



Partiklar i

Cancer i bukspottkörteln kvarstår sedan decennier som en av de dödligaste tumörtyperna i Sverige såväl som globalt, då symtom och diagnos ofta uppkommer sent i sjukdomsförloppet och riktigt effektiv behandling saknas. Diagnostiska verktyg för att kunna upptäcka cancer i tidigare tumörstadium, och därmed högre chans att kirurgiskt och onkologiskt kunna behandla sjukdomen, är av stor betydelse för patientens sjukdomsförlopp.

I en aktuell studie publicerad i *Cell* (Hoshino, Kim, Bojmar, Gyan et al., 2020), huvudsakligen utförd på Weill Cornell Medicine och Sloan Kettering, New York, USA, har så kallade "Extracellulära Vesiklar och Partiklar – EVPs" från ett tjugotal cancertyper, däribland bukspottkörtelcancer, undersökts med avseende på tidig biomarkörspotential. Här beskrivs den senaste kunskapen på området av forskarna **Linda Bojmar** och **Per Sandström**.

tumörvävnad och blod för att tidigare upptäcka bukspottkörtelcancer

– en uppgift för labb och klinik i samarbete

Extracellulära Vesiklar och Partiklar – EVPs är små mikrovesiklar, nanometer (nm) i storlek, som utsöndras från celler och utgörs till stor del av så kallade exosomer, som på senare år studerats flitigt i samband med cancer. EVPs består av både större (Exo-Large – 90-120nm) och mindre (Exo-Small – 60-80nm) exosomer samt mindre partiklar utan distinkt dubbelt fettmembran (Exomere – <50nm) (Zhang et al., 2018, Zhang, Lyden, 2019) (Figur 1). EVPs, och specifikt de mer studerade, samt frekvent använda nomenklaturen, exosomer, avges från celler normalt, men en ökad och förändrad utsöndring uppstår vid malign förändring. Fullständig biogenes av EVPs är okänd men studier har hittills visat specifikt att exosomer bildas via inbuktningar i endosomer och utsöndras i multivesikulära kroppar (multivesicular bodies – MVBs). EVPs tros vara nyckelbudbärare mellan olika celltyper och organ i kroppen och kan överföra material som proteiner och nukleinsyror, och därmed omprogrammera mottagarcellen. Aktivering av stromala celler och immunceller i metastatiska mottagarorgan, tidigt i den metastatiska processen, är ett fenomen kallat pre-metastatisk nisch, och tros föregå samt bidra till metastasering. EVPs tillhör gruppen utsöndrade tumörfaktorer, som kan avges från en primärtumör och påverka distala organ. I djurstudier har samband mellan EVPs och deras specifika innehåll kopplats till förändringar i den pre-metastatiska nischen med ökad metastasering som påföljd (Peinado et al., 2012, Costa-Silva et al., 2015, Hoshino et al.,

2015, Rodrigues et al., 2019). Studier pågår om förekomsten och betydelsen av den pre-metastatiska nischen hos patienter med bland annat bukspottkörtelcancer.

GER SYSTEMISKA EFFEKTER

EVPs innehåller material från dess ursprungscell och kan därmed spegla en tumör eller omkringliggande vävnad. De cirkulerar i blodet och bidrar till de systemiska effekter vi ser vid sjukdomar såsom cancer. Från några få milliliter av blod kan billioner av EVPs renas fram, utsöndrade från kroppens organ, immunsystem, eller en eventuell tumör. EVPs kan renas fram med hjälp av ultracentrifugering (100,000×g), samt räknas och mätas med avseende på storlek med hjälp av ljusreflektion och *Brownian motion* av partiklar i lösning (Nanoparticle Tracking Analysis – NTA). Vidare kan deras morfologi visualiseras med hjälp av elektronmikroskopi (Figur 1). Ny chip-baserad teknik kan studera molekyler på enskilda EVPs, så kallad *single particle analysis*, med hjälp av antikroppar (*Exoview*). Detta möjliggör co-expressionsstudier där andelen positiva partiklar för en viss molekyl kan studeras. På så vis kan man ytterligare förfina möjligheterna att se en ökning eller minskning i EVPs och deras ingående molekyler, specifikt kopplat till ett sjukdomstillstånd. Ny metodologi är också under utveckling för att separera och fånga upp EVPs av en viss storlek och densitet, eller med hjälp av uttryck av specifika markörer. En av dessa metoder kallas *asymmetrisk-flow field-flow fractionation* – AF4,

och kan separera EVPs beroende på densitet och storlek för vidare karakterisering och applikationer (Zhang et al., 2018, Zhang et al., 2019) (Figur 1).

En av de intressanta EVP-molekylerna för cancerforskning är EVP-associerat DNA (Thakur et al., 2014, Kahlert et al, 2014), i kontrast till cirkulerande cell-fritt DNA som kan innehålla EVP-DNA men i en mindre specifik och koncentrerad mängd jämfört med framrenat EVP-DNA. I EVP-DNA kan mutationer påvisas från tumörer genom ett perifert blodprov till skillnad från att behöva analysera en invasiv vävnadsbiopsi.

PROTEINER MEST INTRESSANTA

De kanske mest intressanta och studerade komponenterna i EVPs är proteiner. Dessa proteiner kan vara uttryckta på ytan, eller inkorporerade inuti EVPs (liksom nukleinsyror som kan skyddas från nedbrytning genom att befinna sig inom det dubbla fettmembranet hos EVPs). EVPs innehåller tusentals peptider som bygger upp delar av, eller intakta proteiner. Dessa proteiner kan ha funktionell betydelse såsom bindning till yt-receptorer på mottagarceller. EVP-proteiner utgör också högst intressanta biomarkörer för cancer då deras kombinerade uttryck är specifikt för tumör-typ, stadium, och kan spegla den systemiska effekten av sjukdomen.

Att endast analysera enstaka eller ett fåtal proteiner kan medföra stor osäkerhet vad gäller att uppnå hög sensitivitet och specificitet hos ett diagnostiskt test. Att däremot studera paneler av EVP-proteiner med hjälp av masspektrometri kan ge en starkare träffsäkerhet. Att även inkludera proteiner som detekteras i friska kontrollpatienter men inte i cancerpatienter i en testpanel kan ytterligare stärka precisionen.

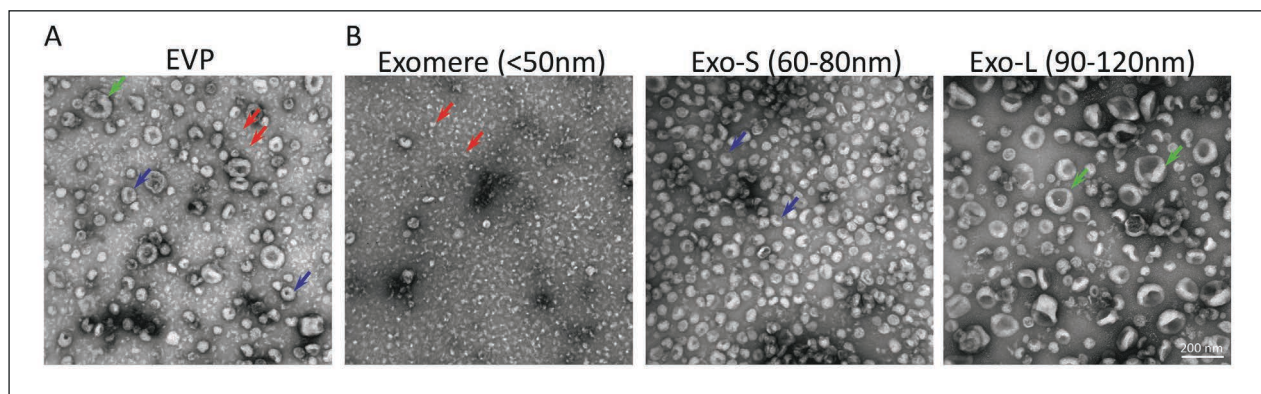
Masspektrometri är ett kraftfullt verktyg för att analysera upp till tusentals proteiner från ett och samma prov. Identifiering av proteiner tillsammans med information om mängden av dessa gör proteomik till en väldigt intressant teknik för ny diagnostik med hjälp av *high-throughput* data. På samma sätt som detta kan användas som ett diagnostiskt

verktyg för tidig upptäckt av cancer kan samma metod appliceras för att detektera progression av sjukdom eller svar på behandling, allt genom analys av ett blodprov.

Masspektrometri detekterar peptider baserat på deras massa och laddning som separeras och matchas till det humana proteomet. Skillnaden mellan att analysera EVP-associerade proteiner i jämförelse med proteiner cirkulerande i blodet är att vanligt förekommande proteiner i blodet kommer att uppta större delen av analyskapaciteten och mindre vanliga, mer specifika proteiner kan bli svåra att detektera med proteomik-metod utfört på helblod eller plasma. Framrening av EVPs före masspektrometri medför förvisso mer tid och arbete för personal men resulterar i ett mer (cancer-)specifikt prov, utsöndrat direkt från tumör-celler eller andra aktiverade/rekryterade/förändrade eller delande celler. Validering av EVP-proteinprofiler pågår, och framtida kostnads-effektivitetsanalyser kommer att visa om kostnader för instrument och upplärning av personal inom masspektrometri-teknik överväger att utföra enskilda analyser av EVP-proteiner med etablerade metoder i klinisk miljö, såsom antikroppsdetektion med hjälp av ELISA, detta beroende på antalet proteiner inkluderade i slutgiltigt validerade paneler. Ett metodalternativ är att designa en mer målinriktad proteomik-panel med högre specificitet och känslighet när de exakta ingående proteinerna i en testpanel har validerats i stora populationer.

DISTINKT EVP-MÖNSTER

I den aktuella studien i *Cell* lades ett stort fokus på analys av bukspottkörtelcancer där man fann att operabla stadium I-III tumörer uppvisade ett distinkt EVP-mönster i blodet, skiljt från andra cancertyper i bröst, lunga, eller kolon. Vidare uppvisade patienter med bukspottkörtelcancer ett tjugotal EVP-proteiner vilka man inte kunde detektera i blodet från friska individer. För att härleda dessa EVP-partiklar jämfördes ett tiotal profiler mellan EVPs från blod, tumörvävnad och frisk bukspottkörtelvävnad från samma patient och man såg då att dessa partiklar verkade komma till stor del från tumörvävnad medan vissa även verkade ha sitt ur-



Figur 1. Extracellulära Vesiklar och Partiklar – EVPs visualiserade med hjälp av elektronmikroskopi. (A) Extracellulära Vesiklar och Partiklar – EVP. (B) Separering av Exosome-Large (green arrow), Exosome-Small (blue arrow) och Exomere (red arrow) med hjälp av AF4. Scale bar: 200nm. AF4 – asymmetric-flow field-flow fractionation. Bild: Adapterad från Zhang & Lyden, 2019.

sprung i intilliggande vävnad, vilken kan vara påverkad av tumörväxten. En viss del av EVP-partiklarna visade unika mönster jämfört med tumör- och vävnads-EVPs, och tros därmed vara utsöndrade av ett förändrat distalt organ såsom lever, eller ett förändrat immunsystem.

” En viss del av EVP-partiklarna visade unika mönster jämfört med tumör- och vävnads-EVPs, och tros därmed vara utsöndrade av ett förändrat distalt organ såsom lever, eller ett förändrat immunsystem.

Just vårt immunsystem verkar spela en stor roll systemisk vid denna typ av cancersjukdom. Förändrade EVPs kan ha en direkt effekt och förändra funktioner i kroppen men kan

även vara en signal på att immunsystemet är dysfunktionellt och kan till exempel fungera pro-cancerogent, eller vara nedsatt så att tumörtillväxt främjas. Detta undersöks vidare i studien där specifika *damage-associated molecular patterns* – DAMPs identifieras, främst associerade med tumör-EVPs jämfört med EVPs från frisk bukspottkörtelvävnad. Vid behandling mot dessa DAMPs eller andra tumörassocierade molekyler kan det vara av stor vikt att uttrycket är lågt i normal, omkringliggande vävnad för att minska eventuella sidoeffekter på organens normalfunktioner. I jämförelse med bukspottkörtelcancer tittar Cell-studien även på lungcancer där man inte hittar lika stora skillnader mellan EVPs från normal lungvävnad och lungtumörvävnad.

Ytterligare ett användningsområde där EVPs kan komma att bidra med information för diagnostisering är inom området för cancer utan känd primärtumör där behandling idag är väldigt komplicerat och ofta medför ospecifik överbehandling av patienter. Genom att analysera EVP-proteiner från en vävnadsbiopsi eller ett blodprov kan EVP-profilen matchas med profiler från kända tumörtyper och på så sätt bidra med information för en säkrare diagnostik. Andra potentiellt framtida användningsområden för EVP-analys är diagnostisk testning i riskgrupper för olika typer av tumörer, till exempel vid bukspottkörtelinflammation, late-onset diabetes och vid fall av ärftlig bukspottkörtelcancer. För bukspottkörtelcancer skulle EVP-mätning även

Instruktionsfilmer inom ONKOLOGI

– för dig och dina patienter

Även som APP

Ett enda klick för rätt och säker läkemedelsanvändning

Beställ kostnadsfria påminnelsekort: info@medicininstruktioner.se

kunna användas som ett behandlingsprediktivt verktyg för kirurgi och cellgiftsbehandling, vid bedömning av operativ risk, neoadjuvant behandling eller vid borderline operabla tumörer, eller som tillägg till histopatologisk verifiering vid avancerad cancer samt vid uppföljning för att diagnostisera recidiv.

” **Som alternativ till blodprov kan även andra kroppsvätskor vara mer lättillgängliga och mindre invasiva än en vävnadsbiopsi, exempelvis lymfvätska, galla eller bukspottkörtelsaft.**

ÄVEN ANDRA KROPPSVÄTSKOR

Den aktuella studien redovisar också EVP-markörer, generella för merparten av de nästan 500 analyserade proverna från patienter och djurmodeller, cellinjer, vävnader och kroppsvätskor. Syftet är att presentera proteiner som kan vara lämpliga för vidare teknikutveckling av metoder för att förfina biomarkörsanalys för bukspottkörtel- och andra cancertyper. Som alternativ till blodprov kan även andra kroppsvätskor vara mer lättillgängliga och mindre invasiva än en vävnadsbiopsi, exempelvis lymfvätska, galla eller bukspottkörtelsaft. Den aktuella studien, samt tidigare publicerade resultat (Zheng et al., 2018) visar på förekomsten och användbarheten av EVPs som biomarkörer även från dessa källor, vilka kan vara mer EVP-koncentrerade och specifika än ett blodprov.

För att en biomarkör ska komma till klinisk nytta behövs stora valideringsstudier och planen är nu att starta upp dessa i den svenska populationen. Intresserade kliniker och forskningsteam är välkomna att delta i studier då initialt endast en milliliter frusen plasma behöver samlas för senare EVP-framrening och analys. Analyser kan till en början centraliseras men förhoppningen är att respektive center med tiden ska kunna hantera sina egna prover. För att underlätta detta är detaljerade EVP-protokoll på väg att göras publika (Cell STAR Protocols, under review). Vår förhoppning är att vi kan förbättra situationen för patienter med bukspottkörtelcancer, och andra cancertyper, genom ett starkt samarbete mellan kliniker och laboratorium, över lands-, universitets-, regions- och forskargrupsgränser.

REFERENSER

Hoshino A*, Kim HS*, Bojmar L*, Gyan KE*, Cioffi M, Hernandez J, Zambirinis CP, ...//... Matei IR, Jarnagin WR, Lyden D. Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers. Cell 2020 Aug 20;182(4):1044-1061. *equal contribution

Zhang H, Freitas D, Kim HS, Fabijanic K, Li Z, Chen H, Mark MT, Molina H, Martin AB, Bojmar L et.al. Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation. Nature Cell Biology 2018 Mar;20(3):332-343.

Zhang H, Lyden D. Asymmetric-flow field-flow fractionation technology for exosome and small extracellular vesicle separation and characterization. Nat Protoc. 2019 Apr;14(4):1027-1053.

Peinado H, Aleckovic M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori- Hoshino A, Hoffman C, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. Nat Med 2012;18:883-91.

Costa-Silva B, Aiello NM, Ocean AJ, Singh S, Zhang H, Thakur BK et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. Nat Cell Biol. 2015 Jun;17(6):816-26.

Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. Nature. 2015 Nov 19;527(7578):329-35.

Rodrigues G, Hoshino A, Kenific CM, Matei IR, Steiner L, Freitas D, Kim HS, Oxley PR, Scandariato I, Casanova-Salas I, Dai J, Badwe CR, Gril B, Tešić Mark M, Dill BD, Molina H, Zhang H, Benito-Martin A, Bojmar L, ... //... Lyden D. Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis. Nature Cell Biology 2019 Nov;21(11):1403-1412.

Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J, Williams C, Rodriguez-Barranco R, Silva JM, Zhang W, Hearn S, Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. Cell Res. 2014 Jun;24(6):766-9.

Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, Zhang J, Weitz J, Chin L, Futreal A, Kalluri R. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. J Biol Chem. 2014 Feb 14;289(7):3869-75.

Zheng J, Hernandez JM, Doussot A, Bojmar L, Zambirinis CP, Costa-Silva B, van Beek EJA, Mark MT, Molina H, Askan G, Basturk O, Gonen M, Kingham TP, Allen PJ, D'Angelica MI, DeMatteo RP, Lyden D, Jarnagin WR. Extracellular matrix proteins and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules characterize pancreatic duct fluid exosomes in patients with pancreatic cancer. HPB (Oxford) 2018 Jul;20(7):597-604.

LINDA BOJMAR, PHD, POSTDOK,
LINKÖPINGS UNIVERSITET,
LINDA.BOJMAR@LIU.SE



PER SANDSTRÖM, MD, PHD, PROFESSOR,
ÖVERLÄKARE, LINKÖPINGS UNIVERSITET,
PER.SANDSTROM@LIU.SE

