

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08411

研究課題名(和文) アポトーシス抵抗性乳癌細胞における癌幹細胞表現型の解析

研究課題名(英文) Analysis of cancer stem cell phenotype of apoptosis-resistant breast cancer cells

研究代表者

高橋 玲 (Takahashi, Rei)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60144565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌細胞株HCC1937の中の一部の細胞は、p53誘導による細胞死(アポトーシス)に抵抗性を呈する。そして、これらの生き残った細胞の特徴は、乳癌幹細胞のマーカーであるALDH1A3、Sox-2、CD44などの発現プロファイルが類似していることが明らかになった。この細胞群はアポトーシス抵抗性を示すのみならず、癌細胞集団社会の再構成能力、上皮・間葉転換(EMT)能力、乳管分化能力を有することが示された。本研究の知見は、癌細胞の特徴の基礎的情報を提供し、さらに癌に対する新しい治療方法の開発に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The subpopulations of the human breast cancer cell line HCC1937 that exhibit resistance to p53-induced apoptosis showed similarities with the breast cancer stem cells in the expression profiles of some breast cancer stem cell-related markers ALDH1A3, Sox-2, and CD44. These apoptosis-resistant cells showed the ability of not only apoptosis-resistance but also reconstruction of cancer cell hierarchy, epithelial-mesenchymal transition, and ductal differentiation. These findings may provide basis of cancer stem cell properties and aid to develop a new therapeutic measure to cancer.

研究分野：病理学

キーワード：乳癌 癌幹細胞 アポトーシス ALDH 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

乳腺組織における乳管は乳管上皮細胞と筋上皮細胞の2種類の細胞から構成されており、乳癌の発生源は主に乳管上皮細胞である。乳癌細胞が乳管の基底膜を破綻させ間質に浸潤していくことで、乳癌の転移が生じる。乳癌の転移、再発の原因となる癌幹細胞は腫瘍始原細胞ともいわれ、癌細胞の少数集団を構成している。癌幹細胞は自己複製能と多分化能を合わせ持つと定義され、化学療法や放射線療法に抵抗があるといわれている。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。アルデヒド脱水素酵素(Aldehyde dehydrogenase:ALDH)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。特にALDHs アイソタイプのひとつであるALDH1A3 はレチノイン酸合成にも関係があり乳癌の臨床的予後マーカーとして知られている。GATA3(GATA-binding protein 3)は乳腺管腔上皮への分化において必要不可欠な zinc-finger 転写因子である。Sox-2(Sex-determining Y [SRY]-box binding protein-2)は多能性幹細胞の維持、胚発生の制御において重要な役割を持つ転写因子であり、乳癌幹細胞にも関連があることが報告されている。腫瘍抑制遺伝子TP53はストレス条件下で誘導され細胞周期停止や細胞死を起こす。ヒト乳癌のサブタイプは、遺伝子発現解析によって luminal A、luminal B、HER2-enriched、basal-like の4つのタイプに分類される。我々の用いたHCC1937細胞は basal-like タイプの乳癌由来の培養細胞株で、エストロゲン、プロゲステロン、ヒト上皮成長因子受容体2が陰性、すなわちトリプルネガティブであり、さらにBRCA-1変異、TP53変異、治療抵抗性を示す予後が悪いといわれている乳癌由来である。

2. 研究の目的

我々はヒト乳癌細胞集団の階層的再構成の動態における癌幹細胞マーカーALDH1A3とSox-2の遺伝子発現の役割を明らかにすることを目的とし、p53誘導によるアポトーシスに抵抗性を示すHCC1937細胞を用いて両遺伝子の発現パターンの変化を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

HCC1937細胞にdoxycyclineで発現誘導可能なwt-p53プラスミドを安定的に遺伝子導入し、分離されたクローンの一つをHCC1937/p53と名付けて使用した。HCC1937/p53細胞をdoxycycline含有培地で1~10日間培養した細胞をそれぞれdox1d~

dox10dと名付けた。

免疫細胞化学染色

スライドガラス上で培養した細胞をdox未処理および処理後に4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.1%TritonX-100で膜透過処理し、0.3%過酸化水素水/メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼを不活性化し、一次抗体として抗ALDH1A3抗体(Purified rabbit polyclonal, ABGENT, 1:1000)、抗GATA3抗体(Rabbit polyclonal, abcam, 1:100)、抗Sox-2抗体(Mouse monoclonal, abcam, 1:100)を4で1日反応させた。さらに第二次抗体反応、酵素反応の後にDABで発色させた。ALDH1A3は細胞質内、GATA3とSox-2は核内に染色された細胞をそれぞれ陽性とした。

二重免疫細胞化学染色

抗ALDH1A3抗体を用いて、上記と同様に一次抗体反応の後、第二次抗体反応、酵素反応させBCIP R/NBTで発色させた。次に抗原賦活化を行い、1時間37で抗Ki-67抗体(Mouse monoclonal, DAKO, 1:500)を反応させ、さらに第二次抗体反応、酵素反応の後にDABで発色させた。ALDH1A3は細胞質内、Ki-67は核内に染色された細胞を陽性とした。

免疫蛍光染色

一次抗体として抗ALDH1A3抗体(Purified rabbit polyclonal, ABGENT, 1:50)、抗Ki-67抗体(Mouse monoclonal, DAKO, 1:500)、抗GATA3抗体(Monoclonal mouse IgG, R&Dsystem, 1:50)を4で1日反応させた。Alexa Fluor 488 conjugated goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor 680 conjugated goat anti-mouse IgGを蛍光標識二次抗体として用いた。DAPIで核染色を行った。

Fluorescence-activated cell sorting =FACS

抗p53抗体(Mouse monoclonal, BD Biosciences)を使用した。7-AAD染色で死細胞を識別し除外した。BD FACS Calibur Flow cytometerで解析を行った。

4. 研究成果

dox投与数時間でp53発現がピークに達し、その後、発現レベルが持続することが確認された。dox1dからdox10dまでの解析でアポトーシスを免れた生細胞数はdox1dからdox5dにかけて減少し、dox8dから再び増加した。細胞数がdox1dで減少したにもかかわらず、免疫細胞化学染色によるALDH1A3+細胞数は一過性に増加した。もともとHCC1937/p53細胞は増殖するにつれて大型細胞が出現し大小混在した集団を形成する特徴をもつことから、細胞長径50μm未満を小型細胞、50μm以上を大型細胞として比較した。ALDH1A3+小型細胞の数はdox1dで一過性に増加しdox7dにかけて減少した。ALDH1A3発現の有無で比較するとALDH1A3+細胞における細胞長径ではdox1dはcontrolに比べて、小型化の傾向がみられた(P<0.001)。さらにALDH1A3+細胞はdox1dからdox4dにかけて時間依存的に、大型化した(P<0.001)。一方、

ALDH1A3⁻細胞は dox1d から dox4d まで ALDH1A3⁺細胞より大型であった ($P < 0.001$)。Control 細胞における ALDH1A3⁺細胞の割合が 45.8%と高い値を示したことから癌幹細胞以外での ALDH1A3 の発現の可能性が推定される。増殖マーカーである Ki-67 を使った二重免疫細胞化学染色において ALDH1A3⁺/Ki-67⁺細胞の総数は、dox1d で増加し、続けて dox3d にかけて減少し、dox7d 以降、再び増加した。さらに ALDH1A3 と Ki-67 の発現パターンを細胞サイズ別にみると dox1d における ALDH1A3⁺/Ki-67⁺小型細胞の数は一過性に顕著に増加した。また ALDH1A3 と Ki-67 の免疫蛍光二重染色でも両者の共発現が示された。ALDH1A3⁺/Ki-67⁺細胞の細胞長径において dox5d は dox1d に比べて大型化の傾向がみられた ($P < 0.001$)。次に ALDH1A3⁺細胞における管腔上皮分化誘導マーカー GATA3 の発現を解析した。ALDH1A3⁺細胞の割合は dox1d で増加し、その後、dox5d まで高い割合を保ち、一方、GATA3⁺細胞の割合は ALDH1A3⁺細胞の動きより遅れて dox3d から dox5d にかけて増加し、dox6d から dox9d にかけて減少した。同一細胞内で ALDH1A3 と GATA3 の共発現を示す細胞も存在することが免疫蛍光二重染色により確認された。細胞の大きさと GATA3 発現には正の相関がみられた。また dox2d から dox8d にかけて GATA3⁺細胞は GATA3⁻細胞に比べて細胞の大きさが顕著に大きくなる傾向がみられた ($P < 0.001$)。ALDH1A3 と同様に癌幹細胞マーカーのひとつである Sox-2 の発現パターンを解析した。細胞の大きさととの関係を見ると、Sox-2⁺細胞は dox1d で小型化の傾向がみられ、dox2d 以降、Sox-2⁺細胞と Sox-2⁻細胞は、いずれも大型化の傾向を示した。これに対して ALDH1A3⁺細胞では dox1d から dox3d にかけて小型細胞の多くがみられ、ALDH1A3⁺細胞における平均細胞長径が 60 μ m 未満であった。すなわち、ALDH1A3⁺細胞は Sox-2⁺細胞と比べて小型化の傾向を示している。また Sox-2⁺細胞の細胞数を経時的にみると、dox7d までの Sox-2 の発現パターンは ALDH1A3 のそれに類似していた。さらに細胞サイズ別による Sox-2 発現頻度は Sox-2⁺小型細胞が、dox1d で一過性の増加がみられ、Sox-2⁺大型細胞は dox2d にかけて増加し、Sox-2⁺小型細胞と Sox-2⁺大型細胞とともにアポトーシス抵抗性を示した。dox2d 以降、Sox-2⁺小型細胞と Sox-2⁺大型細胞は、いずれも dox10d にかけて漸減した。ALDH1A3⁺細胞が dox1d で増加してアポトーシス抵抗性を示したことは、癌幹細胞がアポトーシス抵抗性を示すとする Mimeault らの報告に一致している。乳癌細胞における dox 投与による p53 誘導によって ALDH1A3⁺細胞が増加するという我々の結果から ALDH1A3⁺細胞は p53 依存アポトーシス抵抗性細胞であると考えられる。癌幹細胞の大きさについては明らかにされていないが、我々の実験では、dox1d でアポトーシス抵抗性を示して生き残

った細胞が主に ALDH1A3⁺小型細胞であることから癌幹細胞は小型細胞であることが推定される。実際に Qiuhui らは、癌幹細胞は主に休止状態にあり前駆細胞、成熟細胞より、一般的に小さいと報告している。癌幹細胞は非対称性に分裂し、前駆細胞に比べて分裂速度は遅いが、前駆細胞の増殖速度は速いといわれている。ALDH1A3⁺細胞、ALDH1A3⁺小型細胞はこの実験系で高い Ki-67 index 示したことから癌幹細胞以外にも分裂する前駆細胞が含まれていることを示唆している。ALDH1A3 は悪性度の高い転移巣において強発現するとされているのに対して、乳管発生における管腔分化誘導に関係している GATA3 は転移巣で低発現の傾向がみられ、両者の発現は逆相関を示すと報告されている。このことは我々の実験結果において dox4d から dox6d における ALDH1A3 と GATA3 の発現が逆相関を示したことと一致する。GATA3⁺細胞が ALDH1A3⁺細胞に遅れて増加する理由は、集団を再構成するために p53 誘導によるアポトーシス後に残った ALDH1A3⁺細胞に管腔分化誘導が生じたためであると考えられた。dox5d において免疫蛍光二重染色で ALDH1A3 と管腔前駆細胞マーカーである GATA3 の共発現を示す細胞が 58.5%の割合で検出されたことにより ALDH1A3 が管腔前駆細胞にも発現する可能性が示唆された。癌幹細胞マーカーである ALDH1A3 と Sox-2 の経時的な発現パターンの類似性は両者の相関を強く示唆している。同研究室内の他者の実験結果では同一細胞内における ALDH1A3 と Sox-2 の遺伝子発現を FACS で解析したところ、両者の発現は正相関を示すことが確認された。また FACS による細胞周期では Sox-2 が前駆細胞すなわち細胞分裂に入った細胞にも発現していることが明らかとなった。さらに Sox-2 と GATA3 の共発現が確認されたことにより、Sox-2 が管腔前駆細胞にも発現することが明らかとなった。これらの結果により Sox-2 は ALDH1A3 と同様に乳癌幹細胞に特異的ではなく、前駆細胞と管腔前駆細胞にも発現することが示された。今回の我々の実験結果において両者の相違点も明らかになった。dox1d における Sox-2⁺細胞数が 11 倍の顕著な増加を示したことは、細胞分裂のみでは説明できず、Sox-2⁻細胞に発現のスイッチが入り Sox-2⁻細胞から Sox-2⁺細胞に変化した可能性があると考えられた。Sox-2 は通常では発現が抑制されているが、アポトーシス誘導というストレス下で発現し、集団の再構成に関与することが示唆された。それに対して ALDH1A3⁺細胞は Sox-2 のような発現の変化ではなく、生き残った細胞の数が 1.5 倍の増加を示したと考えられた。

本研究では、癌幹細胞マーカー ALDH1A3 と Sox-2、分化マーカー GATA3 および、増殖マーカー Ki-67 の発現パターンを比較解析することによって、アポトーシス抵抗性乳癌細胞と癌幹細胞との関係および癌ヒエラルキーの

再構成におけるこれらの遺伝子の役割が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Yuka Umeki, Kohta Mohri, Yohji Kawasaki, Hiroshi Watanabe, Rei Takahashi, Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura, Makiya Nishikawa, Induction of Potent Antitumor Immunity by Sustained Release of Cationic Antigen from a DNA-Based Hydrogel with Adjuvant Activity, *Advanced Functional Materials*, 査読有, 25 巻, 2015, 5758-5767,

DOI: 10.1002/adfm.201502139

Karin Kashii-Magaribuchi, Rie Takeuchi, Yuko Haisa, Akemi Sakamoto, Yuki Izawa, Miyuki Isa, Mayu Hukuzawa, Motonobu Murakami, Rei Takahashi, 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*, 査読有, 49 巻, 2016, 149-158,

DOI: 10.1267/ahc.16031

[学会発表](計10件)

井澤優希、伊佐みゆき、福沢真由、村上元庸、高橋玲、アポトーシス抵抗性を示すヒト乳癌細胞における分化能と ALDH 活性の解析、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
伊藤愛実、柏井香輪、井澤優希、伊佐みゆき、福沢真由、村上元庸、高橋玲、アポトーシス抵抗性ヒト乳癌細胞における ALDH1A3 と Sox2 の発現様式の解析、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
川村綾香、北村雅世、福沢真由、高橋玲、天ヶ瀬紀久子、竹内孝治、村上元庸、*Helicobacter pylori* 感染 Mongolian gerbil 胃粘膜における萎縮境界と G 細胞の動態、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
小島万里奈、北村瑠璃、柏井香輪、井澤

優希、伊佐みゆき、福沢真由、村上元庸、高橋玲、アポトーシス抵抗性ヒト乳癌細胞における ALDH1 と GATA3 発現様式の解析、第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016 年 10 月 15 日、大阪薬科大学(大阪府)

北村瑠璃、小島万里奈、柏井香輪、井澤優希、伊佐みゆき、福沢真由、村上元庸、高橋玲、p53 アポトーシス誘導による乳癌幹細胞マーカー ALDH 酵素活性の経時的変化、第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2016 年 10 月 15 日、大阪薬科大学(大阪府)

柏井香輪、竹内利恵、羽井佐ゆう子、坂本朱美、伊藤愛実、井澤優希、伊佐みゆき、福沢真由、村上元庸、高橋玲、Induced expression of cancer stem cell markers ALDH1A3 and Sox-2 in hierarchical reconstitution of apoptosis-resistant human breast cancer cells、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎ブリックホール(長崎県)

井澤優希、柏井香輪、伊佐みゆき、福沢真由、村上元庸、高橋玲、Analysis of ALDH1-positive breast cancer stem/progenitor cells in induction of the vasculogenic mimicry activity、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 17 日、長崎ブリックホール(長崎県)

石村光、井澤優希、福沢真由、村上元庸、高橋玲、p53 誘導性アポトーシスに抵抗性を示すヒト乳癌細胞における癌幹細胞マーカー発現の解析、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017、2017 年 8 月 26 日、京都薬科大学(京都府)

井澤優希、野坂菜由、福沢真由、村上元庸、高橋玲、ヒト乳癌培養細胞における血管擬態誘導と癌幹細胞関連マーカーの発現パターン解析、第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2017 年 9 月 23 日

井澤優希、曲淵香輪、石村光、伊藤愛実、野坂菜由、福沢真由、高橋玲、ヒト乳癌培養細胞における血管擬態誘導の経時的変化と癌幹細胞関連マーカーの発現パターンの解析、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 28 日、金沢駅もてなしドーム地下イベント広場(石川県)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 玲 (TAKAHASHI REI)
同志社女子大学・薬学部・教授
研究者番号：60144565

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()