

## 腫瘍幹細胞マーカー Markers for Tumor-Initiating Cells

森井 英一, 池田 純一郎  
Eiichi Morii and Jun-ichiro Ikeda

大阪大学大学院医学系研究科病態病理学・医学部附属病院病理部

**要旨** 腫瘍はモノクローナルな集団であるが、その構成細胞の性質は多様である。最近、腫瘍を構成する細胞の中には、抗がん剤や放射線に耐性で造腫瘍能に富んだ腫瘍幹細胞と呼ばれる少数の細胞群があり、この細胞群が腫瘍の再発や転移を引き起こすことが明らかにされつつある。本稿では、腫瘍幹細胞を特徴づけるマーカーについて概説する。

キーワード：腫瘍幹細胞, side population, アルデヒド脱水素酵素

### 1. はじめに

腫瘍は単一の細胞から由来しており、一つの腫瘍を構成する細胞はモノクローナルである。ところが、腫瘍を構成する細胞の形態は様々で、ある細胞は長細く、またその横の細胞は他の細胞と接着してあたかも管腔を形成するような形をとるようなこともある。形態のみならず、腫瘍細胞としての性格も多様で、腫瘍を摘出して細胞を1個1個バラバラにして培養すると、旺盛に増殖する細胞もあれば、すぐに死滅してしまう細胞もある。旺盛に増殖して腫瘍を再構成できる細胞が実は腫瘍全体のごく僅かであることは、すでに50年以上前から知られていた。現在では倫理上多大な問題のある実験であるが、腫瘍をもつ患者35人より各々 $10^9$ 個の腫瘍細胞を単離し、それを自家移植した場合、再び腫瘍が形成された人はわずか7人であった<sup>1)</sup>。つまり、残りの28人では、移植された $10^9$ 個もの腫瘍細胞の中に再び腫瘍を形成できる能力のある細胞は存在しなかったことになる。このような、腫瘍の中にごく少数存在する「移植された場合、再び腫瘍を形成することのできる」腫瘍細胞が、腫瘍幹細胞と呼ばれる一群の腫瘍細胞である。通常、正常組織における幹細胞は、「自己複製能」と「多分化能」をもつ細胞と定義されている。腫瘍幹細胞は、自らが腫瘍集団全体を再構成できる能力をもつ。再構成された腫瘍集団の中に再び腫瘍幹細胞がある点で「自己複製能」を、そして再構成された腫瘍集団、つまり自らの子孫たちが多様な形質を有する点で「多分化能」をもつと考えられており、腫瘍「幹細胞」と命名されている。本稿では、腫瘍幹細胞を規定するマーカーについて概説する。なお、腫瘍幹細胞の直接の英訳は tumor stem cell であるが、移植に

よって腫瘍を再構成できる細胞、つまり腫瘍を開始できる細胞という意味で、tumor-initiating cell との英訳が用いられることが多い。

### 2. 細胞表面に存在する腫瘍幹細胞マーカー

腫瘍幹細胞であるかどうかのアッセイは、腫瘍を単離し、それをバラバラにして免疫不全マウスに移植し、腫瘍を再度形成できるかどうか判定するという方法をとる。この時、腫瘍を再構成できたら元の細胞は腫瘍幹細胞であった（移植する腫瘍細胞は1個ではないため、腫瘍幹細胞を含んでいたという表現の方が正確である）と言える。腫瘍幹細胞と非腫瘍幹細胞との分子マーカーを用いた区別は、1997年 Dick らのグループが最初に報告した<sup>2)</sup>。彼らは、白血病細胞の中で、CD34 陽性 CD38 陰性という性質をもつごく少数の細胞のみが NOD/Scid マウスに移植した際に腫瘍を形成できるのに対し、それ以外の大半の白血病細胞は腫瘍を形成できないことを見出した。

これを契機に、様々な腫瘍でも腫瘍幹細胞探しが始まった。固形腫瘍で最も早く腫瘍幹細胞の存在が判明したものは、乳癌である<sup>3)</sup>。CD44 陽性 CD24 陰性という性質をもつ乳癌細胞のみが、NOD/Scid マウスに移植された場合に腫瘍を形成した。CD44 陽性細胞が腫瘍幹細胞としての性質をもつことは、乳癌以外にも前立腺癌、膀胱癌、頭頸部扁平上皮癌でもみられる比較的共通の現象である(表1)<sup>4~6)</sup>。乳癌に引き続き、脳腫瘍でも、CD133 陽性細胞が腫瘍幹細胞としての性質を示すことが明らかとされた<sup>7)</sup>。CD44 と同様、CD133 も、脳腫瘍以外に前立腺癌、大腸癌の腫瘍幹細胞のマーカーとして比較的共通に用いられる。

NOD/Scid マウスに1個の腫瘍細胞を移植して腫瘍を形成することは現実的には困難で、実際には少なくとも数百個の腫瘍細胞を移植して腫瘍を形成するかどうかの判定を行って

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2  
TEL: 06-6879-3711; FAX: 06-6879-3719  
2011年1月31日受付

表1 さまざまな腫瘍の細胞表面に発現する腫瘍幹細胞マーカー

腫瘍の種類	腫瘍幹細胞表面の分子マーカー
急性骨髄性白血病	CD34 陽性, CD38 陰性
乳癌	CD44 陽性, CD24 陰性/弱陽性
脳腫瘍	CD133 陽性
前立腺癌	CD44 陽性, CD133 陽性
膵臓癌	CD44 陽性
頭頸部癌	CD44 陽性
大腸癌	CD133 陽性

いる。その点で、上記のマーカーは、腫瘍幹細胞を比較的多く含む画分で豊富に発現している蛋白質であると言える。

### 3. 薬物排泄能に着目した腫瘍幹細胞マーカー

CD44 や CD133 は腫瘍細胞表面に発現している蛋白質マーカーであるが、腫瘍細胞そのものの性質を利用して機能に着目したマーカーもある。腫瘍幹細胞は、抗がん剤などの薬物療法に耐性を持ち、他の腫瘍細胞が死滅しても、なかなかアポトーシスに陥らない性質をもつ。抗がん剤などの薬物は、腫瘍細胞内に取り込まれて効果を発揮するが、腫瘍幹細胞では細胞内に取り込まれた薬物を細胞外にくみ出す薬物トランスポーターを強く発現しており、細胞内に入ってきた薬物を排泄する能力に優れている。この性質を利用して、腫瘍幹細胞を単離する試みがなされている<sup>8)</sup>。

ヘキスト 33342 色素は細胞内に容易に取り込まれ、紫外線を照射すれば強い蛍光を細胞内から発する薬物である。腫瘍細胞にヘキスト 33342 (Hoechst33342) 色素を加えて紫外線を照射すれば、大半の細胞が強い蛍光を発するのにに対し、ごく一部の細胞は、弱い蛍光しか発さない。この弱い蛍光しか発さない細胞が腫瘍幹細胞の候補となる。これは、薬物排泄能の強い細胞、すなわち腫瘍幹細胞が、取り込まれたヘキスト 33342 色素を細胞外に排泄し、結果的に細胞内でのヘキスト 33342 色素の濃度が低下したことに基づく。この性質を利用して、腫瘍細胞をヘキスト 33342 色素でラベルして、紫外線レーザーをあててフローサイトメトリーを行うと、弱い蛍光しか示さない画分、すなわち腫瘍幹細胞が比較的多く含まれる画分を描出することができる(図1)。大半が強い蛍光を発する細胞であるのに対し、弱い蛍光しか発さない細胞はごく僅かである。そこで、前者を“main” population (MP), 後者を“side” population (SP) と呼ぶ。薬物排泄は、薬物トランスポーターと呼ばれる ATP 依存的に薬物を細胞外へ排泄する物質が担っている。このトランスポーターは、verapamil のような物質でその機能が阻害される。つまり、SP は verapamil 存在下で消失し、非存在下で出現する(図1)。

SP は、薬物排泄能が高いという腫瘍幹細胞の機能を利用して描出された領域である。そこで、細胞表面に発現する蛋白質マーカーが未解明である腫瘍細胞からでも、SP をマーカーにすれば、比較的容易に腫瘍幹細胞を単離することができる<sup>9~11)</sup>。もちろん、皮膚のような、もともと薬物トラン

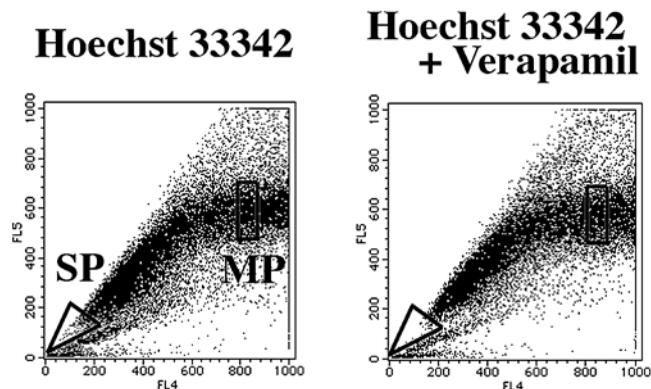


図1 ヘキスト 33342 色素の蛍光による A549 肺癌細胞株のフローサイトメトリー。腫瘍細胞をラベルした時、verapamil を加えると消失する弱い蛍光を発する領域が SP で、この部分に腫瘍幹細胞が多く含まれる。これに対し、大半の腫瘍細胞は強い蛍光を発し、MP に含まれる。FL4 は Hoechst blue, FL5 は Hoechst red の蛍光を検出している。

スポーターを強く発現するような組織から発生した腫瘍では、腫瘍幹細胞でなくとも SP に腫瘍細胞が含まれることが多く、決して SP が腫瘍幹細胞と 1対1 対応するものではない。しかし、細胞表面に発現する腫瘍幹細胞マーカーを同定するための最初の手掛かりとして SP はよく用いられる。

### 4. 薬物代謝系に着目した腫瘍幹細胞マーカー

アルデヒドは細胞にとって毒性が高く、速やかにカルボキシル基をもつ酢酸に酸化され代謝される必要がある。この過程に関与する酵素が aldehyde dehydrogenase (ALDH) である。ALDH はレチノールをレチノイン酸に変換させる活性もあり、正常の幹細胞で豊富に存在する<sup>12)</sup>。高い ALDH 活性は正常幹細胞のみならず、腫瘍幹細胞でもみられることが知られている<sup>13~17)</sup>。そこで、腫瘍細胞の中で ALDH 活性の高い部分のみを描出する試みがなされている。官能基としてアルデヒドをもつ状態では蛍光を発さないが、このアルデヒド基がカルボキシル基に ALDH によって酸化されれば強い蛍光を発する Bodipy-aminoacetaldehyde という物質がある。この物質は脂溶性で、速やかに細胞内に取り込まれる。もし細胞の ALDH 活性が高ければ、取り込まれた非蛍光物質である Bodipy-aminoacetaldehyde は蛍光物質 Bodipy-aminoacetate に変換される。しかし、ALDH の活性を阻害する物質である Diethylaminobenzaldehyde (DEAB) を加えると、蛍光物質への変換がおこらず、かりに ALDH 活性の高い細胞であっても蛍光を発することはない。そこで、DEAB 非存在下では蛍光を発し、DEAB 存在下で蛍光を失う画分に含まれる細胞が、高い ALDH 活性をもつことになる(図2)。このシステムは、現在 Aldefluor というキットで製品化されていることもあり、多くの腫瘍に応用されている<sup>13~17)</sup>。

上述の SP と同様、ALDH 活性を指標とするこの方法は、CD133 や CD44 といった腫瘍幹細胞特有に高発現する細胞表面蛋白質が知られていない臓器の腫瘍からでも腫瘍幹細胞

with DEAB

without DEAB

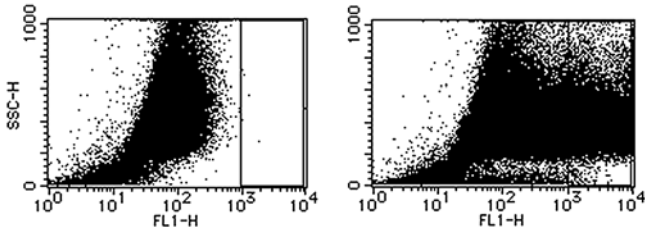


図2 側方散乱光 (SSC-H) と Bodipy-aminoacetaldehyde の蛍光による A549 肺癌細胞株のフローサイトメトリー. DEAB 存在下で消失し, 非存在化で出現する強い蛍光を発する, 線で囲んだ領域が ALDH1 活性の強い細胞群である. FL1-H は, Bodipy-aminoacetaldehyde の蛍光を検出している.

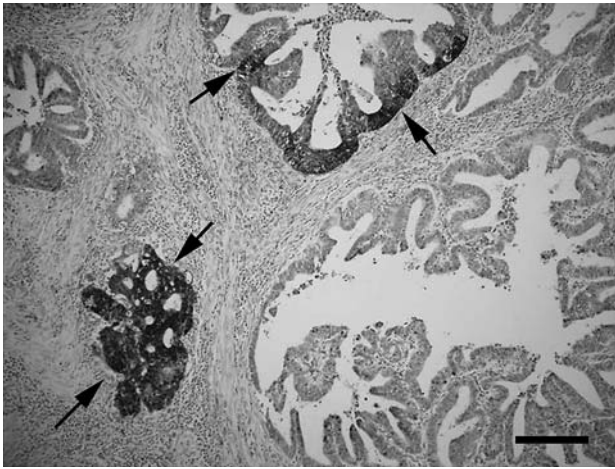


図3 ALDH1 の免疫染色. 子宮内膜癌の細胞の一部が ALDH1 陽性である. バーの長さは 200  $\mu\text{m}$ .

を同定できる可能性がある. ALDH には少なくとも 19 種類のアイソフォームが知られている. 腫瘍幹細胞で比較的多く利用されているアイソフォームは ALDH1A1 であるが, 他のアイソフォームが腫瘍幹細胞で高い発現を示すこともあり, どのアイソフォームが ALDH 活性を規定しているかは, 腫瘍の種類により, あるいは腫瘍の状態によって異なるのかもしれない.

ALDH1 蛋白質を免疫染色で検出すると, 子宮内膜癌では, ごく一部の細胞だけが ALDH1 を発現していることがわかった (図3)<sup>18)</sup>. ALDH1 発現細胞が多い症例ほど, 転移する確率や再発する確率など, 悪性の指標が高かった (表2). このことは, ALDH1 発現細胞が腫瘍幹細胞としての性格を有することと矛盾しない. 実際, 子宮内膜癌の細胞株で検討したところ, 一つの細胞株の中でも ALDH1 活性の高い細胞と低い細胞が混在しており, ALDH1 活性の高い細胞ほど, 抗がん剤に対する抵抗性が高く, *in vitro* でコロニーを形成する能力, 基底膜を構成する成分を破って浸潤していく能力も高かった. また, ALDH1 活性の高い細胞は, 静止期にあり, あまり分裂しないことも最近わかってきており (未発表デー

表2 子宮内膜癌 98 例における ALDH1 高発現症例の特徴. P 値 0.05 以下が有意なもの. ALDH1 高発現症例では, 腫瘍の広がり (T 因子) が高度で, リンパ節転移陽性例, 再発症例, 予後不良例が多い.

	ALDH1 低発現症例数	ALDH1 高発現症例数	P 値
腫瘍の広がり (T 因子)			
T1	43	27	
T2	5	3	
T3	10	10	0.047
リンパ節転移の有無			
転移なし	50	23	
転移あり	8	17	0.002
腫瘍の組織グレード			
G1	28	10	
G2	19	20	
G3	11	10	0.065
再発の有無			
再発なし	51	27	
再発あり	7	13	0.014
予後			
生存	53	30	
死亡	5	10	0.027

タ), 抗がん剤が分裂期の細胞に有効で, 静止期の細胞にはほとんど効果がないことも一致すると考える.

## 5. 今後の展開

腫瘍幹細胞は, 再発や転移の原因になると考えられる腫瘍の中でも生存能力の高い細胞群である. 通常の抗がん剤は分裂期にある腫瘍細胞をターゲットにするため, なかなか静止期にある腫瘍幹細胞には有効でない. そこで, 腫瘍幹細胞に特異的なターゲットを見出し, それに対する標的療法が必要となる. ところが, 腫瘍幹細胞で多く用いられるシステムは, 正常幹細胞でも多く用いられるシステムでもあるため, なかなか特異的なターゲットが現在開発できていない. 本稿で述べたような, 腫瘍幹細胞の機能に着目したアプローチにより, 今後特異的なターゲットが開発されるであろう. また, 免疫染色を駆使して細胞レベルで腫瘍幹細胞を描出した場合, 腫瘍幹細胞が存在しやすい部位にある一定のパターンがあることがわかるのかもしれない. このような, 腫瘍幹細胞が存在しやすい部位 (ニッチと呼ばれる) を破壊できるような薬剤も今後開発される可能性もある. そのためにも, 機能からのアプローチにより特異的な分子を見出し, さらにその分子を組織切片で染色することで腫瘍幹細胞を多角的に評価することが, 今後ますます必要になるであろう.

## 文 献

- 1) Southam, C. and Brunschwig, A.: *Cancer*, 14, 971-978 (1961)
- 2) Bonnet, D. and Dick, J.E.: *Nat. Med.*, 3, 730-737 (1997)
- 3) Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. and

- Clarke, M.F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 3983–3988 (2003)
- 4) Richardson, G.D., Robson, C.N., Lang, S.H., Neal, D.E., Maitland, N.J. and Collins, A.T.: *J. Cell Sci.*, 117, 3539–3545 (2004)
  - 5) Li, C., Heldt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Ckarke, M.F. and Simeone, D.M.: *Cancer Res.*, 67, 1030–1037 (2007)
  - 6) Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F. and Ailles, L.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 973–978 (2007)
  - 7) Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J. and Dirks, P.B.: *Cancer Res.*, 63, 5821–5828 (2003)
  - 8) Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Nuchtern, J.G., Jax, T.W., Gobel, U., Goodell, M.A. and Brenner, M.K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 14228–14233 (2004)
  - 9) Kato, K., Takao, T., Kuboyama, A., Tanaka, Y., Ohgami, T., Yamaguchi, S., Adachi, S., Yoneda, T., Ueoka, Y., Kato, K., Hayashi, S., Asanoma, K. and Wake, N.: *Am. J. Pathol.*, 176, 381–392 (2010)
  - 10) Xu, J.X., Morii, E., Liu, Y., Nakamichi, N., Ikeda, J., Kimura, H. and Aozasa, K.: *Exp. Cell Res.*, 313, 1877–1885 (2007)
  - 11) Ikeda, J., Morii, E., Liu, Y., Qiu, Y., Nakamichi, N., Jokoji, R., Miyoshi, Y., Noguchi, S. and Aozasa, K.: *Clin. Cancer Res.*, 14, 4780–4786 (2008)
  - 12) Ma, I. and Allan, A.L.: *Stem Cell Rev.*, [Epub ahead of print] Nov 20 (2010)
  - 13) Alison, M.R., Guppy, N.J., Lim, S.M. and Nicholson, L.J.: *J. Pathol.*, 222, 335–344 (2010)
  - 14) Marquardt, J.U., Factor, V.M. and Thorgeirsson, S.S.: *J. Hepatol.*, 53, 568–577 (2010)
  - 15) Rasper, M., Schafer, A., Piontek, G., Teufel, J., Brockhoff, G., Ringel, F., Heindl, S., Zimmer, C. and Schlegel, J.: *Neuro. Oncol.*, 12, 1024–1033 (2010)
  - 16) Neumeister, V., Agarwal, S., Bordeaux, J., Camp, R.L. and Rimm, D.L.: *Am. J. Pathol.*, 176, 2131–2138 (2010)
  - 17) Jiang, F., Qiu, Q., Khanna, A., Todd, N.W., Deepak, J., Xing, L., Wang, H., Liu, Z., Su, Y., Stass, S.A. and Katz, R.L.: *Mol. Cancer Res.*, 7, 330–338 (2009)
  - 18) Rahadiani, N., Ikeda, J., Mamat, S., Matsuzaki, S., Ueda, Y., Umehara, R., Tian, T., Wang, Y., Enomoto, T., Kimura, T., Aozasa, K. and Morii, E.: *Cancer Sci.*, 102, 903–908 (2011)