



*Professori
Sakari Knuutila
Helsingin yliopisto*

Keuhkosyövän molekyylipatologia

Keuhkosyövän tunnuspiirteinä ovat lukuisat muutokset genomien rakenteessa ja toiminnassa. Sama ilmiö liittyy kaikkiin pitkälle edenneisiin syöpiin.

Kompleksiset genomien poikkeavuudet viittaavat kontrolloimattomaan kasvuun eli pitkälle edenneeseen syöpään. Siksi onkin suoranainen ihme, että kaaoksen keskeltä on voitu löytää genomien muutoksia, joilla on merkitystä molekulaarisesti kohdistettujen täsmähoitojen kehittämiseksi.

Mikä on mahdollistanut kliinisesti merkittävien geenimuutosten löytämisen? Ihmisen koko genomien järjestyksen selvittäminen runsaat kymmenen vuotta sitten ja samaan aikaan alkanut vallankumouksellinen teknologian ja bioinformatiikan kehitys ovat mahdollistaneet syövän genomilaajuiset tutkimukset. Näissä tutkimuksissa paljastui, että tiettyjen geenien toimintaverkostot ovat monissa syöväissä selvästi poikkeavia. Samalla todettiin, että verkostojen joissakin geneeissä on toistuvia aktivoivia mutaatioita. Näin päästiin kyseisen syövän aloitusmutaatioiden jäljille.

Ei-pienisoluisissa keuhkosyövässä *EGFR*- ja *ALK*-toimintaverkostot osoittautuivat suurella osalla potilaista poikkeaviksi. Poikkeavuuden aiheuttajiksi osoitettiin näiden geenien toistuvat mutaatiot, joita alettiin kutsua superaloiusmutaatioiksi (*super drivers*). Kyseisten geenimuutosten synnyttämiin proteiineihin on sittemmin kehitetty kohdistettuja estohoitoja.

Geenitestit osana hoidon valintaa

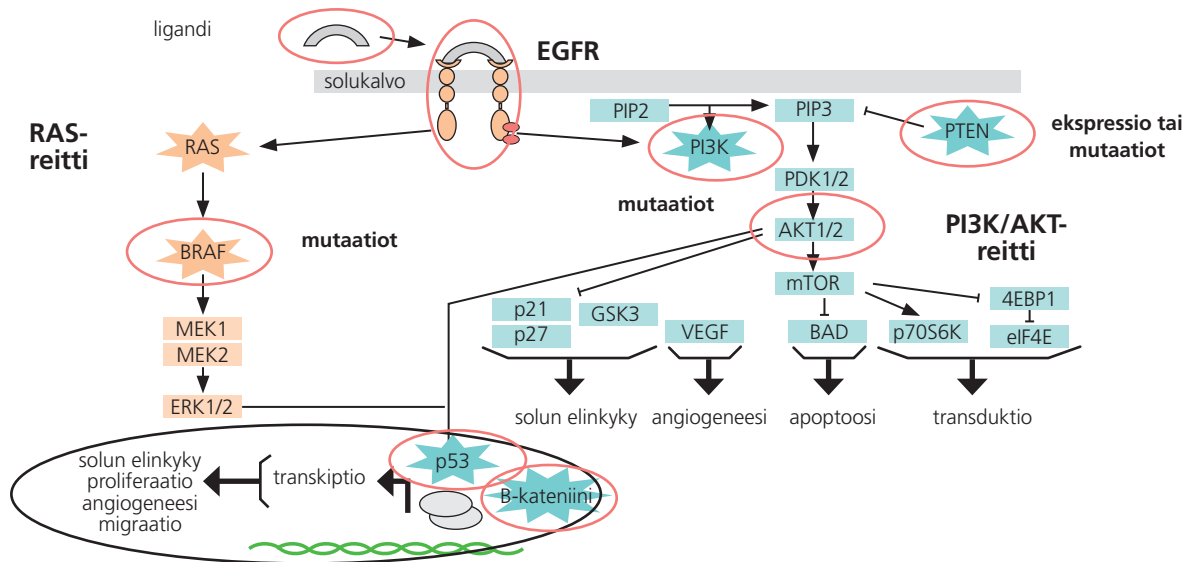
Geenimuutokseen perustuvat henkilökohtaiset hoidot ovat parantaneet hoitotuloksia useissa syöväissä. Keuhko- ja suo-

YDINASIAT

- Keuhkosyövän genomimuutosten joukossa on kliinisesti ja hoidollisesti merkityksellisiä aloitusmutaatioita, joita voidaan hyödyntää ennusteen ja hoitotuloksen arvioimisessa. Niihin voidaan myös kehittää molekulaarisesti kohdistettuja estohoitoja.
- *EGFR*- ja *ALK*-geenejä aktivoivat mutaatiot ja niihin kohdistetut estohoidot ovat nyky-päivän hoitokäytäntöä ei-pienisoluisessa keuhkosyövässä. Lisäksi käynnissä on useita hoitokokeiluja.
- Uuden polven sekvensointimenetelmät (NGS) ovat ylivoimaisia syöpätautiin geenitestauksessa.

listosyövän myöhäisessä vaiheessa täsmähoidolla saadaan parempia hoitotuloksia kuin perinteisillä solunsalpaajilla.

Molemmilla edellä mainituissa syöväissä *EGFR*-geenin toimintaverkosto on aktivoitunut (kuva 1). *EGFR* on solukalvon läpäisevä reseptori, joka välittää solun ulkopuolista viestiä monien välituotteiden kautta solutumaan. Verkosto säätelee monia solun keskeisiä tapahtumia, kuten kasvua, lisääntymistä ja kuolemaa. Lisäksi se on mukana syövän etäpesäkkeiden synnyssä. *EGFR*-reseptori toimii normaalisti tarkkaan säädellysti, mutta se voi aktivoitua syövässä muun muassa siten, että *EGFR*-geeni monistuu tai siihen syntyy aktivoiva mutaatio. Myös ylimäärä reseptoriin kiinnittyvää proteiinia (ligandia) voi aktivoida verkoston. Viestintäreitit aktivaatio voi johtua myös jonkin *EGFR*:n



Kuva 1. EGFR-toimintaverkosto pelkistetyksi.

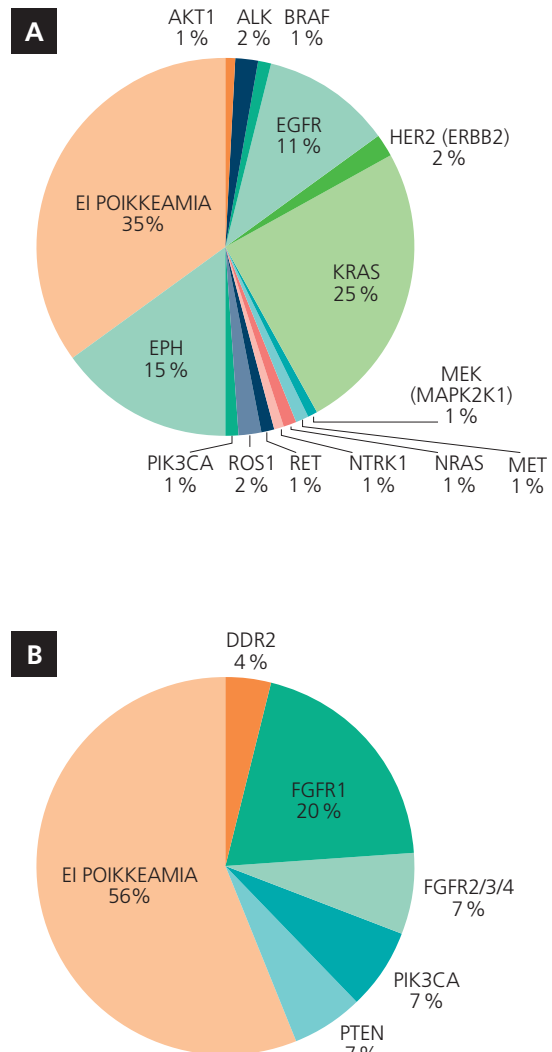
alapuolella olevan verkoston muun geenin mutaatiosta (kuten *KRAS*, *BRAF* tai *PI3CK*, kuva 1).

Kehukosyövässä EGFR- tai ALK-estohoito tehoaa vain potilaille, joilla on aktivoiva *EGFR*- tai *ALK*-mutaatio, mutta ei *KRAS*-mutaatiota. *EGFR*-geenin eksonin 20 mutaatioiden on osoitettu liittyvän EGFR-estohoidon resistenssiin.

EGFR-estohoidossa kemiallisesti rakennettu pieni lääkemolekyylillä kilpailee ATP:n kanssa *EGFR*:n kinaasiosassa ja estää ATP:n fosforylaation perustuvan reseptorin aktivaation. Kun lääkemolekyylillä kiinnittyy kinaasiosaan, ATP ei pysty kiinnittymään siihen, ja kun ATP on pois pelistä, reseptori ei aktivoitu. ALK- ja muut tyrosiinikinaasintäjä toimivat periaatteessa samalla tavalla.

Kehukosyövän *EGFR*- ja *ALK*-geenimuutokset rajoittuvat lähes yksinomaan ei-tupakoiviin potilaisiin, joilla on adenokarsinoma. Omien tutkimustemme perusteella tässä alatyypissä 11,4 prosentilla suomalaispotilaista on *EGFR*-geenimuutoksia ja 2,3 prosentilla *ALK*-muutoksia, lähes yksinomaan *ALK*-fuusioita (kuva 2). On kuitenkin huomioitava, että pienellä osalla suurisoluista keuhkosyöpä sairastavista on myös *EGFR*-mutaatio. *ALK*-fuusioita on kuvattu myös levyepiteelikarsinoomassa. Näitä mutaatioita ei ole kuitenkaan todettu pienisoluisissa keuhkosyövässä eikä keuhkojen primaareissa karsinoidikasvaimissa.

KRAS-mutaatioita on noin 25 prosentilla ei-pienisoluisista keuhkosyöpä sairastavista potilaista. Pienellä osalla *KRAS*-positiivisista potilaista on *EGFR*-mutaatio. *KRAS*-mutaatiot ovat yleisimpiä tupakoivilla potilailla. *KRAS*-mutaatiopositiiviset potilaat eivät hyödy EGFR-estohoidosta, koska *EGFR*-toimintaverkosto aktivoituu *RAS*-mutaation takia alavirtaan. Nykykäytännön mukaisesti *EGFR*-mutaatio- ja *ALK*-fuusiotestiä suositellaan ei-tupakoiville adenokarsinoomapotilaille ennen estohoidon aloittamista.



Kuva 2. Aloitusmutaatioiden yleisyys suomalaisilla keuhkojen adenokarsinoomaa (A) ja keuhkojen pienisoluisilla karsinoomaa (B) sairastavilla.

Mielestäni kaikkien ei-pienisoluisten keuhkosyöpien alatyypin testaamista tulisi kuitenkin harkita, koska *EGFR*- ja *ALK*-mutaatioita nähdään myös muissa alatyypeissä. *EGFR*- ja *ALK*-mutaatiot sulkevat lähes aina toisensa pois, mutta pienellä osalla *EGFR*- ja *ALK*-positiivisia potilaita voi siis olla primaarista hoitoresistenssiä aiheuttava aktivoiva *RAS*-mutaatio.

Estohoito on siis aiheellinen, jos potilaalta löydetään jokin noin 30:stä hoitoon reagoivasta *EGFR*-mutaatiosta (kuva 3) tai *ALK*-fuusio, eikä potilaalla ole *RAS*-mutaatiota. Estohoidot ovat sen sijaan todennäköisesti hyödyttömiä, jos mutaatiota ei ole tai potilaalla on *EGFR*-eksonin 20 resistenttimutaatio. Tämän vuoksi geenitestit ovat olennaisia, kun valitaan hoitoon soveltuvia potilaita.

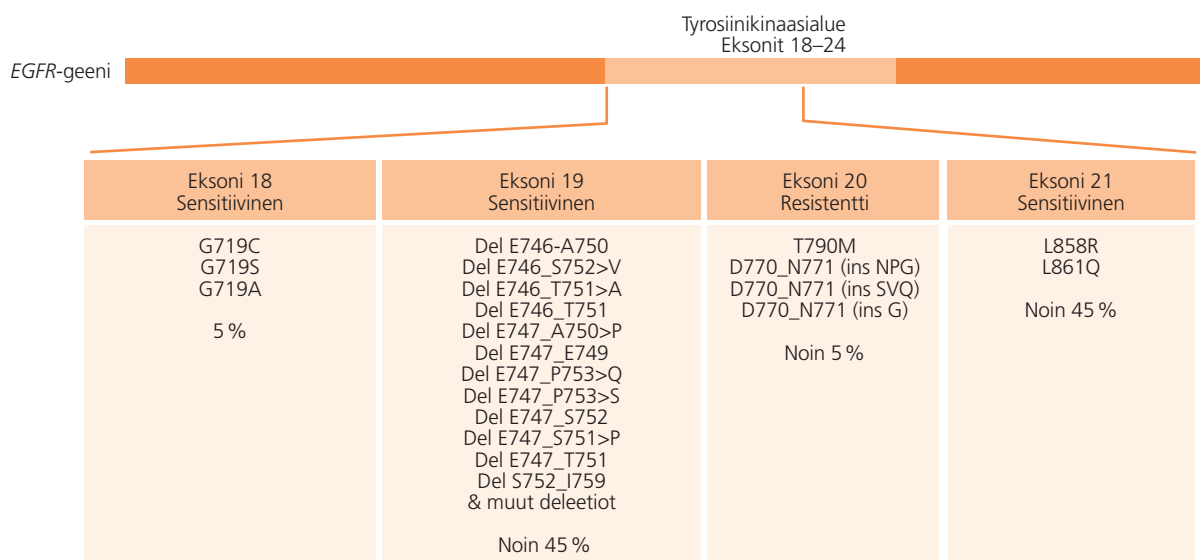
EGFR- ja *ALK*-mutaatioiden lisäksi keuhkosyövissä tunnetaan joukko muitakin aloitusmutaatioita, joihin on jo kehitetty tai ollaan kehittämässä molekulaarisesti kohdistettua estohoitoa (taulukko 1, kuva 2).

Hoitoresistenssi täsmähoidoille

Estohoidoilla saadaan *EGFR*-positiivisten potilaiden tautivapaata elinaikaa pidennettyä tilastollisesti merkitsevästi useilla kuukausilla, mutta silti tauti palaa lähes väijäämättä (kuva 4). Resistenssi syntyy, koska *EGFR*- ja *ALK*-verkot aktivoituvat uudestaan joko näihin geeneihin syntyvien (tai niissä jo olleiden) resistenttien mutaatioiden tai samaa

Taulukko 1. Keuhkosyöpien aloitusmutaatioita ja estäjiä. AC = adenokarsinooma, RTK = reseptorityrosiinkinaasi.

Geeni tai muutos	Histologia	Yleisyys, %	Proteiini	Estäjä käytössä	Hoitokokeiluja meneillään	Prekliinisiä tutkimuksia
AKT1-mutaatiot	AC	Alle 1	Seriini-TK		Ei	Pan-AKT-estäjät
ALK-uudelleenjärjestymät	AC	2,3	RTK	Kritsotinibi, seritinibi	Alektinibi, PF-06463922, TSR-011, AP26113, ASP3026, X-396, Hsp90-estäjät	ALK-estäjät
BRAF-mutaatiot	AC	1	Seriini-TK		Vemurafenibi, dafrafenibi, MEK-estäjät, dasatinibi	RAF-estäjät
EGFR-mutaatiot	AC	11,4	RTK	Gefitinibi, erlotinibi, afatinibi, isotinibi	CO1686, AZD9291, setuksimabi + afatinibi, Hsp90-estäjät	Mutaatiospesifiset EGFR-estäjät
HER2 (ERBB2)-mutaatiot	AC	2	RTK		ERBB/HER2-estäjät, mTOR/P13K-estäjät	HER2-estäjät, Hsp90-estäjät
KRAS-mutaatiot	AC	25	GTPase		Sytotoksinen kemoterapia + MEK-estäjät, P13K-estäjät, FAK-estäjät	KRAS G12C-estäjät, KRAS-estäjät, MEK- ja P13K-estäjät, JAK/TBK1/1KK-estäjät
MEK1 (MAPK2K1)-mutaatiot	AC	Alle 1	Seriini-TK		Ei	MEK-estäjät
MET-monistumat	AC	1	RTK		Kritsotinibi, tivantinibi, onartutsumabi, muut MET-estäjät	MET-estäjät
NRAS-mutaatiot	AC	1	GTPase		Ei	MEK-estäjät
NTRK1-uudelleenjärjestymät	AC	Alle 1	RTK		Kritsotinibi	TRKA-estäjät
RET-uudelleenjärjestymät	AC	1	RTK		Kabotsantinibi, vandetanibi, sunitinibi, ponatinibi	RET-estäjät, Hsp90-estäjät
ROS1-uudelleenjärjestymät	AC	2	RTK		Kritsotinibi, seritinibi, PF-06463922	ROS-estäjät, Hsp90-estäjät
DDR2-mutaatiot	SCC	4	RTK		Dasatinibi	DDR2-estäjät
FGR1-monistumat	SCC	20	RTK		FGFR-estäjät	FGFR-estäjät
FGFR2/3/4-mutaatiot ja uudelleenjärjestymät	SCC	7	RTK		FGFR-estäjät	FGFR-estäjät
PIK3CA-mutaatiot	SCC	7 (SCC) 1 (AC)	Lipidikiinaasi		P13K-estäjät	P13K-estäjät, mTPR-estäjät
PTEN-mutaatiot	SCC	6 (NSCLC)	Lipidi/proteiini-fosfataasi		Ei	P13K-estäjät



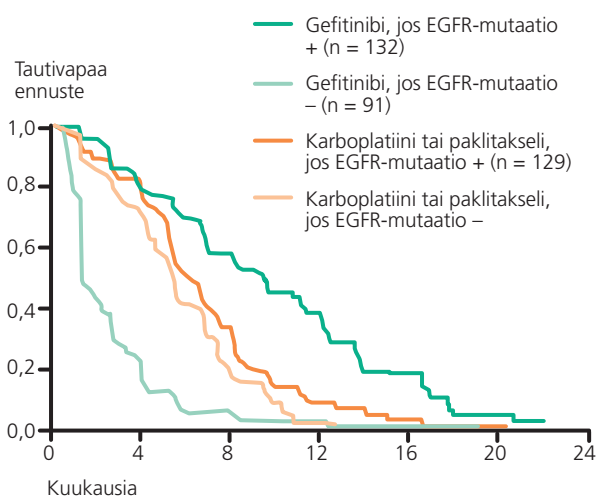
Kuva 3. EGFR-geenin sensitiiviset ja resistentit mutaatiot.

viestintäreittä aktivoivien alavirran geenien mutaatioiden takia. Kompleksiset genomien muutokset mahdollistavat syövän kannalta otollisen sivureitin löytymisen.

Tulevaisuudessa näemme, pystytäänkö kaikki aktivoivat mutaatiot vaimentamaan useiden estäjämolekyylien yhdistelmähoidoilla. Hoitojen ja hoidettavien potilaiden valinnassa geenitestit ovat tärkeitä. Joskus ne ovat jopa edellytys hoitojen korvattavuudelle.

Uuden polven sekvensointi

Uuden polven sekvensointimenetelmillä (*next generation sequencing*, NGS) voidaan selvittää perimän emäsjärjestyksen muutokset joko kattavasti tai kohdistetusti niin, että sek-

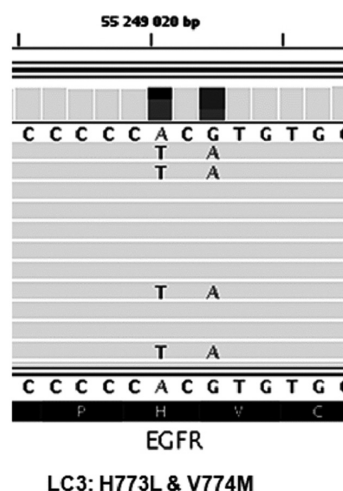


Kuva 4. EGFR-mutaatioposiitivisten ja -negatiivisten eipienisoluisista keuhkosyöpää sairastavien potilaiden tautivapaa ennuste, kun hoitona on ollut EGFR-estäjä tai solusalpaaja.

vensointiin sisältyy vain proteiineja koodaavat geenialueet. Jälkimmäisessä tapauksessa kyseessä on eksomisekvensointi. Sekvensointi voidaan rajata edelleen käsittämään vain kliinisesti merkitykselliset geenit (kohdistettu NGS).

Aiempaan niin sanottuun suoraan sekvensointiin (Sanger) verrattuna NGS:llä voidaan selvittää yhden geenin tai DNA-jakson sijasta koko genomien emäsjärjestys, myös geenifuusioidet ja geenimonistumat ja -deleetiot. NGS-menetelmiä on lukuisia.

Tällä hetkellä tutkimuslaboratoriossani on käytössä Ion Torrentin teknologiaan perustuva kohdistettu NGS.



Kuva 5. NGS:n osoittamat geenimuutokset EGFR:n eksonissa 20. Eri monistustuotteista kuvan (harmaa vyöhyke) kyseinen geenialue on sekvensoitu (luettu) moneen kertaan. Luennoissa (kuvan harmaissa vyöhykkeissä) nähdään toistuvasti kahdessa kohtaa emäksen muuttuminen. Käytetty kaupallinen PCR-kitti ei sisältänyt muutoksia paljastavia alukkeita. Toisin sanoen nämä mitä ilmeisimmin EGFR-estohoidon resistenssin aiheuttavat muutokset jäivät näkymättä perinteisellä PCR-menetelmällä.

Menetelmässä PCR:llä sekvensoitavat kohdat monistetaan rakennettujen kirjastojen avulla. Sekvensointi perustuu DNA:n emäsosien erilaisten vetysidosten aiheuttaman pH:n mittaamiseen. Menetelmä mahdollistaa korkean lukupeiton, joten se on herkkä. Jos lukupeitto on esimerkiksi 500 (keskimääräinen tutkimuksessamme), kohde on sekvensoitu 500 kertaa. Mitä suurempi lukujen (readien) määrä on, sitä herkemmin poikkeavuus voidaan todeta.

Kuvassa 5 jokainen harmaa vyöhyke osoittaa EGFR:n eksonin 20 yhtä luentaa. Kuvassa todetaan toistuvasti (useassa vyöhykkeessä), että tutkitun geenin emäs vaihtuu kahdessa kohtaa, mikä osoittaa keuhkosityövissä tunnetun hoitoresistenssiin liittyvän mutaation. Hoitoresistenttien mutaatioiden toteaminen on hoidollisesti ensiarvoisen tärkeää, koska niiden avulla voidaan välttyä tehottoman ja kalliin hoidon antamiselta.

Ylivertainen NGS

Jo kahden geenin 50 mutaation testaaminen kliinisessä diagnostiikassa perinteisellä, useimmiten polymeerasiketjureaktioon (PCR, *polymerase chain reaction*) perustuvalla menetelmällä on erittäin haastavaa. Haaste on moninkertainen, jos geenien ja mutaatioiden määrä on kymmenkertainen.

Lähitulevaisuudessa meidän pitää määrittää päivässä suuri määrä – jopa useita satoja – geenimuutoksia pienestä, useimmiten formaliiniin fiksoidusta ja paraffiniin valetusta (FFPE-), näytteestä, jotta pystymme valitsemaan potilaalle oikean täsmälääkeyhdistelmän. Aivan viime päiviin asti tämä ei ole ollut mahdollista, mutta NGS-menetelmän avulla rajoittamaton määrä erityyppisiä geenimuutoksia

Taulukko 2. Ion Torrent NGS-menetelmän etuja.

Voidaan kohdistaa kaikkiin kliinisesti merkityksellisiin mutaatioihin eli voidaan poimia vain etukäteen määritellyt hoitoon liittyvät mutaatiot kliiniseen käyttöön.

Luotettava (olemme vertailleet monien menetelmien tuloksia)

Pieni lähtömateriaali: 10–50 ng (Ion Torrent)

- FFPE, ohutneulabiopsiat, seerumi, uloste (CRC), yskös?, hengitysilma?

Herkkä: alle 1 prosenttia

- Lukupeitto jopa tuhansia

Nopea: 2 vuorokautta

Halpa: alle 200 euroa/analyysi

Tuottaa samasta materiaalista tutkimuskäyttöön uutta tietoa, joka voi hyödyntää hetken päästä tutkittavaa potilasta, koska hoidollisesti uutta tietoa syntyy kiihtyvällä vauhdilla.

(emäsmutaatiot, kopiomäärämuutokset ja geenifuusiot) voidaan määrittää samanaikaisesti yhdellä testillä.

Taulukkoon 2 on listattu nykyisin käyttämämme NGS-menetelmän etuja. Olemme tehneet sillä jo yli 700 tutkimusta.

Kirjallisuutta

Kaikki symposiumissa pidetyn esityksen diat löytyvät osoitteesta www.helsinki.fi/cm/g/presentations/.

Armengol G, Sarhadi VK, Rönty M, Tikkanen M, Knuutila A, Knuutila S. Driver gene mutations of non-small cell carcinoma are rare in primary carcinoids of the lung – NGS study by Ion Torrent. Lung 2015; 193(2): 303–8.

Calò A, Nottegar A, Gilioli E ym. ALK/EML4 fusion gene may be found in pure squamous carcinoma of the lung. J Thorac Oncol 2014; 9(5): 729–32.

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S ym. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. N Engl J Med 2009; 361: 947–57.

Mäki-Nevala S, Rönty M, Morel M ym. Epidermal growth factor receptor mutations in 510 Finnish non-small cell lung cancer patients. J Thorac Oncol 2014; 9(6): 886–91.

Mäki-Nevala S, Sarhadi VK, Tuononen K ym. Mutated Ephrin receptor genes in non-small cell lung carcinoma and their occurrence with driver mutations – Targeted resequencing study on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of 81 patients. Genes Chrom Cancer 2013; 52(12): 1141–9.

Sarhadi VK, Lahti L, Scheinin I ym. Targeted deep sequencing of 9p region in acute lymphoblastic leukemia yields concordant results with array CGH and reveals novel genomic alterations. Genomics 2013; 102(3): 182–8.

Tuononen K, Kero M, Mäki-Nevala S ym. ALK fusion and its association with other driver gene mutations in Finnish non-small cell lung cancer patients. Genes Chrom Cancer 2014; 53(11): 895–901.

Tuononen K, Mäki-Nevala S, Sarhadi VK ym. Comparison of targeted next-generation sequencing (NGS) and real-time PCR in the detection of EGFR, KRAS, and BRAF mutations on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of non-small cell lung carcinoma – Superiority of NGS. Genes Chrom Cancer 2013; 52(5): 503–11.

Tuononen K, Sarhadi VK, Wirtanen A ym. Targeted resequencing reveals ALK fusions in non-small cell lung carcinomas detected by FISH, immunohistochemistry, and real-time RT-PCR: A comparison of four methods. BioMed Res Int 2013; 757490.

Tuononen K. Predictive biomarkers in diffuse gliomas and non-small cell lung cancer. Väitöskirja. Helsinki: Helsingin yliopisto, 2015.