

РАКОВЫЕ КЛЕТКИ: ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ИЕРАРХИЯ И ВЗАИМОПРЕВРАЩЕНИЯ

А.В. Лихтенштейн, К.И. Жордания

ФГБУ РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН, Москва

В обзорной статье рассматривается концепция раковых стволовых клеток в общем случае и применительно к серозному раку яичников.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, рак яичников, многостадийный канцерогенез, эпителиально-мезенхимальный переход.

CANCER CELLS: FUNCTIONAL HIERARCHY AND INTERCONVERSIONS

A.V. Lichtenstein, K.I. Zhordania

Federal State Budgetary Institution — Russian Oncological Scientific Center named after N.N. Blokhin, Moscow

The article reviews the cancer stem cells concept in general and specifically with regard to ovarian cancer.

Key Words: Cancer stem cells, ovarian cancer, multi-stage carcinogenesis, epithelial-mesenchymal transition.

Полтора века назад возникла теория «зародышевых зачатков» Вирхова-Конгейма, согласно которой в организме присутствуют «заблудившиеся» эмбриональные клетки, по большей части дремлющие, но способные под воздействием воспаления пробудиться и породить опухоль. В её основе была идея о том, что «опухоли растут по тем же законам, что управляют эмбриональным развитием» [1]. Исследования последнего времени возрождают эту теорию на новом уровне наших знаний и детализируют представления о раковой стволовой клетке (РСК).

Концепция РСК

В пользу существования неких специализированных клеток, дающих начало опухолевому росту, свидетельствует ряд простых соображений. Очевидно, что подавляющее большинство клеток организма не способно к злокачественной трансформации, поскольку терминально дифференцировано и не способно делиться. Но и преобладающая часть клеток, сохранивших пролиферативную активность, также должна быть исключена из рассмотрения, поскольку живёт относительно недолго (недели и месяцы). Дело в том, что многостадийный канцерогенез, как правило, — процесс чрезвычай-

но длительный¹, развивающийся на протяжении десятилетий (для полной трансформации клетка должна накопить в своем геноме несколько, от двух до восьми и более, мутаций — событий крайне редких) [3]. Следовательно, шанс пройти полную трансформацию имеют только те клетки, которые, во-первых, сохранили способность деления и, во-вторых, живут долго, сопоставимо с продолжительностью жизни организма. Лишь одна известная нам популяция клеток удовлетворяет этим условиям — стволовые клетки. Таким образом, само представление о многостадийности и, соответственно, длительности канцерогенеза фокусирует внимание на этой, видимо единственной, популяции клеток, которые могут дать начало раковой опухоли.

Схема строения крипты кишечника иллюстрирует это положение (рис. 1). Расположенные в её основании медленно делящиеся стволовые клетки дают начало «транзиторным» клеткам, пролиферативная активность которых постепенно угасает по мере их перемещения к вершине крипты. Мутации этих клеток обычно не имеют серьёзных последствий, поскольку вскоре (через 5–6 суток) они слущиваются в просвет кишечника и погибают (время их жизни недостаточно для полной трансформации). Иное

¹ Недавно обнаружен феномен хромотрипсиса (одномоментно возникающих множественных перестроек одной или нескольких хромосом). Эта внутриклеточная катастрофа, обусловленная дефектами митоза, позволяет клетке «одним прыжком» преодолеть последовательные стадии канцерогенеза [2]. Такие молниеносно возникающие опухоли составляют несколько процентов от общего их числа.

дело стволовая клетка крипты (её мутации передаются дочерним клеткам и распространяются в конце концов на всю крипту), которая живёт достаточно долго, чтобы накопить множество генетических дефектов [4]. Следует также учесть, что каждый генетический дефект (мутация протоонкогена или гена-супрессора) наделяет клетку дополнительным селективным преимуществом, благодаря чему формируется клон (чем он больше, тем выше вероятность возникновения в одной из его дочерних клеток ещё одной, дополнительной мутации, определяющей прохождение очередного этапа трансформации). Таким образом, канцерогенез — это дарвиновский процесс последовательных циклов мутации-селекции.

Современная концепция РСК предполагает существование в опухоли определённой клеточной иерархии, в противоположность бытовавшей ранее «стохастической» модели (опухоль как хаотический клеточный конгломерат). Предполагается, что «движущей силой» опухолевого роста является минорная субпопуляция клеток с особыми свойствами: способностью самообновления и дифференцировки (в ходе асимметричного деления одна дочерняя клетка заменяет материнскую, «обновляя» её, а другая дифференцируется); пластичностью (способностью развития в разных направлениях); неограниченным потенциалом деления; способностью формировать опухоль *de novo*. Стволовые клетки составляют

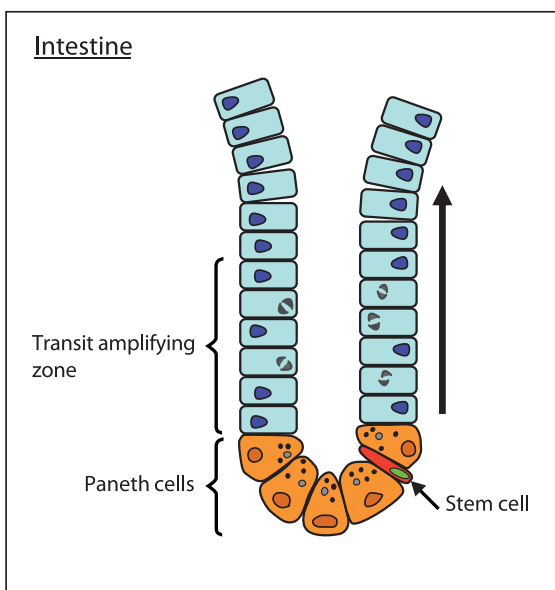


Рис. 1. Схема строения крипты кишечника. Клетки разных типов обозначены на рисунке. Стрелка указывает направление движения пролиферирующих клеток к поверхности крипты (в просвет кишечника)

обычно доли процента клеточной популяции, хотя иногда их содержание выше [5, 6] и может сильно варьировать в опухолях разного происхождения [7]. Основная же масса опухоли — дифференцированные раковые клетки, обречённые в конечном итоге на гибель и не способные воссоздать опухоль *de novo*, но именно они, доминируя количественно, определяют клиническое течение заболевания [8, 9]. Важную роль в «пробуждении» стволовых клеток и выборе ими «раковой» ветви развития играют их взаимоотношения с «нишей» [10–12]. Мутации, воспаление и другие дестабилизирующие (эндогенные и экзогенные) факторы ослабляют эту связь и способны инициировать опухолевый рост.

Доказательства существования РСК

До последнего времени концепция РСК основывалась на косвенных свидетельствах: результатах тестов *in vitro* (способности клеток формировать сферические колонии в суспензии), опытах ксенотрансплантации опухолевых клеток человека мышам с иммунодефицитом (таким способом определяли субпопуляцию клеток, способных генерировать опухоли *de novo*), идентификации специфических маркеров, таких как CD44, CD24, CD133, ALDH (альдегиддегидрогеназа). Таким способом удалось показать существование в различных опухолях человека субпопуляции клеток, отвечающих отмеченным выше критериям [13]. Эти свидетельства, однако, казались многим исследователям сомнительными и неоднократно подвергались критике, поскольку получены были в весьма искусственных условиях, далеких от реальной ситуации. Так, экспрессия специфических маркеров чрезвычайно зависима от состава культуральной среды и содержания в ней кислорода. Что касается переноса опухолевых клеток человека из их естественного микроокружения в организм экспериментального животного, то эта процедура сама по себе способна существенно исказить клеточный фенотип (высказывалось мнение: опыты подобного типа демонстрируют, что опухолевые клетки способны делать в принципе, но вовсе не то, что они делают в действительности).

Решающие доказательства существования РСК получены благодаря развитию метода, позволяющего проследить родословную клеточного клона (lineage tracing). Этот метод, использующий генно-инженерные приемы, дает возможность стабильно пометить клетку-предшественника флуоресцирующим белком *in vivo* и проследить затем переход метки в дочерние

клетки, визуализируя тем самым последовательные стадии развития. Эксперименты типа lineage tracing, предпринятые для проверки концепции РСК применительно к естественно растущей опухоли, были поставлены на моделях рака головного мозга, кишечника и кожи мышей. Суммарные результаты сводятся к следующему: а) в исследованных опухолях, несомненно, существует клеточная иерархия: небольшая субпопуляция долгоживущих и стабильно пролиферирующих клеток (РСК) пополняет сосуществующую и количественно преобладающую субпопуляцию слабо пролиферирующих дифференцированных клеток; б) по мере прогрессии опухоли фракция РСК может существенно увеличиться; в) рецидив заболевания, возникающий через некоторое время после удаления основной массы опухоли, обусловлен активностью сохранившихся РСК; г) избирательное ингибирование РСК (посредством генно-инженерных манипуляций) подавляет опухолевый рост; д) опухоли клонально гетерогенны, причем клоны конкурируют и вытесняют друг друга [14–17].

Происхождение РСК: EMT- и MET-переходы

Принципиально важен вопрос о происхождении стволовых раковых клеток: непосредственно из нормальных стволовых или из клеток изначально более дифференцированных, но приобретших свойства стволовых вторично [7, 10, 18, 19]. В ряде случаев определенно показано, что раковые стволовые клетки происходят непосредственно из соответствующих нормальных [20–23]. Одновременно было замечено, что обретение раковыми клетками соответствующего «стволовому» фенотипа сопряжено с эпителиально-мезенхимальным переходом (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) [24]. Феномен EMT — переход эпителиальной, фиксированной на подложке неподвижной клетки в фибробластоподобную клетку, подвижную и способную мигрировать в окружающей среде, — непреходящий атрибут эмбриогенеза. Клеточная миграция — важнейшая составляющая как нормального развития (без неё невозможно развитие эмбриона), так и опухолевой прогрессии (без неё невозможно метастазирование). Воспаление, гипоксия, иммунологические реакции, постоянно сопровождающие онкологический процесс, стимулируют EMT раковых клеток. С этим феноменом часто связывают обретение раковыми клетками лекарственной устойчивости [25].

Клетки, прошедшие EMT, находятся, как было отмечено рядом исследователей, в состоянии пролиферативного покоя, что явно противоречит представлению о быстром росте очагов метастазирования. Этот парадокс был снят, когда выяснилось, что раковые стволовые клетки способны, в зависимости от обстоятельств, совершать двунаправленные переходы из одного состояния в другое (flip-flop переходы). Иными словами, EMT и противоположный ему MET (мезенхимально-эпителиальный переход) чередуются, позволяя раковой клетке максимально адаптироваться к меняющемуся окружению и реализовать метастатический потенциал. Благодаря MET мигрирующая в отдалённый орган клетка способна закрепиться во внеклеточном матриксе, вновь обрести способность деления и в итоге сформировать метастаз [25].

Эти данные, вкуче с доказанной *in vitro* и *in vivo* возможностью раковых клеток «двигаться вспять» (спонтанно дедифференцироваться из стволовых клеток в стволовые [26]), формируют представление об их высокой пластичности и, в целом, о динамической структуре раковой опухоли: существующая в ней иерархия не фиксирована жёстко (стволовые клетки → дифференцированные клетки), как это обычно происходит в нормальном развитии, но, напротив, подвижна и допускает взаимные переходы (стволовые клетки ↔ «дифференцированные клетки»). Эти данные согласуются с представлением о клеточной «стволовости» как свойстве, присущем скорее клеточной популяции, чем отдельной клетке (имеется в виду, что в популяции эту транзиторную функцию могут брать на себя разные индивиды) [27].

Применительно к раку молочной железы предложен следующий сценарий развития событий: в первичной опухоли РСК присутствуют преимущественно в MET-подобном состоянии (активно делятся и экспрессируют ALDH). Мигрирующие же в кровотоки EMT-подобные клетки инвазивны, не пролиферируют и имеют фенотип CD44⁺CD24⁻. После диссеминации РСК возвращаются в исходное MET-состояние и формируют метастаз [25].

Высокая пластичность раковых клеток и возможность их взаимных переходов делают несостоятельными надежды некоторых исследователей на выделение в опухоли в качестве мишени химиотерапии какой-то одной клеточной субпопуляции, элиминации которой было бы достаточно для радикального излечения. На первом этапе исследований РСК именно их рассматривали в подобном качестве: избирательное

уничтожение РСК таргетными препаратами может, как полагали, лишить опухоль её «движущей силы». Способность раковых клеток к «движению вспять» и воссозданию, таким образом, субпопуляции РСК лишает эти надежды оснований. По-видимому, вся клеточная иерархия опухоли должна находиться под химиотерапевтическим «прицелом».

Стволовые клетки рака яичников

Из-за сложности гистологического строения и, соответственно, многообразия форм возникающих в яичниках злокачественных новообразований, идентификация иницирующих опухоль клеток представляет в этом случае особенно сложную проблему [28]. Анализ клинических, гистологических и молекулярно-биологических данных даёт серьёзные основания для предположения, что таковыми (иницирующими серозный рак яичников) являются клетки эпителия маточной трубы [29, 30]. С этой точки зрения представляет интерес сопоставление клинических данных с результатами экспериментов, проведенных на модельных системах.

Относительно локализации клеток, дающих у мышей начало серозному раку яичников, существу-

ет несколько предположений: поверхностный эпителий; эпителий маточных труб; клетки переходной зоны (хилума), где нервно-сосудистый пучок входит в яичник (рис. 2). Полученные недавно данные свидетельствуют в пользу последнего предположения [31]: а) клетки, экспрессирующие ALDH1 и LGR5 (маркеры стволовых клеток) и способные формировать сферические колонии, находятся преимущественно в хилуме; б) опыты типа «пульс-чейс» (мечение клеток бромдезоксигидромином с последующим слежением за перемещением метки) показали, что ALDH1+ — клетки хилума, делящиеся относительно медленнее других клеток яичника, возрастают в числе сразу после овуляции, что позволяет предполагать их участие в репарации поверхностного эпителия; в) в опытах lineage tracing отмечено избирательное накопление метки в хилуме с последующим её переходом в поверхностный эпителий; г) у генетически модифицированных мышей (с условной инактивацией *Trp53* and *Rb1*) клетки хилума первыми обнаруживают патологические изменения и, трансплантированные внутривентриально, с высокой частотой формируют метастатические серозные карциномы, к чему клетки других локализаций не способны.

Возникает вопрос, в какой степени результаты, полученные на экспериментальных животных, применимы к человеку (имеется в виду локализация РСК в хилуме и их способность порождать серозный рак яичников) [32]. При обсуждении этого вопроса нельзя исключать возможность того, что серозный рак может возникать и из стволовых (более дифференцированных) клеток, особенно если принять во внимание их пластичность и способность становиться стволовыми вторично [33]. Учитывая практическое значение этой проблемы и применение высокоэффективных современных технологий в поисках специфических маркеров рака яичников [34], ответ на этот вопрос можно ожидать в недалеком будущем.

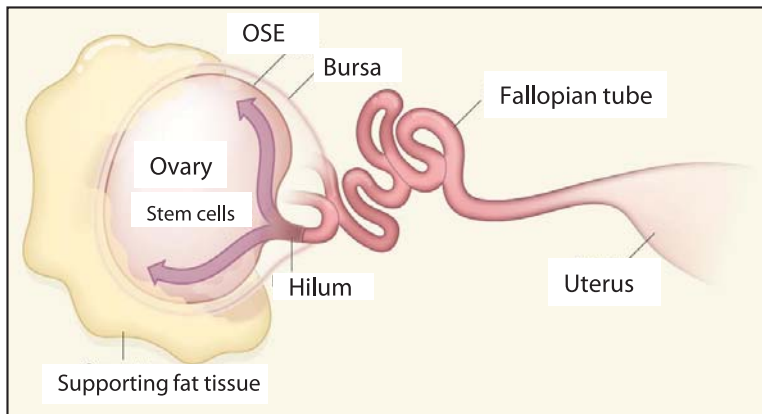


Рис. 2. Схема строения яичника. На рисунке представлено взаимное расположение различных отделов яичника. Стволовые клетки, дающие начало серозному раку, локализованы предположительно в хилуме

ЛИТЕРАТУРА

1. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? // *Lancet*. 2001. V. 357. P. 539–545.
2. Forment J.V., Kaidi A., Jackson S.P. Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering // *Nat Rev Cancer*. 2012. V. 12. P. 663–670.
3. Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E. et al. Cancer Genome Landscapes // *Science*. 2013. V. 339. P. 1546–1558.
4. Barker N., Ridgway R.A., van Es J.H. et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer // *Nature*. 2009. V. 457. P. 608–611.

5. Adams J.M., Kelly P.N., Dakic A. et al. Response to Comment on «Tumor Growth Need Not Be Driven by Rare Cancer Stem Cells» // Science. 2007. V. 318. P. 1722d.
6. Kelly P.N., Dakic A., Adams J.M. et al. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells // Science. 2007. V. 317. P. 337.
7. Kennedy J.A., Barabe F., Poepl A.G. et al. Comment on «Tumor Growth Need Not Be Driven by Rare Cancer Stem Cells» // Science. 2007. V. 318. P. 1722.
8. Hermann P.C., Huber S.L., Herrler T. et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer // Cell Stem Cell. 2007. V. 1. P. 313–323.
9. Hermann P.C., Huber S.L., Heeschen C. Metastatic cancer stem cells: a new target for anti-cancer therapy? // Cell Cycle. 2008. V. 7. P. 188–193.
10. Clarke M.F., Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve // Cell. 2006. V. 124. P. 1111–1115.
11. Li L., Neaves W.B. Normal Stem Cells and Cancer Stem Cells: The Niche Matters // Cancer Res. 2006. V. 66. P. 4553–4557.
12. Walkley C.R., Shea J.M., Sims N.A. et al. Rb Regulates Interactions between Hematopoietic Stem Cells and Their Bone Marrow Microenvironment // Cell. 2007. V. 129. P. 1081–1095.
13. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells // Nature. 2001. V. 414. P. 105–111.
14. Chen J., Li Y., Yu T.S. et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy // Nature. 2012. V. 488. P. 522–526.
15. Driessens G., Beck B., Caauwe A. et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis // Nature. 2012. V. 488. P. 527–530.
16. Schepers A.G., Snippert H.J., Stange D.E. et al. Lineage Tracing Reveals Lgr5+ Stem Cell Activity in Mouse Intestinal Adenomas // Science. 2012. V. 337. P. 730–735.
17. Gilbertson R.J., Graham T.A. Cancer: Resolving the stem-cell debate // Nature. 2012. V. 488. P. 462–463.
18. Perez-Losada J., Balmain A. Stem-cell hierarchy in skin cancer // Nat. Rev. Cancer. 2003. V. 3. P. 434–443.
19. Bjerkvig R., Tysnes B.B., Aboody K.S. et al. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights // Nat Rev Cancer. 2005. V. 5. P. 899–904.
20. Kim C.F., Jackson E.L., Woolfenden A.E. et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer // Cell. 2005. V. 121. P. 823–835.
21. Zhu L., Gibson P., Currie D.S. et al. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation // Nature. 2009. V. 457. P. 603–607.
22. Barker N., Ridgway R.A., van Es J.H. et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer // Nature. 2009. V. 457. P. 608–611.
23. Wang X., Julio M.K., Economides K.D. et al. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer // Nature. 2009. V. 461. P. 495–500.
24. Mani S.A., Guo W., Liao M.J. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells // Cell. 2008. V. 133. P. 704–715.
25. Liu S., Clouthier S., Wicha M. Role of microRNAs in the Regulation of Breast Cancer Stem Cells // J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2012. V. 17. P. 15–21.
26. Chaffer C.L., Brueckmann I., Scheel C. et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011. V. 108. P. 7950–7955.
27. Lander A.D. The ‘stem cell’ concept: is it holding us back? // J. Biol. 2009. V. 8. P. 70.
28. Berns E.M.J.J., Bowtell D.D. The Changing View of High-Grade Serous Ovarian Cancer // Cancer Research. 2012. V. 72. P. 2701–2704.
29. Жордания К.И. Серозный рак яичников или серозный рак маточной трубы? // Онкогинекология. 2012. № 3. P. 4–9.
30. Li J., Fadare O., Xiang L. et al. Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis // J Hematol. Oncol. 2012. V. 5. P. 8.
31. Flesken-Nikitin A., Hwang C.I., Cheng C.Y. et al. Ovarian surface epithelium at the junction area contains a cancer-prone stem cell niche // Nature. 2013. V. 495. P. 241–245.
32. Seton-Rogers S. Ovarian cancer: At the starting line // Nat Rev Cancer. 2013. V. 13. P. 296–297.
33. Brenton J.D., Stingl J. Stem cells: Anatomy of an ovarian cancer // Nature. 2013. V. 495. P. 183–184.
34. Kulasingam V., Pavlou M.P., Diamandis E.P. Integrating high-throughput technologies in the quest for effective biomarkers for ovarian cancer // Nat Rev Cancer. 2010. V. 10. P. 371–378.