

口腔癌幹細胞を標的とした新規診断治療法の可能性

杉浦 剛

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
先進治療科学専攻 顎顔面機能再建学講座 顎顔面疾患制御学分野

The possibilities for utility of oral cancer stem cells as new diagnostic and therapeutic targets

Tsuyoshi Sugiura

Department of Maxillofacial Diagnostic and Surgical Science, Field of Oral and Maxillofacial Rehabilitation,
Advanced Therapeutic Course, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

ABSTRACT

The accumulating evidences that cancer stem cells (CSCs) involve in cancer invasion and metastasis gives us the concept of CSC targeted therapy. We have reported the involvement of epithelial–mesenchymal transition (EMT) and CSCs in invasion and metastasis model *in vivo* and *in vitro* with established adenoid cystic carcinoma (AdCC) cell lines. In this model, highly metastatic AdCC cell line shows not only the character of EMT, but also sphere forming ability and high expression of EMT related genes, stem cell markers and differentiation markers suggesting cancer stem cell (CSC) involved in EMT of AdCC. Surprisingly, silencing of T-box transcription factor Brachyury by shRNA results in down regulation of all EMT and stem cell markers. In addition, sphere forming ability, EMT character and tumorigenesis *in vivo* are simultaneously lost. We have also reported that Brachyury is a reliable prognostic factor for patients with oral carcinoma. We conclude that EMT directly link to CSC, and Brachyury is a one of the central regulator of EMT and CSC. These results suggest the possibility that Brachyury could be a possible diagnostic and therapeutic target for anti-CSC therapy for oral carcinoma in future.

Key words: cancer stem cell, epithelial–mesenchymal transition, Brachyury

I. 緒言

癌の動態は一様でなく、同一個体における癌組織をとってもその中に多様な形質発現をした細胞集団が存在することは、臨床的にも実験的にも証明されている。さらに限界希釈法で単一の細胞由来から樹立したモノクローナルな培養癌細胞株から、*in vitro*においても、*in vivo*、特に実験的動物転移モデルにおいても

高浸潤能を獲得し、転移をおこす細胞が分離されることがその実例である。つまり、癌組織が発生当初、遺伝子異常をきたした少数の細胞集団から構成されていたとしても、その発育過程において様々な形質を有する細胞集団に成長すると考えられる。このことは組織発生における“分化”のプロセスに近似している。癌細胞の集団の中に特別な性質（造腫瘍性、高転移性な

ど)を持つ細胞集団が存在するのではないかという考え方は古くから提唱されており、正常組織幹細胞や造血幹細胞の発見とともに、これらの特別な細胞集団を「癌幹細胞」と考えるようになった¹⁾。

しかし一方で、組織幹細胞が発見されていない組織もあることから、未だに癌幹細胞の存在については異論が存在する。本稿では癌幹細胞についてその性格や定義を整理するとともに、われわれの最新の知見を概説し、治療への展開の可能性について述べる。

II. 癌幹細胞の存在の証明

腫瘍組織の中に自己複製能をもつ細胞集団が存在することは白血病幹細胞の存在の発見で証明されている。ヒト白血病細胞の中には免疫不全マウスにAML(急性骨髄性白血病)を発症させる白血病幹細胞が非常にわずかな頻度で存在する。この非常に稀な細胞集団は正常造血幹細胞と同様にCD34⁺CD38⁻の性質をもち、フローサイトメトリーで分取される。他の白血病細胞はAMLを発症させる能力がなく、自己複製能力がないと考えられる。すなわち、白血病幹細胞の、自己複製能と共に多様な白血病細胞への分化メカニズムが存在することを示唆している²⁾。これは造血幹細胞における分化システムと同様である。同じような考え方から細胞表面マーカーの発現を利用した固形腫瘍(乳癌^{3,4)}、大腸癌^{5,6)}、頭頸部扁平上皮癌⁷⁾など)からの癌幹細胞の存在の報告が相次いだ。しかし、このような細胞表面マーカーを利用した癌幹細胞の分取には考慮すべき問題が存在する。細胞表面マーカーにより純化した細胞集団はマウスに接種し、造腫瘍性が検討されるが、この細胞集団が単にマウスにおいて生着しやすいか否かを見ているだけではないかとの議論がある。

さらに、腫瘍内の細胞集団の多様性は、造血細胞のように多様性への分化機構によっても説明できるが、従来から個々の細胞は様々な障害をうけており様々な遺伝子異常が様々な程度に蓄積するために多様化するという確率論的モデルが存在している。

2006年のAACR(American Association for Cancer Research)では、癌幹細胞の定義として「腫瘍内で自己複製能と腫瘍を構成する様々な分化系統の癌細胞を生み出す能力を持つ細胞」であり、「持続的に拡大する腫瘍の形成を繰り返す能力によって、実験的にのみ定義され得る」と説明した⁸⁾。すなわちこのレポートを解釈すると、癌幹細胞の具備すべき要件は、①造腫瘍性を持つ ②自己複製能がある ③様々な性格を有

する癌細胞へ変化する。ということになる。さらに近年、分離した癌幹細胞様細胞が非対称性分裂をすることが視覚的に証明され、癌幹細胞の存在が証明されたと言える⁹⁾。

我々は、腺様嚢胞癌細胞株を用いた動物自然転移モデルを作成することを目的に、腺様嚢胞癌細胞株ACCSにGFPを発現させたACCS-GFPを用い、ヌードマウスの舌に様々な条件で腫瘍の接種を行った。その結果、腺様嚢胞癌細胞株ACCS-GFPは造腫瘍性を持たないが、ある一定条件以上の細胞数をマトリゲルに浮遊させて接種した場合にのみ、わずかに約17%で腫瘍形成が認められることが明らかとなった。造腫瘍性の高い細胞を得るため、ACCSにGFPを発現させたACCS-GFPを用い、再度舌に同様の条件で接種し、形成された腫瘍を再度培養皿上で培養することをくりかえした(*in vivo selection*)。これにより100%の造腫瘍性を持ったACCST-GFPが樹立された。興味深いことに、ACCST-GFPは約30%に顎下リンパ節に転移をきたし、これをGFPの発光で確認することができた。さらに原発巣からの*in vivo selection*を繰り返行くと、100%の顎下リンパ節転移をきたすACCSM-GFPを樹立できた。これらのマウスには約60%に肺転移が存在していた¹⁰⁾。

この実験結果は親株ACCS-GFPの細胞集団の中に、ごく一部の造腫瘍性を有する細胞集団が存在し、*in vivo selection*によって純化されたことを示している。さらに、造腫瘍性を持つ細胞集団の中に、リンパ節転移をきたす細胞集団も存在しており、造腫瘍性を指標としたセレクションを繰り返すだけで転移率が増加したことから、造腫瘍性を持つ限られた細胞集団の中にもさらに階層化があることを示唆している。ACCSM-GFPはスフェア形成実験で著明なスフェア形成能を示したことから、前項の三つの条件をみたし、腺様嚢胞癌幹細胞をリッチに含む細胞集団であると考えられた。さらに、幹細胞のマーカーについてReal-time PCRを用いて発現を検討した。胚性幹細胞のマーカー(Nodal, Lefty, Oct-4, Pax6, Rex1, Nanog)、体性幹細胞マーカー(未分化マーカー)(SOX2, Brachyury, AFP)は、いずれもACCSM-GFPにおいて親株の2~9倍の発現を示した¹¹⁾。

III. 癌幹細胞の由来とは(癌幹細胞と癌細胞における上皮間葉移行)

癌幹細胞は組織幹細胞が癌化したものだと考えられている。すなわち、癌組織における癌細胞形質の不均

一性は、癌幹細胞の各段階の分化程度の細胞が混在することによって生じているという考え方である。ところが、正常上皮細胞においては最終分化状態にあるような細胞が上皮としての性格を失い、間葉系の組織に形質転換し幹細胞様に変化する現象が、特に発生段階において知られている。これが上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) である。正常組織における EMT は、リプログラミングと呼ばれる機構により制御されている。近年、癌細胞においても EMT の現象が認められること、EMT をおこした癌細胞が幹細胞に極めて類似した遺伝子発現をしていること^{12, 13)}、実験的に EMT を起こした癌細胞が幹細胞様の性質を有すること^{14, 15)} から、分化の進んだ細胞から発生した癌細胞が、正常細胞におけるリプログラミングに類似した機転で EMT を起こし、高分化な癌細胞からの癌幹細胞を発生させているのではないかと仮説されている。EMT の重要な現象として、上皮系のマーカーである E-cadherin の消失と間葉系マーカーである vimentin の増加が特徴的である^{16, 17)}。これにより、腫瘍細胞の細胞間接着が阻害され、腫瘍細胞は原発巣からの逸脱が可能になる。そのため、EMT は非転移性腫瘍が転移性腫瘍に転換するための、重要なステップと考えられている¹⁸⁾。このように、浸潤転移過程における EMT も癌幹細胞が中心となったイベントであると考えると非常に説明しやすい。

我々の実験系でも ACCS-GFP (親株)、ACCST-GFP (造腫瘍性)、ACCSM-GFP (造腫瘍性高転移) をウエスタンブロットにより、E-cadherin および vimentin の発現比較をおこなうと、E-cadherin は ACCSM-GFP のみ発現が完全に消失しており、vimentin は ACCS-GFP、ACCST に比べ、ACCSM-GFP において強い発現が認められた。さらに E-cadherin の裏打ち蛋白である β -catenin は ACCSM-GFP では細胞膜から細胞質にシフトが認められた。EMT 関連遺伝子 (snail, Twist1, Twist2, slug, ZEB1, ZEB2, GSK3 β および TGF- β 2)¹⁹⁻²³⁾ は、いずれも ACCSM-GFP において親株の 2~3 倍の発現を示した。

以上より、ACCSM-GFP は ACCS-GFP が EMT をおこした状態であると考えられる。ACCSM-GFP が癌幹細胞様形質を持つことから、他の研究者の主張と同様に、癌幹細胞様細胞は EMT の現象と本質的に同一で、本腫瘍の悪性形質に寄与していると考えられる。

IV. Brachyury・・・癌幹細胞を標的とした治療の可能性

癌幹細胞は一般に、抗がん剤に対する薬剤耐性成立しており、放射線感受性が低下していることがよく知られている^{15, 24)}。臨床上認められる、放射線化学療法による完治症例における再発は、癌幹細胞が関与していると考えられている。すなわち、癌幹細胞から派生した癌細胞は抗がん剤に反応するし、放射線によっても反応して十分な治療効果を示すが、癌幹細胞に対してはこのいずれも効果が十分でない為、放射線化学療法からエスケープして生存する。この細胞が再発腫瘍を生じさせる。再発腫瘍は放射線化学療法に対する耐性が成立しているため治療は極めて困難となる。さらに外科的治療によって切除断端の検索で腫瘍細胞が検出されなくても再発や転移を起こす症例にも癌幹細胞が関与している可能性がある。癌幹細胞は EMT 様形質を示す為、原発巣から離脱し、間質中を遊走し、外科的切除からエスケープする。さらに、このような癌幹細胞は早期に脈管に侵入する。癌幹細胞は自己複製能があるため着床せずとも脈管中で増殖しスフェアを形成し、腫瘍塞栓をおこし転移巣を形成すると考えられる。これらの事実は癌幹細胞を治療の標的とする新しい治療法の根拠となっている。

さて、癌幹細胞標的治療のアプローチとしては次のような方法が考えられる。

1. 癌幹細胞に特異的な表面抗原を用いたモノクローナル抗体による治療
2. 癌幹細胞の自己複製能の維持に必要な細胞内シグナルの阻害 (分化誘導を含む)
3. 癌幹細胞のもつ薬剤耐性や放射線耐性を克服した上での化学療法

上記のアプローチに用いる分子標的は正常細胞では発現しないことが望まれ、さらに癌病巣に選択的に輸送するシステムも考慮されるべきであろう。

このような考え方から、我々は癌幹細胞様細胞を含む ACCSM-GFP を用いて、癌幹細胞の幹細胞形質を制御する因子の検索を試みた。その理由としては、前述した癌幹細胞標的治療のストラテジーにおいて、癌幹細胞形質を制御する因子が明らかとなれば、これを用いて上記の 2 および 3 を同時に満足させる強力な治療ツールと成り得ると考えたからである。

そこで我々は幹細胞マーカーとして、今回癌幹細胞の検索に使用した遺伝子群に着目した。これらの遺伝子群は全て高転移細胞株 ACCS-M GFP で高発現していた。この遺伝子群の多くは転写因子をコードし、幹

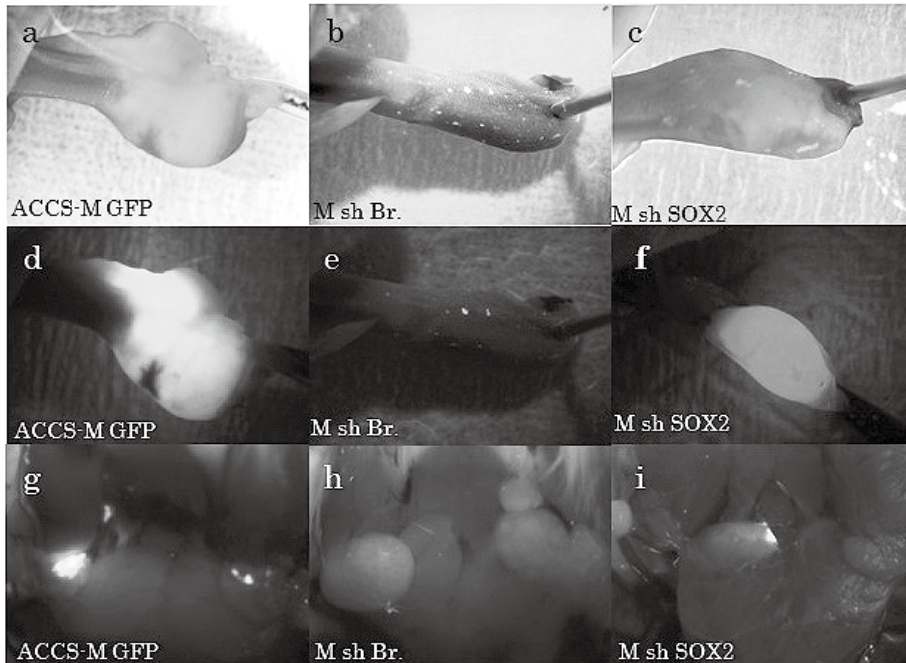


図1. Brachyury ノックダウンによる造腫瘍性・転移能の抑制

ACCS-M GFP (a, d, g), ACCS-M GFP に対する Brachyury ノックダウン M sh Br (b, e, h), ACCS-M GFP に対する SOX2 ノックダウン M sh SOX2 (c, f, i) をヌードマウス舌に接種した。その後舌 (a-f), 顎下リンパ節 (g-i) を摘出し、転移の有無を470nmの励起光下で観察し、腫瘍形成と転移の有無を検出した。肺の微小転移巣を○印で示す。(Shimoda, M., Sugiura, T. *et al.* BMC cancer, 12, 377. 2012. より改変)

細胞機能の根底に関与していることが予想される。この中でも、Fernando らは2010年に T-box 転写因子である Brachyury が腫瘍細胞において EMT を誘導していることを報告している²⁵⁾。そこで腺様嚢胞癌幹細胞様細胞である ACCS-M GFP に対して Brachyury shRNA (short hair-pin RNA) を遺伝子導入することによって Brachyury をノックダウンし、EMT および癌幹細胞形質が変化するか否か検討した。その結果、Brachyury ノックダウンによって、1. 全ての幹細胞マーカーの減弱が認められた。2. EMT の現象が消失した。3. スフェア形成能が著しく低下した。4. マウスにおける造腫瘍性が消失した (図1)。一方で、SOX2などの iPS 細胞作製に重要な遺伝子をノックダウンしてもこれらの効果は Brachyury ノックダウンほど強力ではなかった¹¹⁾。

このことから、Brachyury は癌幹細胞の重要な制御因子であると推察される。

Brachyury は脊椎動物の脊索の分化や後方中胚葉の形成に重要な役割を担うものとして知られている^{26, 27)}。Fernando の報告にもあるように、Brachyury は、

ヒトの癌細胞において、E-cadherin のプロモーター領域に結合することが知られている Slug の発現を高め、Brachyury 自身も E-cadherin のプロモーター領域に結合することで、互いに協調して E-cadherin の発現を抑制している²⁵⁾。Slug は、E-cadherin の転写抑制とは別に、EMT に特徴的で重要なステップである、デスモゾームによる細胞間結合の破壊を制御していることが示されている^{28, 29)}。つまり Slug は、EMT の最初のステップでは、デスモゾームによる細胞間結合に関与する蛋白質の制御を主に行っており、EMT の最終的なステップでは、Brachyury と共に E-cadherin の制御を行っていると思われる。脊椎動物での発生過程において、Brachyury はさらに、Wnt/PCP シグナル経路、NF κ B や TGF β といったシグナル経路を構成する下流遺伝子を制御している³⁰⁾ ことも考えると、Brachyury が、上皮間葉移行と癌幹細胞に関わる複数のシグナルに同時に関与して制御を行っていると思定される。さらに、Brachyury は発生過程においては重要で高発現を認めるものの、成熟正常組織では発現を認めなくなる。このことは先に述べた癌の治療標的として

Brachyury が適切であることを意味している。

以上のことから、Brachyury ノックダウンによる癌幹細胞標的治療を想定し、Brachyury ノックダウンが薬剤耐性に与える影響、放射線感受性に与える影響を検討した。その結果、癌幹細胞である ACCS-M GFP は抗癌剤耐性および放射線耐性を示し、Brachyury ノックダウンによりこれらの耐性は改善された³¹⁾。薬剤耐性に関わる遺伝子には薬剤排泄に関わる ABC ファミリー遺伝子、薬剤流入に関わる SLC ファミリー遺伝子がある。これらの遺伝子群の発現を検討すると、ABC ファミリー遺伝子は癌幹細胞である ACCS-M GFP でわずかに増加しているのみであった。一方、薬剤耐性の確立に細胞内への薬剤流入に重要であるとされる SLC19A1 の遺伝子発現が著明に低下しており、癌幹細胞では抗癌剤の細胞内流入が抑制されていることが確認された。この SLC19A1 の低下は Brachyury ノックダウンにより親株と同等レベルに回復した。さらに Brachyury による薬剤耐性については

さらに、Brachyury による細胞周期調節機構も関与している可能性がある。Huang らは Brachyury が癌幹細胞の細胞周期を静止期である G₀ 期に維持するために重要であることを示した³²⁾。化学療法も放射線治療も細胞周期にある細胞に対し治療が細胞障害性を発揮することによって効果をもつ。細胞周期上のチェックポイントが癌細胞では機能しておらず、細胞障害を受けた細胞は M 期になるとアポトーシスをおこす。Brachyury が細胞周期を制御する機能は、癌幹細胞の化学放射線療法に対する耐性の根本的なメカニズムかもしれない。

以上より Brachyury を分子標的として癌幹細胞制御を行うことにより、従来の放射線化学療法が癌幹細胞に対する効果を発揮すると考えられる。

V. 診断治療への展開

Brachyury のような強力な標的分子は診断や治療に有効であると想像されるが、実際に口腔癌で発現して

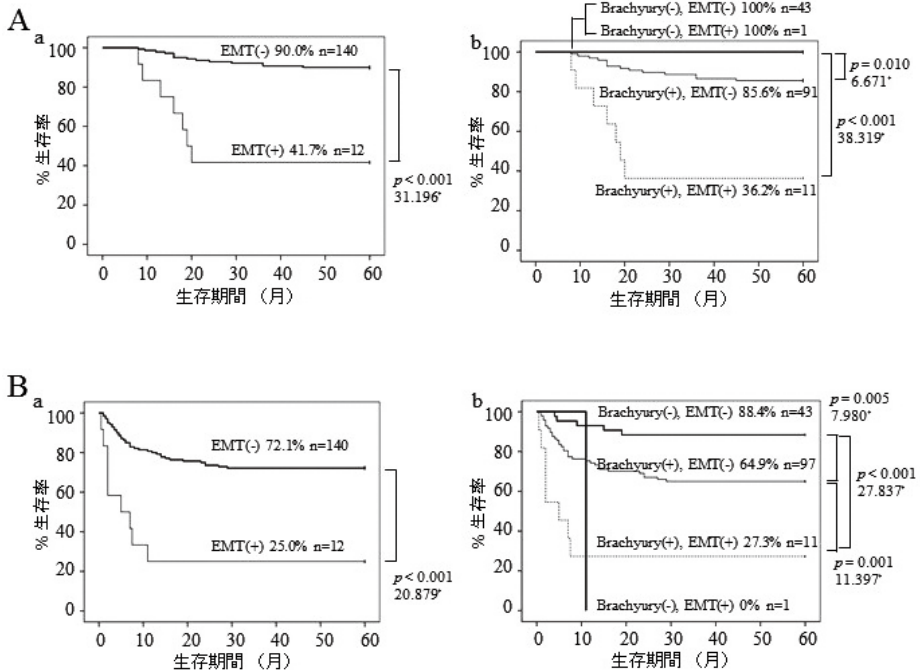


図2. SCCにおけるBrachyury発現、EMTと生存率との相関

Kaplan-Meier 法にて Brachyury 発現、EMT の有無と 5 年生存率の相関を調べた。染色結果をもとに陰性群、陽性群に分類して検討したところ、EMT の有無、Brachyury 発現および EMT の有無と 10 年生存率、無病生存率に負の相関を認めた。(Imajyo, I., Sugiura, T. *et al.* International journal of oncology, 41, 1985-1995. 2012. より改変)

A: 生存率 B: 無病生存率

a: EMT の有無 b: Brachyury の発現および EMT の有無

*: Chi-square statistic

いるのであろうか。そこで口腔扁平上皮癌患者152名の生検材料を用いて免疫染色法により Brachyury もしくは EMT を検出し、予後との相関を検討した³³⁾。Brachyury 発現と関連を認めたものは、腫瘍の大きさ (T 分類)、リンパ節転移、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式 (いずれも $p < 0.05$) であった。ロジスティック解析を行うとこの中でもリンパ節転移と最も強く相関し、オッズ比4.390 ($p = 0.001$) であった。さらに、5年生存率において、Brachyury 陽性群 (80.6%) は Brachyury 陰性群 (100%) より有意に生存率が低かった ($p = 0.002$)。E-cadherin 陰性 (-) 群 (75.0%) は E-cadherin 陽性 (+) 群 (91.1%) および強陽性 (++) 群 (91.7%) に比較して有意に生存率が低かった ($p = 0.032, p = 0.027$)。Vimentin 強陽性 (++) 群 (54.5%) は Vimentin 陰性 (-) 群 (90.3%) に比較して有意に生存率が低かった ($p < 0.001$)。さらに EMT, Brachyury 発現および EMT と 5 年生存率、5 年無病生存率の相関を検討した (図 2)。EMT 陰性 (-) 群 (5 年生存率 90.0%, 無病生存率 72.1%) に比較して EMT 陽性 (+) 群 (5 年生存率 41.7%, 無病生存率 25.0%) で顕著な生存率の低下を認めた (ともに $p < 0.001$)。また、Brachyury 陽性 (+) かつ EMT 陽性 (+) 群 (5 年生存率 36.2%, 無病生存率 27.3%) は、Brachyury 陰性 (-) かつ EMT 陰性 (-) 群 (5 年生存率 100%, 無病生存率 88.4%) に比較して生存率が有意に低かった (ともに $p < 0.001$)。このことから Brachyury が実際の生体においても機能し、予後因子となり得ること、さらに治療標的となり得ると考えられた。

しかし Brachyury を治療標的とすることにはおおきな障壁がある。何故なら現在分子標的薬の主流は抗体製剤であり、全て細胞表面分子を標的としている。一方 Brachyury は細胞質内もしくは核に存在する為抗体製剤は機能しない。すなわち Brachyury を制御するためには遺伝子制御が必要である。In vitro レベルでは先に述べたような遺伝子ノックダウンは遺伝子導入技術を用いて可能であるが、生体における遺伝子ノックダウンは困難である。生体への遺伝子導入においては導入遺伝子のサイズが小さく安定で、導入効率が大きく、さらにその運搬役であるキャリア自体も有毒でなく安定であることが求められる。現在、キャリアの選定、遺伝子抑制のツールについて検討しており、鹿児島大学発の新規治療薬の開発に向け、更なる戦略を推進していく予定である。

参考文献

- 1) Wicha, M.S., S. Liu, and G. Dontu: Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res*, 66, 1883-1890; discussion 1895-1886. 2006.
- 2) Bonnet, D., and J.E. Dick: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3, 730-737. 1997.
- 3) Al-Hajj, M., M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, and M.F. Clarke: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3983-3988. 2003.
- 4) Yu, F., H. Yao, P. Zhu, X. Zhang, Q. Pan, C. Gong, Y. Huang, X. Hu, F. Su, J. Lieberman, and E. Song: let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 131, 1109-1123. 2007.
- 5) Bao, S., Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, and J.N. Rich: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444, 756-760. 2006.
- 6) Ricci-Vitiani, L., D.G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, and R. De Maria: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445, 111-115. 2007.
- 7) Prince, M.E., R. Sivanandan, A. Kaczorowski, G.T. Wolf, M.J. Kaplan, P. Dalerba, I.L. Weissman, M.F. Clarke, and L.E. Ailles: 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, 973-978. 2007.
- 8) Clarke, M.F., J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H. Jamieson, D.L. Jones, J. Visvader, I.L. Weissman, and G.M. Wahl: Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66, 9339-9344. 2006.
- 9) Tamari, K., K. Hayashi, H. Ishii, Y. Kano, M. Konno, K. Kawamoto, N. Nishida, J. Koseki, T. Fukusumi, S. Hasegawa, H. Ogawa, A. Hamabe, M. Miyo, K. Noguchi, Y. Seo, Y. Doki, M. Mori, and K. Ogawa: Identification of chemoradiation-resistant osteosarcoma stem cells using an imaging system for proteasome activity. *International journal of oncology*, 45, 2349-2354. 2014.
- 10) Ishii, K., M. Shimoda, T. Sugiura, K. Seki, M.

- Takahashi, M. Abe, R. Matsuki, Y. Inoue, and K. Shirasuna: Involvement of epithelial-mesenchymal transition in adenoid cystic carcinoma metastasis. *Int J Oncol*, 38, 921-931. 2011.
- 11) Shimoda, M., T. Sugiura, I. Imajyo, K. Ishii, S. Chigita, K. Seki, Y. Kobayashi, and K. Shirasuna: The T-box transcription factor Brachyury regulates epithelial-mesenchymal transition in association with cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma cells. *BMC cancer*, 12, 377. 2012.
 - 12) Aktas, B., M. Tewes, T. Fehm, S. Hauch, R. Kimmig, and S. Kasimir-Bauer: Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 11, R46. 2009.
 - 13) DiMeo, T.A., K. Anderson, P. Phadke, C. Fan, C.M. Perou, S. Naber, and C. Kuperwasser: A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res*, 69, 5364-5373. 2009.
 - 14) Mani, S.A., W. Guo, M.J. Liao, E.N. Eaton, A. Ayyanan, A.Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C.C. Zhang, M. Shipitsin, L.L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R.A. Weinberg: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133, 704-715. 2008.
 - 15) Sarkar, F.H., Y. Li, Z. Wang, and D. Kong: Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir*, 64, 489-500. 2009.
 - 16) Iwatsuki, M., K. Mimori, T. Yokobori, H. Ishi, T. Beppu, S. Nakamori, H. Baba, and M. Mori: Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci*, 101, 293-299. 2010.
 - 17) Wells, A., C. Yates, and C.R. Shepard: E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis*, 25, 621-628. 2008.
 - 18) Micalizzi, D.S., and H.L. Ford: Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer. *Future Oncol*, 5, 1129-1143. 2009.
 - 19) Liu, Y., F. Ye, Q. Li, S. Tamiya, D.S. Darling, H.J. Kaplan, and D.C. Dean: Zeb1 represses Mitf and regulates pigment synthesis, cell proliferation, and epithelial morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 5080-5088. 2009.
 - 20) Kurrey, N.K., S.P. Jalgaonkar, A.V. Joglekar, A.D. Ghanate, P.D. Chaskar, R.Y. Doiphode, and S.A. Bapat: Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells*, 27, 2059-2068. 2009.
 - 21) Niessen, K., Y. Fu, L. Chang, P.A. Hoodless, D. McFadden, and A. Karsan: Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol*, 182, 315-325. 2008.
 - 22) Wendt, M.K., T.M. Allington, and W.P. Schiemann: Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol*, 5, 1145-1168. 2009.
 - 23) Wellner, U., J. Schubert, U.C. Burk, O. Schmalhofer, F. Zhu, A. Sonntag, B. Waldvogel, C. Vannier, D. Darling, A. zur Hausen, V.G. Brunton, J. Morton, O. Sansom, J. Schuler, M.P. Stemmler, C. Herzberger, U. Hopt, T. Keck, S. Brabletz, and T. Brabletz: The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol*, 11, 1487-1495. 2009.
 - 24) Al-Assar, O., R.J. Muschel, T.S. Mantoni, W.G. McKenna, and T.B. Brunner: Radiation response of cancer stem-like cells from established human cell lines after sorting for surface markers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 75, 1216-1225. 2009.
 - 25) Fernando, R.I., M. Litzinger, P. Trono, D.H. Hamilton, J. Schlom, and C. Palena: The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. *J Clin Invest*, 120, 533-544. 2010.
 - 26) Kispert, A., B.G. Herrmann, M. Leptin, and R. Reuter: Homologs of the mouse Brachyury gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium*, and *Locusta*. *Genes Dev*, 8, 2137-2150. 1994.
 - 27) Vidricaire, G., K. Jardine, and M.W. McBurney: Expression of the Brachyury gene during mesoderm development in differentiating embryonal carcinoma cell cultures. *Development*, 120, 115-122. 1994.
 - 28) Lindley, L.E., and K.J. Briegel: Molecular

- characterization of TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition in normal finite lifespan human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 399, 659-664. 2010.
- 29) Savagner, P., D.F. Kusewitt, E.A. Carver, F. Magnino, C. Choi, T. Gridley, and L.G. Hudson: Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol*, 202, 858-866. 2005.
- 30) Savagner, P., K.M. Yamada, and J.P. Thiery: The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 137, 1403-1419. 1997.
- 31) Kobayashi, Y., T. Sugiura, I. Imajyo, M. Shimoda, K. Ishii, N. Akimoto, N. Yoshihama, and Y. Mori: Knockdown of the T-box transcription factor Brachyury increases sensitivity of adenoid cystic carcinoma cells to chemotherapy and radiation in vitro: implications for a new therapeutic principle. *International journal of oncology*, 44, 1107-1117. 2014.
- 32) Huang, B., J.R. Cohen, R.I. Fernando, D.H. Hamilton, M.T. Litzinger, J.W. Hodge, and C. Palena: The embryonic transcription factor Brachyury blocks cell cycle progression and mediates tumor resistance to conventional antitumor therapies. *Cell death & disease*, 4, e682. 2013.
- 33) Imajyo, I., T. Sugiura, Y. Kobayashi, M. Shimoda, K. Ishii, N. Akimoto, N. Yoshihama, I. Kobayashi, and Y. Mori: T-box transcription factor Brachyury expression is correlated with epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*, 41, 1985-1995. 2012.