Az urachus carcinoma molekuláris hátterének vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Módos Orsolya

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Nyirády Péter, az MTA doktora, egyetemi tanár,
Dr. Szarvas Tibor, Ph.D., tudományos munkatárs,

Hivatalos bírálók:
Dr. Bödör Csaba, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Füle Tibor, Ph.D., szaktanácsadó

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Ács Nándor, az MTA doktora, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kiss András, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2017

1. BEVEZETÉS

Az urachus a sinus urogenitale fejlődési maradványa, melynek degradációja a felnőttek mintegy harmadában tökéletlenül megy végbe. Ilyenkor az úgynevezett urachus-maradvány marad vissza, melyből kiinduló daganatokat urachus carcinomának (UrC) nevezzük.

Az UrC egy rendkívül ritka malignus betegség, melyet leggyakrabban a húgyhólyagra történő inváziója kapcsán diagnosztizálnak. A hólyagrákoknak körülbelül fél százalékát, a húgyhólyag adenocarcinomáinak (ADC) pedig mintegy harmadát teszi ki. Szövettani megjelenése alapján felmerül a colrectalis carcinomához (CRC) való hasonlósága is. Prognózisa általában kedvezőtlen, az öt éves túlélési idő alig éri el az 50%-ot. Ennek oka, hogy többnyire előrehaladott stádiumban diagnosztizálják.

Az UrC stádiumának meghatározására több rendszer is ismert, melyek közül az ún. Sheldon- illetve a Mayo-féle stádiumbeosztást használják a leggyakrabban. A kétféle stádiumbesorolás prognosztikai értékével és klinikai alkalmazhatóságával kapcsolatban azonban megoszlanak a vélemények.

Az UrC lokális eseteiben az elsődlegesen választandó terápia a sebészi kezelés. A leggyakrabban alkalmazott műtét a parciális cystectoma, mely magába foglalja a ligamentum umbilicale medianum és a köldök *en-bloc* eltávolítását is.

A késői tünetekből adódóan az UrC-ás betegek 20-30%-át metasztatizált betegséggel diagnosztizálják. Ilyenkor hatékony sugárkezelés hiányában egyedüli lehetőségként a szisztémás terápia kínálkozik. Az UrC ritka előfordulásából adódóan nagy esetszámot felölelő klinikai tanulmányok nem állnak rendelkezésünkre, ezért a kemoterápiára vonatkozó irányelvek sem fogalmazódtak meg. Az ebből adódó bizonytalanságot jól jellemzi, hogy míg egyesek a húgyhólyag érintettsége miatt a hólyag urothel sejtes daganataiban is használatos ciszplatin alapú kemoterápiát választják, addig mások az UrC-ának a CRC-áhozvaló klinikai és szövettani hasonlósága miatt a vastagbél tumorok esetén használt 5-fluorouracil (5-FU) alapú kezeléseket részesítik előnyben. A metasztatikus UrC-ák öt éves túlélése kevesebb, mint 20%, ami rámutat kemoterápiás kezelés jelenleg gyenge hatékonyságára. Az UrC klinikai, patológiai, illetve kemoterápiás kezelésére vonatokozó ismereteink többnyire kisebb esetszámokat feldolgozó tanulmányokból származnak. Ezért szükségesnek láttuk az összes elérhető irodalmi adat szisztematikus összegzésével metaanalízist végezni.

Az UrC genetikai hátterének feltérképezése segíthet eldönteni, hogy az UrC az urothel sejtes vagy a CRC-ához áll közelebb, ezáltal támpontot nyújthat a megfelelő kemoterápiás kezelés kiválasztásához. Másrészt, egyes célzott terápiával kezelhető

mutációk azonosítása a személyre szabott terápiák alkalmazását teszik lehetővé.

Hisztológiai és immunfenotípus-beli hátterét tekintve az UrC igen sok hasonlóságot mutat a CRC-ához. Ebből kiindulva azon célzott terápiás szerek alkalmazása tűnik elsősorban indokoltnak, melyeket CRC-ában sikerrel alkalmaznak. Ilyen az anti-EGFR kezelés, mely a CRC esetében másodvonalbeli standard kezelésnek számít.

Az EGFR-inhibitorok alkalmazásánál az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) jelátviteli út mutációi a terápiás döntéshozatalt merően befolyásolják. Az EGFR szignálútnak az EGFR szintjénél lejjebb elhelyezkedő tagjait érintő aktiváló mutációk az EGFR-jelátviteli útvonalat ligand bekötődése nélkül is aktiválják, így a sejtek felfokozott proliferációjához, növekedéséhez és túléléséhez valamint daganatos elfajulásához vezethetnek. Az EGFR gén exonjainak mutációi, valamint az EGFR amplifikációja pozitív prediktora az anti-EGFR terápiának, míg a szignálút lejjebb elhelyezkedő tagjainak aktiváló mutációi az EGFR-inhibitor kezelést kontraindikálják. A mai napig kevés publikáció áll rendelkezésünkre az EGFR-gátló kezelésekről UrC-ában, s bár ezek az eredmények bíztatóak, a mutációk előfordulásának gyakoriságáról igen keveset tudunk.

A húgyhólyagban felfedezett ADC urachális, primer húgyhólyag illetve szekunder, elsősorban vastagbél áttét eredetének szövettani vizsgálat alapján történő elkülönítése egyelőre megoldatlan, holott e tumor entitások differenciálása egymástól több szempontból is lényeges. Az UrC megkülönböztetése a CRC inváziójától az UrC diagnózisának fontos feltétele. Ezen felül az UrC és a primer hólyag ADC elkülönítése alapvetően meghatározza a sebészi terápiát, hisz míg az UrC parciális, addig a primer hólyag ADC radikális cystectomiával kezelendő. Továbbá az UrC-ára specifikus markerek felfedezése segíthet az ismeretlen eredetű mucinózus ADC-ák urachális eredetének igazolásában.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. Irodalomkutatáson alapuló vizsgálataink célja az volt, hogy aktuális képet kapjunk az UrC klinikopatológiájáról, prognosztikájáról és kezeléséről, ezért az irodalomban fellelhető összes UrC-ás esetet összegyűjtöttük és a közölt adatok felhasználásával metaanalízist végeztük. E munka során különös figyelmet szenteltünk a különböző kemoterápiás szerek hatékonyságának statisztikai összevetésére.

2.2. Célul tűztük ki, hogy a lehető legnagyobb számú UrC szövetmintát és klinikai adatot gyűjtsük össze, melyeken a CRC-ában gyakran mutálódott gének, a KRAS, az NRAS, a BRAF, valamint az EGFR és a PIK3CA mutációs forrópontjait analizáltuk. Összefüggéseket kerestünk a mutációk jelenléte valamint a betegek klinikopatológiai és túlélési adatai között.

További célunk volt, hogy eredményeinket az irodalomi adatokkal összevetve összehasonlítsuk az UrC mutációs profilját a CRC, az urothel sejtes carcinoma és a hólyag primer ADC mutációs mintázatával.

2.3. Az UrC molekuláris hátterének további feltérképezése céljából immunhisztokémiai vizsgálattal 15 UrC-ás mintán elemeztük az urothelsejtes és a CRC-ában ismert markerek, a RHAMM, a BGN, az MMP-7, az IMP3, a TP53 és Ki67 szöveti expressziójának előfordulását és prognosztikus értékét.

3. MÓDSZEREK

3.1. Az UrC klinikopatológiája, prognosztikája és kezelése

Az adatgyűjtés során szisztematikus PubMed keresést végeztünk a „urachal cancer” és „urachal carcinoma” keresőszavak használatával, vizsgálatunkba így összesen 25 tanulmányt válogattunk be, melyek együttesen 1010 UrC-ás beteg adatait dolgozták fel.

3.2. Az EGFR-jelátviteli útvonal mutáció analízise

Az EGFR jelátviteli útvonal mutációanalíziséhez egy széleskörű nemzetközi kooperáció kereti között 31 formalin-fixált, paraffinba ágyazott UrC szöveti blokkot gyűjtöttünk össze öt különböző egyetemi klinikáról (Budapest, Essen, Krakkó, Rennes, Vancouver). A blokkokból natív metszetek készültek, melyeken hematoxilin-eozin festést követően patológus jelölte be a tumoros szöveti részeket. Makrodisszekciót követően izoláltuk a daganat DNS-ét, majd PCR-rel amplifikáltuk a KRAS, az NRAS, a BRAF, az EGFR és a PIK3CA gének 13 exonját, végül piroszekvenálással határoztuk meg a mutációk jelenlétét.

Saját eredményeinket további, az UrC EGFR szignálút mutációira irányuló publikált adatokkal összegeztünk. E mutációs gyakorisági adatokat a CRC-ában, az urothelsejtes carcinomában

és a hólyag primer ADC-ában talált irodalmi adatokkal vetettük össze.

3.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunhisztokémiai vizsgálatainkat 15 UrC-ás beteg mintáin végeztük el. A p53, Ki67, RHAMM, BGN, MMP-7 és az IMP3 ellenanyagokkal történő immunfestés detektáláshoz diamino-benzidint (DAB) használtunk.

Az immunhisztokémiai eredmények kvantitatív és a kvalitatív analízisét két patológus végezte egymástól függetlenül. A RHAMM, BGN, MMP-7 és az IMP3 festés kiértékeléshez az „H-score”-t alkalmaztuk. Az ellenanyagokkal az immunhisztokémiai festés automatizált módon történt. A reakció végtermékét DAB festékkel jelenítettük meg. A Ki67 és a p53 értékelés a pozitív tumor magok százalékos becslésével történt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az UrC klinikopatológiája, prognosztikája és kezelése

Irodalomkutatást követően metaanalízist végeztünk, mely során összesen 1010 UrC beteg adatait értékeltük. A páciensek között 604 férfi (60%) és 406 nő (40%) szerepelt, a medián életkor pedig 52 év volt (20-90 év). A leggyakoribb tünetek között a makroszkópos vagy mikroszkópos haematuria (73%), az alhasi fájdalom (14%), a dysuria (13%) valamint a mucosuria (10%) szerepeltek. A daganatok 90%-a bizonyult ADC-ának. A malignitási fokra vonatkozó adatok alapján a tumorok 18%-a alacsony, 48%-a közepes, míg 34%-a magas malignitású volt. A Sheldon-féle stádiumbesorolás szerint az I-es stádiumú csoportba a betegek 0,6%-a, a II-es és III-as csoportba 8%-a illetve 68%-a, míg a IV-es stádiumú csoportba 24%-a került. A Mayo-féle stádiumbesorolás során a betegek 33%-a sorolódott az I-es, míg 40%-a a II-es, 7%-a a III-as és 20%-a a IV-es stádium csoportba került. A diagnózis felállításakor a betegek 21%-a rendelkezett távoli áttéttel. Azon eseteknél, ahol a sebészi kezelés nyirokcsomó eltávolítással egészült ki, a nyirokcsomó pozitivitás 17%-ban igazolódott. A műtéti kezelés után a betegek 21%-ánál igazoltak pozitív sebészi szélt.

A prognosztikai faktorok vizsgálata során a multivariencia analízis független prognosztikai faktorként azonosították a

következőket: (1) Sheldon stádium, (2) Mayo stádium, (3) nyirokcsomók érintettsége, (4) távoli metasztázisok jelenléte, (5) pozitív sebészi szél, (6) ECOG státusz.

A különböző kemoterápiás kezelések hatékonyságának összehasonlítása végett 74 UrC beteg adatainak feldolgozásával metaanalízist végeztünk. A radiológiai válaszok alapján a betegek hasonlóan jól reagáltak az 5-FU alapú kezelésre, mint a kombinált platina–5-FU alapú kezelésre, hisz mindkét csoportban a válaszolók aránya 40% feletti értéket mutatott (44% és 43%). Ez az arány a platina-alapú kezelést kapott betegcsoportban csupán 10% volt. A kezelés alatt progrediáló betegeket is figyelembe véve a leghatékonyabb kezelésnek a platina-5-FU kombinált terápia tűnik, hisz ezek a kezelések adták a legalacsonyabb progressziós arányt (14%).

4.2. Az EGFR-jelátviteli útvonal mutáció analízise

Harmincegy UrC-ás betegnél vizsgáltuk az EGFR jelátviteli útvonal 5 génjének 13 exonján a leggyakrabban előforduló patogén mutációkat. Összesen 14 mutációt találtunk 13 (42%) betegnél. Leggyakrabban a KRAS gén mutálódott (26%), melyet a BRAF (16%) és az NRAS (3%) gének mutációi követtek. Egy esetben mind a BRAF, mind pedig az NRAS génben mutációt találtunk. Az EGFR és a PIK3CA gének minden esetben vad típusúnak bizonyultak. A mutációk jelenléte, valamint a betegek

klinikopatológiai adatai között (Sheldon-stádium, Mayo-stádium, malignitás, nyirokcsomó áttét jelenléte, kalcifikáció jelenléte és pecsétgyűrűsejtes fenotípus) nem találtunk összefüggést. Ezen felül a mutációk jelenléte és teljes túlélés között sem találtunk összefüggést.

A továbbiakban összehasonlítottuk az UrC, a hólyag urothelsejtes és primer ADC, valamint a CRC mutációs mintázatát. A CRC és az UrC mutációs mintázatainak összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a KRAS gén érintettsége mindkét tumorban gyakori (28% vs. 41%). További hasonlóság mutatkozott az UrC és a CRC között a BRAF gén mutációinak összehasonlításakor (8% vs. 10%), míg az NRAS és az EGFR gének ritkán érintettek mindkét tumorentitásban. Az UrC és a CRC mutációs mintázata között különbséget csupán a PIK3CA gén esetében láttunk, ugyanis e gén mutációi viszonylag gyakorinak számítanak CRC-ában (15%), UrC-ában viszont az esetek mindössze 2%-ában volt kimutatható. A CRC-ától eltérően az UrC és a hólyag urothelsejtes carcinomájának mutációs gyakoriságai között egyértelmű különbségeket találtunk. Egyrészt az UrC-ában gyakori KRAS mutációk urothelsejtes daganatokban ritkák (3%), ezzel szemben a PIK3CA urothelsejtes daganatokban gyakori (20%), míg UrC-ában ritka eseménynek számít. Az UrC és a hólyag primer ADC mutációs mintázata nagymértékben hasonlít egymásra: a KRAS gén mutációja viszonylag gyakran

érintett mindkét tumorentitásban (UrC-ában 28%, primer ADC-ában pedig 18%), melyet a BRAF gén érintettsége követ (mindkét tumorban 8%), míg az NRAS és az EGFR gének érintettsége e két tumorféleségben alig, vagy egyáltalán nem fordul elő.

4.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Tizenöt UrC-ás beteg mintáin két patológus egymástól függetlenül elemezte az MMP-7-tel, a BGN-nel, a RHAMM-mal és az IMP3-mal való festődés intenzitását, melyek közül a RHAMM és az IMP3 szignifikánsan erősebb festődést mutatott a tumor szövetekben, mint a környező normál szövetben ($p=0,0431$ és $p=0,0052$). A Ki67 és a p53 festődés intenzitásának analízise szignifikáns emelkedést eredményezett a tumor szövetekben mindkét immunreakció esetén ($p=0,0006$ és $p=0,0024$). Az IMP3 festődés szignifikánsan erősebbnek mutatkozott a korai stádiumú (Sheldon $\leq$ IIIA) UrC-ás daganatokban ($p=0,0048$). A RHAMM, a BGN, az MMP-7, az IMP3, a Ki67 és a p53 immunreaktivitása valamint a daganat malignitási foka (grade), illetve a betegek neme és életkora között összefüggést nem találtunk. A Cox regressziós analízis segítségével az immunreakciók és a betegek teljes, betegség-specifikus és progresszió-mentes túlélése között nem találtunk szignifikáns összefüggést.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. Metaanalízisünk megmutatta, hogy a CRC-ában alkalmazott 5-FU-alapú kemoterápia UrC-ában hatékonyabb, mint az urothel sejtes carcinomában használt platina-alapú kezelések. A leghatékonyabb kemoterápiás kezelésnek az 5-FU és platina kombinációja tűnik.

5.2. Összehasonlítva az UrC, a CRC és az urothelsejtes carcinoma mutációs mintázatát megállapítottuk, hogy az UrC mutációi lényeges átfedést mutatnak a CRC és a hólyag primer ADC mutációs mintázatával, míg az urothel sejtes daganatétól markánsan eltérnek.

5.3. Az UrC és a CRC genetikai és molekuláris hátterében nagymértékű hasonlóságot találtunk, mely megerősíti azt az elképzelésünket, hogy a CRC-ában használt kezelések – úgy, mint az EGFR-gátlók – hatékonyak lehetnek UrC esetén is. Ritka tumorok esetén a célzott terápiák méginkább felértékelődnek, különösen az olyan előrehaladott esetekben, ahol a kemoterápiás kezelés hatástalannak bizonyul. Vizsgálataink megmutatták, hogy UrC-ában az EGFR-szignálút tagjaiban gyakran fordulnak elő aktiváló génmutációk, ami az EGFR-szignálút

mutációanalízisének fontosságát hangsúlyozza azon esetekben, amikor UrC-ás betegek EGFR-gátló terápiáját tervezzük.

5.4. Immunhisztokémiai vizsgálataink szerint a RHAMM, az IMP3, a Ki67 és a p53 fehérjeexpressziója a normál szövetekhez képest UrC-ában magasabb. Továbbá, az IMP3 expressziója szignifikánsan emelkedett az alacsonyabb stádiumú UrC-ában, ami az IMP3-nak a korai karcinogenezisben betöltött esetleges szerepére utal.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. **O. Modos,** H. Reis, C. Niedworok, H. Rübben, A. Szendrői, A.M. Szász, J. Tímár, K. Baghy, I. Kovalszky, T. Golabek, P. Chlosta, K. Okon, B. Peyronnet, R. Mathieu, S.F. Shariat, P. Hollósi, P. Nyirády and T. Szarvas (2016). Mutations of KRAS, NRAS, BRAF, EGFR, and PIK3CA genes in urachal carcinoma - occurence and prognostic significance. Oncotarget, 7:39293-39301. **IF: 5.008**

2. C. Niedworok, M. Panitz, T. Szarvas, H. Reis, A. C. Reis, A. Szendrői, P. Nyirády, A. M. Szasz, **O. Modos** and H. Ruebben, F. vom Dorp (2016) Urachal carcinoma of the bladder – impact of clinical, laboratory and immunohistochemical parameters on patients' prognosis. J Urol, 195:1690-6. **IF: 4.700**

3. T. Szarvas*, **O. Modos***, C. Niedworok, H. Reis, A. Szendrői, A.M. Szász and P. Nyirády (2016) *Clinical, prognostic, and therapeutic aspects of urachal carcinoma-A comprehensive review with meta-analysis of 1,010 cases.* Urol Oncol. 2016;34:388-98. **IF: 2.921**

*megosztott elsőszerzőség

6.2. Egyéb témában megjelent közlemények

1. **O. Modos***, A. Keszthelyi* and A. Majoros (2014) *Radikális cystectomia szövődményei magas kockázatú betegek esetében.* Uroonkológia, 19:35-40.

2. T. Szarvas, **O. Modos**, A. Horváth and P. Nyirády (2016) Why are upper tract urothelial carcinoma two different diseases? Transl Androl Urol. 5:636-647.

*megosztott elsőszerzőség