

幹細胞様ヒト乳癌細胞はマトリゲル上で血管擬態を惹起する

Stem-like human breast cancer cells initiate vasculogenic mimicry on matrigel

井澤 優希
(IZAWA Yuki)

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 | 2 |
| 2 | 序論 | 6 |
| 3 | 研究方法 | 8 |
| 3.1 | p53 発現誘導可能な HCC1937/p53 細胞の培養 | 8 |
| 3.2 | マトリゲル上での VM 形成と評価 | 9 |
| 3.3 | 免疫蛍光染色 | 9 |
| 3.4 | ALDEFLUOR アッセイと fluorescence-activated cell sorter (FACS) による細胞分離 | 10 |
| 3.5 | Droplet Digital PCR (ddPCR) | 10 |
| 3.6 | 統計解析 | 11 |
| 4 | 結果 | 12 |
| 4.1 | HCC1937/p53 細胞の VM 形成 | 12 |
| 4.2 | VM 構造における癌幹細胞の分布 | 14 |
| 4.3 | 癌幹細胞と VM 形成 | 17 |
| 4.4 | アポトーシス抵抗性 HCC1937/p53 細胞と VM 形成能 | 19 |
| 5 | 考察 | 21 |
| 5.1 | 腫瘍細胞の VM 形成と構造的特徴 | 21 |
| 5.2 | VM 形成と癌幹細胞の関係 | 21 |
| 5.3 | VM 構造における癌幹細胞マーカー発現分布 | 22 |
| 5.4 | 治療抵抗性を示す癌幹細胞と VM 形成能力の関係 | 22 |
| 5.5 | VM 形成と癌細胞の脱分化 | 23 |
| 6 | 結論 | 24 |
| 7 | 補足データ | 25 |
| 8 | 参考文献 | 28 |
| 9 | 謝辞 | 34 |

1 要旨

【目的・背景】

癌幹細胞は『自己複製能と多分化能の両方を有する癌細胞』と定義されており、腫瘍の中でも少数の細胞から構成される集団である。癌幹細胞は腫瘍の進展と転移を促進し、化学療法および放射線治療に対して耐性を持つとされる。癌幹細胞によって強い侵襲性を獲得するとされる癌腫の例として、トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) が挙げられる。TNBC は臨床的に使用される乳癌分類において、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) の全てが陰性を示す乳癌であり、強い治療抵抗性を特徴とする。乳癌においては、いくつかの癌幹細胞マーカーが知られている。ALDH1(aldehyde dehydrogenase 1)は乳癌幹細胞マーカーのひとつとされ、そのサブタイプの 1 つである ALDH1A3 の発現は、特に癌幹細胞と強い関係を示す。Sox-2(Sex-determining region Y(SRY)-box binding protein-2)は幹細胞の多能性の維持および胚発生の調節において重要な役割を果たし、乳癌幹細胞においてもその特異的発現が確認されている。一方、GATA3(GATA-binding protein 3)は、乳腺管腔上皮の分化に必須の役割を果たす zinc-finger 型転写因子である。

血管擬態 (vasculogenic mimicry: VM) は腫瘍細胞が血管様構造を形成する血管外微小血流機構で、侵襲性の強い腫瘍にみられる。VM は血管新生とは異なるものであるが、宿主血管から血液供給を受ける機能的な微小循環として作用することが確認されている。臨床的には、顕著な VM 形成を有する乳癌症例は、非 VM 症例よりも高い血行性再発率および低い 5 年生存率を示す。また、様々な癌腫において、VM 形成と癌幹細胞の存在が予後に関与しているとの報告もある。

乳癌の悪性度と VM の関係が次第に明らかになってきているが、VM 形成における癌幹細胞の役割を説明できる分子メカニズムには未だ不明な点が多い。本研究では TNBC 由来のヒト乳癌細胞株を用いて、癌幹細胞の特性を有するアポトーシス耐性細胞に着目し、VM 形成と癌幹細胞の関連を明らかにすることを目的とする。

【研究方法】

ヒト乳癌細胞株 HCC1937 を American Type Culture Collection (ATCC) から入手して用いた。使用した HCC1937/p53 細胞は、HCC1937 細胞に doxycycline(Dox)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である。HCC1937/p53 細胞を Dox 含有培地で 1~7 日間培養した細胞をそれぞれ Dox1d~Dox7d と名付けた。

〈マトリゲル上での培養 (thin gel 法)〉

VM 形成は、マトリゲル (CORNING, USA) 上で無血清培養することによって誘導した。

30~40 μ L/well の液状のマトリゲルを氷上の 8well 培養スライドにコーティングし、37°Cで 15 分間インキュベートしてゲル化させた。opti-MEM 培養液中の細胞(2.45×10^5 /well)をマトリゲル上に播種後、37°C, 5%CO₂ の条件下で培養し、VM 形成を観察した。

〈droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)〉

total RNA を TRIzol (Life Technologies, USA) で抽出し、SuperScriptIII 逆転写酵素 (Life Technologies, Inc.) を用いて cDNA を合成した。QX100™ Droplet Digital™ PCR システム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて、目的遺伝子を増幅し、解析した。GAPDH (Hs03929097_g1)、VE-カドヘリン (Hs00170986_m1)、MMP-2 (Hs01548727_m1)、MMP-9 (Hs00957562_m1) それぞれの TaqMan® プローブ (Thermo Fisher Scientific) を用いて反応を行なった。

〈蛍光免疫染色〉

マトリゲル上の細胞を 4%パラホルムアルデヒド中で 30 分間固定し、0.25% TritonX-100 で 10 分間透過処理を行なった。一次抗体として抗 ALDH1A3 (Purified Rabbit Polyclonal, ABGENT, 1:50)、抗 Ki-67 (Mouse IgG1 monoclonal, DAKO, 1:500)、および抗 GATA3 (Mouse IgG2B monoclonal, R&D system, 1:300) を 4°Cで一晩反応させた。二次抗体としてそれぞれ Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 680 conjugated goat anti-mouse IgG1、Alexa Fluor 680 conjugated goat anti-mouse IgG を室温で 1 時間インキュベートし一次抗体結合を検出した。蛍光画像は共焦点レーザー走査顕微鏡 (A1, NIKON INSTRUMENT, Japan) で撮影した。

〈ALDEFLUOR 分析と Fluorescence-activated cell sorting (FACS)〉

ALDEFLUOR キット (STEMCELL Technologies, Canada) で ALDH 酵素活性を検出し、Cell Sorter (SH800SONY, Japan) を用いて ALDH⁺細胞と ALDH⁻を選別した。死細胞は 7-aminoactinomycinD (7-AAD) (BD Biosciences, USA) を用いて識別し除外した。

【結果】

HCC1937/p53 細胞をマトリゲル上で 24 時間培養すると VM の特徴である honeycomb 構造が形成された。この構造の 3 次元配列を共焦点顕微鏡で撮影し、得られたスライス画像から Fiji/ImageJ を用いてスタックを作成したところ、honeycomb 構造の架橋領域 (B 領域) に 3 次元構造が確認された。さらに、ddPCR を用いて VM 関連遺伝子である VE-カドヘリン (vascular endothelial-cadherin) および MMP(matrix metalloproteinase)-9 の発現亢進が検出されたことから、今回の honeycomb 構造が真の VM によることを確認した。

免疫蛍光二重染色によって、VM 構造における ALDH1A3 と GATA3 の発現パターンを解析した。癌幹細胞または前駆細胞の特性を有する ALDH1A3⁺細胞は、VM 構造の B 領域に発現し、一方、分化した特性を有する GATA3⁺細胞は集合領域 (A 領域) に局在していた。

癌幹細胞の VM 形成能力は、異なる 2 つの方法で選別した癌幹細胞類似集団を用いて検

討した。①ALDEFLUOR キットを用いた FACS による ALDH⁺細胞の分離方法: ALDH⁺細胞集団は24時間以内に VM 形成が完了したが、ALDH⁻細胞集団は VM を形成しなかった。②アポトーシス耐性を示す Dox2d 細胞を用いた方法: Control 細胞では24時間で VM 形成が完了し、その後、無血清培養条件のために徐々に VM 構造は崩壊した。一方、Dox2d 細胞では Control 細胞よりも早く、6時間で VM 形成が完了し、その後は Control 細胞と同様に崩壊した。

【考察】

VM の立体構築については、thin gel 培養法を用いてマトリゲル上に VM 構造を誘導し、撮影されたスライス画像からスタック合成画像を作成して評価した。VM 構造における細胞の3次元配列は B 領域で顕著であることが明らかになった。この立体配列の差は形態的に VM の形成過程を明らかにする手掛かりになると考えられる。この形態学的特徴に加えて、VM 関連遺伝子の発現が確認されたことから、HCC1937/p53 細胞に VM 形成能力を持つ細胞が含まれていることが示された。

予後不良の炎症性乳癌 (IBC) では、ALDH⁺細胞が癌の侵襲と転移に関与することや、VM 形成率が高いことが報告されている。今回の研究では、我々が使用した HCC1937 細胞も予後不良の TNBC 由来であり、特に、ALDH⁺の割合が高いことが知られている。その中で ALDH⁺細胞は24時間以内に VM 形成が可能であることを明らかにし、一方、ALDH⁻細胞はこの能力を欠いていることを示した。この結果は、癌幹細胞様細胞として選別された ALDH⁺細胞の中に VM 形成の開始に必要な細胞を含んでいることを示し、この細胞集団が予後の悪化に関与することを示唆した。

マトリゲル上の免疫蛍光染色では、VM を形成しつつある B 領域に ALDH1A3⁺細胞が局在を示すことから、VM の形成促進において重要な役割を果たしていると推定された。我々が過去に報告した研究結果によると、癌幹細胞の活性化が起こると ALDH1A3 の発現が亢進し、それに続き、前駆細胞として Ki-67 発現を伴う細胞増殖、さらに、GATA3 発現を伴う細胞分化が起こることが明らかになっている。これに今回の結果を当てはめると、活性化された癌幹細胞(ALDH1A3⁺)は最初に B 領域において細胞増殖 (Ki-67⁺) を開始し、さらに A 領域で GATA3⁺を発現する細胞が分化する過程で、VM 形成につながると考えられる。したがって、今回の結果は、VM 形成の促進において癌幹細胞が重要な役割を担っていることを明らかにし、分子メカニズム的に VM 形成過程を明らかにする手掛かりになると考えられる。

Dox2d 細胞が ALDH⁺細胞に比較してより迅速な VM 形成を示すことには、いくつかの理由が考えられる。1) それぞれ選別した細胞重集団中の癌幹細胞含有率の違い。Dox2d の p53 耐性細胞の割合は HCC1937/p53 全細胞の 31.05%であり、FACS によって単離された ALDH⁺細胞の割合は 51.77%であったことから、前者の方が VM 形成可能な癌幹細胞をより多く含んでいると考えられる。2) 培養細胞へのストレス。腫瘍環境の低酸素状態や腫瘍

細胞への血液供給不足によるストレス条件下で VM が起こり、腫瘍細胞は侵襲性の強い腫瘍タイプになると報告されている。同様に、p53 誘発アポトーシスがストレスとして関与し、このストレスを受けて生き残ることができる Dox2d 細胞は VM を形成する能力を獲得し得ると推測できる。しかし、乳癌において、p53 に関連する TP53INP1 (p53 駆動酸化ストレス応答蛋白質) は VM 形成の阻害に関与することが報告されている。

【結論】

TNBC は他のタイプの乳癌よりも多くの癌幹細胞を含有しており、予後が悪い腫瘍であることが知られている。その原因の一つとして、TNBC における高い VM 形成率が提唱されている。我々の実験において、癌幹細胞は VM 形成の惹起に重要であることが示された。さらに、p53 誘発アポトーシスを免れた TNBC 由来 HCC1937/p53 細胞は癌幹細胞に類似した特性を示し、高い VM 形成能を示した。これらの結果は、TNBC における治療耐性細胞は VM 形成において重要な役割を果たすということを示す最初の実験的エビデンスである。今後、既存の抗血管形成療法が効果的でない場合に、抗 VM 形成療法の開発が腫瘍細胞への血液供給阻害や転移・再発を抑制する新たな治療法になることが期待される。

2 序論

癌幹細胞は『自己複製能と多分化能の両方を有する癌細胞』と定義されており、heterogeneity の高い癌細胞を生み出す少数の細胞から構成される集団である[29, 39, 63]。癌幹細胞は腫瘍の進展と転移を促進し、化学療法および放射線治療に対して耐性を持つとされ[6, 10]、抗がん薬治療後に残存した癌幹細胞が再発や転移を起こすことが治療上大きな問題であると考えられている。癌幹細胞は1990年代に、急性骨髄性白血病において発見され、以降、数多くの固形癌でも存在が確認されている[56]。癌幹細胞が同定された固形癌のなかでも、乳癌は癌幹細胞に関する研究において最も一般的に用いられる癌腫の一つで[10]、intratumoral heterogeneity（腫瘍内不均質性）を示し、癌幹細胞を頂点とした前駆細胞、成熟細胞の階層的な集団を構成する癌幹細胞仮説（階層性モデル）が当てはまると考えられている[14, 26]。乳癌幹細胞は、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）遺伝子発現が陰性を示す basal-like タイプ乳癌との類似点が見られる。臨床病理学的定義で分類されるトリプルネガティブ乳癌（TNBC）の多くは、basal-like タイプに分類される[11, 26]。TNBCとは高頻度に TP53 変異を示す[37]、予後不良で転移のリスクが高い乳癌である[4, 36]。TNBCの多くが basal-like タイプであることから、TNBCの強い侵襲性は階層性モデルの癌幹細胞に起因していると考えられている[21, 33]。

乳癌にはいくつかの癌幹細胞マーカーが知られている。ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1)はその一つで、ALDH1 発現を示す癌幹細胞集団は炎症性乳癌（IBC）の転移性および侵襲性に関与することが示されている[9]。特に、ALDHファミリーのサブタイプの1つである ALDH1A3 は新たな臨床的な癌幹細胞マーカーとして期待されており、癌幹細胞の含有率と転移性乳癌の発生との間に明確な相関関係がある[9, 39]。さらに、ALDH1A3 は癌幹細胞だけでなく TNBC に存在する増殖能の強い前駆細胞においても発現することが明らかになっている[22]。Sox-2 (Sex-determining region Y (SRY)-box binding protein-2)は、幹細胞の多能性維持および胚発生の調節において重要な役割を果たしているが[3, 5, 46, 59, 60]、乳癌幹細胞においてもその特異的発現が確認され、癌幹細胞マーカーとしても用いられている[28]。一方、GATA3 (GATA-binding protein 3) は乳腺管腔上皮の分化に必須の役割を果たす zinc-finger 型転写因子であり[24, 54]、今回の実験では乳腺管腔上皮分化誘導マーカーとして使用した。

近年、癌細胞の血管擬態（vasculogenic mimicry :VM）形成能力が報告されている[65]。VMは腫瘍細胞が内皮細胞を模倣する血管外微小血流機構であり、主に侵襲性の強い腫瘍にみられる[18]。VMは血管新生とは異なるもので、腫瘍細胞によって血管様構造が形成され、第二の循環系として機能する[38]。実際に、VM構造内の血流がユーイング肉腫で観察され、腫瘍細胞からなるVM構造は宿主血管からの血液供給を受ける機能的な

微小循環としてはたらくことが報告されている[13, 18, 55]。VM 形成において vascular endothelial (VE) -カドヘリン、マトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) -2、および MMP-9 が発現していることが知られており[17, 52, 57]、これらは VM 関連遺伝子として用いられている[33, 63]。臨床的には、VM 形成は腫瘍の浸潤、転移、予後に関係があることが知られている[32]。顕著な VM 形成を有する乳癌症例では非 VM 症例と比較して血行性再発率が高く、5 年生存率も低い傾向があるという報告がある[50]。さらに、VM および癌幹細胞の特徴と TNBC の侵襲性との強い関連性も示唆された[33, 63]。TNBC の患者は無病生存期間 (disease-free survival :DFS) が短く、疾患の初期段階で臓器転移を起こす傾向があり[8, 11, 30]、再発率は診断後の最初の 2 年間で急速に上昇して 2~3 年でピークに達し、その後は再発リスクが低下することが特徴である[11, 30]。この TNBC 患者の予後と、前述の VM 形成を有する患者の予後を比較すると、早期での転移や高い再発率の特徴であるという類似点がみられる。さらに、様々な癌腫の予後に関しても VM 形成と癌幹細胞が関与していると報告があり[13]、例として、ALDH1 高発現の上皮性卵巣癌の患者では高い VM 形成率は転移、および、より短い全生存期間 (OS) との関連が確認された[62]。

乳癌において、p53 に関連する TP53INP1 (p53 駆動酸化ストレス応答蛋白質) は ROS/snail シグナリング系を介した VM 形成の阻害に関与することが報告されている[58]。腫瘍抑制遺伝子 TP53 はストレス誘導条件下および DNA 損傷の後に細胞周期停止およびアポトーシスを誘導する[23, 43]。TP53INP1 は p53 の Ser46 リン酸化を介して p53 依存性アポトーシスを調節し、p53-Ser46 キナーゼの補因子として働く[40]。乳癌幹細胞における p53 媒介シグナル伝達経路の変化がアポトーシス耐性表現型を引き起こすと示唆されている[22]。

乳癌の悪性度と VM の関係が次第に明らかになってきているが、VM 形成における癌幹細胞の役割を説明できる分子メカニズムには未だ不明な点が多い。本研究では、癌幹細胞の特性を有する TNBC 由来 HCC1937 細胞のアポトーシス耐性細胞集団に着目し、癌幹細胞類似細胞と VM 形成の関連を明らかにすることを目的とした。我々の結果は、TNBC 細胞の治療耐性細胞集団が VM 形成における重要な役割を果たすことを示唆した。

3 研究方法

3.1 p53 発現誘導可能な HCC1937/p53 細胞の培養

ヒト乳癌細胞株 HCC1937 は American Type Culture Collection (ATCC) から入手した。HCC1937 は ER、PR、および HER2 の発現が陰性の TNBC で、TP53 および BRCA1 の変異を有する細胞である [26]。使用した HCC1937/p53 細胞は HCC1937 細胞に doxycycline (Dox) 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である [22]。HCC1937/p53 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) (SIGMA, USA) [20]、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。Dox 含有培地で 1~7 日間培養した HCC1937/p53 細胞をそれぞれ Dox1d~Dox7d と命名した [22]。

$$\text{VM score} = \left[\frac{\text{A} \left((\text{No. of sprouting cells}) \times 1 + (\text{No. of connected cells}) \times 2 + (\text{No. of polygons}) \times 3 \right)}{\text{Total number of cells}} \right] + \left[\text{B} \left(0, 1 \text{ or } 2 \right) \right]$$

Fig. 1 Formula for quantification of the VM score

The VM score was assessed by a modified formula. A: Each cell within the optical field is counted and this number is referred to as the “total number of cells”. Each cell that shows sprouting is given 1 point. When two or more prolongations unite and form connected cells, 2 points are awarded to each cell involved in this process. The formation of a polygon is given an additional 3 points. Thus, the score for sprouting, connected cells, and polygons is divided by the total number of cells. B: The presence of a complex mesh (luminal structures consisting of walls of two to three cells thick) is given a score of 1 and is added to the total value. This score is added once per optical field. If this complex structure is present and the walls are four or more cells thick, then a score of 2 is awarded. The absence of complex mesh receives 0 points. The individual final scores are derived from a total of ten fields each in three independent experiments.

3.2 マトリゲル上での VM 形成と評価

マトリゲル®基底膜マトリックス (CORNING, USA) を培地として使用した。今回の実験では thin gel 法 (manufacturer's protocol 内) を採用した。まず、30~40 μ L/well の液状のマトリゲルを氷上で 8 ウェル培養スライド (Falcon®, CORNING, USA) にコーティング後、37°C で 15 分間インキュベートしてゲル化させ、培地を作成した。細胞は 1% GlutaMAX™ (Life Technologies, USA) を含んだ無血清培地 opti-MEM (Life technologies, USA) に懸濁した [19]。この細胞懸濁液をマトリゲル上に 2.45×10^5 /well ずつ播種し、5% CO₂ インキュベーターで 37°C, 5% CO₂ にて培養した。形成された VM 構造は倒立顕微鏡 CKX41 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) で観察し、DP70 デジタルカメラ (OLYMPUS, Tokyo, Japan) で撮影した。得られたカラー画像は Fiji/ImageJ ソフトウェア (version 1.52g, Java 1.80_172, NIH) を用いてグレースケール画像に変換した [12]。VM 形成の定量的評価は VM スコア計算式を用いた (Fig. 1) [2, 27]。

3.3 免疫蛍光染色

マトリゲル上の細胞を 4% パラホルムアルデヒドで 30 分間固定し、PBS で洗浄後、0.25% TritonX-100 で 10 分間透過処理した [53]。その後、細胞を 45 分間 10% 正常ヤギ血清 (SeraCare Life Sciences, MA, USA) で処理し、抗 ALDH1A3 (Purified Rabbit Polyclonal, ABGENT, 1:50)、抗 Ki-67 (Mouse IgG1 monoclonal, DAKO, 1:500)、および抗 GATA3 (Mouse IgG2B monoclonal, R&D system, 1:300) を 4°C で一晩反応させた。非免疫ウサギ血清または isotype mouse IgG を使用し negative control として反応させたところ、バックグラウンドシグナルは観察されなかった。これらの抗体の特異性は製造業者のデータシート内でウェスタンブロッティングによる特異的なシグナルバンドの検出、および細胞型特異的な免疫組織化学染色パターンが掲載されており、既存の刊行論文に基づいて広く確認されている [44, 48, 61]。二次抗体としてそれぞれ Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, USA, 1 : 1,000)、Alexa Fluor 680 conjugated goat anti-mouse IgG1 (Life Technologies, USA, 1 : 1,000)、Alexa Fluor 680 conjugated goat anti-mouse IgG (Life Technologies, USA, 1 : 1,000) を用いて室温で 1 時間インキュベートし、一次抗体結合を検出した。核染色は DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, 300 μ g/mL) (Molecular Probes, USA) を使用した。蛍光画像の撮影は共焦点レーザー走査顕微鏡 (A1, NIKON INSTECH, Tokyo, Japan) を使用した。ランダムに選択された画像領域 (合計 13 領域) の強度は Fiji/ImageJ ソフトウェア (version 1.52g, Java 1.80_172, NIH) を用いて各蛍光チャンネルについて定量的に分析した [12]。

3.4 ALDEFLUOR アッセイと fluorescence-activated cell sorter (FACS)による細胞分離

ALDEFLUOR キット (STEMCELL Technologies, Canada) で ALDH 酵素活性を検出し、ALDH⁺細胞と ALDH⁻細胞を分離した[9]。HCC1937/p53 細胞を ALDEFLUOR assay buffer に懸濁し ALDH 基質 (BAAA, 1×10^6 細胞あたり $1 \mu\text{mol/L}$) を加え、 37°C , 30 分間インキュベートした。各サンプルの negative control として、ALDH 基質を加えたサンプル細胞に ALDH 阻害剤 (DEAB: diethylaminobenzaldehyde, 50mmol/L) 加えて 37°C , 30 分間インキュベートしたものを用意した。FACS による細胞分離には Cell Sorter SH800 (SONY, Tokyo, Japan) および SH800 Software (Ver.2.1.2) (SONY, Tokyo, Japan)を用いた。ALDEFLUOR の蛍光色素は 488nm レーザーで励起させ、蛍光を FITC525/50 バンドパスフィルター (FL2) で検出した。生存細胞のみを選別するために、7-aminoactinomycin D(7-AAD) (BD Biosciences, USA) $20 \mu\text{L}$ で 5 分間インキュベート後に、核染色された死細胞を排除した。

3.5 Droplet Digital PCR (ddPCR)

VM 形成した細胞をマトリゲルと共に microcentrifuge tube へ移した。TRIzol® (Life Technologies, USA) で total RNA を抽出し、SuperScrip®III 逆転写酵素 (Life Technologies) を用いて cDNA を合成した[12]。ddPCR は QX100™ Droplet Digital™ PCR システム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用し、manufacturer's protocol に従って実験を行った。サンプルとして ddPCR SuperMix (Bio-Rad Laboratories)、各標的遺伝子の TaqMan® プローブ (Thermo Fisher Scientific, USA)[GAPDH (Hs03929097_g1)、VE-カドヘリン (Hs00170986_m1)、MMP-2 (Hs01548727_m1)、MMP-9 (Hs00957562_m1)] および適宜濃度調整した cDNA テンプレートを混合した。これらのサンプルと Droplet Generation Oil for Probes (Bio-Rad Laboratories) を Droplet Generator DG8 カートリッジ (Bio-Rad Laboratories) に移し、QX100 ddPCR Droplet Generator (Bio-Rad Laboratories) でドロップレットを生成した。生成されたドロップレットを 96 ウェル PCR プレート (Eppendorf, Hamburg, Germany) に移し、プレートを Heat Sealer (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いてオイルでヒートシールし、C1000 Touch™ Thermol Cycler (Bio-Rad Laboratories) で PCR 反応を行った。熱サイクル条件は 95°C , 10 分後、 94°C , 30 秒と 60°C , 1 分を 40 サイクル繰り返し、 98°C , 10 分とした (加熱速度 $1^\circ\text{C}/\text{sec}$)。QX100 Droplet Reader (Bio-Rad Laboratories) を用いて生成された個々のドロップレットの FAM®チャンネル蛍光を検出し、QuantaSoft™ソフトウェア (Ver. 1.3.2.0) (Bio-Rad Laboratories) によってポアソン分布に当てはめ、cDNA のコピー数から最終濃度を算出した。各標的遺伝子のサンプル測定値を GAPDH 測定値で除することで補正した。

3.6 統計解析

全ての実験を少なくとも 3 回繰り返した。結果は平均±標準誤差 (SE)として表した。2 群間の平均値の相違を解析するため Student's t-test を用いた (Bell Curve for Excel Ver.2.2.1)。P <0.05 を有意とみなした。

4 結果

4.1 HCC1937/p53 細胞の VM 形成

HCC1937/p53 細胞は様々な細胞の大きさや多形性 (pleomorphism) を示し、特定の構造を形成することなく不規則なコロニーを生じる。フラスコ内の培養では個々の細胞の形状は flat であった (Fig. 2a)。一方、マトリゲル上で 24 時間培養した細胞は血管構造に類似したメッシュ状、もしくは honeycomb 構造を形成した (Fig. 2b)。これらは VM の構造として知られている。我々はこの honeycomb 構造を 2 つの領域 (集合領域/架橋領域) に分類した。集合領域 (aggregated regions: A 領域) は細胞の厚さが 4 個あるいはそれ以上の細胞が集まった構造であり (Fig. 2b: *), 架橋領域 (bridging regions: B 領域) は厚さ 1~3 個の細胞で細胞間を繋いでいる構造である (Fig. 2b: ▲)。これらの立体構造を明らかにするため、共焦点レーザー走査顕微鏡で核 (DAPI) のスライス画像を撮影し、Temporal-Color Code (Fiji/ImageJ) を用いて画像処理をした。24 枚の連続スライス画像 (厚さ: $1.0\mu\text{m}$) からスタックを作成し、核の深度方向の位置を Fig. 2c, 2d の frame に従ったカラーコードで表示した。興味深いことに、特に B 領域は赤色と緑色の位置の異なる核が確認され、3 次元構造であることが明らかになった (Fig. 2c, 2d)。

さらに、この honeycomb 構造が VM として形成していることを確認するため、VM 関連遺伝子とされる VE-カドヘリン、MMP-2、および MMP-9 の発現を解析した [13, 33, 57, 63] (Fig. 3)。VM 群ではこれらの遺伝子の発現が確認された。Control 群との比較では MMP-2 の発現は変化がなかったが、VE-カドヘリンおよび MMP-9 の発現は VM 群において有意に増加した。特に、VE-カドヘリンおよび MMP-9 の発現が有意であることは VM が形成されていることを示す [52]。この結果から今回の honeycomb 構造は真の VM 形成メカニズムによって形成された VM 構造であることが確認された。

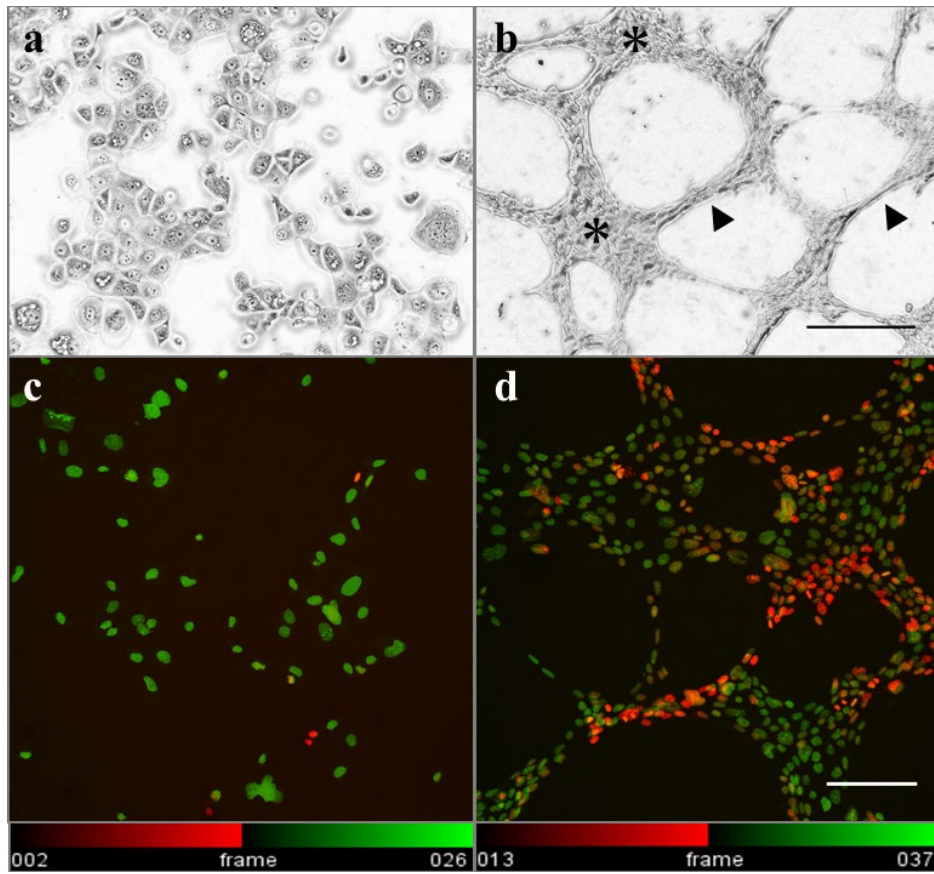


Fig. 2 VM formation of HCC1937/p53 cells on matrigel

a) b) Microscopic appearances of the cellular structures 24 hr after seeding on matrigel are photographed using an inverted phase contrast microscope. a: Cultured in flask for 24 hr. b: Cultured on matrigel. (Bar=200 μ m) The aggregated regions (asterisks) are 4 or more cells thick, whereas the bridging regions (arrowheads) are 1-3 cells thick. c) d) The cells were stained with DAPI and photographed using a confocal laser scanning microscope. The 3D structures in the B regions are shown using Temporal-Color Code of Fiji/ImageJ software. Twenty-four vertical serial sections (each 1.0 μ m thick) were stacked and displayed with the color code according to the depth of the nuclear location. c: Cells cultured on APS-coated slides for 24 hr. d: Cells cultured on matrigel for 24 hr (Bar=100 μ m).

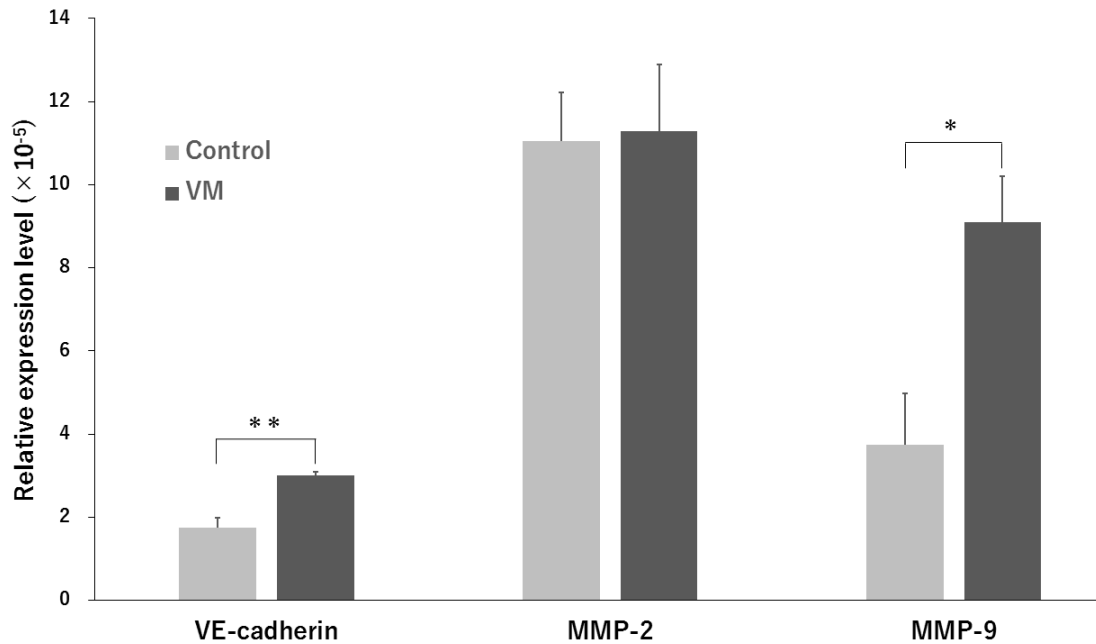


Fig. 3 Detection of VM-related gene expression in cells on matrigel by ddPCR

Control: Cells cultured in flask. VM: Cells cultured on matrigel. Relative mRNA expression level is calculated by dividing each value of the VM-related gene by that of GAPDH. Means \pm SE are obtained from four independent assays for controls and five independent assays for VM experiments. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (Student's t-test).

4.2 VM 構造における癌幹細胞の分布

VM 形成過程における癌幹細胞の役割を明らかにするために、乳癌幹細胞マーカー ALDH1A3 および乳腺管腔上皮分化誘導マーカー GATA3 の発現パターンを二重免疫蛍光染色法を用いて解析した。ALDH1A3 を発現する細胞は B 領域（黄色い枠内）に局在する傾向があり、対照的に、A 領域（白い枠内）は GATA3 の発現が強くみられた (Fig. 4A)。細胞増殖マーカーが発現した Ki-67⁺細胞は A 領域と比較して B 領域に多く、B 領域における盛んな細胞増殖が確認された (Fig. 4B)。これらの局在を定量的に評価するため、各標的タンパクの免疫蛍光強度を領域ごとに測定し、相対的蛍光強度 (B 領域の蛍光強度/A 領域の蛍光強度) を比較した (Fig. 4C)。ALDH1A3⁺細胞および Ki-67⁺増殖細胞は B 領域に局在し、GATA3⁺細胞は A 領域に局在することが明らかとなった ($P < 0.05$)。

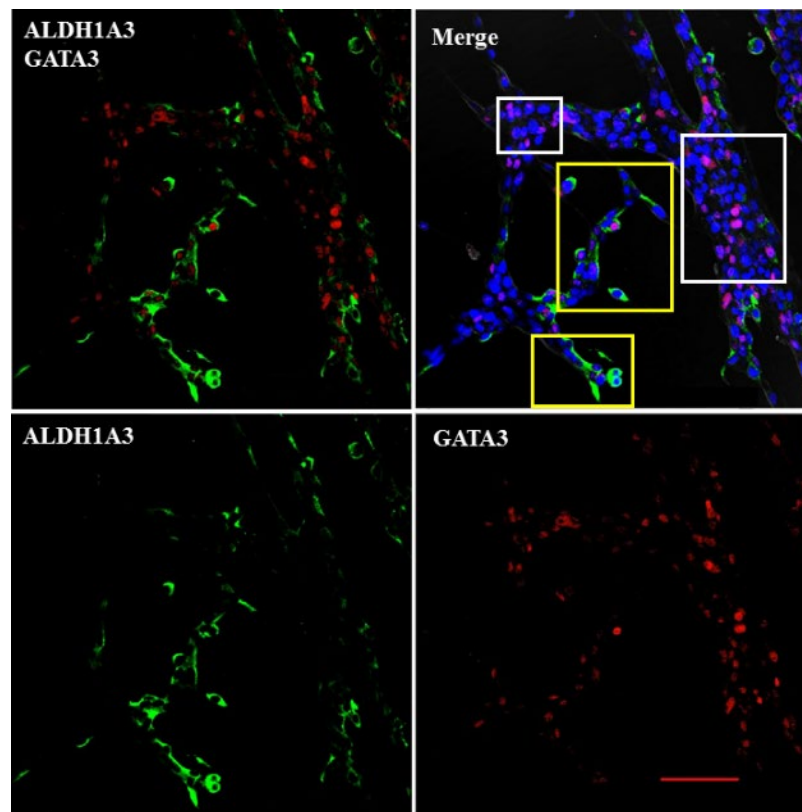


Fig. 4A

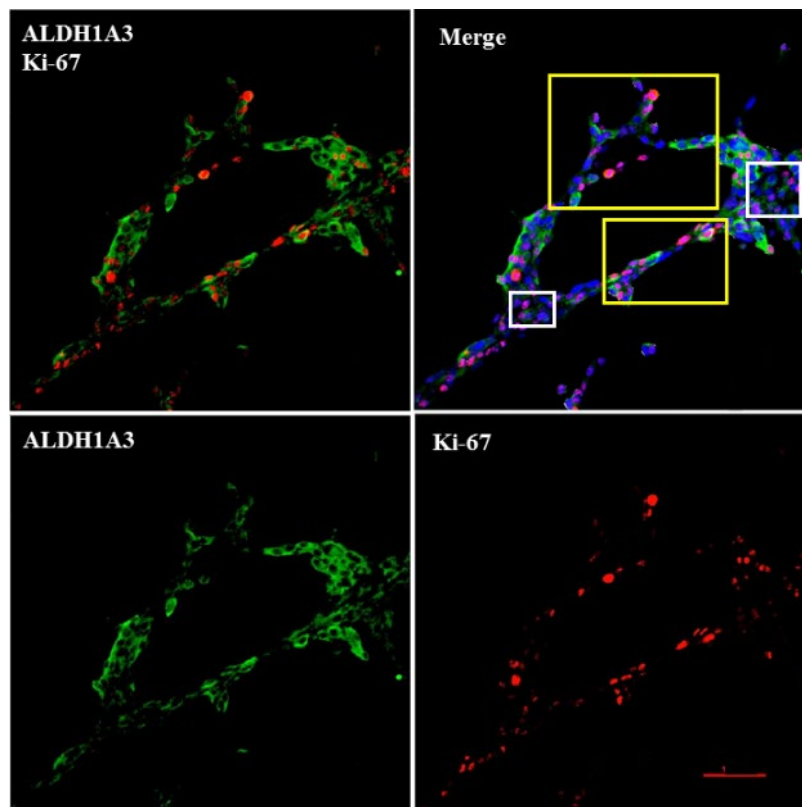


Fig. 4B

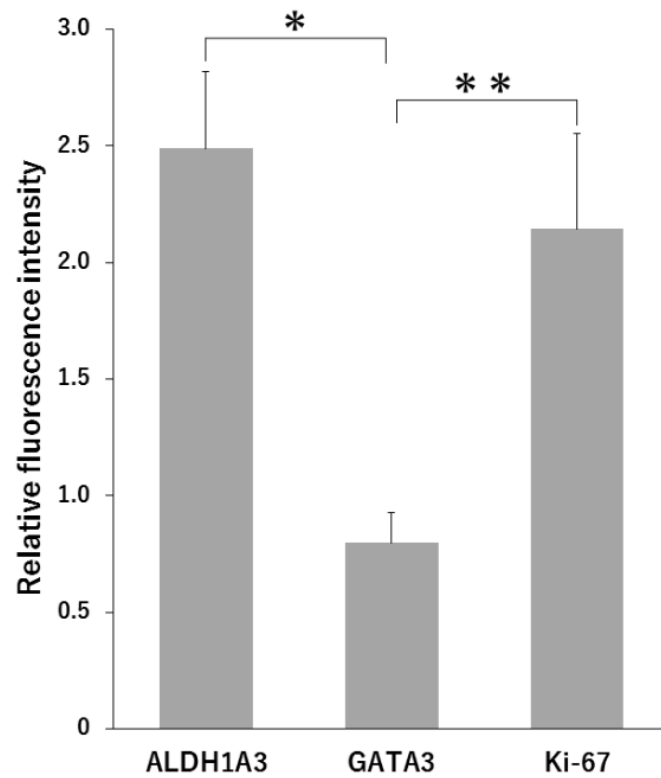


Fig. 4C

Fig. 4 Localization of gene expression patterns in the process of VM formation by double immunofluorescence analysis

Gene expression patterns in the process of VM formation. A: Expressions of ALDH1A3 (cytoplasm, green) and GATA3 (nuclear, read). B: Expressions of ALDH1A3 (cytoplasm, green) and Ki-67 (nuclear, read). Nuclei are stained with DAPI (blue). Quantitative evaluation of the expression patterns by relative fluorescence intensities. The average values of relative fluorescence intensities are obtained from the cells in yellow open squares: B region, and white open squares: A region. (Bar=100 μ m). C: Values are obtained by dividing the total intensities by the numbers of cells in each region. Then, relative intensities (Means \pm SE) are calculated as average values of the B region (n=7) divided by those of the A region (n=6). The experiments were repeated three times. *P<0.05, **P<0.05 (Student's t-test).

4.3 癌幹細胞と VM 形成

癌幹細胞は VM 形成能力をもつことが *in vitro* [65] と *in vivo* [45, 57] の両方で報告されている。HCC1937/p53 細胞における癌幹細胞の VM 形成能力を調べるため、aldefluor アッセイを用いて ALDH 活性を検出し、FACS によって ALDH⁺ および ALDH⁻ 細胞の分離を行った (Fig. 5A)。negative control サンプル (ALDH 阻害剤 DEAB 投与) を用いて、ALDH⁺ の範囲を決定した。negative control サンプルは ALDH が阻害されているため、試薬 (ALDH 基質) の蛍光物質への変換が起こらず、ALDH 活性による蛍光が起こらない。そこで、negative control サンプルで蛍光を有する領域をバックグラウンドとみなし、negative control サンプルで蛍光のない画分 (With DEAB の赤色範囲: 0.11%) で、しかも、test サンプル (DEAB 非投与) で発光を発する画分に含まれる細胞 (Without DEAB 赤色範囲: 51.77%) を ALDH⁺ 細胞と定義した。一方、Without DEAB の ALDH 活性が最も低い細胞集団 (青色範囲: 11.59%) を ALDH⁻ 細胞とした。選別した細胞はマトリゲル上に播種し、24 時間培養した (Fig. 5B)。ALDH⁺ 細胞は 24 時間以内に VM 形成が完了した。一方、ALDH⁻ 細胞は丸い形態を維持し、VM 形成初期にみられる発芽様形態がみられず、フラスコ培養でみられたコロニー集団 (Fig. 2a) の形成も示さなかった。

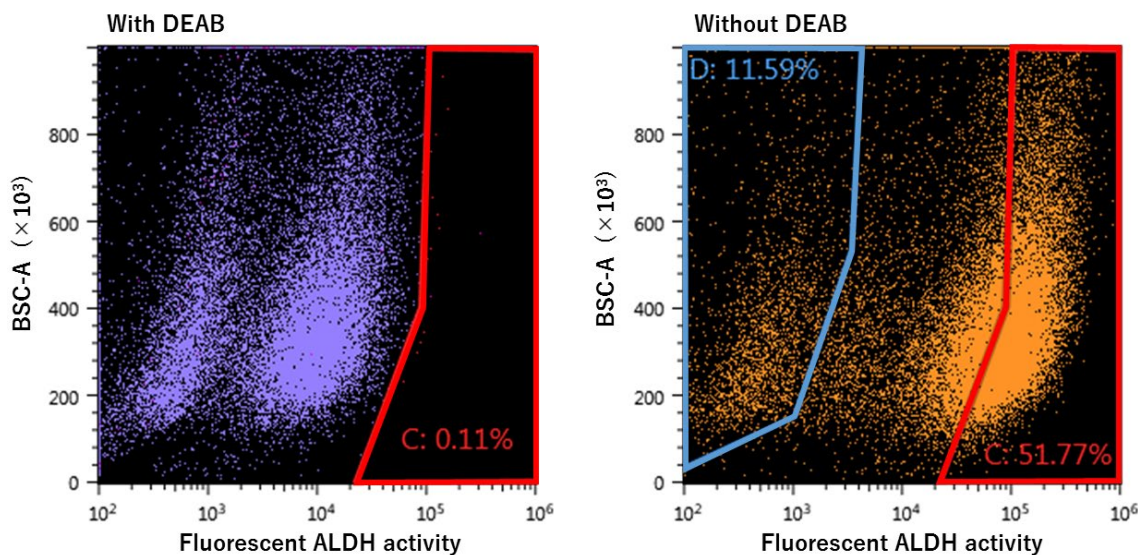


Fig. 5A

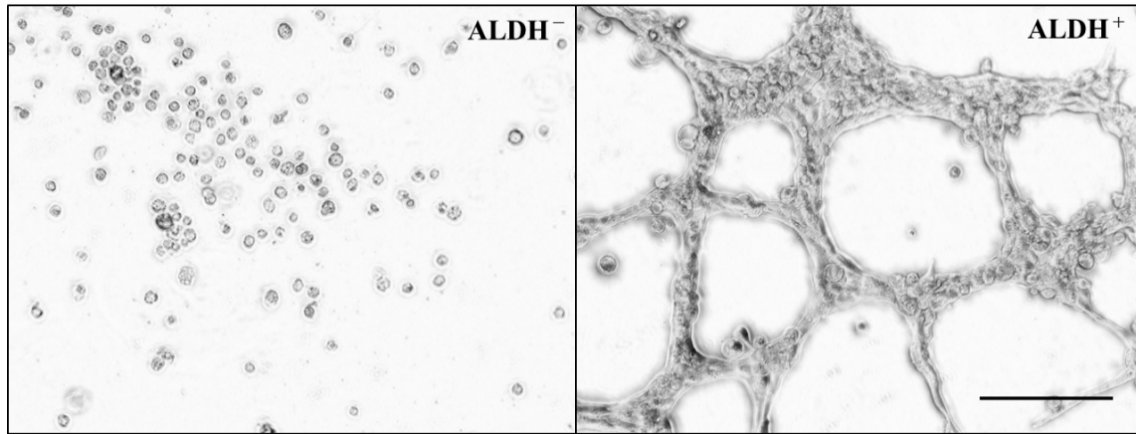


Fig. 5B

Fig. 5 Ability of FACS-sorted ALDH⁺ cells to form VM

A: Isolation of ALDH⁺ and ALDH⁻ cells by the aldefluor assay. In control, DEAB ALDH inhibitor was added to establish the baseline fluorescence of the cells (red range: 0.11%) of ALDH⁺ cells are defined as the cells exhibit the aldefluor activity exceeded the baseline (51.77%). ALDH⁻ cells are defined as in the blue range, removing the intermediate range (11.5%). In order to select living cells, 7-AAD for nuclear staining was added, and the stained cells were regarded as dead cells and removed. B: VM formation of ALDH⁺ and ALDH⁻ cells cultured on Matrigel for 24 hr (Bar = 200 μ m).

4.4 アポトーシス抵抗性 HCC1937/p53 細胞と VM 形成能

我々の過去の研究結果では、p53 誘発アポトーシスに耐性の HCC1937/p53 細胞集団は免疫染色法の解析において癌幹マーカーALDH1A3 および Sox-2 の発現割合が増加し、癌幹細胞を豊富に含むことを明らかにしている (Fig. 6 折れ線グラフ)。Dox2d 細胞を癌幹細胞類似細胞として用いた理由は、p53 誘導によるアポトーシスで細胞数の減少が確認でき、且つ、両方の癌幹細胞マーカー遺伝子の発現割合が高いので、癌幹細胞が豊富な集団であると予想されたためである (Fig. 6)。さらに、再確認としてリアルタイム PCR によって Dox2d 細胞は ALDH1A3 および Sox-2 の発現が亢進していることを確かめた (Fig. S1)。

Dox2d 細胞の比較のため、Dox 処理をしていない細胞を Control 細胞として用いた。それぞれの細胞を thin gel 法で培養し、経時的に解析した。Control 細胞は 24 時間で VM 形成が完了し、その後、無血清培養条件のために徐々に形態が崩壊した (Fig. 7A)。一方、Dox2d 細胞は Control 細胞よりも早く 6 時間で VM 形成が完了し、その後同様に崩壊した (Fig. 7A)。実際、Dox2d 細胞は 1~6 時間の VM スコア値変動に対する線形回帰分析からも、Control 細胞よりも速く VM を形成したことが示された (Fig. 7B)。

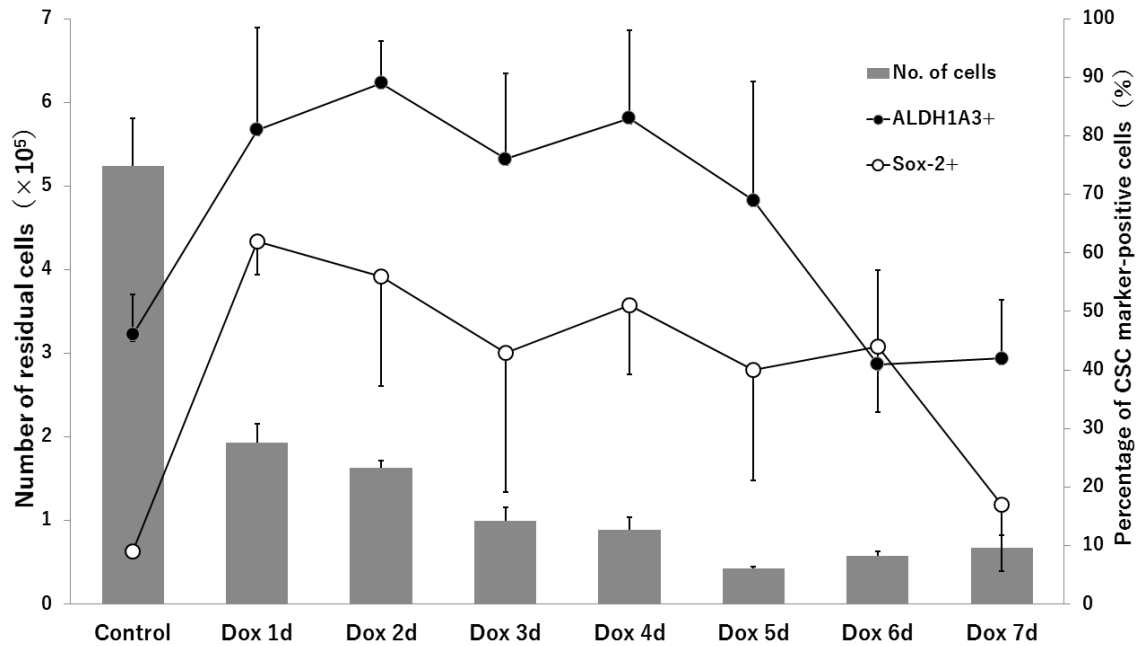


Fig. 6 The expression patterns of ALDH1A3 and Sox-2 in Dox-treated cells

The time-course changes of the percentage of ALDH1A3⁺ cells and Sox-2⁺ cells in our previous study [22] are shown. Residual HCC1937/p53 cells indicate apoptosis-resistant cells in those showing Dox-induced p53 overexpression.

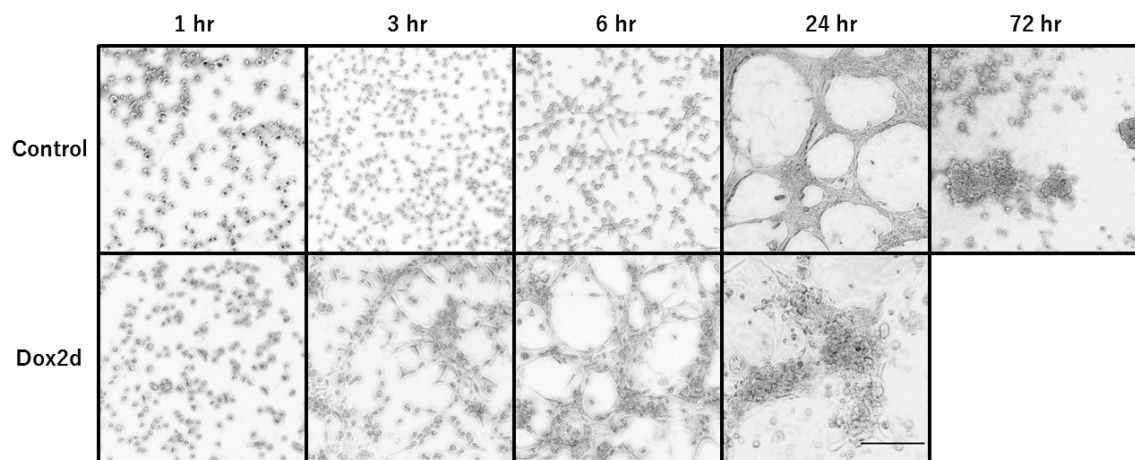


Fig. 7A

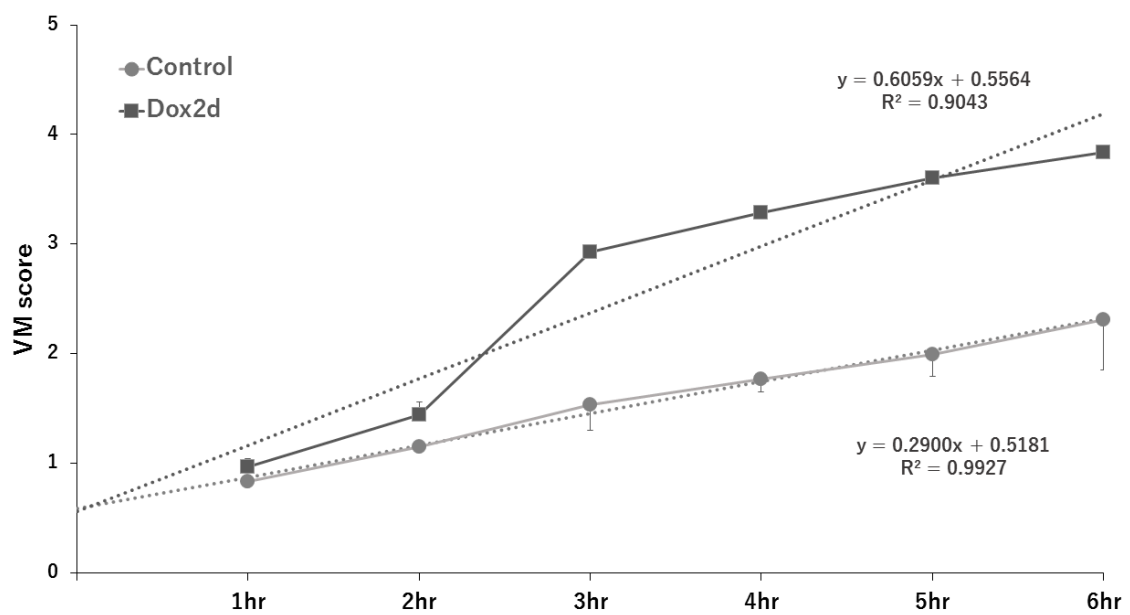


Fig. 7B

Fig. 7 Accelerated VM formation on matrigel in apoptosis-resistant subpopulations of HCC1937/p53 cells

A: The cells on Dox for 2 days were seeded in matrigel and cultured. The control cells were not treated with Dox. B: The time-course changes of VM scores were calculated by the formula in Fig. 1. Each line graph is modified by linear regression (Control: $R^2=0.9927$, Dox2d: $R^2=0.9043$) and shown as a dotted line.

5 考察

5.1 腫瘍細胞の VM 形成と構造的特徴

VM は乳癌、肝臓癌、グリオーマ、卵巣癌、メラノーマ、前立腺癌など種類の癌で確認されている[65]。VM の構造と役割についても様々な癌腫で研究されており、*in vivo* ではメラノーマ内の血管様構造に内皮細胞がないことが示され[38]、ユーイング肉腫細胞が形成した血管様構造内では血流が確認された[55]。また、*in vitro* では単層のマトリゲル内で培養した唾液腺腺様嚢胞癌およびメラノーマの組織学的断面によって洞様血管構造および管状構造が認められた[38, 57]。これまではマトリゲル内での培養によって形態の観察が行われてきたが、我々は別アプローチとしてマトリゲル上で培養する thin gel 培養法を用いた。この培養を経時的に観察すると、最初の変化として細胞が出芽様の形に変化し、続いて細胞がお互いに手を伸ばすように接着し、最後に honeycomb (VM) 構造を形成した (Fig. 7A)。この VM 構造は、VM 構造を形成しつつある B 領域と、細胞が集合した A 領域から構成されることを示した (Fig. 2B)。この構造の 3 次元配列については、color-coded multi-image TIFF 法 (Fiji/ImageJ) によって効果的に可視化でき、立体構造が確認された (Fig. 2c および 2d)。thin gel 法で培養し撮影したことで、VM 構造全体の立体構造を捕らえることができ、領域ごとの立体構造の違いを明らかにした。特に、VM 形成しつつある B 領域で細胞の 3 次元配列が顕著であり、この構造領域の立体配列の差は形態的に VM の形成過程を明らかにする手掛かりになると考えられる。以上の形態的な特徴に加え、VM 関連遺伝子の発現が確認されたことより、HCC1937/p53 細胞には VM 形成能力を持つ細胞が含まれていることが明らかとなった (Fig. 3)。

5.2 VM 形成と癌幹細胞の関係

VM の誘導における癌幹細胞様細胞の役割は様々な種類の癌種で示している。例えば乳癌においては、癌幹細胞様細胞は ALDH 活性[27]、マンモスフェア形成能[34]、および CD133[33, 57]、CD44⁺/CD24⁻[27, 41]、Sox-2[28]などの発現パターンによって同定・単離され、VM 形成との関係が明らかにされている。予後不良の炎症性乳癌 (IBC) では ALDH 活性を示す細胞亜集団が癌の侵襲性と転移性に関与すること[9]や、VM 形成率が高いことが報告されている[50]。IBC の異種移植腫瘍内では VM と血管新生の接合が確認されており、これは転移における VM の役割を裏づける証拠とされている[49]。

我々が使用した HCC1937 細胞は ALDH⁺癌幹細胞の含有率が高いとされる[7, 21, 22]basal-like 乳癌由来で[26]、FACS によって選別した ALDH⁺細胞には高い VM 形成能力

が示され (Fig. 5A)、IBC の研究結果と一致した[27]。このことは、VM が悪性腫瘍に関連する予後不良のマーカーになり得るというコンセンサスとも一致する[62]。今回の実験では、ALDH⁺細胞は 24 時間以内で VM が形成された一方で、ALDH⁻細胞はこの能力を欠いていることが示されたことから、ALDH⁺亜集団の中に含まれる癌幹細胞様細胞が VM 形成の開始に必須であることが明らかになった。

5.3 VM 構造における癌幹細胞マーカー発現分布

マトリゲル上での免疫蛍光分析では、立体構造を示し VM が形成されつつある B 領域に ALDH1A3⁺細胞が局在を示すことから、癌幹細胞が VM の形成促進において重要な役割を果たしていると推定された。我々が過去に報告した研究結果によると、癌幹細胞は活性化が起こると ALDH1A3 発現が亢進を示し、それに続き、前駆細胞として Ki-67 発現を伴う細胞増殖、さらに、GATA3 発現を伴う細胞分化が検出され、成熟細胞へと分化するという階層モデルが明らかになっている[22]。これを今回の免疫蛍光二重染色の結果に当てはめると、活性化された癌幹細胞 (ALDH1A3⁺) は最初に B 領域において細胞増殖 (Ki-67⁺) を開始し、さらに A 領域で GATA3⁺を発現する細胞が分化する過程で、VM 形成につながると考えられる (Fig. 4A, 4B)。GATA3 は乳腺管腔上皮分化誘導マーカーであるが、その発現調節はヒト胚性幹細胞における脈管形成および血管新生においても確認され[15]、さらに、ヒト内皮細胞の活性化に必要である[51]。VM は血管内皮細胞で構成される血管新生と区別されるが、ヒト内皮細胞が VM 形成に関与することが知られている。メラノーマでは VEGF-A (vascular endothelial growth factor -A) が内皮細胞の脱分化を引き起こし、VM 形成が誘導され、さらに、VEGFR2 の発現が VM 形成に寄与する報告がある[65]。しかし、GATA3 は VEGF を刺激しなという報告がある[51]ため、VM 形成には間接的、若しくは、別の経路で関与していると推察できる。

以上より、今回の結果は分子メカニズム的に VM 形成過程を明らかにする手掛かりになると考えられる。特に、(考察 5.1) で述べた立体構造が顕著な B 領域において、ALDH1A3 と Ki-67 の発現が発現していたことは、癌幹細胞の自己複製能力、もしくは、前駆細胞が VM 形成の促進に重要な役割を果たしていると示唆される。

5.4 治療抵抗性を示す癌幹細胞と VM 形成能力の関係

癌幹細胞類似集団を 2 つの手段で分離したが、VM 形成の完了時間に差がみられた。ALDH⁺細胞は VM 形成に 24 時間要したのに対し、Dox2d 細胞は 6 時間で VM 形成が完了した。Dox2d 細胞における VM 形成速度の促進には次のような理由が考えられる。1) 細胞

亜集団中の癌幹細胞含有率の違い。Dox2d 細胞集団には FACS で分離した ALDH⁺細胞集団よりも多くの癌幹細胞が含まれていると推定される。すなわち、Dox2d の p53 耐性細胞の割合は HCC1937/p53 全細胞の 31.05%であり (Fig. 6)、FACS によって単離された ALDH⁺細胞の割合は 51.77%であった (Fig. 5)。このことから、Dox2d 細胞は VM 形成能を有する癌幹細胞をより厳密に分離できていると考えられる。2) 培養細胞に対するストレスの関与。腫瘍環境の低酸素状態、または、腫瘍細胞への血液供給不足によるストレス条件下で VM が起こり、腫瘍細胞は侵襲性の強い腫瘍タイプになるとされている[25, 31]。今回の実験では、p53 誘発アポトーシスがストレスとして関与し、このストレスを受けて生き残ることができる Dox2d 細胞は VM を形成する能力を獲得し得ると推測できる。実際に、Dox2d 細胞は ALDH1A3、Sox-2、および GATA3 の有意な発現亢進だけでなく、VE-カドヘリンおよび MMP-9 を含む VM 関連因子の発現も確認された (Fig.S2)。しかし、p53 の調節因子である TP53INP1 (p53 駆動酸化ストレス応答蛋白質) が VM 形成の阻害に関与することが乳癌で報告されている[58]。この報告の中で、TP53INP1 過剰発現において VE-カドヘリン、MMP-2 および MMP-9 の発現が減少することも確認されており、今回の結果とは一致しない。Dox2d 細胞は p53 の発現があるにも関わらず、アポトーシスが起こっていないことから、何らかの理由で TP53INP1 を含むアポトーシス経路が進まず、アポトーシス誘導や VM を阻害する機能が抑制されているという可能性が推察される。これは、TP53INP1 の喪失または低発現は、乳癌の進行と正の関連があるとの報告とも一致する[58]。

5.5 VM 形成と癌細胞の脱分化

VM は血管内皮様の特性を含む様々な細胞表現型をとるために脱分化することで、悪性細胞の能力を示す[38, 66]。幹細胞関連マーカーや多能性を誘導する因子を再活性化すると、脱分化や幹細胞様状態を引き起こすことができる。脱分化の例として、腫瘍進展において重要な役割を担う上皮間葉移行(EMT)がある[42]。Sox-2 は EMT 誘導因子のひとつであり、さまざまな癌タイプの癌幹細胞集団における自己再生および集団の維持を調節する[16]。実際に、Sox-2 の発現亢進は、我々の形成した VM 構造においても発現が確認されている (Fig.S3)。

6 結論

癌幹細胞は VM 形成の惹起に重要であることが示され、VM 形成が高悪性度の乳癌における転移能および予後の悪化に関係しているという臨床的な報告[50]に一致する結果を得ることができた。

TNBC は他のタイプの乳癌よりも多くの癌幹細胞を含有するため、予後不良で薬剤耐性腫瘍を示すことが知られている[8, 11]。この薬剤耐性のメカニズムの一つとして、VM 形成が提唱されている[33, 63, 64]。我々の実験において、p53 誘発アポトーシスから免れた TNBC 由来 HCC1937/p53 細胞は幹細胞様特性を示し、VM 形成を促進したことによっても明らかとなった。これらの結果は、TNBC における治療耐性細胞は VM 形成において重要な役割を果たすということを示す最初の実験的エビデンスである。

今後、従来の抗血管形成療法が効果的でない場合、抗 VM 形成療法が開発されれば腫瘍細胞への血液供給をブロックするための代替方法になることが期待されているが[1]、加えて、治療抵抗性を示す癌細胞が原因の転移や再発を抑制する新たな治療法になる可能性も期待される。

7 補足データ

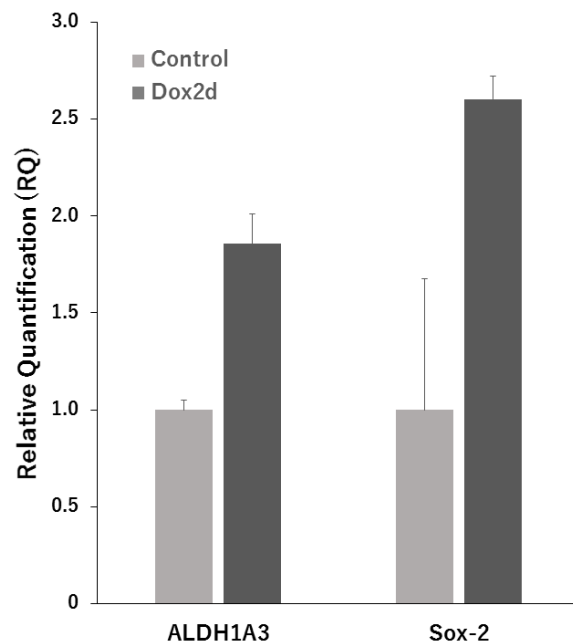


Fig. S1

Analysis of mRNA expression of ALDH1A3 and Sox-2 in Dox2d cells by real-time PCR

The cycle threshold values were converted to relative gene expression levels by the $\Delta \Delta C_t$ method [35, 47].

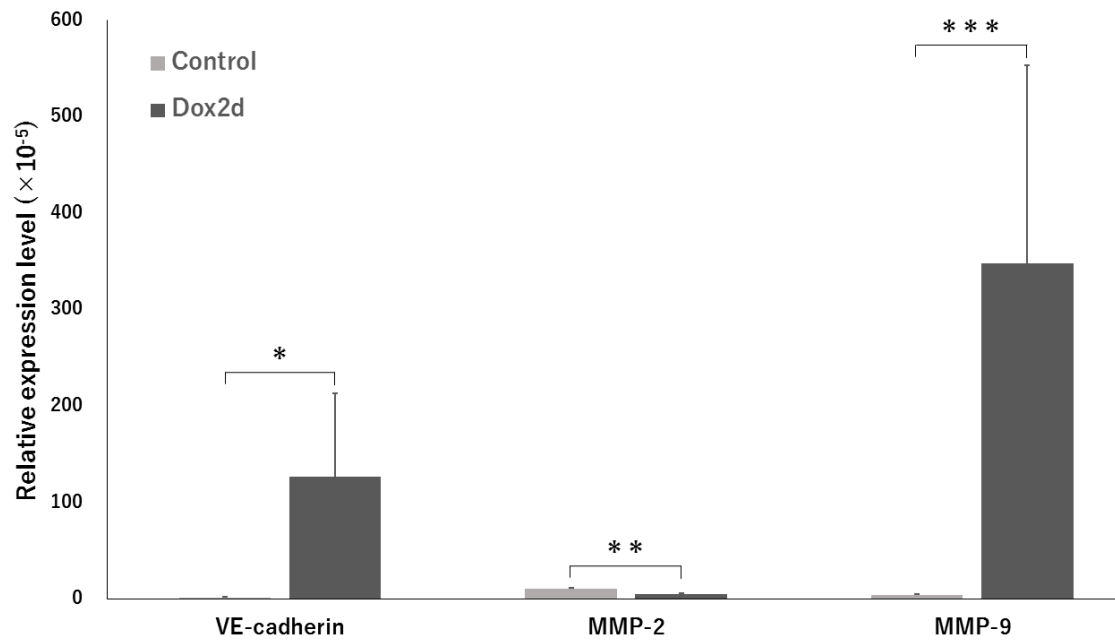


Fig. S2

Analysis of VM-related gene expression in Dox2d cells by ddPCR

Control: Cells cultured in flask.

Dox2d: Cells cultured with doxycycline for 2 days in flask.

Relative mRNA expression level is calculated by dividing each value of VM-related gene by that of GAPDH. Means \pm SE are obtained from four independent assays for controls and five independent assays for VM experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$, and *** $P < 0.05$ (Student's t-test).

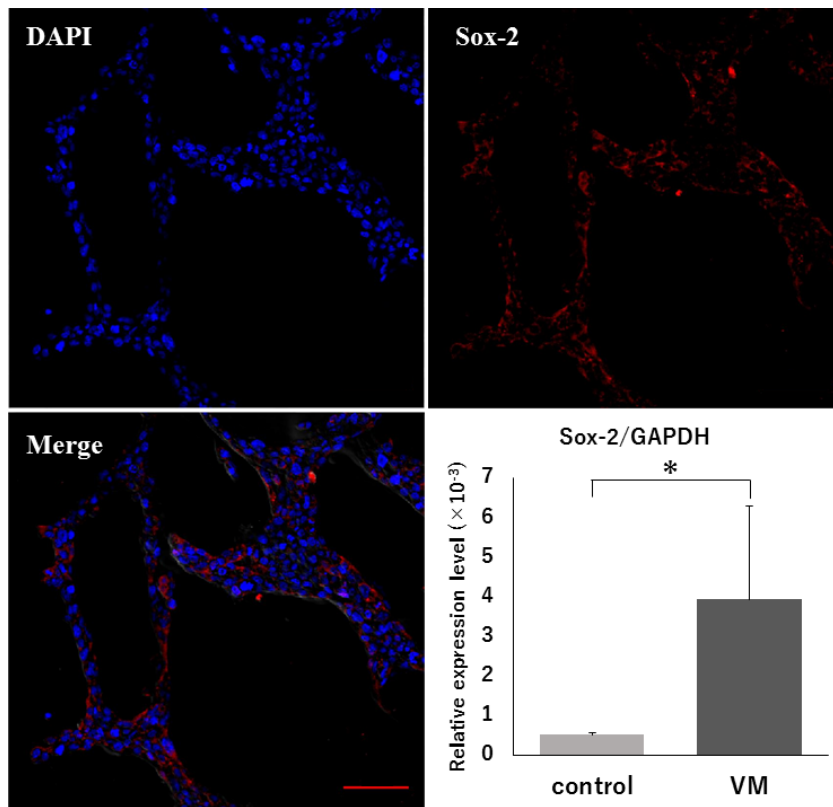


Fig. S3

Expression of Sox-2 in the process of VM formation by immunofluorescence and ddPCR analysis.

Gene expression patterns in the process of VM formation. Expression of Sox-2 (cytoplasm, red). Nuclei are stained with DAPI (blue) (Bar=100 μ m).

Relative mRNA expression level is calculated by dividing values of Sox-2 gene by those of GAPDH (Sox2/GAPDH).

Control: Cells cultured in flask.

VM: Cells cultured on matrigel for 24 hr.

Means \pm SE are obtained from three independent assays for controls and five independent assays for VM experiments. *P<0.05 (Student's t-test)

8 参考文献

1. Angara, K., Borin, T. F., and Arbab, A. S. (2017) Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma. *Translational oncology*. 10; 650–660.
2. Aranda, E., and Owen, G. I. (2009) A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biological research*. 42; 377–89.
3. 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 & development*. 17; 126–140.
4. Barcellos-Hoff, M. H., and Kleinberg, D. L. (2013) Breast cancer risk in BRCA1 mutation carriers: insight from mouse models. *Annals of Oncology*. 24; viii8-viii12.
5. Batchuluun, K., Azuma, M., Fujiwara, K., Yashiro, T., and Kikuchi, M. (2017) Notch Signaling and Maintenance of SOX2 Expression in Rat Anterior Pituitary Cells. *Acta histochemica et cytochemica*. 50; 63–69.
6. Bomken, S., Fišer, K., Heidenreich, O., and Vormoor, J. (2010) Understanding the cancer stem cell. *British Journal of Cancer*. 103; 439–445.
7. Burga, L. N., Tung, N. M., Troyan, S. L., Bostina, M., Konstantinopoulos, P. A., Fountzilias, H., Spentzos, D., Miron, A., Yassin, Y. A., Lee, B. T., and Wulf, G. M. (2009) Altered Proliferation and Differentiation Properties of Primary Mammary Epithelial Cells from BRCA1 Mutation Carriers. *Cancer Research*. 69; 1273–1278.
8. Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., Ollila, D. W., Sartor, C. I., Graham, M. L., and Perou, C. M. (2007) The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. *Clinical Cancer Research*. 13; 2329–2334.
9. Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Tarpin, C., Diebel, M., Esterni, B., Houvenaeghel, G., Extra, J.-M., Bertucci, F., Jacquemier, J., Xerri, L., Dontu, G., Stassi, G., Xiao, Y., Barsky, S. H., Birnbaum, D., Viens, P., and Wicha, M. S. (2010) Aldehyde Dehydrogenase 1-Positive Cancer Stem Cells Mediate Metastasis and Poor Clinical Outcome in Inflammatory Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 16; 45–55.
10. Chuthapisith, S., Eremin, J., El-Sheemey, M., and Eremin, O. (2010) Breast cancer chemoresistance: Emerging importance of cancer stem cells. *Surgical Oncology*. 19; 27–32.
11. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S. A. (2007) Triple-Negative Breast

- Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*. 13; 4429–4434.
12. Egashira, N., Minematsu, T., Miyai, S., Takekoshi, S., Camper, S. A., and Osamura, R. Y. (2008) Pituitary changes in Prop1 transgenic mice: hormone producing tumors and signet-ring type gonadotropes. *Acta histochemica et cytochemica*. 41; 47–57.
 13. Fan, Y.-L., Zheng, M., Tang, Y.-L., and Liang, X.-H. (2013) A new perspective of vasculogenic mimicry: EMT and cancer stem cells (Review). *Oncology letters*. 6; 1174–1180.
 14. Fulawka, L., Donizy, P., and Halon, A. (2014) Cancer stem cells--the current status of an old concept: literature review and clinical approaches. *Biological research*. 47; 66.
 15. Gerecht-Nir, S., Dazard, J.-E., Golan-Mashiach, M., Osenberg, S., Botvinnik, A., Amariglio, N., Domany, E., Rechavi, G., Givol, D., and Itskovitz-Eldor, J. (2005) Vascular gene expression and phenotypic correlation during differentiation of human embryonic stem cells. *Developmental Dynamics*. 232; 487–497.
 16. Herreros-Villanueva, M., Zhang, J.-S., Koenig, A., Abel, E. V., Smyrk, T. C., Bamlet, W. R., de Narvajas, A. A.-M., 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. *Oncogenesis*. 2; e61.
 17. Hess, A. R., Seftor, E. A., Seftor, R. E. B., and Hendrix, M. J. C. (2003) Phosphoinositide 3-kinase regulates membrane Type 1-matrix metalloproteinase (MMP) and MMP-2 activity during melanoma cell vasculogenic mimicry. *Cancer research*. 63; 4757–4762.
 18. Hillen, F., and Griffioen, A. W. (2007) Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*. 26; 489–502.
 19. Hongisto, V., Jernström, S., Fey, V., Mpindi, J.-P., Kleivi Sahlberg, K., Kallioniemi, O., and Perälä, M. (2013) High-Throughput 3D Screening Reveals Differences in Drug Sensitivities between Culture Models of JIMT1 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*. 8; e77232.
 20. Iwabuchi, E., Miki, Y., Ono, K., Onodera, Y., and Sasano, H. (2017) *In Situ* Evaluation of Estrogen Receptor Dimers in Breast Carcinoma Cells: Visualization of Protein-Protein Interactions. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 50; 85–93.
 21. Kai, M., Kanaya, N., Wu, S. V., Mendez, C., Nguyen, D., Luu, T., and Chen, S. (2015) Targeting breast cancer stem cells in triple-negative breast cancer using a combination of LBH589 and salinomycin. *Breast Cancer Research and Treatment*. 151; 281–294.
 22. Kashii-Magaribuchi, K., Takeuchi, R., Haisa, Y., Sakamoto, A., Itoh, A., Izawa, Y., Isa, M., Fukuzawa, M., Murakami, M., and Takahashi, R. (2016) Induced Expression of Cancer Stem Cell Markers ALDH1A3 and Sox-2 in Hierarchical Reconstitution of Apoptosis-

- resistant Human Breast Cancer Cells. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 49; 149–158.
23. Ko, L. J., and Prives, C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes & Development*. 10; 1054–1072.
 24. Kouros-Mehr, H., Bechis, S. K., Slorach, E. M., Littlepage, L. E., Egeblad, M., Ewald, A. J., Pai, S., Ho, I., and Werb, Z. (2008) GATA-3 Links Tumor Differentiation and Dissemination in a Luminal Breast Cancer Model. *Cancer Cell*. 13; 141–152.
 25. Larson, A. R., Lee, C.-W., Lezcano, C., Zhan, Q., Huang, J., Fischer, A. H., and Murphy, G. F. (2014) Melanoma Spheroid Formation Involves Laminin-Associated Vasculogenic Mimicry. *The American Journal of Pathology*. 184; 71–78.
 26. Lawrence, R. T., Perez, E. M., Hernández, D., Miller, C. P., Haas, K. M., Irie, H. Y., Lee, S.-I., Blau, C. A., and Villén, J. (2015) The Proteomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Reports*. 11; 630–644.
 27. Lee, C.-H., Wu, Y.-T., Hsieh, H.-C., Yu, Y., Yu, A. L., and Chang, W.-W. (2014) Epidermal growth factor/heat shock protein 27 pathway regulates vasculogenic mimicry activity of breast cancer stem/progenitor cells. *Biochimie*. 104; 117–126.
 28. 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.
 29. Li, X., Xu, Y., Chen, Y., Chen, S., Jia, X., Sun, T., Liu, Y., Li, X., Xiang, R., and Li, N. (2013) SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/ β -catenin signal network. *Cancer Letters*. 336; 379–389.
 30. Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G. N., and Pusztai, L. (2008) Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 26; 1275–1281.
 31. LIU, K., SUN, B., ZHAO, X., WANG, X., LI, Y., QIU, Z., LIU, T., GU, Q., DONG, X., ZHANG, Y., WANG, Y., and ZHAO, N. (2015) Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by the Twist1-Bmi1 connection in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Medicine*. 36; 783–791.
 32. Liu, T., Sun, B., Zhao, X., Li, Y., Zhao, X., Liu, Y., Yao, Z., Gu, Q., Dong, X., Shao, B., Lin, X., Liu, F., and An, J. (2015) USP44+ Cancer Stem Cell Subclones Contribute to Breast Cancer Aggressiveness by Promoting Vasculogenic Mimicry. *Molecular Cancer Therapeutics*. 14; 2121–2131.
 33. Liu, T. J., Sun, B. C., Zhao, X. L., Zhao, X. M., Sun, T., Gu, Q., Yao, Z., Dong, X. Y.,

- Zhao, N., and Liu, N. (2013) CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 32; 544–553.
34. Liu, Y., Sun, B., Liu, T., Zhao, X., Wang, X., Li, Y., Meng, J., Gu, Q., Liu, F., Dong, X., Liu, P., Sun, R., and Zhao, N. (2016) Function of AURKA protein kinase in the formation of vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer stem cells. *OncoTargets and therapy*. 9; 3473–3484.
 35. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 25; 402–408.
 36. 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. *Modern Pathology*. 19; 264–271.
 37. Manié, 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 Thé, 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 Research*. 69; 663–671.
 38. Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M. G., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S., and Hendrix, M. J. C. (1999) Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry. *The American Journal of Pathology*. 155; 739–752.
 39. 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.
 40. Okamura, S., Arakawa, H., Tanaka, T., Nakanishi, H., Ng, C. C., Taya, Y., Monden, M., and Nakamura, Y. (2001) p53DINP1, a p53-Inducible Gene, Regulates p53-Dependent Apoptosis. *Molecular Cell*. 8; 85–94.
 41. Paulis, Y. W. J., Huijbers, E. J. M., van der Schaft, D. W. J., Soetekouw, P. M. M. B., Pauwels, P., Tjan-Heijnen, V. C. G., and Griffioen, A. W. (2015) CD44 enhances tumor aggressiveness by promoting tumor cell plasticity. *Oncotarget*. 6; 19634–19646.
 42. Qiao, L., Liang, N., Zhang, J., Xie, J., Liu, F., Xu, D., Yu, X., and Tian, Y. (2015) Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 19; 315–326.
 43. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 282; 5842–5852.

44. Rexer, B. N., Zheng, W. L., and Ong, D. E. (2001) Retinoic acid biosynthesis by normal human breast epithelium is via aldehyde dehydrogenase 6, absent in MCF-7 cells. *Cancer research*. 61; 7065–7070.
45. Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E. A., Stassi, G., Larocca, L. M., and De Maria, R. (2010) Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 468; 824–830.
46. 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.
47. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 3; 1101–1108.
48. Shi, S. R., Key, M. E., and Kalra, K. L. (1991) Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*. 39; 741–8.
49. Shirakawa, K., Kobayashi, H., Heike, Y., Iwanaga, T., Konishi, F., Terada, M., and Wakasugi, H. (2002) Hemodynamics in Vasculogenic Mimicry and Angiogenesis of Inflammatory Breast Cancer Xenograft Hemodynamics in Vasculogenic Mimicry and Angiogenesis of Inflammatory Breast. *Cancer research*. 2; 560–566.
50. Shirakawa, K., Wakasugi, H., Heike, Y., Watanabe, I., Yamada, S., Saito, K., and Konishi, F. (2002) Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *International Journal of Cancer*. 99; 821–828.
51. Song, H., Suehiro, J. I., Kanki, Y., Kawai, Y., Inoue, K., Daida, H., Yano, K., Ohhashi, T., Oettgen, P., Aird, W. C., Kodama, T., and Minami, T. (2009) Critical role for GATA3 in mediating Tie2 expression and function in large vessel endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 284; 29109–29124.
52. Sun, T., Zhao, N., Zhao, X., Gu, Q., Zhang, S., Che, N., Wang, X., Du, J., Liu, Y., and Sun, B. (2010) Expression and functional significance of Twist1 in hepatocellular carcinoma: Its role in vasculogenic mimicry. *Hepatology*. 51; 545–556.
53. Syaidah, R., Tsukada, T., Azuma, M., Horiguchi, K., Fujiwara, K., Kikuchi, M., and Yashiro, T. (2016) Fibromodulin Expression in Folliculostellate Cells and Pericytes Is Promoted by TGF β Signaling in Rat Anterior Pituitary Gland. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 49; 171–179.
54. Takaku, M., Grimm, S. A., and Wade, P. A. (2015) GATA3 in Breast Cancer: Tumor Suppressor or Oncogene? *Gene Expression*. 16; 163–168.
55. Van Der Schaft, D. W. J., Hillen, F., Pauwels, P., Kirschmann, D. A., Castermans, K., Oude Egbrink, M. G. A., Tran, M. G. B., Sciot, R., Hauben, E., Hogendoorn, P. C. W.,

- Delattre, O., Maxwell, P. H., Hendrix, M. J. C., and Griffioen, A. W. (2005) Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Research*. 65; 11520–11528.
56. Visvader, J. E., and Lindeman, G. J. (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews. Cancer*. 8; 755–68.
 57. Wang, S., Gao, X., Liu, X., Gao, S., Fan, Y., Jiang, Y., Ma, X., Jiang, J., Feng, H., Chen, Q., Tang, Y., Tang, Y., and Liang, X. (2016) CD133+ cancer stem-like cells promote migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma by inducing vasculogenic mimicry formation. *Oncotarget*. 7; 29051–29062.
 58. Wang, Y., Sun, H., Zhang, D., Fan, D., Zhang, Y., Dong, X., Liu, S., Yang, Z., Ni, C., Li, Y., Liu, F., and Zhao, X. (2018) TP53INP1 inhibits hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation via the ROS/snail signalling axis in breast cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 22; 3475–3488.
 59. Weina, K., and Utikal, J. (2014) SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clinical and Translational Medicine*. 3; 1–10.
 60. Yamanaka, S. (2007) Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 1; 39–49.
 61. Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L. C., and Chang, C. (1998) Human aldehyde dehydrogenase gene family. *European journal of biochemistry / FEBS*. 251; 549–57.
 62. Yu, L., Zhu, B., Wu, S., Zhou, L., Song, W., Gong, X., and Wang, D. (2017) Evaluation of the correlation of vasculogenic mimicry, ALDH1, KiSS-1, and MACC1 in the prediction of metastasis and prognosis in ovarian carcinoma. *Diagnostic pathology*. 12; 23.
 63. Zeng, F., Ju, R., Liu, L., Xie, H., Mu, L., Zhao, Y., Yan, Y., Hu, Y.-J., Wu, J.-S., and Lu, W.-L. (2015) Application of functional vincristine plus dasatinib liposomes to deletion of vasculogenic mimicry channels in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 6; 36625–36642.
 64. Zhang, D., Sun, B., Zhao, X., Ma, Y., Ji, R., Gu, Q., Dong, X., Li, J., Liu, F., Jia, X., Leng, X., Zhang, C., Sun, R., and Chi, J. (2014) Twist1 expression induced by sunitinib accelerates tumor cell vasculogenic mimicry by increasing the population of CD133+ cells in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer*. 13; 1–14.
 65. Zhang, J., Qiao, L., Liang, N., Xie, J., Luo, H., Deng, G., and Zhang, J. (2016) Vasculogenic mimicry and tumor metastasis. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 21; 533–541.
 66. Zuazo-Gaztelu, I., and Casanovas, O. (2018) Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. *Frontiers in oncology*. 8; 248.

9 謝辞

本論文を作成するにあたり、終始温かい御指導と御鞭撻を賜りました同志社女子大学大学院 薬物治療学研究室 高橋玲教授に深く感謝申し上げます。高橋教授には同志社女子大学在学中より実験、論文妙読による研究面に関して、御指導頂きました。また、学術論文、学位論文の執筆にあたり、ご多忙にも関わらず、多くの時間を割き、御配慮を賜りましたことに深甚の謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、実験を実施するための環境を整えていただき、多くの御指導ならびに御助言を賜りました薬物治療学研究室 村上元庸教授、井上沙奈助手、崎山真由助手、伊佐みゆき実験補佐、米田晶子実験補佐、泉恵理香事務補佐の方々に深い感謝の意を示します。

博士課程在学中、多くの協力をいただいた卒業生を含む薬物治療学研究室の皆様の存在が研究を進めていく上で、大きな励みとなったことをここに記すとともに、心より感謝申し上げます。

また、研究を進めるにあたり、御支援、御協力をいただきながら、ここにお名前を記することが出来なかった方々にも心から感謝申し上げます。

最後になりましたが、激励をいただいた友人、これまで温かく見守ってくれた家族に深く感謝申し上げます。