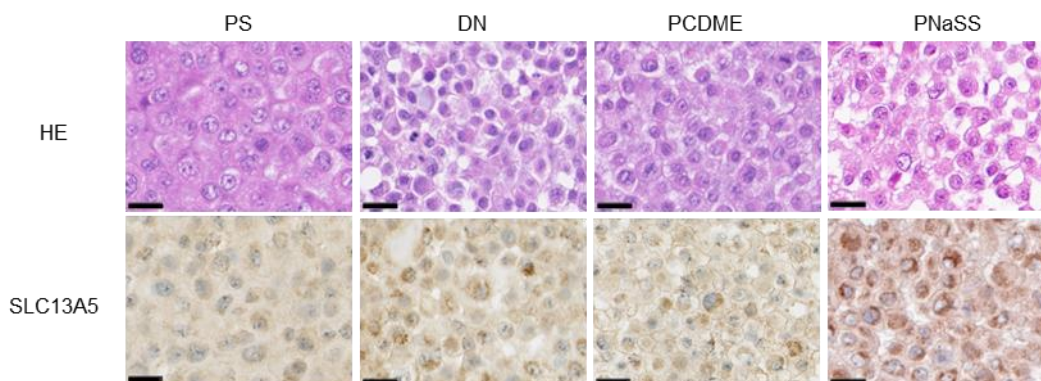


図 17 ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞の免疫細胞化学

PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上で 0.5×10^4 個/mL の密度で 10 日間培養した ACC-MESO-4 細胞のセルブロックを用いた。HE（上段）と SLC13A5（下段）の染色像を示す。Scale : 25 μ m。

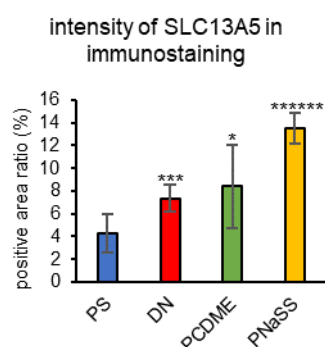


図 18 SLC13A5 染色の陽性率の比較

画像解析ソフト「imageJ」を用いて図 15 の陽性部分の面積を算出した。横軸は培養基材の種類（PS ディッシュと 3 種のハイドロゲル）を示す。*: $P < 0.05$ 、***: $P < 0.005$ 、*****: $P < 0.0001$ 。

さらに、PS ディッシュおよび PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上で 0.5×10^4 個/mL の密度で 10 日間培養した ACC-MESO-4 細胞を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、PS ディッシュに対していずれのゲル上でも高い蛍光強度を示す細胞が確認された（図 19）。免疫細胞化学染色および免疫蛍光染色の結果から、ハイドロゲル上で培養することにより、SLC13A5 蛋白の発現が誘導されることが明らかとなった。一方、発現の程度には細胞間でかなりのばらつきが認められ、全ての細胞で均一に発現している訳ではないことが明らかとなった。

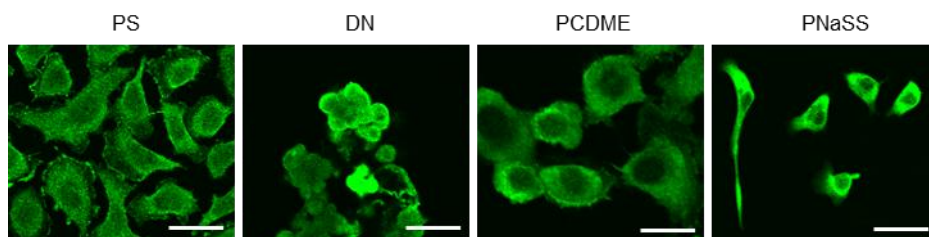


図 19 ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞における SLC13A5 の免疫蛍光染色
PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲル上で 0.5×10^4 個/mL の密度で 10 日間培養した ACC-MESO-4 細胞を抗 SLC13A5 抗体で染色した。SLC13A5 の細胞膜および細胞質での発現を示す。Scale : 50 μ m。

4. PNaSS-SN ゲル上培養細胞の *in vivo* 腫瘍形成能の評価

PNaSS-SN ゲル上培養中皮腫細胞においても、幹細胞マーカーの発現増加の他に *in vivo* 腫瘍形成能力を獲得しているかを検討した。中皮細胞にとって、中皮細胞の存在しない背部皮下よりも、生理的な環境で中皮に覆われた腹膜の直下（壁側腹膜と筋層の間の間質）に中皮腫細胞株を移植した。ハイドロゲルはウェスタンブロッティングで SLC13A5 蛋白の発現量が最も高かった PNaSS-SN ゲルを選択し、コントロールには PS ディッシュを用いた。マウス生体内で腫瘍を可視化するために、予め tdTOMATO-Luc2 を安定発現させた ACC-MESO-4 細胞および MSTO-211H 細胞を作製し、野生型と同様にゲル上培養により幹細胞マーカー遺伝子の発現が誘導されることを確認した（図 20）。

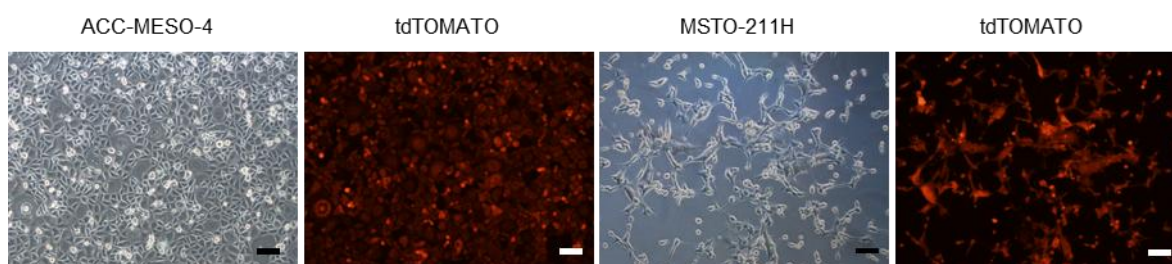


図 20 tdTOMATO-Luc2 の安定発現の確認
PS ディッシュ上で培養した ACC-MESO-4 細胞と MSTO-211H 細胞の位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡での観察像を示す。Scale : 100 μ m。

当時、準備できる PNaSS-SN ゲルの枚数に限りがあったため、十分量の細胞を得るために培養条件を 1×10^5 個/mL の密度で 3 日間とした。ヌードマウスの腹部正中を麻酔下で切開し、腹膜直下の腹壁に PS ディッシュ、PNaSS-SN ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞 5×10^4 個、MSTO-211H 細胞 1×10^3 個をそれぞれ移植した（n=4）。腹腔内の腫瘍形成は、*in vivo* ルシフェリンを腹腔内投与し、IVIS

imaging system にて発光強度（total photon 数）を計測することにより評価した。その結果、ACC-MESO-4 細胞では 5 週目に PS ディッシュで 2/4 匹、 PNaSS-SN ゲルで 3/4 匹に発光強度の増加が認められた（図 21、 $P=0.626937$ ）。また、MSTO-211H 細胞は 7 週目に PNaSS-SN ゲルで 2/4 匹の発光増強を認めた（図 22、 $P=0.044037$ ）。PS ディッシュには発光は認められなかった。このことから、PNaSS-SN ゲル上培養細胞は PS ディッシュ上培養細胞と比較して早期の腫瘍形成を可能にすることが示唆された。なお、MSTO-211H 細胞の発光分布は線状ないし帯状で、腹膜の輪郭に類似しているのに対し、ACC-MESO-4 細胞の発光分布は球状で、移植した部位に局限して見られた。ACC-MESO-4 細胞の分布が移植部からほとんど変化していないことから、ACC-MESO-4 細胞は MSTO-211H 細胞と比べて遊走しにくい状態にあったと推察される。分注時点では個々の細胞が分散していることを確認しているが、細胞数が多いために移植後に凝集した可能性が考えられた。ACC-MESO-4 細胞を移植したマウスの多くに腫瘍形成が確認された理由として、細胞間の相互作用が腫瘍形成に有利に働いた可能性が考えられる。

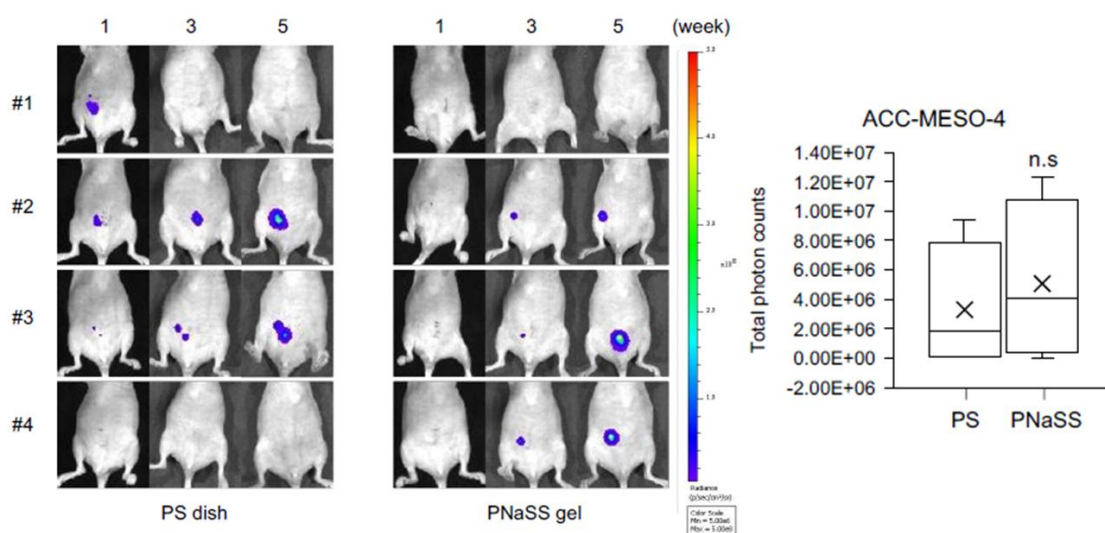


図 21 IVIS Spectrum imaging system による bioluminescence imaging

PS ディッシュ上、PNaSS-SN ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞を移植したヌードマウス（各群 $n=4$ ）の移植後 1 週間から 5 週間までの生物発光シグナルの観察（左）と発光強度（total photon 数）の比較（右）。

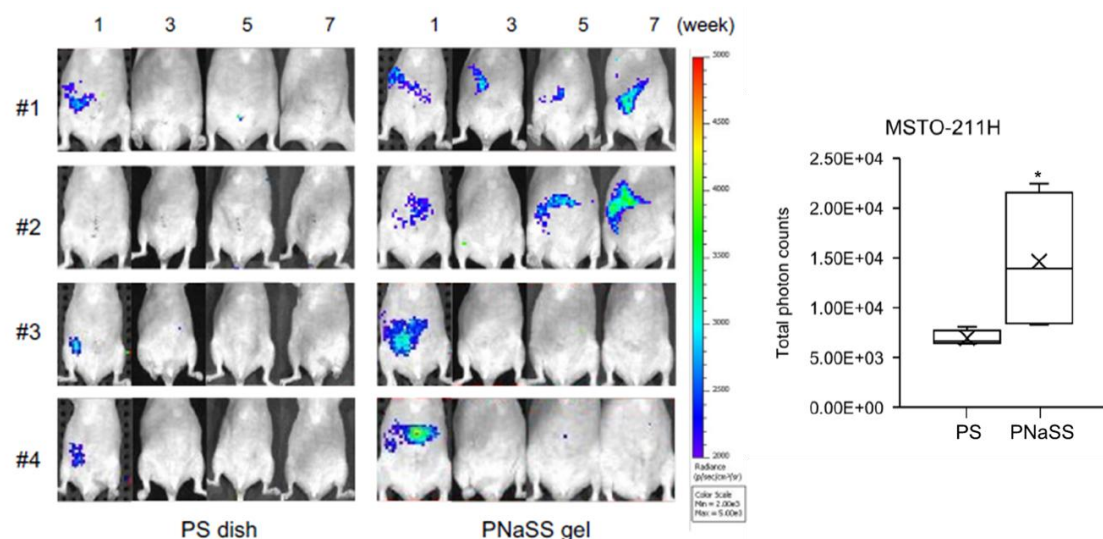


図 22 IVIS Spectrum imaging system による bioluminescence imaging

PS ディッシュ上、PNaSS-SN ゲル上培養した MSTO-211H 細胞を移植したヌードマウス（各群 n=4）の移植後 1 週間から 7 週間までの生物発光シグナルの観察（左）と発光強度（total photon 数）の比較（右）。

5. SLC13A5 阻害剤を用いた実験

BI01383298 はヒト NaCT に選択的な高親和性阻害剤であり、クエン酸の antagonist として作用する (Higuchi et al, 2020)。ゲルにより誘導された幹細胞性と SLC13A5/NaCT の関連性を調べるため、SLC13A5 阻害剤処理後の幹細胞マーカー (*SOX2*, *Nanog*) の発現変化を検討した。ACC-MESO-4 細胞、MSTO-211H 細胞を PS ディッシュ、PNaSS-SN ゲル上に 1.0×10^5 個/mL の密度で播種し、0 μ M (0.1% DMSO)、5 μ M、10 μ M の濃度になるように BI01383298 を添加した。培養後 48 時間で MSTO-211H 細胞を、72 時間で ACC-MESO-4 細胞の RNA を回収し real-time PCR を行った。PS ディッシュ、PNaSS ゲルいずれで培養した場合も、薬剤投与により ACC-MESO-4 細胞と MSTO-211H 細胞の幹細胞マーカーの発現抑制は認めなかった (図 23)。

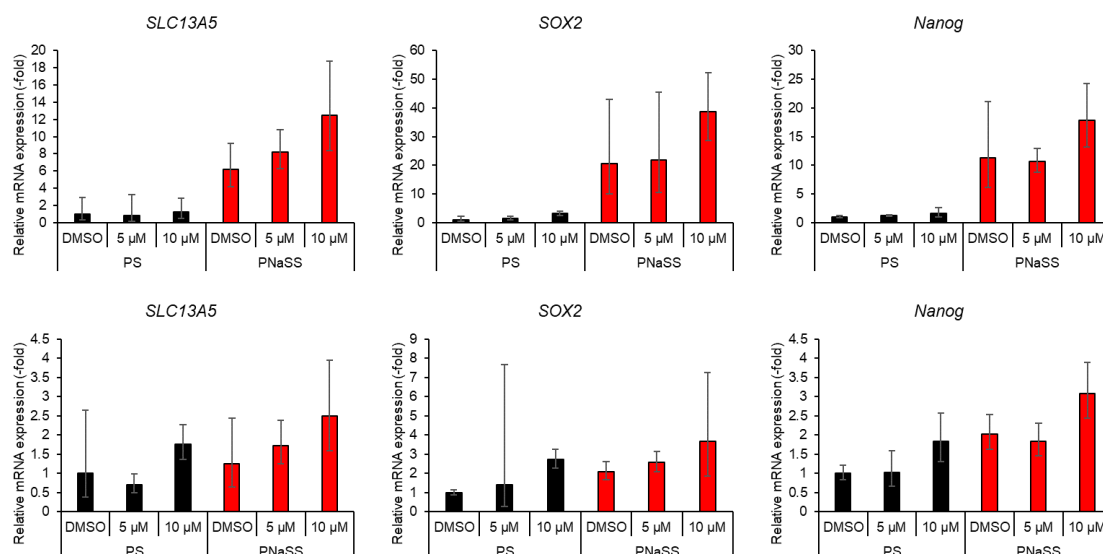


図 23 ハイドロゲルによるがん幹細胞誘導における SLC13A5/NaCT 関与の検討
PS ディッシュ上、PNaSS-SN ゲル上で培養した ACC-MESO-4 細胞（上段）、MSTO-211H 細胞（下段）に BI01383298 を添加した後の SLC13A5、SOX2、Nanog の発現量の変化を示す。横軸は PS ディッシュ、PNaSS-SN ゲル上細胞に添加した BI01383298 の濃度（0、5、10 μM）を示す。

6. PNaSS-SN ゲル上培養細胞の代謝解析

SLC13A5 はクエン酸輸送に関与する遺伝子であるため、ゲル上培養により SLC13A5 蛋白発現が増加することで TCA 回路が亢進し、酸化的リン酸化（OXPHOS）を刺激するのではないかと仮説を立てた。そこで、Seahorse XFp Extracellular Flux Analyzer を用いて PS ディッシュ上細胞と PNaSS-SN ゲル上細胞の OCR/ECAR 比、すなわちミトコンドリアにおける OXPHOS によるエネルギー産生と解糖系によるエネルギー産生の割合を比較することにした。細胞は PS ディッシュ上、PNaSS-SN ゲル上で 1.0×10^5 個/mL の密度で 3 日間培養した ACC-MESO-4 細胞、MSTO-211H 細胞を用いた。予想に反して、ACC-MESO-4 細胞、MSTO-211H 細胞いずれにおいても OCR/ECAR 比に有意差は認められなかった（図 24）。

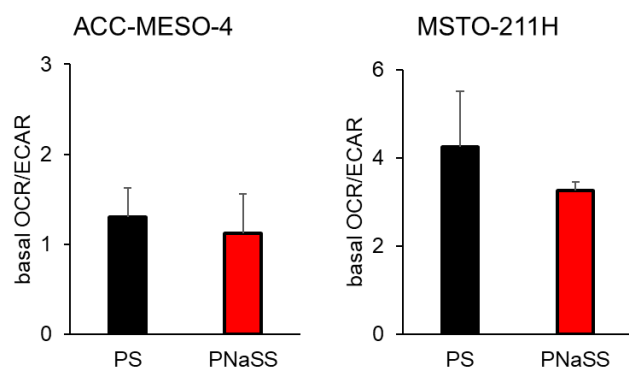


図 24 ACC-MESO-4 細胞と MSTO-211H 細胞の代謝解析

PS ディッシュ、PNaSS-SN ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞（左）と MSTO-211H 細胞（右）における OCR/ECAR 比を示す。

次に、細胞外クエン酸濃度を変えることで SLC13A5 蛋白の機能が促進する可能性を考えた。細胞外クエン酸濃度が高いと細胞毒性を発揮することが報告されているため (Xiaodong et al, 2009)、クエン酸の至適濃度を検討した。まず、PS ディッシュ上で ACC-MESO-4 細胞、MSTO-211H 細胞を培養し、細胞外クエン酸濃度を 0、1、2、3、4、5 mM になるように RPMI 培地にクエン酸を添加して 7 日間培養後、細胞数と viability を計算した。細胞を計数する際には、0.25% トリプシン-EDTA 溶液を用いて培養基から細胞を剥離し、トリパンブルーで染色した。結果、細胞数と viability はクエン酸濃度依存性に減少した (図 25)。SLC13A5 のコードする NaCT のミカエリス定数は 650 μ M であることから (Inoue et al, 2002)、1 mM 以上のクエン酸濃度において細胞毒性が現れるのは合理的と解釈できる。

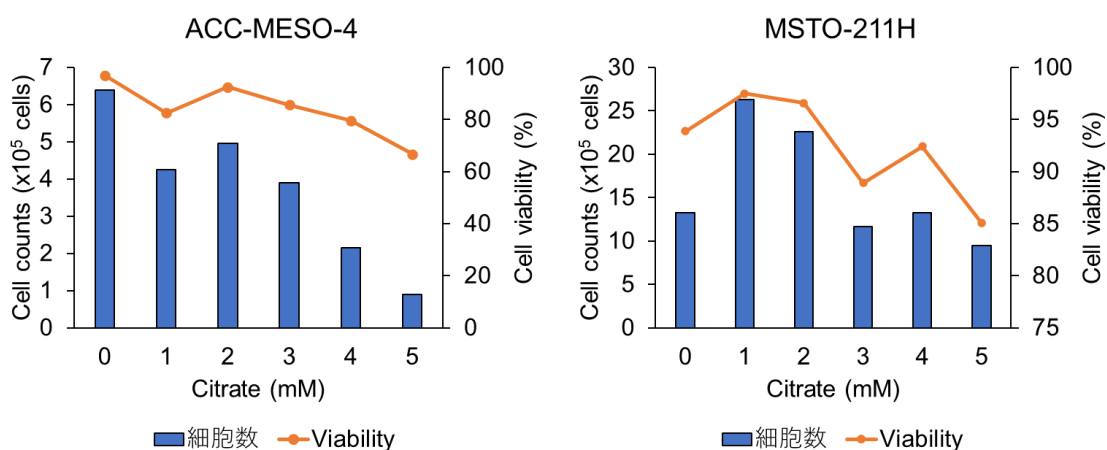


図 25 細胞外クエン酸濃度の上昇による細胞毒性の評価①

PS ディッシュ上で、クエン酸を添加した培地で 7 日間培養した ACC-MESO-4 細胞と MSTO-211H 細胞の細胞数と viability を示す。横軸はクエン酸濃度を示す。

そこで、ACC-MESO-4 細胞を PS ディッシュ、PNaSS-SN ゲル上に 1×10^5 個/mL の密度で播種し、細胞外クエン酸濃度を 0、100、250、500、750、1000 μM に調整して 3 日間培養後に viability を評価した。0 μM から 1000 μM の濃度では viability の変化は明らかではなかった。しかし興味深いことに、PS ディッシュ上よりも PNaSS-SN ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞の方が高い生存率を示した (図 26)。基材から回収する際の刺激も viability が低下する一因であるが、ACC-MESO-4 細胞は PS ディッシュに比べて PNaSS-SN ゲルに強く接着するため、剥離時の物理的刺激は PNaSS-SN ゲル上細胞に対する方がどうしても強くなる。このことから、PNaSS-SN ゲル上細胞の方が PS ディッシュ上細胞より細胞外ストレスに強い傾向にある可能性が示唆された。

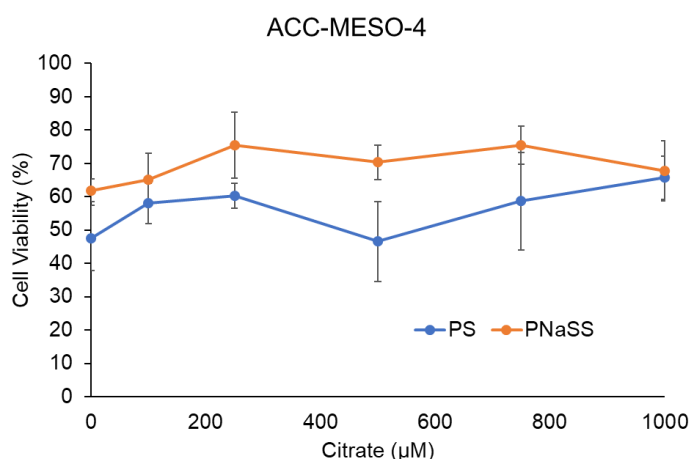


図 26 細胞外クエン酸濃度の上昇による細胞毒性の評価②

PS ディッシュおよび PNaSS-SN ゲル上で、クエン酸を添加した培地で 3 日間培養した ACC-MESO-4 細胞の viability を示す。

以上の予備実験からクエン酸濃度を 500 μM に設定し、改めて ACC-MESO-4 細胞、MSTO-211H 細胞の代謝解析を行った。PS ディッシュ上細胞と PNaSS-SN ゲル上細胞とで細胞外クエン酸に対する感受性の違いを調べるため、それぞれにおいてクエン酸濃度 0 μM と 500 μM の OCR/ECAR 比を算出した。しかし、PS ディッシュ上細胞、PNaSS ゲル上細胞のいずれにおいてもクエン酸濃度が 0 μM と 500 μM との間の OCR/ECAR 比に有意差を認めなかった (図 27)。

以上より、ゲル上培養により SLC13A5 蛋白が増加しても、NaCT としての機能の差を検出できるほど多くはない、もしくは別の因子により機能面は厳密に制御されていると推察される。

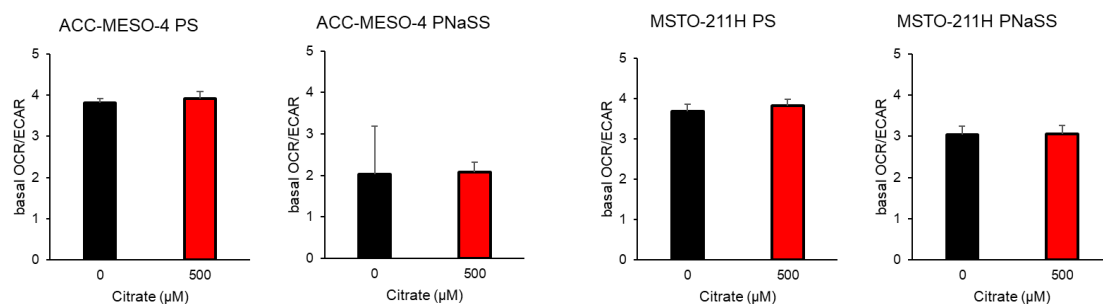


図 27 細胞外クエン酸濃度の変化に対する ACC-MESO-4 細胞と MSTO-211H 細胞の OCR/ECAR 比の変動

PS ディッシュ、PNaSS-SN ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞（左）と MSTO-211H 細胞（右）において、それぞれ細胞外クエン酸（500 μM）に対する OCR/ECAR 比の変動を示す。

【3】SLC13A5 の過剰発現細胞を用いた機能解析

1. SLC13A5 の一過性過剰発現

ゲル上培養により誘導される SLC13A5 は細胞間のばらつきや蛋白検出量に限界があるため、さらなる機能解析のために、SLC13A5 を過剰発現させた細胞株を作製することにした。SLC13A5 過剰発現ベクターと、empty control ベクターをそれぞれ ACC-MESO-4 細胞、MSTO-211H 細胞と、導入効率が良く内在性の SLC13A5 の発現がない HEK293T 細胞にトランスフェクションした。48 時間培養後、倒立顕微鏡（IX73, Olympus）にて緑色蛍光タンパク質の発現を観察したところ、トランスフェクション効率は HEK293T 細胞は 8 割程度、ACC-MESO-4 細胞は 5%未満、MSTO-211H 細胞は弱陽性も含めると半数程度であった（図 28）。なお、MSTO-211H 細胞と HEK293T 細胞において Flag の免疫蛍光染色を行うと、細胞膜に淡い陽性像が見られた（図 29）。

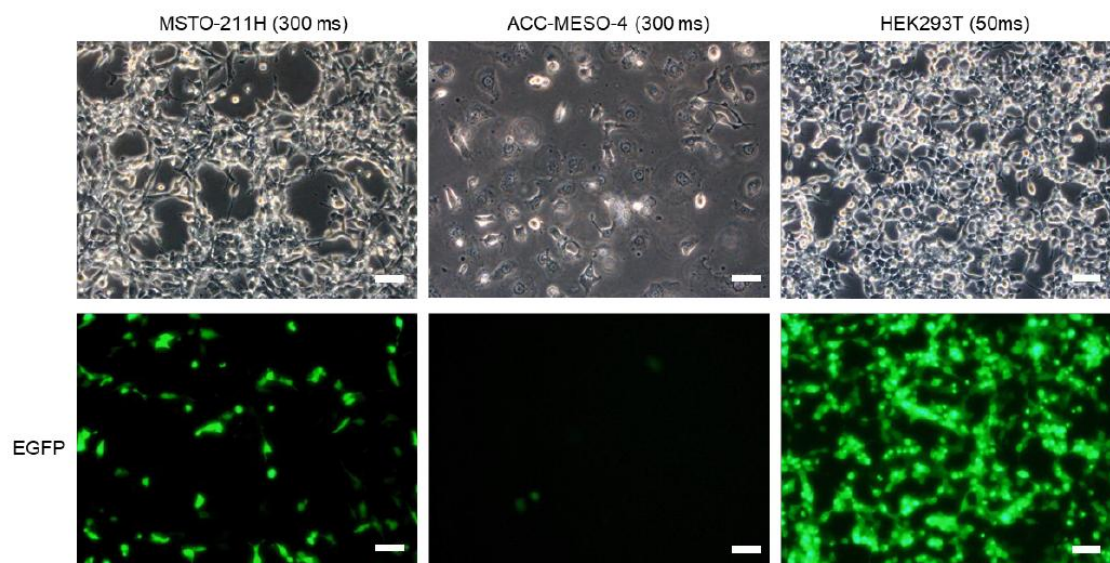


図 28 SLC13A5 一過性過剰発現細胞のトランスフェクション効率
SLC13A5 過剰発現ベクターを導入して 48 時間後の MSTO-211H 細胞、ACC-MESO-4 細胞および HEK293T 細胞の蛍光顕微鏡での観察像を示す。ベクターに組み込まれた EGFP により緑色蛍光タンパク質の発現を認める。() 内は露光時間を示す。Scale : 50 μ m。

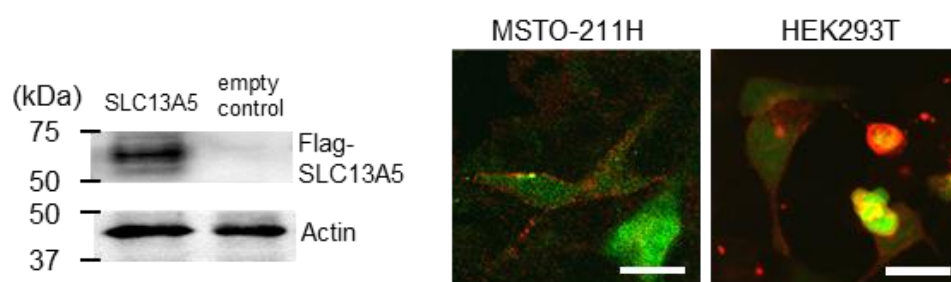


図 29 Flag 標識 SLC13A5 のウェスタンブロッティングと免疫蛍光染色
SLC13A5 過剰発現ベクターまたは empty control ベクターを導入して 48 時間後の HEK293T 細胞における Flag-SLC13A5 蛋白発現を示す (左)。導入後 48 時間の MSTO-211H 細胞および HEK293T 細胞の Flag の局在を示す。赤: Flag、緑: EGFP。Scale : 20 μ m。

2. SLC13A5 過剰発現細胞のシグナル解析

SLC13A5 蛋白が誘導するシグナルを調べるため、最も導入効率の良かった HEK293T 細胞を用いてウェスタンブロッティングを行った。肝細胞癌において SLC13A5 の下流分子として報告されている AMPK、phospho-AMPK、mTOR、phospho-mTOR、p53 や中皮腫幹細胞との関連が報告されている YAP/TAZ、phospho-YAP (Kandasamy et al, 2020) に加えて、ERK1/2、phospho-ERK1/2、SOX2、Actin を調べた。結果、SLC13A5 過剰発現 HEK293T 細胞では、コントロールと比較して有意に phospho-ERK1/2 と SOX2、phospho-YAP の発現が増加すること

が分かった (図 30)。この他 AKT、phospho-AKT、FAK、phospho-FAK、phospho-p38MAPK についてもウェスタンブロッティングを行ったが、明らかな変化は認められなかった。

ERK-SOX2 シグナル伝達の活性化は、胃癌において幹細胞性や転移を増強させ (Lu et al, 2021)、肺癌においては細胞増殖、上皮間葉系移行 (EMT)、転移を促進することが報告されている (Wang et al, 2018)。また、乳癌では ERK の活性化は YAP の活性化をもたらし、細胞増殖を誘導することが報告されている (Qin et al, 2019)。このことから、SLC13A5 の発現増加により ERK-SOX2 シグナルや ERK-YAP シグナルが活性化された可能性が示唆された。肝細胞癌においては、SLC13A5 をノックダウンしてクエン酸流入を減少させることにより、AMPK の抑制が解除され、mTOR シグナル伝達を介した細胞増殖を低下させることが報告されているが (Kopel et al, 2020)、phospho-AMPK や phospho-mTOR の発現量の変化は認められなかった。このことから、SLC13A5 は既報とは別に未知のシグナル伝達を介して ERK1/2 を活性化している可能性が示唆される。

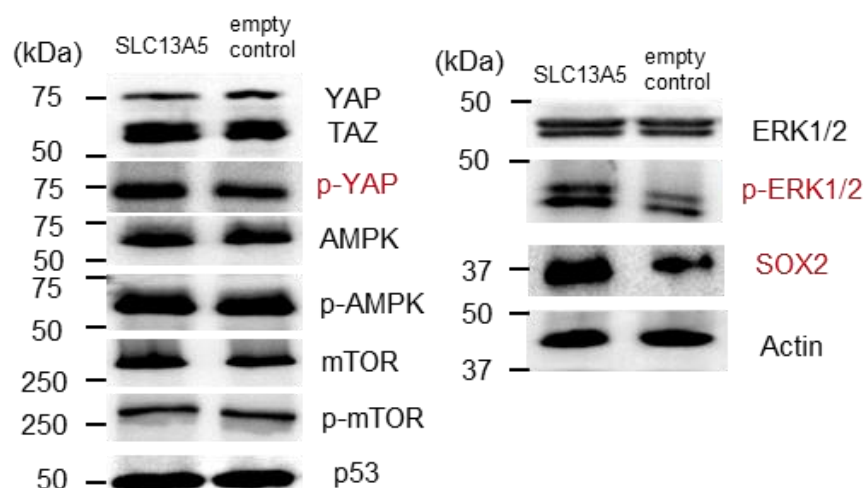


図 30 SLC13A5 一過性過剰発現 HEK293T 細胞のウェスタンブロッティング
左が過剰発現群、右がコントロール群。YAP/TAZ、phospho-YAP、AMPK-alpha、phospho-AMPK-alpha、mTOR、phospho-mTOR、p53、ERK1/2、phospho-ERK1/2、SOX2、Actin の蛋白発現を示す。

3. SLC13A5 過剰発現細胞における代謝解析

SLC13A5 のエネルギー代謝への関与を調べるため、SLC13A5 を一過性過剰発現させた HEK293T 細胞と empty control ベクターを導入した HEK293T 細胞を用いて、それぞれの OCR、ECAR を測定した。結果、過剰発現細胞において、基礎呼吸活性と最大呼吸活性の有意な亢進を認め、OCR/ECAR 比も有意に増加し酸化リン酸化 (OXPHOS) へのシフトが見られた (図 31)。このことから、

SLC13A5 の高発現により OXPHOS が刺激され、がん細胞のエネルギー代謝をより CSCs のそれに近づけることが示唆された。

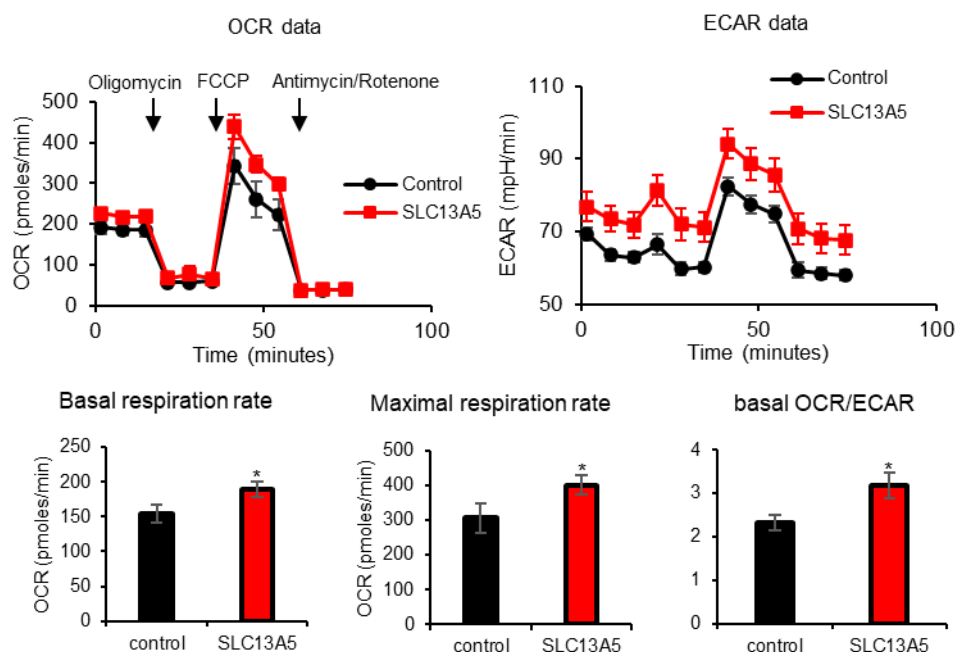


図 31 SLC13A5 一過性過剰発現 HEK293T 細胞の代謝解析

コントロール群と比較した過剰発現群の基礎呼吸活性、最大呼吸活性、OCR/ECAR 比の変動を示す。* : $P < 0.05$ 。

4. SLC13A5 過剰発現細胞における薬剤耐性の評価

中皮腫の化学療法に用いられるシスプラチンに対する薬剤感受性を調べるため、SLC13A5 を一過性過剰発現させた MSTO-211H 細胞を用いて CCK-8 アッセイを行った。コントロールには empty control ベクターを導入した MSTO-211H 細胞を用いた。結果、過剰発現群はコントロール群よりも高い IC₅₀ を示し、シスプラチンに対する抵抗性を示した（過剰発現群 : IC₅₀ = 24.0、コントロール群 : IC₅₀ = 14.0）。1 μ M のシスプラチンを添加した場合に、最も有意に細胞生存率の上昇が見られた ($P = 0.031283$ 、図 32)。

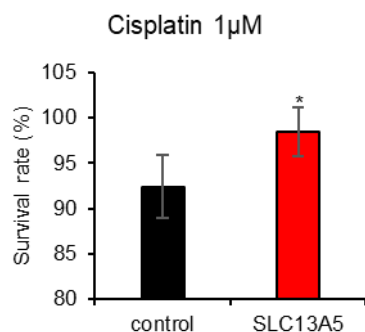


図 32 SLC13A5 一過性過剰発現 MSTO-211H 細胞の薬剤感受性試験

1 μ M のシスプラチン投与後 24 時間時点における、コントロール群と過剰発現群の細胞生存率を示す。* : $P < 0.05$ 。

【4】SLC13A5 のノックダウンによる機能解析

SLC13A5 阻害実験と過剰発現実験により、SLC13A5 の発現増加により SOX2 の発現を促進するが、一方で NaCT の機能が阻害されても幹細胞マーカー (SOX2、*Nanog*) の発現に変動は見られないことが示された。すなわち、SLC13A5 は SOX2 発現や代謝、薬剤耐性といった中皮腫幹細胞としての性質を強化する一方で、幹細胞マーカーの発現を維持するのに必ずしも不可欠な因子ではないことを示唆している。そこで、SLC13A5 のノックダウンが中皮腫細胞の幹細胞性や代謝にどの程度影響を与えうるのかを調べることにした。

1. 中皮腫細胞株の SLC13A5 ノックダウン

細胞株は過剰発現実験において比較的高いトランスフェクション効率を示した MSTO-211H 細胞を選択した。4 種の siRNA (Hs_SLC13A5_7、Hs_SLC13A5_8、Hs_SLC13A5_9、Hs_SLC13A5_10) 各 5 nM と、それら全種を混合したもの、および negative control siRNA を MSTO-211H 細胞にトランスフェクションし、48 時間培養後に総 RNA を抽出して real-time PCR を行った。結果、Hs_SLC13A5_9 を導入した細胞において最も SLC13A5 の発現低下が見られたが、ノックダウン効率は 40%程度が限界であった (図 33)。

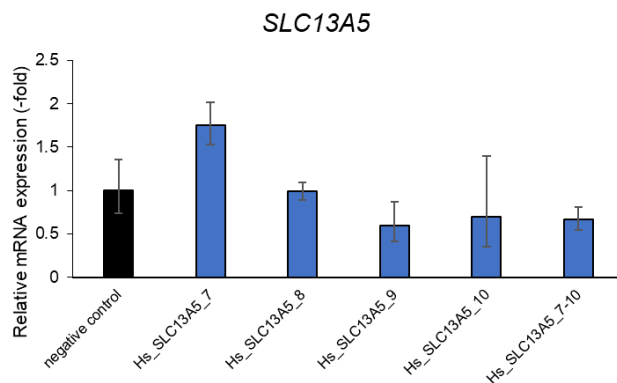


図 33 4 種の siRNA による *SLC13A5* の遺伝子発現の抑制効果の比較

横軸の一番左は negative control siRNA を導入した細胞で、中央 4 種の異なる siRNA を導入した *SLC13A5* ノックダウン細胞を示す。一番右は 4 種の siRNA 全てを混合して導入した *SLC13A5* ノックダウン細胞を示す。

次に、最も効果的にノックダウンするために、siRNA の至適濃度を検討した。Hs_SLC13A5_9 を 10、20、30 nM に増やして濃度の違いによる *SLC13A5* の遺伝子発現の変動を調べた。結果、通常培養した MSTO-211H 細胞と比較して、negative control 群の *SLC13A5* の発現はいずれも低下した。また、10 nM 以上では Hs_SLC13A5_9 による *SLC13A5* の発現抑制効果は明らかではなかった (図 34)。したがって、以降の検討は 5 nM で行うことにした。

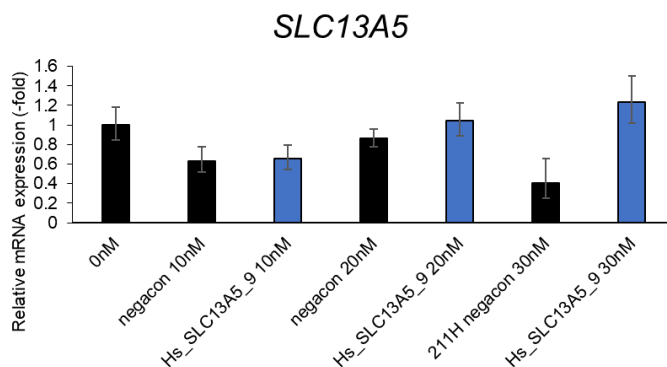


図 34 Hs_SLC13A5_9 の濃度変化による *SLC13A5* の遺伝子発現の抑制効果の比較

横軸の 0 nM は PS ディッシュ上で通常培養した MSTO-211H 細胞を表す。negacon : negative control siRNA を導入した細胞、Hs_SLC13A5_9 : *SLC13A5* ノックダウン細胞を示し、それぞれ 10、20、30 nM の濃度で siRNA を導入したものを比較した。

2. *SLC13A5* ノックダウン細胞における幹細胞マーカーの発現検討

5 nM の Hs_SLC13A5_9 もしくは negative control siRNA を導入した MSTO-211H 細胞を用いて real-time PCR を行い、幹細胞マーカー (*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*) の発現変動を調べた。比較対象として、PS ディッシュ、PNaSS-SN ゲル上で 3 日間培養した MSTO-211H 細胞を用いた。結果、*SLC13A5* のノックダウンでは幹細胞マーカーの発現は抑制されなかった (図 35)。むしろ PS ディッシュ上で通常培養した細胞や、negative control を導入した細胞よりも高い発現を示し、トランスフェクションそのものの影響を受けて幹細胞マーカーの発現が亢進している可能性が考えられた。ノックダウン効率が不十分であることと併せ、*SLC13A5* と幹細胞性との因果関係を評価することは極めて困難であった。

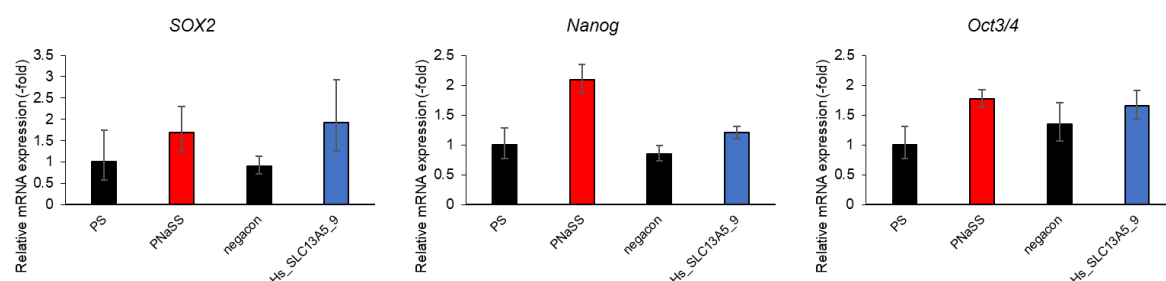


図 35 *SLC13A5* をノックダウンした MSTO-211H 細胞における幹細胞マーカー (*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*) の発現変動

横軸は PS : PS ディッシュ上 (通常培養) 細胞、PNaSS : PNaSS-SN ゲル上細胞、negacon : negative control siRNA を導入した細胞、Hs_SLC13A5_9 : *SLC13A5* ノックダウン細胞を示す。

3. *SLC13A5* ノックダウン細胞における代謝解析

次に、*SLC13A5* のノックダウンが中皮腫細胞のエネルギー産生に影響を与える可能性について検討した。5 nM の Hs_SLC13A5_9 もしくは negative control siRNA を導入した MSTO-211H 細胞を用いてそれぞれの OCR、ECAR を測定した。結果、*SLC13A5* のノックダウン細胞とコントロール群では、OCR/ECAR 比に有意差を認めず、エネルギー代謝に明らかな変動を認めなかった (図 36)。

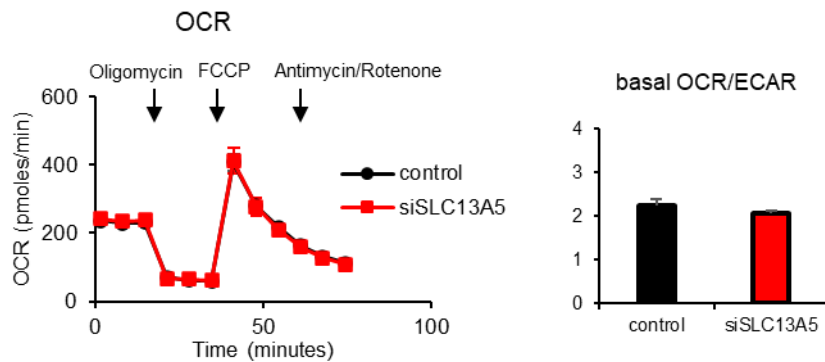


図 36 *SLC13A5* ノックダウン細胞とコントロール群の OCR の変動および OCR/ECAR 比
黒色が negative control 細胞、赤色が *SLC13A5* ノックダウン細胞を示す。

【5】臨床検体における候補分子の発現検討

1. 公開データベースを用いた候補分子の発現と生存率に関する検討

オンラインツール GEPIA (URL : <http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) を用いて TCGA データベースから 87 名の患者の生存解析を行い、3 つの候補分子の遺伝子発現と中皮腫患者の予後との関連を調べた。*HCRTR2* は上位 50% の高発現群と下位 50% の発現群、*SLC13A5* と *TMEM151B* は上位 75% の高発現群と下位 25% の低発現群とでそれぞれ比較したが、各群の間に有意差は見られなかった (図 37)。さらに、211 人の患者を含む Bueno コホートでも生存解析を行った。最も差が顕著となるように候補分子の発現量のカットオフ値を最適化すると、上皮型中皮腫における *SLC13A5* 高発現群では、わずかに予後不良の傾向が見られた。一方、二相型中皮腫においては *HCRTR2*、*SLC13A5*、*TMEM151B* いずれの高発現群も有意に予後良好であった (図 38)。

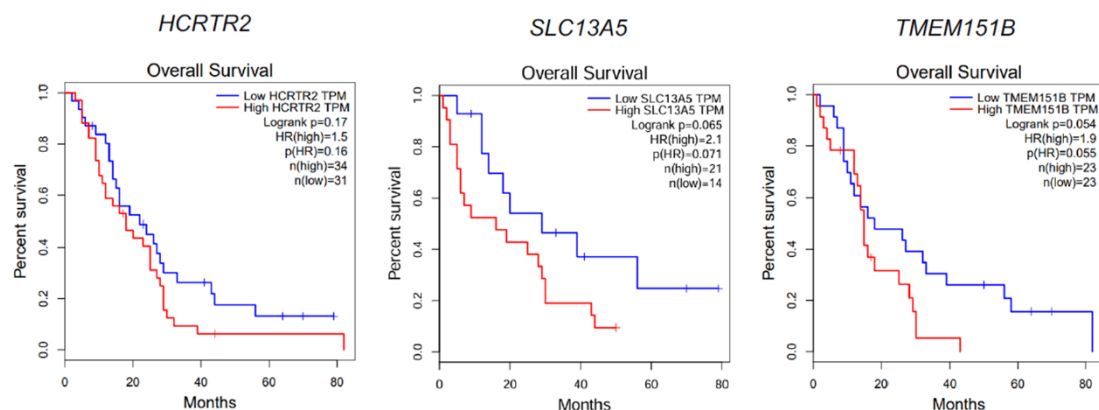


図 37 TCGA データベースを用いた生存解析
HCRTR2 の発現を上位 50%、下位 50% の 2 群に、*SLC13A5* と *TMEM151B* の発現を上位 75%、下位 25% の 2 群に分けた Kaplan-Meier 曲線を示す。

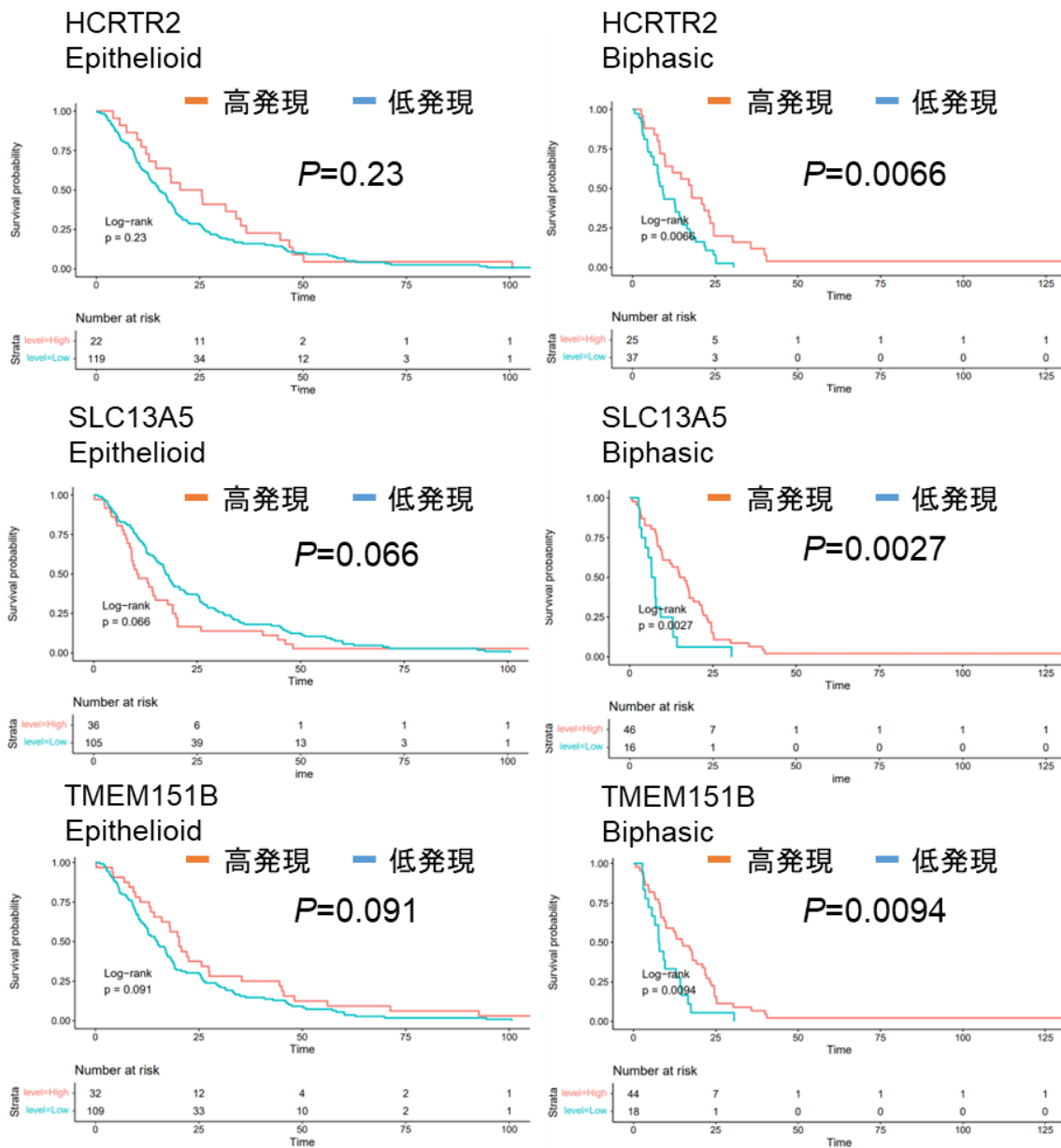


図 38 Bueno コホートを用いた生存解析
 候補分子 (*HCRTR2*、*SLC13A5*、*TMEM151B*) の発現量のカットオフ値を最適化して 2 群に分けた Kaplan-Meier 曲線を示す。Epithelioid : 上皮型中皮腫 (左)、Biphasic : 二相型中皮腫 (右) の症例に分けて解析した。

2. scRNA-seq データベースを用いた臨床検体における遺伝子発現の解析

今回同定した 3 分子 (*HCRTR2*、*SLC13A5*、*TMEM151B*) のヒトの臨床検体における実際の発現を調べるために、Knelson らの scRNA-seq 遺伝子発現データセットを用い、クラスタリングを行った。結果、UMAP クラスタリングは、腫瘍細胞、線維芽細胞、免疫細胞集団の幅広い発現を示した (図 39)。メソセリン (*MSLN*)

陽性腫瘍細胞は2種類のクラスター (Tumor Cluster 1, Tumor Cluster 2) に大別され、Tumor Cluster 1 には正常中皮にも発現する *CLDN15*、*CA9*、*HP*、*MST1*、*RYR2* が高発現を示すという特徴が見られた (図 40 の*)。興味深いことに、*SLC13A5*、*TMEM151B*、*HCRT2* と、幹細胞マーカーである *SOX2*、*Oct4 (POU5F1)* の発現はすべて Tumor Cluster 1 に属していた (図 40 の**)。発現量はごくわずかで、腫瘍全体に占める割合は非常に少ない。しかし、中皮腫に含まれる中皮腫幹細胞の割合が 0.27-1.32% であったという報告を踏まえると (Kai et al, 2010)、これらの分子が中皮腫幹細胞特異的に発現していることを支持する所見といえる。

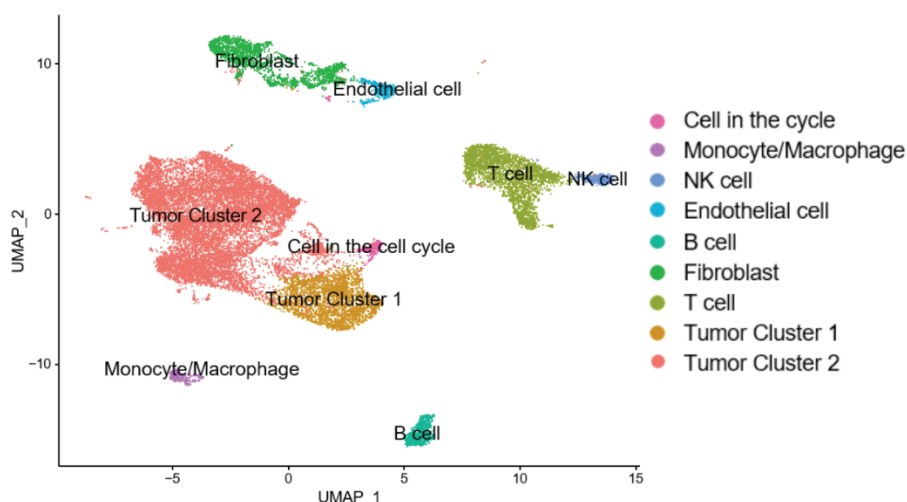


図 39 scRNA-seq 遺伝子発現データセットを用いた UMAP

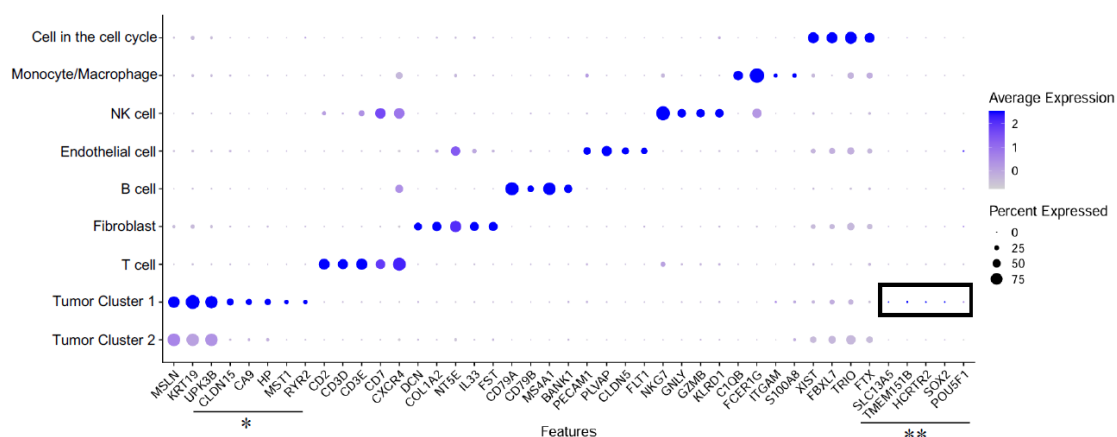


図 40 scRNA-seq 遺伝子発現データセットを用いたクラスター分類
各クラスターを代表する遺伝子群の特徴から「Tumor Cluster 1」、「Tumor Cluster 2」、「Fibroblast」、「Endothelial cell」、「T cell」、「NK cell」、「B cell」、「Monocyte / Macrophage」と名付けた。

3. 中皮腫臨床検体を用いた SLC13A5 の発現解析

自験例の中皮腫臨床検体においても *SLC13A5* の遺伝子発現が見られることを確認するため、2008 年から 2023 年までの胸膜中皮腫患者の剖検症例 5 例の FFPE 検体から RNA 抽出を試みた。剖検症例であるため、死後変化や固定、標本作製時の修飾により、正常中皮はほとんど脱落していたため、5 例中 4 例は正常胸膜の採取が困難であった。そこで、同一患者の各臓器標本を確認し、中皮細胞の残存を認めた腸管漿膜や心膜を代替のコントロールとして採取した（表 4）。各種検体から抽出された RNA（各量 17-20 μ L）の濃度を示す（表 6）。

表 6 中皮腫臨床検体から抽出された RNA 濃度

Case	RNA (ng/ μ L)	
	非腫瘍	腫瘍
1	53.8	269.5
2	30.0	464.8
3	27.6	465.6
4	28.2	971
5	96.3	1312.1

そこで、real-time PCR を行うのに十分な量の RNA が抽出されたと考え、採取量の多かった Case 5 の腫瘍部分を用いて、SLC13A5 プライマー①（表 5）で real-time PCR を行った。しかし、同一プライマーでありながら、中皮腫細胞株の real-time PCR で得られたものと異なる melt curve および Tm 値（融解温度）が得られた（図 41 左上）。Melt curve および Tm 値が異なる原因として、検体採取から長時間経過していたことで RNA が断片化し、正常に増幅していない可能性が考えられた。そこで、real-time PCR を終えた後の ACC-MESO-4 細胞や臨床検体の PCR product を、2.5%アガロースゲルで電気泳動した。さらに、断片化した RNA の検出を期待して primer product の短い SLC13A5 プライマー3 種（②、③、④）においても、real-time PCR および PCR product の電気泳動を試みた。①では、Case 5 で生成された primer product は 50 bp 程度で、ACC-MESO-4 細胞で検出されたもの（184 bp）とは異なるものであった（図 42）。②では、ACC-MESO-4 細胞と Case 4 で生成された primer product はいずれも期待した 56 bp 付近に検出されたが、melt curve は明瞭な 2 峰性を示し、多数の primer dimer の混在が示唆された（図 41 右上、図 42）。③、④では、いずれも ACC-MESO-4 細胞では単峰性であったが、Case 1 では多峰性の melt curve が見られた（図 41 左下、右下）。ACC-MESO-4 細胞と Case 1 で生成された

primer product はいずれも期待した 63 bp、68 bp 付近に検出されたが、Case 1 では同時に 50 bp 以下まで淡いバンドが広く分布し、非特異的な配列を検出している可能性が考えられた。Sample の入っていない primer のみの primer product を電気泳動すると、Case 1 では 50 bp 付近に強いバンドが検出され、多数の primer dimer が形成されていることが示された（図 43）。

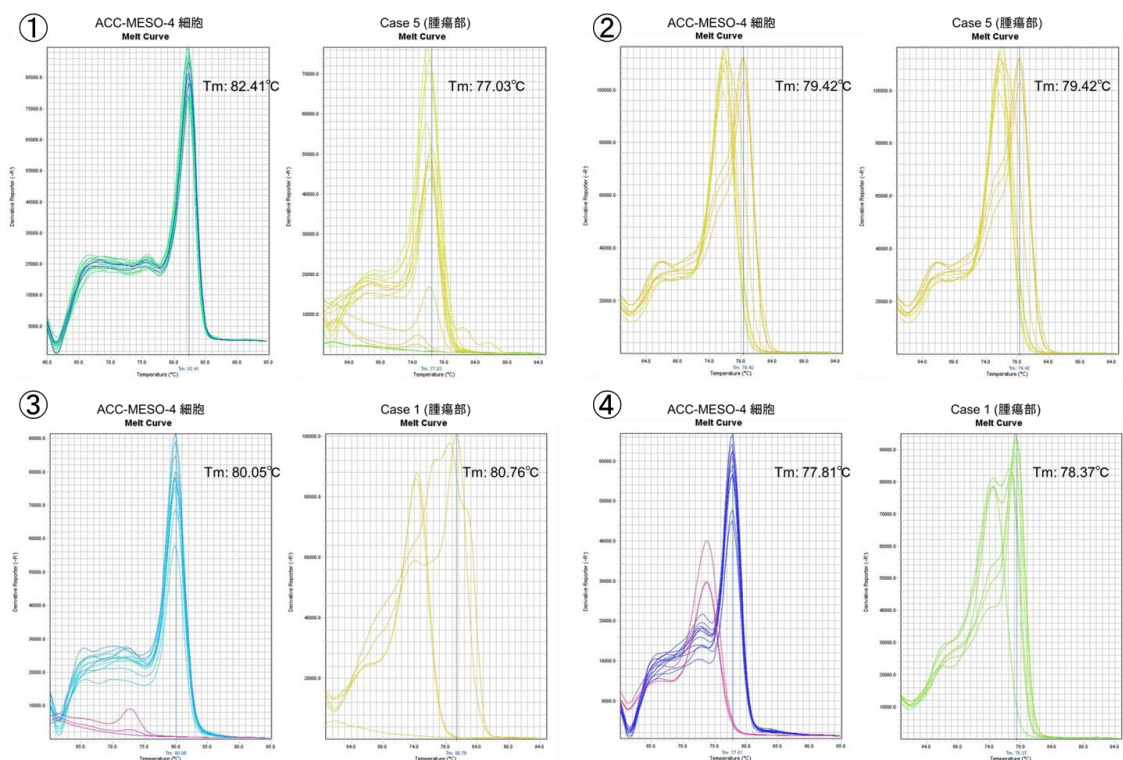


図 41 ACC-MESO-4 細胞と Case 1, Case 5 の腫瘍部から抽出した RNA を用いた real-time PCR の melt curve
 左上は SLC13A5 プライマー①、右上は②、左下は③、右下は④（表 5）を使用した。

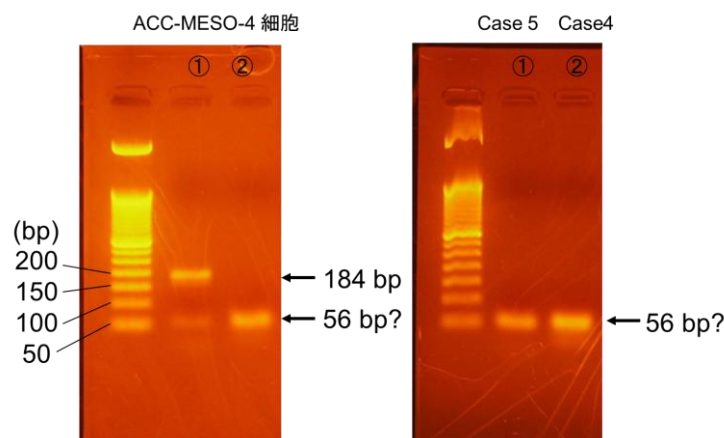


図 42 アガロース電気泳動による primer の評価

ACC-MESO-4 細胞と Case 4, Case 5 の腫瘍部から抽出した RNA を用いた real-time PCR の primer product をアガロースゲル電気泳動したものを示す。左のレーンは SLC13A5 プライマー① (184bp)、右のレーンはプライマー② (56bp) (表 5)。

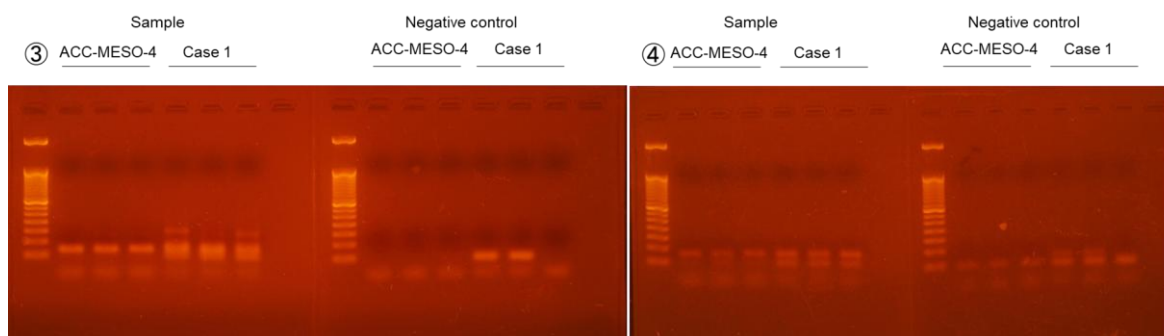


図 43 アガロース電気泳動による primer の評価②

ACC-MESO-4 細胞と Case 1 の腫瘍部から抽出した RNA を用いた real-time PCR の primer product をアガロースゲル電気泳動したものを示す。左の画像は SLC13A5 プライマー③ (63bp)、右はプライマー④ (68bp) で (表 5)、それぞれ sample と negative control の primer product を 3 ウェル分採取し、それぞれ 3 レーンに流した。

以上、臨床検体から採取された RNA は real-time PCR で評価することができなかった。なお、これらの検体を用いて抗 SLC13A5 抗体 (sc-293277, Santa Cruz Biotechnology) の免疫組織化学も試みたが、標本の状態不良や抗体の特異性の問題により、ほとんどの症例で腫瘍細胞の細胞質だけでなく、背景の炎症細胞や血管内皮細胞などにも淡く染色され、有意な陽性像を判定することができなかった。Case 1 のみ、NaCT の発現部位である細胞膜に一部陽性像が見られた (図 44)。

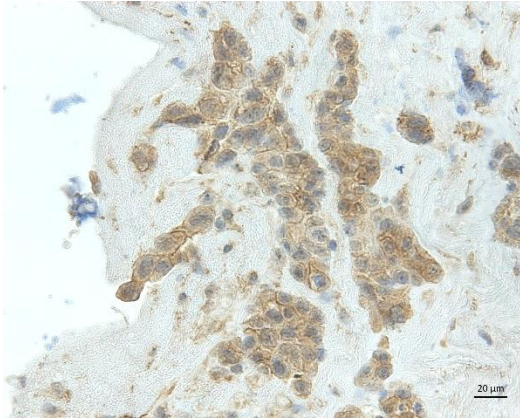


図 44 Case 1 の SLC13A5 免疫組織化学

考察

本研究では、ヒト中皮腫細胞株をハイドロゲル上で培養することにより、汎幹細胞マーカー (*SOX2*、*Nanog*、*Oct3/4*)、およびこれまで中皮腫幹細胞との関連が報告されている 5 分子 (*CD44*、*ALDH1A2*、*ALDH1A3*、*CD9*、*CD26*) の相対的遺伝子発現量が増加し、早期腫瘍形成能を獲得することを明らかにした。中皮腫幹細胞の表現型として、スフェロイド形成やマトリゲル浸潤、遊走、腫瘍形成、血管新生、上皮間葉系移行、幹細胞性の増強がある (Kandasamy et al, 2020)。本研究では、特に代表的な特徴といえる幹細胞性の増強を、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲルいずれを用いても誘導することが可能であった。さらに、PAMPS/PDMAAm-DN ゲルではスフェロイドの形成を認め、PNaSS-SN ゲルでは ACC-MESO-4 細胞、MSTO-211H 細胞において PS ディッシュに対して腫瘍形成能の優位性を示した。なお、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞のマイクロアレイ解析、エンリッチメント解析により、Molecular Signatures Database (MSigDB) pathway database において上 (中) 皮間葉移行にかかわる遺伝子の発現が亢進していることが示唆された (図 45)。実際 real-time PCR により、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞において複数の上 (中) 皮間葉移行関連分子の遺伝子発現が有意に増加することが確認された (図 46)。以上の結果を総合すると、ヒト中皮腫細胞株をハイドロゲル上で培養することにより、いくつかの中皮腫幹細胞の表現型を有する、中皮腫幹細胞と非常に相同性の高い細胞群を創出することができたと考えられる。このことは当教室で開発したハイドロゲルを用いた手法が、他の癌種と同様にヒト中皮腫細胞株においても有効であることを示し、特に簡便さという点では従来の中皮腫幹細胞抽出法に比べて明らかに優位性があるといえる。ただし、誘導される幹細胞性は可逆的であり、中皮腫細胞株において幹細胞性を持続させるにはハイドロゲルからの刺激のみではなく、幹細胞用培地など他の培養条件の追加を検討する必要がある。また、SLC13A5 の免疫細胞化学や免疫蛍光染色の結果から、誘導される遺伝子や蛋白の発現量は細胞毎に異なることが示唆され、ハイドロゲルで誘導した中皮腫幹細胞様細胞は不均一性に富んだ細胞集団であることも明らかとなった。Real-time PCR で汎幹細胞マーカーの相対的発現量が試行回数によって 1.2 倍程度から 100 倍以上までのばらつきが認められたことも、細胞の不均一性に依存する可能性がある。同一の細胞株内にも分化段階や細胞周期に多少のばらつきがあると想定され、それらが HARP 現象の程度に影響したと推察されるが、従来の中皮腫幹細胞抽出法において幹細胞性の可塑性を検討した報告はないため、今後より詳細な比較検討が望まれる。

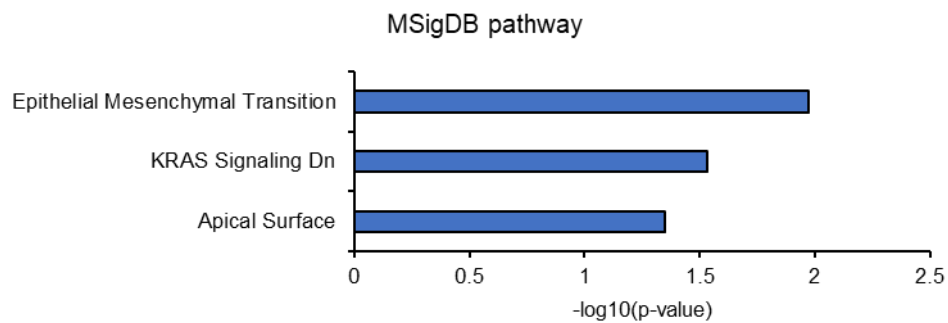


図 45 マイクロアレイ解析にて発現増加を確認した遺伝子のエンリッチメント解析② MSigDB pathway database による解析結果を示す。

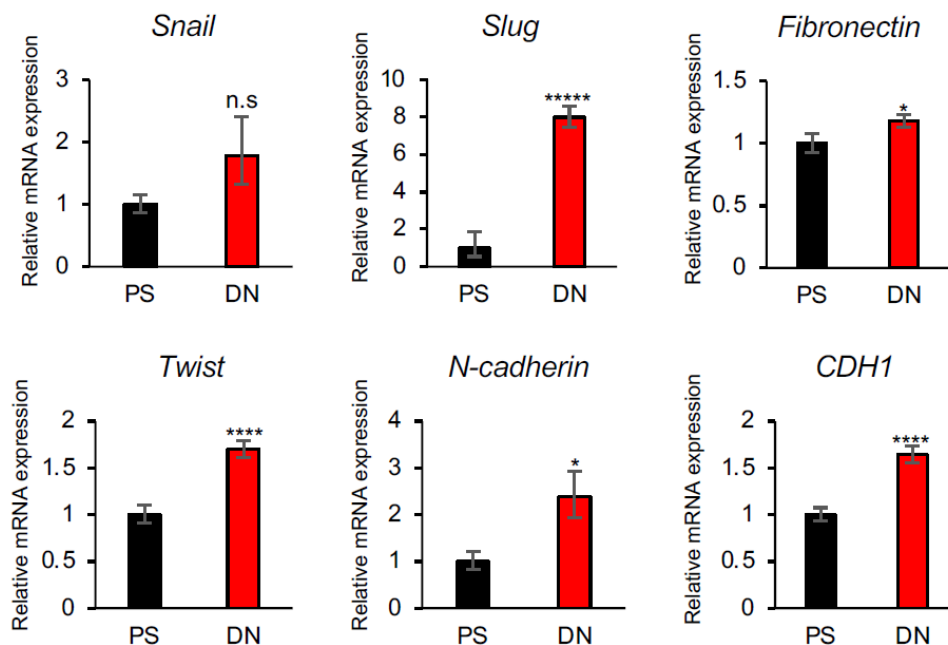


図 46 Real-time PCR による上（中）皮間葉移行関連分子の遺伝子発現
PS ディッシュ、PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上で 3 日間培養した ACC-MESO-4 細胞における上（中）皮間葉移行関連分子 (*Snail*, *Slug*, *Fibronectin*, *Twist*, *N-cadherin*, *CDH1*) の発現量の変化。2 群間の比較は PS ディッシュをコントロールとして t 検定を行った。横軸は培養基材の種類 (PS ディッシュと DN ゲル) を示す。*: $P < 0.05$, ****: $P < 0.0001$, および*****: $P < 0.0005$ 。

本研究により、ハイドロゲルで誘導した中皮腫幹細胞様細胞に特異的に発現する 3 遺伝子 (*SLC13A5*, *TMEM151B*, *HCRTR2*) を同定した。4 種のヒト中皮腫細胞株で PAMPS/PDMAAm-DN ゲル、PCDME-SN ゲル、PNaSS-SN ゲルにより誘導されるこれら 3 遺伝子の発現増加パターンは、汎幹細胞マーカー *SOX2*、

Nanog、*Oct3/4* の発現パターンと強い相関を示すことから、3 分子と幹細胞性との関連性が強いことが示唆された (スピアマンの順位相関係数: $\rho=1$)。なお、ACC-MESO-4 細胞で 3 種のハイドロゲルにより誘導される中皮腫幹細胞関連遺伝子と汎幹細胞マーカーの発現パターンを比較すると、*ALDH1A2*、*ALDH1A3*、*CD9* が汎幹細胞マーカーと特に強い相関を示した (スピアマンの順位相関係数: $\rho=1$)。今回同定した 3 分子のうち、*SLC13A5* は蛋白の発現増加も認められた。免疫細胞化学および免疫蛍光染色における染色強度の多彩さは、中皮腫幹細胞様細胞に不均一性があることを支持する所見である。PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上、PCDME-SN ゲル上、PNaSS-SN ゲル上培養した ACC-MESO-4 細胞で誘導される *SLC13A5* の相対的発現量は、PS ディッシュ上と比べてそれぞれ 129.5 倍、26.0 倍、64.8 倍であったが、ウエスタンブロット法による蛋白発現量はそれぞれ 4.7 倍、4.6 倍、7.4 倍とそれほど多いとは言えない。また、免疫細胞化学による各種ゲル上培養細胞の *SLC13A5* 陽性面積割合は、PS ディッシュ上の 4.3% に対してそれぞれ 7.3%、8.4%、13.5% と 2-3 倍程度の増加にとどまった。このことから、*SLC13A5* の遺伝子発現はハイドロゲルにより数倍から多い時には 100 倍以上誘導されるにもかかわらず、蛋白の発現増加量はいずれのゲルでも数倍前後に収斂している。一般に mRNA から蛋白質に翻訳されるまでには mRNA の核外移行やリボソームへの結合、tRNA によるアミノ酸運搬など多くの段階を踏むため、*SLC13A5*/NaCT ではそのいずれかの段階で厳密な制御を受けていると推察されるが、現時点では NaCT の翻訳制御機構や機能制御機構についてほとんど明らかになっていないため (Bergeron et al, 2013)、今後さらなる解析が望まれる。*SLC13A5* のコードする NaCT は膜貫通蛋白であるが、免疫細胞化学や免疫蛍光染色の観察結果では、ゲル上培養細胞においては細胞質に多く発現していることが窺われた。そのため、膜貫通した状態で細胞質側に internalization している可能性や、ターンオーバーが早いために輸送過程にある状態を見ている可能性も考えられる。

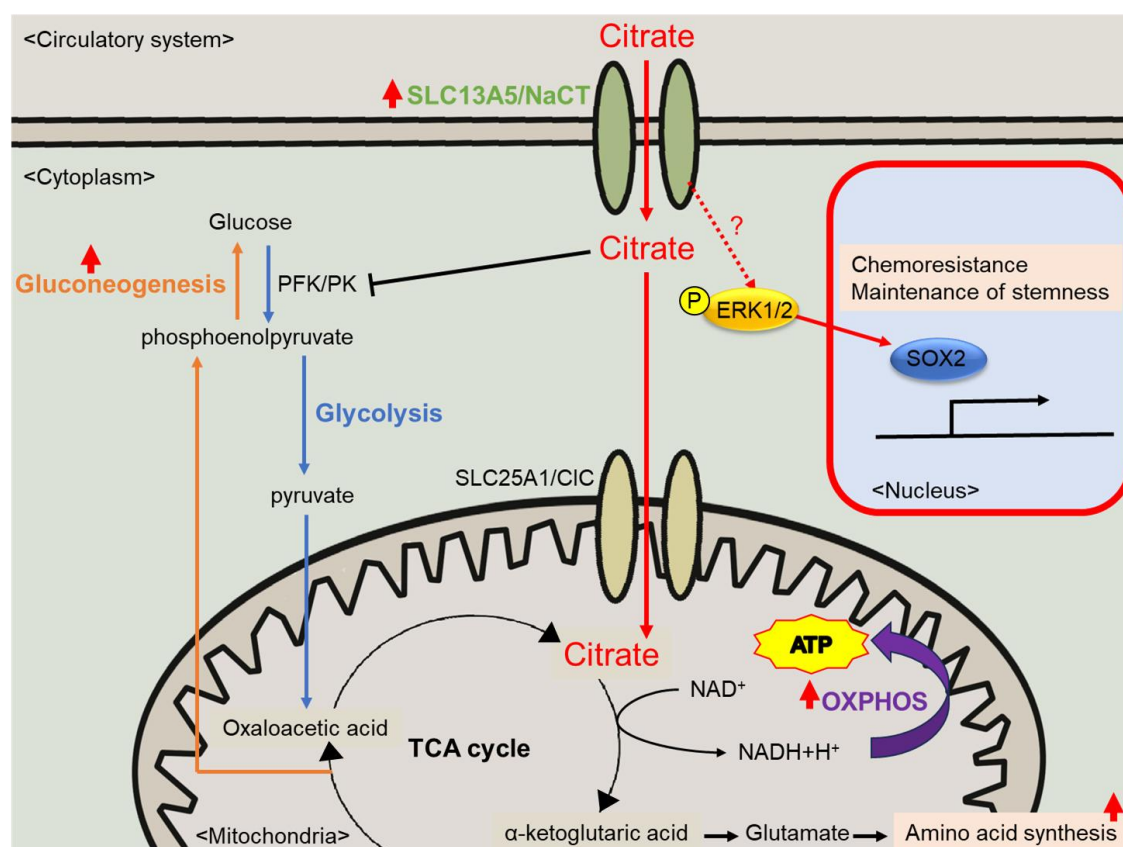
NaCT は細胞外クエン酸を細胞質に輸送する。クエン酸は、解糖系の律速酵素を阻害したり、脂肪酸合成の基質になったり、TCA 回路の構成要素として広く細胞のエネルギー産生にかかわる (Icard et al, 2012; Iacobazzi and Infantino, 2014)。また、NaCT を介したクエン酸の取り込みは、栄養が制限された条件下で代謝的に重要であり、金属毒性に対する抵抗性を促進する可能性があることが報告されている (Avi Kumar et al, 2021)。エンリッチメント解析において糖原性アミノ酸の代謝が亢進していることから、糖新生系も亢進していることが推察される。すなわち PAMPS/PDMAAm-DN ゲル上培養した中皮腫幹細胞様細胞は低栄養環境と類似した代謝状態にあるように見える。個体の栄養状態は、幹細胞や前駆細胞の自己増殖や分化といった活動に影響を与えることが近年明らかにされつつ

ある (Kasuga et al, 2013)。先行研究において、DN ゲルは低酸素ニッチを模倣している可能性が見出されているが、低栄養環境も模倣している可能性も考えられた。

中皮腫幹細胞様細胞で TCA 回路が亢進している可能性については、ゲル上培養細胞および *SLC13A5* 過剰発現細胞を用いた代謝解析にて検討した。ゲル上培養細胞とコントロールの OCR/ECAR 比に有意差は出なかったが、上述したようにゲル上で発現誘導できる *SLC13A5* 蛋白量が多くないために、機能を十分に反映できていない可能性が考えられた。*SLC13A5* が細胞のエネルギー代謝に及ぼす影響をより明瞭に把握するために、*SLC13A5* 過剰発現 HEK293T 細胞で代謝解析を再検討したところ、コントロールに比し過剰発現細胞で有意に酸化的リン酸化にシフトすることが確かめられた。HEK293T 細胞のみの結果となったのは研究の限界で、ヒト中皮腫細胞株では *SLC13A5* 過剰発現ベクターの導入効率が悪く、同様の検討をすることは困難であった。

SLC13A5 の過剰発現細胞を用いたウェスタンブロッティングでは、ERK1/2-SOX2 経路や ERK-YAP 経路の活性化が示唆された。SOX2 の発現は幹細胞性の獲得に重要な分子であり、*SLC13A5* の発現が何らかのシグナル伝達を介して幹細胞性に寄与していることが明らかとなった (図 47)。中皮腫においてはこれまでも ERK の活性化が進行促進や細胞遊走に寄与することが報告されてきたが、AKT pathway に焦点を当てた検討がほとんどである (Rose et al, 2014; Tamminen et al, 2015; Li et al, 2018)。今回の検討では AKT、phospho-AKT の発現も調べたが、明らかな変化を認めなかった。*SLC13A5* から ERK1/2 活性化に至るまでの分子の特定までは時間の関係上難しく、今後の課題としたい。ただし、*SLC13A5* の阻害実験やノックダウン実験において、*SLC13A5* の発現抑制が幹細胞マーカーの発現に影響を与えることはなく、その貢献度は限定的なものと推察される。

臨床検体から抽出された発現遺伝子のデータベースを調べることで、臨床検体中にも *SLC13A5* を発現する細胞集団が少数ながら存在することが明らかとなった。現在オープンアクセスが可能な scRNA-seq のデータベースは今回使用した 1 件のみであり、データ不足によるバイアスが生じる可能性は否定できないが、臨床検体中にもハイドロゲル上で誘導した中皮腫幹細胞様細胞に類似する細胞が存在することが示されたことは非常に有用であった。自験例の中皮腫 5 例においても *SLC13A5* の遺伝子発現が見られることを確認するため、FFPE 検体から RNA 抽出を試みたが、real-time PCR で評価に足る質を確保することができなかった。断片化した RNA を検出するために、product の短い primer を 3 種類追加で設計したが、いずれも primer dimer の形成や非特異的分子への結合により、適切に検出することは困難であった。



結論

1. 本研究から得られた新知見

- 1) ヒト中皮腫細胞をハイドロゲル上で培養することにより、幹細胞性が誘導され、マイクロアレイ解析によりゲル上培養細胞で特異的に発現する 3 つの分子 *HCRTR2*、*SLC13A5*、*TMEM151B* を同定した。
- 2) このうち *SLC13A5* はハイドロゲル上での蛋白発現量の増加を認め、ERK の活性化を通じて幹細胞性に寄与し、細胞のエネルギー代謝を酸化的リン酸化にシフトさせ、さらにシスプラチンに対する感受性を低下させることが明らかとなった。
- 3) データベース解析により、ヒト中皮腫検体中に *SLC13A5* を発現する腫瘍細胞が存在することが確認された。

2. 新知見の意義

中皮腫では、これまで再発症例や手術不能症例に対して有効な治療法が存在しなかった。本研究により得られた新知見により、中皮腫幹細胞の性質の一端が明らかとなり、中皮腫幹細胞に対する治療法の開発の一助となることが期待される。

3. 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

本研究では、*SLC13A5* が中皮腫幹細胞の機能維持に若干なりとも寄与することが示された。今後は固定条件を統一した臨床検体を収集し、*SLC13A5* の免疫組織化学を行い、*SLC13A5* 発現細胞の解剖学的局在や診断補助の可能性について検討したい。

4. 今後の課題

本実験により、*SLC13A5* は厳密な翻訳制御または機能制御を受けている可能性が示唆されたが、その制御機構はいまだ明らかにされていない。中皮腫に含まれる *SLC13A5* 発現細胞がごく少数であることから、*SLC13A5* そのものを治療標的とするのは至難であると思われるが、単剤ではなく従来の治療法と併用することでより良い治療効果を得られる可能性がある。また、*SLC13A5* がどのようなシグナル伝達を介して ERK1/2 を活性化させるのかを明らかにすることで、下流分子の中に *SLC13A5* よりも適した治療標的が見つかる可能性がある。

謝辞

本研究と論文作成にあたり適切な助言と直接の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室、田中伸哉教授、津田真寿美准教授に深謝いたします。また培養機材に関する指導、情報提供をいただきました北海道大学大学院先端生命科学研究院先端融合科学研究部門ソフト&ウェットマター龔劍萍教授に感謝いたします。

最後に、本論文を作成するにあたってご指導・ご協力を頂いたすべての皆様に、重ねて御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Alison, M.R., Guppy, N.J., Lim, S.M. and Nicholson, L.J. (2010) Finding cancer stem cells: Are aldehyde dehydrogenases fit for purpose?, *Journal of Pathology* 222, 335–344.

Arai, E., Chiku, S., Mori, T., Gotoh, M., Nakagawa, T., Fujimoto, H. and Kanai, Y. (2012) Single-CpG-resolution methylome analysis identifies clinicopathologically aggressive CpG island methylator phenotype clear cell renal cell carcinomas. *Carcinogenesis* 33, 1487–1493.

Avi Kumar, Thekla Cordes, Anna E. Thalacker-Mercer, Ana M. Pajor, Anne N. Murphy and Christian M. Metallo (2021) NaCT/SLC13A5 facilitates citrate import and metabolism under nutrient-limited conditions. *Cell Rep* 36, 109701.

Baldini, E.H., Richards, W.G., Gill, R.R., Goodman, B.M., Winfrey, O.K., Eisen, H.M., Mak, R.H., Chen, A.B., Kozono, D.E., Bueno, R, et al (2015) Updated patterns of failure after multimodality therapy for malignant pleural mesothelioma. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 149, 1374–1381.

Bergeron, M.J., Cl  men  on, B., Hediger, M.A. and Markovich, D. (2013) SLC13 family of Na⁺-coupled di- and tri-carboxylate/sulfate transporters. *Molecular Aspects of Medicine* 34, 299–312.

Blum, W., Pecze, L., Felley-Bosco, E., Wu, L., Perrot, M. de and Schwaller, B. (2017) Stem Cell Factor-Based Identification and Functional Properties of In Vitro-Selected Subpopulations of Malignant Mesothelioma Cells. *Stem Cell Reports* 8, 1005–1017.

Bueno, R., Stawiski, E.W., Goldstein, L.D., Durinck, S., Rienzo, A. De, Modrusan, Z., Gnad, F., Nguyen, T.T., Jaiswal, B.S., Chirieac, L.R., et al (2016) Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nature Genetics* 48, 407–416.

Chew S., Okazaki Y., Akatsuka S., Wang S., Jiang L., Ohara Y., Ito F., Saya H., Sekido Y., Toyokuni S. (2017) Rheostatic CD44 isoform expression and its association with oxidative stress in human malignant mesothelioma. *Free Radic. Biol. Med* 106, 91-99.

Cornedine J. de Gooijer, Frank J. Borm, Arnaud Scherpereel and Baas, P. (2020) Immunotherapy in Malignant Pleural Mesothelioma, *Frontiers in Oncology* 10.

Cortes-Dericks, L., Froment, L., Boesch, R., Schmid, R.A. and Karoubi, G. (2014) Cisplatin-resistant cells in malignant pleural mesothelioma cell lines show ALDH^{high}CD44⁺ phenotype and sphere-forming capacity. *BMC Cancer* 14, 304.

D Bonnet and J E Dick. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730–737.

Das, B., Tsuchida, R., Malkin, D., Koren, G., Baruchel, S. and Yeger, H. (2008) Hypoxia Enhances Tumor Stemness by Increasing the Invasive and Tumorigenic Side Population Fraction. *Stem Cells* 26, 1818–1830.

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

Etcheverry, A., Aubry, M., de Tayrac, M., Vauleon, E., Boniface, R., Guenot, F., Saikali, S., Hamlat, A., Riffaud, L., Menei, P., et al. (2010) DNA methylation in glioblastoma: Impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics*, 11.

Ghani, F.I., Yamazaki, H., Iwata, S., Okamoto, T., Aoe, K., Okabe, K., Mimura, Y., Fujimoto, N., Kishimoto, T., Yamada, T., et al. (2011) Identification of cancer stem cell markers in human malignant mesothelioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 404, 735–742.

Gong, J.P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T. and Osada, Y. (2003) Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength. *Advanced Materials* 15, 1155–1158.

Gopal, E., Miyauchi, S., Martin, P.M., Ananth, S., Srinivas, S.R., Smith, S.B., Prasad, P.D. and Ganapathy, V. (2007) Expression and functional features of NaCT, a sodium-coupled citrate transporter, in human and rat livers and cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, 402–408.

Haas, F., Volz, J., Gehr, R., Reichel, J. and Estève, J. (2014) Entangled states of more than 40 atoms in an optical fiber cavity. *Science* 344, 180–183.

Han, Y., Zhang, T., Chen, H. and Yang, X. (2022) Global magnitude and temporal trend of mesothelioma burden along with the contribution of occupational asbestos exposure in 204 countries and territories from 1990 to 2019: Results from the Global Burden of Disease Study 2019. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 179.

Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W.M., Zheng, S., Butler, A., Lee, M.J., Wilk, A.J., Darby, C., Zager, M., et al. (2021) Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 184, 3573-3587, e29.

Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Nuchtern, J.G., Jax, T.W., Gobel, U., Goodell, M.A. and Brenner, M.K. (2004) A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 14228-14233.

Hotta, A., Cheung, A.Y.L., Farra, N., Garcha, K., Chang, W.Y., Pasceri, P., Stanford, W.L. and Ellis, J. (2009) EOS lentiviral vector selection system for human induced pluripotent stem cells. *Nature Protocols* 4, 1828–1844.

Hu, Z.I., Ghafoor, A., Sengupta, M. and Hassan, R. (2021) Malignant mesothelioma: Advances in immune checkpoint inhibitor and mesothelin-targeted therapies. *Cancer* 127, 1010–1020.

Iacobazzi, V. and Infantino, V. (2014) Citrate-new functions for an old metabolite. *Biological Chemistry* 395, 387–399.

Icard, P., Poulain, L. and Lincet, H. (2012) Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1825, 111–116.

Inoue, K., Zhuang, L. and Ganapathy, V. (2002) Human Na⁺-coupled citrate transporter: primary structure, genomic organization, and transport function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299, 465–471.

Jones, C.L., Inguva, A. and Jordan, C.T. (2021) Targeting Energy Metabolism in Cancer Stem Cells: Progress and Challenges in Leukemia and Solid Tumors. *Cell Stem Cell* 28, 378–393.

Kai, K., D'Costa, S., Yoon, B. Il, Brody, A. R., Sills, R. C. and Kim, Y. (2010) Characterization of side population cells in human malignant mesothelioma cell lines. *Lung Cancer* 70, 146–151.

Kaibara, T., Wang, L., Tsuda, M., Nonoyama, T., Kurokawa, T., Iwasaki, N., Gong, J.P., Tanaka, S. and Yasuda, K. (2022) Hydroxyapatite-hybridized double-network hydrogel surface enhances differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to osteogenic cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 110, 747–760.

Kandasamy, S., Adhikary, G., Rorke, E.A., Friedberg, J.S., Mickle, M.B., Alexander, H.R. and Eckert, R.L. (2020) The YAP1 signaling inhibitors, verteporfin and CA3, suppress the mesothelioma cancer stem cell phenotype. *Molecular Cancer Research* 18, 343–351.

Kaneko, T. and Mikoya, T. (2017) Application of poly CDME (PCDME) gel to the palatal plate. *Hokkaido J. Dent. Sci* 38, 136–139.

Kasuga, H., Fukuyama, M., Kitazawa, A., Kontani, K. and Katada, T. (2013) The microRNA miR-235 couples blast-cell quiescence to the nutritional state. *Nature* 497, 503–506.

Knauf, F., Mohebbi, N., Teichert, C., Herold, D., Rogina, B., Helfand, S., Gollasch, M., Luft, F. C. and Aronson, P. S. (2006) The life-extending gene Indy encodes an exchanger for Krebs-cycle intermediates. *Biochemical Journal* 397, 25–29.

Knauf, F., Rogina, B., Jiang, Z., Aronson, P. S. and Helfand, S. L. (2002) Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the life-extending gene Indy. *PNAS* October 29, 14315–14319.

Knelson, E.H., Ivanova, E. V., Tarannum, M., Campisi, M., Lizotte, P.H., Booker, M.A., Ozgenc, I., Noureddine, M., Meisenheimer, B., Chen, M., et al. (2022) Activation of Tumor-Cell STING Primes NK-Cell Therapy. *Cancer Immunology Research* 10, 947–961.

Kopel, J., Higuchi, K., Ristic, B., Sato, T., Ramachandran, S. and Ganapathy, V. (2020) The Hepatic Plasma Membrane Citrate Transporter NaCT (SLC13A5) as a Molecular Target for Metformin. *Scientific Reports* 10.

- Lam, S.K., Li, Y.Y., Xu, S., Leung, L.L., U, K.P., Zheng, Y.F., Cheng, P.N.M. and Ho, J.C.M. (2017) Growth suppressive effect of pegylated arginase in malignant pleural mesothelioma xenografts. *Respiratory Research* 18.
- Li, C., Rezov, V., Joensuu, E., Vartiainen, V., Rönty, M., Yin, M., Myllärniemi, M. and Koli, K. (2018) Pirfenidone decreases mesothelioma cell proliferation and migration via inhibition of ERK and AKT and regulates mesothelioma tumor microenvironment in vivo. *Scientific Reports* 8.
- Li, F., Tiede, B., Massagué, J. and Kang, Y. (2007) Beyond tumorigenesis: Cancer stem cells in metastasis. *Cell Research* 17, 3–14.
- Li, Z., Li, D., Choi, E. Y., Lapidus, R., Zhang, L., Huang, S. M., Shapiro, P. and Wang, H. (2017) Silencing of solute carrier family 13 member 5 disrupts energy homeostasis and inhibits proliferation of human hepatocarcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry* 292, 13890–13901.
- Li, Z. and Wang, H. (2021) Molecular mechanisms of the SLC13A5 gene transcription. *Metabolites*, 11.
- Liu, C., Morimoto, N., Jiang, L., Kawahara, S., Noritomi, T., Yokoyama, H., Mayumi, K. and Ito, K. (2021) Tough hydrogels with rapid self-reinforcement. *Science*, 372.
- Liu, J., Tan, Y., Zhang, H., Zhang, Y., Xu, P., Chen, J., Poh, Y.C., Tang, K., Wang, N. and Huang, B. (2012) Soft fibrin gels promote selection and growth of tumorigenic cells. *Nature Materials* 11, 734–741.
- Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15.
- Lu, J., Bang, H., Kim, S.M., Cho, S.J., Ashktorab, H., Smoot, D.T., Zheng, C. hui, Ryeom, S.W., Yoon, S.S., Yoon, C., et al. (2021) Lymphatic metastasis-related TBL1XR1 enhances stemness and metastasis in gastric cancer stem-like cells by activating ERK1/2-SOX2 signaling. *Oncogene* 40, 922–936.

Meerbeeck, J.P. Van, Scherpereel, A., Surmont, V.F. and Baas, P. (2011) Malignant pleural mesothelioma: The standard of care and challenges for future management. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 78, 92–111.

Mosaoa, R., Kasprzyk-Pawelec, A., Fernandez, H.R. and Avantaggiati, M.L. (2021) The mitochondrial citrate carrier *slc25a1/cic* and the fundamental role of citrate in cancer, inflammation and beyond. *Biomolecules* 11, 1–17.

Nakagawa, K., Yamazaki, K., Kunitoh, H., Hida, T., Gemba, K., Shinkai, T., Ichinose, Y., Adachi, S., Nambu, Y., Saijo, N., et al. (2008) Efficacy and safety of pemetrexed in combination with cisplatin for malignant pleural mesothelioma: A phase I/II study in Japanese patients. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 38, 339–346.

Neuschäfer-Rube, F., Lieske, S., Kuna, M., Henkel, J., Perry, R. J., Erion, D. M., Pesta, D., Willmes, D. M., Brachs, S., Von Loeffelholz, C., et al. (2014) The mammalian INDY homolog is induced by CREB in a Rat model of type 2 diabetes. *Diabetes* 63, 1048–1057.

Nonoyama, T., Wada, S., Kiyama, R., Kitamura, N., Mredha, M.T.I., Zhang, X., Kurokawa, T., Nakajima, T., Takagi, Y., Yasuda, K. et al. (2016) Double-network hydrogels strongly bondable to bones by spontaneous osteogenesis penetration. *Advanced Materials* 28, 6740–6745.

Patro, R., Duggal, G., Love, M.I., Irizarry, R.A. and Kingsford, C. (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nature Methods* 14, 417–419.

Price, B. (2022) Projection of future numbers of mesothelioma cases in the US and the increasing prevalence of background cases: an update based on SEER data for 1975 through 2018. *Critical Reviews in Toxicology* 52, 317–324.

Prummel, K.D., Nieuwenhuize, S. and Mosimann, C. (2020) The lateral plate mesoderm. *Development* 147.

Qin, X., Li, J., Sun, J., Liu, L., Chen, D. and Liu, Y. (2019) Low shear stress induces ERK nuclear localization and YAP activation to control the proliferation of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 510, 219–223.

Rina Ohashi, Ken Tajima, Fumiyuki Takahashi, Ri Cui, Tao Gu, Kazue Shimizu, Kazuto Nishio, Kazuya Fukuoka, Takashi Nakano and Kazuhisa Takahashi (2009) Osteopontin modulates malignant pleural mesothelioma cell functions in vitro. *Anticancer Res.* 29, 2205–2214.

Rogina B., Reenan R. A., Nilsen S. P. and Helfand S. L. (2000) Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science* 290, 2137–2140.

Rose, A.H., Bertino, P., Hoffmann, F.W., Gaudino, G., Carbone, M. and Hoffmann, P.R. (2014) Increasing dietary selenium elevates reducing capacity and ERK activation associated with accelerated progression of select mesothelioma tumors. *American Journal of Pathology* 184, 1041–1049.

Sancho, P., Barneda, D. and Heeschen, C. (2016) Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *British Journal of Cancer* 114, 1305–1312.

Scherpereel, A., Astoul, P., Baas, P., Berghmans, T., Clayson, H., Vuyst, P. De, Dienemann, H., Galateau-Salle, F., Hennequin, C., Hillerdal, G., et al. (2010) Guidelines of the European Respiratory Society and the European Society of Thoracic Surgeons for the management of malignant pleural mesothelioma. *European Respiratory Journal* 35, 479–495.

Schumann, S.O., Kocher, G. and Minervini, F. (2021) Epidemiology, diagnosis and treatment of the malignant pleural mesothelioma, a narrative review of literature. *Journal of Thoracic Disease* 13, 2510–2523.

Sun, J., Aluvila, S., Kotaria, R., Mayor, J. A., Walters, D. E. and Kaplan, R. S. (2010) Mitochondrial and Plasma Membrane Citrate Transporters: Discovery of Selective Inhibitors and Application to Structure/ Function Analysis. *Mol Cell Pharmacol* 2, 101–110.

Suzuka, J., Tsuda, M., Wang, L., Kohsaka, S., Kishida, K., Semba, S., Sugino, H., Aburatani, S., Frauenlob, M., Kurokawa, T., et al. (2021) Rapid reprogramming of tumour cells into cancer stem cells on double-network hydrogels. *Nature Biomedical Engineering* 5, 914–925.

Tagliamento, M., Bironzo, P., Curcio, H., Luca, E. De, Pignataro, D., Rapetti, S.G., Audisio, M., Bertaglia, V., Paratore, C., Bungaro, M., et al. (2022) A systematic review and meta-analysis of trials assessing PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors activity in pre-treated advanced stage malignant mesothelioma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 172.

Tajima, K., Ohashi, R., Sekido, Y., Hida, T., Nara, T., Hashimoto, M., Iwakami, S., Minakata, K., Yae, T., Takahashi, F., et al. (2010) Osteopontin-mediated enhanced hyaluronan binding induces multidrug resistance in mesothelioma cells. *Oncogene* 29, 1941–1951.

Tamminen, J.A., Yin, M., Rönty, M., Sutinen, E., Pasternack, A., Ritvos, O., Myllärniemi, M. and Koli, K. (2015) Overexpression of activin-A and -B in malignant mesothelioma - Attenuated Smad3 signaling responses and ERK activation promote cell migration and invasive growth. *Experimental Cell Research* 332, 102–115.

Tang, Z., Li, Chenwei, Kang, B., Gao, G., Li, Cheng and Zhang, Z. (2017) GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research* 45, W98–W102.

Thomason, R.T., Bader, D.M. and Winters, N.I. (2012) Comprehensive timeline of mesodermal development in the quail small intestine. *Developmental Dynamics* 241, 1678–1694.

Tian, Y., Arai, E., Gotoh, M., Komiyama, M., Fujimoto, H. and Kanai, Y. (2014) Prognostication of patients with clear cell renal cell carcinomas based on quantification of DNA methylation levels of CpG island methylator phenotype marker genes. *BMC Cancer* 14.

Usami, N., Fukui, T., Kondo, M., Taniguchi, T., Yokoyama, T., Mori, S., Yokoi, K., Horio, Y., Shimokata, K., Sekido, Y. et al. (2006) Establishment and characterization of four malignant pleural mesothelioma cell lines from Japanese patients. *Cancer Science* 97, 387–394.

Valent, P., Bonnet, D., Maria, R. De, Lapidot, T., Copland, M., Melo, J. V., Chomienne, C., Ishikawa, F., Schuringa, J.J., Stassi, G., et al. (2012) Cancer stem cell definitions and terminology: The devil is in the details. *Nature Reviews Cancer*, 12, 767–775.

Varghese, S., Whipple, R., Martin, S. S. and Alexander, H. R. (2012) Multipotent Cancer Stem Cells Derived from Human Malignant Peritoneal Mesothelioma Promote Tumorigenesis. *PLoS ONE* 7.

Wada, S., Kitamura, N., Nonoyama, T., Kiyama, R., Kurokawa, T., Gong, J.P. & Yasuda, K. (2016) Hydroxyapatite-coated double network hydrogel directly bondable to the bone: Biological and biomechanical evaluations of the bonding property in an osteochondral defect. *Acta Biomaterialia* 44, 125–134.

Walpole, S., Pritchard, A.L., Cebulla, C.M., Pilarski, R., Stautberg, M., Davidorf, F.H., la Fouchardière, A. de, Cabaret, O., Golmard, L., Stoppa-Lyonnet, D., et al. (2018) Comprehensive study of the clinical phenotype of germline BAP1 variant-carrying families worldwide. *Journal of the National Cancer Institute* 110, 1328-1341.

Wang, K., Ji, W., Yu, Y., Li, Z., Niu, X., Xia, W. and Lu, S. (2018) FGFR1-ERK1/2-SOX2 axis promotes cell proliferation, epithelial–mesenchymal transition, and metastasis in FGFR1-amplified lung cancer. *Oncogene* 37, 5340–5354.

Wu, C. and Alman, B.A. (2008) Side population cells in human cancers. *Cancer Letters* 268, 1–9.

Xiaodong Zhang, Emilie Varin, Stéphane Allouche, Yunfei Lu, Laurent Poulain and Philippe Icard (2009) Effect of citrate on malignant pleural mesothelioma cells: a synergistic effect with cisplatin. *Anticancer Res.* 29, 1249–1254.

Yamazaki, H., Naito, M., Ghani, F.I., Dang, N.H., Iwata, S. and Morimoto, C. (2012) Characterization of cancer stem cell properties of CD24 and CD26-positive human malignant mesothelioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419, 529–536.

Yang, J.J., Chen, Y.M., Kurokawa, T., Gong, J.P., Onodera, S. and Yasuda, K. (2010) Gene expression, glycocalyx assay, and surface properties of human endothelial cells cultured on hydrogel matrix with sulfonic moiety: Effect of elasticity of hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 95 A, 531–542.

Yang, J.J., Liu, J.F., Kurokawa, T., Kitada, K. and Gong, J.P. (2015) Hydrogels as feeder-free scaffolds for long-term self-renewal of mouse induced pluripotent stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9, 375–388.

Yang, Q.-Z., Spelbrink, E. M., Nye, K. L., Hsu, E. R. and Porter, B. E. (2020) Epilepsy and EEG Phenotype of SLC13A5 Citrate Transporter Disorder. *Child Neurology Open* 7, 1-7.

Yates, D.H., Corrin, B., Stidolph, P.N. and Browne, K. (1997) Malignant mesothelioma in south east England: clinicopathological experience of 272 cases. *Thorax* 52, 507–512.

Yin, H., Akasaki, T., Lin Sun, T., Nakajima, T., Kurokawa, T., Nonoyama, T., Taira, T., Saruwatari, Y. and Ping Gong, J. (2013) Double network hydrogels from polyzwitterions: High mechanical strength and excellent anti-biofouling properties. *Journal of Materials Chemistry B* 1, 3685–3693.

Zheng, S.C., Stein-O'Brien, G., Augustin, J.J., Slosberg, J., Carosso, G.A., Winer, B., Shin, G., Bjornsson, H.T., Goff, L.A. and Hansen, K.D. (2022) Universal prediction of cell-cycle position using transfer learning. *Genome Biology* 23.

石本崇胤, 永野修, 馬場秀夫, 佐谷秀行 (2010) 腫瘍をめぐる Q&A Question 18 ニッチとは？癌幹細胞との関係は？ *Surgery Frontier* 17, 85–87.

田畑康彦 (2012) ハイドロゲル. *再生医療* 11, 57-59.

日本癌治療学会 (2020) がん診療ガイドライン 悪性胸膜中皮腫, <http://www.jscocpg.jp/lung-cancer/guideline2/> (2023 年 11 月 9 日参照)