

がん幹細胞検出のためのアルデヒド脱水素酵素1応答性蛍光プローブ

ALDH1-reponsive fluorescent probes for cancer stem cell detection

三木 康嗣¹, 大江 浩一¹
Koji Miki¹, Kouichi Ohe¹

1. 京都大学大学院工学研究科
1. Graduate School of Engineering, Kyoto University

連絡先: kojimiki@scl.kyoto-u.ac.jp; ohe@scl.kyoto-u.ac.jp

要約

がんの多様性や可塑性を理解したり、化学療法や放射線治療への抵抗能やがんの転移能を解明する上で、がん幹細胞 (cancer stem(-like) cell: CSC) の存在が注目されている。CSCは、蛍光ラベル化したモノクローナル抗体により区別された特異な細胞表面抗原を提示する表現型として認識されている。近年、レチナールなど生体内アルデヒドの代謝にかかわるアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) が CSCの内在性バイオマーカーとして注目されている。特に、ALDHのホルミル基をカルボキシ基へと変換する機能に注目した低分子蛍光プローブの開発が盛んである。大別すると、市販されているAldefluorTMに代表される光を照射すれば常時発光するalways-on型プローブとALDHに応答すると発光するturn-on型プローブがある。本総説では、ALDH応答性蛍光プローブの特徴と展望について概説する。

キーワード: 蛍光プローブ, がん幹細胞, アルデヒド脱水素酵素, イメージング

Abstract

For a better understanding of cancer heterogeneity and plasticity, many researchers have paid much attention on cancer stem-like cells (CSCs), which are related to self-renewal, differentiation, therapeutic resistance, and metastasis. To detect and isolate CSCs, many researchers have been focusing their attention on biomarkers overexpressed in CSCs. It is well-known that aldehyde dehydrogenases (ALDHs), which

transform biological aldehydes such as retinal into the corresponding carboxylic acids, are one of critical intracellular enzymes overexpressed in CSCs. Focusing on the enzymatic transformation of formyl group, “always-on”-type fluorescence probes such as AldefluorTM were developed. Recently, by utilizing some “turn-on”-type fluorescence probes, which emit fluorescence after ALDH-mediated transformation, high-contrast CSC visualization and isolation were achieved. In this review, the perspective of ALDH-responsive fluorescence probes is also summarized.

Keywords: fluorescence probe, cancer stem cell, aldehyde dehydrogenase, imaging

1. はじめに

がんは日本人の死因の30%程度を占める疾患であるが、その発生については諸説議論されている。クローン進化モデル (clonal evolution model) ¹では、直線的なクローン進化により悪性度の高い細胞集団が発現するとされる説であり、ダーウィンの進化論の観点からも理解しやすい。一方、がん幹細胞仮説 (cancer stem cell hypothesis) ^{2,3}として知られる未分化がん幹細胞(もしくはがん幹細胞様細胞と呼ぶべきかもしれない。ここではcancer stem(-like) cell: CSCと略す) が親玉としてがん細胞を生み出すという説も古くから提唱されている。特異な酵素などを発現している細胞集団が化学療法や放射線療法に耐性を示すという実験結果などからCSCと見なすことのできる表

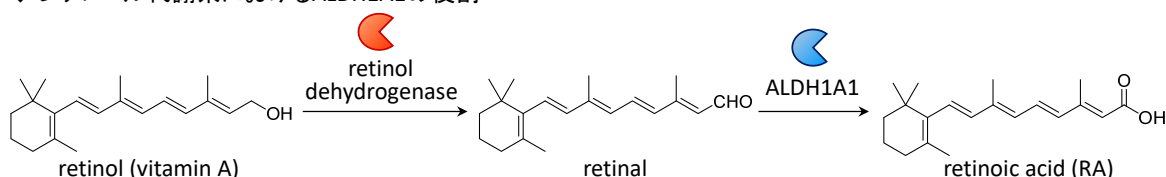
現型が存在することが認識されており^{4,5}、クローン進化モデルだけでは説明できないところがある。ただ、iPS細胞の発見や分化後のがん細胞からCSCが生じる現象などを考慮し、最近ではがんの多様性（もしくは不均一性：heterogeneity）と可塑性（plasticity）の観点から包括的に理解されつつある^{6,7}。このような背景のもと、CSCの多寡はがんの悪性度に直結することは間違いないと考えられており、CSCの存在を評価する手法が開発されてきた。特に、細胞表面に提示される物質（抗原）を識別するモノクローナル抗体の種類で区別する手法は、分子生物学を中心に深く研究されている⁴。このように、モノクローナル抗体をラベル化し、CSCを可視化する手法はあるものの、プローブ全体の分子サイズが極めて大きくなることや光照射により常時発光する（always-on型）発光団しか利用できないことから抗原提示量が低いCSCの高コントラストな検出には難があると考えられる。一方、アルデヒド脱水素酵素1（aldehyde dehydrogenase 1: ALDH1）はCSCの細胞内バイオマーカーの1つとして広く認識されている⁸⁻¹¹。分子サイズが小さいalways-on型プローブだけでなく、ALDH1に応答し発光するturn-on型プローブも開発さ

れている。本総説ではCSCを対象とする研究に欠かせない分子プローブの中でも、ALDH1活性を利用しCSCを識別する発光性分子プローブについて紹介する。

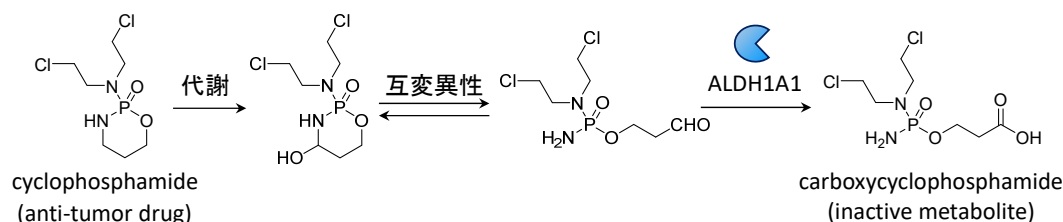
2. アルデヒド脱水素酵素

アルデヒド脱水素酵素（aldehyde dehydrogenase: ALDH）は主に細胞質に発現する酵素であり、生体内に存在するアルデヒドを酸化しカルボン酸へと変換する機能をもつ（図1a）⁸⁻¹¹。抗がん剤シクロホスファミドを不活性化することができるため、がんの薬剤耐性の原因の1つである。活性中心はシステインのメルカプト基であり、生体内電子伝達体であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（nicotinamide adenine dinucleotide: NAD）を基質認識部位近辺に取り込み補酵素として活用することで酸化反応を起こす。酒類に含まれるエタノールから発生するアセトアルデヒドを酢酸へと変換する際にもALDHが働いている。ただし、ALDHには19種類のisoformが知られており¹²、アセトアルデヒドを酸化する酵素は主にALDH2などである（図1b）。

(a) ◆ レチノール代謝系におけるALDH1A1の役割



◆ 抗がん剤シクロホスファミドの不活性化におけるALDH1A1の役割



(b)

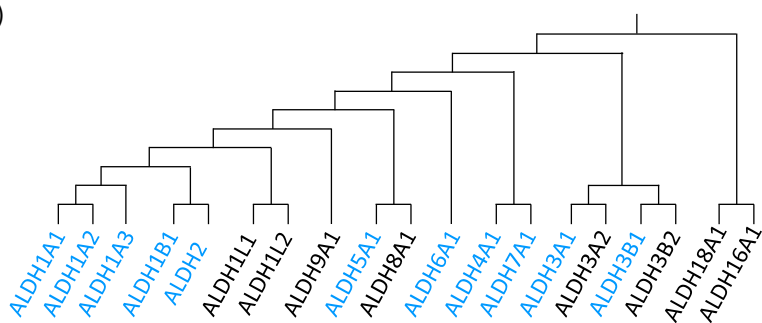


図1. (a) ALDH1A1の酵素活性と機能。 (b) ALDHのisoform。青で示すisoformはがん細胞で発現し悪性度に直結していることが示唆されている。

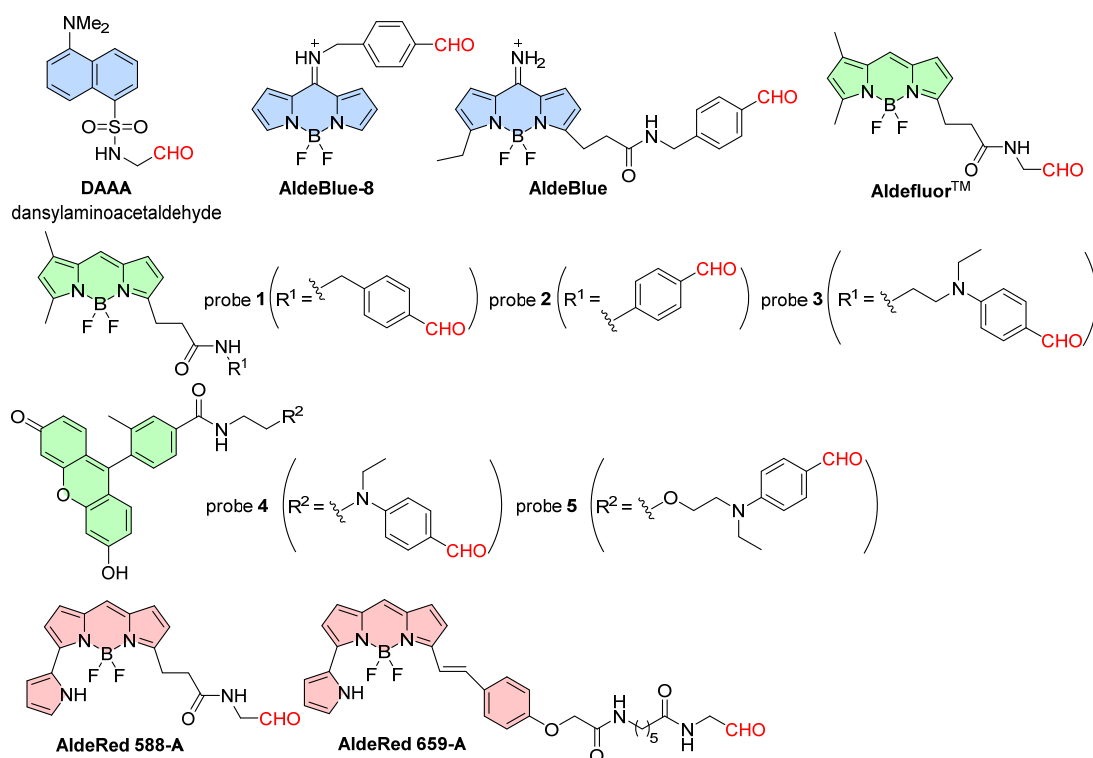


図2. ALDH1検出用always-on型プローブ.

アルデヒドを酸化しカルボン酸へと変換する酸化反応として生体内で重要な位置を占めるものがレチナールの酸化によるレチノイン酸の産生である (図1a) ⁸⁻¹¹. なお、レチナールは酸化酵素によるレチノール (ビタミンA) の酸化を経て生成する。レチノイン酸は細胞の分化や生長、アポトーシス制御に用いられており、CSCの機能制御に重要な役割を果たす。CSCでは特に、レチナールを基質とするALDH1A1の活性が高いことが知られている。その他にも、レチナールを基質とするALDH1A2、ALDH1A3、ALDH1B1や他のアルデヒド類を基質とするALDH2、ALDH3A1、ALDH3B1、ALDH4A1、ALDH5A1、ALDH6A1、ALDH7A1などもがんの悪性度に関与していることが報告されている⁸。このようにALDHにはCSCとの関連が未解明なisoformも多いが、その一部はがんの悪性度に直結する重要な酵素群であり、CSCにおいて高発現しているものと推定される。これらを背景に、がんの悪性度の評価、CSCの可視化を視野に、ALDH類の活性を捉える分子プローブの開発が検討された。

3. always-on型分子プローブ

ALDH1の活性を検出する蛍光性分子プローブの先駆けはpush-pull型発光団として知られるダンシル基 (5-

dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl) に基質となるホルミル基を結合させた化合物 dansylaminoacetoaldehyde **DAAA**である (図2) ¹³. そのCSC選択的な染色には、電荷の有無に起因した膜透過能の差を活用している¹⁴. その機構は以下のとおりである。脂溶性でかつ電荷をもたない分子プローブである**DAAA**は細胞膜を透過することが可能であり、作用させた**DAAA**のうちある一定量は通常のがん細胞 (normal cancer cell: NCC) においてもCSCの場合と同じように細胞外から細胞内、またその逆方向へと行き来する。NCC内ではALDH1が高発現していないため再度膜透過し細胞外へ出るものもある。一方、CSCでは**DAAA**に含まれるホルミル基がALDH1により酸化されカルボキシ基へと変換される。中性条件では大半のカルボキシ基は脱プロトン化しカルボキシラートとして存在するため、酵素反応後の生成物 dansylglycineはアニオン性物質となる。dansylglycineはアニオン性リン脂質で構成される細胞膜と静電反発し膜透過が阻害されるためCSC内に留まることとなる。この効果によりCSC内にdansylglycineが蓄積し、CSCの発光強度が相対的に増大することになる。ただ、always-on型である**DAAA**が一定量NCC内に留まるため、コントラストの観点から共焦点レーザー顕微鏡を用いるCSCの検出

には不向きとされる。これらを踏まえ、フローサイトメトリ分析によりALDH活性の高い細胞種の識別に利用されている。また、ALDH活性の高い細胞種は抗がん剤であるシクロホスファミド系薬剤 4-ヒドロキシシクロホスファミド (4-HC) への耐性が高いことが示されている。360 nm前後の励起光を用い、検出波長521 nmでフローサイトメトリ分析が行われているが、モル吸光係数が低い ($\epsilon = 4480$ at 335 nm in acetone) ことを考慮すると、発光団の改良が望まれる。

1999年、後に**Aldefluor**TMとして市販されるBODIPY類緑体が報告された¹⁵。蛍光活性化セルソーティング (fluorescence-activated cell sorting: FACS) によりCSCを分取する技術が確立され、CSCをターゲットとする研究では汎用されている。そのCSC選択的な染色機構は**DAAA**と同様である。そのため、**DAAA**と同様に共焦点レーザー顕微鏡でのCSCの識別には適用しにくい。しかし、「はじめに」で説明したように発がん機構に未知の部分が多い中で、CSCの有無を評価でき、CSC分取にも有効な**Aldefluor**TMは画期的な分子プローブとして注目され、開発後20年が経つ現在でもALDH1検出用分子プローブのgolden standardとして研究者に重用されている。

AldefluorTM assay kitとして市販されている分子プローブは、**Aldefluor**TMのホルミル基がアセタールへと変換された化合物であり、使用前に酸処理により変換する必要がある¹⁵。**Aldefluor**TMの光吸収・発光波長は報告されていないが、この前駆体の吸発光波長は495 nm / 512 nmであり**Aldefluor**TMも同様の値を示すと考えられる。そのため、汎用される緑色系染色剤や発光タンパク質との併用ができない。これらを背景に、類似のBODIPYを発光団にもつ改良型分子プローブが開発された。Min、Wangらは**Aldefluor**TMの発光団であるBODIPYの α 位に2-ピロリル基を結合させパイ共役系の拡張を検討した¹⁶。開発された分子プローブ**AldeRed 588-A**および**AldeRed 659-A**の吸発光波長は報告されていないが、前駆体であるアセタールの吸発光波長はそれぞれ588 nm / 599 nmおよび659 nm / 671 nmである。**AldeRed 588-A**については、フローサイトメトリ分析においてNCCとCSCの識別が可能であることが示されている。*in vivo*イメージングへの利用が期待される**AldeRed 659-A**は残念ながら阻害剤による阻害効果が確認できず、CSCの識別、分取には向かないことも示されている。

最近、Yagishitaらは多色染色を目的に青色発光を示す

BODIPY類緑体を修飾し、ALDH1活性を検出する分子プローブ**AldeBlue**および**AldeBlue-8**を開発した¹⁷。どちらもALDH1A1、ALDH1A2、ALDH1A3に応答することから、CSCで発現するALDH1群を網羅的に検出できる可能性がある。**AldeBlue**はALDH3A1に 応 答 する が、**AldeBlue-8**はALDH3A1には応答しない。なお、Yagishita、UranoらはALDH1A1だけでなくALDH1A3やALDH3A1に 応 答 する 一 連 の 緑 色 発 光 性 色 素 probe 1–5を報告している¹⁸。probe 1–3は**Aldefluor**TMと発光団が同じである。probe 4と5はフロオレセイン誘導体であるTokyoGreenを発光団とし、5の吸収極大と発光極大はそれぞれ494 nmと516 nmであり、**Aldefluor**TMの吸発光波長とほぼ同じ値である。なお、probe 5はALDH1A1、ALDH3A1に 応 答 する が、probe 4は 応 答 しない。これらの知見は、単純に発光団に基質であるホルミル基を結合させるだけでは望みの機能を持たない可能性が高いことを示す。実験的に得られた知見に加え、酵素活性中心付近の構造とプローブの分子構造や極性を深く理解することが親和性と選択性の高いプローブ創製に極めて重要である。

4. turn-on型分子プローブ

前項で示した通り、**Aldefluor**TMを始め、ALDH1に 応 答 する 様 々 な always-on型プローブが開発されてきた。しかし、always-on型プローブはALDH1 応 答 前 でも 光 照 射 に よ り 発 光 する ため、プローブを作用させた後未反応のプローブを除去する必要がある。また、ALDH1を発現していない細胞内にも一定量の未反応のプローブが残存するため、顕微鏡観察においてコントラスト良く1細胞レベルでCSCを識別することは困難なことが多い。そこで、MurthyらはALDH1により変換されるホルミル基をパイ共役系に直結したpush-pull型分子プローブ**TBA**を設計した (図3)¹⁹。このプローブはALDH1に 応 答 した 際 に 発 光 波 長 が 変 化 する 波 長 シ フ ト 型 分 子 プ ロ ー ブ である。**TBA**は分子内電荷移動 (intramolecular charge transfer: ICT) により生じる励起子から発光するためStokes shiftが110~190 nmと大きな値を示す。ALDHによる変換反応で生じるカルボキシラートはホルミル基に比べて電子求引能が低いため、ICTの効果が弱く吸収波長が浅色シフトしStokes shiftも小さくなる。そのためALDHで変換されて生じるカルボキシラート**TBC**の発光波長は70~110 nm程度短波長側に観測される。特に、**TBA2**では**TBC2**の発光極大波長において214倍も発光量が増大する。4種類の

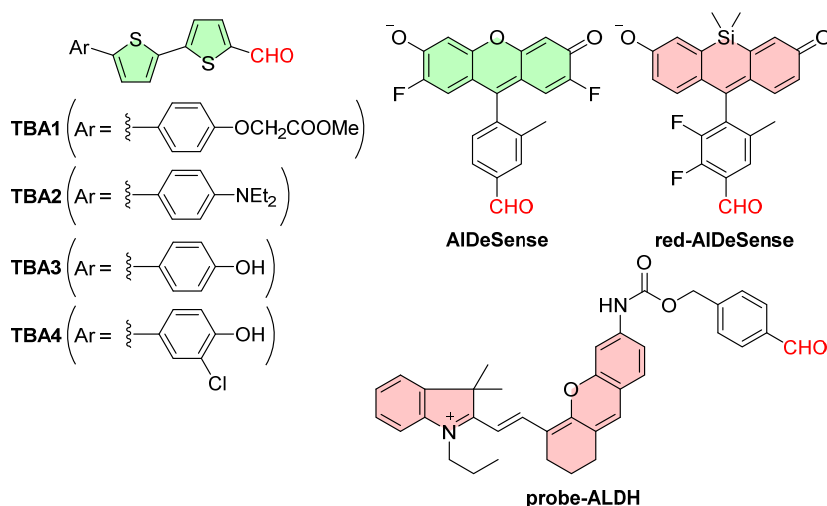


図3. ALDH1応答性分子プローブ TBA、AlDeSenseおよびprobe-ALDH.

TBAはいずれもALDH1A1、ALDH3A1、ALDH3A2に応答するが、ALDH1A3やALDH2については応答するものとしていないものがある。5-thienylthiophene-2-carboxaldehyde構造が共通であることからこのようなisoform選択性が生じる点は興味深い。

ALDH1と反応する前は無蛍光状態であるが、反応後発光するようになるturn-on型プローブが近年注目されている。Chanらは、Pennsylvania Green発光団で生じる励起子がdonor-photoinduced electron transfer (d-PeT)により効果的に発光クエンチされる**AlDeSense**を開発した(図3)²⁰。共焦点レーザー顕微鏡によりCSCとNCCを明確に区別できることが示された。CSC性の高い腫瘍様塊においても**AlDeSense**は強い発光を示した。また、FACSで得たCSCを多く含む細胞群を用い作成した肺転移モデルマウスから摘出した肺においても、**AlDeSense**はCSCが有意に含まれていることを示した。このように**AlDeSense**はturn-on型ALDH1応答性プローブの先駆けとしてCSCの1細胞レベルでの観察や*ex vivo*での利用に道を付けた。ただし、**AlDeSense**は緑色発光性プローブであるため、*in vivo*実験や臨床現場には適用しにくい。Chanらはシリコン置換キサンテン色素を発光団に持つ**red-AlDeSense**を後年発表している²¹。PeTは原理上赤色領域より長波長領域では適用しにくい、置換基を工夫することにより吸発光波長の長波長化を達成した。フルオレセインでラベル化された抗CD44抗体との共染色も可能である。ただし、吸発光波長は594 nm / 614 nmであり、*in vivo*応用に適した近赤外吸発光特性の実現には至っていない。なお、ごく最近PeTに基づくturn-on型プローブとしてヘミシアニン骨

格をもつ**probe-ALDH**が報告された²²。ただ、ALDHのisoformに関する記述がなく、HepG2細胞全体から発光が観察されていることからCSCの検出には至っていない可能性もあり、続報が待たれる。

ごく最近、Miki、Oheらは赤から近赤外領域で発光するALDH1A1応答性turn-on型プローブ**C5S-A**および**C7S-A**を開発した(図4a)²³。発光団であるシアニン色素は、求核性消光基(nucleophilic quencher)によりパイ共役系が分断され消光状態である。開発されたプローブは、この消光状態の構造と基質であるホルミル基をアルキル鎖により連結されている。なお、求核性消光基のイミニウムカチオン部分への求核付加は可逆であり、中性条件では求核性消光基の付加した閉環体と脱離した開環体との平衡は閉環体側に偏り消光している。一方、酸性条件ではチアジナン環がプロトン化を契機に開環し、発光性シアニン色素(開環体)が主となる。ALDH1A1に応答し生じる**C5S-C**および**C7S-C**は分子内カルボキシ基をもつ(吸発光波長はそれぞれ642 nm / 666 nmおよび744 nm / 773 nmである)。適度な距離にプロトン源が存在するため、チアジナン環の開環が促進され、中性条件でも開環体が優先発生し発光する。なお、カルボキシ基は中性条件では主にカルボキシラートとして存在するため、開環後に生じるイミニウムカチオンとの静電相互作用により開環体が安定化されるため平衡が開環体側に偏ると説明することもできる。このようにカルボキシ基(カルボキシラート)が求核性消光基の脱離を促進し、蛍光状態へと活性化する活性化基(activator)として機能していることから、このturn-on機構はactivator-induced nucleophilic quencher

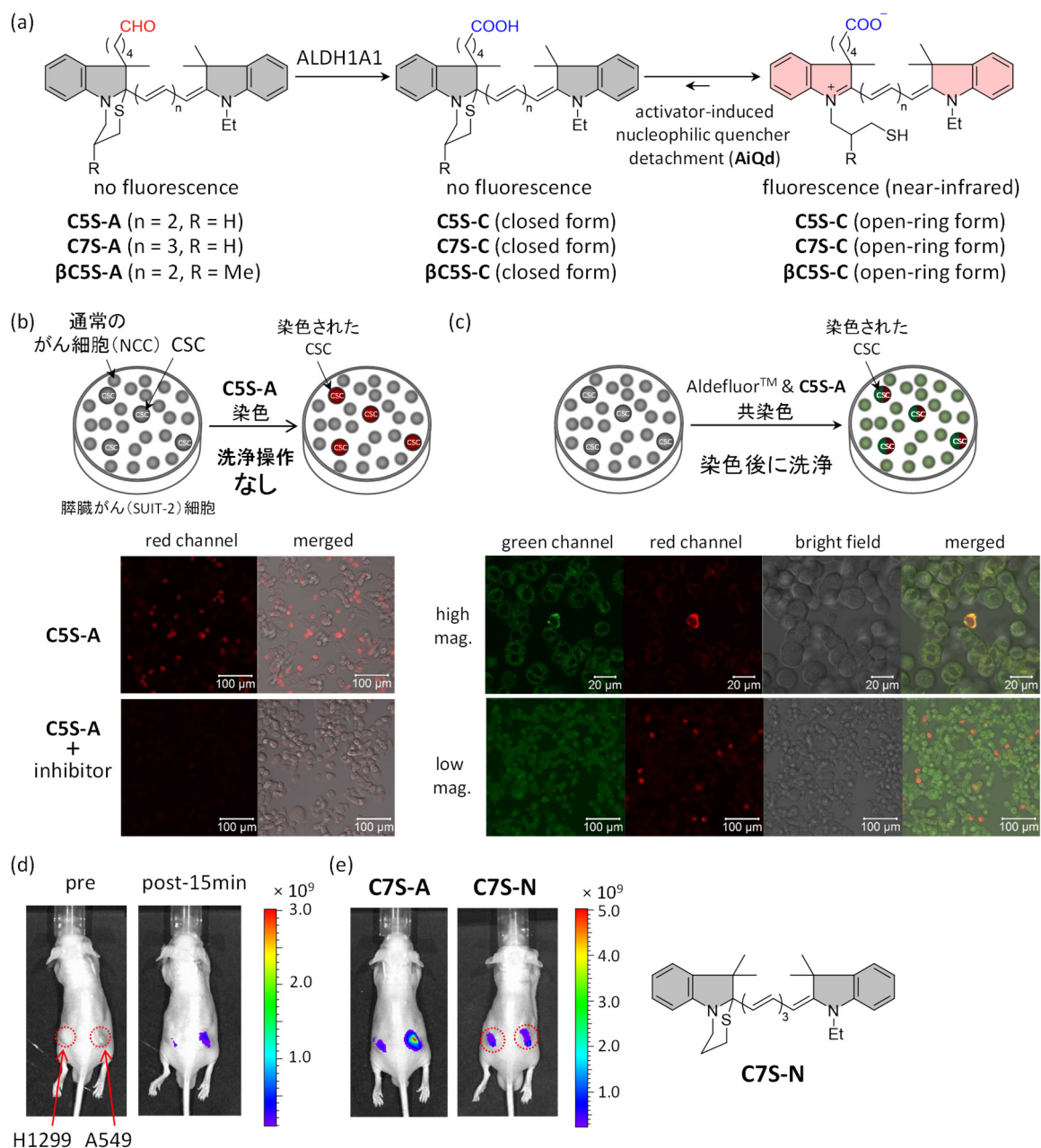


図4. (a) ALDH1A1応答性プローブC5S-A、C7S-Aおよび β C5S-A. (b) C5S-Aを用い洗浄操作なしでSUIT-2細胞を観察した共焦点レーザー顕微鏡画像. inhibitor: disulfiram. (c) C5S-AとAldefluorTMで共染色したSUIT-2細胞を観察した共焦点レーザー顕微鏡画像. (d) C7S-Aを用いるマウスに移植したALDH1A1活性の高い腫瘍の検出. (e) C7S-AとALDH1A1応答性をもたないプローブC7S-Nとの比較. (文献23より許可を得て転載)

detachment (AiQd) と名付けられている²⁴. カルボキシ基 (カルボキシレート) が生じる酵素反応に適用できるため、AiQdを利用するturn-on型発光プローブの対象としてアセチルコリンエステラーゼなどエステラーゼにも適用できる²⁵.

C5S-AはAlDeSenseと同様に共焦点レーザー顕微鏡観察において明確にCSCを識別した (図4b)。**AldefluorTM**を用い共局在性を検証したところ、良い一致を示した (図4c)。このように緑色発光性分子との共局在試験も容易で

ある。なお、always-on型の**AldefluorTM**を用いると高倍率画像においてCSCが識別可能であるが、低倍率では識別が困難であり、顕微鏡を用いるCSC検出に不向きであることがわかる。一方、**C5S-A**を用いるとバックグラウンド発光量が低いため低倍率でも容易にCSCを識別できる。このことに加え、**C5S-A**が酵素応答前にはほぼ発光しないことから、**C5S-A**による染色では**C5S-A**を含む培地を交換せずとも同様の像が得られる点も特徴である。**AldefluorTM**と同様に、**C5S-A**により染色したがん細胞群

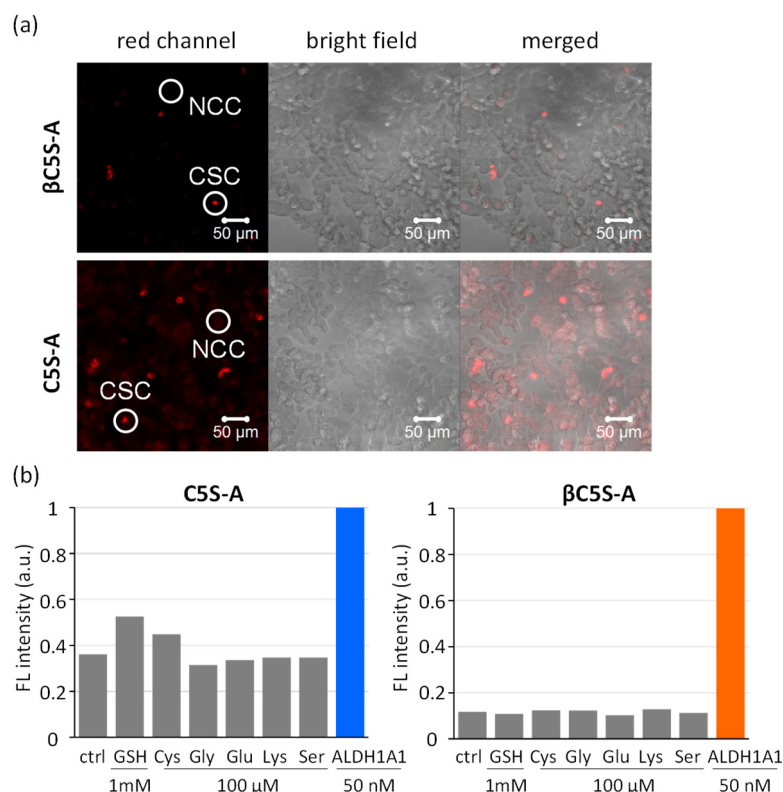


図5. (a) C5S-AもしくはβC5S-Aを用い洗浄操作なしでSUIT-2細胞を観察した共焦点レーザー顕微鏡画像。 (b) C5S-AもしくはβC5S-Aに様々な生体内物質を作用させた際の発光量変化 (37 °C, 60 min) 。 (文献27より許可を得て転載)

をFACSにより分取することも可能である。なお、**C5S-C**は双性イオン化合物であるため、通常の有機アニオントランスポーターによる排泄が起こりにくいと考えられる。

Aldefluor™は染色1日後には細胞内からその発光はほぼ観察されなくなるが、**C5S-A**の場合染色3日後においても発光が確認され、CSCを識別できることがわかった²⁶。長時間にわたるCSCの観察、例えばCSCの細胞分裂を追跡できるツールとして期待される。

この**C5S-A**の高コントラストにCSCを識別できる性能を活かし、**C5S-A**で染色した細胞群に抗がん剤を作用させ生き残る細胞を評価したところ、投与する前に比べ投与後は強く発光する細胞の割合が大きく増大することが示された²⁶。このことは、ALDH1A1を発現するCSCが薬剤耐性を示すことを支持する結果である。

C7S-Aは**C7S-C**へと変換されると近赤外発光するため、生体イメージングに適している²²。ALDH1A1活性の高いヒト肺基底上皮腺癌細胞A549とALDH1A1活性の低いヒト非小細胞肺癌細胞H1299をマウスに移植し、それぞれの部位に**C7S-A**を投与することでALDH1A1活性の違いを識別できることが示された (図4d, 4e)。また、ヒト膵臓がん細胞 SUIT-2をFACSによりCSCを多く含む

細胞群とCSCをほぼ含まない細胞群に分け、それぞれマウスに移植した後に**C7S-A**を投与したところ、CSCを多く含む腫瘍から強い発光が検出された。このように**C7S-A**は生体イメージングに適用可能なプローブとして機能することが立証されている。

ごく最近、Miki, Oheらは**C5S-A**を改良した**βC5S-A**を報告した²⁷。**C5S-A**は上述の通り共焦点レーザー顕微鏡やFACSなどの評価、分取に利用できるが問題点もある。高コントラストに酵素活性を可視化するturn-on色素として、酵素と応答する前に中性条件で無発光状態である閉環体の割合が100%であることが望ましい。しかし、実際の**C5S-A**では閉環体の割合が84%であり、発光性の開環体が16%含まれていた。そのため、細胞染色した際にCSCとそれ以外の細胞の発光量の割合 (コントラスト) は 3.7 ± 0.38 にとどまる (図5a)。開発した**βC5S-A**は求核性消光基の近傍にメチル基を配し、Thorpe-Ingold効果により求核的閉環反応を促進し、中性条件においても閉環体の割合を91%まで高めることに成功した。このことにより細胞染色時のコントラストは 10.3 ± 1.6 へと改善した。**C5S-A**はそれほど顕著ではないが、ALDH1A1と反応する前に生体内のチオールと反応し、ジスルフィドを与えることで発

光性分子へと変換されてしまうことがわかっていた（図5b）。閉環体の割合が高い**8C5S-A**ではこの反応はほとんど観測されず、バックグラウンド発光が効率良く抑えられた。なお、ALDH1A1との応答前の閉環体の割合を高めると細胞染色時のコントラストは改善するが、ALDH1A1に応答後にactivatorにより活性化され開環する割合が低くなることがわかっている。ALDH1A1との応答前の閉環体の割合とコントラストはトレードオフの関係にある点は注意する必要がある。

なお、開発された**C5S-A**、**C7S-A**、**8C5S-A**はいずれもALDH1A1に対し高い選択性を示す（他のisoformに対しほとんど応答しない）。この高いisoform選択性はアルキル鎖末端にホルミル基を持つretinalに類した構造特性に由来すると考えられるが、はっきりしたことはわかっていない。

5. まとめと将来展望

CSCで高発現するALDH1類を識別できる分子プローブの開発によりCSCの可視化、分取が可能となった。がんの発生起源として、クローン進化モデルやがん幹細胞仮説などを包括するがんの可塑性に関する概念が理解されつつある。しかし、CSCの性質はその表現型の評価にとどまり、CSCの起源に迫る研究は少ないように感じられる。時間的、空間的に1細胞レベルでCSCを追跡できる分子プローブはCSCの本質に迫ることのできる唯一の手段かもしれない。isoform選択性の高い多色染色可能な分子プローブ群、CSCの他の機能やバイオマーカーを追跡できる分子プローブ群などは今後の当該領域の発展に大きく寄与すると考えられる。これらを手にした人類が近い将来CSCだけでなく、がんの発生起源に迫れる日が来ることを期待したい。

謝辞

本稿で紹介した蛍光プローブ類は、開発に没頭してくれた学生諸氏の努力のたまものであり、深く感謝申し上げます。また、筆者らと共に研究を推進いただいた京都大学、神戸大学の共同研究者の先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Greaves M. Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012; 481: 306–13.

2. Reya T. Morrison SJ. Clarke MF. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414: 105–11.
3. Wicha MS. Liu S. Dontu G. Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift. *Cancer Res* 2006; 66: 1883–90.
4. Walcher L. Kistenmacher AK. Suo H. et al. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol* 2020; 11: 1280.
5. Snyder V. Reed-Newman TC. Arnol L. et al. Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets. *Front Oncol* 2018; 8: 203.
6. Shackleton M. Quintana E. Fearon ER. et al. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell* 2009; 138: 822–9.
7. Tang DG. Kondo T. Cancer cell heterogeneity and plasticity: From molecular understanding to therapeutic targeting. *Semin Cancer Biol.* 2022; 82: 1–2.
8. Vassalli G. Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. *Stem Cell Inter* 2019; 3904645.
9. Tomita H. Tanaka K. Tanaka T. et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 11018–32.
10. Xu X. Chai S. Wang P. et al. Aldehyde dehydrogenases and cancer stem cells. *Cancer Lett* 2015; 369: 50–7.
11. Zanoni M. Bravaccini S. Fabbri F. et al. Emerging Roles of Aldehyde Dehydrogenase Isoforms in Anti-cancer Therapy Resistance. *Front Med* 2022; 9: 795762.
12. Koppaka V. Thompson DC. Chen Y. et al. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacol Rev* 2012; 64: 520–39.
13. Jones RJ. Barber JP. Vala MS. et al. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood* 1995; 85: 2742–6.
14. Rotman B. Papermaster BW. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 55: 134–41.
15. Storms RW. Trujillo AP. Springer JB. et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9118–23.
16. Minn I. Wang H. Mease RC. et al. A red-shifted fluorescent substrate for aldehyde dehydrogenase. *Nat. Commun.* 2014; 5: 3662.

17. Yagishita A. Ueno T. Tsuchihara K. et al. Amino BODIPY-Based Blue Fluorescent Probes for Aldehyde Dehydrogenase 1-Expressing Cells. *Bioconjugate Chem* 2021; 32: 234–8.
18. Yagishita A. Ueno T. Esumi H. et al. Development of Highly Selective Fluorescent Probe Enabling Flow-Cytometric Isolation of ALDH3A1-Positive Viable Cells. *Bioconjugate Chem.* 2017; 28: 302–6.
19. Maity S. Sadlowski CM. George Lin JM. et al. Thiophene bridged aldehydes (TBAs) image ALDH activity in cells via modulation of intramolecular charge transfer. *Chem Sci* 2017; 8: 7143–51.
20. Anorma C. Hedhli J. Bearrood TE. et al. Surveillance of Cancer Stem Cell Plasticity Using an Isoform-Selective Fluorescent Probe for Aldehyde Dehydrogenase 1A1. *ACS Cent Sci* 2018; 4: 1045–55.
21. Bearrood TE. Aguirre-Figueroa G. Chan J. Rational Design of a Red Fluorescent Sensor for ALDH1A1 Displaying Enhanced Cellular Uptake and Reactivity. *Bioconjugate Chem.* 2020; 31: 224–8.
22. Wang Q. Li Z. Hao Y. et al. Near-Infrared Fluorescence Probe with a New Recognition Moiety for Specific Detection and Imaging of Aldehyde Dehydrogenase Expecting the Identification and Isolation of Cancer Stem Cells. *Anal Chem* 2022; 94: 17328–33.
23. Oe M. Miki K. Ueda Y. et al. Deep-Red/Near-Infrared Turn-On Fluorescence Probes for Aldehyde Dehydrogenase 1A1 in Cancer Stem Cells. *ACS Sens* 2021; 6: 3320–9.
24. Oe M. Miki K. Ohe K. An enzyme-triggered turn-on fluorescent probe based on carboxylate-induced detachment of a fluorescence quencher. *Org Biomol Chem* 2020; 18: 8620–4.
25. Oe M. Miki K. Masuda A. et al. An activator-induced quencher-detachmentbased turn-on probe with a cationic substrate moiety for acetylcholinesterase. *Chem Commun* 2022; 58: 1510–3.
26. Okamoto A. Funakoshi Y. Oe M. et al. Identification of Breast Cancer Stem Cells Using a Newly Developed Long-acting Fluorescence Probe, C5S-A, Targeting ALDH1A1. *Anticancer Res* 2022; 42: 1190–205.
27. Oe M. Suzuki K. Miki K. et al. Steric Control in Activator-Induced Nucleophilic Quencher Detachment-Based Probes: High-Contrast Imaging of Aldehyde Dehydrogenase 1A1 in Cancer Stem Cells. *ChemPlusChem* 2022; 87: e202200319.