

УДК 577.2:616\_-006:615.277

## МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК СРЕДСТВО ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ

© 2013 г. С. Ш. Каршиева\*, Л. С. Красикова, А. В. Белявский

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 18.07.2012 г.

Принята к печати 22.08.2012 г.

Разработка противоопухолевых средств, обладающих низкой токсичностью и выраженным избирательным действием, является одним из приоритетных направлений генной терапии рака. Мезенхимные стволовые клетки обладают природным тропизмом к опухолям, что делает возможным их использование в качестве таргетного средства доставки терапевтических генов в опухоли различной этиологии. В настоящее время в качестве терапевтических агентов используют гены, кодирующие ферменты (цитозиндеаминаза, тимидинкиназа, карбоксилэстераза), цитокины (IL-2, IL-4, IL-12, IFN- $\beta$ ), апоптоз-индуцирующие факторы (TRAIL). На экспериментальных моделях опухолей различной этиологии, а также на животных с метастазами в головной мозг и легкие показано, что мезенхимные стволовые клетки могут успешно доставлять терапевтические гены в опухоль и вызывать значительный противоопухолевый эффект. Для успешного клинического применения данной стратегии необходимо, однако, решить ряд технических проблем.

**Ключевые слова:** мезенхимные стволовые клетки, тропизм, генная терапия рака, клеточная терапия рака.

MESENCHYMAL STEM CELLS AS AN ANTITUMOR THERAPY TOOL, by S. S. Karshieva\*, L. S. Krasikova, A. V. Belyavsky (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; \*e-mail: skarshieva@gmail.com). Development of antitumor preparations with low toxicity and high selectivity of action is one of the top priorities of cancer gene therapy. Mesenchymal stem cells possess natural tropism towards tumors, a property that makes possible their use as a vehicle for targeted delivery of therapeutic genes into tumors of various etiologies. At present, genes encoding enzymes (cytosine deaminase, thymidine kinase, carboxyl esterase), cytokines (IL-2, IL-4, IL-12, IFN- $\beta$ ) and apoptosis inducing factors (TRAIL) are used as therapeutic genes. Mesenchymal stem cells, as demonstrated using experimental models of tumors of various etiologies as well as animals with metastases in brain and lungs, are able to successfully deliver therapeutic genes into tumors and produce significant antitumor effect. However, to effectively use this therapeutic strategy in clinic, one still has to solve a number of technical problems.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, tropism, cancer gene therapy, cancer cell therapy.

DOI: 10.7868/S0026898413010060

### ВВЕДЕНИЕ

Использование соматических стволовых клеток (СК) для доставки терапевтических генов в очаги патологии — новая быстро развивающаяся стратегия, направленная на повышение эффективности современных методов генной терапии. В настоящее время установлено, что СК, в частности, мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) и нейральные стволовые клетки (НСК) при их системном введении мигрируют и проникают в первичные и вторичные очаги солидных опухолей. Предполагается, что присущий

СК тропизм к опухолям может быть использован для разработки эффективных и хорошо переносимых способов терапии больных со злокачественными солидными опухолями. Модифицированные МСК и НСК уже более 10 лет используются в модельных системах для доставки противоопухолевых средств. При этом во многих работах применяются ортотопические модели опухолей головного мозга, важность которых обусловлена тем, что опухоли центральной нервной системы составляют 1.5% всех опухолей, характеризуются высокой агрессивностью и являются причиной смерти 2.3% онкологических больных. Кроме того, метастазы в головной мозг

\* Эл. почта: skarshieva@gmail.com

выявляют у больных меланомой, раком легкого, молочной железы, почки и толстой кишки. Эффективность химиотерапии при опухолях данной локализации колеблется от 20 до 60% и осложняется тем, что многие цитотоксические препараты не могут преодолевать гематоэнцефалический барьер. В 2010 г. Американское агентство по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) одобрило проведение пилотных клинических испытаний с использованием клеток НВ1.F3, представляющих собой иммортализованную линию НСК, на больных глиомой с исчерпанными возможностями. В этих испытаниях клетки НВ1.F3, экспрессирующие цитозиндезаминазу, вводили интракраниально в полость, образовавшуюся после резекции опухоли [1].

Использование иммортализованной линии клеток в этом случае очевидно обусловлено сложностью получения достаточных количеств НСК и вряд ли может считаться клинически безопасным. В настоящее время вследствие доступности и легкости культивирования клинически наиболее перспективным видом соматических СК представляются МСК. С учетом этого данный обзор посвящен анализу современного состояния, проблемам и перспективам использования МСК как средства таргетной доставки терапевтических белков в опухоли.

## СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

### *Выделение и характеристика МСК*

Впервые МСК выделили из стромы костного мозга животных и культивировали в виде колоний фибробластоподобных клеток российский ученый А.Я. Фриденштейн и соавт. во второй половине XX века [2]. Свое название мезенхимные стволовые/стромальные клетки они получили позднее, благодаря способности дифференцироваться в различных направлениях в рамках мезенхимной линии. В настоящее время, согласно рекомендациям Международного Общества Клеточной Терапии к МСК человека относят гетерогенную популяцию клеток, выделяемых из тканей взрослого организма и эмбрионов, которая обладает следующими свойствами: 1) проявляет адгезивность к поверхности пластика в культуре; 2) экспрессирует мезенхимные маркеры CD105, CD90 и CD73, не содержит гемопоэтических маркеров (CD45, CD34, CD19, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$  и CD19 и HLA-DR); 3) способна дифференцироваться *in vitro* в остеобласты, адипоциты и хондроциты [3]. В последние годы появился ряд публикаций, доказывающих принадлежность МСК к перицитам [4, 5], хотя, видимо, не все МСК имеют перицитарную природу [6]. Несмотря на то, что костный мозг является одним из основных источников МСК, предна-

значенных для клинического применения, МСК успешно выделяют и из других тканей и органов, включая жировую, мышечную, нервную ткань, печень, легкие, сухожилия, пульпу, а также плаценту, амниотическую и синовиальную жидкость, менструальную и пуповинную кровь. Перспективным источником МСК считается жировая ткань, так как из нее можно получить, по разным данным, в 10–50 раз больше МСК (в расчете на вес ткани), чем из костного мозга, используя при этом минимально инвазивную процедуру, проводимую под местной анестезией [7, 8]. МСК, выделенные из разных источников, хотя и обладают общими свойствами, имеют определенные отличия, в частности, по дифференцировочному потенциалу. Например, МСК из альвеолярной кости, имеют более низкий хондрогенный и адипогенный потенциал, чем МСК из гребня подвздошной кости человека. МСК из пуповинной крови могут дифференцироваться в кардиомиоциты и гепатоциты. Кроме того, несмотря на идентичные профили экспрессии поверхностных маркеров, глобальные паттерны генной экспрессии довольно существенно различаются у МСК из жировой ткани, костного мозга и пуповинной крови [9].

### *Иммуногенность МСК*

Большой интерес для регенеративной медицины представляют иммуномодулирующие свойства МСК, позволяющие облегчить приживление трансплантата и предупредить развитие острой и хронической реакции “трансплантат против хозяина”. Во многих исследованиях *in vivo* и *in vitro* показано, что МСК обладают сниженной иммуногенностью и могут оказывать иммуносупрессорное действие. Иммунофенотипический профиль МСК представлен как HLA класса I+, HLA класса II–, CD40–, CD80– и CD86–. Для реализации иммуносупрессорного эффекта МСК должны быть предварительно активированы провоспалительными цитокинами – интерлейкинами (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и/или фактором некроза опухолей  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). Как аутогенные, так и аллогенные МСК способны подавлять функциональную активность дендритных клеток, В-лимфоцитов, CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, нейтрофилов, ингибируя их пролиферацию, дифференцировку и хемотаксис. Механизм иммуносупрессии МСК до конца не ясен, но существуют предположения, что это происходит путем секреции таких растворимых факторов, как индоламин-2,3-диоксигеназа, индуцибельная NO-синтаза, простагландин E<sub>2</sub>, IL-6 и др. [9, 10]. Хотя способность МСК “уходить” от иммунного надзора организма-хозяина можно рассматривать как преимущество при их использовании в качестве средств доставки противоопухолевых агентов в варианте аллотрансплантации, тем не менее, иммуносупрессорная

активность МСК может приводить к нежелательным эффектам, создавая благоприятные условия для роста опухоли. Например, аллогенная подкожная трансплантация мышины меланомы В16 приводит к росту опухоли только при совместном введении с МСК [11].

### **Туморогенность МСК**

Выделенные из тканей животных и человека МСК выращивают в количествах, необходимых для клинических и исследовательских целей, в условиях *in vitro*, лишь отчасти приближенных к физиологическим. Отсутствие естественного микроокружения может привести к изменению природных свойств МСК и негативным побочным эффектам трансплантации. Генетические aberrации, которые теоретически могут возникнуть в МСК, культивируемых *in vitro*, вызывают беспокойство в связи с появлением сообщений о приобретении клеткой опухолевых свойств, например о спонтанной трансформации культур как мышинных [12], так и крысиных МСК [13]. Даже на ранних пассажах фиксируются такие злокачественные изменения в свойствах МСК, как утрата контактного торможения, активация пролиферации, анеуплоидия. Следует, однако, подчеркнуть, что генетическая стабильность клеток грызунов, по крайней мере в условиях *in vitro*, значительно ниже, чем клеток человека. Сообразно этому случаи спонтанной трансформации МСК человека на ранних и средних пассажах крайне редки и фиксируются лишь при длительном пассировании *in vitro* [14, 15]. Тем не менее, существуют, по-видимому, различия в генетической стабильности МСК человека, выращенных в разных условиях [16], что говорит о необходимости серьезного контроля качества МСК, предназначенных для клинического применения, а также дальнейших поисков оптимальных методов их культивирования.

### **Направленная миграция МСК к опухолям**

Клеточная терапия с использованием МСК в качестве средств доставки основана на способности МСК к хоумингу, т.е. к направленной миграции к очагам патологии, в том числе к поврежденным тканям, очагам воспаления, злокачественным новообразованиям, и их колонизации.

Избирательную миграцию СК в опухоли впервые обнаружили в 2000 г. Оказалось, что НСК мигрируют в глиому и распределяются между клетками опухоли [17]. На доклинических моделях было показано, что МСК при внутривенном или интратекарном их введении мигрируют к ортотопически привитым глиомам, медуллобластоме, метастазам меланомы в головной мозг, диссеминированной нейробластоме с множественной локализацией, включая печень, яичники и кост-

ный мозг, а также к ксенографтам рака молочной и предстательной железы и к меланоме человека, подкожно привитым мышам с иммунодефицитом. Способность МСК успешно преодолевать гематоэнцефалический барьер [18, 19] позволяет использовать их системное введение в терапии злокачественных опухолей центральной нервной системы.

Молекулярные основы тропизма МСК к опухоли *in vivo* плохо изучены, однако в опытах *in vitro* показано, что их миграция регулируется многими хемокинами, цитокинами и их рецепторами: SDF-1/CXCR4, SCF/c-Kit, HGF/c-Met, VEGF/VEGFR, MCP-1/CCR и HMGB1/RAGE [7, 20, 21]. Кроме того, большую роль в мобилизации и хоуминге МСК играют молекулы адгезии ( $\beta$ 1- и  $\beta$ 2-интегрины, L-селектин), белки внеклеточного матрикса (MMP2, MT1-MMP и TIMP-2), цитокины (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-8) и факторы роста (нейротрофин-3, VEGF, TGF-ss1) [22–25]. Отмечено, что существенную роль в механизме миграции МСК к солидным опухолям играет урокиназа (uPA), которая секретируется опухолевыми клетками [26].

### **Способы повышения эффективности и/или специфичности опухолевого тропизма МСК**

Поскольку по некоторым данным сигнальная ось SDF-1/CXCR4 играет значительную роль в миграции МСК в опухоли, можно ожидать, что сверхэкспрессия CXCR4 в этих клетках повысит эффективность их хоуминга. Данные на этот счет весьма противоречивы, с аргументами как за [27, 28], так и против [29, 30]. Стимуляция экспрессии ядерных рецепторов Nur77 и Nur1, играющих существенную роль в миграционной оси SDF-1/CXCR4, может рассматриваться как еще один способ повышения хоуминга МСК в опухоли [31]. На экспериментальных моделях глиомы показано, что сверхэкспрессия хемокинового рецептора CXCR1 в МСК пуповинной крови также способствует миграции этих клеток в опухоль [32]. Установлено также [33], что облучение мышей с опухолью молочной железы стимулирует тропизм МСК, при этом в миграции участвует рецептор хемокинов CCR2. МСК, в которые ввели искусственный рецептор, способный связываться с опухолевым маркером ErbB2, обладали более высокой способностью мигрировать в опухоли яичника, экспрессирующие *erbB2* [34].

### **Методы мониторинга миграции МСК *in vivo***

В связи с неуклонным ростом интереса к клеточной терапии увеличивается и потребность в неинвазивных методах визуализации и контроля миграции МСК. Методы детекции миграции СК можно условно разделить на три категории: деструктивные оптические методы, неинвазивные

оптические методы, неинвазивные неоптические методы.

К деструктивным оптическим методам относятся выполняемые на фиксированных срезах гистологический и иммуногистохимический анализ, иммунофлуоресценция, флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH), проточная цитофлуориметрия с использованием различных флуоресцентных клеточных красителей, белков (зеленый флуоресцентный белок, GFP, люцифераза светлячков) и меченых антител [35, 36]. К достоинствам этих подходов относятся высокое разрешение и способность анализировать на клеточном уровне события, происходящие в экспериментальной опухоли. Эти методы, однако, трудоемки и плохо подходят для сравнительного количественного анализа большого числа образцов. Количественный анализ МСК, меченных GFP или люциферазой светлячков, можно проводить, измеряя уровень флуоресценции или хемилюминесценции, соответственно, в лизатах опухолей. С точки зрения чувствительности и специфичности использование люциферазы для мечения клеток представляется гораздо более предпочтительным в силу того, что системы обнаружения хемилюминесценции имеют наиболее низкий уровень фона, наиболее высокую чувствительность и самый широкий динамический диапазон. С помощью этого подхода, исходя из нашего опыта, можно достаточно надежно количественно анализировать образцы, доля меченых клеток в которых не превышает нескольких десятых процента.

В неинвазивных оптических методах мониторинга миграции МСК наиболее часто применяются репортерные флуоресцентные белки — зеленый, GFP [35, 37], красный, RFP [38], а также флуоресцентные красители, которые могут метить непосредственно клетки и сохранять сигнал в течение нескольких недель и дольше. Использование пары GFP-RFP для разработки противоопухолевой терапии на основе МСК особенно привлекательно, поскольку спектры флуоресценции этих белков слабо перекрываются, что дает возможность пометить, например, опухолевые клетки белком одного цвета, а МСК — другого. Это позволяет изучать взаимоотношения опухолевых клеток и МСК между собой, а также клеток каждого типа с клетками реципиента. Биолуминесцентная томография с использованием МСК, экспрессирующих люциферазу светлячков, является неинвазивным, количественным и широко используемым методом оценки миграции клеток на моделях. Большое преимущество данного подхода состоит в крайне низком уровне фонового излучения, что позволяет надежно визуализировать нужные клетки и ткани [33].

Экспрессия чужеродных маркерных белков может вызывать иммунную реакцию организма и элиминацию клеток, их несущих, поэтому к результатам длительных (более 2–4 недель) опытов

с применением таких подходов следует относиться с осторожностью. К недостаткам флуоресцентных красителей относится возможность перетекания красителей с целевых клеток на окружающие, а также падение уровня сигнала при пролиферации клеток. Общий недостаток неинвазивных оптических методов — поглощение видимого света тканями, что резко снижает возможность мониторинга глубоколежащих опухолей. В последние несколько лет созданы новые виды флуоресцентных белков, спектр поглощения которых смещен в инфракрасную область спектра [39]. Поглощение тканями в этой области спектра снижено, что позволяет лучше видеть глубоколежащие области. Пока, к сожалению, число работ, выполненных с использованием таких белков, слишком мало, чтобы сделать выводы об их эффективности в экспериментальной онкологии.

Неоптические методы, такие как магнитно-резонансная (МРТ), позитронно-эмиссионная (ПЭТ) и фотонно-эмиссионная компьютерная томография (ФЭКТ), уже используются для отслеживания клеток разного типа и, по-видимому, будут адаптированы для клинического мониторинга миграции МСК. Миграцию клеток при помощи неоптических методов оценивают с использованием прямой или непрямой маркировки клеток. Для визуализации при помощи МРТ применяют прямое мечение МСК магнитными наночастицами, такими как суперпарамагнитный оксид железа (SPIOs), марганца, европия или хелаты гадолиния, а также перфторуглеродные наночастицы [39–41]. В случае ПЭТ и ФЭКТ применяют изотопы меди, кобальта, йода, технеция, галлия, и индия [42–44]. Контрастирующие агенты вводят в клетку при помощи поликатионных трансфицирующих агентов, липосом, микроинъекции, электропорации или рецептор-опосредованного эндоцитоза [42]. МСК можно метить и непрямой способом при помощи стабильной трансдукции генов внутриклеточных металлопротеинов, например трансферрина и ферритина [45], что приводит к накоплению железа в клетках и, соответственно, к повышению их контрастности для МРТ, а также гена, кодирующего мутантную тимидинкиназу вируса простого герпеса типа 1 (HSV1-tk), который обеспечивает усиленное поглощение вводимого радиоактивного субстрата [<sup>18</sup>F]-FHBG при ПЭТ-визуализации [46].

Чувствительность МРТ достаточна для выявления даже 1000 меченых МСК [42], однако визуализация единичных клеток затруднена из-за размывания картины при таких внутренних движениях, как дыхание или судороги. ПЭТ имеет, по-видимому, более высокую чувствительность, чем МРТ, но более низкое разрешение (порядка миллиметра против микрометра у МРТ) и обеспечивает возможность более длительной визуализации по сравнению с МРТ [36].

Недостатки неоптических методов заключаются в возможном появлении ложноположительных сигналов (например, магнитные наночастицы после гибели несущих их МСК поглощаются фагоцитами), в снижении коэффициента сигнал/шум, уменьшении сигнала из-за деления клеток, коротких периодов полураспада меченых агентов. В сочетании с такими методами, как ПЭТ и ФЭКТ, МРТ дает более полное представление о локализации и функциональности клеток.

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ МСК

### *Векторы и методы трансфекции МСК*

Для получения генетически модифицированных МСК в них тем или иным способом вводят генетические конструкции, обеспечивающие экспрессию “терапевтических последовательностей”, к которым можно отнести не только белоккодирующие последовательности, но и, например, малые интерферирующие РНК. Вирусные векторы считаются в настоящее время наиболее эффективным инструментом доставки терапевтических последовательностей в клетки. Векторы на основе ретровирусов и особенно лентивирусов не только эффективны, но и способны обеспечивать длительную экспрессию в МСК за счет интеграции в геном. Это, однако, может приводить к инсерционному мутагенезу и повышению риска неопластической трансформации.

Транзиентная трансфекция при помощи аденовирусных векторов – один из наиболее эффективных и часто применяемых методов генетической модификации МСК. Аденовирусные векторы обладают значительной иммуногенностью, что может резко снижать эффективность их повторного введения в организм. Поэтому такие преимущества вирусных векторов, как эффективность, длительность экспрессии и возможность определенного таргетирования тканей за счет модификации белков оболочки, в значительной мере нивелируются их потенциальной онкогенностью, токсичностью и иммуногенностью.

Плазмидные векторы с точки зрения технологичности производства, простоты использования, безопасности и минимальной иммуногенности имеют значительные преимущества перед вирусными, но в большинстве случаев значительно уступают им в эффективности доставки и длительности работы. Применительно к МСК химические методы – липофекция или комплексообразование с полиэтиленимином – характеризуются низкой (несколько процентов) эффективностью трансфекции плазмид. Введение плазмид в МСК путем электропорации гораздо более эффективно, хотя и требует серьезной оптимизации протоколов. В частности, можно добиться 50–60% эффективности трансфекции МСК жировой ткани человека при выживаемости более 50% клеток (неопублико-

ванные данные нашей лаборатории). Некоторые фирмы предлагают разработанные ими модификации метода электропорации, в частности, нуклеофекцию или микропорацию, которые, по утверждению производителей, позволяют достичь 80–90% эффективности трансфекции МСК при гибели относительно небольшой части клеток. В рутинных экспериментах эффективность этих методов ниже ([47, 48] и неопубликованные данные нашей лаборатории) и не радикально превышает уровни, достигаемые с применением классической электропорации. Тем не менее, весьма вероятно, что дальнейшее усовершенствование технологии электропорации в сочетании с новыми подходами, направленными на повышение эффективности доставки из цитоплазмы в ядро [49], и использование магнитной селекции трансфицированных клеток поможет получать популяции МСК, подавляющая часть которых генетически модифицирована.

## ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ФАКТОРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ МСК

Существует значительное число белков, обладающих противоопухолевой активностью, экспрессию которых в МСК использовали в экспериментальной терапии опухолей.

### *Факторы, вызывающие апоптоз опухолевых клеток*

Фактор TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) активно изучается в опытах *in vivo* и *in vitro*. Показано, что у мышей с глиомой, получавших МСК, экспрессирующие TRAIL, значительно увеличивается продолжительность жизни [50]. Установлено также [51], что такие МСК вызывают гибель клеток плоскоклеточного рака легкого с так называемым SP (side population)-фенотипом, предположительно стволовых опухолевых клеток, устойчивых к традиционным методам терапии. МСК, экспрессирующие TRAIL, вызывали гибель ряда клеточных линий рака прямой кишки, устойчивых к действию растворимого фактора TRAIL, при этом действие МСК-TRAIL могло потенцироваться 5-фторурацилом, по крайней мере, в системе *in vitro* [52]. Предварительное облучение глиом, как оказалось [53], усиливает миграцию TRAIL-экспрессирующих МСК в опухоли. Этот эффект обусловлен, в частности, повышенной экспрессией облученными клетками хемокина IL-8/CXCL8, который служит хемоаттрактантным фактором для МСК. Обнаружено также [54], что чувствительность глиомных клеток, устойчивых к проапоптотическому действию TRAIL, восстанавливается после обработки ингибиторами протеасом. МСК, продуцирующие TRAIL, спо-

способны эффективно элиминировать метастазы в легких [55].

### **Факторы-“самоубийцы”**

**Цитозиндезаминаза.** Этот фермент способен превращать нетоксичный для клеток субстрат 5-фторцитозин в цитотоксический продукт 5-фторурацил, который вызывает гибель клеток. Основным механизмом гибели опухолевых клеток при использовании МСК, несущих ген цитозиндезаминазы, считается так называемый “bystander effect”, т.е. гибель клеток, соседствующих с МСК (очевидно, за счет образования межклеточных коннексиновых каналов, по которым могут переноситься цитотоксические продукты). В первой статье, посвященной использованию НСК для противоопухолевой терапии, в качестве цитотоксического гена-“самоубийцы” применяли ген цитозиндезаминазы [17]. МСК, продуцирующие цитозиндезаминазу, проявляли противоопухолевую активность в отношении клеток меланомы, глиобластомы, рака прямой кишки, молочной железы и мочевого пузыря человека [56]. В опытах *in vivo* показали, что использование МСК, продуцирующих цитозиндезаминазу, в сочетании с субстратом – 5-фторцитозин, подавляет рост метастазирующей опухоли предстательной железы и меланомы [57]. Подобные МСК эффективны при раке желудка [58], а НСК – при медуллобластоме [59]. Установлено [60], что хотя на ранней стадии рост глиом у крыс можно подавить однократным введением НСК, продуцирующих цитозиндезаминазу, при диссеминованном процессе требовалось многократное введение НСК. Описана перспективная процедура селекции клеток, экспрессирующих цитозиндезаминазу, с целью повышения их цитотоксического эффекта [61].

**Тимидинкиназа.** НСК, экспрессирующие ген тимидинкиназы, оказались способными подавлять рост медуллобластомы и продлевать жизнь мышей, которым предварительно ввели нетоксичный предшественник ганцикловир [62]. МСК, в которые с помощью лентивирусного вектора ввели ген тимидинкиназы, сохраняли свой тропизм к различным опухолям и при ксенотрансплантации обладали способностью останавливать рост подкожного узла рака предстательной железы после обработки ганцикловиром, а также значительно ингибировали рост трансплантированной метастазирующей фибросаркомы [63]. МСК, несущие ген тимидинкиназы, могли подавлять рост рака поджелудочной железы [64].

**Карбоксилэстераза.** Механизм противоопухолевого действия этого фермента заключается в том, что он превращает нетоксичный субстрат СРТ-11 в продукт SN-38, который ингибирует топоизомеразу I и вызывает гибель клеток. Показано, что МСК, продуцирующие карбоксилэстеразу, способны сдерживать рост глиомных опухолей

[65], а НСК, в которые с помощью аденовирусной трансдукции ввели экспрессирующую конструкцию, секретировали карбоксилэстеразу и вызвали гибель клеток меланомы [66].

### **Факторы, усиливающие противоопухолевый иммунный ответ (цитокины)**

**IL-12.** Этот гетеродимерный белок считается одним из наиболее мощных цитокинов. Он обладает противоопухолевым действием, активирует Т-лимфоциты и натуральные киллеры, а также проявляет антиангиогенную активность. В большинстве работ противоопухолевое действие СК (НСК, МСК костного мозга и пуповинной крови), продуцирующих IL-12, изучали на ортотопических моделях глиом [67–69]. Обнаружено, что при интракраниальном введении СК рост опухоли значительно замедляется, и у 30–70% мышей увеличивается выживаемость. Уровень IL-12 в крови возрастает на 4–7 сут после инокуляции МСК. Пик IL-12 в опухоли наблюдается на 3 сут, снижение уровня – на 6 сут, далее его уровень не меняется в течение 2 нед. В зоне роста опухоли усиливается инфильтрация цитотоксическими CD4+ и CD8+ Т- и NK-клетками, а также значительно повышается содержание IFN- $\gamma$  в крови и опухоли, что подтверждает сопряженность противоопухолевого эффекта IL-12 с усилением противоопухолевого иммунитета. Замечено, что хотя при контралатеральном подкожном и внутриопухолевом введении МСК обеспечивается одинаковое содержание IL-12 и IFN- $\gamma$  в крови, а при внутривенном введении пик достигается раньше, чем при первых двух способах, противоопухолевый эффект и опухолеспецифичный Т-клеточный иммунный ответ выше при введении клеток непосредственно в опухоль [70]. Повторное введение глиомных клеток в ипсилатеральное и контралатеральное полушарие головного мозга “леченых” мышей не приводит к росту опухоли, что указывает на возникновение устойчивого длительного иммунитета против глиом. Выраженный противоопухолевый эффект МСК, продуцирующих IL-12, наблюдали также на моделях меланомы, рака шейки матки [70], почки [71], саркомы Юинга [72]. Антиметастатическая активность отмечена на моделях метастазирующей меланомы, гепатомы, рака молочной железы [73]. Подкожное введение инкапсулированных в матригель МСК, секретирующих IL-12, ингибирует рост опухоли молочной железы [74].

**IL-2** стимулирует рост и дифференцировку цитотоксических Т-лимфоцитов. Системное введение МСК, продуцирующих IL-2, приводило к подавлению инфильтрации печени и селезенки В-клетками при мышинной лимфоме [75], роста метастазов в легких на метастатической модели рака желчного пузыря хомяков [76], а также к значительному увеличению продолжительности

жизни животных. Кроме того, противомеланомный эффект IL-2, наблюдаемый у 90% мышей, опосредован СВ8+- и НК-клетками, но не цитотоксическими CD4+-Т-лимфоцитами [77].

**IL-4** стимулирует пролиферацию В- и Т-лимфоцитов и дифференцировку Т-хелперных клеток. В 2000 г. в одной из первых работ [78], в которых СК использовали для противоопухолевой терапии, показали, что НСК, продуцирующие IL-4, способны эффективно противостоять росту экспериментальных глиом. При этом ингибирующий эффект опосредуется CD4+- и СВ8+-Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами и макрофагами.

**IL-7** продуцируется стромальными клетками красного костного мозга и тимуса, а также клетками других типов за исключением лимфоцитов. Он стимулирует дифференцировку гемопоэтических клеток-предшественников в лимфоидном направлении, пролиферацию и созревание В-, Т-лимфоцитов и НК-клеток. Установлено, что МСК, секретирующие IL-7, подавляют рост глиом, а при дополнительной иммунизации клеток глиомы посредством экспрессии в них IFN- $\gamma$  вызывают регрессию глиом [79].

**IFN- $\alpha$**  продуцируется макрофагами, фибробластами, а также клетками разного типа в присутствии патогенов. МСК, секретирующие IFN- $\alpha$ , при их многократном подкожном введении способны существенно задерживать рост плазмацитомы и продлевать жизнь мышей. При этом наблюдается апоптоз опухолевых клеток, снижение плотности микрокапилляров и ишемический некроз [80]. В то же время, при внутривенном введении подобные эффекты отсутствовали, вероятно, вследствие “застревания” МСК в легких.

**IFN- $\beta$** . Системное введение МСК, секретирующих IFN- $\beta$ , приводило к остановке роста злокачественных опухолей молочной железы за счет подавления фосфорилирования фактора транскрипции Stat3, а также значительно снижало число метастазов в печени и легких [81].

**Фракталкин (CX3CL1)**. Внутривенное и интратрахеальное введение МСК, экспрессирующих фракталкин, подавляло метастазирование и рост рака легкого [82, 83].

**Антиангиогенные факторы**. МСК, экспрессирующие PEDF (pigment epithelial-derived factor) — фактор, ингибирующий прорастание сосудов в опухоли, останавливают рост рака печени [84] и предстательной железы [85]. МСК, продуцирующие  $\alpha 1$ -антитрипсин, вызывают апоптоз эндотелиальных клеток и, предположительно, могут использоваться для блокирования роста сосудов в опухоли [86].

**Гибридный белок TNF-Tumstatin** подавляет пролиферацию и апоптоз клеток рака предстательной железы человека на ксеногенной модели [87].

**Белки-симпортеры**. Весьма интересным представляется использование МСК, содержащих

конструкции, кодирующие ген *NIS* (симпортер иодида натрия) [88, 89]. Такие клетки трансплантировали животным, служащим экспериментальной моделью рака молочной железы, после чего вводили радиоактивный  $^{131}\text{I}$ . Через 2 недели повышенная радиоактивность хорошо выявлялась в области опухолей с помощью сцинтиграфии или ПЭТ. Если на ранних сроках радиоактивность выявляла и в других тканях, то со временем метка концентрировалась в опухолях. Существенное подавление роста опухолей отмечено при применении  $^{131}\text{I}$  в терапевтических дозах. Таким образом, этот подход применим как для неинвазивного мониторинга, так и в терапии опухолей.

### БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ, БИДОСТУПНОСТЬ И СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МСК

Для обеспечения эффективной противоопухолевой терапии необходимо, чтобы значительное число МСК, продуцирующих противоопухолевые факторы, достигало своей цели. Следует сказать, что в ранних работах, в которых убедительно показана эффективная миграция СК в опухоли головного мозга, использовали интракраниальное введение НСК. Что же касается МСК, то представления о высокой эффективности их хоуминга в опухоли, по-видимому, могут быть несколько преувеличенными, как показано, например, в [37]. В настоящее время надежно установлено, что при стандартном внутривенном введении культивируемых МСК весьма значительная их часть задерживается в легких, поскольку МСК имеют большой размер и физически неспособны проходить по капиллярам [90]. При этом задержанные в легких клетки, по-видимому, не перераспределяются в другие ткани, а погибают. По данным нашей лаборатории число МСК, остающихся в организме мыши, неуклонно снижается после системного введения и через 3 недели составляет менее 5% от введенного количества (готовится к печати). Вследствие этого фактическое количество МСК, способных попасть в опухоль, значительно ниже номинально вводимого. Один из возможных вариантов решения этой проблемы состоит в подборе условий культивирования МСК, позволяющих минимизировать размеры этих клеток. В 2010 г. сообщили, что культивирование МСК в виде сфероидов приводит к существенному снижению их размеров [91]. Наши работы, однако, показали, что применить этот принцип на практике будет не просто, поскольку культивирование в виде сфероидов быстро приводит к гибели МСК, при этом только в сфероидах минимального размера (до 10000 клеток) потери клеток относительно невелики (готовится к печати).

В свете этих данных можно предполагать, что эффективность использования МСК в терапии

опухолей может зависеть от способа их введения в организм. В подтверждение этому показано, что внутриопухолевое введение МСК, секретирующих IL-12, значительно более эффективно, нежели подкожное или внутривенное [70]. Секретирующие IL-12 МСК, инкапсулированные во внеклеточный матрикс и введенные подкожно, ингибировали рост опухолей шейки матки значительно более эффективно, чем неинкапсулированные, вызывая полное исчезновение опухолей у 60% мышей [74]. Впрочем, недоказанной осталась способность инкапсулированных МСК выходить из матрикса и достигать опухолей. Вполне вероятно, что обнаруженные эффекты связаны с отдаленным действием IL-12, секретируемого инкапсулированными клетками.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение МСК, продуцирующих белки с противоопухолевой активностью, в терапии онкологических заболеваний представляет собой новую и весьма интересную стратегию. Несмотря на очевидные перспективы, следует иметь в виду и возможные побочные эффекты, и негативные последствия этого подхода. По данным многих исследователей СК и, в частности МСК, способны стимулировать рост злокачественных новообразований, поскольку эти клетки обладают определенными иммуносупрессорными свойствами и могут рекрутироваться опухолью, создавая строму, которая выполняет поддерживающую и стимулирующую функции и даже может защищать опухоль от атак иммунной системы [3, 92–94]. Очевидно при проведении работ в этой области следует принимать во внимание эти наблюдения. В частности, важно добиваться максимальной степени модификации СК конструкциями, экспрессирующими гены противоопухолевых белков, с тем, чтобы возможный ростстимулирующий эффект МСК перекрывался негативным воздействием синтезируемых ими белков на опухоль. Кроме того, большие перспективы может иметь подход, основанный на одновременном синтезе в МСК как белков, прямо ингибирующих опухоль, так и факторов, стимулирующих клетки иммунной системы. Весьма интересной представляется и стратегия, направленная на подавление иммуносупрессорного фона, характерного для опухолей. Например, введение мышам кроветворных клеток-предшественников, эффективно мигрирующих в опухоли и продуцирующих доминантно-негативный вариант рецептора T $\beta$ RII иммуносупрессорного фактора TGF- $\beta$ , останавливает рост опухоли [95]. Показано, что МСК, стимулированные IFN- $\gamma$ , способны выступать в качестве эффективных антигенпредставляющих клеток [70]. Это их свойство позволяет надеяться на использование СК в иммунотерапии опухолей.

В настоящее время действенность терапии с использованием МСК ограничена невысокой эффективностью хоуминга в опухоли, связанной прежде всего с потерей клеток в капиллярных системах легких и других органов, и кратковременностью сохранения оставшихся МСК после системного введения. Очевидно, что для успешного клинического применения необходимо искать пути решения этих проблем. В качестве альтернативы можно использовать многократное введение клеток, различные пути введения, а также импрегнацию клеток в матрикс для снижения их потерь. Перспективным представляется и использование гемопоэтических клеток-предшественников в качестве средства доставки, поскольку в отличие от МСК они имеют малые размеры, способны беспрепятственно циркулировать в кровотоке и характеризуются эффективным хоумингом в опухоли [96, 97]. Такая стратегия может быть весьма эффективной [98–100].

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.512.11.2051), а также Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (грант А.В. Белявскому).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim J.H., Kim J.Y., Kim S.U., Cho K.G. 2012. Therapeutic effect of genetically modified human neural stem cells encoding cytosine deaminase on experimental glioma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**, 534–540.
2. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р.К., Латыкина К.С. 1970. О фибробластоподобных клетках в культурах кроветворных тканей морских свинок. *Цитология.* **12**, 1147–1155.
3. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* **8**, 315–317.
4. Traktuev D.O., Merfeld-Clauss S., Li J., et al. 2008. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ. Res.* **102**, 77–85.
5. Crisan M., Yap S., Casteilla L., et al. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem. Cell.* **3**, 301–313.
6. Feng J., Mantesso A., De Bari C., et al. 2011. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 6503–6508.
7. Cihova M., Altanerova V., Altaner C. 2011. Stem cell based gene therapy. *Mol. Pharmaceutics.* **8**, 1480–1487.
8. Mizuno H., Tobita M., Uysal A.C. 2012. Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells.* **30**, 804–810.
9. Aquino J.B., Bolontrade M.F., Garcia M.G., et al. 2010. Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gene Therapy.* **17**, 692–708.

10. Ghannam S., Bouffi C., Djouad F., et al. 2010. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanism and clinical applications. *Stem Cell Res. Therapy*. **1**, 1–7.
11. Galderisi U., Giordano A., Paggi M.G. 2010. The bad and the good of mesenchymal stem cells in cancer: boosters of tumor growth and vehicles for targeted delivery of anticancer agents. *World J. Stem Cells*. **2**, 5–12.
12. Zhou Y.F., Bosch-Marce M., Okuyama H., et al. 2006. Spontaneous transformation of cultured mouse bone marrow-derived stromal cells. *Cancer Res*. **66**, 10849–10854.
13. Foudah D., Redaelli S., Donzelli E., et al. 2009. Monitoring the genomic stability of *in vitro* cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chromosome Res*. **17**, 1025–1039.
14. Григорян А.С., Кругляков П.В. 2009. Спонтанная злокачественная трансформация мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в культуре — происходит ли она в действительности? *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. **4**, 78–82.
15. Prockop D.J., Brenner M., Fibbe W.E., et al. 2010. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy*. **12**, 576–578.
16. Ueyama H., Horibe T., Hinotsu S., et al. 2012. Chromosomal variability of human mesenchymal stem cells cultured under hypoxic conditions. *J. Cell Mol. Med*. **16**, 72–82.
17. Aboody K.S., Brown A., Rainov N.G., et al. 2000. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **23**, 12846–12851.
18. Song C.H., Honmou O., Ohsawa N., et al. 2009. Effect of transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on mice infected with prions. *J. Virol*. **83**, 5918–5227.
19. Yang K.L., Lee J.T., Pang C.Y., et al. 2012. Human adipose-derived stem cells for the treatment of intracerebral hemorrhage in rats via femoral intravenous injection. *Cell Mol. Biol. Lett*. **17**, 376–392.
20. Aboody K.S., Najbauer J., Danks M.K. 2008. Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Therapy*. **15**, 739–752.
21. Karp M.J., Teo G.S.L. 2009. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. **4**, 206–216.
22. Hemedi H., Jakob M., Ludwig A.K., et al. 2010. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. **19**, 693–706.
23. Birnbaum T., Roider J., Schankin C.J., et al. 2007. Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J. Neurooncol*. **83**, 241–247.
24. Ringe J., Strassburg S., Neumann K., et al. 2007. Towards *in situ* tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J. Cell Biochem*. **101**, 135–146.
25. Augello A., Kurth T.B., Bari C.D. 2010. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. *Eur. Cells Materials*. **20**, 121–133.
26. Gutova M., Najbauer J., Frank R.T., et al. 2008. Urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor mediate human stem cell tropism to malignant solid tumors. *Stem Cells*. **26**, 1406–1413.
27. Bobis-Wozowicz S., Miekus K., Wybieralska E., et al. 2011. Genetically modified adipose tissue-derived mesenchymal stem cells overexpressing CXCR4 display increased motility, invasiveness, and homing to bone marrow of NOD/SCID mice. *Exp. Hematol*. **39**, 686–696.
28. Thieme S., Ryser M., Gentsch M., et al. 2009. Stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ -directed chemoattraction of transiently CXCR4-overexpressing bone marrow stromal cells into functionalized three-dimensional biomimetic scaffolds. *Tissue Eng. Part C Methods*. **15**, 687–696.
29. Wiehe J.M., Kaya Z., Homann J.M., et al. 2012. GMP-adapted overexpression of CXCR4 in human mesenchymal stem cells for cardiac repair. *Int. J. Cardiol*. [Epub ahead of print]
30. Gheisari Y., Azadmanesh K., Ahmadbeigi N., et al. 2012. Genetic modification of mesenchymal stem cells to overexpress CXCR4 and CXCR7 does not improve the homing and therapeutic potentials of these cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells Dev*. [Epub ahead of print]
31. Maijenburg M.W., Gilissen C., Melief S.M., et al. 2012. Nuclear receptors Nur77 and Nurr1 modulate mesenchymal stromal cell migration. *Stem Cells Dev*. **21**, 228–238.
32. Kim S.M., Kim D.S., Jeong C.H., et al. 2011. CXC chemokine receptor 1 enhances the ability of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells to migrate toward gliomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **407**, 741–746.
33. Klopp A.H., Spaeth E.L., Dembinski J.L., et al. 2007. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res*. **67**, 11687–11695.
34. Komarova S., Roth J., Alvarez R., et al. 2010. Targeting of mesenchymal stem cells to ovarian tumors via an artificial receptor. *J. Ovarian. Res*. **3**, 1–14.
35. Bexell D., Gunnarsson S., Tormin A., et al. 2009. Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol. Ther*. **17**, 183–190.
36. Reagan M.R., Kaplan D.L. 2011. Concise review: mesenchymal stem cell tumor-homing: detection methods in disease model systems. *Stem Cells*. **29**, 920–927.
37. Bexell D., Gunnarsson S., Svensson A., et al. 2012. Rat multipotent mesenchymal stromal cells lack long-distance tropism to 3 different rat glioma models. *Neurosurgery*. **70**, 731–739.
38. Wang H., Cao F., De A., et al. 2009. Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging. *Stem Cells*. **27**, 1548–1558.
39. Anderson S.A., Glod J., Arbab A.S., et al. 2005. Non-invasive MR imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model. *Blood*. **105**, 420–425.
40. Webb G.A., Hoehn M., Himmelreich U. 2006. *In vivo* molecular MR imaging: potential and limit. In: *Modern Magnetic Resonance*. Ed. Webb G.A. Dordrecht, Netherlands: Springer, 1087–1098.

41. Mishra R., Su W., Pohmann R., Pfeuffer J., et al. 2009. Cell-penetrating peptides and peptide nucleic acid-coupled MRI contrast agents: evaluation of cellular delivery and target binding. *Bioconjug. Chem.* **20**, 1860–1868.
42. Patel D., Kell A., Simard B., et al. 2011. The cell labeling efficacy, cytotoxicity and relaxivity of copper-activated MRI/PET imaging contrast agents. *Biomaterials*. **32**, 1167–1176.
43. Korf J., Veenma-van der Duin L., et al. 1998. Divalent cobalt as a label to study lymphocyte distribution using PET and SPECT. *J. Nucl. Med.* **39**, 836–841.
44. Hung S.C., Deng W.P., Yang W.K., et al. 2005. Nov 1. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive *in vivo* positron emission tomography imaging. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7749–7756.
45. Naumova A.V., Reinecke H., Yarnykh V., et al. 2010. Ferritin overexpression for noninvasive magnetic resonance imaging-based tracking of stem cells transplanted into the heart. *Mol. Imaging*. **9**, 201–210.
46. Yaghoubi S.S., Gambhir S.S. 2006. PET imaging of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk) or mutant HSV1-sr39tk reporter gene expression in mice and humans using [18F]-FHBG. *Nat. Protoc.* **1**, 3069–3075.
47. Balyasnikova I.V., Franco-Gou R., Mathis J.M., Lesniak M.S. 2010. Genetic modification of mesenchymal stem cells to express a single-chain antibody against EGFRvIII on the cell surface. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **4**, 247–258.
48. Madeira C., Ribeiro S.C., Pinheiro I.S., et al. 2011. Gene delivery to human bone marrow mesenchymal stem cells by microporation. *J. Biotechnol.* **151**, 130–136.
49. Lam A.P., Dean D.A. 2010. Progress and prospects: nuclear import of nonviral vectors. *Gene Ther.* **17**, 439–447.
50. Choi S.A., Hwang S.K., Wang K.C., et al. 2011. Therapeutic efficacy and safety of TRAIL-producing human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against experimental brainstem glioma. *Neuro. Oncol.* **13**, 61–69.
51. Loebinger M.R., Sage E.K., Davies D., et al. 2010. TRAIL-expressing mesenchymal stem cells kill the putative cancer stem cell population. *Br. J. Cancer.* **103**, 1692–1697.
52. Mueller L.P., Luetzkendorf J., Widder M., et al. 2011. TRAIL-transduced multipotent mesenchymal stromal cells (TRAIL-MSC) overcome TRAIL resistance in selected CRC cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Ther.* **18**, 229–239.
53. Kim S.M., Oh J.H., Park S.A., et al. 2010. Irradiation enhances the tumor tropism and therapeutic potential of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in glioma therapy. *Stem Cells.* **28**, 2217–2228.
54. Kahana S., Finniss S., Cazacu S., et al. 2011. Proteasome inhibitors sensitize glioma cells and glioma stem cells to TRAIL-induced apoptosis by PKC $\epsilon$ -dependent downregulation of AKT and XIAP expressions. *Cell Signal.* **23**, 1348–1357.
55. Loebinger M.R., Eddoaudi A., Davies D., et al. 2009. Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res.* **69**, 4134–4142.
56. Kucerova L., Matuskova M., Pastorakova A., et al. 2008. Cytosine deaminase expressing human mesenchymal stem cells mediated tumour regression in melanoma bearing mice. *J. Gene Med.* **10**, 1071–1082.
57. Cavarretta I.T., Altanerova V., Matuskova M., et al. 2010. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing prodrug-converting enzyme inhibit human prostate tumor growth. *Mol. Ther.* **18**, 223–231.
58. You M.H., Kim W.J., Shim W., et al. 2009. Cytosine deaminase-producing human mesenchymal stem cells mediate an antitumor effect in a mouse xenograft model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **24**, 1393–1400.
59. Shimato S., Natsume A., Takeuchi H., et al. 2007. Human neural stem cells target and deliver therapeutic gene to experimental leptomeningeal medulloblastoma. *Gene Ther.* **14**, 1132–1142.
60. Chang D.Y., Yoo S.W., Hong Y., et al. 2010. The growth of brain tumors can be suppressed by multiple transplantation of mesenchymal stem cells expressing cytosine deaminase. *Int. J. Cancer.* **127**, 1975–1983.
61. Unger M.M., Wahl J., Ushmorov A., et al. 2007. Enriching suicide gene bearing tumor cells for an increased bystander effect. *Cancer Gene Ther.* **14**, 30–38.
62. Pu K., Li S.Y., Gao Y., et al. 2011. Bystander effect in suicide gene therapy using immortalized neural stem cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase gene on medulloblastoma regression. *Brain Res.* **1369**, 245–252.
63. Song C., Xiang J., Tang J., et al. 2011. Thymidine kinase gene modified bone marrow mesenchymal stem cells as vehicles for antitumor therapy. *Hum. Gene Ther.* **22**, 439–449.
64. Zischek C., Niess H., Ischenko I., et al. 2009. Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. *Ann. Surg.* **250**, 747–753.
65. Choi S.A., Lee J.Y., Wang K.C., et al. 2012. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Characteristics and therapeutic potential as cellular vehicles for prodrug gene therapy against brain stem gliomas. *Eur. J. Cancer.* **48**, 129–137.
66. Gutova M., Najbauer J., Chen M.Y., et al. 2010. Therapeutic targeting of melanoma cells using neural stem cells expressing carboxylesterase, a CPT-11 activating enzyme. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **5**, 273–276.
67. Ehteshami M., Kabos P., Kabosova A., et al. 2002. The use of interleukin 12-secreting neural stem cells for the treatment of intracranial glioma. *Cancer Res.* **62**, 5657–5663.
68. Ryu C.H., Park S.H., Park S.A., et al. 2011. Gene therapy of intracranial glioma using interleukin 12-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Hum. Gene Ther.* **22**, 733–743.
69. Hong X., Miller C., Savant-Bhonsale S. 2009. Antitumor treatment using interleukin-12-secreting marrow stromal cells in an invasive glioma model. *Neurosurgery.* **64**, 1139–1146.
70. Seo S.H., Kim K.S., Park S.H., et al. 2011. The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity. *Gene Ther.* **18**, 488–495.
71. Gao P., Ding Q., Wu Z., et al. 2010. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* **290**, 157–166.

72. Duan X., Guan H., Cao Y., et al. 2009. Murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interleukin-12 gene delivery into Ewing sarcoma tumors. *Cancer*. **115**, 13–22.
73. Chen X., Lin X., Zhao J., et al. 2008. A tumor-selective biotherapy with prolonged impact on established metastases based on cytokine gene-engineered MSCs. *Mol. Ther.* **16**, 749–756.
74. Eliopoulos N., Francois M., Boivin M.N. 2008. Neorganoid of marrow mesenchymal stromal cells secreting interleukin-12 for breast cancer therapy. *Cancer Res.* **68**, 4810–4818.
75. Kim S.W., Kim H.J., Kim S.B., et al. 2003. Murine bone marrow stromal cells: implications for their use in gene modified cell therapy. *Leuk. Lymphoma*. **44**, 1973–1978.
76. Kim M.H., Lee S.S., Lee S.K., et al. 2006. Interleukin-2 gene-encoded stromal cells inhibit the growth of metastatic cholangiocarcinomas. *World J. Gastroenterol.* **12**, 1889–1894.
77. Stagg J., Lejeune L., Paquin A., Galipeau J. 2004. Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Hum. Gene Ther.* **15**, 597–608.
78. Benedetti S., Pirola B., Pollo B., et al. 2000. Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat. Med.* **6**, 447–450.
79. Gunnarsson S., Bexell D., Svensson A., et al. 2010. Intratumoral IL-7 delivery by mesenchymal stromal cells potentiates IFN $\gamma$ -transduced tumor cell immunotherapy of experimental glioma. *J. Neuroimmunol.* **218**, 140–144.
80. Sartoris S., Mazzocco M., Tinelli M., et al. 2011. Efficacy assessment of interferon-alpha-engineered mesenchymal stromal cells in a mouse plasmacytoma model. *Stem Cells Dev.* **20**, 709–719.
81. Ling X., Marini F., Konopleva M., et al. 2010. Mesenchymal stem cells overexpressing IFN- $\beta$  inhibit breast cancer growth and metastases through stat3 signaling in a syngeneic tumor model. *Cancer Microenviron.* **3**, 83–95.
82. Xin H., Kanehira M., Mizuguchi H., et al. 2007. Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. **25**, 1618–1626.
83. Xin H., Sun R., Kanehira M., et al. 2009. Intratracheal delivery of CX3CL1-expressing mesenchymal stem cells to multiple lung tumors. *Mol. Med.* **15**, 321–327.
84. Gao Y., Yao A., Zhang W., et al. 2010. Human mesenchymal stem cells overexpressing pigment epithelium-derived factor inhibit hepatocellular carcinoma in nude mice. *Oncogene*. **29**, 2784–2794.
85. Zolochovska O., Yu G., Gimble J., Figueiredo M.L. 2011. PEDF and MDA-7 cytokine gene therapies delivered by adipose-derived mesenchymal stem cells are effective in reducing prostate cancer cell growth. *Stem Cells Dev.* **21**, 1112–1123.
86. Ghaedi M., Soleimani M., Taghvaie N.M., et al. 2011. Mesenchymal stem cells as vehicles for targeted delivery of anti-angiogenic protein to solid tumors. *J. Gene Med.* **13**, 171–180.
87. Zhang X., Xu W., Qian H., et al. 2011. Mesenchymal stem cells modified to express lentivirus-TNF $\alpha$ -Tumstatin inhibit the growth of prostate cancer. *J. Cell Mol. Med.* **15**, 433–444.
88. Dwyer R.M., Ryan J., Havelin R.J., et al. 2011. Mesenchymal stem cell (Msc) mediated delivery of the sodium iodide symporter (Nis) supports radionuclide imaging and treatment of breast cancer. *Stem Cells*. **29**, 1149–1157.
89. Knoop K., Kolokythas M., Klutz K., et al. 2011. Image-guided, tumor stroma-targeted (131)I therapy of hepatocellular cancer after systemic mesenchymal stem cell-mediated NIS gene delivery. *Mol. Ther.* **19**, 1704–1713.
90. Lee R.H., Pulin A.A., Seo M.J., et al. 2009. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Stem Cell*. **5**, 54–63.
91. Bartosh T.J., Ylöstalo J.H., Mohammadipour A., et al. 2010. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their anti-inflammatory properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 13724–13729.
92. Hodgkinson C.P., Gomez J.A., Mirotsoy M., Dzau V.J. 2010. Genetic engineering of mesenchymal stem cells and its application in human disease therapy. *Hum. Gene Ther.* **21**, 1513–1526.
93. Nardi N.B., Camassola M. 2011. Isolation and culture of rodent bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Meth. Mol. Biol.* **698**, 151–160.
94. Porada C.D., Almeida-Porada G. 2010. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 1156–1166.
95. Noyan F., Díez I.A., Hapke M., et al. 2012. Induced transgene expression for the treatment of solid tumors by hematopoietic stem cell-based gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **19**, 352–357.
96. Davis C., Price R., Acharya G., et al. 2011. Hematopoietic derived cell infiltration of the intestinal tumor microenvironment in Apc Min/+ mice. *Microsc. Microanal.* **17**, 528–539.
97. Tabatabai G., Hasenbach K., Herrmann C., et al. 2010. Glioma tropism of lentivirally transduced hematopoietic progenitor cells. *Int. J. Oncol.* **36**, 1409–1417.
98. Beyer I., Li Z., Persson J., et al. 2011. Controlled extracellular matrix degradation in breast cancer tumors improves therapy by trastuzumab. *Mol. Ther.* **19**, 479–489.
99. Casazza A., Fu X., Johansson I., et al. 2011. Systemic and targeted delivery of semaphorin 3A inhibits tumor angiogenesis and progression in mouse tumor models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 741–749.
100. Li Z., Liu Y., Tuve S., et al. 2009. Toward a stem cell gene therapy for breast cancer. *Blood*. **113**, 5423–5433.