

Ki-67 och cyklin A – prognostiska faktorer vid bröstcancer

Dags att införa proliferationsmarkörer i klinisk rutin



CECILIA AHLIN, med dr, specialläkare, gynekologiska kliniken, Universitetssjukhuset, Örebro

ahlins.post@telia.com

MÄRTEN FERNÖ, professor, institutionen för kliniska vetenskaper, avdelningen för onkologi, Lunds universitet

ROSE-MARIE AMINI, docent, biträdande överläkare, avdelningen för patologi och cytologi, Karolinska universitetssjukhuset, Stockholm

EGLE TOLOCKIENE, överläkare, klinisk patologi/cytologi, Norr-

lands universitets-sjukhus, Umeå

CARL BLOMQVIST, professor, överläkare, institutionen för onkologi, radiologi och klinisk immunologi, Uppsala universitet

JONAS BERGH, professor, överläkare, institutionen för onkologi-patologi, Karolinska institutet, Stockholm

MARIE-LOUISE FJÄLLSKOG, docent, överläkare, institutionen för onkologi, radiologi och klinisk immunologi, Uppsala universitet

I Sverige drabbas cirka 7 000 patienter årligen av bröstcancer, vilket motsvarar 15–20 kvinnor varje dag. Tack vare införandet av mammografiscreeningen, ökad medvetenhet om sjukdomen hos allmänheten och effektiva tilläggsbehandlingar som strålbehandling, antikroppsbasead behandling, cytotatika och antihormonell terapi har dödligheten reducerats avsevärt. Trots detta dör cirka 1 500 kvinnor av sin bröstcancer varje år.

För att avgöra vilka kvinnor som har nytta av adjuvant behandling använder man sig av prognostiska faktorer. En prognostisk faktor ger information om risken för återfall utan tilläggsbehandling. Med hjälp av dessa faktorer skiljs patienter med högre risk för återfall från dem med låg risk, där adjuvant behandling kan begränsas. Behovet av bättre prognostiska faktorer är i dag stort. Ännu större är emellertid behovet av behandlingspredikativa markörer, framför allt i den lymfkörtelnegativa gruppen där överbehandling med cytotatika är mest markant.

Införandet av proliferationsmarkörer som prognostiska faktorer vid val av adjuvant behandling har varit föremål för diskussion både nationellt och internationellt under senare år. En nyhet är att både 2009 års konsensuskonferens i S:t Gallen och Svenska bröstcancergruppen (SweBCG) anser att proliferationsmarkörerna Ki-67 och cyklin A är prognostiska faktorer vid bröstcancer. De faktorer som i dag är internationellt etablerade och som rekommenderas i riktlinjerna från S:t Gallen är ålder, tumörstorlek, axillärt lymfkörtelstatus, progesteron (PgR) och östrogenreceptorer (ER), histologisk grad (NHG) enligt Nottingham, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), Ki-67 och kärlinväxt (Fakta 1) [1]. De svenska rekommendationerna är i linje med dem från S:t Gallen.

Proliferation

Hos friska celler är celledningen noggrant reglerad och består av flera faser. I den första fasen (G_1) växer cellen och blir större. När den nått en viss storlek går den in i nästa fas, DNA-syntesfasen (S-fasen). Här fördubblas arvsmassan (DNA-replikation)

■ fakta 1

Prognostiska faktorer enligt riktlinjer från S:t Gallen

- Ålder
- Tumörstorlek
- Axillärt lymfkörtelstatus
- PgR
- ER
- NHG
- HER2
- Ki-67
- Kärlinväxt

så att en kopia bildas av varje kromosom. Under nästa fas (G_2) kontrollerar cellen att DNA-replikationen har utförts felfritt och förbereder sig för delning. Kromosomerna separeras i mitosfasen (M), och cellen delar sig sedan i två dotterceller. Genom denna mekanism får dottercellerna exakt samma kromosomuppsättning som modercellen. Efter delningen är cellerna tillbaka i G_1 -fasen och cellcykeln är fullbordad.

Om cellcykelns normala regleringsmekanismer sätts ur spel kan det i många fall ge upphov till cancer. Att kunna bedöma tumörers proliferationshastighet har därför kommit att spela en alltmer central roll vid bedömningen av vilka tumörer som har nytta av olika tilläggsbehandlingar, till exempel cytotatika. Ki-67 och cyklin A är proteiner som uttrycks i olika faser av cellcykeln. Ki-67 uttrycks i alla tillväxtceller under sena G_1 -, S-, M- och G_2 -faserna av cellcykeln, medan celler i G_0 (vilofasen) saknar Ki-67-antigen.

Cykliner binder till cyklinberoende kinas (cyclin dependent kinase, CDK). Tillsammans driver CDK-molekyler och cykliner cellen från den ena fasen i cellcykeln till nästa. Cyklin A bildar komplex med CDK2 och är aktivt i S-fasen. Cyklin B bildar komplex med CDK1 och är aktivt i faserna G_2 -M. Cyklin E bildar komplex med CDK2 och finns framför allt i sen G_1 -fas eller tidig S-fas.

Proliferation som prognostisk faktor vid bröstcancer

Proliferationsaktiviteten i en bröstcancertumör kan mätas med flera olika metoder:

- flödescytometri (undersökning av den procentuella andelen celler i S-fasen)

■ sammanfattat

Bröstcancer är i dag den vanligaste cancerformen hos kvinnor.

Proliferationsmarkörer har i flera studier visat sig ha både ett prognostiskt och ett prediktivt värde vid val av cytotatika.

Både Svenska bröstcancergruppen (SweBCG) och konsensuskonferensen i S:t Gallen anser att en proliferations-

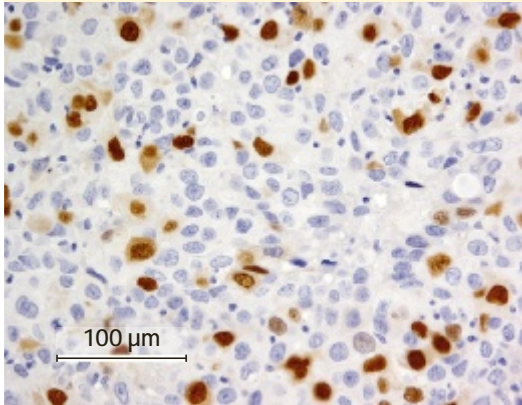
markör ska ligga till grund för val av adjuvant behandling efter bröstcanceroperation.

Cyklin A och Ki-67 har i vetenskapliga studier visat sig ha ett prognostiskt värde, hög reproducerbarhet och definierade beslutsgränser som skiljer hög proliferation från låg.

■ fakta 2

Proliferationsmarkörer

- S-fas
- MI (mitotiskt index)
- Ki-67
- Cyklin A
- (Genexpressionsanalys)



Figur 1. IHC-färgning för cyklin A, brun kärna = positiv, blå kärna = negativ.

- mitosaktivitet (manuell räkning i mikroskop av antalet mitoser)
- immunhistokemisk färgning (IHC-färgning) (Figur 1) med hjälp av antikroppar riktade mot proteiner som är aktiva under olika delar av cellcykeln (Ki-67, cyklin A) (Fakta 2).

Den prognostiska betydelsen av de olika proliferationsmarkörerna har undersökts i ett flertal studier av bröstcancer. Sammanfattningsvis kan man konstatera att samtliga faktorer har visat sig ha en prognostisk betydelse för både total överlevnad och metastasfri överlevnad hos patienterna [2-6]. Studiernas svagheter har varit brister vid standardiseringen av metodologi, vid valet av antikropp samt vid avläsning och bedömning. Studierna har också varit små och haft oklara brytpunkter (cut-off, det värde som bäst separerade en högriskgrupp från en lågriskgrupp).

Vid 2009 års konsensuskonferens i St Gallen diskuterades återigen proliferationsmarkörernas roll som prognostiska faktorer vid bröstcancer. Diskussionen resulterade i att Ki-67 nu anses vara en prognostisk faktor och att Ki-67-värdet rekommenderas ligga till grund för bedömningen av vilka bröstcancerpatienter som har nytta av adjuvant behandling [1]. Denna rekommendation är i linje med rekommendationerna från Svenska bröstcancergruppen, där både Ki-67 och cyklin A bedöms kunna användas vid val av adjuvant behandling. På senare år har intresset för så kallade genexpressionsanalyser av bröstcancertumörer ökat markant. Sammanfattningsvis visar resultaten från dessa retrospektiva studier att de gener som kodar för proliferation spelar en avgörande roll för patientens prognos. Speciellt viktigt verkar detta vara för tumörer som är ER-positiva. Resultaten är lovande, men fler studier behövs [7, 8].

Proliferation som prediktiv faktor vid bröstcancer

Proliferationsmarkörer (S-fas och Ki-67) som prediktiva faktorer har studerats framför allt vid metastatisk sjukdom och vid neoadjuvant behandling. I ett flertal studier har man sett

»På senare år har intresset för så kallade genexpressionsanalyser på bröstcancertumörer ökat markant... Resultaten är lovande, men det behövs fler studier.«

ett signifikant förbättrat behandlingssvar på antracyclinbaserad kemoterapi riktad mot tumörer med hög proliferation [9, 10]. Oncotype DX är en genexpressionsanalys med multiparametrar som i flera studier visat sig ha ett prediktivt värde hos patienter med körtelnegativ eller hormonreceptorpositiv bröstcancer och som behandlas med tamoxifen. Utifrån testresultatet kan man avgöra vilka patienter som har nytta av cytostatikatillägg [11]. Genexpressionsanalyser har även studerats i den neoadjuvanta situationen. Resultaten talar för att patienter med höga testresultat har mest glädje av neoadjuvant kemoterapi [12].

Svenska erfarenheter av Ki-67 och cyklin A

Ki-67. Den prognostiska betydelsen av Ki-67 har studerats i ett flertal retrospektiva studier både internationellt och nationellt. År 2007 publicerades en översiktsartikel av Azambuja et al [3]. Resultaten av deras metaanalys visar att Ki-67 är en prognostisk faktor för både lymfkörtelpositiva och lymfkörtelnegativa patienter. Ki-67 har även analyserats på ett material från Lund där totalt 200 premenopausala patienter med lymfkörtelnegativ bröstcancer studerades. Majoriteten av dessa patienter fick aldrig någon adjuvant systembehandling. Resultaten från denna studie visar att ER-positiva patienter och patienter med NHG II-tumörer kan delas upp i två undergrupper, lågt respektive högt Ki-67. Det fanns en signifikant skillnad avseende MFS (metastasis-free survival, på svenska sjukdomsfri överlevnad) mellan de två grupperna [13]. I majoriteten av de studier som undersökt Ki-67:s prognostiska värde har valet av antikropp, metodologi och brytpunkt varierat. Samma avsaknad av överensstämmelse finns även vid de patologikliniker i landet där Ki-67 i dag används rutinmässigt.

År 2007 publicerades ett arbete där syftet var att försöka hitta den mest optimala brytpunkten för Ki-67 (och cyklin A). Totalt undersöktes 570 patienter med lymfkörtelnegativ bröstcancer (T1-4N0-1M0) på vävnadsmikromatris (tissue microarray, TMA) (Fakta 3). Sammanfattningsvis visade resultaten att den mest optimala brytpunkten för Ki-67:s medelvärde låg på 15 procent (RR=2,8, 95 procent CI:1,4-5,5) och för hot spot-området 22 procent (RR=2,9, 95 procent CI:1,5-5,6) [14].

För några år sedan utfördes även en undersökning av reproducerbarheten i Sverige. Elva fall skickades på TMA till 21 avdelningar. Inga direktiv gavs, utan de skulle göra egen infärgning och bedömning. När det gällde förbehandling och antikroppsspädning var variationen stor mellan avdelningarna. Samstämmigheten var bättre när det gällde val av antikropp

■ fakta 3

Vävnadsmikromatris (TMA)

- 0,6-2 mm biopsier
- Tillåter bedömning av flera tumörer samtidigt

- Kostnads- och tidsbesparande
- RNA-, DNA- och protein-nivå



TMA-klossar och glas.

TABELL 1. För- och nackdelar med olika sätt att mäta proliferation.

	Fördelar	Nackdelar
S-fas	Många cellkärnor räknas, vilket ger god statistisk säkerhet	Kräver färskt material Tillblandning av benigna celler och kärndébris Måttlig reproducerbarhet [18]
MI (NHG)	Används rutinmässigt vid Elston-gradering Görs på paraffinbäddat material	Kräver van patolog Måttlig reproducerbarhet [19] Kan ej bedömas i finnålsaspirat
Ki-67	IHC-färgning på paraffinbäddat material God reproducerbarhet Kan bedömas i finnålsaspirat	Avsaknad av internationellt accepterad brytpunkt
Cyklin A	IHC-färgning på paraffinbäddat material God reproducerbarhet [16]. Kan bedömas i finnålsaspirat	Avsaknad av internationellt accepterad brytpunkt

»Cyklin A och Ki-67 har i vetenskapliga studier visat sig ha ett prognostisk värde, hög reproducerbarhet och definierade brytpunkter som skiljer hög proliferation från låg.«

och om färgmaskin använts eller inte. Bedömningen varierade också: hot spot eller inte, antal synfält, val av beslutsgräns och sättet att svara (i exakta procenttal eller i 3–5 grupper). För att kunna jämföra resultaten av de utskickade proven rangordnades de inom varje avdelning. Trots variationerna visade resultaten en god överensstämmelse med medelkappa = 0,70 [Fernö M; opublicerade data].

Cyklin A. Liksom Ki-67 har cyklin A i ett flertal studier visat sig ha ett prognostiskt värde vid analys av bröstcercertumörer. Majoriteten av dessa studier har dock varit små, och patientmaterialen har varit heterogena på så sätt att lymfkörtelpositiva och lymfkörtelnegativa patienter har blandats. En del patienter hade också fått adjuvant systembehandling med cytostatika.

För att närmare undersöka cyklin A:s prognostiska roll vid lymfkörtelnegativ bröstcancer designade vi en fall-kontrollstudie. Fallen gällde kvinnor som dött i bröstcancer, och kontrollerna var kvinnor som var friska från sin bröstcancer vid den aktuella tidpunkten. Totalt inkluderades 190 fall och 190 kontroller från Uppsala-Örebroregionen. Alla patienter hade tumörer ≤5 cm (T1–2), alla saknade lymfkörtelmetastaser och ingen hade fått adjuvant cytostatikabehandling.

Resultaten visar en statistiskt signifikant korrelation mellan cyklin A, Ki-67 och död i bröstcancer (oddskvoter, OR):

- Cyklin A – medel-OR = 2,7 (95 procents CI: 1,7–4,3)
- Cyklin A – hot spot-OR = 3,4 (95 procents CI: 2,1–5,5)
- Ki-67 – medel-OR = 1,9 (95 procents CI: 1,2–3,1)
- Ki-67 – hot spot-OR = 1,7 (95 procents CI: 1,1–2,7)

Slutsatsen från denna studie är att cyklin A är en minst lika bra prognostisk faktor som Ki-67 i denna grupp av patienter [15].

Reproducerbarheten och bestämning av den mest optimala brytpunkten för TMA har också undersökts av flera oberoende bedömare. Reproducerbarheten var bra, med kappavärden mellan 0,71 (hot spot-område) och 0,87 (medelvärde) [16], och med den mest optimala brytpunkten för cyklin A på den 70:e percentilen. Detta motsvarar ett medelvärde på 8 procent (RR = 2,4; 95 procents CI: 1,2–4,9) och ett hot spotvärde på 11

procent (RR = 2,6; 95 procents CI: 1,3–5,1) [15]. Dessa brytpunkter är i linje med tidigare publicerade resultat där man bland annat använt sig av medelvärdet, medianvärdet eller det värde som motsvarar NHG III [4, 17].

Analys och bedömning av Ki-67 och cyklin A

Vid införandet av nya metoder och vid bedömning av redan etablerade är det av största vikt ur kvalitetssynpunkt att analyserna och bedömningarna utförs likartat. Nedan följer några rekommendationer:

- IHC-färgningsmetod på formalinfixerat och paraffinbäddat material.
- Standardisering avseende val av primär antikropp, fixeringstid, val av buffertlösning och hur bedömningen ska göras enligt rekommendationer från KVASt-gruppen (Svensk förening för patologi).
- Minst 200 tumörceller inom ett definierat hot spot-område ska räknas.
- Regelbundna reproducerbarhetsundersökningar.

Slutsatser

Proliferationsmarkörer vid bröstcancer har visat sig ha ett prognostiskt värde vid både lymfkörtelnegativ och lymfkörtelpositiv sjukdom. Vid 2009 års konsensuskonferens i St Gallen beslöt man att en proliferationsmarkör ska ligga till grund för bedömningen av vilka bröstcancerpatienter som har nytta av adjuvant behandling. Flera studier talar även för att proliferation har ett prediktivt värde vid val av cytostatika.

Cyklin A och Ki-67 har i vetenskapliga studier visat sig ha ett prognostiskt värde, hög reproducerbarhet och definierade brytpunkter som skiljer hög proliferation från låg. Detta sammantaget med de metodologiska och bedömningsmässiga fördelarna gör att proliferationsmarkörer nu rekommenderas av Svenska bröstcancergruppen som prognostiska faktorer vid bröstcancer.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

■ *Överläkare Dorthe Grabau, avdelningen för klinisk patologi, Lunds universitetssjukhus, har medverkat med kommentarer i samband med manusskrivandet.*

■ *Medlemmarna i Cancerfondens planeringsgrupp har medverkat i diskussioner i samband med initiativtagandet till artikeln.*

Kommentera denna artikel på Lakartidningen.se

REFERENSER

1. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*. 2009;20(8):1319-29.
2. van Diest PJ, van der Wall E, Baak JP. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol*. 2004;57(7):675-81.
3. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq, V et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1504-13.
4. Kühling H, Alm P, Olsson H, Fernö M, Baldetorp B, Parwaresch R, et al. Expression of cyclins E, A, and B, and prognosis in lymph node-negative breast cancer. *J Pathol*. 2003;199(4):24-31.
5. Bukholm IR, Bukholm G, Nesland JM. Over-expression of cyclin A is highly associated with early relapse and reduced survival in patients with primary breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2001;93(2):283-7.
6. Baldini E, Camerini A, Sgambato A, Prochilo T, Capodanno A, Pasqualetti F, et al. Cyclin A and E2F1 overexpression correlate with reduced disease-free survival in node-negative breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2006;26(6B):4415-21.
7. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res*. 2008;10(4):R65.
8. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buysse M, Larsimont D, Bontempi G, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5158-65.
9. Rozan S, Vincent-Salomon A, Zafarani B, Validire P, De Cremoux P, Bernoux A, et al. No significant predictive value of c-erbB-2 or p53 expression regarding sensitivity to primary chemotherapy or radiotherapy in breast cancer. *Int J Cancer*. 1998;79(1):27-33.
10. Hietanen P, Blomqvist C, Wasenius VM, Niskanen E, Franssila K, Nordling S. Do DNA ploidy and S-phase fraction in primary tumours predict the response to chemotherapy in metastatic breast cancer? *Br J Cancer*. 1995;71(5):1029-32.
11. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(23):3726-34.
12. Gianni L, Zambetti M, Clark K, Baker J, Cronin M, Wu J et al. Gene expression profiles in paraffin-embedded core biopsy tissue predict response to chemotherapy in women with locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23(29):7265-77.
13. Klintman M, Bendahl PO, Grabau D, Lövgren K, Malmström P, Fernö M. Is the prognostic value of Ki-67 dependent on er status and histological grade? *Cancer Res*. 2009;69(2 Suppl):Abstract nr 1076.
14. Ahlin C, Aaltonen K, Amini RM, Nevanlinna H, Fjällskog ML, Blomqvist C. Ki67 and cyclin A as prognostic factors in early breast cancer. What are the optimal cut-off values? *Histopathology*. 2007;51(4):491-8.
15. Ahlin C, Wenjing Z, Holmqvist M, Holmberg L, Nilsson C, Jirström K, et al. Cyclin A is a proliferative marker with good prognostic ability in node negative breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:2501-6.
16. Aaltonen K, Ahlin C, Amini RM, Salonen L, Fjällskog ML, Heikkilä P, et al. Reliability of cyclin A assessment on tissue microarrays in breast cancer compared to conventional histological slides. *Br J Cancer*. 2006;94(11):1697-702.
17. Poikonen P, Sjöström J, Amini RM, Villman K, Ahlgren J, Blomqvist C. Cyclin A as a marker for prognosis and chemotherapy response in advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93(5):515-9.
18. Baldetorp B, Bendahl PO, Fernö M, Stål O. Improved DNA flow cytometric, DNA ploidy, and S-phase reproducibility between 15 laboratories in analysis of breast cancer using generalized guidelines. *Cytometry A*. 2003;56(1):1-7.
19. Boiesen P, Bendahl PO, Anagnostaki L, Domanski H, Holm E, Idvall I, et al. Histologic grading in breast cancer – reproducibility between seven pathologic departments. *South Sweden Breast Cancer Group. Acta Oncol*. 2000;39(1):41-5.