

# Ny kunskap om **uvealt melanom** – implikationer för behandling

Forskare vid Sahlgrenska akademien och Sahlgrenska Universitetssjukhuset har kartlagt arvsmassan i metastaser från uvealt melanom, den svåra formen av melanom som utgår från ögat. Kartläggningen ger bland annat nya insikter om hur metastaser uppkommer och hur immunceller som infiltrerar tumörerna ser ut. Studien ger hopp om nya angreppssätt och refereras här av **Jonas Nilsson**, professor i experimentell cancerkirurgi på Sahlgrenska Center för cancerforskning.

**M**elanom uppkommer när pigmentcellerna, melanocyterna, drar på sig mutationer och börjar dela sig okontrollerat. Eftersom solens UV-ljus kan leda till både mutationer och inflammation i huden är den vanligaste platsen från vilken melanom uppkommer i ljushyade just i den solexponerade delen av huden. Mörkhyade personer däremot har inte lika mycket solningsinducerad melanom utan kan istället utveckla melanom i exempelvis handflatan eller under huden, så kallat akralt melanom. Dessutom kan både ljus- och mörkhyade personer utveckla slemhinnemelanom exempelvis i mun, läpp, näsa och anus, även om det är ovanligt. En annan ovanlig melanomform är uvealt melanom som utgår från ögat.

Uvealt melanom uppkommer i ögats uvea som består av regnbågshinnan (iris), ciliärkroppen och åderhinnan. 80 individer om året i Sverige utvecklar uvealt melanom. Inga säkra riskfaktorer finns, förutom en nord-sydlig gradient av

fall i Europa med flest patienter i Norden. En del studier antyder att blått ljus såsom vid svetsning och från dataskärmar skulle kunna vara en riskfaktor, men givet att sjukdomen är relativt ovanlig är inte epidemiologin enkel att göra för att få fram starka bevis.

Behandlingen sker genom att antingen strålbehandla tumören i ögat eller i vissa fall operera bort hela ögat, och detta botar cirka 50 procent av patienterna. Om däremot tumören sprider sig utanför ögat är prognosen mycket dålig och ytterst få överlever. Metastaser av uvealt melanom kan uppkomma tidigt efter strålning eller kirurgi av ögat, men ibland tar det flera år efter den primära tumören behandlats innan metastaser detekteras. Uvealt melanom sprider sig framförallt till lever, vilket är svårupptäckt med radiologi, och anledningen till denna tropism är inte utrett. Det finns hypoteser om att mikromiljön passar bäst i levern, att levern producerar olika tillväxtfaktorer eller att tumörcellerna lätt-



**// Dessvärre finns ingen rent målinriktad behandling för uvealt melanom. Detta beror på att det är helt andra gener som muteras i den melanomformen än i hud- och slemhinnemelanom.**

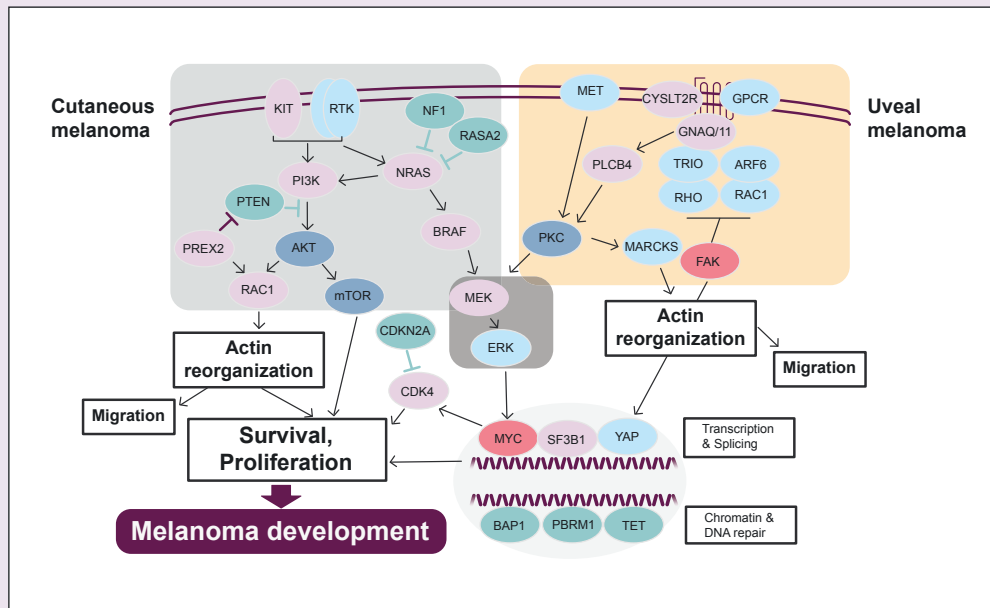
are kan gömma sig för immunsystemet i den immunsuppressiva miljön som finns i levern. Samtliga är rimliga hypoteser med vissa prekliniska evidens men i avsaknad av en riktigt bra djurmodell för uvealt melanom har det varit svårt att helt reda ut denna process.

**GENETIKEN I MELANOM**

Melanom uppkommer när onkogenet muteras i kombination med en inaktivering av tumörsuppressorgener. I hudmelanom är de vanligaste onkogenerna som muteras ett kinas kallat BRAF och ett G-protein kallat NRAS. Dessa är muterade redan i nevi där melanocyterna hålls i schack av tumörsuppressorgener och så kallade epigenetiska reglermekanismer. Om BRAF/NRAS dock muteras tillsammans med en eller flera tumörsuppressorgener som CDKN2A,

PTEN, TP53 eller NF1 kan cellerna dela sig okontrollerat och sprida sig. I de akrala melanomen kan BRAF också muteras med i dessa melanom, och i slemhinnemelanom ser man även andra mutationer som i exempelvis KIT. Intressant nog så kan BRAF- och KIT-mutationer göra att patienterna kan behandlas med målinriktade terapier som hämmar de muterade proteinerna. Behandling av patienter som har spritt hudmelanom med BRAF-hämmare som vemurafenib eller dabrafenib leder till responser i flertalet av patienter men svaret är inte alltid långvarigt. Dock kan ytterligare responser och uthållighet i responsen erhållas om man lägger till så kallade MEK-hämmare, exempelvis trametinib, som inhiberar MEK som direkt regleras av BRAF. Signalkedjan i cellen hämmas då mer effektivt och patientens behandlingsvar blir förbättrat.

Dessvärre finns ingen rent målinriktad behandling för uvealt melanom. Detta beror på att det är helt andra gener som muteras i den melanomformen än i hud- och slemhinnemelanom. I uvealt melanom är det G-proteinet GNAQ/GNA11 som muteras först och främst, men även två gener som i signalkedjan är uppströms (CYSLTR2) och nedströms (PLCB4) kan muteras i enstaka fall. En tumör har alltid en av de fyra muterad, ej två eller fler. Eftersom GNAQ och GNA11 är G-protein är de precis som NRAS i hudmelanom nära nog omöjliga att skapa hämmare mot då det aktiva sätet i proteinet binder co-faktorn GTP stenhårt så inga läkemedel kan knuffa bort den. Det pågår forskning över hela världen som syftar till att lösa detta problem.



Figur 1: Signalvägar i melanom. Bilden visar de vanligast muterade onkogenerna (rosa) och tumörsuppressorna (gröna) i melanom. En del onkogener amplifieras (röda), dvs antalet kopior av genen blir mycket fler. Generna påverkar sedan flera andra signalkomponenter i cellen som aktiveras vilket leder till celledelning och melanomutveckling. Notera olikheter i vilka gener som muteras mellan hudmelanom och uvealt melanom, men att också en del av de reglerade vägarna är likadana.

Dock är det oerhört svårt att göra något som specifikt inhiberar den *mutede* formen av proteinet, och om inte det sker så blir det sannolikt ohållbara biverkningar. Nedströms om GNAQ/GNA11 aktiveras MAPK-vägen (inkl MEK), YAP/TAZ i Hippovägen via kinaset FAK. Arbete pågår för att utröna om dessa kan vara targets för läkemedel mot uvealt melanom (figur 1).

Förutom de ovannämnda mutationerna finns också mutationer i andra gener i uvealt melanom som sker samtidigt som de onkogen mutationerna. Om mutationer uppkommer i EIFAX sker nästan aldrig spridning av tumören och även mutationer i SF3B1 är relativt gynnsamma. Mutationer sker även i tumörsuppressorgen BAP1, en gen som kan vara både familjär och sporadisk, och som har återfunnits muterad i framförallt uvealt melanom, mesoteliom och i njurcancer. BAP1s exakta funktion är inte helt utrönt då den tillskrivits funktion i bland annat genreglering, DNA-skaderespons, celldödsreglering och mitos. Vad som dock är känt är att om BAP1-mutationer uppkommer i uvealt melanom sprider sig alltid tumören.

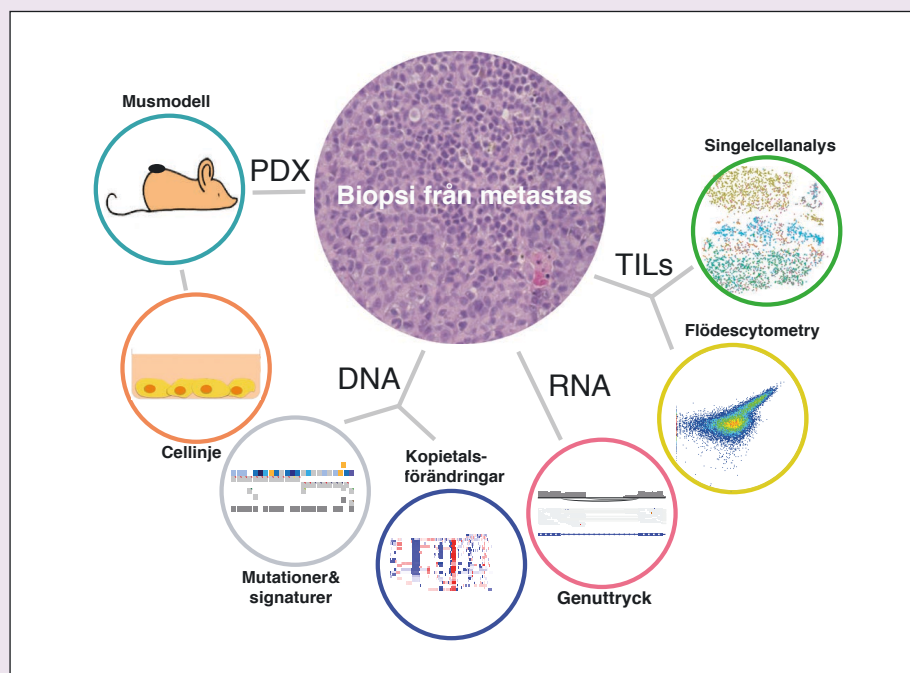
Intressant nog sammanfaller prognos också med hur avläsningen av generna i tumörens arvs massa styrs. Har patientens tumör en viss 'gensignatur', klass 1, uppkommer strängt taget aldrig metastaser. Har tumören däremot en klass 2 gensignatur kommer metastaser att utvecklas och sjukdomen blir då obotbar. Denna gensignatur kan användas kliniskt genom ett kommersiellt kit men eftersom RNA-analys krävs är det inte använt så ofta i kliniken som istället använder andra parametrar, bland annat tumörstor-

lek och BAP1 immunohistokemisk analys. I vilket fall som helst visar detta att genetiken styr prognos och därför är denna typ av forskning sannolikt nyckeln till att i framtiden kunna attackera uvealt melanom med målinriktade behandlingar eller immunterapi.

#### PÅGÅENDE STUDIER FÖR SPRITT UVEALT MELANOM

I dagsläget finns ingen godkänd behandling för uvealt melanom och de ovannämnda behandlingarna för hudmelanom har inte visat sig lovande. Exempelvis fallerade en MEK-hämmare, selumetinib, i en fas 3-prövning. Studier på kombinationer, till exempel med PKC- eller FAK-hämmare, är på väg in i tidiga faser och olika typer av immunterapi testas också.

Immunterapi som syftar till att väcka upp immunsystemet mot melanom, så kallade immuncheckpointinhibitorer (ICI), är godkända för patienter med hudmelanom. Två typer av targets används: CTLA4-hämmande monoklonala ICI vilka verkar vid antigenpresentation och eventuellt mot immunsuppressiva T-celler (Treg), eller PD1/PDL1-hämmade monoklonala ICI vilka verkar där T-celler har kontakt med tumörcellerna och stängs av av dessa. ICI leder till att uttrötade T-celler vaknar upp och kan attackera melanomcellerna och leda till riktigt långvariga tumörresponser som eventuellt är botande i patienter med hudmelanom. Dessvärre har inte denna typ av revolutionerande behandling (som gav Nobelpriset i medicin 2018), resulterat i någon större revolution för patienter med uvealt melanom. De används som off-label och kan i några fall stabilisera sjuk-



Figur 2. I vår studie använde vi biopsier från patienter på de här beskrivna sätten och erhöll ny kunskap om metastaserat uvealt melanom.

domen men oftast har de ingen större effekt. På Sahlgrenska driver vi en svensk multicenterstudie kallad PEMDAC-studien för patienter med metastaserat uvealt melanom. Här erhåller patienterna både en PD1-hämmare men också en HDAC-hämmare, som styr om genavläsning i uveala melanomcellerna. De slutliga resultaten av denna prövning kommer att offentliggöras senare i år men på ESMO förra året presenterade vi preliminära data som visar att en del patienters tumörer inte bara stabiliseras utan även krymper.

Andra intressanta typer av behandlingar som pågår i kliniska prövningar är så kallad TIL-terapi, en bispecifik bindande molekyl, tebentafusp, som sammanför melanomceller med T-celler samt PV-10, en immunstärkande molekyl som administreras intratumoralt. I Sverige pågår en svensk fas 3 multicenterstudie kallad SCANDIUM, där isolerad leverperfusion (IHP) med melfalan jämförs mot läkarens val. Denna studie startades då retrospektiva data antydde att IHP-behandlade patienter levde längre än de som inte fått denna behandling. Inklusionen är på sluttampen och efter sista patienten inkluderats ska data sammanställas två år efter för att se om IHP förlänger överlevnaden. Både kontrollarmen och IHP-armen tillåter deltagande i andra studier vid tumörprogress så därför förväntas inte eventuella nya behandlingar påverka utfallet och möjligheten att avgöra om IHP ger en fördel.

#### SCANDIUM-STUDIENS PREKLINISKA EFTERMÅLE

Under isolerad leverperfusion kopplar kirurgen levern till en hjärt-lungmaskin och levern perfunderas med mycket

höga doser melfalan. Eftersom levern är synlig har leverkirurgierna möjlighet att biopsiera levermetastaser, vilket normalt sett är svårt eftersom uvealt melanom inte syns så bra med exempelvis ultraljud. Dessa metastaser har nu kunnat användas till ett stort antal experiment. Vår forskargrupp har kunnat göra sekvensering av tumörerna, både helgenom samt de avlästa generna i form av RNA-sekvensering. Vi har kunnat odla ut tumör-infiltrerande lymfocyter (TILs) samt av en del biopsier kunnat skapa djurmodeller som bär på patientens tumör, så kallad patient-deriverad xenograft, eller Avatarmus. Från tumörerna som växte upp på mössen kunde cellodlingar skapas. Alla dessa analyser och verktyg har nu använts i en studie som nyligen publicerades i Nature Communications (Karlsson et al., 2020). Vi gjorde ett stort antal nya fynd på den hittills största samlingen metastaser av uveala melanom i världen (figur 2).

Det första nya fyndet var att mutationer i BAP1-tumör-suppressorgen visade sig vara mycket vanligare än förväntat. Genom att hela genomet sekvenserades kunde vi upptäcka en del mutationer i de delarna av BAP1-genen som inte kodar för proteinet, nämligen i de så kallade intronerna. För att utröna vad BAP1 gjorde använde vi oss av en av våra cellinjer som hade en muterad BAP1 och sedan förde vi in en funktionell form av BAP1 genom genteknik. Vi fann att genavläsningen förändrades dramatiskt. Många av de generna som förändrades ingår i den gensignatur som skiljer mellan god och dålig prognos i primärtumören (Klass 1 och 2). Våra resultat antyder alltså att denna gensignatur till stor del härleds från om tumören bär på en BAP1-mutation eller



inte. Detta kommer ha betydelse i kliniken och stärker att man kan använda immunhistokemisk analys av kärnlokalisering, alltså funktionell BAP1, för klinisk prognostisering.

Ett annat viktigt fynd var när vi undersökte vilka mutationer som uppkommit och hur de uppkommit. Genom att utforska hur bassekvensen ser ut över hela genomet kan man erhålla så kallade mutationssignaturer, som avslöjar något om vilken mutationsprocess som ägt rum i tumören. De flesta metastaserna hade mutationssignaturer som är typiska för tumörer som uppkommer på grund av ålder och celldelningar, men en antydning till problem med DNA-reparation kunde också urskiljas. Intressant nog hittade vi även en tumör som hade en helt annan mutationssignatur. Denna tumör liknade ett hudmelanom för det var tydligt att arvsmassan var skadad av solens UV-ljus. När vi undersökte detta närmare visade sig denna tumör vara ett irismelanom, en mycket ovanlig form av den redan ovanliga melanomformen uvealt melanom. Vi undersökte fler irismelanom och kunde verifiera att irismelanom har ett UV-skadat genom. Sannolikt beror detta på att iris befinner sig perifert i ögat och därför kan nås av solljusets UV-ljus, vilket inte övriga delen av uvea kan. Däremot är det fortfarande oklart om UV-skada leder till några specifika drivande mutationer eller om de bara råkar samexistera med de viktiga mutationerna i exempelvis GNAG/GNA11 eller BAP1. Några veckor efter vår studie publicerades kunde en annan studie koordinerad från Australien konfirmera vårt fynd i ett större material av framförallt primära uveala melanom.

Vi undersökte även större kromosomala förändringar i genomet på metastaserna och kunde upptäcka några kopietalsförändringar som inte sker alls eller ofta i primära tu-

mörer men som däremot var frekventa i metastaserna. Ett exempel var en del som omfattade hudmelanomsuppressorn CDKN2A (se ovan), som inte tidigare kopplats till uvealt melanom. Ett liknande resultat erhöles även en annan gruppering från framförallt USA. En del av de andra kopietalsförändringarna ledde till förändring i genavläsning och med genteknik (siRNA) kunde vi påvisa att en del av dessa gener var viktiga för uveala melanom i cellodling, såsom PTK2 som kodar för FAK (figur 1). De generna kommer att följas upp för att utröna vad deras funktion är i framtida studier.

Den sista stora analysen vi utförde var att sekvensera individuella immunceller, så kallade TILs, som växt ur tumören. Våra analyser visade att inte bara PD-1 och CTLA4 finns på TILs från uvealt melanom men också andra immuncheckpointproteiner. Vi kunde också visa att det fanns tumörreaktiva TILs, vilket också förklarar varför en del patienter kan svara på TIL-terapi. Sammantaget visar vår komplexa studie fördelen med samarbete med preklinisk och klinisk, där framförallt Joakim Karlsson och Lisa Nilsson på labbet, samt Roger Olofsson Bagge, Per Lindnér, Lars Ny och Ulrika Stierner från Sahlgrenska, Charlotta All-Ericksson från St Eriks ögonsjukhus och svenska melanomstudiegruppen varit betydelsefulla. Studien visar också betydelsen av biobanker av levande material, då deskriptiva analyser kan följas upp med funktionella analyser i material från samma patient. På grund av kliniska studier så kan även ett litet land som Sverige producera biobanker för ovanliga sjukdomar till följd av nationell samordning, till exempel genom cancerdiagnosstudiegrupperna.

JONAS NILSSON, PROFESSOR I EXPERIMENTELL CANCERKIRURGI  
PÅ SAHLGRENSKA CENTER FÖR CANCERFORSKNING,  
JONAS.A.NILSSON@SURGERY.GU.SE

