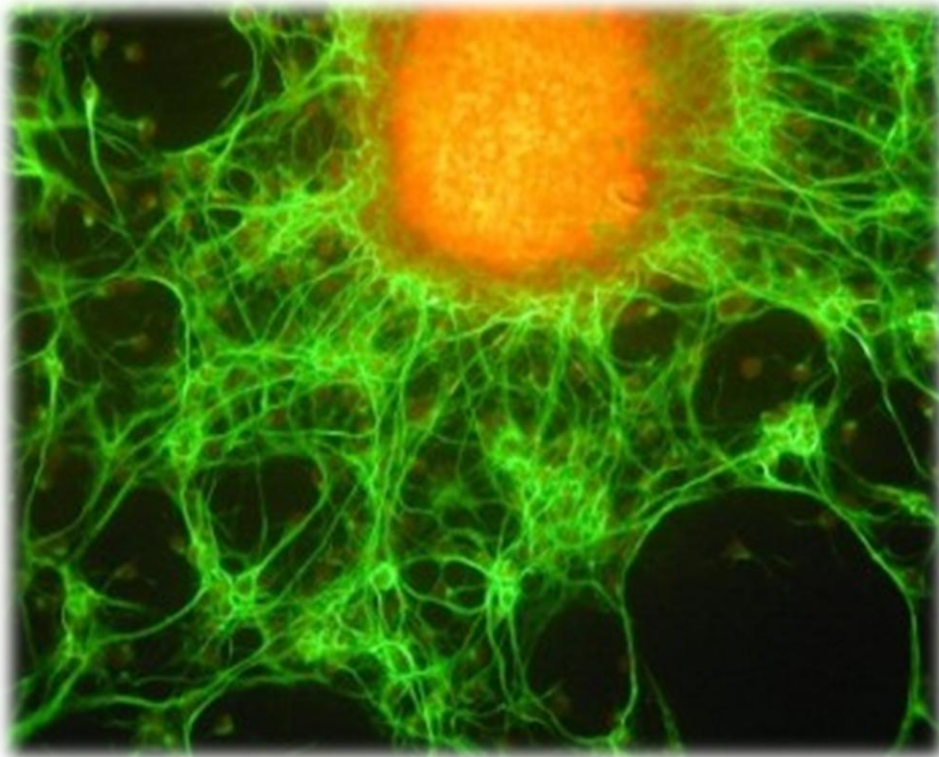


Jakten på kreftstamceller -muligheter for nye behandlingsmetoder for munnhulekreft

Prosjektoppgave for det integrerte masterstudiet i odontologi



v/Rebecca Christiansen og Hilde Tolo

Veiledere:

Anne Christine Johannesen, Gades institutt, UiB

Daniela Elena Costea, Gades Institutt, UiB

Universitetet i Bergen, 2010



Innholdsfortegnelse

Sammendrag.....	3
Abstract	4
1. Innledning	5
2. Munnhulekreft.....	7
2.1 Etiologi.....	7
2.2 Epidemiologi.....	7
2.3 Prognose.....	8
3. Stamceller.....	10
3.1 Embryonale og somatiske stamceller.....	11
3.2 Stamceller i oral mukosa.....	11
3.3 Stamcelleforskning.....	13
4. Kreftstamceller.....	15
4.1 Kreftceller	15
4.2 Genetiske forandringer og malign transformasjon.....	16
4.2.1 Mutasjoner	16
4.2.2 Aneuploiditet.....	16
4.3 Den maligne tumors heterogenitet	17
4.3.1 Stokastisk modell	17
4.3.2 Den hierarkiske modellen.	17
4.4 Kreftstamceller.....	17
4.5 Opphavet til kreftstamceller.....	19
5. Forskning på kreftstamceller.....	22
6. Kreftstamcellenes relevans	25
6.1 Dagens behandling av munnhulekreft.....	25
6.2 Kreftstamcellers resistens mot konvensjonell kreftbehandling	25
6.2.1 Resistens mot apoptose	25
6.2.2 Resistens mot stråling	25
6.2.3 Resistens mot kjemoterapi	26
6.2.4 Angiogenese og kreftstamceller	26
7. Muligheter for nye behandlingsmetoder	27
8. Diskusjon	30
9. Konklusjon.....	32
10. Hospitering på laboratoriet.....	33
Litteraturliste.....	34

Sammendrag

Munnhulekreft er en kreftform som har en overlevelse på 60-70 % etter fem år, og den blir redusert til kun 30-40 % etter fem år dersom man har spredning til lymfesystemet. Å overleve munnhulekreft er ofte assosiert med flere senplager som bidrar til redusert livskvalitet for den som blir rammet. Kreftbehandlingen man benytter i dag tar utgangspunkt i at alle kreftceller er like. Nyere forskning har vist at en andel av kreftcellene i en tumor er mer motstandsdyktige mot stråling og cellegift enn resten av kreftcellene. Disse cellene blir av noen kalt for kreftstamceller, og de er definert som kreftceller med stamcellelignende egenskaper. Stamceller er celler som har evnen til å fornye seg selv uendelig, og de kan differensieres til spesialiserte celler. Når man isolerer kreftceller med stamcellelignende egenskaper og transplanterer dem til mus, kan de gjenskape tumoren som de ble hentet ut fra. Kunnskapen om kreftstamcellene fører sannsynligvis med seg nye muligheter for utvikling av mer effektiv behandling av kreft. Det er en lang vei å gå fra å lokalisere kreftstamcellene til å utvikle nye og mer effektive behandlingsmetoder. For å lykkes i utviklingen nye behandlingsmetoder med utgangspunkt i denne kunnskapen, krever det at man lærer kreftstamcellene bedre å kjenne. Man må finne ut hva som skiller kreftstamcellene fra resten av kreftcellene, og man må vite mer om hva som skiller kreftstamcellene fra somatiske stamceller. I dag er immunhistokjemi, fluorescensaktivert cellostering og forskning på mus de viktigste forskningsmetodene som blir brukt i jakten på kreftstamceller. Det blir spennende å se hvilke konsekvenser den nye kunnskapen om kreftstamcellene får for fremtidens kreftbehandling, og ikke minst følgene det får for fremtidens kreftpasienter.

Abstract

The five year survival rate of patients diagnosed with oral cancer is no more than 60-70%. The survival rate is dramatically decreased to 30-40% if there are metastases in the regional lymph nodes. Current cancer therapy is based on the idea that all cancer cells are alike, and that they respond in a similar way to treatment. However, recent studies have shown that within the same tumour the cancer cells respond differently to treatment, and that there exists a sub-population of cancer cells being more resistant to radiation and chemotherapy than the bulk of the tumour cells. This sub-population of cancer cells has also been proven to share several properties with the somatic stem cells, and has therefore been called the 'cancer stem cell sub-population'. Stem cells are defined by their capacity to undergo self-renewal as well as to give rise to specialized cells by differentiation. By extrapolation, the term 'cancer stem cells' defines the cancer cells within a tumour that possess the capacity to self-renew and to cause the heterogeneous lineages of cancer cells that comprise the tumour. Experimentally, cancer stem cells are defined as cancer cells that are able to generate new tumours in immunodeficient animals with similar histological appearance as the tumour from which they were isolated. Thus "tumour-initiating cell" and "tumorigenic cell" are also used as alternative terms in the literature to describe putative cancer stem cells. The cancer stem cells are assumed to play an important role in the development, growth and metastasis of cancer. The fact that cancer stem cells are able to resist cancer therapy makes them an attractive potential target for developing new and improved cancer therapies. In order to develop therapies that target the cancer stem cell population, it is of crucial importance to have good knowledge on their properties and biological behaviour. Advanced research must be done to define the unique characteristics of the cancer stem cells compared to the bulk of the cancer cells on one hand and to the normal somatic stem cells on the other hand. Identification of successful ways for targeting the cancer stem cell sub-population may lead to more effective treatment strategies and consequently to improved therapeutic outcome for cancer patients.

1. Innledning

I 2008 fikk så mange som 26 121 nordmenn diagnosen kreft. Frem til 2020 er det beregnet at antall krefttilfeller vil øke med 30 prosent [1]. Hvis det ikke er tegn til spredning, er sjansen for fem års overlevelse ca. 60 % for menn og ca. 70 % for kvinner. Med spredning til lymfesystemet reduseres sjansene for overlevelse til ca. 30 % for menn og knapt 40 % for kvinner.

Det finnes i dag ingen sikker kur mot alle former for kreft. Selv om man har kartlagt risikofaktorer for utvikling av kreft, er ikke disse absolutte, og kreft blir oppfattet som en sykdom som rammer tilfeldige ofre, unge som gamle. Man kan gå med en kreftsvulst i kroppen i mange år før det blir oppdaget, noe som gjør sykdommen desto mer skremmende og ubegripelig. Kanskje nettopp det brutale ved sykdommen gjør at så mange engasjerer seg og deltar i kampen mot kreft. I 2009 hadde kreftforeningen nær 100 000 medlemmer i Norge [2].

Om kreft ikke alltid medfører død, så fører sykdommen ofte med seg senplager, frykt for spredning og reduksjon av livskvalitet. Ikke bare pasienten blir rammet av den langvarige sykdomsprosessen, men også pårørende følger den tunge kampen mot kreften. I og med at kreft rammer såpass mange, vil store deler av befolkningen ha et forhold til kreft.

Dagens kreftbehandling tar utgangspunkt i at alle celler i en kreftsvulst er like. Det er vist at enkelte kreftceller er mer motstandsdyktige mot behandling sammenlignet med de øvrige kreftcellene [3]. Dersom dette er riktig, antyder det at man har ulike kreftceller i en og samme tumor. Kreftcellene som skiller seg ut fra mengden, ved økt resistens mot dagens behandling, samt økt evne til proliferasjon og selvfornyelse, har senere fått navnet kreftstamceller av flere forskere.

Nyere forskning antyder at kreftstamcellene kan forklare hvorfor dagens kreftbehandling ikke er så effektiv som man skulle ønske. Man tror at det er disse cellene som gjør tumorvekst og proliferasjon av kreftceller mulig. Håpet er at vi gjennom økt kunnskap om den maligne tumors heterogenitet kan finne behandlingsformer som kurerer alle krefttyper. Man håper at det å kunne angripe kreftstamcellene, hindrer kreftsvulsten sitt potensial til å spre seg og å danne nye svulster. Å utvikle en slik behandlingsform krever at man finner ut hva som karakteriserer kreftstamcellene, og hva som skiller dem fra resten av kreftcellene.

I denne oppgaven ønsker vi å presentere begrepet kreftstamceller, deres mulige rolle i utvikling og opprettholdelse av kreft. Vi ønsker å rette fokus mot munnhulekreft, og gir en presentasjon av denne sykdommen, hvor vi tar for oss etiologi, epidemiologi og prognose. Videre vil vi gå inn på

kreftstamcellenes mulige opprinnelse, og vi ønsker å gi et innblikk i forskningen som gjøres på kreftstamceller i munnhulen, samt ved andre kreftformer. Til slutt ser vi nærmere på hvilke muligheter den nye kunnskapen om kreftstamceller gir med hensyn til utvikling av nye behandlingsmetoder mot kreft.

For å gi en bredere forståelse av kreftstamcellene, ha vi også valgt å forklare begrepene stamceller og kreftceller.

2. Munnhulekreft

Munnhulekreft er plateepitelkarsinom i munnhulen som omfatter leppens innside, tunge, bukkal mukosa (Figur 1) [4], gingiva (Figur 2) [5], overgangsfold, munngulv og gane. Et plateepitelkarsinom er en ondartet svulst utviklet fra plateepitelceller i hud eller slimhinner (leppe, munnhule, spiserør, skjede og livmorhals).



Figur 1: Klinisk bilde som viser plateepitelkarsinom i oral mukosa. *Kilde:* img.medscape.com/pi/emed/ckb/otolaryngology/



Figur 2: Klinisk bilde som viser plateepitelkarsinom i gingiva *Kilde:* www.whocollab.od.mah.se/images/carcinoma1.gif

2.1 Etiologi

De viktigste etiologiske faktorene for utvikling av munnhulekreft er alkohol, tobakk og soleksponering (UV-stråling). I ikke-vestlige kulturer ser man også at såkalt tyggetobakk bidrar til utvikling av munnhulekreft. Studier viser at alkohol og tobakk er potenserende risikofaktorer, noe som innebærer at de forsterker hverandres karsinogene evne. At alkohol og tobakk er risikofaktorer knyttet til livsstil har ført til at munnhulekreft blir kalt en livsstilssykdom. 75-90 % av tilfellene av munnhulekreft kan assosieres med alkohol og tobakk.

2.2 Epidemiologi

Gjennomsnittsalderen for pasienter med nyoppdaget munnhulekreft er 64 år. De fleste studier indikerer at kun 4-6 % av krefttilfellene i munnhulen oppstår hos pasienter som er yngre enn 40 år [6]. Sykdommen rammer oftere menn enn kvinner.

Tabellen nedenfor viser antall nye tilfeller av munnhulekreft i Norge i 2008, fordelt på primær lokalisasjon og kjønn [7].

	Menn	Kvinner	Totalt
Munn	159	126	285
- Leppe	54	50	104
- Tunge	62	32	94
- Andre deler av munn	43	44	87

Data hentet fra register 2009-11-27 16:30:43

Data fremkommet 2009-12-22 09:31:46

Data nedlastet 2010-01-06 18:59:25

Kilde: Kreftregisteret i Norge

En viss prosentandel av tilfellene av munnhulekreft som her presenteres, kan være andre kreftformer som manifesteres i munnhulen som følge av tumorvekst og/eller metastase.

2.3 Prognose

Til tross for nye og avanserte behandlingsmetoder, har prognosen ved oralt plateepitelkarsinom ikke blitt bedre i løpet av de fire siste tiår. Prognosen for pasienter med munnhulekreft er svært avhengig av lokaliseringen og utbredelsen av primærsvulsten, og som tidligere nevnt om det foreligger spredning til lymfesystemet. Den høyeste overlevelsesraten finner man ved leppekreft, og den laveste overlevelsesraten har man ved tungekraft og kreft i gingiva.

Overlevelsesraten ved munnhulekreft er også sterkt assosiert med tidlig diagnostisering. Det er derfor svært viktig at undersøkelse av slimhinner, særlig tunge og munngulv, blir en naturlig del av rutineundersøkelsen av tannhelsen, og at alt tannhelsepersonell bevisst har fokus på problemstillingen, spesielt ved risikopasienter.

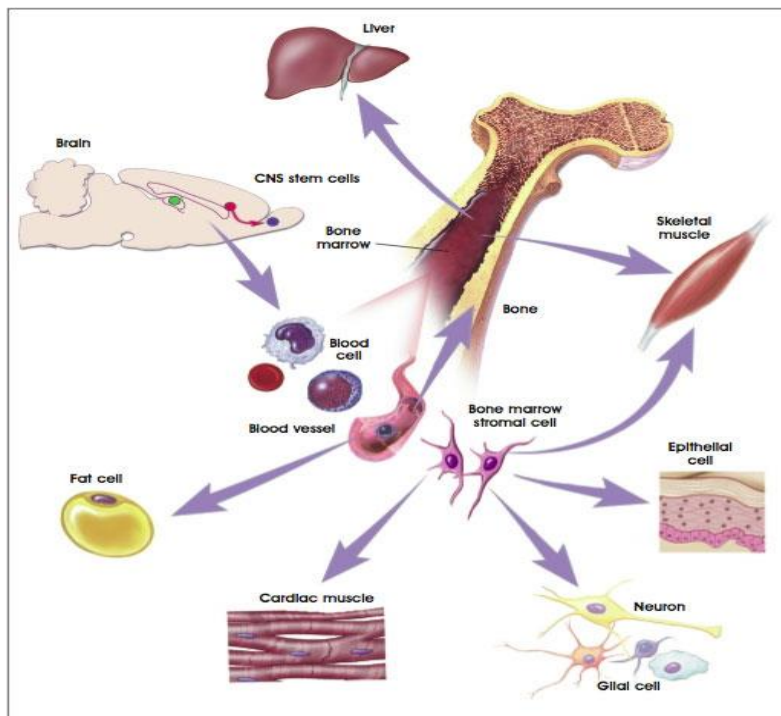
Kreft i munnhulen begynner ofte som kroniske sår med vollformet avgrensning, sykdomsutviklingen er vanligvis symptomfri. Fra munnhulen er det liten avstand til lymfesystemet, og dette medfører at en ofte ser tidlig spredning av munnhulekreft. Spredning kan oppdages klinisk

som faste palpable lymfeknuter, som vanligvis ikke er ømme. En lesjon som har økt potensial for å utvikles til kreft i munnhulen, kalles epitelial precancer. WHO deler precancer inn i prekankrøse lesjoner og prekankrøse lidelser. En prekankrøs lesjon er definert som morfologisk forandret vev, hvor kreft har større sannsynlighet for å oppstå sammenlignet med omliggende tilsynelatende friskt vev. Eksempler på prekankrøse lesjoner er leukoplaki og erytroplaki. En prekankrøs lidelse er definert som en generell tilstand assosiert med en signifikant økt risiko for kreftutvikling. Eksempler her vil være lichen planus, lupus erythematosus og epidermolysis bullosa.

3. Stamceller

I 1908 ble uttrykket «stamceller» foreslått for vitenskapelig bruk av den russiske forskeren Aleksander Maksimov.

En stamcelle er en celle som har potensial til å regenerere vev gjennom et helt menneskeliv. Stamceller er karakterisert ved at de kan fornye seg selv uendelig ved mitotisk celledeling, og ved at de kan differensieres til spesialiserte celletyper (Figur 3) [8]. Det er stamceller som sørger for fornying av vev i kroppen. Stamcellene reparerer og erstatter ødelagt vev.



Figur 3: Stamceller i beinmarg kan gi opphav til flere ulike spesialiserte celler.

Kilde: <http://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter4.asp>

Når en stamcelle blir stimulert av sitt miljø til celledeling, vil det utløse symmetrisk eller asymmetrisk celledeling. Ved symmetrisk celledeling, vil stamcellen gi opphav til to like celler, enten to nye stamceller, eller to vevsspesifikke differensierte celler. Ved asymmetrisk celledeling gir stamcellen opphav til en ny stamcelle og en progenitorcelle. Progenitorcellen, også kalt *transit amplifying cell*, initierer generering av vevsspesifikke celler. Progenitorcellen gjennomgår et begrenset antall mitoser og ender til slutt opp som en differensiert celle. Levetiden for en progenitorcelle strekker seg ikke lenger enn fra noen få dager til uker. Forskerne vet enda ikke hvorfor, men på et eller annet tidspunkt begynner stamceller å endre utvikling, og kan i prinsippet

bli til en hvilken som helst del av kroppen, disse kalles da differensierte celler. Differensierte celler kan for eksempel være nerveceller, leverceller, muskelceller og beinmarg.

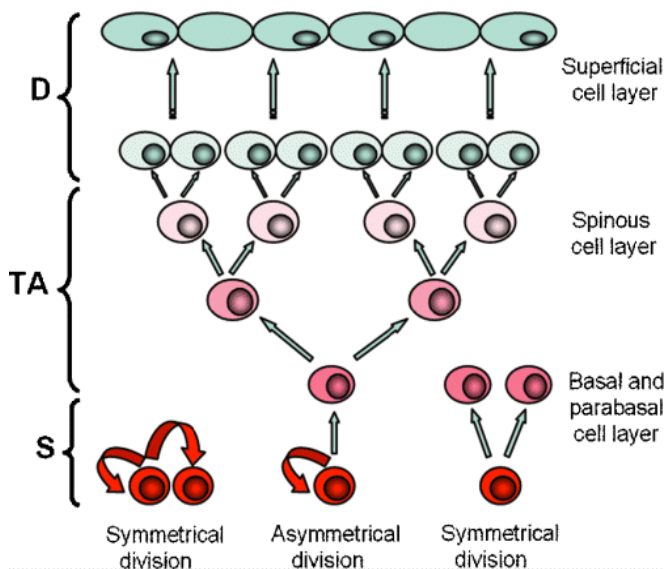
3.1 Embryonale og somatiske stamceller

Det skilles mellom embryonale og somatiske stamceller. Embryonale stamceller finnes i embryoet på et tidlig stadium i befruktede egg, som kalles blastocyststadiet. Disse stamcellene er pluripotente, det vil si at de kan gi opphav til nesten alle celletyper i kroppen. Det finnes noen få somatiske stamceller på fosterstadiet, for eksempel i blodet i navlestrengen. Disse er pluripotente på samme måte som de embryonale. De aller fleste somatiske stamceller finner vi i utviklede organismer, barn som voksne. De somatiske stamcellene er multipotente, det vil si at de kan differensieres til spesialiserte celletyper, begrenset til opprettholdelse av vevet de befinner seg i. En av de viktigste funksjonene til somatiske stamceller, er at de opprettholder konstant funksjonell vevsmasse, homeostase. Homeostase er opprettholdelse av balansen mellom celledød og cellefornyelse i et vev. De somatiske stamcellene er gitt navn etter hvilket vev de opprettholder, for eksempel: Endotele stamceller, mesenchymale stamceller, osv.

3.2 Stamceller i oral mukosa

Oral mukosa er et sammensatt vev med komponenter av både epitel og bindevev. Overflaten i oral mukosa består av et flerlaget plateepitel. Dette plateepitelet blir stadig fornyet ved kontinuerlig proliferasjon av celler i dypere cellelag, og disse beveger seg oppover mot overflaten. Det er flere bevis som indikerer at fornyelse og reparasjon av epitel avhenger av en subpopulasjon av basalceller, kjent som stamceller [9,10,11,12]. Basalcellelaget i oral mukosa ser ut til å bestå av tre ulike celletyper (Figur 4) [13]:

1. Stamceller - de eneste cellene i basalcellelaget med ubegrenset evne til å fornye seg selv.
2. Progenitorceller - Celler produsert av stamceller som prolifere før de gjennomgår differensiering.
3. Postmitotiske differensierte celler som forbereder seg på å emigrere fra basalcellelaget mot overflaten av epitelet [14].

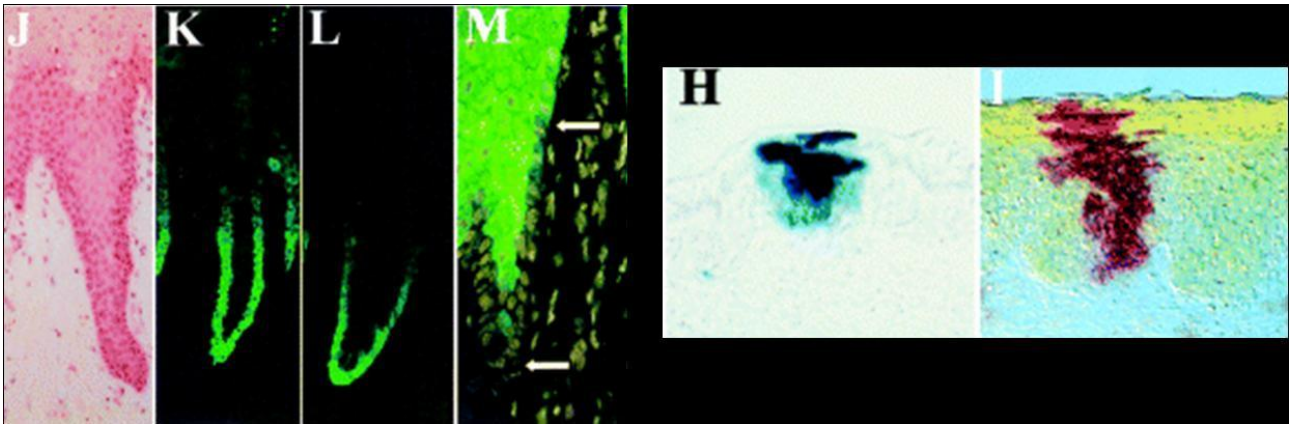


Figur 4. Det hierarkiske stamcellemønsteret i human oral mukosa. Symmetrisk og asymmetrisk celledeling. Stamceller (S, røde celler) med lav proliferasjonsevne, men stor selvfornyelskapasitet. Disse cellene produserer en ny stamcelle og en mer differensiert celle, ved asymmetrisk celledeling. De differensierte cellene (TA) har en høyere proliferasjonsrate, men en lav eller ingen selvfornyelskapasitet. Disse cellene deler seg og differensieres til spesialiserte celler som opprettholder vevet (D). (DE Costea et al, 2006)

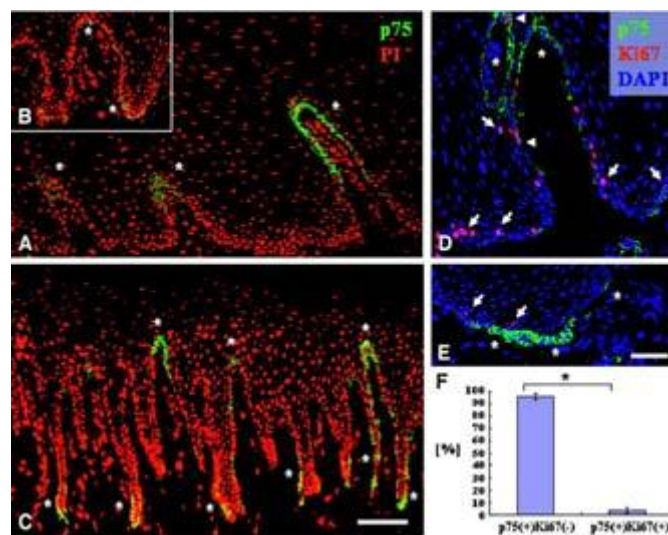
Det har vist seg generelt å være vanskelig å påvise lokalisasjon av stamceller i menneskekroppen. Ved identifisering av stamceller, brukes monoklonale markører. Dette er markører som binder seg til spesifikke protein på celleoverflaten. Man har hatt vanskeligheter med å identifisere spesifikke stamcellemarkører, det vil si å identifisere protein som utelukkende er uttrykt på stamcelleoverflaten.

Forskningen som er gjort på stamcellemønster i oral mukosa er hovedsaklig funnet ut via arbeid fra andre epitel, vanligvis epidermis, men også ved direkte undersøkelse av oralt vev. Det er påvist at stamceller eksisterer i human epidermis, og man har også klart å bevise deres lokalisasjon i dette vevet. Forskning viser at man finner stamcellepopulasjoner i utposinger og i basalmembranen i hårfollikkelen. Man vet mindre om hvordan disse fordeler seg i basalmembranen, om de er arrangert i grupper, eller om de er spredt enkeltvis [15].

Tilstedeværelse av stamceller i tungepapiller ble påvist allerede i 1986. Tungepapillen er en kompleks struktur, og den har tre distinkte regioner med differensiering. Det ble foreslått at hver av disse regionene blir fornyet av stamceller [16]. Stamcellers lokalisasjon i oralt epitel har blitt forsøkt påvist ved hjelp av de spesifikke stamcellemarkørene CK19 (Figur 5) [17] og CK15 (cytokeratin). Studier ved hjelp av disse stamcellemarkørene indikerer at sannsynlig lokalisasjon for stamcellene i keratinisert epitel i ganen vil være nederste del av epiteliale retelister [18]. Andre forskere har, ved hjelp av markøren p75, påvist stamceller i øvre deler av de epiteliale retelistene (Figur 6) [19].



Figur 5: Stamceller i oral mukosa markert med stamcellemarkøren CK19 lokalisert til nederste del av de epitelial retelistene.



Figur 6: Stamceller i oral mukosa markert med stamcellemarkøren p75 lokalisert til den øverste delen av de epiteliale retelistene.

3.3 Stamcelleforskning

Flere forskere mener at embryonale stamceller har et stort potensial for behandling av en rekke sykdommer, blant annet diabetes.

Det finnes i dag studier som viser at munnslimhinne, under bestemte forhold, kan utvikles fra embryonale stamceller [20,21].

De somatiske stamcellene har ikke de samme mulighetene for utvikling av ulike celletyper som de embryonale stamcellene. I tillegg er andelen somatiske stamceller i modent vev mindre enn andelen embryonale stamceller i embryonalt vev. Dette gjør at embryonale stamceller er mer tilgjengelige og aktuelle for bruk i forskning.

I Norge er det i dag forbudt, ved den norske bioteknologiloven, å forske på embryonale stamceller som hentes fra befruktete egg (embryo). Dette forbudet har vært omdiskutert, og enkelte mener det legger store begrensninger på stamcelleforskningen. Det er hovedsakelig forskning på embryonale stamceller som gir grunnlag for etisk debatt. Forskning på humane embryonale stamceller krever at man ødelegger et embryo, som jo er et foster i en tidlig utviklingsfase. Motstandere av forskning på humane embryonale stamceller frykter at det å tillate slik forskning vil være første skritt mot reproduktiv kloning, noe som vil være med på senke verdien av et menneskeliv. Noen mener at et humant embryo *er* et menneskeliv med verdi og rett til beskyttelse.

4. Kreftstamceller

4.1 Kreftceller

Kreftceller kan skilles fra normale somatiske celler ved at de unnslipper normale vekstregulerende mekanismer og ved at de kan invadere og kolonisere områder som normalt er reservert for andre celler [22]. Som eksempel på normale vekstregulerende mekanismer kan man nevne apoptose, ekstracellulære signal som regulerer proliferasjon, intracellulære signal og mekanismer som regulerer og stopper celledeling og DNA-reparasjon. En malign celle lar seg altså ikke styre av disse mekanismene, og man kan si at den er utenfor kroppens kontroll. En slik ”unormal” celle, som vokser og prolifererer ukontrollert, gir opphav til en tumor, også kalt en neoplasme. Så lenge cellene i neoplasmen ikke har invasiv evne, vil tumoren karakteriseres som benign, godartet. At en kreftcelle er invasiv vil si at den har evne til å bryte ut av tumoren for så å forflytte seg, via blodbanen eller lymfen, til andre deler av kroppen hvor den kan kolonisere og danne sekundære tumorer. Dette kaller vi metastase. En tumor blir karakterisert som ondartet eller kreft når cellene i tumoren er maligne, og har invadert omkringliggende vev. I tillegg til kreftcellene vil en malign tumor også inneholde andre celletyper, som fibroblaster og inflammatoriske celler og blodkar.

En viktig egenskap hos de fleste kreftceller er at de kan unngå apoptose. Apoptose er en viktig cellefunksjon for regulering av homeostasen i vevet. At kreftcellene unngår apoptose er med på å fremme tumorvekst.

Kreftceller innehar vanligvis mutasjoner og epigenetiske forandringer som inaktiverer spontan DNA-reparasjon. Dette gjør at de kan proliferere til tross for DNA-skade. Dette kan føre til enda hyppigere akkumulering av mutasjoner, og gir et enda større malignt potensiale. Mange av de normale humane cellene har en innebygd begrensning for hvor mange ganger de kan dele seg. Antall celledelinger er begrenset av telomerer som sitter i enden på kromosomet og blir kortere for hver celledeling. Avlesing, replikasjon, av DNA-sekvensen som koder for telomerer, er avhengig av enzymet telomerase. Telomerase fremmer også beskyttelse av kromosomendene. Det er mangelen på telomerase som gjør at telomerene blir kortere for hver celledeling, dette finner vi i friske somatiske celler. Man tenker seg at kreftcellene har telomeraseaktivitet, og at de med dette har lengre levetid og kan dele seg mer enn friske celler [23].

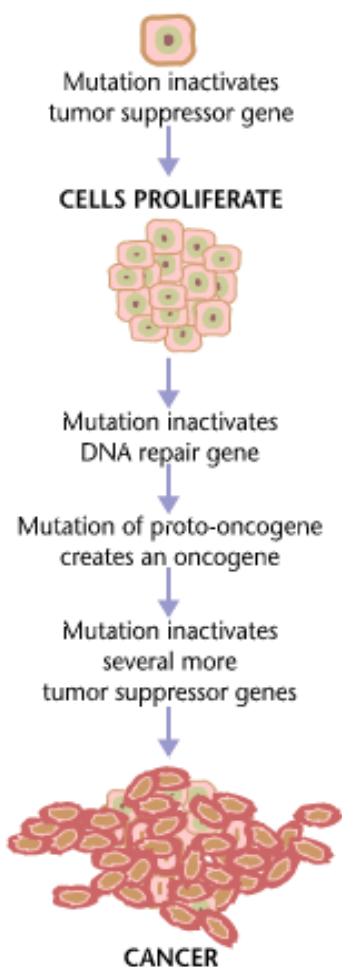
4.2 Genetiske forandringer og malign transformasjon

Man vet at kreft oppstår ved at celler gjennomgår malign transformasjon (Figur 7) [24]. Den maligne transformasjonen skjer som resultat av genetiske forandringer, som multiple mutasjoner og/eller aneuploiditet. Mutasjoner er forandringer i cellens DNA, mens aneuploiditet er definert som endring, tap og/eller rearrangering av kromosomene i en celle.

4.2.1 Mutasjoner

Forskning har vist at kreftutvikling, hos mennesker, er avhengig av minst 3-6 somatiske mutasjoner [25,26]. Cellene i kroppen gjennomgår stadig mutasjoner uten at det får store følger. Det som gir potensial for malignitet er når en mutasjon øker cellens evne til å overleve sammenlignet med de andre cellene i nisjen, og således fører til klonal ekspansjon av denne celltypen.

Protoonkogener er gener som fremmer cellevekst og mitoser, mens tumorsuppressorer (f. eks TP53) forhindrer cellevekst og regulerer apoptose. Mutert TP53 er en av de vanligste muterte gener i kreft [27]. Mutasjoner av protoonkogener kan gjøre dem til onkogener. Et onkogen er et gen, som mutert eller uttrykt i et stort antall, kan være med på å omdanne en normal celle til en kreftcelle. Aktivering av onkogen kan føre til at unormale celler overlever og prolifererer fremfor å gå i apoptose, programmert celledød. Det skal oftest flere steg til, som mutasjoner i andre gen og forandringer i miljøet (f. eks virusinfeksjoner), for at kreft skal kunne oppstå.



Figur 7: Malign transformasjon. Kilde: <http://en.wikipedia.org/wiki/Carcinogenesis>

4.2.2 Aneuploiditet

I tillegg til spesifikke genmutasjoner, kan kreft også oppstå som et resultat av endring, tap eller rearrangering av kromosomer. Dette kalles aneuploiditet. Dette ble foreslått allerede i 1890 av Hansemann D. Ueber [28] og ble beskrevet i detalj i 1914 av Boveri [29]. Flere oppfatter aneuploiditet mer som et sent stadium i kreftutviklingen, enn en direkte årsak til kreft. Dette er ikke

nødvendigvis tilfellet, ettersom normale celler som er eksponert for kjemiske karsinogener, kan bli aneuploide lenge før de viser seg å være karsinogene [30,31].

Man kan altså si at både mutasjoner og kromosomal rearrangering er viktig i det initiale stadiet av opprinnelse til tumor, og at begge mekanismene kan være involvert i dannelsen av kreftstamceller.

4.3 Den maligne tumors heterogenitet

Flere modeller har blitt foreslått for å forklare tumorens heterogenitet og tumorens evne til metastase; den stokastiske modellen og den hierarkiske modellen er to av disse.

4.3.1 Stokastisk modell

Med utgangspunkt i den stokastiske modellen har alle kreftceller med samme genetiske utgangspunkt som gir lik evne til proliferasjon, selvfornyelse og tumordannelse, og vil reagere likt på ytre påvirkning. Alle kreftcellene har her likt potensial for genetiske forandringer og metastase. Man tenker seg at kun en distinkt populasjon av kreftcellene (klon) gjennomgår et ekstra antall mutasjoner som gir denne gruppen mer aggressiv egenskaper og økt evne til metastase. Ved den stokastiske modellen er tumorens heterogenitet genetisk basert.

4.3.2 Den hierarkiske modellen.

Den hierarkiske modellen går ut på at primære tumorer og metastaserende kreft blir initiert av sjeldne kreftstamceller. Kreftcellene i tumoren har ulik proliferasjonsevne, ulik tumorinitierende evne og ulik evne til selvfornyelse, dette til tross for at de bærer de samme genetiske forandringene som de andre kreftcellene. Ved den hierarkiske modell er tumorens heterogenitet basert på kreftcellenes ulike funksjoner.

For over 40 år siden ble det postulert at vevsspesifikke stamceller kan være den cellulære opprinnelsen til kreft [32]. Det er en stadig økende mengde bevis som indikerer at de cellulære og molekylære hendelsene som fører til tumordannelse er styrt av celler som ligner kreftstamcellene [33, 34, 35, 36, 37, 38].

4.4 Kreftstamceller

Kreftstamceller er omtalt med ulike begreper i litteraturen; *tumorinitierende celler*, *stemloider* og *tumor propagating cells*. Begrepet kreftstamceller kan defineres som kreftceller med stamcellelignende egenskaper. Kreftstamcellene har evne til å gjennomgå både symmetrisk- og asymmetrisk celledeling. Symmetrisk celledeling har vi når kreftstamcellen fornyer seg selv. Ved asymmetrisk celledeling tenker man seg at kreftstamcellene gir opphav til en ny malign stamcelle,

og en celle som kan differensieres for opprettholdelse av tumorvevet. Man tenker seg at kreftstamcellene er tumorigene, det vil si at kreftstamcellene har tumordannende evne, og at de kan rekonstruere tumoren de er en del av. Det er vist at plateepitelkarsinom i hode- og halsregionen inneholder en distinkt populasjon av kreftceller, med evne til å produsere tumorer i mus og å reprodusere den originale tumors heterogenitet/cellesammensetning [39]. Ved undersøkelse av cellekulturer, er det påvist at cellelinjer (mange celler dyrket ut av samme celle) fra plateepitelkarsinom i hode – og halsområdet inneholder en liten subpopulasjon av celler med klonogene karakteristika [40]. At en celle er klonogen vil si at den ved dyrkning kan proliferes og danne en klon på minst 50 celler. Denne klonogeniteten indikerer at disse kreftcellene har et stort vekstpotensial.

Kreftstamcellene utgjør kun en liten andel av tumoren, og de er ofte referert til som en subpopulasjon av celler i en tumor. Det er stadig mer bevis som tyder på at vekst og spredning av kreft blir drevet av kreftstamceller.

Kreftstamcellene uttrykker et distinkt repertoar av overflateprotein, og dette har gjort det mulig å identifisere dem i en rekke ulike maligne tumorer:

- I blod [41].
- I hjernen [35].
- I bryst [42].
- I colon [43].
- I ovariet [44].
- I pancreas[45].
- I prostata [46].

De overordnede biologiske prinsippene er felles for somatiske stamceller og kreftstamceller. Dette gjør det mulig å anvende kunnskapen man har om somatiske stamceller i forskningen på kreftstamceller og deres rolle i tumordannelse, tumorvekst og metastaser.

Likheter mellom somatiske stamceller og kreftstamceller [47]:

1. De har evne til asymmetrisk celledeling som gir opphav til en ny stamcelle og en progenitorcelle som er utgangspunktet for differensierte celler.
2. De har lignende signalveier for regulering av selvfornyelse.
3. De uttrykker lignende faktorer som fremmer pluripotensitet og udødelighet.
4. De har evne til å skape et hierarki av celler som inkluderer progenitorceller og differensierte celler.
5. De har forlengede telomerer og økt telomeraseaktivitet som gir dem en forlenget levetid.
6. De uttrykker spesielle transportmolekyler, som bidrar til økt motstand mot spesifikk vekstkontroll.
7. De kan sekretere vekstfaktorer og cytokiner som gir mulighet for uavhengig vekstkontroll.
8. De kan begge fremme angiogenese
9. De uttrykker lignende protein på celleoverflaten.

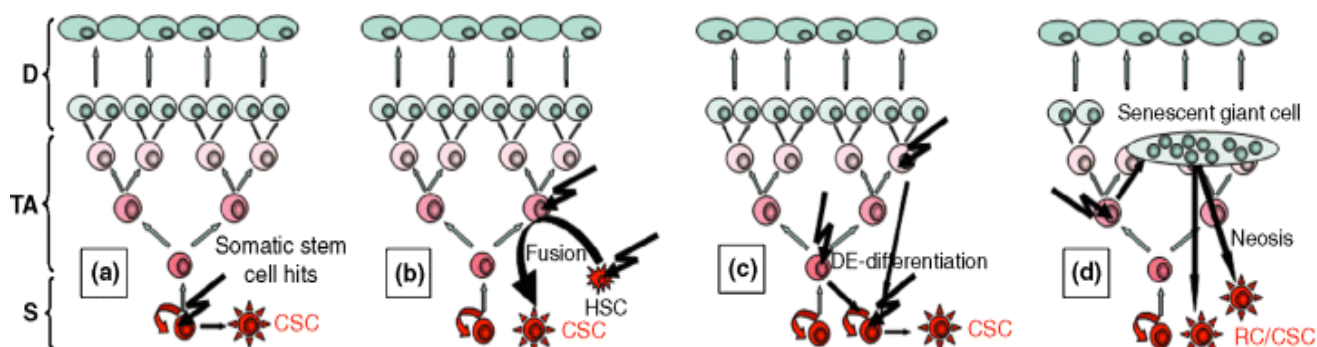
Det som skiller kreftstamcellene fra somatiske stamceller er at selvfornyelse er en velregulert prosess hos normale stamceller, mens den er ute av kontroll hos kreftstamcellene. Både somatiske stamceller og kreftstamceller har evne til å danne vev, men i motsetning til de somatiske stamcellene danner kreftstamcellene uorganiserte vev med et uorganisert differensieringsmønster [48].

4.5 Opphavet til kreftstamceller

Opphavet til kreftstamcellene, og hvordan de blir utviklet er fremdeles et mysterium. Man har ulike teorier om deres opprinnelse (Figur 8) [13]:

1. At de er utviklet fra somatiske stamceller.
2. At de er utviklet fra stamceller i benmarg

3. At de er utviklet fra somatiske celler som har gjennomgått dedifferensiering.
4. At de er utviklet fra kjempeceller, ved neose.



Figur 8: Hypotesen om opphavet til kreftstamcellene i oralt plateepitelkarsinom. (a) Multiple genetiske forandringer i normale epiteliale stamceller. (b) Fusjon mellom en stamcelle i blodet og en mutert oral keratinocyt, eventuelt mellom en mutert stamcelle i blodet og en keratinocyt. (c) Dedifferensiering. (d) Neose.

1. Opprinnelse fra normale somatiske stamceller?

En teori for kreftstamcellenes opprinnelse går ut på at kreftstamcellene er en forandrede somatiske stamceller. Denne teorien støttes av at stamcellene er de cellene i kroppen med lengst levetid, og dermed har størst sannsynlighet for akkumulering av multiple mutasjoner.

2. Fra stamceller i benmarg?

En annen foreslått mekanisme for opprinnelsen til kreftstamceller er at de oppstår ved at somatiske stamceller fusjonerer med preeksisterende differensierte celler. Både in vitro og in vivo studier har vist at stamceller fra benmarg kan fusjonere med flere ulike celletyper, deriblant epitelceller [49]. Man har ikke funnet direkte bevis for en slik fusjonsprosess i plateepitelkarsinom. Teorien kan imidlertid muligens forklare plateepitelkarsinomets invasive mekanismer. Celfusjon mellom en stamcelle fra benmarg, og en mutert oral keratinocyt kan muligens gi en celle med genetisk ustabilitet, aneuploiditet (kromosomabnormalitet), endret genom og stamcelleegenskaper, en kreftstamcelle [13].

3. Ved dedifferensiering av modne celler?

Både in vitro og in vivo eksperiment indikerer at mutasjoner i keratinocytter kan gi evne til selvfornyelse og dedifferensiering [50, 51].

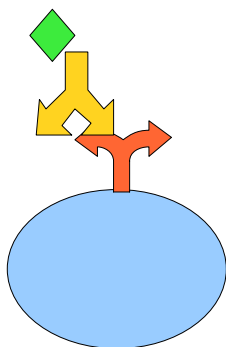
4. Fra kjempeceller?

I følge in vitro observasjoner kan DNA ødeleggelse føre til dannelse av kjempeceller som muligens kan unngå apoptose, dele seg og gi opphav til stamcellelignende celler. Dette kan være en mulig opprinnelse til kreftstamceller [52, 53]. Denne prosessen kalles neose.

5. Forskning på kreftstamceller

Jakten på behandlinger rettet spesifikt mot kreftstamcellene vil bli enklere dersom man greier å identifisere ulikheter i genuttrykk, både mellom normale celler og kreftceller, og innenfor den heterogene populasjonen av kreftceller [54]. Forskning på kreftstamceller er utfordrende. Dette kommer delvis av at kreftstamcellene utgjør kun en liten del av tumoren, og dessuten av at de forandres og utvikles veldig raskt til andre typer celler. Det er mange ulike forskningsmetoder som blir brukt i jakten på kreftstamcellene. Viktige forskningsmetoder i jakten på kreftstamceller er bruk av spesifikke markører for merking av kreftstamcellene før man visualiserer dem ved hjelp av immunhistokjemi eller fluorescensaktivert celledatering. Man tester også ulike cellepopulasjoners tumorigenitet i immunsupprimerte dyr.

Immunhistokjemi blir brukt for å identifisere og visualisere kreftstamcellene. Immunhistokjemi er en metode som blir brukt for å lokalisere antigen (protein) på celleoverflaten. Denne metoden tar utgangspunkt i at antistoff binder spesifikt til antigen i biologiske vev. Visualisering av en antigen-antistoff interaksjon kan oppnås på ulike måter. Vanligvis kobles antistoffet sammen med et enzym, for eksempel peroksidase, som katalyserer en fargeproduserende reaksjon.



Figur 7: Skisse av antistoff-antigen reaksjon. Celle (blå) uttrykker antigen (rød) på celleoverflaten.

Antigenet binder til antistoff(gul) som er markert med fargeproduserende katalysator (grønn)

Det har vist seg vanskelig å finne proteinmarkører som utelukkende markerer kreftstamcellene. Overflateprotein, som CD24, CD44, CD 133, og integriner har blitt brukt som markører for kreftstamceller. En kombinasjon av flere overflateprotein har blitt brukt som en kompleks kreftstamcellesignatur. Et eksempel på dette er kreftstamceller i bryst som har blitt identifisert basert på signaturen «CD44 positiv og CD24 negativ/lav» [42].

Fluorescensaktivert celledatering er en metode som blir brukt for å isolere kreftstamcellene. Dette går ut på at celler fra et medium blir markert ved hjelp av en proteinmarkør, for eksempel CD44. Cellene som uttrykker proteinet CD44 på overflaten fester til seg CD44 antistoff som er merket med

et fluorescent molekyl. Når laserstråler treffer disse cellene, vil de sende ut lys. Man kan så grafisk skille cellene i mediet fra hverandre basert på hvor mye lys de sender ut. De som lyser sterkt uttrykker mye CD44 og kalles CD44 positive og de som lyser lite uttrykker lite CD44 og kalles CD44 negative. Man kan deretter gi de CD44 positive cellene en positiv ladning slik at de tiltrekkes en negativ pol i maskinen, FACS sorteren, og på denne måten kan man skille CD44 positive celler fra CD44 negative celler. Deretter kan man dyrke cellene i kulturer, og undersøke hva som videre skiller cellene.

Allerede sent på 1800-tallet, foreslo forskere at ikke alle, men en andel av kreftcellene, som har stamcellelignende egenskaper, kunne være kilden til tumorer [55, 56, 57]. Det første bevis på kreftstamcellers eksistens ble presentert i 1986. Det viste seg at kun en liten andel av kreftcellene, i leukemi, var klonogene [58].

Dyreforsøk er også en aktuell forskningsmetode for forskning på kreftstamceller. Dette er spesielt aktuelt ved testing av ulike kreftcellers tumorigene egenskaper. Man transplanterer da kreftceller fra menneske til immunsupprimerte mus, og undersøker om man får utviklet tumor i mus etter 4-5mnd.

I 1997 viste John Dick et al. at en liten gruppe kreftceller kunne overføre leukemi til mus. Musene som ble brukt i dette forsøket, hadde en spesiell form for diabetes, og de hadde svært dårlig immunforsvar på grunn av umodne lymfocytter (*nonobese diabetic/severe immunodeficient NOD/SCID*). Felles for kreftcellene som hadde evne til å danne tumor in vivo, var at de kunne selekteres ved at de var CD34 positive og CD38 negative, og dermed hadde en spesiell fenotype. Kreftcellene uten denne fenotypen viste seg å ikke kunne utvikle tumor. Leukemien som ble indusert i musene gjenspeilte den histologiske fenotypen i den originale tumoren [41].

CD44 er en markør for den tumorinitierende subpopulasjonen i bryst- og munnhulekreft. I brystkreft ble det vist, i 2003, at kun en liten cellepopulasjon som uttrykker CD44 og har liten eller ingen forekomst av CD24, hadde evnen til å danne nye tumorer i immunsupprimerte mus. Disse tumorinitierende cellene viste seg å ha evnen til å gjenskape den opprinnelige heterogeniteten i tumor [42].

I 2007 utviklet Prince et. al en immunsupprimert musemodell for å teste det tumorigene potensialet for ulike populasjoner av kreftceller fra plateepitelkarsinom i hode- og halsområdet. De klarte å vise at en liten populasjon av CD44 positive kreftceller, som utgjør <10 % av kreftcellen i hode- og halskreft, kan gi opphav til en tumor in vivo. Ved immunhistokjemi viste de at tumorene som ble

dannet av disse cellene representerte den originale tumors heterogenitet [39].

I 2008, publiserte Quintana E et al. resultat fra et forskningsprosjekt der de hadde utviklet kreft i mus, ved å injisere humane kreftceller i immunsupprimerte mus. I dette forsøket ble det brukt celler fra subkutan melanom fra syv pasienter. Åtte uker etter injeksjon ble det funnet palpable tumorer i fire av syv mus. Man sammenlignet også veksten av melanom i NOD/SCID mus i forhold til NOD/SCID-IL2Ry mus for å se om flere tumorigene celler ble funnet i mer immunsupprimerte mus. Det viste seg at tumorer vokste fortere i NOD/SCID-IL2Ry mus, altså i de musene som var sterkest immunsupprimerte [59].

Nyere studier antyder at ALDH (aldehyd dehydrogenase) aktivitet kan være en bedre markør for kreftstamceller enn CD44 i tumorer i hode- og halsområdet. Kreftceller med høy ALDH aktivitet, som utgjør rundt 1-7,8 % av tumoren, har vist seg å ha tumorigen evne [60].

6. Krefstamcellenes relevans

6.1 Dagens behandling av munnhulekreft

De fleste behandlingsstrategier mot kreft er i dag basert på det klassiske synet at tumoren blir generert av en cellepopulasjon som har like proliferative egenskaper [61].

Tradisjonell kreftbehandling består av strålebehandling, kjemoterapi og evt. kirurgisk fjerning av kreftsvulsten. Strålebehandling er kreftbehandling ved hjelp av ioniserende stråling. Ved strålebehandling påvirkes cellenes evne til å dele seg. Kjemoterapi, cellegift eller cytostatika, som behandling mot kreft, forhindrer blant annet dannelsen av ny DNA og nye celler, eller blokkerer den skadelige kjernens eller kreftcellens vekst.

6.2 Krefstamcellers resistens mot konvensjonell kreftbehandling

Nyere forskning indikerer at krefstamceller er resistent mot kjemoterapi og stråling. Dersom dette stemmer, kan krefstamcellene trolig danne nye tumorer etter gjennomført strålebehandling og kjemoterapi. Flere resistensmekanismer er foreslått. Disse er blant annet DNA reparasjon, økt Wnt/b-catenin og Notch signalisering.

6.2.1 Resistens mot apoptose

Det er mange molekylære mekanismer som kan ha sammenheng med resistens mot apoptose for krefstamceller:

Cellesyklus resistens. Mange krefstamceller inngår ikke i cellesyklus, men befinner seg i hvilestadiet, og de følger dermed ikke normal celledeling [62, 63].

DNA replikasjon - og reparasjonsmekanisme. Det er mulig at stamceller er resistente mot DNA-ødeleggende agens, og de har da ikke-synkronisert DNA syntese, i tillegg til at de har en mer effektiv DNA reparasjon enn andre celler [62, 64, 65, 66, 67, 68].

Antiapoptotiske proteiner. Stamceller uttrykker mer antiapoptotiske protein, som Bcl-2 og inhibitorer for apoptose, enn differensierte celler [69].

6.2.2 Resistens mot stråling

Forsøk med cellekulturer med primærtumor fra mennesket, har vist økt populasjon av krefstamceller etter stråling, og at krefstamcellene har større evne til overlevelse sammenlignet

med normale kreftceller. Det er blant annet foreslått at kreftstamcellepopulasjonen unngår stråleindusert celledød gjennom aktivering av en mekanisme som reparerer skadet DNA. Kreftceller, som andre celler, responderer på DNA skade gjennom aktivering av en kompleks beskyttelses- og reparasjonsmekanisme. I følge forsøket skadet strålingen alle kreftceller like mye, men kreftstamcellene har evnen til å reparere skaden, og leve videre til tross for skaden [3].

6.2.3 Resistens mot kjemoterapi

De fleste formene for cellegift eller kjemoterapi som blir brukt mot kreft, ødelegger DNA eller forstyrrer celledelingen for å indusere celledød i tumorceller som formerer seg raskt. Det er gjort flere studier som antyder at kreftstamceller er resistente mot kjemoterapi. Det er foreslått at autokrin stimulering av interleukin-4 reseptorer på kreftstamceller muligens kan bidra til resistens mot kjemoterapi [70].

6.2.4 Angiogenese og kreftstamceller

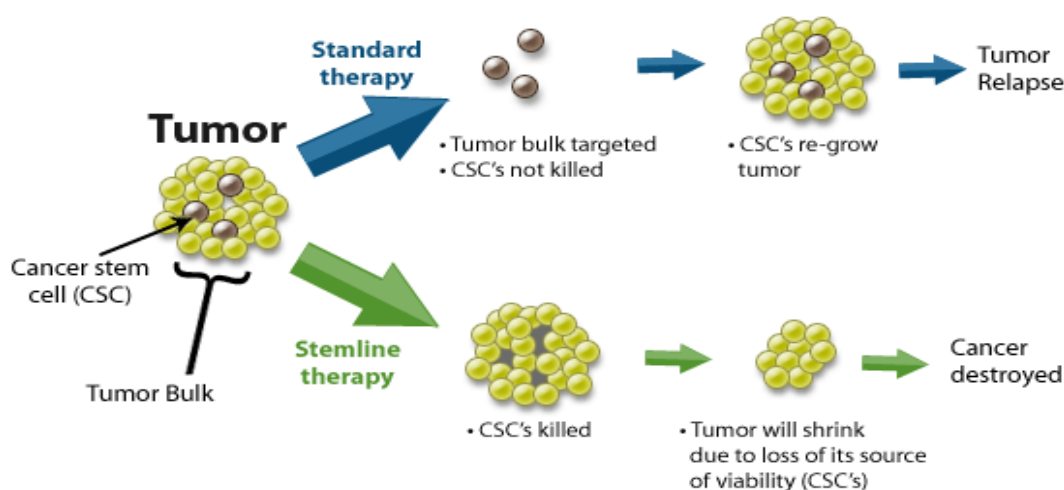
Angiogenesen bidrar til å gi næring til en voksende tumor, og angiogenesen spiller derfor en avgjørende rolle i kreftutviklingen. Angiogenese er en prosess hvor allerede eksisterende blodårer sender ut kapillærskudd for å danne nye blodårer

I tumorens tidlige vekstfase, induseres ikke angiogenese. Så lenge en tumor har en diameter på 1-2mm, får tumoren oksygen og næring ved diffusjon fra blodårer. Dersom tumoren overskrider denne størrelsen, er den avhengig av ekstra vaskularisering. Tumoren forblir liten eller in situ i noen år, til det skjer en angiogenetisk switch som fører til at tumoren blir vaskularisert. Det molekylære grunnlag for denne endringen er ikke helt klart, men kan involvere økt produksjon av angiogenetiske faktorer eller tap av angiogenetiske inhibitorer. De viktigste tumorassosierte angiogenetiske faktorene er vaskulære endotele vekstfaktorer (VEGF) og fibroblastfaktorer.

Kreftstamceller bidrar til angiogenese. Man har funnet ut at kreftstamceller produserer betydelig høyere nivå av VEGF sammenlignet med de resterende kreftcellene. Høyere nivå VEGF fører til forsterket endotelmigrasjon og karformasjon in vitro [62].

7. Muligheter for nye behandlingsmetoder

Som tidligere nevnt finnes det indikasjoner for at kreftstamceller er mer motstandsdyktige mot strålebehandling og cellegift enn andre kreftceller, og at dagens strålebehandling og kjemoterapi favoriserer vekst av kreftstamcellene. Celler som ikke følger vanlig cellyklus er ofte arvelig resistente mot cellegift og stråleterapi (Fig. 8) [46]. Dersom kreftstamcellene overlever, vil sykdommen ha potensial for repopulasjon og gjendanning av tumoren [13]. Dersom hypotesen om kreftstamceller stemmer, må man rette kreftbehandlingen spesifikt mot disse cellene for å knekke tumorens potensial for proliferasjon og gjendanning.



Figur 8: Kreftstamcellers resistente mot konvensjonell kreftbehandling (blå pil). Behandling som spesifikt angriper kreftstamcellene (grønn pil).

Dersom det stemmer at kreftstamcellenes resistens mot stråling kommer av deres effektive DNA reparasjon, kan stråleterapi bli mer effektiv dersom man kombinerer den med et medikament som inhiberer DNA-reparasjon.

Det at angiogenesen spiller en avgjørende rolle for utvikling, vekst og spredning av kreft, gjør at den er et attraktivt mål for kreftbehandling. Som tidligere nevnt bidrar kreftstamceller til angiogenese ved at de produserer høyere nivå av VEGF sammenlignet med de resterende kreftcellene. Dersom man lykkes i å angripe kreftstamcellene, vil dette muligens som konsekvens også redusere tumorens angiogenese, og følgelig redusere tumorens vekst og evne til metastase.

Et håp er at å kombinere stråling med et agens som sensitiverer kreftstamceller for stråling, med et agens rettet mot tumor angiogenese, og i tillegg et agens som kan redusere antall kreftceller, kan

avansere behandlingen av solide tumorer (Fig. 8) [71]. For eksempel ved å bruke radiosensitiverende Chk1/2 inhibitor sammen med antiangiogenetisk terapi *bevacizumab* og den cytotoksiske medisinen *temozolomide* [62].

Man kan tenke seg en behandling som rettes mot kreftstamcellers proliferasjon, ved at man favoriserer symmetrisk celledeling, slik at kreftstamcellene kun gir opphav til nye differensierte celler, og at de da mister sine stamcelleegenskaper.

Studier i mus har vist at medikamentet *salinomycin* reduserer andelen kreftstamceller flere hundre ganger bedre enn medikamentet *paclitaxel* i mus. *Paclitaxel* er et medikament som i dag blir brukt som kjemoterapeutisk middel, og *salinomycin* er et medikament som blir brukt som antibiotika for dyr. *Salinomycin* har med andre ord vist seg å ha spesifikk toksisitet mot kreftstamceller. Denne egenskapen til *Salinomycin* ble oppdaget av Piyush Gupta et al i 2009, da de utførte en studie hvor de testet 16 000 ulike substansers selektive toksisitet mot kreftstamceller [72].

I februar 2010 vil det i *Journal of Clinical Investigation* publiseres en artikkel som omhandler en forbindelse mellom inflammasjon og kreftstamceller i brystkreft, noe som kan gi mulighet for ny terapi mot de cellene som er resistente mot dagens kreftbehandling. Denne artikkelen er skrevet av Max S. Wicha og hans medarbeidere ved Universitetet i Michigan, USA. Disse forskerne har funnet en reseptor på kreftstamcellene, CXCR1, som trigger vekst av kreftstamcellene som respons på inflammasjon og vevsødeleggelse. CXCR1 er reseptor for IL-8 og IL-1 som blir produsert ved kronisk inflammasjon og vevsødeleggelse. Når tumorer blir eksponert for kjemoterapi, vil de døende cellene produsere IL-8 som stimulerer kreftstamceller til replikasjon. Det finnes et medikament som blokkerer denne reseptoren (opprinnelig brukt til å hindre negativ vertsrespons ved organtransplantasjon), og som er vist å ta knekken på kreftstamcellene, og å hindre spredning av dem i mus. Dette medikamentet heter *Repertaxin* og er et antiinflammatorisk medikament som nå testes for mulig bruk ved organtransplantasjon for å motvirke negativ vertsrespons. Studien viste at de musene som ble behandlet med *repertaxin* eller en kombinasjon av kjemoterapi og *repertaxin* hadde færre kreftstamceller enn de musene som ble behandlet med kjemoterapi alene. I tillegg viste det seg at musene som ble behandlet med *repertaxin* utviklet signifikant færre metastaser enn mus behandlet med kjemoterapi alene. Universitetet i Michigan har tatt patent på denne teknologien, og ser nå etter en kommersiell partner som kan være med på å bringe teknologien ut på markedet [73].

Mandag 14. desember 2009 kunne Reuters i Chicago meddele at et eksperimentelt medikament, MK-0752, utviklet av Merck & Co Inc i samarbeid med Dr. Jenny Chang ved *Baylor College of*

Medicine, hadde evnen til å drepe kreftstamceller som var igjen etter gjennomført kjemoterapi. MK-0752 (gamma-sekretase inhibitor) er et medikament som blokkerer signalveien Notch, som er en signalvei kreftstamcellene i brystkreft er avhengige av for å overleve. MK-0752 kombinert med kjemoterapi i mus viste seg å angripe kreftstamcellene. Dr. Max S Wicha ved universitetet i Michigan var også med på denne studien. Neste steg vil være testing av dette medikamentet in vivo hos pasienter med brystkreft i sent stadium [74].

Foreløpig har det blitt forsket mer på kreftstamceller og nye behandlingsmetoder for andre kreftformer, som brystkreft, enn munnhulekreft. I og med at både brystkreft og munnhulekreft er plateepitelkarsinomer, er det rimelig å anta at dersom man utvikler nye behandlingsmetoder som er effektive mot brystkreft, vil en kunne håpe at disse medikamentene kan være effektive også mot munnhulekreft.

Det er en lang vei å gå fra å vise en substans sin selektive toksisitet mot kreftstamceller i mus, til å finne et medikament som kan være virksomt som en del av kreftbehandlingen hos mennesker.

8. Diskusjon

Dagens kreftbehandling er basert på at alle kreftceller har det samme potensial for proliferasjon og for å få flere mutasjoner for økt aggressivitet. Den hierarkiske kreftmodellen, som kreftstamcellene er en del av, representerer et paradigmeskifte i vår tankegang, og den har store konsekvenser for forståelsen av kreftbiologien, og samtidig konsekvenser for utvikling av nye behandlingsmetoder for kreft.

Begrepet kreftstamceller er fremdeles ikke fullt ut akseptert, og det er en pågående debatt som omhandler validiteten til kreftstamcellene. Teorien om kreftstamcellers rolle i kreftutvikling og spredning av kreft blir kritisert fordi det menes at begrepet kreftstamceller er lite presist, og fordi det er opp til den enkelte forsker å velge sin egen definisjon av begrepet.

Mye av forskningen som gjøres på kreftstamceller, blir gjort på mus. Man gjør blant annet forsøk hvor man overfører kreftceller fra menneske til mus, for så å følge tumorutviklingen. I Norge er dyreforsøk svært regulert, og det er strenge krav som må oppfylles før man får bruke dyr i forskning. Flere er kritiske til bruk av dyreforsøk for studier på humane kreftceller og kreftstamceller. Mange mener at musemodeller ikke gir resultater som kan overføres til forholdene i menneskekroppen. De mener at sykdommer i mus ikke kan sammenlignes med menneskelige sykdommer, på grunn av de store fysiologiske forskjellene mellom mennesker og mus. Det er også en pågående debatt om legitimiteten av å bruke musemodeller for å forske på menneskesykdommer [75].

Forsøkene med musemodeller har vist at noen få celler har evnen til å danne en ny tumor (<10 %). Det diskuteres om dette resultatet beviser kreftstamcellers eksistens, eller om det kan begrunnes i at mange av kreftcellene taper sin tumorigenitet i overføringen fra menneske til mus. Man har overført kreftceller fra mus til mus, altså mellom to like arter. Her vises det derimot at 30-60 % av kreftcellene i en tumor kan gi opphav til en ny malign tumor, fremdeles langt under 100 %, noe som støtter teorien om at kreftceller har ulik tumorigen evne [59].

Den enkelte kreftstamcelle har en lang vei å gå fra den blir tatt ut av en krefttumor i et menneske til den skilles fra resten av cellene, blir klonet, og plassert inn i en mus for så å danne en ny tumor. Det har vært diskutert om man kan stole på resultatene i slike undersøkelser med hensyn til den store påkjenning en slik undersøkelsesprosess vil være for en celle. Kan det tenkes at cellene forandres på veien? Musene som benyttes i forsøkene er dessuten svært immunsupprimert, og gir således et svært kunstig miljø for cellene, som ikke kan sammenlignes med de faktiske forholdene i

menneskekroppen. Selv om kreftstamcellene kan danne en tumor i mus, vil det ikke dermed si at kreftstamcellene kan gjøre det samme hos mennesker.

Et argument som taler for stamcellers viktige posisjon i kreftutviklingen er deres lange levetid. Stamceller lever uendelig i motsetning til andre somatiske celler, og har dermed større sannsynlighet for å akkumulere de multiple mutasjonene som er nødvendig for kreftutvikling. I denne sammenheng vil det være interessant å dra frem at kvinnene som ble utsatt for radioaktiv stråling i forbindelse med atombombene i Hiroshima og Nagasaki, utviklet brystkreft 20-30 år etter eksponering [76]. Sannsynligheten for utvikling av brystkreft var størst hos de som ble eksponert for den radioaktive stråling i sen tenåringsalder. Dette samsvarer med at nivået av stamceller i brystkjertlene er størst hos denne aldersgruppen [77].

Normalt humant epitel har en selvfornyelsesrate estimert til 14-24 dager [78], og de fleste epitelceller overlever ikke lenge nok til å akkumulere genetiske forandringer som trengs for å utvikle oralt plateepitelkarsinom [79]. Som tidligere nevnt, kreves det 3-6 mutasjoner for at en normal somatisk celle skal utvikles til en kreftcelle [25, 26]. Den hierarkiske stamcellestrukturen i epitel, indikerer at stamceller er de eneste cellene som lever lenge nok til å akkumulere det nødvendige antall genetiske forandringer for å oppnå malignitet [80, 81, 82]. Disse funnene støtter teorien om at stamceller spiller en rolle ved utvikling av kreft.

Det er klart at dersom det er slik at kreftstamcellene kan være nøkkelen til utvikling av nye behandlingsmetoder for kreft, så vil dette være et ekstremt interessant forskningsområde for kommersielle aktører innenfor legemiddelindustrien. Man kan frykte at denne kommersielle interessen kan ha en negativ innvirkning på forskningsprosessen, og at man kanskje trekker konklusjoner til egen vinnings fordel, før man har tilstrekkelig vitenskapelig bevis for å for eksempel lansere et nytt medikament på markedet.

9. Konklusjon

Forskere har funnet at kreftceller har varierende evne til proliferasjon, og at kun en andel av kreftcellene har evne til å danne en tumor in vivo. Dessuten tror man at kreftstamcellene spiller en viktig rolle for tumorens vekst, spredning, og resistens mot behandling, og at disse cellene kan gi økt kunnskap om hvordan kreft oppstår. Man tenker seg at denne nye kunnskapen om tumorens heterogenitet kan gi muligheter for utvikling av nye, mer effektive, behandlingsmetoder mot kreft. Dersom man angriper kreftstamcellene kan man sannsynligvis hemme tumorens evne til vekst og spredning.

At det finnes kreftstamceller er en relativt ny oppdagelse, og begrepet har fremdeles ikke fått fullstendig vitenskapelig aksept.

Det er viktig å merke seg at det er en lang vei å gå før terapi som er rettet mot kreftstamcellene kan brukes i kreftbehandling hos mennesker. Man må finne mer ut om hva som skiller kreftstamceller fra normale somatiske stamceller. Man må sikre at medikamentene angriper kreftstamcellene selektivt, og at medikamentene ikke angriper friske celler i kroppen.

Det vil sannsynligvis gå år før medikament rettet mot kreftstamceller blir brukt som rutinebehandling på mennesker. I første omgang vil disse medikamentene kun benyttes som eksperimentell behandling hos pasienter med alvorlig kreft, som anses som uhelbredelig.

Uansett om kunnskapen om kreftstamcellene direkte forandrer behandlingen av kreft eller ei, så bidrar denne kunnskapen til at man sannsynligvis kommer et steg videre i forståelsen av kreft. Kunnskapen om kreftstamcellene gir grunn til optimisme med hensyn til å bedre prognosen, og å øke overlevelseshraten for munnhulekreft og andre kreftformer.

10. Hospitering på laboratoriet

Under arbeidet med denne oppgaven fikk vi mulighet til å besøke laboratoriet på Patologisk avdeling ved Gades Institutt ved Universitetet i Bergen. Daniela Elena Costea viste oss rundt og gav oss en innføring i hvordan forskningen på stamceller og kreftstamceller foregår her.

Her fikk vi se immunosupprimerte mus som hadde fått injisert celler fra maligne tumorer i menneske. Vi observerte at forsøksdyrene her lever under akseptable forhold, og at det er strenge restriksjoner for hvordan man behandler dyr som brukes i forskning. Videre fikk vi sett på stamceller og klonogene cellekulturer i mikroskop, og i tillegg fikk vi demonstrert hvordan en FASC sorterer fungerer.

Litteraturliste

1. Krefregisteret.
<http://www.krefregisteret.no/no/Generelt/Nyheter/Krefststatistikken-publiseres-i-dag/>
(Lest 25.01.2010).
2. Kreftforeningen. <http://aarsrapport2008.kreftforeningen.no/?id=418.0> (Lest 25.01.2010).
3. Eyles CE, Rich JN. Survival of the fittest: Cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J of Clin Onco* 2008; 2839-2845.
4. img.medscape.com/pi/emed/ckb/otolaryngology/8. (Lest 25.01.2010).
5. www.whocollab.od.mah.se/images/carcinoma1.gif. (Lest 25.01.2010).
6. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Oral Oncol. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. 2001; 37(5): 401-18.
7. <http://www.krefregisteret.no/no/Registrene/Krefststatistikk/> (Lest 25.01.2010).
8. <http://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter4.asp> (Lest 25.01.2010)
9. Lavker RM, Sunn TT. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: Morphological and functional correlations. *Science* 1982; 215: 1239-41.
10. Hume WJ, Potten CS. Proliferative units in stratified squamous epithelium. *Clin exp. Dermatol* 1983; 8: 95-106.
11. Hall PA, Watt FM. Stem cells: The generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989; 106: 619-33.
12. Cotsarelis G, Kaur P, Dhouailly D, Hengge U, Bichenbach J. Epithelial stem cells in the skin: Definition, markers, localization and functions. *exp, dermatol* 1999; 8: 80-8.
13. Costea DE, Tsinkalovsky O, Vintermyr OK, Johannessen AJ, Mackenzie IC. Cancer stem cells--new and potentially important targets for the therapy of oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases* 2006; 12: 443-454.
14. Watt FM. Epidermal stem cells: Markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998; 353: 831-7
15. Ambler CA, Määttä A: Epidermal stem cells: Location, potential and contribution to cancer. *J Pathol* 2009; 217: 206-216.
16. Bickenbach JR, McCutcheon J, Mackenzie IC. Rate of loss of tritiated thymidine label in basal cells in mouse epithelial tissues. *Cell Tissue Kinet* 1986; 19: 325-33.
17. Tudor D, Locke M, Owen-Jones E, Mackenzie IC. Intrinsic patterns of behavior of epithelial stem cells. University of Wales, College of Medicine, Heath Park, Cardiff, UK 2004; 9(3): 208-14.
18. Dabelsteen S, Mackenzie I.C. The stem cell concept in oral mucosa and in cancer. *Nor Tannlegeforen Tid* 2006; 116: 32-36.

19. Nakamura T, Endo K, Kinoshita S. Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Dep. of Ophtalm., Kyoto Prefect. Uni of Med* 2007; 25(3): 628-38.
20. Iuchi S, Dabelsteen S, Easley K, Rheinwald JG, Green H. Immortalized keratinocyte lines derived from human embryonic stem cell. *Dep. of Cell Biol, Harvard Med. School* 2006; 103 (6): 1792-7.
21. Dabelsteen S et al. Epithelial cells derived from human embryonic stem cells display p16INK4A senescence, hypermotility, and differentiation properties shared by many P63+ somatic cell types. 2009; 27(6): 1388-99
22. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194: 23-28.
23. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J. Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed. Garland Science, Taylor & Francis Group, NY, pp 2008; 538-539.
24. <http://en.wikipedia.org/wiki/Carcinogenesis> (Lest 25.01.2010)
25. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
26. Hahn WC, Weinberg RA . Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347:1593-1603.
27. Kumar et al. Neoplasia. In: *Robbins Basic Pathology, 7th Edition*. Ed Sonders Elsevier p 187.
28. Hansemann, D. Ueber asymmetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Virchovs Arch. Pathol. Anat.* 1890; 119: 299-326.
29. Boveri, T. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren* Gustav Fischer verlag, 1914.
30. Duesberg, P., Fabarius A. & Helmann, R. Aneuploidy, The primary cause of the multilateral genomic instability of neoplastic and preneoplastic cells. *IUBMB Life* 2004; 56: 65-81.
31. Duesberg, P. Does aneuploidy or mutation start a cancer? *Science* 2005; 307: 41.30.
32. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14: 213-22.
33. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, Cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.
34. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors". *Cancer research* 2003; 63 (18): 5821–8.
35. Singh, S.K. Et al. Identification of human brain tumor initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401.
36. Singh, S. K., Clarke, I. D., Hilde, T. & Dirks P. B. Cancer stem cells in nervous system tumours. *Oncogene* 2004; 23: 7267-7273.
37. Galli, R. Et al. Isolation and characterization of tumorigenic stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer res.* 2004; 64: 7011-7021.
38. Marx, J. *Cancer research*. Mutant stem cells may seed cancer. *Science* 2003; 301: 1308-1310.
39. Prince ME, Nandan RS, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissmann IL,

- Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma, PNAS 2007; 973-978.
40. Harper LJ, Piper K, Common J, Fortune F, Mackenzie IC. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2007; 36(10):594-603.
 41. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat med 1997; 3: 730-7.
 42. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2003; 100 (7): 3983–8.
 43. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice". Nature 2007; 445 (7123): 106–10.
 44. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP . "Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors". Cancer research 2008; 68 (11): 4311–20.
 45. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. "Identification of pancreatic cancer stem cells". Cancer research 2007; 67 (3): 1030–7.
 46. Maitland NJ, Collins AT . "Prostate cancer stem cells: a new target for therapy". J. Clin. Oncol. 2008; 26 (17): 2862–70.
 47. Max S, Wicha, Suling Liu and Gabriela Dontu. Cancer Res. 2006; 66: 1883-1890.
 48. Sell S, Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. Lab Invest 1994; 70: 6-22.
 49. Wagers AJ, Weissman IL. Placticity of adult stem cells. Cell 2004; 116: 639-648.
 50. Gat U, DasGupta R, Degenstein L, Fuchs E. De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. Cell 1998; 95: 605-614.
 51. Zhu AJ, Watt FM. Beta-catenin signaling modulates proliferative potential of human epidermal keratinocytes independently of intercellular adhesion. Development 1999; 126: 2285-2298.
 52. Sundaram M, Guernsey DL, Rajaraman MM, Rajaraman R. Neosis: a novel type of cell division in cancer. Cancer Biol Ther 2004; 3: 207-218.
 53. Rajaraman R, Rajaraman MM, Rajaraman SR, Guernsey DL. Neosis-paradigm of self-renewal in cancer. Cell biol int 2005; 29: 1084-1097.
 54. Jones RJ, Matsui WH, Smith BD. Cancer stem cells: are we missing the target? J Natl Cancer Inst 2004; 96: 583-58.
 55. Conheim J Ueber entzündung und eiterung. Path Anat Physiol Klin Med 1867; 40: 1-79.
 56. Conheim J Congenitales, quer gestreiftes Muskelsarkon der Nireren Virchows Arch 1875; 65: 64-69.
 57. Durante F: Nesso fisio – pathologico tra la struttura dei mei materni e la genesi di aleuni tumori

- maligni. Arch Memor Observ Chir Pract 1874; 11: 217-226.
58. Griffin JD, Lowenberg V. Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. Blood 1986; 68: 1185-1195.
 59. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumor formation by single human melanoma cells Nature. 2008 ; 4; 456(7222): 593–598.
 60. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, Wicha MS, Prince ME. Head Neck. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase, 2010.
 61. Sarraf C. Emerging themes of cancer stem cells: Editorial – overview. Cell Prolif 2005; 38: 343-345.
 62. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, et al: Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. Cancer Res 2006; 66: 7843-7848.
 63. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. PloS Biol 2004; 2: e301.
 64. Cairns J. The cancer problem. Sci Am 1975; 233: 64-72, 68-77.
 65. Cairns J. Somatic stem cells and the kinetics and mutagenesis and carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U F A 2002; 99: 10567-70.
 66. Potten CS, Owen G, Booth D. Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. J Cell Sci 2002; 115: 2381-8.
 67. Park Y, Gerson SL. DNA rapair defects in stem cell function and aging. Annu Rev Med 2005; 56: 495-508.
 68. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In surch of «stemness.» *Exp Hematol* 2004; 32: 585-98.
 69. Wang S, Iang D, Lippman ME. Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists. *Semin Onko* 2003; 30 supl 16: 133-42.
 70. Todaro M, Alea MP, DiStefano AB, et al: Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 389-402.
 71. <http://stemline.com/csc.asp> (Lest 25.01.2010)
 72. Gupta, P. et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-troughput screening. *Cell*. 2009; 138: 645-659.
 73. Science Daily. <http://www.sciencedaily.com/releases/2010/01/100104181527.htm> (Lest 25.01.2010)
 74. Nyhetsbyrået Reuters.
<http://www.reuters.com/article/idUSN1126590820091211?type=marketsNews> (Lest 25.01.2010).
 75. Wagner KU. University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA. Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling? *Breast Cancer Res* 2004; 6:31-38.
 76. Little MP, Boice JD Jr. Comparison of breast cancer incidence in the massachusetts tuberculosis

- fluoroscopy cohort and in the japanese atomic bomb survivors. *Radiat Res* 1999; 151: 218-24.
77. Smith GH, Chepko G. Mammary epithelial stem cells. *Microsc Res Tech* 2001; 52: 190-203.
78. Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. Dows Institute for Dental Research, College of Dentistry, University of Iowa. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001;(29):7-15.
79. Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 317-322.
80. Owens DM, Watt FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumors. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 444-451.
81. Perez-Losada J, Balmain A. Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 434-443.
82. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 127-135.