

再構成されたトリプルネガティブ乳癌細胞集団の  
浸潤・間葉転換過程における癌幹細胞様細胞の役割

Role of cancer stem-like cells in the process of invasion and  
mesenchymal transformation by a reconstituted triple-negative  
breast cancer cell population

井上 沙奈  
(INOUE Sana)

同志社女子大学大学院  
薬学研究科 医療薬学専攻

## 用語・略語

**ALDH1A3**: 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。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。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。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があり、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。さらに、ALDH1A3 は癌幹細胞だけでなくトリプルネガティブ乳癌 (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。

**Apoptosis-resistant cells (RE)**: HCC1937/p53 細胞である Untreated cells (UT) を Doxycycline (Dox) 含有培地で培養し、生細胞数が最小値となる 5 日目で、生き残った約 10% の細胞をさらに Dox 無添加培地で培養し、得られた再構築細胞集団。

**CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>**: CD44 は、乳癌幹細胞を含むほとんどの細胞で発現する 37kDa の接着分子であり、CD24 は元々 B 細胞の発達初期段階で発見された膜タンパクである。これらを組み合わせた CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>発現パターンを持つ乳癌細胞のみが、NOD/Scid マウスに移植された際に腫瘍を形成したことから、CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>は、代表的乳癌幹細胞マーカーと考えられている。

**EMT (上皮間葉転換)**: EMT を起こした上皮細胞は細胞間接着分子が不活性化され、上皮細胞の性質が失われる。その際、細胞骨格の再配列および接着、細胞構造および形態の変化が

生じて間葉特性を獲得し、細胞の運動能と遊走能が促進される。その逆の現象は MET (間葉上皮転換) という。

**Ki-67** : 増殖中の細胞の全ての細胞周期 (G1 期, S 期, G2 期, M 期) で存在するタンパクである。細胞増殖を休止している静止期 (G0 期) では存在しないことから、細胞増殖能マーカー (増殖細胞マーカー) として用いられている。Ki-67 タンパク質の細胞含有量は、細胞周期の合成期 (S 期) を通じて細胞周期進行中に著しく増加するため、Ki-67 の核発現は、腫瘍の増殖能を評価するために免疫組織化学染色 (IHC) にてよく用いられ、乳癌の予後予測にも応用されている。

**Matrigel** : 基底膜マトリックス、細胞外マトリックスタンパク質を豊富に含む Engelbreth-Holm-Swarm マウス肉腫から抽出した可溶性基底膜調整品である。主成分はラミニン (56%)、コラーゲンIV (31%)、エンタクチン (8%)、およびヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、室温にて哺乳類の細胞基底膜と似た生物活性のあるマトリックスとなる。血管内皮細胞、筋肉と神経細胞などの分化誘導、上皮細胞での組織特異的な細胞形態とタンパク質産生の誘発に用いられ、本研究では乳癌細胞の浸潤性の解析に用いた。

**Overall Survival (OS) 全生存期間** : 臨床試験において、治療開始日から患者が生存した期間のことを示す。

**Progression Free Survival (PFS) 無増悪生存期間** : 治療中 (治療後) に癌が進行せず安定した状態である期間のことを示す。

**p53 誘導アポトーシス** : p53 の重要な機能として G1 期停止と、アポトーシス誘導が挙げら

れる。これらの機能の使い分けが p53 のリン酸化によって制御されている。G1 期停止のメカニズムとして、p53 のセリン 15 とセリン 20 をリン酸化することにより、p53 の安定化が促進し、活性化される。p53 の蓄積と転写機能の活性化は、p21 の発現誘導を介してサイクリン E/Cdk2、サイクリン A/Cdk2 の活性を抑制することより、G1/S 期チェックポイントを制御する。アポトーシス誘導メカニズムとして、重篤な DNA 損傷に暴露されると、p53 の 46 番目のセリン残基がリン酸化され、p53AIP1 の発現を誘導してアポトーシスを引き起こす。

**Snail** : Snail ファミリーは、それぞれ SNAI1、SNAI2 および SNAI3 遺伝子によりコードされるタンパク Snail、Slug および Smuc により構成されており、zinc finger 型転写因子として、DNA 上の 6 つの塩基から成る E-Box 配列 (CAGGTG) を認識し結合する。Snail ファミリーが遺伝子配列上の E-Box に結合すると、それらは転写抑制因子として働くことが多くの研究により明らかにされており、Snail ファミリーの中で最も研究が進んでいるタンパクである。さらに、Snail は、腫瘍の進行中に EMT を引き起こし、癌幹細胞を維持し、放射線および化学療法に対する耐性を誘発する可能性がある転写因子である。免疫組織化学染色により、Snail は乳癌組織のさまざまなサブタイプ、特に乳癌の basal-like サブタイプで発現し、腫瘍の浸潤性と関連している報告がある。

**Tet-On system** : *E. coli* テトラサイクリン耐性オペロンから得られた 2 種類の調節性因子、Tet リプレッサータンパク質 (TetR) と Tet オペレーターDNA 配列 (*tetO*) を基にしたシステムで、哺乳類細胞において導入遺伝子発現を調節できるベクターである。今回用いた Tet-On system は、Dox 存在下でテトラサイクリン応答因子と結合して目的遺伝子の発現を示し、数時間後にピークを示す。

**Triple negative breast cancer とサブタイプ分類**：ヒト乳癌のサブタイプは遺伝子発現解析によって、5つのタイプに分けられる。分化の指標としても、エストロゲン・プロゲステロン・ヒト上皮成長因子受容体 2 で分類され、TNBC は 3 つのバイオマーカー（エストロゲン受容体 [ER]、プロゲステロン受容体 [PR]、およびヒト上皮成長因子受容体 2 [HER2] タンパク質）の発現が陰性である。我々が用いた HCC1937 細胞では、未分化で CSC に近い細胞が多く含まれており、TNBC の中でも p53 変異、BRCA1 変異があり、ヒト乳癌サブタイプ分類では basal-like タイプに属する。

**VM**：血管形成擬態（vasculogenic mimicry: 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る。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。VM 形成において vascular endothelial (VE) - cadherin、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -2、および MMP-9 が発現していることが知られており、これらは VM 関連遺伝子として用いられている。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。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。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、我々の研究では、癌幹細胞は VM 形成の惹起に重要であることを示し、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に一致する結果を得ている。VM 形成の評価は VM スコアでなされる。

**間葉系 CSC ・ 上皮系 CSC (Mesenchymal CSC (M-CSC) ・ Epithelial CSC (E-CSC))**：CSC はその特徴によってさらに分類され、増殖が遅く、静止型を示す間葉系 CSC と、より増殖性が高くなる上皮系 CSC が区別される。

**前駆細胞、成熟細胞**：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。前駆細胞と成熟細胞は幹細胞から分化して形成される細胞である。前駆細胞は強い増殖能を持ち、さらに分化して成熟細胞になる。

# 目次

1 要 旨 .....	8
2 序 文 .....	14
2.1 乳癌における TNBC の特徴.....	14
2.2 癌幹細胞と階層モデル .....	14
2.3 CSC と細胞周期.....	15
2.4 BCSC マーカーとしての ALDH1A3 .....	15
2.5 乳癌細胞の間葉特性獲得.....	16
2.6 間葉系 CSC と上皮系 CSC .....	16
2.7 CSC と EMT.....	17
3 研 究 方 法 .....	18
3.1 p53 発現誘導可能な HCC1937/p53 細胞の培養.....	18
3.2 アポトーシス抵抗性を示す再構成細胞集団 RE の作製.....	18
3.3 Cell count.....	18
3.4 免疫細胞化学染色 .....	18
3.5 FACS 解析.....	19
3.6 Cell cycle 解析 .....	20
3.7 Matrigel invasion assay .....	20
3.8 免疫蛍光染色 .....	20
3.9 細胞集団形成の評価.....	21
3.10 RT-PCR.....	22
3.11 統計分析 .....	22
4 結 果 .....	23
4.1 再構成されたアポトーシス抵抗性細胞集団の作製と増殖率.....	23
4.2 CSC マーカーの発現 .....	24

4.3	免疫細胞化学染色による細胞集団構成の解析.....	24
4.4	CSC 様細胞のサイズと形態.....	25
4.5	上皮様および間葉様 CSC .....	25
4.6	アポトーシス抵抗性細胞の浸潤能獲得 .....	26
4.7	Matrigel 内浸潤様式.....	26
4.8	Matrigel 内浸潤と Snail の発現 .....	27
5	考 察 .....	28
5.1	再構成細胞集団 RE の特徴 .....	28
5.2	CSC 様細胞のサイズと形態学的特徴.....	29
5.3	RE における間葉系 CSC 細胞の特徴.....	29
5.4	浸潤における間葉様 CSC の役割.....	30
5.5	EMT と薬剤耐性.....	31
6	結 論 .....	32
	論文目録.....	33
	謝 辞.....	34
	参 考 文 献.....	35
	図.....	42



## 1. 要旨

### 【背景・目的】

乳癌は、世界中の女性の間で最も頻繁にみられる癌である。乳癌の約 15~20%の症例は、3つのバイオマーカー（エストロゲン受容体 [ER]、プロゲステロン受容体 [PR]、およびヒト上皮成長因子受容体 2 [HER2] タンパク質）の発現が陰性である「トリプルネガティブ乳癌 (TNBC)」に分類される。TNBC はより増殖拡大と再発のリスクが高いため、無増悪生存期間 (PFS) と全生存期間 (OS) が短い特徴があり、TNBC を標的とする新規薬剤の開発の必要性を示唆している。癌細胞集団には、heterogeneity (腫瘍内不均一性) が存在する。腫瘍内ヘテロ不均一性が生じる原因には従来、stochastic model (確率論モデル) が支持されてきたが、近年は癌幹細胞 (CSC) が頂点となる hierarchy model (階層性モデル) が主流になりつつある。CSC は自己複製能と多分化能の両方を備えていると定義されており、乳癌の発生、進行、および転移において重要な役割を果たすことが示されている。さらに、CSC は、化学療法や放射線療法に耐性があると考えられている。

乳癌におけるアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) の役割に関する多くの報告がみられ、特に、ALDH ファミリーのサブタイプの 1 つである ALDH1A3 は、CSC の含有率と転移性乳癌の発症との間に明確な相関関係を示し、新しい臨床 CSC マーカーとして提案されている。以前に我々は、ALDH1A3 が TNBC において CSC のみならず、高度に増殖する癌前駆細胞にも発現していることを報告した。さらに、乳癌幹細胞 (BCSC) は表面マーカー CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>を発現する細胞としても分離、同定されている。

上皮間葉転換 (EMT) は、癌細胞にさらなる悪性の特徴を付与することが示されている。EMT による乳癌転移の過程では、癌細胞は上皮の特性を失い、間葉特性を獲得する。その結果、EMT を起こした癌細胞は基底膜から分離し、他の部位に移動、浸潤し、血液やリンパ系に侵入して遠隔転移を引き起こす能力が高まる。さらに、EMT が誘導された細胞は、

CSC と類似した遺伝子発現パターンを示し、形質転換を受けやすいことが知られている。近年 CSC は、間葉様 (EMT) と上皮様 (間葉-上皮移行 [MET]) の異なる状態で存在することが報告されている。CD44+CD24<sup>-</sup>の発現を伴う間葉様 BCSC は主に細胞周期静止状態にあり、腫瘍の浸潤前線に存在するが、ALDH 活性のレベルが上昇した上皮様 BCSC は増殖状態であり、腫瘍のより中心部に位置している。BCSC の可塑性により、EMT 様状態と MET 様状態間の移行が可能になり、その結果、組織浸潤および転移の能力が獲得される。さらに、CD44+CD24<sup>-</sup>細胞は、Snail、Slug、Twist、および N-cadherin を発現し、E-cadherin は発現しないことが報告されている。さらに CSC には、上皮様 (E) ALDH<sup>+</sup>CSC と間葉様 (M) CD44+CD24<sup>-</sup>CSC に加えて、ハイブリッド (E/M) ALDH<sup>+</sup>/CD44+CD24<sup>-</sup>CSC の 3 種類があることが報告されている。これらの CSC の 3 つのサブタイプは、可塑性を持ち、治療に対して異なる反応を示す。

本研究では、癌幹細胞・前駆細胞・分化細胞および増殖に関連する遺伝子の発現パターンや浸潤能を解析することで、アポトーシス抵抗性を示し再構成された TNBC 細胞集団における CSC の役割を明らかにすることを目的とする。実験方法として、p53 過剰発現によって誘導されるアポトーシスに抵抗性を示す細胞が再構成する乳癌細胞集団について、EMT マーカーの発現と Matrigel における浸潤能獲得を解析した。さらに、アポトーシス抵抗性細胞集団における CSC の役割と EMT を誘導する可塑性を調査した。本研究は、間葉様 CSC を持つ乳癌細胞集団が EMT 獲得に関与することを示した最初の報告であり、これらの結果は、TNBC が再発時に治療抵抗性を獲得するメカニズムの解明に手がかりを与える。

#### 【材料・方法】

用いた細胞は TNBC 由来のヒト乳癌細胞株 HCC1937 細胞である。その HCC1937 細胞を WT-p53 誘導性プラスミドで安定的にトランスフェクトし、単離された単一細胞クローンの 1 つを HCC1937/p53 と命名した。本研究では、Dox 非添加の HCC1937/p53 細胞集

団を Untreated cells (UT) と命名し対照として用いた。生細胞数が最小値となる Dox 添加 5 日目に、p53 誘導アポトーシスに抵抗性のある約 10%の生細胞を、Dox 非添加培地で再び培養し、再構成された細胞集団を Apoptosis-resistant cells (RE) と命名し実験に用いた。

二重免疫細胞化学染色の方法として、APS コーティングスライドガラス上で培養した UT、RE を Dox 非添加および添加後に 4% paraformaldehyde で 10 分間固定し、0.1% TritonX-100 で 10 分間、膜透過処理をした。一次抗体として、抗 ALDH1A3 抗体 (Purified Rabbit Polyclonal, 1:1000)、抗 Ki-67 抗体 (Mouse Monoclonal, 1:500) を反応させ、二次抗体として、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG 抗体、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体を使用し、BCIP®/NBT 溶液、DAB で発色させた。細胞形態はデジタルカメラ (FX380 OLYMPUS, Tokyo, Japan) で撮影し、FLVFS-LS ソフトウェア (Ver.1.11) (OLYMPUS, Tokyo, Japan) を使用して解析した。

FACS 解析では抗 p53 抗体 (Mouse monoclonal) 、抗 CD44 抗体 (APC Mouse Anti-Human CD44) 、抗 CD24 抗体 (FITC Mouse Anti-Human CD24) 、抗 ALDH1A3 抗体 (Purified Rabbit Polyclonal Antibody, 1:500) 、および Alexa Fluor 680 goat anti-rabbit antibody (1:500) を使用した。そして、Cell cycle 解析では、細胞を 10 mM BrdU で 37°C、30 分間パルスラベリングし、BD Cytofix/Cytoperm Buffer で細胞固定後、300 µg/mL の濃度の DNase で処理して、取り込まれた BrdU を露出させた。次に、抗 BrdU 抗体 (1:50) と反応させ、7-AAD で核を染色し、Cell Sorter SH800 で解析した。

Matrigel invasion assay は、thin gel 法を使用し、TransWell hanging inserts に 35 µL の Matrigel でコーティングした。24 時間飢餓状態にした細胞を 1 ウェルあたり  $3.5 \times 10^4$  個の細胞を、1% FBS を含む培地を上部チャンバーに播種し、TC プレーットの下部チャンバーには 1000 µL の 10% FBS を含む培地を加えた。フィルターに到達した細胞を数えるために、4% paraformaldehyde を使用して固定後、ギムザ染色し、浸潤した細胞を顕微鏡下で数えた。また、Matrigel 中の浸潤細胞を 0.25% TritonX-100 で 10 分間透過処理し、抗

ALDH1A3 抗体 (Purified Rabbit Polyclonal, 1:50)、抗 Snail 抗体 (Purified Rabbit Polyclonal, 1:200)、および抗 CD44 抗体 (Mouse Monoclonal, 1:400) と 4°C で一晩反応させた。ALDH1A3 および Snail の二次抗体は Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000)、CD44 の二次抗体は Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-mouse IgG2a (1:1000) を室温で 1 時間インキュベートした。核染色は、DAPI (300 µg/mL) を用いた。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。Fiji/ImageJ ソフトウェア (Ver. 1.52g, Java 1.80\_172, NIH) を用いて、ランダムに選択された画像 (合計 9 視野) の蛍光強度を各蛍光チャンネルについて定量的に分析した。さらに、Matrigel の厚さは約 200 µm であり、連続スライス画像 (厚さ 1 µm) から Z 軸方向にスタックを作成し、細胞浸潤の深さを測定した。そして、浸潤細胞を含む Matrigel を微量遠心管に移し、TRIzol® で total RNA を抽出し、SuperScrip® III 逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。Taq Man® Fast Advanced Master Mix、各標的遺伝子の TaqMan® プローブ [GAPDH, VE-cadherin (PCDH12), MMP-9, SNAI1]、および適宜濃度調整した cDNA テンプレートを混合し、Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System で PCR 反応を行なった。熱サイクル条件は 95°C 1 分、60°C 20 分を 40 サイクル繰り返した。ハウスキーピング遺伝子の GAPDH を内在性コントロール遺伝子として、ターゲット遺伝子を比較定量した。

#### 【結果・考察】

Dox 非添加での UT と RE 生細胞数は、両者はほとんど差がなく経時的に増加したが、Dox を添加すると、UT はアポトーシスにより経時的に細胞数が漸減したのに対し、RE では漸増した。BrdU を用いた細胞周期の FACS 解析では、UT は Dox 添加後、アポトーシスが進行するにつれて S 期および G2/M 期の細胞数割合が減少したが、RE では Dox 添加にも細胞周期に変化がみられず、Dox 非添加時の状態が維持されていた。このことから、

REにはより多くのアポトーシス抵抗性のCSC様細胞が存在することに加えて、CSC以外の細胞もアポトーシス抵抗性を示していることが明らかとなった。さらに、CSCマーカーとしてALDH1A3<sup>+</sup>、CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>の細胞数割合をFACSで解析すると、UTに比べて、REではCSC様細胞の割合が常に高値を示した。二重免疫細胞化学染色では、CSC様細胞、すなわちALDH1A3<sup>+</sup>Ki-67<sup>+</sup>細胞は、UTではDox添加によって一過性に増加するのに対して、REでは、Dox非添加からDox添加後に至るまで高い割合が維持された。さらに、REのCSC様細胞は、UTのそれよりも長径/短径の比が大きい紡錘形を示した。FACSでは、REのCSC様細胞割合がUTより高く、さらに2つのCSCマーカーを比較すると、ALDH1A3<sup>+</sup>上皮系CSCより多くのCD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>間葉系CSCを含むことが示された。一方、浸潤能をみるMatrigel invasion assayでは、REの高い浸潤性が示された。さらに、浸潤様式を共焦点レーザー顕微鏡の連続スライス画像で観察すると、UTの細胞浸潤は単一細胞のみならず、polygon、complex meshなどの立体構造を示す傾向があった。すなわち、UTに比べてREは平面的で、より高い浸潤能力、および上皮間葉移行関連遺伝子の有意な高発現を示した。この実験結果は、TNBCが再発時に治療抵抗性を獲得するメカニズムへの解明に手がかりを与える。

## 【結論】

アポトーシス抵抗性乳癌細胞が浸潤性を示す細胞集団を再構成する過程において、CSC様細胞が深く関与していることを明らかにした。この上皮間葉転換を起こす可塑性は、CSC様細胞の不均一性 heterogeneity に起因することを見出した。このことから、上皮様CSCと間葉様CSCおよびハイブリッド型CSCの存在が新たな癌細胞集団の特性を決定すると考えられた。TNBC由来のHCC1937細胞はハイブリッド型CSC及びEMT様CSCの両方を含むヘテロな集団であり、それらが、治療を機にEMTを起こしていると考えられた。すなわち、従来の治療法とは異なり、EMTを起こす能力があるハイブリッド型CSC及び

EMT 様 CSC を標的とした治療法を開発する必要がある。今後は p53 アポトーシス誘導以外のメカニズムすなわち、抗がん剤あるいは放射線による治療に対する治療抵抗性獲得様式を検討する必要がある。さらに、この実験系は Dox の飲水投与によるアポトーシス誘導が可能であるため、実験動物を用いた腫瘍移植モデルでの検証が期待される。

## 2. 序文

### 2.1 乳癌における TNBC の特徴

乳癌は最も頻繁に診断される悪性腫瘍であり、世界において女性死亡原因の上位である。世界的に、2018 年には約 210 万人の新しい女性の乳癌の症例と約 627,000 人の死亡が発生したと推定されている。再発と転移がこれらの死亡の主な原因であると考えられている。乳癌の約 15~20%の症例は、「トリプルネガティブ乳癌 (TNBC)」に分類され、診断は、3つのバイオマーカー (エストロゲン受容体 [ER]、プロゲステロン受容体 [PR]、およびヒト上皮成長因子受容体 2 [HER2] タンパク質) の発現がないことである [12, 26]。TNBC は、ホルモン陽性乳癌より若い (40 歳未満) 女性で発症しやすい傾向にある。TNBC は、周囲の間質組織における壊死および線維形成反応を伴う浸潤性形態を示す特徴がある。さまざまな種類の乳癌の中で、TNBC はより高い増殖性と再発リスクのため、無増悪生存期間 (PFS) と全生存期間 (OS) が短い。初期の TNBC (ステージ I から III) 患者の半数に疾患の再発がみられ、手術後 5 年の死亡率は約 37%である。さらに、転移性 TNBC 患者は、第一選択の化学療法が無効であった場合には、PFS が短く、TNBC を標的とする新規薬剤の開発が必要とされる [26]。

### 2.2 癌幹細胞と階層モデル

癌細胞集団には、heterogeneity (腫瘍内不均質性) が存在する。その不均一性が生じる原因としては従来、確率論的に癌化に関与する遺伝子変異が加わることであり、stochastic model (確率論モデル) が支持されてきたが、自己複製能、多分化能を有する正常組織幹細胞と酷似した腫瘍細胞が存在することが証明されて以来、腫瘍内ヘテロ不均一性が生じる原因には、癌幹細胞 (CSC) が頂点となり、そこから派生する自己複製能を喪失した分化傾向を有する細胞によって支持されるという hierarchy model (階層性モデル) が主

流になりつつある [5]。CSC は自己複製能と多分化能の両方を備えていると定義されており、乳癌の発生、進行、および転移において重要な役割を果たすことが示されている [33]。さらに、CSC は腫瘍を発生させる能力 (tumor-initiating activity) も有し、化学療法や放射線療法に耐性があると考えられている [10, 13, 24, 38]。

### 2.3 CSC と細胞周期

休眠/静止状態にある CSC は、腫瘍が不均一性を示す重要な要素であり、化学療法抵抗性、腫瘍浸潤性、および転移先の休眠状態を作ることができる。それによって、CSC は標的臓器で長期間生存し、診断後最大 20 年後に転移を形成することがある [11]。最近の研究では、この CSC にみられる静止状態は受動的ではなく、新しい微小環境に対応するための巧妙に制御されたプログラムであることを示唆している。このようにして、休眠/静止 CSC には、腫瘍再増殖能と化学療法を乗り越える能力が潜在する。

### 2.4 BCSC マーカーとしての ALDH1A3

乳癌におけるアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) の役割に関する多くの報告がみられ、その中でも ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1) の発現亢進を示す癌幹細胞集団は炎症性乳癌 (IBC) の転移性および浸潤性に関与することが示されている [8]。特に、ALDH ファミリーの 1 つである ALDH1A3 は、CSC の含有率と転移性乳癌の発症との間に明確な相関関係を示し、新しい臨床 CSC マーカーとして提案されている [34]。以前に我々は、TNBC において ALDH1A3 が CSC のみならず、高度に増殖する前駆細胞にも発現していることを報告した [25]。さらに、乳癌幹細胞 (BCSC) は別の表面マーカー CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>を発現する細胞としても分離、同定されている [1, 52]。13 種類の乳癌細胞株に関する最近の研究では、CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>細胞の存在は、ヒト乳癌における高い浸潤性と遠隔転移の増加に関連がみられた [10]。136 症例の乳癌組織サンプルに関する研究では、CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>細胞が多く含まれていると、遠隔転移率と相関を示した [10]。



## 2.5 乳癌細胞の間葉特性獲得

上皮間葉転換 (EMT) は、癌細胞に悪性の特性を付与することが示されている [51]。EMT による乳癌転移の過程では、癌細胞は上皮の特性を失い、間葉特性を獲得する。その結果、EMT を起こした癌細胞は基底膜から分離し、他の部位に移動や浸潤し、血液やリンパ系に侵入して遠隔転移を引き起こす能力が高まる [31, 32]。EMT における細胞間接着分子の不活性化は、細胞の浸潤能と移動能を促進する。EMT が誘導された細胞は、CSC と類似した遺伝子発現パターンを示し、しかも形質転換を受けやすいことが知られている [24]。すなわち EMT の獲得は、CSC と密接な関連がある。

## 2.6 間葉系 CSC と上皮系 CSC

BCSC マーカーとして、CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>の発現と ALDH1 活性の増加 (ALDEFLUOR™ アッセイで識別) が知られている [1, 43, 53]。その中でも、間葉様 BCSC は CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>が発現する報告があり、不死化ヒト乳腺上皮細胞 (HMLE) から FACS により分離された CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>細胞は、間葉様 BCSC が EMT を起こした時と同様の特徴を有することが示された [53]。臨床例での研究では、他の癌に比べて CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>表現型は TNBC でより一般的にみられ、遠隔臓器への転移のリスクが高いと言われている [18, 21, 29, 39, 53]。CSC は、間葉様 (EMT) と上皮様 (間葉-上皮移行 [MET]) の異なる状態で存在する [30]。CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>の発現を伴う間葉様 BCSC は主に細胞周期静止状態にあり、腫瘍の浸潤前線に存在するが、ALDH 活性のレベルが上昇した上皮様 BCSC は増殖状態であり、腫瘍のより中心部に位置している [30]。BCSC の可塑性により、EMT 様状態と MET 様状態間の移行が可能になり、その結果、組織浸潤および転移の能力が獲得される [30]。さらに、CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>細胞は、Snail、Slug、Twist、および N-cadherin を発現し、E-cadherin は発現しないことが報告されている [30]。近年 CSC には、上皮様 (E) ALDH<sup>+</sup>CSC と間葉様

(M) CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>CSC にハイブリッド (E/M) ALDH<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>CSC を加えた 3 種類があることが報告されている、これらの CSC の 3 つのサブタイプは、相互に可塑性を示し、治療に対して異なる反応を示す [48]。

## 2.7 CSC と EMT

いくつかの EMT マーカーの発現は、乳癌を含む多くの臨床ヒト癌組織で検出されており、乳癌組織の EMT 様変化を推測するために使用されている [53]。Snail は、腫瘍の進行中に EMT を引き起こし、癌幹細胞を維持し、放射線および化学療法に対する耐性を誘発する可能性がある転写因子である [57]。免疫組織化学染色により、Snail は乳癌組織のさまざまなサブタイプ、特に乳癌の basal-like サブタイプで発現し、腫瘍の浸潤性と関連している [53]。

以前我々は、ALDH1A3 陽性の CSC がアポトーシス抵抗性を示したことや [25]、CSC が vasculogenic mimicry (VM) を誘導することにより、転移を促進する可能性を示した [23]。このように、CSC が治療抵抗性、浸潤、および転移に関与していることを報告してきたが、未だその詳細は明らかにされていない。本研究では、p53 過剰発現によって誘導されるアポトーシスに抵抗性を示す細胞が再構成する乳癌細胞集団について、EMT マーカーの発現と Matrigel における浸潤能獲得を解析した。さらに、アポトーシス抵抗性細胞集団における CSC の役割と EMT を誘導する可塑性を調査した。他の研究では、人為的に誘導された EMT 細胞が CSC のような特徴を獲得したことが示されたが [24]、本研究は、間葉様 CSC を持つ乳癌細胞集団の再構成が EMT を惹起したことを初めて示したものであり、これらの結果は、TNBC が再発時に治療抵抗性を獲得するメカニズムの解明に手がかりを与える。

### 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 [17]。HCC1937 細胞は、ER、PR、および HER2 の発現が陰性の TNBC であり、TP53 のコドン 306 (CGA から TGA) にナンセンス変異があり、BRCA1 遺伝子のヌクレオチド 5382 (5382C) に挿入 C がある細胞である。HCC1937 細胞は WT-p53 誘導性プラスミド (Tet-on Advanced System, Clontech, USA) で安定的にトランスフェクトされており、単離された単一細胞クローンの 1 つを HCC1937/p53 と命名した [23, 25]。HCC1937/p53 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS) [22] (SIGMA, USA) および Zeocin™ (1 µg/mL, InvivoGen, USA) を含む RPMI1640 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) で培養した。

#### 3.2 アポトーシス抵抗性を示す再構成細胞集団 RE の作製

本研究では、Dox 非添加の HCC1937/p53 細胞集団を Untreated cells (UT) と命名し対照として用いた。生細胞数が最小値となる Dox 添加 5 日目に、p53 誘導アポトーシスに耐性のある約 10%の生細胞を、Dox 非添加培地で再び培養し、再構成された細胞集団を Apoptosis-resistant cells (RE) と命名し実験に用いた。

#### 3.3 Cell count

Trypan Blue (Life Technologies) で細胞を染色した後、Countess II FL (Life Technologies) で生細胞数を測定した。

#### 3.4 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 UT、RE を Dox

非添加および添加後に 4% paraformaldehyde で 10 分間固定し、0.1% TritonX-100 で 10 分間、膜透過処理をした。一次抗体として、抗 ALDH1A3 抗体 (Purified Rabbit Polyclonal, ABGENT, 1:1000) を 37°C で 1 時間反応の後、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 10 mM 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。37°C、1 時間で抗 Ki-67 抗体 (Mouse Monoclonal, DAKO, 1:500) を反応させ [50]、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) で二次抗体反応し、さらに、DAB で発色させた。非免疫ウサギ血清を使用した negative control では、バックグラウンドシグナルは観察されなかった。これらの抗体の抗原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 [42, 47, 55]。細胞形態はデジタルカメラ (FX380 OLYMPUS, Tokyo, Japan) で撮影し、FLVFS-LS ソフトウェア (Ver.1.11) (OLYMPUS, Tokyo, Japan) を使用して解析した。ALDH1A3 は細胞質の染色を、Ki-67 は核の染色を評価した。

### 3.5 FACS 解析

p53、CD44、CD24、および ALDH1A3 の発現パターンを Cell Sorter SH800 (SONY, Tokyo, Japan) で解析した。抗 p53 抗体 (Mouse monoclonal, BD Biosciences)、抗 CD44 抗体 (APC Mouse Anti-Human CD44, BD Pharmingen™)、抗 CD24 抗体 (FITC Mouse Anti-Human CD24, BD Pharmingen™)、抗 ALDH1A3 抗体 (Purified Rabbit Polyclonal Antibody, ABGENT, 1:500)、および Alexa Fluor 680 goat anti-rabbit antibody (ABGENT, 1:500) を使用した。FACS で検出された蛍光強度は、SH800 ソフトウェア (Ver. 2.1.6)

(SONY、Tokyo、Japan) を使用して解析した。

### 3.6 Cell cycle 解析

細胞周期分析は、以前の報告に従って実施した [7, 19]。すなわち、細胞を 10 mM BrdU で 37°C で 30 分間パルスラベリングした。BD Cytotfix/Cytoperm Buffer で細胞固定し、300 µg/mL の DNase (BD Pharmingen™) で処理し、取り込まれた BrdU を露出させた。次に、細胞を抗 BrdU 抗体 (BD Pharmingen™, 1:50) と反応させ、7-AAD で核を染色し、Cell Sorter SH800 (SONY, Tokyo) で解析した。BrdU で標識されていない細胞を negative control として使用した。

### 3.7 Matrigel invasion assay

Matrigel invasion assay は、以前の報告 [41] および製造元 (Corning) のプロトコルに従って、thin gel 法で解析した。TransWell hanging inserts (24 ウェル) は、TC インサート (SARSTEDT) を購入し、35 µL の Matrigel でコーティングした。24 時間飢餓状態にした細胞を 1 ウェルあたり  $3.5 \times 10^4$  個の細胞から、1% FBS を含む培地を上部チャンバーに播種し、TC プレート (SARSTEDT) の下部チャンバーには 1000 µL の 10% FBS を含む培地を加えた。フィルターに到達した細胞を数えるために、綿棒を使用して Matrigel および非浸潤細胞を除去した。そして、4% paraformaldehyde を使用して固定後、ギムザ染色し、顕微鏡下で細胞数を数えた。Matrigel 中に浸潤した細胞を解析するために、フィルターと共に Matrigel を TC インサートから切り出し、免疫蛍光染色した。以上の Matrigel invasion assay は 3 回の独立した実験で繰り返した。

### 3.8 免疫蛍光染色

Matrigel 中の浸潤細胞を 4% paraformaldehyde で 10 分間固定し、PBS で洗浄後、0.25%

TritonX-100で10分間透過処理した [49]。細胞を10%正常ヤギ血清 (SeraCare Life Sciences, MA, USA) で45分間処理し、抗ALDH1A3抗体 (Purified Rabbit Polyclonal, ABGENT, 1:50)、抗Snail抗体 (Purified Rabbit Polyclonal, abcam, 1:200)、および抗CD44抗体 (Mouse Monoclonal, Cell Signaling, 1:400) と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negative control として使用し、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、既存の刊行論文においても広く確認されている [42, 47, 55]。ALDH1A3 および Snail の二次抗体は Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, USA, 1:1000)、CD44の二次抗体は Alexa Fluor 633-conjugated goat anti-mouse IgG2a (Thermo Fisher Scientific, USA, 1:1000) を室温で1時間インキュベートした [35]。核染色は、4,6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, 300 µg/mL) (Molecular Probes, USA) を用いた [36]。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。Fiji/ImageJ ソフトウェア (Ver. 1.52g, Java 1.80\_172, NIH) を用いて、ランダムに選択された画像 (合計 9 視野) の蛍光強度を各蛍光チャンネルについて定量的に分析した [46]。さらに、Matrigel の厚さは約200 µmであり、連続スライス画像 (厚さ1 µm) からZ軸方向にスタックを作成し、細胞浸潤の深さを測定した。

### 3.9 細胞集団形成の評価

polygon と complex mesh は、以前 Aranda らによって定義されている [2]。すなわち細胞は、sprouting と呼ばれる突起を示し始め、sprouting 細胞は互いに細胞間接触して、connected 細胞となる。さらに、複数の connected 細胞が polygon 構造を形成する。次の段階では、細胞が隣接することによって、2~3 細胞の厚さの壁を持つ polygon 構造を形成し、

これらの構造は、complex mesh と呼ばれている。細胞集団の解析では、polygon 及び complex mesh の形成に関与している細胞数割合を算出した。

### 3.10 RT-PCR

浸潤細胞を含む Matrigel を微量遠心管に移し、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 [14]。Taq Man® Fast Advanced Master Mix (Applied biosystems™)、各標的遺伝子の TaqMan® プローブ (Thermo Fisher Scientific, USA) [GAPDH (Hs03929097\_g1), VE-cadherin (PCDH12) (Hs00170986\_m1), MMP-9 (Hs00957562\_m1), SNAI1 (Hs00195591\_m1) ]、および適宜濃度調整した cDNA テンプレートを混合し、48 ウェル PCR プレート (Applied Biosystems™) に移した [23]。プレートを 48-well Optical Adhesive Film (Applied Biosystems™) でシールし、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) で PCR 反応を行なった。熱サイクル条件は 95°C 1分、60°C 20分を 40 サイクル繰り返した。ハウスキーピング遺伝子の GAPDH を内在性コントロール遺伝子として、ターゲット遺伝子を比較定量した。

### 3.11 統計分析

すべての実験は少なくとも 3 回繰り返し、免疫細胞化学染色の分析では、各プロットで 100 個以上の細胞を使用して調査した。結果は、平均±標準偏差として表した。

Student's t-test では、2 つのグループ間で 0.05 未満の P 値が有意であるとした。

## 4. 結果

### 4.1 再構成されたアポトーシス抵抗性細胞集団の作製と増殖率

Dox 添加で1日から10日間培養した UT と RE をそれぞれ UT Dox1d から UT Dox10d、RE Dox1d から RE Dox10d と命名した。Dox 非添加で培養された UT および RE は、それぞれ UT Dox0d および RE Dox0d と命名し、control として使用した。以前の報告で、UT では Dox 添加後の p53 発現誘導を確認している [25]。Dox 添加後 RE では、Dox 添加された UT と同等またはそれ以上の p53 発現レベルが確認された (Fig. 1)。

アポトーシス抵抗性細胞集団を再構築するために、UT に Dox 添加し、生存細胞数が最小値となる 5 日目で、生き残った約 10% の細胞をさらに Dox 非添加培地で培養した。得られたアポトーシス抵抗性細胞集団を、RE として使用した。UT と RE をそれぞれ Dox 非添加培地で増殖させると、両方共に 10 日間経時的に生細胞数が漸増し、その増殖率に有意な差はなかった (Fig. 2A)。

一方、Dox 添加後では、UT の生細胞数が漸減したが、RE の生細胞数は一貫して増加し続けた。位相差顕微鏡下で観察される典型的な細胞増殖パターンを Fig. 2B に示した。この UT の細胞数減少が緩やかであった理由として、各細胞の細胞周期段階の違いによる非同期培養細胞、特に接着細胞のアポトーシスのタイミングの遅延によって引き起こされたと考えられる。UT では、生存細胞数は p53 誘導アポトーシスにより減少し、Dox5d で最小値を示し、その後わずかに増加した (Fig. 2C)。しかし、RE の生細胞数は増加し続けた (Fig. 2D)。Dox10d では、UT の平均生細胞数は  $1.3 \times 10^5$  個で、RE の  $39.0 \times 10^5$  個よりも著しく少なかった。

BrdU の添加により、細胞周期割合を FACS で解析した。UT Dox3d では、S 期および G2/M 期の細胞が著しく減少したが、G0/G1 期の休止細胞は約 2 倍に増加した (Figs. 3A and B)。一方、RE では、Dox3d で G0/G1 期細胞、S 期、G2/M 期細胞の割合に有意な変化



はなかった (Figs. 3C and D)。UT での経時変化は、G0/G1 期の細胞数割合が増加したのに対し、Dox1d と Dox3d では S 期と G2/M 期の細胞数割合が減少し、Dox5d では S 期の細胞数割合が著しく増加し、Dox7d では G2/M 期の細胞数割合が増加した (Fig. 3E)。対照的に、RE では、G0/G1、S、および G2/M 期の細胞数割合に著しい変化はみられず、Dox0d とほぼ同じ状態が継続した (Fig. 3F)。

## 4.2 CSC マーカーの発現

ALDH1A3<sup>+</sup> と CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> の発現細胞数割合を Cell Sorter SH800 で解析した。ALDH1A3 は蛍光強度の 10<sup>3</sup> 以上を陽性とし、CD44 は 10<sup>3</sup> 以上、CD24 は 10<sup>3</sup> 以下を CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> として解析した (Figs. 4A, B, C and D)。ALDH1A3<sup>+</sup> においては、UT Dox0d (10.0%) よりも RE Dox0d (38.4%) の方が発現細胞数割合は高かった (Figs. 4B and D)。CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> でも、UT Dox0d (23.8%) よりも RE Dox0d の方が発現細胞数割合は高かった (75.3%) (Figs. 4B and D)。したがって、RE には、ALDH1A3<sup>+</sup> または CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> の発現を伴うより多くの CSC 様細胞が含まれていた。さらに、Dox1d から Dox9d まで同様の発現パターンが観察された。ALDH1A3<sup>+</sup> (Fig. 4E,  $p < 0.01$ : Dox7d を除く) および CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> (Fig. 4F,  $p < 0.01$ ) の発現細胞数割合は、UT よりも RE で高かった。

## 4.3 免疫細胞化学染色による細胞集団構成の解析

以前に我々は、免疫細胞化学染色によって CSC だけでなく、Ki-67 陽性前駆細胞でも ALDH1A3 の発現を検出したことを報告した [25]。増殖する前駆細胞は、Ki-67<sup>+</sup> として認識され、ALDH1A3<sup>+</sup>Ki-67<sup>+</sup> および ALDH1A3<sup>-</sup>Ki-67<sup>+</sup> 前駆細胞の 2 つのタイプにさらに分類される。したがって、ヒエラルキーにおける 4 種類の細胞すなわち、CSC 様細胞、ALDH1A3<sup>+</sup> 前駆細胞、ALDH1A3<sup>-</sup> 前駆細胞、および成熟細胞は、Fig. 5A に示すように、ALDH1A3 および Ki-67 の免疫細胞化学染色によって区別することができる。

UT Dox0d では CSC マーカーとして ALDH1A3+Ki-67 細胞数割合は 14.8% で、UT Dox1d では 38.1% と一過性の増加を示した (Fig. 5B)。RE では、ALDH1A3+Ki-67 細胞数割合は Dox0d で有意に高く (40.3%)、Dox 添加後も維持された (Fig. 5B)。これらは、FACS によって得られた結果と一致していた (Fig. 4E)。さらに、ALDH1A3+Ki-67+ 細胞数割合は、UT Dox0d (35.8%) と RE Dox0d (36.5%) でほぼ同等の発現細胞数割合を示した (Fig. 5C)。ただし、Dox1d では、ALDH1A3+Ki-67+ の細胞数割合が UT で 14.2% に減少したが、RE では 43.3% とわずかに増加した (Fig. 5C)。

#### 4.4 CSC 様細胞のサイズと形態

CSC は一般に、前駆細胞や成熟細胞よりも小型であると言われているが [9, 27]、未だ議論される点ではある [27]。以前に我々は ALDH1A3+ 細胞は主に小型細胞であることを報告した [25]。本研究では、ALDH1A3+Ki-67 細胞である CSC 様細胞のサイズを解析した。S 細胞 (<50  $\mu\text{m}$ ) 数割合が、UT (13.3 $\pm$ 3.1%) よりも RE (38.2 $\pm$ 7.9%) で有意に高かった (Fig. 5D)。L 細胞 ( $\geq$ 50  $\mu\text{m}$ ) では、UT と RE における CSC 様細胞数割合に有意な差はみられなかった (Fig. 5D)。さらに、CSC 様細胞から間葉様細胞への形態学的変化を調べるために、ALDH1A3+Ki-67 細胞の長径/短径比を解析した (Fig. 5E)。L 細胞における長径/短径比が、Dox0d および Dox1d において、UT よりも RE で有意に大きく、RE の CSC 様細胞形態は、紡錘形の特徴を示した。

#### 4.5 上皮様および間葉様 CSC

近年、CSC の中でも 3 つのサブタイプが特定されている。すなわち、上皮様の特徴を持ち ALDH1A3+ を発現する E-CSC、間葉様の特徴を持ち CD44+CD24- を発現する M-CSC、およびハイブリッド ALDH1A3+/CD44+CD24- を発現する E/M-CSC である (Fig. 6A) [4, 30, 48]。ALDH1A3 と CD44+CD24- の発現パターンを FACS で調べたところ、E-CSC である

ALDH1A3<sup>+</sup>細胞数割合は、RE (3.4±0.6%) よりも UT (4.9±1.2%) の方がわずかに高かった (Fig. 6B)。M-CSC である CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>細胞数割合は、UT (21.6±2.9%) よりも RE (37.6±1.6%) で有意に高かった (Fig. 6D)。さらに、E/M-CSC である ALDH1A3<sup>+</sup>と CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>の両方を発現する細胞数割合は、UT (5.1±0.4%) よりも RE (32.6±1.3%) で有意に高かった (Fig. 6C)。

#### 4.6 アポトーシス抵抗性細胞の浸潤能獲得

Matrigel invasion assay を、UT Dox0d、UT Dox2d、RE Dox0d、および RE Dox2d の 4 つの実験条件下で行った。Matrigel を通過しフィルターに到達した細胞を、ギムザ染色によって検出した (Fig. 7A)。浸潤細胞数は、すべての実験条件下で 1 時間から 6 時間にかけて徐々に増加した (Fig. 7B)。RE Dox2d は他の条件よりも速く浸潤し、24 時間ではフィルター孔に到達した細胞数がほぼ最大に達した (Fig. 7B)。

#### 4.7 Matrigel 内浸潤様式

Matrigel 中の癌細胞浸潤様式を詳細にみた報告はなく、我々は共焦点レーザー顕微鏡を使用して、Matrigel 中細胞の浸潤深度と形態学的特徴を解析した。Matrigel 培養 1 時間後、細胞の大部分は、孤立した単一細胞として浅い層で検出された (Fig. 8A)。6 時間後では、より深い層に到達した細胞は多細胞集団を形成していた。フィルター近くの最も深い領域に位置する浸潤前線の細胞の大部分は孤在性であり、細胞集団形成はみられなかった (Fig. 8A)。細胞浸潤の深さの違いは、DAPI で核染色された細胞の Z スタック画像を color code scale で表現した。RE 細胞集団の形態は平面的だったが、特に Matrigel 培養 6 時間後、UT の形態はより立体的構造を示していた (Fig. 8A)。細胞集団の浸潤深達度は、共焦点レーザー走査型顕微鏡で得られた Z スタック画像によって測定した (Fig. 8B)。時間とともに浸潤深達度は増加し、RE は UT よりも深い層に到達した。Matrigel 培養 6 時間の場合、

RE Dox2d が最も深く浸潤し、UT Dox2d は最も浸潤していなかった (Fig. 8B)。これらの結果は、ギムザ染色による Matrigel invasion assay の結果と一致しており、RE Dox2d が細胞浸潤と運動性に対して最も高い能力を持っていることが示唆された。浸潤中の多細胞集団の形成率を評価するために、VM スコアで定義されている、polygon と complex mesh の細胞数割合を解析した (Fig. 8C)。Matrigel 培養 6 時間後、polygon と complex mesh 形成率は、UT Dox2d で最も高く、RE Dox2d で最も低かった。以前に、UT における VE-cadherin、MMP-9 の発現と VM の関係を報告したが [23]、今回、VM マーカーである MMP-9 および VE-cadherin の発現割合は、Matrigel 培養 6 時間後に UT Dox2d で大幅に上昇し、RE Dox2d では変化しなかった (Figs. 8D and E)。

#### 4.8 Matrigel 内浸潤と Snail の発現

EMT マーカーの 1 つである Snail の発現は、Matrigel に浸潤する細胞集団の免疫蛍光染色によって検出された (Fig. 9A)。Snail タンパクは、そのリン酸化状態に基づいて核だけでなく細胞質にも局在するため、細胞の核と細胞質の蛍光強度を測定した [28, 37, 44, 56]。Fiji/ImageJ ソフトウェアを使用した定量分析では、それぞれ UT Dox0d および UT Dox2d よりも RE Dox0d および RE Dox2d で有意に高い Snail の発現割合がみられた (Fig. 9B)。さらに、従来の monolayer 培養および Matrigel 培養をしたそれぞれの細胞から RNA を抽出し、RT-PCR で分析した。monolayer および Matrigel の両方において、Snail の発現割合は、UT Dox0d よりも RE Dox0d で有意に高く ( $p < 0.01$ )、RE Dox2d で最も高値を示した (Fig. 9C)。

## 5. 考察

### 5.1 再構成細胞集団 RE の特徴

実際の化学療法では、癌細胞の大部分を死滅させることができる。しかし、細胞集団のごく一部である CSC は薬剤に耐性があり、通常は細胞周期が静止した状態にある。これらの静止状態の CSC は分化して前駆細胞を産生するように誘導され、その一部は化学療法抵抗性を持つ新しい成熟腫瘍細胞に分化する [10]。この臨床観察を今回の研究に適用すると、UT 細胞に Dox 添加した後、CSC が生き残り、ヒエラルキーを再構築するため CSC が前駆細胞と成熟細胞への分化に対応する。in vivo での薬物耐性獲得の根底にあるメカニズムを、今回アポトーシス抵抗性によって、in vitro 実験系で再現した。Dox を添加しない場合、ALDH1A3+CSC 様細胞数割合は UT よりも RE で有意に高かった。我々の結果によって、Dox 添加によるアポトーシスに対する抵抗性を示し、生き残って再構成された細胞集団である RE が多数の CSC 様細胞を含むことが確認された。

Dox 添加後、免疫細胞化学染色により、ALDH1A3+細胞数が UT で徐々に減少したが、RE ではわずかに増加した。UT 細胞数の減少とは対照的に、Dox1d 上で観察された ALDH1A3+Ki-67細胞数割合の増加は、アポトーシス抵抗性を示す CSC 様細胞の生存に起因していた。一方、RE では ALDH1A3+Ki-67を示す CSC 様細胞の割合が Dox 添加前から高く、Dox 添加後も維持されており、RE のアポトーシス抵抗性が示された。免疫染色と同様の結果が、FACS 解析によっても確認された。これらの結果は、RE では、CSC だけでなく、他の構成細胞にもアポトーシスに抵抗性があることを示している。

ALDH1A3+Ki-67+前駆細胞に着目した結果、UT Dox1d の細胞数割合は減少したが、RE の細胞数割合はわずかに増加した。このことから、UT の前駆細胞はアポトーシスに感受性があるが、RE はアポトーシスに耐性がある可能性が示唆された。RE の ALDH1A3+Ki-67+細胞は、細胞数割合を絶対数に換算した場合にも顕著な増加を示した。さらに、BrdU を用

いた細胞周期解析の結果、Dox 添加後も RE の細胞周期パターンは大きく変化せず、RE 前駆細胞がアポトーシス抵抗性を獲得したことが確認された。

## 5.2 CSC 様細胞のサイズと形態学的特徴

上皮細胞は、基底膜上に存在し、細胞間接着性が高い極性を持つ円形の形態を特徴としている。対照的に、間葉細胞は極性や細胞間接着タンパク質を持たず、紡錘形の細胞形態学的特徴 [3, 54] と細胞移動特性 [32] を持っている。CSC は主に休眠状態にあり、一般に前駆細胞または成熟細胞よりも小さいと報告されている [9, 25, 27]。今回の研究で、UT で 50  $\mu\text{m}$  未満の S 細胞に CSC 様細胞が占める割合が高いことは、「アポトーシスに抵抗性を示す癌幹細胞は小型細胞である」ことと一致していた。さらに、RE によるアポトーシスに対する抵抗性は、RE 細胞が小型 CSC 様細胞の割合を含むことに起因する可能性がある。一方、FACS 解析でも、FSC 分画による細胞サイズにより、RE には小型 CSC 様細胞が多いことが確認された (Fig. 10)。免疫染色では、RE の CSC 様細胞の長径/短径比が大きく、これらの細胞が紡錘形である可能性が高いことが示された。したがって、CSC 様細胞が Dox2d で一時的に EMT を引き起こした可能性が示唆された。RE において形態学的変化から EMT が示唆されたが、このことは、蛍光免疫染色と RT-PCR により Snail が高発現しているという結果によっても裏付けられている。

## 5.3 RE における間葉系 CSC 細胞の特徴

Snail は EMT を誘導し、幹細胞を維持する転写因子の 1 つであるが、放射線療法や化学療法に対する耐性を誘発する可能性も示唆されている。CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>を示す細胞は、Snail、Slug、Twist、および N-cadherin の発現亢進を示し、E-cadherin の発現が低下する [30]。FACS の結果から、RE は Dox 添加以前より CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>を発現している細胞数割合が有意に高く (Fig. 4F)、RT-PCR においては、Snail の発現が Dox0d および Dox2d

でも RE の方が有意に高かったことから (Fig. 9C)、RE は間葉系の特徴を持つ細胞集団であることが示された。

#### 5.4 浸潤における間葉様 CSC の役割

不死化ヒト乳腺上皮細胞 (HMLE) を用いた研究では、FACS により分画された CSC 様 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>細胞を調べ、間葉様 BCSC が EMT を受けた細胞と同様の特徴を示した [32]。さらに、CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>は間葉系 CSC で発現し、ALDH1A3 は上皮系 CSC で発現することが知られている [30]。今回の FACS 解析による結果は、RE がより多くの間葉系 CSC 様細胞を含み、UT が上皮系 CSC 様細胞を含んでいたことを示唆していた。乳癌などの固形腫瘍は、多細胞が集合して浸潤する集団浸潤の特徴を示し、その一部は、単一細胞の移動する浸潤形態を示す [16]。しかし、これらの接着性上皮癌細胞が運動性浸潤移動能を獲得するメカニズムはまだ解明されていない [15, 20, 40]。

我々は、VM が CSC の可塑性によって引き起こされることを以前に報告した [23]。その中で UT Dox2d には、より複雑な 3 次元高次構造を形成する能力が高い VM 形成が示された。本研究では、上皮様の特徴を持つ UT が、Matrigel 培養で VM を示唆する遺伝子発現だけでなく、より集団的な浸潤と 3 次元の細胞集団 (polygon と complex mesh) を示すことが明らかになった。一方、間葉様の特徴を持つ RE は Matrigel において平面細胞集団と単一細胞移動能力を持っていたが、VM 関連遺伝子発現はみられなかった。UT Dox2d は、polygon と complex mesh の形成率が最も高く、VM マーカー VE-cadherin と MMP-9 の mRNA 発現割合が有意に高かった。また、補足データによると、これらの複雑な構造の細胞集団では ALDH1A3 を優先的に発現したが、弧在性または少数の集団で移動する細胞は CD44 を発現した (Fig. 11)。一方、RE Dox2d では EMT マーカーである Snail の発現割合が有意に高かった。浸潤先端の深達度は、RE Dox2d が最も Matrigel の深部まで到達していた。これらの結果は、VM を示す可能性がある UT とは対照的に、RE が間葉系細胞の

特徴である浸潤能と遊走能を持つ細胞集団である可能性を示唆している。

## 5.5 EMT と薬剤耐性

EMT と薬剤耐性の間には関係があることが示唆されており、EMT の阻害は、化学療法における薬剤耐性を低下させることが報告されている [54]。口腔癌細胞では、Snail を介した EMT を起こすと静止状態の細胞が多くなり、さらに化学療法に対する耐性を示した報告がある [57]。TNBC における Twist、Snail、および Foxc2 を介した EMT 関連遺伝子の発現は、ABC トランスポーターを介することによって多剤耐性を誘発した [45]。したがって、EMT 能力を獲得した癌細胞は、薬剤耐性に関連があり、さらに幹細胞性と静止状態の細胞が多くなる可能性が示唆されている [26]。さらに、別の研究では、EMT を誘導した乳癌細胞集団では、CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>を発現する細胞が多く存在し、幹細胞のような特徴を示したという報告がある [6, 13, 31, 32]。これらとは逆に、今回の我々の研究では、アポトーシス抵抗性細胞集団 RE が再構成された際に、何らかの原因によって間葉系 CSC が EMT 誘導に関与することを示した。



## 6. 結論

我々の研究では、p53 アポトーシスによって乳癌細胞集団に誘導される様々な変化を *in vitro* で再現することが可能になった。アポトーシス抵抗性を示す癌細胞集団が再構成される過程を詳細に観察することができた。その中で p53 依存性アポトーシス抵抗性を獲得した RE は、EMT 様の形態学的特徴、Matrigel 中の浸潤および移動能力、および Snail 高発現を含む EMT 様の特徴を有することが明らかとなった。癌細胞集団にすでに存在する間葉様 CSC が、その可塑性によって環境の変化に応じて細胞の浸潤と移動に関与することが示された。これらの結果は、TNBC が再発時に治療抵抗性を獲得するメカニズムの解明に手がかりを与える。

## 論文目録

本研究成果の一部は、以下の学術雑誌に公表した。

Sana Inoue, Miki Imanishi, Ai Kanzaki, Atsumi Fujimoto, Marina Maeyama, Ayaka Okamoto, Hiroka Matsuda, Kiyotsugu Yoshikawa, and Rei Takahashi. (2022) Role of cancer stem-like cells in the process of invasion and mesenchymal transformation by a reconstituted triple-negative breast cancer cell population resistant to p53-induced apoptosis. *Acta Histochem. Cytochem.* 55 (5): 169-184.

## 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学研究科 医療薬学専攻（薬物治療学研究室）高橋 玲 特別任用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。

また、終始有益となる御助言と御校閲を賜りました同大学院 生命物理化学研究室 桑原 淳 教授、ならびに生化学研究室 和田 戈虹 教授に深く感謝の意を表します。

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同志社女子大学 薬学部 医療薬学科（薬物治療学研究室）吉川 清次 教授に深い感謝の意を示します。

本論文における実験系の構築に協力してくださった、同志社女子大学薬学部 第 12 期卒業生 今西 美樹氏、神崎 愛氏、第 13 期生 藤本 淳美氏、前山 真里奈氏、岡本 采花氏、第 14 期生 松田 洋佳氏に感謝いたします。

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。

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。

## 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100; 3983-3988.
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. *Biol Res.* 42; 377-389.
3. Biddle, A., Liang, X., Gammon, L., Fazil, B., Harper, L. J., Emich, H., et al. (2011) Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res.* 71; 5317-5326.
4. Bocci, F., Gearhart-Serna, L., Boareto, M., Ribeiro, M., Ben-Jacob, E., Devi, G. R., et al. (2019) Toward understanding cancer stem cell heterogeneity in the tumor microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116; 148-157.
5. Bomken, S., Fiser, K., Heidenreich, O. and Vormoor, J. (2010) Understanding the cancer stem cell. *Br J Cancer.* 103; 439-445.
6. Britton, K. M., Kirby, J. A., Lennard, T. W. and Meeson, A. P. (2011) Cancer stem cells and side population cells in breast cancer and metastasis. *Cancers (Basel).* 3; 2106-2130.
7. Carayon, P. and Bord, A. (1992) Identification of DNA-replicating lymphocyte subsets using a new method to label the bromo-deoxyuridine incorporated into the DNA. *Journal of Immunological Methods.* 147; 225-230.
8. Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Tarpin, C., Diebel, M., Esterni, B., et al. (2010) Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res.* 16; 45-55.

9. 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.* 2016; 1740936.
10. Chuthapisith, S., Eremin, J., El-Sheemey, M. and Eremin, O. (2010) Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surg Oncol.* 19; 27-32.
11. De Angelis, M. L., Francescangeli, F. and Zeuner, A. (2019) Breast Cancer Stem Cells as Drivers of Tumor Chemoresistance, Dormancy and Relapse: New Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)*. 11.
12. Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., et al. (2007) Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 13; 4429-4434.
13. Doherty, M. R., Cheon, H., Junk, D. J., Vinayak, S., Varadan, V., Telli, M. L., et al. (2017) Interferon-beta represses cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114; 13792-13797.
14. 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 Histochem Cytochem.* 41; 47-57.
15. Friedl, P. and Gilmour, D. (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10; 445-457.
16. Friedl, P., Locker, J., Sahai, E. and Segall, J. E. (2012) Classifying collective cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* 14; 777-783.
17. Gazdar, A. F., Kurvari, V., Virmani, A., Gollahon, L., Sakaguchi, M., Westerfield, M., et al. (1998) Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer. *Int J Cancer.* 78; 766-774.

18. Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Fiska, A. and Koukourakis, M. I. (2011) The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol.* 28; 745-752.
19. Gonchoroff, N. J., Katzmann, J. A., Currie, R. M., Evans, E. L., Houck, D. W., Kline, B. C., et al. (1986) S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine. Role of DNase pretreatment. *J Immunol Methods.* 93; 97-101.
20. Gray, R. S., Cheung, K. J. and Ewald, A. J. (2010) Cellular mechanisms regulating epithelial morphogenesis and cancer invasion. *Curr Opin Cell Biol.* 22; 640-650.
21. Honeth, G., Bendahl, P. O., Ringner, M., Saal, L. H., Gruvberger-Saal, S. K., Lovgren, K., et al. (2008) The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* 10; R53.
22. 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 Histochem Cytochem.* 50; 85-93.
23. Izawa, Y., Kashii-Magaribuchi, K., Yoshida, K., Nosaka, M., Tsuji, N., Yamamoto, A., et al. (2018) Stem-like Human Breast Cancer Cells Initiate Vasculogenic Mimicry on Matrigel. *Acta Histochem Cytochem.* 51; 173-183.
24. Kai, K., Arima, Y., Kamiya, T. and Saya, H. (2010) Breast cancer stem cells. *Breast Cancer.* 17; 80-85.
25. Kashii-Magaribuchi, K., Takeuchi, R., Haisa, Y., Sakamoto, A., Itoh, A., Izawa, Y., et al. (2016) Induced Expression of Cancer Stem Cell Markers ALDH1A3 and Sox-2 in Hierarchical Reconstitution of Apoptosis-resistant Human Breast Cancer Cells. *Acta Histochem Cytochem.* 49; 149-158.
26. Lee, K. L., Kuo, Y. C., Ho, Y. S. and Huang, Y. H. (2019) Triple-Negative Breast Cancer:

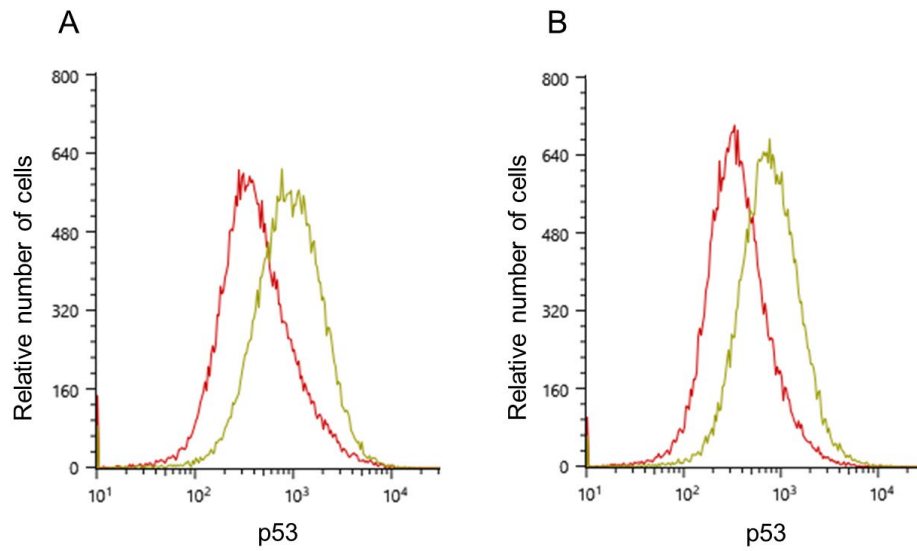
- Current Understanding and Future Therapeutic Breakthrough Targeting Cancer Stemness. *Cancers (Basel)*. 11.
27. Li, Q., Rycaj, K., Chen, X. and Tang, D. G. (2015) Cancer stem cells and cell size: A causal link? *Semin Cancer Biol.* 35; 191-199.
  28. Li, S. S., Chen, D. M., Chen, L. B., Wei, H., Wang, J. L., Xiao, J., et al. (2021) GTSE1 promotes SNAIL1 degradation by facilitating its nuclear export in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep.* 23.
  29. Lin, Y., Zhong, Y., Guan, H., Zhang, X. and Sun, Q. (2012) CD44+/CD24- phenotype contributes to malignant relapse following surgical resection and chemotherapy in patients with invasive ductal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 31; 59.
  30. Liu, S., Cong, Y., Wang, D., Sun, Y., Deng, L., Liu, Y., et al. (2014) Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports.* 2; 78-91.
  31. Mallini, P., Lennard, T., Kirby, J. and Meeson, A. (2014) Epithelial-to-mesenchymal transition: what is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance. *Cancer Treat Rev.* 40; 341-348.
  32. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., et al. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 133; 704-715.
  33. Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A. and Lee, P. W. (2011) Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle.* 10; 1378-1384.
  34. Marcato, P., Dean, C. A., Pan, D., Araslanova, R., Gillis, M., Joshi, M., et al. (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.
35. Masuda, C., Takeuchi, S., N, J. B., S, R. V. 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.
  36. Matsumoto, H., Tsuchiya, T., Yoshiura, K., Hayashi, T., Hidaka, S., Nanashima, A., et al. (2014) ABCC11/MRP8 Expression in the Gastrointestinal Tract and a Novel Role for Pepsinogen Secretion. *Acta Histochem Cytochem*. 47; 85-94.
  37. Muqbil, I., Wu, J., Aboukameel, A., Mohammad, R. M. and Azmi, A. S. (2014) Snail nuclear transport: the gateways regulating epithelial-to-mesenchymal transition? *Semin Cancer Biol*. 27; 39-45.
  38. Nedeljkovic, M. and Damjanovic, A. (2019) Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. *Cells*. 8.
  39. Perrone, G., Gaeta, L. M., Zagami, M., Nasorri, F., Coppola, R., Borzomati, D., et al. (2012) In situ identification of CD44+/CD24- cancer cells in primary human breast carcinomas. *PLoS One*. 7; e43110.
  40. Polyak, K. and Weinberg, R. A. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 9; 265-273.
  41. Rahimian, A., Barati, G., Mehrandish, R. and Mellati, A. A. (2018) Inhibition of Histone Deacetylases Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition in Triple-Negative Breast Cancer Cells through a Slug Mediated Mechanism. *Molecular Biology*. 52; 406-413.
  42. 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 Res*. 61; 7065-7070.
  43. Ricardo, S., Vieira, A. F., Gerhard, R., Leitao, D., Pinto, R., Cameselle-Teijeiro, J. F., et



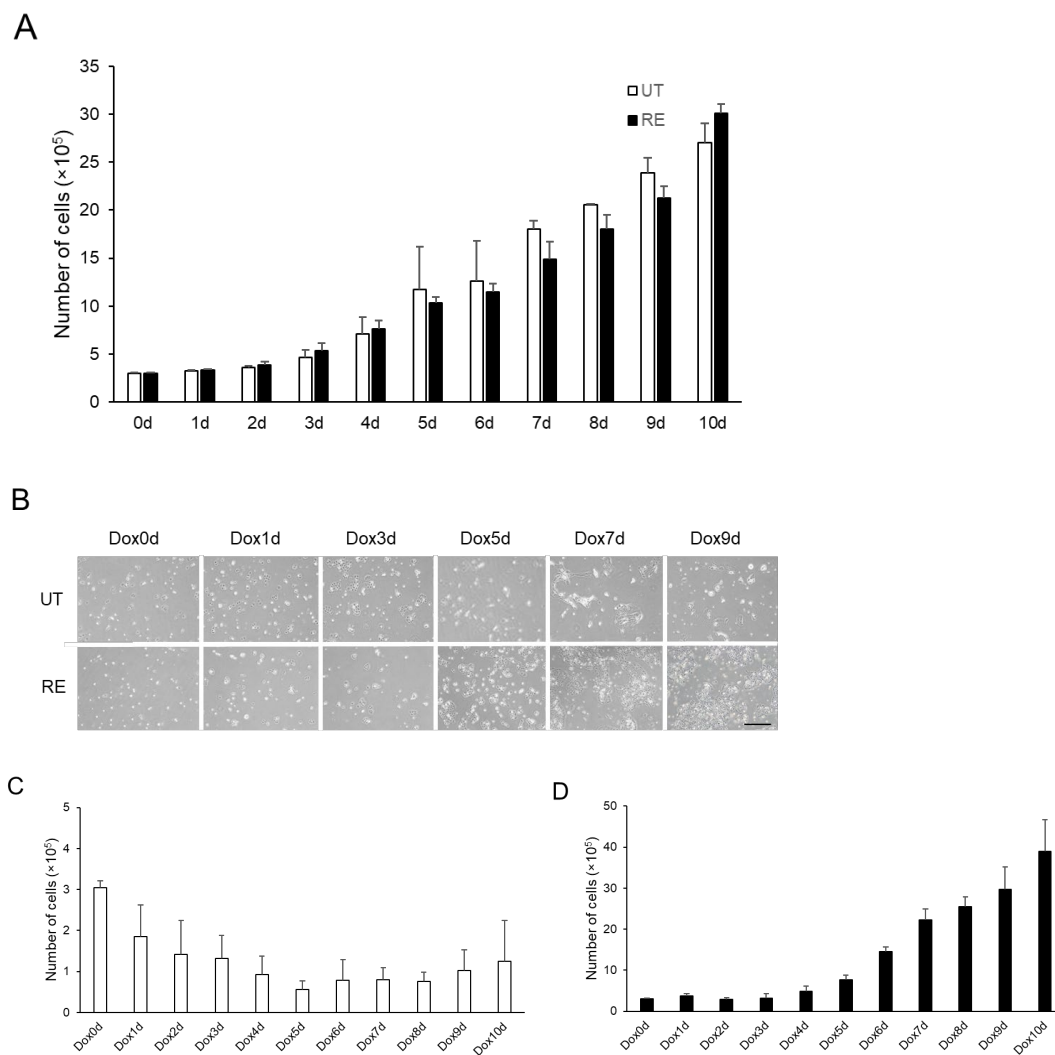
- al. (2011) Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol.* 64; 937-946.
44. Rosivatz, E., Becker, K. F., Kremmer, E., Schott, C., Blechschmidt, K., Hofler, H., et al. (2006) Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Virchows Arch.* 448; 277-287.
45. Saxena, M., Stephens, M. A., Pathak, H. and Rangarajan, A. (2011) Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death Dis.* 2; e179.
46. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 9; 676-682.
47. 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. *J Histochem Cytochem.* 39; 741-748.
48. Sulaiman, A., McGarry, S., Han, X., Liu, S. and Wang, L. (2019) CSCs in Breast Cancer- One Size Does Not Fit All: Therapeutic Advances in Targeting Heterogeneous Epithelial and Mesenchymal CSCs. *Cancers (Basel).* 11.
49. Syaidah, R., Tsukada, T., Azuma, M., Horiguchi, K., Fujiwara, K., Kikuchi, M., et al. (2016) Fibromodulin Expression in Folliculostellate Cells and Pericytes Is Promoted by TGFbeta Signaling in Rat Anterior Pituitary Gland. *Acta Histochem Cytochem.* 49; 171-179.
50. 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.

51. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. and Nieto, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139; 871-890.
52. Wang, H., Wang, L., Song, Y., Wang, S., Huang, X., Xuan, Q., et al. (2017) CD44(+)/CD24(-) phenotype predicts a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett*. 14; 5890-5898.
53. Wu, Y., Sarkissyan, M. and Vadgama, J. V. (2016) Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *J Clin Med*. 5.
54. Xu, X., Zhang, L., He, X., Zhang, P., Sun, C., Xu, X., et al. (2018) TGF-beta plays a vital role in triple-negative breast cancer (TNBC) drug-resistance through regulating stemness, EMT and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 502; 160-165.
55. Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L. C. and Chang, C. (1998) Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem*. 251; 549-557.
56. Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M., et al. (2004) Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 6; 931-940.
57. Zhu, L. F., Hu, Y., Yang, C. C., Xu, X. H., Ning, T. Y., Wang, Z. L., et al. (2012) Snail overexpression induces an epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties in SCC9 cells. *Lab Invest*. 92; 744-752.



**Fig. 1 Dox-induced p53 expression by a FACS analysis**

UT Dox0d (A) and RE Dox0d (B) are indicated by a red line, and UT Dox2d (A) and RE Dox2d (B) by a green line.

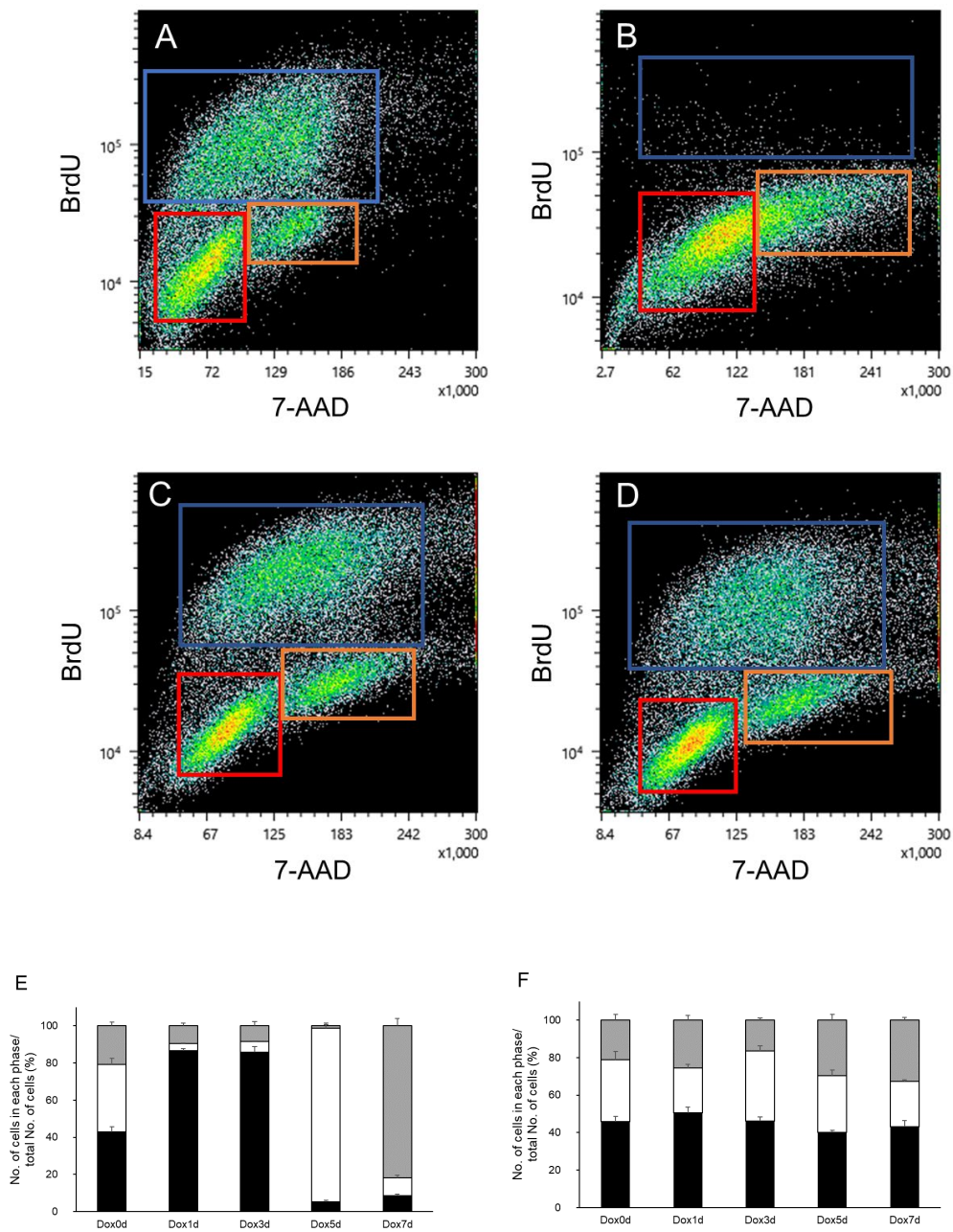


**Fig. 2 Time-course changes in the number of cells and effects of the addition of Dox on growth curves**

A: Changes in the number of cells without Dox.

B: Examples of cell growth patterns with Dox analyzed by an inverted phase-contrast microscope. (Bar: 200  $\mu\text{m}$ )

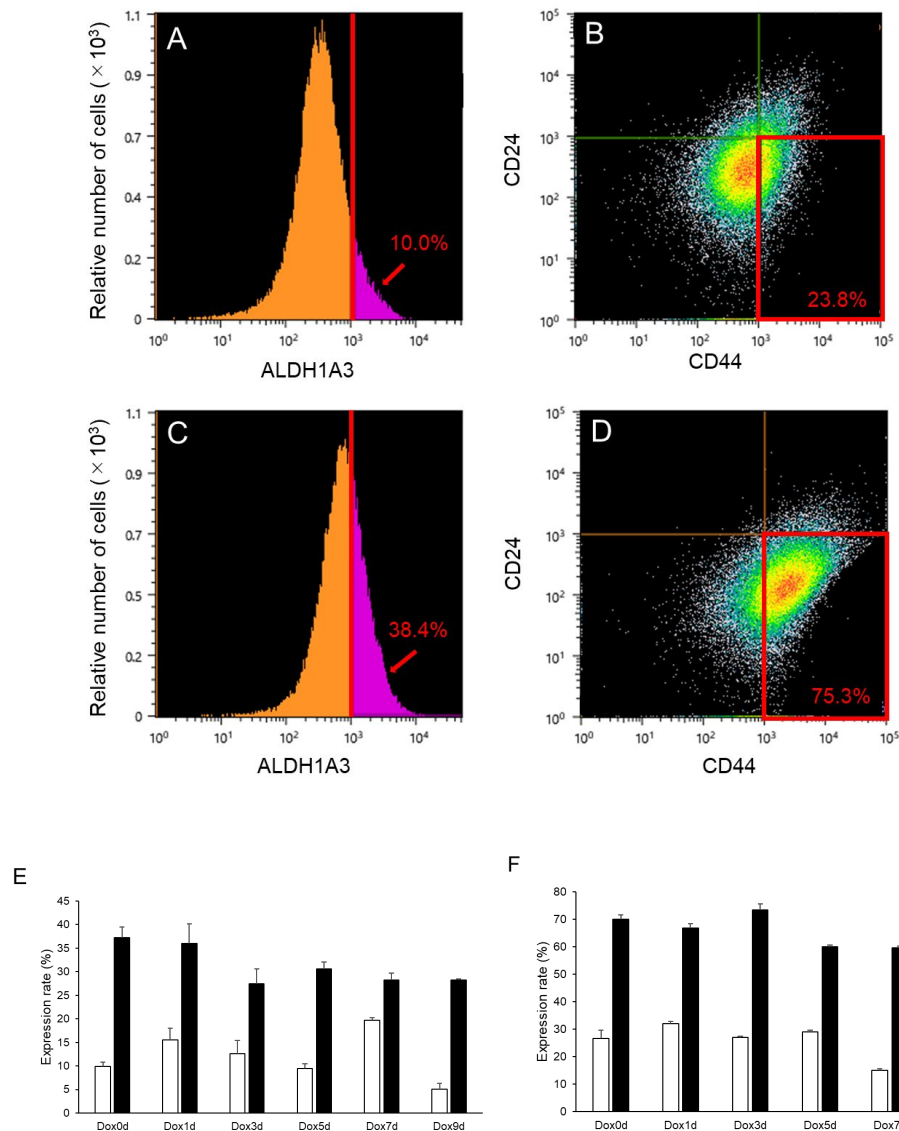
C and D: Changes in the number of viable cells with Dox in UT (C) and RE (D). The number of UT is expressed on a 1/10 scale of RE. ( $\square$ : UT,  $\blacksquare$ : RE)



**Fig. 3 Cell cycle analysis by FACS**

A, B, C, and D: Each cell was pulse labeled with BrdU and nuclear DNA was stained with 7-AAD. The red open square indicates the G0/G1 phase, blue the S phase, and orange the G2/M phase. A: UT Dox0d, B: UT Dox3d, C: RE Dox0d, and D: RE Dox3d.

E and F: Each phase of the cell cycle, the G0/G1(■), S(□), and G2/M(▒) phases, was expressed as a ratio to the total number of cells.



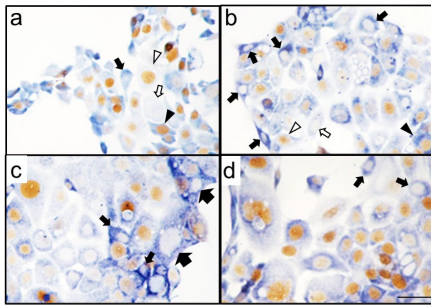
**Fig. 4 Detection of CSC-like cells in UT and the reconstituted RE cell population by a FACS analysis**

A and C: Positive cells are defined as a fluorescent signal intensity of  $10^3$  or more, shown in purple areas in the histogram. A: UT Dox0d, C: RE Dox0d.

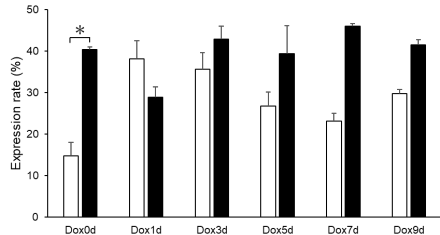
B and D: CD24<sup>-</sup> is defined as  $10^3$  or less and CD44<sup>+</sup> as  $10^3$  or more, which are indicated by the open red square.

E and F: Time-course analysis of the expression patterns of ALDH1A3 (E) and CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> (F) in UT (□) and RE (■). The bar indicates means  $\pm$  SE.

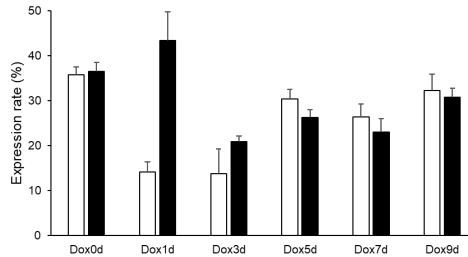
A



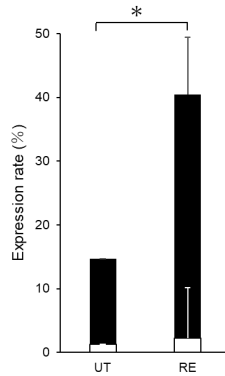
B



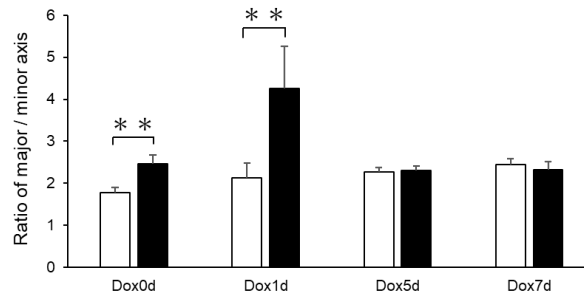
C



D



E



**Fig. 5 Analysis of the cell population constitution by immunocytochemical staining and morphological measurements**

A: Double immunocytochemical staining. ALDH1A3 stains blue in the cytoplasm and Ki-67 stains brown in the nucleus.

a and b: Examples of the expression patterns of ALDH1A3 and Ki-67 in Dox0d.

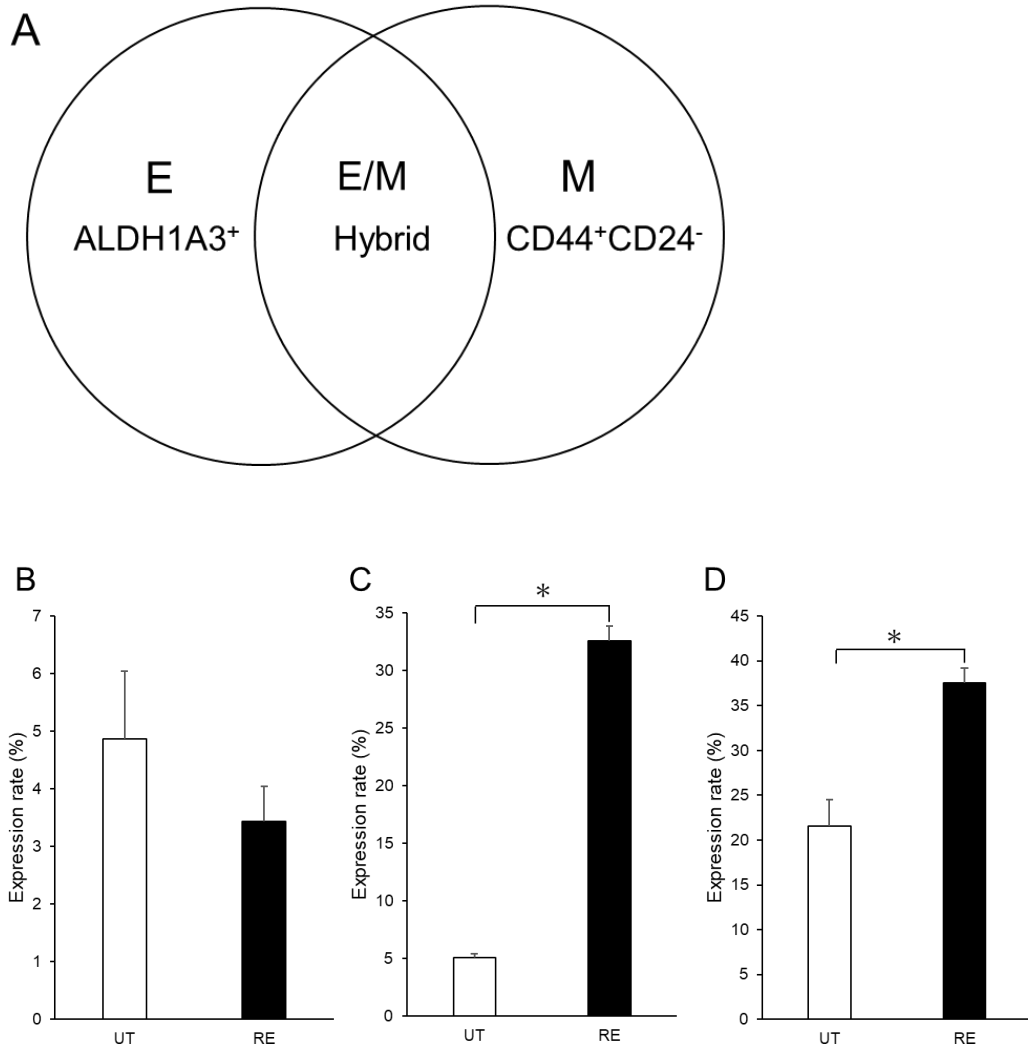
a: UT Dox0d, b: RE Dox0d. solid arrow: ALDH1A3+Ki-67, solid arrowhead: ALDH1A3+Ki-67+, open arrowhead: ALDH1A3-Ki-67+, and open arrow: ALDH1A3-Ki-67.

c and d: Examples of L ( $\geq 50 \mu\text{m}$ ) and S cells ( $< 50 \mu\text{m}$ ), which are distinguished by the length of their major axis. Large arrows: L cells, small arrows: S cells. c: UT Dox1d, d: RE Dox1d (Bar:  $50 \mu\text{m}$ )

B and C: Time-course analysis of expression patterns of the CSC marker, ALDH1A3+Ki-67- (B) and the cancer precursor cell marker, ALDH1A3+Ki-67+ (C) indicated by the expression rate with the addition of Dox. The bar indicates means  $\pm$  SE. \* $P < 0.01$   $\square$ : UT,  $\blacksquare$ : RE

D: The rate of ALDH1A3+Ki-67- cells without Dox sorted by cell size. The ratios of S cells and L cells divided by the total number of cells are shown.  $\blacksquare$ : S cells  $\square$ : L cells The bar indicates means  $\pm$  SE. \* $P < 0.01$  UT versus RE

E: The ratio of the major/minor axis of mesenchymal-like elongated cells in ALDH1A3+Ki-67- cells.  $\square$ : UT,  $\blacksquare$ : RE \*\* $P < 0.05$  (the Student's *t*-test)



**Fig. 6 Epithelial-like and mesenchymal-like CSCs by a FACS analysis**

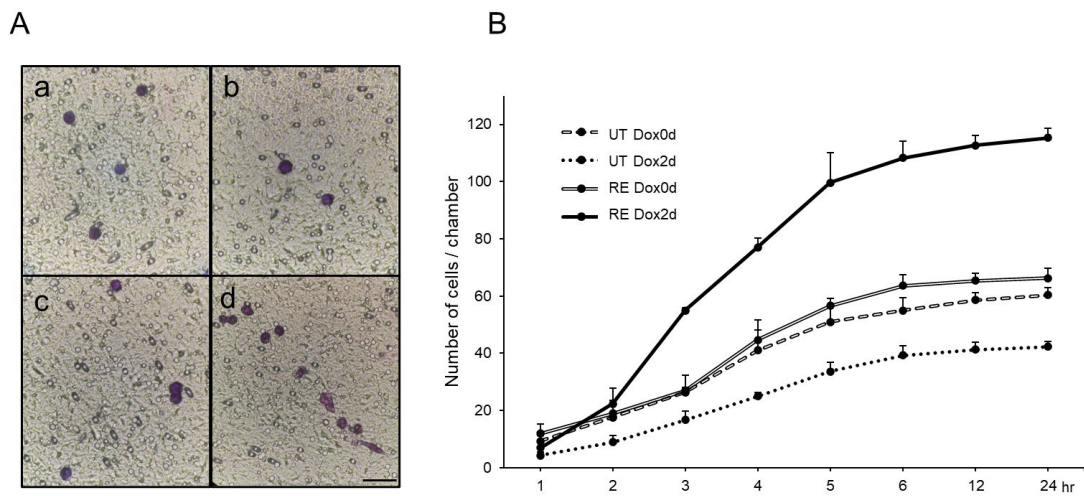
A: The representation of cell subpopulations in the diagram indicates CSCs with the epithelial-like ALDH1A3<sup>+</sup> (E), mesenchymal-like CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> (M), and hybrid epithelial/mesenchymal ALDH1A3<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> (E/M) phenotypes.

B: Ratio of cells from ALDH1A3<sup>+</sup> cells (E) minus hybrid ALDH1A3<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> cells (E/M).

C: Ratio of hybrid ALDH1A3<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> cells (E/M). The bar indicates means  $\pm$  SE. \*P<0.01 UT versus RE

D: Ratio of cells from CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> cells (M) minus hybrid ALDH1A3<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> cells (E/M). The bar indicates means  $\pm$  SE. \*P<0.01 UT versus RE

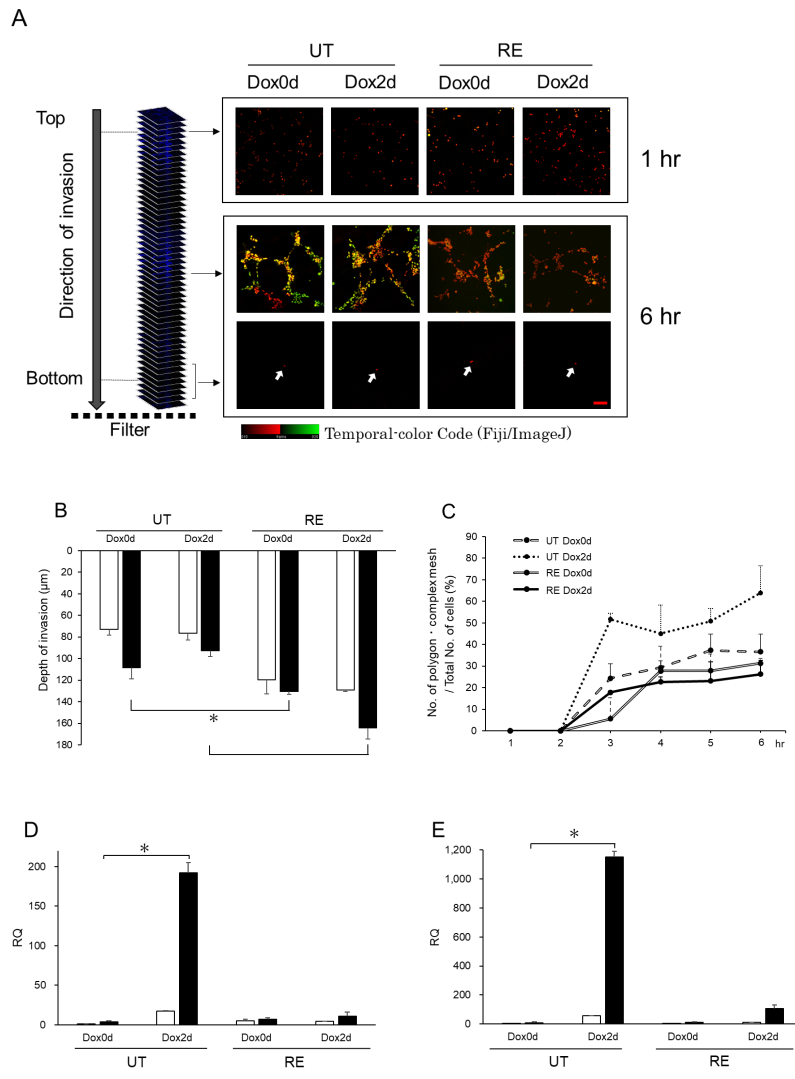




**Fig. 7 Quantification of cell invasion and migration**

A: Cells reaching the filter pores after a 6-hr culture in Matrigel were stained by Giemsa and photographed. (Bar: 50  $\mu$ m)

B: Time-course analysis of the total number of invading cells per chamber. Each point indicates the average value and standard deviation of 3 chambers.



**Fig. 8 Depth and morphological characteristics of invading cells in Matrigel**

**A:** Fluorescence images of cells infiltrating Matrigel by a confocal laser scanning microscope. Cells cultured in the Matrigel chamber were stained with DAPI and color-coded as follows. Regarding the three-dimensional construction of cells, Z-stack images are represented on a color code scale using Fiji/ImageJ software (version 1.52g, Java 1.80\_172, NIH). (Bar: 100 μm)

**B:** Depth of invasion in Matrigel

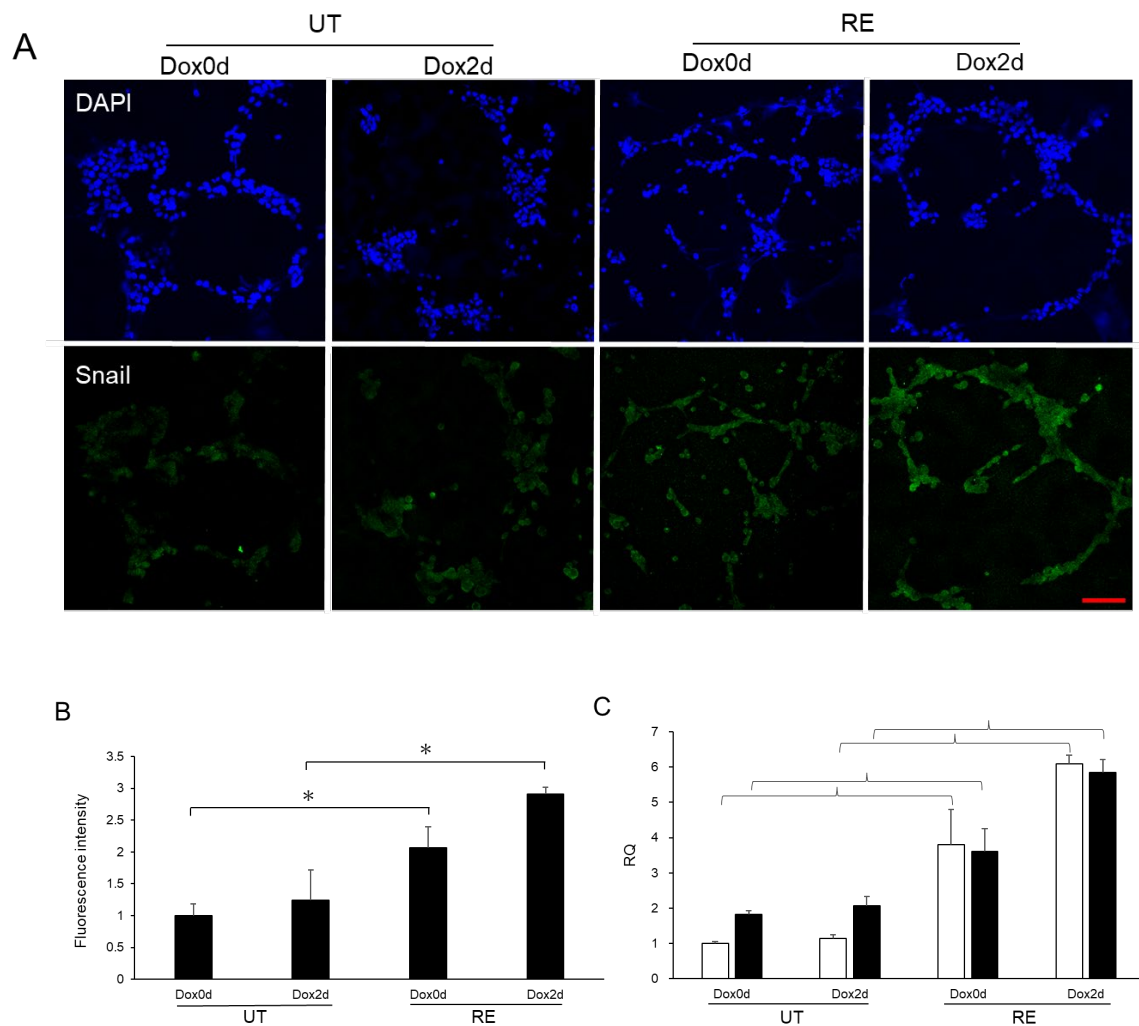
The distance from the surface of Matrigel to the invasion front of cell populations in Matrigel cultures for 1 hr (□) and 6 hr (■) was measured by a confocal laser scanning microscope. The values at each point are indicated by the mean and standard deviation (n=5). \*P<0.01 (the Student's *t*-test)

**C:** Percentages of cell populations that form polygon and complex meshes during infiltration in Matrigel. The definition of the polygon and complex mesh was previously described (Arada 2009).

**D and E:** Expression levels of VM marker mRNA in infiltrating cells in Matrigel.

**D:** MMP-9, **E:** VE-cadherin (□: monolayer culture, ■: Matrigel invasion 6 hr)

\*P <0.01 (the Student's *t*-test)



**Fig. 9 Snail expression patterns in the process of Matrigel infiltration**

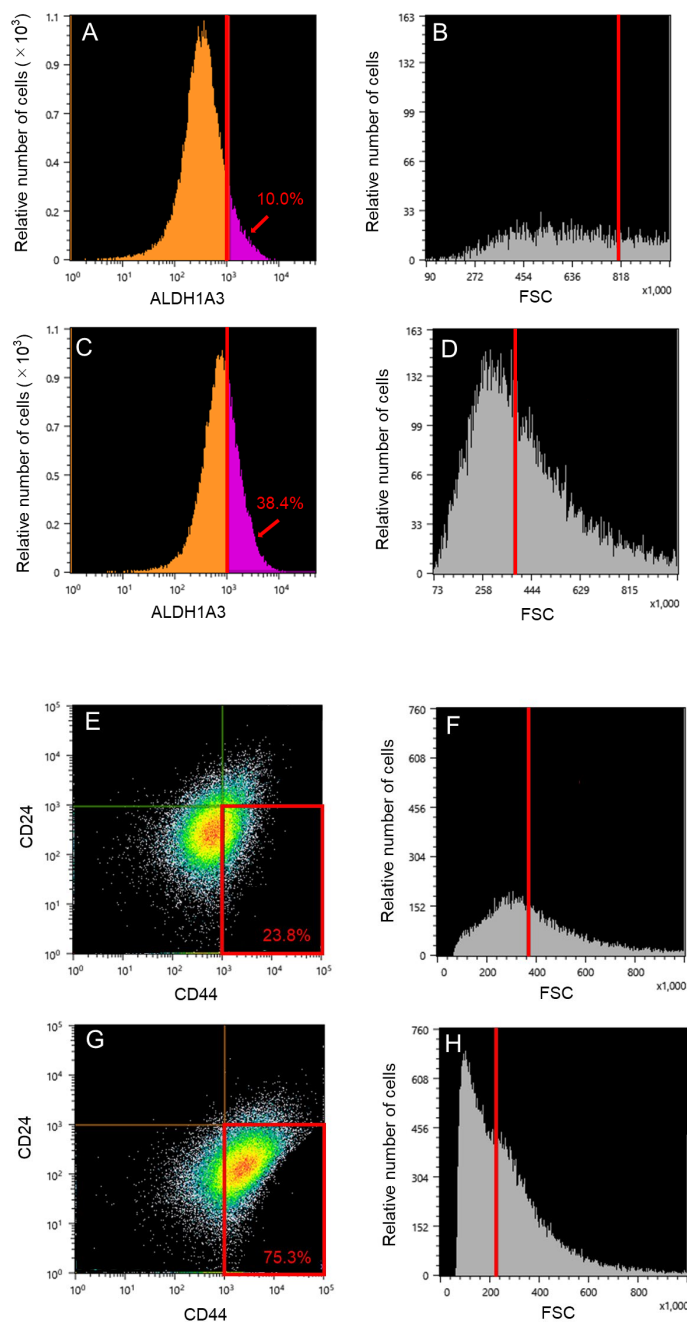
Cells in the Matrigel culture for 6 hr were immunofluorescently stained with Snail.

A: Fluorescence images of Snail expression patterns in Matrigel using a confocal laser scanning microscope. The nucleus is shown by DAPI (blue) and Snail expression is observed in the nucleus and cytoplasm (green). (Bar: 100  $\mu$ m)

B: A quantitative analysis was performed on the Snail fluorescence channel using Fiji/ImageJ software. The average value of fluorescence intensity in 9 randomly selected fields of view where cells exist was measured, and the values of three wells were combined. The bar indicates means  $\pm$  SE. \*P<0.01 UT versus RE

C: Semiquantitative analysis of Snail mRNA expression.

RT-PCR was performed using RNA extracted from cells in the conventional monolayer culture and in Matrigel. (□: monolayer culture, ■: Matrigel invasion 6 hr)



**Fig. 10 Size of CSC-like cells analyzed by FACS**

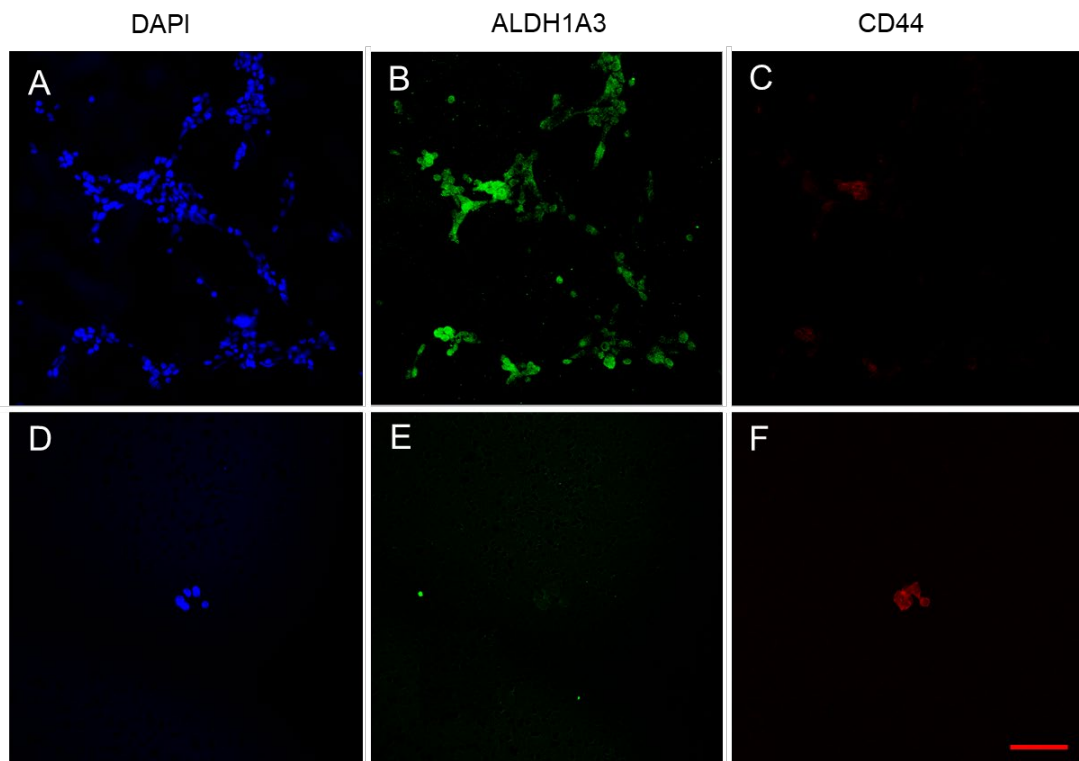
The size of CSC-like cells was detected using the FSC parameters of FACS and compared. In ALDH1A3-positive CSC-like cells, the values of the median of FSC parameter are 781,397 and 381,027 in UT and RE, respectively. In CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> CSC-like cells, the median FSC values are 378,472 and 226,563, respectively. These results suggest RE contains smaller CSC-like cells.

A, B, E, and F: UT Dox0d, C, D, G, and H: RE Dox0d.

A and C: ALDH1A3<sup>+</sup> cells as CSC-like cells are shown in purple areas.

E and G: CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> cells are surrounded by an open red square.

B, D, F, and H: CSC-like cells are arranged by FSC in order of size, and their median is indicated by the red line.



**Fig. 11 ALDH1A3 and CD44 expression patterns in the process of Matrigel infiltration.**

UT Dox0d cells in the Matrigel culture for 6 hr were immunofluorescently stained with ALDH1A3 and CD44 and photographed under a confocal laser scanning microscope. The nucleus is shown by DAPI (blue). The expression of ALDH1A3 (green) and CD44 (red) is observed in the cytoplasm. ALDH1A3 was more highly expressed in the collective cell population during the Matrigel infiltration process (B), and CD44 was preferentially expressed in a single or few cells infiltrating near the filter (F) (Bar: 100  $\mu$ m).