



医療と技術

## 病理組織における 腫瘍幹細胞の可視化を目指して

森井 英一\*

Imaging of Cancer Initiating Cells in Surgical Pathology

Key Words : Cancer Initiating Cells Imaging Immunohistochemistry

### はじめに

病理組織診断では、細胞一個一個を丹念に観察し、その中に腫瘍細胞がいるか、いた場合にはどの程度の悪性なのか、悪性とすればどの程度まで腫瘍がひろがっているかということ判定している。病理診断をしながら感じることであるが、腫瘍細胞には形態的な多様性がある。もともと腫瘍細胞は一個の細胞からスタートしたはずであるにも関わらず、丸い形をしたり、長細くなったり、場合によってはいくつかの腫瘍細胞が集まって大型化したりする。多様性があるのは何も形態だけではなく、機能的にも多様性がみられる。腫瘍に対して化学療法や放射線療法が行われた後の病理標本では、明らかにダメージを来した腫瘍細胞がマクロファージに処理されつつある像もあれば、治療など何食わぬ顔で腫瘍が生存し続ける像もある。あくまでも、スタートは一個の腫瘍細胞であるにも関わらず、多様性を生じるのが腫瘍である。多様性が生まれる背景として、腫瘍では遺伝子変異が生じやすいことや、エピジェネティックな制御機構が働いていることなどがあげられるが、病理診断をしながら腫瘍をみていて興味のある点は、どういった腫瘍細胞が治療に抵抗するのかという点である。もし、そのような治療抵抗性の細胞を診断する時に明らかにすることができれば、現在

診断している腫瘍の未来像を述べるができるかもしれないからである。

医学部で学生講義をする時に、腫瘍を正常細胞とどのように見分けるか、腫瘍細胞の中でも、悪性のものと良性のものをどのように見分けるかを説明することが多い。細胞の核がどうか、細胞質と核との比率がどうか、正常っぽい部分と腫瘍と考えられる部分の間でフロントが形成されているか、など様々なポイントで説明するが、「結局は雰囲気です」と最後にいつも付け加える。たとえば少し悪いかもかもしれないが、雑踏の中を歩いている時、すれ違う人々の雰囲気を我々は感じて、あぶなそうな人がいれば無意識に微妙に避ける傾向にある。この「あぶなそう」を言葉でいろいろ説明すれば、多くのポイントがあげられるだろうが、我々は瞬時にその雰囲気を嗅ぎとっている。それは、これまでの人生経験に立脚した能力である。病理診断する時にも、この「雰囲気」を感じ取りながら仕事を進めて行くが、「雰囲気」を感じるには、多くの病理標本をみて、自分の行った診断の結果にヒヤリとしながら経験値を積み重ねる必要がある。さて、病理診断をする時に興味がある点と前述した、腫瘍細胞の中で治療に抵抗するものを雰囲気で見分けることができるかということであるが、私の経験上、不可能であると言わざるを得ない。腫瘍細胞の顔つきを見て、その腫瘍の予後がどうかを判定する時、基本的に正常に近い顔つきをしていれば、予後がよい傾向にある。正常に近い顔つきをしている腫瘍は「高分化」、正常とかけはなれた顔つきには「低分化」とつけて、一般に低分化腫瘍は予後が不良である。ところが、同じ「高分化」の腫瘍であっても、治療に抵抗する症例と反応する症例がある。あとで見比べてみても、なぜ片方が反応し、もう一方が抵抗を示したのかわからない。つまり、単に腫瘍の「顔つき」を見ていても治



\*Eiichi MORII

1964年4月生  
大阪大学大学院 医学系研究科卒業  
(1996年)  
現在、大阪大学 医学系研究科 病態病理学 教授 医学博士 病理学  
TEL : 06-6879-3710  
FAX : 06-6879-3719  
E-mail : morii@molpath.med.osaka-u.ac.jp

療に抵抗する腫瘍細胞はわからないことになる。そこで、何らかのマーカの開発が必要と考えられる。腫瘍細胞の中には治療に抵抗する一群の集団があり、「腫瘍幹細胞」と呼ばれる。本稿では、「腫瘍幹細胞」に焦点をあて、その可視化をはかる試みについて述べたい。

## 腫瘍幹細胞とは

腫瘍は集団で存在することが普通であるが、腫瘍細胞を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形成できる細胞が実はごく僅かしか存在しないことは50年以上前に報告されている。倫理上多大な問題のある研究だが、腫瘍をもつ35人より各々 $10^9$ 個の腫瘍細胞を単離し自家移植したという研究がある。その結果、腫瘍が再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細胞は存在しなかったことになる。もちろん、この移植された $10^9$ 個の腫瘍細胞のうち、はたしてどの程度が viable な細胞であったのかについては不明で、現在となつては当然追試験することもできない。しかし、腫瘍細胞の中で腫瘍を再び形成できる細胞の数が少ないことは事実であろう。このような、腫瘍の中に存在する「移植により腫瘍を再形成できる」腫瘍細胞が腫瘍幹細胞である。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。

正常の幹細胞は、一方向の分化を示す。つまり、幹細胞から分化した細胞は二度と後戻りすることはなく、分化した細胞から幹細胞ができることはない。ところが、最近の報告によれば、腫瘍幹細胞から多様な形質を示す腫瘍細胞になった細胞からも、再び腫瘍幹細胞が生じる<sup>2)</sup>。その点で、腫瘍幹細胞という名称はふさわしくない。免疫不全マウスに移植した時に腫瘍を再度形成できる細胞という意味で、「腫

瘍開始細胞」と呼ぶ方が正確な言い回しであるが、ここでは慣例にしたがって腫瘍幹細胞と呼ぶ。

腫瘍幹細胞であるかどうかのアッセイは、腫瘍細胞を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とされる。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>3)</sup>。彼らは、白血病細胞中で CD34 陽性 CD38 陰性という性質をもつ少数の細胞のみが免疫不全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>4)</sup>。CD44 陽性 CD24 陰性という性質をもつ乳癌細胞のみが免疫不全マウスに移植された場合に腫瘍を形成した。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>5)</sup>。

CD34 や、CD38, CD44, CD24, CD133 といったマーカーは、いずれも細胞表面に存在する蛋白質であり、フローサイトメトリーで腫瘍細胞を染め分けて、腫瘍の中から特定の形質をもつ集団を単離するのに便利なマーカーである。ところが、病理診断する時には、あくまでも腫瘍の固まりを薄くスライスした切片を相手にしており、フローサイトメトリーで解析対象としているバラバラにされた細胞を相手にするわけではない。病理診断をする時に腫瘍幹細胞を腫瘍の切片上で見ることができれば便利なのであるが、ここで問題なのは、腫瘍幹細胞とそれ以外の細胞を切片上で顕微鏡を通して「顔つき」で見分けることができるかということである。病理診断する時に、標本はヘマトキシリン・エオジン染色という方法で色をつけられる。核を青く、細胞質を赤く染める方法で、染色方法の基本中の基本である。ヘマトキシリン・エオジン染色で腫瘍幹細胞を見分けることができれば、病理診断する時に腫瘍の「顔つき」で判断することができることになり、非常に価値のあることである。ところが、乳癌の腫瘍幹細胞の論文に明記されているが<sup>4)</sup>、通常の染色方法で形態学的に腫瘍幹細胞とそれ以外の細胞を見分けることは不可能である。そこで、通常の染色方法では

なく、免疫染色によって病理標本の中で腫瘍幹細胞をクローズアップする必要が生じる。免疫染色とは、ある蛋白質に対する抗体を切片上で反応させ、その抗体に色をつけることで目的の蛋白質の局在を切片上で可視化する染色方法である。つまり、腫瘍幹細胞に特異的な蛋白質をマーカーとして用いて、その蛋白質に対する抗体で免疫染色することで、腫瘍幹細胞の可視化が可能となる。

### 薬物代謝酵素を利用した腫瘍幹細胞の描出

治療に抵抗する腫瘍細胞では、薬物を代謝する酵素、あるいは薬物を外部へ排出するトランスポーターの活性が高いことが知られている。治療抵抗性の腫瘍細胞を腫瘍幹細胞とほぼ同じ細胞と考え、薬物代謝や排泄に関連した蛋白質を腫瘍幹細胞の描出におけるツールとして用いることができるかもしれない。

ABCトランスポーターは、薬物を腫瘍細胞の外へ排出するトランスポーターとして知られている。ABCは、ATP-binding cassetteの頭文字で、ABCトランスポーターとはATPのエネルギーを用いて物質の輸送を行うトランスポーターの総称である。船底に穴があいて沈みつつある船から必死で水を掻き出している状況と似ているが、腫瘍細胞の中に蓄積されつつある薬物をできるだけ効率よく排泄するポンプがABCトランスポーターである。効率よく薬物を排泄できた腫瘍細胞が生き残るわけである。この性質を利用して、治療抵抗性の腫瘍細胞を描出する方法が開発された。緑色蛍光を発するヘキスト色素で腫瘍細胞を染色した後、しばらく培養するとABCトランスポーターの活性の高い腫瘍細胞では色素を効率よく排泄する。その結果、細胞内の色素濃度が低下する。そこに紫外線をあてると、色素濃度の高い細胞は強い散乱光を発するのに対し、ABCトランスポーターの活性の高い細胞では弱い散乱光しか発しない。この弱い散乱光しか発しない細胞群が薬物排泄機能の高い細胞である。大半の腫瘍細胞が強い散乱光を発するのに対し、弱い散乱光しか発しない細胞群はわずかである。そこで、前者をmain population (MP)、後者をside population (SP)と呼ぶ(図1)。正常の造血幹細胞はSPの分画に存在することが知られており、腫瘍幹細胞もこ

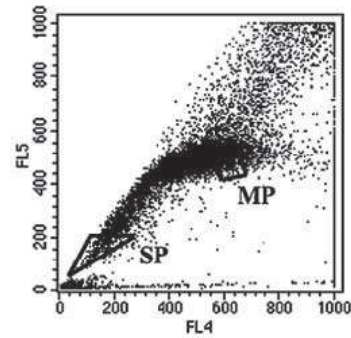


図1：Side population (SP)の描出  
腫瘍細胞をヘキスト色素で染色すると、薬物排泄能の高い細胞では色素濃度が相対的に低下する。このため、これらの細胞は弱い散乱光しか発しないSP分画に含まれるようになる。これに対し、大半の腫瘍細胞はMP分画に存在する。(文献6より一部改変)

の分画に多く含まれるとされている。実際、SP分画に存在する腫瘍細胞はアポトーシス抵抗性を持ち、薬物抵抗性がある<sup>6)</sup>。ABCトランスポーターには様々な種類があるが、SP分画の薬物排泄に関与するABCトランスポーターはABCG2である。ところが、実際の病理標本でABCG2に対する抗体を用いて免疫染色しても、なかなか腫瘍がきれいに染色できず、現在のところ、病理標本上で治療抵抗性にある細胞を描出するためのツールとしては、少なくとも我々はまだ応用することはできていない。

アルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase (ALDH)) は薬物代謝に関与する蛋白質である。アルデヒドは細胞毒性を持ち、速やかに酸化されてカルボキシル基をもつ物質に代謝される必要がある。この過程に関与する酵素がALDHである。ALDHは腫瘍幹細胞でも豊富に存在することが見出されつつある<sup>7)</sup>。フローサイトメトリーで腫瘍細胞の中でALDH活性の高い部分のみを描出する方法がAldefluorアッセイである。Aldefluorアッセイでは、通常は蛍光を発さないがALDHによる酸化で強い蛍光を発するBodipy-aminoacetaldehydeという物質を利用する。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は蛍光物質に変換される。しかし、ALDHの活性を阻害する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非存在下で蛍光を発するが、DEAB存在下では蛍光を



失う画分が、高いALDH活性をもつ細胞を含むことになる(図2)。

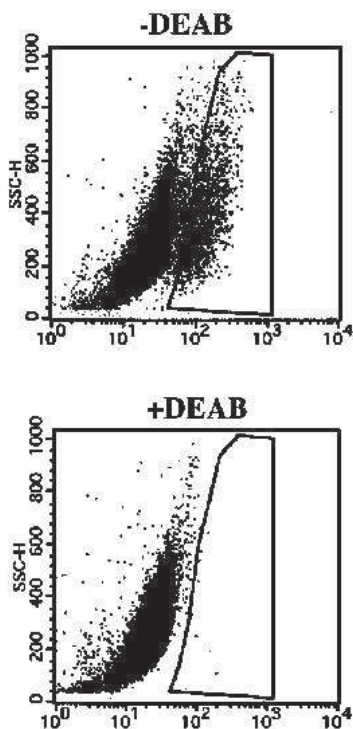


図2: Aldefluor アッセイ  
ALDH 活性の高い細胞(線で囲んだ領域に含まれる)は DEAB 非存在下では強い蛍光を発するが、DEAB により、この蛍光は減弱する。

ALDH 蛋白質に対する抗体を用いた免疫染色は、病理標本で成功している。たとえば、子宮内膜癌の一種である類内膜細胞癌を染色すると、腫瘍細胞のごく一部の細胞だけが陽性像を示し、ALDH の発現に限られた腫瘍細胞のみで認められることがわかる(図3) <sup>7)</sup>。ALDH 発現細胞の多い症例と少ない症例を比較したところ、リンパ節へ転移する確率や再発する確率など、悪性の指標が高い症例ほど ALDH 発現細胞が多い傾向にあることがわかった。このことは、ALDH 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 ALDH 活性の高い細胞と低い細胞が混在しており、ALDH 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 <sup>7)</sup>。また、ALDH 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、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。

### 今後の展開

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、静止期にある腫瘍幹細胞には有効

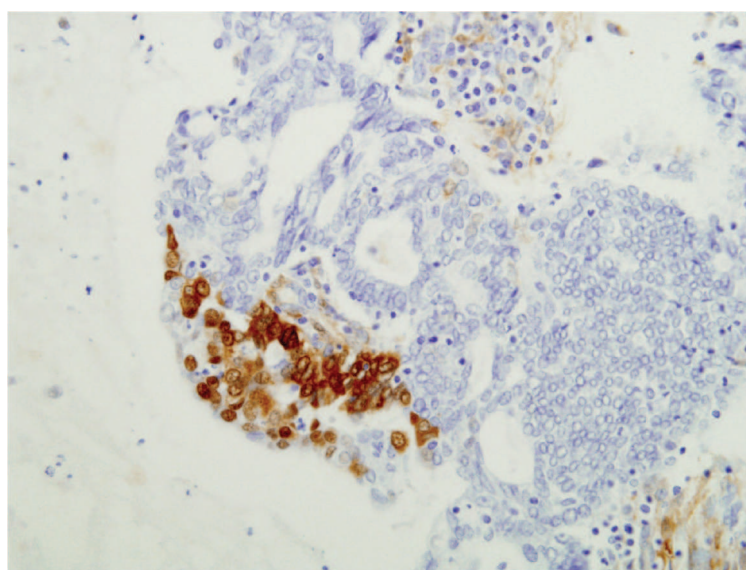


図3: ALDH の免疫染色  
腫瘍細胞の一部が茶色く染色され、これらの細胞が ALDH 陽性である。

でない。腫瘍幹細胞はニッチと呼ばれる特殊な環境に存在しており、静止期にとどまるようなシグナルを受けていることが想定されているが、現実的にニッチを可視化することはできていない。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であるニッチを破壊できるような薬剤も今後開発される可能性がある。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、さらにその分子を病理切片上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ものと考えられる。

### 参考文献

- 1) Southam CM, Brunshwig A, Dizon Q. Autologous and homologous transplantation of human cancer. In; Brennan MJ, Simpson WL (eds). Biological interactions in normal and neoplastic growth. pp 723-738. Boston, Massachusetts: Little, Brown and Co., 1962.
- 2) Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. Nat Med 17: 313-319, 2011.
- 3) Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 3: 730-737, 1997.
- 4) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of human brain tumor initiating cells. Proc Natl Acad Sci USA 100: 3983-3988, 2003.
- 5) Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res 63: 5821-5828, 2003.
- 6) Xu JX, Morii E, Liu Y, Nakamichi N, Ikeda J, Kimura H, Aozasa K. High tolerance to apoptotic stimuli induced by serum depletion and ceramide in side-population cells: high expression of CD55 as a novel character for side-population. Exp Cell Res 313: 1877-1885, 2007.
- 7) Rahadiani N, Ikeda J, Mamat S, Matsuzaki S, Ueda Y, Umehara R, Tian T, Wang Y, Enomoto T, Kimura T, Aozasa K, Morii E. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in endometrioid adenocarcinoma and its clinical implications. Cancer Sci 102: 903-908, 2011.

