

Kancerske stem ćelije - aktuelni koncepti, terapijske implikacije i izazovi

Miljan Krstić¹, Slavica Stojnev¹

¹Institut za patologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Nišu

Apstrakt

Sve veći broj istraživanja podržava koncept da su za nastanak, razvoj i metastaziranje malignih neoplazmi odgovorne kancer(ske) stem ćelije (KSC). One predstavljaju populaciju ćelija sa tumorigenim potencijalom, a poseduju svojstva normalnih matičnih ćelija, poput sposobnosti samoobnavljanja i perpetualne proliferacije, kao i specifični potencijal višelinijske diferencijacije, što obezbeđuje heterogenost tumora. Smatra se da je perzistencija kancer stem ćelija u tumorima odgovorna za razvoj relapsa i metastaza, jer konvencionalni onkološki protokoli ne dovode do njihove eradikacije. Razvoj specifičnih terapijskih strategija usmerenih na eliminaciju KSC mogao bi doprineti velikom napretku u lečenju kancera. Ključni korak u razvoju KSC target terapija, a kasnije i u validaciji njihove primene, jeste identifikacija specifičnih stem ćelijskih markera, gde je uloga patologa od velikog značaja.

Keywords: kancer stem ćelije, biomarkeri, target terapija

Kancerske stem ćelije - definicije i aktuelni stavovi

Sve je više dokaza da maligne neoplazme sadrže malu populaciju ćelija koje se odlikuju tzv. matičnim, „stem cell“ svojstvima, a koje su odgovorne za rast, heterogenost i metastaziranje tumora. Kancerske stem ćelije smatraju se pogonskom silom kancera, jer obezbeđuju neprekidan rast i svojevrsnu besmrtnost neoplastične populacije^{1,2}.

Iako su predmet intenzivne naučne diskusije i istraživanja godinama unazad, koncept postojanja kancer stem ćelija (KSC) sve je šire prihvaćen, jer neuspeh konvencionalnih terapijskih protokola u lečenju maligniteta implicira potrebu da je onkološkom terapijom neophodno delovati i na KSC. Paralelno sa razvojem genomike, proteomike i drugih sofisticiranih metoda visokog prometa, kao i bioinformatike, ostvaren je veliki napredak u razumevanju kancerogeneze, što je dodatno naglasiilo značaj ćelija sa karakteristikama matičnosti, sposobnih da beskonačno proliferišu, snabdevajući tumor heterogenom i hijerarhijski organizovanom populacijom. Pored toga, smatra se da KSC imaju kritičnu ulogu u ishodu onkološke terapije, jer su po pravilu rezistentnije na konvencionalnu hemioterapiju od diferentovanih ćelija koje većinom čine tumorsku masu, kao i da mogu inicirati relaps nakon lečenja^{2,3,4}.

Osnovna odlika stem ćelija je sposobnost asimetrične deobe: njihovom mitozom nastaje jedna kćerka ćelija i jedna opredeljena ćelija, koja će se diferentovati u određenom pravcu. Opredeljena ćelija prolazi kroz

Cancer stem cells - current concepts, therapeutic implications and challenges

Miljan Krstić¹, Slavica Stojnev¹

¹Institute of Pathology, Faculty of Medicine, University of Nis

Abstract

An increasing number of studies support the concept that cancer stem cells (CSCs) are responsible for initiation, growth and metastasis of malignant neoplasms. CSCs represent the population with tumor initiating potential, and possess the properties of normal stem cells, including the ability of self-renewal and perpetual proliferation, as well as the specific potential of multilineage differentiation, which underlies tumor heterogeneity. The persistence of CSCs has been considered the main culprit for tumor relapse and metastasis, since conventional oncologic protocols do not eradicate CSCs. Development of specific therapeutic strategies targeting CSCs may contribute to significant advance in cancer treatment. The crucial step in CSC targeted therapy development, as well as in subsequent efficacy validation, is the identification of specific stem cell markers, where the role of pathologist is of major significance.

Key words: cancer stem cells, biomarkers, targeted therapy

seriju deoba i diferencijalnih koraka koji dovode do nastanka terminalno diferencijirane populacije^(1,4). Čelije u intermedijernom stanju označavaju se kao progenitorne, tranzitne ili tranzitne amplifikujuće čelije. U literaturi se ekvivalentno sa terminom KSC koristi pojam tumor inicirajuće čelije, koji predstavlja funkcionalnu definiciju ove subpopulacije⁵.

Poreklo KSC još uvek nije u potpunosti rasvetljeno. Tumor inicirajuće čelije bi mogle biti organ specifične, i nastajati malignom transformacijom normalnih stem ćelija ili iz diferencijiranih progenitorskih ćelija u kojima usled onkogenih mutacija dolazi do reaktivacije svojstava matičnosti. Zbog dugog života i teorijski beskraje proliferacije, stem ćelije su podložne mutacijama i epigenetskim uticajima koji menjaju njihovu predodređenu sudbinu konvertujući ih u izvor malignih klonova^{6,7}. Stem ćelija poreklom iz kostne srži odlikuje se zadivljujućom plastičnošću i može biti iz cirkulacije regrutovana u solidna tkiva, pre svega epitel, pre svega u uslovima teške hronične inflamacije, a zatim in situ podleći sekvenci metaplazija/displazija/karcinom. Houghton i saradnici su na animalnom modelu pokazali da karcinom želuca može da nastane iz matične ćelije poreklom iz kostne srži koja migrira u gastrične žlezde⁸. Nedavno objavljena studija pokazala je da KSC može biti proizvod fuzije adultne stem ćelije i diferencijirane ćelije koja je akumulirala genetske aberacije kritične za inicijaciju kancerogeneze⁹.

Identifikacija i karakterizacija kancerskih stem ćelija

Ključni korak u razvoju progresivnih terapijskih strategija usmerenih na eradikaciju tumora je molekularna karakterizacija KSC. Razvoj sofisticiranih molekularnih tehnika, pre svega sinteza monoklonalnih visokospecifičnih antitela na površinske ćelijske markere, kao i usavršavanje FACS tehnike (fluorescencom-aktivisano sortiranje ćelija) omogućilo je detekciju i izolaciju subseta ćelija sa potencijalom da inicira tumorski rast^{1,6}. Trenutno je na raspolaganju relativno mali broj ćelijskih površinskih markera asociiranih sa stem ćelijskim karakteristikama. Validacija potencijalnih markera je mukotrpan proces. On uključuje najpre detekciju markera, na osnovu prethodnih saznanja, eksperimentalnih dokaza i poznavanja puteva uključenih u očuvanje kapaciteta za samo-obnavljanje i beskonačnu proliferaciju, koje karakterišu stem ćelije. Veliki broj istraživanja baziran je na ispitivanju tumor inicirajućeg potencijala tzv. sporedne populacije ćelija, koja se izoluje na bazi sposobnosti obično manje frakcije tumorskih ćelija da vrše efluks Hoechst 33342 boje. Sposobnost subseta ćelija da izbacuje boju iz citozola povezana je sa prekomernom ekspresijom ABC transportera, molekula koji eliminišu ksenobiotike iz ćelije i mogu biti u osnovi hemorezistencije. U protočnoj citometrijskoj analizi obično se koristi kombinacija nekoliko sa matičnošću asociiranih markera i izoluju ćelijske frakcije koje pokazuju određeni fenotip. FACS analiza se primenjuje za izolaciju ćelijskog pula koje eksprimira željenu kombinaciju biomarkera na svojoj površini.

Zlatni standard za dokazivanje tumorigene sposobnosti ovako izolovanih ćelija predstavlja ksenotransplantacioni eksperiment: osetljivoj laboratorijskoj životinji ubrizgavaju se selektovane tumorske ćelije i prati nastanak tumora. Nakon disocijacije i transplantacije tumorskih ćelija u imunokompromitovanu životinju, humane KSC moguće je funkcionalno razlikovati i izdvojiti od netumorigene ili slabotumorigene populacije na osnovu njihove sposobnosti da iznova iniciraju tumorski rast in vivo^{2,6}. Tako nastala neoplazma pokazuje veoma sličnu heterogenost populacije onoj koja je postojala u primarnom tumoru.

Dinamički koncept kancer stem ćelija

Novija istraživanja ukazuju na to da se KSC nalaze u dinamičkom ekvilibrijumu sa svojim relativno diferencijiranim progenitorima, te da je bidirekciona konverzija moguća pod dejstvom genskih alteracija i epigenetskih uticaja¹⁰. U neoplastičnim matičnim ćelijama vodeću ulogu igraju signalni putevi odgovorni za održavanje njihovog rasta i samo-obnavljanja. Ekspresija definisanog i ograničenog seta transkripcionih faktora (Sox2, Klf4, c-Myc, Oct4, Nanog), može da reprogramira somatsku ćeliju u ćeliju sa matičnim svojstvima, koja se naziva indukovana pluripotentna stem ćelija¹¹. Ekspresija ovih transkripcionih faktora u humanim kancerima veoma je često povišena i udružena sa progresijom bolesti i lošom prognozom.

Tumori predstavljaju heterogene i hijerarhijski organizovane entitete. U ranom stadijumu razvoja tumora, smatra se da je za tumorski rast odgovoran jedinstveni klon KSC. Međutim, u odmaklim/višim stadijumima bolesti, tumor može da sadrži nekoliko različitih, ali srodnih klonova, koji ili nastaju neposredno iz inicijalnog klona KSC ili iz njihovih progenitorskih ćelija, a u kojima se dešavaju nove mutacije ili se modifikuju pod uticajem KSC niše. Target terapija i/ili hemioterapija eliminiše tumorsku masu, verovatno uključujući i deo KSC. U takvim okolnostima, za relaps bolesti je odgovoran najmanje jedan rezistentan klon KSC, verovatno nakon nastanka novih, dodatnih mutacija^{1,2}.

U tumorima odmaklog stadijuma, pojedini klonovi KSC stiču povećanu sposobnost samo-obnavljanja, dok se istovremeno smanjuje diferencijacija. Tokom tumorske progresije, klonovi KSC su u kompetitivnom odnosu. Ta kompeticija rezultuje dominacijom najmanje jednog klona KSC, sa posledičnim gubitkom diferentovanih ćelija potomaka. Vremenom, ovo dovodi do zaravnjenja hijerarhijske strukture i selekcije najagresivnijih klonova KSC. Tumori u odmaklom stadijumu stoga mogu biti sačinjeni gotovo u potpunosti od agresivnih, multirezistentnih KSC, što je situacija slična onoj koju predlaže tradicionalni stohastički model kancerogeneze¹².

U karcinomima kancerske stem ćelije odlikuju se dinamičkim fenotipom tokom sistemske diseminacije: one pokazuju sposobnost da, barem delimično, izgube epitelna svojstva putem epitelno-mezenhimne tranzicije. Najizvesnije je da je samo jedan deo putujućih KSC sposoban da preživi u sistemskoj cirkulaciji, ekstravazira i ponovo stekne epitelni fenotip (mezenhimno-epitelna tranzicija), kako bi se implantirao u novoj mikrookolini i inicirao metastatski rast. Ovakve ćelije označavaju se kao „metastaza inicirajuće ćelije“ i funkcionalno se razlikuju od KSC klonova svojom sposobnošću metastaziranja in vivo. Metastaza inicirajuće ćelije su adaptirani potomci KSC i predstavljaju subpopulaciju sa metastatskim kapacitetom i, verovatno, organ-specifičnim tropizmom^{12,13}.

Značaj mikrookoline (niše) kancerskih stem ćelija

Analogno normalnim stem ćelijama, smatra se da i KSC egzistiraju samo u okviru određenih kompartmana, gde interakcija KSC sa okolnim ćelijama i stromom obezbeđuje signale neophodne za njihovo preživljavanje i održavanje matičnosti. Postojanje niše, tj. specifičnog miljea KSC, jedan je od osnovnih problema zašto je sjajne eksperimentalne rezultate dobijene in vitro veoma teško reprodukovati na animalnim modelima.

Studije su pokazale da hipoksija u KSC niši pospešuje ekspresiju signala koji održavaju matična svojstva, dok produkti tumor infiltrišućih makrofaga povećavaju rezistenciju KSC na hemioterapeutike. Parakrini uticaji medijatora koje sekretuju stromalne ćelije mogu da pomeraju dinamički ekvilibrijum između matičnih i progenitorskih kancerskih ćelija u pravcu matičnih^{14,15}. Utvrđeno je da se mikrookolina kolorektalnog karcinoma odlikuje stvaranjem velikih količina HGF, hepatocitnog faktora rasta, koji pospešuje epitelno-mezenhimnu tranziciju tumorskih ćelija. Blokada ovog medijatora antitelom na MET receptor preko kojeg HGF deluje, inhibiše se rast tumora i nastanak agresivnijih metastatskih fenotipa¹⁶.

Biomarkeri kancerskih stem ćelija

KSC ekspimiraju jedinstveni repertoar ćelijskih markera koji se koriste za njihovu karakterizaciju i izolaciju. Istovremeno, ovi marker predstavljaju i terapijske mete, cilj na koji je usmerena target terapija. Najznačajniji i najbolje validirani markeri udruženi sa stem ćelijskim karakteristikama su CD133, CD44, EpCam i aktivnost ALDH. Ni jedan od ovih markera se ne ekspimiraju isključivo na KSC, ali su brojni eksperimentalni dokazi pokazali da monoklonska antitela na navedene markere se sa većim afinitetom vezuju za ćelije koje pokazuju karakteristike KSC nego za druge tumorske ili normalne ćelije.

CD133 (prominin), glikozilisani membranski protein, jedan je od najviše istraživanih^{17,18}. Prvi put je opisan 2004. godine kao marker KSC kod glioblastoma multiforme¹⁹, dok je Lathia 2011. potvrdio da samo populacija CD133 ćelija, uz reprodukciju odgovarajuće mikrookoline, jedina ima tumor inicirajući potencijal i sposobnost da održava heterogenost tumora²⁰. Trenutno se ispituje imunotoksin usmeren na CD133 (CD133-KDEL), koji je pokazao dobru efikasnost na mišjem modelu trostruko negativnog karcinoma dojke²¹. CD44, transmembranski protein koji je receptor za hijaluronsku kiselinu, a uključen je u ćelijsku adhezivnost, motilitet i proliferaciju, igra važne uloge u kancerogenezi i diseminaciji tumora. Opisan je kao značajan površinski biomarker u mnogim neoplastičnim bolestima^{22,23,24}. Aldehid dehidrogenaza izoenzimi (ALDH)

predstavljaju intracelularne citoprotektivne enzime koji su opisani kao marker KSC u različitim tumorima, uključujući karcinom dojke, pluća i pankreasa^{23,25,26}. U istraživanju KSC kolorektalnog carcinoma, ALDH je bio najznačajniji obeleživač frakcije tumora koja je in vivo generisala ksenograte. Nedavna studija je pokazala da ćelije kancerskih linija koje imaju visoku ekspresiju ALDH pokazuju senzitivnost na Salinomycin, novootkriveni, efikasni agens koji uništava KSC²⁶.

Uprkos relativno malom broju specifičnih markera, koristeći njihove kombinacije, napori istraživača da identifikuju i izoluju subpopulacije ćelija koje mogu sadržati KSC doveli su do značajnih rezultata. Fenotip CD34+/CD38-, najstarija opisana kombinacija, i danas je u primeni za identifikaciju leukemijskih KSC²⁷. KSC po prvi put su izolovane u solidnom tumoru kod karcinoma dojke. Al-Hajj i saradnici su izdvojili populaciju ćelija sa tumor inicirajućim potencijalom koristeći površinske makromolekule CD44 i CD24. Utvrđeno je da profil CD44+/CD24-/low korelira sa rezistencijom na terapiju, lošom prognozom i većom invazivnošću tumora, dok dodatak trećeg markera (CD44+/CD24-/low/EpCAMhigh) čini još snažniju fenotipsku kombinaciju²⁸. U nedavno publikovanoj studiji, prepoznavanje KSC omogućio je kompleks citoplazmatske ekspresije ALDH, membranskog CD44 i citokeratina²⁹.

U karcinomu jajnika, detektovana je mala populacija (ispod 0.2%) tumorskih ćelija koje su in vivo i u in vitro uslovima pokazale visoku tumorigenost, aplikacijom fenotipa CD44+/CD17+³⁰. Samo stotinak ćelija koje simultano ekspimiraju ove biomarkere na svojoj membrani bilo je dovoljno da pokrene tumorski rast kod eksperimentalnih životinja. Nedavno je u opsežnoj studiji kompariran kancerogeni potencijal višestruko sortiranih frakcija karcinoma jajnika. Funkcionalno je dokazano da se KSC izvesno sadrže u populaciji sa fenotipom CD44+/CD24+/EpCAM+³¹.

Kancerske stem ćelije kao terapijske mete

S obzirom na to da su sve ubedljiviji dokazi da su KSC glavni krivci za neuspeh onkološkog lečenja, pojavu metastaza i relaps bolesti, smatra se da će veliki uspeh u lečenju malignih bolesti doneti adicija KSC-ciljane terapije konvencionalnim protokolima. Terapija fokusirana na KSC može biti dvojaka: stimulacija sazrevanja, tj. diferencijacije KSC, ili eliminacija i ekstinkcija KSC^{3,5}.

Cilj diferencijacione terapije jeste da KSC izgube svoj kapacitet da se konstantno samoobnavljaju asimetričnom deobom, što bi učinilo tumorski rast neodrživim. U ove svrhe koriste se retinoična kiselina i agensi koji izazivaju epigenetske modifikacije. Primena all-trans retinoične kiseline (ATRA) praćeno hemioterapijom pretvorilo je promijelocitnu leukemiju u izlečivu bolest³². Ispituje se efikasnost ATRA-e i u solidnim tumorima: melanomu, karcinomu prostate i dojke, teratokarcinomima³³. Kostni morfogenetski proteini redukuju pul tumor inicirajućih ćelija glioblastoma koje su CD133+, jer stimulišu sazrevanje tumorskih ćelija u astrocite³⁴.

Eliminaciona terapija je usmerena na uništenje KSC, delovanjem na funkcije i karakteristike specifične za KSC. Pogođeni su ključni molekuli u signalnim putevima zaduženim za očuvanje stanja matičnosti, sposobnosti samoobnavljanja, razlike u profilima genske ekspresije, povećana aktivnost telomeraze, mehanizmi hemorezistencije. Svojstva koja čine KSC posebnim i potentnim, postaju suština njihove vulnerabilnosti.

EpCAM je membranski molekul koji se smatra jednim od najznačajnijih biomarkera matičnosti, ekspimiran na suspektim KSC carcinoma gastrointestinalnog trakta i dojke. Nedavno je sintetisan RNK aptamer, mali, neimunogeni i netoksični molekul koji interaguje sa EpCAM, koji bi se mogao koristiti kao signal za prepoznavanje i ubacivanje toksičnog, citocidnog leka u KSC 35. U iste svrhe ispituje se i veliki broj antitelo-lek konjugata, koji predstavljaju spojeve antitela na neki od površinskih antigena KSC i pikomolarne količine leka, koji ispoljava toksičnost tek nakon internalizacije u ćeliju^{36,37}. Antitelo na Lewis y antigen (CD174), hu3s193, već je u kliničkim studijama kod uznapredovalog karcinoma jajnika, kolona, dojke, pluća, prostate³⁸. U eksperimentalnoj su fazi ispitivanja efikasnosti anti-CD133 antitela konjugovanog sa citotoksičnim lekom monometil auristatin F39. Već su dobijeni odlični rezultati kod želudačnog karcinoma, ali je jasno da je translacija terapeutika u kliničku, rutinsku praksu spor i komplikovan proces.

Ciljana terapija maksimalno šteti zdravo tkivo, minimizujući neželjene efekte, dok istovremeno primenjena hemioterapija uništava gro tumorskih ćelija i time bolje eksponira KSC na dejstvo specifičnog agensa. Međutim, postavlja se pitanje bezbednosti primene terapije usmerene na KSC, jer ovakvi agensi mogu ireverzibilno oštetiti

i zdrava tkiva, delujući na normalne matične ćelije. Na sreću, nedavno je utvrđeno postojanje terapijskog prozora. I normalne i kancerske stem ćelije koriste iste signalne puteve, ali je efekat blokade i gubitka sa matičnošću asociirane signalne transdukcije ipak različit^{40,41}. Notch signalni put, jednog od ključnih za samo-obnavljanje, blokira se kada dođe do delecije Pten gena. Ova delecija ili blokada nishodnog dejstva Pten-a primenom Rapamicina (Sirolimusa) dovodi do deplecije pula leukemija inicirajućih ćelija, dok davanje Rapamicina eksperimentalnim životinjama sa delecijom Ptena dovodi do restoracije hematopoetske stem ćelije, tj. ima sasvim suprotan efekat⁴². Takođe, inhibicija Notch puta selektivno redukuje CD133+ populaciju ćelija kod embrionalnih tumora mozga⁴³.

Jedna od najvažnijih odlika KSC je i povećana aktivnost telomeraza, koja je u osnovi KSC da neograničeno proliferišu i održavaju imortalnost. U tom smislu, sa velikim entuzijazmom ispituju se agensi sa anti-telomeraznom dejstvom. Glikoprotein izolovan iz smeđe alge *Laminaria japonica* u kulturi efikasno uništava ćelijske linije gastričnog carcinoma redukujući aktivnost enzima odgovornih za održavanje telomeraza⁴⁴.

Perspektive i izazovi

Veliki i brzi napredak u identifikaciji i izolaciji KSC obeležio je prethodnu dekadu. Međutim, ovo široko polje istraživanja u koje se polažu velike nade, još uvek se sreće sa velikim brojem poteškoća i izazova. Osnovnu prepreku predstavlja nedostatak esaja za senzitivno testiranje sposobnosti samo-obnavljanja potencijalnih KSC kako bi se dobili konzistentni, precizni i reproducibilni rezultati. Model KSC je novim istraživanjima dobio na kompleksnosti, jer je skrenuta pažnja na mnogobrojne procese koji su u međusobnoj interakciji, uključujući fenomen plastičnosti KSC, dinamičnost matičnih fenotipa, interkonverziju i klonalnu evoluciju i heterogenost^{2,7}. Jasno je da impozantan broj faktora može modifikovati KSC, što otežava preciznu procenu rezultata na ksenotransplantacionom modelu i usložnjava translaciju eksperimentalnih istraživanja na nivo kliničkih studija.

Najveći izazov u budućim istraživanjima predstavljaće dalje rasvetljavanje genetskog programa matičnosti KSC, a u funkciji razvoja novih ciljanih terapija. Kancerska heterogenost i fenotipska plastičnost tumorskih ćelija mogu se savladati samo istovremenom eliminacijom tumorigene i netumorigene populacije. Ohrabruju rezultati nedavnih istraživanja koja navode da lekovi koji su već u kliničkoj primeni, poput docetaksela i metformina, pogađaju i frakciju KSC^{45,46}.

Naučna javnost podržava stav da je budućnost onkologije u sinergističkom pristupu eradikaciji neoplastične bolesti koji podrazumeva komplementarnu primenu nekoliko terapijskih modaliteta. Neophodno je ciljano delovati na svaki od esencijalnih aspekata razorne sile kancera: neoangiogenezu, rezistenciju tumorskih ćelija na apoptozu i, skakako i neizostavno, na možda malu, ali devastirajuću frakciju tumor inicirajućih, kancerskih stem ćelija.

Literatura

1. Medema JP. Cancer stem cells: the challenges ahead. *Nat Cell Biol* 2013; 15(4): 338-44.
2. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Research* 2012; 22:457-472.
3. Stojnev S, Krstic M, Ristic-Petrovic A, Stefanovic V, Hattori T. Gastric cancer stem cells: therapeutic targets. *Gastric Cancer* 2014; 17(1): 13-25.
4. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006; 355(12): 1253-61.
5. Panyam J. Cancer stem cells. *Drug Deliv Transl Res* 2013; 3:111-12.
6. Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun Signal* 2010; 8(1):6.
7. Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 2012; 21(3):283-96.
8. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004; 306(5701):1568-71.

9. Lu X, Kang Y. Cell fusion as a hidden force in tumor progression. *Cancer Research* 2009; 69(22):8536-9.
10. Li Y1, Latterra J. Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Cancer Res.* 2012; 72(3):576-80.
11. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4):663-76.
12. Baccelli I, Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol* 2012; 198(3):281-93
13. Yang L, Ping YF, Yu X, Qian F, Guo ZJ, Qian C, et al. Gastric cancer stem-like cells possess higher capability of invasion and metastasis in association with a mesenchymal transition phenotype. *Cancer Lett* 2011; 310(1):46-52.
14. Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res* 2011; 71(3):634-9.
15. Cabarcas SM, Mathews LA, Farrar WL. The cancer stem cell niche - there goes the neighborhood? *Int J Cancer* 2011; 129(10):2315-27.
16. van der Horst EH, Chinn L, Wang M, Velilla T, Tran H, Madrona Y, et al. Discovery of fully human anti-MET monoclonal antibodies with antitumor activity against colon cancer tumor models in vivo. *Neoplasia* 2009; 11(4):355-64.
17. Bertolini G, Roz L, Perego P, Tortoreto M, Fontanella E, Gatti L, et al. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(38):16281-6.
18. Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, Duniho S, Jonas M, Anderson M, et al. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br J Cancer* 2008; 99(1):100-9.
19. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63(18):5821-8.
20. Lathia JD, Hitomi M, Gallagher J, Gadani SP, Adkins J, Vasanji A, et al. Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Dis* 2011; 2:e200.
21. Swaminathan SK, Roger E, Toti U, Niu L, Ohlfest JR, Panyam J. CD133-targeted paclitaxel delivery inhibits local tumor recurrence in a mouse model of breast cancer. *J Control Release* 2013; 171(3):280-7.
22. Andrews TE, Wang D, Harki DA. Cell surface markers of cancer stem cell: diagnostic macromolecules and targets for drug delivery. *Drug Deliv Transl Res* 2013; 3:121-42.
23. Wakamatsu Y, Sakamoto N, Oo HZ, Naito Y, Uraoka N, Anami K, et al. Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. *Pathol Int* 2012; 62(2):112-9.
24. Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, Pai R, Weissman IL, Prince ME, et al. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck* 2012; 34(1):42-9
25. Ucar D, Cogle CR, Zucali JR, Ostmark B, Scott EW, Zori R, et al. Aldehyde dehydrogenase activity as a functional marker for lung cancer. *Chem Biol Interact* 2009; 178(1-3):48-55.
26. Zhi QM, Chen XH, Ji J, Zhang JN, Li JF, Cai Q, et al. Salinomycin can effectively kill ALDH(high) stem-like cells on gastric cancer. *Biomed Pharmacother* 2011; 65(7):509-15.
27. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367(6464):645-8.
28. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(7):3983-8.
29. Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, Camp RL, Rimm DL. In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. *Am J Pathol* 2010; 176(5):2131-8.
30. Zhang S, Schafer-Hales K, Khuri FR, Zhou W, Vertino PM, Marcus AI. The tumor suppressor LKB1 regulates lung cancer cell polarity by mediating cdc42 recruitment and activity. *Cancer Res* 2008; 68(3):740-8.
31. Wei X, Dombkowski D, Meirelles K, Pieretti-Vanmarcke R, Szotek PP, Chang HL, et al. Mullerian inhibiting substance preferentially inhibits stem/progenitors in human ovarian cancer cell lines compared with chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(44):18874-9.
32. Ohno R, Asou N, Ohnishi K. Treatment of acute promyelocytic leukemia: strategy toward further increase of cure rate. *Leukemia* 2003; 17(8):1454-63.
33. Cruz FD, Matushansky I. Solid tumor differentiation therapy — is it possible? *Oncotarget* 2012; 3: 559-67.
34. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature (Lond)* 2006; 444:761-5.

35. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2007; 2(12):751-60.
36. Lambert JM. Drug-conjugated monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2005; 5:543-9.
37. Chari RV. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *ACC Chem Res* 2008; 41:98-107.
38. Scott AM, Tebbutt N, Lee FT, Cavicchiolo T, Liu Z, Gill S, et al. A phase I biodistribution and pharmacokinetic trial of humanized monoclonal antibody Hu3s193 in patients with advanced epithelial cancers that express the Lewis-Y antigen. *Clin Cancer Res* 2007; 13:3286-92.
39. Smith LM, Nesterova A, Ryan MC, Duniho S, Jonas M, Anderson M, et al. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody – drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br J Cancer* 2008; 99:100-9.
40. Al-Hajj M. Cancer stem cells and oncology therapeutics. *Curr Opin Oncol* 2007; 19(1):61-4.
41. Piazzini G, Fini L, Selgrad M, Garcia M, Daoud Y, Wex T, et al. Epigenetic regulation of Delta-Like1 controls Notch1 activation in gastric cancer. *Oncotarget* 2011; 2(12):1291-301.
42. Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 2006; 441(7092):475-82.
43. Fan X, Matsui W, Khaki L, Stearns D, Chun J, Li YM, et al. Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res* 2006; 66(15):7445-52.
44. Han MH, Kim GY, Moon SK, Kim WJ, Nam TJ, Choi YH. Apoptosis induction by glycoprotein isolated from *Laminaria japonica* is associated with down-regulation of telomerase activity and prostaglandin E2 synthesis in AGS human gastric cancer cells. *Int J Oncol* 2011; 38:577-84.
45. Hirsch HA, Iliopoulos D, Tsihchlis PN, Struhl K. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. *Cancer Res* 2009; 69(19):7507-11.
46. Yan H, Chen X, Zhang Q, Qin J, Li H, Liu C, et al. Drug-tolerant cancer cells show reduced tumor-initiating capacity: depletion of CD44 cells and evidence for epigenetic mechanisms. *PLoS One* 2011; 6(9):e24397.