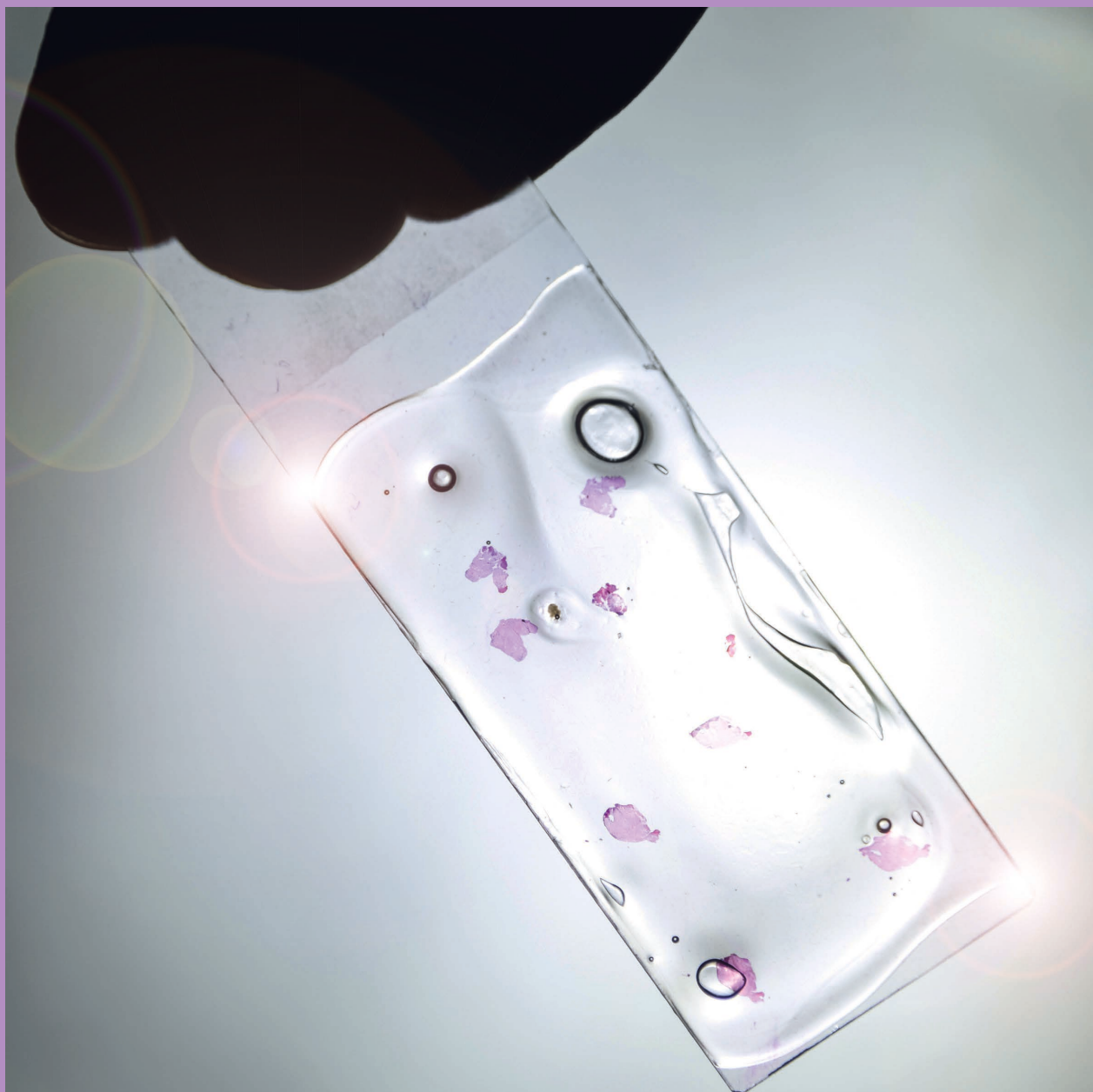




Nytt testsystem för bröstcancer avslöjar hur tumörens omgivning påverkar cancercellerna

Delar av den tumörvävnad som normalt kasseras vid cancerkirurgi bär på hittills outnyttjad kunskap om sjukdomen, visar studier vid Göteborgs Universitet. Forskningen utgör grund för en ny experimentell plattform för cancerdiagnostik, prognoser och för att testa cancerläkemedel. Här sammanfattas den nya kunskapen av forskarna **Anna Gustafsson, Emma Jonasson, Göran Landberg** och **Anders Ståhlberg**.

Bröstcancer är idag den vanligaste cancerformen bland kvinnor i Sverige. Sjukdomen har många olika kliniska uppträdanden och tumörbiologiska egenskaper och bröstcancer kan delas in i flera olika undergrupper med delvis olika prognos. Kategorisering av bröstcancer görs efter sedvanlig patologiundersökning och med hjälp av histologi och uttryck av specifika proteinmarkörer såsom hormonreceptorer och celldelningsmarkörer. Även storskaliga eller riktade genuttrycksanalyser används för att kategorisera sjukdomen. Diagnostisk information inkluderande viktiga parametrar som tumörgrad och tumörstorlek används sedan tillsammans med kliniska observationer för att bestämma lämplig behandling för patienten.

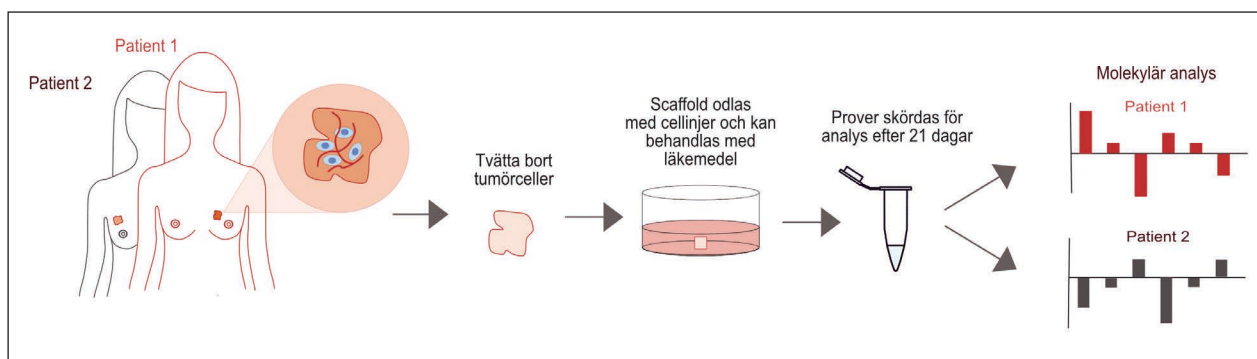
Överlevnaden hos bröstcancerpatienter har successivt ökat under de sista 30 åren och idag överlever 9 av 10 kvinnor sin bröstcancer vilket beror på bättre och mera effektiva behandlingar samt tidigare detektion av sjukdomen. Trots förbättrad överlevnad avlider runt 1 400 personer i Sverige årligen av sjukdomen (Cancer i siffror, 2018). Även om vissa undergrupper av bröstcancer har sämre prognos än andra är det svårt att efter operation och primär handläggning av patienten avgöra vilka tumörer som kommer att vara de mest aggressiva. Ett mera individanpassat behandlingsbeslut skulle kunna användas om man på förhand kunde identifiera de bröstcancerpatienter som har stor sannolikhet att få en spridd cancersjukdom. Kan man dessutom utvärdera vilken behandling som är mest effektiv för respektive undergrupp och patient skulle det medföra kraftfullare behandling där det verkligen krävs men samtidigt skulle man undvika överbehandling av bröstcancerpatienter med bättre prognos.

MIKROMILJÖN HAR STOR PÅVERKAN

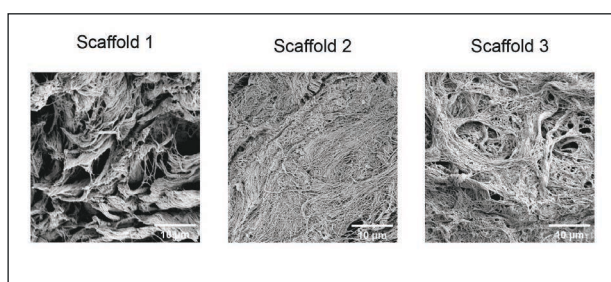
Dagens läkemedelsbehandlingar för bröstcancer med exempelvis olika cytostatika och endokrinbehandlingar på-

verkar cancercellerna direkt och minskar på så sätt tumörbördan för patienterna. På liknande sätt tas många av dagens nya läkemedel fram genom att man skräddarsyr läkemedel mot molekylära mekanismer som är unika eller kritiska för cancercellerna. Man vet dock att omgivningen runt de enskilda tumörcellerna också har stor påverkan på deras egenskaper och den påverkar även hur tumörcellerna reagerar på olika behandlingar. Denna omgivning, även kallad mikromiljö, innefattar dels tumörens strukturella uppbyggnad som inkluderar den extracellulära matrisen, men också andra celltyper som finns i cancercellernas närhet såsom immunceller, fibroblaster, fettceller och epitelceller (Park et al. 2000). Mikromiljön påverkar också andelen av olika typer av cancerceller som alla har olika egenskaper. Vissa cancerceller delar sig snabbt, några migrerar och ett antal celler är mera behandlingsresistenta. Den sistnämnda gruppen av mera inaktiva och tåliga cancerceller kallas ibland cancerstamceller eftersom de kan inducera tumörväxt i bland annat djurmodeller. Cancerstamcellerna tros finnas i specifika mikromiljöer som bidrar till att de får sina unika egenskaper att överleva cellgifts- och strålningsbehandlingar. Mikromiljön kring cancercellerna förefaller således kraftfullt påverka olika cancerens egenskaper men i avsaknad av bra metoder att mäta effekten av mikromiljön används denna typ av information sällan i diagnostik eller vid utveckling av nya cancerbehandlingar.

Under de senaste åren har intresset ökat för att försöka utveckla olika konstgjorda tredimensionella (3D) cellodlingsmodeller som till skillnad från traditionell cellodling på tvådimensionella (2D) ytor bättre kan efterlikna in vivo-liknande förhållanden genom att återskapa interaktionerna mellan tumörcellerna och deras mikromiljöer. Problemet med dessa modellsystem, som ofta är skapade av syntetiska material, är att de väsentligt skiljer sig från hur den verkliga tumörmikromiljön ser ut och uppför sig. För att möta be-



Figur 1. Utveckling av ett nytt experimentellt system för att inkorporera tumör-specifika omgivningar i cellodling. Tumörbitar från patienter tvättas med detergentlösningar för att ta bort celler vilket resulterar i scaffolds. Standardiserade cellinjer odlas på scaffolds och skördas efter 21 dagar för att genomföra molekylära analyser och därmed undersöka effekten av specifika mikromiljöer på cellernas egenskaper.



Figur 2. Variation av scaffoldstruktur. Struktur hos tre olika scaffolds genom analys med svepelektronmikroskopi visar på likheter och skillnader mellan specifika scaffolds.

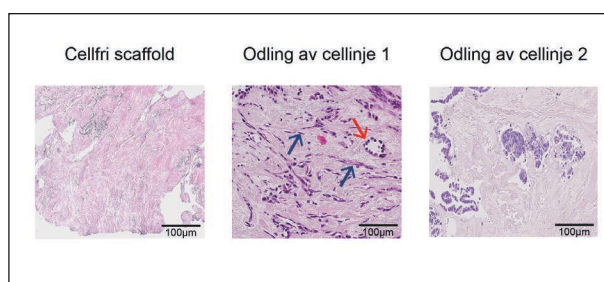
hovet av att bättre återskapa tumör-specifika omgivningar har vi därför utvecklat ett nytt experimentellt testsystem där vi använder oss av bröstcervävnader från patienter.

STUDIEN OCH TUMÖRSKELETTET

Då varje bröstcancer är unik i sig hypotiserade vi att även tumörens mikromiljö är unik och innehåller outnyttjad klinisk information om hur den specifika omgivningen påverkar cancerens egenskaper och progress till spridd sjukdom (Landberg et al. 2019). För att undersöka detta utvecklade vi en ny metod för att kunna odla standardiserade cancer-cellinjer i en patients egen cancermikromiljö. Metoden bygger på att man tvättar bort alla celler, inkluderande de ursprungliga cancer-cellerna, från den primära tumören och skapar ett intakt men cellfritt tumorskelett, även kallat scaffold. Genom att tvätta tumörerna stegvis med detergent över en veckas tid försvinner cellerna medan de omgivande byggstenarna och strukturerna finns kvar intakta (Figur 1).

Elektronmikroskopiska studier av olika cellfria scaffolds visade både strukturella likheter och olikheter inom och mellan olika tumorskelett (Figur 2). När vi jämförde proteininnehållet i 15 cellfria scaffolds med hjälp av masspektrometri, identifierades två tydliga grupper som kunde kopplas till högre respektive lägre nivå av tumörgrad och celldelningsgrad hos originaltumörerna. Ett protein som var kopplat till lägre tumörgrad var periostin, och i en uppföljningsanalys av 455 bröstcancerprover visade det sig att mängden periostin var associerat till lägre celldelningsgrad i cancer-cellerna vilket validerar observationerna från cellfria scaffolds. Cancer-celler som behandlades experimentellt

” För att möta behovet av att bättre återskapa tumör-specifika omgivningar har vi därför utvecklat ett nytt experimentellt testsystem där vi använder oss av bröstcervävnader från patienter.



Figur 3. Infiltration av standardiserade cellinjer i cellfria tumorskelett. Immunohistokemi-analys av en cellfri scaffold samt av två scaffolds där olika typer av bröstcancer-celler har odlats och växt in i strukturen. De två cellinjerna har olika kapacitet att infiltrera omgivningen. I cellinje 1 sker tydliga morfologiska förändringar där vissa celler får ett mera fibroblastiskt utseende (blå pilar) medan andra celler får ett mer endoteltiskt utseende (röd pil).

med periostin uppvisade även lägre kapacitet att förflytta sig och migrera in i sin omgivning.

Eftersom alla celler tvättats bort från scaffolds förväntade vi oss att de kvarvarande proteinerna i tumorskeletten i huvudsak skulle vara associerade till tumörens struktur och uppbyggnad. Trots detta hade enbart 33 utav 143 detekterade proteiner funktioner som var direkt kopplade till den så kallade extracellulära matrisen, som är en viktig strukturell del av mikromiljön (Lu, Waeber and Werb. 2012), vilket indikerar att många proteiner som finns i tumorskelettet har andra funktioner än uppbyggnad av strukturen. Flera masspektrometri-identifierade proteiner visade sig dessutom vara kopplade till sekretion och utsöndring av

proteiner, vilket visar att kommunikation mellan celler kraftfullt påverkas av cancers mikromiljö.

ANPASSAR SIG TILL OMGIVNINGEN

Nästa steg var att undersöka hur cancercellerna förändrades av att växa i olika scaffolds. Genom att odla standardiserade cancerceller i scaffolds och sedan studera hur de växte kunde vi observera att celler som introducerats i scaffolds växte in i vävnaderna och anpassade sig till varje unik strukturell omgivning (Figur 3). Cancercellerna som växte i tumörskeletten ändrade form, utseende och blev lik verklig tumörvävnad. För att bättre förstå hur cancercellerna anpassade sig till den nya scaffold-omgivningen studerade vi också hur genuttrycket förändrades. Genom att fokusera analyserna på viktiga cancerrelaterade processer kunde vi visa att celler som vuxit i tumörskeletten under 3 veckor ökade uttrycket av cancerstamcells-relaterade gener och minskade uttrycket av celldelningsgener jämfört med celler som vuxit i traditionell 2D-odling. Proteinanalyser och olika funktionella tester verifierade också att cancerceller som odlats i scaffolds fick ökade cancerstamcellsegenskaper med lägre celldelningsgrad. Genom att analysera genuttrycket på hundratals enskilda cancerceller kunde vi även konstatera att celler som odlats i scaffolds skilde sig tydligt från 2D-odlade celler, men att det också fanns stora variationer i genuttrycket mellan enskilda cancerceller som odlats i scaffolds, vilket indikerade att mikromiljöerna är unika och specifika för bröstcancer.

Eftersom det finns andra modellsystem för cancer jämförde vi också scaffold-metoden med exempelvis djurmodeller och artificiellt framtagna tillväxsystem. Omfattande genuttrycksanalyser visade att cancerceller som odlats i

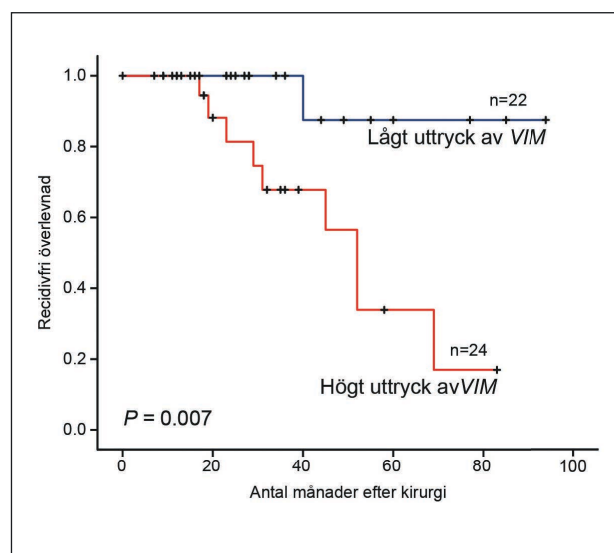
scaffolds påminde om tumörer som bildats genom att samma standardiserade cellinjer injicerats i möss, vilket stöder antagandet att scaffolds är en relevant modell för att skapa en in vivo-liknande tumörtillväxt som efterliknar människokroppen. För att belysa om scaffolds påminner om andra 3D-baserade odlingsmodeller, jämförde vi genuttrycket av scaffoldodlade celler med genuttrycket av celler som odlats i 3D-utskrivna matriser gjorda av biomaterialet alginat. Genuttrycksprofilerna hos celler odlade i scaffolds respektive 3D-utskrivna tumörer var till viss del lika, vilket tyder på vissa generella effekter av 3D-odlingar. Det fanns dock även tydliga skillnader mellan systemen vilket bevisar att den specifika uppbyggnaden och kompositionen av tumörskelettet är viktig.

Modellsystemet som visar hur aggressiv en viss canceromgivning är kan således användas som komplement till andra diagnostiska och prognostiska tester för att optimalt kunna identifiera aggressiva tumörer redan på ett tidigt stadium.

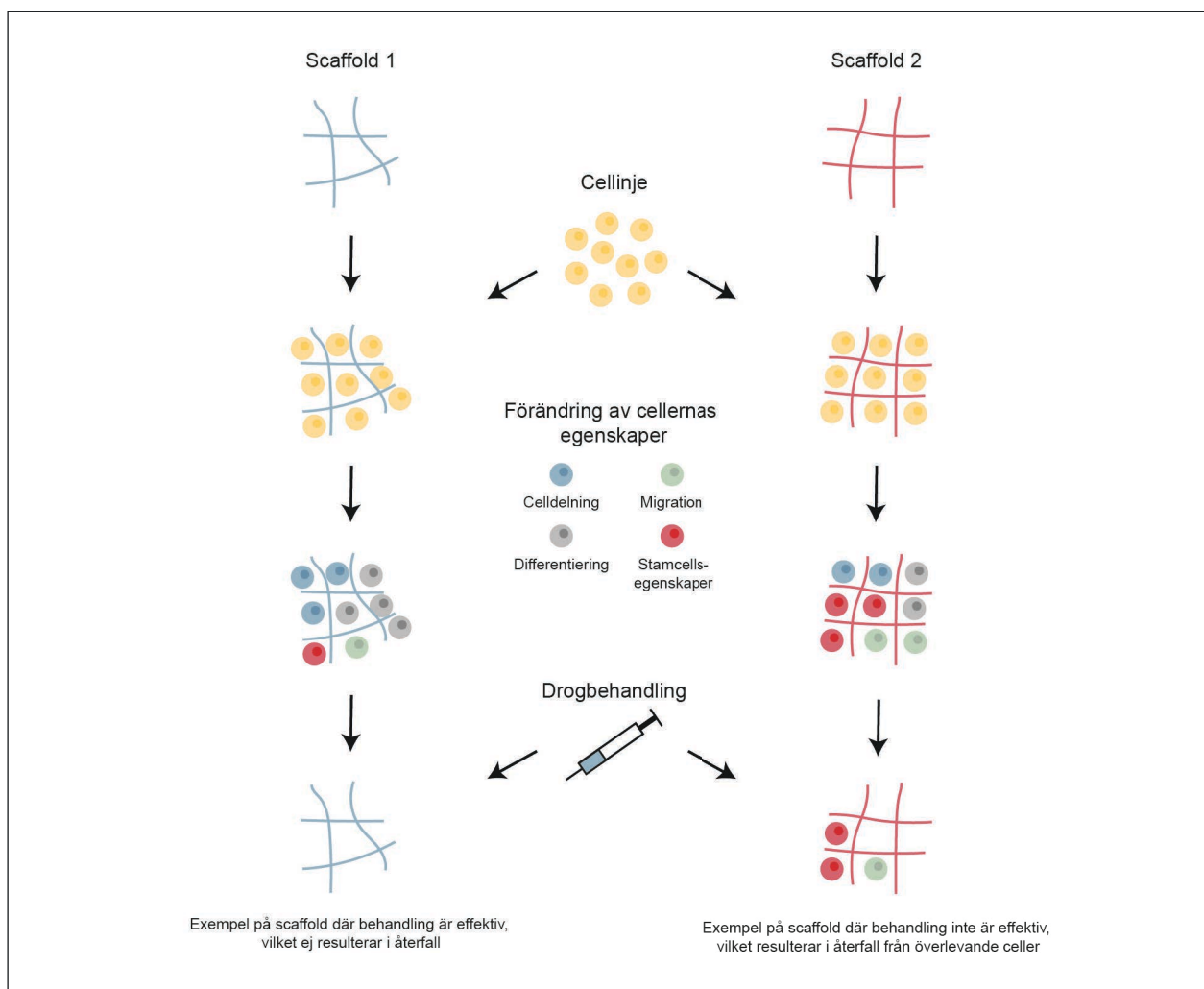
Eftersom vi observerade stora variationer mellan olika patienters scaffolds ville vi också undersöka om det fanns några kopplingar mellan resultaten från varje bröstcancer-scaffold och hur aggressiv cancersjukdomen var för varje patient. Genom att analysera och tillverka scaffolds från bröstcancervävnad från en biobank av frysta prover och sedan jämföra scaffoldresultaten med klinisk information, kunde vi visa att det fanns en koppling mellan exempelvis tumörrecidiv och specifika förändringar i genuttryck hos cancercellerna som fått växa i de olika bröstcanceromgivningarna. Detta syntes tydligast för migrationsmarkören vimentin, där kraftig påverkan på denna gen var kopplat till aggressiv cancersjukdom och dålig prognos (Figur 4). Våra data visar därmed att det finns information lagrad i tumörens mikromiljö som kan relateras till patientens kliniska sjukdomsutveckling och att denna aktivitet kan mätas med vår nya scaffoldmetodik.

VAD KAN MAN GÖRA MED SYSTEMET?

Sammanfattningsvis visar vår studie på vikten av att använda den annars förbisedda informationen från patientens unika tumörmikromiljö. Våra resultat visar att standardiserade cancercellinjer som odlas i cellfria patientscaffolds ändrar sina egenskaper på ett patient-unikt sätt. Dessa förändringar är även kopplade till klinisk relevant information. Modellsystemet som visar hur aggressiv en viss cancerom-



Figur 4. Prognostisk information finns i bröstcancerscaffolds. Överlevnadsanalys för 46 olika scaffolds med klinisk uppföljningsdata visar att det går att särskilja scaffolds som kommer från patienter som fått återfall och de som inte har fått det. Figuren visar att cancerceller som växt i scaffolds från patienter som inte fått återfall får ett lägre genuttryck av migrationsmarkören vimentin än i cellerna som växt i scaffolds från patienter med en sämre prognos.



Figur 5. Bröstcancerscaffolds kan användas för framtida drogtestar. Egenskaperna hos cancercellerna som odlats i scaffolds förändras i relation till mikromiljön. Varje tumör är unik vilket innebär att cancercellerna som odlas i testsystemet kommer att bli delvis patientanpassade. Detta kan användas för att skräddarsy varje patients behandling samt för att utvärdera nya droger.

givning är kan således användas som komplement till andra diagnostiska och prognostiska tester för att optimalt kunna identifiera aggressiva tumörer redan på ett tidigt stadium. Metoden kan också användas för att testbehandla en patientscaffold med olika etablerade cancerbehandlingar för att optimalt kunna identifiera den mest effektiva behandlingen för varje enskild patient. Då varje tumör kan delas upp i flera mindre delar kan många droger testas simultant för att studera deras effekt och att rätt läkemedel identifieras för den specifika tumören.

Scaffolds kan i framtiden även användas för att studera nya experimentella behandlingars nytta i ett in vivo-liknade tillväxsystem där man tar hänsyn till viktiga variationer mellan olika patienter (Figur 5). Scaffold-systemet kommer också att kunna användas som en plattform för att utveckla nya behandlingar inom cancer generellt, vilket kan öka precisionen och mångfalden av cancerläkemedel. Mängden djurförsök i utvecklingsarbetet kring cancerläkemedel kan också minskas eftersom scaffolds är ett in vivo-liknande screenings- och valideringssystem som annars bara djurförsök kan erbjuda.



Fotnot: Denna studie utfördes vid Göteborgs Universitet i samarbete med Paul Fitzpatrick, Pauline Isakson, Joakim Karlsson, Erik Larsson, Andreas Svanström, Svanbeidur Rafnsdottir, Emma Persson, Daniel Andersson, Jennifer Rosendahl, Parmida Ranji, Pernilla Gregersson, Ylva Magnusson, Sarunas Petronis (RISE) och Joakim Håkansson (RISE), tillsammans med Proteomic Core Facility vid Göteborgs Universitet, samt Patologi- och Kirurgmottagningen vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset. Studien har fått stöd från BioCARE, Cancerfonden, VINNOVA och Vetenskapsrådet.

REFERENSER

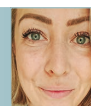
Landberg, G., Fitzpatrick, P., Isakson, P., Jonasson, E., Ståhlberg, A. (2019). Patient-derived scaffolds uncover breast cancer promoting properties of the microenvironment. *Biomaterials*, doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119705

Cancer i siffror. (2018) Socialstyrelsen

Park, C., Bissell, M., Barcellos-Hoff, M. (2000) The influence of the microenvironment on the malignant phenotype, *Mol. Med.*, doi.org/10.1016/S1357-4310(00)01756-1

Lu, P., Weaver, V., Werb, Z. (2012) The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology*, doi.org/10.1083/jcb.201102147

ANNA GUSTAFSSON, DOKTORAND, SAHLGRENSKA CANCER CENTER, GÖTEBORGS UNIVERSITET, ANNA.GUSTAFSSON.3@GU.SE



EMMA JONASSON, PHD, SAHLGRENSKA CANCER CENTER, GÖTEBORGS UNIVERSITET, EMMA.JONASSON@GU.SE



GÖRAN LANDBERG, PROFESSOR, SAHLGRENSKA CANCER CENTER, GÖTEBORGS UNIVERSITET, GORAN.LANDBERG@GU.SE



ANDERS STÅHLBERG, DOCENT, SAHLGRENSKA CANCER CENTER & WALLENBERG CENTER FÖR MOLEKYLÄR OCH TRANSLATIONELL MEDICIN, GÖTEBORGS UNIVERSITET; KLINISK GENETIK OCH GENOMIK, SAHLGRENSKA UNIVERSITETSSJUKHUSET, ANDERS.STAHLBERG@GU.SE



Möjlighet till förlängt doseringsintervall för TECENTRIQ (atezolizumab) som monoterapi

Vi påminner om möjligheten att ge TECENTRIQ som monoterapi var 4:e¹ vecka istället för var 3:e², vilket kan underlätta för sjukvård och patient.

I RCCs tillfälliga rekommendationer gällande utredning och behandling av lungcancer under pågående Coronapandemi, rekommenderas bland annat att immunterapi som monoterapi skall ges med så långa cykelintervall som möjligt.³ Regimen "atezolizumab var 4:e vecka" finns beskriven i Nationella Regimbiblioteket.⁴

Eller



1200 mg var 3:e vecka



1680 mg var 4:e vecka

1. Produktresumé Tecentriq 840 mg. fass.se 2. Produktresumé Tecentriq 1200 mg. fass.se

3. RCC i Samverkan 200414. www.cancercentrum.se/samverkan/covid-19/avvikelser-i-behandlingsrekommendationer 4. Regimbiblioteket.se

TECENTRIQ® ▼ (atezolizumab) PD-L1 hämmare, L01XC32 (Rx, EF)

Indikationer: Icke-småcellig lungcancer (NSCLC): Monoterapi vid behandling av lokalt avancerad eller metastaserad NSCLC efter tidigare behandling med kemoterapi. Patienter med EGFR-muterad eller ALK-positiv NSCLC bör också ha fått målstyrd behandling innan de behandlas med Tecentriq; i kombination med bevacizumab och karboplatin/paklitaxel som första linjens behandling vid metastaserad NSCLC av icke-skivepiteltyp. Hos patienter med EGFR-muterad eller ALK-positiv NSCLC först efter behandlingssvikt på målstyrd terapi; i kombination med nab-paklitaxel och karboplatin som första linjens behandling vid metastaserad NSCLC av icke-skivepiteltyp som är negativ för EGFR och ALK. Småcellig lungcancer (SCLC): i kombination med karboplatin och etoposid som första linjens behandling vid utbredd SCLC. Trippelnegativ bröstcancer (TNBC): i kombination med nab-paklitaxel som första linjens behandling vid lokalt avancerad eller metastaserad TNBC med ett PD-L1 uttryck $\geq 1\%$. Urotelialt carcinom: Monoterapi vid lokalt avancerad eller metastaserad urotelialt carcinom (UC) efter tidigare behandling med platinuminnehållande kemoterapi eller då cisplatin inte anses lämpligt, och då med tumörer som har ett PD-L1-uttryck $\geq 5\%$. **Kontraindikationer:** Överkänslighet mot atezolizumab eller mot något hjälpämne i läkemedlet. **Varningar och försiktighet:** Immunrelaterade biverkningar, vilka kan inträffa efter sista dosen Tecentriq. Inför behandling med Tecentriq i kombination med andra läkemedel bör de kombinerade riskerna nogt övervägas innan behandlingen inleds. **Förpackningar:** Koncentrat till infusionsvätska, lösning 1200 mg respektive 840 mg atezolizumab. De båda produktresuméerna uppdaterades senast 2020-02-13. För fullständig information se www.fass.se.

▼ Detta läkemedel är föremål för utökad övervakning. Detta kommer att göra det möjligt att snabbt identifiera ny säkerhetsinformation. Hälso- och sjukvårdspersonal uppmanas att rapportera varje misstänkt biverkning. Se avsnitt biverkningar på fass.se, om hur man rapporterar biverkningar. Rapporteringen ska göras till Läkemedelsverket www.lakemedelsverket.se eller direkt till Roche på sverige.safety@roche.com eller via 08 - 726 12 00.

Roche AB, 08-726 12 00, www.roche.se

TECENTRIQ®
atezolizumab