

Pauliina M. Munne, Mariel Savelius, Iiris Juopperi, Iiris Rätty ja Juha Klefström

Kuinka pitää syöpä hengissä?

Syöpäsoluviljelmällä tarkoitetaan tavanomaisesti petrimaljan muovipohjan tarjoamaan kaksikulotteiseen pintaan ja vasikan seerumin ravintoaineisiin sopeutunutta syöpäsolukloonaa. Luonnottomassa muovimaljajämpäristössä kasvavat solut eivät kuitenkaan pysty lähimainkaan jäljittelemään aidon syöpäkudoksen toimintoja tai lääkevastetta. Syöpätutkimus tarvitsee siksi kiireesti syöpäkudoksen biologian ja monimuotoisuuden paremmin säilyttäviä kudostiljelymalleja. Leikkauksista saatava elävä syöpäkudos on mielenkiintoinen syöpämalli, koska se edustaa potilaan syöpää pienoisluonnossa. Elävästä syöpäkudoksesta saatu yksilöllinen tieto syöpäkasvaimesta tuo myös uusia mahdollisuuksia hoidon räätälöimiseksi. Tuoreen syöpäkudoksen kasvattaminen ja tutkiminen laboratoriossa ei kuitenkaan ole helppoa. Se pitää pystyä pitämään hengissä. Esittelemme syöpäkudoksen kolmiulotteisia tiljelymalleja ja pohdimme, miksi potilasperäiset elävät syöpäntäytteenä ovat tärkeitä kehitettäessä uusia syöpähoitoja.

Syöpäsolulinjan ja syöpäkudoksen erojen pohtiminen kannattaa, jotta ymmärrettäisiin, miksi tavanomaiset syöpäsolulinjat eivät mallinna riittävän hyvin syöpäkudoksen toimintoja tai lääkevastetta. Solulinjat ovat lähitöisin syöpäkudoksesta, joka on ensin mekaanisesti ja entsymaattisesti pilkottu yksittäisiksi soluiksi. Solut levitetään petrimaljoille ja päälle kaadetaan ravintoaineliuosta, jossa on noin kymmenesosa vasikan seerumia tai vastaavaa kasvutekijälientä. Uusi ympäristö aiheuttaa soluille sokin, jonka seurauksena niistä valtaosa kuolee tai lakkaa kasvamasta. Jotkin solut pärjäävät ja alkavat jakaantua. Solulinja koostuu näiden selviytyjien jälkeläisistä. Klonaalisissa solulinjoissa kaikki solut ovat yhden selviytyjäsolun jälkeläisiä eli perimältään homogeenisia. Uusien tutkimusten valossa tosin edes klonaalisissa solulinjoissa kaikki solut eivät ole ilmiänsul- taan keskenään identtisiä (1).

Solulinja ei ole kuitenkaan koskaan vastaavalla tavalla geneettisesti heterogeeninen solupopulaatio kuin syöpäkudos. Vaikka maljalla esiintyisikin useampia solupopulaatioita, tämän monimuotoisuuden aiheuttaneet valintapaineet muovimaljalla ovat hyvin erilaisia kuin ne, joita elimistössä muhiva syöpäkudos kasvaessaan kohtaa. Syöpäkudoksen heterogeenisuuden

taustalla on mikroevolutiivinen ohjelma, jota ei maljalla pystytä jäljittelemään. Syöpäkudos ei myöskään koostu pelkästään transformoituneista epiteelisoluista, vaan niiden seasta löytyy syövälle ominaista verisuonitusta, immuunisoluja, rasvasoluja ja sidekudosta (2,3).

Eri alkuperää edustavat elimistön terveet solut ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa kasvainkudoksen kanssa, ja nämä vuorovaikutukset säätelevät kasvainsolujen geenien ilmentymistä ja kasvaimen biologiaa. Paradoksaalisesti tämä kasvainsolujen ja elimistön terveiden solujen keskinäinen viestintä lopulta edesauttaa syövän kasvua (4). Solulinjat antavat siis hyvin vaillinaisen ja usein riittämättömän kuvan monimuotoisesta ja mikroympäristön kanssa rikkaassa vuorovaikutuksessa elävästä oikeasta syövästä.

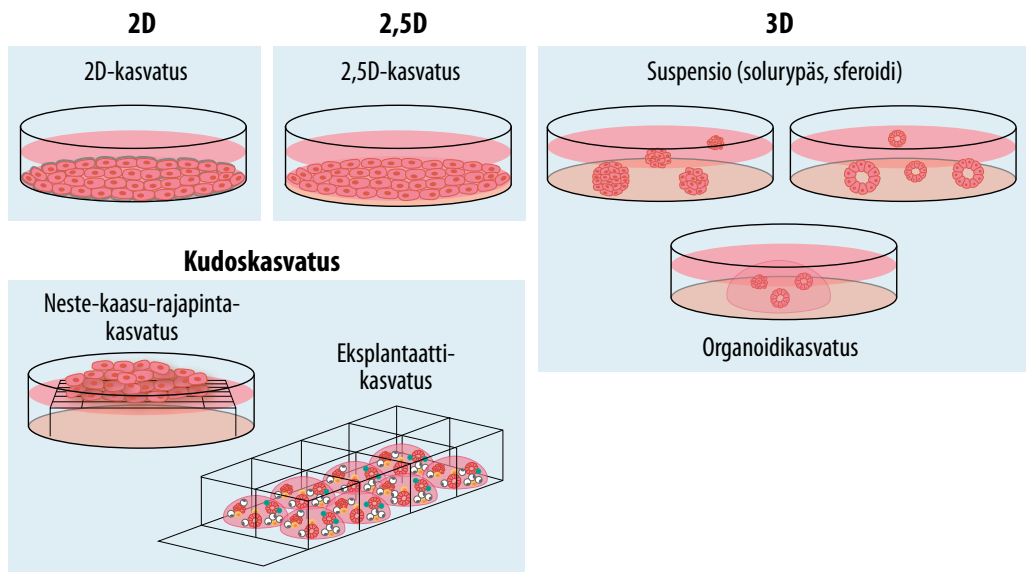
Syövän solumallien puutteisiin on jo pitkään kiinnitetty huomiota, mutta kehitys kohti monimutkaisempia syöpämallia oli pitkään melko hidasta. Tärkeä sysäys soluviljelytekniikoiden mullistukselle tuli lääketieteellisuuden piiristä. Lääkeyrityksissä nimittäin herättiin siihen, että lääketestauksen prekliinisessä vaiheessa lääkekehityspuutket olivat vielä pullollaan aihio- lääkkeitä, jotka tehokkaasti niittivät syöpäsolut kuoliaaksi petrimaljalla tai siirtoistutteis-

Samojen aihiolääkkeiden teho riitti kuitenkin vain harvoin nujertamaan syövän kliinisissä kokeissa (5,6). Epäonnistuneiden onkologisten lääkekokeiden kustannukset ovat vuosittain miljardeja euroja, ja syövän aihiolääkkeistä yli 90 % epäonnistuu kliinisen vaiheen testauksessa. Pahimmassa tapauksessa näin suuri epäonnistumisprosentti voi tehdä syöpälääkekehityksestä taloudellisesti kannattamatonta liiketoimintaa.

Yksi tekijä syövän aihiolääkkeiden epäonnistumisen taustalla on, että prekliinisen tutkimusvaiheen solu- ja eläinkokeet lupailevat tehoja, joita potilaissa ei sitten havaitakaan (7). Tähän ongelmaan on viime aikoina herätty Euroopassa ja Yhdysvalloissa, ja uusien syöpälääkkeiden testaamiseen soveltuvien ”ennustavien” kudostallien kehittämiseen on panostettu merkittäviä resursseja esimerkiksi eurooppalaisessa lääkeyritysten ja yliopistojen yhteisessä Innovative Medicines Initiativen PREDECT-ohjelmassa (www.preduct.eu) tai Yhdysvalloissa käynnissä olevassa Stand Up To Cancer -hankkeessa (8).

Mikä sitten olisi paras syöpäkudostallimalli? Syöpäkudos on monimutkaisten vuorovaikutusten muodostama kokonaisuus, ja niinpä paras syövän kudostallimalli olisi eittämättä potilaan alkuperäinen syöpä sitä ympäröivän kudoksen ja fyysisen rakenteen kera. Siirtogeeniset syövät jyrsijämalleissa ovat tietyin rajoituksin erittäin hyviä syöpämalleja, mutta tässä katsauksessa keskitymme ihmisen syöpäsoluihin perustuviin laboratorion soluviljelykaapissa kasvatettaviin kudostallimalleihin. Näiden mallien syöpäkudostallirakenteen koon rajat määrittää kaasujen, aineenvaihduntatuotteiden ja ravinteiden kulkeutuminen solukkuun ja solukosta pois. Liian paksussa näytteessä kudoksen sisäosiin muodostuu ravinne- ja happivaje, joka on jo pienenäkin voimakas soluviestinnän muokkaa ja suurempana aiheuttaa kudostallipalees- sa kuolion.

Suuren kudostallin viljelemiseen liittyviä ongelmia voidaan ratkoa kahdella tapaa – joko rekonstruoidaan soluista riittävän pieniä kudostallimalleja tai pilkotaan (dekonstruoidaan) alkuperäisestä syöpäkudoksesta sen kokoisia



KUVA 1. Solulinjoista kudostallikasvatukseen. Kaksiulotteisissa (2D) kasvatuksissa solut kasvavat muovilla ja kaksi- ja puolikulotteisissa (2,5D) kasvatuksissa ohuen soluväliainematon päällä. Kolmiulotteisissa (3D) kasvatuksissa solut muodostavat ryppäitä tai sferoideja suspensiokasvatuksessa tai organoideja kasvatusmatriksissa. Potilas-peräisissä syöpäkudostallimalleissa säilyy osa syövän monimuotoisesta kudostalliympäristöstä, jossa sekä saman- että erityyppiset solut ovat jatkuvassa vuorovaikutuksessa keskenään.

TIETOLAATIKKO. Kolmiulotteinen matriksikasvatus (9–13).

Kolmiulotteisessa matriksikasvatuksessa epiteelisolut muodostavat epiteelirakenteita, joissa solut kykenevät luomaan autenttisia adheesiokontakteja naapurisolujen ja soluväliaineen kanssa. Kasvatusmatriksissa solut muodostavat usein alkuperäiselle kudokselle tyypillisiä toiminnallisia rakenteita. Matriksit ovat eräänlaisia geelejä, jotka jäljittelevät tai koostuvat normaaleista tyvikalvon tai sidekudoksen komponenteista kuten kollageenista, lamiiniinista tai erilaisista tyvikalvon johdannaisista (9). Kasvatusmatriksina on käytetty myös luonnosta löytyvien (kitosaani, hyaluronihappo, silkki) tai täysin synteettisten polymeerien muodostamia hydrogeelejä (9).

Matriksin valinnassa on huomioitava mallinnettavan solurakenteen mikroympäristö. Esimerkiksi jos mallinnetaan basaalisten epiteelisolujen vuorovaikutusta tyvikalvon kanssa, ovat lamiiniinipohjaiset geelit oiva valinta. Sidekudokseen tunkeutuvien syöpäsolujen lähiympäristöä puolestaan mallinnetaan kollageenipohjaisilla geeleillä (10). Hiiren Engelbreth–Holm–Swarmin sarkoomakasvaimesta eristetty matrigeeli (tai vastaavat tuotteet Cultrex ja Geltrex) on yksi yleisimmistä lamiiniinipohjaisista kasvatusgeeleistä (11).

Matriksin hiirikasvainalkuperän vuoksi geeli ei kuitenkaan ole optimaalinen ihmisen kudoksen kasvun ja ilmiäsuun kannalta. Yksi tulevaisuuden edistysaskelista saattaa olla siirtyminen ihmisen kasvaimista eristettyihin matrikseihin, joista hyvä esimerkki ovat Suomessakin kehitettävät hyvänlaatuisista myoomista lähtöisin olevat kasvatusmatriksit (12,13).

paloja, jotka säilyttävät osia alkuperäisestä monimuotoisuudesta mutta säilyvät elinkykyisinä diffuusion kautta saatavalla ravinne- ja happimäärällä. Esittelemme molempiin lähestymistapoihin perustuvia kudosisviljelytekniikoita ja kuvaamme, kuinka niitä nykyään hyödynnetään syöpätutkimuksessa.

Kudosisviljelyä kolmessa ulottuvuudessa

Uudet kudosisviljelytekniikat perustuvat ajatuksen, että kudoksen biologia tapahtuu kolmessa ulottuvuudessa. Kolmiulotteisissa kudosisviljelmissä solut tarttuvat petrimaljan pohjamuovin sijaan toisiinsa soluihin tai soluväliaineeseen, jolloin ne kykenevät paremmin keskinäiseen

vuorovaikutukseen. Soluja voidaan kasvat-
taa kolmiulotteisesti soluryppäinä ravintoliu-
oksessa tai geelimäisessä soluväliaineessa eli
solunulkoisessa matriksissa (**KUVA 1** ja **TIETO-
LAATIKKO**) (9–13). Kolmiulotteisessa geelissä
voidaan rekonstruoida soluista syöpäkudosta
tai dekonstruoida isommasta syöpäkappaleesta
pieniä syöpäeksplantaatteja tai syöpäviipaleita.

Solurypäskasvatukset. Tavanomaisissa
kaksiulotteisissa petrimaljakasvatuksissa epi-
teelisolut tai epiteeliperäiset syöpäsolut tart-
tuvat kiinni petrimaljan pohjaan. Jos soluja
kuitenkin estetään tarttumasta maljan pohjaan,
esimerkiksi mekaanisen liikkeen tai viljely-
maljan pohjan pinnoituksen avulla, ne alkavat
muodostaa aggregaatteja eli soluryppäitä. En-
simmäiset kolmiulotteiset soluviljelymallit oli-
vat juuri tällaisia solurypäskasvatuksia, joissa
soluja kasvatettiin pisarakasvatuksena (hanging
drop) (**KUVA 2**) (14).

Syöpäsoluja kasvatettiin 1960-luvulla ylei-
sesti Mosconan tekniikalla, jossa solut kasvavat
ravistelijassa keikkuvassa erlenmeyerpulloissa
(15). Pian huomattiin, että näissä solususpensi-
okasvatuksissa solut muodostavat erilaisia
ryppäitä, esimerkiksi pallomaisia rakenteita,
joissa solut ovat liittyneinä toisiinsa saman-
laisilla solu-soluliitoksilla kuin alkuperäisessä
kudoksessa. Näitä solupallukoita, jotka ovat
rakenteeltaan symmetrisiä, alettiin yleisesti
kutsua sferoideiksi (**KUVA 1**) (16). Sferoideihin
liittyvä termistö on kuitenkin melko kirjavaa, ja
sanaa on toisinaan käytetty kirjallisuudessa ku-
vaamaan mitä tahansa kolmiulotteista viljelmää.
Sferoidirakenteilla voi olla erillisiä kerroksia tai
ne voivat olla sisältä onttoja. Syöpäsolulinjoista
tehtyjä sferoideja kutsutaan kasvainsferoideik-
si (17). Etenkin vähäravinteisissa olosuhteissa
kasvatettuihin sferoideihin voi rikastua soluja,
joissa on syöväntasolujen piirteitä (17).

Sferoidimalleilla ei välttämättä pyritäkään
aina jäljittelemään alkuperäisen kasvainkudok-
sen rakenteita, vaan sferoidiviljelmien avulla
voidaan yksinkertaisesti pitää viljeltyjen solu-
jen uusiutumiskykyä paremmin yllä kuin kaksi-
ulotteisissa kasvatuksissa. Solurypäskasvatuk-
silla voidaan siis jossain määrin rekonstruoida
syöpäkudoksen piirteitä, ja varsinkin syöväntasolujen
mahdollinen rikastuminen viljel-

missä tekee rypäskasvatuksista mielenkiintoisia syöpämalleja.

Organoidit. Syöpä ei ole pelkästään virheellisen geenitoiminnan tuotos, vaan kasvainsolujen toimintaa ohjaa myös mikroympäristö. Se käsittää kasvainsolujen yhteisvaikutukset muiden solujen ja ympäröivän soluväliaineen kanssa sekä kasvaimeen kohdistuvat fysikaaliset tekijät.

Mikroympäristön merkitys syövän ilmi-
asuun valkeni Mina Bissellin pioneiritutkimus-
ten myötä. Hänen kuuluisa toteamuksensa on,
että kasvaimen fenotyyppi hallitsee genotyyppiä. Tämän päätelmän Bissell teki osoitettuaan,
että sopivassa matriksiympäristössä kasvatettu rintasyöpäkudos kykenee järjestäytymään normaalin näköiseksi rinnan rauhasrakenteeksi huolimatta syöpäsolujen viallisesta genomista (18). Hän osoitti myös, että tyvikalvoa mallintavissa geeleissä maitorauhasen solut kykenevät muodostamaan onttoja rinnan rauhasrakkuloita muistuttavia rakenteita. Kun viljeltyjä kolmiulotteisia rauhasrakkuloita käsiteltiin maidon tuottamista stimuloivilla laktogeenisilla hormoneilla, nämä rakenteet alkoivat tuottaa esikuvansa rintarauhasen tavoin maitoproteiineja (19). Tähän eivät petrimaljalla kasvatetut rintaepiteelisolut kykene.

Kolmiulotteisilla rauhasrakkuloilla tehdyt kokeet tuottivat omissakin tutkimuksissamme yllätyksen vuonna 2007, kun osoitimme, että kolmiulotteisia rauhasrakkuloita ympäröivä tyvikalvo pystyy taltuttamaan jopa vahvan MYC-syöpägeenin mitoosia lietsovat vaikutukset (14,20). Bissellin provokatiiviseen toteamukseen fenotyypin dominanssista on siis helppo yhtyä, ja samalla tällaiset löydökset painottavat sitä, kuinka tärkeä elementti kudostympäristö onkaan solidien syöpäkasvainten biologialle.

Matrigeelikasvatuksista alkunsa saaneet organoidiviljelmät käynnistivät 2000-luvulla kokonaan uuden aikakauden soluviljelyssä (21). Organoideiksi luetaan tyypillisesti biologisissa matrikseissa (geeleissä) kasvatetut soluryppäät, joissa esiintyy kudostyypillisiä rakenteita (esimerkiksi rauhasrakkulat) ja kudostyypillisiä toimintoja (esimerkiksi maitoproteiinien synteesi). Organoidi voi saada alkunsa kudoksen kantasoluista, indusoiduista pluripotentista

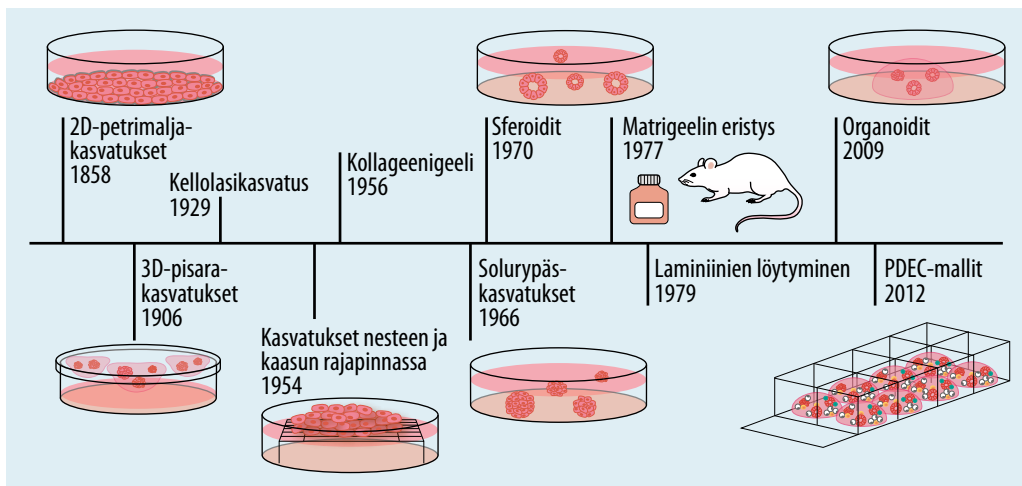
kantasoluista taikka normaalin tai kasvainkudoksen soluista.

Organoidit ovat paljastaneet kantasoluista muodostuvien kudosten hämmästyttävän omatoimisuuden kudostekniikan muodostamisen ja monimutkaisten erilaistumisprosessien kannalta. Hyvän esimerkin tarjoaa merkki-paalututkimus vuodelta 2009, jossa osoitettiin yksittäisten LGR5-positiivista merkkiproteiinia ilmentävien suolen kantasolujen kykenevän tuottamaan geelikasvatuksessa eräänlaisen minisuolen (22). Nykyään kantasoluihin perustuva organoidimenetelmä soveltuu mitä erilaisempien kudostekniikoiden kasvattamiseen, minihaimasta aina silmän rakenteisiin asti (23).

Lisäksi syöpäsolujen organoidiviljelmät tuovat kuvaan mukaan monet fysikaaliset muuttujat ja syöpäsolujen monimutkaisen kommunikoinnin toisten syöpäsolujen, soluväliaineen ja tyvikalvon kanssa (14). Tutkimuksen näkökulmasta organoideista liikkeelle lähtenyt soluviljelytekniikoiden raju kehitys on melkein pärrätyksellisen vuosikymmenen vaihteen genomikan vallankumoukseen. Viljelyssä kasvainorganoideissa on kuitenkin yksi puute, syöpäsolut ovat nimittäin niissä keskenään miltei yksin.

Potilasperäiset syöpäkudostekniikat. Mitäpä olisi syöpä ilman sidekudossolujen tuottamia kasvutekijöitä, proteaaseja ja sytokiineja? Tai syöpä vailla sille ärhenteleviä T-soluja ja luonnollisia tappajasoluja? Tai syöpä ilman makrofagien ja säätelijä-T-solujen immuunipuolustuksen äkäisyyttä toppuuttelevia vaikutuksia? Ei se olisi syöpä ollenkaan. Miten sitten saada nämä syövän olemassaolon kannalta keskeiset muut kuin syöpäsolut malliin mukaan?

Viljelyssä kasvavaa homogeenista syöpäsolukkoa voidaan toki yrittää rikastaa ulkoapäin tuoduilla sidekudossoluilla ja valkosoluilla (co-culture models), mutta silloin yhteiselon taustalta puuttuu yhteinen evoluutio ja kokemuspohja. Syövän biologian ymmärtämisen kannalta näillä väkiväisillä yhteiskasvatusmalleilla saadut tulokset voivat olla pahimmassa tapauksessa jopa harhaanjohtavia. Siksi on pyritty kehittämään erilaisia dekonstruktio-malleja, joissa elimistöstä irrotettu syöpäpala pyritään saattamaan sellaiseen muotoon, että se säilyttää elinkykynsä ex vivo -viljelmänä. Ex vivo



KUVA 2. Satakaksikymmentä vuotta soluviljelystä (14). Aikajalla solu- ja kudosisviljelystekniikan kehityksen historiallisia virstanpylväitä. Kudosisviljelyn pioneerina pidetään saksalaista embryologia Wilhelm Rouxia. Hän kasvatti 1800-luvun loppupuolen kokeissaan kanan alkion osia lämpimässä isotonisessa suolaliuoksessa. Kudospalat pysyivät muutaman päivän hengissä maljan pohjalla, ja kudosisviljely sai alkunsa (14). PDEC = patient-derived explant cultures

-kudosismallien historia juontaa juurensa viime vuosisadan alun pisaraviljelymenetelmiin tai myöhempiin kellolasikasvatuksiin, joissa kyettiin kasvattamaan aivan pieniä sikiökautisia elimiä tai elinten osia (**KUVA 2**) (14,25,26).

Viime vuosisadan puolessa välissä kudosisviljelyn mahdollisuuksia edistettiin kehittämällä neste- ja kaasun rajapinnan mallinen kudosisviljelytekniikka (**KUVA 2**) (14). Tässä menetelmässä kudosis viipaloidaan ja viipaleet asetetaan huolellisesti kellumaan silikonilla päällystetyn tai huokoisen suodatinpaperin päälle. Viipaleet voidaan myös asettaa lepäämään metalliverkosta tehdyn kehikon pinnalle (27,28).

Viipalekasvatusta on käytetty muun muassa keuhko-, rinta- ja eturauhassyöpätutkimuksessa (29). Huolimatta mallin tehostetusta kaasujen vaihdosta näidenkin viipalekasvatusten haasteena voi olla kudospalan keskelle muodostuva nekroottinen alue. Menetelmällä kasvatetaan kudosten lisäksi myös soluaggregaatteja, joko suodatinpaperin päällä tai upotettuna soluväliaineeseen kuten kollageeniin (30). Esimerkiksi epidermaaliset keratinosyytit muodostavat neste- ja kaasun rajapinnassa kasvatettaessa kasvualustalleen aluksi yhden solukerroksen. Kasvun edetessä kaasun ja neste- ja kaasun rajapinnassa alkaa muodostua erilaistuneita solukerroksia,

jotka muistuttavat normaalia ihon kerrostunutta rakennetta. Näin saadaan normaalille tai neoplastiselle ihokudokselle histologisesti oikeasuuntainen malli, jota voidaan käyttää esimerkiksi mallintamaan ihon, suun tai nielun alueen rakenteita (31).

Viipaloimisen vaihtoehtoinen menetelmä on pilkkoa kasvain riittävän pieniksi paloiksi ex vivo -kasvatuksiin. Tuore kasvainkudos paloitellaan pilkkomalla se ensin mekaanisesti leikkausveitsellä ja viimeistelemällä hienon-nus entsymaattisella kollageenaasikäsittelyllä. Näin saadut pienet kasvainfragmentit siirretään geelikasvatuksiin. Kasvatusgeeleinä voidaan käyttää soluväliaineesta eristettyjä komponentteja tai synteettisiä hydrogeelejä (17).

Potilaan kasvaimesta tuoreena saaduille ex vivo -viljelmille ei ole vielä vakiintunutta nimeä, mutta viime aikoina niitä on alettu kutsua PDEC-viljelmiksi (patient-derived explant cultures). PDEC-viljelmien kasvainfragmentit ovat läpimitaltaan noin 60–200 µm, ja omien havaintojemme mukaan eksplantaatit kasvavat sopivassa kasvatusliuoksessa ja geeliympäristössä jopa kuukausia. Rintasyövän eksplantaattiviljelmissä esiintyy kasvainsolujen lisäksi kasvaimen sidekudossoluja, rasvasoluja ja immu-nisoluja (**KUVA 1**).

Havainnot eri solutyypin läsnäolosta ja toiminnoista PDEC-viljelmissä ovat mielenkiintoisia, mutta vastauksia ollaan vasta hake-massa sellaisiin kriittisiin kysymyksiin, kuten kuinka autenttisia kasvainsolujen ja muiden solutyypin yhteisvaikutukset ovat eksplantaateissa tai pystytäänkö nämä vuorovaikutukset ottamaan huomioon tutkittaessa lääkevasteita eksplantaateilla. Tutkimusta tarvitaan vielä paljon lisää. Parhaassa tapauksessa PDEC-viljelmät kuitenkin toiminevat ikään kuin ikkuna yksilöllisen syöpäkudoksen lääkevasteisiin. Tätä tietoa voidaan käyttää hyväksi esimerkiksi pyrittäessä löytämään uusia syöpälääkkeen tehoa ennustavia biomarkkereita.

Diagnostiikasta yli jäävät syöpä-näytteet yksilöllistetyn lääketieteen työkaluiksi

PDEC-viljelmät taipuvat kaksiulotteisten solu-viljelmien tapaan helposti laboratorio-olosuhteissa tehtävään kokeelliseen tutkimukseen, niissä on paikallisesti edustettuna kunkin spesifisen syöpätapauksen heterogeeninen kasvainsolukirjo ja vieläpä osa kasvaimen alkupe-raisestä mikroympäristöstä. Luonnollisesti on otettava huomioon, että PDEC-viljelmissä kasvainkudos ei ole fysiologisessa ympäristössään, joten happi, ravinteet tai vaikkapa lääkeaineet eivät kulkeudu kasvaimeen systeemisesti. Myös kaasujen tai aineiden pitoisuudet eksplantaateissa voivat vaihdella koon mukaan ja eri viljelmien välillä.

Monia keskeisiä syöpätoimintojakaan, esimerkiksi angiogeneesiä, leviämistä tai metastasointia, ei voida suoraan tutkia eksplantaattiviljelmissä. Näistä puutteista huolimatta PDEC-viljelmätekniikoiden yleistyminen kokeellisessa syöpätutkimuksessa tekee laboratoriolöydöksistä kliinisesti merkittävämpiä. Tutkimuskohteenahan on solulinjan sijaan autenttinen, yksilöllinen ja aidon kasvainmikro-evoluution läpikäynyt kasvainkudos. Lähtökohdat siihen, että PDEC-mallit ennustaisivat aitoja kasvainvasteita tai vasteeseen liittyviä biomarkeriprofileja paremmin kuin reduktio-nistiset soluviljelymallit, ovat siis melko hyvät.

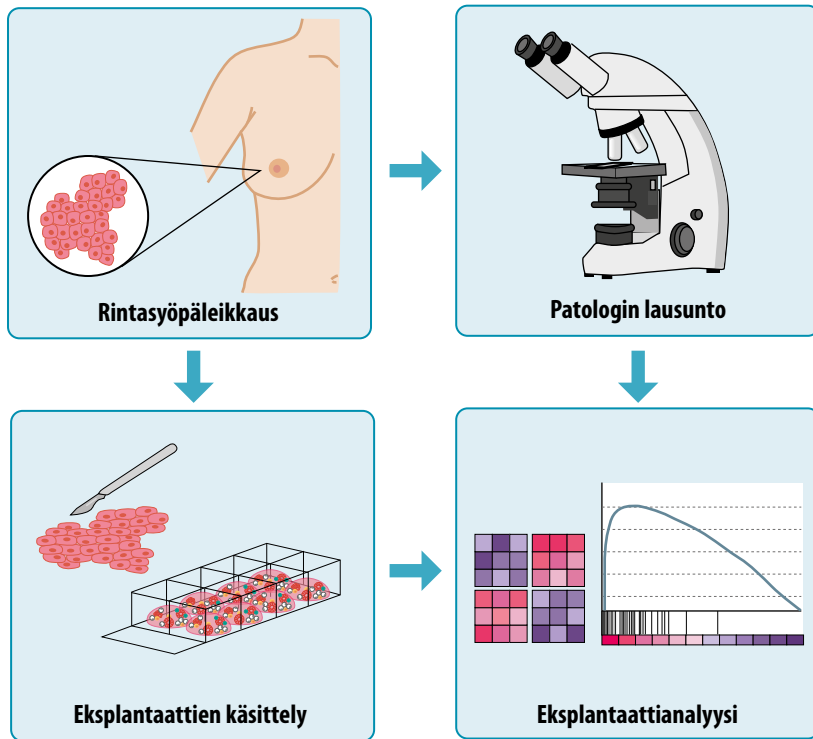
Ydinasiat

- » Kolmiulotteiset solu- ja kudosisviljelykasvatukset mallintavat syöpäkudosta paremmin kuin tavanomaiset petri-maljalalla kasvavat solulinjat.
- » Potilasperäisillä PDEC-kudoskasvatuksilla pyritään säilyttämään sekä syöpäsolujen keskinäinen että syöpäsolujen ja mikro-ympäristön solujen vuorovaikutus mahdollisimman autenttisinä.
- » PDEC-mallit luovat uusia mahdollisuuksia kehittää yksilöllisiä hoitoja sairaaloiden ja tutkimuslaitoksen yhteistyöhankkeissa.
- » PDEC-mallit saattavat ennustaa muita so-lumalleja paremmin lääkevasteita ja uusien mahdollisten lääkeaineiden tehoa kliinisissä kokeissa.

Argumentin tueksi vaaditaan kuitenkin vielä paljon lisää kriittistä empiiristä tutkimusta.

On tärkeää huomioda, että jo PDEC-mallien kehittäminen on translationaalista tutkimusta. Niillä tehtävät tutkimukset vaativat saumatonta yhteistyötä syöpiä leikkaavan kirurgin, näytteitä analysoivan patologin ja laboratorio-tutkimuksen suorittavan syöpäbiologin kesken. Lääkekokeiden suunnittelun kannalta on myös oleellista käydä säännöllistä vuoropuhelua syöpäpotilaita hoitavan onkologin kanssa (KUVA 3).

PDEC-koejärjestelyt muodostavat tavallaan kokonaisen tutkimusohjelman, jossa sekä logistiikan että tiedonvälityksen kannalta yhteydenpito eri sidosryhmien kesken on ensiarvoisen tärkeää. Projekti, joka tuo klinikon, kirurgin, patologin ja solubiologin yhteen, usein myös materiaalitutkimuksen insinöörin ja bioinformatikon, ei sisällä pelkästään näytelogiikan suunnittelua. Saman pöydän ääressä suunnitellaan myös kokeita, analysoidaan tuloksia ja vaihdetaan tutkimusideoita. Työskentely eri alojen ammattilaisten kanssa on mielekästä, kun selkeänä yhteisenä päämääränä on tuoda uusia tehokkaampia yksilöllistettyjä hoitomuotoja syöpäpotilaiden ulottuville.



KUVA 3. Elävän kasvainnäytteen matka sairaalasta laboratorioon. Kirurgisella leikkauksella poistetusta kasvaimesta otetaan näytepala patologin tutkittavaksi. Jäljelle jäävä osa toimitetaan jäässä elävänä tutkimuslaboratorioon. Tutkimuslaboratoriossa näyte pilkotaan mekaanisesti ja entsymaattisesti pienemmiksi paloiksi, jotka siirretään matriksikasvatukseen. Näin tuotettujen PDEC-viljelmien avulla voidaan selvittää lääkeweiteita ja niiden yhteyttä erilaisiin biomarkkeriprofiileihin. Alkuperäisen kasvainnäytteen diagnoosi saadaan patologilta ja huomioidaan tulkittaessa PDEC-viljelmistä saatuja tutkimustuloksia.

Onko PDEC-projektin ja siihen liittyvän logistiikan pystyttäminen monimutkaista? Potilaan suostumus tutkimukseen toki tarvitaan, mutta sen jälkeen elävän näytteen tuottaminen laboratoriotutkimuksiin ei juuri vaadi sairaalalta erityisjärjestelyjä. Kun kirurgi poistaa leikkaamalla syövän, siitä otetaan edustava näyte toimitettavaksi patologin mikroskoopin alle. Yli jäävä syöpäkudos päätyi aiemmin jätteisiin. Jäteastiaa parempi osoite on kuitenkin tutkimuslaboratorio, jossa on valmiudet hyödyntää elävää syöpäkudosta vaikkapa yksilöllisten lääkeweiteiden selvittämiseksi.

Lopuksi

Vanha vitsi kertoo katuvalon alla toikkaroivasta humalaisesta, joka pyytää sattumoisin paikalle tulleet poliisit apua hukassa olevien

kotiavaintensa etsimiseen. Poliisi tiedustelee, katosivatko avaimet varmasti juuri tässä kohdassa? Humalainen vastaa, että hän kadotti avaimet tuonne puistoon, mutta eihän niitä siellä pimeässä näe etsiä. Vitsillä on syvempikin merkitys, joka liittyy tieteellisen tutkimuksen tulosten tulkintaa vinouttavaan katuvalovaikutukseen (streetlight effect). Sillä tarkoitetaan vastausten etsimistä alueelta, jolla erotuskyky on hyvä, vaikka tiedetään tutkittavan ilmiön puuttuvan valokeilasta.

Reduktionistisilla solulinjoilla toteutettu syöpätutkimus säilyttää paikkansa tulevaisuudessa, mutta uudet syöpätutkimuksen kudosisviljelymallit tuovat tutkimuksen valokeilaan ilmiöitä, joita ei ole aiemmin voitu suoraan tutkia. Tässä katsauksessa olemme esittäneet, että varsinkin potilaasta lähtöisin oleva elävä kasvainmateriaali avaa uusia näkymiä yksilöl-

listen hoitojen testaamiseen ja kehittämiseen. Tulevaisuudessa eksplantaattikasvatuksia voidaan ehkä tuottaa leikatun primaarikasvaimen ja biopsioiden lisäksi myös potilaan verinäytteestä kalastetuista kiertävistä kasvainsoluista, jolloin saataisiin informaatiota esimerkiksi metastoittaisen syövän ominaispiirteistä (32).

Toisaalta rintasyövän etäpesäkkeiden geenien ilmentymisprofiili on osin sen mukainen, mihin kohdekudokseen syöpäsolut ovat vaelanneet (33). Tämän vuoksi yksi tulevaisuuden haaste on oppia mallintamaan etäpesäkkeiden kohteena olevien kohdekudosten erityispiirteitä. PDEC-viljelmissä majailevat mikroympäristön, etenkin immuunipuolustuksen solut tarjoavat houkuttavia mahdollisuuksia selvittää, kuinka aktivoida työn väsyttämää immuunipuolustusta (exhausted immune cells).

Immuunihoito on yksi lupaavimmista syövän hoitomuodoista, mutta syövällä näyttäisi olevan keinonsa karata tältäkin hoitomuodolta. Im-

muunihoidon yhdistäminen täsmälääkkeisiin voi kuitenkin osoittautua keinoksi ajaa syöpä ahtaalle (34). Jos pystymme samanaikaisesti selvittämään viljelyolosuhteissa uusien täsmälääkityksen ja immuunihoidon yhdistelmien vaikutuksia sekä syöpäkudokseen että syöpään tunkeutuneiden TIL-solujen (tumor infiltrating lymphocytes) aktiivisuuteen, saatamme löytää hoitomuotoja, jotka tuhoavat syöpäkudosta ilman immunosuppressiivisia vaikutuksia.

Tie uusiin syöpätutkimuksen läpimurtoihin ei kuitenkaan käy yksinomaan uusien syöpämallien kautta, vaan oleellista on PDEC-malleja hyödyntävän projektin aikana tapahtuva yhteistyö ja tiedonkulku sairaalan ja tutkimuslaitoksen välillä. Potilaista peräisin olevan kasvainkudoksen hyödyntäminen uusien lääkevasteita ennustavien biomarkkereiden löytämiseksi tarjoaa esimerkiksi erinomaisen liitännäisohjelman adaptiiviseen kliniseen lääketutkimukseen (35). ■

PAULIINA M. MUNNE, FT, post doc -tutkija

MARIEL SAVELIUS, biotekniikan maisteriopiskelija

IIRIS JUOPPERI, lääketieteen opiskelija

IIRIS RÄTY, lääketieteen opiskelija

JUHA KLEFSTRÖM, tutkimusjohtaja

Lääketieteellinen tiedekunta, tutkimusohjelmayksikkö,
translationaalisen syöpäbiologian tutkimusohjelma,
Helsingin yliopisto

SIDONNAISUUDET

Pauliina Munne, Mariel Savelius, Iiris Juopperi, Iiris Räty:

Ei sidonnaisuuksia

Juha Klefström: Apuraha (Orion Pharma, AbbVie), luento-/asiantuntijapalkkio (Orion Pharma, Biomedicum Genomics)

SUMMARY

3D models in cancer research

Traditional two-dimensional cell line cultures are the oldest and still the most commonly used method in cancer research. However, the cell culture as a preclinical model of cancer has been criticized for its poor predicting capability of the drug responses in clinical trials. Patient-derived tumor explant cultures (PDEC) offer a new intriguing advancement over traditional two-dimensional clonal cancer cell cultures. PDECs are cultured in three-dimensional matrices, instead of petri dish, to preserve the cellular heterogeneity and cellular contacts with other cells and the extracellular matrix. These new tumor explant models are expected to be more authentic than petri dish cultures with regards to molecular mechanisms of cancer and the personalized drug responses. Here, we discuss the strengths and weaknesses of new 3D culture methods, including PDECs, in cancer research and drug discovery.

KIRJALLISUUTTA

1. Sato S, Rancourt A, Sato Y, Satoh MS. Single-cell lineage tracking analysis reveals that an established cell line comprises putative cancer stem cells and their heterogeneous progeny. *Sci Rep* 2016;6:23328.
2. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells – what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:497–512.
3. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013;19:1423–37.
4. Klefström J. Miksi syöpä leviää, voiko sitä estää? *Duodecim* 2012;128:1830–2.
5. Arrowsmith J. Trial watch: phase II failures: 2008–2010. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:328–9.
6. Printz C. Failure rate: why many cancer drugs don't receive FDA approval, and what can be done about it. *Cancer* 2015;121:1529–30.
7. Collier R. Rapidly rising clinical trial costs worry researchers. *CMAJ* 2009;180:277–8.
8. Stand Up To Cancer. Entertainment Industry Foundation (EIF). www.standup2cancer.org.
9. Caliri SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods* 2016;13:405–14.
10. Cheung K J, Padmanaban V, Silvestri V, ym. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:E854–63.
11. Orkin RW, Gehron P, McGoodwin EB, ym. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* 1977;145:204–20.
12. Abberton K M, Bortolotto S K, Woods AA, ym. Myogel, a novel, basement membrane-rich, extracellular matrix derived from skeletal muscle, is highly adipogenic in vivo and in vitro. *Cells Tissues Organs* 2008;188:347–58.
13. Salo T, Sutinen M, Hoque Apu E, ym. A novel human myoma tissue derived matrix for cell culture studies. *BMC Cancer* 2015;15:981.
14. Partanen JI, Nieminen AI, Mäkelä TP, ym. Suppression of oncogenic properties of c-Myc by LKB1-controlled epithelial organization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:14694–9.
15. Halpern B, Pejsachowicz B, Febvre HL, ym. Differences in patterns of aggregation of malignant and non-malignant mammalian cells. *Nature* 1966;209:157–9.
16. Inch WR, McCredie JA, Sutherland RM. Growth of nodular carcinomas in rodents compared with multi-cell spheroids in tissue culture. *Growth* 1970;34:271–82.
17. Weiswald LB, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 2015;17:1–15.
18. Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 2011;17:320–9.
19. Streuli CH, Bailey N, Bissell HJ. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell–cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol* 1991;115:1383–95.
20. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74.
21. Debnath J, Brugge JS. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat Rev Cancer* 2005;5:675–88.
22. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, ym. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009;459:262–5.
23. Willyard C. The boom in mini stomachs, brains, breasts, kidneys and more. *Nature* 2015;523:520–2.
24. Butcher D T, Alliston T, Weaver VM. A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2009;9:108–22.
25. Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. *Exp Biol Med* 1906;4:140–3.
26. Fell HB, Robison R. The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated in vitro. *Biochem J* 1929;23:767–84.
27. Trowell OA. The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp Cell Res* 1959;16:118–47.
28. Saxén L. The effect of tetracyclin on osteogenesis in vitro. *J Exp Zool* 1966;162:269–94.
29. Davies EJ, Dong M, Gutekunst M, ym. Capturing complex tumour biology in vitro: histological and molecular characterisation of precision cut slices. *Sci Rep* 2015;5:17187.
30. Nurmenniemi S, Sinikumpu T, Alahuhta I, ym. A novel organotypic model mimics the tumor microenvironment. *Am J Pathol* 2009;175:1281–91.
31. Horch RE, Kopp J, Beier J, ym. Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med* 2005;9:592–608.
32. Yu M, Bardia A, Aceto N. Cancer therapy. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science* 2014;345:216–20.
33. McBryan J, Fagan A, McCartan D, ym. Transcriptomic profiling of sequential tumors from breast cancer patients provides a global view of metastatic expression changes following endocrine therapy. *Clin Cancer Res* 2015;21:5371–9.
34. Kersten K, de Visser KE, van Miltenburg MH. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol Med* 2017;9:137–53.
35. Tenhunen O, Turpeinen M, Kurki P. Kliinisen lääketutkimuksen uudet tutkimusasetelmat. *Duodecim* 2017;133:599–605.