

התרומה הקלינית לביצוע ריצוף גנומי נרחב בחולי סרטן הריאה

תקציר:

רקע: במהלך העשור האחרון חל שיפור ניכר בהבנת המסלולים של התא המשפיעים על התפתחותן של שאתות הריאה (Lung tumors). התקדמות זו הובילה לגילוי מגוון מוטציות משפיעות הניתנות לחסימה נקודתית על ידי טיפול תרופתי מכוון מטרה. טיפול מסוג זה מאריך משמעותית את הישרדות החולים ומשפר את איכות חייהם. כשני שלישים משאתות האדנוקרצינומה נושאות מוטציות משפיעות, הכוללות שינויים גנטיים נוספים בעלי יעדי טיפול נוספים מלבד הגנים המקובלים כיום לביור מולקולארי (EGFR) ו-ALK. לאחרונה, מבדקים חדשניים המבוססים על טכנולוגיות ריצוף גנומי נרחב (Next-Generation Sequencing) מאפשרים לאתר יותר מוטציות עם פוטנציאל פעולה בהשוואה לשיטות האבחון המולקולארי הסטנדרטיות המבוססות על אתרי אבחון ממוקדים. עם זאת, ההשפעה הקלינית של איתור רחב של המסלולים אינה ברורה.

מטרות: המטרה המרכזית של המחקר היא לכמת את תרומתו בפועל של ריצוף גנומי נרחב לשינוי האסטרטגיה הטיפולית בסרטן הריאה, בהתחשב במבדקים הקליניים שבוצעו בהתאם להחלטת הרופא המטפל.

שיטות מחקר: נתונים נאספו מתיקים של 50 חולי סרטן ריאה, אשר עברו מבדקי ריצוף נרחב משנת 2011 ואילך, ומצויים במעקב השירות לסרטן הריאה במרכז דוידוף לטרטן. הריצופים הנרחבים בוצעו באמצעות טכנולוגיית Illumina HiSeq 2000 על ידי שימוש בהרכב (פאנל רחב מבוסס Hybrid capture, הדוגם באופן מלא אקסונים של מאות גנים ועשרות אינטרונים המעורבים בפתוגנזה של סרטן).

תוצאות: מתוך 46 מטופלים שעמדו בתנאי ההכללה, נמצאה מוטציה מניעה (אחת או יותר) ב־39 חולים (84.8%) ושינוי החלטה טיפולית התקבל ב־21 חולים (45.7%). מתוכם, 15 מטופלים (37.5%) היו שליליים בביור מולקולארי סטנדרטי וזכו לשינוי טיפולי שלא היה מתקבל אילולא הייתה מתבצעת בדיקת ריצוף העומק. הגנים השכיחים ביותר שכללו שינויים גנטיים הם EGFR (26.1%), KRAS (19.6%), ALK (13%), STK11 (10.9%) ו-RET (8.7%). הריצופים הנרחבים איפשר לאבחן עשרה מטופלים כנשאי שינויים גנטיים בגנים ALK או EGFR, וזאת לאחר שאובחנו באופן שגוי כשליליים במבדקים מולקולאריים אחרים.

דיון: תוצאותינו מדגישות את החשיבות של אפיון מולקולארי באמצעות ריצוף עמוק כבדיקה אבחונית בחולים הלוקים בסרטן ריאה מתקדם. יש להמשיך ולהעריך את כלי ריצוף העומק בהשוואה לשיטות אחרות במחקרים גדולים יותר, אקראיים ומבוקרים. שאיפתנו היא, שבמרכז רפואי רבין יהיה ריצוף גנומי נרחב חלק מהאבחון השגרתי ויהווה בסיס להכונה טיפולית מיטבית.

מסקנות: ריצוף גנומי נרחב מאפשר איתור ברמת דיוק גבוהה של מוטציות משפיעות במרבית חולי סרטן הריאה בישראל שנבדקו במחקרנו. במדגם זה, ביצוע מבדקים מולקולאריים עמוקים הוביל לשינוי החלטה טיפולית בכמחצית מהחולים.

אנה בליובסקי רחנבלום¹
מאיה אילוז²
אליזבטה דודניק²
ליאור שושן-גוטמן³
עדי דביר³
ניר פלד⁴

¹הפקולטה לרפואה סאקלר, אוניברסיטת תל אביב
²מרכז דוידוף לטרטן, מרכז רפואי רבין – בית חולים בייליסון, פתח תקווה
³טבע תעשיות פרמצבטיות בע"מ
⁴המערך לאונקולוגיה, מרכז רפואי סורוקה אוניברסיטת בן גוריון, באר שבע

*העבודה נכתבה כחלק מהדרישות האקדמיות של הפקולטה לרפואה סאקלר, באוניברסיטת תל אביב, לקבלת תואר דוקטור לרפואה (MD) של אנה בליובסקי רחנבלום.

ניגוד אינטרסים:

מבין מחברי המאמר, מר עדי דביר וד"ר ליאור שושן-גוטמן הם עובדים של חבר טבע.
ניר פלד הוא יועץ עבור: AstraZeneca, BI, BMS, Lilly, MSD, Novartis, Pfizer, Roche, FMI, NovellusDx, Gaurdant360, Takeda
אליזבטה דודניק היא יועצת עבור: BI, Merck/MSD, Roche Pharmaceuticals, Astra Zeneca וקיבלה תשלומי הוצאות.
ליטר הכותבים אין ניגוד אינטרסים.

סרטן ריאה; רפואה מותאמת אישית; ריצוף גנטי עמוק; אפיון מולקולארי; טיפול מכוון מטרה; מוטציות משפיעות. מילות מפתח: KEY WORDS: Non-small cell lung cancer; Precision/personalized Medicine; Next-generation sequencing; Targeted therapy; Driver mutations

הקדמה

מספר הנפטרים מסרטן הריאה גבוה יותר בהשוואה לסוגי סרטן אחרים בישראל ובעולם [1,2]. כאלפיים חולי סרטן ריאה מאובחנים לראשונה בישראל בכל שנה, מהם כ-1,600 נפטרים [1]. סרטן הריאה אחראי לשליש התמותה הסרטנית בישראל. שאתות מסוג Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) הן מגוונות ביותר מבחינה גנטית [3] ומציבות אתגר טיפולי משמעותי. הטיפול המערכתי עד לאמצע שנות ה-2000 נסמך על מישלבי

כימותרפיה על בסיס פלטינום [4]. במהלך העשור האחרון, חל שיפור ניכר בהבנת המנגנונים המולקולאריים והגנטיים של שאתות הריאה, ובהתאם גילוי מגוון מוטציות משפיעות (Driver mutations) המעורבות בהתפתחות השאת (Tumor) ובשגשוגה. מונח זה, הקרוי "התמכרות לאונקוגן" (Oncogene addiction), הוצג על ידי Weinstein כבר בשנת 2002 [5]. פרידגימת הטיפול החדשה מתבססת על אפיון מולקולארי של השאת ועל טיפול נקודתי במוטציות הניתנות לחסימה בשיעור של 64%-75% מהשאתות קיימת מוטציה אחת [6-9].

תרשים 1:

הרכב אוכלוסיית מחקר. מתוך 50 מטופלים שעברו בירור בריצוף נרחב, נכללו 46 חולים מתקדמים עם סרטן ריאה של תאי אפיתל, כפי שמפורט בפרק התוצאות. מתוכם, 28 מטופלים עברו בירור מולקולארי מלא טרם הריצוף הנרחב (קבוצה א'). שבעה מטופלים עברו בירור מולקולארי לגן EGFR בלבד טרם ריצוף הנרחב (קבוצה ב'), רוו מטופלים לא עברו בירור מולקולארי סטנדרטי כלל וניגשו ישירות לביצוע הריצוף הנרחב כבדיקה ראשונה (קבוצה ג'). מתוך קבוצה ג', שישה מטופלים אותרו למוטציות סטנדרטיות בגנים EGFR ו-ALK (המאותרות גם באמצעי הבירור המולקולארי הרגילים). שיעורי השינוי הטיפולי שהתקבלו מפורטים עבור כל קבוצה



* אחוז שינוי טיפולי בקבוצת ההכללה (n=46)

החולים עברו את המבדקים המולקולאריים המקובלים כיום למחלה מתקדמת לגן EGFR ולגן ALK, בבתי החולים השונים בישראל או במסגרת אחרת, וכלל החולים עברו את מבדק ריצוף העומק הרחב. רוב השאתות היו מסוג אדנוקריניומה (89.1%).

אישור ועדה אתית: מספר פרוטוקול המחקר המיוחס למחקר המתואר הוא RMC-14-0391.

איסוף נתונים: שיטת ריצוף עומק (ספקטרום רחב): ריצופי העומק בוצעו על ידי חברת Foundation Medicine מארה"ב בסיוע אונוקוסט-טבע (טבע תעשיות פרמצבטיות בע"מ). מבדק ריצוף העומק FoundationOne מבצע מיצוי דנ"א מארבע דגימות מקובעות בפורמלין ועטופות בפרפין (FFPE) אשר נחתכות בעובי של עשרה מיקרומטר. נעשה שימוש בהרכב (פאנל) המבוסס על הכנת ספריית הגנים באמצעות Hybrid capture וריצוף עומק בטכנולוגיית HiSeq 2000 מבית חברת Illumina. תחילה, האבחנה הפתולוגית של כל דגימה אוששה בצביעת המטוסקסילין-אאוזין (H&E), ודגימות שהכילו למעלה מ-20% דנ"א הועברו הלאה למיצוי החומר התורשתי. ריצוף העומק התבצע עבור 3,769 אקסונים של 236 גנים המעורבים בפתוגנזה של סרטן ריאה אינטרוניים של 19 גנים שעוברים באופן שכיח סידור מחדש (Rearrangement). סך הכול רוצפו 1.14 מיליון זוגות בסיסים (Base pairs) על גבי ספריות גנים בשיטת Hybrid capture (SureSelect Custom Kit, מבית חברת Agilent Technologies). מבדק FoundationOne עבר תיקוף, והוכחה רגישות של 95%-99% וסגוליות גבוהה (ערך מנבא חיובי > 99%) [13]. משנת 2011 ועד למועד סיום המחקר התבצעו עדכונים בהרכב ריצוף עומק זה, בהתאם להתקדמות הידע המדעי אודות הביולוגיה של הסרטן, ונכון לשנת 2017, ההרכב (הפאנל) דוגם אקסונים של 315 גנים ואינטרוניים של 28 גנים.

לפחות [10,11]. הגנים השכיחים ביותר הם EGFR, KRAS ו-ALK. הגישה המקובלת כיום כוללת איתור מוטציות בגנים EGFR ו-ALK, וטיפול מכוון מטרה על ידי מעכבי טירוזין קינאזה (TKIs). אולם הבדיקות הסטנדרטיות לגנים אלו בלבד אינן מכסות את כלל המוטציות הניתנות לטיפול שקיימות באינטרוניים ובאקסונים של הגנום השאתי. בעוד שחציון ההישרדות של חולי סרטן ריאה גרורתי עומד על כשנה אחת, הרי שבמחקר רטרוספקטיבי רב מרכזי שנערך בארה"ב [10] הודגם, כי ההישרדות בחולי סרטן ריאה עם גרורות שטופלו בתרופות מותאמות לפרופיל הגנטי של השאת, עלתה מחציון של 2.4 שנים ל-3.5 שנים.

הטכנולוגיות המקובלות כיום לאיתור מוטציות מבוססות ברובן על Multiplex PCR ו-FISH Fluorescence in Situ Hybridization). Multiplex PCR מאפשר לבדוק מספר מצומצם של מוטציות נקודתיות (Hot Spots) בגנים בודדים. בהתבסס על טכנולוגיות דוגמת אלו, מאותרות מוטציות בגן EGFR בכ-21% מהחולים, ובפועל כ-17% מהחולים מטופלים בתרופה מכוונת מטרה לגן זה [10]. בבדיקת הגן ALK מאותרים שינויים ב-8%-15% [7,10]. מנגד, טכנולוגיות חדשניות לריצוף גנטי עמוק (Next-Generation Sequencing) מאפשרות לרצף את הגנום הסרטני לעומק, תוך ניצול מיטבי של הרקמה, ומעבר מביוררים טוריים לבירור מקביל למספר רב של גנים בבדיקה אחת. ייחודו של הריצוף העמוק הוא ניתוח מספר רב מאוד של רצפי דנ"א (או "קריאות") באופן מהיר וחסכוני. ניתן לכוון את ריצוף העומק לגנים הנושאים מוטציות משפיעלות באמצעות בדיקת טווח (ספקטרום) צר של מוטציות נקודתיות, על ידי כיסוי אזורי גנים קצרים המוגדרים כ-Hot Spots בטכנולוגיית ה-PCR ולאחריה ריצוף עומק. גישה מתקדמת יותר מאפשרת ריצוף גנטי רחב שאינו מכוון דווקא לאתרים המוטנטים השכיחים. מבדקי ריצוף עומק רחבים מאפשרים קבלת מידע רב אודות שינויים שהתרחשו באקסונים ואינטרוניים, פולימורפיזם שקיים בגנים הקשורים למטבוליזם של תרופות, איחויי גנים (Gene fusions) ועוד.

היישום הקליני של ריצוף העומק החל בשנת 2011 והתפתחותו מאז הייתה מאוד מהירה [12]. בשנת 2013, במחקר שבוצע בו ריצוף עמוק ל-2,221 חולים בסרטן הריאה, נחשפו מוטציות בעלות משמעות טיפולית ב-76% מהשאתות [13]. מספר זה גדול פי שלושה ממספר השינויים האופרטיביים שהתגלו בשיטות האבחון הרווחות כיום [13]. לסיכום, טכנולוגיות ריצוף העומק מעניקות כלים לפילוח של קבוצות חולים על בסיס מולקולארי; חולים אלה יכולים להפיק תועלת קלינית משמעותית מרשימה גדלה והולכת של תרופות ביולוגיות [9,14,15]. סך האתרים המוטנטים גדול מסך התרופות הקיימות, ולכן ישימותם הקלינית של מבדקי הריצוף העמוק והשפעתם על שינוי האסטרטגיה הטיפולית דורשים המשך הערכה בשנים הקרובות.

מטרות המחקר

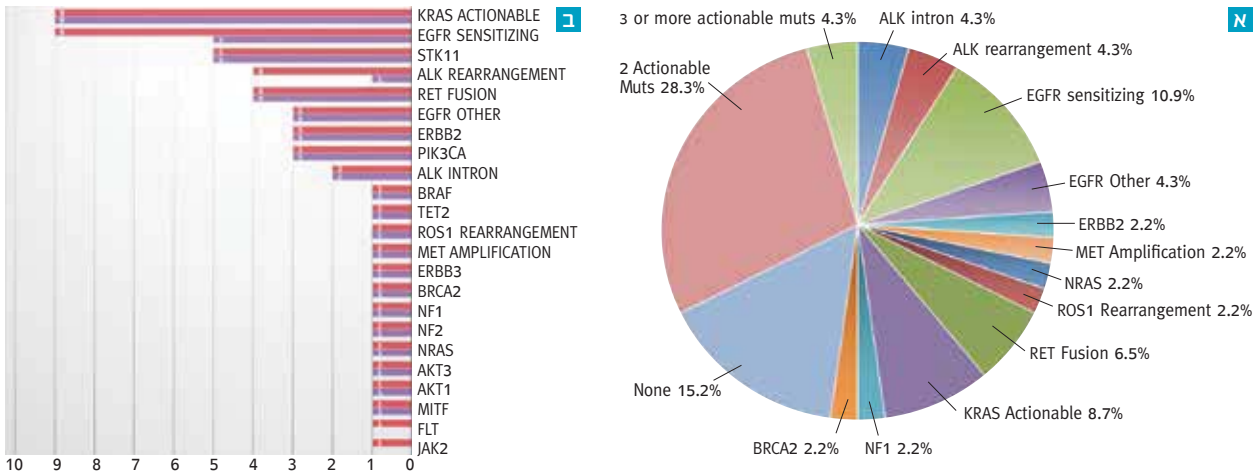
המטרה במחקר הייתה לבדוק את תרומתם בפועל של מבחני ריצוף עמוק לשינוי האסטרטגיה הטיפולית, בהתחשב במבדקים הקליניים שבוצעו, בהתאם להחלטת הרופא המטפל.

שיטות המחקר

מאפייני המטופלים: במחקר נבחנו באופן רטרוספקטיבי 50 תיקי חולים המצויים במעקב השירות לסרטן הריאה במרכז דידוף לסרטן, אשר עברו מבדקי ריצוף עמוק משנת 2011 ואילך. מרבית

תרשים 2:

מוטציות משפיעות ברות טיפול כפי שמופו בריצוף נרחב. בתרשים א' ניתן לראות את שכיחות המוטציות בקבוצת המחקר (n=46). בתרשים ב' מפורטת היארעות המוטציות בסיווג לשתי קבוצות: באדום - מוטציות מכלל המטופלים שנכללו (n=46), ובסגול - מוטציות מכלל המטופלים שנכללו בניכוי המוטציות הסטנדרטיות שהתגלו בשישה מטופלים שעברו ריצוף נרחב בלבד. הקבוצה הסגולה מייצגת את מספר המוטציות שהתגלו באופן בלעדי בריצוף נרחב, שלא היו מאותרות אלמלא בוצעה בדיקה זו



טבלה 1:

מאפיינים דמוגרפיים, קליניים והיסטופתולוגיים של קבוצת המחקר (46 משתתפים). 4 משתתפים הוצאו מהמחקר כפי שמתואר בפרק התוצאות

גיל בעת קביעת אבחנה (שנים)	64 (חציון) טווח: 20-83
שלב מחלה בעת קביעת אבחנה	IV 80.4% (n=37) III 17.4% (n=8) I או II 2.2% (n=1)
מין	גבר 39.1% (n=18) אישה 60.9% (n=28)
סטטוס עישון לעולם לא עישן	עשן 45.7% (n=21) לעולם לא עישן 50% (n=23) קיימת היסטוריית עישון (ממוצע שנות חפיסה) 35 שנות חפיסה מידע חסר 4.3% (n=2)
מוצא	אשכנזי 43.5% (n=20) לא אשכנזי 19.6% (n=9) מוצא מעורב 4.3% (n=2) לא יהודי 2.2% (n=1) מידע חסר 30.4% (n=14)
היסטוריה של סרטן קודם מסוג אחר	לא 80.4% (n=37) כן 19.6% (n=9)
פתולוגיית השאת	אדנוקרצינומה 89.1% (n=41) קרצינומת אפיתל קשקשי 2.2% (n=1) שאת נירואנדוקרינית 4.35% (n=2) קרצינומה מסוג אחר (Large Cell, Mixed) 4.35% (n=2)

מטופלים (84.8%). עשרים וארבעה מטופלים (52.2%) אובחנו עם מוטציה אחת, 15 (32.6%) אובחנו עם שתיים או שלוש מוטציות (13 ו-2 בהתאמה), ובשבעה מטופלים (15.2%) לא נמצאה אף מוטציה. פירוט מלא של המוטציות שנמצאו ניתן לראות באיור 2.

שיטות פתולוגיה מולקולאריות סטנדרטיות: שיטות אלה

הן ותיקות יותר וכוללות מבדקי אימונוהיסטוכימיה ו-FISH לגן ALK, מבדקי Real-time-PCR לגן EGFR ומבדקי ריצוף עומק בטווח (ספקטרום) צר, המאתר מוטציות נקודתיות (Hot spots) ב-48 גנים ומרצף אותן באמצעות טכנולוגיית Illumina MiSeq. מבדקים אלו בוצעו במסגרת בתי החולים/קופות החולים בישראל, או לחלופין בוצעו באופן פרטני בישראל או בחו"ל.

ניתוח נתונים: במחקר זה, פילוח מוטציות משפיעות בוצע עבור שינויים גנטיים שהם בעלי משמעות טיפולית בלבד (נכון לשנת ביצוע הבדיקה), וכולל שינויים גנטיים הניתנים לטיפול מכוון מטרה המאושר על ידי ה-FDA לשימוש כנגד סרטן הריאה או כנגד שאתות מסוג אחר.

תוצאות

מאפיינים דמוגרפיים, קליניים והיסטופתולוגיים: מתוך 50 הנכללים במחקר, שלושה מטופלים לא נכללו במחקר כיוון שאובחנו בשלבים מוקדמים (I או II) ולא התקדמו לשלב IV, למרות שביצעו מראש ריצוף עומק. מטופל נוסף לא נכלל כיוון שהשאת שבה לקה התבררה כמזותליומה. אוכלוסיית המחקר סווגה לשלוש קבוצות, כמפורט בתרשים 1: קבוצה א' - 28 מטופלים שעברו מבדקים מולקולאריים סטנדרטיים לשני הגנים EGFR ו-ALK טרם ריצוף העומק; קבוצה ב' - שבעה מטופלים שעברו מבדק לגן EGFR טרם ריצוף העומק, אולם לא עברו בירור לגן ALK; וקבוצה ג' - 11 מטופלים שעברו ריצוף עומק כבדיקה ראשונה ולא עברו מבדקים מולקולאריים סטנדרטיים משיקולי מיעוט רקמות או על פי שיקול דעתו של הרופא המטפל. שנים עשר (12) מטופלים עברו את הבירור לגן EGFR (מבין 48 גנים נבדקים) על ידי מבדק ריצוף עומק בספקטרום צר (הבודק אתרים חמים) בטכנולוגיית Illumina MiSeq. מאפיינים דמוגרפיים, קליניים והיסטופתולוגיים של קבוצת ההכללה מפורטים בטבלה 1.

מאפיינים גנטיים: פילוח מוטציות עם משמעות טיפולית על ידי ריצוף עומק (תרשים 2) איתר מוטציה אחת או יותר ב-39

טבלה 2:

מאפיינים דמוגרפיים, גנטיים וקליניים בחולים שהועברו לטיפול מכוון מטרה על פי המוטציה המשפיעלת ו21 מטופלים מתוך 46, 45.7%.

באפור מסומנת קבוצה א', בירוק קבוצה ב' ובאדום קבוצה ג' כפי שמתוארות באיור 1

מס' קווי טיפול קודמים	טיפול מכוון מטרה	FLT1	JAK2	MET *Variant	AKT1	ROS1	ERBB2	NF1	BRAF	RET Fusion	KRAS	EGFR - Other	EGFR - Sens	ALK Intron	ALK Rear	מס' מוטציות	Stage האבחנה	סטטוס עישון בעת האבחנה ומס' שנות חפיסה	גיל בעת האבחנה	מין הנבדק	מס' נבדק
1	Crizotinib													X		1	IV	ללא עישון	44	M	1
0	Crizotinib													X		1	IV	ללא עישון	38	F	2
0	Gefitinib								X				X			2	IV	עישון ולא ידוע	60	M	3
1	Erlotinib												X			1	III A	ללא עישון	73	F	4
2	Afatinib												X			1	IV	ללא עישון	68	F	5
0	Erlotinib												X			1	IV	ללא עישון	65	F	6
2	Erlotinib						X						X			2	IV	עישון 80 שנות חפיסה	63	F	7
1	Trastuzumab						X									1	IV	ללא עישון	56	F	8
1	Trastuzumab				X		X									2	IV	עישון 17 שנות חפיסה	65	M	9
0	Afatinib										X	X				2	IV	עישון 55 שנות חפיסה	72	F	10
0	Cabozantinib									X						1	IV	עישון 20 שנות חפיסה	48	F	11
2	Cabozantinib									X						1	IV	עישון 18 שנות חפיסה	72	F	12
1	Crizotinib					X										1	IV	עישון 20 שנות חפיסה	55	M	13
2	Everolimus							X								1	IV	עישון 30 שנות חפיסה	74	M	14
1	Crizotinib			X												1	IV	ללא עישון	34	F	15
0	Crizotinib														X	1	III B	ללא עישון	20	F	16
0	Crizotinib														X	1	IV	ללא עישון	26	F	17
0	Crizotinib		X										**X		X	3	IV	ללא עישון	75	F	18
0	Erlotinib												X			1	IV	ללא עישון	83	F	19
0	Erlotinib												X			1	IV	ללא עישון	53	F	20
0	Erlotinib	X											X			2	IV	ללא עישון	65	F	21

* במקרה זה אותר שינוי גנטי חדש בגן MET שלא היה ידוע טיבו. על פי שיקול הקליני החלט כי החולה תופל בתרופה Crizotinib המעורבת בעיכוב המסלול התאי האונקוגני של הגן MET.
** במקרה זה אותרה אמפליפיקציה של הגן EGFR אשר סווגה כמוטציה מסוג Sensitizing

נשאה איחוי בגן ALK והגבר (אמפליפיקציה) של הגן EGFR יחדיו. **קבוצת השינוי הטיפולי:** מתוך 46 מטופלים, 21 מטופלים (45.7%) הועברו לטיפול מכוון מטרה על פי המוטציה שאותרה. ב-37.5% מהמטופלים (n=15/40) השינוי הטיפולי לא היה מתקבל אילולא הייתה מתבצעת בדיקת ריצוף העומק. מאפייני המטופלים וסוג הטיפול שניתן מפורטים בתרשים 1 ובטבלה 2. שני שלישים מהמוטציות שטופלו היו בגנים ALK או EGFR (n=14). תשעה מטופלים טופלו במעכבי טירוזין קינאזה לגן EGFR (Erlotinib, Gefitinib ו-Afatinib), ושבעה מטופלים טופלו ב-Crizotinib כתרופה מכוונת מטרה למוטציות בגנים ALK, MET ו-ROS1. שני מטופלים טופלו בתרופה Cabozantinib לאיחוי בגן RET ושני מטופלים טופלו ב-Trastuzumab כתוספת לכימותרפיה למוטציה בגן ERBB2 (HER-2). בנוסף, חולה אחד טופל ב-Everolimus עבור מוטציה בגן NF1. עבור למעלה ממחצית מהמטופלים, היה זה קו הטיפול הראשון. אם נפחית את קבוצת המטופלים שנמצאה חיובית למוטציה סטנדרטית בגנים EGFR/ALK אך לא עברה בדיקת לאיתור סטנדרטי בגנים אלו (n=6),

10 מטופלים (21.7%) אותרו כנשאי מוטציות בגנים EGFR או ALK באמצעות ריצוף עמוק, אולם באופן שגוי לא אותרו באמצעות התבחינים המולקולאריים המקובלים שבוצעו. מטופלים אלה הופנו לריצוף עמוק על אף המבדקים הסטנדרטיים השליליים לנוכח חשד גבוה לקיום מוטציה משפיעלת. חשד זה התבסס על מאפיינים אפידימולוגיים כגון גיל צעיר, אנמזה משפחתית או אישית של שאתות, ומטופלים שאינם מעשנים או מעשנים קלים. בקבוצה זו, חמישה מטופלים נשאו מוטציות משפיעלות (Sensitizing) בגן EGFR, ושניים נשאו מוטציות אחרות בגן EGFR היו בעלי שינויים גנטיים באינטרון הגן ALK ומטופלת אחת נשאה איחוי קלאסי מסוג ALK-EML4. מתוך קבוצה ג' (11 מטופלים) שעברו את מבדק ריצוף העומק כבדיקה ראשונה, בעיקר עקב שיקולי מחסור ברקמה), תשעה אותרו כנשאי מוטציות משפיעלות, אשר שש מהן היו בגנים ALK או EGFR. מתוך ששת המטופלים הללו, שלושה אותרו כנשאי מוטציה משפיעלת בגן EGFR (Sensitizing), שניים אותרו כנשאי איחוי בגן ALK ומטופלת אחת

טכנולוגיות סטנדרטיות כגון שיטת האתרים החמים, יש מקום להמשיך המחקר לאיתור יעדי טיפול מכוון בחולי סרטן הריאה. במחקר שפורסם בשנת 2015, הודגמה ישימותו של ריצוף עומק המבוסס על Hybrid capture ככלי להכוונה טיפולית ב-31 חולי שלב IIIA או IV [17]. במחקר אחר מוטציות בנות טיפול (מאושר או ניסיוני) ב-65% מהחולים, ו-23% מהחולים (n=7/31) טופלו בפועל בתרופה מכוונת מטרה. חולים אלו הגיבו באופן חלקי לטיפול (Partial response) או שמחלתם נותרה יציבה (Stable disease) לאורך חודשים. תוצאות מחקרנו מחזקות את חשיבות האפיון המולקולארי המוביל להרחבת המנעד הטיפולי, כך שיכלול טיפולים ביולוגיים מכווני מטרה. תוצאות הישרדות לקבוצת החולים אשר טופלה במחקר זה עדיין נאספות ולא הוצגו בעבודה זו. לפיכך, תוצאות מחקר זה מדגימות, כי יש מקום ליישום שיטת האבחון של הרקמות לריצוף עמוק כאשר בדיקות אפיון מולקולארי ראשוניות מפורשות כשליליות, ובפרט כאשר קיים חשד קליני להימצאות מוטציה האחראית להתהוותו של סרטן הריאה.

חשד קליני לאיתור מוטציה משפיעלת עולה כאשר סרטן הריאות, ובפרט הסרטן הבלוטני (אדנוקרצינומה), מופיע בחולים צעירים עם הרגלי עישון מופחתים או כאלו שלא עישנו מעולם. במחקר זה נכללו גם 11 חולים אשר נבדקו ישירות בשיטת הריצוף הגנטי העמוק. במצבים אלו החלטה זו התקבלה על ידי הצוות המטפל בשל מיעוט רקמות והחשש לצורך לביצוע ביופסיה נוספת אם תתקבל תשובה ראשונית שלילית מבדיקות האתרים החמים. בנוסף, עולה ממחקרנו נתון מדאיג, על שיעור מסוים של מטופלים הנושאים מוטציות בנות טיפול בגנים ALK או EGFR, אשר אינו מאותר במבדקים הרגילים. טיפולים אלו הם יעילים יותר ורעילים פחות בהשוואה לכימותרפיה, ולכן יש לעשות מאמץ יתר לאיתורן של מוטציות אלו. הסיבות לכישלון באיתור טמונות בהבדלים איכותיים וטכניים בין המבדקים המבוצעים כיום בבתי החולים/קופות החולים לבין ריצוף העומק הרחב. הודות לריצוף כלל האקסון המתבצע בריצוף העומק, מאותרות מוטציות רבות יותר שאינן תלויות בקיום פריימרים/גלאים (Probes) מתאימים. ריצוף אינטרונים מעניק טווח נוסף של שינויים גנטיים שניתן לאתר בריצוף עומק ולא קיים בשיטות הסטנדרטיות. אנו תומכים בגישה משולבת שבה יתבצע בירור מולקולארי ראשוני לאזורים חמים והשלמה של בירור מולקולארי אקסומי עמוק במקרים שליליים, כמפורט במחקר זה.

במחקר הנוכחי מספר מגבלות. ראשית, אוכלוסיית המחקר קטנה והתמקדות במרכז רפואי אחד. עם זאת, במחקר הוצג שינוי בהחלטה על הטיפול (שלא היה מתקבל אילו בוצע הריצוף העמוק) ב-37.5%, ולכן תוצאותיו משמעותיות ביותר ומצביעות על הצורך לחידוד קליני ולחשיבות הנחישות באיתור יעד לטיפול ביולוגי, גם לנוכח היעדר ממצא זה בבדיקות המולקולאריות החמות.

לסיכום

לנוכח ממצאי מחקר זה, יש מקום לביצוע ריצוף גנומי נרחב לחולי סרטן הריאה הבלוטני אשר נמצאים שליליים בתבחיני הריצוף הסטנדרטיים דוגמת האתרים החמים. בדיקות שגרתיות לגנים EGFR ו-ALK נכללות כיום בסל הבריאות, אולם בדיקת ריצוף העומק שנבחנה במחקר זה ובדיקות דומות מאותה קטגוריה אינן נכללות בסל, וזאת על אף שקיימת המלצה על ביצוען מטעם ארגונים מקצועיים דוגמת ה-National Comprehensive Cancer Network. בעתיד, עם התקדמות נוספת בהבנת הבסיס

נקבל שיעור שינוי טיפולי בעקבות ריצוף עמוק של 37.5% (n=15/40). שיעור זה מייצג את אחוז השינוי הטיפולי "הבלעדי", שלא היה מתקבל אילו היה מתבצעת בדיקת ריצוף עמוק. מתוך עשרת המטופלים שאותרו כנשאי שינויים גנטיים בגנים EGFR או ALK על ידי ריצוף עמוק, אך נמצאו שליליים בבדיקות הסטנדרטיות, שמונה טופלו בטיפול מכוון מטרה; מטופלת אחת לא טופלה בטיפול מכוון מטרה כיוון שנשאה מוטציה בגן EGFR באקסון 20 המקנה עמידות מוחלטת למעכבי טירוזין קינאזה בסרטן הריאה; מטופלת נוספת, צעירה בת 22 שנים שהתאפיינה במהלך מחלה סוער, אובחנה בריצוף עמוק כנושאת איחוי שכחי בגן ALK (מסוג ALK-EML4) לאחר שתוצאות מבדק מולקולארי שבוצע בשיטת FISH חזרו שליליות. חולה זו האחרונה נפטרה יומיים טרם קבלת תוצאות ריצוף העומק.

השלכות קליניות

במדגמנו, כמחצית (45.7%) מהחולים הועברו לטיפול מכוון-מטרה על פי המוטציה המשפיעלת שאותרה. בהוצאת המטופלים שלא עברו בדיקות מולקולאריות סטנדרטיות, אך כן אותרו למוטציות שהיו יכולות להימצא על ידי (n=6), מוטציות בגנים EGFR או ALK שנדגמות בשיטות שאינן מבוססות על ריצוף עמוק (רחב), ביצוע בדיקת הריצוף העמוק הובילה לשינוי טיפולי בשיעור גבוה של 37.5%. טיפול מכוון-מטרה מעניק איכות חיים משופרת והישרדות טובה יותר על פני כימותרפיה. בנוסף, הדגמנו כי ריצוף העומק הרחב מאפשר אבחון מולקולארי מקיף ומדויק יותר, מאחר שעשרה מטופלים במחקרנו אובחנו בריצוף העמוק הרחב כבעלי מוטציות בנות טיפול בגנים EGFR או ALK, אך לא אותרו ככאלה בשיטות הישנות (שליליות כזובות - False negative).

דיון

ריצוף גנטי עמוק מאפשר דיוק רב יותר תוך שימוש בכמויות דנ"א מזעריות (50-200 ננוגרם לכל בדיקה) [13]. חסרונו בקושי בהבנת התוצאות הגנטיות (ביר-אינפורמיקה) מול היכולות הטכנולוגיות. שינויים גנטיים רבים אינם ניתנים לתרגום קליני בשל היעדר תרופות המתאימות לחסימת המסלול הביולוגי המאוחר. במחקרנו, השאתות נבחנו לקיום מוטציות בעלות השלכה טיפולית בלבד. על אף שאותרו כאלה ב-84.8% מהחולים, רק כמחצית טופלו על פיהן הלכה למעשה. דוגמה מובילה העשויה להסביר את הפער היא היעדר טיפול יעיל לחסימת מוטציה משפיעלת של מסלול ה-KRAS, שהוא הגן המוטנטי השכיח ביותר במחקרנו בפרט וב-NSCLC בכלל [10].

חיסרון נוסף המתלווה לגילוי שינויים בגנים רבים הוא חוסר היכולת להבדיל בין מוטציות מורשות (Germline) למוטציות סומאטיות המאפיינות את השאת בלבד [16], וכן הקושי בדירוג החשיבות השפועלית בין המוטציות השונות אם מאותרת יותר ממוטציה אחת. בעבודה זו, הדגמנו כי היישום של טכנולוגיית הריצוף העמוק הוביל לשינוי החלטה טיפולית ב-37.5% מהחולים, שינוי שלא היה מתקבל אילו היה מתבצעת בדיקה זו. בקרב 90% מהחולים שטופלו (n=19/21), הטיפול הנבחר היה טיפול ביולוגי כחלופה לכימותרפיה וב-10% מהחולים (n=2/21) הטיפול הביולוגי התווסף למישלב הכימותרפיה. טיפול מכוון מטרה הוא יעיל יותר ורעיל פחות, ומוביל לשיפור באיכות הטיפול של חולי סרטן הריאה ובהישרדותם [9,10,15]. לפיכך, תוצאות מחקר זה מוכיחות, כי כאשר מתקבלת תוצאה שלילית ראשונית של

אנו שואפים לכך שבמרכז הרפואי רבין יוצעו למטופלים בדיקות גנטיות מתקדמות, המבוססות על ריצוף עומק רחב מתוך רקמת השאת להכונה טיפולית מותאמת אישית.

מחבר מכותב: ניר פלד

המערך לאונקולוגיה, מרכז רפואי סורוקה
אוניברסיטת בן גוריון, באר שבע
טלפון: 08-6400537/295
דוא"ל: peled.nir@gmail.com

הגנטי של סרטן הריאה והפיכת כלי ריצוף העומק למשתלמים יותר כלכלית, צפוי שהשימוש בהם יהפוך לחלק שגרת המטופל האונקולוגי, שיותאם למטופל באופן אישי כפי שמתבצעים כיום תבחיני רגישות לאנטיביוטיקה להתאמת טיפול בזיהומים. מהפך הרפואה המותאמת אישית ("Precision Medicine") מציג תקווה חדשה לחולי סרטן הריאה. הטכנולוגיות הייחודיות לריצוף נרחב מאפשרות שימוש מיטבי ברקמת השאת לקבלת מידע גנומי נרחב, בעוד שאפשרויות הטיפול במסגרת מחקר או שלא במסגרת מחקר העומדות בפני המטופל, גדלות והולכות [18].

ביבליוגרפיה

1. הרישום הלאומי לסרטן והמרכז הלאומי לבקרת מחלות, משרד הבריאות. עדכון נתוני היארעות ותמותה מסרטן לשנת 2012, יום הסרטן הבינלאומי, 2015.4.2.
2. Siegel R, Ma J, Zou Z & Jemal A, Cancer statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians 2014; 64:9-29.
3. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA & al, Molecular biology of lung cancer. J Thorac Dis, 2013; 5 Suppl 5:S479-90.
4. Schiller JH, Harrington D, Belani CP & al, Eastern Cooperative Oncology Group. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. N Engl J Med, 2002; 346: 92-98.
5. Weinstein IB, Cancer. Addiction to oncogenes - the Achilles heal of cancer. Science, 2002; 297: 63-64.
6. Califano R, Abidin A, Tariq NU & al, Beyond EGFR and ALK inhibition: Unravelling and exploiting novel genetic alterations in advanced non small-cell lung cancer. Cancer Treat Rev, 2015;41:401-411.
7. Shlomi D, Onn A, Gottfried M & al, Better Selection Model for EML4-ALK Fusion Gee Test in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer. J Cancer Therapy, 2013 ;4: 54-58.
8. Bar J, Cyjon A, Flex D & al, EGFR mutation testing practice in advanced non-small cell lung cancer. Lung, 2014 ;192:759-63.
9. Pekar-Zlotin M, Hirsch FR, Soussan-Gutman L & al, Fluorescence in situ hybridization, immunohistochemistry, and next-generation sequencing for detection of EML4-ALK rearrangement in lung cancer. Oncologist, 2015;20:316-22.
10. Kris MG, Johnson BE, Berry LD & al, Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. JAMA, 2014; 21;311.
11. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. Nature, 2014; 31;511:543-50.
12. Thomas F, Desmedt C, Aftimos P & al, Impact of tumor sequencing on the use of anticancer drugs. Curr Opin Oncol, 2014; 26:347-56.
13. Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA & al, Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. Nat Biotechnol, 2013; 31:1023-31.
14. Kumarakulasinghe NB, van Zanwijk N & Soo RA, Molecular targeted therapy in the treatment of advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). Respirology, 2015;20:370-8.
15. Peled N, Palmer G, Hirsch FR & al, Next Generation Sequencing Identifies and Immunohistochemistry Confirms a Novel Crizotinib Sensitive ALK Rearrangement in a Patient with Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. J Thorac Oncol, 2012;7:e14-6.
16. Jones S, Anagnostou V, Lytle K & al, Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation. Sci Transl Med, 2015; Vol. 7, Issue 283, p. 283ra53
17. Drilon A, Wang L, Arcila ME & al, Broad, Hybrid Capture-Based Next-Generation Sequencing Identifies Actionable Genomic Alterations in Lung Adenocarcinomas Otherwise Negative for Such Alterations by Other Genomic Testing Approaches. Clin Cancer Res, 2015 Jan 7.
18. פלד נ' - בליובסקי רוזנבלום א', רפואה מותאמת אישית בסרטן הריאות - התקווה שמעבר למסך העיניים. "הרפואה" 2015

כרוניקה

התגובה החיסונית לזיהומים בפטריה קנדידה



הזיהומים נחשבו גורם אלימות - שימש אותם מצוקה ששיפעל את תגובת מערכת החיסון. זני פטריה חסרי קנדידליזין, גרמו נזק מיקטי (מזערי) לתאי אפיתל, ושיפעלו תגובה חזקה מלווה של אינטרליקין 17. החוקרים מסכמים כי התגובה של מערכת החיסון הראשונית לפטריה זו מונהגת של ידי סינרגיה בין נזק תאי הנגרם על ידי קנדידליזין, שמועצם על ידי אינטרליקין 17 המלבה את הדלקת.

הזיהומים בפטריות הם אתגר למערכת החיסון, מאחר שהם מסוגלות לשנות את צורתן ואת האנטיגנים המוצגים על גביהם בהתאם לשינוי בתנאי הסביבה. **וארמה** וחב' (Sci Immunol 2017;2:eaam8834) חקרו את התגובה של מערכת החיסון הראשונית לפטריה קנדידה אלביקוס. פטריה זו מסוגלת לעבור מהופעת תאים בודדים דמויי שמרים, לצורה של קורים חוטיים ככל שמתמשך הזיהום. החוקרים מצאו כי אנזים מסוים, קנדידליזין - חלבון הקשור עם הופעת

איתן ישראלי