

Heterogenność raka piersi – sprawozdanie z IMPAKT Breast Cancer Conference

Breast cancer heterogeneity – report from IMPAKT Breast Cancer Conference



lek. Katarzyna Pogoda
Oddział Chemioterapii Kliniki Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

STRESZCZENIE

W dniach 2–4 maja 2013 r. w Brukseli odbyła się 5. konferencja IMPAKT poświęcona tematyce badań podstawowych nad rakiem piersi. Najważniejszym zagadnieniem poruszonym podczas konferencji było zjawisko heterogenności raka piersi, występujące zarówno między guzami, jak i w obrębie jednego guza. Potwierdzono heterogenność raka piersi na poziomie molekularnym, wykazując różnice w częstości aberracji genetycznych (najczęściej w obrębie *PIK3CA*, *TP53* i *ARID1A*) w guzach u chorych na hormonozależnego, zaawansowanego raka piersi (badanie BOLERO-2). Przedstawiono również wyniki badań genetycznych, które wykazały, że aby ograniczyć wpływ heterogenności w obrębie guza, należy wykonywać 3 biopsje z każdego raka piersi. Zbadano najczęstsze zaburzenia szlaku PI3K/mTOR w zależności od typu molekularnego raka piersi. Natomiast próba określenia za pomocą immunohistochemii biomarkerów odpowiedzi na terapię skojarzoną ewerolimusem z trastuzumabem nie powiodła się. Zaprezentowano wyniki dwóch prac naukowych, w których analizowano wartość testów molekularnych w predykcji późnego nawrotu raka piersi (5–10 lat od rozpoznania) – najlepsze wyniki osiągnięto w przypadku PAM50 i Breast Cancer Index. Poza tym przedstawiono najnowsze doniesienia w zakresie obrazowania molekularnego pozwalającego na wczesną ocenę skuteczności stosowanej terapii.

SŁOWA KLUCZOWE: biopsja przerzutu, HER2, heterogenność, mTOR, profile molekularne

ABSTRACT

On 2–4 May 2013, in Brussels took place the 5th IMPAKT conference on translational research in breast cancer. The most important issue raised during the conference was the phenomenon of breast cancer heterogeneity, both inter- and intratumour. Heterogeneity of breast cancer was confirmed at the molecular level, showing the differences in the frequency of genetic aberrations (typically *PIK3CA*, *TP53* and *ARID1A*) in patients with hormone-dependent advanced breast cancer (BOLERO-2 trial). The results of genetic tests were also presented, which showed that in order to reduce the impact of heterogeneity within the tumor, 3 biopsies should be performed from each breast cancer. The most common disorders of PI3K/mTOR pathway were analyzed depending on the molecular type of breast cancer. However, an attempt to determine by immunohistochemistry biomarkers predicting response to combination therapy with everolimus and trastuzumab failed. The results of two studies, which analyzed the value of molecular tests in predicting late recurrence of breast cancer (in 5–10 years after diagnosis), were presented – the best results were achieved with PAM50 and Breast Cancer Index. The latest discoveries in molecular imaging were also presented – it allows for early assessment of treatment efficacy.

KEY WORDS: metastasis biopsy, HER2, heterogeneity, mTOR, molecular profile

WPROWADZENIE

W dniach 2–4 maja 2013 r. w Brukseli odbyła się konferencja IMPAKT, w której udział wzięło ok. 500 uczestników z Europy i innych kontynentów. Była to już 5. edycja tego spotkania, które gromadzi osoby zainteresowane tematyką badań podstawowych nad rakiem piersi. Wykłady wygłosili czołowi eksperci w tej dziedzinie, ale wyniki swoich prac prezentowali również młodzi naukowcy. Najważniejszym zagadnieniem poruszonym podczas konferencji było zjawisko heterogenności raka piersi, obserwowane zarówno między guzami (*intertumour*), jak i w obrębie jednego guza (*intratumour*). Kolejnym poruszonym tematem był szlak przekazywania sygnału PI3K/AKT/mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Poza tym przedstawiono wyniki analiz biomarkerów ocenianych w ramach badań neoadiuwantowych. Kolejnym interesującym tematem spotkania była wartość rokownicza testów genetycznych pozwalających na określenie późnego ryzyka nawrotu u chorych na hormonozależnego raka piersi bez nadmiernej ekspresji receptora ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*). Przedstawiono również najnowsze osiągnięcia z zakresu obrazowania molekularnego. Spotkanie zakończyła bardzo ciekawa dyskusja na temat korzyści i ograniczeń wykonywania biopsji przerzutów raka piersi.

HETEROGENNOŚĆ RAKA PIERSI

Powszechnie wiadomo, że rak piersi jest chorobą heterogenną. Za pomocą immunohistochemii, a w określonych przypadkach również za pomocą badania fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) można wyróżnić podtypy biologiczne raka piersi (luminalny A, luminalny B, HER2-dodatni, potrójnie ujemny). Poza tym wykazano, że guzy wyglądające w ocenie mikroskopowej bardzo podobnie mogą się znacznie różnić pod względem genetycznym. Martine Piccart i wsp. przeprowadzili analizę aberracji genetycznych za pomocą techniki sekwencjonowania onkogenów w guzach u chorych na zaawansowanego raka piersi poddanych terapii w ramach badania BOLERO-2 (egzemestan ± ewerolimus). W badaniu wykazano wydłużenie czasu przeżycia bez progresji choroby (PFS, *progression-free survival*) oraz zwiększenie odsetka odpowiedzi w ramieniu z ewerolimusem w porównaniu z grupą kontrolną. Korzyść z terapii dwulekowej odniosły praktycznie wszystkie chore w prospektywnie zdefiniowanych podgrupach badania. Jednak stwierdzono pewne różnice pod względem molekularnych uwarunkowań wrażliwości na ewerolimus i interakcji między receptorem estrogenowym a szlakiem mTOR. W 230 guzach oceniono regiony kodujące 182 genów

związanych z powstawaniem nowotworów pod kątem zmienności liczby ich kopii i sekwencji. W guzach wszystkich chorych stwierdzono przynajmniej jedno zaburzenie genetyczne, a w 98% raków wystąpiły przynajmniej 2 takie zmiany. Mutacje najczęściej obejmowały geny: *PIK3CA* (49%), *TP53* (24%) oraz *ARID1A* (16%). W ok. 2/3 guzów stwierdzono nadmierną amplifikację przynajmniej jednego genu. Wyniki tej pracy dowodzą, że w ramach badań klinicznych III fazy możliwe jest przeprowadzenie sekwencjonowania genów, które pozwala na rozwój terapii ukierunkowanych molekularnie u chorych z konkretnymi zaburzeniami genetycznymi.

W trakcie konferencji wiele czasu przeznaczono na omówienie zagadnień związanych z heterogennością w obrębie jednego guza (*intratumour heterogeneity*). Pierwsze prace dotyczące tego tematu przeprowadził David Paul von Hansemann już pod koniec XIX w. Rak piersi, podobnie jak inne nowotwory, składa się z wielu różnych komórek, między którymi stwierdza się różnice pod względem ekspresji genów. To z kolei może przekładać się na różnice w wynikach wielu biopsji pobranych z tego samego guza, co stanowi przeszkodę w doborze optymalnej terapii ukierunkowanej molekularnie u konkretnego chorego. Michał Jarzab przedstawił wyniki swojej analizy 120 biopsji pobranych z 40 raków piersi. Celem pracy była ocena strategii polegającej na wykonaniu 3 biopsji z jednego guza, a następnie ocenie różnic sygnatur genów mających znaczenie predykcyjne i prognostyczne. Wykazano, że wykonanie 3 biopsji jest wystarczającym postępowaniem, pozwalającym zminimalizować wpływ heterogenności w obrębie guza i umożliwiającym przeprowadzenie bardziej wiarygodnej oceny czynników prognostycznych i predykcyjnych.

Podobne badanie przeprowadzili Lau i wsp., którzy wykonali po 3 biopsje z każdego z 51 raków piersi. Następnie analizowali wpływ heterogenności genetycznej w obrębie guzów, wpływ błędów związanych z przygotowaniem próbek do badań i nieprawidłowości w czynnościach związanych z samą techniką badania na ostateczny wynik ekspresji genów. Badacze wykazali, że największy wpływ na końcowy wynik analizy ma heterogenność w obrębie guza. Stwierdzili, że wyniki badań są bardziej wiarygodne, jeśli zwiększa się liczbę biopsji z każdego guza do 2–3 oraz stosuje optymalne procedury badania.

Niezwykle interesującym rozwinięciem zagadnienia heterogenności raka piersi była przeprowadzona pod koniec konferencji debata, w której próbowano rozstrzygnąć, czy w świetle doniesień o niejednorodnej budowie raka piersi należy przeprowadzać biopsję przerzutu. Alastair Thompson i Peter Campbell przekonywali, że biopsja przerzutu pozwala potwierdzić rozsiew nowotworu oraz wykluczyć niezłśliwy charakter zmiany

lub obecność innych nowotworów pierwotnych. Poza tym wykazano, że takie postępowanie u 1 na 6 chorych zmienia dalsze leczenie (w dużej mierze z uwagi na konwersję receptorów). Z kolei Charles Swanton i Fabrice Andre twierdzili, że biopsja przerzutu nie dostarcza zbyt wielu dodatkowych informacji, gdyż większość tych samych mutacji stwierdza się zarówno w guzie pierwotnym, jak i przerzutowym. Poza tym, tak jak w guzie pierwotnym, również w przerzucie istnieje zjawisko heterogenności pod względem genów. Dodatkowo pozostaje pytanie, który przerzut wybrać do biopsji, jeśli u chorego doszło do maszynego nawrotu w różnych lokalizacjach. Zwrócono również uwagę na konieczność wykonywania większej liczby przekrojów preparatów oraz na potrzebę analizy punktów odcięć w przyjętych zasadach oceny ekspresji receptorów (w tym 10% w przypadku HER2). Jedną z propozycji postępowania było wykonywanie biopsji z pierwszego przerzutu i stosowanie odpowiedniego leczenia, natomiast w przypadku braku odpowiedzi na terapię – rozważenie wykonania kolejnej biopsji, ale ze zmian opornych na leczenie lub z nowych ognisk nowotworu. Z kolei ocena krążących komórek nowotworowych nie powinna stanowić rutynowego postępowania w chwili rozsiewu, gdyż komórki te nie zawsze są obecne we krwi. Na zakończenie dyskusji zaprezentowano przypadek kliniczny, a postępowanie poddano pod głosowanie uczestników konferencji. U chorej na ER-dodatniego/HER2-ujemnego raka piersi w obrębie tkanek miękkich doszło do małej wznowy, z której pobrano materiał za pomocą biopsji i otrzymano status receptorów: ER-ujemny/HER2-ujemny. Jakie leczenie należy zastosować u tej chorej: hormonoterapię czy chemioterapię? Wyniki głosowania pokazały, jak wiele jeszcze należy zrobić w omawianym zagadnieniu – około połowy uczestników głosowało za leczeniem hormonalnym (mała wznowa w tkankach miękkich pomimo konwersji receptora ER), druga połowa uczestników za chemioterapią (brak ekspresji receptorów estrogenowych w przerzucie).

SZLAK PI3K/AKT/MTOR

Wykład na temat szlaku PI3K/AKT/mTOR i możliwych celów terapeutycznych wygłosiła Ana Vivancos. Przeprowadzono analizę, której celem było określenie najczęstszych zaburzeń tego szlaku w zależności od typu molekularnego raka piersi. Wyłoniono 4 interesujące geny: *PTEN* (najczęstsze zaburzenia w podtypie bazalnym – 67%), *PIK3CA* (najczęściej w podtypie luminalnym – 28–47%), *INPP4B* (podtyp HER2 – 54% i podtyp bazalny – 53%) oraz *AKT1* (najczęściej podtyp luminalny – 3%).

Z kolei w badaniach przedklinicznych wykazano, że ewerolimus przełamuje oporność na trastuzumab. Obserwacja ta przyczyniła się do zaprojektowania badania RADHAR, którego

wyniki przedstawiono podczas konferencji IMPAKT. Oceniono wartość prognostyczną biomarkerów szlaku AKT/mTOR określanych za pomocą immunohistochemii w przewidywaniu odpowiedzi na neoadiuwantowe leczenie skojarzone trastuzumabem z ewerolimusem u chorych na niezaawansowanego raka piersi. Do badania RADHAR włączono 80 chorych z nadmierną ekspresją lub amplifikacją genu *HER2*, T0–3, N0–2, bez względu na status receptorów steroidowych. W jednym ramieniu chore poddano monoterapii trastuzumabem, a w drugim – leczeniu skojarzonym (trastuzumab + ewerolimus). Odpowiedź kliniczną w ramieniu z trastuzumabem stwierdzono u 35% chorych, a w ramieniu skojarzonym u 45% chorych. Wyniki te nie przełożyły się jednak w takim stopniu na odsetek patologicznych odpowiedzi całkowitych (odpowiednio 43,5% vs 47,5%). Poza tym nie wykazano, aby którykolwiek z 7 analizowanych biomarkerów, które są związane z aktywacją szlaku mTOR: p4EBP1, pS6, eIF4E, Ki67, pAKT, LKB1 i kaspaza 3, mógł mieć wartość predykcyjną odpowiedzi na leczenie ewerolimusem z trastuzumabem. Na podstawie wyników badania RADHAR można stwierdzić, że aktywacja szlaku PI3K/AKT/mTOR zachodzi najprawdopodobniej bez udziału czynników zwiększających apoptozę lub zmniejszających nasilenie proliferacji.

TESTY OCENIAJĄCE PÓŹNE RYZYKO NAWROTU RAKA PIERSI

Ostatnio w badaniu ATLAS wykazano, że stosowanie tamoksyfenu przez 10 lat, czyli wydłużenie terapii o kolejne 5 lat, istotnie zmniejsza ryzyko nawrotu raka piersi ($p = 0,002$), umieralność z powodu raka piersi ($p = 0,01$), jak również umieralność całkowitą ($p = 0,01$). Wyniki tego badania są szczególnie interesujące z uwagi na fakt, że w przypadku raków luminalnych ryzyko wystąpienia przerzutów jest stałe przez wiele lat od rozpoznania choroby, a do około połowy nawrotów dochodzi po zakończeniu 5-letniej terapii tamoksyfenem.

Istotne znaczenie ma wyłonienie grupy chorych o dużym ryzyku rozsiewu, u których przedłużona terapia tamoksyfenem przyniosłaby największą korzyść. Niestety, na podstawie samych czynników związanych z guzem i chorobą nie można do końca precyzyjnie ustalić poziomu ryzyka nawrotu. Pomocne w takich sytuacjach mogą być testy molekularne. Opracowano już wiele takich narzędzi, w tym Oncotype DX, PAM50, IHC4, MammaPrint. Jednak do tej pory oceniano je pod kątem predykcji nawrotu raka piersi w ciągu pierwszych 5 lat od rozpoznania.

Niedawno jednak przeprowadzono analizy wartości tych testów w przewidywaniu późnego nawrotu, czyli 5–10 lat od

diagnozy. Ivana Sestak i wsp. porównali w ramach badania ATAC wartość 5 wskaźników: Clinical Treatment Score (CTS) (opracowany na podstawie cech guza i chorej), IHC4 (ekspresja receptorów ER, PgR, HER2 i Ki67) oraz 3 profili molekularnych: Oncotype DX, PAM50 i Breast Cancer Index. Największą wartość predykcyjną późnego nawrotu nowotworu miał wskaźnik CTS, a następnie dwa testy molekularne: PAM50 i Breast Cancer Index.

Podobne badanie przeprowadziła grupa austriacka, która oceniła wartość testu PAM50, analizującego ekspresję 50 genów dyskryminujących i 8 genów kontrolnych u chorych na hormonozależnego raka piersi. Testy wykonano u 1478 chorych, które w latach 1996–2009 wzięły udział w badaniu ABCSG-8. Na podstawie wyniku testów chore podzielono na 2 grupy: o małym i o dużym ryzyku późnego nawrotu. Po obserwacji, której mediana wyniosła 11 lat, nawrotu w okresie 5–10 lat od rozpoznania nie stwierdzono u 98,7% chorych z grupy małego ryzyka i u 91,5% chorych z grupy dużego ryzyka nawrotu. Test PAM50 miał dużą wartość prognostyczną zarówno w grupie bez przerzutów, jak i w grupie z przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych. Dodatkowym atutem tego testu jest możliwość jego wykonania przy użyciu materiału utrwalonego w formalinie i zatopionego w bloczku parafinowym w lokalnym laboratorium.

Wyniki tych dwóch badań wskazują na dużą korzyść z dołączenia testów molekularnych w określaniu ryzyka nawrotu raka oraz podejmowaniu decyzji o długości terapii. Dostęp do tych testów nadal jednak stanowi problem z uwagi na ich duży koszt.

NOWE METODY OBRAZOWANIA RAKA PIERSI

Dwa bardzo interesujące wykłady dotyczące najnowszych osiągnięć w obrazowaniu nowotworów wygłosiła Katja Pinker-Domenig. Obrazowanie molekularne pozwala na uzyskanie dokładniejszych informacji na temat nowotworu oraz zwiększa możliwości prowadzenia prac badawczych w onkologii. Możliwe jest dzięki obrazowaniu na poziomie komórek i genów (w porównaniu z konwencjonalnymi badaniami obrazowymi, w których widać zmiany makroskopowe). Obrazowanie molekularne pozwala zatem na bezpośrednie uwidocznienie molekularnego celu terapeutycznego, biomarkerów lub konkretnych genów. Przykładem obrazowania celu molekularnego było badanie przeprowadzone przez Petera Smitha-Jonesa i wsp., w którym porównano pozytonową tomografię emisyjną (PET, *positron emission tomography*) ^{68}Ga -DOTA-Fab-herceptin (HER2 PET) z ^{18}F -FDG w obrazowaniu odpowiedzi

nowotworu na leczenie białkiem szoku termicznego (17AAG) w modelu mysim. Badacze wykazali, że zmniejszenie sygnału w badaniu HER2 PET jest lepszym czynnikiem predykcyjnym zmniejszenia masy guza. Już po 24 h od leczenia 17AAG obserwowano zmniejszenie sygnału HER2, podczas gdy nasilenie glikolizy mierzone w PET z użyciem ^{18}F -FDG pozostawało na tym samym poziomie.

Podobne wyniki otrzymano w innym badaniu na myszach z wyindukowanym HER2-dodatnim rakiem piersi poddanych terapii trastuzumabem. W pracy tej analizowano nasilenie apoptozy (stężenie aneksyny V), metabolizm glukozy (^{18}F FDG-PET) i nasilenie proliferacji (^{18}F – FLT-PET). Wykazano, że obrazowanie molekularne apoptozy pozwala dokładnie przewidzieć zmniejszenie HER2-dodatniego guza, co powoduje, że ta metoda stanowi ciekawe narzędzie do wczesnej oceny odpowiedzi na neoadiuwantową terapię trastuzumabem, jednak zdecydowanie wymaga jeszcze dalszej oceny w ramach większych badań. Podobnie wartość ^{18}F FLT-PET była znaczna. Natomiast nie stwierdzono zmian w badaniu PET z powszechnie stosowanym znacznikiem ^{18}F -FDG, gdyż trastuzumab nieznacznie wpływa na metabolizm glukozy.

Poza tym za pomocą badań molekularnych można obrazować konkretne biomarkery obecne na powierzchni lub wewnątrz komórek – zmiana ich sygnału świadczy o odpowiedzi na stosowane leczenie. Kolejną możliwością jest obrazowanie genu reporterowego, a przez to zbadanie czynników wpływających na uaktywnienie się innego, trudniejszego do analizy genu.

Oprócz radioznaczników, duży postęp nastąpił w innych obszarach – obrazowaniu dyfuzji rezonansu magnetycznego (MR-DWI, *diffusion-weighted magnetic resonance*). Przy użyciu tej metody ocenia się szybkość dyfuzji cząsteczek wody, jest ona znacząco większa w obszarze martwicy niż w tkance nowotworu. Różnica w szybkości dyfuzji wody pozwala więc znacznie wcześniej przewidzieć odpowiedź na stosowane leczenie niż konwencjonalne metody obrazowania.

Oczekiwane są wyniki badania ZEPHIR, w którym chore na rozsianego HER2-dodatniego raka piersi poddano terapii T-DM1. W badaniu tym za pomocą PET sprzężonej z tomografią komputerową, z użyciem trastuzumabu znakowanego cyrkonem (^{89}Zr), oceniana jest ekspresja domeny zewnątrzkomórkowej receptora HER2. Jeśli ekspresja ta pozostaje na tym samym poziomie, najprawdopodobniej oznacza to, że chora nie odpowiada na terapię T-DM1.

Dołączenie molekularnych badań obrazowych do oceny skuteczności nowych terapii może zmniejszyć liczbę wymaganych chorych w badaniach klinicznych, koniecznych ze względów statystycznych, co również skróci czas oczekiwania na wyniki

badania i przyspieszy drogę leku do jego rejestracji, jeśli wyniki będą zadowalające.

WNIOSKI

Z roku na rok dokonuje się ogromny postęp w zakresie badań podstawowych nad rakiem piersi. W tym roku zagadnienie heterogenności zdominowało tematykę konferencji IMPAKT. Zjawisko heterogenności między guzami było powszechnie znane (podtypy biologiczne i molekularne raka piersi). Potwierdzono je również na poziomie molekularnym, wykazując różnice w częstości aberracji genetycznych (najczęściej *PIK3CA*, *TP53* i *ARID1A*) w guzach u chorych na hormonozależnego, zaawansowanego raka piersi (badanie BOLERO-2).

Dotychczas mniejszą wagę przywiązywano do wpływu heterogenności w obrębie guza na wyniki leczenia. Podczas konferencji przedstawiono wyniki badań genetycznych, które wykazały, że aby ograniczyć wpływ tego zjawiska, należy wykonywać 3 biopsje z każdego raka piersi. Ustalenia te wymagają jednak potwierdzenia w większych badaniach.

Zbadano najczęstsze zaburzenia szlaku PI3K/mTOR w zależności od typu molekularnego raka piersi. Natomiast próba określenia za pomocą immunohistochemii biomarkerów od-

powiedzi na terapię skojarzoną ewerolimusem z trastuzumabem nie powiodła się.

Przedstawiono wyniki dwóch prac naukowych, w których określono testy genetyczne mające największą wartość predykcyjną późnego nawrotu raka piersi (w 5–10 lat od rozpoznania). Najlepsze wyniki osiągnięto w przypadku PAM50 i Breast Cancer Index.

Ogromny postęp dokonał się również w zakresie diagnostyki obrazowej. Już teraz jesteśmy w stanie zobrazować poszczególne geny i zmianę ich ekspresji, a co za tym idzie – szybciej przewidzieć odpowiedź na leczenie ukierunkowane molekularnie. Ten obszar badań może w przyszłości istotnie wpłynąć na konstrukcję badań klinicznych oceniających skuteczność nowych leków przeciwnowotworowych.

Przesłanie konferencji IMPAKT jest zdecydowanie optymistyczne. Zaprezentowane wykłady stanowiły znakomite źródło inspiracji do dalszych badań. Konieczna jest współpraca szerokiego grona specjalistów: biologów, klinicystów i patologów, aby osiągnąć jak najlepsze rezultaty badań nad konkretnym zagadnieniem. Zapadalność na raka piersi zwiększa się, dlatego tak ważne jest opracowanie nowych, skuteczniejszych strategii postępowania. Kolejną ważną kwestią jest jak najszybsze wdrożenie osiągnięć badań podstawowych do praktyki klinicznej.

Adres do korespondencji:

lek. Katarzyna Pogoda
Oddział Chemioterapii Kliniki Onkologicznej,
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
00-973 Warszawa, ul. Wawelska 15