

Føreløbig titel:

TIDLIG DIAGNOSTIK AF TYKTARMSKRÆFT - en undersøgelse af biomarkører i plasma fra donorer, som deltager i Det Danske Bloddonorstudie

Førsteforfatter/ medforfattere/ sidsteforfatter:

Christian Erikstrup / Ole B. V. Pedersen, Rudi Steffensen, Kaspar Rene Nielsen, Henrik Hjalgrim, Mikkel S. Petersen, Henrik Ullum / (??) Kim Varming
(Udfyldes når beslutning er truffet af styregruppen)

Synopse (Kort beskrivelse af baggrund, formål, metode og evt. forventede resultater)

På trods af mange års intensiv forskning er kræft fortsat et stort helbredsproblem og er årsag til mere end 15.000 dødsfald i Danmark om året. For de fleste dødelige kræftformer gælder det, at de opdages for sent til at kunne kureres ved operation. Det vil derfor være et stort fremskridt, hvis der kunne findes biomarkører i blodet, som med høj sikkerhed kan stille kræftdiagnoser tidligt og som derfor kan bruges til screening af raske eller af patienter med uklare symptomer.

Selvom donorer skal være raske for at donere blod, udvikler de sygdomme ligesom alle andre danskere. Som eksempel har vi set på forekomsten af tyktarmskræft hos danske bloddonorer. Blandt de 255.738 bloddonorer, som havde doneret mindst en gang i perioden fra 1999 til 2003, var der 187, som fik diagnosen tyktarmskræft inden 1. jan 2003. Det svarer til en incidens på 18/100.000 personår, hvilket kun er ganske lidt lavere (25 %) end den aldersstandardiserede incidensrate i den danske befolkning. Bloddonorer udvikler altså kræft ligesom alle andre danskere, selvom de på det tidspunkt de donerer blod opfatter dem selv som raske.

Med den forventede inklusionsrate til DBDS vil vi have 100.000 personårs opfølgning ved udgangen af 2012. På det tidspunkt vil vi altså forvente at finde ca. 18 tilfælde af tyktarmskræft. Da bloddonorerne donerer blod op til 4 gange årligt vil vi have op til 10 plasmaprøver og 3 års opfølgning for de først inkluderede donorer ved udgangen af 2012. I gennemsnit vil vi have 1½ års opfølgning for hver donor. DBDS udgør derfor en enestående platform til at undersøge, om der kan findes biomarkører i plasma fra donorer, som kan forudsige udviklingen af kræft. Da et af de mest lovende områder indenfor biomarkører er mikroRNA (miRNA) vil vi primært undersøge disse.

FORMÅL

Med udgangspunkt i kendte miRNA, som er associeret til tryktarmskræft, vil vi undersøge, om der findes biomarkører, som kan bruges diagnostisk forud for, at sygdommen giver symptomer.

Herunder skal der sammensættes et diagnostisk panel af udvalgte miRNA.

miRNA resultater skal sammenholdes med histone-complexed DNA fragments (hcDNA), som udtryk for cellehenfald (tumorbyrde), p53 og carcinoembryogen antigen (CEA).

METODE

Den grundlæggende metode er et case-control studie af cirkulerende biomarkører hos syge sammenlignet med raske kontroller, samt brug af historisk materiale til at fastlægge, hvor tidligt de cirkulerende biomarkører kan findes hos donorer, som udvikler sygdom.

Plan for projektets udførelse

Fase 1: Patientprøver og prøver fra matchede kontroller analyseres på Exicon miRCURY 11.0 arrays for at finde egnede markører.

Fase 2: donorprøver fra donorer som udvikler tyktarmskræft og kontroller testes for anvendelighed af diagnostisk panel af udvalgte miRNA. Gøres vha. udvalgte primere og

SYBRGreen på LightCycler 480 II. I fase 2 indgår følgende:

- Validering af miRNA qPCR fra h.h.v. friskt og frosset plasma
- Validering af miRNA qPCR direkte i plasma overfor miRNA oprenset fra plasma.
- qPCR på udvalgte miRNA i donorplasma fra donorer, som har udviklet cancer og kontroller.

Materiale

Personer der skal indgå i studiet:

Fase 1: EDTA plasma fra patienter indlagt med nydiagnosticeret og ubehandlet tyktarmskræft til validering af, hvilke miRNA der kan bruges til at skelne mellem syge og raske (vha. microarray). Der bruges tilsvarende antal alders- og kønsmatched bloddonor-kontroller.

Fase 2: Det udvalgte miRNA panel testes på arkiverede EDTA plasmaprøver fra DBDS donorer, som udvikler cancer igen med brug af det dobbelte antal alders- og kønsmatched raske bloddonorkontroller. Identificering af donorer som udvikler cancer vil ske ved registersamkøring mellem DBDS og sundhedsstyrelsens registre (cancerregisteret). Plasmaprøver er nedfrosset for hver donation (mindst siden indgang i DBDS).

Variabler der skal indgå i studiet:

(inkl. angivelse af om data allerede findes eller skal indsamles/måles)

Identificering af personer med cancer vha. udtræk fra cancerregisteret.

Der isoleres total RNA inkl. miRNA fra plasma. RNA oprenses på søjle fra Exicon (Exicon miRCURY RNA isolation kit), som isolerer både miRNA og almindeligt RNA. Totalt RNA mærkes og hybridiseres til Exicon miRCURY 6th gen arrays eller qPCR, som anbefalet af producenten. Der konstrueres specifikke primere til identificering af miRNA ved qPCR. qPCR prøverne køres på LightCycler 480 II med SYBRGreen til kvantisering.

Alle data ovenfor er nye og skal bestemmes som en del af undersøgelsen.

Statistiske analyser:

Ekspressionsdata analyseres ved hjælp af R og Bioconductor. Normalisering af data gøres v.h.a. LOWESS. Differentielt udtrykte gener identificeres v.h.a. lineære modeller i Limma og signifikansniveau bestemmes ud fra volcano-plots / Benjamini-Hochberg. Der foretages efterfølgende clusteranalyse af arraydata.

Sygdomsprediktion af miRNA panel vil blive bedømt vha. ROC kurver. Ud fra specifikke tærskelværdier beregnes odds ratio for prædiktion af udvikling af leukæmi eller lymfom. Signifikansniveau for miRNA panelet sættes til $< 0,05$.

Tidsperspektiv:

Forår 2013: Finansiering af projektet og indsamling af prøver på nydiagnosticerede patienter med CRC.

Efterår 2013 til udgangen af 2014: Identificering af DBDS donorer som har udviklet CRC. Fremskaffelse af plasmaprøver på cases og kontroller fra frysehus. miRNA oprensning og analyse af Exicon miRCURY 11.0 arrays / qPCR. Databearbejdning og publicering af resultater.

Persons ansvarlig for udformning af synopsis/kontaktperson(er):

Ole B. V. Pedersen / Christian Erikstrup

Finansiering (allerede opnået / skal søges / finansieres af DBDS midler):

Finansieres vha. fonde (skal søges).

Godkendt af styregruppen (dato):

Yderligere kommentarer: