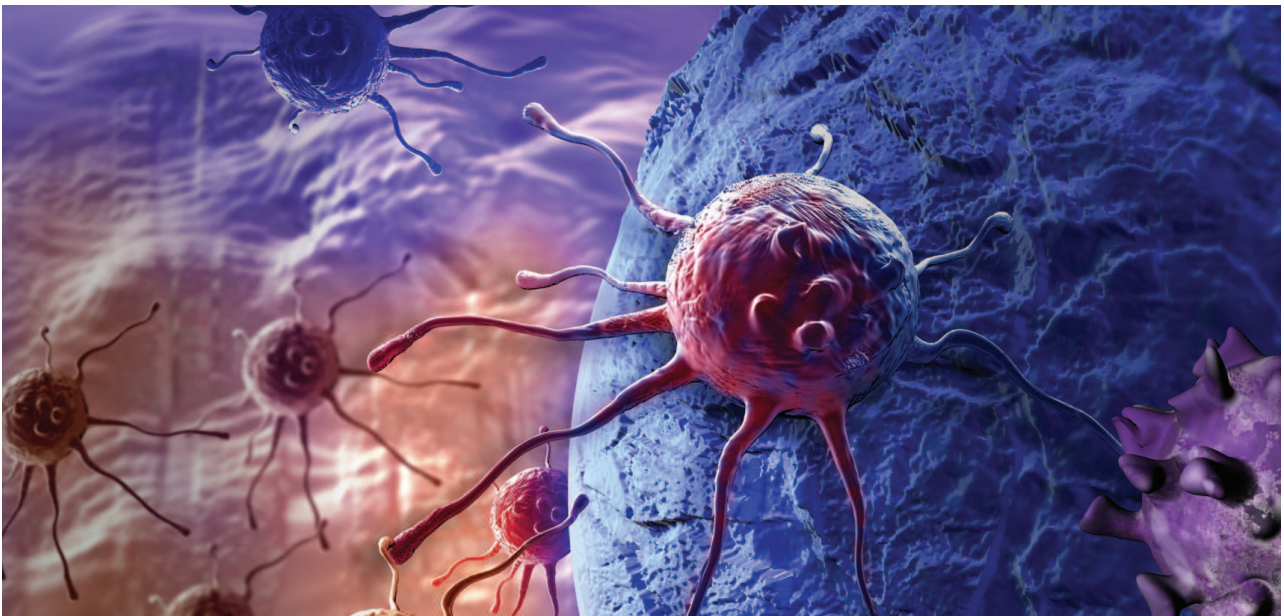


Zirkulierende epitheliale Tumorzellen: Echtzeitkontrolle in der adjuvanten Krebstherapie, der Erhaltungstherapie und Langzeitüberwachung

Die Verwendung zirkulierender epithelialer Tumorzellen (CTC) in der Krebstherapie gewinnt immer mehr an Bedeutung. In verschiedenen Phasen der Therapie lassen sich die CTC bei Brustkrebspatientinnen nutzen. Klinische Studien der letzten Jahre zeigten die Vorteile der CTC als Verlaufskontrolle in der Chemotherapie, der endokrinen Erhaltungstherapie und bei Beendigung der Hormontherapie. Dabei erwies sich ein Anstieg der CTC als prognostisch ungünstig, während gleichbleibende oder sinkende CTC prognostisch von Vorteil waren. Darüber hinaus lassen sich verschiedene Charakteristika an den CTC untersuchen um Rückschlüsse auf die Wirksamkeit einer medikamentösen Therapie zu ziehen.



© vitanovski – Fotolia

Kreberkrankungen gehören mittlerweile zu den größten Herausforderungen des Gesundheitssystems. Nach Herz-Kreislauf Erkrankungen ist Krebs Haupttodesursache in der westlichen Welt. Großen Anteil daran haben die demographische Entwicklung und die damit einhergehende Überalterung der Bevölkerung. Krebs stellt den Thera-

peuten vor die Herausforderung optimale Therapieoptionen für die Behandlung einer äußerst heterogenen individuellen Erkrankung zu finden. Beispielsweise war eine Diagnostik, die ein Therapieversagen zeitnah erkennen lässt, in der adjuvanten Situation bis vor kurzem nicht vorhanden. Diesem Mangel wurde versucht, mit neoadjuvan-

KREBSTHERAPIE

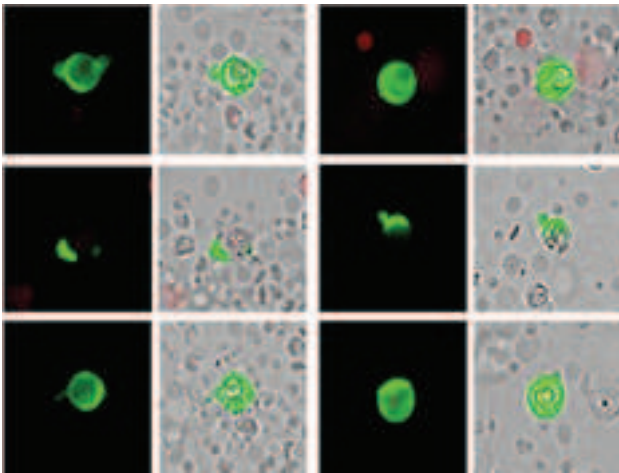


Abb. 1: Lebende EpCAM positive Zellen

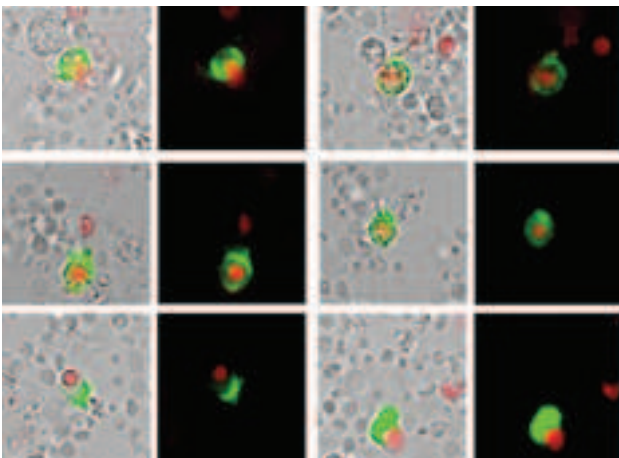


Abb. 2: Tote, mit Propidiumiodid gefärbte EpCAM positive Zellen

ten Therapien Rechnung zu tragen. Die neoadjuvante Situation bietet die Möglichkeit, durch die Tumorverkleinerung in vivo die Wirksamkeit von Medikamenten zu testen, mit dem Ziel in der Zukunft bei Therapieversagen kurzfristig die Therapie zu wechseln. Irritierend war dabei die Tatsache, dass trotz einer Zunahme pathologisch kompletter Remissionen mit den neueren Therapieschemata keine Verbesserung des rezidivfreien und Gesamtüberlebens erreicht werden konnte [1] und es keinen, eigentlich zu erwartenden, Vorteil dieser Kombinationstherapien gegenüber der adjuvanten Behandlung gab. Damit bietet dieser Ansatz außer der lokalen noch keine zuverlässige systemische Erfolgskontrolle.

Die Gründe hierfür können vielfältig sein, möglicherweise beruht die Tumorverkleinerung nicht alleine auf der Elimination der Tumorzellen, sondern auch auf der vermehrten Freisetzung der Tumorzellen während einer neoadjuvanten Therapie [2]. Diese könnten dann Ausgangspunkt für Metastasen werden, denn in den seltensten Fällen stellt der Primärtumor die Todesursache dar. Die in Organen entstehenden Fernmetastasen sind verantwortlich für

einen Großteil der Todesfälle bei Krebserkrankungen. In Anbetracht der steigenden Zahl von Krebsfällen wird es zunehmend wichtiger dem Patienten eine zuverlässige und belastungsarme Erfolgskontrolle während einer Therapie und Überwachung im weiteren Krankheitsverlauf zu bieten. Erst basierend hierauf können dann zielgerichtete Therapieentscheidungen getroffen werden.

Stellenwert der zirkulierenden Tumorzellen in der Onkologie

Die Verbreitung der Metastasen im Organismus geschieht mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Tumorzellen, die sich vom Primärtumor losgelöst haben und über die hämatogene und lymphogene Bahnen in den Körper gelangen, die zirkulierenden Tumorzellen. Diese zirkulierenden Tumorzellen können sich im fremden Gewebe festsetzen und Fernmetastasen bilden. Darüber, wie und auf Grund welcher Reize dies geschieht, ist noch wenig bekannt. Man geht davon aus, dass sich zirkulierende Tumorzellen schon in einem relativ frühen Stadium der Krankheit im Blutkreislauf befinden, im Prinzip sobald die Vaskularisation des Tumors erfolgt ist.

Die Zahl der zirkulierenden Tumorzellen ist eng mit dem klinischen Verlauf verknüpft, bei einer erhöhten Tumoraktivität steigt in der Regel die Zahl der Zellen im Blut. Auch wenn die mittlere Halbwertszeit der Mehrzahl der ausgeschwemmten Zellen auf 2-3h geschätzt wird [3], können ruhende bzw. dormante Zellen jahrelang unerkannt überdauern. Sie werden offenbar weder vom Immunsystem noch von den meisten Zytostatika eliminiert. Bislang ist bekannt, dass zirkulierende Tumorzellen mehr als 10 Jahre nach Operation im Blut detektiert werden können [4]. Diese Residualtumorzellen können auch noch Jahrzehnte später wieder zu einem erneuten Ausbruch der Krankheit führen. Eine ausreichend sensitive und spezifische Diagnostik zur frühzeitigen Erkennung um ein Wiederauftreten der Erkrankung zu erkennen, wäre eigentlich unerlässlich.

Detektionsmethoden

Momentan gibt es eine Vielfalt von Methoden zum Nachweis der seltenen zirkulierenden Tumorzellen. Wegen der geringen Zahl dieser Zellen zielt ein Großteil der Methoden auf die Anreicherung und Selektion dieser Zellen ab. Die Identifikation solcher Zellen kann dabei mit Hilfe von biologischen und/oder physikalischen Methoden erfolgen. Prinzipiell unterscheiden sich zirkulierende Tumorzellen von hämatopoetischen Zellen sowohl in ihrer Zellausstattung als auch zum Teil in ihrer Morphologie und erlauben damit eine Differenzierung. Wenn es sich bei dem Primärtumor um ein Karzinom handelt, können zirkulierende Zellen aufgrund ihres epithelialen Ursprungs erkannt werden. Theoretisch sind damit 90 % der weltweiten Krebsfälle einer Detektion zugänglich. Tumorzellen eines

Karzinoms exprimieren spezifische Oberflächenantigene, darunter das epitheliale Adhäsionsmolekül EpCAM (CD 326), und intrazellulär verschiedene Zytokeratine. Die ersten Ansätze etwa aus der Jahrtausendwende zum Nachweis seltener Zellereignisse, wie sie die zirkulierenden Tumorzellen darstellen, verwenden dabei überwiegend magnetische Antikörper gegen EpCAM und/oder Zytokeratine, und kombinieren die magnetische Anreicherung mit anschließender Identifikation über Fluoreszenz [5]. Zur Anreicherung und Selektion kommen aber auch Filtrationsmethoden [6], Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll Separation) sowie fluoreszenzaktivierte Zellsortierung zum Einsatz. Ein Großteil der Methoden befindet sich allerdings noch in der Entwicklung oder klinischen Testung.

Mit der Maintrac[®] Analyse geht man einen Schritt weiter, denn das System erlaubt die Detektion vitaler Zellen ohne Anreicherung. Diese können direkt im Blutkontext über fluoreszierende Oberflächenantikörper in einem mikroskopischen Bildanalyseverfahren identifiziert werden (► Abb. 1, ► Abb. 2). Die zusätzliche mikroskopische Untersuchung der Morphologie, gewährleistet eine weitere Verifizierung und erlaubt eine höhere Spezifität. In vitro können die vitalen Zellen nach der quantitativen Bestimmung dann weiteren Untersuchungen unterzogen werden. Die klinische Relevanz dieses Testsystems konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden [2, 6–10].

Einsatzmöglichkeiten zirkulierender Tumorzellen

Prinzipiell können die zirkulierenden Tumorzellen in allen Stadien der Erkrankung zur Erfolgskontrolle bzw. zur Überwachung der Therapie herangezogen werden.

Erfolgskontrolle während der adjuvanten Chemotherapie

In der adjuvanten Therapie besteht die Resttumorlast aus relativ wenigen Einzelzellen. Eine kurative Therapie liegt im Bereich des Möglichen. Die individuelle Optimierung der Behandlung einer minimalen Zelltumorlast ist aber erst mit einer mikroskopischen Erfolgskontrolle möglich. Aufgrund der Heterogenität der Krebserkrankung wirken Chemotherapien nicht auf alle Zellen des Tumors in gleichem Maße. Wenn man davon ausgeht, dass der Tumor, der makroskopisch komplett entfernt worden ist, Zellen ins Blut abgegeben hat, kann ein Anstieg der Zellzahl nur auf erneuter Aktivität dieser Zellen beruhen. Das bedeutet, dass sich die Metastasierungswahrscheinlichkeit erheblich erhöht. Deshalb ist es therapierelevant diese Tumorzellen des Patienten zu identifizieren und quantifizieren. Wie eine solche Überwachung aussieht, ist in ► Abb. 3 gezeigt. Die epithelialen, tumorverdächtigen Zellen werden dabei aus Blutproben, bestimmt und der Zellzahlverlauf aufgezeichnet. Der Anstieg in ► Abb. 3a ist prognostisch ungünstig, dagegen ist das Absinken (► Abb. 3b) und die sich auf gleichem Ni-

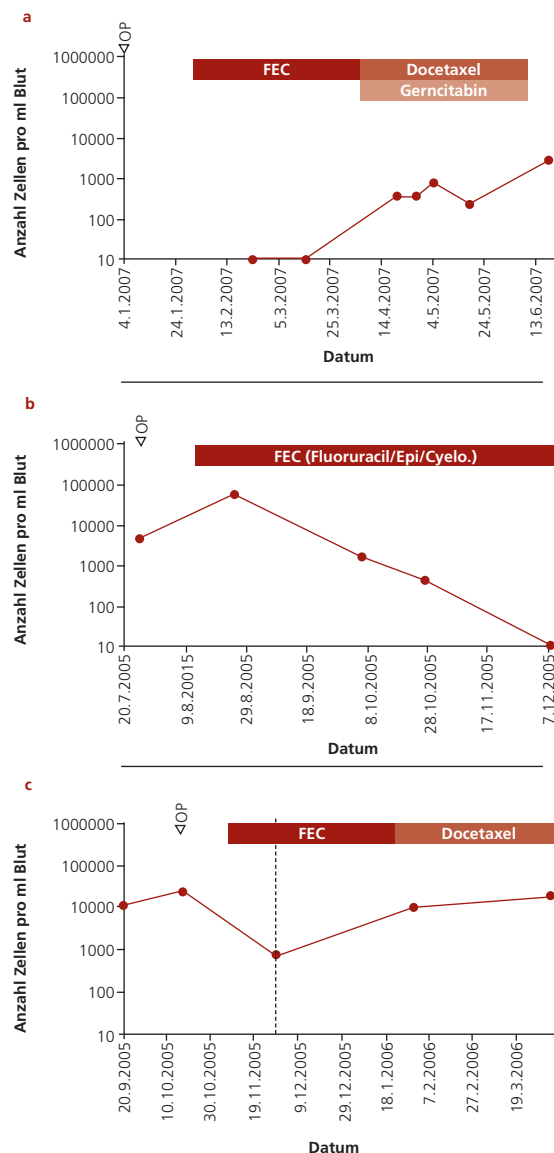


Abb. 3: Zahl der CTC im Verlauf der Chemotherapie.

veau befindende Zellzahl (► Abb. 3c) am Ende Therapie prognostisch von Vorteil. Damit lässt sich das Verhalten der zirkulierenden Tumorzellen und das Ansprechen auf verschiedene therapeutische Maßnahmen in Echtzeit überprüfen. Es konnte gezeigt werden, dass die Dynamik der Zellzahl hochsignifikant mit dem Tumor- bzw. Metastasenwachstum korreliert (► Abb. 4) Patienten, deren CTC-Zahl sich deutlich verringert oder bei denen die Zellen ganz eliminiert werden, erleiden selten einen Rückfall. Bei gutem Ansprechen auf eine Therapie ist ein Rückgang der Zellzahl bei den CTC meist bereits nach dem ersten Therapiezyklus festzustellen. Aber auch nach einem anfänglichen Ansprechen kann ein Anstieg der Zellzahl im Verlauf der weiteren Therapie anzeigen, dass noch aktive Reste des Tumors im Körper vorhanden sind oder sich Metastasen gebildet haben. Das Verhalten der CTCs war dabei in seiner Aussagekraft dem Nodalstatus oder der Tumorgröße

KREBSTHERAPIE

(► Abb. 5) in dieser Studie [7] überlegen gewesen.

Hormontherapie

Auch im weiteren Verlauf der Erkrankung kann die serielle Bestimmung der Zahl zirkulierender Tumorzellen eine Hilfestellung bieten. 2011 wurden 179 Patientinnen mit primärem Brustkrebs unter adjuvanter Hormontherapie wiederholt auf ihre CTC untersucht und bis zu sieben Jahre nachbeobachtet [8]. Die Dynamik der CTC korrelierte eindeutig mit dem klinischen Verlauf (► Abb. 6). Ein Anstieg bzw. Rückgang der Zellzahl um den Faktor 10 war dabei hochsignifikant mit der Rezidivwahrscheinlichkeit verknüpft. Fälle von Patientinnen bei denen aufgrund ansteigender CTC von Tamoxifen auf Aromataseinhibitoren gewechselt wurde, verliefen äußerst vielversprechend. Die Zahl der CTC sank oftmals durch den Wechsel der Medikation. Damit hat man ein Werkzeug in der Hand, das geeignet ist die Hormontherapie bei östrogenrezeptorpositiven Patientinnen zu überwachen und gegebenenfalls bei dauer-

haft steigenden Zellzahlen geeignete Gegenmaßnahmen zu ergreifen.

Langzeit-Überwachung

Mit CTC kann auch nach dem Abschluss einer Therapie der weitere Verlauf der Krankheit überwacht werden. Eine Studie bei hormonrezeptorpositiven Brustkrebspatientinnen, die bis zu sieben Jahre nach der Absetzung der Erhaltungstherapie beobachtet wurden, zeigte eindeutig, dass ein Anstieg der CTC nach Beendigung der endokrinen Therapie mit einer signifikant höheren Rezidivrate verbunden ist (► Abb. 7) [11]. Bei Patientinnen die unregelmäßig Tamoxifen einnahmen, konnten Schwankungen in der Zellzahl festgestellt werden, ein mögliches Indiz, dass die Wiederaufnahme der Hormontherapie bei steigenden Zellzahlen durchaus sinnvoll sein kann. Ansteigende Zahlen der CTC nach Beendigung der Hormontherapie sollten zu weiteren diagnostischen Maßnahmen führen, um frühzeitig eine Intervention einleiten zu können, dabei ist auch die Wiederaufnahme der endokrinen Therapie in Betracht zu ziehen. Die CTC Bestimmung liefert eine Basis um eine individuelle Entscheidung treffen zu können, ob nach fünf Jahren Hormontherapie diese weitergeführt werden soll. Insofern kann das Langzeit-Monitoring als Vorsorge innerhalb der Nachsorge verstanden werden.

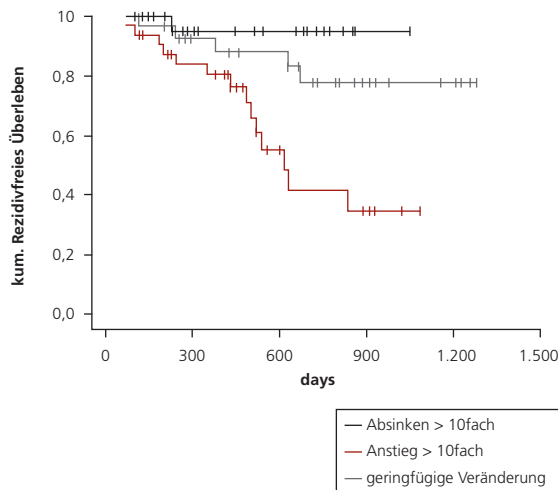


Abb. 4: Kaplan Meier Kurve adjuvante Brustkrebsbehandlung und der Einfluss steigender (Faktor 10), gleichbleibender und sinkender CTC auf das rezidivfreie Überleben der Patientinnen (log rank $p < 0,001$).

Zirkulierende epitheliale Tumorzellen als prädiktive Faktoren

Nach Diagnosestellung ist das unverzügliche Einleiten einer effektiven Therapie für das Überleben des Patienten von entscheidender Bedeutung. Nachdem die CTC wohl über die gleiche Heterogenität wie der Primärtumor und Metastasen verfügen, erlauben sie Schlussfolgerungen auf die Grunderkrankung. Eine weitere Charakterisierung der CTC ist möglich. Sie kann Aufschluss über das Ansprechen auf eine entsprechende Therapie geben und als prädiktiver Marker dienen, wie beispielsweise der Östrogenrezeptor oder die HER2/neu Amplifikation beim Mamma-

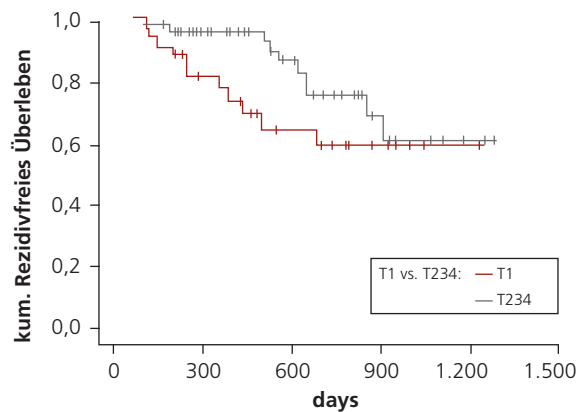
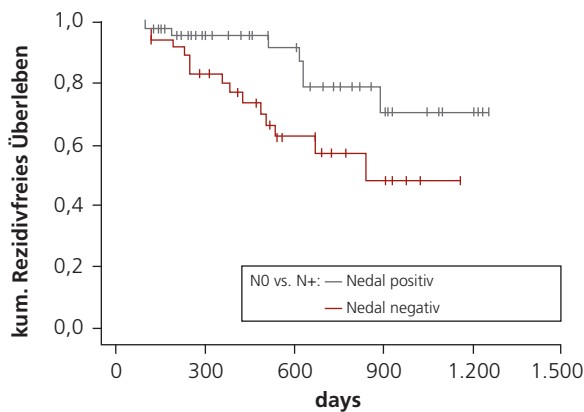


Abb. 5: Kaplan Meier Plots des Nodalstatus und der Tumorgröße in Korrelation zum rezidivfreien Überleben.

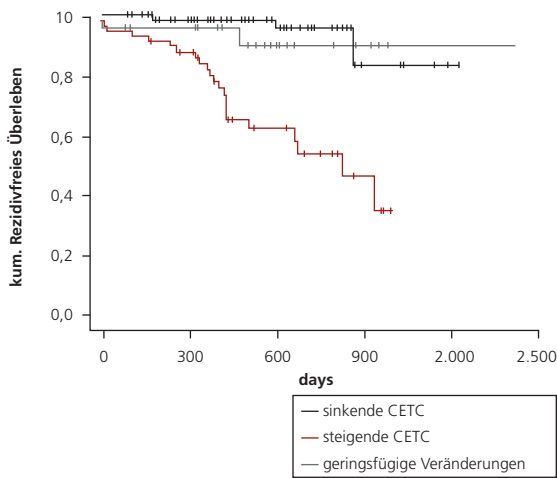


Abb. 6: Kaplan Meier Plot Rezidivfreies Überleben in der endokrinen Erhaltungstherapie (log rank $p < 0,001$).

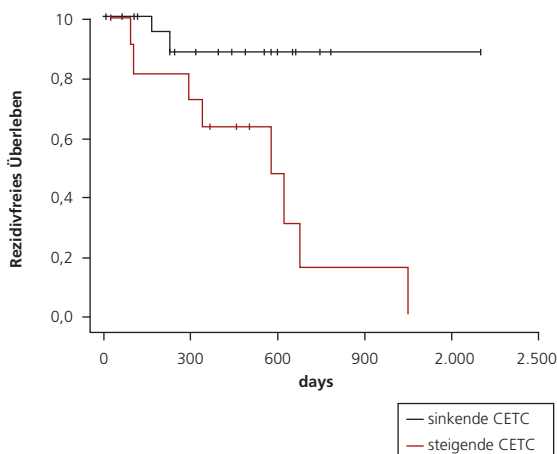


Abb. 7: Rezidivfreies Überleben nach der Tamoxifenherapie von 36 Brustkrebspatientinnen (log rank $p < 0,006$).

karzinom, der Androgenrezeptor bei Prostatakarzinom und c-kit bei Magenkrebs. Eine Detektion von PDL-1 auf CTC, relevant für neue Medikamente im Bereich der Checkpointinhibitoren, ist ebenfalls möglich.

Grenzen und Chancen

Epitheliale Zellen können auch durch entzündliche Erkrankungen z.B. der Leber und des Gastrointestinaltrakts, Verletzungen, Operationen oder Verbrennungen in das Blut gelangen. Wenn eine maligne Erkrankung diagnostiziert wurde, ist eine präzise Anamnese des Arztes unumgänglich um positive Ergebnisse nicht fälschlich als Tumorzellen zu werten. Aufgrund von CTC kann keine Aussage über die Lokalisation des Rezidivs getroffen werden. Allerdings können bestimmte Proteine, wie der jeweilige Hormonrezeptor oder PSA einen Hinweis auf die Herkunft des Primärtumors geben. Gleichzeitig bietet die Bestim-

mung eine höhere Empfindlichkeit gegenüber klassischen bildgebenden Verfahren und ermöglicht eine frühere Entdeckung des Rezidivs. Eindeutig sind nicht alle gefundenen Zellen in der Lage Metastasen zu bilden, wahrscheinlich ist sogar nur ein sehr kleiner Teil der Zellen dazu in der Lage [12]. Problematisch ist die Detektion und Identifikation dieser Zellen. Es existieren viele Marker, auch genetische, welche zur Identifikation dieser Zellen dienen. Jedoch ist keiner der Marker ausreichend spezifisch. Deswegen ist ein quantitativer Ansatz, der möglichst alle Subpopulationen epithelialer Zellen einschließt, von großer Bedeutung, nur so kann ein verstärktes Tumorstadium anhand der Zunahme von CTC erkannt und möglicherweise gestoppt werden.

Ausblick

Für eine erfolgreiche Krebsbehandlung sind verschiedene Faktoren wichtig. Der Verlauf einer Krebserkrankung kann durch möglichst frühe Entdeckung positiv beeinflusst werden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Identifikation von therapieentscheidenden Eigenschaften auf den Tumorzellen, wie das Vorhandensein bestimmter Zielmoleküle als Angriffspunkte für Medikamente. Folgerichtig ist die Therapie eines Patienten nicht zwangsläufig immer durch allgemeingültige Schemata möglich. Eine auf das individuelle Ansprechverhalten des Tumors ausgerichtete Therapie verspricht dem Patienten die größtmögliche Wahrscheinlichkeit rezidivfrei mit einer hohen Lebensqualität zu leben. Dabei werden CTC voraussichtlich sowohl bei der Prognose als auch bei Wahl der Therapie in der Zukunft eine zunehmend wichtigere Rolle spielen.

Alle Literaturstellen können Sie auf unserer Homepage einsehen: www.dzkg.de > Zeitschrift > Aktuelles Heft

DR. STEFAN SCHUSTER
SIMFO GmbH Bayreuth
Tel.: +49 921/7930842
E-Mail: sschuster@simfo.de



DR. RER. NAT. STEFAN SCHUSTER



PROF. DR. MED. KATHARINA PACHMANN