

ハイブリッドリポソームを用いた形質転換肝幹細胞の
選択的排除に関する基礎研究

押方 歩, 宮崎龍介, 松下 琢, 上岡龍一*

Selective Elimination of the Transformed Hepatic Stem Cells
Using Hybrid Liposomes

Ayumi OSHIKATA, Ryusuke MIYAZAKI, Taku MATSUSHITA, and Ryuichi UEOKA*

Division of Applied Life Science, Graduate School of Engineering, Sojo University,
4-22-1 Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan

(Received December 24, 2010; Accepted January 27, 2011; Published online February 21, 2011)

To realize regenerative medicine, it is very important to eliminate the transformed stem cells selectively included in iPS cells, ES cells and adult stem cells derived from organs, because the transformed stem cells have a risk of tumorigenesis after the cell transplantation. Ueoka *et al.*, have developed hybrid liposomes (HL) which selectively accumulated to membranes of tumor cells and have high inhibitory effects on the growth of tumor cells along with the induction of apoptosis. Therefore, we have investigated the application of HL23 (DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃) to the selective elimination of transformed stem cells using hepatoblast, which we could induce from human fetal hepatocytes by the treatment of 1 mM sodium butyrate for 8 days. During the induction process, the transformed cells appeared and produced abnormal prothrombin (PIVKA-II), which is a clinical marker for hepatoma, and also formed colonies in soft agar plate, which is a criteria for neoplastic cell transformation. On the other hand, by the treatment with 0.33 mM HL23 for 96 h during the induction process, PIVKA-II production rate of the cells and colonies formed in the soft agar plate also remarkably decreased less than those of the normal cells. Furthermore, the population of hepatoblasts in the remaining cells increased about four times. These results suggest that the transformed hepatic stem cells could be selectively eliminated by the treatment of HL23, and HL treatment of the stem cells would be a useful culture method for quality control of the stem cells to reduce a risk of tumorigenesis after the cell transplantation.

Key words—hepatoblast; hybrid liposome; regenerative medicine; transformed cell; colony formation; tumorigenesis

緒 言

現在, iPS 細胞や ES 細胞, 各種臓器幹細胞を利用した再生医療が, 新しい医療として大変注目されている。¹⁾ これらの幹細胞を細胞移植治療に応用する際には, 生体外で種々の方法で目的の細胞へ分化誘導したのちに移植するということが一般的に考えられる。しかし, この際に, 未分化な細胞や, 形質転換を引き起こした細胞が混入した場合, 細胞移植後に異常増殖して, 腫瘍を形成するリスクがある。²⁻⁵⁾ これを未然に防ぐためには, 腫瘍を形成する可能性がある細胞を, 事前に選択的に排除する方法が重要であり, 幹細胞を用いた再生医療を安全な医療技術とするためには, これらの確立が必要とな

ってくる。

一方, これまで, われわれは, 肝幹細胞の一種である肝芽細胞に着目し, 未分化の細胞集団である正常ヒト胎児肝細胞から, 肝芽細胞を効率よく誘導する条件の検討を行ってきた。⁶⁾ その結果, 酪酸ナトリウム (Sodium Butyrate; SB) が, 肝芽細胞の有効な誘導剤になることを発見した。⁶⁾ しかしその際, SB 濃度依存的に, 肝腫瘍マーカーである異常プロトロンビン (PIVKA-II)⁷⁾ の分泌量が増大することも同時に見出した。

また, 上岡らが開発したハイブリッドリポソーム (HL)^{8,9)} は, リン脂質などのベシクル分子とミセル界面活性剤を緩衝溶液中で超音波照射することで容易に得られ, 調製時に有機溶媒の混入が全くなく, 素材, 組成比及びイオン強度の選択により, 膜直径, 膜流動性などのコントロールが可能な生体適合

崇城大学大学院工学研究科応用生命科学専攻

*e-mail: ueoka@life.sojo-u.ac.jp

性に優れた医用素材である。¹⁰⁻¹³⁾ HL は、動物を用いた安全性試験により、無毒性であることが明らかとなっている。また、脳腫瘍治療用のドラッグキャリアーとして用いられ、治療効果が得られている。¹⁴⁾ 一方、HL 自身が *in vitro* 及び *in vivo* において各種がん細胞に対して増殖抑制効果を示し、アポトーシスを誘導することを明らかにしている。¹⁵⁻¹⁹⁾ さらに、生命倫理委員会の承認後、悪性リンパ腫瘍の患者に対する臨床試験において、高い安全性及び固形リンパ腫瘍の顕著な縮小効果が得られている。²⁰⁾ このような HL の特徴の 1 つは、正常細胞とがん細胞の膜流動性の違いを認識し、がん細胞だけに選択的に蓄積することによって、がん細胞にアポトーシスを誘導することである。²¹⁾

そこで、本研究では、幹細胞の安全な培養技術の確立を目標に、この HL の正常細胞とがん細胞の高い選択性に着目し、ヒト胎児肝細胞から肝芽細胞を誘導する際に出現する形質転換細胞を、HL を用いて選択的に除去することを試みた。この形質転換細胞の腫瘍原性については、肝腫瘍マーカーである PIVKA-II 産出、がん遺伝子 *c-fos* mRNA の発現、²²⁾ そして、腫瘍性形質転換の指標として一般的に用いられる軟寒天コロニー形成法²³⁾ を用いて、*in vitro* での評価を行った。

実験方法

1. 試料 L- α -ジミリスチルフォスファチジルコリン (DMPC) は市販品 (日本油脂) をそのまま使用した。ポリオキシエチレン (23) ドデシルエーテル (C₁₂(EO)₂₃) は市販品 (Sigma) を、Elworthy らの方法に従い精製したものを使用した。²⁴⁾

2. 細胞 正常胎児肝細胞として Hc 細胞 (DS ファーマバイオメディカルより購入) を、肝がん細胞として HuH7 細胞 (理研バイオリソースセンターより購入) を使用した。また、Hc 細胞には CS-C Complete Medium を、HuH7 細胞は DMEM 培地を使用し、37°C、5% CO₂ の条件下で培養を行った。

3. ハイブリッドリポソームの調製 HL は 90 mol% のリン脂質 (DMPC) と 10 mol% の PEG 系界面活性剤 (C₁₂(EO)₂₃) を 5% ブドウ糖溶液中に溶解後、45°C、窒素雰囲気下で超音波照射することにより調製した。孔径 0.20 μ m フィルターでろ過滅菌し試験溶液とした。この DMPC/10 mol% C₁₂

(EO)₂₃ (以下、HL23 とする) を、0.33 mM になるように培地中に添加し使用した。

4. 肝芽細胞の誘導条件 Hc 細胞は、35 mm dish に 5 \times 10⁴ cells/dish になるよう播種した。酪酸ナトリウム (SB) 処理を行う場合は、播種 2 日目から 1 mM SB 含有培地で培養し、処理時間は 8 日間とした。HL23 処理を行う場合は、細胞が定常期に入る播種 6 日目から、0.33 mM HL23 含有培地で培養した。このとき、SB 処理も同時に行った。HL23 含有培地は 24 時間毎に交換し、HL23 処理時間は 96 時間とした。

5. PIVKA-II 測定法 培地中の PIVKA-II 濃度は、臨床用に市販されている ELISA 測定キット (エイテスト PIVKA-II, 三光純薬) を使用して測定した。細胞数は、トリパンブルーによる色素排除法で計数し、細胞数当たりの PIVKA-II 分泌速度を求め、PIVKA-II 産出速度として評価した。

6. *In situ* hybridization 法による *c-fos* mRNA の可視化 *In situ* hybridization 法で使用する細胞は、4 well Lab-Tek Chamber に 2.5 \times 10⁴ cells/well になるように播種した。プローブとしてはアンチセンスプローブ (コスモバイオ社) を使用した。このプローブは標的とする *c-fos* mRNA と相補的な塩基配列をしており、*c-fos* mRNA に特異的にハイブリダイズする。プローブの標識法として、アビジン-ビオチン法を使用し、ビオチン化プローブと Alexa-633 標識ストレプトアビジンを用い、*c-fos* mRNA を赤色蛍光で検出できるようにした。観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP, Leica) を用いて行った。

7. 軟寒天コロニー形成法 35 mm dish に 0.5 % アガロース含有寒天培地を入れて固化させた後、0.33 % アガロース含有寒天培地で細胞懸濁液を調製し、固化させた寒天培地の上に重層した。その後、37°C の CO₂ インキュベーター内で培養し、播種後、9 日目に軟寒天培地中に形成されたコロニーをクリスタルバイオレットで染色後、顕微鏡観察により計数して、コロニー形成数を算出した。

8. フローサイトメーターを用いた肝芽細胞数測定 SB 処理した Hc 細胞をトリプシンにより剥離した後、細胞固定を行った。肝芽細胞は、肝実質細胞と胆管上皮細胞に分化するため、肝実質細胞のマーカー (アルブミン) と、胆管上皮細胞のマーカー

(サイトケラチン 19) の両方を持つことが知られている。そのため、両マーカーに対して蛍光免疫二重染色を行い、フローサイトメーター (FCM) によって両マーカー陽性の細胞の定量測定を行った。抗体の蛍光標識分子は FCM で使用できる励起波長 (488 nm) にあわせて FITC (蛍光波長: 505–545 nm) と PE (同: 560–590 nm) を用いた。

9. TUNEL assay HL23 処理による細胞死 (アポトーシス) の解析には、*In Situ Cell Death Detection Kit* (Roche Diagnostics) を用いた TUNEL assay にて検討した。細胞を Uncoated glass bottom dish (Mat Tek) に播種し、37°C の CO₂ インキュベーター内で各実験条件に従い培養した。HL23 処理 48 時間後、10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (和光純薬) で細胞を固定した。Terminal deoxytransferase, Fluorescein-dUTP 混合液を 37°C で 60 分間反応させ、染色を行った。観察は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

結果と考察

1. 肝芽細胞の形質転換に与える酪酸ナトリウム濃度の影響 これまでの研究で、ヒト胎児肝細胞である Hc 細胞を酪酸ナトリウム (SB) で処理することで、濃度依存的に肝芽細胞が誘導されることが明らかとなっている。この時、臨床で使用されている肝腫瘍マーカー PIVKA-II assay を用いて、種々の SB 濃度で処理した肝芽細胞の形質転換の評価を行った。また、肝細胞がんである HuH2 の PIVKA-II 産出速度は、約 2100 mAU/10⁶ cells/d²⁵⁾ であることが報告されている。Table 1 に示したように、肝細胞がんである HuH2 に比べると、PIVKA-II 産出速度は十分に低いものの、SB の処理濃度依存的に増加した。SB 無処理の Control 細胞に比べ、1 mM SB 処理条件においても PIVKA-II 産出速度は増加し、2.5 mM SB 以上で処理すると、形質転換が有意に助長されることが示唆された。一般的に SB は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤として知られており、²⁶⁾ クロマチンのアセチル化を通じて、p21 等の転写を活性化し、乳がん細胞等の分化誘導を促進することが報告されている。^{26,27)} Hc 細胞においても、SB 処理による HDAC の阻害によって転写因子等の発現が促進され、肝芽細胞が誘導されたものと考えられる。一方、肝がん

Table 1. Effect of SB Concentrations on PIVKA-II Production of the Transformed Hepatoblasts

| | PIVKA-II production [mAU/10 ⁶ cells/d] | |
|-----------|---|-----|
| Control | 2.6 (±0.8) | n=4 |
| 1 mM SB | 7.5 (±5.0) | n=4 |
| 2.5 mM SB | 31.4 (±11.2)* | n=4 |
| 5 mM SB | 45.6 (±3.6)* | n=3 |

* $p < 0.05$ using the Student's *t*-test.

細胞に対しては、SB が、がん遺伝子である *c-fos* の転写を促進し、形質転換の助長に関与することも報告されている。²⁸⁾ そこで、次に、本細胞の *c-fos* の発現に与える SB の影響について検討を行った。

2. In situ hybridization による *c-fos* mRNA の可視化 Figure 1 に、SB 処理濃度を 0 mM (Control), 1 mM, 2.5 mM, 5 mM の各条件で、播種後 2 日目から 8 日目までの 6 日間 SB 処理を行い *c-fos* mRNA に対する *in situ* hybridization を行った結果を示した。赤色蛍光が *c-fos* mRNA を発現している細胞を示す。同時にポジティブコントロールとして、HuH7 の染色結果も示した。*c-fos* は、肝がん細胞で発現していることが報告されているがん遺伝子で、正常肝細胞での報告例はない。Figure 1 に示したように、Control 及び 1 mM SB の条件では *c-fos* mRNA の発現はみられなかったが、SB 処理濃度依存的に発現量は増加し、2.5 mM において、一部の細胞で赤色蛍光がみられ、さらに、5 mM SB 処理を 6 日間行った Hc 細胞では、明瞭な赤色蛍光がみられた。これらのことから、PIVKA-II と同様に、SB 処理濃度依存的に、がん遺伝子 *c-fos* の発現が助長されることが示唆された。

3. HL23 処理による PIVKA-II 産出速度の変化

これまでの研究で、SB 処理濃度依存的に、肝芽細胞の増殖速度も抑制されることが示されており、増殖性を保ったまま肝芽細胞を誘導できる条件として、1 mM SB 処理 8 日間が見い出されている。⁶⁾ そこで、形質転換細胞の選択的排除に対する HL の効果を検討するために、はじめに、1 mM SB 処理条件下で、0.33 mM HL23 処理を 96 時間行った場合の PIVKA-II 産出速度を検討した。Figure 2 に結果を示したように、1 mM SB 処理を行うことによって、PIVKA-II 産出速度が Control に比べ増加した。一方、これに HL23 処理を行うことによって、

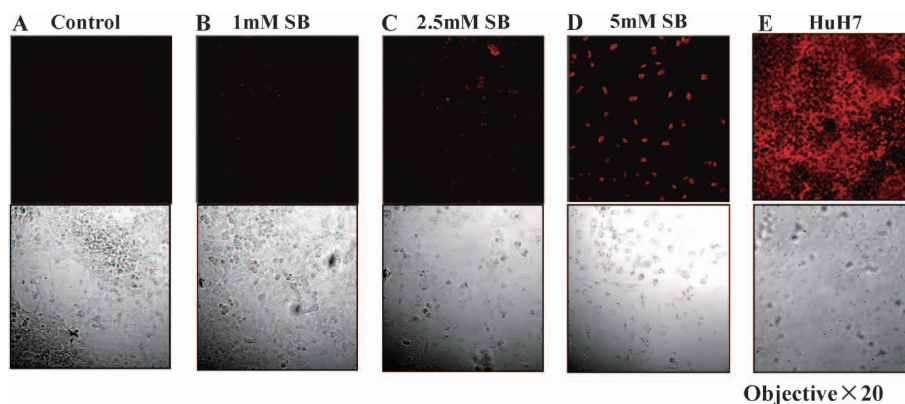


Fig. 1. Effect of SB Concentrations on *c-fos* mRNA Expression of the Transformed Hepatoblasts

Upper photographs indicate fluorescence images stained with *in situ* hybridization of *c-fos* mRNA. Lower photographs indicate phase contrast images. SB treatment: 6 days, Alexa-633 concentration: 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Red: *c-fos* mRNA.

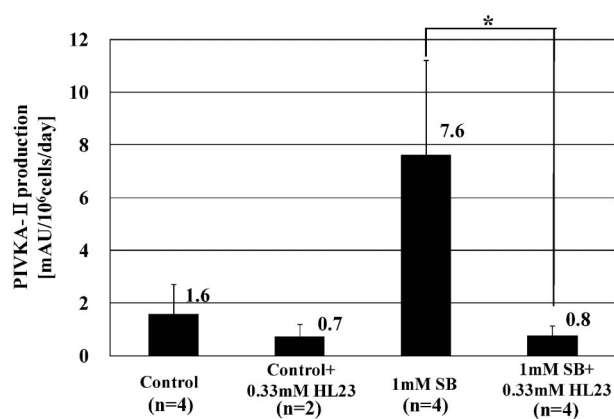


Fig. 2. Effect of HL23 Treatment on PIVKA-II Production of the Transformed Hepatoblasts

Error bars indicate \pm S.D. * $p < 0.05$ using the Student's *t*-test.

PIVKA-II 産出速度は Control の約 1/2 程度まで低下した ($n=4$)。以上の結果から、HL23 処理によって、形質転換細胞が選択的に除去され、PIVKA-II 産出速度が低下した可能性が示唆された。

4. 軟寒天コロニー形成法による形質転換細胞の腫瘍原性評価と HL23 処理効果 次に、HL23 処理による形質転換細胞の選択的排除を、軟寒天コロニー形成法によって評価した。軟寒天コロニー形成法は、がん細胞の接着非依存性を利用した腫瘍原性の一般的な評価法の 1 つである。実験条件を PIVKA-II 測定と同じ 8 日間 SB 処理にそろえ、培養を行った。Figure 3 に、Control (A)、Control + 0.33 mM HL23 処理 (B)、1 mM SB 処理 (C)、1 mM SB + 0.33 mM HL23 処理 (D) を行ったコロニーの写真を示した。また、Fig. 4 には、そのコロニー計数結果を示した ($n=2-4$)。1 mM SB 処理によってコ

ロニー数が、Control の約 4 倍に増加するとともに、明瞭で大きなコロニーが観察された。一方、HL23 処理を行うことによって、コロニー数は大幅に減少して SB 処理の約 1/35 となった。さらに、SB 無処理の Control よりも低いコロニー数となった。そこで、HL23 処理による残存細胞数の変化を、Fig. 5 に示した。1 mM SB 処理条件では、細胞の増殖速度が抑制されるため、Control に比べ、細胞数が減少した。さらに、SB 処理とともに HL23 処理を 96 時間行った場合は、SB 処理細胞数の約 1/2 程度に減少した。以上の結果から、腫瘍原性を有した形質転換細胞が、HL23 処理によって選択的に排除されたことが、PIVKA-II 産出速度の測定だけでなく、軟寒天コロニー形成法によっても示唆された。また、さらに、この選択的排除機構について検討するために、HL23 処理した細胞に対し、TUNEL 染色を行った。その結果、48 時間処理で TUNEL 陽性細胞が観察され、アポトーシスの誘導が確認された (Fig. 6)。これまで、既に HL23 処理によるがん細胞の増殖抑制において、アポトーシス誘導が確認されており、¹⁶⁾ 同様の機構によるものであることが示唆される。

5. HL23 処理による残存細胞中の肝芽細胞率決定 Figure 5 で示した HL23 処理による残存細胞のうち、肝芽細胞の割合を確認するために、フローサイトメーターによる解析を行った。Figure 7 にその結果及び各々の条件の肝芽細胞率を示した。Control で約 2% の肝芽細胞が確認されたが [Fig. 7 (A)], 1 mM SB で 8 日間処理では、肝芽細胞が 12% まで増大した [Fig. 7 (B)]。また同時に、HL23

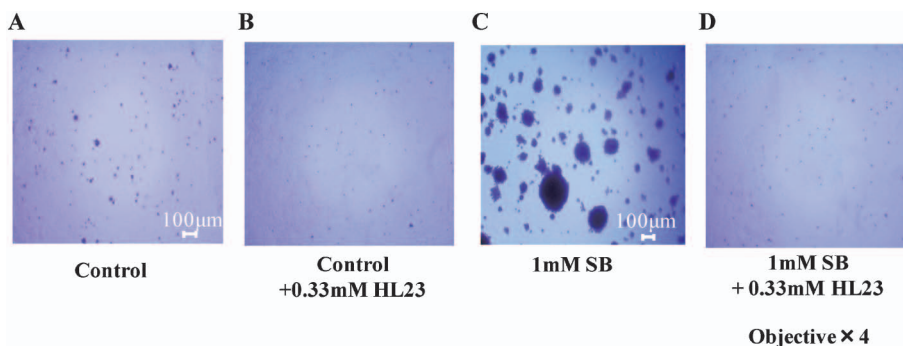


Fig. 3. Effect of HL23 Treatment on the Colonies Formed in Soft Agar Plate
Scale bar: 100 µm. Cells were stained crystal violet.

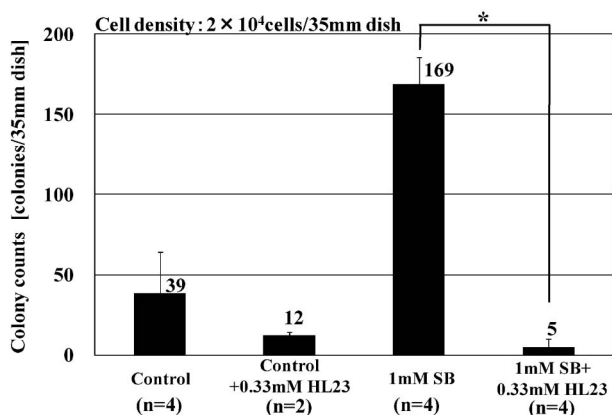


Fig. 4. Effect of HL23 Treatment on the Number of Colonies
Error bars indicate ±S.D. **p*<0.01 using the Student's *t*-test.

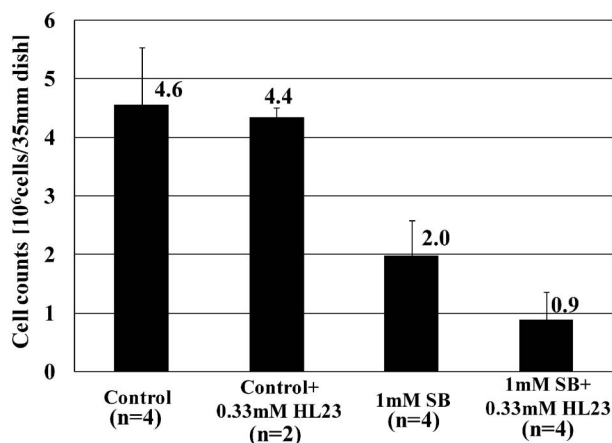


Fig. 5. Effect of HL23 Treatment on the Total Cell Numbers
Error bars indicate ±S.D.

処理することによって、肝芽細胞率が47%に増大した [Fig. 7(C)]. さらに、2.5 mM SB 処理では、49%の肝芽細胞率が得られ [Fig. 7(D)], 2.5 mM SB+HL23 処理することで、90%の肝芽細胞率が得

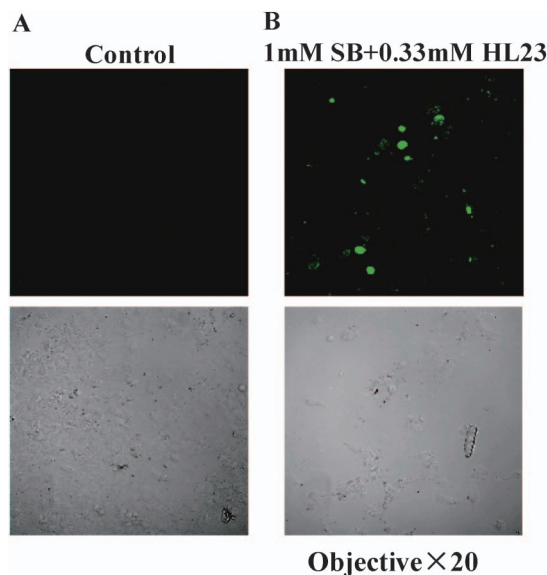


Fig. 6. Apoptosis Induction of the Transformed Hepatoblasts after the Treatment with HL23 for 48 h
Upper photographs indicate fluorescence images stained with TUNEL assay. Lower photographs indicate phase contrast images.

られた [Fig. 7(E)]. これらの結果は、SB 処理することで肝芽細胞率が増加するが、それに加えて HL23 処理することで、さらに、肝芽細胞率が向上することを示唆している。Figure 5 で示したように、HL23 処理によって細胞数全体は減少するが、この時、肝芽細胞や肝芽細胞以外の細胞が同じ割合で減少するのではなく、肝芽細胞以外の細胞がより選択的に減少したことで、肝芽細胞率が向上したものと考えられる。

本実験では、直径 35 mm の培養ディッシュ当たり 1×10^5 cells の細胞密度でヒト胎児肝細胞を播種しているため、播種時の肝芽細胞数は、約 2% の 2×10^3 cells と見積もられる。そこから、8 日間の 1

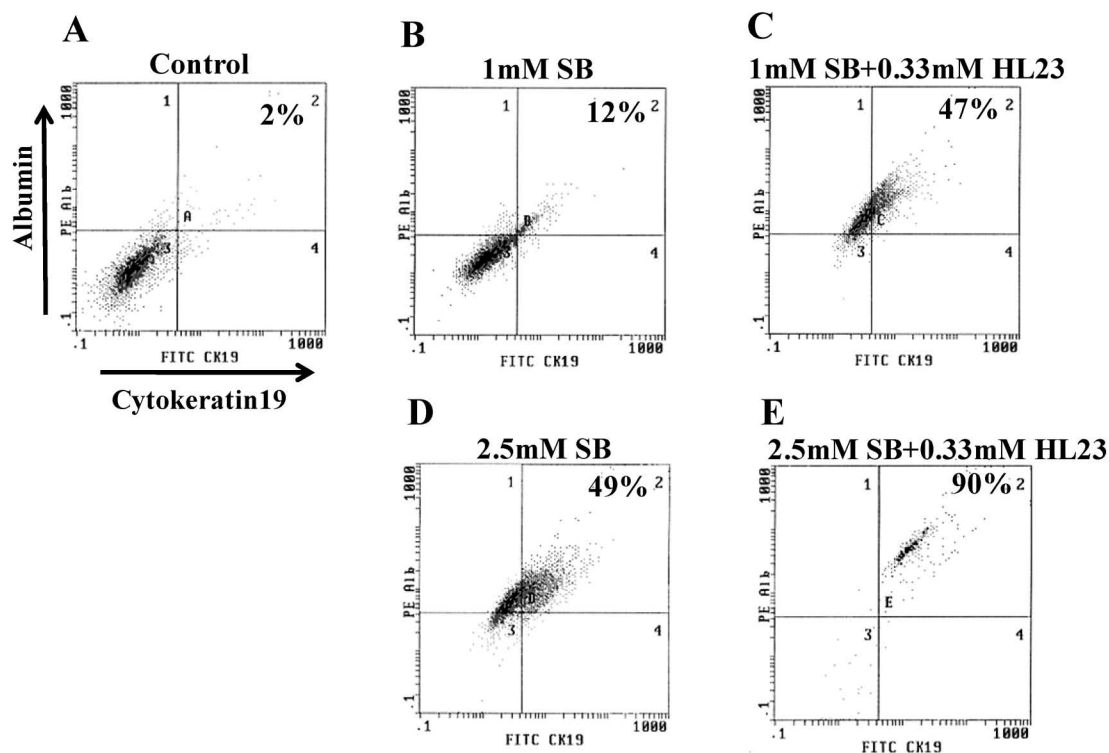


Fig. 7. FCM Analysis of Hepatoblasts by the Treatment of SB+HL23

mM SB 処理と、その期間内での 96 時間 HL23 処理によって、肝芽細胞数が 0.9×10^5 cells まで、約 45 倍に増殖したことになる。また同時に、肝芽細胞率も約 4 倍向上する結果が得られた。

以上のことから、肝幹細胞の一種である肝芽細胞の誘導培養時に、コロニー形成能を持った形質転換細胞が出現してくるが、0.33 mM の HL23 処理を 96 時間行うことで、主に肝芽細胞以外の形質転換細胞が選択的に除去されることが示唆された。

現在、iPS 細胞や、ES 細胞、間葉系幹細胞や各種臓器由来の幹細胞を用いた再生医療の実現に向けて、多くの研究が行われている。安全性の確保に向けた研究も、iPS 細胞の導入因子の検討や、ベクターの改良など、様々な試みがなされている。本研究は、その中で、これらの細胞の生体外での培養中に出現し得る形質転換細胞を、HL23 を培養液中に添加することによって、選択的かつ積極的に除去できる可能性を示したものであり、幹細胞の品質保証、安全性確保の方法の 1 つとして、その利用が大いに期待されるものである。

結 言

本研究では、肝幹細胞の一種である肝芽細胞を、

ヒト胎児肝細胞から誘導する際に出現する形質転換細胞に着目し、ハイブリッドリポソーム (HL23) を用いて、この細胞の中から、形質転換細胞を選択的に除去することを試みた。その結果、以下のような知見が得られた。

- (1) ヒト胎児肝細胞の酪酸ナトリウム (SB) 処理によって、肝幹細胞の一種である肝芽細胞を誘導する際に出現する形質転換細胞は、肝腫瘍マーカーである PIVKA-II を産出するとともに、肝がん遺伝子の 1 つである *c-fos* mRNA を発現し、さらに、腫瘍原性の指標である軟寒天中でコロニーを形成する性質を有していることが示された。
- (2) この肝芽細胞の誘導時に、0.33 mM の HL23 を 96 時間処理することによって、PIVKA-II 産出速度が減少するとともに、コロニー形成数も大幅に減少した。どちらの形質転換の指標も、SB 無処理のコントロール細胞よりも低い値となり、HL23 による形質転換細胞の選択的除去がなされたことが示唆された。
- (3) HL23 処理によって細胞数が減少したが、その残存細胞中の肝芽細胞率をフローサイトメーターによって解析したところ、HL23 無処理よりも肝芽細胞率が、約 4 倍向上したことから、

HL23 処理によって排除された細胞は、肝芽細胞以外の細胞であることが示唆された。

謝辞 本研究の一部は、文科省科学研究費補助金基盤研究 (C) (19560782) の補助を受けて行われました。また実験面で、本学上岡研究室の古水雄志博士研究員にお世話になりました。

REFERENCES

- 1) Tsushima M., Iwata H., Ueda M., Nakatsuji N., *Protein, Nucleic Acid and Enzyme*, **45** (Suppl.), 2001 (2000).
- 2) Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S., *Nature*, **448**, 313–317 (2007).
- 3) Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., *Nat. Biotechnol.*, **26**, 101–106 (2008).
- 4) Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., *Science*, **322**, 949–953 (2008).
- 5) Miura K., Okada Y., Aoi T., *Nat. Biotechnol.*, **27**, 743–745 (2009).
- 6) Kiyota A., Matsushita T., Ueoka R., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 2308–2311 (2007).
- 7) Liebman H. A., Furie B. C., Tong M. J., Blanchard R. A., Lo K. J., Furie B., *New Engl. J. Med.*, **310**, 1427–1431 (1984).
- 8) Ueoka R., Moss R. A., Swarup S., Matsumoto Y., Straus G., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185–2186 (1985).
- 9) Ueoka R., Matsumoto Y., Moss R. A., Swarup S., Sugii A., Harada K., Kikuchi J., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588–1595 (1988).
- 10) Ueoka R., Dozono H., Matsumoto Y., Cho M., Kitahara K., Kato Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 219–220 (1990).
- 11) Ueoka R., Yamada E., Yamashita O., Matsumoto Y., Kato Y., *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6597–6600 (1991).
- 12) Goto K., Matsumoto Y., Ueoka R., *J. Org. Chem.*, **60**, 3342–3346 (1990).
- 13) Tanoue O., Baba M., Tokunaga Y., Goto K., Matsumoto Y., Ueoka R., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2129–2132 (1999).
- 14) Kitamura I., Kochi M., Matsumoto Y., Ueoka R., Kuratsu J., Ushio Y., *Cancer Res.*, **56**, 3986–3992 (1996).
- 15) Matsumoto Y., Kato T., Iseki S., Suzuki H., Nakano K., Iwahara M., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 1937–1940 (1999).
- 16) Matsumoto Y., Iwamoto Y., Matsushita T., Ueoka R., *Int. J. Cancer*, **115**, 377–382 (2005).
- 17) Komizu Y., Matsumoto Y., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 6131–6134 (2006).
- 18) Nagami H., Matsumoto Y., Ueoka R., *Int. J. Pharm.*, **315**, 167–172 (2006).
- 19) Shimoda S., Ichihara H., Matsumoto Y., Ueoka R., *Int. J. Pharm.*, **372**, 162–168 (2009).
- 20) Ichihara H., Nagami H., Kiyokawa T., Matsumoto Y., Ueoka R., *Anticancer Res.*, **28**, 1187–1196 (2008).
- 21) Nakano K., Iwamoto Y., Takata W., Matsumoto Y., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3251–3254 (2002).
- 22) Yuen M. F., Wu P. C., Lai V. C. H., Lau J. Y. N., Lai C. L., *Cancer*, **91**, 106–112 (2001).
- 23) Azare J., Leslie K., Ahmadie H., Gerald W., Weinreb P., Violette S., Bromberg J., *Mol. Cell. Biol.*, **27**, 4444–4453 (2007).
- 24) Elworthy P. H., Macfarlane C. B., *J. Chem. Soc.*, 537–541 (1962).
- 25) Okuda H., Obata H., Nakanishi T., Furukawa R., Hashimoto E., *J. Hepatol.*, **4**, 357–363 (1987).
- 26) Davie J. R., *J. Nutr.*, **133**, 2485S–2493S (2003).
- 27) Prasad K. N., Sinha P. K., *In Vitro*, **12**, 125–132 (1976).
- 28) Tichonicky L., Kruh J., Defer N., *Biol. Cell.*, **69**, 65–67 (1990).