

Betegekből származó tumormintákból képzett xenograftok lehetséges szerepe a hatékony, személyre szabott terápia kiválasztásában

Tóvári József

Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály, Budapest

A hatékony daganatellenes terápia gyors kiválasztása a kezelés eredményességén felül csökkenti a beteg felesleges megterhelését, valamint komoly pénzügyi következményekkel is jár. Kísérleti állatokat, köztük olyanokat, amelyek humán daganatok létrehozására is alkalmasak voltak, korábban elsősorban újfajta terápiás lehetőségek kutatásában használtak. Napjainkban azonban lehetőség nyílt arra, hogy az eddig szövettényészeti sejtekből képzett kísérletes daganatok helyett közvetlenül a betegből származó tumorszövetet ültessük be az állatokba. Ezzel a módszerrel a humán daganatsejteken kívül az azokat körülvevő környezeti elemek is transzplantálásra kerülnek, melyeknek nagy szerepe van a daganatellenes terápiák hatékonyságában is. Ezek a szövetek bizonyítottan több generáción keresztül túlélnek és funkcionálisan aktívak is maradnak, így a modell jobban tükrözi a klinikai körülményeket. Ezért a modellt alkalmazva kiválaszthatjuk akár egy adott beteg saját daganatára a legígéretesebb terápiát is a lehetőségek közül. Magyar Onkológia 59:324–328, 2015

Kulcsszavak: betegeredetű tumormintákból képzett xenograftok, tumormodellek, immunszupprimált egerek, személyre szabott terápia

The rapid selection of the efficient anticancer therapy may decrease the unwanted burden to patients and has financial consequences. Tumor models including xenografts in mice were used previously mostly in the development of new anticancer drugs. Nowadays xenografts from direct patient-derived tumor tissues (PDTT) in immune deficient mice yield better models than experimental tumors originating from cell cultures. The new method enables researchers to observe heterogeneous tumor cells with their surrounding tissue elements and matrices representing the clinical situation in humans much better. The cells in PDTT tumors are alive and functionally active through several generations after serial transplantation. Therefore using these models we may investigate tumor response to different therapies, the selection of resistant cell populations and the formation of metastasis predicting the outcomes in the personalized therapy.

Tóvári J. Potential role of patient-derived tumor xenografts (PDTXs) in the selection of optimal therapeutic strategy. Hungarian Oncology 59:324–328, 2015

Keywords: patient-derived tumor xenograft (PDTX), personalized therapy, immune deficient mice

Levelezési cím: Dr. Tóvári József, Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály,
H-1122 Budapest, Ráth György u. 7–9., e-mail: tozsi@oncol.hu

Közlésre érkezett: 2015. október 8. • Elfogadva: 2015. október 25.

KÍSÉRLETI ÁLLATOK A DAGANATKUTATÁSBAN

Állatokban létrehozott kísérletes daganatok használata elengedhetetlen a daganatellenes hatóanyagok és terápiás protokollok fejlesztésében. A leggyakrabban használt modelleket rágszálókban fejlesztették ki, azon belül is a legkülönbözőbb genetikai háttérű egértörzsekben. A National Cancer Institute-ban (NCI, USA) 1955-ben vezették be az első egérleukémia-modellt hatóanyagok tesztelésére, majd később szolid daganatos modelleket is kialakítottak. A '70-es években már humán eredetű tumormodellek (xenograftok) is léteztek, de igazán akkor terjedtek el ezek a kísérletes rendszerek, amikor megjelentek az immunuszupprimált egértörzsek (1, 2). Addig komoly kihívást jelentett egy idegen faj szövetét beültetni a kísérleti állatokba: thymectomia után teljestest-besugarazással tettük tönkre az állatok meglévő immunrendszerét, amit a tumordarabok/tumorsejtek beültetése után csontvelő-transzplantálással építettünk fel újra. Ez gyakran igen komoly állatszámvesztéssel és kis hatásfokú tumormegeredéssel járt.

Manapság a leggyakrabban használatos immunuszupprimált egerek az athymicus nude egér (3), a súlyos, kombinált immunhiányos (severe combined immune deficient, SCID) (4), a nem elhízott cukorbeteg SCID (non-obese diabetic, NOD-SCID) (5) és a rekombinációaktiváló gén-2 (Rag2) génkiütött egér (6). Az utóbbi három közös jellemzője, hogy károsodott a DNS-rekombináció és ezáltal a génátrendezés a sejtekben, ennek következtében nincsenek megfelelően működő T-sejt-receptorok és immunglobulinjaik sem, ezért nincs immunválasz az idegen sejtekkel/szövetekkel szemben (7). Ezek a mutációk teszik lehetővé a xenograftok létrehozását, ugyanakkor érdemes megemlíteni, hogy immunhiányos állapotuknak köszönhetően a tartásuk igen körülményes (steril környezetet kell biztosítani nekik), és beszerzésük is igen költséges (70–180 EUR/állat).

Az 1980-as évektől kezdődően többféle stratégiát fogadott el az NCI a potenciális daganatellenes szerek tesztelésére. Kezdetben P388 leukémiamodellemben tesztelték a hatóanyagokat, amit kiegészítettek egy xenograftpanellel. A kezdeti „hatóanyag-megközelítést” 1989-ben felváltották a „betegségmegközelítéssel”: ennek keretében egy 60, különböző szöveti eredetű tumorsejtből álló panelen (NCI-60) szűrték *in vitro* a hatóanyagokat, amelyet egy három, különösen érzékeny sejtvonalból álló panelre váltottak 1999-ben. Természetesen az *in vitro* szűrésekben hatékonynak bizonyult vegyületeket xenograftpanelen *in vivo* is letesztelték (8).

A 80-as évek elejétől alkalmazott *in vitro* és *in vivo* szűrések eredményességéről egy 2001-ben született összefoglaló tanulmány megállapította, hogy 39 hatóanyag

esetében, ahol legalább a xenograftmodellek harmadában pozitív daganatellenes hatást tapasztaltak, az szignifikáns korrelációt mutatott a humán fázis II vizsgálatokban mért aktivitásukkal (9).

DAGANATOK LÉTREHOZÁSA KÍSÉRLETI ÁLLATOKBAN

A napjainkban használt daganatmodellek túlnyomó többségében szövettenyésztésből származó sejteket juttatunk a kísérleti állatokba. Leggyakrabban a daganatnövekedést és a kezelőszerek arra gyakorolt hatását a legkönnyebben monitorozhatóan, subcutan (sc.) transzplantáljuk a tumorsejteket az állatok hátbőre alá. Ez a lokalizáció csak kismértékben hasonlít az eredeti szöveti környezetre, a megeredés hatékonysága számos esetben nem túl magas, és áttétek is csak ritkán alakulnak ki. Ezért számos esetben a szöveti eredetüknek megfelelő helyre (orthotopicusan) is inokuláljuk a tumorsejteket. Az utóbbi modellben érvényesülhetnek a „gazdaszövet” lokális tulajdonságai, sőt, gyakran metasztatizisok is kialakulnak, lehetővé téve azok biológiai sajátosságainak vizsgálatát, azonban ebben az esetben valamilyen képkötővel lehet csak a daganatnövekedés dinamikáját nyomon követni.

A sejtvonalak használatának nagy előnye, hogy tökéletesen ismerhetjük a sejtek genetikai háttérét és fehérjeexpressziós profilját (mutációk megléte, hormonreceptorok expressziója, génamplifikáció előfordulása, fehérjék kifejeződésének változása stb.), amely lehetővé teszi az azonos szöveti eredetű, de eltérő mutációs státuszú sejtvonalak közötti különbségek vizsgálatát. Ezzel lehetővé válhat egy adott molekula terápiás célpontként történő meghatározása, vagy a vizsgált hatóanyag alkalmazhatóságának felderítése az eltérő genetikai háttérű daganatok esetében. Azonban ezek a sejtvonalak akár több évtizedesek is lehetnek, már sok-sok passzázson mentek át, amely egy komoly szelekciós mechanizmus, ami abba az irányba nyomta el a sejtek fehérjeexpresszióját, hogy minél jobban alkalmazkodjanak a sejtenyésztési körülményekhez. Gyakran említik, hogy két, *in vitro* régebben fenntartott, eltérő szöveti eredetű tumorsejtvonal génexpressziós profilja sokkal jobban hasonlít egymásra, mint a tumorsejt és az eredeti szövet génkifejeződési mintázata. Ennek megfelelően a sejtvonalakból képzett daganatokban nem lehet kimutatni azt a nagyfokú heterogenitást, amely a klinikai tumorokban gyakran kialakul. Ráadásul a szövettenyésztési sejtekből származó daganatok esetében a tumorokban egyébként mindig jelen lévő, a terápia szempontjából szintén fontos környezeti sejtek (immunsejtek, fibroblasztok stb.) és struktúrák (extracelluláris mátrix, vagy az adott szervre lokálisan jellemző citokinek, növekedési faktorok stb.) nem

1. táblázat. A különböző xenograftmodellek sajátosságai

	Tumorminta eredete		Beültetés helye	
	Szövettenyésztési sejtvonal	Friss humán tumor	Subcutan	Orthotopicus
Heterogenitás	homogén sejtpopuláció	kifejezett és megtartott heterogenitás		
Tumormegeredés hatékonysága	100% körül minden oltási helyen	függ az oltás helyétől	40–60% között	akár >95%
Időigény	rövid, néhány hét	több hónap is lehet		
Tumor környezete	csak egérstróma a xenograftban	humán strómaelemek is a xenograftban		
Metasztázisok kialakulása			ritka	gyakori
Tumorerő növekedésének követése			könnyű mérési lehetőség	nehézkés, képkalkotó szükséges
A modell költsége	viszonylag olcsóbb	költséges		

találhatóak meg (10). Ennek megfelelően az ilyen kísérletes daganatokban sokkal nehezebb vizsgálni a klinikumban gyakran megfigyelhető rezisztencia kialakulását, rezisztens sejtpopulációk kiszelektálódását. Ezek az alkalmazási korlátok szükségessé teszik olyan újfajta tumormodellek kialakítását, amelyek még jobban mutatják a klinikai daganatok biológiai sajátosságait, segítve a daganatellenes hatóanyagok fejlesztését, valamint a személyre szabott terápia helyes megválasztását.

BETEGBŐL SZÁRMAZÓ DAGANATMINTÁKBÓL KIALAKÍTOTT TUMORMODELLEK

A korábban említett modellek hiányosságainak kiküszöbölésére alkalmasnak tűnik olyan xenograftok létrehozása, amelyeknél a daganatszövet közvetlenül a betegből származik. A beültetésre szánt daganatszövet lehet biopsziás minta vagy sebészi anyag egyaránt. Előnynek tűnik, hogy ezekben az esetekben a daganatsejteket az eredeti szöveti környezetükkel együtt transzplantáljuk, ráadásul több vizsgálat is kimutatta, hogy az eredeti szöveti sajátosságok több átoltás után is megtartottak a mintában (11–13). Ennek megfelelően ez a modell közelebb áll a valós klinikai szituációhoz, így a tumorok kezelése során a környezeti elemek terápiát befolyásoló hatásai is vizsgálhatóak. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a daganatok növekedéséhez elengedhetetlen azok beereződése, amely természetesen „egérerek” képződését jelenti a xenograftokban, sőt a sorozatos transzplantálások során egyre több egéredetű egyéb sejt jelenik meg a humán daganatsejtek környezetében, de az eredeti humán környezeti sejtek is több generáción keresztül túlélnek és kimutathatóan aktívak a daganatokban (11–13).

A tumorok transzplantálásának másik fontos eleme a PDTX-modellek esetében is a daganatok beültetésének helye. Ezekben a xenograftokban is leggyakrabban a kísér-

leti állatok hátbőre alá (subcutan) ültetjük a daganatokat, ami természetesen messze áll biológiai tulajdonságait tekintve az eredeti szöveti környezet sajátosságaitól, ugyanakkor nagy előnye, hogy viszonylag nagyobb tumordarabot transzplantálhatunk, ami heterogén tumorsejt-populációt és több, nem tumoros környezeti elemet tartalmazhat. Sajnos ebben az oltási lokalizációban a tumorok megeredésének aránya mindössze 40–60%, és csak ritkán adnak áttétet a beültetett daganatok, ami csökkenti a metastázisok vizsgálatának lehetőségét.

Egy másik lokalizáció, amelyet a PDTX-modelleknél gyakran alkalmaznak, a vesetok alá (subrenal capsular, SRC) történő transzplantáció. Ezen az oltási helyen „valószínűleg” szöveti környezetbe kerül a tumorminta, és sokkal jobb (akár 95% feletti is) a tumorok megeredésének aránya, ugyanakkor csak kisebb tumordarab ültethető be, ami csökkenti a heterogenitás és az eredeti környezeti elemek előfordulásának gyakoriságát (14). Természetesen a PDTX-modellek esetében is alkalmazhatjuk az orthotopicus oltási technikákat, amelyek során a kivett tumordarabot az eredeti szöveti környezetnek megfelelő anatómiai lokalizációba ültetjük (tejléc, prosztatata, intracutan, vastagbél, agy stb.), biztosítva az adott szerv környezeti sajátosságainak meglétét. Ezekből a lokalizációkból gyakran alakulnak ki metastázisok is (15), így még jobban modellezhetjük a valós klinikai szituációkat. Az egyes tumormodellek használhatóságát az 1. táblázat hasonlítja össze.

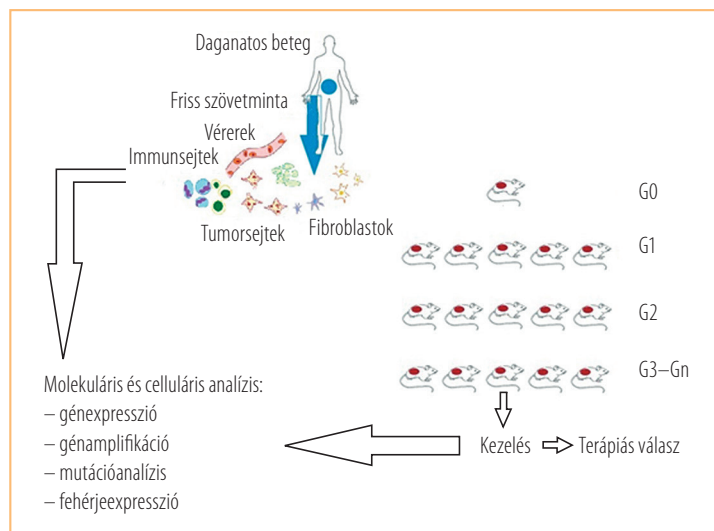
A PDTX-MODELLEK KIALAKÍTÁSA

A PDTX-modellek esetében a transzplantálásra kerülő friss humán tumordarab származhat biopsziás mintából és sebészi anyagból egyaránt. A sebészi anyag természetesen jobb kiindulási minta, mivel a nagyobb mennyiségű szövetből több xenograftvonalat is alapíthatunk, valamint számos kez-

deti vizsgálatot (mutációk azonosítása, fehérjeexpressziós vizsgálatok stb.) végezhetünk (16). Amennyiben több kísérleti állatban is indítottunk xenograftot (G0, első generáció), a későbbiekben csak egy megeredt tumort passzálunk tovább. A beültetéskor néhány mm³-es tumordarabokat transzplantálunk (természetesen a méret nagyban függ az oltás helyétől), majd 1–2 cm³-re hagyjuk megnőni a daganatokat. A G1 generációban már több állatot (3–5) vonunk be a transzplantációba és a G2-ben is ezzel az állatszámmal dolgozunk. Ezután a G3 (és a következők is) az a generáció, amelyben már a kísérletnek megfelelő állatszámban alakítjuk ki a xenograftokat. Itt egy-egy csoportba minimum 5 állat kerül, és ebben a fázisban tesztelhetjük a kísérletes hatóanyagokat, vagy kiválaszthatjuk az adott beteg tumorára legmegfelelőbb daganatellenes készítményt és terápiás protokollt is (11, 17). Természetesen a kialakult, nagyobb xenograftokból minden passzálás során vehetünk mintát további kísérletes és diagnosztikai vizsgálatok céljából. A PDTX-modellek kialakítását az 1. ábra szemlélteti (18).

Mivel a daganatokon belüli heterogenitás, valamint az egyes betegek daganatai között meglévő különbségek gyakran kifejezettek, indokolt, hogy egyszerre több daganatdarabot is elindítsunk ugyanabból a betegből több kísérleti állatban, valamint több betegből származó, de azonos szöveti eredetű tumorokból xenograftbankokat is létrehozunk. Ilyen bankok ma már több szöveti eredetű daganat esetében léteznek (19–21), sőt ezeket meg is vásárolhatjuk kísérletes felhasználásra, például újfajta daganatellenes hatóanyagok tesztelésére. Számos publikáció támasztja alá, hogy ezek a vonalak kifejezetten stabilan expresszálják az eredeti tumor markereit, és megtartják annak szöveti környezeti sajátosságait is (22).

1. ábra. A PDTX-modellek kialakításának sematikus rajza



A PDTX-MODELLEK KLINIKAI ALKALMAZHATÓSÁGA

A betegből származó tumorxenograftok három fő területen használhatók. Az első, amelyben a leggyakrabban alkalmazzák ezeket a modelleket, az újfajta daganatellenes hatóanyagok fejlesztése. A hatóanyagok sejtrendszerben történt szűrése után PDTX-modellpanelen tesztelhetők, ahol többféle szöveti eredetű xenograftokat, vagy egyféléből, de több páciensből származó tumorokat vonhatunk be a vizsgálatokba. Ezek során a targetspecifikus hatóanyagok fejlesztése is vizsgálható, meghatározva a target valódi szerepét *in vivo* kezelési körülmények között.

A második felhasználhatósága a modelleknek a terápia hatékonyságát jelző markerek, vagy a rezisztencia kialakulásában fontos szerepet betöltő molekulák azonosítása. A xenograftokból folyamatosan tudunk mintát venni a kezeléseket alatt, amelyeket feldolgozva vizsgálhatjuk például a terápiára rezisztens populációk kialakulását, azok biológiai sajátosságait. Azonosíthatunk újfajta markereket, amelyek a kezelés hatékonyságát jelzik, vagy a rezisztencia kialakulásában szerepet játszó molekuláris eseményeket, amelyek későbbi terápiás célpontok lehetnek.

A harmadik és a klinikai gyakorlatban még úttörőnek számító felhasználási lehetőség az adott betegre alkalmazható, leghatékonyabbnak ígérkező személyre szabott terápia meghatározása. Ennek során a daganatmintában meghatározhatjuk a terápia előtti molekuláris sajátosságokat, majd a xenograftmodellekben kipróbálhatjuk az egyes lehetséges terápiás modalitásokat és protokollokat. Közben monitorozhatjuk a beteg daganatában az egyes kezelésekre hatására bekövetkező molekuláris változásokat, amelyek hatással lehetnek a terápia sikerességére. Így egyszerre többféle terápiás lehetőséget próbálhatunk ki, kiválasztva közülük azt, amely a leghatékonyabbnak ígérkezik az adott beteg kezelésében.

ÖSSZEFOGLALÁS

A betegből származó tumormintákból létrehozott xenograftmodellek újfajta eszközt adtak a kezünkbe a daganatellenes küzdelemben. A több generáción át jól megtartott tumormorfológia és molekuláris sajátosságok, valamint a környezeti elemek megléte olyan modell jelent, amely jelenleg a legjobban reprezentálja a klinikai sajátosságokat (23). Ennek megfelelően a modellek használhatóak mind új targetek és daganatellenes szerek kifejlesztésében, mind a meglévő modalitásokat tesztelve újfajta terápiás protokollok kidolgozásában. Kifejezetten ígéretes a személyre szabott terápia megválasztásában, ahol egy adott beteg tumormintájából

származó modellekben tesztelhetjük a különböző terápiás lehetőségeket, sőt, még az áttétek kialakulását is vizsgálhatjuk. Azonban mindenképp megjegyzendő, hogy a modellek kialakítása viszonylag időigényes, komoly laboratóriumi és állatházi háttérrel igényel, költséges, és állatkísérletes etikai kérdéseket vet fel (24). Ezeket a hátrányokat azonban messze felülmúlják azok a potenciális előnyök, amelyek az újfajta daganatellenes szerek fejlesztése során lépnek fel, valamint a beteg felesleges megterhelésének csökkentéséből származnak.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni *Gacs Alexandrának* az ábra elkészítésében nyújtott segítségével, valamint *Dr. Bálintné Tátrai Enikőnek* és *Dr. Bartal Alexandrának* a kézirat kritikus javításáért.

KUTATÁSI TÁMOGATÁSOK

A munka témájában folytatott kutatásainkat az OTKA K84173 és a KTIA AIK 12-1-2013-0041 számú pályázatokból fedezzük.

IRODALOM

1. Sausville A, Burger A. Contribution of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res* 66:3351–3354, 2006
2. Venditti JM, Wesley RA, Plowman J, et al. Current NCI preclinical antitumor screening in vivo: results of tumor panel screening, 1976–1982, and future directions. *Adv Pharmacol Chemother* 20:1–20, 1984
3. Dwyer JM, Mason S, Warner NL, Mackay IR. Antigen binding lymphocytes in congenitally athymic (nude) mice. *Nat New Biol* 234:252–253, 1971
4. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301:527–530, 1983
5. Prochazka M, Gaskins HR, Shultz LD, Leiter EH. The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3290–3294, 1992
6. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855–867, 1992
7. Shimamoto Y, Kameya T, Nagai K, et al. Transplantation of human tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 56:1251–1260, 1976
8. Boyd M. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen: concept, implementation, and operation, 1985–1995. In: *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*. Ed. Teicher B, Humana Press, Totowa, NJ 1997
9. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer* 84:1424–1431, 2001
10. Van Kempen LC, Ruiters DJ, van Muijen GN, et al. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur J Cell Biol* 82:539–548, 2003
11. Rubio-Viqueira B, Jimeno A, Cusatis G, et al. An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 12:4652–4661, 2006
12. Bankert RB, Egilmez NK, Hess SD. Human-SCID mouse chimeric models for the evaluation of anti-cancer therapies. *Trends Immunol* 22:386–393, 2001
13. Perez-Soler R, Kemp B, Wu QP, et al. Response and determinants of sensitivity to paclitaxel in human non-small cell lung cancer tumors heterotransplanted in nude mice. *Clin Cancer Res* 6:4932–4938, 2000
14. Cutz JC, Guan J, Bayani J, et al. Establishment in severe combined immunodeficiency mice of subrenal capsule xenografts and transplantable tumor lines from a variety of primary human lung cancers: potential models for studying tumor progression-related changes. *Clin Cancer Res* 12:4043–4054, 2006
15. Wang Y, Xue H, Cutz JC, et al. An orthotopic metastatic prostate cancer model in SCID mice via grafting of a transplantable human prostate tumor line. *Lab Invest* 85:1392–1404, 2005
16. Priolo C, Agostini M, Vena N, et al. Establishment and genomic characterization of mouse xenografts of human primary prostate tumors. *Am J Pathol* 176:1901–1913, 2010
17. Fichtner I, Rolff J, Soong R, et al. Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clin Cancer Res* 14:6456–6468, 2008
18. Jin K, Teng L, Shen Y, et al. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. *Clin Transl Oncol* 12:473–480, 2010
19. Shu Q, Wong KK, Su JM, et al. Direct orthotopic transplantation of fresh surgical specimen preserves CD133+ tumor cells in clinically relevant mouse models of medulloblastoma and glioma. *Stem Cells* 26:1414–1424, 2008
20. Kolfshoten GM, Pinedo HM, Scheffer PG, et al. Development of a panel of 15 human ovarian cancer xenografts for drug screening and determination of the role of the glutathione detoxification system. *Gynecol Oncol* 76:362–368, 2000
21. Giovannella BC, Stehlin JS Jr, Shepard RC, et al. Correlation between response to chemotherapy of human tumors in patients and in nude mice. *Cancer* 52:1146–1152, 1983
22. Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clin Pharmacol Ther* 85:217–221, 2009
23. Boven E, Winograd B, Berger DP, et al. Phase II preclinical drug screening in human tumor xenografts: a first European multicenter collaborative study. *Cancer Res* 52:5940–5947, 1992
24. Kelland LR. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* 40:827–836, 2004