

*Г.А. Дашян, В.Ф. Семиглазов, Р.В. Донских, В.В. Воротников,
В.С. Аполлонова, Т.Ю. Семиглазова*

Роль стволовых клеток рака молочной железы в метастазировании

ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

Раковые стволовые клетки (РСК) обладают способностью самообновления и формирования гетерогенных линий раковых клеток, образующих опухоли. Многочисленные данные подтверждают наличие модели, в которой РСК играют важную роль в иницировании, прогрессировании и клиническом исходе рака. Анализ роли РСК в метастазировании, напротив, остается, главным образом, гипотетическим и умозрительным. В данном обзоре суммированы последние данные, которые подтверждают теорию РСК в качестве источника метастатических поражений при раке молочной железы с акцентом на ключевую роль микроокружения.

Ключевые слова: раковые стволовые клетки, рак молочной железы, метастазирование

Несмотря на последние достижения в лечении рака молочной железы, рецидивы заболевания остаются серьезной проблемой радикальной терапии. В настоящее время примерно у 40% всех больных раком молочной железы (РМЖ) возникают рецидивы, от 60 до 70% этих рецидивов приходится на отдаленные метастазы. Существует множество причин рецидива заболевания, в том числе, нерадикальное местное лечение (операция, лучевая терапия) и неэффективное системное лечение заболевания.

Кроме этих терапевтических проблем, свойства, присущие раковым стволовым клеткам молочной железы (РСКмж), предрасполагают к рецидивам при стандартной терапии. Следовательно, большой интерес вызывает определение новых терапевтических стратегий, направленных на элиминацию этой подгруппы клеток при РМЖ и других видах злокачественных опухолей [33]. Данная концепция проста: если будут разработаны методы лечения, направленные на элиминацию РСК, устраняющих способность раковых клеток воссоздавать новые опухолевые клетки, то традиционное хирургическое вмешательство с адьювантной терапией будет гораздо эффективнее, даже при распространенных формах заболевания. Действительно, такой подход уже демонстрирует многообещающие результаты на мышинных моделях рака молочной железы [20].

Определение стволовых клеток рака молочной железы

Раковые стволовые клетки представляют собой клетки, обладающие способностью делиться асимметрично, производя одну стволовую клетку (самообновление) и одну клетку-предшественник, способную генерировать гетерогенные линии раковых клеток. Впервые РСК в опухолях молочной железы у человека были определены в 2003 году Al-Hajj и соавт. [1], который обнаружил клеточную популяцию, характеризующуюся маркерами клеточной поверхности CD44⁺/CD24^{-low}/ESA⁺ и отсутствием экспрессии CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64 и CD140b (клеточная линия⁻). Всего 200 таких клеток были способны образовывать опухоли после ксенотрансплантации NOD/SCID мышам, в то время как десятки тысяч других клеток не обладали такой способностью. Образующиеся опухоли воспроизводили фенотипическую гетерогенность родительской опухоли, содержащей клетки CD44⁺/CD24^{-low} линии, которые могут последовательно пассироваться с формированием новых опухолей [1]. Фенотип CD44⁺/CD24⁻ широко использовался для идентификации и выделения клеток рака молочной железы с повышенной онкогенностью.

Другим маркером РСКмж является альдегиддегидрогеназа (ALDH) из группы цитозольных изоферментов. Активность ALDH повышена в человеческих гемопоэтических стволовых клетках, а также в раковых стволовых клетках различных тканей [14, 19]. Было установлено, что ALDH является маркером РСКмж. ALDH-положительные клетки опухоли РМЖ могли вызывать опухоли у мышей NOD/SCID с фенотипическими характеристиками, сходными с родительской опухолью, что указывает на наличие популяции РСК в ALDH⁺ пуле клеток [10, 11, 18]. Клетки РМЖ фенотипа CD44⁺/CD24⁻/ALDH⁺ обладали большей онкогенностью, чем клетки только CD44⁺/CD24⁻ или ALDH⁺ [18].

Гипотеза раковых стволовых клеток представляет общую концептуальную модель, которая помогает описать функциональные свойства этой малочисленной клеточной популяции. Тем не менее, определение, является ли раковая клет-

ка стволовой или нет, зависит от экспериментальной системы, используемой для идентификации, и ясно, что одного анализа здесь недостаточно.

«Золотым стандартом» анализа нормальной деятельности стволовых клеток молочной железы уже на протяжении многих лет является трансплантация очищенной жировой ткани молочной железы мышей, где популяцией стволовых клеток считаются те клетки, которые могут восстановить популяцию клеток жировой ткани молочной железы мыши, из которой был удален эндогенный эпителий. В идеале это осуществляется в течение ряда последовательных трансплантаций, демонстрирующих способность самообновления кандидатов в стволовые клетки. Однако, этот анализ, на самом деле, только определяет поведение субпопуляции клеток в строме молочной железы. Это больше соответствует развитию молочной железы в пубертатном периоде, чем в ткани взрослой особи в развитом состоянии.

Аналогичная проблема существует и при анализах РСК. Субпопуляцию опухоли выделяют и вводят животным (иммунодефицитным в случае опухолевых клеток человеческого происхождения) либо на участок, сходный с участком первичной опухоли (например, жировая ткань молочной железы), или на совершенно другой участок (например, подкожно). При изучении вопросов метастазирования, возможны также инъекции в хвостовую вену или сердечная пункция. Что же на самом деле исследуют эти анализы? В случае ортотопических трансплантатов это исследование показывает способность малочисленных групп раковых клеток прорасти в «местном» микроокружении. В случае гетеротопических ксенотрансплантатов можно предполагать, что это определение метастатического потенциала — способности расти в чужеродной ткани. Инъекции в хвостовую вену и сердце исследуют способность проникать из сосудов в ткани и расти в чужеродных тканях. В целом, все эти анализы исследуют способность малого числа клеток расти в разных органах и тканях организма. Клетки, которые способны расти, называются «раковыми стволовыми клетками». Но ни один из анализов не исследует способность этих клеток поддерживать существующую опухоль *in situ*. Более того, несколько исследований показали непосредственную связь способности роста незначительного числа клеток с развитием резистентности к терапии (хотя существуют и исключения). Однако, большинство исследователей пришли к компромиссному использованию анализа неадгезивных онкосфер *in vitro* (маммосфер) в качестве тест-системы для исследования реакции сферообразующих клеток на терапию [16]. Способность образовывать

блуждающие опухолевые колонии, устойчивые к anoikis (потеря опухолевыми клетками фактора межклеточной адгезии), была приписана тем же клеткам, которые дают рост при трансплантации их малого числа *in vivo* [17]. Однако, это не всегда так, и не всем исследователям удалось двумя различными тестами получить аналогичные результаты [25]. Кроме того, по крайней мере, при раке молочной железы, анализы трансплантатов с целью выявления РСК хорошо работают для «базальноподобного» молекулярного подтипа, но неэффективны при люминальном подтипе [1]. Следовательно, либо при люминальном подтипе РСК отсутствуют, либо проводимые анализы неэффективны. Тем не менее, несмотря на эти предостережения, анализы трансплантатов/ксенотрансплантатов *in vivo*, ассоциирующиеся с образованием неадгезивных сфер *in vitro*, являются лучшими функциональными исследованиями активности РСК на сегодняшний день. Как и при обычных анализах стволовых клеток, их также следует проводить в несколько раундов трансплантаций/образования сфер с целью демонстрации самообновления первичных клеток.

Ниша для метастатических РСК

Важное значение для онкогенности имеет микроокружение. РСК требуют весьма специфического и дискретного микроокружения (*ниши*), которое обеспечивает место физического закрепления посредством адгезивных молекул и внешних факторов [23]. Для возникновения метастатических поражений фундаментальную роль играет перmissive ниша на отдаленных участках, как и в месте первичной опухоли. Поэтому было выдвинуто предположение о том, что когда дремлющие РСК находятся в метастатических очагах, их выживание, пролиферация и/или дифференцирование может активироваться нерегулируемой передачей сигнала из ниши [5, 23, 32, 35]. Точные механизмы, посредством которых метастатическая ниша влияет на судьбу РСК, неизвестны; однако, два типа молекул оказались значимыми как при создании метастатической ниши, так и в биологии РСК: компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) и факторы, выделяемые клетками стромы.

Сигналы от ВКМ

Молекулы ВКМ активируют специфические адгезивные рецепторы, экспрессируемые на РСК, и генерируют сигналы, которые влияют на судьбу РСК. Например, в MCF-7 клетках рака молочной железы взаимодействие гиалуроновой кислоты (ГК) с CD44 вызывает *рекрутинг* (выделение субстанций, активирующих обновление

пула иммунокомпетентных клеток) Nanog в комплексе CD44-ГК [7]. Рекрутинг Nanog поддерживает активацию Nanog и экспрессию регуляторов плюрипотентных стволовых клеток, таких как Rex1 и Sox2 [7]. Кроме того, Nanog регулирует транскрипционную активность STAT-3, содействуя экспрессии АТФ-связывающего кассетного (ABC) транспортера MDR1 [7]. Следовательно, MCF-7 клетки, обработанные ГК, демонстрируют пониженное внутриклеточное удержание цитотоксических лекарственных средств и обладают множественной лекарственной резистентностью [7]. На участках метастазирования отмечается повышенная экспрессия как ГК, так и CD44, что указывает на то, что под влиянием среды, обогащенной ГК, CD44-экспрессирующие опухолевые клетки перепрограммируются с приобретением определенных свойств стволовых клеток, либо циркулирующие РСК находят соответствующую среду для разрастания [3].

Взаимодействия CD44-ГК могут совпадать с передачей сигнала HER2 (ErbB2/neu), что способствует злокачественности. Ген HER2 (*ERBB2*) экспрессируется в 20–30% случаев РМЖ человека и ассоциируется с метастатическим фенотипом [30]. Роль амплификации HER2 в разрастании РСК подтверждается целым рядом доказательств: а) гиперэкспрессия HER2 совпадает с экспрессией маркера стволовых клеток ALDH у больных РМЖ [18], б) усиленная транскрипционная экспрессия HER2 у мышей увеличивает самообновление и способность репликации РСК [12] и в) гиперэкспрессия HER2 в клеточных линиях РМЖ увеличивала популяцию РСК, о чем свидетельствуют повышение активности ALDH, образование маммосфер, онкогенез и экспрессия генов, относящихся к стволовым клеткам [22]. Прогрессирование РМЖ, индуцированное ErbB2, и разрастание стволовых клеток, по крайней мере, частично опосредовано путем активации NF-κB [24]. Кроме того, CD44 и HER2 могут быть физически связаны межклеточными дисульфидными связями в раковых клетках яичников [6]. Перекрестные связи между этими рецепторами были подтверждены анализами, в которых связывание ГК с CD44 активировало активность тирозинкиназы HER2 [8]. Агонист HER2 герегулин способствует синтезу ГК и последующей активации CD44 [6]. Передача сигнала, опосредованная CD44, может внести значительный вклад как в цитоскелетную регуляцию, необходимую для инвазии, так и в разрастание РСК [9].

Сигналы от стромальных клеток

Кроме компонентов ВКМ, различные типы клеток в метастатической нише вклю-

чают фибробласты, клетки иммунной системы и эндотелиальные клетки [34]. Все эти клетки способны секретировать факторы, способствующие метастазированию. Например, хемокин CXCL12 экспрессируется стромальными фибробластами и эндотелиальными клетками и, посредством активации его рецептора CXCR4, играет заметную роль в *хоуминге* (способность стволовых клеток, при их введении в организм находить зону повреждения и фиксироваться там) опухолевых клеток в определенные органы. Обычно отмечается избыточная экспрессия CXCR4 в клетках РМЖ человека; его экспрессия совпадает с уровнем агрессивности опухоли и наличием метастазов в легких в мышинных моделях [15]. Соответственно, обработка клеток РМЖ антителами, нейтрализующими CXCR4, или подавление *миРНК* (малые интерферирующие РНК) уменьшали экспериментальное метастазирование в легких [26, 31]. Экспрессия CXCR4 также ассоциировалась с обнаружением диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге у больных РМЖ [2]. Хотя не ясно, являются ли эти клетки онкогенными, большинство из них относятся к CD44+/CD24-, что указывает на чувствительность РСК к хоумингу, индуцированному хемокином [4].

Кроме дифференцированных стромальных клеток, плюрипотентные клетки также могут обеспечивать сигналы, способствующие метастазированию. Гемопозитические клетки-предшественники экспрессируют рецептор CXCR4 и, тем самым, привлекаются к участкам метастазирования с помощью CXCL12 [28]. Тем не менее, гемопозитические клетки-предшественники присутствуют в ожидаемых участках метастазирования (например, в подмышечных лимфоузлах) без каких-либо признаков микрометастазов, что указывает на участие этих клеток в создании восприимчивого микроокружения (предметастатической ниши) [28].

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) могут также увеличивать метастатический потенциал, генерируя сигналы в первичных и метастатических очагах. МСК накапливаются в опухоли и легких при внутривенном введении мышам с остеогенной саркомой [36]. МСК увеличивают частоту метастазирования в легких при остеосаркоме путем секреции CCL5 [36]. МСК человека также стимулируют миграцию клеток РМЖ, инвазию и метастазирование путем секреции CXCL12, IL-6 и CCL5 [13, 21, 29]. Секреция CCL5 из МСК зависит от наличия раковых клеток или благоприятной среды, что указывает на взаимодействие между раковыми клетками и их нишей [21, 27].

Заключение

Раковые стволовые клетки играют центральную роль в прогрессировании РМЖ, поскольку они участвуют в онкогенезе и резистентности к терапевтическим схемам. Несколько клинических исследований обнаружили корреляцию между увеличением числа РСК и наличием метастазов. Данные на основе моделей метастазов *in vivo* и исследований *in vitro* показывают, что РСК обладают повышенной инвазивностью и метастатическими способностями, что говорит о ключевой роли РСК в формировании вторичных опухолей.

Микроокружение является важнейшим регулятором метастазов, вызванных РСК. Сигналы от ВКМ или стромальных клеток могут выступать в качестве хемоаттрактантов или могут регулировать "диапаузу" в метастатических очагах. Кроме того, специфические клеточные программы позволяют раковым клеткам изменять свое микроокружение посредством секреции аутокринных/паракринных сигналов, повышающих инвазивность. Поскольку некоторые из этих программ также поддерживают характеристики РСК, они могут создавать молекулярную основу для связи "стволовость"-метастазирование (stemness-metastasis link). Все эти сигналы обеспечивают потенциальные цели для изменения поведения РСК, ответа на терапевтические средства, а также ликвидации метастатических РСК. Таким образом, новые подходы, ориентированные на микроокружение РСК, могут стать основой для разработки эффективных и клинически применимых методов лечения, которые будут предотвращать рецидивы заболевания и метастазирование.

ЛИТЕРАТУРА

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells [Erratum appeared in Proc Natl Acad Sci USA 2003, 100:6890] // Proc Natl Acad Sci. — USA. — 2003. — Vol. 100. — P. 3983–3988.
- Andre F, Cabioglu N, Assi H. et al. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer // Ann Oncol. — 2006. — Vol. 17. — P.945–951.
- Auvinen P, Tammi R, Tammi M. et al. Expression of CD 44 s, CD 44 v 3 and CD 44 v 6 in benign and malignant breast lesions: correlation and colocalization with hyaluronan // Histopathology. — 2005. — Vol. 47. — P. 420–428.
- Balic M, Lin H, Young L. et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype // Clin Cancer Res. — 2006. — Vol. 12. — P. 5615–5621.
- Borovski T, De Sousa E Melo F. et al. Cancer stem cell niche: the place to be // Cancer Res. — 2011. — Vol. 71. — P. 634–639.
- Bourguignon LY, Gilad E, Peyrollier K. Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44- dependent ovarian tumor cell growth and migration // J Biol Chem. — 2007. — Vol. 282. — P. 19426–19441.
- Bourguignon LY, Peyrollier K, Xia W, Gilad E. Hyaluronan-CD44 interaction activates stem cell marker Nanog, Stat3-mediated MDR1 gene expression, and ankyrin-regulated multidrug efflux in breast and ovarian tumor cells // J Biol Chem. — 2008. — Vol. 283. — P. 17635–17651.
- Bourguignon LY, Zhu H, Chu A. et al. Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation // J Biol Chem. — 1997. — Vol. 272. — P. 27913–27918.
- Bourguignon LY. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression // Semin Cancer Biol. — 2008. — Vol. 18. — P. 251–259.
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F. et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer // Clin Cancer Res. — 2010. — Vol. 16. — P. 45–55.
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F. et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature // Cancer Res. — 2009. — Vol. 69. — P. 1302–1313.
- Cicalese A, Bonizzi G, Pasi CE. et al. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells // Cell. — 2009. — Vol. 138. — P.1083–1095.
- Corcoran KE, Trzaska KA, Fernandes H. et al. Mesenchymal stem cells in early entry of breast cancer into bone marrow // PLoS One. — 2008. — 3:e2563.
- Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D. et al. Identification of a primitive brain derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity // Stem Cells. — 2006. — Vol. 24. — P. 975–985.
- Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y. et al. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer // Biomed Pharmacother. — 2006. — Vol. 60. — P. 273–276.
- Dontu G., Abdallah W.M., Foley J.M. et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells // Genes and Development. — 2003. — Vol. 17. — P. 1253–1270.
- Dontu G., Al-Hajj M., Abdallah W.M. et al. Stem cells in normal breast development and breast cancer // Cell Proliferation. — 2003. — Vol. 36. — Suppl. 1. — P. 59–72.
- Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E. et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome // Cell Stem Cell. — 2007. — Vol. 1. — P. 555–567.
- Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L. et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity // Blood. — 2004. — Vol. 104. — P.1648–1655.
- Iliopoulos D., Hirsch H.A., Struhl K. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types // Cancer Research. — 2011. — Vol. 71. — P. 3196–3201.
- Karnoub AE, Dash AB, Vo AP. et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis // Nature. — 2007. — Vol. 449. — P. 557–563.
- Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driv-

- ing tumorigenesis and invasion // *Oncogene*. — 2008. — Vol. 27. — P. 6120–6130.
23. Li L, Neaves WB: Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters [Erratum appeared in *Cancer Res* 2006;66:6458] // *Cancer Res*. — 2006. — Vol. 66. — P. 4553–4557.
 24. Liu M, Sakamaki T, Casimiro MC. et al. The canonical NF-kappaB pathway governs mammary tumorigenesis in transgenic mice and tumor stem cell expansion // *Cancer Res*. — 2010. — Vol. 70. — P. 10464–10473.
 25. Moraes R.C., Zhang X., Harrington N. et al. Constitutive activation of smoothened (SMO) in mammary glands of transgenic mice leads to increased proliferation, altered differentiation and ductal dysplasia // *Development*. — 2007. — Vol. 134. — P. 1231–1242.
 26. Muller A, Homey B, Soto H. et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis // *Nature*. — 2001. — Vol. 410. — P. 50–56.
 27. Pinilla S, Alt E, Abdul Khalek FJ. et al. Tissue resident stem cells produce CCL5 under the influence of cancer cells and thereby promote breast cancer cell invasion // *Cancer Lett*. — 2009. — Vol. 284. — P. 80–85.
 28. Psaila B, Kaplan RN, Port ER, Lyden D. Priming the 'soil' for breast cancer metastasis: the pre-metastatic niche // *Breast Dis*. — 2006. — Vol. 26. — P. 65–74.
 29. Sasser AK, Sullivan NJ, Studebaker AW, Hendey LF. et al. Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-alpha-positive human breast cancer // *FASEB J*. — 2007. — Vol. 21. — P. 3763–3770.
 30. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene // *Science*. — 1987. — Vol. 235. P. 177–182.
 31. Smith MC, Luker KE, Garbow JR. et al. CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer // *Cancer Res*. — 2004. — Vol. 64. — P. 8604–8612.
 32. Velasco-Velazquez M.A., Popov V.M. et al. The Role of Breast Cancer Stem Cells in Metastasis and Therapeutic Implications // *The American Journal of Pathology* — 2011. — Vol. 179. — P. 2–11.
 33. Vermeulen L., de Sousa e Melo F., Richel D.J., Medema J.P. The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities // *Lancet Oncol*. — 2002. — Vol. 13. — e83–e89.
 34. Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells // *Genes Dev*. — 2008. — Vol. 22. — P. 559–574.
 35. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift // *Cancer Res*. — 2006. — Vol. 66. — P. 883–1890 (discussion pp.1895–1886).
 36. Xu WT, Bian ZY, Fan QM. et al. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis // *Cancer Lett*. — 2009. — Vol. 281. — P. 32–41.

Dashyan G.A., Semiglazov V.F., Donskikh R.V., T.Yu. Semiglazova, Vorotnikov V.V., Apollonova V.S.

Breast cancer stem cells role in metastasis

Petrov Research Institute of Oncology. St.Petersburg

Cancer stem cells (CSCs) possess self-renewal and heterogeneous cancer cell lines formation. Numerous data confirm the existence of a model in which CSCs have an important role in cancer initiation, progression and clinical outcome. Analysis of CSCs role in metastasis, in contrast, remains mainly conceptual and hypothetical. Recent data are summarized in this review which support the CSCs theory as a source of breast cancer metastatic lesions with noting the key role of the microenvironment.

Key words: cancer stem cells, breast cancer, metastasis

Поступила в редакцию 12.02.2015 г.