

Kmenové buňky nádorů

MUDr. Iva Slaninová, Ph.D.
Biologický ústav LF MU
ipokorna@med.muni.cz

Hierarchie buněk v tkáních

Kmenové buňky – „self-renewal“ - klon

Progenitorové buňky – s každým dělením více diferencované

Progenitor cell divisions

?

0

00 [once]

0000 [twice]

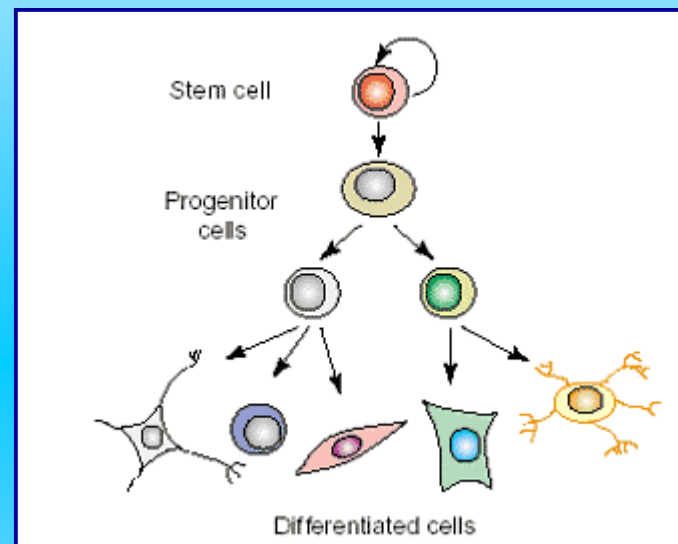
00000000 [3 times]

0000000000000000 [4 times]

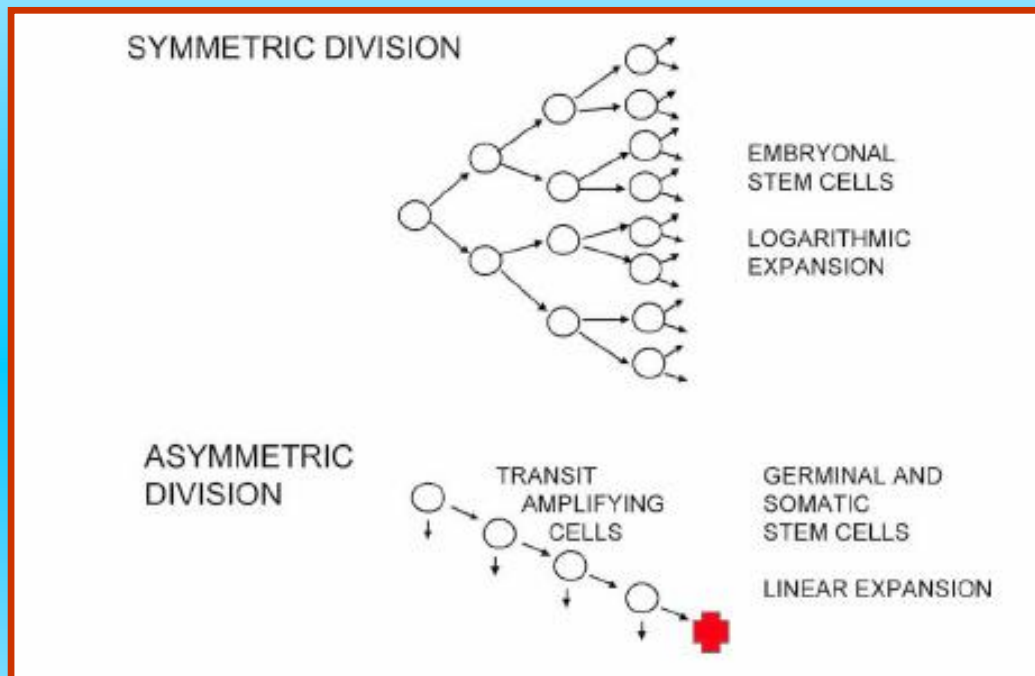
00000000000000000000000000000000 [5 times]

XX etc

Plně diferencované buňky – postmitotické – málo progenitorů tvoří spoustu diferencovaných bb



Symetrické a asymetrické dělení



Sell S. Crit Rev. Oncol Hematol: 51, 2004

Symetrické dělení – každá dceřinná bb stejná jako mateřská (klon buněk) - **Self-renewal - sebeobnovení**

Asymetrické – jedna dceřinná bb stejná, druhá zahajuje proces diferenciaci – progenitorové bb – uchovávají si schopnost proliferace – obnova tkání - **Diferenciaci**

Kmenové buňky

Přítomny ve všech tkáních jako zásoba bb pro obnovu tkání a orgánů

Potenciál pro terapii

Potenciál pro vznik nádorů

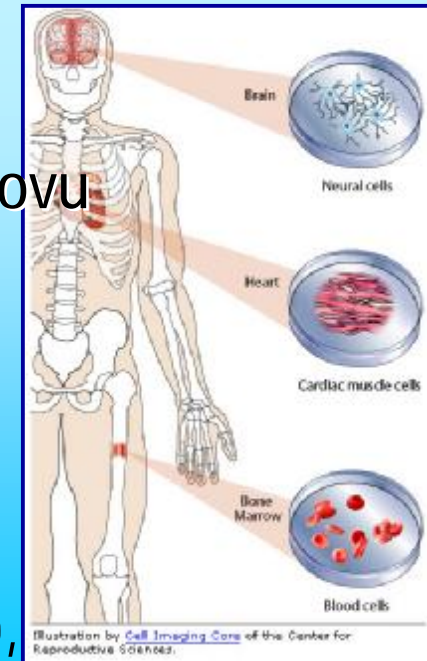
Ø aktivní mechanismus sebeobnovy (self-renewal), vysoká proliferační aktivita

Ø větší pravděpodobnost vzniku a kumulace mutací

Ø nemusí dediferencovat

Progenitorové bb – transformace je podmíněna znovuzískáním self-renewal

- dědění existujících mutací do dalších generací, pak už stačí k transformaci 1 mutace



Nádorové buňky

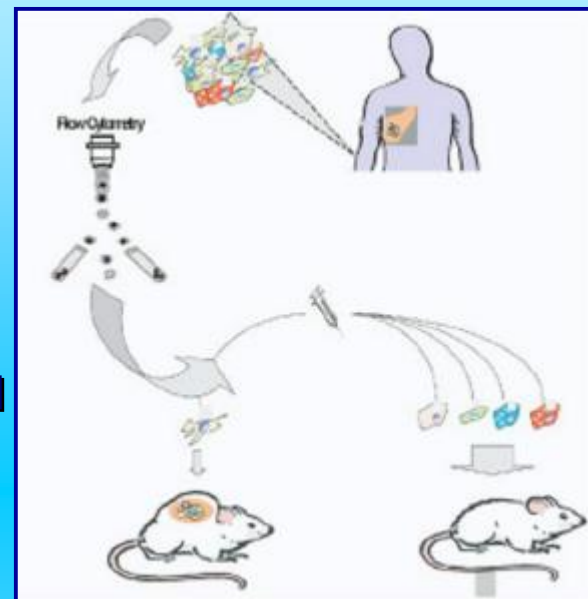
Mutace normálních bb

Mutace kmenových bb

!!Jen některé nádorové bb jsou schopny u imunodeficientních myší vyvolat nádor!!

- **tumorigenní bb**

Existence **nádorových kmenových buněk** (cancer stem cells) byla předpovězena před více než 40 lety (jako funkční heterogenita nádorů), ale až v posledním desetiletí byly tyto bb charakterizovány u hematopoetických malignit, i u nádorů prsu a mozku.



Clarke, M.F., Biology of Blood and Marrow transplantation 11. 2005

Kmenové a nádorové buňky

Společné vlastnosti

- 1) Extenzivní **proliferační potenciál** a schopnost dát vznik nové tkáni (normální x abnormální)
- 2) Schopnost **sebeobnovy** (self-renewal) – společné mechanismy - **nesmrtelnost**
- 3) Schopnost tvořit vyzrálé bb – **diferenciace**
- 4) Nádorové kmenové bb mohou vznikat z normálních k.b.
- 5) Metabolické **signální dráhy**, které jsou porušeny při nádorové transformaci hrají významnou roli při regulaci vývoje kmenových buněk (Wnt, Shh, Notch)
- 6) Schopnost **invazibility** migrace a růstu v místech vzdálených od svého vzniku

Kmenové a nádorové buňky

- 7) Dlouhé **telomery**, vysoká telomerázová aktivita
- 8) Vysoká exprese **ABC transportérů** – resistance k cytostatikům
- 9) Sekrece **růstových faktorů** a cytokinů
- 10) Sekrece **chemoatraktantů** pro endoteliální progenitory – angiogeneze
- 11) **Mobilita** – migrace normálních k.b., metastázování nádorových
- 12) Exprese podobných **povrchových receptorů** (CXCR4, Sca-1 antigen, CD133)

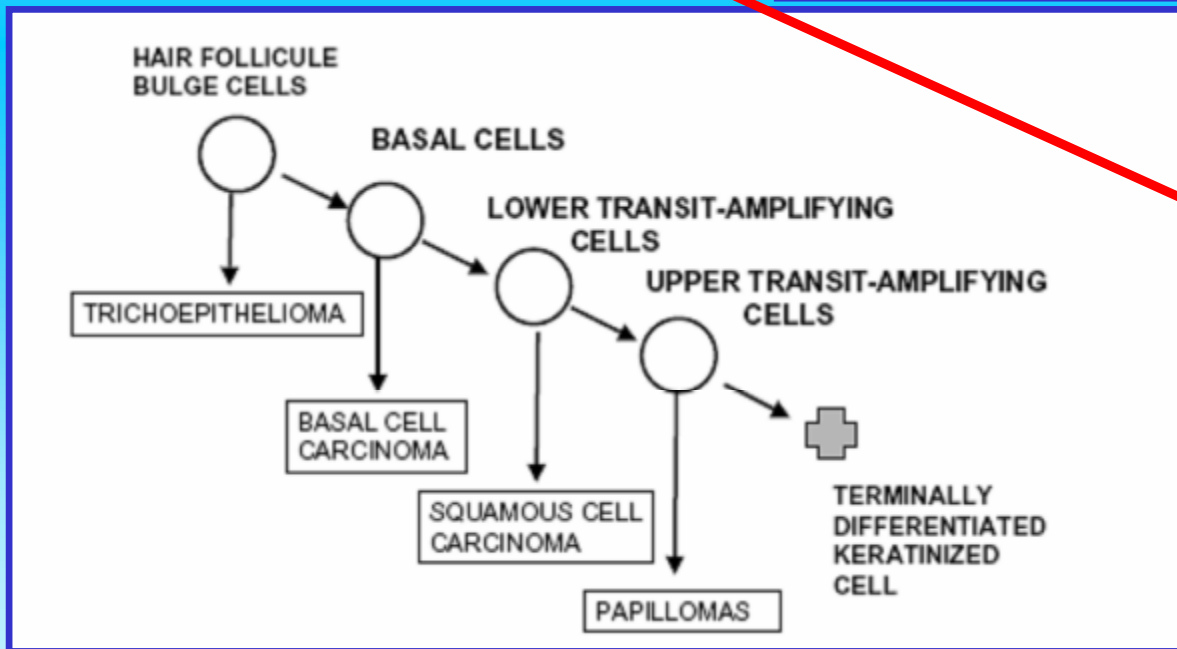
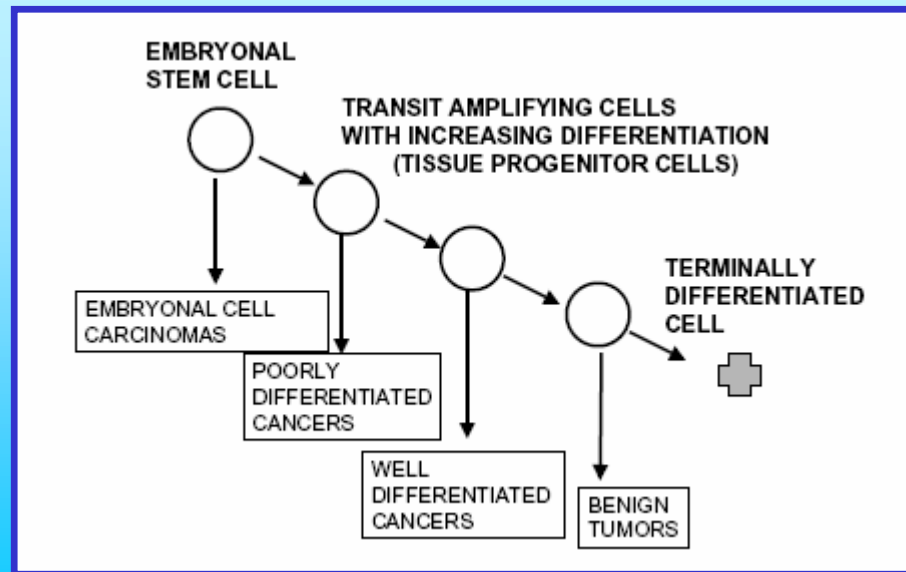
Kmenové a nádorové buňky

Table 1. Normal tissue/organ-specific stem cells are origin of cancer stem cells for different tumors

| Normal tissue | Corresponding tumor |
|--------------------------------------|------------------------|
| Hematopoietic stem cells | Leukemias |
| Neural stem cells | Brain tumors |
| Bronchial endocrine stem cells | Small cell lung cancer |
| Mammary gland epithelium stem cells | Breast cancer |
| Skeletal muscle satellite cells | Rhabdomyosarcoma |
| Neuroectodermal stem cells | Neuroblastoma |
| Renal tubular epithelium stem cells | Willms tumor |
| Retina pigment epithelium stem cells | Retinoblastoma |
| Liver oval stem cells | Hepatoblastoma |
| Ovarian epithelium stem cells | Ovarian cancer |
| Cervical epithelium stem cells | Cervical cancer |

Ratajczak, Folia Histochemica and Cytobiologica, 43, 2005

Vztah mezi stupněm diferenciaci a typem rakoviny



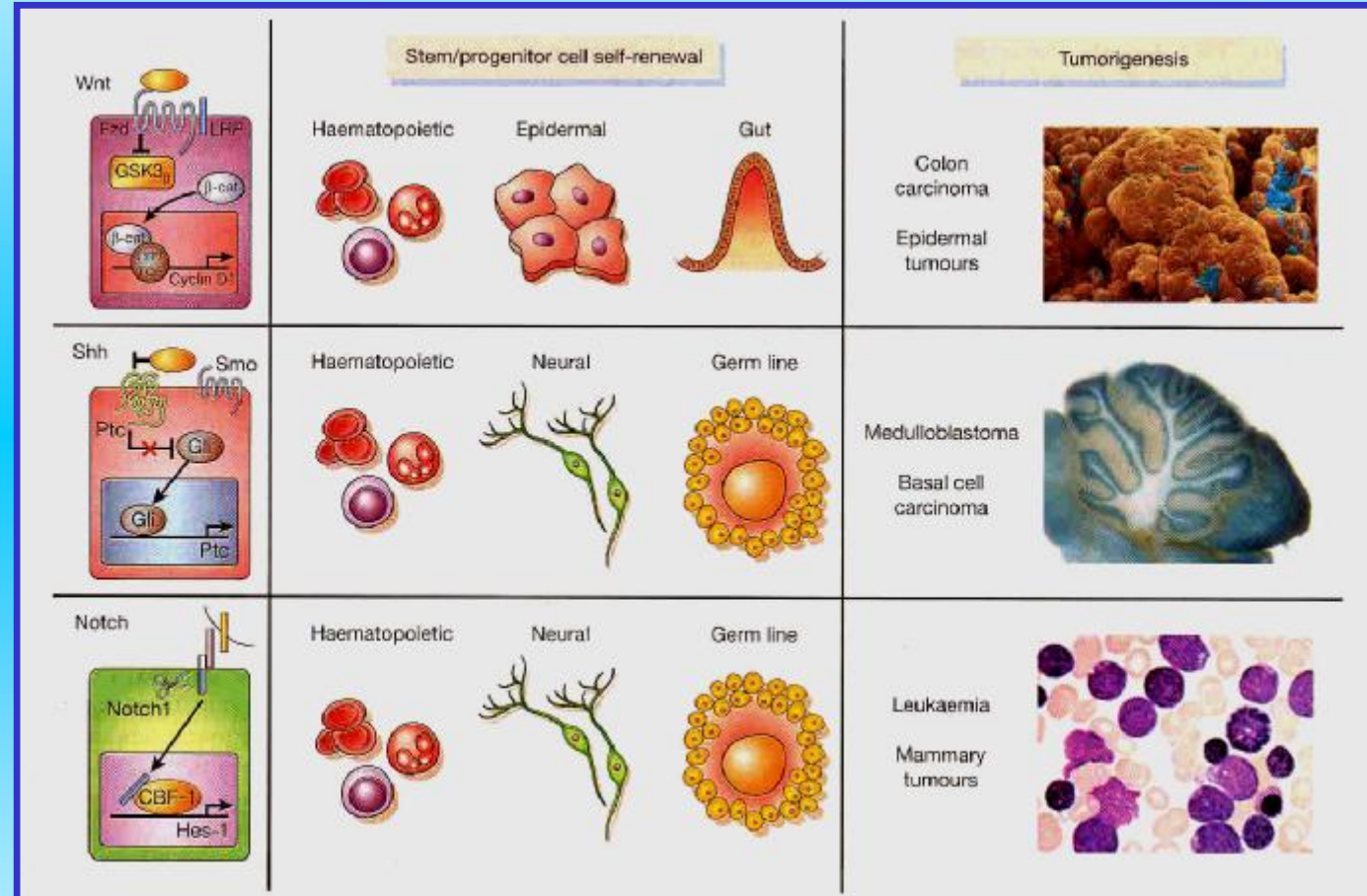
Rostoucí diferencovanost -klesající malignita

Sell S. Crit Rev. Oncol Hematol: 51, 2004

Signální dráhy regulující vývoj kmenových buněk i nádorovou transformaci

Dráhy zapojené v sebeobnovování kmenových bb a udržení jejich multipotence

A zároveň jejich narušení vede k nádorové transformaci



Apoptóza – např. zábrana apoptóze zvýšenou expresí bcl-2

Reya T., et al., Nature: 414, 2001

Signální dráha Wnt/b-catenin

Pokud dráha není aktivována **b-catenin** je navázán na adheriny v buněčných spojích nebo je v komplexu s axinem –fosforylován, přístupný degradaci. Vazba **Wnt** na receptor – fosforylace Dsh proteinu, který asociuje s **axinem** a brání Gsk-3 ve fosforylaci negativních regulátorů – axinu a APC (adenomatous polyposis coli) a **b-cateninu**. Nefosforylovaný **b-catenin** je chráněn před destrukcí – je transportován do jádra, kde aktivuje **transkripční faktory** (Tcf a Lef) a umožňuje transkripci genů podmiňujících **proliferaci** (cyclin D1, c-jun, c-myc).

Wnt –onkogen

Wnt/**b-catenin** signalizace – důležitá v proliferaci a diferenciaci - důležitá při vývoji a při kancerogenezi

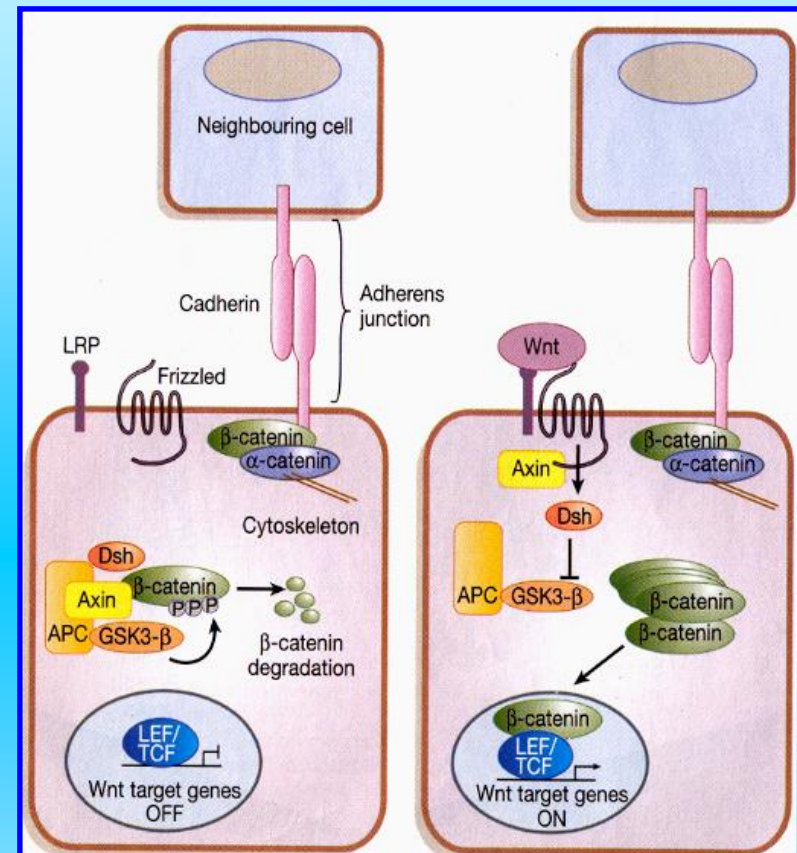
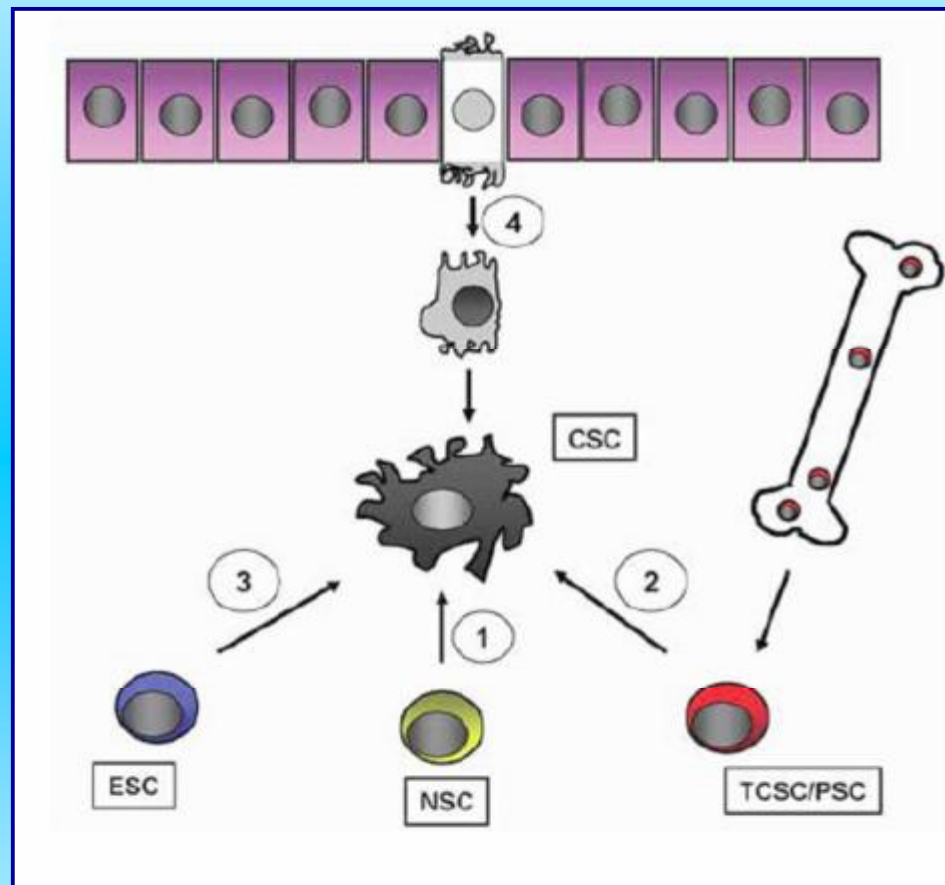


Figure 1 The canonical Wnt signalling pathway. In the absence of Wnt signalling (left panel), β -catenin is in a complex with axin, APC and GSK3- β , and gets phosphorylated and targeted for degradation. β -Catenin also exists in a cadherin-bound form and regulates cell-cell adhesion. In the presence of Wnt signalling (right panel), β -catenin is uncoupled from the degradation complex and translocates to the nucleus, where it binds to Lef/Tcf transcription factors, thus activating target genes. (Adapted from ref. 44.)

Reya and Clevers, Nature434, 14 April, 2005

Mechanismy vzniku nádorových kmenových buněk (CSC)

- 1) Transformací tkáňově specifických k.b. (NSC) nebo progenitorů
- 2) Z bb kostní dřeně inkorporovaných v nesprávný čas na nesprávné místo (chronický zánět, devastace tkání zářením)
- 3) Z aberantních depozit embryonálních kmenových bb(ESC) (Virchovova hypotéza)
- 4) Mutace vedoucí k dediferenciaci a imortalizaci diferencovaných bb (familiární rakoviny)



Ratajczak, Folia Histochemica and Cytobiologica, 43, 2005

Kmenové bb jako terče mutací



U většiny nádorů jsou terče transformace neznámé

Určité typy leukémií – kumulace mutací v hematopoetických kmenových bb

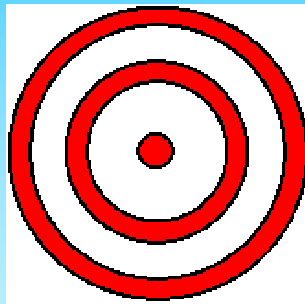
Důkazy: AML (akutní myeloidní leukémie) – fenotyp CD34+CD38- stejný jako kmenové bb – jsou schopné transferovat leukémii do imunodeficientních myší, bb CD34+CD38+ to nedovedou

AML T8/21 – AML1-ETO chimerický transkript – u pacientů v remisi je tento transkript i v normálních hematopoetických kmenových bb v kostní dřeni – tyto bb nejsou leukemické a mohou diferencovat → **translokace vzniká v normálních hematopoetických kmenových bb a až další mutace vedou k leukémii**

Progenitorové bb jako terče mutací

Model myší s myeloidní leukémií vzniklé z progenitorů – exprese antiapoptotického bcl2 – **zábrana apoptóze** – klíčová událost při vzniku myeloidních leukémií

Mutace se akumulují v kmenových bb, ale jsou exprimovány až u progenitorových bb



„Embryonal rest“ hypotéza

Tkáňové kmenové bb jsou ekvivalentem dříve popsaných „embryonal rests“ a **většina nádorů vzniká na základě zástavy dozrávání buněčné linie** derivované z těchto bb

!!! Nádorová tkáň je méně diferencovaná než normální tkáň !!!

Stupeň diference – důležitý prognostický znak (grading)

„Embryonal rest“ hypotéza

V 19. a začátkem 20. století Virchow, Cohnheim, Ribbert a další - domněnky o **embryonálním původu nádorů** – rakovina vzniká z progenitorů podobných embryonálním nebo germinálním bb lokalizovaným na nesprávných místech (Virchow's embryonal rests)

Teratokarcinomy - embryonální karcinomy – struktury připomínající embrya – výskyt u mladších dospělých v místech podél migrace embryonálních bb

Nádory dětského věku: Wilmsův tumor (nefroblastom) – ledviny – nediferencovaná mesodermální tkáň

Neuroblastomy

Mladší děti horší prognóza, starší - nádor diferencovanější, příznivější

Dediferenciační hypotéza

Rakovina může být vnímána jako blok ontogeneze, problém kontroly progenitorových bb svým okolím (niche) nebo narušení morfogeneze a diferenciacce kmenových bb chemikáliemi

Mutagenní faktory (chemikálie, záření, viry), způsobí indukci dediferenciacce již diferencované bb -**anaplazie**

Nádor jako specifický orgán

Aberantní orgán iniciovaný nádorovou bb, která získala schopnost neomezeného dělení díky akumulaci mutací

Kmenové bb nádoru vzácné bb s neomezeným proliferačním potenciálem, řídí růst a propagaci nádoru

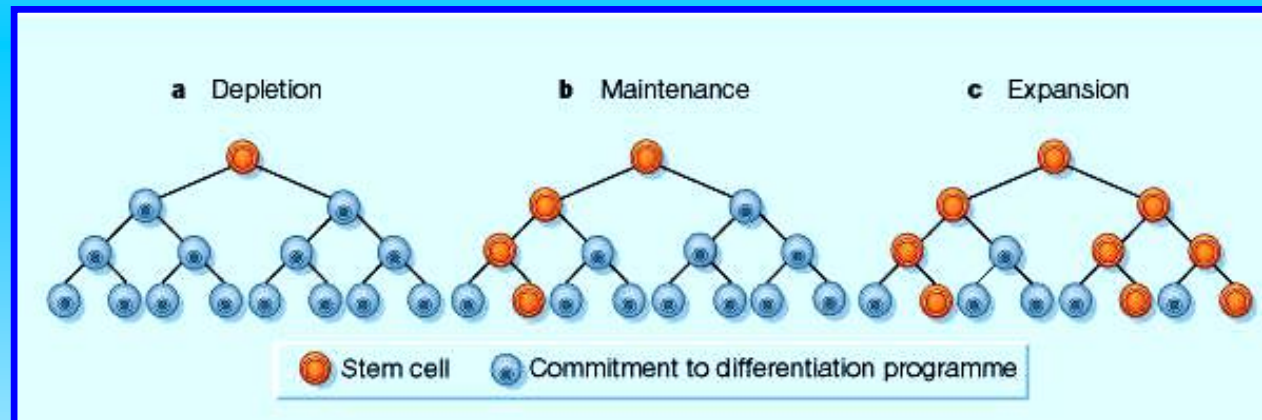
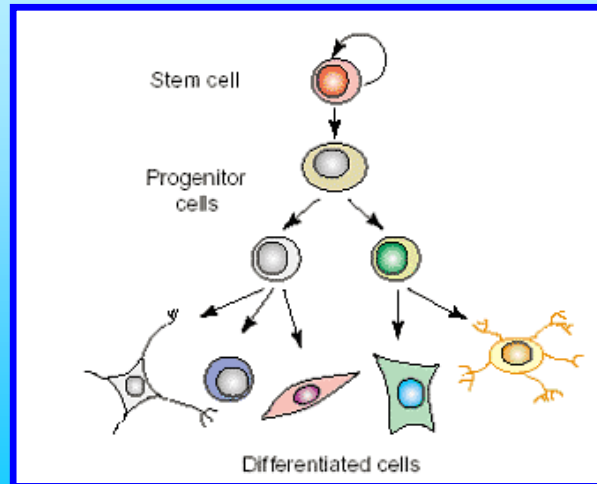
Nádor i normální tkáň – heterogenní kombinace bb s různým diferenciačním potenciálem. Nádorové bb podléhají procesům analogickým self-renewal a diferenciaci.

Jen některé bb nádoru jsou schopny extenzivní proliferace (1z 10000-1 ze 100 nádorových bb je schopna tvořit kolonie

Klonogenní leukemické bb = leukemické kmenové bb

!!! Nová teorie vzniku nádorů vycházející z kmenových bb !!!

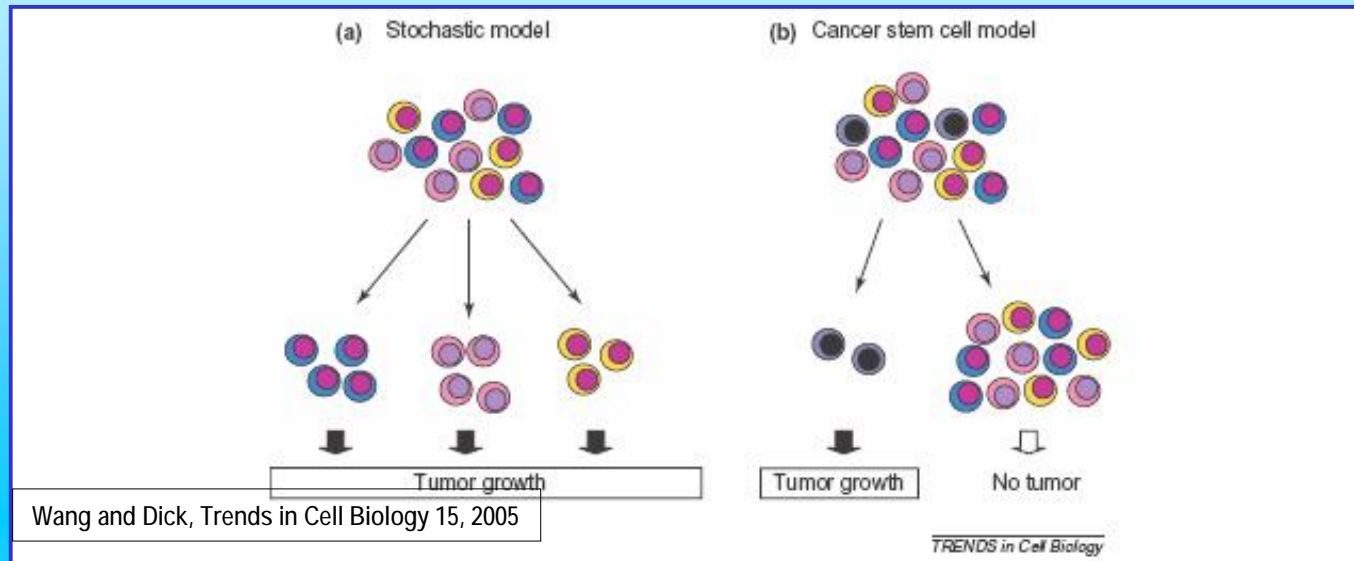
Možnosti chování kmenových bb



Dick, J.E. Nature:423, 2003

Jen málo nádorových buněk je **tumorigenních** = tumorigenní bb jsou patrně **nádorové kmenové bb**

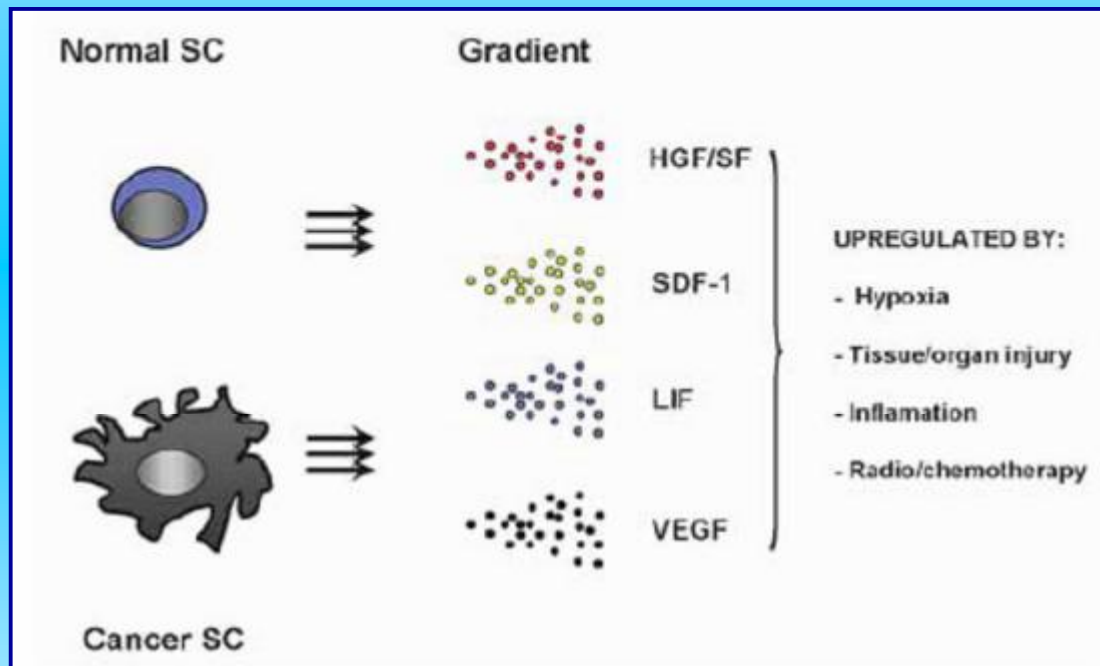
Teorie vzniku a šíření nádorů



- 1) **Všechny** bb nádoru mají nízkou pravděpodobnost extenzivní proliferace a v klonogenní assay se chovat jako nádorové kmenové bb – stochastický model
- 2) Většina bb nádoru má jen omezenou možnost proliferace a nemůže se chovat jako kmenové bb, ale **malá část** bb je schopná extenzivně proliferovat a tvořit nádor – model nádorových kmenových bb

Metastázování

Podobné faktory regulují transport normálních kmenových bb při regeneraci tkání a metastázování nádorových bb



Ratajczak, Folia Histochemica and Cytobiologica, 43, 2005

Chemoatraktanty a receptory

Chronický zánět

Radiace

Poranění, poškození tkáně

Inkorporace v nesprávný čas na nesprávné místo

Jedním z vedlejších účinků radio- a chemoterapie je vytváření prostředí přitahujícího metastázující bb do určitých orgánů

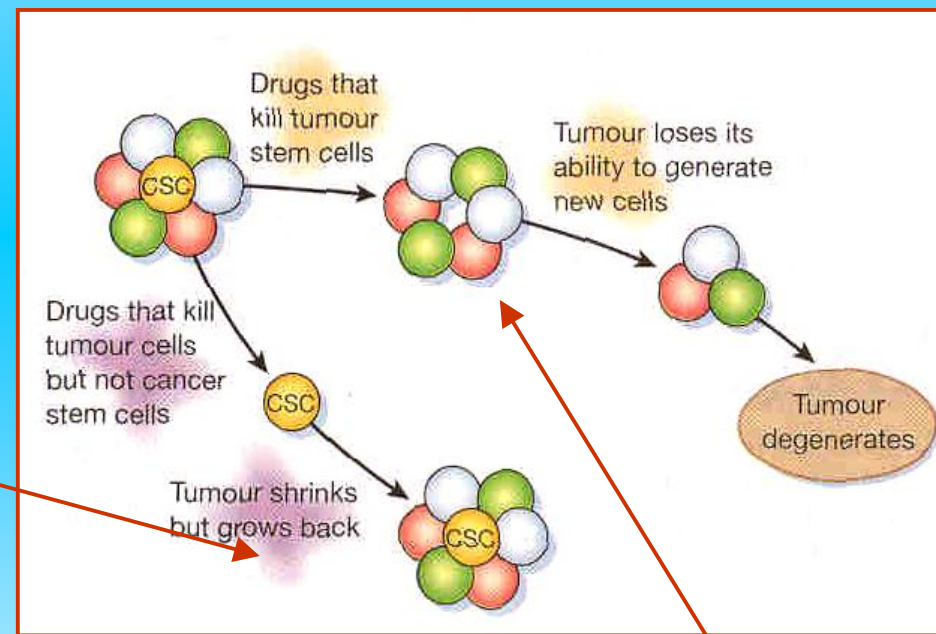
Terapie

Růst nádoru - řízen minoritními bb odolnými vůči terapii (resistence k cytostatikům – ABC transportéry, exprese antiapoptotických proteinů).



= **Komplikace terapie**

Klasická terapie zmenší nádor usmrcením bb s limitovaným proliferačním potenciálem, kmenové bb zůstanou a obnoví nádor!!



!!! Terapie cílená na kmenové bb !!!!

Reya T., et al., Nature: 414, 2001

Diferenciační terapie

!!! Vyšší stupeň diferenciacce – nižší malignita !!!

Pokusy s naočkováním bb teratokarcinomu do normální myši blastocysty. Blastocysta nejen kontrolovala růst těchto nádorových bb, ale bb byly i začleněny do vyvíjejícího se embrya – **dospělá myš s normálně fungující tkání nádorového původu – chiméra**. Samec Terry Tom takto vyvinuté myši měl **potomky s genotypem nádorových bb**.

Injekce leukemických bb do placenty 10 denního myšího plodu – indukce **hematopoetické maturace** a výskyt normálních bílých krvinek nesoucích znaky leukemických bb

I bb neuroblastomu a melanomu byly diferencovány v embryonálním prostředí

Diferenciační terapie

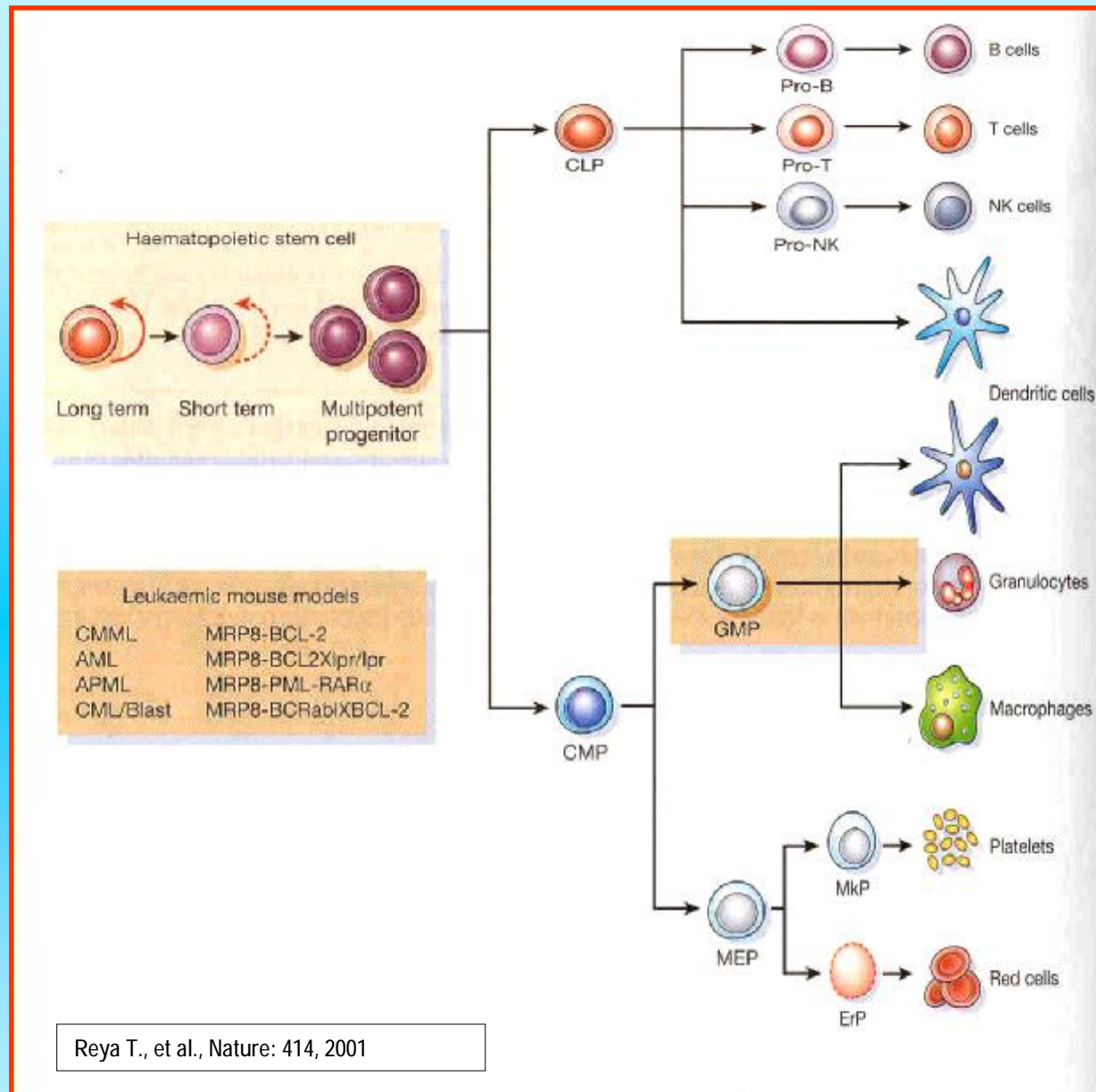
!!! Nádorové bb mohou zastavit proliferaci a diferencovat !!!

Terapeutická aplikace diferenciačních látek

– RA (retinoid acid, Vitamin A)

ATRA (all-trans-retinoic acid) – akutní promyelotická leukémie

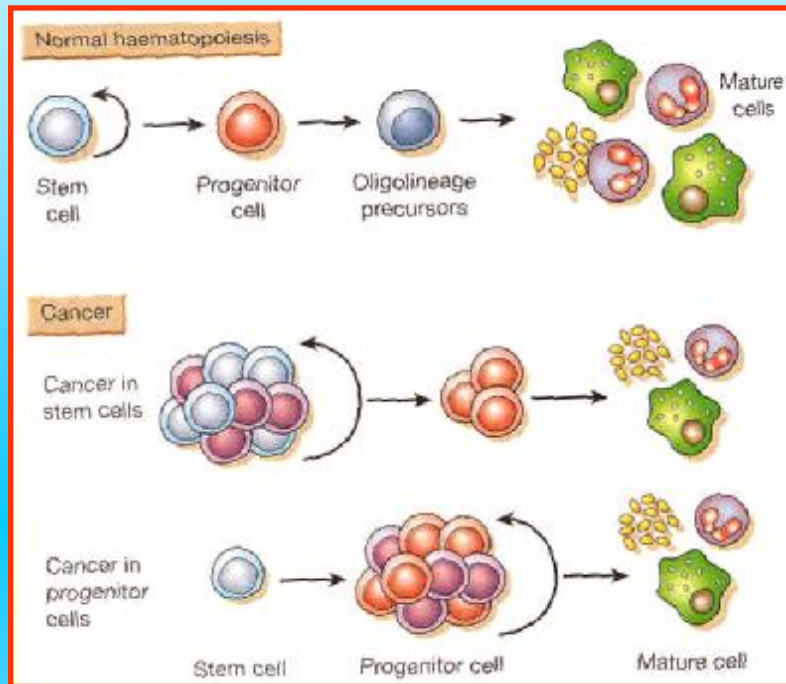
Leukémie – příklad malignity kmenových bb



CLP – common lymphoid progenitors – prekuzory všech lymphoidních bb

CMP – common myeloid progenitors – prekuzory všech myeloidních bb

Leukémie – příklad malignity kmenových bb



AML- nediferencované blasty –
přežití měsíce

CML – středně diferencované
bb – přežití roky

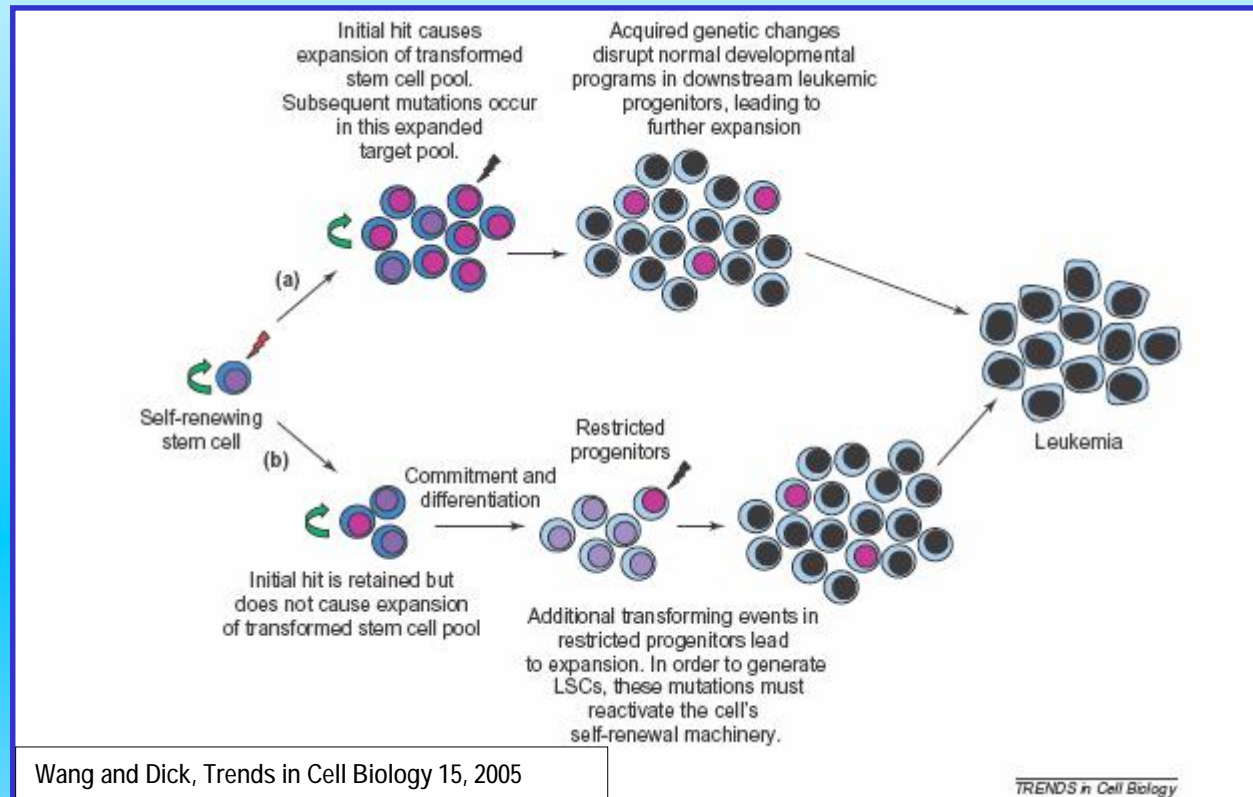
Chronická lymfocytární l. –
dobře diferencované – přežití
desetiletí

Vzhledem k vysokému stupni sebeobnovování jsou kmenové bb dobrým terčem leukemické transformace

CML (chronická myeloidní leukémie) – první příklady genetických abnormalit spojených s rakovinou a potvrzení klonálního charakteru

AML (akutní myeloidní leukémie) klonální choroba aberantní hematopoeza – akumulace funkčně nezralých blastů, které neumí normálně diferencovat

Model iniciace a progresu leukémie



Transformující mutace v kmenových bb – a) klonální expanze – terče pro další mutace – ty jsou přenášeny na progenitorové bb (leukemické kmenové bb = kmenové bb)

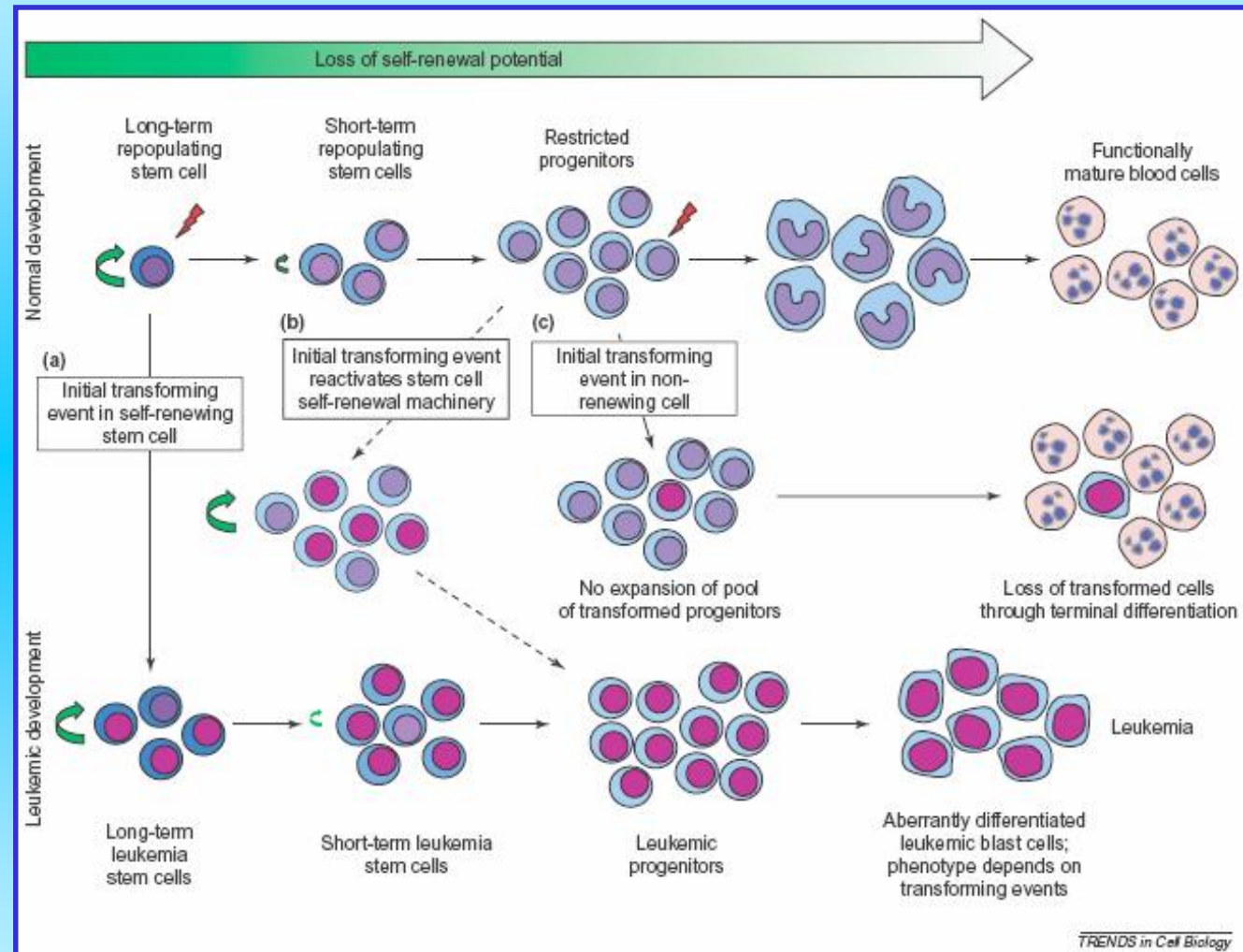
b) Iniciační mutace nevede ke klonální expanzi, ale přetrvává i v dalších generacích, další mutace v progenitorových bb může vést k obnově self-renewal a tvorbě leukemických kmenových bb (leukemické kmenové bb = progenitorové bb).

Proč je jednodušší transformace kmenových bb ?

a) U bb kde je aktivní self-renewal, je vysoká proliferační aktivita a tím i vyšší pravděpodobnost transformace

b) U progenitorů musí nejdříve dojít k obnově self renewal a až další mutací k transformaci

c) Pokud dojde k mutaci nevedoucí k self-renewal – bb odumře nebo diferencuje



Wang and Dick, Trends in Cell Biology 15, 2005

Důkazy existence kmenových nádorových bb

Jen malá část populace nádorových bb je schopná extenzivní proliferace

colony-forming assay – myší myelom – 1 z 10000-100 bb byla schopná tvořit kolonie

naočkování zdravé myši – 1-4% bb tvořilo kolonie ve slezině

Klonogenní leukemické bb = leukemické kmenové bb

Jen 1 z 1000-5000 bb CA plic, ovaria nebo neuroblastomu tvořila kolonie

V případech solidních nádorů bylo nalezeno malé množství diseminovaných nádorových bb u pacientů, kteří neměli metastázy – možná jim imunitní systém nedovolí se rozrůst nebo to potvrzuje domněnku, že jen některé (a to kmenové) bb jsou schopny expanze

Transplantace nádorové kmenové bb – stejná historie vývoje nádoru i hierarchie bb, jako u původního nádoru. Hierarchie bb je podobná jako u vyvíjející se tkáně.

Neúspěšnost léčby – vyšší resistance kmenových bb – vysoká exprese ABC transportérů a antiapoptotických proteinů

Teorie kmenových nádorových bb předpokládá:

Rakovina je hierarchická nemoc jejíž rozvoj je podporován populací vzácných kmenových bb

Pro úspěšnou terapii nádorů je nutné zasáhnou nádorové kmenové bb. Proto je nutné stanovit a charakterizovat vlastnosti těchto bb

Studium charakteristik kmenových bb může odhalit i vlastnosti bb nádorových

