

## 骨髄由来間葉系幹細胞によるがん幹細胞性再獲得機構

## Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Provide an Advantageous Tumor Microenvironment for the Restoration of Gastric Cancer Stem Cells

仙波秀峰

Shuho Semba

神戸大学大学院医学研究科病理学講座病理学分野

**要旨** 近年、がん微小環境を構成する液性因子や各種細胞の中でも、骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell [BM-MSC]) が関心を集めている。胃癌細胞株 MKN-7 とヒト BM-MSC を *in vitro* で共培養させることにより、両者の直接的接触はがん幹細胞マーカー CD133 陽性 MKN-7 細胞の割合を増加させたが、これは MKN-7 細胞が WNT5A 及び TGF- $\beta$  の刺激の影響を受けたことによる。事実、ヒトスキルス型胃癌組織には、BM-MSC マーカー CD271 陽性を示す間質細胞が観察され、胃癌細胞は高い WNT5A 発現と TGF- $\beta$  受容体発現を伴っていた。以上より、BM-MSC はがん幹細胞性再獲得に有利な微小環境を提供している可能性が考えられた。がん幹細胞性維持機構の解明には、がん微小環境構成因子である BM-MSC の機能を理解することが不可欠である。

キーワード：骨髄由来間葉系幹細胞、がん幹細胞、cancer-associated fibroblast (CAF)、WNT5A、TGF- $\beta$

## 1. はじめに

近年、がん研究の分野ではがんを理解するための新たな仮説『がん幹細胞 (cancer stem cell)』が注目を集めている。これは、がん細胞の増殖・分化の過程においても組織幹細胞 (tissue stem cell) と同様、自己複製能 (self-renewal) に基づく細胞の階層構造 (hierarchy) が存在するという概念で、がん細胞の多様性 (heterogeneity) や治療抵抗性、局所再発、引いては遠隔転移の誘因となると考えられている<sup>1)</sup>。造腫瘍能 (tumorigenicity) と多分化能 (multipotency) に代表されるがん幹細胞の性質 (=がん幹細胞性) 維持のため、様々な分子レベルのメカニズムによるがん幹細胞自身の制御が必要であることが明らかとなっているが、これらは 1) がん幹細胞内部のシグナル伝達経路の影響 (intrinsic signal), 2) がん細胞を取り巻く微小環境による影響 (extrinsic signal), の 2 つに大別することが出来る<sup>2)</sup>。前者は、がん幹細胞内でのがん幹細胞性を維持するために不可欠なシグナル伝達経路であり、これまでの研究から WNT・Notch・Hedgehog シグナルに代表される胚性幹細胞 (embryonic stem cell) や組織幹細胞等に共通する細胞内シグナルがいくつか同定されている。一方、後者のがん微小環境の重要性については未だ不明な点が多い。しかし、*in vitro* でのがん幹細胞の長期培養実験や 3 次元での tumor sphere 形成実験には特殊な培養液が

必要であることは、がん幹細胞性維持にはがん微小環境を模倣する液性因子や細胞増殖のための足場の必要性が想定される<sup>3)</sup>。がん幹細胞仮説を否定する実験結果として、マウス皮下に移植された 1 個の非がん幹細胞メラノーマ細胞も腫瘍形成能を示すという事実が報告されたが<sup>4)</sup>、がん幹細胞の存在を否定するというよりもむしろ、がん細胞自身が存在する微小環境の影響を受けて分化した非がん幹細胞からがん幹細胞へと転換する能力 (interconvertibility) が存在する可能性を示唆するとも捉えられる。この様に、がん微小環境の理解はがん幹細胞の性質を理解するために不可欠であり、がん幹細胞を標的としたがん治療開発のためにも、分子レベルでの解明が急務である。

## 2. cancer-associated fibroblast としての骨髄由来間葉系幹細胞の役割

正常細胞から発生したがん細胞は常に環境ストレスに晒されており、炎症細胞による生体の防御反応 (がん免疫)、血管から供給される酸素や栄養状態は、がん細胞が分裂・増殖を行う間刻一刻と変化している。様々な細胞から成るがん微小環境構成因子の中、活性化された線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast [CAF]) が注目されており、がん細胞の運動能や間質マトリックスの分解をはじめとする悪性度を増加させる作用や腫瘍内部の血管新生の誘因となる事実も実験レベルで証明されている<sup>5)</sup>。CAF の起源となる細胞としては未だ議論の余地が残されているが、1) がん原発部に存在する線維芽細胞や間葉系幹細胞、2) がん細胞自身の上皮-間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition [EMT]), 3) 循環

〒650-0017 神戸市中央区楠町7丁目5-1  
TEL: 078-382-5461; FAX: 078-382-5479  
E-mail: semba@med.kobe-u.ac.jp  
2011年2月17日受付

血液を介し動員された骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cell [BM-MSC]), が想定されており, 実験レベルではいずれの説もその可能性が証明されている. 特に近年, BM-MSC の CAF としての役割がにわかには研究者たちの議論の中心になっている. 本来, 骨や軟骨, 筋肉, 脂肪, 神経といった多種多様な間葉系細胞へ分化する能力を潜在的に有している BM-MSC であるが, 組織修復の際にも上皮細胞の再生や血管新生に関与しており, 腫瘍内部でどの様ながん微小環境を構成するのか, その生物学的意義は非常に興味深い.

組織幹細胞の中, 間葉系幹細胞は骨や軟骨, 筋肉, 脂肪, 神経等の各種間葉系細胞へ分化を示すものと考えられているが, 間葉系幹細胞はそもそも骨髄に存在し, 様々な間葉系組織を構成可能な細胞として単離されたものである<sup>6)</sup>. 即ち, 細胞の有する「能力」から定義された細胞であるが故, その形態学的特徴や細胞表面マーカーから定義されたものではない. このことが, BM-MSC が体内にどの様に分布し, CAF としてどの様な作用を有しているのか解析することを困難にしている. 現在までに用いられている BM-MSC の特徴としては, 細胞表面マーカー CD105/CD73/CD90 陽性・CD45/CD34/CD14/CD11b/CD79/CD19 陰性の細胞群で, プラスチックディッシュに付着し, *in vitro* での骨, 軟骨, 脂肪に分化可能な細胞とされている. 最近では, CD106/CD146 に加え, CD271 (低親和性 NGF 受容体) も BM-MSC を同定する細胞表面マーカーとして有用ではないかと考えられている.

このような BM-MSC マーカーの同定と共に, がん微小環境を形作る CAF としての BM-MSC の機能に関するデータが蓄積されてきている. 末梢循環を巡る組織幹細胞として損傷部位の組織修復・再生への関与が当初想定されてきたが, BM-MSC は B リンパ球由来の腫瘍の増殖を *in vitro*・*in vivo* で促進するのみならず, 乳癌組織中に BM-MSC が検出されたという報告もあり<sup>7)</sup>, 腫瘍内でサイトカインやインターロイキン分泌を介し, がん細胞の浸潤・転移に関与することが明らかとなってきた. 興味深いことに, 乳癌細胞と BM-MSC の共培養は, がん細胞からの IL-6 の分泌は IL-6 の受容体 (IL-6 receptor, gp130) 発現レベルの高い BM-MSC に作用し, BM-MSC からの CXCL7 発現を亢進させる<sup>2)</sup>. これにより乳癌細胞の運動能亢進に至るのであるが, 同時に BM-MSC が CAF として作用することにより, 共培養した乳癌細胞中の aldehyde dehydrogenase (ALDH) 陽性細胞が増加, 即ち BM-MSC により乳癌細胞のがん幹細胞性が回復する結果が得られている<sup>2)</sup>. この様なサイトカインネットワークによる BM-MSC ががん幹細胞性回復の他, TRAIL を介したグリオーマのがん幹細胞性再獲得機構も実験モデルでも証明されている<sup>8)</sup>. この様に, BM-MSC はがん細胞の悪性を助長させる CAF としての作用のみならず, がん幹細胞性を再獲得させる影響があるという面でもその生物学的意義が注目されている.

### 3. 骨髄由来間葉系幹細胞が胃癌がん幹細胞に及ぼす影響

これまで胃癌細胞の増殖・浸潤過程における間質線維芽細胞の CAF としての役割について検討してきた経緯より, BM-MSC との共培養による胃癌細胞の性質の変化について検討を試みた. 高分化型胃癌より樹立されたヒト胃癌細胞株 MKN-7 とヒト由来 BM-MSC である UE6E7T-12 細胞を 1:1 の割合で単純に混合・共培養行くと, MKN-7 細胞は UE6E7T-12 細胞と高頻度に接触し, それを足場とした増殖を示した (図 1A). この UE6E7T-12 細胞 (original) と MKN-7 細胞との接着は, 長期継代培養により分化を促した UE6E7T-12 細胞 (differentiated) や胃壁より樹立された線維芽細胞 NF-23 と比べても顕著であり, BM-MSC は胃癌細胞の増殖のために有利な足場を提供する可能性が考えられた. 興味深いことに, UE6E7T-12 細胞を GFP でラベルすると, MKN-7 細胞との接触が UE6E7T-12 細胞に形態的变化を誘導し, 線維芽細胞様の紡錘形細胞突起を延長させるようになり (図 1B), CAF への分化・成熟を示唆する  $\alpha$ -smooth muscle actin 発現も誘導されていた. 軟寒天培地で MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞を混合した際には, MKN-7 細胞の凝集を亢進させる結果が得られた (図 1C). 本来 MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞は元来細胞集塊形成能が殆ど認められないにも関わらず, MKN-7 細胞集塊の中心に UE6E7T-12 細胞が位置することによって, 胃癌細胞の凝集を亢進させる結果となった. MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞の混合共培養後, 両者を上皮マーカー EpCAM を用いて細胞分離後細胞数を計測すると, UE6E7T-12 細胞との共培養により MKN-7 細胞の増殖促進効果が確認されたが, これは UE6E7T-12 細胞のコンディショニングメディウムでは見られなかったことから, MKN-7 細胞の増殖亢進は液性因子を介してではなく BM-MSC との直接的接触が引き金となったと考えられた. 尚, この時 UE6E7T-12 細胞の増殖は見られない. 以上より, BM-MSC は胃癌細胞の増殖にとって有利な足場を提供し, 細胞凝集と増殖を促進する作用があると考えられた (図 1D).

この際, BM-MSC との共培養・直接的な接触により MKN-7 細胞はどの様な性質の変化が見られるであろうか. RT-PCR による MKN-7 細胞の遺伝子発現解析を行ったところ, 上皮系マーカー E-cadherin には大きな発現の変化は認められなかったが, 間葉系マーカー vimentin と EMT を司る転写因子 Snail の発現上昇が見られ, 同時にがん幹細胞性マーカー CD133 発現レベルの増加が観察された (図 2A). また, これも UE6E7T-12 細胞のコンディショニングメディウムでは誘導されず, BM-MSC との直接的コンタクトが刺激となったと考えられた. CD133 はグリオーマや乳癌, 大腸癌をはじめ様々なヒト悪性腫瘍でがん幹細胞を識別するためのマーカーとして有用であることが報告されているが<sup>9)</sup>, 造腫瘍能と多分化能の点から, CD133 は MKN-7 でもがん幹細胞性マーカーとして利用するデータが得られている. このことから, BM-MSC は胃癌細胞に EMT とがん幹細胞性回復に作用する

可能性が示唆された。この事実を踏まえ、UE6E7T-12 細胞との共培養が CD133 陰性 MKN-7 細胞のがん幹細胞性を回復・維持に有利に作用しているかについて検討した。マグネティックビーズと抗 CD133 抗体を用い CD133 陰性 MKN-7 細胞を分離し、UE6E7T-12 細胞と 48 時間培養を行うと、CD133 陽性 MKN-7 細胞の割合が 4.9% に回復したが、これは UE6E7T-12 細胞非存在下での結果 (0.9%) と比べ、有意に高い結果が得られた。尚、両者の混合共培養下では、UE6E7T-12 細胞の周囲に CD133 陽性 MKN-7 細胞の存在が確認された (図 2B)。電子顕微鏡での CD133 陽性 MKN-7 細胞、CD133 陰性 MKN-7 細胞の観察を行うと、CD133 陽性細胞では細胞表面に特徴的な微絨毛構造が観察されたが、CD133 陰性細胞には見られなかったことから、がん幹細胞に特徴的な細胞表面の構造と考えられた。また、分離前の MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞の共培養を行った際、UE6E7T-12 細胞との直接的接触を示す MKN-7 細胞にもこの

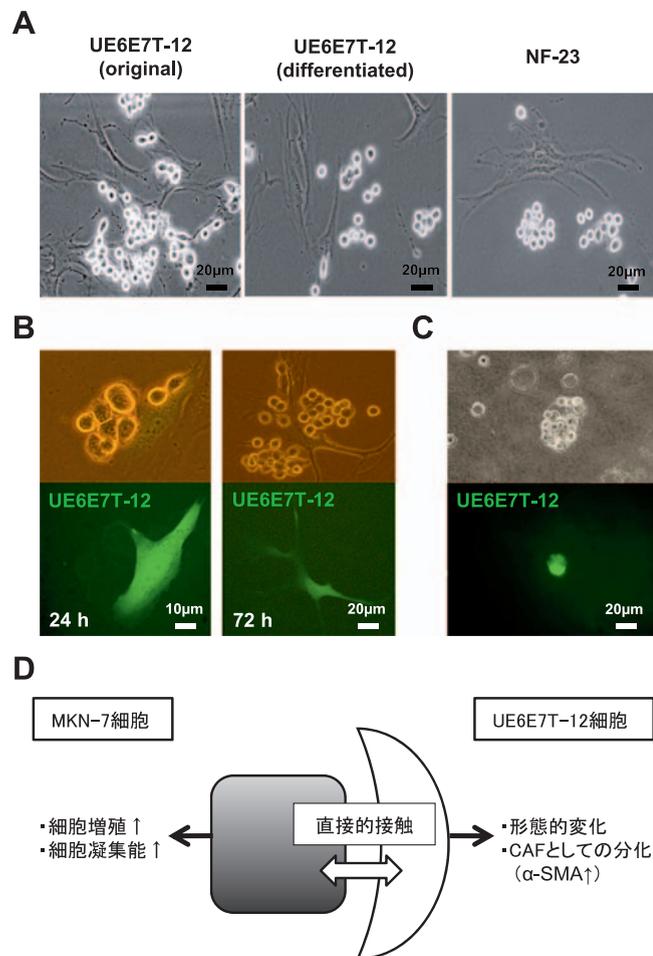


図 1 A. MKN-7 細胞を間質細胞と共培養した際、MKN-7 細胞は UE6E7T-12 細胞 (original) を足場とした増殖を示し、UE6E7T-12 細胞 (differentiated) や NF-23 細胞との違いが顕著。B. UE6E7T-12 細胞を GFP でラベル。UE6E7T-12 細胞は MKN-7 細胞との共培養で細胞突起を延長。C. 軟寒天培地での細胞凝集実験。D. MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞の共培養による相互作用。

微絨毛構造が見られ、この細胞は CD133 陽性 MKN-7 細胞であり、BM-MSC との直接的接触ががん幹細胞性を回復させたというひとつの傍証となった (図 2C)。

UE6E7T-12 細胞との接触により増加する CD133 陽性 MKN-7 細胞、これががん幹細胞としての性質を本当に有しているのだろうか。マウス皮下への接種実験では、UE6E7T-12 細胞単独ではマウス皮下に腫瘍を形成することはないが、MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞の混合した群では高い造腫瘍能が見られ、腫瘍の大きさは MKN-7 細胞のみを接種した群と比べても顕著であった。MKN-7 細胞と

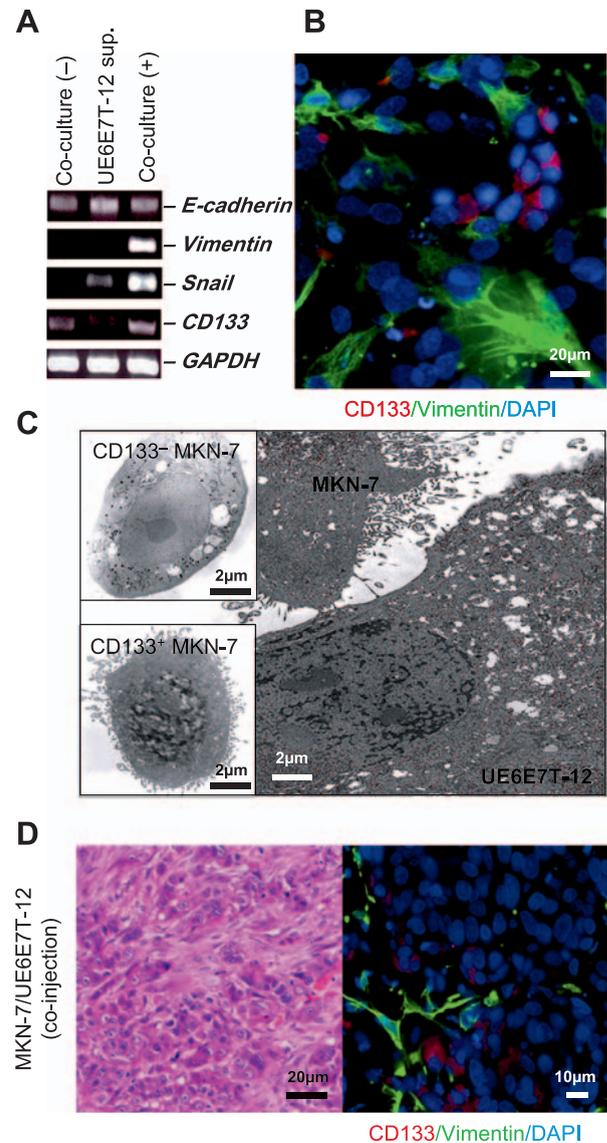


図 2 A. RT-PCR による発現遺伝子の変化は、EMT とがん幹細胞性回復を示唆した。B. UE6E7T-12 細胞近傍に存在する MKN-7 細胞はがん幹細胞性が回復。C. CD133 陰性 MKN-7 細胞、CD133 陽性 MKN-7 細胞、MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞の混合培養の電子顕微鏡像。D. マウス皮下に MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞の混合したものを接種した腫瘍では、BM-MSC の増殖が確認され (左)、間質細胞近傍に CD133 陽性 MKN-7 細胞が認められた。

UE6E7T-12 細胞の混合したものを接種した群では腫瘍内部に UE6E7T-12 細胞由来の線維成分の増生を伴っており、高い造腫瘍性は BM-MSC が CAF として作用している可能性を示唆するものであった (図 2D)。この時にも、BM-MSC 近傍に CD133 陽性 MKN-7 細胞が局在しており、両者が直接的に接触する状況がマウス皮下腫瘍の形成に一役買ったものと考えられた。更に、MKN-7 細胞が CD10 や MUC2 (大腸上皮マーカー) や villin (小腸上皮マーカー)、chromogranin A (神経内分泌マーカー) の発現を示し、BM-MSC が多分化能回復の面でもがん幹細胞性を亢進させたものと推測された。

#### 4. 骨髄由来間葉系幹細胞による胃癌細胞のがん幹細胞性再獲得機構

UE6E7T-12 細胞との接触は MKN-7 細胞の内部にどのような細胞内シグナル伝達経路が活性化されたのか検討するため、cDNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を試みた。MKN-7 細胞 (original) に加え、CD133 抗体を用いて分離した CD133 陽性 MKN-7 細胞、CD133 陰性 MKN-7 細胞を用い、UE6E7T-12 細胞との共培養時に共通して発現誘導される遺伝子を解析した結果、細胞同士の接触により特異的に発現誘導される 65 個の共通遺伝子を同定し、その中より wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A) 遺伝子、及び transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )-induced (TGFBI) 遺伝子に着目した。WNT シグナルは生物の発生段階で活性化される重要な細胞内シグナル経路でありながら、がん細胞の自己複製能をはじめとするがん幹細胞性や上皮-間葉移行に関与すると考えられており、事実強制的に WNT5A 遺伝子をがん細胞に発現させることによって、胃癌転移巣形成が亢進すると報告されている<sup>10)</sup>。また、TGFBI 遺伝子が MKN-7 細胞に発現誘導されることはこの細胞が細胞外の TGF- $\beta$  刺激を受けていることに他ならない。これまでも TGF- $\beta$  刺激がグリオーマ前駆細胞を増加させることも報告されており、がん幹細胞性に及ぼす影響を有するものとして知られている<sup>11)</sup>。そこで、MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞、両者の共培養条件下での WNT5A、TGF- $\beta$ 1 発現を免疫組織化学的に検討したところ、WNT5A は BM-MSC との接触が引き金となり MKN-7 細胞発現が誘導され、同時に TGF- $\beta$ 1 は BM-MSC に特異的にのみ発現誘導され (図 3A)、培養上清中の TGF- $\beta$ 1 濃度も共培養により上昇した。

それでは、本当に WNT シグナルと TGF- $\beta$  シグナルが MKN-7 細胞のがん幹細胞性回復に有効に作用するのであろうか。そこで、CD133 陰性 MKN-7 細胞をリコンビナント WNT5A (500 ng/ml) で 48 時間処理すると CD133 mRNA レベルは 26 倍にも発現増加すると同時に、CD133 陽性 MKN-7 細胞割合は 4.8% に増加した (コントロール: 0.9%)。同様に TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) も CD133 mRNA レベルを 51 倍に上昇させ、CD133 陽性 MKN-7 細胞割合は 3.2% へと増加させた。BM-MSC との共培養は WNT5A と TGF- $\beta$ 1 発現を増加させるのみならず、これらの下流で作用する  $\beta$ -catenin、Smad4 発

現亢進を引き起こしたが、WNT5A 阻害剤 XAV939、TGF- $\beta$  阻害剤 SB431542 はこれら分子の核内移行を妨害し、CD133 陽性 MKN-7 細胞回復を抑制した。以上より、BM-MSC が提供するがん微小環境は直接的な接触するがん細胞自身の WNT5A 発現を亢進させ、また一方 BM-MSC からの TGF- $\beta$ 1 分泌も促進される。これら WNT5A のオートクライン作用、TGF- $\beta$ 1 のパラクライン作用がそれぞれがん幹細胞性再獲得を生じていることが明らかとなった。

WNT シグナルと TGF- $\beta$  シグナルの活性化は特に胃癌の悪性度、特にスキルス型胃癌との関連が示唆されている。WNT5A 高発現する胃癌はとりわけスキルス型胃癌に多く見られ<sup>10)</sup>、TGF- $\beta$  シグナルは間質の線維成分増加に必要であるのみならず、がん細胞に作用することによりがん細胞に EMT を引き起こすことが明らかとなっている<sup>11)</sup>。今回、我々の解析では、BM-MSC マーカー CD271 陽性 BM-MSC はスキルス型胃癌間質に高頻度に検出されたが、高分化型管状腺癌症例には CD271 陽性 BM-MSC は認められなかった (図 3B)。特に、スキルス型胃癌症例は高い WNT5A 発現、I 型 TGF- $\beta$  レセプター (TGFBRI) 発現を示し、がん細胞は

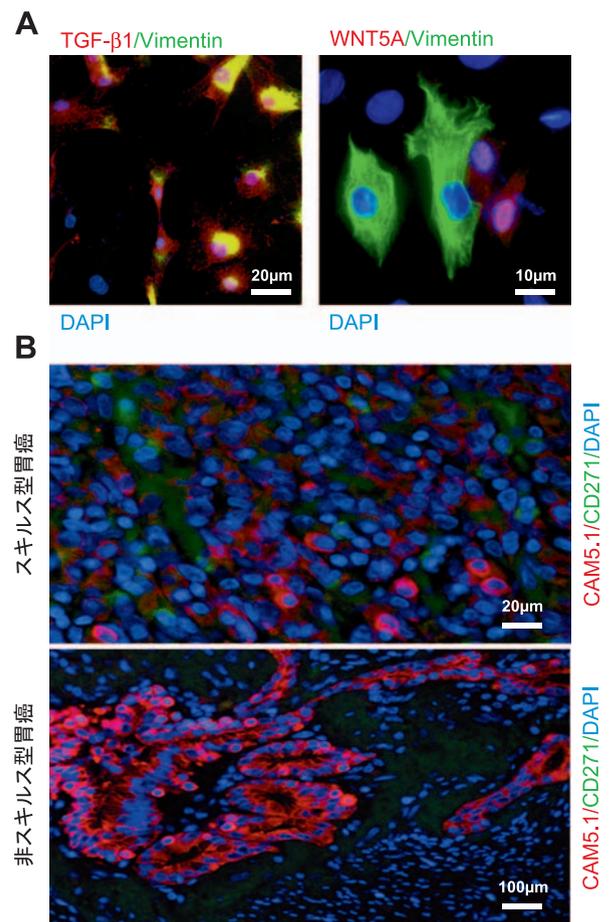


図 3 A. MKN-7 細胞と UE6E7T-12 細胞を混合した際、MKN-7 細胞には WNT5A 発現、UE6E7T-12 細胞には TGF- $\beta$ 1 発現亢進が確認された。B. ヒト胃癌組織での CD271 陽性間質細胞はスキルス型胃癌症例にのみ認められた。

高い WNT5A 発現と共に、高い TGF- $\beta$  に対する感受性を有するものと推測された。更に、CD133 陽性がん細胞はスキルス型胃癌内に多く認められたことより、BM-MSc は胃癌細胞のがん幹細胞性再獲得のために有利ながん微小環境を提供し、胃癌細胞の浸潤能や転移能に代表される悪性度、特にスキルス型胃癌への転換を促進させている可能性がある。この様に、胃癌の増殖・進展過程において BM-MSc との接触が胃癌細胞に EMT やがん幹細胞性回復させ、これは WNT・TGF- $\beta$  シグナルの活性化によるものであることが明らかとなった (図 4)。スキルス型胃癌で特に BM-MSc がその悪性度を増している可能性も考えられたことより、将来 WNT5A や TGF- $\beta$  を標的とした胃癌治療の開発が望まれる。

### 5. 骨髄由来間葉系幹細胞の形成するがん微小環境の生物学的意義

がん細胞が原発巣から離れ脈管内に侵入した後、体内循環により全身を巡って骨髄ニッチを利用し静止期に入り、抗がん剤に対する不応性を発揮、時期をずらしての再発・転移を引き起こすのではないかと信じられてきた。この cancer dormancy の概念からがん細胞にとって骨髄は非常に“住み心地の良い”環境であり、骨髄ニッチががん細胞にどのような変化をもたらすのか研究が行われてきた。上述の我々の研究成果は、この骨髄ニッチに類似したがん微小環境が胃癌、特にスキルス型胃癌の原発部位において BM-MSc により模倣される可能性を支持するものとなった。同時に、BM-MSc が存在する体循環においても、がん細胞は抗がん剤の影響や炎症反応、血流や血管による物理的影響も受ける可能性があり、この様な場においてもがん細胞と BM-MSc との凝集やがん幹細胞性回復に作用するのではないかと推測される。がん細胞が他臓器に転移を形成する際にも、脈管中で BM-MSc と共存することによりがん幹細胞性を維持することが

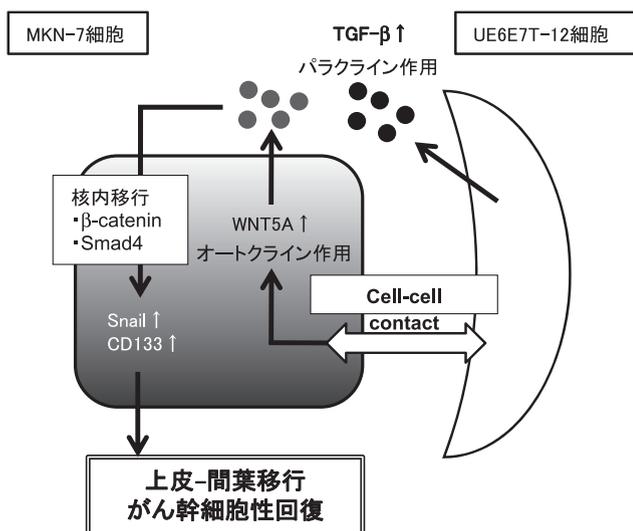


図 4 BM-MSc のがん細胞に対する影響。両者の直接的接触ががん細胞の EMT とがん幹細胞性回復を促進させるが、WNT シグナルと TGF- $\beta$  シグナルの活性化が必要である。

可能になるのではないかと想像も膨らむ。

また、以前の我々のスキルス型胃癌細胞 HSC-39 と胃壁由来の線維芽細胞との直接的接触の生物学的意義についての研究では、1) スキルス型胃癌細胞との vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) と integrin  $\alpha 4$  を介したコンタクトが線維芽細胞の増殖を促し、スキルス型胃癌の豊富な間質増生と密接に関連すること、2) 胃壁由来の線維芽細胞とのコンタクトが胃癌細胞に Snail 発現と間質マトリックス分解酵素群の発現を誘導することを報告した<sup>13)</sup>。上述の結果と WNT シグナル、TGF- $\beta$  シグナルのいずれも EMT を誘引する中心的な役割を担うことを鑑みると、これらにより回復するがん幹細胞性は EMT と密接に関連するのではないかと考えている。『Snail により生じる EMTこそが分化したがん細胞のがん幹細胞性再獲得の本質である』と断定するために更なるデータを蓄積し、Snail により発現回復する新規がん幹細胞マーカーを同定すべく現在研究を遂行している段階である。

### 6. おわりに

BM-MSc が実際のヒト悪性腫瘍の発生のみならず、進展・転移に「がん幹細胞性再獲得」という側面を持つのであれば、これを標的とした治療法を開発し、既存のがん治療と併せた相乗効果も見込まれる。治療抵抗性の悪性腫瘍に対しては、がん幹細胞性を維持しにくい環境を人為的に作り上げることにより、薬剤や放射線に対する感受性が増加する可能性もある。CAF のマーカーを抗原提示能を有する樹状細胞に導入し CAF に対する免疫応答を誘導させたり、腫瘍内部に取り込まれる BM-MSc に抗がん作用のあるインターフェロンを発現させる試みも報告されている。BM-MSc は腫瘍に取り込まれ血管新生に関与することを利用するならば、反対に血管新生を妨害するためにも用いることが出来るかもしれない。未来のがんの制圧のためにも今後更なるデータの集積が望まれる。

### 謝 辞

本研究における cDNA マイクロアレイ発現遺伝子解析は、国立がんセンター研究所佐々木博己先生、青柳一彦先生の協力により行われたものである。横崎宏教授(神戸大学)には、本研究の実施過程において多くの有益な助言を頂いた。また、本研究は日本学術振興会科学研究補助金基盤研究(C)として実施されたものである。この場を借りて、関係各位に謝意を表す。

### 文 献

- 1) Campbell, L.L. and Polyak, K.: *Cell Cycle*, 6, 2332-2338 (2007)
- 2) Liu, S., Ginestier, C., Ou, S.J., Clouthier, S.G., Patel, S.H., Monville, E., Korkaya, H., Heath, A., Dutcher, J., Kleer, C.G., Jung, Y., Dontu, G., Taichman, R. and Wicha M.S.: *Cancer Res.*, 71, 614-624 (2010)
- 3) Sato, T., Vries, R.G., Snippet, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J. and Clevers, H.: *Nature*, 459, 262-265 (2009)

- 4) Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M. and Morrison, S.J.: *Nature*, **456**, 593–598 (2008)
- 5) De Wever, O. and Mareel, M.: *J. Pathol.*, **200**, 429–447 (2003)
- 6) Caplan, A.I.: *Tiss. Eng.*, **11**, 1198–1211 (2005)
- 7) Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R. and Weinberg, R.A.: *Nature*, **449**, 557–563 (2007)
- 8) Sasportas, L.S., Kasmieh, R., Wakimoto, H., Hingtgen, S., van de Water, J.A., Mohapatra, G., Figueiredo, J.L., Martuza, R.L., Weissleder, R. and Shah, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **106**, 4822–4827 (2009)
- 9) Bidlingmaier, S., Zhu, X. and Liu, B.: *J. Mol. Med.*, **86**, 1025–1032 (2008)
- 10) Kurayoshi, M., Oue, N., Yamamoto, H., Kishida, M., Inoue, A., Asahara, T., Yasui, W. and Kikuchi, A.: *Cancer Res.*, **66**, 10439–10448 (2006)
- 11) Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, M. and Miyazono, K.: *Cell Stem Cell*, **5**, 504–514 (2009)
- 12) Komuro, A., Yashiro, M., Iwata, C., Morishita, Y., Johansson, E., Matsumoto, Y., Watanabe, A., Aburatani, H., Miyoshi, H., Kiyono, K., Shirai, Y., Suzuki, H.I., Hirakawa, K., Kano, M.R. and Miyazono, K.: *J. Natl. Cancer Inst.*, **101**, 592–604 (2009)
- 13) Semba, S., Kodama, Y., Ohnuma, K., Mizuuchi, E., Masuda, R., Yashiro, M., Hirakawa, K. and Yokozaki, H.: *Br. J. Cancer*, **101**, 1365–1373 (2009)