

## Stemowe komórki nowotworowe

Przemysław Janik

*Współczesne terapie lekami przeciwnowotworowymi lub promieniowaniem jonizującym bardzo często powodują dramatyczną redukcję liczby komórek rakowych, jednak długotrwałe remisje lub całkowite wyleczenia są raczej rzadkie. Wskazuje to na istnienie frakcji komórek opornych na leczenie chemiczne; są one zapasowym rezerwuarem samoodnawiających się komórek nowotworowych. W populacji komórek nowotworowych małą lub bardzo małą frakcją komórek stanowią komórki klonogenne, a wśród nich stemowe komórki nowotworowe. Znajdowano je zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Wiadomo, że komórki stemowe charakteryzują się wysoką opornością na leczenie chemiczne i promieniowanie. Mogą one natomiast być wrażliwe na inne formy terapii, np. indukującej ich wstępne różnicowanie. Logicznym wnioskiem wypływającym z tych rozważań jest stworzenie nowego paradygmatu leczenia, który uwzględniłby stemowe komórki nowotworowe jako istotny cel terapii uzupełniającej po uprzednim zastosowaniu klasycznych metod cytoredukcji.*

### Cancer stem cells

*Contemporary cancer treatment with either cytoreductive drugs or ionizing radiation induces a dramatic reduction of the tumor cells number, nevertheless the curability or long term remissions are very rare. This advocates for the existence of the separate tumor cell fraction highly resistant to the classical treatments. This particular cell fraction may account for tumor regrowing ability. Because of their specific characteristic these resistant and clonogenic cells could be considered as the “cancer stem cells” (CSC). In turn the “cancer stem cells” may be sensitive to a novel type of therapy which at first leads to their differentiation and subsequently to elimination by classical cytoreduction. The main conclusion from these considerations is an urgent need for a new paradigm for the tumor treatment with regard to the existence of this highly specific CSC cell fraction.*

**Słowa kluczowe:** nowotworowy, komórki macierzyste, karcinogeneza, nowe sposoby terapii przeciwnowotworowych

**Key words:** cancer stem cells, carcinogenesis, new perspectives of cancer treatment

Podstawową rolę w powstawaniu nowotworów odgrywiają mutacje, a nowotworowy fenotyp jest wynikiem akumulacji kilku – kilkunastu następujących po sobie mutacji, np. w raku jelita [1] lub też sprzężenia ich ze zmianami epigenetycznymi, np. metylacją chromatyny. Lajtha [2; patrz też Li i wsp., 3] przypuszcza, że transformacja może być zapoczątkowywana w narządowo specyficznych komórkach stemowych, z których pewna frakcja po zmutowaniu może być rozpatrywana jako stemowe komórki nowotworowe (*cancer stem cells* – CSC). Komórki te wykazują charakterystyczne cechy, takie jak: zdolność do samoodnowy, Nielimitowany potencjał replikacyjny oraz dużą zdolność do różnicowania w potomstwo o różnym stopniu dojrzałości [4]. Chociaż stemowe komórki nowotworowe (CSC) stanowią stosunkowo nikłą część całej populacji guza, są one niezwykle istotne dla wzrostu

nowotworu, a zwłaszcza dla jego zdolności regeneracyjnej po zastosowaniu chemio- lub radioterapii [5-10].

Obserwacje kliniczne wskazują, że tradycyjne formy terapii skierowanej przeciw szybko lub wolno proliferującym komórkom nowotworowym mogą być nieskuteczne w niszczeniu CSC, które cechują się wysoką ekspresją specyficznych, skierowanych na zewnątrz, ATP-zależnych systemów transportujących (MDR- *Multi Drug Resistance*). Jeżeli zastosowana terapia oszczędzi CSC, to wkrótce musi nastąpić wznowa nowotworu.

W badaniach stemowych komórek nowotworowych stosuje się dwie drogi postępowania, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Pierwsza z nich, to selekcja CSC na drodze morfologicznego wyodrębnienia klonów tych komórek – holoklonów, albo też ich izolacja metodą EasySep lub MACS. Te ostatnie techniki opierają się na elektromagnetycznym rozdziale komórek osadzających się na metalowych kulkach opłaszczonych mniej lub bardziej specyficznymi przeciwciałami.

Druga droga postępowania, to wymuszenie czynnikami cytoredukcyjnymi ograniczenia populacji komórek

nowotworowych do tych niewrażliwych na leki chemiczne, np. doksorubicynę. Frakcja takich przetrwałych komórek będzie wzbogacona w lekooporne CSC. Ponieważ gęstość CSC ulegnie względnemu zwiększeniu po leczeniu cytoredukcyjnym, to ich obecność można będzie monitorować przez oznaczanie markerów typowych dla komórek stemowych, np. antygenów powierzchniowych CD 133, CD 34, CD2 i innych. Następnie komórki te mogą być poddane działaniu innej grupy związków, które spowodują zatrzymanie ich wzrostu lub indukują różnicowanie, takich jak: cyclopamina, Gleevec, retinoidy, kalcitrol. W warunkach eksperymentalnych *in vitro* skutki tych działań mogą być mierzone testami MTT lub/i wydajnością klonowania charakterystyczną dla danej frakcji. Natomiast w warunkach klinicznych można oczekiwać, że sumaryczny wynik działań skierowanych zarówno przeciw komórkom nowotworowym, jak i przeciw CSC będzie znacznie skuteczniejszy terapeutycznie. Ten system leczenia, po eksperymentalnej jego weryfikacji, może zostać wykorzystany w klinice. Optymistycznie myśląc, może on doprowadzić do całkowitej lub choćby częściowej eliminacji stemowych komórek nowotworowych, a tym samym ograniczyć wznowy nowotworów.

W tym miejscu warto przypomnieć, że klinicznie obserwowana masa guzów mieści się w szerokim zakresie od 0,5 g do 0,5 kg wagi, co odpowiada średnio liczbie od  $2 \times 10^7$  do  $10^{11}$  komórek. Aby guz osiągnął istotne rozmiary, potrzebne jest około 30-40 podwojeń licząc od momentu powstania pojedynczej transformowanej komórki nowotworowej. Jeśli frakcja stemowych komórek w guzie jest szacowana na około 0,5% całej populacji komórek (11, 12), to działanie skierowane wybiórczo na CSC stanie się istotne terapeutycznie dopiero wtedy, gdy pozostała populacja zostanie znacząco zredukowana w wyniku leczenia konwencjonalnego. Teoretycznie, całkowita ilość komórek guza po leczeniu cytoredukcyjnym, a przed włączeniem terapii anty-stemowej nie powinna przekraczać liczby  $10^5$ - $10^6$  komórek lub nawet mniejszej. Wzrasta wtedy znacząco odsetek stemowych komórek opornych na tradycyjne sposoby leczenia i terapia uderzająca w CSC staje się bardziej efektywna.

Powracając jeszcze raz do rozważań na temat tempa wzrostu komórek nowotworowych należy podkreślić, że

po konwencjonalnym działaniu cytoredukcyjnym pozostaje przeważnie około  $10^5$  do  $10^6$  komórek. Do osiągnięcia przeciętnej, istotnej klinicznie wielkości guza, mieszczącej się w granicach  $10^{10}$  lub  $10^{11}$  komórek, potrzebne byłoby około 10-15 podwojeń populacji, co w wymiarze czasowym daje średnio 600-900 dni (zakładając średni czas podwojenia na 60 dni). Redukcja populacji komórek stemowych pozostałych po leczeniu cytoredukcyjnym przy założeniu jej 50% skuteczności, dawałaby wydłużenie wspomnianego czasu o dodatkowe 300-600 dni (5-10 podwojeń), co znacząco zwiększyłoby średni czas przeżycia pacjentów (Tab. I).

Odnowa komórek stemowych w organizmie jest kontrolowana między innymi poprzez drogi sygnałowe WNT i *Sonic Hedgehog* (SHH) [13]. Aktywność ich jest niezbędna w wielu procesach fizjologicznej odnowy, takich jak: gojenie ran, odnowa krypt jelitowych, neurogeneza czy aktywność krwiotwórcza. Stała stymulacja zarówno WNT, jak i SHH prowadzi do wzrostu populacji niezróżnicowanych komórek macierzystych. Natomiast ich inhibicja może być wykorzystana w terapii nowotworów w celu ograniczenia ekspansji CSC.

W pierwszej z tych dróg sygnałowych białko WNT, reagując ze specyficznym receptorem *Frizzled* (Fz) i pod wpływem zmian aktywności fosforylacyjnej kinazy GSK3 $\beta$ , indukuje translokację  $\beta$ -kateniny do jądra komórkowego i połączenie jej z kompleksem transkrypcyjnym aktywującym ekspresję genów proliferacyjnych.

Drugim systemem sygnałowym jest *Sonic Hedgehog* (SHH). Proteina *Hedgehog* reguluje aktywność dwóch receptorów: *Patched 1* (PTCH1) oraz *Smoothed* (SMO). W wyniku aktywacji białko SMO po uwolnieniu z błony komórkowej aktywuje proliferacyjne czynniki transkrypcyjne GLI 1 i 2, co również skutkuje ekspansją niezróżnicowanych komórek stemowych.

Szlaki transdukcji sygnałów WNT i SHH mogą być hamowane przez ich naturalnych lub chemicznych antagonistów takich jak np. WIF1, niesterydowe leki przeciwzapalne, cyclopamina [13, 14], a tym samym wpływać również na tempo wzrostu stemowych komórek nowotworowych.

Tab. 1. Prognozowany efekt terapii skierowanej przeciw nowotworowym komórkom macierzystym

	Wielkość	Liczba komórek	Konieczna liczba podwojeń	Czas wzrostu guza
Guz klinicznie diagnozowalny	od 0,5 g do 0,5 kg	$5 \times 10^7$ $10^{11}$ (śmierć)	25	1500 dni (około 4,1 lat)
Cytoredukcja o 95% komórek		ok. $5 \times 10^5$	10 (do osiągnięcia granicy diagnozowalności $5 \times 10^7$ komórek)	600 dni (>2 lat)
Cytoredukcja CSC o 50%		ok. $1 \times 10^5$	5-10 (dodatkowa liczba podwojeń konieczna do efektu j.w.)	<b>Zysk</b> (szacunkowe wydłużenie czasu wzrostu nowotworu) 300-600 dni

\* jedno podwojenie 60 dni

Istotną cechą komórek macierzystych jest ich zdolność do różnicowania. Można przypuszczać, że cechę tę wykazują również nowotworowe komórki macierzyste [15]. Potwierdzają to badania z użyciem retinoidów lub analogów witaminy D wykazujące, że dodatek tych czynników różnicujących prowadzi do zwolnienia proliferacji i indukcji różnicowania (a więc lekowrażliwości) komórek nowotworowych.

W większości nowotworów, głównie raków, wykazano obecność markerów powierzchniowych, których obecność jest kojarzona z narządowymi komórkami stemowymi [16, 17]. Komórki nowotworowe centralnego układu nerwowego ekspresują markery BMI1 i CD133, natomiast w raku piersi wykazano obecność molekuł CD24, CD44 oraz wysoką aktywność szlaków Wnt oraz Shh wysoko-specyficznych dla komórek macierzystych. W raku jelita grubego część populacji ekspresjonuje CD133 zaś w raku prostaty – CD44 i CD 133. Komórki nowotworowe wywodzące się z układu krwiotwórczego wykazują wysoką ekspresję CD34, CD38, CD150, cKit oraz VEGF i bFGF charakterystyczną dla hematopoetycznych komórek progenitorowych [16] (Tab. II).

**Tab. II. Markery powierzchniowe CSC w różnych typach nowotworów [16, 17]**

Guz mózgu	CD133, BMI 1
Rak piersi	CD44, BMI 1, Wnt, SHH
Rak jelita grubego	CD133
Rak trzustki	CD44, CD133
Rak prostaty	CD44, CD133

Znajomość tych markerów i ich związków z poszczególnymi lokalizacjami nowotworów może być pomocna zarówno w selekcjonowaniu komórek stemowych jak i monitorowaniu skuteczności terapii tak cytotoksycznej jak i dodatkowej (inicjującej różnicowanie) na wielkość ich populacji.

Głównym zadaniem badań stemowych komórek nowotworowych było i jest poznanie właściwości CSC

oraz wykorzystanie tej wiedzy do znalezienia efektywnych sposobów redukcji ich wzrostu w warunkach klinicznych. Można to osiągnąć przez zastosowanie specyficznych inhibitorów dróg przekazywania sygnałów istotnych dla CSC (np. WNT lub SHH) czy też przez stosowanie innych, bardziej selektywnie działających związków i przeciwciał. Należą do nich Gleevec (*ligand c-kit*), przeciwciała anty CD20, a także czynniki promujące różnicowanie komórek macierzystych [10, 15].

Występowanie subpopulacji komórek stemowych w warunkach *in vitro* wykazali Locke i McKenzie dla kilku nowotworowych linii komórkowych [18], co później zostało wielokrotnie potwierdzone przez innych badaczy. Obecność i utrzymywanie się CSC w warunkach hodowli *in vitro* stwarza unikalne warunki eksperymentalne do badań biologicznej charakterystyki CSC jak i efektów proponowanej „anty-stemowej” terapii przeciwnowotworowej [18].

Zgodnie z obserwacjami McKenzie [18] komórki nowotworowe *in vitro* hodowane we względnie niskiej gęstości mogą rosnąć bądź w postaci homogennej, gęsto upakowanych kolonii lub też w heterogennej skupiskach komórkowych dość szybko rozpraszających się na podłożu. Te pierwsze nazwane zostały holoklonami, podczas gdy drugie – paraklonami. Holoklony, co podkreślają autorzy publikacji, mogą być odpowiednikiem rozrostu typowego dla stemowych komórek nowotworowych w warunkach hodowli *in vitro* [5, 18]. Cechę tę można więc wykorzystać do określenia liczby holoklonów (równoważnika obecności CSC) w badanej populacji. Stosując opisane już wcześniej procedury klasycznej cytoredukcji, można doprowadzić do względnego wzbogacenia badanych linii komórkowych w komórki stemowe, a następnie eksponować je na działania substancji „drugiego rzutu” o przypuszczalnych właściwościach „anty-stemowych”, dobranych na podstawie wstępnej analizy molekularnej czy immunohistochemicznej. Zastosowanie tego schematu doświadczalnego z użyciem doxorubicyny i Gleevecu w eksperymentach na komórkach mysiego raka jelita CT-26 przedstawione są w Tabeli III (A. Lipiec – dane niepublikowane)

Można przypuszczać, że opisane doświadczenie polegające na dwustopniowym traktowaniu komórek nowotworowych preparatami o różnych stopniach spe-

**Tab. III. Redukcja liczby kolonii komórkowych *in vitro* po wyłącznym lub skojarzonym traktowaniu doxorubicyną i Gleeveciem**

Gęstość wysiania: 200 komórek/płytkę	Średnia liczba kolonii komórkowych	n prób	Odchylenie standardowe	%
Kontrola	48,5	81	9,8	100%
Doxorubicyna 0,01ug/ml	27	42	11	55%
Gleevec 10 uM	21,6	30	11,4	44,5%
Doxorubicyna + Gleevec (0,01ug/ml + 10uM)	4,2	10	2,3	8,6%

A. Lipiec: dane niepublikowane.

cyficzności w stosunku do komórek stemowych będzie stanowił impuls do próby wprowadzenia nowego paradygmatu leczenia nowotworów. Ten schemat leczenia sprowadzałby się do wstępnego intensywnego leczenia cytostatykami, a równocześnie lub następnie lekami indukującymi różnicowanie lub(i) zatrzymującymi w inny sposób samoodnowę stemowych komórek nowotworowych.

**Prof. dr hab. med. Przemysław Janik**

Zakład Biologii Komórki

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie

Warszawa, ul. W. K. Roentgena 5

## Piśmiennictwo

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-67. Review.
2. Lajtha LG. Stem cell concepts. *Differentiation* 1979; 14: 23-34. Review.
3. Li L, Neaves WB. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. *Cancer Res* 2006; 66: 4553-7. Review.
4. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB i wsp. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9339-44.
5. Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst* 1971; 46: 411-22.
6. Denekamp J. Tumour stem cells: facts, interpretation and consequences. *Radiother Oncol* 1994; 30: 6-10.
7. Hill RP, Milas L. The proportion of stem cells in murine tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16: 513-8.
8. Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 2006; 12: 296-300.
9. Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T. Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* 1977; 63: 125-30.
10. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 2004; 23: 7274-82. Review.
11. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A i wsp. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-8.
12. Janik P, Bertram JS, Szaniawska B. Modulation of lung tumor colony formation by a subcutaneously growing tumor. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66: 1155-8.
13. Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001; 411: 349-54. Review.
14. Rak J. Is cancer stem cell a cell, or a multicellular unit capable of inducing angiogenesis? *Med Hypotheses* 2006; 66: 601-4.
15. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004; 432: 324-31. Review.
16. Vermeulen L, Sprick MR, Kemper K i wsp. Cancer stem cells – old concepts, new insights. *Cell Death Differ* 2008; 1-12.
17. Watt F, Eggan K. Molecular mechanisms of stem cell identity and fate. Poster w *Nature Cancer Reviews*. *Nature* 2006; 441: 1060.
18. Locke M, Heywood M, Fawell S i wsp. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res* 2005; 65: 8944-50.

Otrzymano i przyjęto do druku: 1 marca 2008 r.