

## Эндотелиальные клетки–предшественницы костного мозга играют ключевую роль в прогрессии опухолевого роста на примере модели легочных метастазов у мышей

Наиболее ранней стадией рака является карцинома *in situ*. Она представляет собой образования мелкого размера, чаще всего не более 1–3 мм в диаметре, не прорастающие глубже базальной мембраны. В этой фазе опухоли лишены сосудов и питание клеток осуществляется лишь за счет процесса диффузии необходимых веществ из окружающих тканей. Так как трансформированные клетки значительно лимитированы в отношении необходимых для жизнедеятельности продуктов, рост новообразований в эту фазу сильно замедлен и они в течение нескольких месяцев или даже лет пребывают в «латентном состоянии». Ключевые события, которые инициируют фазу быстрого (экспоненциального) роста опухоли, плохо изучены. Они четко ассоциируются с васкуляризацией новообразования, так называемым «ангиогенным переключением», которое, возможно, стимулируется ангиогенными факторами продуцируемыми трансформированными клетками [1].

Формирование метастазов во многих случаях происходит по схожему сценарию. Большинство попадающих в системную циркуляцию малигнизированных клеток, по-видимому, погибает, а меньшая часть заселяет преме́тастатические ниши или участвует в их формировании [2, 3]. Затем клетки пролиферируют и формируют лишенные сосудов микрометастазы диаметром до 1–2 мм, в которых появление новых клеток находится в равновесии с их гибелью [4]. В подобном состоянии микрометастазы могут находиться длительное время, их прогрессия в макрометастазы также ассоциируется с «ангиогенным переключением» [5].

Неудивительно, что феномен «ангиогенного переключения» является предметом внимательного изучения, так как раскрытие основных механизмов данного процесса может дать толчок к разработке новых видов терапии и профилактики новообразований. Новые кровеносные сосуды могут образовываться путем ответвления от уже существующих или формироваться *de novo* за счет дифференцировки эндотелиальных клеток–предшественниц, мигрирующих из костного мозга [1]. Ранее было продемонстрировано, что циркулирующие эндотелиальные клетки–предшественницы могут участвовать в формировании сосудистой сети некоторых видов опухолей, а также трансплантированных тканей [6, 7]. Однако количество мигрирующих клеток было столь мало, что какая-либо существенная роль у описанного явления остается сомнительной.

Эти данные, опубликованные в журнале *Science* исследовательской группой V. Mittal, позволяют по новому оценить роль циркулирующих эндотелиальных клеток–предшественниц костномозгового происхождения в процессе «ангиогенного переключения».

На первом этапе исследования RPF<sup>+</sup> клетки карциномы легких Левиса, трансплантировали внутрикожно сингенным мышам, клетки костного мозга которых экспрессировали GFP (рис. 1А). На 14–е сут. после введения злокачественных клеток первичные опухоли подвергались резекции. Легкие исследовались на наличие метастазов на 14–е, 21–е и 28–е сут. Через 2 недели в легочной ткани животных было обнаружено в среднем около 12 RPF<sup>+</sup> микрометастазов (менее 1 мм в диаметре). Общее количество метастазов увеличивалось со временем (22 и 35 к 21–м и 28–м сут., соответственно). На 28–е сут. посттрансплантационного периода

47% процентов метастазов являлись макрометастазами (более 1 мм в диаметре). Таким образом, прогрессия микрометастазов в макрометастазы наступала на 3–4–й неделе после введения малигнизированных клеток.

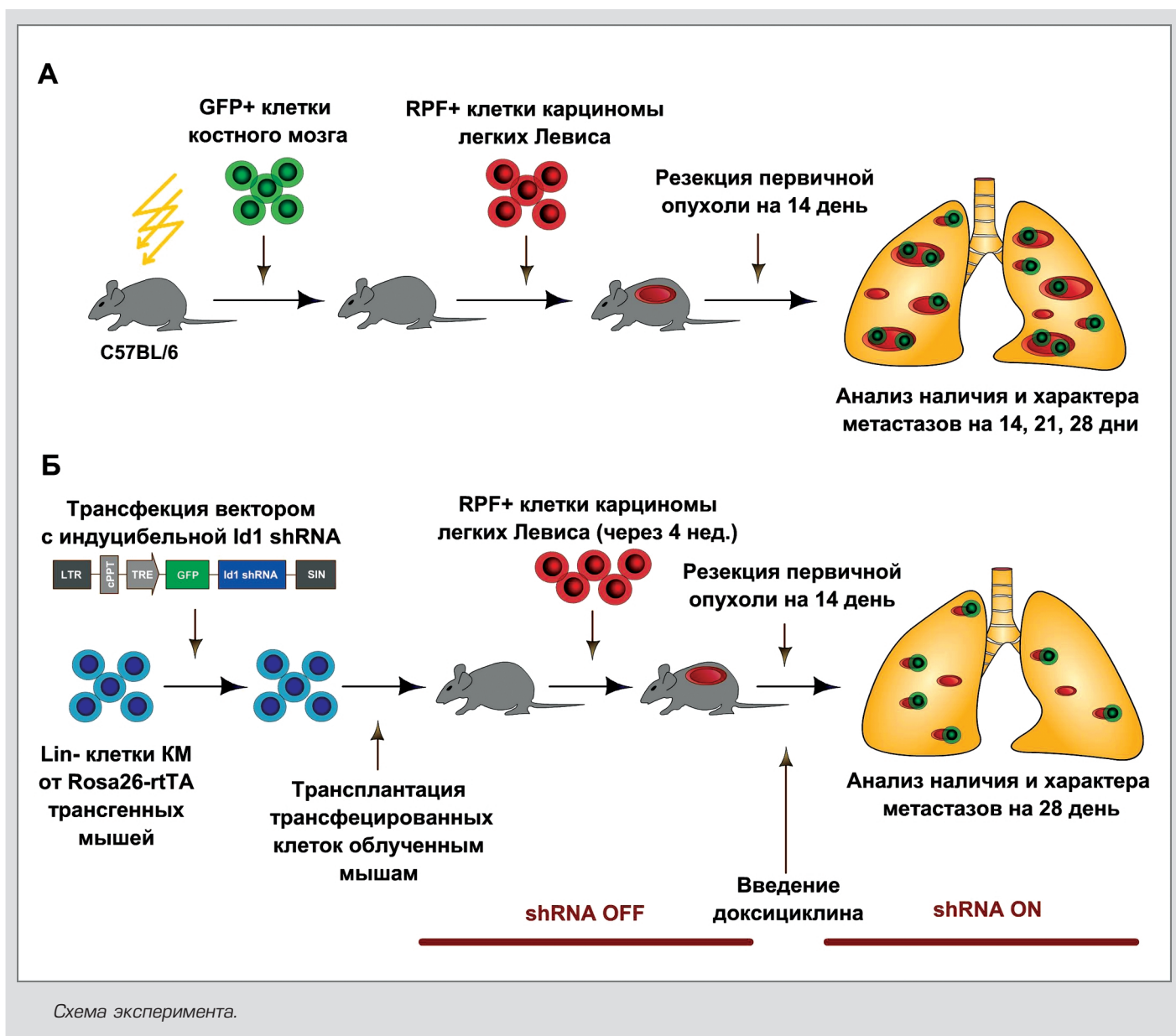
Ассоциируется ли прогрессия микрометастазов в макрометастазы с «ангиогенным переключением»? Иммуногистохимическое исследование метастазов на 14–е сут. показало практически полное отсутствие капиллярной сети при наличии редких CD31<sup>+</sup> эндотелиоцитов. Напротив, анализ макрометастазов на 21–28–е сут. посттрансплантационного периода выявил большое количество сосудов, содержащих CD31<sup>+</sup> клетки. Следовательно, экспансия роста метастазов сопровождалась и параллельным развитием и ростом сосудов.

При детальном анализе макрометастазов было обнаружено, что около 13% клеток эндотелия формирующихся сосудов характеризовались фенотипом GFP<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>, то есть имели костномозговое происхождение. Как было показано ранее, эндотелиальные клетки костномозгового происхождения являются потомками костномозговых эндотелиальных клеток–предшественников (bone-marrow endothelial progenitor cells, BM-EPCs) с высокой степенью экспрессии VE-cadherin, VEGFR2, слабой экспрессией CD31 и CD133 и отсутствием экспрессии гематопозитических маркеров [8]. Инфильтрация GFP<sup>+</sup>/VE-cadherin<sup>+</sup> BM-EPCs наблюдалась по периферии микрометастазов. Концентрация этой популяции клеток была в 5 раз выше, чем в нормальной окружающей легочной ткани.

Таким образом, прогрессия микрометастазов в макрометастазы ассоциируются с «ангиогенным переключением», в процессе которого BM-EPCs мигрируют в очаги поражения, дифференцируются и участвуют в формировании сети кровеносных сосудов метастатических очагов.

Для оценки значимости мигрирующих эндотелиальных клеток–предшественников в прогрессии роста метастазов была создана *in vivo* модель с селективной недостаточностью BM-EPCs. Авторы сфокусировались на транскрипционном факторе Id1, так как у мышей с нокаутом по гену Id1 наблюдается ослабленный рост новообразований по причине дефектов формирования сосудов [9]. В ответ на введение клеток опухоли авторы обнаружили 2,5–кратное возрастание экспрессии мРНК Id1 в клетках костного мозга. Более того, экспрессия ограничивалась популяцией EPCs и не была обнаружена в других клетках костного мозга, что может свидетельствовать о ключевой роли Id1 в реализации функций EPCs по формированию сосудистой сети новообразований.

В модели использовалась shRNA, которая снижала уровень эндогенного Id1, а также его мРНК, более чем на 95%. В качестве контроля использовалась неспецифическая shRNA. Lin<sup>–</sup> клетки костного мозга Rosa26–rtTA трансгенных мышей трансфицировались вектором на основе лентивируса с Id1 или неспецифической shRNA, экспрессия которых могла быть индуцирована доксициклином. Этот подход позволил авторам селективно подавлять экспрессию Id1 в клетках костного мозга в ранее установленное время прогрессии микрометастазов в макрометастазы, не оказывая какого-либо влияния на вклад BM-EPCs в рост первичной опухоли, которая не растет у мышей с нокаутом по гену Id1.



Трансфицированные клетки трансплантировались латентно облученным мышам. На 4-й неделе посттрансплантационного периода осуществлялась подкожная инъекция RPF+ клеток карциномы легких Левиса. До введения доксициклина параметры роста опухолей у мышей обеих групп были одинаковы. Однако введение доксициклина на 14-е сут. после трансплантации опухолевых клеток приводило к существенному снижению общего количества легочных метастазов у животных опытной группы к 28-м сут. ( $28 \pm 5$  у мышей без введения доксициклина (-Dox) и  $8 \pm 5$  у мышей с введением доксициклина (+Dox) в сравнении с животными контрольной группы ( $32 \pm 7$  у -Dox мышей и  $33 \pm 6$  у +Dox мышей). Снижение количества метастазов у +Dox мышей опытной группы было обусловлено снижением количества макрометастазов ( $13,8 \pm 6,1$  у -Dox мышей и  $0,6 \pm 1,3$  у +Dox мышей,  $P = 0,0014$ ). Не было обнаружено значительного снижения числа микрометастазов у всех групп мышей, что свидетельствует о том, что репрессия Id1 не влияет на начальную колонизацию опухолевыми клетками тканей легких, однако нарушает прогрессию микрометастазов в макрометастазы. Более того, +Dox мыши

опытной группы имели значительно большую продолжительность жизни.

Подавление экспрессии Id1 приводило к трехкратному снижению уровня циркулирующих c-kit<sup>+</sup>/VEGFR2<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup> EPCs в сравнении с -Dox мышами. Снижение количества EPCs было специфично, так как уровни клеток гематопозитического ряда, включая B-, T-клетки, миелоидные и VEGFR1<sup>+</sup> клетки, существенно не изменялись. Индуцированная недостаточность циркулирующих BM-EPCs привела к существенному снижению плотности сосудов в метастатических очагах у +Dox мышей опытной группы ( $22,2 \pm 4,7\%$  у -Dox мышей и  $4,1 \pm 2,9\%$  у +Dox мышей).

Таким образом, BM-EPCs играют ключевую роль в процессе «ангиогенного переключения», который лежит в основе прогрессии метастатических очагов. При этом BM-EPCs не влияют на инициацию образования метастазов, которая, как было показано ранее, зависит от VEGFR1<sup>+</sup> гемопоэтических клеток [2]. Несмотря на то, что лишь около 12% эндотелиальных клеток в сосудистой сети макрометастазов имеют костномозговое происхождение, недостаточность мигрирующих EPCs приводит к критическому

снижению ангиогенеза и, как следствие, подавлению формирования макрометастазов. Эти факты свидетельствуют о том, BM-EPSCs могут иметь важную «инструктивную» функ-

цию в инициации формирования новых сосудов благодаря секреции многочисленных паракринных факторов.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Bergers G., Benjamin L. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 2003; 3: 401–10.
2. Kaplan R., Riba R., Zacharoulis S. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820–7.
3. Hiratsuka S., Watanabe A., Aburatani H., Maru Y. Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat. Cell. Biol.* 2006; 8: 1369–75.
4. Townson J., Chambers A. Dormancy of solitary metastatic cells. *Cell Cycle* 2006; 5: 1744–50.
5. Holmgren L., O'Reilly M., Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.

*Nat. Med.* 1995; 1: 149–53.

6. Peters B., Diaz L., Polyak K. et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat. Med.* 2005; 11: 261–2.

7. Minami E., Laflamme M., Saffitz J., Murry C. Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart. *Circulation* 2005; 112: 2951–8.

8. Nolan D., Ciarrocchi A., Mellick A. et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes Dev.* 2007; 21: 1546–58.

9. Ruzinova M., Schoer R., Gerald W. et al. Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors. *Cancer Cell* 2003; 4: 277–89.

Подготовил В.С. Сергеев

По материалам: Gao D., Nolan D., Mellick A. et al. Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science*. 2008; 319: 195–8

## Количество стволовых гемопоэтических клеток в кровотоке подвержено суточным колебаниям

Одним из наиболее эффективных методов лечения пациентов с заболеваниями системы крови (иммунопатии, лейкозы, лимфомы) является трансплантация клеток костного мозга [1, 2]. Эффективность операции определяется не только HLA-совместимостью клеточного материала, но и успешностью проведения предоперационных мероприятий – миелоабляции. Помимо ликвидации трансформированных клеток крови и освобождения костномозговых ниш от стволовых кроветворных клеток (СКК) реципиента радикальные способы предоперационной подготовки сопровождаются тяжелыми побочными эффектами в виде манифестации оппортунистических инфекций, остеопении, поражения эндокринных желез, печени, нервной и дыхательной систем [3].

С целью предотвращения побочных эффектов разрабатываются новые щадящие способы предтрансплантационных мероприятий. В частности, положительные результаты были получены при системном введении антител против c-kit (CD 117), экспрессирующегося СКК. В результате блокировались c-kit-зависимые процессы пролиферации, дифференцировки, миграции и адгезии клеток, что вызывало временное высвобождение недифференцированных гемопоэтических клеток из занимаемых костномозговых ниш, нивелируя риск развития опасных побочных реакций [4]. Одновременно детализируются физиологические механизмы миграции недифференцированных гемопоэтических клеток, что создает предпосылки для разработки более совершенных предтрансплантационных методов [5].

В журнале *Nature* S. Mendez-Ferrer с соавт. опубликовали материалы исследования, в которых описали суточные колебания численности СКК в крови и идентифицировали механизмы высвобождения недифференцированных гемопоэтических клеток из костномозговых ниш.

Авторы показали, что максимальное содержание СКК в крови мышей приходится на 5 часов после начала воздействия светового стимула длительностью 12 часов, а самая низкая численность наблюдается через 5 часов

после прекращения его действия. Приняв выявленные циркадианные колебания за стандарт, исследователи показали, что при воздействии только светом в течение 2 недель происходит нарушение ритмичности изменения содержания СКК в крови, а при нахождении животных в темноте на протяжении 2 недель колебания численности имели ритмичный характер, который отличается от стандартного. Следовательно, изменение длительности светового раздражителя влияет на численность СКК в кровотоке.

Одним из основных цитокинов, ответственных за миграцию недифференцированных гемопоэтических клеток, является CXCL12 (SDF-1) [6, 7]. Механизм действия гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ), применяющегося в клинической практике для мобилизации СКК в кровоток, реализуется, как считается, через индукцию биодegradации CXCL12 и супрессию синтетической активности остеобластов [8]. Исследователи установили, что протеолизу подвергается лишь та фракция цитокина, которая синтезируется остеобластами, а циркадианным колебаниям подвержен уровень экспрессии мРНК CXCL12 в преостеобластах и ретикулярных клетках.

По аналогии с доказанной зависимостью секреции Г-КСФ от сигналов симпатической нервной системы (СНС) [9] авторы предположили, что продукция CXCL12 также регулируется симпатическим отделом вегетативной нервной системы. Подтверждением послужило отклонение суточного ритма экспрессии CXCL12 при денервации костного мозга как введением 6-гидроксидофамина (системная обратимая дисфункция СНС), так и односторонней резекцией бедренного и седалищного нервов вблизи выхода их из поясничного и крестцового сплетений соответственно. Десимпатизацию костного мозга подтверждали использованием антител против тирозинкиназы, что позволяет визуализировать волокна СНС при нормальном физиологическом состоянии [10]. Аритмичность колебаний секреции CXCL12 коррелировала с отклонением содержания СКК в кровотоке.