効果的ながん治療を目指した CD44 ターゲティングナノキャリア

慶應義塾大学 大学院薬学研究科^{*1)}・慶應義塾大学 薬学部^{*2)}

山之内 翔^{*1,2)}・金澤秀子^{*1,2)}

CD44-Targeting Nanocarriers for Cancer Treatment

Recently, the theory of cancer stem cell (CSC) is gaining increasing attention from researchers and has become an important focus of cancer research. Since the discovery that the marker molecule is over-expressed in a variety of solid tumors, many studies have focused on methods for targeting the hyaluronan receptor CD44. Hyaluronic acid, the primary CD44 binding molecule, has proved a significant factor in developing nanocarriers that demonstrate preferential tumor accumulation and increased cell uptake. Research is frequently conducted to add further functions to nanocarriers targeting CD44. It is expected that more effective drug delivery will be possible by combining with existing technology. In this review, we introduce research approaches from the current literature that take advantage of CD44-targeting ability and describe the possible advantages for each approach. Finally, we describe our recent progress in hyaluronic acid-modified thermoresponsive liposome aiming for CD44-targeting and combined with oncothermia.

近年、がん幹細胞(CSC)の理論は研究者から注目を集めており、がん研究の重要な焦点となってきた。マーカー分子がさまざまな固形腫瘍において過剰発現されているという報告以来、多くの研究がヒアルロン酸レセプター CD44 を標的とする方法に注目している。CD44 の主要な結合分子であるヒアルロン酸は、腫瘍集積性や細胞取り込みの増加を目指すナノキャリアの開発において重要なリガンドとなることが明らかにされている。そのため CD44 を標的としたナノキャリアにさらなる機能を付加する研究が頻繁に行われている。既存の技術との組み合わせによって、より効率的な薬物送達が可能になることが予想される。この本稿では、これまでの文献から、CD44 ターゲティング機能を利用した研究アプローチを紹介し、それぞれのアプローチで得られる利点について記述する。

Tsubasa Yamanouchi^{*1,2)}, Hideko Kanazawa^{*1,2)}

Keywords: CD44-targeting, drug delivery, hyaluronic acid, nanocarriers

1. はじめに

がん組織では、細胞形態や遺伝子発現、代謝、増殖、転移能を含む、がん細胞の遺伝的および表現型の特徴が変化してしまう¹⁾。がん細胞の異種性は、効果的な治療戦略を設計するうえでそれを理解することが非常に重要であるといえる。

近年、がん組織中にはその増殖や転移などに大きく関わる「がん幹細胞」と呼ばれる細胞が存在するという考え方が注目を集めている²⁾。がん幹細胞はがん組織中に0.1%～数%以下の割合で存在して

おり、自己修復能や無限増殖能をもつといわれている³⁾。また、従来のがん治療に対して抵抗性を示すため、治療によりがんが消失したように見えてもがん幹細胞が生き残り、再発の原因となるといわれている⁴⁾。このがん幹細胞について、これまでの研究から特異的に高発現しているマーカー分子などの発見が報告されており⁵⁾、その中でもヒアルロン酸をはじめとする細胞外マトリックスと結合する Cluster of differentiation-44(CD44)は、多くの種類のがんにおいてがん幹細胞の主要な表面マーカーの1つとされる⁶⁾。

^{*1)} Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Keio University

^{*2)} Faculty of Pharmacy, Keio University

2. がん幹細胞と CD44

CD44は、CD44遺伝子によってコードされる単一のポリペプチド鎖および細胞表面糖タンパク質であり⁷⁾、細胞外結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインの3つの主要ドメインに分けられる(Fig.1)。CD44遺伝子は、ヒト染色体11番に位置する20のエキソンから成る非常に複雑な遺伝子である^{8,9)}。ヒトのCD44遺伝子において、エキソン1-5および16-20は、CD44の標準形態(CD44s)を形成する。それ以外のエキソン6-15は、バリエントエキソン1-10(v1-10)と呼ばれ、CD44のバリエントアイソフォーム(CD44v)を形成するように選択的にスプライシングされる^{10,11)}。現在では9個のバリエントアイソフォームがヒトにおいて検出されている。がん幹細胞の表面に高発現しているCD44は、正常細胞に発現しているバリエントエキソンをもたないCD44sとは異なり、エキソンv8-10を高頻度を含むCD44 v8-10であることが報告されている¹²⁾。さらに、このCD44 v8-10は腫瘍進行促進因子であると考えられている^{13~16)}。その分子機構の解析により、CD44 v8-10はシスチンのト

ランスポーター xCT の安定化に寄与しており、これによりがん幹細胞ではシスチンの取り込みが亢進することで、細胞内部において抗酸化物質であるグルタチオン(GSH)合成が促進され、酸化ストレス耐性を獲得している(Fig.2)¹⁷⁾。その結果、がん細胞の増大と治療抵抗性が促進されている。

がん幹細胞におけるCD44は、選択的スプライシングおよび翻訳後修飾が促進されるために正常細胞のものとは構造が異なり、ヒアルロン酸との高い親和性を保持していることが報告されている¹⁸⁾。このことからがん幹細胞へのターゲティングにヒアルロン酸を用いることは非常に有効性が高いと考えられる。薬物送達キャリアに修飾するヒアルロン酸の分子量やその修飾量により、細胞への薬物送達効率は変化する。それらに関する研究として、分子量の大きいヒアルロン酸の修飾および修飾量の増加により、細胞への取り込みが向上することが報告されている¹⁹⁾。しかし、分子量を大きくし、修飾量を増加したキャリアは、サイズが大きくなることや内封薬物の放出率が低下することも同時に報告されているため、修飾に最適なヒアルロン酸の分子量を検討する必要がある。また、CD44に結合したヒアルロン

Fig.1 CD44の概略図と遺伝子構造

Fig.2 CD44 v による高レベルのグルタチオン (GSH) 維持機構

Table 1 CD44 アイソフォームの生物学的機能

CD44アイソフォーム	生物学的機能	がんの種類	文献
CD44	腫瘍の成長、転移、低い生存率	膵臓がん	40
CD44v	増殖性、化学療法抵抗性	肺腺がん	25
CD44v3	腫瘍組織で過剰発現した移行、増殖およびシスプラチン耐性	頭頸部扁平上皮がん	42,43
CD44v4, CD44v5	肺転移	膵臓がん	44
CD44v6	転移; 肝転移との関連	膵臓がん	21,23,45
CD44v6	上皮表現型細胞の発現、腫瘍原性および化学療法抵抗性	前立腺がん	45,46
CD44v6	転移、腫瘍の進行段階	結腸がん、直腸腺がん	47,48
CD44v6, CD44v9	リンパ節転移、肝転移、TNM ^{*1} 期と相関	膵臓がん	15
CD44v9	予後不良と関連、EMT ^{*2} 介在性の浸潤へ寄与	膀胱がん	49
CD44v8-10	腫瘍の開始	胃がん	50
CD44v8-10	肺転移	乳がん	51
CD44v (v6-10, v7-10, v8-10)	トランスジェニックGanマウスにおけるCD44v発現の相関	胃がん	52

*1: TNM分類。*2: EMT(上皮間葉転移、Epithelial-Mesenchymal Transition)。

酸は、CD44を巻き込んだ細胞膜の嵌入により細胞内へと取り込まれると考えられているが、その機構についてはまだ不明瞭な点が多く、具体的な取り込み経路の解明には至っていない²⁰⁾。

前述のようにCD44は、がん幹細胞を含むいくつかの細胞種で過剰発現が認められ、がんの発生および進行に関与すると考えられる。異なるCD44vアイソフォームは、膜貫通ドメインに挿入される付加的なペプチドをコードするため、これらは、コンフォメーション変化を引き起こし、サイトカインや成長

因子を含む分子の結合部位を提供する。これらの異なる結合モチーフがCD44の生物学的活性に影響することは明らかである。腫瘍細胞においては複数のCD44vアイソフォームが発現し、それらが腫瘍の種類、転移および予後に関連するといわれている(Table 1)。例えば、膵臓がんでは最も広く研究されているCD44変異型はCD44v6である。膵臓がんにおけるCD44v6の発現上昇は、転移に関連することが報告されている²¹⁾。ヒト膵臓がんにおける研究では、CD44vが臨床での予後のマーカーとして

使用できる可能性を示唆している。CD44v6の発現は生存期間²²⁾や肝転移と有意に関連している²³⁾との報告もある。CD44v6の抑制と内分泌抵抗性乳がん細胞の浸潤能力の低下との間に関連があったことなどが報告されている²⁴⁾。その他、Table 1に示すように近年、CD44vが高発現しているヒト肺腺がん細胞において、がん幹細胞様の特徴をもった細胞群が増加していることが報告されている²⁵⁾。そのようながん幹細胞表面のCD44をターゲティングの標的とすることで、がん幹細胞への選択的薬物輸送を行い、がん幹細胞治療を達成することができると考えられている。

3. CD44ターゲティングと送達戦略

現在CD44ターゲティングを目的とした研究では、抗CD44抗体によるターゲティングとヒアルロン酸によるターゲティングの2通りの方法が用いられている²⁶⁾。抗CD44抗体の利点としては選択性が非常に高いことがあげられる。しかし、モノクローナル抗体はコストが高いことが欠点である。それに対してヒアルロン酸は、コストの低さが利点であるが、選択性の高さは抗CD44抗体に劣る。双方に利点と欠点が存在するため、状況に応じて用いる方法を選択する必要がある。

薬物とCD44ターゲティング分子の組み合わせ方としては、薬物自体にCD44ターゲティング分子を修飾した薬物コンジュゲート²⁷⁾や、薬物を送達するナノキャリアにCD44ターゲティング分子を利用した機能性ナノキャリア²⁸⁾という構成がよく用いられる。ナノキャリアは多くの薬物を一度に輸送できることから、非常に多くの種類が研究の対象となっている。そのような中でもリポソームや高分子ミセル、 dendrimerなどにCD44ターゲティング分子を修飾することによってCD44発現細胞への薬物送達が向上することが報告されている²⁹⁾。

しかし、CD44ターゲティング分子のみを修飾したキャリアには欠点も存在する。血中からのクリアランスが迅速であり、ターゲティング効果を最大限に活かさない点や、内封薬物の放出が制限されるといった点などがそれにあたる。よって、近年では

CD44ターゲティング分子に加えて他の分子を同時に用いることで、それらの欠点の改善を目的とした研究も行われている。代表的なものは製剤の血中滞留性の改善のためにポリエチレングリコール(PEG)や、腫瘍での薬物放出性の改善のために刺激応答性高分子などを用いる場合である。以降では、近年研究が行われているCD44ターゲティングナノキャリアおよび筆者らの研究についてその一部を紹介する。

4. PEG化ヒアルロン酸修飾リポソーム

リポソームにPEG化したヒアルロン酸(Fig.3)を修飾することで、CD44に対する親和性を維持しながら高い血中滞留性を付与する研究が行われている³⁰⁾。血中滞留性により、標的細胞での治療効果を向上させることを目的としている。Lingxuan Moらは、未修飾ソラフェニブ(SF)封入リポソーム(SF-Lip)、SF封入ヒアルロン酸修飾リポソーム(HA-SF-Lip)、SF封入PEG化ヒアルロン酸修飾リポソーム(PEG-HA-SF-Lip)の3種類のSF封入リポソームを用いて、CD44発現レベルの異なる2種類の細胞における細胞内取り込みと、細胞障害性の比較、さらに*in vivo*での有効性を報告している³¹⁾。

HA-SF-Lip および PEG-HA-SF-Lip の細胞障害性は、CD44過剰発現細胞におけるSF-Lipのものよりも大きかったが、CD44低発現細胞では有意な差はみられなかった。しかし、CD過剰発現細胞の担がんラットの静脈内投与では、SF溶液と比較し

Fig.3 PEG化ヒアルロン酸(HA)の構造式

て、PEG-HA-SF-Lip は血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) および血漿半減期をそれぞれ3倍および2倍に増加させた。このことから PEG と HA の併用により、*in vivo* でのリポソーム内封薬物の高い血中滞留性および CD44 による選択的細胞取り込みの達成が可能であると考えられる。

5. pH 応答性ヒアルロン酸高分子ミセル

ヒアルロン酸とヒスチジンのコンジュゲートを用いることで、pH 応答性を付与して細胞内の低 pH 環境で迅速に内封薬物を放出する高分子ミセルの研究が報告されている³²⁾。ヒアルロン酸に疎水性ポリ (L-ヒスチジン) (PHis) を結合させ、それらを用いて高分子ミセルを調製した (HA-PHis-Micelle)。この高分子ミセルに抗がん薬ドキソルビシン (DOX) を封入し、pH を変化させた放出実験での薬物放出性、および CD44 過剰発現細胞に対する細胞障害性について検討している。この高分子ミセルは低 pH において迅速に内封された DOX を放出し (Fig. 4)、CD44 過剰発現細胞にクラスリン介在性のエンドサイトーシスにより取り込まれ、その後細胞質へと移行していることが観察されたとしている。これらの結果より、生体適合性の pH 応答性

Fig. 4 pH 応答性ヒアルロン酸-ポリ (L-ヒスチジン) ミセル (HA-PHis-Micelle)
(a) (ヒアルロン酸-ポリヒスチジン) コンジュゲート。
(b) ドキソルビシン内封ミセル (HA-PHis-Micelle) イメージ図。

HA-PHis-Micelle は、DOX の細胞内標的送達のための有望なナノシステムであることが示された。

6. ヒアルロン酸誘導体修飾 pH 応答性リポソーム

リポソームにメチルグルタミンやカルボキシシクロヘキサンをヒアルロン酸と重合させた誘導体を修飾することで pH 応答性を付与する研究が報告されている³³⁾。弱酸性環境を有するエンドソームの融合または不安定化を介してその内封薬物を細胞質に移行させることを目的としている。ヒアルロン酸にメチルグルタリル (MGul) ユニットを結合させた MGul-HA またはカルボキシシクロヘキサン (Chex) ユニットを結合させた CHex-HA を調製し (Fig. 5)、それらを修飾したリポソーム (MGul-HA-Lip、CHex-HA-Lip) の pH 応答性および CD44 過剰発現細胞への取り込みを観察している。MGul-HA-Lip、CHex-HA-Lip はともに中性 pH で安定であったが、弱酸性条件下では内封薬物の放出を示した。また、CHex-HA-Lip は MGul-HA-Lip および未修飾のリポソームと比較して、より効率的に内封薬物を CD44 過剰発現細胞に送達したことを示している。さらに、いずれのリポソームも CD44 低発現細胞にはわずかにしか取り込まれず、遊離ヒアルロン酸を用いた取り込み競合阻害実験から、調製したヒアルロン酸誘導体修飾リポソームが CD44 によって認識され取り込みが起ることを確認している。したがって、調製したリポソームは、細胞特異的に薬物

Fig. 5 MGul-HA-C₁₀ と CHex-HA-C₁₀ の構造式

を送達するキャリアとして有用であると結論している。

7. がん温熱療法との併用を目指した ヒアルロン酸修飾温度応答性リポソーム

筆者らは、温度応答性高分子Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)をベースとした高分子とヒアルロン酸を同時に修飾したリポソームを作製し、がん幹細胞ターゲティングを目指したDDSの構築を試みている。PNIPAAmは下限臨界溶解温度(Lower Critical Solution Temperature: LCST)を32℃にもつ温度応答性高分子である³⁴⁾。LCST以下では高分子鎖のアミド基と水分子との間において水素結合が働いて高分子鎖が水和し、ランダムコイル状のコンフォメーションをとる。これに対しLCST以上ではその水素結合が温度上昇により不安定化して脱水和が起こり、高分子鎖は収縮してグロビュール状のコンフォメーションをとり、さらに疎水性相互作用によって高分子が会合して相分離が起こる。この性質を活かして、これまでに筆者らは、PNIPAAm高分子ミセルやPNIPAAm修飾リポソームを薬物送達キャリアに用いることで、その細胞取り込みや内封薬物放出を温度により制御することが可能であることを報告している(Fig.6)^{35,36)}。細胞内へと取り込まれたリポソームをポリマーのLCST以上の温度に昇温することでリポソーム膜が不安定化し、内封した抗がん薬

の放出が期待できる。それにより、CD44高発現細胞へのターゲティングと温度に依存した薬物放出制御を同時に達成することを考えた(Fig.7)。

NIPAAmと*N,N*-Dimethylacrylamide (DMAAm)を可逆的付加開裂連鎖移動(Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer: RAFT)重合により共重合させ、LCSTを40℃にもつ温度応答性高分子を合成した(Thermo-Sensitive Polymer: TSP)。この高分子とヒアルロン酸を同時に修飾したリポソーム(TSP-HA-Lip)を調製し、抗がん薬DOXを封入した。また、従来のヒアルロン酸のみを修飾したリポソーム(HA-Lip)および未修飾リポソームも同様に調製し、CD44発現レベルの異なる2種類の細胞を用いてそれらの細胞内取り込みと細胞障害性の比較を行った。CD44過剰発現細胞ではTSP-HA-LipおよびHA-Lipの細胞内取り込みが未修飾リポソームと比べて向上したが、CD44低発現細胞では未修飾リポソームと比較して有意差はみられなかった。また、CD44過剰発現細胞に対する細胞障害性は、TSPのLCST以下の温度では小さかったが、LCST以上の温度では非常に大きな細胞障害性を示すことを確認した。このことから、TSPとHAを併用することで、CD44過剰発現細胞への選択性と温度による内封薬物放出制御をもつ薬物送達キャリアを調製することが可能であることが示唆された。局所的にがんを昇温させることで治療を行うがん温熱療法とこのリポソームを併用することによって、より安全でありながら高い治療

Fig.6 PNIPAAmの温度による性質変化とナノキャリアへの応用

Fig. 7 ヒアルロン酸温度応答性高分子修飾リポソーム (HA-TSP-Liposome)

(a) HA-TSP-Liposome と CD44 targeting 治療戦略の概念図。

(b) CD44 過剰発現細胞に対する細胞障害性。未修飾リポソーム: NC-Lip、ヒアルロン酸のみを修飾したリポソーム: HA-Lip、温度応答性高分子修飾リポソーム: TSP-Lip、ヒアルロン酸温度応答性高分子修飾リポソーム: HA-TSP-Lip。

効果を発揮できると考えている。

がん組織はワールブルク効果³⁷⁾によって正常な組織に比べて酸性に傾いており、熱に弱く、また、微小血管も少ないため血流増大による放熱作用も小さい。このため、42°C以上の温度にがん組織を昇温させることによってがん細胞は死滅する。これを利用したものががん温熱療法やハイパーサーミアと呼ばれるがん治療法である³⁸⁾。がん組織を昇温させる際には、赤外線やマイクロ波といった電磁波が用いられる。また、ハイパーサーミアの中でも特にオンコサーミアと呼ばれる治療法が欧州で承認されている³⁹⁾。電磁波を用いて腫瘍を昇温させるという点ではハイパーサーミアと同様であるが、オンコサーミアではフラクタル変調された特殊なマイクロ波を用いる。この特殊なマイクロ波はがん組織に吸収されやすい。また、均一な加熱をした際に比べてがん

細胞内部よりもその周辺が強く昇温するという特徴もっており、細胞内外の温度差によりアポトーシスを誘導することも報告されている。これにより、従来のハイパーサーミアと比較して出力に対する治療効果が非常に大きいため、強い熱を与える必要がなく皮膚の熱傷などといった通常細胞への被害を軽減することが可能である。近年、物理医療デバイスの進歩が著しいことから、今後このような物理医療デバイスを効果的に使用することにより、新しいがん細胞ターゲティング DDSが行えるものと考えている。

8. おわりに

本稿ではがん幹細胞に関する知見および CD44 高発現細胞への薬物デリバリーの最近の研究動向を紹介

介した。がん幹細胞の CD44 に関する研究は近年非常に注目されており、論文数の推移も増加の傾向にある。特に本稿でも紹介したような CD44 を標的としたナノキャリアにさらなる機能を付加する研究が頻繁に行われている。既存の技術との組み合わせによってより効率的な薬物送達が可能になることが予

想される。さらに、DDS キャリアのみで治療を行うのではなく、今後本稿で例としてあげた温熱療法をはじめとする物理医療デバイスとの併用についての研究が進んでいくことでより効果的な治療方法の確立が期待できる。

文献

- 1) Egeblad M., *et al.*, *Dev. Cell*, **18**, 884-901 (2010)
- 2) Visvader J.E., *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 755-768 (2008)
- 3) Reya T., *et al.*, *Nature*, **414**, 105-111 (2001)
- 4) Shackleton M., *et al.*, *Cell*, **138**, 822-829 (2009)
- 5) Zhang C., *et al.*, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **137**, 1679-1686 (2011)
- 6) Jaggupilli A., *et al.*, *Clin. Dev. Immunol.*, 708036 (2012)
- 7) Tammi R.H., *et al.*, *Semin. Cancer Biol.*, **18**, 288-295 (2008)
- 8) Colombatti A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 1926-1929 (1982)
- 9) Goodfellow P.N., *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, **12**, 659-663 (1982)
- 10) Screaton G.R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 12160-12164 (1992)
- 11) Screaton G.R., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **268**, 12235-12238 (1993)
- 12) Tanabe K.K., *et al.*, *Lancet*, **341**, 725-726 (1993)
- 13) Brown R.L., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **121**, 1064-1074 (2011)
- 14) Afify A.M., *et al.*, *Int. J. Biol. Markers*, **26**, 50-57 (2011)
- 15) Li Z., *et al.*, *Diagn. Pathol.*, **9**, 79 (2014)
- 16) Endo K., *et al.*, *J. Hepatol.*, **32**, 78-84 (2000)
- 17) Ishimoto T., *et al.*, *Cancer Cell*, **19**, 387-400 (2011)
- 18) Bourguignon L.Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 1829-1838 (2000)
- 19) Qhattal H.S., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **8**, 1233-1246 (2011)
- 20) Greyner H.J., *et al.*, *Matrix Biol.*, **29**, 503-510 (2010)
- 21) Rall C.J., *et al.*, *Cancer Res.*, **55**, 1831-1835 (1995)
- 22) Gotoda T., *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 1033-1040 (1998)
- 23) Zhou G., *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **167**, 2257-2268 (2012)
- 24) Bellerby R., *et al.*, *Front. Oncol.*, **6**, 145 (2016)
- 25) Nishino M., *et al.*, *J. Cancer*, **8**, 1774-1785 (2017)
- 26) Mattheolabakis G., *et al.*, *J. Drug Target.*, **23**, 605-618 (2015)
- 27) Saravanakumar G., *et al.*, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **10**, 17-31 (2014)
- 28) Yoon H.Y., *et al.*, *Biomaterials*, **33**, 3980-3989 (2012)
- 29) Platt V.M., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **5**, 474-486 (2008)
- 30) Han X., *et al.*, *J. Control. Release*, **197**, 29-40 (2015)
- 31) Mo L., *et al.*, *Nanomedicine*, **14**, 557-567 (2018)
- 32) Qiu L., *et al.*, *Acta Biomater.*, **10**, 2024-2035 (2014)
- 33) Miyazaki M., *et al.*, *Bioconj. Chem.*, **29**, 44-55 (2018)
- 34) Yamanouchi T., *et al.*, 高分子論文集, **75**, 116-127 (2018)
- 35) Wang J., *et al.*, *ACS Omega*, **2**, 316-325 (2017)
- 36) Wang J., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **523**, 217-228 (2017)
- 37) Warburg O., *Science*, **123**, 309-314 (1956)
- 38) Lee S.Y., *et al.*, *Int. J. Hyperthermia*, **31**, 869-874 (2015)
- 39) Gabor A., *et al.*, *Conference Papers in Medicine*, 272467 (2013)
- 40) Li L., *et al.*, *Gastroenterology*, **146**, 1108-1118 (2014)
- 41) Reategui E.P., *et al.*, *Cancer Biol. Ther.*, **5**, 1163-1168 (2006)
- 42) Wang S.J., *et al.*, *Head Neck.*, **29**, 550-558 (2007)
- 43) Piselli P., *et al.*, *Anticancer Res.*, **20**, 825-831 (2000)
- 44) Castellà E.M., *et al.*, *Virchows Arch.*, **429**, 191-195 (1996)
- 45) Hernandez J.R., *et al.*, *Med. Oncol.*, **32**, 159 (2015)
- 46) Ni J., *et al.*, *Prostate*, **74**, 602-617 (2014)
- 47) Wielenga V.J., *et al.*, *Cancer Res.*, **53**, 4754-4756 (1993)
- 48) Todaro M., *et al.*, *Cell Stem Cell*, **14**, 342-356 (2014)
- 49) Kobayashi K., *et al.*, *Oncol. Rep.*, **36**, 2852-2860 (2016)
- 50) Lau W.M., *et al.*, *Cancer Res.*, **74**, 2630-2641 (2014)
- 51) Yae T., *et al.*, *Nat. Commun.*, **3**, 883 (2012)
- 52) Ishimoto T., *et al.*, *Cancer Sci.*, **101**, 673-678 (2010)