

Nya möjligheter att omvandla **aggressiv bröstcancer** till **behandlingsbar sjukdom**

Ny forskning visar att cancercellers kommunikation med andra celltyper i den omkringliggande vävnaden, såsom bindvävs-, blodkärls- och immunceller, påverkar tumörers möjligheter att bildas, sprida sig och motstå behandling. Här beskriver professor **Kristian Pietras** och forskaren **Sophie Lehn** vid Lunds universitet fyndet av en tillväxtfaktor – PDGF-CC – som förmedlar information mellan tumörceller och bindvävsceller främst i basala brösttumörer. Den nya kunskapen öppnar upp för utveckling av nya läkemedel som manipulerar bindvävscellerna i tumören, vilket resulterar i att de mest svårbehandlade tumörformerna svarar på konventionell hormonterapi.

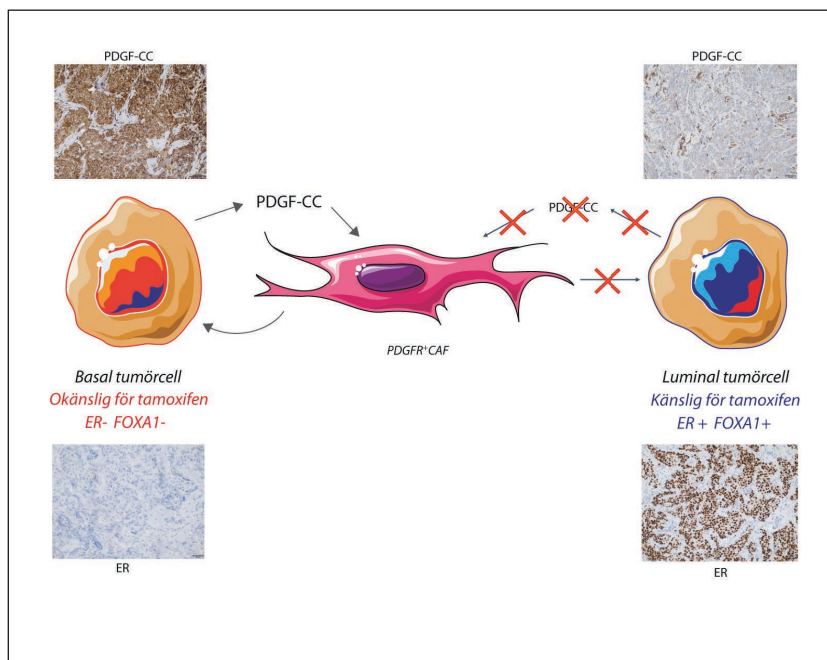
Bröstcancer är en heterogen sjukdom som består av flera olika subtyper med vitt skilda prognoser och behandlingsalternativ. Molekylärt kan bröstcancer delas in i främst fyra subtyper: Luminal A, Luminal B, HER2-positiv eller basal subtyp. Majoriteten av alla bröstcancerpatienter diagnostiseras med en av de två hormonberoende subtyperna, Luminal A eller B. På molekylär nivå kännetecknas dessa subtyper primärt av hög ak-

tivitet i de genprogram som aktiveras av de intracellulära hormonreceptorerna för östrogen (ER) och progesteron (PR), samt av transkriptionsfaktorn FOXA1. Den senare är viktig för åtkomsten till det DNA som transkriberas i den hormonberoende subtypen, vilket är en förutsättning för att den luminala identiteten ska bibehållas.

Flertalet av de patienter som diagnostiseras med en luminal tumör kan idag behandlas framgångsrikt med hor-

monella terapier riktade direkt eller indirekt mot östrogenreceptorn (ER). Likaså finns det för patientgruppen med tumörer som överuttrycker HER2-receptorn effektiv behandling tillgänglig i form av terapier riktade specifikt mot HER2-receptorn. Men för patientgruppen som diagnostiseras med en tumör av den basala subtypen, i vilken så kallad trippelnegativ bröstcancer ingår (varken ER, PR eller HER2 uttrycks), finns få behandlingsalternativ förutom





Figur 1. Schematisk bild över den PDGF-CC-medierade parakrina signalvägen som är aktiv i basal bröstcancer. Immunohistokemiska färgningar i en basal och en luminal brösttumör visar det inversa förhållandet mellan PDGF-CC och ER (östrogenreceptor). Den primära tumörvävnaden härstammar från patienter inkluderade i SCAN-B-studien.

CAF=Cancer-associerad fibroblast, PDGFR=Platelet-derived growth factor receptor
ER=östrogenreceptor, PDGF-CC=Platelet-derived growth factor-CC

kirurgi, strålning och cytostatika att tillgå. Som namnet antyder är det helt andra genprogram som är aktiva i den basala subtypen, och hormonterapi rekommenderas inte till denna patientgrupp.

Exakt hur de olika subtyperna av bröstcancer uppstår är inte klarlagt. Subtyperna är namngivna efter vilken slags celltyp i bröstkörteln som de efterliknar. Den allmänna uppfattningen har länge varit att luminal bröstcancer uppstår i luminala progenitorceller, och motsvarande att basal bröstcancer härstammar från basala eller myoepiteliala progenitorceller. Detta antagande har dock nyligen motbevisats i flertalet studier som istället indikerar att både luminal och basal bröstcancer har sitt ursprung i luminala progenitorceller. Studier av bröstkörteln hos möss har visat att mutationer av onkgener och tumör-suppressorgener i luminala progenitorceller ger upphov till både basal respektive luminal bröstcancer (Koren et al., 2015; Lim et al., 2009; Molyneux et al., 2010; Van Keymeulen et al., 2015). Vår senaste studie tyder på att bröstcancerstromat, som utgörs av tumörens stöd-vävnad samt övriga celltyper i tumören

förutom själva cancercellerna, kan vara ytterligare en bidragande faktor till att vissa brösttumörer utvecklas till en hormonberoende luminal subtyp medan andra blir hormonberoende och basala.

I bröstcancerstromat finns bindvävs-celler, även kallade fibroblaster, som aktiveras i takt med att cancercellerna blir mer aggressiva. Dessa tumör-aktiverade fibroblaster, även kallade cancer-associerade fibroblaster, utsöndrar många olika signalmolekyler i tumörens mikromiljö. Vilka molekyler som utsöndras beror på vilken av fibroblastens receptorer som aktiverats. Signalerna som härrör från den aktiverade cancer-associerade fibroblasten har i sin tur stor påverkan på vilka genprogram som sätts på eller stängs av i bröstcancer-cellen, vilket i förlängningen kan påverka cancerens egenskaper, såsom spridning och svar på behandling.

PARAKRIN SIGNALVÄG

Vår forskargrupp har identifierat en parakrin signalväg mellan maligna celler och bindvävs-celler med betydelse för bröstcancerens subtyp. Vi har specifikt studerat tillväxtfaktorn *Platelet-deri-*

ved growth factor-CC (förkortas PDGF-CC), och funnit att denna genom att aktivt förmedla signaler mellan cancer-celler och fibroblaster upprätthåller den basala subtypsidentiteten hos tumören (Roswall et al., 2018) (Figur 1). En genomgång av primära tumörvävnadsprover från cirka 1 400 bröstcancerpatienter visade att höga nivåer av PDGF-CC i cancercellerna var vanligare i basal bröstcancer. Cancer-associerade fibroblaster positiva för PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor), vilken är själva receptorn som PDGF-CC binder till och aktiverar, kunde dessutom identifieras i vävnadssnitten. Det talar för att den parakrina signalvägen är aktiv i de basala brösttumörerna. Högt PDGF-CC-uttryck i cancercellerna var vidare associerat med en kortare patientöverlevnad, vilket tyder på att den identifierade parakrina signaleringen är kopplad till tumörprogression.

Vi studerade fortsättningsvis subtypsidentiteten av spontant utvecklad bröstcancer i flera experimentella musmodeller, och fann att de tumörer som utvecklades med en intakt PDGF-CC-medierad (parakrin) signalväg alltid hamnade i gruppen med tumörer av basal subtyp. De tumörer som istället utvecklades helt utan PDGF-CC-medierad signalering (genom bruk av en så kallad knock-ut mus) klassificerades däremot konsekvent som luminal, hormonberoende subtyp. Vi kunde även fastställa ett ökat uttryck av de gen-transkript som är viktiga för de luminala genprogrammen, nämligen ER och FOXA1. Tester i möss gjordes också att med hjälp av en PDGF-CC-specifik antikropp, hämma förmågan hos PDGF-CC att aktivera de cancer-associerade fibroblasterna i basala brösttumörer, och därmed förhindra att den parakrina signalvägen fullföljdes. Detta upplägg resulterade återigen i att tumören utvecklades till luminal subtyp.

NY BEHANDLINGSSTRATEGI

Luminal hormonberoende bröstcancer kan som tidigare nämnts i de flesta fall behandlas effektivt med endokrina terapier av olika slag. Vi testade behandling med ett av de mest använda läkemedlen mot ER-positiv bröstcancer, tamoxifen, i samma experimentella

musmodeller i vilka vi sett omvandlingen av brösttumörer från en basal subtyp till luminal subtyp efter att PDGF-CC-signalering hämmats. Både möss som hade tumörer med aktiv parakrin PDGF-CC-signalering och de utan (efter behandling med PDGF-CC-antikropp) behandlades med tamoxifen. Som förväntat svarade tumörerna av basal subtyp inte på endokrin behandling. Slående nog observerade vi ett signifikant behandlingssvar på endokrin terapi hos tumörer som hade omvandlats till luminal subtyp genom neutralisering av PDGF-CC. Detta resultat öppnar upp för en ny behandlingsstrategi där man genom att först rikta behandlingen mot tumörens mikromiljö, i detta fall mot den PDGF-CC-medierade aktiveringen av cancer-associerade fibroblaster, kan tvinga cancercellen att aktivera luminala genprogram. Denna omprogrammering till följd av manipulering av stromat resulterar i att cancercellen slår om till att drivas av hormonberoende intracellulära signalvägar, mot vilka det finns väl etablerade terapier.

Den luminal-specificerande transkriptionsfaktorn FOXA1, som i våra studier är en av de gener vars uttryck förstärks då den parakrina PDGF-CC-signaleringen hämmas, har tidigare kopplats till plasticitet i bröstcancer-cellers genprogram. I en studie nedreglerades FOXA1 i luminala bröstcancer-cellinjer vilket resulterade i uppreglering av basala genprogram. Detta visar hur viktigt FOXA1 är för vilket slags genprogram som aktiveras, och i förlängningen vilken subtyp bröstcancer klassificeras som (Bernardo et al., 2013). Subtypstillhörighet kan också påverkas av epigenetiska faktorer. Ett exempel på detta är histondemetylasenzymet JARID1B, som i bröstcancer-celler har visat sig kunna binda in till och öppna upp DNA för transkription specifikt i regioner med luminala genprogram (Yamamoto et al., 2014). Det återstår att se om denna typ av histonreglering är aktiv också i våra modeller. Ett ytterligare exempel som understryker stromats betydelse i bröstcancer är en studie från Brechbuhl et al., i vilken hormonkänslighet och tamoxifensvar studerades i möss efter att luminala bröstcancer-cellinjer injicerats tillsam-

mans med två olika typer av cancer-associerade fibroblaster (CD146-negativa eller CD146-positiva) (Brechbuhl et al., 2017). Cancer-associerade fibroblaster som var negativa för cellyteproteinet CD146 bidrog till att de luminala tumörerna blev mindre känsliga för stimulering med östrogen, samtidigt som tumörerna uppvisade resistens mot tamoxifen. Återigen ett exempel som bekräftar relevansen av studier kring samspelet mellan tumörceller och cancer-associerade fibroblaster.

Således tyder en ökande mängd data på att brösttumörens molekylära subtyp påverkas av den miljö som cancer utvecklas i. En viktig uppgift för framtida studier blir att definiera det fulla spektrat av parakrina signalvägar i fibroblaster som bidrar till att påverka tumörens egenskaper. Tidigare studier ger stöd för både främjande effekter av bindväven på tumören, till exempel stimulering av blodkärlsbildning eller dämpning av immunförsvaret, och hämmande effekter av bindväven på tumörens tillväxt, till exempel inkapsling av tumören för att förhindra spridning.

”Vår senaste studie tyder på att bröstcancerstromat, som utgörs av tumörens stödvävnad samt övriga celltyper i tumören förutom själva cancercellerna, kan vara ytterligare en bidragande faktor till att vissa brösttumörer utvecklas till en hormonberoende luminal subtyp medan andra blir hormonberoende och basala.”

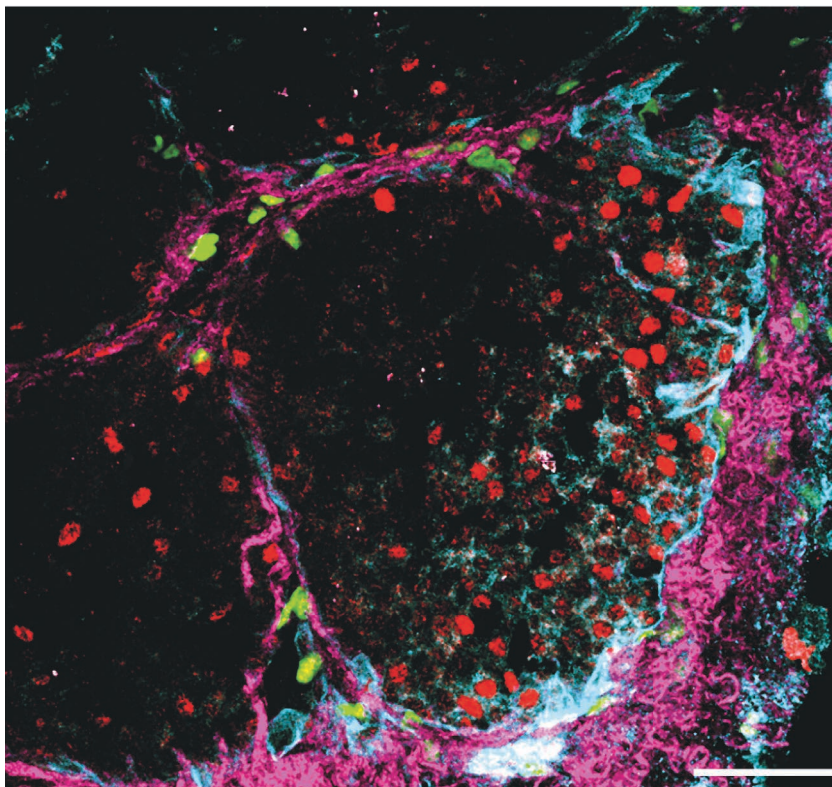
UNDERGRUPPER AV FIBROBLASTER

En hypotes som diskuterats länge är att det finns flera olika sorters fibroblaster som har olika funktion och som därmed kan påverka tumörens utveckling på olika sätt. I en nyligen publicerad studie har vi undersökt uttrycksmönstret av gener i cancer-associerade fibroblaster med avancerad och känslig teknik som tillåter analys av uttrycksmönstret i en cell i taget (Bartoschek et al., 2018). Genom analys av vilka gener som är aktiva i 768 enskilda cancer-as-

socierade fibroblaster från en experimentell modell av bröstcancer, har vi kunnat identifiera tre olika undergrupper av fibroblaster som skiljer sig åt i sin funktion och sitt ursprung. Den största gruppen av cancer-associerade fibroblaster i studien har sitt ursprung runt blodkärl och har ett påslag av gener som styr utveckling av blodkärl. En andra grupp av cancer-associerade fibroblaster har till uppgift att producera bindvävsproteiner, så kallat extracellulärt matrix, som ger tumören stadga och underlättar cellers migration. Denna grupp av celler, som har kidnappats av tumören från den normala bröstvävnaden motsvarar intressant nog de celler som aktiveras av PDGF-CC och som också är CD146-negativa; således är det troligen denna undergrupp av fibroblaster som bidrar till miljön som får brösttumörer att utvecklas till en cancer av basal subtyp. Slutligen fann vi en tredje grupp av celler, som egentligen utgörs av tumörceller som har förklätt sig till cancer-associerade fibroblaster. Det är sedan tidigare känt att tumörceller måste genomgå en för-

vandling till att bli mer bindvävsliknande, en process kallad epitelial-tillmesenkymal transformation. De bindvävsliknande egenskaperna krävs för att tumörcellen ska kunna lösgöra sig från de omkringliggande tumörcellerna och sprida sig ut i kroppen. Vår data tyder på att den tredje celltypen vi identifierat är tumörceller med en ökad metastaserande förmåga.

Till sist kunde vi, genom att studera tumörvävnad från både experimentella musmodeller och från bröstcancerpa-



Figur 2. Vävsnitt från en experimentell brösttumör infärgad för olika sorter fibroblaster. Kärlfibroblaster, ljusblå; Matrixfibroblaster, gröna; Mesenkymala tumörceller, röda; Kollagenfibrer, lila.

tienter, bekräfta att de tre olika typerna av fibroblaster som vi identifierat är separata celltyper som samexisterar inom olika slags tumörer (Figur 2).

Det är vår förvissning att vi med mer kunskap om tumörens cellulära arkitektur och kommunikation mellan olika celltyper inom cancers mikromiljö kommer att kunna hitta nya vägar att behandla tumörsjukdomar. Framgångsrika försök att med hjälp av läkemedel förhindra tumörcellernas kommunikation med omkringliggande vävnad föreligger redan, men mer forskning behövs för att hitta strategier för att förbättra utfallet av denna typ av behandling. Kunskapen från våra studier öppnar nu upp för möjligheten att utveckla läkemedel som slår ut specifik parakrin signalering mellan bröstcan-

cerceller och fibroblaster för att uppnå bättre behandlingseffekt med färre biverkningar.

REFERENSER

Bartoschek, M., Oskolkov, N., Bocci, M., Lovrot, J., Larsson, C., Sommarin, M., Madsen, C. D., Lindgren, D., Pekar, G., Karlsson, G., et al. (2018). Spatially and functionally distinct subclasses of breast cancer-associated fibroblasts revealed by single cell RNA sequencing. *Nat Commun* 9, 5150.

Bernardo, G. M., Bebek, G., Ginther, C. L., Sizemore, S. T., Lozada, K. L., Miedler, J. D., Anderson, L. A., Godwin, A. K., Abdul-Karim, F. W., Slamon, D. J., and Kerj, R. A. (2013). FOXA1 represses the molecular phenotype of basal breast cancer cells. *Oncogene* 32, 554-563.

Brechbuhl, H. M., Finlay-Schultz, J., Yamamoto, T. M., Gillen, A. E., Cittelly, D. M., Tan, A. C., Sams, S. B., Pillai, M. M., Elias, A. D., Robinson, W. A., et al. (2017). Fibroblast Subtypes Regulate Responsiveness of Luminal Breast Cancer to Estrogen. *Clin Cancer Res* 23, 1710-1721.

Koren, S., Reavie, L., Couto, J. P., De Silva, D., Stadler, M. B., Roloff, T., Britschgi, A., Eichlisberger, T., Kohler, H., Aina, O., et al. (2015). PIK3CA(H1047R) induces multipotency and multi-lineage mammary tumours. *Nature* 525, 114-118.

Lim, E., Vaillant, F., Wu, D., Forrest, N. C., Pal, B., Hart, A. H., Asselin-Labat, M. L., Gyorki, D. E., Ward, T., Partanen, A., et al. (2009). Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers. *Nat Med* 15, 907-913.

Molyneux, G., Geyer, F. C., Magnay, F. A., McCarthy, A., Kendrick, H., Natrajan, R., Mackay, A., Grigoriadis, A., Tutt, A., Ashworth, A., et al. (2010). BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 403-417.

Roswall, P., Bocci, M., Bartoschek, M., Li, H., Kristiansen, G., Jansson, S., Lehn, S., Sjolund, J., Reid, S., Larsson, C., et al. (2018). Microenvironmental control of breast cancer subtype elicited through paracrine platelet-derived growth factor-CC signaling. *Nat Med* 24, 463-473.

Van Keymeulen, A., Lee, M. Y., Ousset, M., Brohee, S., Rorive, S., Giraddi, R. R., Wuidart, A., Bouvencourt, G., Dubois, C., Salmon, I., et al. (2015). Reactivation of multipotency by oncogenic PIK3CA induces breast tumour heterogeneity. *Nature* 525, 119-123.

Yamamoto, S., Wu, Z., Russnes, H. G., Takagi, S., Peluffo, G., Vaske, C., Zhao, X., Moen Volian, H. K., Maruyama, R., Ekram, M. B., et al. (2014). JARID1B is a luminal lineage-driving oncogene in breast cancer. *Cancer Cell* 25, 762-777.

KRISTIAN PIETRAS, PROFESSOR, AVDELNINGEN FÖR TRANSLATIONELL CANCERFORSKNING, LUNDS UNIVERSITET, KRISTIAN.PIETRAS@MED.LU.SE



SOPHIE LEHN, BITRÄDANDE FORSKARE, AVDELNINGEN FÖR TRANSLATIONELL CANCERFORSKNING, LUNDS UNIVERSITET, SOPHIE.LEHN@MED.LU.SE

