

## 博士論文

論文題目 Epstein-Barr virus が幹細胞性に与える影響と発癌への関与

氏名 沼倉 里枝

## 目 次

I. 要 旨.....	1
II. 序 文.....	2
1. 癌幹細胞仮説 Cancer Stem Cell Hypothesis.....	2
2. Epstein-Barr Virus (EBV) 関連胃癌と Viral carcinogenesis .....	4
3. 癌幹細胞仮説と EBV .....	7
III. 方 法.....	9
1. 細胞株.....	9
2. 細胞培養.....	10
2-1. 二次元培養.....	10
2-2. 三次元培養.....	10
3. Spheroid 形態解析 .....	10
3-1. フラクタル解析.....	10
3-2. Three-dimentional (3D) interactive surface plot .....	11
4. Three-dimentional (3D) Tumor Spheroid invasion assay と免疫染色.....	11
5. コロニーアッセイ .....	12
5-1. コラーゲンゲルを用いた足場依存性コロニーアッセイ.....	12
5-2. 軟寒天培地での足場非依存性コロニーアッセイ.....	12
6. マイクロアレイ発現解析.....	13
6-1. Pathway 解析.....	13
6-2. 変動遺伝子発現解析.....	14
7. Real-time qRT-PCR .....	14
8. Western Blot.....	16
9. セルブロックとヒト胃癌 Tissue Microarray (TMA) 免疫組織化学.....	16
10. Fluorescence-activated cell sorting: FACS .....	17
11. Magnetic activated cell sorting: MACS .....	18

12. ノードマウス移植実験.....	18
13. トランスジェニックマウス (C57BL6/J).....	19
14. トランスジェニックマウスの胃解剖と組織学的評価.....	20
14-1. 胃解剖.....	20
14-2. 組織学的評価.....	20
14-2-1. 腫瘍の評価.....	20
14-2-2. 炎症の評価.....	21
15. トランスジェニックマウスの胃組織に対する免疫組織化学.....	22
<b>IV. 結果.....</b>	<b>23</b>
<b>1. Epstein-Barr Virus (EBV) 感染上皮細胞の幹細胞性.....</b>	<b>23</b>
1-1. 胃正常上皮細胞株にみる EBV 感染での spheroid 形態の変化.....	23
1-1-1. U 底細胞低吸着プレートでの 3 次元培養.....	23
1-1-2. コラーゲンゲルの中での spheroid 培養.....	27
1-1-3. コラーゲンゲルを用いた足場依存性コロニー形成.....	29
1-2. 幹細胞性関連遺伝子の発現変動.....	31
1-2-1. 全遺伝子に対する発現変動遺伝子解析.....	31
1-2-2. 多能性関連遺伝子の発現と CD44.....	35
<b>2. Epstein-Barr virus (EBV) 感染と CD44.....</b>	<b>38</b>
2-1. GES1-EBV での CD44v6 の発現.....	38
2-2. EBV 関連胃癌での CD44v6 の発現.....	42
2-3. 胃癌細胞株での CD44v6 の発現.....	45
2-4. EBV 関連胃癌細胞株 SNU719 での Cancer Stem cell 単離の試み.....	45
2-4-1. SNU719 での CD44v6 と CD133 の共発現.....	45
2-4-2. CD44v6 陽性群と陰性群でのコロニー形成の比較.....	50
2-4-3. CD44v6 陽性群と陰性群でのノードマウスにおける腫瘍形成.....	50

<b>3. Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) と Stemness Enrichment .....</b>	<b>53</b>
3-1. LMP2A 導入 GES1 細胞株 (GES1-LMP2A) の幹細胞性.....	53
3-1-1. GES1-LMP2A の足場依存性コロニー形成 .....	54
3-1-2. GES1-LMP2A での spheroid 形態の変化 .....	54
3-1-3. GES1-LMP2A での CD44v6 蛋白の発現.....	54
3-2. LMP2A と発癌 .....	58
3-2-1. トランスジェニックマウスでの胃腫瘍形成 .....	58
3-2-2. LMP2A/C2mE マウスでの Cd44 発現 .....	62
3-2-3. 腫瘍と stemness enrichment、Cd44 発現 .....	64
3-2-4. LMP2A と CD44v6 発現.....	67
3-2-5. CD44v6 と組織学的炎症.....	71
<b>V. 考 察.....</b>	<b>76</b>
1. EBV 感染上皮の幹細胞性.....	76
2. EBV 感染上皮における CD44v6 .....	78
3. LMP2A と発癌.....	80
4. EBV 感染と胃粘膜発癌.....	81
<b>VI. 結 論.....</b>	<b>83</b>
<b>VII. 引 用 文 献.....</b>	<b>84</b>

## I. 要 旨

Epstein-Barr virus (EBV) と悪性腫瘍との関連は以前より知られてきたが、EBV 感染の発癌メカニズムに関しては未だ結論が出ていない。本研究で、私は、EBV が癌幹細胞様性格を誘導する可能性について研究した。ヒト胎児正常胃上皮細胞株の EBV 感染株において、Spheroid 形態やコロニー形成、マイクロアレイ発現解析、CD44v6 発現など EBV 関連胃癌細胞株 SNU719 との類似性・移行性について検討した。さらに EBV 潜伏感染遺伝子 LMP2A の役割について、同様の検討を加えるとともに、LMP2A トランスジェニックマウスを用い幹細胞性の誘導と炎症の促進作用が胃発癌に重要である可能性を見出した。

## II. 序 文

### 1. 癌幹細胞仮説 Cancer Stem Cell Hypothesis

癌幹細胞仮説は、古くは、Rudolph Virchow の説に遡るとされている。

彼は “Rest Embryonal Hypothesis of cancer origin” という題で概念を提唱したが[1-3]、

その概念の原基は 1829 年の Recamier によるものが最初とされている[4]。その後、

Durante、Julius Cohnheim による成熟組織内の胎児遺残説が加えられてほぼ完成したも

のとなり、正常組織の一部には胎児遺残組織が存在しており、何かの契機で活性化し、

癌となるのではないかと考えられるようになった[5]。その後、この仮説は、cancer は

活性化した germ cells あるいは異所性胎盤組織から生じるとする Beard の説へと発展

していくが、当時の歴史・技術的背景などから概念の域をこえることはなかった。

腫瘍構成細胞の一部に腫瘍形成能があることを最初に示したのが Southam と

Brunschwig の、再発癌患者から採取した癌細胞を同じ患者の他の部位へ移植する実験

である[6]。ここでわかったことは、移植した先で新しく腫瘍を形成するためには少な

くとも  $10^8$  個の腫瘍細胞が必要であるということであった。その後、in vitro での colony

initiation 実験[7]、急性骨髄白血病患者の CD34+CD38- cells は non-obese diabetic/severe

combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice で腫瘍を形成するにもかかわらず、より

分化した CD34+CD38+ cells では大量であっても腫瘍形成することはないという

Lapidot らによる実験[8]、乳癌でも同様の所見が得られる[9]ことが報告され、癌幹細胞仮説での根幹となる腫瘍内 hierarchy の概念へとつながっていくのである。癌幹細胞仮説では、腫瘍とは分化度の異なる heterogenous な細胞集団で[10]、腫瘍形成能を有するのは、その中のごく一部の未熟な細胞であり、その点において腫瘍の中で hierarchy を形成しているとする。また、その未熟な細胞が腫瘍を形成するには絶対数が必要である (Stemness Enrichment)。組織の幹細胞と癌幹細胞とは、自己増殖能、多分化能において共通点を有するほか、組織固有の発現パターンなど他にも類似点が多いことなどから、癌幹細胞は組織幹細胞、あるいは、前駆細胞に由来するという考えがある[11]。しかし、まだその実態については不明な点が多い。

癌幹細胞の特徴的な性質である腫瘍形成能を実験的に証明する方法として、免疫不全マウスに移植し腫瘍形成をみる方法がある。一方、癌幹細胞の実験的同定法として、Side population、sphere 培養、そして、細胞表面マーカーによる方法が知られている。現在、多くの癌での発現が知られているのは CD133 と CD44 である[12]が、胃癌においては CD44 を支持する報告が多い[13,14]。CD44 にはヒアルロン酸を始めとする細胞外基質受容体としての機能が知られる所謂 standard form と alternative splicing の段階において生み出される variants が存在する。いずれも胎生期の発達において特に重要な役割を果たすことが知られているものの[6]、特に近年癌との関連での報告が目立

つのが CD44 variants (CD44v) であり[15-17]、癌では CD44 の alternative splicing が異常であると考えられる研究者もいる[18]。慢性骨髄性白血病では CD44v 発現の背景に、embryonal reprogramming の存在を示唆する報告も存在する[19]。CD44v の中でも、variant 9 (CD44v9) [20-24]と CD44 variant 6 (CD44v6) を癌幹細胞マーカー候補として支持する文献は少なくない[25-27]。CD44v6 の発現は過去に Fukayama らのグループによって Epstein-Barr Virus (EBV) 関連胃癌との関連が示唆されていた[28]。

## 2. Epstein-Barr Virus (EBV) 関連胃癌と Viral carcinogenesis

Epstein-Barr Virus (EBV) は全世界人口の 98%程度に感染しているとされるが、その中の一部に様々な Malignancies を発症することが知られている。胃癌もそのうちの一つであり、EBV 関連胃癌 (EBVaGC) は胃癌全体のおよそ 6-16%を占め[29-30]、固有の臨床病理学的特徴を有することが知られている[31]。臨床的には、噴門部や体部に好発し、組織学的には、小型の腺管が互いに癒合し全体として網目状を呈するような形態 (Lace pattern) は粘膜内の癌に特徴的であり、また、粘膜下層に浸潤する癌は、著明なリンパ球浸潤を伴う傾向にある。こうした EBV 関連胃癌 (EBVaGC) の臨床的・形態的な独特の特徴から、その carcinogenic mechanism に関しては、その他の胃癌とは異なるものと推測される。発癌過程における EBV 感染の時期についての結論は未

だに出ていない。上咽頭粘膜では、特に chromosome 3p の heterozygosity が EBV 感染前に認められ、腫瘍形成に必要な条件とする報告がある[32]が、EBV 関連胃癌では詳細は不明である。EBV に関連した腫瘍に共通の特徴を述べる。EBV は腫瘍細胞の DNA に integrate されるのではなく、plasmid として維持されている。EBV 関連腫瘍での Terminal repeats (TRs)の数は一定で、腫瘍は単一の EBV 感染細胞から生じる[33,34]。さらに EBER *in situ* hybridization でほとんどの癌細胞が陽性を示す[35]。EBV 関連腫瘍の診断がつく前に、既に血清ウイルス titers が高値であるという[36]。sensitive DNA *in situ* hybridization では、腸上皮化生を含む非腫瘍性上皮にも EBV が感染している[37]との報告があるが、追加して確認した報告はなく、否定的である。一方、*In situ* hybridization では、異型腺管上皮にも EBER 陽性シグナルが検出される [32]ことから、異型細胞の状態でも EBV 感染が生じ、発癌に関与するのではないかと考えられる。また残胃癌に対する EBV 関与は、通常胃癌と比較して 27%と高い[38]。ここから、少数の異型性のない上皮細胞に EBV が感染し、胃癌の発生源地になっているという可能性は否定できない[32]。

EBV 関連胃癌での EBV 潜伏感染様式は modified latency I EBV infection

(EBNA1,LMP2A の発現はあるが、EBNA2 と LMP1 の発現はなく、EBERs と BARTs の発現はあり) であり、特に LMP2A は EBV 関連胃癌の 43%に発現しているとの報

告もある[32]。LMP2A genes は B cell antigen-receptor signaling を阻害する働きが知られている[39]一方、LMP2A が、phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K)と Wnt signaling pathway を上皮細胞において活性化するという報告[40,41]があり、LMP2A が胃発癌にも寄与するのではないかと考えられている。EBV 関連胃癌と EBV 感染との関連への検討は様々な実験的制約の存在により容易ではなかった。その理由の一つとして、EBV 関連胃癌には *in vitro* における適切なモデルがないことであったが、近年、EBV 関連胃癌と同じ潜伏感染様式を示す EBV 関連胃癌細胞株 SNU719[42]、YCCEL1、NCC-24 などが樹立された。SNU719 では、nude mice での腫瘍形成が証明されており(40-56 日)、その腫瘍組織には monoclonal もしくは bi-clonal な EBV genome が確認されている。

### 3. 癌幹細胞仮説と EBV

発癌以前に EBV 感染が先行し、発癌に関与するという仮説は、癌幹細胞の概念に基づくと、EBV が癌幹細胞様細胞を誘導するという仮説に言い換えることができる。

上咽頭癌 (Nasopharyngeal carcinoma: NPC) では、幹細胞の signal pathway の一つとして考えられている Hedgehog pathway が亢進しているとの報告[43]、CD44 発現増加の報告[44]などがある。さらに、LMP2A 発現により幹細胞の指標と考えられている Side population(SP)細胞の割合が増加するという当研究室での報告がある[45]。癌幹細胞の由来に関しては、発生母地に存在する正常幹細胞や前駆細胞に由来する可能性が推測されているが[46]、実際のところはわかっていない。当研究室では、日比谷ら (2012 年学位論文) が 100 週齢の LMP2A トランスジェニックマウスの一部の個体にヒト胃癌に類似した浸潤性胃癌が形成されたことを示した。こうした既報告の通り LMP2A で幹細胞集団が増え、しかもその中から癌幹細胞が生じてくるのだとするならば、LMP2A が Cancer initiation に関与している可能性がある。

本研究では、次のような前提仮説を設定した。胃癌幹細胞は、胃粘膜上皮の幹細胞／前駆細胞に多能性誘導がもたらされることにより生じる。これは、iPS 細胞の概念[47]に基づくもので、古典的に、ある遺伝子（OCT3/4、SOX2、c-MYC、KLF4）の導入で多能性と分化抑制がもたらされ、胎生期の幹細胞に類似した幼弱な細胞が出現するというものである。多能性と分化抑制の程度は様々であるため、自己増殖能においては癌幹細胞に至らぬまでも、より幼弱化した幹細胞様細胞が出現する。また、分化抑制により、幹細胞様細胞の相対的割合は増加する。EBV が発癌に関与するならば、EBV が胃粘膜上皮の幹細胞／前駆細胞に感染することで、幹細胞様細胞の増加がみられるはずである。また、多能性誘導を示唆する所見、そして、EBV 感染により生じた幹細胞様細胞が作り上げる三次元形態は、感染前のものとは異なると同時に、一部、EBV 関連胃癌に類似するといった形態変化がみられることが想定される。

以上の前提仮説に基づき、本研究では、ヒト胎生9ヶ月正常胃上皮細胞株 GES1、その recombinant EBV 感染株（GES1-EBV）、そして EBV 関連胃癌細胞株（SNU719）を用いて、幹細胞様細胞増加、多能性誘導、三次元形態の変化について検証するため実験を行った。さらに、LMP2A 導入 GES1 細胞株（GES1-LMP2A）、トランスジェニックマウスを用いた実験を行い、EBV 潜伏感染遺伝子 LMP2A の関与についても検討を加えた。

### Ⅲ. 方 法

#### 1. 細胞株

ヒト胃上皮細胞株(GES1)、ヒト胃癌細胞株 (Well-differentiated adenocarcinoma cell line (MKN1, MKN7)、 Moderately differentiated adenocarcinoma cell line (TMK1)、 Poorly differentiated adenocarcinoma cell line (NUGC3)、 Adenosquamous carcinoma cell line (AGS)、 Liver metastasis of the gastric cancer (MKN74) )、 Epstein-Barr virus (EBV) 関連胃癌細胞株(SNU719, YCCEL1, NCC24)、ならびに、EBV 関連胃癌細胞株以外の細胞株について各々の EBV 感染株を用いた。GES1 は胎生9ヶ月齢の胃上皮細胞から、Simian virus 40(SV40)により不死化した細胞であり、ヌードマウスでの腫瘍形成能はない[48]。本研究で用いた EBV 感染細胞株は、recombinant EBV (BXLF1 に neomycin 耐性遺伝子が組み込まれている) を持続感染させた Akata 細胞株との共培養の後、neomycin 選択によって樹立された。GES1 の EBV 感染株 (GES1-EBV) については2つのクローン (#6 と #8) を用いた。さらに、EBV 潜伏感染遺伝子 LMP2A の作用を調べるため、Lipofection 法により作成した LMP2A 導入 GES1 細胞株 (GES1-FLAG-LMP2A、以下 GES1-LMP2A と表記) 、そのコントロールとしてベクターのみを導入した GES1 細胞株 (GES1-FLAG) を用いた。

## 2. 細胞培養

### 2-1. 二次元培養

GES1、GES1-FLAG、GES1-LMP2A、SNU719、NCC-24、MKN1、MKN7、MKN74、

TMK1、NUGC3、AGS は RPMI1640 (+10% Fetal Bovine Serum[FBS]+1%

Penicillin/Streptomycin) で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下に培養を行った。対応する EBV 感

染株では培地に 0.1% G418 を加えた。

### 2-2. 三次元培養 (spheroid 培養)

二次元培養を行い confluency に達した後、上記の通常培地または無血清培地で、1000

個/well 或いは 10000 個/well となるように、96well U 底細胞低吸着プレート

(PrimeSurface® 住友ベークライト株式会社) で 3~4 日間培養した。各細胞株で 8 well ずつ培養を行った。

## 3. Spheroid 形態解析

### 3-1. フラクタル次元解析

形成された spheroid は培養 4 日目で画像を撮影し、Image J (National Health

Institute(NIH), <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) の「Fractal Box Count」からフラクタル次元値

(D) を求め、GES1 をコントロールとして、解析ソフト Graphpad Prism で One-way ANOVA 検定 (Dunnett's multiple comparisons test ( $p < 0.05$ )) を行った。画像解析の際には、well の中心にない spheroid は除外した。

### 3-2. Three-dimensional (3D) interactive surface plot

フラクタル次元解析を行った spheroid 画像 (RGB 画像) に対し、Image J の Plugins 「3D interactive surface plot」を用いて、輝度を高さに変換して視覚化し、細胞株間での比較を行った。

## 4. Three-dimensional (3D) Tumor Spheroid invasion assay と免疫染色

Vinci らの方法[49]を参考に、コラーゲンゲル (CellMatrix, 新田ゼラチン株式会社) を用いて行った。Spheroid 培養を EGF(2.5ng/ul)添加無血清培地で 4 日間行った後 (細胞株あたり 96well U 底プレートに 8well 作製)、spheroid を崩さないよう静かに well に入れ固まらせ、37°C5%CO<sub>2</sub> の条件下で 72 時間培養の後、顕微鏡下で画像を撮影した。

Spheroid が well の中心にあり、焦点が合う画像のみを選択し、Image J で spheroid 全体の面積と浸潤部分の面積 (棘状に伸びだす部分) を求めた。浸潤部分の面積は、skeletonized 画像に変換し、細かい網目状を呈する部分とし、全面積に対する浸潤面積の割合を算出し、One-way ANOVA 検定 (Dunnett's multiple comparisons test ( $p < 0.05$ ))

で比較を行った。また、この spheroid をコラーゲンゲルごと well からくりぬき、そのままパラフィンブロックに埋め、薄切後、Anti-CD44v6[VEF-18] antibody (ab78960, Abcam, 500 倍希釈) に対する免疫染色を行った。

## 5. コロニーアッセイ

### 5-1. コラーゲンゲルを用いた足場依存性コロニーアッセイ

コラーゲンゲル (CellMatrix) と通常培地混合液を培養プレートの well 底に薄くしいた後、混合液に 1000 個/well となるように調整した細胞を混ぜ、下層ゲルの上に注いで固まらせた後、乾燥を防ぐため通常培地で覆った。培養は、37°C5%CO<sub>2</sub> の条件で 21 日間行った。21 日目に Glutaraldehyde+Crystal violet(3%)で染色 (室温 30 分反応) の後、顕微鏡下でコロニー数を計測した。GES1 と GES1-EBV、SNU719 では 96well U 底プレート (各細胞株につき 8well ずつ)、GES1-FLAG と GES1-LMP2A では 6well プレート (各細胞株につき 3well ずつ) で行った。

### 5-2. 軟寒天培地での足場非依存性コロニーアッセイ

SNU719 に対し、6 well 平底プレートの各ウェル下層に 0.6% アガロースゲル、上層に細胞と 1%アガロースの混合ゲルを 1000 個/well となるように調整し、18 日間培養

した。18日目に Glutalaldehyde+Crystal violet(3%)染色を行い、顕微鏡下でコロニー数を計測した。統計は One-way ANOVA 検定 (Turkey's multicomparison test ( $p < 0.05$ )) で行った。

## 6. マイクロアレイ発現解析

RNA サンプル (GES1 細胞株 : GES1, GES1-EBV(#6), GES1-EBV(#8), GES1[spheroid], GES1-EBV(#6)[spheroid], GES1-EBV(#8)[spheroid], GES1-FLAG, GES1-LMP2A、トランスジェニックマウス : WT, C2mE, LMP2A/C2mE[背景粘膜と腫瘍], Wnt1/C2mE[背景粘膜と腫瘍], LMP2A/Wnt1/C2mE[背景粘膜と腫瘍]) を Agilent Expression Array 解析 (タカラバイオ株式会社) に提出し得られた正規化済みの蛍光シグナル値データを自然対数変換し、以下の解析に用いた。尚、SNU719 は当教室のデータを用いており、比較に際しては内在性コントロール (GAPDH) に対する相対値で行った。

### 6-1. Pathway 解析

Pathway 解析は、全遺伝子に対し Fold change (FC) を基準に発現変動遺伝子を抽出し、Entrez ID 及び GENE SYMBOL で各種 online free software (DAVID; David Bioinformatics Resources 6.7(National institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH(<https://david.ncifcrf.gov>)), Reactome; Reactome a curated pathway

database(<http://www.reactome.org/>) を用いて、発現変動遺伝子がエンリッチされる signal pathway (KEGG pathway を用いた) をリスト化した。

## 6-2. 変動遺伝子発現解析

Online 情報 (<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/appendix.aspx>) や各種文献

[50-109]を参考に、stem cell/cancer stem cell への関与、及び、発生、消化管の恒常性へ

の関与が示唆されている遺伝子 (計 324 遺伝子) をリスト化した。変動遺伝子は Fold

change (FC) を基に抽出し、サンプル間での発現値の比較を行った。トランスジェニ

ックマウスに関しては、非腫瘍群 (WT, C2mE, LMP2A/C2mE[背景粘膜], Wnt1/C2mE[背

景粘膜]) と腫瘍群 (LMP2A/C2mE[腫瘍], Wnt1/C2mE[腫瘍], LMP2A/Wnt1/C2mE[腫瘍])

の 2 群に分け、“Fold change(FC) (FC>1 or FC<-1) と Welch’ s T 検定 p 値 (p<0.05)

の二つの条件を満たす遺伝子を有意な発現変動遺伝子とし、横軸に Log<sub>2</sub>[Fold change]、

縦軸に -Log<sub>10</sub>(p 値)をとった volcano plot を作成した。ある遺伝子と他の遺伝子発現と

の関係は、単回帰分析 (p<0.05) で求めた。

## 7. Real-time qRT-PCR

GES1、GES1EBV 感染株、GES1-FLAG、GES1-LMP2A から、Total RNA を ISOGEN

II (ニッポン・ジーン) で抽出、cDNA 逆転写 (ReverTra Ace, TOYOBO LIFE SCIENCE)

を行い、real-time PCR (KAPA SYBR FAST MASTER MIX(2x) UNIVERSAL, KAPABIOSYSTEMS) を triplicate の系で行った (Illumina ECO PCR system, illumina) 。  
比較は $\Delta\Delta Cq$ 法で行った。プライマー配列は次の通り：

hGAPDH(Forward:GAAGGTGAAGGTCGGAGTC,Reverse:GAAGATGGTGATGGGATT  
C),hKLF4(Forward:CCCACATGAAGCGACTTCCC,Reverse:CAGGTCCAGGAGATCGT  
TGAA),hOCT3/4(Forward: GGCTCGAGAAGGATGTGGTCCG, Reverse:  
GGGCTCCCATAGCCTGGGGT),hSOX2(Forward:GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAG  
A, Reverse: TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGG),hCD44v6(Forward:  
TCCAGGCAACTCCTAGTAGT,Reverse:CAGCTGTCCCTGTTGTCGAA),hBMI1(  
Forward:AACAATGGAATATGCCTTCTCTGC,Reverse:ACTGGGGACAATGAAATGTT  
TAGC),hLGR5(Forward:CATCCCTAATAAAGCTGGACCTATC, Reverse:  
GCTCTGTAAGGCATGATTTCTCTG),hPTCH1(Forward:CACTGTGGTCCATCCCGA,Rev  
erse:GTGATGGGCGTGCAGTAGC),hSMO(Forward:CCAGGAGGAAGCGCACGGCAA  
G,Reverse:TCGCACTGGCCTGAACTGTTGAACT),hGLI1(Forward:  
GTGTGGGGACAGAAGGAC,Reverse:GAGATGACCGTAGGAGCC),hCXCR4(Forward:  
GGTGGTCTATGTTGGCGTCT, Reverse: TGGAGTGTGACAGCTTGGAG)。

## 8. Western Blot

二次元培養細胞を RIPA buffer (+Protease inhibitor) を加え、セルスクレイパーを用いて全細胞蛋白を抽出した。ブロッキング (5% スキムミルク + TBS)、一次抗体反応 (60 分)、当該アイソタイプでの二次抗体反応 (90 分) の後、発光試薬 (イムノスター LD、和光純薬工業株式会社) を用いて、専用ソフトウェア (Fujifilm LAS 4000) でバンドを検出した。Anti-CD44v6[VEF-18] antibody (ab78960, Abcam) を添付文書記載の手順に従い用いた。

## 9. セルブロックとヒト胃癌 Tissue Microarray (TMA) 免疫組織化学

セルブロックは二次元培養の細胞をセルストレイナーで集め、アガロースで固めた後、パラフィンで包埋した。薄切標本に対して CD44v6 の免疫染色 (Anti-CD44v6[VEF-18] antibody (ab78960, Abcam) を全自動特殊染色機 (Bentana Benchmark) で行った。

非 EBV 関連胃癌と EBV 関連胃癌を含むヒト胃癌 TMA に対する CD44v6 免疫染色

(Anti-CD44v6[VEF-18] antibody (ab78960, Abcam) を全自動特殊染色機 (Bentana Benchmark) で行い、染色態度に関して、非 EBV 関連胃癌と EBV 関連胃癌の比較を行った。染色強度の評価については、各 TMA core に対し腫瘍部のみを手動的に囲んだ上で、Definiens Tissue Studio (CTC ライフサイエンス株式会社) の” Membrane and

Cells”メニューで解析を行った。測定された Average Membranous intensity の数値データに重み付け ( $=10 \times x$ ) をした上で、全例と胃体上-中部発生例の双方で Welch' s T 検定 ( $p < 0.05$ ) で比較を行った。染色範囲の評価に際しては、Image J の Plugins “IHC Tool box” を用いて、染色陽性領域(DAB stain)を描出し、腫瘍部全体の面積に対する染色陽性領域の比率として比較を行った (Welch' s T 検定( $p < 0.05$ ))。

#### **10. Fluorescence-activated cell sorting: FACS**

二次元培養細胞を Trypsin/EDTA、及び、0.2mM EDTA で回収した後、抗体を添付文書に従い反応させた。蛍光波長の計測と描出は、BD LSR Fortessa -20、及び、BD FACSDiva software (BD Bioscience) を用いて行った。使用した抗体は以下の通り：  
CD44v6 抗体 (Human CD44 v6 Alexa Fluor 488-conjugated antibody[FAB3660G], R&D Systems)、CD133 抗体 (133/1(AC133) antibody, human, Miltenyi Biotec)、CD44v9 抗体 (Anti Human CD44 v9 Monoclonal antibody(RV3), COSMO BIO)。

## 11. Magnetic activated cell sorting: MACS

Miltenyi Biotec マニュアル細胞分離装置を用い、添付の説明書に従って行った。細胞回収後、CD44v6 抗体 (ab78960、5uL/100uL) と 4°C で 10 分間反応させ、その後、anti-PE microbeads と 4°C、15 分間の条件で反応させ、細胞分離装置で、negative sorting と positive sorting を行い、各々の最終的な細胞数を計測、Flowcytometry の CD44v6 蛍光値測定から、分離が適切に行われているかを確認した後、軟寒天培地でのコロニーアッセイ、ヌードマウスへの移植実験に用いた。

## 12. ヌードマウス移植実験

MACS で分離した CD44v6 陽性群 (CD44v6-positive) と陰性群 (CD44v6-negative) をヌードマウスに皮下移植し腫瘍形成を調べた。CD44v6 陽性群と陰性群は、マトリゲルを入れた PBS と 1:4 の割合で混ぜ、各々、同一個体の片側の大腿部に 2000 個ずつ、移植した。移植は 4 匹のヌードマウスに行った。

### 13. トランスジェニックマウス

Gan マウス (Wnt1/C2mE) [110,111]は、Oshima らにより作製されたトランスジェニックマウスで、本研究で用いた Gan マウス (以下、Wnt1/C2mE) は金沢大学大島教授より供与された。Wnt1/C2mE マウスは、いずれも胃上皮細胞に発現するサイトケラチン 19(K19)遺伝子プロモーター制御下に導入された Wnt1 マウスと COX-2(Ptgs2)/mPGES-1(Ptges) (C2mE) マウスの交配で得られる。Wnt1 マウスに比べて、炎症関連遺伝子 (COX-2(Ptgs2)/mPGES-1(Ptges) (以下、C2mE) ) と共発現させた Gan マウス (Wnt1/C2mE) では腸型の隆起性腫瘍が胃に高率に形成されることから、胃での炎症性発癌モデルマウスとされている。LMP2A に腫瘍形成能が潜在的に存在する場合、C2mE と共発現させた LMP2A/C2mE マウスでは、Wnt1/C2mE マウスと同様に胃での腫瘍形成がみられるのではないかと考え、トランスジェニックマウスを作成した。LMP2A/C2mE マウスは、LMP2A トランスジェニックマウスと C2mE マウスとの交配によって得た。LMP2A トランスジェニックマウスは、H,K-ATPase 遺伝子プロモーター (自治医科大学武藤博士供与) と SV40 polyA cassette の間に LMP2A 遺伝子を組み込んだトランスジェニックベクターを C57BL/6 マウス受精卵に注入し作成した。また、LMP2A/C2mE と Wn1/C2mE の交配によって、LMP2A/Wnt1/C2mE マウスを得た。

## 14. トランスジェニックマウスの胃解剖と組織学的評価

### 14-1. 胃解剖

20-25 週齢マウス計 116 個体を解剖した。各 Genotype の内訳は、WT (4 例)、LMP2A (9 例)、C2mE (20 例)、LMP2A/C2mE (31 例)、Wnt1/C2mE (26 例)、LMP2A/Wnt1/C2mE (26 例) である。腹部を切開し、臓器に顕著な異常がみられないか確認した後、食道と十二指腸の両端を切除して胃を取り出し、大彎に沿って切開し胃を開き、その状態で写真を撮影した。食道と十二指腸を結ぶ正中線上で刃を入れて 2 片に分け、片方を扁平上皮領域（食道及び前胃）、胃底腺領域、幽門腺領域、十二指腸領域の 4 片に切り分け、凍結保存した（肉眼的に隆起がみられた場合には、“腫瘍”として分け、これも凍結保存）。残りの胃は切り出してパラフィンブロックを作成した。胃の組織学的評価については、文献[112]を参考としつつ、次の基準で行った。

### 14-2. 組織学的評価

#### 14-2-1. 腫瘍の評価

腫瘍の評価は組織学的に行った。腺管不整を伴う隆起性病変に対して、Dysplasia と定義し、以下の基準で 3 つの Grade に分類した。Grade 1 は indeterminate for neoplasia 相当の病変で、次の 3 つの基準のうち、いずれかが該当するものとした：a. 完全に固有腺上皮が消失したもの、b. 固有腺上皮が残っているが、腺窩上皮に細胞異型があり、

かつ、腺管の分岐が複雑でないもの、**c. Mucous metaplasia**（十二指腸の **Brunner** 腺に似た淡明な細胞質と基底部に圧排された核を有する腺管からなる）の上にやや異型のある上皮が見られ、腺管の構造は単純なもの。**Grade 2** はヒトでいう **adenoma** あるいは **low grade dyaplasia** 相当の細胞異型があり、腺管の分岐や癒合など、構造がやや複雑なもので、核は細長く、基底側に配列する。**Grade 3** はヒトでいう上皮内癌あるいは **high grade dysplasia** 相当の細胞異型がある、または高度の構造異型があるもの、核は丸く、極性が乱れている、核分裂像が目立つ。本論文で「腫瘍」と表現するものは、この **Grade 3** 相当の病変である。

#### 14-2-2. 炎症の評価

前胃-腺胃境界部から腺胃近位で評価した。上記文献[112]に従い、**Grade1-4** に分類した。粘膜筋板下の粘膜下層にみられるごく軽度の炎症細胞浸潤は **Inflammation Grade 1 (I1)** とした。**Inflammation Grade 3 (I3)** と **Inflammation Grade 4 (I4)** はいずれも高度の炎症細胞浸潤で、両者の区別には炎症細胞浸潤の深さを優先して行った。粘膜下層主体のものは **I3**、固有筋層以深にみられるものは **I4** とした。**Inflammation Grade 2 (I2)** は **I1** と **I3/I4** の中間のものをとった。

## 15. トランスジェニックマウスの胃組織に対する免疫組織化学

マウス胃未染標本に対し、Cd44v6 抗体 (RAT ANTI MOUSE CD44v6, AbD Serotec (a Bio-Rad company), 1000 倍希釈) を用いて、全自動特殊染色装置 (Bentana Benchmark) で染色した。細胞膜に染色されるものを陽性と判定した。

CD44v6 陽性面積の比較は、LMP2A/C2mE マウスの腫瘍好発部位である食道と十二指腸を結ぶ直線と大彎線の間位置する、前胃-腺胃上部領域 (腫瘍好発部位) の画像 (対物レンズ 2 倍) に対して計測を行った。まず、画像全体における腺胃の粘膜部分の全面積 (表層から粘膜筋板上まで) を計測した後、画像全体における CD44v6 陽性部分の面積を計測した。全面積に対する陽性部分の面積の割合を算出し (図 26a)、比較に用いた。粘膜の組織評価は、CD44v6 免疫染色標本と同一切片の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色標本に対して行っている。

## IV. 結 果

### 1. Epstein-Barr Virus 感染上皮細胞の幹細胞性

胃粘膜上皮細胞への EBV 感染の幹細胞への影響を検討し、EBV 関連胃癌細胞と比較するため、ヒト正常胃上皮細胞株 (GES1) とその EBV 感染株 (GES1-EBV)、EBV 関連胃癌細胞株 (SNU719) を用いて、三次元形態、幹細胞様性質、多能性誘導について比較を行った。三次元形態の比較は spheroid 培養とその形態解析で行った。幹細胞様性質として知られる浸潤能、自己増殖能について、胃粘膜固有層間質の成分でもある type1 コラーゲンを用いて調べた。また、マイクロアレイ発現解析により多能性誘導遺伝子の発現について調べた。

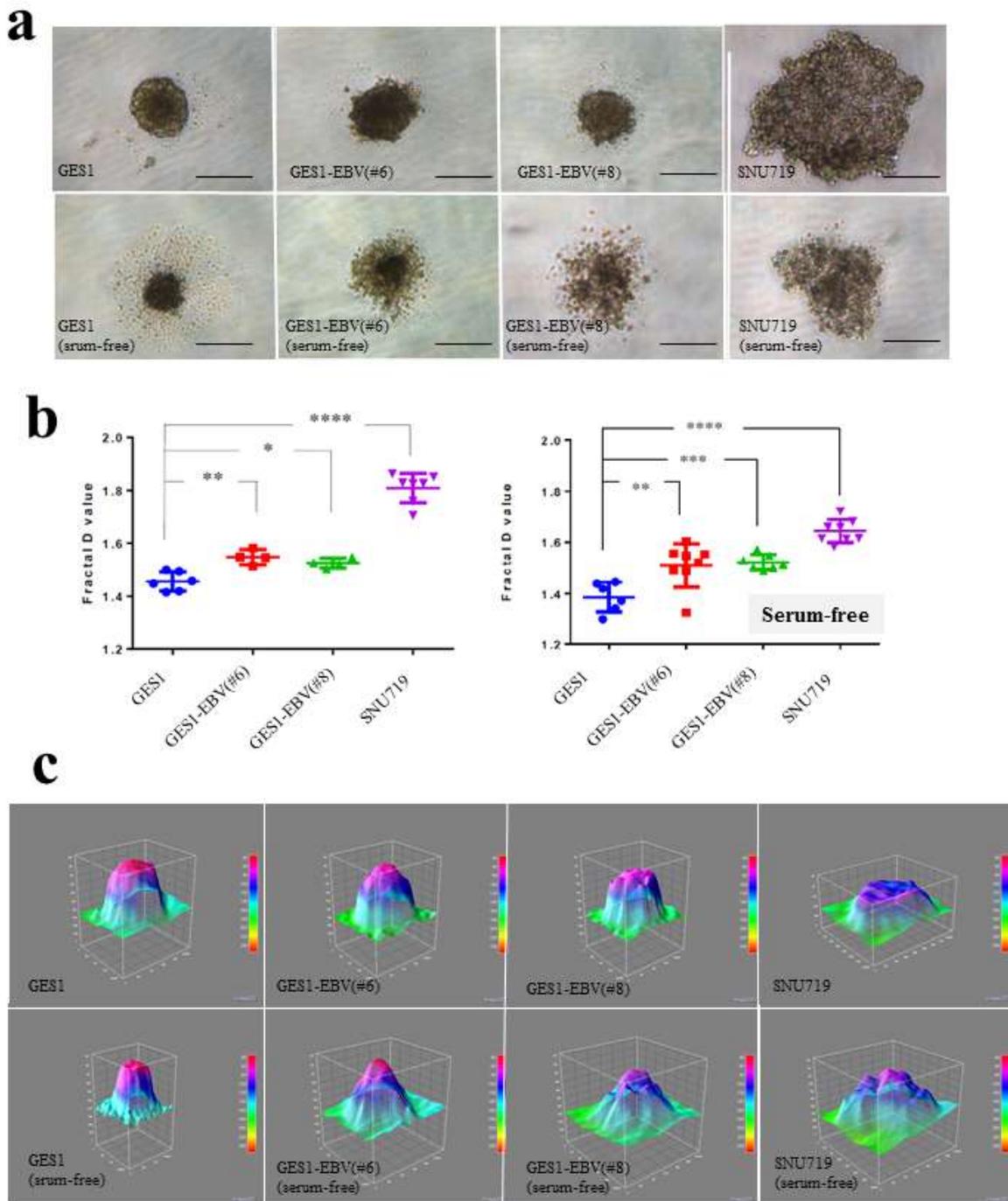
#### 1-1. 胃正常上皮細胞株にみる EBV 感染での spheroid 形態の変化

##### 1-1-1. U 底細胞低吸着プレートでの 3 次元培養

96 ウェル U 底細胞低吸着プレート (PrimeSurface® 住友ベークライト株式会社) に 1000 個/well、あるいは 10000 個/well となるよう細胞を調整して 4 日間 3 次元培養を行い、形成された spheroid の形態変化について血清入りの通常培地と無血清培地の 2 つの条件で調べた (図 1a)。まず、通常培地での spheroid は、球体である GES1 に対

し、GES1-EBV(#6,#8)では凹凸が目立った。SNU719 の spheroid でも凹凸がみられ、サイズはより増大していた。この傾向は無血清培地になると、より顕著となった。形態の「複雑性」を表す指標の一つとしてフラクタル次元値が知られているが、Image J analyze tool menu の”Fractal Box Counts” を用いて GES1-EBV や SNU719 の spheroid での凹凸を数値化し比較を行った (図 1b)。通常培地と無血清培地の両方で、フラクタル次元は GES1 と比較して、GES1-EBV(#6,#8)、SNU719 で有意に上がっていた。次に、Image J plugins menu の 3D interactive surface plot を用いて、spheroid 画像の RGB 値分布を視覚化した (図 1c)。通常培地の GES1 spheroid では、球体を反映して、中心部が濃く、周囲が徐々に薄くなる傾向があり、高い山を形成する。通常培地の GES1-EBV(#6,#8)でもこのような傾向はみられるが、SNU719 では中心部と周囲の濃淡が不明瞭となり、平坦な plot となった。一方、無血清培地での GES1-EBV(#8)では、SNU719 と同様に平坦な plot に近づいた。

さらに、GES1-EBV(#8)では、スタートの細胞数を 1000 個/well から 10000 個/well に増やした場合、無血清培地で 3 次元培養を行うと、細胞接着が失われ、網様の形態となり、SNU719 と形態的に似ていた (図 2)。



**図1. GES1, GES1-EBV, SNU719での spheroidの形態変化**

(a) Spheroid (培養4日目) の顕微鏡写真 (上段: 通常培地、下段: 無血清培地)

Scale bar = 100 $\mu$ m.

(b) Spheroid (培養4日目) の Fractal box count解析

通常培地 (左図) : GES1(n=6), GES1-EBV(#6)(n=4), GES1-EBV(#8)(n=4), SNU719(n=7).

無血清培地 (右図) : GES1(n=6), GES1-EBV(#6)(n=8), GES1-EBV(#8)(n=7), SNU719(n=8).

(Dunnett's multiple comparisons test \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ )

(c) Spheroid (培養4日目) の 3D interactive surface plot (上段: 通常培地、下段: 無血清培地)

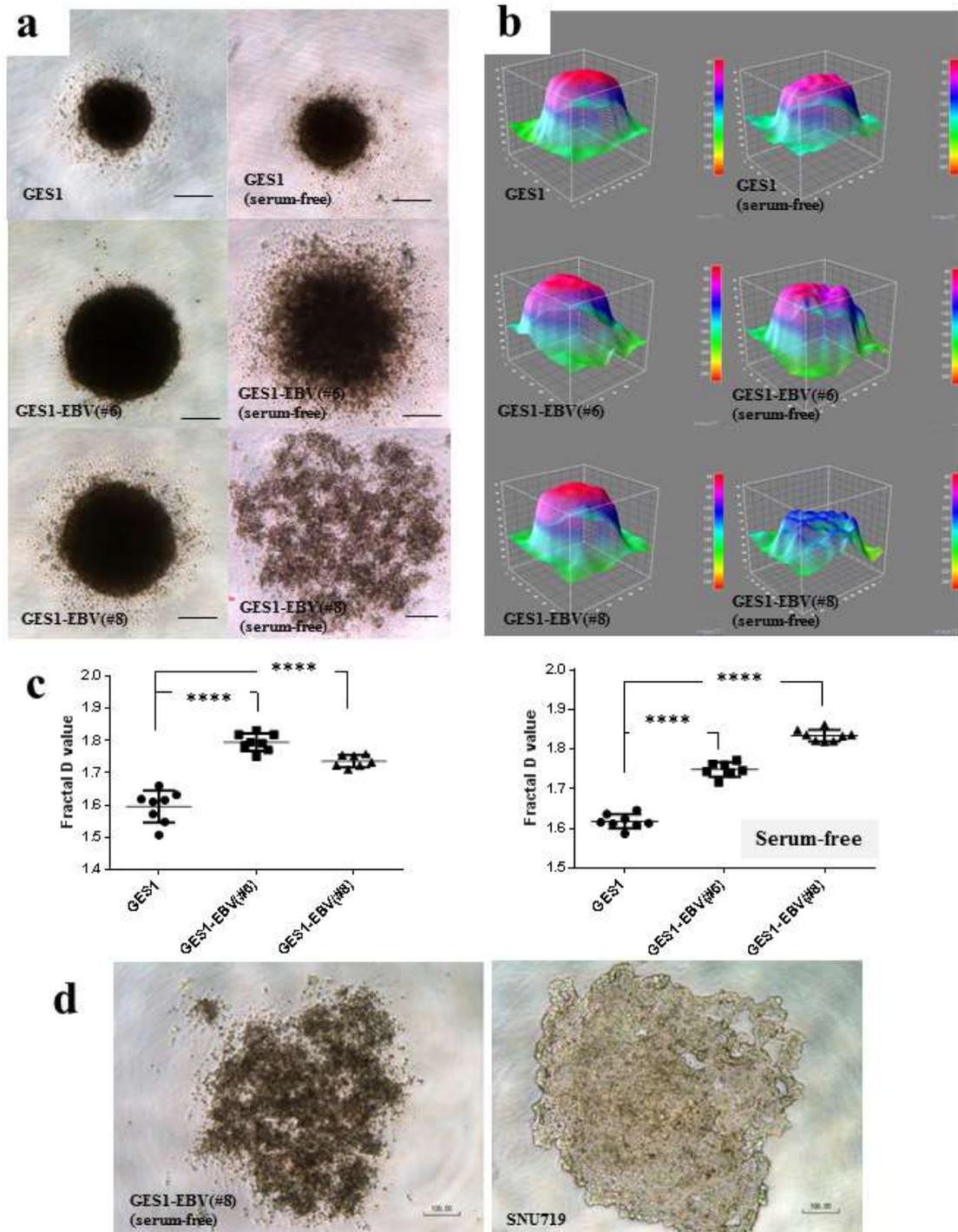


図2. 細胞数を増加させたときのspheroid形態の変化

(a) Spheroid (培養4日目) の顕微鏡写真 (右列: 通常培地, 左列: 無血清培地) Scale bar=100um

(b) 3D interactive surface plot画像

(c) Fractal box Count解析

通常培地 (左) : GES1(n=8), GES1-EBV(#6)(n=8), GES1-EBV(#8)(n=7)

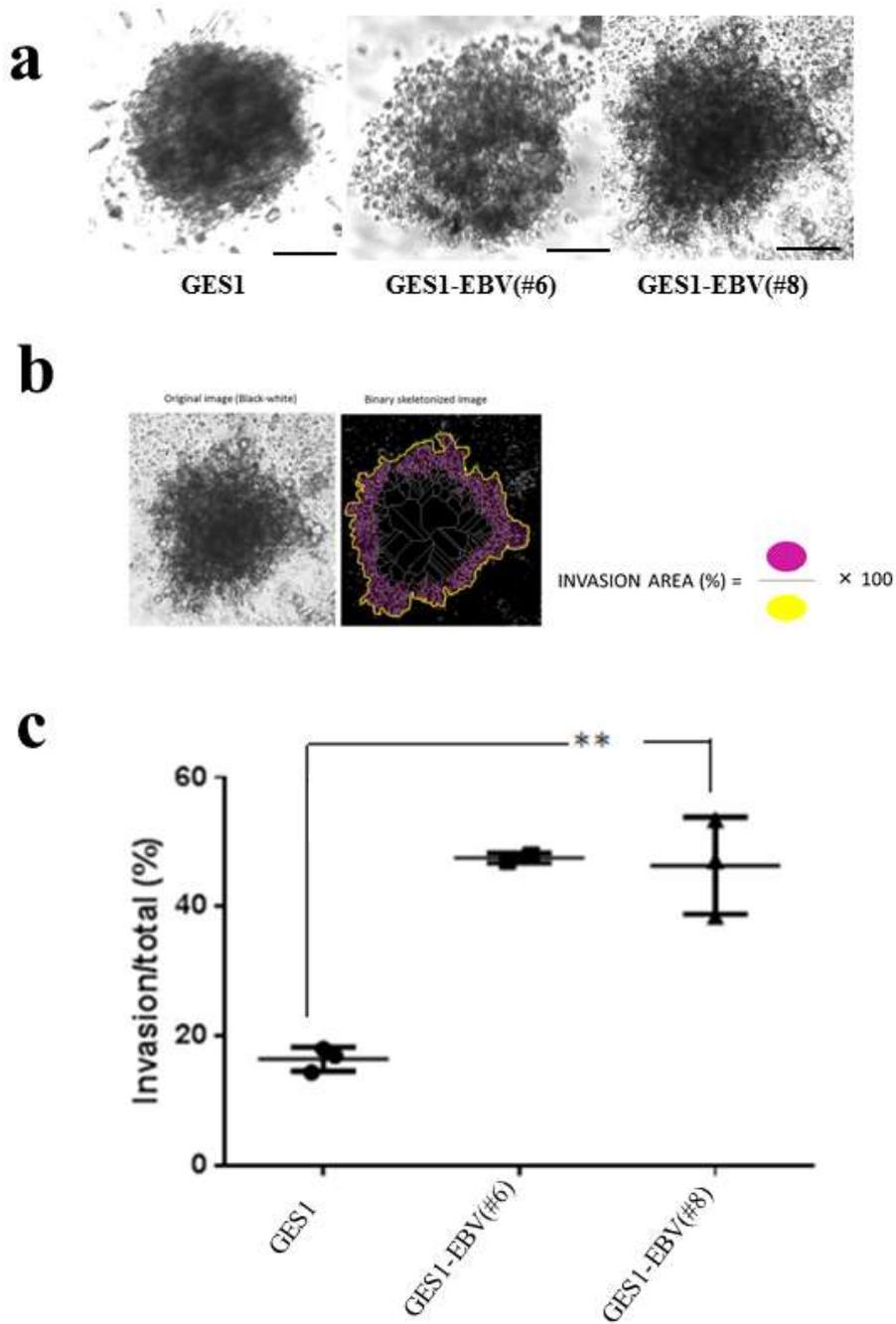
無血清培地 (右) : GES1(n=8), GES1-EBV(#6)(n=7), GES1-EBV(#8)(n=8)

(Dunnett's multiple comparisons test \*\*\*\*p<0.0001)

(d) 無血清培地での GES1-EBV(#8)と通常培地のSNU719は形態的に似ている。Scale bar=100um

### 1-1-2. コラーゲンゲルの中での spheroid 培養

胃粘膜固有層間質に含まれる type 1 Collagen を用いて、培養した spheroid のコラーゲン基質への浸潤能を調べた。浸潤能の指標として、全面積に対する浸潤部の面積の割合を求めた (図 3b)。コラーゲン内で培養した spheroid は周囲に伸び出すような構造 (「浸潤部」とする) を伴っており、GES1-EBV(#6,#8)でより顕著であった (図 3a)。GES1-EBV(#6,#8)では GES1 と比較して、浸潤部の割合が有意に高かった (図 3c)。



**図3. コラーゲンゲルを用いた Three-dimensional tumor spheroid invasion assay**

- (a) Spheroid培養4日目でコラーゲンゲル注入後72時間後の顕微鏡写真 (Scale bar=100um)
- (b) コラーゲンゲル中での相対的浸潤面積比率の算出法 (浸潤部分は skeletonized画像に変換 (Image J) した後の網状領域とし、全面積に対する比率として算出した)
- (c) GES1とGES1-EBVでの浸潤面積比較 (Dunnnett's multiple comparison test:  $**p < 0.01$ )  
 GES1(n=3), GES1-EBV(#6)(n=2), GES1-EBV(#8)(n=3).

### 1-1-3. コラーゲンをを用いた足場依存性コロニー形成

同様に、コラーゲンをを用いて、その中での増殖能力の変化をコロニー形成アッセイで調べた。GES1 では、丸いコロニーが数個みられたのに対して、GES1-EBV(#6)では棘を有する大きなコロニーが多数形成されていた。GES1-EBV(#8)では GES1 のコロニーと同様であった。SNU719 では、サイズの小さい棘を有するコロニーが GES1-EBV(#6)よりさらに多数形成されていた (図 4a) 。GES1 に対するコロニー形成率 (Plate Efficiency(%))= $[\text{コロニー数}] / 1000 \text{ 個} \times 100$  ) は GES1-EBV(#6)と SNU719 で有意に高かった (図 4b) 。

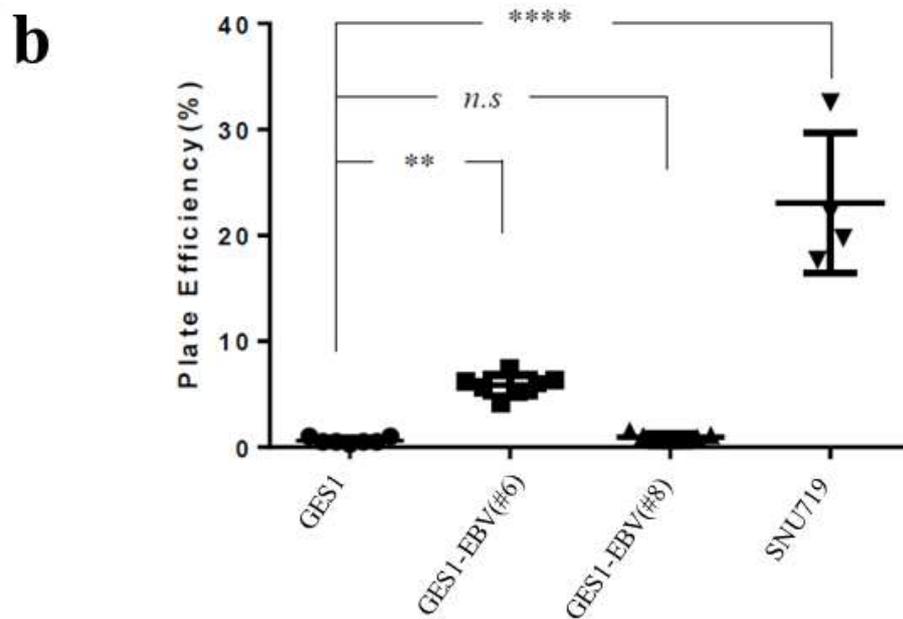
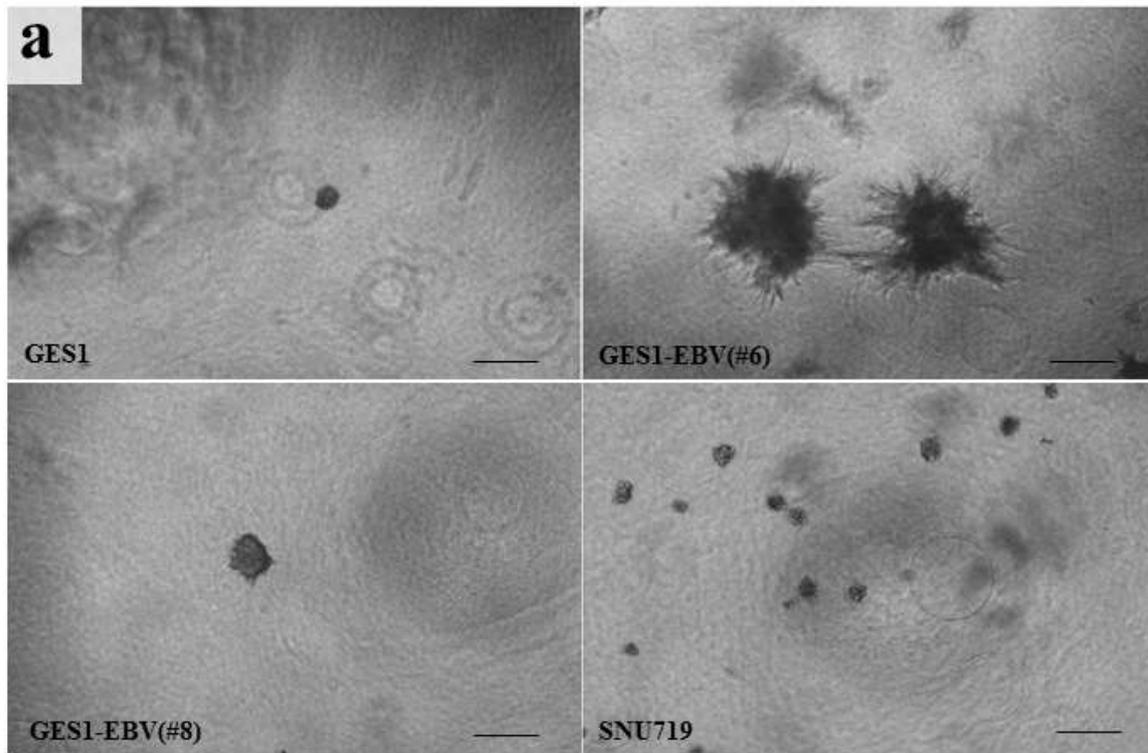


図4. コラーゲンゲルを用いた足場依存性コロニーアッセイ  
 (a) 培養18日目の各細胞株におけるコロニーの代表的顕微鏡写真 (Scale bar=100um)  
 (b) 培養18日目の Plate efficiency(=コロニー数/1000×100) (%)の比較  
 GES1(n=7), GES1-EBV(#6)(n=7), GES1-EBV(#8)(n=7), SNU719(n=4).  
 (One-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ )

## 1-2. 幹細胞性関連遺伝子の発現変動

こうした以上の形態学的特徴とともに、幹細胞遺伝子発現について検討した。現在、胃癌幹細胞マーカーの候補とされているのは、CD44 と CD133 であるため、特に両者との関連性に着目して検討した。

### 1-2-1. 全遺伝子に対する発現変動遺伝子解析

Agilent Expression Array 解析（タカラバイオ株式会社）で、全遺伝子に対して、GES1-EBV で GES1 と比較して発現が増加（2 倍以上）している遺伝子を二次元培養と三次元培養の各々で抽出し、それらが多く含まれる（エンリッチメント）Pathway をリストアップした（Pathway 解析）。

David (David Bioinformatics Resources 6.7(National institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH)(<https://david.ncifcrf.gov>)) で、発現増加遺伝子がエンリッチメントされる KEGG pathway を調べたところ、三次元培養（spheroid）で、上位にリストアップされた Hematopoietic lineage の中に、胃癌幹細胞マーカー候補である CD44 がリストアップされていた（表 1）。CD133 はリストアップされていなかった。

次に、Pathway 内での発現増加遺伝子の機能的局在と関係性について視覚的に捉えることが可能な Reactome pathway (Reactome a curated pathway database(<http://www.reactome.org/>)) で、発現増加遺伝子がエンリッチメントされる pathway を調べたところ、上位にリストアップされたのは「Activation of Matrix Metalloproteinase」と「Collagen degradation」であり、両者とも pathway 内では、MMPs と CD44 の関与が認められた (図 5a,b)。二次元培養と三次元培養 (spheroid) の両者で、MMP9 と CD44 の発現変化を比較したところ (図 5c)、MMP9 も CD44 も、二次元培養 (MMP9 : 2.97 倍、CD44 : 1.15 倍) より三次元培養 (MMP9 : 13.2 倍、CD44 : 2.02 倍) で GES1-EBV での発現増加がみられた。

表1. GES1-EBVでGES1に対し2倍以上の発現増加を示す遺伝子が Enrichされる KEGG pathway (DAVID) (上: 二次元培養 (2D culture) 下: 三次元培養 (3D culture))

Two-Dimension (2D) Culture	KEGG	Count	%	PValue	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
Systemic lupus erythematosus	hsa05322	17	1.166781	0.00055	331	99	5085	2.638011535	0.0877976	0.087798	0.667054
p53 signaling pathway	hsa04115	12	0.82361	0.003945	331	68	5085	2.711036076	0.4831706	0.281092	4.693583
Jak-STAT signaling pathway	hsa04630	20	1.372684	0.005083	331	155	5085	1.982262937	0.5730477	0.247003	6.010504
Cytokine-cytokine receptor interaction	hsa04060	29	1.990391	0.005642	331	262	5085	1.700433569	0.6112616	0.210387	6.650195
B cell receptor signaling pathway	hsa04662	12	0.82361	0.008401	331	75	5085	2.458006042	0.7555667	0.245547	9.751971
Natural killer cell mediated cytotoxicity	hsa04650	17	1.166781	0.011617	331	133	5085	1.963632647	0.857931	0.277646	13.24915
Complement and coagulation cascades	hsa04610	11	0.754976	0.012727	331	69	5085	2.449100223	0.8822306	0.263301	14.42631
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	hsa05014	9	0.617708	0.019699	331	53	5085	2.608732828	0.9639374	0.339866	21.49348
T cell receptor signaling pathway	hsa04660	14	0.960879	0.021691	331	108	5085	1.991440081	0.974326	0.334302	23.41245
Toll-like receptor signaling pathway	hsa04620	13	0.892244	0.029355	331	101	5085	1.977356346	0.9930967	0.391997	30.39961
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	hsa00980	9	0.617708	0.038485	331	60	5085	2.304380665	0.9985755	0.448885	37.95714
RIG-I-like receptor signaling pathway	hsa04622	10	0.686342	0.038709	331	71	5085	2.163737713	0.9986298	0.422703	38.13238
Aldosterone-regulated sodium reabsorption	hsa04960	7	0.480439	0.046863	331	41	5085	2.622872301	0.9996697	0.460205	44.22168

Three-Dimensional (3D) Culture	KEGG	Count	%	PValue	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	Bonferroni	Benjamini	FDR
Cytokine-cytokine receptor interaction	hsa04060	79	3.170144	7.15E-17	583	262	5085	2.629954303	1.95E-14	1.95E-14	1.33E-13
Graft-versus-host disease	hsa05332	16	0.642055	1.15E-05	583	39	5085	3.578308484	0.002018	0.00101	0.014086
<b>Hematopoietic cell lineage</b>	hsa04640	24	0.963082	6.3E-05	583	86	5085	2.434081934	0.011034	0.003692	0.077328
Allograft rejection	hsa05330	14	0.561798	9.58E-05	583	36	5085	3.39193825	0.016718	0.004206	0.11748
Chemokine signaling pathway	hsa04062	40	1.605136	0.000112	583	187	5085	1.8656956	0.019558	0.003943	0.137619
Type I diabetes mellitus	hsa04940	15	0.601926	0.000141	583	42	5085	3.115045332	0.024465	0.00412	0.17255
Asthma	hsa05310	12	0.481541	0.0002	583	29	5085	3.609155971	0.034638	0.005023	0.245485
Systemic lupus erythematosus	hsa05322	25	1.00321	0.000234	583	99	5085	2.202557305	0.040287	0.005127	0.286295
Intestinal immune network for IgA production	hsa04672	16	0.642055	0.000241	583	49	5085	2.848041446	0.041472	0.004695	0.294887
Jak-STAT signaling pathway	hsa04630	32	1.284109	0.001176	583	155	5085	1.800697173	0.187099	0.020502	1.433904
Calcium signaling pathway	hsa04020	34	1.364366	0.002558	583	176	5085	1.684956339	0.362889	0.040154	3.094302
NOD-like receptor signaling pathway	hsa04621	16	0.642055	0.003455	583	62	5085	2.250871466	0.456207	0.049499	4.158496
Cell adhesion molecules (CAMs)	hsa04514	27	1.083467	0.003565	583	132	5085	1.784071417	0.466639	0.0472	4.287842
Autoimmune thyroid disease	hsa05320	14	0.561798	0.003905	583	51	5085	2.394309353	0.497707	0.047994	4.68751
B cell receptor signaling pathway	hsa04662	18	0.722311	0.003977	583	75	5085	2.093310463	0.504088	0.045681	4.772428
Steroid hormone biosynthesis	hsa00140	13	0.521669	0.004474	583	46	5085	2.464948915	0.545826	0.048133	5.354378
Toll-like receptor signaling pathway	hsa04620	21	0.842697	0.009377	583	101	5085	1.81351154	0.809515	0.092934	10.91804
Complement and coagulation cascades	hsa04610	16	0.642055	0.009883	583	69	5085	2.022522187	0.82589	0.092548	11.4746
Primary immunodeficiency	hsa05340	10	0.401284	0.014492	583	35	5085	2.492036266	0.923409	0.126481	16.40093
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	hsa05014	13	0.521669	0.014574	583	53	5085	2.139389624	0.924516	0.121194	16.48571
p53 signaling pathway	hsa04115	15	0.601926	0.019819	583	68	5085	1.923998587	0.970495	0.154453	21.78025
Drug metabolism	hsa00983	11	0.441413	0.020652	583	43	5085	2.231241773	0.974596	0.153757	22.59225
Natural killer cell mediated cytotoxicity	hsa04650	24	0.963082	0.027029	583	133	5085	1.573917641	0.991954	0.189156	28.55546
Pc epsilon RI signaling pathway	hsa04664	16	0.642055	0.028999	583	78	5085	1.789154242	0.994368	0.194105	30.30991
Neuroactive ligand-receptor interaction	hsa04080	40	1.605136	0.035564	583	256	5085	1.362832333	0.998294	0.225031	35.87695
Cytosolic DNA-sensing pathway	hsa04623	12	0.481541	0.044206	583	55	5085	1.903009512	0.99965	0.263657	42.58266
Antigen processing and presentation	hsa04612	16	0.642055	0.047412	583	83	5085	1.681373866	0.999806	0.271397	44.90187

**a**

Reactome pathway: $\text{Log}([\text{GES1EBV}]/\text{GES1}) > 2$	Entities pValue
Chemokine receptors bind chemokines	0.002469
<b>Activation of Matrix Metalloproteinases</b>	0.024277
CLEC7A/inflammasome pathway	0.029321
<b>Collagen degradation</b>	0.035511
binding of TCF/LEF:CTNNB1 to target gene promoters	0.039342

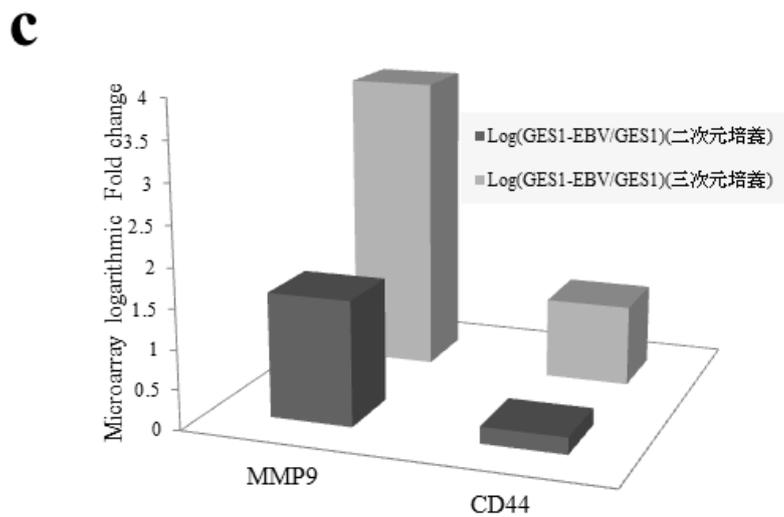
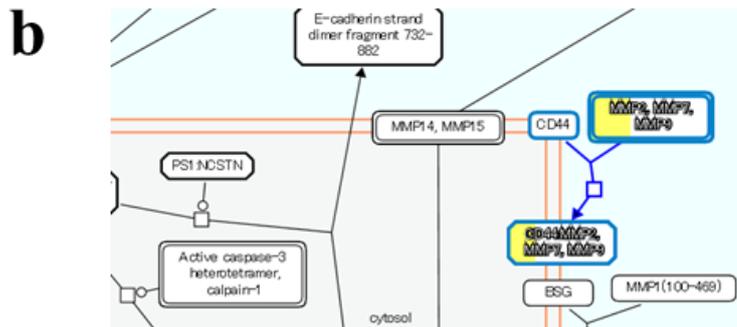


図5. GES1-EBV (三次元培養) での発現増加遺伝子がエンリッチされるReactome pathway  
 (a) GES1-EBVでGES1に対し4倍以上発現増加遺伝子に対する Reactome pathway解析結果.  
 (b) “Activation of Matrix Metalloproteinases”, “Collagen degradation”に関与するReactome pathway mapを一部転載。黄色で示す箇所が発現増加遺伝子。CD44とMMPsが関与する箇所に相当  
 (c) MMP9とCD44のマイクロアレイFold changeによる二次元及び三次元培養での比較

## 1-2-2. 多能性関連遺伝子の発現と CD44

次に、多能性誘導遺伝子（POU5F1(OCT3/4)、SOX2、KLF4、LIF、MYC）発現について、GES1 と GES1-EBV で比較を行った。

まず、二次元培養でのマイクロアレイ発現データを用いて、内在性コントロール

（GAPDH）に対する多能性誘導遺伝子の相対的発現を比較した（図 6a）。その結果、GES1-EBV では GES1 に対し、LIF と KLF4、MYC の増加がみられた。KLF4 に関しては Real-time qPCR でも確認され、SNU719 でも増加していた（図 6b）。

多能性誘導遺伝子のマイクロアレイ発現値を Fold change で比較すると、三次元培養では二次元培養より、LIF、KLF4、MYC の発現が高くなる傾向にあった。

その中で、KLF4 は、培養形態（二次元培養と三次元培養（spheroid））に関わらず、GES1-EBV で 2 倍以上発現が増加し、統計学的に有意であった（二次元培養：3.09 倍、 $p=0.035$ 、三次元培養：5.94 倍、 $p=0.0032$ ）（図 7a）。

マイクロアレイ発現値で、KLF4 と相関のある幹細胞関連遺伝子を単回帰分析で調べたところ、KLF4 は POU5F1 と MYC、消化管幹細胞マーカー候補である BMI1 と LGR5、Hedgehog pathway 関連遺伝子（PTCH1, SMO, GLI1）のほか、CD44 と有意な相関関係にあることがわかった（図 7b）。

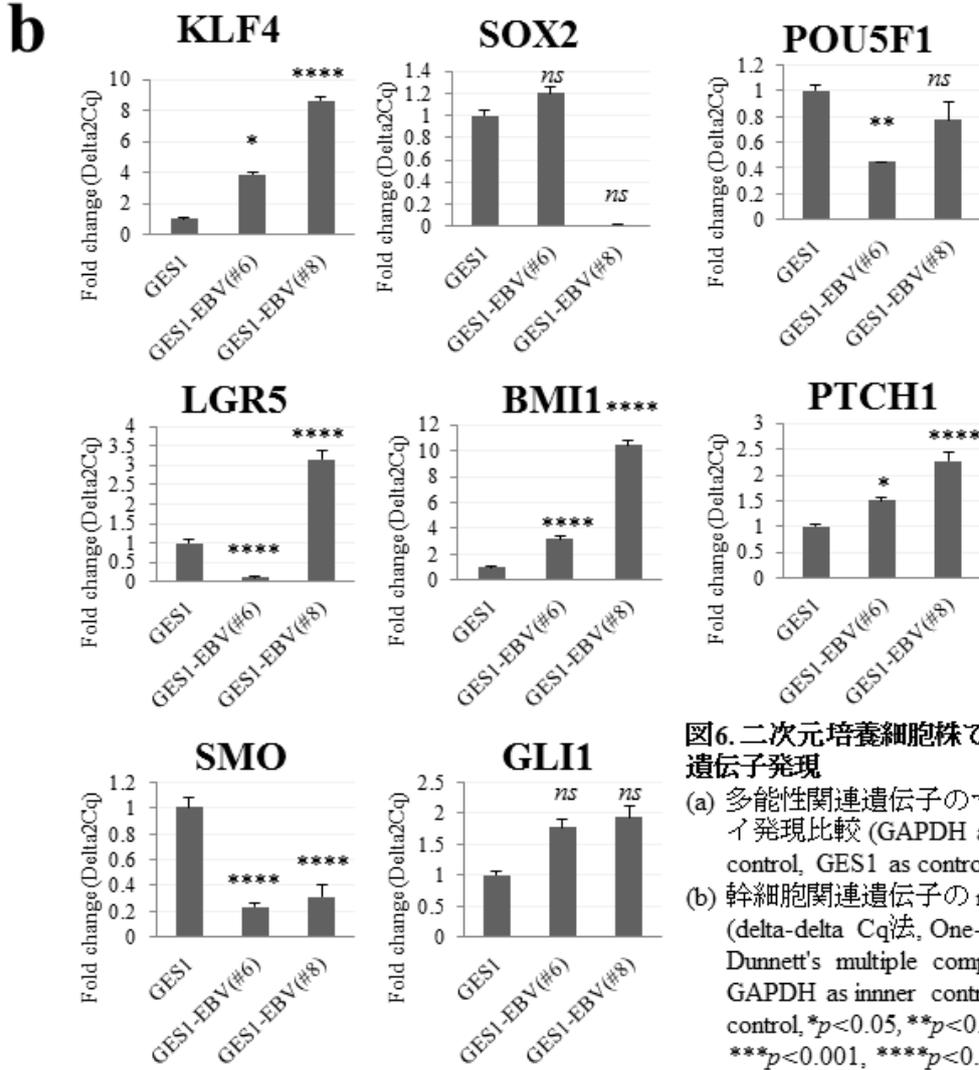
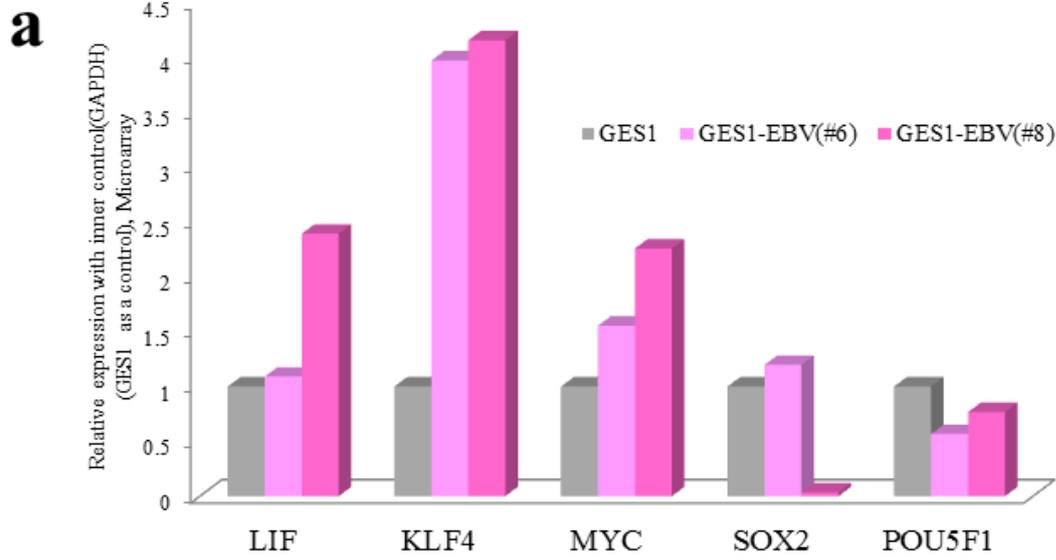


図6. 二次元培養細胞株での幹細胞関連遺伝子発現

(a) 多能性関連遺伝子のマイクロアレイ発現比較 (GAPDH as inner control, GES1 as control)  
 (b) 幹細胞関連遺伝子の real-time qPCR (delta-delta Cq法, One-way ANOVA, Dunnett's multiple comparisons test, GAPDH as inner control, GES1 as control, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ )

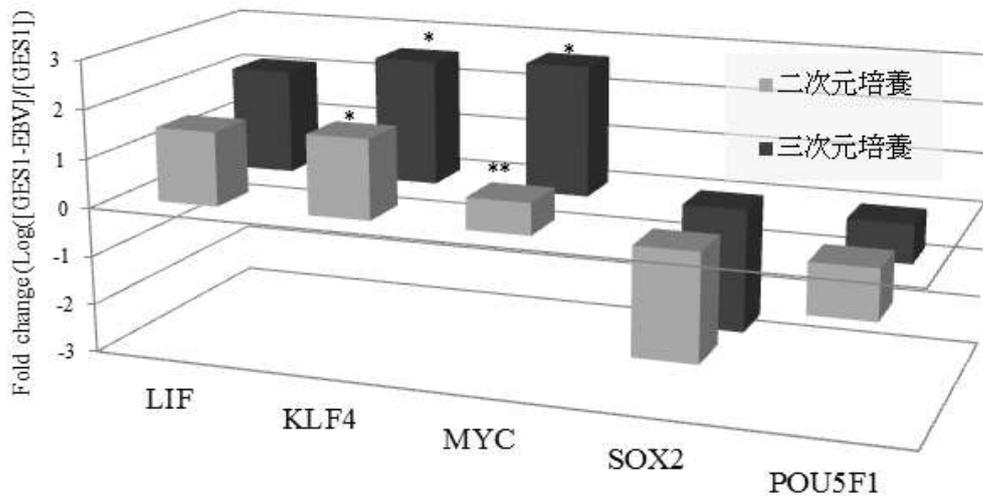
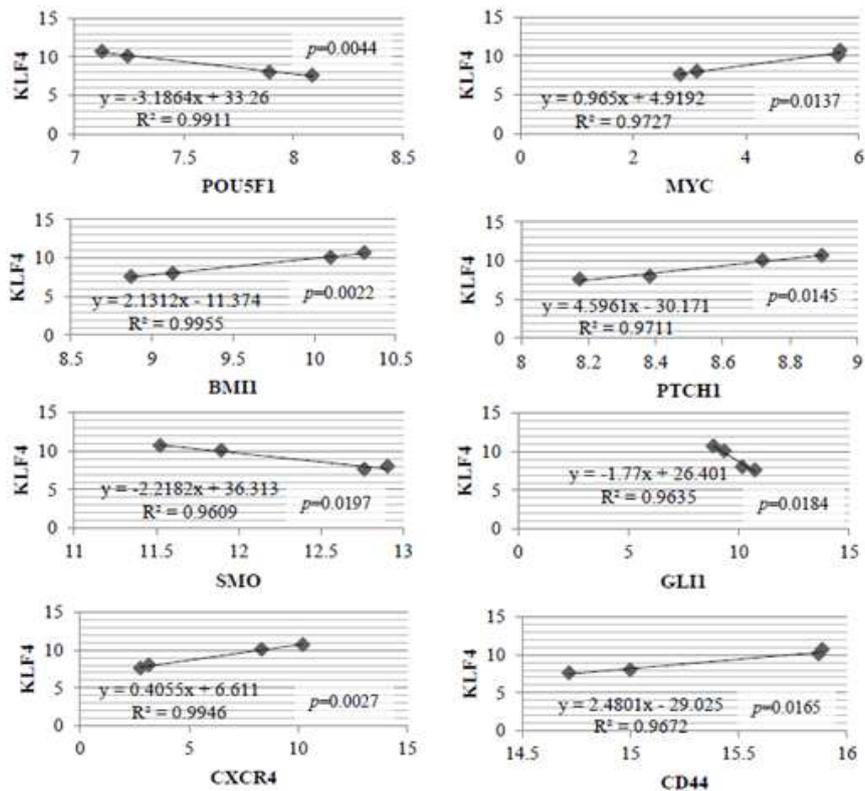
**a****b**

図7. 二次元培養と三次元培養に共通する幹細胞遺伝子発現変動

- (a) 二次元(Dish)培養と三次元(Spheroid)培養の多能性幹細胞遺伝子発現比較 (Fold change法)  
 (二次元培養: KLF4(3.10倍,\* $p=0.03$ ), MYC(1.56倍,\*\* $p<0.01$ ). 三次元培養: KLF4(5.94倍,\* $p=0.03$ ), MYC(6.38倍\* $p=0.03$ )).
- (b) KLF4と有意な相関がみられた幹細胞関連遺伝子  
 CD44と正の相関関係にあった。

## 2. Epstein-Barr virus (EBV) 感染と CD44

CD44 で、癌との関連がより示唆されているのは alternative splicing variants であり、その中でも CD44v6 は報告が多いだけでなく、1997 年に EBV 関連胃癌での高発現が報告されている。CD44v6 が EBV 関連胃癌の癌幹細胞マーカーであり、かつ、GES1-EBV でも発現が増加しているとなれば、CD44v6 は Cancer initiating cell への変化を示唆する可能性もあると考えた。

そこで、CD44v6 に着目し、GES1-EBV での発現増加を調べるとともに、それが EBV 関連胃癌の癌幹細胞マーカーである可能性を検証した。

### 2-1. GES1-EBV での CD44v6 の発現

二次元培養の GES1-EBV(#6,#8)において CD44v6 mRNA の発現は GES1 に比して増加の傾向にあった (Fold change, GES1-EBV(#6):2.37 倍、GES1-EBV(#8):1.14 倍)。また、その発現は血清の影響を受けており、無血清培地条件にした際の CD44v6 発現はさらに増加した (Fold change, GES1-EBV(#6):7.82 倍、GES1-EBV(#8):20.8 倍) (図 8a)。

GES1-EBV での CD44v6 発現増加は、蛋白レベルでも確認され (図 8b,c) 、 Real-time qPCR での結果と同様、Western Blot においても、GES1-EBV の CD44v6 発現量は GES1 と SNU719 との間にあった (図 8b) 。二次元培養の Cell block に対する免疫染色でも、GES1-EBV では GES1 に比較して、CD44v6 が細胞膜に陽性となる細胞が増えていた (図 8c) 。Spheroid の CD44v6 陽性細胞は、コラーゲンに浸潤する部分に存在していた (図 9) 。

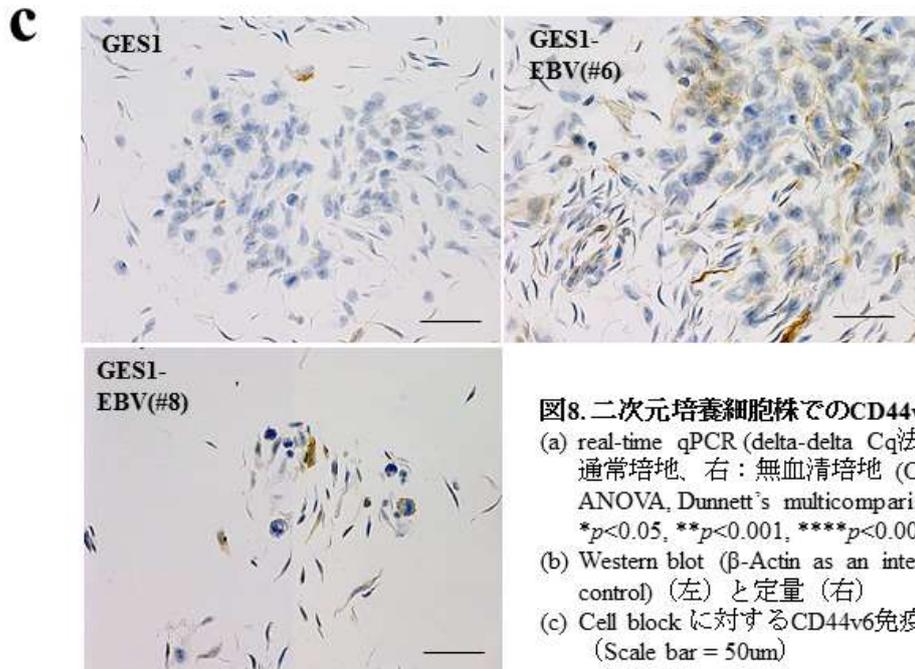
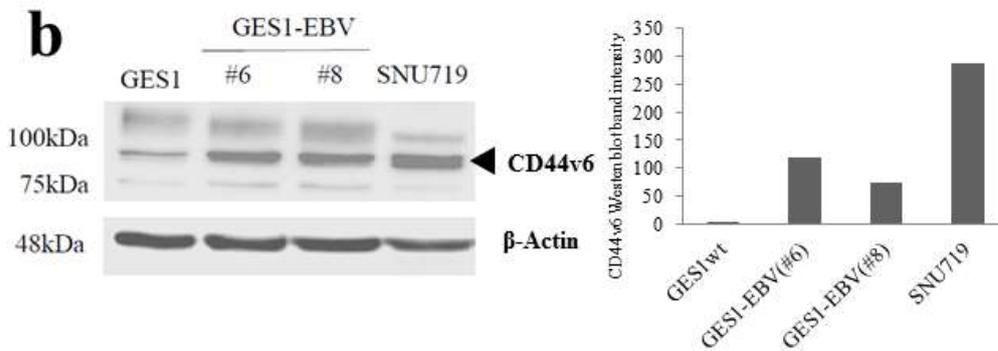
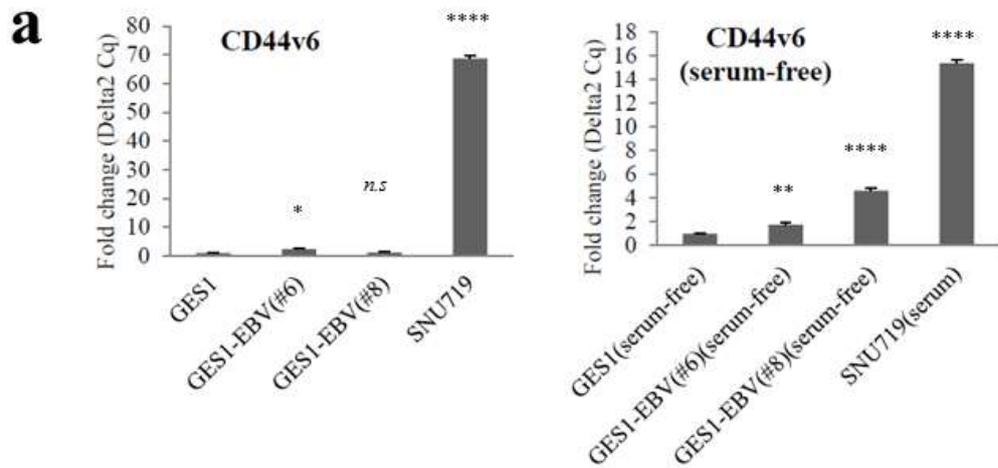


図8. 二次元培養細胞株でのCD44v6の発現  
 (a) real-time qPCR (delta-delta Cq法). 左: 通常培地、右: 無血清培地 (One-way ANOVA, Dunnett's multicomparison test; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ )  
 (b) Western blot ( $\beta$ -Actin as an internal control) (左) と定量 (右)  
 (c) Cell block に対するCD44v6免疫染色 (Scale bar = 50um)

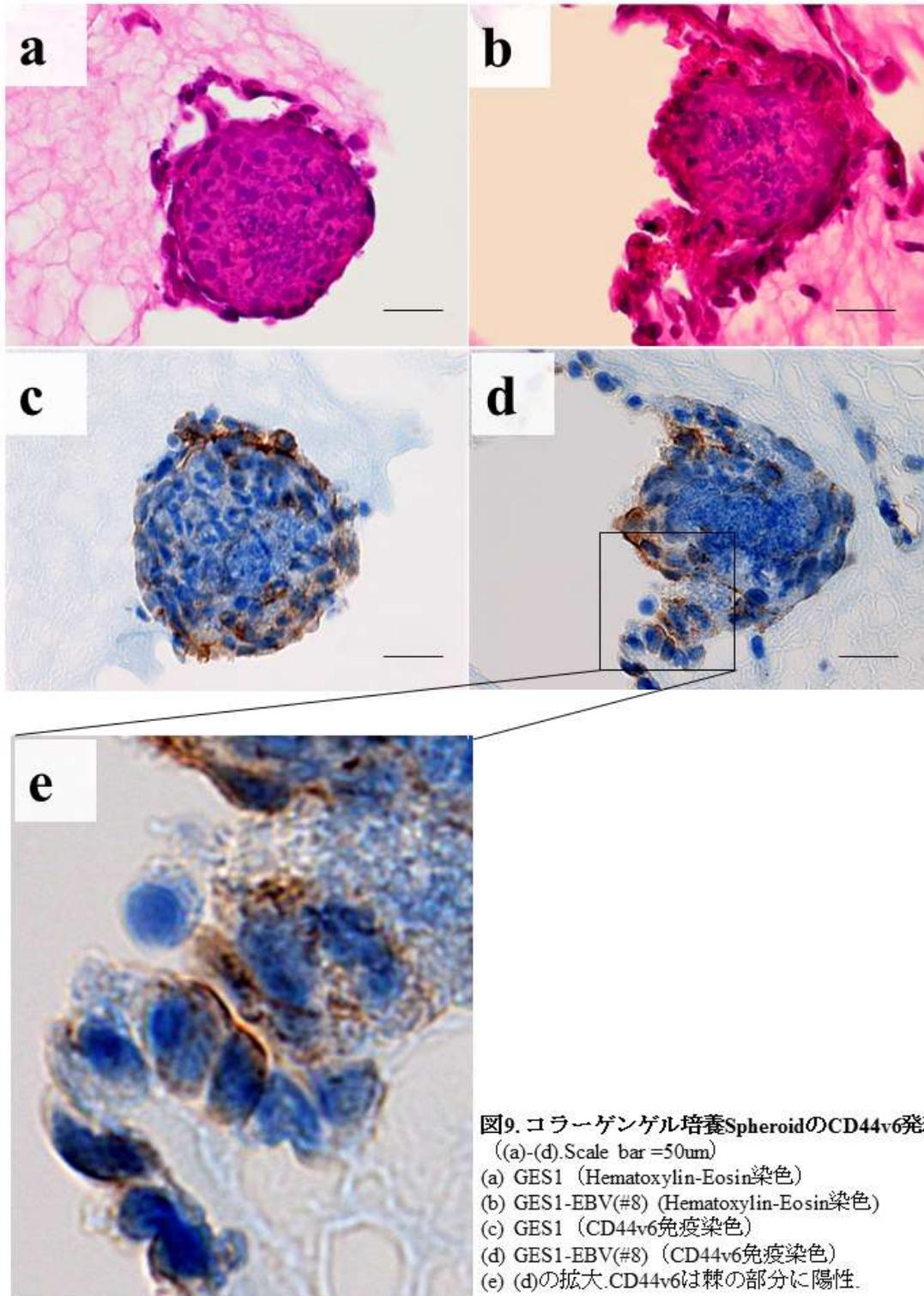


図9. コラーゲンゲル培養SpheroidのCD44v6発現

((a)-(d).Scale bar =50um)

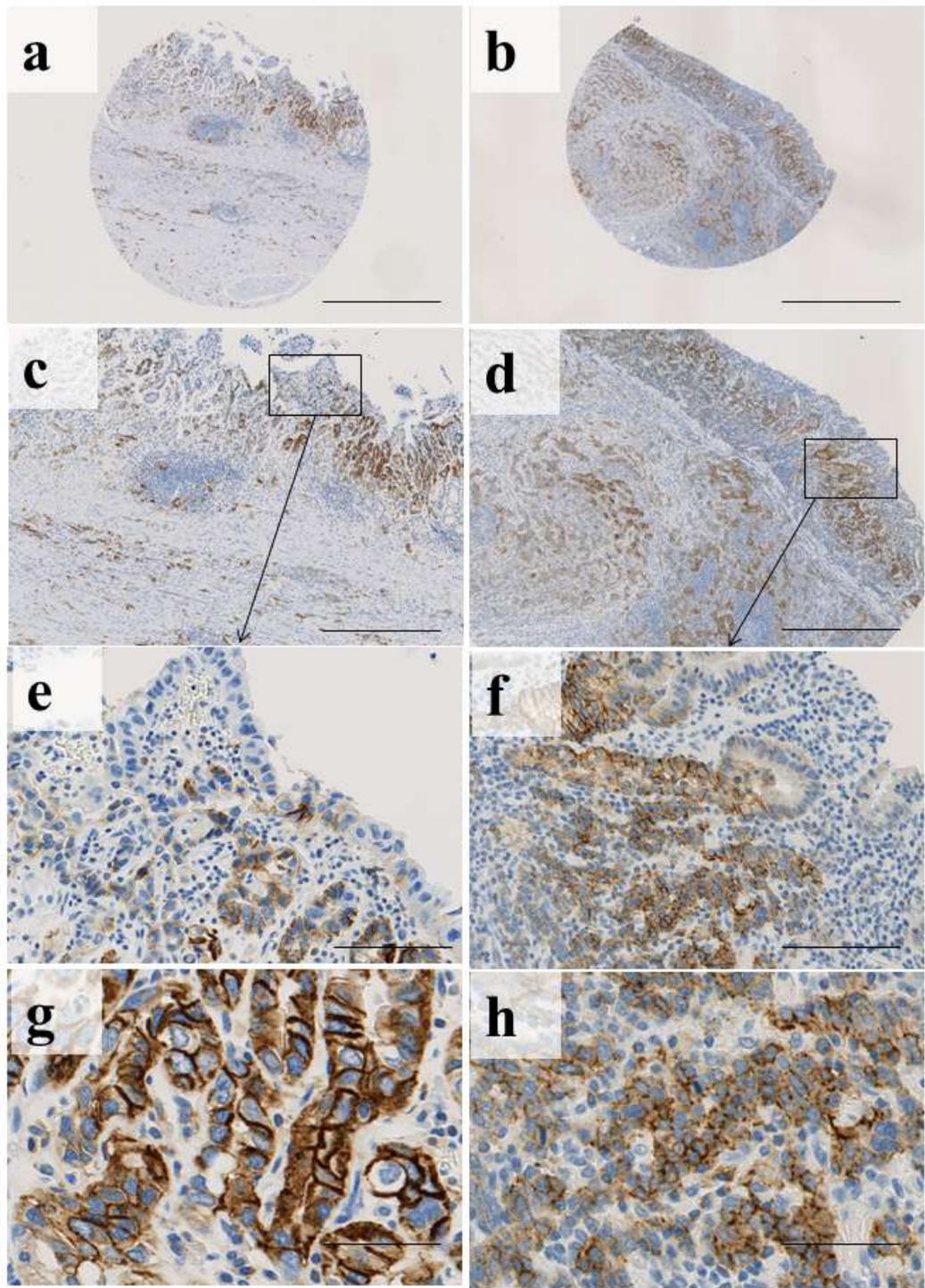
- (a) GES1 (Hematoxylin-Eosin染色)
- (b) GES1-EBV(#8) (Hematoxylin-Eosin染色)
- (c) GES1 (CD44v6免疫染色)
- (d) GES1-EBV(#8) (CD44v6免疫染色)
- (e) (d)の拡大.CD44v6は棘の部分に陽性.

## 2-2. EBV 関連胃癌での CD44v6 の発現

通常胃癌と EBV 関連胃癌を含めたヒト胃癌 TMA での CD44v6 発現を免疫組織学的に検討した。

ヒト胃癌 TMA に対する CD44v6 の免疫染色では、EBV の有無に関わらず、ほとんどの症例（89 例/90 例）で染色が確認され、症例により染色される範囲や強度は様々であり、染色態度には heterogeneity がうかがえた（図 10）。

通常胃癌と EBV 関連胃癌を比較すると、EBV 関連胃癌では、CD44v6 陽性領域の割合が高いことが示唆された（図 11a）。一方、染色強度に関して、両者に大差はなかったが（図 11b）、癌の局在が胃体上部から中部のものに限局して比較をすると、EBV 関連胃癌で染色強度が高い傾向にある可能性も示唆された（図 11c）。



**図10. 胃癌 (a,c,e,g) と EBV関連胃癌 (b,d,f,h) でのCD44v6免疫組織化学 (TMA)**  
 (a,c,e,g)と(b,d,f,h)は同一症例。(e)は(c)の拡大部、(f)は(d)の拡大部をそれぞれ示している。  
 (a)(b). Scale bar=1mm, (c)(d). Scale bar=500um, (e)(f). Scale bar=100um, (g)(h). Scale bar = 50um

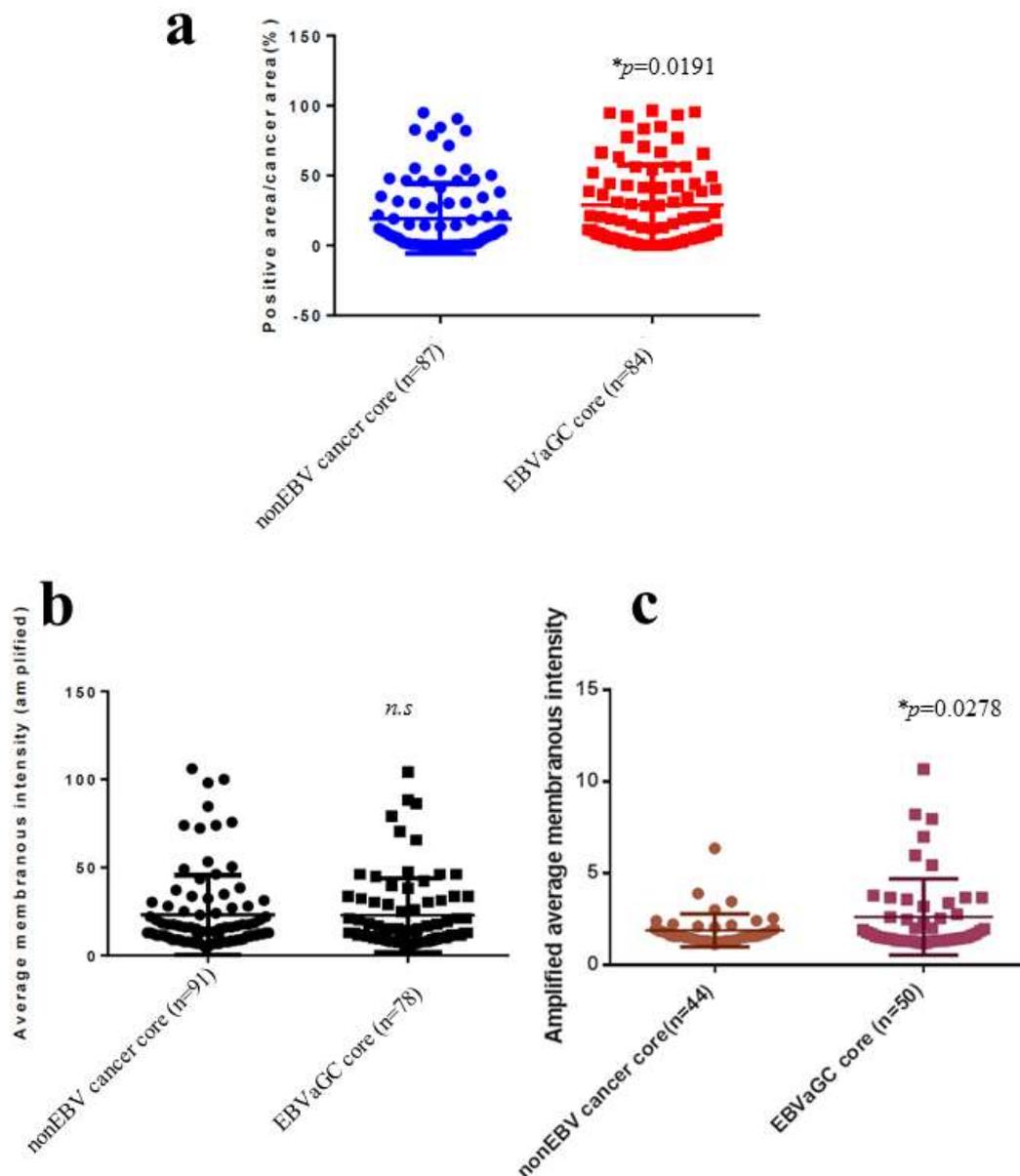


図11. 非EBV関連胃癌とEBV関連胃癌でのCD44v6発現の比較（ヒト胃癌TMA免疫組織化学）

- (a) 腫瘍部の全面積に対するCD44v6陽性領域の面積比率の比較（Image J, IHC-Tool boxでの解析）（Welch's T検定;  $p < 0.05$ ）
- (b) (c) 腫瘍部におけるCD44v6染色強度の比較（Tissue Studio, 解析でのAverage membranous intensity値(x)からWeighted score= $(10 \times x)^2$ を算出し、その値で比較を行った）（Welch's T検定;  $p < 0.05$ ）(b)は全コアに対する比較、(c)は癌の局在が胃体上部-中部のものに限局して比較を行ったものである

### 2-3. 胃癌細胞株での CD44v6 の発現

様々な胃癌細胞株での CD44v6 の細胞表面における発現を Flowcytometry で検討した (図 12)。

ほとんどの胃癌細胞株で CD44v6 発現が確認された。各々の EBV 感染株では、5 例中 1 例 (NUGC3:4.5%, NUGC3R:22.2%) に右方 shift がみられた。EBV 関連胃癌細胞株について、SNU719 では 32.6%、YCCEL1 では 34.6%、NCC17%であり、SNU719 と YCCEL1 での発現は高い傾向にあった。しかも、SNU719 では、CD44v6 低発現と高発現の 2 群に分かれるような hierarchy を思わせる二峰性の波形を示した。

### 2-4. EBV 関連胃癌細胞株 SNU719 での Cancer Stem cell 単離の試み

#### 2-4-1. SNU719 での CD44v6 と CD133 の共発現

Flowcytometer で SNU719 の CD44v6 高発現群と低発現群について、各々での CD133 発現を調べた。SNU719 では 1.2%の細胞が CD133 を発現している (図 13)。

CD44v6 (Fluorescein isothiocyanate(FITC)標識抗体) と CD133 (Phycoerythrin(PE)標識抗体) の共染色を SNU719 に対して行った。測定は蛍光補正の上、行った。CD44v6 及び CD133 の発現を蛍光強度によって High と Low に分け、High と Low の境界は FITC

及び PE のコントロールを参考に設定した。Prodipium Iodide (PI) 染色後、PerCP-Cy5.5 で蛍光を示すものは死細胞と考えて評価対象から除外した。

SNU719 では CD44v6 陰性細胞より、CD44v6 陽性細胞で CD133 陽性細胞の含有率が高かった (図 14)。

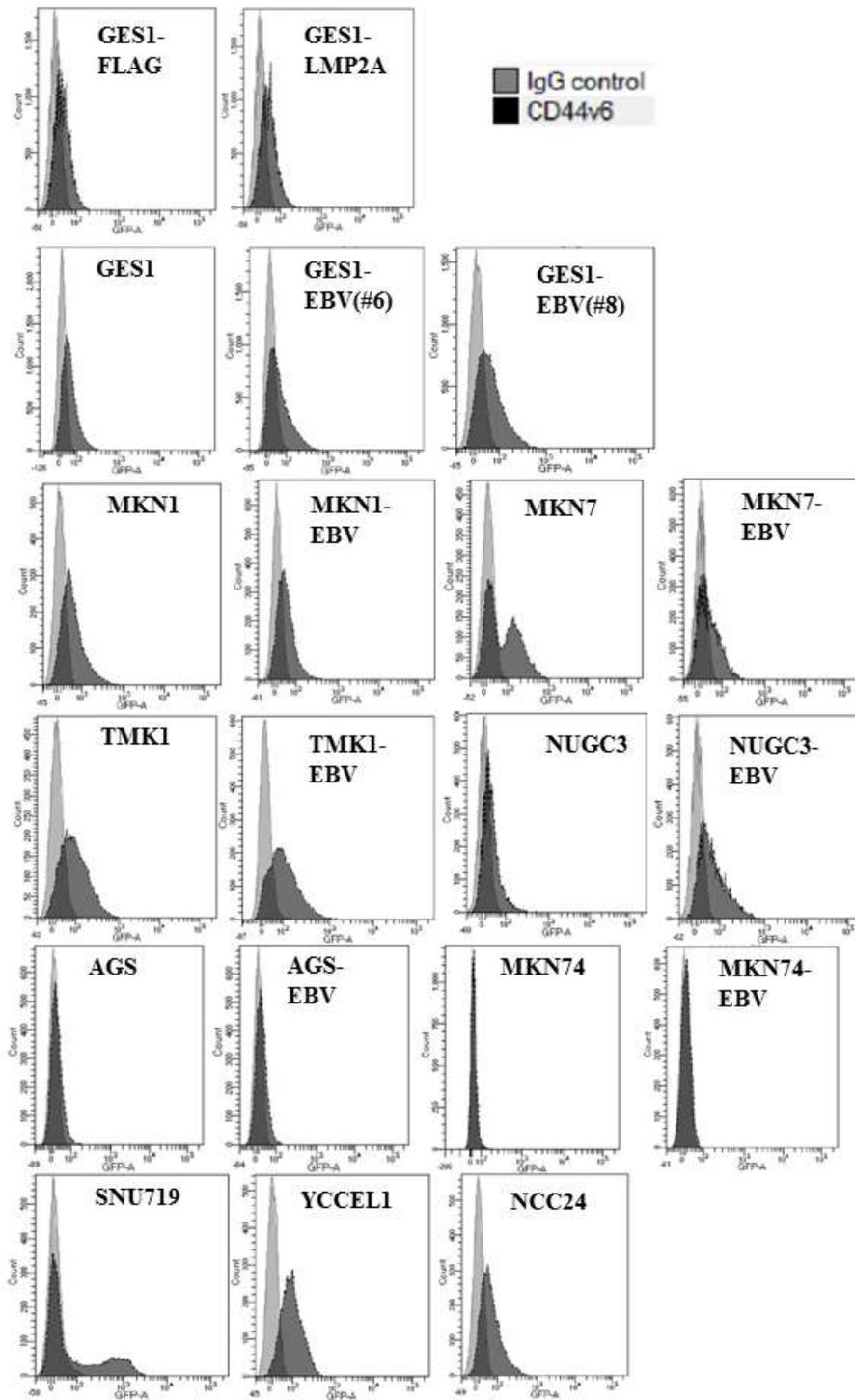


图12. CD44v6 Flowcytometry

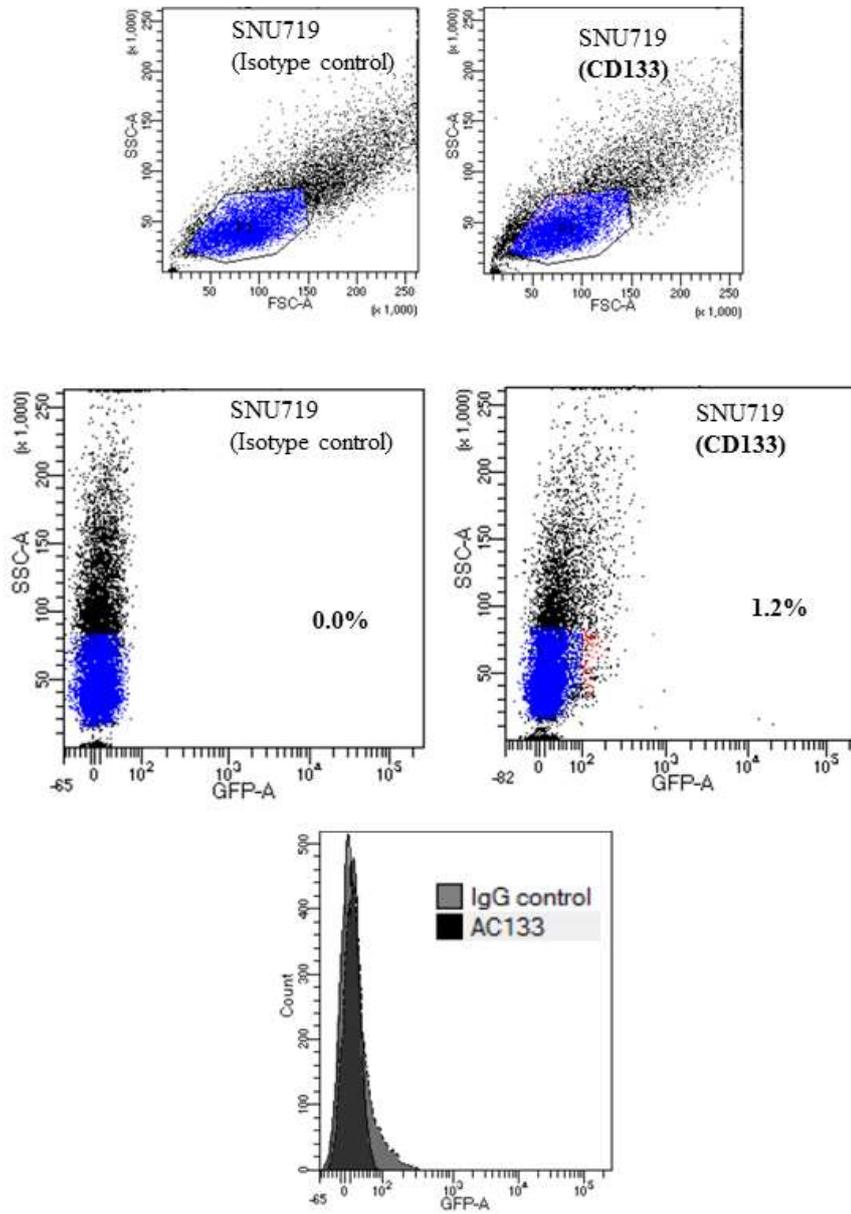


图13. CD133 Flowcytometry (SNU719)

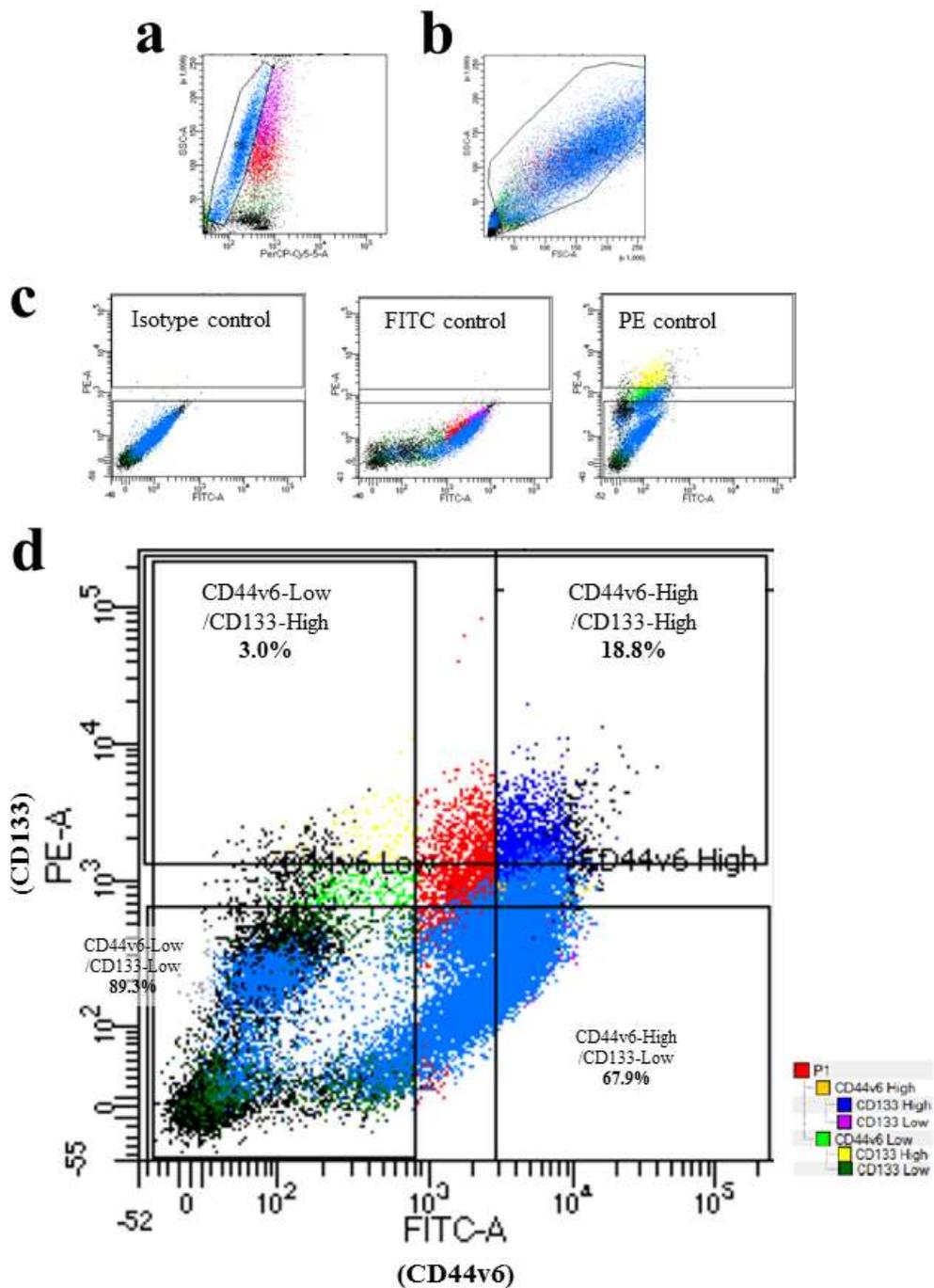


図14. CD133とCD44v6の二重染色 (SNU719)

- (a) Propidium Iodide (PI) 染色での死細胞除去 (水色)
- (b) (a)を参考に Lesionを決定した
- (c) 蛍光補正 (左端から Isotype control, FITC control, PE control)
- (d) CD133(PE標識)、CD44v6(FITC標識)の二重染色。CD44v6-Highは CD44v6-Lowに比べてCD133-Highの割合が高い。

#### 2-4-2. CD44v6 陽性群と陰性群でのコロニー形成の比較

次に、Magnetic activated cell sorting (MACS)で、SNU719 を CD44v6 陽性群

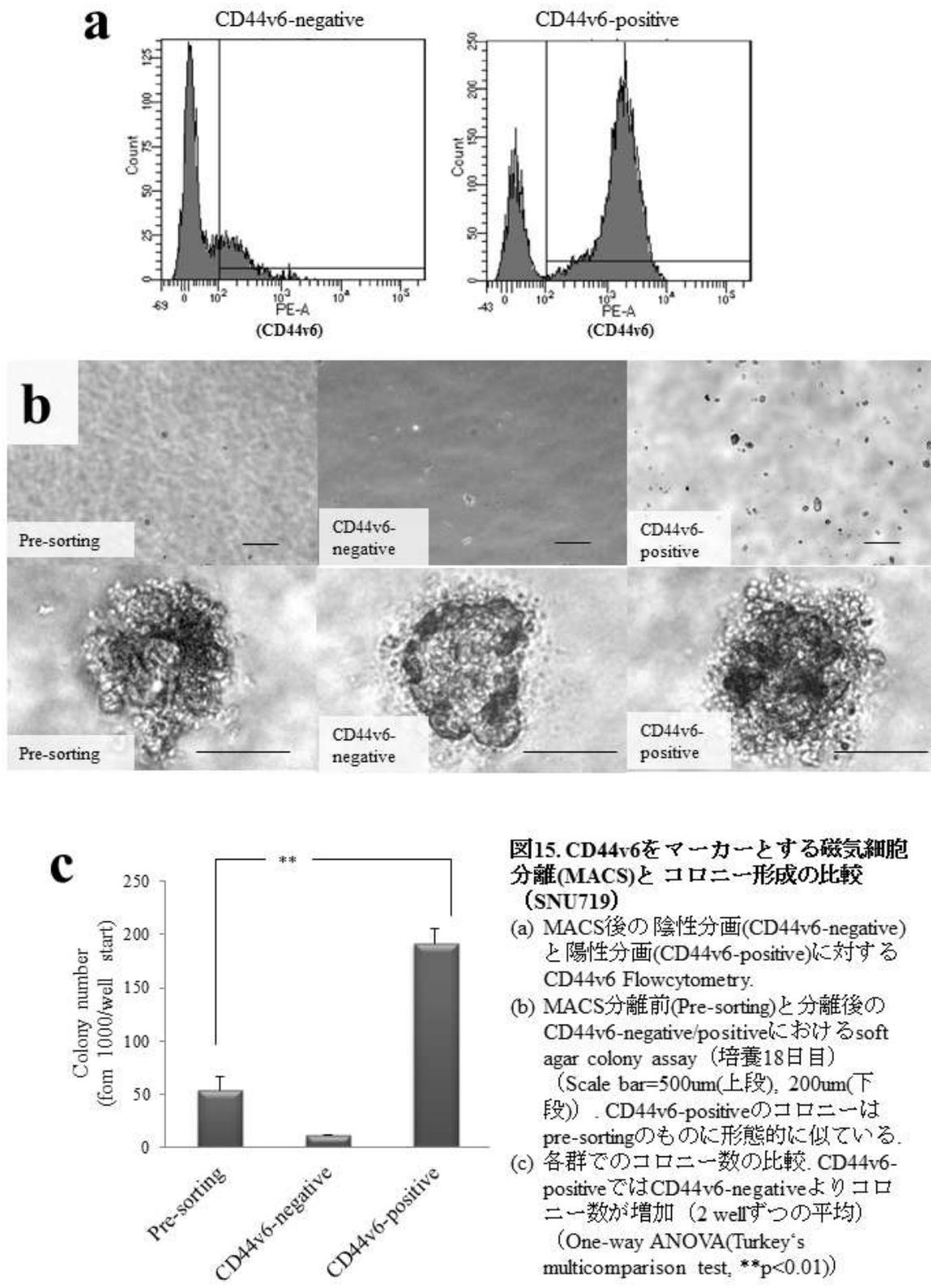
(CD44v6-positive) と陰性群 (CD44v6-negative) に分けて、分離精度を Flowcytometer で確認した後 (図 15a)、軟寒天培地での接着非依存性のコロニー形成をみた。

2 well ずつの平均コロニー数を比較したところ、分離前(Pre-sorting) ( $54 \pm 12.0$  個) 及び CD44v6 陰性群 ( $11 \pm 0.7$  個) に比べて、CD44v6 陽性群 ( $192 \pm 14.1$  個) で有意に高かった。(図 15b,c)。また、CD44v6 陽性群のコロニーは分離前(Pre-sorting)のコロニーに形態上類似する傾向にあった。

#### 2-4-3. CD44v6 陽性群と陰性群でのヌードマウスにおける腫瘍形成

MACS で分離した SNU719 の CD44v6 陽性群 (CD44v6-positive) と陰性群

(CD44v6-negative) をヌードマウスの大腿部皮下に移植し、腫瘍形成能について検討した (図 16a)。4 匹のヌードマウスに移植し、CD44v6 陽性群 (CD44v6-positive) を移植した 2 匹の皮下に腫瘍形成が確認された (図 16b,c)。皮下腫瘍のみられたものの 1 匹の腫瘍の肉眼的最長径は 1.1cm、重量は 0.224g であった (図 16c)。残りの 1 匹の腫瘍最長径は 0.5cm であり、現在も経過観察中である。

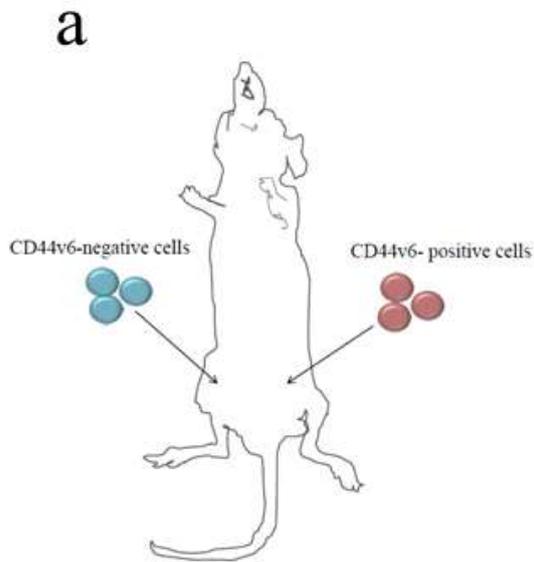


**図15. CD44v6をマーカーとする磁気細胞分離(MACS)とコロニー形成の比較 (SNU719)**

(a) MACS後の陰性分画(CD44v6-negative)と陽性分画(CD44v6-positive)に対するCD44v6 Flowcytometry.

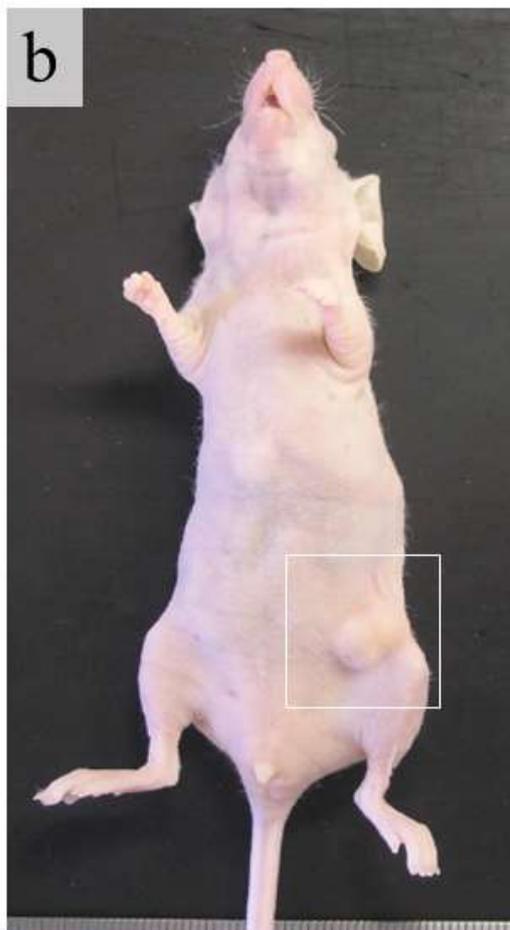
(b) MACS分離前(Pre-sorting)と分離後のCD44v6-negative/positiveにおけるsoft agar colony assay (培養18日目) (Scale bar=500um(上段), 200um(下段)). CD44v6-positiveのコロニーはpre-sortingのものに形態的に似ている.

(c) 各群でのコロニー数の比較. CD44v6-positiveではCD44v6-negativeよりコロニー数が増加 (2 wellずつの平均) (One-way ANOVA(Turkey's multicomparison test, \*\*p<0.01))



**図16. ノードマウスでの腫瘍形成**

磁気細胞分離法 (MACS) により分離した CD44v6陽性群 (CD44v6-positive)、CD44v6陰性群 (CD44v6-negative) をノードマウス (計4匹) に移植した。



(a) 移植部位 (シエーマ)

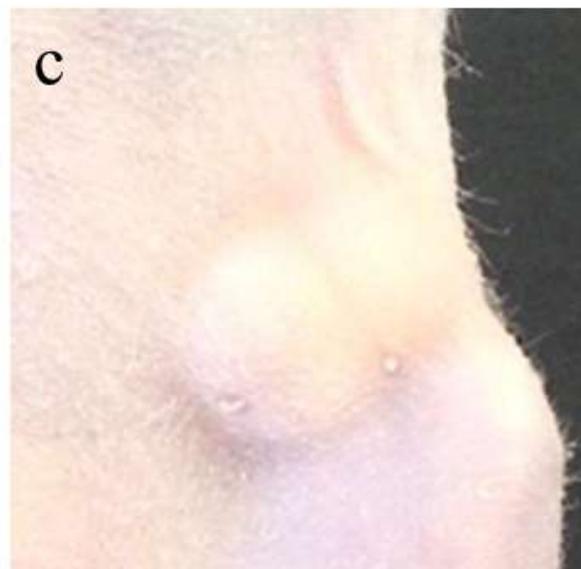
図のように陽性群と陰性群をマウスの両側大腿部皮下に2000個ずつ移植

(b) CD44v6陽性群移植部位に腫瘍形成

(代表的写真) 89日目に解剖。解剖時3匹 (経過中1匹死亡)。2匹で、CD44v6陽性群移植部位に腫瘍形成がみられた。

(c) 皮下腫瘍(b:白枠)の拡大

写真の皮下腫瘍は長径1.1cm、重量0.224gであった。



### 3. Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) と Stemness Enrichment

幹細胞様細胞の増加については、2013年にLMP2Aの関与が示唆されている[45]。加えて、100週齢のLMP2Aトランスジェニックマウスの一部に胃腫瘍が形成されるといふ報告も存在する（日比谷ら、2012年学位論文）。従って、LMP2Aの幹細胞様細胞増加作用が発癌に関与している可能性が推測される。

そこで、GES1でもLMP2Aの幹細胞様細胞増加の所見が得られるかについて、LMP2A遺伝子を導入したGES1細胞株（GES1-LMP2A）を用いて検証するとともに、トランスジェニックマウスでの胃腫瘍形成から、LMP2Aの発癌における役割を検討した。

#### 3-1. LMP2A 導入 GES1 細胞株（GES1-LMP2A）の幹細胞性

GES1-LMP2Aの、コントロール（GES1-FLAG）に対する幹細胞性変化について、コラーゲンゲルでのコロニー形成・浸潤能、三次元形態変化、遺伝子発現の観点から比較を行った。

### 3-1-1. GES1-LMP2A の足場依存性コロニー形成

GES1-LMP2A では GES1-EBV(#6)と同様にコラーゲン中でのコロニー形成率が高く

(GES1-FLAG: $7 \pm 2.3$  個、GES1-LMP2A: $36 \pm 9.5$  個)、コロニーは大きく、棘状の形態を示した (図 17)。

### 3-1-2. GES1-LMP2A での spheroid 形態の変化

GES1-EBV と同様、GES1-LMP2A での spheroid 形態も複雑性の高い構築を形成した。

GES1-FLAG に対する GES1-LMP2A でのフラクタル次元も有意に上がっており、コラーゲンでの浸潤面積も有意差はなかったが、増加の傾向があった (図 18)。

### 3-1-3. GES1-LMP2A での CD44v6 蛋白の発現

CD44v6 蛋白の細胞膜表面発現は、GES1-FLAG で 4.2%、GES1-LMP2A で 10.4% と増加しており (図 19a)、同程度に CD133 蛋白発現も増加していた (GES1-FLAG:0.8%、GES1-LMP2A:1.6%) (図 19b)。

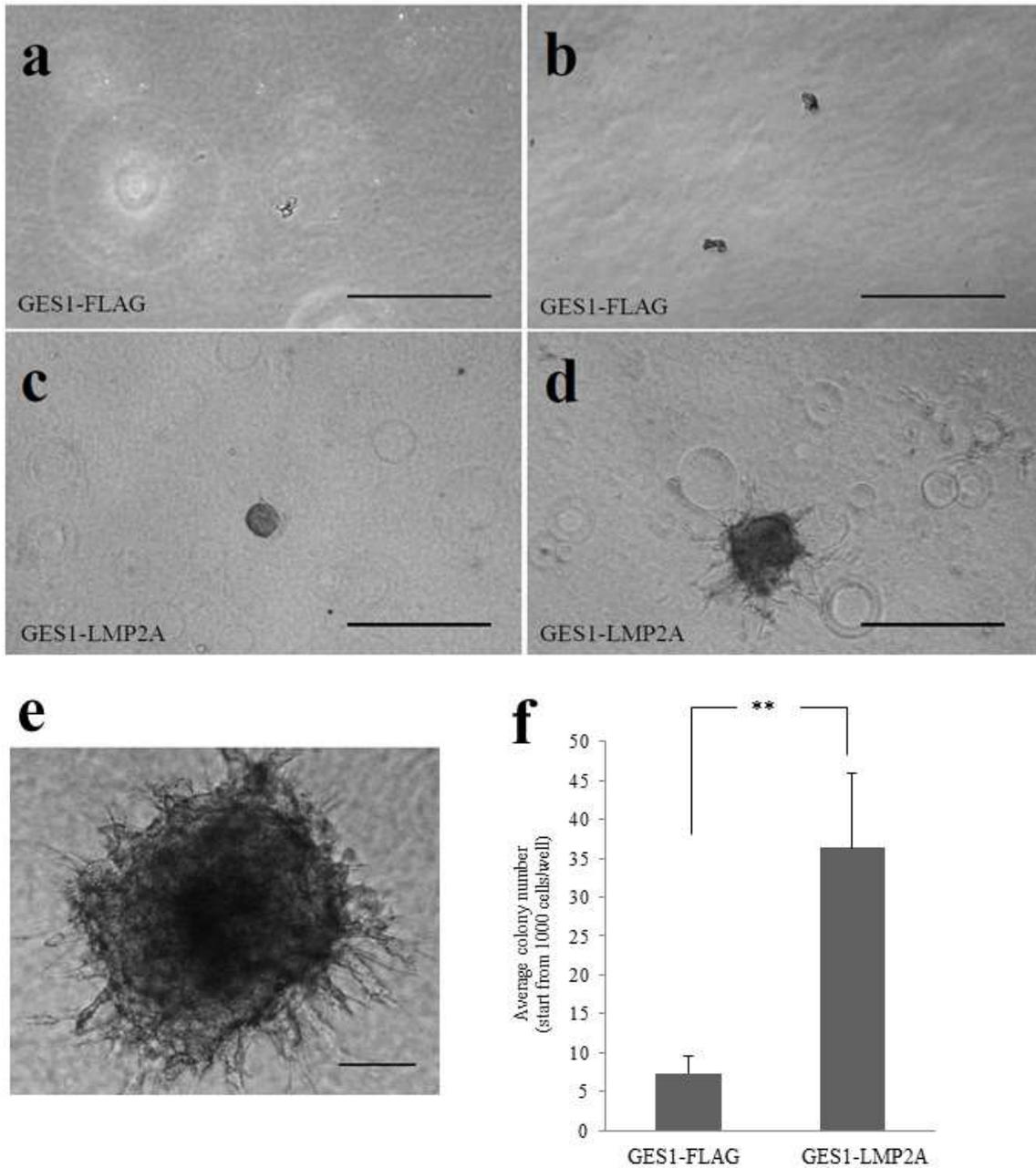


図17. コラーゲンゲル中でのコロニー形成の比較 (GES1-FLAG, GES1-LMP2A)

(a)-(d) 培養18日目の顕微鏡写真 ((a)(b):GES1-FLAG, (c)(d):GES1-LMP2A) ( Scale bar =500um)  
 (e) GES1-LMP2Aの代表的なコロニーの顕微鏡写真(Scale bar = 100um). 周囲の棘状構造が特徴的である。

(f) 平均コロニー形成数の比較. (unpaired t test, \*\*p<0.01).  
 各々3wellずつ計測。GES1-LMP2Aでコロニー数が増加。

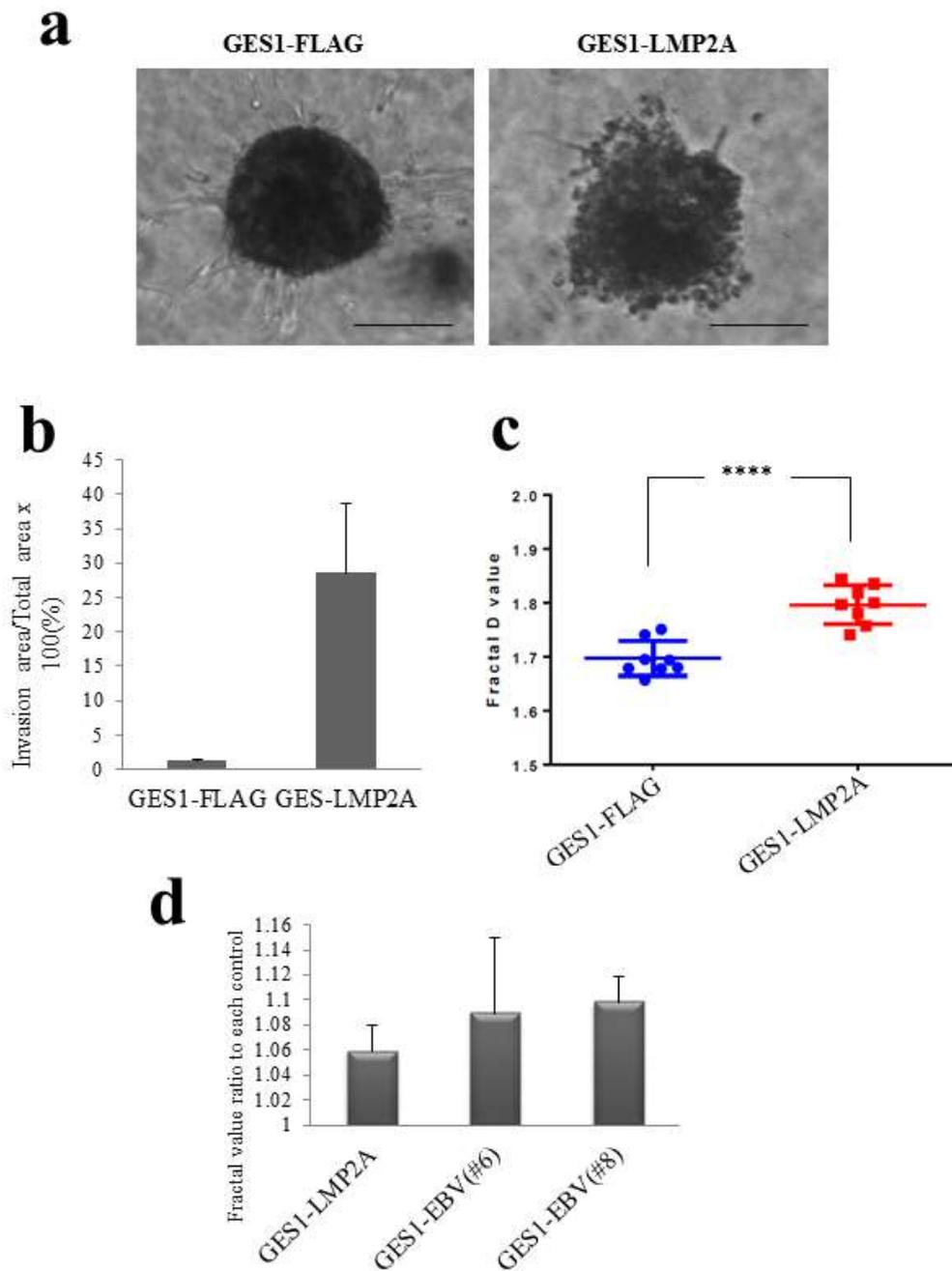
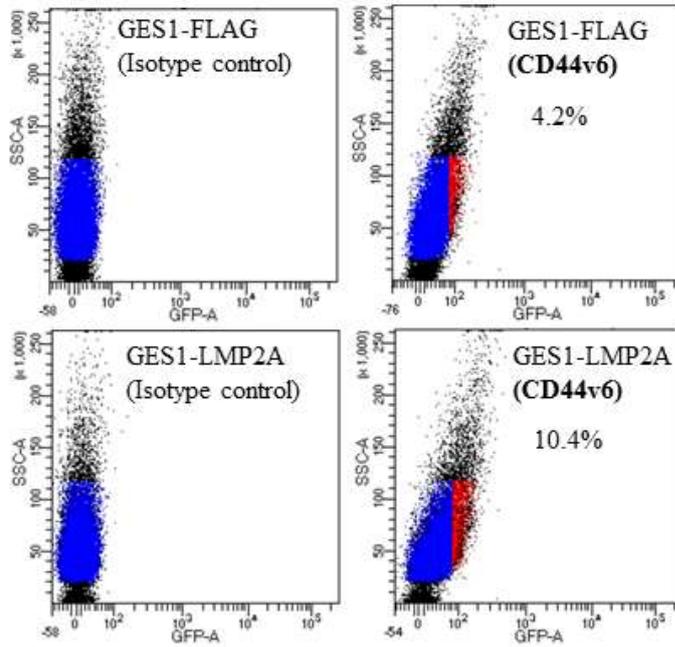


図18. Spheroidの形態変化 (GES1-FLAG, GES1-LMP2A)

- (a) コラーゲンゲル培養 Spheroid顕微鏡写真 (培養4日目のspheroidに対しコラーゲンゲル注入後72時間の撮影)。Scale bar = 100 $\mu$ m.
- (b) (a)の浸潤面積比較 (GES1-FLAG: n=2, GES1-LMP2A: n=3)
- (c) Spheroid (培養4日目)での Fractal Box Count解析 (unpaired t test,  $p < 0.05$ ) \*\*\*\* $p < 0.0001$  (GES1-FLAG: n=8, GES1-LMP2A: n=8)
- (d) GES1-LMP2A, GES1-EBV(#6), GES1-EBV(#8)での各々のコントロールに対するフラクタル次元相対比の比較。

**a**



**b**

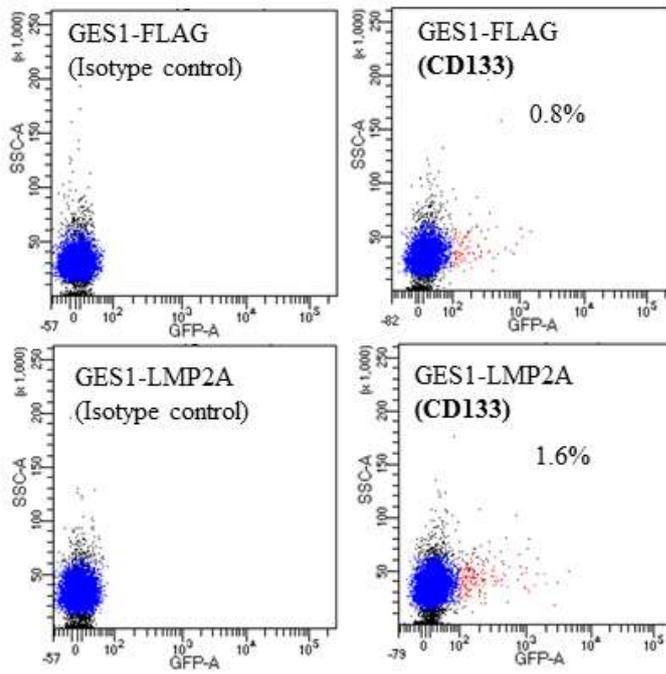


図19. GES1-LMP2Aでの表面発現の変化 (CD44v6、CD133)

(a) CD44v6 Flowcytometry.

(b) CD133 Flowcytometry.

### 3-2. LMP2A と発癌

日比谷ら（2012 年学位論文）の報告によれば、LMP2A トランスジェニックマウスでは腫瘍が形成されるが、その頻度は低い（2 例／25 例）。

近年、炎症性発癌モデルマウスとして Wnt1/C2mE (Gan) マウスが知られている。

Wnt1/C2mE マウスは、Proto-oncogene である Wnt1 遺伝子、アラキドン酸カスケードを構成し炎症に関与する COX-2 遺伝子／mPGES1 遺伝子（以下、C2mE）を共発現するトランスジェニックマウスである。このマウスは、Wnt1 単独トランスジェニックマウスや C2mE トランスジェニックマウスと比較して、高率に胃腫瘍を形成することがわかっており、炎症の腫瘍促進作用を示すモデルとなっている。以上をふまえて、LMP2A/C2mE マウスを作成し、胃腫瘍形成について調べることにした。

#### 3-2-1. トランスジェニックマウスでの胃腫瘍形成

20-25 週齢の Wild type マウス、LMP2A マウス、C2mE マウス、Wnt1/C2mE マウス、LMP2A/C2mE マウス、LMP2A/Wnt1/C2mE マウスでの胃腫瘍形成を調べた。

Wnt1/C2mE マウスでは、既報告にあるように、前胃-腺胃境界部に腫瘍を形成したが、

同様の腫瘍形成は、LMP2A/C2mE マウスにもみられ (図 20)、LMP2A マウスや C2mE マウスには明らかではなかった。

腫瘍好発部位である前胃-腺胃上部の胃粘膜について、組織学的に Dysplasia の評価 (図 21a,b) をし、各 genotype 間で比較を行った。

Dysplasia Grade 3 は、正常腺胃にはない高度の異型を呈する病変で、ヒトの Adenocarcinoma に相当する。この Dysplasia Grade 3 は、LMP2A/C2mE マウス、Wnt1/C2mE マウス、LMP2A/Wnt1/C2mE マウスの 3 つの genotype にだけにみられた。さらに、LMP2A/Wnt1/C2mE マウスでは、Wnt1/C2mE マウスに比べて、Dysplasia Grade 3 の頻度が高い傾向があった (図 21c)。

以降、Dysplasia 3 の症例を「腫瘍」と表記する。

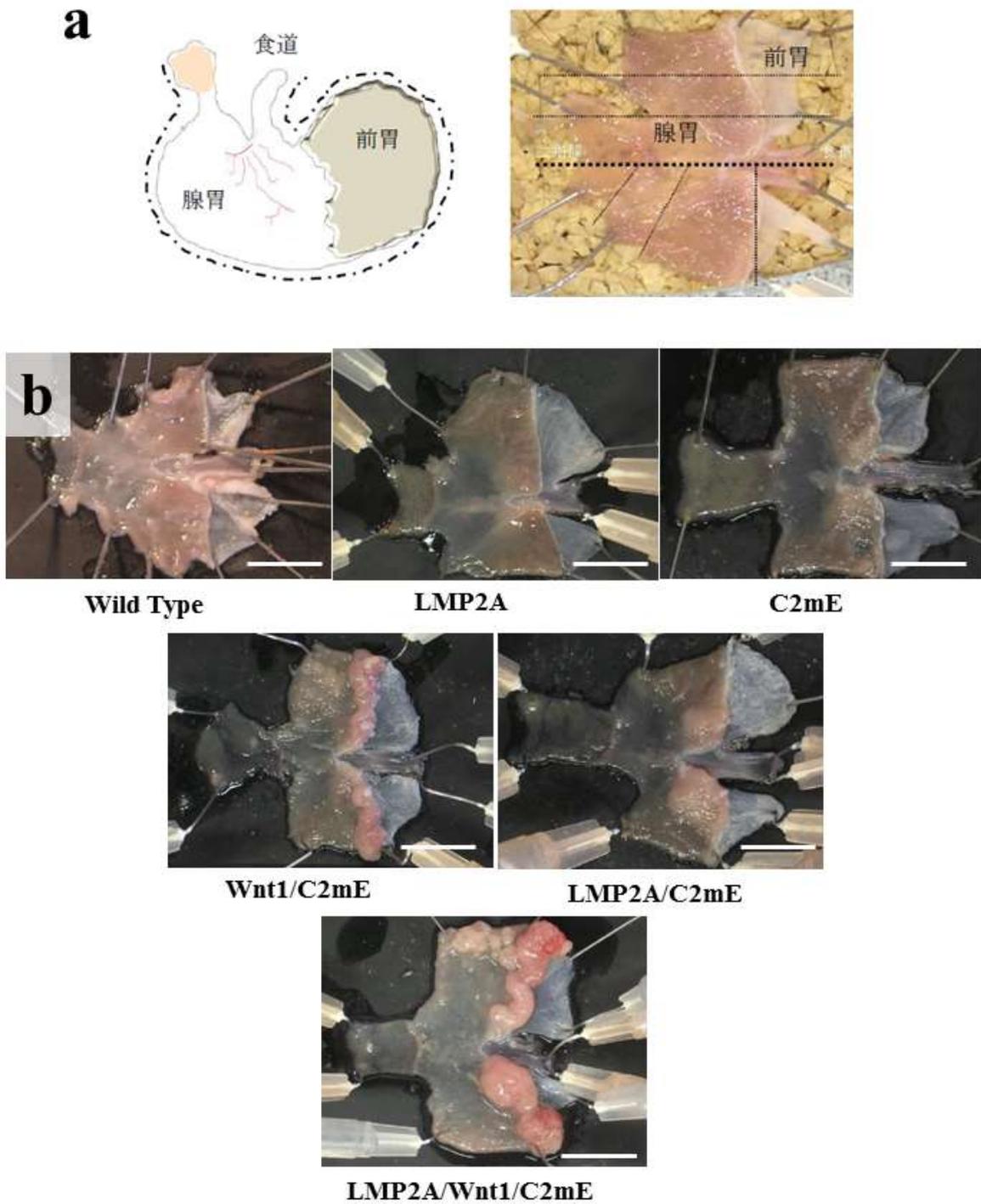


図20. トランスジェニックマウスの胃粘膜変化

(a) トランスジェニックマウス胃解剖模式図。大彎で開き、長軸方向に割をいれ標本にした  
 (b) 25週齢胃肉眼写真 (Wild type, LMP2A, C2mE, Wnt1/C2mE, LMP2A/C2mE, LMP2A/Wnt1/C2mE) scale bar =1cm

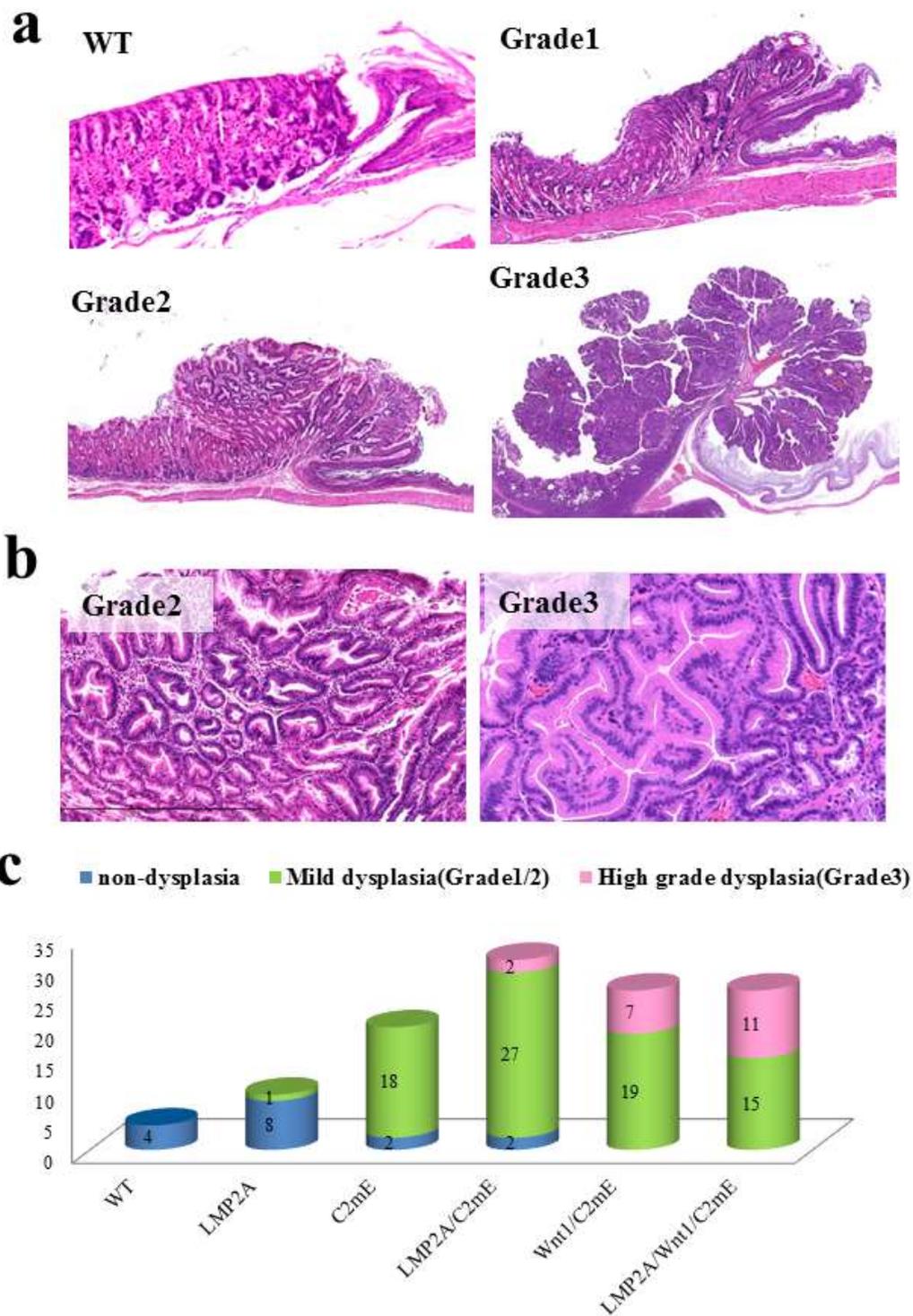


図21. トランスジェニックマウス胃の不整粘膜 (Dysplasia) 評価

(a) WT(Dysplasiaなしのコントロール), Grade 1, Grade 2, Grade 3の代表例。

(b) Grade 2とGrade 3の代表的拡大写真。Grade 3の腺管の方が複雑に入り組んでいる

(c) トランスジェニックマウス dysplasiaの評価内訳。ヒト胃癌に近いGrade3はWT, LMP2A, C2mE,ではみられず, LMP2A/C2mE, Wnt1/C2mE, LMP2A/Wnt1/C2mEの個体に認められた。縦軸と棒グラフ内の数字は個体数を表している。

### 3-2-2. LMP2A/C2mE マウスでの Cd44 発現

トランスジェニックマウスでの胃腫瘍形成から、LMP2A に腫瘍形成を促進する作用があり、そして、その促進作用は炎症によって顕在化する可能性が示唆された。

LMP2A の幹細胞性増加作用が腫瘍形成に重要である可能性を検討するため、

LMP2A/C2mE マウスの腫瘍での幹細胞関連遺伝子発現について、LMP2A/C2mE マウスの背景粘膜（非腫瘍）と C2mE マウスの胃粘膜（非腫瘍）の両者に対する比較を行った。

マイクロアレイ発現値で、LMP2A/C2mE マウスの腫瘍で、LMP2A/C2mE マウスの背景粘膜（非腫瘍）、及び、C2mE マウスの胃粘膜（非腫瘍）に比べて 1.5 倍以上増加していた遺伝子をリストアップした（図 22）。その結果、リストアップされた遺伝子の中に、Cd44 があり、LMP2A/C2mE 背景粘膜の 20.6 倍、C2mE 胃粘膜の 3.2 倍であった。

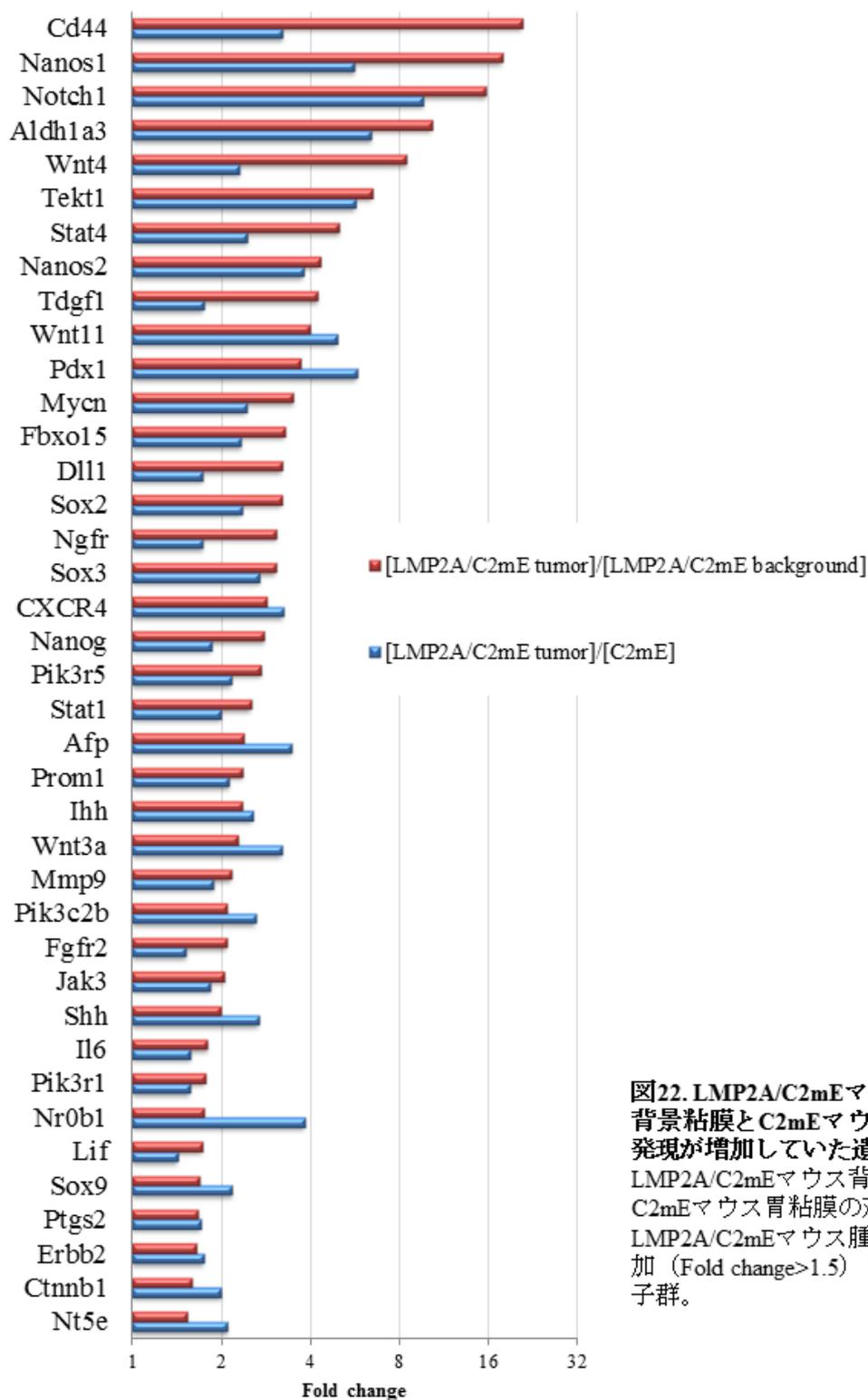


図22. LMP2A/C2mEマウス腫瘍で背景粘膜とC2mEマウス粘膜に対し発現が増加していた遺伝子  
 LMP2A/C2mEマウス背景胃粘膜とC2mEマウス胃粘膜の双方に対し、LMP2A/C2mEマウス腫瘍で発現が増加 (Fold change>1.5) している遺伝子群。

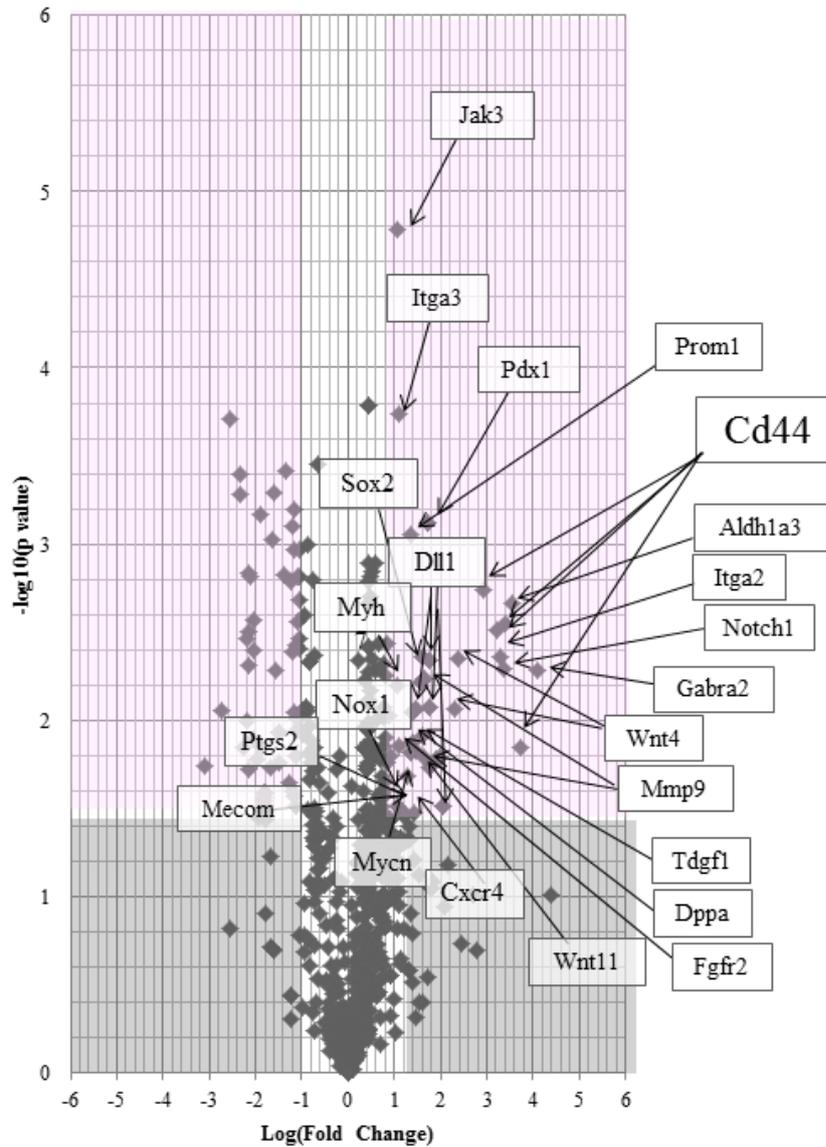
### 3-2-3. 腫瘍と stemness enrichment、Cd44 発現

マイクロアレイ発現値で、腫瘍群（LMP2A/C2mE 腫瘍、Wnt1/C2mE 腫瘍、LMP2A/Wtn1/C2mE 腫瘍）と非腫瘍群（Wild type 粘膜、LMP2A 粘膜、C2mE 粘膜、LMP2A/C2mE 背景粘膜、Wnt1/C2mE 背景粘膜）の 2 群間比較を行った。

腫瘍群の非腫瘍群に対するマイクロアレイ発現変動遺伝子（Fold change>2 or <-2、かつ、Welch's T 検定  $p$  値<0.05 を満たす遺伝子）を抽出し、volcano plot で描出した。

Volcano plot では、Fold change=2 ( $\text{Log}_2[\text{Fold change}]=1$ )と  $p$  値=0.05 ( $-\text{Log}_{10}[p \text{ 値}]=1.30$ )で線引きをし、辺縁 4 つの分画に分けた場合、有意な発現増加遺伝子は第 1 象限、有意な発現低下遺伝子は第 2 象限にみられる。

CD44 は腫瘍で有意な発現増加遺伝子であった。CD44 と有意な相関関係にあった幹細胞関連遺伝子を図 23a,b に示した。CD44 は、Prom1 (CD133)や Aldh1a3、Sox2、Mmp9 と正の相関関係にあった。



**図23(a). トランスジェニックマウス2群間比較**  
 非腫瘍性病変 (WT, C2mE, LMP2A/C2mE, Wnt1/C2mE) に対する腫瘍  
 (LMP2A/C2mE, Wnt1/C2mE, LMP2A/Wnt1/C2mE) の発現増加変動遺伝子 (Fold change > 1 and  
 Welch's t test  $p < 0.05$ ) の抽出 (Volcano plot)。

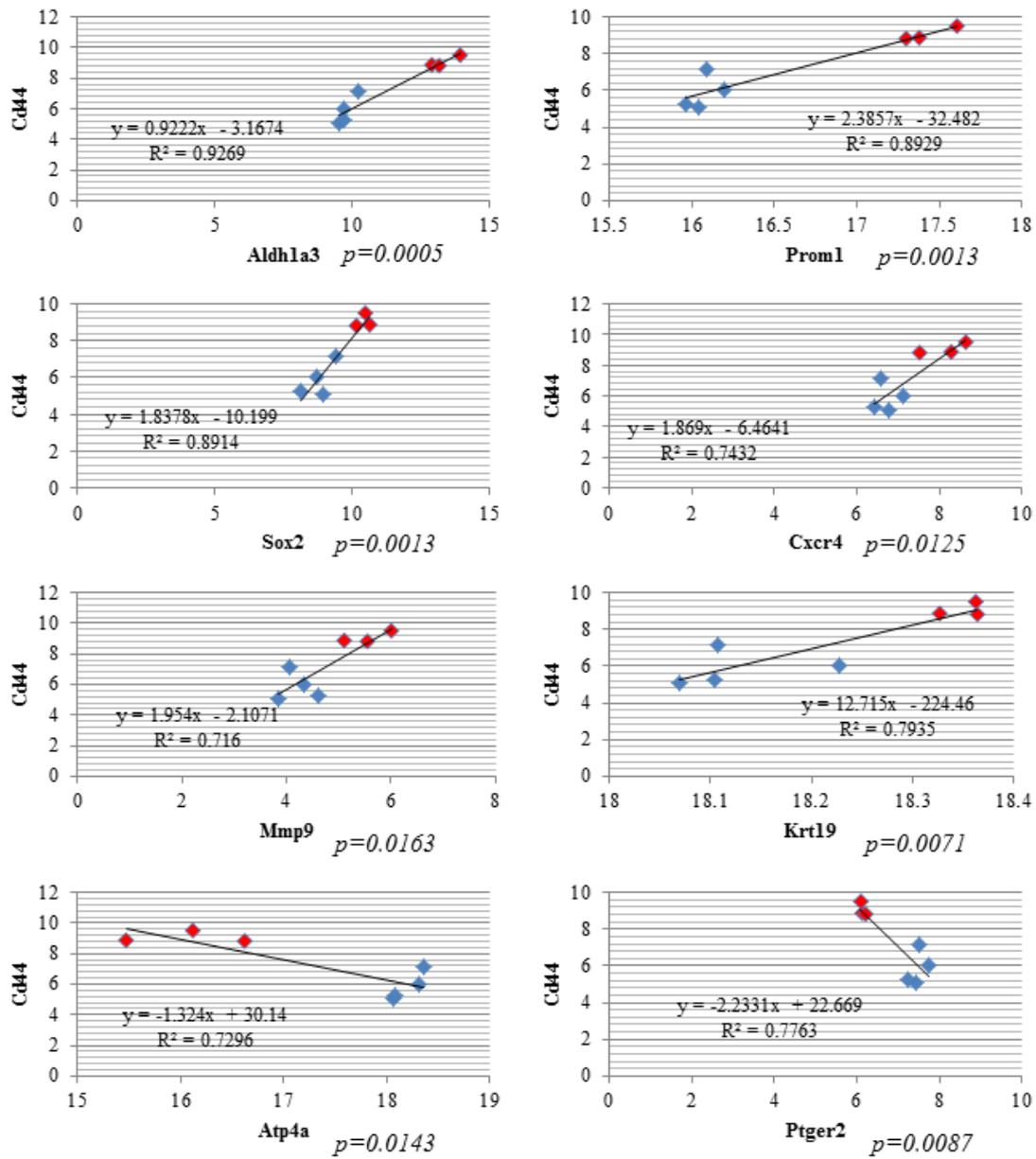


図23(b). トランスジェニックマウスCd44に対する単回帰分析

Cd44と他の幹細胞マーカーとのマイクロアレイシグナル値の単回帰分析 (T検定  $p < 0.05$ )  
 点は青色が非腫瘍 (WT, C2mE, LMP2A/C2mE[背景], Wnt1/C2mE[背景])、赤色が腫瘍  
 (LMP2A/C2mE[腫瘍], Wnt1/C2mE[腫瘍], LMP2A/Wnt1/C2mE[腫瘍]) を示す。

#### 3-2-4. LMP2A と CD44v6 発現

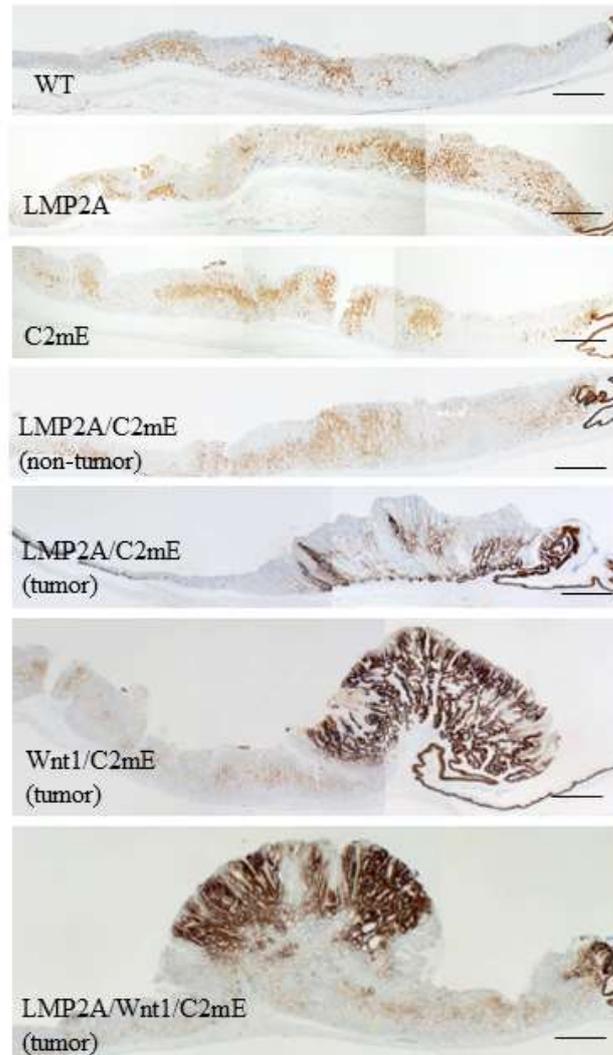
25 週齢のトランスジェニックマウス (Wild type、LMP2A、C2mE、LMP2A/C2mE、Wnt1/C2mE、LMP2A/Wnt1/C2mE) の胃組織標本 (各々3 例) に対して、CD44v6 免疫染色を行った (図 24、図 25)。正常 (Wild type) では前胃の重層扁平上皮の基底付近の細胞に陽性となり、腺胃は陰性となる。

LMP2A/C2mE マウス、Wnt1/C2mE マウス、LMP2A/Wnt1/C2mE マウスの腫瘍では、全例に CD44v6 が陽性となった (図 25)。

正常粘膜、および、腫瘍性粘膜 (Dysplasia Grade 3) の単位長あたりの CD44v6 陽性面積を比較したところ、CD44v6 の陽性面積は、腫瘍で有意に増加していた (図 26b)。

25 週齢の LMP2A/C2mE マウス腫瘍組織 (3 例) と C2mE 非腫瘍組織 (4 例) の CD44v6 免疫染色標本に対して、CD44v6 陽性面積の比較を行った。

その結果、LMP2A/C2mE マウスでは、C2mE マウスに比べて、CD44v6 陽性領域の割合が高い傾向にあった (図 26c)。



**図24. トランスジェニックマウス胃CD44v6免疫組織化学**

20-25週齢のWild type, LMP2A, C2mE, LMP2A/C2mE, Wnt1/C2mE, LMP2A/Wnt1/C2mEマウスの代表的なCD44v6免疫染色像。正常(Wild type)では前胃重層扁平上皮に陽性、腺胃には陰性となる。Scale bar = 500um

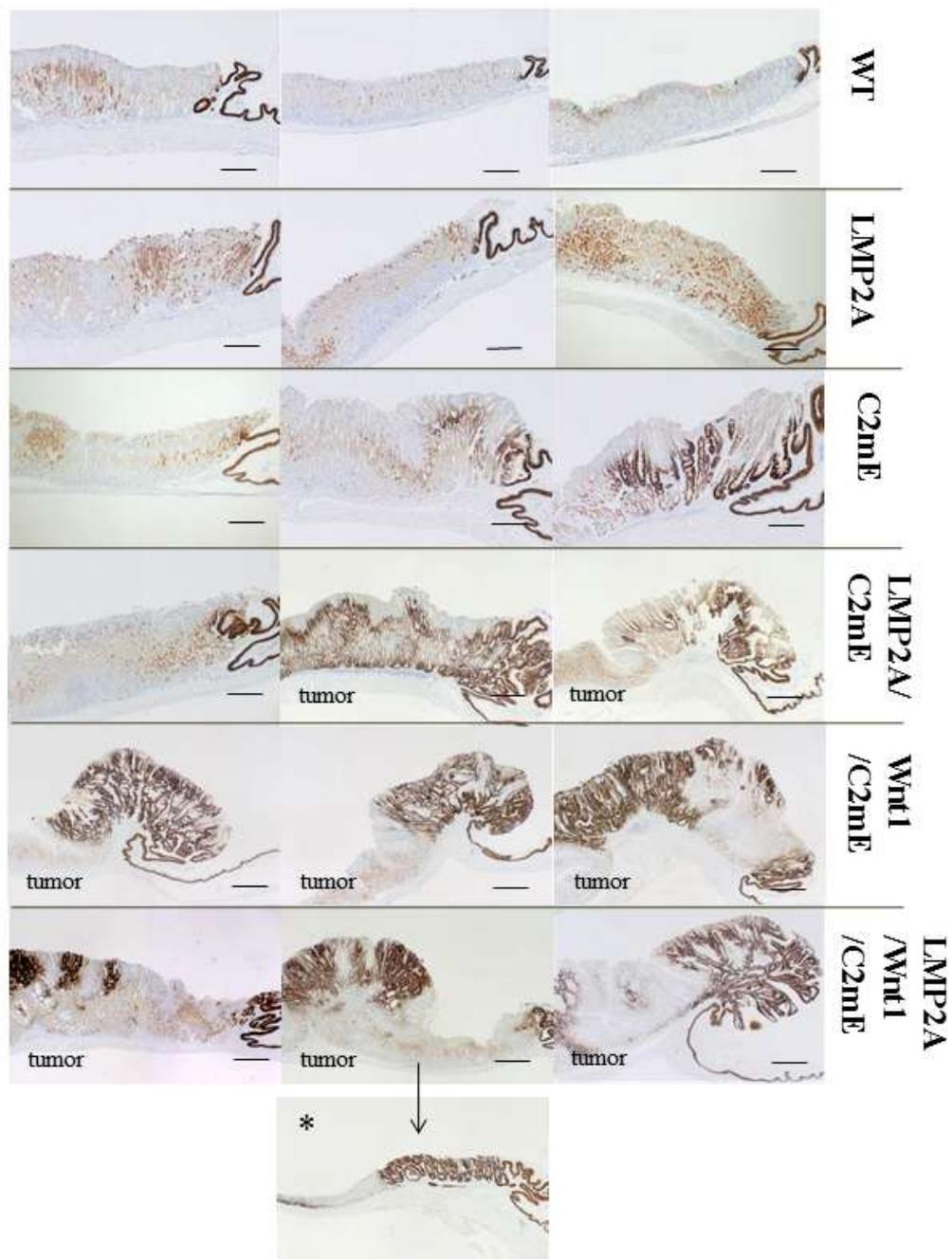


図25. トランスジェニックマウス胃CD44v6免疫組織化学

各genotypeにつき3例ずつの比較 (20-25週齢) . Scale bar = 200um

\*はLMP2A/Wnt1/C2mE (真ん中) の大彎側の切片。

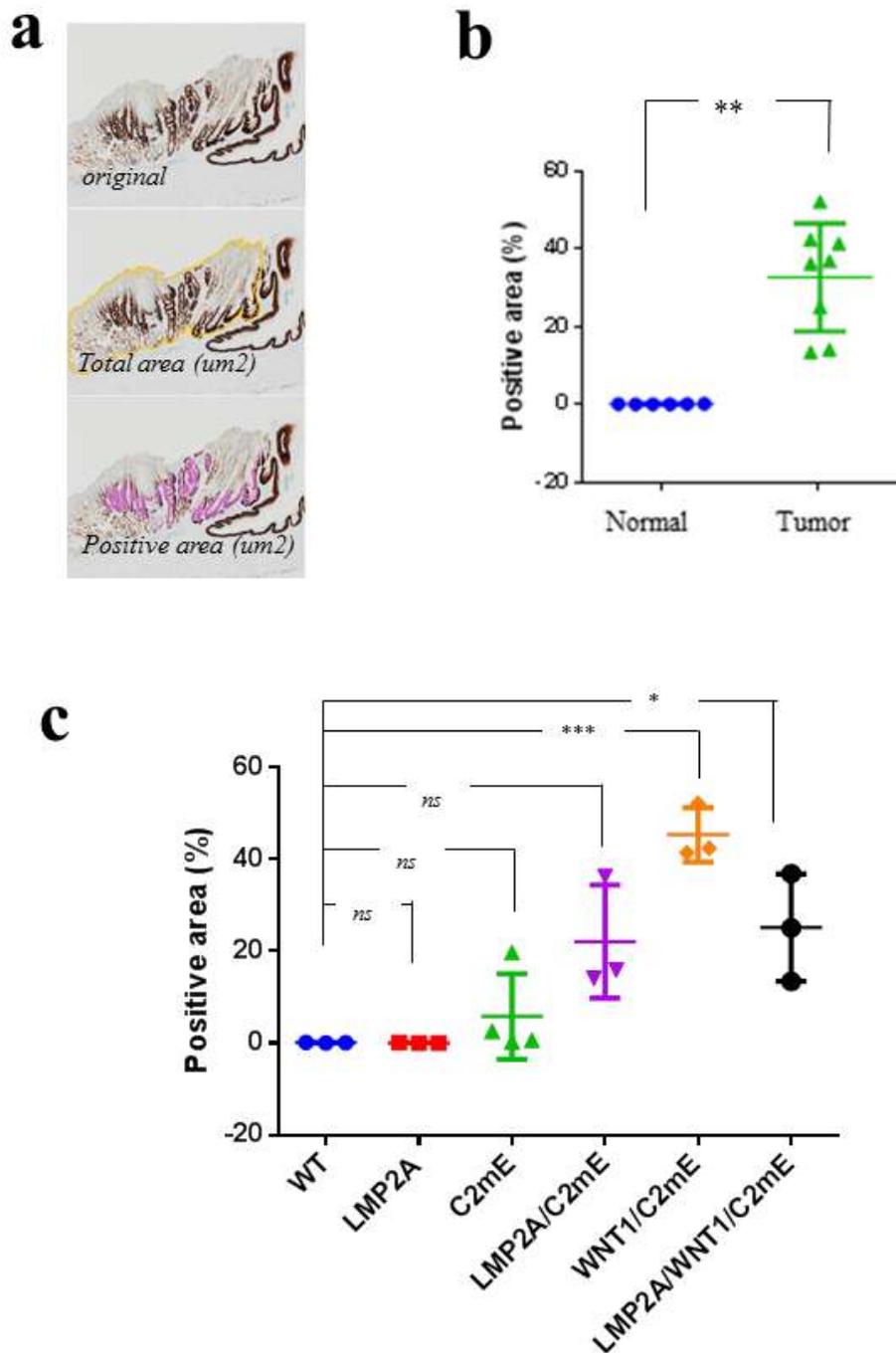


図26. CD44v6免疫染色陽性面積の比較

(a) 測定方法の例

(b) “Normal” (正常粘膜: n=6), “Tumor” (Dysplasia[Grade 3]: n=8) の比較 (Tukey’s multiple comparisons test, \*\* $p < 0.01$ )

(c) Genotype間の比較 (Tukey’s multiple comparisons test; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ )

WT(Wild type)n=3, LMP2A:n=3, C2mE:n=4, LMP2A/C2mE:n=3, Wnt1/C2mE:n=3, LMP2A/Wnt1/C2mE:n=3.

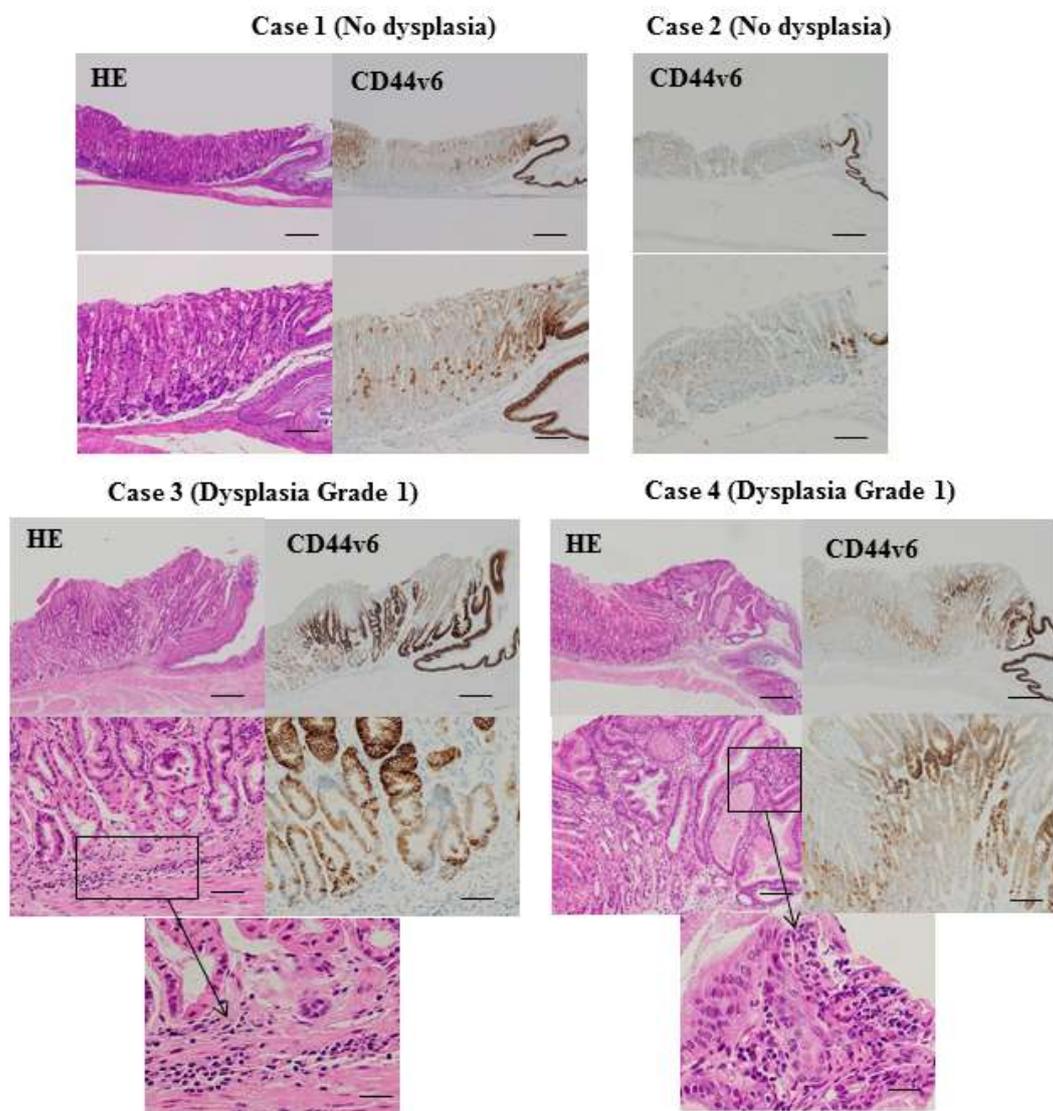
### 3-2-5. CD44v6 と組織学的炎症

次に、炎症が腫瘍形成を促進する可能性について調べるため、CD44v6 発現と炎症との関連について検討を行った。

25 週齢トランスジェニックマウスの CD44v6 免疫染色では、CD44v6 の発現が、腫瘍だけでなく、C2mE マウスの Dysplasia Grade 1 組織（2 例）でも確認された。この陽性例について観察すると、CD44v6 陽性部位の周囲に炎症細胞浸潤を伴う傾向にあることがうかがえた（図 27）。

そこで、組織学的炎症の有無で CD44v6 陽性面積を比較した。尚、陽性面積と組織学的炎症、いずれの評価も、LMP2A/C2mE マウスの腫瘍好発部位である、食道と十二指腸を結ぶ線と大彎との中間部に相当する前胃一腺胃上部領域の画像（対物レンズ 2 倍）に対して行った。

その結果、組織学的炎症がみられる組織では、CD44v6 陽性面積が有意に高いことがわかった（図 28）。



**図27. C2mE (25週齢) 4例における炎症細胞浸潤とCD44v6発現**

腺胃にCD44v6陽性となる症例 (Case 3, 4) は炎症細胞浸潤を伴っている  
炎症のない症例 (Case 1, 2) では腺胃のCD44v6は陰性である

(Hematoxylin-Eosin:HE, CD44v6)

Case 1-2 : 上段 (Scale bar=500um) , 下段 (Scale bar =100um)

Case 3-4 : 上段 (Scale bar=500um) , 中段 (Scale bar =100um) , 下段 (Scale bar =20um)

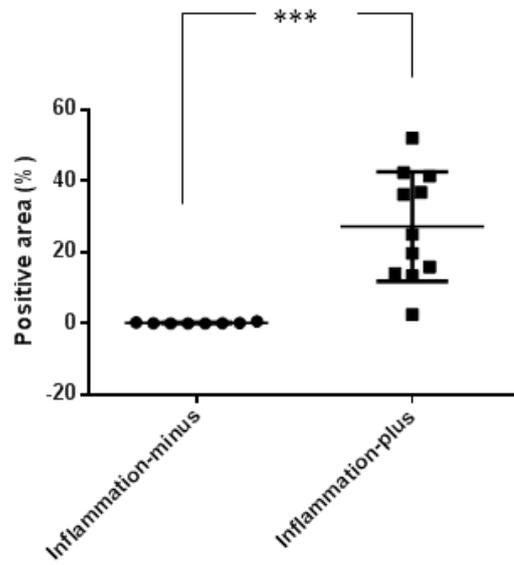


図28. CD44v6陽性面積と組織学的炎症

“Inflammation-minus”（非炎症例：n=8）と“Inflammation-plus”（炎症例：n=11）の比較。

Tukey's multiple comparisons test (\*\*\*) $p < 0.001$

25 週齢における全 genotype (WT、LMP2A、C2mE、LMP2A/C2mE、Wnt1/C2mE、LMP2A/Wnt1/C2mE) のトランスジェニックマウスに対して、前胃-腺胃を中心とした胃粘膜での組織学的な炎症細胞浸潤を Inflammation Grade1(I1)～Inflammation Grade4(I4)まで分類し（「方法 14-2-2」参照）評価を行った。Inflammation Grade 1(I1)を軽度(mild)、Inflammation Grade2(I2)を中等度(moderate)、Inflammation Grade 3/4(I3/I4)を高度(high)とすると、中等度以上の組織学的炎症の頻度は、C2mE マウス（15.3%）より LMP2A/C2mE マウス（44.4%）で高い傾向がうかがえた (unpaired t test,  $p=0.078$ ) (図 29)。

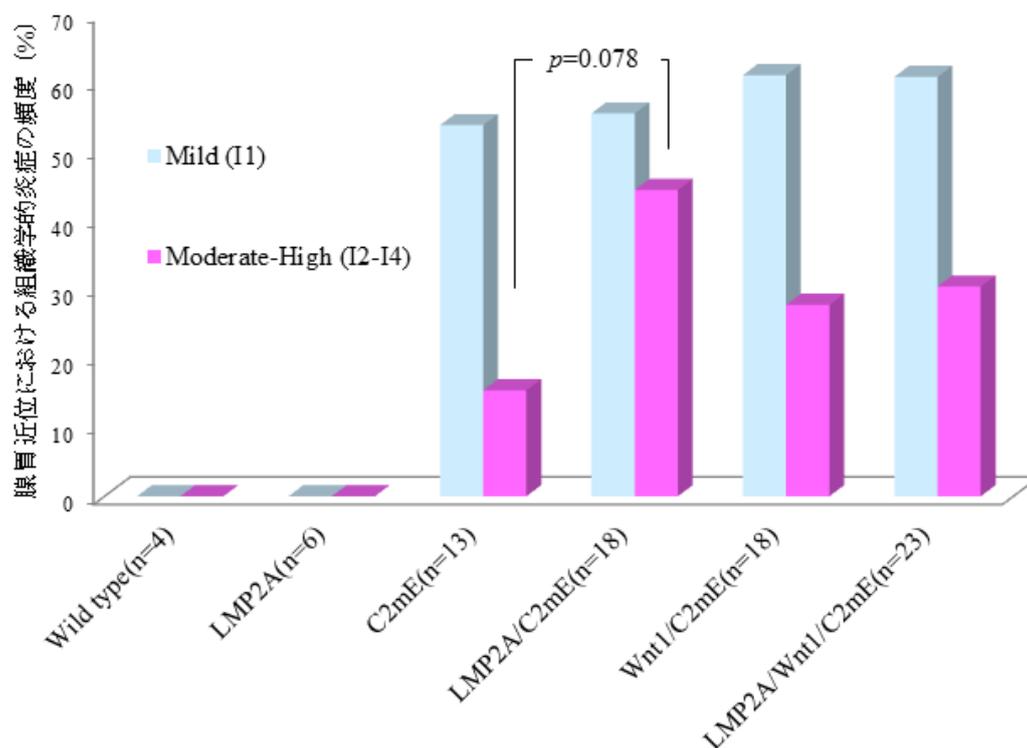


図29. 腺胃近位における組織学的炎症 (Inflammation Grade(I1-I4)) の頻度 (25週齢)  
 炎症はC2mE遺伝子を含む個体にみられ始める。腺胃近位粘膜での中等度以上の組織学的炎症(Moderate-High:I2-I4)は、C2mEマウス(15.3%)よりLMP2A/C2mEマウス(44.4%)で多い傾向 (unpaired t test,  $p=0.078$ )。

## V. 考 察

### 1. EBV 感染上皮の幹細胞性

癌幹細胞仮説は、過去の実験結果の蓄積から帰納的推測を経て構築されてきた面があり、未だ発展と検証の途上にある。本研究で、以下の仮説を設定した。

“胃粘膜上皮の幹細胞（あるいは前駆細胞）に Epstein-Barr virus(EBV)が感染すると、様々な程度に多能性と分化抑制がもたらされる結果、より胎生期細胞に近い未熟な幹細胞様細胞の出現とその相対的な割合が増加する。その中から、異常な自己増殖能を獲得したものが出現し、EBV 関連胃癌が形成される”

検証の出発点として、ヒト胃上皮細胞株 GES1 の EBV 感染株 (GES1-EBV) を用いた。

仮説に従えば、GES1 よりも GES1-EBV で幹細胞様細胞増加の所見が得られる。幹細胞様細胞の増加があれば、幹細胞性質も増大するという仮定のもと、幹細胞性質として知られる増殖能と浸潤能を指標に、GES1 と GES1-EBV で比較を行った。

GES1-EBV では spheroid の形態の複雑性が増加した。血清には分化を促進する因子が含まれる[113]ことから、幹細胞培養では無血清培地が使用されることがある[114]。

無血清下の GES1-EBV(#8)では、一つの塊ではなくいくつかの不整な小塊状に分かれるような形態となり、3D interactive surface plot でみると spheroid 内及び Background 間での輝度差が小さくなり、細胞構成がより均質なものとなっていることから示唆さ

れた。一方、不整に入り組む腺管様形態は、ヒト EBV 関連胃癌組織にみられる lace-pattern[115]を思わせた。

以上の spheroid 形状の変化、コロニー形成の増加は、EBV 感染による幹細胞の増加、あるいは、幹細胞性形質の獲得による可能性が考えられた。

GES1-EBV の性質変化は、特にコラーゲンゲル中において顕著で、浸潤面積が増大した。さらに、GES1-EBV(#6)ではコロニー形成の増加もみられた。

多能性関連遺伝子について、GES1-EBV では LIF、KLF4、MYC の増加がみられた。

KLF4 は RT-qPCR でも発現増加が確認され、EBV 関連胃癌細胞株 SNU719 においても更に高くなる傾向があった。KLF4 は、マウスでは LIF-STAT3 経路依存性とする報告も存在する[116-117]。Fibroblast に BMI1 を作用させるか、あるいは、sonic hedgehog pathway を活性化させると、KLF4, N-myc, SOX2 を発現する中間的な細胞となり、それに POU5F1 を添加すると iPS 細胞となるという報告がある[118]。

BMI1 に関しては GES1-EBV で顕著に増加していた。BMI1(Polycomb ring finger oncogene)は、当初 c-MYC との関連で記述された遺伝子であり[119]、Self-renewal、増殖、分化における epigenetic silencing で中心的な役割を果たすとされる[120]。造血器[121]、神経[122]、毛包[123]の幹細胞マーカーとの報告、頭頸部扁平上皮癌[124, 125]、膀胱癌[126]、大腸癌[127]、骨髄性白血病[128]において癌幹細胞との報告もある。造

血系腫瘍に至っては Progenitors からの transformation への関与を指摘する研究もある [129]。さらに、GES1 に BMI1 を overexpression させた *in vitro* の実験では malignant transformation が確認される一方、マウスでの腫瘍形成を伴わないことから、発癌初期過程への関与が注目されている [130]。BMI1 は腸管では LGR5 とともに消化管の幹細胞マーカーである可能性が指摘されている [131]。

## 2. EBV 感染上皮における CD44v6

今回、胃上皮細胞の幹細胞マーカーである CD44 の発現に着目した。上述の KLF4 について、CD44 との正の相関がみられる。さらに、三次元培養 (spheroid) の GES1-EBV では、CD44 に関連した分子である Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) が増加していた。MMP9 はゼラチナーゼの一つであり、胃粘膜においては、基底膜を構成する要素に対する酵素でもある。Spheroid の浸潤面積の増大からも、EBV 感染胃粘膜の幹細胞は細胞外基質 (特に腺上皮と固有筋層の境界部での基底膜など) を分解して周囲に広がることが考えられる。

また、CD44 には standard isoform に加えて、複数の alternative splicing variants が存在する。MMPs と CD44 variant isoforms 発現 [132, 133]、特に、CD44v6 との関連に注目

した報告もある[133]。尚、CD44v6 が EBV 胃癌において高発現することは 1997 年に Fukayama らのグループにより報告されていた[28]。

本研究において、GES1 と GES1-EBV の CD44v6 mRNA 発現の差は、無血清下でより明瞭となった。また、GES1-EBV spheroid のコラーゲンゲルへの浸潤部分の細胞には CD44v6 が強く発現していた。以上の結果から、三次元形態の変化は CD44v6 の発現変化を反映しており、EBV 感染による癌幹細胞様細胞誘導を示唆する可能性が考えられた。

胃癌細胞への EBV 感染による CD44v6 陽性細胞の増加すること、ならびに、EBV 関連胃癌で CD44v6 の発現が高いことなど、SNU719 での MACS 分離実験から、少なくとも EBV 関連胃癌において CD44v6 が癌幹細胞マーカーとなっているものと推定された。CD44v6 が EBV 関連胃癌の幹細胞マーカーである可能性が支持された。

臨床検体で CD44v6 mRNA 発現を調べた研究[134]によれば、CD44v6 は、胃粘膜での発現はなく、食道重層扁平上皮で 100%、non-dysplastic Barrett's mucosa で 64%、Barrett's carcinoma で 77%に発現しているという。この傾向は、免疫組織学的検討によっても支持されている[135]。ヒト EBV 関連胃癌 TMA での CD44v6 発現が胃体上部から中部発生の癌において有意に高いという本研究結果との関連性を思わせる。

### 3. LMP2A と発癌

LMP2A の胃発癌について、EBV 感染と同様、LMP2A 導入による GES1 上皮細胞の変化を検討した。GES1-LMP2A では、コラーゲン基質でのコロニー形成能の増加が得られ、LMP2A の幹細胞増加への関与を支持する。

さらに、炎症マウスと交配により、25 週齢の LMP2A/C2mE マウスで、LMP2A マウスや C2mE マウスにはみられない Dysplasia Grade3 相当の腫瘍が形成された。

この観察結果から、LMP2A には腫瘍形成能があり、それが C2mE の存在によって顕在化することが推定される。

マイクロアレイで、LMP2A/C2mE マウスの腫瘍で、C2mE マウス胃粘膜に比べて、CD44 の発現が増加していた。また、少数例での検討ではあるが、LMP2A/C2mE マウスの腫瘍では、C2mE マウス胃粘膜に比べて、前胃－腺胃上部での CD44v6 発現面積が高い傾向がみられた。今回、LMP2A の発癌に関与する可能性のあるものとして、幹細胞増加作用のほかに、炎症の存在が示唆された。

組織学的炎症の頻度と程度に関して、genotype の中で最も高かったのが、LMP2A/C2mE マウスであった。

以上から、LMP2A の発癌には、CD44v6 発現細胞の増加、ならびに、炎症の存在の両者が関与している可能性が示唆された。

#### 4. EBV 感染と胃粘膜発癌

GES1-EBV、GES1-LMP2A での、コラーゲン存在下での顕著な性質変化を考慮すると、炎症により傷害を受けた正常胃粘膜上皮細胞に EBV が感染して、多能性をもたらすことで未熟な細胞が相対的に増加する一方、炎症の促進によって、その増殖能力が顕在化しやすい状態となり、癌幹細胞性質を獲得していくという機序が想定される。

本研究では、可能性の指摘にとどまったが、実証に向けて、更なる実験を進めていきたい。

LMP2A による stem-ness enrichment を論じた既報告[45]では、マウス胎仔の fibroblast から樹立された NIH3T3 細胞株を用いているが、阻害実験から、LMP2A による side population のコロニー形成能には、Stat3、MEK/ERK、PI3 kinase の関与があることが示唆された。Jak-Stat3 pathway、PI(3) kinase pathway は、マウスの Embryonal stem cell (ES cells)で、多能性維持を維持する機構として、多能性誘導遺伝子 (KLF4、SOX2、NANOG、TBX3) の上流に位置すると考えられている pathway でもあり、さらに上流には LIF が想定されている[117]。マウスでは、LIF は KLF4 との関連も報告されてい

る[116]。今回は、LMP2A について多能性誘導遺伝子の発現を検索できていないため、  
今後は LIF 発現などを中心に詳細な検討を進めたい。LIF は Interleukin(IL)-6 family に  
属し、炎症との cross-talking などの機序もあるかもしれない。IL-6 は cancer stem cells  
と non-stem cancer cells 間の移行に関与するのではないかという報告もある[136]。

炎症と発癌の関係について述べたのは、1828 年の Marjolin が最初とされているが、こ  
のテーマと関連付けられることが多いのは、rest embryonal hypothesis の提唱者である  
Rudolph Virchow である[137]。

## VI. 結 論

胃上皮細胞への Epstein-Barr virus (EBV) 感染に伴い、spheroid 形態の変化や幹細胞マーカー遺伝子の発現上昇などの癌幹細胞様変化がみられた。このような変化を誘導する因子の一つとして、EBV 潜伏感染遺伝子である Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) の関与が示唆され、さらに LMP2A 発現と炎症との相互作用が腫瘍形成に寄与する可能性が示唆された。以上の結果は、EBV 感染による癌幹細胞様細胞誘導の可能性を支持するものである。

## VII. 引 用 文 献

1. Bignold, L.P., B.L. Coghlan, and H.P. Jersmann, Hansemann, Boveri, chromosomes and the gametogenesis-related theories of tumours. *Cell Biol Int*, 2006. 30(7): p. 640-4.
2. Huntly, B.J. and D.G. Gilliland, Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(4): p. 311-21.
3. Ratajczak, M.Z., D.M. Shin, and M. Kucia, Very small embryonic/epiblast-like stem cells: a missing link to support the germ line hypothesis of cancer development? *Am J Pathol*, 2009. 174(6): p. 1985-92.
4. Sell, S., Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004. 51(1): p. 1-28.
5. Mariusz Z. Ratajczak., The embryonic rest hypothesis of cancer development-an old XIX century theory revisited., *Journal of Cancer Stem Cell Research* (2014), 2:e1001
6. William L. Farrar, *CANCER STEM CELLS* (USA, Cambridge University Press, 2010), ISBN 978-0-511-60410-2.
7. Hamburger, A.W. and S.E. Salmon, Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 1977. 197(4302): p. 461-3.

8. Lapidot, T., C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, et al.,  
A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*,  
1994. 367(6464): p. 645-8.
9. Al-Hajj, M., M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison and M.F. Clarke,  
Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003.  
100(7): p. 3983-8.
10. Reya, T., S.J. Morrison, M.F. Clarke and I.L. Weissman, Stem cells, cancer, and  
cancer stem cells. *Nature*, 2001. 414(6859): p. 105-11.
11. Tu, S.M., Cancer: a "stem-cell" disease? *Cancer Cell Int*, 2013. 13(1): p. 40.
12. Karsten, U. and S. Goletz, What makes cancer stem cell markers different?  
*Springerplus*, 2013. 2(1): p. 301.
13. Greve, B., R. Kelsch, K. Spaniol, H.T. Eich and M. Götte, Flow cytometry in cancer  
stem cell analysis and separation. *Cytometry A*, 2012. 81(4): p. 284-93.
14. Takaishi, S., T. Okumura, S. Tu, S.S. Wang, W. Shibata and R. Vigneshwaran, et al.,  
Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*,  
2009. 27(5): p. 1006-20.

15. Bartolazzi, A., D. Jackson, K. Bennett, A. Aruffo, R. Dickinson and J. Shields, et al., Regulation of growth and dissemination of a human lymphoma by CD44 splice variants. *J Cell Sci*, 1995. 108 ( Pt 4): p. 1723-33.
16. Ishimoto, T., O. Nagano, T. Yae, M. Tamada, T. Motohara, H. Oshima and M. Oshima, et al., CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*, 2011. 19(3): p. 387-400.
17. Guo, W. and P.S. Frenette, Alternative CD44 splicing in intestinal stem cells and tumorigenesis. *Oncogene*, 2014. 33(5): p. 537-8.
18. Prochazka, L., R. Tesarik, and J. Turanek, Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell Signal*, 2014. 26(10): p. 2234-9.
19. Holm, F., E. Hellqvist E, C.N. Mason, S.A. Ali, N. Delos-Santos and C.L. Barrett, et al., Reversion to an embryonic alternative splicing program enhances leukemia stem cell self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(50): p. 15444-9.
20. Aso, T., M. Matsuo, H. Kiyohara, K. Taguchi, F. Rikimaru and M. Shimokawa, et al., Induction of CD44 variant 9-expressing cancer stem cells might attenuate the efficacy of

chemoradiation and worsens the prognosis of patients with advanced head and neck cancer. *PLoS One*, 2015. 10(3): p. e0116596.

21. Go, S.I., G.H. Ko, W.S. Lee, R.B. Kim, J.H. Lee and S.H. Jeong, et al., CD44 Variant 9 Serves as a Poor Prognostic Marker in Early Gastric Cancer, But Not in Advanced Gastric Cancer. *Cancer Res Treat*, 2015.

22. Katoh, S., T. Goi, T. Naruse, Y. Ueda, H. Kurebayashi and T. Nakazawa, et al., Cancer stem cell marker in circulating tumor cells: expression of CD44 variant exon 9 is strongly correlated to treatment refractoriness, recurrence and prognosis of human colorectal cancer. *Anticancer Res*, 2015. 35(1): p. 239-44.

23. Kiuchi, S., S. Ikeshita, Y. Miyatake and M. Kasahara, Pancreatic cancer cells express CD44 variant 9 and multidrug resistance protein 1 during mitosis. *Exp Mol Pathol*, 2015. 98(1): p. 41-6.

24. Ue, T., H. Yokozaki, Y. Kitadai, S. Yamamoto, W. Yasui and T. Ishikawa, et al., Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer*, 1998. 79(2): p. 127-32.

25. Gu, M.J. and B.I. Jang, Clinicopathologic significance of Sox2, CD44 and CD44v6 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Pathol Oncol Res*, 2014. 20(3): p. 655-60.

26. Snyder, E.L., D. Bailey D, M. Shipitsin, K. Polyak and M. Loda, Identification of CD44v6(+)/CD24- breast carcinoma cells in primary human tumors by quantum dot-conjugated antibodies. *Lab Invest*, 2009. 89(8): p. 857-66.
27. Todaro, M., M. Gaggianesi , V. Catalano, A. Benfante, F. Iovino and M. Biffoni, et al., CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell*, 2014. 14(3): p. 342-56.
28. Chong, J.M. and M. Fukayama, [Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: the genetic alteration and the expression of CD44 variant][1-5]. *Nihon Rinsho*, 1997. 55(2): p. 381-5.
29. Shibata, D. and L.M. Weiss, Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 1992. 140(4): p. 769-74.
30. Takada, K., Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol*, 2000. 53(5): p. 255-61.
31. Fukayama, M., Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathol Int*, 2010. 60(5): p. 337-50.

32. Erle S. Robertson, *EPSTEIN-BARR VIRUS*, (USA, Caister Academic Press, 2005), ISBN 978-1-904455-03-5.
33. Fukayama, M., Y. Hayashi, Y. Iwasaki, J. Chong, T. Ooba and T. Takizawa, et al., Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. *Lab Invest*, 1994. 71(1): p. 73-81.
34. Imai, S., S. Koizumi, M. Sugiura, M. Tokunaga, Y. Uemura and N. Yamamoto, et al., Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(19): p. 9131-5.
35. Fukayama, M., J.M. Chong, and H. Uozaki, Pathology and molecular pathology of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001. 258: p. 91-102.
36. Levine, P.H., G. Stemmermann, E.T. Lennette, A. Hildesheim, D. Shibata and A. Nomura, Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr-virus-associated gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer*, 1995. 60(5): p. 642-4.
37. Yanai, H., K. Takada, N. Shimizu, Y. Mizugaki, M. Tada and K. Okita, Epstein-Barr virus infection in non-carcinomatous gastric epithelium. *J Pathol*, 1997. 183(3): p. 293-8.

38. Yamamoto, N., M. Tokunaga, Y. Uemura, S. Tanaka, H. Shirahama and T. Nakamura, et al., Epstein-Barr virus and gastric remnant cancer. *Cancer*, 1994. 74(3): p. 805-9.
39. Miller, C.L., J.H. Lee, E. Kieff and Longnecker, An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(2): p. 772-6.
40. Scholle, F., K.M. Bendt, and N. Raab-Traub, Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J Virol*, 2000. 74(22): p. 10681-9.
41. Morrison, J.A., A.J. Klingelutz, and N. Raab-Traub, Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A activates beta-catenin signaling in epithelial cells. *J Virol*, 2003. 77(22): p. 12276-84.
42. Oh, S.T., J.H. Cha, D.J. Shin, S.K. Yoon and S.K Lee, Establishment and characterization of an in vivo model for Epstein-Barr virus positive gastric carcinoma. *J Med Virol*, 2007. 79(9): p. 1343-8.

43. Port, R.J., S. Pinheiro-Maia, C. Hu, J.R. Arrand JR, W. Wei and L.S. Young, et al., Epstein-Barr virus induction of the Hedgehog signalling pathway imposes a stem cell phenotype on human epithelial cells. *J Pathol*, 2013. 231(3): p. 367-77.
44. Lun, S.W., S.T. Cheung , P.F. Cheung , K.F. To, J.K Woo and K.W. Choy, et al., CD44+ cancer stem-like cells in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*, 2012. 7(12): p. e52426.
45. Nakaya, T., Y. Kikuchi, A. Kunita, S. Ishikawa, K. Matsusaka and R. Hino, et al., Enrichment of stem-like cell population comprises transformation ability of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A for non-transformed cells. *Virus Res*, 2013. 174(1-2): p. 108-15.
46. Iacovides, D., S. Michael, C. Achilleos and K. Strati, Shared mechanisms in stemness and carcinogenesis: lessons from oncogenic viruses. *Front Cell Infect Microbiol*, 2013. 3: p. 66.
47. Yamanaka, S., *A fresh look at iPS cells*. *Cell*, 2009. **137**(1): p. 13-7.
48. Ke, Y., T. Ning, and B. Wang, [Establishment and characterization of a SV40 transformed human fetal gastric epithelial cell line-GES-1]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 1994. 16(1): p. 7-10. [Abstract only]

49. Vinci, M., C. Box, and S.A. Eccles, Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay. *J Vis Exp*, 2015(99): p. e52686.
50. Kwon, M.C., B.K. Koo, Y.Y. Kim, S.H. Lee, N.S. Kim and J.H. Kim, et al., Essential role of CR6-interacting factor 1 (Crif1) in E74-like factor 3 (ELF3)-mediated intestinal development. *J Biol Chem*, 2009. 284(48): p. 33634-41.
51. Fre, S., M. Huyghe, P. Mourikis, S. Robine, D. Louvard and S. Artavanis-Tsakonas, Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, 2005. 435(7044): p. 964-8.
52. Riccio, O., M.E. van Gijn, A.C. Bezdek, L. Pellegrinet, J.H. van Es and U. Zimmer-Strobl, et al., Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep*, 2008. 9(4): p. 377-83.
53. van Es, J.H., P. Jay, A. Gregorieff, M.E. van Gijn, S. Jonkheer and P. Hatzis, et al., Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol*, 2005. 7(4): p. 381-6.
54. Ye, D.Z. and K.H. Kaestner, Foxa1 and Foxa2 control the differentiation of goblet and enteroendocrine L- and D-cells in mice. *Gastroenterology*, 2009. 137(6): p. 2052-62.

55. Schneider, M.R., M. Dahlhoff, D. Horst, B. Hirschi, K. Trülsch and J. Müller-Höcker, et al., A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation. *PLoS One*, 2010. 5(12): p. e14325.
56. Garg, P., A. Ravi, N.R. Patel, J. Roman, A.T. Gewirtz and D. Merlin, et al., Matrix metalloproteinase-9 regulates MUC-2 expression through its effect on goblet cell differentiation. *Gastroenterology*, 2007. 132(5): p. 1877-89.
57. Andreu, P., S. Colnot, C. Godard, S. Gad, P. Chafey and M. Niwa-Kawakita, et al., Crypt-restricted proliferation and commitment to the Paneth cell lineage following Apc loss in the mouse intestine. *Development*, 2005. 132(6): p. 1443-51.
58. Benoit, Y.D., F. Paré, C. Francoeur, D. Jean, E. Tremblay and F. Boudreau, et al., Cooperation between HNF-1alpha, Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. 298(4): p. G504-17.
59. D'Angelo, A., O. Bluteau, M.A. Garcia-Gonzalez, L. Gresh, A. Doyen and S. Garbay, et al., Hepatocyte nuclear factor 1alpha and beta control terminal differentiation and cell fate commitment in the gut epithelium. *Development*, 2010. 137(9): p. 1573-82.

60. Mustata, R.C., T. Van Loy, A. Lefort, F. Libert, S. Strollo and G. Vassart, et al., Lgr4 is required for Paneth cell differentiation and maintenance of intestinal stem cells ex vivo. *EMBO Rep*, 2011. 12(6): p. 558-64.
61. Glinka, A., C. Dolde, N. Kirsch, Y.L. Huang, O. Kazanskaya and D. Ingelfinger, et al., LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/beta-catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep*, 2011. 12(10): p. 1055-61.
62. Shroyer, N.F., D. Wallis, K.J. Venken, H.J. Bellen, and H.Y. Zoghbi, Gfi1 functions downstream of Math1 to control intestinal secretory cell subtype allocation and differentiation. *Genes Dev*, 2005. 19(20): p. 2412-7.
63. Andreu, P., G. Peignon, C. Slomianny, M.M. Taketo, S. Colnot and S.A. Robine, et al., genetic study of the role of the Wnt/beta-catenin signalling in Paneth cell differentiation. *Dev Biol*, 2008. 324(2): p. 288-96.
64. Fevr, T., S. Robine, D. Louvard and J. Huelsken , Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol*, 2007. 27(21): p. 7551-9.

65. Kim, B.M., J. Mao, M.M. Taketo and R.A. Shivdasani, Phases of canonical Wnt signaling during the development of mouse intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 2007. 133(2): p. 529-38.
66. Visco, V., F.A Bava, F. d'Alessandro, M. Cavallini, V. Ziparo and M.R. Torrisi, Human colon fibroblasts induce differentiation and proliferation of intestinal epithelial cells through the direct paracrine action of keratinocyte growth factor. *J Cell Physiol*, 2009. 220(1): p. 204-13.
67. Bosse, T., C.M. Piaseckyj, E. Burghard, J.J. Fialkovich, S. Rajagopal and W.T. Pu, et al., Gata4 is essential for the maintenance of jejunal-ileal identities in the adult mouse small intestine. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(23): p. 9060-70.
68. Battle, M.A., B.J. Bondow, M.A. Iverson, S.J. Adams, R.J. Jandacek and P. Tso, et al., GATA4 is essential for jejunal function in mice. *Gastroenterology*, 2008. 135(5): p. 1676-1686 e1.
69. Jensen, J., E.E Pedersen, P. Galante, J. Hald, R.S. Heller and M. Ishibashi, et al., Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet*, 2000. 24(1): p. 36-44.

70. Auclair, B.A., Y.D. Benoit, N. Rivard, Y. Mishina and N. Perreault, Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology*, 2007. 133(3): p. 887-96.
71. Katz, D.P. and J.L. Knittle, Effects of hypocaloric diet low in essential fatty acids on in vitro human adipose tissue prostaglandin production and essential fatty acid status. *Nutrition*, 1991. 7(4): p. 256-9.
72. Hill, M.E., S.L. Asa, and D.J. Drucker, Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Mol Endocrinol*, 1999. 13(9): p. 1474-86.
73. van Es, J.H., M.E. van Gijn, O. Riccio, M. van den Born, M. Vooijs and H. Begthel, et al., Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, 2005. 435(7044): p. 959-63.
74. Noah, T.K., A. Kazanjian, J. Whitsett and N.F. Shroyer, SAM pointed domain ETS factor (SPDEF) regulates terminal differentiation and maturation of intestinal goblet cells. *Exp Cell Res*, 2010. 316(3): p. 452-65.
75. Gregorieff, A., D.E. Stange, P. Kujala, H. Begthel, M. van den Born and J. Korving, et al., The ets-domain transcription factor Spdef promotes maturation of goblet and paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 2009. 137(4): p. 1333-45 e1-3.

76. Vidrich, A., J.M. Buzan, B. Brodrick, C. Ilo, L. Bradley and K.S. Fendig, et al.,  
Fibroblast growth factor receptor-3 regulates Paneth cell lineage allocation and accrual of  
epithelial stem cells during murine intestinal development. *Am J Physiol Gastrointest Liver  
Physiol*, 2009. 297(1): p. G168-78.
77. Desai, S., Z. Loomis, A. Pugh-Bernard, J. Schrunk, M. J. Doyle and A. Minic, et al.,  
Nkx2.2 regulates cell fate choice in the enteroendocrine cell lineages of the intestine. *Dev  
Biol*, 2008. 313(1): p. 58-66.
78. Haegbarth, A., W. Bie, R. Yang, S.E. Crawford, V. Vasioukhin and E. Fuchs, et al.,  
Protein tyrosine kinase 6 negatively regulates growth and promotes enterocyte differentiation  
in the small intestine. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(13): p. 4949-57.
79. Schonhoff, S.E., M. Giel-Moloney, and A.B. Leiter, Minireview: Development and  
differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology*, 2004. 145(6): p. 2639-44.
80. Shorning, B.Y., J. Zabkiewicz, A. McCarthy, H.B. Pearson, D.J. Winton and O.J.  
Sansom, et al., *Lkb1* deficiency alters goblet and paneth cell differentiation in the small  
intestine. *PLoS One*, 2009. 4(1): p. e4264.

81. Yamada, S., H. Kojima, M. Fujimiya, T. Nakamura, A. Kashiwagi and R. Kikkawa, Differentiation of immature enterocytes into enteroendocrine cells by Pdx1 overexpression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 281(1): p. G229-36.
82. Chen, C., R. Fang, C. Davis, C. Maravelias and E. Sibley, Pdx1 inactivation restricted to the intestinal epithelium in mice alters duodenal gene expression in enterocytes and enteroendocrine cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. 297(6): p. G1126-37.
83. VanDussen, K.L. and L.C. Samuelson, Mouse atonal homolog 1 directs intestinal progenitors to secretory cell rather than absorptive cell fate. *Dev Biol*, 2010. 346(2): p. 215-23.
84. Shroyer, N.F., M.A. Helmrath, V.Y. Wang, B. Antalffy, S.J. Henning and H.Y. Zoghbi, Intestine-specific ablation of mouse atonal homolog 1 (Math1) reveals a role in cellular homeostasis. *Gastroenterology*, 2007. 132(7): p. 2478-88.
85. Yang, Q., N.A. Bermingham, M.J. Finegold and H.Y. Zoghbi, Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science*, 2001. 294(5549): p. 2155-8.

86. Batlle, E., J.T. Henderson, H. Beghtel, M.M. van den Born, E. Sancho and G. Huls, et al., Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, 2002. 111(2): p. 251-63.
87. Bastide, P., C. Darido, J. Pannequin, R. Kist, S. Robine and C. Marty-Double, et al., Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J Cell Biol*, 2007. 178(4): p. 635-48.
88. Mori-Akiyama, Y., M. van den Born, J.H. van Es, S.R Hamilton, H.P. Adams and J. Zhang, et al., SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 2007. 133(2): p. 539-46.
89. Varnat, F., B.B. Heggeler, P. Grisel, N. Boucard, I. Corthésy-Theulaz and W. Wahli, et al., PPARbeta/delta regulates paneth cell differentiation via controlling the hedgehog signaling pathway. *Gastroenterology*, 2006. 131(2): p. 538-53.
90. Crissey, M.A., R.J. Guo, S. Funakoshi, J. Kong, J. Liu and J.P. Lynch, Cdx2 levels modulate intestinal epithelium maturity and Paneth cell development. *Gastroenterology*, 2011. 140(2): p. 517-528 e8.
91. Gao, N., P. White, and K.H. Kaestner, Establishment of intestinal identity and epithelial-mesenchymal signaling by Cdx2. *Dev Cell*, 2009. 16(4): p. 588-99.

92. Suh, E. and P.G. Traber, An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(2): p. 619-25.
93. Lopez-Diaz, L., R.N. Jain, T.M. Keeley, K.L. VanDussen, C.S. Brunkan and D.L. Gumucio, et al., Intestinal Neurogenin 3 directs differentiation of a bipotential secretory progenitor to endocrine cell rather than goblet cell fate. *Dev Biol*, 2007. 309(2): p. 298-305.
94. Jenny, M., C. Uhl, C. Roche, I. Duluc, V. Guillermin and F. Guillemot, et al., Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J*, 2002. 21(23): p. 6338-47.
95. van den Brink, G.R., S.A. Bleuming, J.C. Hardwick, B.L. Schepman, G.J. Offerhaus and J.J. Keller, et al., Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet*, 2004. 36(3): p. 277-82.
96. Pellegrinet, L., V. Rodilla, Z. Liu, S. Chen, U. Koch and L. Espinosa, et al., Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology*, 2011. 140(4): p. 1230-1240 e1-7.
97. Flentjar, N., P.Y. Chu, A.Y. Ng, C.N. Johnstone, J.K. Heath and M. Ernst, et al., TGF-betaRII rescues development of small intestinal epithelial cells in Elf3-deficient mice. *Gastroenterology*, 2007. 132(4): p. 1410-9.

98. Murayama, M., R. Okamoto, K. Tsuchiya, J. Akiyama, T. Nakamura and N. Sakamoto, et al., Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell-specific genes in human intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol*, 2009. 44(3): p. 173-82.
99. Coant, N., S. Ben Mkaddem, E. Pedruzzi, C. Guichard, X. Tréton and R. Ducroc, et al., NADPH oxidase 1 modulates WNT and NOTCH1 signaling to control the fate of proliferative progenitor cells in the colon. *Mol Cell Biol*, 2010. 30(11): p. 2636-50.
100. Park, M.J., H.Y. Kim, K. Kim and J. Cheong, Homeodomain transcription factor CDX1 is required for the transcriptional induction of PPARgamma in intestinal cell differentiation. *FEBS Lett*, 2009. 583(1): p. 29-35.
101. Soubeyran, P., F. André, J.C. Lissitzky, G.V. Mallo, V. Moucadel and M. Roccabianca, et al., Cdx1 promotes differentiation in a rat intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology*, 1999. 117(6): p. 1326-38.
102. Papetti, M. and L.H. Augenlicht, MYBL2, a link between proliferation and differentiation in maturing colon epithelial cells. *J Cell Physiol*, 2011. 226(3): p. 785-91.
103. Amann, J.M., B.J. Chyla, T.C. Ellis, A. Martinez, A.C. Moore and J.L. Franklin, et al., Mtgr1 is a transcriptional corepressor that is required for maintenance of the secretory cell lineage in the small intestine. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(21): p. 9576-85.

104. Muncan, V., O.J. Sansom, L. Tertoolen, T.J. Phesse, H. Begthel and E. Sancho, et al., Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene c-Myc. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(22): p. 8418-26.
105. Ghaleb, A.M., B.B. McConnell, K.H. Kaestner and V.W. Yang, Altered intestinal epithelial homeostasis in mice with intestine-specific deletion of the Kruppel-like factor 4 gene. *Dev Biol*, 2011. 349(2): p. 310-20.
106. Katz, J.P., N. Perreault, B.G. Goldstein, C.S Lee, P.A. Labosky and V.W. Yang, et al., The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development*, 2002. 129(11): p. 2619-28.
107. Garcia, M.I., M. Ghiani, A. Lefort, F. Libert, S. Strollo and G. Vassart, LGR5 deficiency deregulates Wnt signaling and leads to precocious Paneth cell differentiation in the fetal intestine. *Dev Biol*, 2009. 331(1): p. 58-67.
108. de Lau, W., N. Barker, T.Y. Low, B.K. Koo, V.S. Li and H. Teunissen, et al., Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature*, 2011. 476(7360): p. 293-7.

109. Klaus H. Kaestner, *Development, Differentiation, and Disease of the luminal gastrointestinal tract*, vol.96 of *Progress in molecular biology and translational science* (USA, ACADEMIC PRESS, 2010), ISBN 978-0-12-381280-3
110. Oshima, H., M. Oshima, K. Inaba and M.M. Taketo, Hyperplastic gastric tumors induced by activated macrophages in COX-2/mPGES-1 transgenic mice. *EMBO J*, 2004. 23(7): p. 1669-78.
111. Oshima, H., A. Matsunaga, T. Fujimura, T. Tsukamoto, M.M. Taketo and M. Oshima, Carcinogenesis in mouse stomach by simultaneous activation of the Wnt signaling and prostaglandin E2 pathway. *Gastroenterology*, 2006. 131(4): p. 1086-95.
112. Rogers, A.B., N.S. Taylor, M.T. Whary, E.D. Stefanich, T.C. Wang and J.G. Fox JG, *Helicobacter pylori* but not high salt induces gastric intraepithelial neoplasia in B6129 mice. *Cancer Res*, 2005. 65(23): p. 10709-15.
113. Brunner, D., J. Frank, H. Appl, H. Schöffl, W. Pfaller and G. Gstraunthaler, Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *ALTEX*, 2010. 27(1): p. 53-62.

114. Spooncer, E., C.M. Heyworth, A. Dunn and T.M. Dexter, Self-renewal and differentiation of interleukin-3-dependent multipotent stem cells are modulated by stromal cells and serum factors. *Differentiation*, 1986. 31(2): p. 111-8.
115. Uemura, Y., M. Tokunaga, J. Arikawa, N. Yamamoto, Y. Hamasaki and S. Tanaka, et al., A unique morphology of Epstein-Barr virus-related early gastric carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1994. 3(7): p. 607-11.
116. Niwa, H., Molecular mechanism governing pluripotency of stem cells. *Leading Author's*, 1, e008(2012)
117. Guo, G., J. Yang, J. Nichols, J.S. Hall, I. Eyres and W. Mansfield, et al., Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*, 2009. 136(7): p. 1063-9.
118. Moon, J.H., J.S. Heo, J.S. Kim, E.K. Jun, J.H. Lee and A. Kim, et al., Reprogramming fibroblasts into induced pluripotent stem cells with Bmi1. *Cell Res*, 2011. 21(9): p. 1305-15.
119. Jacobs, J.J., B. Scheijen, J.W. Voncken, K. Kieboom, A. Berns and M. van Lohuizen, Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev*, 1999. 13(20): p. 2678-90.

120. Valk-Lingbeek, M.E., S.W. Bruggeman, and M. van Lohuizen, Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell*, 2004. 118(4): p. 409-18.
121. Park, I.K., D. Qian, M. Kiel, M.W. Becker, M. Pihalja and I.L. Weissman , et al., Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, 2003. 423(6937): p. 302-5.
122. Molofsky, A.V., S. He, M. Bydon, S.J. Morrison and R. Pardal., Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev*, 2005. 19(12): p. 1432-7.
123. Claudinot, S., M. Nicolas, H. Oshima, A. Rochat and Y. Barrandon, Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(41): p. 14677-82.
124. Kurihara, K., T. Isobe, G. Yamamoto, Y. Tanaka, A. Katakura and T. Tachikawa, Expression of BMI1 and ZEB1 in epithelial-mesenchymal transition of tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 2015. 34(2): p. 771-8.
125. Allegra, E., S. Trapasso, D. Pisani and L. Puzzo, The role of BMI1 as a biomarker of cancer stem cells in head and neck cancer: a review. *Oncology*, 2014. 86(4): p. 199-205.

126. Zhu, D., X. Wan, H. Huang, X. Chen, W. Liang and F. Zhao, et al., Knockdown of Bmi1 inhibits the stemness properties and tumorigenicity of human bladder cancer stem cell-like side population cells. *Oncol Rep*, 2014. 31(2): p. 727-36.
127. Espersen, M.L., J. Olsen, D. Linnemann, E. Høgdall and J.T. Troelsen, Clinical implications of intestinal stem cell markers in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*, 2015. 14(2): p. 63-71.
128. Sengupta, A., A.M. Ficker, S.K. Dunn, M. Madhu and J.A. Cancelas, Bmi1 reprograms CML B-lymphoid progenitors to become B-ALL-initiating cells. *Blood*, 2012. 119(2): p. 494-502.
129. Warner, J.K., J.C. Wang, K. Takenaka, S. Doulatov, J.L. McKenzie and L. Harrington, et al., Direct evidence for cooperating genetic events in the leukemic transformation of normal human hematopoietic cells. *Leukemia*, 2005. 19(10): p. 1794-805.
130. Chen, Y., G. Lian, Q. Zhang, L. Zeng, C. Qian and S. Chen, et al., Overexpression of Bmi-1 induces the malignant transformation of gastric epithelial cells in vitro. *Oncol Res*, 2013. 21(1): p. 33-41.
131. Freeman, H.J., Crypt region localization of intestinal stem cells in adults. *World J Gastroenterol*, 2008. 14(47): p. 7160-2.

132. Wu, G., Y. Zhou, T. Li, J. Guo and Z. Zhou, Immunohistochemical levels of matrix metalloproteinase-2 and CD44 variant 6 protein in the diagnosis and lateral cervical lymph node metastasis of papillary thyroid carcinoma. *J Int Med Res*, 2013. 41(3): p. 816-24.
133. Xu, Y.P., X.Q. Zhao, K. Sommer and P. Moubayed , Correlation of matrix metalloproteinase-2, -9, tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase and CD44 variant 6 in head and neck cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci*, 2003. 4(4): p. 491-501.[abstract only]
134. Menges, M., R. Goebel, W. Pueschel, M. Zeitz and A. Stallmach, Expression of CD44v5 and -v6 in Barrett's carcinoma is not increased compared to that in nondysplastic Barrett's mucosa. *Exp Mol Pathol*, 2002. 72(3): p. 207-12.
135. Lagorce-Pages, C., F. Paraf, S. Dubois, J. Belghiti and J.F. Fléjou, Expression of CD44 in premalignant and malignant Barrett's oesophagus. *Histopathology*, 1998. 32(1): p. 7-14.
136. Iliopoulos, D., et al., Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(4): p. 1397-402.

137. Chi Hin Cho and Jun Yu, From Inflammation to cancer-advances in diagnosis and therapy for gastrointestinal and hepatological diseases (Singapore, World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd., 2012), ISBN 978-981-4343-59-6