

Received: 2012.04.20
Accepted: 2012.08.09
Published: 2012.09.10

Nowotworowe komórki macierzyste

Cancer stem cells

Katarzyna Wieczorek, Jolanta Niewiarowska

Katedra i Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Teoria istnienia nowotworowych komórek macierzystych (cancer stem cells – CSC) zyskuje coraz większe znaczenie w świecie medycyny. Liczne dowody badań *in vivo* oraz *in vitro* wskazują, że to właśnie populacja nieodróżnicowanych, samoodnawiających się komórek w guzie nowotworowym jest odpowiedzialna za odtwarzanie choroby i przerzutowanie. CSC, podobnie jak zwykle komórki macierzyste, funkcjonują w otoczeniu innych komórek organizmu, tzw. niszy, skąd czerpią sygnały do różnicowania i proliferacji. Zaburzenia w szlakach sygnałowych między CSC a niszą, wynikające m.in. z nabytych mutacji onkogennych, mogą prowadzić do niekontrolowanych podziałów komórek macierzystych, ich uniezależnienia od pierwotnej niszy lub zasiedlenia nowego mikrośrodowiska. CSC identyfikowane są na podstawie ekspresji swoistych markerów – białek błonowych lub enzymów komórkowych. Do izolowania wykorzystuje się najczęściej metody oparte na pomiarze fluorescencji barwnika (uzyskiwanie populacji pobocznej, SP) lub też fluorescencji fluoroforu związanego z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko określonemu markerowi CSC. Inną metodą jest uzyskiwanie zróżnicowanych morfologicznie klonów z pojedynczej komórki: holo-, mero- lub paraklonów. Standardowym testem *in vivo* potwierdzającym macierzysty charakter wyizolowanych komórek jest tworzenie przez nie guzów w myszach NOD/SCID. Model ten może jednak w pełni nie odzwierciedlać złożoności chorób nowotworowych u ludzi. Rozwiązanie zagadki procesu onkogenezy, w tym istnienia nowotworowych komórek macierzystych, bez wątpienia stanowi jeden z priorytetów współczesnej medycyny, który powinien się przyczynić do udoskonalenia standardowej terapii onkologicznej.

Słowa kluczowe: nowotwory • komórki macierzyste • onkogeneza • terapia przeciwnowotworowa • markery nowotworowych komórek macierzystych

Summary

Cancer stem cell theory gains increasingly greater significance in the world of medicine. Numerous findings of scientific research *in vivo* and *in vitro* indicate that it is the population of undifferentiated, self-renewing cells which is responsible for recurrence of cancer and metastasis. Similarly to normal stem cells, cancer stem cells (CSC) function in the environment of the other cells of the organism, called the niche, where they receive signals for differentiation and proliferation processes. Disorders in the signaling pathways between CSC and the niche that result from e.g. acquired oncogenic mutations may lead to uncontrolled proliferation of stem cells, gaining independence from the primary niche or settling a new microenvironment. CSC are identified on the basis of specific markers – membrane proteins or cell enzymes. Methods based on the measurement of dye fluorescence (obtaining side population, SP) or fluorescence of the fluorophore conjugated with a monoclonal antibody directed against the specific CSC marker are used for isolation. A different method obtains morphologically miscellaneous clones by single cell cloning: holo-, mero- and paraclones. Tumor forming assay in NOD/SCID mice is a standard *in vivo* test that confirms the stem character of isolated cells. However, this model may not fully reflect the complexity of cancer illnesses in human beings. Solving the mystery of oncogenesis, including

the existence of cancer stem cells, is undoubtedly one of the priorities of contemporary medicine that should contribute to the improvement of cancer therapy.

Key words: cancer • stem cell • oncogenesis • cancer therapy

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1009706>

Word count: 3157

Tables: 1

Figures: 2

References: 43

Adres autorki: dr hab. Jolanta Niewiarowska, Katedra i Zakład Biofizyki Molekularnej i Medycznej Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: jolanta.niewiarowska@umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **ABC** – kasetka wiążąca ATP (ATP-binding cassette); **ALDH** – dehydrogenaza aldehydowa (aldehyde dehydrogenase); **AML** – chroniczna białaczka szpikowa (acute myeloid leukemia); **CD** – grupa zróżnicowania (cluster of differentiation); **CSC** – nowotworowe komórki macierzyste (cancer stem cells); **EMS** – zarodkowe komórki macierzyste (embryonic stem cells); **EMT** – przemiana nabłonka w mezenchymę (epithelial to mesenchymal transition); **FACS** – cytometria przepływowa (fluorescence activated cell sorting); **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor); **NOD/SCID** – myszy z cukrzycą niepowodującą otyłości, z ostrym, złożonym upośledzeniem odporności (non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency); **PDGF- α** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); **SP** – populacja poboczna (side population); **VEGF-1** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyńowego (vascular endothelial growth factor).

1. CZYM SĄ KOMÓRKI MACIERZYTE?

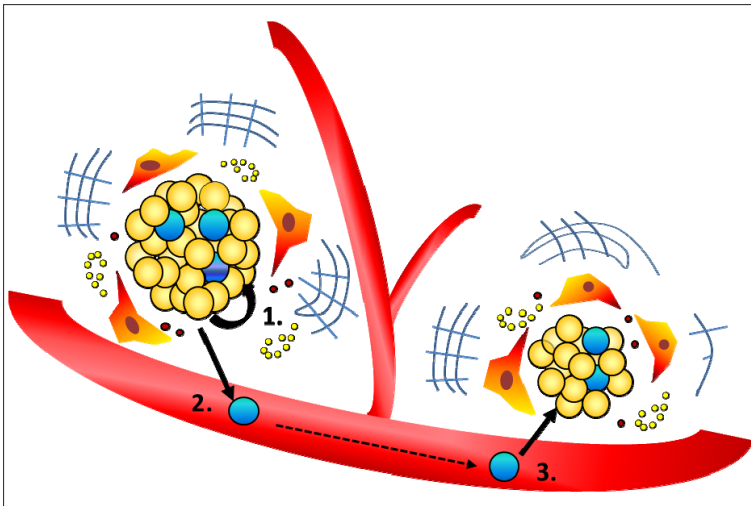
Komórki macierzyste są niewyspecjalizowanymi komórkami zdolnymi do różnicowania w wiele odmiennych typów komórek tworzących tkanki i organy. Proces ich tworzenia rozpoczyna się już podczas wczesnego etapu rozwoju zarodka, po zapłodnieniu. Komórki węzła zarodkowego oraz pierwotnej ektodermy w blastocystyce mogą się różnicować do każdego typu komórek; nazywane są totipotencjalnymi. Pierwotne komórki zarodkowe nazywane także embrionalnymi (embryonic stem cells – EMS) to oddzielone od komórek trofoblastu linie komórek zarodkowych o pełnym potencjale rozwojowym charakterystycznym dla danego węzła zarodkowego. Dzięki swoim niezwykłym właściwościom są często wykorzystywane w modyfikacjach transgenicznym i do uzyskiwania organizmów o oczekiwanym genotypie. Na dalszym etapie rozwoju zarodka następuje podział na linię komórek płciowych oraz somatycznych (pluripotencjalnych) [6]. Pula somatycznych komórek macierzystych - zdolnych do samoodnawiania i nieskończonej proliferacji – występująca we wszystkich tkankach dojrzałego organizmu pełni rolę swoistego systemu naprawczego, umożliwiając zastąpienie martwych komórek nowymi [37].

Terapie oparte na wykorzystaniu ludzkich komórek macierzystych hodowanych *in vitro* są wielką nadzieją wielu gałęzi medycyny, m.in. regeneracyjnej, transplantologii czy onkologii. Jednym z powszechnych schorzeń, z którym skutecznie się walczy za pomocą transplantacji embrionalnych komórek macierzystych jest cukrzyca – uważana też za nieinfekcyjną epidemię XXI wieku [37]. Wszczepione do mięszu trzustki komórki macierzyste mają za zadanie

zastąpić uszkodzone komórki beta, zdolne do wydzielania insuliny [11]. Również w schorzeniach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona leczenie z wykorzystaniem komórek macierzystych pozwoliło na zahamowanie lub spowolnienie degeneracji mózgowia u większości pacjentów [21]. Podanie komórek macierzystych może być nieocenione w odnowie i budowaniu immunokompetencji pacjenta w chorobie AIDS, ponieważ spowalnia progresję choroby oraz zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia charakterystycznych powikłań [26,28]. Nowatorskie terapie oparte na transplantacji komórek macierzystych mogą być również pomocne w odbudowie elementów morfotycznych krwi podczas chemioterapii stosowanej w chorobach nowotworowych, co może zapewnić bardziej efektywne leczenie oraz zmniejszyć działania niepożądane [32].

2. NOWOTWOROWE KOMÓRKI MACIERZYTE

Istnienie nowotworowych komórek macierzystych (cancer stem cells – CSC), tłumaczące zjawisko heterogenności w obrębie nowotworów, podejrzewano już ponad 40 lat temu, jednakże ówczesna nauka nie dysponowała wystarczającymi narzędziami i technikami molekularnymi, aby można było przeprowadzić bardziej szczegółowe badania. Najwięcej dowodów potwierdzających powyższą hipotezę pochodzi z badań nad chorobami krwi, np. chroniczną białaczką szpikową (acute myeloid leukemia – AML). W chorobie tej dochodzi do zaburzenia procesu hematopoezy, co w konsekwencji przyczynia się do akumulacji niedojrzałych komórek niezdolnych do dalszego różnicowania. Dokładne śledzenie aberracji hematopoezy jest możliwe przez wprowadzenie ilościowych testów pomiaru



Ryc. 1. CSC w niszach; udział niszy w przerzutowaniu komórek (wg [7] zmodyfikowano); 1 – CSC o charakterze macierzystym, 2 – odróżnicowywanie komórek prawidłowych do nowotworowych CSC, 3 – przemiana komórek nabłonka w mezenchymy (epithelial to mesenchymal transition – EMT)

klonogenności komórek białaczki. Wykazały one, że tylko część komórek nowotworowych jest zdolna do proliferacji *in vivo* oraz *in vitro* [39].

Obecnie dysponujemy coraz większą liczbą dowodów na istnienie pewnej puli komórek, także w przypadkach guzów litych (np. guzów piersi czy mózgu), które mają charakter komórek macierzystych zdolnych do samoodnawiania [1,14]. Za nowotworowe komórki macierzyste uznaje się populację niezróżnicowanych komórek, które mogą zostać wyizolowane na podstawie ekspresji określonej cząsteczki lub kombinacji cząsteczek nazywanych markerami. Komórki te wykazują zwiększoną zdolność do onkogenezy w porównaniu do zwykłej komórki nowotworowej, powodują utworzenie guza nowotworowego u laboratoryjnych myszy o obniżonej odporności (severe combined immunodeficiency – SCID), a także mogą być odpowiedzialne za przerzutowanie [3]. Zwykle komórki nowotworowe mają bardzo ograniczoną lub nawet brak możliwości samoodnawiania, co sugeruje, że to właśnie populacja nowotworowych komórek macierzystych może być odpowiedzialna za wzrost i rozprzestrzenianie się nowotworu. Ta rewolucyjna teoria rzuca zupełnie nowe światło na diagnozę i skuteczne leczenie chorób nowotworowych.

3. NOWOTWOROWE I ZWYKŁE KOMÓRKI MACIERZYSTE – PODOBIENSTWA I RÓŻNICE

Nowotworowe komórki macierzyste mają bardzo wiele właściwości prawidłowych komórek macierzystych, głównie unikalne zdolności samoodnawiania, proliferacji, różnicowania i multipotencji. Udowodniono, że jednym z czynników bezpośrednio wpływających na podtrzymywanie puli komórek macierzystych jest specjalne mikrośrodowisko, nazywane niszą [36]. Jest ona odpowiedzialna m.in. za to czy komórka „wybierze” drogę samoodnawiania, czy też różnicowania do innego typu komórki, np. w celu gojenia rany czy ubytku zdrowych komórek danej tkanki. Budowa niszy jest złożona – składa się z komórek mezenchymalnych, układu immunologicznego, sieci naczyń krwionośnych, czynników rozpuszczalnych, a także komponentów macierzy pozakomórkowej [7]. Do utrzymania swoich właściwości i zdolności odnowy komórki macierzyste potrzebują sygnałów od komórek niszy, w której występują. Uwalniane związki sygnałowe mogą aktywować

szlaki decydujące o dalszym losie komórki macierzystej. Komórki te mogą mieć także fizyczny wpływ na podział komórki macierzystej. Podczas podziału mitotycznego komórka dzieli się na dwie komórki potomne, z czego jedna dziedziczy przyłączenie do innych komórek niszy, natomiast druga aktywuje ekspresję genów odpowiedzialnych za szlaki różnicowania. W wyniku tego, w obrębie niszy – w niewielkiej odległości od siebie – mogą egzystować komórki zdolne do samoodnawiania oraz różnicujące się [41]. Wynika to z niesymetrycznego podziału komórek macierzystych: jedna z komórek potomnych odbudowuje rezerwę komórek macierzystych, podczas gdy druga rozpoczyna proces różnicowania [30]. Nisza jest również odpowiedzialna za zabezpieczenie przed niekontrolowanym rozprzestrzenieniem komórek macierzystych w organizmie [10]. Nowotworowe komórki macierzyste prawdopodobnie podlegają podobnej regulacji w swoim mikrootoczeniu. Wykazano, że CSC nowotworu jelita grubego, aby zachować sprawny szlak sygnałowy Wnt (odpowiedzialny m.in. za różnicowanie i proliferację), wymagają jednocześnie stymulacji przez czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor - HGF) wydzielany przez komórki mezenchymalne. Potwierdza to wpływ komórek obecnych w lokalnym otoczeniu guza na zachowanie zdolności onkogenezy przez komórki nowotworowe. Nisze CSC położone są zazwyczaj w obrębie naczyń krwionośnych, co umożliwia późniejsze przerzutowanie komórek nowotworowych. Mikrootoczenie może utrzymywać CSC nie tylko w stanie komórek macierzystych (ryc. 1, pkt. 1), ale także wpływać bezpośrednio na odróżnicowywanie komórek prawidłowych do nowotworowych CSC (ryc. 1, pkt. 2) oraz indukować przemianę komórek nabłonka w mezenchymy (epithelial to mesenchymal transition – EMT), co prowadzi do późniejszego przerzutowania (ryc.1, pkt. 3) [7]. Podejrzewa się, że osiedlenie komórek przerzutuujących do innych organów może być poprzedzone utworzeniem nowej, pierwotnej niszy w miejscu przerzutu, która umożliwi inicjację i rozrost wtórnych guzów w innych tkankach.

Szczegółowa rola niszy w kontroli i regulacji funkcji nowotworowych komórek macierzystych jest jednak wciąż niewyjaśniona [12].

Wiadomo, że geny odpowiedzialne za kierowanie komórki na drogę samoodnawiania, a nie różnicowania, są

potencjalnymi onkogenami. Przykładem może być gen *Bmi1*, pełniący ważną rolę w syntezie czynników transkrypcyjnych i represji epigenetycznej. Udowodniono, że prawidłowe komórki macierzyste neuronów mogą zachować swoją odrębność i zdolności do samoodnawiania jedynie wtedy, gdy *Bmi1* powoduje represję genów odpowiedzialnych za promocję różnicowania lub śmierci komórki [18]. W ten sam sposób guzy mogą być utrzymywane przez populację komórek nowotworowych o właściwościach komórek macierzystych zdolnych do samoodnowy. W badaniach przeprowadzanych na mysim modelu białaczki wykazano, że obecność genu *Bmi1* jest niezbędna do utrzymania i proliferacji puli CSC. Natomiast w przypadku jego braku komórki nie są zdolne do samoodnawiania i ostatecznie ich proliferacja zanika [27].

Reasumując, CSC mogą podlegać regulacji tymi samymi szlakami molekularnymi jak prawidłowe komórki macierzyste, co niewątpliwie może się przyczynić do nieskutecznej terapii przeciwnowotworowej.

Różnicą między CSC a zwykłymi komórkami macierzystymi jest częstość ich występowania. Inaczej niż zwykle komórki macierzyste, obecne w tkance w bardzo małych ilościach, CSC stanowią dość znaczną populację komórek nowotworowych. Oszacowano, że w guzie piersi, domniemane nowotworowe komórki macierzyste o fenotypie CD24⁻/CD44⁺ stanowią 12–60% wszystkich komórek nowotworowych, natomiast w guzie jelita grubego o fenotypie CD133⁺ 3,8–24,6% [1,19]. Niemniej znane są również doniesienia, że w przypadku nowotworów słabo zróżnicowanych, nowotworowe komórki macierzyste stanowią większość komórek guza [23].

Ponieważ komórki nowotworowe – zależnie od sprzyjających warunków – mogą ewoluować, to te o charakterze zjadliwym oraz mało zróżnicowanym będą wykazywać wzrostową przewagę nad innymi komórkami nowotworu i będą przeważyć w obrębie guza. Stąd też w procesie progresji nowotworu granica między nowotworowymi komórkami macierzystymi a resztą komórek może się zacierać, a nawet zanikać. Współczesna nauka nie dysponuje uniwersalnym markerem CSC. Potwierdzono to wielokrotnie, na przykład w badaniach nad nowotworowymi komórkami macierzystymi glejaka, które wykazują tak fenotyp CD133⁺, jak i CD133⁻, zależnie od analizowanej części guza [5]. Podobną genetyczną dywergencję wykazano dla macierzystych komórek nowotworu piersi o fenotypie CD24⁻/CD44⁺ i CD24⁺/CD44⁻. Dane te mogą wskazywać zarówno na znany fakt genetycznej heterogenności nowotworów, jak i istnienie ciągłej selekcji najlepiej przystosowanych do danego środowiska komórek [34].

4. NOWOTWOROWE KOMÓRKI MACIERZYSTE A PROCES NOWOTWORZENIA

Powszechnie uważa się, że onkogeneza jest inicjowana w zdrowych komórkach macierzystych danej tkanki lub też komórkach progenitorowych, powstałych z komórek macierzystych. Istniejące w nich gotowe mechanizmy samoodnawiania zapewniają im długowieczność w danej niszy. Co więcej, komórka będąca częścią stale odnawiającej się populacji, po oddzieleniu od niszy, może się stać początkiem guza nowotworowego. Hipoteza inicjacji

nowotworzenia z komórek macierzystych znalazła eksperymentalne potwierdzenie w przypadku takich nowotworów, jak chroniczna białaczka szpikowa czy mięsak Ewinga. Odkryto jednak, że białaczki mogą się rozwijać również z bardziej zróżnicowanych komórek progenitorowych, które na nowo nabyły zdolności samoodnawiania. Wysunięto hipotezę o możliwości istnienia alternatywnego modelu powstawania CSC, pochodzących od komórek bardziej zróżnicowanych [2].

W zdrowym organizmie prawidłowe komórki macierzyste pozostają w ścisłej zależności od swojego otoczenia złożonego z innych komórek, tworzących tzw. niszę. Zazwyczaj komórki niszy regulują szlaki metaboliczne komórek macierzystych i niejako zabezpieczają przed ich niekontrolowanym wzrostem. Istnieją jednak drogi, na których naturalne bariery mogą zostać przełamane i rozpocznie się proces nowotworzenia [12]:

- Ekspansja komórek niszy

Mutacje onkogenne nagromadzone w komórkach niszy lub bezpośrednio w samych komórkach macierzystych przyczyniają się do zwiększenia populacji komórek niszy. Stymuluje to również wzrost nieprawidłowych, nowotworowych komórek macierzystych.

- Zasiedlenie nowej niszy

CSC z mutacjami onkogennymi uzyskują zdolność zasiedlenia odmiennego środowiska, co prowadzi do inwazji lokalnych tkanek i tworzenia przerzutów, przy czym nowa nisza dostarcza im sygnałów niezbędnych do samoodnawiania.

- Uniezależnienie od niszy

Genetyczne zmiany w CSC uniezależniają je od pierwotnego mikrośrodowiska i pozwalają na autonomiczne podziały oraz samoodnawianie. Takie uniezależnienie od własnej niszy jest prawdopodobnie przyczyną złośliwienia pierwotnie łagodnych zmian nowotworowych.

- Zaburzenia w procesie różnicowania

Mutacje w częściowo już zróżnicowanej komórce progenitorowej powodują, że nabywa ona właściwości komórki macierzystej i samoodnawiania.

5. IDENTYFIKACJA NOWOTWOROWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

5.1 Markery nowotworowych komórek macierzystych

Nowotworowe komórki macierzyste są bardzo często perspektywnie izolowane na podstawie ekspresji określonych markerów. Najczęściej są to cząsteczki występujące na powierzchni komórek należące do grupy CD (cluster of differentiation), jak choćby popularny marker CD133. Analizie poddawane są także stężenia enzymów cytotekcyjnych, np. dehydrogenazy aldehydowej ALDH lub poziom ekspresji transporterów z grupy ABC, pełniących główną rolę w oporności wielolekowej [17]. Jak dotąd nie znaleziono uniwersalnego markera, na podstawie obecności którego można byłoby zidentyfikować CSC każdego nowotworu (tabela 1) [2].

Tabela 1. Główne markery definiujące ludzkie nowotworowe komórki macierzyste

Marker	Przykłady nowotworów	Opis funkcji
CD24	trzustki	sjałoglikoproteina; ligand dla P-selektyny; umożliwia komórkom przyłączanie się do płytek krwi i tworzenie zakrzepu chroniącego komórki nowotworowe w krążącej krwi podczas inwazji
CD44	piersi, jelita grubego, żołądka, głowy i szyi, wątroby, jajnika, trzustki, gruczołu krokowego	glikoproteina występująca na powierzchni komórek, łączy się z hialuronianem; często występuje w różnych izoformach
CD90	ostra białaczka T limfoblastyczna	synonim: Thy-1. Białko zakotwiczone w glikozylofosfatydoilinozytolu
CD105	nerek	białko integralne błonowe typu 1
CD117	jajnika	synonim: protoonkogen <i>c-kit</i> . Receptor czynnika wzrostu mastocytów/komórek macierzystych
CD133	ostra białaczka B limfoblastyczna dzieci; jelita grubego, endometrium, wątroby, płuc, kości, jajnika, trzustki, gruczołu krokowego, mięsak Ewinga	synonim: prominina 1, białko błony plazmatycznej występujące w błonie plazmatycznej. Przeciwciała wykrywają dwa odmienne glikozylowane epitopy, z czego CD133/2 jest częściej wykorzystywany. Ekspresja CD133 jest zależna od fazy cyklu komórkowego
CD166	jelita grubego	cząsteczka adhezyjna zaktywowanych leukocytów (activated leukocyte cell adhesion molecule -ALCAM)
ALDH	piersi, jelita grubego, głowy i szyi, kości	nadrodzina genów ALDH kodująca enzymy detoksyfikujące. Wysoka ekspresja ALDH może utrudniać eradykację guza nowotworowego
Bmi1	mózgu, białaczka	białko Polycomb, supresor genów <i>ink4a</i> oraz <i>arf</i>
EpCam	jelita grubego, trzustki	glikozylowane białko błonowe integralne typu 1; zaangażowane w szlak sygnałowy Wnt stymulujący m.in. proliferację komórek
$\alpha 2\beta 1$	piersi, gruczołu krokowego	integryna, białko błonowe pośredniczące m.in. w procesach adhezji, migracji i różnicowania
β -katenina	gruczołu krokowego, żołądka, piersi	podjednostka kompleksu białkowego kadheryny, integralny komponent szlaku Wnt

5.2 Metody stosowane do identyfikacji i izolowania nowotworowych komórek macierzystych

5.2.2. Metody *in vitro*

- Populacja poboczna (side population – SP)

Jednym ze sposobów wyodrębniania populacji komórek nowotworowych jest uzyskiwanie populacji pobocznej, w której barwniki fluorescencyjne nie są akumulowane. W metodzie tej komórki macierzyste wykazują podwyższoną ekspresję białek oporności wielolekowej o zdolności aktywnego transportu związków poza obręb komórki – transporterów ABCB1 (glikoproteiny P) i ABCG2. Fluorescencyjne związki, takie jak Hoechst 33342 lub DyeCycle Violet, będące substratami tych białek są aktywnie wypompowywane z komórki i taka populacja wykazuje niewielką fluorescencję po wzbudzeniu w świetle lasera. Dla odróżnienia, w komórkach prawidłowych niebędących macierzystymi, o niskiej ekspresji powyższych białek, Hoechst 33342 efektywnie wnika do wnętrza komórki i interkaluje między pary zasad w DNA, co skutkuje wysokimi wartościami fluorescencji [3].

- Cytometria przepływową (fluorescence activated cell sorting – FACS)

Metoda FACS umożliwia sortowanie heterogennej mieszaniny komórek w oparciu o charakterystykę fluorescencji

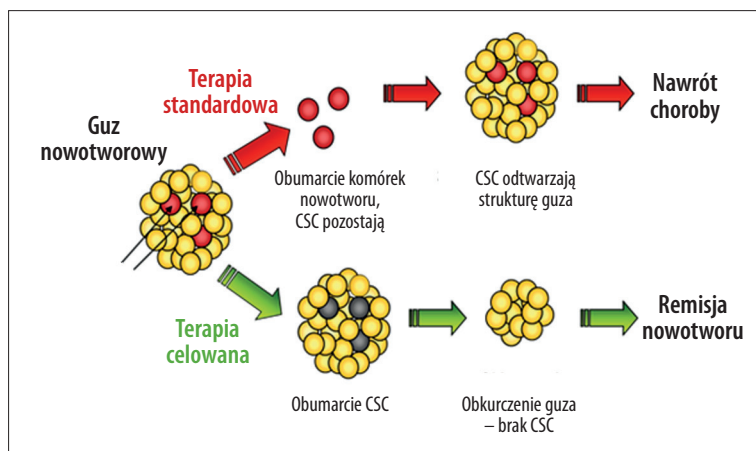
i załamania światła. W izolowaniu CSC najczęściej stosuje się kilka swoistych przeciwciał monoklonalnych przeciwko charakterystycznym dla danej tkanki markerom skoniugowanym z różnobarwnymi fluoroforami. Dzięki precyzyjnej selekcji otrzymanych wyników można nie tylko dokonać pozytywnej, bądź negatywnej selekcji wybranych komórek, ale także oddzielić je od pozostałych, otrzymując w ten sposób jednorodną populację [13].

- Klonowanie z pojedynczej komórki (single cell cloning)

Metoda ta polega na uzyskiwaniu klonów z pojedynczych komórek nowotworowych, zróżnicowanych pod względem morfologicznym. Udowodniono, że z trzech rodzajów klonów: holo-, mero- i paraklonów, to właśnie holoklonny utworzone są z komórek podobnych do macierzystych, wykazujących ekspresję takich markerów, jak CD44 lub β -katenina, które w doświadczeniach *in vivo* generowały guzy nowotworowe [42].

5.2.3. Metody *in vivo*

Badania *in vivo* nad komórkami macierzystymi, w tym również nowotworowymi, przeprowadzane są najczęściej na zwierzęcym modelu z użyciem myszy o obniżonej odpowiadzi immunologicznej, nazywanych też skrótem NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient). I tak, u zwierząt z nabytą cukrzycą, które mają zwiększoną



Ryc. 2. Zasada działania standardowej i celowanej terapii przeciwnowotworowej (na podstawie: <http://www.stemline.com>)

skłonność do chorób nowotworowych, wprowadzenie dodatkowej recesywnej mutacji na chromosomie 16 powoduje upośledzenie rozwoju limfocytów T i B oraz komórek NK [8]. Takie mutanty stanowią szeroko wykorzystywany i wiarygodny model zarówno w badaniach nad komórkami macierzystymi, jak i w immunologii, onkologii czy transplantologii.

Standardem w testach funkcjonalnych CSC *in vivo* jest test onkogenezy u myszy NOD/SCID. Najczęściej jest on poprzedzony opisanym już wcześniej testem selekcji klonów *in vitro*, gdzie ludzkie komórki nowotworowe pochodzące najczęściej z biopsji z guza hodowane są w małym zagęszczeniu tworząc charakterystyczne sfery zwane holo-, para- lub meroklonami. Do uzyskanych kolonii dodaje się przeciwciała monoklonalne, zwykle przeciwko markerowi powierzchniowemu CD133. Komórki pozytywne CD133⁺ są następnie kilkakrotnie pasażowane i namnażane, odtwarzając pierwotne kolonie z jakich pochodzą. Tak wyselekcjonowane populacje są poddawane ksenotransplantacji, czyli wszczepieniu do organizmu o innym pochodzeniu niż dawca komórek. Ponieważ organizmami takimi są zwierzęta laboratoryjne z upośledzoną odpowiedzią systemu immunologicznego, możliwa jest ocena rozwoju guza nowotworowego bez ryzyka odrzucenia przeszczepu [2]. Początkowo sądzono, że CSC występują w guzach nowotworowych w niewielkiej liczbie, ponieważ wygenerowanie potomnego guza po ksenotransplantacji do laboratoryjnych myszy wymagało wykorzystania bardzo dużej liczby ludzkich komórek nowotworowych. Okazało się jednak, że ludzkie komórki inaczej zachowują się w organizmie odmiennego gatunku, czyli w środowisku niekompatybilnym immunologicznie. Badania przeprowadzone tylko w obrębie jednego gatunku, np. myszy, wskazują na wręcz odwrotną zależność – częste występowanie nowotworowych komórek macierzystych w guzach nowotworowych. Wykazano, że zaledwie 10 mysich komórek nowotworowych CSC chłoniaka i ostrej białaczki szpikowej (AML), po transplantacji do innego, immunologicznie i histokompatybilnego organizmu jest w stanie utworzyć guz [22]. Wyniki badań nad częstością występowania CSC w guzach nowotworowych wyraźnie wskazują na zależność indukowania guza od środowiska immunologicznego biorcy. Środowisko, w którym nie występują komórki naturalnych killers (NK) jest szczególnie sprzyjające rozwojowi guzów nowotworowych: na 254 transplantacje pojedynczych komórek nowotworowych aż 27% zakończyło się rozwojem guza nowotworowego [31].

Reasumując, w praktyce metody *in vitro* i *in vivo* często są stosowane kolejno [40], uzupełniane diagnostyką laboratoryjną. Na przykład nowotworowe linie komórkowe często bada się wstępnie pod względem ekspresji najpopularniejszych markerów dla CSC, takich jak CD133, CD44 czy CD24 wykorzystując metodę FACS, a następnie ich zdolność do onkogenezy jest porównywana w testach *in vivo* u myszy NOD/SCID [25].

6. NOWE STRATEGIE TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Skuteczna terapia przeciwnowotworowa powinna zwalczać zarówno zróżnicowane komórki guza, jak i populację nowotworowych komórek macierzystych. Konwencjonalne, powszechnie stosowane strategie, takie jak chemio-, radio- czy immunoterapia mogą jedynie unieszkodliwiać szybko rosnące, zróżnicowane komórki nowotworowe (ryc. 2). Skutkują one zatem redukcją masy guza, ale nie zwalczają komórek mogących inicjować jego powstawanie. W rezultacie, po kilku miesiącach może nastąpić nawrót choroby, a pozostałe komórki nowotworowe wykazują większą inwazyjność i oporność na leki, co jest negatywnym prognostykiem dalszej terapii.

Do skonstruowania swojej chemioterapii niezbędna jest szczegółowa identyfikacja markerów nowotworowych komórek macierzystych. Idea celowanego i selektywnego leczenia skierowanego przeciwko wybranym komórkom nowotworowym wywołuje wiele entuzjazmu w świecie medycznym, niestety wciąż brakuje wiarygodnych danych pozwalających na wprowadzenie takiego leczenia u ludzi. Nowe strategie terapeutyczne opierają się najczęściej na blokowaniu kaskad sygnałowych zaangażowanych w proces samoodnawiania nowotworowych komórek macierzystych i jednocześnie zatrzymywania wzrostu zróżnicowanych komórek nowotworu. W tym celu stosuje się np. niskocząsteczkowe związki lub swoiście działające przeciwciała, które mogą doprowadzić nie tylko do redukcji całkowitej masy guza, ale i eradykacji puli nowotworowych komórek macierzystych. Przykładem takiej nowatorskiej terapii może być zastosowanie mieszaniny docetakselu, standardowego cytostatyku z grupy antracyklin i jabłczanu sunitinibu (SU11248), związku oddziałującego na czynniki wzrostu VEGF-1, PDGF- α oraz β /KIT/FLT-3, którą testowano w ksenoprzeszczepach raka gruczołu krokowego PC-3 u myszy [16]. Obiecujące dla nowych terapii wydają się również nowe klasy cząsteczek peptydowych, np. E4orf4

[9] czy brewininy 2R (brevinin-2R) [15], które wykazują zdolności do półswoistego zabijania komórek nowotworowych, a nawet „przekierowywania” wybranych szlaków komórkowych na promowanie śmierci komórki zamiast jej proliferacji [24]. W eksperymentalnej terapii nowotworu piersi zastosowano leczenie wykorzystujące modyfikowane, polimeryczne, pegylowane micelle zawierające paklitaksel oraz salinomycynę. Udowodniono, że strategia taka eliminuje komórki nowotworowe wraz z CSC znacznie skuteczniej niż konwencjonalne leczenie [43]. Ponieważ wiele typów nowotworów wykazuje swoiste profile ekspresji mikroRNA, podejmowane są także próby terapii z zastosowaniem tych cząsteczek [20]. W glejakach, transfekcja macierzystych komórek nowotworowych mikroRNA-124 oraz mikroRNA-137 skutkuje zatrzymaniem cyklu komórkowego i dalszym różnicowaniem komórek o fenotypie CD133⁺ [35]. W innym modelu wykazano, że mikroRNA-34 powoduje inhibicję samoodnawiania nowotworowych komórek macierzystych w trzustce o fenotypie CD44⁺/CD133⁺ zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* [2,25]. Inne strategie terapeutyczne mogą zakładać zatrzymanie inwazji i procesu przerzutowania przez blokowanie integryn lub markera CD44 na powierzchni komórki nowotworowej [3].

7. NIEĆCISŁOŚCI I WĄTPLIWOŚCI TOWARZYSZĄCE ISTNIENIU NOWOTWOROWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Testy wykorzystujące ksenotransplantację dostarczyły dowodów potwierdzających istnienie nowotworowych komórek macierzystych. Powstaje jednak zasadnicze pytanie: na ile realistycznym modelem rozwoju nowotworów ludzkich są ksenoprzeszczepy u myszy z upośledzoną odpornością? Wiadomo, że przeszczepione ludzkie komórki nowotworowe, aby rosnąć i utworzyć guz muszą najpierw zaadaptować się do obcego środowiska. Możliwe, że to właśnie zdolności adaptacji komórek do nowego otoczenia, a nie ich zakodowane możliwości onkogenezy, odgrywają główną rolę w procesie wzrostu guza.

Niektóre badania wykorzystujące transgeniczne myszy jako modele białaczek wskazują, że zarówno komórki nowotworowe o fenotypie komórek macierzystych, jak i niemające takich cech są w stanie indukować proces nowotworowy u myszy „biorców” [22]. Powyższe wyniki mogą być tłumaczone przypuszczeniem, że modele ksenoprzeszczepów zawierają więcej komórek inicjujących guz niż pierwotnie sądzono. Szczególnie w przypadkach guzów litych, komórki nowotworowe wymagają sąsiedztwa komórek śródbłonna i fibroblastów oraz wydzielanych przez nie czynników parakrynych. Ludzkie komórki nowotworowe przeszczepione do obcego organizmu są pozbawione takiego otoczenia, muszą więc – do właściwego wzrostu – rekrutować mysie zdrowe komórki śródbłonna i macierzy pozakomórkowej. Przeszczepiając tę samą frakcję ludzkich komórek

nowotworowych do różnych rejonów organizmu myszy zaobserwowano, że nie w każdej części ciała powstaje guz. Z kolei suplementacja tych samych przeszczepów zdrowymi komórkami macierzy pozakomórkowej, śródbłonna lub mezenchymalnymi znacznie zwiększa prawdopodobieństwo nowotworzenia. Rodzi się więc pytanie, który z powyższych wyników badań odzwierciedla i obrazuje prawdziwą zdolność onkogenezy komórek nowotworowych [34].

Kolejną niedogodnością w stosowaniu mysiego modelu jest to, że organizmy zwierząt laboratoryjnych z upośledzoną odpornością nie mają limfocytów ani makrofagów – komórek, które odgrywają ważną rolę w procesach angiogenezy, metastazy i wzrostu guza. Chociaż badania nad ulepszeniem mysich modeli do ksenotransplantacji wciąż trwają, możliwe, że nigdy nie będą w stanie w pełni odzwierciedlać złożoności procesu nowotworowego człowieka.

Istnienie CSC zakłada, że tylko komórki o charakterze macierzystych mają zdolności do samoodnawiania, natomiast pozostałe komórki nowotworowe – jeśli nie są zastępowane przez nowe – wymierają. Według tego założenia, zmiany genetyczne mogą akumulować się wyłącznie w komórkach macierzystych, podczas gdy reszta komórek nowotworowych uważana jest za zróżnicowane i ukształtowane ewolucyjnie. Głównym problemem powyższej hipotezy jest implikowanie stabilności genetycznej w obrębie guza oraz odrzucenie możliwości nabywania fenotypu komórek macierzystych przez bardziej zróżnicowane komórki nowotworowe, co udowodniono w przypadku zróżnicowanych komórek nowotworowych z nabytą mutacją w obrębie genu β -kateniny [38] lub po aktywacji czynnika transkrypcyjnego FOXC2 [4].

Kolejną nieścisłością teorii istnienia CSC jest założenie, że nowotworowe komórki macierzyste od początku wykazują oporność na leczenie i tylko eliminacja ich komórek progenitorowych zapewni terapeutyczny sukces. Komórki progenitorowe powinny więc pozostać wrażliwe na chemioterapię przez cały okres jej trwania, dopóki nie pojawi się oporność. Założenie to – jak wiemy – jest oczywiście błędne, ponieważ jednym z markerów CSC jest podwyższona ekspresja białek oporności wielolekowej ABCB1 czy ABCG2 [29,33].

Zwolennicy istnienia CSC sugerują, że mogą one również ewoluować i nabywać genetyczne zmiany zależne od presji środowiskowej w organizmie, co jest sprzeczne z naszą wiedzą o zróżnicowaniu i genetycznej niestabilności nowotworów. Rozwiązanie zagadki procesu nowotworzenia, w tym istnienia nowotworowych komórek macierzystych, bez wątplenia stanowi jeden z priorytetów współczesnej medycyny, który powinien się przyczynić do udoskonalenia standardowej terapii onkologicznej.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 3983–3988
- [2] Alison M.R., Islam S., Wright N.A.: Stem cells in cancer: instigators and propagators? *J. Cell Sci.*, 2010; 123: 2357–2368
- [3] Alison M.R., Lim S.M., Nicholson L.J.: Cancer stem cells: problems for therapy? *J. Pathol.*, 2011; 223: 147–161

- [4] Battula V.L., Evans K.W., Hollier B.G., Shi Y., Marini F.C., Ayyanan A., Wang R.Y., Briskin C., Guerra R., Andreeff M., Mani S.A.: Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2010; 28: 1435–1445

- [5] Beier D., Hau P. Proescholdt M., Lohmeier A., Wischhusen J., Oefner P.J., Aigner L., Brawanski A., Bogdahn U., Beier C.P.: CD133⁺ and CD133⁻ glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.*, 2007; 67: 4010–4015
- [6] Bishop J.: Wczesny rozwój zarodkowy. W: Ssaki transgeniczne. Red: Krystyna Kruczyńska, Irena Zienkiewicz. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001: 45–48
- [7] Borovsky T., De Sousa E Melo F., Vermeulen L., Medema J.P.: Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.*, 2011; 71: 634–639
- [8] Bosma G.C., Davison M.T., Ruetsch N.R., Sweet H.O., Shultz L.D., Bosma M.J.: The mouse mutation severe combined immune deficiency (SCID) is on chromosome 16. *Immunogenetics*, 1989; 29: 54–57
- [9] Brestovitsky A., Sharf R., Mittelman K., Kleinberger T.: The adenovirus E4orf4 protein targets PP2A to the ACF chromatin-remodeling factor and induces cell death through regulation of SNF2h-containing complexes. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: 6414–6427
- [10] Calvi L.M., Adams G.B., Weibrecht K.W., Weber J.M., Olson D.P., Knight M.C., Martin R.P., Schipani E., Divieti P., Bringhurst F.R., Milner L.A., Kronenberg H.M., Scadden D.T.: Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 2003; 425: 841–846
- [11] Chhabra P., Brayman K.L.: Current status of immunomodulatory and cellular therapies in preclinical and clinical islet transplantation. *J. Transplant.*, 2011; 2011: 1155–1179
- [12] Clarke M.F., Fuller M.: Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, 2006; 124: 1111–1115
- [13] Davidson College, Davidson, Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Department of Biology, <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/FACS.html> (03.01.2012)
- [14] Fang D., Nguyen T.K., Leishear K., Finko R., Kulp A.N., Hotz S., Van Belle P.A., Xu X., Elder D.E., Herlyn M.: A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.*, 2005; 65: 9328–9337
- [15] Ghavamli S., Asoodeh A., Klonisch T., Halayko A.J., Kadkhoda K., Krocak T.J., Gibson S.B., Booy E.P., Naderi-Manesh H., Los M.: Brevinin-2R(1) semi-selectively kills cancer cells by a distinct mechanism, which involves the lysosomal-mitochondrial death pathway. *J. Cell. Mol. Med.*, 2008; 12: 1005–1022
- [16] Guérin O., Formento P., Lo Nigro C., Hofman P., Fischel J.L., Etienne-Grimaldi M.C., Merlano M., Ferrero J.M., Milano G.: Supra-additive antitumor effect of sunitinib malate (SU11248, Sutent[®]) combined with docetaxel. A new therapeutic perspective in hormone refractory prostate cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2008; 134: 51–57
- [17] Hang D., Dong H.C., Ning T., Dong B., Hou D.L., Xu W.G.: Prognostic value of the stem cell markers CD133 and ABCG2 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis. Esophagus*, 2012 (w druku)
- [18] Jacobs J.J., Kieboom K., Marino S., DePinho R.A., van Lohuizen M.: The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*, 1999; 397: 164–168
- [19] Jensen J.B., Parmar M.: Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol. Neurobiol.*, 2006; 34: 153–161
- [20] Ji Q., Karnak D., Hao P., Wang R., Xu L.: No small matter: microRNAs – key regulators of cancer stem cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2010; 3: 84–87
- [21] Jung Y.W., Hysolli E., Kim K.Y., Tanaka Y., Park I.H.: Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: prospects for novel therapies. *Curr. Opin. Neurol.*, 2012; 25: 125–130
- [22] Kelly P.N., Dakic A., Adams J.M., Nutt S.L., Strasser A.: Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*, 2007; 317: 337–345
- [23] Kern S.E., Shibata D.: The fuzzy math of solid tumor stem cells: a perspective. *Cancer Res.*, 2007; 67: 8985–8988
- [24] Klonisch T., Wiehac E., Hombach-Klonisch S., Ande S.R., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K., Los M.: Cancer stem cell markers in common cancers – therapeutic implications. *Trends Mol. Med.*, 2008; 14: 450–460
- [25] Lee H.J., You D.D., Choi D.W., Choi Y.S., Kim S.J., Won Y.S., Moon H.J.: Significance of CD133 as a cancer stem cell markers focusing on the tumorigenicity of pancreatic cancer cell lines. *J. Korean Surg. Soc.*, 2011; 81: 263–270
- [26] Lenaerts L., De Clercq E., Naesens L.: Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Rev. Med. Virol.*, 2008; 18: 357–374
- [27] Lessard J., Sauvageau G.: Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*, 2003; 423: 255–260
- [28] Mitsuyasu R.T., Zack J.A., Macpherson J.L., Symonds G.P.: Phase I/II clinical trials using gene-modified adult hematopoietic stem cells for HIV: lessons learnt. *Stem Cells Int.*, 2011; 2011: 393698 (w druku)
- [29] Nakanishi T., Ross D.D.: Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin. J. Cancer*, 2012; 31: 73–99
- [30] Papailiou J., Bramis K.J., Gazouli M., Theodoropoulos G.: Stem cells in colon cancer. A new era in cancer theory begins. *Int. J. Colorectal Dis.*, 2011; 26: 1–11
- [31] Quintana E., Shackleton M., Sabel M.S., Fullen D.R., Johnson T.M., Morrison S.J.: Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 2008; 456: 593–598
- [32] Reddy N., Greer J.P., Goodman S., Kassim A., Morgan D.S., Chinratanalab W., Brandt S., Englehardt B., Oluwole O., Jagasia M.H., Savani B.N.: Consolidative therapy with stem cell transplantation improves survival of patients with mantle cell lymphoma after any induction regimen. *Exp. Hematol.*, 2012; 40: 359–366
- [33] Schumacher U., Nehmann N., Adam E., Mukthar D., Slotki I.N., Horny H.P., Flens M.J., Schlegelberger B., Steinemann D.: MDR-1 overexpression in HT 29 colon cancer cells grown in SCID mice. *Acta Histochem.*, 2012; 114: 594–602
- [34] Shipitsin M., Polyak K.: The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Lab. Invest.*, 2008; 88: 459–463
- [35] Silber J., Lim D.A., Petritsch C., Persson A.I., Maunakea A.K., Yu M., Vandenberg S.R., Ginzinger D.G., James C.D., Costello J.F., Bergers G., Weiss W.A., Alvarez-Buylla A., Hodgson J.G.: miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.*, 2008; 6: 1–17
- [36] Spradling A., Drummond-Barbosa D., Kai T.: Stem cells find their niche. *Nature*, 2001; 414: 98–104
- [37] Stem Cell Information: The National Institutes of Health resource for stem cell research. <http://stemcells.nih.gov/info> (15.02.2012)
- [38] Varnat F., Duquet A., Malerba M., Zbinden M., Mas C., Gervaz P., Altaba A.R.: Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol. Med.*, 2009; 1: 338–351
- [39] Wang J.C., Dick J.E.: Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.*, 2005; 15: 494–501
- [40] Woodward W.A., Sulman E.P.: Cancer stem cells: markers or biomarkers? *Cancer Metastasis Rev.*, 2008; 27: 459–470
- [41] Yamashita Y.M., Jones D.L., Fuller M.T.: Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science*, 2003; 301: 1547–1550
- [42] Zhang K., Waxman D.J.: PC3 prostate tumor-initiating cells with molecular profile FAM65Bhigh/MFI2low/LEF1low increase tumor angiogenesis. *Mol. Cancer*, 2010; 9: 319–327
- [43] Zhang Y., Zhang H., Wang X., Wang J., Zhang X., Zhang Q.: The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles. *Biomaterials*, 2012; 33: 679–691

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.