

# Desmoplasiens og pankreatiske stellate cellers betydning ved pancreascancer

Michael Friberg Bruun Nielsen<sup>1</sup>, Michael Bau Mortensen<sup>2</sup> & Sönke Detlefsen<sup>1</sup>

## STATUSARTIKEL

1) Afdeling for Klinisk Patologi, Odense Universitetshospital  
2) GI-sektionen, Kirurgisk Afdeling A, Odense Universitetshospital

Ugeskr Læger  
2015;177:V01150079

Duktalt adenokarcinom udgør mindst 85% af alle tilfælde af pancreascancer. I denne artikel fokuseres der på det duktalet adenokarcinom, men i det følgende anvendes den mere brede betegnelse pancreascancer. I Danmark diagnosticeres der hvert år næsten 1.000 patienter med pancreascancer, og femårsoverlevelsen er på kun 5% [1]. Pancreascancer er histologisk kendetegnet ved en voldsom bindevævsreaktion, det såkaldte desmoplastiske stroma, som ledsager og omgiver de invasive karcinomceller (**Figur 1**). Desmoplasien kan udgøre op mod 70-80% af det samlede tumorvolumen, og cellekulturstudier og dyreforsøg tyder på, at desmoplasien reducerer kemoterapeutiske stoffers effekt på cancercellerne [2]. Det desmoplastiske stroma syntetiseres af cancerassocierede fibroblaster (CAF), og en af de vigtigste kilder til CAF er de pankreatiske stellate celler (PSC) [3]. PSC differentierer til en myofibroblastlignende fænotype, når de aktiveres af cytokiner, alkoholderivater eller oxidativt stress [4, 5]. Myofibroblaster har en fænotype mellem glatmuskelceller og fibroblaster. Ved vævsskade producerer de ekstracellulær matrix (ECM). Formålet med denne artikel er at beskrive PSC's og desmoplasiens rolle i udviklingen og behandlingen af pancreascancer.

## OPDAGELSEN AF DEN PANKREATISKE STELLATE CELLE

Mere end 100 år forud for identifikationen af PSC, i 1876, blev den hepatiske stellate celle (HSC) beskrevet af den tyske patolog *Karl Wilhelm von Kupffer* [6]. *Kupffer* havde iagttaget spredt fordelte celler med en karakteristisk stjerneform i det perisinusoidale rum (»Disses rum«). Toogtyve år senere holdt *Kupffer* en

forelæsning i Kiel, hvor han fejlagtigt fortolkede sine tidligere observationer således, at de stjerneformede perisinusoidale celler havde fagocytotiske egenskaber [6]. Det er således leverens specielle makrofager, Kupffercellerne, der i dag er opkaldt efter *Kupffer*. I 1951 (gen)opdagede *Toshio Ito* den originale stellate celle i leveren [6]. *Ito* observerede, at de stjerneformede celler indeholdt fedtdråber, og cellen blev sidenhen navngivet efter *Ito*. *Wake* kunne imidlertid i 1971 bekræfte, at Itocellen var identisk med HSC [6]. De stellate celler, som alle er karakteriseret ved deres stjerneform og indholdet af A-vitaminlipidvakuoler, blev efterfølgende også beskrevet i bl.a. pancreas, lunger, gastrointestinkanalen, milten, huden og uterus [6]. PSC kom i fokus, da de blev isoleret og dyrket i cellekultur af to uafhængige forskergrupper i 1998 [7, 8]. Disse studier viste, at aktiverede PSC (aPSC) fungerer som effektorceller i bindevævsproduktionen i pancreas. Retrospektivt var der dog tale om samme A-vitaminlagrende celle, som *Watari* havde beskrevet i pancreas fra mus i 1982 og *Ikejiri* i den humane pancreas i 1990 [6].

## PANKREATISKE STELLATE CELLER I DEN NORMALE PANCREAS OG I DET DESMOPLASTISKE STROMA VED PANCREASCANCER

I den normale pancreas befinder PSC sig i en ikkeprolifererende tilstand og betegnes som hvilende (*quiescent*) PSC (qPSC). Hos rotter udgør qPSC ca. 4% af de samlede parenkymatiske celler i pancreas [7]. qPSC er lokaliseret periacinært og er kendetegnet ved deres stjerneform og indhold af A-vitaminlipidvakuoler. De udtrykker bl.a. de intermediære filamenter vimentin, desmin, *glial acidic fibrillary protein* (GFAP), nestin og

## FAKTABOKS

- ▶ Pancreascancer er den mest dødelige af de almindelige kræftformer.
- ▶ Pancreascancer bliver ofte diagnosticeret i et sent stadie og viser kun et beskedent respons på kemoterapi.
- ▶ Pancreascancer er karakteriseret ved en udtalt desmoplastisk stromal reaktion.
- ▶ Det desmoplastiske stroma omgiver karcinomcellerne og virker muligvis beskyttende på cancercellerne imod stråle- og kemoterapi.
- ▶ Hvilende pankreatiske stellate celler (PSC) er kendetegnet ved deres stjerneform og deres indhold af A-vitaminlipidvakuoler.
- ▶ PSC kan aktiveres af bl.a. cytokiner og alkoholderivater, hvilket medfører en myofibroblastlignende fænotype.
- ▶ PSC anses for at være en af de vigtigste kilder til cancerassocierede fibroblaster (CAF).
- ▶ CAF syntetiserer og secernerer bindevævskomponenter, der er centrale bestanddele i det desmoplastiske stroma.

synemin [3]. Flere af disse markører, herunder især desmin og GFAP, er dog ikke overbevisende beskrevet i qPSC i humant pankreasvæv, og yderligere undersøgelser er nødvendige for at afklare, om disse markører er til stede i humane qPSC.

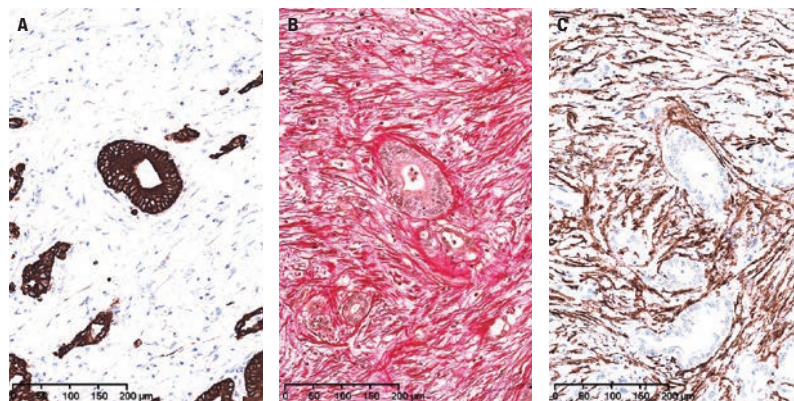
Cytokiner, oxidativt stress og alkoholderivater kan stimulere qPSC til at differentiere til en aPSC-fænotype [4, 5]. aPSC mister deres A-vitaminholdige lipidvakuoler, udtrykker alfa-glatmuskulært aktin (*alpha smooth-muscle actin* (SMA)) og får herved myofibroblastlignende egenskaber (Figur 1). Samtidigt begynder aPSC at syntetisere ECM [8]. Under aktiveringen ændrer PSC morfologi og bliver mere tenformede. Hos mus er det påvist, at knoglemarvsderiverede stamceller bidrager til ca. 5% af aPSC ved induceret kronisk pankreatitis [9]. aPSC anses således for at være en af de vigtigste kilder til CAF i det desmoplastiske stroma. Aktiveringen af PSC medfører en ændring i immunfænotypen, og aPSC udtrykker især markørerne *cluster of differentiation* (CD)34, nestin, SMA, trombocytderiveret vækstfaktorreceptor (*platelet-derived growth factor receptor* (PDGF-R)) og *transforming growth factor*-beta-receptor (TGFβ-R) [3, 5]. Fundet af flere af de anførte markører er dog baseret på undersøgelser af PSC i cellekulturer, som er isoleret fra rotter og mus, og en entydig markørprofil for aPSC in situ i den humane pancreas foreligger endnu ikke.

### PANKREATISKE STELLATE CELLS BETYDNING FOR TUMOR-STROMA-INTERAKTIONEN VED PANCREASCANCER

Det desmoplastiske stroma består af ECM (kollagen, fibronectin, laminin, osteonektin og hyaluronan), CAF, makrofager, små blodkar og betændelsesceller [2]. aPSC anses for at være den vigtigste kilde til CAF og dermed den desmoplastiske stromale reaktion ved pancreascancer, men lokale fibroblaster og knoglemarvsderiverede stamceller bidrager formentlig også til CAF-populationen (Figur 2) [10, 11]. Man må desuden formode, at også epitelial-mesenkymal transition (EMT) og periduktale fibroblaster bidrager til CAF, men dette er ikke tilstrækkeligt undersøgt ved pancreascancer [11]. Resultaterne af cellekulturstudier og dyreforsøg indikerer et nært samspil mellem karcinomcellerne og aPSC, der gensidigt fremmer hinandens vækst og differentiering, først og fremmest via produktion af vækstfaktorer, en proces, der betegnes som heterotyp signalering [12]. Tumorassocierede makrofager indgår også i disse cellulære interaktioner [13]. I cellekulturstudier har man påvist, at karcinomcellerne kan stimulere PSC til at proliferere og migrere samt øge produktionen af ECM [14]. Omvendt kan PSC stimulere karcinomcellernes vækst in vitro [15]. I enkelte studier indikerer resultaterne ydermere, at PSC medvirker til at opretholde en cancerstamcelle (CSC)-niche i det resterende pancreas-

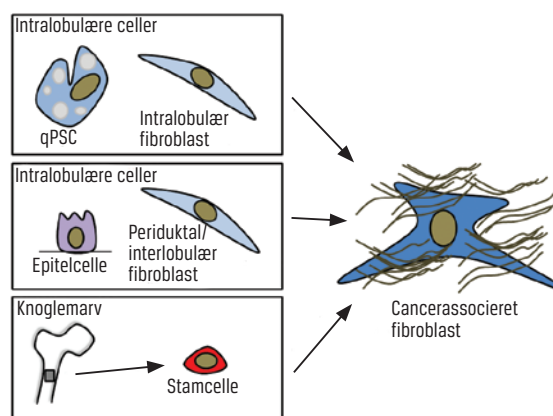
**FIGUR 1**

Det desmoplastiske stroma ved pancreascancer. A. Cytokeratin 8 farver pancreascancer celler, som er arrangeret i irregulære kirtelstrukturer. B. Den siriusrøde bindevævsfarvning fremhæver de kollagene fibre i desmoplasien. C. Immunhistokemi for *smooth muscle actin* viser et kraftigt udtryk i cancerassocierede fibroblaster.



**FIGUR 2**

Skematisk oversigt over kilderne til cancerassocierede fibroblaster (CAF) ved pancreascancer. CAF er ansvarlige for produktionen af ekstracellulær matrix i det desmoplastiske stroma. Den vigtigste kilde til CAF er hvilende pankreatiske stellate celler (qPSC), som i den raske pancreas er lokaliseret periacinært, og som udvikler en myofibroblastlignende fænotype, når de aktiveres af f.eks. cytokiner, alkoholderivater eller oxidativt stress. Man må formode, at også lokale periduktale og interlobulære fibroblaster bidrager til CAF-populationen. I dyreforsøg og cellekulturer har man påvist, at epitelceller kan transformeres til CAF via epitelial-mesenkymal transition, og man kan formode, at dette også sker ved pancreascancer. Knoglemarvsderiverede stamceller bidrager til en mindre andel af CAF.



væv, hvilket medfører en øget risiko for recidiv af canceren efter gennemført operativt indgreb. Dette kan eksemplificeres ved et studie af Hamada *et al* på cellekulturer af PSC og pancreascancer celler; studiet viste, at signalmolekyler produceret af PSC øger ekspansionen af CSC-relaterede gener i cancercellerne [16].

### PANKREATISKE STELLATE CELLERS POTENTIELLE ROLLE I METASTASERING VED PANCREASCANCER

I forsøg med tredimensionelle cellekulturer var PSC i stand til at hæmme karcinomcellernes udtryk af proteiner, der har indflydelse på celle-celle-interaktioner, såsom E-cadherin og beta-catenin [17]. Dette resulterede i, at tumorcellerne udviklede mesenkymale egenskaber, blev mobile og kunne invadere det omgivende stroma. Disse resultater indikerer, at PSC spiller en rolle ved EMT. EMT betegner den proces, hvor karcinomceller mister deres epitheliale egenskaber og differentierer imod en mesenkymal fænotype. Herved kan de entrere blod- og lymfesystemet og senere potentielt danne metastaser. Det er i en musemodel for pancreascancer påvist, hvordan EMT efterfølges af cancercellernes metastasering til leveren [18]. Ved EMT nedreguleres ekspresionen af epitheliale markører såsom cytokeratiner og E-cadherin, og i stedet opreguleres ekspresionen af mesenkymale markører, herunder vimentin [18].

*Bachem et al* beskrev i forsøg med xenografts af humane pancreascancer celler injiceret subkutant i immunhæmmede mus, at tumorcellerne prolifererede hurtigere, når de blev injiceret sammen med humane PSC [19]. Sidenhen har man reproduceret disse fund i ortotope xenograftmodeller af pancreascancer hos mus [15]. Desuden medførte tilstedeværelsen af PSC en kraftigere desmoplastisk stromal reaktion og en øget metastaserings tendens [3, 15]. *Xu et al* injicerede karcinomceller fra en kvinde sammen med PSC fra en mand i en ortotop xenograftmodel af pancreascancer hos mus [20]. Det var muligt at spore cellerne på baggrund af kromosomforskellene, og man så, at PSC ligesom karcinomcellerne metastaserede. PSC influerer desuden på blodforsyningen af pancreascancer celler ved at syntetisere angiogene faktorer såsom *vascular endothelial growth factor* og angiotensin-1 [21].

### PANKREATISKE STELLATE CELLERS OG DET DESMOPLASTISKE STROMAS BETYDNING FOR EFFEKTEN AF RADIOKEMOTERAPI

Da pancreascancer er karakteriseret ved en særdeles kraftig desmoplastisk stromal reaktion, er det en nærliggende hypotese, at desmoplasien kan spille en afgørende rolle for den begrænsede effekt, som især strålebehandling, men også kemoterapi har ved denne kræftform. Dette kunne også være en mulig forklaring på, at pancreascancer celler ofte responderer langt bedre på kemoterapeutika i in vitro-celleforsøg end i den kliniske situation in vivo [22].

Gemcitabin, der anvendes som basis i den kemoterapeutiske behandling af pancreascancer, har en relativt begrænset responsrate, hvilket muligvis skyldes, at det desmoplastiske stroma kan reducere stoffets penetration, sådan som det er indikeret i dyreforsøgsstudier

med mus [23]. Hyaluronsyre, en vigtig komponent af det desmoplastiske stroma, har i en musemodel for pancreascancer vist sig at have stor betydning for den barriere, kemoterapeutika skal overvinde for at nå frem til karcinomcellerne [2, 24]. Ifølge denne hypotese medfører den øgede deponering af ECM en nedsat elasticitet af tumorvævet, hvorved det interstitielle tryk stiger. Dette medfører en reduktion af perfusionen og diffusionen af de kemoterapeutiske stoffer, således at de i mindre grad kan nå frem til karcinomcellerne [25]. I cellekulturstudier har man desuden påvist, at PSC har en direkte beskyttende effekt på karcinomcellerne imod strålebehandling [26].

I enkelte studier har man allerede fokuseret på det desmoplastiske stroma som mål i pancreascancerbehandlingen. Eksempelvis har man i dyreforsøgsstudier påvist, at enzymer, der nedbryder hyaluronsyre, kan forbedre effekten af kemoterapeutika [24]. I en musemodel for pancreascancer lykkedes det at øge perfusionen af tumoren ved at hæmme *hedgehog*-signaltransduktionsvejen [23]. Herved udtyndedes det desmoplastiske stroma, og gemcitabin kunne bedre nå frem til karcinomcellerne [23]. I xenograftmodeller med mus, der fik implanteret humane pancreascancer celler, medførte nanopartikler, som bestod af det kemoterapeutiske stof paclitaxel bundet til albumin, en øget penetration [27]. Retinolsyre har desuden i cellekulturstudier af PSC og pancreascancer celler vist sig at bringe aPSC tilbage til den hvilende tilstand, hvilket resulterede i reduceret cancercellevækst [28]. Patienter, som har metastaserende pancreascancer og er i god almentilstand, tilbydes kombinationskemoterapi med gemcitabin eller trestofskemoterapi uden brug af gemcitabin. Betydningen af PSC og det desmoplastiske stroma i relation til de observerede behandlingsfremskridt med disse regimer er ukendt.

Nye studier tyder på, at det desmoplastiske stromas rolle for pancreascancer progressionen er mere varieret end antaget på baggrund af de ovenfor nævnte studier [29, 30]. Hos modelmus med induceret pancreascancer resulterede reduktion i antallet af myofibroblaster og reduktion af CAF's evne til ECM-produktion i en øget invasiv vækst [29, 30]. Stromareduktionen medførte øget cancercelleproliferation og en øget dødelighed.

### KONKLUSION

Adskillige forskningsresultater indikerer, at desmoplasien, som er produceret af PSC og CAF, spiller en stor rolle for udvikling og progression af pancreascancer samt for effekten af kemo- og stråleterapi. I denne artikel har vi skitseret forskellige mekanismer, der direkte eller indirekte kan danne grundlag for behandlingsformer, som påvirker desmoplasien, PSC og CAF. Det er endnu uafklaret, om desmoplasien har en beskyttende eller fremmende effekt på progressionen af pancreas-

cancer, og formentlig er desmoplasiens betydning kontekst- og stadieafhængig. De fleste studier på området er baseret på cellekultur og dyreforsøg, og forskningen på området bør intensiveres og også inddrage humane vævsprøver med pancreascancer.

## SUMMARY

Michael Friberg Bruun Nielsen, Michael Bau Mortensen & Sönke Detlefsen:

The impact of desmoplasia and pancreatic stellate cells on pancreatic cancer

Ugeskr Læger 2015;177:V01150079

Pancreatic cancer (PC) has an extremely high mortality with a five-year survival of only 5%. The cancer cells are accompanied by the desmoplastic stroma produced by cancer-associated fibroblasts (CAFs). Pancreatic stellate cells are the most important source of CAFs. Several studies indicate that the desmoplastic stroma reduces the effect of radio- and chemotherapy, but experimental reduction of desmoplasia and CAFs leads to more aggressive cancers. Hence, the exact role of desmoplasia in PC remains to be elucidated, and future studies should also include human pancreatic tissue.

**KORRESPONDANCE:** Sönke Detlefsen, Afdeling for Klinisk Patologi, Odense Universitetshospital, Winsløwparken 15, 5000 Odense C. E-mail: sonke.detlefsen@rsyd.dk

**ANTAGET:** 21. april 2015

**PUBLICERET PÅ UGESKRIFTET.DK:** 17. august 2015

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

## LITTERATUR

- Engholm G, Ferlay J, Christensen N et al. NORDCAN: cancer incidence, mortality, prevalence and survival in the Nordic Countries, version 6.1 (25.04.2014). Association of the Nordic Cancer Registries Danish Cancer Society, 2014. www.ancr.nu (25. apr 2014).
- Whatcott CJ, Posner RG, von Hoff DD et al. Desmoplasia and chemoresistance in pancreatic cancer. I: Grippo PJ, Munshi HG, red. Pancreatic cancer and tumor microenvironment. Trivandrum (India): Transworld Research Network, 2012.
- Erkan M, Adler G, Apte MV et al. StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. Gut 2012;61:172-8.
- Klöppel G, Detlefsen S, Feyerabend B. Fibrosis of the pancreas: the initial tissue damage and the resulting pattern. Virchows Arch 2004;445:1-8.
- Detlefsen S, Sipos B, Feyerabend B et al. Fibrogenesis in alcoholic chronic pancreatitis: the role of tissue necrosis, macrophages, myofibroblasts and cytokines. Mod Pathol 2006;19:1019-26.
- Wake K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. Int Rev Cytol 1980;66:303-53.
- Apte MV, Haber PS, Applegate TL et al. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. Gut 1998;43:128-33.
- Bachem MG, Schneider E, Gross H et al. Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. Gastroenterology 1998;115:421-32.
- Marrache F, Pendyala S, Bhagat G et al. Role of bone marrow-derived cells in experimental chronic pancreatitis. Gut 2008;57:1113-20.
- Yen TW, Aardal NP, Bronner MP et al. Myofibroblasts are responsible for the desmoplastic reaction surrounding human pancreatic carcinoma. Surgery 2002;131:129-34.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ et al. The myofibroblast: one function, multiple origins. Am J Pathol 2007;170:1807-16.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000;100:57-70.
- Shi C, Washington MK, Chaturvedi R et al. Fibrogenesis in pancreatic cancer is a dynamic process regulated by macrophage-stellate cell interaction. Lab Invest 2014;94:409-21.
- Apte MV, Wilson JS. Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells. J Gastroenterol Hepatol 2012;27(suppl 2):69-74.
- Vonlaufen A, Joshi S, Qu C et al. Pancreatic stellate cells: partners in crime with pancreatic cancer cells. Cancer Res 2008;68:2085-93.
- Hamada S, Masamune A, Takikawa T et al. Pancreatic stellate cells enhance stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2012;421:349-54.
- Froeling FE, Mirza TA, Feakins RM et al. Organotypic culture model of pancreatic cancer demonstrates that stromal cells modulate E-cadherin, beta-catenin, and Ezrin expression in tumor cells. Am J Pathol 2009;175:636-48.
- Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. Cell 2012;148:349-61.
- Bachem MG, Schunemann M, Ramadani M et al. Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. Gastroenterology 2005;128:907-21.
- Xu Z, Vonlaufen A, Phillips PA et al. Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis. Am J Pathol 2010;177:2585-96.
- Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW et al. Cancer-stellate cell interactions perpetuate the hypoxia-fibrosis cycle in pancreatic ductal adenocarcinoma. Neoplasia 2009;11:497-508.
- Li J, Wientjes MG, Au JL. Pancreatic cancer: pathobiology, treatment options, and drug delivery. AAPS J 2010;12:223-32.
- Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ et al. Inhibition of hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. Science 2009;324:1457-61.
- Provenzano PP, Cuevas C, Chang AE et al. Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Cell 2012;21:418-29.
- Heldin CH, Rubin K, Pietras K et al. High interstitial fluid pressure – an obstacle in cancer therapy. Nat Rev Cancer 2004;4:806-13.
- Mantoni TS, Lunardi S, Al-Assar O et al. Pancreatic stellate cells radioprotect pancreatic cancer cells through beta1-integrin signaling. Cancer Res 2011;71:3453-8.
- von Hoff DD, Ramanathan RK, Borad MJ et al. Gemcitabine plus nab-paclitaxel is an active regimen in patients with advanced pancreatic cancer: a phase I/II trial. J Clin Oncol 2011;29:4548-54.
- Froeling FE, Feig C, Chelala C et al. Retinoic acid-induced pancreatic stellate cell quiescence reduces paracrine Wnt-beta-catenin signaling to slow tumor progression. Gastroenterology 2011;141:1486-97.
- Ozdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL et al. Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival. Cancer Cell 2014;25:719-34.
- Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Cell 2014;25:735-47.