

別添1

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

癌幹細胞を標的とする人工ウイルスを用いた癌幹細胞特異的  
Drug delivery activation system(DDAS)の確立  
(H20-ナノ-若手-009)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大内田 研宙

平成23 (2011) 年 5月

別添2

目 次

I. 総括研究報告 癌幹細胞を標的とする人工ウイルスを用いた癌幹細胞 特異的Drug delivery activation system(DDAS)の確立 大内田 研宙	-----	1
II. 分担研究報告 刺激応答型DDSナノカプセルに関する研究 村田 正治	-----	5
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	12

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
総括研究報告書

癌幹細胞を標的とする人工ウイルスを用いた癌幹細胞特異的新規

Drug delivery activation system(DDAS)の確立

研究代表者 大内田 研宙

(九州大学大学院医学研究院・先端医療医学講座 特任助教)

研究要旨

現在、癌治療における主たる課題は治療抵抗性と転移浸潤であるが、これまでの本研究中で、腺癌を用いて、治療抵抗性の根幹となっている癌幹細胞と転移浸潤に関わる細胞集団における特異的な分子の機能解析を行い有望な標的分子を複数同定した。これらに加え、癌の悪性度に深く関わる癌間質細胞の標的分子を同様にして同定した。それらの分子を標的にした新規分子治療薬を内包した人工ウイルスを作成し、癌幹細胞及び癌間質細胞特異的新規 DDAS を構築した。

分担研究者

村田 正治

(九州大学大学院医学研究院 災害・救急医学分野・特任准教授)

している間質細胞にも癌の悪性度に深く関わる集団がある。本研究では、異なる蛋白を認識する人工ウイルスを用いて、癌幹細胞に薬剤や分子標的薬を輸送する。癌組織や血液中において標的細胞を的確に認識し、細胞内特異的な薬剤濃度上昇や治療薬の活性化/効果増強を実現し、重篤な副作用を抑える。これにより、治療抵抗性が高く再発、転移の原因となる標的細胞を制御する新規 Drug delivery activation system(DDAS)を開発する。

**A. 研究目的**

固形癌の多くは、依然として根治切除ができなければその後の再発再燃の制御が困難で、その治療法の開発は、社会的要請度が高い。最近、癌組織中の特定の微量細胞集団だけが腫瘍形成能を持つとする癌幹細胞の概念が注目されている。この癌幹細胞は薬剤耐性を有し、再発に関与する。また、微小環境を形成

**B. 研究方法**

本研究は、以下の研究課題を分担して行

う計画となっており、平成 22 年度において、以下の 1)、2) の課題に対する研究を行った。

1) 癌の悪性度に深く関わる癌間質細胞の標的分子の機能解析 (大内田担当)

昨年度までの本研究により、癌幹細胞や治療抵抗性株における標的分子として同定された CXCR4、c-Met に加え、癌間質相互作用に着目し、大腸癌及び膵癌の手術切除サンプルより作成した fibroblast に対しセルソーターを用いて prospective isolation を行い、in vitro、in vivo において機能解析を行った。

2) 抗癌剤含有幹細胞特異的認識人工ウイルスの作成 (村田担当)

我々が独自に開発した人工ウイルスを癌細胞及び癌幹細胞膜表面上に特異的に発現する標的マーカーを認識・結合し、標的細胞に特異的に集積するように改変した。さらに標的細胞内で刺激応答的に崩壊するように機能化した。

3) 癌細胞及び癌幹細胞を標的とする新規人工ウイルスの細胞選択性及び治療効果の検証 (大内田担当)

In vitro にて腫瘍モデルを作成し、2) で作製した新規人工ウイルスの細胞特異的な治療効果を検証した。また、MRI を用いて、in vivo における人工ウイルスの細胞選択性を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、癌に含まれ後天的に出現する特定の細胞集団を対象としており、マイクロアレイや RT-PCR を用いた発現解析も同様に後天的な特定の分子の

発現異常を解析するものであり、ゲノム解析は行わず、平成 13 年の三省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象になる研究ではない。しかし、臨床検体を使用した解析を含む研究であるので、平成 15 年 7 月の厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に従い、九州大学倫理委員会で承認済みである。本研究でのマウスの飼育・管理・実験は、動物愛護、生命倫理の観点に十分に配慮し、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」および九州大学の学内規定に基づいて適切に行う。

実験用各種ウイルス・plasmid の取扱いは、九州大学の学内規定に基づき厳正に行う。すでに P2 レベルの動物実験施設、培養実験施設を専用に確保しており、承認された計画調書に従い、安全性の確保に最大限の注意を払って研究を遂行する。

## C. 研究結果

1) 癌間質細胞特異的分子の機能解析

大内田らは、昨年までに、癌幹細胞や治療抵抗性株における標的分子として CXCR4、c-Met を同定した。さらなる治療効果の効率化を目指して、本年度の研究においては、癌間質相互作用に着目し、大腸癌及び膵癌の手術切除サンプルより作成した fibroblast に対しセルソーターを用いて prospective isolation を行い、機能解析を行った。その結果、CD10 を発現している fibroblast が、特異的に膵癌細胞及び大腸癌細胞の浸潤能を亢進させることが明らかになった。

## 2) 抗癌剤含有癌細胞特異的認識人工ウイルスの作成

村田らは、昨年までの研究により、癌幹細胞に特異的に発現している c-Met に特異的に結合するペプチドをアンテナ分子として人工ウイルス Hsp16.5 に付加することに成功した。同手法を用いて、膵癌細胞特異的に高発現している MUC1 をターゲットとして、その IgG 抗体を人工ウイルスに付加することに成功した。さらに、*in vitro* における機能評価を行ったところ、MUC1 陽性細胞特異的に集積することが示された。

## 3) 癌細胞及び癌幹細胞を標的とする新規人工ウイルスの治療効果の検証 (大内田担当)

2) で作成した新規人工ウイルスに膵癌治療の第一選択薬である塩酸ゲムシタビン (GEM) を内包し、その治療効果を *in vitro* において検証した。その結果、新規人工ウイルスの癌細胞選択性は得られ、一定の治療効果を与えることができた。

## D. 考察

これまでの研究において、我々は癌幹細胞や治療抵抗性株に着目し、その標的分子として c-Met を同定した。本年度の研究においては、癌間質相互作用に着目し、大腸癌及び膵癌の手術切除サンプルより作成した fibroblast に対しセルソーターを用いて prospective isolation を行い、機能解析を行った。その結果、CD10 を発現している fibroblast が、特異的に

膵癌細胞及び大腸癌細胞の浸潤能を亢進させることが明らかになった。これまでの研究において、人工ウイルスに c-Met を特異的に認識するペプチドを付加することに成功したが、本年度の研究においては、MUC1 をターゲットとした IgG の付加に成功した。これにより、様々な IgG 抗体の付加が可能となったため、今後は癌幹細胞の根幹となる腫瘍形成性に関わる細胞集団だけでなく悪性度に関わる癌細胞あるいは周囲の間質細胞を表面マーカーにより絞り込んでいき、同時に、今までの成果をふまえて、総合的にあるいは個別に人工ウイルスに付加することで多機能化人工ウイルスを作成し、さらに治療薬放出システムを強化し、患者予後と直結する転移、浸潤、治療抵抗性に関わる細胞集団を制御するための DDAS を開発する。

## E. 結論

最新の分子生物学的手法を用いて、癌治療抵抗性の根幹をなす癌幹細胞に特異的な分子の機能解析を行うことにより、有望な標的分子を同定し、標的細胞に特異的に作用する人工ウイルスの作成に成功した。また、癌細胞の進展に関与し、患者予後に影響を与える間質細胞に特異的に発現する表面マーカーを同定した。また、人工ウイルスについても、癌幹細胞に特異的に発現する分子に親和性のあるペプチドに加えて、MUC1 をターゲットとする IgG 抗体を付加することに成功し、MUC1 陽性細胞特異的に集積することが示さ

れた。これらの結果は、癌幹細胞、癌細胞、癌間質に特異的に作用する多機能人工ウイルス作成への基盤となる。本研究の成果により、効率的かつ副作用の少ない、新たな治療戦略の開発が期待できる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ■論文発表

1. Taiki Moriyama, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Lin Cui, Naoki Ikenaga, Norihiro Sato, and Masao Tanaka, “Enhanced cell migration and invasion of CD133 pancreatic cancer cells co-cultured with pancreatic stromal cells”, *Cancer*, July 15; 3357-68, 2010
2. Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Lin Cui, Tadashi Kayashima, Katsuya, Morimatsu, Taiki Moriyama, Kohei Nakata, Hayato Fujita, and Masao Tanaka, “CD10+ pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer.”, *Gastroenterology*, 2010 Sep; 139(3):1041-51, 2010
3. Lin Cui, Kenoki Ohuchida, Kazuhiro Mizumoto, Taiki Moriyama, Manabu Onimaru, Kohei Nakata, Tatsuya Manabe, Takashi Ueki, Norihiro Sato, Yohei Tominaga, and Masao Tanaka, “Prospectively isolated cancer-associated CD10(+) fibroblasts have

stronger interactions with CD133(+) colon cancer cells than with CD133(-) cancer cells.”, *PLoS One*. 2010 Aug 12;5(8)

### ■学会発表

1. 池永直樹, 大内田研宙, 水元一博, 崔林, 森山大樹, 藤田逸人, 田中雅夫 “CD10陽性膵星細胞は膵癌の進展を促進する” 第110回日本外科学会定期学術集会(2010)
2. 鬼丸 学, 村田正治, 大内田研宙, 永井英司, 水元一博, 田上和夫, 橋爪 誠, 田中雅夫 “膵癌に対する c-Met 標的能を持つ新規 PEG 化アデノウイルスベクターの開発” 第110回日本外科学会定期学術集会(2010)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

刺激応答型DDSナノカプセルに関する研究

分担研究者 村田 正治

（九州大学大学院医学研究院 災害・救急医学分野・特任准教授）

研究要旨

昨年度までに作製したタンパク質ナノカプセルの内孔に MRI 造影剤 Gd-DTPA を封入、固定化することに成功した。このナノカプセル型 MRI 機能化造影剤は、従来の MRI 造影剤マグネビストと比較して大幅な感度上昇が確認された。またナノカプセルは PEG 修飾することによって免疫原性が低下し、血中滞留性が大幅に向上することも分かった。

**A. 研究目的**

腫瘍化に伴う遺伝子レベル、あるいは分子レベルでの変化が解き明かされることによって新しい治療戦略と治療薬が開発されてきた。しかしながら、これら新規薬物の治療効果を最大限に引き出すためには、同時に病変部位への薬物輸送システム（DDS）の開発が必要不可欠である。これまでに水溶性高分子やリポソームなどを用いた様々な DDS キャリアが開発されてきたが、その標的細胞、病変組織特異性については依然問題が残されている。本研究では、これら従来のドラッグキャリアとは一線を画するナノ DDS の構築を目指す。

この新しいドラッグキャリアのモデルとするのがウイルスである。ウイル

スは非常にシンプルな構造でありながら極めて効果的な感染機構を有する。この感染機序の重要な鍵となっているのが、天然のナノ構造体であるウイルスカプシドである。本研究ではこのカプシドを模したタンパク質ナノカプセルを構築し、これを細胞内シグナルによって崩壊させるシステムを創製する。

我々は既にタンパク質ナノカプセル（ヒト由来または古細菌由来）の遺伝子クローニングと大腸菌を使った大量発現に成功している。この直径 12nm のナノ構造体は非常に安定であり、しかもその内側に多くの薬物を内包することが可能である。本研究では、このナノカプセルを分子生物学あるいは有機合成化学を用いて様々な機能化し、①分子標的

による組織・細胞への侵入、②細胞シグナルによるカプセル崩壊、さらに③内包薬物の放出を実現する。

昨年度までにプロテアーゼ応答型ナノカプセル (Mut6) の基礎検討を行ったが、本年度はそれをプロテアーゼ活性のアッセイシステムへ応用した。

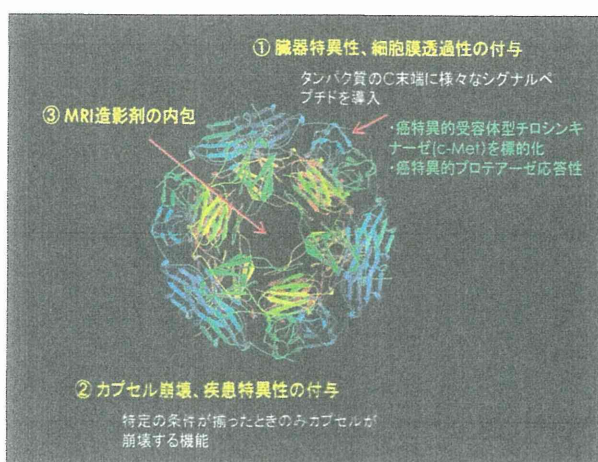


図1 ナノカプセルの機能化

## B. 研究方法

プロテアーゼはほとんど全ての生命現象に関与しており、プロテアーゼ活性の検出は基礎生物学研究において非常に重要である。また、プロテアーゼの異常は様々な疾病の原因となるため、創薬研究における有望な治療ターゲットであり、臨床診断などにも非常に重要である。よって現在までに様々なプロテアーゼ活性検出法が考案されている。Factor Xa 認識配列を有する変異型ナノカプセルのうち、Mut6 が Factor Xa による切断と 90°C での加熱という二重の刺激に反応して構造が付加逆的に崩壊した。本章ではこの変異体の構造ではなく、機能について着目した。野生型ナノカプセルは 100°C においても熱に不安定なタンパク質の凝集を抑制

することが報告されているため、自らが凝集することはないと考えられる。そこで我々は Mut6 がプロテアーゼによる切断により、そのシャペロン様活性を消失したのではないかと考えた。

蛋白質の変性とそれに続く不可逆的凝集は濁度の上昇として簡単に測定が可能であるが、HSP16.5 の存在下では凝集が抑制され、濁度の上昇が抑制される。よって Mut6 が Factor Xa 応答的に活性を変化させるのであれば、熱に不安定なタンパク質の存在下で加熱するだけで、濁度変化としてプロテアーゼ活性を検出することができると考えられる。つまり抗原抗体反応を利用しない、実際の切断活性を評価することが可能な比濁検出法なりえる。この手法では特殊な装置や高価な試薬を必要とせず、ラベルフリーで簡単にプロテアーゼ活性を検出できる。

### ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC)

野生型ナノカプセル及び Mut6 を Factor Xa にて 37°C で 16 時間切断反応を行い、90°C で 30 分間加熱した。沈殿物を除去するため、Ultrafree-MC 0.22  $\mu$ m フィルターデバイスでろ過し、TSK gel BioAssist G3SW<sub>XL</sub> column (TOSOH) を用いて分析した。

### 濁度測定

野生型ナノカプセル発現ベクターをトランスフォーメーションしたタンパク質発現用大腸菌株 BL21 (DE3) は 100  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む 2×YT 培地を用いて 37°C で振とう培養した。OD<sub>600</sub> の値が約 0.8 になった時点で 5,000g にて 10 分間延伸分離して細胞を回収し、25 mM Tris-HCl (pH 8.0) で再懸濁させた。これを氷上に



て 10 秒間の間隔を空けながら 10 秒間超音波照射を 5 回繰り返し、20,000g で 20 分間の遠心分離を 2 回行うことでライセートを作成した。2.0mg/ml のライセート (50  $\mu$ l) は、サンプルの蒸発を防いで多検体を同時に加熱することが可能な iCycler (Bio-Rad) を用いて加熱した。OD<sub>360</sub> の値が約 1.0 以下となるように、加熱後のサンプル 25  $\mu$ l は 100  $\mu$ l に希釈し、UV-Vis spectrometer V-560 (JASCO) を用いて測定を行った。

#### Native-PAGE

野生型ナノカプセル及び Mut6 に Factor Xa を添加し、37°C にて 16 時間インキュベートした後、Factor Xa を反応溶液中から除去するため Microcon YM-100 (MWC0 : 100 KDa) を用いて限外ろ過した。これらの溶液は室温 (r. t.)、80°C、90°C で 60 分間インキュベートした後、20,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した。この上澄みに 2 $\times$ サンプルバッファー (200mM Tris-HCl, 20%グリセロール、0.0050%ブロモフェノールブルー、pH8.6) を等量添加し、これをゲルにアプライし、分析した。

#### SDS-PAGE

サンプルは全て 4 $\times$  NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen) を添加し、95°C で 5 分間加熱した。溶液は 20,000g で 5 分間遠心後、上澄みをゲルにアプライし、電気泳動を行った。泳動後のゲルはクマシーブリリアントブルー (CBB)- 250 を用いて染色した。

(倫理面への配慮)

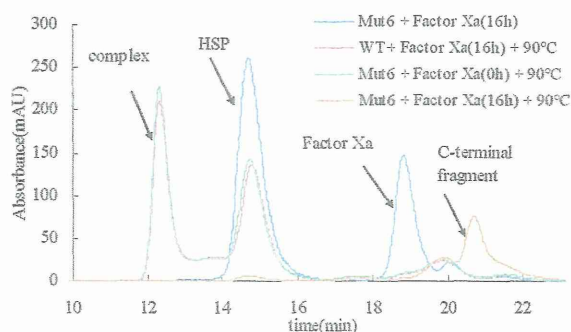
研究の遂行にあたっては該当する法令および指針を遵守することはもちろん、九州大学の倫理委員会の規定にしたがって研

究を推進した。

### C. 研究結果

#### GPC によるプロテアーゼ応答型ナノカプセルのシャペロン様活性の評価

Factor Xa 切断前後の Mut6 のシャペロン様活性を評価するため、切断反応に用いた Factor Xa をそのままシャペロン基質として用いて評価することにした。Factor Xa を添加した直後の Mut6 と、37°C で 16 時間切断反応を行った Mut6 を 90°C で 30 分間加熱し、GPC で分析した。すると混合直後に加熱した Mut6 は切断を受けなかったため、野生型ナノカプセルと同様、熱に不安定な Factor Xa と複合化したピーク (溶出時間 : 12.5 分) が検出された。よって 7 残基のアミノ酸を挿入しているにも関わらず、Mut6 はシャペロン機能を失っていなかったことがわかった。一方切断反応を行った Mut6 の場合、24 量体の Mut6 のピーク、Factor Xa 及び Factor Xa と複合化した Mut6 のピークのどれも検出されず、新しく低分子化したピーク (溶出時間 ; 20.5 分) が出現した。これは、24 量体の Mut6 が崩壊した後に可溶性として残った C 末端フラグメントであると考えられる。この結果から、Mut6 はプロテアーゼ切断を受けた後、90°C において加熱すると、その機能を消失することがわかった。



7 図 2 Factor Xa を基質としたシャペロン様活性の GPC による評価



### Mut6 の Factor Xa 切断活性への特異性評価

本検出法の Factor Xa の切断活性に対する特異性を評価した。様々な条件にてプロテアーゼ反応を行い、その溶液を大腸菌 BL21 (DE3) のライセートに添加し、90°Cにて 5 分間加熱した後に濁度測定を行った(図 3a)。その結果、Factor Xa により切断した Mut6 の場合はサンプルの濁度は上昇したが、Mut6 が認識配列を持たないプロテアーゼであるエンテロキナーゼ(切断配列: NNNK↓)を添加した場合、凝集は抑制されたままであった。また

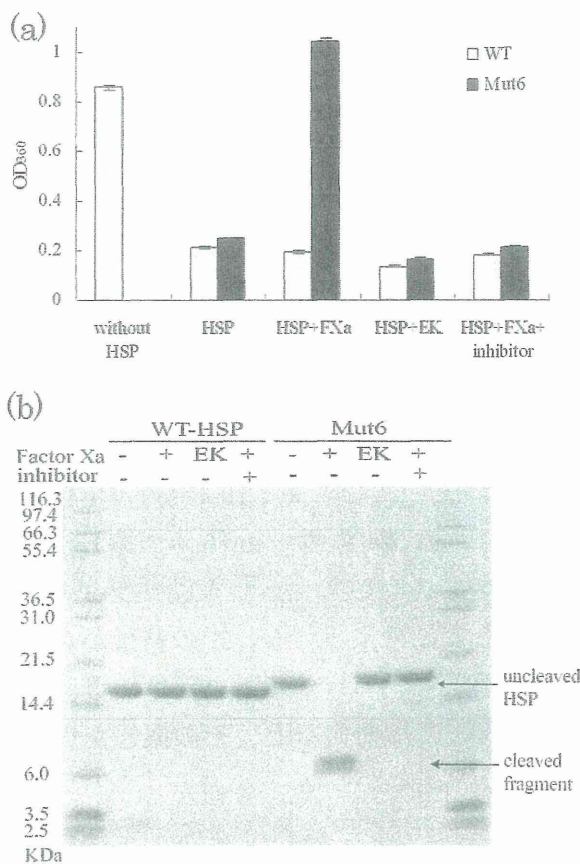


図 3 Factor Xa 切断に対する特異性の評価

(a) プロテアーゼ反応の比濁検出

(b) プロテアーゼ反応の SDS-PAGE による評価

Factor Xa を添加した場合であっても、セ

リンプロテアーゼの特異的阻害剤である *p*-APMSF を添加した場合には濁度の上昇は抑制された。さらに野生型ナノカプセルの場合では、全ての条件で凝集を抑制した。プロテアーゼ反応溶液を SDS-PAGE で分析した結果、切断活性とこれらの濁度変化は完全に一致していた(図 3b)。これらの結果から、本アッセイ系は、Factor Xa の切断活性のみを反映できることが示された。

### ライセート中のプロテアーゼ活性の検出

本アッセイ系のメリットは多量の狭雑物中が存在する中での目的プロテアーゼ活性の検出である。そこで本項ではライセート中でのプロテアーゼ活性を検出することを試みた。Factor Xa は血中に分泌されるプロテアーゼであり、多数の糖修飾がなされることからこれを大腸菌細胞内に高発現させた報告例はない。そこで今回は大腸菌ライセートに精製 Factor Xa を添加することで、ライセート中に Factor Xa が含まれるモデル系とし、この中に Mut6 を添加してライセート中の酵素活性を検出できるか実験した。

0.2u/μl Factor Xa を含むライセートと、含まないライセート 1.0mg/ml 中に 25 μM の Mut6 を添加し、0.5、1、2、4 時間 37°C でインキュベートした後、90°C で 5 分間加熱し、濁度を測定した。結果を図 4a に示す。Factor Xa を含まないライセートでは、37°C でのインキュベートにより濁度は上昇するものの、その上昇率はわずかであった。一方プロテアーゼを含むライセートでは濁度が急激に上昇していき、2 時間後にはプラトーに達した。

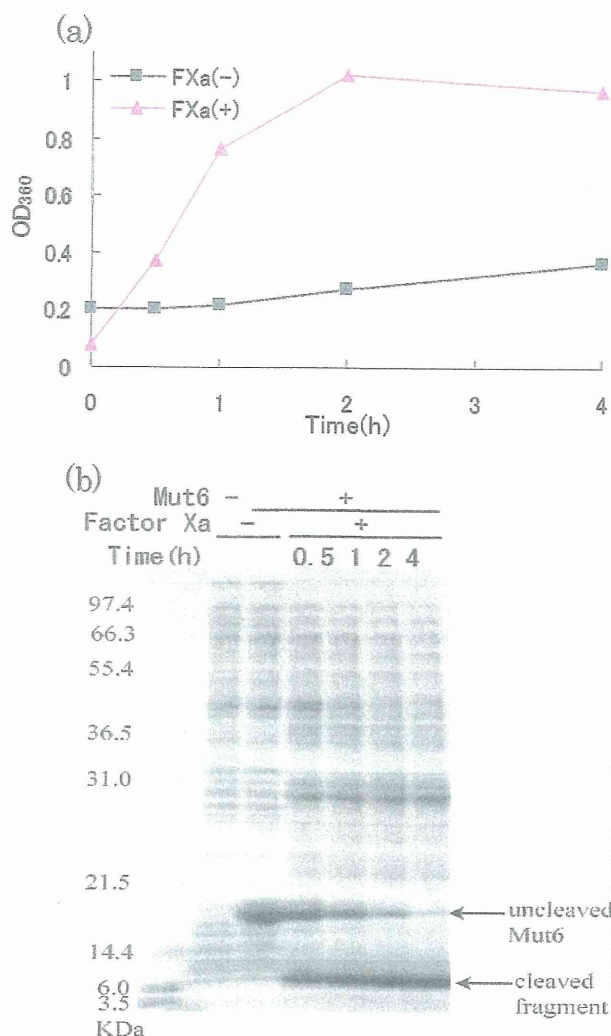


図4 ライセート中での Factor Xa 切断の検出

(a) 反応開始後における濁度の経時変化

(b) SDS-PAGE による切断率の確認

SDS-PAGE の結果(図 4b)からもプロテアーゼ切断率と濁度の上昇には相関があった。これより、ライセート中に存在するプロテアーゼの切断活性の検出に成功した。

そこで次に、Factor Xa をライセート中に様々な濃度で添加し、ライセート中に存在する Factor Xa 量を濁度の差として検出できるか検討した。0-0.2u/μl Factor Xa を含むライセート 1.0mg/ml に 25 μM の Mut6 を添加し、37°C で 2 時間インキュベートした後、90°C 5 分間加熱後、濁度を測定した。

Factor Xa の添加量の違いにより HSP を添加していないライセートの濁度変動するため、ここでは得られた濁度値を同じ酵素濃度での HSP なしでの濁度値で規格化した。結果を図 5a に示す。野生型ナノカプセルは常に凝集を抑制した一方で、Mut6 はプロテアーゼ添加量依存的に凝集抑制能が低下し、濁度は上昇した。SDS-PAGE の結果(図 4b)からもプロテアーゼ切断率と濁度変化には相関があった。この結果から、ライセート中のプロテアーゼ活性の評価にも本アッセイ系は応用

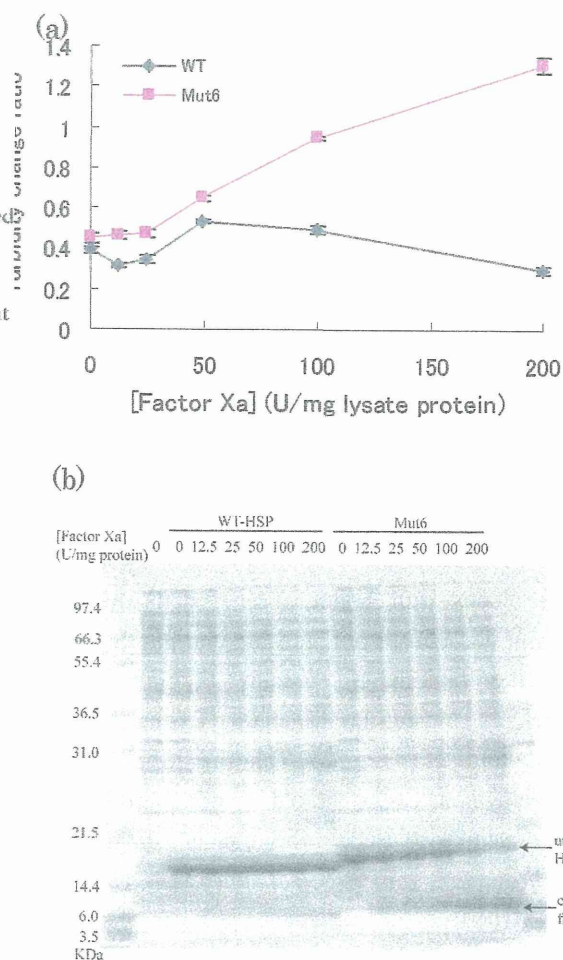


図5 ライセート中の Factor Xa 活性の評価

(a) Factor Xa による切断反応の比濁検出

(b) Factor Xa による切断反応の SDS-PAGE による評価

可能であることが示された。

該当なし

#### D. 結論

Mut6 がプロテアーゼ Factor Xa により活性制御可能なシャペロンタンパク質であることを証明した。プロテアーゼで活性制御が可能なシャペロンタンパク質は他に報告されておらず、全く新しい機能性材料である。さらにこれを用いることでプロテアーゼ活性の比濁型検出法を開発した。具体的には大腸菌ライセートを基質とすることでプロテアーゼの切断活性や阻害剤の阻害能を濁度として容易に検出することに成功した。ライセート中のプロテアーゼ活性を検出できたことから、将来的には細胞内のプロテアーゼ活性検出法として確立することが期待できる。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 研究発表

論文発表

1. Jeong-Hun Kang, Yoji Asami, Masaharu Murata, Hirotarō Kitazaki, Noriaki Sadanaga, Eriko Tokunaga, Satoko Shiotani, Satoko Okada, Yoshihiko Maehara, Takuro Niidome, Makoto Hashizume, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, " Gold nanoparticle-based colorimetric assay for cancer diagnosis ", *Biosensors and Bioelectronics*, **25**, 1869-1874 (2010).
5. Yoshinori Matsuoka, Masaharu Murata, Yuri Fujisaki, Sayoko Narahara, Nao Shinzato, Makoto Hashizume, "Molecular imaging contrast media for visualization of liver function", *Magnetic Resonance Imaging*, **28**(5), 708-715(2010)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Moriyama T, Ohuchida K et al.	Enhanced cell migration and invasion of CD133 pancreatic cancer cells co-cultured with pancreatic stromal cells	Cancer	July 15	3357-68	2010
Ikenaga N, Ohuchida K et al.	CD10+ pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer.	Gastroenterology	139(3)	1041-51	2010
Cui L, Ohuchida K et al.	Prospectively isolated cancer-associated CD10(+)-fibroblasts have stronger interactions with CD133(+)-colon cancer cells than with CD133(-) cancer cells.	PLoS One	5(8)		2010
Jeong-Hum Kang, Murata M et al.	Gold nanoparticle-based colorimetric assays for cancer diagnosis	Biosensors and Bioelectronics	25	1869-74	2010
Matsuoka Y, Murata M et al.	Molecular imaging contrast media for visualization of liver function	Magnetic Resonance Imaging	28(5)	708-15	2010

# Enhanced Cell Migration and Invasion of CD133<sup>+</sup> Pancreatic Cancer Cells Cocultured With Pancreatic Stromal Cells

Taiki Moriyama, MD<sup>1</sup>; Kenoki Ohuchida, MD, PhD<sup>1,2</sup>; Kazuhiro Mizumoto, MD, PhD<sup>1,3</sup>; Lin Cui, MD<sup>1</sup>; Naoki Ikenaga, MD<sup>1</sup>; Norihiro Sato, MD, PhD<sup>1</sup>; and Masao Tanaka, MD, PhD<sup>1</sup>

**BACKGROUND:** Recently, cancer stem cells have been reported as a new therapeutic target in pancreatic cancer as well as other cancers, but the specific role of these cells is unknown. **METHODS:** The authors investigated the functional roles of CD133<sup>+</sup> cells, 1 of the putative cancer stem cell candidates in pancreatic cancer. CD133 expression was assessed in human pancreatic cancer and cancer cell lines by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction and flow cytometry. Next, they compared the ability of CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells to proliferate, migrate, and invade using 2 pancreatic cancer cell lines. In particular, they evaluated the relationship between CD133<sup>+</sup> cells and primary pancreatic stromal cells. **RESULTS:** CD133 was expressed in primary human pancreatic cancer tissues and some cancer cell lines, whereas there was little expression in primary normal pancreatic epithelial cells and primary pancreatic stromal cells. CD133<sup>+</sup> cells, isolated by flow cytometry, showed increased cell proliferation under anchorage-independent conditions ( $P < .01$ ), and enhanced migration and invasion, particularly when cocultured with primary pancreatic stromal cells ( $P < .001$ ). Chemokine-related receptor-4 (CXCR4), markedly overexpressed in CD133<sup>+</sup> cells, may be responsible for the increased invasive ability of the cells cocultured with pancreatic stromal cells, which express stromal derived factor-1, the ligand to CXCR4. **CONCLUSIONS:** These data suggest that CD133<sup>+</sup> cells exhibit more aggressive behavior, such as increased cell proliferation, migration, and invasion, especially in the presence of pancreatic stromal cells. The targeting therapy for the interaction between CD133<sup>+</sup> cancer cells and stromal cells may be a new approach for the treatment of pancreatic cancer. *Cancer* 2010;116:3357-68. © 2010 American Cancer Society.

**KEYWORDS:** CD133, CXCR4, cell invasion, cancer-stromal interaction, pancreatic cancer.

**Pancreatic** cancer is the fifth leading cause of cancer-related death in Japan<sup>1</sup> and the fourth leading cause in the United States,<sup>2</sup> with annual deaths reaching >17,000 in Japan<sup>1</sup> and almost 30,000 in the United States.<sup>2</sup> The prognosis for pancreatic cancer is the worst of all cancers, because of the lack of improvement in early detection, diagnosis, and treatment strategies. Therefore, novel diagnostic modalities for early diagnosis and new therapeutic strategies are urgently needed.

Recently, cancer stem cells have been defined as a very small subset of cells within the tumor population that have the capacity to initiate and sustain tumor growth. It is most notable that cancer stem cells possess the ability to self-renew and undergo multilineage differentiation.<sup>3</sup> The study of cancer stem cells has developed through 2 important techniques, fluorescence-activated cell sorting (FACS) and tumor xenograft models in immunocompromised mice. Bonnet and Dick<sup>4</sup> isolated cancer stem cells in human acute myeloid leukemia for the first time by using cell surface markers (CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup>) and a xenograft model in nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice.

CD133 was reported as a marker of cancer stem cells in the brain,<sup>5-7</sup> colon,<sup>8,9</sup> liver,<sup>10,11</sup> and prostate.<sup>12</sup> In pancreatic cancer, Li and colleagues<sup>13</sup> have determined that pancreatic cancer is hierarchically organized and originates from a primitive stem/progenitor group of cells for which CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> ESA<sup>+</sup> precursors constitute 1 of the most immature stages. However, Hermann and colleagues<sup>14</sup> have reported that a distinct subpopulation of CD133<sup>+</sup> cancer stem cells

**Corresponding author:** Kenoki Ohuchida MD, PhD, or Kazuhiro Mizumoto, MD, PhD, Department of Surgery and Oncology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Fukuoka 812-8582, Japan; Fax: (011) 81-92-642-5458; kenoki@med.kyushu-u.ac.jp or mizumoto@med.kyushu-u.ac.jp

<sup>1</sup>Department of Surgery and Oncology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan; <sup>2</sup>Department of Advanced Medical Initiatives, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan; <sup>3</sup>Kyushu University Hospital Cancer Center, Fukuoka, Japan

**DOI:** 10.1002/cncr.25121, **Received:** July 30, 2009; **Revised:** October 14, 2009; **Accepted:** October 21, 2009, **Published online** April 28, 2010 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)



determined the metastatic phenotype of individual tumors. Therefore, there are 2 possible sources for cancer stem cells in pancreatic cancer; 1 is CD44<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup> ESA<sup>+</sup> cells, and the other is CD133<sup>+</sup> cells. Hermann et al.<sup>14</sup> reported that these 2 populations overlap but are not identical. In this study, we analyzed the 2 kinds of cancer stem cell markers and found that CD44 was indeed expressed in almost 100% of pancreatic cancer cell lines. Therefore, CD44 seemed to be an inappropriate marker to isolate CD44-positive and -negative cells. Therefore, we used CD133 as a candidate marker of cancer stem cells in pancreatic cancer, and investigated the biological function of CD133<sup>+</sup> cells.

Previous studies have attributed the high expression levels of specific adenosine triphosphate-binding cassette drug transporters to the increased resistance of CD133<sup>+</sup> cancer stem cells to chemotherapeutic agents in hepatocellular carcinomas<sup>15</sup> and brain tumors.<sup>16</sup> Others have also demonstrated that cancer stem cells promoted radioresistance in glioblastoma<sup>17</sup> and breast cancer.<sup>18</sup> In pancreatic cancer, however, there are few reports regarding the biological functions of CD133<sup>+</sup> cancer cells. In the present study, we investigated the biological function of CD133<sup>+</sup> cells isolated by FACS in pancreatic cancer cell lines. Our data showed that CD133<sup>+</sup> cells might play important roles in cell proliferation, migration, and invasion in pancreatic cancer.

Invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas is often characterized by abundant desmoplastic stroma. Recently, the stromal reaction has been a focus of attention as a characteristic feature of the majority of pancreatic cancers.<sup>19</sup> Therefore, we also investigated the involvement of CD133<sup>+</sup> cells in tumor-stromal interactions and found that CD133<sup>+</sup> cells significantly increased cell migration and invasion when cocultured with primary pancreatic stromal cells compared with CD133<sup>-</sup> cells. These data suggest that CD133<sup>+</sup> cells contribute to cancer-stromal interaction more than CD133<sup>-</sup> cells.

## MATERIALS AND METHODS

### *Human Pancreatic Tissue Samples*

The tissue samples analyzed in this study were obtained from patients who underwent a surgical procedure to resect a portion of the pancreas in Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan. Normal pancreatic tissues were also taken from areas of peripheral tissue away from the tumor or from the non-neoplastic pancreas resected because of biliary disease. Tissues were removed as soon as possible after resection and used for the experiments in

the present study. The samples were suspended in Hank solution with collagenase, and mechanically dissociated using scissors and then minced with a sterile scalpel blade over ice to yield 1 × 1-mm pieces. The pieces were washed with Hank solution 3× before analysis by flow cytometry. The primary cultures of pancreatic stromal cells were established and maintained as described previously.<sup>20</sup> Written informed consent was obtained from all patients, and the study was approved by the ethics committee of Kyushu University and conducted according to the Ethical Guidelines for Human Genome/Gene Research enacted by the Japanese Government.

### *Cell Lines and Cultures*

The following 14 pancreatic cancer cell lines were used: AsPC-1, KP-1N, KP-2, KP-3, PANC-1, and SUIT-2 (Dr. H. Iguchi, National Shikoku Cancer Center, Matsuyama, Japan); MIA PaCa-2 (Japanese Cancer Resource Bank, Tokyo, Japan); CAPAN-1, CAPAN-2, CFPAC-1, H48N, HS766T, and SW1990 (American Type Culture Collection, Manassas, Va); and NOR-P1 (established by Dr. N. Sato in our laboratory). A human pancreatic ductal epithelial cell line (HPDE6-E6E7 clone 6) immortalized by transduction with the E6/E7 genes of human papillomavirus 16 was kindly provided by Dr. Ming-Sound Tsao (University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada), and maintained as described previously.<sup>20</sup> Primary cultures of human normal pancreatic epithelial cells were obtained from Cell Systems (Kirkland, Wash), and maintained in Cell Systems Corporation (CS-C) medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), according to the supplier's instructions. Total cell numbers were quantified using a particle distribution counter (CDA500; Sysmex, Kobe, Japan).

### *Flow Cytometry and Cell Sorting*

Cells were incubated in phosphate-buffered saline containing 1% FBS with phycoerythrin (PE)-conjugated antihuman CD133/2 antibody (Miltenyi Biotec, Auburn, Calif). Isotype-matched mouse immunoglobulins served as controls. For flow cytometry, samples were analyzed using an EPICS ALTRA flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, Calif) and a FACS Calibur (Becton Dickinson, Bedford, Mass). For cell sorting by flow cytometry, samples were analyzed and sorted on the EPICS ALTRA. For the positive and negative population, only the top 10% most brightly stained cells or the bottom 10% most dimly stained cells were selected, respectively. Aliquots of CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> sorted cells were evaluated for



purity with the same machine, using the CD133/2 antibody. We also analyzed expression of cell surface markers using the antibodies of chemokine-related receptor-4 (CXCR4)-PE (R & D systems, Minneapolis, Minn).

### Transfections

Transfections were performed by electroporation using a Nucleofector system (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany). All studies were performed in triplicate. Cells ( $1-2 \times 10^6$ ) were centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes, and the medium was removed. The cells were resuspended in 98  $\mu$ L of Nucleofector solution (Amaxa Biosystems) at room temperature, followed by the addition of 2  $\mu$ L of 50  $\mu$ mol CXCR4-siRNA or a control-siRNA (both obtained from B-Bridge International, Mountain View, Calif). The transfected cells were resuspended and cultured in regular culture medium containing 10% serum for 24 hours before analysis.

### Quantitative Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay for CD133 mRNA Expression

Total RNA was isolated from cell lines using the High Pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, Ind), and RNA concentrations were measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Del) at 260 and 280 nm (A260/280). RNA integrity was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif). Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assays were performed using the QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) with a Chromo4 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif) according to the manufacturer's instructions. PCR was performed for 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C, followed by a thermal denaturation protocol. The expression levels of CD133 mRNA in all cell lines were normalized to the expression level of 18S rRNA. The following primer pairs were used for PCR amplification: CD133-forward, 5'-GCCACCGCTCTAGATACTGC-3'; CD133-reverse, 5'-GCTTTTTTCTATGCCAAACCA-3'; CXCR4-forward, 5'-GAAGCTGTTGGCTGAAAGG-3'; CXCR4-reverse, 5'-CTCACTGACGTTGGCAAAGA-3'; stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) (CXCL12)-forward, 5'-GAT TGTAGCCCGGCTGAAGA-3'; SDF-1 (CXCL12)-reverse, 5'-TTCGGGTCAATGCACACTTGT-3'; 18S rRNA-forward, 5'-GATATGCTCATGTGGTGTG-3';

and 18S rRNA-reverse, 5'-AATCTTCTTCAGTCGC TCCA-3'.

### Cell Proliferation Assay

Cell proliferation was evaluated by measuring the fluorescence intensity of propidium iodide (PI) as described previously.<sup>21,22</sup> CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells in pancreatic cancer were seeded at  $2 \times 10^4$  cells/well in 24-well tissue culture plates (Becton Dickinson). In anchorage-independent proliferation experiments, cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells/well in 24-well plates coated with Ultra Low Attachment Surface (Corning Inc., Corning, NY). Cell proliferation was evaluated after culture for a further 72 or 120 hours after the initial cell number determination by the PI assay. PI (30  $\mu$ M) and digitonin (600  $\mu$ M) were added to each well to label all nuclei with PI. The fluorescence intensity, corresponding to the total cell number, was measured using a CytoFluor II multiwell plate reader (PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass) with 530-nm excitation and 645-nm emission filters. A separate well, which possessed the same medium but no cells, was used for a baseline PI signal as a control. We evaluated the difference between each sample well and the control well. Cell proliferation was defined relative to the cell number measured at the beginning of the experiment. All experiments were performed in triplicate wells and repeated at least 3 $\times$ .

### Migration Assay and Invasion Assay

Migration of pancreatic cancer cells was measured by counting the number of cells that migrated from transwell chambers 24 hours after seeding cells into the upper chamber. Invasive ability of pancreatic cancer cells was measured by the number of cells invading Matrigel-coated transwell chambers. We also assessed cancer-stromal interaction by coculture with pancreatic cancer-related stromal cells.

In the migration assay, a total of  $5 \times 10^4$  isolated cells were resuspended in 250  $\mu$ L of Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) containing 10% FBS and placed in the upper transwell chamber (8  $\mu$ m pore size, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). The upper chamber was placed in a 24-well culture dish containing 750  $\mu$ L of the medium described above supplemented with  $5 \times 10^4$  primary pancreatic stromal cells. After 24 hours of incubation at 37°C, the number of migrated cells was counted. In the invasion assay,  $5 \times 10^4$  isolated cells were plated in the upper Matrigel-coated transwell chambers (filled with 20  $\mu$ g of Matrigel/well) and reconstituted with 10% FBS-containing medium for 2 hours before the experiment.

Cells were seeded into the upper chambers in 250  $\mu$ L of DMEM supplemented with 10% FBS. The same medium (750  $\mu$ L) was placed in the lower wells. After 72 hours of incubation at 37°C, the number of invading cells was counted.

Cells that had degraded the Matrigel and invaded the lower surface of the Matrigel-coated membranes were fixed with 70% ethanol, stained with H & E, and counted in 5 random fields at  $\times 200$  magnification under a light microscope. The results were expressed as the average number of invading cells per field.

### Statistical Analysis

All data were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation and evaluated using an analysis of variance on Microsoft Office Excel software (Redmond, Wash). Values of  $P < .05$  were accepted as statistically significant in any analysis.

## RESULTS

### ***CD133 Is Markedly Overexpressed in Pancreatic Cancer Tissues Compared With Normal Pancreatic Tissues***

We measured the expression of CD133 in human pancreatic cancer tissues and normal pancreatic tissues by flow cytometry, and found that the expression of CD133 in cancer tissues was much higher than in nonmalignant tissues (Fig. 1A,  $P < .001$ ).

We performed quantitative RT-PCR and flow cytometry to measure the expression of CD133 in 14 pancreatic cancer cell lines, HPDE cells, and primary cultures of normal pancreatic epithelial cells and pancreatic fibroblasts (Fig. 1B and C). There was a wide range of relative CD133 expression levels among the pancreatic cancer cell lines. The primary normal pancreatic epithelial cells and fibroblasts did not express detectable levels of CD133. We selected SUIT-2 and KP-2 cells in which  $>10\%$  of cells were determined to be isolated CD133<sup>+</sup> cells and CD133<sup>-</sup> cells by FACS for the following experiments.

### ***More CD133<sup>+</sup> Cells Survive Than CD133<sup>-</sup> Cells Under Anchorage-Independent Conditions***

To investigate cell proliferation and cell survival, we performed PI assays using SUIT-2 and KP-2 cells. In anchorage-dependent conditions, there was no significant difference in cell proliferation between CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells (Fig. 2A). However, in anchorage-independent conditions, cell survival of CD133<sup>+</sup> cells was significantly increased compared with CD133<sup>-</sup> cells in both SUIT-2 and KP-2 cells (Fig. 2B;  $P = .004$ ).

### ***CD133<sup>+</sup> Cells Show High Migration and Invasion Ability, Especially When Cocultured With Primary Pancreatic Stromal Cells***

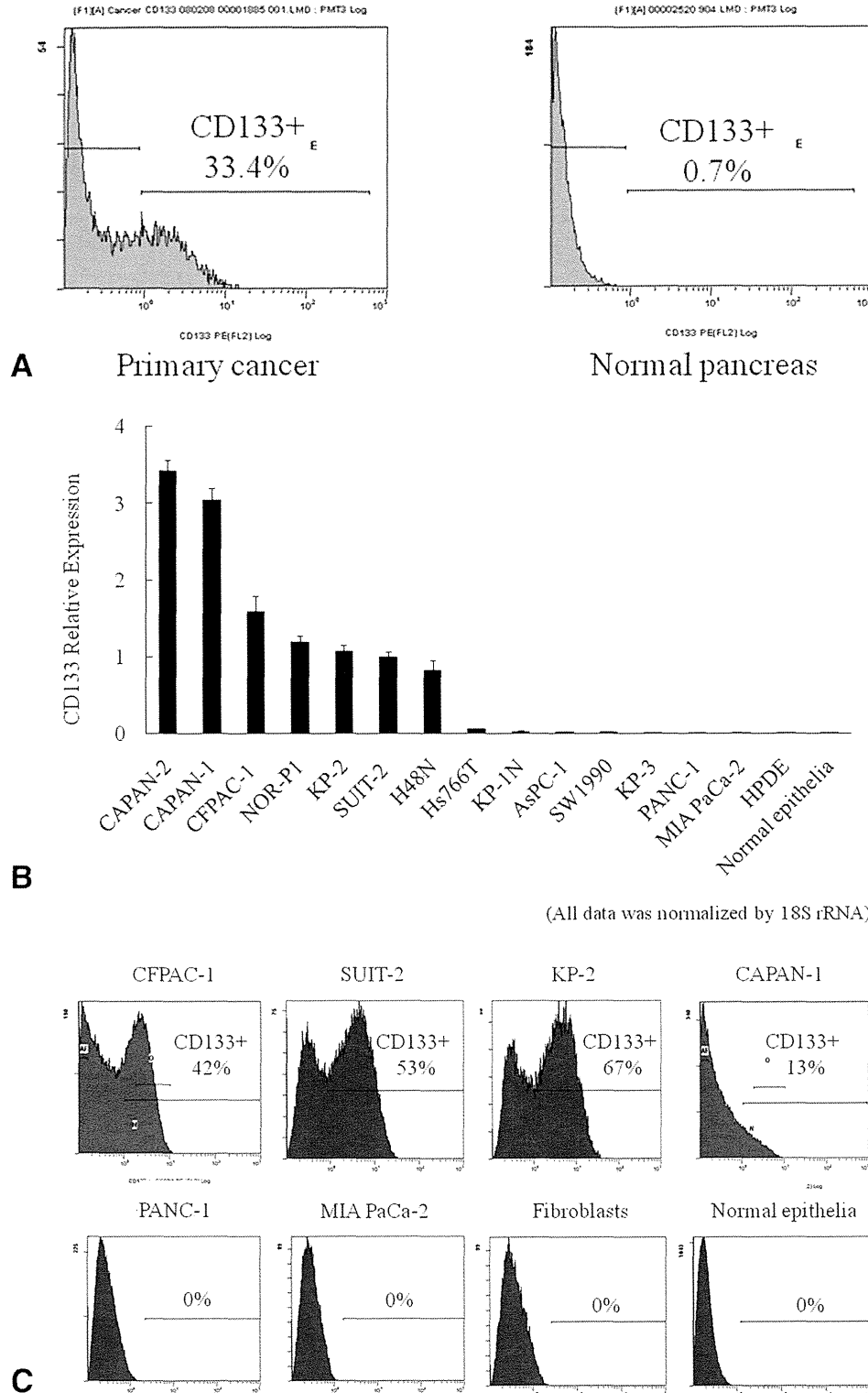
Next, we compared the migration and invasion abilities of CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells using SUIT-2 and KP-2 cells. The CD133<sup>+</sup> SUIT-2 and KP-2 cells exhibited slightly increased cell migration compared with CD133<sup>-</sup> cells 24 hours after seeding in monoculture conditions (Fig. 3A,  $P = .0028$ ; Fig. 3B,  $P = .035$ , respectively). When cocultured with pancreatic stromal cells, CD133<sup>+</sup> cells exhibited markedly increased invasive potential compared with CD133<sup>-</sup> cells (Fig. 3A,  $P = .0002$ ; Fig. 3B,  $P < .0001$ , respectively). Although we found no significant difference in cell invasion between CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells at 72 hours after seeding under monoculture conditions (Fig. 3C;  $P = .12$ ), CD133<sup>+</sup> cells exhibited markedly increased invasive potential compared with CD133<sup>-</sup> cells when cocultured with pancreatic stromal cells (Fig. 3C;  $P < .0001$ ). Similar results were again found in KP-2 cells (Fig. 3D,  $P = .023$  and  $P < .0001$ , respectively).

### ***CD133<sup>+</sup> Cells Expressed CXCR4 at Much Higher Level Than CD133<sup>-</sup> Cells***

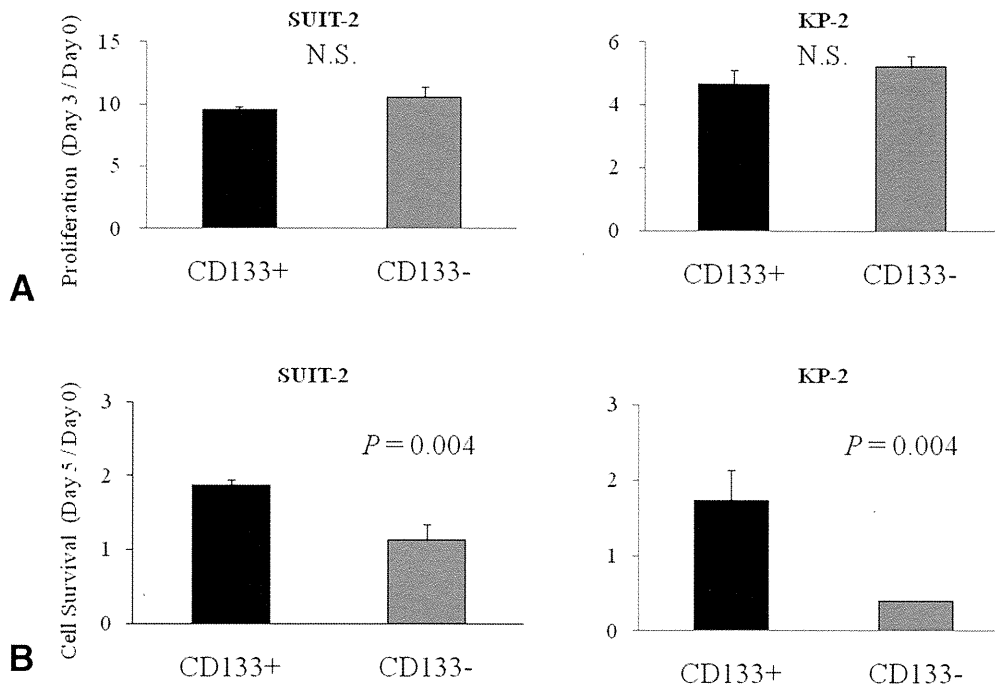
To assess the mechanism underlying the increase in the migration and invasion ability of CD133<sup>+</sup> cells in cocultures with pancreatic stromal cells, we focused on 2 major tumor-stromal cell interactions in pancreatic cancer, CXCR4/SDF-1<sup>14</sup> and c-Met/hepatocyte growth factor (HGF).<sup>20</sup> SUIT-2 and KP-2 CD133<sup>+</sup> cells expressed a significantly higher level of CXCR4 mRNA than CD133<sup>-</sup> cells (Fig. 4A;  $P = .0003$  and  $.001$ , respectively). However, there was no significant difference in c-Met mRNA expression (Fig. 4A). These results suggest that CXCR4 may be responsible for the increased migration and invasion ability of CD133<sup>+</sup> cells when cocultured with pancreatic stromal cells secreting SDF-1 (Fig. 4B, CAF-3).

### ***Down-Regulation of CXCR4 Decreases Cell Migration and Invasion Only in CD133<sup>+</sup> Cells***

To assess whether the CXCR4/SDF-1 axis plays an important role in the migration and invasion of CD133<sup>+</sup> cells in pancreatic cancer, we down-regulated CXCR4 using RNA interference. At 24 hours (Day 1) after transfection with 100 pmol of CXCR4-siRNA or control-siRNA, CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells transfected with CXCR4-siRNA showed 0.3-fold lower levels of CXCR4 mRNA than the cells transfected with control-siRNA (Fig. 5A). At 120 hours (Day 5) after transfection, CXCR4-siRNA was



**Figure 1.** Levels of CD133 expression in human pancreatic tissues and cell lines are shown. (A) Levels of CD133 expression in pancreatic cancer tissues and normal pancreatic tissues as determined by flow cytometry are shown. (B) Levels of CD133 mRNA expression were assessed by quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction and normalized to the level of 18S rRNA in each sample. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of triplicate measurements. (C) Levels of CD133 expression in pancreatic cancer cell lines were assessed by flow cytometry. Data represent triplicate measurements.



**Figure 2.** Cell proliferation and cell survival of pancreatic cancer cells are shown. The propidium iodide assay was used to compare cell proliferation and cell survival between CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells. Two kinds of pancreatic cancer cell lines, SUIT-2 and KP-2, were used and sorted by CD133 expression. (A) In anchorage-dependent conditions, there was no significant difference in proliferation between CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells. (B) In anchorage-independent conditions (floating culture), cell survival of CD133<sup>+</sup> cells was significantly increased compared with CD133<sup>-</sup> cells in both SUIT-2 and KP-2 cells ( $P=0.004$ ). Each value represents the mean  $\pm$  standard deviation of triplicate measurements. N.S. indicates not significant.

effective (Fig. 5A), and no morphological differences between these transfected cells were observed.

Down-regulation of CXCR4 significantly decreased cell migration and invasion only in CD133<sup>+</sup> cells cocultured with pancreatic stromal cells (CAF-3) (Fig. 5B-E). These data suggest that the CXCR4/SDF-1 pathway strongly affects the migration and invasion ability of CD133<sup>+</sup> cells. We also evaluated several invasion-related genes, and found that CD133<sup>+</sup> cells expressed slightly increased levels of FOXM1, MMP-9, and VEGF-A mRNA (data not shown). These results suggest that CD133<sup>+</sup> cells may have several pathways influencing cell invasion in addition to the CXCR4/SDF-1 axis.

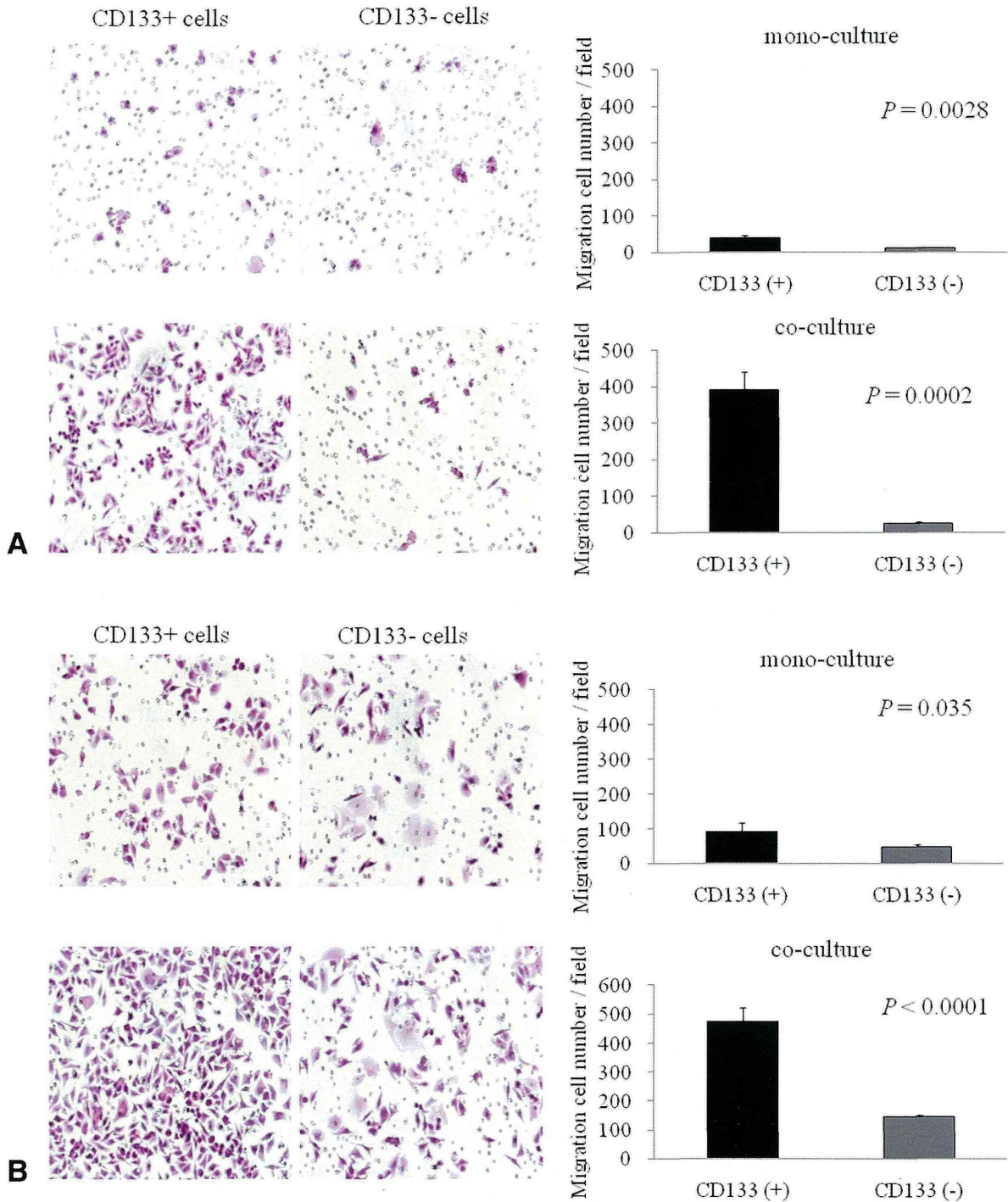
## DISCUSSION

In the present study, we have evaluated the biological function of CD133<sup>+</sup> cells in pancreatic cancer, and obtained the first data regarding the specific relationship between CD133<sup>+</sup> cells and primary pancreatic stromal cells. We found that CD133 expression was increased in pancreatic cancer tissue compared with normal pancreatic tissues as well as in cancer cell lines compared with normal

pancreatic epithelial cells, and that CD133<sup>+</sup> was a marker of high proliferative potential in floating cultures, migration, and invasion. In particular, migration and invasion of CD133<sup>+</sup> cells cocultured with primary pancreatic stromal cells was greatly enhanced.

Recently, CD133 expression has been shown to be a prognostic marker for poor survival in patients with colon cancer,<sup>23,24</sup> and brain tumors.<sup>25,26</sup> Maeda et al.<sup>27</sup> also reported that CD133 expression is correlated with lymph node metastasis, vascular endothelial growth factor-C expression, and poor prognosis in pancreatic cancer. As well as these previous studies, our data also suggest that CD133<sup>+</sup> cells are involved in pancreatic tumor progression, through processes such as invasion and migration.

In a further step, we evaluated the relationship between CD133<sup>+</sup> cancer cells and stromal cells, focusing on the CXCR4/SDF-1 axis. Previously, some studies reported that CXCR4/SDF-1 contributed to tumor progression. The CXCR4/SDF-1 axis promotes migration and invasion in breast cancer.<sup>28</sup> We have also previously reported that DNA methylation influenced CXCR4 expression in pancreatic cancer.<sup>29</sup> It is possible that these findings provide new insights into the role of CXCR4/



**Figure 3.** Cell migration and invasion of CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells in pancreatic cancer are shown. (A) Migration of SUIT-2 CD133<sup>+</sup> cells increased slightly compared with CD133<sup>-</sup> cells in monoculture conditions ( $P=.0028$ ), and increased markedly when cocultured with pancreatic stromal cells ( $P=.0002$ ). (B) Migration of KP-2 CD133<sup>+</sup> cells increased slightly compared with CD133<sup>-</sup> cells in monoculture conditions ( $P=.035$ ), and increased markedly when cocultured with pancreatic stromal cells ( $P < .0001$ ). (C, D) A comparison of invasive ability of CD133<sup>+</sup> and CD133<sup>-</sup> cells is shown. (C) The invasive ability of SUIT-2 CD133<sup>+</sup> cells increased slightly compared with CD133<sup>-</sup> cells in monoculture conditions ( $P=.12$ ), and increased markedly when cocultured with pancreatic stromal cells ( $P < .0001$ ). (D) The invasive ability of KP-2 CD133<sup>+</sup> cells increased slightly compared with CD133<sup>-</sup> cells in monoculture conditions ( $P=.035$ ), and increased markedly when cocultured with pancreatic stromal cells ( $P < .0001$ ).



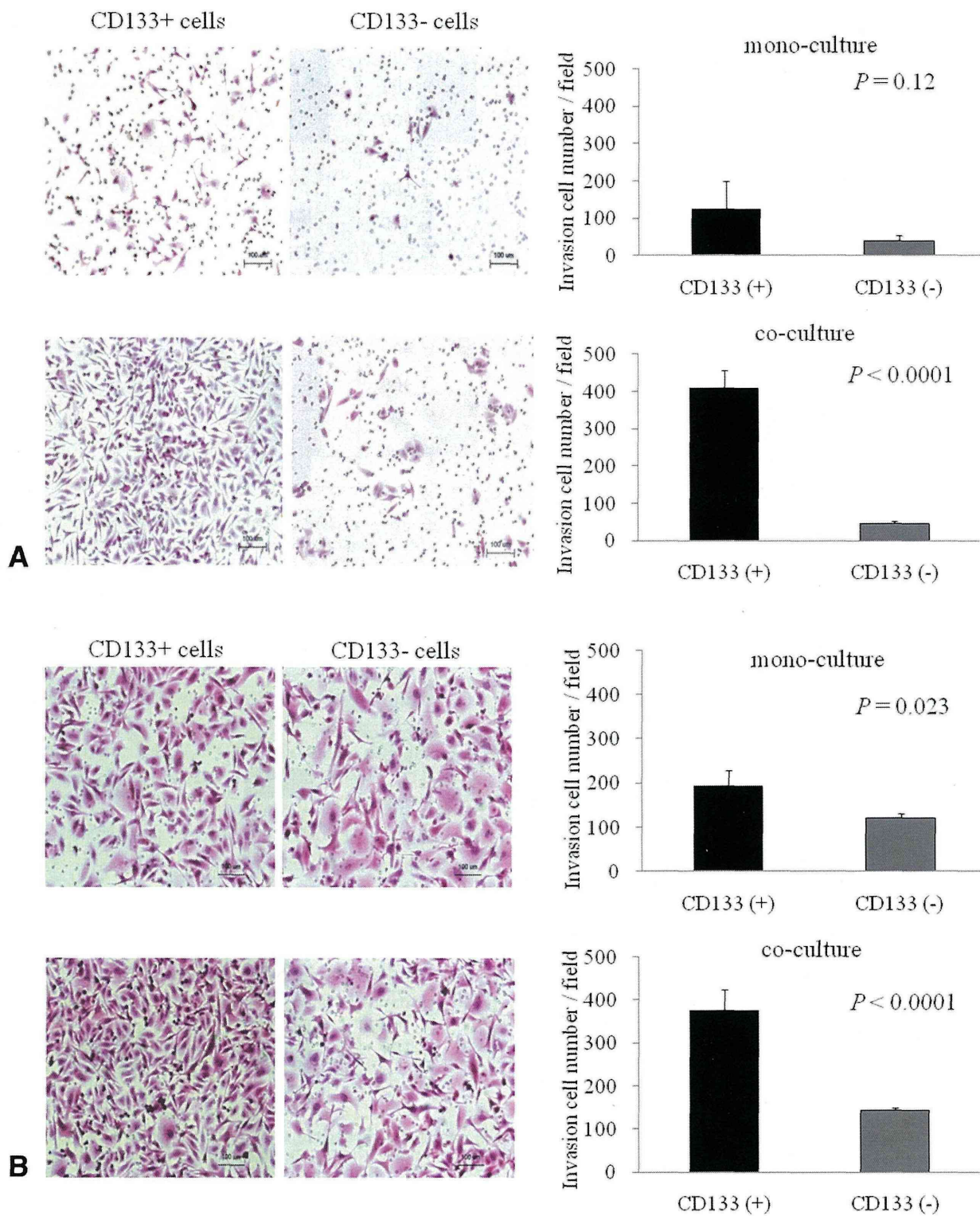


Figure 3. (Continued).