Выделение и характеристика стволовых клеток меланомы

Согласно теории канцерогенеза неопластические клетки, дающие начало опухолям, образуются из «взрослых» стволовых клеток или незрелых предшественников в результате нарушения в них генетических программ, обеспечивающих нормальное обновление тканей [7]. Предполагается, что в долгоживущих стволовых клетках первичные онкогенные события резко увеличивают вероятность инициации новых раундов репликации ДНК и деления клеток, тогда как трансформация интенсивно пролиферирующих, но короткоживущих («амплифицирующих») и других незрелых клеток обеспечивается, главным образом, приобретением ими способности неограниченно долго давать подобных себе потомки. При обоих этих сценариях возникает пул постоянно пролиферирующих бессмертных клеток – так называемых «стволовых клеток опухоли» (опухоль –инициирующих клеток), в которых накапливаются дополнительные генетические изменения, детерминирующие дальнейшую опухолевую прогрессию [1].

В данный момент общепризнанным является тот факт, что именно эпидермальные меланоциты (клетки эктодермального происхождения), являются источником как доброкачественных, так и злокачественных новообразований [2]. В таком случае, в процессе развития меланомы, зрелые, но мутировавшие меланоциты претерпевают несколько стадий дедифференцировки (от доброкачественного невуса – к стадии метастазирующей меланомы) [3]. Альтернативная теория было предложена в Cramer S.F. 1984 году. Она учитывала возможную роль незрелых предшественников меланоцитов в этом процессе [4]. Впоследствии стало известно о присутствии незрелых меланоцитов в человеческой коже [5] и о существовании стволовых клеток в волосяных фолликулах млекопитающих [6]. Принимая во внимание растущий интерес к работам, учитывающим роль стволовых клеток к канцерогенезе [7, 8], исследователи решили более детально изучить различные клеточные популяции, выделенные из человеческой меланомы.

Целью работы James M.Grichnik было выявление таких клеток–предшественников в меланоме, а также изучение в них свойств, характерных для «нормальных» стволовых клеток. В процессе исследования было изучено 3 метастазирующих меланомных линии. Для выделения клеток–предшественников было использовано их свойство исключать ядерный краситель Hoechst 33342.

Существует мнение, что если мутация произошла в терминально дифференцированном меланоците, мутантная форма приобретет способность к более агрессивному клональному росту, а популяция будет гомогенна. Авторы выдвигают гипотезу о том, что мутация происходит именно в клетке–предшественнике, а не в терминально дифференцированном меланоците. При этом мутантная клетка–предшественник «будет пытаться» продолжить свой путь дифференцировки до тех пор, пока в ней не накопится достаточное количество генетических поломок для включения механизмов гибели.

Гипотеза находит свое подтверждение в результатах экспериментов, описанных в работе. Выбранные в качестве объектов 3 меланомные линии были способны стабильно поддерживать морфологическую гетерогенность в культуре – они представляли собой мелкие овальные, веретеновидные, плоские полигональные, и крупные дендритные (отростчатые) формы. Такая морфологическая гетерогенность сохранялась и после получения клонов от одной клетки. Это поддерживает идею о том, что в культуре меланомы присутствуют несколько форм мутировавших клеток, находящихся на разных стадиях «меланоцитарного дифферона». Мелкие клетки, исключающие ядерный краситель, давали начало большим клеточные формам с отростками и имели преимущество при экспансии в культуре. Именно такие крупные, отростчатые клеточные формы авторы называют терминально дифференцированными. Такие клетки выживали в культуре длительное время, но не пролиферировали, а пролиферативная активность сохранялась лишь у мелких клеток.

Гипотеза о существовании субпопуляции стволовых клеток в меланоме нашла подтверждение в работе другой группы, опубликованной в журнале Cancer Research. Авторы характеризуют такие клетки, как неприкрепляющиеся к пластику и образующие сферы в процессе культивирования. После клонирования такие клетки из меланомы поддерживали свойства «стволовости». Они были способны к самообновлению и множественной дифференцировке в адипоциты, хондроциты, остеобласты, меланоциты. Адгезивная фракция, полученная из меланомы, представляет собой, как считают авторы, стадию прогрессии опухоли, демонстрирует веретеновидный и/или эпителиоидный морфо–фенотип и является более дифференцированной. На принадлежность этих СК к опухоли может также указывать экспрессия MCAM (молекулы адгезии) и β_3–интегрина, которые участвуют в инвазии и метастазировании. При трансплантации клетки сфероидов были более туморогенны, чем клетки адгезивной фракции.

Популяция, выделенная из меланомы и способная к формированию сфер охарактеризована впервые. Однако известно, что способность формировать сфероидные колонии в культуре характеризует стволовые клетки из различных нормальных и опухолевых тканей [10,11]. Клетки сфер, имеющие характеристики СК, были способны дифференцироваться в ткани мезенхимальной линии и в меланоциты возможно потому, что они имеют общий источник происхождения в эмбриогенезе – нервный гребень [12]. На это могут указывать и работы по нейрональной дифференцировке клеток меланомы, однако в них не упоминалось о формировании сфероидных колоний [13,14].

CD20 – антиген, характеризующий агрессивную меланому. Стволовые клетки меланомы были обнаружены как в $CD20^+$, так и в $CD20^-$ субпопуляциях всех линий. Однако клетки $CD20^-$ фракции проявляли меньшую способность к мезенхимальным линиям дифференцировки. Авторы предлагают рассматривать моноклональные антитела к CD20 как потенциальный способ лечения меланом различных стадий.

Таким образом, двумя независимыми исследовательскими группами были выделены и охарактеризованы стволовые клетки меланомы. Эти данные поддерживают гипотезу развития меланомы из мутировавших опухоль–инициирующих клеток, обладающих свойствами стволовых. Поскольку такие клетки–предшественники опухоли способны давать

начало нескольким линиям дифференцировки, значит культура такой злокачественной линии должна быть гетерогенна. Предложенная теория также предполагает, что доброкачественный невус и злокачественная меланома происходят от одной мутировавшей СК. В подтверждение гипотезы присутствия в меланоме инициирующих клеток стоит упомянуть работу группы Hochedlinger по репрограммированию ядер меланомных клеток после их переноса в овоцит. Клетки эмбрионов давали начало линиям человеческих эмбриональных стволовых клеток и дифференцировались в меланоциты, лимфоциты и фибробласты [9].

Стоит отметить, что в двух рассматриваемых работах исследовались различные меланомные линии. Более детальная характеристика и выявление особенностей СК меланомы с помощью более точных методов остается будущей задачей. При изучении генотипа или/и фенотипа таких клеток возможна разработка более селективных методов терапии этого заболевания.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bennett D.C. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. Oncogene 2003; 22: 3063–9.
2. Herlyn M., Thurin J., Balaban G. et al. Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. Cancer Res. 1985; 45: 5670–6.
3. Cramer S.F. The neoplastic development of malignant melanoma. A biological rationale. Am. J. Dermatopathol. 1984; 6: 299–308.
4. Grichnik J.M., Ali W.N., Burch J.A. et al. Kit expression reveals a population of precursor melanocytes in human skin. J. Invest. Dermatol. 1996; 106: 967–71.
5. Nishimura E.K., Jordan S.A., Oshima H. et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem–cell fate determination. Nature 2002; 416: 854–60.
6. Reya T., Morrison S.J., Clarke M.F., Weissman I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature 2001; 414:105–11.
7. Al–Hajj M., Wicha M.S., Benito–Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003; 100: 3983–8.
8. Hochedlinger K., Blelloch R., Brennan C. et al. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. Genes Dev. 2004; 18: 1875–85.
9. Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 2004; 432: 396–401.
10. Dontu G., Abdallah W.M., Foley J.M. et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes Dev. 2003; 17: 1253–70.
11. Le Douarin N.M., Kalcheim C. (ed.). The neural crest. "Cambridge University Press" 1999, Cambridge (UK).
12. Fang D., Hallman J., Sangha N. et al. Expression of microtubule–associated protein 2 in benign and malignant melanocytes: implications for differentiation and progression of cutaneous melanoma. Am. J. Pathol. 2001; 158: 2107–15.
13. Brocker E.B., Magiera H., Herlyn M. Nerve growth and expression of receptors for nerve growth factor in tumors of melanocyte origin. J. Invest. Dermatol. 1991; 96: 662–5.

Подготовила В.С. Мелихова
по материалам J. Invest. Dermatol. 2006; 126: 142, Cancer Res 2005; 65: 9328

Трансформация мезенхимальных (стромальных) прогениторных клеток костного мозга приводит к формированию саркомы Юинга

Одним из самых актуальных вопросов регенеративной клеточной медицины является изучение возможности канцерогенеза из «взрослых» стволовых клеток (СК). Гипотеза образования злокачественных клеток подразумевает 2 возможных механизма: 1) прямой – из нормальных стволовых клеток ткани и прогениторов; 2) из опухолевых клеток имеющих свойства стволовых – так называемых опухоль инициирующих клеток (стволовых клеток опухоли) [1, 2]. Большинство исследователей, однако, считает что стволовые клетки опухоли имеют своё происхождение из нормальных взрослых СК различных тканей [1–4]. Механизмы образования раковых СК и участие нормальных стволовых и прогениторных клеток в канцерогенезе активно изучаются и до настоящего времени остаются загадкой [1–4].

Образование сарком семейства Ewing's (саркомы Юинга – СЮ) связывают с рядом хромосомных аномалий, основным сигналом к возникновению которых являются нарушения, вызванные образованием белка слияния EWS–FLI–1 – продукта мутантного гена FLI–1 [5]. В исследовании группы Nicolo Riggi была поставлена цель выявить, трансформация каких именно СК может приводить к возникновению СЮ.

Для этого костномозговые мезенхимальные прогениторные клетки (MPC: $CD44^+/Sca-1^+/Thy-1^+/CD117low/CD13low/CD45^-/CD11b^-/Flk-1^-$), эмбриональные стволовые клетки (ESC) и спонтанно иммортализованные эмбриональные (STO) фибробласты мыши трансфецировались генетической конструкцией, содержащей мутантный ген FLI–1. Экспрессия белка EWS–FLI–1 проверялась в динамике через сутки после трансфекции и обнаруживалась во всех исследуемых клетках. На 14–й день экспрессия белка обнаруживалась лишь в мезенхимальных стромальных клетках (MPC) и сохранялась еще в течение нескольких недель.

Чтобы исследовать возможность образования опухоли, трансформированные MPC, ESC и клетки STO после 5 дней культивирования трансплантировали в иммунодефицитных (SCID) мышей. В результате было обнаружено, что только MPC(+EWS–FLI–1) могли давать начало СЮ. По мере развития опухоли фенотип клеток оставался постоянным (CD99 и NSE), а уровень экспрессии EWS–FLI–1 не менялся. Чтобы показать специфичность MPC к образованию СЮ, клетки были исследованы на способность образовывать другие виды опухолей. Для этого трансфецировали MPC рядом