

BIỂU HIỆN NGUYÊN BÀO SỢI LIÊN QUAN ĐẾN UNG THƯ TRONG UNG THƯ HỐC MIỆNG

Lưu Hải Trung¹, Lưu Thị Thu Thảo², Nguyễn Thị Kim Chi³

TÓM TẮT

Mở đầu: Nguyên bào sợi liên quan đến ung thư (Cancer associated Fibroblasts-CAF) là một trong các thành phần chủ yếu của chất nền ngoại bào (Extra-cellular Matrix-ECM). Nhiều nghiên cứu cho thấy CAF có vai trò tương tác với tế bào bướu trong sự thúc đẩy quá trình tiến triển của nhiều loại ung thư, trong đó có ung thư hốc miệng (UTHM). Tại Việt Nam vẫn chưa có nghiên cứu nào cho thấy biểu hiện CAF có liên quan đến tình trạng di căn hạch.

Mục tiêu: Xác định tỷ lệ mức độ biểu hiện CAF, phân tích mối liên quan giữa mức độ biểu hiện CAF với các đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học và tình trạng di căn hạch trong UTHM.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu cắt ngang mô tả, phân tích 87 mẫu bệnh phẩm của bệnh nhân UTHM đến khám và điều trị tại Bệnh viện Ung Bướu Tp. Hồ Chí Minh (HCM), cắt nhuộm Hematoxylin & Eosin (HE) và miễn dịch huỳnh quang (MDHQ) α -SMA; xác định tỷ lệ mức độ biểu hiện CAF.

Kết quả: Tỷ lệ biểu hiện CAF là 97,7%. Tỷ lệ mức độ biểu hiện CAF mạnh là 47,1% và CAF yếu là 52,9%. Mức độ biểu hiện CAF có liên quan chặt chẽ đến kiểu xâm lấn, số chồi bướu và tình trạng di căn hạch ($p < 0,001$). Tỷ lệ mức độ biểu hiện CAF mạnh trong nhóm di căn hạch là 64,7% trong khi ở nhóm không di căn hạch là 22,2%.

Kết luận: CAF biểu hiện hơn 95% trong UTHM. Xác định mức độ biểu hiện CAF có thể giúp hỗ trợ dự đoán tình trạng di căn hạch, mức độ biểu hiện CAF càng mạnh, khả năng di căn hạch càng cao.

Từ khóa: Nguyên bào sợi liên quan đến ung thư, miễn dịch huỳnh quang, ung thư hốc miệng

SUMMARY

CANCER ASSOCIATED FIBROBLAST EXPRESSION IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Background: Cancer associated Fibroblasts are the main components of ECM. Recent studies have elucidated the role of CAF in tumor cells interaction and tumor progression, including oral squamous cell carcinoma (OSCC). However, not any document shows the relationship between CAF expression and lymph node metastasis in Viet Nam.

Objective: The percentage level of CAF expression was examined. Analyzing the relationship between the level of CAF expression and clinicopathological features, lymph node metastasis.

Methods: Cross-sectional study was conducted on 87 formalin-fixed paraffin-embedded specimens of OSCC patients from Ho

¹Khoa Răng Hàm Mặt, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh

²Bộ môn Mô Phôi-Giải Phẫu Bệnh, Khoa Y, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh

³Bộ môn Bệnh Học Miệng, Khoa Răng Hàm Mặt, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Kim Chi
ĐT: 0908243139

Email: drnguyenchifos@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 03/02/2023

Ngày phản biện khoa học: 01/03/2023

Ngày duyệt bài: 09/03/2023

Chi Minh City Oncology Hospital. The clinicopathological features, CAF expression was evaluated by HE and α -SMA immunofluorescent staining.

Results: Positive CAF expression was detected in 97.7% cases. Strongly positive CAF expression was 47.1% cases and weakly positive CAF expression was 52.9%. The level of CAF expression was significantly correlated to mode of invasion, tumor budding and lymph node metastasis ($p < 0.001$). The percentage of strongly positive CAF expression in metastatic lymph node group was 64.7% and in non-metastatic lymph node group was 22.2%.

Conclusion: CAF expression was more than 95% in OSCC. The level of CAF expression may suggest the metastasis of cervical lymph node in OSCC. The stronger expression of CAF, the higher probability of lymph node metastasis.

Keywords: Cancer associated Fibroblast, immunofluorescence, oral squamous cell carcinoma

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

UTHM là một trong các bệnh lý ác tính trên thế giới. Quan điểm về ung thư cho đến nay đã có nhiều thay đổi, khi không chỉ được xem là tập hợp của các tế bào ác tính, mà còn là cả một vi môi trường khối bướu, bao gồm tế bào bướu và ECM. Vì vậy, vấn đề tiên lượng trong ung thư cần được tiếp cận không chỉ dựa trên tế bào ung thư, mà còn cả ECM. CAF là một trong những thành phần chủ yếu của ECM. Hầu hết chúng là các nguyên bào sợi thường trú ở mô đệm, trải qua quá trình kích hoạt liên quan đến con đường sửa chữa, tái cấu trúc trong mô ung thư và trở thành CAF. CAF sau khi được hoạt hóa sẽ tương

tác với tế bào bướu, thúc đẩy sự tiến triển của nhiều loại ung thư, trong đó có UTHM. α -SMA, một protein actin có vai trò trong việc hình thành cấu trúc và đảm bảo tính di động tế bào, hiện được đa số các nghiên cứu lựa chọn khi đánh giá biểu hiện CAF do độ tin cậy cao về tính đặc hiệu¹. Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu nào cho thấy mối liên quan giữa biểu hiện CAF và tình trạng di căn hạch tại Việt Nam. Do đó, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm gợi ý thông tin cho các nhà phẫu thuật khi đưa ra quyết định nạo hạch cổ cho bệnh nhân.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân đến khám và điều trị tại khoa Ngoại 5, bệnh viện Ung bướu Tp. HCM, từ tháng 1/2020 đến hết tháng 12/2021.

Tiêu chuẩn chọn lựa và loại trừ

Bệnh nhân có hồ sơ bệnh án đầy đủ, có ung thư nguyên phát hốc miệng và được chẩn đoán xác định trên giải phẫu bệnh (GPB) là ung thư biểu mô tế bào gai, được chỉ định cắt rộng bướu kèm theo nạo hạch cổ. Những bệnh nhân đã được điều trị đặc hiệu ung thư, ung thư đa vị trí và mẫu bệnh phẩm mổ không đủ thành phần khảo sát sẽ được loại trừ.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu

Cắt ngang mô tả, phân tích trên 87 mẫu bệnh phẩm đã được đúc khối paraffin.

Phương pháp thực hiện

Biểu hiện CAF (điểm)		
Tại mỗi cường độ n: D_n	$D_n = n \times F_n$	- D_n: Điểm biểu hiện CAF tại mỗi cường độ - n: cường độ biểu hiện CAF: + n=0 nếu CAF không biểu hiện + n=1 nếu CAF bắt màu yếu hơn mạch máu + n=2 nếu CAF bắt màu tương đương mạch máu + n=3 nếu CAF bắt màu mạnh hơn mạch máu - F_n: Tỷ lệ CAF biểu hiện tại cường độ đó
Tại mỗi vi trường: D	$D = \sum D_n$	D: Điểm biểu hiện CAF tại mỗi vi trường
Trong mỗi mẫu bệnh phẩm	Điểm biểu hiện là trung bình cộng 3 vi trường ngẫu nhiên	
Chứng dương nội chứng	Mạch máu niêm mạc bình thường	
Chứng âm nội chứng	Tế bào gai niêm mạc bình thường	

CAF biểu hiện mạnh khi đạt điểm trung bình từ trung bình cộng điểm số lớn nhất và nhỏ nhất có trong mẫu trở lên, ngược lại được cho là CAF biểu hiện yếu.

Nhuộm HE và miễn dịch huỳnh quang (MDHQ) α -SMA được thực hiện theo quy trình chuẩn tại Labo GPB-Khoa Răng Hàm Mặt, Đại học Y Dược Tp. HCM.

Biến số nghiên cứu

Các biến số về đặc điểm lâm sàng: nhóm tuổi, giới tính, kích thước bướu, di căn hạch lâm sàng và giai đoạn lâm sàng: hồi cứu trên bệnh án sẵn có.

Các biến số về GPB: đánh giá theo WHO, Bryne 1992 và số chồi bướu: khảo sát trên tiêu bản nhuộm HE, vật kính x40.

Biến số về CAF: Khảo sát thông qua biểu hiện α -SMA trên tiêu bản nhuộm MDHQ, vật kính x40.

Xử lý thống kê

Sử dụng phần mềm SPSS 20.0. Kiểm định Chi bình phương, kiểm định chính xác Fisher để đánh giá sự liên quan giữa mức độ biểu hiện CAF với các đặc điểm lâm sàng, mô bệnh học cũng như tình trạng di căn hạch. Sử dụng kiểm định t độc lập để đánh giá số điểm biểu hiện CAF trong từng đặc điểm mô bệnh học. Các phép thống kê có ý nghĩa khi $p < 0,05$.

Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu này được sự chấp thuận của Hội đồng Đạo đức Đại học Y Dược Tp. HCM theo quyết định số 782/HĐĐĐ-ĐHYD và Hội đồng Đạo đức Bệnh viện Ung Bướu Tp. HCM theo quyết định số 58/BVUB-HĐĐĐ.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

• Biểu hiện α -SMA tại niêm mạc bình thường

α -SMA không biểu hiện tại biểu mô niêm mạc bình thường, tại mô đệm bên dưới, 100% mẫu nghiên cứu đều biểu hiện α -SMA tại các tế bào cơ trơn thành mạch máu.

• Biểu hiện CAF trong UTHM

CAF biểu hiện thông qua biểu hiện α -SMA. CAF dương tính trong 97,7% số mẫu nghiên cứu (85/87 ca). Điểm biểu hiện CAF lớn nhất là 178,10 và thấp nhất là 0,00. Điểm cắt quyết định biểu hiện CAF (mạnh, yếu) là 89,05. Với điểm cắt như trên, tỷ lệ biểu hiện CAF mạnh là 47,1% (41/87 ca) và tỷ lệ biểu hiện CAF yếu là 52,9% (46/87 ca).

• Liên quan giữa biểu hiện CAF với các đặc điểm lâm sàng

Chúng tôi chưa ghi nhận có sự liên quan nào giữa biểu hiện CAF với các đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân ($p > 0,05$).

Bảng 1. Liên quan giữa biểu hiện CAF với các đặc điểm lâm sàng

Đặc điểm	Biểu hiện CAF		Tổng n (%) n=87	p
	Mạnh n (%)	Yếu n (%)		
Giới tính				
Nam	28 (45,2)	34 (54,8)	62 (100)	0,563 ^a
Nữ	13 (52)	12 (48)	25 (100)	
Nhóm tuổi				
<40	4 (57,1)	3 (42,9)	7 (100)	0,417 ^b
40-60	28 (50,9)	27 (49,1)	55 (100)	
>60	9 (36)	16 (64)	25 (100)	
Kích thước bướu				
T1	8 (40)	12 (60)	20 (100)	0,461 ^a
T2	20 (47,6)	22 (54,8)	42 (100)	
T3	9 (64,3)	5 (35,7)	14 (100)	
T4	4 (36,4)	7 (63,6)	11 (100)	
Di căn hạch lâm sàng				
N0	24 (47,1)	27 (52,9)	51 (100)	0,513 ^b
N1	10 (41,7)	14 (58,3)	24 (100)	
N2	3 (42,9)	4 (52,1)	7 (100)	
N3	4 (80)	1 (20)	5 (100)	
Giai đoạn lâm sàng				
I	4 (26,7)	11 (73,3)	15 (100)	0,357 ^a
II	14 (53,8)	12 (46,2)	26 (100)	
III	14 (51,9)	13 (48,1)	27 (100)	
IV	9 (47,4)	10 (52,6)	19 (100)	

(a): Kiểm định Chi bình phương, (b): Kiểm định chính xác Fisher

• **Liên quan giữa biểu hiện CAF với các đặc điểm mô bệnh học**

Trong các đặc điểm mô bệnh học, biểu hiện CAF có liên quan chặt chẽ với kiểu xâm lấn và số chồi bướu ($p < 0,001$).

Bảng 2. Liên quan giữa biểu hiện CAF với các đặc điểm mô bệnh học

Đặc điểm	Biểu hiện CAF		Tổng n (%) n=87	p
	Mạnh n (%)	Yếu n (%)		
Phân độ mô bệnh học theo WHO				
Tốt	12 (38,7)	19 (61,3)	31 (100)	0,527 ^b
Vừa	26 (51)	25 (49)	51 (100)	
Kém	3 (60)	2 (40)	5 (100)	
Độ sùng hóa				
Cao	4 (26,7)	11 (73,3)	15 (100)	0,096 ^a

HỘI NGHỊ KHOA HỌC VÀ ĐÀO TẠO LIÊN TỤC RĂNG HÀM MẶT LẦN THỨ 45

Vừa	10 (52,6)	9 (47,4)	19 (100)	
Thấp	20 (60,6)	13 (39,4)	33 (100)	
Không	7 (35)	13 (65)	20 (100)	
Đa hình nhân				
Ít	6 (33,3)	12 (66,7)	18 (100)	0,075 ^a
Trung bình	9 (47,4)	10 (52,6)	19 (100)	
Nhiều	19 (65,5)	10 (34,5)	29 (100)	
Rất nhiều	7 (33,3)	14 (66,7)	21 (100)	
Kiểu xâm lấn				
Đầy tới	6 (23,1)	20 (76,9)	26 (100)	<0,001 ^a
Dài/bằng	7 (31,8)	15 (68,2)	22 (100)	
Nhóm lớn ≥15 tế bào	11 (55)	9 (45)	20 (100)	
Nhóm nhỏ <15 tế bào	17 (89,5)	2 (10,5)	19 (100)	
Thâm nhiễm lymphô bào-tương bào				
Rõ	5 (27,8)	13 (72,2)	18 (100)	0,106 ^a
Vừa	10 (40)	15 (60)	25 (100)	
Ít	18 (56,2)	14 (43,8)	32 (100)	
Không	8 (66,7)	4 (33,3)	12 (100)	
Phân độ mô bệnh học theo Bryne 1992				
Độ 1	8 (29,6)	19 (70,4)	27 (100)	0,057 ^a
Độ 2	18 (50)	18 (50)	36 (100)	
Độ 3	15 (62,5)	9 (37,5)	24 (100)	
Phân độ mô bệnh học theo số chồi bướu				
<5 chồi bướu	18 (32,7)	37 (67,3)	55 (100)	<0,001 ^a
≥5 chồi bướu	23 (71,9)	9 (28,1)	32 (100)	
(a): Kiểm định Chi bình phương, (b): Kiểm định chính xác Fisher				

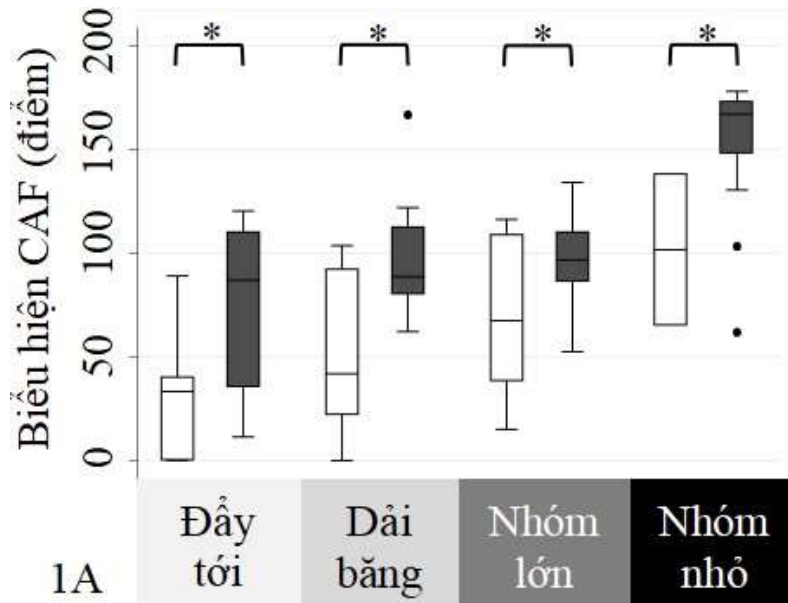
• **Liên quan giữa biểu hiện CAF với tình trạng di căn hạch GPB**

Có sự liên quan chặt chẽ giữa biểu hiện CAF và tình trạng di căn hạch GPB ($p < 0,001$).

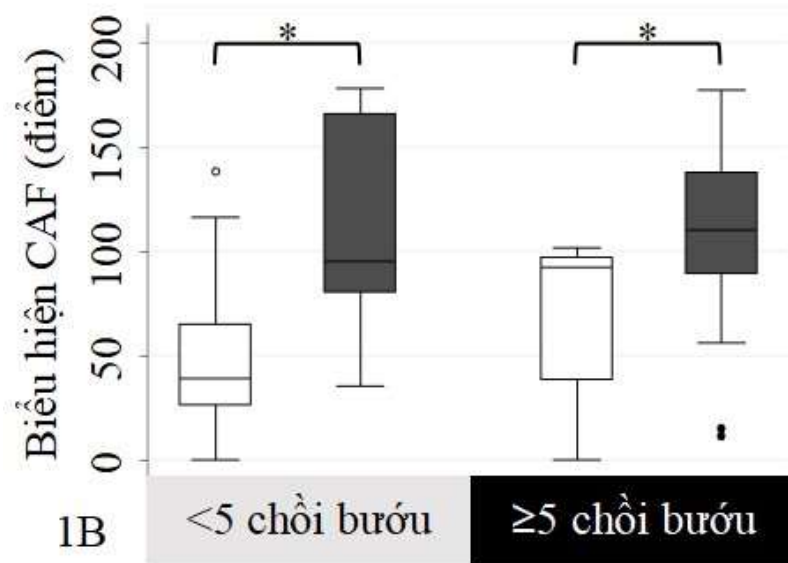
Bảng 3. Liên quan giữa biểu hiện CAF và tình trạng di căn hạch

Di căn hạch GPB	Biểu hiện CAF		Tổng n (%) n=87	P
	Mạnh n (%)	Yếu n (%)		
Có	33 (64,7)	18 (35,3)	51 (100)	<0,001*
Không	8 (22,2)	28 (77,8)	36 (100)	

(*): Kiểm định Chi bình phương



1A: Trong từng kiểu xâm lấn



1B: Trong từng nhóm chồi bướu

(*): Kiểm định t độc lập, $p < 0,05$ **Biểu đồ 1. Liên quan giữa biểu hiện CAF và tình trạng di căn hạch trong các nhóm đặc điểm mô bệnh học**

IV. BÀN LUẬN

Nguyên bào sợi (NBS) là các tế bào hình thoi có nguồn gốc từ trung mô. Trong mô bình thường, NBS ở trạng thái hoạt động không đáng kể. Chúng vừa tham gia tổng

hợp các thành phần ECM vừa tương tác với tế bào sừng để thành lập màng đáy biểu mô. Trong quá trình lành vết thương và trong mô ung thư, NBS được kích hoạt thông qua TGF- β và tăng biểu hiện α -SMA², đây cũng

là dấu ấn sinh học đáng tin cậy được nhiều tác giả lựa chọn¹. Chúng tôi ghi nhận tín hiệu huỳnh quang α -SMA tại mạch máu niêm mạc bình thường, điều này cho thấy vai trò của α -SMA trong quá trình tạo nhu động, co giãn, đảm bảo chức năng sinh lý bình thường của cơ thể.

Tỷ lệ phần trăm số ca có biểu hiện CAF là 97,7% (85/87 ca), tỷ lệ này cao hơn so với Hanley CJ (2018) (51,5%); Li Y (2018) (95,2%)¹ nhưng thấp hơn Shete M (2020) (100%)³. Sự khác biệt có thể do cỡ mẫu, phương pháp chọn mẫu, nhóm chứng, loại kháng thể sử dụng, tỷ lệ pha loãng kháng thể cũng như điểm cắt quyết định dương tính giữa các nghiên cứu. Kellermann MG (2007)¹ không tìm thấy biểu hiện nào của CAF trong các tổn thương loạn sản, điều này trái ngược so với ghi nhận của Shete M (2020)³. Vì vậy, cần thêm nhiều nghiên cứu đánh giá biểu hiện CAF trong các tổn thương loạn sản, giúp hỗ trợ tiên lượng ung thư ở giai đoạn sớm.

Từ việc đánh giá biểu hiện CAF thông qua cả cường độ biểu hiện và tỷ lệ biểu hiện, tương tự so với các tác giả Matsuoka (2015) và Lin N (2017)¹; chúng tôi ghi nhận có 52,9% số ca có CAF biểu hiện yếu và 47,1% số ca có CAF biểu hiện mạnh. Tỷ lệ này có thể thay đổi tùy thuộc vào cách thức phân chia thang điểm giữa các tác giả.

Chúng tôi chưa tìm thấy mối liên quan nào giữa biểu hiện CAF với các đặc điểm lâm sàng như giới tính, nhóm tuổi, kích thước bướu, tình trạng di căn hạch lâm sàng. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Lin N (2017), Takahashi H (2017) nhưng trái với ghi nhận của Matsuoka Y (2015)¹. Sự khác biệt này có thể do tiêu chuẩn chọn mẫu khác nhau, ở nghiên cứu của Matsuoka Y, tác giả chỉ lựa chọn mẫu trên bệnh nhân đã

trải qua quá trình hóa trị¹.

Nghiên cứu này ghi nhận sự liên quan của CAF đối với kiểu xâm lấn và số chồi bướu. Đối với quá trình xâm lấn, nghiên cứu in vitro của Labernadie A (2017) cho biết CAF có thể thành lập các lực kéo cơ học với tập hợp tế bào bướu dựa trên sự thành lập các mối nối N-Cadherin tại CAF và E-Cadherin tại tế bào ung thư, chính sự thành lập mối nối này kích hoạt phức hợp Nectins-afadin bên trong CAF, dẫn đến tăng tính phân cực và di động về phía ngược hướng với tế bào ung thư, nghĩa là tăng khả năng xâm lấn⁴. Tương tự mối liên quan với số chồi bướu, CAF được cho là có thể thúc đẩy tiến trình mất kết nối tế bào thông qua con đường Wnt- β -catenin⁵.

Nhiều nghiên cứu về mô bệnh học cho thấy mối liên quan giữa tăng biểu hiện CAF và tình trạng di căn hạch¹. Vì vậy, kết quả nghiên cứu này tái khẳng định mối liên quan trên.

Mối giao tiếp giữa tế bào bướu và CAF còn thông qua exosomes. Gần đây, Li Y (2018) tìm thấy việc ức chế biểu hiện exosomes miR-34a-5p tại CAF trong sự thúc đẩy con đường Wnt- β -catenin, gây chuyển dạng biểu mô-trung mô tế bào ung thư, giúp tế bào tăng tính di động và dễ dàng phát tán ra ECM, tạo thuận lợi hơn cho quá trình di căn hạch⁶.

Trên thực tế, ngay cả khi diện cắt được cho là sạch, không còn tế bào bướu nhưng vẫn chưa chắc cho tiên lượng tốt. Brandwein-Gensler M (2005) báo cáo có 25% bệnh nhân T1 có diện cắt âm tính tái phát trong vòng 5 năm theo dõi⁷. Vered M (2010) cho rằng hiện tượng này là do quá trình chuyển dạng biểu mô-trung mô đảo ngược có liên quan đến biểu hiện CAF thông qua giảm biểu hiện E-cadherin tại những vị

trí CAF biểu hiện mạnh⁸. Tuy nhiên, vẫn cần thêm nhiều nghiên cứu về biểu hiện CAF tại rìa diện cắt đối với thời gian theo dõi đủ dài để có thể gợi ý sử dụng biểu hiện CAF như một chỉ dấu tiên lượng sau mổ.

Chúng tôi tìm thấy mối liên quan giữa biểu hiện CAF và tình trạng di căn hạch. Hơn nữa, khi đặt mối liên quan này trong từng kiểu xâm lấn hay số chồi bướu, mối liên quan đó vẫn có ý nghĩa, điều này gợi ý khả năng rằng, thực chất các kiểu xâm lấn và số chồi bướu là các biểu hiện trung gian quan sát được giữa các tác động của CAF đến quá trình di căn hạch. Đánh giá biểu hiện CAF có thể hỗ trợ tiên lượng bệnh một cách độc lập ở giai đoạn sớm.

V. KẾT LUẬN

CAF biểu hiện hơn 95% trong UTHM. Mức độ biểu hiện CAF có liên quan chặt chẽ đến kiểu xâm lấn, số chồi bướu và tình trạng di căn hạch. Tỷ lệ mức độ biểu hiện CAF mạnh ở nhóm di căn hạch là 64,7% và ở nhóm không di căn hạch là 22,2%. Mức độ biểu hiện CAF càng mạnh, khả năng di căn hạch càng cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Dourado MR, Guerra E, Salo T, et al.** Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med.* 2018; 47 (5):443-453.
2. **Li Y.** Interaction between oral squamous cell carcinoma cells and fibroblasts through TGF- β 1 mediated by podoplanin. *Experimental Cell Research.* 2018; 369 (2018):43-53.
3. **Shete M, Deshmukh R, Kulkarni T, et al.** Myofibroblasts as important diagnostic and prognostic indicators of oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study in normal oral mucosa, epithelial dysplasia, and oral squamous cell carcinoma. *J Carcinog.* 2020; 19 (1):115-123.
4. **Labernadie A, Kato T, Brugués A, et al.** A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat Cell Biol.* 2017; 19 (3):224-237.
5. **Aizawa T, Karasawa H, Funayama R, et al.** Cancer-associated fibroblasts secrete Wnt2 to promote cancer progression in colorectal cancer. *Cancer Med.* 2019; 8 (14):6370-6382.
6. **Li Y, Tao Y, Shuo G, et al.** Cancer-associated fibroblasts contribute to oral cancer cells proliferation and metastasis via exosome-mediated paracrine miR-34a-5p. *EBioMedicine.* 2018; 36 (2018):209-220.
7. **Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, et al.** Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29 (2):167-178.
8. **Vered M.** Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. *Cancer Sci.* 2010; 101 (1):274-180.