

*Ny prognostisk  
faktor vid njur-  
cancer upptäckt*



De patienter som drabbas av metastaserad njurcancer har en dålig prognos. Att hitta de patienter som är riskgruppen för att utveckla metastaser är därför angeläget. **Helena Fritz**, PhD, Lunds Universitet, Institutionen för translationell medicin, redogör för studien.

**N**jurcellskarcinom (Renal Cell Carcinoma, RCC) är den vanligast förekommande typen av njurcancer, och står för cirka 2 % av alla cancerfall hos vuxna. RCC kan i sin tur delas upp i ett antal subtyper. Klarcellig RCC (clear cell RCC, ccRCC) är vanligast och står för cirka 75 % av fallen<sup>1</sup>. RCC behandlas vanligen med operation, eftersom RCC generellt är svårbehandlat med hjälp av kemo- och radioterapi. För patienter med lokaliserade tumörer är prognosen god. Runt 70 % av patienterna överlever med en uppföljningstid på fem år<sup>2</sup>. För de patienter som drabbas av metastaserande RCC är prognosen betydligt sämre. Överlevnaden för dessa patienter är knappt 10 % över en femårsperiod. Omkring 15-25 % av alla RCC-patienter har metastaser redan då de får sin diagnos. Ytterligare 20-25 % av de patienter som ej har metastaser vid diagnosen utvecklar senare metastaser<sup>2</sup>. Med tanke på den försämrade prognosen för de patienter som får metastaser, skulle det vara fördelaktigt att kunna identifiera dessa patienter med ett prognostiskt verktyg.

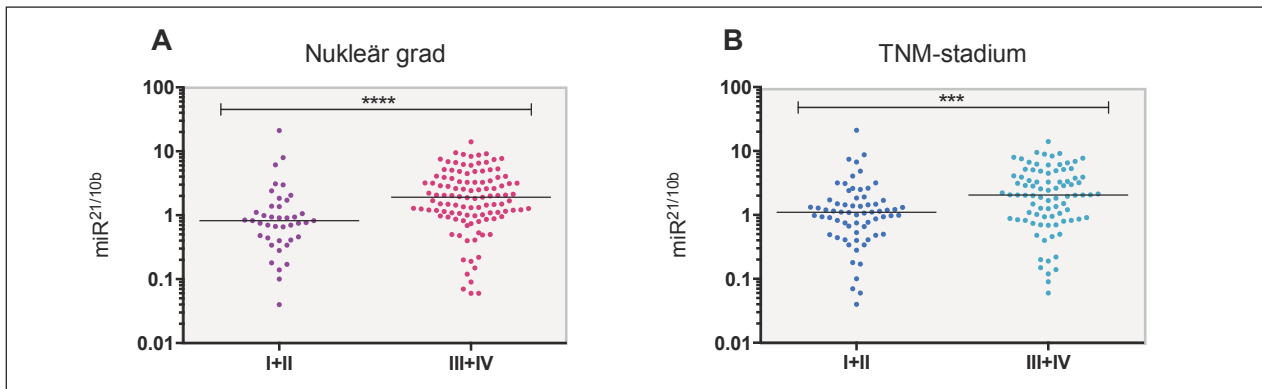
#### STUDIEN

MikroRNA är korta oligonukleotider, cirka 20 nukleotider långa. De kodar inte för proteiner utan istället verkar de som post-transkriptionella regulatorer genom att binda till messenger RNA

(mRNA)-transkript för specifika målgener. MikroRNA uttrycks under embryogenesen, och har också viktiga funktioner i mogna vävnader. Genom att binda till komplementära sekvenser i mål-mRNA kan mikroRNA reglera proteinuttrycket, vanligtvis genom att degradera mål-mRNA eller genom att blocka proteinsyntesen<sup>3</sup>. De komplementära sekvenserna mellan mål-mRNA och mikroRNA är mycket korta, omkring 7 nukleotider<sup>3</sup>, vilket medför att varje enskild mikroRNA kan binda in till ett flertal mål-mRNA.

Trots att mikroRNA inte blev ett allmänt vedertaget koncept förrän 2002, har fältet utvecklats snabbt och idag vet vi att en enda mikroRNA-molekyl kan ha flera hundra mål-mRNA<sup>4</sup>. Studier har även visat att så mycket som 30 % av det mänskliga genomet potentiellt regleras av mikroRNA. Förändrat uttryck av mikroRNA har observerats i ett stort antal sjukdomar, inklusive ett flertal typer av cancer<sup>5</sup>.

2013 presenterade The Cancer Genome Atlas (TCGA) en studie, baserad på ett stort publikt dataset med RCC-prover. Studien identifierade ett flertal prognostiska faktorer, inklusive ett antal mikroRNA<sup>6</sup>. I vår studie<sup>7</sup>, som publicerades i *European Journal of Cancer* 2014, använde vi oss av TCGA-datasetet för att identifiera kandidat-mikroRNA. Sedan mätte vi dem i en väl karakteriserad ko-



Figur 1. En hög miR21/10b-kvot är associerad med allvarligare sjukdom i ccRCC. A, miR21/10b i tumörer med låg nukleär grad (I + II) jämfört med tumörer med hög nukleär grad (III + IV). B, miR21/10b i tumörer med lågt TNM-stadium (I + II) jämfört med tumörer med högt TNM-stadium (III + IV).

hort bestående av 198 prover från RCC-tumörer, av vilka 152 var ccRCC. Vi utvärderade uttrycket av dessa mikroRNA, deras association till prognostiska faktorer som tumör-nod-metastas (TNM)-stadium, samt deras association till patientöverlevnad. Vi använde oss av ett relativt nytt koncept. Vi tog en mikroRNA-kvot<sup>8</sup> och formulerade en kvot bestående av två av våra kandidat-mikroRNA, miR<sup>21/10b</sup>. Vi kunde visa att denna kvot är en självständig prognostisk faktor för ccRCC-patienter som inte har metastas vid diagnostillfället.

#### MATERIAL OCH METODER

Vi använde oss av data från TCGA, som bestod av normaliserade mikroRNA-uttryck, som mätts på två olika deep sequencing-plattformar samt matchade kliniska uppföljningsdata. I datasetet ingick 284 prover som analyserats med Illumina Genome Analyzer, samt 217 prover som analyserats med Illumina Hi-Seq. Alla prover var från ccRCC-patienter. Vi använde oss av Cox proportional hazard-regressionsanalys för att identifiera kandidat-mikroRNAs effekt på patientöverlevnad.

Utvalda kandidat-mikroRNA mättes sedan med hjälp av RT-qPCR i en intern kohort bestående av 198 RCC-prover, varav 152 var ccRCC, samt 50 normalprover från njurkortext. Av normalproverna var 45 matchade prover för vilka det även fanns ett tumörprov tillgängligt. Uttrycket av mikroRNA analyserades med hjälp av SPSS (IBM). För att analysera skillnad i mikroRNA-uttryck mellan olika grupper användes Mann-

Whitney U-testet. För att analysera mikroRNA-uttryck med avseende på överlevnad användes Kaplan-Meier-metoden i kombination med Log rank-testet. För att analysera miR<sup>21/10b</sup>-kvotens potential som prognostisk faktor genomfördes multivariat analys med Cox proportional hazard-regressionsmodell med en så kallad stepwise backward likelihood ratio-metod.

#### RESULTAT

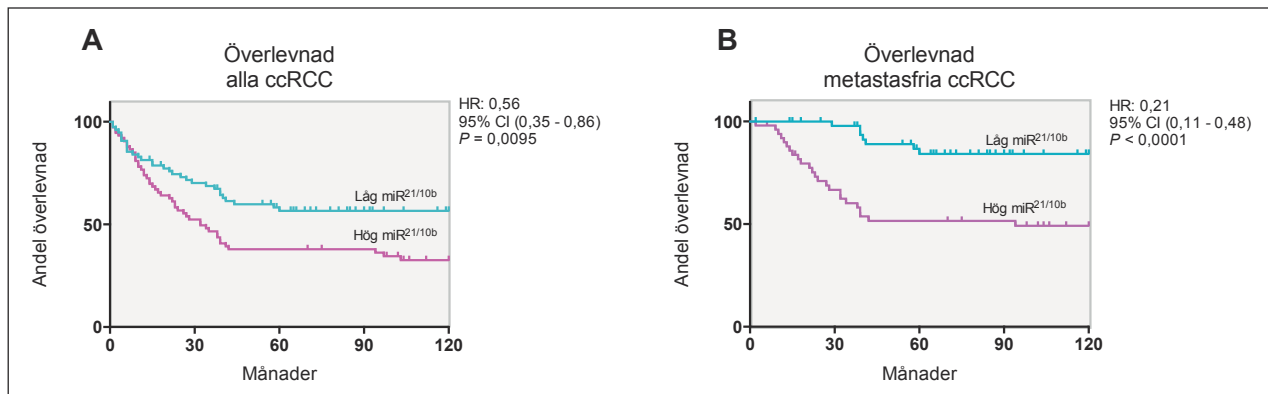
Med hjälp av Cox proportional hazard regressionsanalys använde vi oss av TCGA-gruppen för att identifiera tio kandidat-mikroRNA med stor prediktiv potential, och som hade tillräckligt högt uttryck för att kunna mätas med RT-qPCR i den interna kohorten. Från gruppen av kandidat-mikroRNA valdes fyra mikroRNA ut för att analyseras i den interna kohorten; två mikroRNA för vilka ökat uttryck var associerat med försämrad prognos (miR-21 och miR-223), samt två mikroRNA för vilka minskat uttryck var associerat med försämrad prognos (miR-10b och miR-101). För alla fyra kandidat-mikroRNA fann vi en signifikant skillnad i uttryck mellan tumör- och normalprover. Både miR-21 och miR-223 hade högre uttrycksnivåer i tumörer än i normaler, medan miR-10b och miR-101 hade lägre uttryck i tumörprover jämfört med normalerna. För både miR-10b och miR-21 fann vi dessutom en association till prognostiska faktorer, miR-10b uttrycktes i lägre grad i tumörer med hög nukleär grad eller med högt TNM-stadium. För miR-21 var uttrycket högre i

tumörer med hög nukleär grad jämfört med tumörer med låg nukleär grad.

Då vi kombinerade de normaliserade uttrycksvärdena av miR-21 och miR-10b för att bilda en kvot, miR<sup>21/10b</sup>, fann vi att kvotens association till nukleär grad samt TNM-stadium var kraftigare än för varje mikroRNA enskilt (Figur 1A, B). Kvoten miR<sup>21/10b</sup> var signifikant högre i tumörer med hög nukleär grad, och i tumörer med högt TNM-stadium, jämfört med tumörer med lägre nukleär grad eller TNM-stadium.

*”Med tanke på den försämrade prognosen för de patienter som får metastaser, skulle det vara fördelaktigt att kunna identifiera dessa patienter med ett prognostiskt verktyg.”*

För att utvärdera kvoten miR<sup>21/10b</sup> med avseende på prognostiskt värde använde vi oss av Kaplan-Meier-överlevnadsanalys samt Log-rank-testet. Vi fann att för patienter med ccRCC var överlevnaden signifikant bättre än för patienter med en miR<sup>21/10b</sup>-kvot under medianen (Figur



Figur 2. Uttrycket av miR21/10b korrelerar med överlevnad i ccRCC. A, Kaplan-Meier-analys med miR21/10b uppdelad i uttryck under respektive över medianen i patienter med ccRCC, N=152. B, Kaplan-Meier-analys med miR21/10b uppdelad i uttryck under respektive över medianen i metastasfria patienter med ccRCC, N=105.

2A). 172 månader (CI:  $\pm$  45,6 månader) jämfört med patienter med en miR<sup>21/10b</sup>-kvot över medianen som hade en medianöverlevnad på 32 månader (CI:  $\pm$  6,1 månader). Även med avseende på 5-års överlevnad skiljde sig grupperna åt. Patienter med en miR<sup>21/10b</sup>-kvot under hade en 5-års överlevnad på 56,6%, medan patienter med en miR<sup>21/10b</sup>-kvot över medianen hade en 5-års överlevnad på 37,9%.

I enlighet med våra resultat avseende miR<sup>21/10b</sup>-kvotens effekt på överlevnad fann vi också att de patienter som överlevde sin sjukdom hade en lägre miR<sup>21/10b</sup>-kvot än de som inte överlevde sjukdomen. Däremot fann vi ingen

skillnad i miR<sup>21/10b</sup>-kvot mellan de patienter som hade metastas vid tillfället för diagnos, jämfört med patienter som inte hade metastas. För patienter med metastas vid diagnosen hade miR<sup>21/10b</sup>-kvoten inget prognostiskt värde. För denna grupp var 5-års överlevnaden lägre än 10 % och alla patienter hade avlidit efter 9 år. Då vi analyserade miR<sup>21/10b</sup>-kvotens effekt på överlevnad för de patienter som inte hade metastas vid diagnostillfället fann vi att miR<sup>21/10b</sup>-kvoten hade en signifikant effekt på överlevnaden (Figur 2B). De patienter som hade en miR<sup>21/10b</sup>-kvot under medianen hade signifikant bättre överlevnad jämfört med de som hade en miR21/10b-kvot

över medianen. För patienter med en låg miR<sup>21/10b</sup>-kvot var 5-års överlevnaden 84,2 % och medianöverlevnaden var 223 månader (CI:  $\pm$  37,1 månader). Patienter med en hög miR<sup>21/10b</sup>-kvot hade en 5-års överlevnad på 51,6 % och en medianöverlevnad på 94 månader (CI:  $\pm$  63,8 månader).

För att utvärdera miR<sup>21/10b</sup>-kvotens potential som prognostisk faktor, för patienter utan metastas, använde vi oss av multivariat analys (Tabell 1). Vår analys visade att miR<sup>21/10b</sup>-kvoten är en självständig prognostisk faktor tillsammans med TNM-stadium och tumördiameter. Patienter med en hög miR21/10b-kvot hade 2,6 gånger högre prognostisk risk

Prognostisk faktor	Exp(B)	95% CI av Exp(B)	P-värde
<i>Variabler vid analysstart</i>			
miR21/10b (över medianen mot under medianen)	2.599	1.159 - 5.828	0.02
Ålder (över 65 år mot under 65 år)	1.106	0.522 - 2.343	0.793
Kön (kvinna mot man)	1.471	0.725 - 2.985	0.285
Tumördiameter (över 80mm mot under 80mm)	2.037	0.991 - 4.188	0.053
Nukleär grad (III+IV mot I+II)	2.141	0.848 - 5.405	0.107
TNM-stadium (III+IV mot I+II)	4.048	1.709 - 9.588	0.001
<i>Variabler vid analysstart</i>			
miR21/10b (över medianen mot under medianen)	2.624	1.201 - 5.736	0.016
Tumördiameter (över 80mm mot under 80mm)	2.014	1.011 - 4.013	0.046
TNM-stadium (III+IV mot I+II)	4.313	1.963 - 9.476	<0.0001

Tabell 1. Multivariat analys för prognostiska faktorer i metastasfria patienter med ccRCC.

att dö jämfört med patienter med låg miR<sup>21/10b</sup>-kvot (Exp(B): 2,624, CI: 1,201-5,736; P = 0,016),

#### DISKUSSION

I vår studie<sup>7</sup> presenterade vi en mikroRNA-kvot, miR<sup>21/10b</sup>, och vi visade att miR<sup>21/10b</sup>-kvoten är en självständig prognostisk faktor för ccRCC-patienter som inte hade metastas vid diagnostillfället. Konceptet med en mikroRNA-kvot är relativt nytt och medför ett antal fördelar, bland annat eliminerar det behovet av interna kontroller vid RT-qPCR mätningar och är på sätt kostnadseffektivt. Vidare kan skapandet av en mikroRNA-kvot öka robustheten, då flera prognostiska mikroRNA kombinerar blir kvoten mindre känslig för individuell variation, till exempel om en individ har lägre eller högre basnivåuttryck av en faktor i kvoten. Dessutom uttrycks både miR-21 och miR-10b i relativt höga nivåer i njuren vilket är fördelaktigt då de båda kan mätas med pålitlighet med hjälp av RT-qPCR.

Trots att en hög miR<sup>21/10b</sup>-kvot hade negativ inverkan på patientens överlevnad, verkade inte miR<sup>21/10b</sup>-kvoten vara associerad med metastas. Däremot indikerar miR<sup>21/10b</sup>-kvotens prognostiska värde att en hög miR<sup>21/10b</sup>-kvot kan vara associerad med en ökad risk för utveckling av metastas för patienter som är metastasfria vid diagnosen.

För tillfället har vi liten kännedom om miR-21 och miR-10b, och vilka funktioner de har i njuren. För miR-21 har några studier utförts, där miR-21 verkar fungera som en negativ regulator av tumör-suppressorer, och ökat uttryck av miR-21 är kopplat till ökad proliferation och minskad apoptos i ccRCC-celler. Detta stämmer väl överens med den generella uppfattningen att miR-21 är en så kallad oncomiR vars uttryck ofta är ökat i tumörer<sup>9</sup>. Vidare är det känt att miR-21 uttrycks i ökad grad hos patienter med njurfibros, och miR-21 verkar också ha en koppling till inflammatoriska processer<sup>10</sup>. Vad gäller miR-10b och dess roll i njuren, så finns det nästan ingen forskning publicerad för tillfället, bortsett från en studie där man kunde visa att miR-10b uttrycks i lägre grad i rejekterade njur-allograft, samt att ex-

perimentell inhibering av miR-10b i humana glomerulära celler medförde liknande cellulära effekter som allograft-rejektion<sup>11</sup>. Till skillnad från miR-21 är miR-10b och dess roll i cancer inte lika klar. Uttrycket av miR-10b-uttrycket har rapporterats vara ökat i ett flertal cancertyper, men har också rapporterats vara minskat i ett antal typer av cancer inklusive koloncancer, melanom och ccRCC.

*”Njurcellskarcinom (Renal Cell Carcinoma, RCC) är den vanligast förekommande typen av njurcancer, och står för cirka 2 % av alla cancerfall hos vuxna.”*

#### SAMMANFATTNING

I vår studie identifierade vi en mikroRNA-kvot, miR<sup>21/10b</sup>, som är en självständig prognostisk faktor för ccRCC-patienter utan metastas vid diagnosen. Då RT-qPCR är en vanligt förekommande och relativt lättillgänglig teknik, skulle miR<sup>21/10b</sup>-kvoten kunna vara användbar i klinisk prognosställning för att identifiera metastasfria patienter med ökad risk, vilka skulle kunna dra fördel av intensivare postoperativ uppföljning.

Jag vill tacka mina medförfattare Professor Björn Dahlbäck, MD PhD, Lunds Universitet, Professor Håkan Axelsson, PhD, Lunds Universitet, Professor och överläkare Börje Ljungberg, MD PhD, Umeå Universitet, och David Lindgren, PhD, Lunds Universitet.

#### REFERENSLISTA

1. Weikert S, Ljungberg B. Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention. *World J Urol.* 2010;28(3):247-52. Epub 2010/04/15. doi: 10.1007/s00345-010-0555-1. PubMed PMID: 20390283.

2. Thorstenson A, Bergman M, Scherman-Plogell AH, Hosseinnia S, Ljungberg B, Adolfsson J, et al. Tumour characteristics and surgical treatment of renal cell carcinoma in Sweden 2005-2010: a population-based study from the national Swedish kidney cancer register. *Scand J Urol.* 2014;48(3):231-8. doi: 10.3109/21681805.2013.864698. PubMed PMID: 24666102.

3. Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis.* 2015;35(1):3-11. Epub 2015/01/31. doi: 10.1055/s-0034-1397344. PubMed PMID: 25632930.

4. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 2008;455(7209):58-63. Epub 2008/08/01. doi: 10.1038/nature07228. PubMed PMID: 18668040.

5. Hata A, Lieberman J. Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer. *Science signaling.* 2015;8(368):re3. Epub 2015/03/19. doi: 10.1126/scisignal.2005825. PubMed PMID: 25783160.

6. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature.* 2013;499(7456):43-9. Epub 2013/06/25. doi: 10.1038/nature12222. PubMed PMID: 23792563.

7. Fritz HK, Lindgren D, Ljungberg B, Axelsson H, Dahlback B. The miR(21/10b) ratio as a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2014;50(10):1758-65. doi: 10.1016/j.ejca.2014.03.281. PubMed PMID: 24793999.

8. Larne O, Martens-Uzunova E, Hagman Z, Edsjo A, Lippolis G, den Berg MS, et al. miQ--a novel microRNA based diagnostic and prognostic tool for prostate cancer. *Int J Cancer.* 2013;132(12):2867-75. Epub 2012/11/28. doi: 10.1002/ijc.27973. PubMed PMID: 23184647.

9. Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans.* 2009;37(Pt 4):918-25. Epub 2009/07/21. doi: 10.1042/bst0370918. PubMed PMID: 19614619.

10. Sheedy FJ. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol.* 2015;6:19. Epub 2015/02/18. doi: 10.3389/fimmu.2015.00019. PubMed PMID: 25688245; PubMed Central PMCID: PMC4310327.

11. Liu X, Dong C, Jiang Z, Wu WK, Chan MT, Zhang J, et al. MicroRNA-10b downregulation mediates acute rejection of renal allografts by derepressing BCL2L1. *Exp Cell Res.* 2015;333(1):155-63. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.01.018. PubMed PMID: 25659925.

