

博士論文

患者由来胃がん細胞の不均一性と薬剤抵抗性細胞の治療標的分子

(Heterogeneity in patient-derived gastric cancer cells and
therapeutic targets of drug-tolerant persister cells)

川上 隆兵

東京大学大学院新領域創成科学研究科
メディカル情報生命専攻 がん分子標的治療学分野

令和元年度

博士論文

患者由来胃がん細胞の不均一性と薬剤
抵抗性細胞の治療標的分子
(**Heterogeneity in patient-derived
gastric cancer cells and therapeutic
targets of drug-tolerant persister cells**)

川上隆兵

序論.....	1
1 がん ～悪性新生物～.....	1
2 胃がん.....	2
3 がんの治療法.....	3
4 薬物療法における薬剤耐性.....	6
5 がん幹細胞とがん幹細胞マーカー.....	7
6 修士課程の研究により得られた知見とこれまでの問題点および本研究の目的.....	9
第1章 シングルセル解析による患者由来胃がん細胞における不均一性および細胞傷害性 抗がん剤処理前後の遺伝子発現変動の検討.....	15
要約.....	15
1-1 患者由来胃がん細胞における薬剤処理後の残存分画の抗がん剤抵抗.....	16
1-2 患者由来胃がん細胞における薬剤抵抗性の起源に関する解析.....	19
1-3 シングルセル解析の指標とする細胞系譜関連因子、幹細胞関連因子、抗がん剤耐性関連 因子群の選別.....	24
1-4 シングルセル解析による患者由来胃がん細胞の不均一性の評価および抗がん剤処理に よる遺伝子発現の変動.....	35
考察.....	41
第2章 抗がん剤処理後の残存細胞における ALDH1A3 の発現亢進と細胞増殖維持への寄 与.....	44

要約.....	44
2-1 抗がん剤処理後の残存細胞に発現亢進を示す因子群の細胞増殖への寄与.....	45
2-2 患者由来胃癌細胞における 5-FU 処理後の ALDH1A3 の発現亢進および不均一性の変動.....	51
2-3 患者由来胃癌細胞における 5-FU 処理後の ALDH1A3 の発現亢進 (in vivo) および腫瘍における悪性度との相関.....	57
考察.....	65
第 3 章 患者由来胃癌細胞における ALDH1A3-mTOR 経路を介した細胞増殖.....	67
要約.....	67
3-1 ALDH1A3 の抗がん剤処理後の細胞残存および腫瘍増殖への寄与.....	68
3-2 ALDH1A3 に関連する経路の同定 ～mTOR 経路～.....	76
3-3 ALDH1A3 抑制による細胞周期への影響および 5-FU と mTOR 阻害剤の併用による細胞増殖抑制効果.....	81
考察.....	87
第 4 章 総括.....	90
参考文献.....	93
謝辞.....	105

序論

1. がん ～悪性新生物～

人間にとって健康に生き、病とは無縁に寿命を全うすることは何よりも幸福なことである。しかし実際は、様々な内的・外的要因により、一生の間に何らかの疾患を患い、最悪の場合死に至ることがある。その中でとりわけ先進国において死因の上位に位置する疾患が悪性新生物、すなわちがんである。2017年時点で全世界の死因において、がんは心血管疾患に続いて2位、956万人が命を落としている重篤な疾患である[1]。我が国にいたっては、がんは1981年に心血管疾患を抜いて以来今日に至るまで、不動の死因1位に鎮座し続けている[2]。2017年には37万以上の人々ががんによって命を落としており、我が国にとって最も忌むべき疾患である[2]。その上、全世界でがんにより命を落とす患者の割合は年々増加している。1990年では全死因の約12%であったが、2017年では全死因の17%を占めるまでに至り、今後も増えていくと予想される[1]。この背景には、がんの罹患経路が関係している。細胞は本来、恒常性を保ちつつ増殖をしており、紫外線や化学物質などにより細胞に何らかの異常が生じた場合、修復機構が働き細胞の状態をもとに戻す機能が備わっている。それが何かの弾みで修復されずに細胞に異常が残り、籠が外れ無秩序に際限なく増殖を繰り返すようになることがある。これががんである。近年、医療の進歩により平均寿命が年々延びているが、このことは裏返せば、それだけ身体に対して紫外線や化学物質によるダメージを修復する回数が増えるということである。故に、自然と修復機構に綻びができる確率が上がるということは至極当然である。今後も医療の進歩が続き、平均寿命が延びる可能性が高いことを考えると、がんによる死亡者は増え続けることが予想される。ここにがんという疾患を治す意義がある。

2. 胃がん

がんは、がん腫、肉腫、白血病、リンパ腫、神経膠腫、悪性黒色腫など様々な種類が存在する[3]。そのうち胃がんは世界的に見ても主要ながんの1つであり、患者数5位、死亡数3位に位置するがんである[4]。特にアジアにおいて代表的ながん種であり、日本でも、罹患率2位、死亡率3位とともに上位に位置するがん種である。胃がんは、プロモーターの1つである塩分を含む食材を好んで摂取してきた日本人にとって、特に主要ながん種の1つである。胃がんの原因として古くから知られているものとして、ヘリコバクター・ピロリ菌の感染が挙げられる[5]。しかし、近年では除菌が可能になったことで胃がんを予防できるようになり、その罹患率は年々下降傾向にある。しかし、除菌までに既に菌からの刺激に暴露され続け、がんを発症しつつある人、既に罹患した人、若年性の胃がん罹患した人は未だ多く、有効な治療法の確立が急務である。

胃がんには複数の種類があり、臨床では様々な分類法が確立している[6]。最も古いものが1901年に報告された肉眼型分類のBorrmann分類であり、現在も使用されている[7]。この分類法では胃がんをI型からIV型の4群に分別するが、それぞれの群と分化型に相関があり、I型からIV型にかけて分化度が低いがんの割合が増えるとされている。また、1965年に報告された進行胃がんの進展様式によって分類するLauren分類も現在使用されている[8]。この分類では進行胃がんを腸型がん(intestinal型)、びまん性胃がん(diffuse型)およびその他で分けることが出来る。この分類に関しても分化型に関係していると考えられており、intestinal型は分化度が高く、diffuse型は分化度が低いとされている。それ以外にも胃粘液を構成する上皮細胞の違いで3種類に分類する方法[9]、胃がんの進展の違いで2種類に分類する方法[10]等が存在する。このように臨床において胃がんの分類方法は確立しているが、基礎研究においても近年、分類法が報告された。具体的には、2014年のThe Cancer Genome Atlas Research Networkからの報告により、患者間で4つの種類に分類できることが提唱された[11]。具体的には、エプスタインバーウイルス陽性(Epstein-Barr virus: EBV)、マイクロ

サテライト不安定性 (microsatellite instability: MSI)、ゲノム安定性 (genomically stable: GS)、染色体不安定性 (chromosomal instability: CIN) の 4 種に分類できる。MSI は遺伝子変異が多く、CIN は染色体のコピー数が多いなど、それぞれ特徴を有しており、それらを標的とした治療法の開発が進められている。

3. がんの治療法

がんの歴史は非常に古く、最古のものは約 170 万年前まで遡る。この時代に生きていたヒトに骨肉腫が確認され、2016 年に報告されたこの発見は大きな話題を呼んだ[12]。疾患としての歴史はこれほどまでに古いものの、自身の正常な細胞からできるというがんの性質上、治療法の確立は近代に至るまで困難を極めた。しかしながら、近年では科学技術の発達により様々な治療法が確立されている。今日のがんの主流な治療法は、手術療法、放射線療法、薬物療法の 3 種類に大別される[3]。

手術療法は、がんの部分を直接取り除く、古来より行われてきた最も直接的な方法である。歴史的に見れば、日本では華岡青洲が文化元年（1804 年）10 月に、自身が受け持った 4 例目の乳がん患者に対し、通仙散による全身麻酔下で乳がんの外科的手術を行っている[13]。直接的にがんを除去する手術療法は、がんの中でも特に、腫瘍を形成するような固形がんにも最も有効であるとされている。しかしながら、ある程度まで進行したがんでは、がん細胞と正常細胞が複雑に混在していること、転移能や浸潤能を獲得していること、患者の体力が著しく消耗しており手術に耐えられない可能性があることなどの理由で切除不能になることがある。また、血液がんなどに対しては、そもそも血液は全身を循環しているものなので、外科的療法は適応できない。

放射線療法は、高エネルギーの放射線をがんに直接照射することで、がんを死滅させる方法である。1895 年 11 月 8 日にレントゲンが X 線を見つけて以来[14]、発見当時からその性質が注目され診断から治療まで幅広く応用されてきた。がんに対する放射線療法もその過

程で見出された治療である。放射線療法なら、患者の身体にメスを入れることなく、がんを集中的に攻撃することができる。しかしながら、がんの部分のみに焦点を当て治療することが困難であるという問題がある。例えば、がんの種類や進行度によって、がんが正常細胞と混在する状態を維持している場合、がん焦点を当てたとしても正常細胞も放射線の巻き添えを食う形になる。また、画像診断によりがんの病巣を特定し、放射線照射の距離や角度を綿密に計算したとしても、実際に照射する際には時間経過により、がんの進行状況の変化や患者の体重の増減などで位置が変わっている場合がある。加えて、治療中患者は呼吸を続けているので、それによる身体の動きで照射位置が完全には固定できない。これらの場合、放射線はがん細胞だけでなく、的の外れた正常細胞にも照射される。高エネルギーの放射線はがん細胞であろうが正常細胞であろうが見境なく殺すので、上述のような場合は正常細胞も死滅する。そのため、脱毛、嘔吐、手足の痺れを伴う末梢神経障害、疼痛など様々な副作用が生じることになる。

薬物療法は、化学物質を用いてがんを死滅させる方法である。歴史を紐解くと、その起源は戦争の際に使用された化学兵器マスタードガスにあるとされている。そこからまず、細胞傷害性の抗がん剤ナイトロジェンマスタードが生まれた[15]。細胞傷害性の抗がん剤はどのような細胞にも無差別に作用し死滅させるが、がん細胞の方が正常細胞よりも増殖が異常に速いのでがん細胞に効果的に作用するという絡繰りである。この仕組みとがんの性質をもとに考えると、細胞傷害性の抗がん剤は多種のがんに有効であり、進行がんにも使用可能な治療法であると考えられる。しかし当然ながら、正常細胞に対しても殺細胞効果を示すので、脱毛、嘔吐、手足の痺れを伴う末梢神経障害、疼痛などの副作用が生じ、患者の身体を脅かす。次に分子標的薬が生まれた。分子標的薬は、がんの特異的に発現し生存を補助している因子の機能を直接阻害する薬剤である。がんを発現している特定の因子が標的となるので、副作用が少なく、かつ、より効果的にがんを攻撃することができると考えられている。例えば、CD20 を標的とするリツキシマブは B 細胞性ホジキンリンパ腫の治療薬として知ら

れている[16]。また、9番染色体と22番染色体の相互転座によって生じたフィラデルフィア染色体より産生される bcr-abl タンパク質を標的とするイマチニブは慢性骨髄性白血病の治療薬として知られている[17]。このように、かつては不治の病とされてきた血液がんに対して、分子標的薬は新たな治療の緒を見出すきっかけとなった。分子標的薬は血液がんのみならず、固形がんの治療にも使用される。例えば、human epidermal growth factor receptor type2 (HER2) を標的とするトラスツズマブは乳がんの治療薬として知られている[18][19]。また、echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) 遺伝子と anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase (ALK) 遺伝子が融合した遺伝子[20]より産生されるタンパク質を標的とするクリゾチニブはALK融合遺伝子を有する肺がんの治療薬として知られている[21]。さらに、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) を標的とするゲフィチニブはEGFR機能獲得型変異を有する非小細胞肺がんの治療薬として知られている[22]。しかしながら、分子標的薬も必ずしも万能という訳ではない。例えば、先に述べたトラスツズマブは重篤な副作用である心不全を引き起こし、最悪の場合死に至る可能性があることが知られている[19][23]。特に、トラスツズマブとアントラサイクリン系薬剤との併用により、心不全が起りやすくなるという報告もなされている[24]。また、最後に述べたゲフィチニブは、日本で承認され使用された際、重篤な副作用である間質性肺炎を一部の患者にもたらし裁判にまで発展する大きな問題となった[25]。なお欧米ではこの重篤な副作用はほとんど見られなかった。このように民族の遺伝子背景や生活環がもたらす身体の差異によって生じる重篤な副作用が問題になることがある。また、重要な臓器の正常細胞に分子標的薬の対象となる分子が存在していた場合、重篤な副作用を生じさせる可能性がある。このように3つの療法にはそれぞれ利点と欠点があり、患者の状態によって最善のものを適用することになっている。また、近年では第4の治療法として免疫療法が挙げられることも多い[3]。

4. 薬物療法における薬剤耐性

薬物療法は上述の化学物質を使用するという性質上、進行がんに適応することができ、かつ、大勢の患者に同様にして適応することが出来る有用な治療法である。しかしながら、がん組織が薬剤耐性の形質を示し、抗がん剤の効果が十分に発揮されないことがある。薬剤耐性には、もとより薬剤が効果を示さない自然耐性と、初めは効果を示していたが、最終的に効果を示さなくなる獲得耐性が存在する。加えて、作用機序の異なる複数の薬剤に効果を示さなくなる多剤耐性も存在する[3]。がん組織が化学療法によるダメージを回避して薬剤耐性になる原因としては、遺伝子変異による耐性、休眠状態による不応答、がん組織の不均一性、がん組織への薬剤未到達、周辺組織の微小環境が及ぼす影響など、様々なものが考えられる。また、具体的な耐性機序としては、古くから知られている P 糖タンパク質などの ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターによる薬剤排出[26]や、薬剤不活性化の亢進、薬剤活性の低下、アポトーシス機構の欠損等が挙げられる[3]。加えて、肺がんでは前述した分子標的薬のゲフィチニブやエルロチニブに対して、抵抗性を示す EGFR の T790M 変異を獲得して耐性を示すことがある[27]。この変異の入った耐性形質を示す組織に対して、有効な薬剤として AZD9291 (オシメルチニブ) が開発されている[28]。しかしながら、オシメルチニブに対しても EGFR に C797S 変異が生じて耐性を示すことがある[29]。このように、分子標的薬に対しても耐性機序が存在する。このように化学療法から生き残った細胞は、*persister* 細胞と呼ばれており、近年様々な研究が行われている (Fig. 1)。*'persister'* という言葉は、本来「生残菌：抗生物質などにより耐性を得て生き残った菌」のことである[30]。古くより、細菌集団に抗生物質を添加した際に生き残った菌を *'persister'* として研究がなされてきた。その中で 2008 年に細菌の *persister* に関して行われた研究における考察の中で、*persister* の生存機構の解明ががん細胞における抗がん剤耐性機構の解明に繋がるのではないかということが初めて述べられた[31]。そして 2010 年、がんの亜集団におけるクロマチンを介した薬剤抵抗性を示す細胞分画の可逆性についての論文で、がんにおいて初めて「ヒトがん細胞

株において抗がん剤により大多数の細胞が死滅する条件下で観察される小亜集団 (small subpopulation)」として可逆的の薬剤耐性細胞 (drug-tolerant persisters) を定義づけた[32]。その後、膠芽腫幹細胞における persister の増加にヒストン脱メチル化酵素が寄与しているという報告[33]や、乳がん、悪性黒色腫、肺がん、卵巣がんにおける persister 細胞は glutathione peroxidase 4 (GPX4) と呼ばれる脂質ヒドロペルオキシダーゼの発現を抑制することで、減少させることができるという報告[34]がなされている。このように persister 細胞に関して、一部の明らかになっている部分はあるものの、その生存機序などは十分に明らかではない。

胃がんの薬物療法には S-1、5-フルオロウラシル (5-fluorouracil: 5-FU)、イリノテカン、シスプラチン、タキソールなどの細胞傷害性の抗がん剤や抗 Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2) 抗体ラムシルマブや抗 HER2 抗体トラスツズマブなどの分子標的治療薬が使用される[35]。化学療法は、前述の通り細胞傷害性を生じる化合物ないし特定の分子を標的とした阻害剤を用いて、がんを死滅させることを目的として行われる。しかし、実際の胃がんの化学療法でも上述の通り、一部のがん組織が何らかの原因で、化学物質による死滅を回避し、生き残ることがある。この現象が起きると、生き残った細胞が再発の引き金となり、がん組織が再建される。この胃がんの persister 細胞に関しても、その生存機序などは十分に明らかではない。

5. がん幹細胞とがん幹細胞マーカー

薬剤抵抗性の原因の 1 つとして、前述したがん組織の不均一性が挙げられる。がん組織が不均一な細胞集団によって構成され、この不均一性ないし構成される細胞間の相互作用が、がんの治療抵抗性や悪性化に深く関与するとされている。不均一性が生じる要因として、遺伝子変異による多様性が挙げられるが、もう一方の要因として、がん幹細胞 (cancer stem cell) の存在が挙げられる。がん幹細胞はがん組織内のヒエラルキーの頂点に位置する細胞として存在している。がん幹細胞は、高い腫瘍形成能、多分化能、自己複製能などの生存に有利

な特徴を有しており、それが種々の抵抗性に寄与していると考えられており、抗がん剤抵抗性にも寄与していると考えられている。このがん幹細胞には、目印（マーカー）となるタンパク質が存在しており、がん種によって様々な種類が存在する[36][37][38]。ヒトのがん幹細胞分画が急性骨髄性白血病（acute myeloid leukemia: AML）で初めて同定された際のマーカーは、CD34 と CD38 であり、CD34+/CD38-分画ががん幹細胞分画であると報告されている[39][40]。次いで、固形がんである乳がんでも、高い腫瘍原性を持つ CD44+/CD24-分画が初めて同定された[41]。それ以降、次々に様々な固形がんにおける種々のがん幹細胞マーカーが同定されてきた。今日までに乳がんでは CD44+/CD24-の他に ALDH1+[42]、脳腫瘍では CD133+[43]、大腸がんでは CD133+[44][45]や EpCAM+/CD44+[46]、CD44+/CD24+[47]、膵臓がんでは CD133+/CXCR4[48]や CD44+/CD24+/ESA+[49]、肝臓がんでは CD90+[50]や CD133+/CD49f+[51]、食道がんでは CD44+[52]分画が、がん幹細胞分画として同定されている。胃がんについても、がん幹細胞およびそのマーカーについて研究が進められており、特にマーカーに関しては ALDH1[53]や Lgr5[54]など、様々ながん幹細胞マーカーが同定されてきた。特にその中でも CD44 ないし CD44 スプライシングバリエント（CD44v）が精度の高いマーカーとして同定された[55][56]。CD44 は、リンパ球ホーミングレセプターとして 1983 年に初めて存在が見出され[57]、1989 年に軟骨に關与するタンパク質ファミリーとして同定された膜タンパク質である[58][59]。CD44 はヒアルロナンと結合する重要なレセプターであり[60]、複数のスプライシングバリエントが存在することが報告されている[61]。その中でも特に CD44v に関しては、胃がんにおいてグルタミン-シスチントランスポーター（xCT）を介して活性酸素を除去することによってがん幹細胞の生存に寄与しているという報告があり、単なるマーカーではなく機能的な役割も有していることが知られている[62]。一方で、これまで胃がん幹細胞の薬剤抵抗性に、Sonic Hedgehog 経路関連因子[63][64][65]、RhoA[66]、c-Met[67]などの因子の關与が報告されている。しかしながら、実際の研究は、長期培養された細胞株やスフェア培養（球状細胞塊の状態での培養）によって単離されたがん

幹細胞のみについての研究が多く、臨床におけるがん組織の状態を十分には反映できていない可能性が考えられる。また、このがん幹細胞と抗がん剤処理後の残存細胞の関係性については未だ十分には研究されていない。

6. 修士課程の研究により得られた知見とこれまでの問題点および本研究の目的

修士課程の研究では、Institutional Review Board (IRB) 承認のもと、がん研有明病院の協力により、当研究室で樹立された患者由来胃がん細胞を用いて検討を進めた。患者由来胃がん細胞について、先に述べたがん幹細胞マーカーCD44v を基軸に、がん幹細胞性と薬剤抵抗性の関係について検討を行った。その結果、樹立した患者由来胃がん細胞に対して、抗がん剤処理により残存する分画は CD44v の発現が上昇していることを見出した (Fig. 2)。しかし、CD44v 陽性/陰性細胞を分離し、免疫不全の NOD-SCID マウスにそれぞれ移植しても腫瘍形成能には差が見られなかった (Fig. 3)。これらのことから、がん幹細胞と抗がん剤処理後の残存細胞は必ずしも一致しないことが示唆された。

修士課程の研究より、細胞傷害性抗がん剤に抵抗性を示す胃がん *persister* 細胞は、マーカー分子の発現などにおいてがん幹細胞と共通のプロファイルを部分的に有するものの、腫瘍形成能などの性質においてがん幹細胞とは同義でない可能性を提唱した。しかしながら、修士課程の研究ではあくまでがん幹細胞マーカーCD44v のみを基軸としていたため、その発現量の高低のみでがん幹細胞について議論するにとどまっていた。故に他のがん細胞マーカーの発現等、包括的な検討が十分ではなかった。加えて、Fig. 1 に示した通り、元来のがん細胞集団あるいは腫瘍組織が有する細胞の不均一性について、十分な検討ができておらず、その不均一性が抗がん剤にもたらす影響の検討が不十分であった。

そこで本研究ではまず、がん幹細胞マーカーを含めた様々な遺伝子を指標として患者由来胃がん細胞集団の不均一性を 1 細胞レベルで明らかにする。そして、そこに細胞傷害性抗がん剤を添加した時に、発現及びその不均一性がどのように変化するかを明らかにする。そ

の上で抗がん剤処理後に残存する細胞において、*persister* 細胞のマーカールあるいは治療標的候補因子になりうる遺伝子を同定し、その分子機序を解明することを目的とした。これにより、胃がんにおける薬剤からの残存に寄与する因子を明らかにし、胃がんの薬物療法における新たな治療法の開発を目指す。本研究を行うにあたり、より臨床に近い系を意識するため、修士課程に引き続き、当研究部にて樹立された患者由来胃がん細胞を検討に用いた。樹立した細胞は進行胃がんであることは共通しているが、分化度や浸潤度などが多様であった (Fig. 4)。その中でも特に JSC15-3 に関しては、修士課程での研究から、免疫不全の NOD-SCID マウスに樹立した細胞を移植すると、腫瘍が再形成することが明らかになった。また、その腫瘍をヘマトキシリン・カラッチ染色すると、中・高分化型腺がんの特徴である腺管構造が見られた。これらのことから元の腫瘍の特徴を反映する患者由来胃がん細胞が得られたという報告を修士課程では行った。本研究でもその細胞を中心に検討を行った。



Figure 1. 腫瘍に抗がん剤を投与した際の残存細胞による治療抵抗性および再発機序

腫瘍組織には様々な特徴を有するがん細胞が不均一に存在しており、抗がん剤を添加することで、その一部の細胞が残存する。この残存した細胞（persister細胞）が増殖し、再発の引き金になると考えられている。

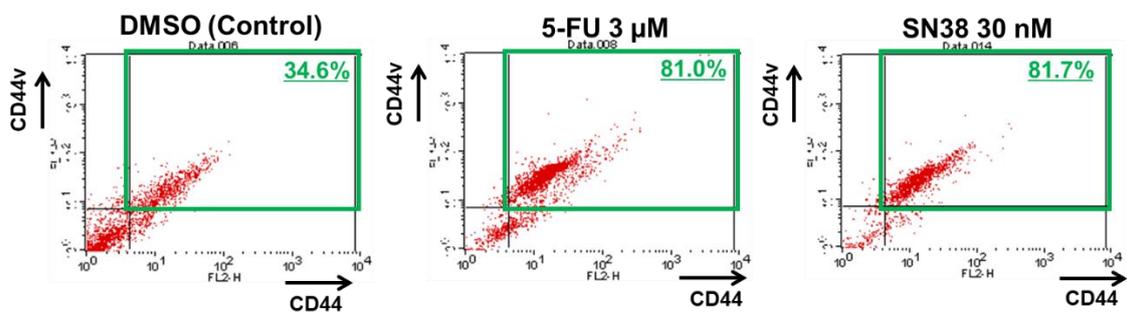


Figure 2. 細胞傷害性抗がん剤処理による CD44v 陽性率の亢進

JSC15-3 に 5-FU および SN38 を 11 日間処理した細胞について、CD44 および CD44v の発現をフローサイトメトリーにより FACSCalibur で検討を行った。縦軸が CD44v、横軸が CD44 を示している。緑の四角は CD44v(+)/CD44(+)の割合を示している。

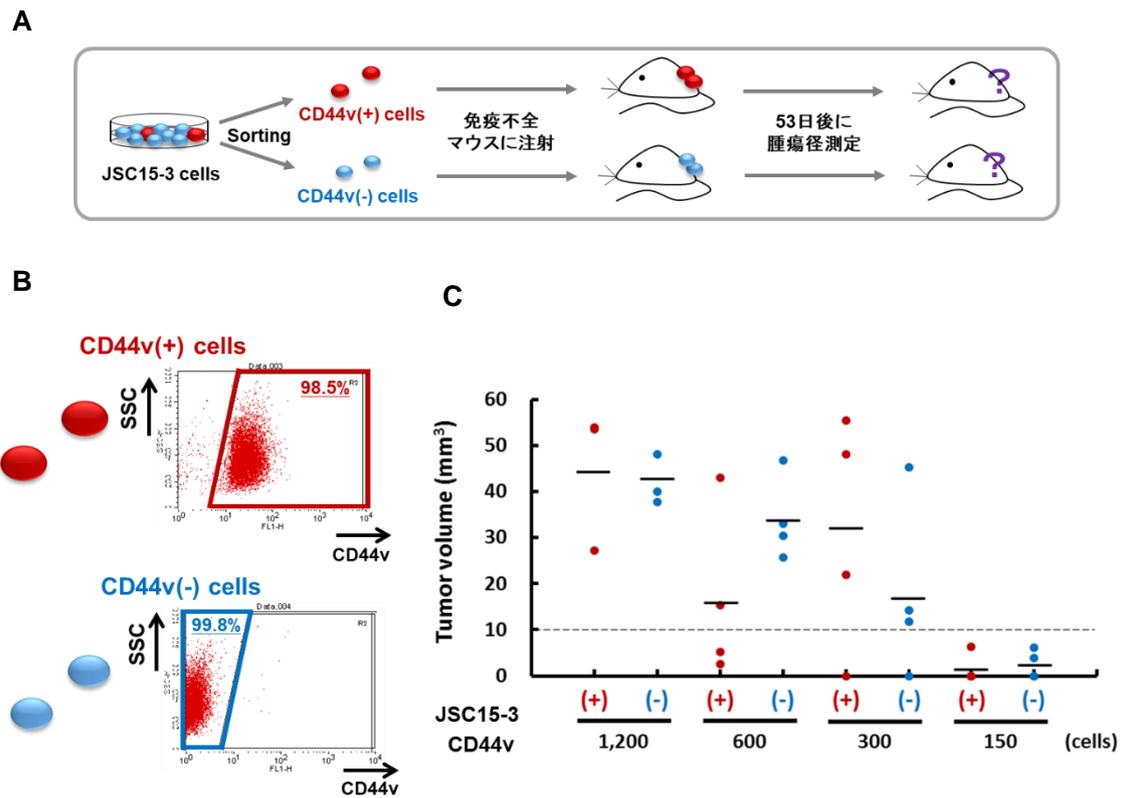


Figure 3. CD44v(+)/(-)細胞の分離および免疫不全マウスにおける造腫瘍性の差異

(A) フローチャートである。赤色が CD44v(+)細胞、青色が CD44v(-)細胞である。(B) CD44v(+)/(-)細胞を FACS Aria によりソーティングした際のそれぞれの陽性率および陰性率を示している。(C) 測定した腫瘍体積を示している。JSC15-3 CD44v(+)/(-)細胞をそれぞれ NOD-SCID マウスの皮下に移植し、53 日後に電子ノギスにより腫瘍体積を測定した。横棒はそれぞれの腫瘍体積の平均値を示している。点線は腫瘍体積が 10 mm³ となるラインを示している。

細胞名	発生部位	分類	組織型	ステージ
JSC15-3	胃体下部小彎	2型	高分化・中分化腺癌	ⅢB
JSC17-2	胃体下部小彎	3型	低分化腺癌・印環細胞癌	ⅡA
JSC17-7	胃下部(胃角部 ～前庭部)	3型	低分化腺癌	ⅡB

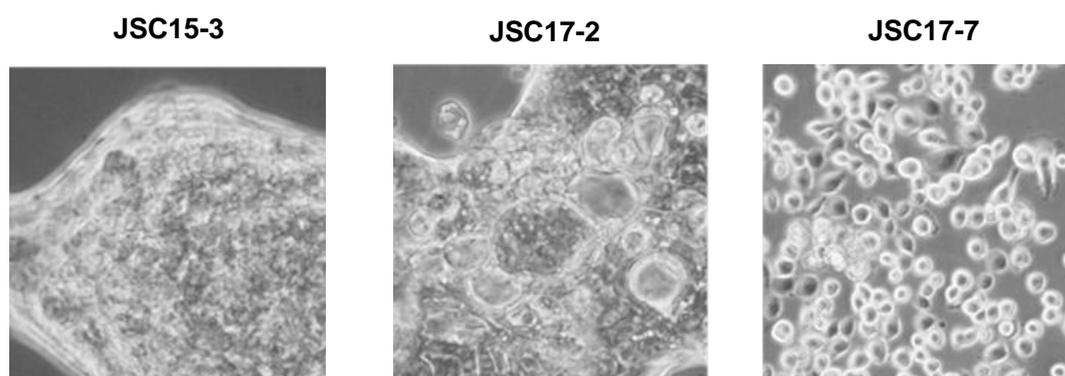


Figure 4. 樹立された患者由来胃癌細胞とその分類

上の表は、所属研究室（がん研究会がん化学療法センター分子生物治療研究部）にて樹立された細胞のうち本研究に用いた細胞の詳細である。左から、細胞名、がんの発生部位、ボールマン分類、組織の分化型、TNM 分類より割り出したステージである。下の写真は、それぞれの患者由来胃癌細胞の培養時の様子である。

第1章

シングルセル解析による患者由来胃癌細胞における不均一性および細胞傷害性抗がん剤処理前後の遺伝子発現変動の検討

<要約>

まず、前提として患者由来胃癌細胞における抗がん剤処理後の残存細胞は薬剤抵抗性の形質を示すのか検討を行った。患者由来胃癌細胞に対して、細胞傷害性抗がん剤 5-フルオロウラシル (5-FU) および DNA トポイソメラーゼIの阻害剤であるイリノテカンの活性化体 SN38 を添加して得られる残存分画は、それぞれの細胞傷害性抗がん剤に交差抵抗性を示した。次にシングルセル解析に用いる遺伝子の選定を行った。文献情報、患者由来胃癌細胞における細胞傷害性抗がん剤処理前後の包括的遺伝子発現解析の結果より、胃系譜関連因子、幹細胞関連因子および細胞傷害性抗がん剤刺激で発現が亢進する因子として、47種類の遺伝子を選定した。シングルセル解析の結果、5-FU 処理前後で明確な細胞分画ないし遺伝子発現の大きな、一部の亜集団が双方の集団に混在することが明らかになった。また、5-FU 処理により複数の遺伝子の発現が亢進したが、特に ALDH1A3 遺伝子に関して、5-FU 処理前に比べて 5-FU 処理後の方が明確な発現亢進を示し、かつ、発現の不均一性に変化が見られた。以上の結果から、5-FU 処理後における種々の遺伝子の発現変動は、一部の細胞の残存と適応応答した細胞による発現誘導によって生じていることが示唆された。

1-1. 患者由来胃癌細胞における薬剤処理後の残存分画の抗がん剤抵抗性

【目的】

がん組織に細胞傷害性抗がん剤を添加した際、一部の細胞が何らかの原因で残存し、薬剤抵抗性の形質を示し、再増殖し再発の引き金となると考えられている。このようなメカニズムが、胃腫瘍組織から樹立された患者由来胃癌細胞においても同様の知見が得られるか、細胞増殖アッセイにより検討する。

【材料・方法】

細胞と培養条件

患者腫瘍由来ヒト胃癌細胞 JSC15-3 は、公益財団法人がん研究会倫理委員会の承認と患者の同意を得た上で、当研究室で患者腫瘍組織から樹立した。これらの患者腫瘍由来細胞は、様々な培地を各細胞に適正な条件で混合し、37°C, 5% CO₂ の条件下、インキュベーター (ESPEC) で培養を行った。JSC15-3 に関して、培養にはカスタム培地 ACL-4 (Nacalai) と Ham's F12 (Nacalai) を 1 : 1 で混合し、非働化済みの fetal bovine serum (以降 FBS と記述) (Sigma) を最終濃度 5% になるように加え、さらに硫酸カナマイシン (以下 Km と表記) (明治) 1 g/20 mL PBS(-) を最終濃度 0.1 g/L になるように加えた培地を用いた。ACL-4 はカスタム培地であり、Ham's F-12 (2.5 mM L-glutamine) と DMEM (1.2 g/L sodium bicarbonate) を 1:1 で混合した培地に 0.02 mg/mL の insulin、0.01 mg/mL の transferrin、25 nM の sodium selenite、50 nM の hydrocortisone、1 ng/mL の EGF、0.01 mM の ethanolamine、0.01 mM の phosphoethanolamin、100 pM の triiodothyronine、0.5 % (w/v) の bovine serum albumin、10 mM の HEPES、0.5 mM の sodium pyruvate、2 mM の L-glutamine を添加したものである。

細胞播種時の細胞数の測定

それぞれの細胞は Disposable Hemocytometer C-Chip (DHC-N01) (Nano EnTek) を用いて、細胞数の測定を行った。

抗がん剤処理後の残存細胞数の評価 (MTS Assay)

CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit (Promega) を、培地が 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ 入った 96 ウェルプレートに、20 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ添加し、37°C、5% CO_2 の条件下で、120 分反応させた。その後、xMark マイクロプレートリーダー (Bio RAD) を用い、490 nm/630 nm の吸光度を測定した。なお、使用した化合物は、一般的な化学療法で使用される細胞傷害性の抗がん剤 5-FU (Sigma-Aldrich) , SN38 (Sigma-Aldrich) である。

【結果】

JSC15-3 に対し、細胞傷害性の抗がん剤である 5-フルオロウラシル (5-FU) および DNA トポイソメラーゼII阻害剤であるイリノテカンの活性体 SN38 をそれぞれ 7 日間添加したものを persister 細胞とし、回収した後にそれらの細胞を 96 ウェルプレートに播種し直し、翌日に 5-FU、SN38 を処理し、7 日間培養した後に薬剤抵抗性の形質が見られるかを細胞増殖試験により検討した。その結果、JSC15-3 の 5-FU 残存および SN38 残存細胞は、5-FU および SN38 に対し、それぞれ薬剤抵抗性を示した (Fig. 6A)。興味深いことに、5-FU 残存細胞も SN38 残存細胞のいずれも、SN38 および 5-FU に対してそれぞれ薬剤抵抗性を示した。具体的に 50% 阻害濃度 (IC50) で比較すると、5-FU あるいは SN38 処理後の残存細胞は未処理の細胞と比較して 3 倍以上耐性になることが明らかになった (Fig. 6B)。このことから、抗がん剤処理後の残存細胞には交差抵抗性があることが示唆された。これらの残存細胞に関して、増殖についての変化を検討したところ、一律に増殖能が低下していることが明らかになった (Fig. 6C)。この細胞増殖が遅く、休眠状態と類似した性質を有する細胞が抵抗性に寄与している可能性が示唆された。

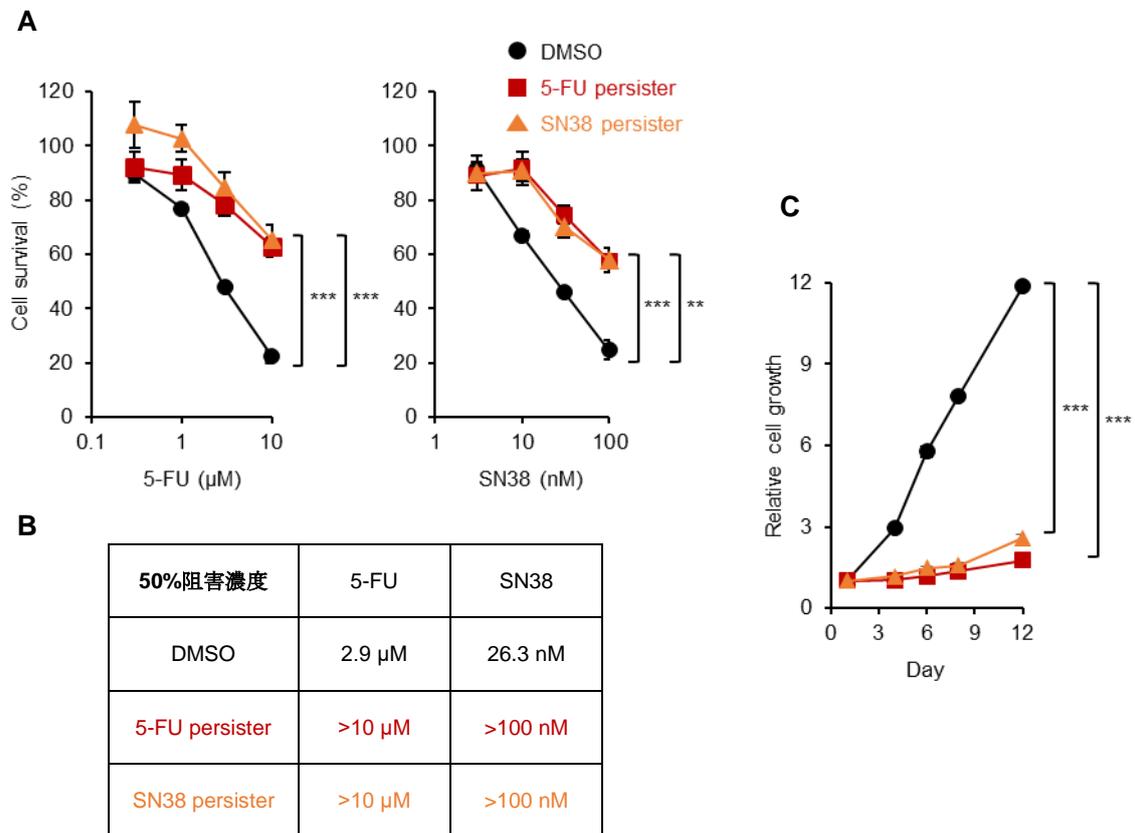


Figure 6. 抗がん剤処理後の残存細胞における薬剤抵抗性

(A) 左は 5-FU 処理、右は SN38 処理時のそれぞれの persister 細胞の生存率を示している。JSC15-3 に 3 μ M の 5-FU および 100 nM の SN38 をそれぞれ添加し、7 日間培養したものを 5-FU 残存細胞 (5-FU persister)、SN38 残存細胞 (SN38 persister) とし、これらをそれぞれ 96 ウェルのコラーゲンコートディッシュに 3,000 細胞播種し、翌日に抗がん剤を添加、その 7 日後に MTS Assay により相対細胞数を定量した。なお 5-FU の濃度は 0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M, SN38 は 1, 3, 10, 30, 100 nM で検討した。(B) A の結果について 50%阻害濃度をまとめたものである。(C) 抗がん剤処理後の残存細胞の増殖を示している。A と同様、MTS Assay により相対細胞数を定量した。図中のアステリスク (*) は有意差 (P 値) を表している。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

1-2. 患者由来胃癌細胞における薬剤抵抗性の起源に関する解析

【目的】

修士課程における検討において、患者由来胃癌細胞に細胞傷害性抗がん剤を添加すると CD44v の発現亢進が観察された。この原因として、元来存在していた細胞の残存と遺伝子の発現誘導の 2 つの可能性が考えられる。そのどちらが寄与しているのかを明らかにするため、ソーティングにより分取した JSC15-3 CD44v(+)/(-)細胞及び緑色蛍光色素である CytoTrack を用いて検討を行う。

【材料・方法】

細胞と培養条件

1-1 に示した方法に準じて行った。

細胞数の測定

1-1 に示した方法に準じて行った。

細胞のソーティング [FACSAria (BD)]

ディッシュ上の細胞をトリプシン処理により回収し、 $200 \times g$, 3 min, 4°C で遠心、上清吸引後、PBS を添加し、細胞懸濁液をエッペンドルフチューブに移動した。 $400 \times g$, 3 min, 4°C で遠心、上清吸引後、Suspension buffer を添加し、使用する抗体によって以下の方法で染色を行った。Suspension buffer は PBS 40 mL、1M HEPES (pH 8.0) 1 mL、0.5M EDTA 80 mL、FBS 200 μL を混合し作製、使用した。

1 次抗体 (ラット抗ヒト CD44v9 抗体、コスモバイオ、LKG-M001、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Suspension buffer) を添加後、 4°C , 1 時間で反応させた。 $400 \times g$, 3 min, 4°C で遠心、上清吸引後、Suspension

buffer で 1 回洗浄した。2 次抗体（ラビット抗ラット IgG- Alexa488 抗体、life technology、A21210、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Suspension buffer）を添加し、4°C、1 時間で反応させた。反応後のサンプルは Suspension buffer にて 2 回洗浄し、得られた細胞懸濁液を FACSAria（BD）にかけ、所定のマニュアルに従い細胞をソーティングした。なお、ソーティング後の細胞は、培養液にて 2 回洗浄を行った後に、細胞数を合わせ、コラーゲンコートディッシュにて培養した。

蛍光色素（CytoTrack）の細胞への導入

CytoTrack™ Cell Proliferation Assay Kit の 500×stock solution に DMSO を 50 μL 添加して混合しておき、細胞数測定により 1.0×10^6 個の細胞を 500 μL の培地で混合した細胞懸濁液に対し、1 μL 添加し混合の後、常温で 15 分間、遮光状態で反応させた。反応後、200 $\times g$ 、3 分、4°C で遠心し、上清を吸引した後、3 mL の培地で細胞を洗浄した。その後培地に懸濁した後にコラーゲンコートディッシュに添加し、培養を行った。

FACSCalibur（BD）を用いたフローサイトメトリー

ディッシュ上の細胞をトリプシン処理により回収し、200 $\times g$ 、3 min、4°C で遠心、上清吸引後、PBS を添加し、細胞懸濁液をエッペンドルフチューブに移動した。400 $\times g$ 、3 min、4°C で遠心、上清吸引後、Suspension buffer を添加し、使用する抗体によって以下の方法で染色を行った。

1 次抗体（ラット抗ヒト CD44v9 抗体、コスモバイオ、LKG-M001、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Suspension buffer）を添加後、4°C、1 時間で反応させた。400 $\times g$ 、3 min、4°C で遠心、上清吸引後、Suspension buffer で洗浄を 1 回行った。2 次抗体（ラビット抗ラット IgG- Alexa488 抗体、life technology、A21210、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Suspension buffer）を添加し、4°C、1 時間で反応させた。反応後のサンプルは Suspension buffer にて 2 回洗浄し、得られた細胞懸濁液について FACSCalibur を用いて解析を行った。

【結果】

抗がん剤によりがん細胞が残存する原因 ～残存 or/and 発現誘導～

修士課程の検討でがん幹細胞マーカーとして用いた CD44v を基軸にして、抗がん剤によりがん細胞が残存する原因について関連する検討を行った。修士課程での研究により得られた結果では、患者由来胃がん細胞に抗がん剤を添加すると CD44v(+)の割合が増加した。これが元来存在していた CD44v(+)細胞の残存によるものか、抗がん剤により CD44 が発現誘導されたものなのかを検討する為に、JSC15-3 に関して CD44v(+)/(-)細胞を分離し、CD44v(+)細胞に緑色蛍光色素の CytoTrack を導入して、未染色の CD44v(-)と 1:1 で混合した。この細胞に対して、5-FU および SN38 を添加した際に、CytoTrack の蛍光がどのように変化するかについて検討を行った。その結果、日数を経過するごとに抗がん剤処理をした JSC15-3 で CytoTrack の陽性率の上昇が見られた (Fig. 7)。このことから、未染色の CD44v(-)細胞が死滅することによって、相対的に CytoTrack を導入した CD44v(+)細胞の割合が増加し、抗がん剤添加による CD44v(+)細胞の割合の増加は元来存在していた CD44v(+)細胞の残存によってもたらされていることが示唆された。一方、他の系として、JSC15-3 に関して CD44v(-)細胞を分離し、5-FU および SN38 を添加した際に、CD44v の陽性率の増加が見られるかの検討を行った。その結果、抗がん剤を処理することにより CD44v(-)細胞に関して、CD44v の陽性率が上昇することが明らかになった (Fig. 8)。このことから、元来 CD44v が発現していない JSC15-3 細胞に抗がん剤を添加することによって CD44v の発現が誘導されて CD44v の陽性率が上昇していることが示唆された。このように CD44v を基軸にした検討により、抗がん剤残存細胞に見られる CD44v の陽性率の上昇は、残存および発現誘導の双方によってもたらされていることが示唆された。

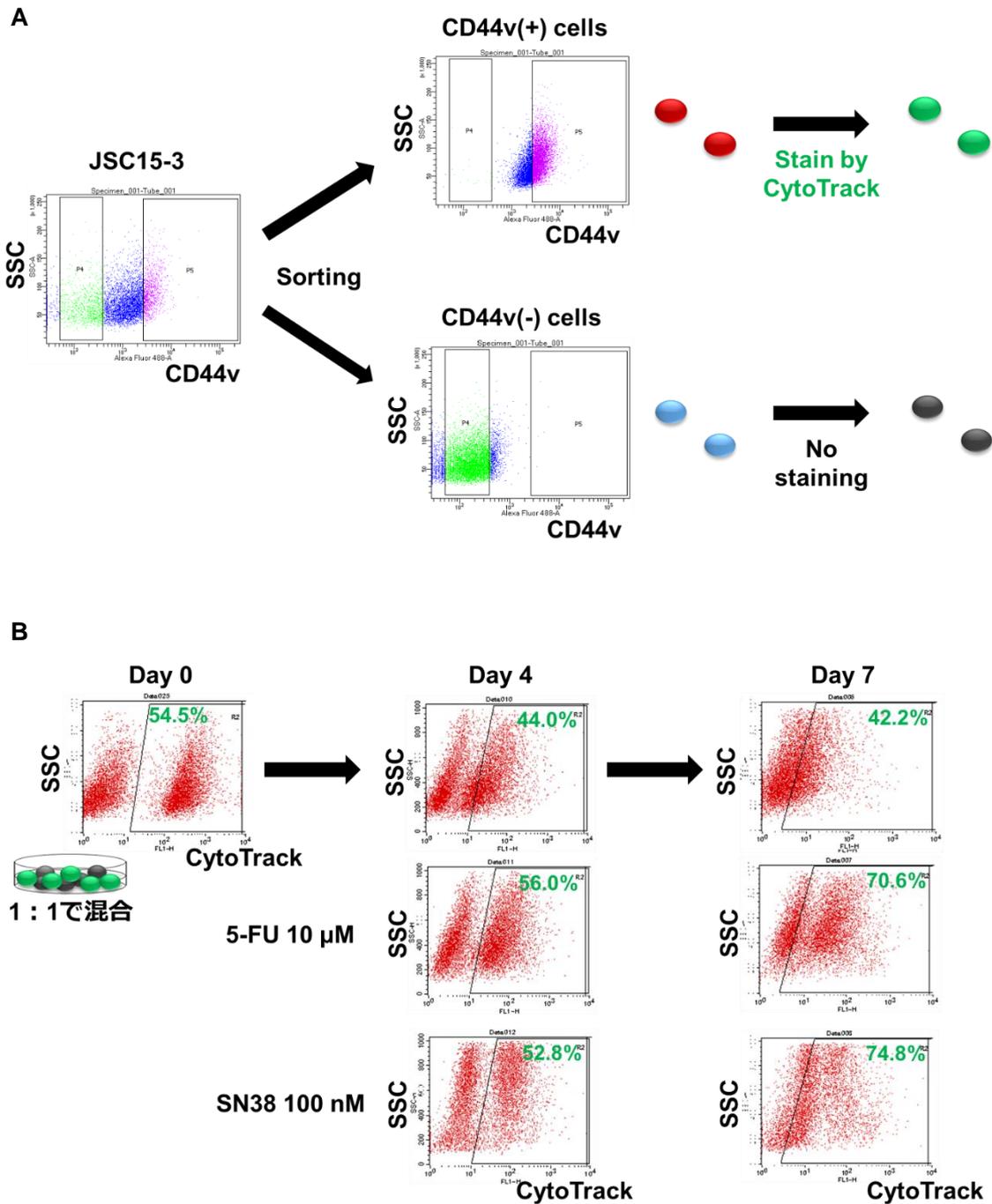


Figure 7. 5-FU, SN38 による CD44v の陽性率の亢進が残存によるものかを証明する系

(A) JSC15-3 CD44v(+)/(-)細胞のソーティングからラベリングまでのフローチャートを示している。赤の球体が CD44v(+)細胞、青の球体が CD44v(-)細胞、緑の球体が CD44v(+)細胞に緑色の色素である CytoTrack を導入した細胞である。(B) 緑色にラベリングした JSC15-3 CD44v(+)細胞と未染色の JSC15-3 CD44v(-)細胞を 1:1 で混合した後に 5-FU, SN38 を添加した際のラベリングした細胞の陽性率の変化を示している。

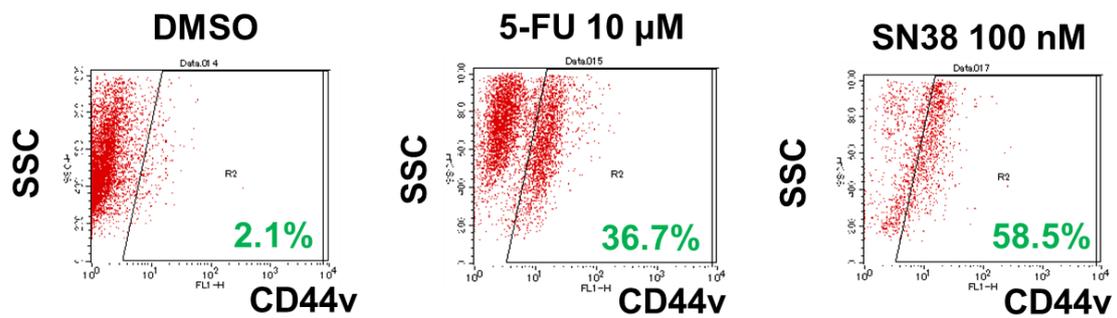


Figure 8. 5-FU, SN38 による CD44v 陽性率の亢進が発現誘導によるものかを証明する系ソーティングした CD44v(-)細胞に対して、5-FU および SN38 を 6 日間処理した際の CD44v の陽性率をフローサイトメトリーにより検討した結果を示している。

1-3. シングルセル解析の指標とする細胞系譜関連因子、幹細胞関連因子、抗がん剤耐性関連因子群の選別

【目的】

シングルセル解析を行うにあたり重要なことは解析に用いる遺伝子セットの選別である。この遺伝子セットについて、細胞系譜関連遺伝子、幹細胞関連遺伝子、抗がん剤耐性関連遺伝子をそれぞれ文献情報やマイクロアレイ解析の結果から絞込みを行う。なお本研究では抗がん剤添加時に発現が亢進する遺伝子を抗がん剤耐性関連遺伝子として検討を行う。

【材料・方法】

細胞と培養条件

患者腫瘍由来ヒト胃がん細胞 JSC15-3、JSC17-2、JSC17-7 は、所内倫理委員会の承認と患者の同意を得た上で、当研究室で患者腫瘍組織から樹立した。これらの患者腫瘍由来細胞は、様々な培地を各細胞に適正な条件で混合し、37°C、5% CO₂ の条件下、インキュベーター (ESPEC) で培養を行った。使用した培地を以下に列挙する。JC15-3 は 1-1 と同様の条件で培養した。JSC17-2 は JSC15-3 と同様の条件で培養した。JSC17-7 の培養には、ACL-4 と RPMI1640 (Nacalai) を 1:1 で混合し、非働化済みの FBS を最終濃度 5% になるように加え、さらに Km を 1 g/20 mL PBS(-) を最終濃度 0.1 g/L になるように加えた培地を用いた。

包括的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ)

細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付のプロトコルに従い RNA を精製した。この RNA から、Gene Chip 3' IVT Express Kit (Affimetrix) を用いて、cDNA を合成した。その後、ビオチン化 RNA を合成し、フラグメント化した後に、Bioanalyzer (Agilent Technology) を用いて、その純度を測定した。合成されたプローブを用いて、Affimetrix Human

GenomeU133 plus2.0 アレイ Chip に対して、添付のプロトコルに従い、ハイブリダイゼーション、染色、洗浄を行い、その後 Gene Chip Scanner (Affymetrix) によりシグナルを検出した。

Reverse Transcription (RT)-qPCR

FastGene RNA Basic Kit (Nippon Genetics) を用いて、添付のプロトコルに従い、細胞から RNA の精製を行った。抽出した RNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo) を用いて、cDNA 合成を行った。ここで得られたサンプルについて、Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて Light Cycle 96 (Roche) により、遺伝子発現レベルの測定を行った。なお用いたプライマーを Table 1 にまとめる。プライマーの設計は基本的に Roche の Universal ProbeLibrary Assay Design Center から行い、それでは設計が困難なものに関しては Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) から行った。なお GAST、MIST1、SOX2 のプライマーに関しては、文献情報より選別した[68]。

【結果】

シングルセル解析の指標として用いる遺伝子群の設定

シングルセル解析を行うにあたり、3つの軸で観察する遺伝子の選別を行った。

1つ目は胃の系譜関連因子の選別を行った。胃組織は複数の分化段階の細胞で構成されており[69]、胃の部位ごとに各分化段階で様々な因子がマーカーとして報告されている[68-74]。例えば、前庭部および幽門部付近の細胞に関しては、LGR5、TROY、MIST1 が胃幹細胞マーカー、SOX9 が分化する前段階の前駆細胞マーカー、MUC5AC、TFF1、GKN1 などが分化で派生した細胞表面の粘液細胞 (pit 細胞) のマーカー、MUC6 および TFF2 などが幽門腺細胞のマーカーとして知られている[68][70-72]。一方で、胃底部の細胞に関しては、先に記した幽門腺細胞と同様のマーカーが、粘液腺細胞 (neck 細胞) のマーカーとして知られて

いる[72]。また、酸を分泌する壁細胞などが存在しており、GIFなどがマーカーとして知られている[72]。加えて、胃体部の細胞に関しては、GIFが主細胞（chief細胞）のマーカーとして知られている。また、腸内分泌細胞のマーカーとしてCHGAなどが知られている[73]。さらに部位ごとによって幹細胞マーカーが異なるという報告もある[74]。しかしながら、文献情報を見ると、各部位のマーカーとして共通に報告されている因子もある一方で、文献によって異なる因子もあるので、胃の系譜関連遺伝子については未だ十分に明らかではない。加えて、それぞれの段階の細胞あるいはマーカー陽性細胞が、胃がん細胞の生存維持や抗がん剤抵抗性にどのような役割をもたらしているのか、あるいはそもそもどのような不均一性が存在するのかは十分に明らかではない。シングルセル解析により、この不均一性を明らかにすることができると考え、系譜関連因子の選別を行った。選別には、先程の論文情報を用い[68][70-74]、選別した遺伝子から胃系譜関連因子の体系的な模式図（Fig. 9）および遺伝子リストを作成した。

2つ目は胃の幹細胞関連因子の選別を行った。幹細胞マーカーに関しては、胃がんにおいても様々な因子の報告があり、胃は複数の部位に分けることができるが[75]、その部位ごとに発現が異なっていることが知られている[72][75-80]。同様に、胃のがん幹細胞に関しても、様々な因子がマーカーとして報告されており、それらの因子におけるがん細胞の生存増殖への寄与が示唆されている[53][55][78][81-90]。しかしながら、これらの因子にどのような不均一性が存在しており、抗がん剤処理によりどのように変化するかについては十分に明らかではない。また幹細胞関連因子の包括的な解析は十分になされていない。シングルセル解析により、幹細胞関連因子の不均一性および抗がん剤処理による変化、また種々の因子の発現レベルの差などを明らかにできると考え、幹細胞関連因子の選別を行った。選別には、系譜関連因子と同様に上に示した論文情報をもとに行った。

3つ目は抗がん剤処理により高発現する遺伝子群の選別を行った。抗がん剤で発現が亢進する因子に関しては、抗がん剤処理後の残存細胞のマーカーになる可能性があるだけでな

く、抗がん剤残存細胞ひいてはがん細胞の生存に機能的に寄与している可能性もある。それらの因子の発現を観察するために用いる WB や RT-qPCR などの手法は、細胞全体の平均的な発現を見ているにすぎず、それらの不均一性までは明らかにすることが出来ない。これらを明らかにするために抗がん剤処理で発現が亢進する因子に関して選別を行った。選別は、樹立した患者由来胃がん細胞 JSC15-3、JSC17-2、JSC17-7 に関して、5-FU および SN38 を処理し、未処理の細胞と並べて GeneChip マイクロアレイ解析を行うことにより、発現の亢進する遺伝子を選別し、遺伝子リストを作成した (Fig. 10)。選別した因子は、JSC15-3 に対する 5-FU 処理後の残存細胞で 2 倍以上、JSC15-3 に対する SN38 処理後の残存細胞で 1.5 倍以上、JSC17-2 に対する 5-FU 処理後の残存細胞で 1.5 倍以上、未処理と比較して発現量が高いという特徴を有していた。上述した遺伝子リストに加え、内部標準や他のがん種で標的とされている遺伝子を加えたリストを作成し、それぞれの遺伝子に対してプライマーをデザインした後、RT-qPCR でワークするのを確認した。

これら 3 つの指標により見出した候補因子の中から、melting curve が単一で、目的の因子の発現を解析できると考えられる遺伝子 47 種を選別してシングルセル解析を行った。選別した遺伝子をリスト化して以下にまとめる。(Table 2)

シングルセル解析の条件設定

シングルセル解析を行うにあたって様々な条件を設定した。まず細胞は患者由来胃がん細胞 JSC15-3 およびその抗がん剤処理後の残存分画を使用した。このがんは Stage3 の進行がんで、先に述べた通り、樹立した細胞は安定培養可能で、元の形質をよく反映した胃がん細胞である。次に薬剤は、修士課程の検討より CD44v の陽性率の上昇が見られた 5-FU を使用した。次に薬剤の処理日数は 7 日間処理とした。その後 4 日間薬剤を抜いて培養することとした。これは 5-FU を処理してすぐに検討を行うと、細胞へのダメージが著しく大きく、その直接的な影響による遺伝子変動が見られる可能性が高いので、5-FU 処理後の残

存細胞で変動する遺伝子を正確に観察できないと判断したためである。なお、5-FU を $3\mu\text{M}$ で 7 日間処理すると 52%の細胞が死滅することが明らかになっている (Fig. 6A)。さらに JSC15-3 はディッシュより細胞を乖離した際、凝集しやすいという特徴を有していたために、 $20\mu\text{m}$ のフィルターを用いて細胞を分離した後に検討を行った。次に細胞集団をシングルセルに分離するための C1 プレートに関しては、JSC15-3 に関して予備検討を行った結果、5-FU 処理前の細胞径が $12\text{--}15\mu\text{m}$ 、5-FU 処理後の細胞径が $15\text{--}18\mu\text{m}$ であったことから、5-FU 処理前の JSC15-3 は Medium ($10\text{--}17\mu\text{m}$)、5-FU 処理後の JSC15-3 は Large ($17\text{--}25\mu\text{m}$) のプレートを使用した。これらの条件でシングルセル解析の実験を 5-FU 処理前後でそれぞれ 2 回ずつ行った。実際に行ったシングルセル解析の流れを以下に示す (Fig. 11)。次にポジティブコントロールとネガティブコントロールに関して記す。前者は JSC15-3 についてシングル化を行う前の 5-FU 処理前後の細胞より RNA を抽出し、1 細胞レベルまで RNA 量を希釈して検討に用いた。後者は細胞を抽出していない液をそのまま検討に使用した。

また、フリーダイムのアプリケーションおよび R を用いた解析によって得られた結果から、全体的な遺伝子の発現が著しく低い細胞、ネガティブコントロール、ポジティブコントロールをそれぞれ除いてシングルセル解析を行った (Fig. 12)。

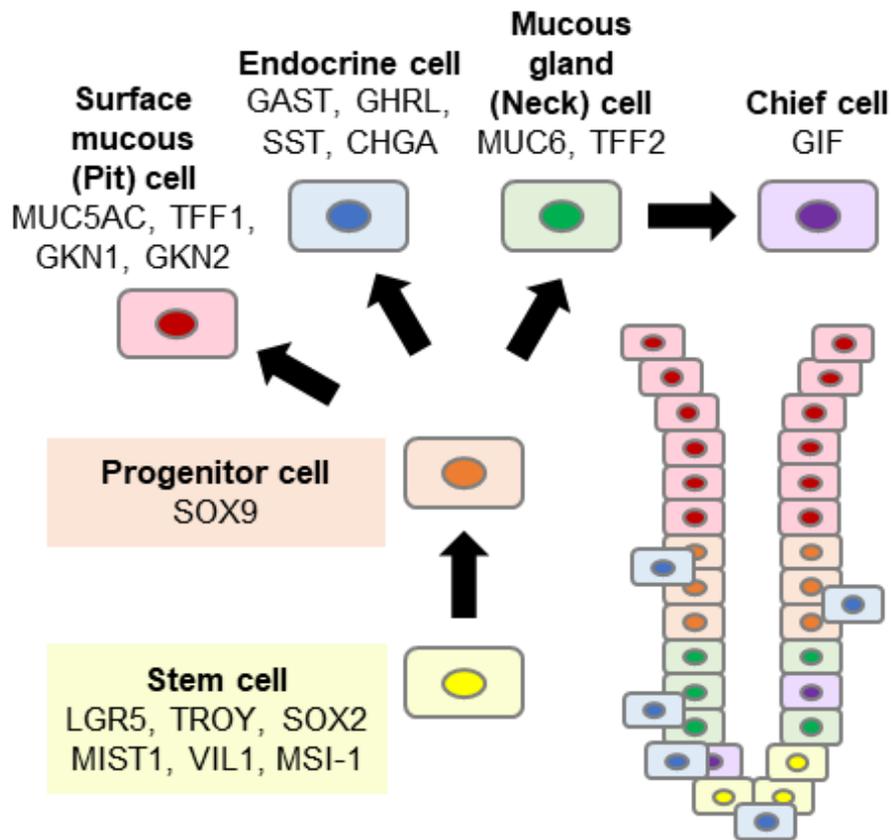


Figure 9. 胃の細胞系譜とマーカー分子

黄色が stem cell、橙色が Progenitor cell、赤色が Surface mucous (Pit) cell、青色は Endocrine cell、緑色が Mucous gland (Neck) cell、紫色が Chief cell で、各マーカータンパク質とともに示している。矢印は分化の方向を示している。右下の模式図は胃組織の中の細胞の構成である。

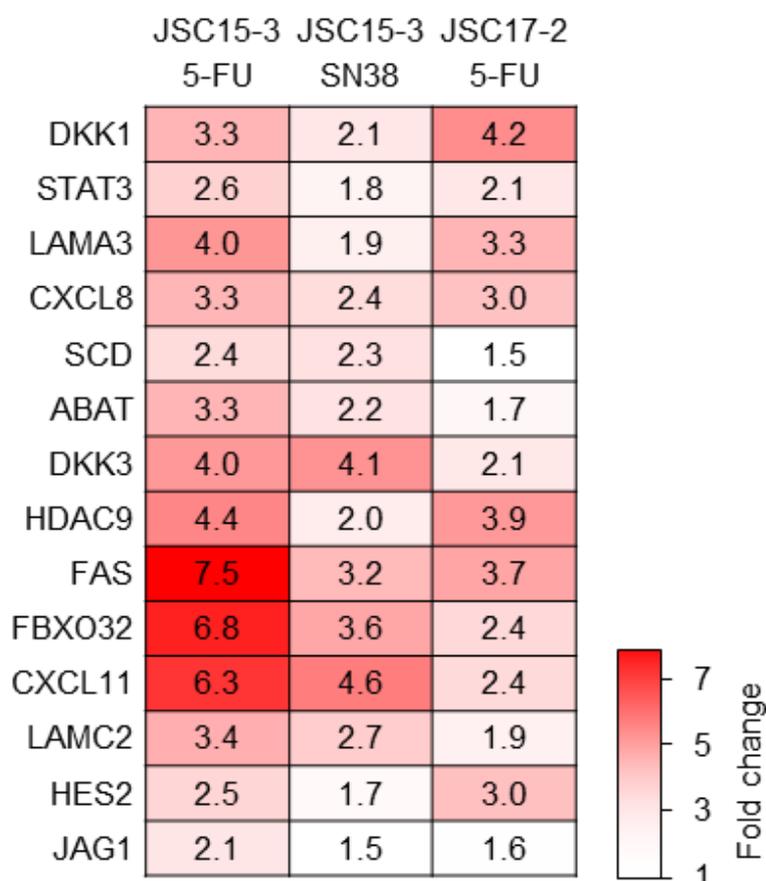


Figure 10. 抗がん剤処理後の残存分画における種々の遺伝子の発現亢進

JSC15-3 に 3 μ M の 5-FU および 30 nM の SN38 を 7 日間、JSC17-2 に 3 μ M の 5-FU を 6 日間処理した細胞について、GeneChip マイクロアレイ解析により網羅的遺伝子発現解析を行った。その中から JSC15-3 の 5-FU 処理後の細胞の遺伝子発現と未処理の遺伝子発現で fold change が 2 倍以上のもの、JSC15-3 の SN38 処理後の細胞の遺伝子発現と未処理の遺伝子発現で fold change が 1.5 倍以上のもの、JSC17-2 の 5-FU 処理後の細胞の遺伝子発現と未処理の遺伝子発現で fold change が 1.5 倍以上のものからシングルセル解析の候補因子として選別した。選別した遺伝子におけるそれぞれの fold change の実値を、左から JSC15-3 の 5-FU 処理、JSC15-3 の SN38 処理、JSC17-2 の 5-FU 処理の順に示す。

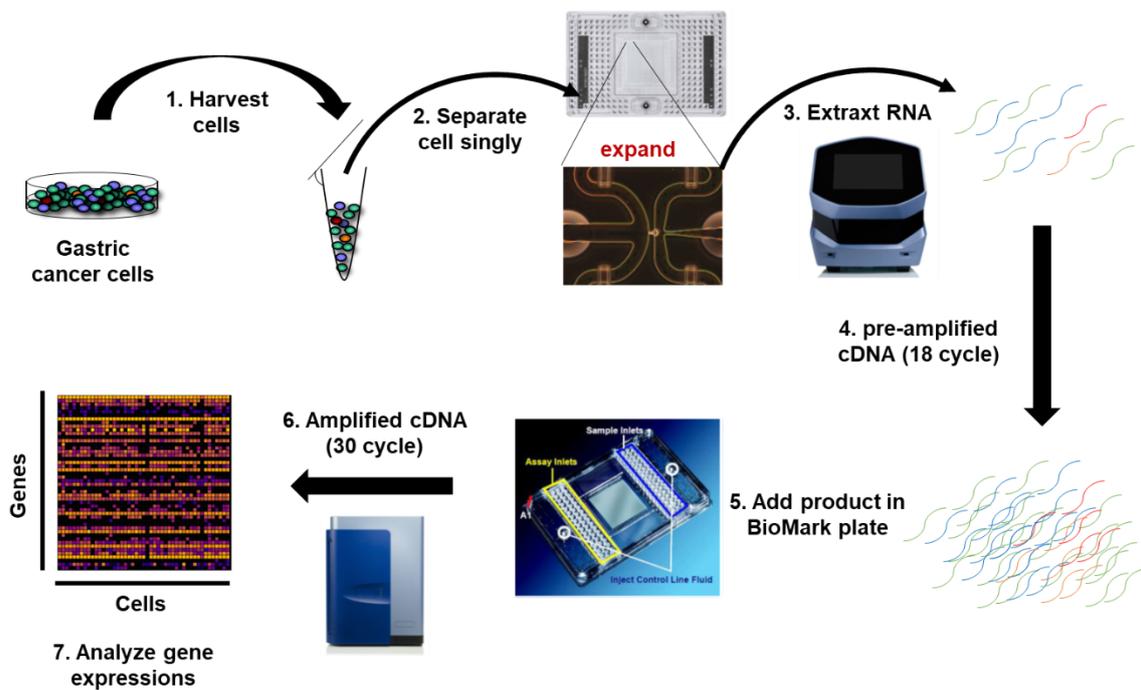


Figure 11. シングルセル解析の手順

シングルセル解析には JSC15-3 の DMSO 処理（ネガティブコントロール）と 5-FU を 7 日間処理の後 4 日間回復培養を行った細胞を用いた。細胞をシングル化する際、DMSO 処理は Medium (10-17 μm)、5-FU 処理は Large (17-25 μm) の C1 プレートを使用した。機器およびプレートの写真は、「シングルセル解析技術セミナー (Fluidigm)」、「C1 Quick-Start Guide (Fluidigm)」および「BioMarkHD システム簡易操作説明書 v4 -Real Time qPCR- (Fluidigm)」より引用した。

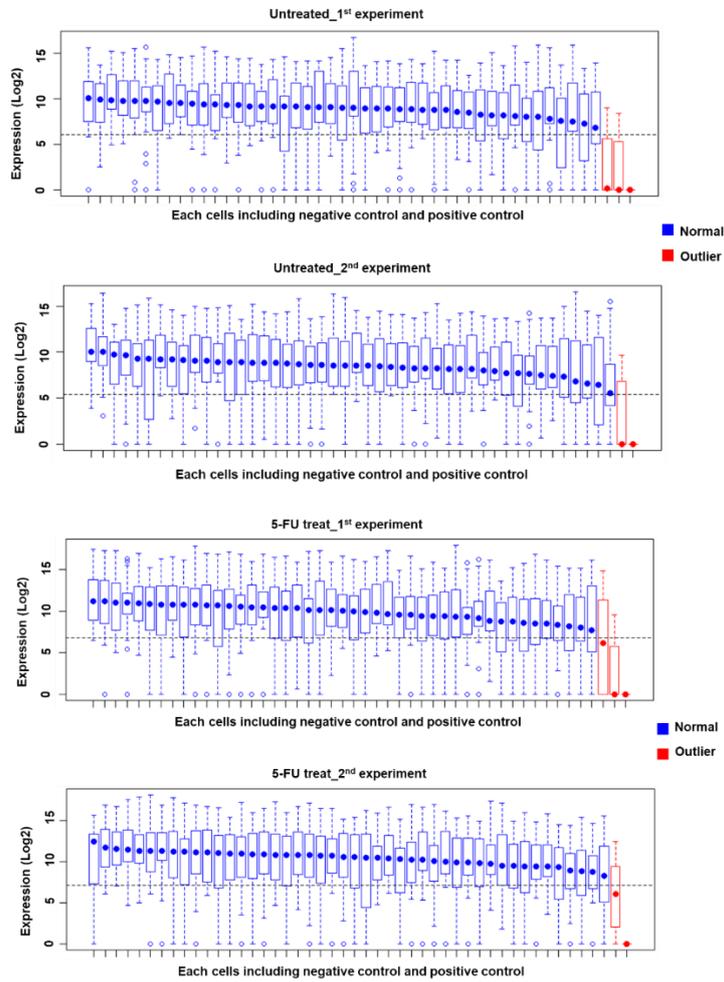


Figure 12. シングルセル解析に用いる細胞の選別

縦軸がシングルセル解析に用いた遺伝子の平均的な発現量、横軸が検討に用いた個々の細胞、ポジティブコントロール、ネガティブコントロールである。いずれの図においても右端に位置するドットのみが記載されているものがネガティブコントロールである。この中から遺伝子発現が著しく低い患者由来がん JSC15-3 細胞を外れの細胞として解析から除外した。上2つが薬剤未処理の細胞、下2つが 5-FU 処理の細胞の結果である。今回の検討では、系の都合上、1度の検討での上限が 48 細胞のため、解析する細胞を増やすことを目的に、それぞれ 2 度の検討を行い、それらを合わせて解析した。青色が解析に含めた細胞、赤色が解析から除外した細胞である。なお 4 つのグラフのいずれも最も右端に位置する発現の見られないプロットが、細胞がないネガティブコントロールである。

Gene name	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
SOX9	gtaccgcacttgacacaac	tctcgctctcggtcagaagtc
GAST	cagagccagtgcaaagatca	agagacctgagaggcaccag
TFF1	ccctgggtgcttctatcctaa	gatccctgcagaagtgctaaaa
TFF2	ggaagtgtgcttctccaac	ccagatgcatcctctggaac
MUC5AC	ctctgtgggacttcaacg	attccatgggtgtcagcttg
MUC6	aggcagcaacatcgaagg	tcctcggtgcgaagtactca
GKN1	tcgtgggattccaacataca	tcgtgtagcacgttctctgagt
GKN2	ggcagctttacttactccagca	tcagcaccaccagaaatgc
SST	accccagactccgtcagttt	acagcagctctgccaagaag
CHGA	caaaccgcagaccagagg	tccagctctgcttcaatgg
GHRL	cagctttgcacagtggatgt	tcttctgagaggggaagtgc
GIF	agaactctgagggcgaccttg	ggcagctttacttactccagca
LGR5	cccttcattcagtgcaagtgtt	attctgatcagccaccatc
TROY	ggagtgtgtgccttggga	gcgatcttcacgaggttga
MIST1	tgctggacatggtcaggat	cggacaagaagctctccaag
VIL1	ttgccacaattccctgagat	cttggatcatgggtgagtgagc
MSI-1	caccaatgggtaccactgaa	actcgtggctcctcagtcagc
SOX2	gcttagcctcgtcagatgaac	aacccaagatgcacaactc
CD24	ctgctggcactgctccta	gttggatttggggccaacc
CD44	caacaacacaaatggctggt	ctgaggtgtctgtctcttcatct
CD49f	tggcctctcatttggctat	aaaatactgtggggctccaat
CD54	ccttctcaccgtgtactgg	agcgtagggtaaggttcttgc
CD133	ggaaactaagaagtatgggagaaca	cgatgccactttctcactgat
CD166	cagttcctgccgtctgct	ctgaattacagtataccatccaagg
CXCR4	ctgagtgtcctcagtagcca	gagtcatagtcccctgagcc
ALDH1A1	ccaagacattgataaagccataa	cacgccatagcaattcacc
ALDH1A3	tctcgacaaagccctgaagt	ggcgtttagcagttgatcc
ABCG2	ttccacgatatggatttacgg	gtttcctgttgcataggatcc
DKK1	atgctgtcagctatgtgc	accaaagcttctcagtgatggtt
STAT3	gagcagagatgtgggaatgg	cggtctcaaaggtgatcagg
LAMA3	tgccatgtcctcacactaa	cacgttccccattcac
CXCL8	ccggaaggaacatctcact	agcactccttggaactc
SCD	cctacctgcaagtctacacctg	tggctccacagacgatga
ABAT	tctttcggaagctgagagaca	acctcgtccaccaagaagg
DKK3	cacatctgtgggagacgaag	cccacagtcctcgtcagat
HDAC9	gcacaagatgcaaggatgat	ttaacctggaccgcacctt
FAS	gtggaccgctcagtagc	ggacgataatctagcaacagacg
FBXO32	acgtgctcagcgaagacc	tgtctgacagaattaatcgtttgc
CXCL11	agtgtgaaggcatggcta	tctttgacatggggaagc
LAMC2	ctacttcggggaccattg	ggttacagttgcaagctcgac
HES2	cagcttaagggctcatcc	gaagcgcacggctatctc
JAG1	gggcaacacctcaacctc	gcctccacaagcaacgtatag
EPCAM	ccatgtgctggtgtgtgaa	tgtgttttagttcaatgatgatcca
ERBB2	ccctgacctgctggaag	ggccgacattcagagtcaat
EGFR	ttcctcccagtcctgaa	ggttcagaggtgattgtgat
ACTB	attggcaatgagcgggttc	tgaaggtagtttcgtggatgc
GAPDH	gaaggtgaaggtcggagtc	gaagatggtgatgggatttc

Table 1 シングルセル解析に使用したプライマーリスト

これらのプライマーはシングルセル解析に用いた。胃系譜関連因子、幹細胞関連因子、抗がん剤で遺伝子発現が亢進する因子、内部標準の因子、その他の因子が含まれている。

Lineage	Stem	Persister	Control
SOX9	LGR5	DKK1	EPCAM
GAST	TROY	STAT3	ERBB2
TFF1	MIST1	LAMA3	EGFR
TFF2	VIL1	CXCL8	ACTB
MUC5AC	MSI-1	SCD	GAPDH
MUC6	SOX2	ABAT	
GKN1	CD24	DKK3	
GKN2	CD44	HDAC9	
SST	CD49f	FAS	
CHGA	CD54	FBXO32	
GHRL	CD133	CXCL11	
GIF	CD166	LAMC2	
	CXCR4	HES2	
	ALDH1A1	JAG1	
	ALDH1A3		
	ABCG2		

Table 2 シングルセル解析に用いた遺伝子セット

これらの遺伝子をシングルセル解析に用いた。Table 1 と同様、胃系譜関連因子、幹細胞関連因子、抗がん剤で遺伝子発現が亢進する因子、内部標準の因子、その他の因子が含まれている。

1-4. シングルセル解析による患者由来胃がん細胞の不均一性の評価および抗がん剤処理による遺伝子発現の変動

【目的】

1-3 で定めた条件で、3 種 47 遺伝子（胃系譜関連因子、胃幹関連因子、薬剤残存分画で高発現している因子）について、5-FU 処理前後の細胞を用いてシングルセル解析を行い、胃がんの不均一性および薬剤残存時の遺伝子発現の変動を、個々の細胞レベルの結果を体系的にまとめて明らかにする。

【材料・方法】

細胞と培養条件

1-1 に示した方法に準じて行った。

細胞数の測定

1-1 に示した方法に準じて行った。

シングルセル解析

患者由来胃がん細胞 JSC15-3 を PBS に回収し、C1 プレート(Fluidigm)を用いて細胞のシングル化を行った。具体的には、C1 Single-Cell Auto Prep Reagent Kit (Fluidigm) and C1 Single-Cell Auto Prep IFC for Preamp (10-17 μm and 17-25 μm)を用いた。そこから顕微鏡で確認して流路内に 1 つの細胞だけが捕捉できているサンプルに関して各々 RNA を抽出し、逆転写により cDNA のプレ増幅を行った。この過程では an Ambion Single Cell-to-CT qRT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific)を使用し、プライマーとしては後の解析に使用する 47 種を混合したものを使用した。プレ増幅した cDNA をそれぞれ 48.48 Dynamic Array IFC EvaGreen

(Fluidigm)、GE 48.48 Dynamic Array DNA Binding Dye (Fluidigm)、SsoFast EvaGreen Supermix Low ROX (Bio-Rad)を用いて、各々Biomark の系により RT-qPCR を行った。得られたデータは Fluidigm Real-Time PCR Analysis software (Fluidigm)により解析を行った。また、プログラム言語の R を用いて、ヒートマップ、バイオリンプロット、主成分分析など、より詳細な解析を行った。検討を行った遺伝子 47 種については上述した。(Table 2)

【結果】

薬剤処理前後における不均一性の変動と薬剤抵抗性への寄与

シングルセル解析の結果、ヒートマップおよびバイオリンプロットから胃系譜関連遺伝子、胃幹関連遺伝子、薬剤残存分画で高発現している遺伝子は、抗がん剤未処理の段階で不均一性を有していることが明らかになった (Fig. 13, 14)。また、ヒートマップから 5-FU 処理前後でそれぞれ大きなクラスターに分離することが出来るが、未処理の細胞にも関わらず 5-FU 処理後のクラスターに属する細胞や 5-FU 処理後の細胞にも関わらず未処理のクラスターに属する細胞が存在することが明らかになった (Fig. 13)。この結果とバイオリンプロットの結果を合わせて見てみると、前者の 5-FU 処理前の細胞にも関わらず 5-FU 処理後のクラスターに属する細胞について、大部分の 5-FU 処理前の細胞と比較すると、LGR5, TROY, ALDH1A3, DKK1, CXCL8, LAMA3, LAMC2 などシングルセル解析に用いた 47 種の遺伝子の中で、一部の遺伝子の発現が亢進していた (Fig. 14)。ヒートマップの結果より、5-FU 処理後の大きなクラスターの方が未処理の大きなクラスターよりも同遺伝子の発現が亢進していることから、5-FU 処理前の細胞にも関わらず 5-FU 処理後のクラスターに属する細胞は 5-FU 処理後の大きなクラスターに属する細胞、つまり、5-FU 処理後の大部分の細胞と類似した遺伝子形質を 5-FU 処理前から有していたということになる。これを支持する結果として、上に記した 4 つのクラスターについて主成分分析を行った所、確かに未処理の細胞にも関わらず 5-FU 処理後のクラスターに属する細胞は 5-FU 処理後の大きなクラスター

一に近い位置に分類された (Fig. 14)。このことは JSC15-3 細胞自体に薬剤抵抗性を示す細胞分画が存在しており、その細胞が残存して抵抗性の形質を示している可能性が示唆された。一方で、先に述べた通り、5-FU 処理後の大きなクラスターの方が未処理の大きなクラスターよりも種々の遺伝子発現が亢進していたことから、遺伝子の発現誘導による適応応答が抵抗性に寄与していることも示唆された。すなわち、元来存在していた薬剤抵抗性を示す細胞分画の残存と遺伝子発現誘導による適応応答の双方が薬剤抵抗性に寄与している可能性が考えられる。

患者由来胃癌細胞における系譜遺伝子群を指標とした細胞不均一性

胃系譜関連因子のみをピックアップしてシングルセル解析を実施した結果、ヒートマップから JSC15-3 に関して、未処理の細胞を TROY(+)/TFF1(+), TROY(+)/TFF1(-), TROY(-)/TFF1(+), TROY(-)/TFF1(-)の分画に大別できることが明らかになった (Fig. 13)。これを裏付ける結果として、未処理の細胞に関して主成分分析をしても、4つのクラスターに目視でも分けることが出来た (Fig. 15)。本来 TROY は幹細胞のマーカー、TFF1 は分化細胞のマーカーとして知られているが、本検討により、これら双方が発現する単純な系譜では分類しきれない複雑な細胞が、がんにおいて存在していることが明らかになった。

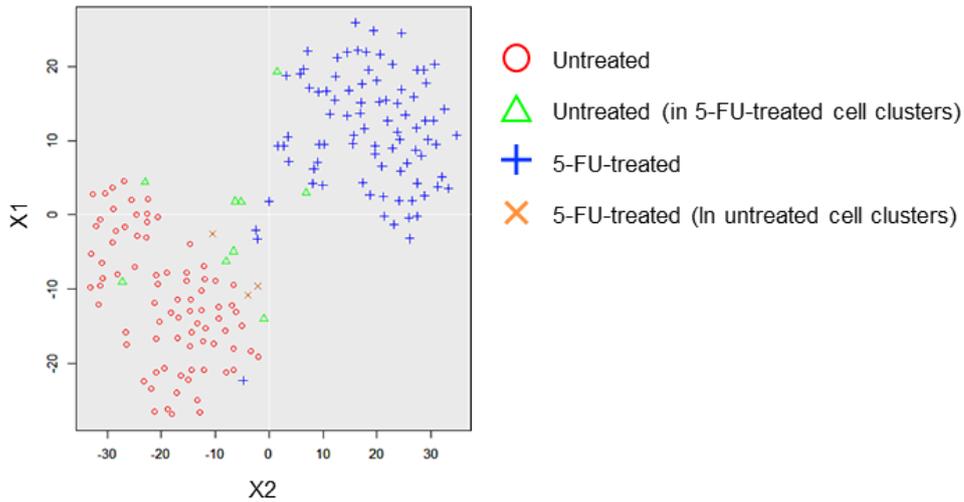
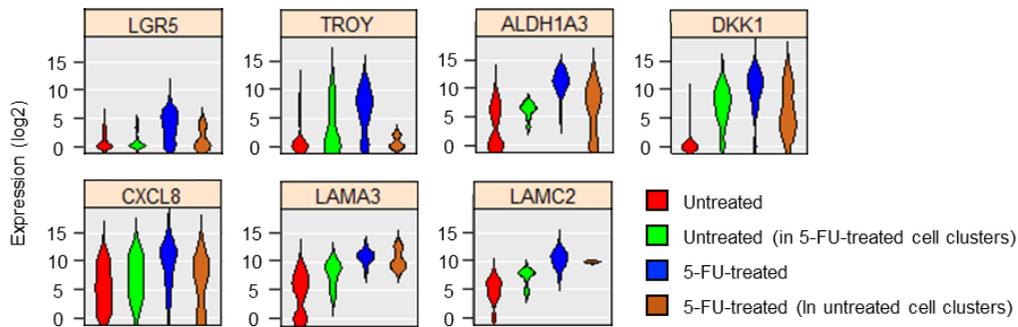
A**B**

Figure 14. シングルセル解析から得られた主成分分析プロットおよびバイオリンプロット

(A) シングルセル解析における主成分分析の結果を示している。この解析では tSNE 解析を用いた。赤色の丸が未処理の細胞、緑色の三角が未処理の細胞であるが大部分の 5-FU 処理の細胞によって形成されるクラスターに属する細胞、青色の十字が 5-FU 処理の細胞、小麦色のバツ印が 5-FU 処理の細胞であるが大部分の未処理の細胞によって形成されるクラスターに属する細胞である。(B) シングルセル解析におけるバイオリンプロットの結果を示している。各色は (A) と同様のものを表している。

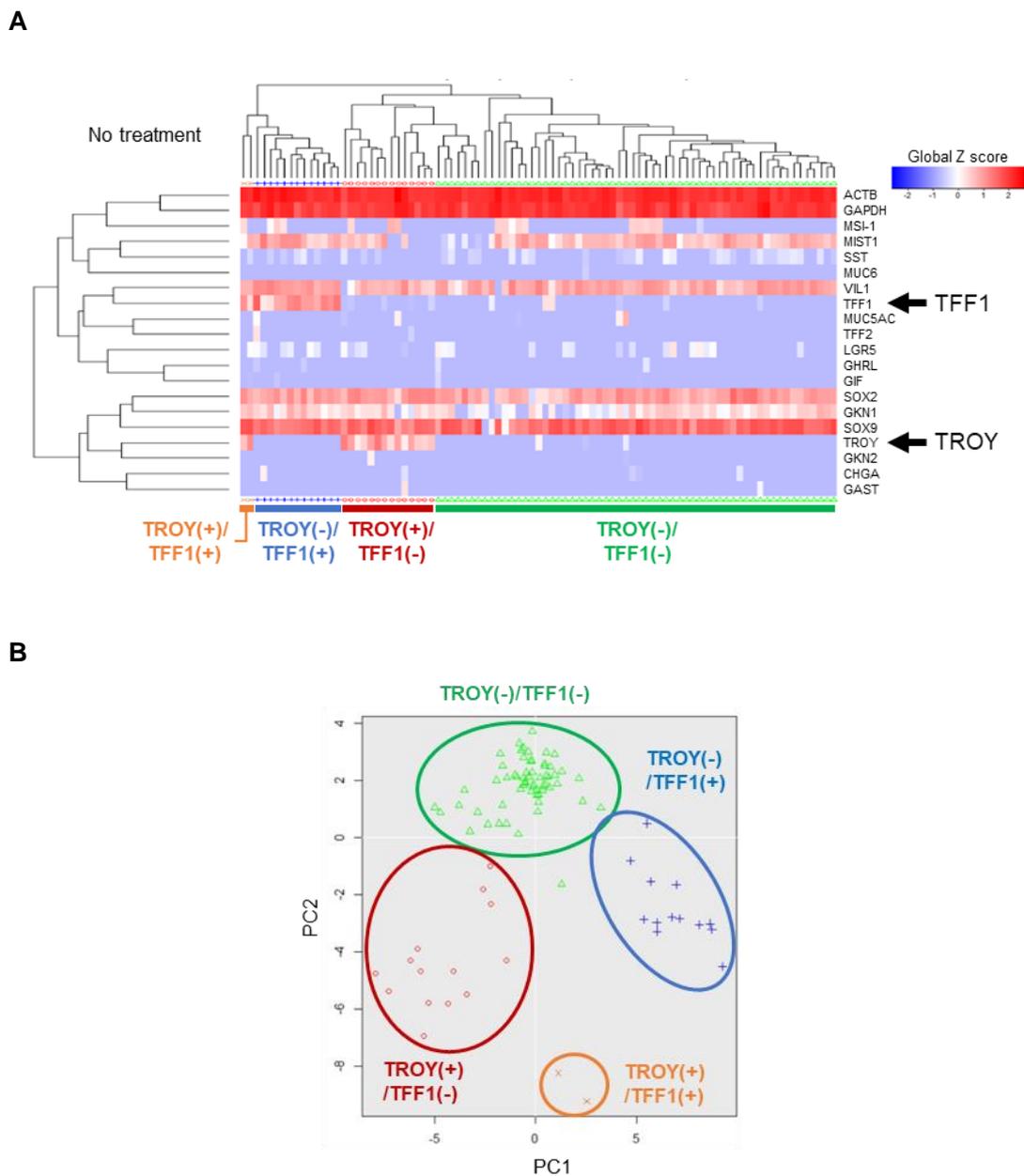


Figure 15. シングルセル解析による系譜関連因子のヒートマップ、主成分分析

シングルセル解析の結果について胃の細胞系譜に関連する因子のみで未処理の細胞について再解析を行った (A) ヒートマップおよび (B) 主成分分析の結果を示す。黄色が TROY(+)/TFF1(+)^{*}の細胞群、青色が TROY(-)/TFF1(+)^{*}の細胞群、赤色が TROY(+)/TFF1(-)^{*}の細胞群、緑色が TROY(-)/TFF1(-)^{*}の細胞群である。

<考察>

患者由来胃癌細胞 JSC15-3 に対して細胞傷害性抗がん剤 5-FU および SN38 を処理した際の薬剤残存分画は、これらの抗がん剤に対して交差抵抗性を示した。このことから、細胞傷害性抗がん剤処理後の残存分画における薬剤抵抗性は、複数の同抗がん剤共通であることが示唆された。また、この薬剤抵抗性は細胞増殖の遅延により生じている可能性が示された。このことは、不均一ながん細胞集団に存在している元々増殖の遅い細胞が生き残った可能性を示唆している。しかし、初めから増殖の遅い細胞は、周囲の増殖の速い細胞に淘汰されると推察される。したがって、抗がん剤処理により、細胞に選択圧がかかり、通常の細胞周期から逸脱して適応応答した細胞が生じた可能性が示唆される。さらに、CD44v を基軸にした検討から、患者由来胃癌細胞における薬剤抵抗性は、薬剤抵抗性を示す細胞分画の残存と遺伝子発現誘導による適応応答の双方から生じていることが明らかになった。これまでのがん幹細胞の知見から考えると、生存に有利な特徴を有するがん幹細胞が抗がん剤により残存するという見方が有効であった。実際に本検討でも蛍光色素を導入した CD44v(+)細胞と未処理の CD44v(-)細胞を 1 : 1 で混合して、5-FU および SN38 を処理すると、蛍光色素の陽性率が 50%を大きく上回ることから、元来存在する CD44v(+)細胞が抗がん剤によって残存していることは事実であると考えられる。しかしながら、CD44v(-)細胞に 5-FU および SN38 を処理した際に DMSO を処理したコントロールの細胞と比較して CD44v の陽性率が上昇することから、残存だけではなく抗がん剤による発現誘導も薬剤抵抗性に寄与している可能性が示唆された。

そして CD44 も含めた胃系譜関連因子、胃幹細胞関連因子、抗がん剤により発現が亢進する因子について、患者由来胃癌細胞 JSC15-3 を用いた細胞傷害性抗がん剤 5-FU 処理前後のシングルセル解析により、抗がん剤処理前の段階で、既に種々の遺伝子発現に細胞ごとの不均一性が存在していることが明らかになった。また、抗がん剤処理によって、LGR5, TROY, ALDH1A3, DKK1, CXCL8, LAMA3, LAMC2 などの遺伝子発現は亢進するが、細胞全体の遺

伝子の発現が単純に亢進するのではなく、遺伝子によっては発現の不均一性も変動することが明らかになった。なお CD44 の遺伝子発現に関しては、抗がん剤処理により確かに亢進しており修士課程における検討の再現性を得る形になった。しかし興味深いことに、発現の不均一性は変化しなかった。近年の研究で、マウスモデルでのシングルセル解析による検討において、大腸がん幹細胞は均一な細胞集団ではなく、遺伝子発現の特徴によって複数の分画に大別できることが報告されている[91]。本研究においても、マイクロアレイ解析の結果では、上述の遺伝子の発現が 5-FU 処理により一律に亢進していたが、シングルセル解析を行うことで、細胞ごとに発現の不均一性があり、抗がん剤添加によりその不均一性が遺伝子によっては変動することが明らかとなった。また、未処理の細胞にも関わらず 5-FU 処理後と類似した遺伝子発現を示す小亜集団や、5-FU 処理後にも関わらず未処理の細胞と類似した遺伝子発現を示す小亜集団が存在することが明らかになった。これらのことから、抗がん剤処理前後の細胞にもそれぞれ不均一性が存在していることが明らかになった。この不均一性がもたらす一部の細胞の残存が薬剤抵抗性を生み出している一因であることが示唆される。一方で、シングルセル解析のバイオリンプロットより、元々細胞ごとに不均一に発現していた遺伝子の一部が、5-FU により発現亢進する際に、5-FU 処理前に遺伝子発現が高い分画の発現レベルを超えて、発現が亢進することが明らかになった。このことから、単なる残存だけでなく発現誘導も抗がん剤抵抗性に寄与していると推察される。これらの結果から、CD44v の陽性率の上昇と同様に、抗がん剤抵抗性についても、残存と発現誘導の双方が寄与している可能性が示唆された。

加えて、シングルセル解析におけるヒートマップをについて、幹細胞関連遺伝子の発現に注目して観察した場合でも、細胞ごとに不均一に発現していた。前述したとおり、がん幹細胞のマーカーは胃がんにおいて様々な因子が知られているが、それらの遺伝子は必ずしも細胞共通に発現している訳ではないことが示唆された。故に、がん幹細胞は 1 つや 2 つのマーカーで断定的に規定できるものではなく、より複雑なものであることが推察された。

本研究のシングルセル解析では、47 遺伝子を選別しており、また細胞も抗がん剤処理前後でそれぞれ 89 個でのみ解析している。故に、限られた遺伝子の発現を見ることしかできず、細胞中に 1%未満の分画が存在するときに解析結果に現出しない可能性がある。しかしながら、本研究における限定された範囲での解析でさえ、抗がん剤処理前後の細胞で選別した遺伝子発現の不均一性が著しく変動することや、抗がん剤処理の大部分のクラスターに分類される抗がん剤未処理の細胞群が存在することなどが明らかになった。したがって、解析する遺伝子や細胞数を増やすことで、遺伝子発現の不均一性や抗がん剤処理前後の細胞クラスターに関して、新たな知見が得られる可能性があり、非常に興味深い。

第2章

抗がん剤処理後の残存細胞における ALDH1A3 の発現亢進と細胞増殖維持への寄与

<要約>

第1章の結果より、患者由来胃がん細胞に対し、5-FU を処理することによって、1細胞レベルで様々な遺伝子の発現の不均一性や発現量が変動することが明らかになった。本章では、これらの遺伝子の中から、がん細胞あるいは persister 細胞の生存増殖に機能的に関与する因子を同定するために siRNA を用いた遺伝子抑制実験を行った。その結果として ALDH1A3 を同定した。ALDH1A3 は、他の aldehyde dehydrogenase (ALDH) ファミリーと比較しても、複数の患者由来胃がん細胞で共通して、5-FU および SN38 処理により発現が最も著しく亢進する遺伝子であった。加えて免疫蛍光染色により、患者由来胃がん細胞に 5-FU 処理をした際、タンパク質レベルでも ALDH1A3 の発現亢進が観察された。特に JSC15-3 に関しては発現の不均一性の変化も見られ、第1章のシングルセル解析の結果と一致していることが確認された。5-FU 処理による ALDH1A3 遺伝子の発現は、免疫不全マウスに移植して形成された JSC15-3 ゼノグラフト腫瘍における 5-FU 処理後の残存分画でも同様に亢進する傾向が観察された。組織マイクロアレイにより、患者腫瘍において Stage 3 以上の検体は ALDH1A3 の発現が高い傾向が見られ、TCGA データベースの解析より、胃がんにおいて ALDH1A3 の発現が亢進している方が予後不良であることが明らかとなった。以上の結果より、ALDH1A3 は、患者由来胃がん細胞に薬剤を処理した際の残存分画で高発現しており、がんの生存増殖および悪性度に関与していることが示唆された。

2-1. 抗がん剤処理後の残存細胞に発現亢進を示す因子群の細胞増殖への寄与

【目的】

前章で行ったシングル細胞解析の結果から、患者由来胃がん JSC15-3 細胞において、胃系譜関連遺伝子、胃幹細胞関連遺伝子、抗がん剤により発現が亢進する遺伝子の一部が不均一に発現しており、細胞傷害性抗がん剤 5-FU 処理によってその発現が亢進し、かつ、不均一性が変化することが明らかになった。これらの遺伝子の中から薬剤残存へのマーカーとして有望な因子および機能的な寄与が大きい因子を同定するために、一過的に遺伝子発現を抑制した際にコロニー形成能の評価および RT-qPCR による解析を行う。

【材料・方法】

細胞と培養条件

1-3 に示した方法に準じて行った。

細胞数の測定

1-1 に示した方法に準じて行った。

siRNA を用いたノックダウン

ディッシュ上の細胞をトリプシン処理により回収し、 $210 \times g$, 3 min, 4°C で遠心、上清吸引後、硫酸カナマイシン未添加のメディウムを添加し、 2.5×10^5 cells/2.5 mL になるように細胞懸濁液を調製した。その後、別のチューブに OptiMEM (gibco) を 0.45 mL/well、silencer select siRNA (Thermo Fisher) を 0.41 μL /well、Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) を 2.3 μL /well、順に添加し、常温で 10 分インキュベートした。その後細胞懸濁液 2.5 mL/well と混合し、6 ウェルのコラーゲンコートディッシュに 3 mL/well ずつ添加した。

抗がん剤処理後の残存細胞数の評価 (MTS Assay)

1-1 に示した方法に準じて行った。

コロニー増殖能の評価

細胞をコラーゲンコートed プレートに播種し、その翌日に DMSO および 5-FU を添加して 14 日間培養した。その後細胞を 10% のホルムアルデヒド (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) で固定し、0.5% のクリスタルバイオレット (Nacalai) で染色した。染色したプレートを純水で洗った後に乾燥させ、コロニー数および面積を ImageJ により定量した。

包括的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ)

1-3 に示した方法に準じて行った。

Reverse Transcription (RT)-qPCR

1-3 に示した方法に準じて行った。なお用いたプライマーを以下に表でまとめる (Table 3)。プライマーの設計は Roche の Universal ProbeLibrary Assay Design Center から行った。

【結果】

抗がん剤処理後の細胞残存に寄与する ALDH1A3 の同定

前章においてシングルセル解析により、患者由来胃がん JSC15-3 細胞に対して細胞傷害性抗がん剤を処理した際に、一部の胃系譜関連遺伝子、胃幹細胞関連遺伝子、抗がん剤により発現が亢進する遺伝子の発現における不均一性の変化および発現亢進が見出された。これらの遺伝子の抗がん剤残存に対する機能的な役割の有無を検討するために、上述の 5-FU 処理により発現が亢進し、さらに発現の不均一性が大きく変化する因子について、siRNA を

用いたノックダウン実験を行った。siRNAを導入したJSC15-3に関して、MTS AssayおよびClonogenic Assayにより細胞増殖能およびコロニー増殖能の評価を5-FU処理前後で検討した。結果、細胞増殖抑制に大きな差は見られなかったが、ALDH1A3をノックダウンした際にコロニー増殖の抑制が見られ、さらに5-FUを処理すると、より強くコロニー増殖を抑制することが明らかになった (Fig. 16)。この結果から、胃癌細胞におけるALDH1A3のコロニー増殖能への寄与が示唆された。なお、コロニー増殖能の検討は5-FU 1 μ Mで行った。予備検討にて、シングルセル解析と同様の5-FU濃度3 μ Mで検討を行った際に、ネガティブコントロールのsiRNAを導入した細胞で65~80%のコロニー増殖能の抑制が見られた。したがって、この状態から種々の遺伝子を抑制すると、死滅する細胞の量が多くなり、評価が困難になると考えたため、5-FU 1 μ Mでコロニー増殖能の評価を行った。

ALDHファミリーにおけるALDH1A3の薬剤残存における発現亢進の優位性

ALDH1A3は19種類存在するアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) ファミリーの1つである。そこでALDH1A3を含めた全19種のALDHファミリーの発現が抗がん剤処理によりどのように変動するかの検討を行った。具体的には、ALDH1A3ファミリー全19種類について、先に述べたマイクロアレイの結果からJSC15-3、JSC17-2、JSC17-7の5-FU処理前後の細胞の発現を確認した。その結果、いずれの細胞に関しても、ALDH1A3の発現亢進の度合いが他の18種類の遺伝子と比較して著しく高いことが明らかとなった (Fig. 17)。そして、このことを確認するためにALDHファミリーのプライマーを用いてRT-qPCRで発現量を定量したところ、4種類の遺伝子はそもそも発現量が低く評価できなかったが、残る15種類の遺伝子については確かにALDH1A3が5-FU処理後の細胞で最も発現亢進していることが確認された (Fig. 17)。

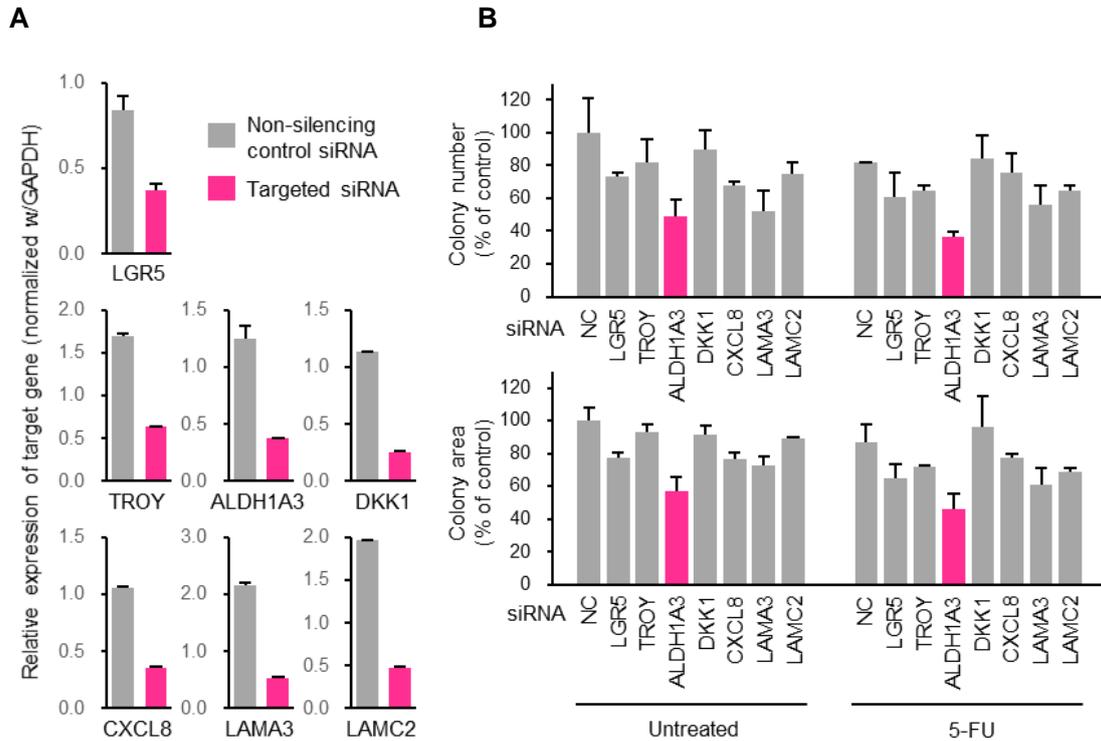


Figure 16. 種々の遺伝子のノックダウン効率および細胞増殖、抗がん剤感受性への影響

(A) JSC15-3 に対し、種々の遺伝子の siRNA によるノックダウン時の遺伝子発現の抑制効率について RT-qPCR で検討したものである。内部標準には GAPDH を用い、SYBR Green の系により検討した。siRNA の処理日数は 2 日間である。(B) siRNA を導入後の JSC15-3 細胞を 12 ウェルプレートに 2,000 細胞ずつ添加し、その翌日に DMSO および 5-FU を添加し、14 日後にクリスタルバイオレットによりコロニーを染色し、ImageJ により解析を行った結果を示している。上にコロニー数、下にコロニーの面積での評価結果を示している。

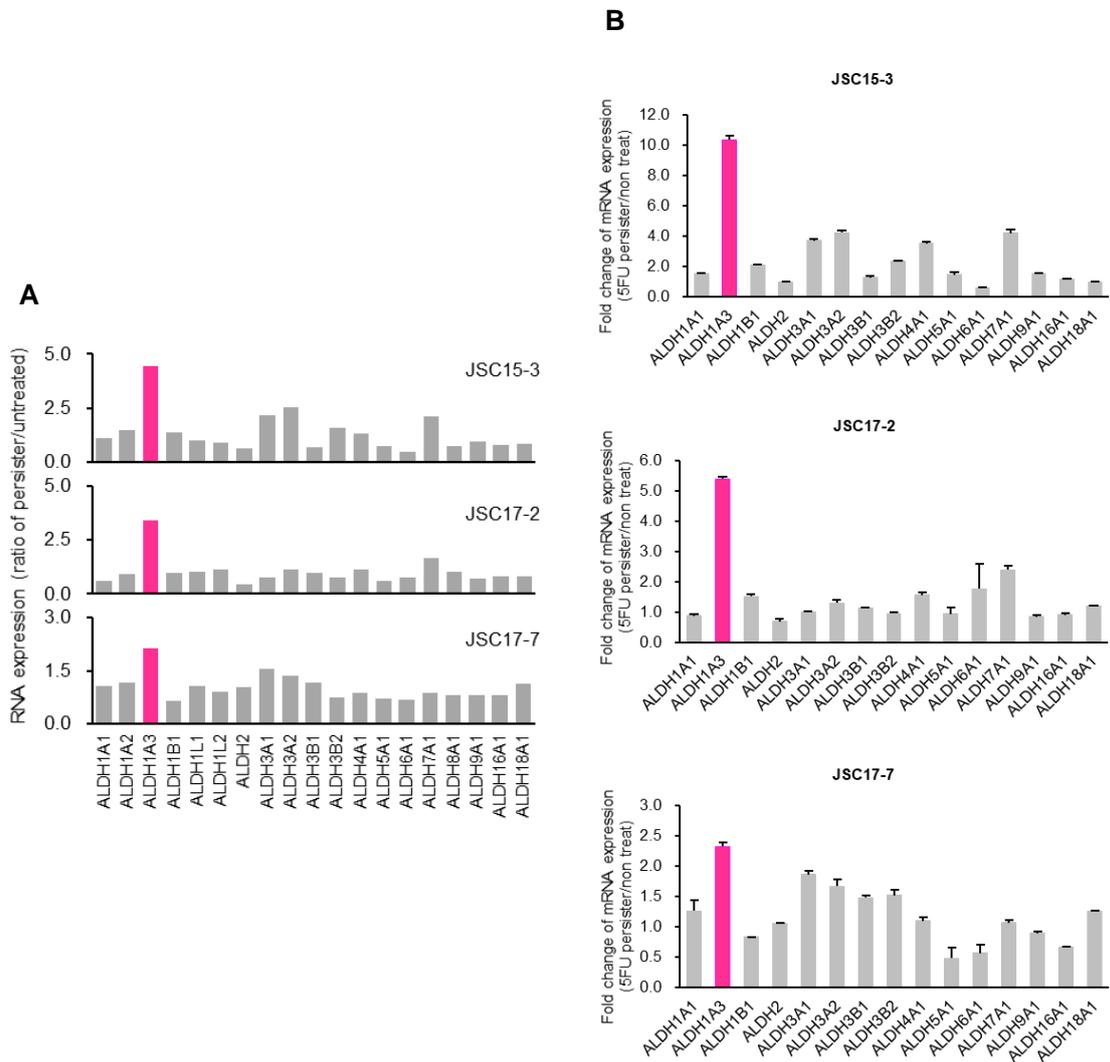


Figure 17. 患者由来胃癌細胞における 5-FU による ALDH ファミリー遺伝子の発現変動

(A) JSC15-3, JSC17-2, JSC17-7 の 5-FU 処理前後の細胞に対する GeneChip マイクロアレイを用いた包括的遺伝子発現解析の数値データより算出した ALDH ファミリーの遺伝子発現変動を示している。縦軸の値は 5-FU 処理後の細胞の ALDH ファミリーの発現量を未処理の細胞の ALDH ファミリーの発現量で除した数値を示している。(B) A を RT-qPCR で検証した結果である。19 種類の ALDH ファミリーのうち ALDH1A2、ALDH1L1、ALDH1L2、ALDH8A1 の 4 種類に関しては発現量が著しく低く、検出できなかったため、結果から除外した。

Gene name	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
ALDH1A1	ccaaagacattgataaagccataa	cacgccatagcaattcacc
ALDH1A2	agggcgatcatcaaacctt	tccaatgggttcatgtcttg
ALDH1A3	tctcgacaaagccctgaagt	ggcgtttagcagttgatcc
ALDH1B1	acccaagcgtgatccctga	cctgccctggaggctaag
ALDH1L1	gccggctgatgtacaggt	atccaggcctcaatggt
ALDH1L2	ctggctttgaaaagacttagg	cctgatgatgggtgtgctcta
ALDH2	cgaggctcttctgcaaccag	tctccagtggacggattga
ALDH3A1	ctggaactacccttcaacct	ggcttgaggaccactgagtt
ALDH3A2	tgcacttcacgctcaactct	ttccgtgataagctcccatc
ALDH3B1	aacgacggcttcatgcac	ggtgtcgaaggagaacttgc
ALDH3B2	gttcatcaaccggcagga	tccagcatctggttcacaac
ALDH4A1	gacaagtccactggctcgat	ggcttgtcattggttccag
ALDH5A1	caacgtggaccaggctgta	tgaccaagaattggtttga
ALDH6A1	gcccctgatggaacattaaa	tccggatgatcgaaaataa
ALDH7A1	cactcagggtggaaaacagg	gctgaggctgcatcttcaa
ALDH8A1	gaaccagggtggcggattt	tgccagtgctaaggtttcc
ALDH9A1	ctccagcattagcctgtggt	agccagttagcaatgcagaaac
ALDH16A1	tgctccactaccatgcaatc	caggatgaggccaattactcc
ALDH18A1	tctcgtcctgactgtctaccc	taacaagcattgcccacttg

Table 3 全 19 種の ALDH1A3 ファミリー遺伝子群の mRNA 発現定量解析に用いたプライマーリスト

ALDH ファミリー全 19 種のプライマーを示す。全てのプライマーは Roche の Universal ProbeLibrary Assay Design Center より設計した。

2-2. 患者由来胃癌細胞における 5-FU 処理後の ALDH1A3 の発現亢進および不均一性の変動

【目的】

第 1 章のシングルセル解析および 2-1 の結果から、患者由来胃癌 JSC15-3 細胞において 5-FU 処理後の残存分画で ALDH1A3 の不均一性が変動し、かつ、発現が顕著に亢進することが示唆された。これらの結果が複数の患者由来胃癌細胞あるいは、複数の細胞傷害性抗がん剤で共通の現象であるか、またタンパク質レベルでも見られるかを検討するために RT-qPCR および免疫蛍光染色を行う。

【材料・方法】

細胞と培養条件

1-3 に示した方法に準じて行った。

細胞数の測定

1-1 に示した方法に準じて行った。

Reverse Transcription (RT)-qPCR

1-3 に示した方法に準じて行った。用いたプライマーは Table 2 で示した ALDH1A3 と同様のものである。

免疫蛍光染色

コラーゲンコート 6 ウェルプレートにカバースリップを落とし込み、その上に回収した細胞を培地と懸濁して添加し、培養を行った。翌日に 5-FU を添加し、JSC15-3 は 6 日後

に、JSC17-2 および JSC17-7 は 4 日後に細胞を固定した。具体的には、培地を吸引し PBS で 1 回洗浄した後、PBS で希釈した 2% のパラホルムアルデヒド (Wako) を添加し 10 分間常温で反応させた。その後、PBS で 2 分×3 回洗浄し、PBS で希釈した 0.5% の NP-40 (Nacalai) を添加し 10 分間常温で反応させた。その後、PBS で 2 分×3 回洗浄し、0.02% のアジ化ナトリウムが入った PBS を添加し、4°C で保存した。カバースリップを取り出し、1% BSA/PBS(-) を 100 μL 添加し、15 分常温で反応させた。その後 PBS で 2 分洗浄し、1% BSA/PBS(-) で 500 倍希釈したマウス抗ヒト ALDH1A3 抗体 (GT926: Gentex) を 100 μL 添加し、4°C で一晩反応させた。その後 PBS で 2 分×5 回洗浄し、1% BSA/PBS(-) で 500 倍希釈した抗マウス 2 次抗体 (A11029) を 100 μL 添加し、30 分暗室で反応させた。反応後 PBS で 2 分×5 回洗浄し、VECTASHIELD (Vector) とともにスライドガラス上にマニキュアで封入、乾燥後、顕微鏡にて観察を行った。

【結果】

複数の患者由来胃がん細胞での細胞傷害性抗がん剤による ALDH1A3 の発現亢進

複数の患者由来胃がん細胞において、ALDH1A3 の発現亢進が他の細胞傷害性抗がん剤でも見られるかどうかを検討するため、JSC15-3, JSC17-2, JSC17-7 に関して、5-FU に加えて SN38 処理後の ALDH1A3 の発現を RT-qPCR により定量した。その結果、いずれの細胞においても SN38 処理後にも ALDH1A3 の発現が亢進していることが確認された (Fig. 18)。これらのことから複数の細胞傷害性抗がん剤で共通に ALDH1A3 の発現が亢進することが明らかになった。

抗がん剤処理後の ALDH1A3 のタンパク質レベルの発現亢進および不均一性の変化

患者由来胃がん細胞への細胞傷害性抗がん剤処理による ALDH1A3 の発現亢進がタンパク質レベルでも観察されるかどうかの検討を行うために、5-FU 処理前後の JSC15-3 に関し

て ALDH1A3 について免疫蛍光染色を行った。結果、濃度依存的に ALDH1A3 の発現が亢進することが明らかになった (Fig. 19)。ここで特筆すべきは、ALDH1A3 の発現が単純に亢進するだけではなく、発現の不均一性が変化したことである。すなわち、薬剤未処理の細胞では ALDH1A3 は細胞ごとに不均一に発現していたが、5-FU の濃度依存的に発現の不均一性が緩和され、かつ、亢進していることが明らかになった (Fig. 19)。この結果はシングルセル解析のバイオリンプロットの結果と類似しており、遺伝子レベルで得られた結果と同様の傾向がタンパク質レベルでも観察された。他の患者由来胃癌細胞 JSC17-2、JSC17-7 に関しても、JSC15-3 と同様に 5-FU を処理することで ALDH1A3 の発現が亢進した (Fig. 20)。これらのことから、複数の患者由来胃癌細胞で 5-FU 処理後の ALDH1A3 の発現がタンパク質レベルでも亢進することが明らかになった。

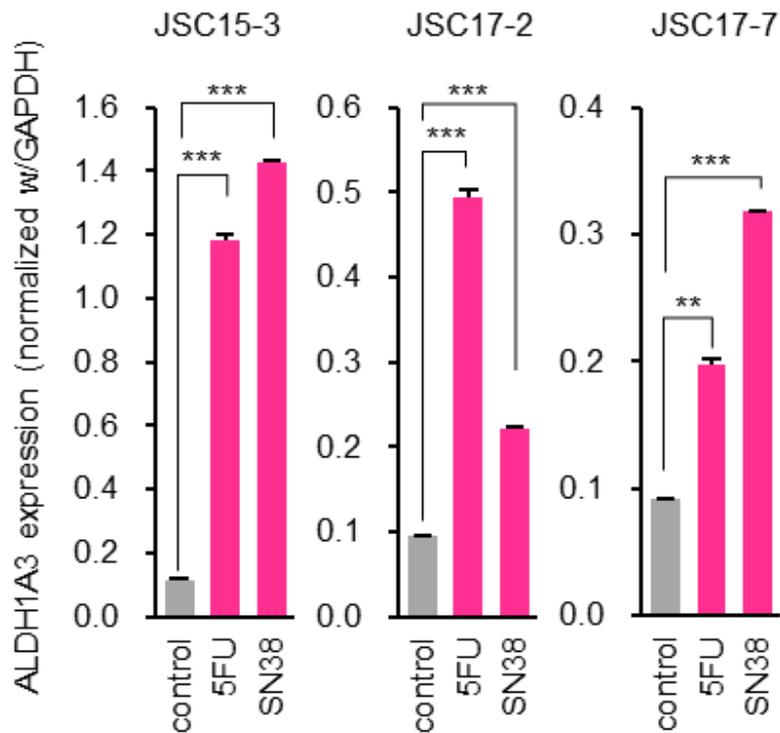


Figure 18. 患者由来胃がん細胞に細胞傷害性抗がん剤を処理した後の残存細胞における
ALDH1A3の発現亢進

JSC15-3に10 μ Mの5-FUおよび100 nMのSN38をそれぞれ7日間、JSC17-2に3 μ Mの5-FUおよび10 nMのSN38をそれぞれ6日間、JSC17-7に0.3 μ Mの5-FUおよび10 nMのSN38をそれぞれ6日間処理した後、それらのALDH1A3の発現変動をRT-qPCRにより評価を行った。内部標準としてGAPDHを用いた。図中のアステリスク(*)は有意差(P値)を表している。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

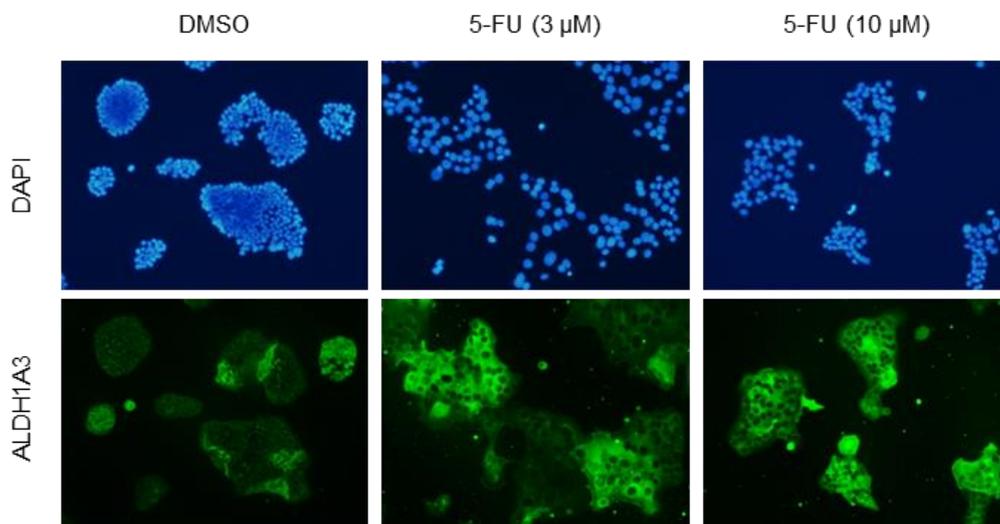


Figure 19. JSC15-3 における 5-FU 処理後の ALDH1A3 の発現亢進および不均一性の瓦解
 JSC15-3 に対して 5-FU を 3 μ M および 10 μ M 処理し、6 日間後に免疫蛍光染色を行った。
 青色が核、緑色が ALDH1A3 を示している。

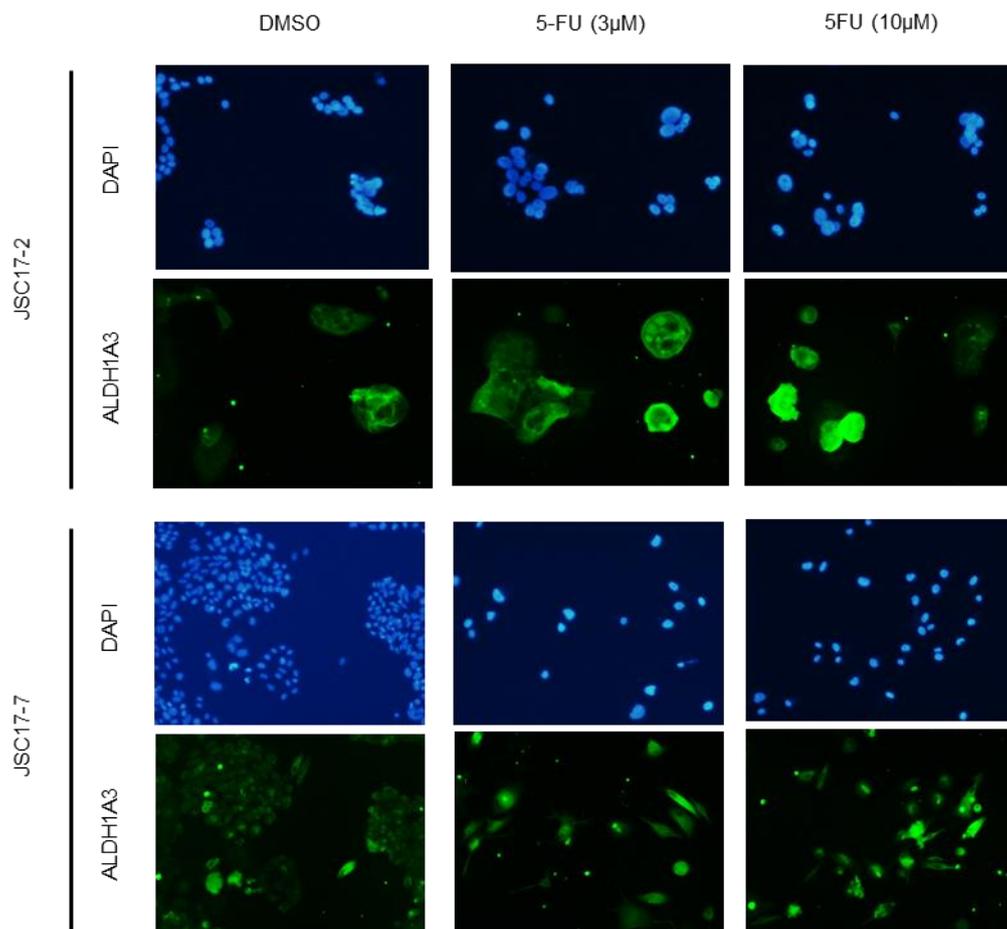


Figure 20. JSC17-2 および JSC17-7 における 5-FU 処理後の ALDH1A3 の発現亢進

JSC17-2 および JSC17-7 に対して 5-FU を 3 μ M および 10 μ M 処理し、4 日間後に免疫蛍光染色を行った。青色が核、緑色が ALDH1A3 を示している。

2-3. 患者由来胃がん細胞における 5-FU 処理後の ALDH1A3 の発現亢進 (in vivo) および腫瘍における悪性度との相関

【目的】

前項より、患者由来胃がん細胞において、5-FU 処理後の残存細胞において ALDH1A3 の発現亢進が認められることが明らかになった。こうした結果が腫瘍組織でも見られるのかを検討するために、RT-qPCR および組織マイクロアレイの免疫組織染色により検討を行う。

【材料・方法】

細胞と培養条件

1-1 に示した方法に準じて行った。

細胞数の測定

1-1 に示した方法に準じて行った。

In vivo での腫瘍形成能の検討および薬剤投与

細胞を $210 \times g, 3 \text{ min}$ で遠心、上清吸引後、Hank's Balanced Salt Solution (gibco) とマトリゲル (BD マトリゲル基底膜マトリックス BD) を 1:1 で混合し、免疫不全ヌードマウス (Charles River) の背部に 2×10^6 個の細胞を皮下注射 ($100 \mu\text{L}/\text{site}$) した。その後、形成された腫瘍の腫瘍径を電子ノギスにより測定し、平均腫瘍体積が 118 mm^3 に至った日から抗がん剤の投与を開始した。なお、長辺と短辺を測定後、 $\text{長辺} \times \text{短辺} \times \text{短辺} / 2$ を腫瘍体積とした。動物実験は全て、がん研究会動物委員会の審査承認を受けた上で、所内ガイドラインに基づいて実施した。

抗がん剤の投与には、5-FU 注 250 mg (協和発酵キリン株式会社) を使用した。5-FU の投

与量がヌードマウス個体あたり 150 mg/kg もしくは 75 mg/kg となるように PBS にて希釈し、それぞれヌードマウスの腹腔内に投与した。この際のコントロールとしては PBS のみの溶液を用いた。投与は 1 週間毎に 4 回行い、その間上記の方法での腫瘍径測定に加えて、電子量りによる体重測定を行った。

Reverse Transcription (RT)-qPCR

基本的には 1-3 に示した方法に準じて行ったが、RNA の抽出は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。また、プライマーは Table 2 で示した ALDH1A3 と同様のものを用いた。

免疫組織染色 (IHC)

パラフィン包埋切片の組織マイクロアレイ (BIOMAX) を購入し、キシレンおよびエタノールにより脱パラフィン処理をした後、Dako REAL Target Retrieval Solution (pH6.0) (Dako) を DW で 10 倍希釈した中に入れ、圧力釜で加熱した。常温まで冷却した後、0.3% H₂O₂ メタノール [30% H₂O₂ (Wako) を 1.5 mL、MeOH (nacalai tesque) を 150 mL] を添加し、常温で 10 分インキュベートした。その後流水にて洗浄し、PBS にて 3 回洗浄した。次に、Blocking One Histo (nacalai tesque) を 3 滴添加し、10 分インキュベートした後、1 次抗体を添加し、4°C で一晩静置した。なお、1 次抗体にはマウス抗ヒト ALDH1A3 抗体 (GT926: GeneTex) を 5 µg/mL で添加した。そして、TBST にて 3 回洗浄した。以降の反応には、ダコ ChemMate ENVISION キット/HRP (DAB) (Dako) を用いた。2 次抗体 (抗マウス) (Dako) を 2~3 滴 /slide で添加し、30 分インキュベートした。さらに、TBST にて 3 回洗浄後、発色反応を行った。まず、基質緩衝液 [BottleB (Dako)] 1 mL に発色基質 [BottleC (Dako)] 1 滴 (約 20 µL) を添加し、発色されるまでインキュベートした。次に、水道水で発色反応を停止し、流水で洗浄した。その後、カラッチ・ヘマトキシリン (武藤化学) を添加し、約 10 秒インキュベート後、流水にて洗浄により、対比染色を行った。そして、70%エタノールで 10 回洗

浄を行った。その後、エタノールで 10 回洗浄を 1 セットとしてこの洗浄を 3 セット行い、次いでキシレンで 10 回洗浄を 1 セットとし、これを 4 セット行った。最後に、Entellan new (Merck) で封入を行い、染色した切片を作製した。

【結果】

In vivo xenograft に対する抗がん剤投与時の残存腫瘍における ALDH1A3 の発現亢進

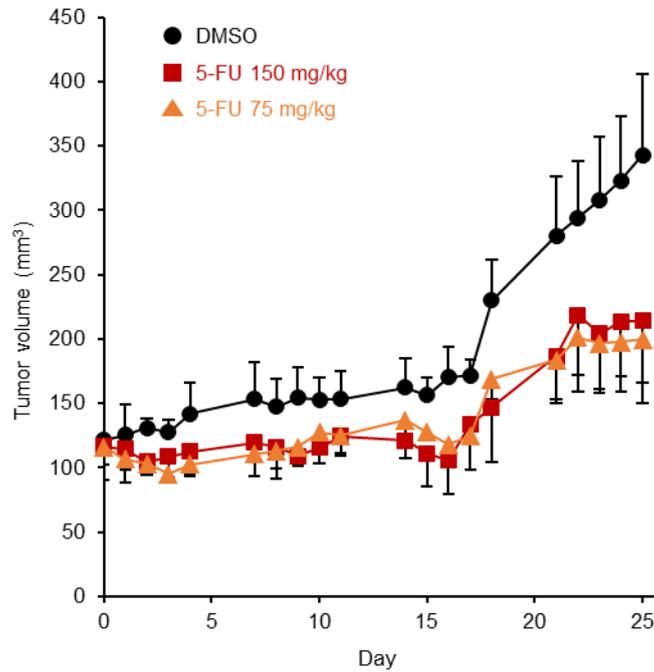
ここまでは in vitro での抗がん剤処理後の残存細胞における ALDH1A3 の発現亢進について検討したが、in vivo での抗がん剤処理後の残存細胞における ALDH1A3 の発現亢進についても検討を行った。まず、ヌードマウスに JSC15-3 を移植し、腫瘍を形成したマウスに対して、腹腔より 5-FU を投与し、縮退した腫瘍を採材した (Fig. 21)。なお投与は 1 週間ごとに 4 回行った。また DMSO、5-FU 75 mg/kg、5-FU 150 mg/kg について、それぞれ 3 匹のマウスで検討する予定であったが、投与開始から 18 日の段階で、5-FU 150 mg/kg 投与のマウスが 1 匹死亡したため、残りの 2 匹で以降の検討を行った。その腫瘍から RNA を抽出し、RT-qPCR により ALDH1A3 の遺伝子発現を検討した。その結果、有意な差は見られないものの 5-FU の投与濃度依存的に ALDH1A3 の発現が亢進する傾向が見られた (Fig. 22)。この結果から、in vivo でも患者由来胃がん細胞に 5-FU を処理した残存細胞に関しても ALDH1A3 の発現が亢進することが示唆された。

胃がん組織における ALDH1A3 の発現量とステージおよび予後との相関

次に ALDH1A3 の発現が臨床腫瘍でどのようになっているかを検討するために、組織マイクロアレイを用いて免疫組織染色により ALDH1A3 の発現を検討した。ALDH1A3 の発現量が低い順に 0、0.5、1、1.5、2、2.5、3 でスコアを定め、全 69 サンプルについて定量を行ったところ、特に Stage3 以降のがんで ALDH1A3 の発現が高い傾向が確認された (Fig. 23)。さらに、TCGA のデータベースを用いて、胃がんについて発現と全生存曲線について検討を

行ったところ、ALDH1A3 の発現量が高いほど有意に予後不良になるという結果が得られた。興味深いことに、胃癌組織における ALDH1A3 の発現に関しては、がんによって不均一であった。また公的データベースの Oncomine により ALDH1A3 の発現を正常組織とがん組織で比較したところ、特に胃について、がん組織で発現が亢進していることが明らかになった (Fig. 24)。これらの結果は ALDH1A3 が、がんの悪性度に寄与していることを示唆している。

A



B

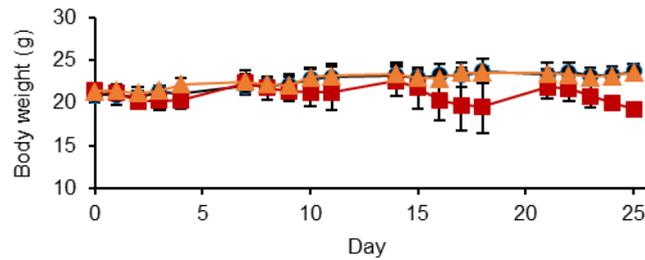
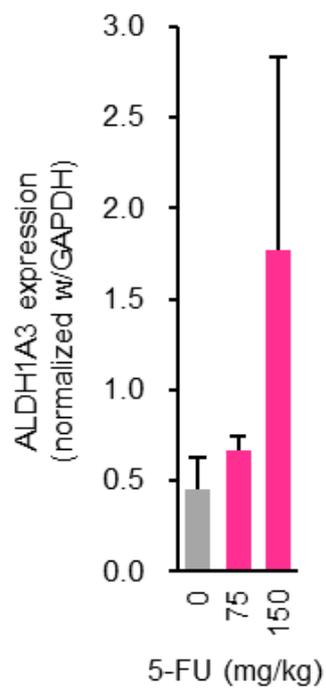


Figure 21. 患者由来ゼノグラフトモデルにおける抗がん剤処理による腫瘍系の縮退
ヌードマウスに JSC15-3 を投与し、形成された腫瘍に対してフルオロウラシルを投与した際の (A) 腫瘍径と (B) 体重変動を示している。ヌードマウスに JSC15-3 を皮下移植して 45 日後にフルオロウラシルの投与を開始した。投与形態は腹腔内投与、投与日数は 1 週間毎に 4 回行い、28 日後に採材した。検討は 1 群 3 匹で行ったが、投与から 18 日目に 5-FU 150 mg/kg 投与しているマウスの内、1 匹が死亡した。



**Figure 22. 患者由来ゼノグラフトモデルにおける抗がん剤処理後の残存細胞での
ALDH1A3 の発現亢進**

ヌードマウスに JSC15-3 を投与し、形成された腫瘍に対してフルオロウラシルを投与した際の残存腫瘍に対して、RT-qPCR にて ALDH1A3 の発現を定量した。内部標準には GAPDH を用いた。

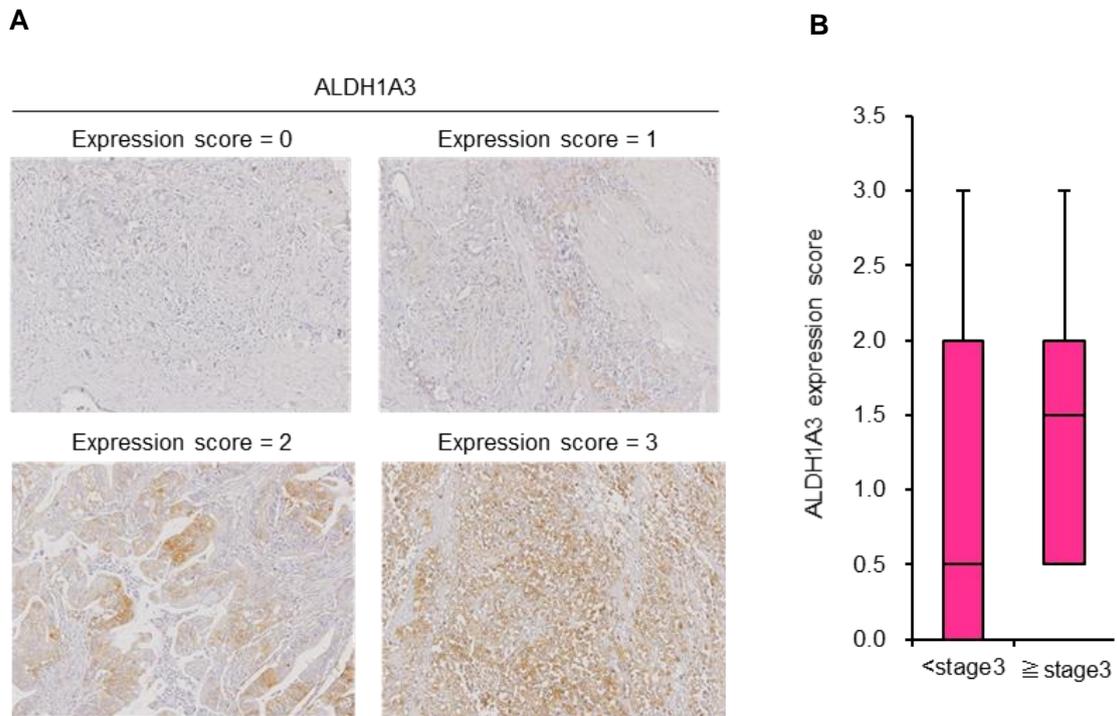


Figure 23. 組織マイクロアレイにおける ALDH1A3 の免疫組織化学染色

BIOMAX より購入した胃がんの組織マイクロアレイを用いた染色の評価は、ALDH1A3 の染色度合いによって、0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 でスコアを定めた。(A) はそのスコアを示す胃がんの組織における ALDH1A3 染色の例である。これらのスコアを元に、72 サンプル中、添付の HE 染色の結果とも照らし合わせ、明確にがんを識別できた 69 サンプルについて、Stage3 以上と Stage3 未満で分別して評価を行った。(B) はその評価を箱ひげ図により行ったものである。なお、Stage3 以上のがんは 7 サンプル、Stage3 未満のサンプルは 62 サンプルであった。

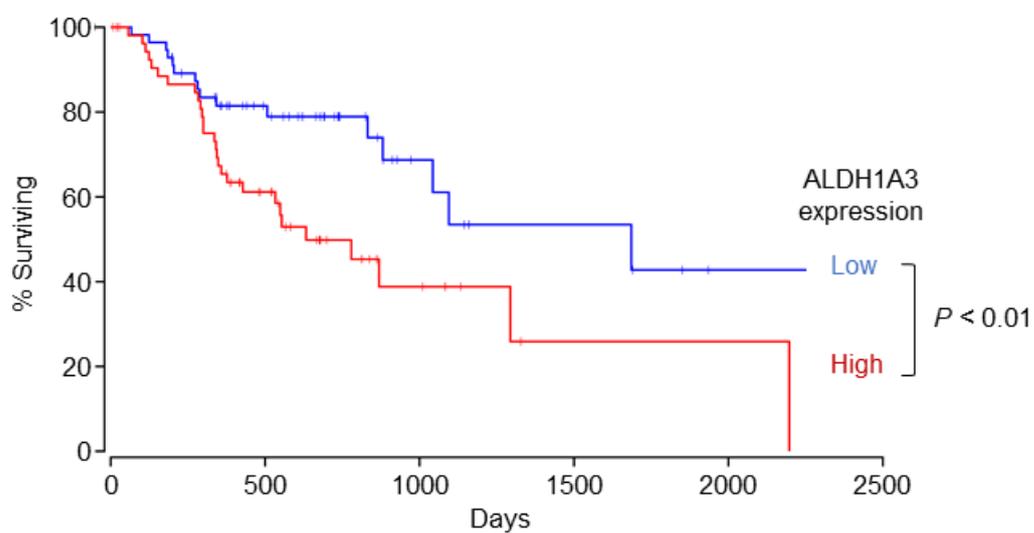


Figure 24. ALDH1A3 の発現と予後との相関

OncoLnc を用いて、TCGA のデータを元に胃がんにおける ALDH1A3 の発現上位 15% と下位 15% を比較した結果を示している。赤色は ALDH1A3 が高発現している患者群、青色は ALDH1A3 が低発現している患者群を示している。

<考察>

本章の検討では、患者由来胃癌細胞において、細胞傷害性抗がん剤残存分画で ALDH1A3 の発現が亢進していた。さらに元々不均一性であった ALDH1A3 の発現が、抗がん剤処理によって不均一性が緩和され、かつ、亢進することが明らかになった。また、この発現亢進の度合いは ALDH ファミリーの中でも突出していた。ALDH1A3 は 19 種類存在するアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) ファミリーの 1 種である。この ALDH は、アルデヒドをカルボキシレートに変換する酵素であるが、古くからその活性と幹細胞との関係性 [92] や、その阻害剤と抗がん剤の併用の有効性 [93] について報告されており、がん幹細胞性を有する分画 [82][94] として報告されてきた因子である。ALDH ファミリーの中でも ALDH1A1 と ALDH1A3 に関しては、乳がんにおいて薬剤耐性と代謝を介したそれぞれの役割は異なるといったような報告 [95] があることから、ALDH ファミリーの因子はそれぞれにがんにおける役割があることが示唆される。本検討では、患者由来胃癌において ALDH ファミリーの中でも突出して ALDH1A3 が抗がん剤処理後の残存分画で発現亢進していたので、ALDH1A3 は胃癌における抗がん剤処理後の残存分画のマーカーと成り得ると考えられる。

ALDH1A3 は 58 種ものヒトがん細胞株において ALDH 酵素活性に中心的に寄与していると報告されている [96]。また乳がん、グリオーマ、皮膚がんにおいて ALDH1A3 の発現はエピジェネティックな修飾や転写翻訳によって制御されているという報告がある [97-99]。特に ALDH ファミリーの中でも ALDH1A3 は間葉系のグリオーマ幹細胞において、FOXD1 によって転写レベルで高発現していることが知られている [98]。また同細胞において、ubiquitin-specific protease 9X (USP9X) により ALDH1A3 は脱ユビキチン化し安定化しているという報告がある [100]。本検討により ALDH1A3 の発現が胃癌の残存細胞で高発現していることと、Oncomine のデータベースにおいて ALDH1A3 の正常組織とがん組織での発現を比較した際、胃では特になん組織の方が高発現していることを加味すると、FOXD1 より

も特異的かつ関係性の強い転写因子がこの発現を調整している可能性も考えられる。

加えて、胃癌組織において ALDH1A3 の発現が亢進しているほどステージの進行したがんである傾向が見られ、TCGA のデータベースでも ALDH1A3 の発現が亢進しているほど予後不良であることから、ALDH1A3 はがんの悪性度にも寄与していることが示唆される。先に述べた通り Oncomine のデータベースによれば ALDH1A3 は胃癌組織で高発現していることも悪性度に寄与していることを支持している。これらのことから、ALDH1A3 が単に抗がん剤処理後の残存細胞のマーカーになり得るだけでなく、がん細胞あるいはがん組織の生存にも寄与している可能性が示唆される。

第3章

患者由来胃癌細胞における ALDH1A3-mTOR 経路を介した細胞増殖

<要約>

第1章、第2章の検討より、ALDH1A3が患者由来胃癌細胞における細胞傷害性抗がん剤処理後の残存分画のマーカーとなり得るだけでなく、がんの悪性度に寄与している可能性があるという結果が得られた。そこで、shRNAを用いてALDH1A3の発現を恒常的に抑制した際の生存増殖への影響を検討した。その結果、ALDH1A3の恒常的な遺伝子発現抑制は、細胞増殖を抑制し、そこに抗がん剤を処理することで更なる増殖抑制が見られることが明らかになった。これがどのような経路によるものかを検討するために、包括的遺伝子発現解析を行った。その結果、mTOR経路の寄与が示唆された。ALDH1A3の恒常的な抑制はmTOR経路の介在因子p70S6Kのリン酸化レベルを低下させた。またmTOR経路を抑制した状態で5-FU処理を行うと、アポトーシス様subG1分画の割合が増加した。そして、mTOR阻害剤テムシロリムスおよび5-FUの併用は、単剤処理と比較してより顕著に細胞増殖を抑制した。以上の結果より、患者由来胃癌細胞におけるALDH1A3を介した生存増殖にはmTOR経路が寄与していることが示唆された。

3-1. ALDH1A3 の抗がん剤処理後の細胞残存および腫瘍増殖への寄与

【目的】

第1章、第2章の検討より、患者由来胃がん細胞において、抗がん剤処理後の残存分画における ALDH1A3 の機能的な重要性が示唆された。特に 2-1 で行った siRNA による遺伝子発現抑制実験から、患者由来胃がん細胞および抗がん剤処理後の残存細胞の生存増殖に対する ALDH1A3 の機能的な関与が示唆された。そこで患者由来 JSC15-3 細胞において ALDH1A3 の発現を恒常的に抑制した際に、生存や増殖にどのような影響が生じるかを検討した。

【材料・方法】

細胞と培養条件

1-1 に示した方法に準じて行った。

細胞数の測定

1-1 に示した方法に準じて行った。

shRNA の構築と細胞への導入

Short hairpin RNA (shRNA) の配列を MISSION shRNA clones (Sigma-Aldrich)によりデザインし、FASMAC で合成を行った。合成したオリゴをハイブリダイズし、pLKO.1 プラスミド (Addgene) の stuffer 部分を除去し、その部位に導入した。目的の配列が導入できているかどうかの確認はシーケンシングにより行った。構築されたプラスミド DNA を HEK293T 細胞に導入し、レンチウイルスへのパッケージングを行った後、これを JSC15-3 細胞に感染させた。感染させた細胞は 1 µg/mL の puromycin で 8 日間選択した。shRNA の配列を以下に

示す。

- shALDH1A3 #2

Fw: 5'-CCGGGCAACCAATACTGAAGTTCAACTCGAGTTGAACTTCAGTATTGGTTGCTTTTTG-3'

Rv: 5'-AATTCAAAAAGCAACCAATACTGAAGTTCAACTCGAGTTGAACTTCAGTATTGGTTGC-3'

- shALDH1A3 #3

Fw: 5'-CCGGGCTGTATTAGAACCCTCAGATCTCGAGATCTGAGGGTTCTAATACAGCTTTTTG-3'

Rv: 5'-AATTCAAAAAGCTGTATTAGAACCCTCAGATCTCGAGATCTGAGGGTTCTAATACAGC-3'

ウェスタンブロッティング

細胞から TNE lysis buffer (150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 60 mM Tris and 1 mM EDTA に 1× protease inhibitor cocktail (Nacalai) と PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche) を加えたもの) を用いてタンパク質を抽出した。その後、BCA Assay により得られたタンパク質の量を定量し、sodium dodecyl sulfate (SDS) を用いて調製した後に、Extra PAGE One Precast Gel (Nacalai) を用いて電気泳動を行った。そのゲルをメタノール処理後の polyvinylidene difluoride (PVDF) のメンブレンに転写した。その後、非リン酸化抗体を見る際には Blocking ONE (Nacalai) を、リン酸化抗体を見る際には Blocking ONE-P (Nacalai) を用いてブロッキングを行い、TBST で洗浄後、1% スキムミルクで希釈した mouse anti-ALDH1A3 (0.5 µg/mL, GT926; GeneTex)、mouse anti-GAPDH (0.02 µg/mL, 10R-G109a; Fitzgerald) を添加しインキュベートした。TBST で洗浄後、1% スキムミルクで希釈した 2 次抗体 (ECL anti-mouse IgG; GE Health care) を添加しインキュベートした。そして、TBST で洗浄後、(ECL GE Health care) で現像を行った。

抗がん剤処理後の残存細胞数の評価 (MTS Assay)

1-1 に示した方法に準じて行った。

【結果】

ALDH1A3 の恒常的な抑制による胃がん細胞の増殖抑制と抗がん剤処理後の残存細胞数の減少

ALDH1A3 の発現を恒常的に抑制した場合にどのような影響が見られるかを検討するために ALDH1A3 の shRNA (shALDH1A3) を 2 種類作製した。Addgene の pLKO.1 プラスミドベクターを用いて shALDH1A3 の配列を導入したものを作製し、レンチウイルスに封入後、JSC15-3 に感染させ、ピューロマイシンによる選択を行った。まず導入した shALDH1A3 の発現抑制効率をウェスタンブロッティングにより検討したところ、遺伝子発現の抑制がタンパク質レベルで確認できた (Fig. 25)。そして、shALDH1A3 を導入した JSC15-3 に関して、細胞増殖および細胞傷害性抗がん剤への影響を検討した。その結果、ALDH1A3 を恒常的に抑制した JSC15-3 は増殖能が低下し、そこに 5-FU や SN38 を加えると、さらに増殖能が低下するという結果が得られた (Fig. 26)。また、各サンプルの DMSO 処理を 100% に補正し、IC50 により評価を行うと、SN38 処理では ALDH1A3 を抑制した状態で相乗的に感受性が増強する傾向が見られたが、5-FU では有意な差が見られなかった (Fig. 27)。

ALDH1A3 の恒常的な抑制による造腫瘍性と腫瘍増殖能の抑制

shALDH1A3 を導入した JSC15-3 とネガティブコントロールの shRNA を免疫不全の NOD-SCID マウスに移植し、腫瘍形成能および腫瘍増殖能についてどのような差があるか検討した。その結果、移植 21 日後に 10 mm³ 以上に成長した腫瘍の数を生着腫瘍数として検討すると、shALDH1A3 を導入した JSC15-3 は 8 匹中 4 匹に腫瘍の生着が見られたが、ネガティブコントロールの shRNA を導入した JSC15-3 は 7 匹中 7 匹全てに腫瘍が生着していた。すなわち、shALDH1A3 を導入した JSC15-3 では腫瘍形成能が低下していることが明らかになった (Fig. 28)。加えて、腫瘍が生着してから 89 日後まで 3,4 日毎に腫瘍径を測定したとこ

ろ、shALDH1A3 を導入した JSC15-3 由来の腫瘍の平均腫瘍径が対照群と比較して小さいことが明らかとなった。これらの結果から、ALDH1A3 が JSC15-3 の造腫瘍性および腫瘍増殖能に寄与している可能性が示唆された (Fig. 26)。

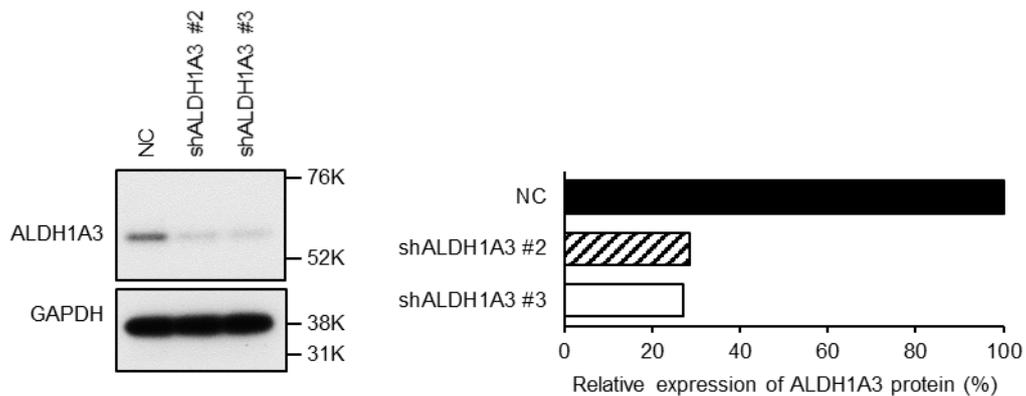


Figure 25. JSC15-3 における shALDH1A3 のノックダウン効率

左図は、shALDH1A3 #2 および shALDH1A3 #3 を導入した JSC15-3 細胞における ALDH1A3 タンパク質の発現レベルをウェスタンブロットで調べたものである。右図は、そのバンドを ImageJ により定量した結果である。内部標準として GAPDH を用い、NC を 100% としてデータを示している。なお、shRNA を導入した JSC15-3 はピューロマイシンにより 8 日間選択を行った後にペレットを回収し、タンパク質を抽出した。NC: negative control

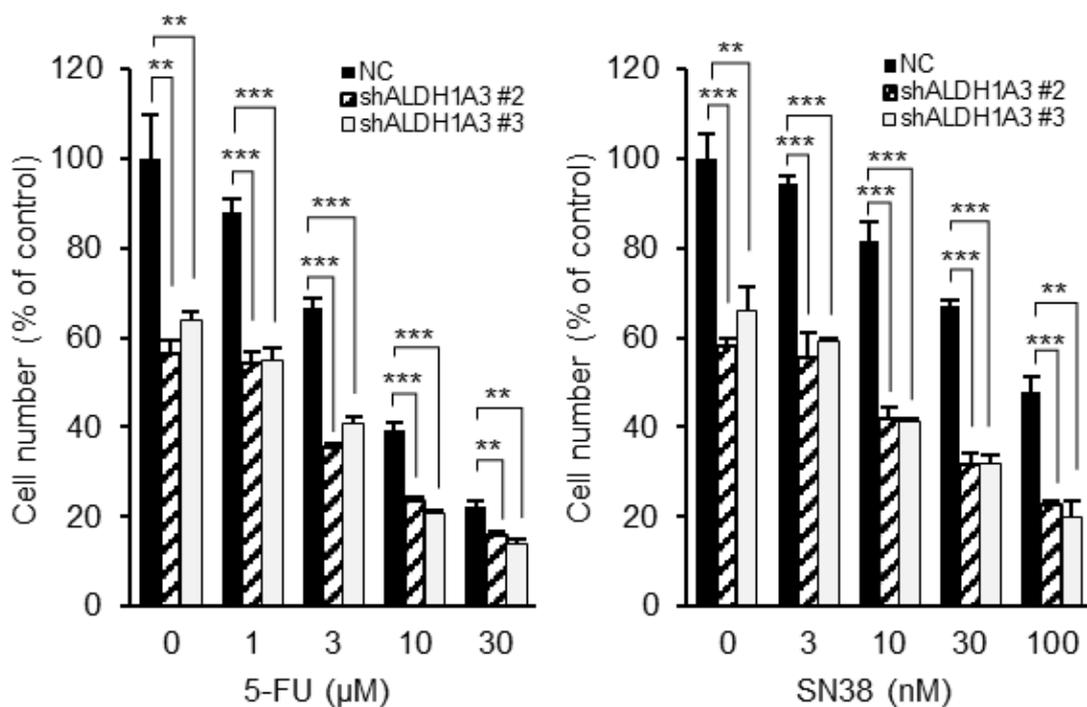
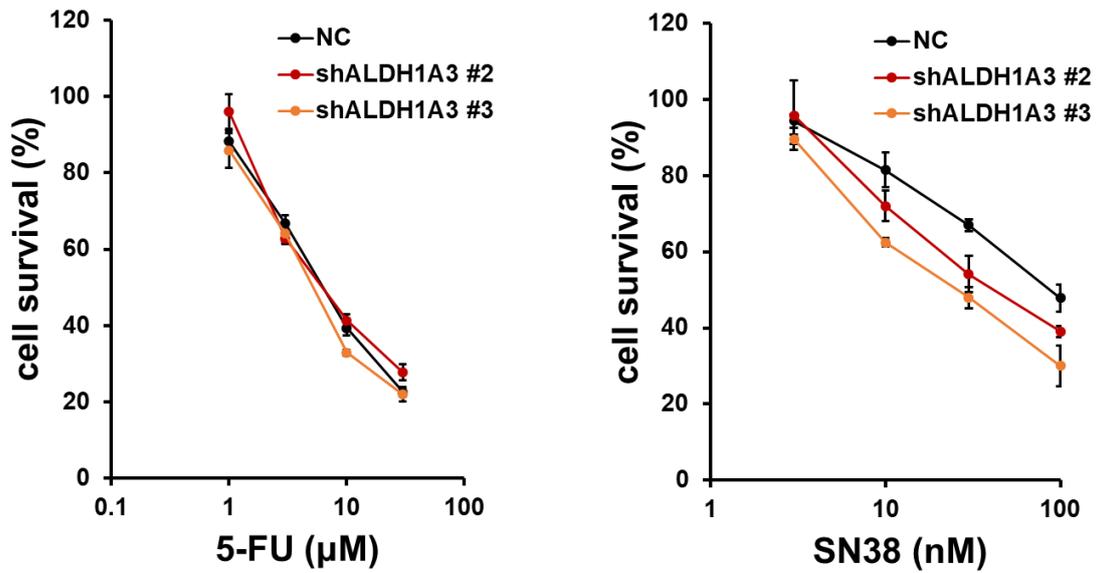


Figure 26. shALDH1A3 による発現抑制がもたらす細胞増殖及び薬剤感受性への影響①
 JSC15-3 に対して shALDH1A3 により恒常的に遺伝子発現を抑制した際の、細胞増殖及び 5-FU (左図) および SN38 (右図) の影響を MTS Assay により検討した結果である。JSC15-3 をコラーゲンコート of 96 ウェルプレートに 3,000 細胞播種し、その翌日に抗がん剤をそれぞれ添加し、7 日後に評価を行った。図中のアスタリスク (*) は有意差 (P 値) を表している。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

A



B

50%阻害濃度	5-FU	SN38
NC	7.3 μM	92 nM
shALDH1A3 #2	7.2 μM	49 nM
shALDH1A3 #3	6.2 μM	27 nM

Figure 27. shALDH1A3 による発現抑制がもたらす細胞増殖及び薬剤感受性への影響②

(A) Figure 26 の結果について、各サンプルの DMSO 処理を 100%とした際の 5-FU および SN38 処理における細胞の生存率を示している。(B) A の結果の 50%阻害濃度を表にまとめている。

A

サンプル名	Day0での10mm ³ 以上の腫瘍数
shNC	7/7 (100%)
shALDH1A3 #2	4/8 (50%)

B

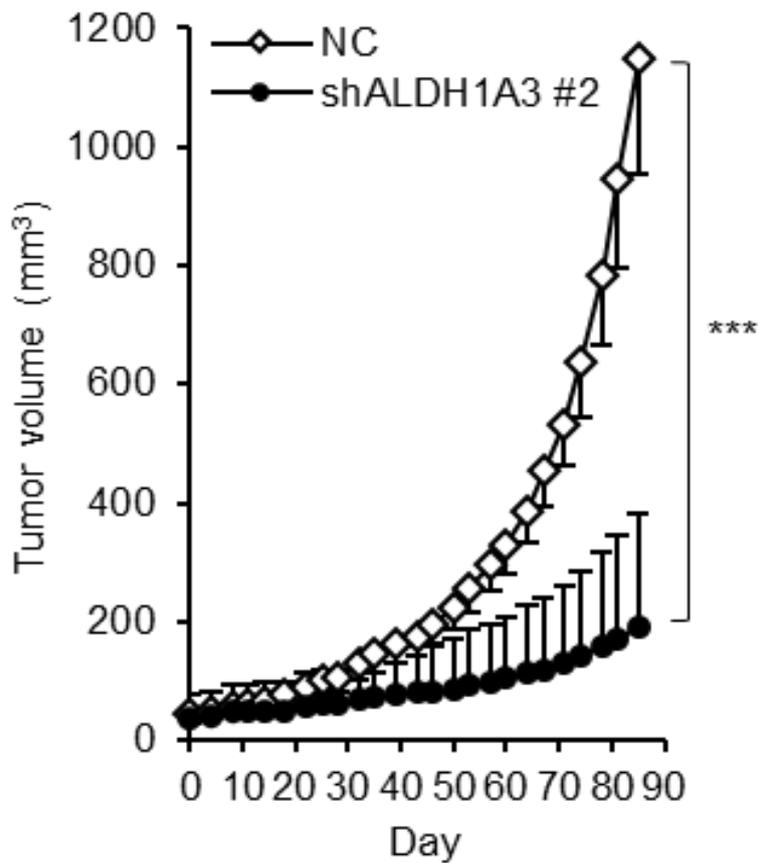


Figure 28. shALDH1A3 による腫瘍形成能および腫瘍増殖能

(A) 移植から 21 日時点で形成された腫瘍の数を示している。この時点で 10 mm³ 以上の腫瘍径のものを腫瘍が形成されていると判定した。(B) A の時点をもとにした時の、89 日までの腫瘍増殖能を示している。Negative control shRNA (shNC) を導入した JSC15-3 は 7 匹、shALDH1A3 を導入した JSC15-3 は 8 匹で検討を行った。検討は NOD-SCID マウスにそれぞれの細胞を皮下移植して行った。図中のアステリスク (*) は有意差 (P 値) を表している。

*** $P < 0.001$

3-2. ALDH1A3 に関連する経路の同定 ～mTOR 経路～

【目的】

3-1 の検討より、ALDH1A3 の発現を恒常的に抑制することで、細胞増殖能が抑制され、抗がん剤処理後の残存細胞の数が減少するという結果が得られた。この結果が、どのような経路に起因するのかを調べるために種々の検討を行った。

【材料・方法】

細胞と培養条件

1-1 に示した方法に準じて行った。

細胞数の測定

1-1 に示した方法に準じて行った。

包括的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ)

1-3 に示した方法に準じて行った。得られたデータを用いて gene set enrichment analysis (GSEA) を行った。

ウェスタンブロッティング

3-1 に示した方法に準じて行った。

なお 1 次抗体には、mouse anti-ALDH1A3 (0.5 µg/mL, GT926; GeneTex)、rabbit anti-phospho-p70S6 kinase (p70S6K, phosphorylated at T389) (1:1,000, #9234; Cell Signaling Technology)、rabbit anti-p70S6K (1:1,000, #9202; Cell Signaling Technology)、mouse anti-GAPDH (0.02 µg/mL, 10R-G109a; Fitzgerald)を使用した。

【結果】

包括的遺伝子発現解析による mTOR 経路の同定

3-1 における ALDH1A3 の恒常的な発現抑制による細胞増殖および抗がん剤処理後の残存細胞数の減少にどのような分子経路が寄与しているのかを明らかにするために、shALDH1A3 を導入した細胞およびネガティブコントロールの shRNA を導入した細胞に関して、GeneChip マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現解析を行った (Fig. 29A)。その結果、様々な遺伝子の発現変動が認められたが、GSEA を行ったところ、mTOR 経路との関係性が示唆された (Fig. 29B)。

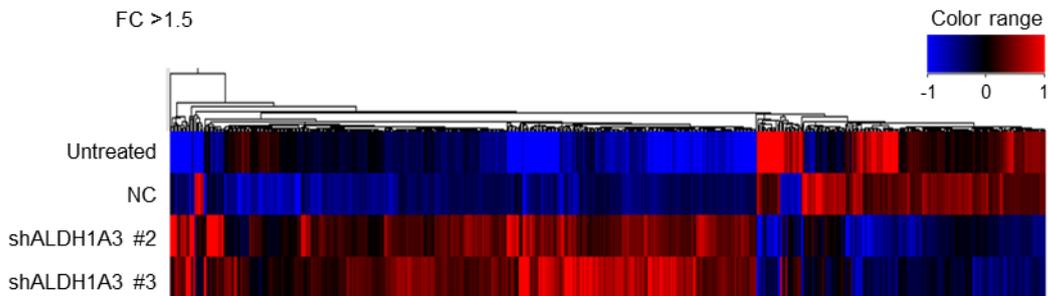
ALDH1A3 の抑制による mTOR 経路の不活性化

上述の結果に基づき、shALDH1A3 を導入した JSC15-3 に関して、mTOR 経路の関連因子についてウェスタンブロッティングによりタンパク質レベルの発現変動について検討した。その結果、mTOR 経路の介在因子である p70S6K (T389) のリン酸化が発現抑制されていたことから、同経路の活性が低下しているものと判断された (Fig. 30)。

mTOR 経路以外の ALDH1A3 の寄与

GSEA では MEK 経路や Wnt 経路の関与も示唆された (Fig. 31)。しかし、Wnt 経路に関しては、ALDH1A3 の発現抑制により、LEF1 など Wnt 経路が活性化する際に働く遺伝子が発現亢進していた。また、MEK 経路や Wnt 経路に関連するタンパク質に関して、ウェスタンブロッティングにより発現を検討したところ、安定したリン酸化レベルの発現低下などが見られなかった。これらのことから、MEK 経路や Wnt 経路の寄与は小さいと判断された。

A



B

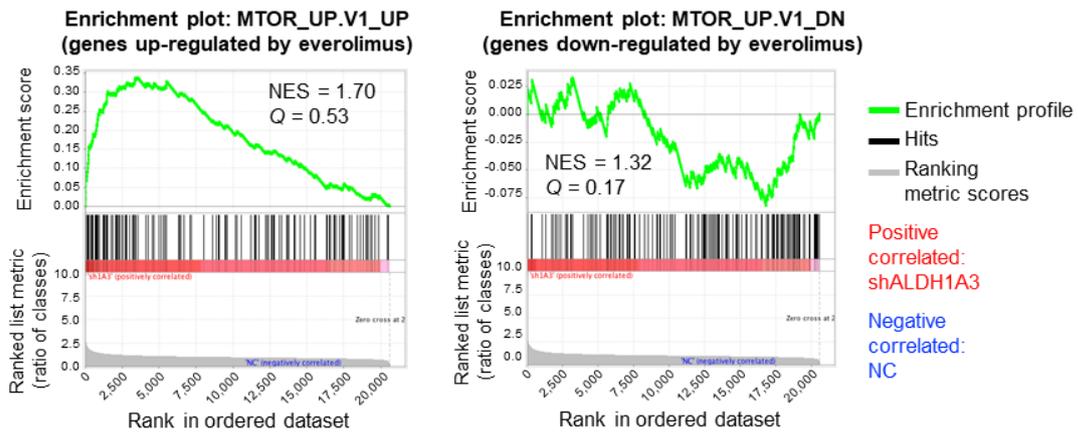


Figure 29. shALDH1A3 を導入した JSC15-3 細胞の網羅的遺伝子発現解析①

(A) マイクロアレイ解析の結果をもとに、shALDH1A3 #2, #3 と Untreated, NC (negative control) で Fold Change が 1.5 倍以上の遺伝子を示している。(B) Oncogenic 経路に関する GSEA の結果で、左は shALDH1A3 で濃縮されている経路、右は NC で濃縮されている経路を示している。

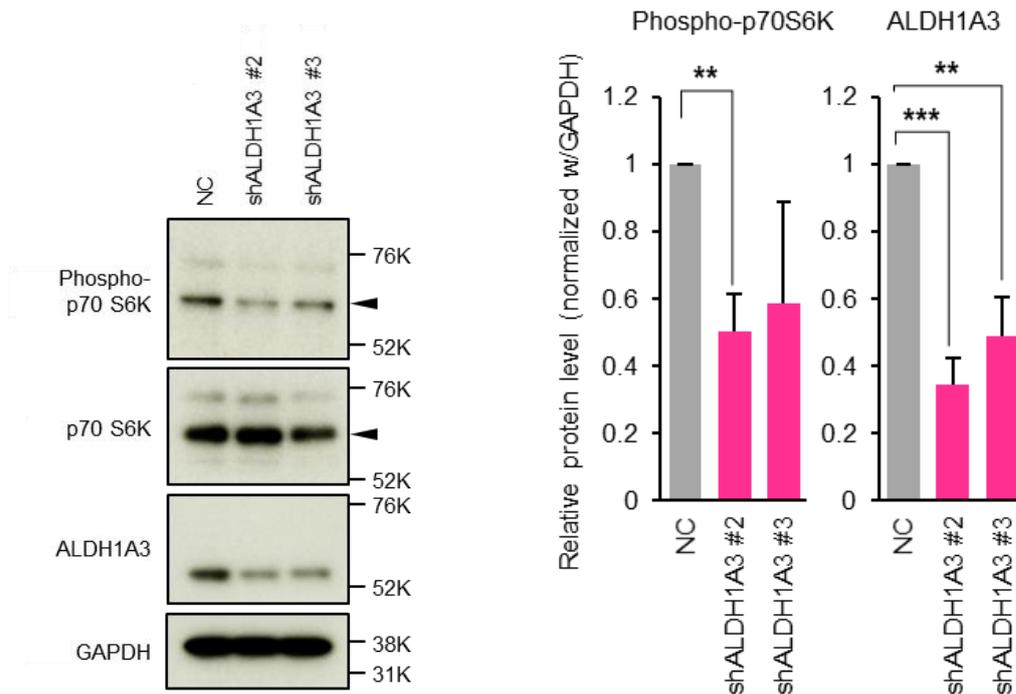


Figure 30. shALDH1A3 を導入した JSC15-3 における mTOR 経路の抑制

左図は shALDH1A3 を導入した JSC15-3 における mTOR 関連因子のウェスタンブロッティングの結果、右図は 3 回の独立したウェスタンブロッティングの結果を定量し、平均化した結果である。定量は ImageJ で行い、内部標準として GAPDH を用いた。図中のアステリスク (*) は有意差 (P 値) を表している。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

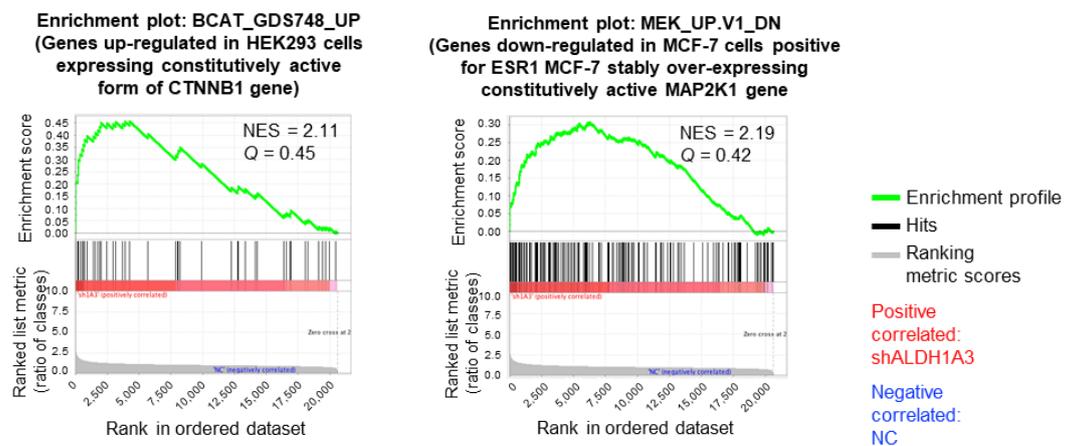


Figure 31. shALDH1A3 を導入した JSC15-3 細胞の網羅的遺伝子発現解析により見出された他の経路

shALDH1A3 を導入した JSC15-3 におけるマイクロアレイ解析の結果をもとに、がんに関連する経路について GSEA を行った際、見出された normalized enrichment score (NES) 値上位の他の経路を示している。左が Wnt 経路、右が MEK 経路への関与が示唆される GSEA の結果である。

3-3. ALDH1A3 抑制による細胞周期への影響および 5-FU と mTOR 阻害剤の併用による細胞増殖抑制効果

【目的】

3-2 の検討より、JSC15-3 に対して ALDH1A3 を抑制した際、mTOR 経路が不活性化することが示唆された。この結果を詳しく検証するため、ALDH1A3 の発現抑制時の遺伝子発現変動データを用いて Gene Ontology 解析を実施した。また、腎がんの治療でも実際に使用されている mTOR 阻害剤テムシロリムスについて、5-FU との併用時にどのような効果が得られるのか検討を行った。

【材料・方法】

細胞と培養条件

1-1 に示した方法に準じて行った。

細胞数の測定

1-1 に示した方法に準じて行った。

包括的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ)

1-3 に示した方法に準じて行った。得られたデータを用いて GSEA および GO 解析を行った。

DNA 量の定量による細胞周期の検討

フローサイトメトリーを用いて細胞周期分布と subG1 分画の定量を行った。具体的には、70%エタノールにより細胞を固定し、50 µg/mL のヨウ化プロピジウム (propidium iodide: PI)

で染色した後、FACSCalibur (BD Biosciences)を用いて解析を行った。

抗がん剤処理後の残存細胞数の評価 (MTS Assay)

1-1 に示した方法に準じて行った。なお検討には 5-FU に加えて、mTOR 阻害剤であるテムシロリムス (Sigma-Aldrich) を用いた。

ウェスタンブロッティング

3-1 に示した方法に準じ、3-2 に示した 1 次抗体を用いて検討した。

【結果】

ALDH1A3 の発現抑制時における細胞周期およびアポトーシスへの寄与

3-2 で行ったマイクロアレイ解析の結果をもとに GO 解析を行ったところ、細胞周期に関連する GO タームが得られた (Fig. 32A)。また、KEGG 経路について、GSEA を行ったところ、細胞周期に寄与する因子が JSC15-3 に対して shALDH1A3 を導入した細胞で濃縮されていることが明らかになった (Fig. 32B)。これを踏まえて、shALDH1A3 を導入した JSC15-3 に関して、抗がん剤処理前後で DNA 量がどのように変化するかを検討するため PI 染色を行った。その結果、shALDH1A3 を導入した JSC15-3 に 5-FU を処理することでアポトーティックな分画 (subG1 分画) の割合が増加した (Fig. 33)。これらの結果は、細胞の生存増殖に寄与している mTOR 経路の関与を間接的に支持するものと考えられる。

mTOR 阻害剤テムシロリムスと細胞傷害性抗がん剤 5-FU の併用による細胞増殖抑制

mTOR 経路を阻害するテムシロリムスに関して、細胞傷害性抗がん剤と併用を行った際、どのような効果が得られるかについて、細胞増殖アッセイにより検討した。その結果、JSC15-3 に関しては、mTOR 経路を阻害するだけで細胞増殖が抑えられ、そこに細胞傷害性抗がん

剤を処理すると、さらに強く細胞増殖が抑制されることが明らかになった (Fig. 34A)。なお、併用に用いた阻害剤濃度で、P70S6K のリン酸化レベルが低下することはウェスタンブロッティングにより確認した (Fig. 34B)。また、各サンプルの DMSO 処理を 100% に補正し、IC50 により評価を行うと、相乗的な効果は見られなかった。

A

GO ACCESSION	GO Term	p-value
GO:0007049	cell cycle	0
GO:000278 GO:0007067	mitotic cell cycle	0
GO:0022402	cell cycle process	2.00E-43
GO:1903047	mitotic cell cycle process	7.47E-36
GO:0051301	cell division	4.30E-29
GO:0007059	chromosome segregation	3.69E-28
GO:0000775 GO:0097521	chromosome, centromeric region	5.01E-26
GO:0098687	chromosomal region	1.44E-25
GO:0005694	chromosome	3.68E-23
GO:0044427	chromosomal part	3.14E-22
GO:0000779	condensed chromosome, centromeric region	4.41E-22
GO:0015630	microtubule cytoskeleton	5.67E-22
GO:0098813	nuclear chromosome segregation	3.55E-21
GO:0000777	condensed chromosome kinetochore	7.92E-21
GO:0000280	nuclear division	1.52E-20
GO:0140014	mitotic nuclear division	2.04E-20
GO:0000776 GO:0005699	kinetochore	4.44E-20
GO:0044770	cell cycle phase transition	4.76E-20
GO:0000793	condensed chromosome	6.04E-20
GO:0000226	microtubule cytoskeleton organization	1.09E-19
GO:0044772	mitotic cell cycle phase transition	1.06E-19
GO:0048285	organelle fission	1.93E-19
GO:0000819	sister chromatid segregation	9.63E-19
GO:0007017	microtubule-based process	7.76E-18
GO:0043228	non-membrane-bounded organelle	3.60E-17
GO:0043232	intracellular non-membrane-bounded organelle	3.60E-17
GO:0005819	spindle	5.97E-17
GO:0007051 GO:0043146	spindle organization	1.68E-16
GO:0006259 GO:0055132	DNA metabolic process	1.98E-16
GO:0051276 GO:0007001 GO:0051277	chromosome organization	7.44E-16
GO:0044430	cytoskeletal part	1.58E-15
GO:0000070 GO:0016359	mitotic sister chromatid segregation	2.96E-15
GO:0051983	regulation of chromosome segregation	3.22E-15

B

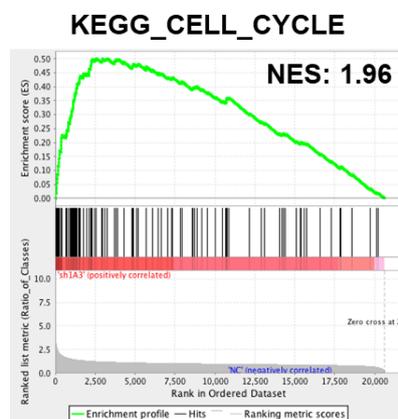


Figure 32. shALDH1A3 を導入した JSC15-3 に関する網羅的遺伝子発現解析②

(A) Figure. 29A のマイクロアレイ解析の結果に対して GO 解析を行った結果を示している。P 値の高い順に $p < 10^{-15}$ までを示している。太字は $p < 10^{-30}$ 以下の GO Term である。(B) Figure. 29A のマイクロアレイ解析の結果に対して KEGG 経路について GSEA を行った結果を示している。shALDH1A3 を導入した JSC15-3 で濃縮されている遺伝子群が関連する経路について解析を行った。

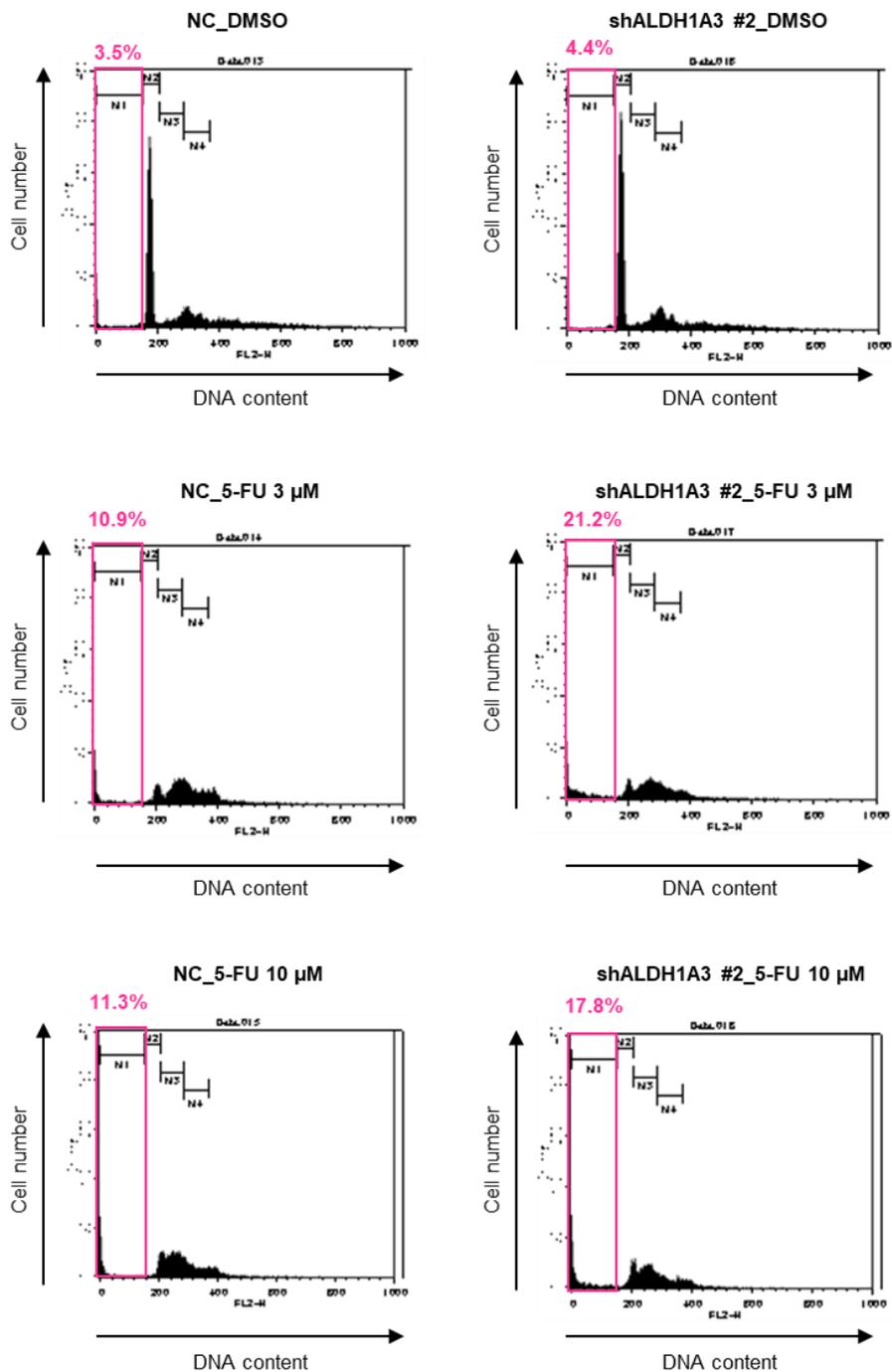


Figure 33. ALDH1A3 を枯渇させた JSC15-3 細胞に抗がん剤を処理した際の DNA 量の変動
 NC、shALDH1A3 #2、shALDH1A3 #3 に関して、いずれも DMSO および 5-FU を 7 日間処理した。ヨウ化プロピジウムで細胞を染色し、FACSCalibur によるフローサイトメトリーで細胞内 DNA 含有量を解析した。ピンク色の四角の数値はアポトーティックな subG1 分画の割合を示している。NC: negative control

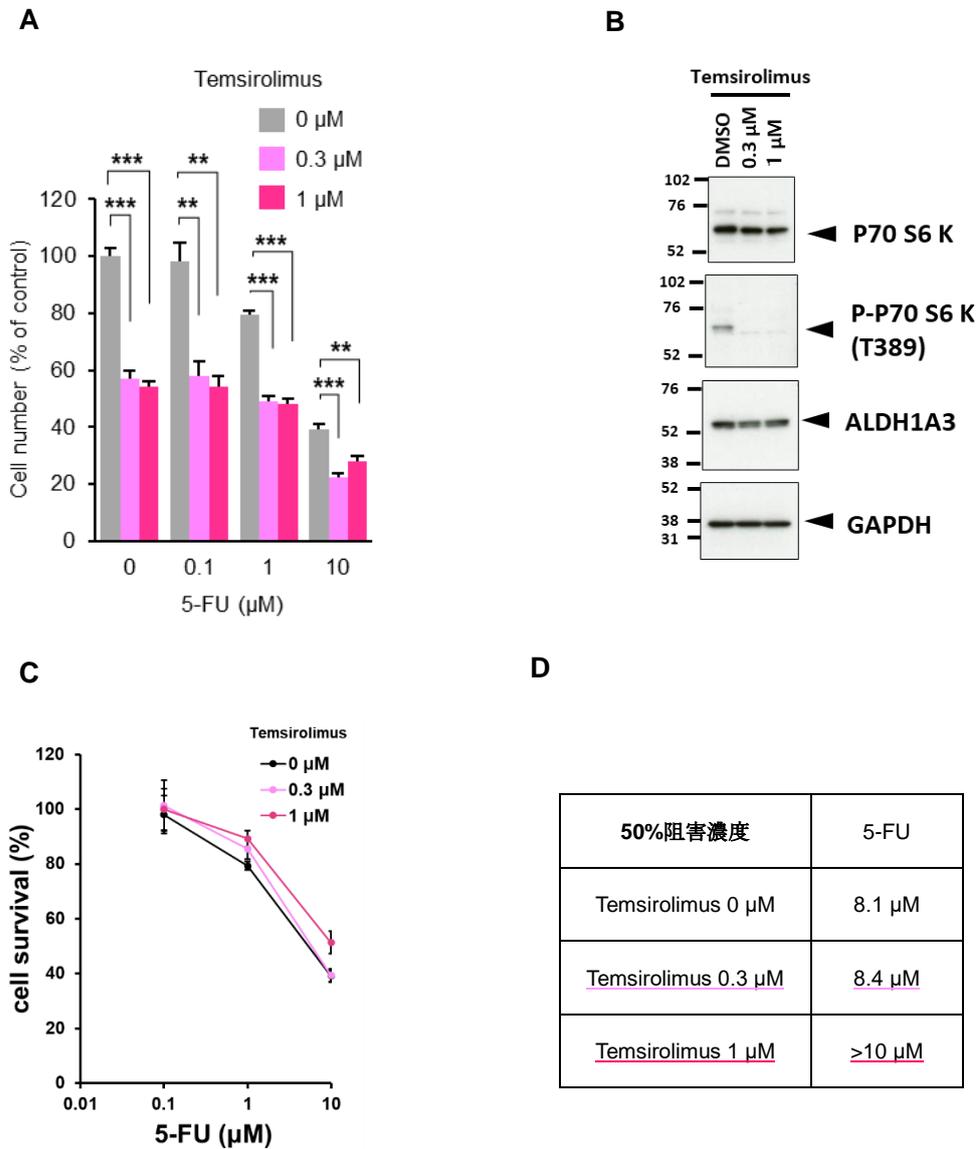


Figure 34. JSC15-3 に対する mTOR 阻害剤および 5-FU との併用による細胞増殖抑制効果

(A) mTOR 阻害剤テムシロリムスと 5-FU の併用時における細胞増殖を示している。JSC15-3 細胞を 96 ウェルプレートに 3,000 細胞播種し、翌日にテムシロリムスと 5-FU を添加し、7 日後に MTS Assay により評価を行った。(B) テムシロリムスによる mTOR 関連因子の発現変動を示している。JSC15-3 に対してテムシロリムスを 2 時間処理した後、ペレットを回収してタンパク質を抽出した。(C) A の結果について、各サンプルの DMSO 処理を 100% とした際の 5-FU および SN38 処理における細胞の生存率を示している。(D) C の結果について、50%阻害濃度をまとめたものである。図中のアスタリスク (*) は有意差 (P 値) を表している。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

< 考察 >

患者由来胃癌細胞において、ALDH1A3 の発現の恒常的な抑制により細胞増殖が抑制され、さらに抗がん剤処理後の残存細胞の数が減少することから、ALDH1A3 の発現が、がん細胞の増殖に寄与することが明らかになった。また同細胞は腫瘍形成能および腫瘍増殖能が低下していることから、ALDH1A3 が腫瘍形成能や腫瘍増殖能にも寄与していることが明らかになった。第 2 章では、患者由来胃癌細胞における抗がん剤処理後の ALDH1A3 の発現亢進および不均一性の欠落から、がん幹細胞分画あるいは薬剤残存分画のマーカースとして有用性について述べたが、第 2 章の考察で述べた通り、ALDH1A3 は単なるマーカースではなく、がん細胞の生存増殖に寄与することが明らかになった。また、これらの抑制に mTOR 経路が寄与していることが示唆された。

mTOR 経路はがん細胞の生存や増殖に寄与する経路として知られており、この経路の阻害剤は実臨床の場で使用されている。しかし、進行胃癌の臨床試験では、第三相試験において、mTOR 阻害剤の 1 つであるエベロリムスとパクリタキセルの併用はあまり効果的ではなかったという結果が示されている。一方で、エベロリムスが、タキサン系の抗がん剤により治療した患者集団の無増悪生存期間および全生存期間を改善するという報告がある [101]。さらに、難治の胃癌患者に対して、カペシタビンとエベロリムスの併用の第二相試験が行われたという報告がある [102]。本研究において ALDH1A3 の不均一性が患者由来胃癌細胞において観察されたことから、生存や増殖に対する ALDH1A3-mTOR の寄与は胃癌の中でも限られた集団に制限されるものであると推察される。この推察に基づくと、mTOR を標的とした治療は、一部の患者集団に対して有効な可能性が考えられる。したがって、mTOR と細胞傷害性抗がん剤との併用を考える場合、効果が得られそうな集団のバイオマーカーを同定することが重要であることが示唆される。

また、ALDH1A3 の細胞増殖への寄与に関しては、ALDH1A3 が特に重要な役割を担っているレチノール経路の関与が示唆される。ALDH ファミリーは先に述べた通りアルデヒド

デヒドロゲナーゼとして知られているが、その役割として著名なものはアルコールから生成されるアセトアルデヒドの分解酵素である。この分解に主に関わる ALDH ファミリーは ALDH2 である。飲酒をした際に、酵素として働くのは主にこの因子である。しかしながら、多量の飲酒つまり高濃度のアルコールを摂取した際は ALDH1 も酵素として働くことが知られている。加えて ALDH1 の主な役割としてレチノール合成経路に関与することが知られている。この ALDH1 に関しては ALDH1A3 が ALDH1A1 と ALDH1A2 に比べて 10 倍以上酵素活性が高いことがマウスレベルの実験により報告されている[103]。ALDH1A3 と ALDH1A1 および ALDH1A2 の配列の相同性は高く、70%以上の配列が共通している[104]にも関わらず、ALDH1A3 の酵素活性がより高いことは非常に興味深い。特にノックアウトマウスに関しては ALDH1A3 を欠落させると胚性致死になることが知られており、ここにレチノール合成経路の終着点として知られている All-trans retinoic acid (ATRA)を添加すると胚性致死を妨げることができるという報告がある[105]。対して ALDH1A1 を欠落させてもノックアウトマウスは生存するという報告がある[106]。これらのことからレチノール合成経路への寄与は ALDH1A3 の方が大きいことが示唆される。

レチノール合成経路に関しては、ATRA の合成から遺伝子発現を介して、細胞の分化および増殖に寄与することが知られている。実際に米国ではニキビの治療薬としてトレチノインが知られており、この薬剤は皮膚細胞の分化と増殖を促進する。がんにおいても、急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia: APL) の治療としてトレチノインが使用されており、白血球の分化および血液凝固作用の抑制を介して治療に貢献している。このように、レチノール合成経路またはその終着点にある ATRA は細胞の分化に寄与していると考えられるが、その一方で、がん幹細胞という視点に立つと、近年興味深い報告がなされている。具体的には、間葉系グリオーマ幹細胞に関して、ALDH1A3 がレチノール合成経路を活性化させ、ATRA の合成を促進し、tissue transglutaminase を介して自己複製能や増殖に寄与することが報告されている[107]。これらのことから、ALDH1A3 はレチノール経路を介してがん

幹細胞、ひいてはがん細胞の生存に寄与していることが示唆される。

また ALDH1A3 と mTOR 経路の関係については、レチノール経路も寄与している可能性が示唆される。レチノール自体が insulin-like growth factor-1 receptor を介して PI3K/Akt 経路の活性化によりマウスの胚性幹細胞の自己複製能に寄与するという報告がある[108]。Akt 経路と mTOR 経路が繋がっていることを加味し、これを本研究に当てはめると、ALDH1A3 を抑制することにより、レチノール合成経路を阻害し、mTOR 経路を不活性化することで、がん幹細胞の自己複製能や増殖に寄与している可能性が示唆される。

第4章 総括

患者由来胃癌細胞のシングルセル解析により、胃系譜関連因子、胃幹細胞関連因子、抗がん剤により発現が亢進する因子の発現が、細胞傷害性抗がん剤処理前の段階から細胞ごとに不均一性を示すことが明らかになった。ここに細胞傷害性抗がん剤を処理するとこれらの遺伝子の一部の発現が亢進したが、その中でも特に ALDH1A3 は、発現が亢進するとともに、発現の不均一性も変動することが示された。また、この患者由来胃癌細胞に細胞傷害性抗がん剤を処理した時に ALDH1A3 の発現が亢進したことに関して、複数の患者由来胃癌細胞および複数の細胞傷害性抗がん剤でも同様の知見が得られた。

これらのことから ALDH1A3 は患者由来胃癌細胞に共通で、抗がん剤処理後の残存細胞における重要な因子であることが示唆された。これまで報告されてきた多くの検討では、マイクロアレイ解析やウェスタンブロットティングなどの手法を用いており、細胞集団全体の平均像で遺伝子発現を評価するに留まっていた。しかしながら、本研究で行ったシングルセル解析により細胞間での不均一性を評価することで、ALDH1A3 を persister 関連因子として同定するに至った。また、複数のがん幹細胞マーカーを指標とした胃幹細胞関連因子についてシングルセル解析を行ったため、がん幹細胞マーカーの中でも特に ALDH1A3 が persister に寄与している可能性が見出された。

シングルセル解析では薬剤未処理の分画と 5-FU 処理後の分画が明確に区別されたが、未処理の分画の一部は 5-FU 処理後の分画に分類された。一方で、5-FU 処理後の分画の一部は未処理の分画に分類された。これらの細胞分画が薬剤抵抗性に寄与している可能性が示唆された。抗がん剤処理後の分画に分類される未処理の分画においても、他の未処理の分画と比較して、ALDH1A3 の遺伝子発現が亢進していた。しかし、抗がん剤処理後の大部分における ALDH1A3 の発現は、この分画の発現よりもさらに亢進していた。したがって、患者由

来胃がん細胞における ALDH1A3 を含む複数の遺伝子発現の亢進は、細胞の残存によるものと抗がん剤による発現誘導によるものの、双方が寄与している可能性が示唆された。修士課程の研究においては、抗がん剤処理後の残存分画では CD44v の発現が亢進していることが示されたが、本研究ではそのメカニズムとして薬剤耐性細胞の残存と適応遺伝子の発現誘導の双方が寄与していることを示した。シングルセル解析によって得られた知見は、この結果を支持するものであった。さらには抗がん剤抵抗性の原因となりうる要素として、薬剤抵抗性を示す細胞分画の残存と遺伝子発現誘導による適応応答の双方が寄与している可能性が示唆された。

患者由来胃がん JSC15-3 細胞において ALDH1A3 の発現を一過的に抑制するとコロニー増殖能が低下し、そこに 5-FU を処理するとさらにコロニー増殖能が低下した。また、抗がん剤により、ALDH1A3 は ALDH ファミリーの中でも突出して発現が亢進することが明らかとなった。加えて、ALDH1A3 は *in vitro* でも *in vivo* でも抗がん剤処理後の残存分画において高発現していることが明らかになった。さらに、ALDH1A3 の発現が亢進している胃がんほど、悪性度が高い可能性が示唆された。以上の結果より、ALDH1A3 が胃がんそのもの、あるいは、抗がん剤処理後の残存分画の生存増殖に寄与していることが示唆された。ALDH1A3 の発現を恒常的に抑制した際にも、細胞増殖能の低下が見られ、そこに細胞傷害性抗がん剤を処理すると、更なる細胞増殖能の低下が見られた。この抑制状態の細胞について、包括的遺伝子発現解析を行ったところ、mTOR 経路の寄与が示唆された。実際に、ALDH1A3 の発現を恒常的に抑制した状態下で、mTOR 経路介在因子の P70S6K のリン酸化レベルの低下が見られた。この状態下で 5-FU を処理すると、アポトーティックな分画の割合が増加した。さらに mTOR 阻害剤テムシロリムスを患者由来胃がん細胞に処理したところ、細胞増殖を抑制した。そこに、5-FU を処理することで、相乗効果までは見られなかったが、より強い細胞増殖抑制効果が見られた。これらの結果から、ALDH1A3 は mTOR 経路を介して、がん細胞および抗がん剤処理後の残存細胞の生存に寄与していることが示唆さ

れた。このことと第3章の結果を加味すると、患者由来胃がんにおける細胞傷害性抗がん剤 5-FU との併用が有効と考えられる薬剤の候補として、mTOR 阻害剤、ALDH 阻害剤、トレチノイン等が考えられる。mTOR 阻害剤に関しては、第3章でも述べた通り、5-FU との併用が細胞増殖の抑制に有効であるという結果が得られている。実際に、mTOR 阻害剤は臨床で腎がんなどの治療薬として使用されており、胃がんにおける persister 細胞の減少という観点においてもその有用性が期待される。ALDH 阻害剤に関しては、古くより用いられているジスルフィラムが有名である。この薬剤は抗がん剤ではないが、検酒薬にも使用されていることを考えると、副作用の影響も低く実用的であると考えられる。また近年では、乳がんにおいてシトラールが ALDH1A3 を特異的に抑制するという報告がある[109]。本検討でも、第2章の 2-1 において、ALDH ファミリーの中でも特に ALDH1A3 が抗がん剤残存分画で高発現していたので、このような ALDH1A3 特異的な阻害剤も併用に有効であると考えられる。トレチノインに関しても、第3章の考察で示した通り、白血病の治療で使われていることを考えると有用であると考えられる。しかしながら、レチノイン酸症候群など重篤な副作用を生じる場合があるので、併用には十分な注意が必要である。

以上のように本研究では、患者由来胃がん細胞において抗がん剤処理後の残存細胞のマーカーになり得て、かつ、生存増殖に寄与する遺伝子として ALDH1A3 を同定した。ALDH1A3 は mTOR 経路を介し、がん細胞の生存増殖に寄与することが示唆された。これらの知見は、5-FU と mTOR 阻害剤や ALDH1A3 阻害剤、トレチノインとの併用が、胃がんの薬物療法に有効である可能性を示唆しており、臨床の場で使用される新たな治療法として有用な可能性を秘めている。

参考文献

1. Our World in data (<https://ourworldindata.org/>) 最終アクセス：2019年12月3日
2. 「がんの統計'18」公益財団法人がん研究振興財団
3. 「進化するがん創薬」清宮啓之編、化学同人 2019年6月
4. Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>) 最終アクセス：2019年12月3日
5. Yamaguchi N, Kakizoe T. Synergistic interaction between *Helicobacter pylori* gastritis and diet in gastric cancer. *Lancet Oncol*, 2: 88-94 (2001)
6. 胃癌の構造 第2版 中村恭一 医学書院 1990年9月
7. 胃癌の Borrmann 分類とは何か—原点よりの考察 望月 孝規 pp.831-840
発行日 1986年8月25日 胃と腸 21巻8号 (1986年8月)
8. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma; diffuse and so-called intestinal-type carcinoma, an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 64: 31-49 (1965)
9. Mulligan RM, Rember RR. Histogenesis and biologic behavior of gastric carcinoma: study of one hundred thirty-eight cases. *AMA Arch Pathol*, 58: 1-25 (1954)
10. Ming SC. Gastric carcinoma, a pathobiological classification. *Cancer*, 39: 2475-2485 (1977)
11. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513: 202-209 (2014)
12. Odes EJ, Randolph-Quinney PS, Steyn M, Throckmorton Z, Smilg JS, Zipfel B, Augustine TN, de Beer F, Hoffman JW, Franklin RD, Berger LR. Earliest hominin cancer: 1.7-million-year old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *S Afr J Sci*, vol 112 (2016)

13. 華岡青洲による最初の全身麻酔の期日について、松木明知 (弘大麻醉科)、日本医史学雑誌 (0549-3323)19 卷 2 号: 193-197 (1973)
14. Röntgen WC. On a new kind of rays. *Science*, 3: 227-231 (1896)
15. Rhoads CP. Nitrogen mustards in the treatment of neoplastic disease; official statement. *J Am Med Assoc*, 131: 656-658 (1946)
16. Genentech and IDEC await approval of lymphoma Mab. *Nat Biotechnol*, 15: 301 (1997)
17. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, Lydon NB. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2: 561-566 (1996).
18. Robertson D. Genentech's anticancer Mab expected by November. *Nat Biotechnol*, 16: 615 (1998)
19. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 344: 783-792 (2001)
20. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448: 561-566 (2007).
21. Zou HY, Li Q, Lee JH, Arango ME, McDonnell SR, Yamazaki S, Koudriakova TB, Alton G, Cui JJ, Kung PP, Nambu MD, Los G, Bender SL, Mroczkowski B, Christensen JG. An orally available small-molecule inhibitor of c-Met, PF-2341066, exhibits cytoreductive antitumor efficacy through antiproliferative and antiangiogenic mechanisms. *Cancer Res*, 67: 4408-4417 (2007)
22. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, Damiano V, Pomatice G, De Placido S, Bianco AR, Tortora G. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*, 6: 2053-2063 (2000)

23. Seidman A, Hudis C, Pierri MK, Shak S, Paton V, Ashby M, Murphy M, Stewart SJ, Keefe D. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol*, 20: 1215-1221 (2002)
24. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, Utriainen T, Kokko R, Hemminki A, Tarkkanen M, Turpeenniemi-Hujanen T, Jyrkkiö S, Flander M, Helle L, Ingalsuo S, Johansson K, Jääskeläinen AS, Pajunen M, Rauhala M, Kaleva-Kerola J, Salminen T, Leinonen M, Elomaa I, Isola J; FinHer Study Investigators. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med*, 354: 809-820 (2006)
25. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*, 361: 947-957 (2009)
26. Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, 221: 1285-1288 (1983)
27. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, Kris MG, Varmus H. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med*, 2: e73 (2005)
28. Cross DA, Ashton SE, Ghiorghiu S, Eberlein C, Nebhan CA, Spitzler PJ, Orme JP, Finlay MR, Ward RA, Mellor MJ, Hughes G, Rahi A, Jacobs VN, Red Brewer M, Ichihara E, Sun J, Jin H, Ballard P, Al-Kadhimi K, Rowlinson R, Klinowska T, Richmond GH, Cantarini M, Kim DW, Ranson MR, Pao W. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov*, 4: 1046-1061 (2014)
29. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, Lai Z, Markovets A, Vivancos A, Kuang Y, Ercan D, Matthews SE, Cantarini M, Barrett JC, Jänne PA, Oxnard GR. Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med*, 21: 560-562 (2015)
30. ライフサイエンス辞書 (<https://lsd-project.jp/cgi-bin/lsdproj/ejlookup04.pl>)
31. Gefen O, Gabay C, Mumcuoglu M, Engel G, Balaban NQ. Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*

A, 105: 6145-6149. (2008)

32. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell*, 141: 69-80 (2010)

33. Liao BB, Sievers C, Donohue LK, Gillespie SM, Flavahan WA, Miller TE, Venteicher AS, Hebert CH, Carey CD, Rodig SJ, Shareef SJ, Najm FJ, van Galen P, Wakimoto H, Cahill DP, Rich JN, Aster JC, Suvà ML, Patel AP, Bernstein BE. Adaptive chromatin remodeling drives glioblastoma stem cell plasticity and drug tolerance. *Cell Stem Cell*, 20: 233-246 (2017)

34. Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, Bole D, Eaton JK, Matov A, Galeas J, Dhruv HD, Berens ME, Schreiber SL, McCormick F, McManus MT. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature*, 551: 247-250 (2017)

35. 胃癌治療ガイドライン 第4版 日本胃癌学会
(<http://www.jgca.jp/guideline/fourth/index.html>)

36. Yoshida GJ, Saya H. Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. *Cancer Sci*, 107: 5–11 (2016)

37. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer*, 8: 755–768 (2008).

38. Taniguchi H, Moriya C, Igarashi H, Saitoh A, Yamamoto H, Adachi Y, Imai K. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer. *Cancer Sci*, 107: 1556–1562 (2016)

39. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367: 645–648 (1994)

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

41. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective

identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 3983–3988 (2003)

42. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1: 555–567 (2007)

43. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432: 396–401 (2004)

44. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445: 111–115 (2007)

45. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445: 111–115 (2007)

46. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 10158–10163 (2007)

47. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 3722–3727 (2010)

48. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 1: 313–323 (2007)

49. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67: 1030–1037 (2007)

50. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P, Chu PW, Lam CT, Poon RT, Fan ST. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*, 13: 153–166 (2008)

51. Rountree CB, Senadheera S, Mato JM, Crooks GM, Lu SC. Expansion of liver cancer stem cells during aging in methionine adenosyltransferase 1A-deficient mice. *Hepatology*, 47: 1288–97 (2008)

52. Zhao JS, Li WJ, Ge D, Zhang PJ, Li JJ, Lu CL, Ji XD, Guan DX, Gao H, Xu LY, Li EM, Soukiasian H, Koeffler HP, Wang XF, Xie D. Tumor initiating cells in esophageal squamous cell carcinomas express high levels of CD44. *PLoS One*, 6: e21419 (2011)
53. Katsuno Y, Ehata S, Yashiro M, Yanagihara K, Hirakawa K, Miyazono K. Coordinated expression of REG4 and aldehyde dehydrogenase 1 regulating tumorigenic capacity of diffuse-type gastric carcinoma-initiating cells is inhibited by TGF- β . *J Pathol*, 228: 391–404 (2012)
54. Wang B, Chen Q, Cao Y, Ma X, Yin C, Jia Y, Zang A, Fan W. LGR5 is a gastric cancer stem cell marker associated with stemness and the EMT signature genes NANOG, NANOGP8, PRRX1, TWIST1, and BMI1. *PLoS One*, 11: e0168904 (2016)
55. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SS, Shibata W, Vigneshwaran R, Gordon SA, Shimada Y, Wang TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*, 27: 1006–1020 (2009)
56. Lau WM, Teng E, Chong HS, Lopez KA, Tay AY, Salto-Tellez M, Shabbir A, So JB, Chan SL. CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells. *Cancer Res*, 74: 2630–2641 (2014)
57. Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*, 304: 30-34 (1983)
58. Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM, Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell*, 56: 1057–1062 (1989)
59. Goldstein LA, Zhou DF, Picker LJ, Minty CN, Bargatze RF, Ding JF, Butcher EC. A human lymphocyte homing receptor, the hermes antigen, is related to cartilage proteoglycan core and link proteins. *Cell*, 56: 1063–1072 (1989)
60. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*, 61: 1303–1313 (1990)
61. Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat

carcinoma cells. *Cell*, 65: 13–24 (1991)

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

63. Song Z, Yue W, Wei B, Wang N, Li T, Guan L, Shi S, Zeng Q, Pei X, Chen L. Sonic hedgehog pathway is essential for maintenance of cancer stem-like cells in human gastric cancer. *PLoS One*, 6: e17687 (2011)

64. Yoon C, Park DJ, Schmidt B, Thomas NJ, Lee HJ, Kim TS, Janjigian YY, Cohen DJ, Yoon SS. CD44 expression denotes a subpopulation of gastric cancer cells in which Hedgehog signaling promotes chemotherapy resistance. *Clin Cancer Res*, 20: 3974–3988 (2014)

65. Xu M, Gong A, Yang H, George SK, Jiao Z, Huang H, Jiang X, Zhang Y. Sonic hedgehog-glioma associated oncogene homolog 1 signaling enhances drug resistance in CD44(+)/Musashi-1(+) gastric cancer stem cells. *Cancer Lett*, 369: 124–133 (2015)

66. Yoon C, Cho SJ, Aksoy BA, Park DJ, Schultz N, Ryeom SW, Yoon SS. Chemotherapy resistance in diffuse-type gastric adenocarcinoma is mediated by RhoA activation in cancer stem-like cells. *Clin. Cancer Res*, 22: 971–983 (2016)

67. Yashiro M, Nishii T, Hasegawa T, Matsuzaki T, Morisaki T, Fukuoka T, Hirakawa K. A c-Met inhibitor increases the chemosensitivity of cancer stem cells to the irinotecan in gastric carcinoma. *Br J Cancer*, 109: 2619-2628 (2013)

68. McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, Tsai YH, Mayhew CN, Spence JR, Zavros Y, Wells JM. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*, 516: 400-404 (2014)

69. Lee ER, Trasler J, Dwivedi S, Leblond CP. Division of the mouse gastric mucosa into zymogenic and mucous regions on the basis of gland features. *Am J Anat*, 164:187-207 (1982)

70. Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, Sato T, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Danenberg E, van den Brink S, Korving J, Abo A, Peters PJ, Wright N,

Poulsom R, Clevers H. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*, 6: 25-36 (2010)

71. Choi E, Roland JT, Barlow BJ, O'Neal R, Rich AE, Nam KT, Shi C, Goldenring JR. Cell lineage distribution atlas of the human stomach reveals heterogeneous gland populations in the gastric antrum. *Gut*, 63: 1711-1720 (2014)

72. Hoffmann W. Current status on stem cells and cancers of the gastric epithelium. *Int J Mol Sci*, 16: 19153-19169 (2015)

73. Leushacke M, Tan SH, Wong A, Swathi Y, Hajamohideen A, Tan LT, Goh J, Wong E, Denil SLIJ, Murakami K, Barker N. Lgr5-expressing chief cells drive epithelial regeneration and cancer in the oxyntic stomach. *Nat Cell Biol*, 19: 774-786 (2017)

74. Huang Q, Zou X. Clinicopathology of early gastric carcinoma: an update for pathologists and gastroenterologists. *Gastrointest Tumors*, 3: 115-124 (2017)

75. What is stomach cancer? (<http://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/about/what-is-stomach-cancer.html>) American Cancer Society, Inc. 最終アクセス : 2019 年 12 月 3 日

76. Aloia L, Mckie MA, Huch M. Cellular plasticity in the adult liver and stomach. *J Physiol*, 594: 4815-4825 (2016)

77. Quante M, Bhagat G, Abrams JA, Marache F, Good P, Lee MD, Lee Y, Friedman R, Asfaha S, Dubeykovskaya Z, Mahmood U, Figueiredo JL, Kitajewski J, Shawber C, Lightdale CJ, Rustgi AK, Wang TC. Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia. *Cancer Cell*, 21: 36-51 (2012)

78. Brungs D, Aghmesheh M, Vine KL, Becker TM, Carolan MG, Ranson M. Gastric cancer stem cells: evidence, potential markers, and clinical implications. *J Gastroenterol*, 51: 313-326 (2016)

79. Hayakawa Y, Ariyama H, Stancikova J, Sakitani K, Asfaha S, Renz BW, Dubeykovskaya ZA, Shibata W, Wang H, Westphalen CB, Chen X, Takemoto Y, Kim W, Khurana SS, Taylor Y, Nagar K, Tomita H, Hara A, Sepulveda AR, Setlik W, Gershon MD, Saha S, Ding L, Shen Z, Fox JG, Friedman RA, Konieczny SF, Worthley DL, Korinek V, Wang TC. Mist1 expressing gastric stem cells maintain the normal and neoplastic gastric epithelium and are supported by a perivascular stem cell niche.

Cancer Cell, 28: 800–814 (2015)

80. Mills JC, Shivdasani RA. Gastric epithelial stem cells. *Gastroenterology*, 140: 412–424 (2011)
81. Saikawa Y, Fukuda K, Takahashi T, Nakamura R, Takeuchi H, Kitagawa Y. Gastric carcinogenesis and the cancer stem cell hypothesis. *Gastric Cancer*, 13: 11-24 (2010)
82. Nguyen PH, Giraud J, Chambonnier L, Dubus P, Wittkop L, Belleannée G, Collet D, Soubeyran I, Evrard S, Rousseau B, Senant-Dugot N, Mégraud F, Mazurier F, Varon C. Characterization of biomarkers of tumorigenic and chemoresistant cancer stem cells in human gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*, 23: 1586-1597. (2017)
83. Chen T, Yang K, Yu J, Meng W, Yuan D, Bi F, Liu F, Liu J, Dai B, Chen X, Wang F, Zeng F, Xu H, Hu J, Mo X. Identification and expansion of cancer stem cells in tumor tissues and peripheral blood derived from gastric adenocarcinoma patients. *Cell Res*, 22: 248– 258 (2012)
84. Fujita T, Chiwaki F, Takahashi RU, Aoyagi K, Yanagihara K, Nishimura T, Tamaoki M, Komatsu M, Komatsuzaki R, Matsusaki K, Ichikawa H, Sakamoto H, Yamada Y, Fukagawa T, Katai H, Konno H, Ochiya T, Yoshida T, Sasaki H. Identification and characterization of CXCR4-positive gastric cancer stem cells. *PLoS One*, 10: e0130808 (2015)
85. Han ME, Jeon TY, Hwang SH, Lee YS, Kim HJ, Shim HE, Yoon S, Baek SY, Kim BS, Kang CD, Oh SO. Cancer spheres from gastric cancer patients provide an ideal model system for cancer stem cell research. *Cell Mol Life Sci*, 68: 3589– 3605 (2011)
86. Jiang Y, He Y, Li H, Li HN, Zhang L, Hu W, Sun YM, Chen FL, Jin XM. Expressions of putative cancer stem cell markers ABCB1, ABCG2, and CD133 are correlated with the degree of differentiation of gastric cancer. *Gastric Cancer*, 15: 440– 450 (2012)
87. Hashimoto K, Aoyagi K, Isobe T, Kouhujii K, Shirouzu K. Expression of CD133 in the cytoplasm is associated with cancer progression and poor prognosis in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 17: 97– 106 (2014)
88. Chen XL, Chen XZ, Wang YG, He D, Lu ZH, Liu K, Zhang WH, Wang W, Li CC, Xue L, Zhao LY, Yang K, Liu JP, Zhou ZG, Hu JK, Mo XM. Clinical significance of putative markers of cancer stem cells in gastric cancer: a retrospective cohort study. *Oncotarget*, 7: 62049-62069. (2016)

89. Gong X, Azhdarinia A, Ghosh SC, Xiong W, An Z, Liu Q, Carmon KS. LGR5-targeted antibody-drug conjugate eradicates gastrointestinal tumors and prevents recurrence. *Mol Cancer Ther*, 15: 1580-1590 (2016)
90. Fukamachi H, Seol HS, Shimada S, Funasaka C, Baba K, Kim JH, Park YS, Kim MJ, Kato K, Inokuchi M, Kawachi H, Yook JH, Eishi Y, Kojima K, Kim WH, Jang SJ, Yuasa Y. CD49f(high) cells retain sphere-forming and tumor-initiating activities in human gastric tumors. *PLoS One*, 8: e72438 (2013)
91. Shiokawa D, Sato A, Ohata H, Mutoh M, Sekine S, Kato M, Shibata T, Nakagama H, Okamoto K. The induction of selected Wnt target genes by Tcf1 mediates generation of tumorigenic colon stem cells. *Cell Rep*, 19: 981-994 (2017)
92. Kohn FR, Sladek NE. Aldehyde dehydrogenase activity as the basis for the relative insensitivity of murine pluripotent hematopoietic stem cells to oxazaphosphorines. *Biochem Pharmacol*, 34: 3465-3471 (1985)
93. Kohn FR, Landkamer GJ, Manthey CL, Ramsay NK, Sladek NE. Effect of aldehyde dehydrogenase inhibitors on the ex vivo sensitivity of human multipotent and committed hematopoietic progenitor cells and malignant blood cells to oxazaphosphorines. *Cancer Res*, 47: 3180-3185 (1987)
94. Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, Allen K, Rohatiner AZ, Lister TA, Bonnet D. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*, 23: 752-760 (2005)
95. Croker AK, Rodriguez-Torres M, Xia Y, Pardhan S, Leong HS, Lewis JD, Allan AL. Differential functional roles of ALDH1A1 and ALDH1A3 in mediating metastatic behavior and therapy resistance of human breast cancer cells. *Int J Mol Sci*, 18: E2039 (2017)
96. Feng H, Liu Y, Bian X, Zhou F, Liu Y. ALDH1A3 affects colon cancer in vitro proliferation and invasion depending on CXCR4 status. *Br J Cancer*, 118: 224-232 (2018)
97. Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is

primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells*, 29: 32-45 (2011)

98. Cheng P, Wang J, Waghmare I, Sartini S, Coviello V, Zhang Z, Kim SH, Mohyeldin A, Pavlyukov MS, Minata M, Valentim CL, Chhipa RR, Bhat KP, Dasgupta B, La Motta C, Kango-Singh M, Nakano I. FOXD1-ALDH1A3 signaling is a determinant for the self-renewal and tumorigenicity of mesenchymal glioma stem cells. *Cancer Res*, 76: 7219-7230 (2016)

99. Pérez-Alea M, McGrail K, Sánchez-Redondo S, Ferrer B, Fournet G, Cortés J, Muñoz E, Hernandez-Losa J, Tenbaum S, Martin G, Costello R, Ceylan I, Garcia-Patos V, Recio JA. ALDH1A3 is epigenetically regulated during melanocyte transformation and is a target for melanoma treatment. *Oncogene*, 36: 5695-5708 (2017)

100. Chen Z, Wang HW, Wang S, Fan L, Feng S, Cai X, Peng C, Wu X, Lu J, Chen D, Chen Y, Wu W, Lu D, Liu N, You Y, Wang H. USP9X deubiquitinates ALDH1A3 and maintains mesenchymal identity in glioblastoma stem cells. *J Clin Invest*, 129: 2043-2055 (2019)

101. Lorenzen S, Riera-Knorrenschild J, Pauligk C, Goetze TO, Hegewisch-Becker S, Seraphin J, Thuss-Patience PC, Kopp HG, Dechow TN, Vogel A, Luley KB, Pink D, Stahl M, Kullmann F, Hebart HF, Siveke JT, Egger M, Homann N, Probst S, Al-Batran SE. A randomized, double-blind, multi-center phase III study evaluating paclitaxel with and without RAD001 in patients with gastric or esophagogastric junction carcinoma who have progressed after therapy with a fluoropyrimidine/platinum-containing regimen (RADPAC). *J Clin Oncol*, 35: 4027. (2017)

102. Lee SJ, Lee J, Lee J, Park SH, Park JO, Park YS, Lim HY, Kim KM, Do IG, Jung SH, Yim DS, Kang WK. Phase II trial of capecitabine and everolimus (RAD001) combination in refractory gastric cancer patients. *Invest New Drugs*, 31: 1580-1586 (2013)

103. Sima A, Parisotto M, Mader S, Bhat PV. Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790, 1660–1664 (2009).

104. Moretti A, Li J, Donini S, Sobol RW, Rizzi M, Garavaglia S. Crystal structure of human aldehyde dehydrogenase 1A3 complexed with NAD⁺ and retinoic acid. *Sci Rep*, 6: 35710 (2016)

105. Dupé V, Matt N, Garnier JM, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. A newborn lethal defect

due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14036–14041 (2003).

106. Fan X, Molotkov A, Manabe S, Donmoyer CM, Deltour L, Foglio MH, Cuenca AE, Blaner WS, Lipton SA, Duester G. Targeted disruption of *Aldh1a1* (*Raldh1*) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol Cell Biol*, 23: 4637-4648 (2003)

107. Sullivan KE, Rojas K, Cerione RA, Nakano I, Wilson KF. The stem cell/cancer stem cell marker *ALDH1A3* regulates the expression of the survival factor tissue transglutaminase, in mesenchymal glioma stem cells. *Oncotarget*, 8: 22325–22343 (2017)

108. Chen L, Khillan JS. A novel signaling by Vitamin A/Retinol promotes self renewal of mouse embryonic stem cells by activating PI3K/Akt signaling pathway via Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor. *Stem Cells*, 28: 57-63 (2010)

109. Thomas ML, de Antueno R, Coyle KM, Sultan M, Cruickshank BM, Giacomantonio MA, Giacomantonio CA, Duncan R, Marcato P. Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker *ALDH1A3*. *Mol Oncol*, 10: 1485-1496 (2016)

謝辞

本研究を進めるにあたり、日頃より並々ならぬご指導ご鞭撻を頂きました、公益財団法人がん研究会がん化学療法センター分子生物治療研究部部長の清宮啓之先生に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、本研究において、日々のディスカッションから実験手技まで幅広くご指導頂きました、同研究部主任研究員の馬島哲夫先生に心より感謝申し上げます。そして、本研究において、臨床細胞の培養などにおいて技術指導を頂きました、同研究部特任研究助手の川田直美様、ヘマトキシリン・エオジン染色や免疫組織染色などの染色した切片に関して、観察方法や考え方等をご指導頂きました同研究部客員研究員の右田敏郎先生、修士課程に動物実験について詳細にご指導頂きました同研究部特任研究助手の吉田喜香様、リアルタイム定量 PCR を含む種々の実験についてご指導頂きました同研究部特任研究員の水谷アンナ先生、コロニーアッセイの詳細な解析方などについてご指導頂きました同研究部博士研究員の岡本啓治先生に心より感謝申し上げます。

さらに、患者腫瘍由来臨床胃がん細胞の樹立にご協力頂きました、公益財団法人がん研究会がん研有明病院消化器センター胃外科医長兼栄養管理部部長の熊谷厚志先生、本研究を支えて頂きました、同センター胃外科院長の佐野武先生、同センター消化器化学療法科部長の山口研成先生、同センター消化器化学療法科前部長の水沼信之先生に心より感謝申し上げます。

加えて、日々の議論を通して、様々な知識や示唆、ご指導を頂き、公私ともにご尽力頂きました分子生物治療研究部の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、この3年間を含めて、これまでずっと支え続けて、また励まして下さった両親に心より感謝申し上げます。