

転移性乳がん患者からの血中循環がん細胞の 検出と1細胞遺伝子解析

森 本 篤 史*¹
飯 嶋 和 樹*²
最 上 聡 文*¹
秋 山 泰 之*¹
片 山 晃 治*²
二 見 達*¹

Detection and Single Cell Genomic Analysis of Circulating Tumor Cells from Metastatic Breast Cancer Patients

Atsushi MORIMOTO
Kazuki IJIMA
Toshifumi MOGAMI
Yasuyuki AKIYAMA
Koji KATAYAMA
Toru FUTAMI

Circulating tumor cells (CTCs) are tumor cells that occur at very low concentrations in the blood of patients with metastatic cancer. The detection and analysis of CTCs is expected to be utilized as a tool for non-invasive real-time monitoring of response to therapy and the selection of individual treatment options.

However, tumor cells are extremely complicated and heterogeneous which is the major obstacle the characterization and eradication of metastasis.

The techniques required to detect and analyze CTCs are as follows :

- 1) High-sensitive technique for detecting various types of CTCs independently from their expression markers.
- 2) Technique for single cell analysis that allows the characterization of malignant tumor cells to develop novel agents for cancer diagnosis and targeted therapy.

In this study, we describe detection and single cell genomic analysis of CTCs from metastatic breast cancer patients using a CTC detection and analysis system based on dielectrophoretic microwell array technology (Tosoh research and technical review 2014).

Fifteen advanced breast cancer patients and 2 healthy donors were recruited at National Cancer Center Hospital. CTCs were generally defined as epithelial marker, cytokeratin/CK-positive and DAPI stained nucleus and white blood cell marker CD45-negative cells. However it is known that CK is not expressed in some tumors during metastases. Our system also discriminates CK-negative CTC candidates to exclude all normal cells with image analysis software.

In 15 blood samples from patients, our system could detect CTC candidates including CK-negative cells in all samples. In 2 blood samples from healthy donors, no CTCs were detected. Moreover, single cell genomic analysis demonstrated that both CK-positive and CK-negative cells had at least one mutation in cancer-associated genes indicating that the detected cells were possible CTCs. The results of the clinical study show that single cells isolated by our system are useful for further genomic analysis. In addition, the result of mutation analysis of isolated single CTCs suggested that CTCs have heterogeneity in cancer-related genes.

* 1 ライフサイエンス研究所/細胞診断グループ

* 2 ライフサイエンス研究所/装置開発グループ

1. 緒 言

末梢血中に極微量に存在する血中循環がん細胞 (Circulating Tumor Cells: CTCs) の検出解析技術は、低侵襲かつリアルタイムでのがん治療効果の判定や適切な治療薬の選定ツールとして期待されている¹⁻⁶。2004年にCellSearch[®]システム (Janssen Diagnostics 製) が、転移性乳がん、転移性前立腺がん及び転移性大腸がん症例の予後予測、治療の効果判定に利用可能なCTC検査装置として米国食品医薬品局 (FDA) 認可され、現在に至るまで上記がん種以外にも非小細胞肺癌、小細胞肺癌、胃がん等からのCTCsの検出および臨床的意義の検証が進められている⁷⁻¹¹。しかしながら、CellSearch[®]システムは、がん細胞表面上皮細胞接着分子 (Epithelial Cell Adhesion Molecule, EpCAM) が発現している一部の限られたCTCsしか検出できないこと、またCTCsの計数に特化した装置であり、治療選択に利用できる情報が得られないことが普及の妨げとなっていた。

このようなCellSearch[®]システムの課題に対し、CTCsと血球細胞 (赤血球、白血球) との細胞径の違いによりCTCsをフィルターに捕捉する技術¹²⁻¹⁴や赤血球を溶血した試料 (白血球、CTCs) をスライドに塗布し、レーザースキャンする技術¹⁵⁻¹⁶、マイクロデバイスを用いた分離技術¹⁷⁻¹⁹などが開発されたことでCTCsが腫瘍組織と同様に多様性に富んだ極めて複雑な集団であることが明らかになってきている。そして近年、がんの多様性解析による治療抵抗性を有する悪性腫瘍細胞の特定など転移メカニズム解明に向けた1細胞解析技術に注目が集まり、マイクロマニピュレーターやセルソーターを用いた1細胞採取と次世代シーケンサによる網羅的遺伝子解析が検討されている²⁰⁻²¹。

そのような技術背景のなか、昨年、我々は血球細胞とCTCsの比重差を利用した濃縮から誘電泳動力による細胞アレイ、蛍光顕微鏡を用いた画像検出、CTCsの1細胞採取が可能で新規の細胞分離解析システムを

開発し、本システムを用いた前臨床・原理検証実験結果を報告した²²。本報告では、本システムを用いた国立がん研究センターでの臨床実験において、転移性乳がん患者からのCTCs検出と1細胞遺伝子解析を行ったので報告する。

2. 技術概要

本システムは、全血から①CTCs濃縮、②誘電泳動による微細孔アレイへの細胞捕捉、③細胞標識・検出、④1細胞採取とCTCsに代表される希少細胞の効率的な分離・検出ならびに性状解析のための単離操作を一連で実施することが可能である (Fig. 1)。

[1] CTCs 濃縮

CTCsは自社で開発した専用構造体を用いて濃縮した (Fig. 2)。Lymphoprep 比重差分離液 (密度: 1.077 ± 0.001 g/ml, 浸透圧: 280 ± 15 mOsm/kg-H₂O, Axis-Shield 製) を下部構造体に充填した後、上部構造体と下部構造体を連結した。連結した上部構造体の開口部から3mLの血液と赤血球・白血球凝集抗体試薬であるRosetteSep Human CD45 depletion Cocktail (STEMCELL Technologies 製)、3mLの生理食塩水を加えた後、遠心した (2000 × g, 5分, 25°C)。遠心後、不要な赤血球および一部の白血球が沈降した下部構造体を取り外し、上部構造体の上蓋を開放することにより上部構造体の下部から上部の画分をすべて回収した。回収液にわずかに混入する赤血球は溶血試薬 (9.0 g/L NH₄Cl, 1.0 g/L KHCO₃, 0.037 g/L EDTA-4Na) を添加することで破碎し、CTCsと残存白血球は遠心 (300 × g, 10分, 25°C) により回収した。上清を除去した回収画分は、300mM マンニール水溶液での洗浄と遠心 (300 × g, 5分, 25°C) を2回実施した。洗浄後の上清を除去し、最終液量が1~2mLのCTCs濃縮液を得た。

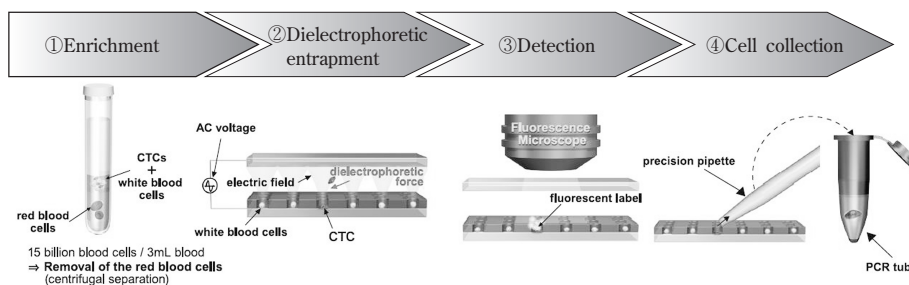


Fig. 1 Workflow of CTC detection and single cell analysis

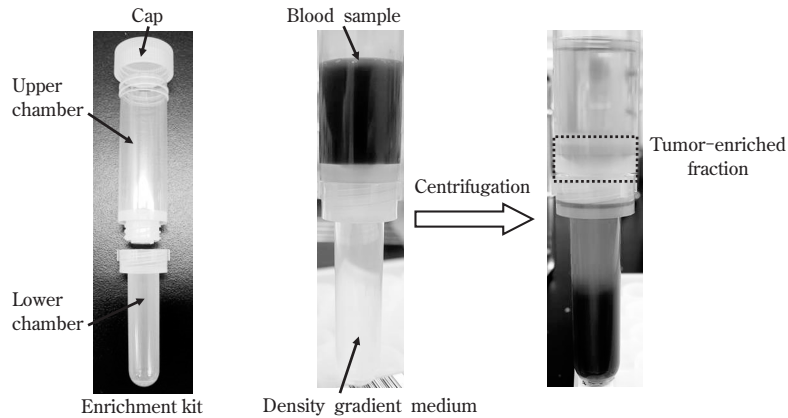


Fig. 2 Enrichment of CTCs with density gradient centrifugation

[2] 誘電泳動力による微細孔アレイへの細胞捕捉

CTCs 濃縮液を Fig. 3 に示した細胞捕捉チャンバーに導入した後、矩形波交流電圧 (3 MHz、20 V_{p-p}) を 3 分間印加し、誘電泳動力により細胞を微細孔アレイに捕捉した (Fig. 4)。交流電圧を印加したまま、0.01% ポリ-L-リジン含有の 300mM マンニトール水溶液を細胞捕捉チャンバーに導入し 3 分間静置することで細胞を微細孔底面に静電的に接着した。次に交流電圧を切り、ホルムアルデヒドとエタノールの混合液でチャンバー内の液交換をし、細胞固定と細胞膜透過処理を行った。続いて、1% 牛血清アルブミン (BSA)、0.05% Tween20 含有の PBS 溶液で洗浄することでホルムアルデヒド・エタノールを除去した後、同溶液を充填し、室温で 10 分間静置することで非特異標識ブロッキングを実施した。

[3] 細胞標識・検出

一般的に CTCs は血管内に浸潤した上皮性細胞 (本来は血液中に存在しない細胞) として検出するため、CTCs の検出には上皮性マーカーであるサイトケラチン (CK) をターゲットにする。一方、CTCs とともに混入してくる白血球は、白血球表面マーカーで

ある CD45 を用いて CTCs と区別する。臨床測定においては、1% BSA、0.05% Tween20、FITC 標識-抗 CK 抗体 (クローン CK3-6H5)、Alexa Fluor 488 標識-抗 Pan-CK 抗体 (クローン AE1/AE3)、PE 標識-抗 CD45 抗体 (クローン J33)、DAPI、及び FcR ブロッキング試薬含有の標識試薬を細胞捕捉チャンバー内に導入し、室温で 30 分間静置することで細胞標識を実施した。標識工程後の細胞捕捉チャンバーは、蛍光顕微鏡 (IX 71、オリンパス製) の自動ステージ上に設置し、EM-CCD カメラ (ADT-100、フローベル製) により微細孔アレイ全域の画像を取得した。なお画像は蛍光 3 波長 (DAPI、FITC (Alexa Fluor 488)、PE) の蛍光画像および明視野画像が取得可能である。

[4] 1 細胞採取

本システムでは、蛍光標識による CTCs の輝点から細胞捕捉チャンバー内での正確な位置情報が保存される。上蓋を外した細胞捕捉チャンバーを本システムのステージに設置し、ソフトウェア上で目的の CTCs を選択することでステージに搭載した細胞採取機構 (吸引ポンプ式の精密ピペット、Fig. 5) によって CTCs を 1 細胞単位で採取することができる。

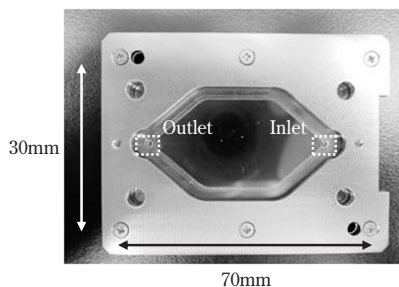


Fig. 3 Cell entrapment chamber

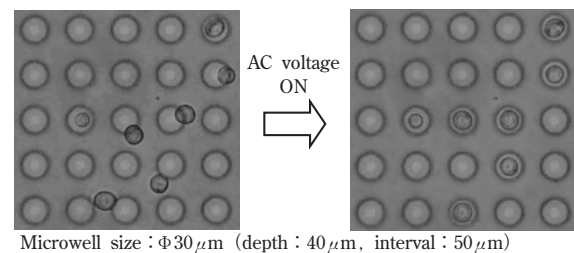


Fig. 4 Dielectrophoretic entrapment of cells in microwells

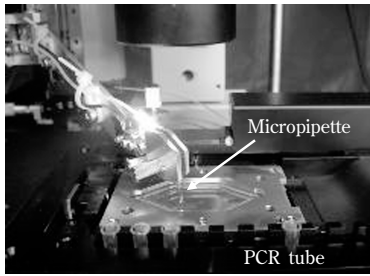


Fig. 5 Single cell picking unit

3. 臨床測定

[1] 検 体

国立がん研究センターにて、インフォームドコンセントを得た転移性乳がん患者 15 症例（43～74 歳）および健常者 2 症例から血液 3mL を EDTA-2K 真空採血管（VP-DK050K、テルモ製）に採血し測定を実施した。

[2] CTC 測定

乳がん患者検体を用いた臨床測定により本システムの性能を評価した。蛍光画像解析により、CK 陽性 / DAPI 陽性 / CD45 陰性の細胞を CTCs と判定し、一方で CK 陰性 / DAPI 陽性 / CD45 陽性の細胞を白血球と判定した。また転移の過程において、一部の CTCs に上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) が起きる結果、CK や EpCAM などの上皮性マーカーが消失することが知られているため²³⁻²⁵、本システムでは CK 陽性に加え、CK 陰性の CTCs 候補 (DAPI 陽性 / CD45 陰性) を自社開発のソフトウェアを用いて抽出した (Fig. 6)。なお、検出 CTCs 数については先行技術である CellSearch[®] システムとの比較を行った。

その結果、CellSearch[®] システムでは全 15 症例中 5 例で CTCs が検出できなかったのに対し (陽性率：

66.7%、診断閾値：> 2 個 / 7.5mL 血液)、本システムでは全症例で CTCs の可能性のある細胞を検出でき (陽性率 100%、診断閾値：> 1 個 / 3mL 血液)、先行技術に対する優位性を示すことができた (Table 1)。なお健常者 2 症例では両システムともに CTCs は検出されず、偽陽性がないことを確認した。一方、同一検体における検出 CTCs 数については両システム間で相関は認められなかった。この理由として、CTCs の濃縮方法の違いが挙げられる。CellSearch[®] システムが採用する濃縮法は、血液中における CTCs の生存もしくは死滅の状態に関わらず細胞の形態が維持されており (DAPI 陽性)、細胞表面に EpCAM が存在する CTCs を選択的に濃縮する。しかしながら前述のように EpCAM や CK の発現量はがん種や転移の過程で大きく変化すること、またモデル実験での報告によると原発巣から血管内に遊出したがん細胞のほとんどはアポトーシス (細胞死) によって死滅し、最終的に転移を成立させる悪性腫瘍は 0.1% 未満であることから²⁶、CellSearch[®] 法では本質的な悪性度を正確に診断できていないことが懸念される。それに対し、本システムでは、比重差分離により CTCs の保有するマーカーの発現量に依存せず、かつ血液中で生存している CTCs を選択的に濃縮可能であるため、より転移や予後のリスクを反映した診断が期待できる。今後、臨床検体データ数を蓄積し、患者予後と照らし合わせながら統計的に解析することで本システムの臨床的有用性を検証していく予定である。

[3] 1 細胞遺伝子解析

15 症例中 5 例の検体から検出された CTCs のうち、計 16 個 (CK 陽性 CTCs : 8 個、CK 陰性 CTCs : 8 個) を本システムで 1 細胞採取し、市販の PCR チューブに回収した。PCR チューブに回収した 1 細胞 CTC 由来のゲノム DNA の配列解析を行うために、Ampli1[™]

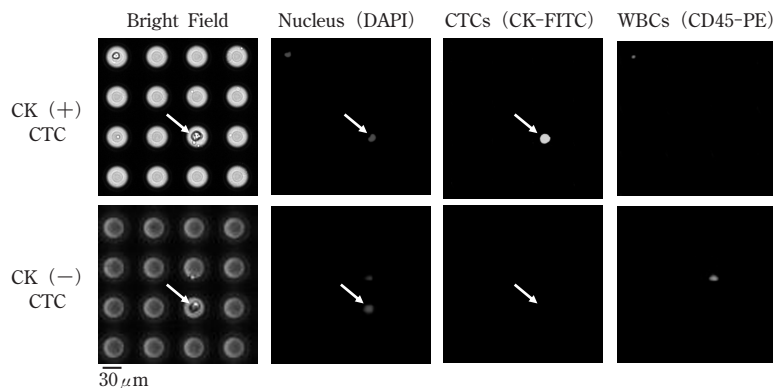


Fig. 6 Captured images of CK-positive and -negative CTCs

Table 1 Number of detected CTCs / 3mL of peripheral blood

Patient No.	Sex	Age	Clinical stage	IHC (Primary tissue)			TOSOH			CellSearch system
				HER2	ER	PgR	CK(+)CTC	CK(-)CTC	Total	
1	F	57	IV	—	1+	—	1	4	5	7
2	F	74	IV	—	2+	2+	7	5	12	45
3	F	70	IV	—	3+	2+	0	4	4	0
4	F	60	IV	—	—	—	0	12	12	2
5	F	52	IV	N.E	N.E	3+	4	19	23	73
6	F	62	IV	—	—	1+	0	6	6	16
7	F	68	IV	1+	1+	2+	0	5	5	2
8	F	62	IV	—	1+	2+	0	3	3	N.E
9	F	63	IV	—	3+	—	0	1	1	0
10	F	52	IV	—	2+	1+	0	5	5	0
11	F	66	IV	1+	3+	2+	0	18	18	3
12	F	48	IV	—	3+	3+	2	0	2	0
13	F	61	IV	—	3+	3+	2	36	38	40
14	F	43	IV	—	3+	3+	5	6	11	56
15	F	53	IV	—	3+	3+	2	8	10	9

N.E : Not Evaluated

全ゲノム増幅キット (Silicon Biosystems 製) を用いて全ゲノム DNA の増幅を行った。アガロースゲル電気泳動により全ゲノムが十分に増幅されていることを確認した後、30 ~ 100 ng の全ゲノム増幅産物を鋳型としてライブラリーを作製後、次世代シーケンサ (Ion Personal Genome Machine™ (Ion PGM™)) System, Life Technologies 製) により遺伝子配列解析を行い、

EGFR/KRAS/BRAF など 50 種のがん関連遺伝子変異の有無を確認した。

その結果、CK 陽性および CK 陰性 CTCs のそれぞれから少なくとも 1 種以上のがん関連遺伝子の変異を検出することができた (Table 2)。CK 陽性 CTCs に加え CK 陰性 CTCs が遺伝子解析により、がん細胞の可能性を支持できたことで本システムが CellSearch®

Table 2 Sequence analysis of single CTCs in breast cancer

CTC types	Patient No.	CTC No.	Gene	Amino acid Mutation	Variant Frequency (%)	Total Read
CK(+)CTCs	2	1	<i>PIK3CA</i>	H1047R	99.5	1886
		2	<i>TP53</i>	D281H	99.4	23511
		3	<i>CSF1R</i>	—	100	52
		4	<i>PIK3CA</i>	H1047R	91.2	3799
	14	5	<i>TP53</i>	D281H	85.6	1746
		5	<i>HRAS</i>	H27H	71.4	7
		6	<i>MLH1</i>	V384D	100	8
		7	<i>APC</i>	—	100	6
CK(-)CTCs	13	8	<i>MET</i>	—	100	380
		9	<i>APC</i>	—	97.4	1946
		10	<i>KIT</i>	K546K	100	1991
		11	<i>KIT</i>	K546K	55.4	1106
	15	12	<i>TP53</i>	—	94.1	1875
		13	<i>MLH1</i>	V384D	100	1990
		14	<i>SMARCB1</i>	Unknown	44.1	810
		15	<i>HRAS</i>	H27H	100	339
		16	<i>APC</i>	P1442P	100	1992

システムでは検出できない上皮性マーカーが消失した CTCs を検出可能であると証明することができた。各 CTC の遺伝子変異プロファイルを詳細に解析すると同一検体 (Patient No.2) から採取した異なる CK 陽性 CTCs (CTC No.1, 2, 4) は、共通したがん関連遺伝子変異 (*PIK3CA*, *TP53*) を保有していた。同様に Patient No.13 から採取した異なる CK 陰性 CTCs (CTC No.10, 11) でも共通のがん関連遺伝子 (*KIT*) を検出した。さらに Patient No.14 から採取した CK 陽性と陰性 CTCs から、がん関連遺伝子 *MLH1* が検出できたことから、CTC 間で比較的共通した性質を有していることが推測された。今後、個々の CTCs の遺伝子やタンパク発現プロファイルを詳細に解析し、原発巣および転移巣のがん細胞と比較することで CTCs が薬効評価や治療選択に利用可能か検証するとともに転移に関与する悪性 CTCs の解明、新規マーカーの探索を実施していく予定である。

4. 総括

国立がん研究センターで実施した末期乳がん患者 15 症例を対象とした臨床測定において、本システムでは全ての症例から CK 陽性および CK 陰性の CTCs を検出することができ、先行技術 CellSearch® システムに対する優位性を示すことができた。また 1 細胞採取した CK 陽性、陰性 CTCs の両者からがん関連遺伝子の変異を検出したことから、遺伝学的にも両細胞はがん細胞であることが確定できた。以上の臨床測定結果から本システムは CTCs の保有するマーカーに依存することなく、転移に関与する可能性のある CTCs を検出することができ、さらに採取した 1 細胞は遺伝子解析に利用可能であることが証明できた。本システムは希少な細胞を効率的に分離・濃縮する工程から目的細胞を高感度に検出し、1 細胞レベルでの精密採取までをトータルで実現できるため臨床および研究双方のニーズに応えることのできるシステムである。近年、CTCs の臨床 (診断・治療)、創薬応用に向け、CTCs の多様性解析や 1 細胞からの DNA、RNA の網羅的解析が進められ CTC 研究が激化しているなかで本システムが CTCs の性質を明らかにし、転移診断および治療に寄与することが期待される。

5. その他

本研究開発は、(旧)独立行政法人国立がん研究センター (現 国立研究開発法人国立がん研究センター)

の倫理委員会の承認を得て実施された。また独立行政法人新エネルギー・産業技術開発機構 (NEDO) によるがん超早期診断・治療機器の総合研究開発プロジェクト、血中循環がん細胞検出技術【CTC 検出自動化】(2010 年～2015 年) の助成を受け実施された。

6. 謝辞

本研究開発の実施にあたり、技術的なご指導・ご助言をいただいた都立駒込病院の小泉史明先生、澤田武志先生、和歌山県立医科大学の洪泰浩先生ならびにご協力いただいた方々に対し深く感謝いたします。

引用文献

- (1) 澤田武志、小泉史明、がん分子標的治療、**13**、1 (2015)
- (2) M. Yu, S. Stott, M. Toner, S. Maheswaran, DA. Haber, *J. Cell Biol.*, **192**, 373 (2011)
- (3) ES. Lianidou, *Clin. Chem.*, **58**, 805 (2012)
- (4) C. Alix - Panabieres, K. Pantel, *Clin. Chem.*, **59**, 110 (2013)
- (5) TM. Gorges, K. Pantel, *Cancer Immunol. Immunother.*, **62**, 931 (2013)
- (6) E. Heitzer, M. Auer, P. Ulz, JB. Geigl, M. Speicher, *Genome Med.*, **5**, 73 (2013)
- (7) W. Jeffrey Allard, J. Matera, M. Miller, M. Repollet, MC. Connelly, C. Rao, AG. J. Tibbe, JW. Uhr, LW. M. M. Terstappen, *Clin Cancer Res.*, **10**, 6897 (2004)
- (8) MG. Krebs, R. Sloane, L. Priest, L. Lancashire, JM. Hou, A. Greystoke, TH. Ward, R.Ferraldeschi, A. Hughes, G. Clack, M. Ranson, C. Dive, FH. Blackhall, *J. Clin. Oncol.*, **29**, 1556 (2011)
- (9) JM. Hou, MG. Krebs, L. Lancashire, R. Sloane, A. Beckon, RK. Swain, LJ. Priest, A. Greystoke, C. Zhou, K. Morris, T. Ward, FH. Blackhall, C. Dive, *J. Clin. Oncol.*, **30**, 525 (2012)
- (10) T. Naito, F. Tanaka, A. Ono, K. Yoneda, T. Takahashi, H. Murakami, Y. Nakamura, A. Tsuya, H. Kenmotsu, T. Shukuya, K. Kaira, Y. Koh, M. Endo, S. Hasegawa, N. Yamamoto, *J. Thorac. Oncol.*, **7**, 512 (2012)
- (11) S. Matsusaka, K. Chin, M. Ogura, M. Suenaga, E. Shinozaki, Y. Mishima, Y. Terui, N. Mizunuma, K. Hatake, *Cancer Sci.*, **101**, 1067 (2010)

- (12) F. Farace, C. Massard, N. Vimond, F. Drusch, N. Jacques, F. Billiot, A. Laplanche, A. Chauchereau, L. Lacroix, D. Planchard, S. Le Moulec, F. André, K. Fizazi, JC. Soria, P. Vielh, *Br. J. Cancer*, **105**, 847 (2011)
- (13) HK. Lin, S. Zheng, AJ. Williams, M. Balic, S. Groshen, HI. Scher, M. Fleisher, W. Stadler, RH. Datar, YC. Tai, RJ. Cote, *Clin. Cancer Res.*, **16**, 5011 (2010)
- (14) M. Hosokawa, H. Kenmotsu, Y. Koh, T. Yoshino, T. Yoshikawa, T. Naito, T. Takahashi, H. Murakami, Y. Nakamura, A. Tsuya, T. Shukuya, A. Ono, H. Akamatsu, R. Watanabe, S. Ono, K. Mori, H. Kanbara, K. Yamaguchi, T. Tanaka, T. Matsunaga, N. Yamamoto, *PLoS One.*, **8**, 6 (2013)
- (15) M. Wendel, L. Bazhenova, R. Boshuizen, A. Kolatkar, M. Honnatti, E.H.Cho, D. Marrinucci, A. Sandhu, A. Perricone, P. Thistlethwaite, K. Bethel, J. Nieva, M. Van den Heuvel, P. Kuhn, *Phys.Biol.*, **9** (2012)
- (16) J. Nieva, M. Wendel, M.S. Luttgen, D. Marrinucci, L. Bazhenova, A. Kolatkar, R. Santala, B. Whittenberger, J. Burke, M. Torret, K. Bethel, P. Kuhn, *Phys.Biol.*, **9** (2012)
- (17) E. Ozkumur, AM. Shah, JC. Ciciliano, BL. Emmink, DT. Miyamoto, E Brachtel, M. Yu, P. Chen, B. Morgan, J. Trautwein, A. Kimura, S. Sengupta, SL. Stott, N. M. Karabacak, TA. Barber, JR. Walsh, K. Smith, PS. Spuhler, JP. Sullivan, RJ. Lee, DT. Ting, X. Luo, AT. Shaw, A. Bardia, LV. Sequist, DN. Louis, S. Maheswaran, R. Kapur, DA. Haber, M. Toner, *Sci. Trans. Med.*, **5** (2013)
- (18) 金田祥平、荒木文子、中村寛子、藤井輝夫、生産研究 65巻 (2013)
- (19) Khoo BL, Warkiani ME, Tan DS, Bhagat AA, Irwin D, Lau DP, Lim AS, Lim KH, Krisna SS, Lim WT, Yap YS, Lee SC, Soo RA, Han J, Lim CT, *PLoS One.*, **9** (2014)
- (20) E. Heitzer, M. Auer, C. Gasch, M. Pichler, P. Ulz, EM. Hoffmann, S. Lax, J. Waldispuehl - Geig, O. Mauermann, C. Lackner, G. Höfler, F. Eisner, H. Sill, H. Samonigg, K. Pantel, S. Riethdorf, T. Bauernhofer, JB. Geigl, MR. Speicher, *Cancer Res.*, **73**, 2965 (2013)
- (21) NE. Navin, *Genome Biol.*, **15**, 452 (2014)
- (22) 最上聡史、森本篤史、飯嶋和樹、秋山泰之、片山晃治、二見達、東ソー研究・技術報告 第58巻 (2014)
- (23) M. Yu, A. Bardia, BS. Wittner, SL. Stott, ME. Smas, DT. Ting, SJ. Isakoff, JC. Ciciliano, MN. Wells, AM. Shah, KF. Concannon, MC. donaldson, LV. Sequist, EBrachtel, D. Sgroi, J. Baselga, S. Ramaswamy, M. Toner, DA. Haber, S. Maheswaran, *Science.*, **339**, 6119, (2013)
- (24) S. Wu, S. Liu, Z. Liu, J. Huang, X. Pu, J. Li, D. Yang, H. Deng, J. Xu, *PLoS ONE.*, **10**, 4, (2015)
- (25) G. Kallergi, MA. Papadaki, E. Politaki, D. Mavroudis, V. Georgoulas, S. Agelaki, *Breast Cancer Res.*, **13**, 3 (2011)
- (26) S. Valastyan, RA. Weinberg, *Cell.*, **147**, 2 (2011)

