



Orsaker till behandlingsresistens i bröstcancer

En ny studie från Göteborg visar att förlust av TGF-beta-receptor typ 2 i bröstcancer kan bidra till resistens mot antiöstrogenet tamoxifen. Endokrin behandling med exempelvis tamoxifen är en vanlig och ofta effektiv tilläggsbehandling för hormonpositiv bröstcancer. **Susann Busch**, PhD, **Hanna Jacobsson** PhD, och **Göran Landberg**, professor MD PhD, Sahlgrenska Cancer Center, Göteborgs Universitet redogör för den aktuella studien och dess resultat.



”I denna studie visar vi för första gången att förlusten av TGFBR2 uttryck är en prediktor för tamoxifenresistens i ER α -positiv bröstcancer.”

Bröstcancer är den vanligaste cancerformen hos kvinnor i västvärlden. Det finns flera olika former av bröstcancer, definierade av histologiskt utseende och exempelvis uttryck av specifika markörer som Östrogenreceptor-alpha (ER α). Informationen om tumören påverkar sedan valet av vilken behandling som skall erbjudas patienten. Östrogen är ett viktigt kvinnligt könshormon och anti-östrogenet tamoxifen är en av de vanligaste adjuvanta endokrinterapier för ER α -positiv bröstcancer. Tyvärr kommer många av de patienter som får tamoxifen inte svara på behandlingen eller utveckla läkemedelsresistens och få återfall i sin cancersjukdom. Upptäckten av nya biomarkörer som klassificerar subgrupper av patienter med potentiell läkemedelsresistens har därför blivit allt viktigare¹.

Transforming growth factor-beta (TGF β) är en viktig signalmolekyl som tros byta från tillväxthämmande funktioner under normala förhållanden, till en tumörframkallande roll i cancer. TGFBR2 är den enda ligandbindande receptorn i TGF β -familjen och dess uttrycksnivå har i tidigare studier kopplats till tumöraggressivitet och kliniskt utfall².

ER α och TGF β signaleringsvägarna samspelar ofta i olika biologiska system. Anti-östrogeninducerad tillväxthämning i bröstcancerceller har visat sig vara medierad via TGF β -signalering³. Det exakta samspellet mellan ER α - och TGF β -signalering i bröstcancer och betydelsen för utveckling av behandlingsresistens är dock fortfarande oklart.

I denna studie visar vi för första gången att förlust av TGFBR2 uttryck är en

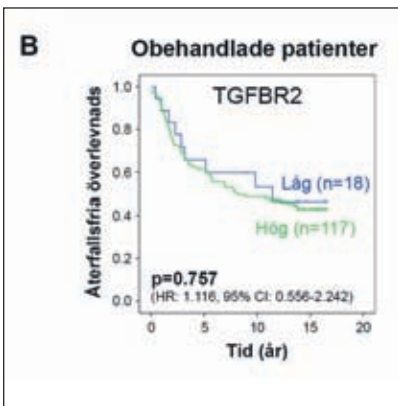
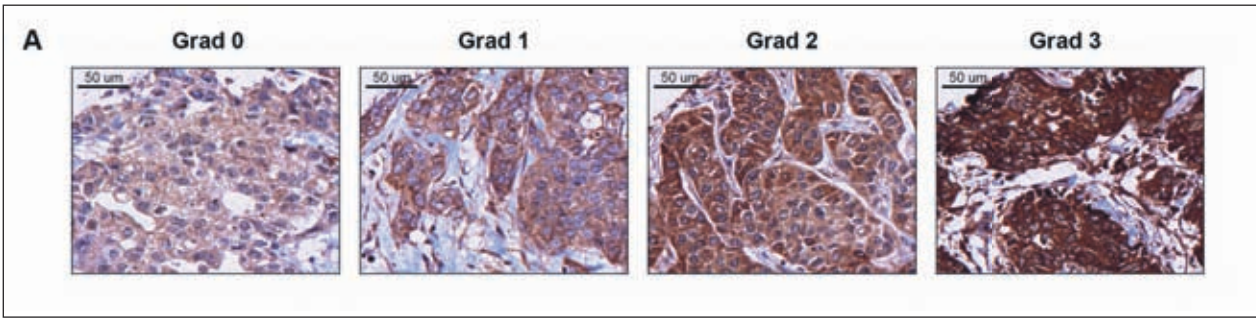
prediktor för tamoxifenresistens i ER α -positiv bröstcancer⁴. I experimentella modellsystem visar vi också att shRNA medierad nedreglering av TGFBR2 i ER α -positiva bröstcancercellinjer ger förändrat svar på östrogen och tamoxifen och påverkad cellcykelsignalering och apoptosinduktion. I linje med dessa resultat visade detaljerade analyser av en tamoxifen-resistent cellinje lågt TGFBR2 uttryck och förändrad TGF β transkriptionsaktivering. Det stärker ytterligare betydelsen av TGF β -signalering för endokrinrespon i bröstcancer.

STUDIEN

I studien analyserades cancerspecifikt uttryck av TGF-beta-receptor typ 2 (TGFBR2) i en kohort bestående av 564 patienter med bröstcancer som randomiserats till tamoxifenbehandling eller ingen tilläggsbehandling (adjuvant). Vi analyserade även fyra andra patientgrupper med bröstcancer med tillgänglig information om TGFBR2uttryck på RNA-nivå samt behandlingsinformation. Studierna av patientmaterial kombinerades sedan med experimentella modellsystem där vi kunde manipulera nivåer av TGFBR2 och undersöka potentiella effekter på viktiga tumörbiologiska parametrar som proliferation och celledöd, såväl som svar på östrogen- eller tamoxifenbehandling. Vi detaljstuderade också en cellinje som utvecklat tamoxifenresistens under långtidsbehandling med antiöstrogener avseende TGFBR2-nivåer och signalering.

Sammanfattningsvis, visar våra resultat en central roll för TGF β -signalering i endokrinresistens i bröstcancer. Data indikerar också att TGFBR2 kan använ-

LÅGT TGFB2 UTTRYCK ASSOCIERAS MED TAMOXIFENRESISTENS I BRÖSTCANCER



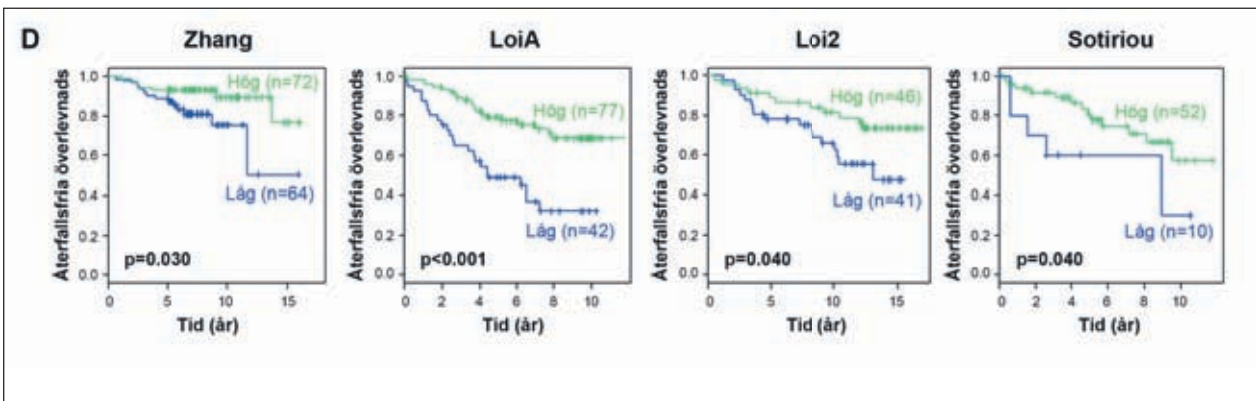
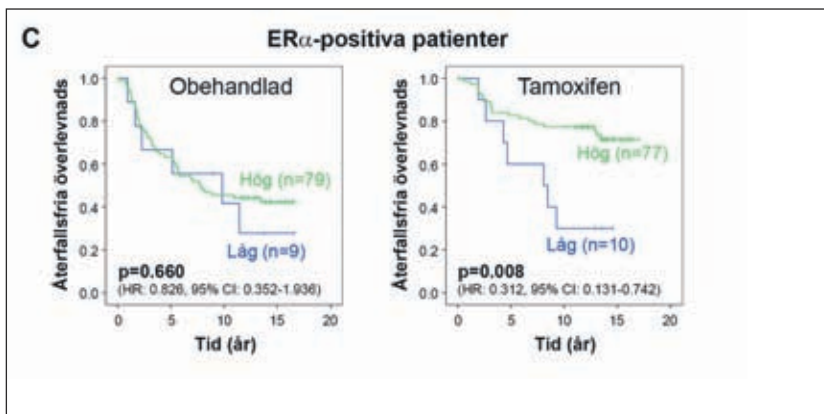
das som biomarkör för att förutsäga behandlingsresultat i ER α -positiv bröstcancer.

RESULTAT

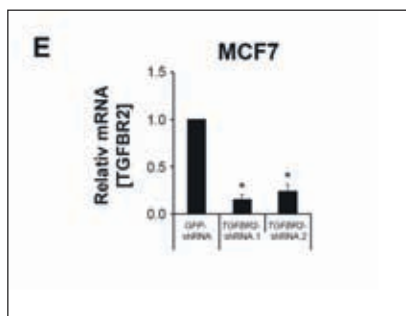
Lågt TGFBR2 uttryck associeras med tamoxifenresistens i bröstcancer.

Graden av TGFBR2 uttryck i tumörvävnad från patienter med bröstcancer, bestämdes med hjälp av immunohistochemisk färgning och analys. Patientmaterialet bestod av 564 pre-menopausala bröstcancerpatienter som ingick i en ti-

dig studie kring tamoxifenbehandling. Patienterna randomiserades till antingen två års adjuvant tamoxifebehandling (n = 276) eller ingen systemisk tilläggsbehandling (n = 288). Intensiteten av infärgningen av tumörcellerna delades in i fyra kategorier från svag (Grad 0), svagt mellan (Grad 1), medium (Grad 2) till stark (Grad 3). Representativa bilder av varje färgningskategori av TGFBR2s expressionsnivåer visas i Figur A. Statistiska analyser för att utvärdera korrelationerna till klinisk-patologiska markörer visade att TGFBR2 var signifikant kopplade till ER α uttryck. Överlevnadsanalyser visade ingen skillnad i tid till återfall mellan patienter med låg eller hög TGFBR2-expression i den obehandlade kontrollgruppen (Figur B). Stratifieringen av ER α -positiva patienter enligt behandlingsalternativen visade dock en betydligt förkortad sjukdomsfri överlevnad för tamoxifenbehandlade patienter med låg TGFBR2 uttryck (Figur C). En multivariat interaktionsanalys validerade TGFBR2 som en behandlingsprediktiv biomarkör oberoende av andra

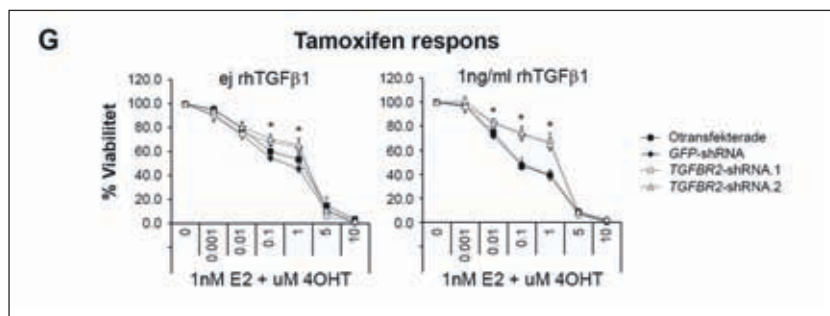
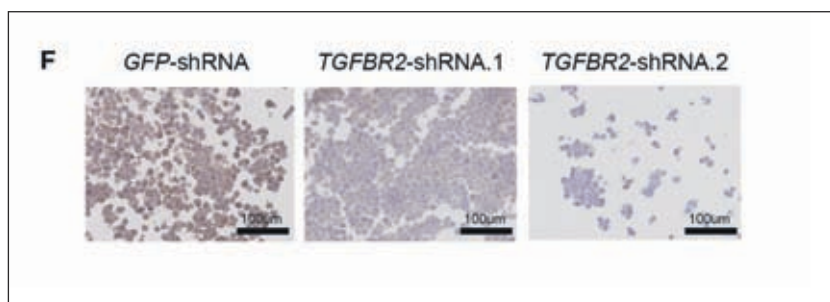


REDUCERAT TGFB2 UTTRYCK LEDER TILL MINSKAD ANTI-ÖSTROGEN KÄNSLIGHET OCH NEDSATT APOPTOSINDUKTION.



kända prognostiska och prediktiva markörer. Analyser av fyra andra cancerspecifika genuttrycksdataset inkluderande tamoxifenbehandlade bröstcancerpatienter visade på en avsevärt förkortad sjukdomsfri överlevnad i patientgrupper med lågt TGFB2 uttryck (Figur D).

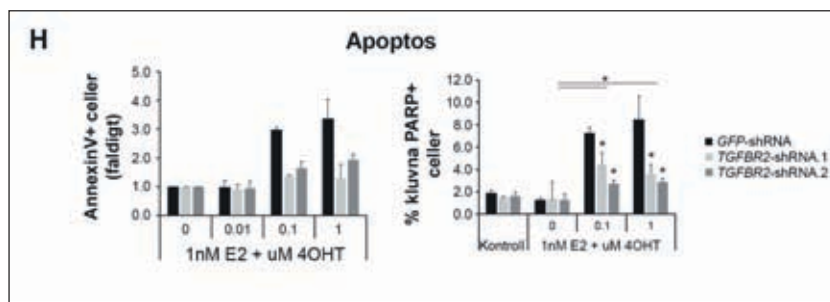
REDUCERAT TGFB2 UTTRYCK LEDER



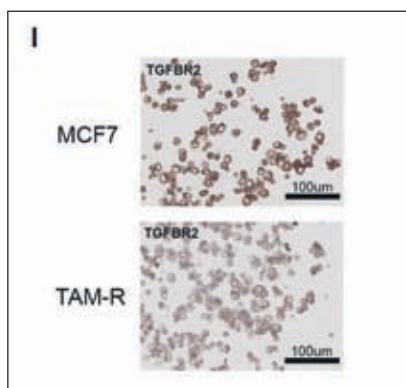
prövning av läkemedelstoxicitet och nedströms funktionsanalyser, behandlades cellerna med den aktiva tamoxifenmetaboliten 4-hydroxy-tamoxifen (4OHT) i hormonfritt medium, som på ett dosberoende sätt minskade cancercellernas tillväxt. Denna respons var signifikant dämpad i TGFB2 nedreglerade celler vid fysiologiskt relevanta koncentrationer av tamoxifen (0.1 och 1µM 4OHT), men var ännu mer framträdande i närvaro av TGFβ1 och en lägre koncentration av tamoxifen (0.01µM 4OHT) (Figur G). TGFB2 nedreglering i T47D-celler resulterade också i minskad känslighet för tamoxifen (data visas ej).

Behandling av TGFB2-nedreglerade celler med en alternativ antiöstrogen drog, Fulvestrant, resulterade också i en förändrad respons vilket tyder på att bristen på TGFB2 kan påverka behandlingssvaret av flera olika typer av endokrin bröstcancer behandling (data ej visade).

Proliferation och programmerad celledöd (apoptos) analyserades vidare för att avgöra om de observerade effekterna av TGFB2 och tamoxifen beror på förändringar i celltillväxt eller celledöd. Proliferationen, analyserat med DNA-celcykel-fas analys av DNA-färgningar eller Ki67-färgningar, var samma i kontroll- och TGFB2-nedreglerade celler vid tamoxifenbehandling (data ej visade). Flödescytometrisk analys av AnnexinV och immunfärgning av kluvet PARP som indikatorer för celledöd, avslöjade dock att tamoxifen-inducerad apoptos minskade i TGFB2-låga celler (Figur H).



Dessutom observerade vi en signifikant induktion av TGFβ transkriptionsaktivitet efter tamoxifenbehandling jämfört med östrogenbehandling där reglering av TGFβ var helt frånvarande i TGFB2 nedreglerade celler (data visas ej).



TILL MINSKAD ANTI-ÖSTROGEN KÄNSLIGHET OCH NEDSATT APOPTOSINDUKTION.

För att ytterligare undersöka vilken roll TGFB2 har i tamoxifenrespons i ERα-positiva bröstcancercellinjer (MCF7, T47D), använde vi två oberoende TGFB2-specifika shRNA konstruktioner (TGFB2-shRNA.1 och -shRNA.2) för att nedreglera uttrycket av TGFB2. Sänkningen av TGFB2 bekräftades på RNA och proteinnivå (Figur E-F). För

En jämförelse mellan en väletablerad, tamoxifen-resistent cellinje (TAM-R) och tamoxifenkänsliga ursprung MCF7-celler påvisade reducerade nivåer av TGFB2 i TAM-R (Figur I). Generering av långtidsbehandlade TAM-R har beskrivits tidigare⁵. Sammantaget visar våra data att tamoxifenresistens i celler som saknar TGFB2 sannolikt

beror på en försämrad förmåga att inducera apoptos genom aktivering av TGFβ-signalering.

TGFBR2 ÄR OBEROENDE ENDOKRIN

”Sammantaget visar våra data att tamoxifenresistens i celler som saknar TGFBR2 sannolikt beror på en försämrad förmåga att inducera apoptos genom aktivering av TGFβ-signalering.”

BEHANDLINGSPREDIKTIV MARKÖR FÖR BRÖSTCANCER

Våra data tyder på att förlust av TGFBR2-uttryck förutspår tamoxifenresistens i pre-menopausal bröstcancer oberoende av andra kända prognostiska eller prediktiva faktorer. Till stöd för våra slutsatser påvisade vi vidare liknande fynd från fyra oberoende genuttrycksdataset inkluderande tamoxifenbehandlade bröstcancerpatienter. I linje med våra data, har Vendrell och kollegor publicerat en artikel där en 47-gensignatur predikterar för dålig tamoxifenrespons och TGBR2 var en de identifierade generna⁶. En annan studie har påvisat mutationer som hämmar funktionen av TGFBR2 i bröstcancer celler från bröstcancerrecidiv⁷. Alla tumörprover i denna studie kom från patienter som hade genomgått adjuvant tamoxifenbehandling vilket antyder att det inte bara är uttrycksnivåer men också mutationsinaktivering av TGFBR2 som kan bidra till tamoxifenresistens.

FÖRLUST AV TGFBR2 UTTRYCK I ERA-POSITIVA BRÖSTCANCERCELLER LEDER TILL TAMOXIFENRESISTENS GENOM FÖRSÄMRAD TGFβ-FÖRMEDLAD CELLDÖD.

Våra data som påvisar nedreglerade uttrycksnivåer av TGFBR2 i en tamoxi-

fen-resistent cellinje (TAM-Rs) stöder betydelsen av TGFBR2 i endokrin behandlingsresistens i bröstcancer. Vi visar också att experimentellt shRNA-inducerad nedreglering av TGFBR2 i endokrint känsliga ERα-positiva bröstcancer celler ger upphov till en försämrad respons mot tamoxifen genom påverkan på induktion av apoptos. Flera studier har beskrivit ett samband mellan anti-östrogener och TGFβ-signalering. Den kliniska effekten av tamoxifen vid bröstcancer har kopplats till en tillväxthämning och induktion av apoptos⁸ vilket också kan medieras via TGFβ-signalering⁹. Våra data tyder även på att tamoxifeninducerad apoptos delvis induceras via den kanoniska TGFβ signaleringsvägen.

Sammanfattningsvis ger vår studie ytterligare bevis för en koppling mellan ERα och TGFβ och att båda påverkar endokrin resistens i bröstcancer. Vi visar vidare att TGFBR2 är en oberoende behandlingsprediktiv biomarkör i bröstcancer och illustrerar experimentellt att förlust av TGFBR2 direkt bidrar till resistensmekanismer. Vår studie fördjupar inte bara förståelsen för tamoxifenresistens i bröstcancer utan väcker också frågor om användningen av TGFβ-inriktade terapier för att specifikt behandla ERα-positiv bröstcancer. Våra data tyder på att avbrott i TGFβ-signalering kan generera endokrin resistens.

Denna studie utfördes i samarbete med Andrew H. Sims (Edinburgh University), Olle Stål (Linköping University), Mårten Fernö (Lund University) och Sydsvenska Bröstcancergruppen samt med stöd av Biocare, en nationell Strategic Research Program vid Göteborgs universitet, Cancerfonden och Breakthrough Breast Cancer Storbritannien.

REFERENSER

1. C. K. Osborne, R. Schiff, Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med* 62, 233 (2011).

2. E. Forrester et al., Effect of conditional knockout of the type II TGF-beta receptor gene in mammary epithelia on mammary gland development and polyomavirus middle T antigen induced tumor formation and metastasis. *Cancer Res* 65, 2296 (Mar 15, 2005).

3. M. B. Buck, K. Pfizenmaier, C. Knabbe, Antiestrogens induce growth inhibition by sequential activation of p38 mitogen-activated protein kinase and transforming growth factor-beta pathways in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 18, 1643 (Jul, 2004).

4. S. Busch, A. H. Sims, O. Stal, M. Ferno, G. Landberg, Loss of TGFbeta Receptor Type 2 Expression Impairs Estrogen Response and Confers Tamoxifen Resistance. *Cancer Res* 75, 1457 (Apr 1, 2015).

5. J. M. Knowlden et al., Elevated levels of epidermal growth factor receptor/c-erbB2 heterodimers mediate an autocrine growth regulatory pathway in tamoxifen-resistant MCF-7 cells. *Endocrinology* 144, 1032 (Mar, 2003).

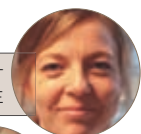
6. J. A. Vendrell et al., A candidate molecular signature associated with tamoxifen failure in primary breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 10, R88 (2008).

7. C. D. Lucke et al., Inhibiting mutations in the transforming growth factor beta type 2 receptor in recurrent human breast cancer. *Cancer Res* 61, 482 (Jan 15, 2001).

8. P. A. Ellis et al., Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 72, 608 (Aug 7, 1997).

9. R. R. Perry, Y. Kang, B. R. Greaves, Relationship between tamoxifen-induced transforming growth factor beta 1 expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. *British journal of cancer* 72, 1441 (Dec, 1995).

SUSANN BUSCH, PHD, SAHLGRENSKA CANCER CENTER, GÖTEBORGS UNIVERSITET
SUSANN.BUSCH@GU.SE



HANNA JACOBSSON PHD, PROFESSOR SAHLGRENSKA CANCER CENTER,
GÖTEBORGS UNIVERSITET



GÖRAN LANDBERG, PROFESSOR SAHLGRENSKA CANCER CENTER,
GÖTEBORGS UNIVERSITET

