НОВОСТИ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ

К вопросу о спонтанной онкогенетической трансформации мультипотентных мезенхимальных стромальных стволовых клеток

Способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга к дифференцировке в ткани мезенхимального происхождения (костную, хрящевую, мышечную, жировую) делает их одним из самых привлекательных источников материала для регенеративной медицины [1, 2]. Однако, в последние годы появились исследования, предостерегающие от преждевременного широкого применения ММСК, в связи с риском онкогенетической трансформации этих клеток. Так, несколькими группами исследователей было показано, что при определённых условиях in vitro или индукции онкогенами, после трансплантации *in vivo* у реципиентов развиваются опухоли из ММСК [4–8]. Однако, ставить знак равенства между ММСК, исследуемыми в эксперименте, и коммерческими «продуктами» на основе ММСК человека, которые находятся на разных стадиях клинических испытаний [3], не совсем корректно. С другой стороны, нельзя игнорировать поток работ по этой тематике, указывающий на огромный интерес и неизученность проблемы.

В недавнем исследовании, выполненном в Johns Hopkins University School of Medicine (USA), результаты которого опубликованы в журнале Cancer Research, более детально изучается спонтанный канцерогенез из ММСК мыши. Это не первая работа, демонстрирующая онконтрансформацию ММСК мыши [6, 8] и человека [5, 7] в культуре, без воздействия каких-либо индуцирующих факторов. Группа Daniel Rubio после выхода работы по спонтанной онкотрансформации ММСК [5] указывала, что необходимо проведение более широкомасштабных (в разных лабораториях) и детальных исследований, поскольку трансформация в их экспериментах не являлась универсальной и наблюдалась не во всех образцах. Поэтому каждое новое исследование и сопоставление результатов, полученных разными лабораториями, крайне важно для понимания механизмов онкогенеза и клинического будущего данной технологии.

Изначальной целью работы было изучение реваскуляризации ишемизированных мышц с помощью введения ММСК. Исследователи изолировали клетки костного мозга и культивировали адгезивную фракцию мононуклеаров для получения ММСК. Уже на третьем пассаже клетки начинали формировать трехмерные структуры, что свидетельствовало об утрате контактного ингибирования. В эти же сроки исследователи наблюдали возникновение хромосомных аномалий (в основном – анеуплоидии). На седьмом пассаже фенотип клеток сильно отличался от исходного и отвечал описанному для человеческих ММСК с характерной высокой экспрессией Sca-1 и CD44, повышенной экспрессией CXCR4 и CD105. При этом гемопоэтические и эндотелиальные маркёры не экспрессировались ($CD45^-$, $CD34^-$, $CD31^-$, $CD11b^-$, $c\text{-}kit^-$, $Flk\text{-}1^-$, $VEGFR2^-$). Эти данные согласуются с работой Wang Y., выполненной на ММСК человека и демонстрирующей потерю контактного ингибирования и изменение морфологии клеток также на третьем пассаже, а первые хромосомные аномалии – на пятом [7].

Для реализации исходной задачи (реваскуляризации ишемизированных мышц) внутривенно или внутримышечно вводили миллион клеток иммунодефицитным nude- или SCID-мышам, которым предварительно удаляли участок артерии левого бедра. Через 35 дней после трансплантации животных умерщвляли и анализировали новообразования, возникновение которых наблюдали уже через 3–4 недели с момента инъекций. В последующих экспериментах также использовали животных без нарушения кровообращения и получали аналогичный результат. У контрольных животных (введение физиологического раствора) образования опухолей не наблюдали. Клетки опухолей, представляющих из себя саркому, давали такие же опухоли через 2 недели после их пересадки вторичным реципиентам – сингенным иммунокомпетентным мышам. Интересно, что при внутримышечном введении наблюдали возникновение сарком мягких тканей у всех животных, а при внутривенном введении опухоли также обнаруживали в лёгких с очагами оссификации.

Авторы подчеркивают, что возникновение опухолей, по их мнению, не связано с лотами фетальной бычьей сыворотки, которые использовалась в экспериментах. Также подчеркивается, что наблюдаемый канцерогенез не связан с линией мышей (линии ММСК, дающие опухоли, были изолированы от 2-х разных линий мышей). Кроме того, эксперименты повторяли разные исследователи в разное время. Интересно, что попытки исследователей повторить полученные результаты на клетках костного мозга крысы не увенчались успехом. Тем не менее, ученые предостерегают о возможной клинической релевантности полученных данных.

Перспективным направлением, которое обозначают сами исследователи, является поиск специфичных маркеров МСК, позволяющих выделять чистую популяцию клеток без предварительного культивирования. Тем самым возможно будет избежать риска онкотрансформации одним только фактом отсутствия культивирования. Однако, следует отметить, что сами исследователи формально работали не с идентичными и гетерогенными популяциями, ведь фенотип определяли на седьмом пассаже, после потери контактного ингибирования (пассаж 3), детекции тотальной тетраплоидии (пассаж 6), а инъекцию реципиентам выполняли на шестом пассаже. Кроме того, для характеристики клеточной популяции как «ММСК» исследователи применили только фенотипический анализ клеток, без проверки функциональных характеристик *in vitro*, что рекомендуется делать группой экспертов [9].

Из настоящей работы и ряда предшествующих исследований следует несколько важных выводов:

– факт спонтанной онкогенетической трансформации ММСК костного мозга мыши и человека присутствует, т.к. это было чётко продемонстрировано в нескольких независимых

лабораториях в разное время; этот феномен универсален для разных линий ММСК, выделенных из разных линий мышей, а также для клеток ММСК подкожного жира [5] и костного мозга [7] человека;

– скорость такой трасформации в культуре, по-видимому, гораздо выше, чем ожидалось, поскольку уже на 3-м пассаже (3 недели) ММСК мыши и человека [7] начинают приобретать хромосомные мутации и теряют контактное ингибирование роста;

– мутантные ММСК почти в 100% дают опухоли у иммунодефицитных мышей при их пересадке на 6-м пассаже (5–7 недель культивирования); для человеческих ММСК самое раннее формирование опухолей было показано на 5-м пассаже [7];

– в клинических испытаниях, использующих ММСК человека, размноженных в культуре, по-видимому, необходимо ввести обязательный анализ кариотипа для контроля хромосомных аномалий перед введением клеток; однако следует отметить, что все исследования по онкогенности ММСК до этого были проведены на иммунодефицитных аллогенных или сингенных моделях, что не соответствует клинической ситуации.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Caplan A.I., Dennis J.E.Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J. Cell Biochem. 2006; 98(5): 1076–84.
2. Caplan A.I., Bruder S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends Mol. Med. 2001; 7(6): 259–64.
3. http://www.osiristx.com/clinical_trials.php.
4. Riggi N., Cironi L., Provero P. et al. Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow–derived mesenchymal progenitor cells. Cancer Res. 2006; 65: 11459–68.
5. Rubio D., Garcia-Castro J., Martin MC, de la Fuente R. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 2005; 65(8): 3035–9.
6. Miura M., Miura Y., Padilla-Nash H.M. et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stemcells leads to malignant transformation. Stem Cells 2006; 24(4): 1095–103.
7. Wang Y., Huso D.L., Harrington J. et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. Cytotherapy 2005; 7(6): 509–19.
8. Tolar J., Nauta A.J., Osborn M.J. et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. Stem Cells 2007; 25(2): 371–9.
9. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8(4): 315–7.

Подготовили О. Дорошенко и А.В. Берсенёв
По материалам: Cancer Res. 2006; 66(22): 10849–54

Спонтанный мутагенез и образование сарком из мезенхимальных стромальных клеток костного мозга

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) являются одним из самым привлекательных кандидатов для клеточной терапии различных заболеваний. Однако серия недавних экспериментальных работ свидельствует о потенциальном риске канцерогенеза при трансплантации этого вида взрослых стволовых клеток [1–3].

В недавней работе, опубликованной в онлайн-версии журнала Stem Cells, описывается образование сарком у мышей после введения культивированных ММСК. Аллогенные ММСК на 9-м пассаже трансфецировали генетической конструкцией и сортировали по яркости метки. Меченые клетки пересаживали вместе с костным мозгом летально облучённым мышам. В качестве генетической конструкции для идентификации клеток использовали невирусные транспозоны (мобильных элементов генома).

Неожиданно мыши, у которых была выявлена наибольшая активность метки, погибли. Основной причиной смерти служила дыхательная недостаточность, которая развилась у животных в связи с образованием в лёгких оссификатов (2–8 очагов у каждого животного) и опухолей. У двух из них, кроме того, были обнаружены такие же опухоли в конечностях. После гистологического анализа новообразования были классифицированы как саркомы (опухоли мезенхимального происхождения).

Клетки из опухолей были выделены и проанализированы на наличие генетических аберраций. Авторы проверили как нетрансфецированные пассированные ММСК, так и трансфецированные клетки. Во всех типах клеток были выявлены спонтанные необратимые хромосомные мутации. Кроме того, исследователи показали, что спонтанный мутагенез первичных ММСК в культуре не зависит от линии мышей.

Генетическое картирование того сайта, куда был встроен транспозон, свидетельствовало о независимости проявления активации онкогенов и экспрессии трансгена. Не было зафиксировано и экспрессии p53 – одного из наиболее изученных опухолевых супрессоров клетки. Нетрансформированные пассированные ММСК, использованные в аналогичных экспериментах *in vivo*, дали сходные результаты. Это свидетельствует о том, что опухолевая трансформация не была сопряжена с действием транспозонов.

При серийных трансплантациях эти клетки также давали злокачественные опухоли. Авторы выделили отдельную линию переродившихся клеток (S1), способных к самообновлению. Цитогенетический профиль линии S1 напоминает клетки человеческой саркомы и может использоваться в модельных экспериментах по противоопухолевому иммунному ответу. Возможно, образование опухолей *in vivo* связано с иммуномодулирующими свойствами ММСК, которые, по мнению авторов, вызывая иммуносупрессию, создают благоприятные условия для развития опухоли. Однако, основные события, связанные с мутагенезом происходят в процессе культивирования и исследователи пока не могут объяснить образование генетических аномалий при пассировании ММСК.

В связи с началом клинических испытаний ММСК сегодня возникает острая необходимость в разработке требований и протоколов (в том числе с использованием генетического и хромосомного анализа) по тестированию клеток на предмет онкогенетической безопасности перед их введением.