

Лекция 4

Современные аспекты концепции раковых стволовых клеток Cancer Stem Cells

Иерархическая теория онкогенеза

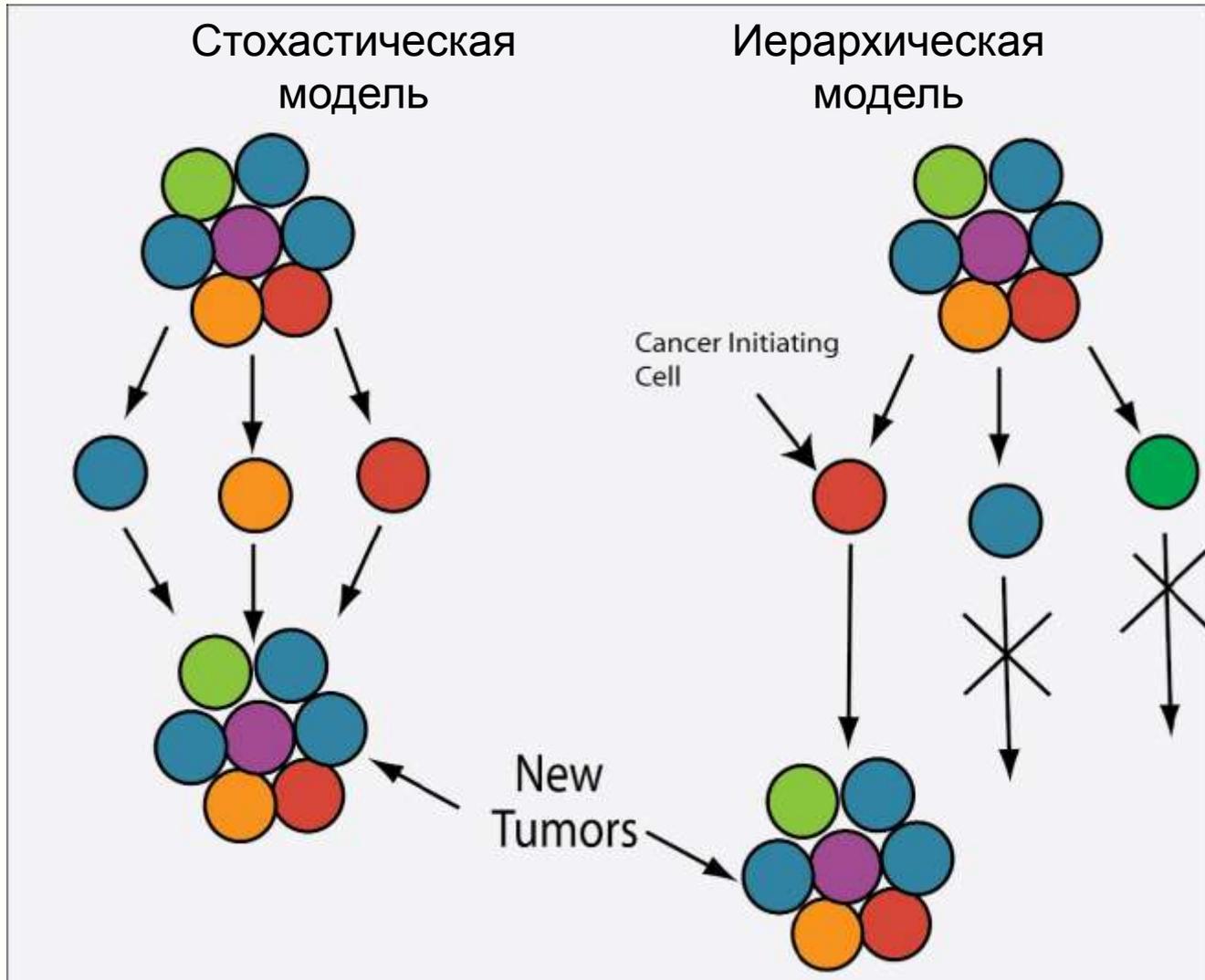
Ярыгин Константин Никитич

д.б.н., член-корр. РАМН
зав. лаб. клеточной биологии
ФГБУ «ИБМХ» РАМН

Основные теории, касающиеся клеток-родоначальников опухолей

- ❖ **Стохастическая теория** утверждает, что любая клетка данной опухоли может при метастазировании, трансплантации или переносе в условия *in vitro* стать родоначальницей новой опухоли.
- ❖ **Иерархическая теория** утверждает, что такими свойствами обладает лишь небольшая часть клеток опухоли, так называемые раковые стволовые клетки. Согласно иерархической теории, в пределах опухоли сосуществуют несколько типов клеток с разными свойствами и в этом смысле она устроена подобно нормальным тканям, где в большинстве случаев регенерация, рост и восстановление паренхимы происходят путем асимметричного деления резидентных или циркулирующих стволовых клеток и дифференцировки части дочерних клеток.
- ❖ Обе теории допускают возможность возникновения опухоли из одной единственной клетки-прародительницы, т.е. **клональность** опухолей.

Стохастическая и иерархическая теории онкогенеза



Определение, возникновение и некоторые свойства РСК

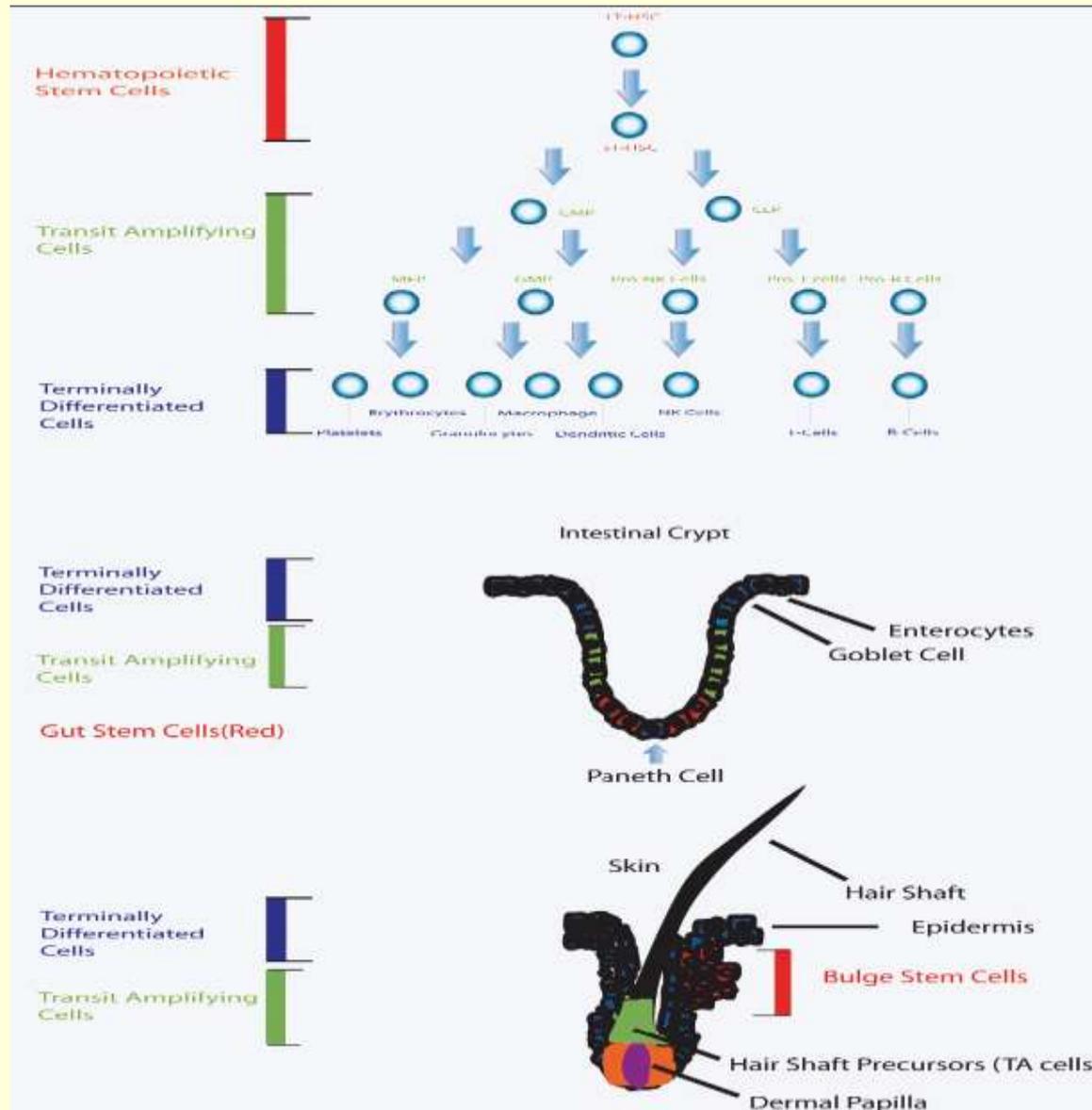
- Раковые стволовые клетки (РСК) – это злокачественно трансформированные клетки, способные к асимметричному делению, в результате которого возникает одна клетка-реплика исходной клетки и одна клетка, утрачивающая способность делиться асимметрично, но обладающая неконтролируемым пролиферативным потенциалом, обычно высокой инвазивностью и часто проявляющая признаки дифференцировки. Как РСК, так и их потомство характеризуются генетическими aberrациями.
- Вероятно, что РСК возникают в результате ряда (от 3 до 7) мутаций, каждая из которых в наиболее изученных модельных системах *in vitro* происходит со средней частотой 1 на 10^6 делящихся клеток.
- Если опухоль содержит РСК, т.е. построена по иерархическому принципу, то, вероятно, лишь РСК обладают способностью бесконечно размножаться и давать метастазы.

Еще в 19 столетии была выдвинута идея о существовании в организме взрослого человека остатков малодифференцированных, эмбрионального типа клеток, могущих перерождаться в раковые клетки. Эта гипотеза развивалась, в частности, Рудольфом Вирховым. Но солидное фактическое подтверждение теории возникновения опухолей не из любых, а лишь из специальных клеток получила после открытия и разработки экспериментальных методов клонирования нормальных стволовых клеток (СК), прежде всего гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Первые РСК были обнаружены при изучении патогенеза лимфобластом в результате использования метода серийных трансплантаций, разработанного в процессе доказательства существования ГСК.

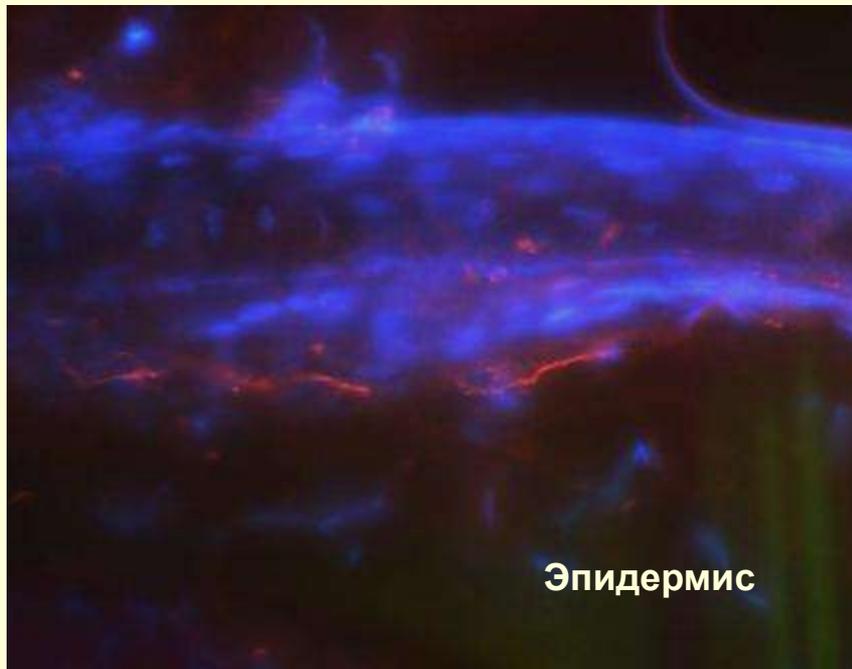
Функциональное определение, стабильность и дифференцировочный потенциал СК

- **Стволовая клетка (СК)** – это клетка, способная претерпевать асимметричное деление, в результате которого образуется одна клетка, идентичная материнской (самовоспроизведение) и вторая клетка, вступившая на путь превращения в клетку одного из 220+ известных цитофенотипов.
- **In vivo** СК может оставаться стволовой только в соответствующем микроокружении (клетки-соседи, межклеточное вещество, лимфа, кровь). В культуре – при соответствующем составе культуральной среды и свойствах поверхности культурального сосуда; иногда необходимо присутствие других клеток – так называемых фидерных клеток, синтезирующих паракринные факторы (факторы роста, цитокины, etc.).
- Некоторые дифференцированные клетки в условиях стимуляции регенерационных процессов могут дедифференцироваться, превращаясь фактически в СК, а затем вновь дифференцироваться в клетки прежнего или других цитофенотипов. Примеры: регенерация печени и поджелудочной железы.
- Экспериментальные данные свидетельствуют о том (хотя строго это не доказано), что в условиях *in vitro* СК способны дифференцироваться в те же 220+ цитофенотипов, что говорит об ограниченности количества программ нормальной дифференцировки клеток данного вида.
- Большинство СК *олиго-* или даже *монопотентны*, т.е. способны давать начало одному или нескольким типам клеток. Но есть резидентные и циркулирующие *плюрипотентные* СК с почти неограниченным потенциалом дифференцировки.

Примеры регенерации быстро обновляющихся тканей с участием стволовых клеток



Эпителиальные СК в волосяном фолликуле и в эпидермисе



Доказательства существования ГСК

- ГСК – источник всех типов клеток крови как миелоидного, так и лимфоидного ряда. Первоначально данные о существовании ГСК были получены в серийных репопуляционных экспериментах на мышах, показавших, что костный мозг содержит небольшое количество клеток, трансплантация которых приводит к полному восстановлению уничтоженной летальным облучением гемопоэтической системы.
- Данные о существовании ГСК у человека были получены в экспериментах по серийной трансплантации клеток костного мозга человека иммунодефицитным мышам или эмбрионам овец после полного уничтожения собственной гемопоэтической системы этих животных. Эти результаты подтверждаются накопленным в настоящее время огромным клиническим опытом трансплантации костного мозга и ГСК, выделенных из пуповинной крови или из периферической крови взрослого человека после стимуляции их выброса из костного мозга путем введения гКОФ.
- ГСК в костном мозге и любой другой ткани мало – не более 1 на 10^4 ядродержащих клеток. Только эти клетки плюрипотентны, т.е. способны дифференцироваться в любые клетки крови и полностью восстанавливать гемопоэз. Все другие ядродержащие клетки – это коммитированные клетки на разных стадиях дифференцировки.
- В настоящее время разработаны несколько методов очистки ГСК, в частности, с использованием клеточного сортера или конъюгированных с антителами магнитных нанночастиц.

Доказательства существования РСК при лейкозах

- РСК в гемопоэтической системе были обнаружены также с помощью метода серийных трансплантаций. Большинство экспериментов было выполнено на линиях мышей “severe combined immunodeficiency” (SCID) или “nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency” (NOD-SCID). Такие мыши не дают иммунной реакции на ксенотрансплантацию человеческих клеток. При трансплантации им гемопоэтических клеток от пациентов с острой миелоидной лейкемией (ОМЛ), острой лимфобластной лейкемией (ОЛБЛ) или хронической миелоидной лейкемией (ХМЛ) только небольшая часть клеток оказалась способной инициировать соответствующие лейкозы и поддерживать их у мышей-реципиентов. Эти клетки и было предложено называть раковыми стволовыми клетками (РСК).
- Обнаружение РСК показало, что общепринятая «стохастическая» теория канцерогенеза, согласно которой любая клетка злокачественной опухоли может инициировать новую опухоль при трансплантации или участвовать в формировании метастазов, в случае человеческой лейкемии не работает. Была предложена новая «иерархическая» теория, утверждающая, что опухоли формируются лишь из специальных «раковых стволовых клеток» (РСК). Лишь РСК являются предшественниками всех опухолевых клеток и, следовательно, находятся на вершине клеточной «иерархии», подобно тому как нормальные СК находятся на вершине иерархии клеток в нормальных тканях. Из всех опухолевых клеток лишь РСК могут самообновляться путем асимметричного деления.
- Количество РСК не превышает 1% от общего числа клеток лейкемии.

Клетки-родоначальники РСК в гемопоэтической системе

- **Какие нормальные клетки служат предшественниками РСК в гемопоэтической системе?**
- С использованием метода цитофлуорометрической сортировки клеток было показано, что РСК сосредоточены исключительно во фракции клеток, имеющих фенотип CD34⁺⁺CD38⁻, содержащей ГСК, но не во фракции «CD34⁺⁺CD38⁺», обогащенной более дифференцированными прогениторными клетками, коммитированными к дифференцировке в те или иные клетки крови. Таким образом, онкотрансформация с образованием РСК в гемопоэтической системе происходит, вероятно, в недифференцированных ГСК. Сходство поверхностных маркеров РСК и ГСК говорит в пользу того, что при лейкемии РСК возникают при трансформации ГСК.
- Существуют, однако данные, позволяющие предположить, что ГСК – не единственный источник РСК. Так, коммитированные прогениторные клетки, трансформированные ретровирусами, содержащими индуцирующими лейкемию фьюжн онкогены MLL-ENL или MOZ-TIF2, способны инициировать лейкемию у мышей-реципиентов. Трансплантация трансформированных клеток выделенных из первичных реципиентов вторичным реципиентам также вызывало лейкемию, что указывало на приобретение коммитированными клетками свойств характерных для СК. С другой стороны, известный лейкомогенный фьюжн онкоген Vcr-Abl в этой модели не работал.
- Позже было показано, что при переходе ХМЛ в агрессивную бластную фазу коммитированные клетки с фенотипом, характерным для клеток-предшественников гранулоцитов-моноцитов, приобретали способность к самообновлению через асимметричное деление. К сожалению, эти данные не подтверждены пока на NOD-SCID модели или в других опытах *in vivo*.
- Эти результаты, взятые вместе, показывают, что утверждение «Все РСК в гемопоэтической системе образуются непосредственно из ГСК» может быть отражает ситуацию слишком упрощенно. Возможно, некоторые онкогены могут трансформировать коммитированные клетки и репрограммировать их в самообновляющиеся РСК.

РСК солидных опухолей: рак молочной железы

- После имплантации в жировую ткань молочных желез мышей NOD-SCID лишь 1-3% клеток, выделенных из опухоли молочной железы человека и имеющие фенотип «CD44⁺/CD24^{-low}» способны инициировать опухоли, гистологически тождественные исходной. Эта субпопуляция инициирующих рак молочной железы клеток представляет собой субпопуляцию РСК.
- Не вполне ясно, какие нормальные клетки служат предшественниками РСК при раке молочной железы. Таковыми могут быть резидентные эпителиальные СК. Действительно, резидентные эпителиальные СК молочных желез мыши, способные воссоздавать ткань молочной железы при трансплантации мышам линии NOD-SCID и формировать колонии самовоспроизводящихся клеток в культуре, в условиях *in vitro* могут претерпевать онкотрансформацию. Однако, по фенотипу они отличаются от клеток рака молочной железы человека. Мышиные эпителиальные СК имеют фенотип «Lin⁻CD29^{high}CD24⁺».

РСК солидных опухолей: опухоли мозга

- РСК были обнаружены в первичных опухолях мозга. Было показано, что около 1% клеток CD133⁺, изолированных из глиобластом и медуллобластом человека, были способны давать начало исходным опухолям при серийных трансплантациях в мышей NOD-SCID. Клетки опухолей CD133⁻ не обладали такой способностью. Таким образом, часть экспрессирующих CD133 клеток опухолей мозга, вероятно, являются РСК.
- Так как между резидентными нейральными СК и РСК опухолей мозга существует фенотипическое и поведенческое сходство, можно предположить, что РСК опухолей мозга – продукт трансформации нейральных СК.
- В мозге человеческих fetusов РСК появляются как результат онкотрансформации как нейральных СК, так и ранних коммитированных клеток.
- Интересно отметить, что поверхностный маркер CD133 экспрессируется резидентными СК костного мозга, мозга и ряда других органов и частью циркулирующих СК.

РСК солидных опухолей: опухоли толстого кишечника

- Предшественники раковых стволовых клеток в толстом кишечнике – это резидентные СК, локализованные в базальной части крипт и претерпевшие соматическую мутацию в одном из аллелей гена АВС, кодирующего “adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein complex”, т.е. имеющие фенотип АВС+/- . Мутация во втором аллеле (“second hit”) с приобретением фенотипа АВС-/- происходит обычно в коммитированной клетке, которая начинает быстро размножаться. Потомки этой клетки заполняют всю крипту. Крипты делятся у основания с образованием моноклональной аденомы (полипа). В других случаях полип образуется в результате слияния нескольких крипт, образованных клетками АВС-/- (поликлональный полип). Механизм озлокачествления полипа не ясен. Вероятно, это происходит потому, что одна из клеток аденомы претерпевает дальнейшие мутации, ведущие к трансформации, и приобретает пролиферативные преимущества.
- При семейном аденоматозном полипозе (семейной форме рака толстого кишечника) мутация в одном из аллелей АВС– наследуемая (все клетки данного индивидуума имеют фенотип АВС+/-). Мутация во втором аллеле – соматическая. Клетками-предшественницами раковых СК являются резидентные СК или коммитированные клетки, претерпевшие “second hit” и имеющие фенотип АВС-/- . В дальнейшем события развиваются по сценарию образования ненаследуемой карциномы толстой кишки.

Опухоли, в отношении которых уже имеются данные о том, что они возникают и развиваются согласно иерархической модели

Опухоль	Идентифицированы ли РСК	Клетки-предшественницы РСК
Лейкемии (ОМЛ, ХМЛ, ОЛБЛ).	Идентифицированы в модели NOD-SCID; имеют фенотип CD34++CD38-.	ГСК (фенотип CD34++CD38-), дедифференцированные под влиянием некоторых онкогенов коммитированные клетки.
Рак кожи (не меланома).	Не идентифицированы.	СК волосяных фолликулов и базального слоя эпидермиса (только эти клетки существуют достаточно долго, чтобы претерпеть онкотрансформацию).
Рак толстой кишки.	По крайней мере в 80% случаев идентифицированы как клетки, имеющие фенотип ABC ^{-/-} , т.е. гомозиготные по мутации в гене ABC, кодирующем “adenomatous polyposis coli tumor supressor protein complex”.	Резидентные СК, локализованные в базальной части крипт и претерпевшие соматическую мутацию в одном из аллелей ABC, т.е. имеющие фенотип ABC ^{+/-} . Мутация во втором аллеле (“second hit”) с приобретением фенотипа ABC ^{-/-} происходит обычно в коммитированной клетке, которая начинает быстро размножаться. Потомки этой клетки заполняют всю крипту. Крипты делятся у основания с образованием с образованием моноклональной аденомы (полипа). В других случаях полип образуется в результате слияния нескольких крипт, образованных клетками ABC ^{-/-} (поликлональный полип). Механизм озлокачествления полипа не ясен. Вероятно, это происходит потому, что одна из клеток аденомы претерпевает дальнейшие мутации, ведущие к трансформации, и приобретает пролиферативные преимущества.
Семейный аденоматозный полипоз (наследственная форма рака толстого кишечника).	Клетки ABC ^{-/-} . Мутация в одном из аллелей – наследуемая (все клетки данного индивидуума имеют фенотип ABC ^{+/-}). Мутация во втором аллеле – соматическая.	Резидентные СК или коммитированные клетки, претерпевшие “second hit” и имеющие фенотип ABC ^{-/-} . В дальнейшем события развиваются по сценарию образования ненаследуемой карциномы толстой кишки.

Как устроены тканевые «ниши» раковых стволовых клеток? Если эти ниши специфичны для РСК и отличаются от ниш нормальных СК, то можно ли устранять РСК, воздействуя на ниши? Пример уже есть – разрушение питающих опухоль сосудов!



Пост-транскрипционная геномика рака: как получить чистые (>90%) образцы раковых стволовых клеток и других раковых клеток?



Возможна ли дедифференцировка нестволовых опухолевых клеток с образованием РСК?

Какова иммуногенность раковых стволовых клеток?

Можно ли использовать материал, взятый при операции на сформировавшейся опухоли, для поиска ранних маркеров этой опухоли на стадии появления первых РСК?

Как можно блокировать пролиферацию раковых стволовых клеток, не «трогая» нормальные стволовые клетки?