Immunhistochemische Beurteilung von Somatostatinrezeptor-subtypen im Entnahmematerial neuroendokriner Tumoren

Funktionen von Somatostatin

Somatostatin ist ein Peptidhormon und spielt eine entscheidende Rolle sowohl in der funktionellen als auch in der physiologischen Regulation verschiedener biologischer Vorgänge einschließlich der Hemmung der Peptidhormonsekretion sowie der Modulation der Zellproliferation und Angiogenese [1, 2]. Unter all den Funktionen dieses Peptidhormons ist Somatostatin insbesondere dafür bekannt, dass es die Hormonsekretion verschiedener Peptide hemmt [3]. Es ist das einzige Peptid, von dem man weiß, dass es an der universellen Suppression von Peptidhormonen beteiligt ist. Das Hormon und/oder sein Rezeptor sind daher über fast alle endokrinen Zellen verteilt, in denen Peptidhormonsynthese und -sekretion stattfinden. Seine biologischen Aufgaben erfüllt Somatostatin durch Wechselwirkung mit hochaffinen Bindungsstellen einer Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [4, 5]. Insbesondere wird die Funktion dieses Peptids über 6 unterschiedliche spezifische Somatostatinrezeptoren oder SSTR vermittelt, nämlich SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4 und SSTR5 [3]. Diese Rezeptorsubtypen sind nachgewiesenermaßen über verschiedene menschliche Organe wie das Zentralnervensystem, das Pankreas, den Gastrointestinaltrakt, die Nieren, das kardiovaskuläre System u. a. verteilt [3].

Somatostatin und neuroendokrine Tumoren

Neuroendokrine Tumoren (NET) entstehen, wie bekannt, aus neuroendokrinen Zellen und sind histologisch durch eine positive Reaktion auf verschiedene neuroendokrine Marker gekennzeichnet, einschließlich Chromogranin A, neuronenspezifischer Enolase (NSE), Synaptophysin u. a. [6]. Es ist für SSTR unter Einsatz verschiedener Techniken nachgewiesen worden, dass sie bei Patienten mit NET weit verbreitet sind [1]. Allerdings besteht eine relativ deutliche inter- und intratumorale Heterogenität hinsichtlich der Häufigkeit und Verteilung der SSTR-Subtypen bei derartigen Patienten [1, 7]. Die Ergebnisse vorangegangener Studien haben jedoch gezeigt, dass SSTR2A den am häufigsten exprimierten Subtyp in NET-Zellen darstellt [7]. Wie beschrieben, hat Somatostatin gewöhnlich eine inhibitorische Wirkung auf neuroendokrine Zellen, d. h. es bewirkt die Suppression der Peptidsekretion oder der Hormonfreisetzung. Daher ist das Somatostatinanalogon Octreotid in die klinische Versorgung der Patienten mit NET eingeführt worden, vor allem zum Einsatz gegen die Symptome des Karzinoidsyndroms, einschließlich Flush und Diarrhö, wobei es die Hormonfreisetzung und -sekretion aus den Tumorzellen hemmt [8]. Darüber hinaus ergaben diverse neuere klinische und grundlegende Laborergebnisse Hinweise darauf, dass diese Somatostatinanaloge auch von sich aus Antitumoreigen-

schaften einschließlich antiproliferativer Funktionen aufweisen [1]. Deshalb können derzeit Somatostatinanaloge auch als antineoplastische Substanzen gegen NET angesehen werden.

Gründe für die Untersuchung von SSTR in NET durch Pathologen

Warum müssen wir, die Pathologen, SSTR in NET untersuchen? Langwirkende Somatostatinanaloge sind schon umfassend zur Steuerung der Hypersekretion verschiedener Peptidhormone bei NET-Patienten eingesetzt worden. Und sie werden nun zunehmend als adjuvante Therapie verwendet, um das potenzielle Wiederauftreten des Tumors zu verhindern, auch bei Patienten mit Störungen des Hormonhaushalts [9, 10]. Es ist jedoch auch sehr wichtig zu beachten, dass diese Somatostatinanaloge nur bei Patienten wirksam sind, bei denen SSTR exprimiert werden. Daher ist es von grundlegender Bedeutung für die Kliniker, Informationen zum Rezeptorstatus vor Beginn der Therapie zu haben. Außerdem ist über eine starke Korrelation zwischen dem Vorhandensein von SSTR und der klinischen Antwort auf eine Octreotidtherapie berichtet worden,

Dieser Beitrag repräsentiert das Austauschprogramm zwischen der Japanischen Gesellschaft für Pathologie und der Deutschen Gesellschaft für Pathologie.

This presentation represents the exchange program between the Japanese Society of Pathology and the German Society of Pathology.

Abb. 1 ◀ Immunhistochemie des Somatostatinrezeptor-Subtyps 2A im menschlichen Pankreas. Nachweis von Membranimmunreaktivität in den Inselzellen

Abb. 2 ◀ Immunhistochemie des Somatostatinrezeptor-Subtyps 2A in einem Glukagonom. Diese japanische Patientin zwischen 40 und 50 Jahren mit multiplen Lebermetastasen erhielt langwirkendes Octreotid aufgrund dieses immunhistochemischen Befundes und blieb in stabilem Zustand

was ebenfalls die Bedeutung der Beurteilung des SSTR-Status in NET-Gewebe als entscheidenden Surrogatmarker der Octreotidtherapie bestätigt.

Radiomarkierte Somatostatinanaloge werden zur Lokalisation von NET mittels Szintigraphie mit hoher Spezifität und Sensitivität eingesetzt, wie beim Octreotid-Scan [11]. Diese Art der Szintigraphie wird zur Auswahl der Patienten für die Therapie mit Somatostatinanaloge verwendet. Allerdings ist dieses Szintigraphieverfahren nicht unbedingt in allen Ländern verfügbar. So gibt es z. B. in Japan überhaupt keinen Octreotid-Scan. Außerdem ist es praktisch unmöglich, die Information zu erhalten, welche SSTR-Subtypen in den Tumoren bestimmter NET-Patienten exprimiert werden. Wie erwähnt, variierten die Verteilung oder die Expressionsprofile der SSTR zwischen den Patienten, selbst innerhalb derselben

histologischen Klassifikation. Diese Information wird bald noch wichtiger und entscheidender für die Kliniker werden, weil ein noch potenteres Somatostatinanalogon entwickelt und eingeführt wird, welches mit spezifischen SSTR-Subtypen der Tumorzellen interagiert. Deshalb ist es für Pathologen, die chirurgisches Entnahmematerial auswerten, wichtig geworden, den Status der SSTR-Subtypen in Tumoren individueller NET-Patienten zu beurteilen, um den Klinikern genauere Informationen hinsichtlich der Auswahl geeigneter Therapien zu liefern.

Vorgehen der Pathologen zur Beurteilung von SSTR in NET

Wie können wir SSTR in NET in unseren diagnostischen Labors beurteilen? Wie bereits erwähnt, kann aus der Sicht der Pathologen die Analyse von SSTR in

NET-Proben im Spektrum der Analyse von Surrogatmarkern für spezifische Therapien betrachtet werden, wie z. B. HER2 für die Herceptinbehandlung und Östrogenrezeptoren für die Therapie mit Aromatasehemmern bei Patienten mit Brustkrebs. Die Auswertung der Echtzeit-Polymerasekettenreaktion („real-time polymerase chain reaction“, RT-PCR), insbesondere der quantitativen RT-PCR, kann wichtige Daten hinsichtlich der genauen Unterscheidung der SSTR-Subtypen liefern. Grundlage dafür ist deren Molekulargewicht und ihre exakte und reproduzierbare Quantifizierung [1].

Hierbei ist es jedoch auch von großer Bedeutung zu beachten, dass viele Entzündungszellen und Endothelzellen SSTR-Subtypen exprimieren, manchmal im Übermaß, wie in Fällen von Entzündungsprozessen, bei denen es zur Tumorzellinfiltration kommt. Deshalb ist die in situ erfolgende Auswertung zwingend zur Beurteilung der SSTR in klinischen Proben. Außerdem entspricht die Situation, in der die Kliniker die Pathologen um eine Beurteilung von SSTR bitten, gewöhnlich dem Zeitpunkt, zu dem sie – zumindest in vielen Ländern – die Patienten mit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung sehen. Daher sind die einzigen verfügbaren Proben für diese von den Klinikern erbetene Analyse möglicherweise archivierte oder mit 10%igem Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben. Unter praktischen Gesichtspunkten kommt als einzige Methode zur Identifizierung von SSTR-Subtypen bei einzelnen Patienten mit einem NET, bei denen die Kliniker die Anwendung von Somatostatinanaloge erwägen, nur die Immunhistochemie in Frage. Darüber hinaus ist in denjenigen Ländern, in denen ein Octreotid-Scan zur klinischen Anwendung nicht zur Verfügung steht, wie in Japan, die Immunhistochemie von SSTR das einzige verfügbare Laborverfahren, um zu bestimmen, ob den Patienten mit einem NET zu diesem Zeitpunkt ein Somatostatinanalogon verabreicht werden kann.

Immunhistochemie von SSTR zur Diagnostik

Verfahren der Immunfärbung

Polyklonale Antikörper gegen SSTR-Subtypen sind bei der Fa. Gramsch Laboratories, Schwabhausen, kommerziell erhältlich. Mit der Kombination einer Mikrowellenbestrahlung zur Antigenrückgewinnung kann die SSTR-Subtypen-Immunreaktivität in mit 10%igem Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben einschließlich archivierten, gelagerten Materials nachgewiesen werden. Als positive Kontrollen können Inselzellen des Pankreas oder gastrointestinale Mukosa dienen. In **Abb. 1** dargestellt ist die positive Immunreaktivität von SSTR2A in menschlichen Inselzellen des Pankreas, die bei einer Autopsie entnommen worden waren. Eine charakteristische Membranimmunreaktivität ist in dieser Darstellung erkennbar. Wie bei der Immunhistochemie anderer Surrogatmarker sollten im Idealfall diese positiven Kontrollen in den Gewebeteilen enthalten sein, die zur Immunfärbung vorliegen. Daher sollten die Pathologen diese Objektträger vor der Durchführung der Immunhistochemie von SSTR auswählen. Negative Kontrollen für die Immunfärbung sollten [aus] Absorptionsstudien vorliegen. Außerdem ist jegliche Vorsicht bei der Bearbeitung der Proben für die Immunhistochemie walten zu lassen, als da sind die unmittelbare Immersion der Proben in das Fixiermittel, eine angemessene Dauer der Fixierung usw. – wie bei jedem immunhistochemischen Verfahren für diagnostische Zwecke. Jedoch liegt in den weitaus meisten Fällen einer auf Anfrage von Klinikern durchgeführten immunhistochemischen Beurteilung von SSTR Archivmaterial vor, bei dem wir Pathologen diese Aspekte der Gewebebearbeitung nicht steuern können.

Interpretation der Immunreaktivität

SSTR sind im Grunde Membranrezeptorproteine, und ihre immunhistochemische Beurteilung ergab mehr Schwierigkeiten als die Interpretation von nukleären Antikörpern wie Ki-67 oder dem Östrogen-/

Zusammenfassung · Abstract

Pathologie 2010 · [Suppl 2] 31:199–203 DOI 10.1007/s00292-010-1369-z
© Springer-Verlag 2010

H. Sasano · S. Iida · A. Kasajima

Immunhistochemische Beurteilung von Somatostatinrezeptor-subtypen im Entnahmematerial neuroendokriner Tumoren

Zusammenfassung

Durch die klinische Entwicklung spezifischer/selektiver oder potenterer Somatostatinanaloge ist die Beurteilung der Somatostatinrezeptor- (SSTR-) Subtypen in archiviertem Material oder mit 10%igem Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben neuroendokriner Tumoren (NET) entscheidend geworden, um den größtmöglichen klinischen Nutzen für NET-Patienten zu erlangen. Die Immunhistochemie der SSTR-Subtypen könnten zur Profilerstellung der Expressionsmuster von SSTR-Subtypen bei diesen Patienten beitragen. Daher ist zu erwarten, dass Kliniker die Pathologen, die chirurgisches Entnahmematerial auswerten, in naher Zukunft bitten, Immunfärbungen und Be-

urteilungen der SSTR-Subtypen in NET-Proben durchzuführen. Mit der Immunhistochemie der SSTR-Subtypen, vor allem ihrer Beurteilung, gehen aber Probleme einher. Daher sollten Pathologen und Kliniker, die an der Versorgung von NET-Patienten beteiligt sind, die Vorteile und Grenzen der immunhistochemischen Beurteilung der SSTR-Subtypen kennen, um das beste Behandlungsergebnis für die Patienten zu erzielen.

Schlüsselwörter

Somatostatinrezeptor · Somatostatinanalogon · Immunhistochemie · Pathologie · Neuroendokriner Tumor

Immunohistochemical evaluation of somatostatin receptor subtypes in surgical pathology specimens of neuroendocrine tumors

Abstract

The clinical development of specific/selective or more potent analogues of somatostatin has made the evaluation of somatostatin receptor subtypes in archival specimens or 10% formalin-fixed and paraffin-embedded specimens of neuroendocrine tumor (NET) critical to conferring the maximum clinical benefits on NET patients. Immunohistochemistry of somatostatin receptor subtypes could contribute to profiling their expression patterns in these patients. Therefore, surgical pathologists are expected to be asked to immunostain and evaluate somatostatin receptor subtypes in NET specimens in the near future by clinicians. However, there are prob-

lems associated with immunohistochemistry of somatostatin receptor subtypes, in particular with their evaluation and interpretation. Therefore, both pathologists and clinicians involved in the care or management of NET patients should be aware of the advantages and limitations of immunohistochemical evaluation of somatostatin receptor subtypes in order to achieve the most efficient treatment outcome for patients.

Keywords

Receptors, somatostatin · Somatostatin analogue · Immunohistochemistry · Pathology · Neuroendocrine tumors

Progesteronrezeptor. In Fällen mit Vorliegen eines NET kann die Immunreaktivität membranös, sowohl membranös als auch zytoplasmatisch oder nur zytoplasmatisch sein. Diese zytoplasmatische Immunreaktivität ist möglicherweise authentisch, was die Internalisierung des Rezeptors infolge der Bindung von Liganden und/oder erhöhter Synthese widerspiegeln könnte, sie könnte aber auch ein Zeichen für nicht-spezifische Immunreaktivität sein. Daher sollte die Interpretation der Ergebnisse mit größter Sorgfalt erfolgen, wenn nur eine zytoplasmatische Immunlokalisierung in Fällen eines NET nachweisbar ist. Wie in **Abb. 2** zu sehen, ist membranöse Immunreaktivität in Fällen eines NET deutlich erkennbar.

Aus diesem Grund ist es wichtig für Pathologen, das Folgende bei der Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse von SSTR zu beachten.

Definition positiver oder negativer SSTR

Für Kliniker ist diese Definition im Hinblick auf die Applikation von Somatostatinanaloga offensichtlich von Bedeutung. Die Informationen können eine hohe Analogie zu denen des Hercep-Tests aufweisen, der routinemäßig bei Brustkrebspatienten durchgeführt wird, obwohl es weder standardisierte Labortests noch Interpretationskriterien dafür gibt.

Grading?

Seitens der Kliniker werden möglicherweise nicht nur Informationen zum Vorliegen, sondern auch zur Menge der einzelnen SSTR-Subtypen vom Pathologen erbeten. Dies könnte der Fall sein, wenn spezifische oder selektive Somatostatinanaloga zur Therapie von NET in naher Zukunft verfügbar sein werden, weil diese selektiven Somatostatinanaloga eine unterschiedliche Affinität zu einzelnen Subtypen aufweisen. Daher ist es wichtig zu wissen, ob nur die Anzahl oder das Verhältnis immunpositiver Zellen beurteilt

werden sollen oder auch die relative Immunintensität von SSTR. Darüber hinaus ist es auch von Bedeutung zu wissen, wie mit den bereits genannten Immunreaktivitätsmustern, d. h. membranös oder zytoplasmatisch, umzugehen ist.

Zusätzlich zu den beschriebenen technischen Problemen sollten die Beurteilungskriterien im Idealfall auf der Korrelation der Ergebnisse mit der klinischen Antwort der Patienten auf eine Octreotidtherapie basieren. Denn die Immunhistochemie wird zum Zweck der Auswahl derjenigen Patienten durchgeführt, die möglicherweise auf Somatostatinanaloga reagieren. Allerdings gibt es bisher in der Literatur keine Veröffentlichungen dazu – im Gegensatz zur HER2-Beurteilung bei Brustkrebspatienten. Jedoch schlugen die Arbeitsgruppen von Papotti et al. [12, 13] Kriterien zur Beurteilung der Immunreaktivität der SSTR-Immunhistochemie sowohl in NET des Pankreas oder des Gastrointestinaltrakts als auch der Lunge vor. Ihre Immunhistochemieergebnisse waren den Veröffentlichungen

Hier steht eine Anzeige.

zufolge in signifikanter Weise mit den Informationen zur SSTR-Expression derselben NET-Fälle korreliert, die aus RT-PCR und/oder mRNA-in-situ-Hybridisierung oder Octreotid-Scan stammten [12, 13].

Dieselbe Gruppe verfeinerte die Auswertungskriterien der SSTR-Immunhistochemie bei NET und schlug im Weiteren ein Punktsystem für die SSTR2A-Immunhistochemie bei NET vor, das mit In-vivo-Daten korreliert. Die Ergebnisse ihrer Studie zeigten deutlich, dass – eher als die zytoplasmatische Färbung – nur die Membranfärbung für einen verlässlichen, standardisierten und klinisch relevanten Bericht betrachtet werden sollte [14]. Es ist jedoch weiterhin sehr wichtig, in naher Zukunft verlässliche und reproduzierbare Interpretationskriterien der SSTR-Immunhistochemie zu etablieren sowie eine Standardisierung der immunhistochemischen Verfahren zur Versorgung der Kliniker mit ebenso verlässlicher Information hinsichtlich der Auswahl von NET-Patienten für eine Therapie mit potenten Somatostatinanaloga wie hinsichtlich HER2 und Östrogen-/Progesteronrezeptoren bei Brustkrebs.

Derzeitige Grenzen der SSTR-Immunhistochemie

Für Pathologen und Kliniker ist es gleichermaßen von Bedeutung, sich immer der Grenzen der Ergebnisse bewusst zu sein, die Labortests mit Surrogatmarkern spezifischer Therapien liefern, bevor die beschriebenen Resultate auf die wirkliche Behandlung der Patienten übertragen werden.

Die Grenzen der SSTR-Immunhistochemie werden zzt. wie folgt zusammengefasst.

- Fehlen standardisierter immunhistochemischer Protokolle und Interpretation:
Das ist möglicherweise immanent unvermeidlich angesichts der Natur der immunhistochemischen Beurteilung, aber eine Studie von großem Umfang könnte zur deren Erstellung beitragen.
- Fehlende Korrelation zwischen den Ergebnissen der Immunhistochemie und der klinischen Antwort auf Oc-

treotid oder Somatostatinanaloga bei Patienten mit NET:

Im Zeitalter der evidenzbasierten Medizin sollte dieser Punkt weiter verbessert werden. Daher ist es für Pathologen wie für Kliniker entscheidend, sich darüber im Klaren zu sein, dass zwar die Expression von SSTR in Tumorzellen, die entweder mittels Immunhistochemie, RT-PCR oder Szintigraphie beurteilt worden ist, obligatorisch für die Behandlung mit Somatostatinanaloga bei NET-Patienten ist, aber ihr Vorhandensein keineswegs bedeutet, dass eine klinische Antwort der Patienten auf die Behandlung erfolgt.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. H. Sasano

Department of Pathology,
Tohoku University School of Medicine
2-1 Seiryomachi, Aoba-ku,
980-8575 Sendai
Japan
hsasano@patholo2.med.tohoku.ac.jp

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Ono K, Suzuki T, Miki Y et al (2007) Somatostatin receptor subtypes in human non-functioning neuroendocrine tumors and effects of somatostatin analogues SOM230 on cell proliferation in cell line NCI-H727. *Anticancer Res* 27:2231–2240
2. Srirajskanthan R, Watkins J, Marelli L et al (2009) Expression of somatostatin and dopamine 2 receptors in neuroendocrine tumours and the potential role for new biotherapies. *Neuroendocrinology* 89:308–314
3. Taniyama Y, Suzuki T, Mikami Y et al (2005) Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr J* 52:605–611
4. Patel YC (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20:157–198
5. Guillermet-Guibert J, Lahalou H, Pyronnet S et al (2005) Somatostatin receptors as tools for diagnostic and therapy: molecular aspects. *Best Pract Res Gastroenterol* 19:535–551
6. Kloppel G, Perren A, Heitz PU (2004) The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann NY Acad Sci* 1014:13–27
7. Reubi JC, Krenning E, Labmerts SW et al (1992) In vitro detection of somatostatin receptors in human tumors. *Metabolism* 41:104–110
8. Caplin ME, Buscombe JR, Hilson AJ et al (1998) Carcinoid syndrome. *Lancet* 352:799–805
9. Khasraw M, Townsend A, Price T et al (2010) Objective radiological disease control with Sandostatin monotherapy in metastatic neuroendocrine tumors. *Intern Med* 40:453–458

10. Oberg K (2010) Caner: antitumor effects of octreotide LAR, a somatostatin analog. *Nat Rev Endocrinol* 6:188–199
11. Krenning EP, Valkema R, Kwekkeboom DJ et al (1995) Somatostatin receptor scintigraphy. In: Freeman LM (ed) *Nuclear Medicine Annual*. Raven, New York, p 1–50
12. Papotti M, Bongiovanni M, Volante M et al (2002) Expression of somatostatin receptor types 1–5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Virchows Arch* 440:461–475
13. Papotti M, Croce S, Bello M et al (2001) Expression of somatostatin receptor types 2,3 and 5 in biopsies and surgical specimens of human lung tumors. Correlation with preoperative octreotide scintigraphy. *Virchows Arch* 439:787–797
14. Volante M, Brizzi MP, Faggiano A et al (2007) Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol* 20:1172–1182