ISTITUTO PER LO STUDIO E LA PREVENZIONE ONCOLOGICA

Servizio Sanitario della Toscana

WORKSHOP

Genetica e neoplasie del colon-retto: il ruolo delle analisi molecolari all'interno del programma di screening

10 novembre 2016

Firenze

Grand Hotel Mediterraneo

Con il patrocinio di

GISCoR
gruppo italiano screening colorettale

Biomarcatori per la diagnosi Precoce del tumore colorettale e le biobanche nello screening

Francesca Maria Carozzi
Laboratorio HPV e Diagnostica Molecolare
Laboratorio Regionale Prevenzione Oncologica
ISPO – Firenze

Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer

- Fecal occult blood test is a widely used non-invasive screening tool for CRC.
- Although fecal occult blood test is simple and cost-effective in screening CRC, there is room for improvement in terms of the accuracy of the test.
- Genetic dysregulations have been found to play an important role in CRC development.
- With better understanding of the molecular basis of CRC, there is a growing expectation on the development of diagnostic tests based on more sensitive and specific molecular markers and those tests may provide a breakthrough to the limitations of current screening tests for CRC.

I Marcatori in studio per il colon-retto

Tsang AHF *et al*. Molecular diagnostics in colorectal cancer

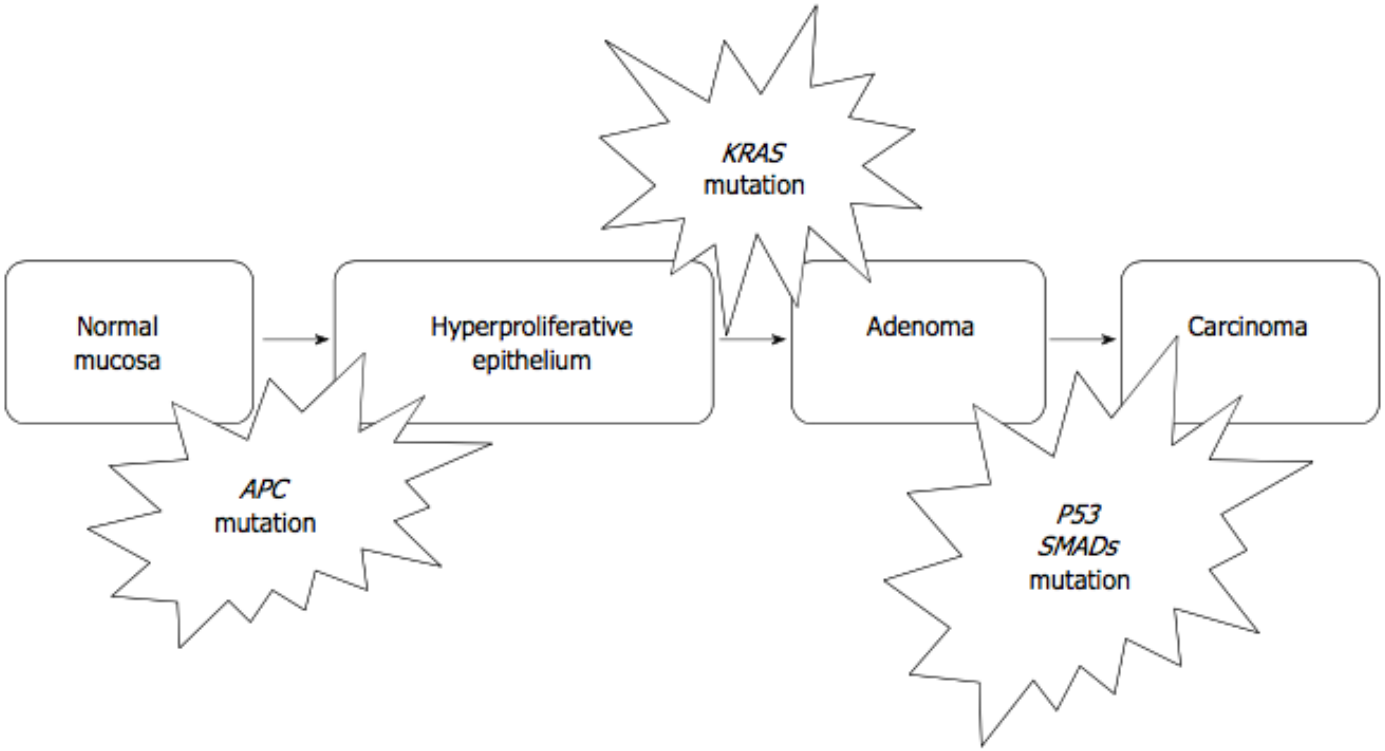
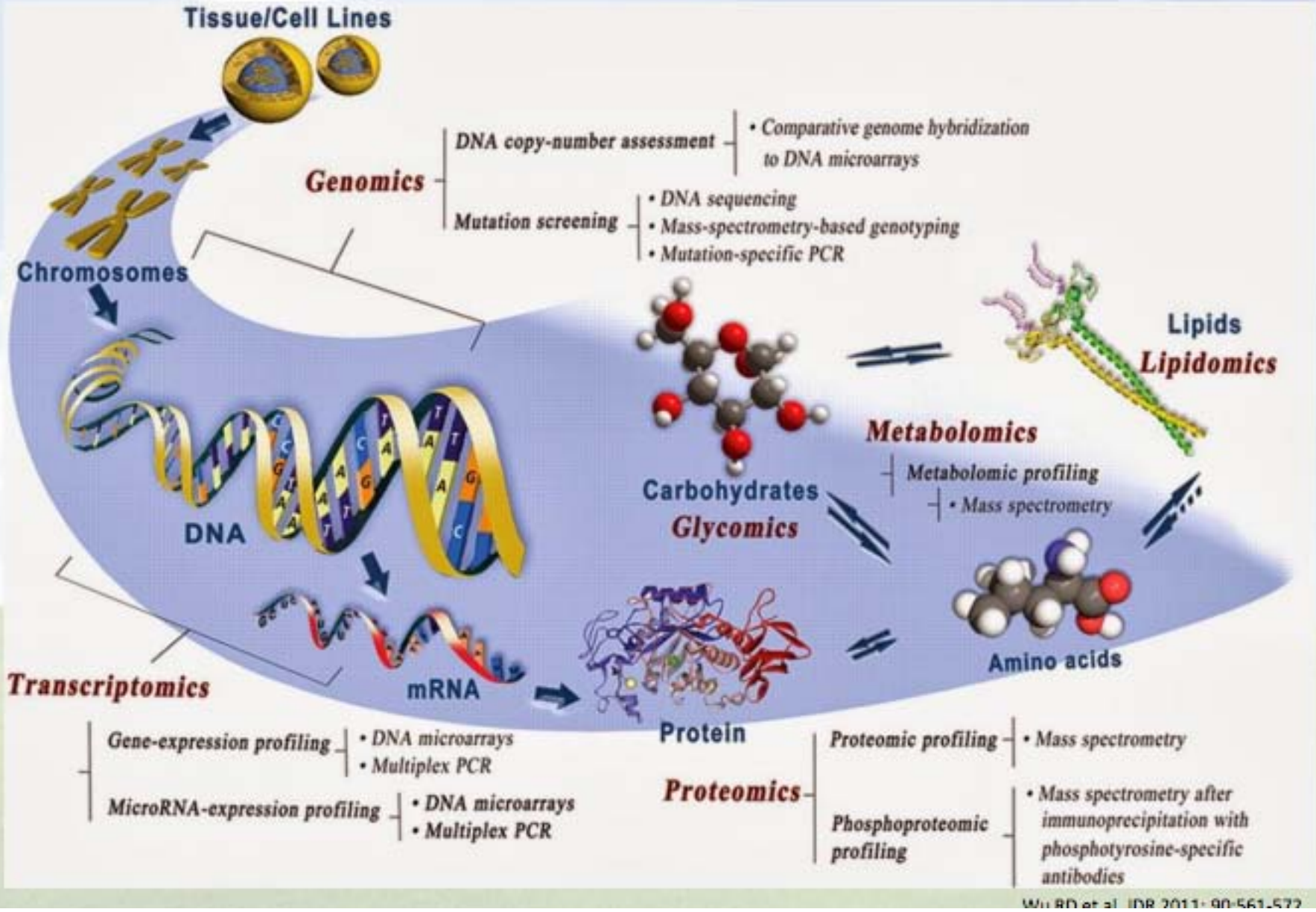


Figure 1 Adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer formation. This is a simplified presentation of colorectal cancer tumourigenesis. The true carcinogenesis progress of colorectal cancer is much more complicated.

From Genomics to… –Omics



Wu BD et al. JDR 2011; 90:561-572

Cancer related molecular markers can be classified in 4 groups

•Biomarcatori di rischio: *per selezionare i soggetti a maggior rischio di sviluppare la neoplasia da sottoporre allo screening*

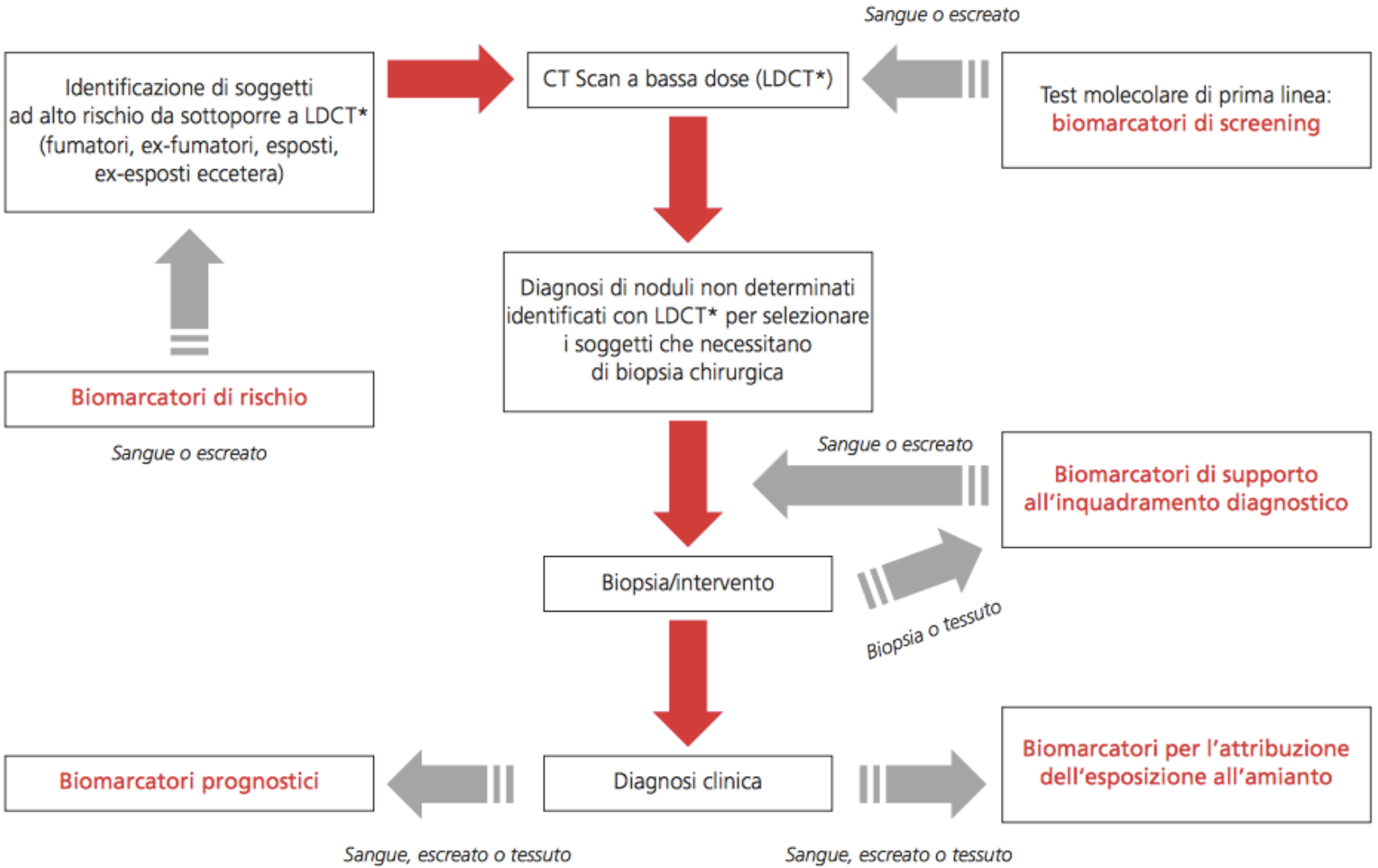
•Biomarcatori di screening: come test di prima linea per i soggetti da sottoporre a screening;

•Biomarcatori di supporto all'inquadramento diagnostico:

- Triage dei soggetti FOBT positivi da inviare a colonscopia
- Gestione dei soggetti fobt positivi con colon negativa

(circa il 50-60% dei soggetti con FOBT positivi hanno colon negativa)

• Biomarcatori prognostici: per la caratterizzazione biologica della neoplasia a scopo prognostico o terapeutico;



F. Carozzi et al E&P 2016

La Cervice

Pubblicazione report HTA Italiano e Linee Guida Europee (anticipate nel report HTA)

- L'infezione persistente con HPV oncogeni è la condizione necessaria per l'evoluzione a carcinoma
  - 12 tipi di HPV causano virtualmente tutti i casi di cancro
- Un programma basato sulla ricerca di HPV oncogeni come test primario è più efficace dello screening con Pap-test sia nella individuazione di lesione precancerose di alto grado e fornisce una protezione maggiore (60-70%) per la prevenzione del carcinoma invasivo (Lancet 2014)

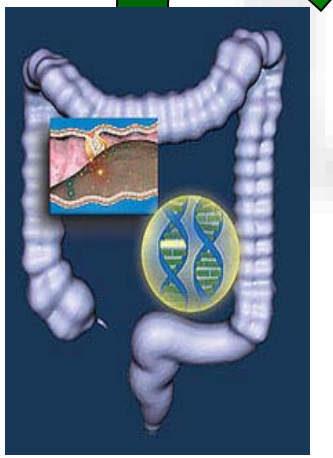
La ricerca nella rete dello screening oncologico:
studi che si basano sulla popolazione invitata e aderente ai programmi di screening

Colon retto e diagnostica precoce

- Una sostanza o alterazione *'genetica'* presente nel tessuto tumorale, ma non nei tessuti non tumorali, determinabile in un fluido biologico facilmente accessibile rappresenta il biomarcatore ideale per l'individuazione precoce del tumore in modo specifico e non invasivo :
  - Campione fecale
  - Prelievo ematico
  - Saliva
  - Ecc...

Feci vs prelievo ematico: pro e contro

- Feci: Cellule tumorali di carcinomi colonrettali e di adenomi si possono ritrovare nelle feci



- **le cellule esfoliano continuamente nel lume intestinale (mentre per il sangue occulto si possono verificare sanguinamenti intermittenti);**
- **la neoplasia tende a esfoliare in quantità superiore rispetto alla mucosa normale e il DNA è stabile**
- **Occorre più materiale fecale rispetto a quello prelevato per FOBT**

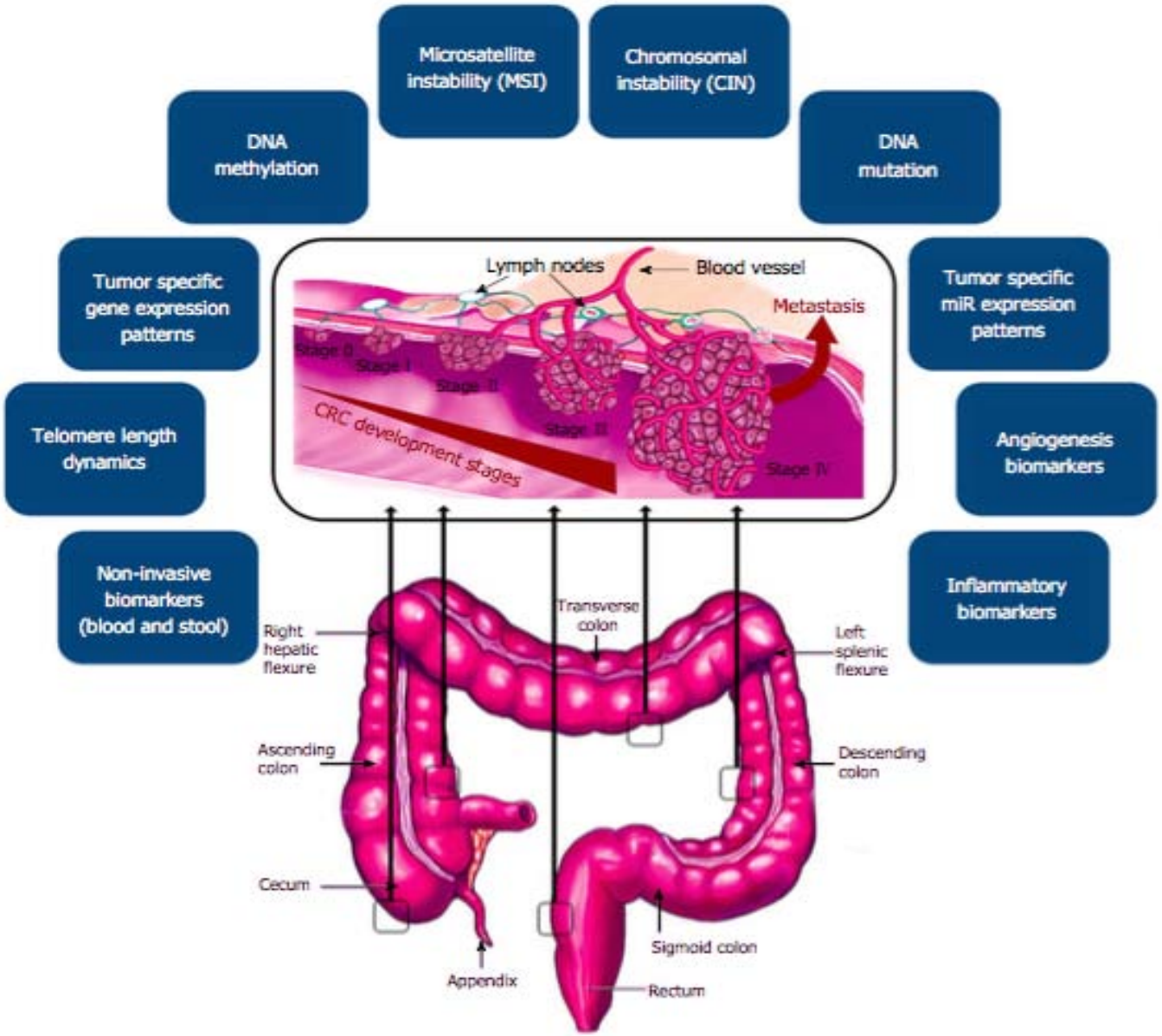
- Prelievo ematico
  - La maggior parte dei marcatori candidati sono stati valutati in ambito clinico e sono per lo più rilevati in fase avanzata.
  - I progressi tecnologici associati a nuove conoscenze dei meccanismi molecolari che contribuiscono alla carcinogenesi del colon-retto hanno consentito studi per biomarcatori ematici per la diagnosi precoce: acidi nucleici circolanti, cellule tumorali circolanti , proteine e RNA.

A causa della eterogeneità del cancro, nessun singolo marcatore molecolare ha una sensibilità ottimale, mentre combinazioni di diversi marcatori hanno consentito nei primi studi una elevata detection rate sia per CCR che per adenomi avanzati.

Cell-Free Nucleic Acids

- The origin of cell-free nucleic acids in circulation is less well-defined than in stool.
- The release of DNA, RNA, and noncoding RNAs in cancer patients into circulation is attributed to a combination of tumor cell necrosis, apoptosis, and possibly secretion.
  - Changes in the concentration and detection of tumor-specific alterations in DNA and/or dysregulated RNA expression profiles have been proposed as CRC-specific biomarkers.
  - The development of diagnostic methods based on the detection of tumor-specific alterations in circulating DNA and/or RNA expression is particularly appealing because they can provide valuable molecular information about the tumor that may be used for diagnostic, predictive, and prognostic purposes.

Different classes of colorectal cancer associated molecular and cellular biomarkers



Aghagolzadeh P et al . Molecular and cellular biomarkers for CRC

Genetic and Epigenetic Alterations in Circulation

- Detection of tumor-derived genetic and epigenetic alterations in stool and blood samples has been explored as candidate CRC biomarkers.
- Detection of mutations possible in cfDNA isolated from stool, serum or plasma
  - point mutations in *KRAS:* Most of the activating mutations, approximately 90%, are found in codons 12 and 13 of exon 1. Close to 5% of the mutations are found in codon 61 in exon 2
  - The sensitivity levels achieved using mutations in this gene were 43% at the highest with a specificity of 93% .
- Circulating DNA methylation biomarkers have also been evaluated.
  - *The* use of the individual methylation status of *Vimentin, NGFR, SEPT9,* and *TMEFF2* had sensitivities ranging from 48–72% and specificities from 69-93%
  - Other genes evaluated as methylation markers include *p16, APC, hMLH1, HLTF,* and *DAPK* .

Come inserire un biomarcatore nella pratica

- Per avere utilità clinica nello screening , i biomarcatori dovranno dimostrare di poter modificare il processo decisionale clinico
  - Alta sensibilità e specificità
  - Elevato VPN e VPP
  - Misurabile in campioni biologici facilmente accessibili
  - Semplice da misurare e Stabile per un periodo di tempo compatibile con il processo di screening
  - costantemente rilevabile in entrambi i sessi e gruppi etnici

- La traslazione finale nella pratica di routine clinica o di screening, tuttavia, richiederà la possibilità di utilizzare piattaforme analitiche facilmente applicabili in uno screening di popolazione che comporta l'analisi di un elevato numero di soggetti.

N Engl J Med. 2014 Apr 3;370(14):1287-97. doi: 10.1056/NEJMoa1311194. Epub 2014 Mar 19.

Multitarget stool DNA testing for colorectal-cancer screening.

Imperiale TF[1], Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Levin TR, Lavin P, Lidgard GP, Ahlquist DA, Berger BM.

- Recently, Imperiale et al. reported that in a large study including 9989 participants, a multitarget stool DNA test had higher sensitivity for the detection of advanced adenomas (42.4%) and CRC (92.3%) than FITs [69].

- This cross-sectional study evaluated the screening potential of a multitarget stool test that detected *KRAS* mutations, methylation of *NDRG4* and *BMP3*, quantification of -*actin* as a reference gene for DNA quantity, and immunochemical detection of hemoglobin.

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

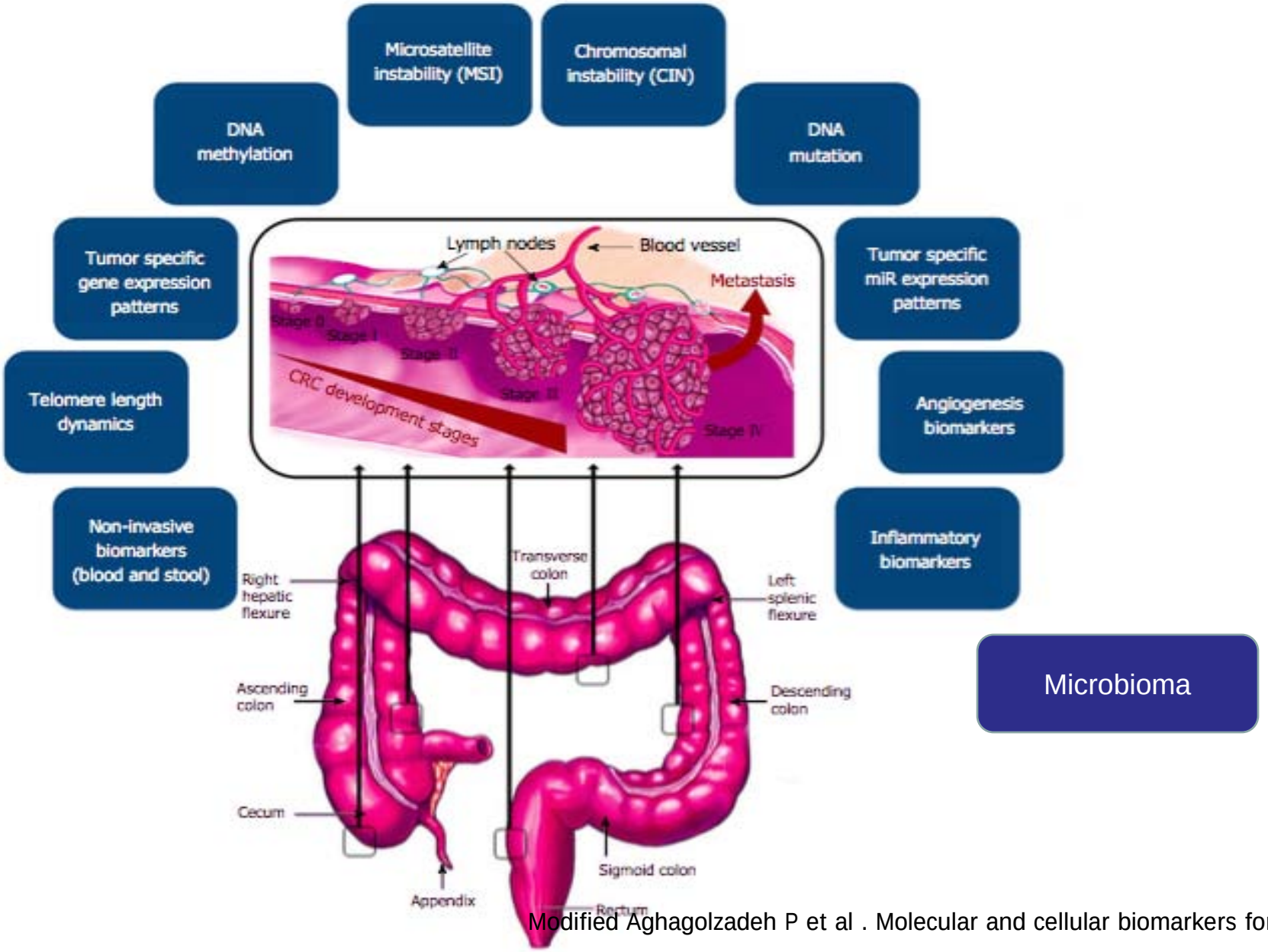
EDITORIAL

Stool DNA and Colorectal-Cancer Screening

Douglas J. Robertson, M.D., M.P.H., and Jason A. Dominitz, M.D., M.H.S.

- First, the number of participants who were excluded from the study because of problems with sample collection or assay application was far greater in the stool DNA group (689 participants, or 6.3% of the total number) than in the FIT group (34 participants, or 0.3%).
- Second, this study compared only the one-time sensitivity of these two tests. Given the lower specificity and greater expense of stool DNA testing as compared with FIT, it is unlikely that the test would be performed annually in the way that FIT testing is recommended.
- Third, an even more important issue may be related to the specificity of stool DNA testing. Roughly 10% of the cohort had a positive stool DNA result and entirely negative results on colonoscopy. This false positive rate is an important consideration when determining the appropriate interval for screening.
- Finally, Imperiale et al. evaluated stool DNA testing among participants who had complete data for all three screening tests. However, realworld effectiveness may be different, particularly given the higher technical failure rate with stool DNA testing. The importance of compliance to the effectiveness of screening was evidenced

Different classes of colorectal cancer associated molecular and cellular biomarkers



Modified Aghagolzadeh P et al . Molecular and cellular biomarkers for CRC

CRC Biomarkers RNA-Based Tests

- The detection of RNA markers in stool has not been as extensively studied as DNA biomarkers partly due to the fact that RNA is less stable than DNA in stool.
- Technological advances in RNA preservation buffers have made it feasible to study CRC tumor-specific RNA transcripts as stool biomarkers.
  - Detection of single and combinations of tumor mRNA transcripts, such as *PTGS2* and *MMP7,* have yielded high specificity for CRC
- Ongoing research in colorectal tumor gene expression profiles (transcriptomics) and noncoding RNA expression profiles (such as miRNAs) are currently being evaluated to identify candidate transcripts and explore their possible applications as CRC detection tools.

MicroRNA markers

- MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA that is usually 19-23 nucleotides in length.
- Due to their small sizes, miRNAs are more stable in blood and FFPE tissues than other nucleic acids such as DNA and RNA.
- miRNAs are involved in post-transcriptional regulation of gene expression: they are able to function as oncogenes or tumor suppressor genes, and dysregulation of miRNA would be associated to cancers.
- miRNAs that are specic to CRC in stool and blood samples may be identified for the development of non-invasive prognostic and predictive markers of the diseases.

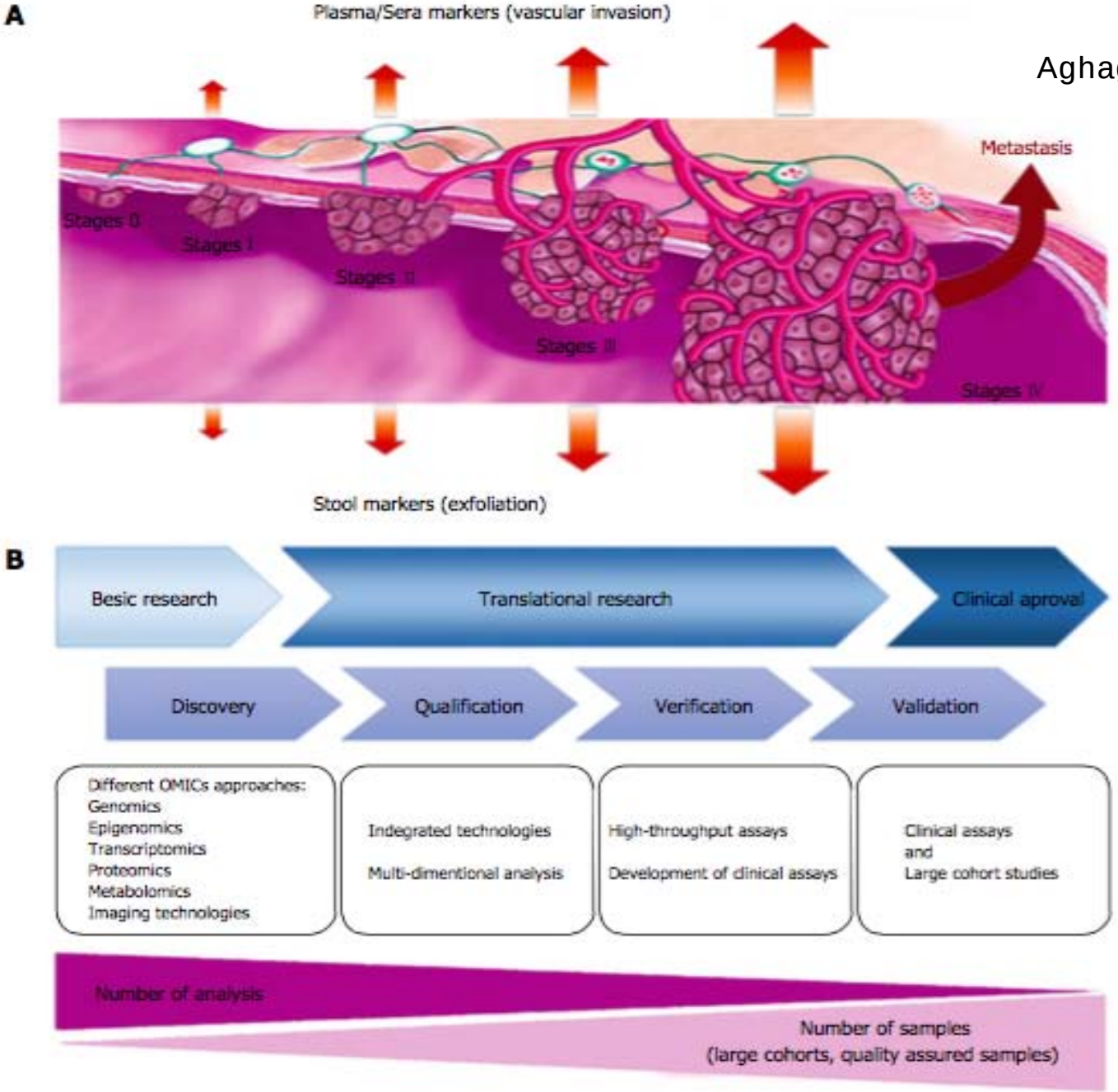
Noncoding RNAs in Circulation

- Since the discovery of miRNAs and the association of particular miRNAs with CRC, intense research efforts have focused on the identification of CRC-specific miRNA transcripts as potential blood biomark- ers.
  - One study reported that a 69-gene miRNA signature panel in plasma could differentiate between CRC and healthy patients].
  - A small study reported that a panel of eight miRNAs (miR-532-3p, miR-331, miR-331, miR195, miR-17, miR142-3p, miR15b, miR532, and miR-652) could accurately detect polyps .
  - Another group evaluated a three-miRNA panel (miRNA 193a-3p, miR23a, and miR-338-5p) for CRC detection achieving 80% sensitivity, 84.4% specificity, and 83.3% accuracy [133].

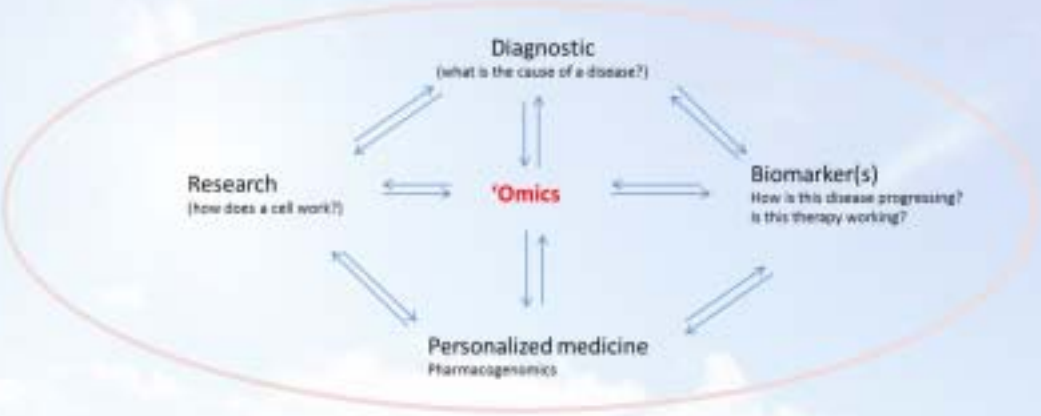
- Although promising, Evaluation of new miRNA candidate markers, both individually and in panels, need to be tested in large independent studies to determine their clinical usefulness.

Schematic view of biomarker secretion during different stages of colorectal cancer development and pipelines of biomarker discovery for colorectal cancer

Aghagolzadeh P et al . 2016



From omics to registries and biobanks and...back



Information about the disease and the patient.

-Who is it?
-What age, sex, type of disease?
-What is the gene(s) involved? Type of mutation?
-Consent for clinical/natural history studies?
-Etc.

Storage and availability of biomaterials

-What type of biomaterial: blood, serum, cells, etc.
-How many samples originating from patients with similar charac
are stored?
-What type of controls are stored?
-Etc.

Registries ⇄ **Biobanks**

complete integration between biobanks and registries

BIOBANCHE di SCREEENING

- Perché
  - Consapevolezza che le banche biologiche sono risorse fondamentali per l'avanzamento delle conoscenze scientifiche
- Punti di forza e limiti
  - Modalità di arruolamento dei soggetti
  - Quali strumenti per favorire l'arruolamento senza appesantire Il programma di screening
- Quali campioni
  - il materiale biologico deve essere raccolto con modalità semplici**, di modo che ci sia una forte accettabilità da parte dei soggetti a cui viene richiesto di partecipare
- Accreditamento delle biobanche
  - garantire la qualità e l'uniformità nei processi di stoccaggio e bioconservazione dei campioni biologici

TECHNOLOGY FEATURE

BUILDING BETTER BIOBANKS

High-quality, data-rich samples are essential for future research. But obtaining and storing these samples is not as straightforward as many researchers think.


What's a biobank?
What am I agreeing to?
Perhaps you'd like to donate some of your genes to a biobank

Donazione del materiale biologico e bioetica:

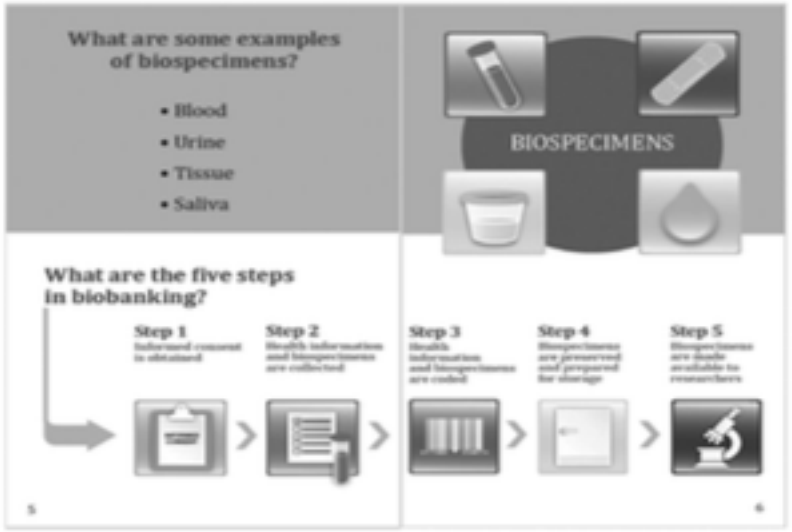
- donazione di “frammenti del sé biologico”
  - la possibilità del donatore di mantenere sempre una qualche forma di controllo sul proprio campione (diritto di revoca del consenso)
  - Il consenso deve garantire al donatore che il campione biologico non verrà mai utilizzato in progetti di ricerca da lui non condivisi
- donazione di informazione significative (individuale e familiare)
- la motivazione alla partecipazione di donatori sani è legata alla speranza di trarre dei benefici dalla ricerca
  - donazione da cui probabilmente non si potrà trarre alcun beneficio

Costruzione di un **sistema di comunicazione e di formazione efficace**

- Le biobanche conservano il campione e le relative informazioni per lungo tempo
- I progetti di ricerca possono portare a conoscere informazioni estremamente sensibili tanto per il donatore/paziente quanto per i suoi familiari
- Le biobanche prolematizzano lo stesso concetto di salute (informazioni genetiche)
- “processo comunicativo tra il medico/ricercatore e il paziente/donatore ed eventualmente altre figure professionali, che avviene nel tempo secondo metodologie comunicative anche nuove rispetto al passato.”
- Restituzione delle informazioni
- Condivisione dei benefici

Brochure,
Webpage
consenso interattivo
Newsletter
incontri formativi rivolti alla cittadinanza


Biobanking:
Hope for a cancer cure
MOFFITT


What are some examples of biospecimens?
• Blood
• Urine
• Tissue
• Saliva
BIOSPECIMENS
What are the five steps in biobanking?
Step 1
Step 2
Step 3
Step 4
Step 5


Biobanco:
Una esperanza de cura para el cáncer
MOFFITT

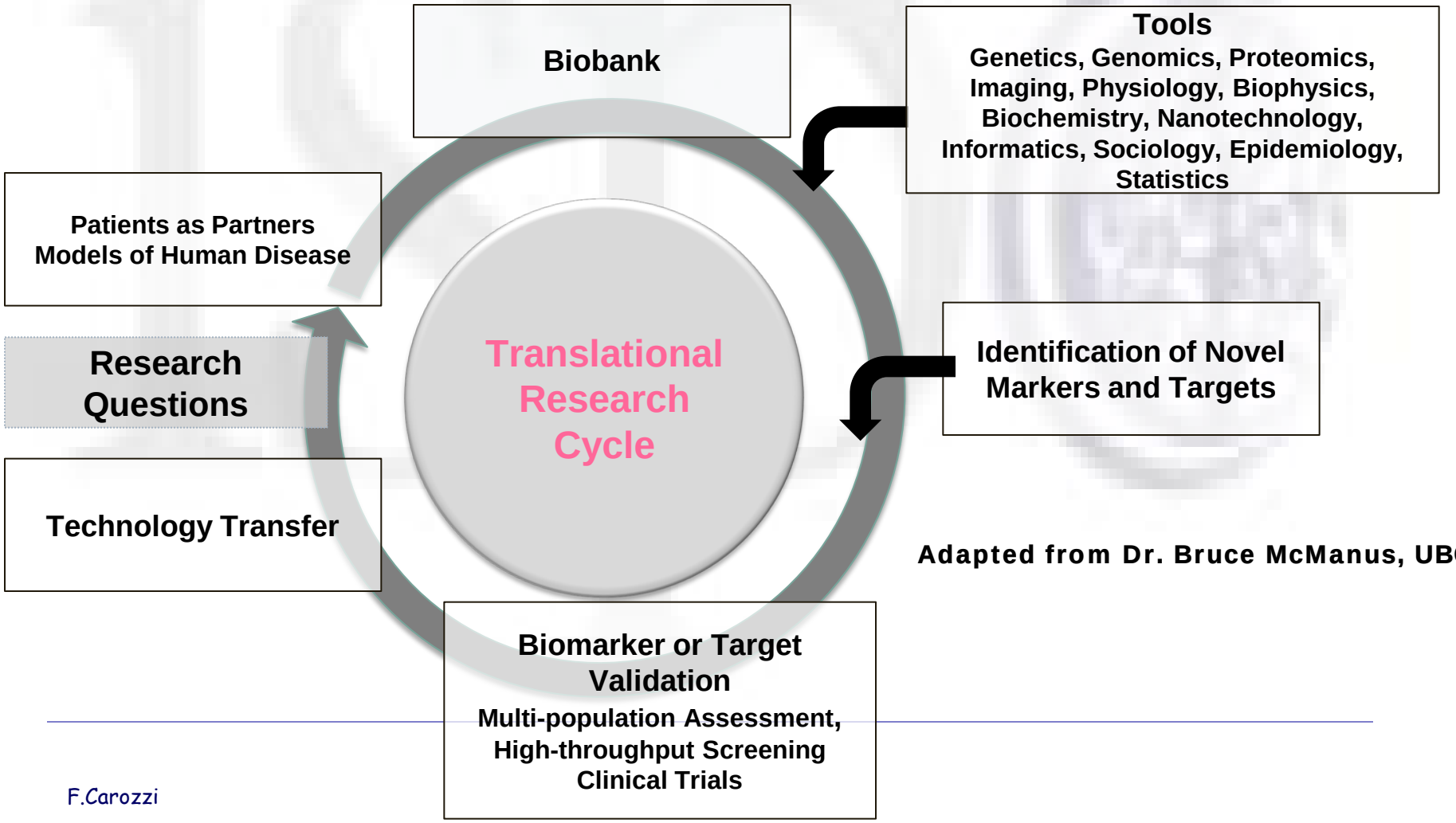

Biobanking:


What is biobanking?
What are biospecimens?
Why are biospecimens important to research?


¿Qué son muestras biológicas?
¿Por qué son importantes las muestras biológicas para la investigación?


Biobanco:

The Translational Research Cycle
The Biobank is Essential to Provide Solutions



Adapted from Dr. Bruce McManus, UBC

Grazie per l'attenzione

f.carozzi@ispo.toscana.it