

ФГБУ НИИ онкологии
СО РАМН, г. Томск

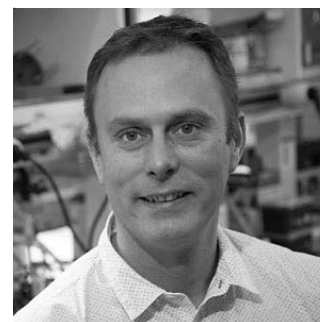
ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ В ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ ОНКОЛОГИИ В 2012 ГОДУ

Н.В. Чердынцева, Н.В. Литвяков, Е.В. Денисов

*Знаменательно,
что именно в 2012 году
молекулярными онкологами
получены неоспоримые
доказательства
существования стволовых
клеток опухоли*

Лауреатами Нобелевской премии 2012 года в области физиологии и медицины стали John Gurdon (Gurdon Institute, UK) и Shinya Yamanaka (Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, USA, and Kyoto University, Japan) за достижения в изучении стволовых клеток, а именно за «открытие возможности перепрограммирования дифференцированных клеток в плюрипотентные» [1]. 40 лет назад, в 1962 году, J. Gurdon провел успешные эксперименты по выращиванию головастика из клетки (икринки) шпорцевой лягушки, в которую вместо собственного разрушенного ядра было имплантировано ядро «взрослой» (дифференцированной) клетки кишечника головастика. Этот результат показал возможность обратимости дифференцировки и послужил началом эры клонирования. Больше трех десятилетий спустя, в 2007 году, S. Yamanaka удалось получить из дифференцированных фибробластов плюрипотентные стволовые клетки, изменив уровень экспрессии генов *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc*, а затем снова дифференцировать их в зрелые клетки различных тканей [39]. Это открытие дало ученым инструмент регуляции стволовых и дифференцированных клеток. Одним из важнейших практически значимых эффектов работы Яманаки в этическом плане является то, что нет необходимости работать со стволовыми клетками, полученными из эмбрионов, так как они могут быть заменены индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками. Важность этих исследований для онкологии связана с перспективой доказательства возможности образования опухолевых стволовых клеток (ОСК) из соматических, поиска маркеров ОСК и молекулярных мишеней для разработки методов их избирательного уничтожения в опухолях. Также появилась практическая перспектива создания банка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для онкологических больных с целью заместительной терапии.

Знаменательно, что именно в 2012 году молекулярными онкологами получены неоспоримые доказательства существования стволовых клеток опухоли. Прямое подтверждение концепции ОСК явилось одним из самых значительных успехов фундаментальной онкологии в 2012 году.



Cedric Blanpain

Нобелевские лауреаты
2012 года в области
физиологии и медицины:



John B. Gurdon



Shinya Yamanaka

Раковые стволовые клетки

Популярная гипотеза о том, что многие опухоли поддерживаются стволовыми раковыми клетками, подобно тому, как обычные стволовые клетки строят нормальные ткани, до сего года подтверждалась лишь косвенными методами. Сортировка клеток по поверхностным маркерам и последующая имплантация разных их субпопуляций мышам позволила выявить клетки, дающие начало новым опухолям, и именно они рассматривались как стволовые. Однако возможность изменения свойств и поведения клеток при трансплантации в новом микроокружении оставляла открытым вопрос о физиологической судьбе этих клеток в «родном» микроокружении, и действительно ли эти клетки могут дать в нем начало новым опухолям. Cédric Blanpain (Université Libre de Bruxelles, Belgium), научным кредо которого является «увидеть, чтобы поверить», усовершенствовал генетическую технологию анализа гистогенеза (lineage tracing), что позволило выявить паттерн клеток, делящихся в ткани, то есть в условиях их естественного микроокружения, и наблюдать динамику процесса в микроскоп. За это исследование С. Blanpain был включен в число 10 известных ученых, отмеченных журналом «Nature» за выдающиеся научные достижения в 2012 году. Предложенный им методический подход позволил непосредственно в ткани, в привычном физиологическом окружении, наблюдать возникновение опухолей из определенных популяций клеток, которые можно с уверенностью считать стволовыми опухолевыми клетками. Процесс формирования опухоли удалось проследить независимо трем группам ученых на разных моделях – опухолях мозга, кожи и кишки. Полученные результаты, более подробное описание которых приведено ниже, подтвердили, что небольшая популяция стволовых клеток ответственна за рост опухоли, но справедливо ли это для других опухолей – пока судить рано. Однако уже сейчас можно говорить о возможном изменении парадигмы химиотерапии, когда для оценки эффективности химиотерапии важно будет знать не столько уменьшение объема опухоли, а то, насколько лекарственное средство воздействует на «причинную» популяцию (клон) клеток – стволовых клеток, способных возобновлять рост опухоли после лечения [5]. Направленное токсическое воздействие на стволовые клетки опухоли может стать той «волшебной пулей», которая позволит уничтожить опухоль.

Немного об истории вопроса

В настоящее время существует две основных теории развития злокачественной опухоли. Согласно стохастической (клональной) теории в опухолевые клетки могут трансформироваться любые соматические клетки, при этом все они являются потенциально клоногенными и могут давать начало новой опухоли, а опухолевая прогрессия осуществляется в результате появления клонов, которые приобретают преимущество благодаря онкогенным мутациям или эпигенетической модификации. По иерархической теории, опухоль развивается из ство-

ловых клеток организма, и они, превращаясь в опухолевые стволовые клетки, формируют ограниченную субпопуляцию размножающихся клеток, которые и обеспечивают рост и развитие опухоли. Каждая из теорий основывается на неоспоримых событиях опухолевого роста и имеет право на существование, более того, обе они подразумевают формирование клональных субпопуляций в пределах одного новообразования и могут дополнять друг друга.

***Стволовые клетки** – это клетки различных органов и тканей, которые способны к асимметричному делению, при этом, одна из дочерних клеток остается стволовой, а другая дает начало специализированным клеткам того или иного типа. Так происходят обновление и регенерация тканей. Термин «стволовая клетка» был введен в науку в 1909 году российским ученым Александром Александровичем Максимовым (<http://ru.wikipedia.org/wiki/>) – так он назвал клетки крови, которые способны дать начало нескольким другим типам клеток. В 1960-е годы была продемонстрирована возможность развития из клеток костного мозга клеток крови, а в 1981-м году американский биолог Мартин Эванс впервые выделил из зародыша мыши плюрипотентные стволовые клетки (способные развиваться в клетки разного типа). В 1998 году американским ученым Дж. Герхарту и Дж. Томпсону впервые удалось получить культуры эмбриональных стволовых клеток, способных развиваться в зрелые клетки различных типов. В 1999 году журнал Science признал открытие стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после открытия двойной спирали ДНК и программы «Геном человека».*

Опухолевые стволовые клетки дают начало иерархии идентичных родительским клеткам, сохраняющих онкогенный потенциал (самовоспроизведение), и клеток, которые «уходят» в дифференцировку, при этом последние могут иметь значительную фенотипическую и функциональную вариабельность, формируя внутриопухолевую гетерогенность. Впервые концепция опухолевых стволовых клеток высказана в 1977 году для миелоидного лейкоза и некоторых нейробластом [18]. Методом лимитирующих разведений культур опухолевых клеток при трансплантации была показана редкая субпопуляция клеток острого миелобластного лейкоза, не более 0,01-1% от общего числа опухолевых клеток, которая могла индуцировать лейкемию у иммунодефицитных мышей. Впоследствии опухолевые стволовые клетки были найдены во многих солидных опухолях животных и человека [43]. Доля стволовых клеток в солидных опухолях может сильно варьировать, отражая их биологическое и функциональное разнообразие, а также злокачественный потенциал опухоли [21]. В частности, распределение ОСК

в опухоли молочной железы связано с ее молекулярным подтипом – наибольшая частота отмечается при «трижды негативном» подтипе, который имеет неблагоприятный прогноз [8, 26]. Мета-анализ 12 исследований показал, что уровень CD133+ ОСК в опухоли может быть перспективным прогностическим фактором при колоректальном раке [45]. При повышенной частоте ОСК опухоли хуже отвечают на химио- и лучевую терапию, а сами стволовые клетки оказываются химиорезистентными, так как находятся в состоянии покоя (не пролиферируют), и в них высоко экспрессированы гены множественной лекарственной устойчивости. Кроме того, ОСК могут претерпевать адаптивные изменения и в процессе лекарственной терапии, усиливая устойчивость к химиопрепаратам. Таким образом, жизнеспособность концепции опухолевых стволовых клеток подтверждается ее клинической пользой. В настоящее время активно разрабатываются таргетные препараты, направленные непосредственно на ОСК [7, 17, 43].

Прямые доказательства существования опухолевых стволовых клеток

В работе коллектива С. Blanpain изучалось развитие индуцированных (канцерогеном ДМБА – диметилбен(а) антраценом и промотором ТРА) плоскоклеточных карцином кожи мышей [11]. Чтобы иметь возможность наблюдать поведение индивидуальных клеток, их маркировали особым образом. Мышам трансфецировали генетическую конструкцию K14CREER/Rosa-YFP, которая активируется при введении тамоксифена, и при этом экспрессируется флуоресцирующий белок YFP (yellow fluorescent protein). Стволовые клетки кожи и их потомки у этих мышей, при введении тамоксифена, продуцировали белок YFP и флуоресцировали под действием ультрафиолета желтым светом. Изучив в динамике развитие плоскоклеточной карциномы, исследователи установили, что папилломы, образующиеся на первом этапе канцерогенеза, состоят из потомков стволовых клеток кожи. При дальнейшей трансформации папилломы в плоскоклеточную карциному стволовые клетки, по-видимому, уже опухолевые стволовые клетки, начинают бесконтрольно и активно делиться, и некоторые участки опухоли составляют потомки одной-единственной стволовой клетки. Таким образом, в данной работе напрямую было показано, что образование папиллом и плоскоклеточных карцином происходит за счет стволовых клеток.

Группой исследователей под руководством проф. Luis Parada (University of Texas Southwestern Medical Center, USA) была выдвинута рабочая гипотеза, предполагавшая, что нейральные стволовые клетки, из которых образовались опухолевые стволовые клетки, являются родоначальниками мультиформной глиомы [6]. Исследователи получили генетически трансформированную линию мышей, у которых развивались спонтанные глиомы, и нейральные стволовые клетки этих мышей были маркированы двумя способами. Во-первых, они экспрессиро-

вали флуоресцентный белок GFP (Нобелевская премия по химии 2008 г. за открытие и изучение зеленого флуоресцентного белка медузы *Aequorea victoria* (green fluorescent protein, GFP)), который позволял с помощью флуоресцентного микроскопа отличать их от других клеток. Во-вторых, они могли быть селективно убиты при помощи лекарства от герпеса – ганцикловира, поскольку экспрессировали ген тимидинкиназы вируса простого герпеса, при этом ганцикловир был совершенно безвреден для других клеток, как здоровых, так и опухолевых.

Исследователи выяснили, что при развитии глиомы только небольшое количество клеток в опухоли светится зеленым, т.е. в опухоли есть стволовые клетки и они родственны нейральным стволовым клеткам. Мышам провели химиотерапию препаратом темодал, который обладает селективностью в отношении пролиферирующих клеток. После химиотерапии оказалось, что часть опухолевых клеток выжила, и опухоль снова начала расти. Выжившими клетками были светящиеся зеленым стволовые клетки опухоли, они начали активно размножаться и восстанавливать объем опухоли, при этом хорошо была заметна асимметричность деления стволовых клеток – половина их дочерних клеток уже не светилась зеленым, т.е. не была стволовыми и подвергалась определенной дифференцировке. Тем не менее, для того чтобы однозначно доказать роль стволовых клеток в развитии глиомы, нужно было продемонстрировать, что в отсутствие фактора нет и изменений, которые он вызывает. Исследователи при помощи ганцикловира убили нейральные стволовые клетки у мышей еще в молодом возрасте, и у этих мышей злокачественные глиомы в процессе онтогенеза не развивались. Это достаточно четко свидетельствует о том, что нейральные стволовые клетки являются родоначальниками развития злокачественной глиомы, и подтверждает рабочую гипотезу ученых.

Третья группа исследователей (University Medical Center Utrecht, Netherlands) выполнила изящную работу на модели кишечной аденомы, которая развивается у мутантных мышей [32]. Для маркировки клеток использовали многоцветный CRE (cAMP response element) репортер R26R-Confetti, который позволяет выявить стволовые клетки слизистой кишечника. После введения тамоксифена они и их потомки светятся одним из четырех цветов: красным, синим, зеленым или желтым. Через 24 дня исследователи второй раз ввели животным тамоксифен. После второго введения тамоксифена делящиеся стволовые клетки (только делящиеся) и их новые потомки перекрашивались в другой цвет: если клетка при первом введении была красной, то после второго введения она становилась синей и наоборот, а если была зеленой, то становилась желтой и наоборот. Через 2 дня после второго введения тамоксифена исследователи увидели (рис. 1а), что практически все клетки опухоли – одного цвета, т.е. опухоль составили потомки одной группы клеток (которые окрасились изначально в один цвет). Небольшая группа клеток через 2 дня после второй инъекции тамок-