

Nádorová angiogeneze

Jan Novotný^{1,2}, Michal Zikán³

¹Onkologická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

²Institut onkologie a rehabilitace Na Pleši, s. r. o., Praha

³Gynekologicko-porodnická klinika VFN a 1 LF UK, Praha

Nádorová angiogeneze představuje pro nádorové buňky účinný mechanismus vlastního přežití a šíření se do vzdálených tkání. Není proto překvapením, že se antiangiogenní strategie široce studuje a uplatňuje v léčbě. Po prvních klinicky používaných molekulách, jež působí v oblasti receptoru pro vaskulární epiteliální růstový faktor (VEGFR) ať již vyvázáním VEGF, či inhibicí intracelulární domény VEGFR se pozornost vědců obrací k dalším cílům, které jsou součástí angiogenních kaskád (proteiny TIE, VHL a další).

Klíčová slova: angiogeneze, VEGF, TIE, angiopoietin, DLL4.

Tumor angiogenesis

Tumor angiogenesis represents efficient mechanism that allows survival of tumor cells and promotes tumor growth. Antiangiogenic strategies are widely tested in various tumor types. The initial therapeutic attempts were focused on the inhibition of vascular epithelial growth factor signalling cascade and now research continues on other angiogenic signalling pathways (Tie, FGF).

Key words: angiogenesis, VEGF, TIE, angiopoietin, DLL4.

Úvod

Angiogeneze je komplexní fyziologický proces, při němž se novotvořené kapiláry formují z již existujících cév (1). Vyžaduje interakci celé řady struktur – různých buněčných populací (endoteliálních buněk, pericytů, buněk stromatu), extracelulární matrix, cytokinů a růstových faktorů. S aberantní angiogenezí se lze setkat u mnoha patologických stavů. Jejím důsledkem je prostorová a časová deregulace tvorby nových kapilár (schéma 1). Za normálních podmínek se setkáváme s angiogenezí při hojení ran, při obnově endometria v průběhu menstruačního cyklu nebo při hojení ischemických stavů.

Fyziologická angiogeneze

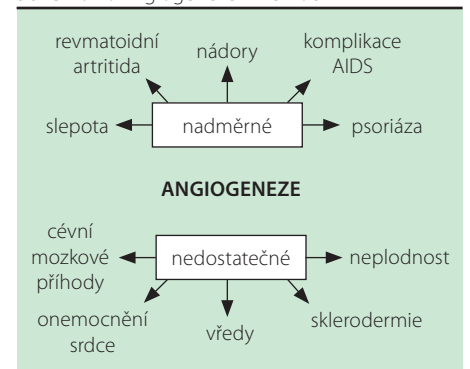
Angiogeneze je několikastupňový proces (tabulky 1 a 2).

Nejprve musí dojít k narušení bazální membrány stávajících cév a k částečné degradaci extracelulární matrix. Tyto první kroky umožní infiltraci avaskulárních prostor endoteliálními buňkami, z nichž se formují kapiláry. Z molekulárně biologického pohledu je tento proces způsoben migrací buněk ve směru gradientu proangiogenních chemokinů, především VEGFA (2). Mezi další chemokiny patří izoformy VEGF (VEGFB, VEGFC, VEGFD) a placentární růstový faktor PLGF (nebo-li PGF). Je třeba poznamenat, že zatímco VEGFA se váže na receptory VEGFR1 a VEGFR2, které stimulují angiogenezi, pak VEGFC a VEGFD se váží téměř výhradně na receptor VEGFR3 a stimulují přednostně lymfangiogenezi. Jedním ze zajímavých zjištění při studiu angiogeneze byla skutečnost, že receptor VEGFR1 nemusí být jen stimulačním

chemokinem, ale cestou sekvence VEGF, migrace monocytů a parakrinní aktivací proteáz může naopak za určitých podmínek proces angiogeneze inhibovat. Angiogenní signály vyvolávané cestou VEGF-VEGFR jsou obvykle

Klin Farmakol Farm 2010; 24(3): 124–126

Schéma 1. Angiogeneze v nemoci



Tabulka 1. Signální cesty a molekuly podílející se na procesu fyziologické a nádorové angiogeneze

Ligand – receptor	Základní úloha fyziologické angiogeneze	Úloha v nádorové angiogenezi
VEGF-VEGFR1 VEGF-VEGFR2	Indukují proliferaci endotelových cév, dávají vznik pupenům z endotelových buněk, zvyšují permeabilitu stávajících cév	Zahajuje dlouhodobou angiogenezi, snižuje imunitní odpověď na přítomnost nádoru
VEGFC-VEGFR3-NRP2	Lymfangiogeneze	Metastazování lymfatickými cestami
Notch kaskáda	Negativní regulace výše uvedených signálních cest, inhibice tvorby cévních pupenů	U nádorů přítomna zvýšená exprese DLL4, která vede k novotvorbě defektních cév
Ephrin-B2-EPHB4	Způsobuje nasměrování vývoje endotelových cév v buňky arterií nebo žil	Neznámá
PDGF-BB-PDGFRbeta	Zvyšuje migraci a proliferaci dalších populací buněk přítomných v cévách	Zvyšuje přežívání stromálních buněk v novotvořených cévách
ANGPT1-TIE2	Zvyšuje interakci mezi ECM a buňkami cévní stěny	Neznámá
ANGPT2-TIE2	Indukce apoptózy endoteliálních cév	Indukce monocytů exprimujících TIE2, amplifikuje VEGF mediovanou angiogenezi
TGFbeta-TGFbetaRII	Zvyšuje tvorbu proteáz, vede k diferenciaci fibroblastů do buněk cévní stěny (myofibroblastů)	Indukuje expresi VEGF na stromálních buňkách

dále potencovány současnou stimulací kaskády angiopoietin – TIE (3). V současné době rozlišujeme tři typy angiopoietinů (ANGPT1, ANGPT2 a ANGPT4). Všechny se váží na membránové tyrosinkinázové receptory TIE1 a TIE2. Angiopoietin1 se váže na TIE2. Je produkován především fibroblasty, za patologických podmínek i buňkami nádorovými. Angiopoietin2 je produkován endotelovými buňkami.

Vzniklý gradient VEGFA vede ke vzniku pupenu tvořeného endotelovými buňkami, které v důsledku aktivace proteáz a ztráty kontaktu s BM lamininem mohou snadno migrovat. Protože endotelové buňky na svém povrchu exprimují membránové matrixmetaloproteinázy (MT1-MMP), dokáží snadno rozrušit extracelulární matrix. Tato enzymatická aktivita MT1-MMP je negativně regulována delta like ligandem DLL4, který se váže na své receptory notch1 a notch4 (synonymum: NOTC1 a NOTC4) a zabráňuje extenzivní angiogenezi (4). A navíc, tyto komplexy DLL4 a jejich receptorů umožňují zrání cév tím, že zajišťují migraci pericytů a buněk hladké svaloviny do oblasti tvorby cév.

Postupně dochází k završení procesu tvorby nové cévy. Inhibiční mechanismy (trombospondiny 1 a 2, angiostatin, endostatin, tumstatin, canstatin, vasoinhibin, TGFbeta a další) snižují proliferaci endotelových buněk ve prospěch myofibroblastů a pericytů, vznikají fyziologická spojení cévních buněk (zonula adherens, zonula occludens) a tvoří se lumen a bazální membrána. Začíná průtok krví nově tvořenou cévou, který s sebou nese zvýšenou koncentraci kyslíku v okolní tkáni. Zpětnovězně tak dochází k inhibici tvorby VEGF a angiogeneze je v daném místě ukončena.

Nádorová angiogeneze

Nádorová angiogeneze vzniká aktivitou stejných mechanismů jako angiogeneze fyziologická. Rozdíl lze nalézt pouze v tom, že proces angiogeneze v oblasti nádoru nekončí vznikem nové cévy, ale stále trvá, protože nádor secernuje angiogenní působky a je hypoxický.

Nádorové cévy poznáme podle toho, že směřují nahodilými směry a jsou všelijak pokroucené. Mají také zvýšenou permeabilitu, což způsobuje intersticiální hypertenzi. Tento jev je důležitý především proto, že nám, onkologům omezuje průnik léků směrem k nádoru. Antiangiogenní léky jsou schopny po omezenou dobu „normalizovat“ angiogenezi v oblasti nádoru. To zvyšuje oxygenaci nádoru a jeho perfuzi cytostatiky.

Tabulka 2. Proangiogenní a antiangiogenní onkogeny

Proangiogenní faktory	Antiangiogenní faktory
angiopoietin 1 a 2	angiostatin
bFGF	endostatin
epidermální růstový faktor	thrombospondin 1 a 2
hepatický růstový faktor (= scatter faktor)	interferon alfa, beta, gama
interleukin 8	interleukin 1, 4, 12, 18, 21
placentální růstový faktor	semaforin
destičkový růstový faktor A a B	solubilní VEGFR1
TGF alfa, beta	tkáňový inhibitor metaloproteináz 2
VEGF A, B, C, D	vasostatin

Mechanismy zvyšující nádorovou angiogenezi

Hlavním spouštěčem angiogeneze je hypoxie a nedostatek živin, které se dostávají poté, co velikost nádorového ložiska dosáhne přibližně 1–2 mm nebo 10–20 buněčných vrstev. Ovšem existují i další způsoby aktivace a udržování dlouhodobé angiogeneze.

Velmi běžné je narušení regulace cestou Von Hippel Lindauova genu jeho zárodečnou nebo získanou mutací. Tyto mutace způsobují neschopnost označit protein HIFalfa ubikvitinovým řetězcem, který je nezbytný pro jeho degradaci v proteozomu. Přebytek HIFalfa v buňce pak vede k přepisu genů anaerobní glykolýzy, erythropoetinu a jeho receptoru, VEGF, VEGFR2 a dalších molekul. Se zvýšenou aktivitou HIF1 alfa se lze také setkat v případech aktivace kaskád MAPK kináz, fosfatidylinositol-3-kinázy nebo proteinkinázy C. Také ztráta funkce onkosupresoru PTEN má stejné následky.

Endotelové buňky stimulované buňkami nádorovými ve zvýšené míře produkují a uvolňují ANGPT2, což aktivuje další kaskádu – systém Angiopoietin – TIE2. Za zvýšenou tvorbu a rychlé uvolňování ANGPT2 je z molekulárně biologického hlediska zodpovědná nadbytečná aktivace inzulinové signalizace, kaskády VEGFR a PDGFR beta v nádorových buňkách. Zajímavé je, že kaskáda Ang-TIE2 za určitých podmínek zvyšuje hypervaskularizaci nádoru, a za podmínek jiných, dosud bližší ne přesně definovaných, naopak růst nádorových buněk inhibuje a zvyšuje jejich apoptózu. Proto také neexistuje přímá souvislost mezi mírou exprese ANGPT1 a ANGPT2 a prognózou nádorů plic, ledvin či prsu. V některých studiích byla zjištěna lepší prognóza u pacientů s nádory hlavy a krku, pokud byly v nádoru přítomny vyšší koncentrace ANGPT1; vyšší poměr ANGPT2/ANGPT1 byl spojen s horším přežíváním pacientů s akutní myeloidní leukémií, hepatocelulárním karcinomem, nádory plic, ovaríí a s neuroendokrinními nádory.

Výše jsme uvedli, že kaskáda VEGF-VEGFR je inhibována negativním regulátorem DLL4-NOTC1. U některých nádorů se setkáváme s vysokými koncentracemi proteinu JAG1, což je negativní regulátor negativního regulátoru DLL4. Tedy, v jeho přítomnosti se inhibiční vliv DLL4 na produkci VEGF neuplatňuje a angiogeneze pokračuje.

Nedávno bylo zjištěno, proč nemocní s Downovým syndromem jsou méně ohroženi vznikem nádorů než ostatní lidé (5). Genem zodpovědným za toto pozorování je gen DSCR1 (Down's syndrome candidate region) lokalizovaný na 21 chromozomu. Kóduje protein, jehož funkcí je negativní regulace signální kaskády VEGF – calcineurin – NFAT. Tato inhibice způsobuje snížení hustoty kapilár v oblasti zvýšené koncentrace VEGF.

Terapeutické využití inhibice angiogeneze v terapii nádorů

Nejlépe prozkoumána je transdukční signální kaskáda VEGF-VEGFR, a proto je i nejčastějším cílem protinádorových přípravků. O jejich vysokomolekulárních (bevacizumab) i nízkomolekulárních (sunitinib, sorafenib) inhibitech pojednává následující článek. Charakteristika novějších inhibitorů testovaných ve fázi II a III klinických zkoušek je shrnuta v tabulce 3. Zajímavé je, že nízkomolekulární inhibitory VEGFR způsobují u některých pacientů krátkodobé zvýšení koncentrace VEGF, což je příznivým prognostickým faktorem a prediktorem léčebné odpovědi.

Jak víme z klinické praxe, antiangiogenní léky působí pouze omezenou dobu. Po několika týdnech až měsících dochází ke vzniku rezistence a opětovnému nádorovému růstu. Proto řada léků nepřináší našim pacientům zásadní zlepšení přežívání nemocných. Dnes jsou známy celkem čtyři mechanismy, které vedou ke vzniku rezistence na antiangiogenní látky (6).

Prvním je aktivace angiogenních kaskád jiných než VEGF-VEGFR. Proto i ty musí být in-

hibovány. A tak do klinických zkoušek postoupily inhibitory kaskády angiopoietin-TIE. Prvním takovým lékem je monoklonální protilátka vyvazující ANGPT2 (7). Protože i interferony mají antiangiogenní efekty, jsou studovány jeho nové lékové formy. K selektivní dopravě interferonu alfa do nádoru se využívá monocytů, které exprimují TIE2 receptor (8). Zcela recentně se syntetizují látky, které inhibují další molekuly, které mají vzdálenější vztah k angiogenezi (tabulka 3).

Druhým mechanismem je aktivace prekursorů endoteliálních buněk v kostní dřeni, jejichž růst je nezávislý na signalizaci VEGF-VEGFR. Třetím pak autonomní tvorba nadbytečného množství pericytů, které jsou schopny podporovat růst cév i při nižších koncentracích VEGF. Posledním známým způsobem je schopnost nádorových buněk zajistit si přístup k živinám jinými postupy, než je angiogeneze. V těchto případech rezistence jde zejména o posílení procesu invaze a metastazování. Tyto tři poslední mechanismy dosud nejsou předmětem farmakologické intervence.

Iatrogenní stimulace angiogeneze

Zatímco se výše uvedenou terapií snažíme angiogenezi snižovat, ne vždy se nám to daří. A u některých postupů tomu může být právě naopak. V posledních několika letech vyvolaly mnoho diskuzí výsledky některých studií, které hodnotily vliv podání léků k podpoře krve tvorby (ESA) na přežívání pacientů a na interval do progresu nemoci. Vzhledem k pozorováním, že u pacientů s nádory hlavy a krku a u pacientek s karcinomem prsu vede podání ESA ke zhoršení výsledků léčby ve srovnání se substitucí anémie krevními předvody, došlo k výraznému omezení spotřeby těchto léků. Pravděpodobným vysvětlením těchto pozorování je přítomnost receptorů pro erythropoetin na nádorových buňkách, i když kolem tohoto kategorického tvrzení existuje celá řada nejasností. V nádorových buňkách sice byla prokázána mRNA pro receptor pro erythropoetin, jakákoliv exprese receptoru pro ESA na membráně nádorových buněk však nalezena nebyla z důvodu neexistence vhodných detekčních monoklonálních protilátek. A navíc, pokud by tyto receptory nalezeny byly, musela by být následně prokázána funkčnost celé signální kaskády, aby bylo možné považovat vztah mezi ESA

Tabulka 3. Novější antiangiogenní léky v klinických zkouškách

Lék	Cílová struktura	Mechanismus účinku
VEGF inhibitory aflibercept	VEGFA, VEGFB, PlGF	Decoy receptor
VEGFR inhibitory AEE788 cediranib CT-322 pazopanib vandetanib vatalanib XL184	VEGFR1, VEGFR2, EGFR VEGFR1–3, PDGFR, KIT VEGFR1–3 VEGFR1–3, PDGFR, KIT VEGFR2, EGFR, MET VEGFR1–3, PDGFR, KIT VEGFR2, MET, RET, KIT, TIE2, FLT3	Tyrosinkinázový inhibitor Tyrosinkinázový inhibitor Inhibitor fibronektinu Tyrosinkinázový inhibitor Tyrosinkinázový inhibitor Tyrosinkinázový inhibitor Tyrosinkinázový inhibitor
Inhibitory extracelulární matrix tumstatin ⁺ endostatin ⁺ canstatin ⁺	Kolagen IV Kolagen XVIII Kolagen IV	Vazba na integrinový receptor Vazba na integrinový receptor Vazba na integrinový receptor
Inhibitory ang-TIE2 CEP-11981 AMG386 PF-4856884 MED1-3617	TIE2, VEGFR1–3 ANGPT1, ANGPT2 ANGPT2 ANGPT2	Tyrosinkinázový inhibitor Peptidová vaba na cíl CovX Monoklonální protilátka
Inhibitory jiných cest ABT510 AMG102 dasatanib 2ME2 tandutinib	CD35 receptor HGF/SF PDGFR, SRC, BCR/ABL, KIT, EPHA2 HIF1-alfa PDGFR, KIT, FLT3	Peptid mímující thrombospondin 1 Monoklonální protilátka Tyrosinkinázový inhibitor Suprese HIF1-alfa, poškození mikrotubulů Tyrosinkinázový inhibitor
+ endogenní substance		

a špatnými léčebnými výsledky za definitivně prokázány (9).

Závěr

Již před 35 lety byla vyslovena teorie, že nádorové buňky přežívají pouze díky nekončícímu procesu angiogeneze, která vzniká jako důsledek poruch autokrinních a parakrinních regulací v oblasti nádoru. Základní myšlenka této teorie je i dodnes platná. S přibývajícím poznáním snad budeme schopni tyto abnormální signální cesty přerušit a zajistit tak pacientům s nádory naději na delší a kvalitnější život.

Literatura

1. Chung SA, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Rev Cancer* 2010; 10: 505–514.
2. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Mol Biol Cell* 2010; 21: 687–690.
3. Huang H, Bhat A, Woodutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nature Rev Cancer* 2010; 10: 575–585.
4. Hellstrom M, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 2007; 44: 776–780.

5. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to antiangiogenic therapy. *Nature Rev Cancer* 2008; 8: 593–603.
6. Baek KH, et al. Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* 2009.
7. Brown J, et al. A human monoclonal anti-ANG2 antibody leads to broad antitumor activity in combination with VEGF inhibitors and chemotherapy agents in preclinical models. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 145–156.
8. De Palma M, et al. Tumor-targeted interferon alfa delivery by Tie expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Cell* 2008; 14: 299–311.
9. Fandrey J, Dicato M. Examining the involvement of erythropoiesis Stimulating Agents in Tumor Proliferation (Erythropoietin Receptors, Receptor Binding, Signal Transduction), angiogenesis and venous thromboembolic events. *The Oncologist* 2009; 14(dopl. 1): 34–42.

*Práce byla vytvořena za podpory
výzkumného záměru MŠMT 0021620808.*

MUDr. Jan Novotný, Ph.D.

Onkologická klinika VFN a 1. LF UK
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2
onkologie@seznam.cz