

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra buněčné biologie



Ladislav Sivák

**Mezenchymální kmenové buňky v interakci s imunitním  
systémem a jejich využití v nádorové terapii**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Marek Kovář Ph.D.  
Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.

Praha, 2011

**Čestné prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím s jejím eventuálním zveřejněním v tištěné nebo elektronické podobě.

V Praze dne 13. srpna 2011

Ladislav Sivák

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Markovi Kováři, Ph.D., za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Dále děkuji celému kolektivu laboratoře nádorové imunologie na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. za příjemné pracovní prostředí a poskytnutou pomoc. Největší poděkování patří mé rodině a přítelkyni za podporu a pomoc během celého studia.

## **Abstrakt**

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) jsou multipotentní progenitorové buňky, se schopností se diferencovat v buňky ektodermální, mezodermální a endodermální buněčné linie. Interagují s buňkami vrozeného a adaptivního imunitního systému a moduluji jejich efektorové funkce. Imunoregulační efekt MSC vede k potlačení zánětlivé imunitní odpovědi a indukuje protizánětlivou reakci. Navíc MSC mají schopnost migrovat do místa nádorů prostřednictvím solubilních faktor, které jsou produkovány nádorovými buňkami a podílet se tak na růstu a metastázování nádorů. Tato vlastnost činí z mezenchymálních kmenových buněk slibný nástroj v nádorové terapii. Cílem práce je formou literární rešerše zpracovat souhrnný přehled současných poznatků o MSC na jednotlivé buňky imunitního systému a jejich potenciální využití v nádorové terapii.

**Klíčová slova:** mezenchymální kmenové buňky, imunoregulace, nádory, genová terapie nádorů

## **Abstract**

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent progenitor cells with the ability to differentiate into ectodermal, mesodermal and endodermal cell line. They interact with innate and adaptive immunity and modulate their effector functions. Immunoregulatory effect of MSC results in suppression of inflammatory immune response and induces anti-inflammatory immune response. In addition, MSC have the ability to migrate into tumor site through soluble factors produced by tumor cells and contribute to tumor growth and metastasis. Preferential homing to site of cancer growth and regulation of immune system make the MSC a promising tool for cancer therapy.

**Key words:** mesenchymal stem cells, immunoregulation, tumors, cancer gene therapy

# Obsah

I.	Úvod.....	1
II.	Kmenové buňky .....	2
III.	Mezenchymální kmenové buňky.....	3
3.1	Morfologie .....	3
3.2	Povrchové markery mezenchymálních kmenových buněk.....	4
3.3	Nika mezenchymálních kmenových buněk .....	5
3.4	Mobilita MSC .....	6
IV.	Potenciál MSC regulovat imunitní systém.....	7
4.1	Interakce MSC a dendritických buněk.....	8
4.2	Interakce MSC a NK.....	10
4.3	Interakce MSC a B lymfocytů .....	11
4.4	Interakce MSC a T lymfocytů .....	12
4.4.1	Inhibice solubilními faktory .....	13
4.4.2	Inhibice galektiny .....	14
4.4.3	Inhibice zprostředkována NO.....	15
4.4.4	Inhibice prostřednictvím molekuly HLA-G5 .....	15
4.4.5	Inhibice prostřednictvím TLR .....	16
4.5	Interakce MSC a Treg.....	16
V.	Role MSC v nádorech .....	17
5.1	Mobilita MSC v nádorovém prostředí .....	18
5.2	MSC v nádorové tkáni .....	19
VI.	Role MSC v nádorové terapii .....	21
VII.	Závěr.....	24
VIII.	Použitá literatura.....	25

## Seznam použitých zkratek

APC	antigen presenting cell, antigen prezentující buňka
ATT	$\alpha_1$ -antitrypsin
bFGF	basic fibroblast growth factor, základní růstový faktor fibroblastů
CAF	carcinoma-associated fibroblast, fibroblast asociován s nádorem
CD	cluster of differentiation, diferenciační antigeny
CFU-F	colony forming units fibroblasts
CML	chronic myelogenous leukemia, chronická myeloidní leukémie
Cox	cyklooxygenase, cyklooxygenáza
CRD	carbohydrate-recognition domain
DC	dendritic cells, dendritické buňky
DKK-1	dickkopf-1 protein
DNAM1	DNAX accessory molecule 1
EGF	epidermal growth factor, epidermální růstový faktor
FGF	fibroblast growth factor, fibroblastový růstový faktor
FSP	fibroblast surface protein, fibroblastový povrchový protein
GM-CSF	granulocyte-monocyte colony stimulating factor
GVHD	graft versus host disease, reakce štěpu proti hostiteli
HDGF	hepatoma-derived growth factor
HGF	hepatocyte growth factor, hepatocytový růstový faktor
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen
HSV	herpes simplex virus
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM	intercellular adhesive molecule, mezibuněčná adhezivní molekula
IDO	indolamine 2,3 dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxid synthase, indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
KIR	killer inhibitor receptors
LPS	lipopolysaccharide, lipopolysacharid
MCP	monocyte chemotactic protein

mDC	myeloid dendritic cells, myeloidní dendritické buňky
MHC	major histocompatibility komplex, hlavní histokompatibilní systém
MIC-A	MHC class I polypeptide related sequence A
MLR	mixed lymphocyte reaction
MMP	matrix metalloproteinase
MSC	mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky
NCR	natural cytotoxicity receptors
NKG2D	natural-killer group 2, member D
NO	nitric oxid, oxid dusnatý
pDC	plasmacytoid dendritic cell, plazmacytoidní dendritické buňky
PDGF	platelet-derived growth factor, růstový faktor z destiček
PD-L	programmed death ligand
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
PKR	protein kinase R, protein kináza R
PVR	poliovirus receptor
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tc	cytotoxic T lymphocytes, cytotoxické T lymfocyty
TCM	tumor conditioned medium
TGF	transforming growth factor, transformující růstový faktor
Th	helper T lymphocyte, pomocné T lymfocyty
TNF	tumor necrosis factor, faktor nekrotizující nádor
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
ULBP3	UL16-binding protein 3
uPA	urokinase plasminogen activator, urokinásový aktivátor plazminogenu
VCAM	vascular cell adhesion protein, cévní adhezivní molekula
VEGF	vascular endothelial growth factor, cévní endoteliální růstový faktor
VLA	very late activation antigen, pozdní aktivační antigen



# I. Úvod

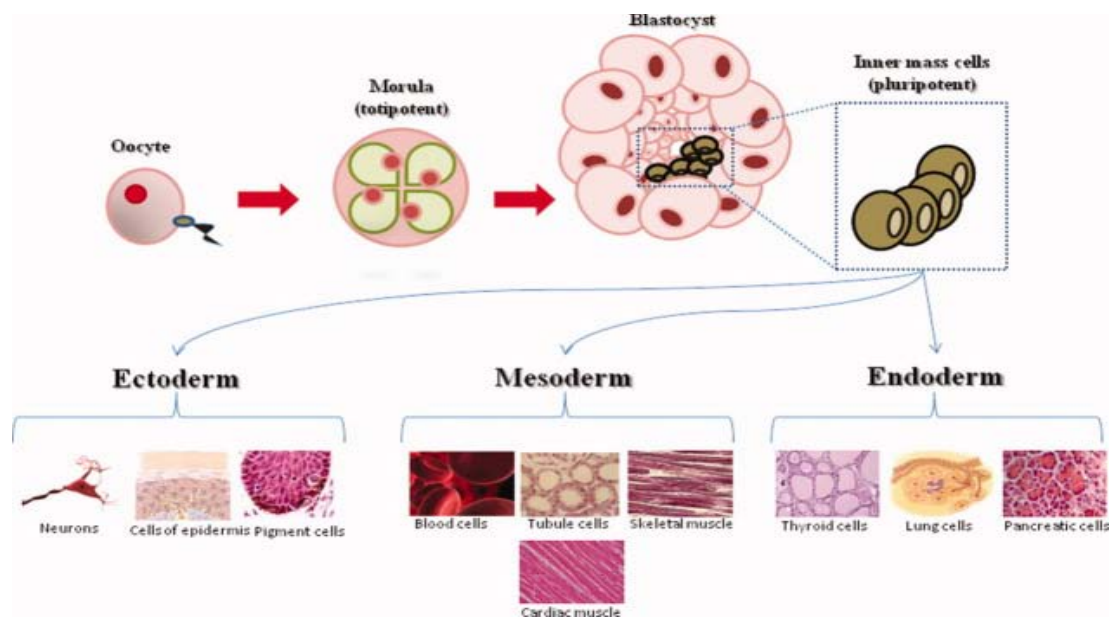
Kmenové buňky se schopností se diferencovat do všech tří zárodečných linií představují slibný nástroj pro využití v terapii. Prvotní záměr, využít embryonální kmenové buňky, se potkal s obtížemi zejména v problému jejich získávání. Proto se výzkum zaměřil na kmenové buňky, které jsou lehké izolovatelné, a dají se snadno kultivovat in vitro.

Alternativou se staly mezenchymální kmenové buňky. MSC mají schopnost se diferencovat do buněk mezodermální, ektodermální a endodermální buněčné linie. Hlavním zdrojem je kostní dřev, ale nacházejí se také v mnoha jiných tkáních, ze kterých je lze izolovat. Ačkoliv zatím není identifikován specifický povrchový marker, je možné pro jejich získávání využít kombinaci dostupných pozitivních a negativních markerů. Kromě diferenciačního potenciálu, mají MSC schopnost interagovat s buňkami imunitního systému a modulovat jejich efektorové funkce a proliferační potenciál. Dále se ukázalo, že alogenní MSC po systémové aplikaci nevyvolávají imunitní reakci, tudíž jsou imunotolerantní a navíc mají schopnost migrovat a preferenčně se usídlit v místě poranění nebo v tkáních, která byla ovlivněná patologickými podmínkami. Imunoregulační vlastnost MSC spolu s diferenciačním potenciálem a schopnost cíleně migrovat se staly hlavním cílem pro jejich využití v transplantační terapii a v potenciální léčbě autoimunitních onemocnění. Navíc vlastnost MSC preferenčně migrovat do místa nádoru spolu s možností jejich genetické modifikace představují nový přístup pro využití buněčné terapie v léčbě nádorů.

## II. Kmenové buňky

Kmenové buňky mají neomezenou schopnost sebeobnovy a potenciál diferencovat se nejméně do jednoho typu terminálně diferencované buňky. U kmenových buněk rozlišujeme dva mechanismy dělení. Asymetrickým dělením vzniká jednak kopie sebe sama, a jednak dceřiná buňka, která se dále diferencuje. Druhým mechanismem, tzv. populační asymetrií, vznikají dvě dceřiné buňky, které mají obě potenciál se stát kmenovou buňkou nebo se jako obě progenitorové buňky dále diferencovat [1].

Rozeznáváme dva základní typy kmenových buněk: embryonální kmenové buňky a kmenové buňky dospělého organismu. Embryonální kmenové buňky získané z oplodněného vajíčka se označují jako totipotentní, mají schopnost se dále diferencovat a vytvářet blastocystu. Kmenové buňky pocházející z vnitřní vrstvy blastocysty (obr. 1), embryoblastu, jsou označovány jako pluripotentní, a postupně formují tři zárodečné vrstvy – ektoderm, mezoderm a entoderm. Kmenové buňky dospělého organismu se nacházejí v mnoha tkáních, jako například kostní dřeň, mozek, srdce, plíce, ledviny a slezina [2]. Představují důležitou složku při udržování homeostázy ve tkáních. Jejich hlavním úkolem je nahrazovat poškozené buňky nebo nahrazovat buňky eliminované apoptózou [3].



**Obr. 1** Embryonální kmenové buňky pocházející z oplodněného vajíčka jsou označovány jako totipotentní buňky, které se dále diferencují a formují blastocystu, z které se vzniká embryo. Blastocysta je složena z dvou druhů buněk, které tvoří vnější obal nazývaný jako trofoblast a vnitřní masu buněk označovanou jako embryoblast. Embryonální kmenové buňky z embryoblastu se mohou diferencovat do tří zárodečných vrstev, ektodermu, mezodermu a endodermu, převzato z [2].

### **III. Mezenchymální kmenové buňky**

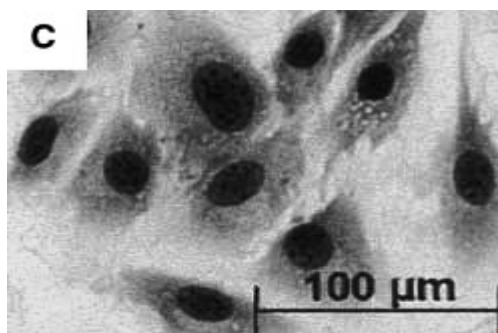
Mezenchymální kmenové buňky jsou nehematopoetické kmenové buňky označovány také jako mezenchymální stromální buňky nebo stromální buňky kostní dřeně. Jsou to primitivní buňky, které se vyvíjejí ze zárodečné vrstvy mezodermu. Hlavním zdrojem mezenchymálních kmenových buněk je kostní dřeň, kde však tvoří pouze 0,01% – 0,001% z celkové populace buněk nacházejících se v kostní dřeni [4]. Kromě kostní dřeně se MSC nacházejí v mnoha dalších tkáních, jako například v tukové tkáni, pupečnickové krvi, choriových klících v placentě, plicích, a játrech [5]. V kostní dřeni tvoří MSC heterogenní populaci buněk složenou s progenitorových buněk v různém stádiu vývoje [6].

Friedenstein et al., popsal mezenchymální kmenové buňky, jako adherentní buňky tvarem podobným fibroblastům, které mají schopnost se diferencovat do adipocytů, chondrocytů a osteocytů. Definoval je jako CFU-F (colony forming units fibroblasts) [7].

Mezenchymální kmenové buňky hrají důležitou roli v udržování homeostázy mikroprostředí v kostní dřeni. Kromě ovlivňování hematopoetických kmenových buněk růstovými faktory, produkují celou řadu proteinů extracelulární matrix jako fibronectin, laminin nebo kolagen [5]. MSC označované jako multipotentní, se mohou diferencovat do buněk mezenchymální a nemezenchymální buněčné linie., v závislosti na růstových a diferenciacích faktorech [8]. Schopnost MSC diferencovat se do různých vývojových linií představuje skvělý nástroj pro terapeutickou aplikaci v tkáňovém inženýrství a genové terapii. Kromě diferenciacího potenciálu, vykazují MSC také schopnost regulovat imunitní systém, což poukazuje na jejich možné využití v transplantaci kostní dřeně a léčbě autoimunitních onemocnění. Velkou výhodou v terapii představuje nízká imunogenicitu alogenních mezenchymálních kmenových buněk [9].

#### **3.1 Morfologie**

MSC izolované z kostní dřeně jsou ploché adherentní buňky o velikosti kolem 90 $\mu$ m s charakteristickým jádrem obsahujícím rozptýlené granule o průměru 30 $\mu$ m (obr. 2) [75]. Morfologické znaky, které odlišují MSC od fibroblastů, představují nepravidelně tvarované jádro a velké množství organel, zejména mitochondrii a golgiho aparátu [76]. Navíc lze pozorovat vřetenovitý tvar MSC, podobající se fibroblastům [6].



**Obr. 2** Morfologická charakterizace MSC izolovaných z kostní dřeně. MSC mají vřetenovitý tvar podobný fibroblastům s nápadným jadérkem nepravidelného tvaru. Obarvené Giemsa-Romanowski. Původně zvětšené 100x, převzato a upraveno z [75].

### 3.2 Povrchové markery mezenchymálních kmenových buněk

Mezenchymální kmenové buňky na svém povrchu exprimují široké spektrum adhezivních molekul, receptorů pro růstové faktory a cytokiny [5]. Abdallah a Kasem, 2008 metodou hmotnostní spektrometrie identifikovali 463 specifických proteinů na membránách jednak nediferencovaných, a jednak in vitro diferencovaných MSC [10].

Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii (ISCT – International Society for Cellular Therapy) navrhla tři základní kritéria, které identifikují MSC [11].

- 1) Za standardních kultivačních podmínek musí být MSC adherentní.
- 2) Více než 95% populace MSC musí na svém povrchu obsahovat diferenciační antigeny (CD - cluster of differentiation) CD105, CD73, CD90. Kromě těchto pozitivních markeru musí méně než 2% populace MSC na svém povrchu exprimovat negativní markery CD45, CD34 (markery hematopoetických progenitorových buněk a endoteliálních buněk), CD14 nebo CD11b (jsou především exprimovány na povrchu monocytu a makrofágu), CD79 $\alpha$  nebo CD19 (markery B lymfocytů) a lidský leukocytární antigen HLA-DR (human leukocyte antigen).
- 3) Za vhodných diferenciačních podmínek se MSC musí in vitro diferencovat v osteoblasty, adipocyty a chondroblasty.

Mezenchymální kmenové buňky exprimují na svém povrchu řadu diferenciačních antigenů, jako jsou například CD44, CD105 (známý jako endoglin), CD106 (vascular cell adhesion molekule, VCAM-1), CD166, CD29, CD73 (známý jako ecto 5' nukleozidáza), CD90 (také označován jako Thy-1), CD117, STRO-1 a Sca-1 [5]. Ačkoliv lidské a myší

MSC exprimují stejné molekuly, MSC z jiných druhů neexprimují stejnou sadu markerů [13]. Proto pro charakterizaci MSC s cílem určit specifický marker, bylo použito mnoho jak pozitivních tak negativních markerů (tab. 1) [2]. Pro mezenchymální kmenové buňky neexistuje jedinečný marker pro jejich identifikaci. Pomocí vhodného výběru pozitivních a negativních markerů je lze s velkou určitostí identifikovat. Nejznámější marker Stro-1, který ve spojení s CD106, podílející se na buněčné adhezi, chemotaxi a signální transdukci, slouží jako důležitá kombinace markeru pro identifikaci MSC [12].

**Tab. 1** Markery použité pro izolaci mezenchymálních kmenových buněk

Pozitivní markery				Negativní markery		
CD9	CD10	CD13	CD29			
CD44	CD49	CD51	CD54	CD45	CD34	CD14
CD58	CD61	CD62L	CD71	CD11c	CD19	CD80/CD40
CD73	CD90	CD102	CD104	CD15	CD18	CD25
CD105	CD106	CD119	CD120	CD31	CD49d	CD50
CD121	CD123	CD124	CD126	CD62E	CD62	CD117
CD127	CD140	CD166	CCR1			
CCR4	CCR7	CXCR5	CCR10			
V-CAM	AL-CAM	J-CAM-1	CD340			
CD349	Stro-1					

### 3.3 Nika mezenchymálních kmenových buněk

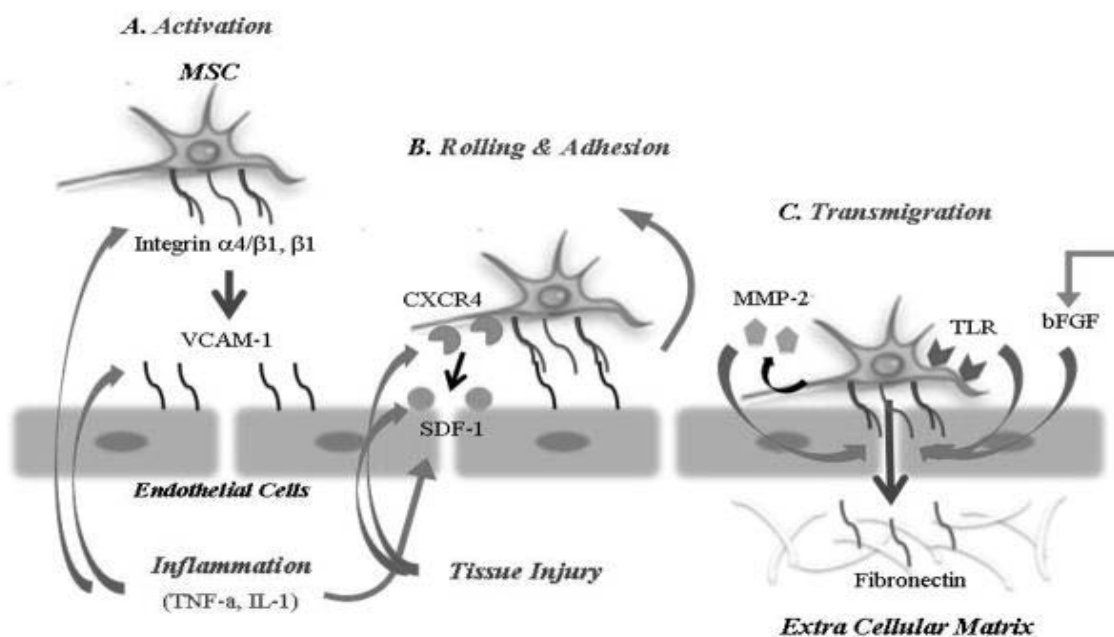
Mezenchymální kmenové buňky lze nalézt v mnoha tkáních. Přesto se ví jen málo o povaze a lokalizaci MSC v nediferencovaném stádiu. Je pravděpodobné, že MSC se nalézají v místech zvaných nika kmenových buněk, která slouží jako rezervoár kmenových buněk [5]. První hypotézu o nice kmenových buněk vytvořil Schofield, který za niku pokládal specifické mikroprostředí v kostní dřeni. Nika kmenových buněk představuje dynamické mikroprostředí reagující na lokální a systémové podněty vedoucí k regulaci kmenových buněk. Podmínky uvnitř niky regulují činnost kmenových buněk, jednak udržování kmenových buněk v klidovém stádiu za nepřítomnosti aktivačních podnětů, a jednak proliferací (symetrickým a asymetrickým dělením) a diferenciací progenitorových buněk [8]. Není zcela jasné, jakými signály jsou MSC uvnitř niky regulovány, tj. zda MSC zůstane v klidovém stavu nebo dojde k diferenciaci. Protože proteiny z rodiny Wnt indukují nediferencované stadium u hematopoetickým kmenových buněk, je pravděpodobné že se také podílejí na regulaci MSC [5]. Je také pravděpodobné, že MSC sídlí v perivaskulární nice, což by vysvětlovalo jejich schopnost migrovat k místním a vzdáleným tkáním jako reakci na poranění či patogenezi onemocnění [8]. V neposlední

řadě se mezenchymální kmenové buňky stále častěji srovnávají s pericyty, s předpokladem, že se můž jednat o jednu a tu samou buňku. Bylo popsáno mnoho nápadných podobností mezi pericyty a MSC, jako například oba typy buněk byly izolovány z krevních cév a exprimují markery Stro-1, CD44, CD90, CD105 a CD145.

### 3.4 Mobilita MSC

Po adekvátním stimulu mohou MSC opouštět svoji niku a přecházet do krevního oběhu. Cirkulující kmenová buňka pod vlivem chemokinů opouští krevní oběh a migruje do místa, kde pod vlivem mikroprostředí vykonává svoji funkci [5]. MSC mají schopnost migrovat do mnoha tkání, ale preferenčně se přemísťují do místa poranění, nebo do tkání, které byly ovlivněné patologickými podmínkami [13]. Tato schopnost MSC byla využita při léčbě různých onemocnění, jako zlomeniny kostí, chrupavek, nebo myokardiálního infarktu [14].

Do zánětlivých oblastí jsou MSC naváděny prostřednictvím chemokinů v interakci s receptory exprimovanými na jejich buněčném povrchu. Honczarenko a kol., 2006 ukázali, že MSC exprimují tři CC chemokinové receptory (CCR1, CCR7, CCR9) a tři CXC chemokinové receptory (CXCR4, CXCR5, CXCR6) [15]. Mechanismus, kterým MSC prostupují cévním endotelem do tkání, je podobný jaký nacházíme u leukocytů. Počáteční fáze zahrnuje proces kutálení, který je následován interakcí mezi povrchem endotelu a MSC, zprostředkovanou P a E selektiny a integrinem  $\alpha 4/\beta 1$ , a také interakcí mezi receptorem CXCR4 a jeho ligandem SDF-1 [2]. Pevná adheze MSC na endotel je zprostředkována vazbou integrinu VCAM-1 na endotelu a VLA-4 (very late activation molecule) exprimovaného na povrchu MSC (obr. 3) [16].



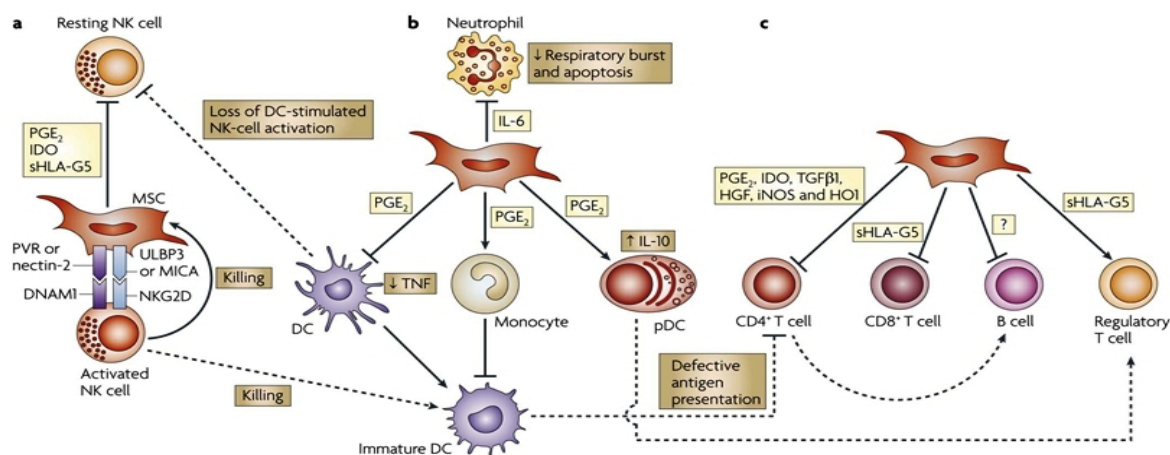
**Obr. 3** MSC mají schopnost migrovat do mnoha tkání. Cévním endotelem prostupují mechanismem podobným, s jakým se můžeme setkat také u leukocytů. Počáteční fáze je zahajovaná interakcí mezi integrinem  $\alpha4/\beta1$  a VCAM-1, exprimovaným na endoteliálním povrchu v zánětlivém prostředí. Podobně jako u T lymfocytů, následuje proces kutálení a adheze na povrchu endotelu, zprostředkovaným mezibuněčným kontaktem mezi CXCR4 na povrchu MSC a jeho ligandem SDF-1, exprimovaného endotelem. Konečná fáze přestupu do extracelulárního matrix zahrnuje interakci mezi integriny a fibronektinem, která je modulována pomocí bFGF (basic fibroblast growth factor), TLR signalizaci a MMP-2 (matrix metalloproteinase) [17].

## IV. Potenciál MSC regulovat imunitní systém

Schopnost MSC se diferencovat do buněk mezodermální buněčné linie spolu se schopností tlumit imunitní systém umožňuje jejich využití pro prevenci a léčbu autoimunitních onemocnění, jako například reakce proti hostiteli (GVHD, graft versus host disease) [18].

Schopnost modulovat imunitní systém byla zpozorována, poté, co bylo zjištěno, že MSC po transplantaci nepodněcují vznik imunitní reakce. MSC exprimují MHC třídy I a nepatrné množství MHC třídy II a FasL, a nexpimují kostimulační molekuly CD80, CD86, CD40 a CD40L. Fenotyp MSC je označován jako neimunogenní neboli imunotolerantní [13, 17]. Protože buňky imunitního systému jsou navzájem provázány vzájemnými interakcemi, imunosupresivní vlastnosti MSC se projevují jak na buňky vrozené, tak adaptivní imunity, včetně NK buněk, dendritických buněk (DC), B lymfocytů a T lymfocytů [18]. Ačkoliv, imunoregulační mechanismus působení MSC není zatím

zcela objasněn, je pravděpodobné, že zahrnuje mezibuněčný kontakt a také působení prostřednictvím sekrečních faktorů (obr. 4) [17].



**Obr. 4** MSC ovlivňují proliferaci a efektorovou funkci buněk imunitního systému prostřednictvím mezibuněčného kontaktu a solubilních faktorů **a**) MSC inhibují proliferaci, cytotoxicitu a produkci cytokinů klidových NK buněk. Tento efekt je zprostředkován  $PGE_2$  (prostaglandin  $E_2$ ), IDO (indolamine 2,3-dioxygenase) a solubilním HLA-G5 produkovanými MSC. Naopak aktivované NK buňky mají schopnost zabít MSC přímým mezibuněčným kontaktem. Na tomto ději se podílí aktivační receptor NKG2D (natural-killer group 2, member D) exprimovaný NK buňkami a jeho ligandy ULBP3 (UL16-binding protein 3) nebo MIC-A (MHC class I polypeptide related sequence A) nacházející se na MSC. Součástí procesu je také interakce mezi molekulami DNAM1 (DNAX accessory molecule 1) a jeho ligandy PVR (poliovirus receptor) a nectin, které jsou exprimované na MSC **b**) MSC inhibují diferenciaci monocyťů do stádia nezralé myeloidní DC (mDC). Mají také schopnost indukovat nezralé stádium v terminálně diferencovaných DC, inhibovat produkci TNF (tumor-necrosis factor) a zvýšit sekreci IL-10 (interleukin-10) plazmacytoidními DC (pDC). Klíčovou roli v těchto dějích hraje  $PGE_2$  produkovaný MSC. Navíc, konstitutivní sekrece IL-6 buňkami MSC vede k narušení respiračního vzplanutí a inhibici apoptózy u neutrofilů **c**) Imunosupresivní efekt MSC se projevuje také v interakci s  $CD4^+$  a  $CD8^+$  naivními T lymfocyty. Efektorové funkce  $CD4^+$  jsou inhibovány prostřednictvím solubilních faktorů  $PGE_2$ , IDO, TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1), HGF (hepatocyte growth factor) a iNOS (inducible nitric-oxide synthase). Tvorba defektních  $CD4^+$  T lymfocytů vede k narušení aktivace B lymfocytů. HLA-G5 produkovaný MSC inhibuje toxicitu  $CD8^+$  T lymfocytů a indukuje spolu s IL-10 nárůst regulačních T lymfocytů. [6].

## 4.1 Interakce MSC a dendritických buněk

Dendritické buňky jsou antigen prezentující buňky (APC). Diferencují se z  $CD34^+$  kmenových buněk kostní dřeně a z krevních monocytů stimulací faktorem stimulujícího kolonie (GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor) a interleukinem-4 (IL-4) in vitro. Hrají klíčovou roli ve vyčtyávání, transportu a prezentaci antigenu, se schopností stimulovat naivní T lymfocyty. Schopnost DC zahájit imunitní reakci závisí na přechodu od antigen zpracovávající k antigen prezentující buňce, v procesu známém jako maturace [19]. Zrání je doprovázeno změnou exprese chemokinových receptorů zejména



CCR7, pomocí kterého reagují na chemokin lymfatických uzlin CCL19, a snížením exprese epiteliálního kotevního proteinu E-kadherinu. Následně v lymfatické uzlině dochází ke zvýšení exprese MHC II třídy, CD80, CD86, které hrají roli v procesu prezentace antigenu spolu s dalšími povrchovými markery jako CD11c a CD83 [6, 20].

MSC mají silný, ale reverzibilní inhibiční účinek na diferenciaci CD34<sup>+</sup> progenitorových buněk a monocytů do nezralých DC [21]. Navíc MSC vykazují inhibiční efekt na diferencované DC, a to jak zralé, tak nezralé DC [19]. MSC inhibují tři základní funkce procesu maturace:

1. Expresi kostimulačních molekul
2. Schopnost prezentovat definovaný antigen
3. Schopnost migrovat podél gradientu

MSC inhibují expresi CCR7, a tudíž i schopnost migrovat podél gradientu CCL19. Inhibují ztrátu tkáňového kotevního proteinu E-kadherinu [20]. Interakce MSC se zralými DC vede k inhibici exprese MHC II třídy, CD11c a CD83, stejně jako kostimulačních molekul CD80, CD86 a HLA-DR, jehož výsledkem je narušení antigen prezentující funkce DC, a tudíž potlačení aktivace a proliferace T lymfocytů [6]. Změna fenotypu zralých DC v tolerogenní fenotyp je závislá na aktivaci MSC mezibuněčným kontaktem s DC [22]. MSC také inhibují sekreci cytokinů myeloidních dendritických buněk jako TNF- $\alpha$ , interferonu- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) a IL-12. Na druhou stranu zvyšují sekreci protizánětlivého cytokinu IL-10 plazmacytoidními DC [21]. Vzhledem k nedostatečné produkci IL-12, snížení exprese MHC II třídy a kostimulačních molekul spolu se zvýšenou sekrecí IL-10, mohou MSC modulovat rovnováhu mezi Th1 a Th2 buňkami ve prospěch protizánětlivé reakce zprostředkované Th2 [19].

Djouad et al., ukázali, že IL-6 a VEGF (vascular endothelial growth factor) produkované MSC, se na inhibičním procesu podílejí pouze okrajově. Klíčovou roli v inhibici diferenciaci a funkce DC hraje PGE<sub>2</sub>, který je MSC produkován konstitutivně [18]. Sekrece PGE<sub>2</sub> se zvyšuje přímým mezibuněčným kontaktem [18], který je navíc nezbytný k zastavení buněčného cyklu monocytů v G<sub>0</sub> fázi, jako důsledek snížené exprese cyklinu D2 [23].

## 4.2 Interakce MSC a NK

NK buňky jsou granulární lymfocyty, které mají důležitou roli v časné obraně hostitele proti infekci a rakovině [24]. Nacházejí se v periferní krvi, kostní dřeni, v primárních a sekundárních lymfatických tkáních. Vykazují cytolytický efekt na nádorové a virem infikované buňky [25]. Jejich funkce je regulovaná skupinou povrchových receptorů, reagujících na molekuly HLA a převádějících inhibiční nebo aktivační signály do nitra buňky. Inhibiční receptory KIR (killer imunoglobulin-like receptor) jsou specifické pro alotypické determinanty společné pro alely HLA třídy I. Klíčovými receptory pro aktivaci NK jsou přirozené cytotoxické receptory (NCR, natural cytotoxicity receptor), včetně NKp46, Nkp30 a NKp44. Na aktivaci se také podílí receptor NKG2D s ligandy MIC-A spolu s ULBP, a také DNAM1, jehož ligandem je PVR a nectin [26]. NK buňky kromě cytotoxické aktivity produkují imunoregulační cytokiny, jako TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, a také řadu chemokinů podílejících se na okamžité imunitní odpovědi. Chemokiny produkované NK buňkami modulují vývoj adaptivní imunitní odpovědi a její interakci s vrozenou imunitou. Proto narušení této funkce může vést ke snížení potence vrozené imunity a inhibici funkce buněk adaptivního imunitního systému [24].

MSC inhibují cytotoxicitu, produkci cytokinů a aktivaci NK buněk v závislosti na jejich funkčním stavu. Také poměr mezi NK buňkami a MSC (NK:MSC) se podílí na inhibičním účinku MSC [25]. MSC inhibují aktivaci klidových NK buněk, které jsou aktivované cytokiny IL-2 a IL-15. Výsledkem je zabránění zvýšené exprese aktivačních receptorů NKp30, NKG2D, NKp44 a CD69, které jsou charakteristické pro aktivované NK a naopak se nevyskytují u klidových NK buněk [27]. Cytokiny aktivované NK mají schopnost lýzovat MSC prostřednictvím ligandů (PVR, Nectin, ULBP, MIC-A) aktivačních receptorů NK buněk, které jsou exprimované na povrchu MSC [25, 26]. Kromě klidových, také aktivované NK buňky mohou být v menší míře inhibovány MSC, ale pouze v prostředí bohatém na IFN- $\gamma$ , který chrání MSC před lyzí aktivovanými NK buňkami [6]. Mechanismus inhibičního efektu MSC je zprostředkován především solubilními faktory, podporován přímým mezibuněčným kontaktem prostřednictvím interakcí adhezivních molekul LFA-1 na povrchu NK a ICAM-1 na buněčném povrchu MSC [26]. Inhibice může probíhat pomocí zpětnovazebné smyčky mezi NK a MSC, na které se mohou podílet také receptory NKG2D a DNAM1. Interleukinem aktivované NK produkují IFN- $\gamma$ , který indukuje produkci PGE<sub>2</sub> aIDO v MSC. PGE<sub>2</sub> inhibuje cytotoxicitu

a produkci cytokinů snížením exprese  $\gamma_c$  řetězce v receptoru pro IL-2 a IL-15. Navíc,IDO katalyzuje degradaci aminokyseliny tryptofanu. Produkt katabolického procesu degradace, L-kynurenin, má schopnost inhibovat expresi aktivačních receptorů NK buněk po aktivaci cytokiny zatím neznámým mechanismem [26, 27, 28].

### 4.3 Interakce MSC a B lymfocytů

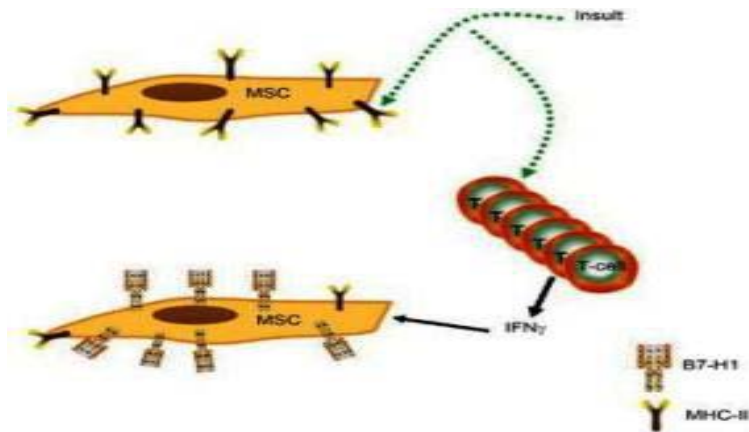
Jeden z hlavních typů buněk podílejících se na adaptivní imunitní odpovědi jsou B lymfocyty, které jsou specializované pro produkci protilátek [6]. Interakce mezi MSC a B lymfocyty vede k inhibici diferenciaci, produkce imunoglobulinů, chemotaxi a proliferaci B lymfocytů [29]. Dále, Rasmusson et al., demonstrovali, že MSC mohou podporovat přežívání, proliferaci a diferenciaci B lymfocytů do plazmatických buněk produkujících protilátky [30]. Ačkoliv, přesný mechanismus působení MSC není zcela objasněn, je pravděpodobně zprostředkován solubilními faktory a také mezibuněčným kontaktem, protože supernatant izolovaný z kultury MSC nemá žádný inhibiční účinek na B lymfocyty [29, 31]. Inhibiční účinek MSC, může být in vivo ovlivňován do jisté míry také MSC zprostředkovanou inhibicí T lymfocytů [6].

Ovlivňování B lymfocytů buňkami MSC nepostihuje expresi HLA-DR, CD80, CD86 nebo CD40, a proto antigen prezentující funkce B lymfocytů je zachována. MSC narušuje migraci B lymfocytů do sekundárních lymfatických orgánů jako výsledek inhibice exprese chemokinových receptorů jako CXCR4, podílející se na adhezi B lymfocytů na cévní stěnu venule s vysokým endotelem lymfatických uzlin, CXCR5 a CXCR7, zodpovědných za chemotaktický pohyb podél gradientu chemokinů CXCL12 a CXCL13 [31, 32]. MSC inhibují B lymfocyty prostřednictvím TGF  $\beta$ , HGF, PGE<sub>2</sub> a IDO, které podobně jako u T lymfocytů zastavují buněčný cyklus B buněk v G<sub>0</sub> fázi buněčného cyklu, ale neindukují apoptózu [32-34]. Asari et al., ukázali, že možným mechanismem který by se mohl podílet na inhibici, je snížení exprese transkripčního faktoru Blmp-1. Za normálních podmínek Blmp-1 potlačuje expresi transkripčních faktorů PAX-5 a Bcl-6 čímž umožňuje diferenciaci B lymfocytů v plazmatické buňky [33].

## 4.4 Interakce MSC a T lymfocytů

Mezenchymální kmenové buňky inhibují proliferaci T lymfocytů aktivované antigenem, směsnou lymfocytární reakci (MLR) nebo mitogeny [35]. Inhibice není omezena na hlavní histokompatibilní komplex (MHC) a je zprostředkována jak alogenními, tak autologními mezenchymálními kmenovými buňkami. Účinek je závislý na poměru mezi MSC:T lymfocyty [36]. MSC působí na primární i sekundární T buněčnou odpověď. Suprese prostřednictvím MSC postihuje paměťové i naivní T lymfocyty, pomocné T lymfocyty ( $T_H$ , helper T cells) a cytotoxické T lymfocyty ( $T_c$ , cytotoxin T cells) [32]. Působení MSC ireverzibilně zastavuje buněčný cyklus T lymfocyt; v  $G_0/G_1$  fázi [6]. Podstatou inhibice buněčného cyklu je blokáce exprese cyklinu D2, který reguluje přechod do  $G_1$  fáze buněčného cyklu následkem zvýšení exprese negativního regulátoru  $p27^{KIP1/WAF1}$  [32].

Inhibiční efekt MSC je zprostředkován solubilními faktory a také mezibuněčným kontaktem. English et al., ukázali, že  $IFN-\gamma$  produkovaný aktivovanými T lymfocyty, je nezbytný pro imunosupresivní funkci MSC [37]. Obě sub-populace T lymfocytů,  $CD4^+$  a  $CD8^+$  T lymfocyty produkují  $IFN-\gamma$  [38]. Při nízké koncentraci  $IFN-\gamma$ , MSC exprimují na svém buněčném povrchu MHC glykoproteiny II třídy, pomocí kterých mohou prezentovat antigen T lymfocytům v rané fázi imunitní odpovědi. Následnou aktivaci T lymfocytů se hladina  $IFN-\gamma$  zvýší a způsobí snížení exprese MHC II třídy, narušení funkce MSC jako antigen prezentující buňky a aktivaci imunosupresivní aktivity. Současně  $IFN-\gamma$  indukuje expresi inhibiční kostimulační molekuly PD-L1 (programmed death ligand 1) na buněčném povrchu MSC. PD-L1 se v mnoha tkáních podílí na inhibici buněčného cyklu [37]. Tento mechanismus by umožňoval MSC fungovat jednak jako APC buňka v rané fázi imunitní odpovědi, a později vykonávat imunosupresivní funkci (obr. 5) [6, 39].



**Obr. 5** Klidové MSC exprimují na svém povrchu MHC II třídy (vlevo nahoře), a proto mohou zastávat funkci antigen prezentujících buněk v rané fázi imunitní odpovědi. Po setkání s cizorodou částicí prezentují na svém povrchu antigen v komplexu s MHC II třídy T lymfocytům. Aktivované T lymfocyty produkují IFN- $\gamma$ , který indukuje pokles exprese povrchových MHC II třídy na MSC. Současně dojde ke zvýšení exprese inhibiční kostimulační molekuly PD-L1 na povrchu MSC. Tak dojde k přesmyku směrem k imunosupresivní funkci MSC, převzato a upraveno z [39].

Inhibice T lymfocytů imunosupresivními MSC vede ke snížení produkce IFN- $\gamma$  T lymfocyty a současně ke zvýšené produkci IL-4. Je pravděpodobné, že MSC indukují změnu pro-zánětlivého stavu, reprezentovaného T<sub>H</sub>1 lymfocyty s produkcí IFN- $\gamma$ , na stav protizánětlivý se zvýšenou hladinou IL-4 produkovaného T<sub>H</sub>2 lymfocyty [40].

#### 4.4.1 Inhibice solubilními faktory

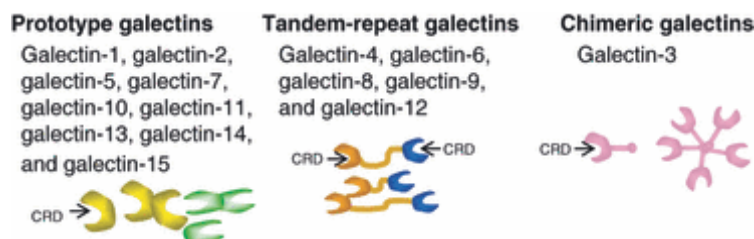
Inhibiční účinek MSC je zprostředkován sekrecí solubilních faktorů jako PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$ 1, IL-10, HGF,IDO [41]. Některé solubilní faktory jsou produkovány konstitutivně, jiné naopak vyžadují dynamickou interakci mezi MSC a T lymfocyty [29]. PGE<sub>2</sub> je lipid syntetizovaný z arachnoidální kyseliny enzymy cyklooxygenáza-1 (cox-1) a cyklooxygenáza-2 (cox-2). Cox-2 je v myších a lidských MSC exprimován konstitutivně. IFN- $\gamma$ , ale nikoliv TNF- $\alpha$  podněcuje expresi enzymu cox-2, a tudíž i syntézu PGE<sub>2</sub> [17]. English et al., demonstrovali za použití indometacinu, inhibitoru enzymu cyklooxygenázy, že PGE<sub>2</sub> je nenahraditelným faktorem v inhibici T lymfocytů prostřednictvím MSC [37]. TGF- $\beta$ 1 a HGF jsou supresivní mediátory proliferace T lymfocytů v MLR [29]. Ačkoliv oba faktory redukuje proliferaci, je nepravděpodobné, že se podílejí na inhibici v zánětlivém prostředí, protože zánětlivé cytokiny IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  redukuje expresi TGF- $\beta$ 1. Dalším faktorem podílejícím se na inhibici, jehož důkazem jsou inhibiční reakce v MLR, je IL-10. Podobně jako v případě TGF- $\beta$ 1, je exprese IL-10 inhibována IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ .

Proto je nepravděpodobné, že v zánětlivém mikroprostředí IL-10 hraje klíčovou roli v inhibici [37].

IDO je syntetizována MSC po indukci IFN- $\gamma$  [17]. Inhibice pomocí IDO může být zprostředkována deplecí esenciální aminokyseliny tryptofanu, jejímž následkem je zastavení buněčného cyklu T lymfocyty, které se tímto stávají citlivé k indukci apoptózy. Na druhou stranu toxické metabolity jako kynurenin a antranilová kyselina, vzniklé katabolismem tryptofanu, mají schopnost indukovat apoptózu v CD4<sup>+</sup> T lymfocytech. Jestli toxické metabolity působí na T lymfocyty přímo nebo prostřednictvím receptoru není známo [42].

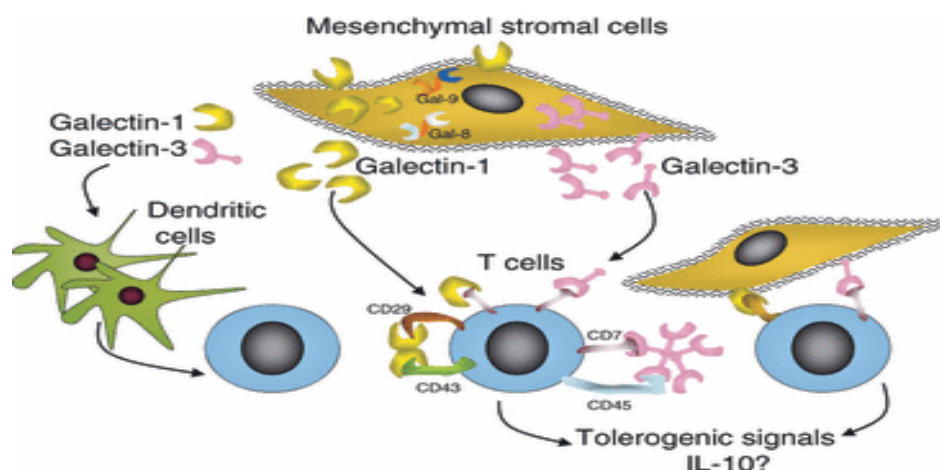
#### 4.4.2 Inhibice galektiny

Galektiny patří do rodiny lektinů vykazujících pleiotropický efekt v imunitním systému. Podle struktury lze galektiny rozdělit do tří skupin (obr. 8). Jsou exprimovány na různých tkáních a buněčných typech jako je placenta či mozek. MSC konstitutivně exprimují galektin-1, galektin-3, galektin-8 a galektin-9.



**Obr. 6** Lidské galektiny dělíme na prototypové, tandemové galektiny a chimérické galektiny. Prototypový galektin obsahuje pouze jednu sacharidy rozpoznávající doménu (CRD, carbohydrate-recognition domain) a proto, může tvořit pouze homodiméri. Tandemové galektiny obsahují dvě různé CRD spojené malým peptidem dlouhým 5-70 aminokyselin. Chimérický galektin je zastoupen pouze galektinem-3, obsahujícím jednu CRD doménu a velké terminální domény bohaté na prolin, glycín a tyrosin, podléhají oligomerizaci a umožňují tvorbu pentaméru, převzato z [43].

Galektin-1 a galektin-3 mohou modulovat proliferaci, genovou expresi, adhezi a migraci T lymfocytů. Inhibice může probíhat přímým účinkem nebo nepřímým účinkem prostřednictvím indukce regulačních DC, které produkují IL-10 (obr. 7) [43, 44].



**Obr. 7** Galektin-1 a galektin-3 se podílejí na inhibici T lymfocytů zprostředkovanou MSC. MSC exprimují galektin-1, galektin-3, galektin-8 a galektin-9. Na rozdíl od galektinu-8 a galektinu-9 se galektin-1 a galektin-3 vyskytují v solubilní formě a v této formě jsou také MSC produkovány. Interakce produkovaného nebo membránově vázaného galektinu s receptorem na T lymfocytech vede k inhibici lymfocytů. Kromě přímé interakce můžou galektiny na T lymfocyty působit nepřímou cestou prostřednictvím indukce tolerogéních DC schopných inhibovat funkci T lymfocytů, převzato z [43].

#### 4.4.3 Inhibice zprostředkována NO

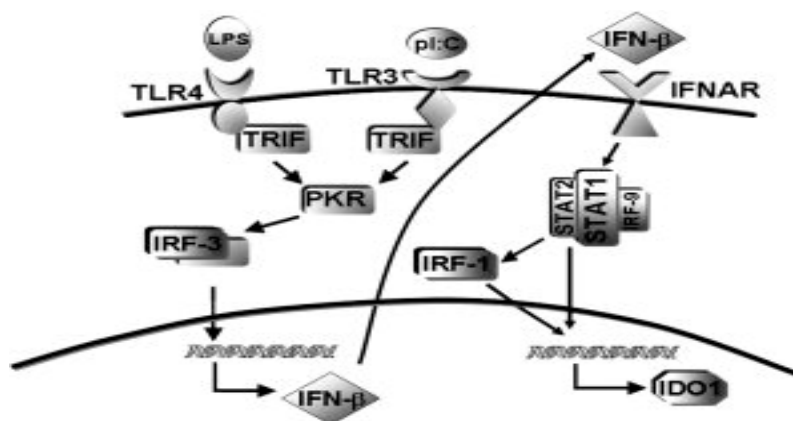
IFN- $\gamma$  ve spolupráci s TNF, IL-1 $\alpha$  a IL-1 $\beta$  může indukovat v MSC sekreci oxidu dusnatého (NO, nitrid oxide), který je syntetizován enzymem NO syntáza. Rozlišujeme tři typy enzymů, indukovatelnou NO syntázu (iNO), endotelialní NO syntázu a nervovou NO syntázu. Na inhibici proliferace T lymfocytů se NO podílí prostřednictvím inhibice fosforylace transkripčního faktoru STAT5 v T lymfocytech (signal transducer and activator of transcription - 5), který hraje kritickou roli v proliferaci T lymfocytů [45].

#### 4.4.4 Inhibice prostřednictvím molekuly HLA-G5

HLA-G je neklasická HLA molekula I třídy, která má inhibiční efekt na buňky imunitního systému. Může být exprimována v 7 různých izoformách, čtyři membránově vázané (HLA-G1 až HLA-G4) a tři solubilní (HLA-G5 až HLA-G7). Poprvé byl identifikován v cytotrofoblastu, kde hraje klíčovou roli v toleranci matky vůči plodu. HLA-G5 se také podílí zatím neznámým mechanismem na inhibici proliferace T lymfocytů a indukuje CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>(forkhead box P3) regulační T lymfocyty (Treg) [6, 41].

#### 4.4.5 Inhibice prostřednictvím TLR

Nejčastěji se vyskytující Toll-like receptory na buněčném povrchu MSC jsou TLR3 a TLR4. Z 13 identifikovaných analogů Toll-like receptorů, MSC navíc exprimují nízkou hladinu TLR1, TLR2, TLR5 a TLR6. Liotta et al., uvádějí, že TLR3 a TLR4 regulují inhibiční účinek MSC na T lymfocyty prostřednictvím Notch receptoru exprimovaného na povrchu T lymfocytů [46]. Regulační mechanismus je založen na inhibici exprese Jagged-1, ligandu Notch receptoru, exprimovaného MSC. Nicméně, Opitz et al., demonstrovali pozitivní účinek receptoru TLR3 a TLR4 na imunosupresivní vlastnosti MSC. Potenciální signální dráha začínající zapojením TLR3 a TLR4 receptoru vede přes aktivaci PKR (protein kinase R), autokrinní signalizaci IFN- $\beta$  k aktivaci STAT-1 a až k syntéze funkčního enzymu IDO, jehož působením dochází k depleci tryptofanu (obr. 8) [47].



**Obr. 8** MSC exprimují receptory TLR3 a TLR4, které se podílejí na imunosupresivních účincích MSC na T lymfocyty. Navázáním ligandu, LPS (lipopolysaccharide) a pi:C (poly-cytidylic-inosinic acid), na receptory TLR3 a TLR4 vede k aktivaci IRF3 (IFN response factor 3), který je závislý na aktivitě PKR. IRF3 indukuje transkripci IFN- $\beta$ , který je uvolňován a autokrinním a parakrinním způsobem se váže a aktivuje IFNAR (interferon- $\alpha/\beta$  receptor). Navázání ligandu vede k fosforylaci STAT1 a transkripci IDO, převzato z [47].

#### 4.5 Interakce MSC a Treg

Možným mechanismem, pomocí kterého mohou MSC modulovat děje v imunitním systému, představuje expanze regulačních CD4<sup>+</sup> T lymfocytů [29], zejména Treg, charakterizovaných transkripčním faktorem Foxp3 [48]. Prevosto et al., ukázali, že na imunosupresivních vlastnostech MSC se mohou podílet také jiné regulační T lymfocyty ze skupiny CD4<sup>+</sup> jako, CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Tr 1), CD4<sup>+</sup>TGF- $\beta$ <sup>+</sup> (Th3) [49]. Interakce MSC



s CD4<sup>+</sup> T lymfocyty vede k nárůstu Treg buněk. Indukce je zprostředkována přímým kontaktem, ale její nepostrádatelnou složkou jsou solubilní faktory, zejména TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> a IL-6 [32, 48]. Ghannam et al., ukázali, že MSC mají schopnost indukovat expresi transkripčního faktoru Foxp3 v T<sub>H</sub>17 lymfocytech a vznik Treg fenotypu. Za přítomnosti IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-21 a IL-23 se mohou také lidské Treg diferencovat v IL-17 produkující buňky. MSC brání diferenciaci naivních CD4<sup>+</sup> T lymfocytů do T<sub>H</sub>17 buněk in vitro a inhibují produkci IL-17, IL-22, IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  diferencovaných T<sub>H</sub>17 lymfocytů. Tento efekt je částečně zprostředkován PGE<sub>2</sub>, který je produkován MSC [50].

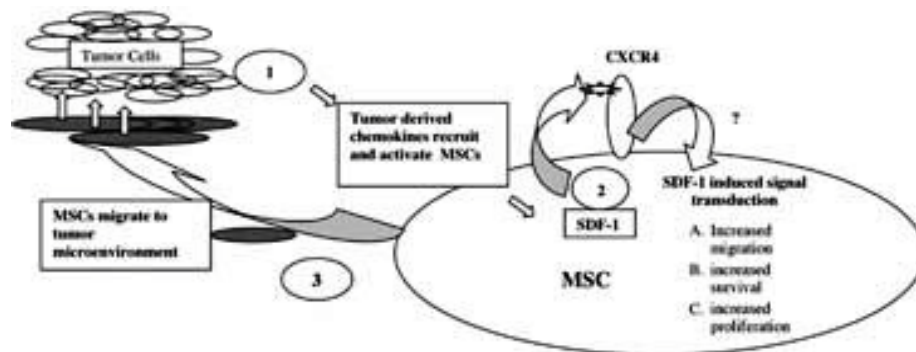
## V. Role MSC v nádorech

Obecně se nádor skládá ze dvou vzájemně propojených kompartmentů. Z parenchymu představující maligní tkáň a stroma, které obsahuje extracelulární matrix, pojivovou tkáň, buňky imunitního systému, cévy a MSC sloužící jako tkáň podpurná. Stroma se nachází mezi maligními buňkami a normální tkání hostitele a hraje klíčovou roli v růstu nádoru [66].

Mobilizace MSC z kostní dřeně do krevního oběhu, je považovaná za fyziologickou reakci vyvolanou endokrinními signály následkem poranění tkáně nebo poškození tkáně patologickou reakcí. MSC migrují do místa zánětu, kde jako trofické faktory se podílejí na narušení zánětlivých reakcí a hojení poškozené tkáně [51]. Podobně jako místo poranění je také vznik nádoru doprovázen desmoplastickou reakcí, která rekrutuje stromální buňky, růstové faktory, cytokiny a proteiny podílející se na přestavbě matrix [52]. Proto MSC migrují a usídľují se do různých nádorů, jako jsou gliomy, melanomy, střevní a pankreatické nádory a nádory prsu, kde se podílejí na proliferaci, vaskularizaci, metastázování, migraci nádorových buněk, a zároveň inhibují jejich apoptózu, čímž napomáhají nádorovému růstu a metastázování. Na schopnosti MSC migrovat a usídľovat v nádorech se podílí mnoho chemokinových molekul, jako CXCL-12 (SDF-1, stromal cell-derived factor-1), CXCR4, CCL2 (MCP-1, Monocyte chemotactic protein-1) a CCR2 [53]

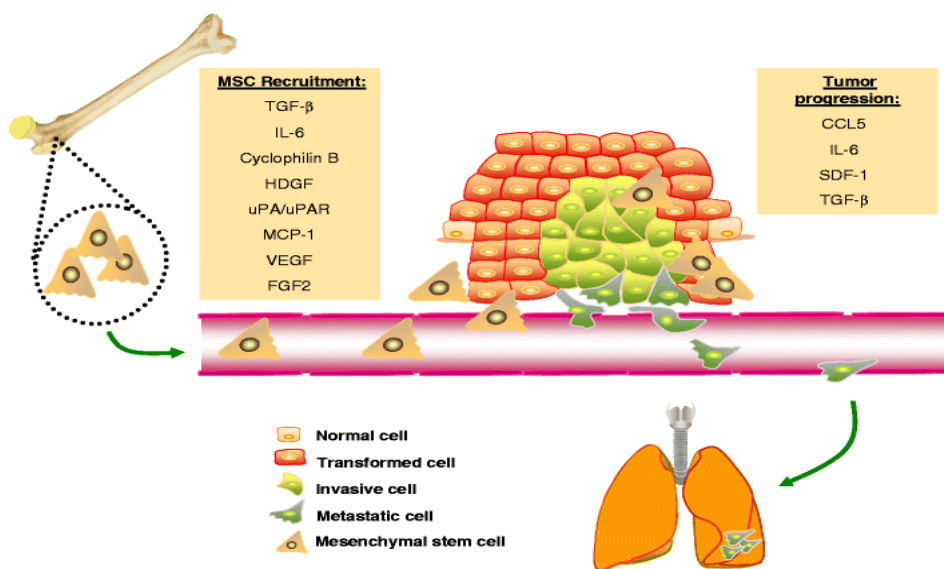
## 5.1 Mobilita MSC v nádorovém prostředí

Jednou z prvních molekul, u které bylo prokázáno, že se podílí na migraci MSC do místa nádoru, byl MCP-1. Je to chemokin podílející se na chemotaxi různých buněk imunitního systému a také je produkován mnoha buňkami, jako jsou fibroblasty či nádorové buňky. Ačkoliv MCP-1 byl schopný zvýšit chemotaxi MSC do místa nádoru, jeho neutralizace měla pouze okrajový efekt. Proto je pravděpodobné, že se na tomto procesu podílejí také jiné signální molekuly [51, 54]. Další chemotaktické faktory produkovány nádorovými buňkami, které uvádějí Lin et al., podílející se na migraci MSC do nádoru jsou cyklofilin B (cyclophilin B) a HDGF (hepatoma-derived growth factor) [55]. Také Beckermann et al., ukázali, že MSC migrují směrem k nádorovým buňkám za pomoci růstových faktorů produkováných nádorem, pro které MSC exprimují na svém povrchu receptory. Jako nejsilnější chemoatraktant uvádějí PDGF (platelet-derived growth factor), za kterým následuje EGF (epidermal growth factor) a VEGF (vascular endothelial growth factor) [56]. Dalším možným mediátorem podílejícím se na migraci MSC s preferencí směrem k nádorovým buňkám představuje urokinasový aktivátor plazminogenu (u-PA). U-PA zvyšuje afinitu MSC k nádorovým buňkám nepřímo, pravděpodobně prostřednictvím cytokinů, růstových faktorů a chemokinů, jako například VEGF [51, 57]. V 60 % případu dojde u nádoru prsu k tvorbě metastáz do kosti, která je zprostředkováná především cirkulujícími nádorovými buňkami. Halpern et al., uvedly, že MSC kostní dřeně mají schopnost prostřednictvím produkováných chemokinů CXCL1 a CXCL5, které se podílejí také v migraci leukocytů, rekrutovat cirkulující nádorové buňky, a tím přispívat k tvorbě metastáz. CXCL1 a CXCL5 se vážou na receptor CXCR2, který je exprimován nádorovými buňkami. Je nutné podotknout, že nádorové buňky také produkují chemokiny CXCL1 a CXCL5, i když v daleko menší míře než bylo pozorováno u MSC [58]. Po kultivaci MSC v TCM (tumor conditioned medium), indukují faktory produkované nádorovými buňkami expresi 104 genu v MSC, zejména SDF-1, BMP-6 a glutathion transferázu. Menon et al., demonstrují, že právě SDF-1 hraje kritickou roli v migraci MSC, autokrinním působením přes receptor CXCR4 (obr. 9) [59].



**Obr. 9** Cytokiny a chemokiny produkované nádorovými buňkami rekrutují MSC do místa nádoru. Signální molekuly nádorového prostředí následně interagují s receptory na povrchu MSC a indukují zvýšení SDF-1. Produkovaný SDF-1 autokrinně zvyšuje proliferaci, a migraci MSC do místa nádoru, převzato z [59].

Rattigan et al., demonstrovali roli IL-6 v migraci MSC směrem k nádorovým buňkám prsu. Interakce mezi receptorem na povrchu MSC a IL-6 produkovaným nádorovými buňkami vede k stimulaci STAT3 a současně k aktivaci migrace MSC (obr. 10) [60].



**Obr. 10** Mezenchymální kmenové buňky migrují preferenčně do místa nádoru chemotaxi zprostředkovanou chemokiny produkovanými nádorovými buňkami. Ve tkáni nádoru podporují růst a metastázi. Mezi tyto chemokiny patří TGF- $\beta$ , IL-6, cyklofilin B, uPA/uPAR, MCP-1 a VEGF, převzato z [51].

## 5.2 MSC v nádorové tkáni

Imunosupresivní vlastnosti MSC a schopnost migrovat preferenčně do místa nádoru, pravděpodobně vytváří ideální prostředí podporující růst a metastázování. Djouad et al., demonstrovali, že po systémové aplikaci MSC spolu s melanomovými buňkami, jsou

lokalizovány ve stroma obklopující nádor, a dochází k rozvoji nádoru v imunokompetentním příjemci [61]. Navíc Karnoub et al., ukázali, že sekrece CCL5 buňkami MSC byla výrazně zvýšená v kultivaci s nádorovými buňkami prsu a závislá na mezibuněčném kontaktu obou typu buněk. Interakce CCL5 s CCR5 receptorem exprimovaným nádorovými buňkami se podílí na schopnosti nádoru prsu metastázovat do plic, prostřednictvím extravazace nádorových buněk [52]. Také Molloy et al., ukázali aditivní účinek MSC na sekreci CCL2 nádorovými buňkami prsu, který se aktivně podílí v mikroprostředí nádoru na angiogenezi a metastázování [54].

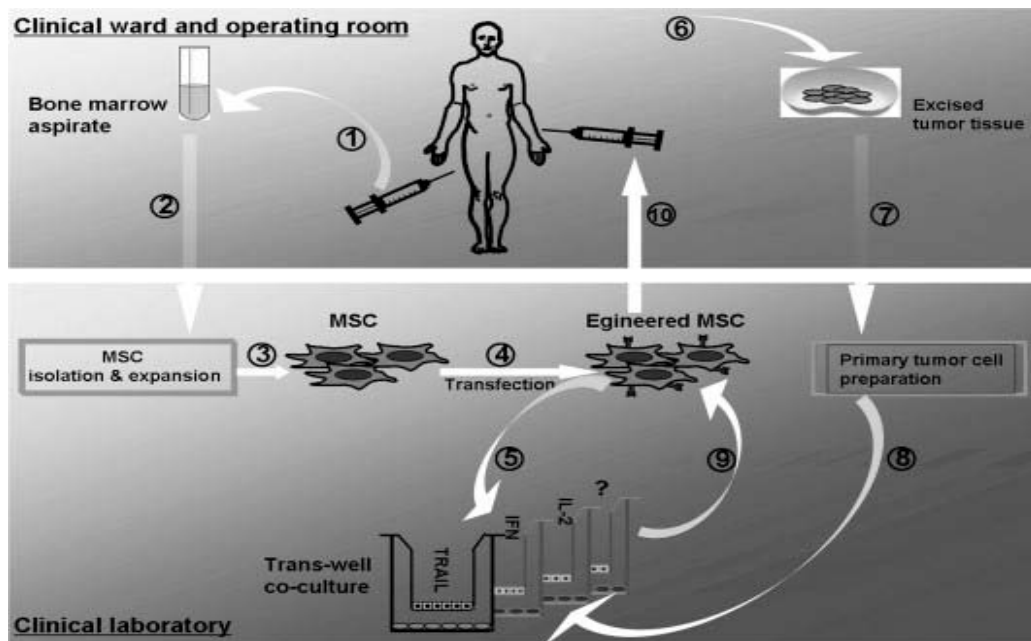
Nádorová hypoxie je typickým znakem některých druhů tumorů. Za bazálních podmínek MSC produkují VEGF [61]. Beckermann et al., demonstrovali, že v prostředí za sníženého obsahu kyslíku-hypoxii in vitro, nádorové buňky pankreatu exprimují HIF-12, který indukuje zvýšenou sekreci VEGF buňkami MSC. Ačkoliv schopnost MSC diferencovat se do endotelových buněk v interakci s nádorovými krevními cévami in vitro a in vivo nebyla pozorována, právě mechanismem sekrece VEGF se MSC mohou podílet na tvorbě krevních cév v rostoucích nádorech [56].

Mezenchymální fibroblasty nacházející se v nádorovém prostředí jsou také označovány jako aktivované nebo asociované fibroblasty s nádorem (CAF, carcinoma-associated fibroblast). Ačkoliv tkáňový původ CAF není znán, mají některé své funkce společné se MSC a proto je pravděpodobné, že se z nich také vyvíjejí. Je známo, že CAF se aktivně podílejí na angiogenezi nádorů [62]. Mishra et al., demonstrovali, že po kultivaci v médiu získaného z nádorových buněk po dobu 30 dnů, MSC vykazují charakteristické chování pro CAF a také vykazují vysokou expresi CAF markerů [63]. Tyto nálezy také potvrdili Shinigawa et al., kteří, pozorovali, že MSC exprimují  $\alpha$ -SMA, vimentin, FSP (fibroblast surface protein) a trvalou sekreci SDF-1 [53]. MSC byly také použity v patologii několika forem hematologických malignit, u kterých byl naopak pozorován inhibiční účinek MSC na růst nádoru [62]. Interakce MSC s buňkami chronické myeloidní leukemie (CML) vedla k inhibici proliferaci nádorových buněk mechanismem nezávislým na mezibuněčném kontaktu a zprostředkován solubilním Dkk-1. Dkk-1 produkovaný MSC inhibuje kanonickou WNT signální dráhu, a tudíž inhibuje proliferaci buněk CML [64].

## VI. Role MSC v nádorové terapii

Špatná prognóza agresivních nebo metastatických nádorů spolu s nežádoucími vedlejšími efekty dostupných léčebných metod vyžaduje vývoj nových efektivnějších protinádorových postupů. MSC izolované z různých tkání vykazují schopnost migrovat do místa nádoru. Na základě této vlastnosti mohou být MSC využity pro cílenou distribuci protinádorových genů do invazivních a metastatických nádorů (obr. 11) [65]. Terapeutické geny, které byly vloženy do MSC a distribuovány do tumorů s vysokou selektivitou mohou představovat enzymy aktivující proléčivo (cystein deamináza, karboxylesteráza, tymidinkináza), interleukin (IL-2, IL-12, IL-4, IL-23), IFN- $\beta$ , geny indukující apoptózu tumorů (TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) a metaloproteináza (PEX) [66]. MSC použité pro terapeutické účely jako nosiče musí být nejprve geneticky upraveny pomocí vektoru, aby produkovali potřebné terapeutikum. Nejčastěji se jedná o protein nebo peptid s dočasnou nebo stabilní expresí zprostředkovanou transdukcí MSC, pro kterou byly použity nejčastěji adenovirus, retrovirus, HSV-1 a HIV typu I [65].

Nádorové buňky mnoha nádorů jsou senzitivní na působení IFN- $\beta$ , který představuje antiangiogenní a antimetastatickou molekulu. Antiangiogenní efekt IFN- $\beta$  je zprostředkován inhibicí migrace endotelových buněk a také snížením exprese FGF. Přímý protinádorový efekt IFN vede přes stimulaci imunitní odpovědi zprostředkovanou MHC třídy I, zvýšenou aktivitou T<sub>C</sub> lymfocytů, makrofágů a NK buněk. Systémové podání účinných vysokých dávek je limitováno nadměrnou toxicitou [67]. Jeden z prvních, který využil MSC jako nosič pro IFN- $\beta$  do nádorového prostředí byl Studeny et al., kteří použili MSC izolované z kostní dřeně a následně geneticky modifikovány adenovirovým vektorem nesoucím gen pro IFN- $\beta$  [68]. Také Nakamizo et al., na gliomech [69] a Kumar et al., na metastázách nádoru prsu v plicích ukázali, že za použití MSC transdukovaných rAVV (recombinant adeno-associated virus) kódující myší IFN- $\beta$  vede k výrazné redukci objemu nádoru, zvýšenému počtu apoptických nádorových buněk, snížení proliferace nádorových buněk a počtu krevních cév [67].

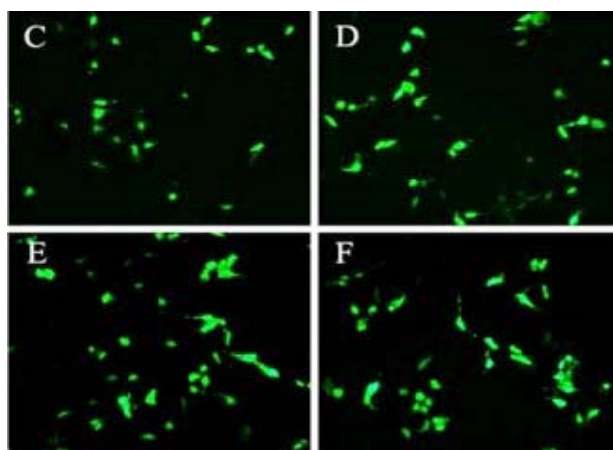


**Obr. 11** Pacienti v pokročilém stádiu rakoviny podstupují chirurgickou léčbu, která tak poskytuje přímý přístup k nádorové tkáni a její identifikaci, a činí tak možné využití tohoto klinického modelu individuální léčby rakoviny zprostředkovaném geneticky upravenými MSC. Horní panel představuje klinické oddělení nebo operační sál spolu s laboratoří, na dolním panelu jsou v tomto klinickém modelu vzájemně propojeny. Nejprve je 10-15 ml aspirátu kostní dřeně odebráno pacientovi (1). Následně dojde k izolaci a expanzi MSC ex vivo. Tento krok se skládá ze dvou částí. Prvním krokem je oddělení jaderných buněk gradientovou centrifugací a adhezivní kultivace. Druhým krokem je pak namnožení pasážováním pro získání potřebného množství buněk vzhledem na celkovou hmotnost pacienta (2). Dalším krokem v postupu představuje kontrola kvality a charakteristik MSC buněk (3). Tímto způsobem vybrané MSC podstupují transdukcii protinádorových genů pomocí specifických vektorů. Podle typu rakoviny mohou být přenášeny například geny pro IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 nebo IL-12 (4). Dalším krokem je určit citlivost nádorových buněk na různě geneticky upravené MSC za použití například transwell systému, ve kterém se pozoruje životaschopnost nádorových buněk (5). Vzorek nádoru je excízi odebrán a udržován na ledě v aseptickém prostředí (6). Před použitím v transwell systému je určen počet buněk a jejich životaschopnost (7). Následně jsou kultivovány spolu s geneticky upravenými MSC (8) a připraveny pro transplantaci (9). Způsob podání do pacienta si však vyžaduje individuální posouzení v souvislosti s typem nádorů (10), převzato z [66].

Protože existuje velké množství variací v populaci pacientů s rakovinou, s ohledem na přípravu MSC, je nepravděpodobné očekávat jediný terapeutický model [66]. TRAIL představuje slibnou molekulu z rodiny TNF, která indukuje apoptózu v různých nádorech. Rozeznáváme membránově vázaný protein, z kterého působením cysteinových proteáz vzniká jeho solubilní forma. Apoptický efekt vyžaduje vazbu na receptor smrti a následnou aktivaci kaspázy-8 a indukci apoptózy [70]. Využití MSC izolovaných z kostní dřeně [71] a z tukové tkáně [70] transdukovaných TRAIL na modelech nádorů pankreatu, střeva a gliomu, vedlo k indukci apoptózy a redukci objemu nádoru. Aplikace toho postupu v kombinaci s tradiční chemoterapií může představovat nový přístup v nádorové terapii [71]. Novou možnost v terapii mozkových nádorů, demonstrovali Nakamura et al., který použili MSC transdukované adenovirovým vektorem kódujícím IL-2. Výsledkem bylo

zvýšení protinádorového efektu MSC a prodloužení přežívání modelových myší [72]. Navíc byly MSC použity v genové terapii jako nosiče pro IL-12 v Ewingovém sarkomu s protinádorovým účinkem [73].

Angiogeneze hraje klíčovou roli v růstu nádorů a jejich metastázování [66]. Protože prvním krokem je proteolytický proces degradace extracelulární matrix, zprostředkovaný serinovými proteázami, inhibice tohoto procesu by mohla vést také k regulaci angiogeneze nádorů. Hlavním inhibítorem lidské serinové proteázy je AT $\alpha$ 1 ( -antitrypsín), který je produkován zejména játry. Použití ATT transdukovaných MSC na HUVEC (human umbilical cord vein endothelial cells) představujících in vitro model angiogeneze, vedlo ke snížení proliferace HUVEC jako důsledek zvýšené apoptózy buněk (obr. 12). Proto geneticky modifikované MSC produkující ATT by mohly mít terapeutické využití v inhibici angiogeneze nádorů [74].



**Obr. 12** Proliferace HUVEC byla inhibována geneticky upravenými MSC produkujícími ATT protein a znázorněna imunohistochemickým barvením. Horní panely (C, D) reprezentují kultivaci transdukovaných MSC spolu s HUVEC, kde došlo k výraznému snížení počtu buněk. Naopak dolní panely (E, F) představují kultivaci nemodifikovaných MSC spolu s HUVEC, kde bylo pozorováno pouze nepatrné snížení počtu buněk, převzato a upraveno z [74].

K dnešnímu dni, byla řada protinádorových genů navržena pro modulaci MSC s úspěšným protinádorovým účinkem v různých modelech nádorů jako IFN- $\alpha$  v melanomu, IFN- $\beta$  v nádoru pankreatu, IFN- $\gamma$  v leukémii, IL-2 na gliomu, IL-12 na melanomu a nádoru jater, NK4 v nádoru plic a TRAIL v nádoru prsu a nádoru plic [66].

## VII. Závěr

MSC jsou multipotentní kmenové buňky, které se vyvíjejí z mezodermy. Na rozdíl od ostatních kmenových buněk mají schopnost se diferencovat také do buněk ektodermální a endodermální zárodečné linie. Největší množství MSC se nachází v kostní dřeni, kde přesto tvoří pouze malou část všech buněk kostní dřene. V dospělém organismu pravděpodobně sdílí perivaskulární niku, vzhledem k možnosti migrovat do vzdálených či lokálních tkání. Jsou to adherentní ploché buňky, které nemají specifický marker, a proto se při jejich izolaci využívá kombinace pozitivních a negativních markerů. Kromě diferenciačního potenciálu mají MSC také imunoregulační vlastnosti. Jsou zprostředkovány jednak solubilními faktory, jako HLA-G5, IDO, PGE<sub>2</sub>, TGF-β, NOS, a jednak přímým kontaktem MSC s efektorovými buňkami imunitního systému. Imunoregulační efekt MSC je charakterizován inhibicí zánětlivé imunitní odpovědi, která je zprostředkována T<sub>H</sub>1 lymfocyty a vysokou hladinou IFN-γ, a zejména v protizánětlivou imunitní odpověď. Protože exprimují velmi málo molekul MHC třídy I a nemají na svém povrchu kostimulační molekuly CD80 a CD86 mohly by být přínosem pro léčbu mnohých autoimunitních onemocnění. Kromě imunoregulačních vlastností mají MSC schopnost migrovat preferenčně do poškozených tkání a také do místa rostoucího nádoru. Otázkou zůstává, zda MSC podporuje či inhibuje růst a metastázování nádorů. V důsledku schopnosti inhibovat imunitní systém spolu s diferenciačním potenciálem je pravděpodobné, že vytvářejí ideální prostředí pro růst nádoru. Bylo však zaznamenáno několik studií, které pojednávaly o inhibiční funkci MSC v nádorech. Na základě vlastností MSC se preferenčně přemísťovat do místa nádorů, by mohly být využity pro cílenou distribuci protinádorových genů do invazivních a metastatických nádorů. Řada protinádorových genů byla navržena pro genetickou modifikaci MSC, jako IFN-γ v leukémiích, IL-12 v melanomu a nádoru jater, nebo TRAIL v nádoru prsu či v nádoru plic. MSC tak představují velký přínos pro využití buněčné terapie v léčbě nádorů.



## VIII. Použitá literatura

- [1] F. M. Watt and B. L. M. Hogan, "Out of Eden: Stem cells and their niches," *Science*, vol. 287, pp. 1427-1430, Feb 2000.
- [2] H. K. Salem and C. Thiemermann, "Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status," *Stem Cells*, vol. 28, pp. 585-596, Mar 2010.
- [3] L. H. Li and T. Xie, "Stem cell niche: Structure and function," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 21, pp. 605-631, 2005.
- [4] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells," *Science*, vol. 284, pp. 143-147, Apr 1999.
- [5] S. Bobis, D. Jarocha, and M. Majka, "Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications," *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, vol. 44, pp. 215-230, 2006.
- [6] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia, "Mesenchymal stem cells in health and disease," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, pp. 726-736, Sep 2008.
- [7] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhyan, N. V. Latsinik, A. F. Panasyuk, and I. V. Keiliss-Borok, "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo," *Transplantation*, vol. 17, pp. 331-40, Apr 1974.
- [8] N. Z. Kuhn and R. S. Tuan, "Regulation of Stemness and Stem Cell Niche of Mesenchymal Stem Cells: Implications in Tumorigenesis and Metastasis," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 222, pp. 268-277, Feb 2010.
- [9] F. Djouad, L. M. Charbonnier, C. Bouffi, P. Louis-Pence, C. Bony, F. Apparailly, C. Cantos, C. Jorgensen, and D. Noel, "Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism," *Stem Cells*, vol. 25, pp. 2025-2032, Aug 2007.
- [10] B. M. Abdallah and M. Kassem, "Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications," *Gene Therapy*, vol. 15, pp. 109-116, Jan 2008.
- [11] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, and E. M. Horwitz, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, vol. 8, pp. 315-317, Aug 2006.
- [12] C. M. Kolf, E. Cho, and R. S. Tuan, "Mesenchymal stromal cells - Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation," *Arthritis Research & Therapy*, vol. 9, 2007.
- [13] G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, and J. Middleton, "Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing," *Stem Cells*, vol. 25, pp. 2739-2749, Nov 2007.
- [14] V. Sordi, M. L. Malosio, F. Marchesi, A. Mercalli, R. Melzi, T. Giordano, N. Belmonte, G. Ferrari, B. E. Leone, F. Bertuzzi, G. Zerbin, P. Allavena, E. Bonifacio, and L. Piemonti, "Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets," *Blood*, vol. 106, pp. 419-427, Jul 2005.
- [15] M. Honczarenko, Y. Le, M. Swierkowski, I. Ghiran, A. M. Glodek, and L. E. Silberstein, "Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors," *Stem Cells*, vol. 24, pp. 1030-1041, Apr 2006.

- [16] B. Ruster, S. Gottig, R. J. Ludwig, R. Bistrrian, S. Muller, E. Seifried, J. Gille, and R. Henschler, "Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells," *Blood*, vol. 108, pp. 3938-3944, Dec 2006.
- [17] H. Yagi, A. Soto-Gutierrez, B. Parekkadan, Y. Kitagawa, R. G. Tompkins, N. Kobayashi, and M. L. Yarmush, "Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Immunomodulation and Homing," *Cell Transplantation*, vol. 19, pp. 667-679, 2010.
- [18] G. M. Spaggiari, H. Abdelrazik, F. Becchetti, and L. Moretta, "MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E(2)," *Blood*, vol. 113, pp. 6576-6583, Jun 2009.
- [19] X. X. Jiang, Y. Zhang, B. Liu, S. X. Zhang, Y. Wu, X. D. Yu, and N. Mao, "Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells," *Blood*, vol. 105, pp. 4120-4126, May 2005.
- [20] K. English, F. P. Barry, and B. P. Mahon, "Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation," *Immunology Letters*, vol. 115, pp. 50-58, Jan 2008.
- [21] A. J. Nauta, A. B. Kruisselbrink, E. Lurvink, R. Willemze, and W. E. Fibbe, "Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34(+)-derived and monocyte-derived dendritic cells," *Journal of Immunology*, vol. 177, pp. 2080-2087, Aug 2006.
- [22] Q. Wang, B. Sun, D. Wang, Y. Ji, Q. Kong, G. Wang, J. Wang, W. Zhao, L. Jin, and H. Li, "Murine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Cause Mature Dendritic Cells to Promote T-Cell Tolerance," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 68, pp. 607-615, Dec 2008.
- [23] R. Ramasamy, H. Fazekasova, E. W. F. Lam, I. Soeiro, G. Lombardi, and F. Dazzi, "Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle," *Transplantation*, vol. 83, pp. 71-76, Jan 2007.
- [24] P. A. Sotiropoulou, S. A. Perez, A. D. Gritzapis, C. N. Baxevanis, and M. Papamichail, "Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells," *Stem Cells*, vol. 24, pp. 74-85, Jan 2006.
- [25] A. Poggi, C. Prevosto, A. M. Massaro, S. Negrini, S. Urbani, I. Pierri, R. Saccardi, M. Gobbi, and M. R. Zocchi, "Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: Role of NKp30 and NKG2D receptors," *Journal of Immunology*, vol. 175, pp. 6352-6360, Nov 2005.
- [26] G. M. Spaggiari, A. Capobianco, S. Becchetti, M. C. Mingari, and L. Moretta, "Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation," *Blood*, vol. 107, pp. 1484-1490, Feb 2006.
- [27] G. M. Spaggiari, A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M. C. Mingari, and L. Moretta, "Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2," *Blood*, vol. 111, pp. 1327-1333, Feb 2008.
- [28] M. Della Chiesa, S. Carlomagno, G. Frumento, M. Balsamo, C. Cantoni, R. Conte, L. Moretta, A. Moretta, and M. Vitale, "The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46-and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function," *Blood*, vol. 108, pp. 4118-4125, Dec 2006.
- [29] A. J. Nauta and W. E. Fibbe, "Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells," in *Blood*. vol. 110, ed United States, 2007, pp. 3499-506.

- [30] I. Rasmusson, K. Le Blanc, B. Sundberg, and O. Ringden, "Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 65, pp. 336-343, Apr 2007.
- [31] A. Corcione, F. Benvenuto, E. Ferretti, D. Giunti, V. Cappiello, F. Cazzanti, M. Risso, F. Gualandi, G. L. Mancardi, V. Pistoia, and A. Uccelli, "Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions," *Blood*, vol. 107, pp. 367-372, Jan 2006.
- [32] M. Shi, Z. W. Liu, and F. S. Wang, "Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 164, pp. 1-8, Apr 2011.
- [33] S. Asari, S. Itakura, K. Ferreri, C. P. Liu, Y. Kuroda, F. Kandeel, and Y. Mullen, "Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation," *Experimental Hematology*, vol. 37, pp. 604-615, May 2009.
- [34] F. Schena, C. Gambini, A. Gregorio, M. Mosconi, D. Reverberi, M. Gattorno, S. Casazza, A. Uccelli, L. Moretta, A. Martini, and E. Traggiai, "Interferon-gamma-Dependent Inhibition of B Cell Activation by Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Murine Model of Systemic Lupus Erythematosus," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 62, pp. 2776-2786, Sep 2010.
- [35] R. Yanez, A. Oviedo, M. Aldea, J. A. Bueren, and M. L. Lamana, "Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells," *Experimental Cell Research*, vol. 316, pp. 3109-3123, Nov 2010.
- [36] R. Ramasamy, C. K. Tong, H. F. Seow, S. Vidyadaran, and F. Dazzi, "The immunosuppressive effects of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells target T cell proliferation but not its effector function," *Cellular Immunology*, vol. 251, pp. 131-136, 2008.
- [37] K. English, F. P. Barry, C. P. Field-Corbette, and B. P. Mahon, "IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells," *Immunology Letters*, vol. 110, pp. 91-100, Jun 2007.
- [38] H. M. Sheng, Y. Wang, Y. Q. Jin, Q. Y. Zhang, Y. Zhang, L. Wang, B. Shen, S. Yin, W. Liu, L. Cui, and N. L. Li, "A critical role of IFN gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1," *Cell Research*, vol. 18, pp. 846-857, Aug 2008.
- [39] P. Rameshwar, "IFN gamma and B7-H1 in the immunology of mesenchymal stem cells," *Cell Research*, vol. 18, pp. 805-806, Aug 2008.
- [40] S. Aggarwal and M. F. Pittenger, "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses," *Blood*, vol. 105, pp. 1815-1822, Feb 2005.
- [41] Z. Selmani, A. Naji, I. Zidi, B. Favier, E. Gaiffe, L. Obert, C. Borg, P. Saas, P. Tiberghien, N. Rouas-Freiss, E. D. Carosella, and F. Deschaseaux, "Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4(+)CD25(high)FOXP3(+) regulatory T cells," *Stem Cells*, vol. 26, pp. 212-222, 2008.
- [42] A. L. Mellor and D. H. Munn, "IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism," *Nature Reviews Immunology*, vol. 4, pp. 762-774, Oct 2004.
- [43] M. Sioud, "New Insights into Mesenchymal Stromal Cell-Mediated T-Cell Suppression Through Galectins," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 73, pp. 79-84, Feb 2011.
- [44] M. Sioud, A. Mobergslien, A. Boudabous, and Y. Floisand, "Evidence for the Involvement of Galectin-3 in Mesenchymal Stem Cell Suppression of Allogeneic T-Cell Proliferation," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 71, pp. 267-274, Apr 2010.
- [45] K. Sato, K. Ozaki, I. Oh, A. Meguro, K. Hatanaka, T. Nagai, K. Muroi, and K. Ozawa, "Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells," *Blood*, vol. 109, pp. 228-234, Jan 2007.

- [46] F. Liotta, R. Angeli, L. Cosmi, L. Fili, C. Manuelli, F. Frosali, B. Mazzinghi, L. Maggi, A. Pasini, V. Lisi, V. Santarlasci, L. Consoloni, M. L. Angelotti, P. Romagnani, P. Parronchi, M. Krampera, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato, "Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing notch signaling," *Stem Cells*, vol. 26, pp. 279-289, 2008.
- [47] C. A. Opitz, U. M. Litzemberger, C. Lutz, T. V. Lanz, I. Tritschler, A. Koppel, E. Tolosa, M. Hoberg, J. Anderl, W. K. Aicher, M. Weller, W. Wick, and M. Platten, "Toll-Like Receptor Engagement Enhances the Immunosuppressive Properties of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Inducing Indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via Interferon-beta and Protein Kinase R," *Stem Cells*, vol. 27, pp. 909-919, 2009.
- [48] K. English, J. M. Ryan, L. Tobin, M. J. Murphy, F. P. Barry, and B. P. Mahon, "Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells," in *Clin Exp Immunol.* vol. 156, ed England, 2009, pp. 149-60.
- [49] C. Prevosto, M. Zancolli, P. Canevali, M. R. Zocchi, and A. Poggi, "Generation of CD4(+) or CD8(+) regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction," *Haematologica-the Hematology Journal*, vol. 92, pp. 881-888, Jul 2007.
- [50] S. Ghannam, J. Pene, G. Torcy-Moquet, C. Jorgensen, and H. Yssel, "Mesenchymal Stem Cells Inhibit Human Th17 Cell Differentiation and Function and Induce a T Regulatory Cell Phenotype," *Journal of Immunology*, vol. 185, pp. 302-312, Jul 2010.
- [51] C. P. El-Haibi and A. E. Karnoub, "Mesenchymal Stem Cells in the Pathogenesis and Therapy of Breast Cancer," *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, vol. 15, pp. 399-409, Dec 2010.
- [52] A. E. Karnoub, A. B. Dash, A. P. Vo, A. Sullivan, M. W. Brooks, G. W. Bell, A. L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo, and R. A. Weinberg, "Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis," *Nature*, vol. 449, pp. 557-U4, Oct 2007.
- [53] K. Shinagawa, Y. Kitadai, M. Tanaka, T. Sumida, M. Kodama, Y. Higashi, S. Tanaka, W. Yasui, and K. Chayama, "Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer," *International Journal of Cancer*, vol. 127, pp. 2323-2333, Nov 2010.
- [54] A. P. Molloy, F. T. Martin, R. M. Dwyer, T. P. Griffin, M. Murphy, F. P. Barry, T. O'Brien, and M. J. Kerin, "Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells," *International Journal of Cancer*, vol. 124, pp. 326-332, Jan 2009.
- [55] S. Y. Lin, J. Yang, A. D. Everett, C. V. Clevenger, M. Koneru, P. J. Mishra, B. Kamen, D. Banerjee, and J. Glod, "The isolation of novel mesenchymal stromal cell chemotactic factors from the conditioned medium of tumor cells," *Experimental Cell Research*, vol. 314, pp. 3107-3117, Oct 2008.
- [56] B. M. Beckermann, G. Kallifatidis, A. Groth, D. Frommhold, A. Apel, J. Mattern, A. V. Salnikov, G. Moldenhauer, W. Wagner, A. Diehlmann, R. Saffrich, M. Schubert, A. D. Ho, N. Giese, M. W. Buchler, H. Friess, P. Buchler, and I. Herr, "VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma," *British Journal of Cancer*, vol. 99, pp. 622-631, Aug 2008.
- [57] M. Gutova, J. Najbauer, R. T. Frank, S. E. Kendall, A. Gevorgyan, M. Z. Metz, M. Guevorkian, M. Edmiston, D. Zhao, C. A. Glackin, S. U. Kim, and K. S. Aboody, "Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor mediate human stem cell tropism to malignant solid tumors," *Stem Cells*, vol. 26, pp. 1406-1413, Jun 2008.
- [58] J. L. Halpern, A. Kilbarger, and C. C. Lynch, "Mesenchymal stem cells promote mammary cancer cell migration in vitro via the CXCR2 receptor," *Cancer Letters*, vol. 308, pp. 91-99, Sep 2011.

- [59] L. G. Menon, S. Picinich, R. Koneru, H. Gao, S. Y. Lin, M. Koneru, P. Mayer-Kuckuk, J. Glod, and D. Banerjee, "Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells," *Stem Cells*, vol. 25, pp. 520-528, Feb 2007.
- [60] Y. Rattigan, J. M. Hsu, P. J. Mishra, J. Glod, and D. Banerjee, "Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu," *Experimental Cell Research*, vol. 316, pp. 3417-3424, Dec 2010.
- [61] F. Djouad, P. Ponce, C. Bony, P. Tropel, F. Apparailly, J. Sany, D. Noel, and C. Jorgensen, "Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals," *Blood*, vol. 102, pp. 3837-3844, Nov 2003.
- [62] J. Stagg, "Mesenchymal stem cells in cancer," *Stem Cell Reviews*, vol. 4, pp. 119-124, 2008.
- [63] P. J. Mishra, R. Humeniuk, D. J. Medina, G. Alexe, J. P. Mesirov, S. Ganesan, J. W. Glod, and D. Banerjee, "Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells," *Cancer Research*, vol. 68, pp. 4331-4339, Jun 2008.
- [64] Y. Zhu, Z. Sun, Q. Han, L. Liao, J. Wang, C. Bian, J. Li, X. Yan, Y. Liu, C. Shao, and R. C. Zhao, "Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1," *Leukemia*, vol. 23, pp. 925-933, May 2009.
- [65] K. S. Aboody, J. Najbauer, and M. K. Danks, "Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy," *Gene Therapy*, vol. 15, pp. 739-752, May 2008.
- [66] L. J. Dai, M. R. Moniri, Z. R. Zeng, J. X. Zhou, J. Rayat, and G. L. Warnock, "Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy," *Cancer Letters*, vol. 305, pp. 8-20, Jun 2011.
- [67] C. Ren, S. Kumar, D. Chanda, L. Kallman, J. Chen, J. D. Mountz, and S. Ponnazhagan, "Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model," *Gene Therapy*, vol. 15, pp. 1446-1453, Nov 2008.
- [68] M. Studeny, F. C. Marini, R. E. Champlin, C. Zompetta, I. J. Fidler, and M. Andreeff, "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors," *Cancer Research*, vol. 62, pp. 3603-3608, Jul 2002.
- [69] A. Nakamizo, F. Marini, T. Amano, A. Khan, M. Studeny, J. Gumin, J. Chen, S. Hentschel, G. Vecil, J. Dembinski, M. Andreeff, and F. F. Lang, "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas," *Cancer Research*, vol. 65, pp. 3307-3318, Apr 2005.
- [70] G. Grisendi, R. Bussolari, L. Cafarelli, I. Petak, V. Rasini, E. Veronesi, G. De Santis, C. Spano, M. Tagliazzucchi, H. Barti-Juhasz, L. Scarabelli, F. Bambi, A. Frassoldati, G. Rossi, C. Casali, U. Morandi, E. M. Horwitz, P. Paolucci, P. Conte, and M. Dominici, "Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells as Stable Source of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Delivery for Cancer Therapy," *Cancer Research*, vol. 70, pp. 3718-3729, May 2010.
- [71] M. R. Loebinger, A. Eddaoudi, D. Davies, and S. M. Janes, "Mesenchymal Stem Cell Delivery of TRAIL Can Eliminate Metastatic Cancer," *Cancer Research*, vol. 69, pp. 4134-4142, May 2009.
- [72] K. Nakamura, Y. Ito, Y. Kawano, K. Kurozumi, M. Kobune, H. Tsuda, A. Bizen, O. Honmou, Y. Niitsu, and H. Hamada, "Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model," *Gene Therapy*, vol. 11, pp. 1155-1164, Jul 2004.
- [73] X. P. Duan, H. Guan, Y. Cao, and E. S. Kleinerman, "Murine Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Interleukin-12 Gene Delivery Into Ewing Sarcoma Tumors," *Cancer*, vol. 115, pp. 13-22, Jan 2009.

- [74] M. Ghaedi, M. Soleimani, N. M. Taghvaie, M. Sheikhatollahi, K. Azadmanesh, A. S. Lotfi, and J. Wu, "Mesenchymal stem cells as vehicles for targeted delivery of anti-angiogenic protein to solid tumors," *Journal of Gene Medicine*, vol. 13, pp. 171-180, Mar 2011.
- [75] L. D. Meirelles and N. B. Nardi, "Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization," *British Journal of Haematology*, vol. 123, pp. 702-711, Nov 2003.
- [76] S. Raimondo, C. Penna, P. Pagliaro, and S. Geuna, "Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells," *Journal of Anatomy*, vol. 208, pp. 3-12, Jan 2006.