

УДК 577.2: 616-006

А.С. Исабекова*, В.Б. Огай

РГП «Национальный центр биотехнологии», г. Астана, Казахстан,

*e-mail: venerah07@mail.ru

Паракринные регуляторы раковых стволовых клеток толстой кишки

Раковые стволовые клетки основная причина возобновления болезни после лечения. Для эффективной борьбы с этими клетками необходимо понимание механизмов выживания этих клеток и их стимуляторов. В данной работе оценено влияние микроокружения опухоли на рост и поддержание опухоли. Основными модуляторами раковых стволовых клеток являются опухоль ассоциированные миофибробласты и макрофаги, а также Th17 клетки.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, микроокружение, индукторы.

А.С. Исабекова, В.Б. Огай

Тоқ ішектің бағаналы ісік жасушаларының паракринды реттеушілері

Бағаналы ісік жасушалары аурудың емдеуден кейін қайталануының негізгі себепшілері. Бұл клеткалармен нәтижелі күресу үшін бұл клеткалардың тірі қалу механизмдерін және оларды қоздыратын заттарды түсіну қажет. Бұл жұмыста ісік микроайналасының ісіктің өсуі мен өркендеуіне қосатын үлесі бағаланған. Бағаналы ісік клеткаларының негізгі реттеушілері ісікпен байланысқан миофибробластар мен макрофагтар және Th17 клеткалары.

Түйін сөздер: бағаналы ісік жасушалары, микроайнала, қоздырушалар.

A.S. Issabekova, V.B. Ogay

Paracrine regulators of colon cancer stem cells

Cancer stem cells are main cause of cancer recurrence. For effective treatment it is necessary to understand how survive and stimulate these cells. In this work it was estimated influence of cancer microenvironment to growth and surveillance of cancer. The main modulators of cancer are cancer associated miofibroblasts and macrophages, and also Th17 cells.

Keywords: cancer stem cells, microenvironment, inductors.

В настоящее время доказано существование раковых стволовых клеток в разных солидных опухолях. Ученые обнаружили, что именно эти клетки отвечают за развитие метастаз и возникновение рецидивов после лечения [1]. В поддержании роста и пролиферации опухоли участвуют сами клетки опухоли и ее микроокружение. Микроокружение опухоли состоит из стромальных фибробластов, миофибробластов, клеток костного мозга, межклеточного матрикса, эндотелиальных клеток, инфильтрации лейкоцитов, таких как макрофаги, Т-лимфоциты, дендритные клетки [2]. Опухоль и некоторые клетки окружения выделяют цитокины и ростовые факторы, которые активизируют пролиферацию, редиференцируют клетки, активируют воспаление и др. процессы. В работе проанализи-

зирована литература и составлена база данных по факторам, которые выделяют клетки микроокружения.

Материалы и методы

База данных по индукторам раковых стволовых клеток толстой кишки и микроокружения опухоли были созданы на основе анализа литературных данных за последние десять лет. Источниками статей были следующие базы данных: PubMed (www.pubmed.gov), BioMedCentral. На данный момент проанализировано более 300 статей по РСК толстой кишки.

Результаты и их обсуждение

В результате анализа литературных данных создана база данных по паракринным регуля-

торам раковых стволовых клеток толстой кишки, которая включает 12 индукторов (BMP4, HB-EGF, HGF, IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17A, IL-22, IL-23, Lefty, MFG-E8, TNF- α) (таблица 1). Рассмотрим каждый из регуляторов, взяв за основу продуцентов.

Эпителий кишечника имеет пролиферативный компартмент – крипту, стволовые клетки которого являются главным источником опухоли. В каждой крипте есть шесть стволовых клеток, которые делятся каждый день и дают популяцию пролиферативных клеток. Дочерние клетки поднимаются вдоль крипты и во время миграции подвергаются дифференцировке. Эпителий кишечника самообновляется каждые 2-7 дней, стволовые клетки продуцируют около 10¹⁰ клеток в день. Одной из основных компонент микроокружения является строма опухоли, в которой есть миофибробласты. Миофибробласты участвуют в регуляции самообновления эпителия кишечника. Пролиферация, дифференцировка и апоптоз стволовых клеток эпителия кишечника регулируется за счет Wnt сигнально-

го пути. В норме фибробласты, расположенные на дне крипты, выделяют Wnt лиганды. Wnt1, 2, 3, 3A, 8A, 8B, 10A, 10B лиганды активируют канонический путь, который запускает пролиферацию клеток толстой кишки. Неканонический сигнальный путь контролирует тканевую полярность и клеточное движение, и имеет следующие лиганды: Wnt4, 5A, 5B, 6, 7A, 7B. Блокирование пути по средствам Wnt антагониста Dickkopf-1 (DKK1) приводит к потере пролиферации у эпителиальных клеток [3].

Bone morphogenetic proteins (Bmps) является членом семейства TGF β . BMP является антагонистом Wnt сигнальной системы и ингибирует распространение стволовых клеток крипты, а также стимулирует их дифференцировку. Мутации в рецепторе BMPR 1a приводят к возникновению ювенильного полипоза, что показывает на важность этого сигнала в гомеостазе кишечника. В кишечнике Vmр4 продуцируется стромальными клетками, тогда как рецептор к нему есть на эпителиальных и стромальных клетках. На дне крипты Vmр4 не запускает дифференци-

Таблица 1 – Паракринный регуляторы РСК

Индуктор	Продуценты	Функция	Рецептор
BMP4	Миофибробласты	Блокирует пролиферацию активированную через Wnt и Notch сигнальные пути, индуцирует дифференцировку	BMPR 1
HB-EGF	Макрофаги M2	Приводит к экспрессии и секреции GM-CSF раковыми стволовыми клетками	EGFR
HGF	Стромальные фибробласты, миофибробласты	Альтернативный стимулятор Wnt сигнального пути	c-Met
IL-1 β	Иммунные и стромальные клетки	Рост и инвазивность опухоли	IL1R + gp130
IL-6	TAM	STAT3 and sonic hedgehog pathways	gp130
IL-11	Стромальными фибробластами	Активирует STAT3	gp130
IL-17A	T-клетки	Активирует STAT3, повышает выживаемость	IL-17R
IL22	Лимфоциты	Активирует STAT3 и экспрессию IL10	IL-22R
IL-23	Миелоидные клетки	Активирует STAT3, повышает выживаемость	IL-23R
Lefty	hESC	Ингибитор продуцируется ЭСК и может активировать апоптоз и дифференцировку РСК	
MFG-E8	TAM	Активация STAT3 и sonic hedgehog сигнального пути	alpha-v/beta-3, alpha-v/beta-5
TNF- α	Макрофаги	Активирует эпителиальный NF- κ B и STAT3	TNFR+gp130

ровку стволовых клеток, потому что миофибробласты секретируют ингибиторы BMP – gremlin 1, gremlin 2, chordin-like 1. Таким образом миофибробласты формируют благоприятную стромальную нишу для стволовых клеток кишечника [4]. Выявлена особая группа миофибробластов стромы опухоли названная опухоль ассоциированные миофибробласты (ОАМ). ОАМ основные регуляторные клетки микроокружения опухоли, которые выделяют целый ряд цитокинов и ростовых факторов. ОАМ выделяют HGF (таблица 1), который является альтернативным активатором Wnt сигнального пути. HGF может дедифференцировать нетуморогенные опухолевые клетки в более незрелые клетки за счет активации Wnt сигнального пути. Активация β -катенин зависимой транскрипции и последующей клоногенности раковых стволовых клеток связана с hepatocyte growth factor. Есть работы, в которых показано, что HGF способен приводить к рассипанию клеток на ранних стадиях эпителиально-мезенхимальной трансформации [5].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) мигрируют из костного мозга в область воспаления или повреждение ткани. МСК направленно мигрируют в опухоль как в область повреждения ткани и встраиваются в строму опухоли, где они дифференцируются в опухоль ассоциированные миофибробласты и стимулируют рост и метастазирование опухоли [6].

У эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) существуют факторы, которые тормозят дифференцировку. Экспериментальные работы показали, что РСК могут использовать эти механизмы ингибирования дифференцировки, такие как Nodal, Wntless, TGF β . Nodal имеет ингибитор Lefty, который блокирует Nodal сигнальный путь и активирует дифференцировку. В работе предложено использовать Lefty как фактор стимулирующий дифференцировку у ЭСК и РСК [7].

Иммунные клетки, которые заселяют опухоль и предраковые новообразования, выделяют ряд цитокинов. Эти цитокины вызывают локальный иммунный ответ и поддерживают рост и выживаемость раковых клеток через активацию таких транскрипционных факторов как NF- κ B. Например, IL-6 относится к этой группе цитокинов, синтез которых запускается за счет активации NF- κ B в миелоидных клетках. На ранних стадиях колит ассоциированного рака толстой кишки Т клетки являются основным проду-

центом IL-6. Данные проточной цитометрии показали, что дендритные клетки (CD11c+) и макрофаги (CD11b+) являются основными продуцентами IL-6 после Т-клеток (CD3+). IL-6/gp130 индуцирует STAT3 активацию во время развития рака, которая приводит к пролиферации энтероцитов [8].

IL-22 также как и IL-6 является активатором STAT3 сигнальной системы, который выполняет важную защитную функцию в иммунной системе кишечника. IL-22 продуцируется активированными Т клетками, среди них Th17, НК (NKp46+), дендритными клетками (CD11c+). Этот цитокин выделяется особенно в большом количестве в острую фазу воспаления за счет активации TLR лигандами или IL-23[9].

Th17 клетки являются продуцентами IL-17A, цитокина который индуцирует синтез ангиогенного фактора VEGF и TGF β в клетках мишенях. На мышцах с *ApcMin* генотипом было выявлено, что *Bacteroides fragilis* вызывают рак толстой кишки через IL17A/STAT3 сигнальный путь [10].

В микроокружении опухоли присутствуют активированные миелоидные клетки, то есть нейтрофилы, дендритные клетки, макрофаги. В поддержании РСК тумор ассоциированные макрофаги (ТАМ) занимают одну из ключевых ролей. Тогда как наличие активных дендритных клеток ассоциирована с высокой выживаемостью больных раком. ТАМ являются особой группой макрофагов, которые секретируют ряд цитокинов обеспечивающих рост и пролиферацию опухоли. ТАМ выделяют такие цитокины как HB-EGF, IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-23, MFG-E8, TNF, VEGF [11].

HB-EGF действует на РСК через активацию HER1, который запускает антиапоптозный сигнальные пути и пролиферацию. Также этот цитокин стимулирует секрецию GM-CSF в РСК [12].

IL-1 β ингибирует TRAIL-индуцированный апоптоз в раковых линиях толстой кишки HCT116 и HKe-3. Этот цитокин индуцирует Wnt сигнальный путь, стабилизирует SNAIL. Витамин D₃ ингибирует продукцию IL-1 β в макрофагах. В работе предложено использовать витамин D₃ в комбинации с противоопухолевой терапией [13].

MFG-E8 – является ростовым фактором, который участвует в фагоцитозе, ангиогенезе, иммунной устойчивости. Фактор активиру-

ет STAT3 сигнальный путь в РСК. MFG-E8 и IL-6 синергично стимулируют туморогенность и устойчивость к лекарственным препаратам у РСК. [14].

Еще один цитокин, который активирует STAT3, является IL-11. Миелоидные клетки и ОАМ продуцируют цитокин в микроокружение опухоли [15].

Выявлено, что рецептор к IL-23 экспрессируется у всех пациентов с IV стадией (TNM stage) рака толстой кишки. Экспрессия IL-23R коррелирует с инвазивностью карцином. В клеточной линии DLD-1 после стимуляции IL-23 активируется пролиферация и инвазивность клеток. IL-23 стимулирует малигнизацию опухоли [16].

TNF α /NF κ B важный медиатор рака толстой кишки ассоциированного с воспалением. Сигнал TNF α передается через два рецептора – TNFR1 и TNFR2. TNFR1 проявляет проапоптотную функцию через внутриклеточные домены смерти. TNFR2 не имеет домены смерти, и повышает пролиферацию эпителиальных клеток кишечника у животных при экспериментальной модели воспаления и у раковых стволовых клеток. Эти данные подтверждают, что через TNFR2 рецептор TNF α имеет протуморогенный эффект [17].

Таким образом среди рассмотренных клеток ключевую роль в поддержании рака играют опухоль ассоциированные миофибробласты и макрофаги, а также Th17 клетки.

Литература

- 1 Merlos-Suárez A., Barriga F.M., Jung P. et al. The Intestinal Stem Cell Signature Identifies Colorectal Cancer Stem Cells and Predicts Disease Relapse // *Cell Stem Cell*. – 2011. – Vol. 8, № 5. – P. 511-524.
- 2 Croker A.K., Allan A.L. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease // *J. Cell. Mol. Med.* – 2008. – Vol. 12, №2. – P. 374-390.
- 3 Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease // *Cell*. – 2006. – Vol. 127. – P. 469–80.
- 4 Pinchuk I.V., Mifflin R. C., Saada J. I. et al. Intestinal Mesenchymal Cells // *Curr Gastroenterol Rep.* – 2010. – Vol. 12, № 5. – P. 310–318.
- 5 Vermeulen L., De Sousa E., Melo F. et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment // *Nat Cell Biol.* – 2010. – Vol. 12. – P. 468–76.
- 6 Shinagawa K., Kitadai Y., Tanaka M. et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer // *Int. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 127. – P. 2323–2333.
- 7 Postovit L.M., Margaryan N.V., Seftor E. et al. Human embryonic stem cell microenvironment suppresses the tumorigenic phenotype of aggressive cancer cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – Vol. 105, № 11. – P.4329-34.
- 8 Lin W.W., Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer // *J Clin Invest.* – 2007. – Vol. 117. – P. 1175–1183.
- 9 Zheng Y., Valdez P.A., Danilenko D.M. et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens // *Nat. Med.* – 2008. – Vol. 14. – P. 282–289.
- 10 Wu S., Rhee K.J., Albesiano E. et al. A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses // *Nat Med.* – 2009. – Vol. 15. – P. 1016-1022.
- 11 Schwaab T., Weiss J.E., Schned A.R. et al. Dendritic cell infiltration in colon cancer // *J Immunother.* – 2001. – Vol. 24, № 2. – P. 130-7.
- 12 Rigo A., Gottardi M., Zamò A. Macrophages may promote cancer growth via a GM-CSF/HB-EGF paracrine loop that is enhanced by CXCL12 // *Mol Cancer.* – 2010. – Vol. 9, № 273.
- 13 Kaler P., Augenlicht L., Klampfer L. Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3 // *Oncogene.* – 2009. – Vol. 28. – P. 3892–3902.
- 14 Hao N.-B., Lu M.-H., Fan Y.-H. et al. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors / *Clin Dev Immunol.* – 2012. – Vol. 2012, № 948098. – doi: 10.1155/2012/948098.
- 15 Onnis B., Fer N., Rapisarda A. et al. Autocrine production of IL-11 mediates tumorigenicity in hypoxic cancer cells // *J Clin Invest.* – 2013. – Vol. 123, № 4. – P. 1615–1629. – doi:10.1172/JCI59623.
- 16 Suzuki H., Ogawa H., Miura K. et al. IL-23 directly enhances the proliferative and invasive activities of colorectal carcinoma // *Oncology Letters.* – 2012. – Vol. 4, № 2. – P. 199-204.
- 17 Micheau O., Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes // *Cell.* – 2003. – Vol. 114. – P. 181–90.