

Makrofagi towarzyszące nowotworowi – pochodzenie, charakterystyka oraz znaczenie w raku piersi

Tumor associated macrophages – origin, characteristic and importance in breast cancer

Artur Anisiewicz, Karolina Okła, Anna Wawruszak

anna_wawruszak@interia.pl, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

a.anisiewicz@gmail.com, Laboratorium Doświadczalnej Terapii Przeciwnowotworowej, Zakład Onkologii Doświadczalnej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

karolinaokla@gmail.com, I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem w grupie kobiet – co roku odnotowuje się ponad 1,5 mln nowych przypadków oraz ponad 0,5 mln zgonów. Dzięki zdolności rozpoznawania, pochłaniania i niszczenia obcych patogenów oraz zdolności do prezentacji antygenów makrofagi są kluczowymi elementami układu odpornościowego. Obwodowymi prekursorami dla makrofagów są powstające w szpiku kostnym monocyty. Dominującą klasą monocytów ludzkich są komórki o fenotypie CD14+/CD16-/CCR2^{high}. W modelu mysim rozróżnia się monocyty klasyczne (CCR2+/Ly6C^{high}) oraz niespecyficzne (CX₃CR1+/Ly6C^{low}). W odpowiedzi na sygnały środowiskowe przenikają do tkanek, gdzie ulegają różnicowaniu do makrofagów. W stanie fizjologicznym komórki te odpowiadają za utrzymywanie homeostazy tkanki, organizują również lokalną i systemową odpowiedź immunologiczną. Ze względu na ekspresję markerów powierzchniowych oraz drogę aktywacji wyróżnia się makrofagi aktywowane klasycznie (M1) oraz makrofagi alternatywne o działaniu przeciwzapalnym i stymulującym (M2). Makrofagi obecne w mikrośrodowisku guza (TAMs) stanowią istotną część nacieku komórek leukocytarnych. W większości typów nowotworów dominujący typ infiltrujących makrofagów stanowią komórki o fenotypie zbliżonym do makrofagów klasy M2. TAMs M2 charakteryzują się pronowotworowymi właściwościami. Komórki te wspierają angiogenezę w obrębie guza, promują jego wzrost, stymulują inwazyjność i przerzutowanie. Istotną cechą jest również immunosupresja układu immunologicznego, m.in. polaryzacja odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th2 oraz indukcja komórek Treg. Obecność makrofagów w podścielisku guza pacjentów z rakiem sutka jest negatywnym czynnikiem prognostycznym. TAMs M2 odpowiadają za progresję tej choroby, m.in. poprzez wydzielanie CCL18 oraz aktywację szlaku WNT/β-katenina.

Breast cancer is the most common tumour among women – every year over 1,5 million new cases and over 0,5 million deaths is recorded. Macrophages are key players of immunity because of their ability to recognize, engulf and destruction of pathogens and ability to presentation of antigens. Monocytes generated in the bone marrow are circulating precursors of macrophages. The dominant class of human monocytes are CD14+/CD16-/CCR2^{high} cells. In murine model exist classic monocytes (CCR2+/Ly6C^{high}) and nonspecific monocytes (CX₃CR1+/Ly6C^{low}). In response to environmental cues, monocytes penetrate into the tissues and differentiate into macrophages. They are responsible for homeostasis maintaining and the local and systemic immunity in physiological state. In view of the expression of surface mark-

Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

ers there are classic activated macrophages (M1) and anti-inflammatory, alternative macrophages (M2). Macrophages present in microenvironment of tumour (TAMs) are important part of the leukocyte infiltration. In the most types of cancer cells similar to M2 macrophages are dominant. TAMs M2 are characterized by pro-tumour properties. They promote angiogenesis, tumour growth, invasiveness and metastasis. Moreover, they are responsible for immunosuppression including polarization of immunity into Th2 cells and induction of Treg cells. Inherence of macrophages in the tumour stroma of breast cancer is negative prognostic factor for patients. TAMs M2 stimulate the progression of cancer through CCL18 production and activation of WNT/ β -catenin signalling.

1. Wprowadzenie

Rak sutka (łac. *carcinoma mam-mae*) jest wysoce heterogenną grupą chorób związaną z nadmiernym, nieprawidłowym i niekontrolowanym rozrostem komórek nabłonka organizujących struktury przewodów i zrazików. Pomimo ciągłego postępu w dziedzinie farmakologii i onkologii nadal jest to jeden z najczęściej zabijających nowotworów złośliwych. Według baz danych WHO, rak piersi jest najpowszechniejszym nowotworem występującym w grupie kobiet – w 2012 roku odnotowano ponad 1,5 mln nowych przypadków oraz ponad 0,5 mln zgonów (GLOBOCAN 2012) [1]. Wzrastające z roku na rok statystyki dotyczące zapadalności/umieralności na raka sutka związane

są z tzw. zachodnim stylem życia (m.in. ograniczenie aktywności fizycznej, stres, nieprawidłowe odżywianie), wysoką dostępnością do antykoncepcji hormonalnej oraz coraz lepiej rozwiniętym programem badań przesiewowych (mammografia). Niestety, pomimo coraz wyższej powszechności badań skriningowych, nadal liczne przypadki wykrywane są w stadium objawowym, charakteryzującym się niepomysłnym rokowaniem [2].

Poznanie i zrozumienie molekularnego oraz komórkowego podłoża rozwoju i progresji raka sutka rodzi nadzieję na stworzenie nowych, skuteczniejszych strategii terapeutycznych.

2. Makrofagi i odporność

Komórki układu immunologicznego odgrywają niebagatelną rolę w utrzymywaniu homeostazy ustroju, a co z tym związane, w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu. Makrofagi są kluczowymi elementami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej ze względu na ich wyjątkową zdol-

ność rozpoznawania, pochłaniania i niszczenia obcych patogenów [3]. Wraz z monocytami i komórkami dendrytycznymi stanowią główną pulę komórek prezentujących antygen (APC), dzięki czemu uczestniczą w powstawaniu komórek immunokompetentnych [4].

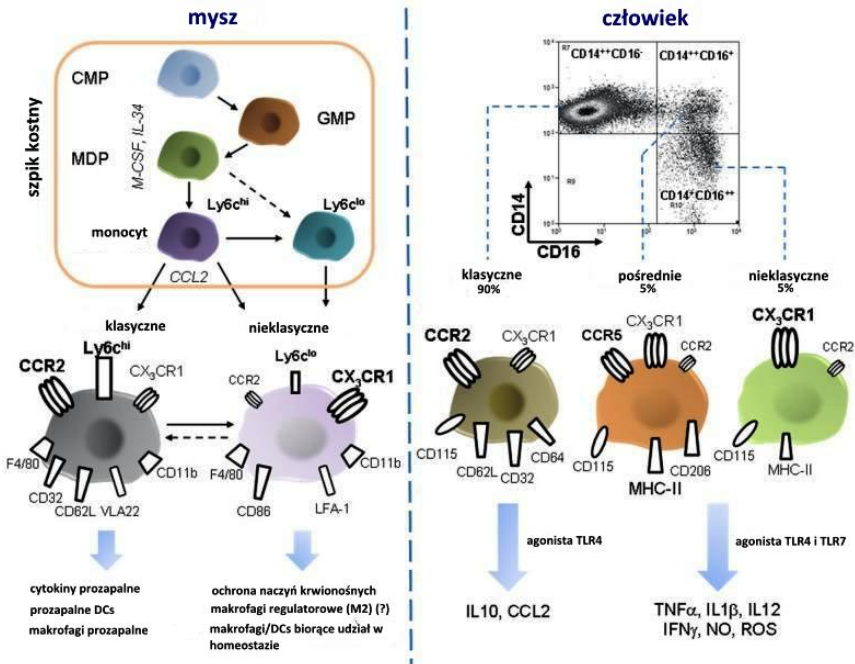
2.1. Monocyty

Miejszem pochodzenia monocytów, obwodowych prekursorów dla makrofagów, jest przede wszystkim szpik kostny. W procesie mielopozy, w wyniku różnicowania się mieloidealnej komórki progenitorowej, a następnie wspólnej komórki progenitorowej linii mieloidealnej i granulocytarnej, powstają neutrofile bądź monocyty [5]. Obecność w mikrośrodkowisku czynnika stymulującego tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF), czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) oraz interleukiny 3 (IL-3) stymuluje różnicowanie w kierunku monocytów. Komórki te ze szpiku kostnego trafiają do krwi, gdzie jako jednojądrzaste fagocyty pełnią funkcje obronne oczyszczając krew z mikroorganizmów oraz obumarłych bądź nieprawidłowo wykształconych czy zmienionych komórek. Po kilku dniach monocyty opuszczają łożysko naczyniowe przechodząc przez śródbłonek w procesie diapedezy. Po przeniknięciu do tkanek nabierają specyficznych cech fenotypowych oraz funkcjonalnych, różnicując się w zależności od obecności konkretnych czynników w makrofagi (GM-CSF i M-CSF) lub komórki dendrytyczne DC (GM-CSF i IL-4) [6].

W ostatnich latach dowiedziono, że obecne na obwodzie monocyty stanowią heterogenną grupę komórek wykazujących ekspresję markerów CD11b, CD11c i CD14 (dla ludzi) oraz CD11b i F4/80 w przypadku myszy [7]. Na podstawie fenotypu

(markerów powierzchniowych i receptorów) zarówno mysie, jak i ludzkie monocyty mogą być podzielone na dwie grupy. W przypadku ludzi dominującą klasą monocytów są stanowiące blisko 90% wszystkich monocytów klasyczne komórki o fenotypie $CD14+/CD16-/CCR2^{high}$ (Rysunek 1). W modelu mysim proporcje pomiędzy monocytami klasycznymi ($CCR2+/Ly6C^{high}$) a niespecyficznymi ($CX_3CR1+/Ly6C^{low}$) są wyrównane [7, 8].

Fenotyp monocytów decyduje o ich funkcjach i dalszych losach. Monocyty klasyczne $Ly6C^{high}$ migrują w kierunku stanu zapalnego oraz miejsc przebudowy tkanek, gdzie przenikają do tkanek i różnicują się w kierunku komórek dendrytycznych bądź makrofagów. Główną funkcją monocytów $Ly6C^{low}$ jest ochrona integralności śródbłonna naczyniowego oraz udział w procesach jego naprawy (rekrutacja neutrofilii) [10]. Ekstrawazacja komórek $Ly6C^{high}$ odbywa się w wyniku interakcji cząsteczek CD62L, obecnych na powierzchni monocytów klasycznych, z odpowiednimi molekułami obecnymi na endotelium objętym stanem zapalnym. Monocyty tej klasy po przedostaniu się do tkanki ulegają różnicowaniu w kierunku makrofagów o fenotypie M1. Komórki $Ly6C^{low}$, nie wykazujące ekspresji CD62L, mogą przenikać do tkanek w wyniku interakcji CX_3CR1/CX_3CL1 gdzie dają początek makrofagom klasy M2 [11].



Rysunek 1. Heterogenność monocytów ludzkich i mysich [9]

2.2. Charakterystyka makrofagów

Monocyty trafiające do tkanek, różnicują się w kierunku makrofagów lub komórek DC. Wraz z pozostałymi komórkami układu immunologicznego koordynują procesy zapalne oraz procesy naprawcze. Jako komórki APC biorą udział w prezentacji antygenów w kontekście MHC klasy II limfocytom Th organizując lokalną oraz systemową odpowiedź na zagrożenie patogenami. Makrofagi kontrolują stan zapalny, odpowiadają za cytotoksyczność oraz fagocytozę. Ponadto uczestniczą w utrzymaniu homeostazy organizmu dzięki udziałowi w takich procesach jak hematopoeza, hemostaza, remodeling tkanek,

gojenie ran oraz metabolizm lipidów i żelaza. Makrofagi wydzielają ponad sto nisko- i wysoko-cząsteczkowych związków o aktywności biologicznej. Są to m.in. enzymy (lizozym, proteazy, kwaśne hydrolazy lizosomalne), inhibitory białek (inhibitory proteaz, inhibitory fosfolipazy), czynniki kaskady krzepnięcia krwi, składowe dopełniacza, reaktywne formy, szereg cytokin i chemokin oraz metabolity kwasu arachidonowego (produkty cyklooksygenazy oraz lipooksygenazy) [6, 12].

Makrofagi charakteryzuje wysokie zróżnicowanie funkcjonalne i strukturalne. Zasadniczy podział

Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

wyróżnia obecne na błonach śluzowych makrofagi wolne, makrofagi osiadłe (tkankowe) oraz makrofagi wędrujące, aktywowane w odpowiedzi na stan zapalny [10].

Prekursory makrofagów rezydualnych pojawiają się w określonych tkankach już na etapie życia płodowego. Morfologia oraz zróżnicowanie funkcjonalne uzależnione są od miejsca ich docelowej lokalizacji. Do tej grupy makrofagów zalicza się między innymi makrofagi pęcherzyków płucnych, histiocyty, komórki Kupffera zatok wątrobowych, osteoklasty, komórki mikrogleju centralnego układu nerwowego, makrofagi przewodu pokarmowego, makrofagi szpiku kostnego czy też makrofagi występujące w tkankach limfoidalnych [13].

Makrofagi aktywne w odpowiedzi na stan zapalny trafiają do tkanek w sytuacji zagrożenia. W odpowiedzi na pojawiające się czynniki chemo-taktyczne wędrują do ogniska lokalnego stanu zapalnego, gdzie ulegają aktywacji. W tkance uruchamiane są mechanizmy bójcze, m.in. fagocytoza, sekrecja peptydów, wewnątrzkomórkowa degranulacja oraz sekrecja peptydów. Jednakże rezultat aktywacji makrofagów może być całkiem odmienny i uzależniony jest od obecności sygnałów indukcyjnych bądź supresyjnych [14].

Ze względu na ekspresję markerów powierzchniowych oraz drogę aktywacji wyróżnia się makrofagi aktywowane klasycznie (M1) oraz makrofagi alternatywne o działaniu przeciwzapalnym i stymulującym (M2). Aktywatory oraz charakterystyczne markery komórek o fenotypie M1 oraz poszczególnych klas makro-

fagów M2 przedstawione są na Rysunku 2.

Dla makrofagów mysich charakterystycznymi cząsteczkami opisującymi fenotyp komórek klasy M2 są markery FIZZ1, Arg-1 oraz YM1 [16].

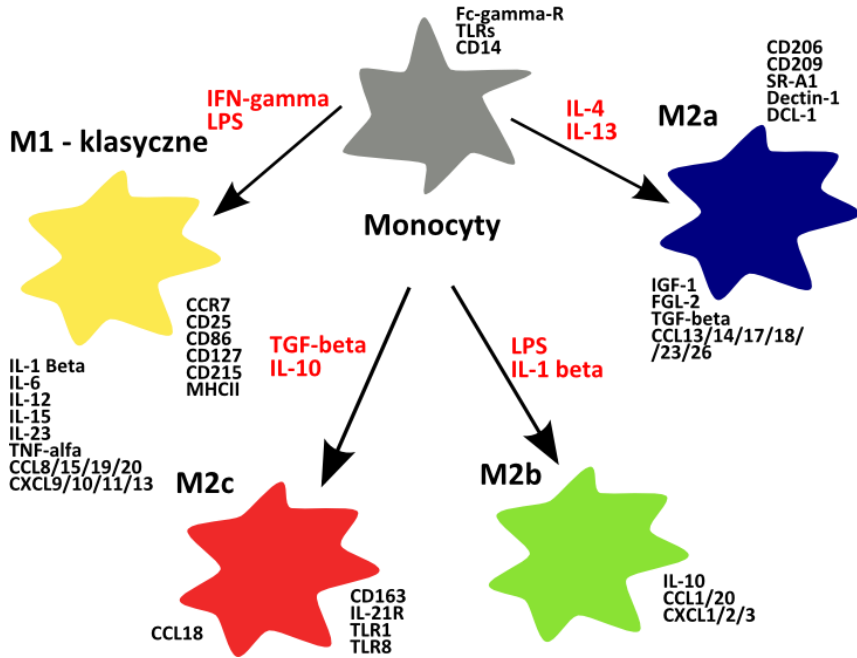
Droga i skutek aktywacji makrofagów uzależnione są od występującej w danym momencie i w danym miejscu kombinacji czynników indukcyjnych i supresyjnych.

Polaryzację w kierunku klasy M1 obserwuje się na wczesnych etapach odpowiedzi zapalnej, rozwijanej wskutek infekcji bakteryjnych, wirusowych i grzybiczych oraz w przypadku uszkodzenia tkanek. Komórki M1 charakteryzuje podwyższona zdolność do prezentacji antygenów limfocytom Th1 i Th17, wysoka ekspresja czynników związanych ze szlakiem NFκB oraz zdolność do magazynowania żelaza [6]. Makrofagi M1 wytwarzają specyficzne cytokiny, m.in. TNFα, IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 oraz chemokiny takie jak CCL5, CCL8, CXCL2 i CXCL4 [4].

Z drugiej strony, podczas wyciszenia stanu zapalnego aktywowane są makrofagi alternatywne. Podwyższony stosunek M2/M1 obserwuje się także w przebiegu infekcji pasożytniczych, w procesach włóknienia, tworzenia blaszek miażdżycowych oraz podczas tworzenia ziarniniaków [6]. Komórki M2 aktywują limfocyty Th2 oraz limfocyty Treg, wydzielają również cytokiny oraz inne czynniki o działaniu stymulującym i przeciwzapalnym, m.in. IL-10, TGF-β, IL-1RA, CCL16, CCL18 i CCL22. Zwiększona ekspresja arginazy 1 skutkuje zmianą metabolizmu L-Argininy w kierunku wytwarzania

ornitydyny i poliamin, ną syntazę tlenu azotu (iNOS) [4].
w konsekwencji blokując indukowa-

Aktywacja i polaryzacja makrofagów



Rysunek 2. Zróżnicowanie makrofagów – charakterystyczne aktywatory i markery. Opracowanie własne na podstawie [15]

3. Komórki TAMs

Makrofagi obecne w mikrośrodowisku guza (TAMs – tumor associated macrophages) stanowią istotną część nacieku komórek leukocytarnych. W większości typów nowotworów dominujący typ infiltrujących makrofagów stanowią komórki o fenotypie zbliżonym do makrofagów klasy M2. W związku z tym wielu naukowców stawia często znak równości pomiędzy komórkami M2 a

makrofagami TAMs. Analizy fenotypu komórek naciekających nowotwór wskazują jednak, że w mikrośrodowisku guza mogą być obecne zarówno komórki klasy M1, jak i M2, zaś stosunek M1/M2 uzależniony jest m.in. od typu nowotworu, jego stadium rozwojowego oraz kombinacji czynników indukcyjnych/supresyjnych wydzielanych przez same komórki nowotworowe [6, 17].

3.1. Polaryzacja makrofagów M1 i M2

Rozrost tkanki nowotworowej możliwy jest dzięki odpowiedniej modulacji mikrośrodowiska rozwijającego się guza. Komórki nowotworowe poprzez wydzielanie konkretnych cząsteczek wpływają na lokalną odpowiedź układu immunologicznego, prowadząc do upośledzenia jego funkcjonowania [18].

CCL2 (MCP-1 – chemotaktyczny czynnik białkowy 1) jest prawdopodobnie najsilniej działającym czynnikiem chemotaktycznym oddziałującym na znajdujące się na obwodzie monocytu. Jej nadmierną sekrecję stwierdza się m.in. w mięśniakach, glejakach, nowotworach płuc i piersi, w raku szyjki macicy, w raku jajnika oraz czerniaku złośliwym [18]. Poza rekrutacją monocytów do środowiska guza, CCL2 indukuje ich aktywność oksydacyjną, wzmacnia wydzielanie IL-1 i IL-6, stymuluje także wytwarzanie urokinazowego aktywatora plazminogenu. Wśród innych czynników działających chemotaktycznie na monocyty wyróżnia się m.in. VEGF, CCL5 (RANTES), M-CSF, GM-CSF,

IL-8 oraz MIP-1 α (białko zapalne makrofagów) [4].

Wędrowka monocytów do środowiska guza w odpowiedzi na czynniki chemotaktyczne, migracja okolicznych makrofagów tkankowych oraz proliferacja komórek TAMs skutkują zwiększeniem procentowej zawartości komórek linii monocytarnej w nacieku leukocytarnym. W wyniku progresji choroby nowotworowej komórki o fenotypie typowym dla klasy M1 ulegają polaryzacji w kierunku pronowotworowych TAMs M2, jednakże należy zaznaczyć, że uzależnione jest to m.in. od typu nowotworu oraz występujących w jego środowisku specyficznych cytokin i chemokin. Obecne w nacieku makrofagi M2 pod względem fenotypowym są niemal identyczne z makrofagami alternatywnymi M2 występującymi w stanie fizjologicznym, jednak ich indukcja odbywa się w wyniku stymulacji IL-10, TGF- β oraz prostaglandyną E2, wytwarzanymi przez komórki nowotworowe (tzw. Makrofagi M2c – Rysunek 2) [19].

3.2. Antynowotworowe właściwości TAMs M1

W zależności od typu nowotworu oraz specyficznych sygnałów wytwarzanych przez komórki nowotworowe i komórki znajdujące się w otoczeniu guza (komórki śródbłonna, fibroblasty, komórki układu immunologicznego), makrofagi TAMs mogą wykazywać właściwości anty- lub pronowotworowe.

Fenotyp makrofagów M1 charakteryzuje wysoka ekspresja prozapalnych cytokin, m.in. IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12 i IL-23. Nadmierna produk-

cja czynników stymulujących środowisko stanu zapalnego na początkowych etapach rozwoju choroby nowotworowej oddziałuje mobilizująco na komórki układu immunologicznego [20]. Wydzielana przez makrofagi IL-12 stymuluje komórki NK do sekrecji IFN- γ [4]. Interferon działa pobudzająco na komórki immunologiczne, w tym na makrofagi, prowadząc do uruchomienia mechanizmów cytostatycznych (TNF- α i IL-1) i cytotoksycznych. Produkowany przez

komórki M1 tlenek azotu (NO) wykazuje działanie toksyczne w stosunku do komórek nowotworowych, istnieją jednakże doniesienia świadczące o jego stymulującej roli w procesie neoangiogenezy [21]. Bezpośrednie niszczenie komórek nowotworowych przez makrofagi odbywa się na drodze cytotoxyczości zależnej (ADCC) lub niezależnej od przeciwciał (MTC). Pierwsza strategia polega na wytworzeniu połączenia pomiędzy makrofagem a komórką nowotworową poprzez znajdujące się na jej powierzchni przeciwciało i receptor dla fragmentu Fc. W przypadku MTC dochodzi do bezpośredniej interakcji, jednakże ten typ cytotoxyczości jest mechanizmem rozwijającym się dłużej niż ADCC. Makrofagi po pośrednim lub bezpo-

średnim związaniu komórki nowotworowej wydzielają m.in. aktywne formy tlenu, proteazy oraz inne czynniki prowadzące do efektu cytotoxicznego [14].

Długotrwałe utrzymywanie się środowiska stanu zapalnego jest czynnikiem niekorzystnym i w dłuższej perspektywie działa stymulująco na rozwój guza. Badania wskazują, że progresji choroby nowotworowej towarzyszy postępująca polaryzacja fenotypu makrofagów TAMs w kierunku komórek M2. Jednakże w niektórych typach nowotworów (m.in. rak żołądka, czerniak, chłoniak grudkowy) obserwuje się przewagę fenotypu M1, zaś wysoki stosunek M1/M2 stanowi dobry czynnik rokowniczy dla pacjentów [4, 22, 23].

3.3. Pronowotworowe właściwości TAMs M2

W zaawansowanych stadiach większości złośliwych nowotworów obserwuje się zwiększenie odsetka makrofagów TAMs M2 o właściwościach immunosupresyjnych i pronowotworowych. Postęp i rozwój choroby nowotworowej możliwy jest dzięki odpowiedniej modulacji mikrośrodowiska guza. Udowodniono, że długotrwałe utrzymywanie się stanu zapalnego jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym, sprzyjającym progresji choroby nowotworowej. Komórki nowotworowe, fibroblasty (CAF) oraz makrofagi migrujące do środowiska guza w odpowiedzi na czynniki m.in. M-CSF i CCL2 wydzielają nadmierne ilości

cytokin prozapalnych. Skutkuje to uruchomieniem szlaków sygnałowych JAK/STAT3, PI3K/Akt oraz Ras/ERK, odpowiadających m.in. za proliferację, przeżycie komórek nowotworowych, inwazję i przerzutowanie [24]. Produkowane przez komórki nowotworowe cytokiny, m.in. IL-6, IL-4, IL-10, TGF- β , prostaglandyny E2 w dłuższej perspektywie hamują aktywność cytotoxiczną makrofagów, obniżają ekspresję cząsteczek MHC klasy II na ich powierzchni, stymulują także (IL-10 i IL-4) polaryzację fenotypu w kierunku komórek M2 o właściwościach pronowotworowych [4].

3.3.1. Neoangiogeneza

Nadmierny i nieregularny wzrost komórek nowotworowych związany z przyspieszonymi podziałami komórkowymi objawia się większym zużyciem tlenu, prowadząc do rozwinięcia stanu niedotlenienia. W guzach nowotworowych o objętości 1-2 mm³ dyfuzja tlenu ulega zahamowaniu, zaś postępująca dezintegracja i nefunkcjonalność naczyń krwionośnych pogłębiają hipoksję tkanki nowotworowej. Istnieje wiele dowodów wskazujących na istotną rolę makrofagów TAMs M2 w regulacji, inicjacji i promocji procesu neoangiogenezy. Zarówno w ludzkich, jak i w mysich guzach komórki TAMs gromadzą się w słabo unaczynionych, nekrotycznych polach, znajdowane są również w okolicach naczyń krwionośnych [25]. Uważa się, że wysoki odsetek TAMs M2 skorelowany jest z wyso-

kim poziomem hipoksji. Komórki nowotworowe znajdujące się w stanie niedotlenienia wydzielają czynniki o działaniu chemotaktycznym w stosunku do monocytów/makrofagów - VEGF, EMAP-II oraz endotelinę 2. M2 migrujące do miejsc hipoksji, przy współpracy komórek guza wydzielają szereg związków proangiogennych, stymulujących komórki śródbłonna do neowaskularyzacji tkanki guza [12]. Są to m.in. VEGF, TNF- α , TGF- β , IL-8, bFGF, COX-2 oraz PDGF [26]. Dodatkowo TAMs M2 charakteryzują się wysoką ekspresją metaloproteinaz macierzy (MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12) oraz uPA (urokinazowy aktywator plazminogenu) uczestniczących w przebudowie macierzy zewnątrz-komórkowej [27].

3.3.2. Wzrost guza

Infiltracja makrofagów TAMs M2 w obrębie tkanki nowotworowej wpływa pozytywnie na proliferację komórek, co potwierdza m.in. poziom MIB-1 w raku piersi, poziom Ki67 w raku macicy oraz indeks mitotyczny w raku nerkowokomórkowym [23]. Poza działaniem immunosupresyjnym

w stosunku do środowiska guza, makrofagi towarzyszące nowotworowi wydzielają szereg czynników stymulujących wzrost, proliferację i przeżycie. Są to przede wszystkim MMP-9, IL-23, hepatocytarny czynnik wzrostu (HGF), EGF, PDGF, TGF- β oraz bFGF [26].

3.3.3. Inwazja i przerzutowanie

Makrofagi TAMs M2 promują proces przerzutowania w wyniku stymulacji angiogenezy, indukcji wzrostu guza, zwiększenia zdolności do migracji oraz inwazyjności komórek nowotworowych. W wielu typach nowotworów wysoki odsetek komórek TAMs skorelowany jest z zaję-

ciem węzłów chłonnych oraz formowaniem przerzutów odległych. Zarówno czynnik CSF-1 uwalniany przez komórki nowotworowe, jak i epidermalny czynnik wzrostu (EGF) wydzielany przez makrofagi pobudza migrację obu typów komórek [25]. Ponadto nadmierna produkcja TNF- α

zwiększa inwazyjność w wyniku stymulacji ekspresji MIF oraz EMM-PRIN (czynnik indukujący metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej), indukujących wytwarzanie MMPs 1,2,3,7,9,12 [12, 19]. Metaloproteinazy macierzy wraz z innymi enzymami (m.in. plazmina, urokinazowy aktywator plazminogenu, tkankowy aktywator plazminogenu) odpowiadają za przebudowę struktury macierzy pozakomórkowej prowadząc do jej rozluźnienia, co sprzyja migracji i przerzutowaniu komórek nowotworowych do okolicznych,

zdrowych tkanek [28]. Co więcej, również inne czynniki produkowane przez makrofagi, m.in. IL-1 β , katepsyna B, Wnt5a, Wnt5b, MSF (czynnik stymulujący migrację) oraz semaforyna 4D promują inwazyjność komórek guza [25]. Wskazuje się także na istotną rolę cząsteczek mikroRNA w regulacji inwazyjnego fenotypu komórek nowotworowych. Na przykład, powstające w makrofagach TAMs mir-233 regulują metastazę poprzez szlak mef2c- β -kateniny [26].

3.3.4. Immunosupresja

Niezakłócony rozrost guza możliwy jest dzięki odpowiedniej modulacji mikrośrodowiska, w którym się on znajduje. Komórki nowotworowe przy współpracy makrofagów TAMs M2 działają immunosupresyjnie na układ immunologiczny gospodarza. Na etapie inicjacji choroby nowotworowej obserwowany jest podwyższony poziom cytokin prozapalnych, m.in. IL-1, IL-6 oraz TNF- α . Czynniki te działają hamująco w stosunku do cytotoksycznej aktywności makrofagów. Równocześnie komórki nowotworowe produkują cytokiny (IL-10, IL-4) stymulujące polaryzację fenotypu w kierunku klasy M2. TAMs M2 wydzielają związki o działaniu przeciwzapalnym, tj. IL-10, IL-1RA

oraz TGF- β [29]. Efektem tego jest polaryzacja odpowiedzi immunologicznej w kierunku limfocytów Th2, indukcja limfocytów T regulatorowych oraz supresja limfocytów T CD8+ i komórek NK [4]. Progresji wielu nowotworów towarzyszy wysoka ekspresja arginazy 1, metabolizującej L-argininę w kierunku poliamid i proliny. Prowadzi to do niefunkcjonalności receptorów TCR oraz upośledzenia i supresji komórek CD8+. Ponadto immunosupresja może być również związana z wydzielaniem specyficznych chemokin, m.in. CCL17, CCL18, CCL22 działających chemotaktycznie dla komórek Treg oraz Th2 [26].

4. Makrofagi TAMs w raku piersi

Liczne źródła wskazują na występowanie wysokiego odsetka makrofagów TAMs M2 w przebiegu choroby nowotworowej gruczołu sutkowego [3,4,23,26,30]. Występowanie makrofagów CD163+ (marker cha-

raktery-styczny dla fenotypu M2) w podścielisku guza u pacjentów ze stwierdzonym rakiem piersi jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Wykazano dodatnią korelację pomiędzy obecnością komórek

CD163+ a większym rozmiarem guza i wyższym poziomem markera Ki67

w potrójnie negatywnym raku sutka [31].

4.1. TAMs a progresja raka sutka

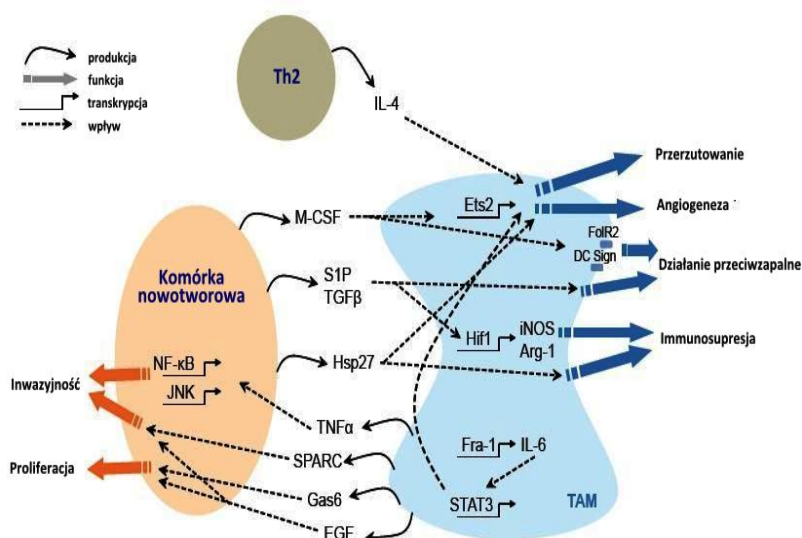
TAMs uczestniczą we wzroście nowotworu, wspierają angiogenezę, promują również inwazyjny fenotyp komórek nowotworowych zwiększając ich zdolność przerzutowania. Zarówno w mysim, jak i w ludzkim modelu raka piersi stwierdza się ekspresję markerów charakterystycznych dla makrofagów klasy M2 [30].

Dodatkowo, TAMs izolowane z myszy obarczonych rakiem sutka charakteryzują się niską zdolnością cytotoksyczną z uwagi na obniżoną ekspresję i funkcjonalność czynników NF- κ B i C/EBP, co skutkuje zaburzeniem w produkcji NO. W mysim modelu raka piersi MMTV-PyMT IL-4 produkowana przez naciekające limfocyty CD4+ stymuluje ekspresję czynnika EGF, prowadząc do zwiększonego przerzutowania w płucach. Również katepsyna B, której produkcję indukuje IL-4, wykazuje wpływ na zwiększoną inwazyjność komórek nowotworowych. W nowotworach gruczołu sutkowego stwierdza się często wysoki poziom czynnika MCSF [3, 19]. Bezpośrednim efektem szlaku sygnałowego dla tego białka jest czynnik transkrypcyjny Ets2. Jego aktywacja promuje przerzutowanie do płuc, m.in. w wyniku hamowania aktywności inhibitorów angiogenezy (model PyMT). Komórki ludzkiego raka piersi produkują nadmierne ilości białka szoku ciep-

nego 27 (Hsp27), wspierającego różnicowanie monocytów do makrofagów. TAMs powstałe w wyniku indukcji Hsp27 działają immunosupresyjnie w stosunku do limfocytów T, wspierają angiogenezę i przerzutowanie komórek guza. Co więcej, uwalniany przez obumierające komórki nowotworowe TGF- β oraz S1P (sfingozyna-1-fosforan) indukuje czynnik HIF-1 (czynnik indukujący hipoksję) o działaniu proangiogennym [3].

W mysim modelu raka piersi 4T1 stwierdza się także nadekspresję czynnika transkrypcyjnego Fra-1, aktywującego inny czynnik STAT3. Jego obecność wykrywa się w około 70% pierwotnych nowotworów ludzi, zaś konstytutywna aktywacja STAT3 zwiększa proliferację komórek nowotworowych [32].

Poprzez sekrecję TNF- α przez makrofagi TAMs, w komórkach raka sutka aktywowane są szlaki NF- κ B oraz JNK stymulujące ich inwazyjność. Podobnym działaniem charakteryzuje się osteonektyna (SPARC), odpowiadająca za interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi a macierzą zewnątrzkomórkową. Ponadto, proliferacja komórek może być również stymulowana produkowanym przez TAMs M2 mitogenem Gas6 (Rysunek) [3].



Rysunek 3. Pronowotworowa aktywność makrofagów TAMs w raku piersi [3]

4.2. CCL18 a metastaza

Charakterystyczną cechą makrofagów klasy M2 jest wydzielanie specyficznych chemokin, m.in. CCL18 [19]. W stanie fizjologicznym białko to pełni rolę chemoatraktanta dla dziesięciu limfocytów B, T oraz niedojrzałych komórek DC. CCL18 wydaje się odgrywać ważną rolę w polaryzacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku limfocytów Th2, działa także stymulująco na różnicowanie w kierunku komórek Treg produkujących IL-10. Wysoką ekspresję CCL18 stwierdza się w chorobach alergicznych oraz zaburzeniach o podłożu zapalnym [33].

Analiza profilu cytokin wydzielanych przez TAMs, obecne w mikrośrodowisku guza, wskazuje na wysoki poziom ekspresji CCL18, który związany jest ze złym rokowaniem oraz większym ryzykiem przerzutowania. CCL18 wydzielana przez

makrofagi M2 ulega specyficznemu związaniu z obecnym na komórkach nowotworowych receptorem PITPNM3 (Nir1), należącym do rodziny białek G (GPCR) [34].

Aktywacja receptora PITPNM3 prowadzi do fosforylacji i translokacji cytoplazmatycznej kinazy tyrozynowej Pyk2 w kierunku błony komórkowej. Białko to należy do dużej rodziny kinaz FAK (focal adhesion kinase) i odpowiada za regulację adhezji komórkowej, migracji i inwazji. Badania kliniczne wskazują, że nadekspresja Pyk2, obserwowana w kilku typach nowotworów w tym w raku piersi, związana jest ze złośliwym fenotypem komórek nowotworowych wykazujących skłonności do przerzutowania oraz stanowi niekorzystny czynnik prognostyczny. Co więcej, aktywacji i translokacji Pyk2 na membranę towarzyszy indukcja innej

kinazy tyrozynowej - kinazy Src [35]. Skutkuje to m.in. aktywacją białka STAT3 pomimo braku obecności

czynników wzrostowych i pobudzających, co przekłada się na promowanie proliferacji i przerzutowania [36].

4.3. Szlak WNT/ β -katenina

Ścieżka sygnałowa WNT/ β -katenina odgrywa istotną rolę w procesie tumorigenezy. Wykazano, że niska ekspresja błonowej β -kateniny lub jej jądrowa lokalizacja są złym czynnikiem prognostycznym dla pacjentów z rakiem. Co więcej, nieprawidłowa ekspresja APC – negatywnego regulatora β -kateniny – jest jedną z głównych przyczyn raka okrężnicy [37].

Pronowotworowe właściwości szlaku związane są fosforylacją i aktywacją β -kateniny, jej translokacją do jądra komórkowego oraz związaniem z czynnikiem transkrypcyjnym Tcf. Powstały kompleks ulega przyłączeniu w miejscu promotorów genów odpowiedzialnych za proliferację i zahamowanie apoptozy [38]. Aktywacja β -kateniny możliwa jest dzięki

połączeniu białka Wnt z błonowym receptorem Fzd. Efektem tego oddziaływania jest powstanie aktywnego kompleksu receptorowego, do którego następnie przyłącza się aktywna uwalniająca β -kateninę [39].

Badania prowadzone na mysim modelu raka piersi MMTV-PyMT wskazują, że makrofagi TAMs posiadają ekspresję ligandów Wnt, m.in. Wnt5b oraz Wnt7b. Również w przypadku makrofagów izolowanych z podścieliska guza ludzkiego raka piersi stwierdzono nadekspresję Wnt7b. Co więcej, obecność ligandów Wnt oraz aktywacja β -kateniny wiązana jest z indukcją genów odpowiedzialnych za proliferację, inwazyjność komórek raka piersi, angiogenezę oraz przerzutowanie [37].

5. Podsumowanie

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem w grupie kobiet. Według szacunkowych danych WHO, w 2035 roku ilość nowych przypadków przekroczy 2,5 miliona, zaś ilość zgonów wyniesie blisko 850 tysięcy [1].

Pomimo intensywnego rozwoju w dziedzinie farmakologii chorób nowotworowych, leczenie raka sutka – szczególnie potrójnie ujemnego – jest nadal mało satysfakcjonujące. Brak możliwości zastosowania terapii celowanej w przypadku raków nie wykazujących ekspresji receptorów estrogenowych, progesteronowych

oraz nadekspresji receptorów HER-2 wymusza poszukiwania nowych, terapeutycznych celów.

Analiza mikrośrodowiska guza wskazuje na obecność komórek TAMs klasy M2 w nacieku leukocytarnym [4]. Ich obecność związana jest ze stymulacją neoangiogenezy, promowaniem migracji, inwazyjności oraz przerzutowania. Infiltracja TAMs M2 w raku sutka jest również niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [31].

Pronowotworowa aktywność makrofagów TAMs sprawia, że naukowcy starają się wykorzystać je

Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

jako cel terapeutyczny. Wyróżnia się trzy kierunki badań celujących w te komórki: zahamowanie migracji monocytów do mikrośrodowiska guza, likwidacja makrofagów obecnych w tkance nowotworowej oraz neutralizacja czynników uwalnianych

przez TAMs M2. Niestety, tego typu terapie związane są z wieloma niepożądanymi objawami dlatego konieczne jest lepsze zrozumienie molekularnych zależności leżących u podstaw raka piersi [25].

Literatura

1. <http://globocan.iarc.fr/Pages/online.aspx>
2. http://eu.cmkp.edu.pl/css_bart/dok_eu/Rak%20piersi%20A-II.pdf
3. Laoui D., Movahedi K., Van Overmeire E., Van den Bossche J., Schoupe E., Mommer C., Nikolaou A., Morias Y., De Baerselier P., Van Ginderachter J.A. *Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions*, The International Journal of Developmental Biology, 55 (2011), s. 861-867
4. Eljaszewicz A., Gackowska L., Kubiszewska I., Jankowski M., Urbańska M., Wiese M., Helmin-Basa A., Michałkiewicz J., Zegarski W. *Aktywność makrofagów w rozwoju choroby nowotworowej*, Współczesna Onkologia, 14 (2010), s. 1-6
5. Obeid E., Nanda R., Fu Y., Olopade O.I. *The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression*, International Journal of Oncology, 43 (2013), s. 5-12
6. Nazimek K., Bryniarski K. *Aktywność biologiczna makrofagów w zdrowiu i chorobie*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 66 (2012), s. 507-520
7. Geissmann F., Jung S., Littman D.R. *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*, Immunity, 19 (2003), s. 71-82
8. Ziegler-Heitbrock L., Ancuta P., Crowe S., Dalod M., Grau V., Hart D.N., P.J., Leenen, Y. Liu, G. MacPherson, G.J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, Shortman K., Sozzani S., Strobl H., Zembala M., Austyn J.M., Lutz M.B. *Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood*, Blood, 116 (2010), s. 74-80
9. Zimmermann H. W., Trautwein Ch., Tacke F. *Functional role of monocytes and macrophages for the inflammatory response in acute liver injury*, Frontiers in Physiology, 3 (2012), s. 1-18
10. Ginhoux F., Jung S. *Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis*, Immunology, 14 (2014), s. 392-404
11. Lee H., Choi H., Ha S., Lee K., Kwon Y. *Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments*, Biochimica et Biophysica Acta, 1835 (2013), s. 170-179
12. Siveen K.S., Kuttan G. *Role of macrophages in tumor progression*, Immunology Letters, 123 (2009), s. 97-102

Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

13. S. J. Galli, N. Borregaard, T.A. Wynn Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, Mast cells and neutrophils, *Nature Immunology*, 12 (2011), s.1035-1044
14. <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Chorobik03>
15. <http://www.biologend.com/NewsLegend/022311/index.htm>
16. Lin Y., Yang X., Yue W., Xu X., Li B., Zou L., He R. *Chemerin aggravates DSS-induced colitis by suppressing M2 macrophage polarization*, *Cellular & Molecular Immunology*, 11 (2014), s. 355-366
17. Franklin R.A., Liao W., Sarkar A., Kim M.V., Bivona M.R., Liu K., Pamer E.G., Li M.O. *The Cellular and Molecular Origin of Tumor-associated Macrophages*, *Science*, 344 (2014), s. 921-925
18. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes, *Trends in Immunology*, 23 (2002), s. 549-555
19. Schmieder A., Michel J., Schonhaar K., Goerdts S., Schledzewski K. *Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages*, *Seminars in Cancer Biology* 22 (2012), s. 289-297
20. Solinas G., Germano G., Mantovani A., Allavena P. *Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation*, *Journal of Leukocyte Biology*, 86 (2009), s. 1-9
21. Świątoniowski G., Dąbrowska M., Łacko A., Mazur G., Kłaniewski T., Molenda W. *Rola makrofagów związanych z guzem nowotworowym w progresji oraz w procesach odporności przeciwnowotworowej w raku piersi*, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 13 (2004), s. 137-142
22. Zhang M., He Y., Sun X., Li Q., Wang W., Zhao A., Di W. A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients, *Journal of Ovarian Research*, 7 (2014), s. 1-16
23. Lewis C.E., Pollard J.W. *Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments*, *Cancer Research*, 66 (2006), s. 605-612
24. Taniguchi K., Karin M. Il-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer, *Seminars in Immunology*, 26 (2014), s. 54-74
25. Coffelt S.B., Hughes R., Lewis C. E. *Tumor associated macrophages: Effectors of Angiogenesis and tumor progression*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1796 (2009), s. 11-18
26. Hao N., Lu M., Fan Y., Cao Y., Zhang Z., Yang S. *Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors*, *Clinical and Developmental Immunology*, (2012), s. 1-11
27. Galdiero M.R., Bonavita E., Barajon I., Garlanda C., Mantovani A., Jallou S. *Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer*, *Immunobiology*, 218 (2013), s. 1402-1410
28. Allavena P., Sica A., Solinas G., Porta Ch., Mantovani A. *The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages*, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 66 (2008), s. 1-9
29. Allavena P., Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory

Review and Research on Cancer Treatment

Volume 1, Issue 1 (2015)

- tumour micro environment, *Clinical and Experimental Immunology*, 167 (2012), s. 195-205
30. Obeid E., Nanda R., Fu Y., Olopade O.I. *The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (Review)*, *International Journal of Oncology*, 43 (2013), s. 5-12
 31. Medrek C., Ponten F., Jirstrom K., Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients, *Cancer*, 12 (2012), s. 1-9
 32. Poczęta M., Bednarek I. *STAT3 – ukryty czynnik transkrypcyjny celem terapii przeciwnowotworowych*, *Annales Academiae Medicae Silesiensis*, 67 (2013), s. 133-141
 33. Chang Y., Nadai P., Azzaoui I., Morales O., Delhem N., Vorng H., Tomavo S., Yahia S.A., Zhang G., Wallaert B., Chenivesse C., Tscopoulos A. *The Chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4+ T cells of health but not allergic subjects* *The FASEB Journal*, 24 (2010), s. 5063-5072
 34. Chen J., Yao Y., Gong Ch., Yu F., Su S., Chen J., Liu B., Deng H., Wang F., Lin L., Yao H., Su F., Anderson K.S., Liu Q., Ewen M. E., Yao X., Song E., *CCL18 from Tumor-Associated Macrophages Promotes Breast Cancer Metastasis via PITPNM3*, *Cancer Cell*, 19 (2011), s. 541-555
 35. Li H., Cui X., Wu W., Yu F., Yao H., Liu Q., Song E., Chen J. *Pyk2 and Src Mediate Signaling to CCL18-Induced Breast Cancer Metastasis*, *Journal of Cellular Biochemistry*, 115 (2014), s. 596-603
 36. Zhang S., Huang W., Zhang L., Zhang Ch., Lowery F. J., Ding Z., Guo H., Wang H., Huang S., Sahin A.A., Aldape K.D., Steeg P.S., Yu D. *Src Family Kinases as Novel Therapeutic Targets to Treat Breast Cancer Brain Metastases*, *Cancer Research*, 73 (2013), s. 5764-5774
 37. Yeo E., Cassetta L., Qian B. *Myeloid WNT7b mediates the Angiogenic Switch and Metastasis in Breast Cancer*, *Cancer Research* 74 (2014), s. 2962-2973
 38. Starska K., Lewy-Trenda I., Woś J., Papież P., Forma E., Bryś M. *Ekspresja β -kateniny w tkanku nowotworowym raka krtani oraz znaczenie w ocenie inwazyjności zmian*, *Otarynolaryngologia* 11 (2012), s. 155-162
 39. Koziański K., Dobrzyń A. *Szlak sygnałowy Wnt i jego rola w regulacji metabolizmu komórki*, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67 (2013) s. 1098-1108