

# Objev nádorových kmenových buněk: převrat v názorech na vznik a progresi nádorového bujení

**Hledání mechanismu vzniku nádorů má dlouhou tradici. Již od samého počátku onkologie je jedním z výzkumných směrů hledání a definování buněk schopných neomezeného růstu a dělení se. Všechny publikované práce se již delší dobu shodují na skutečnosti, že téměř všechny nádory (vyjma nádorů virového původu) jsou klonální povahy a reprezentují potomstvo jediné zakládající buňky. Vůbec však nebylo jasné, zda jsou všechny, nebo jen některé buňky nádoru schopny iniciovat vznik nádoru *de novo* (tzn. podnítit tvorbu metastáz, popř. v experimentálním modelu zahájit tvorbu nádoru např. po transplantaci do zdravého jedince) a udržovat jej následně v růstu.**

## Paradox odolávající 50 let

V 50. letech 20. stol. byla provedena významná série transplantačních experimentů spočívajících v injikování izolovaných lidských nádorových buněk do stehna nositele nádoru. Injikované nádorové buňky byly schopny iniciovat vznik nádoru *de novo*, vesměs však jen tehdy, pokud bylo injikováno více než milion buněk najednou (Southam a Brunswick 1960). Podkožní injekce buněk z lidských nádorů do myši vedly ke shodným výsledkům.

Byly navrženy dvě hypotézy vysvětlující paradox, že nádorové buňky iniciují vznik nového nádoru, jen pokud je jich použito velké množství. Stochastická hypotéza tvrdila, že každá buňka daného nádoru je schopna potenciálně iniciovat vznik nádoru, ale přeskok do cyklu nádorového bujení regulují náhodné jevy nastávající s velmi nízkou pravděpodobností. Druhá hypotéza – hierarchická – tvrdila naopak, že nádory jsou funkčně heterogenní, a tedy pouze některé buňky jsou schopny iniciovat vznik metastáz či nádoru *de novo*. Buněk s tímto schopnostmi by mělo být jen malé množství, nicméně by měly být schopny podněcovat vznik nádorů s velmi vysokou frekvencí. Přestože obě hypotézy předpovídaly, že v nádoru existuje jen velmi omezené množství buněk se schopností navodit jeho růst, každá z nich předpokládala naprosto odlišné biologické mechanismy v pozadí těchto dějů.

Podle stochastické hypotézy je nádor relativně homogenní a mechanismy nádorového bujení stojící za zhoubnou povahou nádoru fungují ve všech buňkách stejně. To znamená, že pokud by byl náhodně vybrán vzorek buněk z části nádoru, všechny by nesly klíčové znaky celého nádoru.

Hierarchická hypotéza naopak předpokládala přítomnost funkčně různorodých

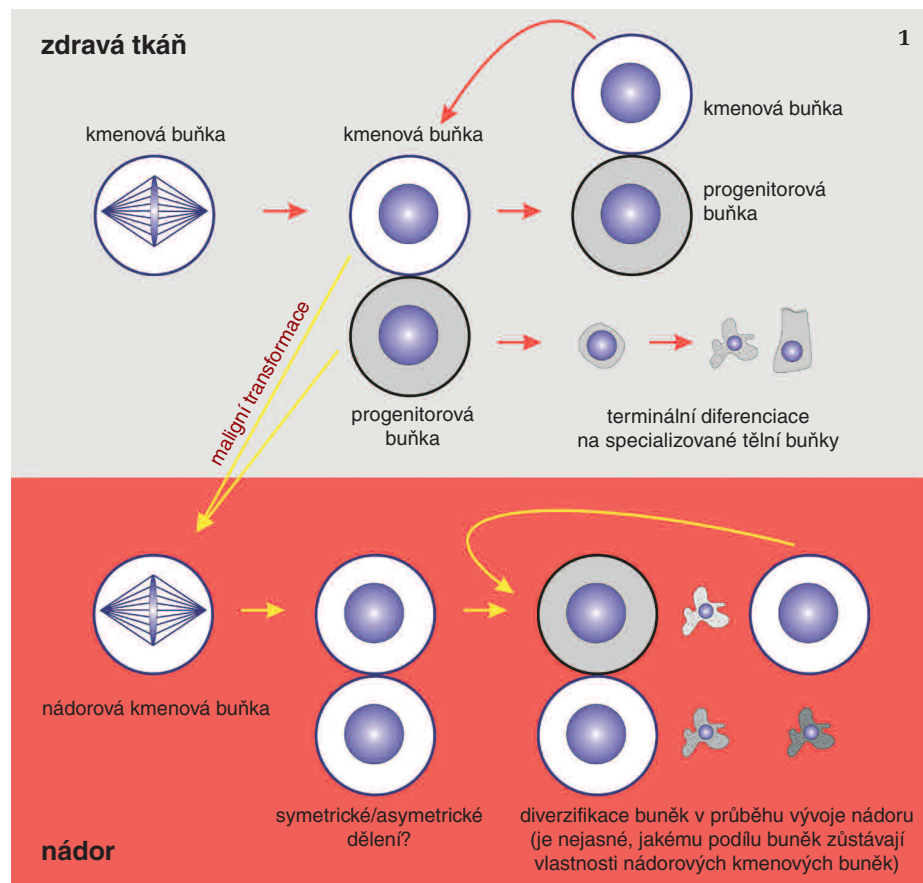
buněk v rámci jednoho nádoru – různé subpopulace buněk nádoru se tedy mohou lišit schopností dále se dělit. Tato hypotéza zároveň tvrdila, že buněk iniciujících zhoubné bujení je v nádoru poměrně málo, a předpokládala, že odstranění těch, které se neúčastní zhoubného bujení nádoru (ale tvoří většinu masu nádoru), může vést k pozdějšímu opětovnému propuknutí nemoci (relapsu). Tento předpoklad odpovídá častým pozorováním, kdy pacienti léčení chemoterapií přijdou o naprostou

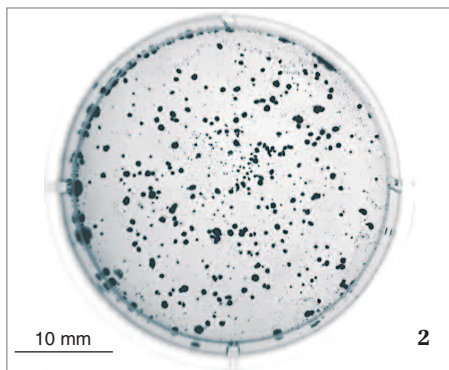
většinu buněk tvořících původní nádor, ten se však po několika měsících až letech obnoví v plném rozsahu, přičemž je větší odolnější k léčivům použitým dříve. Buňky iniciující zhoubné bujení jsou tedy k chemoterapii (či jiným způsobům léčby) odolnější.

## Vyvrácení stochastické hypotézy – objev nádorových kmenových buněk

Nález nádorových kmenových buněk znamenal naprostý převrat v chápání vzniku a progresi nádorového bujení a potvrzení platnosti hierarchické hypotézy. Tyto buňky byly objeveny r. 1997 v laboratoři kanadského vědce Johna E. Dicka na University Health Network v Torontu. Již záhy po jejich identifikaci se na ně upřela pozornost stovek vědeckých kapacit celého světa. I když existence těchto buněk měla po publikování objevu řadu oponentů, je dnes podpořena mnohými pozorováními. Jejich přítomnost vysvětluje, proč dochází tak často k relapsům nemoci po chemoterapii pacientů s nádorovým bujením.

Nádorové kmenové buňky byly nejprve identifikovány u pacientů postižených akutní myeloidní leukémií. Malé procento leukemických buněk neslo na svém povrchu antigeny CD34, přičemž jim chyběl povrchový antigen CD38 (zkratkou CD a číslem se označují povrchové molekuly nejružnějších tělních buněk; tento systém číslování byl vyvinut r. 1982 a původně se používal pro zjednodušení klasifikace povrchových molekul bílých krvinek). Když byly tyto buňky odděleny od ostatních a v malém množství přeneseny do myši, bylo zjištěno, že samy o sobě mají schopnost iniciovat vznik leukémie v myších v plném rozsahu. Pokud byly myším transplantovány leukemické buňky, kterým chyběl antigen CD34 (např. buňky





**1** Vlastnosti normálních a nádorových kmenových buněk. Normální kmenové buňky dospělého organismu mají schopnost sebeobnovy mechanismem asymetrického buněčného dělení. Jedna ze dvou dceřiných buněk při něm zachovává vlastnosti mateřské buňky, zatímco druhá se diferencuje, ztrácí schopnost neomezeného dělení a vznikají z ní progenitorové buňky dávající terminální diferenciaci vznik nejrůznějším specializovaným tělním buňkám. Mutacemi se některé mohou přeměnit na nádorové. Vzniká nádorová kmenová buňka, která vesměs nevyužívá asymetrického dělení. Záhy se proto vytváří shluk velkého množství dělicích se buněk, z nichž vzniká nádor. Většina z nich se do jisté míry diferencuje na základě vlastností okolního prostředí, některé si však trvale ponechávají schopnost neomezeného dělení. Upraveno podle: R. P. Hill a R. Perris 2007

**2** Míru invazivity nádorů je možno odhadnout z jejich schopnosti tvořit sférické kolonie. K založení každé z nich postačuje jedna jediná buňka. Často používanou metodou je výsev buněk do polotuhého agaru, kde tumorigenní buňky již po dvou týdnech vytvářejí pouhým okem viditelné kolonie. Na obrázku jsou kolonie agresivní buněčné linie NCI-H460, jež byla odvozena r. 1982 z buněk pacienta s nádorem plic. Foto P. Heneberg

s antigenem CD38), nedošlo k rozvoji nádorového bujení ani při vnesení řádově většího množství buněk.

### Nádorové kmenové buňky u všech nádorů?

O šest let později, r. 2003, bylo zjištěno, že nádorové kmenové buňky nejsou jen výsadou leukemických buněk, ale hrají roli i u nádorů pevných tkání, např. u nádoru prsu. Objev učinila laboratoř Michaela F. Clarka na Michiganské univerzitě, jež selektovala buňky na základě jiných antigenů – konkrétně šlo o přítomnost povrchového markeru CD44 a absenci CD24. Podobně jako u popsaného pokusu s leukemickými buňkami je i antigen CD44 často asociovaný se zárodečnými kmenovými či alespoň málo diferencovanými buňkami. Výsledky týmu F. Clarka se velmi podobaly těm, které získal J. E. Dick u leukemických buněk. Transplantace méně než 100 buněk CD44<sup>+</sup> CD24<sup>-</sup> vedla u myší k iniciaci nádoru, zatímco transplantace řádově většího množství (řekněme desítek nebo i milionů) buněk s fenotypem CD44<sup>-</sup> CD24<sup>+</sup> téměř nikdy k tvorbě nádoru u pokusných myší ne-

vedla. Z nově vzniklých nádorů bylo možno opět izolovat buňky CD44<sup>+</sup> CD24<sup>-</sup> a iniciovat tímto způsobem vznik několika dalších generací nádorů.

Tyto výsledky skrývaly enormní potenciál pro využití v klinickém výzkumu, do studia nádorových kmenových buněk se proto vzápětí vrhla celá řada vědeckých týmů. Během několika let byla potvrzena přítomnost nádorových kmenových buněk u mnoha dalších typů nádorů, např. u melanomů, nádorů mozku, plic, slinivky břišní, prostaty či konečníku. Z nádorových kmenových buněk se stalo během několika let dogma, které dnes uznává naprostá většina autorit v oboru.

### Jak spolehlivě rozpoznat skutečně nádorové kmenové buňky?

Většina vědců zabývajících se způsobem vzniku a progresu nádorového bujení tedy již teorii o roli nádorových kmenových buněk přijala. Řada z nich, včetně autora článku, si dokonce výše uvedené experimenty na některém z mnoha druhů nádorových buněk úspěšně vyzkoušela. Nicméně zůstává stále řada nejasností, které je nutné vyřešit. Hlavní problém spočívá v tom, že dosud nejsme schopni spolehlivě rozpoznat a definovat nádorovou kmenovou buňku (a kmenovou buňku vůbec). Proto je problematická i jejich izolace. Také nevíme, zda se vlastnosti nádorových kmenových buněk nemění v čase.

Je rovněž možné, že u nádoru koexistují populace buněk v různých stadiích (de)diferenciace. Jednotlivé buňky nádorů by tedy nesly odlišné množství znaků a vlastností kmenových buněk – v angličtině se tento jev označuje jako degree of stemness. Tato dosud empiricky neověřená hypotéza se zdá být do značné míry pravděpodobná. Nasvědčuje tomu skutečnost, že pokud na základě dnes běžně používaných povrchových antigenů vytřídíme populaci nesoucí znaky nádorových kmenových buněk (CD24, CD44, CD133, CD166 ad.), dostaneme řekněme 1 % (či méně) buněk přítomných v původní biopsii nádorové tkáně. Pokud tyto buňky transplantujeme z člověka do experimentálního zvířete (xenotransplantace), potřebujeme jich k vyvolání nádorového bujení až o několik řádů méně než buněk z původní nerozříděné populace.

Nicméně stále nám k vyvolání nádoru nestačí jediná buňka, obvykle jich potřebujeme kolem stovky, někdy i více. Izolujeme tedy populaci se znaky nádorových kmenových buněk, jen některé z nich mají ale schopnost obnovit nádor. Tato pozorování podporují hypotézu o přítomnosti mnoha typů různé diferencovanosti buněk v jednom nádoru. Podobně si nemůžeme být jisti, zda buňky vytřídění podle námi zvolených znaků jsou jedinými nádorovými kmenovými buňkami v daném nádoru. Z hlediska případného použití nádorových kmenových buněk pro léčebné postupy je významné, že nejsme dosud schopni spolehlivě určit, zda buňky identifikované na základě jejich schopnosti obnovit růst nádoru po své transplantaci jsou skutečně těmi (nebo dokonce jedinými), které způsobují relaps zhoubného bujení na původním místě nádoru po jeho léčbě např. chemoterapií.

Situace je komplikována tím, že zastoupení jednotlivých povrchových antigenů používaných pro selekci nádorových kmenových buněk se v nádorových buňkách do značné míry mění v závislosti na prostředí, ve kterém se nádor nachází. Vystavíme-li nádor např. sníženému obsahu kyslíku, exprese jednotlivých genů se změní, začne se tvořit více proteinů asociovaných s časnými stadii embryonálního vývoje. U buněčné linie pocházející z medulloblastomu (nejčastějšího nádoru mozku v dětském věku) bylo např. zjištěno, že při hypoxii dochází ke zvýšení syntézy povrchového antigenu CD133 používaného právě jako jeden z klíčových znaků kmenových buněk (Blazek a kol. 2007).

Námítka proti současným postupům izolace a definice nádorových kmenových buněk spočívá rovněž v nedostatečné kontrole místa jejich transplantace, ve kterém bývá iniciován vznik nádoru. Každá část těla má mj. odlišné složení růstových hormonů, které mohou podpořit nebo naopak potlačit růst transplantovaných buněk. Přesto je definice kmenových nádorových buněk mimo jiné založena i na jejich schopnosti růstu po xenotransplantaci. Tato definice je problematická i proto, že některé faktory ovlivňující růst kmenových buněk nejsou stále dostatečně objasněny. Růst některých transplantovaných buněk bývá výrazně podpořen podáváním estrogenu (White a kol. 1982). Transplantované buňky také mnohem lépe rostou, jsou-li do dárce vneseny se substancí zvanou Matrigel obsahující koktejl růstových faktorů. Je proto možné, že identifikace nádorových kmenových buněk současnými postupy vede jen k identifikaci buněk schopných tvořit růstové faktory v množství dostatečném pro to, aby stimulovaly samy sebe k dalšímu růstu (Hill 2006). Za malým množstvím buněk schopných indukovat nádor možná stojí i naše imunita. Nasvědčuje tomu studie melanomových buněk z prosince 2008, která pro xenotransplantaci využila relativně vzácně používaný typ vysoce imunodeficientních myší. Autorům studie se podařilo indukovat tvorbu nádoru z každé čtvrté transplantované buňky z původního melanomu (Quintana 2008). Tento naprosto nečekaný objev pravděpodobně ukazuje na zcela klíčovou roli našeho imunitního systému v boji se zhoubným bujením.

### Dlouhá cesta k terapeutickému využití

Objev a charakterizace nádorových kmenových buněk je bezesporu jednou z nejvýznamnějších novinek biologie posledního desetiletí. Při prokazování jejich přítomnosti se klade důraz především na jejich schopnost tvorby neadherentních sférických kolonií a schopnost tvorby nádoru při xenotransplantaci jen malého množství buněk. Z terapeutického hlediska je důležité, že se ukazuje možnost použití blokujících protilátek proti povrchovým receptorům nádorových kmenových buněk (např. proti CD44). Selektivní inhibice nádorových kmenových buněk je velmi slibným směrem výzkumu směřujícím k potlačení či úplné eliminaci tvorby metastáz zhoubných nádorů. První práce potvrzující správnost této cesty se již objevují (Hermann a kol. 2007).