

Forskare från KTH/SciLifeLab och Stanford har identifierat en ny typ av cancerceller som får hudcancer att växa och sprida sig ur sin miljö. Upptäckten kan ge ökad förståelse även för andra cancertyper och kan leda till att nya mål för läkemedel undersöks. Resultaten, som nyligen publicerades i en artikel i den vetenskapliga tidskriften *Cell*, refereras här av forskaren **Kim Thrane**.

Där tumörer angränsar till omgivande frisk vävnad finns en nyupptäckt typ av cancerceller som är specialiserade på att hjälpa tumören att växa och sprida sig. Dessa utgör bara en liten del av alla cancerceller i en tumör, men har en stor inverkan på sjukdomsförloppet, exempelvis genom att aktivera celldelning i andra cancerceller eller genom att dämpa immunresponser och därmed hjälpa tumören att undkomma kroppens immunförsvar.

Dessa relativt få cancerceller spelar alltså en avgörande roll för tumörens tillväxt och spridning, men fram tills nu har vi inte vetat om att de existerar. Att blockera signalvägar som den här typen av cancerceller använder sig av skulle kunna bli en framtida behandling för skivepitelcancer, och möjligen också andra cancerformer. Upptäckten skulle med andra ord kunna vara av stor betydelse för kommande behandlingsmetoder.

I samarbete med Stanford University School of Medicine i USA har vi från Kungliga Tekniska Högskolan (KTH) genomfört en utförlig kartlägg-

ning av skivepitelcancer i huden¹. Skivepitelcancer drabbade år 2016 cirka 6 500 personer i Sverige och är den hudcancerform som ökar mest. Många fall kan botas med operation och eventuellt strålbehandling, men spridd sjukdom behandlas vanligen med cytostatika och immunterapi som blockerar PD-1/PD-L1².

PROTOTYP FÖR CARCINOM

Skivepitelcancer uppstår i celltypen keratinocyter i hudens yttersta lager, epidermis. Epidermis har normalt en ordnad struktur där keratinocyter delar sig vid basalmembranet och sedan förskjuts uppåt och blir plattare i takt med att de kommer närmare hudytan där de till slut dör. Vid skivepitelcancer störs emellertid denna struktur och basalmembranet invaderas av cancerceller. Detta förlopp är mycket likt det som sker när cancer uppstår i annan epitelvävnad i kroppen, såsom magtarmkanalen, luftvägar och runt olika organ. Cancer som uppstår i epitelceller kallas gemensamt carcinom och omfattar ungefär 90 procent av alla cancerfall. Skivepitelcancer kan därför fungera som en

prototyp för carcinom och vi tror att resultaten från denna studie kan ge ökad förståelse för tillväxt och spridning av många former av cancer.

En fördel med att studera just skivepitelcancer är att både tumörer och motsvarande normal vävnad är relativt lättillgänglig, och förutom att analysera tumörer från tio patienter har vi inkluderat normal hudvävnad från alla patienter. På så sätt har vi kunnat identifiera skillnader som uppstår i vävnaden runt omkring en tumör, utöver just cancercellerna.

För att klassificera och profilera enskilda celler har vi analyserat deras genaktivitet med en numera ganska vanlig metod inom cell- och molekylärbiologisk forskning kallad singel-cell RNA-sekvensering. Genom denna metod kan man visa vilka gener som är aktiva i varje enskild cell och sedan gruppera liknande celler baserat på genuttrycksprofiler. Många celltyper har väldokumenterade genuttrycksprofiler och med hjälp av dessa kan man klassificera grupper av celler som exempelvis keratinocyter eller immunceller. Man kan dessutom få en mer detaljerad bild av



Specialiserade celler
driver tillväxt och spridning av
skivepitelcancer

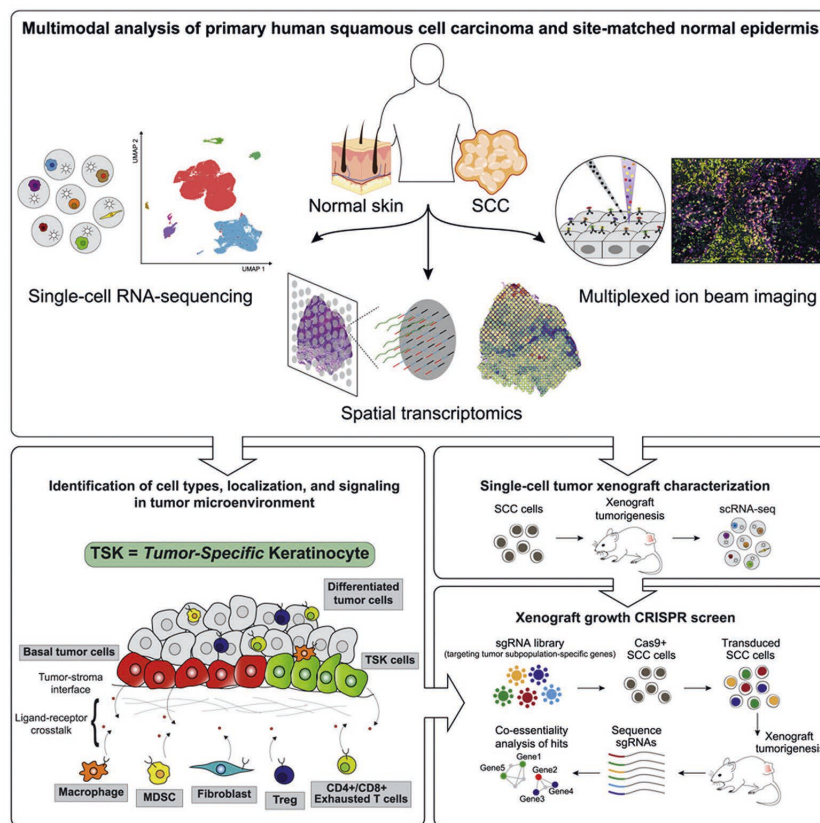
vilken typ av keratinocyt eller vilken typ av immuncell det rör sig om.

TRE SUBPOPULATIONER

Efter att ha särskilt keratinocyterna från andra celltyper gjorde vi en mer utförlig indelning av de keratinocyter som kom från patienternas friska hudvävnad och fann att de bestod av tre subpopulationer. Vi undersökte vilka gener som skiljde grupperna åt och identifierade markörgener för varje subpopulation som vi sedan kunde jämföra med tidigare studier. Vi fann att de tre subpopulationerna motsvarade basceller, cyklade celler och differentierande keratinocyter, som alla fyller kända funktioner i normal hudvävnad.

Vi upprepade proceduren med de keratinocyter som kom från patienternas tumörvävnad och fann tre subpopulationer vars genuttryck liknade de tre som fanns i normal hud. Basceller, cyklade celler och differentierande keratinocyter fanns alltså alla i varsin cancervariant i tumörerna. Utöver dessa tre kunde vi dessutom identifiera en tumorspecifik subpopulation som vi kallar TSK (tumor-specific keratinocytes). De här cellerna hade en unik genuttrycksprofil och liknade inte någon celltyp som förekommer i normal hudvävnad.

Vid närmare efterforskning fann vi att gener som var karakteristiska för TSK var involverade i processer för cellmigration och nedbrytning av extracellulär matris, vilket tyder på att dessa celler har tillförskaffat sig invasiva egenskaper. Vi ställde oss därför frågan om de genomgått EMT (Epithelial-Mesenchymal-Transition) – en process varvid epitelceller övergår till mesenchymala celler. EMT förekommer bland annat under fosterutveckling där epitelceller får kapaciteten att vandra från ett område till ett annat, men kan också manifesteras i cancer där processen ger cancercellerna förmågan att släppa fäste och sprida sig³. Vi använde oss av en databas som sammanställt flera set av gener som kännetecknar biologiska processer⁴ och jämförde mot de genuttrycksprofiler som vi tagit fram för de olika keratinocyt-typerna. Därmed kunde vi bekräfta att de invasiva TSK-cellerna hade EMT-egenska-



Figur 1. Tumörvävnad och normal hud från tio patienter analyserades med tre kompletterande metoder för att identifiera celltyper, deras placering och signalering. Ett modellsystem sattes upp i möss, och gener essentiella för tumörtillväxt undersöktes genom att slå ut gener som identifierats i patienternas cancerceller¹.

”Kombinationen av singel-cell RNA-sekvensering och Spatial Transcriptomics hjälpte oss att lägga pusslet om vilka celltyper som finns i tumörerna, vad de har för funktioner, och var de finns.

per, dock i varierande utsträckning. Det har tidigare beskrivits att cancer-celler med fenotypisk plasticitet, som befinner sig i mitten av ett EMT-spektrum, är kritiska för tumörens spridning³.

HJÄLP ATT LÄGGA PUSSLET

Sammantaget fanns alltså fyra subpopulationer av keratinocyter i tumörerna men eftersom singel-cell RNA-sekvensering görs efter att tumörerna dissociats till enskilda celler kan den här metoden inte svara på hur olika celltyper förhåller sig till varandra. Vi tog

därför en del av varje tumör och analyserade med Spatial Transcriptomics (ST) som är utvecklad på avdelningen för genteknologi på KTH, i professor Joakim Lundebergs forskningsgrupp. ST är också baserat på RNA-sekvensering, men istället för enskilda celler, analyseras ett tvärsnitt av intakt vävnad som också färgas och fotograferas i mikroskop så att genuttrycket kan kombineras med histologi⁴.

Kombinationen av singel-cell RNA-sekvensering och Spatial Transcriptomics hjälpte oss att lägga pusslet om vilka celltyper som finns i tumörerna,

vad de har för funktioner, och var de finns. TSK-cellerna var nästan uteslutande belägna längs tumörernas yttre gräns, intill omgivande vävnad, vilket ytterligare bekräftar deras roll som invasiva, och potentiellt kommunikativa med andra celler.

Cancerceller omges av andra celltyper i ett komplext ekosystem, tumörens mikromiljö, och kan undkomma kroppens immunförsvar genom olika mekanismer. För att ta reda på vilka celltyper som medverkar i de här mekanismerna sökte vi i deras genuttrycksprofiler efter välkända gener kopplade till immunsuppression. Bland andra undersökte vi PD-L1, den ligand som deaktiverar cytotoxiska T-celler genom att binda PD-1, och fann att den uttrycktes nästan uteslutande av migrerande dendritiska celler och endast minimalt av cancerceller och andra celltyper. Det indikerar att immunterapi med anti-PD-1/PD-L1 involverar en mer komplex mekanism än att det är cancercellerna som uppregulerar liganden och dämpar immunrespons. För

att nämna ett annat exempel fann vi att CD276, var produkt är ett ytprotein har kopplats till rekrytering av regulatoriska T-celler (Tregs) och inhibering av T-cellsrespons, uttrycktes av TSK-celler och fibroblaster. PD-L1 och CD276 representerar två separata mekanismer som gör att tumörerna kommer undan kroppens immunförsvar och med hjälp av ST kunde vi också se att de sker i olika regioner av tumören.

OMFATTANDE SIGNALERING

Utöver ST använde vi en ytterligare metod som analyserar intakt vävnad, och som avslöjar hur olika celltyper angränsar till varandra. Med hjälp av mul-

” För att förstå vilka gener som är essentiella för tumörers tillväxt sökte vi en modell där cancercellerna skulle efterlikna vad vi tidigare observerat i patienttumörerna.

tiplexed ion beam imaging (MIBI)⁶ analyserade vi 38 proteinmarkörer specifika för stromala, immun-, och cancerceller och genererade högupplösta bilder över tumörernas mikromiljö. Fibroblaster, makrofager och Tregs var vanligast förekommande i tumörernas yttre gräns, medan cytotoxiska T-celler och neutrofiler var exkluderade från tumörerna, vilket indikerar att positioneringen av Tregs inhiberar de sistnämndas tillträde. B-celler var den enda celltyp som uppvisade utbredd infiltrering i tumörerna.

Vi gick tillbaka till genuttrycksprofilerna som erhållits med singel-cell RNA-sekvensering för att få en upp-

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

fattning om vilka celltyper som kommunicerar med varandra, samt vilka signalvägar det sker genom. Eftersom många par av ligander och receptor är välkända kunde vi para ihop celltyper baserat på vilka gener för ligander och receptorer de uttryckte. Det visade att TSK-cellerna deltog i omfattande autokrin och parakrin signalering, och interagerade speciellt mycket med fibroblaster, makrofager, endotelceller och myeloidderiverade suppressorceller. TSK-cellernas positionering i tumörernas yttre gräns, deras omgivande celltyper, samt höga aktivitet i cell-cell-signalering styrker ytterligare teorin om att de här cellerna är drivande för sjukdomsförloppet.

För att förstå vilka gener som är essentiella för tumörers tillväxt sökte vi en modell där cancercellerna skulle efterlikna vad vi tidigare observerat i patienttumörerna. Vi lät därför cellinjer av human skivepitelcancer växa i möss och analyserade sedan med singel-cell RNA-sekvensering. Tumörerna som bildades i mössen visade sig bilda fyra subpopulationer av keratinocyter motsvarande de vi identifierat i patienttumörerna. När samma cellinjer istället fick växa *in vitro* blev subpopulationerna inte alls lika distinkta, vilket visar att tumörens mikromiljö är nödvändig för att återskapa en tillförlitlig modell.

Med hjälp av CRISPR/Cas9 testade vi sedan att slå ut gener som vi identifierat som karakteristiska för de olika subpopulationerna av keratinocyter. Förutom gener nödvändiga för celldelning och nukleotidmetabolism visade det sig att ett stort nätverk av gener, specifikt för TSK-cellerna, behövdes för tumörtillväxt. Bland dessa fanns ITGB1, CD151, FERM1 vars produkter är ytproteiner involverade i integrin-signalering. Det verkar alltså som att det här nätverket behövs för att TSK-cellerna ska kunna kommunicera med andra celler i tumörens mikromiljö. För att testa den här teorin slog vi ock-

så ut de här generna i cancerceller som fick växa *in vitro* och fick så bekräftat att de, jämfört med *in vivo*-systemet, inte hade alls samma effekt på tumörtillväxten.

POTENTIAL SOM BEHANDLING

Vi ställde oss frågan om TSK-cellerna och deras signalering var unik för skivepitelcancer och undersökte därför data från andra cancerformer⁷. Det visade sig att de tumörer med TSK-liknande genuttrycksprofil gav sämre överlevnad i sex olika cancerformer av typen carcinom och specifikt kunde vi se att FERM1 var återkommande amplifierad i genomet i de 31 cancerformer vi undersökte.

Tillsammans indikerar de här upptäckterna att blockering av TSK-cellers integrin-signalering skulle kunna ha potential som behandling mot flera cancerformer.

På senare år har allt fler studier fokuserat på tumörens mikromiljö i syfte att förstå cancers uppkomst och spridning, samt att identifiera nya terapeutiska mål. Här har singel-cell RNA-sekvensering varit ett effektivt verktyg för att klassificera kända och nya celltyper, samt att förstå deras funktioner. Men för att rekonstruera hur celltyperna positionerar sig till varandra i tumörens mikromiljö behövs andra metoder, och nya tekniker riktar sig därför till att detektera RNA och/eller proteiner *in situ*. I den här studien analyserade vi intakt vävnad med både ST och MIBI, där ST ger en global bild av hela genuttrycket medan MIBI detekterar ett begränsat antal proteinmarkörer, men i högre bildupplösning. Vi har tidigare använt ST för att studera malignt melanom, där vi kunde påvisa heterogenitet i genuttryck inom och mellan patienters metastaser. Vi identifierade också en genuttrycksprofil i metastasernas yttre gräns, mellan tumörceller och stroma, som var delad mellan patienter⁸.

REFERENSER:

1. Ji AL, Rubin AJ, Thrane K, Jiang S, Reynolds DL, Meyers RM et al. Multimodal Analysis of Composition and Spatial Architecture in Human Squamous Cell Carcinoma. *Cell*. 2020;182(2):497-514.e22. doi:10.1016/j.cell.2020.05.039
2. Cancerfonden: Skivepitelcancer. Tillgänglig via: <https://www.cancerfonden.se/om-cancer/cancersjukdomar/skivepitelcancer>, besökt 22 augusti 2020.
3. Lambert AW, Pattabiraman DR, Weinberg RA. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*. 2017;168(2017):670-691. doi:10.1016/j.cell.2016.11.037.
4. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst*. 2015;1(6):417-425. doi:10.1016/j.cels.2015.12.004
5. Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, Lundmark A, Navarro JF, Magnusson J, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*. 2016;353(6294):78-82. doi:10.1126/science.aaf2403
6. Keren L, Bosse M, Marquez D, Angoshtari R, Jain S, Varma S, et al. A Structured Tumor-Immune Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer Revealed by Multiplexed Ion Beam Imaging. *Cell*. 2018;174(6):1373-1387.e19. doi:10.1016/j.cell.2018.08.039
7. TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>.
8. Thrane K, Eriksson H, Maaskola J, Hansson J, Lundeberg J. Spatially Resolved Transcriptomics Enables Dissection of Genetic Heterogeneity in Stage III Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer Res*. 2018;78(20):5970-5979. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0747

KIM THRANE, DOKTORAND PÅ KTH:S AVDELNING FÖR GENTEKNOLOGI PÅ SCIENCE FOR LIFE LABORATORY (SCILIFELAB), KIM.THRANE@SCILIFELAB.SE

