

Význam testování RAS u kolorektálního karcinomu

Jaroslava Barkmanová¹, Libor Staněk²

¹Onkologická klinika 1. LF UK, VFN a ÚVN v Praze

²Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze

Kolorektální karcinom (CRC) je závažné celosvětově rozšířené onemocnění s vysokou incidencí a mortalitou. V éře rozvoje diagnostiky v molekulární onkologii se snažíme nacházet prediktivní a prognostické faktory ve snaze o co nejefektivnější terapii CRC. RAS mutace u těchto nádorů fungují jako negativní prediktor. Molekulární testování nádorů na všechny aktivační mutace v KRAS a NRAS před zvažováním anti-EGFR terapie u metastatického kolorektálního karcinomu je zcela zásadní pro výběr skupiny pacientů vhodných k této léčbě.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, RAS testování, KRAS a NRAS mutace, antiEGFR léčba.

Significance of RAS testing in colorectal cancer

Colorectal cancer is a very serious world-wide spread disease with high incidence and mortality. We try to find the predictive and prognostic factors based on the progress in molecular oncology diagnostics to pursue the most effective therapy for patients with CRC. RAS mutations work as negative predictors. Molecular testing of tumors for all activating mutations in KRAS and NRAS before considering anti-EGFR therapy is therefore essential in selecting the group of eligible patients for this treatment in metastatic colorectal cancer.

Key words: colorectal cancer, RAS testing, KRAS and NRAS mutations, anti-EGFR therapy.

Onkologie 2015; 9(4): 167–170

Kolorektální karcinom (CRC) patří na celém světě mezi nejčastější nádorová onemocnění. V České republice je u obou pohlaví zhoubný nádor kolorekta druhou nejčastější onkologickou diagnózou po karcinomu prostaty u mužů a po karcinomu prsu u žen s více než 8 tisíci případy ročně (1). Až ve 25–30 % případů bývá v době stanovení primárního nádoru ve střevě již zjištěné metastatické postižení jater (méně často jiných orgánů), u dalších 35 % se metastázy vyvinou v pozdějším období. Jedná se tedy o velmi početnou skupinu nemocných, u které potřebujeme znát prediktory odpovědi na onkologickou léčbu.

Kolorektální karcinom – jeden název, více chorob

Stejně jako sám pacient – hostitel, jsou i zhoubné nádory nesmírně heterogenní. O to více to platí o kolorektálním karcinomu. Zkoumání jeho biologických charakteristických znaků, mezi které patří DNA mismatch repair (MMR), chromozomální mikrosatelitní instabilita (MSI), přechody z epiteloidní do mezenchymové formy nádoru a geneticky podmíněné změny, vede k vývoji nových léčiv s cílem možného ovlivnění uvedených procesů. Skupina profesora Dienstmanna referovala na ASCO 2014 jménem Colorectal Cancer Subtyping Consortia výsledky analýzy genové exprese více než 30 kohort pacientů. Bylo provedeno srovnání napříč různými klasifikacemi, ve snaze dosáhnout konsenzu v typizaci kolorektálního karcinomu. Výstupem je identifikace čtyř podtypů CRC, CMS 1–4 (CMS – colorectal

molecular subtypes). Každý subtyp je charakterizován svými klíčovými molekulárními a klinickými vlastnostmi (obrázek 1) (2). Problémem i nadále zůstává nejen genetická heterogenita samotného primárního nádoru, ale i výrazné genetické rozdíly mezi primárním nádorem a metastázou. Chromozomální instabilita, přítomná u většiny CRC, vede k neustálému selektování nových klonů nádorových buněk s rozdílnými molekulárními alteracemi. Určitý klon buněk může mít větší tendenci k metastazování, ale v případě analýzy primárního nádoru nemusí být zastížen. Otázkou tedy je, zda u pacienta má být v rámci hodnocení biomarkerů, prediktorů odpovědi na léčbu, testován primární nádor nebo metastáza. V současné době neexistuje závazný postup, ale obecně rutinně probíhá testování primárního tumoru, pouze v případě jeho nedostupnosti je testována nádorová metastáza (3).

EGFR kaskáda a skupina onkogenů RAS

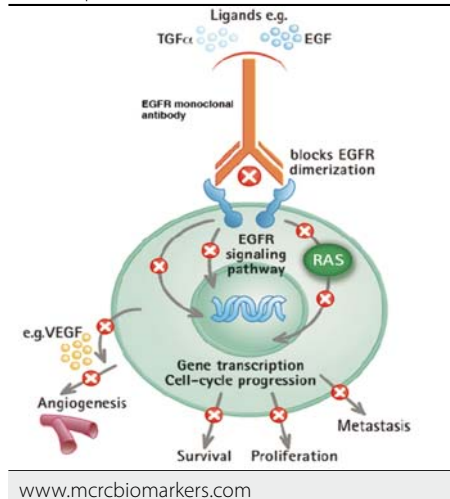
Signální kaskáda receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) patří do rodiny tzv. Erb/HER receptorových komplexů. Jedná se o nejdůležitější cestu regulující proliferaci, přežívání, apoptózu i schopnost migrace zdravých i nádorových buněk sliznice kolorekta. U nemutované formy (RAS wild type, wt-RAS) je aktivita EGFR signální cesty funkčně kontrolována EGFR. Po navázání aktivačního ligandu dojde po dimerizaci receptoru k aktivaci vnitřní receptorové tyrozin-kinázy a následné aktivaci RAS tyrozin-kinázy. Ta předá signál do dalších etází. Zamezením navázání ligandu na EGFR dojde k blokádě celé signální cesty. Tento mechanismus se uplatňuje u kolorektálního karcinomu při použití anti-EGFR protilátek (cetuximab, panitumumab), které jednak blokují signální cestu a současně

Obrázek 1. Molekulární subtypy kolorektálního karcinomu

CMS 1	14 %	Ženy, starší věk, pravá část colon, MSI, hypermutace, BRAF mutace , imun.aktivace	Lepší RFS, střední OS, horší SaR
CMS 2	41 %	Levá část colon, epiteloidní, MSS, vysoká CIN, TP53 mutace, aktivace WNT/MYC cesty	Střední RFS, lepší OS, lepší SaR
CMS 3	8 %	Epiteloidní, CIN/MSI, KRAS mutace , IGFBP2 overexpres	Střední RFS, OS a SaR
CMS 4	20 %	Mladší věk, stadia III/IV, mezenchymální, CIN/MSI, TGFβ/VEGF aktivace, NOTCH3 overexpres	Horší RFS, horší OS, střední SaR
Neklasifikované	17 %	Směšené subtypy s variabilní epiteloidně-mezenchymální aktivací?	Střední RFS, OS a SaR

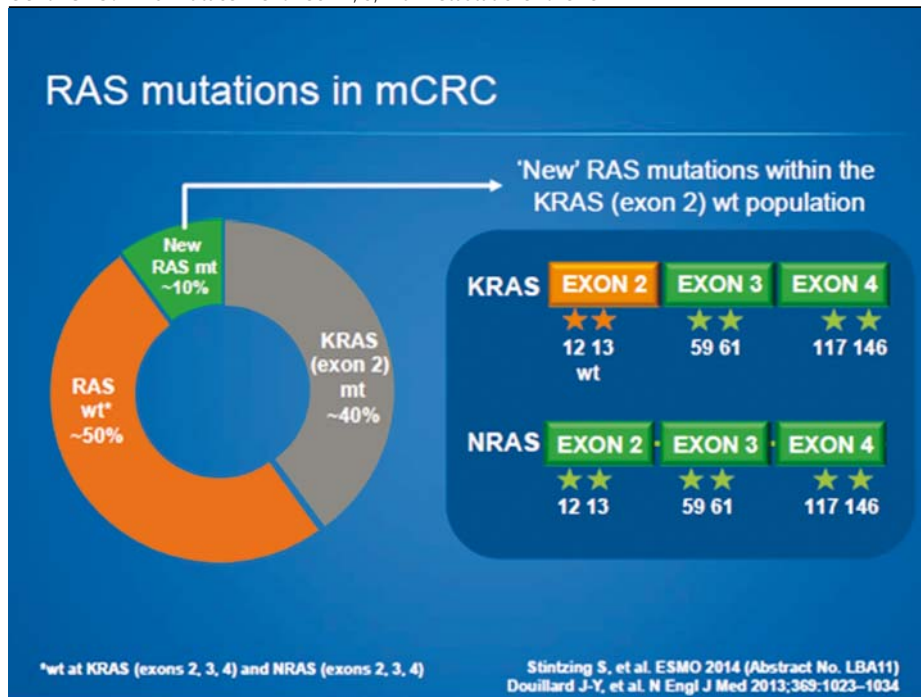
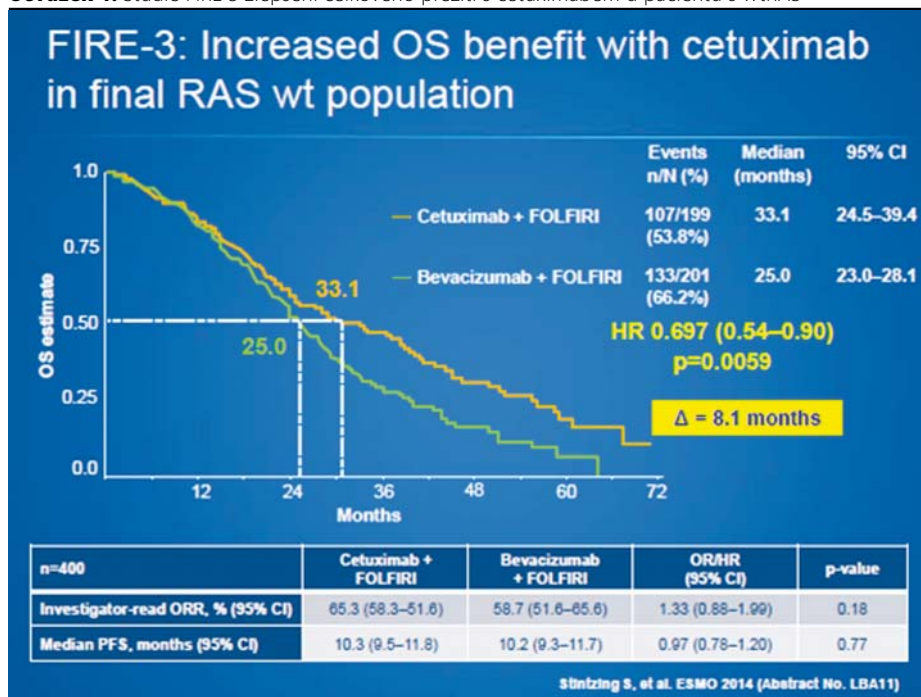
Adaptováno dle Dienstmann et al J Clin Oncol 2014; 32(Suppl; abstr 3511): 5.

CIN – chromozomální instabilita; MSI – mikrosatelitová instabilita; MSS – mikrosatelitová stabilita; RFS – relaps free survival (přežití bez recidivy); OS – overall survival (celkové přežití); SaR – survival after relaps (přežití po recidivě)

Obrázek 2. Mechanismus inhibice antiEGFR monoklonální protilátkou

přes Fc-receptor gama aktivují imunitní systém (obrázek 2) (4, 5). V případě, že je KRAS mutován, dochází ke konstituční expresi a aktivitě RAS tyrozinkinázy, která pak není ovlivněna inhibicí EGFR receptoru protilátkou.

Proteinové produkty RAS onkogenů patří do skupiny tzv. G proteinů. Plní funkci molekulárních přepínačů mezi receptorovými a nerekceptorovými tyrozinkinázami, přenášejícími signál z cytoplazmy do jádra buňky. U lidí existují tři potenciálně onkogenní RAS geny kódující proteiny H-RAS, N-RAS a K-RAS. U CRC mají význam dva, KRAS a NRAS (6). Mutace KRAS se vyskytuje zhruba u 40 % a NRAS u 4–6 % pacientů s kolorektálním karcinomem, vede k trvalé aktivaci proteinu K-RAS nebo N-RAS, který vysílá stimulační signál k jádru nádorové buňky bez ohledu na aktivaci EGFR. Blokáda receptoru protilátkou je pak neúčinná. Současná data ukazují, že nejvyšší četnost mutací je v genu K-RAS v exonu 2. Klinicky významné mutace onkogenů RAS (KRAS a NRAS) jsou identifikovány pouze v několika málo kodonech (12, 13, 56, 61, 117 a 146) tzv. hotspot geny. Tyto kodony leží na třech různých exonch, exonu 2 (kodony 12, 13), exonu 3 (kodony 59, 61) a exonu 4 (kodony 117, 146) (obrázek 3). Rozšíření mutační expertízy na celý RAS umožňuje určit nádory „RAS independentní“, u kterých o účinnosti anti-EGFR léčby nemusíme pochybovat. Kromě stavu RAS vyšetřujeme u CRC také BRAF. BRAF je součástí buněčné signalizační dráhy RAS. Frekvence BRAF mutací u CRC je asi 10 %. Podle dosavadních poznatků karcinomy s mutací RAS nemají většinou mutace BRAF. Vyšetření BRAF je tedy přínosné u wild type RAS nádorů jako pomůcka při určování prognózy nemocných. Zatímco RAS mutace mají roli prediktivní, BRAF mutace u metastatického CRC jsou od roku 2010

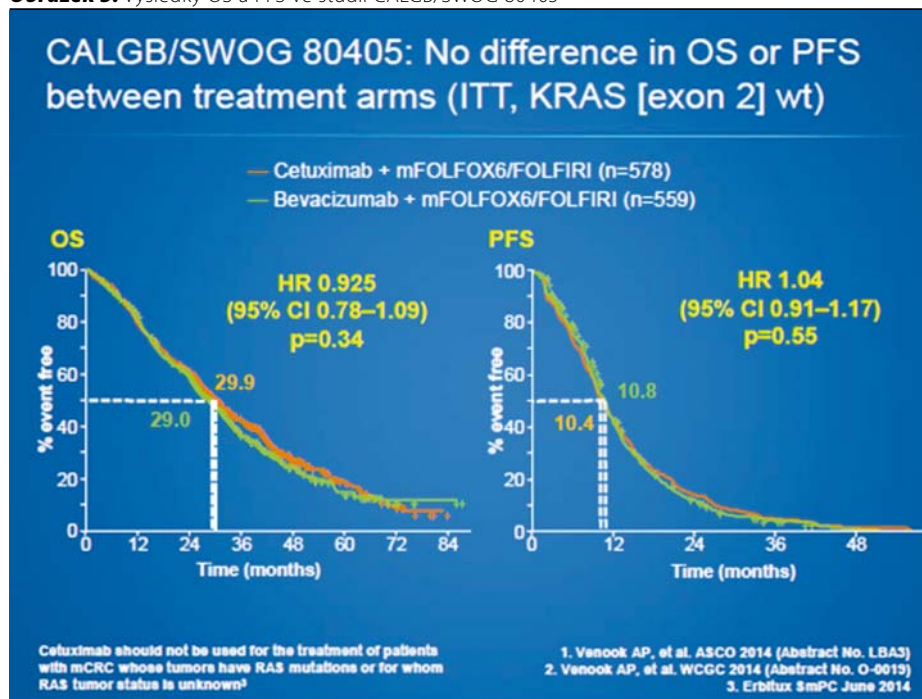
Obrázek 3. RAS mutace v exonch 2, 3, 4 u metastatického CRC**Obrázek 4.** Studie FIRE-3 zlepšení celkového přežití s cetuximabem u pacientů s wtRAS

považovány za negativní prognostický marker. To bylo ověřeno v několika klinických studiích, mimo jiné ve studii CRYSTAL (7).

Metody mutační analýzy RAS onkogenů

Vyšetření mutačního stavu RAS jako prediktivního markeru je centralizováno do referenčních laboratoří oprávněných k tomuto testování. Jejich seznam je vyvěšen na stránkách Společnosti českých patologů. Využití vlastních cesty (tzv. in-house metody) je velice omezené

a vyžaduje provedení řady validačních testů. V současné době se využívá pouze při zavedení sekvenčních metod např. Sangerovo sekvenování (horší senzitivita mutované DNA ve vzorku) nebo NGS. Rutině jsou využívány komerčně dodávané kity, které jsou CE IVD (pro diagnostiku in vitro). Tím je také zajištěna reprodukovatelnost mezi jednotlivými laboratořemi. V současné době jsou nejvíce využívány metody PCR v reálném čase (Real Time – PCR; qRT – PCR) (8) a dále metoda PCR s následnou reverzní hybridizací na stripky tzv. StripAssay. K dispozici pro toto tes-

Obrázek 5. Výsledky OS a PFS ve studii CALGB/SWOG 80405

tování je celá řada kitů pro detekci hotspot genů v exonech 2, 3 a 4 genů KRAS a NRAS dosahující různé senzitivity zachytu mutovaných alel.

Do budoucna se jako velmi slibná jeví metoda založená na tzv. sekvenování nové generace (NextGen Sequencing – NGS), dosud nepoužívaná v běžné praxi pro finanční náročnost. Při nárůstu počtu nutných vyšetření ale její úspornost v množství biologického materiálu brzy vyrovná náklady (9).

Výsledky studií

Kliničtí onkologové si při terapii metastatického kolorektálního karcinomu neustále kladou otázku, jaká je optimální kombinace a řazení jednotlivých modalit léčby. Jedná se o načasování chirurgického výkonu, volbu nejvhodnější kombinace chemoterapie s biologickou léčbou, tj. s antiEGFR nebo antiVEGF protilátkou s ohledem na procento odpovědi, event. dosažení resekability jaterních či plicních metastáz. Důležitý je nejen čas do progresu onemocnění (PFS, progress free survival), ale i optimalizace léčby s cílem co nejdelšího celkového přežití pacientů (OS, overall survival). Především prodloužení celkového přežití lze očekávat na základě výběru nemocných vhodných k určité terapii podle biomarkerů.

Analýzy stavu RAS ve studiích **CRYSTAL** a **OPUS** zcela jasně prokázaly, že antiEGFR terapie je metodou správné volby u mCRC wt-RAS (7, 10). Rozhodnutí o tom, zda u mCRC zahájit paliativní chemoterapii kombinací FOLFOX či FOLFIRI a zda přidat v první linii biologickou

léčbu cetuximabem, panitumumabem či avastinem měly přinést výsledky studií PEAK, FIRE-3, PRIME a CALGB/SWOG 80405 (11). Ve studii **PEAK** fáze II. bylo 285 pacientů rozděleno náhodně do skupiny s terapií FOLFOX6 + panitumumab nebo bevacizumab u mCRC wtKRAS v 1. linii léčby. Při zařazování do studie byly zpočátku hodnoceny jen mutace KRAS v exonu 2 a výsledky terapie nevykazovaly zásadní rozdíl v účinnosti léčby uvedených kombinací. Teprve následná analýza dalších mutací KRAS v exonu 3, 4 a NRAS exonu 2, 3, 4 ukázala lepší výsledky u pacientů s divokým typem KRAS i NRAS ve prospěch kombinace chemoterapie s panitumumabem u PFS (13,5 vs. 9,5 měs., HR 0,63, p = 0,02) i OS (medián nedosažen vs. 29 měs., HR 0,55, p = 0,06). Stejným způsobem byla doplněna analýza RAS stavu ve studii **PRIME**, kde pacienti léčení kombinací FOLFOX4 + panitumumab vs. FOLFOX4 dosáhli významně delší doby PFS i OS (mediány PFS 10,1 vs. 7,9 měs., HR 0,72, 95 % CI 0,58–0,90, p = 0,004, mediány OS 26,0 vs. 20,2 měs., HR 0,78, 95 % CI 0,62–0,99, p = 0,04). Na konferenci ESMO 2013 byly publikovány výsledky z analýzy mutací KRAS a NRAS ze studie **FIRE-3**. Pacienti s wtCRC v 1. linii byli rozděleni do skupiny FOLFIRI + cetuximab vs. FOLFIRI + bevacizumab. Celková analýza RAS ve všech exonch ukázala vyšší četnost léčebných odpovědí (RR) u pacientů s kombinací cetuximabem, i když rozdíl nebyl statisticky významný (65,5 vs. 59,6 %, p = 0,32). V PFS se skupiny téměř nelišily, naopak OS byl jednoznačně delší v rameni FOLFIRI + cetuximab (33,1 vs. 25,9 měs., HR 0,69,

95 % CI 0,52–0,92, p = 0,01) (obrázek 4). Studie **CALGB/SWOG 80405** byla zahájena již v roce 2004 s bevacizumabem v 1. linii a cetuximabem ve 2. a 3. linii s možností volby chemoterapeutického režimu podle lékaře. 73 % nemocných bylo léčeno FOLFOXEM a 27 % FOLFIRI. Výsledky OS přinesly nový standard v délce celkového přežití s mediánem u bevacizumabu 29 měsíců a u cetuximabu 29,9 měsíce (HR 0,925, 95 % CI 0,78–1,09, p = 0,34). I průměrné PFS bylo zhruba stejné, 10,8 u bevacizumabu vs. 10,4 u cetuximabu (HR 1,04, 95 % CI 0,91–1,17, p = 0,55) (obrázek 5). Velmi důležitý byl poznatek, že u téměř 11 % pacientů, s chemoterapií nebo společně s chirurgickou léčbou, bylo dosaženo kompletní remise s délkou 5,5 roku. Přestože nebyly významné rozdíly mezi rameny studie, za nejpodstatnější považujeme možnost prodloužení celkového přežití nemocných za hranici 30 měsíců.

Závěr

Nová éra systémové léčby u CRC se datuje od druhé poloviny devadesátých let minulého století. Došlo v ní nejen k obohacení repertoáru cytostatik, ale také se významným způsobem posunuly vědecké poznatky na poli molekulární biologie, které umožnily nástup cílené léčby za pomoci monoklonálních protilátek. Hlubší rozpoznání principů procesu metastazování, buněčné komunikace a signálních drah vede k vývoji látek s možností zásahu klíčových struktur nádorové buňky. Ke správné volbě léčby u mCRC máme zatím k dispozici pouze prediktivní markery pro antiEGFR terapii. KRAS a NRAS mutace zde fungují jako negativní prediktivní faktor, BRAF mutace je považována za negativní prognostický marker. Testování RAS mutací je nyní již standardní součástí vyšetření u mCRC. Problémem i nadále zůstává interpretace některých výsledků vyšetření. Ze zasedání zástupců českých pracovišť provádějících tato molekulárně-patologická vyšetření, které se konalo v červnu 2014, vzešly tyto závěry: vzorky tkáně s méně než 10 % nádorových buněk nejsou vhodné k testování. Vzorky s obsahem 10–30 % nádorových buněk jsou suboptimální, ale použitelné při použití předchozí direktive vzorku. Stejně tak důležité je stanovení hranice, tzv. cut-off, procenta RAS mutovaných alel v nádoru. Bylo zjištěno, že PFS u pacientů s nádory s nízkou prevalencí mutovaných alel (< 5 %) byl srovnatelný s PFS pacientů s KRAS nádory divokého typu (12, 13). Pětiprocentní cut-off RAS mutací je obecně přijímán nejen v mezinárodních studiích, ale i v klinické praxi.

Literatura

1. www.svod.cz
2. Dienstmann et al J Clin Oncol 2014; (suppl; abstr 3511)32: 5.
3. Dundr P, Staněk L. Molekulární diagnostika u kolorektálního karcinomu, Farmakoterapie monografie 2013.
4. Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocr Relat Cancer 2004; 11: 689–708.
5. Spano JP, et al. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives. Ann Oncol 2005; 6(2): 189–194.
6. Adjei AA. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. J Natl Cancer Inst 2001; 93(14): 1062–1074.
7. Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil and leucovorin as first line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumour KRAS and BRAF mutation status J Clin Oncol 2011; 29: 2011–2019.
8. Staněk L. [Polymerase chain reaction: basic principles and applications in molecular pathology]. Cesk Patol. 2013; 49(3): 119–21. Czech.
9. Tomášek J., Berkovcová J. Nový prediktivní molekulární marker RAS umožňuje přesnější indikaci inhibitorů EGFR v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu. Farmakoterapie 2013; 9(6): 557–668.
10. Bokemeyer C, et al. Treatment outcome according to tumor RAS mutation status in OPUS study patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) randomized to FOLFOX4 with/without cetuximab. J Clin Oncol 2014; (Suppl; abstr 3505) 32: 5.
11. Lezama M, Valera J. Impact of cetuximab in current treatment of metastatic colorectal cancer. Expert Opin. Biol. Ther. 2014; 14(3): 387–399.
12. Van Cutsem E, et al. Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Plus Cetuximab Treatment and RAS Mutations in Colorectal Cancer, ASCO, ESMO 2014, J Clin Oncol Jan 2015; 59: 4812
13. Pekin D, Normand C, Kostopoulos S, et al. Detection and quantification of minority subclones of KRAS on metastatic colorectal cancers by digital microfluidics: Therapeutic implications. Cancer Res, 2013; 73(Abstr 4211).

Článek přijat redakcí: 15. 4. 2015

Článek přijat k publikaci: 30. 5. 2015

MUDr. Jaroslava Barkmanová
Onkologická klinika 1. LF UK, VFN a ÚVN
barkmanova.jaroslava@vfn.cz

Mgr. Ing. Libor Staněk
Ústav patologie 1. LF UK a VFN v Praze
stanek.libor@seznam.cz
