

Louise Olsson, med dr, överläkare, kliniken för kirurgi och urologi, Mälarsjukhuset, Eskilstuna, centrum för klinisk forskning, Centrallasarettet, Västerås (louise.olsson@ltvastmanland.se)

Analys av fekalt DNA – framtida metod för screening för kolorektal cancer?

II En intressant debatt om införande av allmän screening för kolorektal cancer i Sverige ägde rum i Läkartidningen under hösten 2003. Samtliga landsting har emellertid nu sagt nej till screening, även på försöksnivå, med hänvisning till alltför höga kostnader i relation till antalet fall som skulle upptäckas tidigare.

Syftet med denna artikel är att belysa en ny metod under utveckling, baserad på mutationsanalys av fekalt DNA, som möjligen kan bli aktuell för screening för kolorektal cancer i framtiden.

Kolorektal cancer – ett folkhälsoproblem

Varje år diagnostiseras ca 45 000 nya cancerfall i Sverige, varav drygt 5 000 gäller tjocktarmen. Var nionde malignitet kommer därmed att utgöras av en kolorektal cancer. Sjukdomens prognos är fortfarande sådan att nästan hälften av de insjuknade kommer att avlida av sin sjukdom.

Vad kan göras åt detta folkhälsoproblem här och nu? En slagkraftig primärprevention vore givetvis det bästa, men möjligheterna till detta är begränsade. Sjukdomen uppfyller alla kriterier som WHO uppställt för screening. Ingen annan malignitet är heller så framgångsrikt kartlagd i molekylärbiologiska termer som just kolorektal cancer. Av rent pragmatiska skäl förefaller det därför rimligt att fundera över hur dessa två omständigheter skulle låta sig kombineras för en tidigrelagd diagnostik.

Flertal metoder för screening

Kännetecknande för screening för kolorektal cancer är tillgången till ett flertal olika metoder. De randomiserade studier som oftast hänvisas till i debatten har använt sig av påvisande av ockult blod i feces med guajak–peroxidasbaserade test. Det är med denna metod som den relativa mortalitetsreduktionen i kolorektal cancer vid screening har uppmätts till 15 respektive 18 procent i två studier [1, 2]. I dessa båda populationsbaserade studier, genomförda i Nottingham respektive på Fyn, användes F-Hb utan rehydrering vartannat år. I Minnesotastudien inkluderades frivilliga, och fecestestet rehydrerades, ett förfarande som ökar sensitiviteten och antalet uppföljande koloskopier samtidigt som specificiteten minskar. Mortalitetsreduktionen för dem som på detta sätt årligen screenades uppmättes till 33 procent [3] och för dem som screenades vartannat år till 21 procent.

En metaanalys av dessa randomiserade studier har uppskattat den relativa risken (RR) för kolorektal cancer-relaterad mortalitet i screeninggruppen till 0,84 (95 procents konfidensintervall, CI, 0,77–0,93), dvs en reduktion på 16 procent [4]. Eftersom livstidsrisken för kolorektal cancer är ca 5 procent i västvärlden och mortaliteten i sjukdomen är ca 50

Sammanfattat



Screening för kolorektal cancer med påvisande av ockult blod i feces (F-Hb) har i randomiserade studier visat sig reducera mortaliteten i sjukdomen.

Ett bekymmer med F-Hb är den relativt låga specificiteten, som i screeningsammanhang innebär att ett stort antal individer med falskt positiva resultat måste genomgå koloskopi.

Genetiken vid kolorektal cancer är väl kartlagd. Ett screeningtest byggt på denna kunskap torde teoretiskt sett kunna uppnå hög specificitet. Ett icke-invasivt test, som fecesprov, är också av särskild vikt vid massundersökning av asymtomatiska individer.

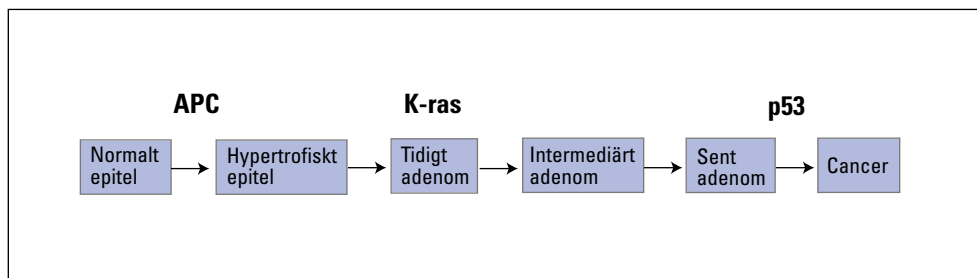
Mutationer i APC-genen initierar utvecklingen mot kolorektal cancer i de flesta fall. Med hjälp av nyutvecklad teknologi, baserad på analys av fekalt DNA, påvisades 17/28 cancer Dukes' B.

En annan genetisk förändring, mikrosatellitinstabilitet, är kännetecknande för proximal cancer. Via analys av mikrosatelliten BAT 26 i fekalt DNA detekterades 17/18 möjliga proximala cancer. I bägge studierna uppnåddes mycket hög specificitet (100 procent).

Analys av fekalt DNA har stark potential som screeninginstrument för kolorektal cancer på grund av den höga specificiteten. Mycket utvecklingsarbete kvarstår dock innan metoden kan utvärderas i randomiserade studier.

procent innebär detta en reduktion från 2,5 till 2,1 procent. Screening skulle med andra ord innebära att ca 400 personer per år i Sverige skulle avlida i annan (och senarelagd) diagnos än kolorektal cancer.

Screening med sigmoidoskopi är ett annat alternativ. Eftersom majoriteten av cancer kan nås med ett 60 cm långt sigmoidoskop ter sig metoden attraktiv. Hittills har evidens för effekten kommit framför allt från fall-kontrollstudier [5], som visat på minskad mortalitet i kolorektal cancer. Nackdelen med denna design är att metoden inte har kunnat utvär-



Figur 1. Adenom–karcinom-utvecklingen i relation till involverade gener. (Fritt efter Fearon, Vogelstein. *Cell* 1990;61:759-67.)

deras på intentionsbasis. Randomiserade studier med sigmoidoskopi har dock nu initierats [6].

Även andra metoder kan användas för screening [7]. Sigmoidoskopi kan kombineras med F-Hb, men effekten på mortaliteteten i kolorektalcancer är inte känd. Komplet koloskopi och dubbel kontrastströntgen kan likaså användas men är inte utvärderade för screening.

Följsamhet en stötesten

Följsamhet (compliance) är en stötesten vid all screening. I de populationsbaserade F-Hb-studierna uppgick deltagandet till 55–67 procent. Vidare utgjorde åtminstone en fjärdedel av cancerarna sk intervallcancer, dvs de detekterades inte av screeninginstrumentet utan diagnostiserades i stället mellan screeningtillfällena. Sensitiviteten hos F-Hb är med andra ord inkomplett och har för screening uppskattats till ca 60 procent. Sammantaget innebär detta att majoriteten av kolorektala cancer under pågående screeningstudie var kliniska fall som diagnostiserades genom symptom.

Ett annat bekymmer med F-Hb är den begränsade specificiteten för cancer, där benigna blödningskällor orsakar falskt positiva resultat. Det medför behov av uppföljande koloskopi hos en betydande andel icke-tumörbärande individer. Ekelund och Janzon framförde i sin debattartikel [8] att till de verkligt svåra frågorna med screening hör just det försvarbara i att inducera biverkningar hos »oskyldiga« för att nå fördelar för andra (numbers needed to harm, NNH).

Ett flertal andra metoder gör sig nu också gällande som potentiella screeninginstrument. Virtuellt koloskopi är ett intressant exempel. Mer specifika test för påvisande av ockult blödnings är en annan möjlighet, där framför allt immunokemiska test är aktuella. Ett helt nytt koncept är också analys av fekalt DNA, som tidigare varit aktuellt mest i infektionssammanhang.

Fördelar med DNA-diagnostik

En avgörande fördel med DNA-baserad diagnostik är dess komplett icke-invasiva natur, utan risk för omedelbara skador. Inga förberedelser krävs heller, varken laxering eller dietföreskrifter. Ett fecetest speglar hela tjocktarmen och inte enbart undersökta delar, som vid exempelvis sigmoidoskopi. Tillgång på skopister utgör ingen begränsande faktor.

Eftersom metoden baserar sig på detektion av mutationer, som ju är en integrerad del av själva sjukdomen och inte en indirekt markör som blod, borde man teoretiskt sett också ha möjlighet att uppnå mycket hög specificitet.

Följsamheten kan, liksom för F-Hb, komma att utgöra ett problem. Ett F-DNA kräver dock enbart ett prov och ingen föregående diethållning. En förutsättning för metodens spridning är automatisering av själva laboratorieprocessen för att reducera kostnaderna för analysen.

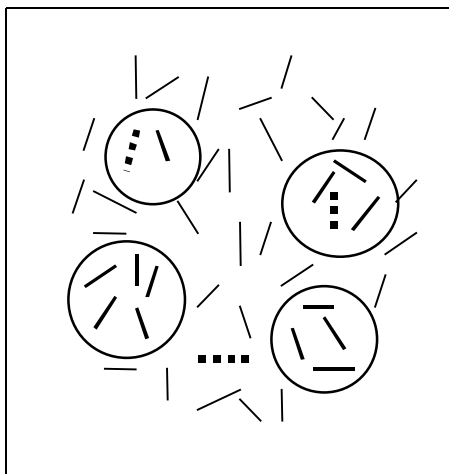
Grundforskning nu tillämpbar

Förutsättningen för att man över huvud taget har kunnat börja diskutera mutationsanalys som en möjlig metod att detek-

tera kolorektal cancer är den kunskapsutveckling av genetiken vid kolorektal cancer som ägt rum de senaste 15 åren [9]. Det har medfört en ganska klar bild över vilka gener som är inblandade och också i vilken turordning de olika mutationerna uppträder [10] (Figur 1). Det är således resultatet av framgångsrik grundforskning som nu kan börja omsättas i praktisk tillämpning.

Den första pilotstudien inom ämnet publicerades för drygt tio år sedan [11]. En forskargrupp vid Johns Hopkins, Baltimore, sökte efter K-rasmutationer i feces och kunde påvisa sådana hos åtta av nio patienter med kolorektal cancer. Det har emellertid visat sig att just K-ras kan vara muterad även vid icke-maligna tillstånd [12]. Flera andra forskargrupper har använt sig av K-ras, eftersom den varit mest lättillgänglig ur teknisk synvinkel [13]. Andra har försökt isolera p53 ur feces med nackdelen att dessa mutationer anses uppträda sent i adenom–karcinomsekvensen [14] (Figur 1).

Ur teoretisk synvinkel borde i stället ett test baserat på APC(adenomatosis polyposis coli)-genen vara optimalt för att hitta tidiga cancer. Mutationer i denna gen anses vara den initierande händelsen i utvecklingen mot malignitet i de allra



Figur 2. Principen för digital PCR-analys. I syfte att kunna detektera muterat DNA när det föreligger i endast en mycket liten fraktion fördelas DNA på en mängd mindre enheter, som amplifieras och analyseras separat. Därmed ökas kvoten muterat/normalt DNA i vissa enheter så att en muterad gen kan detekteras. Prickad linje = muterad gen. Heldragen linje = icke-muterad gen (vild typ).

flesta fall. Vid familjär adenomatös polypos (FAP) är för övrigt detta händelseförlopp accentuerat på grund av att den ena allelen av APC-genen på kromosom 5 är medfött muterad. Problemet har dock varit att APC-genen är stor, och de mutationer som uppträder vid kolorektal cancer kan vara av olika slag och kan också finnas spridda över en stor del av genen. Hittills har det därför inte funnits tekniska möjligheter att detektera den i muterad form i feces.

Digital PCR – nålen i höstacken

DNA-baserad diagnostik finns föreslagen även för andra diagnoser, t ex urinblåse- och lungcancer. Oavsett diagnos försvåras emellertid möjligheten till DNA-diagnostik av att DNA i den aktuella kroppsvätskan till övervägande del är normalt.

Även vid förekomst av malignitet är den muterade fraktionen gener mycket liten och därmed svår fångad. I fallet APC-gener i feces hos patienter med kolorektal cancer kan det röra sig om mindre än 1/100.

I syfte att komma runt detta problem har en ny metod utvecklats, kallad digital polymeraskedjereaktion (PCR) (Figur 2) [15]. I korthet innebär den att man i stället för att utföra PCR på DNA en masse fördelar det DNA man vill undersöka på ett stort antal mindre enheter. PCR utförs sedan på varje liten enhet för sig. Mutationsstatus i den del av PCR-produkten man är intresserad av avläses med hjälp av fluorescensmärkta oligonukleotider. Om PCR-produkten är fullt komplementär till proben fås en signal och en annan signal om ingen hybridisering sker. Eftersom varje enhet utgörs av bara några få molekyler blir en muterad gen betydligt mer framträdande och möjlig att detektera på detta sätt. Bildligt uttryckt innebär således digital PCR att man i stället för att tämligen utsiktslöst börja leta efter nålen i den stora höstacken så fördelar man höet på en mängd mindre hötappar. Varje hötapp söks sedan igenom var för sig, och därmed ökar chanserna att hitta den enstaka nålen/muterade genen.

Muterade APC-gener kan detekteras

En första studie med syfte att detektera muterade APC-gener i fekalt DNA från patienter med kolorektal neoplasia publicerades år 2002 [16]. I studien ingick 28 patienter med kolorektal cancer Dukes' B, 18 med adenom >1 cm och 28 med

Tabell I. Påvisande av APC-mutationer i fekalt DNA med »digital protein truncation test« (DPTT).

DPTT	Adenom	Cancer	Kontroller	Totalt
Positiv	9	17	0	26
Negativ	9	11	28	48
Totalt	18	28	28	74

Tabell II. Påvisande av BAT 26-mutationer i fekalt DNA med digital PCR.

Digital PCR	Adenom	Cancer	Kontroller	Totalt
Positiv	0	17	0	17
Negativ	19	29	69	117
Totalt	19	46	69	134

normal koloskopi (Tabell I). Själva analysen försiggick i ett flertal steg. En metod för att extrahera DNA ur feces fanns utvecklad sedan tidigare. Man gick nu vidare och utarbetade ett sätt att isolera APC-generna, varefter digital PCR utfördes. Inför det sista analyssteget utvecklades en ny metod kallad »digital protein truncation test« (DPTT). Man drog härvid fördel av det faktum att i stort sett alla APC-mutationer innebär ett s k stopp-kodon och resulterar i ett trunkerat eller förkortat protein. Denna princip används för övrigt som rutinmetod för att genetiskt diagnostisera FAP. Efter transkription och translation in vitro av varje digital PCR-produkt för sig kunde man således slutligen analysera själva proteinprodukten med hjälp av radiografi.

I denna första studie på ett litet patientmaterial detekterade metoden 17/28 cancer, således motsvarande en sensitivitet på 61 procent (95 procents CI 41–79 procent) (Tabell I). Hälften (9/18) av adenomen kunde påvisas. Av störst intresse var dock att ingen av de 28 kontrollpatienterna fick positivt utfall, vilket svarade mot en specificitet på 100 procent.

Proximalt läge inget hinder

De flesta studier om DNA-baserad diagnostik av kolorektal cancer har fokuserat på distala tumörer. Det har förelegat vissa farhågor om att proximal cancer skulle vara svårare att detektera på detta sätt. I syfte att närmare utröna detta har en studie om fekal mutationsanalys fokuserat på just proximal cancer [17].

Mikrosatelliter är korta sekvenser av baser som upprepar sig ett stort antal gånger. Dessa finns spridda över genomet. Mikrosatelliter är känsliga för replikationsfel, och blir de bestående uppstår s k mikrosatellitinstabilitet (MSI). En sådan genetisk förändring är karakteristisk för proximal cancer, vilket man använt sig av i den aktuella studien [18]. MSI är annars mest känt som ett utmärkande drag för ärftlig icke-polypos koloncancer (HNPCC). Syndromet orsakas av medfödda mutationer i just de gener som är ansvariga för korrigering av genomet efter replikation. En mikrosatellit, BAT 26, har visat sig vara en fullgod markör för att kartlägga om mikrosatellitinstabilitet föreligger eller inte.

Fecesprov från 46 patienter med cancer i caecum eller colon ascendens, 19 med adenom >1 cm inom samma område samt 69 kontrollpatienter med normal koloskopi undersöktes med digital PCR avseende muterat BAT 26 i feces (Tabell II). Bland cancerpatienterna identifierades 17/46, motsvarande en sensitivitet på 37 procent (95 procents CI 23–52 procent). Inget adenom (0/19) detekterades. Samtliga 69 kontroller fick negativt utfall, och därmed uppnåddes återigen en specificitet på 100 procent.

I denna studie fanns tillgång till paraffinbäddat tumörmaterial, och man kunde därför jämföra mutationsförekomst i

feces med mutationsförekomst i själva cancer. BAT 26 be-
fanns vara muterat i tumörmaterialet i 18 fall. Metoden kun-
de sålunda detektera 17/18 teoretiskt möjliga cancer. Härav
drogs slutsatsen att ett proximalt läge inte utgör något hinder
för DNA-diagnostik.

Lämplig för screening

Resultaten av ovan redovisade studier måste konfirmeras i
större material för att klargöra om metoden verkligen håller
vad den utlovat hittills. Rimligtvis kommer dock DNA-base-
rad analys i en eller annan form att ingå i arsenalen av dia-
gnostiska metoder för kolorektal cancer i framtiden. Den sva-
ga sensitiviteten kan möjligen motverkas av ett kombina-
tionstest, där man simultant analyserar förekomsten av ett
flertal genetiska förändringar [19, 20]. En sådan lösning lär
dock öka på kostnaderna för analysen ytterligare och kan in-
nebära att specificiteten äventyras. Sensitiviteten hos muta-
tionsanalys av fekalt DNA kommer sannolikt ändå aldrig att
bli tillräckligt god för att metoden ska lämpa sig för klinisk
utredning av symtombärande individer som komplement el-
ler alternativ till koloskopi.

Det stora värdet av mutationsanalys av feces ligger i dess
möjlighet att kunna användas för screening. En mycket hög
specificitet, med inga eller mycket få falskt positiva fall, gör
att i praktiken alla individer med positivt utfall på testet har
nytta av att komma på en uppföljande koloskopi. Denna om-
ständighet – kommunicerad till allmänheten på ett pedago-
giskt sätt – borde bidra till ökad följsamhet vid screening. Det
innebär dock att kostnaderna, både psykologiskt och ekono-
miskt, för utredning av falskt positiva fall minskar.

Med svag sensitivitet kvarstår dock problemet att förmed-
la att ett negativt utfall på testet inte är någon garanti för att
individen dagen efter screeningtillfället inte drabbas av sym-
tom som mycket väl kan vara första tecknet på tjocktarms-
cancer. Utvecklingsarbetet kring fetal mutationsanalys foku-
seras därför nu på förbättring av sensitiviteten.

Metodutveckling har sin tid och utvärdering i randomise-
rade studier har sin. Först därefter kan ett ställningstagande
till ett eventuellt införande av metoden göras. När det gäller
screening är det ställningstagandet av mångfasetterad, poli-
tisk karaktär och inte enbart av medicinsk eller teknisk natur.

*

Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.

Referenser

1. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, et al. Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996;348:1472-7.
2. Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jorgensen OD, Sondergaard O. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* 1996;348:1467-71.
3. Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 1993;328:1365-71.
4. Towler BP, Irwig L, Glasziou P, Weller D, Kewenter J. Screening for colorectal cancer using the faecal occult blood test, hemoccult. *Cochrane Database Syst Rev* 2000(2):CD001216.
5. Selby JV, Friedman GD, Quesenberry CP Jr, Weiss NS. A case-control study of screening sigmoidoscopy and mortality from colorectal cancer. *N Engl J Med* 1992;326:653-7.
6. Single flexible sigmoidoscopy screening to prevent colorectal cancer: baseline findings of a UK multicentre randomised trial. *Lancet* 2002;359:1291-300.
7. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale – Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;124:544-60.
8. Ekelund G, Janzon L. För tidigt att rekommendera allmän screening för kolorektal cancer. *Läkartidningen* 2003;100:2922-6.
9. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
10. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70.
11. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, et al. Identifi-

cation of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992;256:102-5.

12. Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, Smith KJ, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 1994;54:5523-6.
13. Smith-Ravin J, England J, Talbot IC, Bodmer W. Detection of c-Ki-ras mutations in faecal samples from sporadic colorectal cancer patients. *Gut* 1995;36:81-6.
14. Eguchi S, Kohara N, Komuta K, Kanematsu T. Mutations of the p53 gene in the stool of patients with resectable colorectal cancer. *Cancer* 1996;77(8 Suppl):1707-10.
15. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9236-41.
16. Traverso G, Shuber A, Levin B, Johnson C, Olsson L, Schoetz DJ Jr, et al. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 2002;346:311-20.
17. Traverso G, Shuber A, Olsson L, Levin B, Johnson C, Hamilton SR, et al. Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet* 2002;359:403-4.
18. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
19. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000;119:1219-27.
20. Dong SM, Traverso G, Johnson C, Geng L, Favis R, Boynton K, et al. Detecting colorectal cancer in stool with the use of multiple genetic targets. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:858-65.



= artikeln är referentgranskad