

# Svenskt samarbete för genomiska analyser av bröstcancervävnad

## Grund för framtidens individualiserade cancerbehandling

**NIKLAS LOMAN**, överläkare, stygruppmedlem, verksamhetsområde onkologi och radiofysik, Skånes universitetssjukhusvård, Lund/Malmö; för SCAN-B:s medarbetare och stygrupp  
niklas.loman@med.lu.se

En av nio svenska kvinnor insjuknar i bröstcancer. 2011 rapporterades drygt 8 000 nya fall och ca 1 400 dödsfall i sjukdomen [1]. Dagens riktlinjer för behandling bestäms av kliniskpatologiska kriterier. Behandlingen består av kirurgi och kombinationer av radioterapi och medicinsk tilläggsbehandling (endokrina läkemedel, antikroppar och cytostatika). Denna strategi, som innebär att många patienter får någon form av tilläggsbehandling, har tillsammans med effektiv mammografiscreening lett till en kraftig minskning av dödligheten i bröstcancer.

### Femårsöverlevnad, långtidsprognos och överbehandling

Överlevnaden efter fem år närmar sig i dag 90 procent, vilket är bland de högsta i världen [2]. Femårsöverlevnaden speglar dock inte till fullo långtidsprognosen, då ca 20–25 procent av kvinnor som är friska fem år efter diagnosen får återfall och avlider i sjukdomen [3]. Trots tillgång till prognostiska markörer kan vi inte på individuell nivå förutsäga vilka patienter som botas med endast kirurgi och vilka som riskerar återfall trots intensiv tilläggsbehandling. Konsekvensen är att vi »överbehandlar« en betydande andel kvinnor, som därmed utsätts för bieffekter utan att få någon överlevnadsfördel [4]. Svårigheten att välja optimal behandling till varje patient inverkar inte bara på patienternas livskvalitet utan får också samhällsekonomiska följder [5, 6].

Sammanfattningsvis finns det minst tre särskilt viktiga frågeställningar vid fortsatt utveckling av adjuvant behandling av tidig bröstcancer:

- Hur kan vi identifiera de patienter som inte har behov av tilläggsbehandling?
- Kan vi utveckla mer effektiva behandlingar för de patienter som har den allvarligaste prognosen?
- Kan vi utveckla metoder för att individuellt utvärdera och styra den medicinska tilläggsbehandlingen?

### Nya generationens biomarkörer

Bröstcancer är, liksom all neoplas, orsakad av förändringar i genomet. Ibland är de medfödda, men oftast uppstår de under cancerutvecklingen. Det finns olika slags förändringar av den genetiska koden, såsom utbyte av enstaka nukleotider (punktmutationer), ökning eller förlust av genetiskt material och epigenetiska mekanismer. Förändringarna påverkar uttrycksnivåerna för tusentals gener i tumörcellerna och har därigenom fundamental betydelse för cancers egenskaper. Dessvärre finns det i dag enbart enstaka exempel på att mätning av sådana biomarkörer utnyttjas i kliniken för att styra behandlingen (uttrycksnivån av steroidhormonreceptorer, förekomst av HER2-amplifiering och uttrycksnivån av proliferationsmarkören Ki67).

Metodologiska framsteg gör det möjligt att i tidigare oöverträffad omfattning och noggrannhet karakterisera föränd-

ringar i gener och i genuttryck. Med högkapacitetssekvensering, även kallad nästa generations sekvensering eller djupsekvensering, kan vi »läsa« sekvensen för både DNA- och RNA-molekyler, inte bara kvalitativt utan också kvantitativt. Man kan identifiera mutationer, kromosomala rearrangemang och kopietal för varje del av genomet samt nivån för varje mRNA. Fördelen med djupsekvensering är att den speglar hela genomet, där man med tidigare metoder bara kunde analysera fördefinierade sekvenser.

Den nya tekniken blir alltmer effektiv och mindre kostsam. Exempelvis kan ett Illumina HiSeq-instrument sekvensera ett helt humant genom på mindre än två veckor, något som tog det internationella humana genomprojektet (Human Genome Project, HUGO) mer än tio år och miljarder kronor att genomföra. Kostnaden för genuttrycksprofilering fortsätter att sjunka, och rutinmässiga kliniska test baserade på tumörsekvensering behöver därför inte bli oöverkomligt dyra.

### Stora, icke-selektade och populationsbaserade material

Den första vågen av genombaserade biomarkörer som utvecklades från genchipbaserade metoder har haft vissa begränsningar och fått utstå berättigad kritik. I utvecklingsfasen var antalet prov och representationen av den naturliga sjukdomsheterogeniteten i stor utsträckning otillräcklig, med bristande överensstämmelse och överförbarhet mellan studier som följd. Majoriteten av studierna inkluderade ett fåtal hundra prov och innehöll ofta skevhet i urvalet av patienter. Studier i valideringsfasen lider av samma problem. Antalet studier där genuttrycksprofiler och liknande markörer använts prospektivt för att styra behandling är också begränsat.

Det finns ett fåtal genbaserade kliniska test för prognostik vid bröstcancer: MammaPrint (Agendia BV) och OncotypeDX (Genomic Health, Inc). Nyligen blev även Prosigna (Nano String Technologies) tillgängligt. Testen är relativt dyra, och deras generaliserbarhet och nytta har ifrågasatts på grund av att de utvecklats och validerats i relativt små och selekterade studiepopulationer [7] eller endast för en undergrupp av bröstcancer [8–10]. Prosigna (PAM50) bygger på en tidig rapport [11] om molekylära subtyper av bröstcancer, en upptäckt som validerats i många senare genomförda studier men där kopplingen till behandlingsinsatser ännu saknas.

Gemensamt för dessa profiler är att de i första hand baseras på tumörens proliferation och att de har sitt värde i att kunna identifiera subgrupper av bröstcancer med gynnsam prognos och begränsad nytta av kemoterapi. Det saknas ännu test som

### SAMMANFATTAT

**Trots att prognosen** vid bröstcancer förbättrats är de kriterier vi i dag använder i valet av terapi otillräckliga. Vi behöver bättre verktyg för att karakterisera cancer och styra behandlingen. **South Sweden Cancerome Analysis Network – Breast (SCAN-B)** är ett nätverk av vårdgivare och forskare vars mål är att genom

systematisk insamling av vävnad och genomiska analyser identifiera och studera nya biomarkörer – till gagn för framtidens bröstcancerpatienter.

**SCAN-B förväntas** minska tiden från upptäckt till validering och kliniskt införande av mer kraftfulla prognostiska och prediktiva test för bröstcancer.

## KLINIK & VETENSKAP UTBILDNING OCH FORSKNING

förutsäger nyttan av en specifik terapi, och testen har ett begränsat värde för patienter med receptornegativa, högprolifererande och HER2-positiva tumörer. Dessa test används i mycket liten omfattning i vårt land.

### SCAN-B

South Sweden Cancerome Analysis Network Breast (SCAN-B) är ett långsiktigt multidisciplinärt samarbetsprojekt som startade 2009 med syftet att bidra till utveckling, validering och införande av kliniskt användbara molekylära tumöranalyser i rutinsjukvården med målsättningen att förbättra vård, livskvalitet och överlevnad för framtidens patienter med bröstcancer. I SCAN-B ingår forskare, kliniker och sjukvårdspersonal vid Lunds universitet, Skånes universitetssjukhus och de sex sjukhus som behandlar bröstcancerpatienter i Södra sjukvårdsregionen (Malmö/Lund, Helsingborg, Kristianstad, Halmstad, Växjö och Karlskrona). Projektet, som inkluderar patienter sedan augusti 2010, har fullt stöd från Sydsvenska bröstcancergruppen och landstingen inom Regionalt cancercentrum Syd. Projektet har godkänts av regionala etikprövningsnämnden i Lund.

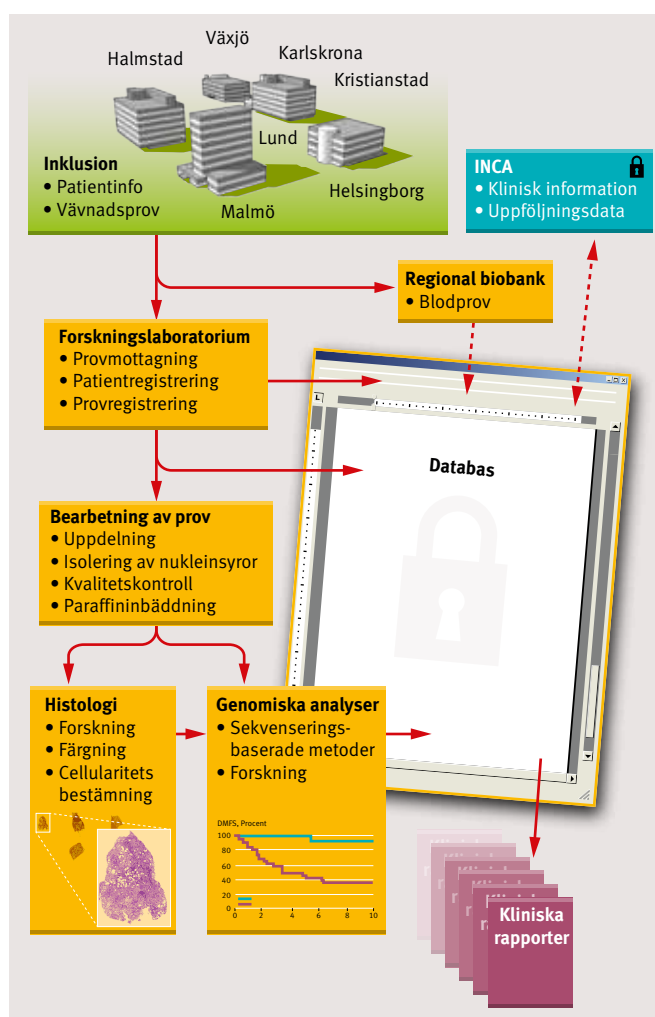
### Inkludering av bröstcancerpatienter i SCAN-B

Patienter med säkerställd eller starkt misstänkt primär bröstcancer kan efter att ha lämnat informerat samtycke inkluderas i SCAN-B (Figur 1). Vid den rutinmässiga provtagningen tas ett extra blodprov vid klinisk-kemiska laboratoriet på alla deltagare. I samband med patologens utskärning av operationspreparatet placeras ett ofixerat tumörprov i ett speciellt SCAN-B-provrör som innehåller en RNA-skyddande lösning. I de fall preoperativ terapi planeras tas material från en nålbiopsi. Proven skickas varje vecka via det vanliga sjukhustransportsystemet till centrala forskningslaboratoriet, avdelningen för onkologi, Lunds universitet. Förutsättningen för provtagning inom projektet är att den kliniska diagnostiken inte äventyras; därför kan patienter med små tumörer och tumörer med diffust växtsätt inte alltid bidra till vävnadsinsamlingen. Det är ansvarig patolog som avgör om det är möjligt att ta vävnadsprov till SCAN-B.

Sedan augusti 2010 har omkring 4 000 patienter valt att delta i SCAN-B (Tabell I). 25–30 nya patienter inkluderas varje vecka. För 2011 och 2012 representerar detta 81 procent av det totala antalet nya invasiva bröstcancerdiagnoser i regionen. Endast ca 3 procent av tillfrågade patienter avböjer deltagande i SCAN-B, och ungefär motsvarande antal tillfrågas inte på grund av språksvårigheter eller oförmåga att lämna informerat samtycke. Tumörprov har kunnat samlas in från 74 procent av alla inkluderade patienter (Tabell I).

### Tumörpreparation för RNA-sekvensering

Tumörprov bearbetas rutinmässigt varje vecka i vårt laboratorium. De delas i upp till tre bitar: en för automatiserad isolering av DNA, RNA och protein, en liten angränsande del som formalinfixeras för snittning och bedömning av tumörcells-



**Figur 1.** Infrastrukturen inom SCAN-B, som möjliggör införande av biomarkörtest som kan rapporteras till behandlande läkare. Processen börjar med att patienter vid medverkande sjukhus tillfrågas om de vill delta (97 procent av de tillfrågade väljer att delta). Vid provtagningen tas ett extra blodprov som skickas till den regionala biobanken, och ett ofixerat tumörprov sänds till forskningslaboratoriet. All prov- och analysinformation registreras i ett datahanteringssystem. I databasen lagras också information från bröstcancerkvalitetsregistret INCA.

innehåll och en eventuell kvarvarande del som lagras för kompletterande isolering av nukleinsyror och protein. All studie-, prov- och analysinformation registreras i ett datahanteringssystem [12, 13]. Vi registrerar tekniska kvalitetsmått under hela omhändertagandet av tumörvävnad och kan visa att det i genomsnitt går  $53 \pm 30$  (SD) minuter från bröstkirurgin tills provet placeras i konserverande lösning. Genom-

**TABELL I.** Antal patienter inkluderade i SCAN-B på de olika medverkande sjukhusen från respektive startdatum till och med 31 augusti 2013. Antalet insamlade vävnadsprov inom parentes.

Sjukhus	Startdatum	2010	2011	2012	2013	Totalt	Andel prov, procent
Halmstad	2010-10-01	27 (17)	191 (122)	121 (93)	114 (71)	453 (303)	67
Helsingborg	2010-11-01	36 (27)	240 (192)	215 (166)	161 (123)	652 (508)	78
Karlskrona	2010-10-04	38 (24)	142 (106)	120 (80)	86 (63)	386 (273)	71
Kristianstad	2010-09-15	48 (29)	189 (165)	212 (187)	166 (126)	615 (507)	82
Lund	2010-11-10	30 (12)	184 (143)	166 (148)	148 (129)	528 (432)	82
Malmö	2010-08-30	97 (65)	268 (177)	283 (194)	236 (138)	884 (574)	65
Växjö	2010-10-01	40 (27)	142 (99)	163 (114)	116 (92)	461 (332)	72
Totalt		316 (201)	1356 (1004)	1280 (982)	1027 (742)	3979 (2929)	74

snittlig vikt för tumörprovet är 86 ±80 mg. Klinisk och patologisk information hämtas från bröstcancerkvalitetsregistret INCA. Alla patientbundna data hanteras konfidentiellt och kodat enligt gällande regelverk.

Hittills har >2800 tumörprov bearbetats för isolering av RNA och DNA. Fokus ligger initialt på heltranskriptom-sekvensering (mRNA-seq) med användning av Illumina Hi-Seq 2000-djupsekvenseringsmaskiner. Minst 1 µg av högkvalitativ total-RNA kan isoleras från 95 procent av proven. Med mRNA-seq får vi kvantitativa genuttrycksprofiler som är lika reproducerbara och mer känsliga än genchipbaserade metoder för genuttrycksprofilering. Dessutom överträffar mRNA-seq genchipbaserade metoder eftersom den även rapporterar sekvensvarianter (tex genmutationer), splitsningsvarianter och fusionstranskript. Vi planerar att i framtiden integrera DNA-sekvenserings-, DNA-kopietals-, metylerings- och andra molekylära analyser i SCAN-B-rutinen.

### Implementering av SCAN-B i sjukvården

SCAN-B är ett långsiktigt projekt med målsättningen att stegvis närma sig klinisk användning. Nya och tidigare identifierade biomarkörer kan inom SCAN-B valideras i oberoende serier av populationsbaserade fall från den kontinuerligt allt större provbasen. Provanter och analyser anpassas så att resultat framöver kan rapporteras till behandlande läkare inom en rimlig tidsram. Processen från upptäckt till kliniskt införande av nya biomarkörer kan därmed göras kortare.

Med de deltagande enheterna kommer SCAN-B att under många år samla in en mycket stor populationsbaserad bröstcancerserie, uppskattningsvis över 1 200 nya fall per år. Under 2014 kommer vi att ha tillgång till mer än 5 000 tumörer som analyserats med samma tekniker. Med denna samling möjliggörs åtskilliga typer av delstudier med tillräckligt underlag ock utveckling av markörer för klassificering av bröstcancer i förfinade biologiska undergrupper för prognosbedömning och behandlingsprediktion. Vi kommer även att identifiera kvinnor som bör erbjudas cancergenetisk vägledning och

mutationsanalys av BRCA1 och BRCA2, de dominerande ärftliga bröstcancer-generna där vi redan vet att speciellt omhändertagande har betydelse för utfallet.

Ett projekt som påbörjats är att utveckla mRNA-sekvenseringsbaserad kvantifiering av de biomarkörer (ER, PgR, HER2, Ki67 och histologisk grad) som används kliniskt i dag. Avsikten är även att genomföra riktade terapistudier på speciella grupper av patienter, vilket kommer att vara en central del i valideringen och utvecklingen av nya kliniskt användbara biomarkörer. Vi hoppas att dessa och framtida resultat från SCAN-B kan komplettera befintliga kliniska och patologiska utvärderingar och bli ytterligare en del av våra samlade resurser i arbetet med att bota och behandla bröstcancer.

Under hösten 2013 utökades projektet i och med att Akademiska sjukhuset i Uppsala gått med och varje vecka skickar tumörprov för analys till Lund. Vi vill framföra en öppen inbjudan också till andra sjukhus i Sverige och övriga nordiska länder att gå med i SCAN-B-nätverket. SCAN-B kan också stå som modell för liknande translationella projekt för andra cancerformer och sjukdomar.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

■ *SCAN-B-projektet har kunnat genomföras tack vare medverkan av medarbetare vid deltagande sjukhus, avdelningen för onkologi vid Lunds universitet, Sydsvenska bröstcancergruppen och, framför allt, patienterna. Följande personer har bidragit till rapportens tillkomst: Lao H Saal, Lund; Dorthe Grabau, Lund; Cecilia Hegardt, Lund, Jonas Manjer, Malmö; Christer Larsson, Lund; Martin Malmberg, Helsingborg; Lisa Rydén, Lund; Åke Borg, Lund (samtliga medlemmar i SCAN-B:s styrgrupp); Johan Vallon-Christersson, Lund; Jari Häkkinen, Lund; Janne Malina, Malmö (medarbetare i SCAN-B).*

■ *Forskningsbidrag har erhållits från fru Berta Kamprads stiftelse.*

### REFERENSER

1. Socialstyrelsen. Socialstyrelsens statistikdatabas för cancer. 2012.
2. Socialstyrelsen. Öppna jämförelser av cancervårdens kvalitet och effektivitet. Jämförelser mellan landsting 2011. Stockholm: Socialstyrelsen; 2011. Artikelnr 2011-8-1.
3. Brenner H, Hakulinen T. Very-long-term survival rates of patients with cancer. *J Clin Oncol.* 2002;20(21):4405-9.
4. Dodwell D, Thorpe H, Coleman R. Refining systemic therapy for early breast cancer: difficulties with subtraction. *Lancet Oncol.* 2009;10(8):738-9.
5. Gordon L, Scuffham P, Hayes S, et al. Exploring the economic impact of breast cancers during the 18 months following diagnosis. *Psychooncology.* 2007;16(12):1130-9.
6. Armstrong K. Can genomics bend the cost curve? *JAMA.* 2012;307(10):1031-2.
7. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002;347(25):1999-2009.
8. Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(27):2817-26.
9. Ahmed AA, Brenton JD. Microarrays and breast cancer clinical studies: forgetting what we have not yet learnt. *Breast Cancer Res.* 2005;7(3):96-9.
10. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2006;59(3):225-31.
11. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
12. Saal LH, Troein C, Vallon-Christersson J, et al. BioArray Software Environment (BASE): a platform for comprehensive management and analysis of microarray data. *Genome Biol.* 2002;3(8):SOFTWARE0003.
13. Vallon-Christersson J, Nordborg N, Svensson M, et al. BASE - 2nd generation software for microarray data management and analysis. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:330.

### SUMMARY

Although the prognosis of early breast cancer has improved significantly during the preceding decades, today's biomarkers that are used to assign patient to different treatments are insufficient. Many patients receive adjuvant treatment when in fact they are cured by surgery alone, and others recur in spite of having had what we consider today to be appropriate treatment. The SCAN-B initiative is a collaborative effort of physicians, nurses and researchers whose aim is to systematically collect patient material and perform genomic analyses in order to identify and implement new clinically useful biomarkers in the treatment of breast cancer. Patients are prospectively and consecutively offered to contribute in the study throughout the South Swedish health care region. Blood, tissue and follow-up data is collected in parallel with clinical care taking.