

博士論文（要約）

Time-lapse imaging に基づくがん幹細胞の生物像の解明

指導教員 石井 源一郎 教授

47-157304 宮下 知之

目次

I. 要旨	p. 4
II. 略語表	p. 8
III. 背景	p. 11
IV. 目的	p. 18
V. 実験材料と実験方法	p. 19
VI. 結果 –単細胞レベルにおけるがん幹細胞の細胞運命の解明–	p. 32
VII. 考察 –単細胞レベルにおけるがん幹細胞の細胞運命の解明–	p. 41
VIII. 結論 –単細胞レベルにおけるがん幹細胞の細胞運命の解明–	p. 48
IX. 結果 –がん幹細胞の浸潤像の解明–	p. 49
X. 考察 –がん幹細胞の浸潤像の解明–	p. 54
X I. 結論 –がん幹細胞の浸潤像の解明–	p. 59
X II. 総合考察	p. 60
X III. 今後の展望	p. 63
X IV. 参考文献	p. 64
X V. 謝辞	p. 73
X VI. Figures and Tables	p. 74

I. 要旨

論文の内容の要旨

論文題目 Time-lapse imaging に基づくがん幹細胞の生物像の解明

氏名 宮下 知之

背景と目的

腫瘍組織は一見、均一ながん細胞から構成されている様に見えるが、実際には形態学的にも生物学的にも不均一ながん細胞から構成されていることが知られている。不均一ながん細胞の中で、がん幹細胞と呼ばれる亜集団は、転移や再発に深く関わっていると考えられている。我々は、扁平上皮癌においては、膜タンパク質である Podoplanin が陽性の細胞集団にがん幹細胞が濃縮されていることを明らかにしてきた (Atsumi N. 2008 BBRC)。

がんはその進展過程で、組織間質へ浸潤した後、血流やリンパ流を経て転移先の臓器に定着することで転移巣が形成される。脈管に侵入したがん細胞は、単細胞、もしくは少数の細胞からなる細胞塊の状態転移臓器に定着し、そこで増殖することにより転移巣を形成する。がん幹細胞は高い浸潤能を持ち、異所への高い生着能を持ち増殖することで転移巣を形成すると考えられている。

しかし、がん幹細胞が間質に浸潤していく過程や、単細胞/少数細胞の状態からどのようにして増殖していくのか、については未だ不明な点が多い。本研究では、がん幹細胞の特徴として、転移巣の形成能の高さおよび浸潤能の高さに着目した。がん幹細胞が非がん幹細胞と比較して少数の状態でもどのように増殖し腫瘍塊 (コロニー) を形成するのか、間質に対しどのように浸潤していくのかを time-lapse imaging を基に捉え、がん幹細胞の生物学的特徴を明らかにすることを本研究の目的とした。

結果

1 コロニー形成過程におけるがん幹細胞の細胞運命の解明

1-1 がん幹細胞の単細胞レベルにおけるコロニー形成能

がん幹細胞が単細胞の状態でもどのように増殖するのかを視覚的に捉える為に、Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)(Fig. 1) をヒト分化型扁平上皮癌細胞株 A431 に導入した (A431-Fucci 細胞)。A431-Fucci 細胞の

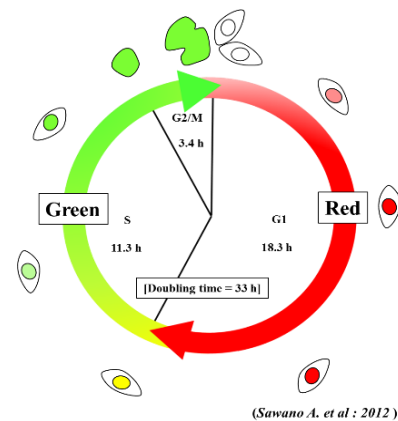


Fig. 1 Fucci 概要

Podoplanin 陽性細胞分画と陰性細胞分画をそれぞれ 384 well plate に単細胞播種し、1 時間ごとに 7 日間 time-lapse imaging を行った。得られた time-lapse imaging を基に、最終的な細胞数、細胞死、細胞周期の解析を行った。Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも 8 細胞以上からなるコロニーの形成頻度が高かった (Fig. 2)。単細胞からのコロニー形成過程において、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞ではその細胞周期には差が認められなかった (Fig. 3) が、Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも細胞死をきたす頻度が低かった (Fig. 4)。これらの結果より、Podoplanin 陽性がん幹細胞は細胞死を回避し、高いコロニー形成能を示すことが明らかとなった。

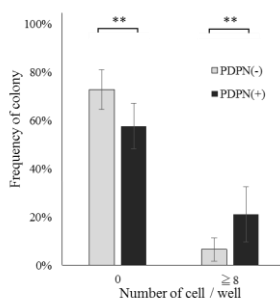


Fig. 2 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞のコロニー形成率

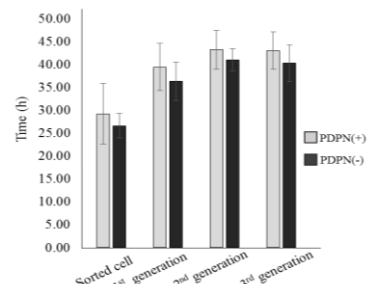


Fig. 3 細胞周期の長さ

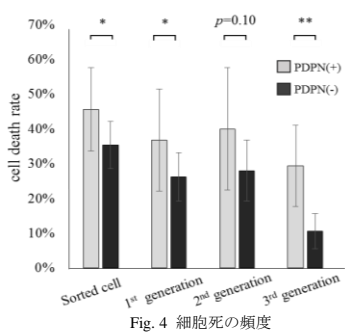


Fig. 4 細胞死の頻度

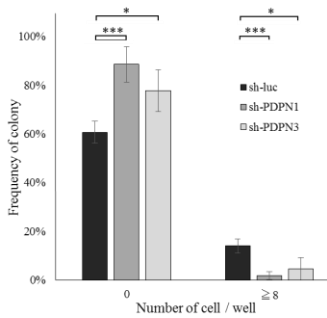


Fig. 5 sh-RNA 導入細胞のコロニー形成率

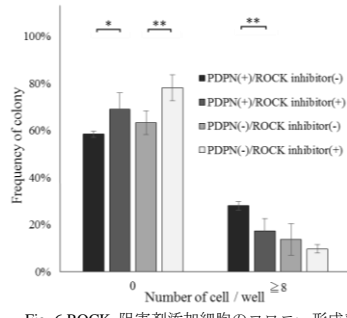


Fig. 6 ROCK 阻害剤添加細胞のコロニー形成率

1-2 がん幹細胞のコロニー形成における Podoplanin の機能の検討

単細胞レベルのコロニー形成における Podoplanin の機能を検討した。Sh-RNA を用いた Podoplanin のノックダウンにより A431-Fucci の単細胞レベルにおけるコロニー形成能は抑制された (Fig. 5)。Podoplanin はその下流に Rho-ROCK (Rho-associated coiled-coil kinase) シグナルの存在が知られている。そこで ROCK 阻害剤を用いて Podoplanin の下流シグナルの阻害を行うと、単細胞レベルにおけるコロニーの形成は阻害された (Fig. 6)。以上より、Podoplanin 陽性がん幹細胞は Podoplanin-ROCK シグナルを通じて単細胞レベルにおける高いコロニー形成能を示すことが明らかとなった。

2 がん幹細胞の浸潤像の解明

2-1 線維芽細胞依存的ながん細胞の浸潤像の特徴

作製した A431-Fucci を用い、癌細胞単独群と、線維芽細胞と癌細胞の共培養群を作製し、collagen invasion assay を行った (Fig. 7)。12 時間ごとに 72 時間、time-lapse imaging を行い、浸潤細胞数、浸潤様式、細胞死、細胞周期の解析を行った。

線維芽細胞との共培養群では、単独群と比較して癌細胞の浸潤が促進されていた (Fig. 8)。次に浸潤様式を大きく A) 非浸潤部から連続性の浸潤、B) 非連続性でかつ 6 細胞以上からなる胞

巢、C) 非連続性かつ5細胞以下からなる胞巣、に分類した (Fig. 9)。線維芽細胞依存的な浸潤ではB), C)の浸潤様式が有意に多かった (Fig. 10)。

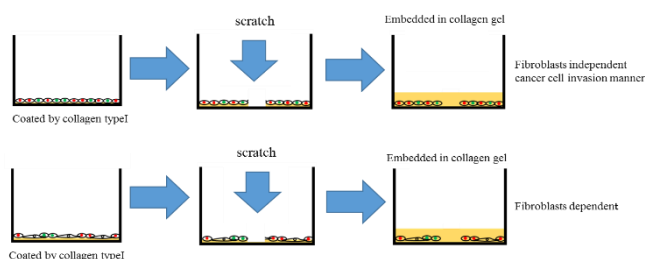


Fig. 7 collagen invasion assay 概要

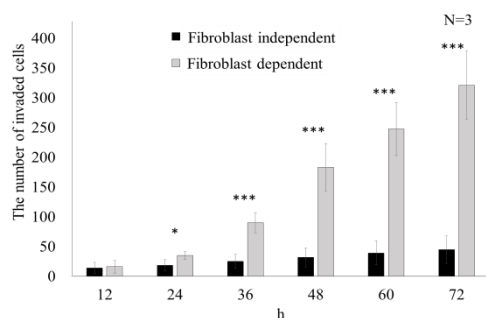


Fig. 8 線維芽細胞依存的/非依存的な浸潤における浸潤癌細胞数

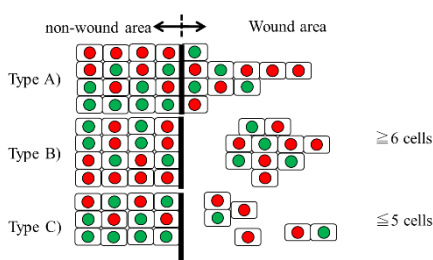


Fig. 9 癌細胞の浸潤様式

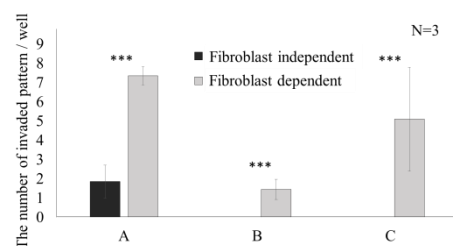


Fig. 10 線維芽細胞依存的/非依存的な浸潤における各浸潤様式数

次に浸潤細胞の細胞死の頻度を算出した。細胞死の同定には caspase apoptosis assay kit を用い、caspase が活性化した細胞の核を抽出し、浸潤細胞あたりの細胞死を起こした細胞の数を apoptotic ratio として算出した。線維芽細胞依存的な浸潤と非依存的な浸潤における apoptotic ratio を比較すると、細胞死を起こす頻度に差が無いことが明らかとなった (Fig. 11)。

浸潤部における癌細胞の細胞周期について Fucci の蛍光を基に解析した。線維芽細胞非依存的な浸潤と比較して線維芽細胞依存的な浸潤では、60 時間以降で増殖期の癌細胞の割合が高かった (Fig. 12)。このことから、線維芽細胞依存的な浸潤様式の特徴として 1) 少数の腫瘍塊を形成すること、2) 高い増殖能を伴う、ことが明らかとなった。

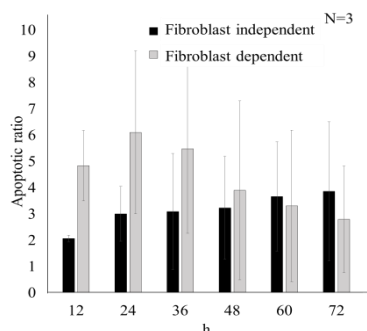


Fig. 11 線維芽細胞依存的/非依存的な浸潤における細胞死の頻度

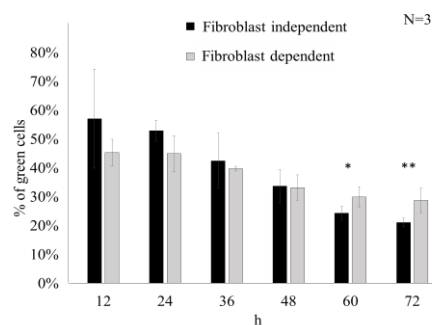


Fig. 12 線維芽細胞依存的/非依存的な浸潤における増殖細胞割合

2-1 がん幹細胞の浸潤像の特徴

上記の結果を基に、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞における、線維芽細胞依存的、非依存的な浸潤において浸潤細胞数、浸潤様式、細胞周期の解析を行った。線維芽細胞非依存的な浸潤においては、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の間に、浸潤癌細胞数に差は認められなかった (Fig. 13)。

一方で線維芽細胞依存的な浸潤において Podoplanin 陽性細胞のほうで有意に浸潤数が促進されていた (Fig. 14)。そこで先述の様に癌細胞の浸潤様式を検討したところ、両者の浸潤様式に差は認められなかった (Fig. 15)。

次に、線維芽細胞依存的な浸潤における Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の細胞周期について検討を行ったところ両者に差を認めることは出来なかった (Fig. 16)。

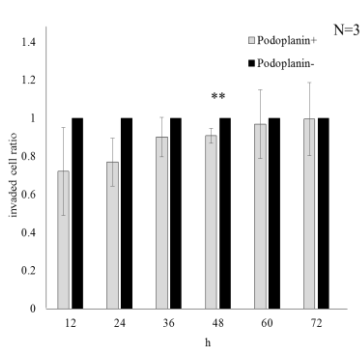


Fig. 13 線維芽細胞非依存的な Podoplanin

陽性細胞と陰性細胞の浸潤癌細胞数

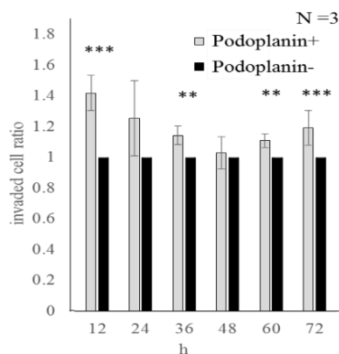


Fig. 14 線維芽細胞依存的な Podoplanin

陽性細胞と陰性細胞の浸潤癌細胞数

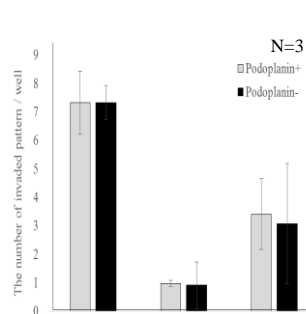


Fig. 15 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の

各浸潤様式数

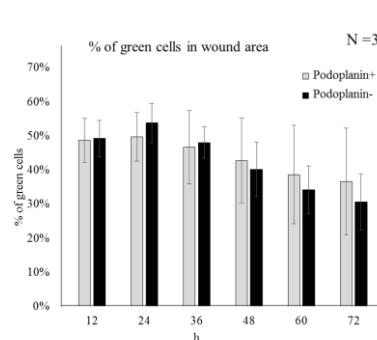


Fig. 16 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の浸潤癌細胞

の細胞周期

結論と展望

本研究では、time-lapse imaging を用い、単細胞レベルにおけるがん幹細胞のコロニー形成能と、間質に浸潤する際の生物像を明らかにした。単細胞レベルにおいて Podoplanin 陽性細胞は高いコロニー形成能を示し、陰性細胞と比較して細胞死をきたす頻度が低かった。さらに、がん幹細胞マーカーである Podoplanin をノックダウン、Podoplanin の下流シグナルの抑制を行うと単細胞レベルにおけるコロニー形成能は抑制されたことから、Podoplanin 陽性がん幹細胞は Podoplanin-ROCK シグナルを通じて細胞死を回避し、単細胞レベルにおける高いコロニー形成能を示すことが明らかとなった。

がん細胞の組織間質への浸潤における特徴として、線維芽細胞依存的な様式と非依存的な様式が知られている。本検討では線維芽細胞非依存的な浸潤においては Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の間に浸潤数の差を認めることは出来なかった。しかし、線維芽細胞依存的な浸潤においては Podoplanin 陽性細胞は陰性細胞と比較して有意に浸潤細胞数は増加していた。しかし、増殖細胞割合の差を認めなかった。このことから、がん幹細胞と非がん幹細胞では線維芽細胞による増殖促進効果には差が無い一方、がん幹細胞の持つ内因的な要因により浸潤が促進されていることが示唆された。

今後は、Podoplanin 分子の発現抑制（がん幹細胞における内因性因子の抑制）を介して浸潤における Podoplanin の機能を確認し、がん幹細胞の浸潤における生物像を明らかにしたいと考える。

II. 略語表

AACR	American Association for Cancer Research
ATCC	American Type Culture Collection
BCA	Bicinchoninic Acid
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CLEC-2	C-type lectin-like receptor
CMV	human Cytomegalovirus immediate early promoter
CTC	Circulating Tumor Cells
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECM	Extracellular Matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EF	human Elongation Factor subunit promoter
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin

ESA	Epithelial Specific Antigen
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fucci	Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator
gp	glycoprotein
HEK	Human Embryonic Kidney
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
mCherry	monomeric Cherry
MCS	Multi Cloning Site
MEM	Minimum Essential Medium
mVenus	monomeric Venus
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLAG	Platelet Aggregation stimulating
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride

RNA	ribonucleic acid
ROCK	Rho-associated protein kinase
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSV	Rous Sarcoma Virus
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TBST	Tris Buffered Saline Tween20
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WB	Western blotting

Ⅲ. 背景

(1) がんの転移過程

がんはその進展過程で、組織間質へ浸潤した後、血流やリンパ流を経て転移先の臓器に定着することで転移巣が形成される[1, 2]。がんは転移の最初の段階で組織間質へと浸潤するが、組織間質はコラーゲンなどの細胞外マトリクスと、線維芽細胞に代表される間質細胞から構成されている。コラーゲンは様々な種類が同定されているが、最も多く間質組織に存在しているのは type1 コラーゲンで、全体の 3 割程度の存在比である。線維芽細胞は間質に最も多く存在する間葉系の細胞であり、様々な臓器に広汎に存在している。形態的な特徴として紡錘状の形態を取り、type1 コラーゲンを大量に産生し、組織の構造や恒常性の維持に関与していることが知られている[3]。組織間質を浸潤した後に脈管に侵入したがん細胞は circulating tumor cell (CTC) と呼ばれ、単細胞、もしくは少数の細胞からなる細胞塊の状態のまま転移臓器に定着し、そこで増殖することにより転移巣を形成する[4]。

組織に存在する線維芽細胞は浸潤においてがん細胞の浸潤を促進することが知られている。Gaggioli らは扁平上皮癌が浸潤する際には線維芽細胞が先行し、その後ろをがん細胞が追随することを見出してきた[5]。我々も、肺腺癌において線維芽細胞が浸潤の先進部に存在すること、癌細胞は先行した線維芽細胞が形成した ECM tracks を

通り浸潤していくことを明らかにしてきた[6]。

(2) がん幹細胞

腫瘍組織は、一見均一な細胞から構成されているように見えるが、形態学的にも生物学的にも不均一な腫瘍細胞集団から構成されていることが知られている。不均一な細胞集団の中で、腫瘍形成や転移能が高い、あるいは治療抵抗性を示す一部の亜集団は、幹細胞の性質を有する特殊な細胞集団（がん幹細胞）として考えられてきた。がん幹細胞は 1997 年に急性骨髄性白血病にて発見されて以降、様々な臓器において様々なマーカーによりその存在は明らかにされてきた [7]。Bonnet らは、急性骨髄性白血病細胞中の CD34 陽性 CD38 陰性細胞の腫瘍形成能が高いことから、これらの細胞集団をがん幹細胞として初めて報告した。その後、神経膠腫（CD133 陽性）[8]、乳癌（CD44 陽性 CD24 陰性 ESA 陽性）[9]、膀胱癌（CD44 陽性、CD24 陽性、ESA 陽性）[10]、大腸癌（CD133 陽性）[11]、前立腺癌（CD44 陽性 / CD44 陽性、CD24 陰性）[12] [13] など、様々な臓器において多数の報告がされている。

がん幹細胞は自己複製能、すなわち自身と同様の性質を持つ細胞を産生する能力と、多分化能、すなわち分化した細胞を生み出す能力を兼ね備えた細胞であると考えられている。一方、非がん幹細胞は多分化能のみを持ち、やがて分化が進行し細胞死を迎えるとされている。すなわち、がん幹細胞の特徴として、i) 不均等分裂を起こ

す、ii) 腫瘍組織を構築する、ことが挙げられる。実際、2006年のAACR ワークショップにおいて、がん幹細胞とは、「自己複製しがんを作る細胞」と定義された[14]。実験レベルにおいて、がん幹細胞集団と非がん幹細胞集団を免疫不全マウスの皮下にそれぞれ異種移植した際には、がん幹細胞集団が腫瘍組織を高率に形成するのに対し、非がん幹細胞は腫瘍組織を形成する頻度が低いことがわかっている [15]。また、免疫不全マウスの尾静脈に注射し、肺への転移能を評価した実験においても、がん幹細胞集団の方が非がん幹細胞集団よりも転移巣形成能が高い[16]事が報告されている。すなわち、がん幹細胞は、転移巣を含めた腫瘍組織の形成能が高い細胞集団である。

がん幹細胞のもう一つの特徴として、休眠状態、すなわち細胞周期の進行が遅いと考えられてきた。その理由としてがん幹細胞の有する高い抗がん剤耐性が挙げられる。治療抵抗性とがん幹細胞の関連は古くから論じられているが、がん幹細胞は増殖の活発な細胞に作用する抗がん剤に耐性を持つことから、増殖の進行が遅いと考えられている。実際、実験レベルにおいても全身に播種された転移がん幹細胞の増殖が遅いことが明らかとなっている[17, 18]。

(3) Podoplanin

1983年に鶴尾らのグループは、マウス結腸癌において高転移株と低転移株を取得

し、高転移株に高い反応性を示す抗体が血小板の凝集を阻害し肺転移を抑制することを見出し、上記抗体が認識する因子を gp44 (Aggrus、後に Podoplanin として名称統一) と名づけた[19, 20, 21]。1997年に Breiteneder-Geleff らは、腎臓に存在する足細胞 (Podocyte) において足突起の形成に重要である糖タンパク質 Podoplanin を報告した[22]。また、上記のグループだけでなく、様々なグループが類似分子を単離してきたが、現在ではすべて Podoplanin の名称で統一されている。

Podoplanin は膜一回貫通型タンパク質で、162 アミノ酸から成っており、正常組織では、リンパ管内皮細胞、中皮細胞、扁平上皮の基底細胞などに発現している。

Podoplanin の機能として、細胞外に存在する PLAG ドメイン は、血小板上のレセプター (CLEC-2) と結合し、血小板凝集を促進すること [21]、また、細胞外ドメインで CD44 と結合し、遊走能の亢進を起こすこと [23] も知られている。一方、

Podoplanin の細胞内ドメインにリン酸化 ERM が結合し、RhoA の活性化を引き起こすことが報告されている [24]。この様に、Podoplanin の機能としては血小板の凝集能と細胞遊走能が挙げられ、がん研究においても両者に着目した研究が報告されている。転移の際に血中へ浸潤したがん細胞が Podoplanin を介して血小板凝集を引き起こし、免疫細胞からの攻撃を回避することで転移を促進することが明らかとなっている。また、食道扁平上皮癌において Podoplanin の発現が認められる症例でリンパ節転移が多く、がん細胞に発現する Podoplanin が細胞遊走を引き起こすことが明らか

かとなっている。

(4) がん幹細胞マーカーとしての Podoplanin

我々は、A431 (ヒト分化型扁平上皮癌細胞株) の Podoplanin 陽性細胞集団にがん幹細胞が濃縮されていることを見出した。96 well プレートに単細胞播種した際に、Podoplanin 陽性細胞の方が、陰性細胞よりコロニーの形成率が有意に高かった。また、Podoplanin 陽性細胞集団からは Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞が、Podoplanin 陰性細胞集団からは Podoplanin 陰性細胞のみが産生されることを見出した。さらに、マウスへの皮下異種移植実験において Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも腫瘍形成能が高かった。以上から、Podoplanin ががん幹細胞マーカーであると結論付けた[25]。また、扁平上皮癌において Podoplanin は腫瘍辺縁部に発現している。腫瘍辺縁部には幼若な細胞が存在しており、形態的にも未分化な細胞で発現している。

更に、Rahadiani らも TE11 (食道扁平上皮癌細胞株) において、Podoplanin 陽性細胞集団からは Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞が、Podoplanin 陰性細胞集団からは Podoplanin 陰性細胞のみが産生されること、Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも腫瘍形成能が高いこと、を報告[26]しており、分化型扁平上皮癌のがん幹細胞マーカーとして Podoplanin は妥当であると思われる。

(5) がん幹細胞の単細胞レベルにおける研究

現在までに行われてきたがん幹細胞の研究は、ある種の細胞表面マーカーを発現している一部の亜集団をがん幹細胞として評価し、その集団としての生物像を評価するものが大半である。がん幹細胞の単細胞レベルにおける研究報告としては、sphere 形成能やコロニー形成能の評価を行った報告はあり[27]、一般的にがん幹細胞の幹細胞性の評価として用いられている。しかし、最終的なコロニーの形成能あるいは大きさの評価は行われている[28] 一方で、その形成過程を詳細に検討した報告は皆無である。

(6) がん幹細胞の浸潤における研究

がんの浸潤における研究としては、特定の因子に着目した研究が多い。特に、がんの浸潤と EMT との関わりは古くから論じられており、がん幹細胞と EMT との関わりも多く報告がある。具体的には、がん幹細胞は EMT を起こし間葉系の形質を示すことで高い浸潤能を示すこと[29, 30]や、細胞の遊走能を亢進することで知られる TGF- β の感応性が高いこと[31]などが報告されている。しかしながら、結果としての高い浸潤能の検討は行っているものの、がん幹細胞が非がん幹細胞と比較し、どの

ような違いを持って、すなわち細胞が移動しないことに起因するのか、増殖が異なることに起因するのか、など浸潤していく過程については未だ不明な点が多い。

IV. 目的

本研究では、がん幹細胞の特徴として、転移巣の形成能の高さおよび浸潤能の高さに着目した。がん幹細胞が非がん幹細胞と比較して少数の状態でのどのように増殖し腫瘍塊（コロニー）を形成するのか、間質に対しどのように浸潤していくのかを *time-lapse imaging* を基に捉え、がん幹細胞の生物学的特徴を明らかにすることを本研究の目的とした。

V. 実験材料と実験方法

(1) 細胞培養

使用した細胞株は A431 (ヒト分化型扁平上皮癌細胞株 ; ATCC)、HEK293T (ヒト胎児腎細胞株)、ヒト包皮線維芽細胞 (Cellular Engineering Technologies) である。A431 は DMEM high glucose (SIGMA) に 10% FBS と 1% Penicillin / Streptomycin を加えた培地で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。HEK293T は RPMI 1640 (SIGMA) に 10% FBS と 1% Penicillin / Streptomycin を加えた培地で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。ヒト包皮線維芽細胞は α -MEM (SIGMA) に 10% FBS と 1% Penicillin / Streptomycin を加えた培地で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。

(2) レンチウイルスベクターのトランスフェクション

(i) mCherry-hCdt1 の導入

ヒト Cdt 1 の調節領域をコードする部位に mCherry をコードする遺伝子を連結した配列を組み込んだ mCherry-hCdt1 (30 / 120) / pCSII-EF-MCS ベクター (理化学研究所バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) 5ug を、3ug の pCMV-HIV 及び pCMV-VSV-G-RSV-Rev ベクターと共に 500ul の Opti-MEM I Reduced Serum

Medium (Invitrogen) に加えて、5 分間室温でインキュベートした (A 液)。また、20ul の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を 500ul の Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) に加えて、5 分間室温でインキュベートした (B 液)。A 液と B 液を混合した後、20 分間室温でインキュベートした。この混合液を、あらかじめ 24 時間前に 6cm dish (日本 BD) に播種した 1.0×10^6 個の HEK293T 細胞に添加した。添加後 24 時間、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した後に培地を交換してさらに 24 時間培養した。培養上清を 0.45um filter (Millipore) に通してから、前日あらかじめ 10 cm dish (日本 BD) に播種した 1.0×10^6 個の A431 細胞に添加した。4 時間後に 10% FBS、1% Penicillin / Streptomycin 含有 DMEM high glucose を加え、37°C、5% CO₂ の条件下で 48 時間培養した後、細胞を回収した。得られた細胞の mCherry 陽性分画を FACS AriaII (日本 BD) を用いて単離した (Fig.2)。

(ii) mVenus-hGeminin の導入

(i) で得られた細胞に、ヒト Geminin の調節領域をコードする部位に mVenus をコードする遺伝子を連結した配列を組み込んだ mVenus-hGeminin (1 / 110) / pCSII-EF-MCS ベクター (理化学研究所 バイオリソースセンター 三好浩之博士より提供) を (i) と同様の手順により導入し、細胞を回収した。得られた細胞の mVenus 陽性分画を FACS AriaII (日本 BD) を用いて単離した (Fig.3)。

(iii) sh-RNA 発現ベクターの導入

コントロールとして sh-luciferase、Podoplanin のノックダウンコンストラクトとして sh-Podoplanin1、sh-Podoplanin3 配列を CS-Rfa-EG vector に挿入し、sh-luciferase、sh-Podoplanin1、sh-Podoplanin3 コンストラクトを構築した。(i) と同様の手順により導入し、細胞を回収した。

(3) 細胞周期測定

1.0×10^6 個の A431-Fucci 細胞を 300ul の 3% FBS / PBS に懸濁し、 -20°C の冷エタノールを 700ul 添加し、細胞を固定した。細胞を 500 μl の 3% FBS / PBS に懸濁し、2ul の DRAQ5 far-red fluorescent DNA dye (Biostates) を添加後、室温で 5 分静置し、FACS caliber (日本 BD) で細胞周期を測定した。さらに、A431-Fucci の mCherry 陽性分画、mVenus と mCherry 両陽性分画、mVenus 陽性分画をそれぞれ FACS AriaII (日本 BD) を用いて sorting し、DRAQ5 far-red fluorescent DNA dye (Biostates) を添加、それぞれの細胞分画の細胞周期を測定した (Fig.4)。

(4) FACS

1.0×10^6 個の A431 細胞を 100ul の 3% FBS / PBS に懸濁した。一次抗体として、抗ヒト Podoplanin 抗体である gp36 (clone 18H5、Abcam、Cambridge、UK) 抗体を 100 倍希釈して用いた。ネガティブコントロールとしては Mouse IgG1, k

isotype Control (clone P3, eBioscience) を 50 倍希釈して用いた。二次抗体としては、Anti-mouse IgG1 PE-Cy7 (eBioscience), goat anti-mouse IgG, F(ab')₂-APC (Santa Cruz) を 100 倍希釈して用いた。

(5) Single cell based Time-lapse imaging

1.0 × 10⁶ 個の A431 細胞を 10 cm dish に播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 48 時間培養した後に培地を交換してさらに 24 時間培養した。培養上清を 0.22um filter (Millipore) に通し、384 well plate (日本 BD) に添加した。実験手法 (4) で示した手順に従って抗体反応させ、FACS AriaII を用いて G₀/G₁期の細胞 (mCherry 陽性細胞) を single cell sorting した。Podoplanin の発現の高い 15%の細胞を陽性集団、Podoplanin の発現が低い 15%の細胞を陰性集団とし、それぞれ培養上清添加済の 384 well plate (日本 BD) に FACS AriaII (日本 BD) を用い、single cell sorting を行った。384 well plate (日本 BD) をインキュベーター顕微鏡 IncuCyte ZOOM (ESSEN bio science) に設置し、37°C、5% CO₂ の条件下で 1 時間毎に 168 時間、蛍光タイムラプスイメージングを行った (Fig.5、6)。

(6) Time-lapse imaging を基にした細胞運命系譜図

細胞運命系譜図の作成にあたり、以下の 4 点に留意した。

(i) 生細胞の判定

核に赤色あるいは緑色の蛍光が確認でき、細胞質に透明の領域が確認できたものを生細胞として判定した (Fig.5 B)。

(ii) 死細胞の判定

細胞の縮小が起こり、その後、細胞が断片化した所見と、細胞が膨張し、細胞膜の破たんが起こった所見を細胞死と判定した (Fig.5 C、D)。

(iii) 細胞分裂の判定

核膜の消失と共に、緑色の蛍光が細胞全体に広がり、細胞の中央に割面が生じた後に二つの娘細胞が確認できた時を細胞分裂と判定した (Fig.5 E)。

(iv) 細胞数の判定

得られた Time-lapse imaging の 168 時間目の写真を用い、生細胞の数を計数し、168 時間後における細胞数とした (Fig.5 F)。

(7) 増殖率の算出

総播種細胞数は、播種した後に確認できた細胞数であり、実験方法 (5)-(i) で示した形態を示す細胞の数の合計とした。一例として、Fig.5 F において総播種細胞数は 3 個、総細胞数は 168 時間後の細胞数の合計で、Fig.5 F において $0 + 4 + 22 = 26$ 個とし、 $[\text{増殖率}] = 26 / 3 = 8.7$ として算出した。

(8) 1 well あたりの増殖率の頻度の算出

各 well において単細胞由来の A431-Fucci 細胞が何個の細胞になったかを 1 well あたりの増殖率として算出した。さらに、算出した増殖率を示す well の、独立した各実験において観察された頻度を算出した。第一回目の Podoplanin 陽性細胞においては、総播種細胞数が 40 個あり、21 well において増殖率が 0 であった。この場合、 $21 / 40 \times 100 = 53\%$ のように頻度を算出した。

(9) 死細胞割合算出

生細胞数：168 時間が経過した時点で生存していた細胞数、死細胞数：168 時間の観察内で細胞死をきたした細胞数、生細胞割合：生細胞数 / (生細胞数+死細胞数)、死細胞割合：死細胞数 / (生細胞数+死細胞数) と定義した。

(10) 細胞周期の長さ

核に赤色の蛍光を呈する時期を G₁ 期と規定した。また、核に黄色～緑色の蛍光を呈する時期を S / G₂ / M 期と規定した。

(11) 世代間の解析

(i) 世代における生細胞と死細胞の定義

播種した細胞を第一世代として、分裂して産生された娘細胞を第二世代、さらに分裂して産生された娘細胞を第三世代（第四世代以降同様）と定義した。第一世代における死細胞は、観察時間である播種後 168 時間以内に細胞死をきたした細胞と定義した。第二世代における死細胞は、分裂した後に観察時間内に細胞死をきたした細胞と定義した（第三世代以降同様）。第一世代における生細胞は、観察終了の播種後 168 時間時点で生存した細胞、もしくは播種後 168 時間以内に分裂した細胞と定義した。第二世代における生細胞は、分裂した後に観察終了時点で生存した細胞、もしくは観察終了までに分裂した細胞と定義した（第三世代以降同様）。尚、観察時間が 33 時間（A431 細胞の細胞周期）に満たない細胞は、検討対象から除外した。（Fig.1、12）

(ii) 世代における死細胞割合

(i) の定義に従って、各世代における生細胞数と死細胞数を算出し、死細胞割合：死細胞数 / (生細胞数+死細胞数) と定義した。

(12) 培養細胞からの RNA 回収と精製

実験方法 (4) に倣い Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞を 1.0×10^6 個ずつ単離した。単離した細胞を 10 cm Dish に播種し、48 時間培養した。10 ml の PBS で 2 回洗浄した後、1 ml の TRIzol reagent (Invitrogen) を加え、セルスクレーパー (ザルスタット)

を用いて回収した。回収した TRIzol reagent に 200 μ l のクロロホルム (和光純薬) を加え、4°C, 15000 rpm で 10 分間遠心して得られた上層から、total RNA を精製した。

(13) 定量的 RT-PCR

精製された total RNA より、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TAKARA) を用いて cDNA を合成した。その後、SYBR Premix Ex Taq™ (TAKARA) を用いて Thermal Cycler Dice Real Time System II (TAKARA) による定量的 RT-PCR 反応を行った。標的遺伝子の mRNA の発現は、*GAPDH* で標準化した。使用したプライマーの配列は Table. 4 に示した。

(14) Western blotting

線維芽細胞の蛋白質の回収は、氷冷した PBS で 2 回細胞を洗浄し、Lysis バッファー [20mM HEPES-NaOH (pH7.9), 300mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% NP-40, 15% Glycerol, Complete EDTA-free Protease inhibitor Cocktail (Sigma), PhosSTOP (Sigma)] を用いて行った。回収した細胞溶解液を 15,000 rpm で 4°C, 15 分間の遠心を行った。遠心後、上清を MPC サンプリングチューブ (ザルスタット) に移し、これを蛋白質抽出液とした。蛋白質抽出液の濃度の定量はブラッドフォード法を用いて行った。定量後の蛋白質抽出液サンプルに 3xSample buffer [0.5M Tris-HCl (pH6.8),

10% SDS, 22.7% (w/v) Glycerol, 1% BPB, 10% 2-mercaptoethanol] を加え、100°Cで5分加熱した。ポリアクリルアミド電気泳動は、4-20%ゲル (Bio-Rad) を用いて、150V で 60 分間の電気泳動を行った。電気泳動後、PVDF メンブレン (Millipore) に転写し、ブロッキング液 [5% skim milk, 1% BSA, 1xTBST] を用いてブロッキング操作を行った。一次抗体反応は、一次抗体をブロッキング液に 1,000 倍希釈し、メンブレンに添加して 4°Cで一晩インキュベートして行った。一次抗体は mouse anti-human MYPT1 抗体 (Cell Signaling)、mouse anti-human Phospho-MYPT1 (Thr696) 抗体 (Cell Signaling)、rabbit anti-human β -actin 抗体 (Santa Cruz) を使用した。一次抗体反応後、メンブレンを 1xTBST で 3 回洗浄した。二次抗体反応は、二次抗体をブロッキング液に 10,000 倍希釈し、メンブレンに添加して、室温で 1 時間インキュベートして行った。二次抗体は Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep 抗体 (GE healthcare) を使用した。二次抗体反応後、メンブレンを 1xTBST で 3 回洗浄した。標的蛋白質の検出には ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare) を用いて、発光により検出を行った。

(15) ROCK 阻害剤処理

ROCK 阻害剤 Y-27632 (Wako) 5mg を 2.96 ml の超純水 (Gibco) に溶解し、5mM のストック溶液を作製した。終濃度 10 μ M になるよう細胞培養培地にて希釈

し、384 well plate (日本 BD) の各 well に 100ul ずつ添加した。

(16) Collagen invasion assay

1.0 × 10⁶ 個の A431 細胞と線維芽細胞を 10 cm dish に播種し、37°C、5% CO₂ の条件下で 48 時間培養した後に細胞を回収した。また、終濃度 0.3mg / ml となるよう pH3 の希塩酸でセルマトリックス Type I-A (新田ゼラチン, 3mg / ml, pH3) を希釈し、ESSEN image lock 96 well plate (ESSEN bio science) の各 well に 50ul ずつ添加しインキュベーター内で 24 時間静置することでコラーゲンコートを行った。回収した細胞を計数し、癌細胞単独群では 1.0 × 10⁴ 個の癌細胞を、線維芽細胞との共培養群では癌細胞と線維芽細胞がそれぞれ 5.0 × 10³ 個をコラーゲンコートした ESSEN image lock 96 well plate (ESSEN bio science) の各 well に播種した。播種後 1 時間 37°C、5% CO₂ の条件下で静置した後に、WOUNDMAKER 96 (ESSEN bio science) でスクラッチを入れた。スクラッチを入れた後に、細胞培養培地にて 3 回洗浄した。セルマトリックス Type I-A (新田ゼラチン, 3mg / ml, pH3)、5×DF 培地 (新田ゼラチン)、再構成用緩衝液 (新田ゼラチン) をそれぞれ 8 : 1 : 1 となるよう混和し、細胞培養培地を吸引除去した ESSEN image lock 96 well plate (ESSEN bio science) の各 well に 50ul ずつ添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 30 分静置した。コラーゲンゲルが固まったことを確認した後に、細胞培養培地を各 well に 100ul ずつ添加し、

IncuCyte ZOOM (ESSEN bio science) に設置し 72 時間、time-lapse imaging を行った。

(17) 浸潤癌細胞の浸潤様式解析

Collagen invasion assay において、スクラッチを入れた部分に浸潤した細胞を浸潤先進部、そうでない部分を非浸潤先進部とした。浸潤先進部における A431 細胞の浸潤様式を以下の 3 種類に分類した (Fig. 20 A)。

- A) 非浸潤先進部と連続的な浸潤
- B) 非浸潤先進部と非連続的な浸潤かつ 6 細胞以上からなる胞巣
- C) 非浸潤先進部と非連続的な浸潤かつ 5 細胞以下からなる胞巣

(18) Caspase apoptosis assay

IncuCyte Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent (ESSEN bio science) を細胞培養培地にて 1000 倍希釈し、ESSEN image lock 96 well plate (ESSEN bio science) の各 well に 100ul ずつ添加し、観察を行った。

IncuCyte Caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent は caspase-3/7 が活性化した細胞、すなわちアポトーシスを起こしている細胞において、caspase の働きにより遊離した DNA 染色色素により核酸が緑色に呈色される試薬である。したがって、

核酸成分を含むアポトーシス小胞も呈色される。

死細胞割合：(呈色した核及びアポトーシス小胞の数) / 浸潤細胞数

として算出した。

(19) 免疫染色

(i) 腫瘍組織の免疫染色

肺扁平上皮癌患者 14 症例を対象にして免疫組織化学的染色を行った。組織切片はキシレンとエタノールを用いて脱パラフィン化した後、0.3% (v/v) 過酸化水素を含有したメタノールに 30 分間浸し、内因性ペルオキシダーゼを阻害した。その後、抗原を賦活する為に、10mM クエン酸バッファー (pH 6.0) に浸して 95°C で 20 分間 H2850 Microwave Processor (EBSciences) を用いてマイクロウェーブ処理を行った。一次抗体は、mouse anti-human Geminin 抗体 (Abcam) を 250 倍で Antibody Diluent with Background Reducing Components (Agilent) で希釈し添加した後、4°C で一晩反応させた。その後、Envision+ system (Agilent) 及びジアミノベンジジンを用いて発色させた。ヘマトキシリンを用いて対比染色した後、封入した。明視野観察は、Nano Zoomer 2.0 HT (Hamamatsu Photonics) を用いて対物レンズ 20 倍を用いて検鏡をした。

(ii) 腫瘍組織における増殖細胞割合算出法

線維芽細胞を多く含む領域を fibroblasts-rich area、線維芽細胞をほとんど含まない領域を fibroblasts-poor area とした。各領域において無作為に 5 視野選出し、腫瘍細胞においてヘマトキシリンの染色を基に総癌細胞数を計測した。また、同様に Geminin の染色を基に増殖癌細胞数を計測した。

増殖細胞割合 = Geminin 陽性癌細胞数 / 総癌細胞数

として算出し、同一検体における fibroblasts rich area と poor area の増殖細胞割合を Wilcoxon の順位和検定を用いて統計解析を行った。

(20) 統計処理

全ての実験結果は、mean ± SD 値で示した。2 サンプル間の比較については、学生 t 検定、もしくは Wilcoxon の符号付き順位和検定を用いて統計解析を行い、両側検定で P 値が 0.05 未満であった場合に有意差ありとみなした。

VI. 結果 –単細胞レベルにおけるがん幹細胞の細胞運命の解明–

(1) A431-Fucci 作製

(i) mCherry-hCdt1 の導入

実験手法 (2)-(i) に従い、A431 細胞に mCherry-hCdt1 を Lentivirus を用いてトランスフェクションした。得られた細胞を A431-mCherry と名付けた。A431-mCherry の mCherry 陽性細胞分画を FACS AriaII を用いて単離した。得られた細胞を A431-mCherry pure と名付けた (Fig.2)。

(ii) mVenus-hGeminin の導入

実験手法 (2)-(ii) に従い、A431-mCherry pure に mVenus-hGeminin を Lentivirus を用いてトランスフェクションした。得られた細胞を A431-mCherry pure mVenus と名付けた。A431-mCherry pure mVenus の mVenus 陽性細胞分画を FACS AriaII を用いて単離した。得られた細胞を A431-Fucci と名付けた (Fig.3)。

(iii) A431-Fucci の細胞周期測定

作製した A431-Fucci の mCherry 陽性分画、mCherry mVenus 両陽性分画、

mVenus 陽性分画をそれぞれ FACS AriaII を用いて単離した。単離前の細胞と、上記の細胞分画の細胞周期を実験手法 (4) に従い、測定した。Fig.4 における黒線は単離前の A431-Fucci2 の細胞周期ヒストグラム、赤線は mCherry 陽性細胞分画の細胞周期ヒストグラム、黄線は mCherry mVenus 両陽性細胞分画の細胞周期ヒストグラム、緑線は mVenus 陽性細胞分画の細胞周期ヒストグラムである。mCherry 陽性細胞分画には G_0 / G_1 期の細胞が、mCherry mVenus 両陽性細胞分画には G_0 / G_1 期から S 期への遷移中の細胞が、mVenus 陽性細胞分画には S / G_2 / M 期の細胞が存在していることを確認した (Fig.4)。以上の結果から、作製した A431-Fucci は細胞周期を正確に反映する細胞株であることを確認した。

(2) A431-Fucci の増殖率

実験手法 (5) に従い、mCherry 陽性の G_0 / G_1 期の細胞を 384 well plate に single cell sorting した (Fig.5 A)。

単細胞が確認できた well に対して、A431-Fucci が 168 時間後に何個の細胞になっていたかを計測した。

実験は 5 回行い、各実験における総播種細胞数と、168 時間後の総細胞数を Table. 1 に示す。この結果を基に、それぞれにおける増殖率を実験方法 (7) に従って算出した。独立した 5 回の実験においていずれも Podoplanin 陽性細胞の方が、陰性細胞よ

りも高い増殖率を示した。上記 5 回分の平均増殖率を算出した。Fig.7 に示すように、Podoplanin 陽性細胞の増殖率は 4.1、Podoplanin 陰性細胞の増殖率は 1.5 であり、で Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも有意に増殖率が高かった ($p=0.03$)。

(3) 1 well あたりの増殖率

実験方法 (8) に従い、1 well あたりの増殖率の頻度を算出した。独立した 5 回実験における 1 well あたりの平均増殖率を Fig.8 に示す。増殖率が 0 の well 頻度は、Podoplanin 陰性細胞が 73%、陽性細胞が 58%で有意差を持って Podoplanin 陰性細胞の方が高かった ($p=0.03$)。一方、増殖率 ≥ 8 の well の頻度は、Podoplanin 陰性細胞が 7%、陽性細胞が 21%で有意差を持って Podoplanin 陽性細胞の方が高かった ($p=0.03$) (Fig.8)。

(4) Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の細胞周期

実験方法 (10) に従い、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の G_1 期の長さ、 $S/G_2/M$ 期の長さ、細胞周期全体の長さを測定した。独立した実験を 5 回行い、合計で Podoplanin 陽性細胞を 1092 細胞、Podoplanin 陰性細胞を 501 細胞測定した。 G_1 期の長さは Podoplanin 陰性細胞が 18.5~20.6 時間で平均が 18 時間、陽性細胞が 16.5~20.5

時間で平均が 19.9 時間であった。S / G₂ / M 期の長さは Podoplanin 陰性細胞が 15.3~21.3 時間で平均が 20.9 時間、陽性細胞が 18.1~27.7 時間で平均が 17.2 時間であった。細胞周期全体の長さは Podoplanin 陰性細胞が 35.1~40.4 時間で平均が 38.8 時間、陽性細胞が 35.5~44.5 時間で平均が 37.0 時間であった。G₁期の長さ、S / G₂ / M 期の長さ、細胞周期全体の長さのいずれにおいても Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の間に有意な差を認めなかった (Fig.9)。

(5) Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の死細胞割合

細胞の動態を、得られた time-lapse imaging をもとに時間軸も含めた細胞運命系譜図を作成し (Fig.6)、実験方法 (9) に従い各細胞における死細胞割合を算出した。例えば、この細胞運命系譜図における生細胞数 : 8、死細胞数 : 2、生細胞割合 : 80%、死細胞割合 : 20%、となる。独立した 5 回の実験を行い、Podoplanin 陰性細胞の死細胞割合は平均値が 81%であったのに対し、Podoplanin 陽性細胞は平均値が 65%であった。Fig.10 に、5 回の実験の平均死細胞割合を示す。死細胞割合は有意に Podoplanin 陽性細胞にて低かった ($p=0.01$)。

(6) Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞由来娘細胞の各世代における細胞周期

Fig.11 に世代の模式図を示す。細胞分裂してできた 2 つの娘細胞を次世代とした。

A431 の doubling time が約 33 時間であるため、33 時間の観察が不可能であった娘細胞については検討から除外することとした。実験方法 (10) に従い、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の各世代の G₁期の長さ、S / G₂ / M 期の長さ、細胞周期全体の長さを測定した。各世代において G₁期の長さ、S / G₂ / M 期の長さ、細胞周期全体の長さのいずれにおいても Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の間で有意な差を認めなかった (Fig.12)。

(7) Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞由来娘細胞の各世代における死細胞割合

独立した 5 回の実験において各世代における平均死細胞割合を測定した。第一世代から第三世代では Podoplanin 陰性細胞のほうが陽性細胞よりも死細胞率が高い傾向を示した。第四世代では Podoplanin 陰性細胞が 29%、陽性細胞が 11%であり、有意に陰性細胞で死細胞率が高かった ($p=0.01$) (Fig.13)。

(8) sh-RNA 発現細胞の 1 well あたりの増殖率

実験方法 (2)-(iii) に従い、sh-RNA 発現細胞の作製を行った。Sh-RNA 発現ベクターには、導入細胞に恒常的に GFP が発現する配列が組み込まれている。そのため、Fucci の mVenus-hGeminin と蛍光が重なり合うため、A431-mCherry pure 細胞に sh-RNA 発現コンストラクトの導入をレンチウイルスベクターを用い、形質導入を行

った。また、実験手法 (4) に基づき、sh-RNA 導入細胞の Podoplanin の発現を FACS を用いて測定した。コントロールである sh-luciferase 群と比較して、Podoplanin のノックダウンコンストラクトを導入した細胞で、Podoplanin の発現の低下が確認された (Fig. 14)。

上述したように、Sh-RNA 導入ベクターには GFP の発現配列が組み込まれている。したがって、GFP 陽性かつ mCherry 陽性細胞、すなわち sh-RNA 導入かつ G₀ / G₁期の細胞を実験方法 (5) に従い 384 well plate に single cell sorting した。各実験における総播種細胞数と、168 時間後の総細胞数を Table. 2 に示す。

得られた結果を基に、実験方法 (8) に従い、1 well あたりの増殖率の頻度を算出した。独立した 3 回実験における 1 well あたりの平均増殖率を Fig.15 に示す。増殖率が 0 の well 頻度は、コントロールである sh-luciferase 導入細胞で 61%、sh-Podoplanin1 導入細胞が 88%、sh-Podoplanin3 導入細胞が 78%で、Podoplanin をノックダウンすることで有意に増加した (sh-luciferase vs sh-Podoplanin1, $p<0.01$, sh-luciferase vs sh-Podoplanin3, $p=0.05$)。一方、増殖率 ≥ 8 の well の頻度は、sh-luciferase 導入細胞で 14%、sh-Podoplanin1 導入細胞が 2%、sh-Podoplanin3 導入細胞が 4%で、Podoplanin をノックダウンすることで有意に減少した (sh-luciferase vs sh-Podoplanin1, $p<0.01$, sh-luciferase vs sh-Podoplanin3, $p=0.04$) (Fig.15)。

(9) sh-RNA 発現細胞の死細胞割合

結果 (5) 同様に sh-RNA 導入細胞において細胞運命系譜図を作成し、実験方法 (9) に従い各細胞における死細胞割合を算出した。独立した 3 回の実験を行った。コントロールである sh-luciferase 導入細胞で 69%、sh-Podoplanin1 導入細胞が 92%、sh-Podoplanin3 導入細胞が 84%で、Podoplanin をノックダウンすることで増加した (sh-luciferase vs sh-Podoplanin1, $p<0.01$, sh-luciferase vs sh-Podoplanin3, $p=0.08$) (Fig.16)。

(10) Podoplanin の下流のシグナル

Fig.17 A に Podoplanin の下流のシグナルを示す。Rho-ROCK シグナルが活性化されると、ROCK のキナーゼである MYPT1 がリン酸化されることが知られている。そこで、実験手法 (4), (14) に基づき、単離した Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の cell lysate を回収した。回収した cell lysate を用い、実験手法 (14) に基づき total の MYPT1 量とリン酸化 MYPT1 量を WB 法を用い検討したところ、Podoplanin 陽性細胞で MYPT1 の強いリン酸化が確認された (Fig.17 B)。また、Podoplanin をノックダウンすることで MYPT1 のリン酸化は抑制された (Fig.17 B)。

(11) ROCK 阻害剤添加細胞の 1 well あたりの増殖率

実験方法 (15) に従い、あらかじめ ROCK 阻害剤を添加した 384 well に、実験方法 (5) に従い Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞を単細胞播種した。各実験における総播種細胞数と、168 時間後の総細胞数を Table. 3 に示す。得られた結果を基に、実験方法 (8) に従い、1 well あたりの増殖率の頻度を算出した。独立した 3 回の実験における 1 well あたりの平均増殖率を Fig.18 に示す。増殖率が 0 の well 頻度は、Podoplanin 陽性細胞において、ROCK 阻害剤処理することで 58%から 69%に増加した ($p=0.06$)。また、Podoplanin 陰性細胞において、ROCK 阻害剤処理することで 63%から 78%に増加した ($p=0.03$)。一方、増殖率 ≥ 8 の well の頻度は、Podoplanin 陽性細胞において、ROCK 阻害剤処理することで 28%から 17%に減少した ($p=0.03$)。しかし、Podoplanin 陰性細胞においては、ROCK 阻害剤処理による変化は確認されなかった。

(12) ROCK 阻害剤添加細胞の死細胞割合

結果 (5), (10) 同様に ROCK 阻害剤添加細胞において細胞運命系譜図を作成し、実験方法 (9) に従い各細胞における死細胞割合を算出した。独立した 3 回の実験を行った。Podoplanin 陽性細胞において、ROCK 阻害剤処理することで 70%から 79%に増加した ($p=0.08$)。また、Podoplanin 陰性細胞において、ROCK 阻害剤処理するこ

とで 75%から 86%に増加した ($p=0.06$) (Fig.19)。

Ⅶ. 考察 – 単細胞レベルにおけるがん幹細胞の細胞運命の解明 –

(1) A431-Fucci の作製

A431-Fucci2 作製にあたり、A431-mCherry 強陽性細胞分画を継時的に観察したところ、赤色の蛍光が細胞周期非依存的に常に発現している細胞が多数見られた。Cdt1 は G1 期で高発現であり、S 期に移行後にユビキチン化を受けて分解される [32]。mCherry-hCdt1 が過剰量発現していると、S 期においてユビキチン化が間に合わず、分解されずに残ってしまう事が原因と考えられた。mCherry 弱陽性細胞分画のみを単離し、継時的に観察したところ、これらの細胞では mCherry の蛍光が細胞周期の進行とともに明滅する様子を確認した。そこで、mCherry 弱陽性細胞分画に mVenus-hGeminin を形質導入し、A431-Fucci の作製を行った。得られた A431-Fucci の蛍光は細胞周期を正確に反映することを確認した。

(2) Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の増殖

Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞を 1 個 / well ずつ播種し、両者の 168 時間後の総細胞数（増殖率）を検討したところ、Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも増殖率が有意に高かった。次に、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の 1 well あたりの増殖率を検討した。増殖率 \geq 8 の well の頻度、すなわち大型のコロニーを形成する頻度

は、Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞より有意に高く、また、増殖率が 0 の well の頻度は、有意に低かった。以上の結果は、がん幹細胞の同定に一般的に用いられるコロニーフォーメーションアッセイにおいて、がん幹細胞は非がん幹細胞よりコロニー形成能が高いことと一致する。従って、今回が用いた系は、既存の系と比較しても、妥当であると思われる。

我々は、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞を 1×10^5 個 / well ずつ播種すると、両者の 168 時間後の細胞数に有意な差がない事を確認している [25]。単細胞から培養した状態と、多細胞から培養し、細胞間相互作用が働く状態とでは、細胞の増殖 / 生存に与える影響が異なることが示唆された。

(3) Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の細胞周期

Podoplanin 陽性細胞の方が 168 時間後の細胞数が多い理由として、細胞周期のサイクルが短い事、もしくは細胞死をきたす頻度が低い事が考えられた。そこで、まず、Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の細胞周期の長さを算出した。G₁期の長さ、S / G₂ / M 期の長さ、細胞周期全体の長さを測定した。G₁期の長さを、核に赤色の蛍光が確認できた時間、S / G₂ / M 期の長さを、核に黄色～緑色の蛍光が確認できた時間としてそれぞれ算出した。Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の間に G₁期、S / G₂ / M 期、いずれの長さも差は認められなかった。一般に、がん幹細胞は組織幹細胞と同

様に休眠状態にあると考えられている [33] が、今回の実験系でその現象は確認できなかった。組織幹細胞は、生体内で周囲の異種あるいは同種細胞と共に微小環境として幹細胞ニッチを形成し、その幹細胞性はニッチによって保たれるとされている [34]。実際、腸管陰窩において *Lgr5* 陽性幹細胞と隣接する *Paneth* 細胞の分泌する *Wnt* シグナルにより、幹細胞の増殖が亢進する報告 [35] や、毛根において角化細胞からの *FGF16* や *BMP6* により毛包幹細胞の休眠が保たれているとする報告 [36] 等が相次いでいる。がん細胞において、卵巣腺がんの薬剤耐性株を作製し、その細胞が長期にわたり生細胞膜染色色素 *PKH* を保持する報告 [37] や、膀胱がん細胞株において細胞周期の遅い細胞にがん幹細胞マーカーが発現しており、薬剤抵抗性も有している報告 [38] がある。今回の *in vitro* における単細胞レベルでの解析では、他の細胞との相互作用が不十分であり、がん幹細胞ニッチが形成されなかったことも推察された。その結果、がん幹細胞は休眠へ移行せず、非がん幹細胞との細胞周期に差が見られなかった可能性も考えられた。

(4) *Podoplanin* 陽性細胞と陰性細胞の死細胞割合

次に、*Podoplanin* 陽性細胞と陰性細胞の死細胞割合を算出したところ、*Podoplanin* 陽性細胞の方が陰性細胞よりも 細胞死をきたす頻度が有意に低い事が明らかになった。本研究で用いたヒト扁平上皮がん A431 では、免疫組織化学的検討に

より、Podoplanin 陽性領域に未分化マーカーである CD44 の発現が高い事を確認している [25]。また、リアルタイム PCR を用いた検討においても Podoplanin 陽性細胞において未分化マーカーである CD44, Sox2 の発現が高く、一方角化マーカーである IVL の発現が低かった (Sup Fig.1)。

非がん幹細胞は分化が進んだ細胞が多いと考えられており、非がん幹細胞は分化が進んで細胞死をきたすという可能性も考えられた。

(5) Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞由来娘細胞の各世代における細胞周期

以上までの検討で、播種後 168 時間において Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の間に、細胞周期の長さには差がない一方、Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも細胞死をきたす頻度が低い事が明らかになった。しかし、FACS sorting 直後に細胞死をきたす頻度に差があり (すなわち dish への生着能に有意差を生じ)、そのことが最終的な細胞数に影響を与えている可能性も考えられたので、各世代における細胞周期の長さとし細胞死割合を算出した。

Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の細胞周期には世代間の差は認められなかった。第一世代と第二世代以降を比較すると、第一世代の方が細胞周期の長さが短く見えるが、これは、赤色の蛍光が確認できた G₁期の細胞をランダムに播種しているために分散が大きくなったためであると考えた。

(6) Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞由来娘細胞の各世代における死細胞割合

各世代における死細胞割合は、第一世代（sorting 直後の細胞）から第三世代までは Podoplanin 陽性細胞の方が低い傾向を示した。しかし、第四世代では有意に Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも低かった。世代が進むにつれて死細胞割合に差が出るのかどうかを検討するためには長期的な観察が必要ではあるが、細胞同士が重なり合い、解析が困難なため、集団の状態を模倣する系の立ち上げが必要だと思われる。以上から、sorting 直後のプラスチックディッシュへの生着/生存率による影響は少なく、各世代ごとに Podoplanin 陽性細胞の方が陰性細胞よりも死細胞割合が低く、その事が、最終的な細胞数を決定していることが明らかとなった。

(7) sh-RNA 発現細胞の 1 well あたりの増殖率

次に、がん幹細胞に発現する Podoplanin ががん幹細胞の幹細胞性に与える影響について検討した。そこで、まず Podoplanin のコロニー形成における機能を検討した。Sh-RNA 導入細胞の 1 well あたりの増殖率を算出したところ、Podoplanin のノックダウンコンストラクトを導入した細胞において 8 細胞以上からなるコロニーの形成頻度が減少した。また、コロニーを形成できなかった細胞の頻度は Podoplanin のノックダウンコンストラクトを導入した細胞において上昇した。この現象は

Podoplanin のノックダウン効率に比例していたことから、Podoplanin がコロニー形成における機能分子であることが示唆された。

(8) sh-RNA 発現細胞の死細胞割合

Podoplanin をノックダウンすることで抑制されたコロニー形成能が、Podoplanin 陰性細胞と同様、細胞死によるものか確認した。結果、Podoplanin をノックダウンすることにより細胞死をきたす細胞の頻度が上昇した。このことから、Podoplanin が単細胞レベルにおける細胞死の機能分子であることが明らかとなった。

(9) Podoplanin の下流のシグナル

Podoplanin は細胞内ドメインに ERM binding domain を持ち、Rho-ROCK signal を活性化することが知られている。Rho-ROCK signal の評価には本検討では ROCK のリン酸化ターゲットである MYPT1 を用いた。MYPT1 はリン酸化されることで不活性化され、細胞の増殖や生存を促進することが知られている[39]。WB 法を用いた検討では Podoplanin 陽性細胞でリン酸化 MYPT1 レベルが上がっており、Podoplanin 陽性細胞は ROCK signal を活性化することで高いコロニー形成能を示すことが示唆された。

(10) ROCK 阻害剤添加細胞の 1 well あたりの増殖率

Podoplanin 陽性細胞において ROCK signal の亢進が見られたことから、ROCK 阻害剤を用い、Podoplanin の下流のシグナルの阻害を行った。Podoplanin 陽性細胞を ROCK 阻害剤で処理した際にのみ 8 細胞以上からなるコロニーの形成が阻害された。以上より、Podoplanin 陽性細胞は Podoplanin-ROCK signal を活性化させることで高いコロニー形成能を示すことが明らかとなった。

(11) ROCK 阻害剤添加細胞の死細胞割合

ROCK 阻害剤添加条件下において、コロニー形成過程における細胞死の頻度を算出したところ、Podoplanin 陽性細胞だけでなく、陰性細胞においても細胞死が促進されていた。ROCK signal は Rho だけでなく Rac や Cdc42 などによっても調節されていることが知られている[40]。ROCK 阻害剤は特異的に Podoplanin-ROCK signal を阻害するだけでなく、広範に ROCK signal を阻害する。Podoplanin を介さない ROCK signal までも阻害してしまったため、Podoplanin 陰性細胞においても細胞死の誘導が起こったことが考えられる。

VIII. 結論 —単細胞レベルにおけるがん幹細胞の細胞運命の解明—

がん幹細胞は Podoplanin を介して ROCK シグナルをより活性化することで細胞死を回避し、単細胞レベルにおける高いコロニー形成能を示すことが明らかとなった (Fig. 18)。

IX. 結果 —がん幹細胞の浸潤像の解明—

X. 考察 —がん幹細胞の浸潤像の解明—

XI. 結論 —がん幹細胞の浸潤像の解明—

5年以内に出版予定

XII. 総合考察

がんはその進展過程で原発巣から離脱し、脈管を介して転移先の臓器に定着し、転移巣を形成する。その際に中心的な役割を果たすとされているのががん幹細胞である。本検討では、我々が同定した扁平上皮癌のがん幹細胞マーカーである Podoplanin をモデルとして用い、がんの進展過程におけるがん幹細胞の生物像を明らかにすることを目的とした。本検討では我々が独自に開発した *in vitro* のモデルを用いて、がん幹細胞の単細胞レベルにおけるコロニー形成能と、浸潤能について、time-lapse imaging を用いて詳細に検討することで、がんの進展過程を明らかにすることを試みた。転移先に到達したがん細胞は、その後転移巣を形成するが、その際には単細胞、もしくは少数の状態であることが明らかとなっている。本検討では、単細胞の状態からどのようにしてがん幹細胞が増殖していくのかを詳細に検討したところ、従来の報告同様にがん幹細胞のほうが高いコロニー形成能を示した。その際に、がん幹細胞は非がん幹細胞と比較して、細胞死をきたしにくいことが明らかとなった。しかし、細胞周期に両者の差を認めなかった。がん幹細胞は休眠状態にあるという報告もあり、その調節には細胞間相互作用によることが知られている。今回は *in vitro* の系を用いたがん幹細胞の内因性の性質を検討したものであり、その結果、細胞周期に差を認めなかった可能性が示唆される。がん幹細胞に発現する Podoplanin

ががん幹細胞性の維持への関与を検討するために、sh-RNA を用いた発現抑制系と、下流の阻害剤添加を行った。Podoplanin の発現抑制と、下流シグナルである ROCK シグナルを阻害することで細胞死が促進されコロニー形成能が抑制されたことから、Podoplanin はがん幹細胞の生存に寄与していることが明らかとなった。また、一般にがん幹細胞は高い浸潤・遊走能を持つとされているが、本検討では線維芽細胞依存的な浸潤においてのみ、がん幹細胞の浸潤が促進されていた。実際のヒト扁平上皮癌においては、腫瘍胞巣の辺縁部（コラーゲンなどの細胞外マトリクスと直接接する領域）にがん幹細胞が存在することから、がん幹細胞は線維芽細胞と相互作用することで、間質中へとより多く浸潤していくものと考えられる。その際に、がん幹細胞に発現する Podoplanin は浸潤促進的に働く機能分子と考えられた。実際に Podoplanin を遺伝子操作により過剰発現するとがん細胞の浸潤能が亢進する報告や、本検討同様、発現抑制することで浸潤能が抑制されることが明らかとなっている[45, 46]。

Podoplanin はその下流のシグナルで細胞骨格を制御することが知られており、線維芽細胞の形成した tracks 内の遊走にも寄与していることが考えられる。すなわち、がん幹細胞は Podoplanin を介することで少数の状態において生存・増殖が可能であり、また線維芽細胞存在下では高い浸潤能を示すことが明らかとなった。

現在では、抗 Podoplanin 抗体を用いた転移の抑制効果が明らかになっており、抗体医薬の標的としての Podoplanin が注目されている。すなわち、血小板との相互作用

用を阻害することによる転移抑制実験[47]や、抗 Podoplanin 抗体を用いた転移抑制及び転移巣への治療実験が行われている[48]。現在ではがん幹細胞を標的とした治療が様々な製薬企業で行われている。がん幹細胞に発現する Podoplanin の有するシグナルを阻害することでがん幹細胞の浸潤や転移巣の増大を抑制することも可能であることが示唆された。

XIII. 今後の検討

がん幹細胞からはがん幹細胞と非がん幹細胞が、非がん幹細胞からは非がん幹細胞のみが産生されると考えられているが、近年では非がん幹細胞からもがん幹細胞が産生される、すなわち可塑性を有していることが明らかとなってきた。正常組織幹細胞においては、組織の損傷の際等で組織幹細胞が障害を受けた場合にのみ、非幹細胞から幹細胞へと形質が転換することが分かっている[49]。同様の現象はメラノーマや乳がん、大腸癌でも確認されており、がん幹細胞を一時的に枯渇させても、やがて元の細胞構成を取り戻すことが明らかとなっている[50, 51, 52]。本検討では分裂中の細胞の Podoplanin の発現を検討することは出来なかった。すなわち、FACS により分取した Podoplanin 陰性細胞から陰性細胞のみが産生されているのか、細胞死をきたした細胞は Podoplanin 陰性細胞なのかは不明である。浸潤細胞においても同様に、線維芽細胞やコラーゲンからの影響で Podoplanin 陰性細胞が陰性細胞のままであったかは不明である。そこで、Podoplanin のプロモーターの下流に蛍光タンパク質を組み込むことで Podoplanin の発現を可視化する系の構築を予定している。

また、がん幹細胞は周囲の細胞との相互作用により様々な形質を示すことが知られている。今後は、これら間質細胞ががん幹細胞の生物像に及ぼす影響についても明らかにしたいと考える。

XIV. 参考文献

- 1 Schroeder, A. *et al.* Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer* **12**, 39-50, doi:10.1038/nrc3180 (2011).
- 2 Clark, A. G. & Vignjevic, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol* **36**, 13-22, doi:10.1016/j.ceb.2015.06.004 (2015).
- 3 Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 392-401, doi:10.1038/nrc1877 (2006).
- 4 Fabisiewicz, A. & Grzybowska, E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Med Oncol* **34**, 12, doi:10.1007/s12032-016-0875-0 (2017).
- 5 Gaggioli, C. *et al.* Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* **9**, 1392-1400, doi:10.1038/ncb1658 (2007).
- 6 Neri, S. *et al.* Podoplanin-expressing cancer-associated fibroblasts lead and enhance the local invasion of cancer cells in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* **137**, 784-796, doi:10.1002/ijc.29464 (2015).

- 7 Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**, 730-737 (1997).
- 8 Singh, S. K. *et al.* Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821-5828 (2003).
- 9 Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3983-3988, doi:10.1073/pnas.0530291100 (2003).
- 10 Li, C. *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* **67**, 1030-1037, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2030 (2007).
- 11 Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**, 111-115, doi:10.1038/nature05384 (2007).
- 12 Patrawala, L. *et al.* Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* **25**, 1696-1708, doi:10.1038/sj.onc.1209327 (2006).
- 13 Hurt, E. M., Kawasaki, B. T., Klarmann, G. J., Thomas, S. B. & Farrar, W. L. CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer* **98**, 756-765,

- doi:10.1038/sj.bjc.6604242 (2008).
- 14 Clarke, M. F. *et al.* Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* **66**, 9339-9344, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3126 (2006).
- 15 Dick, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* **112**, 4793-4807, doi:10.1182/blood-2008-08-077941 (2008).
- 16 Bruttel, V. S. & Wischhusen, J. Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? *Front Immunol* **5**, 360, doi:10.3389/fimmu.2014.00360 (2014).
- 17 Harper, K. L. *et al.* Mechanism of early dissemination and metastasis in Her2(+) mammary cancer. *Nature*, doi:10.1038/nature20609 (2016).
- 18 Lawson, D. A. *et al.* Single-cell analysis reveals a stem-cell program in human metastatic breast cancer cells. *Nature* **526**, 131-135, doi:10.1038/nature15260 (2015).
- 19 Tsuruo, T., Yamori, T., Naganuma, K., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. Characterization of metastatic clones derived from a metastatic variant of mouse colon adenocarcinoma 26. *Cancer Res* **43**, 5437-5442 (1983).
- 20 Watanabe, M., Okochi, E., Sugimoto, Y. & Tsuruo, T. Identification of a

- platelet-aggregating factor of murine colon adenocarcinoma 26: Mr 44,000 membrane protein as determined by monoclonal antibodies. *Cancer Res* **48**, 6411-6416 (1988).
- 21 Sugimoto, Y. *et al.* Suppression of experimental lung colonization of a metastatic variant of murine colon adenocarcinoma 26 by a monoclonal antibody 8F11 inhibiting tumor cell-induced platelet aggregation. *Cancer Res* **51**, 921-925 (1991).
- 22 Breiteneder-Geleff, S. *et al.* Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* **151**, 1141-1152 (1997).
- 23 Martin-Villar, E. *et al.* Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol Biol Cell* **21**, 4387-4399, doi:10.1091/mbc.E10-06-0489 (2010).
- 24 Martin-Villar, E. *et al.* Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* **119**, 4541-4553, doi:10.1242/jcs.03218 (2006).
- 25 Atsumi, N. *et al.* Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem Biophys Res Commun* **373**,

- 36-41, doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.163 (2008).
- 26 Rahadiani, N. *et al.* Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* **17**, 1311-1323, doi:10.1245/s10434-009-0895-5 (2010).
- 27 Geng, S. *et al.* Isolation and identification of a distinct side population cancer cells in the human epidermal squamous cancer cell line A431. *Arch Dermatol Res* **303**, 181-189, doi:10.1007/s00403-010-1100-1 (2011).
- 28 Driessens, G., Beck, B., Caauwe, A., Simons, B. D. & Blanpain, C. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* **488**, 527-530, doi:10.1038/nature11344 (2012).
- 29 Wang, J. J. *et al.* Autocrine hGH stimulates oncogenicity, epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like behavior in human colorectal carcinoma. *Oncotarget* **8**, 103900-103918, doi:10.18632/oncotarget.21812 (2017).
- 30 Shibue, T. & Weinberg, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* **14**, 611-629, doi:10.1038/nrclinonc.2017.44 (2017).
- 31 Oshimori, N., Oristian, D. & Fuchs, E. TGF-beta promotes heterogeneity and

- drug resistance in squamous cell carcinoma. *Cell* **160**, 963-976, doi:10.1016/j.cell.2015.01.043 (2015).
- 32 Sugimoto, N. *et al.* Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J Biol Chem* **279**, 19691-19697, doi:10.1074/jbc.M313175200 (2004).
- 33 Sosa, M. S., Bragado, P. & Aguirre-Ghiso, J. A. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* **14**, 611-622, doi:10.1038/nrc3793 (2014).
- 34 Sottocornola, R. & Lo Celso, C. Dormancy in the stem cell niche. *Stem Cell Res Ther* **3**, 10, doi:10.1186/scrt101 (2012).
- 35 Sato, T. *et al.* Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**, 415-418, doi:10.1038/nature09637 (2011).
- 36 Hsu, Y. C., Pasolli, H. A. & Fuchs, E. Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle. *Cell* **144**, 92-105, doi:10.1016/j.cell.2010.11.049 (2011).
- 37 Kusumbe, A. P. & Bapat, S. A. Cancer stem cells and aneuploid populations within developing tumors are the major determinants of tumor dormancy. *Cancer Res* **69**, 9245-9253, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2802 (2009).

- 38 Dembinski, J. L. & Krauss, S. Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis* **26**, 611-623, doi:10.1007/s10585-009-9260-0 (2009).
- 39 Serrano, I., McDonald, P. C., Lock, F., Muller, W. J. & Dedhar, S. Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase. *Nat Commun* **4**, 2976, doi:10.1038/ncomms3976 (2013).
- 40 Nobes, C. D. & Hall, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62 (1995).
- 41 Friedl, P. & Alexander, S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* **147**, 992-1009, doi:10.1016/j.cell.2011.11.016 (2011).
- 42 Kagawa, Y. *et al.* Cell cycle-dependent Rho GTPase activity dynamically regulates cancer cell motility and invasion in vivo. *PLoS One* **8**, e83629, doi:10.1371/journal.pone.0083629 (2013).
- 43 Yano, S. *et al.* Invading cancer cells are predominantly in G0/G1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time FUCCI imaging. *Cell Cycle* **13**, 953-960, doi:10.4161/cc.27818 (2014).

- 44 Haass, N. K. *et al.* Real-time cell cycle imaging during melanoma growth, invasion, and drug response. *Pigment Cell Melanoma Res* **27**, 764-776, doi:10.1111/pcmr.12274 (2014).
- 45 Li, J. C. *et al.* Podoplaninpositive cancer cells at the edge of esophageal squamous cell carcinomas are involved in invasion. *Mol Med Rep* **10**, 1513-1518, doi:10.3892/mmr.2014.2338 (2014).
- 46 Nakashima, Y. *et al.* Podoplanin is expressed at the invasive front of esophageal squamous cell carcinomas and is involved in collective cell invasion. *Cancer Sci* **104**, 1718-1725, doi:10.1111/cas.12286 (2013).
- 47 Sekiguchi, T. *et al.* Targeting a novel domain in podoplanin for inhibiting platelet-mediated tumor metastasis. *Oncotarget* **7**, 3934-3946, doi:10.18632/oncotarget.6598 (2016).
- 48 Kato, Y. *et al.* The chimeric antibody chLpMab-7 targeting human podoplanin suppresses pulmonary metastasis via ADCC and CDC rather than via its neutralizing activity. *Oncotarget* **6**, 36003-36018, doi:10.18632/oncotarget.5339 (2015).
- 49 van Es, J. H. *et al.* Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol* **14**, 1099-1104, doi:10.1038/ncb2581 (2012).

- 50 Roesch, A. *et al.* A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* **141**, 583-594, doi:10.1016/j.cell.2010.04.020 (2010).
- 51 Gupta, P. B. *et al.* Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* **146**, 633-644, doi:10.1016/j.cell.2011.07.026 (2011).
- 52 Shimokawa, M. *et al.* Visualization and targeting of LGR5(+) human colon cancer stem cells. *Nature* **545**, 187-192, doi:10.1038/nature22081 (2017).

XV. 謝辞

本研究を行うにあたり、熱心な御指導と御高配を賜りました東京大学新領域創成科学研究科先端生命科学専攻がん先端生命科学分野教授 兼 国立がん研究センター先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野長 石井源一郎教授に御礼申し上げます。

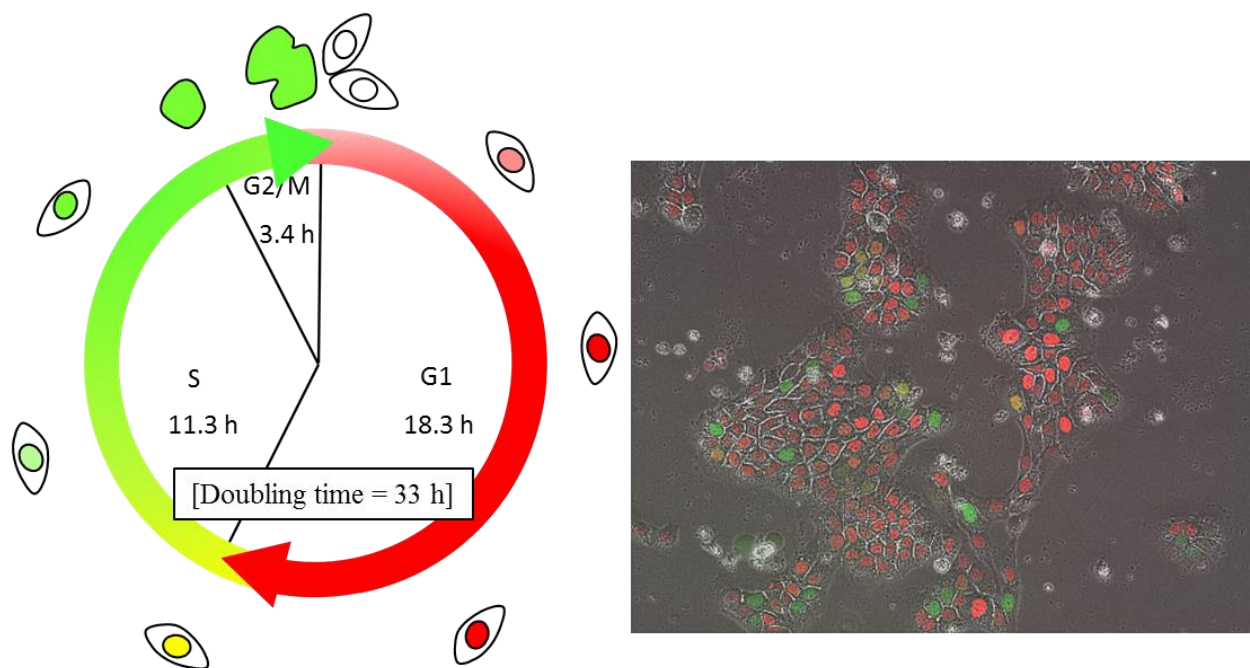
終始にわたり、有益な御指導と御助言を賜りました国立がん研究センター先端医療開発センター長 落合淳志教授に深謝致します。

本研究を遂行する上で、親身に御指導、御協力を戴いた国立がん研究センター先端医療開発センター臨床腫瘍病理分野 橋本弘子様、国立がん研究センター東病院病理臨床検査課 菅野雅人先生に御礼申し上げます。また研究生活を支えてくださった臨床腫瘍病理分野の大沼世史子さんを始めとしたスタッフ、そして学生の皆様々に感謝致します。

心から尊敬できる先生、先輩方に恵まれ、5年間充実した研究生活を送れたことを幸せに思います。

XVI. Figures and Tables

Fig.1 A431 細胞における細胞周期と Fucci



(Sawano A. et al : 2012 改変)

Fig.2 A431-mCherry pure の作製

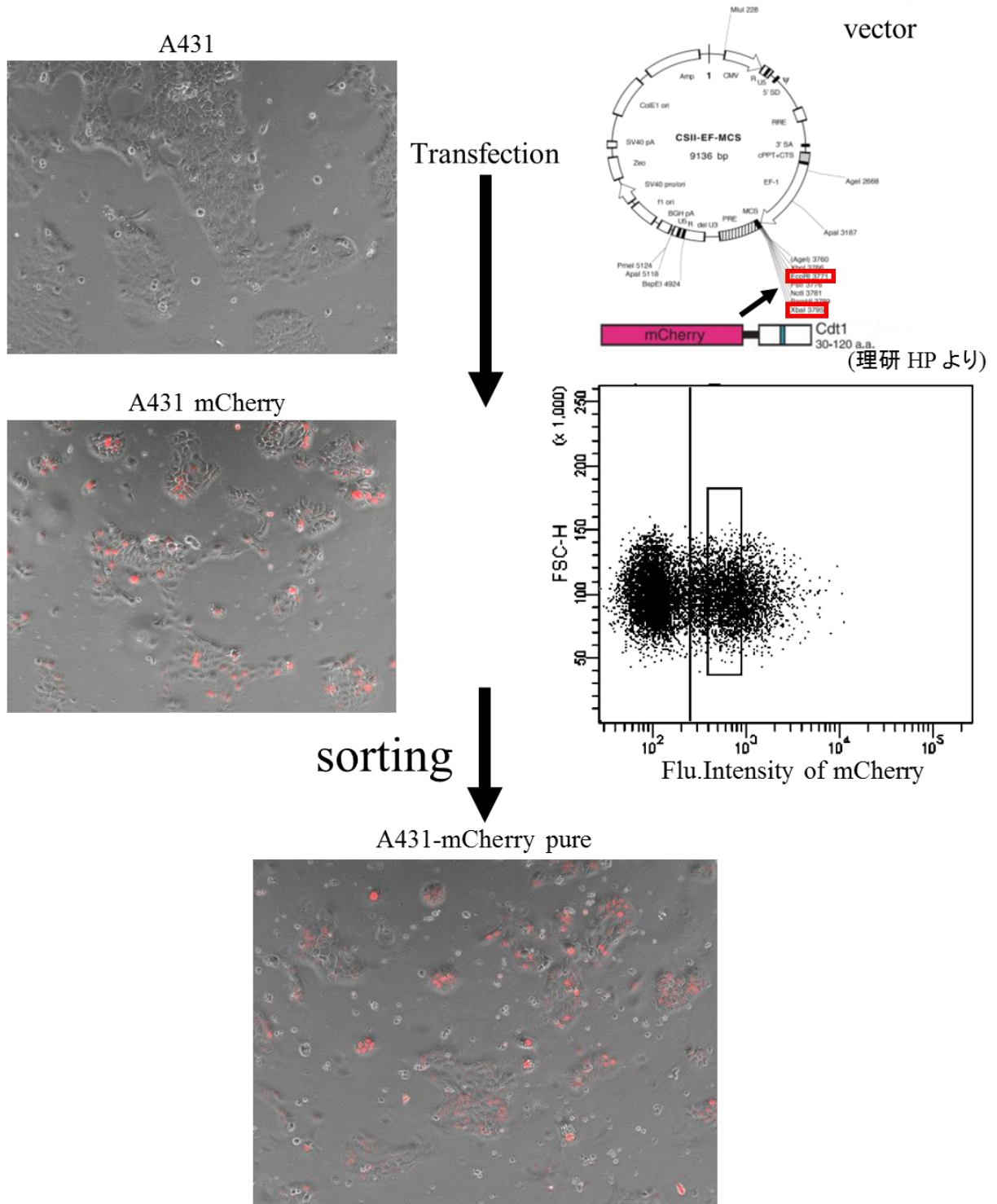
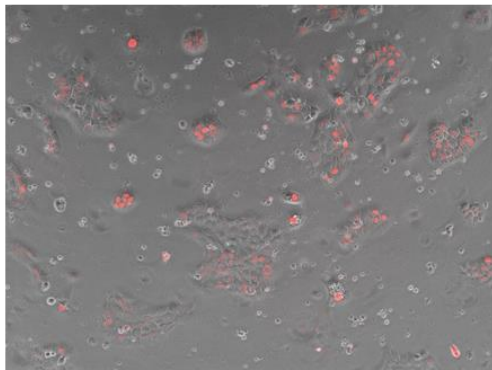
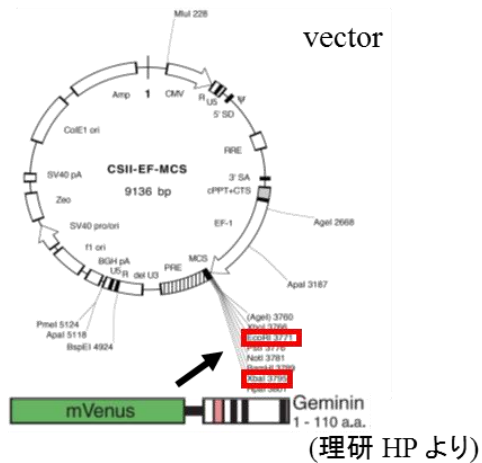


Fig.3 A431-Fucci の作製

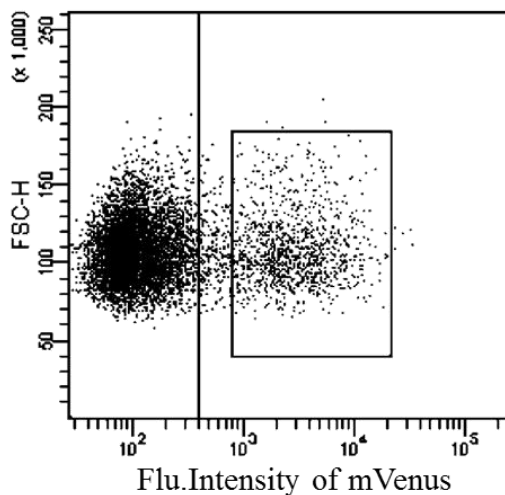
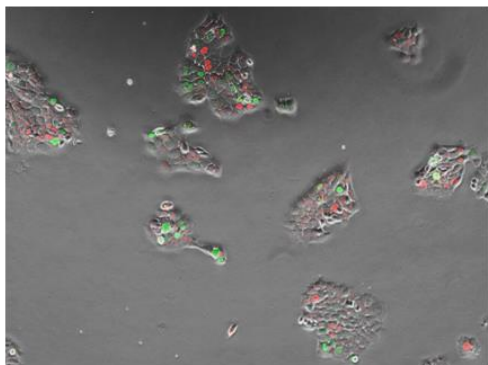
A431 mCherry pure



Transfection

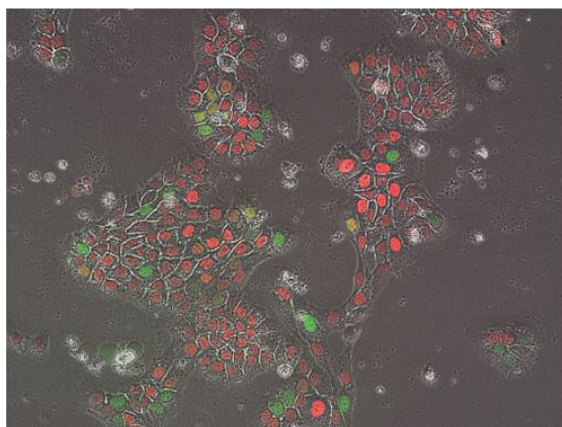


A431 mCherry pure - mVenus



sorting

A431 mCherry pure - mVenus pure



A431-Fucci

Fig.4 A431-Fucci の細胞周期測定

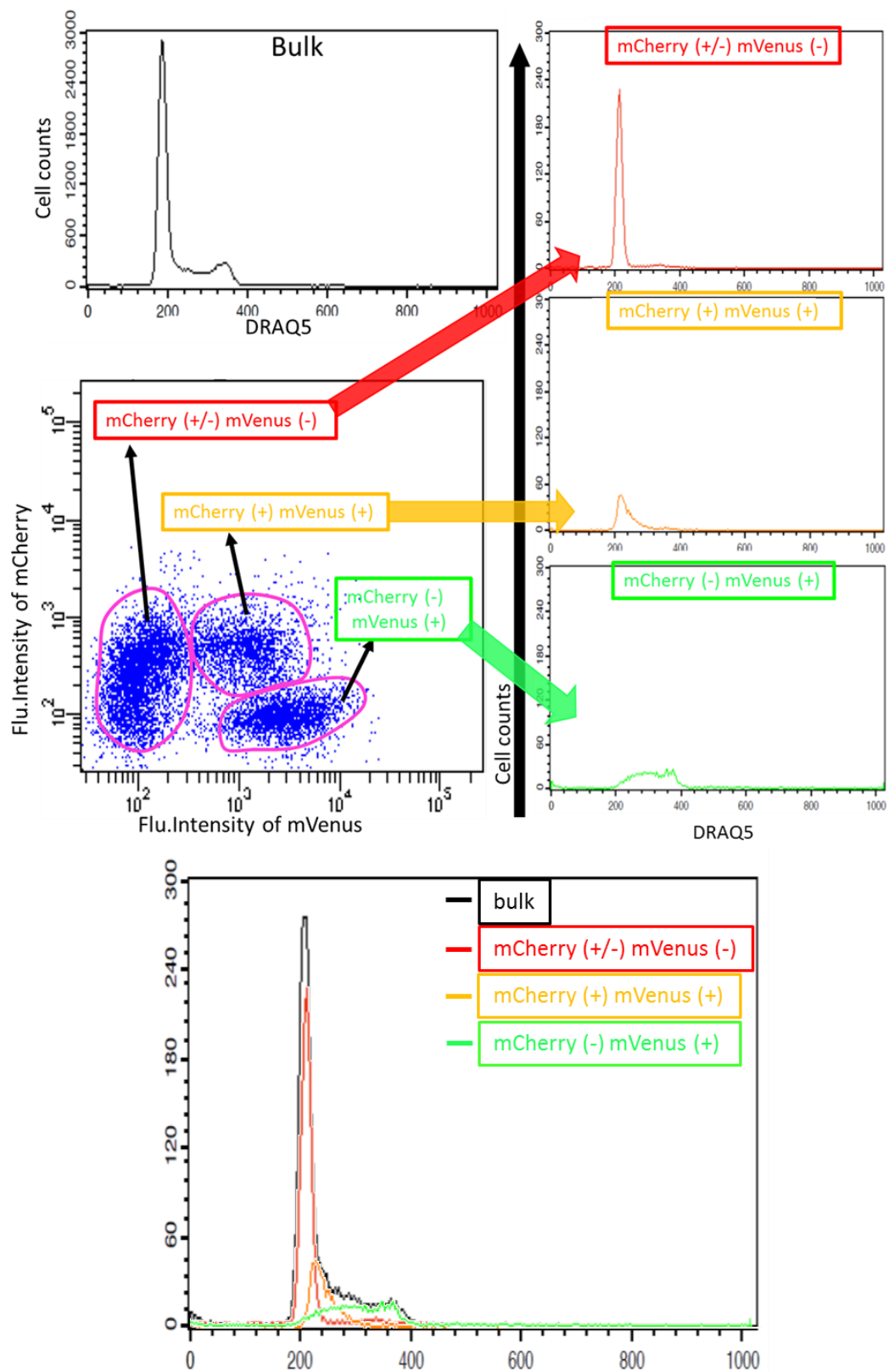
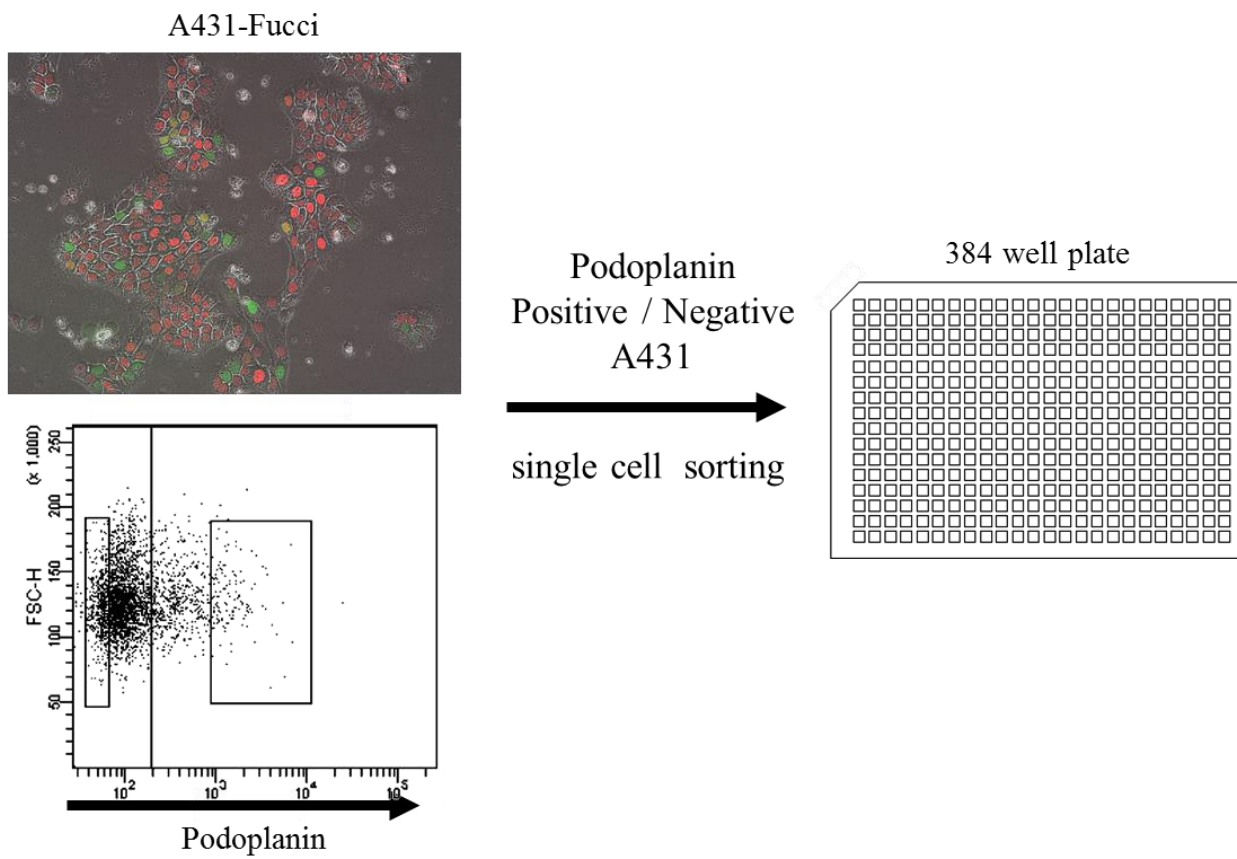
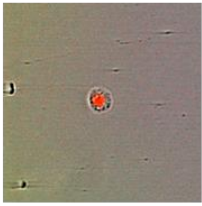


Fig.5 実験方法

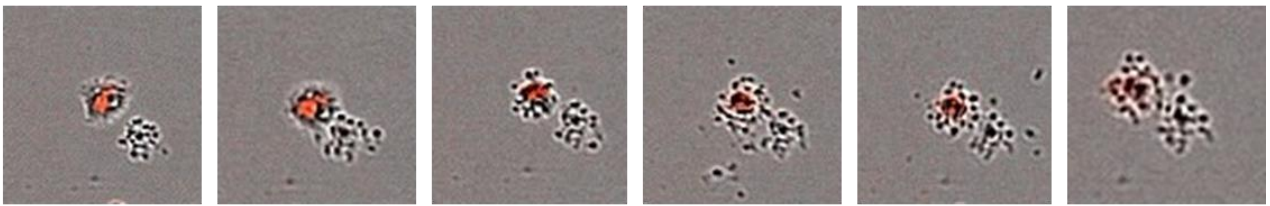
(A)



(B)



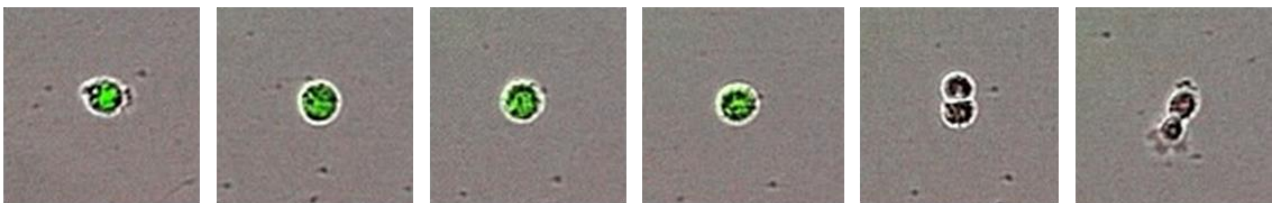
(C)



(D)



(E)



(F)

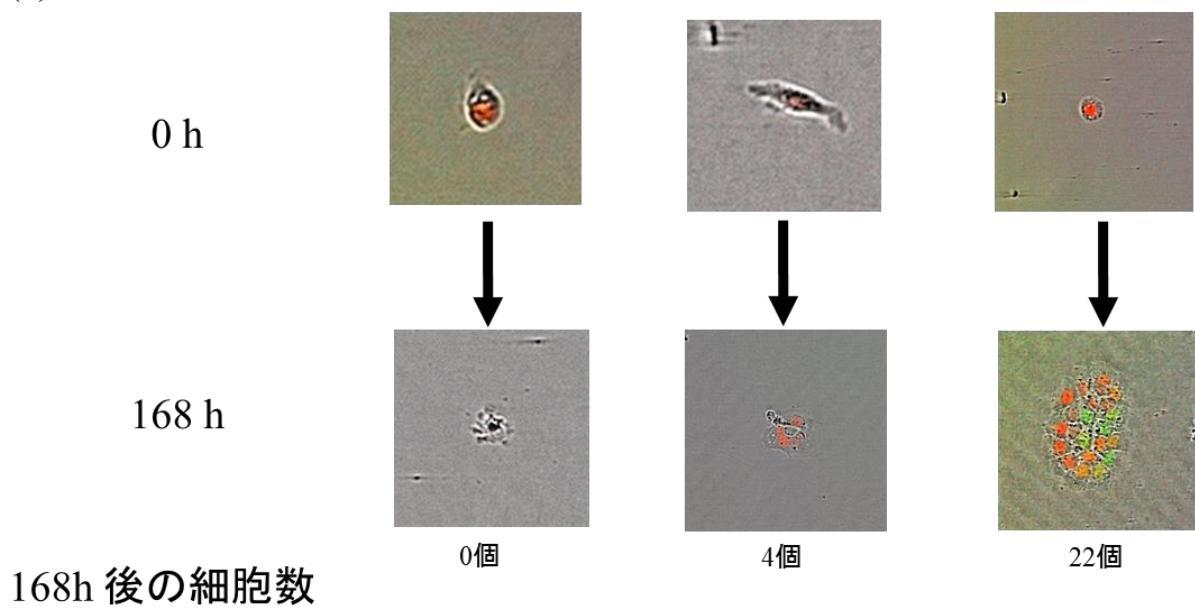


Fig.6 細胞運命系譜図

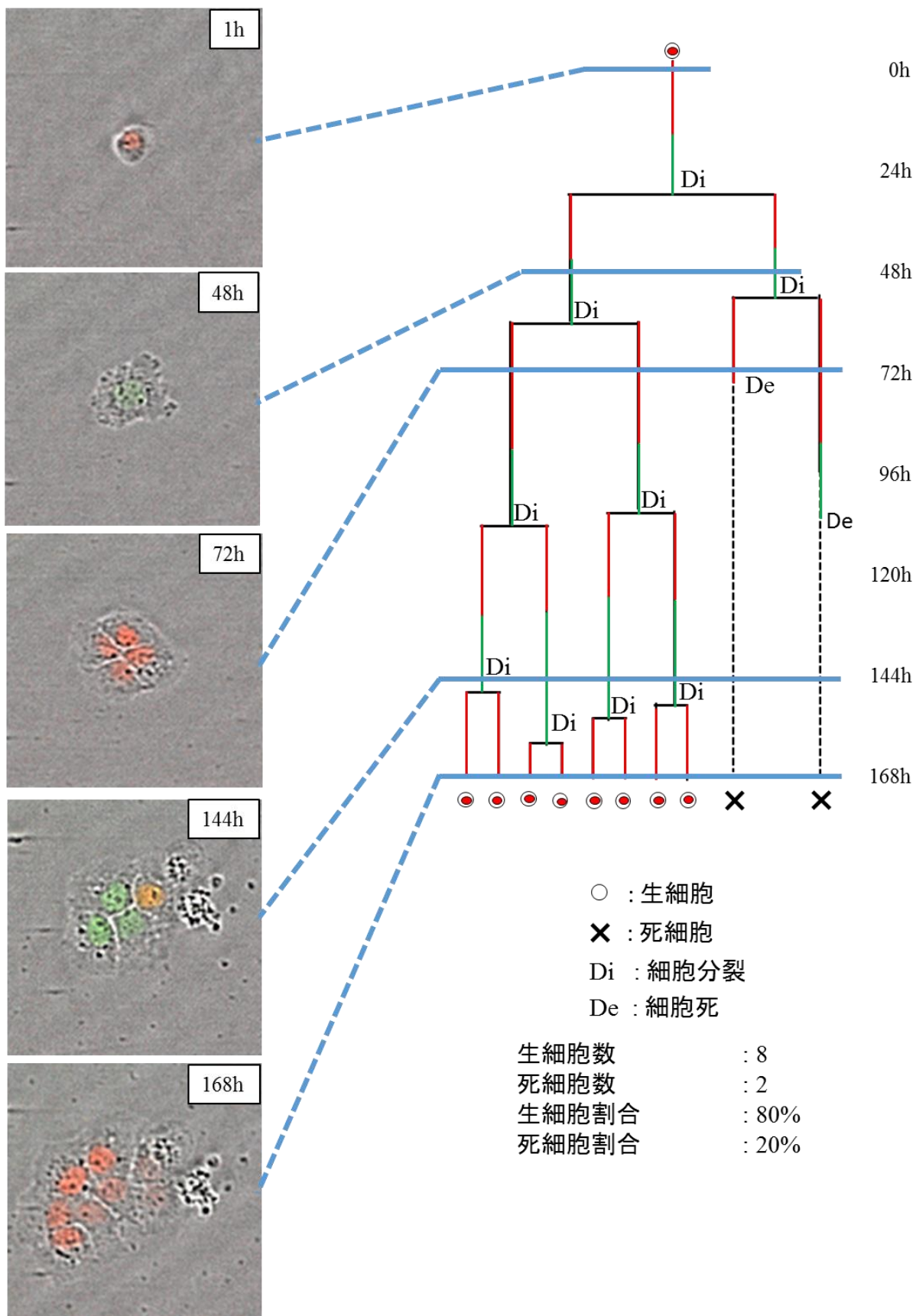


Fig.7 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の平均増殖率

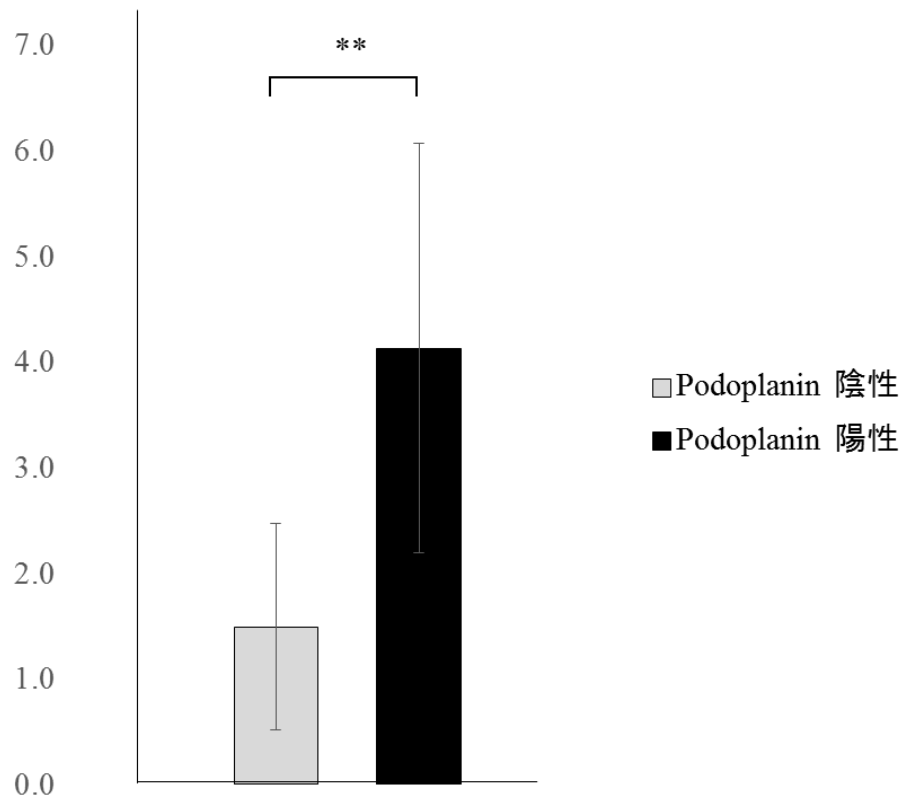


Fig.8 1 well あたりの平均増殖率 (N=5)

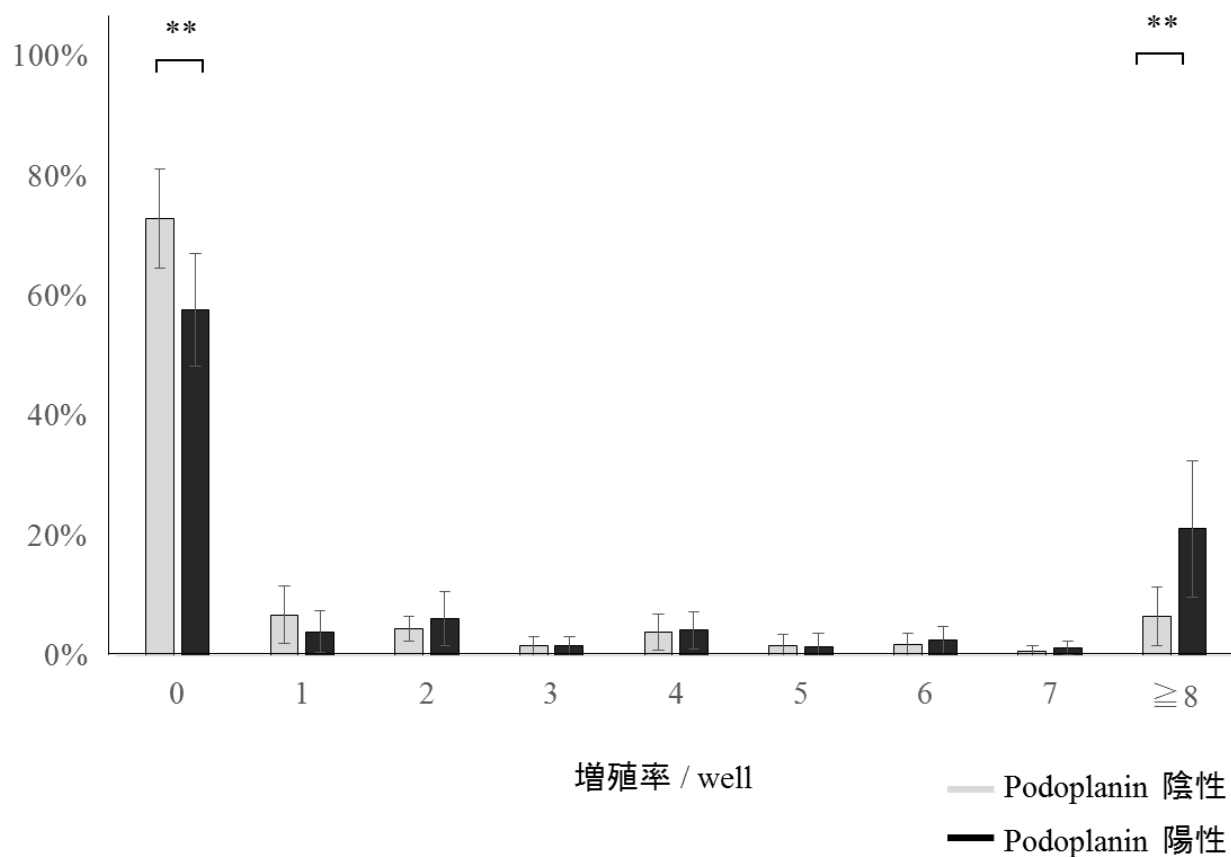


Fig.9 細胞周期

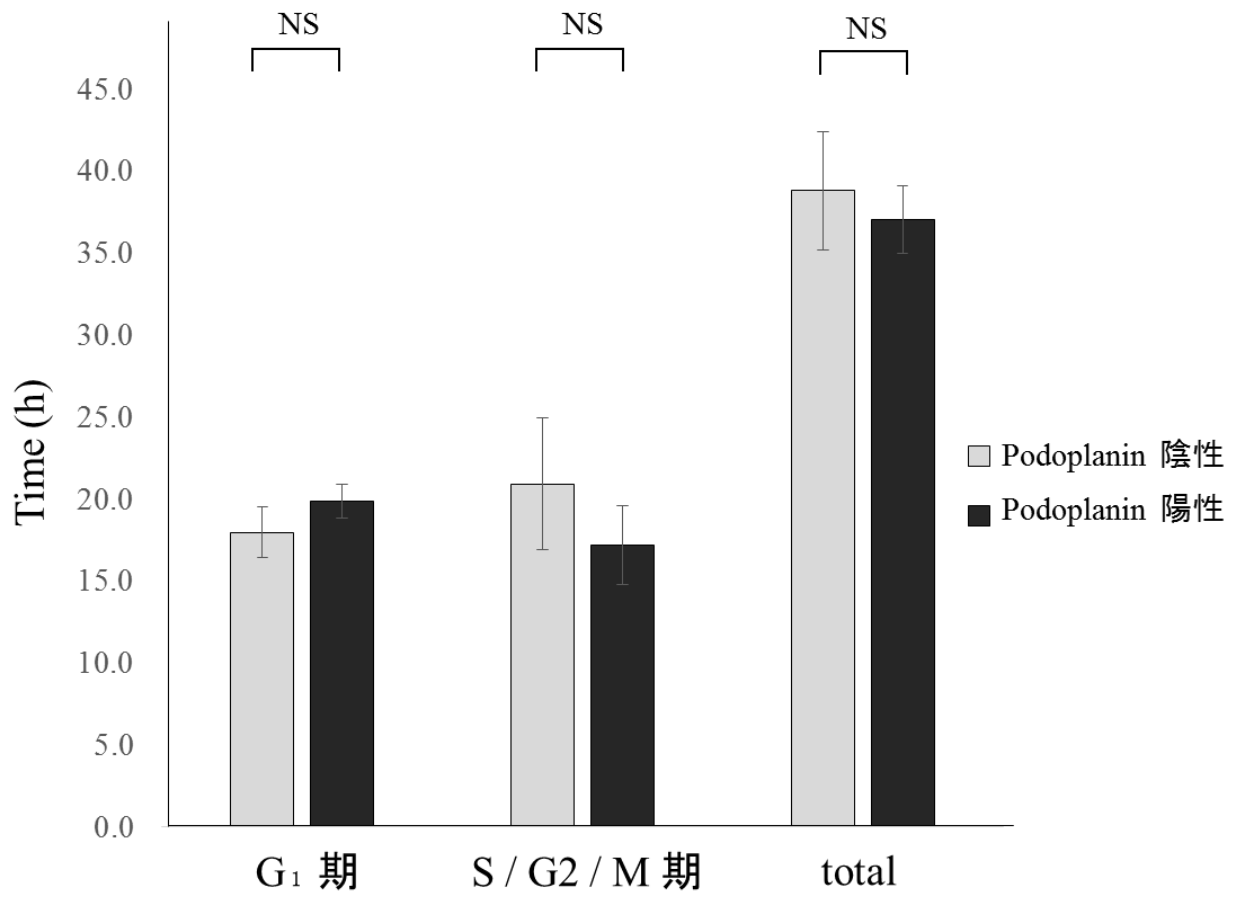


Fig.10 平均死細胞割合 (N=5)

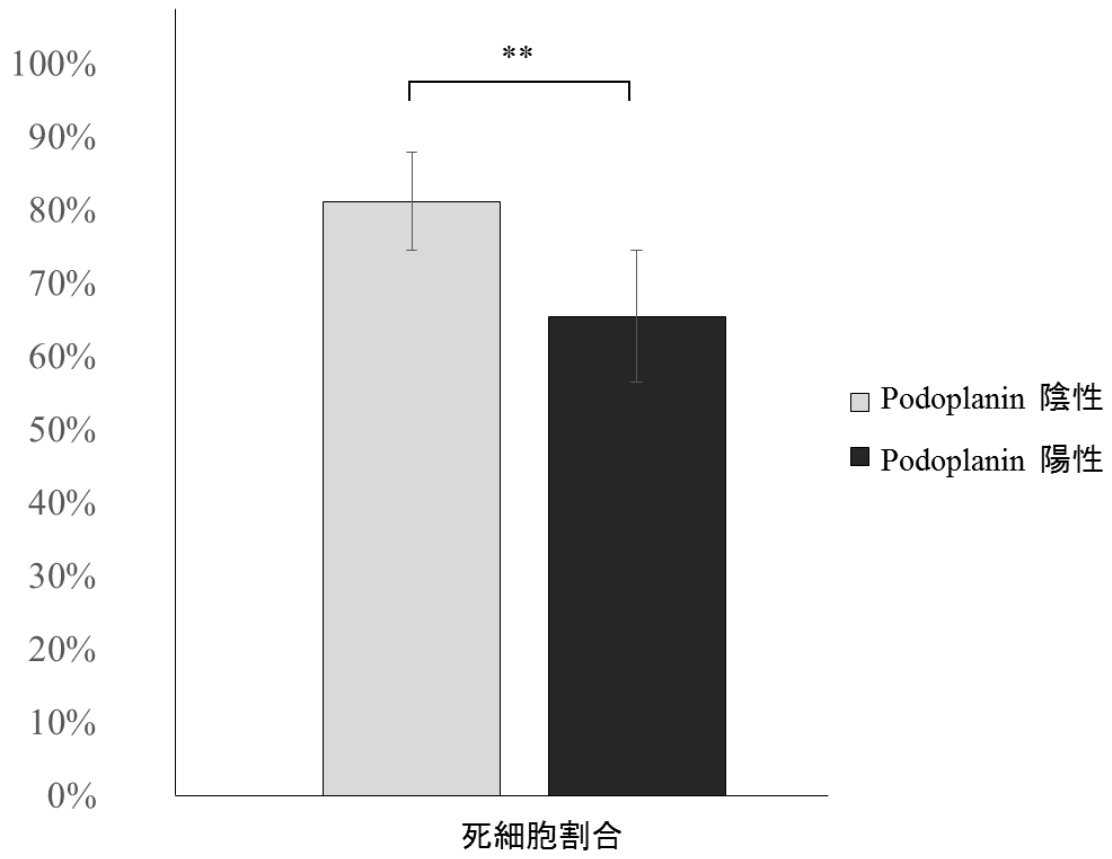
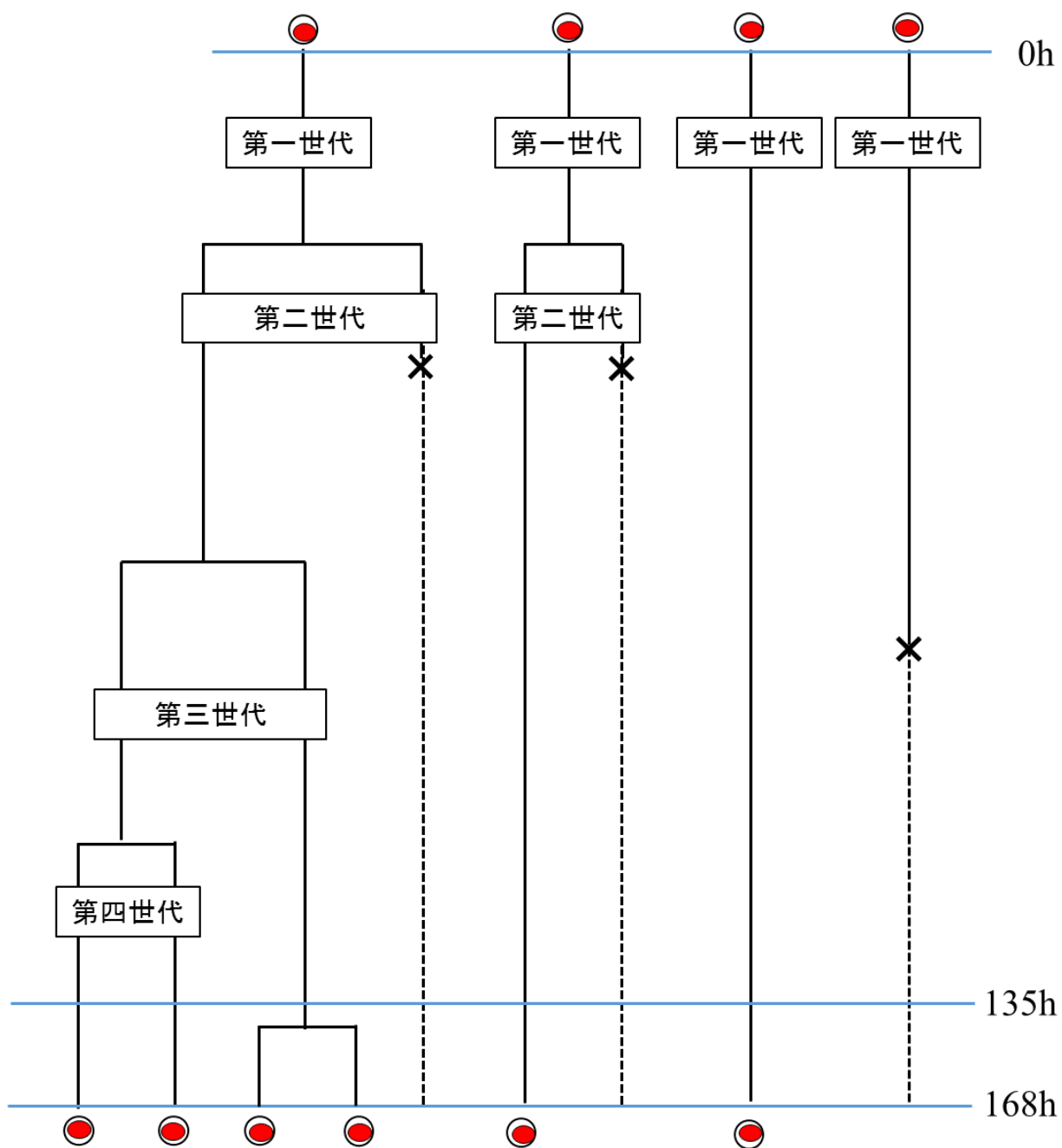


Fig.11 世代模式図



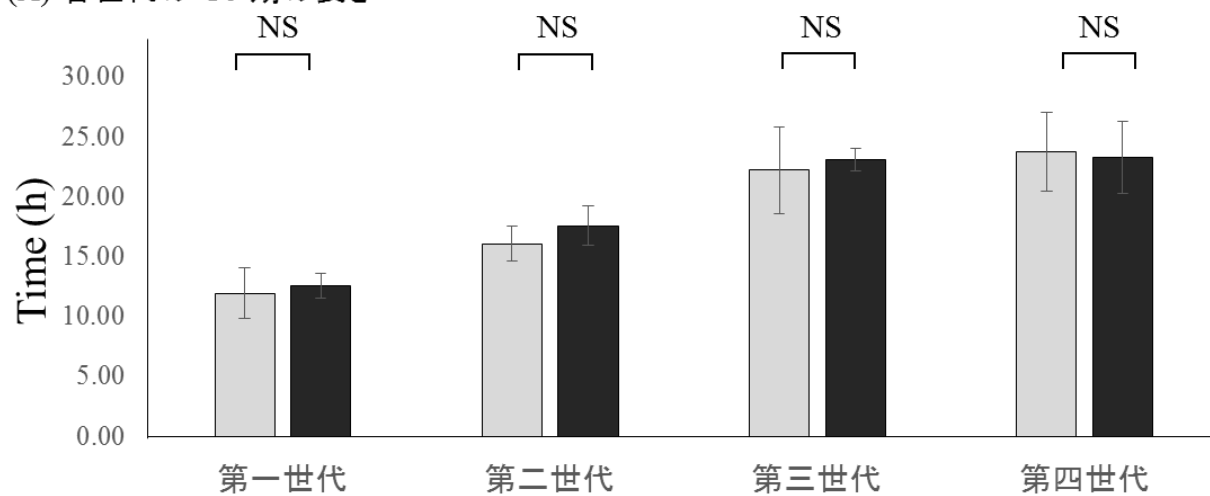
● : 生細胞

× : 細胞死

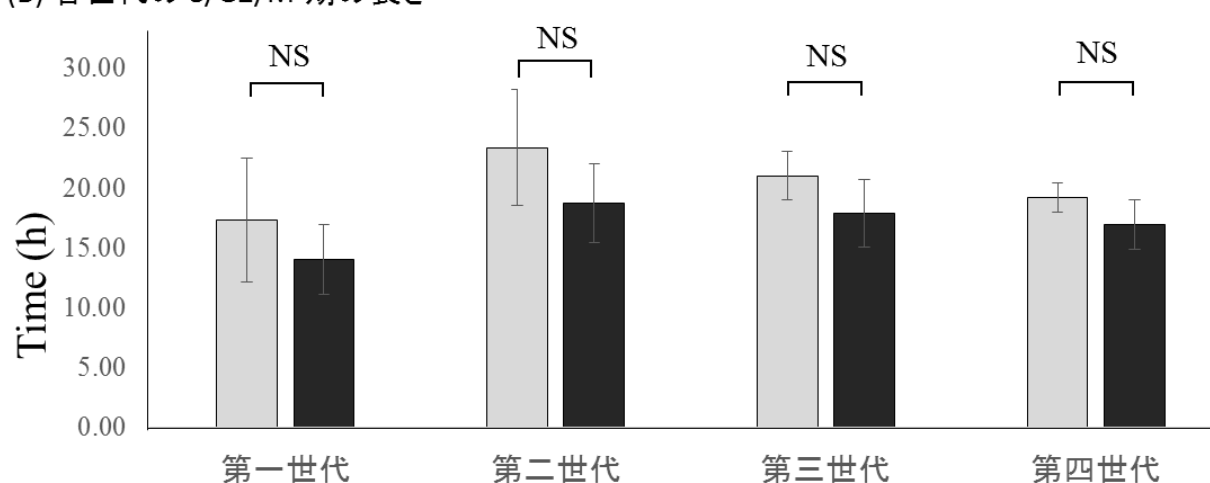
第一世代	生細胞数 : 3	死細胞数 : 1
第二世代	生細胞数 : 2	死細胞数 : 2
第三世代	生細胞数 : 2	死細胞数 : 0
第四世代	生細胞数 : 2	死細胞数 : 0

Fig.12 各世代における細胞周期

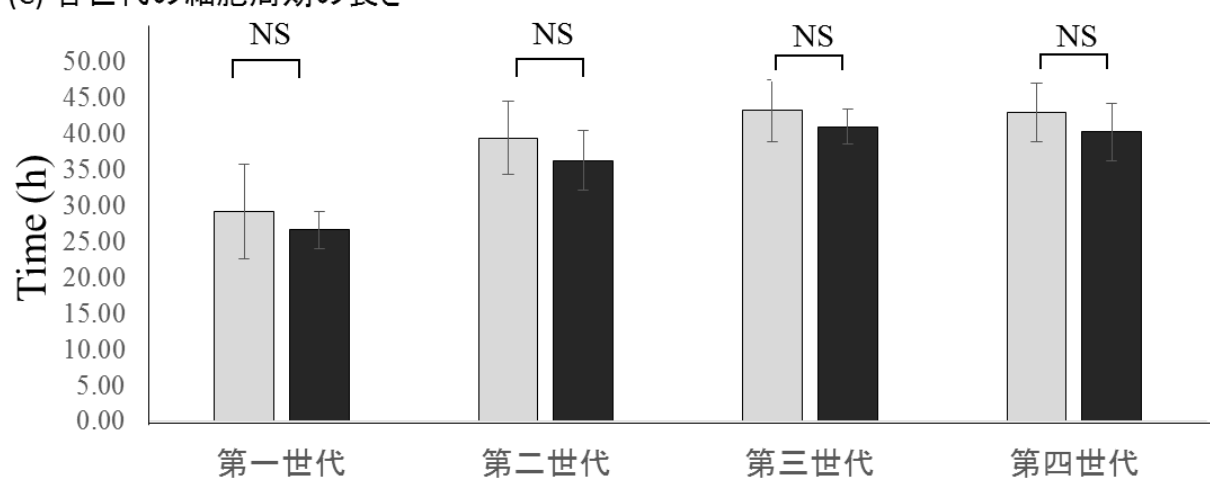
(A) 各世代の G₁ 期の長さ



(B) 各世代の S/G₂/M 期の長さ



(C) 各世代の細胞周期の長さ



□ Podoplanin 陰性 ■ Podoplanin 陽性

Fig.13 各世代における平均死細胞割合 (N=5)

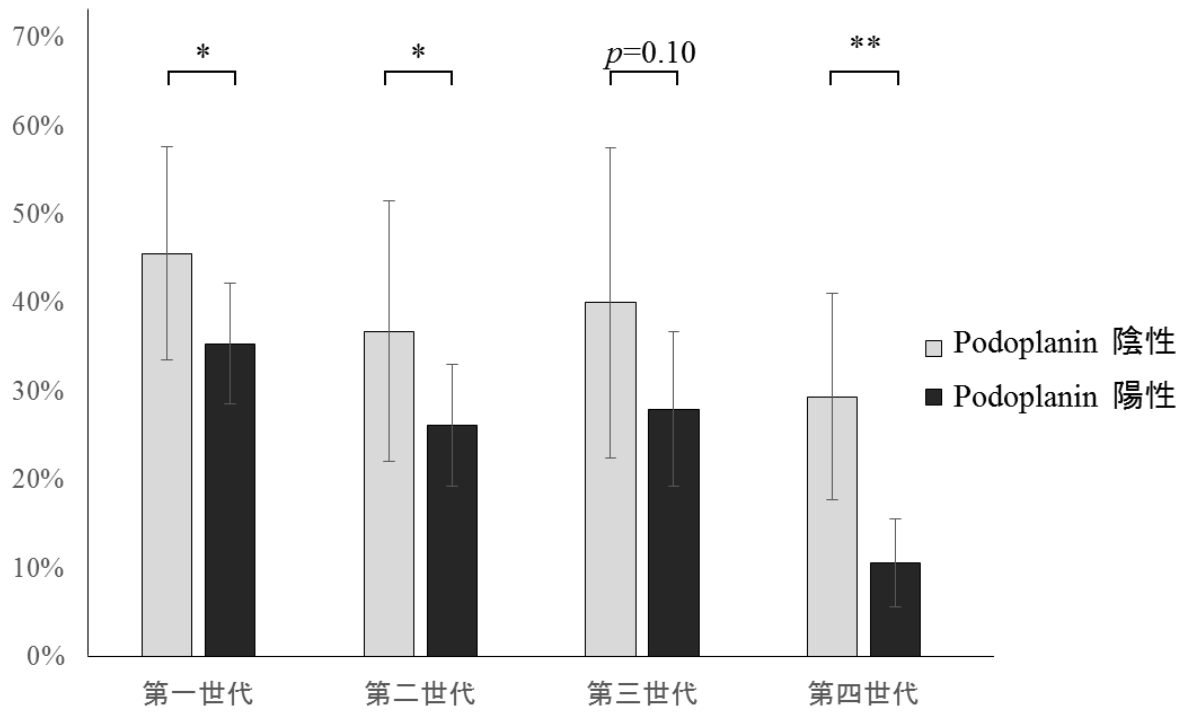


Fig.14 sh-RNA 導入細胞の Podoplanin の発現

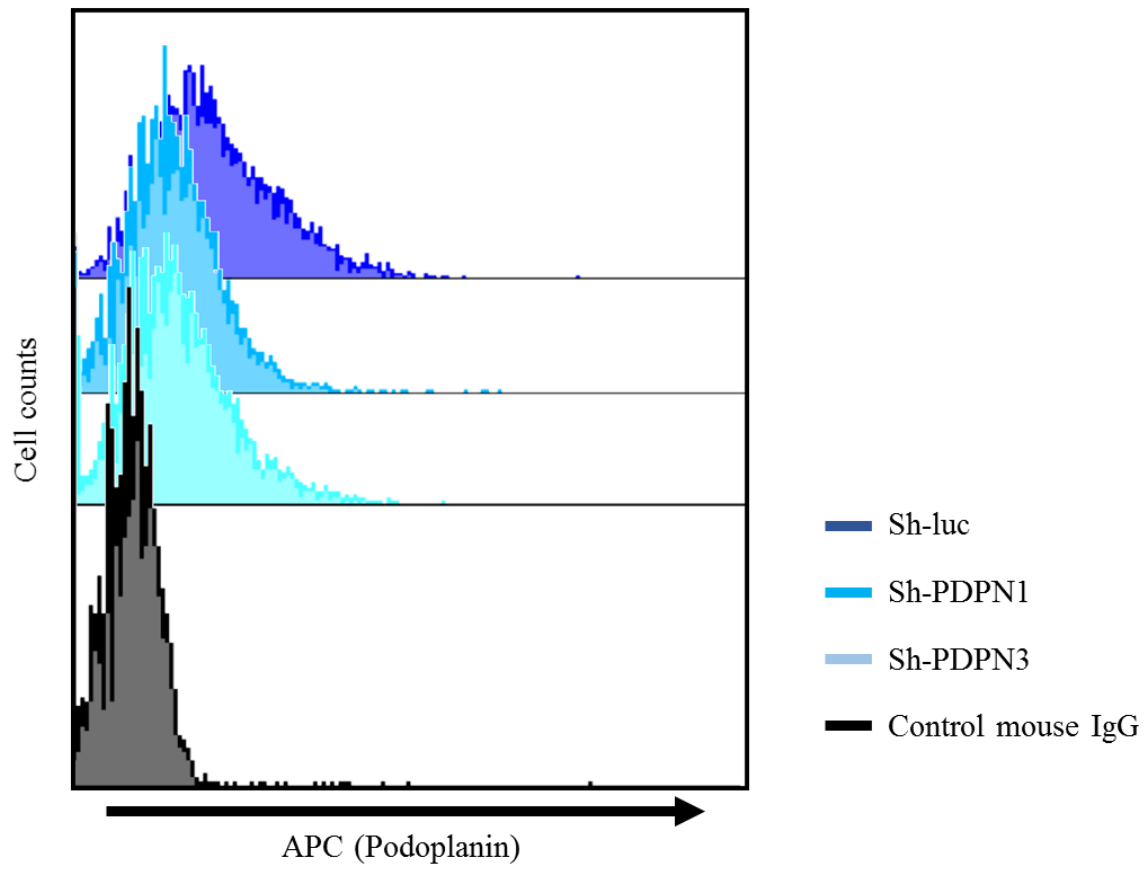


Fig.15 sh-RNA 導入細胞の1 well あたりの平均増殖率 (N=3)

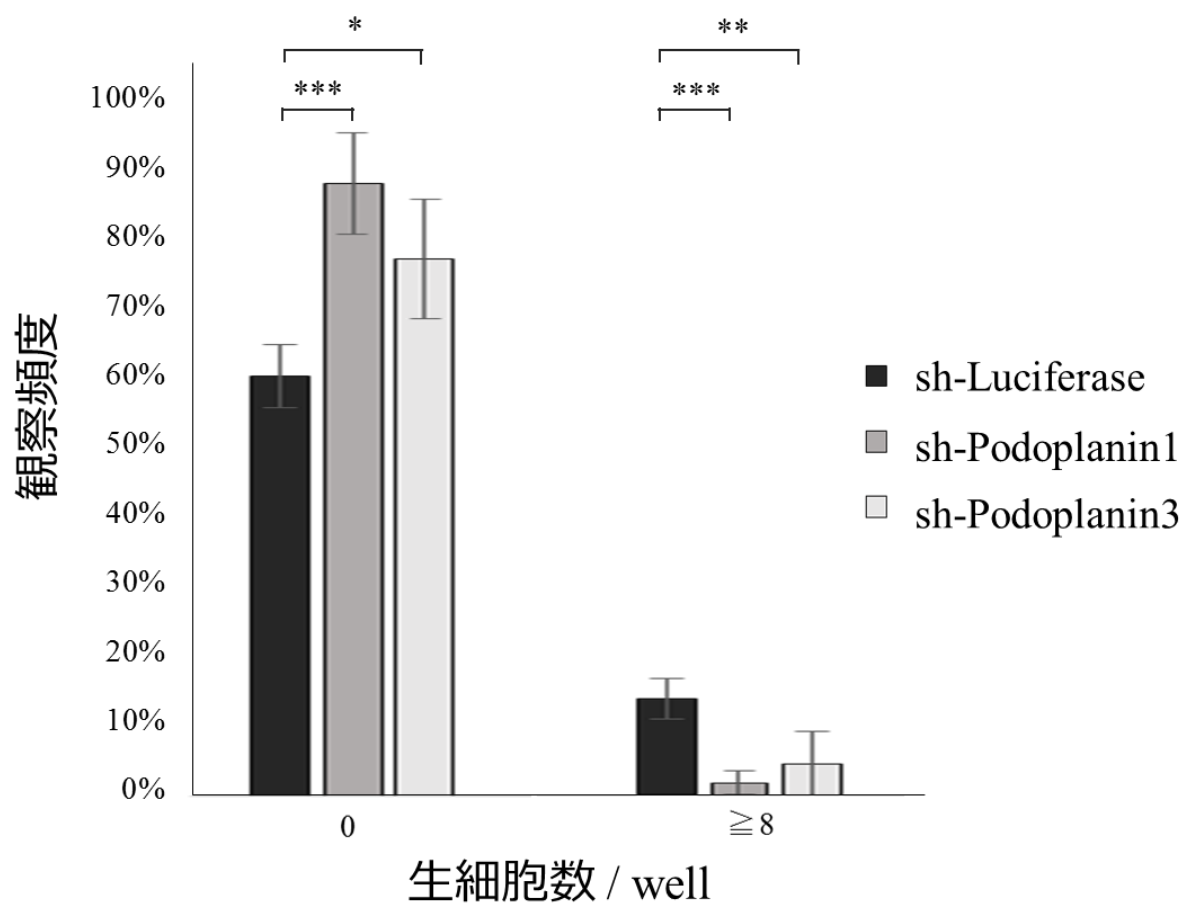


Fig.16 sh-RNA 導入細胞の平均死細胞割合 (N=3)

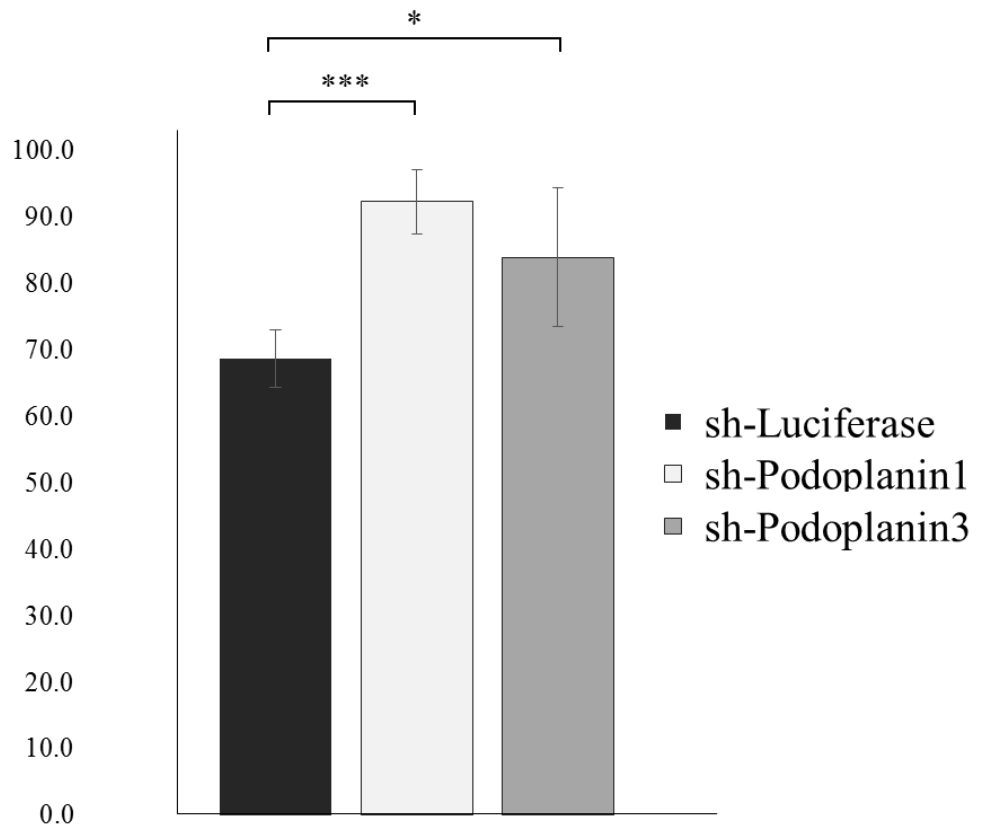
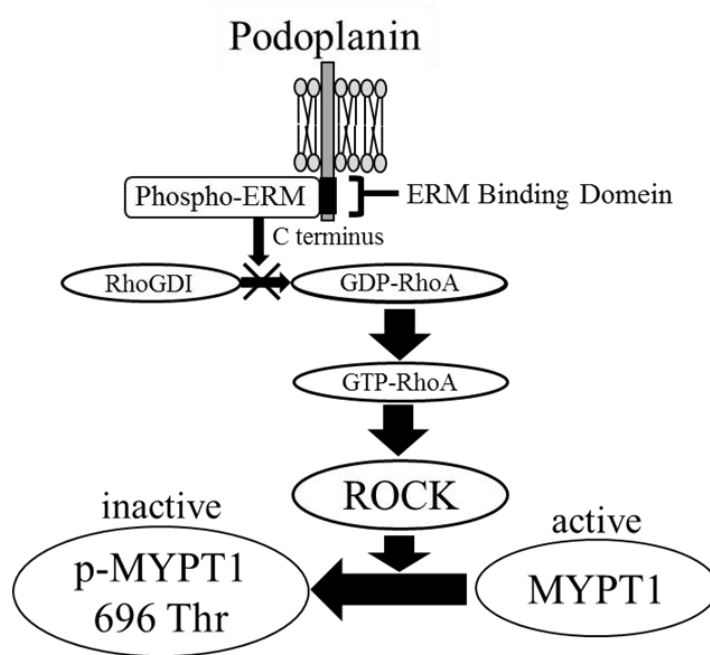


Fig.17 Podoplanin の下流シグナル

(A)



(B)

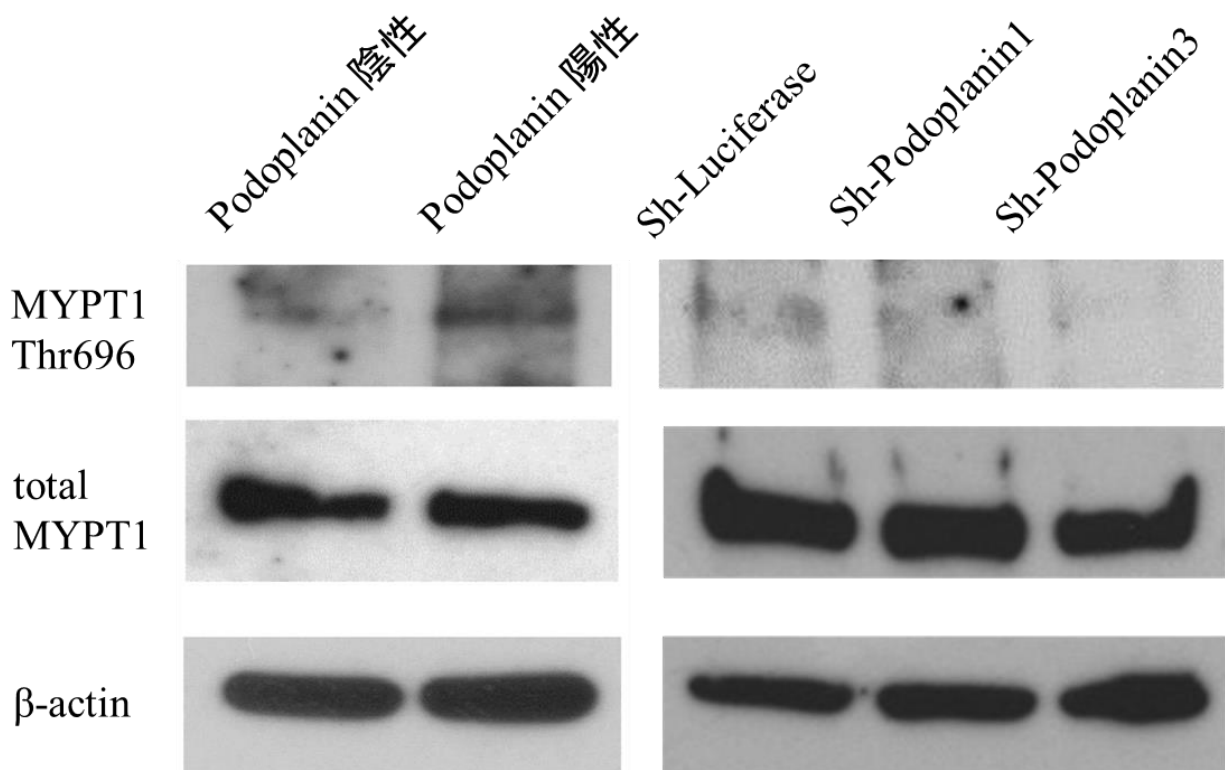


Fig.18 ROCK 阻害剤添加細胞の1 well あたりの平均増殖率 (N=3)

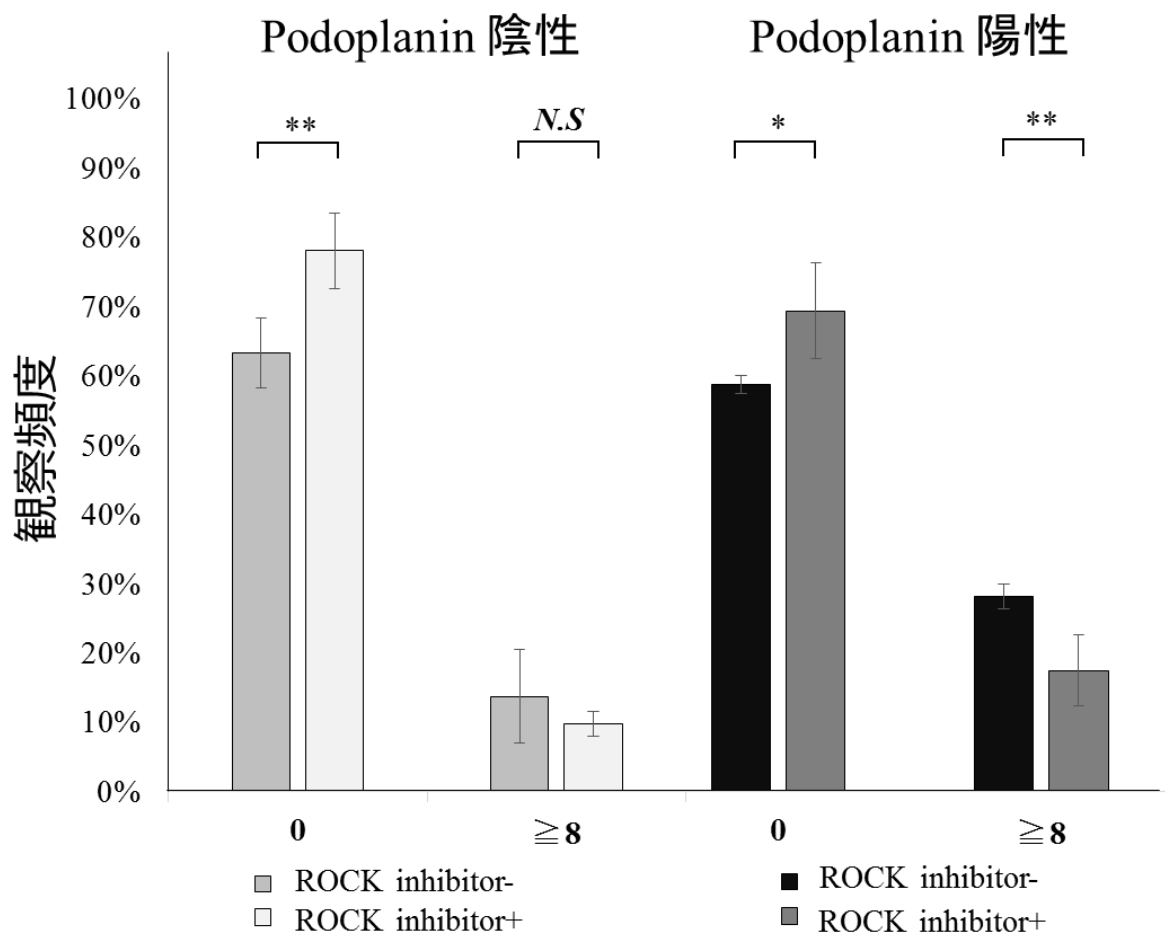


Fig.19 ROCK 阻害剤処理細胞の平均死細胞割合 (N=3)

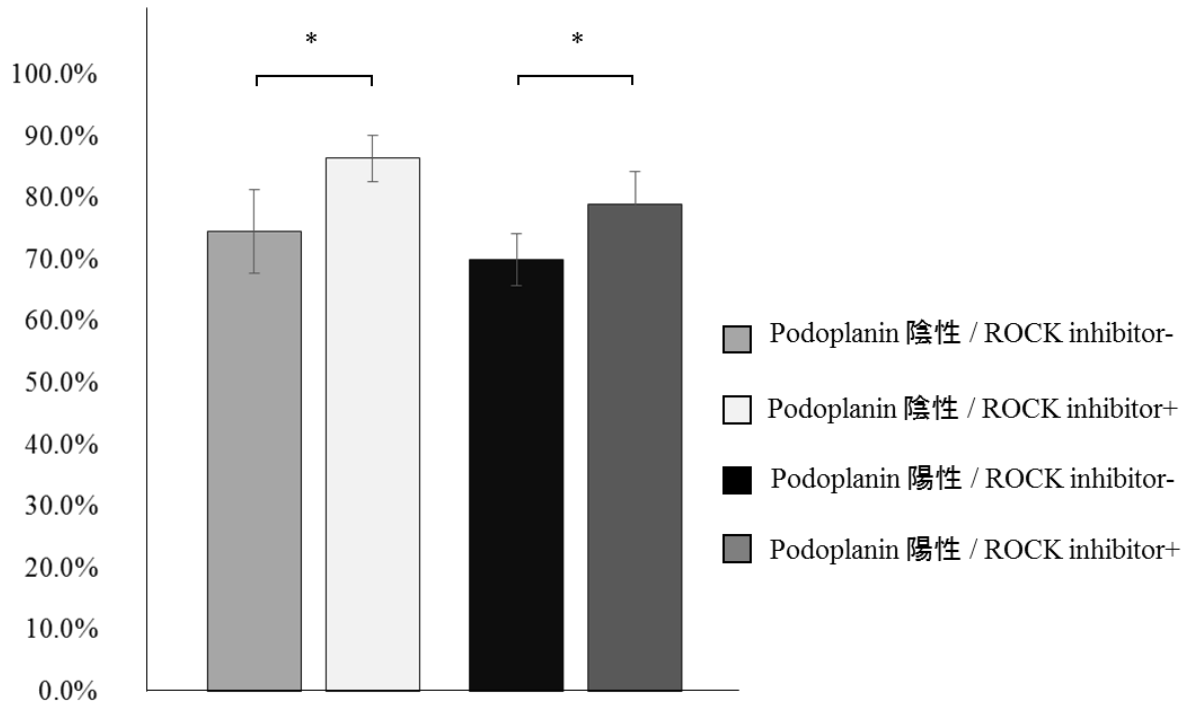
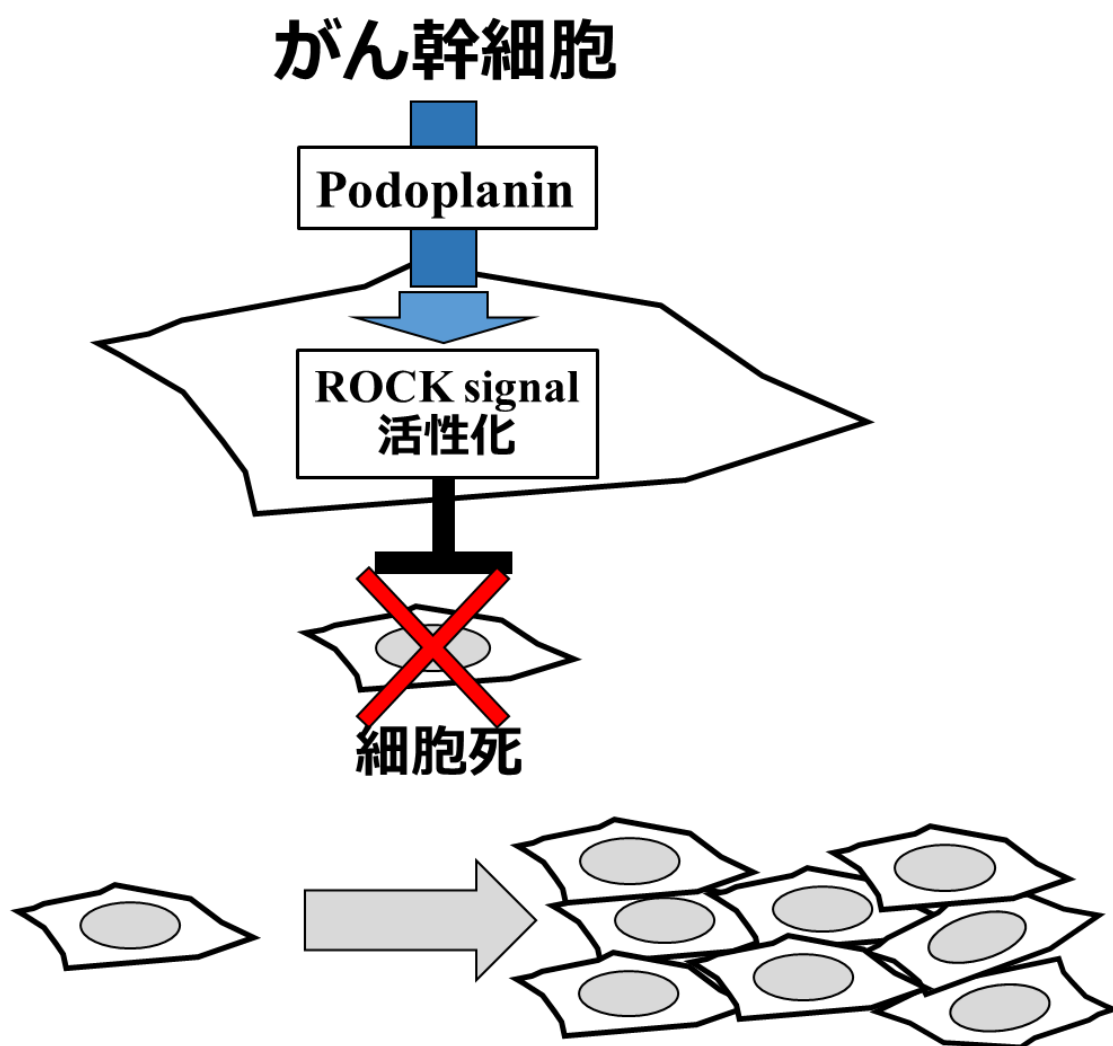


Fig.20 Graphic abstract



Sup Fig. 1 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の分化 / 未分化マーカー発現

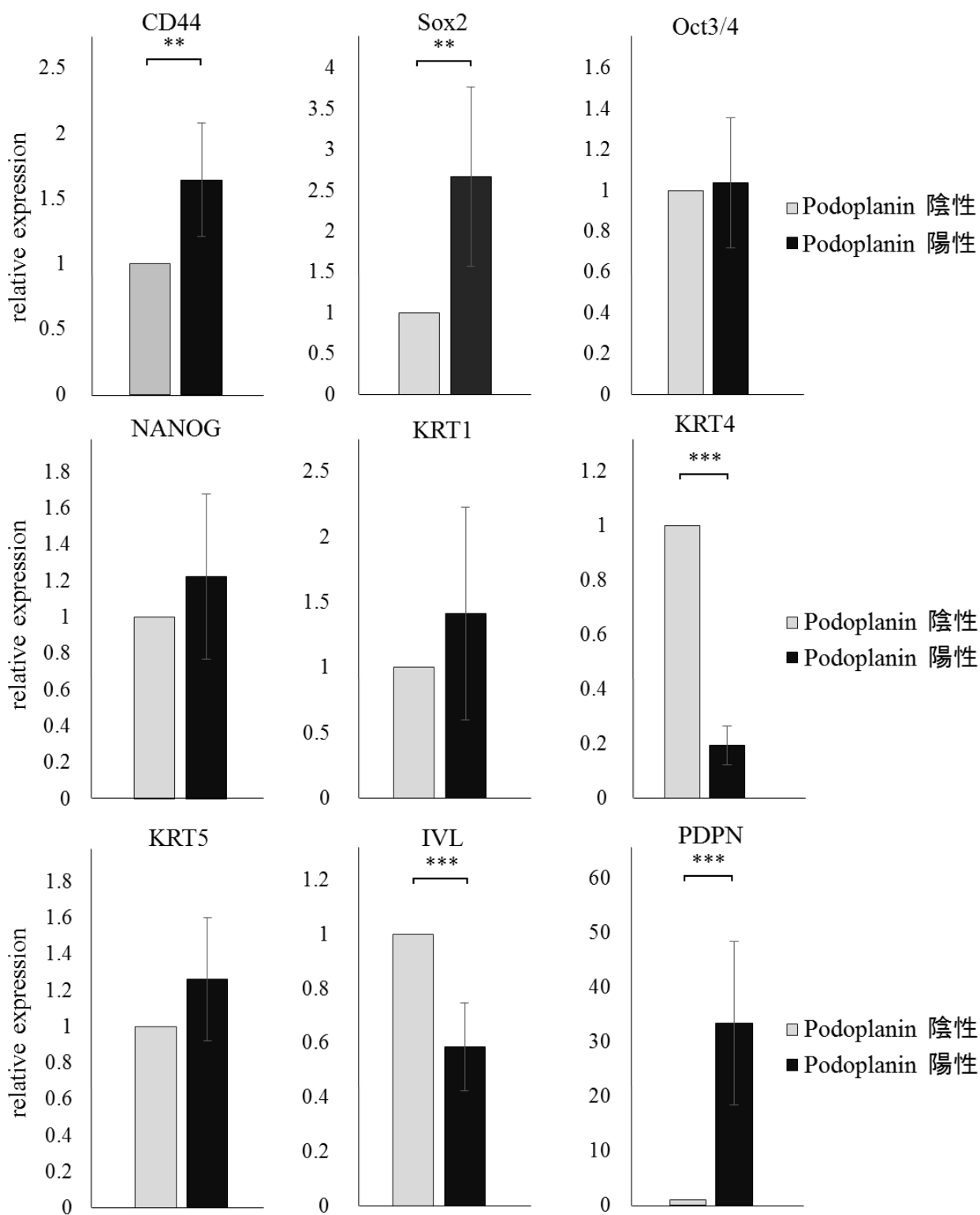


Table. 1 各実験における Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の総播種細胞数と168h の総細胞数

Experiment 1	Seeded cells	Number of grown cells
Podoplanin 陰性	66	75
Podoplanin 陽性	40	155
total	106	230

Experiment 2	Seeded cells	Number of grown cells
Podoplanin 陰性	45	18
Podoplanin 陽性	81	104
total	126	122

Experiment 3	Seeded cells	Number of grown cells
Podoplanin 陰性	42	122
Podoplanin 陽性	48	320
total	90	442

Experiment 4	Seeded cells	Number of grown cells
Podoplanin 陰性	46	93
Podoplanin 陽性	52	211
total	98	304

Experiment 5	Seeded cells	Number of grown cells
Podoplanin 陰性	54	55
Podoplanin 陽性	51	242
total	105	297

Table. 2 各実験における sh-RNA 導入細胞の総播種細胞数と168h の総細胞数

Experiment 1	Seeded cells	Number of grown cells
Sh-luciferase	29	82
Sh-Podoplanin1	30	21
Sh-Podoplanin3	45	50

Experiment 2	Seeded cells	Number of grown cells
Sh-luciferase	35	74
Sh-Podoplanin1	32	2
Sh-Podoplanin3	32	10

Experiment 3	Seeded cells	Number of grown cells
Sh-luciferase	53	113
Sh-Podoplanin1	48	22
Sh-Podoplanin3	43	74

Table. 3 各実験における ROCK 阻害剤処理細胞の総播種細胞数と168h の総細胞数

Experiment 1	Seeded cells	Number of grown cells
Podoplanin 陽性 ROCK inhibitor (-)	24	118
Podoplanin 陽性 ROCK inhibitor (+)	25	91
Podoplanin 陰性 ROCK inhibitor (-)	30	65
Podoplanin 陰性 ROCK inhibitor (+)	18	40

Experiment 2	Seeded cells	Number of grown cells
Podoplanin 陽性 ROCK inhibitor (-)	58	235
Podoplanin 陽性 ROCK inhibitor (+)	61	199
Podoplanin 陰性 ROCK inhibitor (-)	40	151
Podoplanin 陰性 ROCK inhibitor (+)	54	89

Experiment 3	Seeded cells	Number of grown cells
Podoplanin 陽性 ROCK inhibitor (-)	68	283
Podoplanin 陽性 ROCK inhibitor (+)	57	196
Podoplanin 陰性 ROCK inhibitor (-)	41	95
Podoplanin 陰性 ROCK inhibitor (+)	65	73

Table. 4 プライマー配列

	Forward primer	Reverse primer
CD44	5'-CTCCGGACACCATGGACAA-3'	5'-CCACGTGGAATACACCTGCAA-3'
POU5F1	5'-GCTGGATGTCAGGGCTCTTTG-3'	5'-TTCAAGAGATTTATCGAGCACCTTC-3'
SOX2	5'-CTCCGGACACCATGGACAA-3'	5'-CCACGTGGAATACACCTGCAA-3'
NANOG	5'-CCTGTGATTTGTGGGCCTGA-3'	5'-CTCTGCAGAAGTGGGTTGTTT-3'
IVL	5'-TTCTAAGATGTCCCAGCAACACAC-3'	5'-GTTTCATTGCTCCTGATGGGTA-3'
KRT1	5'-GGGAGCAAATCAAGTCACTCAAC-3'	5'-TCTGCTGCTCCAGGAACCTC-3'
KRT4	5'-CCATCAACCAGAGCTTGCTCAC-3'	5'-TCCATTGGTCTCCAGGACCTTA-3'
KRT5	5'-CCCTCAACAATAAGTTTGCCTCCT-3'	5'-AGAACCTTGTTCTGCTGCTCCA-3'
PDPN	5'-GAAGACCGCTATAAGTCTGGCTTGA-3'	5'-ACTTTGTTCTTGCGCGTGGA-3'
CDH1	5'-TACACTGCCAGGAGCCAGA-3'	5'-TGGCACCAGTGTCCGGATTA-3'
FN1	5'-GCAGGCTCAGCAAATGGTTC-3'	5'-GTCCGCTCCCACTGTTGATTTA-3'
SNAI1	5'-CCAGTGCCTCGACCACTATG-3'	5'-GCAGCTCGCTGTAGTTAGGCTTC-3'
SNAI2	5'-ATGCATATTCGGACCCACACATTAC-3'	5'-AGATTGACCCACACATTAC-3'
VIM	5'-AACCTGGCCGAGGACATCA-3'	5'-TCAAGGTCAAGACGTGCCAGA-3'
ZEB1	5'-TACAGAACCCAACTTGAACGTCACA-3'	5'-GATTACACCCAGACTGCGTCACA-3'
GAPDH	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

XVII. Figure and Tables legends

Fig.1 A431 細胞における細胞周期と Fucci

Fucci (Fluorescent ubiquitination - based cell cycle indicator) : G1 期にある細胞の核を赤色に、G1/S 遷移期にある細胞の核を黄色に、S/G2/M 期にある細胞の核を緑色に描出できる。

A431 細胞の細胞周期は 33 h で、G1 期が 18.3 h、S 期が 11.3 h、G2/M 期が 3.4 h である。

Fig.2 A431-mCherry pure の作製

A431 に CS2-EF-MCS mCherry-hCdt1 をレンチウイルスを用いて形質導入した。導入が確認できた細胞を FACS AriaII を用いて単離した (A431-mCherry pure)。

Fig.3 A431-Fucci の作製

A431-mCherry pure に CS2-EF-MCS mVenus-hGeminin をレンチウイルスを用いて形質導入した。導入が確認できた細胞を FACS AriaII を用いて単離した (A431-Fucci)。

Fig.4 A431-Fucci の細胞周期測定

A431-Fucci の mCherry 陽性細胞、mCherry mVenus 両陽性細胞、 mVenus 陽性細胞をそれぞれ単離し、70 % エタノールで固定後、DRAQ5 で細胞周期を測定した。

Fig.5 実験方法

(A) フローサイトメトリーを用いて、A431-Fucci の Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞を 384 well plate にそれぞれ単細胞播種した。

(B) 核に赤色あるいは緑色の蛍光が確認でき、細胞質に透明の領域が確認できたものを生細胞として判定した。

(C) 細胞の縮小が起こり、その後、細胞が断片化した所見を細胞死と判定した。

(D) 細胞が膨張し、細胞膜の破たんが起こった所見を細胞死と判定した。

(E) 核膜の消失と共に、緑色の蛍光が細胞全体に広がり、細胞の中央に割面が生じた後に二つの娘細胞が確認できた時を細胞分裂と判定した。

(F) IncuCyte ZOOM を用いて各 well における7日後の細胞数を計測した。

Fig.6 細胞運命系譜図

Time-lapse imaging を基に時間軸も含めた細胞運命系譜図を作成した。Fucci の蛍光を基に細胞周期、細胞分裂、細胞死を特定した。また、赤線、緑線は各細胞周期の長さを反映した。

Fig.7 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の増殖率 (N=5)

スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。 ** $p < 0.05$

Fig.8 1 well あたりの平均増殖率 (N=5)

スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。 ** $p < 0.05$

Fig.9 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の A431 の細胞周期 (N=5)

スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。

Fig.10 平均死細胞割合 (N=5)

スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。 ** $p < 0.05$

Fig.11 世代模式図

細胞分裂してできた 2 つの娘細胞を次世代とした。A431 の doubling time が約 33 時間であるため、33 時間の観察が不可能であった娘細胞については検討から除外することとした。

Fig.12 各世代における細胞周期

(A) 各世代の G₁ 期の長さ

(B) 各世代の S/G₂/M

(C) 各世代の細胞周期の長さ

スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。

Fig.13 各世代における平均死細胞割合 (N=5)

スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$

Fig.14 sh-RNA 導入細胞の Podoplanin の発現

Fig.15 sh-RNA 導入細胞の 1 well あたりの平均増殖率 (N=3)

スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$

Fig.16 sh-RNA 導入細胞の平均死細胞割合 (N=3)

スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。* $p < 0.1$, *** $p < 0.01$

Fig.17 Podoplanin の下流シグナル

(A) Podoplanin の下流シグナル概略図

(B) Podoplanin 陽性細胞 / 陰性細胞、sh-RNA 導入細胞のウェスタンブロッティング

Fig.18 ROCK 阻害剤添加細胞の 1 well あたりの平均増殖率 (N=3)

スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$

Fig.19 ROCK 阻害剤処理細胞の平均死細胞割合 (N=3)

スチューデントの t 検定を用いて統計解析を行った。* $p < 0.1$

Fig.20 Graphic abstract

がん幹細胞は Podoplanin を介して ROCK シグナルを活性化することで細胞死を回避し、少数の状態から高いコロニー形成能を示した。

Fig. 21 - 30

5 年以内に出版予定

Sup Fig. 1 Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の分化 / 未分化マーカー発現

Sup Fig. 2 - 3

5年以内に出版予定

Table. 1 各実験における Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞の総播種細胞数と 168h の総細胞数

Table. 2 各実験における sh-RNA 導入細胞の総播種細胞数と 168h の総細胞数

Table. 3 各実験における ROCK 阻害剤処理細胞の総播種細胞数と 168h の総細胞数

Table. 4 プライマー配列