

Jouni Härkönen ja Juha Väyrynen

Immuunisolujen arviointi kasvainnäytteistä

Kasvaimen immuunimikroympäristön arviointi on tärkeää syövän ennusteen määrittämisessä ja hoitopäätösten tukena, etenkin immuunihoitojen yleistyessä. Arvioinnissa olennaisia piirteitä ovat immuunisolujen määrä, koostumus, toiminnallinen tila ja sijainti suhteessa kasvainsoluihin. Käytettävissä olevat menetelmät vaihtelevat hematoksyliini-eosiinivärjättyjen leikkeiden visuaalisesta arviosta immunohistokemiaan, monivärjäysmenetelmiin, spatiaaliseen proteomiikkaan, geeniekspressiopohjaiseen analytiikkaan sekä yksisolutason ja spatiaalisiin transkriptomiikkamenetelmiin. Kliinisessä käytössä vakiintuneimpia ovat PD-L1-immunohistokemia ja kasvaimen infiltroivien lymfosyyttien arviointi. Esimerkiksi Immunoscore ja uudemmat spatiaaliset menetelmät tarjoavat nykyiseen diagnostiikkaan nähden monipuolisempaa biologista tietoa, mutta niiden laajaa käyttöönottoa rajoittavat standardointiin, kustannuksiin, aineistojen analyysiin ja kliiniseen validointiin liittyvät haasteet.

Kasvaimen ja immuunijärjestelmän vuorovaikutus on yksi syöpäbiologian keskeisistä tutkimuskohteista (1,2). Immuunimuovusteorian mukaisesti immuunijärjestelmä vaikuttaa syövän kehitykseen kaksijakoisesti: se tunnistaa ja tuhoaa kasvainsoluja mutta suosii samalla sellaisten solukloonien säilymistä, jotka kestävät immuunipuolustuksen vaikutuksia (1). Lisäksi tietyt tulehdusmekanismit voivat luoda syövän kehittymistä ja etenemistä tukevia olosuhteita (2). Kasvainalueen immuunisolukon koostumus, toiminnallinen tila ja sijainti vaikuttavat merkittävästi taudinkulkuun ja hoitovasteeseen (3). Ennusteellinen eli prognostinen biomarkkeri antaa tietoa taudinkulusta, kun taas predikttiivinen biomarkkeri ennustaa tietystä hoidosta saatavaa hyötyä.

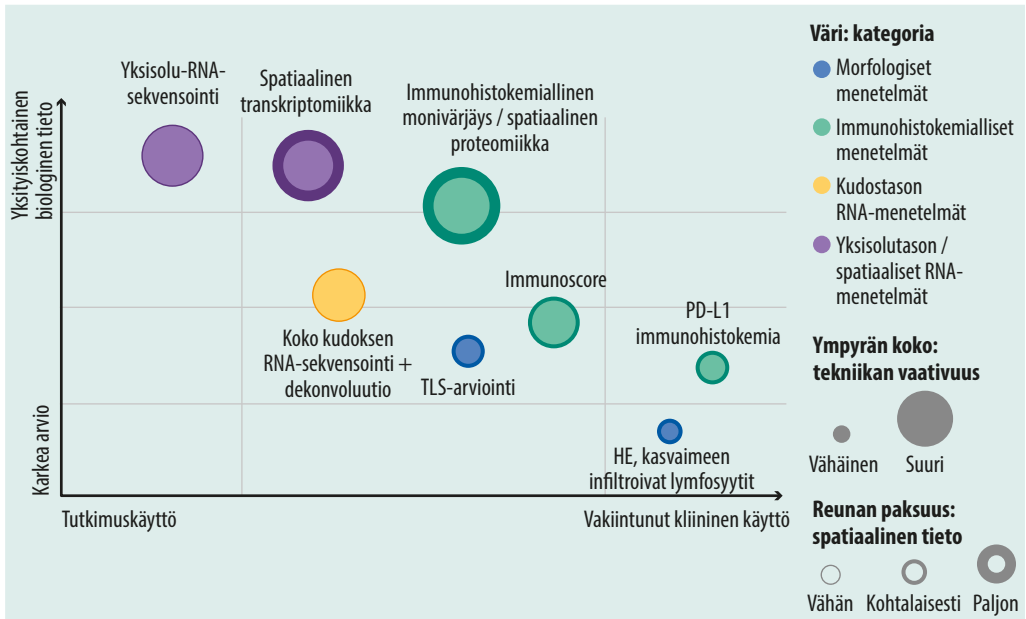
Immuunihoitojen, erityisesti immuunivahvistuksen vapauttajien, kuten PD-1- ja PD-L1-vasta-aineiden, nopea yleistyminen on lisännyt tarvetta luotettaville menetelmille, joilla kasvainnäytteiden immuunisolukkoa voidaan arvioida (4). Käytettävissä olevien menetelmien valikoima on laaja (kuva 1). Yksinkertaisimmillaan lymfosyyttien määrää arvioidaan silmämääräisesti hematoksyliini-eosiinivärjätystä leikkeistä (HE), kun taas edistyneimmät menetelmät mahdollistavat tuhansien geenien

tai kymmenien proteiinien samanaikaisen analyysin yksittäisen solun tasolla, niin että kudoksen rakenne säilyy. Tarkastelemme keskeisiä menetelmiä niiden kliinisen käyttövalmiuden näkökulmasta ja arvioimme niiden soveltuvuutta diagnostiseen työhön.

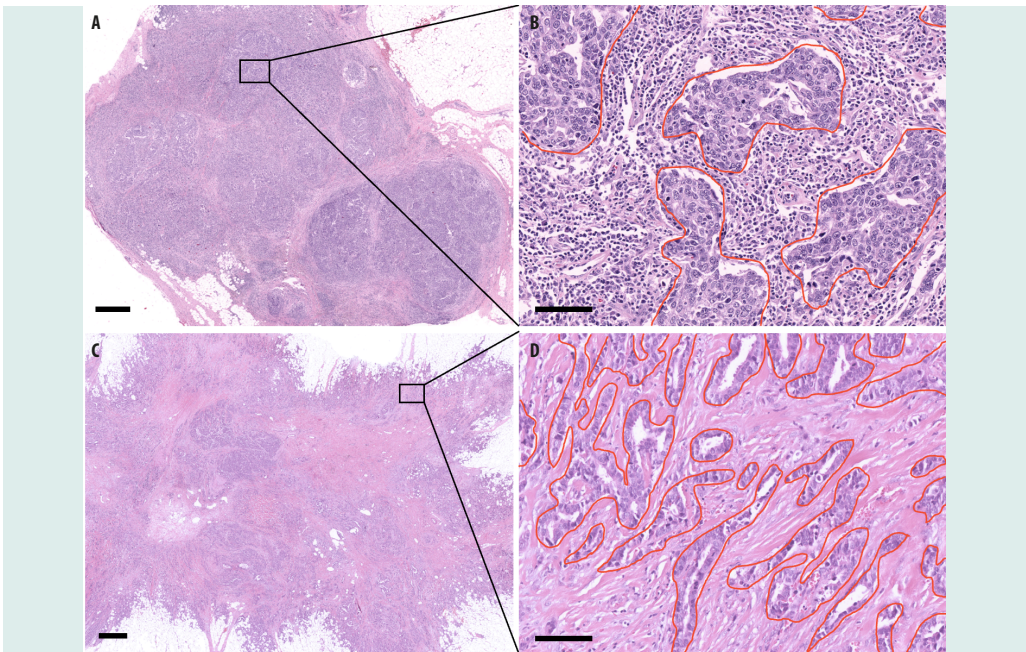
Lymfosyyttien arviointi HE-leikkeistä

Kasvaimen infiltroivien lymfosyyttien (tumor-infiltrating lymphocytes, TIL) arviointi HE-värjätystä leikkeistä on yksinkertainen ja edullinen tapa arvioida kasvaimen immuunimikroympäristöä, sillä se ei vaadi lisävärjäyksiä tai erityislaitteistoa. International TILs Working Group julkaisi vuonna 2014 rintasyöpää koskevan standardoidun arviointimenetelmän (5). Siinä kasvaimen strooman lymfosyytit (sTIL) arvioidaan jatkuvana muuttujana prosenttiosuutena invasiivisen kasvaimen stroomasta (kuva 2). Arvioinnista jätetään pois muun muassa nekroosialueet sekä aiemmat biopsiakohdat.

ESMO:n (European Society for Medical Oncology) uusimmissa hoito-ohjeissa vuodelta 2024 TIL-arvioinnin ennustearvosta kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä (TNBC) katsotaan olevan vahvaa tutkimusnäyttöä (6). Hoitopä-



KUVA 1. Kasvaimen immuunimikroympäristön arviointimenetelmät. Kuvassa havainnollistetaan kasvainnäytteiden immuunisolukon arviointiin käytettäviä menetelmiä suhteessa niiden kliiniseen vakiintuneisuuteen ja tuotetun biologisen tiedon yksityiskohtaisuuteen. HE- (hematoksiliini-eosiinivärjäys) ja immunohistokemiapohjaiset menetelmät ovat kliinisessä käytössä vakiintuneimpia, kun taas uudemmat spatiaaliset ja yksisolutason menetelmät tuottavat tarkempaa biologista tietoa mutta ovat toistaiseksi pääosin tutkimuskäytössä. Värit kuvaavat menetelmäryhmiä, symbolien koko teknistä vaativuutta ja reunan paksuus spatiaalisen tiedon määrää. TLS = tertiäriset lymfoidiset rakenteet



KUVA 2. Kasvaimeen infiltroivien lymfosyyttien arviointi HE-leikkeestä. Rintasyövässä kasvaimeen infiltroivat lymfosyytit arvioidaan prosenttiosuutena invasiivisen kasvaimen stroomasta (sTIL). Kuvissa esitetään kaksi kolmoisnegatiivista duktaalista invasiivista karsinoomaa TCGA (The Cancer Genome Atlas) -aineistosta. **A, B.** Runsaasti lymfosyyttejä sisältävä kasvain, sTIL noin 70 % (TCGA-BH-A1FC). **C, D.** Niukasti lymfosyyttejä sisältävä kasvain, sTIL alle 5 % (TCGA-BH-A1EW). Punaisella rajatut kasvainepiteelialueet jätetään arvioinnin ulkopuolelle. Mitat: A ja C, 1 mm; B ja D, 100 µm.

töksiä ohjaavia selkeitä raja-arvoja ei kuitenkaan ole tunnistettu, ja TIL-arvioinnin merkitys on ensisijaisesti prognostinen. Yhdeksän tutkimuksen (2148 TNBC-potilasta) yhdistetyssä analyysissä jokainen kymmenen prosenttiyksikön lisäys sTIL-määrässä oli yhteydessä 16 %:n pienempään kokonaiskuolleisuuden vaaraan seuranta-aikana (HR 0,84; 95 %:n LV 0,79–0,89) (7). Myös HER2-positiivisessa rintasyövässä suuri TIL-määrä liittyy parempaan hoitovasteeseen ja ennusteeseen, mutta arviointi ei vielä ohjaa hoidonvalintaa predikttiivisenä biomarkerina. Esimerkiksi ShortHER-tutkimuksen kymmenen vuoden seuranta-analyysissä varhaisessa HER2-positiivisessa rintasyövässä (866 potilasta) vähintään 20 %:n sTIL-määrä näytti tunnistavan potilasryhmän, jossa liittännäishoidon keventäminen ei lisännyt etäusuutuman tai kuoleman riskiä (8). Estrogeenireseptoripositivisessa rintasyövässä TIL-määritysten kliininen merkitys on sen sijaan epävarmempi. Arvioinnin rajoitteita ovat havainnoitsijoiden välinen vaihtelu sekä HE-värjäyksen rajallinen kyky erotella lymfosyyttien alaryhmiä toisistaan. Tietokoneavusteisten kuva-analyysimenetelmien on raportoitu parantavan arvioinnin toistettavuutta (9), mutta niiden kliininen validointi on vielä kesken.

Vastaavia lymfosyyttien ja muiden immuunisolujen arviointimenetelmiä on kuvattu myös muissa kiinteissä kasvaimissa, kuten melanoomassa, keuhkosyövässä ja paksusuolisyövässä (käsittää myös peräsuolisyövän) (4). Esimerkiksi paksusuolisyövässä invaasiorintaman tulehdusreaktiota arvioiva Klintrup–Mäkinen-pisteytys on lukuisissa takautuvissa tutkimuksissa osoittautunut tavallisista ennusteparametreista riippumattomaksi ennustetekijäksi (10). Etenevä näyttö on kuitenkin toistaiseksi vähäistä, ja menetelmän asema kliinisessä päätöksenteossa on vielä epäselvä.

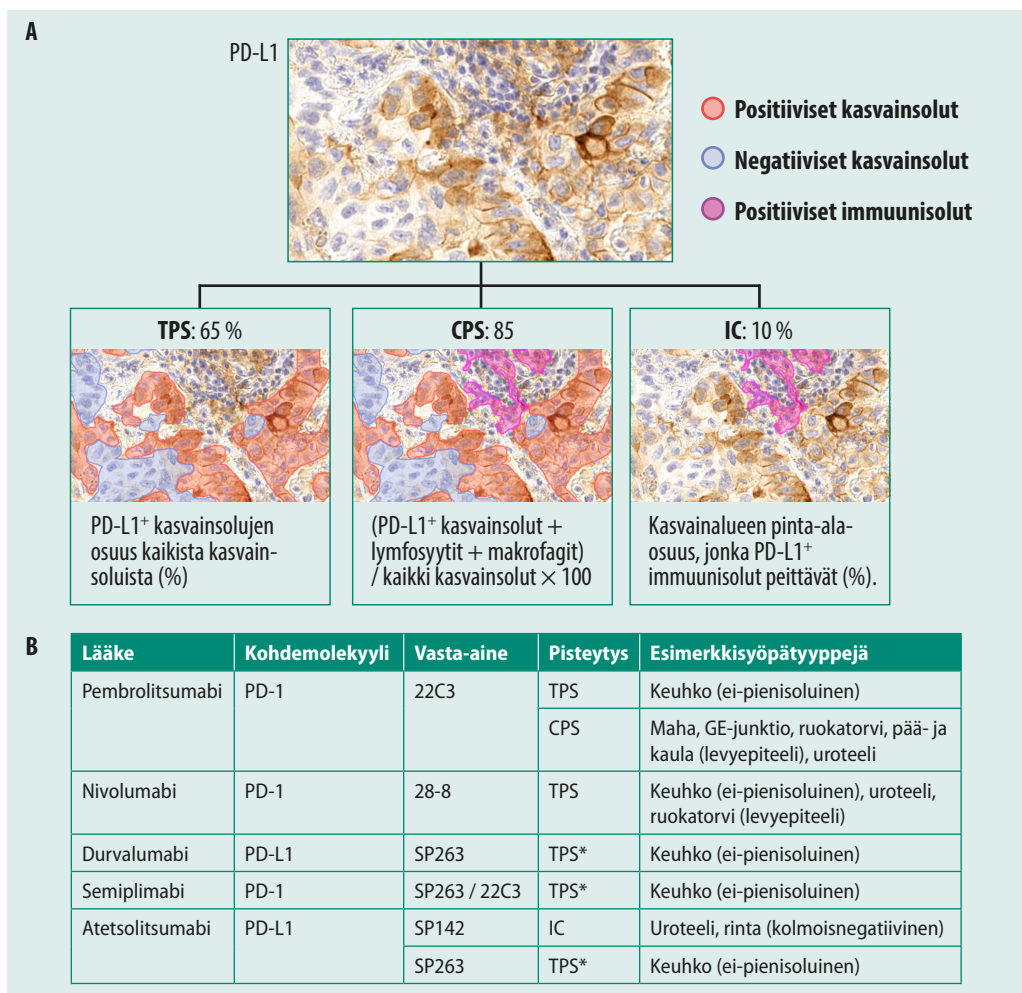
PD-L1-immunohistokemia

PD-L1-proteiinin immunohistokemiallinen määrittäminen on tällä hetkellä kliinisesti laajimmin käytetty yksittäinen immuunihoitoon liittyvä predikttiivinen biomarkeritutkimus. Proteiinia ilmenee vaihtelevasti sekä kasvain- että immu-

nisoluissa, etenkin makrofageissa. PD-L1-ilmenemisen arviointi ohjaa immuuniaktivaation vapauttajahoitojen valintaa useissa syöpätyypeissä kuten ei-pienisoluisessa keuhkosyövässä, maha-ruokatorvisyövässä, kolmoisnegatiivisessa rintasyövässä, pään ja kaulan levyepiteelikarsinoomassa sekä uroteelikarsinoomassa (11).

Menetelmän monimutkaisuutta lisää eri immuuniaktivaation vapauttajahoitoihin liittyvä vasta-ainekloonien ja pisteytysjärjestelmien vaihtelu (KUVA 3). Neljästä yleisimmin käytetystä kloonista (22C3, 28-8, SP142 ja SP263) kukin on alun perin validoitu tietyn immuunihoitolääkkeen yhteydessä (11). TPS-pisteytys (tumor proportion score), jossa huomioidaan vain kasvainsolujen PD-L1-värjäytyminen, on käytössä erityisesti keuhkosyövässä (11,12). CPS-pisteytyksessä (combined positive score) huomioidaan myös kasvaimeen liittyvät lymfosyytit ja makrofagit. Sitä käytetään muun muassa maha-ruokatorvisyövässä (11). IC (immune cells) -pisteytys perustuu vain immuunisolujen PD-L1-ilmenemiseen, ja sitä käytetään esimerkiksi uroteelikarsinoomassa (11). Pisteytys ei sinänsä määrää, käytetäänkö PD-1- vai PD-L1-vasta-ainetta, vaan määrittäminen menetelmä, pisteytysjärjestelmä ja raja-arvo ovat lääke-, syöpätyyppi- ja hoitoaihekohtaisia.

Pisteytettävän solukon lisäksi myös raja-arvot vaihtelevat syöpätyypin ja lääkkeen mukaan. Blueprint-vertailututkimuksessa osoitettiin, että kloonit 22C3, 28-8 ja SP263 antavat kasvainsoluvärjäyksessä pääosin samankaltaiset tulokset, mutta immuunisolujen arvioinnissa erot ovat suurempia (12). Vaihtelua voi esiintyä myös eri patologioiden tulkinnan välillä (13). Kansainväliset immunohistokemian laadunarviointiohjelmat kuten NordiQC ovat parantaneet menetelmien toistettavuutta. Tästä huolimatta immunohistokemiallinen PD-L1-määrittäminen on epätäydellinen biomarkeri, sillä vasteita nähdään myös PD-L1-negatiivisissa kasvaimissa, eikä PD-L1-positiivisuus ennusta hyötyä kaikilla potilailla (11). Tietokoneavusteinen kuva-analyysi voi parantaa PD-L1-arvioinnin yhdenmukaisuutta ja toistettavuutta sekä tukea patologin tulkintaa. PD-L1-määrittäminen rinnalla tutkitaan myös muita biomarkkereita, kuten kasvaimeen infiltroivia lymfosyyttejä, kasvaimen mutaatio-



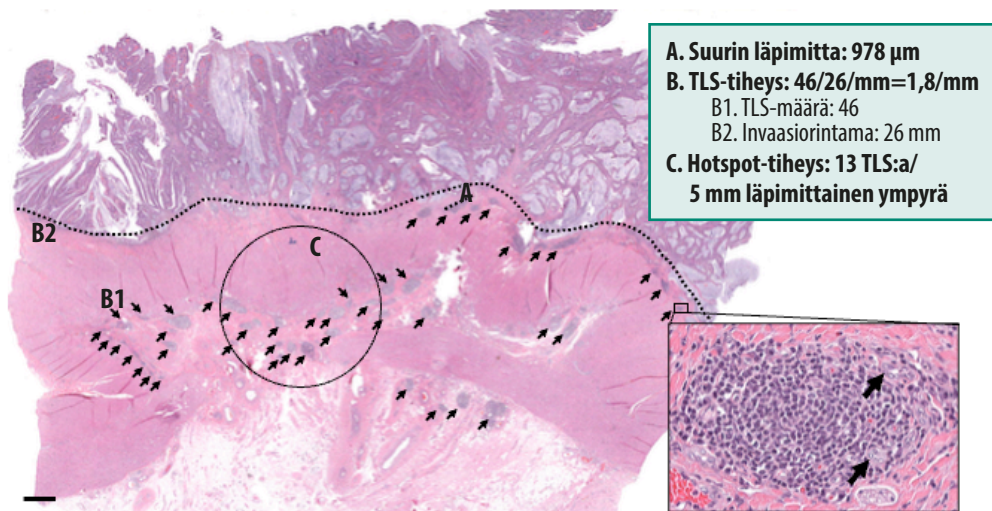
KUVA 3. PD-L1-immunohistokemian pisteytysperiaatteet. PD-L1-immunohistokemian tulkinta perustuu lääke-aineen, syöpätyypin ja hoitoaiheen mukaan eri vasta-ainekloonien ja pisteytysjärjestelmiin. **A.** Esimerkkikuvis-
sa havainnollistetaan TPS-pisteytystä (tumor proportion score), CPS-pisteytystä (combined positive score) ja IC
(immune cells) -pisteytystä. **B.** Esimerkkejä eri syöpätyypeissä käytettävistä lääkeaineista kohdemolekyylineen,
vasta-ainekloonien ja pisteytysjärjestelmistä. *Vasta-ainekloonien SP263 ja SP142 yhteydessä TPS-tyyppisestä
pisteytyksestä käytetään usein lyhennettä TC (tumor cells).

kuormaa ja geeniekspressioprofiileja. Näiden yhdistäminen saattaa ennustaa hoitovastetta yksittäistä biomarkkeria tarkemmin (14).

Immunoscore – standardoitu T-solujen määrän mittaus paksusuolisyövässä

Immunoscore on immunohistokemiaan ja digitaaliseen patologiaan perustuva kvantitatiivinen menetelmä, joka on kehitetty erityisesti paksusuolisyövän ennusteen arviointiin (15,16). Menetelmässä määritetään CD3- ja CD8-positiivisten T-lymfosyyttien tiheys (soluja/mm²) kasvaimen keskialueelta ja invaasioreunalta. Automaattinen kuva-analyysi tuottaa neljä tiheyslukua kahdesta solutyypistä kahdelta alueelta. Nämä muunnetaan ennalta määritettyihin viitejakaumiin suhteutetuiksi persentileiksi, joiden keskiarvo muodostaa Immunoscoren (15).

Menetelmä on validoitu kansainvälisessä monikeskustutkimuksessa, jossa 14 keskusta 13 maasta arvioi 2 681 levinneisyysasteen I–III paksusuolisyöpänäytettä (15). Suuri Immunoscore oli yhteydessä merkitsevästi pienempään uusiutumisriskiin (HR 0,31; 95 %:n LV 0,23–



KUVA 4. Tertiääristen lymfoidisten rakenteiden (TLS) arviointi. TLS-rakenteet ovat imusolmukkeita muistuttavia organisoituneita immuunisolu-kertymiä, joita voidaan tunnistaa HE-leikkeestä ja tarvittaessa varmistaa immunohistokemiallisesti. Kuvassa havainnollistetaan TLS-rakenteita paksusuolisyövässä (The Cancer Genome Atlas -aineiston (TCGA) tapaus TCGA-CM-6674) sekä niiden määrän, tiheyden ja koon arviointia. Lähikuvassa nähdään yksittäinen TLS. Yleiskuvan nuolet osoittavat kunkin TLS-rakenteen ja lähikuvassa ne osoittavat suuriendoteelisiä suonirakenteita (high endothelial venules), jotka mahdollistavat lymfosyyttien siirtymisen verenkierrosta kudokseen. Mittajana 1 mm.

0,41), ja sen suhteellinen ennustemerkitys oli suurempi kuin TNM-levinneisyysluokituksen (15). Vuonna 2024 julkaistu yhdistetty analyysi 2 643 potilaan SCOT- ja IDEA-HORG-tutkimuksista vahvisti menetelmän ennustearvon levinneisyysasteen III paksusuolisyövässä (16). Lisäksi Immunoscore Biopsy on kansainvälisesti validoitu uusiutumisriskin arviointiin peräsuolisyövän aktiivisen seurannan strategiassa (17). Menetelmä on saatavilla kaupallisena IVD-testinä, mutta sillä ei ole vakiintunutta itsenäistä roolia hoidon valinnassa. Laajaa käyttöä rajoittavat lisäksi erityisohjelmiston ja laadunvarmistuksen vaatimukset sekä niihin liittyvät kustannukset.

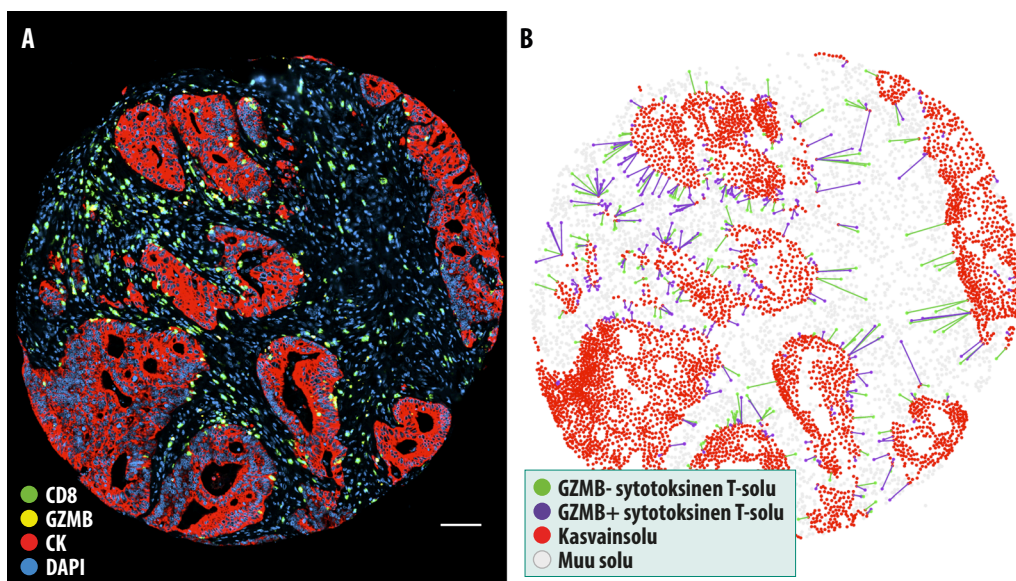
Tertiaariset lymfoidiset rakenteet

Tertiaariset lymfoidiset rakenteet (tertiary lymphoid structures, TLS) ovat imusolmukkeita muistuttavia organisoituneita immuunisolu-kertymiä eli imukeräsiä. Ne muodostuvat kasvaimen yhteyteen kroonisen tulehdusreaktion seurauksena (18). Niissä dendriittisolut voivat esitellä kasvaimen antigeeneja lymfosyyteille ja aktivoida paikallista adaptiivista

immuunivastetta. TLS-rakenteiden esiintyminen liittyy useissa syöpätyypeissä parempaan ennusteeseen, ja niiden mahdollista predikttiivista merkitystä immuunihoidoissa tutkitaan (19). Myös TLS-rakenteiden koostumus voi olla merkityksellinen, ja eräässä tutkimuksessa erityisesti kypsät, itukeskuksen sisältävät TLS-rakenteet ennustivat immuuniaktivaation vapauttajien tehoa PD-L1-ilmentymisestä riippumatta (20). TLS-rakenteet voidaan tunnistaa HE-leikkeestä tiheinä lymfosyyttikeräyminä, ja reaktion vahvuutta voidaan kuvata esimerkiksi suurimman imukeräsen läpimitalla tai imukerästen alueellisella tiheydellä (KUVA 4) (21). Lisäksi rakenteiden kypsyys voidaan vahvistaa immunohistokemiallisesti esimerkiksi CD20-, CD21- ja BCL6-värjäyksillä (18). Standardoittua arviointimenetelmää ei kuitenkaan toistaiseksi ole, mikä rajoittaa TLS-arvioinnin käyttöä kliinisenä biomarkerina.

Monivärjäysmenetelmät ja spatiaalinen proteomiikka

Tavanomainen immunohistokemia mahdollistaa yhden tai muutaman antigeenin arvioinnin



KUVA 5. Multiplex-immunofluoresenssin menetelmä solutyypin spatiaalisen sijainnin tarkassa arvioinnissa. A. Paksusuolisyövän kasvainsolut (sytokeratiini, CK) on merkitty punaisella, CD8 vihreällä, grantsyymi B (GZMB) keltaisella ja tumat (DAPI) sinisellä. Mittajana 100 µm. B. Saman näytteen solukohtainen analyysi, jossa kullekin sytotoksiseen T-solulle on määritetty lähin kasvainsolu. GZMB-negatiiviset sytotoksiset T-solut on merkitty vihreällä, GZMB-positiiviset violetilla, kasvainsolut punaisella ja muut solut harmaalla. Viivat osoittavat etäisyyden lähimpään kasvainsoluun. GZMB-positiivisten ja -negatiivisten sytotoksisten T-solujen erottelu havainnollistaa monivärjäysmenetelmän kykyä tunnistaa toiminnalliselta tilaltaan erilaisia solupopulaatioita. GZMB:n ilmentymisen liittyä sytotokseen toimintaan, mutta erottelulla ei ole vakiintunutta diagnostista merkitystä.

kerrallaan. Immunohistokemiallisilla monivärjäysmenetelmillä voidaan puolestaan tunnistaa samasta kudosteikasta useita merkkiaineita yhden solun tarkkuudella (22). Spatiaalinen proteomiikka kattaa nämä menetelmät, joissa proteiinien ilmentyminen yhdistetään niiden sijaintitietoon kudoksessa (23). Menetelmien avulla voidaan arvioida immuunisolujen määrän lisäksi niiden toiminnallista tilaa ja sijaintia suhteessa kasvainsoluihin. Tätä havainnollistaa **KUVA 5**, jossa tunnistetaan sytotoksisia T-soluja ja mitataan niiden etäisyyttä lähimpiin kasvainsoluihin. Immuunisolujen sijainti voi sisältää ennustetietoa pelkkien solumäärien lisäksi. Esimerkiksi paksusuolisyövässä T-solujen sijainti kasvainsolujen läheisyydessä on ollut yhteydessä ennusteeseen T-solutiheydestä riippumatta (24). Kasvaimen immuunimikroympäristön arvioinnissa monivärjäysmenetelmät ja spatiaalinen proteomiikka eivät vielä kuulu rutiinidiagnostiikkaan eivätkä ohjaa hoidon valintaa. Käyttöönottoa rajoittavat kalliit kustannukset, standardoinnin puute ja suuren tietomäärän analyysin vaatavuus (22).

RNA-pohjainen immuunisoluprofilointi

Massiivista rinnakkaissekvensointia käytetään kudostiagnostiikassa laajasti kasvainten mutaatioiden määrittämiseen. RNA-pohjaiset menetelmät mahdollistavat kuitenkin diagnostisesti tärkeiden geenifuusioiden määrittämisen lisäksi kudoksen solukoostumuksen arvioinnin (25).

Dekonvoluutiomenetelmät. Koko kudoksen RNA-sekvensointidata sisältää tietoa kaikista kudoksen RNA:ta ilmentävistä soluista. Dekonvoluutioalgoritmeilla tästä yhteissignaalista voidaan arvioida eri solupopulaatioiden suhteellisia osuuksia tunnettujen solutyypikohtaisten geeniekspressioprofilien perusteella (26,27). Menetelmien käyttö rajoittuu pääosin tutkimukseen, eikä niitä sovelleta rutiinidiagnostiikassa tai hoitopäätöksissä. **KUVASSA 6A** esitetään suosituksen koneoppimiseen perustuvan CIBERSORT-menetelmän avulla TCGA (The Cancer Genome Atlas) -aineiston paksusuolisyöpänäytteistä ennustetut solupopulaatio-profiilit. Samalla perusperiaatteella toimivia

malleja on nykyisin lukuisia. Dekonvoluutiomenetelmien etu on mahdollisuus analysoida kustannustehokkaasti suuria aineistoja (26).

KUVASSA 6B esitetään CIBERSORT-menetelmällä TCGA-aineistossa arvioitujen makrofagifenotyyppien yhteys paksusuolisyövän ennusteeseen, mikä on linjassa aiemman tutkimustiedon kanssa (28). **KUVASSA 6C** esitetään kahden esimerkinäytteen estimoidut immuunisoluprofiilit ja niiden vastaavat HE-kuvat. Esimerkki havainnollistaa, kuinka dekonvoluutiomenetelmät voivat tuottaa hyödyllistä tietoa, kun karkea arvio riittää. Tarkempi analyysi, kuten solunsisäisten signalointireittien tarkastelu, harvinaisten solupopulaatioiden tunnistaminen tai solujen sijainnin tarkka arviointi kudoksessa, edellyttää kuitenkin suuremman resoluution menetelmiä.

Yksittäisten solujen RNA-sekvensointi on keskeinen menetelmä kudoksen tarkan soluprofiilin tutkimisessa (29). Menetelmässä kudos hajotetaan yksittäisiksi soluiksi. Solujen RNA-molekyylit käänteiskopioidaan ja merkitään soluviivakoodilla, joiden avulla sekvenssit voidaan myöhemmin yhdistää oikeaan lähtösoluun (29). Näin saadaan solukohtaista tietoa tuhansien geenien ilmentymisestä. **KUVASSA 7A–C** havainnollistetaan solutyyppien tunnistamista ja merkkigeenien ilmentymistä. Sekvensointikustannusten pieneneminen on mahdollistanut menetelmän laajamittaisen tutkimuskäytön. Samalla analyysimenetelmät ovat monipuolistuneet. Niillä voidaan esimerkiksi arvioida solujenvälistä signalointia ja mallintaa matemaattisesti, miten geenien ilmentyminen vaikuttaa solujen fenotyyppiin (30–32). Yksittäisten solujen RNA-sekvensoinnin keskeinen rajoite on kudoksen rakenteen ja solujen sijaintitiedon häviäminen näytteen käsittelyssä. Menetelmä on tällä hetkellä tutkimuskäytössä, ja mahdollinen tuleva potilashyöty liittyy uusien biomarkkereiden, lääkehoidon kohteiden ja hoitovasteeseen vaikuttavien solupopulaatioiden tunnistamiseen.

Spatiaaliset transkriptomiikkamenetelmät. Spatiaalinen transkriptomiikka yhdistää geenien ilmenemistä koskevan tiedon kudoksen rakenteeseen (33). Sekvensointipohjaiset menetelmät, kuten Visium ja Visium HD,

Ydinasiat

- » Kasvaimen immuunimikroympäristön arvioinnissa yksinkertaiset histologiset menetelmät ovat edelleen kliinisessä käytössä vakiintuneimpia.
- » PD-L1-immunohistokemia on immuoterapian kannalta tärkein vakiintunut biomarkeritutkimus.
- » Kasvaimeen infiltroivien lymfosyyttien arviointi antaa ennustetietoa erityisesti kolmoisnegatiivisessa ja HER2-positiivisessa rintasyövässä.
- » Spatiaalinen proteomiikka ja transkriptomiikka syventävät käsitystä immuunisolujen sijainnista ja toiminnallisista tiloista.
- » Yksikään menetelmä ei yksin kuvaa kattavasti kasvaimen immuunimikroympäristöä, vaan eri menetelmät täydentävät toisiaan.

mahdollistavat laajan transkriptomisen analyysin, mutta niiden solukohtainen erottelukyky vaihtelee. Teknologiat perustuvat viivakoodattuihin alueisiin, joiden avulla sekvensoidut RNA-transkriptit voidaan kohdistaa niiden alkuperäiseen spatiaaliseen sijaintiin kudoksessa. Visium HD:n resoluutio lähestyy yhden solun tarkkuutta. Solukohtainen tulkinta riippuu kuitenkin edelleen solujen laskennallisesta segmentoinnista (33). Kvantamisopohjaiset menetelmät, kuten Xenium ja CosMx, voivat saavuttaa yhden solun tai jopa solunsisäisen tarkkuuden, mutta analyysi kohdistuu rajatun paan geenijoukkoon (33).

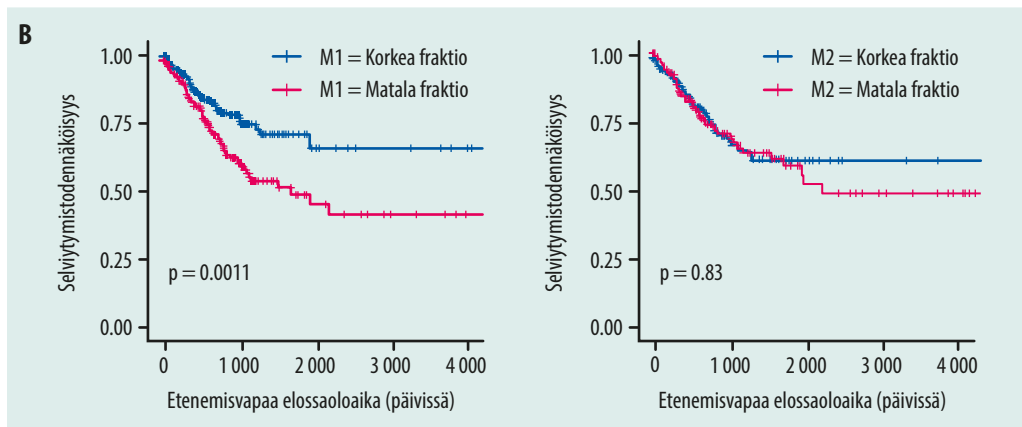
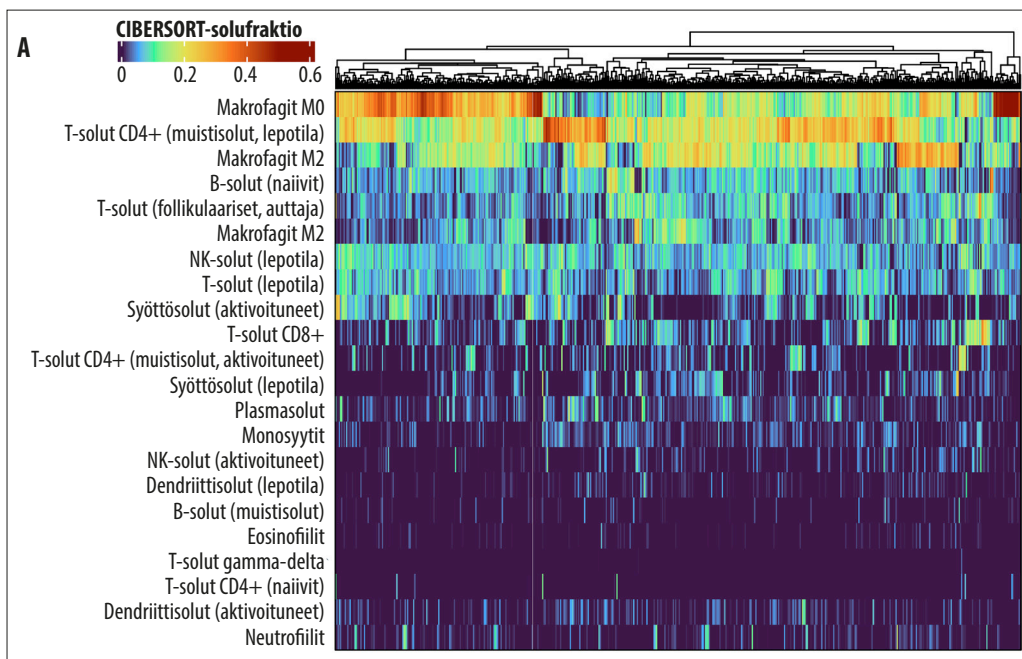
Spatiaalista transkriptomiikkaa havainnollistava analyysi eri solujen merkkigeenien sijoittumisesta paksusuolen kasvainkudoksessa esitetään **KUVASSA 7D**. Spatiaalinen transkriptomiikka voi auttaa tunnistamaan solujen sijaintiin ja vuorovaikutuksiin perustuvia biomarkkereita, joita ei voida havaita koko kudoksen RNA-sekvensoinnilla tai yksittäissolusekvensoinnilla. Yksittäissolusekvensoinnin etuna on parempi transkriptien havaitsemisherkkyys, kun taas

spatiaalinen transkriptomiikka säilyttää kudoksen sijaintitiedon. Menetelmät voivat siten täydentää toisiaan (34). Spatiaalisen transkriptomiikan kliininen soveltaminen on kuitenkin vielä varhaisessa vaiheessa, ja nykyinen merkitys liittyy ensisijaisesti uusien spatiaalisten biomarkkereiden tunnistamiseen ja kasvaimen biologian tutkimiseen.

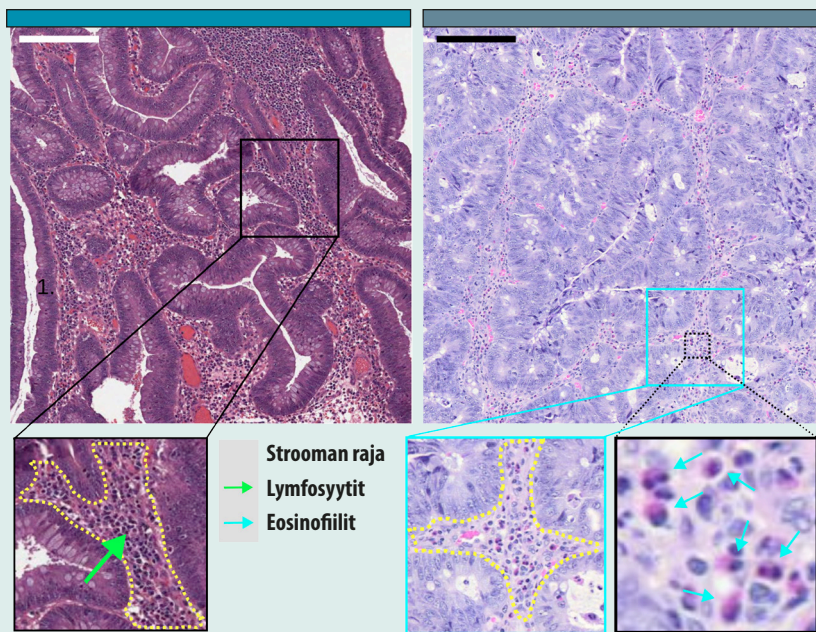
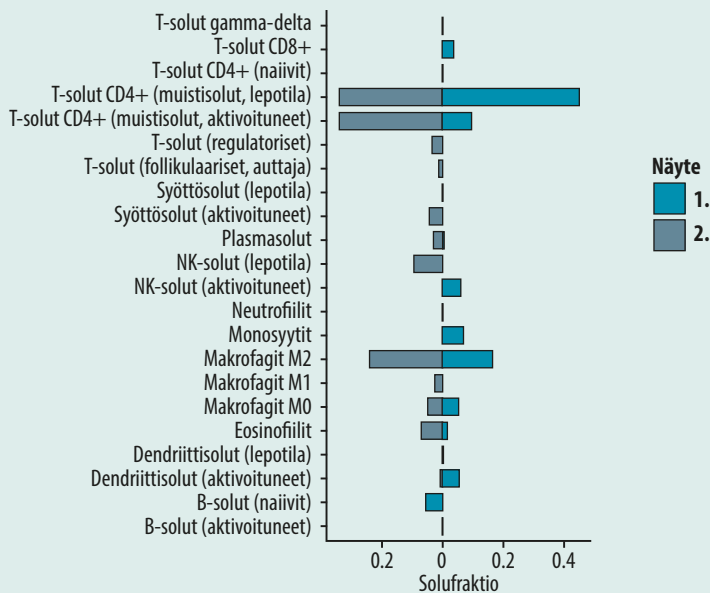
Lopuksi

Kasvainnäytteiden immuunisolukon arviointiin on käytettävissä laaja ja nopeasti kehittyvä

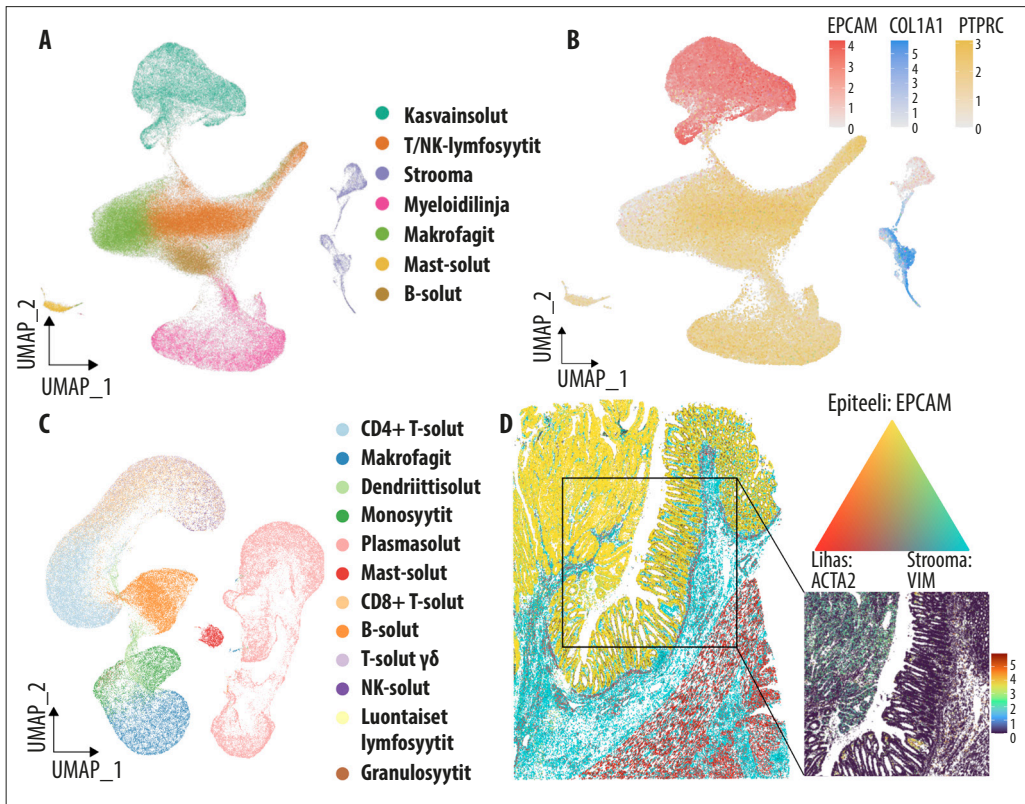
menetelmävalikoima, joka ulottuu rutiinikäytössä olevista HE- ja immunohistokemiamenetelmistä tutkimuslaboratorioiden spatiaalisiin multiomiikkamenetelmiin. PD-L1-immunohistokemia on kliinisessä käytössä vakiintunein immunoterapiaan liittyvä prediktivinen biomarkeritutkimus. TIL-arvioinnin prognostinen arvo on osoitettu erityisesti kolmoisnegatiivisessa ja HER2-positiivisessa rintasyövässä. Immunoscore on vahva ennustetekijä paksusuolisyövässä ja voi tulevaisuudessa tulla osaksi kasvaimen luokitusjärjestelmiä. Monivärjäys- ja transkriptomipohjaiset solujen profiloitime-



C



KUVA 6. Geeniekspressiopohjainen immuunisolukon laskennallinen arviointi. Koko kudoksen RNA-sekvensointidatasta voidaan dekonvoluutioalgoritmien avulla estimoida kasvaimen immuunisolukon koostumusta. **A.** TCGA (The Cancer Genome Atlas) -aineiston paksusuolisöpänpäätteen (n = 540; sarakkeet) laskennallisesti arvioidut immuunisolupopulaatiot (rivit) lämpökarttana. **B.** M1- ja M2-makrofagifraktioiden yhteys etenemättömään elossaoloaikaan. Suuri M1-fraktio liittyy suotuisampaan ennusteeseen, kun taas M2-fraktiolla ei todettu ennustemerkitystä. **C.** Kahden esimerkinäytteen dekonvoluutiolla arvioidut immuunisoluprofiilit ja vastaavat HE-kuvat. Näytteessä 1 on runsaasti lymfositteja ja näytteessä 2 runsaasti eosinofiilejä. Suurennot osoittavat, että immuunisolut painottuivat stroomaan, mikä ei ole pääteltävissä pelkästä dekonvoluutioanalyyseistä. Eosinofiilejä on merkitty turkooseilla nuolilla ja lymfositteilla vihreällä nuolella. Mittajanat 250 µm.



KUVA 7. Yksisolutason ja spatiaalisen transkriptomiikan merkitys immuunisolukon arvioinnissa. Yksisolutason RNA-sekvensointi mahdollistaa kasvaimen ja immuunisolukon erilaisten solupopulaatioiden tunnistamisen, kun taas spatiaalinen transkriptomiikka liittyy geeniekspression kudoksen rakenteeseen. Kuvassa esitetään julkisesta yksittäissoluaineistosta laadittuja UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) -visualisaatioita sekä spatiaalisen transkriptomiikan tuottamaa geeniekspression visualisointia. **A.** Karkeasti luokitellut solupopulaatioklusterit UMAP-kartassa. **B.** Valittujen merkkigeenien ilmentyminen UMAP-kartassa. Kuvassa esitetään epiteelisolujen merkkiaine *EPCAM*, strooman merkkiaine *COL1A1* ja leukosyyttien merkkiaine *PTPRC* (*CD45*). **C.** Suuremmalla resoluutiolla klusteroidut immuunisolutyypit UMAP-kartassa. **D.** Visium HD:lla tuotetun spatiaalisen mRNA-datan visualisointi. Vasemmalla esitetään *EPCAM*:n, *ACTA2*:n ja *VIM*:n ilmentyminen kudoksenäytteessä, oikealla alhaalla makrofagimarkkeri *CD68*:n ilmentyminen kohdennetulla alueella. Vasemmanpuoleinen kudosaareke edustaa kasvainta ja oikeanpuoleinen hyvänlaatuisia paksusuolen limakalvoa sekä sen alla olevaa stroomaa. Makrofagit ovat sijoittuneet runsaampina kasvaimen alueelle. Paneelit havainnollistavat menetelmien tuottamaa tietoa, eikä paneelin D näyte ole sama kuin paneeleissa A–C esitetty aineisto. Analysoitu data on ladattu Gene Expression Omnibus -tietokannasta GEO-tunnisteilla GSE178341 (paneelit A–C) ja GSM8594569 (paneeli D).

netelmät ovat toistaiseksi pääasiassa tutkimuskäytössä, eikä niille ole vielä vakiintuneita kliinisiä käyttökohteita prognostisina tai prediktivisinä biomarkkereina.

Teknologiat ovat uusia, ja niiden hyödyntäminen edellyttää kehittyneen laboratorioinfrastruktuurin lisäksi moniammatillista yhteistyötä solu- ja molekyylibiologian, bioinformatiikan sekä patologian asiantuntijoiden välillä. Menetelmien edelleen kehittyessä ja yleistyessä ne voivat kuitenkin mahdollistaa immuunimik-

roympäristön aiempaa kokonaisvaltaisemman arvioinnin myös kliinisen diagnostiikan ja hoitopäätöksenteon tukena. Keskeisiä haasteita ovat menetelmien standardointi ja laadunvarmistus, kustannusten ja suuren informaatiomäärän hallinta, tulosten sovittaminen kliiniseen päätöksentekoon sekä riittävän laajat etenevät kliiniset validointitutkimukset. ■

KIRJALLISUUTTA

1. Roerden M, Spranger S. Cancer immune evasion, immunoediting and intratumour heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2025;25:353–69.
2. Hanahan D. Hallmarks of cancer – then and now, and beyond. *Cell* 2026;189:2254–77.
3. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell* 2023;41:374–403.
4. Yamaguchi H, Hsu JM, Sun L, ym. Advances and prospects of biomarkers for immune checkpoint inhibitors. *Cell Rep Med* 2024;5:101621.
5. Salgado R, Denkert C, Demaria S, ym. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015;26:259–71.
6. Loibl S, André F, Bachelot T, ym. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2024;35:159–82.
7. Loi S, Drubay D, Adams S, ym. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: a pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. *J Clin Oncol* 2019;37:559–69.
8. Dieci MV, Bisagni G, Bartolini S, ym. Tumor-infiltrating lymphocytes and survival outcomes in early ERBB2-positive breast cancer: 10-year analysis of the ShortHER randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 2025;11:386–93.
9. Schirris Y, Voorthuis R, Opdam M, ym. Label-efficient computational tumour infiltrating lymphocyte assessment in breast cancer (ECTIL): multicentre validation in 2340 patients with breast cancer. *Lancet Digit Heal* 2025;7:100921.
10. Alexander PG, McMillan DC, Park JH. The local inflammatory response in colorectal cancer – type, location or density? A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2020;83:101949.
11. Doroshow DB, Bhalla S, Beasley MB, ym. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18:345–62.
12. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, ym. PD-L1 Immunohistochemistry assays for lung cancer: results from phase 1 of the blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol* 2017;12:208–22.
13. Brunnström H, Johansson A, Westbom-Fremer S, ym. PD-L1 immunohistochemistry in clinical diagnostics of lung cancer: interpathologist variability is higher than assay variability. *Mod Pathol* 2017;30:1411–21.
14. Lu S, Stein JE, Rimm DL, Wang DW, ym. Comparison of biomarker modalities for predicting response to PD-1/PD-L1 checkpoint blockade: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol* 2019;5:1195–204.
15. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, ym. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet* 2018;391:2128–39.
16. Domingo E, Kelly C, Hay J, ym. Prognostic and predictive value of immunoscore in stage III colorectal cancer: pooled analysis of cases from the SCOT and IDEA-HORG studies. *J Clin Oncol* 2024;42:2207–18.
17. El Sissy C, Kirilovsky A, Lagorce Pagès C, ym. International validation of the immunoscore biopsy in patients with rectal cancer managed by a watch-and-wait strategy. *J Clin Oncol* 2024;42:70–80.
18. Teillaud JL, Houel A, Panouillot M, ym. Tertiary lymphoid structures in anticancer immunity. *Nat Rev Cancer* 2024;24:629–46.
19. Peyraud F, Guegan JP, Vanhersecke L, ym. Tertiary lymphoid structures and cancer immunotherapy: From bench to bedside. *Med* 2025;6:100546.
20. Vanhersecke L, Brunet M, Guégan JP, ym. Mature tertiary lymphoid structures predict immune checkpoint inhibitor efficacy in solid tumors independently of PD-L1 expression. *Nat Cancer* 2021;2:794–802.
21. Karjula T, Niskakangas A, Mustonen O, ym. Tertiary lymphoid structures in pulmonary metastases of microsatellite stable colorectal cancer. *Virchows Arch* 2023;483:21–32.
22. Väyrynen J, Väyrynen S, Ollila-Raj H, ym. Immunohistokemialliset monivärjäykset kudostutkimuksessa: diagnostiikan arkipäivää ja tulevaisuutta. *Duodecim* 2023;139:531–40.
23. Method of the Year 2024: spatial proteomics. *Nat Methods* 2024;21:2195–6.
24. Väyrynen JP, Haruki K, Lau MC, ym. Spatial organization and prognostic significance of NK and NKT-like cells via multi-marker analysis of the colorectal cancer microenvironment. *Cancer Immunol Res* 2022;10:215–27.
25. Small C, Montgomery SB. RNA sequencing in disease diagnosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2024;25:353–67.
26. Dai Y, Guo S, Pan Y, Castignani C, ym. A guide to transcriptomic deconvolution in cancer. *Nat Rev Cancer* 2026;26:84–103.
27. Newman AM, Liu CL, Green MR, ym. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* 2015;12:453–7.
28. Väyrynen JP, Haruki K, Lau MC, ym. The prognostic role of macrophage polarization in the colorectal cancer microenvironment. *Cancer Immunol Res* 2021;9:8–19.
29. Vandereyken K, Sifrim A, Thienpont B, ym. Methods and applications for single-cell and spatial multi-omics. *Nat Rev Genet* 2023;24:494–515.
30. Dimitrov D, Schäfer PSL, Farr E, ym. LIANA+ provides an all-in-one framework for cell-cell communication inference. *Nat Cell Biol* 2024;26:1613–22.
31. Jin S, Plikus M V, Nie Q. CellChat for systematic analysis of cell-cell communication from single-cell transcriptomics. *Nat Protoc* 2025;20:180–219.
32. Kamimoto K, Stringa B, Hoffmann CM, ym. Dissecting cell identity via network inference and in silico gene perturbation. *Nature* 2023;614:742–51.
33. Lim HJ, Wang Y, Buzdin A, ym. A practical guide for choosing an optimal spatial transcriptomics technology from seven major commercially available options. *BMC Genomics* 2025;26:47.
34. Longo SK, Guo MG, Ji AL, ym. Integrating single-cell and spatial transcriptomics to elucidate intercellular tissue dynamics. *Nat Rev Genet* 2021;22:627–44.

**JOUNI HÄRKÖNEN, FM, sairaalasolubiologi (erikoistuva),
tohtorikoulutettava**

Patologian osasto, Sairaala Nova, Keski-Suomen
hyvinvointialue
A.I. Virtanen –instituutti, Itä-Suomen yliopisto

JUHA VÄYRYNEN, LT, patologian professori

Translationaalisen lääketieteen tutkimusyksikkö, Oulun
yliopisto
Patologian osasto, Pohjois-Pohjanmaan hyvinvointialue

VASTUUTOIMITTAJA

Seppo Meri

SIDONNAISUDET

Jouni Härkönen: Ei sidonnaisuuksia

Juha Väyrynen: Ei sidonnaisuuksia

SUMMARY

Evaluation of immune cells in tumor samples

Assessment of the tumor immune microenvironment is important for determining cancer prognosis and supporting treatment decisions, especially as immunotherapies become more widely used. Key features in the assessment include the number, composition, functional state, and location of immune cells in relation to tumor cells. Available methods range from visual assessment of hematoxylin-eosin-stained sections to immunohistochemistry, multiplex staining methods, spatial proteomics, gene expression-based analytics, and single-cell and spatial transcriptomic methods. In clinical use, the most established approaches are PD-L1 immunohistochemistry and assessment of tumor-infiltrating lymphocytes. For example, Immunoscore and newer spatial methods provide more comprehensive biological information than current diagnostics, but their broad implementation is limited by challenges related to standardization, costs, data analysis, and clinical validation. Tiivistelmän kääntämiseen on käytetty tekoälyä.