

Полногеномные исследования в онкологии

**Зав. отделом эпидемиологии и профилактики
НИИ канцерогенеза
ФГБУ “РОНЦ им. Н.Н.Блохина” Минздрава РФ**

**Приглашенный профессор Оксфордского Университета
Президент Противоракового общества России**

чл.- корр. РАН Д. Г. Заридзе

Основные доказанные факторы риска злокачественных опухолей

Факторы окружающей среды

- *Курение*
- *Инфекционные агенты*
- *Избыточный вес*
- *Низкая физическая активность*
- *Питание*
- *Экзогенные гормоны*
- *Репродуктивный анамнез*
- *Потребление алкоголя*
- *Ультрафиолетовое излучение*
- *Ионизирующее излучение*

Наследственность

- *Герминогенные мутации с высокой пенетрацией*
- *Генетический полиморфизм с низкой пенетрацией*

Герминогенные мутации с высокой пенетрацией (*Rb, APC, HMLH1, VHL, TP53, BRCA1, BRCA2*)

- ❑ очень высокий риск развития рака (кумулятивный риск может достигать 100%).
- ❑ встречаемость очень низкая (10^{-4})
- ❑ доля злокачественных опухолей в результате герминогенных мутаций низкая (3–4%).
- ❑ у индивидов с герминогенными мутациями факторы окружающей среды и образа жизни не влияют на риск
- ❑ они имеют моногенную этиологию

Генетический полиморфизм с низкой пенетрацией

- ❑ Наиболее распространенным тип полиморфизма – **однонуклеотидный полиморфизм** (Single nucleotide polymorphisms- SNPs).
- ❑ Частота встречаемости SNPs < 1%.
- ❑ Риск развития рака, связанный с этим типом наследственности не высок (<1,5).
- ❑ Большинство опухолей развиваются в результате комбинированного эффекта большого числа аллельных вариантов, разбросанных по всему геному т. е. имеют **полигенную** этиологию
- ❑ в их развитии важную роль играют внешние факторы.

Исследования, основанные на гипотезе *Candidate gene studies*

Изучаемые гены (не более 2-3) выбираются на основании знаний об их функции, на основании гипотезы о возможной связи полиморфизма этих генов с риском развития рака.

Этот тип исследований не дал убедительных результатов.

Подавляющее большинство полученных результатов не воспроизведены в других аналогичных работах и, скорее всего, *ложно положительны*.

Неудачи этих исследований можно объяснить:

- *малым числом наблюдений,*
- *отсутствием информации о факторах риска,*
- *неоправданной надеждой выявить аллельные варианты с выраженным эффектом ($OR > 2.0$)*

Полногеномные исследования

Genome-Wide Association Studies (GWAS)

Новая платформа для открытия аллельных вариантов, влияющих на предрасположенность к развитию злокачественных опухолей.

- Этот метод позволяет без предварительной гипотезы одновременно анализировать несколько сотен тысяч аллельных вариантов (более 1 000 000 SNPs) во многих тысячах образцах
- Идентификация геномных вариантов, влияющих на риск развития заболевания, на основании сканирования всего генома значительно ускорит процесс открытия генов, предрасполагающих к развитию различных форм рака
- Позволит оценить влияние факторов окружающей среды на риск развития рака и модификацию этого эффекта в зависимости от генетических вариантов(генотипа)

В докладе представлены результаты многоцентровых молекулярно - эпидемиологического исследования рака легкого, верхних дыхательных и пищеварительных органов (ВДПО) и почки, которое проводится совместно с

Международным агентством по изучению рака (МАИР)

Международным консорциумом

«Геном злокачественных опухолей»

Многоцентровые исследования являются принятым «инструментом» для получения воспроизводимых результатов, отражающих изучаемый биологический и молекулярный механизм.

Полногеномное исследование рака легкого

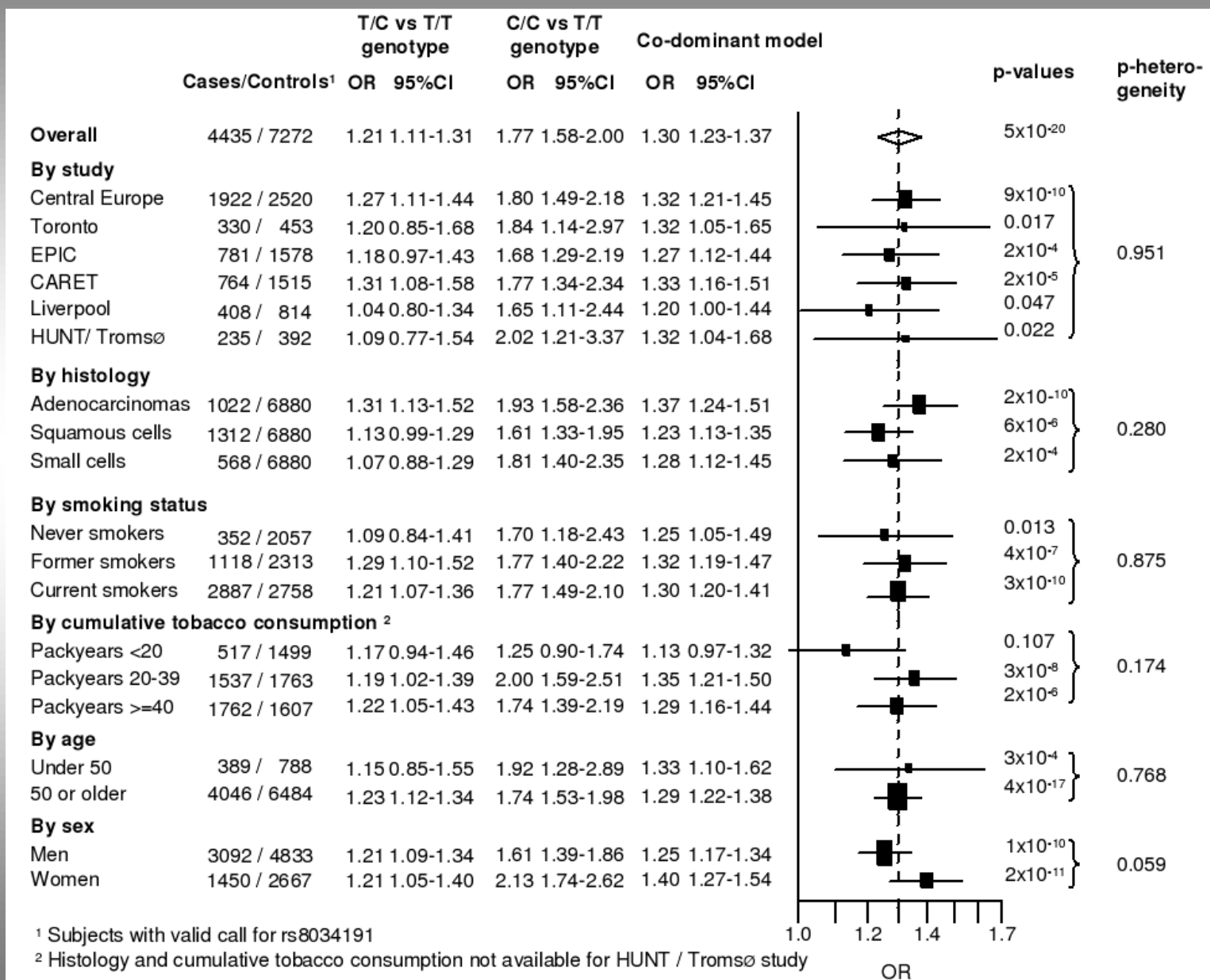
(Hung et al, Nature, 10, 633-37, 2008).

- В рамках международного многоцентрового исследования рака легкого проведен анализ генома 4435 больных раком легкого и 7272 здоровых людей.
- Для генотипирования использовался *ILLUMINA Sentrix HumanMap300 Bead Chip*, содержащий 317139 SNPs (около 80% всех часто встречающихся геномных вариантов).
- В результате были идентифицированы участки генома, содержащие варианты SNPs, которые значительно чаще встречались у больных раком легкого, чем у здоровых людей.

Связь между однонуклеотидным полиморфизмом (SNPs) и риском рака легкого.

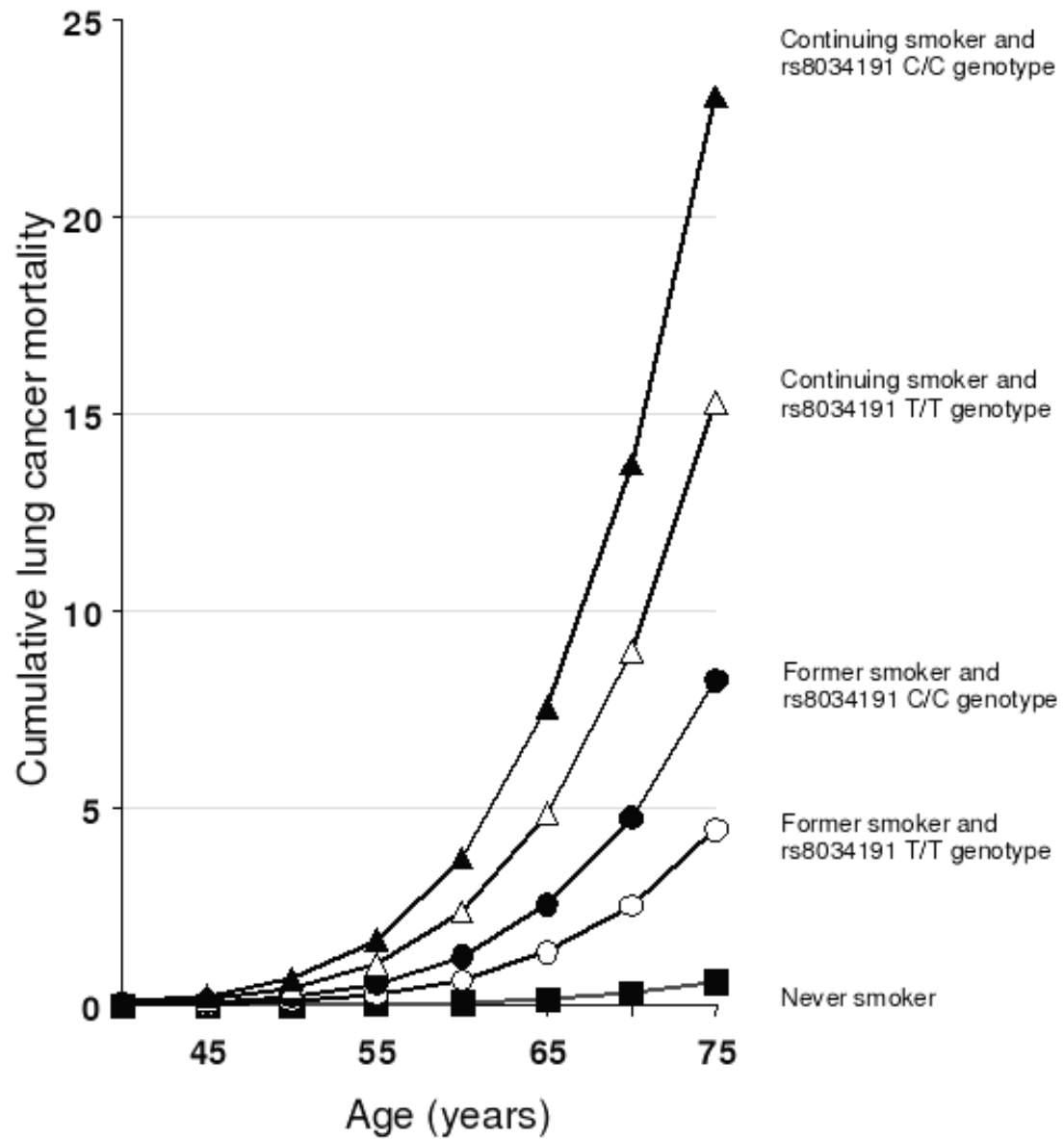
- Первый участок расположен на длинном плече хромосомы 15 (15q25). Ассоциация с риском была наиболее выражена для двух SNPs (rs1051730, rs8034191). Риск развития рака легкого наиболее высок у лиц гомозигот (C/C) по rs8034191.
- На идентифицированном участке хромосомы 15q25 расположены несколько генов, а именно, гены ацетилхолиновых рецепторов никотина (CHRNA2, CHRNA3, CHRNA4), которые взаимодействуют с никотином и другими токсинами, содержащимися в табачном дыме.

Относительный риск рака легкого в зависимости от полиморфизма rs8034191, расположенном на длинном плече хромосомы 15 (15q25)



¹ Subjects with valid call for rs8034191

² Histology and cumulative tobacco consumption not available for HUNT / Tromsø study



В двух полногеномных исследованиях выявлена связь между полиморфизмом (rs16969968) на участке расположенном на хромосоме 15q25 и риском развития рака ВДПО (OR=1,22, 95% CI 1,12-1,34) (Chen D et al, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 20, 658-664, 2011)

Этот вариант полиморфизма обнаружен и у интенсивно курящих индивидов (*Lips et al, 2010*). В связи с этим дискутируется вопрос о том, является ли этот полиморфизм предрасполагающим к **никотиновой зависимости** или к раку легкого и раку ВДПО

Связь между однонуклеотидный полиморфизм (SNPs) с риском рака легкого (*Nature Genetics*, 2010).

- Второй участок расположен на коротком плече хромосомы 5 (5p15), который содержит два SNPs высокого риска. У индивидов гетерозиготных и гомозиготных по этим SNPs повышен риск развития рака легкого. Однако величины ОР ниже, чем для SNPs, расположенных на длинном плече хромосоме 15.
- Лocus 5p15 содержит ген hTERT, который регулирует образование теломеразы и поддерживает сохранность теломеров.

Редкий вариант *BRCA2* повышает риск рака легкого

В результате генотипирования 10 246 образцов рака легкого и 38 295 контрольных образцов

+мета-анализ 4 полногеномных исследований больных раком легкого (11348) и контрольных лиц (15861) было выявлено, что

:

полиморфный локус *BRCA2* (rs11571833) ассоциирован с повышенным риском рака легкого

ОР плоскоклеточного рака = 2,47, P = 4,74 × 10⁽⁻²⁰⁾

ОР аденокарциномы = 1,47, p=10⁻²⁰

- Wang et al, Nature Genetics 46, 736-741, 2014

Редкий вариант *BRCA2* повышает риск рака ВДПО (*Delahaye-Sourdeix et al., JNCI, 2015*)

Генотипирование¹ rs11571833 в образцах **5942** плоскоклеточного рака ВДПО и **8086** контрольных образцов показало, что этот редкий вариант *BRCA2* (rs1157183) повышает риск рака ВДПО

ОР=2.53 (95% ДИ 1.89-3.38, $p=3 \times 10^{-10}$)

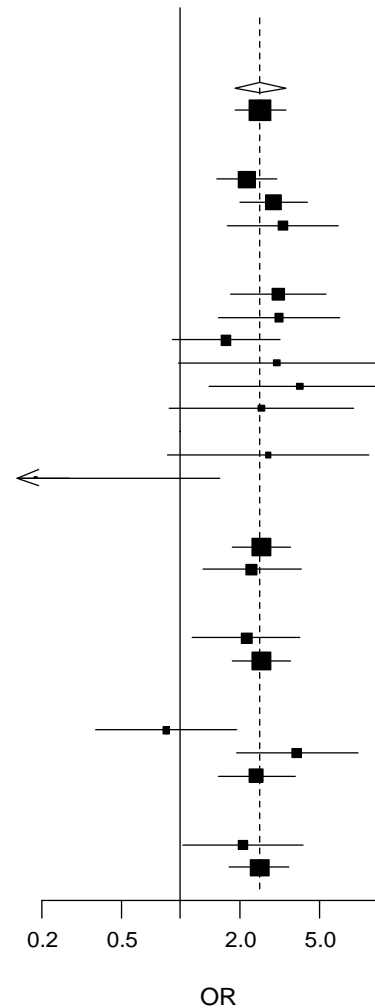
Связь более выражена у курильщиков и бросивших курить, чем у никогда не куривших индивидов:

Никогда не курившие	ОР= 0.84 (95%ДИ 0.34-1.93)
Бросившие курить	ОР= 3.86 (95% ДИ 1.91-7.80)
Курильщики	ОР= 2.42 (95% ДИ 1.54-3.50)

Частота гетерозигот по минорному аллелю (Т) rs11571833 <1.

1. TAQMAN (C_27537307_30 Applied Biosystems, Carlsbad, CF)

rs11571833/BRCA2 (T)	ca	co	p	OR	95%CI
Log-Additive	5942	8086	3.5e-10	2.53	1.89- 3.38
Heterozygous	149	75	3.5e-10	2.53	1.89- 3.38
By subgroup (p_het= 0.402)					
Oral/Oropharynx	3086	8086	1.7e-05	2.16	1.52- 3.06
Larynx/Hypopharynx	2195	8086	6.6e-08	2.93	1.98- 4.34
Esophagus	635	8086	3e-04	3.30	1.73- 6.26
By study (p_het= 0.333)					
Arcage	1401	1505	5.3e-05	3.12	1.80- 5.41
Central Europe	741	1652	0.0013	3.14	1.56- 6.31
SA (Latin America)	1493	1207	0.0971	1.69	0.91- 3.16
Rome	309	231	0.0567	3.04	0.97- 9.55
Poland	402	1016	0.0104	4.01	1.39- 11.59
ORC	419	457	0.0856	2.55	0.88- 7.43
Japan	556	1203		NA	
ORC India	401	457	0.0882	2.77	0.86- 8.91
ACTREC India	220	358	0.1222	0.19	0.02- 1.57
By gender (p_het= 0.722)					
Male	4584	5966	4.7e-08	2.58	1.83- 3.62
Female	1358	2120	0.0047	2.28	1.29- 4.04
By age (p_het= 0.643)					
Young (age < 50)	1091	1629	0.0167	2.15	1.15- 4.02
Old	4447	6456	1.1e-07	2.55	1.80- 3.59
By smoking status (p_het= 0.021)					
Never smokers	847	2632	0.6892	0.84	0.37- 1.93
Former smokers	1145	1981	2e-04	3.86	1.91- 7.80
Current smokers	3485	2338	1e-04	2.42	1.54- 3.79
By drinking status (p_het= 0.626)					
Never drinkers	915	1927	0.0391	2.06	1.04- 4.10
Ever drinkers	4614	5141	1.8e-07	2.50	1.77- 3.52



Редкий вариант *BRCA2* повышает риск плоскоклеточного рака легкого и рака ВДПО¹

Известно, что у носителей герминогенных мутации в гене *BRCA 2* значительно повышен риск развития рака молочной железы и яичника.

Редкий вариант *BRCA2* (rs11571833) связан с повышенным риском рака легкого и рака ВДПО

¹ Wang et al, *Nature Genetics* 46, 736-741, 2014

Полногеномное исследование почечно-клеточного рака (ПКР)

*Purdue MP, ... Zaridze D,Matveev V, ...Mukeria A, Shangina O....et al,
Nature Gen, 2010*

Стадия идентификации - 3800 больных (ПКР) и 8500 контрольных лиц
Стадия репликации - 2500 больных и 4900 контрольных лиц

Идентифицирован участок (локус) на хромосоме 2 (2p21)
влияющий на предрасположенность к ПКР.

Локус на 2p21 содержит два аллельных варианта (полиморфизма),
которые повышают риск ПКР (rs7579899 и rs11894252).

На этом участке 2p21 расположен ген *EPAS1*, который кодирует
фактор индуцируемый гипоксией HIF-2 альфа (hypoxia inducible factor).
HIF-2 альфа – ключевой фактор в механизме канцерогенеза с участием
гена *von Hippel-Lindau (VHL)*.

Полногеномное исследование ПКР

(Purdue MP, ... Zaridze D,Matveev V, ...Mukeria A, Shangina O, et al, Nature Genetics, 2010)

Риск ПКР у индивидов с rs7579899 вариантом (на 2p21) полиморфизма повышен только

- у курильщиков (OR=1,3; 95%ДИ 1,1-1,4)
- кутивших в прошлом (OR=1,2; 95%ДИ 1,1-1,3)
- Но не у некурящих (OR=1,0; 95%ДИ 0,9-1,1).

P на гетерогенность =0,003

Это наблюдение указывает на то, что влияние полиморфизма гена *EPAS1* на риск развития ПКР, скорее всего, зависит от фактора курения.

Связь между герминогенным полиморфизмом в гене *VHL* и инактивацией *VHL* в опухолевой ДНК спорадического светлоклеточного рака почки (СКРП)

Moore L, Nickerson ML, Zaridze P, Matveev V et al Von Hippel-Lindau (VHL) Inactivation in Sporadic Clear Cell Renal Cancer: Association with Germline VHL Polymorphism and Etiologic Risk Factors, PLOS genetics, 2011

В СКРП *VHL* инактивирован 88%

77.9% - генетические (соматические мутации, делеции и т.д.)

8.7% - эпигенетические (метилирование)

- Вероятность эпигенетической инактивации *VHL* в опухолевой ДНК СКРП ассоциирована с врожденным (герминогенным) полимофизмом на участке хромосомы 3p , на которой расположен *VHL*.
- У лиц с некоторыми часто встречающимися аллельными вариантами по сравнению с распространенными вариантами вероятность эпигенетической инактивации *VHL* в опухолевой ДНК повышена во много раз.
- Из 10 отобранных информативных единичных нуклеотидных последовательностей (**tag SNPs**) 7 статистически достоверно повышали вероятность эпигенетической инактивации *VHL* в опухоли

<u>SNP</u>	Лок.		(M-)	(M+)	ОР (95%ДИ)
rs 265 318 - 2872	A>C	AA	83%	69%	1,0
		AC	16%	28%	2,7(1,1-6,7)
		CC	0,3%	3%	31,3 (1,3-75; p=0,03)
rs 779805 - Ex1+19	G>A	AA	51%	38%	1,0
		AG	44%	41%	1,2 (0,5-2,8)
		GG	5%	22%	6,0 (1,9-18,9; p=0,002)

Вероятность изменений *VHL* в опухолевой ДНК СК СКРП обратно пропорциональна курению

Относительный риск инактивации *VHL*

Никогда не курил	1,00
Бросил курить	0,70 (95% ДИ 0,37 – 1,31)
Курит	0,56 (95%ДИ 0,32-0,99; p=0,05)
	p тренда = 0,04

Нами впервые выявлено, что частота инактивации *VHL* в опухолевой ДНК СК рака почки зависит от

- врожденного (герминогенного) полиморфизма в локусе, на котором расположен ген *VHL* (на хромосоме 3p),
- факторов образа жизни, в частности курения

Обнаруженные аллельные варианты (SNPs) *VHL* в герминогенном геноме, которые коррелируют с эпигенетическим механизмом соматической инактивации *VHL*, скорее всего, являются маркерами наследственной предрасположенности к эпигенетической альтерации в почке

Молекулярные подтипы СК рака почки

1. СК рак почки с инактивированным *VHL* посредством соматических мутаций (78%)
2. СК рак почки с инактивированным *VHL* посредством ДНК-метилирование (10%) представляет особый биологический тип опухоли и требует дополнительного внимания.
3. СК рак почки с диким типом *VHL* (12%), который чаще встречается у курящих больных, также, скорее всего, представляет особый биологически тип опухоли (отличный от СК рака почки с инактивированным *VHL*) и требует дополнительного внимания и клинического изучения.

Геномная архитектура СКРП¹

В результате секвенирование всего генома опухоли (whole genome sequencing) идентифицированы мутации, которые встречаются в более чем в 6% случаев СКРП.

- Среди молекулярно-генетических маркеров СКРП первое место занимает ген *VHL* (73%), который кодирует субстрат распознающий субъединицу E3 убиквитин-лигазного комплекса, участвующего в деградации HIF транскрипционных факторов.
- В 40% случаев обнаружены мутации гена *PBRM1* (polybromo 1) которые чаще всего ведут к потере белка. Ген *PBRM1* кодирует BAF180 субъединицу ремоделирующего комплекса нуклеосомы и функционирует как опухолевый супрессор, хотя его роль до конца не ясна.
- Ген *VAPB* кодирует BRCA1 ассоциированный белок 1, который является ядерной деубиквитиназой, и делетирован в 12% СКРП. *VAPB* является опухолевым-супрессором и его гиперэкспрессия подавляет пролиферацию, причем эффект зависит от типа клеток.
- В 19% СКРП обнаруживают мутации гена *SETD2*, который кодирует гистон H3K36 метилтрансферазу, и также является опухолевым супрессором.

1. Scelo et al, Genomic landscape of clear cell renal carcinoma, Nat Comm, 2014

Genomic landscape of clear cell renal carcinoma

(Scelo et al, Nat Comm, 2014)

Gene or pathway	Focal adhesion or PI3K	% with events (<i>n</i> = number of sample pairs evaluated)			mRNA expression in tumour compared with normal	P-value
		Non-silent mutations (<i>n</i> = 94) (%)	CNVs (<i>n</i> = 85) (%)	Switch events (<i>n</i> = 36) (%)		
VHL		73.40	73.40	0.00		1.3×10^{-56}
Focal adhesion/PI3K	Yes	58.50	82.97	34.00	Up	2.7×10^{-4}
PBRM1		39.36	72.34	5.32		5.2×10^{-44}
SETD2		19.15	74.47	0.00		1.1×10^{-15}
BAP1		11.70	71.28	20.21		1.9×10^{-9}
ZFHX4		9.57	7.45	0.00		3.8×10^{-7}
CSMD3		8.51	5.32	0.00		8.1×10^{-5}
MTOR	Yes	8.51	6.38	9.57		1.7×10^{-5}
FAT3		7.45	4.26	0.00		7.1×10^{-4}
KDM5C		7.45	9.57	0.00		1.4×10^{-7}
ZNF469		7.45	5.32	0.00		2.6×10^{-3}
ANPEP		6.38	0.00	0.00	Down	6.1×10^{-9}
COL11A1	Yes	6.38	2.13	0.00		1.3×10^{-5}
MLL3		6.38	8.51	12.77		1.2×10^{-3}
NRXN1		6.38	1.06	0.00		6.1×10^{-5}
PIEZO2		6.38	5.32	0.00	Up	1.6×10^{-2}
TRRAP		6.38	9.57	0.00		2.2×10^{-4}
WDFY3		6.38	3.19	0.00		3.3×10^{-4}

- Получены предварительные данные, указывающие на особенности клинического течения и прогноза у больных с различными типами молекулярных изменений. Исследование показало, что соматические мутации в генах *PBRM1* ($p=0,042$) и *SET* ($p=0,014$) чаще встречаются в больших опухолях (T) high tumor grade (Scelo et al, 2014).
- Выявлена ассоциация мутаций в *VAP1* и *mTOR* с ухудшением общей выживаемости. В частности, показано, что мутации в *VAP1* ассоциированы с high tumor grade и плохим прогнозом (Pena-Llopis и соавт, 2012, Kapur и соавт, 2013, Joseph и соавт. 2014).
- Эти данные указывает на актуальность изучения молекулярных маркеров для индивидуальной оценки прогноза и идентификации больных СКРП с высоким риском рецидивов, метастазов и выбора соответствующей стратегии лечения, увеличивающей выживаемость.

Что дальше?

- Нами создан банк данных и биологического материала, в который входят более 2000 подробно аннотированных случаев почечно-клеточного рака и соответствующее число госпитального контроля. Информация о больных раком и контрольных больных включает эпидемиологические и клинические данные.
- От 65% этих больных получены образцы крови и опухоли, которые хранятся в жидком азоте, а также гистологические препараты и парафиновые блоки.
- Больные, которые проживают (ли) в Москве и области нами прослеживаются, как на основании данных канцер-регистра и записей ЗАГС, так и активно. Прослеживание за когортой этих больных будет продолжаться.

- Идентификация наиболее частых мутаций в генах *VHL*, *PBMR1*, *BAP1*, *SETD2*, *BRAF*, *mTOR* в светлоклеточном раке почки;
- Иммуногистохимическое изучение экспрессии белковых продуктов *VHL*, *PBMR1*, *BAP1*, *PTEN*, *p16ink*, *SDHB*.
- Сопоставление данных генетического и иммуногистохимического анализа для выявления корреляции между наличием мутации гена с экспрессией белкового продукта в опухолевых клетках СКРП.
- Проведение сопоставления данных молекулярно-генетического анализа с клиническими характеристиками пациента и эпидемиологическими данными.
- Изучение возможной ассоциации в частоте мутации с выживаемостью и проводимой терапией.
- Идентификация прогностических молекулярных маркеров СКРП.
- Разработка диагностической панели прогностических молекулярных маркеров СКРП.

БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ