Effectiveness of Hyperthermia on Cancer Stem Cells

KEN OHNISHI*

Department of Biology, Center for Humanity and Sciences, Ibaraki Prefectural University of Health Sciences,
Inashiki-gun, Ibaraki 300-0394, Japan

Abstract: Cancer stem cells (CSCs) or tumor-initiating cells (TICs) have been identified in a variety of cancers and are defined as a small population of cancer cells that have stem cell-like phenotypes. CSCs are resistant to current chemotherapy and radiotherapy and have high ability of tumorigenesis. It is likely that CSCs contribute to cancer metastases and tumor recurrence, which cause a poor prognosis. Thus, targeting strategy of CSCs is extremely important for advancement of cancer therapies. However, CSC itself is not well understood. This review refers to key points to be noticed in CSC research and considers effectiveness of hyperthermia for CSC-targeting. It has been reported that heating has an inhibitory influence on some extra- and intra-cellular factors that are related to the survival of CSCs. In this review, the potentiality of hyperthermia for CSC-targeted cancer therapy is discussed with relation to those survival factors.

Key Words: hyperthermia, cancer stem cell, niche, hypoxia, spheroid

1. がん幹細胞とは何か

がん幹細胞は1997年に白血病で同定され、その後2003年に乳がん、2004年に脳腫瘍、2005年に食道がん、肝臓がんなど固形がんにおいてもそれぞれ同定された。2006年の米国がん学会（AACR）において、がん幹細胞は腫瘍内に存在し、自己複製能と腫瘍を構成するさまざまな系統のがん細胞を生み出す能力（多分化能）を併せ持つ細胞と定義された（Fig. 1）¹⁾。がん幹細胞の発生機序については現在以下の二つの仮説が提示されている²⁾。

①自己複製能を有する正常組織細胞に強力な形質転換能力を持つ遺伝子変異が導入され、がん幹細胞に変化する。

②分化前の前駆細胞に過形成あるいは異形成が起こり、その後脱分化が生じ、がん幹細胞が生まれる。さらに最終的に分化したがん細胞にも脱分化が生じ、がん幹細胞ができるとも言われている。実際にごん幹細胞が体内で発生する過程をリアルタイムで観察することは困難なため、これらの仮説はまだ実証されていない。

2. がん幹細胞研究の注意すべき点

2-1. がん幹細胞の形質維持

がん幹細胞を実験材料として取り扱う上で注意すべき点は腫瘍組織内微小環境（ニッチ）特有のがん

Received 7 April, 2017, Accepted 28 June, 2017. *Corresponding author: Tel, +81-29-840-2157; Fax, +81-29-840-2316;

e-mail, ohnishi@ipu.ac.jp

doi: 10.3191/thermalmed.33.29

©2017 Japanese Society for Thermal Medicine

幹細胞の形質発現を細胞培養系でどう維持するかという点である。ニッチとはがん幹細胞を形成、維持する環境である。生体内のがん幹細胞の形質発現維持には低酸素、低栄養、低 pH などの腫瘍組織内の微小環境や近傍の細胞とのコミュニケーションが深く関わっている。特に低酸素環境では、HIF-1 α の安定化が、がん幹細胞マーカー発現にとって重要である^{3,4)}。また組織を形づくる 3 次元立体構造そのものが形質発現に大きく影響を与えることも正常細胞で知られている⁵⁾。従って、一般的に広く行われている細胞の単層培養では生体内の微小環境と異なり、がん幹細胞の形質は容易に変化すると思われる。本来のがん幹細胞の形質を維持しつつ、培養系の実験を進めて行くには細心の注意が必要である。

現在、がん幹細胞を扱う場合、できるだけがん幹細胞の形質を維持するように培養条件が工夫されている。例えば、脳腫瘍のがん幹細胞を扱う場合、腫瘍を分散させた後、幹細胞の自己複製能を維持するために EGF, bFGF, B27 などの増殖因子を添加した Neurobasal 培地を用い、非接着性のプレートで培養する場合が多い。しかし、このような条件下でがん幹細胞の形質が十分に維持されているかは疑問である。通常の細胞培養環境では、腫瘍組織内の様々な微小環境は十分に再現されないことを強く意識する必要がある。またその形質が維持されたとしても、有効な培養期間についての詳細はまだ明らかにされていない。理想的には生体から摘出直後の腫瘍からがん幹細胞を回収し、がん幹細胞形質が維持されている間に実験を完了するのが最善であるが、後日再実験や追加実験が必要になった場合、一旦培養系に移してしまった細胞を再び実験に用いて問題はないであろうか。このような懸念から、摘出した腫瘍を用いずに株化したがん細胞からがん幹細胞マーカーを目安に細胞をソーティングし、それらのがん幹細胞と見なして実験に用いている研究も多い。しかしながら、マーカー陽性だけを目安に回収した細胞を生体内に存在するがん幹細胞と果たして同一視しても良いのだろうか。マーカー陰性を示す細胞でもがん幹細胞特有の性質を示すとの報告も少なくなく、がん幹細胞マーカーだけで判定された細胞は真のがん幹細胞と一応区別する必要がある。

2-2. がん幹細胞の判定方法

それではどんな細胞をがん幹細胞として同定すべきだろうか。前述したがん幹細胞の特性を全て調べることは大変困難である。検定する特性を絞る必要がある。幹細胞が持つ本来の重要なほたらきは組織を形成維持することにある。がん幹細胞においても、腫瘍組織の形成維持に寄与する対称分裂能と非対称分裂能 (Fig. 1) は重要な特性と思われる、最も信頼できるがん幹細胞の判定基準の一つである。対称

Fig. 1. がん幹細胞の性質.

分裂能と非対称分裂能を確かめるには、一つの細胞が分裂を完了し、二つの娘細胞になった時点でそれぞれの細胞を単離し、遺伝子発現やタンパク質発現を感度の高い分析機器を用いてシングルセル解析すれば良い。両方の娘細胞が共にがん幹細胞特有の遺伝子発現あるいはタンパク質発現を示せば、分裂前の細胞は対称分裂能を保持していたことになる。これとは異なり、一方の細胞はがん幹細胞特有の遺伝子あるいはタンパク質発現を示し、もう一方の細胞はがん細胞特有の遺伝子あるいはタンパク質発現を示す場合には、非対称分裂能を保持していたことになる。なお、がん幹細胞が対称分裂するか非対称分裂能するかは細胞内外の要因によって決まる。患者の腫瘍から回収した CD133 陽性グリオーマ細胞を用いた実験では、大半の細胞が非対称分裂するが、EGF と bFGF を培地に添加すると、それらを添加しない場合に比べ対称分裂をするグリオーマ幹細胞の割合が多くなることが示されている⁶⁾。がん幹細胞の分化が抑えられて自己複製が優先されるものと思われる。さらに、このような対称分裂能と非対称分裂能を持つ細胞に xenograft での高い腫瘍形成能が認められた場合には、がん幹細胞と同定する確固たる証拠となる。

近年、腫瘍は異なる性質のがん細胞からなるヘテロな細胞集団であることが明らかにされ^{7,8)}、がん治療の難しさの一つはこのヘテロ性に起因すると言われている。個々のがん細胞のヘテロ性あるいはごく少数の細胞からなる亜集団間のヘテロ性を調べる場合、シングルセル解析の有用性は高い^{9,10)}。ただシングルセル解析法は新しく開発された技術を利用しているため、ソフトとハードの両面においてまだ一般的に広く普及していない。参考のために細胞の単離方法と細胞を単離した後どのような解析が可能かを Table I にまとめた。細胞の単離方法は解析目的に合わせ選択する必要がある。なお、DNA チップを用いたシングルセル網羅的遺伝子発現解析システムについては、日立製作所が約 2,000 個の遺伝子発現を解析できる小型チップを開発したと 2016 年に発表している¹¹⁾。今後、その実用化が待たれる。

Table I. シングルセルの単離法と解析法

単離法	装置	一度に単離可能な細胞数	選択基準	解析法
マイクロマニピュレーション	マイクロマニピュレーター (eppendorf 社他)	少数	形態, 蛍光	デジタル PCR, シングルセルウエスタン, 免疫細胞染色
セルソーティング	セルソーター (BD 社他)	多数	形態, 蛍光	デジタル PCR, シングルセルウエスタン, 免疫細胞染色
マイクロラフトコレクティング	QIAscout (QIAGEN 社)	少数	なし	デジタル PCR, シングルセルウエスタン, 免疫細胞染色, シーケンス
レーザーマイクロダイセクション	LMD7 (Leica 社)	少数	なし	デジタル PCR, シングルセルウエスタン, 免疫細胞染色
マイクロフルイディクス	Fluidigm C1 System (Fluidigm 社)	多数	なし	シーケンス
ドロップレット	ドロップレット対応装置 (BioRad 社他)	多数	なし	デジタル PCR
ナノディスペンシング	ICELL8 Single-Cell System (WaferGen 社)	最大 1,800 個	なし	シーケンス

2-3. がん幹細胞のモデル細胞

更に配慮すべき点はどのような細胞をがん幹細胞の候補細胞と同定してシングルセル解析すれば良いかということである。独自に患者の腫瘍を入手できれば良いが、そうでない場合には、株化細胞をシングルセル解析に用いる必要がある。そこで、一つの候補細胞としてスフェロイド内に出現するがん幹細胞様細胞が挙げられる。細胞塊からなるスフェロイドは低酸素、低栄養、低 pH などの腫瘍組織で見られる微小環境を内包しており、簡便な *in vitro* 系腫瘍モデルとして非常に有用であり¹²⁾、以前から多くの研究で利用されている。著者らは、神経膠芽腫細胞株 (T98G 細胞など) で作製したスフェロイド内部の低酸素領域に CD133 陽性細胞が出現することを見出した (Fig. 2)¹³⁾。この細胞はがん幹細胞マーカーである CD133 の発現が見られるだけでなく、未分化細胞マーカーである Nestin も発現している。さらに放射線抵抗性、抗がん剤抵抗性、そして高い遊走性を示す (投稿準備中)。神経膠芽腫がん幹細胞は放射線抵抗性¹⁴⁾ および抗がん剤抵抗性¹⁵⁾ を示すことが知られている。このスフェロイドを分散し、単層培養に戻すと CD133 陽性細胞はできなくなる。CD133 発現はスフェロイドという立体構造に依存した可塑的な現象である点が興味深い。このような性質を示すがん幹細胞様細胞をスフェロイドから単離し、分裂後にそれぞれの娘細胞のシングルセル解析を行い、対称分裂能と非対称分裂能が確認できれば、この CD133 陽性細胞をがん幹細胞と同定できる強い根拠が得られる。このようなスフェロイドという腫瘍モデル系とシングルセル解析法を用いた実験系を利用すれば、がん幹細胞の実体/実態の解明に寄与できるのではないだろうか。

Fig. 2. ヒト神経膠芽腫細胞の CD133AC133/HIF1- α 免疫蛍光 2 重染色像
単層培養細胞 (a-c), スフェロイドの凍結切片 (d-f).

3. がん幹細胞の生存戦略

がん幹細胞は前述したように腫瘍内の低酸素微小環境に潜伏している。なぜがん幹細胞は低酸素微小環境を好むのであろうか。低酸素微小環境は、有酸素環境に比べ、活性酸素による DNA 損傷が少なく、細胞の生存には有利にはたらく。がん幹細胞はその低酸素微小環境に適応するために次のような適応戦略を獲得していると考えられる。血管から離れている低酸素微小環境は栄養の供給も受けにくく、がん細胞のような盛んな増殖を示す細胞の生存には適さない。しかし、そのような環境下でも細胞周期の休止期に留まり、休眠の状態を維持できれば細胞は長く生存し続けることができる。休眠の誘導には Notch シグナル伝達系が重要な役割を果たしている¹⁶⁾。低酸素環境下では Notch シグナル伝達系の活性

化を誘導する HIF-1 α が安定化され、Notch シグナル伝達系が活性化される¹⁷⁾。さらに低酸素環境下では内皮細胞から NO が放出され、この NO が Notch シグナル伝達系の活性化に寄与している¹⁸⁾。このようにがん幹細胞は低酸素微小環境で生存し続けられるよう低酸素で誘導される Notch シグナル伝達系を巧妙に利用していると考えられる (Fig. 3)。もし放射線照射あるいは抗がん剤投与によって腫瘍細胞が減少すると、微小環境の変化によりがん幹細胞は休眠状態から脱し、活発な非対称分裂を行うことで、欠損したがん細胞を補い、腫瘍を維持することができる。また、活性酸素による DNA 損傷が生じたとしても、がん幹細胞は DNA 修復能が亢進しているため、身を守ることができる^{2,19)}。このように、がん幹細胞は、腫瘍の維持、さらには再発のために DNA 損傷の蓄積が生じにくい環境で生きていると考えられる²⁰⁾。また、細胞生存シグナル伝達経路の鍵となる Akt の放射線による活性化は、がん細胞よりがん幹細胞の方が亢進していることが報告されている²¹⁾。がん幹細胞の Akt を介したシグナル伝達系は DNA 損傷に起因した細胞死が起きにくいようにはたらいっているのかもしれない。一方、Akt ノックアウトマウスを用いた実験によると、Akt は細胞内の reactive oxygen species (ROS) の量を高めること、ROS 消去作用を阻害することにより、ROS で誘導される細胞死に寄与していることが示唆されている²²⁾。従って、放射線による ROS を介した間接的な DNA 損傷で誘導される細胞死への Akt の関与については、慎重に議論される必要がある。これらに加え、がん幹細胞は免疫作用に対し強い抵抗力を示すことも報告されている²³⁻²⁵⁾。

4. ハイパーサーミアの標的となるがん幹細胞の生存に寄与する因子

Fig. 3 に示すように、がん幹細胞の生死に関わる細胞内外の因子をハイパーサーミアにより阻害または強化することにより、がん幹細胞を標的としたハイパーサーミア効果が期待できる。次にそれぞれの因子を標的としたハイパーサーミアの有効性について説明する。

Fig. 3. ハイパーサーミアの標的となるがん幹細胞の生死に関わる細胞外/内的因子。

4-1. 細胞外因子

1) 低酸素微小環境

ハイパーサーミアによる腫瘍内血流量の増加はがん幹細胞への酸素供給を高め、HIF-1 α の不安定化や内皮細胞からの NO 放出量の低下をもたらす可能性がある。このような HIF-1 α の不安定化および NO 放出量の低下は、Notch シグナル伝達系の不活性化を介してがん幹細胞の休眠状態の解除をもたらし、がん幹細胞の形質維持に影響を及ぼすと考えられる。ハイパーサーミアによりマウス腫瘍の低酸素領域の休眠細胞が減少することが報告されている²⁶⁾。短絡的にこの休眠状態のがん細胞をがん幹細胞と見なせないが、ハイパーサーミアによりがん幹細胞を休眠状態から細胞分裂期に移行させた後に放射線治療を行えば、がん幹細胞の放射線増感できる可能性がある。

2) 免疫系

がん幹細胞は T 細胞によるアポトーシス誘導などの免疫反応に対し抑制的な作用を示す²⁴⁾。熱ショックタンパク質は免疫系のはたらきを強めることが知られているので、ハイパーサーミアにより熱ショックタンパク質を誘導し、この免疫抑制作用を抑えることが期待できる。また腫瘍全体の溶解物で活性化された樹状細胞を接種したマウスに比べ、がん幹細胞溶解物で活性化された樹状細胞を接種したマウスでは、腫瘍中のがん幹細胞が効果的に排除されたと報告されている²⁷⁾。ハイパーサーミアによる熱ショックタンパク質誘導で免疫系を強化することにより、がん幹細胞溶解物による樹状細胞の活性化をより高められる可能性がある。

4-2. 細胞内因子

1) DNA 修復系

細胞を加温することにより相同組換え修復系の BRCA1/2, RPA, MRN complex^{28,29)}、非相同末端結合修復系の DNA-PK, Ku70/80^{30,31)} および塩基除去修復系の DNA pol. β ³²⁾ など多くの DNA 修復因子が変性する。このようにハイパーサーミアは異なるタイプの修復系を同時に阻害することが期待できる³³⁾。そのためがん細胞よりも DNA 修復能が亢進しているがん幹細胞に対しては、放射線治療とハイパーサーミアの併用が非常に有効であると考えられる。

2) 細胞生存シグナル伝達系

細胞生存シグナル伝達経路の鍵となる Akt の放射線による活性化は、がん細胞よりがん幹細胞の方が亢進していること、さらにはがん幹細胞ではハイパーサーミアによる Akt の阻害により放射線増感が見られることが報告されている²¹⁾。また細胞生存にかかわるその他多数のタンパク質、例えば Src, EGFR, Raf1, HSF1, HIF-1 α などを同時に阻害することも効果的と考えられる。これらのタンパク質は Hsp90 のシャペロン機能によって保護されているクライアントプロテインなので、Hsp90 阻害剤をハイパーサーミアと併用することによりがん幹細胞のハイパーサーミア増感が期待できる。実際に Hsp90 阻害剤 (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-AAG) による肝がん幹細胞様細胞の磁気ハイパーサーミア増感が報告されている³⁴⁾。また MCF-7 細胞株と MIA PaCa-2 細胞株において、ハイパーサーミアががん細胞よりがん幹細胞様細胞でより強く metformin 感受性を増強することが報告されている³⁵⁾。ハイパーサーミアと metformin の併用処理が AMPK の活性化を強め mTOR の不活性化をもたらすことが示された。さらに大腸がん細胞株 (HCT116 および SW620) において、ヘキスト 33342 色素に弱蛍光性を示し、がん幹細胞様細胞と見なされる side population (SP) 細胞および CD133 陽性細

胞の割合がマイルドハイパーサーミア（40℃）によって減少することが報告されている³⁶⁾。これらの細胞のスフェア形成能や幹細胞マーカー発現率はマイルドハイパーサーミアによって低下した。

5. がん幹細胞に対するナノ粒子を用いたハイパーサーミアの有効性

近年、がん幹細胞に対するナノ粒子を用いたハイパーサーミアの有効性が注目されている。ナノシェルは表面の伝導性金属電子がレーザー光照射で振動することにより熱を発することが知られている。このしくみを利用したフォトハイパーサーミアが考案されている。マウス移植乳がん腫瘍を放射線単独処理あるいはナノシェルハイパーサーミア単独処理した場合は、それぞれ、乳がん幹細胞の数は減少しない傾向にあったが、ナノシェルハイパーサーミアを放射線と併用すると、乳がん幹細胞の致死率を上げ、腫瘍サイズの著しい縮小がもたらされた³⁷⁾。このハイパーサーミアの作用メカニズムについては明らかにされていないが、DNA修復障害が要因であろうと推察された³⁸⁾。また aldehyde dehydrogenase (ALDH) 陽性でスフェア形成能を有する MCF-7 細胞の乳がん幹細胞様細胞や HMLER^{shEcadherin} がん幹細胞は体外から加温するハイパーサーミアに対して抵抗性を示すが、ナノ粒子を介したフォトハイパーサーミアではがん幹細胞選択的に感受性が上がることが報告されている^{39,40)}。しかしながら、このハイパーサーミアの作用メカニズムについてもまだよく分かっていない。さらに、A549 および MDA-MB-231 培養細胞のがん幹細胞様細胞（SP 細胞）に、体外から加温するハイパーサーミアを処理した場合はがん幹細胞様細胞の割合は減少しなかったが、マグネタイトコアを用いた磁気ハイパーサーミア処理した場合には、がん細胞に比べてがん幹細胞様細胞に多くのマグネタイトコアが取り込まれ、がん幹細胞様細胞が選択的に死滅した⁴¹⁾。がん幹細胞に対して、より選択的な、より効果的なハイパーサーミアが可能となれば、がん幹細胞標的治療として大きな期待を寄せることができる。また磁気ハイパーサーミアでは、ネクローシス、活性酸素種の発生、遅延性の細胞死なども誘導されるため、その多面的な効果による治療効果も期待される。このようにがん幹細胞様細胞に対するナノ粒子を用いたハイパーサーミアの有効性が注目される。しかし、血管から離れた低酸素領域にナノ粒子を効果的に到達させる方法については、今後詳しく検討される必要がある。

6. おわりに

効果的ながん治療を行うためには、腫瘍内に存在するがん幹細胞の性質を正しく理解し、効率良く死滅させる必要がある。しかしながら、がん幹細胞の性質については、まだ不明な点が多く、有効な治療法はまだ提示されていない。今後、ハイパーサーミアにおいて本総説で述べたようながん幹細胞の生存に関わる因子を標的とした分子標的ハイパーサーミア治療の培養細胞レベルおよび移植腫瘍レベルでの基礎研究が進展し、新たな治療戦略が開発されることを期待したい。

引用文献

- 1) Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B., Eaves C.J., Jamieson C.H.M., Jones D.L., Visvader J., Weissman I.L., Wahl G.M.: Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66: 9339-9344, 2006.
- 2) 佐谷秀行, 永野修.: 固形がんのがん幹細胞を標的とした治療戦略の考案. *がん分子標的治療*, 12: 10-13, 2014.
- 3) Bar E.E., Lin A., Mahairaki V., Matsui W., Eberhart C.G.: Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol*, 177: 1491-1502, 2010.
- 4) Iida H., Suzuki M., Goitsuka R.: Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4

- and SOX2. *Int J Oncol*, 40: 71-79, 2012.
- 5) Halban P.A., Wollheim C.B., Blondel B., Meda P., Niesor E.N., Mintz D.H.: The possible importance of contact between pancreatic islet cells for the control of insulin release. *Endocrinol*, 111: 86-94, 1982.
 - 6) Lathia J.D., Hitomi M., Gallagher J., Gadani S.P., Adkins J., Vasanthi A., Liu L., Eyler C.E., Heddleston J.M., Wu Q., Minhas S., Soeda A., Hoepfner D.J., Ravin R., McKay R.D., McLendon R.E., Corbeil D., Chenn A., Hjelmeland A.B., Park D.M., Rich J.N.: Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death and Disease*, 2: e200, 2011.
 - 7) Navin N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., McIndoo J., Cook K., Stepansky A., Levy D., Esposito D., Muthuswamy L., Krasnitz A., McCombie W.R., Hicks J., Wigler M.: Tumor evolution inferred by single cell sequencing. *Nature*, 472: 90-94, 2011.
 - 8) Wang Y., Waters J., Leung M.L., Unruh A., Roh W., Shi X., Chen K., Scheet P., Vattathil S., Liang H., Multani A., Zhang H., Zhao R., Michor F., Meric-Bernstam F., Navin N.E.: Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature*, 512: 155-160, 2014.
 - 9) 鹿島幸恵, 鈴木絢子, 鈴木穰: 一細胞解析技術とその応用. *医学のあゆみ*, 258: 269-273, 2016.
 - 10) 荒井文用: 幹細胞研究における一細胞解析. *医学のあゆみ*, 258: 293-298, 2016.
 - 11) <http://economic.jp/?p=68671>
 - 12) Sutherland R.M.: Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. *Science*, 240: 177-184, 1988.
 - 13) Ohnishi K., Tani T., Bando S., Kubota N., Fujii Y., Hatano O., Harada H.: Plastic induction of CD133^{AC133}-positive cells in the microenvironment of glioblastoma spheroid. *Int J Oncol*, 45: 581-586, 2014.
 - 14) Bao S., Wu Q., McLendon R.E., Hao Y., Shi Q., Hjelmeland A.B., Dewhirst M.W., Bigner D.D., Rich J.N.: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444: 756-760, 2006.
 - 15) Dean M., Fojo T., Bates S.: Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*, 5: 275-284, 2005.
 - 16) Bjornson C.R., Cheung T.H., Liu L., Tripathi P.V., Steeper K.M., Rando T.A.: Notch signaling is necessary to maintain quiescence in adult muscle stem cells. *Stem Cells*, 30: 232-242, 2012.
 - 17) Quail D.F., Taylor M.J., Postovit L.M.: Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. *Curr Stem Cell Res Ther*, 7: 197-216, 2012.
 - 18) Charles N., Ozawa T., Squatrito M., Bleau A.M., Brennan C.W., Hambardzumyan D., Holland E.C.: Perivascular nitric oxide activates notch signaling and promotes stem-like character in PDGF-induced glioma cells. *Cell Stem Cell*, 6: 141-152, 2010.
 - 19) Diehn M., Cho R.W., Lobo N.A., Kalisky T., Dorie M.J., Kulp A.N., Qian D., Lam J.S., Ailles L.E., Wong M., Joshua B., Kaplan M.J., Wapnir I., Dirbas F.M., Somlo G., Garberoglio C., Paz B., Shen J., Lau S.K., Quake S.R., Brown J.M., Weissman I.L., Clarke M.F.: Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, 458: 780-783, 2009.
 - 20) Vermeulen L., Sprick M.R., Kemper K., Stassi G., Medema J.P.: Cancer stem cells—old concepts, new insights. *Cell Death Different*, 15: 947-958, 2008.
 - 21) Man J., Shoemaker J.D., Ma T., Rizzo A.E., Godley A.R., Wu Q., Mohammadi A.M., Bao S., Rich J.N., Yu J.S.: Hyperthermia sensitizes glioma stem-like cells to radiation by inhibiting AKT signaling. *Cancer Res*, 75: 1760-1769, 2015.
 - 22) Nogueira V., Park Y., Chen C.C., Xu P.Z., Chen M.L., Tonic I., Unterman T., Hay N.: Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. *Cancer Cell*, 14: 458-470, 2008.
 - 23) Di Tomaso T., Mazzoleni S., Wang E., Soven G., Clavenna D., Franzin A., Mortini P., Ferrone S., Doglioni C., Marincola F.M., Galli R., Parmiani G., Maccalli C.: Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res*, 16: 800-813, 2010.
 - 24) Kawakami Y., Matsushita M., Ueda R., Tsukamoto N., Ohta S.: Immunotherapy targeting cancer stem cells (Japanese).

- Nihon Rinsho Japan J Clin Med 70: 2142-2146, 2012.
- 25) Wei J., Barr J., Kong L.Y., Wang Y., Wu A., Sharma A.K., Gumin J., Henry V., Colman H., Sawaya R., Lang F.F., Heimberger A.B.: Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clin Cancer Res*, 16: 461-473, 2010.
 - 26) Masunaga S., Ono K., Akaboshi M., Nishimura Y., Suzuki M., Kinashi Y., Takagaki M., Hiraoka M., Abe M.: Reduction of hypoxic cells in solid tumours induced by mild hyperthermia: special reference to differences in changes in the hypoxic fraction between total and quiescent cell populations. *Br J Cancer*, 76: 588-593, 1997.
 - 27) Ning N., Pan Q., Zheng F., Teitz-Tennenbaum S., Egenti M., Yet J., Li M., Ginestier C., Wicha M.S., Moyer J.S., Prince M.E., Xu Y., Zhang X.L., Huang S., Chang A.E., Li Q.: Cancer stem cell vaccination confers significant antitumor immunity. *Cancer Res*, 72: 1853-1864, 2012.
 - 28) Eppink B., Krawczyk P.M., Stap J., Kanaar R.: Hyperthermia-induced DNA repair deficiency suggests novel therapeutic anti-cancer strategies. *Int J Hypertherm*, 28: 509-517, 2012.
 - 29) Krawczyk P.M., Eppink B., Essers J., Stap J., Rodermond H., Odijk H., Zelensky A., van Bree C., Stalpers L.J., Buist M.R., Soullié T., Rens J., Verhagen H.J., O'Connor M.J., Franken N.A., Ten Hagen T.L., Kanaar R., Aten J.A.: Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 9851-9856, 2011.
 - 30) Matsumoto Y., Suzuki N., Sakai K., Morimatsu A., Hirano K., Murofushi H.: A possible mechanism for hyperthermic radiosensitization mediated through hyperthermic lability of Ku subunits in DNA-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 234: 568-572, 1997.
 - 31) Ihara M., Takeshita S., Okaichi K., Okumura Y., Ohnishi T.: Heat exposure enhances radiosensitivity by depressing DNA-PK kinase activity during double strand break repair. *Int J Hypertherm*, 30: 102-109, 2014.
 - 32) Kampinga H.H., Dynlacht J.R., Dikomey E.: Mechanism of radiosensitization by hyperthermia (≥ 43 degrees C) as derived from studies with DNA repair defective mutant cell lines. *Int J Hypertherm*, 20: 131-139, 2004.
 - 33) Oei A.L., Vriend L.E.M., Crezee J., Franken N.A.P., Krawczyk P.M.: Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiat Oncol*, 10:165, 2015.
 - 34) Yang R., Tang Q., Miao F., An Y., Li M., Han Y., Wang X., Wang J., Liu P., Chen R.: Inhibition of heat-shock protein 90 sensitizes liver cancer stem-like cells to magnetic hyperthermia and enhances anti-tumor effect on hepatocellular carcinoma-burdened nude mice. *Int J Nanomed*, 10: 7345-7358, 2015.
 - 35) Lee H., Park H.J., Park C.S., Oh E.T., Choi B.H., Williams B., Lee C.K., Song C.W.: Response of breast cancer cells and cancer stem cells to metformin and hyperthermia alone or combined. *PLoS One* 9: e87979, 2014.
 - 36) Gao F., Ye Y., Zhang Y., Yang J.: Water bath hyperthermia reduces stemness of colon cancer cells. *Clin Biochem*, 46:1747-1750, 2013.
 - 37) Atkinson R.L., Zhang M., Diagaradjane P., Peddibhotla S., Contreras A., Hilsenbeck S.G., Woodward W.A., Krishnan S., Chang J.C., Rosen J.M.: Thermal enhancement with optically activated gold nanoshells sensitizes breast cancer stem cells to radiation therapy. *Sci Transl Med*, 2: 55ra79, 2010.
 - 38) Pelicci P.G., Dalton P., Orecchia R.: Heating cancer stem cells to reduce tumor relapse. *Breast Cancer Res*, 13: 305, 2011.
 - 39) Burke A.R., Singh R.N., Carroll D.L., Wood J.C., D'Agostino R.B. Jr, Ajayan P.M., Torti F.M., Torti S.V.: The resistance of breast cancer stem cells to conventional hyperthermia and their sensitivity to nanoparticle-mediated photothermal therapy. *Biomaterials*, 33: 2961-2970, 2012.
 - 40) Xu Y., Wang J., Li X., Liu Y., Dai L., Wu X., Chen C.: Selective inhibition of breast cancer stem cells by gold nanorods mediated plasmonic hyperthermia. *Biomaterials*. 35: 4667-4677, 2014.
 - 41) Sadhukha T., Niu L., Wiedmann T.S., Panyam J.: Effective elimination of cancer stem cells by magnetic hyperthermia. *Mol Pharm*, 10: 1432-1441, 2013.