

# Význam fibroblastů asociovaných s nádorem při patogenezi karcinomů v oblasti hlavy a krku

## The Importance of Cancer-Associated Fibroblasts in the Pathogenesis of Head and Neck Cancers

Raudenská M.<sup>1</sup>, Svobodová M.<sup>2</sup>, Gumulec J.<sup>2</sup>, Falk M.<sup>3</sup>, Masařík M.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup> Fyziologický ústav, LF MU, Brno

<sup>2</sup> Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno

<sup>3</sup> Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Brno

<sup>4</sup> 1. LF UK a BIOCEV – Biotechnologické a biomedicínské centrum AV ČR, v.v.i., Vestec

### Souhrn

**Východiska:** Navzdory pokroku v protinádorové terapii jsou spinocelulární karcinomy v oblasti hlavy a krku (head and neck squamous cell carcinoma – HNSCC) stále spojeny s nízkou mírou dlouhodobého přežívání pacientů. Nedávné studie poukazují na to, že nádorové stroma může hrát důležitou roli v patogenezi tohoto maligního onemocnění. Fibroblasty jsou hlavní složkou nádorového mikroprostředí a mohou významně ovlivňovat progresi HNSCC, protože přispívají k významným znakům onkogeneze, jako je zánět, neomezený růst, angiogeneze, invaze, vznik metastáz a rezistence k terapii. Je dobře známo, že nádorové buňky mohou modulovat fenotyp fibroblastů do podoby fibroblastů asociovaných s nádorem (cancer-associated fibroblast – CAF), které následně mohou podporovat růst a šíření nádorových buněk. CAF stimuluje progresi nádoru prostřednictvím kontaktů mezi buňkami, remodelace extracelulární matrix a produkce velkého množství signálních molekul a matrixových metaloproteináz. Genetické a epigenetické změny v epiteliálních buňkách tedy pravděpodobně nejsou výlučným faktorem řídícím kancerogenezi HNSCC, jelikož se na tomto procesu mohou významně podílet i negenetické změny v buňkách stromatu. Signály vyvolané buněčným stresem narušují funkční program mnoha buněk, čímž se ve tkáni vytváří oblasti predisponované k maligní transformaci. Koncept „nádorového pole“ (field cancerization) představuje proces aktivního vývoje mezibuněčných interakcí a zpětnovazebných smyček mezi nádorovými a stromálními buňkami. Tento model se jeví jako velice slibný, otvírá nové způsoby studia nádorového onemocnění a může poskytnout nové terapeutické cíle. **Cíl:** V tomto přehledovém článku diskutujeme současné poznatky o CAF, jako je jejich buněčný původ, fenotypová plasticita a funkční heterogenita, a podtrhujeme jejich vliv na progresi HNSCC.

### Klíčová slova

dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku – fibroblasty asociované s nádorem – mikroprostředí nádoru – extracelulární matrix – metastázy nádorů – angiogeneze

Práce na tomto článku byla podpořena projektem AZV 16-29835A.

This article was supported by the project AZV 16-29835A.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslání do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. RNDr. Michal Masařík, Ph.D.  
Ústav patologické fyziologie  
LF MU  
Kamenice 5  
625 00 Brno  
e-mail: masarik@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 18. 6. 2019  
Přijato/Accepted: 9. 9. 2019

doi: 10.14735/amko202039

## Summary

**Background:** Despite progress in anticancer therapies, head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) has still a low survival rate. Recent studies have shown that tumour stroma may play an important role in the pathogenesis of this malignant disease. Fibroblasts are a major component of the tumour microenvironment and may significantly influence HNSCC progression as indicated by the contribution they make to important hallmarks of cancer, such as inflammation, non-restricted growth, angiogenesis, invasion, metastasis, and therapy resistance. It is well known that tumour cells can confer a cancer-associated fibroblast (CAF) phenotype that supports the growth and dissemination of cancer cells. CAFs can stimulate cancer progression through cell-cell contacts and communication, remodelling of extracellular matrix, and production of many signal molecules and matrix metalloproteinases. Consequently, genetic changes in epithelial cells are probably not the only factor that drives HNSCC carcinogenesis. Non-genetic changes in the tumour stroma can also be significantly involved. Stress-induced signals can induce a multicellular program, creating a field of tissue that is predisposed to malignant transformation. The “field cancerization” concept represents a process of active evolution of intercellular interactions and feedback loops between tumour and stromal cells. This model paves the way to study cancer from a new perspective and identify new therapeutic targets. **Purpose:** In this review, we discuss current knowledge about CAFs, such as their cellular origin, phenotypical plasticity and functional heterogeneity, and stress their contribution to HNSCC progression.

## Key words

head and neck squamous cell carcinoma – cancer-associated fibroblasts – cancer microenvironment – extracellular matrix – neoplasm metastasis – angiogenesis

## Úvod

Nádory hlavy a krku jsou globálně pátými nejčastěji se vyskytujícími solidními tumory. Převládající formou tohoto onemocnění jsou nádory dlaždicobuněčné (neboli spinocelulární), které představují více než 90 % všech nádorů této oblasti. Spinocelulární karcinomy hlavy a krku (head and neck squamous cell carcinoma – HNSCC) jsou přesněji klasifikovány podle své polohy (nádory dutiny ústní či nosní, orofaryngu, nosohltanu, hrtanu nebo hypofaryngu), TNM (tumour-node-metastasis) stadia a histologického gradingu. Při léčbě nádorů raného stadia (stadium I a II) jsou účinnými přístupy chirurgie a radioterapie, nicméně u 70 % pacientů je diagnostikováno stadium pokročilé, III nebo IV, kde je efektivita uvedených způsobů terapie radikálně nižší [1]. Zatímco u pacientů s I. a II. stadiem je 5leté přežití v rozmezí 70–90 % (nezávisle na lokalizaci tumoru), 50 % pacientů s pokročilejším stadiem karcinomu zemře do 2 let od stanovení diagnózy. U 5 % pacientů dochází po léčbě k rozvoji dalšího primárního nádoru [2]. Špatná terapeutická odpověď pacientů s pokročilými nádory zdůrazňuje urgentní potřebu hlubšího porozumění mechanismům patogeneze HNSCC. V rámci řešení tohoto závažného klinického problému bylo provedeno mnoho studií zaměřených na poznání vlastností nádorových buněk. S postupem času se však ukazuje, že terapeutická rezistence není pouze inherentní charakteristikou samot-

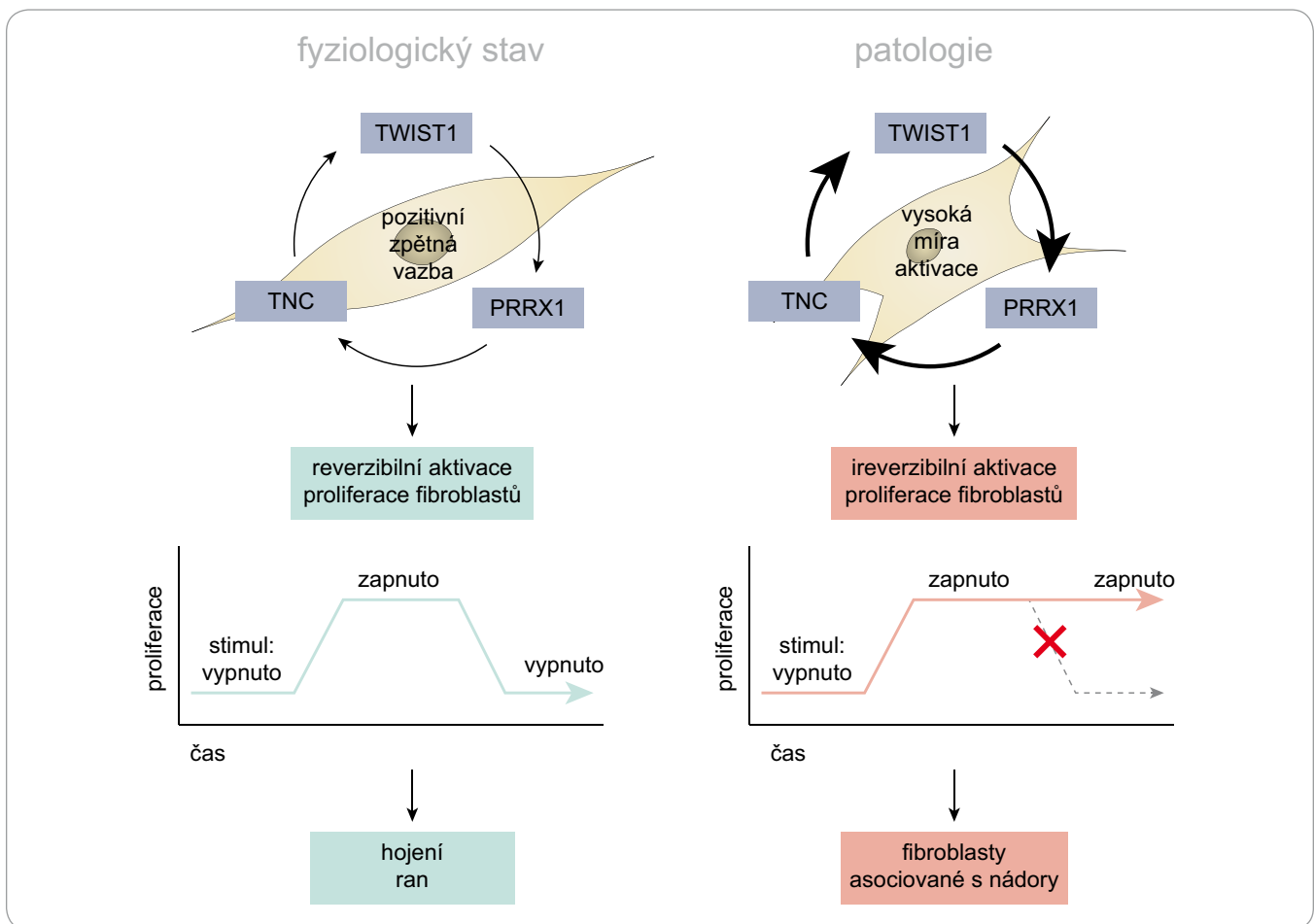
ných nádorových buněk a klíčovou roli mohou hrát rovněž buňky nádorového stromatu a jejich komunikace s buňkami nádorovými [3]. Tento vliv je natolik zásadní, že v některých případech dochází k reverzi rezistence nádorových buněk, pokud je narušena podpůrná (pronádorová) funkce buněk stromatu [4]. V nádorovém mikroprostředí (tumour microenvironment – TME) se nachází mnoho typů buněk, molekul extracelulární matrix (extracellular matrix – ECM) a signálů, které mohou inhibovat, či naopak podporovat růst nádorů. Zásadní podíl na rozvoji HNSCC má např. infekce virem HPV. Karcinomy pozitivní na HPV jsou lokalizovány zejména v oblasti orofaryngu a vykazují příznivější terapeutickou odpověď na radioterapii. Problematika HPV a jeho vlivu na kancerogenezi HNSCC byla podrobně zpracována např. v článku Rautava et al (2012) [5]. V tomto přehledovém článku jsme se zaměřili na roli fibroblastů asociovaných s nádorem (cancer-associated fibroblast – CAF) v TME HNSCC.

### Fibroblasty klidové a aktivované

Fibroblasty jsou buňky mezenchymového původu, které jsou nejhodnějšími buňkami pojivové tkáně a výrazně se podílejí na syntéze i degradaci složek ECM. V důsledku toho jsou fibroblasty zodpovědné za zajištění strukturní integrity většiny tkání. Produkty fibroblastů rovněž spoluvytvářejí bazální membránu, která poskytuje ochrannou bariéru kolem spe-

cializovaného epitelu a přispívá k jeho polaritě, funkčnosti a specifčnosti [6]. Prostřednictvím tvorby a remodelace ECM ovlivňují fibroblasty organogenezi a diferenciaci epitelu. V dobře diferencované a intaktní tkáni zůstávají fibroblasty v klidovém, neproliferujícím stavu a obvykle se nacházejí v intersticiálních oblastech mezi vrstvami funkčního parenchymu. Jsou to tenké, protáhlé buňky vřetenovitého tvaru, které nejsou napojeny na bazální membránu, zato však navazují intenzivní kontakt s vlákny ECM. Klidové fibroblasty jsou obecně považovány za quiescentní, mající mírnou metabolickou a transkripční aktivitu [7]. Spolehlivý marker klidových fibroblastů stále chybí, nicméně fibroblastový specifický protein 1 (fibroblast-specific protein 1 – FSP1 alias S100A4) se této definici zřejmě blíží nejvíce [8]. Je ovšem třeba si uvědomit, že FSP1 není zcela specifický pro fibroblasty. Jeho exprese byla nalezena rovněž u prozánětlivé subpopulace makrofágů v játrech [9] a u nádorových buněčných linií epiteliálního původu [10].

Schopnost aktivace klidových fibroblastů byla poprvé pozorována při procesu hojení ran [11] a později v podmínkách, jako je akutní a chronický zánět a tkáňová fibróza [12]. Pokud dojde k poškození tkáně, rezidentní populace fibroblastů je aktivována, proliferuje a migruje do poraněné oblasti v reakci na signalizaci krevních destiček, které uvolňují svůj bioaktivní obsah, např. transfor-



**Obr. 1. Aktivace fibroblastů pomocí Twist1-Prrx1-TNC pozitivní zpětné vazby.**

Za normálních podmínek působí zpětná vazba mezi Twist1-Prrx1 a TNC jako reverzibilní přepínač. Fibroblasty se vyskytují v aktivovaném stavu pouze po dobu jejich dostatečně vysoké stimulace (stav „zapnuto“). Po odeznění stimulačních impulzů přepínač přejde do stavu „vypnuto“. Za patologických podmínek však může dojít k trvalému zapnutí tohoto přepínače, což vede k trvalé aktivaci fibroblastů. Volně přepracováno dle [19].

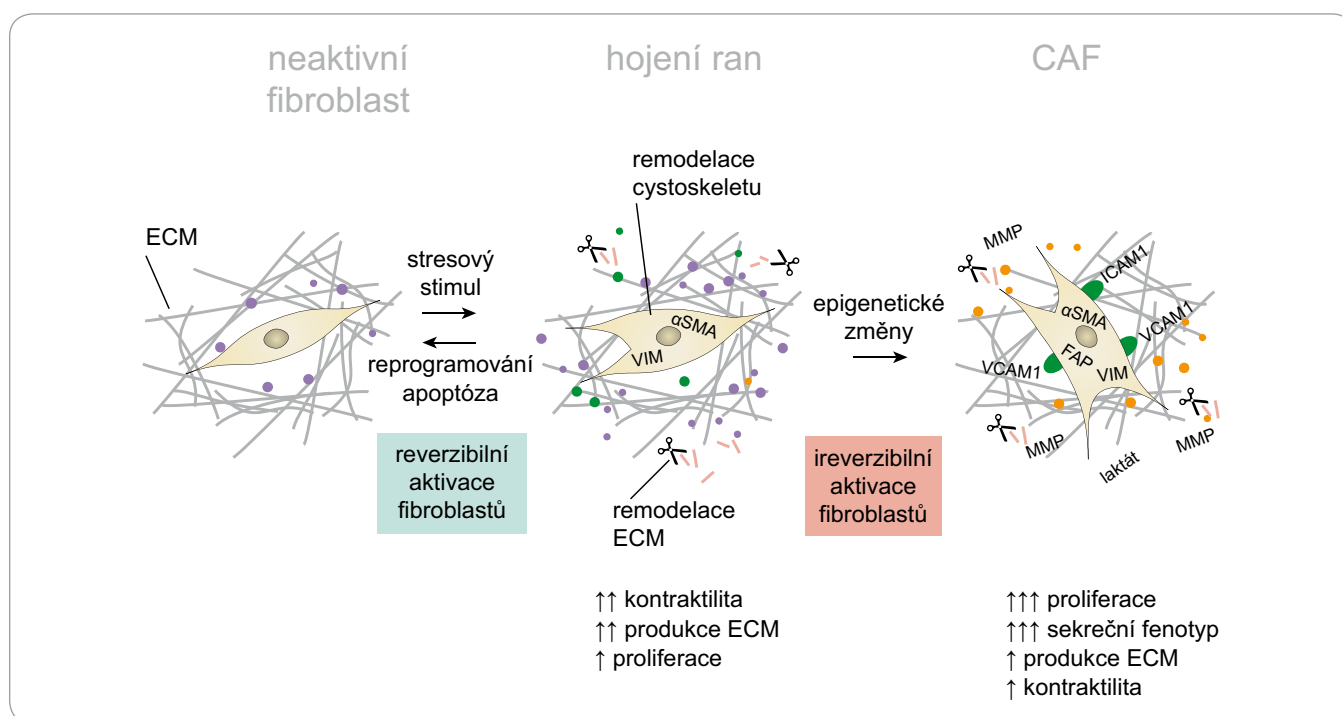
TNC – tenascin C, PRRX1 – paired-related homeobox 1

mující růstový faktor  $\beta 1$  (transforming growth factor  $\beta 1$  – TGF $\beta 1$ ), růstový faktor odvozený z destiček (platelet derived growth factor – PDGF) a interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ). Bazální membrána je degradována a dochází k rekrutování dalších fibroblastů a zánětlivých buněk [13]. Takto se chovající fibroblasty se obecně považují za „aktivované“. U aktivovaných fibroblastů vzrůstá produkce vimentinu, aktinu a  $\alpha$ -aktinu hladké svaloviny ( $\alpha$ -smooth muscle actin –  $\alpha$ -SMA kódovaný genem ACTA2), což jim umožňuje vyvíjet kontraktilní síly potřebné k uzavření rány [14]. Kontraktilita je zprostředkována fokální adhezí mezi aktivovanými fibroblasty a molekulami ECM. V důsledku aktivované exprese aktinu hladké svaloviny jsou aktivované fibroblasty často pojmenovávány jako myo-

fibroblasty, tedy buňky na pomezí fibroblastů a myoblastů. Fibroblasty odebrané z místa hojící se rány nebo z fibrotické tkáně kultivované v podmínkách *in vitro* aktivně syntetizují složky ECM a dělí se více než jejich protějšky izolované z nepoškozených tkání. Mezi produkovánými složkami ECM nechybí kolageny typu I, III, IV a V, různé typy lamininů a fibronektin [15].

Poté, co se rána uzavře, dochází k deaktivaci a masivní apoptóze myofibroblastů. Dlouhodobé přetrvávání myofibroblastů může vést k rozvoji závažných patologických stavů vč. idiopatické plicní fibrózy [16] a nádorů [17]. Mechanismy podílející se na přetrvávající aktivaci fibroblastů nejsou doposud zcela prozkoumány, nicméně je velmi pravděpodobné, že se tohoto procesu účastní po-

zitivní zpětná vazba poskytovaná např. biofyzikálními vlastnostmi opravované tkáně. V důsledku zvýšené produkce, ukládání a vzájemné provázanosti ECM proteinů se zvyšuje tuhost ECM v okolí aktivovaných myofibroblastů. Zvýšená tuhost ECM se může podílet na další aktivaci a perzistenci myofibroblastů, což vede k navýšené tvorbě proteinů ECM a opětovnému zvýšení tuhosti ECM za vzniku pozitivní zpětnovazebné smyčky. Během fyziologického hojení ran je tato amplifikační zpětnovazebná smyčka po nějaké době ukončena. Některé studie naznačují, že přežití aktivovaných myofibroblastů závisí na signálech vycházejících z mechanoreceptorů a přenášených signálními drahami reagujícími na mechanickou stimulaci (proces mechanotransdukce). Přerušení mechano-



**Obr. 2. Model aktivace CAF fenotypu.**

Klidové fibroblasty jsou vřetenovité buňky obklopené fyziologickou ECM. V důsledku poranění tkáně a s ním asociovaných aktivačních stimulů se u fibroblastů zvyšuje exprese  $\alpha$ -SMA, VCAM-1, ICAM-1 a vimentinu; aktivované fibroblasty ztrácí vřetenovitý tvar a díky přestavbám cytoskeletu získávají vysokou schopnost kontraktility a migrace. Dochází k remodelaci ECM a aktivaci sekrečního fenotypu, který dále zesiluje aktivaci a proliferaci fibroblastů. Tento stupeň aktivace je reverzibilní. Reverzibilita takové aktivace může být vysvětlena přeprogramováním nebo apoptózou aktivovaných fibroblastů. U CAF dochází k jejich nevratné aktivaci, umocnění sekrečního fenotypu, další remodelaci ECM a produkci imunomodulačních faktorů. Tento proces je spojen s rozvojem nádorových lézí. Změny v epigenetické regulaci mohou omezit reverzibilitu takovéhoto aktivovaných stavů. CAF získávají zvýšené proliferační vlastnosti a vytvářejí funkčně různorodou populaci, což zvyšuje dynamickou komplexnost vyvíjejícího se nádorového mikroprostředí. Volně přepracováno dle [7].

CAF – fibroblasty asociované s nádorem, ECM – extracelulární matrix,  $\alpha$ -SMA –  $\alpha$ -aktin hladké svaloviny, VCAM1 – vaskulární intercelulární adhezivní molekula 1, ICAM1 – intracelulární adhezivní molekula 1, VIM – vimentin, MMP – matrixová metaloproteináza, FAP – protein aktivovaných fibroblastů

transdukční signalizace u aktivovaných fibroblastů, nikoliv však u neaktivovaných fibroblastů ve zdravé tkáni, vede k indukci apoptózy [18]. Další smyčka pozitivní zpětné vazby může vzniknout v signální dráze Twist1-Prrx1-TNC (paired-related homeobox 1; tenascin C). Twist1 a Prrx1 jsou transkripční faktory nezbytné pro vývoj tkání odvozených z mezodermy, které jsou schopny stimulovat přeměnu normálních klidových fibroblastů na fibroblasty aktivované. TNC pak představuje glykoprotein, který se účastní tvorby ECM. Injekce exogenního TNC do místa poranění je schopna indukovat pozitivní zpětnou vazbu mezi Twist1-Prrx1 a TNC a přispívá ke vzniku fibrotické tkáně podobné idiopatické plicní fibróze [19]. Zpětnovazebná smyčka Twist1-Prrx1-TNC může

být trvale zapnuta, což vede k patologické aktivaci fibroblastů (obr. 1). Myši postrádající expresi buď TLR4 (toll-like receptor 4), nebo jeho ligandů (např. tenascin C) trpí méně závažnou fibrózou kůže, plic a srdce v důsledku působení bleomycinu [20].

### CAF fenotyp

Nádory jsou přirovnávány k ranám, které se nehojí [17], neboť dokážou využít proces hojení ran ke svému prospěchu a ve svém okolí udržovat vysokou míru aktivace fibroblastů. Na rozdíl od procesu hojení rány, ve kterém jsou fibroblasty postupně deaktivovány, zůstávají fibroblasty v TME trvale vystaveny podnětům, které podporují vznik sekrečního fenotypu a fenotypů remodelujících ECM (obr. 2). CAF mohou také

získat zvýšenou schopnost autokrinní signalizace a následně vysoce proliferační či migrační fenotyp. Kromě rezidentních tkáňových fibroblastů mohou jako prekurzory CAF sloužit také adipocyty [21], hematopoetické kmenové buňky [22], mezenchymální kmenové buňky odvozené z kostní dřeně [23], buňky epitelů (prostřednictvím epitelomezenchymové tranzice – EMT [24,25]) a buňky endotelové (prostřednictvím endotelomezenchymové tranzice – EndMT [26]) [27,28]. Aktivované fibroblasty se snadno transdiferencují do chondrocytů, myocytů, adipocytů a endotelových buněk [7].

### Definice CAF

Přesná a specifická molekulární definice CAF prozatím neexistuje, což patrně

odráží skutečnost, že CAF jsou spíše buněčným stavem než buněčným typem. Většina studií uvádí, že CAF exprimují podobné sady markerů jako myofibroblasty. Nejčastěji využívaným markerem CAF je zřejmě  $\alpha$ -SMA, nicméně využívány jsou také další markery jako např. FAP (fibroblast-activation protein), PDGFR- $\alpha$  (platelet-derived growth factor receptor- $\alpha$ ) a PDGFR- $\beta$ . Žádný z těchto markerů ale specificky neoznačuje všechny typy CAF nebo jasně neodlišuje CAF od normálních fibroblastů nebo jiných blízkých příbuzných typů buněk [13].  $\alpha$ -SMA je například exprimován rovněž u pericytů a buněk hladké svaloviny, PDGFR- $\alpha$  u astrocytů a PDGFR- $\beta$  u pericytů a neuronů [13,29]. Vzhledem ke zjevné heterogenitě fibroblastů a jejich různému původu je obtížné rozlišit „pravé“ fibroblasty od buněk podobných fibroblastům. Aby tak bylo možné CAF klasifikovat, musí být použita kombinace několika různých markerů. Například  $\alpha$ -SMA-pozitivní CAF mohou být odlišeny od pericytů na základě negativity na NG-2 antigen (neuron glial antigen 2) a RGS5 (regulator of G-protein signaling 5), jelikož pericyty jsou na tyto markery pozitivní [13]. V několika studiích byly identifikovány proteiny, jejichž exprese by měla být specifická pro CAF. Mezi tyto nadějně markery patří aspirin [30], kolagen 11 $\alpha$ 1 (COL11A1) [31] a MFAP5 (microfibrillar-associated protein 5) [32].

#### Aktivace CAF fenotypu

Zásadní otázkou zůstává, kdy se fibroblast stává CAF. Nomenklatura naznačuje, že se CAF nacházejí pouze v nádorové tkáni, nicméně termín CAF by mohl stejně dobře označovat jakýkoli fibroblast s pronádorovou aktivitou. Důkazy pro existenci CAF, jejichž výskyt předchází vznik malignity, byly získány z prsní tkáně zdravých žen. Zatímco fibroblasty získané z prsní tkáně s vysokou mamografickou denzitou podporovaly rozvoj nádorového onemocnění, fibroblasty odvozené z prsní tkáně s nízkou mamografickou denzitou nikoliv. Následné porovnání genové exprese těchto dvou odlišných typů fibroblastů vedlo k identifikaci CD36 jakožto klíčového markeru ve změně fenotypu fibroblastů [33].

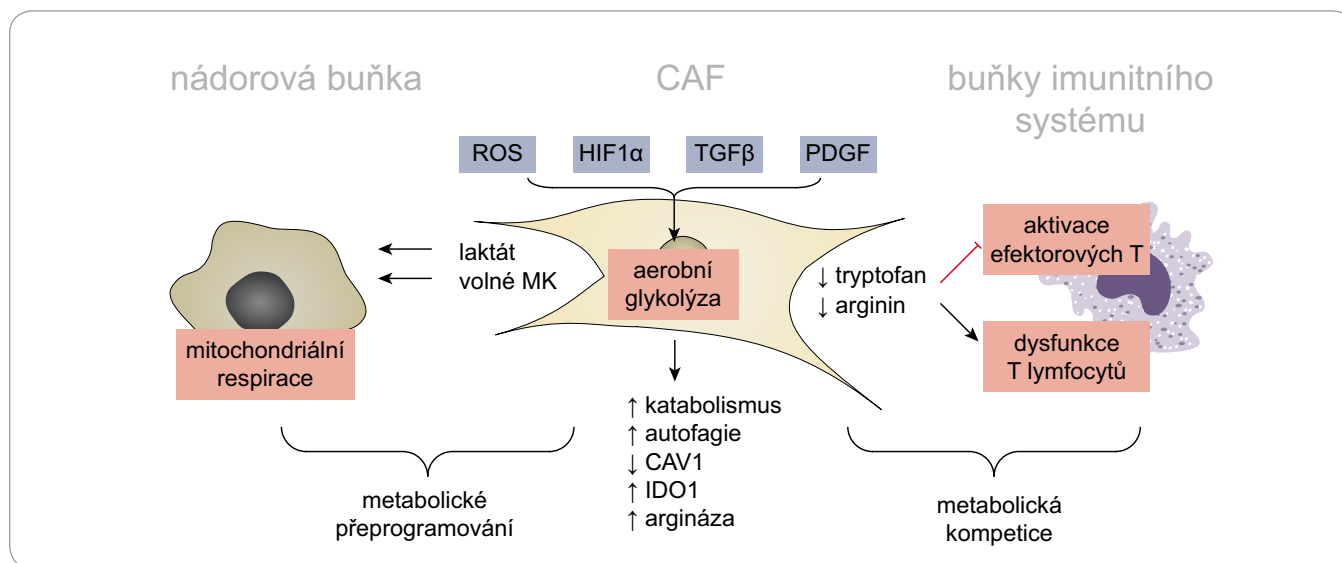
CD36 je glykoprotein, který zastává nezastupitelnou roli v transportu mastných kyselin, a to zejména v srdci, kosterním svalstvu a tukové tkáni. Současně ovlivňuje i obsah adipocytů a akumulaci ECM. Zmíněná pozorování naznačují, že aktivace stromálního programu, jež podporuje nádor, může být v onkogenezi časnou událostí [33]. Zajímavou skutečností je, že populace rezidentních tkáňových fibroblastů z různých částí těla a v rámci jednotlivých orgánů mohou mít výrazně odlišnou náchylnost k získání fenotypu CAF [7]. Například fibroblasty vyskytující se v prostatice tkáni potlačovaly maligní přeměnu imortalizovaného epitelu prostaty [34]. Naopak fibroblasty získané z místa perzistentního zánětu, třeba od pacientů s revmatoidní artritidou, vykazovaly často nádor podporující fenotyp [35]. Rovněž v rámci pro-nádorových CAF se mohou vyskytovat různé subpopulace s odlišnými vlastnostmi. Subpopulace orálních CAF s nižším skóre po barvení  $\alpha$ -SMA (CAF typu C1) podporovala proliferaci nádorových buněk, ale potlačovala jejich přeměnu v nádorové kmenové buňky. Na druhou stranu, CAF s vyšším skóre  $\alpha$ -SMA barvení (CAF typu C2) exprimovaly nižší hladiny BMP4 (bone morphogenetic protein 4), přičemž jejich přítomnost byla spojena s nižší proliferací buněk karcinomu ústní dutiny, zároveň však i s vyšší frekvencí výskytu nádorových kmenových buněk [36].

Doposud není zřejmé, které procesy jsou zásadní pro aktivaci fenotypu CAF. Četné studie ukázaly, že na rozdíl od nádorových epitelálních buněk jsou změny počtu kopií genů a onkogenní a nádorově supresorové mutace (např. mutace TP53) u CAF poměrně vzácné [29]. Hybatelem fenotypu CAF jsou zřejmě epigenetické změny (tj. metylace DNA, modifikace histonů, změny v expresi nekódujících RNA aj.) a abnormální aktivace či inaktivace některých signálních drah (obr. 1, 3). Například umlčení CBF-1 (C-repeat-binding factor alias RBP-J $\kappa$ ) kombinované se sníženou expresí funkčního p53 v kožních fibroblastech postačovalo pro aktivaci fenotypu CAF podporujícího indukci nádorů odvozených od keratinocytů. Na snížení exprese p53 se podílel fibroblas-

tový růstový faktor 2 (fibroblast growth factor 2 – FGF2) vylučovaný sousedními epitelálními nádorovými buňkami [37]. Jak již bylo zmíněno, jako významný aktivátor fenotypu CAF může sloužit také zpětnovazebná smyčka Twist1-Prrxl-TNC (obr. 1) [19], CCN2 alias růstový faktor pojivové tkáně (connective tissue growth factor – CTGF) [38], umlčení exprese TGF $\beta$ 2 (transforming growth factor- $\beta$  type 2 receptor) [39], a naopak aktivace faktorů TLR4 [40,41], CCR5 (C-C chemokine receptor type 5) [42,43] a IRF3 (interferon regulatory factor 3) [44]. Prozářlivý cytokin LIF (leukemia inhibitory factor) se podílí na aktivaci Janusovy kinázy 1 (JAK1) a transkripčního faktoru STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), čímž aktivuje DNA-metyltransferázy 1 (DNMT1) a DNA-metyltransferázy 3b (DNMT3b) a také hypermetylací a umlčení některých klíčových regulačních genů. V důsledku těchto procesů LIF zvyšuje kontraktilitu aktomyozinu a umožňuje tak CAF vytvářet cesty skrze ECM, které jsou následně využívány nádorovými buňkami při kolektivní invazi [45,46]. Kromě výše popsaných mechanismů mohou být normální fibroblasty konvertovány na CAF působením microRNA obsažených v exozomech a mikrovezikulech produkovaných nádorovými buňkami. Tuto konverzi může vyvolat např. miR-214 u nádorů vaječníku a miR-155 u karcinomu pankreatu [47].

#### CAF v nádorovém mikroprostředí

Víceokrový proces progresu nádorového onemocnění vyžaduje podporu buněk obsažených ve stromatu. Klidové fibroblasty však na rozdíl od CAF vykazují spíše inhibiční účinky na buněčnou proliferaci a motilitu nádorových buněk [48]. Pokud má tedy vzniknout nádor, TME musí být přeprogramováno na nádorově permissivní fenotyp. Současné studie naznačují, že vytvoření nádorově permissivního prostředí může dokonce předcházet vzniku samotného ložiska nádorových buněk. Signály indukované buněčným a tkáňovým stresem mohou spustit koordinovaný program koevoluce, který umožní zrod a proliferaci nádorových buněk a upevní interakce mezi nádorovými buňkami



**Obr. 3. Model metabolické symbiózy a konkurence v nádorovém mikroprostředí.** Aktivace CAF a udržení jejich sekrečního fenotypu je energeticky náročná a vyžaduje metabolické změny. U některých typů CAF proto dochází k aktivaci aerobní glykolýzy. Zvýšená závislost CAF na aerobní glykolýze může být vyvolána mnoha faktory – sníženou dostupností kyslíku v rostoucích nádorech, stabilizací faktoru HIF1 $\alpha$ , aktivitou signálních drah TGF $\beta$  a PDGF nebo ztrátou exprese CAV1, zprostředkovanou reaktivními kyslíkovými radikály. Zvýšená produkce laktátu, mastných kyselin a ketolátů podporuje mitochondriální respiraci nádorových buněk. Zatímco metabolická symbióza mezi CAF a nádorovými buňkami stimuluje růst a maligní fenotyp nádorových buněk, jejím vedlejším efektem je snížení dostupnosti klíčových metabolitů pro jiné složky TME. Tato metabolická konkurence následně narušuje funkčnost protinádorové imunity. Například zvýšená exprese indolamin 2,3-dioxygenázy 1 a argináz (ARG1 a ARG2) v CAF radikálně snižuje dostupnost tryptofanu a argininu v TME, čímž inhibuje proliferaci a aktivaci efektorových T lymfocytů. Volně přepracováno dle [7].

CAF – fibroblasty asociované s nádorem, HIF1 $\alpha$  – hypoxia inducible factor 1  $\alpha$ , TGF $\beta$  – transformující růstový faktor  $\beta$ , PDGF – růstový faktor odvozený z destiček, CAV1 – caveolin 1, TME – nádorové mikroprostředí, ROS – reaktivní kyslíkové radikály, IDO1 – indolamin 2,3-dioxygenáza 1, MK – mastné kyseliny

a mikroprostředím [29]. Komunikace v rámci TME může být významně ovlivňována pomocí exozomů. Exozomy uvolňované nádorovými buňkami nebo jinými buňkami stromatu mohou do stromálních fibroblastů dodávat aktivní růstové faktory a cytokiny, stejně jako funkční fragmenty DNA a kódující a nekódující RNA, a indukovat jejich aktivaci [49–54]. Po přeprogramování klidových fibroblastů na CAF dochází k dynamickým změnám jejich metabolismu a sekretomu, což potencuje trvalou autokrinní aktivaci CAF. Bylo prokázáno, že fenotyp CAF (zejména jeho sekreční vzorec) do značné míry přetrvává při *in vitro* kultivaci i bez pokračující stimulace CAF nádorovými buňkami [55].

#### CAF a podpora primárního nádoru

CAF vylučují mnoho růstových faktorů a cytokinů, které mohou podporovat růst nádorových buněk a ovlivňovat ostatní buňky nádorového mikroprostředí. Jako příklad může být uveden růstový faktor hepatocytů (hepatocyte growth factor –

HGF), dále pak fibroblastové růstové faktory FGF2 a 7, TGF $\beta$ , PDGF, osteopontin, SFRP2 (secreted frizzled-related protein 2), faktor 1 odvozený od stromatu (stromal derived factor1 – SDF-1), vaskulární endotelový růstový faktor A (vascular endothelial growth factor A – VEGFA), interleukin 6 (IL6), interleukin 8 (IL8) a mnoho dalších [7,56]. Bez aktivní tvorby nových krevních cév pro zásobování kyslíkem a živinami nejsou nádory schopny růst. Důležité je proto i pozorování, že faktory produkované CAF podporují angiogenezi a přispívají tak k zajištění růstových požadavků maligních nádorů. Výše uvedený SDF-1 (také známý jako CXCL12) produkovaný fibroblasty stimuluje neovaskularizaci nádoru prostřednictvím náboru progenitorových buněk endotelu [55]. SDF-1 je rovněž ligandem CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4), který je vysoce exprimován na nádorových buňkách a po aktivaci přímo stimuluje proliferaci nádorových buněk [55]. Alternativně mohou CAF modulovat angiogenezi a průtok krve

nádorem také nepřímo, a to pomocí remodelace ECM [57]. Kromě schopnosti vylučovat růstové faktory a podporovat proliferaci nádorových buněk působí CAF také jako promutagenní agens poškozující DNA okolních buněk prostřednictvím produkce reaktivních forem kyslíku [58].

CAF podporují růst nádorových buněk rovněž ovlivněním jejich metabolických drah. Nádorové buňky většinou preferují glukózu jakožto zdroj energie. Samotná glukóza však nedokáže pokrýt jejich potřebu uhlíku, a je proto zřejmé, že nádorové buňky musí využívat i jiné zdroje. Některé nádorové buňky jsou závislé na glutaminu a byla prokázána i konzumace laktátu. V průběhu kancerogeneze se CAF přizpůsobují metabolismu nádorových buněk a stávají se k nim komplementárními za vzniku metabolické symbiózy. Metabolická symbióza nabízí účinný systém, ve kterém mohou nádorové buňky využívat metabolity produkované fibroblasty. Jedním z typů metabolické symbiózy je situace, kdy dobře

okysličené anabolické nádorové buňky konzumují laktát poskytovaný katabolickými fibroblasty, které jsou působením nádorových buněk tlačeny do glykolytického metabolismu a autofagie (obr. 3). Katabolický a glykolytický fenotyp fibroblastů může být vyvolán např. ztrátou exprese caveolinu-1 (CAV1) [59]. Metabolický posun od oxidativní fosforylace ke glykolýze doprovázený zvýšenou expresí laktátového exportéru MCT4 (monocarboxylate transporter 4) vykazoval rovněž fibroblasty exprimující snížené množství CD36 [60,61]. Metabolická symbióza CAF s nádorovými buňkami se dynamicky vyvíjí v závislosti na množství kyslíku, extracelulární dostupnosti metabolitů a přítomnosti signálních molekul. Metabolická symbióza se tak může vyskytnout i v opačném uspořádání, kde oxidační metabolismus CAF podporuje růst glykolytických nádorových buněk [62]. Toto je zřejmě případ HNSCC – CAF zde vylučují HGF a stimulují tak glykolytický fenotyp v buňkách HNSCC; buňky HNSCC pak produkují FGF2, jež potencuje využívání laktátu fibroblasty [63].

CAF podporují kancerogenezi také změnou dostupnosti metabolitů v nádorovém mikroprostředí. Například významně ovlivňují biologickou dostupnost tryptofanu a argininu, přičemž hladiny těchto metabolitů jsou klíčové pro aktivitu a funkci T lymfocytů. Metabolická konkurence mezi CAF a buňkami imunitního systému tak může vést ke snížené protinádorové reaktivitě T lymfocytů akumulovaných v nádorech [7]. Přítomnost CAF zároveň zapříčiňuje zvýšenou expresi adhezivních molekul, např. vaskulární intercelulární adhezivní molekuly 1 (vascular cell adhesion molecule 1 – VCAM-1) a intracelulární adhezivní molekuly 1 (intercellular adhesion molecule 1 – ICAM-1), v nádorovém mikroprostředí a dopomáhá tak k rekrutování makrofágů asociovaných s nádorem, které dále přispívají k vytváření nádorově permissivní niky [64]. Vazba makrofágů asociovaných s nádorem na molekuly VCAM-1 nádorových buněk umožňuje přenos signálů, které zajišťují přežití metastazujících buněk karcinomu prsu v plicní tkáni bohaté na leukocyty [65].

### CAF a vznik metastáz

CAF v TME nejenže podporují růst nádorových buněk, ale zvyšují také jejich invazivitu. CAF podporují metastazování nádorových buněk prostřednictvím přechodných heterotypických mezibuněčných kontaktů a produkcí parakrinně působících faktorů [66]. CAF zároveň ovlivňují tuhost ECM. U mnoha nádorů je původní tkáň nahrazena hustou ECM bohatou na kolagen, která se podobá jizvě. K tvorbě remodelovaných a nefyziologicky orientovaných kolagenních sítí významně přispívají právě CAF skrze produkci lysyl-6-oxidázy. Mechanická stimulace nádorových buněk pomocí těchto kolagenních sítí hraje významnou roli v aktivaci invazivního programu nádorových buněk [67]. Molekulární signalizace mezi nádorovými buňkami a CAF dále stimuluje migraci obou typů buněk a modifikuje sousední ECM a bazální membránu [68]. Přestavba ECM pomocí matrixových metaloproteináz (matrix metalloproteinases – MMPs) produkovaných CAF je jedním z nejdůležitějších kroků v progresi nádorového onemocnění. Za fyziologických podmínek je udržována rovnováha mezi aktivitou MMP a jejich inhibitorů. Tato rovnováha je v průběhu kancerogeneze posunována směrem k aktivaci MMP. Výsledkem je významná remodelace ECM, která přispívá k angiogenezi a invazivnímu chování nádorových buněk [58]. Při invazi do sekundárních ložisek mohou nádorové buňky migrovat samostatně, je-li u nich aktivován pseudomezenchymální fenotyp, nebo mohou k migraci využívat tažné síly CAF [69]. CAF jsou manipulovány nádorovými buňkami tak, aby se staly invazivními a schopnými remodelace ECM, a právě CAF zřejmě určují směrovost celé migrující metastatické skupiny. Ve srovnání s normálními fibroblasty produkují CAF ECM bohatou na fibronectin s anizotropní orientací vláken, která nádorové buňky navádí k migraci určitým směrem [70]. CAF pro nádorové buňky budují také cestu skrze ECM a zároveň slouží jako generátor tažné síly [69]. U spinocelulárních karcinomů je přenos tažné síly zprostředkován heterofilní adhezí, na níž se podílí N-kadherin na membráně CAF a E-kadherin na membráně nádorových buněk.

Tato adheze funguje jako mechanický receptor, který podporuje invazi nádorových buněk spuštěním signální dráhy  $\beta$ -katenin–vinculin a remodelací aktinu v obou typech společně migrujících buněk [71]. CAF exprimující N-kadherin slouží jako pozitivní stimulant proliferace a migrace nádorových buněk rovněž u melanomu. Buňky melanomu nejsou schopny produkovat IGF-1 (insulin-like growth factor 1) samy, a spoléhají proto na IGF-1 vylučovaný okolními fibroblasty [72]. Bylo též pozorováno, že metastazování nádorových buněk podporuje zvýšená exprese fibroblastového CAV1 [73], zatímco nízká exprese fibroblastového CAV1 napomáhala vzniku metabolické symbiózy u primárních nádorů (obr. 3). Vzhledem k tomu, že zvýšená kontraktilita (potřebná k pohybu buněk) je spíše než pro sekreční CAF charakteristická pro jejich myofibroblastové subtypy [8], mohla by exprese CAV1 potenciálně sloužit jako nová metoda charakterizace fibroblastů. Další subpopulací CAF jsou ty, které exprimují tenascin C a VEGFA. Tyto CAF byly identifikovány jako klíčové mediátory metastazování karcinomu prsu do plic [74]. CAF v metastázách mohou vylučovat interleukin-11, který v nádorových buňkách aktivuje signalizaci GP130-STAT3. Aktivace této dráhy umožňuje přežití nádorových buněk v cílové tkáni, a tím podporuje nádorovou kolonizaci orgánů [75].

### Význam CAF u HNSCC

Navzdory intenzivnímu výzkumu jsou přesné mechanismy kancerogeneze a rozvoje HNSCC doposud poměrně nejasné. Shromážděné důkazy však naznačují, že nestačí sledovat kumulaci onkogenních mutací v samotných nádorových buňkách. Interakce mezi nádorovými buňkami a buňkami stromatu HNSCC mohou totiž dramaticky ovlivnit progresi tumoru. Cílení terapeutického efektu do nádorového stromatu tak může představovat nový způsob, jak efektivně omezit metastazování [76]. Slibným zástupcem terapeuticky cílitelných buněk stromatu jsou CAF, jelikož nádory pozdního stadia HNSCC často obsahují až 80 % těchto buněk [63]. Buňky HNSCC mohou přispívat k vývoji fenotypu CAF prostřednictvím sekrece

TGFβ1 či IL1β. Tato aktivita vede k zvýšení produkce HGF a SDF-1 u CAF, což hraje zásadní roli v interakci mezi CAF a buňkami karcinomu dutiny ústní [77]. Některé studie uvádějí, že transdiferenciace fibroblastů na CAF závisí na enzymu NAD(P)H oxidáze 4 (NOX4). Zvýšená exprese NOX4 byla nalezena u mnoha typů nádorů, vč. HNSCC [78]. Rozvoj interakcí mezi buňkami HNSCC a CAF následně indukuje zvýšenou expresi TGFβ, VEGF, TNFα, HGF, IL1α, IL1β, IL6, IL33, CXCL12 a MMPs u obou typů buněk. Zvýšené koncentrace těchto rozpustných faktorů přispívají k růstu, migraci a invazivnímu chování buněk HNSCC. U fibroblastů kultivovaných společně s buňkami HNSCC byly také prokázány zvýšené hladiny fibronektinu, tenascin C, trombospondinu 1 a latentního TGFβ vázajícího proteinu 2 (latent TGF-beta binding protein 2 – LTBP2) [79]. Faktory vylučované CAF, jako např. karboxypeptidáza E, růstový faktor destiček D (platelet-derived growth factor D – PDGFD), EFEMP1 (EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1), IBP5 a IBP7 (insulin-like growth factor binding proteins), výrazně zvyšovaly signalizaci skrze receptory epidermálního růstového faktoru, receptory inzulinu podobného růstového faktoru a PDGFR nádorových buněk, a tím podporovaly růst nezávislý na ukotvení a expresi markerů nádorových kmenových buněk [80]. Dalším faktorem, který je produktem CAF a může významně ovlivňovat vznik HNSCC metastáz, je BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Některé studie naznačují, že signální dráha BDNF-TrkB (neurotrophin receptor B) může být kritickou složkou progresu HNSCC [81]. TrkB indukuje v nádorových buňkách EMT a má klíčovou úlohu v invazivním chování HNSCC [82].

Srovnání sekrečních profilů CAF u karcinomu dutiny ústní a neaktivovaných fibroblastů prokázalo v případě prvně jmenovaných buněk také zvýšenou expresi proteinů podílejících se na organizaci ECM a metabolismu kolagenu. Exprese N-terminálního propeptidu kolagenu typu I signifikantně korelovala s přítomností vysoce migrujících CAF ve frontální části tumoru a byla spojena s významně zkráceným přežívá-

ním pacientů s karcinomem dutiny ústní [83]. Ve srovnání s nenádorovými fibroblasty exprimují CAF asociované s HNSCC také vyšší hladiny proteinu NAB2 (NGFI-A-binding protein 2) [84] a kolagenu typu COL11A1, který byl v některých studiích označen jako slibný marker CAF [31]. Rovněž se podařilo prokázat, že COL11A1 přispívá ke kancerogenezi HNSCC a může sloužit jako potenciální terapeutický cíl [85]. S progresí HNSCC vzrůstala v CAF rovněž i exprese periostinu [86]. Periostin je sekretovaný protein ECM kódovaný genem *POSTN*, který mj. umocňuje metastatické schopnosti nádorů HNSCC a podporuje vznik nádorových kmenových buněk. Děje se tak díky vazbě periostinu na PTK7 (protein tyrosine kinase 7) a aktivaci signální dráhy Wnt/β-Catenin. Kombinovaná detekce *POSTN* a PTK7 může být proto potenciálním prognostickým a diagnostickým ukazatelem a slibným terapeutickým cílem [87]. Další funkční molekulou, která přispívá k udržování populace nádorových kmenových buněk v TME, tentokrát exprimovanou na povrchu CAF, je CD44 [88].

Zásadní význam pro kancerogenezi HNSCC mají rovněž imunomodulační účinky CAF. Některé studie potvrzují, že CAF jsou významnými producenty prostaglandinu E2 (PGE2) [89], který stimuluje buněčnou proliferaci a invazivní chování buněk HNSCC, inhibuje apoptózu a narušuje imunitní dohled [90]. Jelikož buňky HNSCC konstitutivně exprimují PGE2 receptory EP1, EP2 a EP3, může PGE2 také modulovat invazivní vlastnosti samotných nádorových buněk [91]. Změny v expresi genů různých proteinů ECM asociované se signalizací TGFβ a aktivací CAF fenotypu spojují CAF rovněž s únikem nádorových buněk HNSCC imunitnímu systému a selháním imunoterapie [92]. CAF se zřejmě významnou měrou podílí také na vzniku rezistence nádorových buněk vůči cisplatině [93]. Farmakologická inhibice Vps34, klíčového mediátoru autofagie, u CAF dokázala tuto rezistenci opět zvrátit, což naznačuje, že autofagický fenotyp je důležitým rysem CAF. Pomocí sekreční autofagie mohou být ovlivňovány hladiny významných cytokinů v TME. Tímto způsobem je regulována

např. hladina interleukinů IL6 a IL8 [94]. Dalším faktorem, kterým se CAF zřejmě podílí na imunomodulaci v TME, může být galactin 1 (Gal-1). Gal-1 je jedním z 15 evolučně konzervovaných proteinů vázajících β-galactosid, který vykazuje biologicky rozmanité aktivity v patogenezi zánětu a nádorového onemocnění. U Hodgkinova lymfomu zprostředkovává Gal-1 imunosupresi CD8<sup>+</sup> T lymfocytů [95]. Předpokládá se také, že Gal-1 hraje roli při vytváření imunitní tolerance v těhotenství [96]. Inhibice exprese Gal-1 v CAF také potlačuje tvorbu metastáz karcinomu dutiny ústní [97].

Závěrem lze říct, že se CAF v rámci patogeneze HNSCC podílejí na mnoha kritických bodech nádorové transformace, jako jsou vytváření nádorově permissivní struktury ECM a metabolické a imunitní přeprogramování TME, s dopadem na metastazování a adaptivní rezistenci vůči chemoterapii a radioterapii. Pleiotropní působení CAF na nádorové buňky je pravděpodobně odrazem heterogeneity a plasticity jejich populace, s kontextově závislým vlivem na kancerogenezi. Specifické vlastnosti CAF poskytují mnoho cílitelných molekul, které by mohly v budoucnu hrát významnou roli v terapii HNSCC.

## Literatura

1. Lemaire F, Millon R, Young J et al. Differential expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Br J Cancer* 2003; 89(10): 1940–1949. doi: 10.1038/sj.bjc.6601373.
2. Duray A, Demoulin S, Hubert P et al. Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010: 701657. doi: 10.1155/2010/701657.
3. Castells M, Thibault B, Delord JP et al. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* 2012; 13(8): 9545–9571. doi: 10.3390/ijms13089545.
4. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(9): 665–674. doi: 10.1038/nrc2714.
5. Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol* 2012; 6 (Suppl 1): S3–S15. doi: 10.1007/s12105-012-0367-2.
6. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 422–433. doi: 10.1038/nrc1094.
7. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016; 16(9): 582–598. doi: 10.1038/nrc.2016.73.
8. Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F et al. In search of definitions: cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int J Cancer* 2019. doi: 10.1002/ijc.32193.
9. Österreicher CH, Penz-Österreicher M, Grivnenkov SI et al. Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflam-



- matory subpopulation of macrophages in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(1): 308–313. doi: 10.1073/pnas.1017547108.
10. Kahounova Z, Kurfurstova D, Bouchal J et al. The fibroblast surface markers FAP, anti-fibroblast, and FSP are expressed by cells of epithelial origin and may be altered during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cytometry A* 2018; 93(9): 941–951. doi: 10.1002/cyto.a.23101.
11. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 27(5): 549–550. doi: 10.1007/bf02147594.
12. Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 2003; 83(12): 1689–1707. doi: 10.1097/01.lab.0000101911.53973.90.
13. Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(7): 1070–1078. doi: 10.1016/j.bbdis.2012.10.013.
14. Sousa AM, Liu T, Guevara O et al. Smooth muscle alpha-actin expression and myofibroblast differentiation by TGFbeta are dependent upon MK2. *J Cell Biochem* 2007; 100(6): 1581–1592. doi: 10.1002/jcb.21154.
15. Muller GA, Rodemann HP. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 1991; 17(6): 680–683. doi: 10.1016/s0272-6386(12)80351-9.
16. Huang SK, Horowitz JC. Outstaying their welcome: the persistent myofibroblast in IPF. *Austin J Pulm Respir Med* 2014; 1(1): 3–13.
17. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315(26): 1650–1659. doi: 10.1056/NEJM198612253152606.
18. Lagares D, Santos A, Grasberger PE et al. Targeted apoptosis of myofibroblasts with the BH3 mimetic ABT-263 reverses established fibrosis. *Sci Transl Med* 2017; 9(420): 3765. doi: 10.1126/scitranslmed.aal3765.
19. Yeo SY, Lee KW, Shin D et al. A positive feedback loop bi-stably activates fibroblasts. *Nat Commun* 2018; 9(1): 3016. doi: 10.1038/s41467-018-05274-6.
20. Varga J, Trojanowska M, Kuwana M. Pathogenesis of systemic sclerosis: recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Scleroderma Relat Disord* 2017; 2(3): 137–152. doi: 10.5301/jrsd.5000249.
21. Bochet L, Lehuède C, Dauvillier S et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res* 2013; 73(18): 5657–5668. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0530.
22. Mori L, Bellini A, Stacey MA et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res* 2005; 304(1): 81–90. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.11.011.
23. Jung Y, Kim JK, Shiozawa Y et al. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat Commun* 2013; 4: 1795. doi: 10.1038/ncomms2766.
24. Iwano M, Plieth D, Danoff TM et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110(3): 341–350. doi: 10.1172/JCI15518.
25. Mink SR, Vashistha S, Zhang W et al. Cancer-associated fibroblasts derived from EGFR-TKI-resistant tumors reverse EGFR pathway inhibition by EGFR-TKIs. *Mol Cancer Res* 2010; 8(6): 809–820. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0460.
26. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L et al. Discovery of endothelial-to-mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 2007; 67(21): 10123–10128. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3127.
27. Bu L, Baba H, Yoshida N et al. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene* 2019; 38(25): 4887–4901. doi: 10.1038/s41388-019-0765-y.
28. Liao Z, Tan ZW, Zhu P et al. Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – accomplices in tumor malignancy. *Cell Immunol* 2019; 343: 103729. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.12.003.
29. Gascard P, Tlsty TD. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev* 2016; 30(9): 1002–1019. doi: 10.1101/gad.279737.116.
30. Maris P, Blomme A, Palacios AP et al. Asporin is a fibroblast-derived TGF-beta1 inhibitor and a tumor suppressor associated with good prognosis in breast cancer. *PLoS Med* 2015; 12(9): e1001871. doi: 10.1371/journal.pmed.1001871.
31. Vazquez-Villa F, Garcia-Ocana M, Galvan JA et al. COL11A1/(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression. *Tumour Biol* 2015; 36(4): 2213–2222. doi: 10.1007/s13277-015-3295-4.
32. Leung CS, Yeung TL, Yip KP et al. Calcium-dependent FAK/CREB/TNNC1 signalling mediates the effect of stromal MFAP5 on ovarian cancer metastatic potential. *Nat Commun* 2014; 5: 5092. doi: 10.1038/ncomms5092.
33. DeFilippis RA, Chang H, Dumont N et al. CD36 repression activates a multicellular stromal program shared by high mammographic density and tumor tissues. *Cancer Discov* 2012; 2(9): 826–839. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0107.
34. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Research* 1999; 59(19): 5002–5011. doi: 10.1186/bcr138.
35. Hu M, Yao J, Carroll D K et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell* 2008; 13(5): 394–406. doi: 10.1016/j.ccr.2008.03.007.
36. Patel AK, Vipparthi K, Thatikonda V et al. A subtype of cancer-associated fibroblasts with lower expression of alpha-smooth muscle actin suppresses stemness through BMP4 in oral carcinoma. *Oncogenesis* 2018; 7(10): 78. doi: 10.1038/s41389-018-0087-x.
37. Procopio MG, Laszlo C, Al Labban D et al. Combined CSL and p53 downregulation promotes cancer-associated fibroblast activation. *Nat Cell Biol* 2015; 17(9): 1193–1204. doi: 10.1038/ncb3228.
38. Hutchenreuther J, Vincent K, Norley C et al. Activation of cancer-associated fibroblasts is required for tumor neovascularization in a murine model of melanoma. *Matrix Biol* 2018; 74: 52–61. doi: 10.1016/j.matbio.2018.06.003.
39. Banerjee J, Mishra R, Li X et al. A reciprocal role of prostate cancer on stromal DNA damage. *Oncogene* 2014; 33(41): 4924–4931. doi: 10.1038/onc.2013.431.
40. Bhattacharya S, Wang W, Qin W et al. TLR4-dependent fibroblast activation drives persistent organ fibrosis in skin and lung. *JCI insight* 2018; 3(13): 98850. doi: 10.1172/jci.insight.98850.
41. Xu Y, Ma J, Zheng Q et al. MPSS impairs the immunosuppressive function of cancer-associated fibroblasts via the TLR4-NF-kB pathway. *Biosci Rep* 2019; 39(5): BSR20182171. doi: 10.1042/BSR20182171.
42. Sasaki S, Baba T, Shinagawa K et al. Crucial involvement of the CCL3-CCR5 axis-mediated fibroblast accumulation in colitis-associated carcinogenesis in mice. *Int J Cancer* 2014; 135(6): 1297–1306. doi: 10.1002/ijc.28779.
43. Tanabe Y, Sasaki S, Mukaida N et al. Blockade of the chemokine receptor, CCR5, reduces the growth of orthotopically injected colon cancer cells via limiting cancer-associated fibroblast accumulation. *Oncotarget* 2016; 7(30): 48335–48345. doi: 10.18632/oncotarget.10227.
44. Zhang Y, Zhang L, Lin XH et al. Knockdown of IRF3 inhibits extracellular matrix expression in keloid fibroblasts. *Biomed Pharmacother* 2017; 88: 1064–1068. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.142.
45. Zeisberg EM, Zeisberg M. The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J Pathol* 2013; 229(2): 264–273. doi: 10.1002/path.4120.
46. Albrengues J, Bertero T, Grasset E et al. Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun* 2015; 6: 10204. doi: 10.1038/ncomms10204.
47. Alkasalias T, Moyano-Galceran L, Arsenian-Henriksson M et al. Fibroblasts in the tumor microenvironment: shield or spear? *Int J Mol Sci* 2018; 19(5): 1532. doi: 10.3390/ijms19051532.
48. Alkasalias T, Flaberg E, Kashuba V et al. Inhibition of tumor cell proliferation and motility by fibroblasts is both contact and soluble factor dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(48): 17188–17193. doi: 10.1073/pnas.1419554111.
49. Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E et al. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 451(2): 295–301. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.109.
50. Webber J, Steadman R, Mason MD et al. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res* 2010; 70(23): 9621–9630. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1722.
51. Balaj L, Lessard R, Dai L et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2011; 2: 180. doi: 10.1038/ncomms1180.
52. Guescini M, Genedani S, Stocchi V et al. Astrocytes and glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)* 2010; 117(1): 1–4. doi: 10.1007/s00702-009-0288-8.
53. Cai J, Han Y, Ren H et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J Mol Cell Biol* 2013; 5(4): 227–238. doi: 10.1093/jmcb/mjt011.
54. Waldenstrom A, Genneback N, Hellman U et al. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One* 2012; 7(4): e34653. doi: 10.1371/journal.pone.0034653.
55. Orimo A, Gupta PB, SgROI DC et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121(3): 335–348. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034.
56. Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18(2): 99–115. doi: 10.1038/s41573-018-0004-1.
57. Seandel M, Noack-Kunmann K, Zhu D et al. Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood* 2001; 97(8): 2323–2332. doi: 10.1182/blood.v97.8.2323.
58. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2010; 15: 166–179. doi: 10.2741/3613.
59. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 2009; 8(23): 3984–4001. doi: 10.4161/cc.8.23.10238.
60. Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol* 2014; 41(2): 195–216. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.03.002.
61. Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Caveolae and signalling in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(4): 225–237. doi: 10.1038/nrc3915.

62. Nakajima EC, van Houten B. Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. *Mol Carcinog* 2013; 52(5): 329–337. doi: 10.1002/mc.21863.
63. Kumar D, New J, Vishwakarma V et al. Cancer-associated fibroblasts drive glycolysis in a targetable signaling loop implicated in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Cancer Res* 2018; 78(14): 3769–3782. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1076.
64. Zhang R, Qi F, Zhao F et al. Cancer-associated fibroblasts enhance tumor-associated macrophages enrichment and suppress NK cells function in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2019; 10(4): 273. doi: 10.1038/s41419-019-1435-2.
65. Chen Q, Zhang XH, Massague J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 538–549. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.025.
66. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD et al. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277(1): C1–C9. doi: 10.1152/ajpcell.1999.277.1.C1.
67. Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA et al. Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(3): 911–916. doi: 10.1073/pnas.1118910109.
68. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE et al. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res* 2012; 10(11): 1403–1418. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0307.
69. Theveneau E, Linker C. Leaders in collective migration: are front cells really endowed with a particular set of skills? *F1000Research* 2017; 6: 1899. doi: 10.12688/f1000research.11889.1.
70. Erdogan B, Ao M, White L M et al. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J Cell Biol* 2017; 216(11): 3799–3816. doi: 10.1083/jcb.201704053.
71. Labernadie A, Kato T, Bruges A et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2017; 19(3): 224–237. doi: 10.1038/ncb3478.
72. Li G, Satyamoorthy K, Meier F et al. Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. *Oncogene* 2003; 22(20): 3162–3171. doi: 10.1038/sj.onc.1206455.
73. Goetz JG, Minguet S, Navarro-Lerida I et al. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* 2011; 146(1): 148–163. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.040.
74. O'Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG et al. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(38): 16002–16007. doi: 10.1073/pnas.1109493108.
75. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* 2012; 22(5): 571–584. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.013.
76. Wheeler SE, Shi H, Lin F et al. Enhancement of head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by tumor-associated fibroblasts in preclinical models. *Head Neck* 2014; 36(3): 385–392. doi: 10.1002/hed.23312.
77. Rouray S, Sunkavali A, Bari KA. Carcinoma-associated fibroblasts, its implication in head and neck squamous cell carcinoma: a mini review. *Oral Dis* 2014; 20(3): 246–253. doi: 10.1111/odi.12107.
78. Barnett RM, Vilar E. Targeted therapy for cancer-associated fibroblasts: are we there yet? *J Natl Cancer Inst* 2017; 110(1): 11–13. doi: 10.1093/jnci/djx131.
79. Dudas J, Fullar A, Bitsche M et al. 9 Matrix remodeling in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2015; 51(5): e30. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.02.012.
80. Alvarez-Teijeiro S, Garcia-Inclan C, Villaronga MA et al. Factors secreted by cancer-associated fibroblasts that sustain cancer stem properties in head and neck squamous carcinoma cells as potential therapeutic targets. *Cancers* 2018; 10(9): 334. doi: 10.3390/cancers10090334.
81. Jiffar T, Yilmaz T, Lee J et al. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) coordinates lympho-vascular metastasis through a fibroblast-governed paracrine axis in the tumor microenvironment. *Cancer Cell Microenviron* 2017; 4(2): 1566. doi: 10.14800/ccm.1566.
82. Kupferman ME, Jiffar T, El-Naggar A et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2010; 29(14): 2047–2059. doi: 10.1038/onc.2009.486.
83. Bagordakis E, Sawazaki-Calone I, Macedo CC et al. Secretome profiling of oral squamous cell carcinoma-associated fibroblasts reveals organization and disassembly of extracellular matrix and collagen metabolic process signatures. *Tumour Biol* 2016; 37(7): 9045–9057. doi: 10.1007/s13277-015-4629-y.
84. Choi SY, Oh SY, Kang SH et al. NAB 2-Expressing cancer-associated fibroblast promotes HNSCC progression. *Cancers* 2019; 11(3): 388. doi: 10.3390/cancers11030388.
85. Sok JC, Lee JA, Dasari S et al. Collagen type XI  $\alpha 1$  facilitates head and neck squamous cell cancer growth and invasion. *Br J Cancer* 2013; 109(12): 3049–3056. doi: 10.1038/bjc.2013.624.
86. Utispan K, Koontongkaew S. Fibroblasts and macrophages: key players in the head and neck cancer microenvironment. *J Oral Biosci* 2017; 59(1): 23–30. doi: 10.1016/j.job.2016.11.002.
87. Yu B, Wu K, Wang X et al. Periostin secreted by cancer-associated fibroblasts promotes cancer stemness in head and neck cancer by activating protein tyrosine kinase 7. *Cell Death Dis* 2018; 9(11): 1082. doi: 10.1038/s41419-018-1116-6.
88. Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 expressed on cancer-associated fibroblasts is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment. *Stem Cells* 2014; 32(1): 145–156. doi: 10.1002/stem.1556.
89. Alcolea S, Antón R, Camacho M et al. Interaction between head and neck squamous cell carcinoma cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE<sub>2</sub>. *J Lipid Res* 2012; 53(4): 630–642. doi: 10.1194/jlr.M019695.
90. Cohen EG, Almahmeed T, Du B et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(9): 3425–3430.
91. Abrahao AC, Castilho RM, Squarize CH et al. A role for COX2-derived PGE<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub>-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. *Oral Oncology* 2010; 46(12): 880–887. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.09.005.
92. Chakravarthy A, Khan L, Bensler NP et al. TGF- $\beta$ -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure. *Nat Commun* 2018; 9(1): 4692. doi: 10.1038/s41467-018-06654-8.
93. Steinbichler TB, Metzler V, Pritz C et al. Tumor-associated fibroblast-conditioned medium induces CDDP resistance in HNSCC cells. *Oncotarget* 2016; 7(3): 2508–2518. doi: 10.18632/oncotarget.6210.
94. New J, Arnold L, Ananth M et al. Secretory autophagy in cancer-associated fibroblasts promotes head and neck cancer progression and offers a novel therapeutic target. *Cancer Res* 2017; 77(23): 6679–6691. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1077.
95. Gandhi MK, Moll G, Smith C et al. Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2007; 110(4): 1326–1329. doi: 10.1182/blood-2007-01-066100.
96. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev* 2011; 241(1): 20–38. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x.
97. Wu MH, Hong HC, Hong TM et al. Targeting galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis by downregulating MCP-1/CCL2 expression. *Clin Cancer Res* 2011; 17(6): 1306–1316. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1824.