

# Förbättrad cancerdiagnostik med 3D-mikroskopi

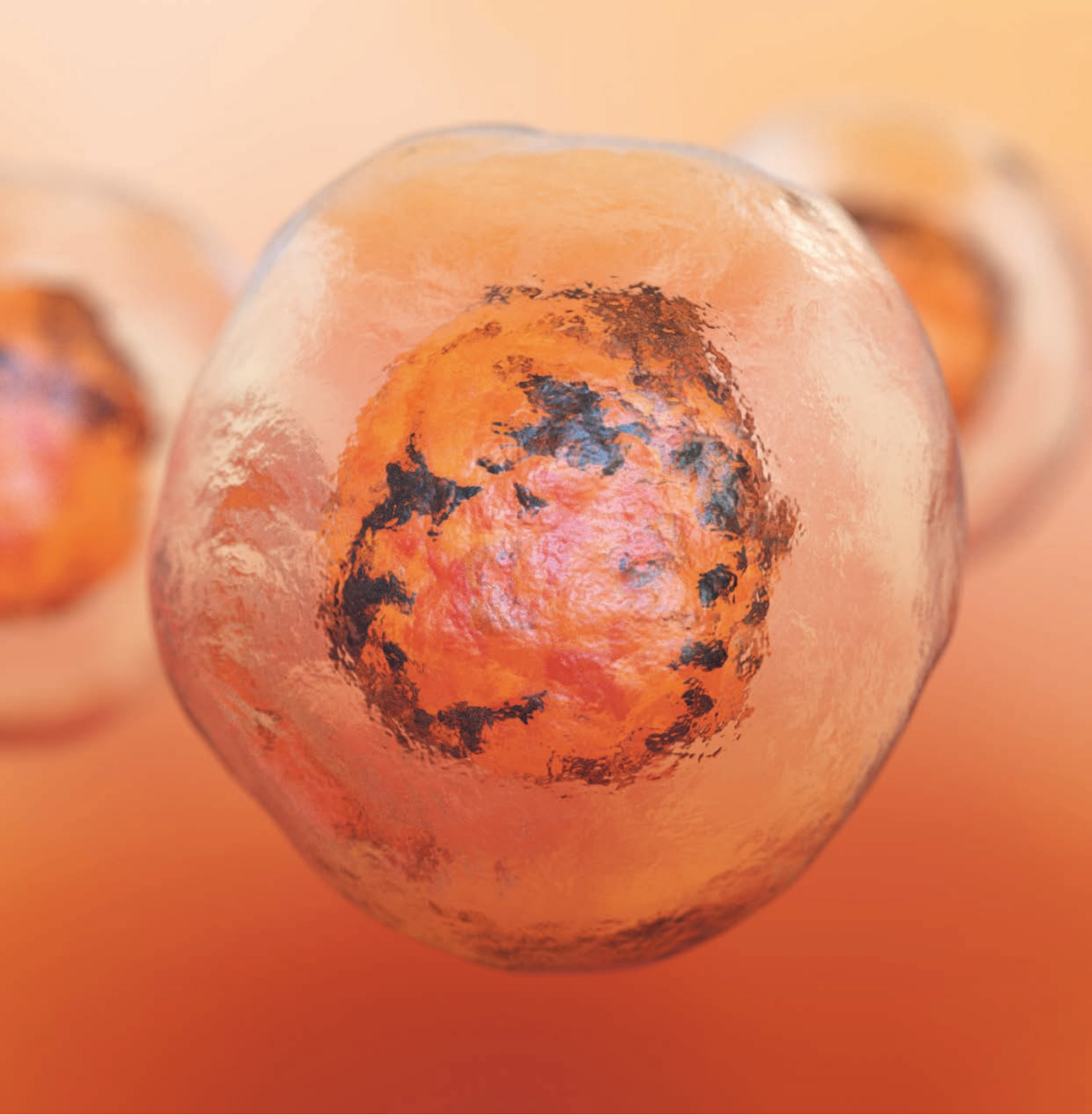
Den senaste tidens landvinningar inom ljusmikroskopi kan användas kliniskt för att förbättra patologisk diagnostisering av tumörer. Nu är det möjligt att avbilda hela tumörer digitalt och studera och karakterisera komplexa strukturer i tre dimensioner (3D). Det skriver professor **Per Uhlén**, Karolinska Institutet och **Ayako Miyakawa**, överläkare vid Karolinska Universitetssjukhuset.

**C**ancertumörer är komplexa sammansättningar av heterogena populationer av celler med olika fenotypiska egenskaper<sup>1</sup>. Framsteg inom tekniken för genskvensering har varit mycket viktig för att klarlägga förekomsten av heterogenitet i olika typer av cancer. Men ett problem när tumörer sekvenseras är att vävnaden dissocieras till en cellsuspension där all information om den spatiala lokalise-

ringen av enskilda celler i tumören saknas. På så sätt förloras viktig information som kan användas vid diagnostiseringen av tumörer, till exempel cellnischer, vaskulatur och skiktformation.

Noggranna patologiska undersökningar är viktigt för att kunna ställa korrekta diagnoser och för att kunna välja adekvata och effektiva behandlingar. Vanligtvis fixeras vävnad som tas från patienter i formalin och bäddas

sedan in i paraffin till så kallade FFPE-prov (Formalin Fixed Paraffin Embedded). Tunna snitt (<10 µm-tjocka) av FFPE-provet kan då skäras och färgas in med olika diagnostiska markörer. Patologer studerar därefter preparaten med ljus- och/eller fluorescensmikroskopi som genererar tvådimensionella (2D) bilder. Men att avbilda den ursprungliga tredimensionella (3D) vävnaden med 2D-bilder skapar ett infor-



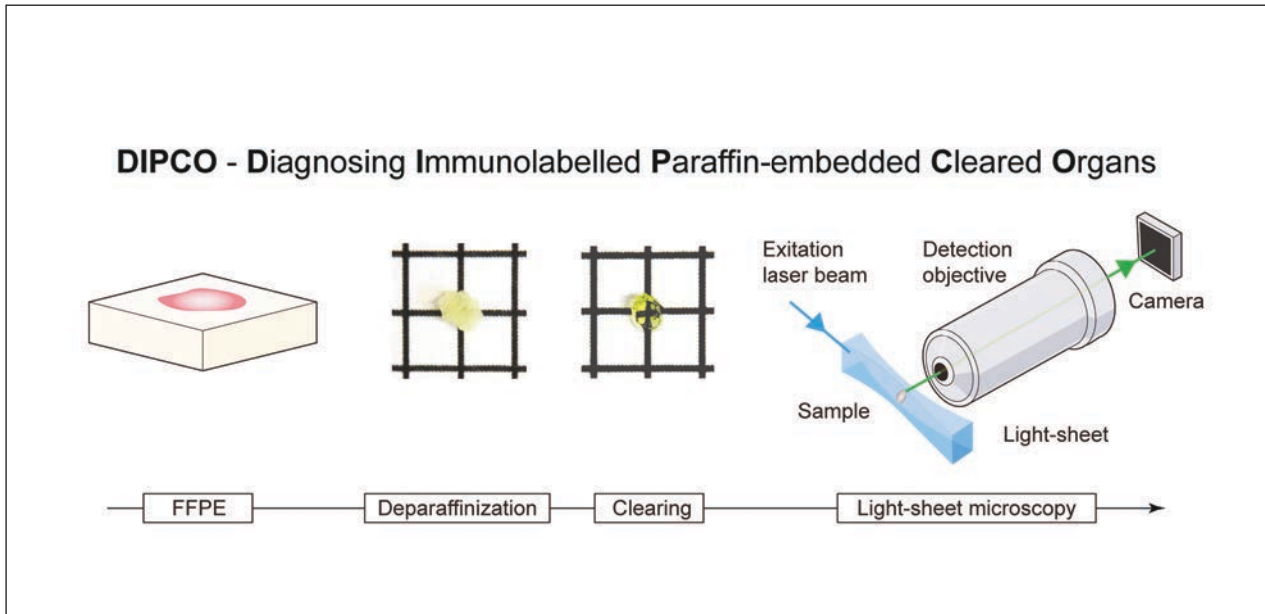
mationsgap mellan vävnaden och bilden. Vissa strukturer i vävnaden kan inte återges med bara 2D-bilder som till exempel tumörers vaskulärsystem.

#### **TIO GÅNGER SNABBARE**

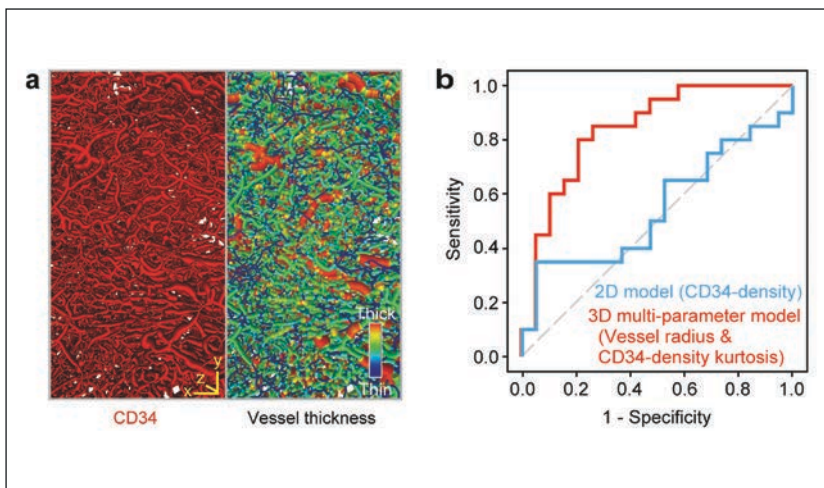
Vi har utvecklat ett nytt protokoll för att undersöka och diagnostisera hela FFPE-tumörer av storlek upp till 10x10x10 mm<sup>3</sup> (Figur 1). Protokolllet har vi valt att kalla DIPCO (Diagno-

sing Immunolabelled Paraffin-embedded Cleared Organs) och det består av diverse olika moment. Genom att tillämpa en metod som på senare tid har förfinats kan vi göra hela FFPE-tumörer genomskinliga för ljus<sup>3</sup>. Metoden går ut på att avlägsna lipider som gör den ogenomtränglig för ljus genom att behandla vävnaden med en serie av metanollösningar och bleka vävnaden med väteperoxid<sup>4</sup>. Processen skadar

inte färgämnen och antikroppar som används för diagnostiseringen. Den transparenta infärgande vävnaden kan sedan avbildas i 3D med ett Light-Sheet mikroskop<sup>5</sup>. Light-Sheet mikroskopi är en etablerad imaging-teknik som lämpar sig väl för 3D-avbildning. Det exciterande ljuset infaller vinkelrätt mot objektivet så att en hel bild av preparatet kan detekteras momentant med en kamera (Figur 1). På så sätt går



Figur 1. Förenklat flödesschema för DIPCO-protokollet som visar hur FFPE-preparat behandlas för 3D-avbildning med Light-Sheet-mikroskop. Linjerna i rutnätet är åtskilda med 3 mm.



Figur 2. (a) Volym rendering av 3D-mikroskopi-data från en 87-årig man med icke-muskelinvasiv urinblåsecancer. Blodkärlen är infärgade med en antikropp mot CD34. Pseudo-färgningen indikerar tunna (blå) och tjocka (röd) blodkärl. x,y,z-skalan är 80 µm. (b) ROC-analys av data från 2D-mikroskopi (röd) och 3D-mikroskopi (blå). När 2D-mikroskopi har nyttjats har densiteten av CD34 analyserats och när 3D-mikroskopi har nyttjats har en multiparametermodell använts där radien och densiteten/kurtosen av CD34 analyserats. Bra ROC-kurvor tenderar mot läsarens övre vänstra hörn; svaga kurvor tenderar mot den prickade diagonala linjen.

det mycket fort att scanna igenom ett helt preparat. Med ett vanligt konfokalmikroskop som belyser vävnaden punkt för punkt skulle ett vävnadsblock av storleken 5x5x5 mm ta cirka 20 timmar att avbilda. Med ett Light-Sheet mikroskop kan ett vävnadsblock av samma storlek avbildas ungefär 10 gånger snabbare, det vill säga på cirka 2 timmar.

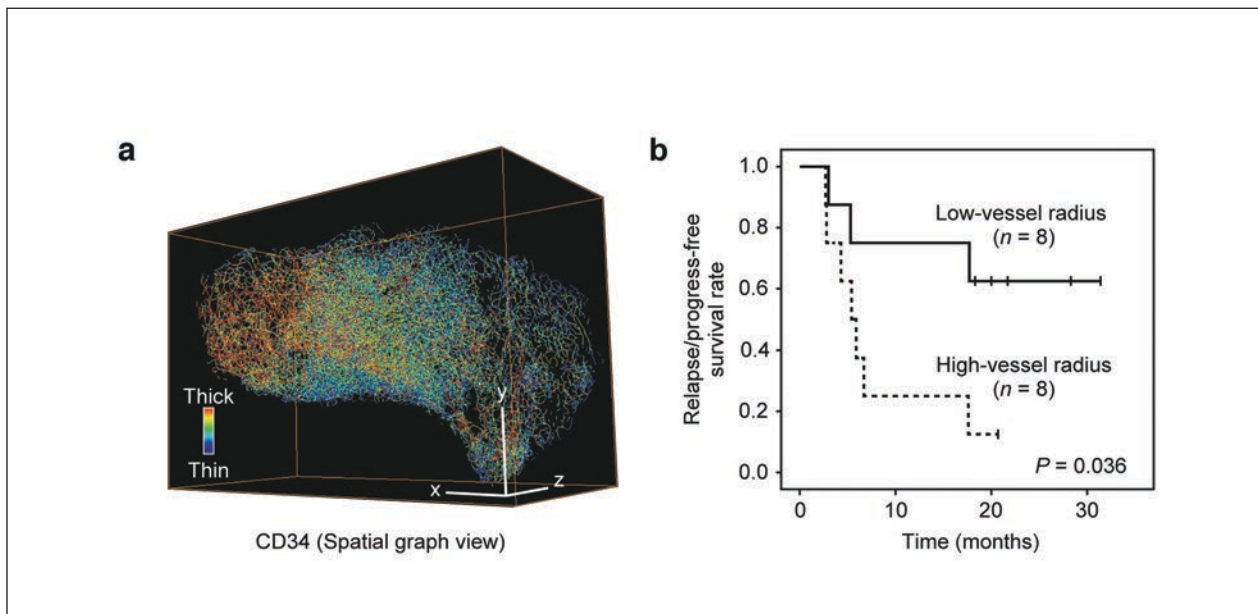
Det övergripande målet för vår studie var att utveckla en metod som kan användas kliniskt för att utföra patologiska undersökningar av intakta FFPE-tumörer. För att utvärdera vår metod undersökte vi en kohort bestående av totalt 74 humana FFPE-preparat: 44 urologiska tumörer (40 från blåsan och 4 från övre urinvägarna), 16 äggstockskarcinom som behandlats kirurgiskt

före systemisk kemoterapi, 3 fall av bukspottkörtelcancer, 1 fall av lungcancer, 1 fall av koloncancer, 2 fall av huvud- och nackcancer, 1 kolon benign polyp samt 6 normala urotelium.

#### HETEROGENT UTTRYCKSMÖNSTER

I en tumör från en 87-årig man med icke-muskelinvasiv cancer i urinblåsan som hade genomgått transuretral resektion kunde vi detektera ett tydligt heterogent uttrycksmönster på cellnivå. När vi undersökte vaskulariteten i tumören genom att immunoinmärka ett protein som heter CD34 kunde vi observera mikrobldkärl som bildade hyper- och hypo-vaskulära nischer över hela tumören (Figur 2a). Analys av heterogeniteten genom att beräkna kärltjockleken med avancerad 3D-analys avslöjade stora variationer i tjockleken från 2,5 µm till 23,0 µm.

Sedan utförde vi ett mera kliniskt relevant test på 39 urinvävnadsprover som redan hade diagnostiserats kliniskt att vara icke-muskelinvasiva tumörer med <math>pT2</math> (n = 19) eller muskelinvasiva tumörer med  $\geq pT2$  (n = 20). Vaskulaturen hos dessa preparat undersöktes och karakteriserades på många olika sätt såsom till exempel blodkärlens längd, radie, densitet och densitetens kurtosis. Kurtosis är ett mått för hur sannolika de mer extrema värdena är



Figur 3. (a) Volym-rendering av 3D-mikroskopi-data från äggstockscancer med platinum-resistens. Blodkärlen är infärgade med en antikropp mot CD34. Pseudo-färgningen indikerar tunna (blå) och tjocka (röd) blodkärl. x,y,z-skalan är 1000 µm. (b) Kaplan-Meier graf som visar två patientgrupper med låg eller hög kärlradie.

för en given sannolikhetsfördelning (2). Denna analys visade att radien och densiteten/kurtosen var signifikant högre i muskelinvasiva tumörer jämfört med icke-muskelinvasiva. För att utvärdera vår metod och jämföra den med konventionell 2D mikroskopiavbildning analyserade vi på nytt alla de 39 muskelinvasiva och icke-muskelinvasiva tumörerna med en ROC (Receiver Operating Characteristic)-analys. Vi var intresserade av att se om vårt DIPCO protokoll med 3D-mikroskopi bättre kunde detektera muskelinvasiva tumörer än en konventionell 2D-metod. När vi utförde en multivariabel-analys där vi kombinerade kärl-radie och densiteten/kurtosen fick vi ett AUC (Area Under Curve)-värde på 0,839, vilket är betydligt bättre än det AUC-värde vi erhöll med 2D-mikroskopiavbildningen som gav 0,547 (Figur 2b).

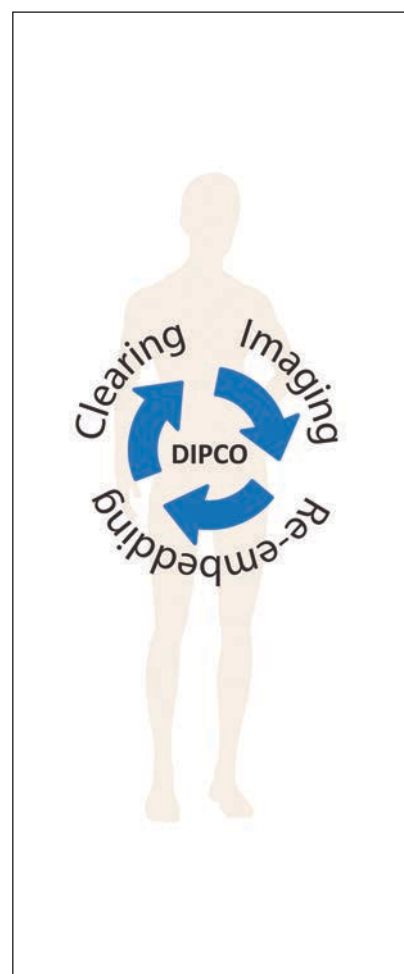
**TEST PÅ ÄGGSTOCKSCANCER**

Vidare testade vi vårt DIPCO protokoll med 3D-mikroskopi på 16 tumörer från patienter med äggstockscancer. Vår analys visade en betydande ökning av kärl-densiteten/kurtosen för steg IVA tumörer jämfört med steg IIIB/C, vilket tyder på en mer heterogen vaskularitet för mer framskriden äggstockscancer (Figur 3a). Vi analyserade också

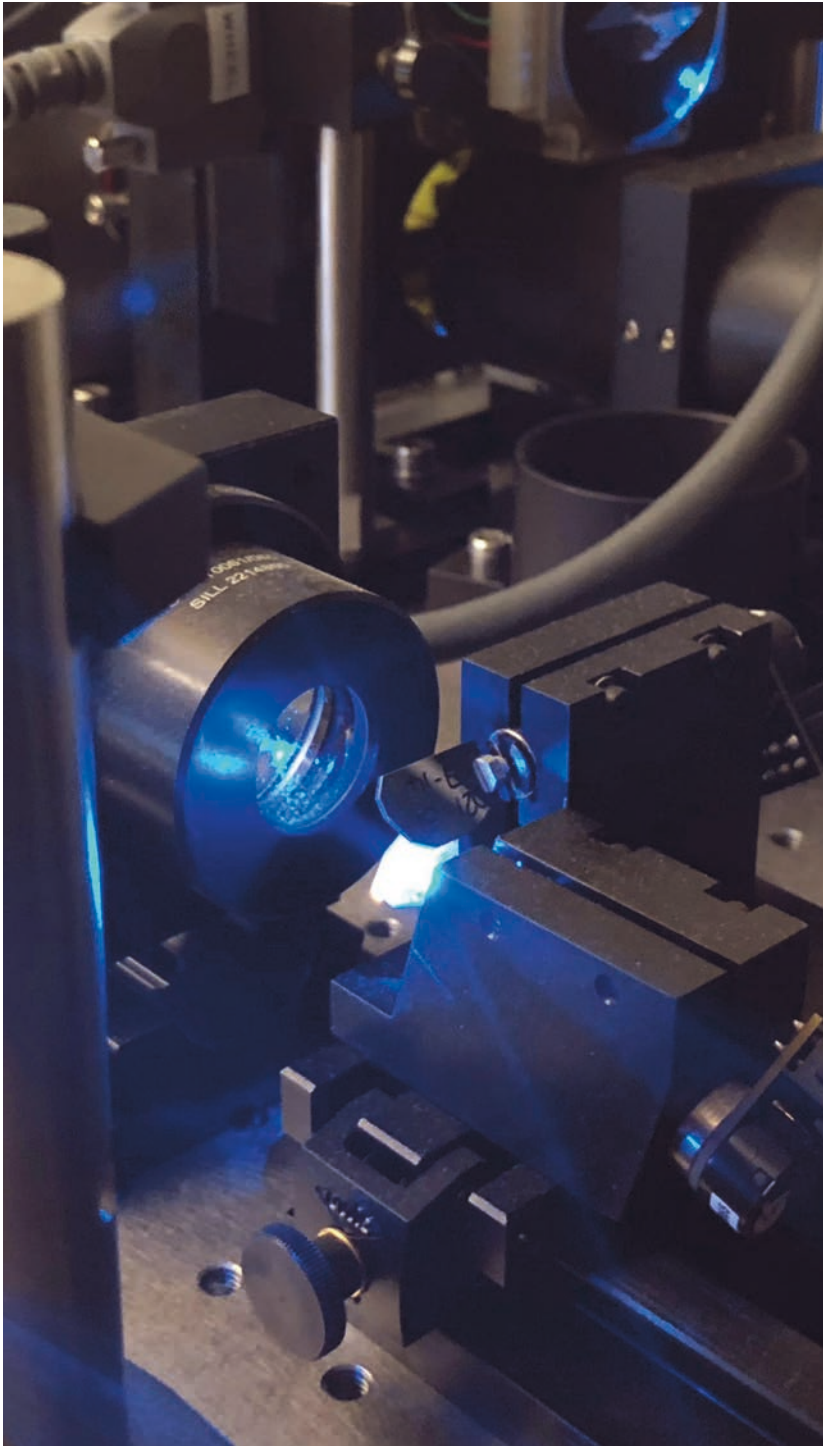
hur tumörerna hade svarat på systemisk kemoterapi med platinum. Vi såg en signifikant skillnad på kärl-radie/variansen mellan tumörer som var platinum-känsliga jämfört med de som var platinum-resistenta. Detta bekräftades av patienternas överlevnadsdata (Figur 3b). Allmängiltigheten för vårt DIPCO protokoll fastställdes genom att undersöka olika typer av cancer: pankreascancer, levermetastaser från pankreascancer, lungcancer, koloncancer och huvud- och halscancer. Typiska heterogena blodkärlssystem observerades i alla dessa tumörer.

Vi var också intresserade av att veta vilken upplösning vi kunde få med 3D-mikroskopi och om vi kunde studera enskilda celler. När vi ökade upplösningen i Light-Sheet mikroskopet kunde vi med hög noggrannhet urskilja enskilda celler i tumörer. I en av tumörerna vi analyserade räknade vi 13 214 289 celler. På det här sättet kunde vi analysera nivån av Vimentin i alla enskilda celler. Sådan information kan användas för att generera en 3D-karta av intressanta proteiner över hela tumören.

Vi testade också om det gick att återställa FFPE-provet till sitt ursprungliga skick efter analysen med DIPCO. Detta är viktigt eftersom vävnadsblocken ogärna offras på en analys. Ef-



Figur 4. DIPCO består av tre steg: Clearing, Imaging och Re-embedding vilket möjliggör återanvändning av prover.



Så här ser det custom-byggda light-sheet-mikroskopet för avbildning av stora vävnadspreparat ut.

ter analysen prövade vi att göra preparatet ogenomskinligt för ljus igen och sedan bäddade in det i paraffin. Det visade sig gå mycket bra. Genom ett stort antal infärgningar kunde vi konstatera att morfologin var oförändrad efter vår 3D-analys. Det betyder att man kan "låna" FFPE-preparat från biobanken för att sedan lämna tillbaka det efter utförd analys för återanvändning (Figur 4).

Sammantaget visar våra resultat att vårt DIPCO protokoll med 3D-mikroskopi ger ökad förståelse för heterogeniteten i tumörer. Denna teknik kan i framtiden erbjuda förbättrad cancerdiagnostik vilket sannolikt kan bidra till bättre val av behandlingsmetoder.

#### REFERENSER

1. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*. 2012 Mar 8;366(10):883-892.
2. Tanaka N, Kanatani S, Tomer R, et al. Whole-tissue biopsy phenotyping of three-dimensional tumours reveals patterns of cancer heterogeneity. *Nature Biomed Eng*. 2017 Oct 2;1:796-806.
3. Chung K, Wallace J, Kim SY, et al. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*. 2013 May 16;497(7449):332-7.
4. Renier N, Wu Z, Simon DJ, et al. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):896-910.
5. Tomer R, Ye L, Hsueh B, Deisseroth K. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat Protoc*. 2014 Jul;9(7):1682-97.

PER UHLÉN, PROFESSOR, INSTITUTIONEN FÖR MEDICINSK BIOKEMI OCH BIOFYSIK, KAROLINSKA INSTITUTET, PER.UHLEN@KI.SE



AYAKO MIYAKAWA, FORSKARE VID KAROLINSKA INSTITUTET OCH ÖVERLÄKARE VID ENHETEN FÖR UROLOGI, KAROLINSKA UNIVERSITETSSJUKHUSET, AYAKO.MIYAKAWA@KI.SE

