

Neuroblastom som modell för att förstå effekt av **syrebrist i tumörer**

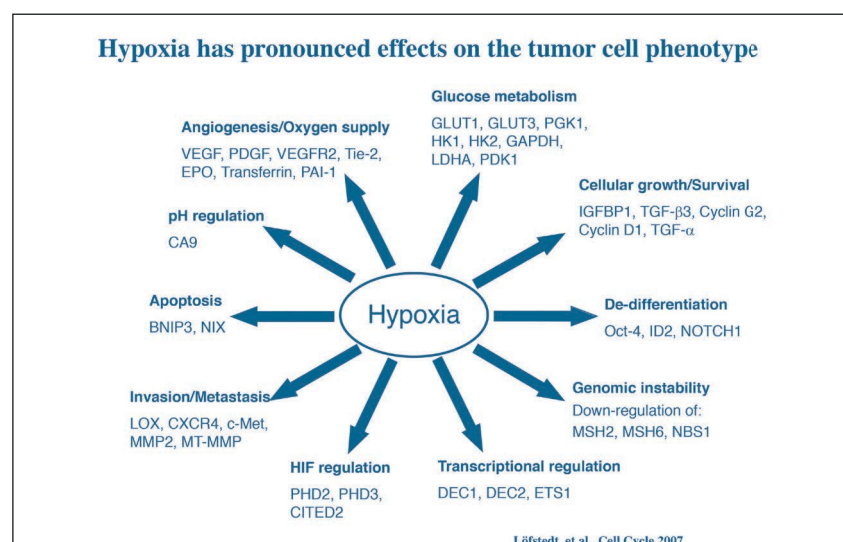
Nobelpriset i medicin och fysiologi för 2019 tilldelades professorerna Gregg Semenza, Peter Ratcliffe och William Kaelin som alla tre har utrett olika molekylära steg i mekanismerna bakom cellers förmåga att känna av och anpassa sig till låga syretryck, hypoxi. Från att ha varit en fråga för främst fysiologer, har insikter om cellers anpassningsmekanismer till lågt syre också kommit att bli centrala i förståelsen av cancercellers och enskilda tumörers beteenden. Här beskriver professor **Sven Pålman** hur upptäckterna bakom Nobelpriset kan bana väg för ny behandling av neuroblastom.

Centralt i dessa mekanismer är några syrekänsliga proteiner, ”Hypoxia Inducible Factor” (HIF) alfa, som förekommer i tre former, HIF-1 α , HIF-2 α samt HIF-3 α . HIF- α subenheter stabiliseras vid låga syrenivåer och bildar då, var för sig, komplex med proteinet ARNT. Dessa proteinkomplex binder till utvalda sekvenser i DNA, sekvenser som finns i de gener som börjar uttryckas vid låga syretryck för att dels anpassa cellen och organismen till det låga syretrycket, dels motverka att det låga syretrycket i vävnader består. En av de grundläggande frågeställningarna som ledde till mekanismernas upptäckt var frågan om hur mängden röda blodkroppar kunde öka hos till exempel individer som vistades på hög höjd. Förklaring, som Semenza var först att publicera (Semenza och Wang, 1992), är att syntesen av erythropoietin, hormonet som stimulerar bildningen av röda blodkroppar, ökar på grund av att uttrycket av erythropoietin-genen vid låga syrenivåer aktiveras av HIF-komplexet, som alltså verkar som en transkriptionsfaktor. Ett annat tidigt fynd som

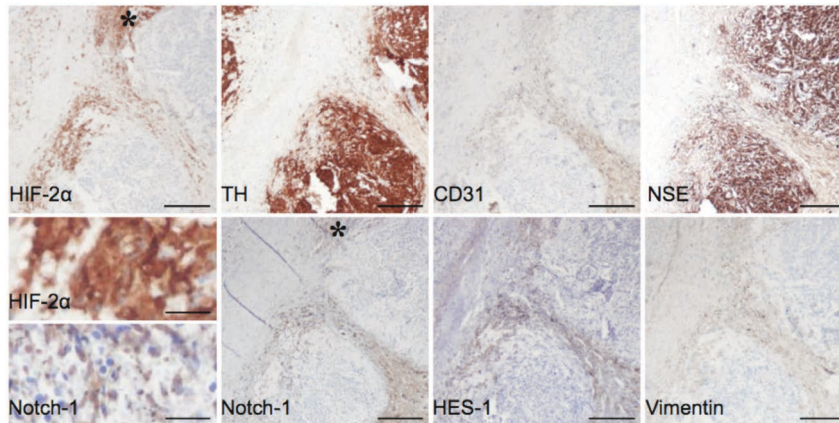
visade sig centralt för förståelsen av normal fysiologi, var upptäckten att nybildning av blodkärl triggas av lokal vävnadshypoxi och att flera pro-angiogena faktorerers gener aktiveras av HIF vid låga syrenivåer.

Solida tumörer är hypoxiska. Det stora intresset bland tumörforskare och onkologer för dessa fynd berodde initialt på att man tidigt hade funnit att solida tumörer över lag var hypoxiska (dåligt

syresatta) och att det i flera tumörformer föreligger en stark korrelation mellan dålig tumörsyresättning och aggressiv tumörsjukdom (Höckel et al., 1996). Lågt syretryck aktiverar en mängd gener och cellulära mekanismer, många kopplade till tumörväxt (Bild 1). Exempelvis är nybildningen av blodkärl centralt för solida tumörers möjligheter att växa sig större än några mm i diameter, en process som är starkt kopplad till hypoxi och aktive-



**The perivascular HIF-2 α positive NB cells are immature – mesenchymal like
... the neuroblastoma stem cell?**



Pietras et al. J Pathol 2008

ringen av HIF-komplexen, som kortfattat beskrivits ovan. Lite senare har man funnit att de gener som är involverade i nedbrytningen av HIF- α subenheter fungerar som suppressorgener i vissa cancerformer, till exempel von Hippel-Lindau (*VHL*)-genen, som kodar för VHL-proteinet, vilket krävs för att HIF- α proteiner skall degraderas vid normala syretryck. Avsaknad av *VHL* i till exempel klarcellig njurcancer leder till att HIF aktiveras även vid normala syretryck, vilket i sin tur kan kopplas till okontrollerad tumörcellsväxt (Cho et al., 2016). Det föreligger därför ett stort medicinskt intresse att med farmakologiska medel både stimulera (blodbrist) och undertrycka (cancer) HIF-aktivitet, ansträngningar som vad gäller cancerbehandling sammanfattats i Wigerup et al. (2017).

HIF-2 och utvecklingen av det sympatiska nervsystemet. Min forskargrupps ingång i detta forskningsfält var observationer i vävnadssnitt från barntumören neuroblastom (som utgår från omogna sympatiska nervceller) att tumörceller som låg nära nekros (det vill säga centralt liggande död tumörvävnad) ändrade utseende och genuttryck, resultat som vi publicerade under samma period som mekanismerna bak-

om cellers förmåga att känna av syretrycket nystades upp av årets nobelpristagare. Något år senare publicerade Steve McKnight's grupp förekomsten av en andra HIF- α -kodande gen, *EPAS1* som kodar för proteinet HIF-2 α . Denna gen var speciellt intressant för oss som studerar neuroblastom, eftersom utslagning av *EPAS1* i möss visade sig resultera i ett ofullständigt utvecklat sympatiskt nervsystem (Tian et al., 1998). Kopplingen mellan ett hypoxiaktiverat protein, HIF-2 α , och normal utveckling av det sympatiska nervsystemet (SNS), samt att neuroblastomceller ändrar sitt utseende och utmognadsgrad i anslutning till tumörnekros, fick oss att undersöka hur odlade neuroblastomceller uppförde sig vid låga syretryck. Lite till vår förvåning fann vi att de hypoxiska neuroblastomcellerna blev stamcellslika (Jögi et al., 2002). Idag vet vi, baserat på en mängd efterföljande studier av andra grupper, att hypoxi håller stamceller omogna och att syre driver differentiering (utmognad) av stamceller, observationer vars implikationer nyligen diskuterats och sammanfattats i Hammarlund et al. (2018).

HIF-2 och neuroblastom. Den koppling mellan normal SNS-utveckling och HIF-2 som utslagningen av *EPAS1* på-

visade, var naturligtvis speciellt intressant för oss eftersom neuroblastomceller beter sig som omogna SNS-neuroblastomceller och att odlade neuroblastomceller kan förmås att differentiera mot en cell med mogna sympatiska nervcellsfunktioner, ett forskningsspår som pågått i min grupp sedan snart 40 år. Vi analyserade därför neuroblastomvävnad för förekomst av HIF-2 α -proteinet och fann som förväntat förhöjda nivåer i tumörceller som låg i anslutning till nekros. Betydligt mera oväntat, och svårförklarligt, var fyndet att vissa tumörceller som låg i anslutning till blodkärl hade kraftigt HIF-2 α -uttryck och att förekomst av dessa HIF-2 α -positiva celler korrelerade till dålig prognos (Holmquist-Mengelbier et al., 2006), observationer som också gjordes i gliomvävnad. Kopplingen mellan aggressiv sjukdom och förekomsten av dessa celler i neuroblastom fick en tänkbar förklaring då vi vid närmare analys av dessa peri-vaskulära, HIF-2 α -positiva celler, fann att dessa celler hade en mesenkymal stamcellsliknande fenotyp (Pietras et al., 2008) (Bild 2). Vi har allt sedan dess försökt isolera dessa celler från neuroblastomvävnad, ett svårt projekt med tanke på hur ovanliga dessa barntumörer är. För att överhuvudtaget gå i land med projektet, men också för att ta fram kli-

niskt relevanta djurmodeller för neuroblastom, har vi etablerat human neuroblastomvävnad som så kallad "patient-derived orthotopic xenografts" (PDOX) i möss (Braekeveldt et al., 2015) för att därigenom få kontinuerlig tillgång till human neuroblastomvävnad. Därtill har det visat sig att dessa PDOX-tumörer bibehåller sina fenotyper vid passage i djur respektive vid odling i stamcellsunderstödjande medium. Och kanske viktigast av allt, dessa PDOX-tumörer har förmåga att metastasera till relevanta organ, inklusive benmärgen, vilket gör dem till extra relevanta tumörmodeller för neuroblastom (Bild 3). För att avsluta detta sidospår, har vi i delvis publicerade försök visa att dessa tumörer har en liten population mesenkymala tumörceller, som är HIF-2 α positiva vid fysiologiska och till och med höga syretryck. Därtill, dessa celler kan spontant övergå i en neuroblast-lik, "bulk" fenotyp, en förväntad egenskap hos en neuroblastomstamcell.

Förekomsten av höga HIF-2 α proteinnivåer i till synes väl syresatta celler (Bild 2) som låg i anslutning till blodkärl var vid tiden för upptäckten både ett kontroversiellt och svårförklarat fynd. Vi kunde dock visa att HIF-2 α stabiliserades vid betydligt högre syretryck än HIF-1 α och att stabilisering av HIF-1 α skedde momentant och kling-

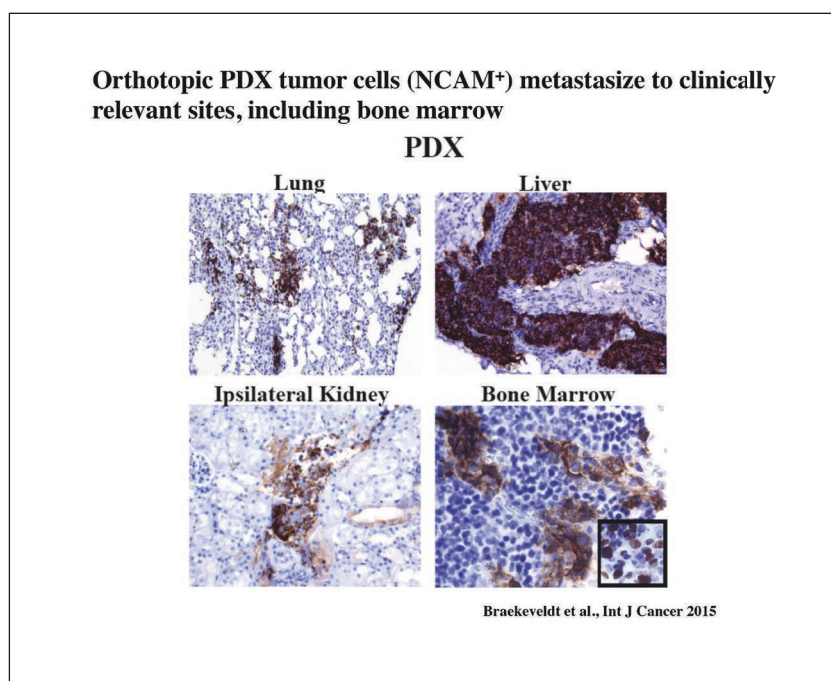
ade av successivt vid akut hypoxi, medan HIF-2 α förblev stabiliserat vid kronisk hypoxi (Holmquist-Mengelbier et al., 2006). Dessa observationer antyder olika roller för HIF-1 och HIF-2-komplexen vid cellers anpassning till förändringar i omgivningens syresättning. Det visar sig också att HIF-2-transkriptionsfaktorn kan vara aktiv vid icke-hypoxiska syrenivåer. Detta till skillnad mot HIF-1-aktiviteten som regleras på fler sätt än bara via proteinstabilisering, vilket gör att HIF-1-transkriptionsfaktorn inte är aktiv vid höga syretryck, även i situationer där HIF-1 α -proteinet är stabilt.

Pseudohypoxi. Baserat på dessa fynd har vi och andra introducerat ett nytt begrepp vad gäller HIF-signalerings för att namnge ett cellulärt tillstånd, "pseudohypoxi", som vi först upptäckte i tumörer, nämligen att tumörceller i vissa fall är syresatta men ändå beter sig som om de vore hypoxiska. Detta tillstånd verkar främst bero på en aktivering av HIF-2 α via molekylära mekanismer som vi idag inte fullt ut känner till vilka de är. En viktig pusselbit för att förstå betydelsen av det pseudohypoxiska tillståndet för tumöruppkomst och malignitet är de tumörformer som förlorat VHL-genen och därmed har ett högt uttryck av framförallt HIF-2 α även i närvaro av syre. Klar-

cellig njurcancer är den VHL-deleterade tumörform där HIF-2 och den pseudohypoxiska fenotypens betydelse för tumörväxt, och möjligen även uppkomst, är mest uppenbar och studerad. Eftersom det nyligen framtagits en grupp strukturellt relaterade HIF-2-inhibitorer som specifikt binder och hämmar den transkriptionella aktiviteten hos HIF-2, men som inte inhiberar HIF-1, har betydelsen av aktiverat HIF-2 för tumörväxt testats experimentellt med positivt resultat. Därmed har kliniska prövningar startats vars resultat hela forskarvärlden nu väntar på.

Hypoxi, pseudohypoxi och stamcellighet. Som nämnts ovan verkar syrebrist bidra till att stamceller bibehåller sin "stamcellighet" och att stamceller ofta ligger i vävnadsnischer som är hypoxiska. Dock gäller detta inte alla stamcells-nischer och vi har ställt oss frågan hur till exempel stamceller i vävnad (adulta stamceller) som regenereras livet ut bibehåller sin stamcellighet om stamcellerna inte ligger i en hypoxisk nisch (Hammarlund et al., 2017). Vi har då lanserat hypotesen att stamceller via pseudohypoxi kan förbli stamceller även i närvaro av syre och att det vi ser i tumörer kan avspegla ett normalt ske- de i utvecklingen. Igen med utgångspunkt i våra neuroblastomstudier där vi ser stamcellslika celler som både är syresatta och har höga nivåer av HIF-2 (Pietras et al., 2008), så finner vi att mycket tidiga, omogna, sympatiska neuroblaster detekterade i human fostervävnad faktiskt har höga HIF-2 α -nivåer trots att vävnaden är väl syresatt. Dessa fynd, tillsammans med det faktum att EPAS1/HIF-2 α verkar som en onkgen i flera olika tumörformer genom att konstitutivt vara aktiverad, dels genom förlust av *VHL* (exempelvis klarcellig njurcancer och paragangliom) eller genom aktiverande mutation i *EPAS1* (HIF-2-kodande genen i paragangliom och feokromocytom) antyder att pseudohypoxi både kan driva stamcellighet och tumörinitiering och/eller tumörprogression.

Ett tack riktas till alla mina medarbetare som genomfört de studier som beskrivits ovan, ingen nämnd – ingen glömd. Några projekt är fortfarande



pågående och leds nu av docent Sofie Mohlin, docent Daniel Bexell och fil dr Emma Hammarlund. Min forskning har under ett stort antal år stötts av Cancerfonden, Barncancerfonden, VR samt ett stort antal privata fonder respektive statsfinansierade riktade satsningar. Detaljerade tack finns i "Acknowledgements" i mina publicerade arbeten, som även redovisar de forskare som deltagit i de specifika studierna.

REFERENSER:

Semenza GL, Wang GL.

A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.* 1992 Dec;12(12):5447-54.

Hockel M, Schlenger K, Aral B, Mitze M, Schaffer U, Vaupel P.

Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res.* 1996 Oct 1;56(19):4509-15.

Josey JA, Wallace EM, Kaelin WG.

On-target efficacy of a HIF-2 α antagonist in preclinical kidney cancer models.

Cho H, Du X, Rizzi JP, Liberzon E, Chakraborty AA, Gao W, Carvo I, Signoretti S, Bruick RK, Nature. 2016 Nov 3;539(7627):107-111. doi: 10.1038/nature19795. Epub 2016 Sep 5.

Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL.

The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development.

Genes Dev. 1998 Nov 1;12(21):3320-4. PMID:9808618

Wigerup C, Pahlman S and Bexell D: Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther* (2016) Apr 29. pii: S0163-7258(16)30055-9. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.04.009.

[Epub ahead of print] Review.

Jögi A, Øra I, Nilsson H, Lindeheim Å, Makino Y, Poellinger L, Axelson H, and Pahlman S:

Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 7021-7026.

Holmquist-Mengelbier L*, Fredlund E*, Löfstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, Pietras A, Vallon-Christersson J, Borg Å, Gradin K, Poellinger L and Pahlman S: Recruitment of HIF-1 α and HIF-2 α to common target genes is differentially regulated by time and oxygen conditions in neuroblastoma HIF-2 α promotes an aggressive neuroblastoma phenotype. *Cancer Cell* 10 (2006) 413-423. *Equal contribution.

Hammarlund EU, von Stedingk K, and Pahlman S: Refined control of cell stemness allowed animals to evolve in the oxic realm. *Nature Ecol Evol* (2018) 2:220-228. Holmquist-Mengelbier

Pietras A, Gisselsson D, Øra I, Noguera R, Beckman S, Navarro S and Pahlman S: High levels of HIF-2 α highlight an immature neural crest-like neuroblastoma cell cohort located in a perivascular niche. *J Pathol* 214 (2008) 482-488.

Braekeveldt N, Wigerup C, Gisselsson D, Mohlin S, Merselius M, Beckman S, Jonson T, Börjesson A, Backman T, Tadeo I, Berbegall AP, Øra I, Navarro S, Noguera R, Pahlman S and Bexell D. Neuroblastoma patient-derived orthotopic xenografts retain metastatic patterns and geno- and phenotypes of patient tumours. *Int J Cancer* (2015) Mar 1;136(5):E252-61. doi: 10.1002/ijc.29217. Epub 2014 Oct 7.

SVEN PÅHLMAN, SENIORPROFESSOR, INSTITUTIONEN FÖR LABORATORIEMEDICIN, TRANSLATIONELL CANCERFORSKNING, LUNDS UNIVERSITET, SVEN.PAHLMAN@MED.LU.SE

