

筑波大学

博士（医学）学位論文

**Luminal type 乳癌における FOXA1 の
癌幹細胞性に関する生物学的意義の検討**

2016

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

田地 佳那

目 次

略語表	・・・ p.3
序論	・・・ p.4

今日の乳癌診療

乳癌幹細胞

Luminal type 乳癌と FOXA1

乳癌細胞と組織内微小環境

乳癌初代培養細胞の研究活用における実際

1. Luminal type 乳癌における FOXA1 の 癌幹細胞性維持に関する生物学的意義の検討

1-1. 目的	・・・ p.10
1-2. 方法	・・・ p.11

細胞株

Luminal type 乳癌患者胸水からの細胞樹立

FOXA1 knockdown (shFOXA1) cells の樹立

Flow cytometry

Mammosphere formation assay

Colony formation assay

Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

Western blotting

Immunocytochemical staining for culture cells

Growth inhibition curve

統計解析

- 1-3. 結果 . . . p.17
1-4. 考察 . . . p.22

2. 原発性乳癌手術検体由来樹立細胞の解析

- 2-1. 目的 . . . p.26
2-2. 方法 . . . p.27

細胞株

Luminal type 乳癌手術検体からの細胞樹立

Flow cytometry

Mammosphere formation assay

Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

Immunocytochemical staining for culture cells

統計解析

- 2-3. 結果 . . . p.31
2-4. 考察 . . . p.34

図表 . . . p.38

参考文献 . . . p.54

謝辞 . . . p.62

略語表

ER: estrogen receptor

PgR: progesterone receptor

HER2: human epidermal growth factor receptor 2

CK: cytokeratin

ALDH: Aldehyde dehydrogenase 1 A1

FOXA1: Forkhead box A1

GATA3: GATA binding protein 3

AGR2: anterior gradient homology 2

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

MEM-NEAA: MEM non-essential amino acids

FBS: Fetal bovine serum

MSC: Mesenchymal stem cell

CAF: Cancer associated fibroblast

序論

今日の乳癌診療

乳癌は女性において最も死亡率の高い癌腫とされているが、その診断及び治療法はこの十数年において著名な進歩を遂げている。乳癌の70%はエストロゲンレセプター (ER) 陽性^(1,2)であり、エストラジオールの影響下において増殖するとされてきたが、このメカニズムに準ずるタモキシフェン (TAM) やアロマターゼインヒビター (AI) といった内分泌療法と化学療法の位置付けが長年不明瞭であった。近年 PAM50^(3,4)による gene intrinsic subtype と手術標本における免疫組織学染色の結果である ER、human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)、増殖能の指標である ki67 の発現が相関することが明らかとなったことで、我々は個々の症例に応じ ER 陽性 HER2 陰性乳癌である luminal type (さらに ki67 > 14% を基準として、luminal A 及び luminal B に分類される)、ER 陽性 HER2 陽性乳癌である luminal-HER2 type、ER 陰性 HER2 陽性乳癌である HER2 enrich type、ER 陰性 HER2 陰性乳癌である triple negative type の5分類に大別し、治療戦略を立てることが可能となった⁽⁵⁾。特に HER2 陽性乳癌に関しては、これに加え抗 HER2 分子標的薬剤の開発もあり、著明な予後の改善を認めた。Luminal type 乳癌に関しては、内分泌療法に抗癌剤治療を追加することが予後改善の観点において利益となりうるか否かを、個別に判断することが可能となった。しかし ki67 の基準値が確定的でないこと、施設間による精度管理の問題もあり^(6,7)、この診断基準においても未だ検討の余地があるとされている。

Luminal type 乳癌は、他のサブタイプに比し予後良好であるとされてきたが、一方で手術検体と予後の解析の結果、ER 陽性 HER2 陰性 ki67 < 14% であるいわゆる luminal A type 乳癌において、晩期再発が多いことが知られている⁽⁸⁾。この原因として、癌細胞の休止状態(dormancy)が仮説として考えられている。また、手術検体材料から抽出した

mRNA の解析と予後との比較から、**oncotype Dx⁽⁹⁾**や**MammaPrint⁽¹⁰⁾**といった再発リスク予測ツールの開発がなされてきた。しかし晩期再発のメカニズムについては未だ十分に明らかにされていない。

乳癌幹細胞

癌幹細胞は当初白血病に基づき確立された癌細胞集団の中の分画であり、近年固形腫瘍においても癌の進展に強く関与していると考えられている。その性質として、多分化能・自己複製能・腫瘍形成能・転移能・薬剤抵抗性を有しているとされている⁽¹¹⁻¹⁶⁾。これらのうち、特に薬剤耐性や自己複製、休止状態に関わるシグナルについて、休眠細胞(dormant cell)と癌幹細胞には共通点がみとめられており⁽¹⁷⁻¹⁹⁾、このことから癌幹細胞が晩期再発に関与している可能性が示唆される。

癌幹細胞のマーカーとしては、まず Al-Hajj らが発表した CD44⁺/CD24^{-low} が挙げられる⁽¹¹⁾。これは乳癌における CD44⁺/CD24^{-low} の集団が他集団に比し高い腫瘍形成能を示したものである。その後 Ginestier らは正常乳腺及び癌における幹細胞のマーカーとして Aldehyde dehydrogenase 1 A1 (ALDH)を挙げ、ALDH 陽性の細胞集団において高い組織形成能及び腫瘍形成能を示すことを明らかにした⁽²⁰⁾。同論文において、この2種のマーカーは部分的に同じ集団を満たすが、完全に一致するものではないことも示されている。これらのマーカーは手術検体に対する免疫組織化学染色においても多数検討されており、臨床的にも予後不良に相関することが示されている⁽²⁰⁻²³⁾。これらの組織染色による検討において、これらのマーカーは **triple negative type** に多く陽性を示すことが知られており、また正常乳腺における幹細胞分画が **ER 陰性**を示すことから、これまで **triple negative type** における乳癌幹細胞のメカニズムの解明が多くなされてきた。一方で **luminal type** 乳癌に関しては、Sun らがエストロゲンによって Gli1 を介した幹細胞性及び浸潤性の亢進が起こることを示している⁽²⁴⁾が、癌幹細胞の維持におけるメカニズムに関しては十分検

討されていない。

癌幹細胞集団を維持する培養系として、Dontu らは mammosphere culture を報告した⁽¹⁵⁾。これは非接着培養系であり、癌幹細胞における足場非依存性及び自己複製能を評価するアッセイとしても広く利用されている。Harrison らは CD44⁺/24⁺を示す癌細胞の集団が、ほかの集団に比し mammosphere をより多く形成することを示した⁽²⁵⁾。また、患者検体由来細胞を用いた mammosphere による評価が、予後予測に有用である可能性を示した論文も存在する⁽²⁶⁾。Mammosphere と上皮間葉転換 (EMT)⁽²⁷⁻²⁹⁾及び薬剤耐性⁽²⁹⁾の関連を示す論文はこれまでにいくつか発表されている。

これらのことから、mammosphere 形成能と乳癌幹細胞マーカー、または乳癌幹細胞の特性の一つである EMT や薬剤耐性には密接な相関があると考えられる。

Luminal type 乳癌と FOXA1

Forkhead box A1 (FOXA1)は GATA binding protein 3 (GATA3)の下流に位置する転写因子で、ER の感受性を維持すると考えられている⁽³⁰⁾。また近年、癌原遺伝子である anterior gradient homology 2 (AGR2)の上流因子として働くことも報告された⁽³¹⁾。

増殖促進因子として、FOXA1 は直接 estrogen receptor 1(ESR1)プロモーターに結合し ER の発現を亢進する⁽³²⁾。さらに FOXA1 はクロマチン化した DNA に結合し ER の活性を調節することでも知られている^(33, 34)。これら増殖促進因子としての FOXA1 の機能を支持する報告として、MCF7 及び T47D といった luminal type 細胞株の FOXA1 knockdown により *in vitro* で増殖抑制がみられることから、FOXA1 が乳腺上皮由来乳癌特異的ながん遺伝子として重要な役割を果たすとする複数の報告が存在する^(35, 36)。また Chen らは遺伝子組み換えマウスによる検討で、幹細胞性の高いマウスの乳腺細胞で FOXA1 がより高発現していることを示した⁽³⁷⁾。

一方で、Wolf らは FOXA1 が p27 の転写を活性化し増殖抑制に働くとしている⁽³⁸⁾。ま

た、手術検体を用いた組織免疫化学染色と予後の解析の結果、FOXA1 発現は予後良好因子であるという報告が複数みられる⁽³⁸⁻⁴⁰⁾。このように FOXA1 は luminal type 乳癌の制御に密接に関わっているとされるが、その役割については未だ確定的でない。また、FOXA1 と癌幹細胞の関係については我々の知る限り報告がない。

乳癌細胞と組織内微小環境

乳腺は腺房と乳管からなる腺実質と間質から成り立っている。腺房及び乳管は乳腺上皮細胞及び筋上皮細胞、基底膜により形成されている。間質には間葉系幹細胞(MSCs)、線維芽細胞、脂肪細胞、脂肪前駆細胞、血管内皮細胞、細胞外基質が存在している⁽⁴¹⁾。MSCs と乳癌細胞の関係については、MSCs がケモカイン CCL5 を分泌し、乳癌細胞の CCR5 と interaction することにより乳癌細胞の悪性化を引き起こすこと⁽⁴²⁾、組織内低酸素において HIF 依存性に MSCs より分泌された CXCL10 と乳癌細胞の CXCR3 との interaction により転移能が上昇すること⁽⁴³⁾、また *in vitro* において MSCs の condition medium を用いた検討で、乳癌細胞の mammosphere 形成能上昇及び E-Cadherin 発現の低下を示すことなど⁽⁴⁴⁾、乳癌の悪性化に関与するという報告が多く存在する。一方で、MSCs が分泌する Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP)により癌細胞の遊走浸潤能が阻害されるという報告も存在する⁽⁴⁵⁾。このため、MSCs の癌組織内での役割は不確定である。但しこれらの検討は骨髄由来 MSCs を用いた検討である。乳癌は比較的骨転移が好発する癌腫であり、既報論文はこのメカニズム解明に寄与する可能性があるが、一方原発組織における initiation 及び原発組織からの浸潤能・転移能獲得を検討するにあたっては、骨髄由来 MSCs は乳癌組織内の MSCs とは性質が異なる可能性も否定できない。事実、既報論文では由来の異なる MSCs の *in vitro* またはマウス移植における検討において、異なる増殖・分化傾向を示したという報告がある^(46, 47)。従って乳癌の initiation における MSCs の影響に関する検討には乳癌組織由来または近接する脂肪由来の MSCs における検討が必要であると考

えられる。乳癌組織由来間葉系幹細胞についての報告は検索しうる限り少ない。Zhang らは乳癌手術検体より樹立した細胞につき MSCs マーカー及び多分化能アッセイを用いて MSC であることを示したのち、この細胞の培養液から採取した condition medium により乳癌細胞株 MCF7 の増殖能及び遊走能が上昇することを示した⁽⁴⁸⁾。今後このような実験系または *in vivo* assay への応用による更なる機序の解明が待たれる。一方線維芽細胞に関連して、Cancer associated fibroblast(CAFs)は乳癌細胞との相互作用により活性化し筋線維芽形質を獲得することで、乳癌細胞の悪性化に寄与していると考えられている⁽⁴⁹⁾。CAFs の活性化の機序としては主に乳癌細胞から分泌された TGF β 及び CXCL12/SDF1 による CAFs の活性化から TGF β R-Smad signal 及び CXCR4 発現を介して筋線維芽形質を維持する機序、もしくは PDGF- α/β 、IL-6 による CAFs の活性化などが報告されている⁽⁵⁰⁾。こうした機序で活性化した CAFs は、CXCL12、CXCL14、CCL18 などのケモカイン発現上昇を通して癌細胞の増殖及び浸潤能を増加させていると考えられている^(51, 52)。

MSCs と CAFs は、このように別々に論じられていることが多いが、一方で Mishra らは乳癌細胞培養液より得られた condition medium により MSCs が CAFs 同様の遺伝子発現及び筋線維芽マーカーを発現したことから、CAFs が MSCs 由来であると論じている⁽⁵³⁾。現時点で CAFs の由来ははっきりしておらず⁽⁵⁴⁾、これらの細胞群のヒエラルキー及び乳癌細胞に対するそれぞれの役割についても、更なる解析が必要である。

乳癌初代培養細胞の研究活用における実際

これまで乳癌における基礎研究による知見の多くは、既に樹立されて商用化されている MCF7 をはじめとした乳癌細胞株に対する解析により得られてきた。細胞株は遺伝子変異や遺伝子修飾状態の変化などを背景として不死化した結果、半永久的な増殖が可能となり、故に多くの研究者が多くの知見を積み重ねてきた歴史がある⁽⁵⁵⁾。薬物療法の効果等臨床応用にも成果を上げていることから、言うまでもなく乳癌研究になくってはならないものであ

るが、一方で不死化に関わる細胞内環境の変化から、生体内での癌細胞との挙動と完全に一致するか否かの検討は困難である。

近年生体材料から細胞を樹立し、乳癌研究に活用しようという流れが起こっている。こうした論文の多くは、手術により摘出された組織または再発患者胸水から細胞樹立し、いくつかの実験でのみ使用し、その理由付けについて従来の細胞株で解析していくという論法を取っていることが多い。しかしこうした論文には、由来患者の組織におけるステータスを根拠とし、樹立細胞そのものに対してホルモン受容体及びサイトケラチンにおける **characterization** が行われていないものもみられ^(56, 57)、また乳癌細胞であることの証明を試みているものにおいても、その手法は論文により異なる⁽⁵⁸⁻⁶¹⁾。特に乳癌手術検体に関しては、前項に述べた通り乳癌細胞のみならず周囲の間質組織に含まれる様々な細胞（線維芽細胞、間葉系幹細胞、脂肪細胞、脂肪前駆細胞、血管内皮細胞、炎症細胞等）が含まれており、培養系により増殖する細胞系が変化することが推測される。しかしこの点について、詳細に検討された報告はほとんどない。従って、細胞株と比較しより生体内に近い細胞条件であるという仮定で生体材料由来の細胞を扱うためには、その前段階として樹立細胞における **characterization** の手法を確立することが肝要と考えられる。

1. Luminal type 乳癌における FOXA1 の 癌幹細胞性に関する生物学的意義の検討

1-1. 目的

本研究において、我々は癌幹細胞が乳癌の晩期再発に関わっていると仮説を立て、特に晩期再発が好発する luminal type 乳癌における癌幹細胞の性質に注目した。癌幹細胞マーカー及び mammosphere により抽出された癌幹細胞集団の解析を行い、その特性を見出すとともに、FOXA1 をはじめとした ER 関連因子との関係を明らかにすることが、luminal type 乳癌の晩期再発制御につながるものと考えた。

筑波大学再生医学・幹細胞生物学教室での先行研究において、再発乳癌患者胸水由来乳癌細胞の樹立に成功しており、この細胞及び文献的に広く用いられている MCF7、HCC1500 といった Luminal type 乳癌の細胞株を用いて、以下の事項につき明らかにすることを目的とした。

- 1) Luminal type 乳癌における癌幹細胞の特性を解明する
- 2) Luminal type 乳癌における癌幹細胞性維持の機序を解明する
- 3) Luminal type 乳癌と癌幹細胞との関連から、新規治療・予後予測マーカーを探索する

1-2. 方法

細胞株

MCF7 及び MDA-MB-231 細胞株は理化学研究所 バイオリソースセンター（茨城県、日本）より購入し使用した。HCC1500 細胞株は American Type Culture Collection (ATCC, Virginia, USA)より購入し使用した。いずれの細胞も維持培養はフェノールレッド含有 DMEM-high glucose 培地に 10% FBS、L-glutamine 0.5mM、MEM-NEAA 1mM、ペニシリン/ストレプトマイシン 1mM を加えた完全培地により行った。培養条件は 37°C、5% (v/v) CO₂/ air、6cm culture dish (Sumitomo-Bakelite, Osaka, Japan)で行った。

Luminal type 乳癌患者胸水からの細胞樹立

79 歳（手術検体にて ER 陽性、PgR 陽性、HER2 陰性：figure 2A に示す）、術後内分泌療法施行中に胸膜転移により胸水貯留をきたした患者に対し、インフォームドコンセントを得た上で胸水を採取した。胸水を RosetteSep™ Human CD45 Depletion Cocktail (StemCell Technologies Inc, Vancouver, BC) で添付文書の如く 20 分間室温静置し、その後比重液 (Histopaque-1083 g/cm³; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を重層して 1500rpm、20 分室温で遠心した。単核球成分のみを抽出し遠心後、細胞ペレットを完全培地内に懸濁し、25cm² 培養フラスコ (Sumitomo-Bakelite, Osaka, Japan)にて培養した。

FOXA1 knockdown cells (shFOXA1 cells)の樹立

FOXA1 をターゲットとした OmicsLink shRNA Expression Clone plasmid 及びコントロールとしての scrambled gene plasmid、Lenti-Pac HIV Expression Packaging Kit を GeneCopoeia (Rockville, USA)より購入した。筑波大学再生医学・幹細胞生物学教室で保存培養されていた HEK293T を提供していただき、Lenti-Pac HIV Expression Packaging Kit

添付文書のプロトコールに準じてトランスフェクションを行い、shFOXA1 及び shControl の pseudo-viral particles を回収した。

この particles を MCF7 に感染させ、その後 5µg/ml puromycin による薬剤選択を行うことで shFOXA1 MCF7 cells 及び shControl MCF7 cells を樹立した。FOXA1 knockdown 効果はウエスタンブロッティングにより評価した。

Flow cytometry

Flow cytometry の解析機器は MofloXDP (Beckman Coulter, Tokyo, Japan)を用いた。

CD44-FITC 抗体 (BD Bioscience, CA, USA)及び CD24-PE 抗体 (Biolegend, CA,USA) による解析では、培養細胞をトリプシン処理し PBS/2% FBS 溶液内に回収後、細胞数を血球計算板で確認し、 5×10^5 cells- 1×10^6 cells をサンプル量とした。相当する細胞溶液を回収し、遠心後 250 µL の PBS/2% FBS 溶液内に再懸濁後、50 µL をコントロールサンプル (非染色) とし、残り 200 µL に対し添付文書の推奨濃度で抗体を添加した。4°C 遮光下 25 分間静置し、その後 2 回 PBS 洗浄を経て、解析へと進んだ。

ALDH1 活性の解析では Aldefluor kit (Stem Cell technologies, British Columbia, CANADA)を用いて、添付文書プロトコールに基づき解析を行った。

Mammosphere formation assay

Mammosphere culture は MammoCult™ medium に 4 µg/mL (0.0004%) heparin, 0.48 µg/mL hydrocortisone (以上 StemCell Technologies Inc.), 0.1% (v/v) penicillin-streptomycin を mammoCult medium の添付文章に従い混合し、培地を作成した。35mm suspension culture dish (Sumitomo-Bakelite)1 枚に対し細胞数 1×10^4 cells とし、細胞数調製のうえ播種、7 日間培養を行った。Mammosphere 数の計測は、顕微鏡下にて直径 100 µm 以上のものをカウントした。タモキシフェン添加下における mammosphere assay では、growth inhibition

curve の結果より $5 \mu\text{M}$ のタモキシフェンを対象の dish に添加した。

Colony formation assay

実験手法は筑波大学再生医学・幹細胞生物学研究室卒業生 佐藤和聡博士の卒業論文及び既出の各論文^(24, 40, 62)を参照し、一部修正した上で実施した。

具体的には、培養細胞をトリプシン処理し回収後、6well culture plate (住友ベークライト、大阪、日本) 1 well 当たり細胞数を 100 cells とし完全培地内に播種した。2 週間後、各 well を PBS で 3 回洗浄し、0.5% (w/v) クリスタルバイオレット含有メタノールで固定及び染色を行った。大量の水道水で洗浄、乾燥後、可視コロニー数を計測した。

Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

RNA の精製は Sepasol-RNA I Super G (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて行った。その後 ReverTra Ace (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて cDNA への逆転写を行った。Real time PCR は、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) および 7500 Fast Real-Time PCR machine (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。PCR 反応の条件は 95°C 3 秒間および 60°C 30 秒間を 40 サイクルとした。 β Actin を internal control とし、Real time PCR 結果の Ct 値より $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法で遺伝子相対発現量を求め、統計学的に比較した。使用プライマーを以下に示す。

<qRT-PCR 使用プライマー>

Human	Sense primer: 5'-CTGGGGGTTCTATTTGGGAAGGTA-3'
Oct4	Antisense primer: 5'-CTGCAGGAACAGATTCTCCAGGTT-3'
Human	Sense primer: 5'-ACAGAAATACCTCAGCCTCCAGCA-3'
Nanog	Antisense primer: 5'-CTCCAGGTTGAATTGTTCCAGGTC-3'
Human	Sense primer: 5'-GAGTGGAAACTTTTGTTCGGAGACG-3'
Sox2	Antisense primer: 5'-CCGGTATTTATAATCCGGGTGCTC-3'
Human	Sense primer: 5'-ATGTGTAGAGGGCATGGTGGAGAT-3'
ESR1	Antisense primer: 5'-GACTTCAGGGTGCTGGACAGAAAT-3'
Human	Sense primer: 5'-GTTGTGAGAGCACTGGATGCTGTT-3'
PgR	Antisense primer: 5'-CTGGAGGTGTCAGGTTTTGTGTTG-3'
Human	Sense primer: 5'-ACTCGTACATCTCGCTCATCACCA-3'
FOXA1	Antisense primer: 5'-CAAGTAGCAGCCGTTCTCGAACAT-3'
Human	Sense primer: 5'-AAGGAAGGCATCCAGACCAGAAAC-3'
GATA3	Antisense primer: 5'-AAACGAGCTGTTCTTGGGGAAGTC-3'
Human	Sense primer: 5'-CTGGCACCACACCTTCTACAATGA-3'
b-actin	Antisense primer: 5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA-3'

Western blotting

接着培養細胞および mammosphere 培養サンプルにおける FOXA1 の protein 発現を解析するため、ウエスタンブロッティングを行った。細胞総蛋白の回収には RIPA buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% Sodium deoxycholate, 1% NP-40, and 0.1% sodium dodecyl sulfate) を使用した。GeneQuant100 (GE healthcare Japan, Tokyo, Japan)を用いて Bradford 法でタンパク濃度を測定し、これに基づいて等量のタンパクサンプルを調製した。4 x loading buffer を添加し 95°C 10 分間の処理を行った後、7.5% SDS-polyacrylamide gel の各ウェルにアプライし、電気泳動を行った。その後 polyvinylidene difluoride membranes (Merk Millipore, Darmstadt, Germany)へ転写し、抗体染色へ移行した。

ブロッキングは 5% skim milk/TBST buffer 1 時間室温で行い、その後 mouse anti-

FOXA1 antibody (clone2F83, dilution 1:1000, Abcam, Tokyo, Japan) オーバーナイト 4°C で一次抗体反応を行った。翌朝 TBST buffer で洗浄後、HRP conjugated goat-antimouse antibody を用いて 1 時間室温で二次抗体反応を行い、洗浄の後検出を行った。Internal control には goat anti-actin antibody (clone C-11, dilution 1:2000, Santa Cruz Biotechnology) を用いて、FOXA1 と同様の手順で処理を行い検出へと進んだ。

反応の検出には luminescence imager (Image Quant LAS4000; GE healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) を用いて行った。

Immunocytochemical staining for culture cells

細胞免疫化学染色（細胞免疫）はセルブロック法を用いた。培養細胞ペレットの固定は臨床組織固定に準じて 10%ホルマリンで固定し、70%エタノールに置換した。その後ペレットをパラフィンブロックに包埋し、細胞免疫に使用した。

ペレットのパラフィンブロック包埋及び細胞免疫の過程は筑波大学 Translational Research and Resource Core(TRRC)に依頼した。HER2 染色を除く細胞免疫は、the autostainer BenchMark ULTRA (Roche, Tokyo, Japan) を用いて行われた。HER2 染色に関しては、染色キットの添付文書に基づくプロトコールで行われた。以下に使用された抗体を示す。

mouse anti-FOXA1 antibody (clone2F83, dilution 1:2000, Abcam)
Ventana ultraView confirm ER (clone SP1, Roche)*
Ventana ultraView confirm PgR (clone 1E2, Roche)*
Histofine HER2 kit (Nichirei, Tokyo, Japan)*
Cytokeratin (CK) 5/6 (clone D5/16 B4, Dako) *
CK8 (clone 35H11, Dako)*

*は筑波大学 TRRC 所有抗体

Growth inhibition curve

Tamoxifen (TAM) による増殖阻害率を測定するため、Johnson らが報告した方法⁽⁶³⁾を一部修正しおこなった。TAM (SIGMA Aldrich, Tokyo, Japan)は DMSO に希釈し 10mM 濃度で - 20℃保管とした。TAM 含有培地は、DMSO の最終濃度が 0.1%以下となる範囲で各濃度の培地を作成し使用した。コントロール培地として 0.1%DMSO 含有培地を使用した。MCF7 および BC#1 を 72 時間培養し、その後トリプシン処理し 0.1% trypanblue 及び血球計算盤を使用して細胞数を計測した。

統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。統計解析には Student's t-test を使用し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。統計解析には GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を使用した。

1-3. 結果

乳癌再発患者胸水由来細胞及び MCF7, HCC1500 の細胞学的特徴

本研究に使用する乳癌再発患者胸水由来細胞（以下 BC#1）、MCF7 及び HCC1500 の細胞学的特徴を解析した。MCF7 及び HCC1500 に関しては、購入元のデータシート及び既報の論文よりいずれも ER receptor 陽性、HER2 陰性の luminal type 乳癌細胞であるとされている。一方で BC#1 に関しては、由来患者の原発組織において ER receptor 陽性、HER2 陰性の luminal type 乳癌と評価されている（図 1）。樹立後の BC#1 とその他の乳癌細胞株の細胞学的特徴を比較するため、この 3 系統の細胞につき ER, PgR, HER2, cytokeratin8, cytokeratin 5/6 の細胞免疫化学染色を行った（なお前述のデータシート情報から、MCF7, HCC1500 の HER2 染色は省略した）。

結果を図 2 に示す。BC#1 の ER はほぼ染色されず、一方 PgR に関しては約 8 割程度の陽性率であった。特に ER に関して臨床検体の染色と乖離する結果であった。MCF7 及び HCC1500 は既報の通り ER 陽性細胞を認めたが、MCF7 に関しては既報の論文と比較し⁽⁶⁴⁾、発現細胞が比較的少ない状況であった。トリプルネガティブ乳癌細胞株である MDA-MB-231 と前述した 3 系統の細胞における ER の発現を qRT-PCR で比較検討したところ（図 3）、3 系統の細胞間での発現傾向は細胞免疫化学染色の結果に一致するものであった。BC#1 と MDA-MB-231 の比較では、MDA-MB-231 に比し BC#1 において約 20 倍の ER 発現を認め、統計学的にも有意に上昇していた。一般的に PgR は ER の下流因子とされており^(65,66)、この PgR の発現が保たれていることと併せて、BC#1 は luminal type 乳癌細胞であると結論付けた。ER の発現が臨床検体と乖離した原因としては、再発転移に伴う発現強度の変化、培養条件による影響等を考えた。特に後者に関しては、エストロゲン非存在下における長期培養条件において ER 発現が低下することがすでに論じられており⁽⁶⁴⁾、MCF7 における ER 発現の低下と合わせて、類似した状況が起こっていると推察された。

サイトケラチンについては、乳腺上皮細胞及び基底細胞由来により発現するサイトケラ

チンの型が異なり、一般的に乳腺上皮細胞はサイトケラチン 8 陽性、基底細胞はサイトケラチン 5/6 陽性を示すとされている^(67,68)。今回のサイトケラチン 8 染色における検討では、MCF7, HCC1500, BC# 1 いずれも強陽性を示した。一方でサイトケラチン 5/6 染色における検討では、MCF7 及び HCC1500 で染色細胞を認めなかった一方、BC#1 では全体の 5% 程度で陽性細胞を認めた。従ってサイトケラチン発現の結果においても、BC#1 が乳癌細胞由来であることを支持する結果であった。

各 luminal type 乳癌細胞における癌幹細胞マーカー発現及び mammosphere forming capacity の評価

ALDH 活性及び CD44⁺/24⁺発現パターンは、前述の通り癌幹細胞マーカーとして知られている。我々は各細胞における ALDH 活性及び CD44⁺/24⁺発現について解析した(図 4A 及び B)。これらのマーカーにおいて、BC#1 はもっともマーカー陽性率が高く、HCC1500 は最も低い傾向を示した。次に mammosphere 形成能について解析し、同様の傾向を得た(図 4C,D)。これらのことから癌幹細胞マーカーと mammosphere 形成能に相関関係があることが示唆される。そこで我々は MCF7 細胞を用いて、癌幹細胞マーカー発現について接着培養と mammosphere 培養との比較を行った。既報論文において、mammosphere 培養により CD44⁺/24⁺発現が上昇することがすでに示されている⁽⁶⁹⁾。我々は ALDH 活性について同様の検討を行い、mammosphere 培養細胞が接着培養細胞に比し高い ALDH 活性を示すことを明らかにした(図 4E,F)。このことから、mammosphere 培養が癌幹細胞マーカー発現と密接に相関することが示された。

幹細胞性の高い集団とその他の集団における ER 関連因子及び多能性遺伝子発現の比較

次に我々は、幹細胞性の高い集団とその他の集団において ER 関連因子及び多能性遺伝

子の発現に違いがあるかどうかを調べるために、qRT-PCRを試みた。この際、比較検討する系として2つの系を計画した(図5)。すなわち i) FACS sortingにより ALDH-high population と ALDH-low population に分けて収集し、mRNA 抽出したものに対する比較、及び ii) 接着培養サンプルと mammosphere 培養サンプルの各々から mRNA 抽出したものに対する比較とした。ER 関連因子としては ER, PgR, FOXA1, GATA3 を、多能性遺伝子としては NANOG^(70, 71), SOX2^(70, 72), OCT4^(70, 71, 73)を対象とした。

初めに i) についての結果を示す(図6)。この系においては採取サンプルが少なく、全体として cDNA 精製量が少なかったことが影響し、多能性遺伝子の解析は不十分であった。ER 関連因子に関しては、いずれも統計学的有意差は生じなかったが、3系統の細胞すべてにおいて ALDH-high population がより FOXA1 高発現を示す傾向が見られた。

次に ii) についての結果を示す(図7)。ER 及び PgR, GATA3 については、3系統で一致する統計学的傾向を認めなかったが、FOXA1 は統計学的有意差をもってすべての細胞系において mammosphere 群で高発現であった。多能性遺伝子について、HCC1500 に関しては mammosphere が少量であった影響でやはり解析が不可能であったが、MCF7 及び BC#1 においては全体として mammosphere 群で多能性遺伝子の発現が高いという結果が得られた。以上の実験結果より、ii) の実験系でより安定したデータが得られると判断し、以下は ii) の実験系のみで比較検討を行うこととした。

Mammosphere culture と FOXA1 タンパク発現についての検討

FOXA1 遺伝子が mammosphere 培養の結果高発現するという前項の結果を受けて、FOXA1 のタンパク発現につき評価した。まず接着培養における FOXA1 タンパク発現を評価するため、接着培養細胞から作成したセルブロックを用いて免疫化学染色を行った(図8A)。MCF7 が最も FOXA1 陽性細胞が多く、HCC1500 においても陽性細胞を認めた。BC#1 ではすべての細胞において陰性であった。

次に Western blot を用いて、MCF7 及び BC#1 を用いた接着培養サンプルと mammosphere 培養サンプルにおける FOXA1 タンパク発現を比較したところ、いずれの細胞系においても qRT-PCR の結果に一致して mammosphere 培養サンプルにおいて明らかな FOXA1 の過剰発現を認めた(図 8B, C)。

FOXA1 発現と内分泌療法耐性の関連についての検討

化学療法耐性及び内分泌療法耐性が癌幹細胞の存在に関わっていることは、これまでに論じられている⁽⁷⁴⁻⁷⁷⁾。また、FOXA1 と薬物療法耐性の関連についてもこれまでもいくつかの論文で検討されている^(40, 78, 79)。しかし、我々の知る限りでは、FOXA1 と癌幹細胞の直接の関連を論じられた論文は存在しない。そこで我々は、TAM 添加 mammosphere 培養による検討を試みた。使用する TAM 濃度を決定するため、growth inhibition assay を施行した。図 9A に示すように、MCF7 及び BC#1 は 5 μ M 以下の濃度において 50%以上の増殖率を保っており、それ以上の濃度において急速に増殖率が低下するという結果であった。全濃度において、細胞形態の明らかな変化は認めなかった (図 9B: BC#1 のみ示す)。この結果から、本実験に使用する TAM 濃度は 5 μ M とした。

TAM 添加 mammosphere 培養において、MCF7 及び BC#1 の mammosphere 数はコントロールと比較し明らかに減少した (図 9C,D)。特に BC#1 においては mammosphere がほとんど形成されなかった。MCF7 mammosphere については、TAM 添加群とコントロール群で形態の違いがみられた(図 9E)。TAM 添加群 MCF7 mammosphere について、TAM 影響下で生存した細胞群 (≒癌幹細胞集団) であると仮定し、このサンプルの多能性遺伝子及び FOXA1 発現を確認するため qRT-PCR を行ったところ、図 10 に示す通り、TAM 添加群において FOXA1 及び多能性遺伝子の発現が有意に高発現であった。

FOXA1 knockdown を用いた FOXA1 と self-renewal potential の関連 についての検討

FOXA1 が直接癌幹細胞性を維持するか否かを検討するため、我々はタンパクレベルで FOXA1 knockdown 効果を確認できる MCF7 に焦点を当て、FOXA1 knockdown MCF7 (shFOXA1 MCF7) cells を樹立した。当研究室で作成したプライマーを用いた qRT-PCR では FOXA1 knockdown 効果の評価できなかったが、ウェスタンブロットによるタンパク発現(図 11A)及び FOXA1 の下流因子である AGR2 の抑制を確認し(図 11B)、FOXA1 knockdown 効果を確認した。shControl MCF7 cells と shFOXA1 MCF7 cells の比較では、ER は shFOXA1 cells において低下を認めたが、多能性遺伝子はむしろ上昇傾向を認めた(図 11B)。

これらの細胞を使用し、最初に mammosphere formation assay による自己複製能の評価を試みた。この結果は我々の予想に反し、2 つの細胞群において mammosphere の形成数に差を認めないというものであった(図 11C)。しかし 2 つの細胞群における接着培養と mammosphere 培養での FOXA1 発現をウェスタンブロットで評価したところ、コントロール群のみならず shFOXA1 MCF7 群においても mammosphere 培養で FOXA1 の過剰発現が起こっていることが明らかとなった(図 11D)。この結果より、mammosphere 培養下において FOXA1 knockdown 効果に勝る FOXA1 過剰発現が起こった結果、mammosphere 形成数に差が生じなくなった可能性を考えた。

そこで我々は、mammosphere formation assay の代替として接着培養条件における colony formation assay を用いて評価することとした。Colony formation assay は mammosphere formation assay 同様自己複製能を評価するための実験系として、これまでも広く用いられているものである^(24, 80)。この結果、図 11E 及び F に示すように、shFOXA1 MCF7 cells において明らかなコロニー形成数の低下が認められ、乳癌細胞において FOXA1 が増殖維持に必要であることが示された。

1-4. 考察

今日において癌の撲滅を目指すにあたり、癌幹細胞仮説はもはや無視できないものとなっている。多くの先行研究が癌幹細胞マーカーの開発や、癌幹細胞が有する性質が癌の維持に関与していることを示している。他癌腫のみならず乳癌においても根治が困難である再発転移は、癌幹細胞が関わっているものとされている。それ故、癌幹細胞を維持するメカニズムを解明し、撲滅への戦略を見出すことが重要となると考えられる。

こうしたことを背景とし、本研究では癌幹細胞を濃縮する培養系としての mammosphere culture を軸として、解析を行った。乳癌再発患者胸水由来細胞 BC#1 及び MCF7, HCC1500 を用いて、これらが各々癌幹細胞マーカー陽性の集団を少数ながら有し、この陽性率に比例して mammosphere を形成することを確認した。各細胞より形成された mammosphere は既報の通り、多能性遺伝子である NANOG、SOX2 及び OCT4 を高発現していた。当初この実験系を遂行する前の仮説として、FOXA1 の発現は mammosphere において低下すると推察していた。その根拠として、手術検体を用いた組織免疫化学染色と予後の解析の結果、FOXA1 発現は予後良好因子であるという報告が多く上がっていたこと⁽³⁸⁻⁴⁰⁾が挙げられる。しかしながら興味深いことに、qRT-PCR の結果では mammosphere 及び癌幹細胞マーカー陽性集団において、FOXA1 は対照集団に比し高発現の傾向が認められ、特に mammosphere において顕著であった。この傾向は接着培養と mammosphere 培養における FOXA1 タンパク発現の比較においても同様であった。これらの結果から我々は、より癌幹細胞性の高い集団において FOXA1 発現が高い傾向にあると結論付けた。注釈すべきは、BC#1 は接着培養において細胞免染、ウェスタンブロットいずれも FOXA1 発現を認めなかったにも関わらず、mammosphere 培養において明らかに高発現を認めていた点である。この結果からは、単純に mammosphere が FOXA1 高発現を示す集団を濃縮するのみならず、機序は明らかではないが、何らかの因子が FOXA1 の過剰発現を引き起こしている可能性を推察する。

前述したように FOXA1 は臨床検体免疫による予後解析で予後良好因子として知られてきたが、一方で別の視点からの報告もみられる。基礎研究分野では、luminal type 乳癌細胞株の FOXA1 knockdown により、*in vitro* で増殖抑制がみられることから、FOXA1 が乳腺上皮由来乳癌特異的ながん遺伝子として重要な役割を果たすと結論付けるものが存在し^(35, 36)、また Chen らはエストロゲンレセプター陽性乳癌の悪性化を引き起こすことで知られる *Tip30* ノックアウトマウスモデルを用いた検討で、*Tip30* ノックアウトマウスの乳腺細胞がコントロールマウスに比較し幹細胞性が高く、さらに FOXA1 が高発現していることを示した⁽³⁷⁾。これらのことから、乳癌における FOXA1 の役割はいまだ曖昧である。この臨床検体免疫染色による検討と基礎研究における結果の乖離の原因として、本来生体内で発生している乳癌では組織不均一性に関連して様々なサブタイプの細胞が混在しており、免疫染色における FOXA1 陽性細胞の存在は、単純に luminal サブタイプの優位性を示しているのみである可能性、故に組織免疫染色においては他の症例に比較し予後良好な傾向を示しているという仮説を立てた。このことは我々が樹立した BC#1 において、本来 luminal type 乳癌では発現がみられないとされるサイトケラチン 5/6 がわずかながらも染色されることが一致すると考える。

一方で晩期再発は、進行が比較的早い triple negative type 及び HER2 enrich type ではなく、luminal type 乳癌に起こる傾向があるとされており⁽⁸⁾、luminal type 乳癌の再発症例において、FOXA1 高発現症例は無再発生存期間が長いことも示されている⁽⁷⁸⁾。Ross-Innes らは、乳癌において ER により占められる特異的な *cis-regulatory elements* が存在し、しかしながら予後良好症例と不良症例でその存在部位が異なること、さらに ER のリプログラミングを FOXA1 が調節していることを示した⁽⁸¹⁾。今回の結果がこの機序に直接的に関わるか否かの検討までは至らなかったが、こうした機序に本研究で見られた FOXA1 の過剰発現が寄与している可能性も今後検討していく必要がある。

薬物耐性は癌幹細胞の重要な性質の一つである。化学療法に関連して、Calcagno らはド

キシソルビシン耐性の MCF7 を樹立し、この細胞が高い癌幹細胞性を示すことを、mammosphere formation assay, 癌幹細胞マーカーの発現で、また *in vivo* で腫瘍形成能が優れていることから示した⁽⁷⁵⁾。これとは逆の視点で、Yenign らは、CD44⁺/24⁻を示す集団がドキシソルビシンに対する低感受性を示すことを明らかにした⁽⁷⁷⁾。内分泌療法耐性に関して、Lin らは TAM 耐性乳癌が癌幹細胞集団より発生する可能性を、DNA メチル化及び SOX2 発現についての解析から論じている。さらに Raffo らは TAM 感受性 MCF7 と TAM 耐性 MCF7 について mammosphere formation assay 及び *in vivo* assay における腫瘍形成能で評価し、TAM 耐性 MCF7 において自己複製能及び腫瘍形成能が高いことを示した⁽⁷⁴⁾。前述したように、化学療法耐性と FOXA1 の関連性についてはいくつか検討されているが、内分泌療法耐性と FOXA1 の関連性については、これまでに十分な検討がなされていない。本論文では、mammosphere 培養をベースとして TAM 添加及び非添加条件における FOXA1 及び多能性遺伝子発現につき検討した。結果として、TAM 非添加群と比較して TAM 添加群は、その増殖阻害効果を背景として mammosphere 形成数こそ低下したが、一方で形成された mammosphere からは FOXA1 及び多能性遺伝子の高発現を認めた。この結果は、luminal type 乳癌における癌幹細胞集団が、FOXA1 を高発現するという我々の仮説を支持する結果である。

次に、FOXA1 が直接癌幹細胞集団の維持に関与するのか、間接的にマーカーとして増加しているのかという点について論じる必要があると考えた。そこで我々は、shFOXA1 MCF7 cells を樹立し、FOXA1 発現と自己複製能の関連について明らかにすることを試みた。Mammosphere formation assay 及びウエスタンブロットによる検討の結果、mammosphere 培養条件においては何らかの因子により FOXA1 の過剰発現が引き起こされてしまい、FOXA1 knockdown による影響が評価できなくなった可能性があると考えた。一方で colony formation assay では shFOXA1 MCF7 cells で明らかなコロニー形成数の減少をみとめた。qRT-PCR の解析において、shFOXA1 MCF7 cells で多能性遺伝子の発現が

コントロール群に比べて有意に高いにもかかわらず今回のような結果となったことから、FOXA1 は多能性遺伝子の発現とは独立して、増殖維持に必要であると結論付けた。本研究では *in vitro* のみの検討であったが、子宮体癌細胞における検討で *in vivo* における腫瘍形成能と colony formation assay を解析し、結果 FOXA1 knockdown がコロニー形成及び腫瘍形成能を低下させたとする報告⁽⁸²⁾が存在し、乳癌細胞における *in vivo* 解析でもこれに類似する結果を得られることと推察する。

以上本研究は、癌幹細胞と FOXA1 過剰発現の関連性を初めて指摘した。これまでに既報論文によって癌幹細胞と晩期再発に関与するとされている静止細胞との類似性、また FOXA1 発現が晩期再発症例に相関していることが明らかとなっているが、本研究の知見によって、癌幹細胞集団において FOXA1 が過剰発現していることが明らかとなり、今後この現象の晩期再発におけるメカニズムの解明が課題となる。臨床応用への展望として、現在広く用いられている乳癌組織における免疫化学染色の診断手法では、FOXA1 の通常の発現と過剰発現を区別する系は確立していないが、この系の開発もしくは FOXA1 上流・下流因子を探索することで新規 luminal type 乳癌幹細胞マーカーを確立し、晩期再発のリスク症例に対し長期フォローアップが検討できる可能性が考えられる。また FOXA1 そのものが luminal type 乳癌幹細胞の性質維持に寄与していることが示唆されたことから、このメカニズムから晩期再発の原因解明及び治療法の開発の可能性も期待される。今後乳癌幹細胞における FOXA1 過剰発現のメカニズム及びその生物学的影響につき更なる検討を積み重ね、解明することで luminal type 乳癌の制御及び晩期再発の抑制へとつながっていくと考え、今後の研究を継続していく計画である。

2. 原発性乳癌手術検体由来樹立細胞の解析

2-1. 目的

これまでに発表されている乳癌細胞株による知見について、乳癌手術検体由来樹立細胞においても同様の結果が得られるか、もしくは新しい知見が得られるのかを検討するために、筆者が研究を遂行していた筑波大学再生医学・幹細胞生物学研究室において乳癌手術検体を用いた初代培養細胞を樹立した。しかし初代培養細胞を用いた既報論文では、由来組織のステータスを根拠とし、樹立細胞の morphology 及びホルモン受容体の発現等に言及していないものも多い。当研究室においても、乳癌幹細胞マーカーCD44⁺/CD24⁻を除き、樹立細胞が乳癌由来であることを立証するプロトコールは未確立であった。本研究において樹立された細胞群が、研究目的に適した材料であるかを判断するために、以下の点を目的とし解析を進めた。

- 1) 乳癌手術検体由来樹立細胞におけるステータスが、由来組織のステータスに一致することを確認する
- 2) 樹立細胞が乳癌由来であることを立証するプロトコールを確立する

2-2. 方法

細胞培養

MCF7 細胞株は理化学研究所 バイオリソースセンター（茨城県、日本）より購入し使用した。これに加え、筑波大学再生医学・幹細胞生物学研究室での先行研究にて樹立された乳癌再発患者胸水由来細胞 BC#1 を使用した（樹立方法は 1-3 参照）。いずれの細胞も維持培養はフェノールレッド含有 DMEM-high glucose 培地に 10% FBS、L-glutamine 0.5mM、MEM-NEAA 1mM、ペニシリン/ストレプトマイシン 1mM を加えた完全培地により行った。培養条件は 37°C、5% (v/v) CO₂/ air、6cm culture dish (Sumitomo-Bakelite, Osaka, Japan) で行った。

Luminal type 乳癌手術検体からの細胞樹立

全ての乳癌組織は、筑波大学附属病院臨床研究倫理委員会承認に基づき、術前にインフォームドコンセントを行い、研究使用に同意を得られた患者の手術検体より採取した。

乳癌組織はハサミで裁断し、PBS+2%FBS+0.1%コラゲナーゼ L (Nitta gelatin, Tokyo, Japan)中で 37°C、1 時間インキュベートした。コラゲナーゼ処理された組織は 18G 針及び 10ml シリンジを用いて複数回吸引破砕を加えた後に 100 μ m のフィルターを通し、1500rpm、5 分間遠心した。得られたペレットをフェノールレッド含有 DMEM-high glucose 培地に 10% FBS、L-glutamine 0.5mM、MEM-NEAA 1mM、ペニシリン/ストレプトマイシン 1mM、bFGF 5ng/mL(PeproTech Rocky Hill, U.S.A) を加えた完全培地に懸濁後、得られたペレット量に応じ 35mm dish または 24well plate (Sumitomo-Bakelite, Osaka, Japan)に播種し、37°C、5% (v/v) CO₂/ air 環境下で培養した。培養液交換については、初回は 7 日後、以降は 3 日毎に新鮮培養液に交換した。

Flow cytometry

Flow cytometry の解析機器は MofloXDP (Beckman Coulter, Tokyo, Japan)を用いた。

CD44 抗体 (BD Biosciences, CA, USA)及び CD24 抗体 (Biolegend, CA,USA)、CD90 抗体、CD73 抗体、CD105 抗体、CD31 抗体、CD45 抗体(以上 BD Pharmingen)による解析では、培養細胞をトリプシン処理し PBS/2% FBS 溶液内に回収後、細胞数を血球計算板で確認し、 5×10^5 cells- 1×10^6 cells をサンプル量とした。相当する細胞溶液を回収し、遠心後 $250 \mu\text{L}$ の PBS/2% FBS 溶液内に再懸濁後、 $50 \mu\text{L}$ をコントロールサンプル (非染色) とし、残り $200 \mu\text{L}$ に対し添付文書の推奨濃度で抗体を添加した。4°C 遮光下 25 分間静置し、その後 2 回 PBS 洗浄を経て、解析へと進んだ。

ALDH1 活性の解析では Aldefluor kit (Stem Cell technologies, British Columbia, CANADA)を用いて、添付文書プロトコールに基づき解析を行った。

Mammosphere formation assay

Mammosphere culture は MammoCult™ medium に $4 \mu\text{g/mL}$ (0.0004%) heparin, $0.48 \mu\text{g/mL}$ hydrocortisone (以上 StemCell Technologies Inc.), 0.1% (v/v) penicillin-streptomycin を mammoCult medium の添付文章に従い混合し、培地を作成した。35mm suspension culture dish (Sumitomo-Bakelite)1 枚に対し細胞数 1×10^4 cells とし、細胞数調製のうえ播種、7 日間培養を行った。Mammosphere 数の計測は、顕微鏡下にて直径 $100 \mu\text{m}$ 以上のものをカウントした。

Quantitative Reverse Transcription PCR (qRT-PCR)

RNA の精製は Sepasol-RNA I Super G (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan)を用いて行った。その後 ReverTra Ace (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて cDNA への逆転写を行った。Real time PCR は、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO)および 7500 Fast Real-

Time PCR machine (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を使用した。PCR 反応の条件は 95°C3 秒間および 60°C30 秒間を 40 サイクルとした。β Actin を internal control とし、Real time PCR 結果の Ct 値より Δ ΔCt 法で遺伝子相対発現量を求め、統計学的に比較した。使用プライマーを以下に示す。

Human	Sense primer: 5'-ATGTGTAGAGGGCATGGTGGAGAT-3'
ESR1	Antisense primer: 5'-GACTTCAGGGTGCTGGACAGAAAT-3'
Human	Sense primer: 5'-CTGGCACCACACCTTCTACAATGA-3'
b-actin	Antisense primer: 5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA-3'

Immunocytochemical staining for culture cells

細胞免疫化学染色（細胞免疫）はセルブロック法を用いた。培養細胞ペレットの固定は臨床組織固定に準じて 10%ホルマリンで固定し、70%エタノールに置換した。その後ペレットをパラフィンブロックに包埋し、細胞免疫に使用した。

ペレットのパラフィンブロック包埋及び細胞免疫の過程は筑波大学 Translational Research and Resource Core(TRRC)に依頼した。細胞免疫は、the autostainer BenchMark ULTRA (Roche, Tokyo, Japan)を用いて行われた。以下に使用された抗体（いずれも筑波大学 TRRC 所有抗体）を示す。

Ventana ultraView confirm ER (clone SP1, Roche)*
Ventana ultraView confirm PgR (clone 1E2, Roche)*
Vimentin (clone V9, Dako)*
Cytokeratin (CK) 5/6 (clone D5/16 B4, Dako) *
CK8 (clone 35H11, Dako)*

間葉系幹細胞に対する多分化能の評価

間葉系幹細胞は、各種分化培養液の影響下で脂肪分化、骨芽細胞分化を呈することが知られている⁽⁸³⁾。乳癌由来間葉系幹細胞の多分化能について以下の手法で評価した。

培養細胞は 4-well IVF Plate (BD Falcon) に播種し、コンフルエンスに達するまで維持培養した。培養液を取り除き、PBS で洗浄後、脂肪分化用培養液または骨芽細胞分化用培養液に置換した。28 日間培養後、脂肪細胞への分化はオイルレッド O (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) にて、骨芽細胞への分化はアリザリンレッド S (Kodak, Tokyo, Japan) でそれぞれ染色することにより評価した。

2-3. 結果

乳癌手術検体由来細胞と癌幹細胞マーカーの発現

方法に示す通り、乳癌手術検体からの組織採取は筑波大学附属病院臨床研究倫理委員会承認に基づき、術前にインフォームドコンセントを行い、研究使用に同意を得られた患者の手術検体より採取した。症例は術前薬物治療非施行症例に限定した結果、35例のうちほぼ全例 Luminal type 乳癌患者であった（1例のみ triple negative 乳癌）。うち 25 例の原発乳癌組織由来細胞が樹立された。代表する 3 系統細胞の由来症例について、手術検体における病理学的ステータスを示す。

#	ER	PgR	HER2 score	Ki-67 (%)	Nuclear Grade
36	+	+	3	10	1
38	+	+	2	40	2
41	+	+	1	3.8	1

<<樹立細胞由来組織の病理学的ステータス>>

樹立された細胞は図 12 に示す通り、いずれも間葉系細胞に類似する形態が主体の増殖を呈した。当初、当研究室において、乳癌幹細胞マーカー CD44+/CD24+ が特異的マーカーと考えられていたため、樹立後 CD44/CD24 発現及び ALDH 活性につき FACS で解析を行った。結果、ほぼすべての細胞系統において CD44+/24+ はほぼ 100% の陽性率を示した。一方 ALDH 活性については次表に示す通り細胞につき陽性率が異なり、CD44+/24+ 発現と傾向が乖離した。この傾向は先行研究にて樹立された BC#1 及び乳癌細胞株である MCF7, HCC1500 のいずれとも異なるものであった (1-4 参照)。このため、乳癌マーカーに関連して、樹立細胞に対する詳細なステータス解析が必要と考えられた。

#	CD44	CD24	ALDH(+) rate
36	+	-	4%
38	+	-	31%
41	+	-	7.18%

<<FACS 解析による樹立細胞における CD44/CD24/ALDH 発現ステータス>>

乳癌手術検体由来細胞における各種乳癌マーカーの発現

乳癌特異的なマーカーとして、由来組織における免疫化学染色で陽性を示していた ER, その下流因子である PgR, 乳腺上皮細胞及び基底細胞由来細胞で陽性を示すサイトケラチン(CK)8 及び 5/6 を候補として考えた。樹立した培養細胞よりセルブロックを作成し、BC#1、BC#38、BC#41 における ER、PgR、サイトケラチン 8 及び 5/6 の細胞免疫化学染色を行った (図 13A,B)。BC#1 においては ER、PgR は由来患者ステータスと異なるものの、CK8 を優位としてサイトケラチンの明らかな染色効果を認めた。一方で BC#38 および BC#41 ではいずれの因子も染色効果が認められなかった。

Vimentin は筋線維芽細胞など間葉系細胞に陽性を示すマーカー⁽⁸⁴⁾であるが、乳癌細胞においても上皮間葉転換(EMT)によって発現を認めることが分かっている⁽²⁷⁾。Vimentin について同様に、MCF7 及び BC#38, BC#41 で比較したところ、MCF7 における発現率は 5% 程度であったのに比し、BC#38 及び BC#41 ではほぼすべての細胞に陽性であった(図 13C)。

乳癌手術検体由来細胞における間葉系幹細胞マーカーの発現

前述した結果より、樹立細胞が間葉系細胞である可能性が考えられた。当研究室の間葉系幹細胞研究グループに協力を得て、間葉系幹細胞マーカーの発現を調べることにした。一般的に間葉系幹細胞では、CD90, CD73, CD105 陽性及び CD31, CD45 陰性を示すといわれ

ている⁽⁸⁵⁾。BC#38 及び BC#41 及びポジティブコントロールとして脂肪由来間葉系幹細胞である AT#151 を間葉系幹細胞研究グループに供与いただき、フローサイトメトリーで解析した。結果を図 14 に示す。BC#38 及び BC#41 において、蛍光強度は AT#151 に比しやや劣るものの、CD90, CD73, CD105 陽性及び CD31, CD45 陰性を示した。MCF7 においても同様の解析を行ったところ、いずれのマーカーもほぼ陰性であった。

さらに AT#151 について CD44/CD24 マーカーをフローサイトメトリーで解析したところ、BC#38 及び BC#41 同様 CD44 陽性、CD24 陰性を示した(図 15)。

乳癌手術検体由来細胞における多分化能の評価

間葉系幹細胞は、各種分化培地影響下において、脂肪分化及び骨芽細胞分化をすることが分かっている^(84, 85)。前述のフローサイトメトリーの結果から、BC#38 及び BC#41 が間葉系幹細胞と同様のマーカー発現を示していたことから、BC#38 を用いて分化培地による多分化能の評価を試みた(図 16)。28 日間の分化培地による培養の結果、脂肪分化培地及び骨芽細胞分化培地いずれも細胞形態の変化を生じた。アリザリンレッド及びオイルレッドによる染色において、いずれも強陽性の染色効果を認め、このことから、BC#38 及び BC#41 は乳癌組織由来間葉系幹細胞であると考えられた。

2-4. 考察

乳癌手術検体由来細胞を樹立するにあたり、当初 BC#1 が growth factor 非存在下で樹立されたことを踏まえて growth factor 非存在下での樹立を試みたが、細胞樹立に至らなかったという当研究室での先行研究結果がある (data not shown)。そのため、まずは bFGF 添加下に細胞樹立を試みた。結果複数の細胞樹立に成功したが、一方で細胞形態は BC#1 と大きく異なり間葉系細胞に類似する形態を呈した。さらに癌幹細胞マーカーである CD44⁺/24⁻と ALDH 活性における陽性率の結果が大きく乖離した。細胞株を使用した乳癌幹細胞研究において、CD44⁺/24⁻の集団がほぼ 100%を占める報告は検索しうる限り認めず、この段階において樹立細胞が本来の乳癌細胞であるのか否か、詳細な検討が必要と考えられた。

乳癌細胞のマーカー候補を検討するにあたり、NCCN guide line に示されている原発不明癌のプロトコール及び既報の乳癌研究を参照した。NCCN guide line によると CK7 陽性/CK20 陰性かつ ER/PgR 陽性がマーカーとして候補に挙がる。しかし CK7 陽性/CK20 陰性による乳癌基礎研究での解析の報告は多くなく、多くの報告は CK8/18 及び CK5/6 を用いた解析を利用していること⁽⁶⁷⁾、また乳癌組織において数は多くないが、CK20 陽性を予後不良症例に認めるという報告もあること、basal marker として CK5/6 が CK14 と比較しより感度が高いという報告があること⁽⁸⁶⁾から、CK8 及び CK5/6 を候補に挙げるに至った。なお、樹立細胞が乳癌細胞であることの証明として、Pan-cytokeratin 陽性を根拠とする論文も散見する^(58, 60)が、上皮以外の細胞に陽性となるサイトケラチンが存在するという報告があり^(87, 88)、また *in vivo* における間葉系幹細胞が上皮損傷治癒に及ぼす影響を検討したいくつかの論文では、間葉系幹細胞が間葉上皮転換(MET)を生じ、Pan-cytokeratin を発現したと報告されている⁽⁸⁹⁻⁹²⁾。このため、Pan-cytokeratin による乳房組織由来初代培養細胞のスクリーニングには慎重であるべきと考える。

以上の経緯に加え、樹立細胞が間葉系細胞形態を示すことから、vimentin を検討項目に

加え、これらの細胞免疫化学染色につき検討した。この結果、今回乳癌組織より樹立した細胞ではホルモン受容体及び CK8, 5/6 発現はいずれも認めなかった。先行研究で樹立された胸水由来 BC#1 においてもホルモン受容体発現状況は非典型的であったが、CK 発現は乳癌マーカーに一致していた。一方で今回乳癌組織より樹立した細胞では vimentin 発現はほぼ 100% であり、MCF7 での発現状況と大きく乖離した。これらの結果から、今回樹立された乳癌手術検体由来細胞は間葉系細胞の可能性が高いと考えた。

乳腺組織内に含まれる間質には線維芽細胞、間葉系幹細胞、脂肪前駆細胞などが存在する。当研究室の間葉系幹細胞研究グループに協力いただき、乳癌手術検体由来細胞における間葉系幹細胞マーカー発現につき検討した。間葉系幹細胞の定義としては、(i) CD90, CD73, CD105 が 95% 以上発現すること、(ii) CD31, CD45 が陰性を示すこと、が一般的である⁽⁸⁵⁾。脂肪由来間葉系幹細胞と比較した結果、乳癌手術検体由来細胞は脂肪由来間葉系幹細胞と同様のマーカー発現を示した。一方比較として MCF7 で解析を行った結果、CD90, CD73, CD105 はいずれも陰性を示した。これらのことから、乳癌手術検体由来細胞は間葉系幹細胞であると考えられた。

間葉系幹細胞の性質として、多分化能が挙げられる。特に脂肪分化及び骨芽細胞分化における実験系は広く用いられている^(84, 85)。乳癌手術検体由来細胞につき、この脂肪分化及び骨芽細胞分化実験を行ったところ、いずれも分化を示す結果となった。このことから、乳癌手術検体由来細胞が間葉系幹細胞であることがほぼ確定的となった。

今回乳癌手術検体から細胞を樹立するにあたり、増殖因子として bFGF を添加した。文献的に一般的な乳腺上皮初代培養細胞または乳癌初代培養細胞の樹立方法としては、上皮増殖因子である Insulin, EGF, hydrocortison, cholera toxinなどを添加するものが多い⁽⁹³⁾。今回間葉系幹細胞が樹立されてきた背景として、こうした上皮増殖因子が非添加であり、間葉系幹細胞の増殖が乳癌細胞に比しより急速に起こったため、間葉系細胞の増殖がより刺激され、乳癌細胞が淘汰されてしまった可能性を考える。但し bFGF 非添加・上皮増殖因

子添加培養系における乳癌初代培養細胞において、今回と同様間葉系細胞形態を示す細胞が樹立された報告があり、これらの論文で述べられている CK8/18 発現低下傾向及び CD44 強陽性傾向、vimentin 強陽性傾向からは今回我々が樹立した細胞の性質と近似している可能性がある（ただし引用文献では当樹立細胞を乳癌細胞と断定しており、CK5/6 及び間葉系幹細胞マーカーについて詳しく言及していないことから、推察の域を出ない）(60, 94)。以上のことから、更なる培養系の検討はもちろん、樹立された細胞につき今回確立したホルモン受容体、CK、間葉系幹細胞マーカーによる乳癌細胞としての証明及び間葉系幹細胞の除外はルーチンとして行っていくべきと考える。

乳癌組織から細胞を樹立する際に、初期の段階で細胞表面抗原を利用した乳癌細胞マーカーを利用し flow cytometry で単離することが、乳癌細胞初代培養を確立することに有用であると考えられるが、乳癌組織由来初代培養細胞樹立に関して表面抗原を利用した単離法はこれまでに報告されていない。当研究室では CD44+/24- が乳癌幹細胞マーカーとする報告から、当初このマーカーで単離することで乳癌細胞であると考えていた。しかし近年の報告では、間葉系幹細胞でも同様のマーカー発現傾向を示すことが知られており(95, 96)、このマーカーでは乳癌細胞は単離できないと考えられる。今回乳癌マーカーとして使用したサイトケラチン及びホルモン受容体は細胞質及び核内タンパクをターゲットとしており、生細胞の sorting には適していない。その他の候補として、癌幹細胞マーカーまたは正常乳腺幹細胞とのコンビネーションで複数の論文で使用されている EpCAM または epithelial specific antigen (ESA) (11, 97-100)が挙げられる。これらは単体または両者をターゲットとした生細胞でも用いられる抗体が販売されており、今後乳癌初代培養細胞を確立していくにあたり、マーカーとして有用であるか今回と同様の検討を行い確立していく計画である。

結論として、今回乳癌手術検体より樹立された細胞群は、間葉系幹細胞と考えられた。但し乳癌研究領域では、乳癌細胞と微小環境との関連性についても近年注目されており、今後これらの樹立細胞は、こうした領域の研究に有意義に活用できるものとする。また、同一

患者由来の乳癌細胞及び間葉系幹細胞を使用した研究は検索しうる限り存在しない。今回確立した細胞の解析プロトコールを活用し、かつ患者組織からの乳癌細胞単離法を確立することで、同一患者由来の乳癌細胞及び間葉系幹細胞との詳細な検討を行うことを今後の検討課題としたい。

図表

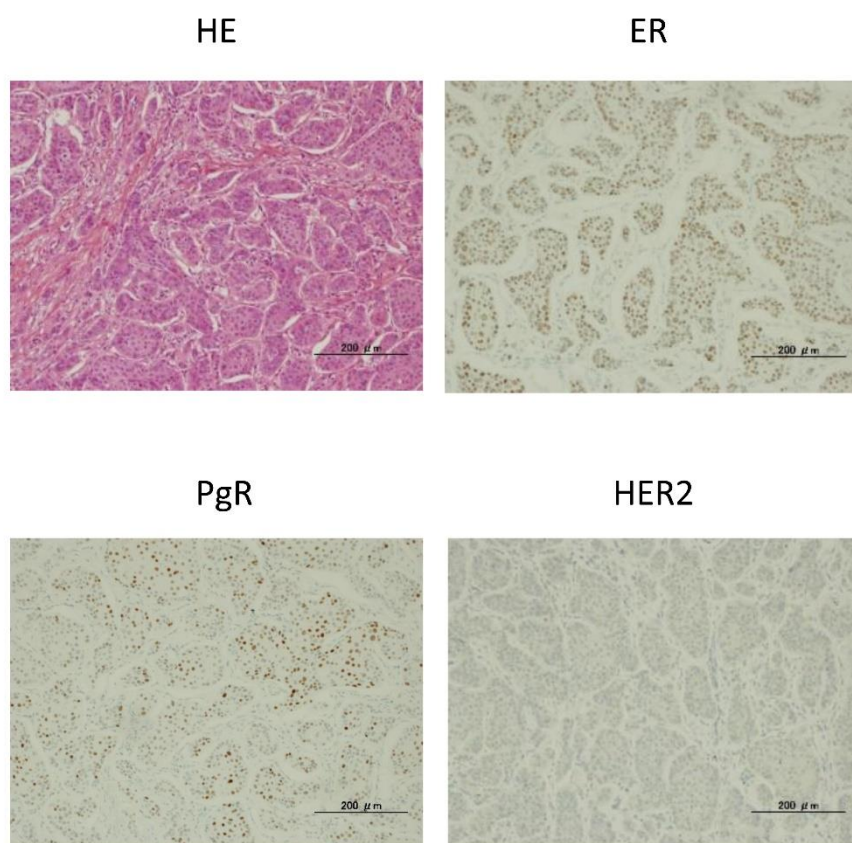


図1: BC#1 由来患者の初発乳癌手術検体組織像

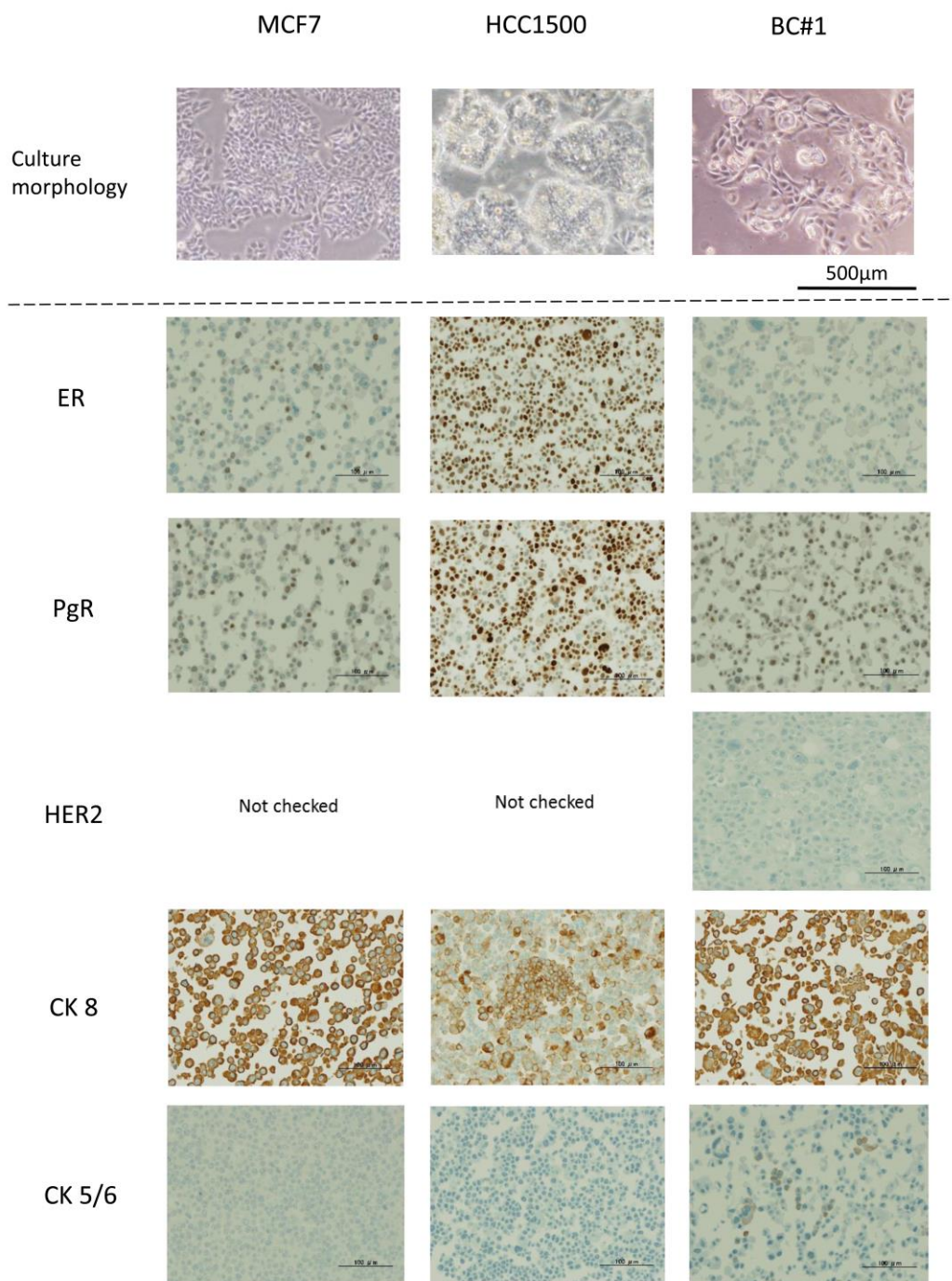


図2: 細胞株及びBC#1細胞の形態及びセルブロックにおける細胞免疫化学組織染色像

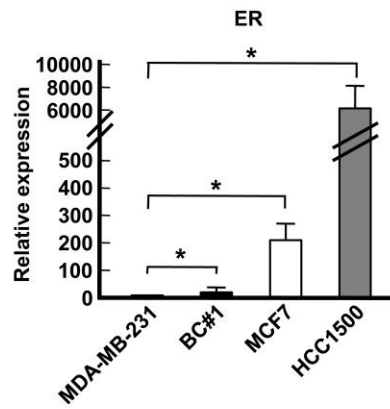


図3: 細胞株及びBC#1における、mRNA ER発現
 MDA-MB-231細胞(ER陰性細胞株)をネガティブコントロールとし、
 これと各細胞との比較をt-testで解析した。
 *: $p < 0.05$

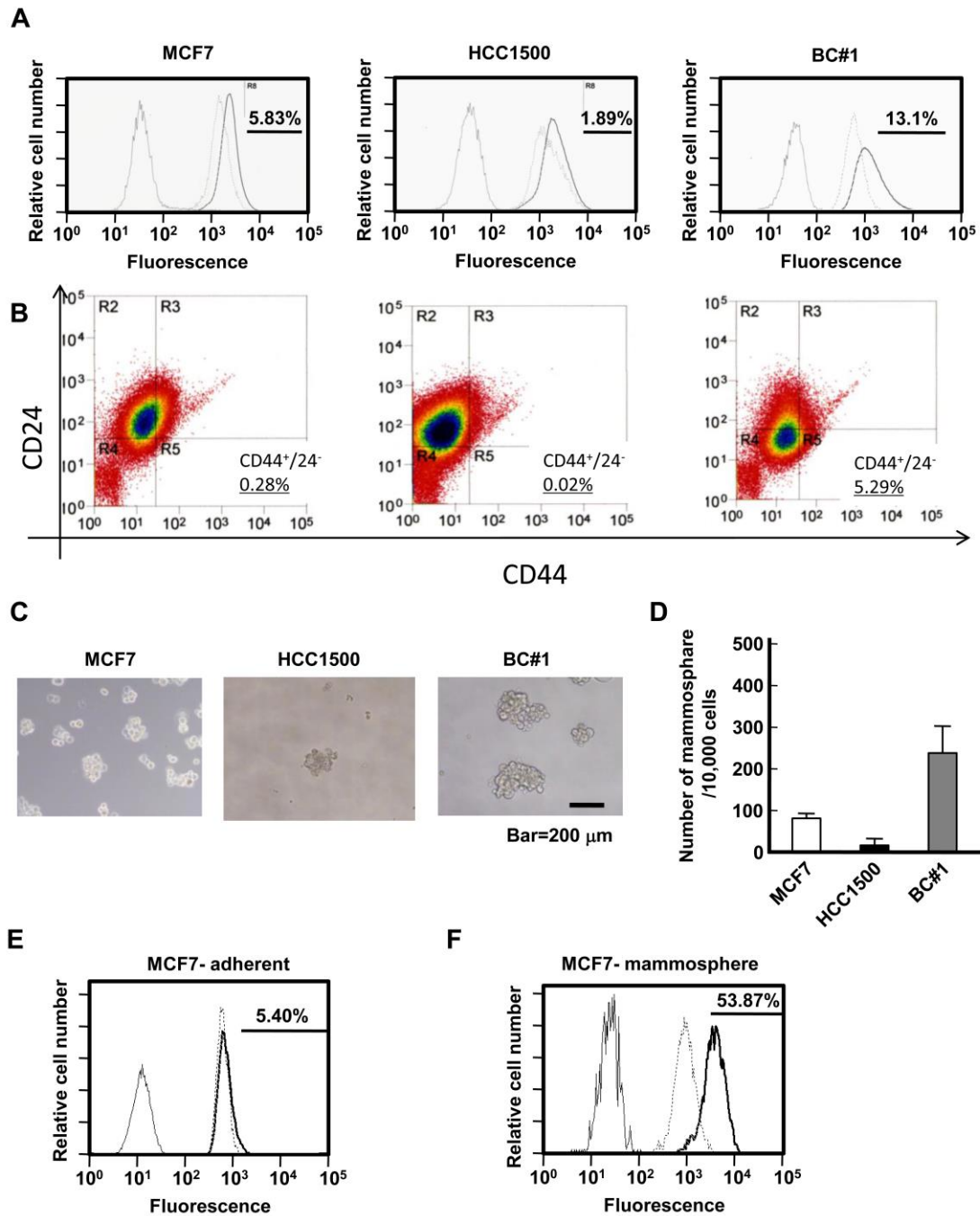


図4: 細胞株及びBC#1における、乳癌幹細胞性の検討

(A): Aldefluorを用いたALDH活性の解析。黒線: unstain, 破線: Aldefluor reagent+ DEAB, 太線: Aldefluor reagent. ALDH陽性率をグラフ中に示す。(B): CD44/24の解析。R5: CD44⁺/CD24⁻を示す。同分画の全体に占める割合をグラフ中に示す。(C): 各細胞におけるmammosphere形態 (D): 各細胞におけるmammosphere形成数 (E)-(F): MCF7の各培養条件下におけるALDH陽性率の変化。接着培養(E)、mammosphere培養(F)時のAldefluorによる解析結果を示す。

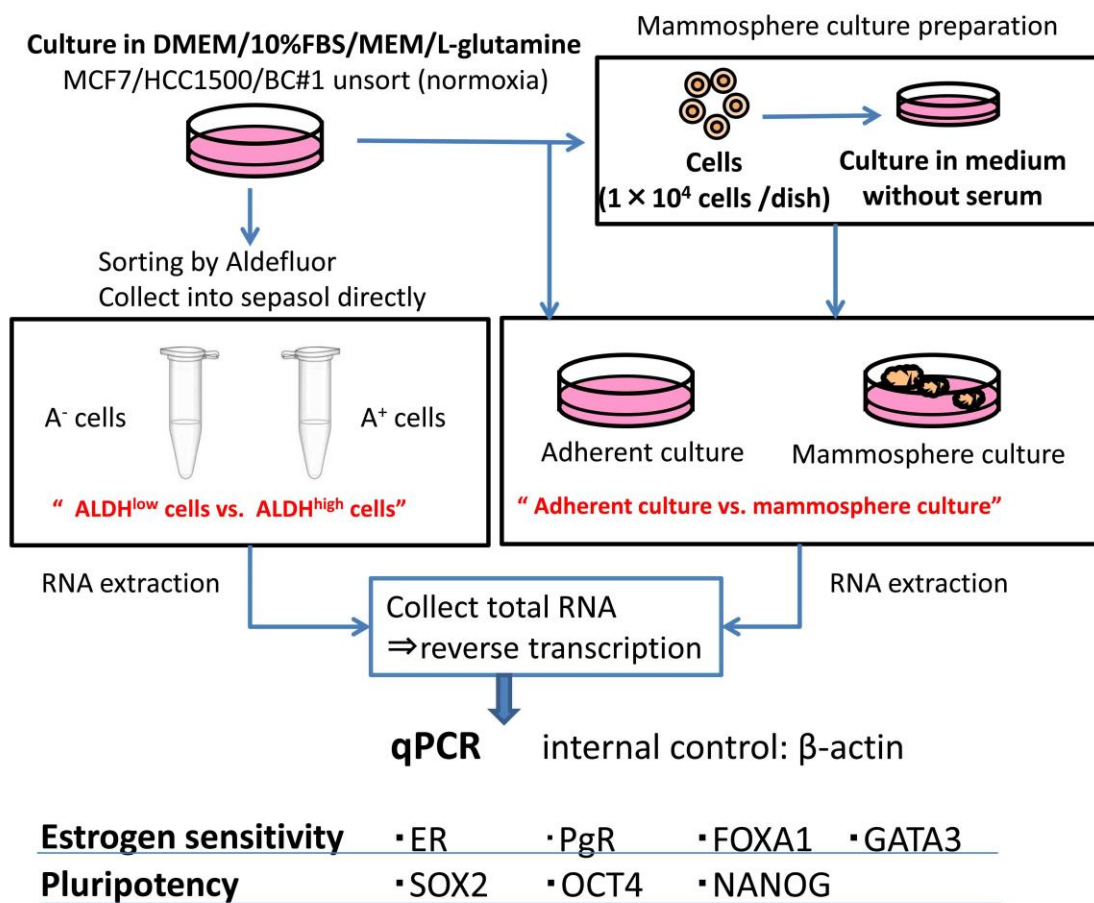


図5： 癌幹細胞性の高い群とその他の群における各種遺伝子の比較(概説図)

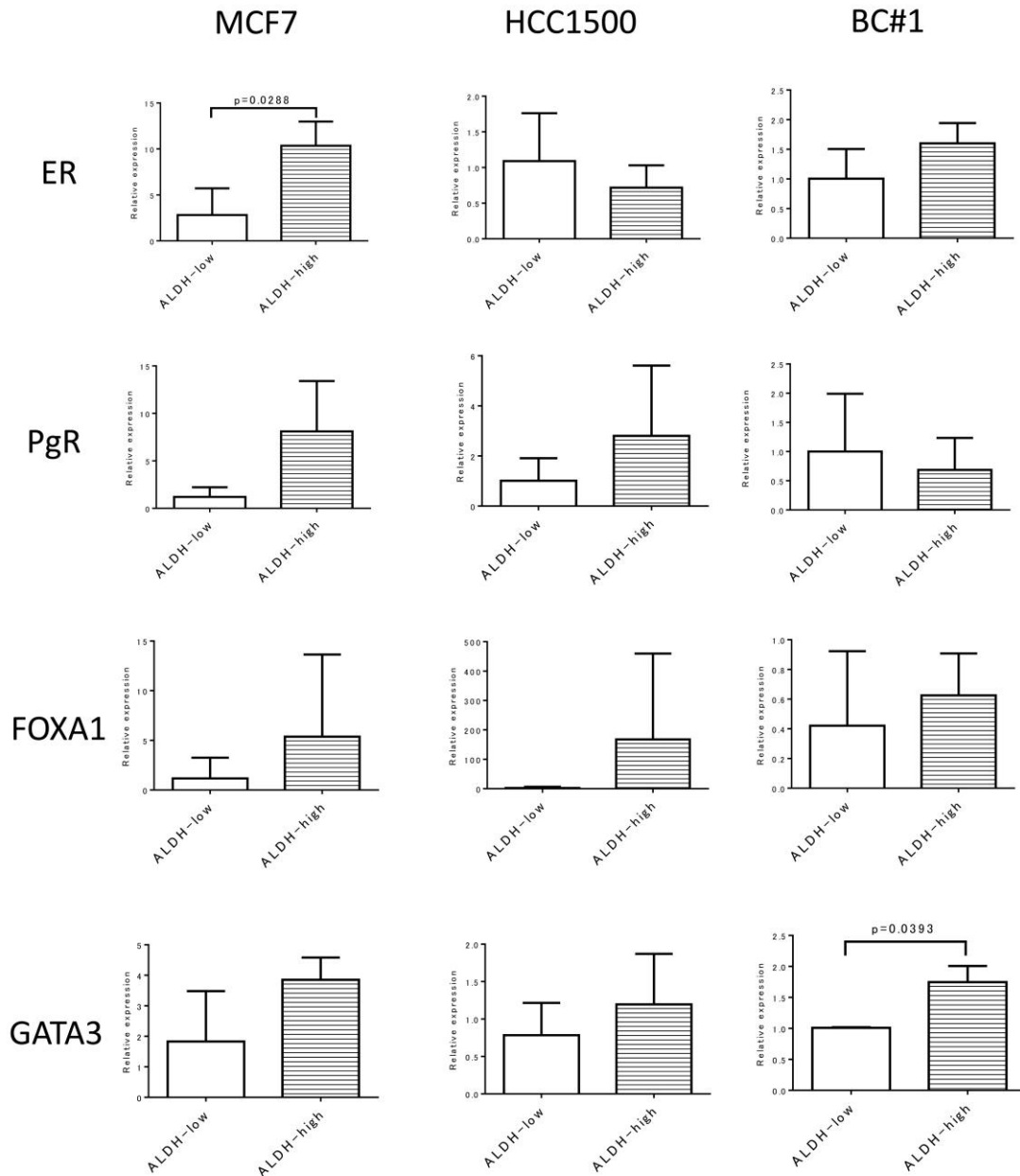


図6: ALDH-low群とALDH-high群における各種遺伝子の発現
平均±SDでデータを示した。t-testによる解析を行った。(各n=3)

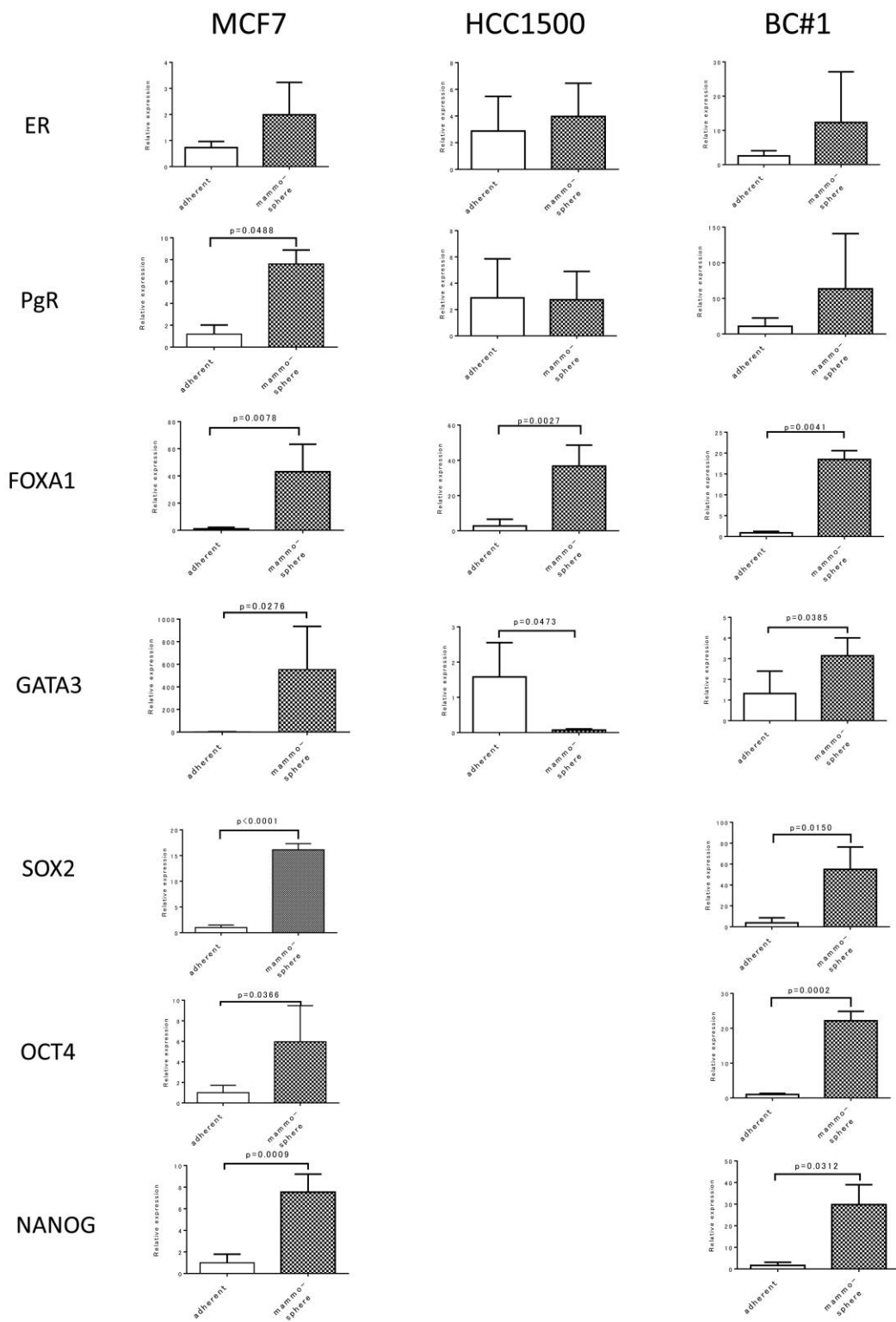
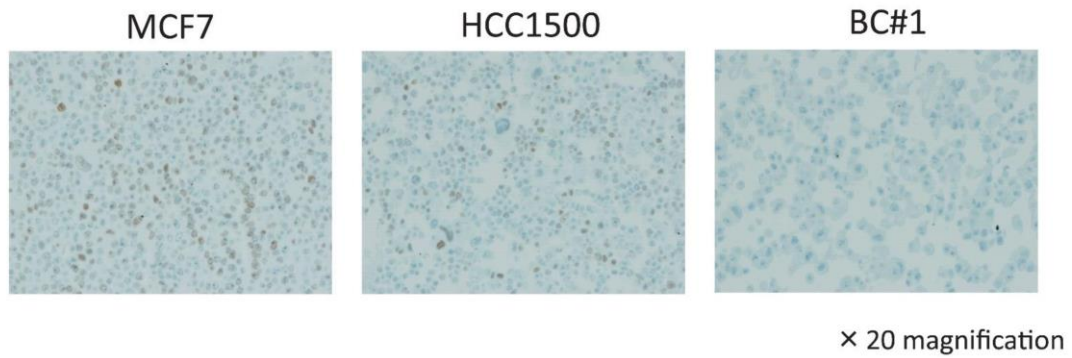
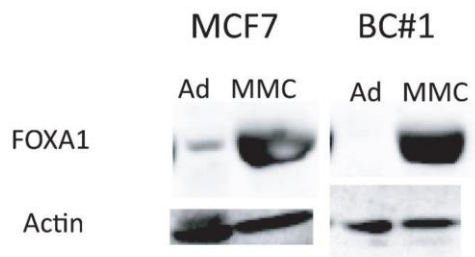


図7: 接着培養群とmammosphere群における各種遺伝子の発現平均±SDでデータを示し、t-testによる解析を行った(各n=3)。

A



B



C

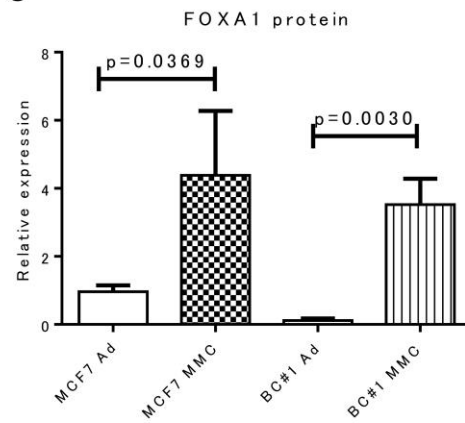


図8: 乳癌細胞におけるFOXA1のタンパク発現

(A): 接着培養細胞セルブロックをもちいたFOXA1細胞免疫化学染色像

(B): MCF7及びBC#1におけるwestern blotによるFOXA1 protein発現

Ad: 接着培養、MMC: mammosphere培養

(C): (B)の結果をImage Jを用いて定量化し、解析した。平均±SDでデータを示した。
t-testによる解析を行った。

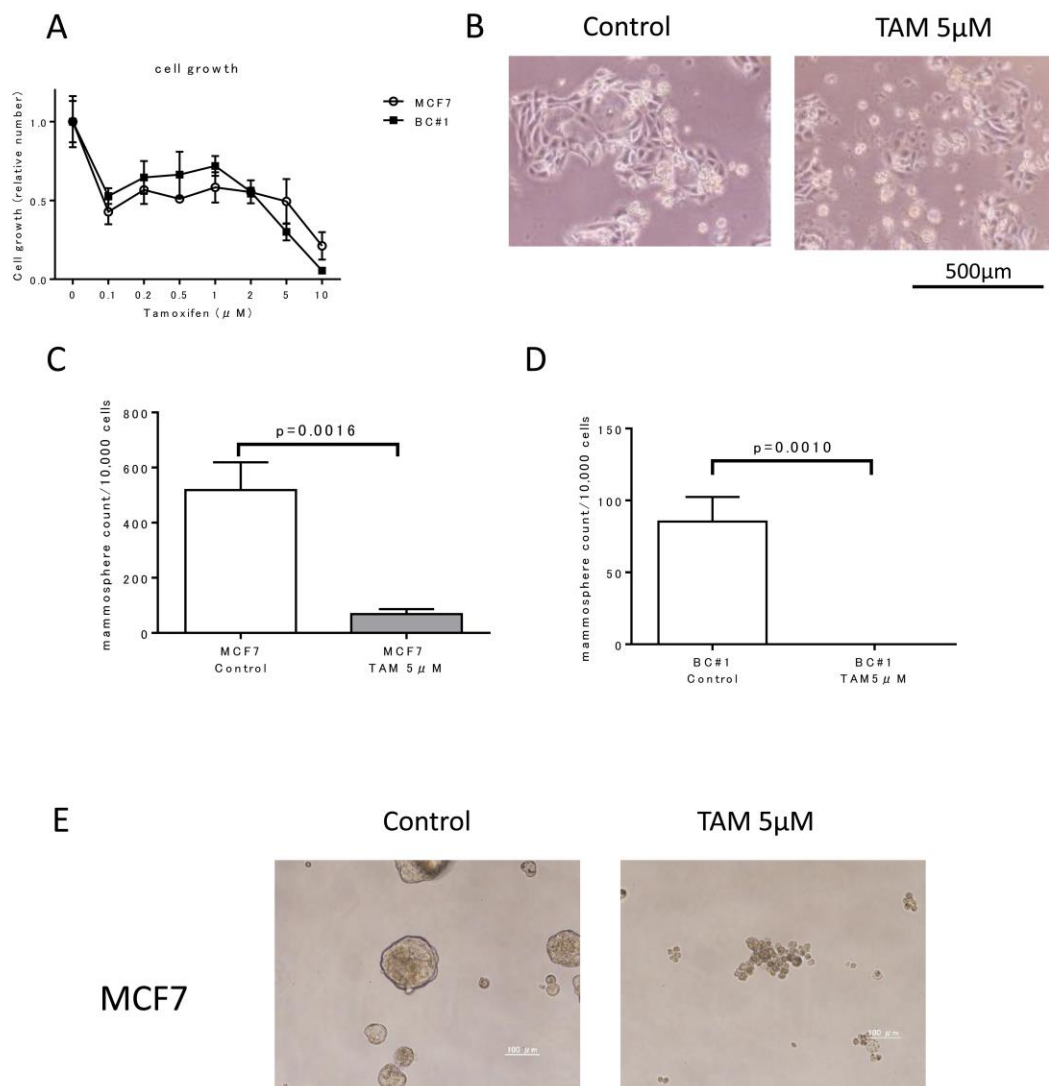


図9: MCF7 及びBC#1におけるTAMのmammosphere 形成に対する影響
 (A): MCF7及びBC#1における、TAMによるgrowth inhibition curve
 (B): BC#1のTAM影響下における細胞像
 (C)-(D): MCF7(C)及びBC#1(D)における、TAM影響下mammospherre数の変化
 平均±SDでデータを示し、t-testによる解析を行った。
 (E): MCF'7におけるTAM影響下mammosphere像の変化

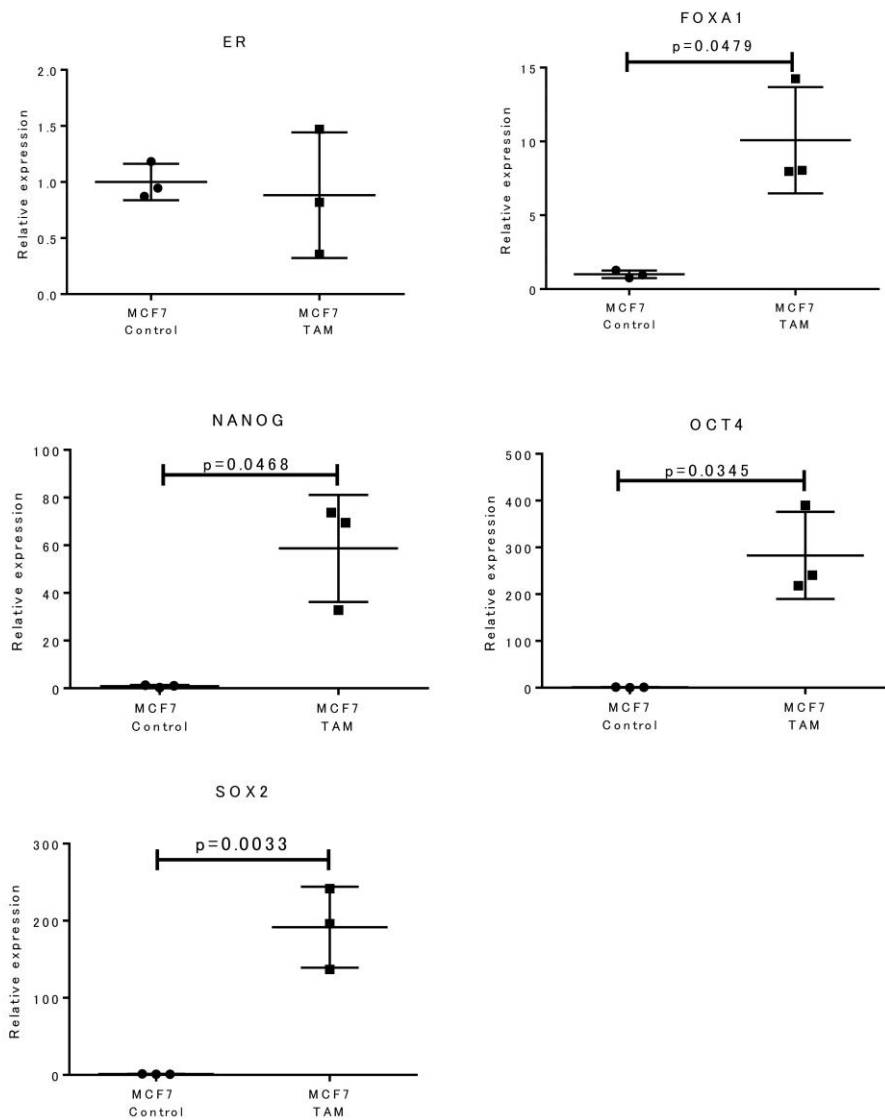


図10: TAM影響下における多能性遺伝子及びFOXA1遺伝子発現の変化
平均±SDでデータを示し、t-testによる解析を行った。

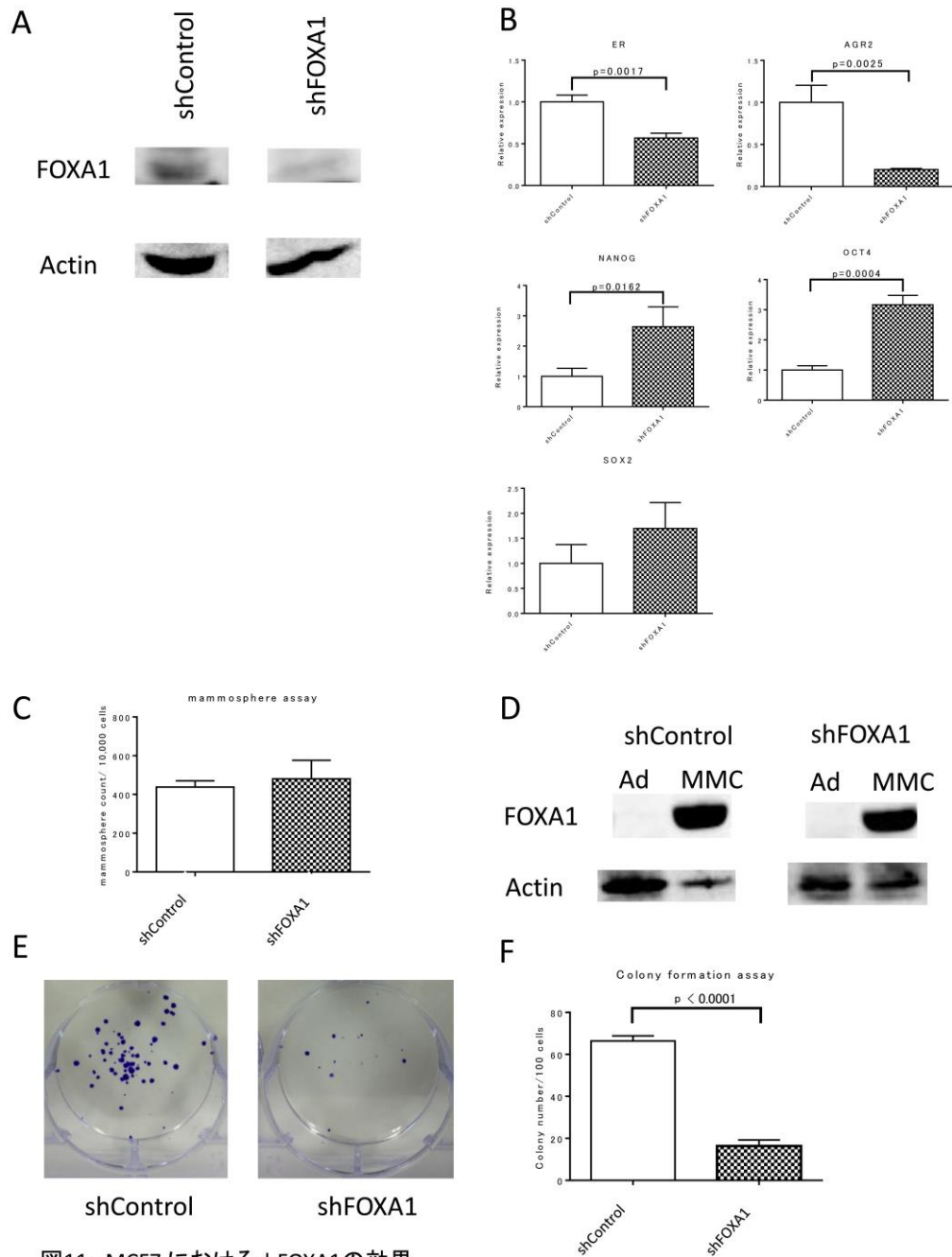


図11: MCF7 におけるshFOXA1の効果

(A): MCF7 shControl及びMCF7 shFOXA1 におけるFOXA1 protein発現

(B): MCF7 shControl及びMCF7 shFOXA1 における遺伝子発現
平均±SDでデータを示し、t-testによる解析を行った

(C): MCF7 shControl及びMCF7 shFOXA1 におけるmammosphere形成数

(D): shControl及びshFOXA1におけるFOXA1 protein発現

Ad: 接着培養、MMC: mammosphere培養

(E): MCF7 shControl及びMCF7 shFOXA1 におけるcolony formation assay

(F): (E) について平均±SDでデータを示し、t-testによる解析を行った

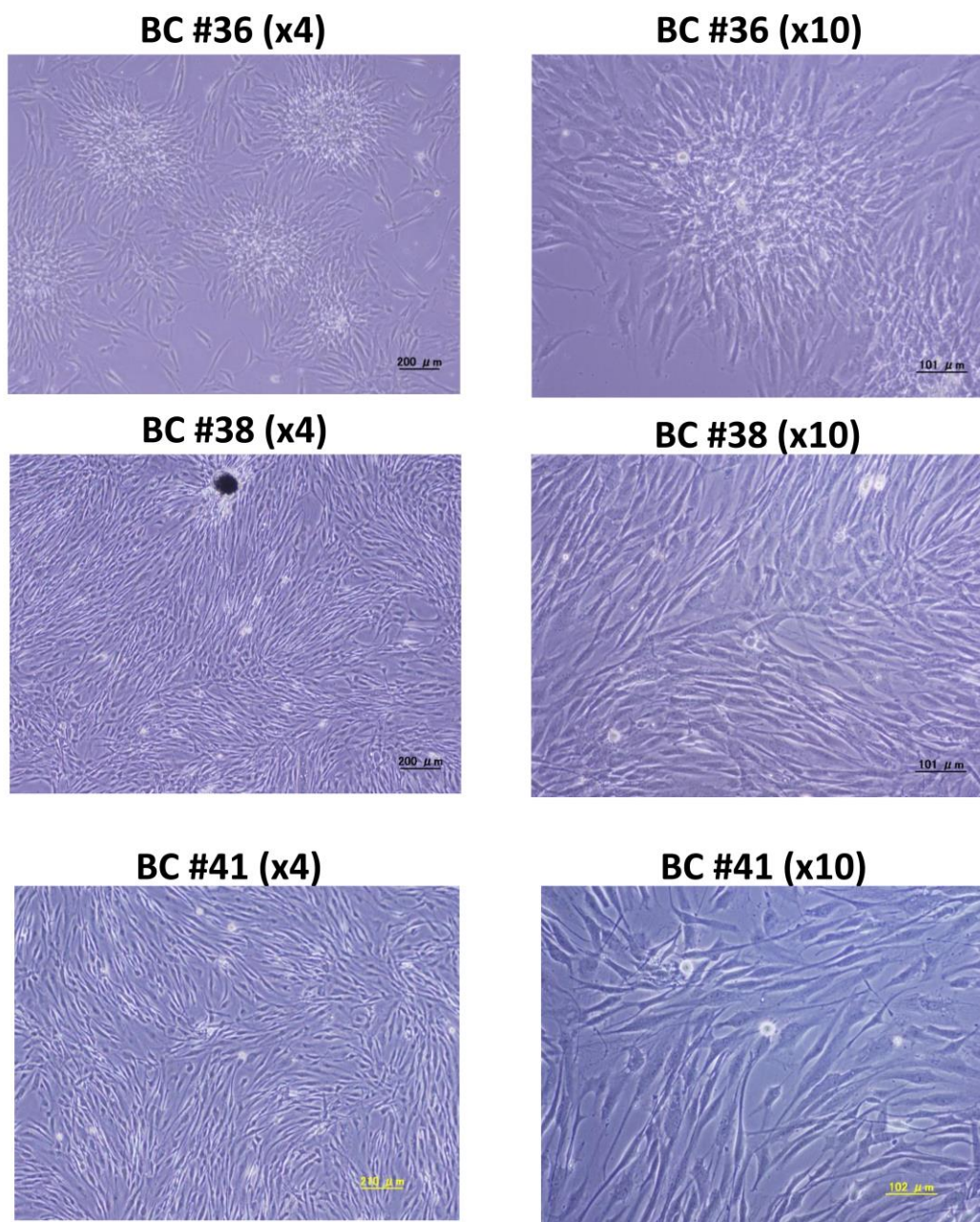
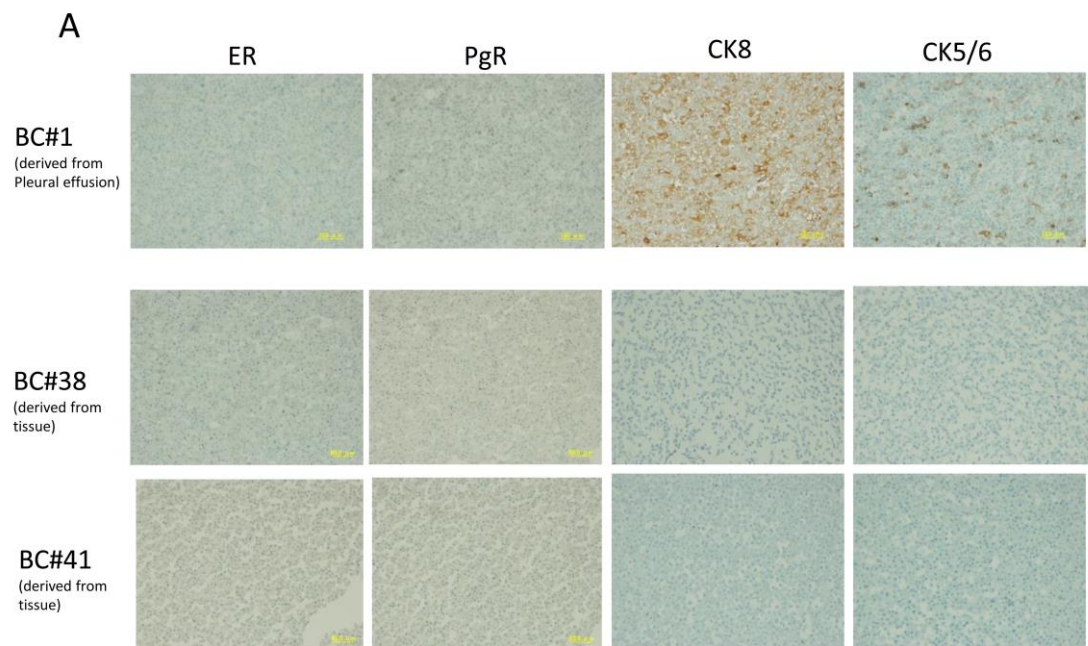


図12: 樹立した乳癌手術検体由来細胞の細胞像



B

	ER	PgR	CK8	CK5/6
BC#1	-	+	+++	++
BC#38	-	-	-	-
BC#41	-	-	-	-

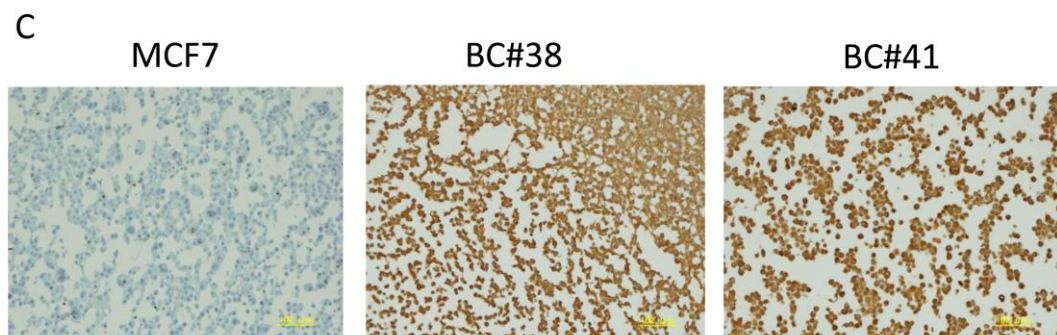


図13: 乳癌手術検体由来細胞における免疫化学染色による各種マーカー発現の検討
 (A): 乳癌再発患者胸水由来細胞(BC#1)及び乳癌手術検体由来細胞(BC#38, BC#41)における各種マーカー発現。対物レンズx10で表示。
 (B): 各種マーカー発現要約
 (C): MCF7及び乳癌手術検体由来細胞におけるvimentin発現。対物レンズx10で表示。

MSC markers of breast tissue-derived cells

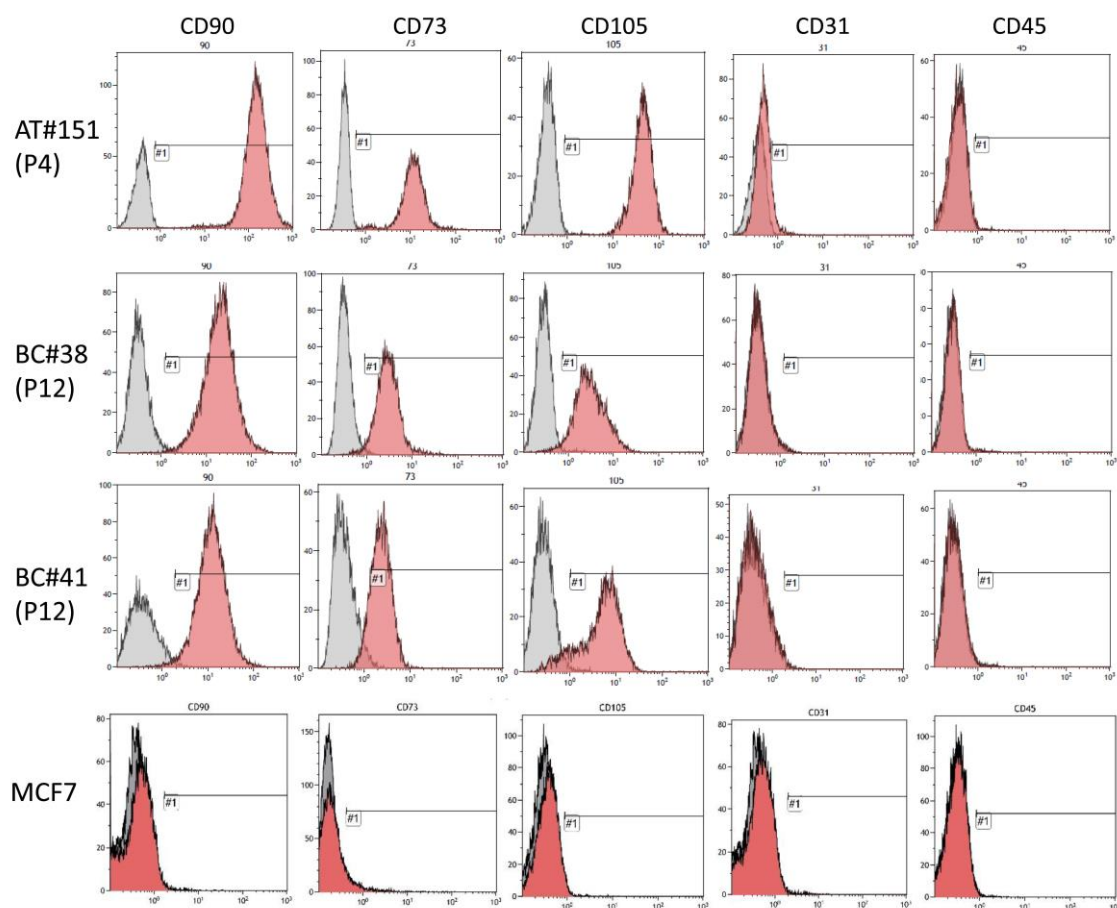


図14: 脂肪由来間葉系幹細胞と乳癌手術検体由来細胞における間葉系幹細胞マーカー発現の比較
横軸: 蛍光強度、縦軸: 相対細胞数を示す。 灰色分画: control(非染色), 赤色分画: 各抗体染色後

The expression of CD44 & CD24 in MSC and breast tissue-derived cells.

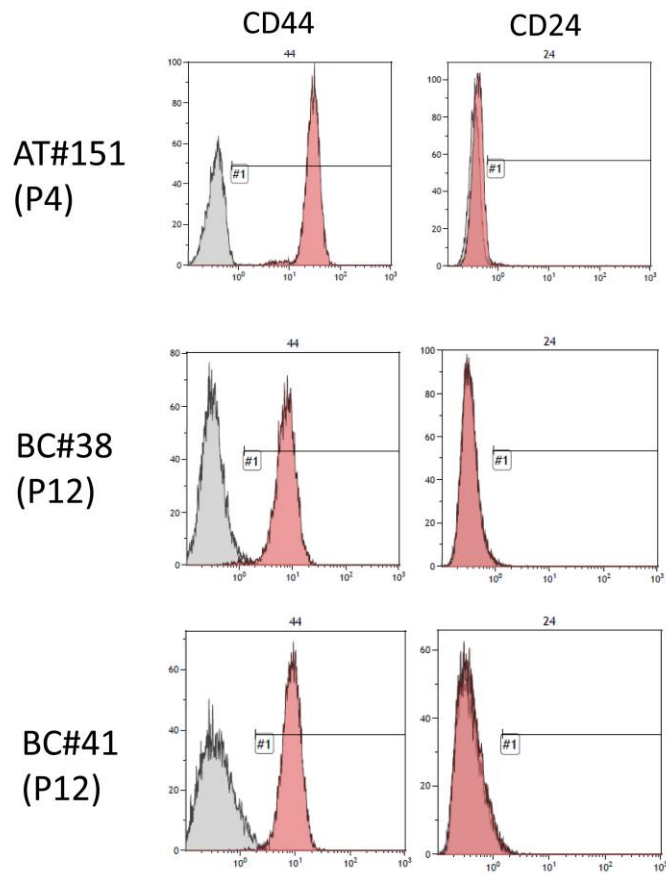
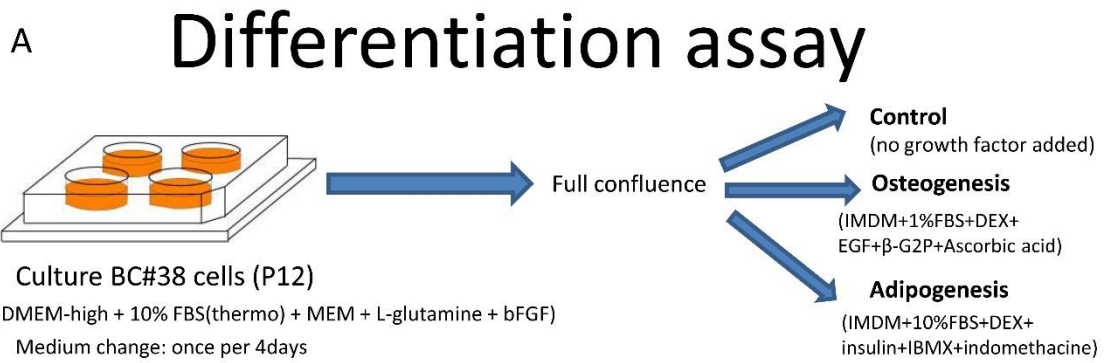


図15: 脂肪由来間葉系幹細胞と乳癌手術検体由来細胞におけるCD44/24発現の比較
 横軸: 蛍光強度、縦軸: 相対細胞数を示す。灰色分画: control(非染色), 赤色分画: 各抗体染色後



B

	day0	day28	Alizarin/Oil red
			Alizarin
			Oil RED
control			
Osteo			
Adipo			

図16: 乳癌手術検体由来細胞における多分化能の評価

(A): 多分化能評価系の概説図

(B): 分化培地による培養細胞の写真及びアリザリンレッド・オイルレッドによる染色結果

参考文献

1. Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R6.
2. Yamashita H, Iwase H, Toyama T, *et al.* Estrogen receptor-positive breast cancer in Japanese women: trends in incidence, characteristics, and prognosis. *Ann Oncol* 2011; 22: 1318-25.
3. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1160-7.
4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-52.
5. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013; 24: 2206-23.
6. Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Toyozumi Y, Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp Ther Med* 2010; 1: 747-54.
7. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, *et al.* Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 2011; 103: 1656-64.
8. Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, *et al.* Evaluation of factors related to late recurrence--later than 10 years after the initial treatment--in primary breast cancer. *Oncology* 2013; 85: 100-10.
9. Paik S, Shak S, Tang G, *et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 2817-26.
10. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-6.
11. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 3983-8.
12. Abdullah LN, Chow EK. Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clin Transl Med* 2013; 2: 3.
13. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, *et al.* Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 2008; 3: e2428.

14. Guler G, Balci S, Costinean S, *et al.* Stem cell-related markers in primary breast cancers and associated metastatic lesions. *Mod Pathol* 2012; 25: 949-55.
15. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, *et al.* In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003; 17: 1253-70.
16. O'Connor ML, Xiang D, Shigdar S, *et al.* Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer Lett* 2014; 344: 180-7.
17. Jo M, Eastman BM, Webb DL, Stoletov K, Klemke R, Gonias SL. Cell signaling by urokinase-type plasminogen activator receptor induces stem cell-like properties in breast cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70: 8948-58.
18. Tobar N, Villar V, Santibanez JF. ROS-NFkappaB mediates TGF-beta1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol Cell Biochem* 2010; 340: 195-202.
19. Kusumbe AP, Bapat SA. Cancer stem cells and aneuploid populations within developing tumors are the major determinants of tumor dormancy. *Cancer Res* 2009; 69: 9245-53.
20. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, *et al.* ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-67.
21. Tsang JY, Huang YH, Luo MH, *et al.* Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 136: 407-17.
22. Yoshioka T, Umekita Y, Ohi Y, *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1 expression is a predictor of poor prognosis in node-positive breast cancers: a long-term follow-up study. *Histopathology* 2011; 58: 608-16.
23. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 876-87.
24. Sun Y, Wang Y, Fan C, *et al.* Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation. *Mol Cancer* 2014; 13: 137.
25. Harrison H, Farnie G, Howell SJ, *et al.* Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res* 2010; 70: 709-18.
26. Ito T, Sato N, Yamaguchi Y, *et al.* Differences in Stemness Properties Associated With the Heterogeneity of Luminal-Type Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer* 2015; 15: e93-e103.
27. Guttilla IK, Phoenix KN, Hong X, Tirnauer JS, Claffey KP, White BA. Prolonged mammosphere culture of MCF-7 cells induces an EMT and repression of the

- estrogen receptor by microRNAs. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132: 75-85.
28. Ziegler E, Hansen MT, Haase M, Emons G, Grundker C. Generation of MCF-7 cells with aggressive metastatic potential in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 148: 269-77.
 29. Qian X, Anzovino A, Kim S, *et al.* N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. *Oncogene* 2014; 33: 3411-21.
 30. Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* 2006; 127: 1041-55.
 31. Wright TM, Wardell SE, Jasper JS, *et al.* Delineation of a FOXA1/ERalpha/AGR2 regulatory loop that is dysregulated in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Mol Cancer Res* 2014; 12: 1829-39.
 32. Bernardo GM, Lozada KL, Miedler JD, *et al.* FOXA1 is an essential determinant of ERalpha expression and mammary ductal morphogenesis. *Development* 2010; 137: 2045-54.
 33. Bernardo GM, Keri RA. FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer. *Biosci Rep* 2012; 32: 113-30.
 34. Hurtado A, Holmes KA, Ross-Innes CS, Schmidt D, Carroll JS. FOXA1 is a key determinant of estrogen receptor function and endocrine response. *Nat Genet* 2011; 43: 27-33.
 35. Yamaguchi N, Ito E, Azuma S, *et al.* FoxA1 as a lineage-specific oncogene in luminal type breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 365: 711-7.
 36. Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, *et al.* Association of double-positive FOXA1 and FOXP1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients. *Horm Cancer* 2012; 3: 147-59.
 37. Chen F, Li A, Gao S, *et al.* Tip30 controls differentiation of murine mammary luminal progenitor to estrogen receptor-positive luminal cell through regulating FoxA1 expression. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1242.
 38. Wolf I, Bose S, Williamson EA, Miller CW, Karlan BY, Koeffler HP. FOXA1: Growth inhibitor and a favorable prognostic factor in human breast cancer. *Int J Cancer* 2007; 120: 1013-22.
 39. Habashy HO, Powe DG, Rakha EA, *et al.* Forkhead-box A1 (FOXA1) expression in breast cancer and its prognostic significance. *Eur J Cancer* 2008; 44: 1541-51.
 40. Kawase M, Toyama T, Takahashi S, *et al.* FOXA1 expression after neoadjuvant chemotherapy is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast cancer.

- Breast Cancer 2015; 22: 308-16.
41. Wiseman BS, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* 2002; 296: 1046-9.
 42. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449: 557-63.
 43. Chaturvedi P, Gilkes DM, Wong CC, *et al.* Hypoxia-inducible factor-dependent breast cancer-mesenchymal stem cell bidirectional signaling promotes metastasis. *J Clin Invest* 2013; 123: 189-205.
 44. Klopp AH, Lacerda L, Gupta A, *et al.* Mesenchymal stem cells promote mammosphere formation and decrease E-cadherin in normal and malignant breast cells. *PLoS One* 2010; 5: e12180.
 45. Clarke MR, Imhoff FM, Baird SK. Mesenchymal stem cells inhibit breast cancer cell migration and invasion through secretion of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2. *Mol Carcinog* 2014.
 46. Batouli S, Miura M, Brahim J, *et al.* Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003; 82: 976-81.
 47. Dai L, Hu X, Zhang X, *et al.* Different tenogenic differentiation capacities of different mesenchymal stem cells in the presence of BMP-12. *J Transl Med* 2015; 13: 200.
 48. Zhang C, Zhai W, Xie Y, Chen Q, Zhu W, Sun X. Mesenchymal stem cells derived from breast cancer tissue promote the proliferation and migration of the MCF-7 cell line. *Oncol Lett* 2013; 6: 1577-82.
 49. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 392-401.
 50. Gandellini P, Andriani F, Merlino G, D'Aiuto F, Roz L, Callari M. Complexity in the tumour microenvironment: Cancer associated fibroblast gene expression patterns identify both common and unique features of tumour-stroma crosstalk across cancer types. *Semin Cancer Biol* 2015.
 51. Peng Q, Zhao L, Hou Y, *et al.* Biological characteristics and genetic heterogeneity between carcinoma-associated fibroblasts and their paired normal fibroblasts in human breast cancer. *PLoS One* 2013; 8: e60321.
 52. Allinen M, Beroukhim R, Cai L, *et al.* Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 2004; 6: 17-32.
 53. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, *et al.* Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2008; 68: 4331-9.
 54. Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW, Banerjee D. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. *Cancer Res* 2009; 69: 1255-8.

55. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 cells--changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107.
56. Boyiri T, Leszczynska J, Desai D, Amin S, Nixon DW, El-Bayoumy K. Metabolism and DNA binding of the environmental pollutant 6-nitrochrysene in primary culture of human breast cells and in cultured MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-435s cell lines. *Int J Cancer* 2002; 100: 395-400.
57. Zhao Z, Lu P, Zhang H, *et al*. Nestin positively regulates the Wnt/beta-catenin pathway and the proliferation, survival and invasiveness of breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res* 2014; 16: 408.
58. Harrison H, Rogerson L, Gregson HJ, Brennan KR, Clarke RB, Landberg G. Contrasting hypoxic effects on breast cancer stem cell hierarchy is dependent on ER-alpha status. *Cancer Res* 2013; 73: 1420-33.
59. Speirs V, Green AR, Walton DS, *et al*. Short-term primary culture of epithelial cells derived from human breast tumours. *Br J Cancer* 1998; 78: 1421-9.
60. Minafra L, Norata R, Bravata V, *et al*. Unmasking epithelial-mesenchymal transition in a breast cancer primary culture: a study report. *BMC Res Notes* 2012; 5: 343.
61. Donatello S, Hudson L, Cottell DC, *et al*. An imbalance in progenitor cell populations reflects tumour progression in breast cancer primary culture models. *J Exp Clin Cancer Res* 2011; 30: 45.
62. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107: 275-81.
63. Johnson N, Bentley J, Wang LZ, *et al*. TAM GI50: Pre-clinical evaluation of cyclin-dependent kinase 2 and 1 inhibition in anti-estrogen-sensitive and resistant breast cancer cells. *Br J Cancer* 2010; 102: 342-50.
64. Milosevic J, Klinge J, Borg AL, Foukakis T, Bergh J, Tobin NP. Clinical instability of breast cancer markers is reflected in long-term in vitro estrogen deprivation studies. *BMC Cancer* 2013; 13: 473.
65. Jensen EV. Steroid hormones, receptors, and antagonists. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 784: 1-17.
66. Freifeld ML, Feil PD, Bardin CW. The in vivo regulation of the progesterone "receptor" in guinea pig uterus: dependence on estrogen and progesterone. *Steroids* 1974; 23: 93-103.
67. Delgallo WD, Rodrigues JR, Bueno SP, Viero RM, Soares CT. Cell blocks allow

- reliable evaluation of expression of basal (CK5/6) and luminal (CK8/18) cytokeratins and smooth muscle actin (SMA) in breast carcinoma. *Cytopathology* 2010; 21: 259-66.
68. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, *et al.* Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 264-71.
 69. Xie G, Zhan J, Tian Y, *et al.* Mammosphere cells from high-passage MCF7 cell line show variable loss of tumorigenicity and radioresistance. *Cancer Lett* 2012; 316: 53-61.
 70. Lengerke C, Fehm T, Kurth R, *et al.* Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. *BMC Cancer* 2011; 11: 42.
 71. Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 2005; 104: 2255-65.
 72. Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, *et al.* Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene* 2012; 31: 1354-65.
 73. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, *et al.* Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005; 65: 5506-11.
 74. Raffo D, Berardi DE, Pontiggia O, Todaro L, de Kier Joffe EB, Simian M. Tamoxifen selects for breast cancer cells with mammosphere forming capacity and increased growth rate. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 142: 537-48.
 75. Calcagno AM, Salcido CD, Gillet JP, *et al.* Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 1637-52.
 76. Liu H, Zhang HW, Sun XF, *et al.* Tamoxifen-resistant breast cancer cells possess cancer stem-like cell properties. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126: 3030-4.
 77. Yenigun VB, Ozpolat B, Kose GT. Response of CD44+/CD24-/low breast cancer stem/progenitor cells to tamoxifen and doxorubicin-induced autophagy. *Int J Mol Med* 2013; 31: 1477-83.
 78. Horimoto Y, Arakawa A, Harada-Shoji N, *et al.* Low FOXA1 expression predicts good response to neo-adjuvant chemotherapy resulting in good outcomes for luminal HER2-negative breast cancer cases. *Br J Cancer* 2015; 112: 345-51.
 79. Xu C, Wei Q, Guo J, *et al.* FOXA1 Expression Significantly Predict Response to Chemotherapy in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Patients. *Ann Surg Oncol* 2015; 22: 2034-9.
 80. Ma SR, Wang WM, Huang CF, Zhang WF, Sun ZJ. Anterior gradient protein 2

- expression in high grade head and neck squamous cell carcinoma correlated with cancer stem cell and epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget* 2015; 6: 8807-21.
81. Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, *et al.* Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature* 2012; 481: 389-93.
 82. Qiu M, Bao W, Wang J, *et al.* FOXA1 promotes tumor cell proliferation through AR involving the Notch pathway in endometrial cancer. *BMC Cancer* 2014; 14: 78.
 83. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-7.
 84. Ngo MA, Muller A, Li Y, *et al.* Human mesenchymal stem cells express a myofibroblastic phenotype in vitro: comparison to human cardiac myofibroblasts. *Mol Cell Biochem* 2014; 392: 187-204.
 85. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, *et al.* Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013; 15: 641-8.
 86. Shao MM, Chan SK, Yu AM, *et al.* Keratin expression in breast cancers. *Virchows Arch* 2012; 461: 313-22.
 87. Ordonez NG. Broad-spectrum immunohistochemical epithelial markers: a review. *Hum Pathol* 2013; 44: 1195-215.
 88. Brown DC, Theaker JM, Banks PM, Gatter KC, Mason DY. Cytokeratin expression in smooth muscle and smooth muscle tumours. *Histopathology* 1987; 11: 477-86.
 89. Zhao F, Zhang YF, Liu YG, *et al.* Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats. *Transplant Proc* 2008; 40: 1700-5.
 90. Perng CK, Ku HH, Chiou SH, *et al.* Evaluation of wound healing effect on skin-defect nude mice by using human dermis-derived mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2006; 38: 3086-7.
 91. Gong L, Wu Q, Song B, Lu B, Zhang Y. Differentiation of rat mesenchymal stem cells transplanted into the subretinal space of sodium iodate-injected rats. *Clin Experiment Ophthalmol* 2008; 36: 666-71.
 92. Nakagawa H, Akita S, Fukui M, Fujii T, Akino K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol* 2005; 153: 29-

- 36.
93. Stingl J, Eaves CJ, Kuusk U, Emerman JT. Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast. *Differentiation* 1998; 63: 201-13.
 94. Nishikata T, Ishikawa M, Matsuyama T, Takamatsu K, Fukuhara T, Konishi Y. Primary culture of breast cancer: a model system for epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells. *Anticancer Res* 2013; 33: 2867-73.
 95. Stimpfel M, Cerkovnik P, Novakovic S, Maver A, Virant-Klun I. Putative mesenchymal stem cells isolated from adult human ovaries. *J Assist Reprod Genet* 2014.
 96. Guan X, Ma X, Zhang L, Feng H, Ma Z. Evaluation of CD24 as a marker to rapidly define the mesenchymal stem cell phenotype and its differentiation in human nucleus pulposus. *Chin Med J (Engl)* 2014; 127: 1474-81.
 97. Pecot CV, Bischoff FZ, Mayer JA, *et al.* A novel platform for detection of CK+ and CK- CTCs. *Cancer Discov* 2011; 1: 580-6.
 98. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; 450: 1235-9.
 99. Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev* 2002; 16: 693-706.
 100. Wang R, Lv Q, Meng W, *et al.* Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis* 2014; 6: 829-37.

謝辞

本研究は、原尚人教授(筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 乳腺内分泌外科学)及び大根田修教授(筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命システム医学 再生医学・幹細胞生物学)のご指導のもと行ったものであり、深く感謝いたします。

本研究計画及びその遂行に際し、多くのご指導、ご助言をいただいた坂東裕子准教授(疾患制御医学専攻 乳腺内分泌外科学)及び実験手法に関してご指導、ご協力いただいた山下年晴助教(生命システム医学 再生医学・幹細胞生物学)、細胞培養実験に際し幾多のサポートをして頂いた同輩の白石章君に感謝いたします。細胞免疫化学染色につき、サポートいただきました筑波大学 Translational Research and Resource Core(TRRC)スタッフの皆様感謝申し上げます。

さらに、温かく見守っていただきました筑波大学乳腺甲状腺内分泌外科スタッフ各位及び再生幹細胞生物学研究室の高崎真美特任助教、大学院生の皆様に深甚なる感謝の意を表します。