

博士論文

グルタチオン合成経路に関わる遺伝子の発現が
肺腺癌の予後とシスプラチン耐性に与える影響について

桧山 紀子

グルタチオン合成経路に関わる遺伝子の発現が肺腺癌の予後と
シスプラチン耐性に与える影響について

所属：外科学専攻呼吸器外科

指導教員名：中島 淳

申請者名：桧山 紀子

要旨

グルタチオンは細胞内の酸化還元状態維持や毒物の細胞外排出促進に関わる重要な分子で、その合成には CD44 の splicing variant である CD44v8-10 と xCT、GCLC など
が関与している。肺腺癌細胞株にこれらの遺伝子を強制発現するといずれも対照に比
べシスプラチンへの耐性を示した。一方、肺腺癌手術検体からこれらの遺伝子の
mRNA 発現量を定量し、上位 25% を高発現群、下位 75% を低発現群として予後を比較
すると無再発生存率、全生存率ともにいずれの遺伝子も有意差を認めなかったが、再
発後治療例に限った再発後生存率では唯一 GCLC の高発現群が予後不良であった。肺
腺癌のシスプラチン耐性にはこれらの遺伝子が関与している可能性があり、GCLC は
肺腺癌における治療効果予測因子となりうる。

序文

1. 肺腺癌治療の現状

肺癌は全世界的に最も多い癌で、2012年の統計では全ての悪性腫瘍の13%を占め、死亡数も男性では1位、女性でも乳癌に次いで2位と予後不良である(1)。組織型は我が国では腺癌が多く、60%以上を占める(2)。肺癌の治療は可能であれば肺葉切除とリンパ節郭清などの根治切除を行うが、3割以上が診断時に切除不能であり(2)、また術後再発も少なくない。従来切除不能・再発肺癌にはシスプラチンを始めとする白金製剤を軸とした2剤併用療法が行われてきた。

近年非小細胞性肺癌、特に肺腺癌においては腫瘍増殖に有利に働く遺伝子変異が多数見つかっており(3-7)、それらに対する分子標的治療薬が開発され、切除不能・再発肺癌の生存期間は飛躍的に延長した(8)。しかしながらこれらの既知の遺伝子変異を持つ肺癌は、腺癌に限っても6割程度と考えられ(表1)、残りの患者には一次治療として従来の白金製剤を含む治療が選択される。

表 1. 肺腺癌にみられる代表的な遺伝子変異の頻度

変異遺伝子	肺腺癌での頻度
EGFR	49% (9)
EML4-ALK 融合遺伝子	2.9-7% (5, 7)
ROS1	2.6% (7)
BRAF	1% (6)

また、分子標的治療薬の奏効例においても、時間の経過とともに耐性化が起きることが知られており、その機序についての研究も多数報告され(10, 11)、一部の耐性化した

細胞に対しても抗腫瘍効果を発揮する新薬も続々と開発・実用化されている(12)。しかしながら多くの耐性化した腫瘍では、従来の白金製剤を含む治療が2次、3次治療として行われている。

シスプラチンを含む治療は、分子標的治療薬と比較して副作用も強く(8)、奏率が3割程度(13)と芳しくなく、このことは他に選択肢のない肺癌患者の予後を不良にしている。シスプラチンの治療効果を予測する因子を解明することは、シスプラチン感受性を高めるための新たな治療標的を生む可能性があり、予後改善に寄与することが期待される。

2. 肺腺癌における癌幹細胞 (cancer stem cell: CSC) 仮説

CSCが初めて注目されたのは、急性骨髄性白血病における報告であった(14)。正常造血幹細胞と同じ表面抗原の発現型(CD34⁺CD38⁻)を持つヒト白血病細胞を免疫不全マウスに移植すると、白血病細胞を再生産できることが示された。このことからCSCは正常幹細胞由来であるという仮説が立てられ、固形腫瘍でも研究が進められることになった。造血器と異なり固形腫瘍の発生する臓器では正常幹細胞自体が解明されていないものも多く、正常幹細胞が突然変異により癌化したものがCSCであるという仮説が適用できない固形腫瘍も多いように思われた。そこで慢性骨髄性白血病の急性転化にみられるような、幹細胞から分化途中にある細胞が変異により自己複製能を再獲得したものがCSCとしてふるまうということも考えられている。CSCの定義は2006

年の American Association for Cancer Research Cancer Stem Cells Workshop で整理された (15)。これによると「自己複製能を持ちながらも、腫瘍に含まれる均一でない細胞を生産することができる、腫瘍内の細胞」とある。Al-Haji らの乳癌による研究(16)では、ヒト乳癌組織より分離した CD44⁺CD24^{-low}腫瘍細胞を免疫不全マウスに移植するとわずか細胞 100 個程度の移植でもヒト乳癌と同様の不均質な腫瘍を形成し、それ以外の発現型の腫瘍細胞では 1 万個の移植でも腫瘍を形成できなかったことから、CD44⁺CD24^{-low}細胞は CSC の性質を持つことが示された。その後数多くの固形癌において CSC の同定に関する研究が報告されている (表 2)。

表 2. 各種 CSC を同定する細胞表面マーカー

癌種	細胞表面マーカー
乳癌	CD44 ⁺ CD24 ^{-low} (16) (17)
	ALDH1(18)
大腸癌	CD133 ⁺ (19)
	EpCAM ⁺ CD44 ⁺ CD166 ⁺ (20)
	ALDH1 ⁺ (21)
膵癌	CD44 ⁺ CD24 ⁺ EpCAM ⁺ (22)
	CD133 ⁺ CXCR4 ⁺ (23)
肺癌	SP(24)
	CD133 ⁺ (25)
	ALDH1 ⁺ (26)
	CD44 ⁺ (27)
頭頸部扁平上皮癌	CD44 ⁺ (28)
神経膠腫	CD133 ⁺ (29) (30)

ALDH1: aldehyde dehydrogenase isoform 1, EpCAM: epithelial cell adhesion molecule, CXCR4: C-X-C motif chemokine receptor 4, SP: Hoechst 33342 染色抵抗性細胞群

肺癌においても CSC マーカーの候補となる細胞表面マーカーの発現状況について検討がされ、組織型によりその発現状況が異なることが知られている（表 3）。

表 3. CSC マーカーの肺癌における発現状況（文献(31)より改変）

CSC マーカー	非小細胞肺癌			小細胞肺癌	文献
	腺癌	扁平上皮癌	大細胞癌		
CD133	+	+	+	+	(25) (26)
CD44	+	+		+	(27)
SP	+	+	+		(24)
ALDH1	+	+	+	+	(26)

CSC は治療耐性の面でも注目されている。正常幹細胞は自己複製能を持ちながらも通常は G0 期で停止しており、細胞分裂はあまり活発ではないことが知られている。CSC も同様の性質を持っているとすれば、細胞分裂の活発な腫瘍細胞の DNA 修復や合成を妨げることにより効果を発揮する多くの殺細胞性抗腫瘍薬や放射線治療には耐性を持つ(32)。実際、乳癌において殺細胞性薬剤を投与すると腫瘍内の CD44⁺CD24^{low} の細胞集団の割合が増えることが示された(33)。腫瘍内でこのような性質を持つ CSC の比率が高ければ治療抵抗性や転移・増殖能に影響を与え、予後不良となることが予想され、実際に結腸直腸癌(34)や乳癌(18)、膵臓癌(35)、神経膠腫(36)などでは予後不良との報告もある。しかしながら既報において腫瘍内で高発現が予後不良因子となる CSC マーカーは、肺癌においては報告が一定していない（表 4）。

表 4. CSC マーカーと肺癌の予後

著者 発行年	組織型 症例数	予後		
		CD133	ALDH1A	CD44
Salnikov(37) 2010	ADC 32 例	有意差なし	-	-
Woo (38) 2011	I 期 ADC 177 例	不良	-	-
Herpel(39) 2011	I, II 期 NSCLC 133 例	有意差なし	-	-
Ko (40) 2011	ADC 82 例	-	-	CD44s 不良
Dimou (41) 2012	NSCLC 430 例	-	良好	-
Okudela (42) 2012	ADC 177 例	不良	不良	不良
Sowa (43) 2015	ADC 239 例	不良	有意差なし	有意差なし
Shinohara (44) 2016	NSCLC 261 例	-	-	CD44v6 は不良 CD44s は差なし
Park (45) 2016	ADC+Sq 368 例	不良	良好	有意差なし

ADC: 腺癌、Sq: 扁平上皮癌、NSCLC: 非小細胞性肺癌

CSC の薬剤耐性に関する研究は、患者の腫瘍内での割合が少ないことや培養すると不均質な腫瘍細胞集団へと変化してしまうことから難しいようであるが、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの高発現による薬剤排出促進(46)や DNA 修復亢進などの機序が考えられている。これらに加え、石本らは CD44 に関して、そのスプライシングバリエーションである CD44v8-10 がグルタチオン産生を増加させることにより酸化ストレスや薬剤への耐性を導いていると報告した(47)。

3. グルタチオン合成経路と酸化ストレス応答

グルタチオンは抗酸化物質として知られ、細胞内では還元型 (GSH) と酸化型 (GSSG) の平衡状態が保たれている。放射線照射や低酸素状態など活性酸素種や過酸化物の発生する状況においては、GSH はそれらを直接還元し自らは GSSG に変換されていく (図 1A)。GSSG が増加して平衡状態が保てない場合、細胞外へ排出されるようになっている。また、還元型グルタチオンのチオール基 (SH 基) は細胞内に入ったシスプラチンなどの親電子性有害物質と親和性が高く (グルタチオン抱合)、無毒化することができる (図 1B)。グルタチオン抱合を受けた有害物質は、ABC トランスポーターのひとつである MDR-1 (Multi Drug Resistance-1) などを通して細胞外へ排出される。

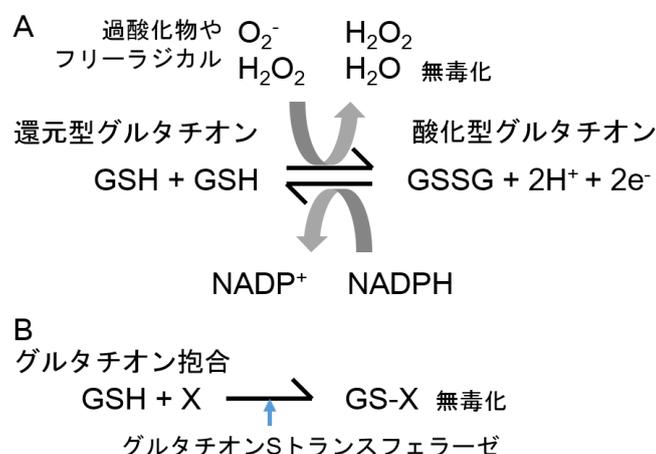


図 1. グルタチオンの代謝経路

- A. 還元型グルタチオン (GSH) はフリーラジカルや過酸化物を直接還元して無毒化し、酸化型グルタチオン (GSSG) に変換される。GSSG は NADPH (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸) により還元される。
- B. 親電子性の有毒物質 X が DNA 等に傷害を与える前に、グルタチオン S トランスフェラーゼによりグルタチオン抱合を受け、無毒化される。

グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンの3アミノ酸からなるトリペプチドであるが、グルタミン酸とシステインの結合は通常のペプチド結合とは異なる γ グルタミル結合の形をとる (図2)。

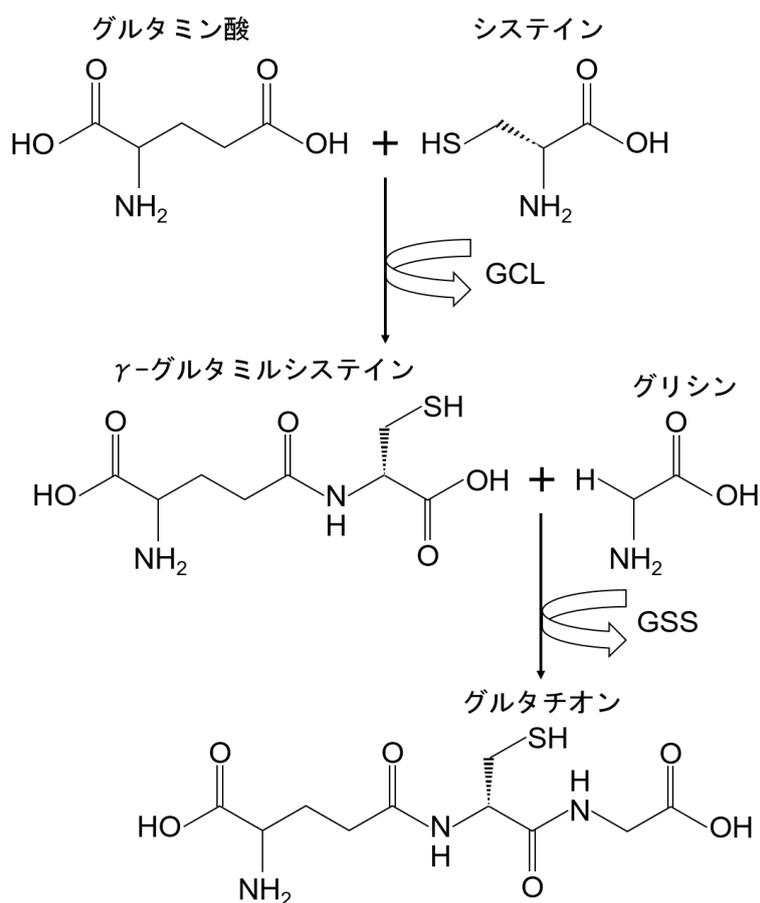


図2. グルタチオン合成経路

GCL: glutamate-cysteine ligase, GSS: glutathione synthetase.

システインのアミノ基は通常のペプチド結合とは異なりグルタミン酸の側鎖側のカルボキシル基と結合する γ グルタミル結合の形式をとる。

この結合を触媒する酵素が glutamate-cysteine ligase (GCL) であり、グルタチオン合成の律速酵素となっている。GCL は触媒活性を持つ catalytic subunit (GCLC) と分子量の小さい modifier subunit (GCLM) の2量体の形を取っている。グルタチオンは細

胞にとってシステインの供給源にもなっているが、グルタチオン濃度を増加させるにはメチオニンから変換してシステインを合成するか、細胞外から取り込む必要がある(48)。細胞外からシステインを供給する場合、シスチン（システインの2量体）としてシスチントランスポーターxC(-)を通して取り込む。xC(-)はxCTとCD98hcのサブユニットに分かれ、卵巣癌の細胞株でシスプラチン感受性株との比較により耐性株でこれらの発現が亢進し、シスチンの取り込み、細胞内GSH濃度ともに上昇していることが報告されている(49)。

一方、癌幹細胞マーカーとしても注目されたCD44は膜1回貫通型タンパクでヒアルロン酸の受容体として知られるが、細胞外ドメインの大きさが異なるスプライシングバリエーションが複数あることが知られている(図3)。

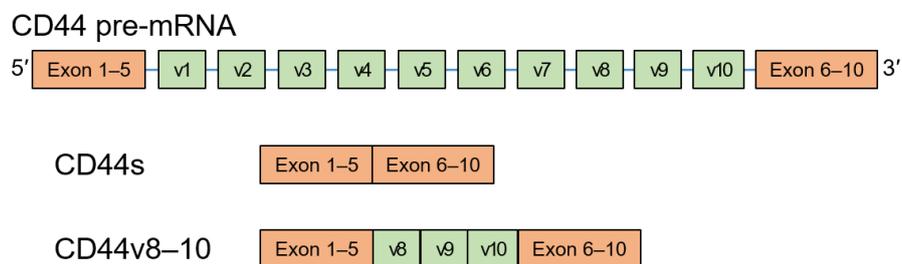


図3. CD44のpre-mRNAとスプライシングバリエーションv8-10

CD44s: standard form of CD44. CD44v8-10以外にもCD44v3, CD44v6などが知られている

石本らはマウス胃癌モデルにおいてCD44v8-10がxc(-)のサブユニットxCTと結合することにより細胞膜上に安定化することを示し(図4)、それによりグルタチオンの原料であるシスチン（システインの2量体）の細胞内取り込みが増加し、細胞が酸化ストレス抵抗性を持つことを示した(47)。

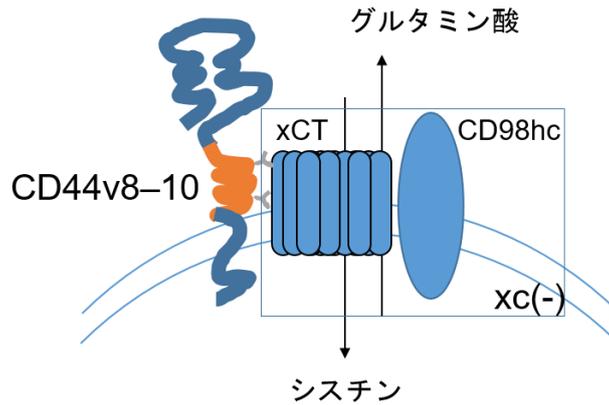


図 4. シスチントランスポーターxc(-)と CD44v8-10 の模式図
(文献(47)より改変)

CD44 の青い部分は standard form や他のバリエーションと共通で、
橙の部分が variant exon v8-10 のコードする部位。xC(-)はグル
タミン酸を細胞外に放出し、シスチンを細胞内に取り込むト
ランスポーターである。

一部のリンパ腫においてサラゾスルファピリジンの抗腫瘍効果が示され、その機序
が xC(-)の阻害によるものであることが報告されてから(50)、サラゾスルファピリジン
は抗炎症剤としてだけでなく xC(-)の阻害剤としても注目されるようになった。

CD44v8-10 が発現している腫瘍細胞では xCT の安定化による酸化ストレス耐性化機
序に依存している可能性があり、xC(-)をサラゾスルファピリジンで阻害すると抗腫瘍
効果が得られることが、頭頸部扁平上皮癌細胞株での検討で示されている(51)。胃癌
では臨床試験も行われ(52)、サラゾスルファピリジンの投与により腫瘍内 CD44v8-10
陽性細胞の減少がみられた。肺癌でも進行非小細胞性肺癌に対してシスプラチン+ペ
メトレキセート療法にサラゾスルファピリジンを併用する第 I 相試験が行われ、奏効
率 26.7%、無増悪期間中央値 11.7 ヶ月と比較的良好な結果が出ている(53)。

以上の背景から、本研究では、1) 肺腺癌の予後における CSC マーカーの意義を再

検討し、2) CD44v8-10 およびこれに関連したグルタチオン合成経路に関わる遺伝子である GCLC、xCT は肺腺癌の予後因子となりうるか、3) 肺腺癌細胞株においてこれらの遺伝子を強制発現するとシスプラチン感受性に影響を与えるか、を検証することを目的とした。

方法

1. 肺腺癌手術検体

1-1. 検体採取

東大病院呼吸器外科にて 2007 年 4 月から 2013 年 8 月に根治手術を行った病理病期 IB 以上の肺腺癌症例において、検体提供に書面による患者の同意が得られ、かつ十分な組織量があり次項 1-2 に述べる抽出法で 8 μg 以上の RNA が抽出できた 92 例を解析に用いた。研究計画については東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会に「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査」を申請し（受付番号 1069）承認を受けている。摘出された肺は、肉眼的に確認した腫瘍部分から 5~10mm 大の組織片を採取し、RNAlater® Solution（Ambion USA）に一晩浸漬したのち-20°C で保管した。また、コントロールとして良性の結節性肺病変を理由に切除された 3 症例（肉芽腫、器質化肺炎、クリプトコッカス症各 1 例）の背景肺（非病変部）を採取し、同様に処理して保管した。

1-2. RNA の抽出

保管されていた組織を 1 ml の RNAiso Plus（タカラバイオ）とともにセラミックビーズ入りチューブ（CKMix, Bertin Instruments, France）に入れ、組織破碎装置 Precellys 24（Bertin Instruments）で毎秒 6500 回の振動を 23 秒、interval 15 秒ののち再度 23 秒の振動を与え、破碎し懸濁した。遠心後の上清に 200 μL のクロロホルム（和光純薬工業）を加え懸濁、遠心ののち水相を回収し、500 μL のイソプロパノール（和光純薬工

業)で 40 μg のグリコーゲン (和光純薬工業) と共沈させ、沈殿を 80%エタノール (和光純薬工業) で洗浄し回収した。回収した RNA は DEPC 処理水に溶解し、 -80°C で保管した。

1-3. 定量的 PCR (polymerase chain reaction) による発現量の評価

組織より抽出した total RNA のうち 1 μg を用いて 20 μL の cDNA を合成した。まず total RNA を DNase I (Thermo Fisher Scientific) で処理して混入した DNA を分解した。

<Total RNA の DNase 処理>

Total RNA	1 μg	
DNase I	1 μL	
DNase buffer	1 μL	
DEPC 処理水	up to 10 μL	室温 15 分
EDTA (25 mM pH 8.0)	1 μL	65°C 15 分

EDTA を加えて DNase を失活させたのち、ランダムプライマー (プロメガ) と dNTP mix を加えてアニールさせ、逆転写を行った。逆転写酵素は SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を、RNase inhibitor は RNase OUT (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

<逆転写反応>

Total RNA (DNase 処理後)	11 μL	
Random primers	0.5 μL	
dNTP mix (20mM each)	0.5 μL	
DEPC 処理水	2 μL	65°C 5 分→氷冷
SS III RT	1 μL	
First strand buffer	4 μL	
RNase OUT	1 μL	
Total	20 μL	25°C 5 分→ 50°C 50 分→ 70°C 15 分

大腸癌や乳癌で CSC のマーカーとして使用されている CD133、ALDH1A1、CD44 と、グルタチオン合成関連遺伝子 (GCLC、xCT、CD44v8-10) の発現量の定量を行った。定量的 PCR に用いるプライマーの設計は、National Center for Biotechnology Information が web 上に公開している primer 設計ツール primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) で候補を絞り込み、Tm 値や GC 含有率をなるべく揃えるようにして選定した。CD44 に関しては、全てのスプライシングバリエーションに共通な exon 2~3 にまたがる領域を増幅する all CD44 のセットと、variant exon 8~10 にまたがる領域を増幅する CD44v のセットを設計した。表 5 に各遺伝子のプライマー配列を示す。

表 5. 定量的 PCR に使用したプライマーの配列

遺伝子名		配列
GAPDH	Forward	5'-CACCACCAACTGCTTAGCAC-3'
	Reverse	5'-TGGCAGGTTTTCTAGACGG-3'
GCLC	Forward	5'-ACGGAGGAACAATGTCCGAG-3'
	Reverse	5'-TACTGAAGCGAGGGTGCTTG-3'
xCT	Forward	5'-CAGGAGAAAGTGCAGCTGAA-3'
	Reverse	5'-CTCCAATGATGGTGCCAATG-3'
all CD44	Forward	5'-TCGCTACAGCATCTCTCGGA-3'
	Reverse	5'-TGCTGCACAGATGGAGTTGG-3'
CD44v	Forward	5'-GGACAGGACAGGACCTCTTTC-3'
	Reverse	5'-CTGCTTTCCTTCGTGTGTGG-3'
CD133	Forward	5'-CCTTCATCCACAGATGCTCCTAA-3'
	Reverse	5'-TAATAAACAGCAGCCCCAGGAC-3'
ALDH1A1	Forward	5'-CTGCCGGGAAAAGCAATCTG-3'
	Reverse	5'-TCTTAGCCCGCTCAACACTC-3'

cDNA の定量的 PCR は THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (タカラバイオ) を用いて SYBR® Green 法で行った。PCR 反応と測定、解析は Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して、以下の protocol で行った。

<PCR 反応液の調整>

cDNA	2 μ L	3 反応分		
Forward primer (5 μ M)	4 μ L			
Reverse primer (5 μ M)	4 μ L			
Master mix	25 μ L	95°C	60 秒	40 cycle
Nuclease free water	15 μ L	60°C	30 秒	
Total	50 μ L	72°C	45 秒	

全てのサンプルはプライマーセットごとに triplicate し、X-Rhodamine を passive reference にして分注誤差の補正を行った。また、40 cycle 終了後に解離曲線分析による PCR 産物の検証を行った。このようにして得られた各症例の各遺伝子の Ct 値を、GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) を内在性コントロールとして、非癌病変 3 症例の背景肺の平均値を基準に、-ddCt 法により定量した。

発現量と臨床病理学的特徴や予後との関係の解析においては、各遺伝子の発現量上位 25% (23 例) を高発現群、下位 75% (69 例) または 25% (23 例) を低発現群とした。また、グルタチオン合成関連遺伝子として CD44v8-10, xCT, GCLC については、3 つすべてが非癌病変 3 症例の背景肺の平均値より高く発現している症例 (9 例) を高発現群とし、すべてが低い症例 (28 例) を低発現群とした。

1-4. 臨床的および病理学的調査項目

患者カルテから手術当時の年齢、性別、喫煙習慣、腫瘍径、TNM 分類における病理学的 T 因子、N 因子、病理病期、脈管侵襲の有無、EGFR 遺伝子変異の有無、再発の有無、再発形式、再発後の治療、転帰についての情報を収集した。また、無再発生存期間（Recurrence-free survival: RFS）は肺切除の日から CT 等の画像診断により再発が確認された日までの期間、全生存期間（Overall survival: OS）は肺切除の日から死亡日あるいは最終生存確認日までの期間、再発後生存期間（Post recurrence survival: PRS）は再発が確認された日から死亡日あるいは最終生存確認日までの期間とした。肺癌以外の原因による死亡は打ち切り例とした。

2. Kaplan Meier-plotter (KM plotter) による予後の解析

オンライン上に公開されている臨床情報付き mRNA 発現データをもとに、Kaplan Meier 法を用いて予後を比較する Web ツール KM plotter が公開されている (<http://kmplot.com>) (54)。利用可能なデータは Gene Expression Omnibus の Affimetrix 社製マイクロアレイによるデータと European Genome-phenome Archive および The Cancer Genome Atlas のデータベース (マイクロアレイだけでなく次世代シーケンサーによる RNA-seq データも含む) を合わせたデータであり、肺癌は 2017 年 10 月の時点で 2437 例が登録されている。これを用いて CD133, ALDH1A1, CD44, xCT, GCLC の発現量により予後に差があるかを検討した。選択した probe set はそれぞれ CD133: 204304_s_at, ALDH1A1: 212224_at, CD44: 212063_at, xCT: 209921_at, 202922_at とし、すべての遺伝子において発現量上位 25% を高発現群、下位 75% を低発現群とし、組織型を腺癌に限って根治切除症例を選択し、RFS と OS について解析した (各遺伝子 204 例)。また、このデータベースにおいては非根治手術症例や術後再発症例の治療内容についての詳細情報がごく一部の症例でしか明らかになっていない。化学療法を施行したことが分かっている腺癌の症例 (根治切除の有無は問わない) に限り OS を解析した (各遺伝子 36 例)。

このツールでは群間の比較の検定に Log rank test が、ハザード比の算出は単変量で Cox 回帰分析が行われる。

3. 肺腺癌細胞株

3-1. 使用細胞株と培養条件

先行実験として各種肺腺癌細胞株における酸化ストレス関連遺伝子の発現状況を調査した。前項 1-2、3 で述べた方法に準じて、細胞株から抽出した total RNA から cDNA を合成し、臨床検体と同じプライマーセットを用いて定量的 PCR を行った結果を図 5 に示す。この結果から、本実験で扱う遺伝子群の発現の程度が正常肺組織と比較して低い NCI-H358 を使用した。

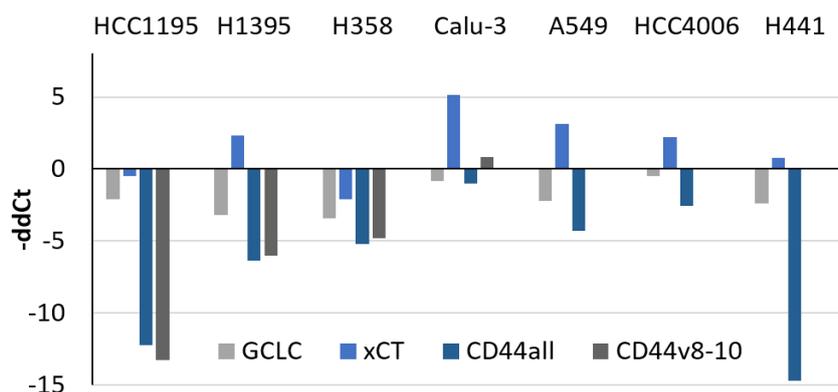


図 5. 各種肺腺癌細胞株の発現状況

肺腺癌細胞株における酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現状況を示す。比較には FirstChoice® Total RNA Survey Panel (Applied Biosystems) キット中のヒト肺 total RNA を基準とし、内在性コントロールに GAPDH を使用した。

ATCC より購入した H358 とその派生株は、RPMI-1640 (和光純薬工業) にウシ胎児血清を 10% 加えた増殖培地で、37°C、CO₂ 5% の環境下で培養した。

レンチウイルスベクターの作成用に使用した Lenti-X™ 293T 細胞株 (タカラバイオ) は D-MEM (和光純薬工業) にウシ胎児血清を 10% 加えた増殖培地で、37°C、CO₂ 5%

の環境下で培養した。

3-2. cDNA のクローニング

グルタチオン合成関連遺伝子として、GCLC、xCT、CD44v8-10 (CD44v) を、また variant との比較のため、CD44 standard isoform (CD44s) の cDNA をクローニングした。まず FirstChoice® Total RNA Survey Panel (Applied Biosystems) キット中のヒト肺および脳由来の RNA 各 1 μ g から、1-3 に述べた方法により cDNA を合成した。これらをテンプレートとし、各遺伝子の coding DNA site を含むように設計したプライマー (表 6) を用いて PCR を行った。プライマー用のオリゴマーはシグマアルドリッチ社製のものを使用した。

表 6. クローニングに使用したプライマーの配列

遺伝子名		配列
GCLC 前半	Forward	5'-CAGACCGGCAAAGAGAAGC-3'
	Reverse	5'-TACTGAAGCGAGGGTGCTTG-3'
GCLC 後半	Forward	5'-ACGGAGGAACAATGTCCGAG-3'
	Reverse	5'-TGTAGCCAGTTCGTCAATAATGC-3'
xCT	Forward	5'-TTTTATTTTCCCCCGTGTG-3'
	Reverse	5'-GCAGATTGCCAAGATCTCAAG-3'
CD44s	Forward	5'-AAACTGCAGCCAACCTCCGA-3'
	Reverse	5'-AAGATTCGCAATGAAACAATCAGTAG-3'
CD44v 前半	Forward	5'-AAACTGCAGCCAACCTCCGA-3'
	Reverse	5'-TGAGAATTACTCTGCTGCGTTGTC-3'
CD44v 後半	Forward	5'-GACAGGACCTCT TTCAATGACAAC-3'
	Reverse	5'-AAGATTCGCAATGAAACAATCAGTAG-3'

GCLC の前半部分以外は耐熱性ポリメラーゼに KOD-plus-（東洋紡）を使用し添付文書に沿って 25 μ L の系で反応させた。GCLC 前半は GC 含有率が高く、KOD-plus-での増幅が困難であったため、AmpliTaq Gold 360 Master Mix（Thermo Fisher Scientific）を用いて、添付の GC enhancer を 10% 添加することにより増幅可能となった。表 7 に PCR 反応条件を示す。

表 7. PCR 反応条件

配列	PCR サイクル	Polymerase
GCLC 前半	95°C, 10 分→(95°C, 30 秒→60°C, 30 秒→72°C, 60 秒)×40 cycle→72°C, 7 分	AmpliTaq Gold 360
GCLC 後半	94°C, 2 分→(98°C, 10 秒→58°C, 30 秒→72°C, 90 秒)×35 cycle→72°C, 5 分	KOD-plus-
xCT	94°C, 2 分→(98°C, 10 秒→60°C, 30 秒→72°C, 90 秒)×35 cycle→72°C, 5 分	KOD-plus-
CD44s	94°C, 2 分→(98°C, 10 秒→55°C, 30 秒→72°C, 90 秒)×35 cycle→72°C, 5 分	KOD-plus-
CD44v 前半	94°C, 2 分→(98°C, 10 秒→50°C, 30 秒→72°C, 60 秒)×35 cycle→72°C, 5 分	KOD-plus-
CD44v 後半	94°C, 2 分→(98°C, 10 秒→60°C, 30 秒→72°C, 60 秒)×35 cycle→72°C, 5 分	KOD-plus-

GCLC は coding DNA site が長く GC 含有率も不均一であったため、また CD44v についてはスプライシングバリエーションの混入を避けるため、数 10 塩基重複するようにして前半と後半に分けて PCR を行い、それらを合わせて overlap extension PCR(55) を行うことにより全長を得た (図 6)。反応条件はどちらも、40 μ L の系で、ポリメラーゼに KOD-plus-を用い、94 $^{\circ}$ C, 2 分 \rightarrow (98 $^{\circ}$ C, 10 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C, 30 秒 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 2 分) \times 30 cycle \rightarrow 72 $^{\circ}$ C, 5 分とした。

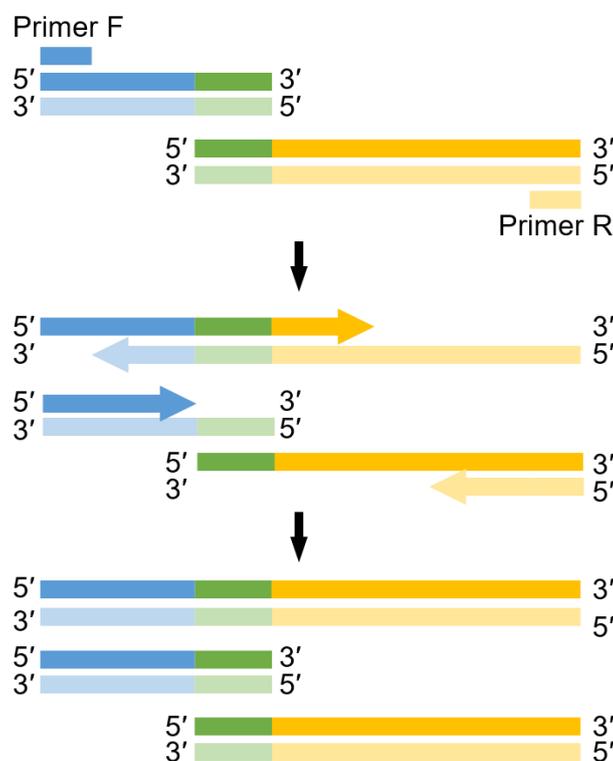


図 6. Overlap extension 法

長い領域のクローニングでは前半 (青+緑) と後半 (緑+黄) に分けて別々に PCR を行った後、精製して再度両端のプライマーとともに PCR 反応を行う。重複部分 (緑) がプライマーとなり伸長反応が起きることによって目的の産物 (青+緑+黄) を得ることができる。

PCR 産物は 1.5%アガロースゲルに電気泳動してバンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ) を用いて精製し、Taq DNA polymerase (New England Biolabs Japan) により A-tailing を行った。精製した PCR 産物は TA クローニングの手法を用いて、pGEM® T-easy vector (プロメガ) に ligation (図 7) し、コンピテントセル (ECOS™ X Competent E. coli DH5α、ニッポン・ジーン) に transform して cDNA の入ったプラスミドを得た。

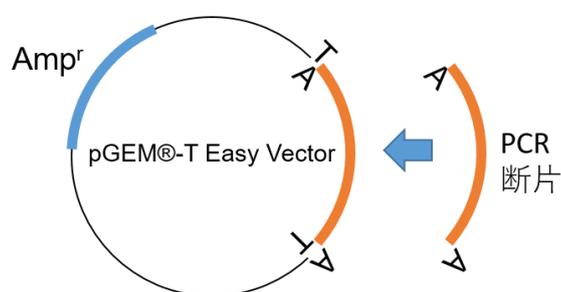


図 7. pGEM® T-easy vector と TA クローニング

クローニングした cDNA の配列は FASMAC 社の DNA シーケンス解析サービスを利用し、NCBI のリファレンス配列 (RefSeq) (表 8) と相違ないことを確認した。

表 8. クローニングした配列の RefSeq ID

遺伝子	RefSeq ID
GCLC	NM_001498.3
xCT	NM_014331.3
CD44s	NM_001001391.1
CD44v	NM_001001390.1

3-3. 強制発現株の樹立

細胞株への強制発現には理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けた cDNA 発現用レンチウイルスベクタープラスミド (CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd) を用いた(56)。図 8 に CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd のベクターマップを示す。

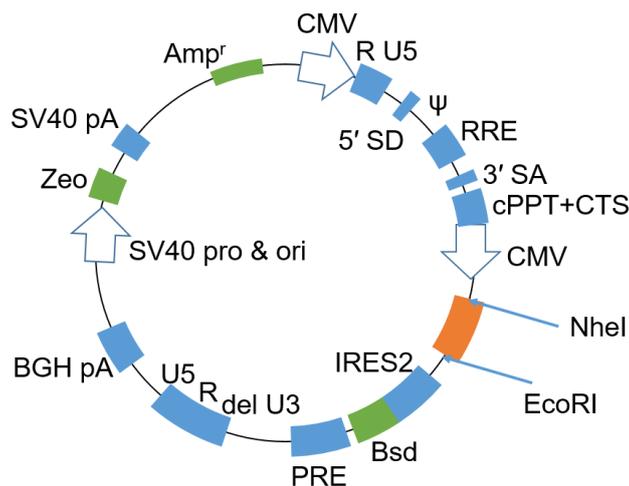


図 8. CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd プラスミドのベクターマップ
橙色の部分に各遺伝子の CDS を挿入した。

CMV: Human cytomegalovirus immediate early promoter

Ψ: packaging signal

5'SD: 5' splicing donor site

3'SA: 3' splicing acceptor site

RRE: Rev responsive element

cPPT: Central polypurine tract

CTS: Central termination sequence

IRES2: Encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site

Bsd: Blasticidin resistance gene

PRE: Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

del U3: Deletion of enhancer and promoter sequence in the U3 region

BGH pA: Bovine growth hormone polyadenylation signal

SV40 pro & ori: SV 40 early promoter and origin

Zeo: Zeocin resistance gene

SV40 pA: SV40 polyadenylation signal

Amp: Ampicillin resistance gene

このベクターは multiple cloning site に Nhe I 認識配列 (GCTAGC) と EcoR I (GAATTC) 認識配列を持ち、この粘着断端を持つ任意の配列を挿入することができる。また、blasticidin 耐性遺伝子を持ち、発現細胞の blasticidin によるセレクションが可能である。

3-2 項で作成したプラスミドをテンプレートにして再度、開始コドン直前の 6 塩基を含み Nhe I 認識配列と足場を付けた Forward プライマーと、EcoR I 認識配列で終止コドンを削除した Reverse プライマー (表 9) で PCR を行った。

表 9. レンチウイルスベクターに挿入する断片作成用プライマー

遺伝子名		配列
GCLC	Forward	5'-GAGGAGGCTAGCGCGGCC <u>ATG</u> GGGCTG-3'
	Reverse	5'-GTAGAAGAATTCGTTGGATGAGTCAGTTTTACTTCCAC-3'
xCT	Forward	5'-TCCCCCGCTAGCCCTACT <u>ATG</u> GTCAG-3'
	Reverse	5'-TCCATTGAATTCCTAACTTATCTTCTTCTGGTACAAC-3'
CD44	Forward	5'-CCGTTGCTAGCGACACC <u>ATG</u> GACAAG-3'
	Reverse	5'-GAGTAGGAATTCACCCCAATCTTCATGTG-3'

赤字 : Nhe I 認識配列、青字 : EcoR I 認識配列、下線部 : 開始コドン

PCR 産物を精製後、Nhe I と EcoR I (New England Biolabs Japan) で制限酵素処理を行って粘着断端を作成し、同様に処理したベクタープラスミドに ligation した。コンピテントセル (One Shot Stbl3 Chemically Competent E.coli, Thermo Fisher Scientific) に transform して十分量のプラスミドを得た。コントロールとして、緑色蛍光色素 (GFP) カセットを挿入したプラスミドも作成した。

前日に継代した Lenti-X293T 細胞を 10cm 培養シャーレに 6.0×10^6 個入れて一晩培

養し、理化学研究所バイオリソースセンターより提供を受けたパッケージングプラスミド (pCAG-HIVgp、pCMV-VSV-G-RSV-Rev) とともに Hilymax (同仁化学研究所) を用いてリポフェクションした。リポフェクションは Hilymax の添付文書に従い、無血清培地は Opti-MEM® (Thermo Fisher Scientific) を使用し、次の protocol に従って調整し、10ml の増殖培地の入った 10cm 培養シャーレに加えた。16 時間培養後に 7.5 µg の forskolin (和光純薬工業) を添加した 7.5 ml の増殖培地に交換し、さらに 48 時間培養した。この培養上清 (=ウイルス液) を回収し、0.45 µm の Millipore filter で濾過し、分注して-80°C で保管した。

<リポフェクション試薬の調整>

CSII-CMV-xxx-IRES2-Bsd	14 µg	(xxx: 各遺伝子)
pCAG-HIVgp	8 µg	
pCMV-VSV-G-RSV-Rev	8 µg	
無血清培地	up to 900 µL	
<hr/>		
Hilymax	150 µL	室温 15 分

前日に H358 細胞を 6 well プレートに 2.5×10^5 /well で播種し一晩増殖培地で培養した後、ウイルス液と増殖培地を 750 µL ずつ混合しポリブレン (シグマアルドリッチ) を 12 µg 加えた培地に交換した。翌日より blasticidin (科研製薬) を 10 µg/mL になるよう加えて 1 週間程度培養してから継代することにより、ベクター発現細胞のみを選択した。このようにして得られた各細胞株は、H358-GCLC、H358-xCT、H358-CD44s、H358-CD44v、H358-GFP と名付けた。

3-4. シスプラチン感受性の評価

シスプラチン（和光純薬工業）を N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）（和光純薬工業）に溶解した、0（DMFのみ）、20、200、1000、2000、4000、10000 μM の希釈系列を作成し、さらにこれらを増殖培地で 200 倍に希釈して終濃度 0、0.1、1、5、10、20、50 μM となるよう調整した。H358 由来の各強制発現株（H358-GCLC、H358-xCT、H358-CD44s、H358-CD44v、H358-GFP）はそれぞれ 96 well プレートに 10^5 個/mL の密度で 100 μL ずつ（ 10^4 個/well）入れ、24 時間培養後に各濃度のシスプラチン含有培地に交換した。48 時間シスプラチン含有培地に曝露した後、細胞生存率の測定を行った。1 回の独立した実験で各濃度につき 3 well ずつ作成した。生存率の算出は、増殖培地 100 μL に対して Cell Counting Kit-8（同仁化学研究所）を 10 μL の割合で混合したものをシスプラチン含有培地と交換し、2 時間後に microplate reader ARVO X（Perkin Elmer）を用いて 450 nm の吸光度を測定することにより行った。各濃度につき 3 well の平均吸光度を用い、シスプラチン濃度 0 μM での生存細胞数を 100% として、各濃度での細胞生存率を算出した。この値をプロビット変換して線形近似し、50% 阻害濃度（ IC_{50} ）を算出した。

4. 統計学的解析

統計学的解析には SPSS ver.22 (SPSS, Inc.) およびフリーソフト R (3.4.3) を使用した。R では臨床検体における各遺伝子の発現量について Z スコア化しヒートマップと樹状図の作成を行い、その他全ての統計解析は SPSS を使用した。肺腺癌症例における各遺伝子の高発現群と低発現群について、臨床病理学的特徴の比較は、平均腫瘍径には Mann-Whitney の U 検定を、それ以外のカテゴリー変数には χ^2 検定を用いた。RFS, OS, PRS の解析は Kaplan-Meier 法を用い、群間の比較は Log rank test を用い、ハザード比の算出は Cox 回帰分析を使用した。細胞株の実験では少なくとも 3 回以上の独立した実験を行い、データはその結果の平均値±標準誤差で示した。各細胞株間での 50%阻害濃度の比較には等分散性を仮定し、Bonferroni の多重比較法を用いた。いずれの検定においても $P < 0.05$ をもって統計学的有意差ありとした。

結果

1. 肺腺癌根治的切除例の予後と各遺伝子の発現

1-1. 患者背景

解析した 92 例の臨床・病理組織学的特徴を表 10 に示す。

表 10. 肺腺癌 92 症例の臨床病理学的特徴

変数		N=92 (%)
年齢	>65 歳	62 (67.4)
性別	男性	54 (58.7)
喫煙歴	喫煙歴あり	56 (60.9)
pT	1	8 (8.7)
	2	71 (77.2)
	3	12 (13.0)
	4	1 (1.1)
平均腫瘍径 (mm) ± SD		37.4 ± 16.8
pN	0	64 (69.6)
	1	11 (12.0)
	2	17 (18.5)
病理病期	IB	51 (55.4)
	II	21 (22.8)
	III	20 (21.7)
静脈侵襲	あり	53 (57.6)
リンパ管侵襲	あり	32 (34.8)

92 例の平均年齢は 69.5 歳で、男性が約 6 割、また根治切除症例を対象としていることから IB 期が半数以上を占めていた。観察期間中央値は 60 ヶ月、生存期間中央値は肺癌による死亡症例が 50% 未満であったため算出不可能であった。

表 11. 再発した 31 症例の再発部位と治療内容、転帰

変数	N=31 (%)
再発部位	
遠隔転移	15 (48.4)
骨転移	10 (32.2)
脳転移	9 (29.0)
リンパ節	1 (3.2)
局所再発	23 (74.2)
肺	10 (32.2)
胸水・胸膜播種	8 (25.8)
リンパ節	7 (22.6)
再発後の治療内容	
緩和治療のみ*	9 (29.0)
抗腫瘍療法あり**	22 (71.0)
化学療法（従来法）	17 (54.8)
化学療法（分子標的治療）	13 (41.9)
放射線治療	15 (48.4)
転帰	
肺腺癌による死亡	13 (41.9)

*: 再発後の観察期間が短く治療の有無が確認できなかった 4 例を含む。 **: 2 次治療以降で使用した症例も含む。従来法は、シスプラチン、カルボプラチン、ペメトレキセド、ドセタキセル、パクリタキセル、S-1 を使用した症例。分子標的治療は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブを使用した症例が含まれる。放射線治療には全脳照射、縦隔照射、局所定位放射線療法、 γ -knife、骨転移疼痛緩和目的の照射を行った症例が含まれる。

観察期間中の再発は 92 例中 31 例に確認され、骨、脳、副腎などの遠隔転移が 15 例、縦隔リンパ節や胸水などの局所再発が 23 例にみられた。そのうち 22 例は再発に対する治療が行われた（表 11）。EGFR 遺伝子変異は 57 例が未検で、非再発症例で

EGFR 遺伝子変異検査を施行されていたのは5例のみであった。また、92例中に EML4-ALK 融合遺伝子が検出された症例はなかった。

良性肺結節により切除された背景肺3例の平均値を基準とした、肺腺癌組織における各遺伝子の mRNA 発現量の分布を図9に示す。なお、肺腺癌組織での Ct 値の標準偏差は GCLC: 2.0, xCT: 2.2, all CD44: 1.5, CD44v8-10: 2.5, ALDH1A1: 2.1, CD133: 3.5 で、これに対して基準とした3例の標準偏差 (GCLC: 0.20, xCT: 0.21, all CD44: 0.42, CD44v8-10: 0.10, ALDH1A1: 0.46, CD133: 1.3) は比較的小さく、値のばらつきは少なかった。

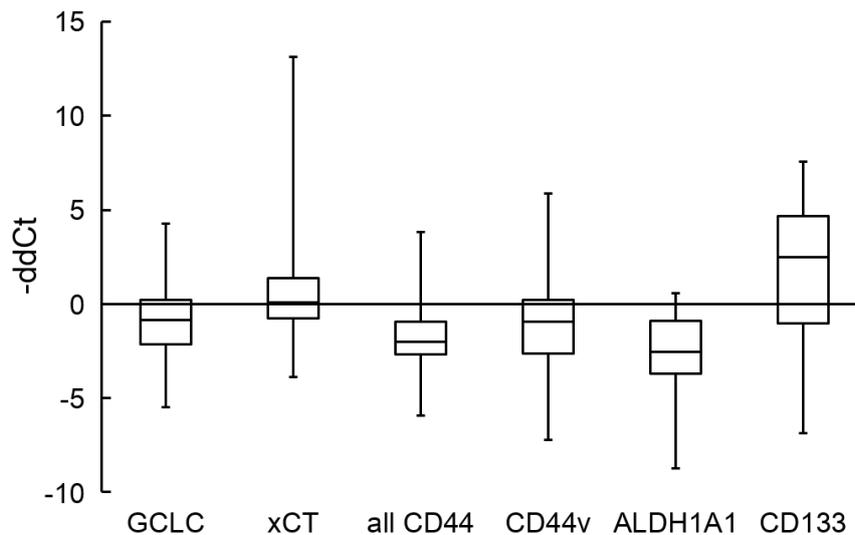


図9. 肺腺癌 92 症例における各遺伝子の mRNA 発現量
qRT-PCR による mRNA の定量。良性肺結節により切除された背景肺3例の平均値を基準とし、内在性コントロールには GAPDH を使用。箱ひげ図のひげは最大値と最小値、箱は第1, 3 四分位範囲と中央値を示す。

GCLC, CD44 (s, v とも), ALDH1A1 は腫瘍ではコントロールに用いた非癌病変の背景肺組織より発現が少ない傾向があり、CD133 は腫瘍でより多く発現している傾向が

あった。以降の発現量の解析では、全ての遺伝子を同じ症例数の割り振りで比較するにあたってなるべくコントロールより発現が多いものが高発現群に入るようにするため、上位 25% で区切った。

各遺伝子の発現量の相関を図 10 に示す。CD133, all CD44 と ALDH1A1 は相関があり、CD133 と CD44all は弱い相関、all CD44 と CD44v8-10 も弱い相関があった。また、xCT は CD44v8-10, GCLC と弱い相関があった。

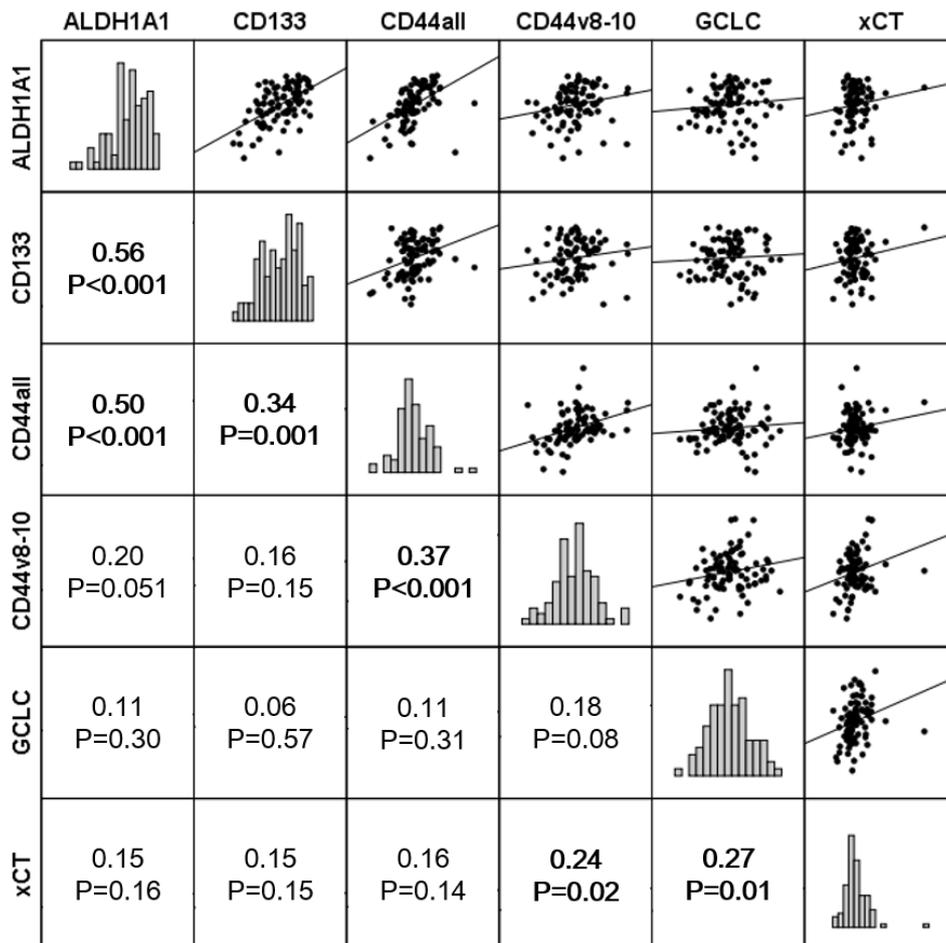


図 10. 発現量の各遺伝子間での相関

右上の散布図には各症例の発現量の分布と線形近似による回帰直線を示す。左下の数値は相関係数と P 値を示す。対角線上には各遺伝子の分布を示す。

統計ソフト R を用いて各遺伝子の発現量を Z スコア化してヒートマップを作成し、Ward 法により樹状図を作ると図 11 のように、モザイク状となった。CD133, ALDH1A1, all CD44 は同一クラスターに、CD44v8-10, xCT, GCLC はまた別の同一クラスターに分類されており、CSC マーカーとグルタチオン合成関連遺伝子とで分かれるようであった。このうちグルタチオン合成関連遺伝子 (CD44v8-10, xCT, GCLC) のみの発現量でヒートマップを作成してもやはりモザイク状であり、症例は大きく 2 群に分かれるもののそれぞれの群に特徴がなく、臨床的に意味のある分類とはならなかった。

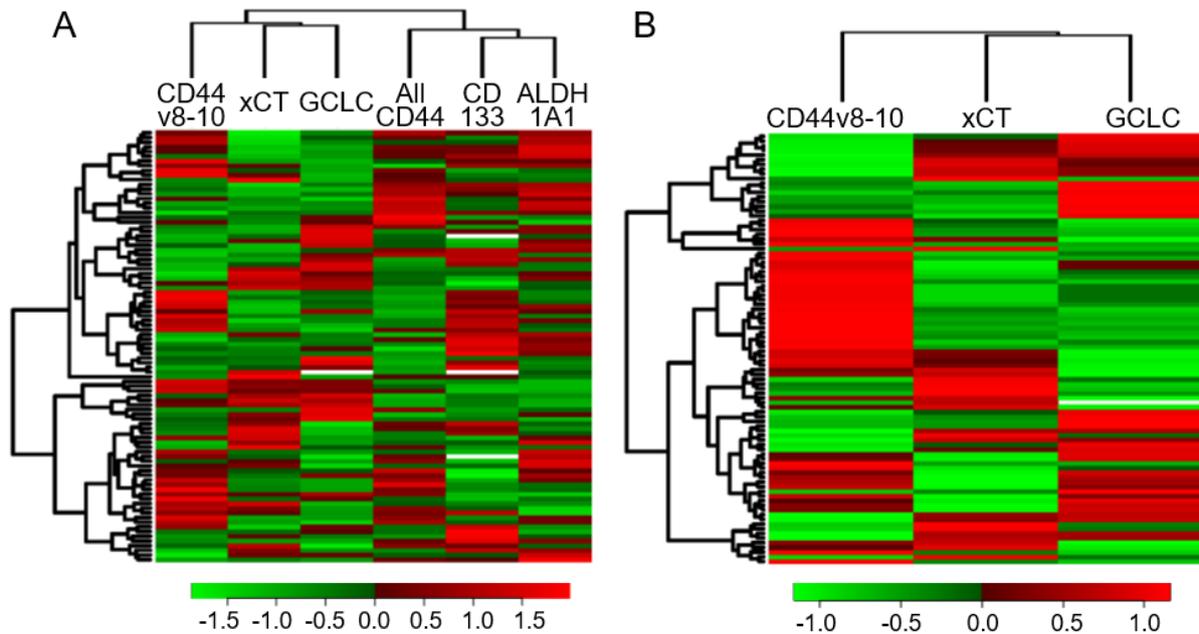


図 11. Ward 法によるクラスター解析

A: 6 遺伝子すべての発現量をもとにした解析。B: グルタチオン合成に関連する 3 遺伝子の発現量をもとにした解析。赤が高発現、緑が低発現、白は real time PCR により検出できなかった検体を示す。

1-2. CD133

表 12 に CD133 の mRNA 発現量上位 25% の高発現群と下位 75% の低発現群それぞれの臨床病理学的特徴を示す。リンパ節転移の有無でみると差はなかったが、N2 症例は高発現群に多かった。また、高発現群は静脈侵襲が少なかった。

表 12-1. CD133 の mRNA 発現量による臨床病理学的特徴の比較

		高発現群		低発現群		P value
		n	(%)	n	(%)	
年齢	>65 歳	16	(69.6)	46	(66.7)	0.80
性別	男性	16	(69.6)	38	(55.1)	0.22
喫煙歴	あり	14	(60.9)	42	(60.9)	1
pT	1	3	(13.0)	5	(7.2)	0.80
	2	16	(69.6)	55	(79.7)	
	3	4	(17.4)	8	(11.6)	
	4	0	(0.0)	1	(1.4)	
平均腫瘍径 (mm) ± SD		40.3±17.6		36.4±16.6		0.33
pN	0	16	(69.6)	48	(69.6)	0.049
	1	0	(0.0)	11	(15.9)	
	2	7	(30.4)	10	(14.5)	
病理病期	IB	11	(47.8)	40	(58.0)	0.50
	II	5	(21.7)	16	(23.2)	
	III	7	(30.4)	13	(18.8)	
静脈侵襲	あり	9	(39.1)	44	(63.8)	0.038
リンパ管侵襲	あり	7	(30.4)	25	(36.2)	0.61
EGFR 遺伝子変異あり		2	(8.7)	12	(17.4)	0.31
再発		6	(26.1)	25	(36.2)	0.37
再発形式	局所再発	5	(21.7)	18	(26.1)	0.68
	遠隔転移	2	(8.7)	12	(17.4)	0.31
肺癌による死亡		4	(17.4)	9	(13.0)	0.60

また、再発した 31 症例について、再発後の治療内容に有意な差はみられなかった。

表 12-2. 再発した 31 症例の治療内容の比較

	高発現群		低発現群		P value
	N=6		N=25		
	n	(%)	n	(%)	
緩和治療のみ*	1	(16.7)	8	(32.0)	0.46
抗腫瘍療法あり**					
化学療法 従来法	5	(83.3)	11	(44.0)	0.083
分子標的治療	2	(33.3)	11	(44.0)	0.63
放射線療法	3	(50.0)	12	(48.0)	0.93

*: 再発後の観察期間が短く治療の有無が確認できなかった症例を含む。**: 2 次治療以降で使用した症例も含む。従来法は、シスプラチン、カルボプラチン、ペメトレキセド、ドセタキセル、パクリタキセル、S-1 を使用した症例。分子標的治療は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブを使用した症例が含まれる。放射線治療には全脳照射、縦隔照射、局所定位放射線療法、 γ -knife、骨転移疼痛緩和目的の照射を行った症例が含まれる。

図 12 に予後を比較したグラフを示す。傾向としては RFS (A) において高発現群が予後良好であるのに対して OS (B) においては 2 群がほぼ重なるようにも思われるが、ともに統計学的に有意な差はみられなかった。低発現群を下位 25% としても同様の結果であった (RFS: $P = 0.12$, OS: $P = 0.98$)。術後再発を来した後に根治を目指した抗腫瘍療法が行われた 22 例の PRS (C) は、高発現群が予後不良であった (Log rank $P = 0.047$ 、ハザード比 3.48、95% 信頼区間 0.93-13.1)。

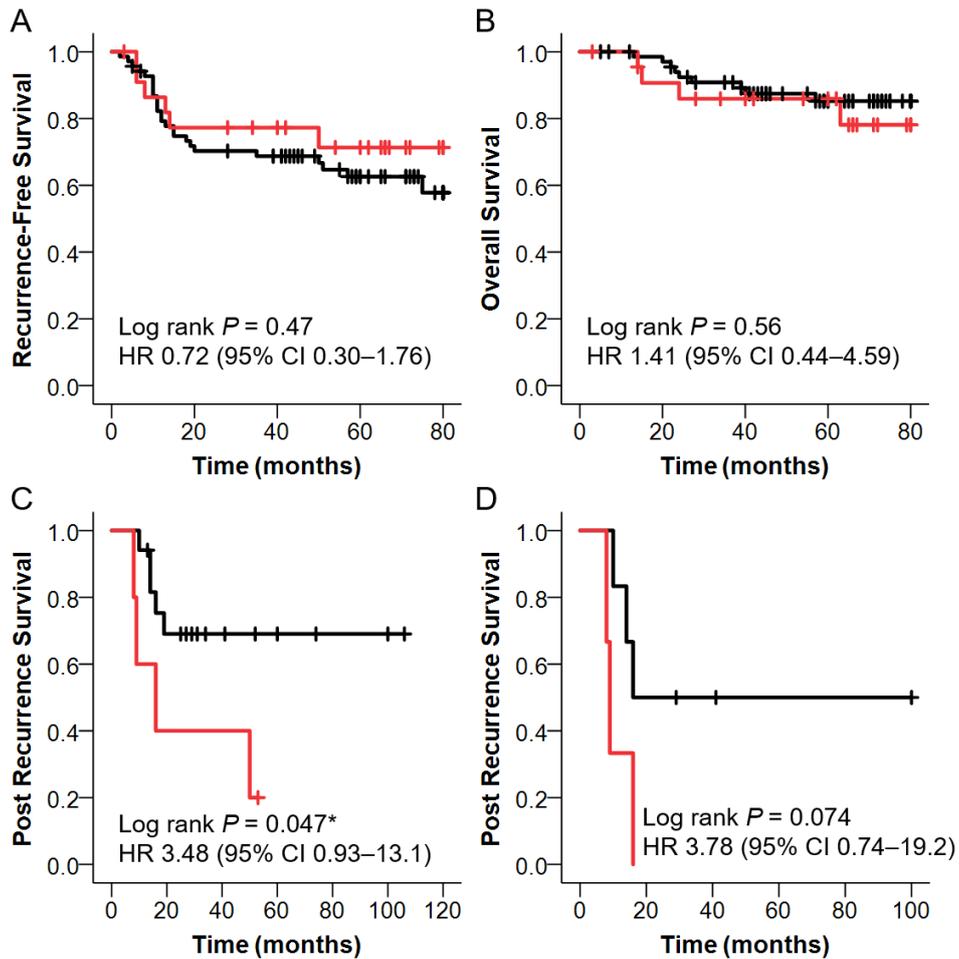


図 12. CD133 の mRNA 発現量と予後

A : RFS、B : OS、赤線 : 高発現群 (23 例)、黒線 : 低発現群 (69 例)。C: 再発後に根治的な治療を行った 22 症例の PRS。赤線 : 高発現群 (5 例)、黒線 : 低発現群 (17 例)。D: EGFR 遺伝子変異なしで再発後に根治的な治療を行った 9 例の PRS。赤線 : 高発現群 (3 例)、黒線 : 低発現群 (6 例)。

EGFR 遺伝子変異のある症例には従来の細胞障害性抗腫瘍薬より奏効率の高いゲフィチニブやエルロチニブなどの EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) が投与されて生存期間が延長している可能性が高く、その影響を排除するためこれらの症例を除くと、有意差はなくなった (D)。

1-3. ALDH1A1

表 13 に ALDH1A1 の mRNA 発現量上位 25% の高発現群と下位 75% の低発現群それぞれの臨床病理学的特徴を示す。高発現群で静脈侵襲が少なかったが、その他の項目には有意差を認めなかった。

表 13-1. ALDH1A1 の mRNA 発現量による臨床病理学的特徴の比較

		高発現群		低発現群		P value
		n	(%)	n	(%)	
年齢	>65 歳	18	(78.3)	44	(63.8)	0.20
性別	男性	14	(60.6)	40	(58.0)	0.81
喫煙歴	あり	13	(56.5)	43	(62.3)	0.62
pT	1	1	(4.3)	7	(10.1)	0.68
	2	20	(87.0)	51	(73.9)	
	3	2	(8.7)	10	(14.5)	
	4	0	(0.0)	1	(1.4)	
平均腫瘍径 (mm) ± SD		35.0±12.3		38.2±18.1		0.84
pN	0	17	(73.9)	47	(68.1)	0.83
	1	2	(8.7)	9	(13.0)	
	2	4	(17.4)	13	(18.8)	
病理病期	IB	16	(69.6)	35	(50.7)	0.27
	II	3	(13.0)	18	(26.1)	
	III	4	(17.4)	16	(23.2)	
静脈侵襲	あり	8	(34.8)	45	(65.2)	0.011
リンパ管侵襲	あり	6	(26.1)	26	(37.7)	0.31
EGFR 遺伝子変異あり		5	(21.7)	9	(13.6)	0.31
再発		7	(30.4)	24	(34.8)	0.70
再発形式	局所再発	5	(21.7)	18	(26.1)	0.68
	遠隔転移	2	(8.7)	12	(17.4)	0.31
肺癌による死亡		2	(8.7)	11	(15.9)	0.39

また、再発症例については、高発現群では分子標的治療施行例が多い傾向にあるが有意差はなかった。

表 13-2. 再発した 31 症例の治療内容の比較

	高発現群		低発現群		P value
	N=7		N=24		
	n	(%)	n	(%)	
緩和治療のみ*	2	(28.6)	7	(29.2)	0.98
抗腫瘍療法あり**					
化学療法 従来法	5	(71.4)	11	(45.8)	0.23
分子標的治療	5	(71.4)	8	(33.3)	0.072
放射線療法	2	(28.6)	13	(54.2)	0.23

*: 再発後の観察期間が短く治療の有無が確認できなかった症例を含む。**: 2 次治療以降で使用した症例も含む。従来法は、シスプラチン、カルボプラチン、ペメトレキセド、ドセタキセル、パクリタキセル、S-1 を使用した症例。分子標的治療は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブを使用した症例が含まれる。放射線治療には全脳照射、縦隔照射、局所定位放射線療法、 γ -knife、骨転移疼痛緩和目的の照射を行った症例が含まれる。

図 13 に予後を比較したグラフを示す。RFS、OS ともに有意な差はなかった。低発

現群を下位 25%としても同様の結果であった (RFS: $P = 0.20$, OS: $P = 0.12$)。

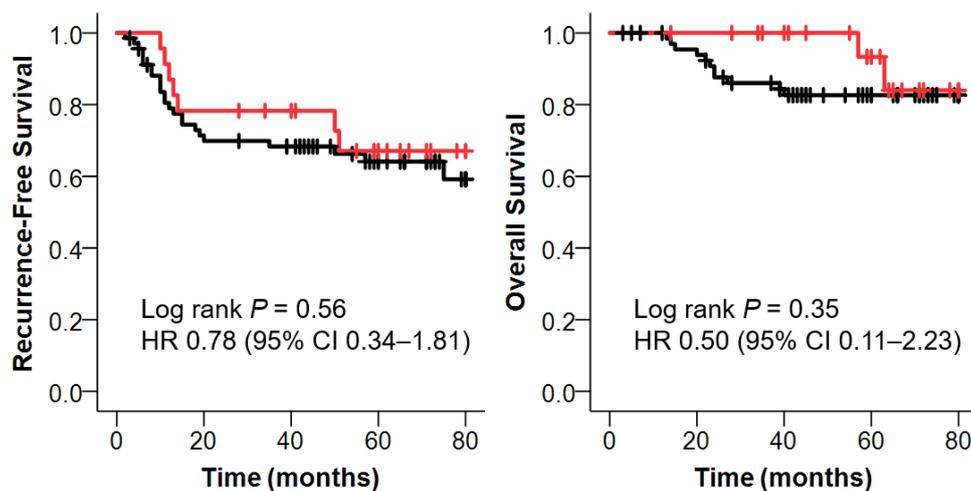


図 13. ALDH1A1 の mRNA 発現量と予後

左 : RFS、右 : OS、赤線 : 高発現群 (23 例)、黒線 : 低発現群 (69 例)

1-4. All CD44

表 14 に全ての variant を含む CD44 の mRNA 発現量上位 25% の高発現群と下位 75% の低発現群それぞれの臨床病理学的特徴を示す。高発現群で静脈侵襲が少なく、局所再発も少なかったが、その他の項目には有意差を認めなかった。

表 14-1. All CD44 の mRNA 発現量による臨床病理学的特徴の比較

		高発現群		低発現群		P value
		n	(%)	n	(%)	
年齢	>65 歳	17	(73.9)	45	(65.2)	0.44
性別	男性	11	(47.8)	43	(62.3)	0.22
喫煙歴	あり	11	(47.8)	45	(65.2)	0.14
pT	1	3	(13.0)	5	(7.2)	0.47
	2	16	(69.6)	55	(79.7)	
	3	4	(17.4)	8	(11.6)	
	4	0	(0.0)	1	(1.4)	
平均腫瘍径 (mm) ± SD		33.2±9.2		38.8±18.5		0.27
pN	0	16	(69.6)	48	(69.6)	0.98
	1	3	(13.0)	8	(11.6)	
	2	4	(17.4)	13	(18.8)	
病理病期	IB	13	(56.5)	38	(55.1)	0.81
	II	6	(26.1)	15	(21.7)	
	III	4	(17.4)	16	(23.2)	
静脈侵襲	あり	9	(39.1)	44	(63.8)	0.038
リンパ管侵襲	あり	7	(30.4)	25	(36.2)	0.61
EGFR 遺伝子変異あり		6	(26.1)	8	(11.6)	0.094
再発		5	(21.7)	26	(37.7)	0.16
再発形式	局所再発	2	(8.7)	21	(30.4)	0.037
	遠隔転移	4	(17.4)	10	(14.5)	0.74
肺癌による死亡		2	(8.7)	11	(15.9)	0.39

再発後の治療内容は、高発現群に積極的な治療を行った症例が多く含まれており、特に EGFR 遺伝子変異症例が多く、分子標的治療の対象となる患者が多かった。

表 14-2. 再発した 31 症例の治療内容の比較

	高発現群		低発現群		P value
	N=5		N=26		
	n	(%)	n	(%)	
緩和治療のみ*	0	(0.0)	9	(34.6)	0.068
抗腫瘍療法あり**					
化学療法 従来法	5	(100.0)	11	(42.5)	0.018
分子標的治療	5	(100.0)	8	(30.8)	0.004
放射線療法	4	(80.0)	11	(42.3)	0.12

*: 再発後の観察期間が短く治療の有無が確認できなかった症例を含む。**: 2 次治療以降で使用した症例も含む。従来法は、シスプラチン、カルボプラチン、ペメトレキセド、ドセタキセル、パクリタキセル、S-1 を使用した症例。分子標的治療は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブを使用した症例が含まれる。放射線治療には全脳照射、縦隔照射、局所定位放射線療法、 γ -knife、骨転移疼痛緩和目的の照射を行った症例が含まれる。

図 14 に予後を比較したグラフを示す。RFS、OS ともに有意な差はなかった。

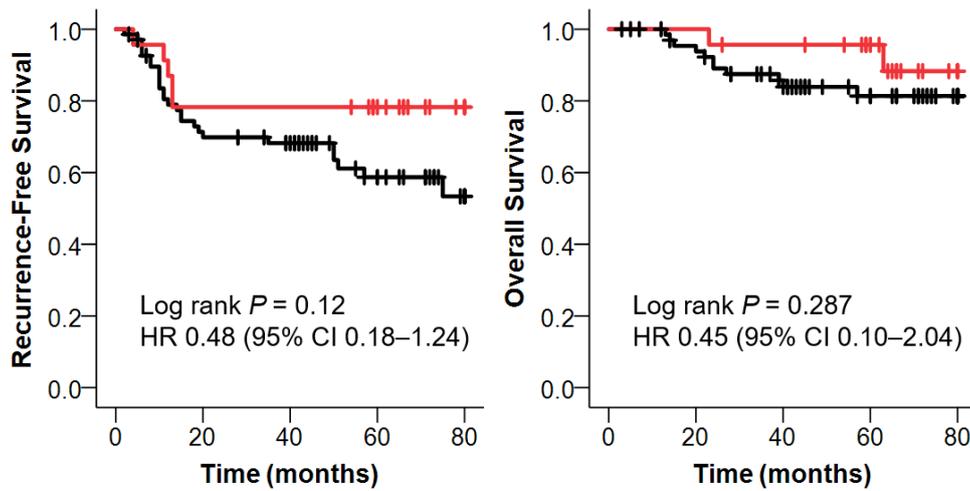


図 14. All CD44 の mRNA 発現量と予後

左：RFS、右：OS、赤線：高発現群（23 例）、黒線：低発現群（69 例）

なお、低発現群を発現量下位 25% とすると RFS に関しては Log rank $P = 0.017$ 、ハザード比 0.30, 95%CI: 0.11-0.86 となり有意差をもって予後良好であったが、OS では $P = 0.15$ と有意差がなかった。

1-5. CD44v8-10

表 15 に CD44v8-10 の mRNA 発現量上位 25%の高発現群と下位 75%の低発現群それぞれの臨床病理学的特徴を示す。高発現群で喫煙歴ありの症例が多くみられたが、その他の項目には有意差を認めなかった。

表 15-1. CD44v8-10 の mRNA 発現量による臨床病理学的特徴の比較

		高発現群		低発現群		P value
		n	(%)	n	(%)	
年齢	>65 歳	13	(56.5)	49	(71.0)	0.20
性別	男性	17	(73.9)	37	(53.6)	0.087
喫煙歴	あり	18	(78.3)	38	(55.1)	0.048
pT	1	2	(8.7)	6	(8.7)	0.60
	2	18	(78.3)	53	(76.8)	
	3	2	(8.7)	10	(14.5)	
	4	1	(4.3)	0	(0.0)	
平均腫瘍径 (mm) ± SD		33.6±12.5		38.6±17.9		0.26
pN	0	15	(65.2)	49	(71.0)	0.52
	1	2	(8.7)	9	(13.0)	
	2	6	(26.1)	11	(15.9)	
病理病期	IB	12	(52.2)	39	(56.5)	0.47
	II	4	(17.4)	17	(24.6)	
	III	7	(30.4)	13	(18.8)	
静脈侵襲	あり	16	(69.6)	37	(53.6)	0.18
リンパ管侵襲	あり	10	(43.5)	22	(31.9)	0.31
EGFR 遺伝子変異あり		5	(21.7)	9	(13.0)	0.31
再発		8	(34.8)	23	(33.3)	0.90
再発形式	局所再発	5	(21.7)	18	(26.1)	0.68
	遠隔転移	4	(17.4)	10	(14.5)	0.74
肺癌による死亡		3	(13.0)	10	(14.5)	0.86

再発した 31 例について、再発後の治療に関しても有意な差はみられなかった。

表 15-2. 再発した 31 症例の治療内容の比較

	高発現群		低発現群		P value
	N=8		N=23		
	n	(%)	n	(%)	
緩和治療のみ*	1	(12.5)	8	(34.8)	0.23
抗腫瘍療法あり**					
化学療法 従来法	6	(75.0)	10	(43.5)	0.12
分子標的治療	5	(62.5)	8	(34.8)	0.17
放射線療法	4	(50.0)	11	(47.8)	0.92

*: 再発後の観察期間が短く治療の有無が確認できなかった症例を含む。**: 2 次治療以降で使用した症例も含む。従来法は、シスプラチン、カルボプラチン、ペメトレキセド、ドセタキセル、パクリタキセル、S-1 を使用した症例。分子標的治療は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブを使用した症例が含まれる。放射線治療には全脳照射、縦隔照射、局所定位放射線療法、 γ -knife、骨転移疼痛緩和目的の照射を行った症例が含まれる。

図 15 に予後を比較したグラフを示す。2 群の生存曲線は RFS, OS とともにほぼ重なり、有意差はなかった。低発現群を下位 25%としても同様の結果であった (RFS: $P = 0.82$, OS: $P = 0.95$)。

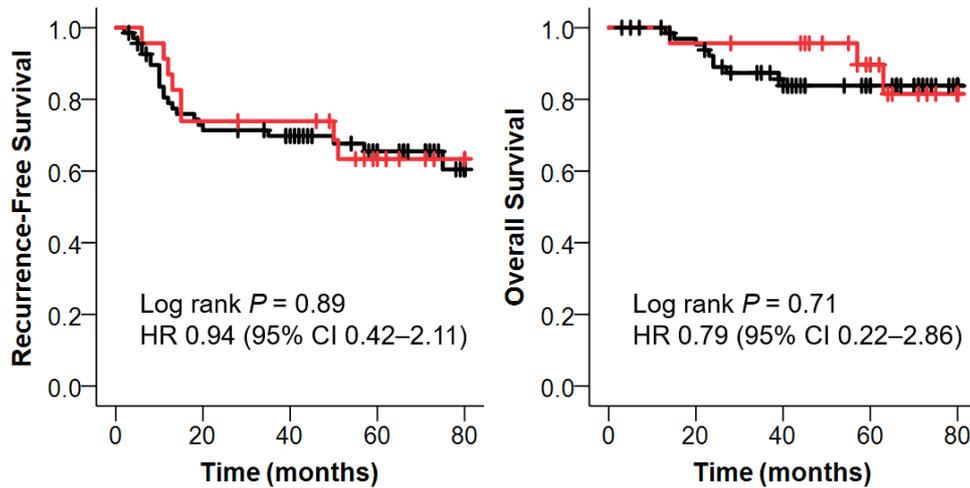


図 15. CD44v8-10 の mRNA 発現量と予後
左 : RFS、右 : OS、赤線 : 高発現群 (23 例)、黒線 : 低発現群 (69 例)

1-6. xCT

表 16 に xCT の mRNA 発現量上位 25% の高発現群と下位 75% の低発現群それぞれの臨床病理学的特徴を示す。いずれの項目にも有意差を認めなかった。

表 16-1. xCT の mRNA 発現量による臨床病理学的特徴の比較

		高発現群		低発現群		P value
		n	(%)	n	(%)	
年齢	>65 歳	15	(65.2)	47	(68.1)	0.80
性別	男性	12	(52.2)	42	(60.9)	0.46
喫煙歴	あり	12	(52.2)	44	(63.8)	0.32
pT	1	2	(8.7)	6	(8.7)	0.41
	2	15	(65.2)	56	(81.2)	
	3	6	(26.1)	6	(8.7)	
	4	0	(0.0)	1	(1.4)	
平均腫瘍径 (mm) ± SD		39.1±24.9		36.8±13.3		0.69
pN	0	15	(65.2)	49	(71.0)	0.14
	1	1	(4.3)	10	(14.5)	
	2	7	(30.4)	10	(14.5)	
病理病期	IB	11	(47.8)	40	(58.0)	0.50
	II	5	(21.7)	16	(23.2)	
	III	7	(30.4)	13	(18.8)	
静脈侵襲	あり	14	(60.9)	39	(56.5)	0.72
リンパ管侵襲	あり	6	(26.1)	26	(37.7)	0.31
EGFR 遺伝子変異あり		3	(13.0)	11	(15.9)	0.74
再発		7	(30.4)	24	(34.8)	0.70
再発形式	局所再発	4	(17.4)	19	(27.5)	0.33
	遠隔転移	4	(17.4)	10	(14.5)	0.74
肺癌による死亡		3	(13.0)	10	(14.5)	0.86

また、再発後の治療内容についても有意差を認めなかった。

表 16-2. 再発した 31 症例の治療内容の比較

	高発現群		低発現群		P value
	N=7		N=24		
	n	(%)	n	(%)	
緩和治療のみ*	2	(28.6)	7	(29.2)	0.98
抗腫瘍療法あり**					
化学療法 従来法	5	(71.4)	11	(45.8)	0.23
分子標的治療	3	(42.9)	10	(41.7)	0.96
放射線療法	3	(42.9)	12	(50.0)	0.74

*: 再発後の観察期間が短く治療の有無が確認できなかった症例を含む。**: 2 次治療以降で使用した症例も含む。従来法は、シスプラチン、カルボプラチン、ペメトレキセド、ドセタキセル、パクリタキセル、S-1 を使用した症例。分子標的治療は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブを使用した症例が含まれる。放射線治療には全脳照射、縦隔照射、局所定位放射線療法、 γ -knife、骨転移疼痛緩和目的の照射を行った症例が含まれる。

図 16 に予後を比較したグラフを示す。2 群の生存曲線は RFS, OS とともにほぼ重なり、有意差はなかった。低発現群を下位 25%としても同様の結果であった (RFS: $P = 0.92$, OS: $P = 0.99$)。

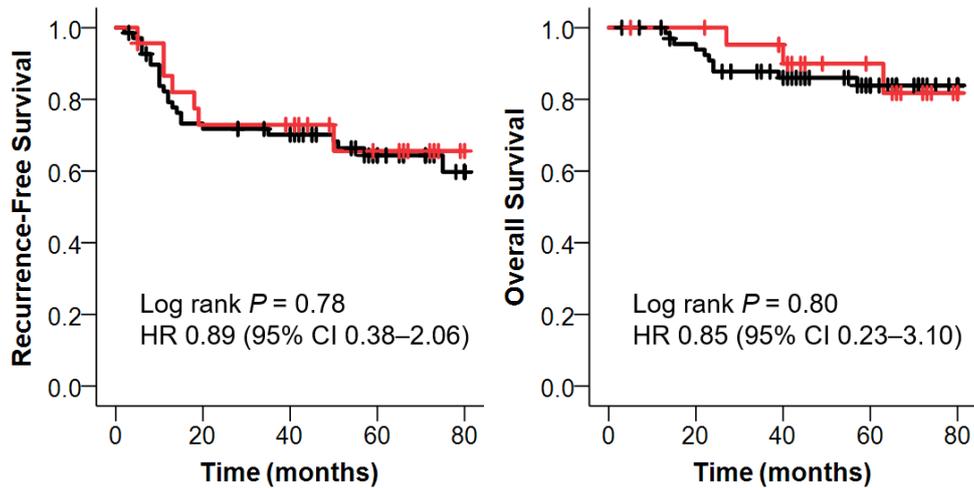


図 16. xCT の mRNA 発現量と予後

左 : RFS、右 : OS、赤線 : 高発現群 (23 例)、黒線 : 低発現群 (69 例)

1-7. GCLC

表 17 に GCLC の mRNA 発現量上位 25% の高発現群と下位 75% の低発現群それぞれの臨床病理学的特徴を示す。高発現群では男性、IB 期が多く、リンパ管侵襲、III 期は少なかった。また、高発現群に EGFR 遺伝子変異症例はいなかった。

表 17-1. GCLC の mRNA 発現量による臨床病理学的特徴の比較

		高発現群		低発現群		P value
		n	(%)	n	(%)	
年齢	>65 歳	18	(78.3)	44	(63.8)	0.20
性別	男性	19	(82.6)	35	(50.7)	0.007
喫煙歴	あり	16	(69.6)	40	(58.0)	0.32
pT	1	1	(4.3)	7	(10.1)	0.54
	2	21	(91.3)	50	(72.5)	
	3	1	(4.3)	11	(15.9)	
	4	0	(0.0)	1	(1.4)	
平均腫瘍径 (mm) ± SD		36.3±13.9		37.7±17.8		0.98
pN	0	20	(87.0)	44	(63.8)	0.085
	1	2	(8.7)	9	(13.0)	
	2	1	(4.3)	16	(23.2)	
病理病期	IB	17	(73.9)	34	(49.3)	0.046
	II	5	(21.7)	16	(23.2)	
	III	1	(4.3)	19	(27.5)	
静脈侵襲	あり	10	(43.5)	43	(62.3)	0.11
リンパ管侵襲	あり	3	(13.0)	29	(42.0)	0.011
EGFR 遺伝子変異	あり	0	(0.0)	14	(20.3)	0.019
再発		4	(17.4)	27	(39.1)	0.056
再発形式	局所再発	3	(13.0)	20	(29.0)	0.13
	遠隔転移	3	(13.0)	11	(15.9)	0.74
肺癌による死亡		4	(17.4)	9	(13.0)	0.60

再発した症例について、再発後の治療内容に有意な差はなかったが、高発現群には EGFR 遺伝子変異症例がいなかったため分子標的治療薬は使用されなかった。

表 17-2. 再発した 31 症例の治療内容の比較

	高発現群		低発現群		P value
	N=4		N=27		
	n	(%)	n	(%)	
緩和治療のみ*	1	(25.0)	8	(29.6)	0.85
抗腫瘍療法あり**					
化学療法 従来法	2	(50.0)	14	(51.9)	0.95
分子標的治療	0	(0.0)	13	(48.1)	0.069
放射線療法	2	(50.0)	13	(48.1)	0.95

*: 再発後の観察期間が短く治療の有無が確認できなかった症例を含む。**: 2 次治療以降で使用した症例も含む。従来法は、シスプラチン、カルボプラチン、ペメトレキセド、ドセタキセル、パクリタキセル、S-1 を使用した症例。分子標的治療は、ゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブを使用した症例が含まれる。放射線治療には全脳照射、縦隔照射、局所定位放射線療法、 γ -knife、骨転移疼痛緩和目的の照射を行った症例が含まれる。

図 17 に予後を比較したグラフを示す。RFS, OS とともに有意差はなかった。しかし RFS では高発現群の予後が良好な傾向があるにも関わらず OS では逆転し予後不良な傾向があった。RFS、OS に関しては低発現群を発現量下位 25%としても有意差を認めなかった (RFS: $P = 0.060$, OS: $P = 0.73$)。図 15C に術後再発を来した後に根治を目指した抗腫瘍療法が行われた 22 例の PRS を示す。高発現群の予後は不良であった (Log rank $P = 0.006$, ハザード比 6.26, 95%信頼区間 1.37-28.7)。

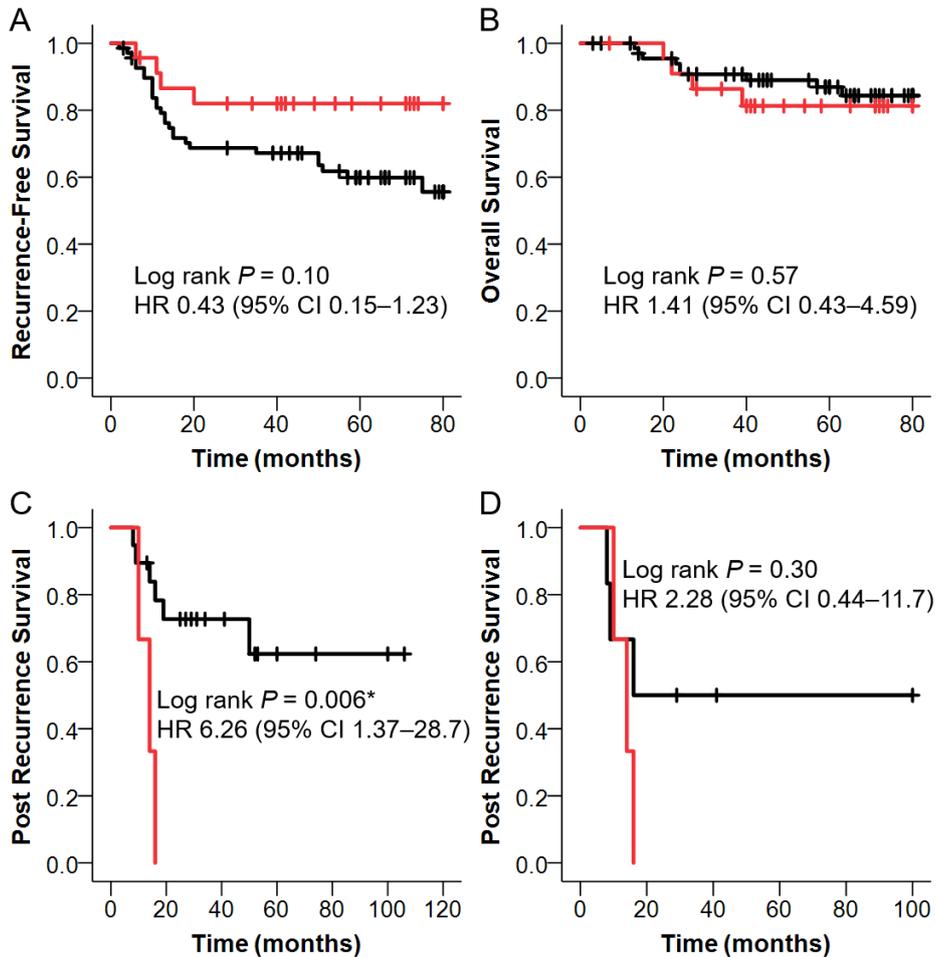


図 17. GCLC の mRNA 発現量と予後

A : RFS、B : OS、赤線 : 高発現群 (23 例)、黒線 : 低発現群 (69 例)。C: 再発後に根治的な治療を行った 22 症例の PRS。赤線 : 高発現群 (3 例)、黒線 : 低発現群 (19 例)。D: EGFR 遺伝子変異なしで再発後に根治的な治療を行った 9 例の PRS。赤線 : 高発現群 (3 例)、黒線 : 低発現群 (6 例)。

EGFR 遺伝子変異のある症例を除くと、有意差はなくなった (図 17D)。

1-8. グルタチオン合成関連遺伝子群

グルタチオン合成に関連する遺伝子群として CD44v8-10, xCT, GCLC の 3 遺伝子すべての発現量が非癌病変 3 症例の背景肺の平均値より高い群と、すべて低い群とで予後を比較すると、RFS、OS とともに有意差はないが予後良好な傾向がみられた。

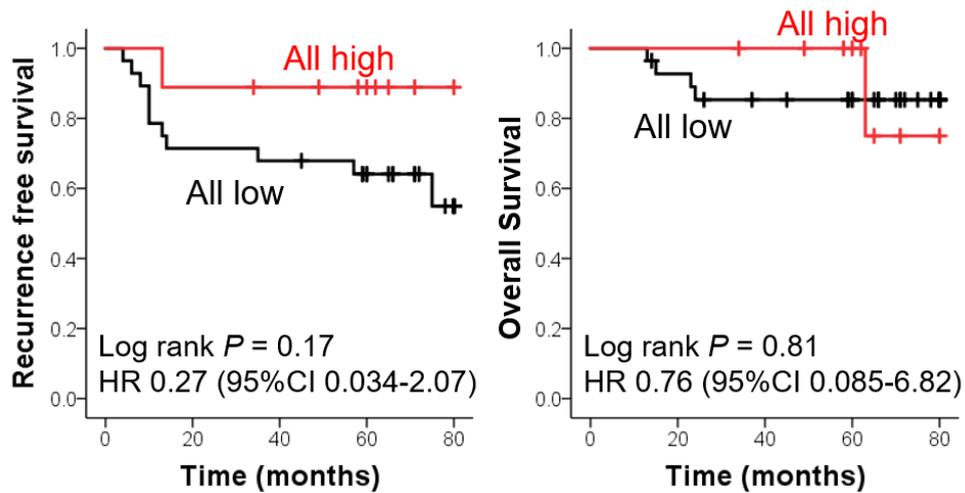


図 18. グルタチオン合成関連遺伝子群の発現と予後

A : RFS、B : OS、赤線 : すべてが高発現な群 (9 例)、黒線 : すべてが低発現な群 (28 例)。

2. 公開データベースでの予後解析

KM plotter を用い、CD133、ALDH1A1、CD44、xCT、GCLC の発現量による肺腺癌の予後を比較した (図 19)。CD44 は根治切除例 (204 例) における高発現群の予後が OS、RFS ともに良好であったが (それぞれ $P=0.015, 0.04$) (G、H)、化学療法施行例 (36 例) については予後不良であった ($P < 0.001$) (I)。その他の遺伝子についてはいずれも有意差を認めなかった。

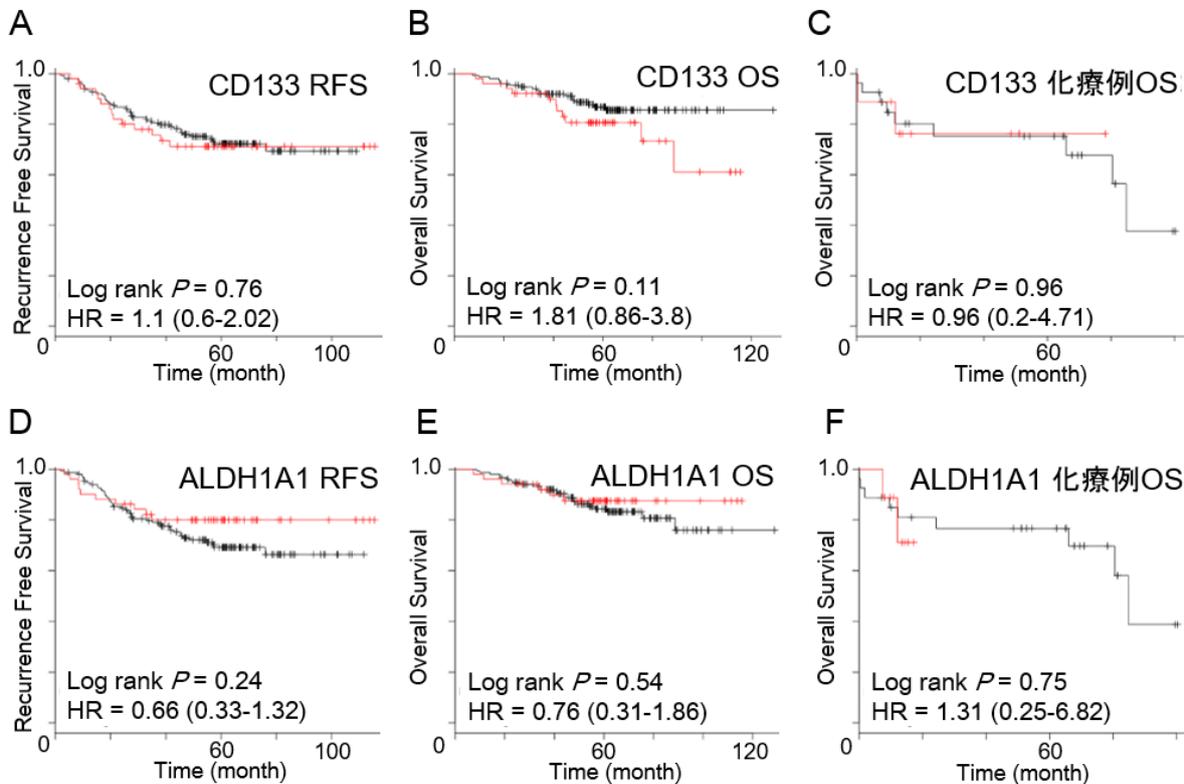
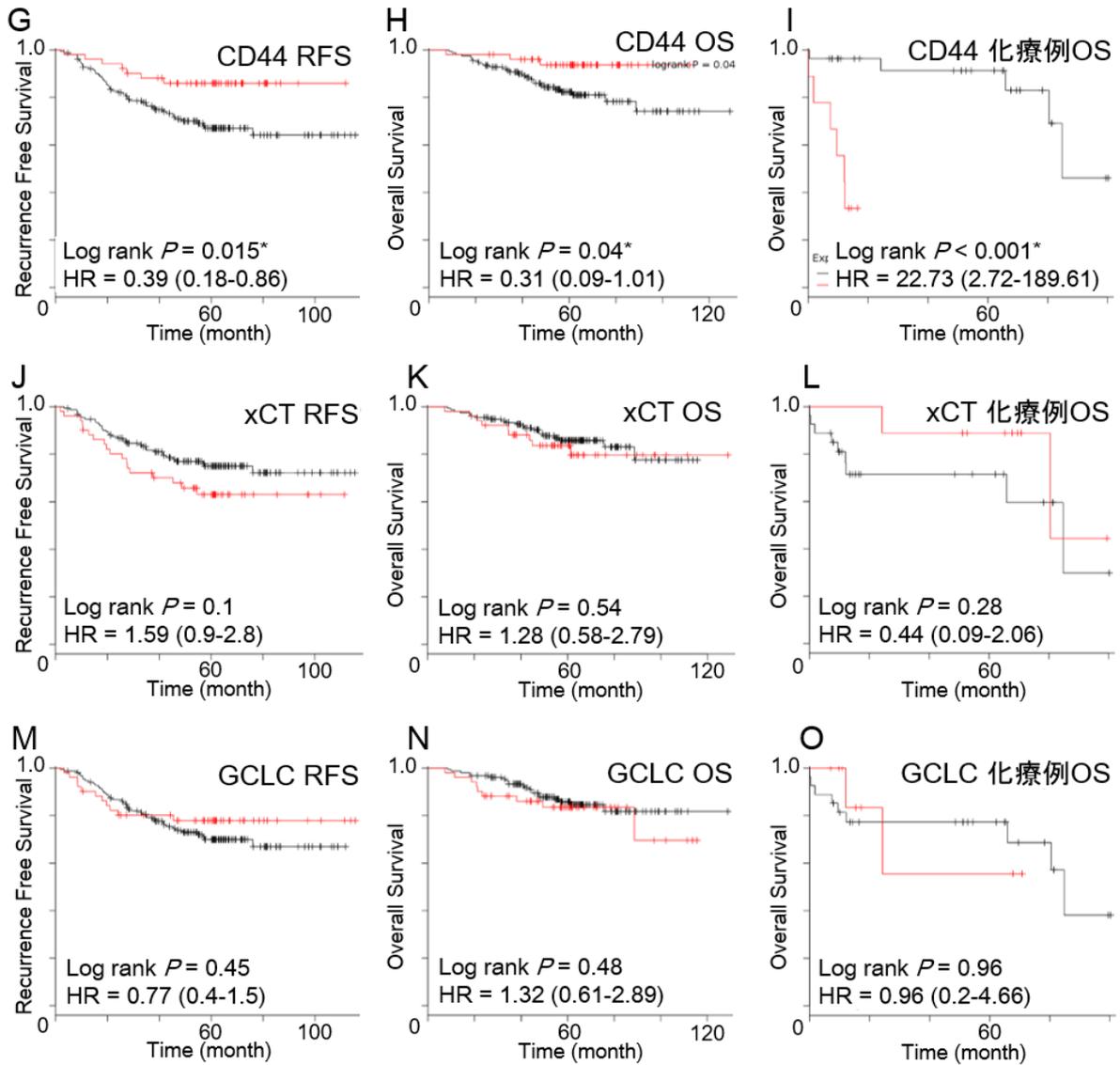


図 19. KM plotter による予後解析

A-C: CD133、D-F: ALDH1A1、G-I: CD44、J-L: xCT、M-O: GCLC。

A, D, G, J, M: 根治切除症例の RFS (高発現 51 例、低発現 153 例)、B, E, H, K, N: 根治切除症例の OS (高発現 51 例、低発現 153 例)、C, F, I, L, O: 化学療法施行例の OS (高発現 9 例、低発現 27 例)。赤線: 高発現群、黒線: 低発現群。



GCLC 高発現は RFS (ハザード比 0.77) と OS (ハザード比 1.32) で逆転する傾向があった (M、N) が、化学療法施行例においては有意な結果ではなかった (O)。

3. 酸化ストレス関連遺伝子の強制発現株におけるシスプラチン耐性化

肺腺癌細胞株 H358 にレンチウイルスベクターを用いて GCLC、xCT、CD44v、CD44s を強制発現した細胞株 (H358-GCLC、H358-xCT、H358-CD44v、H358-CD44s) から total RNA を抽出し、cDNA を合成しリアルタイム PCR を行い、各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。結果を図 20 に示す。強制発現した遺伝子はコントロールの H358-GFP に比較して約 8~64 倍発現量が上昇していた。xCT は他の遺伝子を強制発現すると発現が若干減少する傾向にあった。

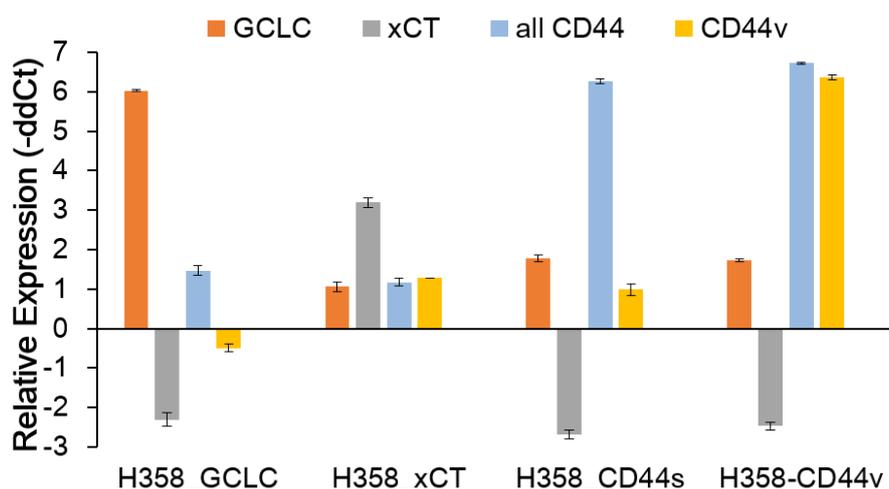


図 20. H358 強制発現系の mRNA 発現量

H358-GFP の Ct 値を基準とし、内在性コントロールには GAPDH を使用した。値は同時に行った 3 well の平均値、ウイスキーはそれらの標準誤差を示す。CD44 の検出には全ての isoform に共通な all CD44 の primer set と、CD44v8-10 のみを増幅できる CD44v の primer set を使用した。

これらの細胞株を、さまざまな濃度のシスプラチンに 48 時間曝露した後の生存率を図 21 に示す。

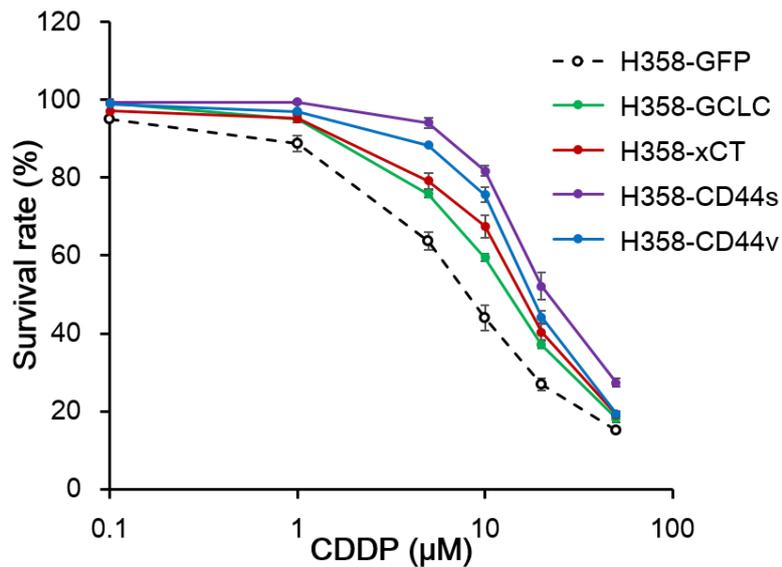


図 21. 強制発現細胞株におけるシスプラチン曝露後の生存率
各マーカーは独立した 3~5 回の実験の平均値を示し、ウィスカーは標準誤差を示す。

生存曲線はコントロールの GFP 発現株に比べいずれの細胞株においても右側へ移

動し、50%阻害濃度にも有意な上昇を認めた (表 18)。

表 18. 各細胞株におけるシスプラチンの 50%阻害濃度

	IC ₅₀ ± 標準誤差(μM)	P value (vs H358-GFP)
H358-GFP	6.9 ± 0.7	
H358-GCLC	12.9 ± 1.6	0.026
H358-xCT	13.9 ± 1.1	0.025
H358-CD44s	26.7 ± 0.7	< 0.001
H358-CD44v	17.7 ± 0.4	0.001

IC₅₀: 50%阻害濃度

考察

1. 肺腺癌手術検体での発現状況に関して

本研究で解析した 92 例は、喫煙歴のある高齢男性が多いという一般的な肺癌患者にみられる特徴と大きく外れるところはなかった。しかし、根治切除症例を対象としているため、IB 期が半数以上を占め、再発は約 3 分の 1、死亡は 14.1%と少なく予後のよい集団であり、特に OS に関しては差がつきにくいことが考えられた。

CD133, CD44 all isoform と ALDH1A1 は相関があり、CD133 と CD44 all isoform は弱い相関があったことから、肺腺癌においてもこれらの CSC マーカーが同一の性質、つまり CSC の特性を持つ細胞で発現しているという可能性はある。もちろんその証明には Shh や Notch などの幹細胞で発現する遺伝子群が同時に発現しているかどうかで確認する必要がある。また、xCT は CD44v8-10, GCLC と弱い相関があり、これらのグルタチオン合成を促進する遺伝子群はある程度は関連して発現していることがわかった。しかしヒートマップ化してみるとモザイクパターンとなり各遺伝子間の関連はそれほど強くなかった。

各遺伝子の高発現群と低発現群を分けるカットオフ値の妥当性に関しては議論の余地があると思われる。本研究では上位 25%と下位 75%との比較としたが、上位 25%と下位 25%を比較する方法、中央値で分ける方法、正常肺での発現量を基準にする方法なども考えられる。それぞれの遺伝子について ROC 曲線を描きカットオフ値を決める方法は、症例数が 92 例しかなく検証に値するテストセットを準備することがで

きないので現実的ではなかった。また、どのカットオフ値による解析でもほぼ同様な結果であった。唯一 all CD44 の RFS においては、上位 25%と下位 25%を比較する方法で高発現群の予後が有意に良好となっていた。これらの中では正常肺を基準にする方法が最も根拠があると考えられるが、図 9 に示したような分布であったため ALDH1A1 のように症例数の偏りが大きくなりすぎるものがあり、便宜上 25%で区切ることにした。他に、症例毎の背景組織での発現量との比較で分類するのはよく行われる方法であるが、肺癌が発生する背景肺には喫煙や大気汚染などの修飾が加わっていること、また背景肺では肺胞上皮細胞、気管支上皮細胞、血球・血管系の細胞の占める割合が多いのに対して、腫瘍組織内に含まれる非癌細胞は、炎症細胞や血管内皮細胞、線維芽細胞などが多く、純粋な背景として引き算することに意味があるのか不明であることから、本研究では実施しなかった。

2. CSC マーカーの mRNA 発現と肺腺癌の予後

CD133 高発現は結腸直腸癌(34)や膵臓癌(35)、神経膠腫(36)で予後不良因子となることが報告されているが、非小細胞肺癌での役割についてははっきりとした結論が出ていない(37, 38, 40, 42, 43)。Salnikov ら(37)の報告では、非小細胞肺癌臨床検体の免疫組織化学的染色で CD133 の発現の有無により非小細胞肺癌の予後に有意差はつかなかったが、グルタチオン S 変換酵素、チミジル酸合成酵素、O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase、MDR-1、Lung resistance protein といった化学療法抵抗性に関連する

タンパクの発現は多くなっている、治療耐性の原因となるとしている。本研究でも臨床検体の mRNA 発現解析で CD133 高発現は統計学的な有意差はないものの RFS（良好）と OS（不良）で異なる傾向を示し PRS では有意に予後不良で、再発後の治療に負の影響を与えている可能性があった。しかし KM plotter による、オンライン上に公開されているマイクロアレイによる mRNA 発現データを用いた解析では RFS、OS ともに 2 群の生存曲線は同様にハザード比が 1 以上で重なっており、化学療法施行例に限っても有意差がなかった。リアルタイム PCR による定量とマイクロアレイ発現解析による定量という手法の違いも影響している可能性がある。

同じく CSC マーカーとされる ALDH1A1 や all CD44 は有意ではないものの高発現群のほうが RFS、OS ともに予後良好の傾向があった。また、高発現で静脈侵襲が少ないなど予後良好因子とも関連があり、CD44 に関しては KM plotter での結果も予後良好であった。ALDH1 高発現は乳癌では予後不良だが(18)、卵巣癌では予後良好(57)、非小細胞肺癌でも予後良好との報告も多い(41, 45)。本研究において、ALDH1A1 と CD44 はコントロールとして用いた非癌病変の背景肺での発現量を上回る症例が少なかった。文献的にも ALDH1 や CD44 は気管支上皮細胞や気管支腺細胞、肺胞上皮細胞など正常組織にも発現がみられることが知られており(45)、肉眼的に腫瘍部と判断した組織片を用いた今回の手法では、正常細胞が混入している影響を否定できない。また、腺癌組織においても病理学的悪性度の低い lepidic dominant subtype や病理病期 I 期により多く発現していると報告されており(45)、良好な予後と関連している可能

性がある。CD44 は EGFR の活性化により発現が増加するとの報告があり(58, 59)、EGFR 活性型の遺伝子変異が多くみられる肺腺癌では EGFR 遺伝子変異の有無と CD44 の発現が関連している可能性がある。本研究では非再発症例に検査を行っていない症例が多いため CD44 高発現と EGFR 遺伝子変異の有無について有意差はつかなかった。高発現群のうち再発した 5 例はすべて EGFR 遺伝子変異陽性例であり、これらに EGFR-TKI が使用されたことは良好な予後に関連している可能性がある。KM plotter による解析では、CD44 高発現が根治切除症例においては予後良好にもかかわらず化学療法施行例では予後不良であり、矛盾した結果となっていた。根治切除症例 204 例と化学療法施行例 36 例でそれぞれの上位 25%を高発現群と定義しているため、カットオフ値が異なることも影響しているかもしれない。さらに使用方法には解析対象が 200 例以下の場合には preliminary analysis、50 例以下の場合には exploratory analysis と記載されていて、特に 36 例しかない化学療法施行例のデータの信頼性に関しては疑問が残る。

肺腺癌の CSC の存在については議論が分かれるところであるが、真の CSC が存在したとしてもその定義上、腫瘍組織内で占める割合は少ないと考えられる。さらに、肉眼的に切り出された腫瘍組織片は純粋な肺腺癌細胞の集合体ではなく、血球成分や血管内皮細胞、線維芽細胞などの正常細胞も含まれる heterogeneous な細胞集団である。したがって、腫瘍組織片から RNA を抽出し定量する我々の方法では、組織全体での平均の発現量を比較しているに過ぎず、腫瘍細胞集団における真の CSC の割合

を比較できていない可能性が高い。いずれにしても本研究では、これらの CSC マーカーの高発現と肺腺癌患者の予後や治療耐性との関連を明らかにすることはできず、これらの遺伝子の発現にバイオマーカーとしての意義があることは示せなかった。

3. グルタチオン合成を促進する遺伝子群と肺癌の予後

CD44v8-10、xCT、GCLC といったグルタチオン合成に関わる遺伝子群の腫瘍内での mRNA 発現量も、肺腺癌の予後に統計学的に有意な影響を与えていなかった。臨床検体の発現解析では GCLC 高発現は IB 期が多くリンパ管侵襲が少ないなど予後良好因子とも関連があり、RFS については良好な傾向があるにも関わらず OS では不良な傾向があって、再発後治療例の PRS は有意に予後不良であり、治療耐性と関連している可能性が示唆された。これについては KM plotter による解析でも同様に RFS と OS での逆転現象がみられたので、再現性はあると考えられる。臨床検体の発現解析で EGFR 遺伝子変異ありの症例を除いた PRS や、KM plotter での化学療法施行例のみの OS では、症例数が少なくなってしまう意味のある評価ができなかった。GCLC 高発現群に男性が多かったことは、女性に多い EGFR 遺伝子変異症例がいなかった理由である可能性がある。

xCT と CD44v8-10 はどちらも臨床検体での発現解析で予後に影響を与えていないようであった。GCLC を含めたこれらのグルタチオン合成に関連する 3 つの遺伝子の発現は互いに弱い相関しかなく、ヒートマップもモザイク状であった。正常肺での発

現量を基準に3つとも高発現/低発現と分けた場合も RFS、OS ともに有意差はなかった。この原因として、今回の mRNA レベルでの発現定量法の限界が関与しているかもしれない。xCT と CD44v8-10 は互いに結合することにより細胞膜上に安定化する(47)と言われているので、mRNA レベルでの発現が著明に亢進していなくても生理活性が高い状態になっている可能性もあり、よい抗体があれば免疫組織化学的染色による検討も有用と思われた。胃癌では、CD44v8-10 の同定を目的とした CD44v9 特異的抗体による免疫組織化学的染色で根治的に内視鏡的切除が行われた早期胃癌の検体の発現状況を調べると、発現している症例では再発率が高いという報告(60)がある一方で、手術検体の発現状況を調べると、I 期では発現している症例の予後が不良であったが、II 期以上では差がなかった(61)という報告もあり、この理由として癌の進行に伴い腫瘍内で CD44v9 を発現している CSC が占める割合は相対的に減っていき、他の予後不良因子による影響が大きくなっていくのではないかと考えられている。本研究では IB 期以上を対象としており、組織量の確保のため腫瘍径の小さい症例は除かれていることから、胃癌において早期と診断される症例と同等な症例は少なかったと考えられ、予後に有意差が出なかった可能性がある。

4. グルタチオン合成関連遺伝子がシスプラチン耐性に与える影響

強制発現を行った細胞株の実験では、GCLC だけでなく xCT、CD44v8-10、CD44s でもシスプラチン耐性が誘導されることがわかった。しかも CD44v8-10 よりも CD44s

のほうがより耐性化していることは、これまでに報告されている CD44v8-10 の機能 (47)から考えると矛盾しているようにも思われる。しかしもともとこれらの発現が比較的少ない細胞株を用いたこともあり、CD44s に関しては、CD44v-xC(-) 複合体によるグルタチオン産生の増加機序に依存しない、別の耐性機序が強く働いた可能性は否定できない。実際、化学療法剤耐性の機序はグルタチオン抱合による無毒化・排出促進以外にも知られており、特に CD44 に関連するところでは、卵巣癌と乳癌の細胞株において CD44 は MDR-1 を介した薬剤の細胞外流出を促進することにより化学療法耐性を獲得するということが報告されている(62, 63)。

50%阻害濃度の増加率は GCLC が最も小さく、このことは臨床検体での結果と乖離していた。本研究で検討したグルタチオン合成に関わる遺伝子群には転写制御因子は含まれていないので、理論的にそれぞれの発現量は mRNA レベルでは直接相互作用をしていないと考えられるが、それぞれの強制発現株は目的の遺伝子以外の発現はほとんど増加せず、xCT に至っては他の遺伝子の強制発現にともなって若干減少する傾向も見られた。酸化ストレスに反応して活性化する転写因子 Nrf2 は GCLC や xCT を始めとする酸化ストレス制御遺伝子群の転写を制御しており(64)、強制発現により細胞内の酸化ストレス環境が変化し、Nrf2 を介して他の遺伝子の発現量にも影響を与えた可能性がある。原料となるシスチンの供給を含むグルタチオン合成に関わる経路の中で、1つの要素の発現量を恣意的に増やしただけでは全体が効率的に活性化されるわけではないが、経路においてより上流の CD44v8-10 や xCT の発現のほうが、GCLC

よりも強く影響を与え、結果としてシスプラチンに対してより耐性となったという可能性が考えられる。

本研究では強制発現系のみを検討であったが、今後の展開としては siRNA などの手法を用いて抑制系を樹立し、シスプラチンの感受性が上昇するかどうかを確認することも必要と思われる。そのために CD44v8-10, xCT, GCLC の3つ全ての発現が比較的多い細胞株を選ぶ必要があり図5に示したような検討もしたが、肺癌細胞株では通常の培養条件下で3つとも強く発現しているものがなかった。

5. 本研究の臨床的意義

本研究では GCLC に関して肺腺癌の治療耐性との関連が示唆され、GCLC の発現量が治療効果予測のバイオマーカーとして有効である可能性を示した。現在 II 期以上の肺腺癌では根治切除後にシスプラチン+ビノレルビンによる術後補助化学療法を行うことが一般的であるが、切除検体で GCLC が低発現であればその予防効果が期待でき、高発現であれば補助化学療法の効果が期待できない（しかし、傾向としては再発しにくい）というように、不必要な治療が行われないようにする指標となるかもしれない。切除不能症例における生検検体は組織量が少なく、研究用に使えることはほとんどないため、本研究の解析対象は根治切除症例とせざるを得なかったが、III B 期以上の症例や術前治療を考慮する症例においての検証が行われればより有効なバイオマーカーとしての結果が出ることを期待される。

すでに肺腺癌においても CD44v8-10 陽性細胞を標的とした、標準治療にサラゾスルファピリジンによる xCT 阻害を組み合わせるといふ臨床応用が始まっているが(53)、本研究ではこれらの遺伝子の発現量が予後に影響を与えているという結果は得られなかった。しかしサラゾスルファピリジンが xCT の阻害によりグルタチオン合成を促進する経路を抑制すると考えれば、その下流にある GCLC の発現量が多い腫瘍にも抗腫瘍効果を発揮することができ、治療耐性克服への可能性を示したと言えるだろう。

結語

今回解析した CSC マーカーとグルタチオン合成に関わる遺伝子群の腫瘍内での mRNA 発現量は、肺腺癌の予後に統計学的に有意な影響を与えていなかったが、CD133 と GCLC の mRNA 高発現は再発後治療例の予後不良と関連していた。また、肺腺癌細胞株において GCLC を含むグルタチオン合成関連の遺伝子を強制発現するとシスプラチン耐性が誘導されたことから、GCLC は治療耐性に関わる因子であることが示唆された。

謝辞

本研究にあたり、多大なるご高配とご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科呼吸器外科学中島淳教授に心より感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、終始直接のご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学医学部附属病院検査部高井大哉講師に深く感謝いたします。

本研究の統計学的解析に関して、ご助言を賜りました、東京大学医学部附属病院臨床研究支援センター上村夕香理助教に深く感謝いたします。

終わりに臨み、本研究に数々のご助言、ご協力を賜りました東京大学医学部附属病院呼吸器内科 305 研の諸氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 65(2):87-108, 2015
2. Sawabata N. Prognosis of lung cancer patients in Japan according to data from the Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. *Respir Investig*. 52(6):317-321, 2014
3. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine*. 350(21):2129-2139, 2004
4. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 304(5676):1497-1500, 2004
5. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara SI, 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(7153):561-U563, 2007
6. Bergethon K, Shaw AT, Ou SHI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP,

- Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen HQ, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji HB, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. ROS1 Rearrangements Define a Unique Molecular Class of Lung Cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 30(8):863-870, 2012
7. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Research*. 62(23):6997-7000, 2002
8. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han BH, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang HY, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*. 361(10):947-957, 2009
9. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res*. 64(24):8919-8923, 2004
10. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song YC, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao XJ, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Janne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*. 316(5827):1039-1043, 2007

11. 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 Medicine*. 2(3):225-235, 2005
12. Wang SH, Cang SD, Liu DL. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 9:7, 2016
13. Ohe Y, Ohashi Y, Kubota K, Tamura T, Nakagawa K, Negoro S, Nishiwaki Y, Saijo N, Ariyoshi Y, Fukuoka M. Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan. *Annals of Oncology*. 18(2):317-323, 2007
14. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 3(7):730-737, 1997
15. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 66(19):9339-9344, 2006
16. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(7):3983-3988, 2003

17. 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(7123):111-115, 2007
18. 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(5):555-567, 2007
19. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 445(7123):106-110, 2007
20. 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(24):10158-10163, 2007
21. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res*. 69(8):3382-3389, 2009
22. 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(3):1030-1037, 2007

23. 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(3):313-323, 2007
24. Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res*. 67(10):4827-4833, 2007
25. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pillozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 15(3):504-514, 2008
26. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, Katz RL. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 7(3):330-338, 2009
27. Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, Tin VP, Cheng LC, Sihoe AD, Fink LM, Ma Y, Wong MP. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One*. 5(11):e14062, 2010
28. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(3):973-978, 2007
29. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB.

Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*. 63(18):5821-5828, 2003

30. 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(7015):396-401, 2004

31. Leon G, MacDonagh L, Finn SP, Cuffe S, Barr MP. Cancer stem cells in drug resistant lung cancer: Targeting cell surface markers and signaling pathways. *Pharmacol Ther*. 158:71-90, 2016

32. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*. 5(4):275-284, 2005

33. Li XX, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang XM, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 100(9):672-679, 2008

34. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 99(8):1285-1289, 2008

35. Maeda S, Shinchu H, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Sato M, Natsugoe S, Aikou T, Takao S. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 98(8):1389-1397,

2008

36. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, Lichter P, Unterberg A, Radlwimmer B, Herold-Mende CC. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res.* 14(1):123-129, 2008
37. Salnikov AV, Gladkich J, Moldenhauer G, Volm M, Mattern J, Herr I. CD133 is indicative for a resistance phenotype but does not represent a prognostic marker for survival of non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer.* 126(4):950-958, 2010
38. Woo T, Okudela K, Mitsui H, Yazawa T, Ogawa N, Tajiri M, Yamamoto T, Rino Y, Kitamura H, Masuda M. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Int J Clin Exp Pathol.* 4(1):32-42, 2010
39. Herpel E, Jensen K, Muley T, Warth A, Schnabel PA, Meister M, Herth FJ, Dienemann H, Thomas M, Gottschling S. The cancer stem cell antigens CD133, BCRP1/ABCG2 and CD117/c-KIT are not associated with prognosis in resected early-stage non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 31(12):4491-4500, 2011
40. Ko YH, Won HS, Jeon EK, Hong SH, Roh SY, Hong YS, Byun JH, Jung CK, Kang JH. Prognostic significance of CD44s expression in resected non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 11:340, 2011
41. Dimou A, Neumeister V, Agarwal S, Anagnostou V, Syrigos K, Rimm DL. Measurement of aldehyde dehydrogenase 1 expression defines a group with better prognosis in

patients with non-small cell lung cancer. *Am J Pathol*. 181(4):1436-1442, 2012

42. Okudela K, Woo T, Mitsui H, Tajiri M, Masuda M, Ohashi K. Expression of the potential cancer stem cell markers, CD133, CD44, ALDH1, and β -catenin, in primary lung adenocarcinoma—their prognostic significance. *Pathology International*. 62(12):792-801, 2012

43. Sowa T, Menju T, Sonobe M, Nakanishi T, Shikuma K, Imamura N, Motoyama H, Hijiya K, Aoyama A, Chen F, Sato T, Kobayashi M, Yoshizawa A, Haga H, Sozu T, Date H. Association between epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness and their effect on the prognosis of lung adenocarcinoma. *Cancer Med*. 4(12):1853-1862, 2015

44. Shinohara S, Hanagiri T, Taira A, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, Uramoto H, So T, Yamada S, Tanaka F. Immunohistochemical Expression and Serum Levels of CD44 as Prognostic Indicators in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology*. 90(6):327-338, 2016

45. Park E, Park SY, Sun PL, Jin Y, Kim JE, Jheon S, Kim K, Lee CT, Kim H, Chung JH. Prognostic significance of stem cell-related marker expression and its correlation with histologic subtypes in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 7(27):42502-42512, 2016

46. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population

phenotype. *Nat Med.* 7(9):1028-1034, 2001

47. 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(3):387-400, 2011

48. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry.* 52(1):711-760, 1983

49. Okuno S, Sato H, Kuriyama-Matsumura K, Tamba M, Wang H, Sohda S, Hamada H, Yoshikawa H, Kondo T, Bannai S. Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. *Br J Cancer.* 88(6):951-956, 2003

50. Gout PW, Buckley AR, Simms CR, Bruchoovsky N. Sulfasalazine, a potent suppressor of lymphoma growth by inhibition of the x(c)- cystine transporter: a new action for an old drug. *Leukemia.* 15(10):1633-1640, 2001

51. Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H, Nagano O. xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 73(6):1855-1866, 2013

52. Shitara K, Doi T, Nagano O, Imamura CK, Ozeki T, Ishii Y, Tsuchihashi K, Takahashi S, Nakajima TE, Hironaka S, Fukutani M, Hasegawa H, Nomura S, Sato A, Einaga Y, Kuwata T, Saya H, Ohtsu A. Dose-escalation study for the targeting of CD44v+ cancer stem cells by sulfasalazine in patients with advanced gastric cancer (EPOC1205). *Gastric Cancer*. 20(2):341-349, 2017
53. Otsubo K, Nosaki K, Imamura CK, Ogata H, Fujita A, Sakata S, Hirai F, Toyokawa G, Iwama E, Harada T, Seto T, Takenoyama M, Ozeki T, Mushiroda T, Inada M, Kishimoto J, Tsuchihashi K, Suina K, Nagano O, Saya H, Nakanishi Y, Okamoto I. Phase I study of salazosulfapyridine in combination with cisplatin and pemetrexed for advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*. 108(9):1843-1849, 2017
54. Szasz AM, Lanczky A, Nagy A, Forster S, Hark K, Green JE, Boussioutas A, Busuttil R, Szabo A, Gyorffy B. Cross-validation of survival associated biomarkers in gastric cancer using transcriptomic data of 1,065 patients. *Oncotarget*. 7(31):49322-49333, 2016
55. Nelson MD, Fitch DH. Overlap extension PCR: an efficient method for transgene construction. *Methods Mol Biol*. 772:459-470, 2011
56. Miyoshi H. Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Methods Mol Biol*. 246:429-438, 2004
57. Chang B, Liu G, Xue F, Rosen DG, Xiao L, Wang X, Liu J. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Modern Pathology*. 22(6):817-823, 2009

58. Zhang M, Wang MH, Singh RK, Wells A, Siegal GP. Epidermal growth factor induces CD44 gene expression through a novel regulatory element in mouse fibroblasts. *J Biol Chem.* 272(22):14139-46, 1997
59. Abhold EL, Kiang A, Rahimy E, Kuo SZ, Wang-Rodriguez J, Lopez JP, Blair KJ, Yu MA, Haas M, Brumund KT, Altuna X, Patel A, Weisman RA, Ongkeko WM. EGFR kinase promotes acquisition of stem cell-like properties: a potential therapeutic target in head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *PLoS One.* 7(2):e32459, 2012
60. Hirata K, Suzuki H, Imaeda H, Matsuzaki J, Tsugawa H, Nagano O, Asakura K, Saya H, Hibi T. CD44 variant 9 expression in primary early gastric cancer as a predictive marker for recurrence. *Br J Cancer.* 109(2):379-386, 2013
61. Go SI, Ko GH, Lee WS, Kim RB, Lee JH, Jeong SH, Lee YJ, Hong SC, Ha WS. CD44 Variant 9 Serves as a Poor Prognostic Marker in Early Gastric Cancer, But Not in Advanced Gastric Cancer. *Cancer Res Treat.* 48(1):142-152, 2016
62. Bourguignon LY, Peyrollier K, Xia W, Gilad E. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells. *J Biol Chem.* 283(25):17635-17651, 2008
63. Ravindranath AK, Kaur S, Wernyj RP, Kumaran MN, Milette-Gonzalez KE, Chan R, Lim E, Madura K, Rodriguez-Rodriguez L. CD44 promotes multi-drug resistance by protecting P-glycoprotein from FBXO21-mediated ubiquitination. *Oncotarget.* 6(28):26308-26321, 2015

64. Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer. *Trends Biochem Sci.* 34(4):176-188, 2009