

# Szemelvények a Semmelweis Egyetem, az Országos Onkológiai Intézet és az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet együttműködésén alapuló tüdőrák-kutatási programból

*Hegedűs Balázs<sup>1,2</sup>, Moldvay Judit<sup>3</sup>, Berta Judit<sup>3</sup>, Lohinai Zoltán<sup>3</sup>, Rózsás Anita<sup>3</sup>, Cserepes T. Mihály<sup>3</sup>, Fábíán Katalin<sup>4</sup>, Ostoros Gyula<sup>3</sup>, Tóvári József<sup>6</sup>, Rényi-Vámos Ferenc<sup>7</sup>, Tímár József<sup>1,5</sup>, Döme Balázs<sup>2,3,7</sup>*

<sup>1</sup>MTA-SE Molekuláris Onkológia Kutatócsoport, Budapest; <sup>2</sup>Bécsi Orvostudományi Egyetem, Mellkassebészeti Tanszék, Bécs; <sup>3</sup>Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet; Semmelweis Egyetem, <sup>4</sup>Pulmonológiai Klinika, <sup>5</sup>II. Sz. Patológiai Intézet; <sup>6</sup>Országos Onkológiai Intézet, Kísérletes Farmakológiai Osztály; <sup>7</sup>Semmelweis Egyetem-Országos Onkológiai Intézet, Mellkassebészeti Klinika, Budapest

*A vizsgálatokat finanszírozó jelentősebb pályázatok adatai:*

*OTKA (F68916, NK73082, K109626, K116151, K76293, MOB80325, PD111656, K84173, K116295), az EGT és Norvég Finanszírozási Mechanizmusok (HU0125) és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (KTIA\_NAP\_13)*

*A tüdőrák jelentős szocioökonómiai terhet ró a magyar társadalomra. Az alábbi írás áttekintést nyújt három hazai csúcsintézmény – a Semmelweis Egyetem, az Országos Onkológiai Intézet és az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet – tüdőrákokkal kapcsolatos transzlációs kutatási munkáiról. Az angiogenezist szabályozó molekuláris rendszerek vizsgálata során az apelin és az erythropoietinreceptor (EPOR) molekulák expresszióját találtuk a nem-kissejtes tüdőrák (NSCLC) prognózisát szignifikánsan befolyásoló tényezőnek. Jellemeztük továbbá a KRAS-mutáció-altípusok és az ERCC1- (excision repair cross-complementation group 1) expresszió jelentőségét a platinaalapú kemoterápiák hatékonyságával összefüggésben, valamint egy nagy hazai kohorszon vizsgáltuk az ún. ritka EGFR- (epidermal growth factor receptor) mutációk epidemiológiáját és prediktív jelentőségét NSCLC-ben. Végül tárgyaljuk az NSCLC agyi áttétképzésében potenciálisan szerepet játszó molekulák azonosítására tett vizsgálataink eredményét. Az alábbi közleményben összefoglalt tanulmányaink klinikailag is releváns információkkal szolgáltak, így bízunk benne, hogy ezáltal hozzájárulhatnak a tüdőrákos betegek kezelésének fejlődéséhez. Magyar Onkológia 59:282–285, 2015*

**Kulcsszavak:** tüdőrák, érképződés, KRAS, EGFR, célzott terápia

*Lung cancer places a significant socio-economic burden on the Hungarian population. This overview summarizes the findings of collaborative translational lung cancer research efforts of three Hungarian flagship academic institutions, the Semmelweis University, the National Institute of Oncology and the National Koranyi Institute of TB and Pulmonology. With regards to the molecular factors regulating tumor angiogenesis, we identified the prognostic significance of apelin and erythropoietin receptor (EPOR) expression in non-small cell lung cancer (NSCLC). Furthermore, the impact of KRAS mutation subtypes and ERCC1 (excision repair*

Levelezési cím: Dr. Döme Balázs; e-mail: domeb@yahoo.com, tel.: +36 20 313 1869

Közlésre érkezett: 2015. november 10. • Elfogadva: 2015. november 21.

*cross-complementation group 1) expression on the response to platinum-based chemotherapy have been studied. We also described the epidemiology and predictive power of rare EGFR (epidermal growth factor receptor) mutations in a large Hungarian patient cohort. Lastly, the expression of molecular factors associated with NSCLC progression was studied specifically in brain metastatic matched cases series. These preclinical and clinical studies provide clinically relevant information that hopefully will contribute to the improvement of lung cancer patient care.*

Hegedűs B, Moldvay J, Berta J, Lohinai Z, Rózsás A, Cserepes TM, Fábíán K, Ostoros G, Tóvári J, Rényi-Vámos F, Tímár J, Döme B. Excerpts from the collaborative lung cancer research program of Semmelweis University, the National Institute of Oncology and Korányi Institute of TB and Pulmonology (2010–2015). *Hungarian Oncology* 59:282–285, 2015

**Keywords:** lung cancer, angiogenesis, KRAS, EGFR, targeted therapy

Az elmúlt néhány évben a Semmelweis Egyetem, az Országos Onkológiai Intézet és az Országos Korányi Tbc és Pulmonológiai Intézet együttműködésén alapuló tüdőrákkutatási program két alapvető iránya a tumorokban zajló érképződési folyamatok molekuláris mechanizmusának jobb megértése, és a célzott és klasszikus terápia hatékonyságát meghatározó molekuláris faktorok vizsgálata volt.

Az antiangiogén terápia megjelenése a XXI. század első évtizedében új fejezetet nyitott számos daganat, így a tüdőrák gyógyításában is. A 2000-es évek második felében a munkacsoport számos fontos eredményt ért el tüdődaganatok vér- és nyirokéreképződésének vizsgálatával (1–4). Az utóbbi néhány évben a vaszkularizáció folyamatában szereplő molekuláris faktorok kutatása került előtérbe. Bár korábban számos tanulmány jelent meg az apelin peptid – a G-protein kapcsolt APJ receptor endogén liganduma – szerepéről a véreképződés folyamatában, a Korányi Intézet munkacsoportja vizsgálta meg elsőként az apelin lehetséges szerepét a nem-kissejtes tüdőrák ereződésében, és tárta fel ennek klinikopatológiai jelentőségét (5). Az immunhisztokémiai vizsgálatokban 94, I–IIIa stádiumú beteg, míg a molekuláris vizsgálatokban 46 beteg sebészi úton eltávolított fagyasztott tumoros és normális tüdőszövege került elemzésre. Humán nem-kissejtes tüdőrákmintákban az apelin expressziójának mértéke szignifikánsan megnőtt a normális tüdőszövethez képest, és az apelin kifejeződésének mértéke pozitív korrelációt mutatott a tumorok angiogén fenotípusával, azaz a tumorokban található mikroerek számával. A nagymértékű apelinexpresszió rosszabb túléléssel is párosult az ötéves követési periódus alatt. A preklinikai vizsgálatokban hat nem-kissejtes tüdőráksejtvonal szerepelt, amelyek apelintermelése mRNS- és fehérjeszinten is igazolódott. Habár a tumorsejtek proliferációját az apelint kódoló vektorral történő transzfekció vagy exogén apelinnel történő kezelés nem befolyásolta *in vitro*, az apelint kifejező transzfektált sejtek szubkután tumorai szignifikánsan gyorsabban nőttek *in vivo*. A xenograft tumorok morfológiai analízise alapján az apelin túltermelése

serkentette a tumorok angiogenezisét a kontroll tumorokhoz képest. Ezen eredmények alapján az apelin egy új angiogén faktor humán nem-kissejtes tüdőrákban, és munkacsoportunké az első tanulmány, amely az apelinexpresszió és egy humán daganattípus klinikai viselkedése közötti kapcsolatot igazolt. További vizsgálataink azt is igazolták, hogy az apelin *in vitro* és kísérletes daganatmodellekben képes a nyirokéreképződés fokozására is (6).

A daganatok vérellátása nemcsak a tumor növekedése szempontjából fontos, de a rosszul oxigenizált tumorszövet kevésbé érzékeny a sugárkezelésre és a kemoterápiára, továbbá a hypoxia növeli az áttétképzés valószínűségét is. A daganatos betegek kezelése során gyakran előforduló szövődmény a vérszegénység, amely csökkenti az életminőséget, és a kezelés kedvezőtlen kimenetelét is okozhatja. A rekombináns humán erythropoietin (EPO) az egyik lehetséges választás a daganatos betegekben kialakuló vérszegénység kezelésére, azonban az EPO tumornövekedésre gyakorolt hatására vonatkozó kísérletes és klinikai vizsgálatok eredményei igencsak ellentmondásosak. Ennek hátterében az állhat, hogy a tumorsejtek és az endotélsejtek is termelhetnek erythropoietinreceptort (EPOR), és így a rekombináns humán erythropoietin (rhEPO) kezelés elősegítheti a daganatsejtek proliferációját, valamint az intratumorális érképződést. Ennek megfelelően került meghatározásra az EPOR kifejeződésének szintje 43, III–IV. stádiumú tüdő-adenokarcinómás beteg bronchoszkópos mintájában kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval, és megállapítást nyert, hogy a magas intratumorális EPOR-expresszió szignifikánsan jobb túléléssel párosult, mint az alacsony EPOR-expresszió (7). Preklinikai vizsgálataink során igazoltuk három humán adenokarcinóma-sejtvonalban az EPOR kifejeződését, bár ennek ellenére a rhEPO-kezelés (önmagában vagy kemoterápiával kombinálva) nem befolyásolta a sejtek *in vitro* proliferációs képességét. A rhEPO-kezelés *in vivo* vizsgálatára a H1975 humán tüdőadenokarcinóma-sejtvonal szubkután modell-

jében került sor. A tumor növekedésének mérése mellett az osztódó sejtek immunfluoreszcens jelölésével a tumor-, illetve endotélsejtek proliferációja is meghatározásra került. A rhEPO-kezelés szignifikánsan csökkentette a tumorsejtek proliferációját és a xenograftok növekedését, ugyanakkor a tumoron belüli endotélsejtek osztódási képességét szignifikánsan fokozta. *In vivo* eredményeink arra utalnak, hogy az exogén rhEPO csökkentette az intratumorális hypoxiát. Klinikai eredményeink pedig arra engednek következtetni, hogy a magas EPOR-szint egy lehetséges pozitív prognosztikai marker az előrehaladott humán tüdő-adenokarcinóma esetében.

A tüdőrák és elsősorban a tüdő-adenokarcinóma gyógyításában egy másik terápiás lehetőség is megjelent az elmúlt évtizedben, ez pedig az onkogén fehérjék direkt gátlása. Az egyik legfontosabb célpont az epidermális növekedési faktor tirozinkináz receptora, az EGFR. Az EGFR-mutáció meglete ugyanakkor nem feltétlenül jár együtt a fehérje fokozott aktivitásával vagy éppen a gátlószerekre adott válasszal, ezért kutatásaink egyik iránya a meghatározó klinikopatológiai tényezők azonosítása volt. Mivel az adenokarcinómák további szövettani altípusokra bonthatók, összehasonlítottunk 61, sebészileg eltávolított I. stádiumú, lepidikus terjedést mutató (LAC) és 49 invazív terjedést mutató (InvAC) adenokarcinómát az EGFR fehérje expressziója és foszforilációs aktivitása (Y1173) szempontjából (8). A LAC csoportban kedvezőbb prognózis és szignifikánsan gyakoribb foszfo-EGFR immunhisztokémiai pozitívitas volt megfigyelhető. Az EGFR- és a KRAS-mutációk arányát illetően nem volt különbség a két csoport között. InvAC-ban foszfo-EGFR-pozitívitas kizárólag EGFR-mutáció-pozitív/KRAS vad típusú tumor esetén volt megfigyelhető. Ezzel szemben LAC-ban a foszfo-EGFR daganatok gyakorisága hasonló volt az EGFR-mutáció-pozitív és a KRAS-mutáció-pozitív tumorokban, ami a KRAS-mutációt hordozó daganatokban az EGFR-szignalizáció egy érdekes feedback aktivációjára utalhat. Eredményeink alapján az EGFR-mutáns tüdődaganatok csak egy kisebb csoportjában fordul elő EGFR-autofoszforiláció, amely megfigyelés akár klinikai jelentőséggel is bírhat. Továbbá megállapítottuk, hogy az EGFR-proteinexpresszióval ellentétben az EGFR-autofoszforiláció korrelál a tüdő-adenokarcinómák egyes szövettani és molekuláris altípusaival.

Bár az EGFR gén számos mutációját leírták, nem minden elváltozásról ismert, hogy milyen mértékben járul hozzá a fehérje aktivációjához és az EGFR-TKI-kezelésre adott válaszhoz. Éppen ezért végeztük el 814, KRAS- és EGFR-mutációs analízis eredménnyel rendelkező tüdő-adenokarcinómás beteg retrospektív vizsgálatát (9). A daganatok 27%-a KRAS-, 5%-a klasszikus, valamint 6%-a ritka EGFR-mutációt hordozott. A ritka EGFR-mutációk –

szemben a klasszikus mutáns daganatokkal – gyakrabban fordultak elő dohányzó betegekben. A klasszikus EGFR-mutációt hordozó betegek szignifikánsan jobb terápiás választ adtak EGFR-TKI-kezelésre (71% vs. 37%), továbbá hosszabbnak bizonyult a medián progressziómentes túlélés (12 vs. 6,2 hónap) a ritka mutáns daganatban szenvedő betegekhez képest. Ugyanakkor számos ritka mutációt hordozó beteg is rendkívül jól válaszolt a célzott terápiás kezelésre. E vizsgálataink alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a ritka EGFR-mutációk meghatározása és az EGFR-TKI-kezelésre adott válaszok vizsgálata alapvetően fontos a ritka EGFR-mutációk prediktív értékének meghatározásához, így mind több beteg számára válhatnak alkalmazhatóvá ezek a modern kezelések. A vizsgálat komoly nemzetközi érdeklődést keltett, és már két kommentár is napvilágot látott az eredményekkel kapcsolatban a tekintélyes *Journal of Thoracic Oncology* folyóiratban (10, 11).

Míg a KRAS-mutáció egyértelműen negatív prediktív faktora az EGFR-TKI-terápiának, addig a klasszikus kemoterápia hatékonyságára vonatkozó hatása nem egyértelmű. A KRAS mutációja során is többféle onkogén fehérje alakulhat ki, és az egyes altípusok közötti különbségek jelenleg is intenzív kutatás alatt állnak. Éppen ezért végeztük el 505, szubtypus-specifikus KRAS-mutációs analízissel rendelkező előrehaladott adenokarcinómában szenvedő és klasszikus platinabázisú kemoterápiával kezelt beteg vizsgálatát (12). Kimutattuk, hogy a nemdohányzók aránya szignifikánsan magasabb volt a G12V KRAS-mutációt hordozó betegekben, összevetve a többi KRAS-altípussal. A G12V KRAS-mutációk esetén platinaalapú kezeléssel a terápiás válasz, a progressziómentes és a teljes túlélés is hosszabb volt, összehasonlítva a többi KRAS-szubtypussal. Eredményeink arra utalnak, hogy a kezelés kiválasztásakor fontos ismerni és figyelembe venni az onkogén mutációk különböző altípusait, és ezek alapján kiválasztani az elérhető leghatékonyabb terápiát az adott beteg számára.

A célzott terápia megjelenése ellenére az előrehaladott tüdőrák kezelésében a klasszikus platinabázisú kemoterápia mind a mai napig a legfontosabb modalitás. Mindazonáltal jelenleg is intenzív kutatások tárgya, milyen molekuláris faktorok határozzák meg a terápia hatásosságát. Az ERCC1 (excision repair cross-complementation group 1) döntő szerepet játszik a platinaszármazékok indukálta DNS-adduktok kijavításában, és alacsony expressziója esetén várható a kemoterápiás szer eredményes alkalmazása. Vizsgálataink során N2 stádiumú tüdőrák miatt platina-bázisú neoadjuváns kezelésben részesülő 27 laphámrákos és 19 adenokarcinómás beteg kemoterápia előtti (bronchoszkópos excízióból) és utáni (sebészi reszekátumból származó) tumorszövetének ERCC1-proteinexpresszióját tanulmányoztuk (13). A 27 laphámrák közül 24 esetben

találtunk ERCC1-pozitivitást, ebből 13 a kemoterápia hatására ERCC1-negatívvá vált, 11 esetben pedig csökkent az expresszió mértéke. A 19 adenokarcinómából 11 volt ERCC1-pozitív, melyből 6 a kemoterápiát követően negatívvá vált és 4 esetben csökkent az expresszió. Nem fordult elő olyan eset, amelyben az ERCC1 kifejeződése megemelkedett volna. Nem volt korreláció megfigyelhető a kezdeti ERCC1-szint vagy ERCC1-csökkenés és a teljes túlélés között. Eredményeink azt igazolták, hogy a citotoxikus kezelés szignifikánsan csökkenti a tumorsejtek ERCC1-expresszióját, ami arra utalhat, hogy a kemoterápia hatására daganatsejt-szelekció jön létre.

A tüdőrákok magas halálozási aránya elsősorban az áttétek kialakulásának következménye, ennek ellenére az áttétképzés molekuláris háttere még nem pontosan ismert. A tüdő primer daganatai gyakran adnak agyi áttétet, azonban kevésbé ismertek az áttétképződésre és a peritumorális agyödémára vonatkozó prediktív faktorok. Ennek megfelelően 52 tüdőrákos beteg primer tumora, valamint közülük 26 beteg agyi áttéte került immunhisztokémiai vizsgálatra (14). Adenokarcinómákban az agyi áttét kialakulásával korrelált a fokozott kollagén VII-expresszió, míg laphámrákokban a kaszpáz-9 és CD44v6 fokozott, valamint a cellular apoptosis susceptibility protein (CAS) és Ki-67 csökkent expressziója. Az agyi áttét körüli ödéma mértékével korrelált a primer laphámrákok fokozott  $\beta$ -catenin-, E-cadherin- és csökkent kaszpáz-9-expressziója, továbbá az agyi áttétek csökkent CD44v6-expressziója. Metasztatikus adenokarcinómákban pozitív korreláció volt megfigyelhető a dohányzás és a p16-, valamint a kaszpáz-8-expresszió között. Agyi áttétet nem adó laphámrákokban negatív összefüggés volt látható a dohányzás és a kaszpáz-3, metastatikus laphámrákokban pedig a dohányzás és a p27 expressziója között. Ezen eredmények megerősítik a tüdőadenokarcinómák és laphámrákok közti molekuláris különbségeket, és felhívják a figyelmet a nem-kissejtes tüdőrákok szövettani altípusok szerinti szeparált analízisének szükségességére.

Az elmúlt néhány évben egy erős transzlációs hangsúlyú, részben klinikai, részben preklinikai tüdőrák-kutatási program alakult ki, amelybe valamennyi részt vevő intézetből több fiatal biológus és orvos kapcsolódott be. Ennek

a munkának az eredménye egyrészt a számos bemutatott nemzetközi tudományos közlemény, másrészt jó néhány megvédett vagy fokozatszerzési fázisban lévő PhD-diszertáció, amelyek mind jól példázzák a kutató- és gyógyító intézetek, valamint a társszakmák összefogásának jelentőségét egy gyümölcsöző együttműködés érdekében.

## IRODALOM

1. Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, et al. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11:7344–7353, 2005
2. Dome B, Timar J, Dobos J, et al. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66:7341–7347, 2006
3. Dome B, Dobos J, Tovari J, et al. Circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells: characterization, mobilization, and therapeutic considerations in malignant disease. *Cytometry A* 73:186–193, 2008
4. Bogos K, Renyi-Vamos F, Dobos J, et al. High VEGFR-3-positive circulating lymphatic/vascular endothelial progenitor cell level is associated with poor prognosis in human small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 15:1741–1746, 2009
5. Berta J, Kenessey I, Dobos J, et al. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol* 5:1120–1129, 2010
6. Berta J, Hoda MA, Laszlo V, et al. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget* 5:4426–4437, 2014
7. Rózsás A, Berta J, Rojkó L, et al. Erythropoietin receptor expression is a potential prognostic factor in human lung adenocarcinoma. *PLoS One* 8:e77459, 2013
8. Moldvay J, Barbai T, Bogos K, et al. EGFR autophosphorylation but not protein score correlates with histologic and molecular subtypes in lung adenocarcinoma. *Diagn Mol Pathol* 22:204–209, 2013
9. Lohinai Z, Hoda MA, Fabian K, et al. Distinct epidemiology and clinical consequence of classic versus rare EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 10:738–746, 2015
10. Lohinai Z, Ostoros G, Moldvay J, et al. Reply to Rare versus artifactual EGFR mutations. *J Thorac Oncol* 10:e80–81, 2015
11. Domingues PM, Montella T, Baldotto C. Rare versus artifactual EGFR mutations. *J Thorac Oncol* 10:e79–80, 2015
12. Cserepes M, Ostoros G, Lohinai Z, et al. Subtype-specific KRAS mutations in advanced lung adenocarcinoma: a retrospective study of patients treated with platinum-based chemotherapy. *Eur J Cancer* 50:1819–1828, 2014
13. Podmaniczky E, Fábán K, Pápay J, et al. Decreased ERCC1 expression after platinum-based neoadjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Pathol Oncol Res* 21:423–431, 2015
14. Fábán K, Németh Z, Furák J, et al. Protein expression differences between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma with brain metastasis. *Anticancer Res* 34:5593–5597, 2014