

アポトーシス抵抗性ヒト乳癌細胞の階層的再構成における  
癌幹細胞マーカーALDH1A3 と Sox-2 の発現誘導

Induced expression of cancer stem cell markers ALDH1A3 and Sox-2 in  
hierarchical reconstitution of apoptosis-resistant human breast cancer cells

柏井 香輪  
(KASHII Karin)

同志社女子大学大学院

薬学研究科 医療薬学専攻

アポトーシス抵抗性ヒト乳癌細胞の階層的再構成における

癌幹細胞マーカーALDH1A3 と Sox-2 の発現誘導

Induced expression of cancer stem cell markers ALDH1A3 and Sox-2 in  
hierarchical reconstitution of apoptosis-resistant human breast cancer cells

柏井 香輪

(KASHII Karin)

同志社女子大学大学院

薬学研究科 医療薬学専攻

# 目次

1 要 旨 .....	- 1 -
2 序 文 .....	- 2 -
3 研 究 方 法.....	- 3 -
4 結 果 .....	- 5 -
5 考 察 .....	- 19 -
6 結 論 .....	- 21 -
7 参 考 文 献.....	- 22 -
8 謝 辞 .....	- 28 -

## 〔要旨〕

治療抵抗性を示す癌細胞集団における癌幹細胞の存在とその集団の階層的再構成過程を明らかにすることを目的とする。ヒト乳癌培養細胞株 HCC1937 を用いて、doxycycline(以下 dox)で p53 依存性アポトーシスを誘導可能な *in vitro* の実験系を作成し、アポトーシス抵抗性を示す細胞について、免疫細胞化学染色、免疫蛍光染色および Fluorescence-activated cell sorting (以下 FACS)によって乳癌幹細胞関連遺伝子 ALDH1A3、Sox-2、管腔前駆細胞関連マーカーGATA3、および細胞増殖マーカーKi-67 の発現パターンを経時的に解析した。

dox 投与後のアポトーシスによって、HCC1937/p53 細胞の総数は減少したが、免疫細胞化学染色では dox1d において乳癌幹細胞マーカーである ALDH1A3 を発現する ALDH1A3+細胞の数は増加し、その細胞は細胞長径 50  $\mu$  m 未満の小型細胞の多くがみられた。control 細胞における ALDH1A3+細胞の割合が、45.8%と高い値を示したことから、癌幹細胞以外での ALDH1A3 の発現の可能性が推定される。増殖マーカーである Ki-67 を使った二重免疫細胞化学染色では、dox1d において ALDH1A3+/Ki-67+細胞数の顕著な増加がみられ、さらに免疫蛍光二重染色でも、ALDH1A3/Ki-67 の共発現を示す細胞が確認され、ALDH1A3 は癌幹細胞のみならず前駆細胞にも発現することが明らかになった。GATA3 の経時的な発現パターンを比較すると、ALDH1A3+細胞の割合は dox1d で増加したのに対して、管腔前駆細胞マーカーである GATA3 を発現する GATA3+細胞の割合は ALDH1A3+細胞よりも遅れて dox5d をピークとして一過性に増加した。dox5d で、免疫蛍光二重染色において ALDH1A3 と GATA3 の共発現を示す細胞が 58.5%の割合で確認された。これらの結果から ALDH1A3 が管腔前駆細胞にも発現する可能性が示唆された。もう一つの癌幹細胞マーカーである Sox-2 の発現は ALDH1A3 発現と正の相関を示し、癌幹細胞のみならず前駆細胞と管腔前駆細胞にもみられたことが明らかになった。今回の実験結果において両者の相違点も明らかになった。dox1d における Sox-2+細胞数が 11 倍の顕著な増加を示したことは、細胞分裂のみでは説明出来ず、Sox-2<sup>-</sup>細胞に発現のスイッチが入り、Sox-2<sup>-</sup>細胞から Sox-2+細胞に変化した可能性があると考えられた。それに対して ALDH1A3+細胞は Sox-2 のような発現の変化ではなく、生き残った細胞の数が 1.5 倍の増加を示したと考えられた。本研究では、癌幹細胞マーカーALDH1A3 と Sox-2、分化マーカーGATA3 および、増殖マーカーKi-67 の発現パターンを比較解析することによって、アポトーシス抵抗性乳癌細胞と癌幹細胞との関係および癌ヒエラルキー再構成におけるこれらの遺伝子の役割が明らかとなった。

## 〔序文〕

乳腺組織における乳管は乳管上皮細胞と筋上皮細胞の 2 種類の細胞から構成されており、乳癌の発生源は主に乳管上皮細胞である [11,13,44]。乳癌細胞が乳管の基底膜を破綻させ、間質に浸潤していくことで、乳癌の転移が生じる [6]。乳癌の転移、再発の原因となる癌幹細胞は腫瘍始原細胞ともいわれ、癌細胞の少数集団を構成している [12,24]。癌幹細胞は自己複製能、多分化能を合わせ持つと定義され、化学療法や放射線療法に抵抗性があるといわれている [4,8,19,37]。乳癌細胞の階層的な構造は幹細胞、前駆細胞、成熟細胞から構成されている [9,21]。乳癌幹細胞は表面マーカー解析によって CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>を示す細胞として分離、同定されている [1]。アルデヒド脱水素酵素 (Aldehyde dehydrogenase:ALDHs)は 19 個のアイソタイプが知られており、細胞質、ミトコンドリア、核内に局在している [24]。ALDHs はアルデヒドからカルボン酸への酸化反応の触媒作用、エステル加水分解作用、抗酸化作用を持つ NAD(P)H の補酵素などの代謝過程において必要不可欠な酵素である [24]。ALDHs は正常幹細胞のみならず有望な腫瘍幹細胞マーカーとして広く使われている [10]。特に ALDHs アイソタイプのひとつである ALDH1A3 はレチノイン酸合成にも関係あり乳癌の臨床的予後マーカーとして知られている [36]。GATA3(GATA-binding protein 3) は乳腺管腔上皮への分化において必要不可欠な zinc-finger 転写因子である [16]。Sox-2 (Sex-determining region Y [SRY] -box binding protein -2)は多能性幹細胞の維持、胚発生の制御において重要な役割を持つ転写因子であり、乳癌幹細胞にも関連があることが報告されている [2,18,39,45]。腫瘍抑制遺伝子 TP53 はストレス条件下で誘導され、細胞周期停止や細胞死を起こす [14,35]。

ヒト乳癌のサブタイプは、遺伝子発現解析によって luminal A、luminal B、HER2-enriched、basal-like の 4 つのタイプに分類される [5]。我々の用いた HCC1937 細胞は basal-like タイプの乳癌由来の培養細胞株で、エストロゲン (ER)、プロゲステロン(PR)、ヒト上皮成長因子受容体 2(HER2)が、陰性、すなわちトリプルネガティブであり、さらに BRCA-1 変異、TP53 変異、治療抵抗性を示す予後が悪いといわれている乳癌由来である [3,22,23]。我々はヒト乳癌細胞集団の階層的再構成における癌幹細胞マーカーALDH1A3 と Sox-2 の発現の役割を明らかにするために p53 誘導によるアポトーシスに抵抗性を示す HCC1937 細胞を用いて両遺伝子の発現パターンを解析した。

## 〔研究方法〕

### p53 誘導可能な HCC1937 細胞の作成と細胞培養

ヒト乳癌細胞系列 HCC1937 は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。HCC1937 細胞に doxycycline で発現誘導可能な wt-p53 プラスミド(Tet-on Advanced system, Clontech, USA) を安定的に遺伝子導入し、分離されたクローンの一つを HCC1937/p53 と名付けて使用した。HCC1937/p53 細胞は 10%FBS(SIGMA, USA)、Zeocin™ (1 µg/mL, InvivoGen, USA)、Penicillin-Streptomycin Mixed Solution(Nacalai tesque, Kyoto, Japan) が含まれている RPMI1640(Nacalai tesque, Kyoto, Japan) 内で培養した。HCC1937/p53 細胞を doxycycline 含有培地で 1~10 日間培養した。そして、その細胞をそれぞれ dox1d~dox10d と名付けた。

### 免疫細胞化学染色

APS コーティングスライドガラス(MATSUNAMI, Japan) 上で培養した細胞を dox 未処理および処理後に 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間、固定し、0.1%TritonX-100 で 10 分間、膜透過処理をした。Sox-2 染色においては、10mM クエン酸緩衝液 (PH6.0) 中でマイクロウェーブによって抗原賦活化を 20 分間行った。その後に 0.3%過酸化水素水/メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼを 10 分間不活性化し、10%正常ヤギ血清(Nichirei, Tokyo, Japan) で 10 分間処理した。一次抗体として、抗 ALDH1A3 抗体 (Purified Rabbit Polyclonal, ABGENT, 1:1000)、抗 GATA3 抗体(Rabbit Polyclonal, abcam, 1:100)、抗 Sox-2 抗体(Mouse Monoclonal, abcam, 1:100) を 4°C で 1 日反応させた。抗 ALDH1A3 抗体については、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体(Nichirei, Tokyo, Japan) を反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(Nichirei, Tokyo, Japan) を使用し、酵素として反応させた。抗 GATA3 抗体、抗 Sox-2 抗体においては、ペルオキシダーゼ標識抗マウス+抗ウサギ IgG 抗体(Histofine Simple Stain Max-PO (MULTI), Nichirei, Tokyo, Japan) を二次抗体に使用し、酵素反応させた。いずれも、DAB (Metal-Enhanced DAB Substrate kit, Thermo Scientific, USA) で発色させた。そして New hematoxylin (MUTO PURE CHEMICALS CO, LTD, Tokyo, Japan) で対比染色し、脱水させ、封入した [29]。ALDH1A3 は細胞質内、GATA3、Sox-2 は核内に染色された細胞をそれぞれ陽性とした。

### 二重免疫細胞化学染色

抗 ALDH1A3 抗体を用いて、上記と同様に一次抗体反応の後、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Histofine Simple Stain AP, Nichirei, Tokyo, Japan) を使用し二次抗体反応、酵素反応させ BCIP®/NBT 溶液(SIGMA-ALDRICH, USA) で発色させた。次に 10mM クエン酸緩衝液 (PH6.0) 中でマイクロウェーブによって抗原賦活化を 20 分間行った。1 時間、37°C で抗 Ki-67 抗体 (Mouse Monoclonal, DAKO, 1:500) を反応させ [42]、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体(Histofine Simple Stain Max-PO (MULTI), Nichirei, Tokyo, Japan) で二次抗体反応、さらに酵素反応させた後、DAB で発色させた。細胞形態はデジタルカメラ (FX380 OLYMPUS, Tokyo, Japan) で捕らえ、FLVFS-LS ソフト

ウェア(Ver.1.11)(OLYMPUS, Tokyo, Japan)で解析した。ALDH1A3 は細胞質内、Ki-67 は核内に染色された細胞を陽性とした。

### **免疫蛍光染色**

抗 ALDH1A3 抗体(Purified Rabbit Polyclonal, ABGENT, 1:50)、抗 Ki-67 抗体 (Mouse Monoclonal, DAKO, 1:500) 抗 GATA3 抗体(Mouse Monoclonal IgG, R&Dsystem,1:50)を 4℃で 1 日一次抗体として反応させた。Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG(Life technologies,USA.1:1000)、Alexa Fluor 680 conjugated goat anti-mouse IgG (Life technologies,USA.1:1000)を蛍光標識二次抗体として用いた [27]。DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole,dihydrochloride,300  $\mu$ g mL) (Molecular Probes, USA)で核染色を行った [28]。蛍光画像は共焦点レーザー顕微鏡(A1,NIKON InSTECH,Tokyo,Japan)で捕らえた。

### **Fluorescence-activated cell sorting=FACS**

抗 p53 抗体 (Mouse Monoclonal,BD Biosciences) を使用した。7-AAD(BD pharmingen™)染色で 20  $\mu$  L、死細胞を識別し除外した。蛍光強度は BD FACS Calibur フローサイトメーター(BD Biosciences)を使用し解析し、データは CELL Quest software (Ver.2.0.1)(BD Biosciences)を使用し解析した。

### **統計解析**

全ての実験は少なくとも 3 回以上、繰り返され、免疫細胞化学染色の解析においてそれぞれのプロットにおいて 200 個以上の細胞を使って調査した。結果は平均±標準偏差で表した。2 個のグループの比較の違いにおいて Student's t-test、2 個以上のグループの比較の違いにおいて Dunnett's 多重比較テストによる ANOVA で解析した (Bell Curve for Excel Ver.2.0) 。0.05 未満の P 値が有意であるとした。

〔結果〕

Fig.1

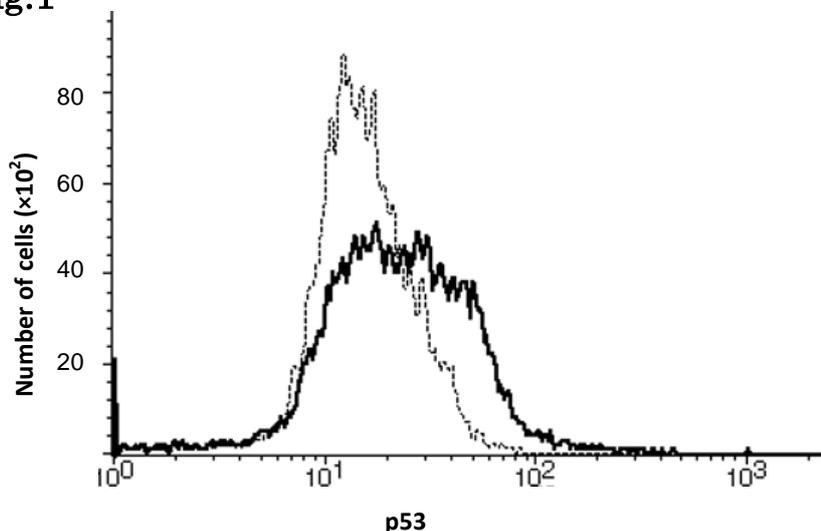


Figure 1: Flow cytometric analysis of induced expression of p53 after 24 hr of doxycycline treatment using anti-p53 antibody.

〈dotted line: dox<sup>-</sup> control, solid line: dox1d〉

#### FACSによる p53 の発現誘導の確認

dox 投与数時間で p53 発現がピークに達し、その後、発現レベルが持続することが確認されているが、dox1d で、p53 の発現が亢進することを FACS で示した (Fig.1)。

#### Growth curve と ALDH1A3 の発現

dox1d から dox10d までの解析でアポトーシスを免れた生細胞の数は、dox1d から dox5d にかけて細胞数は減少し、dox8d から再び増加した (Fig.2B)。HCC1937/p53 細胞数が dox1d で減少したにもかかわらず、免疫細胞化学染色による ALDH1A3<sup>+</sup>細胞数は一過性に増加した (Fig.2 B)。もともと HCC1937/p53 細胞は増殖するにつれて大型細胞が出現し大小混在した集団を形成する特徴をもつことから、細胞長径 50  $\mu$ m 未満を小型細胞、50  $\mu$ m 以上を大型細胞として比較した。ALDH1A3<sup>+</sup>小型細胞の数は dox1d で一過性に増加し dox7d にかけて減少した (Fig.2 A,D)。ALDH1A3 の発現の有無で比較すると ALDH1A3<sup>+</sup>細胞における細胞長径では dox1d は control に比べて小型化の傾向がみられた (\*P<0.001)。さらに、ALDH1A3<sup>+</sup>細胞は dox1d から dox4d にかけて時間依存的に、大型化した (\*P<0.001)。一方、ALDH1A3<sup>-</sup>細胞は dox1d から dox4d まで ALDH1A3<sup>+</sup>細胞より大型であった (#P<0.001)(Fig. 2C)。

Fig. 2A

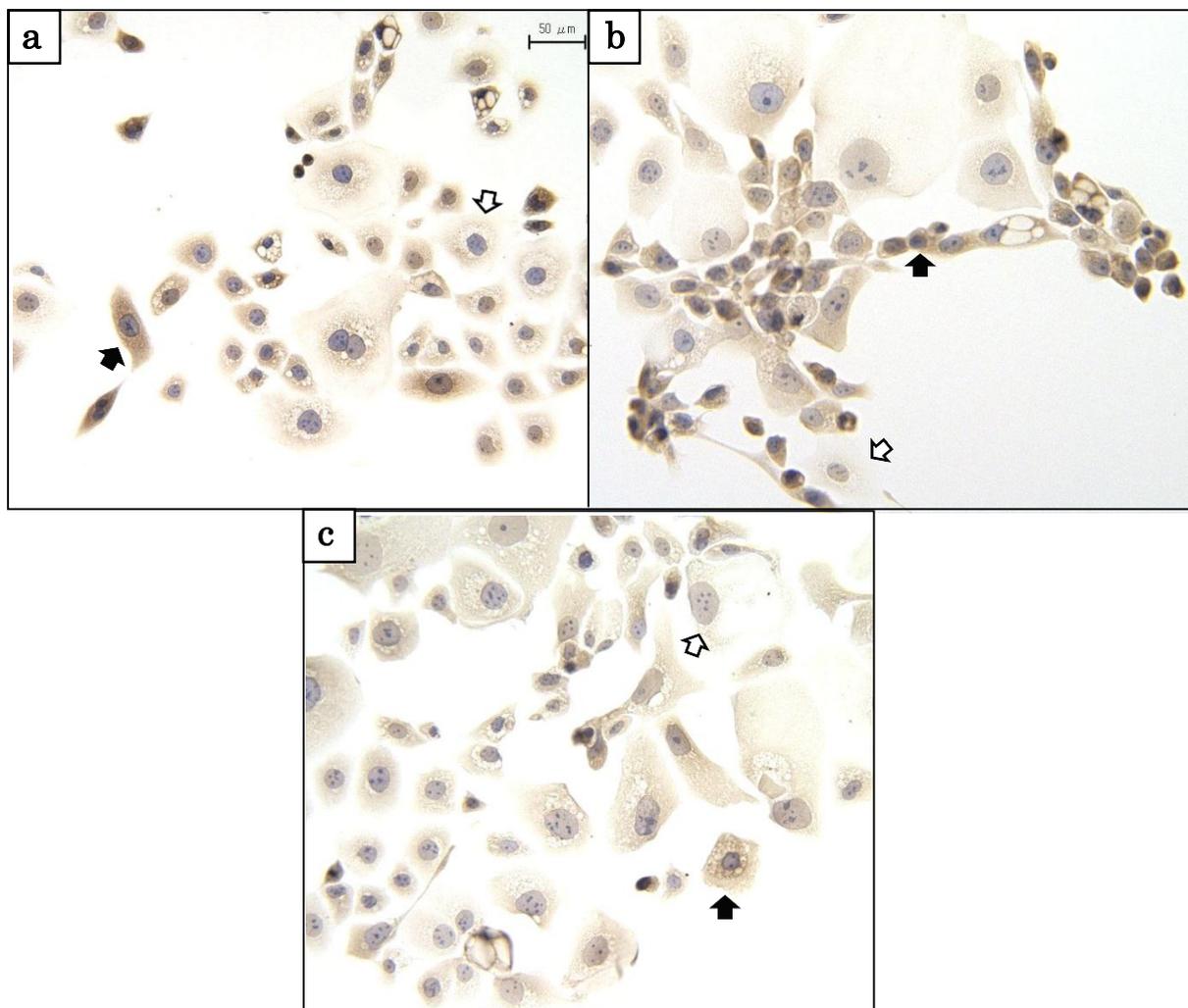
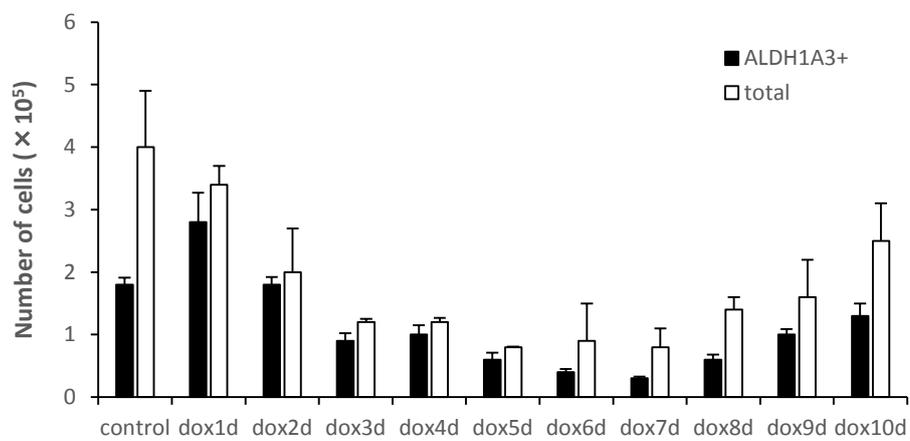
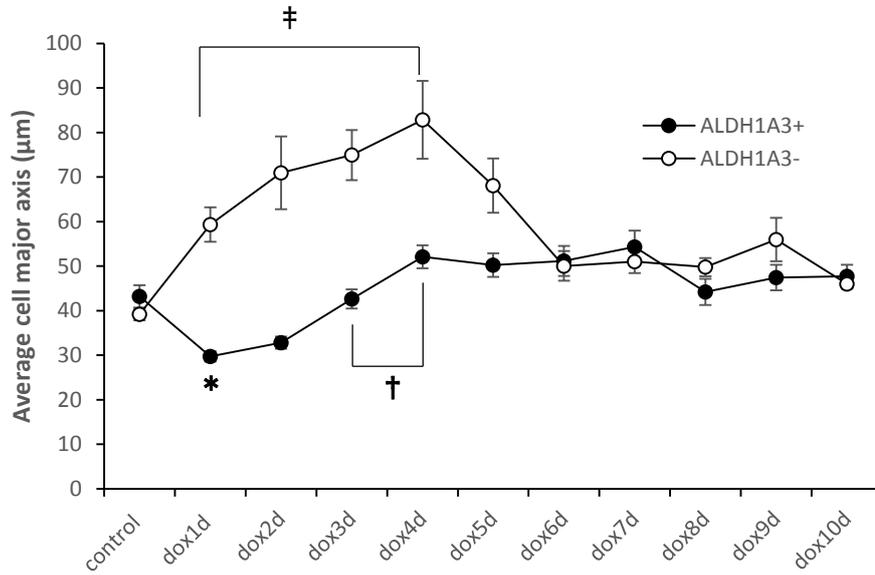


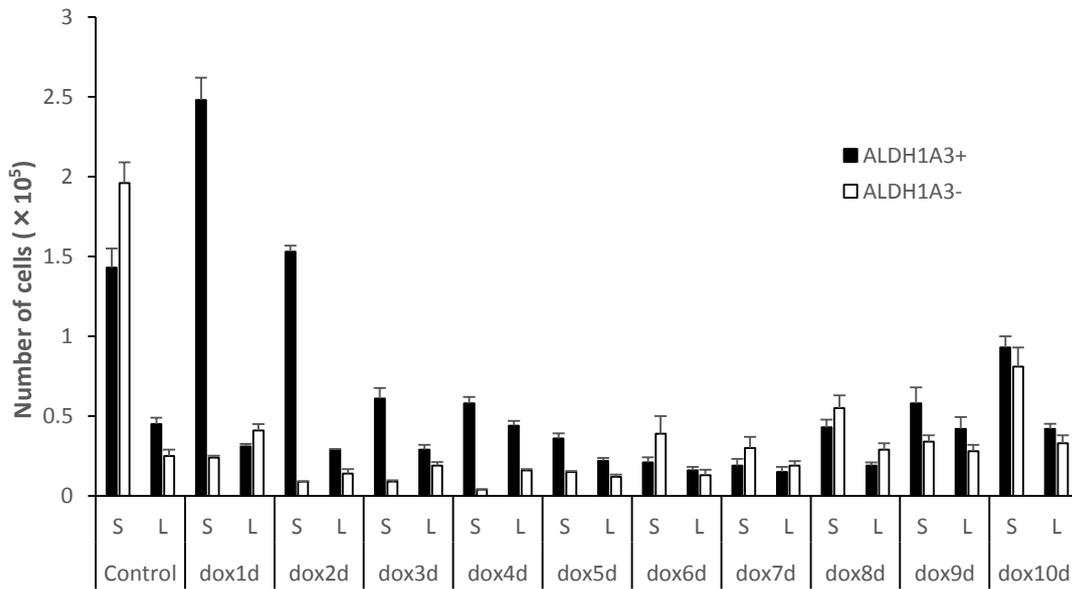
Fig. 2B



**Fig. 2C**



**Fig. 2D**



**Figure 2: Expression patterns of CSC marker, ALDH1A3, in apoptosis-resistant breast carcinoma cells.**

A) Immunocytochemical analysis of ALDH1A3.

Representative images are shown for control (a), dox1d (b) and dox6d (c)

Closed and open arrows indicate ALDH1A3<sup>+</sup> cells and ALDH1A3<sup>-</sup> cells, respectively.

Magnification: ×200

B) The time-course changes of the number of residual ALDH1A3<sup>+</sup> cells after induction of apoptosis by doxycycline treatment. The bar indicates the mean  $\pm$  SD.

C) The time-course changes of average cell major axis in ALDH1A3<sup>+</sup> and ALDH1A3<sup>-</sup> cells after induction of apoptosis by doxycycline treatment. The bar indicates the mean  $\pm$  SEM. \*P<0.001 versus control with student's t-test, †P<0.001 versus dox1d with Dunnett's multiple-comparison test, ‡P<0.001 versus ALDH1A3<sup>+</sup> with student's t-test.

D) Correlation between the cell size and the ALDH1A3 expression patterns.

The bar indicates the mean  $\pm$  SD.

S: small cells(< 50  $\mu$  m) , L: large cells( $\geq$  50  $\mu$  m)

### ALDH1A3 と細胞増殖マーカーKi-67 との関係

次に ALDH1A3 が乳癌幹細胞のみならず分裂する前駆細胞にも発現するかどうかを検討した。その結果、ALDH1A3 は Ki-67<sup>-</sup>細胞の少数集団内で発現し、それは幹細胞に似た特徴と考えられた。二重免疫細胞化学染色において ALDH1A3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup>細胞の総数は、dox1d で増加し、続けて dox3d にかけて減少し、dox7d 以降、再び増加した (Fig.3B)。さらに ALDH1A3 と Ki-67 の発現パターンを細胞サイズ別にみると dox1d における ALDH1A3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup>小型細胞の数は一過性に顕著に増加した (Fig.3A,B)。実際に ALDH1A3 と Ki-67 の免疫蛍光二重染色でも dox7d における同一細胞内での両方の遺伝子を共発現している細胞が検出された (Fig.3D)。ALDH1A3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup>細胞の細胞長径において dox5d は dox1d に比べて大型化の傾向がみられた (\*P<0.001)、一方 ALDH1A3<sup>+</sup>Ki67<sup>-</sup>細胞は dox1d から dox3d まで小型化で dox4d 以降は大型化する傾向がみられた (Fig.3C)。

### ALDH1A3 と分化マーカーGATA3 との関係

次に ALDH1A3<sup>+</sup>細胞における管腔上皮分化誘導マーカーである GATA3 の発現を解析した。ALDH1A3<sup>+</sup>細胞の割合は dox1d で増加し、その後、dox5d まで高い割合が持続した (Fig.4A)。一方、GATA3<sup>+</sup>細胞の割合は ALDH1A3<sup>+</sup>細胞の動きより遅れて dox3d から dox5d にかけて増加し、dox6d から dox9d にかけて減少した (Fig.4A)。同一細胞内で ALDH1A3 と GATA3 の共発現を示す細胞の存在は免疫蛍光二重染色によっても確認された (Fig.4B)。細胞の大きさと GATA3 の発現には正の相関がみられた (Fig.4C)。また、dox2d から dox8d にかけて GATA3<sup>+</sup>細胞は GATA3<sup>-</sup>細胞に比べて細胞の大きさが顕著に大きくなる傾向がみられた (\*P<0.001) (Fig.4D,E)。

Fig. 3A

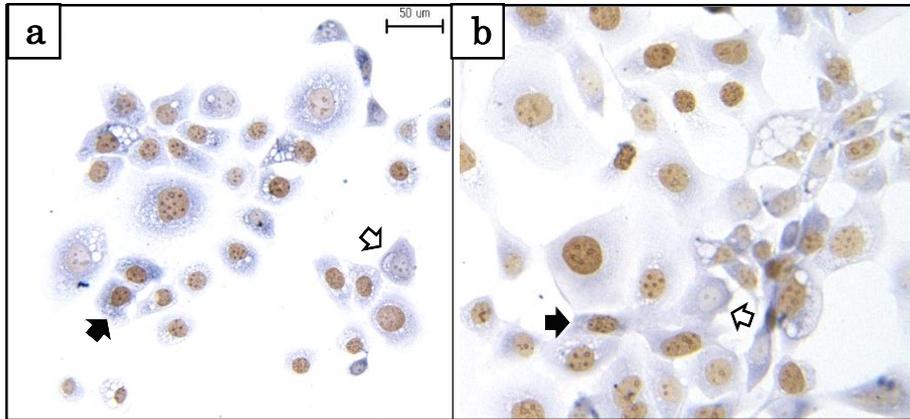
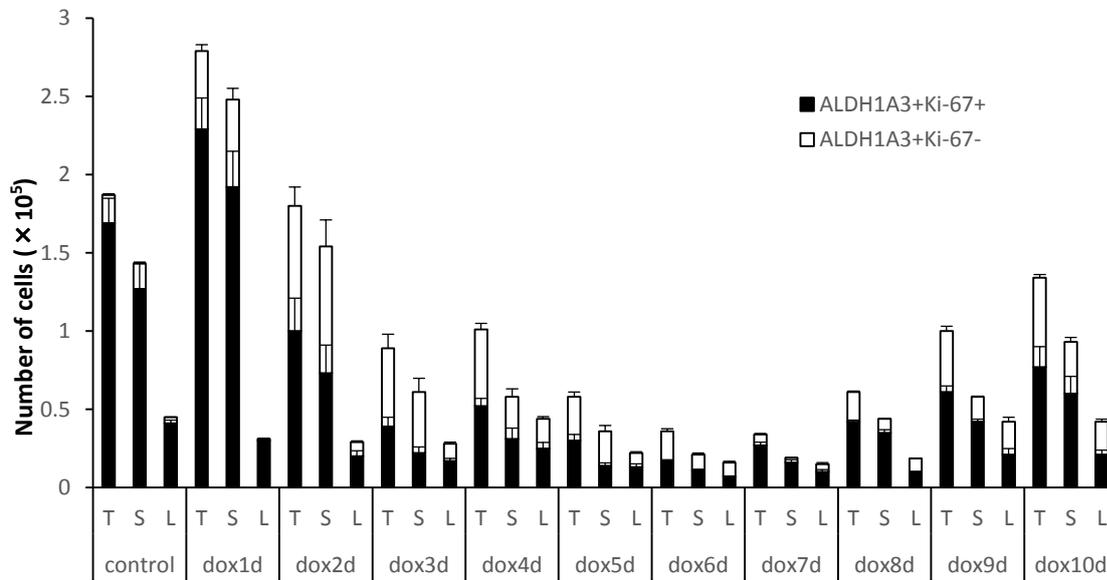
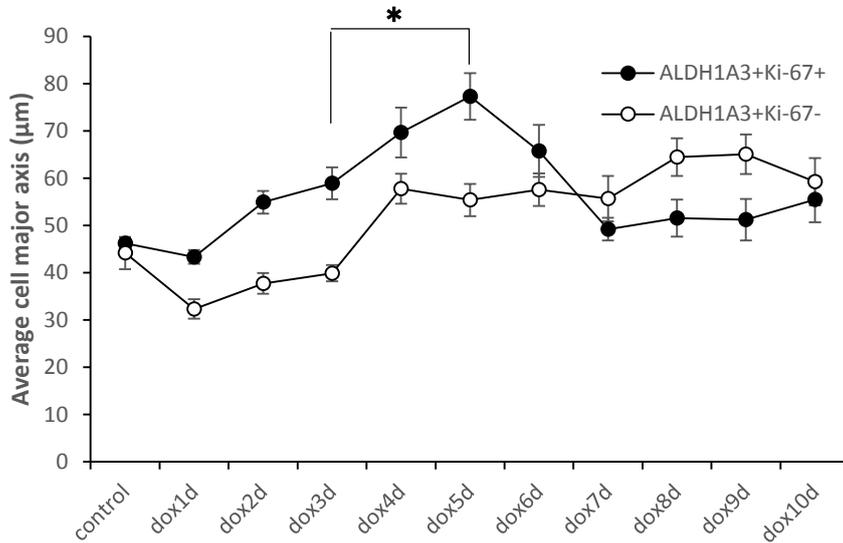


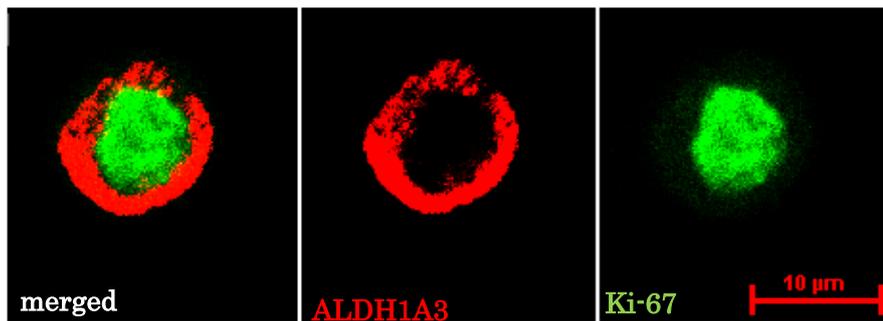
Fig. 3B



**Fig. 3C**



**Fig. 3D**



**Figure 3: The relationship between the expression of CSC marker ALDH1A3 and cell proliferation.**

A) Double immunocytochemical analysis of ALDH1A3 (BCIP, cytoplasmic, blue) and Ki-67 (DAB, nuclear, brown). Representative images are shown for control (a) and dox1d (b). Closed and open arrows indicate ALDH1A3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup> and ALDH1A3<sup>+</sup>/Ki-67<sup>-</sup> cells, respectively. Magnification; ×200

B) Correlation of ALDH1A3 expression with the proliferation index.

The bar indicates the mean ± SD.

T: total cells S: small cells (< 50 μm), L: large cells (≥ 50 μm)

C) The time-course changes of the average cell major axis of ALDH1A3<sup>+</sup> cells in proliferating Ki-67<sup>+</sup> and non-proliferating Ki-67<sup>-</sup> conditions.

The bar indicates the mean  $\pm$  SEM. \*P<0.001 versus dox1d with Dunnett's multiple-comparison test.

D) Double immunofluorescence analysis for ALDH1A3 (cytoplasmic, red) and Ki-67 (nuclear, green) of dox7d cells. Scale bar stands for 10  $\mu$  m.

Fig. 4A

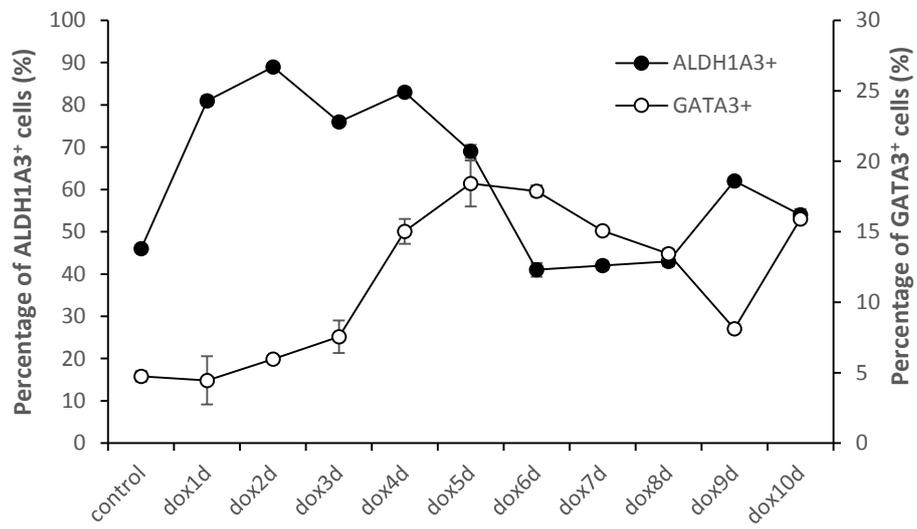


Fig. 4B

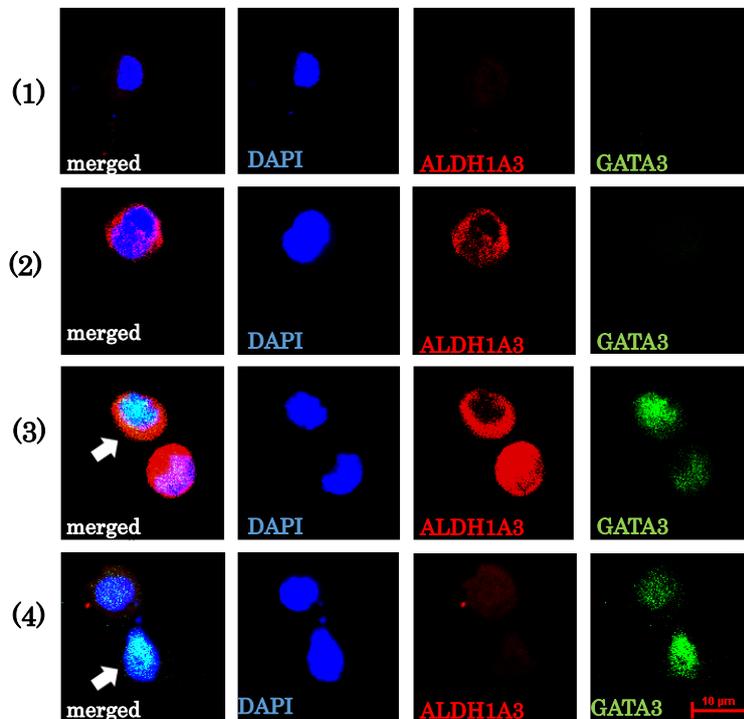


Fig. 4C

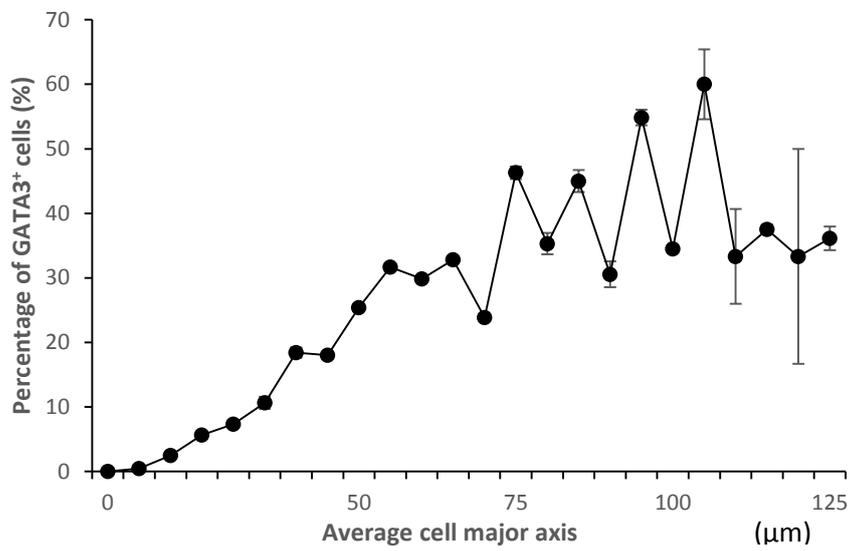
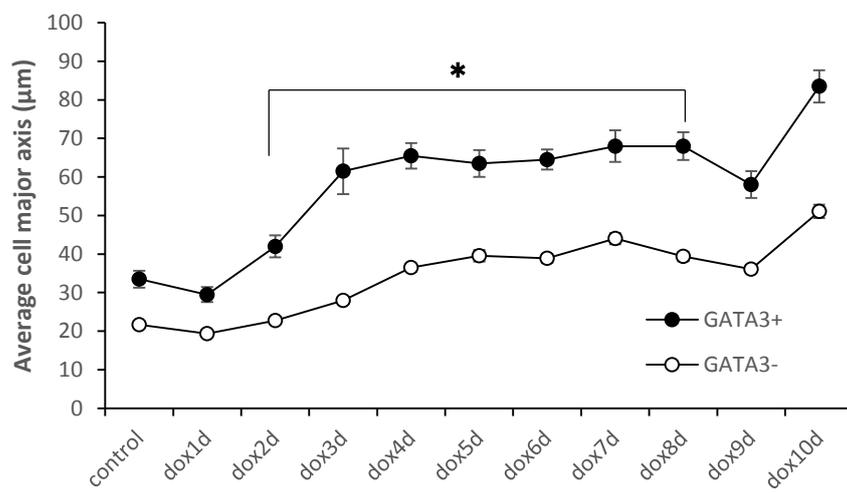
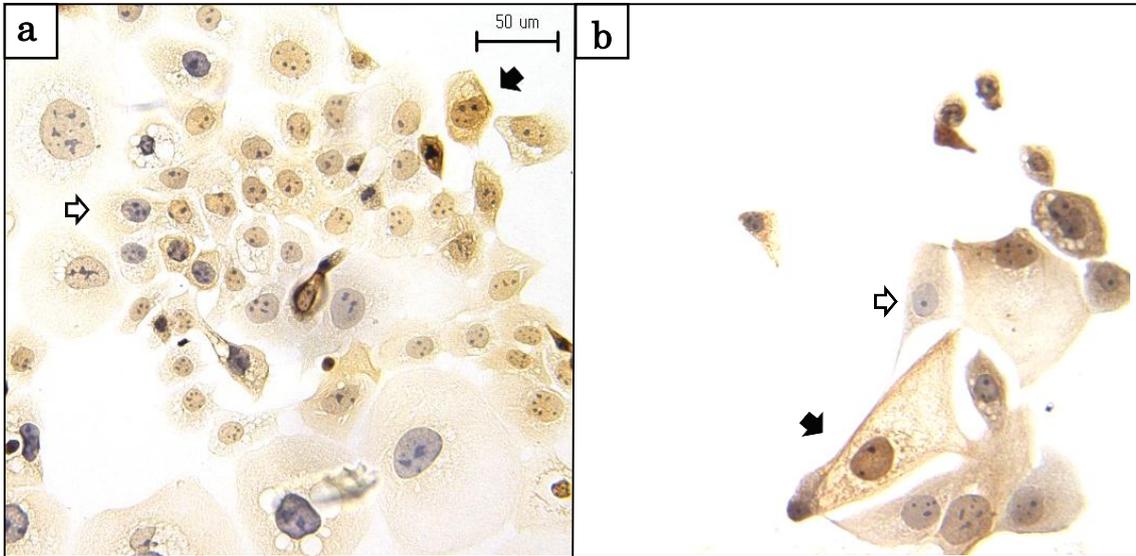


Fig. 4D



**Fig. 4E**



**Figure 4: The relationship of expression patterns between the CSC marker, ALDH1A3, and the differentiation marker, GATA3.**

A) The time-course changes of the percentage of ALDH1A3<sup>+</sup> cells and GATA3<sup>+</sup> cells after induction of apoptosis by doxycycline treatment. The bar indicates the mean  $\pm$  SEM.

B) Double immunofluorescence analysis of ALDH1A3 (cytoplasmic, red) and GATA3 (nuclear, green). Representative images are shown for ALDH1A3<sup>-</sup>/GATA3<sup>-</sup>/control (1), ALDH1A3<sup>+</sup>/GATA3<sup>-</sup>/dox3d (2), ALDH1A3<sup>+</sup>/GATA3<sup>+</sup>/dox5d/arrow (3) and ALDH1A3<sup>-</sup>/GATA3<sup>+</sup>/dox7d arrow (4).

Nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bar stands for 10  $\mu$  m.

C) The relationship between percentage of GATA3<sup>+</sup> cells and average cell size of GATA3<sup>+</sup> cells. The bar indicates the mean  $\pm$  SEM.

D) The time-course changes of the average cell major axis and GATA3 expression after induction of apoptosis by doxycycline treatment.

The bar indicates the mean  $\pm$  SEM. \*P < 0.001 versus GATA3<sup>-</sup> with student's t-test.

E) Immunocytochemical analysis of expression patterns of GATA3 (DAB, nuclear, brown). Representative images are shown for control (a) and dox5d (b).

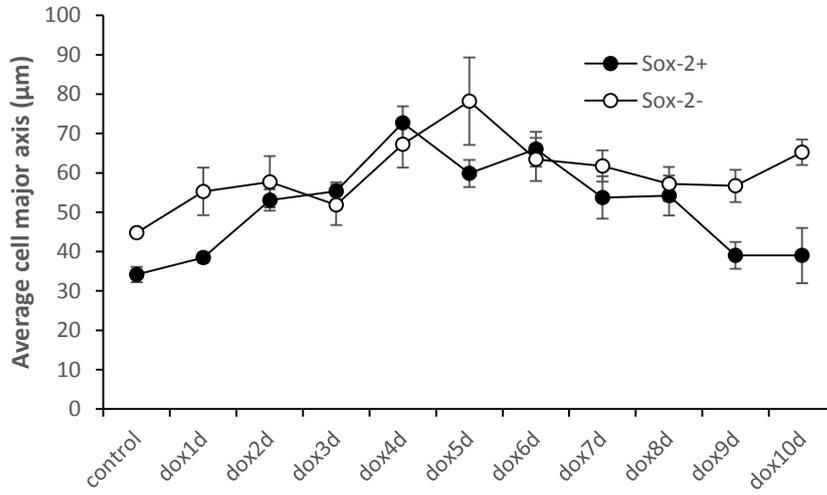
Closed and open arrows indicate GATA3<sup>+</sup> cells and GATA3<sup>-</sup> cells, respectively.

Magnification;  $\times 200$

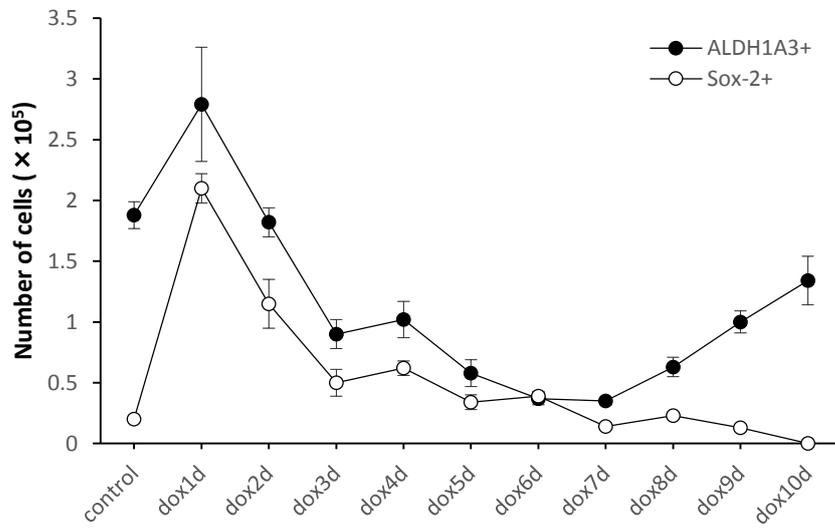
### ALDH1A3 と癌幹細胞マーカーSox-2 との関係

我々は ALDH1A3 と同様に癌幹細胞マーカーのひとつとされている Sox-2 発現パターンを解析した。細胞の大きさとの関係を見ると、Sox-2<sup>+</sup>細胞は dox1d では小型化の傾向がみられ、dox2d から dox8d まで、Sox-2<sup>+</sup>細胞と Sox-2<sup>-</sup>細胞は、いずれも、大型化の傾向を示した (Fig.5. A,D)。それに対して ALDH1A3<sup>+</sup>細胞では dox1d から dox3d にかけて小型細胞が多くみられ、全体的に ALDH1A3<sup>+</sup>細胞における平均細胞長径は 60 $\mu$ m 未満であった (Fig.2C)。すなわち、ALDH1A3<sup>+</sup>細胞は Sox-2<sup>+</sup>細胞と比べて、小型化の傾向を示している。また Sox-2<sup>+</sup>細胞の細胞数を経時的にみると、dox7d までの Sox-2 の発現パターンは Fig.2B で示した ALDH1A3 のそれに類似していた (Fig.5B)。また dox7d 以降 ALDH1A3<sup>+</sup>細胞は増加傾向、Sox-2<sup>+</sup>細胞は減少傾向がみられ、ALDH1A3<sup>+</sup>細胞、Sox-2<sup>+</sup>細胞いずれも、それぞれ、ほぼ元の control レベルに戻っていることが示された (Fig.5B)。さらに細胞サイズ別による Sox-2 の発現頻度は Sox-2<sup>+</sup>小型細胞は、dox1d で一過性の増加がみられ、Sox-2<sup>+</sup>大型細胞は dox2d にかけて増加し、Sox-2<sup>+</sup>小型細胞と Sox-2<sup>+</sup>大型細胞とともにアポトーシス抵抗性を示した。dox2d 以降、Sox-2<sup>+</sup>小型細胞と Sox-2<sup>+</sup>大型細胞は、いずれも dox10d にかけて漸減した (Fig.5C)。

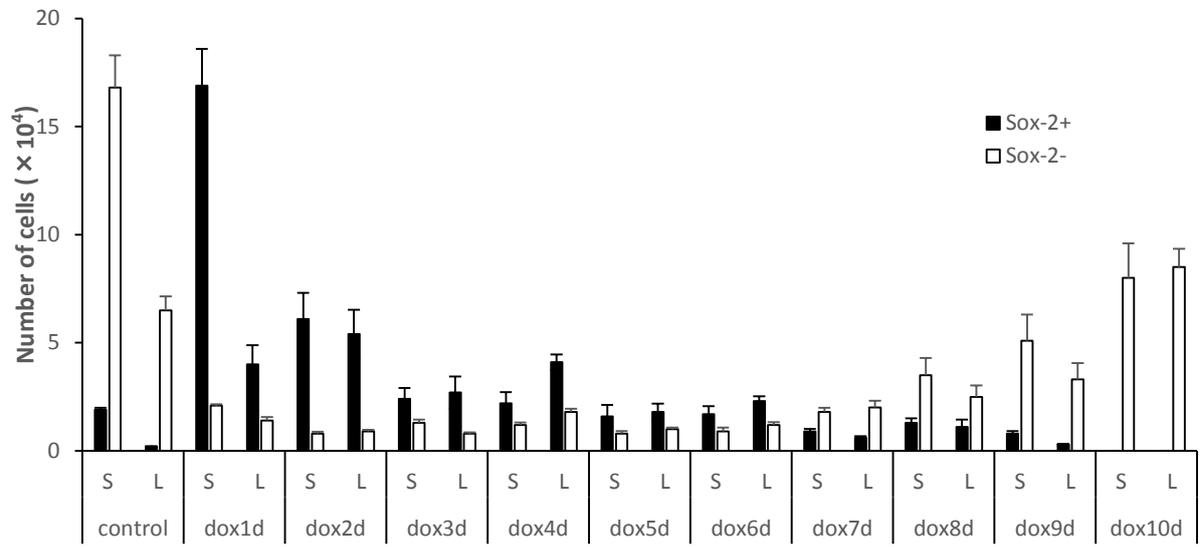
**Fig. 5A**



**Fig. 5B**



**Fig. 5C**



**Fig.5D**

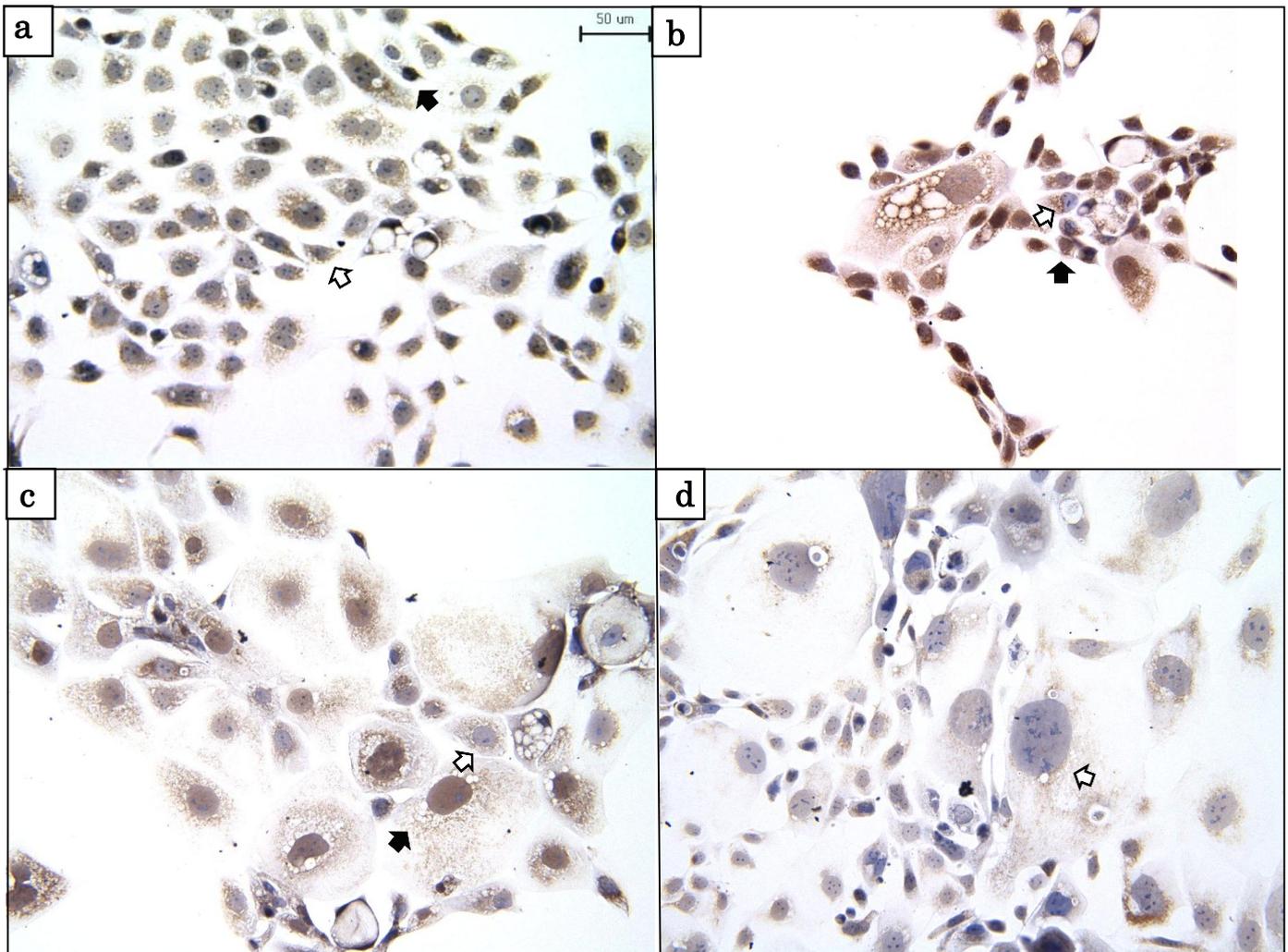


Figure 5: The relationship between ALDH1A3 and Sox-2 expression

A) The time-course changes of average cell major axis in Sox-2<sup>+</sup> cells and Sox-2<sup>-</sup> cells after induction of apoptosis by doxycycline treatment.

The bar indicates the mean  $\pm$  SEM.

B) The time-course changes of the number of ALDH1A3<sup>+</sup> cells and Sox-2<sup>+</sup> cells.

The bar indicates the mean  $\pm$  SD.

C) The time-course change of cell size and the expression patterns of Sox-2.

The bar indicates the mean  $\pm$  SD.

S: small cells( $< 50 \mu\text{m}$ ), L: large cells( $\geq 50 \mu\text{m}$ )

D) Immunocytochemical analysis of Sox-2 (DAB, nuclear, brown).

Representative images are shown for control (a), dox1d (b), dox4d (c), and dox10d (d)

Closed and open arrows indicate Sox-2<sup>+</sup> and Sox-2<sup>-</sup> cells, respectively.

Magnification:  $\times 200$

## 〔考察〕

### ALDH1A3 発現とアポトーシス抵抗性

ALDH1A3<sup>+</sup>細胞が dox1d で増加してアポトーシス抵抗性を示したことは癌幹細胞がアポトーシス抵抗性を示すとする [4,30,31] の報告に一致している。ヒト大腸癌培養細胞株における wildtype p53 の誘導の報告 [26]、我々の実験結果の乳癌細胞における dox 投与による p53 の誘導によって ALDH1A3<sup>+</sup>細胞が増加するという報告を合わせると ALDH1A3<sup>+</sup>細胞は p53 依存アポトーシス抵抗性細胞であると考えられる。

### ALDH1A3<sup>+</sup>小型細胞とアポトーシス抵抗性

癌幹細胞の大きさについては議論のあるところであるが [19]、我々の実験では、dox1d でアポトーシス抵抗性を示して生き残った細胞が主に ALDH1A3<sup>+</sup>小型細胞であることから癌幹細胞は小型細胞であることが推定される (Fig.2C,D)。実際に、癌幹細胞は主に休止状態にあり、一般的に、前駆細胞や成熟細胞よりも小さいと報告している [6,19]。

### ALDH1A3 発現と細胞増殖マーカーKi-67 との関係

癌幹細胞は非対称に分裂するが、前駆細胞に比べて分裂速度は遅いのに対し、前駆細胞の増殖速度は速いといわれている [21,40]。Morimoto らは ALDH1<sup>+</sup>細胞は主に Ki-67<sup>-</sup>であり、ALDH<sup>-</sup>細胞は Ki-67<sup>+</sup>であると報告 [32] しているが、我々の結果では ALDH1A3<sup>+</sup>細胞の多くが Ki-67<sup>+</sup>であった。Morimoto らの報告は未治療のヒト乳癌組織を用いた解析であるが、p53 誘導によるアポトーシスを起こした培養細胞の変化を解析した我々の実験系とは異なる。抗癌剤や放射線による治療を始めた患者由来の組織を用いた解析との比較は興味深いものになるだろう。また、この実験系で ALDH1A3<sup>+</sup>細胞の割合が control において高いことから、数%しか存在しない癌幹細胞以外にも陽性を示す細胞が存在する可能性が推定される。実際、ALDH1A3<sup>+</sup>細胞、さらには ALDH1A3<sup>+</sup>小型細胞において高い Ki-67 index を示していることから、これらの細胞に前駆細胞が含まれていることが示唆される。

### ALDH1A3 発現と分化マーカーGATA3 の関係

ALDH1A3 は悪性度の高い転移巣において強発現するとされているのに対して [25]、乳管発生における管腔分化誘導に関係している GATA3 は転移巣で低発現の傾向がみられ [15,16]、両者の発現は逆相関を示すと報告されている。このことは我々の実験結果において dox4d から dox6d における ALDH1A3 と GATA3 の発現パターンが逆相関を示したと一致する (Fig4A)。GATA3<sup>+</sup>細胞が ALDH1A3<sup>+</sup>細胞に遅れて増加する理由は、集団を再構成するために p53 誘導によるアポトーシス後に残った ALDH1A3<sup>+</sup>細胞に管腔分化誘導が生じたためであると考えられた。dox5d における免疫蛍光二重染色で ALDH1A3 と管腔前駆細胞マーカーである GATA3 [7] の共発現を示す細胞が検出されたことにより ALDH1A3 が管腔前駆細胞にも発現することが明らかとなった (Fig.4B)。同研究室内の他者の実験結

果では、免疫蛍光二重染色で dox 投与後に GATA3 と Ki-67 の共発現を示す細胞が検出されたことは GATA3 がアポトーシス抵抗性を示す ALDH1A3<sup>+</sup>前駆細胞にも発現していることを示している。我々が用いた HCC1937 細胞はトリプルネガティブで BRCA1 変異と p53 変異の特徴を持った細胞で basal-like タイプに近いと考えられる [3,5]。HCC1937 細胞のゲノムには BRCA1 遺伝子の 5382 挿入変異、正常野生型 BRCA1 欠乏が含まれている [43]。管腔前駆細胞のマーカーとしての GATA3 の発現が誘導されるという我々のデータは HCC1937/p53 細胞が管腔前駆細胞に起源をもつという考え方に一致する [17,20]。

### ALDH1A3 発現と癌幹細胞マーカー Sox-2 の関係

basal-like 乳癌細胞における Sox-2 発現の頻度は、他の luminal、HER2<sup>+</sup>の乳癌細胞のそれよりも高い傾向があると報告されている [38]。我々の実験で使用した basal-like の乳癌由来の HCC1937 細胞の解析における Sox-2 の発現パターンからも、Sox-2 は重要な役割をもつことが確認された。我々の見出した Sox-2 と ALDH1A3 の発現相関は、これまでも胎児型横紋筋肉腫細胞における Sox-2 と ALDH1 の解析 [33]、ALDH 活性の高い乳癌細胞における Sox-2 と ALDH1A3 の解析 [34] で報告されている。同研究室の他者の実験結果では、同一細胞内における ALDH1A3 と Sox-2 の遺伝子発現を FACS で解析したところ、両者の発現は正相関を示すことが確認された。また FACS による細胞周期では Sox-2 が前駆細胞すなわち細胞分裂に入った細胞にも発現していることが明らかとなった。さらに Sox-2 と GATA3 の共発現が確認されたことにより Sox-2 が管腔前駆細胞にも発現することが明らかとなった。これらの結果により、Sox-2 は ALDH1A3 と同様に乳癌幹細胞に特異的に発現するのではなく、前駆細胞、管腔前駆細胞にも発現することが示された。今回の我々の実験結果において両者の相違点も明らかになっている。Embryonic Stem Cells (ESCs)細胞において p53 は多能性因子と結合することで、多能性因子の発現を抑制すると報告されている [35,41]。我々の実験結果では dox1d の Sox-2 過剰発現がみられたの (Fig.5B)は、正常細胞と異なり、癌細胞では何らかの理由で p53 の発現亢進は Sox-2 発現を抑制できないと考えられた。dox1d において Sox-2<sup>+</sup>細胞数が 11 倍の顕著な増加を示したことは、細胞分裂のみでは説明できず、Sox-2<sup>-</sup>細胞に発現のスイッチが入り、Sox-2<sup>-</sup>細胞から Sox-2<sup>+</sup>細胞に変化した可能性があると考えられた (Fig.5B)。このように Sox-2 は、通常では、発現が抑制されるが、アポトーシス誘導というストレス下で発現し、集団の再構成に関与することが示唆された。一方、ALDH1A3<sup>+</sup>細胞は control ですすでに多く、dox 投与後の増加の割合は Sox-2 発現と比べて少ない傾向がみられた。これは ALDH1A3<sup>+</sup>細胞が Sox-2 のような発現の変化ではなく、生き残った細胞の数が 1.5 倍の増加を示したことによると考えられた (Fig.5B)。

## 〔結論〕

本研究では、癌幹細胞マーカーALDH1A3 と Sox-2、分化マーカーGATA3 および、増殖マーカーKi-67 の発現パターンを比較解析することによって、アポトーシス抵抗性乳癌細胞と癌幹細胞との関係および癌ヒエラルキー再構成におけるこれらの遺伝子の役割が明らかとなった。

〔参考文献〕

1. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. and Clarke, M. F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS*. 100; 3983-3988.
2. Avilion, A.A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N. and Lovell-Badge, R. (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 17; 126-140.
3. Barcellos-Hoff, M. H. and Kleinberg, D. L. (2013) Breast cancer risk in BRCA1 mutation carriers: insight from mouse models. *Ann Oncol*. 24; 8-12.
4. Baumann, M., Krause, M. and Hill R. (2008) Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. *Nature Rev*. 8; 545-554
5. Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C. Nielsen, T.O., Moorman, P. G., Earp, H. S. and Millikan, R. C. (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the carolina breast cancer study. *JAMA*. 295; 2492-2502.
6. Chen, W., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M-C. and Zeniou, M. (2016) Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy. *Stem cells Int*. 10; 1155-1171.
7. Chou, J., Provot, S. and Werb, Z. (2010) GATA3 in development and cancer differentiation: cells GATA have it!. *J Cell Physiol*. 222; 42-49.
8. Dean, M., Fojo, T. and Bates, S. (2005) Tumor stem cells and drug resistance. *Nature Rev Cancer*. 5; 275-284.
9. Fulawka, L., Donizy, P. and Halon, A. (2014) Cancer stem cells - the current status of an old concept: Literature review and clinical approaches. *Bio Res*. 47; 66-75.
10. Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha,,

- M. S. and Dontu, G. (2007) ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 1; 555-567.
11. Girardi, R. R., Shehata, M., Gallardo, M., Blasco, M. A., Simons, B.D. and Stingl, J. (2015) Stem and progenitor cell division kinetics during postnatal mouse mammary gland development. *Nat Commun*. 6; 8487-8499.
12. Herreros-Villanueva, M., Zhang, J-S., Koenig, A., Abel, E.V., Smyrk, T.C., Bamlet, W.R., Narvajás, A A-M de., Gomez, T.S., Simeone, D.M., Bujanda, L. and Billadeau, D.D. (2013) SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 2; 1038-1050.
13. Keymeulen, A. V., Rocha, A. S., Ousset, M., Beck B., Bouvencourt, G., Rock, J., Sharma, N., Dekoninck, S. and Blanpain, C. (2011) Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*. 479; 189-193.
14. Ko, L. J. and Prives, C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. 10; 1054-1072.
15. Kouros-Mehr, H., Bechis, S. K., Slorach, E. M., Littlepage, L. E., Egeblad, M., Ewald, A. J., Pai, S-Y., Ho, I-C. and Werb, Z. (2008) GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. *Cancer Cell*. 13; 141-152.
16. Kouros-Mehr, H., Slorach, E. M., Sternlicht, M. D. and Werb, Z. (2006) GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary Gland. *Cell*. 127; 1041-1055.
17. Leccia, F., Del Vecchio, L., Mariotti, E., Di Noto, R., Morel, A-P., Puisieux, A., Salvatore, F. and Ansieau, S. (2014) ABCG2, a novel antigen to sort luminal progenitors of BRCA1<sup>-</sup> breast cancer cells. *Mol Cancer*. 13; 213-226.
18. Leis, O., Eguiara, A., Lopez-Arribillaga, E., Alberdi, M. J., Hernandez-Garcia, S., Elorriaga, K., Pandiella, A., Rezola, R. and Martin, A.G. (2012) Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*. 31; 1354-1365.
19. Li, Q., Rycaj, K., Chen, X. and Tang, D. G. (2015) Cancer stem cells and cell size: A

causal link?. *Sem Cancer Biol.* 35; 191-199.

20. Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N. C., Pal, B., Hart, A. H., Asselin-Labat, M-L., Gyorki, D. E., Ward, T., Partanen, A., Feleppa, F., Huschtscha, L. I., Thorne, H. J., kConFab, Fox, S. B., Yan, M., French, J. D., Brown, M. A., Smyth, G. K., Visvader, J. E. and Lindeman, G. J. (2009) Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nature Med.* 15; 907-913.

21. Liu, Y., Nenutil, R., Appleyard, M. V., Murray, K., Boylan, M., Thompson, A .M. and Coates, P. J. (2014) Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells. *Br J Cancer.* 110; 2063-2071 .

22. Livasy, C. A., Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore D. T. and Perou, C. M. (2006) Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 19; 264-271.

23. Manie,E., Vincent-Salomon, A., Lehmann-Che, J., Pierron, G., Turpin, E., Warcoin, M., Gruel, N., Lebigot, I., Sastre-Garau, X., Lidereau, R., Remenieras, A., Feunteun J., Delattre, O., de the, H., Stoppa-Lyonnet, D. and Stern, M-H. (2009) High frequency of tp53 mutation in BRCA1 and sporadic basal-like carcinomas but not in BRCA1 luminal breast tumors. *Cancer Res .* 69; 663-671.

24. Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A. and Lee, P.W.K. (2011) Aldehyde dehydrogenase its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *cell cycle* .10; 1378-1384.

25. Marcato, P., Dean, C. A., Pan, D., Araslanova, R., Gillis, M., Joshi, M., Helyer, L., Pan, L., Leidal, A., Gujar, S., Giacomantonio, C. A. and LEE, P. W.K. (2011) Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells.* 29; 32-45.

26. Marchitti, S. A., Brocker, C., Stagos, D. and Vasiliou, V. (2008) Non-P450 aldehyde

oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4; 697-720.

27. Masuda, C., Takeuchi, S., Bisem, N. J., Vincent, S. R. and Tooyama, I. (2014) Immunohistochemical localization of an isoform of TRK-fused gene-like protein in the rat retina. *Acta histochem.cytochem.* 47; 75-83.

28. Matsumoto, H., Tsuchiya, T., Yoshiura, K., Hayashi, T., Hidaka, S., Nanashima, A. and Nagayasu, T. (2014) ABCC11/MRP8 expression in gastrointestinal tract and a novel role for pepsinogen secretion. *Acta Histochem.Cytochem.* 47; 85-94.

29. Matsuta, M., Matsuta, M., Suzuki, H., Akasaka, T. and Kagabu T. (1998) Detection of the p53 gene deletion by dual color fluorescence in *situ* hybridization in squamous cell carcinoma of the skin. *Acta Histochem. Cytochem.* 31; 197-202.

30. Mimeault, M. and Batra, S. K. (2006) Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells.* 24; 2319-2345.

31. Mimeault, M. and Batra, S.K. (2007) Functions of tumorigenic and migrating cancer progenitor cells in cancer progression and metastasis and their therapeutic implications. *Cancer Metastasis Rev.* 26; 203–214.

32. Morimoto, K., Kim, S. J., Tanei, T., Shimazu, K., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Terada, N. and Noguchi, S. (2009) Stem cell marker aldehyde dehydrogenase1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2. and high ki67 expression. *Cancer Sci.* 100; 1062–1068.

33. Nakahata, K., Uehara, S., Nishikawa, S., Kawatsu, M., Zenitani, M., Oue, T. and Okuyama H. (2015) Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is a potential marker for cancer stem cells in embryonal rhabdomyosarcoma. *PLOS ONE.* 10; 1371-1387.

34. Piva, M., Domenici, G., Iriondo, O., Rabano, M., Simoes, B. M., Comaills, V., Barredo,

- I., Lopez-Ruiz, J. A., Zabalza, I., Kypta, R. and Vivanco, M. d. M. (2014) Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. *EMBO Mol Med.* 6 ; 66-79.
35. Qin, H., Yu, T., Qing, T., Liu, Y., Zhao, Y., Cai, J., Li, J., Song, Z., Qu, X., Zhou, P., Wu, J., Ding, M. and Deng, H. (2007) Regulation of apoptosis and differentiation by p53 in human embryonic stem cells. *J Bio Chem.* 282; 5842-5852.
36. Qiu, Y., Pu, T., Li, L., Cheng, F., Lu, C., Sun, L., Teng, X., Ye, F. and Bu, H. (2014) The expression of aldehyde dehydrogenase family in breast cancer. *J Breast Cancer.* 17; 54-60.
37. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I.L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 414; 105-111.
38. Rodriguez-Pinilla, S. M., Sarrío, D., Moreno-Bueno, G., Rodriguez-Gil, Y., Martínez, M. A., Hernandez, L., Hardisson, D., Reis-Filho, J.S. and Palacios, J. (2007) Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. *Mod Pathol.* 20; 474-481.
39. Sarkar, A. and Hochedlinger, K. (2013) The Sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell.* 12; 15-30.
40. Seaberg, R.M. and Van der Kooy, D.(2003) Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci.* 26; 125-131.
41. Solozobova, V. and Blattner, C. (2011) p53 in stem cells. *World J Biol chem* 2; 202-214.
42. Takekoshi, S., Yasui, Y., Inomoto, C., Kitatani, K., Nakamura, N. and Osamura, R.Y. (2014) A histopathological study of multi-hormone producing proliferative lesions in estrogen-induced rat pituitary prolactinoma. *Acta Histochem.Cytochem.* 47;155-164.
43. Tomlinson, G. E., Chen, Tina T-L., Stastny, V. A., Virmani, A. K., Spillman, M. A., Tonk, V., Blum, J. L., Schneider, N.R., Wistuba, I. I., Shay, J. W., Minna, J. D. and Gazdar, A. F. (1998) Characterization of a breast cancer cell line derived from a germ-line BRCA1

mutation carrier. *Cancer Res.* 58; 3237-3242.

44. Visvader, J. E. and Stingl, J. (2014) Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* 28; 1143-1158.

45. Yamanaka, S. (2007) Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* . 1; 39-49.

## 〔謝辞〕

本論文を作成するにあたって厳しくも優しいご指導を賜りました同志社女子大学大学院 薬物治療学研究室の高橋 玲 教授に深く感謝します。実験、論文妙読による研究面、学術論文、学位論文の執筆に関して、ご多忙にも関わらず、多くの時間を筆者の私のために割き、本当に未熟で至らない私を根気よく丁寧に熱心にご指導してくださったことを心から感謝の気持ちと御礼を申し上げます。そして博士課程進学に関して同志社女子大学在学中から丁寧なご指導、ご助言をしていただいた村上元庸 教授に深く感謝しております。研究を遂行するにあたって、多くのご協力、ご助言をいただいた薬物治療学研究室の福沢真由 助手、伊佐みゆき実験補佐、米田晶子実験補佐の方々に深く感謝しております。実験、研究の解析を通して様々な議論と、多くのご協力をして頂いた薬物治療学研究室の皆様にも心より御礼申し上げます。最後に、研究面に関してご助言をしていただいた父、温かく見守って下さった母、そして家族に深く感謝申し上げます。