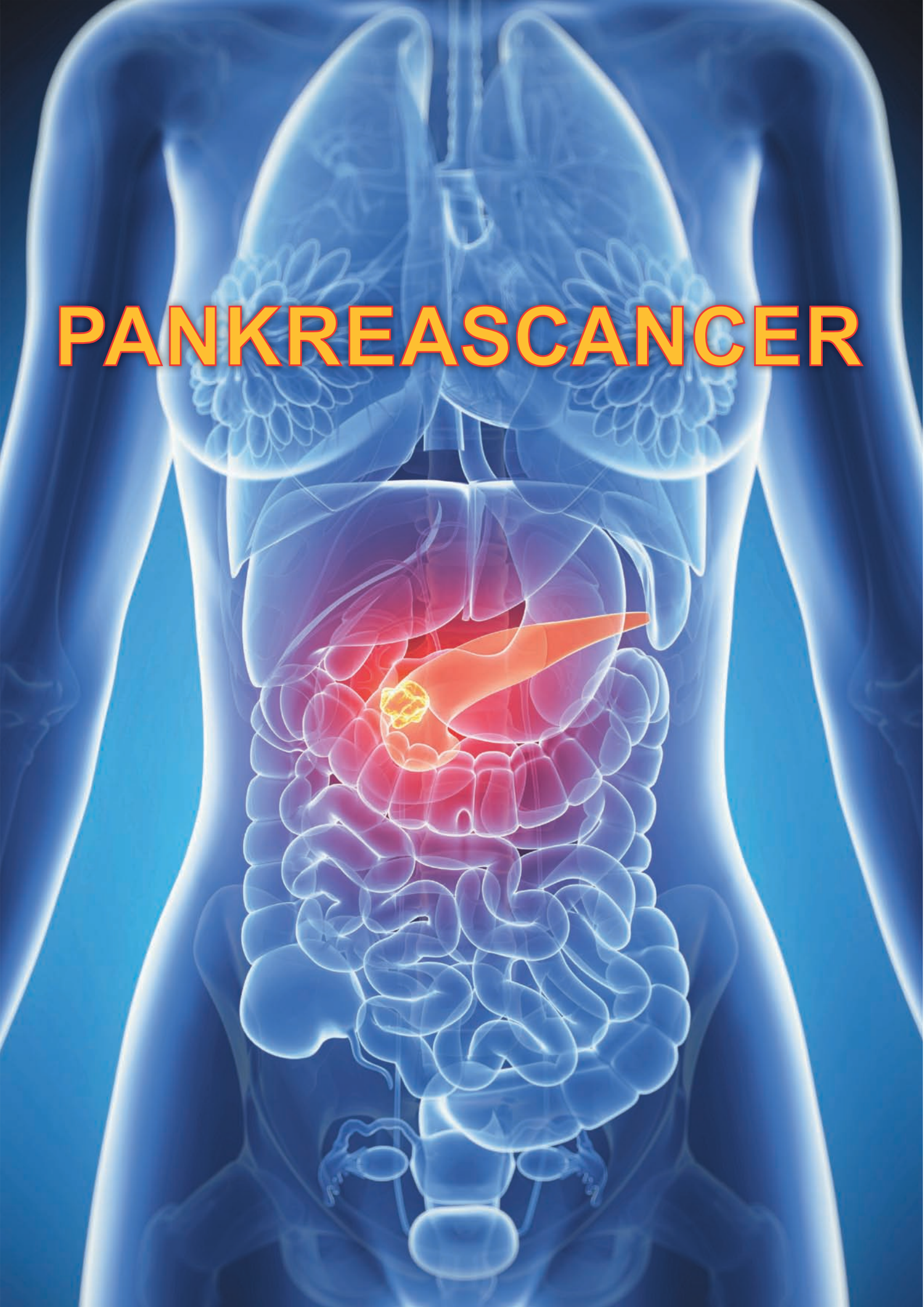


PANKREASCANCER



Tidig upptäckt, prognostiska faktorer och behandling

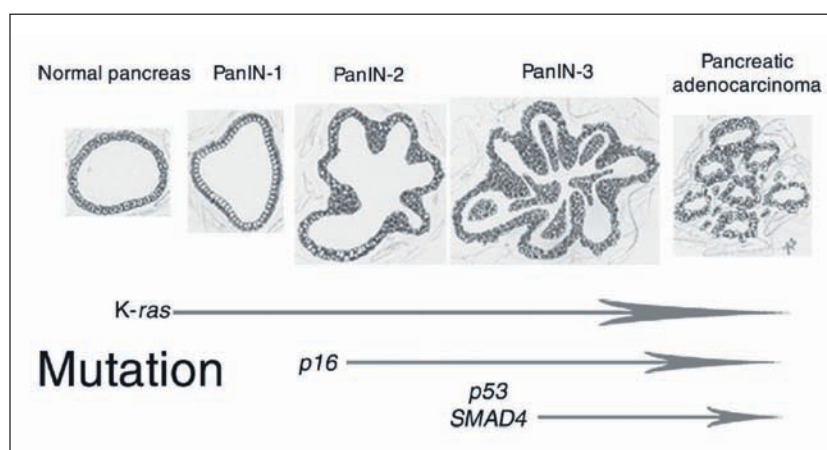
Daniel Ansari, MD, PhD, har nyligen presenterat sin avhandling om pankreascancer. Syftet med studien är att ta fram förbättrade möjligheter till tidigare diagnostik, prognostiska faktorer och behandling.

AVHANDLINGENS SYFTE

Vår forskningsgrupp vid Lunds universitet, ledd av professor Roland Andersson, är en translationell gruppering bestående av kliniska och prekliniska forskare. Inom gruppen finns kirurger, patologer, onkologer, biomedicinska analytiker, proteinanalytiker och kemister. Biobanking (blod och vävnad) utgör en central del i vår forskning. Experimentella faciliteter för cell- och djurstudier finns inom gruppen liksom faciliteter för avancerad proteinanalys (CEBMMS) och farmakologi (Chemical Biology & Therapeutics). Syftet med denna avhandling, som består av sex delarbeten, har varit att förbättra utfallet för patienter med pankreascancer, med fokus på tidig diagnostik, prognostiska faktorer och behandling.

INLEDNING

Pankreascancer drabbar årligen cirka 1000 patienter i Sverige. Denna cancerform är den fjärde vanligaste orsaken till död i cancer, med en femårsöverlevnad på cirka 6 procent. Bara lungcancer, prostatacancer och koloncancer skördar årligen fler liv i Sverige. Om inga framsteg görs i fråga om diagnostik och behandling av pankreascancer kommer sjukdomen att segla upp som nummer två på listan över de dödligaste cancerformerna år 2030, efter lungcancer¹.



Figur 1. Genetiska förändringar vid utveckling av pankreascancer. Inaktivering av tumör-suppressorn p53 sker i de flesta duktala adenokarcinom och är en av de viktigaste faktorerna som påverkar progressionen av PanIn till invasiv cancer. Från referens¹⁰.

Pankreascancer ger diffusa symtom och det saknas strategier för tidig diagnostik. Cirka 85 procent av patienterna diagnostiseras i avancerat stadium (stadium III och IV). Serumentumörmarkören CA 19-9, är den enda biomarkören för pankreascancer som används kliniskt. CA 19-9 kan användas för terapeutisk monitorering men har en diagnostisk sensitivitet och specificitet på 80 procent som inte gör den optimal i screeningsyfte.

Kirurgisk borttagande är för närvarande den enda potentiellt kurativa be-

handlingsstrategin för pankreascancer. Om patienter kunde diagnostiseras tidigare, skulle fler patienter kunna erbjudas kirurgisk behandling. Korttidsöverlevnaden efter pankreaskirurgi (Whipples operation) har förbättrats efter att den avancerade onkologiska kirurgin har centraliserats. Fortsatta förbättringar av långtidsöverlevnaden kräver ökad förståelse för prognostiska faktorer och utveckling av ny individualiserad kemoterapi.

DUKTALT ADENOKARCINOM VANLIGAST

Den vanligaste formen av pankreascancer utvecklas från de duktala cellerna i exokrina pankreas. Duktalt adenokarcinom utgör cirka 85 procent av alla pankreascancer. Etiologin vid pankreascancer är bristfälligt kartlagd. De vanligaste riskfaktorerna rapporterade i litteraturen är rökning, övervikt, ärftlighet, kronisk bukspottsinfektion, diabetes mellitus och cysta i pankreas. De flesta som insjuknar i pankreascancer är mellan 60 och 80 år gamla. Det är ovanligt med pankreascancer under 50 års ålder (under 10 procent).

Pankreascancer utvecklas från förstadiet, vanligen pankreatisk intraepitelial neoplasia (PanIN), associerade med genetiska (KRAS, p16, p53, SMAD4) och epigenetiska förändringar på vägen till invasiv cancer (Figur 1). Pankreascancer kan också utvecklas från intraduktal papillär mucinös neoplasia (IPMN) eller mucinös cystisk neoplasia.

TIDIG DETEKTION MED HJÄLP AV PROTEIN DJUPSEKVENERING I SERUM

Hos de flesta patienterna är gulsot, då ögonvitor och hud färgas gula och urinen blir mörk, ett kännetecken för cancer i bukspottkörteln, liksom viktnedgång och smärtor i övre delen av buken och i ryggen. Förekomsten av nydebuterad diabetes mellitus bör öka misstanken om en underliggande pankreascancer.

Det finns ett behov av att identifiera nya proteinbiomarkörer för tidig diagnos av pankreascancer. Blod är en attraktiv källa för biomarkörer eftersom den tillåter icke-invasiv diagnostik. Masspektrometri är en viktig metod inom proteomanalys. Den baseras på separation av molekyler baserad på kvoten mellan massa och laddning (m/z). Tyvärr har det länge varit svårt att analysera proteiner direkt i blod. En av anledningarna är vanligt förekommande proteiner i blod som till exempel albumin och IgG försvårar identifiering av mindre vanliga proteiner (ofta sjukdomsmarkörer). Genom att använda "depletion", kan vanliga proteiner i serum avlägsnas vilket underlättar identifiering av sjukdomsmarkörer. Utvecklingen av högupplöst masspektrometri tillåter också förbättrad proteindetektering.

I delarbete I studerades värdet av masspektrometri för att påvisa proteinmarkörer i serum tidigt i förloppet vid pankreascancer². Serumproverna behandlades med speciella kolonner för att ta bort de 7 vanligaste proteinerna i serum (albumin, IgG, IgA, transferrin, haptoglobin, antitrypsin, fibrinogen). Detta följdes av trypsinering för att generera peptidfragment som lättare kan analyseras med masspektrometri jämfört med hela proteiner. Vid en jämförelse mellan reseabel pankreascancer, benigna pankreassjukdomar och friska individer, identifierades 134 serumproteiner som kunde särskilja grupperna från var-

andra, varav 40 proteiner var uppreglerade vid pankreascancer (Figur 2). Flera av dessa proteiner kunde via interaktionsanalyser kopplas till p53, den vanligaste muterade tumörsuppressorn vid pankreascancer.

Resultaten från denna studie är ett viktigt steg i utvecklingen av ett enkelt blodbaserat diagnostiskt test för pankreascancer.

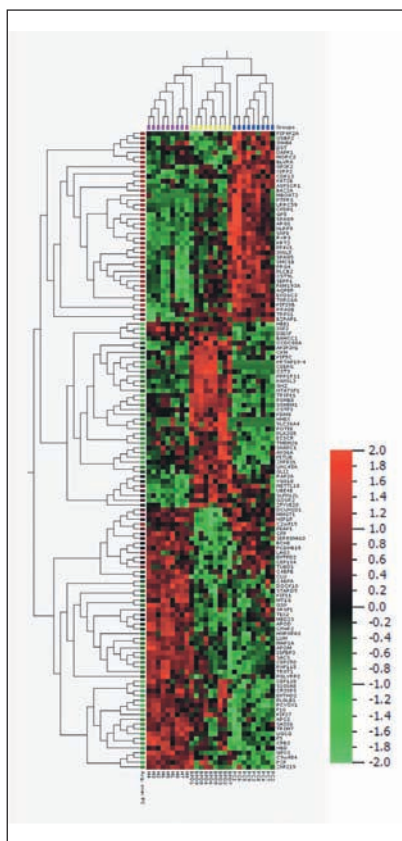
ARTIFICIELLA NEURALA NÄTVERK PREDIKTERAR PROGNOSEN

Det är väsentligt med en korrekt bedömning av prognosen för varje patient för att styra val av behandling. Det finns flera prognostiska modeller beskrivna i litteraturen, men det saknas fortfarande ett etablerat prognostiskt system. Nuvarande stadiindelning, s.k. TNM-klassifikationen tar inte hänsyn till faktorer utöver T-stadium (primärtumörens storlek och utbredning), N-stadium (spridning till regionala lymfkörtlar) och M-stadium (förekomst av fjärrmetastaser). För patienter som genomgår kirurgi är TNM-indelningen inte tillräckligt pålitlig för att förutsäga den enskilda patientens prognos efter operation. En modell för prediktering av överlevnad kan baseras på s.k. artificiella neurala nätverk, en avancerad datoriserad optimeringsmodell som kan analysera icke-linjära samband.

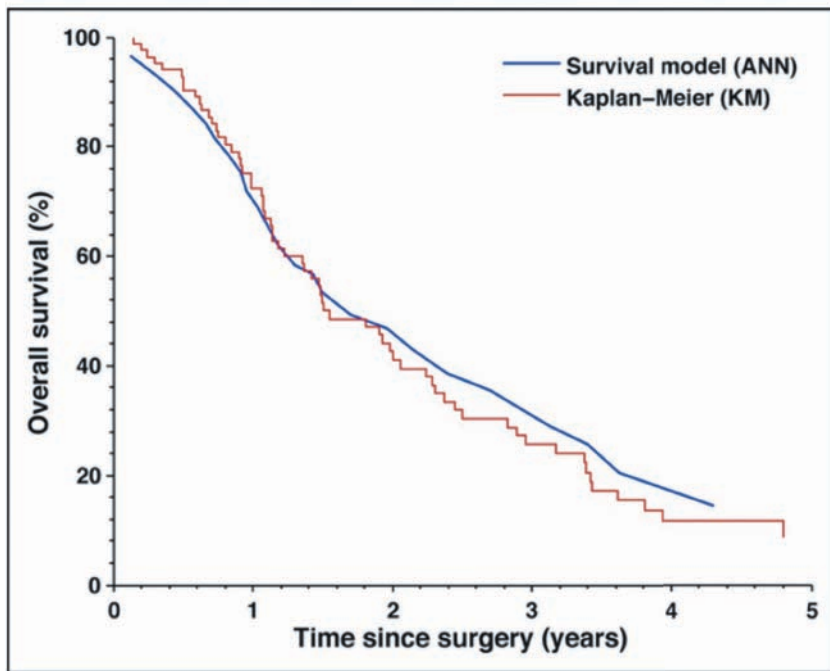
I delarbete II utvecklades en algoritm för prognostisering av pankreascancer med hjälp av artificiella neurala nätverk³. Riskfaktorer tillgängliga i daglig klinisk praxis och som bidrar till sämre prognos vid pankreascancer identifierades och rangordnades. En modell togs fram som hade bättre prediktionsförmåga än traditionell cox regressionsanalys.

WHIPPLES OPERATION – CENTRALISERING LÖNAR SIG

Pankreascancer är svårbehandlad och det finns därmed en stor potential för terapiförbättringar. Kirurgin (Whipples operation) har successivt förfinats och dödsfall i samband med operation har minskat. Idag är dödsfallen bara några enstaka procent. Det är visat att centralisering av pankreaskirurgi till högvolumscentra har haft en viktig roll i detta. Dessa data är dock baserade på jämförelse av olika centra, och det finns en brist på studier som beskriver övergången från låg- till högvolums sjukhus.



Figur 2. Hierarkisk klustring av proteiner och serumprover. Varje rad representerar ett protein och varje kolumn representerar ett prov. Protein klustringen visas till vänster och klustringen av proverna visas högst upp i figuren. Färgkodningen (röd-grön) visar den relativa expressionsnivån där röd indikerar uttryck över medelvärdet och grön indikerar uttryck under medelvärdet. Denna analys identifierade 134 differentiellt uttryckta proteiner (p<0.0009). Total 40 protein var uppreglerade i pankreascancer jämfört med benigna pankreascancer och friska kontroller. Blå, pankreascancer; gul, benigna pankreassjukdomar; rosa, friska kontroller. Från referens².



Figur 3. Jämförelse mellan överlevnadsprediktion med hjälp av ANN respektive Kaplan-Meier. Från referens³.

”Resultaten från denna studie är ett viktigt steg i utvecklingen av ett enkelt blodbaserat diagnostiskt test för pankreascancer.”

I delarbete III kartlades alla patienter som genomgått Whipples operation i Lund under perioden 2000-2012⁴. Totalt 221 patienter inkluderades. Resultaten visade att sedan övergången till högvolumskirurgi (definierat som 25 eller fler operationer per år) har de operativa resultaten förbättrats vad gäller blodförlust vid operation, operationstid, blödningsskomplikationer, risk för reoperation och vårdtid. Operativ mortalitet minskade från 4 till 0 procent.

EPIGENETISKA LÄKEMEDEL MED FOKUS PÅ MUC4-POSITIVA TUMÖRER

Cytostatika kan ges som efterbehandling efter kirurgi eller som behandling när tumören växer så att den inte kan opereras. Gemcitabin ges rutinmässigt både i adjuvant och palliativt syfte. Tyvärr är gemcitabinresistens ett vanligt problem. Det har därför länge funnits stort intres-

se av kombinationsbehandling av pankreascancer. Den största framgången vad gäller den onkologiska behandlingen av pankreascancer sedan gemcitabin, kom först 2011 när Conroy et al visade att man kunde öka överlevnaden för avancerad pankreascancer från 6,8 månader med gemcitabinmonoterapi till 11,1 månader med FOLFIRINOX⁵. Dock är FOLFIRINOX en tuff behandling associerad med svåra biverkningar och lämpar sig endast för patienter med gott allmäntillstånd. År 2013 visade Von Hoff et al nano-albuminbundet paclitaxel (nab-paclitaxel) som ökade överlevnaden för pankreascancer från 6,7 månader med gemcitabinmonoterapi till 8,5 månader med nab-paclitaxel. Även om detta är stora framgångar så är överlevnaden för avancerad pankreascancer i bästa scenariot under ett år. Det krävs således

bättre förståelse av tumörbiologin och utveckling av ny typ av individanpassad behandling.

MUC4 är ett cellyteprotein som ofta finns i vävnad från patienter med pankreascancer men som saknas i normal pankreas. MUC4 har visats öka proliferation av cancerceller, bidra till ökad invasivitet, interaktion med extracellulär matrix (stroma) samt bidra till sämre prognos i kliniska material. Det är dock oklart om uttrycket av MUC4 är stabilt vid metastatisk sjukdom.

I delarbete IV studerades uttrycket av MUC4 i vävnad från primär pankreascancer och matchade lymfkörtelmetastaser⁶. Resultaten visade att majoriteten av primärtumörerna uttryckte MUC4 och att detta uttryck bibehölls i metastaserna, vilket talar för att MUC4 är ett potentiellt behandlingsmål även vid metastaserande sjukdom.

I delarbete V utfördes experimentella djurstudier genom transplantation av pankreastumörcellinjer i immundefekta möss i syfte att arbeta vidare med MUC4-proteinet⁷. Tumörer från en av cellinjerna (Capan-1) uttryckte mest MUC4 och bedömdes därför bäst lämpad för fortsatta studier.

MUC4 har i tidigare experimentella studier kunnat kopplas till gemcitabinresistens. Det är visat att uttrycket av MUC4-proteinet styrs epigenetiskt i pankreascancer, både genom DNA-metylering men också genom histon-modifiering⁸. Vi spekulerade om epigenetisk reglering av MUC4-uttryck kan förändra cancercellernas beteende och göra dem mer mottagliga för cystostatikabehandling.

I delarbete VI undersöktes den tillväxthämmande effekten av 76 olika epigenetiska och fosfatat småmolekylhämmare på pankreascancer celler. De har tidigare bland annat använts i forskning om malaria och epilepsi⁹. Apicidin, en s.k. HDAC-hämmare visade sig ha en kraftigt antiproliferativ effekt och potentierade även effekten av gemcitabin genom att nedreglera MUC4 i cancer cellinjen Capan-1.

KONKLUSION

Pankreascancer är en utmaning. Långtidsöverlevnaden har inte förbättrats nämnvärt de senaste decennierna. Enligt vissa rapporter ökar incidensen samti-

••• pankreascancer

digt som det saknas bra metoder för screening, prevention, prognostisering och behandling. I min avhandling har jag påvisat flera serumproteiner som kan diagnostisera resekel pankreascancer från kontrollgrupper. Fortsatt validering planeras i pre-diagnostiska serumprover från Malmö-Kost-Cancer kohorten. I framtiden skulle våra proteinbiomarkörer kunna kombineras med artificiella neurala nätverk i syfte att förbättra den prediktiva förmågan.

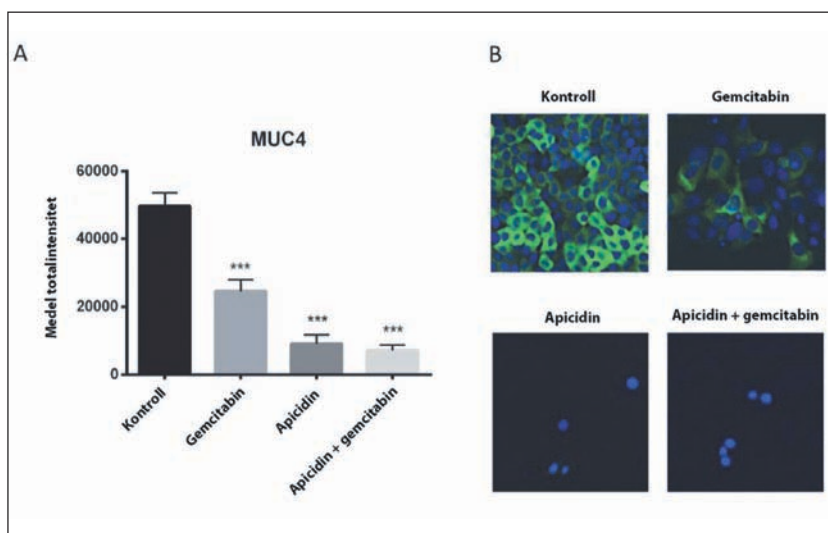
Centraliseringen av pankreaskirurgi i södra Sverige har varit framgångsrik med operativ mortalitet nära 0 procent. Det behövs ökad förståelse av tumörbiologi liksom utveckling av ny typ av systemisk behandling för att optimera behandlingsarsenalen. Epigenetiska läkemedel skulle kunna få en central roll antingen som monoterapi eller som sensitiseringsbehandling inför kemoterapi.

FOTNOT

Avhandlingen "Pancreatic Cancer – Early Detection, Prognostic Factors, and Treatment" presenterades 26 september, 2014 i Lund med professor Helmut Friess, Klinikum rechts der Isar, München, Tyskland, som opponent. Handledare var professor Roland Andersson och bihandledare docent Bodil Andersson och professor György Markovarga.

REFERENSER

1. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res* 2014;74(11):2913-21.
2. Ansari D, Andersson R, Bauden MP, et al. Protein deep sequencing applied to biobank samples from patients with pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014.
3. Ansari D, Nilsson J, Andersson R, Regner S, Tingstedt B, Andersson B. Artificial neural networks predict survival from pancreatic cancer after radical surgery. *Am J Surg* 2013;205(1):1-7.



Figur 4. Analys, s.k. high content screening, av MUC4-uttryck i Capan-1 celler; kontroll och efter behandling med gemcitabin (5 μ M), apicidin (0.05 μ M) och gemcitabin plus apicidin. A: Medel total MUC4-uttryck per cell. B: Immunofluorescens färgning av MUC4. Förstoring 10x

4. Ansari D, Williamsson C, Tingstedt B, Andersson B, Lindell G, Andersson R. Pancreaticoduodenectomy--the transition from a low- to a high-volume center. *Scand J Gastroenterol* 2014;49(4):481-4.

5. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2011;364(19):1817-25.

6. Ansari D, Urey C, Gundewar C, Bauden MP, Andersson R. Comparison of MUC4 expression in primary pancreatic cancer and paired lymph node metastases. *Scand J Gastroenterol* 2013;48(10):1183-7.

7. Ansari D, Bauden MP, Sasor A, Gundewar C, Andersson R. Analysis of MUC4 expression in human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Anticancer Res* 2014;34(8):3905-10.

8. Vincent A, Ducourouble MP, Van Seuning I. Epigenetic regulation of the human mucin gene MUC4 in epithelial cancer cell lines involves both DNA methylation and histone modifications mediated by DNA methyltransferases and histone deacetylases. *FASEB J* 2008;22(8):3035-45.

9. Ansari D, Urey C, Said Hilmersson K, et al. Apicidin sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine by epigenetically regulating MUC4 expression. *Anticancer Res* 2014; In press.

10. Aho U, Zhao X, Lohr M, Andersson R. Molecular mechanisms of pancreatic cancer and potential targets of treatment. *Scand J Gastroenterol* 2007;42(3):279-96.

DANIEL ANSARI, MD, PHD, LUNDS UNIVERSITET
DANIEL.ANSARI@MED.LU.SE

