

••• forskning

*Nya forskningsfynd
visar hur bröstcancer
sprider sig via
lymfsystemet*



Bröstcancer celler sprider sig via lymfsystemet men det är oklart hur detta går till. Ny forskning visar att cancer celler kan förklä sig till immunceller och vandra via lymfsystemet liksom immunceller gör vid inflammation. **Jonas Fuxe** och **Mikael Karlsson**, docenter och cancerforskare respektive immunolog vid Karolinska Institutet berättar här om de nya upptäckterna.

Svullna lymfknotor kan vara ett tecken på att cancer har börjat sprida sig. Många cancerformer inklusive bröstcancer och prostatacancer sprider sig just via lymfsystemet och kan bilda lymfmetastaser i närliggande lymfknotor. Det är en av de viktigaste prognostiska markörerna i dessa cancerformer.

Det har länge varit oklart hur cancer celler sprider sig genom lymfsystemet och det finns idag inga läkemedel som kan förhindra det. I en forskningsstudie, som nyligen publicerades i tidskriften *Oncogene*, har vi upptäckt en mekanism för hur bröstcancer celler sprider sig via lymfsystemet genom att förklä sig till immunceller¹.

DRIVKRAFTER TILL ATT CANCERCELLER BÖRJAR SPRIDA SIG

Den absolut största orsaken till att människor dör i cancer är att den sprider sig och bildar metastaser i vitala organ som lungor och lever. Vi vet fortfarande för lite om hur spridningsprocessen går till och kanske framförallt, varför cancer celler sprider sig. Man uppskattar att endast en bråkdel av de cancer celler som ger sig iväg på resa genom kroppen faktiskt överlever och bildar metastaser i ett annat organ². Men, vilka är då de drivkrafter som gör att cancer celler väljer att vandra iväg från den vävnad där de skapades, för att ge sig ut på en osäker vandring genom främmande vävnader och kärl?

En tänkbar orsak är att den lokala miljön blir ogynnsam i takt med att tumören växer okontrollerat. I linje med detta finns det forskningsresultat som visar att tecken på metabolisk obalans som dålig syresättning (hypoxi) och celledöd (apoptos/nekros) är förknippade med spridningsbenägenhet i olika tumörmodeller³. Flykt skulle alltså kunna vara en anledning till att cancer celler sprider sig för att söka sig till en ny, bättre miljö.

Ny forskning visar dock att en tumörs spridningsbenägenhet inte är så nära kopplad till dess tillväxt som man tidigare trott⁴. Det finns inga tydliga linjära samband mellan en tumörs storlek och dess förmåga att sprida sig. Små tumörer kan vara väldigt spridningsbenägna samtidigt som stora tumörer kan vara godartade. Det här antyder att cancer cellers förmåga att sprida sig och bilda metastaser styrs av andra mekanismer än de som styr cellernas tillväxt. Denna teori förstärks av det faktum att de flesta cancerläkemedel som används idag och som är utvecklade för att slå på cancer cellernas tillväxt, har väldigt begränsade effekter på tumörers kapacitet att metastasera.

”Vi hoppas att forskningen ska leda till att vi får fram bättre verktyg både för diagnostik och behandling av metastaserande cancer.”

INFLAMMATIONENS ROLL I CANCERCELLERS SPRIDNINGSBENÄGENHET

En del av förklaringen till varför cancer celler sprider sig kan finnas i den forskning som på senare år har visat att inflammation påverkar tumörers spridningsbenägenhet^{5,6}. Experimentella studier har påvisat att immunceller som infiltrerar tumörer kan frisätta ämnen som ökar spridningen av cancer celler. Dessutom har kliniska studier visat att anti-inflammatoriska läkemedel kan ha en hämmande effekt på spridning-

en av cancer. Vi utgick från dessa rön och frågade oss; hur påverkar inflammatoriska signaler cancercellers förmåga att sprida sig?

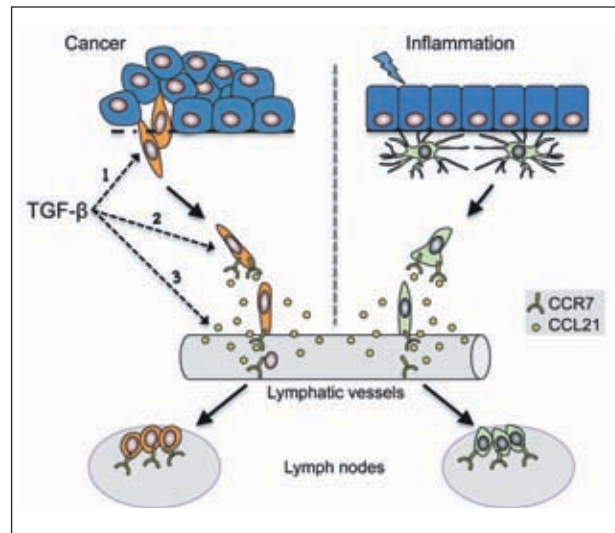
Våra tidigare resultat har visat att bröstcancerceller, som är epitelceller till sitt ursprung, kan omvandlas till mesenky-mala celler genom en process som kallas "Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)"¹⁷⁻¹⁹. EMT processen är viktig under olika delar av fosterutvecklingen då den bidrar till att epitelceller får kapacitet att vandra från ett område till ett annat för att bilda nya vävnadslager. EMT är aktiv under fosterutvecklingen men inte i normala, färdigutvecklade vävnader. Det som har upptäckts under senare år är dock att EMT kan återuppväckas vid patologiska tillstånd som cancer och inflammation. En bidragande orsak till detta är att faktorer som kan framkalla EMT, såsom Transforming Growth Factor beta (TGF- β), ofta ansamlas i inflammatoriska vävnader och i cancer-tumörer. I bröstcancer är en ökad mängd TGF- β associerat med lymfmetastasering.

"Vi tror att våra resultat är konceptuellt viktiga då de antyder att cancercellers spridningsbenägenhet inte bara är en flyktmekanism utan en aktiv process som drivs av EMT och inflammation."

TVÄRVETENSKAPLIGT PROJEKT

Vi frågade oss om TGF- β faktorn kunde vara sammankopplad med spridning av bröstcancerceller via lymfsystemet genom dess förmåga att framkalla EMT. För att studera detta startade vi ett tvärvetenskapligt projekt uppbyggt på samarbete mellan cancerforskare och immunologer. Vi använde oss av ett modellsystem där vi först märkte in cancercellerna med ett fluorescerande protein och därefter injicerade dem i möss. Genom högupplöst konfokalmikroskopi kunde vi sedan följa hur de fluorescerande cancercellerna vandrade från injektionsplatsen till dränerande lymfknuta. Vi upptäckte ganska snabbt att om vi lät cellerna genomgå EMT genom att förbehandla dem med TGF- β vandrade de mer effektivt till lymfknutorna. Vidare mikroskopingsstudier visade att EMT cellerna vandrade mot och tog sig in i lymfatiska kärl i området där de hade injicerats. Dessa resultat antydde att EMT cellerna kunde känna igen och specifikt vandra emot lymfkärl.

För att studera detta ytterligare utvecklade vi en ny 3D kultiveringsmetod som bygger på att man låter celler växa på små (mikrometer stora) dextrankulor. Dessa byggs sedan in i en matrixstruktur uppbyggd av fibrin. Vi blandade kulor som var täckta med bröstcancerceller som fluorescerade i grönt tillsammans med kulor täckta med lymfatiska endotelceller som fluorescerade i rött. Genom att filma hur bröstcancer-



Figur 1. Schematiskt diagram som visar hur våra studier påvisade att cancerceller som genomgår EMT via TGF- β (1) (orange färgade) vandrar på ett målsökande sätt in i lymfsystemet liksom dendritiska celler (gröna) gör vid inflammation. Detta kunde spåras till att cancercellerna började uttrycka kemokin receptorn CCR7 på cellytan när de genomgick EMT (2). Likaktiverade dendritiska celler kunde de då känna av och vandra emot en gradient av CCL21 som produceras av lymfatiska endotelceller. TGF- β påverkade även lymfatiska endotelceller att producera CCL21 (3). Resultaten visar hur cancerceller kan erhålla och använda sig av egenskaper som immunceller har för att sprida sig.

cellerna vandrade i matrixen kunde vi studera huruvida deras EMT status påverkade migrationen. Vad vi upptäckte var att cancerceller som befann sig i EMT specifikt sökte sig mot kulor täckta med lymfatiska endotelceller. Samma mönster sågs inte när vi kombinerade EMT celler med endotelceller från blodkärl. Totalt sett visade dessa studier att bröstcancer-cellerna som genomgår EMT börjar vandra specifikt mot lymfatiska endotelceller och lymfkärl.

IMMUNCELLER OCH METASTASERANDE CELLER KAN VANDRA IN I LYMFSYSTEMET

För att ta reda på hur detta går till sneglade vi på immunsystemet. Vi utgick från det faktum att immunceller är de enda celler i våra kroppar som har kapacitet att liksom metastaserande cancerceller vandra in i lymfsystemet. Framförallt dendritiska celler är specialiserade på att vandra till lymfknutorna där de presenterar antigen för lymfocyterna, vilket startar en immunrespons. Förklaringen till att dendritiska celler vandrar in i lymfsystemet vid inflammation är att de, när de blir aktiverade, börjar uttrycka en receptor som kallas CCR7 på sin yta. Detta gör att de kan känna igen och vandra mot en gradient av CCL21, en CCR7-ligand som utsöndras av lymfatiska endotelceller. Vi spekulerade i att en tänkbar orsak till att bröstcancerceller som genomgår EMT börjar sprida sig via lymfsystemet skulle kunna vara att de också börjar uttrycka CCR7.

Vi testade det och fann att CCR7 uttrycket blev uppreglerat på bröstcancercellerna när vi drev in dem i EMT med TGF- β . Genom att manipulera uttrycket av CCR7 kunde vi

se att CCR7 var viktig för EMT cellernas förmåga att vandra mot lymfatiska endotelceller i vår 3D kultiveringsmetod. CCR7 var också viktigt för spridning av cellerna till lymfknutorna, in vivo. Vi fann även att uttrycket av CCL21 i de lymfatiska endotelcellerna var viktigt för att attrahera EMT cellerna.

”Totalt sett visade dessa studier att bröstcancer celler som genomgår EMT börjar vandra specifikt mot lymfatiska endotelceller och lymfkärl.”

Sammanfattningsvis visar våra resultat att TGF- β -inducerad EMT är en process som aktiverar cancer celler för målstyrd migration genom det lymfatiska systemet, genom att ge dem egenskaper som dendritiska celler har (Figur 1). Vi är entusiastiska över dessa fynd då de visar att cancer celler, när de genomgår EMT, kan börja känna igen inflammatoriska signaler likt aktiverade immunceller.

Parallellt med detta har vi nyligen publicerat en studie där vi har kartlagt en hel uppsättning gener som normalt sett är mest uttryckta i immunceller, men som uppregleras i bröstcancer celler som genomgår EMT¹⁰. I vår pågående och framtida forskning ämnar vi gräva djupare i vilka immuncells-egenskaper cancer celler får när de genomgår EMT och hur dessa används när cancer metastaserar, samt hur de påverkar en immunrespons mot tumören. Vi tror att våra resultat är konceptuellt viktiga då de antyder att cancer cellers spridningsbenägenhet inte bara är en flyktmekanism utan en aktiv process som drivs av EMT och inflammation. Vi hoppas att forskningen ska leda till att vi får fram bättre verktyg både för diagnostik och behandling av metastaserande cancer.

Denna studie har gjorts i samarbete mellan oss och forskare vid från Umeå universitet, Louisiana State University Health Sciences Centre, Princeton University i USA och Nihon University School of Medicine i Tokyo, Japan. Studien har finansierats av Svenska Vetenskapsrådet, svenska Cancerfonden, Barncancerfonden, Svensk Förening för medicinsk forskning (SSMF), Karolinska Institutets Strategiska Forskningsprogram inom Cancer (StratCan), och Nordic Cancer Union.

REFERENSER

1. Pang, M.F., Georgoudaki, A.M., Lambut, L., Johansson, J., Tabor, V., Hagikura, K., Jin, Y., Jansson, M., Alexander, J.S., Nelson, C.M., Jakobsson, L., Betsholtz, C., Sund, M., Karlsson, M.C. & Fuxe, J. TGF-beta1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. *Oncogene* (2015).
2. Kang, Y. & Pantel, K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer cell* 23, 573-581 (2013).
3. Rundqvist, H. & Johnson, R.S. Hypoxia and metastasis in breast cancer. *Current topics in microbiology and immunology* 345, 121-139 (2010).
4. Comen, E.A., Norton, L. & Massague, J. Breast cancer tumor size, nodal status, and prognosis: biology trumps anatomy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 2610-2612 (2011).
5. Coussens, L.M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867 (2002).
6. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436-444 (2008).
7. Vincent, T., Neve, E.P., Johnson, J.R., Kukulev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., Crystal, R.G., de Herreros, A.G., Moustakas, A., Pettersson, R.F. & Fuxe, J. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 11, 943-950 (2009).
8. Fuxe, J. & Karlsson, M.C. TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition: a link between cancer and inflammation. *Semin Cancer Biol* 22, 455-461 (2012).
9. Fuxe, J., Vincent, T. & Garcia de Herreros, A. Transcriptional crosstalk between TGF-beta and stem cell pathways in tumor cell invasion: role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* 9, 2363-2374 (2010).
10. Johansson, J., Tabor, V., Wikell, A., Jalkanen, S. & Fuxe, J. TGF-beta1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Promotes Monocyte/Macrophage Properties in Breast Cancer Cells. *Frontiers in oncology* 5, 3 (2015).

JONAS FUXE, DOCENT, INSTITUTIONEN FÖR MEDICINSK BIOKEMI OCH BIOFYSIK, KAROLINSKA INSTITUTET.
JONAS.FUXE@KI.SE



MIKAEL KARLSSON, DOCENT, INSTITUTIONEN FÖR MIKROBIOLOGI, TUMÖR BIOLOGI OCH CELL BIOLOGI (MTC),
KAROLINSKA INSTITUTET

