

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 616-006-018:576.3.017.22

М.Д. Фармаковская, Н.В. Хромова, В.А. Рыбко, П.Б. Копнин

РОЛЬ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В РЕГУЛЯЦИИ СВОЙСТВ РАКОВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина» МЗ РФ, Москва

Контактная информация

*Копнин Павел Борисович, к.б.н., заведующий лабораторией цитогенетики НИИ канцерогенеза***адрес:** 115478 Москва, Каширское ш., 24; тел.+7(499)324-17-39**e-mail:** pbkopnin@mail.ru

Статья поступила 16.10.2015, принята к печати 27.11.2015.

Резюме

РСК – это субпопуляция трансформированных клеток, которая является возможной причиной устойчивости злокачественных новообразований к терапии, а также рецидивирования и метастазирования опухолей.

По этой причине РСК представляются перспективной мишенью для разработки новых подходов к противоопухолевой терапии. Выявлен ряд механизмов, позволяющих трансформированным клеткам приобретать фенотип стволовых, что значительно осложняет лечение злокачественных новообразований. Такими механизмами является вариант эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) и утрата е-кадгерина, приводящие к образованию в карциномах клеток, обладающих свойствами РСК.

Целью данного обзора является рассмотрение возможных механизмов образования РСК в карциномах человека.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, эпителиально-мезенхимальный переход, Е-кадгерин.

M.D. Farmakovskaya, N.V. Khromova, V.A. Rybko, P.B. Kopnin

THE ROLE OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN REGULATION OF SOLID TUMORS CANCER STEM CELLS CHARACTERISTICS

FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» MH, RF, Moscow

Abstract

CSCs are a tumor cell subpopulation that is a potential cause of cancer therapy resistance, recurrence and metastasis. This is the reason cscs seem a promising target for developing new approaches in anticancer treatment.

Several mechanisms have been revealed that allow cancer cells to acquire CSC phenotype making malignant tumor treatment much more complicated. One of such mechanisms is a variant of epithelial-to-mesenchymal transition and e-cadherin loss, which results in cells with CSC characteristics occurring in carcinomas.

The purpose of the present study is to review possible ways if cscs formation in human carcinomas.

Key words: cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin.

Введение

Одним из важных аспектов современной экспериментальной онкологии, активно изучаемым в последнее время, являются так называемые «раковые стволовые клетки» (РСК; англ – «cancer stem cells») (CSCs); «tumor initiating cells» (TICS), «tumor-propagating cells» (TPCs)).

Концепция рск сформировалась еще в 1970-х [14] гг. На сегодняшний день под термином «рск» чаще всего подразумевают субпопуляцию трансформированных клеток, обладающую рядом свойств, отличающих их от остальных клеток опу-

холи и сближающих их с нормальными стволовыми клетками:

- Способностью к асимметричному делению, в результате которого образуется «самообновленная» рск и дочерняя клетка, фенотипически отличающаяся от родительской, потомки которой и формируют основную часть опухолевых клеток (рис. 1, а);
- Способностью формировать опухоль при инъекции экспериментальным животным [29; 36];
- Активностью систем, ответственных за детоксикацию/выведение токсичных веществ (например, abc-транспортеров) и, соответственно, устойчивость к химиотерапевтическим агентам [9].

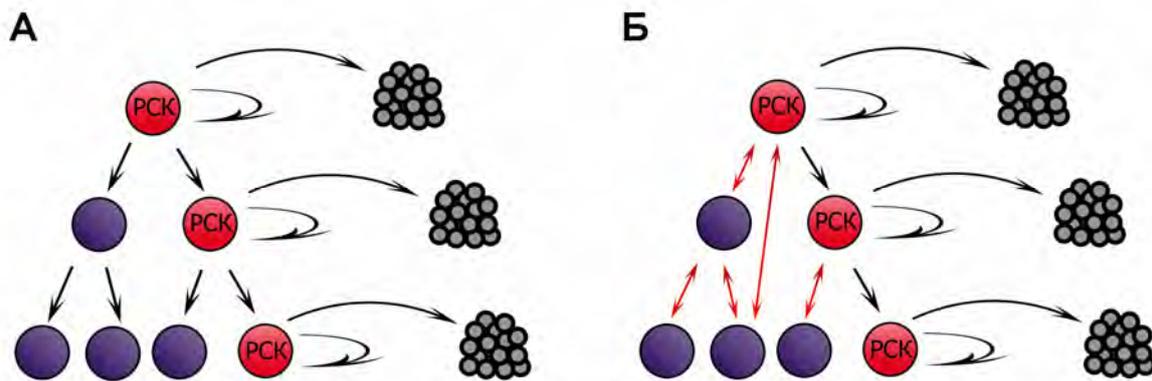


Рис. 1. Модели раковых стволовых клеток.

Красные клетки – PCK, синие клетки – дочерние клетки, не обладающие способностью к самообновлению, серые клетки – основная масса опухолевых клеток.

А – классическая модель PCK;

Б – стохастическая модель PCK, учитывающая возможность перехода между «стволовым» и «нестоловым» состояниями.

PCK характеризуются экспрессией определенных для каждого типа опухолей поверхностных маркеров, позволяющих отделять их от остальных клеток [36].

Интерес к PCK объясняется тем фактом, что, согласно доминирующим в настоящее время представлениям, именно эти клетки являются причиной злокачественного роста, устойчивости к химиотерапии, рецидивирования и метастазирования опухолей [9; 40].

PCK и механизмы их возникновения

Не существует общепринятой модели, объясняющей механизмы возникновения PCK. Наиболее очевидной является гипотеза, согласно которой PCK образуются из нормальных тканевых стволовых клеток в результате мутаций, нарушающих механизмы саморегуляции пролиферации [36; 41; 38]. Однако в последние годы появилась и другая гипотеза происхождения PCK, состоящая в том, что иерархическая структура «дифференцировок» среди опухолевых клеток не является статичной и возможны взаимные переходы между субпопуляциями, приводящие к формированию PCK из различных типов трансформированных клеток [35]. Такие взаимные превращения могут происходить стохастически [4], под действием внешних [19] или эпигенетических [5] факторов. Формирование фенотипа PCK в целом можно рассматривать как частичную дедифференцировку опухолевых клеток (рис. 1, б).

Основной характеристикой PCK (см. выше), является способность формировать опухоли при инъекции лабораторным мышам с подавленным клеточным иммунитетом (scid/nude), тогда как основная масса трансформированных клеток такой способностью не обладают [29; 30].

В связи с этим одним из бурно развивающихся направлений в разработке новых противоопухолевых препаратов является поиск веществ, избира-

тельно воздействующих именно на PCK. Так, например, показано, что ряд антибиотиков (салиномицин, азитромицин, доксициклин) значительно снижают долю PCK в популяциях различных типов трансформированных клеток [23; 28]. На экспериментальных моделях показано, что избирательное удаление PCK из популяции клеток ряда новообразований приводило к излечению [30] или к значительному увеличению продолжительности жизни животных [6; 39]. Однако даже после избирательного уничтожения PCK среди трансформированных клеток могут со временем вновь появляться клетки, обладающие характеристиками опухолевых стволовых. Так, в культуре клеток протоковой аденокарциномы молочной железы среди нескольких фенотипически-различных субпопуляций трансформированных клеток можно выделить люминальные, базальные и стволовые (эти состояния клеток можно интерпретировать как различные степени дедифференцировки эпителиальных клеток). Эти субпопуляции сосуществуют в определенных соотношениях как *in vitro*, так и *in vivo*, в зависимости от типа и стадии опухоли. Если разделить и изолировать клетки каждого типа, то через некоторое время в таких субпопуляциях вновь обнаруживаются клетки всех трех типов в соотношениях, близких к исходным. Таким образом, в популяции неопластических клеток, по-видимому, существуют некоторые механизмы, которые обеспечивают поддержание определенной и постоянной для каждой злокачественной опухоли доли PCK. Считается, что это происходит за счёт частичной трансдифференцировки других неопластических клеток (рис. 2) [12; 24]. Возможность приобретения нестволовыми трансформированными клетками свойств PCK значительно затрудняет терапию онкологических заболеваний. По этой причине перспективным представляется изучение механизмов, приводящих к приобретению свойств PCK, однако такие механизмы изучены недостаточно.

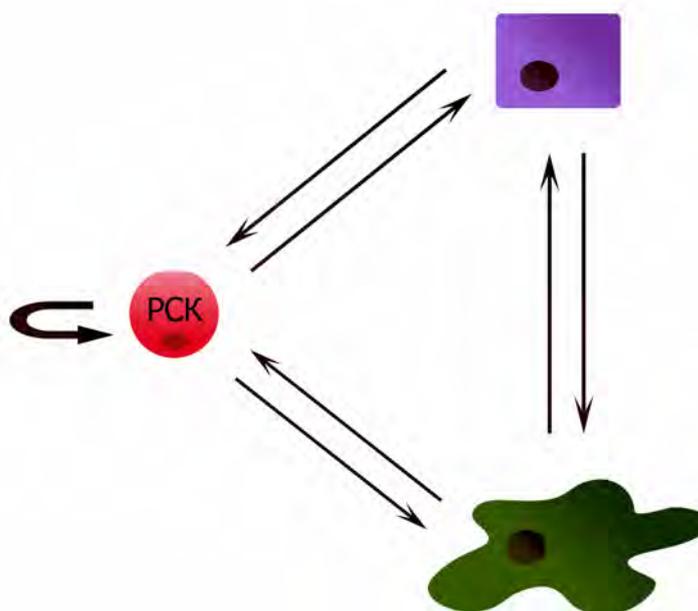


Рис. 2. Модель поддержания соотношения между различными субпопуляциями раковых клеток за счёт взаимопревращения. Стрелками показаны возможные переходы из одного фенотипического состояния в другое. Красная клетка обладает стволовым фенотипом, синяя – люминальным, зеленая – базальным.

Необходимо отметить, что РСК солидных опухолей, как и нормальные стволовые клетки взрослого организма, находятся в постоянном тесном взаимодействии со своим микроокружением – нишей, все компоненты которой (другие неопластические клетки, клетки опухолевой стромы, сосуды, внеклеточный матрикс) вносят вклад в поддержание фенотипа РСК посредством межклеточных взаимодействий или с помощью секретируемых молекул [15]. Известно, что аутокринные/паракринные сигнальные каскады, такие как *wnt*, *notch*, *hedgehog* (НН), *TGF-β* и рецепторные тирозинкиназы (например, *c-met*, *egf*, *pdgf*), играют важную роль в поддержании популяции РСК и активации механизмов дедифференцировки в трансформированных клетках [7; 17; 18; 26; 32; 39].

Опухоль-ассоциированные фибробласты путём секреции цитокинов *VEGF*, *HGF* и др., а также путём активации сигнальных каскадов *WNT* и *NOTCH*, могут стимулировать переход трансформированных клеток в «стволовое» состояние [33; 42].

Ещё одним механизмом взаимодействия трансформированных клеток с опухолевой стромой является гипоксия: при недостатке кислорода активируются молекулы семейства *HIF*, которые в свою очередь активируют экспрессию ряда транскрипционных факторов – *oct 4*, *sox*, *nanog* – характерных для эмбриональных стволовых клеток, а также, согласно последним данным, играющим важную роль в формировании фенотипа РСК [16]. Кроме того, в формировании фенотипа РСК может играть роль воспаление: опухоль-ассоциированные макрофаги способствуют увеличению доли РСК, секретирова интерлейкин-6 и эпидермальный фактор роста *egf8*, что активирует *stat3*- и *hh*-сигнальные каскады [20].

Таким образом, микроокружение активно участвует в регуляции пула РСК и может «подталкивать» нестволовые трансформированные клетки к приобретению черт РСК.

ЭМП и E-кадгерин

ЭМП – процесс, играющий важную роль в инвазии и метастазировании, в результате которого эпителиальные клетки теряют апико-базальную полярность и межклеточные контакты, происходит реорганизация цитоскелета. Клетки приобретают веретеновидную форму, способность к миграции, что сближает их с мезенхимальными. Главным событием, индуцирующим ЭМП, является ослабление межклеточных адгезионных контактов за счет подавления синтеза мембранных молекул: кадгеринов, окклюдина и клаудина, десмоплакина [3]. Известен ряд факторов, которые могут индуцировать эмп, например, транскрипционные факторы *slug*, *snail*, *twist*, *sip-1*, *zeb1* [1], а также цитокины *tgf-β* и *vegf* [11; 21; 43].

Утрата клетками эпителиальных черт в ходе эмп может быть рассмотрена как вариант их дедифференцировки, при этом приобретение опухолевой клеткой фенотипа РСК также является частичной дедифференцировкой. Таким образом, предполагают, что прохождение трансформированными эпителиальными клетками ЭМП может приводить к увеличению доли РСК в злокачественных опухолях.

Действительно, было показано, что доля РСК увеличивается в популяции трансформированных клеток с экспериментально-индуцированным ЭМП. Более того, добавление *TGF-β* или экзогенная экспрессия *snail* в эпителиальных клетках молочной железы, приводят к появлению маркеров РСК РМЖ.

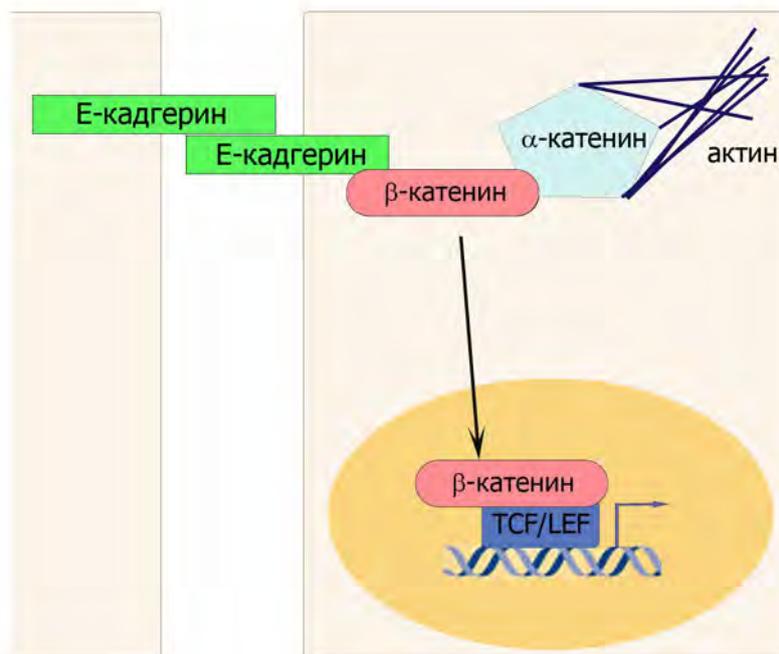


Рис. 3. Схема строения адгезионного контакта.

Примечательно, что клетки с фенотипом РСК в солидных опухолях концентрируются в зоне инвазии [27]. Также показано, что клетки, прошедшие ЭМП, имеют повышенную устойчивость к химио- и радиотерапии, а профиль экспрессии генов в таких клетках частично сходен с таковым в «стволовом» состоянии [1; 22].

Ключевым событием в процессе прохождения эмп является утрата центральной молекулы межклеточных адгезионных контактов – е-кадгерина. цитоплазматическая часть молекулы е-кадгерина взаимодействует с другими компонентами контакта: p120-катенином, γ -катенином/плакоглобином и β -катенином (что препятствует перемещению последнего в ядро). Адгезионный комплекс присоединяется к кортикальному актиновому цитоскелету путем соединения α - и β -катенинов. Кроме того, е-кадгерин является негативным регулятором WNT-сигнального каскада, удерживая на мембране его центральный медиатор β -катенин.

При утрате е-кадгерина β -катенин транслоцируется в ядро (рис. 3), где он может активировать некоторые звенья WNT сигнального каскада, который играет важную роль в поддержание фенотипа РСК ряда злокачественных опухолей: например, плоскоклеточного рака кожи [40]. Так, прямой эффектор данного сигнального каскада – β -катенин – может активировать транскрипционные факторы семейства *tcf/lef*, которые, в свою очередь, модулируют активность транскрипционных факторов, регулирующих плюрипотентное состояние стволовой клетки: *nanog*, *c-myc* и др. [37]. Кроме того, *wnt*-сигнальный каскад может непосредственно индуцировать ЭМП, что в свою очередь тоже может

приводить к увеличению доли РСК в популяции трансформированных клеток [40; 42].

Для многих злокачественных новообразований человека описаны различные нарушения адгезионных контактов или экспрессии е-кадгерина. известно, что е-кадгерин действует как ингибитор инвазии для большого количества трансформированных клеточных линий эпителиального происхождения и моделей канцерогенеза *in vivo* [10; 25; 31]. Нарушение Экспрессии Е-Кадгерина В Трансформированных клетках приводит к локальной инвазии и метастазированию.

Для многих карцином человека была показана зависимость между уровнем экспрессии е-кадгерина и выживаемостью онкологических больных [2; 22]. Gupta et al. Показали, что при подавлении экспрессии е-кадгерина в клетках линии РМЖ количество РСК РМЖ увеличивалось [13].

Таким образом, можно заключить, что сохранение экспрессии Е-кадгерина препятствует прохождению трансформированными эпителиальными клетками ЭМП, следовательно, приобретению черт РСК. Предотвращение утраты эпителиальной дифференцировки и, в частности, Е-кадгерина, представляется перспективным подходом к разработке новых методов борьбы со злокачественными новообразованиями человека.

Выводы

Накапливаются данные, позволяющие создавать новые методы диагностики и лечения злокачественных опухолей человека. уже сейчас в клинической практике используют маркеры РСК (напри-

мер, cd133, nestin и др.), продукцию е-кадгерина и ряда других молекул для диагностики таких заболеваний как глиобластома, аденокарцинома поджелудочной железы, аденокарцинома желудка и др. [8; 34]. Однако, учитывая влияние микроокружения и возможность перехода между нестволовым и стволовым состояниями опухолевых клеток, наиболее перспективным направлением разрабатываемых терапевтических методов представляются подходы, направленные не на непосредственное уничтожение клеток с фенотипом РСК, а блоки-

рующие пути, приводящие к приобретению такового. Так, изучение механизмов возникновения и поддержания РСК позволит усовершенствовать и разработать новые более эффективные и, возможно, безопасные методы лечения злокачественных опухолей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (соглашение № 14-15-00467).

Литература

1. Arumugam T., Ramachandran V., Fournier K.F. et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer // *Cancer Research*. – 2009. – 69(14). – P. 5820–8.
2. Birchmeier W., Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2006. – 1198. – P. 11–26.
3. Brabletz T., Hlubek F., Spaderna S. et al. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin // *Cells Tissues Organs*. – 2003. – 179. – P. 56–65.
4. Chaffer C.L., Brueckmann I., Scheel C. et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state // *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America USA*. – 2011. – 108(19). – P. 7950–5.
5. Chaffer C.L., Marjanovic N.D., Lee T. et al. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity // *Cell*. – 2013. – 154(1). – P. 61–74.
6. Chen J., Li Y., Yu T.S. et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy // *Nature*. – 2012. – 488(7412). – P. 522–6.
7. Cole M.F., Johnson S.E., Newman J.J. et al. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells // *Genes & Development*. – 2008. – 22(6). – P. 746–55.
8. Dahlrot R.H., Hermansen S.K., Hansen S., Kristensen B.W. What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? // *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. – 2013. – 6(3). – P. 334–48.
9. Dando I., Cordani M., Dalla Pozza E. et al. Antioxidant Mechanisms and ROS-Related MicroRNAs in Cancer Stem Cells // *Oxidative Medicine and Cell Longevity*. – 2015. – 2015. – P. 425708.
10. Graff J.R., Gabrielson E., Fujii H. et al. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – 275. – P. 2727–32.
11. Gonzalez-Moreno O., Lecanda J., Green J.E. et al. VEGF elicits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in prostate intraepithelial neoplasia (PIN)-like cells via an autocrine loop // *Experimental Cell Research*. – 2010. – 316(4). – P. 554–67.
12. Gupta P.B., Fillmore C.M., Guozhi J. et al. Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells // *Cell*. – 2011. – 19. – P. 633–44.
13. Gupta P.B., Onder T.T., Jiang G. et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening // *Cell*. – 2009. – 138. – P. 645–59.
14. Hamburger A.W., Salmon S.E. Primary bioassay of human tumor stem cells // *Science*. – 1977. – 197(4302). – P. 461–3.
15. Hanahan D., Coussens L.M. Accessories to crime: functions of cells recruited to tumor microenvironment // *Cancer Cell*. – 2012. – 21(3). – P. 309–22.
16. Heddleston J.M., Li Z., McLendon R.E. et al. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype // *Cell Cycle*. – 2009. – 8(20). – P. 3274–84.
17. Hu Q., Zhang L., Wen J. et al. The EGF receptor-sox2-EGF receptor feedback loop positively regulates the self-renewal of neural precursor cells // *Stem Cells*. – 2010. – 28(2). – P. 279–86.
18. Ikushima H., Todo T., Ino Y. et al. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors // *Cell Stem Cells*. – 2009. – 5(5). – P. 504–14.
19. Iliopoulos D., Hirsch H.A., Wang G. et al. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion // *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America USA*. – 2011. – 108(4). – P. 1397–402.
20. Jinushi M., Chiba S., Yoshiyama H. et al. Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anti-cancer drug responses of cancer stem/initiating cells // *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*. – 2011. – 108(30). – P. 12425–30.

21. *Khromova N., Kopnin P., Rybko V., Kopnin B.P.* Downregulation of VEGF-C expression in lung and colon cancer cells decelerates tumor growth and inhibits metastasis via multiple mechanisms // *Oncogene*. – 2012. – 31(11). – P. 1389–97.
22. *Kurrey N.K., Jalgaonkar S.P., Joglekar A.V. et al.* Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells // *Stem Cells*. – 2009. – 27(9). – P. 2059–68.
23. *Lamb R., Ozsvari B., Lisanti C.L. et al.* Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease // *Oncotarget*. – 2015. – 6(7). – P. 4569–84.
24. *Li Y., Littera J.* Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? // *Cancer Research*. – 2012. – 73(3). – P. 576–80.
25. *Lynch H.T., Grady W., Lynch J.F. et al.* E-cadherin mutation-based genetic counseling and hereditary diffuse gastric carcinoma // *Cancer Genet Cytogenet*. – 2000. – 122. – P. 1–6.
26. *Marson A., Foreman R., Chevalier B. et al.* Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency // *Cell Stem Cell*. – 2008. – 3(2). – P. 132–5.
27. *Mirantes C., Espinosa I., Ferrer I.* Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer // *Human Pathology*. – 2013. – 44(10). – P. 1973–81.
28. *Naujokat C., Steinhart R.* Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2012. – 2012. – P. 950658.
29. *O'Brien C., Kreso A., Jamieson H.M.* Cancer stem cells and self-renewal // *Clinical Cancer Research*. – 2010. – 47. – P. 1478–93.
30. *Pérez-Caro M., Cobaleda C., González-Herrero I. et al.* Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment // *The EMBO Journal*. – 2009. – 28(1). – P. 8–20.
31. *Perl A.K., Wilgenbus P., Dahl U. et al.* A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma // *Nature*. – 2009. – 392. – P. 190–3.
32. *Po A., Ferretti E., Miele E. et al.* Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog // *The EMBO Journal*. – 2010. – 29(15). – P. 2646–58.
33. *Plaks V., Kong N., Werb Z.* The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? // *Cell Stem Cell*. – 2015. – 16(3). – P. 225–38.
34. *Rasheed Z.A., Yang J., Wang Q. et al.* Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma // *Journal of National Cancer Institution*. – 2010. – 102(5). – P. 340–51.
35. *Scheel C., Eaton E.N., Li S. et al.* Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast // *Cell*. – 2011. – 145(6). – P. 926–40.
36. *Shackleton M.* Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different // *Seminars in Cancer Biology*. – 2010. – 20. – P. 85–92.
37. *Sineva G.S., Pospelov V.A.* β -Catenin in pluripotency: adhering to self-renewal or Wnting to differentiate? // *International Review of Cell and Molecular Biology*. – 2014. – 312. – P. 53–78.
38. *Smalley M., Ashworth A.* Stem cells and breast cancer: a field in transit // *Nature Reviews: Cancer*. – 2003. – 3(11). – P. 832–44.
39. *Song I.S., Jeong Y.J., Han J.* Mitochondrial metabolism in cancer stem cells: a therapeutic target for colon cancer // *BMB Reports*. – 2015. – P. 3333.
40. *Takebe N., Miele L., Harris P.J. et al.* Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update // *Nature Reviews: Clinical Oncology*. – 2015. – 12(8). – P. 445–64.
41. *Todaro M., Alea M.P., Di Stefano A.B. et al.* Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4 // *Cell Stem Cell*. – 2007. – 1(4). – P. 389–402.
42. *Vermeulen L., De Sousa E., Melo F. et al.* Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment // *Nature Cell Biology*. – 2010. – 12(5). – P. 468–76.
43. *Yi Z.Y., Feng L.J., Xiang Z., Yao H.* Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells // *Journal of Investigative Surgery: the official journal of the Academy of Surgical Research*. – 2011. – 24(2). – P. 67–76.