

Molekylærbiologisk diagnostikk ved lungekreft

Sammendrag

Bakgrunn. Lungekreft er på tiende plass blant dødsårsakene i Norge. På tross av stor forskningsinnsats de senere årene for å bedre diagnostisering, prognosevurdering og terapi for denne pasientgruppen, har ikke dette resultert i vesentlig bedring i overlevelse.

Materiale og metode. Kunnskapen er hentet fra vitenskapelige artikler og oversiktsartikler.

Resultater og diskusjon. Vi har fått økt kunnskap om molekylære defekter i lungekreftcellen. Nye studier viser at i tillegg til mutasjoner og tap av en rekke gener i lungekarsinomer og premaligne stadier, er mange gener inaktivert på grunn av hypermetylering. Bruk av avvikende promotormetylering som molekylær markør kan få stor betydning for tidlig diagnostikk av lungekreft og i screeningprogrammer. Videre indikerer nyere forskning at genespresjonsprofiler kan komme til å få stor nytte i klassifisering og diagnose av lungekreft. Flere interessante lungekreftmarkører er identifisert.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

Aage Haugen

age.haugen@stami.no
Toksikologisk seksjon
Statens arbeidsmiljøinstitutt
Postboks 8149 Dep
0033 Oslo

Årlig rammes ca. 2 100 personer av lungekreft i Norge. Forskning viser entydig at røyking er den viktigste årsaken til lungekreft. 85 % av tilfellene anses å være forårsaket av røyking. Andre risikofaktorer kan være passiv røyking i mange år eller det å ha

et yrke der man eksponeres for asbest, uran eller annen industriforurensning. Nesten alle pasienter med lungekreft (90 %) dør innen fem år. Best prognose har de pasientene som opereres, men disse utgjør mindre enn 20 % av tilfellene. Selv blant opererte pasienter er residivfrekvensen høy, med femårsoverlevelse på mindre enn 50 %. Behandlingsresultatene ved lungekreft er ikke blitt vesentlig bedre de siste 20 årene. Den dårlige overlevelsen skyldes hovedsakelig at mer enn 2/3 av pasientene har metastaser på diagnosetidspunktet. Det er stort behov for å utvikle bedre diagnostiske og terapeutiske strategier i behandlingen av lungekreft.

Det finnes to hovedgrupper av lungekreft: småcellet (SCLC) og ikke-småcellet lungekreft (NSCLC). Den sistnevnte deles tradisjonelt inn i tre histologiske hovedtyper, plateepitelkarsinom, adenokarsinom og storcellet karsinom. Småcellet lungekreft oppstår fra umodne celler i bronkiens slimhinne. Den vokser meget raskt og sprer seg til andre organer tidlig i sykdomsforløpet. Plateepitelkarsinom oppstår ofte i de store luftveiene, mens adenokarsinom vanligvis er lokalisert perifert. Småcellet lungekreft utgjør ca. 15–20 % og ikke-småcellet lungekreft ca. 80 % av tilfellene. Sykdomsutvikling, behandlingssopplegg og prognose er forskjellig for disse fire hovedtypene av lungekreft.

Genetiske forandringer

Kunnskap om molekylære defekter i lungekreftcellen vil kunne være en rettesnor for forløp og prognose. Gjennom de senere års fremskritt innen molekylærbiologi har vi fått økt kjennskap til gener og cellulære prosesser som har betydning for utviklingen av lungekreft. En rekke tumorsuppressorgener er involvert: mutasjoner i TP53 (90 % ved småcellet lungekreft, 50 % ved ikke-småcellet lungekreft), Rb (90 % ved småcellet lungekreft, 15 % ved ikke-småcellet lungekreft), og CDKN2A (p16) (inaktivert i 70 % av tilfellene med ikke-småcellet lungekreft, meget sjeldent ved småcellet) (1). Siden Rb-p16 er komponenter i samme signalvei, vil den biologiske betydningen av en forandring i Rb tilsvare en forandring i p16, de er gjensidig eksklusive. Defekter i p53- og Rb-p16-signalveiene er meget vanlig ved lungekreft. Dette indikerer at disse signalveiene spiller en sentral rolle i regulering av cellevekst, differensiering og apoptose i lungeepitelcellen. Kromosomområdet 3p er studert mye de senere årene, og resultatene viser at dette

området inneholder flere kandidater til tumorsuppressorgener (FHIT, RASSF1, SEMA3B). LOH i 3p er meget vanlig i lungesvulster (ca. 80 %), men vår forståelse er langt fra komplett med hensyn hvilken biologisk/patogen betydning dette kromosomområdet har. Videre er en rekke andre gener forandret i lungekreftceller, men i mindre grad enn p53 og Rb/CDKN2A: PTEN, SMAD4/TGFβIIIR og PPP1R3 (mindre enn 10 %), myc-amplifikasjon forekommer i ca. 10 % av lungekrefttilfellene, mens KRAS-mutasjon forekommer i ca. 30 % av tilfellene med ikke-småcellet lungekreft, hovedsakelig adenokarsinomer. Nylig er det rapportert mutasjoner i EGFR i 8 % (USA) til 40 % (Japan) av adenokarsinomer, særlig blant ikke-røykere (2, 3).

DNA-metylering spiller en viktig rolle i regulering av genuttrykk og representerer en viktig inaktiveringsmekanisme. Den synes å ha like stor betydning for endring i genuttrykk som genetiske forandringer. Genespresjonen skrur av på grunn av metylering av CpG-områder i promotoregioner. Generelt har svulster global hypometylering, mens promotorområdet er hypermetylert. Mange gener i lungesvulster er vist å være inaktive på grunn av hypermetylering (4) (tab 1). DNA-hypermetylering er også påvist i flere gener tidlig i lungekreftutviklingen som CDKN2A, MGMT, DAPK, RAR-β, FHIT, RASSF1A, og APC.

Biomarkører

En av hovedutfordringene de senere årene har vært å utvikle nye metoder for tidlig diagnostikk av lungekreft og å identifisere forandringer som er prediktive for tumorprogressjon.

Sputumprøver vil kunne inneholde kreftceller/premaligne celler og proteiner som er endret selv på et tidlig trinn i utviklingen av lungekreft. Slike prøver er ikke alltid like representative, siden prøvene vil kunne inne-

! Hovedbudskap

- Lungekreft er den vanligste kreftform i verden
- Femårsoverlevelse er under 15 %
- DNA-mikromatriseteknologi og proteomikk kan komme til stor nytte innen klassifisering, stadiemdeling og behandling av lungekreft

Tabell 1 Gener som er forandret på grunn av metylering i lungekreft

Cellessyklus	DNA-reparasjon	Apoptose	RAS-veien	Invasjon
CDKN2A	MGMT	DAPK	RASSF1A	E-cadherin
PAX5 α		Caspase-8	NORE1A	H-cadherin
PAX5 β		FAS		TIMP3
CHFR		TRAILR1		LAMA3
				LAMB3
				LAMC2

holde celler fra ulike områder av respirasjonsveien. Dette bidrar til at sputumcytologi ofte har lav sensitivitet. Bronkioalveolære lavage kan også benyttes til å skaffe biologisk materiale. Dette er mer representativt, fordi man kan ta prøver fra et spesifikt område. Studier har vist at celler som inneholder punktmutasjoner i KRAS og p53, kan detekteres i tidlige stadier av lungekreft. Studier viser at denne testen er mer sensitiv enn sputumcytologi og røntgen thorax. KRAS-mutasjoner ble påvist opptil 18 måneder før den kliniske diagnosen. Imidlertid kan KRAS-mutasjoner også påvises i sputumprøver, selv om svulsten er KRAS-negativ. Dette er ikke overraskende. En påvisning av KRAS-mutasjoner kan skyldes andre primære lungesvulster eller tidlige stadier hos individer med høy risiko for å utvikle lungekreft. Den største ulempen med testen er imidlertid at KRAS-mutasjoner finnes så å si bare i adenokarsinomer, slik at bare en liten del av lungekreftpasientene potensielt vil ha nytte av testen (5).

Med hjelp av en sensitiv polymerasekjedereaksjonsmetode er det påvist avvikende metylering i promotorområdet til CDKN2A og MDMT i sputum hos 100 % av pasientene med plateepitelkarsinom opptil tre år før

klinisk diagnose (6). Det er gjennomført flere studier av metylering i genpromotorområdet i sputumprøver fra personer med høy risiko for lungekreft. Det er også gjennomført en oppfølgingsstudie hvor tre blant åtte høyrisikopersoner med hypermetylering i CDKN2A utviklet lungekreft ett år etter innsamlingen av sputumprøven. I en annen studie utviklet 3/5 personer som var positive for RASSF1A-metylering, lungekreft 12–14 måneder etter sputumprøven (7). Disse studiene indikerer at bruk av avvikende promotor-metylering som molekylær markør kan få stor betydning for diagnostikk av tidlige maligne forandringer og til bruk i screening av høyrisikopersoner.

Flere studier av kreftpasienter har påvist hypermetylering i DNA fra plasma eller serum. En undersøkelse viser hypermetylering i serum blant 50 % av pasienter med lungekreft når promotorregionen i fire gener ble analysert. Man må imidlertid forvente at screening av plasma vil ha lav sensitivitet med hensyn til å påvise premaligne tilstander, siden det må skje en vaskularisering for at DNA skal kunne frigjøres til serum/plasma.

Ved å sammenlikne mikrosatellittendringer i plasma fra pasienter med lungekreft og kontrollpersoner har man funnet at slike

endringer korrelerte med klinisk status av pasienten. Ved å benytte revers transkriptase-polymerasekjedereaksjon (RT-PCR) ble epidermal vekstfaktorreseptor-mRNA påvist i blod fra lungekreftpasienter, men sjelden fra kontrollpersoner. Ekspresjon av andre molekyler, enten kreftspesifikke eller celletypespesifikke gener som CEA, cytokeratin 19, nevromedin B-reseptor er også benyttet til å påvise sirkulerende tumorceller hovedsakelig for prognostisk vurdering.

Forandret proteinekspresjon

Forandret proteinuttrykk, spesielt de som er overuttrykt i svulsten, kan få praktisk anvendelse som diagnostiske tumormarkører. Ulike proteiner er blitt studert, men så langt har ingen proteiner vist seg å være tilstrekkelig prediktive i diagnostikk og prognose. Økt ekspresjon av både epidermal vekstfaktor (EGF) og epidermal vekstfaktorreseptor (EGFR) er påvist i mer enn 60 % av tilfellene med ikke-småcellet lungekreft, noe som indikerer at den signalveien er viktig for denne typen. Småcellet lungekreft er forbundet med økt ekspresjon av nevroendokrine faktorer, som GRP/BN og deres reseptorer. Det tyder på at GRP-reseptors autokrine sløyfe er involvert i veksten av en del tilfeller.

Lungekreft er forbundet med økt ekspresjon i flere sykliner: 12–40 % av den ikke-småcellede typen har økt ekspresjon av syklin D1, ca. 20 % er forbundet med høyt nivå av syklin B1. Disse pasientene hadde kortere overlevelse sammenliknet med pasienter der svulstene uttrykte et lavt nivå.

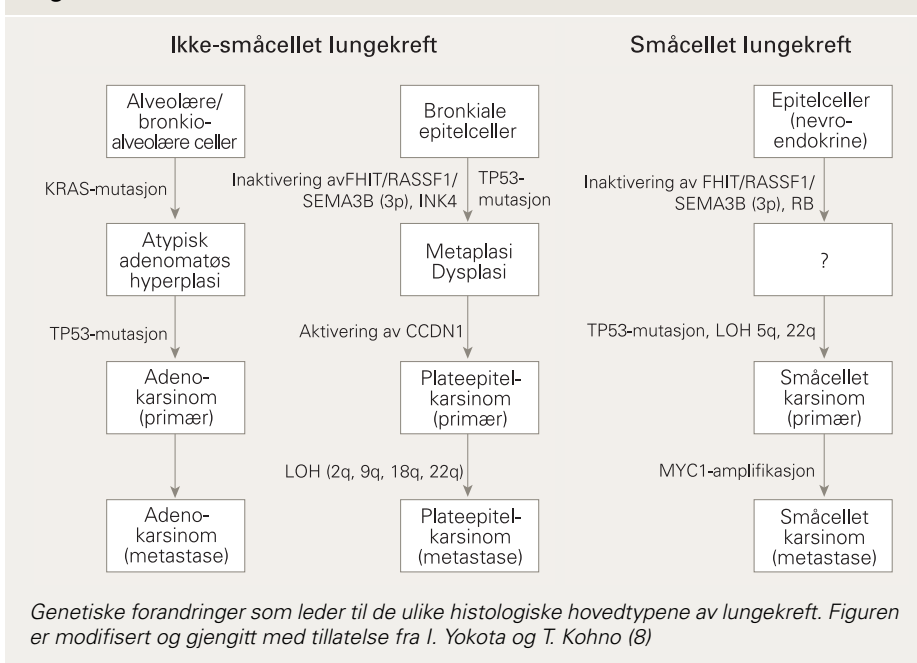
Molekylær klassifisering av lungekreft

Senere års forskning har gitt oss økt kunnskap om genetiske forandringer som leder til de ulike histologiske hovedtypene (fig 1) (8). Fra et diagnostisk synspunkt er det viktig å kartlegge og forstå både de genetiske forandringene som går igjen i alle hovedtypene, og de som er forskjellige mellom de ulike histologiske hovedtypene.

Utvikling de senere årene innen mikromatriseteknologien har gjort det mulig å analysere flere tusen gener samtidig. I arbeidet med å identifisere molekylære markører til bruk i kreftklassifisering og prognose har flere grupper analysert genekspresjonsprofiler i lungesvulster (9–14). Målsettingen med disse studiene er å identifisere profilene som kan predikere overlevelse og som er til nytte i klinisk diagnostikk. Man regner med at genekspresjonsprofiler vil utkonkurrere dagens kliniske/prognostiske indikatorer. Genekspresjonsprofiler kan bidra til ny klassifisering av lungekreft og behandling basert på molekylær patologi.

Genmarkører er analysert med oligonukleotider og cDNA-mikromatrise. Unike og karakteristiske genekspresjonsprofiler er identifisert for hver av de histologiske hovedtypene av lungekreft (tab 2) (15). Gener

Figur 1



Genetiske forandringer som leder til de ulike histologiske hovedtypene av lungekreft. Figuren er modifisert og gjengitt med tillatelse fra I. Yokota og T. Kohno (8)

Tabell 2 Genekspresjonsprofil og histologi

Småcellet karsinom	Plateepitelkarsinom	Adenokarsinom
GRP	Cytokeratiner	NAP1
DDC	SFN/14-3-3 σ	MUC1
CHGA	p63	TITF1
CHGB	PFN2	FOLR1
CHGC	BPAG1/KIAA0728	SFTPA2
ASCL1		SFTPB
IA-1/INSM1		
PTTG1		
PGP9.5		
UCHL1		

som er påvist i mer enn ett datasett, er en rekke cytotkeratiner, kollagen VII- α 1, galectin 7, p63, det kalsiumbindende proteinet s100A2 og profilin 2. Karakteristisk for plateepitelkarsinom er også gener involvert i cellulære prosesser som detoksifisering og antioksidantproteiner (glutathion-S-transferase, karboksylesterase, peroksiredoksin). Polymorfismer i slike gener kan være viktige determinanter for predisposisjon og kan dermed være nyttig informasjon som kan inkorporeres i strategier for forebygging eller screening. Man ser tydelig neuroendokrin differensiering i småcellede karsinomer, hvor flere av genekspresjonsmarkørene er neuroendokrine gener. Mikromatrisestudier viser også overlapp mellom studier for insulinomassosiert gen 1 (IA-1), hASH1 (human achaetescuta homolog-1), FOXG1B (forkhead box G1B) og thymosin- β .

Karakteristisk for adenokarsinomer er abnormalt uttrykk av gener som surfaktant A2 og B, mucin 1 og pronapsin A. Dette indikerer at disse tumorene oppstår fra type II-

pneumocytter og Clara-celler. Det er nå mulig å dele opp adenokarsinomer i tre kategorier basert på genekspresjonsprofiler. Adenokarsinomer har vist seg å være mer heterogene enn plateepitelkarsinomer og småcellede karsinomer.

Det er gjennomført få studier hvor man har sett på om overlevelse kan predikeres ut fra genekspresjonsprofil. Genekspresjonsprofiler er funnet å ha prognostisk betydning i adenokarsinomer. En kategori som består av svulster som uttrykker neuroendokrine markører som aromatisk aminosyre-dekarboksylase, hASH1 og IA-1, var assosiert med signifikant dårligere overlevelse sammenliknet med andre adenokarsinomer. Det er også utviklet en risikoindeks basert på relativ ekspresjon av visse gener der man kunne identifisere høy- og lavriskogrupper av stadium I-adenokarsinomer.

Konklusjon

Molekylærbiologiske metoder er på full fart inn i diagnostisk utredning av lungekreft. Kunnskap på det molekylære plan er betydelig, men videre studier er nødvendig innen dette feltet. Det er fortsatt stort behov for å øke vår forståelse av cellulære mekanismer som har betydning for utvikling av lungekreft samt å utvikle bedre diagnostiske og terapeutiske strategier for lungekreft.

Manuskriptet er godkjent 4.5. 2005.

Litteratur

1. Zöchbauer-Müller S, Gazdar A, Minna J. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 681–708.
2. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129–39.

3. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: Biological and clinical implications. *Cancer Res* 2004; 64: 8919–23.
4. Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 1–11.
5. Wistuba I, Mao L, Gazdar AF. Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene* 2002; 21: 7298–306.
6. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000; 60: 5954–8.
7. Honorio S, Agathangelou A, Schuermann M et al. Detection of RASSF1A aberrant promoter hypermethylation in sputum from chronic smokers and breast cancer patients. *Oncogene* 2003; 22: 147–50.
8. Yokota I, Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci* 2004; 95: 197–204.
9. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13790–5.
10. Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 13784–9.
11. Sugita M, Geraci M, Gao B et al. Combined use of oligonucleotide and tissue microarrays identifies cancer/testis antigens as biomarkers in lung carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 3971–9.
12. Beer DG, Kardia SL, Huang CC et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002; 8: 816–24.
13. Petty RD, Nicolson MC, Kerr KM et al. Gene expression profiling in non-small cell lung cancer: From molecular mechanisms to clinical application. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3237–48.
14. Tomida S, Koshikawa K, Yatabe Y et al. Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. *Oncogene* 2004; 23: 5360–70.
15. Meyerson M, Franklin WA, Kelley MJ. Molecular classification and molecular genetics of human lung cancers. *Semin Oncol* 2004; 31: 4–19.