

癌症幹細胞模型與臨床治療應用

文、圖 / 林柏翰 張金堅*

台大醫院基因醫學部 台中澄清醫院中港院區外科*

前言

幹細胞(stem cell)定義為具有自我修復(self-renewing)與分化為其他細胞能力(differentiation abilities)的細胞。例如胚胎幹細胞具有分化為各式細胞的能力(pluripotent)；而成人身上的幹細胞，大多是各個組織或是器官的前驅細胞(progenitors)，可以複製、分化為該lineage的細胞，例如造血幹細胞(hematopoietic stem cell)，可以分化為各種血球。本文要探討的主題，癌症幹細胞(cancer stem cell, 癌症幹細胞)，其理論基礎就是從體細胞的幹細胞理論發展而來。經過多年的發展，惡性腫瘤的癌症幹細胞(癌症幹細胞)理論已逐漸被大家接受，雖然惡性腫瘤起源與依賴一小群癌症幹細胞樣細胞增殖的想法已經存在已久，但是在近十年，才因為技術發展的進步，而有足夠的實驗數據加以證實癌症幹細胞存在的理論。本篇文章，就在癌症幹細胞存在理論的基礎之下，討論癌症幹細胞的模型與臨床的治療應用。

癌症幹細胞的存在證實

癌症幹細胞存在的證明，最早是由迪克(Dick)和他的同事在1994年，證明CD34+CD38-是急性骨髓性白血病(acute myeloid leukemia, AML)的癌症幹細胞，他們在依序的植入實驗中(serial transplantation)，發現並且證明這一群細胞可以植入免疫缺陷小鼠並啟動白血病生成；而該群細胞只占數百萬AML細胞中的一小部分，這一部分也是生成腫瘤最原始的部分；除了血液腫瘤，固態腫瘤在2003年，由克拉克(Clarke)和他的同事們，發現帶有標記CD44+CD24/low的乳癌細胞，可以表現如急性骨髓性白血病之CD34+CD38-的癌症幹細胞相似表現，也就是在連續數代小鼠移植實驗中，可以啟動乳癌腫瘤的生成，因此確立了CD44+CD24/low為乳癌細胞。爾後，各種癌症幹細胞的細胞表面標記逐一被找出來(表1)，確定了癌症幹細胞的理論⁽¹⁾。

癌症幹細胞模型理論

在確立了癌症幹細胞存在之後，了解癌症幹細胞的運作與建立癌症幹細胞的模型，便成為受人重視的課題。本篇文章所要討論的主題，著重在這幾年

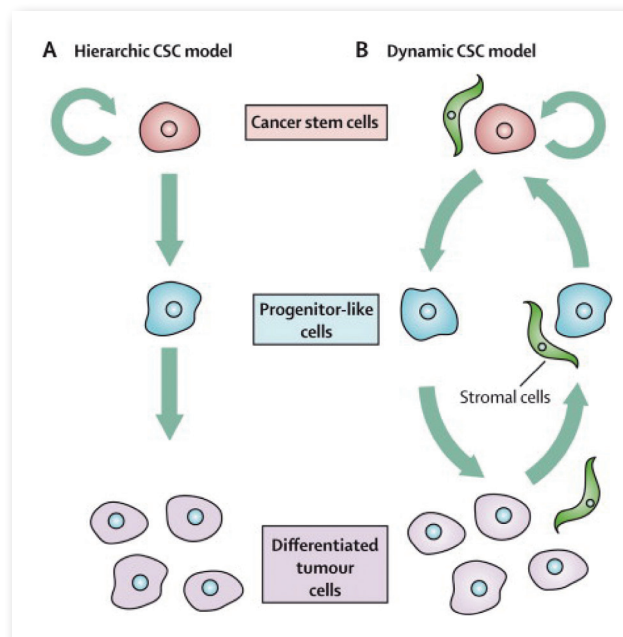


圖1 癌症幹細胞模型(A)分層癌症幹細胞模型(B)動態的癌症幹細胞模型⁽²⁾。

癌症幹細胞的模型理論。過去癌症幹細胞的模型理論，主要是參考一般體幹細胞(somatic stem cell)提出的假說，是分層癌症幹細胞模型(hierarchic 癌症幹細胞模型，圖1A)，圖中顯示，癌症幹細胞單向的分化為其他腫瘤細胞，所述分化的腫瘤細胞已喪失選殖(cloning)能力，只有癌症幹細胞才扮演腫瘤惡化的角色，這個理論可以解釋當癌症接受治療之後，微小殘留疾病(癌症幹細胞因對治療較不敏感，易殘留下來)造成腫瘤的復發。從這個模型可知，針對癌症幹細胞做治療，應該是清除癌症成功的方向。不幸的是，癌症幹細胞通常比分化的腫瘤細胞對大多數常見的治療方法，例如化學藥物治療，具有更高的耐受性，這可以解釋為什麼治療失敗；所施加的藥物有效地殺死大多數分化的腫瘤細胞，導致腫瘤縮小，但在癌症幹細胞相對未受傷害，仍留在病人體內。治療停止後，導致腫瘤重新生長，這在臨床表現即所謂復發⁽²⁾。

因此，許多研究人員相信，針對癌症幹細胞治療，可以有效的治癒腫瘤。這種假設建立在於癌症幹細胞族群是隨時間穩定的想法(分層癌症幹細胞模型)，然而，近幾年發現，無法在一個已分化的腫瘤中，確切的知道癌症幹細胞的真正族群。癌細胞可以

在微環境 (microenvironment)、表觀基因 (epigenetic) 調控等因素的影響，進行去分化 (dedifferentiation) 的能力，而得到癌症幹細胞的一個表現；因此，癌症幹細胞是一個動態的平衡，我們把這種觀念稱之為癌症幹細胞的動態模型 (圖 1B)，圖中顯示癌症幹細胞可以被基質細胞 (stromal cells) 的信號調控。癌症幹細胞分化生成腫瘤內分化的細胞群，而分化的腫瘤細胞在微環境的影響下發生去分化，可以再度成為癌症幹細胞。這個觀念，大大影響了我們對惡性腫瘤的生物學知識，對於癌症的治療，尤其是要評估該治療是否對於癌症幹細胞有效，新的臨床試驗方法應該被重新思考^(3,4)。

癌症幹細胞的動態調控

癌症幹細胞除了表現特定的細胞表面抗原，細胞內的訊號傳遞路徑，也與一般癌細胞不同，顯示出癌症幹細胞的特徵，圖 1B 顯示，一個癌症細胞可以在外環境、訊號傳遞與表觀基因調控之下，進行去分化的能力，顯現出癌症幹細胞的特徵。

癌症幹細胞的訊號傳遞路徑

癌症幹細胞的訊號傳遞，主要有 Notch、Hedgehog 和 Wnt 等幹細胞常見的訊號路徑，例如，肺癌幹細胞的會表現較高活性的 Notch 和 Wnt 的訊號，並表達高水平的 Oct4。結直腸癌的癌症幹細胞，Wnt 訊號傳遞路徑通常是被活化的，當結直腸癌細胞的 Wnt 路徑活性降低，則喪失選殖能力，並且表達與分化出腸道細胞相關的標記物，喪失癌症幹細胞能力。其他研究也顯示，Notch 和 Hedgehog 兩個路徑，是維持結直腸癌幹細胞的關鍵途徑，這是正常幹細胞和癌症幹細胞之間的一個相似之處。激活這些途徑被認為是誘

表 1 利用流式細胞儀 (flow cytometric) 分析各種癌症幹細胞表面標記表⁽¹⁾

	Putative marker patterns for cancer stem cells (CSCs)	Annotation
Acute myelogenic leukemia	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	
	CD90 ⁺	High risk AML
Acute lymphoblastic leukemia	CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD19 ⁺	
Bone sarcoma	Stro-1 ⁺ /CD105 ⁺ /CD44 ⁺	
Brain tumor	CD133 ⁺	
Breast cancer	ESA ⁺ /CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} /lin ⁻	Further enrichment by selection of ESA ⁺ cells
	CD90 ^{low} /CD44 ⁺	Cells localized at the invasive front
	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} /ALDH1 ^{high}	
Colon cancer	CD133 ⁺	
	ESA ^{high} /CD44 ⁺ (CD166 ⁺)	
	CD133 ⁺ /CD44 ⁺	
	CD133 ⁺ /CD24 ⁺	
Colon cancer (metastatic)	CD133 ⁺ /CD44 ^{low} /CD24 ⁺	Two subsets of tumor-initiating cells identified
	CD133 ⁺ /CD44 ⁺ /CD24 ⁻	
Endometrial cancer	CD133 ⁺	
	SP ⁺	
Gall bladder cancer	CD133 ⁺ /CD44 ⁺	
Gastric cancer	CD44 ⁺	
Liver cancer	CD133 ⁺ /CD44 ⁺	
	CD90 ⁺	
	EpCAM ⁺	
	CD133 ⁺	
Metastatic melanoma	CD20 ⁺	
Ovarian cancer	CD133 ⁺ /ALDH ⁺	
	CD44 ⁺ /CD117 ⁺	
Pancreatic cancer	CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /ESA ⁺	
Prostate cancer	CD44 ⁺ /α ₂ β ₁ ^{hi} /CD133 ⁺	
	CD44 ⁺ /CD24	
	SP ⁺	
Renal cell carcinoma	CD105 ⁺ (CD133 ⁻ /CD24 ⁻)	
Head and neck cancer	CD44 ⁺	No further enrichment by endothelial-specific antigen or CD2

*lin = lineage marker CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, and CD56.

發腫瘤選殖能力和促進腫瘤向外侵襲的原因之一。因此，這些幹細胞相關的路徑往往成為抗癌藥物發展的新標的，這類路徑的抑制劑，目前也相繼在各個臨床試驗研究中⁽⁵⁾。

癌症幹細胞與 microRNA(miRNA)

最近研究顯示，某些 microRNA(miR) 例如 miR-302 cluster, miR-372/373, let-7, 與 miR-200 family, 可以調控其他基因的表現，影響細胞週期、上皮-間質轉化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)，進而與癌症幹細胞相關。Li and colleagues 的研究顯示 miR-302 會促進皮膚癌細胞的去分化，獲得幹細胞的特性。miR-200 可以經由標的抑制 Klf4 與 Sox2, 促使胰臟癌與大腸癌細胞，重新獲得幹細胞的特性。由此可見，這些癌症幹細胞 miRNA, 經過標的基因與調控細胞週期，亦參與癌症幹細胞形成⁽⁶⁾。

癌症幹細胞環境與去分化作用

當一個體細胞接受來自外部環境的訊息，或是在人為的調控之下，可以表現出廣泛的可塑性，就有可能誘導成為多能幹細胞(inducible pluripotent stem cells)。這些訊息可以提供我們知道，癌症細胞也可以經由環境的調控，重新獲取癌症幹細胞的特徵(圖2)。比方說結直腸癌，其周邊有許多的肌肉纖維母細胞(myofibroblast)，分泌肝細胞生長因子(hepatocyte growth factor)，可以誘導結腸直腸癌細胞重新獲得幹細胞功能。若是腫瘤處在低氧狀態(hypoxia)之下，周遭的間質細胞、發炎細胞或是巨噬細胞可以分泌介白素6(interleukin-6)和macrophage-derived milk-fat globule EGF8等物質，經由前述的Hedgehog等相關訊號傳遞路徑，使細胞趨向於癌症幹細胞的特徵。類似的結果在乳癌細胞也可以被發現，這表示基質細胞和癌細胞之間發生重要的相互作用。癌細胞也可以自行分泌細胞激素，例如乳癌細胞可以分泌介白素6，吸引和激活間質幹細胞，間質幹細胞則會表現CXCL7，來支持癌症幹細胞，這顯示癌症幹細胞和間質細胞之間有密切的關聯。這些細胞之間的訊號，最終會傳遞到癌細胞Notch、Hedgehog和Wnt等幹細胞的訊號路徑，來調控整體癌細胞與癌症幹細胞的組成比率。除了與環境之間的交互作用，癌細胞也可以經過自分泌(autocrine)和旁分泌(paracrine)作用，來正向調控這些Notch、Hedgehog和Wnt等幹細胞的訊號路徑，來維

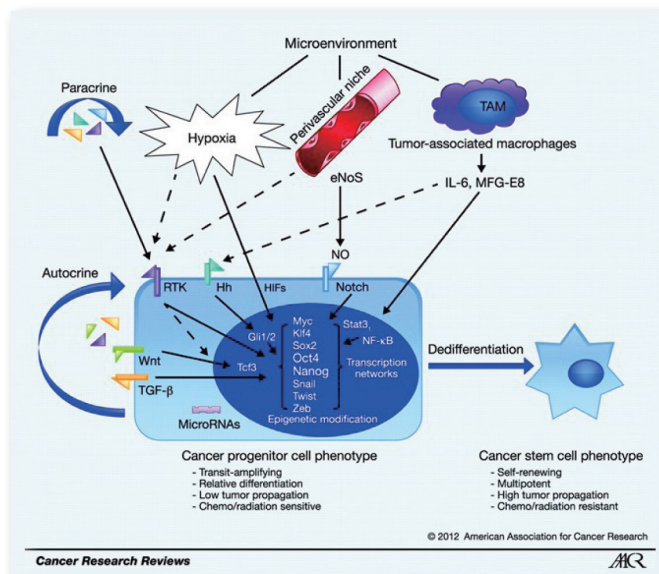


圖2 本圖顯示環境與癌症幹細胞的動態調控。癌症細胞可以經過環境對癌細胞的功能性聯絡，調控細胞內訊號傳遞、基因表現、表觀基因調控(epigenetic modification)，來使癌症細胞發生去分化作用，而得到癌症幹細胞的表現型與特徵⁽⁵⁾。

持癌症幹細胞⁽⁶⁻¹⁰⁾。

癌症幹細胞和治療反應

治療的抗藥性

一般腫瘤的治療，初始大多會有腫瘤縮小的現象，但是治療後抗藥性的產生卻是常見的，通常就是因為有一群細胞亞群產生抗藥性。在結直腸癌中，癌症幹細胞比非幹細胞的癌細胞對常規化療更有抵抗力；從小鼠實驗中，人類結直腸癌原發性腫瘤移植到小鼠身上，經過oxaliplatin的治療後，細胞表現癌症幹細胞表型的比例顯著增加。臨床上也發現，癌症幹細胞在結直腸癌病人給予氟尿嘧啶-5(5-fluorouracil)治療後，比率也會上升。研究化學治療對腫瘤細胞之間的敏感度差異的分子機轉方面，發現癌症幹細胞有較多的抗凋亡分子(anti-apoptotic factors)、較高表現的藥物外排機能(drug efflux pumps)，該現象也在乳癌等其他不同癌症發現，顯示這是各種癌症幹細胞的共同特點。不僅僅是在化學治療，標靶藥物治療，例如在慢性骨髓性白血病(chronic myeloid leukaemia)、胃腸道基質瘤(gastrointestinal stromal tumours)接受標靶

藥物 imatinib 治療，其癌症幹細胞對藥物有較高的抗藥性，這抗藥機轉並非來自 BCR-ABL 或是 c-KIT 的突變至今尚不明。研究顯示，惡性腦瘤如 glioblastoma multiforme，在接受腦部放射線治療之後，CD133 陽性的細胞比率上升，顯示腦瘤的幹細胞比率增加^(2,7-10)。

癌症幹細胞的特異性標靶治療

因此，癌症幹細胞的治療，就顯現出它的重要性。問題是，如果只清除癌症幹細胞，這樣的治療足夠嗎？從目前的幹細胞模型理論(圖3)，我們可以看出，分化的細胞也需要標靶治療的，很明顯的，癌症幹細胞與其分化細胞，都需要進行有效的標靶治療。

針對外部環境訊號與細胞內的幹細胞訊號傳遞，直接給予標靶藥物抑制，是目前標靶藥物發展的一個想法，然而這在臨床病人應用上，可能是有問題的，因為正常的幹細胞也非常依賴於這些訊號傳遞路徑的；但是這些路徑在腫瘤可能被異常的活化，若給予適當的藥物或是劑量，來干擾這些訊號傳遞，就可能可以提供一個有效的治療。例如，Notch 抑制劑正在進行臨床試驗，評估用於治療結腸直腸癌的可行性。臨床設計上，應該合併這一類藥物與其他藥物針對非癌症幹細胞的部分，如此一來，才可以避免當癌症幹細胞比率下降之後，其他細胞經由去分化作用，獲得幹細胞的特徵與能力，造成腫瘤的復發。研究顯示肺癌的幹細胞可以藉由自分泌或是旁分泌作用，活化與依賴 c-KIT，若我們使用 c-KIT 的抑制劑加上肺癌的標準治療-白金類化學治療，則可以提高肺癌治療的成績。未來，這些類型的藥物提供治療癌症成功的機會，以改善病人的預後。然而，這些藥物必須通過臨床試驗，才能夠證實。

臨床試驗設計

新型抗癌藥物臨床試驗的發展需經過幾個階段。第一階段藥物的安全性評估，第二階段的研究目標是提供一個基礎，預測該癌症病人可能對該藥物有效，需經過第三階段，大規模臨床試驗，通過之後，才能上市成為病人使用之藥物。在療效的評估當中，我們最常使用 response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) 的規範做為標準。病人的病灶的最長直徑需減少了 30% 以上，才定義為部份緩解，也就是對藥物有反應。RECIST 標準已在許多情況下是正確的；然而，通過 RECIST 標準判斷藥物的反應，則對癌症幹

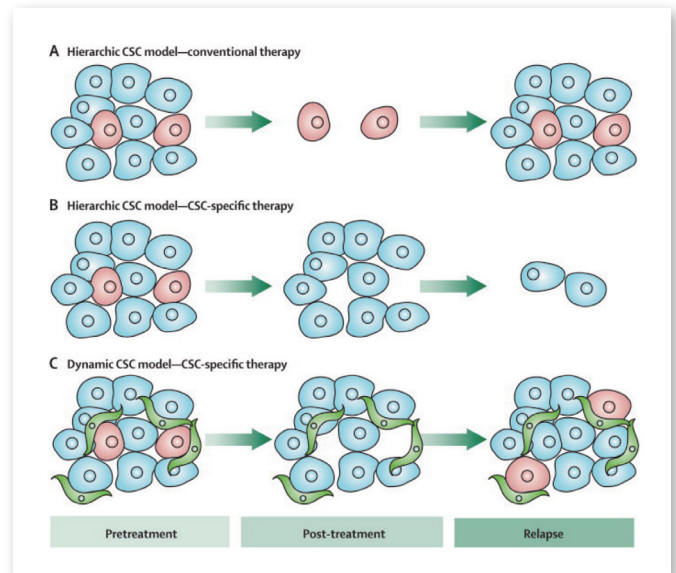


圖3 (A)分層癌症幹細胞模型之下，傳統藥物治療後的預測結果。顯示癌細胞死亡但是會留下癌症幹細胞，造成疾病復發。(B)分層癌症幹細胞模型之下，針對癌症幹細胞特異治療後，剩下癌細胞，腫瘤可能可以獲得較好治療效果。(C)動態的癌症幹細胞模型之下，針對癌症幹細胞執行特異性治療後，分化的腫瘤細胞在微環境的影響下，可以重獲癌症幹細胞的特徵，如此說明為何腫瘤無法被消滅⁽²⁾。

細胞模型的治療反映評估，產生極大的缺點。在腫瘤體積短期內的下降，似乎與藥物對癌症幹細胞影響無關。影像學上，藥物治療後產生影像學完全或是部份緩解，則未必影響癌症幹細胞，腫瘤緩解之後快速復發或新的轉移的這個現象，則說明了癌症幹細胞並沒有因為影像學上的腫瘤縮小而減少或是消失。反之，或許有些藥物，並沒有達到 RICIST 的標準，但是卻可以減少或是消滅癌症幹細胞，但是這在現今臨床試驗中，就會被宣告該藥物失敗，而不被繼續試驗下去。

新臨床試驗設計

如何能進行藥物對於癌症幹細胞療效的臨床試驗？理想狀態之下，應該在第三期臨床試驗下進行，但是若受限於經濟因素，設計一個類似第二期臨床試驗，可以先了解該藥物是否可能達到預設目標。除了一般影像學評估，另一個重要的就是要取得腫瘤細胞(圖4)，癌症幹細胞的表面標記讀數，可以是臨床試驗的一個評估的指標(end-point)，因為這些癌症幹細胞的標記，直接正相關於腫瘤發生的能力，也就是代

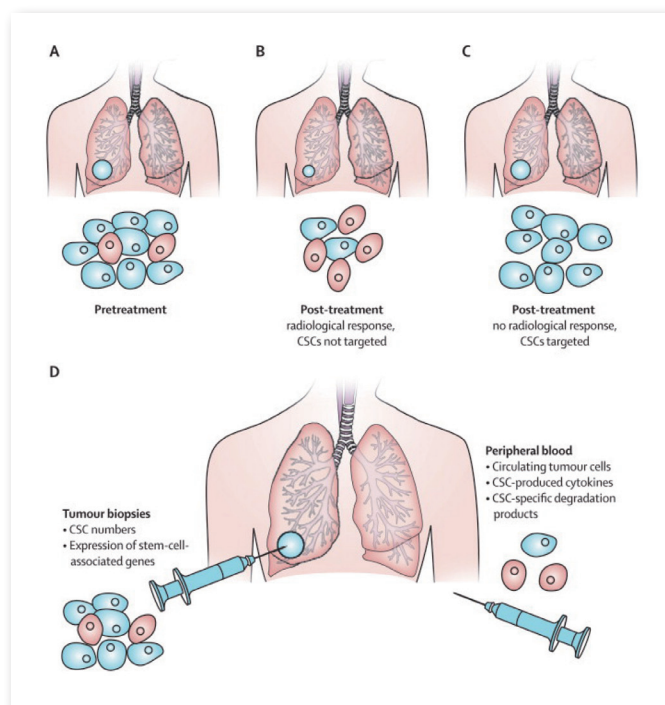


圖4 治療反應的評估(A)治療前腫瘤大小。腫瘤內含大部分癌細胞與少量癌症幹細胞。(B)傳統治療使腫瘤縮小，大多數癌細胞死亡，但是未影響癌症幹細胞。(C)針對癌症幹細胞治療，但是腫瘤未縮小。(D)新的臨床試驗設計，希望藥物可以殺死癌細胞與癌症幹細胞，因此需要監測癌症幹細胞的數量，主要有兩個方法，第一是對腫瘤做切片，另一是監測血液中的循環癌症幹細胞⁽²⁾。

表了腫瘤治療後復發、轉移等不良的預後。因為要取得腫瘤組織，會因為是侵入性檢查而受到一些限制，並且可能發生併發症（如出血）的風險；此外，也可能因為只取到少量的組織，而和整個腫瘤的癌症幹細胞比率有些偏差。但是整體而言，監測癌症幹細胞作為評估指標，意味著對可能出現的新轉移病灶，我們可以提早開始做測量。

另一個具有挑戰性的方法來評估治療效果，是監測循環腫瘤細胞。循環腫瘤細胞中可能富有癌症幹細胞，過去乳癌研究顯示，CD44+/CD24-/ALDH+細胞比率與將來發生腫瘤轉移成症相關。結直腸癌的CD133 mRNA表現，也預測第二期與第三期的病人，有較差的預後。因此，臨床試驗的評估加入癌症幹細胞的治療成果，將有助於提升抗癌治療⁽²⁾。

結語

本篇文章討論了癌症幹細胞的模型發展，讓我們知道癌症幹細胞可以受到許多因素例如外在環境的影響，且呈現一個動態平衡。動態理論解釋了為什麼專門只針對癌症幹細胞的藥物，有可能不足以作為抗癌藥物，但是合併治療卻可以提升治療成績。最後，癌症幹細胞理論提供了臨床試驗評估抗癌藥物的新方法，提供有效藥物發展的框架。我們相信，癌症可以治癒或是成為慢性可控制的疾病，此目標將來必可達到。

參考文獻

1. Greve B, Kelsch R, Spaniol K, et al.: Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. *Cytometry Part A* 2012;81(A):284-293.
2. Vermeulen L, de Sousa e Melo F, Richel DJ, et al.: The developing cancer stem-cell model: clinical challenges and opportunities. *Lancet Oncol* 2012;13:e83-89.
3. Visvader JE, Lindeman GJ: Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 2012;10:717-728.
4. Tang DG: Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Res* 2012;22:457-472.
5. Takebe N, Miele L, Harris PJ, et al.: Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; Epub ahead of print.
6. Li Y, Lathera J: Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Cancer Res* 2012;72:576-580.
7. Fessler E, Dijkgraaf FE, De Sousa E Melo F, et al.: Cancer stem cell dynamics in tumor progression and metastasis: is the microenvironment to blame? *Cancer Lett* 2013;341:97-104.
8. Shin K, Lim A, Odegaard JI, et al.: Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. *Nat Cell Biol* 2014;16:469-478.
9. Takeuchi M, Higashino A, Takeuchi K, et al.: Transcriptional dynamics of immortalized human mesenchymal stem cells during transformation. *PLoS One* 2015;10:e0126562.
10. Poleszczuk J, Hahnfeldt P, Enderling H: Evolution and phenotypic selection of cancer stem cells. *PLoS Comput Biol* 2015 ;11:e1004025.