

## 구강 편평세포암종에서의 암줄기세포 이론과 최신 지견

김덕훈 · 윤준용 · 이주현 · 김성민 · 명 훈

서울대학교 치의학대학원 치의학과 구강악안면외과학교실

**Abstract** (J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg 2011;37:97-108)

## Cancer stem cell theory and update in oral squamous cell carcinoma

Deok-Hun Kim, Jun-Yong Yun, Ju-Hyun Lee, Hoon Myoung, Soung-Min Kim

Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

Cancer stem cells have stem cell-like features, such as the ability for self-renewal and differentiation but show unlimited growth because they have the lost normal regulation of cell growth. Cancer stem cells and normal stem cells have similar features. They show high motility, diversity of progeny, robust proliferative potential, association with blood vessels, immature expression profiles, nestin expression, epidermal growth factor (EGF)-receptor expression, phosphatase and tensin homolog (PTEN) expression, hedgehog pathway activity, telomerase activity, and Wnt pathway activity. On the other hand, with cancer cells, some of these signaling pathways are abnormally modified. In 1875, Cohnheim suggested the concept of cancer stem cells. Recently, evidence for the existence of cancer stem cells was identified. In 1994, the cancer stem cells' specific cell surface marker for leukemia was identified. Since then, other specific cell surface markers for cancer stem cells in solid tumors (e.g. breast and colon cancer) have been identified. In oral cancer, studies on cancer stem cells have been performed mainly with squamous cell carcinomas. Oral cancer specific cell surface markers, which are genes strongly expressed in oral cancer and cancer stem cell specific side populations, have been identified. Cancer stem cells are resistant to radiotherapy and chemotherapy. Therefore, to eliminate malignant tumors efficiently and reduce the recurrence rate, therapy targeting cancer stem cells needs to be performed. Currently, studies targeting the cancer stem cells' specific signaling pathways, telomerase and tumor vasculatures are being done.

**Key words:** Neoplastic stem cells, Cell surface antigens, Signal pathways, Mouth neoplasms, Cancer chemotherapy

[paper submitted 2010. 12. 10 / revised 2011. 3. 17 / accepted 2011. 4. 13]

## 1. 줄기세포

줄기세포는 자가재생(self-renewal)을 할 수 있고, 각 기관의 세포로 분화(differentiation)하여 기관형성(organogenesis)을 이룰 수 있는 미성숙(immature) 세포를 말한다. 줄기세포는 크게 두 종류로 분류할 수 있다. 배아줄기세포(embryonic stem cell)는 신체의 어느 기관으로도 분화할 수 있고, 주머니배(blastocyst)에서 기원한다. 연구목적의 줄기세포는 수정 후 6일경에 세포 수가 대략 200개인 주머니배의 내세포괴(inner cell mass)에서 채취한다. 다른 종류의 줄기세포는 성인줄기세포(adult stem cell)이다. 성인줄기세포

는 자가재생과 분화를 할 수 있다는 점에서는 배아줄기세포와 동일하지만 분화가 주로 특정 기관 내 세포로 이루어진다는 점에서 배아줄기세포와 구분된다. 성인줄기세포의 대표적인 예로 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell)을 들 수 있다.

줄기세포는 분화하여 하나는 줄기세포로, 다른 하나는 분화하는 세포로 된다. 이러한 형태의 분열을 비대칭분열(asymmetric division)이라 한다. 이 분열과정에는 천천히 증식하는 줄기세포, 빠르게 증식하는 이행증폭세포(transit amplifying cell), 최종분화세포(terminally differentiated cell)가 존재한다. 이러한 자가재생과 분화는 줄기세포 주변의 미세환경(stem cell niche)과의 상호작용으로 조절되고 있다. 조혈줄기세포의 계통 특이적 발생(lineage specific differentiation)은 다양한 신호경로(signaling pathway)를 활성화하는 cytokine과 성장인자에 의해 조절된다. 이러한 신호경로에는 bone morphogenetic protein (BMP) 신호경로, Wnt 신호경로 그리고 Notch 신호경로 등이 있다<sup>1</sup>. 조혈줄기세포에서 이러한 상호작용의 한 형태를 볼 수 있다. 기저층에

**명 훈**

110-749 서울특별시 종로구 연건동 28

서울대학교 치의학대학원 치의학과 구강악안면외과학교실

**Hoon Myoung**Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Dentistry,  
School of Dentistry, Seoul National University

28, Yeongeong-dong, Jongno-gu, Seoul, 110-749, Korea

TEL: +82-2-2072-3059 FAX: +82-2-766-4948

Email: myoung@snu.ac.kr

\*이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2010-0016443).

존재하는 조골세포(osteoblast)는 조혈줄기세포의 휴지(休止, quiescence)를 매개하는 niche cell이다. 이는 조골세포가 분비한 angiopoietin-1이 조혈줄기세포의 Tie-2 surface receptor에 결합되어 이루어진다<sup>2</sup>. 혈관 주변부는 조혈줄기세포의 또 다른 niche로 작용한다. 이곳에서 국소적으로 chemokine인 CXCL12가 발현된다<sup>3</sup>. 조혈줄기세포에서 CXCL12 chemokine receptor인 CXCR4과 CD44가 발현되면 이 세포들은 다른 niche로 유도된다<sup>4</sup>.

## 2. 암줄기세포의 개념

암줄기세포(cancer stem cell)는 줄기세포와 같이 비대칭적 분열을 통해 자가재생과 분화를 할 수 있으나, 정상 줄기세포와 달리 분열조절능력에 장애가 생겨 종양을 생성하는 세포이다. 최근 연구를 통해 정상 줄기세포에서 발견되는 Notch<sup>5,7</sup>, Sonic hedgehog (SHH)<sup>8-12</sup>, Wnt<sup>13,14</sup>,  $\beta$ -catenin, phosphatase and tensin homolog [HONG7](PTEN), transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , Bmi-1<sup>15-21</sup> 등의 신호경로가 악성 종양에서 변형되어 있음이 밝혀 졌다. 암줄기세포는 정상 줄기세포와 높은 운동성, 자손(progeny)의 다양성, 강한 증식 잠재력, 혈관계(vasculature), 미성숙한 발현양상, nestin, epidermal growth factor (EGF)-receptor, PTEN의 발현, Hedgehog 신호경로 활성화도, telomerase 활성화도, Wnt 신호경로 활성화도 등에서 공통된 특징을 보인다<sup>22</sup>.(Fig. 1)

암줄기세포는 다음과 같은 기본적인 특성이 있다. 첫째, 본래의 줄기세포 집단을 유지하기 위해 자가재생을 할 수

있어야 한다. 둘째, 암줄기세포는 다양한 종류의 성숙세포로 분화할 수 있어야 한다. 셋째, 줄기세포의 총 수는 외부와 내부 기제(mechanism)에 의해 엄격하게 조절되어야 한다. 이 3가지의 기본적인 특성에 기반해서, 암줄기세포 집단을 확인하기 위한 4가지의 중요한 방법론이 개발되었다. 첫째, 암줄기세포의 유지를 촉진하는 배양 상황에서 sphere assay에 의해 강화되면(enriched) 종양 sphere를 형성한다. 둘째, 암줄기세포에 대해 강화되는 side population을 Hoechst 33342 staining을 사용하여 확인할 수 있다. 셋째, 여러 세대를 통해서 암줄기세포의 작은 집단이 병렬적으로 이식(serially transplanted)될 수 있다. 넷째, 암세포의 매우 작은 부분만이 면역억제 쥐로 이식되어도 암을 유발할 수 있다<sup>23</sup>.

## 3. 암줄기세포의 발견과 연구

종양이 줄기세포에서 기원할 것이라는 가설은 1875년 Cohnheim의해 제안되었으나 최근에 이르러서야 존재를 증명하는 증거들이 발견되고 있다<sup>24</sup>. 1961년 Southam과 Brunschwig<sup>25</sup>은 고형 악성 종양(solid malignancy)을 피하로 자가이식(auto transplantation)하였을 때 59명의 환자 중 단지 14명의 환자에서만 결절(nodule)이 발생하는 것을 발견하여 종양세포 중 제한된 수의 세포만이 종양을 형성할 수 있음을 제안하였다. 1997년 Bonnet과 Dick<sup>26</sup>에 의해 인간 종양세포가 면역억제 쥐로 이식되었다. 이 중 CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> 표현형은 백혈병(leukemia)을 일으켰으나, CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup>

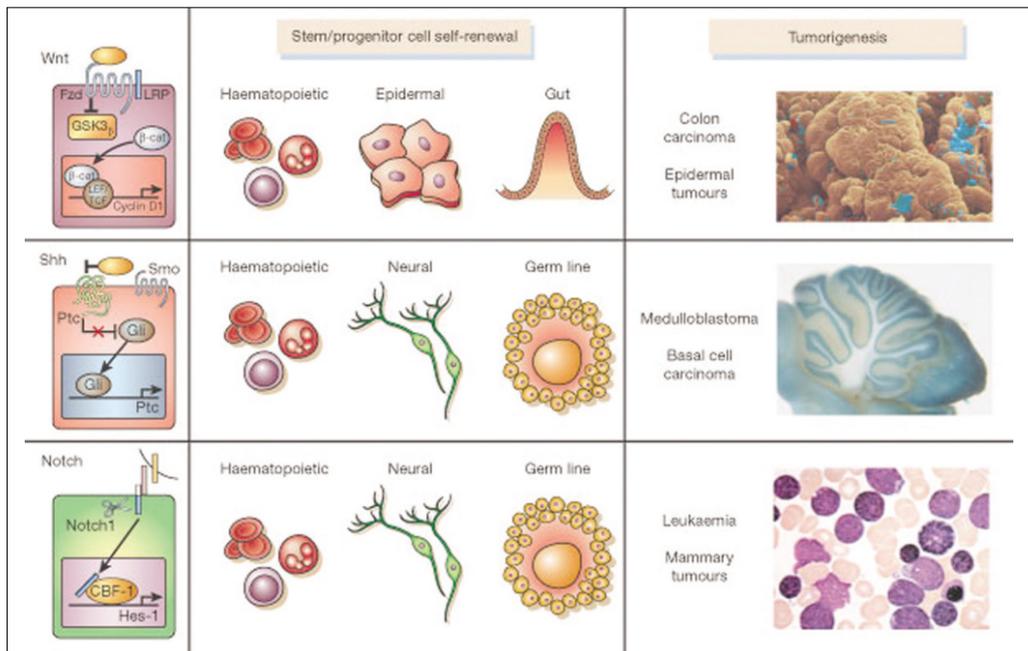


Fig. 1. Signalling pathways that regulate self-renewal mechanisms during normal stem cell development and during transformation<sup>27</sup>.

표현형에서는 백혈병이 발생하지 않았고, 백혈병을 유발하는 세포(leukemia initiating cell)의 빈도는 1:250,000이었다. 이를 통해 최초로 생체 내(*in vivo*)에서 암줄기세포의 존재를 확인하였다. 2004년 Al-Hajj와 Clarke<sup>28</sup>은 유방암줄기세포에서 Lin-/ erythropoiesis-stimulating activity (ESA)-/CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/low 표지자가 50배(fold) 강화됨을 발견하였다. 2007년 Ricci-Vitiani 등<sup>29</sup>이 CD133<sup>+</sup>가 대장암줄기세포의 표지자가 될 수 있음을 밝혔다. Matsui 등<sup>30</sup>은 CD138<sup>-</sup>이 다발성 골수종(multiple myeloma)의 암줄기세포에 대한 표지자일 가능성을 제시하였다. 이와 같이 2000년대 초부터 유방암은 CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/low, 뇌종양, 대장암은 CD133<sup>+</sup>, 전립선암은 CD44<sup>+</sup>/α2β1hi/CD133<sup>+</sup>, 흑색종은 adenosine triphosphate binding cassette (ABC) sub-family B member 5 (ABCB5<sup>+</sup>) 등 고형암(solid tumor)에서도 암줄기세포의 표지자가 될 수 있는 표지자들이 제시되었다. 이러한 암세포주에서 추출된 세포표면 표지자(cell surface marker)는 정상 줄기세포에서도 발견할 수 있다.

1996년 Goodell 등<sup>31</sup>은 side population이라는 골수유래세포를 기술하였다. 이 세포들은 형광 DNA 염료(fluorescent DNA staining dye)인 Hoechst 33342 dye를 축적하지 않았다. 이 연구자들은 side population이 조혈줄기세포에 풍부하게 존재함을 밝혀냈다<sup>32</sup>. Hoechst 33342을 능동적으로 배출하는 side population의 표현형은 ABC subfamily G member 2 (ABCG2)나 수송단백질(transporter proteins)의 ABC family인 breast cancer resistance protein (BCRP)의 발현과 밀접하게 관련된 것이 밝혀졌다. 최근에는 side population이 신경교세포종(neuroblastoma), 유방암, 폐암, 교모세포종(glioblastoma), 난소암(ovarian cancer) 등에서 발견되었고, 암줄기세포의 기원으로 제안되었다<sup>33-37</sup>.

#### 4. 암줄기세포 가설

암줄기세포 가설은 종양은 조직 내의 줄기세포에서 발생한다는 것과 그 세포로부터 발생하여 구성된 종양은 줄기세포의 기본적인 특성을 가지고 있어야 한다는 것으로 구성된다<sup>38</sup>.

기존의 시각을 통해 바라보는 암조직의 구성은 stochastic model로 설명한다. 여러 종류의 암세포로 구성된 암에서 각각 암세포는 스스로를 복제할 수 있는 자가복제능력을 지니고 있고, 한 종류의 암세포는 유전적 돌연변이(genetic mutation)가 축적되어 다른 종류의 암세포로 변화할 수 있다. Stochastic model에서는 거의 모든 종류의 암세포들이 각각 암을 형성할 수 있는 능력을 지니고 있다. 만약 모든 종류의 암세포들이 자가복제능력을 지니고 있다면 소수의 암세포만으로도 면역억제 위에서 암이 발생되어야 한다. 그러나 실제로는 암이 잘 발생되지 않고, 많은 수의 암세포를 주입해야 암이 발생한다. 이를 바탕으로 암세포 중의 일부분만 암을 형성할 수 있는 능력을 가지고 있다는 가설을 이끌어 낼 수 있다. 이러한 세포를 암줄기세포로 볼 수 있다. 이 가설은 hierarchial model로 설명된다. Hierarchial model에서는 최초에 형질전환을 일으킨 암줄기세포가 존재하고, 이 암줄기세포는 정상 줄기세포의 특성을 유지하고 있어, 자가복제능력을 유지해 같은 종류의 암줄기세포를 만들어내고 동시에 분화한 여러 종류의 세포들을 만들어 낸다. 분화한 세포들은 자가복제능력이 없으므로 암을 형성할 수 없다. 이 모델을 이용하면 암을 형성하려면 왜 매우 많은 수의 암세포가 필요한지를 쉽게 이해할 수 있다. 많은 수의 암세포 중 암줄기세포는 매우 소수이며, 이 암줄기세포가 있어야 다시 암이 발생하기 때문이다<sup>39</sup>.(Fig. 2)

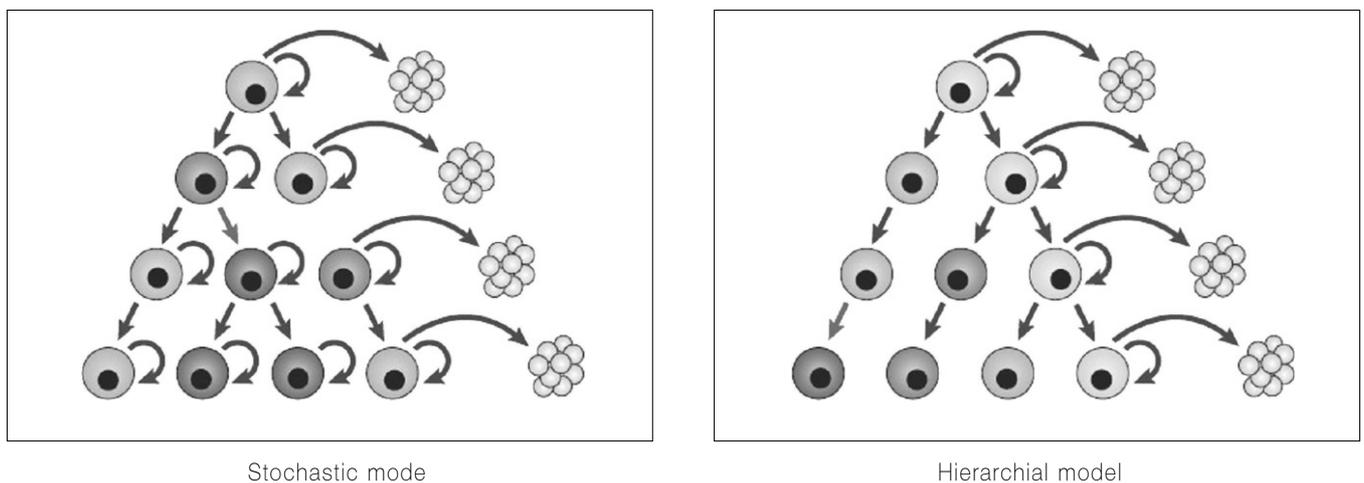


Fig. 2. Stochastic model and Hierarchial model<sup>40</sup>.

Polyak과 Hahn<sup>39</sup>은 정상적인 세포의 암줄기세포로의 변형이 크게 3가지로 이루어짐을 제시하였다. 첫 번째 변형 유형은 변이가 줄기세포의 비대칭세포 분열단계에서 일어나 종양이 대부분 다능성이 떨어지는 딸세포(*less multipotent daughter cell*)로 구성되는 것이다<sup>41</sup>. 상피암이 다양한 분화 정도를 보이는 세포들로 구성되어 있다는 점에서 이러한 유형의 변형을 추정할 수 있다<sup>42</sup>. 두 번째 유형은 줄기세포 자체에 유전자변이가 축적되어 종양이 형성되는 것이다. 이 모델에서는 암줄기세포가 분화능력을 가지므로 악성 종양에서 보이는 다양한 분화를 설명할 수 있다. 세 번째 유형은 이행증폭세포 또는 분화된 상피세포의 유전자변이로 인해 역분화(*dedifferentiated*)가 일어나고 이러한 세포들이 줄기세포와 유사한 형질을 나타낸다는 것이다<sup>43,44</sup>. 이 모델의 증거는 초파리의 난소에서 소수의 정상인 이행증폭세포들이 줄기세포로 다시 돌아가는 능력을 보이는 것에서 볼 수 있다<sup>45</sup>.

### 5. 구강 암줄기세포 연구

중층 편평상피는 인체를 환경으로부터 보호하는 역할을 한다. 기저막 하에 존재하는 기저층의 줄기세포에서 증식이 일어나고, 세포가 조직표면을 따라서 이동하는 동안 최종분화가 일어난다. 가장 바깥층의 세포들은 일생을 통해 떨어져 나가고 기저층의 줄기세포의 증식을 통해 대체된다. 표피(*epidermis*), 구강, 자궁경부(*cervix*), 식도(*oesophagus*)의 내피를 예로 들 수 있다. 중층 편평상피에 특징적인 대표적 암종으로 편평세포암을 들 수 있다<sup>46</sup>.

구강 편평상피세포암이 줄기세포로부터 유래할 수 있다는 데에는 다양한 시나리오가 있다. 악성 줄기세포(*malignant stem cell*)로 부터 직접 유래할 수도 있고, 분화하는 세포가 예정된 분화과정에서 벗어나 악성의 상피 내(*intraepithelial*) 세포로 변환되면서 기저층 상부(*suprabasal compartment*)에서 악성 잠재성(*tumorigenic potential*)이 발현되는 것일 수도 있다. 후자는 상피내암(*carcinoma in situ*)에서 기저막은 온전한 상태이고 전형적인 악성을 나타내는 세포가 상피 내에만 존재하는 것에 의해 지지될 수 있다. 이 병소에서 악성 잠재력은 편평상피의 *stratum basale*가 아닌 *stratum spinosum*에서 발현되는 것으로 보인다. 이러한 구강 편평상피세포암의 역분화는 전형적으로 p53 돌연변이와 DNA 복구기전(*DNA repair mechanism*)의 손실과 관계된다<sup>47,48</sup>. 이에 더해 암유전자(*oncogene*)의 활성화, 종양억제 유전자의 하향 조절(예를 들어, CD82) 그리고 E-cadherin과  $\beta$ -catenin 같은 세포-세포 접촉 단백질의 하향 조절이 구강 편평상피세포암의 특징으로 기술되었다<sup>49-55</sup>. 이로 보아 구강 편평상피세포암은 구강과 진피의 표피 내의 *stratum basale*에 존재하는 것으로 추정되는 악성 각질세포(*keratinocyte*)와 그에 대응하는 악성 줄기세포로부터 유래하는 것으로 추정된다. 이는 상피줄기세포를 면역조직학적으로

연구하는 과정에서도 확인되었다. 줄기세포는 진피유두(*dermal papilla*)와 기저막(*basal membrane*)에 가장 많이 존재하였다<sup>56</sup>.

몇몇 신호경로들이 표피의 세포주기와 각질세포의 정상 분화과정 조절에 연관되어 있다<sup>57</sup>. 안면부에서 발생하는 기저세포암(*basal cell carcinoma*)에서 이러한 연관성에 관한 연구가 이루어졌다. Notch 유전자는 하나의 큰 막 통과 단백질(*transmembrane protein*)을 암호화(*encode*)하고 있고, 이 단백질은 정상적인 표피 완전성(*integrity*)과 기능에 필수적이다. 피부와 구강점막에서 Notch1과 Notch2 신호경로는 각질세포의 분화를 유도하고 조절한다. 이 중 Notch2가 기저표피층에만 존재하고 Notch1이 모든 표피층에 존재하는 양상은, 조직에 따라 국소화(*localization*) 되는 것은 특수한 기능이 있음을 암시한다. 피부에서 Notch1과 Notch2는 종양억제자(*tumor suppressor*)로 작용하고 줄기세포 유지, 증식, 세포사를 조절하는 것으로 생각된다<sup>58-60</sup>. 기저세포암의 경우 SHH 신호전송이 증가하고 Wnt 신호경로의 활성이 증가되는 것이 악성 전환의 분자적 원인으로 밝혀졌다. 이러한 불균형은 Notch의 결핍 그리고 Notch1, Notch2 발현이 기저세포암에서 감소되는 것과 강하게 연관되어 있다<sup>60</sup>. 동물실험에서 Notch 유전자를 결손(*deletion*)시켜 쥐에서 기저세포암이 유도될 수 있음이 알려졌다<sup>61-63</sup>. 그리고 자외선 노출이, 특히 Notch1 결핍 피부 부위에서, 악성 기저세포로의 변환을 유발했다.

두경부 편평세포암에서도 이와 같은 연구가 이루어져 암의 발생, 진행, 재발, 전이에 암줄기세포가 연관될 수 있다는 것이 밝혀졌다<sup>64-66</sup>. Chen 등<sup>67</sup>에 의해 암줄기세포 가설이 인두암과 비인두암을 포함한 몇몇 두경부 악성 암에서 시험되었다<sup>66,67</sup>. 원발 구강 편평세포암에 존재하는 줄기세포 및 증폭세포와 관련된 증식 잠재력과 클론원성(*clonogenic*)을 지닌 부차 집단(*subpopulation*)을 포함한 세포들이 기관형적 시험관 내 배양(*organotypic in vitro culture*) 모델을 사용해서 구강 편평세포암에서 분리되었다<sup>68</sup>. 분리 후 몇 년이 지나고 광범위한 시험관 내 증식(*in vitro propagation*)를 거친 후에도 구강 편평세포암에서 분리된 세포주는 현저한 이형성(*heterogeneity*)을 나타내고, 종양유발세포뿐만 아니라 정상 구강 상피의 줄기세포 및 증폭세포들에 해당하는 세포들을 포함하고 있었다. 이 집락은 암줄기세포의 기본적인 특성을 나타낸다<sup>69</sup>. 이 *holoclone* 형태의 뚜렷한 집락을 지닌 구강 편평세포유래세포주는  $\beta$ 1-integrin, E-cadherin,  $\beta$ -catenin 그리고 *epithelial specific antigen (ESA)*와 같은 줄기세포와 관계된 분자들을 더 많이 발현하고 있었다. 그러나 시험관 내와 생체 내에서 구강 편평세포암줄기세포 유사세포들을 식별할 신뢰할 만한 세포표면 표지자가 충분하지 않아 종양유발 시의 이 줄기세포들의 역할과 구강 편평세포암의 약물 내성(*drug resistance*)에 관해서는 아직 많은 부분이 알려져 있지 않다<sup>70</sup>.

앞서 언급된 바와 같이 현재까지 암줄기세포나 종양유발

세포는 고휘암으로부터 다양한 방식을 통해 성공적으로 분리되었다. 구강암 분야에서도 암줄기세포나 종양유발세포는 side population을 통해서 식별할 수 있고<sup>35,71</sup>, 특이적인 세포표면 표지자의 발현을 통해서도 식별할 수 있다. 두경부 편평세포암에서는 CD44<sup>+</sup> 세포의 부차 집단이 암줄기세포의 독특한 특성을 지닌 것으로 확인되었다<sup>66</sup>. Zhang 등<sup>72</sup>의 연구에서, 구강 편평세포암주에서 흐름세포 측정(flow cytometry) 또는 면역세포화학(immunocytochemistry)을 이용해서 CD133<sup>+</sup> 세포의 작은 부차 집단(1-2%)을 식별하고, 이 부차 집단 내에서 면역조직화학염색(immunohistochemical staining)과 면역형광염색(immunofluorescence staining)을 이용해 구강 편평세포암조직이 존재함을 확인하였다. 이 부차 집단이 암줄기세포와 같은 뚜렷한 특성을 지니고 있었다. 우선, CD133<sup>-</sup> counterpart에 비해서 시험관 내에서 clonogenicity와 침습성이 증가되었다. CD133<sup>+</sup> 구강 편평세포암세포가 줄기세포 특이적인 유전자를 더 많이 발현하는 점도 밝혀졌다. 반정량적 semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석법을 이용해서 octamer binding transcription factor-4 (OCT-4), human telomerase reverse transcriptase (hTERT), Nanog 그리고 ABCG2 유전자의 mRNA 발현 수준이 CD133<sup>-</sup> counterpart에 비해서 더 높은 것을 확인했고, 증가된  $\beta$ -catenin 발현이 면역형광 세포화학적(immunofluorescence cytochemical) 연구를 통해 확인되었다. 정제된 CD133<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup> 구강 편평세포암세포를 nude mouse에 접종해 생체 내에서 CD133<sup>+</sup> 구강 편평세포암세포가 종양을 잘 형성함을 밝혀냈다. 화학요법 내성을 확인하기 위해 paclitaxel를 사용해서 시험관 내와 생체 내에서 실험한 결과 CD133<sup>+</sup> 구강 편평세포암세포는 증가된 내성을 나타내었다. 이상의 발견을 기반으로, 암줄기세포의 특성을 나타내는 CD133<sup>+</sup> 세포가 구강 편평세포암의 발생과 재발에 기여할 수도 있음이 제안되었다.

Jensen 등<sup>73</sup>은 편평세포암에서의 줄기세포 유전자발현을 증명하였다. 열네 개의 인간 편평상피세포주에서 줄기세포 표지자의 발현을 확인하기 위해서 실시간 quantitative real time PCR을 사용하였다. 정상표피 및 구강 각질세포에 비해 대부분의 편평세포암세포주에서 2-3배 증가된 colony forming efficiency을 보였고, 분화 표지자인 involucrin의 발현은 감소되었다<sup>74</sup>. 증가된 clonal growth ability와 감소된 involucrin으로 비추어 볼 때, 편평세포암주는 원발 각질세포(primary keratinocyte)에 비해 줄기세포 비율이 더 많아 보였다.  $\beta$ 1-integrin의 높은 발현을 이용하여 clonogenic, putative 줄기세포를 강화할 수 있었다. 그럼에도 전체 줄기세포 표지자와 연관성(correlation)은 발견되지 않았다. 대신, 정상 줄기세포 표지자와 비교하여 발현이 증가, 감소되었는지 또는 다양한지에 따라 표지자는 3가지로 분류되었다. 편평세포암에서 하향 조절된 표지자는 microtubule associated protein 4 (MAP4)와 leucine-rich repeats and

immunoglobulin-like domains 1 (LRIG1)이었다. MAP4는 세포주기 진행을 조절하며 증식 중인 세포에서 널리 발견된다고 알려져 있다. LRIG1은 EGF receptor의 음성 조절자(negative regulator)로서 줄기세포의 휴지를 매개한다. 편평세포암종에서 일관되게 활성화 되어있는 표지자는 FRMD4A, oxidative stress response gene 1 (OSR1), 다른 스트레스 반응 유전자인 guanidine nucleotide binding protein 1-like protein (GNL1), serine kinase인 phosphorylase b kinase (PYK) 그리고 I- $\kappa$ B kinase/nuclear factor (NF)- $\kappa$ B cascade 조절자인 FLJ12875 등 이었다. 이 중 FRMD4A의 경우가 가장 활성화되었다. 그러나 정상 구강 각질세포에서도 FRMD4A 발현이 증가된 것으로 보아 악성 상태를 반영한다기 보다 기원을 반영하는 것으로 생각된다. 마지막으로 편평세포암종에서 다양한 발현정도를 보이는 표지자로 putative ring finger 단백질인 KIAA1991, DNA 복구(repair) 연관 domain을 포함하는 단백질인 family with sequence similarity (FAM) 120B, mRNA degradation과 관계된 RNase5a, 세포표면 proteoglycan인 melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan (MCSP), 초파리에서 polycomb과 trithorax을 조절하는 additional sex combs-like 1 (ASXL-1), putative 전사인자인 zinc finger protein 187 (ZFP187), ribosome 활성도를 조절하는 dimethyladenosine transferase 1-like (DIMT1L) 등이 있다. MCSP는 다양한 발현을 나타내는 표지자로 분류되었어도 7개의 구강 안면피의 원발 편평세포암세포주 중 5개에서 활성화되었다. 이처럼 전체 줄기세포 표지자와 연관성이 발견되지 않는 것 외에 편평세포암의 기저세포는 정상 구강과 표피 점막에서 관찰되는 표지자의 complement를 완전하게 유지하고 있지 않았다. 따라서 정상 줄기세포의 부분이 편평세포암에서 확장되어있다는 증거는 없다. MAP4와 LRIG1의 발현 감소가 일관되게 구강 편평세포암주에서 관찰되었는데, LRIG1의 상실은 epidermal growth factor receptor (EGFR) 신호를 강화하여 기저층의 성장을 촉진하고 committed progenitor를 확장하는 결과를 가져올 것이다. 이는 편평세포암의 불량한 예후와 관계되어 있을 수 있다<sup>75,76</sup>. 일곱 개의 구강 안면피의 원발성 편평세포암세포주 중 5개에서 활성화된 MCSP는 integrin 매개경로를 통해 small guanosine triphosphatases (GTPases)인 CDC42와 ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1)를 활성화한다<sup>77,78</sup>. 전에 보고된 바와 같이 small GTPase인 RAC1은 편평세포암에서 발현이 증가된다. MAP4의 상실이 편평세포암에서 어떤 결과를 일으키는지는 확실하지 않지만, MAP4가 세포주기 진행과 cytokinesis를 조절하는 여러 단백질의 전사 후 조절에 관계하는 것으로 볼 때, 세포주기가 더 급속하게 진행되도록 하는 것으로 추측된다<sup>79</sup>.  $\beta$ 1-integrins의 발현과 세포 외 기질 구성요소(extracellular matrix component)에 부착하는 능력에 따라 편평세포암주는 세포이형성(cellular heterogeneity)을 보였다. 결국, 암에서는 상피의 항상성을 유지하

는 경로가 상실되어 세포증식을 촉진시키고, 분화를 억제하는 표지자는 활성화되고, 비분화 상태를 유지하는 표지자는 하향 조절되었다.

Chen 등<sup>23</sup>은 SASVO3 세포주가 암줄기세포의 특성을 지님을 밝혀냈다. 종양을 생성할 수 있는 SAS-GFP 세포를 6주 된 nude mouse에 피하로 주입하여 각각 SASVO1, SASVO2, SASVO3라 이름 붙여진 3가지 이종이식 유래(xenograft-derived) SAS 세포주를 생성하였다. 이 중 SASVO3 세포주는 시험관 내에서 증식, 이주, 침습능력이 다른 세포주에 비해 증가되었고, 생체 내에서의 종양형성능력 또한 다른 세포주에 비해 뛰어났다. Hoechst 33342 dye를 통해 SASVO3 세포주에서 side population의 비율이 다른 세포주에 비해 높은 것 또한 확인할 수 있었다. 암세포와 줄기세포의 표지자는 Bmi-1, phosphorylated AKT (pAKT), CD133, CD44, Nanog, Oct-4, p21 그리고 p14INK4A/ARF 등이 있다. 이 중 CD133, CD44, Nanog 그리고 Oct-4는 암줄기세포의 공통된 표지자로 알려져 있다<sup>65,66</sup>. SASVO3 세포주는 이주와 침습이 강화되어 악성 전환 가능성이 높는데 이는 증가된 Bmi-1과 pAKT 발현과 관계된 것으로 보인다.

Häyry 등<sup>80</sup>에 의하면 Bmi-1, C-myc, Snail 발현정도는 허에서 발생한 편평세포암의 예후와도 관계된다. 개개 환자에 있어서 tumor, node, metastasis (TMN) stage는 임상적 결과를 신뢰성 있게 예측하지 못한다. 작은 T1 구강 편평세포암도 잠재적 결절전이(occult nodal metastasis)를 일으켜 공격적으로 행동할 수 있음이 밝혀졌다<sup>81</sup>. Bmi-1은 주요한 epigenetic regulator로 polycomb repressive complex 1의 필수 구성요소이다. Spivakov와 Fisher<sup>82</sup>의 chromatin과 histone 변형을 통해서 세포주기와 줄기세포의 자가복제를 조절한다. Bmi-1은 p16INK4A/ARF locus를 하향 조절하여 종양억제유전자인 Rb과 p53에 영향을 미칠 수 있다<sup>83</sup>. Bmi-1은 정상 점막에 비해 구강 편평세포암세포에서 과발현되는데 이로 인해 구강 악성 종양 발생에서 세포의 분열과 생존이 영향을 받는 것으로 여겨지고 있다<sup>84</sup>. C-myc는 다른 유전자와 함께 세포증식과 세포사(apoptosis)와 같은 기능을 활성화하는 전사요소이다. C-myc 또한 구강암 형성에 관계된다고 여겨진다. C-myc mRNA의 하향 조절은 불량한 예후와 관계가 있다<sup>85</sup>. Bmi-1과 함께 c-myc는 시험관 내에서 몇몇 세포들을 immortalizing 할 수 있다. 이 두 인자들은 공통의 신호경로를 가지고, 서로 영향을 미칠 수 있다. Snail은 세포 간 부착(cell adhesion)과 cadherin 등의 기저세포막 단백질(basement membrane protein)을 하향 조절하기 때문에 epithelial-mesenchymal transition의 필수 zinc-finger 전사요소로 알려져 있다<sup>86</sup>. 구강 편평세포암에서 Snail의 발현과 연관된 E-cadherin과  $\beta$ -catenin 등의 세포부착 분자의 상실은 암의 분화와 관계되어 있다. 전체적인 Snail의 발현정도는 매우 낮았지만 주로 침습적인 부분에서 탐지되었다. 이는 림프절전이와 관계된 것으로 보인다<sup>87</sup>. Häyry 등<sup>80</sup>의 연구결과에 의하면 허에서 발생한 편평세포암의 예후와

Bmi-1의 발현은 통계적 유의성을, c-myc와 Snail의 발현은 경향성(tendency)을 발견할 수 있었다.

2007년, Harper 등<sup>88</sup>은 두경부 편평세포암주에서 매우 희귀한 side population의 존재를 확인했다. Zhang 등<sup>89</sup>은 구강 편평세포암주와 원발 구강 편평세포암조직에서 side population과 non-side population 세포 간의 생물학적 특징을 비교하였다. Side population은 대부분의 암종에 존재하는데<sup>35-37</sup> 이는 구강 편평세포암에서도 side population이 암발생에 어떤 역할을 할 수 있음을 의미한다. Side population은 구강 편평세포암 표본에서 0.1%에서부터 10%까지 매우 다양하게 존재한다. 그러나 side population 세포와 non-side population 세포 간에 증식을 차이는 크지 않았다. 이로 보아 개개 구강 편평세포의 다양한 증식률에는 side population 세포가 큰 영향을 미치지 않는 것으로 생각한다. Side population이나 세포들이나 non-side population 세포들이 세포사와 연관된 sub-G1 군락에서 뚜렷하게 관찰되지 않은 것을 고려하면, side population 세포가 세포주기 중 G1기에 집중적으로 존재하는 반면, non-side population 세포들은 대부분 S기에 존재하는 것은 흥미로운 사실이다. Side population 세포가 줄기세포의 특성을 지니고 있는지 여부는 아직 논쟁 중인 문제이다. 이전에 행해진 연구<sup>37,90</sup>와 달리 Burkert 등<sup>91</sup>은 4개의 위장관 암세포주를 분석해, side population과 non-side population 세포들이 비슷한 clonogenicity과 생체 내 종양형성능을 보였다고 보고하였다. 게다가 이 저자들은 side population과 non-side population 세포들이 추가로 행해진 배양 중 서로 상호변환된 것을 발견하였다. 이를 바탕으로 side population 표현형은 위장관 암줄기세포의 보편적인 표지자가 아니라고 결론 내렸다. Zhang 등<sup>89</sup>의 연구에서는 이전 연구에서 제시된 바와 같이 구강 편평세포에서 유래된 side population 세포는 집락을 형성하는 능력이 더 강했고, involucrin, CK13의 낮은 발현과 CK19의 높은 발현 그리고 줄기세포 표지자(Bmi-1, NSPc1, Oct-4)의 높은 발현으로 보아 덜 분화된 것으로 보여졌다<sup>20,92,93</sup>. Non-side population 세포가 생체 내에서 종양을 형성하려면 최소 106개가 필요했던데 반해 side population 세포는 104개 정도면은 nude mouse에서 종양을 형성할 수 있었다. Side population 세포는 시험관 내와 생체 내에서 원래의 분류되지 않은(unsorted) 세포 집락을 닮은 side population과 non-side population 세포를 모두 형성할 수 있는 것 또한 관찰되었다. 이는 side population 세포가 줄기세포와 같은 능력을 지닌다는 개념과 맥락을 같이한다. 대조적으로 non-side population 세포는 side population 세포를 형성하지 못했다. Non-side population 세포가 생체 내 실험에서 종양세포를 거의 형성하지 못한다는 사실을 함께 비추어 보면, 구강 편평세포암에서 유래된 side population 세포는 줄기세포의 특성과 표현형을 지닌 것으로 결론지을 수 있다. 구강 편평세포암에서 유래된 side population 세포는 ABCG2의 높은 발현을 보였고, 다른 transporter member이자 다약물 내성을 나

타내는 ABCB1도 높은 수준으로 발현되었다.

### 6. 암줄기세포의 치료적 응용

암줄기세포는 천천히 증식하는 특징을 가지고 있고 DNA 복구를 할 수 있는 줄기세포의 특성을 지니고 있어, 세포독성 항암제에 내성을 지니고 있을 뿐 아니라 방사선 치료에도 내성을 가지고 있다. 이는 세포독성 항암제의 치료 표적은 빠른 증식을 보이는 세포이기 때문이다. 따라서 실질적으로 항암제에 대한 반응을 보이는 세포는 암줄기세포가 아닌 이행증폭세포일 가능성이 높다<sup>94</sup>. 분화 초기 단계의 유선모세포(earliest mammary progenitor cell)에서 기원한 것으로 추정되는 기저 세포형(basal cell phenotype) 유방암을 예로 들 수 있다<sup>95</sup>. 이 암종은 예후가 불량하고 기존의 항암요법에 저항성을 지닌 것으로 알려져 있다. 항암요법에 대한 저항성은 암줄기세포에 대한 치료가 안되었기 때문으로 볼 수 있다. 암줄기세포는 정상 줄기세포와 함께 세포에서 약물 세포 외로 배출시킬 수 있는 능력을 가지고 있어 항암요법에 대한 내성을 나타내는 것으로 보인다<sup>96</sup>.

이와 같은 맥락에서 암줄기세포는 최근 새로운 항암치료의 연구대상이 되어 몇몇 생화학적, 생리적 인자들이 약제 개발을 위한 표적으로 떠오르고 있다(Fig. 3). 여러 잠재적 치료법이 발견되었지만, 많은 치료법이 크게 분화치료법(differentiation therapy)이나 제거치료법(elimination therapy)으로 분류할 수 있다. 이 치료법에서 암줄기세포는 분화되거나 제거된다<sup>97-99</sup>. 암줄기세포 신호체계에서 어떤 역할을 하는 것으로 알려진 분자들은 새로운 치료법 개발에 있어서 잠재적 표적이 될 수 있다. 여기에는 CD133<sup>100</sup>, hedgehog/patched (HH/PTCH)의 구성요소<sup>101</sup>, Wnt<sup>102</sup>, Notch 신호경로<sup>98,102</sup>, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)<sup>103</sup>, telomerase<sup>104</sup> 등이 포함된다. 세포 내 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)<sup>100</sup>의 수준과 종양혈관계

(tumor vasculature)<sup>100,105</sup> 같은 암줄기세포의 niche를 조절하는 다양한 요소들도 잠재적 치료 표적으로 제시되었다. 많은 암에서 암세포가 과발현하는 항원을 표적으로 한다. 드문 경우이긴 하나 graft-versus-disease을 유도하는 면역요법 접근법(immunotherapeutic approach)도 성공적이었다<sup>106-109</sup>.

연구자들은 최근 뇌종양에서 CD133<sup>+</sup> 세포들이 자가재생과 분화능력을 지니고 있고, 생체 내에서 종양성장을 일으키는 능력을 지니고 있음을 입증했다. 반면에 CD133<sup>-</sup> 세포들은 그러한 능력이 없었다. 암표본에서 분리된 이러한 CD133<sup>+</sup> 뇌종양줄기세포는 세포주기 checkpoint 단백질인 CHK1과 CHK2를 인산화(phosphorylation)하여 DNA 복구 checkpoint를 우선적으로 활성화하여 이온화 방사선(ionizing radiation)에 의한 치명적 손상을 피할 수 있다. 반대로 CHK1과 CHK2의 약리적 억제제(pharmacological inhibitors)는 CD133<sup>+</sup> 세포의 효과적인 DNA 복구기전을 교란시켜 CD133<sup>+</sup> 세포의 방사선 내성을 감소시킨다. 다른 연구에서는 보통 신경전구세포(neural precursor cell)를 성숙한 정상세포(astrocyte)로 분화하게 유도하는 가용성 인자(soluble factor)인 BMP가 CD133<sup>+</sup> 뇌종양줄기세포의 분화를 유도한다는 것을 밝혀냈다. 이러한 분화로 원래의 종양 유발 능력이 저해되었다<sup>100</sup>. 이는 CD133<sup>+</sup> 뇌종양줄기세포를 치료적으로 과발현 되도록 유도된 BMP를 이용해 강제적으로 분화되도록 하는 것이 기존의 화학요법에 대해 종양을 감작(sensitizing)하고, 재발률을 낮추는데 효과적인 도구가 될 수 있음을 의미한다. 또한 뇌종양줄기세포에서 CD133<sup>+</sup>을 종양 선택적으로 억제하는 것이 방사선요법에 대해 감작하고, 자가재생능과 분화능을 감소시킬 수 있음을 의미한다.

HH/PTCH는 정상 줄기세포의 성장과 유지에 일정 역할을 하고 있다. 표유류의 HH 유전자는 indian hedgehog (IHH), desert hedgehog (DHH), SHH의 동종을 포함하고 있고, 소세포폐암(small-cell lung cancer), 전립선암, 유방암, 위암, 췌장암세포주에서 높게 발현되었다. HH/PTCH 신호경로에서, HH의 수용체로 작용하는 PTCH의 돌연변이적 비활성화는 PTCH에 의해 조절되는 G-protein-coupled receptor family protein인 smoothened (SMO)의 구성요소를 활성화한다. HH/PTCH 신호경로의 조절상실(deregulation)은 암에서 줄기세포를 활성화하는 전구현상으로 여겨진다. SMO에 결합하여 SMO를 비활성화 시키는 스테로이드 유사(steroid-like) 혼합물인 cyclopamine은 HH 신호체계를 활성화해서 세포성장을 억제한다. 이는 PC-3와 DU-145 인간 전립선암세포주를 이중이식해 증식시킨 후 21일 후 cyclopamine으로 치료해 근치한(eradicated) 쥐에서 보여졌다. 최근 vitamin D3가 PTCH와 SMO 사이에서 필수적인 신호분자로 기능하는 것이 밝혀졌다. 보통 vitamin D3는 보통 PTCH에 의해 분비되고 분비된 세포의 인접한 SMO를 억제한다. Cyclopamine은 vitamin D3와 비슷한 방식으로 작용하고, SMO와 결합하는데 있어서 경쟁적으로 작용하는 것

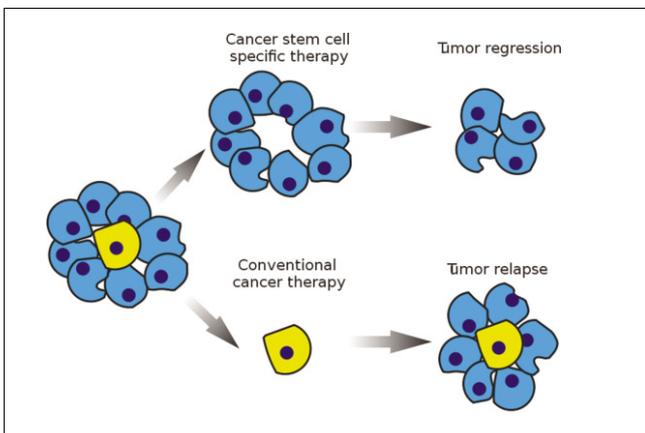


Fig. 3. Stem cell specific and conventional cancer therapie<sup>110</sup>.

으로 보인다. 이는 vitamin D3와 그 스테로이드 유도체(steroidal derivative)가 암줄기세포의 항암화학물질로 쓰여 HH 신호체계를 활성화할 수 있음을 제안한다. Cyclopamine으로 치료한 경우 HH/PTCH 신호경로의 구성요소인 GLI2, GLI3, PTCH, suppressor of fused (SUFU) 그리고 SHH의 발현이 상당히 하향 조절되었다. 이 유전자들의 mRNA나 단백질의 상대적 발현수준은 암줄기세포에 대한 표적억제제(targeted inhibitor)의 효율을 평가하는 지표로 사용될 수 있을 것이다<sup>101,111</sup>.

정상 줄기세포의 자가재생과 분화에 관계된 다른 신호체계로는 Notch와 canonical Wnt 신호경로가 있다. Notch 신호경로는 신경줄기세포에서 특히 중요한 역할을 한다. Canonical Wnt와 Notch 신호경로 사이의 동반 상승효과(synergy)는 장상피세포의 최종 분화를 억제하는데 관계되어 있고, 조혈줄기세포의 자가재생에 필수적이다. Canonical Wnt 신호경로에서 세포 외 Wnt 단백질은 Frizzled (FZD) family의 수용체에 결합한다. 이는 lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5)와 LRP6의 부수용체(coreceptor) 활성화와 함께 단백질 가수분해(proteolysis)의 억제를 일으키고 이어서  $\beta$ -catenin의 핵 축적을 일으킨다. 결과적으로 T-세포 인자/림파구 향상인자(T-cell factor/Lymphoid enhancer factor) 단백질과의 상호작용을 통해 fibroblast growth factor 20 (FGF20), dickkopf related protein 1 (DKK1), Wnt inducible signaling pathway protein 1 (WISP1), myc 그리고 cyclin D1 (CCND1)의 전사를 활성화한다. 이 신호경로의 조절이 상실되는 것은 정상 줄기세포를 암줄기세포로 변환하는 것을 유도하는 것으로 생각된다. PKF118-310와 ZTM000990는 canonical Wnt 신호경로를 표적으로 하는 소분자(small-molecule)이다. 반면 anti-Wnt1와 anti-Wnt2는 시험관 내에서 항암효과를 나타낸 monoclonal antibody이다<sup>4</sup>. Notch ligand는 Notch family 수용체에 결합하고 Notch 세포 내 domain의 세포질로의 분비를 단백질 가수분해를 통해 일으킨다. 세포 내 domain은 이어서 hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH)에 결합하고 몇몇 downstream 표적유전자의 전사 활성화를 유도한다<sup>102</sup>. Notch 신호경로의 이상 활성화(aberrant activity)는 침습전 유방암(pre-invasive breast cancer)과 관내암(ductal carcinoma in situ)의 초기에 일어나는 현상이다. 관내암에서 Notch1 세포 내 domain의 과발현은 술후 5년 내 재발을 감소시킨다<sup>112</sup>. 폐 샘암종(lung adenocarcinoma) 세포주 A549가 nude mouse에 이식되었을 때와 methylcellulose medium에서 증식되었을 때 활성화 형태 Notch1의 과발현은 두 경우에서 종양유발과 집락형성 성질을 감소시켰다. 이로 보아 Notch1의 과발현을 유도하는 제제와 같은 Notch 신호경로를 표적으로 하는 치료법이 암줄기세포의 제거치료법에 있어 새로운 수단으로 기능할 수도 있을 것이다.

STAT3은 생리적, 병리적 조건에서 세포의 생존, 증식, 분화, 종양의 생성, 전이, 면역계 침습(immune invasion), 혈관

의 생성에 관여한다<sup>113,114</sup>. 최근에 자가재생 골육종세포의 작은 subpopulation이 "sarcosphere"라고 알려진 spherical suspended clonal colony를 혈청이 결핍(serum starved)되고 고정 비의존적(anchorage independent)인 조건에서 형성할 수 있음이 보여졌다. 이 sarcosphere는 Nanog, Oct-3 그리고 Oct-4 뿐 아니라 활성화된 STAT3도 발현하였다. Nanog, Oct-3, Oct-4는 다능성 줄기세포(pluripotent stem cell)의 표지자이다. Sarcosphere는 점점 더 커졌고 포함된 총 세포수는 증가하였다. 이 sarcosphere는 더 낮은 비율의 세포들이 배아줄기세포의 표지자를 발현하였고, 이형유전자형(heterogeneous genotype)을 나타내는 것이 증가되었다<sup>103</sup>. 이로부터 STAT3는 Nanog, Oct-3 그리고 Oct-4와 결합되어 골육종 sarcosphere의 줄기세포 성질을 유지하는데 기여하는 것을 알 수 있다. STAT3가 암줄기세포를 이용한 항암요법에서 표적으로서의 가치가 높음을 의미한다.

항암약제의 종양 선택적인 독성을 증가시키기 위한 다른 표적으로 telomerase가 있다. 대부분의 세포에서 telomere은 분열하면서 짧아진다. Telomere의 길이는 telomerase (RNA template-dependent DNA-synthase) 효소에 의해 염색체 종말에 짧게 반복되는 핵산을 더하면서 유지된다. 정상 줄기세포는 상대적으로 telomere가 길어서 telomerase 없이도 임시로 증식할 수 있음에도 불구하고 telomere가 짧아지는 것을 방지하고 replicative senescence (비축된 telomere 길이의 소실)를 막기 위해 telomerase가 존재한다. 암세포의 특징적으로 짧은 telomere을 보상하기 위해서는 telomerase와 그 작용이 대부분의 악성 종양에서 절대적으로 필요하다<sup>104,115</sup>. 이를 함께 고려하면 telomerase의 억제는 암줄기세포에 대한 강력한 치료적 접근이 될 수 있을 뿐 아니라 정상 줄기세포와 암줄기세포의 telomere 길이 차이로 인해 합리적인 수준의 암 특이성과 차등적인 감수성(differential sensitivity)까지 제공해준다. GRN163L은 인간 telomerase (human telomerase, hTR)의 RNA 틀(RNA template) 부위의 직접적인 억제제로서 만성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종, 고형암, 비소세포폐암(non-small-cell lung cancer)에서 현재 임상 실험 단계에 있다<sup>104</sup>. GRN163L는 활성화된 telomerase를 지닌 암줄기세포를 제거하고 재발률을 낮추는 역할을 할 수 있다.

지금까지 언급한 새로운 암줄기세포치료법을 위한 생화학적 표적 외에 많은 생리적 표적이 있다. 이 중에는 세포 내 활성 산소종 수준<sup>100</sup>과 암줄기세포에 영양과 혈류를 공급하는 종양혈관계<sup>100,105</sup>가 있다. 활성 산소종은 몇몇 동물 및 인간모델에서 종양의 유발에 일정 역할을 한다. 이가 양이온(bivalent cation)에 의존적인 superoxide dismutase는 보다 활성적인 형태의 활성 산소종을 중화하는데 중요한 역할을 한다. 따라서 이런 이가 양이온을 제거하여 암세포를 제거할 수 있다<sup>116</sup>. 암줄기세포와 직접 연관된 활성 산소종 상태에 대해서는 알려진 바가 거의 없지만, 세포의 산화환원 상태(cellular redox state)가 줄기세포의 자가재생능과 분

화능에 일정 역할을 하는 것으로 제안되었다. 자가재생과 분화를 촉진하는 세포 외 성장인자들이 전구세포가 더욱 환원되고 산화되도록 하는 것이 밝혀졌다<sup>100</sup>. 만약 활성 산소종 상태와 암줄기세포를 연결짓는 좀 더 결정적인 연구가 행해진다면, 치료에 이용 가능한 표적을 제공해줄 것이다. 암줄기세포는 종양혈관계에 의해 공급을 받는 heterogeneous bulk tumor population 사이에 존재하므로, 이러한 혈관을 억제하면 암줄기세포로의 영양공급을 중단시키고 방사선요법과 화학요법에 대한 내성도 줄일 수 있을 것이다<sup>105</sup>. CD133, STAT3, hTR 또는 HH/PTCH, Wnt, Notch 신호경로의 표적 억제제와 결합된 혈관생성억제제(angiogenesis inhibitors)는 많은 악성 조직 형태에서 암의 치료결과를 향상시킬 수 있을 것이다.

몇몇 알려진 신호경로에 초점을 맞춘 치료접근법 외에 암을 공격하기 위한 새로운 방법이 최근 제안되었다. 흥미로운 예로 아직 완전히 밝혀지지 않은 기전에 의해 암세포를 선택적(예를 들어 apoptin)<sup>117,118</sup>으로 또는 반 선택적(예를 들어 Brevinin-2R, S100A8/A9)<sup>119-121</sup>으로 제거하는 단백질을 들 수 있다. Apoptin의 경우에는 PI3-K/Akt/CDK2와 같은 세포증식에 관계되는 다양한 신호경로를 이용하거나 mitotic catastrophe 연관 기전을 통해 세포사를 유발하는 것으로 보인다<sup>122-124</sup>. 흥미롭게도 세포의 생존, 세포사 그리고 세포증식 같은 반대되는 작용들이 세포 내에서 긴밀하게 상호연관되어 있고, 몇몇 자극원들은 양이나 시간에 따라 반대의 작용을 하는 것으로 보인다는 점이다<sup>80,96</sup>.

이와 같은 암줄기세포를 표적으로 하는 항암치료를 시작할 때는 약물의 반응을 평가할 수 있는 새로운 방법이 고안되어야 한다.

## 7. 암줄기세포 이론의 한계와 발전 방향

암줄기세포 이론의 한계점은 한 암종에 대해 일관되게 적용할 수 있는 암줄기세포의 특성이 존재하는지에 대한 규명이 어렵다는 점이다. 이미 언급된 바와 같이 side population은 구강 편평세포암 표본에서 매우 다양한 비율로 존재하고, non-side population 세포들도 종양형성능을 보였다고 보고 되기도 하였는가 하면, side population과 non-side population 세포들 간에 상호변환도 발견되었다. 이처럼 side population이 줄기세포 특이적인지에 관해서도 아직 논쟁 중이다.

교모세포종을 보면 환자의 28%에서 p53 돌연변이, 36%에서 EGFR 증폭, 25%에서 PTEN 돌연변이, 31%에서 p16INK4a 결손이 나타나는 등 몇몇 유전적 변화가 발견되었다. 이처럼 유전적으로 다양한 교모세포종에 CD133의 발현이라는 암줄기세포 특성을 동일하게 적용할 수 있는지에 대해서는 의문이 생긴다. 최근에는 교모세포종 환자에서 CD133을 발현하는 암세포는 1%에서 50%까지로 매우 다양하고, 심지어 CD133을 발현하는 암세포가 1% 이하

인 환자에서는 CD133을 발현하지 않는 세포도 면역억제제의 뇌에서 암을 생성할 수 있다는 것이 연구를 통해 확인되었다<sup>125</sup>. 결국 교모세포종의 암줄기세포가 환자에 따라 각기 다른 특성을 가지고 있을 가능성이 있다고 할 수 있다. 기존의 연구에서 밝혀진 바와 같이 암세포는 유전적으로 불안정하다. 이러한 불안정성으로 인해 암세포 유전자에 돌연변이가 생기고 축적된다. 이러한 불안정성에서 side population의 존재나 특정 표지자의 발현과 같은 암줄기세포의 특성이 유지될 수 있는지에 대해서는 앞으로 더 연구되어야 할 분야이다.

암줄기세포에 대한 연구는 결국 효과적인 항암치료라는 결과로 이어져야 한다. 이러한 치료법에서 가장 중요한 과정은 정상 세포나 일반적인 암세포와 구분되는 암줄기세포만의 특성을 파악해 이 암줄기세포만을 치료표적으로 삼도록 하는 것이다. 암줄기세포의 불안정성으로 인해 한 환자에서도 다양한 특성을 보이는 암줄기세포가 존재하고 치료과정 중에도 새로운 특성을 지닌 암줄기세포가 생성될 수 있다면 언급된 치료법과는 개념과 방법이 다른 새로운 치료적 접근이 필요하다. 따라서 암줄기세포의 특성이 환자별로 다른 것은 아닌지, 또 한 환자 안에서도 암줄기세포의 특성이 계속 유지되는 등은 앞으로 더욱 심도 있게 연구되어야 할 분야이다. 또한 암줄기세포의 임상적 적용을 위해서는 더욱 정확한 암줄기세포 표지자의 발견도 필요하다. 그리고 암줄기세포 표지자에 비해 상대적으로 연구가 덜 이루어진 암줄기세포 niche, 즉 암줄기세포와 미세환경(microenvironment)도 암줄기세포 자체의 특성을 이해하기 위해서 뿐만 아니라 치료표적으로서도 더 많은 연구가 이루어져야 한다.

## References

1. Bray I, Brennan P, Boffetta P. Projections of alcohol- and tobacco-related cancer mortality in Central Europe Int J Cancer 2000; 87:122-8.
2. Arai F, Hira A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell 2004;118:149-61.
3. Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Côté D, Means TK, et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. Nature 2005;435:969-73.
4. Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. Nat Immunol 2006;7:333-7.
5. Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. Nat Med 2000;6:1278-81.
6. Henrique D, Hirsinger E, Adam J, Le Roux I, Pourquie O, Ish-Horowicz D, et al. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signalling in the embryonic chick retina. Curr Biol 1997;7:661-70.
7. Austin J, Kimble J. Glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in C. elegans. Cell 1987;51:589-99.
8. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of

- primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2001;2:172-80.
9. Wechsler-Reya RJ, Scott MP. Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron* 1999; 22:103-14.
  10. Zhang Y, Kalderon D. Hedgehog acts as a somatic stem cell factor in the *Drosophila* ovary. *Nature* 2001;410:599-604.
  11. Wechsler-Reya R, Scott MP. The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:385-428.
  12. Gailani MR, Bale AE. Acquired and inherited basal cell carcinomas and the patched gene. *Adv Dermatol* 1999;14:261-83.
  13. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837-51.
  14. Chan EF, Gat U, McNiff JM, Fuchs E. A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet* 1999;21:410-3.
  15. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM. On mammary stem cells. *J Cell Sci* 2005;118:3585-94.
  16. Miller SJ, Lavker RM, Sun TT. Interpreting epithelial cancer biology in the context of stem cells: tumor properties and therapeutic implications. *Biochem Biophys Acta* 2005;1756:25-52.
  17. Crowe DL, Parsa B, Sinha UK. Relationships between stem cells and cancer stem cells. *Histol Histopathol* 2004;19:505-9.
  18. Young HE, Duplaa C, Romero-Ramos M, Chesselet MF, Vourch P, Yost MJ, *et al.* Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochim Biophys* 2004;40:1-80.
  19. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004;432:324-31.
  20. Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 2004;118:409-18.
  21. Tsai RY. A molecular view of stem cell and cancer cell self-renewal. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 36:684-94.
  22. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 2005;353:811-22.
  23. Chen CY, Chiou SH, Huang CY, Jan CI, Lin SC, Tsai ML, *et al.* Distinct population of highly malignant cells in a head and neck squamous cell carcinoma cell line established by xenograft model. *J Biomed Sci* 2009;16:100.
  24. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;51:1-28.
  25. Southam CM, Brunschwig A. Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. *Cancer* 1961;14:971-8
  26. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-7.
  27. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105-11.
  28. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004;23:7274-82.
  29. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-5
  30. Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, *et al.* Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* 2004;103:2332-6
  31. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med* 1996;183:1797-806.
  32. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, *et al.* Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997;3:1337-45.
  33. Hirshmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, *et al.* A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:14228-33.
  34. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:781-6.
  35. Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:4827-33.
  36. Wang J, Guo LP, Chen LZ, Zeng YX, Lu SH. Identification of cancer stem cell-like side population cells in human nasopharyngeal carcinoma cell line. *Cancer Res* 2007;67:3716-24.
  37. Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, *et al.* Ovarian cancer side population defines cells with stem cell like characteristics and mullerian inhibiting substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:11154-9.
  38. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift. *Cancer Res* 2006;66:1883-90.
  39. Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 2006;12:296-300.
  40. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumor stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006;6:425-36.
  41. Caussinus E, Gonzalez C. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 2005;37:1125-9.
  42. Lininger RA, Fujii H, Man YG, Gabrielson E, Tavassoli FA. Comparison of loss heterozygosity in primary and recurrent ductal carcinoma in situ of the breast. *Mod Pathol* 1998;11:1151-9.
  43. Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100 Suppl. 1:11842-9.
  44. Prindull G. Hypothesis: cell plasticity, linking embryonal stem cells to adult stem cell reservoirs and metastatic cancer cells? *Exp Hematol* 2005;33:738-46.
  45. Kai T, Spradling A. Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries. *Nature* 2004;428:564-9.
  46. Janes SM, Watt FM. New roles for integrins in squamous cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 2006;6:175-83.
  47. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, *et al.* The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53:4477-80.
  48. Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 1999;55:64-75.
  49. Chen Q, Samaranyake LP, Zhen X, Luo G, Nie M, Li B. Up-regulation of Fas ligand and down regulation of Fas expression in oral carcinogenesis. *Oral Oncol* 1999;35:548-53.
  50. Gastman BR, Atarshi Y, Reichert TE, Saito T, Balkir L, Rabinowich H. Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer Res* 1999;59:5356-64.
  51. Imai Y, Sasaki T, Shinagawa Y, Akimoto K, Fujibayashi T. Expression of metastasis suppressor gene (KAI1/CD82) in oral squamous cell carcinoma and its clinico-pathological significance. *Oral Oncol* 2002;38:557-61.
  52. Kropveld A, Rozemuller EH, Leppers FG, Scheidel KC, de Weger RA, Koole R, *et al.* Sequencing analysis of RNA and DNA of exons 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of head and neck squamous cell cancers. *Lab Invest* 1999;79:347-53.
  53. Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 1993;62:623-51.
  54. Molès JP, Watt FM. The epidermal stem cell compartment: variation in expression levels of E-cadherin and catenins within the basal layer of human epidermis. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:867-74.
  55. Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N, Fujimoto R, *et al.* Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells *in vitro*. *Oral Oncol* 2001;37:65-71.

56. Hombach-Klonisch S, Paranjothy T, Wiechec E, Pocar P, Mustafa T, Seifert A, *et al.* Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples. 2008;56:165-80.
57. Lowell S, Jones P, Le Roux I, Dunne J, Watt FM. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol* 2000;10:491-500.
58. Fuchs E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 1990;111:2807-14.
59. Okuyama R, Nguyen BC, Talora C, Ogawa E, Tommasi di Vignano A, Lioumi M, *et al.* High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell* 2004;6:551-62.
60. Okuyama R, Tagami H, Aiba S. Notch signaling: Its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. *J Dermatol Sci* 2008;49:187-94.
61. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, *et al.* Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 2003; 33:416-21.
62. Proweller A, Tu L, Lepore JJ, Cheng L, Lu MM, Seykora J, *et al.* Impaired notch signaling promotes de novo squamous cell carcinoma formation. *Cancer Res* 2006;66:7438-44.
63. Thélou J, Rossio P, Favier B. Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing. *BMC Dermatol* 2002;2:7.
64. Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2009;45:633-9.
65. Chiou SH, Yu CC, Huang CY, Lin SC, Liu CJ, Tsai TH, *et al.* Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:4085-95.
66. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:973-8.
67. Chen JS, Pardo FS, Wang-Rodriguez J, Chu TS, Lopez JP, Aguilera J, *et al.* EGFR regulates the side population in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2006;116:401-6.
68. Mackenzie IC. Growth of malignant oral epithelial stem cells after seeding into organotypical cultures of normal mucosa. *J Oral Pathol Med* 2004;33:71-8.
69. Locke M, Heywood M, Fawell S, Mackenzie IC. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma derived cell lines. *Cancer Res* 2005;65:8944-50.
70. Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, Johannessen AC, Mackenzie IC. Cancer stem cells-new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2006;12:443-54. Erratum in; *Oral Dis* 2006;12:584.
71. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, *et al.* The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the sidepopulation phenotype. *Nat. Med.* 2001;7:1028-34.
72. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133<sup>+</sup> cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett* 2009;289:151-60.
73. Jensen KB, Jones J, Watt FM. A stem cell gene expression profile of human squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2008; 272:23-31.
74. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* 1993;73:713-24.
75. Tanemura A, Nagasawa T, Inui S, Itami S. LRIG-1 provides a novel prognostic predictor in squamous cell carcinoma of the skin: immunohistochemical analysis for 38 cases. *Dermatol Surg* 2005;31:423-30.
76. Lindström AK, Ekman K, Stendahl U, Tot T, Henriksson R, Hedman H, *et al.* LRIG1 and squamous epithelial uterine cervical cancer: correlation to prognosis, other tumor markers, sex steroid hormones, and smoking. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:312-7.
77. Eisenmann KM, McCarthy JB, Simpson MA, Keely PJ, Guan JL, Tachibana K, *et al.* Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas. *Nat Cell Biol* 1999;1:507-13.
78. Majumdar M, Vuori K, Stallcup WB. Engagement of the NG2 proteoglycan triggers cell spreading via rac and p130cas. *Cell Signal* 2003;15:79-84.
79. Andersen SS. Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends Cell Biol* 2000;10:261-7.
80. Häyry V, Mäkinen LK, Atula T, Sariola H, Mäkitie A, Leivo I, *et al.* Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer* 2010;102:892-7.
81. Keski-Säntti H, Atula T, Hollmén J, Mäkitie A, Leivo I. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol* 2007;43:1007-13.
82. Spivakov M, Fisher AG. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet* 2007;8:263-71.
83. Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardo R. BMI-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev* 2005;19:1432-7.
84. Kang MK, Kim RH, Kim SJ, Yip FK, Shin KH, Dimri GP, *et al.* Elevated BMI-1 expression is associated with dysplastic cell transformation during oral carcinogenesis and is required for cancer cell replication and survival. *Br J Cancer* 2007;96:126-33.
85. Vora HH, Shah NG, Trivedi TI, Goswami JV, Shukla SN, Shah PM. Expression of C-myc mRNA in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Surg Oncol* 2007;95:70-8.
86. Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, *et al.* The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2000; 2:84-9.
87. Zidar N, Gale N, Kojc N, Volavsek M, Cardesa A, Alos L, *et al.* Cadherin-catenin complex and transcription factor Snail-1 in spindle cell carcinoma of the head and neck. *Virchows Arch* 2008;453:267-74.
88. Harper LJ, Piper K, Common J, Fortune F, Mackenzie IC. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Pathol Med* 2007;36:594-603.
89. Zhang P, Zhang Y, Mao L, Zhang Z, Chen W. Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes. *Cancer Lett* 2009; 277:227-34.
90. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2<sup>+</sup> and ABCG2<sup>-</sup> cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res* 2005;65:6207-19.
91. Burkert J, Otto WR, Wright NA. Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells. *J Pathol* 2008;214: 564-73.
92. Song LB, Zeng MS, Liao WT, Zhang L, Mo HY, Liu WL, *et al.* Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Res* 2006;66:6225-32.
93. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005;26:495-502.
94. Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:43-7.
95. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol* 2005;23:7350-60.

96. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:275-84.
97. Banerji S, Los M. Important differences between topoisomerase-I and -II targeting agents. *Cancer Biol Ther* 2006;5:965-6.
98. Massard C, Deutsch E, Soria JC. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol* 2006;17:1620-4.
99. Zuse A, Prinz H, Müller K, Schmidt P, Günther EG, Schweizer F, *et al.* 9-Benzylidene-naphtho[2,3-b]thiophen-4-ones and benzylidene-9(10H)-anthracenones as novel tubulin interacting agents with high apoptosis-inducing activity. *Eur J Pharmacol* 2007; 575:34-45.
100. Tang C, Ang BT, Pervaiz S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J* 2007;21:3777-85.
101. Lou H, Dean M. Targeted therapy for cancer stem cells: the patched pathway and ABC transporters. *Oncogene* 2007;26: 1357-60.
102. Katoh M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 2007;13:4042-5.
103. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, *et al.* Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia* 2005;7:967-76.
104. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2008;8:167-79.
105. Yang ZJ, Wechsler-Reya RJ. Hit 'em where they live: targeting the cancer stem cell niche. *Cancer Cell* 2007;11:3-5.
106. Booy EP, Johar D, Maddika S, Pirezada H, Sahib MM, Gehrke I, *et al.* Monoclonal and bispecific antibodies as novel therapeutics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2006;54:85-101.
107. Johnston JB, Navaratnam S, Pitz MW, Maniate JM, Wiechec E, Baust H, *et al.* Targeting the EGFR pathway for cancer therapy. *Curr Med Chem* 2006;13:3483-92.
108. Krzemieniecki K, Szpyt E, Rashedi I, Gawron K, Los M. Targeting of solid tumors and blood malignancies by antibody-based therapies. *Centr Eur J Biol* 2006;1:167-82.
109. Rashedi I, Panigrahi S, Ezzati P, Ghavami S, Los M. Autoimmunity and apoptosis: therapeutic implications. *Curr Med Chem* 2007;14:3139-51.
110. Peter Znamenskiy. A diagram illustrating the distinction between cancer stem cell targeted (above) and conventional (below) cancer therapies [internet]. San Francisco, California: Wikimedia Commons;2009. Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cancer\\_stem\\_cells\\_text\\_resized.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cancer_stem_cells_text_resized.svg).
111. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, *et al.* Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004;431:707-12.
112. Farnie G, Clarke RB. Mammary stem cells and breast cancer: role of Notch signalling. *Stem Cell Rev* 2007;3:169-75.
113. Chen Z, Han ZC. STAT3: A critical transcription activator in angiogenesis. *Med Res Rev* 2008;28:185-200.
114. Houghton J. Bone-marrow-derived cells and cancer: an opportunity for improved therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4:2-3.
115. Keith WN, Thomson CM, Howcroft J, Maitland NJ, Shay JW. Seeding drug discovery: integrating telomerase cancer biology and cellular senescence to uncover new therapeutic opportunities in targeting cancer stem cells. *Drug Discov Today* 2007;12:611-21.
116. Hashemi M, Ghavami S, Eshraghi M, Booy EP, Los M. Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2007;557:9-19.
117. Burek M, Maddika S, Burek CJ, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Los M. Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent. *Oncogene* 2006;25:2213-22.
118. Maddika S, Mendoza FJ, Hauff K, Zamzow CR, Paranjothy T, Los M. Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action. *Cancer Biol Ther* 2006;5:10-9.
119. Ghavami S, Asoodeh A, Klonisch T, Halayko AJ, Kadkhoda K, Krocak TJ, *et al.* Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. *J Cell Mol Med* 2008;12:1005-22.
120. Ghavami S, Kerkhoff C, Chazin WJ, Kadkhoda K, Xiao W, Zuse A, *et al.* S100A8/9 induces cell death via a novel, RAGE-independent pathway that involves selective release of Smac/DIABLO and Omi/HtrA2. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:297-311.
121. Grote J, König S, Ackermann D, Sopalla C, Benedyk M, Los M, *et al.* Identification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and Ku70/Ku80 as transcriptional regulators of S100A9 gene expression. *BMC Mol Biol* 2006;7:48.
122. Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V, *et al.* Loss of negative regulation by Numb over Notch is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol* 2004;167:215-21.
123. Weijzen S, Rizzo P, Braid M, Vaishnav R, Jonkheer SM, Zlobin A, *et al.* Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med* 2002;8:979-86.
124. Alexander HK, Booy EP, Xiao W, Ezzati P, Baust H, Los M. Selected technologies to control genes and their products for experimental and clinical purposes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007; 55:139-49.
125. Ju KM, Jin JY, Kim HK, Nam DH. Research direction and prospect of brain cancer stem cell. *Molecule-cell biology News* 2008;20:12-8.