

Dr. Tímár József
Országos Onkológiai Intézet
Budapest

A vastagbélrák prognosztikus és prediktív pathológiája

Genomika

A vastagbélrákok újszerű felosztása a molekuláris ismeretekre alapozott, mely figyelembe veszi a mai tudásunk alapján meghatározó jelentőségű genomikai sajátosságokat: a mikroszatellita instabilitást (MSI) vagy stabilitást (MSS), a kromoszomális instabilitást (CIN) valamint az epigenetikai státuszt (CpG sziget-metilátor genotípus, CIMP). Mindezek figyelembe vételével 6 genetikai alcsoport képezhető, melyeket érdekes módon egyéb genetikai jellegzetességek is kísérik.

A leggyakoribb csoport az MSI-low/MSS-CIMP0 mely 40%-os gyakorisággal fordul elő, nem jellemzi KRAS/BRAF mutáció, a disztális kolonfélnben helyezkedik el és független a nemtől, ugyanakkor CIN jellemzi (CRC-6).

A kissé ritkább forma az MSS-CIMP_{low} csoport 35%-os gyakorisággal. Ebben a formában nincs CIN azonban KRAS mutáció jellemzi és férfi nemhez kapcsolódik (CRC-5).

A következő csoport az MSIH-CIMPH, mely 10%-os gyakorisággal fordul elő, CIN negatív, a proximális kolonfélnben fordul elő idős nőkben. Genetikailag MLH1 inaktivitással jár (metiláció), BRAF mutáns, CDKN1B/p27 negatív (CRC-1).

Ezen formánál ritkább az MSIH-CIMPL/0 forma 5%-al. Ebbe a csoportba van a HNPCC-Lynch szindróma is. Ezek a daganatok KRAS mutánsok, CIN negatívak, a proximális kolonfélnben fordulnak elő, nyáktermelés jellemzi erős limfocitás infiltrációval (CRC-2).

Hasonló gyakoriságú az MSIL/MSS-CIMPH csoport, melyeket BRAF mutáció jellemez genetikailag, mely CIN negatív. Ugyanakkor gyengén differenciált, pecsétgyűrűsejtes szövettani típusú, idős nőbetegben a jobb kolonfélnben helyezkedik el (CRC-3).

Az utolsó variáns az MSIL-CIMP-L csoport, melyek KRAS mutánsok (mellette MGMT metiláltak) (CRC-4).

Ezek a genetikai-szövettani asszociációk igen hasznosak farmakogenetikai szempontból is, aminek egyre gyakoribb jelentősége lesz a személyre szabott terápiák meghatározásában (1).

Az elmúlt két évben hatalmas munkát végezett el Vogelstein munkacsoportja, akik 11 vastagbélrák (és 11 emlőrák) teljes genomjának szekvenálását végezték el. Nyilván sokféle szempontból fogják feldolgozni ezeket, eddig a mutáció-analízist publikálták, aminek eredményeként (szerintük) át kell értékelni eddigi genomikai szemléletünket. Eredményeik alapján egy-egy vastagbélrákot közel 70 mutáció jellemez, melyek közül 20-25 tekinthető rák-génnek. Ezen mutáns csoportot aztán több mint 100 vastagbélrákon tovább elemeztek. A mutáns rákgének között megtalálhatók voltak a klasszikusnak tekinthető gének (KRAS, BRAF, TGFBR2, APC, NF1) de számos új onkogén is látótérbe került, mint pl. a RET. Ezeken kívül adhéziós molekulák, metalloproteázok, transzport-fehérjék, transzkripciós faktorok is gyakran mutáltak. Izgalmas és farmakogenetikai jelentőségű lehet a DNS repair enzim ERCC6 mutációja, ami a platina-alapú terápiákkal szembeni érzékenységet határozhatja meg. Talán a legizgalmasabb megfigyelés az, hogy az egyes daganatok mennyire egyedi mutációs spektrum szempontjából és hogy mennyire különböznek egymástól, ami tovább erősíti azt a nézetet, hogy a rákot individuálisan kell kezelni (2, 3).

Természetesen továbbra is jelentősége van az expressziós profiloknak is, különösen olyan gének esetében melyek elvesznek, vagy megjelennek a malignus transzformáció során. 36 adenoma és 14 korai invazív karcinoma genomikai analízise alapján 32 gént azonosítottak melyek expressziója jellegzetesen megváltozott a transzformáció során. Kiemelkedő jelentősége van fokozottan kifejeződő géneknek, melyek között az EIAF transzkripciós faktor, az IGF-2 inzulin-szerű növekedési faktor, a BPM-4 (csontmatrix fehérje), iNOS a TIMP-1 metalloproteáz inhibitor, a TGFβ₂ jelátvitelben fontos SMAD4,

valamint a más daganatokban metasztázis szuppresszornak tartott NM23 (NDP-kináz) szerepeltek (4). Egy másik vizsgálatban a vastagbélrákra jellemző géneket vastagbélrák (35)-normál mukóza(13) összehasonlításával keresték, de a genetikai vizsgálatokat fehérje-szinten is igyekeztek validálni. Ebben a vizsgálatban közel 600 eltérően kifejeződő gént találtak, melyek között apoptózis-gátló gének, (BIRC1/6, BFAR), lipidszignál-útvonal génjei (pl. PIK3R2), transzlációt szabályozó EIF4EL3, HLA-E, keratin-7, ubiquitin ligáz SMURF2, ATM tumorszupresszor, VEGF szerepeltek. A csökkent expressziót mutató gének között figyelmet érdemel a beta2 mikroglobulin (B2M), mely felelős lehet az immunológiai láthatatlanná válásban (5). Egy másik vizsgálatban 33 UICC-St-II kolon karcinómát hasonlítottak a normál mukózához microarray segítségével, és egy 17 génes szettet találtak, melyet PCR vizsgálattal is megerősítettek. A 17 kolonrák-specifikus gén között a C-MYC onkogén tűnik jelentősnek és a más-hol metasztázis gének tartott S100A11 (HMGA1). Ugyanakkor számos korábban már vastagbélrákkal kapcsolatba hozott gént is találtak, azonban ezek expressziós szintje alacsonyabb volt a 17 génnél: ezek között említést érdemel az APC, BCL2, ciklinD1, p21, p27, EGFR, dekorin, beta-catenin, E-cadherin, CD44, DPD, MLH1, MSH2, MSH6, PCNA, PTEN, uPA, COX2 (6).

Sajnálatosan kevés vizsgálat foglalkozik azzal, hogy a rektum és a kolon daganatai miben térnek el genetikailag egymástól. Egy nagyobb microarray analízis azt találta, hogy a COX2 expresszió elsősorban a rektális rákokban fokozódik, míg a kolon rákjaira a BCL2 és EGFR valamint a GSK3B fokozott expressziója jellemző. Érdekes módon mindkét daganatban jellegzetes a WNT/beta-catenin jelátviteli pálya zavara és fokozott a VEGF citokin expressziója (7).

Prognosztikus genomika

Ezek a vizsgálatok arra irányulnak, hogy igyekezzenek olyan genetikai jellemzőket azonosítani a primer tumorban, melyek hatékonyabbak a klasszikus TNM rendszernél annak megjóslásában, hogy milyen kimenetele lesz a betegségnek. Gyakorlatilag az ún. metasztázis gének feltárása a cél. Ugyanakkor látni kell azt is, hogy nagy jelentősége lenne azoknak a vizsgálatoknak is melyek a metasztázisok jellemzőit vizsgálná, mert az abban specifikusan expresszáldó gének között lehet keresni az ún. metasztázis-fenntartó géneket. A kétféle csoport együttes ismeretére lenne szükség ahhoz, hogy pontos képet kaphassunk a betegség genetikájáról... Jelenleg elsősorban ún. metasztázis-génekre nézve rendelkezünk adatokkal. Egy érdekes vizsgálat a RAP1 kináz inhibitor (RKIP) prognosztikus erejét analizálta nagyszámú kolorektális beteg esetében és azt találta hogy az RKIP pozitív prognosztikus tényező, mely felül írja az N státuszt és a vaszkuláris inváziót is. A megfigyeléseket 10 éves túlélési adatokkal támasztották alá (8). A genomikai vizsgálatok legnagyobb hibája, hogy nagyon labor- és beteganyag-specifikus. Ezt úgy kell megszüntetni, hogy független beteganyagon és vizsgálati rendszereken kell ellenőrizni (validálni) a kapott mintázatokat. Ilyen vizsgálatot végeztek német és újjélandi szerzők egymás anyagán tesztelve eredményeiket. Mindegyikük azonosított egy ún. metasztázis-mintázatot (22 és 19 gén) melyek eltértek egymástól és egymás beteganyagán validálták azt. Eben az is érdekes, hogy nyilvánvalóan más-más genetikai háttere van a két égtájon a vastagbélráknak. Érdekes módon az újjélandi mintázat prognosztikus ereje igen jó volt a német beteganyagon, míg a német mintázat nem működött az újjélandin. Az újjélandi mintázat elsősorban hatékonyak voltak St-III-ban de alig működtek alacsonyabb stádiumok esetén (9).

Egy amerikai vizsgálatban 78 kolorektális rák expressziós profilját vizsgálták prognosztikus szempontból és a 3 éves túlélés alapján értékelték. 43 génből álló marker-mintázatot azonosítottak, mely 93%-os érzékenységgel és 84%-os specificitással volt képes jelezni a túlélést ami sokkal jobbnak bizonyult, mint a Dukes stádium. Erőssége a vizsgálatnak, hogy egy dán beteganyagon is hasonló sikerrel tudták alkalmazni (10). Az ún. prognosztikus gének között a csontmatrix fehérje osteopontin és a neuregulin (EGFR3 ligand) voltak megtalálhatók, valamint számos immunológiai válaszreakcióban szereplő gén.

Egy másik vizsgálatban májjáttéteket és primer tumorokat hasonlítottak össze és egy 46 génes májmetasztázis-mintázatot találtak (metasztázis-fenntartó gének!). A mintázatból a WNT5A (beta-catenin jelátvitel) és a CA-II (hipoxia-HIF jelátvitel) expresszióját validálták is PCR vizsgálattal (11).

Különös, hogy mindkét gén csökkent expressziója jellemezte a májáttéteket, ugyanakkor fokozódó expressziót mutatott a PGI2 szintáz (amikor a COX2 csökkent), a TIMP1 metalloproteáz gátló, az EPOR, az SDF1 és az EIF4A transzkripciós faktor.

Egy 33 elemből álló UICC-St-II kohorsz esetében a nyirokcsomó+/- tumorokat diszkrimináló prognosztikus szettet kerestek a primer tumorban és relatíve kicsi 68 génes mintázatot azonosítottak, mely hatékonyan volt képes megjósolni a nyirokcsomó-áttétképző képességet. PCR vizsgálattal 4 expresszióját validálták: IL-8, UBD, ICAM1 és PPM1G. A mintázatban több transzkripciós faktor, proteasomális fehérje és ubiquitinációs enzim szerepeltek, ami arra utal, hogy elsősorban poszt-transzkripciós szabályozási változásokat jelenthet a limfatikus áttétképző képesség elnyerése, sem mint genetikai módosulásokat (6).

Korábban számos vizsgálatban igazolódott, hogy a vastagbélrákban emelkedett a VEGF expresszió, ami egyik oka lehet az angiogenetikus képességnek. Ugyanakkor az is ismert, hogy a VEGF citokin igen polimorf, számos SNP-t tartalmaz génje. Egy koreai munkacsoport 45 vastagbélrákos betegben elemezte a VEGF polimorfizmust (634, 936 és 2578 codonok) és annak esetleges prognosztikai szerepét. Meglepő módon azt találták, hogy a VEGF-634-GG, 936-CT/TT genotípusok esetében kedvezőtlenebb 5 éves túlélés következik be, ami független az egyéb klasszikus prognosztikus tényezőktől. Különösen a 2578A/936T/634G SNP kombináció tűnik kedvezőtlennek a túlélés szempontjából (12). Ennek a vizsgálatnak esetleg anti-VEGF terápia farmakogenomikája szempontjából is jelentősége lehet.

Immunológia

Az elmúlt évek egyik fontos eredménye volt az, hogy nagy (több száz betegből álló) beteganyagon igazolódott, hogy a vastagbélrákot infiltráló CD3+ T sejtek denzitásának igen nagy prognosztikus jelentősége van és ennek alapján jobban lehet a betegség kimenetelét illetve a túlélést megjósolni, mint a klasszikus patológiai stádium meghatározással (13). Más analízisek a T-reguláló immunszuppresszív sejtek negatív prognosztikus szerepét bizonyították ebben a daganatféleségben is. Egy 40 kolorektális rákból álló anyagon az antigén-prezentáló DC és a makrofágok denzitását vizagálták primer tumorokban és a periférián kimutatható daganatellenes T sejt immunválaszhoz hasonlították meg a teljes túléléshez. Kimutatták, hogy a DC denzitás mértéke egyenesen arányos a T sejt daganatellenes válasszal és jobb prognózist jelent. Ugyanakkor egy ellentmondása vizsgálatnak, hogy a DC denzitás egyenes arányban állt a FOXP3+ T reguláló immunszuppresszív sejtekkel is, melyek más vizsgálatban kedvezőtlen prognózissal kapcsolódtak (14).

Farmakogenomika

Korábban többször felvetődött, hogy az MSI státusznak jelentősége volna az 5FU terápia iránti érzékenység szempontjából, azonban egy nagy 542 betegből álló anyagon megvizsgálva ezt kijelenthető, hogy az MSI-H genetikai alcsoport nem jelent szelekciós markert a kemoterápia indikációjára (15). A vastagbélrák célzott terápiájának egyik hatékony eszköze az anti-EGFR antitest-terápia, azonban a prediktív tényezők ezek esetében még nem ismertek. A Cetuximab esetében egy vizsgálat utalt arra, hogy az EGFR gén kópiaszámának megemelkedett volta pozitívan korrelált a terápiás válasszal, de ezeket az eredményeket még vitatják (16). Egy újabb vizsgálatban a kolorektális rákos betegek 30%-ban észleltek EGFR génamplifikációt és 59%-ban 7 kromoszóma poliszómiát, ami kicsit magasnak tűnik (17). Ezesetben a Cetuximab válasszal jól korreláltak ezek az adatok. A frissen törzskönyvezett panitumumab esetében is hasonló eredményre jutottak, az alacsony EGFR kópiaszám (<2.47/sejtmag vagy <40% sejtből kr7 polisomia) kedvezőtlenebb progressziómentes és teljes túléléshez vezetett. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy valódi EGFR génamplifikáció igen ritka, sokkal gyakoribb ennél a 7 kromoszóma poliszómiája/megsokszorozódása (18).

Ennek az évnek kétségtelenül legfontosabb felfedezése ebből a szempontból az volt, hogy vastagbélrákban az EGFR ellenes terápiákat a KRAS mutációs állapot alapvetően befolyásolja. A biológiai jelenség igazi általános érvényét mi sem bizonyítja jobban, mint az hogy 2006/2007-ben három

nagy tanulmány igazolta egybehangzóan ezt. A vizsgálatok egyértelműen bebizonyították, hogy a KRAS mutáns vastagbélrákok rezisztensek mind a Cetuximabra, mind pedig, a Panitumumabra (19, 20, 21, lsd. Panitumumab/Vectibix törzskönyvi leirata). Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a BRAF mutáns tumorok eltérő érzékenysége nézve nincsenek meggyőző adatok még, pedig elméletileg az volna várható, hogy miután ugyanazon jelátviteli útvonalról van szó, mint a KRAS, hasonló következménye volna. Kiderült az is, hogy a gyakori PTEN vesztés a vastagbélrákban szintén a Cetuximab iránti rezisztenciához vezet (17). Fontos dolog az, hogy frissen törzskönyvezett panitumumab indikációjának feltétele a KRAS mutáns státusz ismerete és valószínűleg nem kell sokat várni, hogy ez legyen a feltétele a Cetuximab alkalmazásának is. Ugyanakkor érdekes és egyelőre további ellentmondás, hogy az EGFR gén-státusz és fehérje expresszió az egyik leggyengébb prediktív markere az EGFR-t célzó terápiáknak, mely ellentmondást előbb vagy utóbb illene felszámolni.

Irodalom:

1. Ogino S, Goel A.: Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Molec Diagn* 10:13-27, 2008
2. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, et al: The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314:268-274, 2006
3. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, et al: The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314:268-274, 2007
4. Nosho K, Yamamoto H, Adachi Y, et al: Gene expression profiling of colorectal adenocarcinomas and early invasive carcinomas by cDNA array analysis. *Br J Cancer* 92:1193-1200, 2005
5. Bianchini M, Levy E, Zucchini C, et al: Comparative study of gene expression by cDNA microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa. *Int J Oncol* 29:83-94, 2006
6. Grade M, Hörmann P, Becker S, et al: Gene expression profiling reveals a massive, aneuploidy-dependent transcriptional deregulation and distinct differences between lymph node-negative and lymph node-positive colon carcinomas. *Cancer Res* 67:41-56, 2007
7. Grade M, Ghadimi BM, Varma S, et al: Aneuploidy-dependent massive deregulation of the cellular transcriptome and apparent divergence of the Wnt/b-catenin signaling pathway in human rectal carcinomas. *Cancer Res* 66:267-282, 2006
8. Zlobec I, Baker K, Minoo P, et al: Node-negative colorectal cancer at high risk of distant metastasis identified by combined analysis of lymph node status, vascular invasion, and Raf-1 kinase inhibitor protein expression. *Clin Cancer Res* 14:143-148, 2008
9. Lin YH, Friederichs J, Black MA, et al: Multiple gene expression classifiers from different array platforms predict poor prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 13:498-507, 2007
10. Eschrich S, Yang I, Bloom G, et al: Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 23:3526-3535, 2005
11. Ki DH, Jeung HC, Park CH, et al: Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer. *Int J Cancer* 121:2005-2012, 2007
12. Kim JG, Chae YS, Sohn SK, et al: Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms associated with prognosis for patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14:62-66, 2008
13. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al: Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-1964, 2006
14. Nagorsen D, Voigt S, Berg E, et al: Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med* 5:62, 2007

15. *Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS, et al:* A nagyfokú mikroszatellita-instabilitás prognosztikai és prediktív szerepe vastagbélrákban: A National Cancer Institute és a National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project közös vizsgálata. *J Clin Oncol* 3:127134, 2007
16. *Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, et al:* Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 6:279-286, 2005
17. *Frattini M, Saletti P, Romagnani E, et al:* PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 97:1139-1145, 2007
18. *Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, et al:* Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol* 25:3238-3245, 2007
19. *Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, et al:* KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66:3992-3995, 2006
20. *Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, et al:* Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J cancer* 96:1166-1169, 2007
21. *Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, et al:* Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 25:3230-3237, 2007