

Роль стволовых клеток в канцерогенезе толстой кишки

Н.А. Нефёдова, П.Г. Мальков

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;
Россия, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5

Контакты: Нина Александровна Нефёдова ale_x_05@mail.ru

Значительную роль в развитии и прогрессировании колоректального рака играют так называемые стволовые клетки опухоли (cancer stem cells, CSC), которые способны к самоподдержанию и мультипотентной дифференцировке. CSC могут образовываться из мутантных стволовых клеток или путем дедифференцировки эпителиальных клеток крипты. В последнее время большое внимание уделяется изучению роли CSC в раке толстой кишки, но крайне мало публикаций относительно их экспрессии в полипах толстой кишки. По классификации Всемирной организации здравоохранения (2010) в группу предопухолевых поражений толстой кишки помимо классических тубулярных, ворсинчатых и тубуло-ворсинчатых аденом отнесены так называемые зубчатые образования, включающие гиперпластический полип, зубчатую аденому на широком основании и традиционную зубчатую аденому. Большое количество публикаций посвящено вновь выделенным категориям CSC, но полного понимания процессов, вовлеченных в формирование полипов и их прогрессию в рак толстой кишки, до сих пор нет. Идентификация CSC в полипах толстой кишки позволит оценить их потенциал злокачественности, проводить адекватную терапию, определить объем операции и дальнейшую тактику лечения. Это в свою очередь будет способствовать раннему обнаружению и предотвращению рака. Выявление CSC, оценка их локализации и распределения в тубулярной аденоме, зубчатой аденоме на широком основании, традиционной зубчатой аденоме и гиперпластическом полипе позволяют оценить потенциал злокачественности и прогноз для каждого полипа. В связи с этим определение маркеров, характерных для CSC толстой кишки, представляется интересным не только с научной, но и с практической точки зрения.

Ключевые слова: колоректальный рак, стволовые клетки опухоли, потенциал злокачественности, полипы толстой кишки, специфические поверхностные маркеры стволовых клеток опухоли, экспрессия Musashi-1, экспрессия альдегиддегидрогеназы 1, экспрессия CD24, экспрессия CD44, экспрессия Sox2, экспрессия Ki-67

DOI: 10.17650/2220-3478-2015-5-3-15-24

Role of stem cells in large bowel carcinogenesis

N.A. Nefedova, P.G. Mal'kov

M.V. Lomonosov Moscow State University; Bldg. 5, 31 Lomonosovskiy Prosp., Moscow, 119192, Russia

Cancer stem cells (CSC) play a significant role in the development and progression of colorectal cancer. They are capable of self-renewal and multipotent differentiation. CSC can be formed from stem cells or mutant by dedifferentiation of crypt epithelial cells. Recently, much attention is paid to CSC in colon cancer, but very little has been published regarding their expression in colon polyps. In 2010 The World Health Organization attributed the so-called serrated lesions, including hyperplastic polyp, serrated sessile adenoma and traditional serrated adenoma to a group of precancerous lesions of the colon in addition to the classical tubular, villous and tubulo-villous adenomas. Despite the large number of publications devoted to the newly selected category, a full understanding of the processes involved in the formation of polyps and their progression into colon cancer, there is still no. Identification of CSC in colon polyps will assess their potential malignancy conduct adequate therapy, determine the amount of the operation and further treatment strategy. This in turn will contribute to the early detection and prevention of cancer. Identification of CSC, an assessment of their localization and distribution in tubular adenomas, serrated adenoma broad-based, traditional serrated adenoma and hyperplastic polyps allow to evaluate the potential of malignancy and prognosis for each of the polyps. In this regard, the definition of markers characteristic of colon CSC, is interesting not only from a scientific, but also from a practical point of view.

Key words: colorectal cancer, tumor stem cells, malignant potential, colonic polyps, specific surface markers of tumor stem cells, Musashi-1 expression, aldehyde dehydrogenase 1 expression, CD24 expression, CD44 expression, Sox2 expression, Ki-67 expression

Введение

Значительную роль в развитии и прогрессировании колоректального рака (КРР) играют так называемые стволовые клетки опухоли (cancer stem cells, CSC), которые способны к самоподдержанию и мультипотентной дифференцировке. CSC могут образовываться из мутантных стволовых клеток или путем

дедифференцировки эпителиальных клеток крипты. Эпителий кишечника подвержен постоянной и быстрой регенерации благодаря кишечным стволовым клеткам. Считается, что это обстоятельство значительно увеличивает риск возникновения CSC и, как следствие, злокачественного новообразования толстой кишки [1].

Выявление CSC, оценка их локализации и распределения в тубулярной аденоме, зубчатой аденоме на широком основании (sessile serrated adenoma, SSA), традиционной зубчатой аденоме (traditional serrated adenoma, TSA) и гиперпластическом полипе (hyperplastic polyp, HP) позволяют оценить потенциал злокачественности и прогноз для каждого полипа (polyp, P).

Пути канцерогенеза толстой кишки

Классическая концепция развития KPP, предложенная В. Vogelstein [2], основана на возникновении его из традиционных аденом (тубулярных, ворсинчатых и тубуловорсинчатых) в результате активации Wnt-сигнального каскада из-за инактивирующей мутации в гене *APC* (*adenomatous polyposis coli*), приводящей к активации генов *KRAS/BRAF* или активирующей мутации в гене, кодирующем β -катенин [3]. Этот путь характерен для случаев с наследственным KPP и наследственным аденоматозным полипозом. Wnt-сигнальный путь активирует транскрипционные факторы ядерного комплекса β -катенина и TCF/LEF (T cell factor/lymphoid enhancer factors), которые регулируют транскрипцию большого числа генов, вовлеченных в поддержание гомеостаза тканей, эмбриональное развитие [4]. Также Wnt-сигнальный путь участвует в формировании нормальной слизистой оболочки толстой кишки. Общая доля опухолей толстой кишки, возникших по данному механизму, составляет 60 % [5].

По классификации Всемирной организации здравоохранения (2010) в группу предопухолевых поражений толстой кишки отнесены так называемые зубчатые образования, включающие 3 категории [6]:

- HP – «сидячее» образование, преимущественно в левой половине толстой кишки, характеризующееся наличием удлиненных «недоформированных» крипт на всем протяжении от поверхности слизистой оболочки до мышечной пластинки, с зубчатым характером просвета в верхней половине и апикальной части крипты;

- SSA/P – приподнятое образование, характеризующееся распространением «зубчатости» на всю глубину крипт до базальных отделов с признаками патологического ветвления, дилатации базальных отделов и горизонтальным ростом вдоль мышечной пластинки. Возможна дисплазия эпителия [7];

- TSA – полиповидное образование, морфологически характеризующееся наличием эктопических крипт, которые не достигают мышечной пластинки.

По некоторым данным, зубчатые аденомы состоят из 2 типов клеток: «высоких столбчатых» клеток с эозинофильной цитоплазмой и вытянутым ядром посередине, морфологически похожих на терминально дифференцированные клетки поверхностного эпителия нормальной слизистой оболочки, и «низких» клеток с базально расположенным круглым ядром и большим

количеством гранул муцина в цитоплазме, морфологически похожих на клетки базальных отделов крипт [8].

Стоит отметить, что данное выделение различных типов клеток встречается только в единственной работе и не соотносится с терминологией, предлагаемой нормальным гистологическим строением кишечной крипты. Возможно, «низкие» клетки соответствуют бескаемчатым энтероцитам, а «высокие» – каемчатым, или же эти клетки, характеризующиеся особыми мутациями, могут представлять собой новое качество.

Активно обсуждается «зубчатый» путь канцерогенеза, характерный для 30 % наблюдений KPP. Его связывают с соматической мутацией V600E в *BRAF*-протоонкогене (*BRAF* V600E), метиляторным фенотипом (CpG island methylator phenotype) и микросателлитной нестабильностью (MSI) [7, 9]. В литературе описано не менее 2 молекулярных механизмов развития карциномы толстой кишки из зубчатого образования. Первый предполагает развитие карциномы из SSA/P в результате начальной активирующей мутации *BRAF*, 2-й – из TSA в результате начальной мутации *KRAS*. Однако есть данные о том, что TSA в качестве предшественника могут иметь SSA/P или HP, в связи с чем возможна общность этих 2 зубчатых путей (рис. 1) [10, 11].

Несмотря на большое количество публикаций, посвященных молекулярным механизмам зубчатого пути, полного понимания процессов, вовлеченных в формирование полипов и их прогрессию в рак толстой кишки, до сих пор нет. Вместе с тем установлено, что опухоли толстой кишки, развившиеся по зубчатому пути, могут нуждаться в особом режиме химиотерапии (ХТ) [12]. Пациенты с KPP, характеризующимся мутацией *BRAF* V600E, имеют значительно худшую общую выживаемость по сравнению с таковой при аденокарциномах с диким типом *BRAF*- или *KRAS*-мутаций [13].

Понятие о стволовых клетках опухоли

Традиционная, так называемая стохастическая (stochastic – случайный), модель развития опухоли, в основе которой лежит предположение, что каждая раковая клетка может давать начало новой опухоли, в последнее десятилетие – с момента идентификации CSC – вытеснена «иерархической» моделью, согласно которой только CSC способны инициировать опухолевый рост как в первичном очаге, так и в метастазах (рис. 2) [2]. В соответствии с этими представлениями опухоль организована иерархично, как нормальная ткань, с небольшой субпопуляцией недифференцированных клеток, имеющих уникальные биологические свойства, необходимые для инициации, поддержания и распространения опухоли [14, 15]. CSC расположены в нише с мезенхимальными клетками, которые обеспечивают выживание CSC, регулируют их пролиферацию посредством секреции растворимых факторов [16].

Путь BRAF-мутации

Путь KRAS-мутации

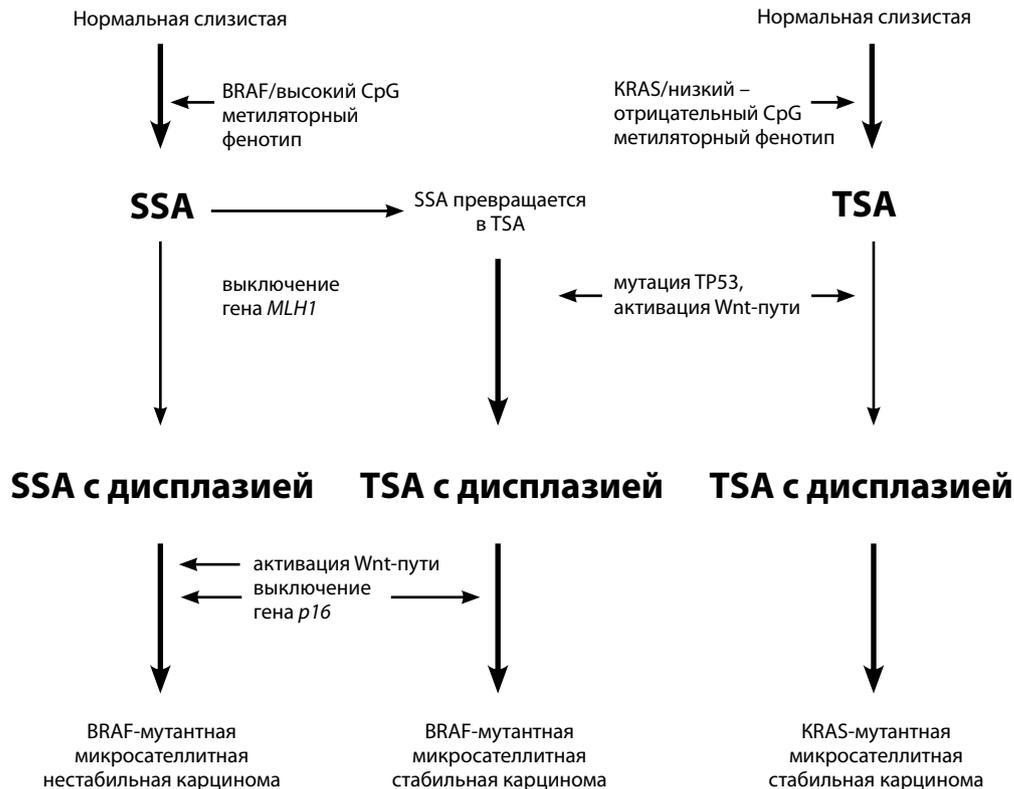


Рис. 1. «Зубчатые» пути канцерогенеза. КСК – кишечная стволовая клетка. Приводится по М. Bettington, 2015 [11], с изменениями

Данная модель косвенно указывает на то, что полная эрадикация опухоли возможна лишь при элиминации всех CSC, так как оставшиеся могут вызывать рецидивы и/или метастазы у пациентов с КРР. Идентификация и изоляция CSC необходима для лучшего понимания их роли в туморогенезе и для развития CSC-специфичной терапии. Поэтому предпринимается множество попыток в направлении идентификации специфических поверхностных маркеров CSC.

CSC отличаются от остальных клеток 3 уникальными особенностями:

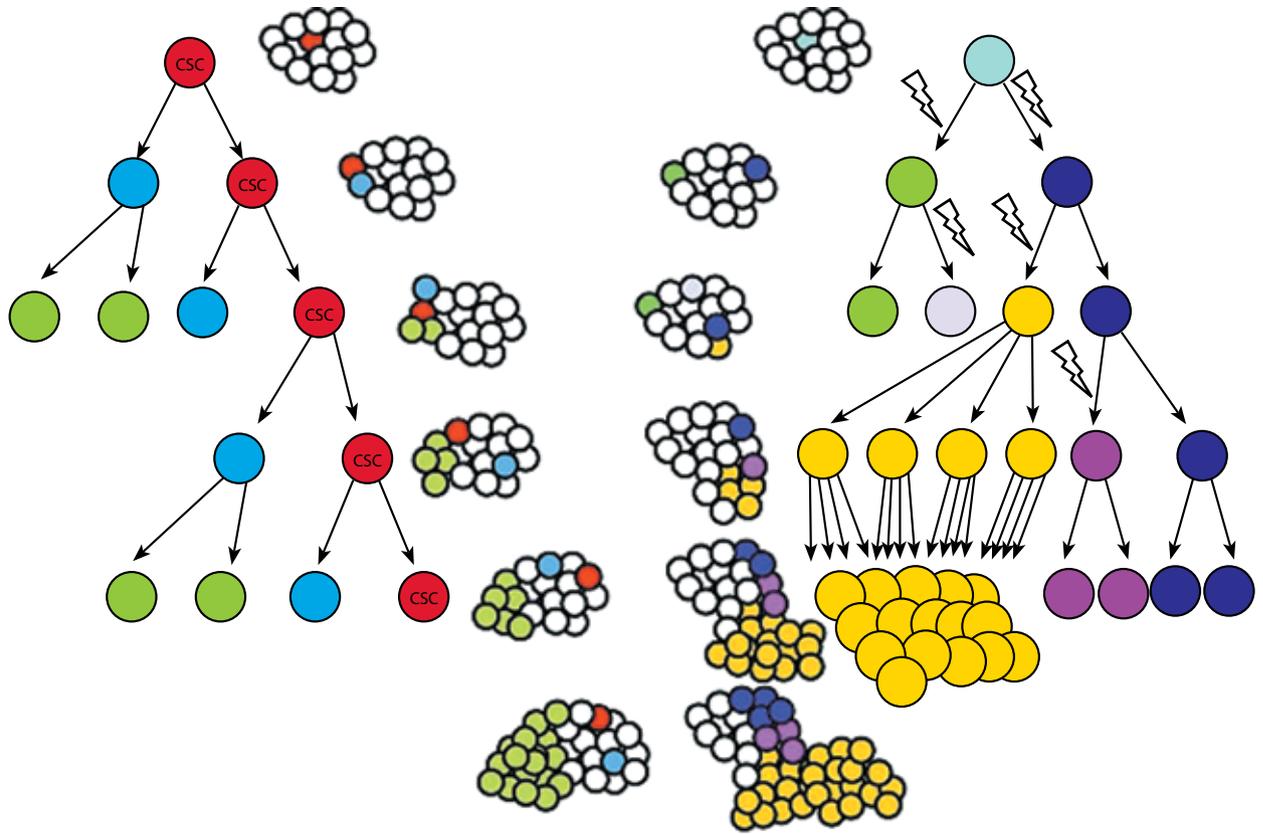
- 1) способностью к неограниченному самообновлению;
- 2) способностью воссоздавать полный пул опухолевых клеток в «материнской» опухоли;
- 3) наличием своеобразного фенотипа, характеризующегося экспрессией уникального набора маркеров [17].

Как и нормальные стволовые клетки, CSC обладают мультилинейным потенциалом дифференцировки и дают начало иерархично организованной клеточной популяции. Увеличение популяции самих CSC осуществляется благодаря преобладанию их симметричного деления (приводящему к образованию 2 дочерних клеток) над ассиметричным (в результате которого образуется 1 дочерняя CSC и 1 дифференцированная

клетка). Эта концепция была неоднократно подтверждена посредством математического моделирования и флуоресцентного окрашивания с РКН-26 [18].

CSC демонстрируют высокий уровень экспрессии белков, принадлежащих семейству мембранных ABC-транспортеров, вовлеченных в обеспечение резистентности к ХТ (в том числе паклитакселом, цисплатином, 5-фторурацилом, митоксантроном, антрациклинами, этопозидом, алкалоидом барвинка, камптотецином, топотеканом и иматинибом) [19]. Уникальные свойства CSC могут объяснить неудачи множества методов противоопухолевой терапии, направленной на быстроделющиеся клетки, так как CSC делятся медленно и нечувствительны к большинству цитотоксических препаратов [17].

Остается открытым вопрос об источнике возникновения CSC. Многие авторы придерживаются мнения, согласно которому CSC могут образовываться из нормальных стволовых клеток различных тканей, поскольку CSC обладают признаками, свойственными нормальным стволовым клеткам (самоподдержание и дифференцировка). Другие отмечают, что самовоспроизведение CSC не единственный их источник в опухоли, а в качестве возможной дополнительной причины указывают на дифференцированные опухолевые клетки, которые в результате изменения экспрес-



Иерархическая модель (CSC)

Стохастическая модель: клоногенность клеток

Рис. 2. Иерархическая и стохастическая модели канцерогенеза. Приводится по А. Antoniou, 2013 [15], с изменениями. Здесь и в рис. 3, 5: ⚡ – действие онкогена

сии генов приобретают свойства стволовых и образуют так называемые вторичные CSC (рис. 3).

Нормальная толстая кишка состоит примерно из миллиона крипт Либеркюна, каждая из которых содержит около 2 тыс. клеток, включающих энтероциты, энтерохромаффиноциты, бокаловидные клетки и клетки Панета (рис. 4) [20]. Клетки эпителия кишечника обновляются примерно 1 раз в 5 дней. Способность поддерживать тканевой гомеостаз обеспечивается самообновляемыми недифференцированными мультипотентными стволовыми клетками, лежащими в основе крипты, в ее пролиферативной зоне, и дающими начало временно амплифицированным клеткам. Данные клетки делятся ассиметрично, порождая эпителиальные клетки всех типов. Число длительно живущих стволовых клеток составляет 4–6 на 1 крипту. В основе кишечной крипты расположены 2 популяции предполагаемых стволовых клеток. Первая располагается непосредственно над клетками Панета (по некоторым данным, между ними [21]) и характеризуется экспрессией G-протеина рецептора *Lgr5*, являющегося мишенью гена *Wnt*. Вторая находится на расстоянии +4 от основания крипты и характеризуется экспрессией гена *Bmi1* и обратной транскриптазой теломеразы *Tert* [2].

Наличие клеток всех типов с разной степенью дифференцировки у больных с КРР и популяции стволовых клеток в базальных отделах крипт во время формирования аденом у пациентов с наследственным аденоматозным полипозом вынуждает отдать предпочтение иерархической модели туморогенеза, а не стохастической [22]. Однако «истоки» иерархической модели дискуссионны. По аналогии с причинами возникновения CSC (или нормальной стволовой клеткой, или нормальной дифференцированной клеткой) существуют 2 возможные теории развития рака толстой кишки: «восходящая» и «нисходящая» (рис. 5).

Первая предполагает развитие КРР из стволовой клетки, находящейся в базальном отделе крипты, в результате аномальной дифференцировки в направлении CSC. В пользу этой теории говорит идентификация специфических генов, характерных для кишечных стволовых клеток, в предшественнике аденомы, индуцированной активным *Wnt*-сигнальным путем [23]. Исследования демонстрируют формирование опухоли у *Bmi1*^{-/-}, *CD133*^{-/-}, *Lgr5*-рекомбинантных мышей с делецией гена *APC* в обоих аллелях. Формирование опухоли, однако, не происходит, если делеция *APC* находится в клетках-предшественниках или дифференцированных клетках [23].

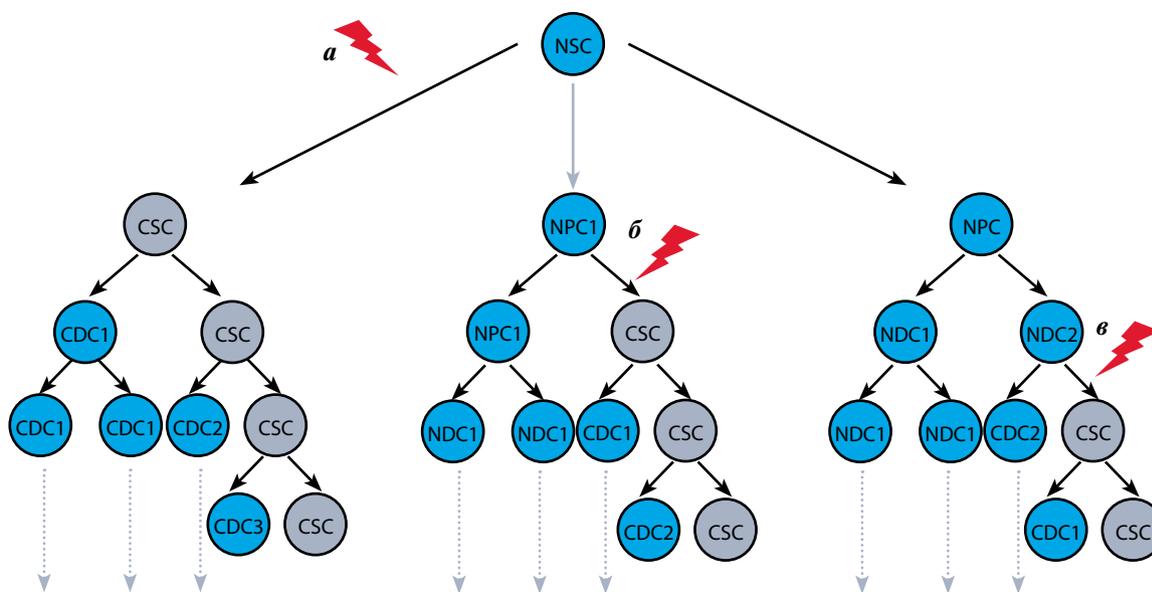


Рис. 3. Источники CSC: а – CSC образуется из нормальной стволовой клетки в результате мутации; б – CSC образуется из нормальной промежуточной клетки в результате мутации; в – CSC образуется из дифференцированной клетки в результате мутации. NSC – нормальная стволовая клетка; NPC – нормальная промежуточная клетка; NDC – нормальная дифференцированная клетка; CDC – раковая дифференцированная клетка. Приводится по С. Fanali, 2014 [1]

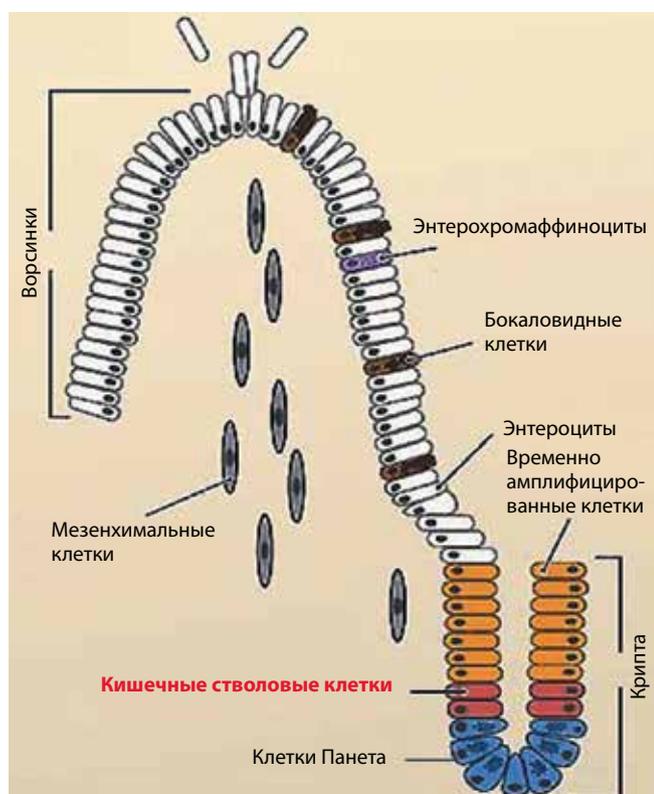


Рис. 4. Строение кишечной крипты. Предполагаемые стволовые клетки (красные) находятся в узком промежутке вблизи основания крипты. Эти стволовые клетки движутся вниз и дифференцируются в клетки Панета (синие) или вверх и превращаются в пролиферативные временно амплифицированные клетки (proliferative transiently amplifying cells, оранжевые), которые дают начало 3 типам клеток: энтероцитам (белые), бокаловидным клеткам (коричневые) и энтерохромафиноцитам (фиолетовые), формирующим кишечную ворсинку. Приводится по С. Vlanrain, 2007 [20]

Сторонники «нисходящей» теории руководствуются гистологическими проявлениями аденомы толстой кишки, такими как дисплазия/неоплазия эпителия и повышенная экспрессия Ki-67, наблюдаемыми в вершине ворсинок при интактных клетках базальных отделов [24]. Возможно, эти теории не являются альтернативными.

Известно, что сигнальные пути самообновления нормальных стволовых клеток, такие как Wnt, Notch, Hedgehog, также участвуют в развитии CSC и играют важную роль в их функционировании [17].

Маркеры, характерные для стволовых клеток толстой кишки

Некоторые исследователи утверждают, что CSC KPP идентифицируются экспрессией поверхностного клеточного маркера CD133. В исследовании М. Mohammedi и соавт. впервые проведена оценка экспрессии CD133 в клетках предопухолевых поражений толстой кишки (зубчатые полипы без дисплазии), включающих HP и SSA на широком основании без дисплазии. Показано, что в SSA экспрессия CD133 достоверно выше, чем в HP [25]. Намного меньше данных имеется о таких предполагаемых маркерах CSC KPP, как CD44, CD166, CD29, CD24, Lgr5, ALDH1, Musashi-1 (Msi-1), Sox-2 и ядерном β-катенине [17].

Экспрессия Musashi-1 в клетках колоректального рака и предопухолевых поражений толстой кишки

РНК-связывающий белок Msi-1 был первой молекулой, обнаруженной в предполагаемых кишечных стволовых клетках. Экспрессия Msi-1 обнаружена в криптах тонкого кишечника мышей, гиперэкспрес-

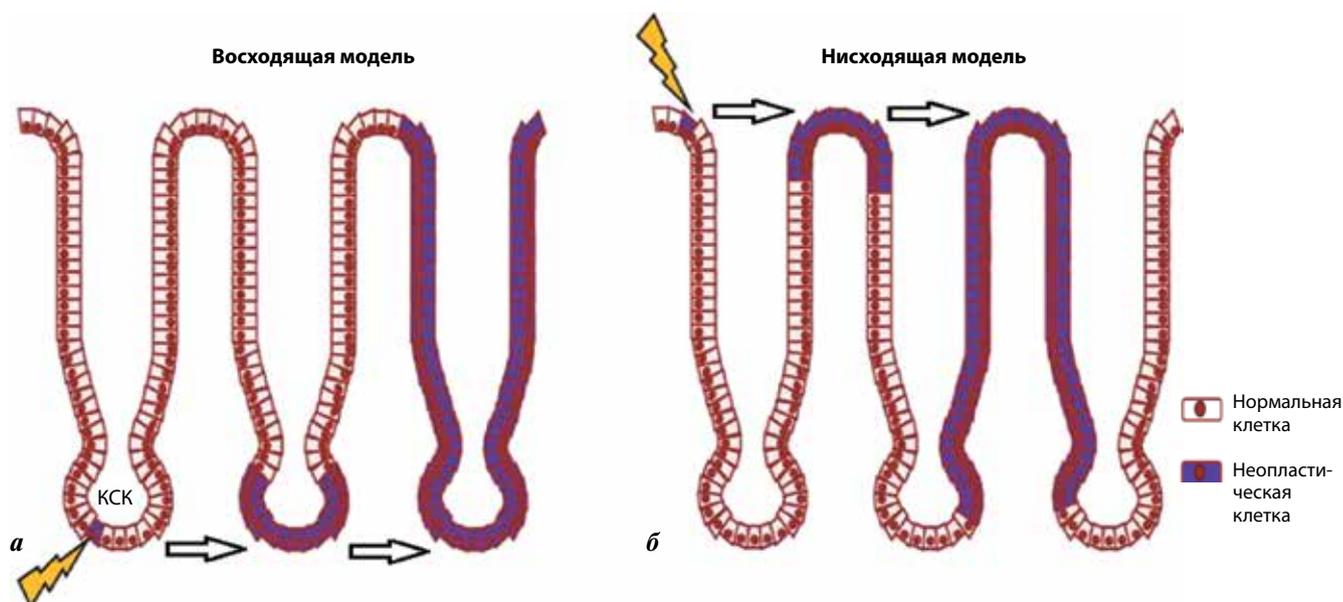


Рис. 5. Модели развития колоректального рака. Приводится по М.А. Puglisi, 2013 [17], с изменениями

сия Msi-1 наблюдается в тонкокишечных аденомах Min мышей, являющихся генетической моделью канцерогенеза тонкого кишечника [26]. Впоследствии экспрессию Msi-1 выявили в стволовых клетках крипт толстого кишечника человека [27]. Большинство клеток, экспрессирующих Msi-1, расположены в базальных отделах крипт в позициях от 1 до 10 [28]. Не все авторы считают Msi-1 маркером CSC толстой кишки [29]. Также есть данные о снижении активности гена *Msi-1* в опухолях толстой кишки [30].

Показано, что Msi-1 подавляет экспрессию генов, специфичных для клеток Панета, в кишечных стволовых клетках, причем сигнальный путь отличен от Wnt и Notch — главных путей, участвующих в дифференцировке клеток Панета. Эти данные указывают на то, что роль Msi-1 может заключаться в поддержании кишечных стволовых клеток в недифференцированном состоянии [31].

Неоднозначна локализация экспрессии белка Msi-1. В норме Msi-1 экспрессируется в ядрах нижней трети крипт толстого кишечника. В очагах со сниженным слизеобразованием и индуцированных 1,2-диметилгидразином опухолях у крыс отмечалась повышенная диффузная цитоплазматическая реакция, в то время как ядерная реакция не проявлялась в большинстве опухолей [29]. Есть данные о цитоплазматической и ядерной реакции Msi-1 в нормальной слизистой оболочке толстой кишки человека [27].

Экспрессия Sox2 в клетках колоректального рака и предопухолевых поражений толстой кишки

Семейство генов *Sox* представляет собой семейство транскрипционных факторов, необходимых для развития и поддержания стволовых клеток. В 1990 г. в Y-хромосоме впервые был обнаружен фактор, детер-

минирующий развитие яичка у млекопитающих. Ген *Sry*, кодирующий данный фактор, содержит домен HMG (high-mobility group), который обеспечивает точное узнавание и связывание ДНК. Белки, содержащие HMG-домен, с аминокислотной последовательностью, повторяющей как минимум на 50 % последовательность HMG гена *Sry*, называют Sox-белки. Функции этих белков разнообразны: включают регуляцию эмбрионального развития и поддержание гомеостаза стволовых клеток во взрослом состоянии [32].

В 1994 г. ген *Sox2*, один из членов семейства *Sox*, был охарактеризован у человека. Он расположен в хромосоме 3q26.3-q27 и кодирует белок, состоящий из 317 аминокислот. *Sox2* играет ключевую роль в поддержании стволовых клеток, детерминации их гибели и является необходимым фактором для репрограммирования соматических клеток по пути плюрипотентности [33]. *Sox2* участвует в развитии большого количества типов злокачественных новообразований и является маркером CSC [32]. Для рака пищевода и легкого наличие *Sox2* служит прогностическим маркером [34]. Транскрипционные факторы семейства генов *Sox* регулируют активность ядерного β-катенина и TCF [4].

Реакция Sox2 в норме имеет ядерную локализацию [35]. В нормальной слизистой оболочке толстой кишки экспрессия Sox2 чаще всего отсутствует [36]. Есть данные об экспрессии Sox2 в прилежащей к опухоли интактной слизистой оболочке в нише стволовых клеток — в базальных отделах крипт. Однако это наблюдается не часто: лишь в 4,8 % случаев [35]. Этот феномен может объяснить тот факт, что Sox2 играет большую роль в развитии верхнего, но не нижнего отдела пищеварительного тракта [35]. В резидуальных раковых клетках после проведенной ХТ реакция Sox2 описывается как диффузная цитоплазматическая [37].

В норме Sox2 регулирует баланс между β -катенином в адгезивном комплексе на плазматической мембране и ядерным сигнальным комплексом EMT. Sox2 уменьшает экспрессию E-кадгерина на плазматической мембране, что приводит к снижению связывающей способности адгезивного комплекса к β -катенину. Одновременно компоненты Wnt-сигнального пути в ядре рекрутируют больше β -катенина, активируют Wnt-путь и его мишени. Sox2 также увеличивает активность Wnt-пути за счет уменьшения LEF/TCF-активности и экспрессии хорошо известных генов-мишеней циклина *D1* и *c-Myc* в клетках с уменьшенной транскрипцией Sox2 [38]. Существующая взаимосвязь между EMT и Sox2 не удивительна, поскольку EMT является ключевым процессом в развитии эмбриона, а Sox2 играет ключевую роль в развитии и формировании тканей и органов на ранних этапах эмбриогенеза [39]. Подавление транскрипции Sox2 приводит к ингибированию Wnt-сигнального пути у пациентов с KPP [38].

В клетках KPP наблюдается более высокая экспрессия матричной РНК Sox2 и более сильная иммуногистохимическая (ИГХ) реакция с антителами к Sox2 по сравнению с прилежащей слизистой оболочкой, которая в большинстве зарубежных источников определяется как «нормальная» [4]. Показано, что подавление транскрипции гена Sox2 в клетках рака толстой кишки приводит к увеличению экспрессии E-кадгерина и, как следствие, MET-рецептора, однако механизмы неизвестны. Snail- и Slug-транскрипционные факторы связываются с промоторным регионом E-кадгерина и угнетают экспрессию E-кадгерина при EMT. В клетках KPP было выявлено уменьшение активности данных факторов в результате подавления активности SOX2. Вопрос о том, каким образом Sox2 влияет на Snail и Snag – прямо или опосредованно – требует дальнейшего изучения [38].

На культуре клеток показано, что подавление транскрипции Sox2 приводит к достоверному снижению активности белка MMP2 и, как следствие, уменьшению клеточной миграции и подвижности [4, 35, 38]. Этот факт подтверждается исследованием, в котором у больных раком толстой кишки с сильной реакцией Sox2 (по данным ИГХ-анализа) процент метастазов в печень и регионарные лимфатические узлы (ЛУ) был вдвое выше, чем у пациентов с отрицательной реакцией Sox2 [38].

Считают, что высокая экспрессия SOX2 ассоциирована с плохим прогнозом, коротким безрецидивным периодом, низкой степенью дифференцировки, поражением ЛУ, стадией T3–4 и отдаленными метастазами у пациентов с KPP [35, 37, 38].

Коэкспрессия β -катенина и Sox2 встречается сравнительно нечасто (7 % случаев), однако это составляет 1/3 всех случаев KPP с положительной Sox2-реакцией. Во всех подобных случаях показана достоверная корреляция с развитием отдаленных метастазов и метастазов в регионарных ЛУ [35].

Больные раком прямой кишки, у которых развились отдаленные метастазы, имели достоверно более высокий уровень гена Sox2 после проведенной предоперационной химиолучевой терапии по сравнению с пациентами без метастазов ($p = 0,0009$) [37]. Это косвенно подтверждает принадлежность Sox2 к CSC.

Существуют противоречивые данные о том, что гиперэкспрессия Sox2 ингибирует пролиферацию клеток аденокарциномы кишки за счет ингибирования mTOR-пути [40].

В литературе крайне мало публикаций об экспрессии Sox2 в клетках предопухолевых поражений толстой кишки и при различных гистологических типах KPP. Так, есть данные о высокой ядерной экспрессии Sox2 в клетках муцинозных аденокарцином и перстневидно-клеточного рака толстой кишки [36]. В HP, SSA, TSA, а также в ворсинчатых аденомах отмечена сильная ядерная ИГХ-реакция Sox2 в муцинозных клетках, в то время как в немучинозных аденокарциномах и тубулярных аденомах выявлена отрицательная реакция [36].

Повышенная экспрессия Sox2 в HP, SSA, TSA, ворсинчатой аденоме, муцинозной аденокарциноме и перстневидно-клеточном раке толстой кишки ассоциирована с повышенным уровнем экспрессии MUC5AC, что дает основание думать о ворсинчатой аденоме и зубчатых образованиях как о предшественниках муцинозного и перстневидно-клеточного рака толстой кишки [36].

Экспрессия альдегиддегидрогеназы 1 в клетках колоректального рака и предопухолевых поражений толстой кишки

Альдегиддегидрогеназа 1 (aldehyde dehydrogenase 1, ALDH1) – детоксифицирующий фермент, который окисляет внутриклеточные альдегиды и превращает ретинол в модулятор пролиферации – ретиноевую кислоту. Гиперрегуляция ALDH1 приводит к увеличению пролиферации, обеспечивает устойчивость к алкилирующим агентам и защиту стволовых клеток от окислительного стресса, способствуя увеличению их существования [27]. ALDH1A1 – одна из 19 изоформ ALDH, экспрессируемых у человека – считается специфическим маркером для идентификации, изоляции и отслеживания CSC толстой кишки и подсчета числа CSC во время развития KPP [41], однако, по некоторым данным, ALDH1 также является маркером нормальных стволовых клеток в различных тканях [42]. Отмечена ассоциация высокого уровня ALDH1 с плохим прогнозом и наличием метастазов у больных раком молочной железы [43].

ALDH1 имеет цитоплазматическую локализацию при ИГХ-окрашивании. В исследовании I.J. Goossens-Beumer среднее количество опухолевых клеток, экспрессирующих ALDH1, у пациентов с KPP составило 1,6 % [44]. Наблюдалась корреляция между высоким

уровнем экспрессии ALDH1 и неблагоприятным прогнозом. Показано, что ALDH1 – независимый прогностический фактор общей и безрецидивной выживаемости. Обнаружена статистическая разница в клинических исходах пациентов с раком толстой кишки и раком прямой кишки. Корреляция между высокой экспрессией ALDH1 и плохим прогнозом выявлена только для рака толстой кишки.

Экспрессия CD24 в клетках колоректального рака и предопухолевых поражений толстой кишки

CD24 – маленькая, сильно гликозилированная муциноподобная адгезивная молекула, состоящая из 27 аминокислот [45]. Она заякоривается на клеточной мембране и в норме экспрессируется в развивающейся поджелудочной железе и мозге, пре-В-лимфоцитах, регенерирующей мышце, нормальных кератиноцитах и почечных канальцах. CD24 экспрессируется большим количеством злокачественных солидных опухолей, в том числе клетками рака толстой кишки. Есть данные о повышенной экспрессии CD24 РНК при КРР в опухолевых клетках по сравнению со слабым уровнем в окружающей интактной слизистой оболочке [46].

Экспрессия белка CD24 в мембране и цитоплазме клеток выявляется по данным ИГХ-анализа. Согласно результатам исследования S. C. Lim, в интактной слизистой оболочке толстой кишки отмечается слабое фокальное мембранное окрашивание в части клеток, обладающих большим пролиферативным потенциалом и ориентированных в просвет [47]. По другим данным, в интактной слизистой оболочке отсутствует реакция с CD24, и только в небольшом числе случаев наблюдается мембранное окрашивание [48]. В аденомах толстой кишки отмечается мембранное окрашивание CD24 [47]. По данным одних исследований, в аденокарциномах уровень реакции значительно выше по сравнению с аденомами [47], других – экспрессия CD24 одинаково высокая как в клетках аденом, так и в клетках рака толстой кишки [49]. Есть мнение о смене характера реакции CD24 в аденокарциномах с мембранной на цитоплазматическую: авторы объясняют это нарушением архитектоники и потерей полярности клеток [47]. По данным С. Weichert, в аденокарциномах толстой кишки в 84,4 % случаев наблюдается сильное цитоплазматическое окрашивание, однако в 68,7 % обнаружена также и мембранная реакция [48]. Внутрицитоплазматическая реакция CD24 ассоциирована с метастазами в регионарные ЛУ и описывается как независимый прогностический фактор плохой общей выживаемости [47, 48]. Мембранное окрашивание CD24 ассоциировано с наличием отдаленных метастазов, однако достоверной корреляции с другими клинико-морфологическими особенностями не обнаружено [49].

Есть данные о возможной роли CD24 в качестве маркера CSC. Субпопуляция CD24-положительных клеток, изолированная от остальных опухолевых клеток КРР, демонстрирует такие свойства стволовых клеток, как повышенная резистентность к ХТ, самообновление и способность образовывать опухоль как *in vitro*, так и *in vivo* в отличие от субпопуляции CD24-отрицательных клеток [50].

Экспрессия CD44 клетками колоректального рака и предопухолевых поражений толстой кишки

Белок CD44 – член семейства трансмембранных белков, насчитывающий как минимум 20 вариантов, образующихся из одного гена в результате альтернативного сплайсинга и посттрансляционных модификаций. CD44 является адгезивным белком, который участвует во взаимодействиях клетка–клетка и клетка–межклеточный матрикс посредством своего лиганда – гиалуроновой кислоты. CD44 также вовлечен в рециркуляцию лимфоцитов, активацию лимфоцитов, миелопоэз, лимфопоэз и ангиогенез [51].

CD44 считается маркером CSC некоторых солидных опухолей, в том числе молочной железы, поджелудочной железы, головы и шеи, гепатоцеллюлярного рака печени, немелкоклеточного рака легкого и КРР [50]. CD44-положительные CSC рака толстой кишки демонстрируют большую туморогенность и способность к формированию колоний *in vitro* по сравнению с CD44-отрицательными клетками. Более того, только CD44-положительные клетки способны запоминать морфологические и фенотипические свойства опухоли, из которых они были выделены в результате серии трансплантаций [52].

Экспрессия CD44 регулируется Wnt-сигнальным путем через β-катенин. Активация β-катенина в опухоли кишечника ассоциирована с повышенной экспрессией CD44, а делеция CD44 в гене *APC* ингибирует рост опухоли у мышей [53]. CD44 необходим для поддержания «стволовости» колоректальных CSC, является потенциальным комаркером CSC CD166. Показано, что CD44- и CD166-положительные клетки обладают большей туморогенностью, чем CD44- и CD166-отрицательные клетки. CD44-положительные клетки имеют больший потенциал пролиферации, способность к формированию колоний, меньшую склонность к апоптозу и повышенную резистентность к лекарственному воздействию по сравнению с CD44-отрицательными клетками [54].

Экспрессия белка CD44 имеет мембранную локализацию. В интактной слизистой оболочке наблюдается в нижней трети крипт. Маленькие кластеры инвазивных клеток в аденокарциномах часто активно экспрессируют CD44, что свидетельствует об их недифференцированном состоянии [55].

Противоречивые данные получены относительно роли CD44 в прогрессии опухоли и образовании мета-

стазов при раке толстой кишки [52, 56]. Снижение экспрессии CD44, по одним данным, коррелирует с уменьшением метастатического потенциала клеток KPP [57], по другим – это приводит к увеличению метастатического и миграционного потенциалов [58]. Показано, что низкодифференцированные опухоли толстой кишки имеют более высокий уровень экспрессии CD44 по сравнению с высокодифференцированными, и сверхэкспрессия этого маркера ассоциирована с уменьшением выживаемости у пациентов [59]. Экспрессия CD44 в клетках KPP ассоциирована с глубиной инвазии опухоли и вовлечением ЛУ. Сверхэкспрессия CD44 считается независимым отрицательным прогностическим фактором общей выживаемости у пациентов с запущенным раком толстой кишки [60].

В литературе мало данных об экспрессии CD44 в предопухолевых поражениях толстой кишки. Экспрессия CD44 обнаруживается как в традиционных аденомах толстой кишки, так и в зубчатых (в зубчатом и тубулярном компонентах). В железах тубулярной аденомы показана высокая экспрессия CD44 (наряду с высокой экспрессией маркера стволовых клеток LGR5 и низкой экспрессией цитокератина 20), что указывает на малодифференцированное состояние базальных отделов крипт [55]. В SSA реакция с CD44 наблюдается в «низких» клетках [8]. Экспрессия CD44

в SSA значительно выше, чем в интактной слизистой оболочке и НР, хотя все CD44-положительные клетки расположены в базальных отделах крипт [55]. Однако нет уверенности в том, что данная экспрессия характеризует именно CSC. В НР экспрессия маркера стволовых клеток CD44 выше по сравнению с интактными криптами, хотя все CD44-положительные клетки расположены в базальных отделах крипт [55]. Экспрессия CD44 в эктопических криптах TSA не отличается от интактных крипт, что свидетельствует о наличии развитой клеточной иерархии в эктопических криптах [55].

Заключение

Количество публикаций, посвященных роли CSC в онкогенезе, стремительно увеличивается. Однако вопрос об участии этих клеток в малигнизации полипов толстой кишки остается малоизученным. Неясно участие CSC в традиционном и зубчатом путях канцерогенеза в толстой кишке. Сведения о маркерах этих стволовых клеток противоречивы. Относительный консенсус достигнут в отношении CD133, однако его наличие в полипах толстой кишки и роль в их малигнизации не определены. Обсуждается роль маркеров CD24, CD44, ALDH1, Sox2, Msi-1 в клетках предопухолевых поражений толстой кишки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fanali C., Lucchetti D., Farina M. et al. Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014;20(4):923–42.
2. Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525–32.
3. Wong N.A., Pignatelli M. Beta-catenin – a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002;160(2):389–401.
4. Fang X., Yu W., Li L. et al. ChIP-seq and functional analysis of the SOX2 gene in colorectal cancers. *OMICS* 2010;14(4):369–84.
5. Arends M.J. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2013;21(2):97–102.
6. Snover D.C., Ahnen D.J., Burt R.W., Odze R.D. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated polyposis. In book: WHO classification of tumours of the digestive system. Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H. et al. (eds.). Lyon, France: IARC, 2010. Pp. 160–5.
7. Caruso M., Fung K.Y., Moore J. et al. Claudin-1 Expression Is Elevated in Colorectal Cancer Precursor Lesions Harboring the BRAF V600E Mutation. *Transl Oncol* 2014;7(4):456–63.
8. Jiao Y.F., Nakamura S., Sugai T. et al. Serrated adenoma of the colorectum undergoes a proliferation versus differentiation process: new conceptual interpretation of morphogenesis. *Oncology* 2008;74(3–4):127–34.
9. Bettington M., Walker N., Clouston A. et al. The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology* 2013;62(3):367–86.
10. Харлова О.А., Данилова Н.В., Мальков П.Г. и др. Зубчатые образования (serrated lesions) толстой кишки. Архив патологии 2015;1:60–8. [Kharlova O.A., Danilova N.V., Malkov P.G. et al. Serrated lesions of the colon. *Arkhiv patologii = Pathology Archive* 2015;1:60–8. (In Russ.)].
11. Bettington M.L., Walker N.I., Rosty C. et al. A clinicopathological and molecular analysis of 200 traditional serrated adenomas. *Mod Pathol* 2015;28(3):414–27.
12. Conesa-Zamora P., Garcia-Solano J., Garcia-Garcia F. et al. Expression profiling shows differential molecular pathways and provides potential new diagnostic biomarkers for colorectal serrated adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2013;132(2):297–307.
13. Safaee Ardekani G., Jafarnejad S.M., Tan L. et al. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2012;7(10):e47054.
14. Vermeulen L., Todaro M., de Sousa Mello F. et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(36):13427–32.
15. Antoniou A., Hebrant A., Dom G. et al. Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: a cell population or a cell property? *Cell Cycle* 2013;12(24):3743–8.
16. Gangemi R., Paleari L., Orengo A.M. et al. Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance. *Curr Med Chem* 2009;16(14):1688–703.
17. Puglisi M.A., Tesori V., Lattanzi W. et al. Colon cancer stem cells: controversies and perspectives. *World J Gastroenterol* 2013;19(20):2997–3006.
18. Cicalessi A., Bonizzi G., Pasi C.E. et al. The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 2009;138(6):1083–95.
19. Botchkina G. Colon cancer stem cells – from basic to clinical application. *Cancer Lett* 2013;338(1):127–40.

20. Blanpain C., Horsley V., Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* 2007;128(3):445–58.
21. Vries R.G., Huch M., Clevers H. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol* 2010;4(5):373–84.
22. Dexter D.L., Spremulli E.N., Fligiel Z. et al. Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *Am J Med* 1981;71(6):949–56.
23. Barker N., Ridgway R.A., van Es J.H. et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 2009;457(7229):608–11.
24. Shih I.M., Wang T.L., Traverso G. et al. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(5):2640–5.
25. Mohammadi M., Bzorek M., Bonde J.H. et al. The stem cell marker CD133 is highly expressed in sessile serrated adenoma and its borderline variant compared with hyperplastic polyp. *J Clin Pathol* 2013;66(5):403–8.
26. Potten C.S., Booth C., Tudor G.L. et al. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 2003;71(1):28–41.
27. Todaro M., Francipane M.G., Medema J.P., Stassi G. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology* 2010;138(6):2151–62.
28. Nishimura S., Wakabayashi N., Toyoda K. et al. Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci* 2003;48(8):1523–9.
29. Femia A.P., Dolara P., Salvadori M. et al. Expression of LGR-5, MSI-1 and DCAMKL-1, putative stem cell markers, in the early phases of 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis: correlation with nuclear beta-catenin. *BMC Cancer* 2013;13:48.
30. Femia A.P., Luceri C., Toti S. et al. Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumours induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. *BMC Cancer* 2010;10:194.
31. Murayama M., Okamoto R., Tsuchiya K. et al. Musashi-1 suppresses expression of Paneth cell-specific genes in human intestinal epithelial cells. *J Gastroenterol* 2009;44(3):173–82.
32. Weina K., Utikal J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med* 2014;3:19.
33. Sarkar A., Hochedlinger K. The SOX family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* 2013;12(1):15–30.
34. Toschi L., Finocchiaro G., Nguyen T.T. et al. Increased *SOX2* gene copy number is associated with *FGFR1* and *PIK3CA* gene gain in non-small cell lung cancer and predicts improved survival in early stage disease. *PLoS One* 2014;9(4):e95303.
35. Neumann J., Bahr F., Horst D. et al. SOX2 expression correlates with lymph-node metastases and distant spread in right-sided colon cancer. *BMC Cancer* 2011;11:518.
36. Park E.T., Gum J.R., Kakar S. et al. Aberrant expression of SOX2 upregulates MUC5AC gastric foveolar mucin in mucinous cancers of the colorectum and related lesions. *Int J Cancer* 2008;122(6):1253–60.
37. Saigusa S., Tanaka K., Toiyama Y. et al. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2009;16(12):3488–98.
38. Han X., Fang X., Lou X. et al. Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PLoS One* 2012;7(8):e41335.
39. Avilion A.A., Nicolis S.K., Pevny L.H. et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17(1):126–40.
40. Liu H., Du L., Wen Z. et al. Sex determining region Y-box 2 inhibits the proliferation of colorectal adenocarcinoma cells through the mTOR signaling pathway. *Int J Mol Med* 2013;32(1):59–66.
41. Huang E.H., Hynes M.J., Zhang T. et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2009;69(8):3382–9.
42. Kozovska Z., Gabrisova V., Kucerova L. Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment. *Biomed Pharmacother* 2014;68(8):911–6.
43. Kang E.J., Jung H., Woo O.H. et al. Association of aldehyde dehydrogenase 1 expression and biologically aggressive features in breast cancer. *Neoplasma* 2014; 61(3):352–62.
44. Goossens-Beumer I.J., Zeestraten E.C., Benard A. et al. Clinical prognostic value of combined analysis of Aldh1, Survivin, and EpCAM expression in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2014;110(12):2935–44.
45. Fitzgerald T.L., Rangan S., Dobbs L. et al. The impact of Aldehyde dehydrogenase 1 expression on prognosis for metastatic colon cancer. *J Surg Res* 2014;192(1):82–9.
46. Nestl A., Von Stein O.D., Zatloukal K. et al. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res* 2001;61(4):1569–77.
47. Lim S.C., Oh S.H. The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract* 2005;201(7):479–86.
48. Weichert W., Denkert C., Burkhardt M. et al. Cytoplasmic CD24 expression in colorectal cancer independently correlates with shortened patient survival. *Clin Cancer Res* 2005;11(18):6574–81.
49. Sagiv E., Starr A., Rozovski U. et al. Targeting CD24 for treatment of colorectal and pancreatic cancer by monoclonal antibodies or small interfering RNA. *Cancer Res* 2008;68(8):2803–12.
50. Yeung T.M., Gandhi S.C., Wilding J.L. et al. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(8):3722–7.
51. Sneath R.J., Mangham D.C. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol* 1998; 51(4):191–200.
52. Du L., Wang H., He L. et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2008;14(21):6751–60.
53. Zeilstra J., Joosten S.P., Dokter M. et al. Deletion of the WNT target and cancer stem cell marker CD44 in Apc (Min/+) mice attenuates intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 2008;68(10):3655–61.
54. Wang J.Y., Chang C.C., Chiang C.C. et al. Silibinin suppresses the maintenance of colorectal cancer stem-like cells by inhibiting PP2A/AKT/mTOR pathways. *J Cell Biochem* 2012;113(5):1733–43.
55. Baker A.M., Graham T.A., Elia G. et al. Characterization of LGR5 stem cells in colorectal adenomas and carcinomas. *Sci Rep* 2015;5:8654.
56. Nagano O., Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 2004;95(12):930–5.
57. Harada N., Mizoi T., Kinouchi M. et al. Introduction of antisense CD44S cDNA down-regulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2001; 91(1):67–75.
58. Dallas M.R., Liu G., Chen W.C. et al. Divergent roles of CD44 and carcinoembryonic antigen in colon cancer metastasis. *FASEB J* 2012;26(6):2648–56.
59. Ropponen K.M., Eskelinen M.J., Lipponen P.K. et al. Expression of CD44 and variant proteins in human colorectal cancer and its relevance for prognosis. *Scand J Gastroenterol* 1998;33(3):301–9.
60. Huh J.W., Kim H.R., Kim Y.J. et al. Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: association with prognosis. *Pathol Int* 2009;59(4):241–6.