

Proteaasit eturauhassyövän merkkiaineina

Hannu Koistinen, Juba Rantala, ja Tuomas Mirtti

Eturauhassyöpä on yksi yleisimmistä syövästä. Varhain todettu paikallinen eturauhassyöpä on hoidettavissa, joskin noin kolmannes näistä uusiutuu, ainakin biokemiallisesti (PSA-tasot nousevat). Kliinisesti uusiutunut ja edennyt tai levinnyt eturauhassyöpä kehittää usein 3-5 vuodessa resistenssin ensimmäisen linjan hormonihoitoja vastaan, mikä johtaa entistä aggressiivisempaan ns. kastroatioresistenttiin syöpään. Eturauhassyövän varhaiseen toteamiseen on käytetty säätelämätöntä, ns. opportunistista PSA-seulontaa, mikä onkin vähentänyt kuolleisuutta (1). Koska PSA-testi ei ole syöpäspesifi ja se löytää usein myös pienet ja hitaasti kasvavat syövät, ylidagnostiikka on lisääntynyt PSA-testin laajamittaisen käytön myötä merkittävästi: noin 50% näin löydetyistä syövästä on sellaisia joiden hoidon on ajateltu olevan turhaa. Yleensä eturauhassyövän kasvu on hyvin hidasta ja näin se ei välttämättä aiheuta potilaille edes oireita heidän elinaikanaan. PSA-testi tai edes sen jälkeen syövän toteamiseksi tehdyt biopsiat eivät yleensä kykene erottamaan indolentteja, hoitoa vaatimattomia syöpiä niistä kliinisesti merkityksellisistä syövästä jotka tulisi hoitaa. Vaikka PSA-testin prognostista arvoa voidaan parantaa analysoimalla samanaikaisesti eri PSA-muotoja, kuten vapaan- ja kokonais-PSA:n suhdetta (2), tai muita merkkiaineita, kuten hK2:hta (kallikrein-related peptidase 2, KLK2), nykyisin ei ole käytettävissä testiä jolla voitaisiin luotettavasti erottaa hoitoa vaativat syövät niistä jotka eivät vaadi hoitoa. Ylidagnostiikka on johtanut merkittävään ylihoitoon, suurentuneisiin terveydenhuollon kustannuksiin sekä syöpädiagnoosin ja hoidon sivuvaikutusten potilaille aiheuttamaan elämänlaadun heikentymiseen. Eturauhassyövän diagnostiikkaan kaivataankin uusia ja tarkempia ennusteellisia merkkiaineita. Nykyisin käytetyistä merkkiaineista PSA (tunnetaan myös nimellä KLK3) ja hK2 ovat proteaaseja ja SPINK1 on proteaasi-inhibiittori. Hypoteesimme mukaan myös muut proteaasit voivat olla hyödyllisiä merkkiaineina

Ihmisessä ilmenee noin 600 proteaasia, mikä vastaa noin 2%:a kaikista geeneistämme (3). Yhdessä näitä 600 proteaasia kutsutaan nimellä degradomi. Noin puolet näistä proteaaseista erittyy solun ulkopuolelle. Loput toimivat solussa, joko solun sisällä tai solukalvolla, josta niiden solun ulkoinen osa voi vapautua muiden proteaasien toimesta. Proteaasien aktiivisuutta kontrolloidaan useilla tavoin, mukaan lukien niiden ilmenemisen säätely, inaktiivisten pro-muotojen akti-

vaatio (autoaktivaatio tai muiden proteaasien toimesta), proteaasi-inhibiittoreiden säätely ja translaation jälkeiset muutokset, kuten fosforylaatio (4, 5). Useat proteaasit toimivat kaskadeissa tai verkostona, mikä mahdollistaa "signaalin" vahvistamisen ja tehokkaan säätelyn. Proteaaseilla on lukuisia (pato)fysiologisia vaikutuksia ja niiden on myös havaittu osallistuvan lähes kaikkiin syövän kehityksen vaiheisiin (6). Proteaasit eivät kuitenkaan näytä aikaansaavan syöpää: tämän artikkelin kirjoittamisen aikoihin on listattu 567 geeniä, joissa olevien mutaatioiden on havaittu aiheuttavan syöpää (The Cancer Gene Census, <http://cancer.sanger.ac.uk/census>). Näistä geeneistä vain viisi oli luokiteltu proteaaseiksi tai peptidaaseiksi. Kaksi näistä, KLK2 ja TMPRSS2, liittyy eturauhassyöpään. Kuitenkin kummassakin tapauksessa syöpään liitetty geneettinen muutos on translokaatio, jossa näiden proteaasigeenin androgeeniresponsiivinen elementti on fuusioitunut transkriptiotekijöiden kanssa, aiheuttaen näin näiden transkriptiotekijöiden lisääntyneen androgeeni-riippuvaisen ilmenemisen.

Proteaasien merkitystä etenkin soluinvaaosissa ja metastaasien muodostuksessa on tutkittu laajasti. Sen lisäksi että proteaasit pilkkovat soluväliainetta ja adheesiomolekyylejä, mikä edesauttaa soluinvaaosia, proteaaseilla on lukuisia muitakin syövän kannalta relevantteja funktioita. Ne säätelävät mm. proteaasi-aktivoituja reseptoreita (protease-activated receptors, PARs) ja muita signaalintimolekyylejä, kuten kasvutekijöitä ja kinaaseja (4, 5). Vaikka yleensä lisääntynyt proteaasiaktiivisuus edesauttaa syövän kasvua ja leviämistä, useilla proteaaseilla on kuvattu myös syöpää estäviä vaikutuksia (7). Etenkin matriksin metalloproteaasien (MMP) merkitystä syövässä on tutkittu laajasti. Kliinisissä potilaskokeissa MMP-inhibiittorit eivät ole toimineet odotetusti, minkä on arveltu johtuvan MMP:ien biologian huonosta tuntemisesta (mikä johtuu ainakin osittain käytetyistä solumalleista, jotka eivät toisinnasta syöpää riittävän hyvin) ja siitä että inhibiittorit eivät ole olleet riittävän selektiivisiä (8). Kun osa MMP:sta estää syövän kasvua, näiden samanaikainen inhiboiminen syövän kasvua edistävien MMP:ien kanssa on johtanut huonoihin tuloksiin kliinisissä kokeissa.

Ihmisen eturauhasessa ilmenee yli 300 proteaasia (9). Näistä mm. kallikreiini-perheen proteaasit PSA ja KLK2 ilmenevät erittäin voimakkaasti eturauhasessa, mutta vain heikosti, jos ollenkaan, muissa kudoks-

sa. PSA on yleensä ottaen heikko proteaasi, mutta se pilkkoo siemennesteen semenogeliini-proteiineja erittäin tehokkaasti ja näin liuottaa ejakulaation jälkeen hyytyneen siemennesteen ja edesauttaa siittiöiden liikkuvuutta. PSA:lle on ehdotettu myös lukuisia syövän kasvuun liittyviä toimintoja, sekä sellaisia jotka lisäävät kasvaimen kasvua ja etäpesäkkeiden muodostusta, että sellaisia jotka vähentävät niitä (10). PSA:n on havaittu mm. estävän angiogeneesiä, mikä saattaa osaltaan selittää sen miksi eturauhassyöpä yleensä kasvaa niin hitaasti. Kliinisissä tutkimuksissa matalat PSA-tasot eturauhasessa liittyvät huonoon prognoosiin, kun taas korkeat kudoksen PSA-tasot liittyvät matalaan mikroverisuonten tiheyteen. On huomionarvoista, että vaikka PSA:n ilmeneminen syöpäkudoksessa on vähentynyt, niin eturauhassyövässä PSA:n tasot verenkierrossa ovat yleensä lisääntyneet, johtuen lisääntyneestä kulkeutumisesta kudoksesta verenkiertoon. PSA:n on myös havaittu lisäävän solujen tai kasvaimen kasvua useissa solumalleissa ja hiirillä xenografi-tuumorimallissa. Voikin olla että PSA lisää kasvaimen kasvua sen ollessa hyvin pieni, ja kasvaimen saavuttaessa muutaman millimetrin läpimitan PSA:n angiogeneesiä estävä vaikutus hidastaa kasvaimen kasvua (10). Tätä ei kuitenkaan ole todistettu kokeellisesti. KLK-perheen proteaasien ja MMP:en lisäksi useiden muiden proteaasien, kuten hepsiinin, urokinaasi-typin plasminogeeniaktivaattorin (uPA), matriptaasin ja trypsiini-3:n, merkitystä eturauhassyövän kehityksessä on tutkittu viime aikoina. Näiden proteaasien on ajateltu etenkin edesauttavan syöpäsolujen invaasiota ja metastaasien muodostumista. Tällä hetkellä Notch-signaali, joka aktivoituu proteaasien toimesta, on suuren kiinnostuksen kohteena eturauhassyöpätutkimuksessa. Notch-signaalin on havaittu lisäävän eturauhastuumoreiden kasvua ja soluinvaasiota, sekä edesauttavan kastroatioresistentin syövän kehittymistä (11).

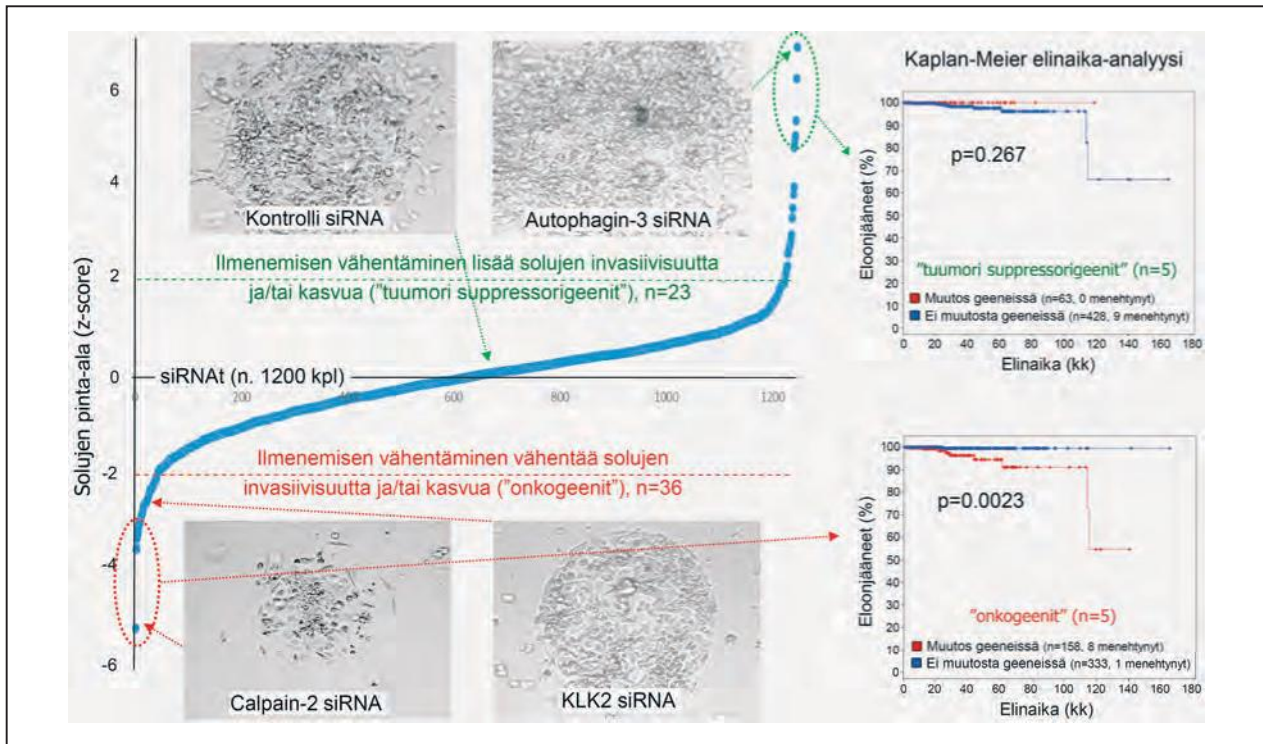
Useiden eturauhasessa ilmenevien proteaasien tasot muuttuvat eturauhassyövässä. Lisäksi useat näistä proteaaseista, kuten hK2, PSA ja TMPRSS2, ovat androgeenisäädelyjä ja niiden tasot muuttuvat kastroatioresistentin syövän kehityksessä (12). Aiemmat tutkimustulokset viittaavat, että tällaisilla proteaaseilla on ennusteellista merkitystä. Esimerkiksi PSA-tasot laskevat antiandrogeenihoidon seurauksena, jos kasvain on hormoni-responsiivinen, kun taas nousevat PSA-tasot kertovat taudin uusiutumisen. Olemme alustavasti tutkineet n. 250 proteaasin mRNA-tasoa eturauhassyövässä, käyttäen julkisesti saatavilla olevia tietopankkeja, ja havaitsimme että yli 10%:lla näistä proteaaseista mRNA-tasot liittyvät potilaiden eloonjäämiseen. Tämä ei tietenkään kerro mitään syy- ja seurauksyhteistä ja erot ovat suurelta osin pieniä, minkä vuoksi on kyseenalaista, onko näiden proteaasien mRNA-tasolla kliinistä käyttöä, ainakaan yksinään. Yhdessä muiden merkkiaineiden kanssa käytettynä ne voivat mahdollisesti olla informatiivisempia. Koska proteaasien aktiivisuutta säädellään voimakkaasti translaation jälkeen, mRNA-tasot eivät välttämättä kerro näiden proteaasien toiminnasta eturauhassyövässä.

Siitä huolimatta, että useiden proteaasien toimintaa

on tutkittu eturauhassyövässä, degradominlaajuisia tutkimuksia ei ole tehty. Lisäksi useat tehdyistä tutkimuksista ovat käyttäneet hyvin pelkistettyjä ja keinotekoisia solumalleja, jotka eivät kuvaa kunnolla syöpää ja sen monimuotoisuutta. Olemme aloittaneet proteaasien degradominlaajuisen tutkimuksen tarkoituksenamme löytää uusia ennusteellisia merkkiaineita ja lääkeainekohteita eturauhassyövän diagnostiikkaan ja hoitoon. Tämä projekti on vasta aluillaan, joten tässä raportoitamamme tulokset ovat alustavia. Tutkiaksemme proteaasien vaikutusta solujen kasvuun ja invasiivisuuteen olemme hiljentäneet proteaasien ilmenemistä, yksi kerrallaan, RNA-interferenssimenetelmällä mallissa, jossa solut kasvavat ns. sferoideina soluväliaineen sisällä. Tämä malli vastaa paremmin syövän mikroympäristöä kuin perinteinen solujen kasvatus muovipinnalla, joka ei edes mahdollista solujen invasiivisuuden tutkimista (13). Uskomme että tällä tavoin löydetty soluinvaasioon ja syöpäsolujen kasvuun vaikuttavat proteaasit voivat toimia, paitsi lääkeaineiden kohdemolekyyleinä, myös funktionaalisina biomerkkiaineina, jotka ennustavat eturauhassyövän aggressiivista käyttäytymistä ja kykyä muodostaa etäpesäkkeitä.

Alustavissa tutkimuksissa olemme havainneet PC-3 eturauhassyöpäsoluilla 23:n proteaasin tasojen vähentämisen lisäävän solujen invasiivisuutta tai kasvua. Nämä ovat mahdollisia syövän kasvua ja invasiivisuutta estäviä proteaaseja ("tuumorisuppressoreita"). Vastaavasti 36:n proteaasin tasojen vähentäminen taas johti invasiivisuuden ja/tai solujen kasvun vähenemiseen. Nämä ovat mahdollisia "onkogeenejä" joiden lisääntyminen syövässä voi edesauttaa syöpäkasvaimen kasvua ja etäpesäkkeiden muodostusta. Nämä proteaasit ovat mahdollisia funktionaalisia biomerkkiaineita. Nostamme tässä esiin kolme näistä proteaaseista. Kalpaiini-2 ja KLK2 ovat tulostemme mukaan potentiaalisia syöpää edistäviä proteaaseja eli koemallissamme niiden tasojen vähentäminen esti syöpäsolujen kasvua ja/tai invasiivisuutta. Autophagin-3:n tasojen vähentäminen taas vaikuttaa lisäävän syöpäsolujen kasvua/invasiivisuutta. Näistä KLK2 (tunnetaan myös nimellä hK2) on tunnettu eturauhassyövän merkkiaine, jonka tasot verenkierrossa ja ilmeneminen kudoksessa lisääntyvät eturauhassyövässä (14). Yksinään hK2 ei ole niin hyvä eturauhassyövän merkkiaine kuin PSA, mutta useissa tutkimuksissa on havaittu että yhdessä eri PSA-muotojen kanssa se parantaa testin prognostista informaatiota ja seulonnan spesifisyyttä. Kalpaiini-2:n ilmenemisen vähentämisen RNA-interferenssillä on aiemminkin havaittu estävän eturauhassyöpäsolujen invasiivisuutta (15), kun taas autophagin-3 geenin poiston on hiirillä havaittu johtavan syöpäalittiuden lisääntymiseen (16), vaikkakaan eturauhassyövän osalta sen toiminnasta ei ole tietoa. Osa muista löydetystä proteaaseista liittyy yksin sen kanssa että proteasomi-inhibiittoreita käytetään syöpälääkkeinä.

Kun tarkastelimme viiden eniten ja vähiten solukasvuun/invaasioon vaikuttaneen proteaasin geeniekspression muutosten, mutaatioiden ja geenien kopiomäärän muutosten yhteyttä eloonjäämiseen havait-



Seuloimme ns. RNA-interferensstekniikalla ihmisen noin 600 proteaasin ilmenemisen vaikutuksia solujen kasvuun ja invasiivisuuteen. Kontrolli siRNA-transfektoidut PC-3 eturauhassyöpäsolut muodostivat koeolosuhteissa noin viikon kasvatuksen aikana invasiivisia solusferoideja, kun taas solut joista oli vähennetty kalpaiini-2:n tai KLK2:n ilmenemistä eivät invasoineet. Kalpaiini-2:n tapauksessa myös solumäärä väheni. Löysimme myös 34 muuta proteaasia, joiden ilmenemisen vähentämisellä oli vastaavanlaisia vaikutuksia (mahdollisia "onkogeenejä"). Vastaavasti löysimme 23 proteaasia, kuten autophagin-3, joiden ilmenemisen vähentäminen lisäsi solujen kasvua ja/tai invasiivisuutta (mahdollisia "tuumori-suppressorigeenejä"). Oikealla viiden eniten ja vähiten solukasvuun/invasioon vaikuttaneen proteaasin geeniekspressi-ion muutosten, mutaatioiden ja geenien kopiomäärän muutosten yhteys eloonjäämisennusteeseen (<http://www.cbioportal.org>, "TCGA provisional" kohortti).

simme että "onkogeeni"-proteaseilla nämä muutokset liittyivät korkeampaan kuolleisuuteen, kun taas "tuumorisuppressori"-proteasien muutokset vaikuttivat liittyvän parempaan elinäkennusteeseen. Tässä analyysissä muutoksen suuntaa ei otettu huomioon, eli esim. mRNA-tasoissa "aliekspressio" oli muutos siinä kuin "yliekspressio". Nämä eivät myöskään, geenideletoita lukuunottamatta, vielä kerro vastaavien proteiinien aktiivisuudesta mitään. Siitä huolimatta degradomi-seulonnan tulokset ovat rohkaisevia ja jatkamme niiden validointia, merkkiainetutkimuksen osalta mm. immunomäärityksin ja immunohistokemiallisin menetelmin. Koska eturauhasen proteasien tasot verenkierrossa ovat riippuvaisia paitsi näiden proteasien ilmenemisestä eturauhasessa, myös niiden kulkeutumisesta/vuotamisesta verenkiertoon, tulemme tutkimaan proteasien proteiinitasoja sekä eturauhas-kudoksessa että verenkierrossa, sekä niiden toimintaa eturauhassyövän kannalta. Tarkoituksenamme on raportoida KliinLab lehdessä näistä tuloksista aikanaan kunhan alkuperäistyö(t) on julkaistu.

Hannu Koistinen kiittää Suomen klinisen kemian yhdistystä (SKKY), Syöpäsäätiötä ja Sigrid Juséliuksen säätiötä projektille myönnetystä apurahoista.

Kirjallisuusviitteet

1. Schroder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. N

Engl J Med 2012;366:981-90.

2. Stenman U-H, Hakama M, Knekt P, Aromaa A, Teppo L, Leinonen J. Serum concentrations of prostate specific antigen and its complex with a1-antichymotrypsin before diagnosis of prostate cancer. Lancet 1994;344:1594-8.
3. Quesada V, Ordóñez GR, Sánchez LM, Puente XS, López-Otín C. The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. Nucleic Acids Res 2009;37:D239-43.
4. Turk B, Turk D, Turk V. Protease signalling: the cutting edge. EMBO J 2012;31:1630-43.
5. López-Otín C, Hunter T. The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer. Nat Rev Cancer 2010;10:278-92.
6. Lopez-Otin C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. J Biol Chem 2008;283:30433-7.
7. López-Otín C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. Nat Rev Cancer 2007;7:800-8.
8. Vandenbroucke RE, Libert C. Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition? Nat Rev Drug Discov 2014;13:904-27.
9. Kappelhoff R, Puente XS, Wilson CH, Seth A, López-Otín C, Overall CM. Overview of transcriptomic analysis of all human proteases, non-proteolytic homologs and inhibitors: Organ, tissue and ovarian cancer cell line expression profiling of the human

- protease degradome by the CLIP-CHIP™ DNA microarray. *Biochim Biophys Acta* 2017;1864:2210-9.
10. Koistinen H, Mattsson J, Stenman UH. KLK-Targeted Therapies for Prostate Cancer. *eJIFCC* 2014;25:77-88.
 11. Stoyanova T, Riedinger M, Lin S, Faltermeier CM, Smith BA, Zhang KX, et al. Activation of Notch1 synergizes with multiple pathways in promoting castration-resistant prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:E6457-66.
 12. Sharma NL, Massie CE, Ramos-Montoya A, Zecchini V, Scott HE, Lamb AD, et al. The androgen receptor induces a distinct transcriptional program in castration-resistant prostate cancer in man. *Cancer Cell* 2013;23:35-47.
 13. Shamir ER, Ewald AJ. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:647-64.
 14. Ulmert D, O'Brien MF, Bjartell AS, Lilja H. Prostate kallikrein markers in diagnosis, risk stratification and prognosis. *Nat Rev Urol* 2009;6:384-91.
 15. Mamoune A, Luo JH, Lauffenburger DA, Wells A. Calpain-2 as a target for limiting prostate cancer invasion. *Cancer Res* 2003;63:4632-40.
 16. Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, López-Otín C. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem* 2007;282:18573-83.

Hannu Koistinen,

Kliinisen kemian ja hematologian osasto, Medicum, Helsingin yliopisto

Juha Rantala,

Misvik Biology, Turku

Tuomas Mirtti, HUSLAB,

Meilahden patologian laboratoriot ja Medicum, Helsingin yliopisto



Kuva Henrik Alfthan

Päätoimittaja

Henrik Alfthan
HUSLAB -talo,
Topeliuksenkatu 32, 00290 Helsinki
P. 050-427 1457
henrik.alfthan@hus.fi

Toimituskunta

Petra Anttila, p. 06-415 4713
Annakaisa Herrala, p. 050-427 9844
Päivi Holm, p. 050-527 3082
Outi Itkonen, p. 050-427 9277
Lotta Joutsu-Korhonen, p. 050-427 2402
Paula Kaarne, p. 044-717 8715
Annika Kouki, p. 050-377 5056
Tuija Männistö, p. 040-635 6432
Tuomas Mäntylä, p. 044-269 1560
Ilkka Penttilä, p. 040-166 2498
Elina Porkkala-Sarataho, p. 014-269 1608
Tanja Savukoski, p. 050-466 9545



Ilmoitukset

Aimo Harmoinen, p. 040-533 5315
sähköposti: aimo.harmoinen@gmail.com

Tilaukset ja osoitteenmuutokset

Jonna Pelanti, p. 050-370 6110
sähköposti: jonna.pelanti@labquality.fi
Tilauhinta: 30 €

Kongressikalenteri

Ilkka Penttilä,
p. 040-166 2498
sähköposti: ilkka.m.penttila@gmail.com

Julkaisija

Suomen kliinisen kemian yhdistys r.y.,
Föreningen för klinisk kemi i Finland r.f.

Kirjapaino

Offset Ulonen Oy, Tampere

Taitto

Marja Rissanen