

RKO 대장암세포에서 3-헵틸아미노-6-알릴티오피리다진과 3-디펜틸아미노-6-알릴티오피리다진의 항암기전

임현경 · 권유미 · 송지윤 · 김경미 · 김채원 · 박명숙 · 정주희[#]

덕성여자대학교 약학대학

(Received January 22, 2016; Revised March 28, 2016; Accepted March 28, 2016)

Anticancer Mechanisms of 3-Heptylamino-6-Allylthiopyridazine and 3-Dipentylamino-6-Allylthiopyridazine in Human Colon Carcinoma RKO Cells

Hyun Kyung Lim, Yumi Kwon, Jiyun Song, Kyoung Mee Kim, Chaewon Kim, Myung-Sook Park and Joohee Jung[#]

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea

Abstract — Allylthiopyridazine derivatives were synthesized and evaluated for anti-proliferative activities in the previous study. In this study, selected two allylthiopyridazine derivatives (compound I, 3-heptylamino-6-allylthiopyridazine and compound II, 3-dipentylamino-6-allylthiopyridazine) were assessed for cytotoxicity and chronic proliferation in human colon carcinoma RKO cells. Two derivatives dose-dependently inhibited cell viability and proliferation. To elucidate the anticancer mechanism of two derivatives, we investigated the expression level of apoptosis-related proteins in RKO cells. Compound I induced the activation of JNK and expression of p53 and p21. On the other hand, compound II showed no change of p53 level. Interestingly, compound II inhibited the nuclear translocation of NF- κ B. This result suggested that compound II suppressed cell proliferation. These different mechanisms of these compounds might have occurred through different steric conformation.

Keywords □ 3-heptylamino-6-allylthiopyridazine, 3-dipentylamino-6-allylthiopyridazine, anticancer effect, RKO cell

건강기능식품 중에 하나인 마늘의 활성성분 중에는 allicin이 대표적이며, 이는 alliinase에 의해 황화합물인 alliin으로부터 전환되어 생성된다. Allicin은 항박테리아, 항진균 및 항암 효과가 있는 것으로 알려지면서,^{1,2)} 이에 대한 메커니즘 연구가 활발하게 진행되고 있다.³⁾ 하지만, allicin은 열에 매우 불안정한 것이 단점으로, 이를 개선하기 위하여 많은 연구들이 새로운 활용 방안을 모색하고 있다.^{4,6)}

그 중 하나로, allicin의 중요한 약리활성 부분인 알릴티오 그룹을 모핵으로 한 유도체를 합성하여 단점을 보완하는 것이 있다. 이전 연구에서 알릴티오 그룹에 아미노피리다진의 모핵을 접목시켜 유도체들을 합성하여 보고한 바 있다.⁷⁾ 알릴티오 그룹에

결합한 아미노피리다진의 모핵은 도파민, 세로토닌, 콜린 및 GABA 효능성 기질로서 작용하며, 모노아민 산화효소와 아세틸콜린에스터라아제의 저해제로도 작용한다고 알려져 있다. 이와 관련하여 다양한 유도체들이 합성되어 왔으며, 유도체가 갖는 다양한 약리 활성이 연구되고 있다. 특히, 심근 조직에서 아미노피리다진 유도체는 트롬복산 A2(TXA2)와 프로스타글란딘 I2(PGI2)와 강한 결합력을 가지고 있어서 TXA2-PGI2의 합성 조절 활성이 있다.⁸⁾ 또한, 아미노피리다진 유도체는 알츠하이머 마우스 모델에서 신경염증의 억제 작용이 있다고 알려졌다.^{9,10)} 더욱이 아미노피리다진 유도체가 저산소에 의한 허혈을 악화시킬 수 있다는 보고도 있다.¹¹⁾

이전 연구에서, 알릴티오 그룹과 아미노피리다진 그룹을 결합 시킴으로써 각각의 모핵이 지닌 다양한 생리 활성을 증대시킬 수 있을 것으로 기대하고 합성된 16 종류의 유도체들로부터 유방암 세포주 MCF-7에서 세포독성을 평가하여 보고한 바 있다.¹²⁻¹⁴⁾ 이에 본 연구에서는 합성한 유도체 중, 활성이 강했던 2가지 화합물을 선별하여 대장암 세포주 RKO 세포에서 항암작용을 비교

[#]Corresponding Author

Joohee Jung

College of Pharmacy, Duksung Women's University, 33, 144-gil, Samyang-ro, Dobong-gu, Seoul 01369, Korea

Tel.: 02-901-8731 Fax.: 02-901-8386

E-mail: joohee@duksung.ac.kr

하고, 이들의 항암 작용 기전을 알아보았다.

재료 및 방법

시약 및 기기

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)와 methyl sulfoxide(DMSO), 항 β -actin 항체는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서, crystal violet과 methanol은 Duksan reagent(Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)과 fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin solution, protease inhibitor, phosphatase inhibitor, RIPA buffer는 GenDEPOT(Barker, TX, USA)에서 구입하였다. Bicinchoninic acid(BCA) assay kit은 Thermo scientific (Waltham, MA, USA)에서, polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane과 항 p53 항체, 항 p21 항체, 항 NF κ B 항체는 Millipore(Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. 항 c-Jun N-terminal kinase(anti-JNK) 항체와 항 lamin B(C-20) 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Dallas, TX, USA), 항 phospho-SAPK/JNK(Thr183/Thy185) 항체는 Cell signaling technology (Danvers, MA, USA), 항 mouse IgG(H+L) horseradish peroxidase conjugate 항체와 항 rabbit IgG(H+L) horseradish peroxidase conjugate 항체, 항 goat IgG(H+L) horseradish peroxidase conjugate 항체는 Bio-Rad(Hercules, CA, USA)에서 구입하였다.

본 실험에서는 Microplate reader(Infinite M200 PRO, TECAN, Austria), Semi-dry electro blotter(Peqlab, Erlangen, Germany), Chemi-doc(FluorChem E, Proteinsimple, San Jose, CA, USA), SDS-PAGE(Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems, Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하였다.

유도체 화합물의 합성

3-Heptylamino-6-allylthiopyridazine과 3-dipentylamino-6-allylthiopyridazine은 김 등¹⁾의 방법에 따라 합성하였다. 3-Allylthio-6-chloropyridazine, alkylamine과 ammonium chloride를 *n*-butanol에 24~48시간 환류시켰다. 이 용액을 감압 하에 증발 건조시킨 후, 10% K₂CO₃에 녹이고, 에틸아세테이트로 추출하고, 세척 후 무수화물 Na₂SO₄로 건조시켰다. 평가를 위해, 유도체들은 DMSO에 희석시키고, 사용 전까지 4°C에서 보관하였다.

세포배양

사람 대장암 RKO(ATCC, Manassas, VA) 세포주는 DMEM 배지에 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 혼합 배지에 배양하였다. 5% CO₂ 배양기에 37°C에서 배양하면서 hemocytometer를 사용하여 세포수를 측정한다 후, 95% 이상의 생

존율에서만 실험에 사용하였다.

MTT 시험

96-well plate의 각 well에 3×10³개의 RKO 세포를 접종하고, 하루 동안 배양하였다. 단계 희석한 유도체를 48시간 동안 세포에 처리한 후, MTT 시약 10 μ l를 첨가하고 37도에서 4시간 동안 반응시켰다. 배지는 버리고 DMSO 100 μ l를 첨가하여 차광한 상태로 37°C에서 10분간 처리하였다. Microplate reader를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다.

집락형성분석법

단일세포로 하여 6-well plate에 대조군은 100개, 유도체 투여군(실험군)은 1,000개의 세포를 접종하고 하루 동안 배양하였다. 두 유도체를 24시간 동안 세포에 처리한 후, 유도체가 들어있지 않은 새로운 배지로 갈아주었다. 10일 후, 10% methanol에 녹인 0.5% crystalviolet 용액으로 15분 동안 세포를 고정 염색하였다. 50개 이상의 세포로 이루어진 집락을 세었다. 대조군의 plating efficiency(PE)과 실험군의 survival fraction(SF)은 다음 식과 같이 계산하였다.

$$PE = (\text{대조군의 집락형성 수} / \text{대조군의 접종한 세포 수}) \times 100$$

$$SF = \text{집락형성 수} / \{ \text{접종한 세포 수} \times (PE/100) \}$$

Western blot

단일세포로 하여 6-well plate에 50,000~80,000개의 세포를 접종하고 하루 동안 배양하였다. 세포에 다양한 농도의 유도체를 처리하고 하루 동안 배양한 후, protease inhibitor와 phosphatase inhibitor를 넣은 RIPA buffer를 이용하여 세포를 용해했다. 핵과 세포질을 분리할 경우에는 RIPA buffer 대신 buffer A(10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.6% NP-40)를 사용하여, 원심분리한 상층액으로부터 세포질 분획을 얻고, 침전물에 buffer B(20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)를 첨가하여 핵 분획을 얻었다. 용해된 세포에서 얻은 총 단백질은 BCA 정량법으로 정량했으며 각 시료 별로 단백질의 양을 동일하게 하여 준비하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질을 Semi-dry electro blotter를 이용하여 PVDF membrane에 옮기고, 검출하고자 하는 단백질과 특이적으로 결합하는 1차 항체와 2차 항체를 차례로 넣어 반응시켰다. 비율은 Anti-JNK, anti-p-JNK, anti-NF κ B와 anti-lamin B(1:1000), anti-p53와 anti-p21(1:2000), anti- β -actin(1:5000), Anti-mouse IgG(H+L) horseradish peroxidase conjugate와 Anti-rabbit IgG(H+L) horseradish peroxidase conjugate(1:3000)로 하였다. 이 후, ECL 용액으로 반응 후, Chemi-doc으로 확인하였다.

통계처리

실험결과는 평균±표준편차로 계산하고, 각 군 간의 유의성 검증은 Student's *t*-test를 사용하여 *p*값이 0.05 미만일 때 유의성 있는 것으로 판정하였다.

실험결과 및 고찰

두 유도체의 구조

이전 연구⁷⁾에서 alkylaminopyridazine 유도체 14종을 합성하였고, 그 중 유방암 세포주 MCF-7에서 세포 독성이 강한 2개의 유도체를 선택하여 본 연구를 진행하였다. Fig. 1에서 나타낸 바와 같이, compound I(3-heptylamino-6-allylthiopyridazine)과 compound II(3-dipentylamino-6-allylthiopyridazine)은 기본적으로 약리 활성을 갖는 모핵은 동일하고 치환기만 다르지만 이로 인한 3차원적 구조가 상이함을 알 수 있었다. 이 구조적 차이가 항암 작용 기전에서 어떻게 나타나는지를 비교하였다.

두 유도체에 의한 세포 생존 및 증식 억제

먼저, 대장암 세포주 RKO에 대한 두 유도체의 항암 효과를 알아보기 위하여, 세포 생존율과 집락형성능을 평가하였다. Fig. 2A와 2B에서 보이는 바와 같이 두 유도체 모두 농도의존적으로 세포 생존을 억제하였다. Compound II는 compound I에 비해 난

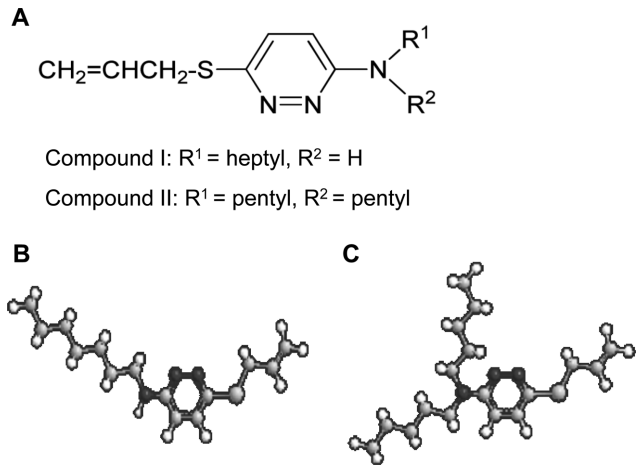


Fig. 1 – Structure of two compounds. (A) Pharmacophoric moiety of two compounds. (B) 3D structure of 3-heptylamino-6-allylthiopyridazine (compound I). (C) 3D structure of 3-dipentylamino-6-allylthiopyridazine (compound II).

용성으로 배지 내에서 결정이 생기지 않는 25 µg/ml 이하에서 평가하였다. 25 µg/ml의 compound I과 II의 세포 생존율은 각각 45%와 70%였다. 같은 모핵으로부터 합성된 두 종류의 유도체가 보인 RKO 세포 사멸 효과는 김 등¹⁾이 보고한 MCF-7 세포에서의 세포 독성과 일치하였다.

집락형성능 시험에서는 단일세포로부터 장기간 배양을 통해

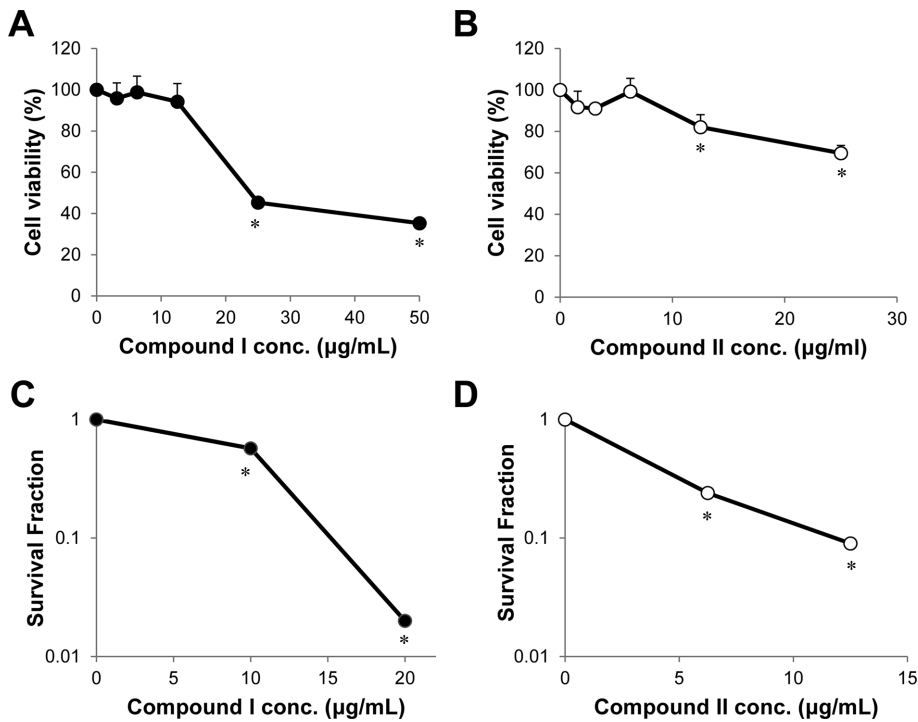


Fig. 2 – Inhibition of cell viability and proliferation by two compounds. Cell viability of compound I (A) and compound II (B) by MTT assay (n=8). Anti-proliferative effect of compound I (C) and compound II (D) by clonogenic assay (n=3). Data represent mean±standard deviation. **P*<0.05, *t*-test.

형성된 집락의 수를 비교함으로써 만성적 항암효과를 확인하였다(Fig. 2C와 2D). 세포 독성시험에서 확인한 바와 같이 강력한 세포 사멸 작용을 갖고 있는 유도체의 지속적인 처리는 단일 세포의 생존을 저해하여 성장 증식을 통한 집락형성을 방해하였으므로, 유도체는 세포주에 24시간 동안만 처리하였다. Compound I의 SF값은 10와 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 0.57와 0.02였으며, compound II의 SF값은 6.25와 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 각각 0.24와 0.09였다. Compound II는 compound I에 비해 세포 사멸 능력은 약하였으나, 세포 증식 억제 효과가 오랫동안 유지되어 집락의 수가 감소함을 볼 수 있었다. 그러나 두 유도체 모두 Fig. 2C와 2D에서 나타낸 농도 이상에서는 세포의 형태가 쭈글쭈글한 모양으로 변하여 정상적인 세포분열이 일어나지 않거나 세포가 죽어 버려 집락 형성을 관찰할 수 없었다.

세포 사멸을 유도하는 단백질의 발현

유도체가 세포 내에서 어떤 작용을 통해서 세포 죽음에 영향을 주는지 알아보기 위하여 관련 단백질의 발현을 조사하였다. 암 억제 유전자로 대표적인 p53의 발현 증가는 암세포에서 세포 사멸사를 유발하는데 중요한 역할을 하므로, compound I과 II를 처리한 세포에서 그 발현 정도를 비교하였다. 그 결과, compound

I은 농도의존적으로 p53 단백질의 발현을 증가시켰다(Fig. 3A). 또한, p53의 발현을 조절하는 상위 단백질로 JNK의 발현도 마찬가지로 비례하여 증가함을 알 수 있었다. JNK는 인산화되어 세포 안에서 핵으로 이동하여 pro-apoptotic gene의 발현을 증가시키고, pro-survival genes의 발현은 감소시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹⁵⁾ Fig. 3에서 보여지는 바와 같이, compound I는 JNK의 발현뿐 아니라 JNK의 인산화를 촉진시켜 활성화시킴으로써, pro-apoptotic gene인 p53의 발현이 증가하고 이를 통해 세포 사멸을 유도하였음을 알 수 있었다. 또한, p53의 하위 단백질이며 세포 주기 조절에 관여하는 p21의 발현도 약간 증가하는 경향을 보였다.

하지만, compound II는 compound I과 달리 JNK와 p53의 발현에 변화가 없었다(Fig. 3B). Compound II는 compound I에 비해 세포 증식 억제에 효과가 뛰어나다고 판단하여 세포 증식에 관련 있는 NF- κ B의 발현을 살펴본 결과, 농도 의존적으로 NF- κ B의 발현이 증가함을 볼 수 있었다. NF- κ B의 활성화는 세포질로부터 핵으로 이동하여 전사인자로 작용하고 염증, 세포사멸사, 발암, 면역 등의 다양한 방면에서의 기능이 알려져 있다. 특히, 이는 세포사멸사를 통한 세포 사멸로부터 세포를 보호하는 유전자를 발현시켜 세포사멸사 억제 작용이 대표적으로 알려져 있다.^{16,17)}

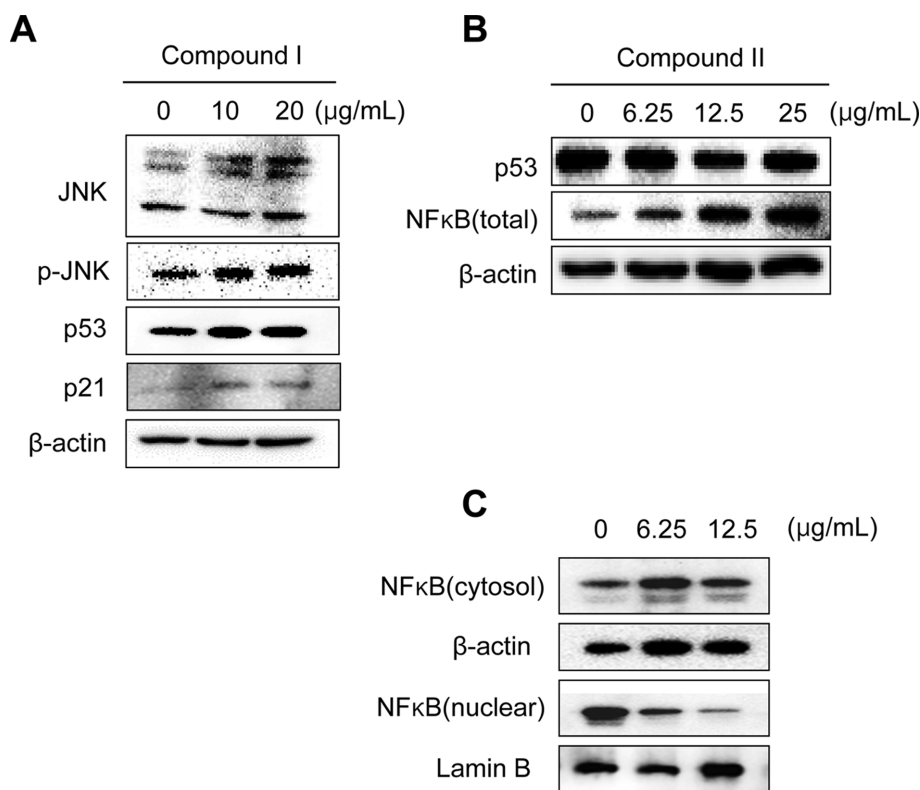


Fig. 3 – JNK, p53, p21 and NF- κ B expression induced by two compounds. (A) JNK, p53 and p21 expression in the whole cell treated with compound I. (B) p53 and NF- κ B expression in the whole cell treated with compound II. β -Actin as a housekeeping gene represented to control. (C) NF- κ B expression in the nuclear of cell treated with compound II.

세포 증식 억제를 위하여 NF- κ B의 발현이 감소할 것이라는 예상과 달리 세포 내의 발현이 증가하였으므로, NF- κ B가 활성화된 것인지를 확인하고자 세포를 핵과 세포질로 나누어서 발현양을 비교하였다. 그 결과, 세포질에서는 발현양이 증가되어 있으나, 핵 내의 NF- κ B의 양은 감소하고 있음을 확인하였다(Fig. 3C). 이는 compound II가 NF- κ B가 세포질에서 핵 내로 이동을 방해하여 세포질에 축적되고 세포 증식을 활성화시키는 신호가 전달되지 않았을 것이라 여겨진다. 핵 내의 NF- κ B의 양 감소는 세포 증식을 억제함으로써 암세포에 대한 치료 표적이 될 수 있음은 시사한 연구들이 보고된 바 있다. Arbab 등의 연구¹⁸⁾에서도 dentatin이 NF- κ B의 핵 내 이동을 저해함으로써 전립선암 세포주의 항암 효과가 있음을 보고한 바 있다. 또한, 시스플라틴의 내성을 가진 방광암 세포주에서도 NF- κ B의 억제제인 epoxyquinomicin의 유도체를 사용하여 NF- κ B의 핵 내 발현을 감소함으로써 치료 효과를 진전시켰음이 보고된 바 있다.¹⁹⁾

Compound II에 의해 핵 내 이동이 저해된 NF- κ B이 세포질 내에서 축적되는 것인지 NF- κ B를 포함한 복합물의 변형에 의하여 핵 내로 이동이 억제된 것인지에 대한 기전은 불행하게도 아직 알 수 없으며, 앞으로 연구가 필요할 것으로 보여진다.

본 연구 결과로부터, 두 유도체가 세포 사멸을 유도하는 기전에서 차이가 있음을 알 수 있었다. Compound I은 JNK-p53의 발현 유도를 통해 세포 사멸을 가져왔으며, compound II는 NF- κ B가 핵으로 이동하는 것을 막아, 암세포의 증식을 억제하여 세포 사멸을 유도한 것으로 보인다.

결 론

Alllicin의 생리반응을 나타내는 구조로 알려진 알릴티오 그룹과 함께 아미노피리다진을 모핵으로 하여 합성된 항암효능을 가진 두 유도체의 활성기전은 서로 다르게 작용하였음을 알 수 있었다. 3-Heptylamino-6-allylthiopyridazine은 p53의 발현 유도를 야기하였으나, 3-dipentylamino-6-allylthiopyridazine은 NF- κ B가 핵 내로 이동하는 것을 억제하였음을 확인하였다. 이와 같은 항암효능의 기전 차이는 헵틸아미노기와 디펜틸아미노기에 의한 입체적 구조 차이로부터 기인한다고 사료된다.

References

- 1) Wallock-Richards, D., Doherty, C. J., Doherty, L., Clarke, D. J., Place, M., Govan, J. R. W. and Campopiano, D. J. : Garlic revisited: Antimicrobial activity of allacin-containing garilic extracts against *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS ONE* **9**, e112726 (2014).
- 2) Tao, M., Gao, L., Pan, J. and Wang, X. : Study on the inhibitory

effect of allacin on human gastric cancer cell line SGC-7901 and its mechanism. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* **11**, 176 (2014).

- 3) Xu, L., Yu, J., Zhai, D., Zhang, D., Shen, W., Bai, L., Cai, Z. and Yu, C. : Role of JNK activation and mitochondrial bax translocation in allacin-induced apoptosis in human ovarian cancer SKOV3 cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2014**, Article ID 378684 (2014).
- 4) Feldberg, R. S., Chang, S. C., Kotik, A. N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D. C. and Thompson, N. H. : *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1763 (1988).
- 5) Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C. H., Nwachukwu, I. D. and Slusarenko, A. J. : Allacin: Chemistry and biological properties. *Molecules* **19**, 12591 (2014).
- 6) Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., Kumagai, H., Seki, T. and Ariga, T. : Biological and chemical stability of garlic-derived allacin. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 4339 (2008).
- 7) Kim, C., Park, E.-H. and Park, M.-S. : Novel alkylaminopyridazine derivatives: Synthesis and their anti-proliferative effects against MCF-7 cells. *Bull. Korean Chem. Soc.* **34**, 3317 (2013).
- 8) Chanh, P. H., Lasserre, B., Kaiser, R., Couquelet, J., Coudert, P. and Rubat, C. : Aminopyridazine derivatives and TXA2-PGI2 balance. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **40**, 143 (1990).
- 9) Zhou, W., Zhong, G., Rao, X., Xie, H., Zeng, S., Chi, T., Zou, L., Wu, D. and Hu, W. : Identification of aminopyridazine-derived antineuroinflammatory agents effective in an Alzheimer's mouse model. *ACS Med. Chem. Lett.* **3**, 903 (2012).
- 10) Craft, J. M., Van Eldik, L. J., Zasadzki, M., Hu, W. and Watterson, D. W. : Aminopyridazines attenuate hippocampus-dependent behavioral deficits induced by human beta-amyloid in a murine model of neuroinflammation. *J. Mol. Neurosci.* **24**, 115 (2004).
- 11) Velentza, A. V., Wainwright, M. S., Zasadzki, M., Mirzoeva, S., Schumacher, A. M., Haiech, J., Focia, P. J., Egli, M. and Watterson, D. M. : An aminopyridazine-based inhibitor of a pro-apoptotic protein kinase attenuates hypoxia-ischemia induced acute brain injury. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3465 (2003).
- 12) Velentza, A. V., Wainwright, M. S., Zasadzki, M., Mirzoeva, S., Schumacher, A. M., Haiech, J., Focia, P. J., Egli, M. and Watterson, D. M. : An aminopyridazine-based inhibitor of a pro-apoptotic protein kinase attenuates hypoxia-ischemia induced acute brain injury. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 3465 (2003).
- 13) Zhou, W., Zhong, G., Rao, X., Xie, H., Zeng, S., Chi, T., Zou, L., Wu, D. and Hu, W. : Identification of aminopyridazine-derived antineuroinflammatory agents effective in an Alzheimer's mouse model. *ACS Med. Chem. Lett.* **3**, 903 (2012).

- 14) Lee, M.-S., Kim, E.-S., Moon, A. and Park, M.-S. : Synthesis of novel allylthio heterocyclo(or aryl)alkylaminopyridazines and their anticancer activity against SK-Hep-1 cells. *Bull. Korean Chem. Soc.* **30**, 83 (2009).
- 15) Dhanasekaran, D. N. and Reddy, E. P. : JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* **27**, 6245 (2008).
- 16) Lee, M.-S. and Kim, K.-A. : NF- κ B pathway in metabolic/endocrine diseases. *대한내분비학회지* **21**, 352 (2006).
- 17) Murtas, D., Piras, F., Minerba, L., Ugalde, J., Piga, M., Maxia, C., Perra, M. T. and Sirigu, P. : Nuclear factor- κ B expression is predictive of overall survival in patients with cutaneous melanoma. *Oncol. Lett.* **1**, 633 (2010).
- 18) Arbab, I. A., Looi, C. Y., Abdul, A. B., Cheah, F. K., Wong, W. F., Sukari, M. A., Abdullah, R., Mohan, S., Syam, S., Arya, A., Mohamed Elhassan Taha, M., Muharram, B., Rais Mustafa, M. and Ibrahim Abdelwahab, S. : Dentatin induces apoptosis in prostate cancer cells via Bcl-2, Bcl-xL, surviving downregulation, caspase-9, -3/7 activation, and NF- κ B inhibition. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, 856029 (2012).
- 19) Ito, Y., Kikuchi, E., Tanaka, N., Kosaka, T., Suzuki, E., Mizuno, R., Shinojima, T., Miyajima, A., Umezawa, K. and Oya, M. : Down-regulation of NF kappa B activation is an effective therapeutic modality in acquired platinum-resistant bladder cancer. *BMC Cancer* **15**, 324 (2015).