

ФЕДЯНИН М. Ю., ХМЕЛЬКОВА Д. Н., СЕРЕБРЬСКАЯ Т. С., НИКОЛЬСКАЯ Т. А., ТЮЛЯНДИН С. А.

■ Стволовые опухолевые клетки рака толстой кишки

Цитирование: Федянин М. Ю., Хмелькова Д. Н., Серебрянская Т. С., Никольская Т. А., Тюляндин С. А. Стволовые опухолевые клетки рака толстой кишки // Злокачественные опухоли. – 2015. – № 4, спецвыпуск 2. С. – 71–81.

DOI: 10.18027/2224-5057-2015-4s2-71-81

Ранее механизм канцерогенеза рака толстой кишки представлялся процессом последовательного накопления аберраций в генах APC, TP53, TGFβ, активации сигнального пути MAPK [1]. Это клинически реализовалось в формировании аденомы с последующей трансформацией в злокачественную опухоль. Однако к настоящему времени показано генетическое разнообразие аденокарцином толстой кишки, каждый подтип которой развивается по своему определенному генетически и/или эпигенетически опосредованному пути канцерогенеза [2]. В последнее десятилетие все чаще появляются работы, посвященные теории стволовых опухолевых клеток – только небольшая фракция опухолевых клеток способна инициировать рост опухоли. Данные клетки способны не только дифференцироваться в более зрелые формы опухолевых клеток, но и поддерживают собственный пул клеток – способность к самообновлению [3]. Кроме этого, данные клетки отличаются большей резистентностью к химиотерапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

рак толстой кишки, стволовые клетки, маркеры

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Федянин Михаил Юрьевич – к.м.н., врач-онколог отделения клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина», Россия, г. Москва, e-mail: fedianinmu@mail.ru

Хмелькова Дарья Николаевна – н.с. лаборатории трансляционных исследований и персонализированной медицины Центра живых систем, МФТИ, Россия, Московская область, г. Долгопрудный, e-mail: darya.khmelkova@gmail.com

Серебрянская Татьяна Сауловна – к.б.н., с.н.с. лаборатории трансляционных исследований и персонализированной медицины Центра живых систем, МФТИ, Россия, Московская область, г. Долгопрудный, e-mail: ts.serebriyskaya@gmail.com

Никольская Татьяна Анатольевна – к.б.н., зав. лабораторией трансляционных исследований и персонализированной медицины Центра живых систем, МФТИ, Россия, Московская область, г. Долгопрудный

Тюляндин Сергей Алексеевич – д.м.н., профессор, зав. отделением клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина», Россия, г. Москва, e-mail: stjulandin@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Возможным источником опухолевых стволовых клеток, рассматриваются нормальные стволовые клетки, характеризующиеся длительным периодом существования, в процессе которого накапливаются мутации, приводящие к развитию злокачественного фенотипа. Однако, ряд других исследований выделяют в качестве источника опухолевых стволовых клеток – клетки-прогениторы, или как их еще называют, транзиторно-амплифицирующие клетки, в которых появляется выраженная способность к самообновлению [3–6]. При раке толстой кишки также была обнаружена субпопуляция клеток, обладающих свойствами стволовости [7–9].

Следует отметить взаимосвязь активности WNT сигнального пути и поддержания специфических функций эмбриональных стволовых клеток и плюропотентных клеток взрослого организма. При этом данные нарушения также имеют значения, как в процессах инициации опухоли, так

и в процессах эпителиально-мезенхимального перехода, а, следовательно, и процессов прогрессирования и метастазирования опухоли.

Однако мало данных о роли стволовых опухолевых клеток в процессах метастазирования при раке толстой кишки. Поэтому изучение фенотипа молекулярных и функциональных особенностей данной субпопуляции опухолевых клеток в первичной опухоли и в метастазах рака толстой кишки, в контексте изменений активности WNT сигнального пути, является актуальным и позволит в будущем разрабатывать новые диагностические и лечебные стратегии.

В данном обзоре мы рассмотрим особенности стволовых клеток неизмененного эпителия толстой кишки, роль WNT сигнального пути в функционировании стволовых клеток кишечной крипты, влияние микроокружения на работу WNT пути и регуляции функций стволовых клеток, фенотип стволовых опухолевых клеток аденокарцином толстой кишки, роль WNT сигналинга в процессах канцерогенеза и метастазирования при раке толстой кишки.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ НЕИЗМЕНЕННОГО ЭПИТЕЛИЯ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Эпителий толстой кишки формирует крипты, каждая из которых включает до 2000 клеток различающихся фенотипом и функциями. При этом обновление клеточного состава в крипте происходит каждые 3–5 дней. Это требует наличия плюрипотентных клеток, необходимых для частого и быстрого обновления клеточного состава. Среди дифференцированных клеток можно выделить три типа, которые выстилают верхнюю треть крипты: энтероциты, нейроэндокринные и бокаловидные клетки [17, 18]. Кроме этого выявляются и клетки, расположенные в основании крипты и находящиеся в процессе нескончаемой замены и старения [19, 20]. Функционирование данного подтипа клеток крипт находится под контролем микроокружения. Эти клетки рассматриваются как стволовые, работа которых и позволяет обновлять эпителий кишки в течение каждых 3–5 дней [18].

Стволовые клетки неизмененного эпителия недифференцированы, мультипотентны, способны к самообновлению, поддерживают тканевую гомеостаз и отвечают за процессы репарации эпителия крипт [21]. Рассматриваемые клетки способны к симметричному делению с образованием двух стволовых клеток или двух клеток прогениторов, с последующей их дифференцировкой, а также способны к ассиметричному делению, при котором образуются две отличающихся дочерних клетки. Одна имеет материнский фенотип и остается в пуле стволовых клеток, а другая способна к дифференцировке в более зрелые клетки крипты – клетки-прогениторы. Прогениторы мигрирует к вершине крипты, где происходит их окончательная дифференцировка. Процесс симметричного деления стволовых клеток на две одинаковые клетки наблюдается в патологических условиях их существования: воспалительное заболевание, травма слизистой, опухоль [22, 23]. Одна кишечная крипта включает 16 стволовых клеток, которые фенотипически четко можно разделить на 2 группы. Одна группа локализуется в основании крипты, и экспрессирует: LRG5 и LRG1 (leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 and 1). При изучении генной сигнатуры LRG5+ клеток выявлена значимая активность транскрипционного фактора Ascl2 (achaete-scute complex homolog 2). Искусственное выключение которого приводит к потере LRG5 позитивных клеток, при гиперэкспрессии Ascl2 значимо увеличивается пул LRG5+ клеток [24]. Кроме Ascl2, специфичными маркерами LRG5+ клеток кишечной крипты являются Troy (TNFRSF1 – tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19) [25], Olfm 4 (olfactomedin 4) [26], и Smoc2 (SPARC related modulator calcium binding 2) [27, 28]. Кроме этого данный подтип стволовых клеток в больших количествах экспрессирует EphB2 (transmembrane ephrin type-B receptor 2). При этом экспрессия последней молекулы (EphB2) постепенно уменьшается при миграции вновь образованной клетки вдоль оси крипты. В клетках Панета экспрессии EphB2 уже не обнаруживается [29]. Интересно отметить, что Lrg5+ клетки ассиметрично делятся в определенные фазы формирования крипты. Смещение локализации Lrg5 позитивных стволовых клеток в кишечной крипте может являться ранним признаком начала опухолевой трансформации [30, 31].

Другая группа стволовых клеток расположена на позиции +4, и экспрессирует Mo-MLV (B lymphoma Moloney murine leukemia virus), Bmi-1 (insertion region 1 homolog), Tert (telomerase reverse transcriptase) [32, 33], Nopx

(homeobox-only protein) [34] и Lrig1 (leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1) [35, 36].

По одной из гипотез данные пулы стволовых клеток различаются функционально. Так Lrg5+ клетки поддерживают активную клеточную популяцию кишечной крипты, а Bmi+ или Tert+ клетки поддерживают пул стволовых клеток и могут восстанавливать число Lrg+ клеток при повреждении крипты [18,33]. Так в ряде исследований отмечена мобилизация Bmi+ стволовых клеток кишечной крипты при лучевом повреждении или действия токсина дифтерии на Lrg5+ клетки крипты [33, 37]. Таким образом, некоторые исследователи рассматривают данный тип клеток в качестве резерва стволовых клеток кишечной крипты. С другой стороны интересно отметить, что, Bmi+ клетки возможно и не оказывают никакого влияния на Lrg+ клетки – у мышей с «выключенным» геном Bmi происходит нормальное формирование кишечных крипт [38]. Восстанавливать пул обеих субпопуляций стволовых клеток и, соответственно, саму кишечную крипту при повреждении могут и клетки прогениторы. Они также могут быть двух подтипов: это коротко живущие прогениторы всех секреторных клеточных линий, экспрессирующие Dll1 (Notch ligand delta-like 1) [43] и дедифференцированные клетки Панета [44].

К сожалению, предполагаемые маркеры группы стволовых клеток в позиции 4+ (Bmi1, Nopx и Tert) широко представлены в различных отделах кишечной крипты и не могут полноценно служить для выделения данной клеточной субпопуляции [27, 28]. Другие маркеры, предлагаемые для выделения данной группы клеток такие, как CD133 (prominin 1) [40, 41] и Msi1 (musashi RNA-binding protein 1) [42], CD29 (субединица интегрин β 1) [85] также не на 100% ограничены стволовыми клетками крипты [39]. Другой предполагаемый маркер стволовых клеток CD24 – одна из молекул адгезии, экспрессируется в зоне стволовых клеток тонкой кишки у мышей и большинство LRG5+ клеток в толстой кишке также являются положительными и по CD24 [86]. Однако, этот же маркер экспрессируется и клетками Панета [87–89].

С помощью метода транзитной экспрессии желтого флюорисцентного белка H2B (H2B-YFP) исследователям удалось выделить и проследить работу стволовых клеток кишечной крипты. Уже через несколько дней после маркировки, все клетки экспрессирующие H2B-YFP локализовались в основании крипты. Они же коэкспрессировали Lrg5, маркеры клеток Панета (например, металлопротеиназу 7 – Mmp7) и энтероэндокринных клеточных линий (хромогранин A – Chga). В процессе наблюдения в отсутствии условий повреждения, маркированные клетки без какого-либо деления превращались в клетки Панета или энтероэндокринные клетки. При повреждении крипты H2B-YFP маркированные клетки начинали экстенсивно делиться и образовывать клоны всех типов эпителиальных клеток. Кроме этого из этих клеток могли образовываться популяции неделящихся H2B-YFP маркированных клеток, которые в дальнейшем могли дифференцироваться в клетки Панета и энтероэндокринные клетки. Такие неделящиеся клетки начинали образовывать скопление в положении 4+ кишечной крипты, и формировали пул молчащих стволовых клеток, активирующихся при повреждении крипты [45]. С помощью метода FACS (fluorescence-activated cell sorting), удалось выделить клетки основания крипты, экспрессирующие транскрипционный фактор SOX-9. Эти клетки показывают способность к самообновлению и дифференцировки in vivo [90]. Также перспективным видится и использование молекулы DCAMKL-1 (CaM kinase-like-1) в качестве маркера

стволовых клеток кишечной крипты. DCAMKL-1 представляет собой киназу, ассоциированную с микротрубочками и экспрессирующуюся в постмитотическом периоде. Экспрессия данного маркера была обнаружена в подгруппе Msi1+ клеток основания кишечной крипты. При этом именно эти клетки были устойчивы к апоптозу, вызванному лучевым воздействием [91].

При изучении экспрессии генов в различных отделах крипты с помощью микрочипирования ДНК, было выявлено, что в клетках основания кишечной крипты среди генов с повышенной экспрессией выявлялись гены, продукты которых вовлечены в процесс роста и развития клетки, включая компоненты PI3K сигнального пути, 6 трансмембранных белков STAMP1, а также гены HOXA4 и HOXB10. Экспрессия HOXA4 и HOXB10 наблюдается в клетках основания крипты и также выражена в клетках аденокарциномы толстой кишки. При этом оба гена коэкспрессируются совместно с такими маркерами стволовых клеток, как CD166 и ALDH1. Основываясь на полученных результатах, исследователи пришли к выводу о возможности применения HOXA4 и HOXB10 в качестве маркеров выделения стволовых клеток крипты и опухоли [92]. Таким образом, в настоящее время является признанным наличие клеток в кишечной крипте со свойствами стволовости. Применяя панель маркеров можно выделить популяцию клеток с данными свойствами. Однако интересно изучить какие механизмы лежат в основе реализации специфических свойств стволовых клеток. Одним из сигнальных путей вовлеченных в поддержание функций стволовости является WNT сигнальный путь.

WNT СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ И НОРМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Сигнальный путь WNT вовлечен в процессы поддержания фенотипа стволовых клеток, локализации эпителиальных клеток в кишечной крипте, развития секреторных клеток и созревания клеток Панета [10]. При действии антагонистов WNT уже через 7–10 дней у взрослых мышей отмечается выраженное подавление пролиферации клеток эпителия и выраженные нарушения структуры кишечных крипт [11]. Такое участие сигнального пути WNT в поддержании баланса между стволовостью и дифференцировкой клеток кишечной крипты, определяет его значимость в процессах канцерогенеза рака толстой кишки. Однако для рассмотрения роли WNT пути в процессах колоректального канцерогенеза необходимо изучить структурные компоненты данного пути. Различают классический и неканонический WNT каскад.

При классическом варианте каскада – WNT лиганды связывают трансмембранные домены члены семейства рецепторов Frizzled и корецепторов Frizzled – LRP6. Образующий комплекс рецептора и лиганда активирует Dsh, с последующим ингибированием комплекса Axin-GSK3 β -APC, в результате чего не происходит ингибирующего фосфорилирования β -катенина по средством GSK3 β [12].

β -катенин представляет собой молекулу, функция которой определяется ее внутриклеточной локализацией. Так β -катенин, связанный с мембранной клетки, участвуют в процессах межклеточного взаимодействия и адгезии [14]. Цитоплазматическая же фракция β -катенина участвует в процессах трансдукции сигнала по WNT пути, участвуя в процессах эмбриогенеза, поддержании функции стволовых клеток и злокачественной трансформации клеток. β -катенин проходит

в ядро клетки, где в совместно с коактиваторами TCF7 (TCF1) и TCF7L2 (TCF4) вызывает экспрессию соответствующих генов мишеней, в том числе и гена с-Мус. Последний подавляет экспрессию ингибитора клеточного цикла p21 через супрессию Miz-1. Кроме этого отмечено, что комплекс β -катенин/TCF4 усиливает экспрессию активатора клеточного цикла – циклина D1 [12]. Уровень ядерного β -катенина также определяется действием различных лигандов, таких как лизофосфатидовая кислота, простогландин E2, деоксихолевой кислоты и внеклеточных ионов Ca(2+) [15]. Кроме того, такие молекулы, как PI3K, ILK, MUC1 и PDCD4, также могут стимулировать ядерную аккумуляцию β -катенина. В ядре β -катенин опосредованная транскрипционная активность регулируется деятельностью таких кофакторов как KLF4, MAML1 и DVL-3 [16]. К примеру, транскрипционный фактор KLF5 (Kruppel-like factor 5) совместно с KLF2 и KLF4 и другими факторами участвует в поддержании стволовых свойств эмбриональных стволовых клеток и может индуцировать образования плюрипотентных стволовых клеток. В неизменном кишечном эпителии экспрессия KLF5 имеет полярную локализацию: повышена экспрессия в участках крипт, содержащих стволовые клетки, и снижена в участках с дифференцированными клетками [93, 94].

Подавление экспрессии как β -катенина, так и эффектора данного сигнального пути – транскрипционного фактора TCF4, приводят в эксперименте к нарушению архитектоники крипты [47–49, 55]. А усиление активности WNT пути увеличивает число Lgr5+ стволовых клеток в кишечной крипте [50]. Аналогично и подавление супрессоров WNT пути (Axin2 или убиквитин лигазами Rnf43 и Znf3) также приводит к увеличению пролиферативной зоны крипты [51]. Данное усиление пролиферации клеток в кишечной крипте происходит вследствие прямого репрессивного действия с-Мус (мишень для TCF4) в отношении ингибитора клеточного цикла p21Cip1/Waf1 [52]. При этом если подавить активность с-Мус происходит арест клеток прогениторов в фазе G1, с последующей их дифференцировкой, и соответственно должно образовываться большее количество дифференцированных клеток [53]. Однако, в некоторых работах, TCF4 наоборот ограничивал экспансию кишечного эпителия в крипте [54].

Описанные выше маркеры стволовых клеток кишечника (Ascl2, EphB2, Vmi1, Lgr5 и Tert), по сути своей находятся под управлением WNT сигнального пути [52, 56–60]. Однако генетическое подавление экспрессии Lgr5 не приводит к изменению кишечной крипты. Только совместная репрессия генов Lgr4 и Lgr5 приводит к повреждению строения кишечной крипты [61]. Одним из объяснений такого феномена является то, что Lgr4 является эквивалентом рецептора Rspo и возникает функциональная избыточность Lgr4 и Lgr5 [61–63].

При неканоническом пути – лиганд WNT5A проявляет свойства антагониста канонического WNT сигнального каскада. WNT5A индуцирует CaMKII/TAK1(MAP3K7)/NLK/CRM1 сигнальный путь, что, вероятно, приводит к подавлению FZD2, тем самым являя собой негативный регулятор WNT пути. При снижении активности WNT5A снижается уровень CRM1, что приводит к аккумуляции в ядре TCF7 (TCF1), что может приводить к активации WNT сигналинга. Также при низкой экспрессии WNT5A и снижения активности PKC-alpha происходит ингибирование ROR-alpha и, как следствие, активации β -катенина, и экспрессии генов мишеней WNT пути – Lef-1, циклина D1, с-Мус и с-Jun. В конечном итоге усиливается пролиферация клеток. WNT5A через экспрессию SIAH2 мо-

жет усиливать внутриклеточную деградацию β -катенина [13]. Неканонический WNT сигнальный путь через WNT5a вовлечен в регенерационные процессы в кишке. Также экспрессия WNT5a является необходимым условием закладки и развития кишечника у эмбриона, а также поддержания гомеостаза тканей кишки в постнатальном периоде [64]. В случае повреждения слизистой кишки WNT5a усиливает сигналинг с TGF- β (transforming growth factor β) и активирует ингибитор клеточного цикла p15INK4B, тем самым с одной стороны ограничивает пролиферацию эпителия, а, с другой, инициирует процессы заживления и восстановления архитектоники поврежденных тканей. При этом не происходит подавления активности классического WNT каскада [65].

Таким образом, в литературе достаточно данных по взаимосвязи компонентов WNT и поддержании свойств стволовых клеток в кишечной крипте. Какую роль оказывает микроокружение на функционирование WNT сигнального пути и реализацию свойств стволовых клеток кишечной крипты?

РОЛЬ МИКРООКРУЖЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КИШЕЧНОЙ КРИПТЕ

На работу стволовых клеток оказывает значимое влияние состояние микроокружения клеток или другими словами «клеточная ниша». Ниша представлена как клеточными элементами, так и структурами экстрацеллюлярного матрикса. На функционирование стволовых клеток также могут оказывать влияние бактерии и составляющие люмена крипты. Ключевыми регуляторами процессов самообновления и дифференцировки стволовых клеток крипты, как считается, являются клетки Панета и кишечные субэпителиальные миофибробласты. Такое эпителиально-мезенхимальное взаимодействие определяет поддержание архитектуры кишечной крипты и поддерживает баланс между процессами пролиферации и дифференцировки [18, 21, 66]. Это позволяет стволовым клеткам находиться в тесном контакте с такими пропролиферативными факторами, как Dll1 и Dll4 клеток Панета, EGF (epidermal growth factor), WNT3 и WNT2b, секретируемые мезенхимальными клетками [67–69]. Основными сигнальными путями, вовлеченными в данные процессы межклеточного взаимодействия, являются WNT, BMP, NOTCH, HEDGEHOG, EGFR и PDGF.

В дистальных отделах кишки, клетки Панета замещаются субпопуляцией бокаловидных клеток, экспрессирующих CD117 (c-Kit/steel factor receptor). Подобно клеткам Панета, CD117+ клетки секретируют Dll1/4 и EGF [70], однако не образуют WNT лиганды [69]. Формирующаяся ниша из клеток Панета и миофибробластов контролирует активность WNT сигнального пути, и тем самым контролирует процессы пролиферации стволовых клеток [71]. Но работа WNT сигнального пути важна и для созревания и локализации клеток Панета. Так, к примеру, инактивация Sox9 (SRV-box containing gene 9), одного из генов-мишеней WNT сигналинга, приводит к потере клеток Панета в кишечной крипте [80, 81].

Отметим, что деятельность WNT каскада кооперируется с активностью HEDGEHOG и BMP сигнальных путей [72]. К примеру, когда клетка-прогенитор перемещается от основания крипты, HEDGEHOG индуцирует BMP сигнальный путь, который в свою очередь активирует процессы дифференцировки и ограничивает процессы пролиферации [73]. Интересно отметить, что стволовые клетки кишечной крипты защищены от пролиферационного действия BMP сигналинга, так как стромальные клетки крипты секретируют антагонист BMP –

gremlin 1/2 и chordin-like 1 [68]. Таким образом, при недостаточной активации HEDGEHOG каскада, происходит BMP индуцированное обеднение крипты клетками-прогениторами. С другой стороны, активности сигнальных путей HEDGEHOG [74, 75] и/или BMP [73, 76] в купе с нарушениями в WNT каскаде может приводить к возникновению опухоли.

Митогенная активность EGF, который секретируется клетками Панета, находится под контролем пан-EGFR ингибитора Lrig1. Искусственная инактивация Lrig1 приводит к неограниченной экспансии клеток предшественников, и, как следствие, создания условий для канцерогенеза [77, 78]. Изменение градиента экспрессии EphB2 – EphB3/ephrin B1 в стволовых клетках и клетках Панета приводит к изменению их расположения в крипте [29, 79].

Другими участниками регуляции функций стволовых клеток крипты являются рецепторы Notch1 и Notch2, представленные на стволовых клетках. При этом лиганды к этим рецепторам – Dll1 и Dll4 секретируются клетками Панета [82, 83]. При активации данных рецепторов происходит экспрессия гена Hes1 (hairy and enhancer of split 1), продукт которого подавляет ингибиторы циклин-зависимых киназ p27Kip1 и p57Kip2, тем самым активирует процессы пролиферации в стволовых клетках [84].

Все выше представленное, является доказательством, что клетки микроокружения вносят значимый вклад в поддержание жизнеспособности стволовых клеток кишечной крипты, регуляцию процессов пролиферации, самообновления и дифференцировки данной клеточной субпопуляции.

Таким образом, основной дискуссионной проблемой в настоящее время является выделение стволовых клеток крипты, так как данные клетки бедны специфическими молекулярными маркерами. Также существуют определенных технические трудности в методологии их выделения и в определении того, как интерпретировать свойства самообновления и мультипотентности. Однако существует некоторый прогресс, по крайней мере, в определении числа таких клеток и их расположения в крипте. Подведя итог изучения крипты кишечника, отметим, что стволовые клетки расположены в позиции 4+, сразу над клетками Панета, экспрессируют Bmi1 и Tert. При делении данные стволовые клетки превращаются в клетки-прогениторы, которые мигрируют к вершине крипты и дифференцируются в более зрелые клеточные формы. Тогда как клетки Панета мигрируют в противоположную сторону – в сторону основания крипты. Вторая группа стволовых клеток расположена в основании крипты между клетками Панета. Они, в свою очередь, экспрессируют молекулы WNT сигнального пути – Lgr5. К настоящему времени на стволовых клетках кишечных крипт выявлены следующие маркеры, ассоциированные с процессами пролиферации и дифференцировки: Msi-1, CD29, Bmi-1, Lgr-5, ALDH-1, Tert, Ascl2, Troy, Olfm 4, Smoc2, EphB2.

СТВОЛОВЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ПРИ РАКЕ ТОЛСТОЙ КИШКИ

Опухоль не просто представлена пролиферирующими клетками. Она представлена клетками различных типов и функций, а также компонентами экстрацеллюлярного матрикса. Зачастую опухолевые клетки имеют довольно четкую иерархическую организацию и взаимодействуют не только друг с другом и микроокружением, но и находятся в постоянном взаимодействии с организмом. Примером такой обособлен-

ной группой клеток в опухоли, ответственными за инициацию опухоли и поддержание пролиферирующего пула клеток являются стволовые опухолевые клетки. Первоначально данные клетки были выявлены при изучении хронического миелолейкоза [95]. Исследователи выявили, что клетки с фенотипом CD34+CD38- обладали способностью к самообновлению, пролиферации и дифференцировке, а также формированию опухоли, фенотипически идентичной донорской. В дальнейшем субпопуляции опухолевых клеток, имеющие свойства стволовых эмбриональных клеток, и способных иницировать рост опухоли в экспериментальных моделях, были выявлены и при солидных опухолях, включая рак толстой кишки [96–99].

Опухолевые стволовые клетки обладают как свойствами эмбриональных стволовых клеток (способны как к симметричному, так и к ассиметричному делению), так и одинаковым с ними фенотипом. Это определило развитие теории происхождения стволовых опухолевых клеток из стволовых клеток неизменной ткани. Если говорить о раке толстой кишки, – стволовые клетки кишечной крипты. Так с помощью специфических промоторов экспрессии онкогенов в стволовых и нестволовых клетках кишечной крипты, Barker с соавторами показали, что делеции гена APC в LRG5+ клетках крипты приводило к быстрой трансформации и развитию аденомы у мышей. Делеции в гене APC в обычных клетках крипты не приводила к формированию опухоли [100]. Аналогичные результаты были получены Zhu с соавторами, но в отношении клеток кишечной крипты, экспрессирующих другой маркер стволовых клеток – CD133 [101].

По другой теории опухолевые стволовые клетки могут образовываться и из дифференцированных клеток, не имеющих фенотип соответствующий стволовым клеткам крипты [102], в том числе и в уже сформировавшейся опухоли [103]. Однако в большинстве своем, эти клетки относятся к группе клеток-прогениторов, обладающих теми или иными свойствами стволовости, включая и способность к самообновлению. В 2008 году было обнаружено, что при индукции эпителиально-мезенхимального перехода в эпителиальных клетках молочных желез человека с последующей гиперэкспрессией генов Twist и Snail или стимуляцией TGFβ сигнального пути происходит формирование фенотипа, характерного для стволовых клеток – CD24low, CD44high. При этом образуемые клетки способны были формировать маммосферы, проявлять свойства стволовости и у них отмечалась способность к эпителиально-мезенхимальному переходу (EMT). Активация EMT в ERBB-трансформированных эпителиальных клетках молочной железы приводило к формированию туморосфер *in vitro* и формированию опухоли *in vivo* [104]. Аналогичные результаты были получены и Morel с соавторами [105]. Еще ряд доказательств перехода дифференцированных опухолевых клеток в стволовые опухолевые клетки посредством активации EMT были получены в экспериментах, вследствие действия различных факторов – IL-6, TNFβ, TGFβ, Slug, Twist2, LBX1 [106–110].

Что касается аденокарцином толстой кишки, то их стволовые опухолевые клетки также имеют мезенхимальный фенотип, экспрессируют маркеры EMT, а также Snail. При этом индукция экспрессии Snail в дифференцированных клетках рака толстой кишки приводит к активации EMT, экспрессии IL-8 и формированию фенотипа стволовых опухолевых клеток. Так в клетках рака толстой кишки коэкспрессия таких активаторов EMT как SNAIL и интерлейкин-8, наблюдается толь-

ко с таким маркером стволовости, как CD44, но не с CD133. Блокирование SNAIL или его эффектора – интерлейкина-8, приводит к нарушению способности стволовых клеток аденокарциномы толстой кишки формировать колоносферы. Экспрессия других индукторов EMT (Slug (SNAIL2) и Twist1) не была повышена в колоносферах. Авторы статьи пришли к выводу, что SNAIL через интерлейкин-8, индуцируя EMT, способствует дедифференцировке клеток и приобретению ими стволовых свойств, что проявляется повышением экспрессии маркеров, отражающих данные свойства [111].

Также индукция EMT в клетках рака толстой кишки наблюдается и при подавлении экспрессии E-кадгерина [112].

В качестве механизма, объясняющего взаимосвязь EMT и проявления у клетки свойств стволовости предлагается модель подавления экспрессии одних из ключевых микро-РНК – микро-РНК 200b и 200c. При активации EMT происходит ингибирование p53, являющегося трансаktиватором семейства микро-РНК 200. «Выключение» микро-РНК 200b и 200c приводит к поддержанию экспрессии таких транскрипционных факторов как Zeb1 и Zeb2 (экспрессия которых также наблюдается при EMT), что позволяет с одной стороны поддерживать клеткой мезенхимальный фенотип, а с другой стороны – помогает клетке проявлять свойства стволовости. Последнее достигается в результате прямого или непрямого (через другие микро-РНК) активирующего влияния на сигнальный путь NOTCH, экспрессию гена Bmi1, ответственного за способность клетки к самообновлению, повышение экспрессии других генов, участвующих в процессах репрограммирования соматических клеток в плюрипотентные – Sox2, Nanog, Oct4 и Lin28 [113, 114].

Одним из ключевых сигнальных путей, активирующимся при EMT, является WNT каскад. Изучение роли WNT пути в его ассоциации с характеристиками стволовых клеток также важна, исходя из выше озвученной теории, что стволовые опухолевые клетки могут образовываться из обычных клеток опухоли при активации данного сигнального пути. Так у всех CD133+ опухолевых клеток, а также в субпопуляциях клеток CD166+, CD44+, CD29+, CD24+ или Lgr5 выявляется ядерная локализация β-катенина [132].

S.J. Leebham с соавторами показал, что стабилизация β-катенина в клетках кишечника мышей приводит к экспансии двух клеточных популяций: стволовых клеток, расположенных в основании крипты и пролиферирующих диспластических клеток, расположенных в средней зоне крипты. Это было ассоциировано с увеличением размеров крипты и интенсивностью клеточного деления. При этом сохранялась нормальная архитектура крипты, без развития дисплазии. Авторы также показали, что проксимальные отделы кишечника более чувствительны к изменениям в активности WNT сигнального пути, что является отражением физиологического градиента экспрессии маркеров стволовых клеток – Lgr5 и Olfm4 [136]. Также, возможно, это является и следствием микросателлитной нестабильности (MSI), более характерной для опухолей проксимальных отделов толстой кишки. При MSI определяется множество мононуклеотидных и динуклеотидных повторов между кодонами 1450 и 1560 гена APC, что определяет склонность к нарушению работы WNT каскада [137, 138]. Таким образом в процессе раннего канцерогенеза рака толстой кишки происходят абберации и в генах WNT пути [133].

Lgr5, как говорилось выше, представляет собой рецепторы с лейцин обогащенными повторами и связанные с G-белком, относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белками,

которые также являются мишенями для сигнального пути WNT [134]. При этом отмечено, что возникновение мутации в гене APC в Lrg-5 + стволовых клетках кишечной крипты чаще приводит к развитию опухоли у мышей, чем при мутации в данном гене в нестволовых дифференцированных клетках крипты. В опухоли Lrg5+ клетки способны превращаться в Lrg5- клетки, устойчивые к химиотерапии, тем самым приводя к репопуляции опухоли [135].

В 40% случаях при раке толстой кишки наблюдаются активирующие мутации в гене K-RAS. Данная мутация не только активирует сигнальный путь MAPK, но может активировать и PI3K/AKT1/GSK3 β каскад, что приводит к аккумуляции β -катенина в ядре и усилении WNT сигналинга при раке толстой кишки. Белок Galectin-3, экспрессия которого повышена в клетках аденокарциномы толстой кишки, также может активировать PI3K/AKT1/GSK3 β / β -катенин сигнальный путь. Таким образом, те или иные абберации WNT сигнального пути приводят к тому, что не происходит фосфорилирования β -катенина и, как следствие, не происходит его деградации. Тем самым β -катенин аккумулируется в цитоплазме и транслоцируется в ядро клетки, где формирует комплекс с транскрипционными факторами TCF7 и TCF4. В свою очередь транскрипционная активность комплексов β -catenin/TCF7 и β -catenin / TCF4 приводит к потере дифференцировки клетками рака толстой кишки и появлению таких маркеров стволовых клеток как CD44 и ENC1 [48, 49] и снижению экспрессии маркеров дифференцированных клеток – Carbonic anhydrase II, Mucin 2, IAP и I-FABP. Кроме того TCF4 вызывает экспрессию металлопротеиназ (Matrilysin – MMP-7) и CAS-L, которые способствуют инвазии и метастазированию клеток рака толстой кишки.

Отмечено, что активность транскрипционного фактора Nanog требуется для поддержания свойства плюрипотентности в эмбриональных стволовых клетках [115]. При раке толстой кишки, коэкспрессия Nanog с высокой активностью WNT пути в клетках, позволяет выделить опухоль инициирующую субпопуляцию [116]. Авторы выявили, что c-JUN и β -катенин/TCF4 приводят к усилению экспрессии Nanog и, тем самым, определяют приобретение клеткой свойств стволовости. Интересно отметить, что на моделях рака молочной железы, сама по себе гиперэкспрессия Nanog в клетках молочной железы у мышей не приводила к инициации опухоли. Однако при коэкспрессии с WNT1 происходило развитие опухоли и формирование метастазов. В данном исследовании, уже на клиническом материале было показано, что экспрессия Nanog в опухоли была ассоциирована с неблагоприятным прогнозом течения заболевания [117].

Симметричное деление опухолевых стволовых клеток на дифференцирующиеся прогениторы может быть индуцировано неопухолевыми клетками, например в присутствии микроРНК-34a [118]. Так активация гена Notch приводит к усилению пролиферации стволовых клеток кишечных крипт, клеток рака толстой кишки и стволовых опухолевых клеток рака толстой кишки, то есть поддерживает процессы самообновления [119]. Тогда как фактор Numb подавляет активность Notch [120] и начинают превалировать процессы дифференцировки над процессами самообновления [121]. В экспериментах показано, что в присутствии Numb удаляются ID1 и ID3 (inhibitor of DNA binding 1 и 3), что коррелировало с усилением дифференцировки и подавлением процессов самообновления и повышением чувствительности опухолевых клеток к химиопрепаратам [120]. Данный про-

цесс находится под контролем микроРНК-34 [118]. В клетках с высокой экспрессией микроРНК-34, повышена активность Numb и, соответственно, снижена экспрессия Notch и клетки дифференцируются в нестволовые. При низкой экспрессии микроРНК-34 клетки активно пролиферируют и самообновляются [118].

Также при поздних стадиях существования опухоли, клетки приобретают фенотип эпителиально-мезенхимального перехода, что определяет такие способности клеток как инвазия, миграция, формирование метастазов [122]. В процессе симметричного деления стволовых опухолевых клеток рака толстой кишки происходит равномерное распределение между образующимися клетками таких факторов как Snail и такого маркера стволовости как CD44. При инактивации Snail происходит переход к ассиметричному делению стволовых клеток с соответственно ассиметричным распределением маркера стволовости CD44, также как и маркеров дифференцировки Vmp4 и цитокератина 20. Данные находки показывают, что Snail является одним из ключевых факторов поддержания процессов самообновления стволовыми опухолевыми клетками рака толстой кишки. Выявлено, что Snail повышает активность таких компонентов WNT пути как β -катенин и TCF4, что приводит к экспрессии микро-РНК-146a. Подавление активности данной микро-РНК, приводит к снижению процессов самообновления, подавлению роста опухоли и способности к метастазированию. Тогда как эктопическая экспрессия микроРНК-146a не влияет на способность опухолевых клеток к миграции и формированию эпителиально-мезенхимального перехода [123]. Выяснилось, что основной мишенью микроРНК-146a является Numb. МикроРНК блокирует Numb зависимую деградацию β -катенина, поддерживая активность WNT сигнального пути и, как следствие, способность к самообновлению стволовых клеток. Также поддерживается и экспрессия микроРНК-146a, тем самым замыкается обратная позитивная сигнальная петля. Однако подавление экспрессии микроРНК-146a, WNT, Notch при повышении активности Numb приводит лишь к переключению на ассиметричное деление стволовой клетки, но не приводит к ассиметричному делению на два дифференцирующихся прогенитора. Возможно, это связано с действием других факторов. Интересно отметить, что клетки с симметричным делением на две стволовые клетки менее чувствительны к действию цетуксимаба – ингибитору EGFR [118]. Клинически было показано, что опухоли с высокой экспрессией Snail и низкой экспрессией Numb обладают резистентностью к цетуксимабу и неблагоприятным прогнозом течения болезни.

И все же механизм, с помощью которого стволовые опухолевые клетки поддерживают свои специфические свойства до конца неизвестен. Одним из предполагаемых участников данного механизма является KLF4 (Kruppel-like factor 4). Он используется для превращения соматических клеток в клетки с плюрипотентными свойствами и является основным фактором для самообновления эмбриональных стволовых клеток [124, 125]. Большинство авторов рассматривает данный фактор в качестве опухолевого супрессора при раке толстой кишки [126–129]. Однако, если его экспрессия ограничена только опухолевыми стволовыми клетками, то это не противоречит данным находкам. Экспрессия KLF4 во всех клеточных линиях рака толстой кишки – низкая [130]. Однако, если клетки рака толстой кишки линии DLD1 культивировать в среде свободной от сыворотки, образующиеся сфероидные клетки (DLD-S) экспрессируют такие факторы

стволовости, как Oct4/3, Sox2 и Nanog, наряду с такими маркерами стволовых клеток, как CD133, CD166, Lgr5 и ALDH1. Именно в этих клетках была значимо повышена экспрессия KLF4 в сравнении с прилежащими клетками обычных клеточных культур рака толстой кишки. Авторами обнаружена выраженная корреляция между экспрессией CD133 и KLF4. Изолированное же подавление экспрессии KLF4 приводило к усилению апоптоза в клетках DLD-S, что не позволяло клеткам проявлять свойства туморогенности, миграции, инвазии и химиорезистентности. Так же снижалась способность клеток к самообновлению. При этом значимо уменьшалось число CD133+ клеток в популяции. В данной работе было также показано, что KLF4 участвует и в регуляции WNT сигнального пути. Таким образом, авторы пришли к выводу, что для большинства клеток KLF4 является онкосупрессором, но для небольшой фракции клеток, наоборот необходим для поддержания свойств стволовости и, как следствие,

его активность может быть ассоциирована с развитием рецидива заболевания [131].

Таким образом, видно, что образование стволовых опухолевых клеток может происходить как из стволовых клеток кишечной крипты, так и из дифференцированных клеток крипты и опухоли. То есть процесс существования стволовых клеток опухоли очень динамичный и зависти от многих факторов. При этом в большинстве случаев активность именно WNT сигнального пути определяет образование и функционирование опухолевых стволовых клеток. Но каков фенотип стволовых клеток опухоли, представляют ли они одну популяцию или различаются друг от друга функционально? Кроме этого, наличие противоречивых данных по маркерам стволовых опухолевых клеток рака толстой кишки позволяет использовать в качестве потенциальных диагностических и, в будущем терапевтических мишеней таких клеток, компоненты EMT и WNT сигнального пути.

ЛИТЕРАТУРА

1. Markowitz SD, Bertagnoli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;361:2449–2460.
2. Dienstmann R, Guinney J, Delorenzi M, et al. Colorectal Cancer Subtyping Consortium (CRCSC) identification of a consensus of molecular subtypes. *J Clin Oncol*. 2014;32:5s (suppl; abstr 3511).
3. Huang EH, Wicha MS. Colon cancer stem cells: Implications for prevention and therapy. *Trends Mol Med*. 2008;14:503–509.
4. Hirai K, Kotani T, Aratake Y, et al. Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) staining predicts distant metastasis of 'benign' thyroid tumor. *Pathol. Int*. 1999;49:264–265.
5. Huntly, BJ, Shigematsu, H, Deguchi, K, et al. MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell*. 2004;6:587–596.
61. Jamieson, CH, Ailles, LE, Dylla, SJ, et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N. Engl. J. Med*. 2004;351:657–667.
7. Ricci-Vitiani L, Lombardi, DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human coloncancer- initiating cells. *Nature*. 2007;445:111–115.
8. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S and Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445:106–110.
9. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007;104:10158–10163.
10. Scoville D, Sato T, He X, et al. Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology*. 2008;134:849e64.
11. Kuhnert F, Davis CR, Wang HT, et al. Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 266–71.
12. Fodde R and Brabletz T. Wnt/b-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Current Opinion in Cell Biology*. 2007, 19:150–158.
13. Yuan Y, Niu CC, Deng G, et al. The Wnt5a/Ror2 noncanonical signaling pathway inhibits canonical Wnt signaling in K562 cells. *Int J Mol Med*. 2011 Jan;27(1):63–9.
14. Tian X, Liu Z, Niu B, et al. E-Cadherin/ β -Catenin Complex and the Epithelial Barrier. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011; Volume 2011 Article ID567305, 6 pages.
15. Yang M, Zhong WW, Srivastava N, et al. G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors stimulate proliferation of colon cancer cells through the β -catenin pathway. *Proc Natl Acad Sci US A*. 26 Apr 2005;102(17):6027–6032.
16. Evans PM, Chen X, Zhang W and Liu C. KLF4 Interacts with β -Catenin/TCF4 and Blocks p300/CBP Recruitment by β -Catenin. *Mol Cell Biol*. Jan 2010; 30(2):372–381.
17. Boman BM, Huang E. Human colon cancer stem cells: A new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol*. 2008;26:2828–2838.
18. Medema JP, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*. 2011;474:318–326.
19. Vries RG, Huch M, Clevers H. Stem cells and cancer of the stomach and intestine. *Mol Oncol*. 2010;4:373–384.
20. Papailiou J, Bramis KJ, Gazouli M et al. Stem cells in colon cancer. A new era in cancer theory begins. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26: 1–11.
21. Todaro M, Francipane MG, Medema JP et al. Colon cancer stem cells: Promise of targeted therapy. *Gastroenterology*. 2010; 138: 2151–2162.
22. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: Models and concepts. *Annu Rev Med*. 2007; 58: 267–284.
23. Davies EJ, Marsh V, Clarke AR. Origin and maintenance of the intestinal cancer stem cell. *Mol Carcinog*. 2011; 50: 254–263.

24. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* 2009;71:241–260.
25. Fafilek B, Krausova M, Vojtechova M, et al. Troy, a tumor necrosis factor receptor family member, interacts with *Lgr5* to inhibit wnt signaling in intestinal stem cells. *Gastroenterology.* 2013;144:381–391.
26. van der Flier LG, Haegebarth A, Stange DE, et al. OLFM4 is a robust marker for stem cells in human intestine and marks a subset of colorectal cancer cells. *Gastroenterology.* 2009;137:15–17.
27. Munoz J, Stange DE, Schepers AG, et al. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cellular Signalling.* 2014;26:570–579.
28. van Es JH, Barker N, van Oudenaarden A, et al. The *Lgr5* intestinal stem cell signature: robust expression of proposed quiescent '+4' cell markers. *EMBO J.* 2012;31:3079–3091.
29. Merlos-Suarez A, Barriga FM, Jung P, et al. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell.* 2011;8:511–524.
30. Takeda K, Kinoshita I, Shimizu Y, et al. Expression of LGR5, an intestinal stem cell marker, during each stage of colorectal tumorigenesis. *Anticancer Res.* 2011;31(1):263–70.
31. Simon E, Petke D, Boger C, et al. The spatial distribution of LGR5+ cells correlates with gastric cancer progression. *PLoS One.* 2012;7(4): e35486.
32. Lopez-Garcia C, Klein AM, Simons BD et al. Intestinal stem cell replacement follows a pattern of neutral drift. *Science.* 2010;330: 822–825.
33. Tian H, Biehs B, Warming S et al. A reserve stem cell population in small intestine renders *Lgr5*-positive cells dispensable. *Nature.* 2011;478:255–259.
34. Takeda N, Jain R, LeBoeuf MR, et al. Interconversion between intestinal stem cell populations in distinct niches. *Science.* 2011;334:1420–1424.
35. Powell AE, Wang Y, Li Y, et al. The pan-ErbB negative regulator *Lrig1* is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell.* 2012;149:146–158.
36. Wong VW, Stange DE, Page ME, et al. *Lrig1* controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat. Cell Biol.* 2012;14:401–408.
37. Yan KS, Chia LA, Li X, et al. The intestinal stem cell markers *Bmi1* and *Lgr5* identify two functionally distinct populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109:466–471.
38. van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P et al. Transcription factor *achaete scute-like 2* controls intestinal stem cell fate. *Cell.* 2009;136:903–912.
39. Itzkovitz S, Lyubimova A, Blat IC, et al. Single-molecule transcript counting of stem-cell markers in the mouse intestine. *Nat. Cell Biol.* 2012;14: 106–114.
40. Snippert HJ, van Es JH, van den Born M, et al. Prominin-1/CD133 marks stem cells and early progenitors in mouse small intestine. *Gastroenterology.* 2009;136:2187–2194 (e2181).
41. Zhu L, Gibson P, Currie DS, et al. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature.* 2009;457:603–607.
42. Potten CS, Booth C, Tudor GL, et al. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; *musashi-1*. *Differentiation.* 2003;71:28–41.
43. van Es JH, Sato T, van de Wetering M, et al. Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat. Cell Biol.* 2012;14:1099–1104.
44. Roth S, Franken P, Sacchetti A, et al. Paneth cells in intestinal homeostasis and tissue injury. *PLoS One.* 2012;7: e38965.
45. Buczacki SJ, Zecchini HI, Nicholson AM, et al. Intestinal label-retaining cells are secretory precursors expressing *Lgr5*. *Nature.* 2013;495:65–69.
46. Schepers A, Clevers H. Wnt signaling, stem cells, and cancer of the gastrointestinal tract. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012;4: a007989.
47. Korinek V, Barker N, Moerer P, et al. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking *Tcf-4*. *Nat. Genet.* 1998;19:379–383.
48. Fevr T., Robine S., Louvard D., Huelsken J. Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27:7551–7559.
49. Ireland H, Kemp R, Houghton C, et al. Inducible Cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of beta-catenin. *Gastroenterology.* 2004;126:1236–1246.
50. Kim KA, Kakitani M, Zhao J, et al. Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science.* 2009;309:1256–1259.
51. Koo BK, Spit M, Jordens I, et al. Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature.* 2012;488:665–669.
52. van deWetering M, Sancho E, Verweij C, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell.* 2002;111:241–250.
53. Muncan V, Sansom OJ, Tertoolen L, et al. Rapid loss of intestinal crypts upon conditional deletion of the Wnt/Tcf-4 target gene *c-Myc*. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26:8418–8426.
54. Angus-Hill ML, Elbert KM, Hidalgo J, Capecchi MR. T-cell factor 4 functions as a tumor suppressor whose disruption modulates colon cell proliferation and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108:4914–4919.
55. van Es JH, Haegebarth A, Kujala P, et al. A critical role for the Wnt effector *Tcf4* in adult intestinal homeostatic self-renewal. *Mol. Cell. Biol.* 2012;32:1918–1927.
56. van der Flier LG, Sabates-Bellver J, Oving I, et al. The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterology.* 2007;132:628–632.

57. Bjerknes M, Khandanpour C, Moroy T, et al. Origin of the brush cell lineage in the mouse intestinal epithelium. *Dev. Biol.* 2012; 362: 194–218.
58. Cho JH, Dimri M, Dimri GP. A positive feedback loop regulates the expression of polycomb group protein BMI1 via WNT signaling pathway. *Biol. Chem.* 2013; 288: 3406–3418.
59. Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science.* 2012; 336: 1549–1554.
60. Zhang Y., Toh L., Lau P., Wang X. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/ β -catenin pathway in human cancer. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 32494–32511.
61. de Lau W, Barker N, Lowet TY, et al. Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature.* 2012; 476: 293–297.
62. Glinka A, Dolde C, Kirsch N, et al. LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep.* 2011; 12: 1055–1061.
63. Barker N, Clevers H. Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology.* 2010; 138: 1681–1696.
64. Bakker ER, Raghoebir L, Franken PF, et al. Induced Wnt5a expression perturbs embryonic outgrowth and intestinal elongation, but is well-tolerated in adult mice. *Dev. Biol.* 2012; 369: 91–100.
65. Miyoshi H, Ajima R, Luo CT, et al. Wnt5a potentiates TGF- β signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science.* 2012; 338: 108–113.
66. Potten CS, Gandara R, Mahida YR, et al. The stem cells of small intestinal crypts: Where are they? *Cell Prolif.* 2009; 42: 731–750.
67. Sato T, van Es JH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature.* 2011; 469: 415–418.
68. Kosinski C, Li VS, Chan AS, et al. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007; 104: 15418–15423.
69. Farin HF, Van Es JH, Clevers H. Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology.* 2012; 143: 1518–1529 (e1517).
70. Rothenberg ME, Nusse Y, Kalisky T, et al. Identification of a cKit(+) colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5(+) stem cells in mice. *Gastroenterology.* 2012; 142: 1195–1205 (e1196).
71. Krausova M, Korinek V. Signal transduction pathways participating in homeostasis and malignant transformation of the intestinal tissue. *Neoplasma.* 2012; 59: 708–718.
72. van Dop WA, Uhmman A, Wijgerde M, et al. Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway. *Gastroenterology.* 2009; 136: 2195–2203 (e2191–e2197).
73. He XC, Zhang J, Tong WG, et al. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat. Genet.* 2004; 36: 1117–1121.
74. Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, et al. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development.* 2005; 132: 279–289.
75. van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, et al. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat. Genet.* 2004; 36: 277–282.
76. Haramis AP, Begthel H, van den Born M, et al. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science.* 2004; 303: 1684–1686.
77. Powell AE, Wang Y, Li Y, et al. The pan-ErbB negative regulator Lrig1 is an intestinal stem cell marker that functions as a tumor suppressor. *Cell.* 2012; 149: 146–158.
78. Wong VW, Stange DE, Page ME, et al. Lrig1 controls intestinal stem-cell homeostasis by negative regulation of ErbB signalling. *Nat. Cell Biol.* 2012; 14: 401–408.
79. Batlle E, Henderson JT, Begthel H, et al. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell.* 2002; 111: 251–263.
80. Bastide P, Darido C, Pannequin J, et al. Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* 2007; 178: 635–648.
81. Mori-Akiyama Y, van den Born M, van Es JH, et al. SOX9 is required for the differentiation of paneth cells in the intestinal epithelium. *Gastroenterology.* 2007; 133: 539–546.
82. Fre S, Hannezo E, Sale S, et al. Notch lineages and activity in intestinal stem cells determined by a new set of knock-in mice. *PLoS One.* 2011; 6: e25785.
83. Pellegrinet L, Rodilla V, Liu Z, et al. Dll1- and dll4-mediated notch signaling are required for homeostasis of intestinal stem cells. *Gastroenterology.* 2011; 140: 1230–1240 (e1231–e1237).
84. Riccio O, van Gijn ME, Bezdek AC, et al. Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO Rep.* 2008; 9: 377–383.
85. Fujimoto K, Beauchamp RD, Whitehead RH. Identification and isolation of candidate human colonic clonogenic cells based on cell surface integrin expression. *Gastroenterology.* 2002; 123: 1941–1948.
86. King JB, von Furstenberg RJ, Smith BJ, et al. CD24 can be used to isolate Lgr5+ putative colonic epithelial stem cells in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Aug 15, 2012; 303(4): G443–G452.
87. Gracz AD, Ramalingam S, Magness ST. Sox9 expression marks a subset of CD24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 298: G590–G600.

88. von Furstenberg RJ, Gulati AS, Baxi A, et al. Sorting mouse jejunal epithelial cells with CD24 yields a population with characteristics of intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 300: G409–G417.
89. Wang W, Wang X, Peng L, et al. CD24-dependent MAPK pathway activation is required for colorectal cancer cell proliferation. *Cancer Sci.* 2010; 101: 112–119.
90. Ramalingam S, Daughtridge GW, Johnston MJ, et al. Distinct levels of Sox9 expression mark colon epithelial stem cells that form colonoids in culture. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 302: G10–G20.
91. May R, Riehl TE, Hunt C, et al. Identification of a novel putative gastrointestinal stem cell and adenoma stem cell marker, doublecortin and CaM kinase-like-1, following radiation injury and in adenomatous polyposis coli/multiple intestinal neoplasia mice. *Stem Cells.* 2008; 26: 630–637.
92. Bhatlekar S, Addya S, Salunek M, et al. Identification of a developmental gene expression signature, including HOX genes, for the normal human colonic crypt stem cell niche: overexpression of the signature parallels stem cell overpopulation during colon tumorigenesis. *Stem Cells Dev.* 15 Jan 2014; 23(2): 167–79.
93. Nagai R, Friedman SL, Kasuga M, editors. *The biology of Krüppel-like factors.* Berlin: Springer-Verlag; 2009.
94. McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, Yang VW. The diverse functions of Krüppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *Bioessays.* 2007; 29: 549–57.
95. Bonnet D and Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as hierarchy that originates from a primitive hemopoietic cell. See comment in PubMed Commons below *Nat Med.* 1997Jul; 3(7): 730–7.
96. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Henandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100, 3983–3988.
97. Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 1030–1037.
98. O'Brien CA, Pollet A, Gallinger S and Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007; 445, 106–110.
99. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature.* 2007; 445, 111–115.
100. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature.* 2009; 457, 608–611.
101. Zhu L, Gibson P, Currie DS, et al. Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation. *Nature.* 2009; 457, 603–607.
102. Magee JA, Piskounova E and Morisson SJ. Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell.* 2012; 21, 283–298.
103. Ibrahim EE, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, et al. Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms. *Stem cells.* 2012; 30: 2076–2087.
104. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008; 133, 704–714.
105. Morel AP, Lievre M, Thomas C, et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008; 3, e2888.
106. Xie G, Yao Q, Liu Y, et al. IL-6 induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int J Oncol* 2012; 40, 1171–1179.
107. Asiedu MK, Ingle JN, Behrens MD, et al. TGFbeta/TNF(alpha)-mediated epithelial-mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudin-low phenotype. *Cancer Res* 2011; 71, 4707–4719.
108. Bhat-Nakshatri P, Appaiah H, Ballas C, et al. SLUG/SNAIL2 and tumor necrosis factor generate breast cells with CD44+/CD24- phenotype. *BMC Cancer* 2010; 10, 411.
109. Fang X, Cai Y, Liu J, et al. Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal. *Oncogen* 2011; 30, 4707–4720.
110. Yu M, Smolen GA, Zhang J, et al. A developmentally regulated inducer of EMT, Lbx1, contributes to breast cancer progression. *Genes Dev* 2009; 23, 1737–1742.
111. Hwang WL, Yang MH, Tsai ML, et al. SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology.* 2011; 141, 279–91, 291.e1–5.
112. Ye J, Wu D, Shen J, et al. Enrichment of colorectal cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition via CDH1 knockdown. *Mol Med Report.* 2012; 6, 507–512.
113. Brabletz S and Brabletz T. The ZEB/miR-200 feedback loop – a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* 2010; 11, 670–677.
114. Hill L, Browne G and Tulchinsky E. ZEB/miR-200 feedback loop: At the crossroads of signal transduction in cancer. *Int J Cancer.* 2013; 132(4): 745–54.
115. Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 2003 May 30; 113(5): 643–55.
116. Ibrahim EE, Babaei-Jadidi R, Saadeddin A, et al. Embryonic NANOG activity defines colorectal cancer stem cells and modulates through AP1- and TCF-dependent mechanisms. *Stem cells.* 2012; 30: 2076–2087.
117. X Lu, SJ Mazur, T Lin, E Appella and Y Xu. The pluripotency factor nanog promotes breast cancer tumorigenesis and metastasis. 2014 May 15; 33(20): 2655–64.

118. Bu P, Chen KY, Chen JH, et al. A microRNA miR-34a-regulated bimodal switch targets Notch in colon cancer stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013 May 2; 12(5): 602–15.
119. Miyamoto S. & Rosenberg DW. Role of Notch signaling in colon homeostasis and carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2011 Nov; 102(11): 1938–42.
120. O'Brien CA, Kreso A, Ryan P, et al. ID1 and ID3 regulate the self-renewal capacity of human colon cancer-initiating cells through p21. *Cancer Cell*. 2012 Jun 12; 21(6): 777–92.
121. Gómez-López S, Lerner RG & Petritsch C. Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Feb; 71(4): 575–97.
122. Tam WL & Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 2013 Nov; 19(11): 1438–49.
123. Hwang WL, Jiang JK, Yang SH, et al. MicroRNA-146a directs the symmetric division of Snail-dominant colorectal cancer stem cells. *Nat Cell Biol*. 2014 Mar; 16(3): 268–80.
124. Li Y, McClintick J, Zhong L, et al. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*. 2005; 105: 635–637.
125. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126: 663–676.
126. Dang DT, Chen X, Feng J, et al. Overexpression of Kruppel-like factor 4 in the human colon cancer cell line RKO leads to reduced tumorigenicity. *Oncogene*. 2003; 22: 3424–3430.
127. Wei D, Kanai M, Huang S, et al. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer. *Carcinogenesis*. 2006; 27: 23–31.
128. Ghaleb AM, McConnell BB, Nandan MO, et al. Haploinsufficiency of Kruppel-like factor 4 promotes adenomatous polyposis coli dependent intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2007; 67: 7147–7154.
129. Zhang W, Chen X, Kato Y, et al. Novel cross talk of Kruppel-like factor 4 and beta-catenin regulates normal intestinal homeostasis and tumor repression. *Mol Cell Biol*. 2006; 26: 2055–2064.
130. Zhao W, Hisamuddin IM, Nandan MO, et al. Identification of Kruppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene*. 2004; 23: 395–402.
131. Leng Z, Tao K, Xia Q, et al. Kruppel-Like Factor 4 Acts as an Oncogene in Colon Cancer Stem Cell-Enriched Spheroid Cells. *PLoS ONE*. 2013;8(2): e56082. doi:10.1371/journal.pone.0056082.