

Sonja Harjuntausta

# IMMUNOSUPPRESSIO JA IMMUUNISOLUT ETURAUHASSYÖVÄN METASTASOITUMISESSA

Lääketieteen ja terveysteknologian tiedekunta  
Kandidaatin tutkielma  
Huhtikuu 2022

# TIIVISTELMÄ

Sonja Harjuntausta: Immunosuppressio ja immuunisolut eturauhassyövän metastasoitumisessa

Kandidaatin tutkielma

Tampereen yliopisto

Bioteknologia ja biolääketieteen tekniikka

Huhtikuu 2022

---

Eturauhassyöpä on yksi yleisimmistä miesten syöpäsairauksista. Osa syöivistä kehittyä kastroaatioreseptiksi ja metastasoituu usein luumun. Hoitokeinot ovat usein riittämättömiä kastroaatioreseptin syövän hoitamiseen, eikä immuuniterapioista ole saatu toivottuja tuloksia. Tämän työn tavoitteena on tutkia eturauhassyövän immunosuppressiota ja immuunisolujen vaikutusta sen metastasoitumisessa.

Immunosuppressiivisessa mikroympäristössä puolustusjärjestelmän kyky tunnistaa syöpäsolut ja hyökätä niitä vastaan on heikentynyt. Syöpäsolut vaikuttavat immunosuppression kehittymiseen vaikuttamalla immuunisolujen toimintaan esimerkiksi T-solujen aktivaatiota estämällä tai edistämällä makrofagien polarisaatiota kohti sen immunosuppressiivista M2-fenotyyppiä. Immunosuppressiivinen ympäristö luo syövälle otollisemman kasvuympäristön ja mahdollistaa sen metastasoitumista. Metastasoitumista edistävät immuunisolut ilmentävät esimerkiksi syöpäkasvaimen kasvuun välttämättömiä kasvutekijöitä.

Tässä työssä käsitellään immuunisolujen toimintaa eturauhassyövän mikroympäristössä ja syöpäsolujen vaikutusta ympäristöönsä. Työssä käsitellään myös immuunisolujen toiminnan kannalta tärkeät signaalintireitit ja signaalintimolekyylit, kuten reseptorit, ligandit sekä signaalinvälittäjät. Työssä keskitytään immuunisoluihin, jotka osallistuvat eturauhassyövän ympäristön immunosuppression sekä metastasoitumisen edistämiseen tai estämiseen.

Eturauhassyövässä immunosuppression kannalta tärkeimpiä immuunisoluja ovat T-solut sekä niiden toimintaan vaikuttavat myeloidiset suppressorisolut ja neutrofiilit, jotka estävät T-solujen aktivaatiota. Lisäksi T-solujen aktivaatioon vaikuttavat myös syöpään liittyvät fibroblastit, stimuloimalla niiden erilaistumista säätelijä-T-soluiksi. Aktivaation estyessä T-solujen sytotoksiset vaikutukset estyvät.

Eturauhassyövän metastasoitumista edistävät immuunisolut, kuten B-solut sekä myeloidiset suppressorisolut, jotka mahdollistavat eturauhassyövän kastroaatioreseptenssin kehittymisen ja selviytymisen androgeenipuutteisessa ympäristössä. Metastasoitumista edistävät myös M2-tyyppin makrofagit ilmentämällä verisuoniston kasvua indusoivaa verisuonten endoteelistä kasvutekijää (VEGF, vascular endothelial growth factor). Eturauhassyövän metastasoitumista luussa rajoittavat pääasiassa neutrofiilit, jotka välittävät syöpäsolujen apoptoosia sekä vapauttavat kasvua rajoittavia yhdisteitä. Näiden immuunisolujen toiminnan sekä syöpäsolujen yhteisvaikutuksen parempi ymmärtäminen auttaisi kehittämään uusia toimivampia terapeuttisia sovelluksia eturauhassyövän hoitoon.

Avainsanat: Eturauhassyöpä, metastasoituminen, immunosuppressio, immunosuppressiivinen mikroympäristö, immuunisolut

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

# ALKUSANAT

Tämä kandidaatin tutkielma on tehty Tampereen yliopistossa kevätlukukauden 2022 aikana.

Haluan kiittää ohjaajiani Kirsi Granbergia ja Aliisa Tiihosta ohjauksesta ja kärsivällisyydestä tämän työn parissa. Ilman heitä tämä työ ei olisi ollut mahdollinen. Haluan kiittää myös Pete Tohnia arvokkaasta vertaispalautteesta. Kiitos ajastanne.

Tampereella, 25.4.2022

Sonja Harjuntausta

# SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO .....	4
2. ETURAUHASSYÖVÄN METASTASOITUMINEN .....	4
3. IMMUNOSUPPRESSIO ETURAUHASSYÖVÄSSÄ.....	5
3.1 T-solut.....	6
3.2 Makrofagit.....	8
3.3 Neutrofiilit.....	10
3.4 Myeloidiset suppressorisolut (MDSC) .....	11
3.5 B-solut .....	12
3.6 Syöpään liittyvät fibroblastit (CAFs) .....	13
4. YHTEENVETO .....	14
5. LÄHDELUETTELO .....	16

# 1. JOHDANTO

Eturauhassyöpä on maailman toiseksi yleisin diagnosoitu syöpä miehillä (Sung ym., 2021). Alkuvaiheen eturauhassyöpää hoidetaan usein eturauhasen poistolla, sädehoidolla tai endokriinisella hoidolla. Endokriinisen hoidon tavoitteena on syöpäkudoksen eristäminen mieshormoneista, joista syöpäkudos on riippuvainen, esimerkiksi antiandrogeenien avulla (Tammela, 2012). Osa pahanlaatuisista kasvaimista kuitenkin kehittyy kastraatioresistenteiksi, joista kolmasosa metastasoi luuhun (S.-Q. Wu ym., 2019). Aggressiivisen syövän hoitovasteen huonontuminen metastasoitumisen seurauksena on luonut tarpeen kehittää uusia hoitomenetelmiä, kuten immuuniterapioita. Immuuniterapian avulla voitaisiin luoda yksilöllinen hoitomenetelmä, mikä ei vahingoittaisi potilaan terveitä kudoksia. Näiden hoitomenetelmien kannalta on tärkeää ymmärtää immuunisolujen merkitys eturauhassyövässä sekä metastasoitumisessa. Tulee myös ymmärtää, miten kasvaimen solut pystyvät välttämään immuunipuolustuksen mekanismit, kuten apoptoosin tai fagosytoinnin.

Tämän työn tavoitteena on kuvata immuunisolujen toimintaa eturauhassyövän mikroympäristössä ja metastasoitumisessa. Työssä kuvataan myös immuunisolujen immunosuppressiivisia eli immuunijärjestelmän toimintaa hillitseviä ominaisuuksia sekä näihin liittyviä signaalintireittejä.

## 2. ETURAUHASSYÖVÄN METASTASOITUMINEN

Eturauhassyövän ensimmäinen vaihe on primäärikasvain. Primäärikasvaimen solujen irtoaminen kasvaimesta ympäristöön on syövän ensimmäinen tapa levitä. Syöväälle ominaisesti sen solujen väliset sidokset ovat heikentyneet eli koheesio on heikko, mikä mahdollistaa solujen irtoamisen ja leviämisen muualle elimistöön. Leviämistä tässä vaiheessa tehostavat myös kasvaimen suurenemisesta aiheutunut mekaaninen paine, kasvainsolujen lisääntynyt liikkuvuus ja syöpäsolujen ilmentämät entsyymit, jotka hajottavat solunulkoista matriksia (esim. tyvikalvoa hajottava kollageenaasi IV). (Isola, 2013)

Kasvaimen suurentumisen jälkeen sen hapen ja ravinteiden saanti vaikeutuu kasvaimen koon suurentuessa verisuoniston puuttumisen takia. Hapenpuute indusoi soluissa verisuoniston muodostumista eli angiogeneesiä aiheuttavien kasvutekijöiden, kuten VEGF:n (vascular endothelial growth factor) erittämisen. Tämä saa aikaan tyvikalvon hajoamisen suonissa,

endoteelisolujen voimakkaan jakautumisen ja migraation sekä alkeissuonten muodostumisen ja lopulta verisuonen muodostumisen. Tämä mahdollistaa syöpäsolujen pääsyn verenkiertoon ja leviämisen muualle elimistöön. Syöpäsolujen tunkeutuminen verisuonistoon tai imusuoniin on metastasoitumisen kannalta tärkeä vaihe, sillä se mahdollistaa syöpäsolujen kulkeutumisen uuteen paikkaan, missä ne kykenevät tunkeutumaan hiussuonten seinämien läpi ja kasvamaan kasvaimiksi. (Isola, 2013)

Etäpesäkkeiden leviämisreittejä ovat siis verenkierto tai imusuonisto. Eturauhassyöpä tyypillisesti metastasoituu valtimoverenkierron kautta luustoon. Verenkierrossa kasvaimen solujen täytyy kestää räsytystä, kuten hemodynaamista jännitystä, joten syöpäsolut usein kulkeutuvat klustereina tai sekoituksena syöpä- ja normaalisoluja. Verenkierron kasvainsolupopulaatio voi koostua syöpäsolujen lisäksi esimerkiksi normaalisoluista, kuten makrofageista, verihiutaleista tai leukosyyteistä. (Rycaj ym., 2017)

### **3. IMMUNOSUPPRESSIO ETURAUHASSYÖVÄSSÄ**

Immuunipuolustus jaetaan kahteen osaan, synnynnäiseen eli luonnolliseen immuunijärjestelmään sekä hankittuun immuunijärjestelmään. Näiden puolustusjärjestelmien immuunivasteilla on erilaisia ominaisuuksia sekä niihin osallistuvat eri solutyypit. Luontaisen immuunijärjestelmän solutyyppejä ovat fagosyytit, kun taas hankitun immuunijärjestelmän solutyyppejä ovat T- ja B-solut. Neutrofiilit, monosyytit, makrofagit ja eosinofiilit ovat fagosyyttejä eli syöpäsoluja. Molemmat puolustusjärjestelmät pyrkivät rajoittamaan syövän kasvua ensisijaisesti eliminoimalla syöpäsoluja. Eliminaation epäonnistuessa puolustusjärjestelmä pyrkii saavuttamaan tasapainon syöpäsolujen kanssa. Tasapainon pettäessä syöpä pääsee pakenemaan immuunivasteelta ja metastasoitumaan. (Meri, 2011)

Kasvaimen mikroympäristössä esiintyy tuumoriin tunkeutuvia lymfosyyttejä (TILs), jotka ovat yksi avaintekijöistä immunosuppressiivisessa ympäristössä (Kwon ym., 2021). Normaalissa kudoksessa tappaja-T-solut sekä luonnolliset tappajasolut toimivat kudoksessa valvojina, jotka tuhoavat transformoidut solut käyttämällä grantsyymiä ja perforiinia aseina. Kuitenkin kasvainsolut kykenevät karkaamaan tästä immuunivalvonnasta jossain kohtaa kasvaimen kehittymisen aikana. Kasvaimen vastainen immuuniaktivaatio on muuttunut tehottomaksi eli ympäristöstä on tullut immunosuppressiivinen. (Cervantes-Villagrana ym., 2020)

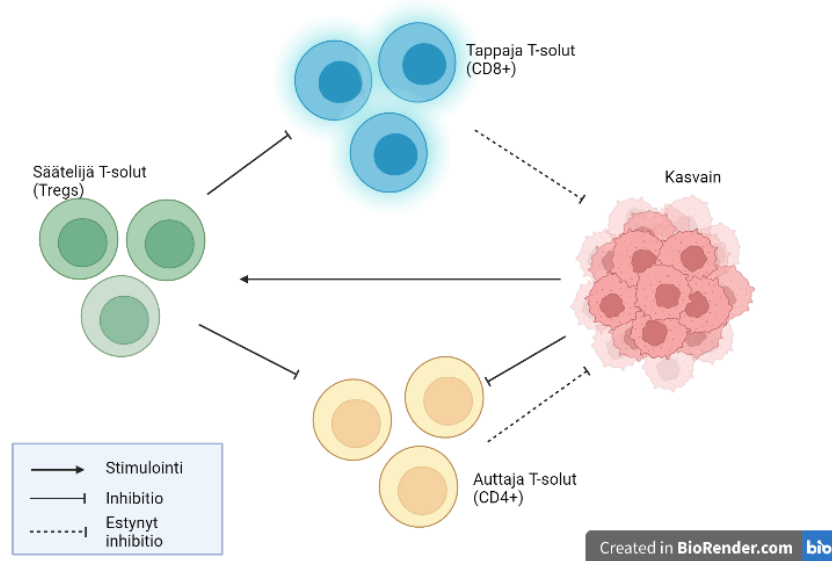
Syövän metastaasin mahdollistavan mikroympäristön kehittymiseen vaikuttavat monien eri immuunisolujen toiminnat sekä niiden säätely. Säätelyyn osallistuvat syöpäsolut sekä

immuunisolut vaikuttamalla toistensa toimintaan induktioiden ja inhibitioiden välityksellä. Myös syöpäsolujen ympäristön immunosuppression saavuttamiseen vaikuttavat niin luontaisen kuin hankitun puolustusjärjestelmän solut.

### 3.1 T-solut

T-solut ovat lymfosyyttejä, jotka kuuluvat hankitun immunitetin soluihin. T-soluvälitteisen immuunivasteen T-soluilla on erilaisia ominaisuuksia, jotka riippuvat niiden pinnalla ilmennetystä CD (cluster of differentiation) molekyylistä, jota solut käyttävät antigeenien tunnistamisessa. Auttaja-T-solut ilmentävät pinnallaan CD4+ molekyyliä, kun taas tappaja- eli sytotoksiset-T-solut ilmentävät CD8+ molekyyliä. Säätelijä-T-solut eli Treg-solut ovat auttaja-T-soluihin kuuluva alaluokka. Auttaja-T-solut eivät fagosytoi, eikä niillä ole omaa suoraa sytotoksisuutta, vaan ne ilmentävät kostimulatorisia ja inhibitorisia molekyylejä ja erittävät kasvutekijöitä (sytokiineja), jotka säätelevät B-solujen vasta-ainetuotantoa sekä makrofagien ja tappaja-T-solujen immuunivasteita. Tappaja-T-solut taas tuhoavat syöpäsoluja suoraan entsyymien, kuten perforiinin ja granzyymin, avulla sekä voivat käynnistää syöpäsolun apoptoosin. (Arstila, 2011)

Tappaja- (CD8+), auttaja- (CD4+) sekä säätelijä-T-solut ovat tuumoriin tunkeutuvia lymfosyyttejä, jotka vaikuttavat syövän metastaasissa eri tavalla. Eturauhassyöpäkasvaimet hyötyvät säätelijä-T-soluista, sillä ne pystyvät supressoimaan tappaja-T-solujen immuunivasteita ja ylläpitämään immunosuppressiivistä ympäristöä (Stultz & Fong, 2021). Kuvasta 1 nähdään T-solujen vaikutus toisiinsa sekä syöpäsolujen vaikutus T-solujen toimintaan. Kasvaimen mikroympäristöön tunkeutuvien säätelijä-T-solujen mekanismit, joilla ne osallistuvat tuumorin kehityksen säätelyyn, ovat kuitenkin edelleen epäselviä (S.-Q. Wu ym., 2019).



**Kuva 1:** T-solujen vaikutus immuunisupressioon kasvaimen mikroympäristössä. Kasvaimen vapauttamat säätelytekijät houkuttelevat lisää säätelijä-T-soluja ympäristöönsä. Säätelijä-T-solut inhiboivat tappaja- sekä auttaja-T-solujen aktivoitumista, jolloin niiden immuunivaste syöpäsoluja vastaan estyy. Kasvaimen solut estävät auttaja-T-solujen aktivoitumista myös suoraan indusoimalla niiden muuntumista säätelijä-T-soluiksi.

Eturauhassyövän mikroympäristössä tappaja T-solujen määrä oli huomattavasti normaalia kudosta pienempi, kun taas muiden T-solujen määrä ei muuttunut merkittävästi kasvaimen ja normaalin kudoksen välillä (Z. Wu ym., 2020). Toisaalta on myös huomattu, että eturauhassyövän metastaasissa FOXP3-positiivisen (forkhead box P3) säätelijä-T-solujen määrä on lisääntynyt (Vitkin ym., 2019). Tämä johtuu esimerkiksi eturauhassyöpäsolujen vapauttamasta TGF- $\beta$ -signaaloinnista (transforming growth factor beta), joka indusoi FOXP3 ilmentämisen auttaja-T-soluissa (CD4+ T-soluissa), mikä taas aiheuttaa auttaja-T-solujen muuttumisen säätelijä-T-soluiksi (Rycaj ym., 2017). Syöpäsolut houkuttelevat säätelijä-T-soluja sen ympäristöön voidakseen hyödyntää niiden ominaisuuksia immunosuppressiivisen ympäristön säätelyssä. Säätelijä-T-solut estävät tappaja-T-solujen toimintaa suoraan erittämällä proteiinia, joka pilkkoo tappaja-T-solu välitteisessä apoptoosissa tarvittavaa granulaasi B:tä (S.-Q. Wu ym., 2019).

Säätelijä-T-solut inhiboivat auttaja- ja tappaja-T-solujen syöpäsoluja estävää toimintaa CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4) antigeenin välittämällä vuorovaikutuksella (S.-Q. Wu ym., 2019). CTLA-4:ää ilmennetään solukalvolla T-solujen aktivaation seurauksena sekä säätelijä-T-soluissa. Sen sitoutuminen T-solussa antigeeniä esitelevään soluun, kuten dentriittisoluun, saa aikaan PI3K-signaloinnin (phosphoinositide 3-kinases) välittäjän eli Akt:n (proteiinikinaasi b) aktivaation estymisen, jolloin MHC-molekyylin (major histocompatibility complex) reseptoriin sitoutumisen jälkeinen normaali solusignaalointi estyy. PI3K-signalointi on T-solujen toiminnalle elintärkeä, joten sen inhibitio estää T-solujen aktivaation. Ilman T-solujen aktivaatiota T-solu



välitteistä apoptoosia eikä sytokiiniin eritystä tapahdu. Syöpäsolut kaappaavat tämän immunosuppressiota edistävän signaalintireitin ekspressoimalla CTLA-4:n ligandeja CD80 ja CD86, jotka edistävät CTLA-4:n ilmentymistä. Eturauhasen syöpäsolujen on todettu myös erittävän adensiiniä kasvaimen ympäristöön, joka aktivoi T-solujen adensiini A2 reseptorin. Tämä saa aikaan auttaja T-solujen antitumoraalisen vasteen estymisen ja näin immuunivasteen estymisen. (Stultz & Fong, 2021)

Ohjelmoitua solukuolemaa säätelevät PD-1 (programmed cell death protein 1) reseptori sekä sen ligandit L1 ja L2. Eturauhassyövässä PD-L1 (programmed cell death ligand 1) ligandin ilmentyminen on selvästi kohonnut erityisesti imusolmukkeisiin metastasoituneessa kasvaimessa. Yhdessä nämä ylläpitävät immuuniaktivaation sekä -suppression tasapainoa. PD-1 reseptoria ja PD-L1 ligandia ilmennetään esimerkiksi säätelijä-T-soluissa. Eturauhasen kasvaimen syöpäsoluissa PD-L1 ligandin ilmenemisen tehostuminen mahdollistaa immuunieditoinnin eli säätelijä-T-solujen aktivoinnin ja ylläpidon sekä auttaja- ja tappaja-T-solujen supression. (Stultz & Fong, 2021) Pahanlaatuisen kasvaimen pinnalla ilmenetty PD-L1 aktivoi T-solun sisäiset fosfataasit sitoutuessaan sen PD-1 reseptoriin. Nämä fosfataasit saavat aikaan T-solun eloonjäämissignaalien tukahtumisen, mikä indusoi ohjelmoidun solukuoleman eli apoptoosin T-solussa. (Cervantes-Villagrana ym., 2020)

T-solujen kasvainsoluja tuhoavat ominaisuudet siis estyvät immunosuppressiivisen ympäristön vaikutuksesta, jolloin ne eivät enää rajoita syöpäsolujen kasvua. Sytokiiniin ilmentymisen estyminen estää myös muiden syöpäsoluja tuhoavien immuunisolujen houkuttelemisen kasvaimen ympäristöön. Näin syöpäsolut muokkaavat T-solujen immuunivastetta suotuisammaksi kasvaimen leviämisen kannalta.

## 3.2 Makrofagit

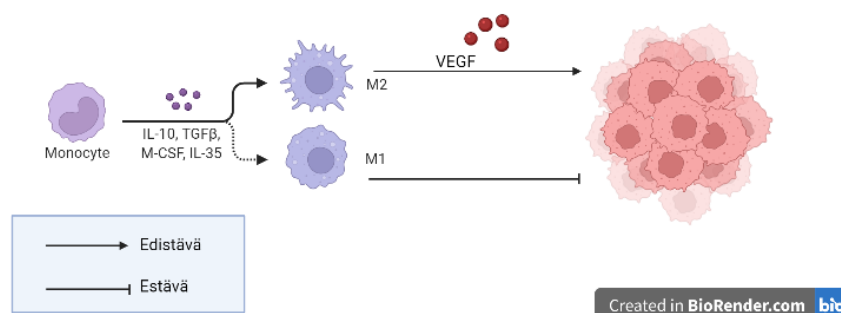
Immuunisolujen yksi olennaisimmista solutyypeistä eturauhassyövän mikroympäristössä on makrofagit. Ne kuuluvat luonnolliseen soluvälitteiseen immunitettiin. Makrofagit ovat fagosytoivia kudoksessa olevia soluja, jotka kypsyvät verenkierron monosyyteistä. Niiden tavoite on tuhota taudinaiheuttajat ja muu vieras materiaali fagosytoosilla ja ne erittävät myös sytokiineja, jotka aktivoivat lisää immuunivasteen soluja. (Salmi & Meri, 2011)

Makrofagit yleensä luokitellaan kahteen fenotyyppiin. M1-fenotyyppi on niiden klassinen muoto, joka pystyy aktivoiduttuaan tuottamaan typpioksidia tai reaktiivisia happivälituotteita, joiden avulla se pystyy taistelemaan mikrobeja vastaan. M2 taas on anti-inflammatorinen eli tulehdusta

rauhottava fenotyyppi, jotka tuottavat tulehdusta rauhoittavia sytokiinejä ja näin edistävät kudosten paranemista. (Saqib ym., 2018)

Eturauhassyövän mikroympäristössä on havaittu makrofagien M1- ja M2-fenotyyppien määrän kasvua terveen kudoksen ympäristöön verrattuna (Z. Wu ym., 2020). Makrofagien tunkeutuminen ympäristöön aiheutuu syöpäsolujen erittämistä kemotaksisista tekijöistä, kuten CCL2-sytokiineistä (C-C motif chemokine ligand 2) (Sottnik ym., 2011). Kasvainkudoksen makrofageilla on todettu sekä kasvainta tukevia, että inhiboivia sytotoksisia ominaisuuksia (kuva 2). Inhiboivia ominaisuuksia on M1 tyyppin makrofageilla, jotka houkuttelevat paikalle lisää CD4+ ja CD8+ T-soluja (Stultz & Fong, 2021). M2-tyypin makrofagien on taas havaittu lisäävän immunosuppressiota esimerkiksi heikentämällä T-solujen toimintaa ja aktivaatiota (Stultz & Fong, 2021). On todettu, että makrofagit voivat vaihdella näiden kahden fenotyypin välillä, mutta ei tiedetä miten. Etenkin kasvaimen ympäristössä M1-tyypin makrofagit muuntuvat M2-makrofageiksi (Lanciotti ym., 2014). Yksi makrofageja M2-fenotyypin suuntaan polarisoiva sytokiini on interleukiini-10 (IL-10), jota ilmentävät esimerkiksi myeloidiset suppressorisolut (Cervantes-Villagrana ym., 2020).

Makrofagien M2-tyyppi erittää verisuonten endoteelistä kasvutekijää (vascular endothelial growth factor, VEGF). VEGF:n erityks kasvaimen ympäristössä edistää tuumorin angiogeneesiä, mikä mahdollistaa myöhäisemmässä vaiheessa kasvaimen metastasoitumisen. (S.-Q. Wu ym., 2019) Syöpäsolujen ekspressoima TGF- $\beta$ -kasvutekijä houkuttelee kasvaimen ympäristöön lisää makrofageja (Stultz & Fong, 2021). Kuten kuvasta 2 huomataan, TGF- $\beta$ -kasvutekijä samalla muuntaa makrofageja M2-fenotyypin muotoon (Zhang ym., 2016).



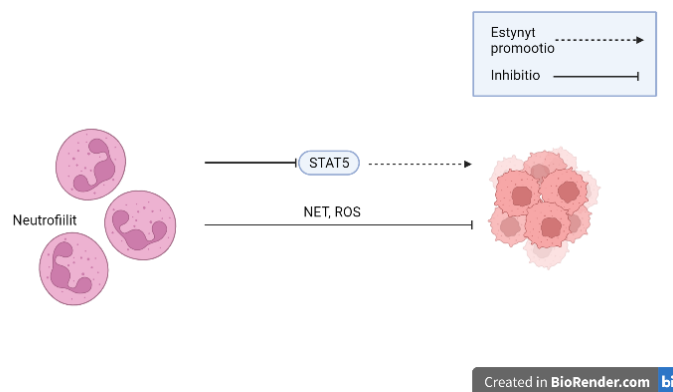
**Kuva 2:** Makrofagien vaikutus syöpäsoluihin. Makrofagien polarisoitumista M2-fenotyypin suuntaan stimuloivat interleukiini-10, TGF- $\beta$  sekä muut sytokiinit. Makrofagien M2-fenotyypin ilmentämä VEGF kasvutekijä indusoi tuumorissa angiogeneesiä, kun taas M1 fenotyyppi tuhoaa syöpäsoluja fagosytoosilla.

### 3.3 Neutrofiilit

Neutrofiilit ovat toinen luonnollisen immunitetin tärkeimmistä solutyypeistä. Neutrofiiliset granulosyytit ovat lyhytikäisiä fagosytoivia valkosoluja. Ne ovat veren yleisin valkosolutyyppi ja niiden päätehtävä on tuhota mikrobeja etenkin akuutissa tulehdusreaktiossa. Neutrofiilit tappavat taudinaiheuttajia fagosytoimalla sekä vapauttamalla hajottavia lysosomaalisia entsyymejä, toksisia reaktiivisia happiradikaaleja ja reaktiivisia typpioksidin (NO) johdannaisia. (Salmi & Meri, 2011)

Eturauhassyövän syöpäsolut stimuloivat neutrofiilien tunkeutumista kasvaimen mikroympäristöön erittämällä interleukiini-8-sytokiinia (IL-8) erityisesti luuhun metastasoituneena (Costanzo-Garvey ym., 2020). Neutrofiilit toimivat luussa anti-tumoraalisina, eli ne inhiboivat tuumorin kasvua (Kwon ym., 2021).

Syövän solut eivät vain houkuttele neutrofiileja kasvaimen ympäristöön, vaan vaikuttavat myös niiden toimintaan, kuten kuvasta 3 nähdään. Eturauhassyöpäsolut vaikuttavat neutrofiilien aktivaatioon solu-solu-kosketuksen välityksellä. Näin syöpäsolut edistävät neutrofiilien oksidatiivista purkaukautta (ROS, reactive oxygen species) sekä niiden ekstrasellulaarisen ansan (neutrophil extracellular trap, NET) muodostumista. Oksidatiivinen purkaus itsessään estää tuumorin kasvua. Samalla se myös aiheuttaa T-solujen aktivaation supressiota, joka taas edistää tuumorin kasvua. (Costanzo-Garvey ym., 2020)



**Kuva 3:** Neutrofiilien vaikutus syöpäsoluihin. Niiden vapauttama ekstrasellulaarinen ansa (NET) ja oksidatiivinen purkaus (ROS) inhiboi suoraan luuhun metastasoituneen eturauhassyövän kasvua. Neutrofiilit inhiboivat myös STAT5:n ilmentymistä syöpäsoluissa, jolloin syöpäsolun kaspasi-7:n aktivoituminen lisääntyy ja syöpäsolu ajautuu apoptoosiin.

Neutrofiilien välittämä syöpäsolujen apoptoosi tapahtuu STAT5-proteiinin (the signal transducer and activator of transcription 5) ilmentymistä säätelemällä. STAT5:n fosforylaatio edistää eturauhassyövän kasvua. Luun neutrofiilit kykenevät inhiboimaan STAT5:n ilmentämistä

syöpäsoluissa, mikä lisää merkittävästi kaspasi-7:n ja kaspasi-3:n aktivoitumista ja näin syöpäsolujen apoptoosia. (Costanzo-Garvey ym., 2020)

Neutrofiilit ovat itsessään siis anti-tumoraalisia, eli estävät eturauhassyövän metastaattisten kasvainten kasvua. Ne välittävät immuunisupressiota vain epäsuorasti T-solujen aktivaation kautta.

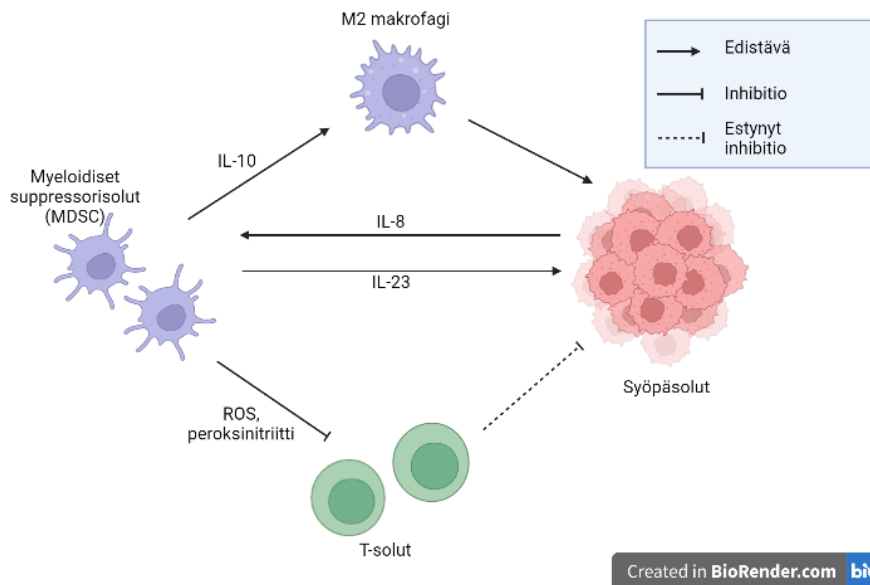
### 3.4 Myeloidiset suppressorisolut (MDSC)

Myeloidiset suppressorisolut (MDSC, Myeloid-derived suppressor cell) ovat myeloidisen linjan valkosoluja. Myeloidisilla suppressorisoluilla tarkoitetaan heterogeenista solupopulaatiota, mikä koostuu myeloidisista esisoluista, epäkypsistä makrofageista, epäkypsistä granulosyyteistä sekä kypsymättömistä dendriittisoluista. Aktivoidussa tilassa suppressorisoluille on ominaista reaktiivisten happi- ja typpilajien sekä arginaasin lisääntynyt vapautus ympäristöön. Myeloidisia suppressorisoluja houkuttelevat kasvaimen mikroympäristöön syöpäsolujen erittämien sytokiinien, kuten interleukiini-8:n, avulla. Myös syöpäsolun CXCL5-ligandin sitoutuminen sen CXCR2-reseptoriin myeloidisen suppressorisolun pinnalla houkuttelee ympäristöön lisää suppressorisoluja. (Stultz & Fong, 2021)

Myeloidisilla suppressorisoluilla on useita immunosuppressiivisia vaikutuksia kasvaimen mikroympäristössä. Kastratioresistentiksi muuttuvan eturauhassyövän yhtenä päätekijänä pidetään androgeenireseptori (AR) signaalointia, sillä syöpäsolujen selviytyminen on mieshormoneista riippuvaista. MDSC-solut edistävät syöpäsolujen selviytymistä ja lisääntymistä androgeenipuutteisissa olosuhteissa erittämällä interleukiini-23 sytokiinia (IL-23), joka vaikuttaa AR-signaalointiin. IL-23 indusoi AR-lokuksen genomien monistumisen sekä AR-säätelijöiden aktivaation. Näin myeloidiset suppressorisolut edesauttavat eturauhassyövän kehittymistä kastratioresistentiksi. (Calcinotto ym., 2018)

Myeloidiset suppressorisolut vaikuttavat immunosuppressioon myös T-solujen aktivaation kautta. MDSC-solut vapauttavat ROS-yhdisteitä (reaktiiviset happilajit) sekä peroksinitriittiä. Nämä katalysoivat T-solureseptorin (TCR) nitraatiota, mikä estää tappaja-T-solujen aktivaation estämällä sen MHC-välitteisen vuorovaikutuksen antigeeniä esittelevän solun kanssa. Suppressorisolut estävät T-solujen aktivaatiota myös pysäyttämällä T-solujen solusykliä. MDSC:t erittävät arginaasi-1:stä, dityppioksidisyntaasia sekä indoleamiini-2,3-dioksigenaasia, jotka saavat aikaan arginiinin ja tryptofaanin ehtymisen, mikä pysäyttää T-solujen solusyklin. T-solujen aineenvaihdunta vähenee ja solut ajautuvat apoptoosiin edistämällä immuunisupressiota. (Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2009)

Suppressorisolut vaikuttavat myös makrofageihin. Niiden tuottamat reaktiiviset happilajit (ROS) estävät myös makrofagien erilaistumista (Cervantes-Villagrana ym., 2020). MDSC:t tuottavat interleukiini-10:ä, joka polarisoi makrofageja M2 fenotyyppin suuntaan. Makrofagit voimistavat tätä efektiä lisäämällä IL-10:n tuotantoa suppressorisoluissa (Ostrand-Rosenberg & Sinha, 2009). Kuvassa 4 on kuvattu suppressorisolujen vaikutusta kasvaimen sekä muihin immuunisoluihin.



**Kuva 4.** Myeloidisten suppressorisolujen immunosuppressiivinen vaikutus kasvaimen mikroympäristössä. Kasvaimen ilmentämä interleukiini-8 houkuttelee myeloidisia suppressorisoluja ympäristöön. MDSC-solujen ilmentämä IL-23 edistää syöpäsolujen selviämistä adrogeenipuutteisessa ympäristössä. MDSC-solujen ilmentämä IL-10 taas polarisoi makrofageja niiden M2-fenotyyppin suuntaan, mikä edistää esimerkiksi kasvaimen angiogeneesiä. T-solujen aktivaatiota suppressorisolut estävät vapauttamalla ROS-yhdisteitä sekä peroksiniittiä, jolloin T-solu välitteinen kasvaimen inhibitio estyy.

### 3.5 B-solut

B-solut ovat lymfosyyttejä, jotka toimivat humoraalisen immuunivasteen välittäjinä. Vasta-ainevälitteisessä immuniteetissä, vasta-aineet eli immunoglobuliinit (Ig) toimivat immuunivasteen välittäjinä. B-solut tuottavat vasta-aineita ja kantavat pinnallaan samaa immunoglobuliinia antigeenia tunnistavana reseptorina. Vasta-aineet sitoutuvat spesifisesti taudinaiheuttajaan, jolloin sen toiminta häiriintyy tai vasta-aineet voivat merkitä sen tuhottavaksi muiden immuunisolujen toimesta. (Salmi & Meri, 2011)

B-solut edesauttavat syövän kasvua ja sen kastroatioresistenssiä. B-soluja eturauhassyövän mikroympäristöön houkuttelee CXCL13-kemokiini, jonka ilmentymistä stimuloi nekroottisessa

solukuolemassa vapautuvat välittäjäaineet, kuten HMGB1 (high mobility group Box 1) ja IL-1 $\alpha$  (interleukin 1 alpha). Syöpäsolujen nekroottista solukuolemaa aiheuttaa esimerkiksi androgeenien puute. B-solut vapauttavat lymfotoksiinia, joka aktivoi I $\kappa$ B-kinaasi- $\alpha$ :a (IKK $\alpha$ ) ja STAT3 (the signal transducer and activator of transcription 3) transkriptiotekijää, jotka edistävät androgeenipuutteisissa oloissa eturauhassyövän solujen selviytymistä ja lisääntymistä. STAT3-transkriptiotekijä toimii anti-apoptoottisena ja tuumorigeenisena säätelijänä. Lopulta sen aktivaatio johtaa kastroatioresistentin eturauhassyövän kehittymiseen. (Ammirante ym., 2010)

IKK $\alpha$  -aktivaatio taas johtaa fosforylaation kautta *BMI1*-geenin (BMI1 proto-oncogene) tehostuneeseen transkriptioon. *BMI1*:n kohonnut ilmentyminen saa aikaan ubikitinoitujen histonien kertymisen eturauhassyöpäsolun tumaan. Tämä mahdollistaa B-soluista riippuvaisen kastroattiresistenttien syöpäsolujen uudelleenkasvun. *BMI1* tunnetaan eturauhassyövän kantasolujen uusiutumisen säätelijänä. (Ammirante ym., 2013)

B-solujen tiedetään myös välittävän terapiaresistenssiä tuottamalla IL-10 sytokiinia ja PD-L1 ligandia. Näitä ekspressoivat vasta-aine immunoglobuliini-A:ta (IgA) tuottavat IgA+ B-solut. IL-10 ja PD-L1 aiheuttaa CD8+ T-solujen uupumista. Tämä IgA+ B-solujen välittämä T-solujen aktivaation estyminen on havaittu voimakkaana varsinkin oksaliplatiinihoidon (kemoterapia) jälkeen. (Shalpour ym., 2015)

### 3.6 Syöpään liittyvät fibroblastit (CAFs)

Fibroblastit eivät ole immuunisolutyyppi, mutta ne ovat kasvaimen mikroympäristön yleisin solutyyppi sekä ne vaikuttavat vahvasti immunosuppressioon ja eturauhassyövän metastasoitumiseen. Niillä tiedetään olevan merkittävä rooli eturauhassyövän kasvainten muodostumisessa ja etenemisessä, ensisijaisesti syöpäsolujen ja fibroblastien välisen kontaktiriippuvaisen ja parakriinisen signaloinnin kautta. Solujen välinen vuorovaikutus saa molemmat solupopulaatiot ekspressoimaan kasvitekijöitä ja fibroblastit indusoivat erittämään matriisin metalloproteaseja ja VEGF:ää, jotka edistävät metastaasille välttämätöntä angiogeneesiä. Fibroblastit myös indusoivat syöpäsolujen epiteeli-mesenkymaalista muutosta CXCL12- (C-X-C motif chemokine 12) ja TGF- $\beta$ -signaloinnin kautta, mikä mahdollistaa niiden kantasolumaiset ominaisuudet. (Stultz & Fong, 2021)

Immunoterapisten hoitojen kehittämisessä syöpään liittyvät fibroblastit ovat tärkeä solutyyppi, sillä ne toimivat immunosuppression välittäjinä immuunisolujen kautta. Fibroblastit vaikuttavat kasvainten mikroympäristöön muokkaamalla sitä kasvaimen kasvua edistäväksi ja

immunosuppressiiviseksi rekrytoimalla erilaisia immuunisoluja sekä vaikuttamalla niiden toimintaan. Fibroblastit houkuttelevat immuunisoluja erilaisten proteiinien, kuten CXCL12, CCL2, CHI3L1 (chitinase-3-like protein 1), IL-6 (interleukiini-6) ja NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) välityksellä. Kemokiini CXCL12, sytokiini CCL2 ja IL-6 houkuttelevat kasvaimen ympäristöön erityisesti verenkierron monosyyttejä, T-soluja, joista erityisesti säätelijä-T-soluja, sekä myös myeloidisia suppressorisoluja. (Monteran & Erez, 2019)

Immuunisolujen toimintaan fibroblastit vaikuttavat niiden immunosuppressiivisia ominaisuuksia vahvistamalla. Ne polarisoivat makrofageja M2-fenotyypin suuntaan IL-6, IL-8 ja CHI3L1 sytokiineja ilmentämällä. Fibroblastit edistävät T-solujen erilaistumista säätelijä-T-soluiksi erittämällä kemokiiniä CXCL12 sekä OX40L ja PD-L2 ligandeja, estäen samalla auttaja-T-solujen erilaistumista Th1-soluiksi. Sytotoksisten T-solujen aktivaatiota ja toimintaa fibroblastit estävät PD-L1 ja PD-L2 ligandien, TGF- $\beta$  sekä FasL (fas ligand) signaloinnin kautta, aiheuttaen tappaja-T-solujen apoptoosia. Fibroblastit inhiboivat myös luonnollisten tappajasolujen (NK, natural killer cells) toimintaa ilmentämällä sytokiineja, kuten prostaglandiini E2:a ja indoliamiinipyrroli-2,3-dioksigenaasia. (Monteran & Erez, 2019)

## 4. YHTEENVETO

Eturauhassyövässä immuunisolut vaikuttavat kasvaimen ympäristöön eri tavoin. Synnynnäisen sekä hankitun immunitetin solujen immuunivaste voi hiljentyä eli ympäristöstä voi kehittyä immunosuppressiivinen. Tämä immunosuppressiivinen ympäristö on otollisempi syövän kasvulle sekä metastasoitumiselle, sillä immuunipuolustus ei tuhoa syövän soluja. Syöpäsolut pystyvät muokkaamaan ympäristöä sen kasvulle otollisempaan suuntaan houkuttelemalla sen ympäristöön immuunisoluja, jotka auttavat sen selviytymistä sekä kasvua esimerkiksi sytokiinien ja kasvutekijöiden välityksellä.

Immunosuppression kannalta tärkeimpiä soluja ovat T-solut sekä niiden toimintaan vaikuttavat immuunisolut, kuten myeloidiset suppressorisolut ja neutrofiilit. T-solujen aktivaatioon vaikuttavat myös syöpään liittyvät fibroblastit, stimuloimalla niiden erilaistumista säätelijä-T-soluiksi. Säätelijä-T-solut estävät auttaja- sekä tappaja-T-solujen aktivaatiota ja niiden syöpäsoluja tuhoavia ominaisuuksia, kuten T-solu välitteistä apoptoosia. Immunosuppressiota syöpäsolut vahvistavat myös itse tappaja-T-solujen apoptoosia indusoimalla sitä. (Ostrand-Rosenberg & Sinha 2009, S.-Q. Wu ym., 2019)

Immuunisolut joko rajoittavat tai indusoivat eturauhassyövän metastasoitumista. B-solut sekä myeloidiset suppressorisolut edistävät syöpäsolujen selviytymistä androgeenipuutteisessa ympäristössä ja mahdollistavat kasvaimen kehittymisen kastroatioresistenssiksi, mikä vaikeuttaa syövän kasvun rajoittamista. Metastasoitumista edesauttaa angiogeneesi, mikä mahdollistaa syöpäsolujen pääsyn muualle elimistöön. Angiogeneesiä kasvaimessa indusoivat M2-fenotyypin makrofagit sekä syöpään liittyvät fibroblastit ilmentämällä VEGF-kasvutekijää. Neutrofiilit kykenevät kuitenkin rajoittamaan luuhun metastasoituneen syövän kasvua välittämällä syöpäsolujen apoptoosia sekä vapauttamalla kasvua rajoittavia yhdisteitä. (Ammirante ym., 2010, Calcinotto ym., 2018, Kwon ym., 2021, S.-Q. Wu ym., 2019)

Yhdessä immunosuppressiota ja metastaasia edistävät tekijät mahdollistavat syövän leviämisen ja huonontavat hoitokeinojen tehoa. Immuunisolujen vaikutusten ymmärtäminen mahdollistaa immunoterapisten hoitomuotojen kehittämisen eturauhassyöpää vastaan. Tähän mennessä kehitetyistä hoidoista ei ole saatu toivottua tulosta, joten parempi ymmärtäminen mikroympäristön eri solujen toiminnasta ja vaikutuksesta toisiinsa mahdollistaisi tehokkaampien hoitojen kehittämisen. Immunoterapioiden kehityksessä on ollut ongelmana eturauhassyövän immunosuppressiivisten mekanismien moninaisuus (Bilusic ym., 2017). Tämä on vaikeuttanut oikean immunoterapisen lähestymistavan löytämistä, sillä harvoin vain yhteen mekanismiin vaikuttamalla on saatu merkittävää tulosta.

Tällä hetkellä on meneillään tutkimuksia, joiden toivotaan selventävän, kuinka terapioiden avulla voitaisiin parantaa T-solujen aktivaatiota ja vähentää immuunivastetta heikentävää ympäristöä kasvaimissa (Fay & Graff, 2020). Mekanismien ymmärrys mahdollistaisi keskittymisen eturauhassyöpää inhiboivien immuunisolujen stimulointiin, immunosuppressiota edistävien tekijöiden poistamiseen sekä kasvaimen immuunijärjestelmää muokkaavien tekijöiden hiljentämiseen, tai näiden yhdistelmiä. Näin elimistön oman immuunipuolustuksen olisi mahdollista toimia syöpäsoluja vastaan toivotulla tavalla, eikä hoito tuhoaisi normaaleja soluja säde- tai kemoterapian tapaan.

Metastasoituneen eturauhassyövän kasvun rajoittaminen ja lopulta eliminointi elimistön omia mekanismeja hyödyntämällä on kunnianhimoinen haaste. Syövän leviämisen mahdollistavien mekanismien moninaisuuden takia voi olla, että toimiva hoitokeino voi vaatia usean erilaisen terapian yhdistelemistä toimivaksi kokonaisuudeksi, jotta saataisiin haluttuja tuloksia.



## 5. LÄHDELUETTELO

- Ammirante, M., Kuraishy, A. I., Shalpour, S., Strasner, A., Ramirez-Sanchez, C., Zhang, W., Shabaik, A., & Karin, M. (2013). An IKK $\alpha$ –E2F1–BMI1 cascade activated by infiltrating B cells controls prostate regeneration and tumor recurrence. *Genes & Development*, *27*(13), 1435–1440. <https://doi.org/10.1101/gad.220202.113>
- Ammirante, M., Luo, J.-L., Grivennikov, S., Nedospasov, S., & Karin, M. (2010). B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature*, *464*(7286), 302–305. <https://doi.org/10.1038/nature08782>
- Arstila, P. (2011). *T-soluluokat [online]*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2013 (viitattu 7.3.2022). Saatavilla Internetissä: <https://www.oppiportti.fi/op/imm00901/do>
- Bilusic, M., Madan, R. A., & Gulley, J. L. (2017). Immunotherapy of Prostate Cancer: Facts and Hopes. *Clinical Cancer Research*, *23*(22), 6764–6770. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0019>
- Calcinotto, A., Spataro, C., Zagato, E., Di Mitri, D., Gil, V., Crespo, M., De Bernardis, G., Losa, M., Mirenda, M., Pasquini, E., Rinaldi, A., Sumanasuriya, S., Lambros, M. B., Neeb, A., Lucianò, R., Bravi, C. A., Nava-Rodrigues, D., Dolling, D., Prayer-Galetti, T., ... Alimonti, A. (2018). IL-23 secreted by myeloid cells drives castration-resistant prostate cancer. *Nature*, *559*(7714), 363–369. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0266-0>
- Cervantes-Villagrana, R. D., Albores-García, D., Cervantes-Villagrana, A. R., & García-Acevez, S. J. (2020). Tumor-induced neurogenesis and immune evasion as targets of innovative anti-cancer therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0205-z>
- Costanzo-Garvey, D. L., Keeley, T., Case, A. J., Watson, G. F., Alsamrae, M., Yu, Y., Su, K., Heim, C. E., Kielian, T., Morrissey, C., Frieling, J. S., & Cook, L. M. (2020). Neutrophils are mediators of metastatic prostate cancer progression in bone. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *69*(6), 1113–1130. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02527-6>

- Fay, E. K., & Graff, J. N. (2020). Immunotherapy in Prostate Cancer. *Cancers*, *12*(7), 1752. <https://doi.org/10.3390/cancers12071752>
- Isola, J. (2013). *Syövän tunkeutuminen ympäristöön [online]*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2013 (viitattu 10.3.2022). Saatavilla Internetissä: <https://www.oppiportti.fi/op/syt00018/do>
- Kwon, J. T. W., Bryant, R. J., & Parkes, E. E. (2021). The tumor microenvironment and immune responses in prostate cancer patients. *Endocrine-Related Cancer*, *28*(8), T95–T107. <https://doi.org/10.1530/ERC-21-0149>
- Lanciotti, M., Masieri, L., Raspollini, M. R., Minervini, A., Mari, A., Comito, G., Giannoni, E., Carini, M., Chiarugi, P., & Serni, S. (2014). The Role of M1 and M2 Macrophages in Prostate Cancer in relation to Extracapsular Tumor Extension and Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. *BioMed Research International*, *2014*, 486798. <https://doi.org/10.1155/2014/486798>
- Meri, S. (2011). *Johdanto immunologiaan [online]*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2013 (viitattu 5.3.2022). Saatavilla Internetissä: <https://www.oppiportti.fi/op/imm00101/do>
- Monteran, L., & Erez, N. (2019). The Dark Side of Fibroblasts: Cancer-Associated Fibroblasts as Mediators of Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1835. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01835>
- Ostrand-Rosenberg, S., & Sinha, P. (2009). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *182*(8), 4499–4506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802740>
- Rycaj, K., Li, H., Zhou, J., Chen, X., & Tang, D. G. (2017). Cellular determinants and microenvironmental regulation of prostate cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, *44*, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2017.03.009>
- Salmi, M., & Meri, S. (2011). *Immuunijärjestelmän solut ja niiden kehitys [online]*. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 2013 (viitattu 5.3.2022). Saatavilla Internetissä: <https://www.oppiportti.fi/op/imm00201/do>

- Saqib, U., Sarkar, S., Suk, K., Mohammad, O., Baig, M. S., & Savai, R. (2018). Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget*, *9*(25), 17937–17950. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24788>
- Shalpour, S., Font-Burgada, J., Di Caro, G., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Dhar, D., Willimsky, G., Ammirante, M., Strasner, A., Hansel, D. E., Jamieson, C., Kane, C. J., Klatte, T., Birner, P., Kenner, L., & Karin, M. (2015). Immunosuppressive plasma cells impede T cell-dependent immunogenic chemotherapy. *Nature*, *521*(7550), 94–98. <https://doi.org/10.1038/nature14395>
- Sottnik, J. L., Zhang, J., Macoska, J. A., & Keller, E. T. (2011). The PCa Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*, *4*(3), 283–297. <https://doi.org/10.1007/s12307-011-0073-8>
- Stultz, J., & Fong, L. (2021). How to turn up the heat on the cold immune microenvironment of metastatic prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, *24*(3), 697–717. <https://doi.org/10.1038/s41391-021-00340-5>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tammela, T. L. J. (2012). Endocrine prevention and treatment of prostate cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *360*(1–2), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.03.002>
- Vitkin, N., Nersesian, S., Siemens, D. R., & Koti, M. (2019). The Tumor Immune Contexture of Prostate Cancer. *Frontiers in Immunology*, *10*, 603. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00603>
- Wu, S.-Q., Su, H., Wang, Y.-H., & Zhao, X.-K. (2019). Role of tumor-associated immune cells in prostate cancer: Angel or devil? *Asian Journal of Andrology*, *21*(5), 433. [https://doi.org/10.4103/aja.aja\\_47\\_19](https://doi.org/10.4103/aja.aja_47_19)
- Wu, Z., Chen, H., Luo, W., Zhang, H., Li, G., Zeng, F., & Deng, F. (2020). The Landscape of Immune Cells Infiltrating in Prostate Cancer. *Frontiers in Oncology*, *10*, 2211. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.517637>

Zhang, F., Wang, H., Wang, X., Jiang, G., Liu, H., Zhang, G., Wang, H., Fang, R., Bu, X., Cai, S., & Du, J. (2016). TGF- $\beta$  induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype. *Oncotarget*, 7(32), 52294–52306. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10561>