

Cirkulerende tumorceller kan muligvis benyttes som prognostisk og prædiktiv markør ved ventrikelcancer

Cecilie Okholm¹, Morten Thorsteinsson² & Michael Patrick Achiam³

STATUSARTIKEL

1) Gastroenheden, Kirurgisk Sektion D, Herlev Hospital
2) Kirurgisk Afdeling K, Bispebjerg Hospital
3) Kirurgisk Gastroenterologisk Klinik, Abdominalcentret, Rigshospitalet

Ugeskr Læger
2014;176:V01130083

Ventrikelcancer er den fjerdehyppigste cancer i verden, med ca. 1 mio. nydiagnosticerede tilfælde i 2008. Incidensen er stigende, med op mod 460.000 tilfælde alene i Østasien [1]. I Danmark har incidensen stort set været uændret igennem de seneste ti år med 224 tilfælde i 2011, hvoraf kun 36% var operable [2]. På trods af præoperativ kemoterapi og intensiveret kurativ ventrikelresektion er femårsoverlevelsen i Danmark 42% [2], og recidiv forekommer hos ca. 50% [3].

Cirkulerende tumorceller (CTC) defineres som levende tumorceller, der befinder sig i blodbanen og er afstødt/frigivet fra primærtumoren. Fra blodcirkulationen kan tumorcellerne migrere til væv eller fjernorganer og således give ophav til spredning af canceren [4]. I flere studier med patienter, som havde metastaserende mamma-, prostata- eller coloncancer, har man påvist, at CTC i perifert blod er en valid prognostisk markør, der muligvis kan bidrage til at forudsige overlevelse, herunder progressionsfri overlevelse og generel overlevelse [5-7]. CTC forekommer sjældent i blodet, der findes ca. 1 CTC pr. 10⁹

leukocytter, hvorfor identifikationen af disse celler afhænger af yderst sensitive analysemetoder [8].

I artiklen præsenteres kort de grundlæggende principper for identifikationen af CTC fra blodet, dernæst fokuseres der på de indtil nu anvendte teknikker til diagnosticering af ventrikelcancer. Desuden beskrives de kliniske aspekter af CTC ved ventrikelcancer.

ANALYSEMETODER

Identifikationen af CTC fra en perifer blodprøve foregår i to trin. Initialt en isolationsproces, der har til formål at separere tumorcellerne fra erythrocytter og leukocytter. Herefter følger en identifikationsproces, hvor tumorcellerne genkendes/identificeres blandt de resterende blodceller. Typisk isoleres CTC enten på baggrund af cellernes fysiske egenskaber, såsom størrelse og densitet, (vha. centrifugering) eller ved immunologisk separation (vha. filtre eller magnetiske partikler) [9]. Ved immunmagnetisk separation kobles antistoffer mod overflademolekyler på CTC (som f.eks. epitelial celle-adhæsionsmolekyler (EpCAM)) til magnetiske »perler«, der selekteres i et magnetisk felt til videre analyse [10].

CTC ved ventrikelcancer er primært undersøgt i mindre studier, hvor man enten har anvendt revers transkriptase-polymerasekædereaktion (RT-PCR) eller immunologiske teknologier (Tabel 1). Der findes yderligere analysemetoder, der er benyttet ved andre cancertyper, men i øjeblikket er disse ikke afprøvet på ventrikelcancer [13].

Immunologiske teknikker

Ved de immunologiske analysemetoder benytter man fluorescensmærkede monoklonale antistoffer, der oftest rettes mod cytotokeratiner (proteinfilamenter i cytoskelettet i epiteliale celler), eller tumorantigener [14]. Efter en given isolationsproces identificeres de mærkede celler ved mikroskopi eller flowcytometri. Den endelige verificering af CTC sker herefter på grund af cellernes fluorescensmærkede antigener, størrelse, form og kerne.

På denne baggrund har Veridex udviklet den semiautomatiserede metode CellSearch. Her isoleres CTC immunmagnetisk ved tilsætning af specialfrem-



TABEL 1

Oversigt over cirkulerende tumorceller-analysemetoder benyttet til ventrikelcancer.

Metode	Navn	Fordele	Ulemper	Reference
RT-PCR		Høj sensitivitet, let, billig	Markører kan også ekspresseres af benigne celler RNA ustabil, let kontamination	Smith <i>et al</i> [11]
Immunologisk	Dynabeads	Fleksibel, bevarer cellemorfologien	Falsk negativ og falsk positiv	Neurater <i>et al</i> [10]
	CellSearch	Semiautomatiseret, kombinerer pos. og neg. selektion Visuel påvisning af CTC FDA-godkendt	Kun EpCAM+, falsk negativ og falsk positiv	Christofanilli <i>et al</i> [7]
Flowcytometri	FACS	Fleksibel, kvantitativ, mulig multiparameteranalyse	Markørfafhængig, kun enkelte metoder muliggør videre analyse	Racila <i>et al</i> [12]

CTC = cirkulerende tumorceller; EpCam = *epithelial cellular adhesion molecule*; FACS = fluorescensaktiveret cellesortering; FDA = Food and Drug Administration, USA; PCR = polymerasekædereaktion; RT = revers transkriptase.

stillede nanopartikler, koblet med antistof mod EpCAM. Cellerne farves dernæst med fluorescerende antistoffer for cellekernen og cytotokeratiner og visualiseres ved fluorescensmikroskopi. Endvidere bruges CD-45 (overflademærker på leukocytter) til at fravælge evt. leukocytter, der er isoleret [7, 15].

Fordelene ved de immunologiske teknikker er, at cellernes morfologi bevares. Dette faciliterer optællingen af CTC og muliggør tillige en videre morfologisk og molekylær analyse [15]. Ulemperne ved de metoder, der er baseret på EpCAM, er relateret til detektion af selve overflademærkerne. Undervejs i den invasive proces, hvor CTC afstødes fra tumoren til blodbanen, nedreguleres de epiteliale markører [16]. Dette kan medføre falsk negative resultater, og i et studie med 131 forskellige tumortyper udtrykte kun 70% EpCAM [17]. Enkelte cytotokeratiner kan desuden udtrykkes af både benigne, maligne samt epiteliale og nonepiteliale celler, hvorfor falsk positive resultater også kan fremkomme [18]. Derudover kan selve centrifugeringen medføre et cellulært tab [19].

Revers transkriptase-polymerasekædereaktion

CTC kan også identificeres indirekte ved brug af revers transkriptase (RT)-PCR. Frit RNA er meget ustabil og forsvinder hurtigt fra blodbanen efter celledød. Det antages derfor, at hvis der er tumor-RNA i blodet, er der også CTC. Ved RT-PCR-metoden isoleres mRNA fra perifert blod, hvorefter specifikke gener amplificeres. Da der ikke eksisterer specifikke markører for CTC, bruger man mRNA fra cytotokeratiner og tumorantigener som f.eks. karcinoembryonalt antigen [14].

RT-PCR er en meget sensitiv analysemetode, hvormed man er i stand til at detektere meget små mængder mRNA fra en blodprøve, hvorfor det er en af de mest anvendte metoder inden for CTC-detektion [11]. Ulemperne er dog fremkomsten af både falsk positive og falsk negative resultater, idet man med RT-PCR ikke kan skelne mellem tumor- og non-tumorceller [13, 20, 21]. Andre ulemper er, at CTC ikke forbliver intakte, hvorfor yderligere analyse ikke kan foretages. Desuden kan RNA let blive kontamineret, hvilket kan medføre falsk positive svar [11]. Ydermere kan det være vanskeligt at estimere et eksakt antal CTC ud fra mængden af det amplificerede mRNA [12].

Ventrikelcancer er endnu et sparsomt beskrevet område, og den optimale metode til identifikation af CTC fra blodbanen er fortsat omdiskuteret. I nogle studier har man påvist, at patienter med ventrikelcancer har lavere CTC-antal end f.eks. patienter med mammacancer, hvilket muligvis kan skyldes en øget portal filtration af cellerne [15]. Der må derfor foku-



TABEL 2

Cirkulerende tumorceller-studier på patienter med ventrikelcancer.

Reference	Metode	Patienter, n	CTC-detektionsrate	Klinisk signifikans
Matsusaka <i>et al</i> [26]	CellSearch	52	67,3% < 4 CTC 32,7% > 4 CTC (Cut-off-værdi: 4)	Effektmonitorering af kemoterapi og prognostisk for PFS og OS
Cao <i>et al</i> [22]	Survivin-mRNA RT-PCR	98	45,9%	Prognostisk for kortere PFS og TNM-stadie
Bertazza <i>et al</i> [23]	Survivin, CK19, CEA, VEGF qRT-PCR	70	Hhv. 98,6%; 97,1%; 42,9%; 36,8%	Survivin korrelerer til kortere OS Prognostisk for TNM-stadie
Allard <i>et al</i> [15]	CellSearch	13	31% (Cut-off-værdi: 2)	Prognostisk for effektmonitorering af kemoterapi
Hiraiwa <i>et al</i> [20]	CellSearch	27	55,6% (Cut-off-værdi: 2)	Prognostisk for OS Korreleret til kortere OS
Kolodziejczyk <i>et al</i> [25]	Flowcytometri for CK+-celler	32	22% før kemoterapiopstart 16% efter kemoterapiopstart	Markør for effektmonitorering af kemoterapi
Pituch-Noworolska <i>et al</i> [24]	Flowcytometri for CK+-celler	57	54,4%	CK+ tilstedeværelse uden prognostisk værdi

CK = cytotkeratin; CEA = karcinoembryonalt antigen; CTC = cirkulerende tumorceller; OS = overlevelse; PCR = polymerasekædereaktion; PFS = varigheden af perioden uden påviselig progression af kræftsygdommen; qRT = kvantitativ revers transkriptase; TNM = tumor-nodus-metastase; VEGF = *vascular endothelial growth factor*.

seres på behovet for en yderst sensitiv teknik til denne cancertype, før metoden endeligt kan implementeres i klinisk brug.

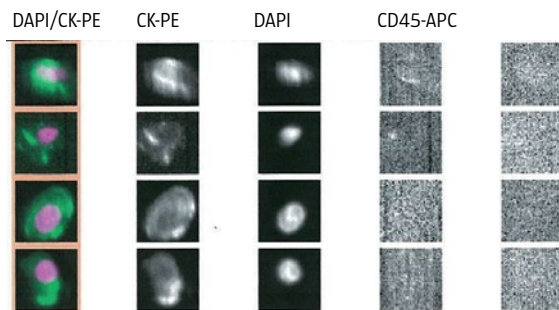
KLINISKE RESULTATER

Cirkulerende tumorceller som prognostisk markør ved ventrikelcancer

I et PCR-baseret studie med 98 kurativt behandlede patienter med ventrikelcancer undersøgte man tilstedeværelsen af markøren survivin til detektion af CTC [22] (Tabel 2). Man konkluderede ud fra overlevelseskurver, at survivin-mRNA var en signifikant prognostisk faktor for sygdomsfri overlevelse. Desuden fandt man, at treårsoverlevelsen for patienter, som var positive for CTC, var signifikant dårligere end overlevelsen for patienter, som var negative for CTC ($p < 0,001$).

I ovenstående studie fandt man ydermere en korrelation mellem mængden af CTC og tumorers TNM-stadie ($p = 0,009$). Lignende resultater ses også ud fra regressionsanalyser, hvor CTC viste sig at være prognostisk for TNM-stadiet hos patienter med ventrikelcancer [23]. Detektionen af CTC blev ud fra de resultater vurderet til at være en god prognostisk markør for kurativt behandlede patienter med ventrikelcancer.

Cirkulerende tumorceller isoleret fra en perifer blodprøve vha. af metoden CellSearch.



Hiraiwa *et al* anvendte CellSearch til måling af CTC hos 27 patienter med metastaserende ventrikelcancer og fandt ligeledes en prognostisk værdi af CTC [20]. Patienter med flere end to CTC pr. prøve havde signifikant kortere overlevelse end patienter med mindre end to CTC pr. prøve. Flere end to CTC pr. prøve var desuden korreleret til peritoneal disseminering, ligesom antallet af CTC var signifikant højere hos patienter med dissemineret cancer ($p = 0,006$). Konklusionen i studiet var, at CTC-antallet muligvis kan være prognostisk for tumorers invasive karakter og stadie.

I et andet studie fandt man samme association hos 70 patienter med resektabel ventrikelcancer, da en øget mængde CTC korrelerede med en større og mere invasiv tumor [23]. Derimod kunne *Pituch-Noworolska et al* ikke finde korrelation af CTC til prognosen og konkluderede derfor, at CK-19 (markør for cytokeratin) formentlig ikke kan benyttes som markør for cancerens aggressivitet [24].

Cirkulerende tumorceller som markør for effekten af kemoterapibehandling

I enkelte studier har man undersøgt, om CTC kan benyttes til vurdering af effekten af kemoterapibehandling. Opfølgende målinger af CTC under kemoterapi synes at vise et løbende et fald i antallet af CTC hos de patienter, der if. opfølgende CT'er af tumoren nu havde stabil sygdom [19]. I et studie med 32 patienter med resektabel ventrikelcancer fandt man, at kemoterapi reducerede antallet af CTC hos 44% af patienterne med CTC [25]. I en anden undersøgelse med 52 patienter med avanceret ventrikelcancer fandt man en korrelation mellem CTC og overlevelse efter påbegyndelse af kemoterapi [26]. Resultaterne afspejles i overlevelseskurver, der viser signifikant forskel i overlevelse, målt henholdsvis to og fire uger efter påbegyndelse af en behandling. Patienter med flere end fire CTC havde kortere median progressionsfri overlevelse og generel overlevelse end patienter med færre end fire CTC ved målinger på de angivne tidspunkter. I studiet anvendte man målinger af CTC som en surrogatmarkør for patienternes

respons på en kemobehandling og fandt, at en reduktion i CTC-antallet var udtryk for, at behandlingen virkede. Ud fra dette konkluderede man, at CTC-antallet kan være en potentiel prognostisk faktor for overlevelsesvarigheden.

Fordelen ved at optimere effekten af kemobehandlingen er, at omfanget af de unødvendige bivirkninger formentlig vil mindskes. I et studie med patienter med metastaserende mammacancer konkluderede man, at et øget CTC-antal ved første followup af kemobehandlingen indikerer en ineffektiv terapi [7]. Opfølgende målinger af CTC kan således tænkes at være en ideel metode til vurdering af effekten af behandlingen på kortere sigt og dermed eventuelt lede onkologer til tidligere at skifte præparat ved behandlingssvigt.

FREMTIDIGT PERSPEKTIV

Identifikationen af CTC ud fra en perifer blodprøve er en minimalt invasiv metode, som formentlig i fremtiden kan anvendes prognostisk i klinisk brug samt til valg af kemoterapibehandling og monitorering af behandlingens effekt. Ved optimering kan teknikken potentielt sidestilles med andre onkologiske diagnosemetoder, hvor cellerne visualiseres fra biopsier eller væsker [4].

Ved den optimale isolationsmetode opfanges intakte CTC uden at skade morfologien, så cellerne kan analyseres videre. Herfra kan genekspressionsprofiler kortlægges, hvilket kan bidrage til at målrette den onkologiske behandling [8]. Hos patienter med mammacancer har man karakteriseret tumorcellernes genekspressionsprofiler og benyttet disse til optimering af den kemoterapeutiske behandling. I et nyere studie har man påvist, at cellerne kan mutere efter afstødning fra primærtumoren [27], hvorfor det vil være relevant at kortlægge CTC molekylært, så en ke-



FAKTABOKS

Ventrikelcancer er p.t. den fjerdehyppigste cancer i verden. Prognosen for ventrikelcancer er ringe med en femårsoverlevelse på 42% for intenderet kurativt behandlede patienter i Danmark.

Cirkulerende tumorceller (CTC) i perifert blod antages at forekomme tidligt i den metastatiske proces og kan muligvis benyttes som prognostisk og prædiktiv markør.

Identifikationen af CTC er vanskelig og kræver sensitive analysemetoder.

CTC kan ud fra en blodprøve enten kvantificeres eller isoleres ved hjælp af en analysemetode baseret på polymerasekædereaktion eller immunhistokemi.

I forsøg med patienter med ventrikelcancer benyttes CTC-målinger til at prædikere prognose og monitorere effekten af kemoterapi.

mobehandling kan rettes direkte mod cellerne. Dette synes at kunne bidrage til en individualisering af behandlingen af metastaserende mammacancer og kan dermed forhindre en kostbar og ineffektiv behandling samt skåne patienten for unødige bivirkninger [15]. Dette er endnu ikke afprøvet på ventrikelcancer, og der mangler fortsat en validering af teknikkerne til denne cancertype. På nuværende tidspunkt er Cell-Search-metoden godkendt til identifikation af CTC ved mamma-, colon- og prostatacancer, men er fortsat ikke valideret til ventrikelcancer.

KONKLUSION

Detektion og karakterisering af CTC kan fremover muligvis bidrage til, at man kan stille en mere præcis prognose for patienter med ventrikelcancer og medvirke til en mere målrettet kemoterapeutisk behandling. Fælles for alle studier med patienter med ventrikelcancer er, at de er forholdsvis små. Resultaterne er positive, og især er mulighederne inden for klinisk brug lovende, men der er behov for en standardiseret metode. Der er endnu ikke en guldstandard til identifikation af CTC hos patienter med ventrikelcancer, og større studier er nødvendige, før dette kan foreslås.

KORRESPONDANCE: Cecilie Okholm, Jagtvej 120, 6., 611, 2200 København N.
E-mail: okholmcecilie@gmail.com

ANTAGET: 3. juni 2013

PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK: 19. august 2013

INTERESSEKONFLIKTER: Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på Ugeskriftet.dk

LITTERATUR

- Globocan 2008. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2008. <http://globocan.iarc.fr> (31. jan 2013).
- Dansk Esophagus-CoVD, Årsrapport for perioden 1. januar 2011-31. december 2011. http://devc.gicancer.dk/Content/Files/Dokumenter/aarsrapport_DECV_2011_final.pdf
- Marrelli D, De SA, de MG et al. Prediction of recurrence after radical surgery for gastric cancer: a scoring system obtained from a prospective multicenter study. *Ann Surg* 2005;241:247-55.
- Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 2007;253:180-204.
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N et al. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3213-21.
- Moreno JG, Miller MC, Gross S et al. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 2005;65:713-8.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:781-91.
- Yu M, Stott S, Toner M et al. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol* 2011;192:373-82.
- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2008;8:329-40.
- Neurauter AA, Bonyhadi M, Lien E et al. Cell isolation and expansion using Dynabeads. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007;106:41-73.
- Smith B, Selby P, Southgate J et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;338:1227-9.
- Racila E, Euhus D, Weiss AJ et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4589-94.
- Alunni-Fabbroni M, Sandri MT. Circulating tumour cells in clinical practice: methods of detection and possible characterization. *Methods* 2010;50:289-97.
- Mostert B, Sleijsers S, Foekens JA et al. Circulating tumor cells (CTCs): detection methods and their clinical relevance in breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2009;35:463-74.
- Allard WJ, Matera J, Miller MC et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 2004;10:6897-904.
- Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 2012;12:178-91.
- Went PT, Lugli A, Meier S et al. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004;35:122-8.
- Traweek ST, Liu J, Battifora H. Keratin gene expression in non-epithelial tissues. *Am J Pathol* 1993;142:1111-8.
- Kobayashi TK, Ueda M, Yamaki T et al. Evaluation of cyto centrifuge apparatus with special reference to the cellular recovery rate. *Diagn Cytopathol* 1992;8:420-3.
- Hiraiwa K, Takeuchi H, Hasegawa H et al. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers. *Ann Surg Oncol* 2008;15:3092-100.
- Kowalewska M, Chechlińska M, Markowicz S et al. The relevance of RT-PCR detection of disseminated tumour cells is hampered by the expression of markers regarded as tumour-specific in activated lymphocytes. *Eur J Cancer* 2006;42:2671-4.
- Cao W, Yang W, Li H et al. Using detection of survivin-expressing circulating tumor cells in peripheral blood to predict tumor recurrence following curative resection of gastric cancer. *J Surg Oncol* 2011;103:110-5.
- Bertazza L, Mocellin S, Marchet A et al. Survivin gene levels in the peripheral blood of patients with gastric cancer independently predict survival. *J Transl Med* 2009;7:111-9.
- Pituch-Noworolska A, Kolodziejczyk P, Kulig J et al. Circulating tumour cells and survival of patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 2007;27:635-40.
- Kolodziejczyk P, Pituch-Noworolska A, Drabik G et al. The effects of preoperative chemotherapy on isolated tumour cells in the blood and bone marrow of gastric cancer patients. *Br J Cancer* 2007;97:589-92.
- Matsusaka S, Chin K, Ogura M et al. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci* 2010;101:1067-71.
- Meng S, Tripathy D, Shete S et al. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9393-8.

Sundhedsstyrelsen

TILSKUD TIL LÆGEMIDLER

Sundhedsstyrelsen meddeler, at der pr. 4. august 2014 ydes generelt uklausuleret tilskud efter sundhedslovens § 144 til følgende lægemidler:

N03AG01 Orfiril Long kapsler*, EuroPharma.DK
J01FA10 Azithromycin "Krka" tabletter*, krka Sverige AB
D07AB02 Locoid Crelo kutanemulsion*, Orifarm A/S
D05BB02 Neotigason kapsler*, Orifarm A/S

*) Omfattet af tilskudsprissystemet.