

TGF- β -FOXO Signaling Regulates Therapeutic Resistance in CML Stem Cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/27830

【総説】

TGF-β-FOXOシグナルによるCML幹細胞の治療抵抗性機構

TGF-β-FOXO Signaling Regulates Therapeutic Resistance in CML Stem Cells

金沢大学がん研究所
 がん幹細胞研究プログラム 遺伝子染色体構築研究分野
 仲 一仁, 平尾 敦

はじめに

正常幹細胞は、分化した体細胞を供給する能力と、自分自身を維持する自己複製の能力を併せ持つ細胞である。一方、がん組織中にも、正常幹細胞と類似の自己複製能と多分化能を有するがん細胞が存在しており、この細胞が供給源となって腫瘍組織全体を構成するという「がん幹細胞説」が提唱されている。抗がん剤や放射線治療後のがん幹細胞の残存は再発や転移・浸潤・播種などががんの悪性進展の原因となることが想定され、がんを根治するための新しい治療標的として注目されている^{1,2)}。

慢性骨髄性白血病Chronic myeloid leukemia (CML) は造血幹細胞を発症起源とする骨髄増殖性疾患である。その発症原因としてフィラデルフィア染色体と呼ばれる染色体転座t(9;22)(q34;q22)によって活性化型チロシンキナーゼBCR-ABLが産生されることが知られている。CML患者の治療薬としてABLに対するチロシンキナーゼ阻害薬Tyrosine kinase inhibitor (TKI) メシル酸イマチニブ、第二世代TKIニロチニブやダサチニブが開発され、慢性期のCML患者の治療成績を著しく改善した。しかし、近年、CML細胞の供給源となるCML幹細胞の存在が明らかとなり、TKI治療後、根絶を免れたCML幹細胞は治療抵抗性の再発の原因となることが解明された。

筆者らは正常造血幹細胞の自己複製の制御メカニズムを手掛りに、CML幹細胞の維持・TKI抵抗性メカニズムの解析を行ってきた。その結果、フォークヘッド転写因子FOXOがCML幹細胞の維持に必須な役割を担っていることを発見した。さらに、このFOXOはがん微小環境(ニッチ細胞)由来のTGF-βシグナルによって制御されており、CMLを発症したマウスにTGF-β阻害薬を投与するとイマチニブ抵抗性のCML幹細胞を抑制できることを世界にさきがけて報告した(図1)。従って、TGF-β-FOXOシグナルは、CML幹細胞を根治する新しい治療薬として期待される。本稿では、TGF-β-FOXOシグナルによるCML幹細胞の維持、並びにイマチニブ抵抗性機構について解説したい。

1. 正常造血幹細胞の自己複製制御メカニズム
 1.1 FOXOによる正常造血幹細胞の制御メカニズム

正常造血幹細胞は多系統に分化した血液細胞を供給す

るとともに、自己複製能を有する細胞であり、個体の生涯を通じて全ての血液細胞を供給して生体の恒常性を維持する。様々な遺伝子改変マウスを用いた解析により、造血幹細胞の多分化能、及び自己複製能という未分化性の維持には細胞周期上のG0期、いわゆるQuiescence状態での制御が必須であることが明らかとなった³⁾。通常、造血幹細胞は増殖因子などに対して不応性を示し、Quiescence状態を保つことで未分化性を維持している。しかし、分化した血液細胞を供給する必要があると、細胞周期に入り、細胞分裂を繰り返して血液細胞を産生する。このような造血幹細胞の機能制御において、PI3K-Aktを中心とするシグナル伝達経路が鍵となることが明らかとなっている。

FOXOはFOXO1, 3a, 4, 6のサブファミリーからなる転写因子であり、PI3K-Aktによって負の制御を受ける。増殖因子などの非存在下、PI3K-Aktシグナルは不活化されており、FOXOは細胞核内に存在して、転写因子として下流の遺伝子発現を制御する。一方、増殖因子の刺激が

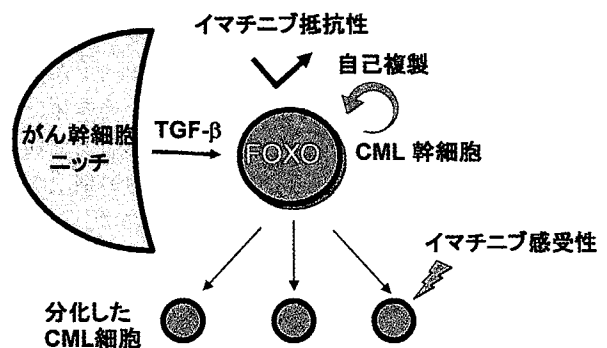


図1. TGF-β-FOXOシグナルによるCML幹細胞のイマチニブ抵抗性機構

CML幹細胞は分化したCML細胞の増殖源となる細胞である。分化したCML細胞はイマチニブ感受性を示し、イマチニブ投与により治療することができる。しかし、CML幹細胞はイマチニブに対して抵抗性を示し、イマチニブ治療後、根絶を免れたCML幹細胞はCMLの再発の原因となる。フォークヘッド転写因子FOXOはこのCML幹細胞の自己複製能の維持・イマチニブ抵抗性を制御する。さらに、CML幹細胞のFOXOは周囲のがん微小環境(ニッチ細胞)由来のTGF-βシグナルによって活性化される。従って、TGF-β-FOXOシグナルはCML幹細胞の維持・イマチニブ抵抗性に重要な役割を担う。

加わると、受容体型チロシンキナーゼはPI3K-Aktシグナルを活性化する。この活性化されたAktはFOXOをリン酸化して細胞核から細胞質へと排出し、転写因子としての機能を抑制する。Yamazakiらは、Quiescence状態にある造血幹細胞ではAktが不活化状態にあり、それに伴ってFOXOが核内に局在していることを発見した⁴⁾。一方、造血幹細胞を前駆細胞に分化誘導するか、あるいはサイトカイン含有条件下で培養するとFOXOが核外に排出されることから、造血幹細胞の機能制御とFOXOの活性との間には何らかの関連性が存在することが指摘された⁴⁾。筆者ら、並びにYalcinらは*Foxo3a*欠損マウスを用いて造血幹細胞の自己複製能の制御における*Foxo3a*の役割を解析した^{5,6)}。その結果、*Foxo3a*欠損マウス由来の造血幹細胞は、野生型マウス由来の造血幹細胞と比較して、レシピエントマウスに移植したときの骨髄再構築能が低下していることが明らかとなった。*Foxo3a*欠損造血幹細胞はG0期に留まることができず、細胞分裂周期が活性化してしまうことが自己複製能の低下の原因であると考えられる。この造血幹細胞の機能低下によって、加齢した*Foxo3a*欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、造血幹細胞集団の頻度が減少していた。このような結果から、造血幹細胞ではFOXOが細胞核内に局在して活性状態に維持され、標的遺伝子の発現を誘導することで自己複製能を維持すると考えられる。同様に、*Foxo1, 3a, 4*のトリプルコンディショナルノックアウトマウスにおいても、造血幹細胞や前駆細胞を含む未分化細胞の著明な減少が報告されている⁷⁾。

1.2 正常造血幹細胞の維持におけるTGF- β シグナルの役割

TGF- β -Smadシグナルは細胞増殖、発生、分化などの多様な生命現象を司るサイトカインシグナルである^{8,9)}。TGF- β が結合するとTGF- β I型、及びII型受容体がヘテロ4量体を形成し、セリン・スレオニンキナーゼが活性化される。Smad2/3は活性化されたTGF- β 受容体によってリン酸化され、Smad4とともに核内に移行して様々な標的遺伝子の転写調節を行う(図2)。造血幹細胞の多分化能や自己複製能などの未分化性の維持には、周囲の微小環境(ニッチ)からの制御シグナルが深く関わっていると考えられており、Yamazakiらは正常造血幹細胞の制御に関わるニッチシグナルの検討を行った。その結果、TGF- β シグナルが造血幹細胞の自己複製能を制御するニッチファクターであることを発見した¹⁰⁾。すなわち、ニッチ細胞から産生されたTGF- β は、正常造血幹細胞のAktを抑制し、FOXOを活性化して造血幹細胞の未分化性を維持すると考えられる。

2. CML幹細胞の治療抵抗性制御メカニズム

2.1 幹細胞疾患としてのCML

ヒトCML患者では複数の成熟血液細胞に分化したCML細胞が検出されることから¹¹⁾、CMLの発症母細胞

は造血幹細胞レベルであると考えられてきた。事実、マウスの造血幹細胞にBCR-ABL遺伝子を導入してレシピエントマウスに移植するとCML様骨髄増殖性疾患を発症するが、より分化度が進行した血液前駆細胞にBCR-ABLを発現させてもCMLは発症しない¹²⁾。このような結果から、CMLは造血幹細胞を起源とする幹細胞疾患であると理解されている。近年、様々な遺伝子改変マウスを用いた解析により、正常造血幹細胞とCML幹細胞の間には共通の制御メカニズムが存在することが報告されている¹³⁾。

2.2 CML幹細胞におけるFOXOの役割

前述のように、CMLの発症の原因として活性化型チロシンキナーゼBCR-ABLの発現が知られている。これまでのCML細胞株を用いた報告において、BCR-ABLはPI3K-Aktシグナルの活性化を介して、FOXOの転写活性を抑制していると考えられてきた。すなわち、FOXOは分化したCML細胞において細胞質に存在している。CML細胞株に対するイマチニブ処理は、BCR-ABLを抑制してPI3K-Aktを不活化し、FOXO活性化する。このFOXOの活性化はアポトーシスの誘導や細胞周期の停止を引き起こし、CML細胞の増殖を抑制することが知られている。Komatsuらは、このようなFOXOによる細胞

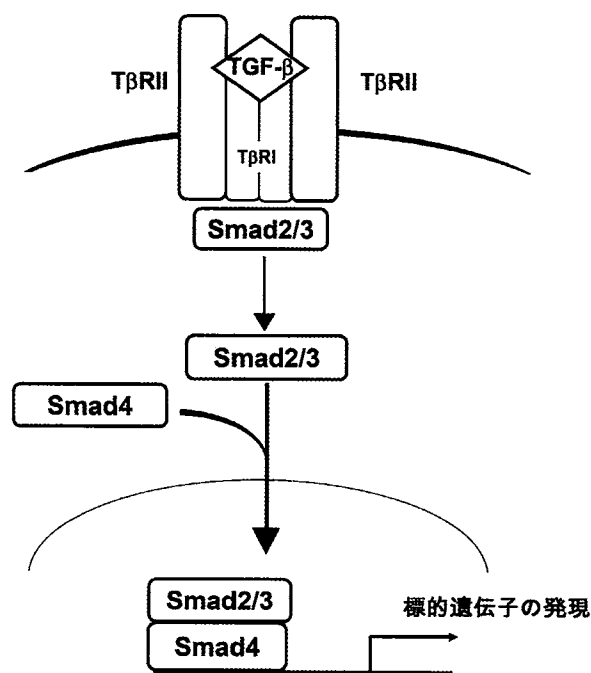


図2. TGF- β -Smadシグナル経路

TGF- β シグナルは細胞増殖、発生、分化など様々な生命現象の制御に関わることが知られている。TGF- β が結合するとTGF- β I型受容体(T β RI)、TGF- β II型受容体(T β RII)がヘテロ4量体を形成してセリン・スレオニンキナーゼが活性化される。Smad2/3は活性化されたTGF- β 受容体によってリン酸化され、Smad4とともに核内に移行して様々な下流の標的遺伝子の転写を調節する。

周期の抑制がイマチニブ抵抗性の原因となる可能性を指摘した¹⁴⁾。

しかし、CML幹細胞におけるFOXOの役割は不明であった。そこで、筆者らは、ヒトCML様骨髄増殖性疾患のマウスモデルを構築し、CML幹細胞におけるFOXOの役割を解析できないかと考えた。まず、正常造血幹細胞にBCR-ABL-ires-GFP遺伝子を導入し、この細胞を放射線照射したレシピエントマウスに移植してCMLのマウスモデルを構築した。次に、このCMLを発症したマウスの骨髄、及び脾臓から、GFP陽性の白血病細胞を取得し、細胞表面マーカーを用いて様々なフラクションのCML細胞を分離して、*in vitro*でのコロニー形成能、並びにレシピエントマウスに二次移植を行った時の*in vivo*での白血病発症能を解析した。その結果、幹細胞のマーカーc-Kit陽性・Sca-1陽性・分化マーカー陰性の細胞集団中にCMLを発症させる能力を有する細胞が存在していることが明らかとなった¹⁵⁾。

次に、CML幹細胞におけるFOXOの細胞内局在を解析した。その結果、CML幹細胞ではBCR-ABLが発現しているにも関わらずFOXOの核局在を示す細胞が多数存在することを見いだした¹⁵⁾。さらに、これらのCML幹細胞を細胞増殖マーカーであるKi67で染色し、FOXOの核局在を示すCML幹細胞と細胞質に存在するCML幹細胞の細胞増殖能を解析した。その結果、FOXOが細胞質に存在するCML幹細胞ではKi67の高発現を認めたのに対して、FOXOが細胞核に存在するCML幹細胞ではKi67の発現レベルが著しく低いことが明らかとなった。従って、FOXOが細胞核に存在するCML幹細胞の細胞増殖能は低く、細胞周期のG0期に維持されていると考えられる。FOXOはこのCML幹細胞の制御に関わっている可能性が示唆された。

そこで、CML幹細胞の維持におけるFoxo3aの役割を検証するため、Foxo3a欠損マウスを用いてCML幹細胞の連続移植を行い、白血病発症能を解析した。野生型マウス由来のCML幹細胞では、少なくとも3次移植まで白血病発症能が維持されていた。これに対して、Foxo3a欠損マウス由来のCML幹細胞では、3次移植での白血病発症能が低下していることが明らかになった¹⁵⁾。このとき発症した白血病を詳細に解析したところ、野生型マウス由来のCML幹細胞は骨髄性白血病に加え、T細胞性、並びにB細胞性リンパ性白血病を発症した。すなわち、野生型マウス由来のCML幹細胞は多分化能を有している。しかし、Foxo3a欠損マウス由来のCML幹細胞は、移植後45日以降、骨髄性白血病、及びリンパ性白血病のいずれの発症も認められなかった。以上の結果から、Foxo3aはCML幹細胞の長期間の自己複製能の維持に必須な役割を担っていることが解明された¹⁵⁾。

2.3 FOXOによるCML幹細胞のイマチニブ抵抗性の制御

さらに、筆者らは、イマチニブ抵抗性のCML幹細胞におけるFOXOの役割を検証した。CML幹細胞を移植したマウスへのイマチニブの投与は、白血病の発症を著しく遅延するが、野生型マウス由来のCML幹細胞を移植したマウスでは60%のマウスがCMLを発症・再発した。これに対して、Foxo3a欠損マウス由来のCML幹細胞を移植したマウスでは、イマチニブ投与後のCMLの発症が改善された¹⁵⁾ (図3A)。さらに、Foxo3a欠損マウス由来のCML幹細胞を移植したマウスでは、イマチニブ投与後に残存するCML幹細胞が減少していることが明らかとなった。従って、Foxo3aはイマチニブ抵抗性のCML幹細胞の維持に必須な役割を担っていると考えられる。

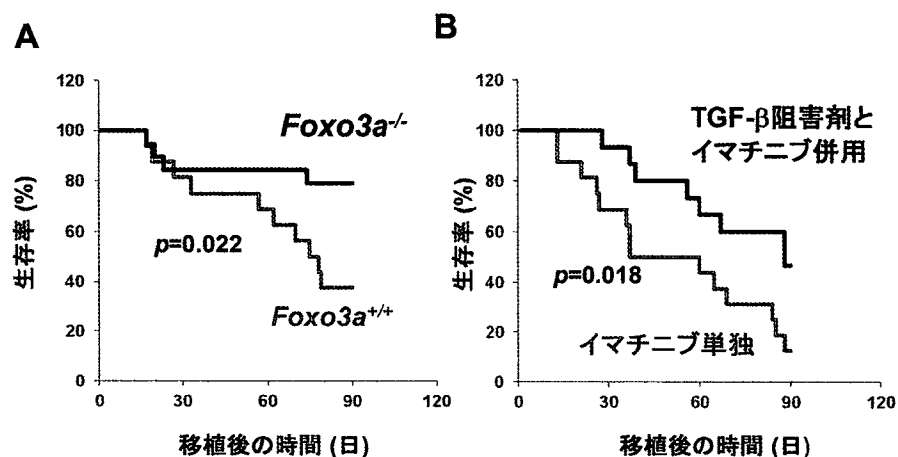


図3. TGF- β -FOXOシグナルの抑制によるイマチニブ抵抗性CML幹細胞の治療効果

(A) *Foxo3a*ノックアウトマウス由来のCML幹細胞におけるイマチニブ抵抗性の解析。野生型・*Foxo3a*ノックアウトマウス由来のCML幹細胞を移植したマウスにイマチニブの投与を行った。*Foxo3a*ノックアウトマウス由来のCML幹細胞を移植したマウスでは、野生型マウス由来のCML幹細胞と比較して、イマチニブ投与後のCMLの発症が改善された。従って、Foxo3aはイマチニブ抵抗性のCML幹細胞の維持に必須な役割を担う。(B) CML幹細胞に対するイマチニブとTGF- β 阻害薬の併用効果。CML幹細胞を移植したマウスに対してイマチニブとTGF- β 阻害薬の併用投与による治療効果を検討した。TGF- β 阻害薬とイマチニブとの併用は、イマチニブ単独投与と比較して、CMLを発症したマウスの生存期間を延長した(文献15)より改変し、引用)。

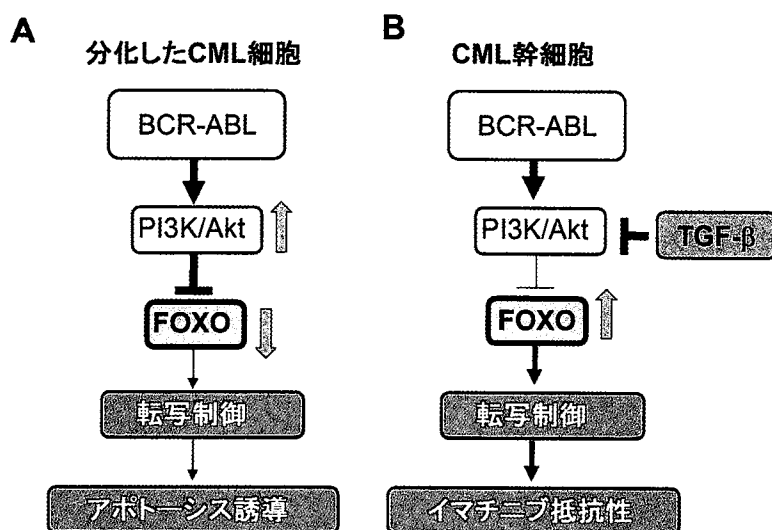


図4. CML幹細胞と分化したCML細胞との間でのTGF- β -FOXOシグナル経路の異なる役割

(A) 分化したCML細胞において、BCR-ABLはPI3K-Aktシグナルを活性化してFOXOの転写活性を抑制している。イマチニブ処理はBCR-ABLを抑制してFOXOを活性化し、CML細胞にアポトーシスを誘導する。(B) 一方、CML幹細胞では、TGF- β シグナルによりAktが抑制され、FOXOを活性化している。FOXOはCML幹細胞の自己複製能の維持・イマチニブ抵抗性に必須な役割を担う。従って、大多数を占める分化したCML細胞をイマチニブにより抑制し、併せてTGF- β -FOXOシグナルを抑制してCML幹細胞を治療することで、慢性期のCML患者に対する新しい治療法の開発が期待される。

2.4 CML幹細胞におけるTGF- β シグナルの役割

では、FOXOを抑制することで、CML幹細胞を排除する新しいCML治療法を開発できないだろうか？ 前述のように、正常造血幹細胞ではTGF- β がFOXOを活性化し、造血幹細胞の維持に関わっている。そこで、筆者らはCML幹細胞においてTGF- β がFOXOを活性化しないか、また、TGF- β 阻害薬によってFOXOを抑制できないか検討を行った。その結果、CML幹細胞にTGF- β の処理を行うとFoxo3aの核局在を示す細胞が増加し、反対にTGF- β 阻害薬の処理を行うとFoxo3aの核局在を示す細胞が減少することが明らかとなった¹⁵⁾。また、*in vitro*においてCML幹細胞をTGF- β 阻害薬で処理すると、コロニー形成能が低下することを見いだした。さらに、CML幹細胞を移植したマウスにおいてTGF- β 阻害薬による治療効果を検討したところ、TGF- β 阻害薬とイマチニブとの併用は、イマチニブ単独投与に比べ、CMLを発症したマウスの病態を改善できることが判明した¹⁵⁾ (図3B)。このような結果から、TGF- β シグナルがCML幹細胞のイマチニブ抵抗性の制御に重要な役割を担っており、TGF- β 阻害薬は、FOXOの抑制を介して、イマチニブ抵抗性のCML幹細胞を抑制できると考えられる (図1)。*In vitro*において、TGF- β 阻害薬はCML幹細胞に対する抑制効果を示すが、正常造血幹細胞は抑制しないことから、副作用の少ないCML幹細胞を治療する分子標的薬として期待される。最近、Yokotaらは、生体内で破骨細胞がTGF- β を産生してCML細胞を制御することを報告しており、ニッチ細胞によるCML幹細胞の維持の制御メカニズムを解明する上で重要な手掛りになると

考えられる¹⁶⁾。また、慢性期のヒトCML患者由来のCML幹細胞でも、同様のTGF- β 阻害薬によるイマチニブ抵抗性のCML幹細胞の抑制効果が確認されている^{15,17)}。一方、TGF- β シグナルは神経膠腫のがん幹細胞の自己複製能と未分化性の維持にも必須な役割を担うことが報告されており^{18,19)}、今後、多くのがん幹細胞の制御におけるTGF- β シグナルの役割のさらなる解明が期待される。

おわりに

本稿では、TGF- β -FOXOシグナルによるCML幹細胞の維持、並びにイマチニブ抵抗性のメカニズムを解説した。すなわちFOXOの機能は、それまで知られていた分化したCML細胞でのアポトーシス誘導とは異なっており、CML幹細胞の維持に必須な役割を担うことが明らかとなった¹⁵⁾ (図4)。今後、このようなCML幹細胞と分化したCML細胞との間での制御メカニズムの相違点、いわゆる“幹細胞パラドックス (Stem cell paradox)”の解明を進めることが、根絶を免れたCML幹細胞の診断法やCML幹細胞を選択的ターゲットとする治療薬を開発していく上で重要になると考えられる¹³⁾ (図4)。また、本稿で紹介したような正常造血幹細胞の自己複製能維持に関わる制御メカニズムは、CML幹細胞の維持や治療抵抗性メカニズムを解明する上で重要な手掛りとなるであろう¹³⁾。例えば、インターフェロン (IFN)- α はマウス正常造血幹細胞の自己複製能を抑制するが^{20,21)}、IFN- α 治療歴を有するCML患者はイマチニブの治療成績が良好であると報告されている²²⁾。従って、IFN- α はイマチニブ抵抗性のCML幹細胞に対する治療薬となる可能性

がある。また、Hedgehogシグナルを制御するSmoの阻害薬シクロパミンやヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬などもCML幹細胞を抑制できることが報告されている^{13,23-25)}。将来、大多数を占める分化したCML細胞をTKIにより治療し、併せてCML細胞の供給源となるCML幹細胞を排除することでCML患者の利益につながる新しい治療法が開発されることを切望する。

謝 辞

本研究を実施するにあたりご指導いただきました金沢大学がん研究所遺伝子染色体構築研究分野の平尾敦教授、ならびに多大な協力いただきました教員の皆様・がん研究所の先生方に感謝申し上げます。また、ヒトCML患者のCML幹細胞を解析するうえでご指導ご助言いただきました金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学講座の中尾眞二教授、近藤恭夫先生に深く感謝申し上げます。さらに、今回の執筆の機会を与えていただきました金沢大学十全医学会編集委員長 井関尚一教授、関係の先生方、並びに金沢大学十全医学会事務局の皆様には厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, et al. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9339-44.
- 2) Naka K, Ohmura M, Hoshii T, Muraguchi T, Hirao A. The molecular bases of the self-renewal and differentiation of leukemic stem cells. *Curr Cancer Therapy Rev* 2008; 4: 178-87.
- 3) Naka K, Ohmura M, Hirao A. Regulation of the self-renewal ability of tissue stem cells by tumor-related genes. *Cancer Biomark* 2007; 3: 193-201.
- 4) Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi S, et al. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J* 2006; 25: 3515-23.
- 5) Miyamoto K, Araki KY, Naka K, et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 101-12.
- 6) Yalcin S, Zhang X, Luciano JP, et al. Foxo3 is essential for the regulation of ataxia telangiectasia mutated and oxidative stress-mediated homeostasis of hematopoietic stem cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 25692-705.
- 7) Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* 2007; 128: 325-39.
- 8) Ikushima H, Miyazono K. Cellular context-dependent “colors” of transforming growth factor- β signaling. *Cancer Sci* 2010; 101: 306-12.
- 9) Ikushima H, Miyazono K. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nature Rev Cancer* 2010; 10: 415-24.
- 10) Yamazaki S, Iwama A, Takayanagi SI, Eto K, Ema H, Nakauchi H. TGF- β as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* 2009; 113: 1250-6.
- 11) Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the

granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* 1977; 63: 125-30.

- 12) Huntly BJ, Shigematsu H, Deguchi K, et al. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* 2004; 6: 587-96.
- 13) Naka K, Hoshii T, Hirao A. A novel therapeutic approach to eradicate tyrosine kinase inhibitor resistant chronic myeloid leukemia stem cells. *Cancer Sci* 2010; 101: 1577-81.
- 14) Komatsu N, Watanabe T, Uchida M, et al. A member of Forkhead transcription factor FKHL1 is a downstream effector of STI571-induced cell cycle arrest in BCR-ABL-expressing cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 6411-9.
- 15) Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, et al. TGF- β -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 2010; 463: 676-80.
- 16) Yokota A, Kimura S, Tanaka R, et al. Osteoclasts are involved in the maintenance of dormant leukemic cells. *Leuk Res* 2010; 34: 793-9.
- 17) Moller GM, Frost V, Melo JV, Chantry A. Upregulation of the TGF β signalling pathway by Bcr-Abl: implications for haemopoietic cell growth and chronic myeloid leukaemia. *FEBS Lett* 2007; 581: 1329-34.
- 18) Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K. Autocrine TGF- β signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 504-14.
- 19) Penuelas S, Anido J, Prieto-Sanchez RM, et al. TGF- β increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 2009; 15: 315-27.
- 20) Essers MA, Offner S, Blanco-Bose WE, et al. IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* 2009; 458: 904-8.
- 21) Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, Ohteki T. Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion. *Nat Med* 2009; 15: 696-700.
- 22) Rousselot P, Huguier F, Rea D, et al. Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* 2007; 109: 58-60.
- 23) Dierks C, Beigi R, Guo GR, et al. Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* 2008; 14: 238-49.
- 24) Zhao C, Chen A, Jamieson CH, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 2009; 458: 776-9.
- 25) Zhang B, Strauss AC, Chu S, et al. Effective targeting of quiescent chronic myelogenous leukemia stem cells by histone deacetylase inhibitors in combination with imatinib mesylate. *Cancer Cell* 2010; 17: 427-42.