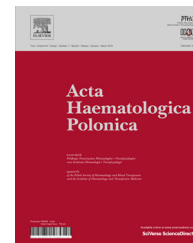




Contents lists available at ScienceDirect

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Praca poglądowa/Review

Białaczkowe komórki macierzyste

Leukaemic stem cells



Maria Cioch*, Karolina Radomska

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Kierownik: Dr hab. med. Marek Hus, Lublin, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 18.03.2014

Zaakceptowano: 01.04.2014

Dostępne online: 13.04.2014

Słowa kluczowe:

- ostra białaczka szpikowa
- białaczkowe komórki macierzyste
- cele terapeutyczne

Keywords:

- Acute myeloid leukaemia
- Leukaemic stem cells
- Therapeutic targets

ABSTRACT

Acute myeloid leukaemia (AML) is a neoplasm originating in early haematopoietic progenitor cells. Each AML clone contains a subpopulation of leukaemic stem cells (LSCs). LSCs have the capacity to repopulate AML in NOD/SCID mice and regrow leukaemia in patients after remission period. LSCs are characterized by CD34+CD38-Lin-CD33+/-CD123+ immunophenotype. The currently available data show that LSCs play a pivotal role in drug resistance. Many studies and clinical trials are being conducted to eradicate LSCs using different forms of target therapy.

© 2014 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

Ostre białaczki szpikowe (Acute Myeloid Leukaemia; AML) stanowią heterogenną grupę chorób wywodzących się z nowotworowo transformowanych komórek macierzystych, prekursorowych lub ukierunkowanych liniowo szpiku, które pod postacią komórek blastycznych naciekają szpik, krew i inne tkanki [1]. W ostatnich latach zwrócono uwagę na fakt, że w każdym przypadku AML populacja komórek białaczkowych jest zróżnicowana pod względem stopnia dojrzałości, a szczególną rolę w samoodnawianiu nowotworu odgrywają białaczkowe komórki macierzyste (Leukaemic Stem Cells; LSCs) [2]. U każdego chorego na AML klon białaczkowy zorganizowany jest w sposób hierarchiczny na wzór prawidłowej hematopoezy. Na szczycie tej hierarchii są LSCs, jako jedyne komórki mające zdolność utrzymania

długoterminowego wzrostu białaczki [3, 4]. Lapidot i wsp. pierwsi dokonali opisu LSCs jako komórek inicjujących rozwój białaczki po ksenogenicznym przeszczepieniu do organizmu myszy z ciężkim niedoborem odporności (SCID) [5]. Doświadczenie Lapidot i wsp. w późniejszym czasie zostało udoskonalone na modelu myszy NOD/SCID [3].

Modele udziału macierzystych komórek białaczkowych w leukemogenezie

Model hierarchiczny leukemogenezy nie jest jedynym obowiązującym. Poza nim znane są jeszcze dwa inne: najstarszy stochastyczny i najnowszy „model niszy”. Model

* Adres do korespondencji: Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ul Staszica 11, 20-81 Lublin, Polska. Tel.: +48 815345468.

Adres email: mariacioch@wp.pl (M. Cioch).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2014.04.002>

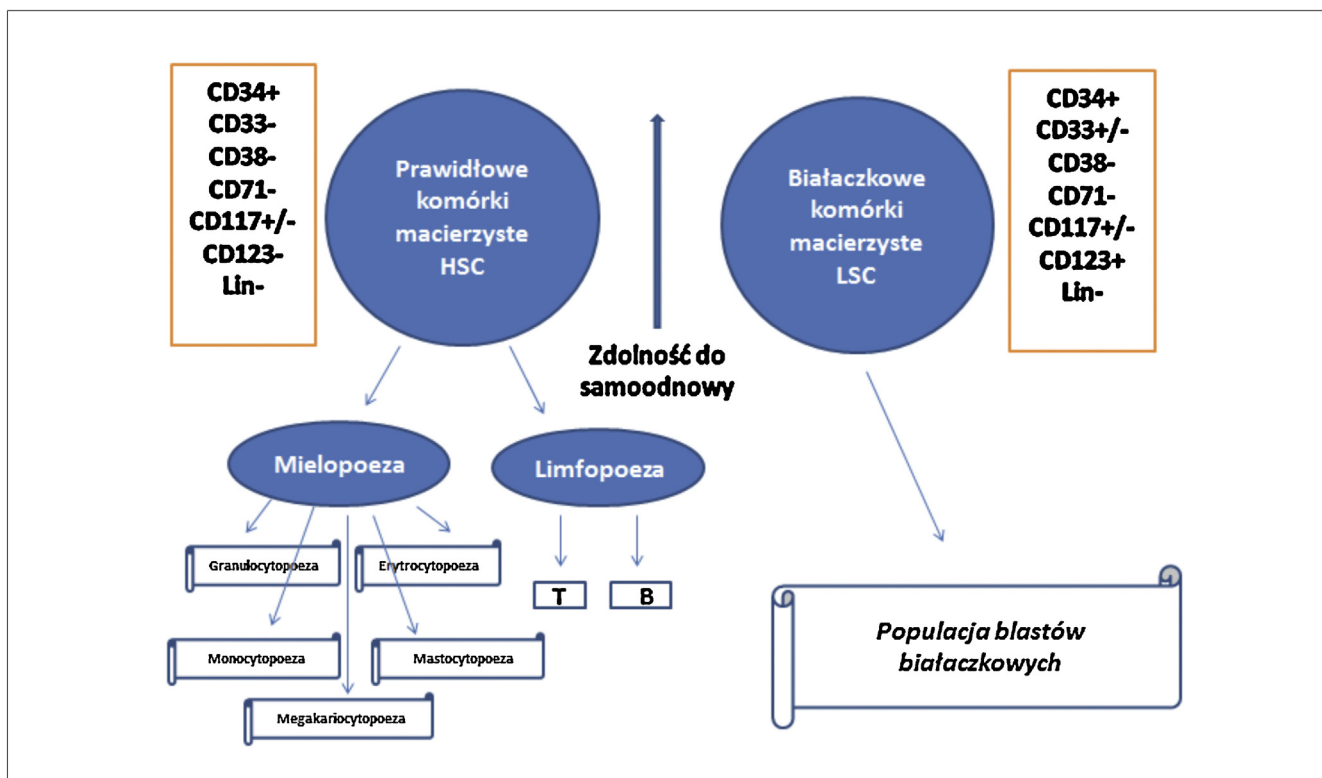
0001-5814/© 2014 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

hierarchiczny oparty jest na idei, że właściwości pluripotencji i dojrzałości dotyczące tej samej komórki wzajemnie się wykluczają. Białaczkowe komórki macierzyste, podobnie jak ich prawidłowe odpowiedniki, mają zdolność do samoodnowy i wielopotencjalnego rozwoju, natomiast tracą je jako dojrzałe komórki białaczkowe [3]. W stochastycznym modelu każda komórka białaczkowa ma potencjalne zdolności inicjowania leukemogenezy, a zmiana ich właściwości następuje pod wpływem czynników zewnętrznych i wewnętrznych, przyczyniających się do powstania mutacji klonalnej [6]. Ostatnio zaproponowano trzeci model leukemogenezy, zakładający, że dojrzałe komórki białaczkowe mogą „uwstecznić się” do LSCs, podtrzymując w ten sposób proliferację [4]. Zdolność do „cofania się w rozwoju” wykazywać mogą zarówno komórki szpiku, jak i zrębu, uformowane w tzw. nisze [7]. Podobnie jak w przypadku prawidłowej hematopoezy, komórki tworzące populację białaczkową znajdują się w stanie stałej fluktuacji odpowiedzialnej za zmianę fenotypu na bardziej lub mniej dojrzały.

Fenotyp macierzystych komórek białaczkowych

Fenotyp macierzystych komórek białaczkowych ustalono przez analogię do prawidłowych macierzystych komórek krwiotwórczych (Haematopoietic Stem Cells; HSCs). Za powszechny antygen LSCs, podobnie jak HSCs uważany jest antygen CD34. Wykazano jednak, że nie jest on specyficzny tylko dla HSCs i LSCs, a jego ekspresja występuje także na komórkach prekursorowych oraz komórkach endotelialnych

[2, 8]. Stąd też LCSs muszą zostać odróżnione od tych komórek przy użyciu innych markerów powierzchniowych. Od komórek endotelialnych różni je ekspresja antygenu CD45, natomiast od bardziej dojrzałych komórek szpiku LSCs różnią się brakiem specyficznych antygenów liniowych, takich jak: CD2, CD3, CD14, CD15, CD16, CD19, CD24, CD56, CD66b, CD41, glikoforyna A, jak również HLA-DR i CD38. Stąd też powszechnie akceptowanym podstawowym fenotypem LSCs jest: CD34+CD38-Lin- [2]. Komórki o takim fenotypie przeszczepione myszom NOD/SCID wywołują rozwój białaczki. Pojawiły się jednak doniesienia, że rozwój białaczki można także uzyskać, przeszczepiając komórki CD34+CD38+ [9]. Taussing i wsp. wykazali, że rozwój AML w modelu ksenogenicznym można uzyskać, wszczepiając myszom zarówno komórki CD34+CD38-, jak CD34+CD38+, z tym że dawka tych drugich komórek musi być większa [10]. Bardzo istotnym zagadnieniem jest możliwość odróżnienia, a następnie oddzielenia prawidłowych HSCs od LSCs. Jest to konieczne dla przeprowadzenia prawidłowych analiz immunologicznych i genetycznych. Poza tym znalezienie antygenów obecnych na LSCs i nieobecnych na HSCs gwarantuje powodzenie terapii celowanej ukierunkowanej na komórki białaczkowe i oszczędzającej prawidłowe komórki krwiotwórcze. Takim antygenem wydaje się być łańcuch α receptora dla interleukiny 3 (IL3) – CD123 [11]. Jest on nieobecny na HSCs, natomiast często wykrywalny na LSCs. Wykazanie ekspresji antygenu CD33 na wielu klonach LSCs, przy jego braku na HSCs, dało nadzieję na zniszczenie macierzystych komórek białaczkowych przy użyciu przeciwciała monoklonalnego anti-CD33 (Mylotarg) [6, 12, 13]. Wydaje się więc, że immunofenotyp



Ryc. 1 – Immunofenotyp krwiotwórczych i białaczkowych komórek macierzystych
Fig. 1 – Immunophenotype of haematopoietic and leukaemic stem cells

LSCs można opisać jako: CD34+CD38-Lin-CD33+/-CD123+. Charakterystykę immunofenotypową HSCs i LSCs przedstawia rycina 1.

Znaczenie macierzystych komórek białaczkowych w oporności na leczenie

Standardowym leczeniem pierwszoliniowym u chorych na AML jest schemat cytotatyczny „3+7” (daunorubicyna + cytarabina). Odsetek całkowitych remisji (*Complete Remission*; CR) po tego typu chemioterapii wynosi 50–75%, a 5-letnie przeżycie sięga 40% (*Overall Survival*; OS), nawet przy zastosowaniu wysokodozowanej chemioterapii i transplantacji komórek krwiotwórczych [14, 15]. Przyczyny niepowodzeń należy upatrywać w przetrwaniu w organizmie chorego komórek białaczkowych, opornych na zastosowane leczenie, pod postacią aktywnej białaczki lub choroby resztkowej (*Minimal Residual Disease*; MRD), która staje się źródłem odrodzenia nowotworu. W różnych badaniach klinicznych wykazano, że duży odsetek LSCs w populacji białaczkowej koreluje z niekorzystnym przebiegiem. Witte i wsp. wykazali, że u dzieci chorych na AML odsetek komórek CD34+CD38-CD45-/low powyżej 0,83% wszystkich komórek białaczkowych szpiku koreluje z przeżyciem wolnym od zdarzeń (*Event Free Survival*; EFS, $p = 0.04$) [16]. Wang i wsp. wyróżniają LSCs jako FISH+CD34+CD38-, stwierdzili, że odsetek tych komórek $\geq 1\%$ całej populacji białaczkowej wydłuża zarówno EFS, jak i OS (odpowiednio 0,0018 i 0,0037) [15]. Badania Ran i wsp. wykazały, że duży odsetek LSCs w szpiku chorych na AML jest silniejszym czynnikiem prognostycznym niż zmiany cytogenetyczne [17].

Mechanizmy oporności indukowane przez białaczkowe komórki macierzyste

Przyczyny oporności LSCs na konwencjonalne formy terapii są złożone [6, 13]. Najważniejsze spośród nich to:

- zwiększona ekspresja błonowych białek wielolekowej oporności (*Multidrug Resistance*; MDR, *Breast Cancer Resistance Protein*; BCRP),
- zwiększona ekspresja molekuł adhezyjnych (CD44, CXCR4), decydujących o silniejszym „zagnieżdżeniu się” LSCs w niszach,
- zaburzenia apoptozy (zwiększona aktywność NF- κ B),
- zaburzenia różnicowania i dojrzewania (PML/RAR α)
- zaburzenia ekspresji i funkcji szlaków sygnałowych komórkowych (Wnt, PI3K/Akt/mTOR, TGF-beta/FOXO3a, Rac, Ras, Hedgehog, miRNA),
- zwiększona ekspresja receptorowych kinaz tyrozynowych (BCR/ABL, KIT, FLT3, PDGFR β , FMS).

Dokładne poznanie wyżej wymienionych i innych mechanizmów oporności AML, związanych z LSCs, może przyczynić się do opracowania nowych, skutecznych form terapii chorych na ostre białaczki szpikowe.

Macierzyste komórki białaczkowe jako nowy cel terapii

W poszukiwaniu nowych, efektywnych sposobów leczenia chorych na AML zwrócono się w ostatnich latach ku możliwościom zniszczenia LSCs. Możliwości destrukcyjnego działania na LSCs są różne i te aktualnie dostępne, jak

Tabela I – Cele terapii, związane z macierzystymi komórkami białaczkowymi
Table I – Targets of therapy associated with leukaemic stem cells

Cel terapii	Lek
białka powierzchniowe obecne na LSCs	
1. CD33	przeciwciało monoklonalne anty-CD33 sprzężone z kalicheamycyną (gemtuzumab ozogamicin, mylotarg)
2. białka wielolekowej oporności	cyklosporyna, walspodar, zosuquidar
3. CD123	przeciwciało monoklonalne anty-IL3R sprzężone z toksyną błoniczą interleukina 3 sprzężona z toksyną błoniczą
inhibitory molekuł adhezyjnych (mobilizacja LSCs z niszy)	
1. CD44	przeciwciało monoklonalne anty-CD44
2. CXCR4	pleryksafor, G-CSF
pobudzanie apoptozy	
NF- κ B	partenolid, inhibitory proteasomu
pobudzanie różnicowania	
PML/RAR α	tretynoina (ATRA) trójtlenek arsenu
inhibitory kinazy tyrozynowej	
kinaza tyrozynowa BCR/ABL	imatynib, nilotynib, dazatynib
kinaza tyrozynowa FLT3	inhibitory FLT3 (CEP701- lestaurytinib)
hamowanie szlaków sygnałowych	
białka Hedgehog	inhibitory białek szlaków sygnałowych (cyklopamina, resweratrol)
szlak Wnt	
szlak PI3K/Akt/mTOR	
szlak Rac	
immunoterapia	interferon α komórki dendrytyczne allogeniczna transplantacja komórek krwiotwórczych

i znajdujące się w badaniach klinicznych zestawione zostały w tabeli 1.

Jednym z pierwszych celów terapii związanych z LSCs stał się antygen CD33, obecny na ukierunkowanych liniowo, prekursorowych, ale także często na macierzystych komórkach białaczkowych, a przy tym nieobecny na prawidłowych komórkach krwiotwórczych. Liczne badania kliniczne wykazały, że zastosowanie przeciwciała monoklonalnego anty-CD33, sprzężonego z kalicheamycyną (gemtuzumab ozogamicin, mylotarg), łącznie z chemioterapią indukującą remisję prowadzi do wydłużenia EFS i OS, dzięki eradykacji LSCs u wielu chorych [18, 19, 20]. Przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko innym białkom powierzchniowych, podlegają obecnie badaniom klinicznym. Bardzo obiecująco prezentują się wstępne wyniki leczenia opornych postaci AML interleukiną 3 (IL-3), sprzężoną z toksyną błoniczą, ukierunkowaną na receptor α dla IL-3 [21]. Prowadzone są także doświadczenia na zwierzętach z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko receptorom dla IL-3 i IL-1 [6, 13].

Wydaje się, że dobrym celem związanym z LSCs są białka wielolekowej oporności, w dużym stopniu odpowiedzialne za oporność tych komórek na chemioterapię. Niestety, w większości przypadków zastosowanie inhibitorów MDR łącznie z cytostatykami prowadzi równocześnie do uszkodzenia prawidłowych HSCs, które również wykazują dużą ekspresję białek oporności (cyklosporyna, walspodar). Większe nadzieje na działanie ukierunkowane tylko na LSCs dają inhibitory 3. generacji, które podlegają obecnie badaniom klinicznym (zosuquidar) [1, 22].

Kolejne działania zwiększające możliwości zniszczenia LSCs polegają na ich mobilizacji z niszy komórkowych i tym samym wystawieniu na cel chemioterapii. Silne działanie mobilizujące wywiera pleryksafor, będący inhibitorem wiązania CXCR4 i SDF-1. Lek ten wykorzystywany jest do mobilizacji obwodowych komórek krwiotwórczych w procedurze transplantacji, stąd też u chorych na ostre białaczki powinien być stosowany z dużą ostrożnością i w odpowiedniej sekwencji z chemioterapią. Badania nad skutecznością tego typu terapii są aktualnie prowadzone [23]. Podobne działanie w stosunku do CXCR4 wywiera G-CSF. Metody polegające na „primingu”, tj. uwrażliwianiu komórek białaczkowych na chemioterapię przez wyprzedzające podawanie G-CSF są już w wielu ośrodkach uznanymi formami leczenia [24]. Badane są obecnie także inne inhibitory molekuł adhezyjnych, m.in. przeciwciała monoklonalne anty-CD44 [13].

Z dostępnych form terapii, które mogą doprowadzić do eliminacji LSCs, należy wymienić leki pobudzające różnicowanie komórkowe (tretynoina, trójtlenek arsenu) i inhibitory kinazy tyrozynowej BCR/ABL (TKI: imatynib, dazatynib). O ile wartość tretynoiny jako skutecznego leku u chorych na AML została dobrze udokumentowana, o tyle zastosowanie TKI w chorych na ostre białaczki podlega obecnie intensywnym badaniom [2, 25]. Toczą się także badania nad wartością terapeutyczną inhibitora kinazy tyrozynowej FLT3 – lesataurynibu [26].

Najmniej zaawansowane, ale budzące największe nadziei są badania nad inhibitorami cząstek szlaków sygnałowych, odgrywających istotną rolę w metabolizmie LSCs. Badane są obecnie m.in. inhibitory białek Hedgehog, szlaku PI3K/Akt/

mTOR, Wnt i Rac [13]. Kobune i wsp. w hodowli komórkowej wykazali uwrażliwienie komórek AML CD34+ na cytarabinę pod wpływem cyklopaminy, naturalnej substancji, pozyskiwanej z roślin liliowatych i będącej inhibitorem białek Hedgehog [27]. Podobny efekt hamujący szlak białek Hedgehog w komórkach LSCs w warunkach hodowli wywiera resweratrol [28].

Najbardziej skutecznymi, aktualnie dostępnymi sposobami eradykacji LSCs z organizmu chorego są różne formy immunoterapii: interferon α , komórki dendrytyczne oraz allogeniczna transplantacja szpiku i infuzja limfocytów dawcy poprzez efekt *graft versus leukemia* [29, 30].

Podsumowanie

Badania nad ostrą białaczką szpikową wykazały w ostatnich latach, że kluczową rolę w oporności na standardowe formy terapii odgrywa populacja białaczkowych komórek macierzystych. Działania naukowców idą w kierunku opracowania efektywnych metod identyfikacji i izolacji LSCs, poznania patomechanizmów ich funkcjonowania i przede wszystkim znalezienia skutecznych sposobów ich eradykacji. Coraz liczniejsze publikacje, dotyczące tego tematu formułują bardzo obiecujące wnioski. Wydaje się, że najlepszy skutek odniesie terapia polegająca na równoczesnym atakowaniu wielu celów na powierzchni i wewnątrz LSCs poprzez zastosowanie leków o różnym mechanizmie działania, co zwane jest zaawansowaną terapią celowaną (*Advanced Targeted Drug Therapy*; ATDT).

Wkład autorów/Authors' contributions

Według kolejności.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO/REFERENCES

-
- [1] Cioch M. Różne aspekty diagnostyczne i kliniczne wielolekowej oporności na cytostatyki u chorych na ostre białaczki szpikowe. Rozpr hab Bestprint Lublin 2006; 13-194.

- [2] Sperr WR, Hauswirth AW, Florian L, et al. Human leukaemic stem cells: a novel target of therapy. *Eur J Clin Invest* 2004;34:31-40.
- [3] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-737.
- [4] Passegué E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(Suppl 1):11842-11849.
- [5] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994;367:645-648.
- [6] Thomas X. Targeting leukemia stem cells: The new goal of therapy in adult acute myeloid leukemia. *World J Stem Cells* 2009;1:49-54.
- [7] Li L, Xie T. Stem cell niche: Structure and function. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2005;21:605-631.
- [8] Buss EC, Ho AD. Leukemia stem cells. *Int J Cancer* 2011;129:2328-2336.
- [9] Becker MW, Jordan CT. Leukemia stem cells in 2010: Current understanding and future directions. *Blood Rev* 2011;25:75-81.
- [10] Taussing DC, Miraki-Moud F, Anjos-Afonso F, et al. Anti-CD38 antibody-mediated clearance of human repopulating cells masks the heterogeneity of leukemia-initiating cells. *Blood* 2008;112:568-575.
- [11] Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123 IL-3 receptor alpha chain eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;5:31-42.
- [12] Walter RB, Appelbaum FR, Estey EH, Bernstein ID. Acute myeloid leukaemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood* 2012;119:6198-6208.
- [13] Sy Wong R, Cheong S-K. Leukaemic stem cells: Drug resistance, metastasis and therapeutic implications. *Malaysian J Pathol* 2012;34:77-88.
- [14] Büchner T, Schlenk RF, Schaich M, et al. Acute myeloid leukemia (AML): different treatment strategies versus a common standard arm-combined prospective analysis by the German AML intergroup. *J Clin Oncol* 2012;30:3604-3610.
- [15] Wang L, Gao L, Xu S, et al. FISH+CD34+CD38- cells detected in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients can predict the clinical outcome. *J Hematol Oncol* 2013;6:85-92.
- [16] Witte K-E, Ahlers J, Schäfer I, et al. High proportion of leukemic stem cells at diagnosis is correlated with unfavorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia. *Ped Hematol Oncol* 2011;28:91-99.
- [17] Ran D, Schubert M, Taubert I, et al. Heterogeneity of leukemia stem cell candidates at diagnosis of acute myeloid leukemia and their clinical significance. *Exp Hematol* 2012;40:155-165.
- [18] Bonnet D. Heterogeneity of the AML-initiating cell compartment. *Ann Hematol* 2011;90(suppl 1):36-39.
- [19] Burnett AK, Hills RK, Milligan D, et al. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *J Clin Oncol* 2011;29:369-377.
- [20] Castaigne S, Pautas C, Terre C, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de novo acute myeloid leukemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2012;379:1508-1516.
- [21] Frankel A, Liu JS, Rizzieri D, Hogge D. Phase I clinical study of diphtheria toxin-interleukin 3 fusion protein in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *Leuk Lymphoma* 2008;49:543-553.
- [22] Lancet JE, Baer MR, Duran GE, et al. A phase I trial of continuous infusion of the multidrug resistance inhibitor zosuquidar with daunorubicin and cytarabine in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2009;33:769-774.
- [23] Zeng Z, Shi YX, Samudio IJ, et al. Targeting the leukaemia microenvironment by CXCR4 inhibition overcomes resistance to kinase inhibitors and chemotherapy in AML. *Blood* 2009;113:6215-6224.
- [24] Löwenberg B, van Putten W, Theonald M, et al. Effect of priming with granulocyte colony-stimulating factor on the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003;349:743-752.
- [25] Dos Santos C, McDonald T, Ho YW, et al. The Src and c-Kit kinase inhibitor dasatinib enhances p53-mediated targeting of human acute myeloid leukemia stem cells by chemotherapeutic agents. *Blood* 2013;122:1900-1913.
- [26] Levis M, Ravandi F, Wang ES, et al. Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse. *Blood* 2011;117:3294-3301.
- [27] Kobune M, Takimoto R, Murase K, et al. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells. *Cancer Sci* 2009;100:948-955.
- [28] Su YC, Li SC, Wu YC, et al. Resveratrol downregulates interleukin-6-stimulated sonic hedgehog signaling in human acute myeloid leukemia. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:5474:30-41.
- [29] Mantripragada K, Reagan JL, Quesenberry PJ, Fast LD. Advances in cellular therapy for the treatment of leukemia. *Discov Med* 2014;17:15-24.
- [30] Arpinati M, Curti A. Immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Immunotherapy* 2014;6:95-106.