

Ny behandling af gliomer rettet mod specifikt mikro-RNA

Bo Halle¹, Claus Andersen¹, Mette Katrine Schulz¹ & Bjarne Winther Kristensen²

STATUSARTIKEL

1) Neurokirurgisk Afdeling, Odense Universitetshospital
2) Afdeling for Klinisk Patologi, Odense Universitetshospital

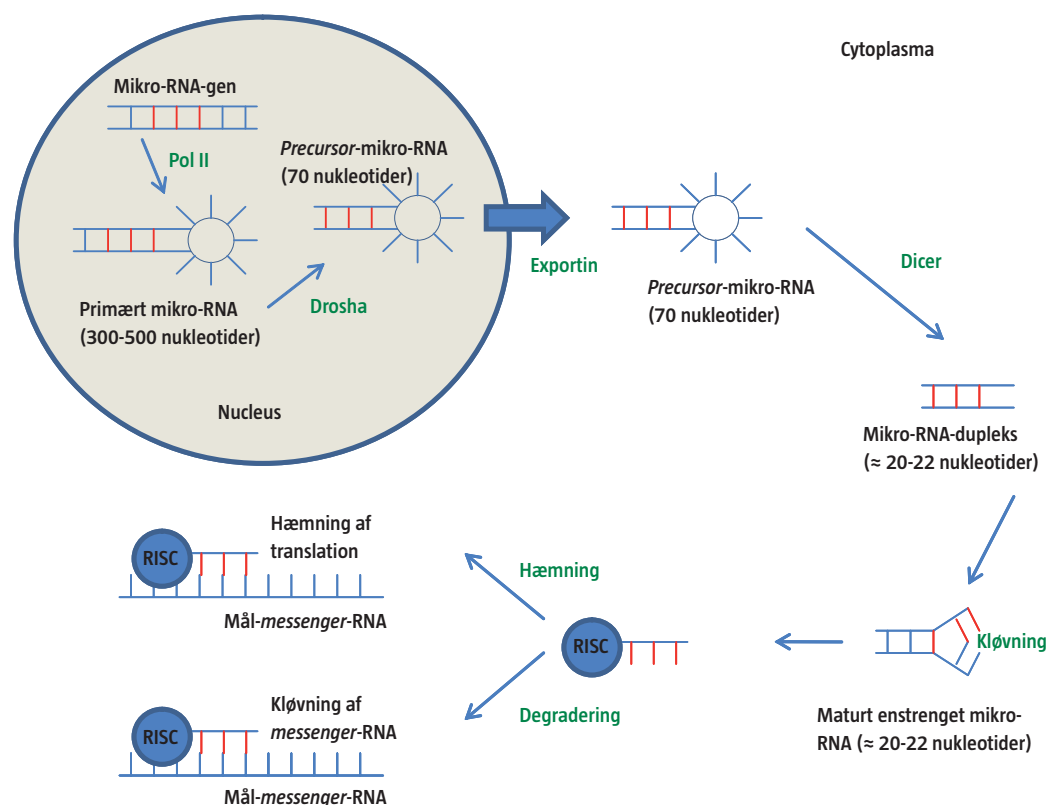
Behandlingen af primære hjernetumorer er en stor udfordring. Til trods for behandling med kirurgi samt stråle- og kemoterapi er medianoverlevelsen for den hyppigste og mest maligne hjernetumor, glioblastom (GBM), 14,6 måneder. Behovet for mere effektiv behandling er således stort. En mulighed, der i de seneste år har påkaldt sig stor interesse, er mikro-RNA (miRNA)-molekylerne, da de udgør et nyt regulatorisk niveau i såvel normale celler som kræftceller. miRNA er meget små RNA-molekyler, der regulerer proteinsyntesen. Mekanismen, hvormed dette sker, kaldes RNA-interferens og blev første gang beskrevet i 1993 [1] i et studie af rundormen *Caenorhabditis elegans*. Overordnet set dannes miRNA-molekyler ved en kompliceret række af processer i såvel cellekernen som cytoplasmaet. Det færdige miRNA-produkt hæmmer herefter proteinsyntesen på messenger-RNA (mRNA)-niveau (Figur 1). Der er i dag identificeret 1.424 hu-

mane miRNA'er [2]. Det menes, at 3% af det humane genom koder for miRNA, og at disse regulerer ca. 30% af de proteinkodende gener. Det kan derfor ikke undre, at miRNA har vist sig at have betydning for talrige cellulære processer, såvel normale som patologiske. I mange cancertyper har man fundet, at niveauerne af de enkelte miRNA'er er forstyrret, således at der både ses over- og underudtrykte miRNA'er i cancercellerne, hvilket ikke ses i de tilsvarende normale væv. Ligeledes er det påvist, at cancercellernes fænotype kan ændres ved at normalisere miRNA-ekspressionen medicinsk. miRNA som angrebepunkt for fremtidig målrettet kræftbehandling er således oplagt.

Formålet med denne statusartikel er at give et kort overblik over den aktuelle miRNA-baserede terapi og de fremtidige udfordringer inden for behandlingen af gliomer, der stadig hører til blandt de mest maligne kræftsygdomme.

FIGUR 1

Mikro-RNA-genese og virkningsmekanisme. Mikro-RNA-genet transkriberes af RNA-polymerase II (Pol II) til primært mikro-RNA. Dette kløves af Drosha-enzymet til precursor-mikro-RNA og transporteres herefter ud af cellekernen via exportin-transportmolekylet. I cytoplasmaet kløves precursor-mikro-RNA via Dicer-enzymet til mikro-RNA-molekyler, der igen kløves til maturt enstrengt mikro-RNA. Maturt enstrengt mikro-RNA binder sig til RNA-induceret silencing complex (RISC) og afhængig af graden af komplementaritet til mål-messenger-RNA forårsages hæmning af translationen eller kløvning af messenger-RNA'et.



MIKRO-RNA OG CANCER

miRNA-udtrykket er undersøgt i mange cancertyper. Der er identificeret både op- og nedregulering i blandt andet leukæmi, karcinomer og gliomer. Betydningen af disse deregulerede miRNA'er er endnu ikke fuldt belyst. For kun fem år siden blev det for første gang påvist, at et miRNA (miRNA-17-92 cluster i B-celle-lymfomer) kunne fungere som et onkogen [3]. Siden er dette også påvist for andre miRNA'er (miRNA-21, miRNA-221, miRNA-155). Modsat er det påvist, at andre miRNA'er, der fungerer som tumorsuppressorer, er nedregulerede i forskellige cancertyper. Dette er blandt andet påvist i kronisk lymfatisk leukæmi (miRNA-15a, miRNA-16-1) samt i lunge-, colon-, bryst-, ovarie- og ventrikelcancer (let-7-familien). Ud over at miRNA'er har betydning for væksten af en given cancer, har de betydning for invasion og metastasering (miRNA-10b) samt kemoresistens (let-7i, let-16, let-21).

MIKRO-RNA OG GLIOMER

Den hyppigste gliøse tumor er det højmaligne GBM. I de senere år har der været forsket intensivt i nye behandlingsmodaliteter bl.a. inden for miRNA-området. I 2005 gennemførtes det første miRNA-profileeringsstudie på GBM [4], og siden da er andre kommet til. Man har herved fået påvist mange deregulerede miRNA'er i netop denne tumortype.

Det mest kendte opregulerede miRNA er miRNA-21, der er overudtrykt i mange cancertyper. *Chan et al* [5] og *Corsten et al* [6] hæmmede i kommercielt tilgængelige GBM-cellelinjer miRNA-21 in vitro med såkaldte *antisense*-oligonukleotider, hvorved celleantallet blev reduceret. Dette menes at bero på caspase-aktivering, der medfører øget apoptose (programmeret celledød). I to andre studier på GBM-cellelinjer har man fundet, at kombinationen af miRNA-21-hæmning og behandling med visse cytostatika (paclitaxel [7] eller teniposid [8]) øger effekten af kemoterapi. På linje med disse in vitro-resultater er det påvist, at intrakraniell implantation af GBM-celler, der inden implantation blev behandlet med en miRNA-21-hæmmer, i mus medførte nedsat tumordannelse. miRNA-221 er også opreguleret i højgradsgliomer [9], og ved hæmning er der påvist en tumorvækstreduktion [10]. I en lignende musemodel medførte direkte intratumoral injektion af en miRNA-10b-hæmmer ligeledes signifikant nedsat tumorvækst. miRNA-10b blev i samme studie fundet opreguleret [11].

Størstedelen af de deregulerede miRNA'er er nedregulerede, og mange af disse har sandsynligvis normale tumorsuppressoregenskaber. Det drejer sig blandt andet om miRNA-124 og miRNA-137. *Silber et*



MIKRO-RNA

1. er små (\approx 20-22 nukleotider) ikkekodende RNA-molekyler, som selv kodes af det humane genom. Mikro-RNA (miRNA) binder til delvist komplementære *messenger*-RNA-sekvenser, og dermed reguleres translationen
2. er aktuelt identificeret i form af 1.424 forskellige humane miRNA-molekyler, der er navngivet i den rækkefølge, de er opdaget
3. er op- og nedregulerede i mange cancertyper
4. har formentlig betydning for cancerstamceller
5. har betydning for tumorvækst, invasion, metastasering og kemoresistens
6. kan op- og nedreguleres med målrettet miRNA-baseret terapi, hvilket er et terapeutisk potentiale inden for fremtidig cancerbehandling.

al [12] påviste i et in vitro-studie, at eksperimentel opregulering af henholdsvis miRNA-124 og miRNA-137 i GBM-cellelinjer medførte hæmning af cellevæksten. *Kefas et al* [13] påviste, at miRNA-7 er nedreguleret i GBM-cellelinjer, og at eksperimentel opregulering hæmmede cellernes evne til invasion og vækst samt øgede andelen af apoptotiske celler. Lignende nedregulering og tumorsuppressive egenskaber er påvist for miRNA-128 [14].

MIKRO-RNA OG CANCERSTAMCELLER

Cancerstamcelle (CSC)-paradigmet er i de seneste år kommet til at omfatte flere og flere cancerformer. CSC-paradigmet bygger på en antagelse om, at tumorer er heterogene og består af kræftceller, der er differentieret i vidt forskellige grader, herunder modne kræftceller, progenitorkræftceller og de helt umodne CSC. CSC defineres som kræftceller, der kan etablere en ny kopi af tumoren og har et uendeligt proliferationspotentiale og dermed kan forny sig selv og samtidig give ophav til mere differentierede cancerceller. Noget tyder på, at den ringe effekt af stråle- og kemoterapi i nogle cancerformer, herunder maligne gliomer, skyldes overlevelse af de formodede CSC trods behandlingen. Dette menes at bero på CSC-karakteristika som øget evne til at gendanne tumoren, lav proliferationsrate, bedre evne til at reparere DNA-skader og overekspression af membrantransportere, hvilket medfører højt effluks af cytostatika fra CSC. Hvis det er muligt, synes det derfor at være oplagt at målrette behandlingen af en given cancer mod netop CSC. En mulighed kunne være miRNA-baseret terapi, i fald det er muligt at identificere miRNA, der er specifikt deregulerede i netop CSC. Der er inden for gliomer lavet et miRNA-ekspressionsstudie med fokus på CSC. Man benyttede den formodede CSC-overflademærker CD133 [15] og gennemførte miRNA-profilering på CD133-positive og -negative GBM-celler [16]. Det har dog siden vist

sig, at der også findes CD133-negative CSC [17], hvorfor miRNA-profilen i studiet ikke udtrykker en egentlig miRNA-CSC-profil i GBM'er. Der savnes derfor indtil videre gode studier af gliomer, hvor man sammenligner miRNA-niveauerne i CSC og de mere differentierede cancerceller.

MIKRO-RNA-BASERET TERAPI

Strategier

miRNA-baseret terapi kan opdeles i direkte og indirekte terapi.

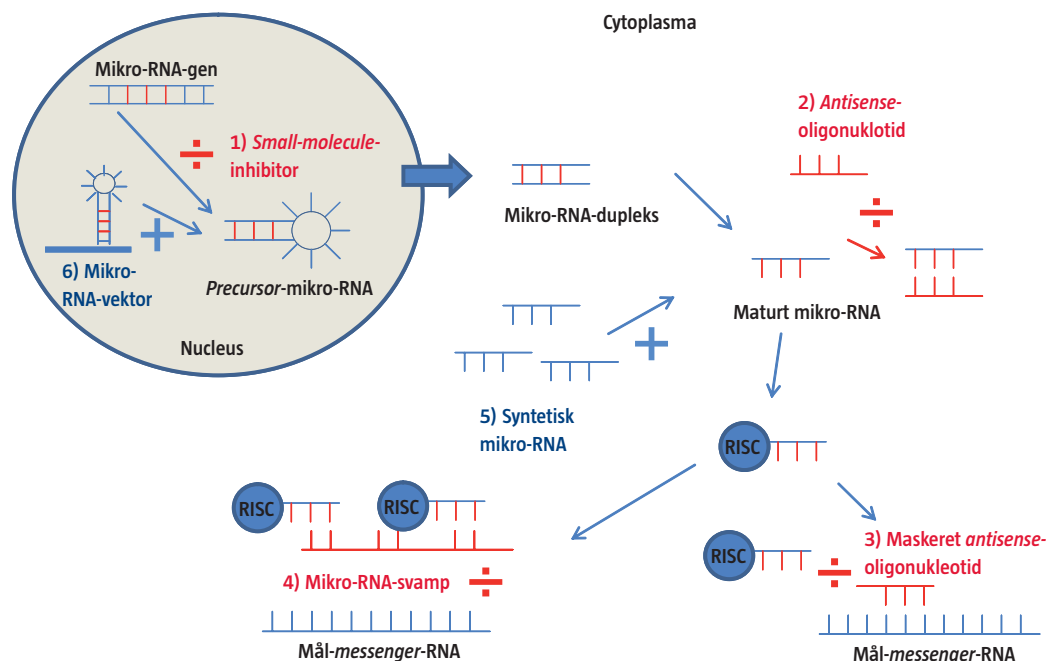
Ved direkte terapi blokeres ekspressionen af et overudtrykt onkogen miRNA, eller også substitueres den manglende ekspression af et tumorsuppressor miRNA (Figur 2). En hyppigt benyttet metode til at hæmme onkogen miRNA er brug af *antisense*-oligonukleotider [5, 6]. *Antisense*-oligonukleotider er korte enkeltstrengede RNA-molekyler, der er omvendt komplementære (deraf navnet *antisense*) til maturt miRNA. De påvirker miRNA'et ved at inducere degradering eller dannelse af dobbeltstrengt inaktivt miRNA. Da *antisense*-oligonukleotider enzymatisk nedbrydes meget hurtigt, har man udviklet forskellige kemiske modifikationer, hvorved stabiliteten er blevet væsentligt øget. En sådan kemisk modifikation er *locked nucleic acid* (LNA)-*antisense*-oligonukleotider, hvor Danmark er et foregangsland i udviklingen af bl.a. et antihepatitismiddel i fase II, tre typer kræftmedicin i fase I og to typer kolesterol-

sænkende medicin i prækliniske forsøg. Der er således stor tiltro til LNA-teknologien, der for nylig også har vist sig at muliggøre hæmning af hele miRNA-familier [18]. Af andre og mindre benyttede metoder kan nævnes miRNA-svampe, maskerende *antisense*-oligonukleotider og *small-molecule*-inhibitorer, hvis virkningsmekanismer kort er beskrevet i Figur 2. For nedregulerede tumorsuppressive miRNA'er (miRNA-7, miRNA-124, miRNA-128, miRNA-137) er der ligeledes flere mulige angrebspunkter. Den mest brugte er direkte indgift af syntetisk miRNA, som også er benyttet i de tidligere refererede studier [12, 13]. En anden mulighed er vektorbaseret terapi, hvor man grundlæggende benytter forskellige virus evne til at levere deres DNA til en given vært. Ved inkorporering af miRNA-gener i udvalgte vira kan man dermed opregulere miRNA-ekspressionen i værten.

Det indirekte princip bygger basalt set på levering af et gen, der medfører cellens død, når det udtrykkes. I genet har man indbygget en række miRNA-målpunkter, således at genet ikke udtrykkes, når de udvalgte miRNA'er er til stede i cellen. I normale celler med højt niveau af de udvalgte miRNA'er sker der således ingenting, men i cancercellerne med undertrykte miRNA'er dør cellen, idet selvmordsgenet udtrykkes. Denne metode er beskrevet i en musemodel for GBM med kombination af miRNA-31, miRNA-127 og miRNA-143 [19].

FIGUR 2

Direkte mikro-RNA-baseret terapi. Opreguleret onkogen mikro-RNA kan hæmmes med: 1) *small-molecule*-inhibitorer, der på transkriptionsniveau hæmmer mikro-RNA, 2) *antisense*-oligonukleotider, der binder til maturt mikro-RNA og herved inaktiverer det, 3) maskerede *antisense*-oligonukleotider, der kompetitivt hæmmer mikro-RNA-RISC-binding til mål-messenger-RNA ved at maskere bindingsstedet, 4) mikro-RNA-svampe, der suger mikro-RNA-RISC til sig via komplementære mikro-RNA-bindingssteder. Nedreguleret tumorsuppressor-mikro-RNA kan opreguleres med: 5) syntetisk mikro-RNA, 6) mikro-RNA-vektorer, hvor mikro-RNA-gener inkorporeres i vira, der efterfølgende angriber cellerne og transkriberer deres gener, herunder det inkorporerede mikro-RNA-gen.



RISC = RNA-induceret silencing complex.

Udfordringer

Som det fremgår, er der identificeret flere mulige miRNA-*targets* i gliomer. Der er uden tvivl andre endnu uopdagede miRNA-*targets*, og man må forvente, at der i fremtiden fokuseres på mulige CSC-specifikke *targets*. Der er gennemført flere dyreforsøg med enten ned- eller opregulering af udvalgte deregulerede miRNA'er i gliomer, hvorved tumorcellernes vækst er blevet hæmmet. Dette er gennemført med flere forskellige teknikker, der dog alle er kendetegnet ved, at de ikke er direkte anvendelige i klinikken. Man har således endnu ikke en dokumenteret brugbar teknik til cerebral miRNA-baseret behandling. Administration er uden tvivl den største udfordring, der må overvindes, før miRNA-baseret behandling af hjernetumorer bliver praktisk anvendelig. Et stort problem er blod-hjerne-barrieren, der minimerer chancen for at opnå et terapeutisk niveau i hjernen ved administration uden for hjernen. Derfor retter interessen sig mod lokal administration. Det mest lovende her er *convection-enhanced-delivery* [20], hvor et lægemiddel infunderes via et mikrokateter, der er placeret i vævet. Der opnås herved en høj koncentration i interstitialvæsken over et relativt stort område. Fra interstitiet ind i cellerne er der også udfordringer som biologisk instabilitet og lavt cellulært optag. Der er forsøgt flere forskellige strategier til at komme uden om dette, herunder forskellige kemiske modifikationer, som også er nævnt tidligere. En anden strategi er indpakning af lægemidler i såkaldte *nanocarriers*, der øger stabiliteten og det cellulære optag, samtidig med at toksiciteten er lav.

Overordnet set er der således grund til optimisme om miRNA-baseret forbedring af behandlingen af gliomer i fremtiden, hvilket på alle måder er ønskværdigt for de mennesker, der får konstateret disse tumorer.

KORRESPONDANCE: Bo Halle, Neurokirurgisk Afdeling, Odense Universitetshospital, Sdr. Boulevard 29, 5000 Odense C. E-mail: bo.halle@ouh.regionsyddanmark.dk

ANTAGET: 5. oktober 2011

FØRST PÅ NETTET: 21. november 2011

INTERESSEKONFLIKTER: ingen

LITTERATUR

1. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993;75:843-54.
2. <http://www.mirbase.org/cgi-bin/query.pl?terms=homo+sapiens> (8. juni 2011).
3. He L, Thomson JM, Hemann MT et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435:828-33.
4. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334:1351-8.
5. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005;65:6029-33.
6. Corsten MF, Miranda R, Kasmieh R et al. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered s-trail in human gliomas. *Cancer Res* 2007;67:8994-9000.
7. Ren Y, Zhou X, Mei M et al. MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells u251 (pten-mutant) and ln229 (pten-wild type) to taxol. *BMC Cancer* 2010;10:27.
8. Li Y, Li W, Yang Y et al. MicroRNA-21 targets Irfp1 and contributes to vm-26 resistance in glioblastoma multiforme. *Brain Res* 2009;1286:13-8.
9. Conti A, Aguenouz M, La Torre D et al. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors. *J Neurooncol* 2009;93:325-32.
10. Zhang C, Kang C, You Y et al. Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27kip1 in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2009;34:1653-60.
11. Gabriely G, Yi M, Narayan RS et al. Human glioma growth is controlled by microRNA-10b. *Cancer Res* 2011;71:3563-72.
12. Silber J, Lim DA, Petritsch C et al. MiR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 2008;6:14.
13. Kefas B, Godlewski J, Comeau L et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res* 2008;68:3566-72.
14. Shi L, Cheng Z, Zhang J et al. hsa-miR-181a and hsa-miR-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res* 2008;1236:185-93.
15. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432:396-401.
16. Gal H, Pandi G, Kanner AA et al. MiR-451 and imatinib mesylate inhibit tumor growth of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;376:86-90.
17. Beier D, Hau P, Proescholdt M et al. Cd133(+) and cd133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 2007;67:4010-5.
18. Obad S, dos Santos CO, Petri A et al. Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny Inas. *Nat Genet* 2011;43:371-8.
19. Wu C, Lin J, Hong M et al. Combinatorial control of suicide gene expression by tissue-specific promoter and microRNA regulation for cancer therapy. *Mol Ther* 2009;17:2058-66.
20. Allard E, Passirani C, Benoit JP. Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors. *Biomaterials* 2009;30:2302-18.