



Studie visar hur **elakartade** hos **spädbarn** uppstår och

I en ny studie i *Cell Stem Cell* visar vi hur cancergenen MYCN kan orsaka hjärntumörer från embryonala humana stamceller från hjärnan eller från hjärnspecifika inducerade pluripotenta stam (iPS)-celler (Cancer et al. 2019). Det skriver docent **Fredrik Swartling** vid institutionen för immunologi, genetik och patologi, Uppsala universitet i en översikt av området. Han understryker att upptäckten är viktig för att vi ska förstå hur den vanligaste elakartade barnhjärntumören av typen medulloblastom uppstår i spädbarn. Samtidigt fann forskarna att tumörerna svarar på behandlingar riktade mot signalvägen mTOR som idag används för att hämma epilepsi hos små barn som fått sjukdomen tuberös skleros.



hjärntumörer kan behandlas

De senaste tio åren har medulloblastom från över tusen patienter kartlagts molekylärt via metyleringsanalys, helgenomssekvensering eller via RNA-sekvensering av hela tumören eller på singelcells nivå. Subgrupperna av de medulloblastom som karakteriserats har fått namnen WNT, SHH, Grupp 3 och Grupp 4 och de kännetecknas av mutationer eller förändringar av specifika utvecklingsbiologiska gener som är inblandade i dessa subgrupper (Figur 1).

Medulloblastom är ett typexempel på en tumörform där den molekylära informationen nu erbjuder så mycket mer

” Medulloblastom är ett typexempel på en tumörform där den molekylära informationen nu erbjuder så mycket mer än vad den histopatologiska analysen tidigare kunnat göra.

... medulloblastom

Medulloblastom (antal fall)	WNT (10%)	SHH (30%)	Gr.3 (25%)	Gr.4 (35%)
Ålder				
Kön (♂:♀)	1:1	1:1	2:1	3:1
Prognos	Mycket god	Intermediär (Dålig vid MYCN amp. & p53 mut.)	Dålig	Intermediär
Anatomi	Ofta i hjärnstammen	I lillhjärnan	I mitten av bakre hjärnan	I mitten av bakre hjärnan
Metastaserande	5-10%	15-20%	40-45%	35-40%
Återfallsmönster	Sällan återfall	Lokalt återfall	Metastatiskt återfall	Metastatiskt återfall
Genetiska förändringar	CTNNB1, DDX3X, SMARCA4, APC, p53 mutation, Monosomi 6	PTCH1, SMO, TERT, SUFU, GLI2, MYCN amp., p53 mutation	MYC amp., GFI1/1B, KBTBD4, OTX2, SMARCA4, Isokromosom 17q	MYCN amp., KDM6A, CDK6, PRDM6, SNCAIP, Isokromosom 17q

Figur 1. Indelningen i molekylära subgrupper för den vanligaste elakartade barnhjärntumören, medulloblastom och karaktäristiska förändringar hos dessa patienter. Informationen i bilden är hämtad från och representerar över tusen undersökta patienter inklusive spädbarn (0-3 år), barn (3-17 år) och vuxna (>17år) modifierad från (Juraschka and Taylor 2019) och (Hovestadt et al. 2020). I mitten av bakre hjärnan hänvisar anatomet till regionen fjärde ventrikeln nära lillhjärnan.

än vad den histopatologiska analysen tidigare kunnat göra. Desmoplastisk histologi (cirka 20–25 procent av patienterna) korrelerar exempelvis ofta med en SHH-beroende tumör men det saknar prognostiskt värde i avsaknad av genetisk information om att suppressorgenen p53 är muterad (inaktiverad) eller om att onkgenen MYCN är amplifierad (överproducerad). Klassisk histologi (cirka 50–60 procent av fallen) kan ha mycket dålig prognos (30–40 procent överlevnad) om cancer-genen MYC är amplifierad men väldigt god prognos om istället CTNNB1-genen (95 procent överlevnad) är muterad.

MER KOMPLEXT UPPBYGGDA

WNT- och SHH-medulloblastom heter så för att det är just signaleringsvägarna WNT (Wingless protein) och SHH (Sonic Hedgehog) som är uppreglerade eller förändrade i dessa grupper. Grupp 3 och Grupp 4 är däremot mer komplext uppbyggda i sin profil och deras indelning bygger inte på någon enstaka signaleringsväg. MYCN-proteinet som behövs för normal hjärnutveckling är ofta amplifierat eller överproducerat i SHH-gruppen som spädbarn ofta kategoriseras in i (Hovestadt et al. 2020).

Medulloblastom kan bota i cirka 75 procent av fallen med operation, cytostatikabehandling samt strålning. De som överlever sin sjukdom drabbas ofta av komplikationer och biverkningar framför allt till följd av strålbehandlingen såsom neurologiska besvär och tillväxtstörningar. Med ökad riskgrupp erbjuds mer intensiv strålbehandling, ofta via avancerad foton- eller protonstrålning, vilket idag fortfarande är de mest effektiva sätten för att bota dessa tumörer. Det är cirka 12–15 barn och ett fåtal spädbarn varje år i Sverige som drabbas av medulloblastom. Vi har visat att de yngsta barnen som har SHH-tumörer med höga nivåer av MYCN och mTOR samt spridd, metastaserande cancer har

väldigt dålig prognos. Vår förhoppning är att precisionsmediciner som specifikt hämmar mTOR-vägen fungerar på små barn med medulloblastom som inte svarar på standardbehandling.

STRÅLNING INGET ALTERNATIV

Det finns idag många läkemedel som kan blockera proteinet SMO som är ett viktigt protein för utvecklingen av vår hjärna. När SMO aktiveras och driver på SHH-vägen delar omogna celler i lillhjärnan på sig under fosterutveckling och spädbarnsålder men vid tvåårsåldern stängs normalt denna väg av eftersom fler celler då inte längre behövs. I utvecklingen av barnhjärntumörer har dessvärre något gått fel och SHH-vägen är fortfarande aktivt påslagen.

SMO-hämning ser ut att vara en lovande behandling av tumörer hos vuxna som aktiverat SHH-vägen via SMO-aktivering, men hos barn visar sig de flesta hämmarna ha väldigt allvarliga biverkningar där normal benutveckling störs och tillväxtplattorna växer ihop (Robinson et al. 2017). Det har lett fram till att dessa hämmare helt enkelt blivit mer eller mindre förbjudna att användas vid behandling för barn med hjärntumörer och att nya alternativ till riktad behandling med färre biverkningar nu behöver hittas.

Strålning är effektivt och utgör en viktig hörnsten i standardbehandling av medulloblastom vilket leder till att mer än 70 procent av drabbade barn bota sin tumör i kombination med olika typer av cytostatika efter att tumören avlägsnats med kirurgi. Strålning av den utvecklade hjärnan och ryggmärgen hos unga barn leder samtidigt till allvarliga neurologiska och hormonella biverkningar. Strålbehandlingen på onkologiklinikerna förfinas hela tiden och till exempel har avancerad protonstrålning nyligen visat sig reducera vissa biverkningar jämfört med fotonstrålning som oftast används i strålbehandling, med bättre resultat för ex-

empelvis IQ hos behandlade barn vilket är lovande (Kahalley et al. 2019b). Dock visar sig även sådan protonstrålning sänka kognitiv förmåga och IQ på behandlade barn jämfört med om de inte får någon strålning alls (Kahalley et al. 2019a). Samtidigt kan de minsta barnen inte strålas utan att de får allvarliga biverkningar varför man undviker att stråla barn som är under fyra år. Ju yngre barn desto känsligare är de. SHH-medulloblastom uppstår ofta hos barn under fyra år och en högriskgrupp involverar MYCN-amplifierade tumörer som även har mutationer i den skyddande p53-genen (Hovestadt et al. 2020) (Figur 1).

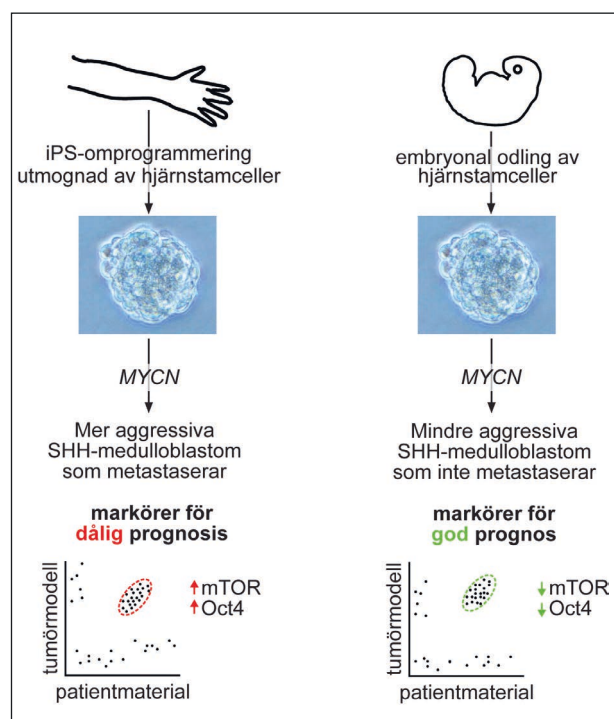
STUDIEN I KORTHET

Vi har i två liknande studier visat att humana celler som omprogrammerats till pluripotenta stamceller och sedan mognar ut till lillhjärnsstamceller kan användas som ursprungsceller för att härma utveckling av medulloblastom (Cancer et al. 2019; Huang et al. 2019). Hudceller kan tas från patienter med Gorlins syndrom, en ärftlig sjukdom som leder till en aktiverad SHH-väg oftast via mutation i genen PTCH1. Dessa hudceller kan sedan omprogrammeras och kan efter utmognad till hjärnceller dela sig och om-

vandlas till SHH-tumörer efter att de transplanterats in i hjärnan på möss. Samtidigt kan vi föra in andra viktiga cancergener såsom MYCN vilket driver fram än mer aggressiva SHH-tumörer.

I den ena studien som leddes från vår forskargrupp (Cancer et al. 2019) var vi specifikt intresserade av om den omprogrammering som görs när iPS-celler skapas (ofta via dedifferentiering av normala hudceller från försökspersoner) i sig bidrar till att en tumör lättare kan uppstå jämfört om man använder celler direkt från den vävnad (i detta fall den omogna hjärnan). I så fall skulle omprogrammering i sig vara en mekanism som normala celler använder för att bli tumörceller och orsaka cancer. Vi odlade därför celler som iPS-programmerats och mognat ut till lillhjärnceller parallellt med hjärnceller som isolerats direkt från den omogna lillhjärnan hos donerade embryon som vi fick från samarbetspartners i England. Vi misstänkte att dessa båda celler utgör ursprungsceller till barnhjärntumörer och förde på samma sätt in cancergenen MYCN i dessa olika populationer av celler. Vi använde lentivirus för att överproducera MYCN i lika stor mängd i de olika celltyperna (Figur 2). Det visade sig att de celler som kom från iPS-programmerade celler mycket snabbare (efter ett antal veckor) omvandlades till tumörceller medan de embryonala cellerna som donerats hade svårare att bli tumörer (även om de till slut efter flera månader ombildades till tumörer).

Kan alltså den metod för omprogrammering av celler som Shinya Yamanaka fick Nobelpriset för år 2012 bidra till att cellerna blir mer benägna att omvandlas till tumörer när de utsätts för cancerstimulerande signaler? Shinya använde endast fyra olika faktorer för att omprogrammera mogna hudceller till att bli stamceller. Vi använde nu avancerad genetisk expressionsanalys (RNA-sekvensering) och epigenetisk metyleringsanalys för att förstå skillnader hos tumörerna och vi studerade i detalj de faktorer som Yamanakas lab identifierat. Vår studie visade att endast en av faktorerna, Oct4, visade sig vara viktig och gjorde att tumörcellerna blev mer aggressiva och ledde till dålig prognos när Oct4 aktiverades genom att den förlorade sin metylering (Figur 2). I samma nummer av tidskriften Cell Stem Cell där vi publicerade vårt arbete bekräftade samtidigt andra stamcellsforskare att just Oct4 är den av "Yamanaka-faktorerna" som bidrar till att iPS-cellerna inte riktigt håller den kvalitet som de ska, och istället gör att de driver iväg och riskerar att bli förändrade (Velychko et al. 2019).



Figur 2. Schematisk figur över studien (Cancer et al. 2019) där MYCN överproduceras i två olika typer av humana stamceller. I detalj jämfördes hudceller som omprogrammerats med iPS-metoder till hjärnstamceller med stamceller donerade direkt från embryonal hjärna. Cellerna odlades på samma sätt. Efter överuttryck av cancergenen MYCN, som ofta är förändrad och amplifierad i medulloblastom, förändrades cellerna efter tid och gav upphov till elakartade hjärntumörer som liknar de SHH-medulloblastom som främst drabbas spädbarn. De iPS-programmerade cellerna gav däremot upphov till mycket mer allvarliga tumörer vilket visade sig bero på faktorn Oct4 som aktiverades och drev på mTOR-vägen i cancercellen. Eftersom mTOR-vägen kan hämmas med precisionsmediciner kunde tumörcellerna effektivt behandlas.

FÖRHOPPNING FÖR FRAMTIDEN

Vad har detta för betydelse för de barn som drabbas av medulloblastom? Vår genetiska analys där vi studerade uttrycksnivåerna av alla gener visade att Oct4 tillsammans med MYCN driver på en väg som heter mTOR. Denna väg är ofta aktiv i SHH-drivna tumörer och kan hämmas av ett flertal läkemedel på marknaden. Vi studerade tre av dessa läkemedel och visade att de alla hämmar fosforyleringen av proteinet 4E-BP1 vilket är en effekt av och markerar en aktiv mTOR-väg. Vi studerade fosforylering av 4E-BP1 i våra modeller men även i biopsier från patienter med SHH-drivna medulloblastom. Fosforyleringen var kraftigt upp-



” Om det i framtiden går att använda mTOR-hämmare på spädbarn med hjärntumörer som inte klarar av strålning vore det förstås fantastiskt.

reglerad i de mest allvarliga tumörformerna i patienterna vilket stämde överens med våra modeller där Oct4 var överproducerad. Vi visade att om vi genetiskt överproducerade Oct4 i våra modeller blev de till vår förvåning lika allvarliga som de celler som får p53-mutation tillsammans med MYCN amplifiering/överproduktion vilket utgör en patientgrupp med mycket dålig prognos (Figur 1).

Vi såg slutligen att de läkemedel som riktas mot mTOR kan användas för att behandla SHH-tumörer. Dessa läkemedel, som även används för att hämma epilepsi som drabbat de patienter som fått den ärftliga sjukdomen tuberös skleros, hämmade effektivt metastasering av tumörerna. Flera av de läkemedel vi testade är nu i kliniska prövningar. Vad som framför allt är lovande är att mTOR-hämmarna kan användas på väldigt unga patienter, barn under fyra år, utan allvarliga biverkningar. Om det i framtiden går att använda mTOR-hämmare på spädbarn med hjärntumörer som inte klarar av strålning vore det förstås fantastiskt.

REFERENSER

Cancer M, Hutter S, Holmberg KO, Rosen G, Sundstrom A, Taylor J, Bergstrom T, Garancher A, Essand M, Wechsler-Reya RJ et al. 2019. Humanized Stem Cell Models of Pediatric Medulloblastoma Reveal an Oct4/mTOR Axis that Promotes Malignancy. *Cell Stem Cell* 25: 855-870 e811.

Hovestadt V, Ayrault O, Swartling FJ, Robinson GW, Pfister SM, Northcott PA. 2020. Medulloblastomics revisited: biological and clinical insights from thousands of patients. *Nat Rev Cancer* 20: 42-56.

Huang M, Taylor J, Zhen Q, Gillmor AH, Miller ML, Weishaupt H, Chen J, Zheng T, Nash EK, McHenry LK et al. 2019. Engineering Genetic Predisposition in Human Neuroepithelial Stem Cells Recapitulates Medulloblastoma Tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 25: 433-446 e437.

Juraschka K, Taylor MD. 2019. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review. *J Neurosurg Pediatr* 24: 353-363.

Kahalley LS, Douglas Ris M, Mahajan A, Fatih Okcu M, Chintagumpala M, Paulino AC, Whitehead WE, Minard CG, Stancel HH, Orobio J et al. 2019a. Prospective, longitudinal comparison of neurocognitive change in pediatric brain tumor patients treated with proton radiotherapy versus surgery only. *Neuro Oncol* 21: 809-818.

Kahalley LS, Peterson R, Ris MD, Janzen L, Okcu MF, Grosshans DR, Ramaswamy V, Paulino AC, Hodgson D, Mahajan A et al. 2019b. Superior Intellectual Outcomes After Proton Radiotherapy Compared With Photon Radiotherapy for Pediatric Medulloblastoma. *J Clin Oncol*: JCO1901706.

Robinson GW, Kaste SC, Chemaitilly W, Bowers DC, Laughton S, Smith A, Gottardo NG, Partap S, Bendel A, Wright KD et al. 2017. Irreversible growth plate fusions in children with medulloblastoma treated with a targeted hedgehog pathway inhibitor. *Oncotarget* 8: 69295-69302.

Velychko S, Adachi K, Kim KP, Hou Y, MacCarthy CM, Wu G, Scholer HR. 2019. Excluding Oct4 from Yamanaka Cocktail Unleashes the Developmental Potential of iPSCs. *Cell Stem Cell* 25: 737-753 e734.

FREDRIK SWARTLING, DOCENT OCH FORSKARE VID INSTITUTIONEN FÖR IMMUNOLOGI, GENETIK OCH PATOLOGI, UPPSALA UNIVERSITET, FREDRIK.SWARTLING@IGP.UU.SE

