



Der Nachweis zirkulierender Tumorzellen (CTC) im Blut und ihre Bedeutung für die Prognose

Die Bedeutung von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark als unabhängiger Marker für die Prognose ist weitgehend anerkannt. Die klinische Bedeutung von zirkulierenden Tumorzellen im Blut (CTC) konnte in letzter Zeit nachgewiesen werden. Die folgende Zusammenfassung gibt einen Überblick über die aktuelle Literatur und die neusten Erkenntnisse.

Einleitung

Tumorzellen im Knochenmark sind oft ruhend und haben eine lange Überlebenszeit (**Jotsuka et al. 2004**), d.h. sie werden nicht von dem körpereigenen Abwehrsystem erkannt und zerstört. Sie können ebenso wie Tumorzellen in den Lymphknoten bereits zum Zeitpunkt der Diagnose des ersten Tumors nachgewiesen werden. Wegen ihrer langen Überlebenszeit sind sie nicht hilfreich bei der genauen Darstellung des Krankheitsverlaufs oder des Erfolgs einer therapeutischen Intervention (**Braun et al. 2000**). Hingegen ist bekannt, dass das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark einher geht mit einer schlechteren Prognose (**Braun et al. 2005**).

Im Gegensatz dazu ist der Nachweis von CTC im Blut von besonderer Bedeutung, da das Blut einen dynamischen Prozeß wieder spiegelt. Die Überlebenszeit von CTC im Blut bis zu 24 Stunden ist relativ kurz (**Patel et al. 2002**). Der zufällige Nachweis dieser Zellen erscheint unwahrscheinlich, außer es erfolgt ein permanenter neuer Zufluss von Tumorzellen. CTC können daher am wahrscheinlichsten während einer fortschreitender Tumorentwicklung nachgewiesen werden, was neben einer Aussage zur Prognose auch eine Beurteilung von Therapieerfolg, sowie einen frühzeitigen Nachweis der Tumorneubildung ermöglicht. Diesen Zusammenhang zeigen klinische Studien der letzten vier Jahre.

Zirkulierende Tumorzellen als prognostischer Faktor

Stathopoulou et al. (2002) untersuchte 148 Brustkrebspatientinnen (Stadium I/II). Die Patientinnen, bei denen zirkulierende Tumorzellen mittels CK19 RT-PCR nachgewiesen worden, hatten eine signifikant schlechtere Prognose. Sie zeigten nach Entfernen des primären Tumors und vor Beginn der adjuvanten Therapie eine signifikant kürzere Überlebenszeit und eine verkürzte erkrankungsfreie Zeit. Die Identifizierung von CTC bei diesen Patientinnen stellte einen wichtigen Faktor bei der Therapieentscheidung dar. Der prognostische Wert in dieser Gruppe war unabhängig von der Einschätzung des Lymphknotenstatus, dessen prognostischer Wert für die erkrankungsfreie Zeit deutlich schlechter war.

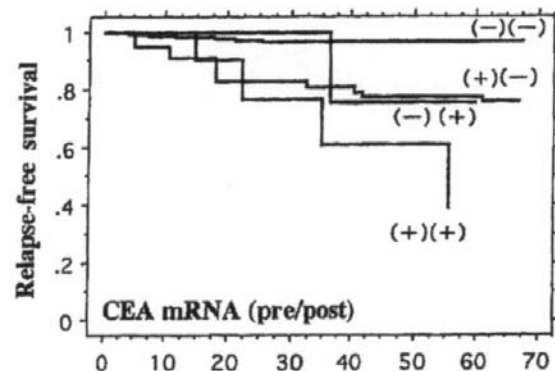
Diese Ergebnisse wurden bestätigt in der Arbeit von **Xenidis et al. (2003)**. 161 Brustkrebspatientinnen (Stadium I/II) wurden nach adjuvanter Chemotherapie auf zirkulierende Tumorzellen mittels CK-19 RT-PCR untersucht und hinsichtlich Länge der erkrankungsfreien Zeit in Abhängigkeit der gewählten Therapie überwacht. Es zeigte sich, dass der Nachweis CK-19 mRNA-positiver Zellen im Blut nach vorangegangener CMF-Therapie eine schlechtere Prognose hinsichtlich der Länge der erkrankungsfreien Zeit hatte.

Giatromanolaki et al. (2004), untersuchte 100 Brustkrebspatientinnen (Stadium I/II oder frühe IIIA) nach der Operation und vor Beginn der adjuvanten Chemotherapie oder der lokalen Radiotherapie auf CTC mittels CK-19 RT-PCR. Es zeigte sich, dass das Vorhandensein von CK-19 mRNA-positiven Zellen im Blut zu einer schlechteren Prognose führte, die durch keine Standard-Chemotherapie verbessert werden konnte.

Ähnliche Ergebnisse wurden von **Gaforio et al. (2003)** mit einer immunozytometrischen Methode an 92 Brustkrebspatientinnen vor Operation und neo-adjuvanter Therapie erhalten. Patientinnen mit Cytokeratin positiven Zellen in ihrer Blutbahn (mutmaßliche CTC) hatten sowohl eine kürzere Überlebenszeit als auch eine kürzere krankheitsfreie Zeit. Dabei muß beachtet werden, dass diese Methode weniger sensitiv ist als eine PCR-basierte Analyse.

Die Bedeutung des prognostischen Wertes von CTC wurde des weiteren durch die Ergebnisse von **Jotsuka et al. (2004)** unterstützt. Sie untersuchten 100 NO-Brustkrebspatientinnen vor und nach operativer Entfernung des Primärtumors. Sie bestimmten das Vorhandensein von CEA-mRNA mittels RT-PCR in einer durch Gradientenzentrifugation erhaltenen Zellfraktion. Es konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit CTC entweder vor oder nach der Operation eine signifikant kürzere krankheitsfreie Zeit hatten als solche ohne CTC zu jedem Zeitpunkt. Patientinnen, die zu beiden Zeitpunkten CTC positiv waren, hatten die schlechteste Prognose.

Abb. 1 Jotsuka et al. (2004). Kaplan-Meier Analyse zeigt die Korrelation zwischen krankheitsfreiem Intervall und der Nachweisbarkeit von CTC vor und / oder nach der Operation. (-)(-) = vor und nach Operation negativ; (+)(+) = vor und nach Operation positiv; (+)(-) vor Operation positiv, nach Operation negativ; (-)(+) vor Operation negativ, nach Operation positiv)



Erst vor kurzem konnte **Cristofanilli et al. (2004)** die klinische Bedeutung von CTC als unabhängiger prognostischer Faktor zeigen. Bei 177 Brustkrebspatientinnen wurde die Menge an CTC vor Beginn einer Therapie ermittelt und im Verlauf überwacht. Als Verfahren wurde eine Immunozytometrische Methode eingesetzt, die daraufhin von der FDA als Testsystem freigegeben wurde. In der abschließenden Beurteilung wird die Menge zirkulierender Tumorzellen vor Beginn einer Behandlung als unabhängiger prognostischer Faktor hinsichtlich der Länge der krankheitsfreien Zeit und der gesamten Überlebenszeit von Patientinnen mit metastasierenden Brustkrebs deklariert.

Hardingham et al. (2000) analysierte die Expression von 4 Tumormarkern (CD19, CK20, MUC1, MUC2) in Blutproben von 94 Darmkrebspatienten (Dukes A/B Patienten) vor der Operation. Die Tumorzellen wurden unter Verwendung des Ber-EP4 Antikörpers mittels immunomagnetischer Selektion gewonnen. Das Ergebnis zeigt, dass der Nachweis von Tumorzellen im Blut assoziiert war mit einer verkürzten krankheitsfreien Zeit, bzw. kürzeren gesamten Überlebenszeit. Diese Daten

befürworten eine chemotherapeutische Intervention bei Patienten, die als Dukes A/B eingestuft werden (günstige Prognose), aber bei denen CTC nachgewiesen werden.

Zu dem gleichen Ergebnis kam auch **Allen-Mersh et al. (2003)**, der bei Darmkrebspatienten das Vorhandensein von CTC 24 Stunden nach der Operation mit der Länge des krankheitsfreien Stadium korrelierte. In einer 6-jährigen Studie mit 53 Patienten konnten 70 % der Rückfälle vorhergesagt werden. Bei nur einem von 43 Patienten, die alle negativ hinsichtlich Lymphknotenbefund und CTC waren, kam es während der Beobachtungszeit zu einem Rückfall.

In einer Studie von **Kienle et al. (2003)** wurden 142 Darmkrebspatienten hinsichtlich des Nachweises von Tumorzellen im Blut und Knochenmark vor und nach der Operation mittels CK 20-RT-PCR untersucht. Dabei wurde unterschieden zwischen Patienten mit oder ohne Chemotherapie vor der Operation. Es konnte gezeigt werden, dass die Chemotherapie vor der Operation mit einer deutlichen Verringerung der Anzahl nachgewiesener Tumorzellen im Blut und Knochenmark einhergeht.

Weiterführende Ergebnisse brachte die erst kürzlich veröffentlichte Studie von **Koch et al. (2005)**. Es wurden 37 Darmkrebspatienten mit Lebermetastasen auf Tumorzellen im Blut und Knochenmark vor, während und nach der Operation (R0) mittels CK 20-RT-PCR untersucht. Über einen Beobachtungszeitraum von 3 Jahren zeigte sich, dass Patienten mit 2 oder 3 positiven Blutproben eine schlechtere Prognose hatten als Patienten mit keiner oder 1 positiven Blutprobe. Patienten mit Tumorzellen im Knochenmark hatten eine signifikant schlechtere Prognose als Patienten ohne nachweisbare Tumorzellen im Knochenmark.

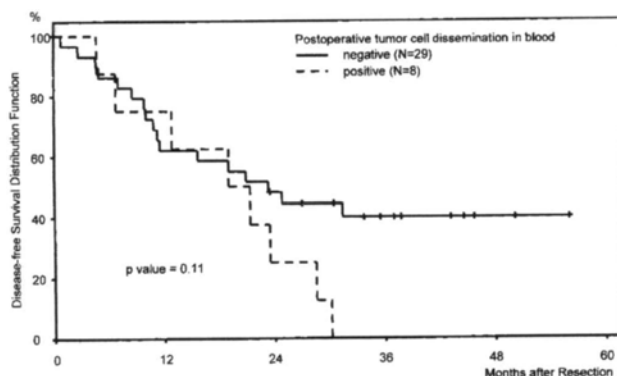


Abb. 2. Koch et al. (2005). Kaplan-Meier krankheitsfreies Intervall, Kurven von Patienten (n=37) nach Resektion von Lebermetastasen, gemäß CK20 RT-PCR-Ergebnisse in postoperativen Blutproben.

Schlussfolgerung

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von CTC im Blut von Tumorpatienten ein neuer Parameter zur Überwachung des Krankheitsverlaufs und der Therapieoptimierung sein kann. Dennoch müssen zurückliegende Veröffentlichungen mit gewisser Vorsicht betrachtet werden, da ein Mangel an Sensitivität (bei Immunozytometrie) oder an Spezifität (bei RT-PCR ohne Zells Selektion) nicht ganz vernachlässigt werden kann. Das erschwert die Übertragung der statistischen Daten auf die individuelle Patientensituation. Bei den Testsystemen der Firma AdnaGen werden durch eine immunomagnetische Anreicherung und eine nachfolgende Multiplex-PCR zirkulierende Tumorzellen im peripheren Blut mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen. Durch diese Kombination von unabhängigen Verfahren in ein Testsystem kommt es weitgehend zu einem Ausschluß von Fehlerquellen.

Laufende Studien zeigen, dass eine CTC-Diagnostik mit dem AdnaGen-Test neue Möglichkeiten zur zeitnahen Beurteilung der Therapieeffizienz im Rahmen der neoadjuvanten Therapie, der adjuvanten Therapie und zur Verlaufskontrolle eröffnet **(Rom, J et al., 2005)**.

Durch die Immunselektion mit drei Antikörpern und nachgeschalteter Multiplex PCR mit den Markern MUC1, Her2 und Ga733-2 lassen sich bei Primärtumoren und metastasierendem Brustkrebs zirkulierende Tumorzellen im Blut zuverlässig nachweisen **(Kaul, S et al., 2005)**. Das ermöglicht eine genaue Krankheitsverlaufs- und Therapiebeobachtung. Die Tumorbilogie der CTC läßt sich nach der Immunoselektion mittels verschiedener molekularbiologischer Methoden (RT-PCR, real-time PCR, Microchip, etc.) analysieren. Der AdnaTest kann somit zur standardisierten Datenerhebung für multizentrische Studien verwendet werden.

Literatur

- Allen-Mersh T. et al. (2003).** "Colorectal cancer recurrence is predicted by RT-PCR detection of circulating cancer cells at 24 hours after primary excision." ASCO meeting, Chicago, May 2003
- Braun S. et al. (2000).** "Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients." *J Clin Oncol* 18(1): 80-6.
- Braun S. et al. (2005).** "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer." *N Engl J Med* 2005 Aug 25;353:793-802.
- Gaforio J. J. et al. (2003).** "Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis." *Int J Cancer* 107(6): 984-90.
- Giatromanolaki A. et al. (2004).** "Assessment of highly angiogenic and disseminated in the peripheral blood disease in breast cancer patients predicts for resistance to adjuvant chemotherapy and early relapse." *Int J Cancer* 108(4): 620-7.
- Hardingham J. E. et al. (2000).** "Molecular detection of blood-borne epithelial cells in colorectal cancer patients and in patients with benign bowel disease." *Int J Cancer* 89(1): 8-13.
- Jotsuka T. et al. (2004).** "Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer." *Surgery* 135(4): 419-26.
- Kaul S et al. (2005).** Immunomagnetic enrichment and multimarker analysis of disseminated tumor cells in peripheral blood of breast cancer patients. , abstract ISMRC 2005.
- Kienle P et. al. (2003).** "Decreased Detection Rate of Disseminated Tumor Cells of Rectal Cancer Patients After Preoperative Chemoradiation. *Annals of Surgery*", Vol 238, No 3, September 2003, 324-331
- Koch M et al. (2005).** "Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases." *Ann Surg.* 2005 Feb;241(2):199-205.
- Patel H. et al. (2002).** "Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer." *Ann Surg* 235(2): 226-31.
- Rom J et al. (2005).** „Multiplex PCR zum Nachweis disseminierter Tumorzellen (DTC) im Blut von Patientinnen mit Mammakarzinom.“, abstract 177. MGG Tagung, Frankfurt, Juni 2005.
- Shariat S. F. et al. (2003).** "Early postoperative peripheral blood reverse transcription PCR assay for prostate-specific antigen is associated with prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy." *Cancer Res* 63(18): 5874-8.
- Smith B. M. et al. (2000).** "Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques." *J Clin Oncol* 18(7): 1432-9.
- Stathopoulou A., et al. (2002).** "Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance." *J Clin Oncol* 20(16): 3404-12.
- Xenidis N. et al. (2003).** "Peripheral blood circulating cytokeratin-19 mRNA-positive cells after the completion of adjuvant chemotherapy in patients with operable breast cancer." *Ann Oncol* 14(6): 849-55.