



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Clinical and molecular features of high-grade osteosarcoma

Anninga, J.K.

Citation

Anninga, J. K. (2013, January 9). *Clinical and molecular features of high-grade osteosarcoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20397>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/20397>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20397> holds various files of this Leiden University dissertation.

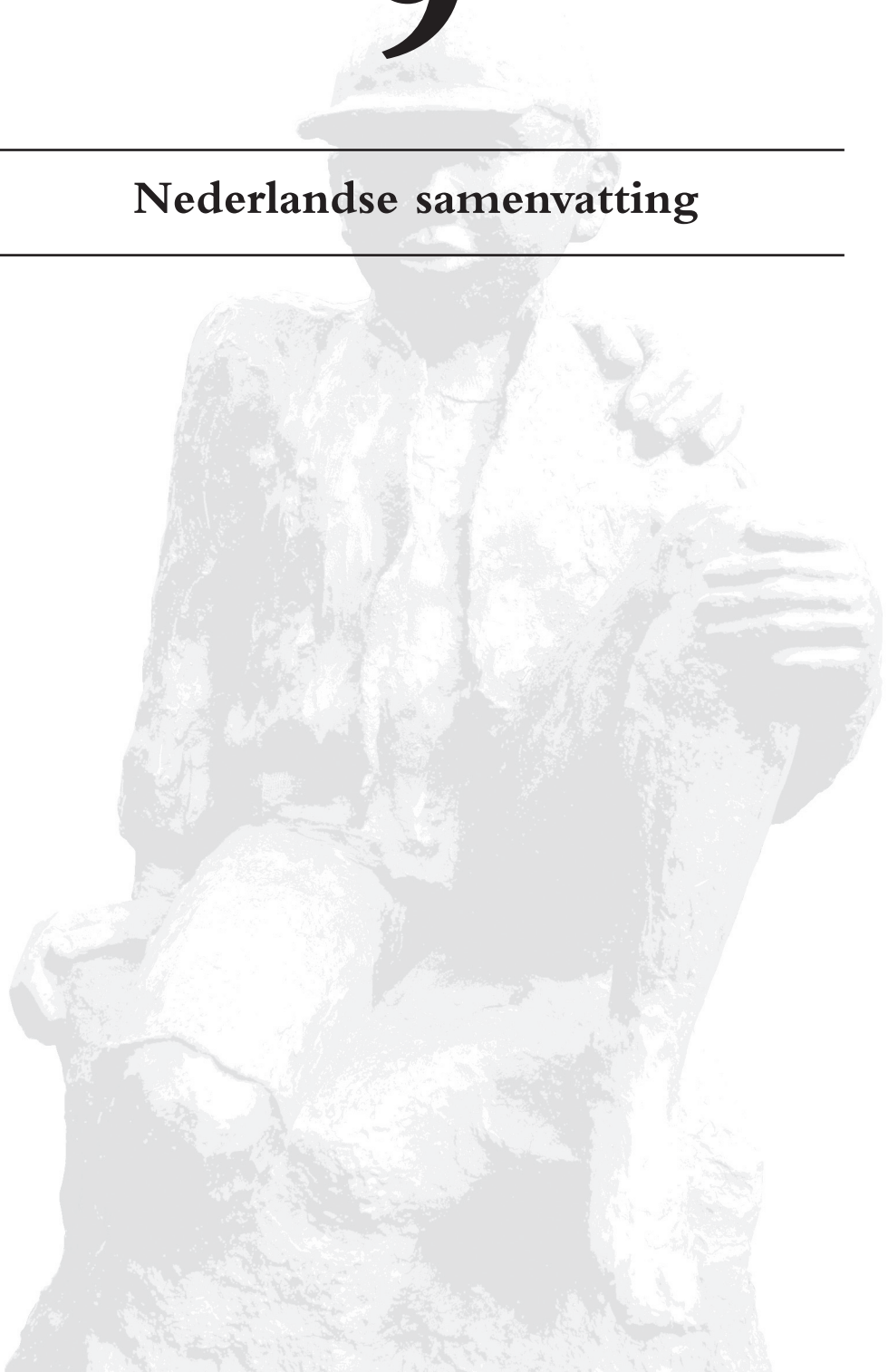
Author: Anninga, Jakob Klaas

Title: Clinical and molecular features of high-grade osteosarcoma

Issue Date: 2013-01-09

9

Nederlandse samenvatting



In dit proefschrift worden 7 studies beschreven op het gebied van de meest voorkomende maligne primaire bontumor, het osteosarcoom. In **hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven over de epidemiologie van het osteosarcoom, zoals de incidentie, leeftijdsverdeling, lokalisatie in het skelet, risicofactoren waaronder genetische syndromen, en de overleving. Deze uitvoerige beschrijving op basis van epidemiologische studies is bedoeld om meer inzicht te krijgen in de oorzaak en het klinisch-biologisch gedrag van het osteosarcoom. De *incidentie is leeftijdsafhankelijk*. Bij jonge kinderen is osteosarcoom zeldzaam, minder dan 2% van de osteosarcomen komt in die leeftijdsgroep voor. Een eerste piek in incidentie (8.6 nieuwe patiënten/1 miljoen bevolking) wordt gezien bij pubers en jong volwassenen, gevolgd door een lage incidentie van gemiddeld $1.7/10^6$ in de leeftijdsgroep van 25-59 jaar. Er is een 2^e incidentie piek (tot $4.9/10^6$) bij mensen van 60 jaar en ouder, die merkwaardig genoeg bij mensen van Aziatische origine ontbreekt. Men schrijft deze 2^e incidentie piek toe aan secundaire osteosarcomen. Het verschil in man-vrouw verdeling en in histologische subtypen tussen oudere en jongere patiënten suggereert een verschillend biologisch gedrag van osteosarcomen.

Een *adequate behandeling* van osteosarcomen is van het allergrootste belang voor de overleving van de patient, die echter sinds de laatste 20-30 jaar niet veel verbeterd is. De huidige therapie bestaat uit pre-operatieve chemotherapie, radicale chirurgie, en chemotherapie na de operatie (neo-adjuvante chemotherapie) waarmee een langdurige overleving van gemiddeld 60% bereikt wordt. *Prognostische factoren* voor osteosarcoom kan men verdelen in factoren die bij de diagnose aanwezig zijn (uitbreiding van het osteosarcoom, zowel systemisch (gemetastaseerde ziekte) als lokaal, en proximale lokalisatie in het bot, metastase bij diagnose) en factoren die gerelateerd kunnen worden aan de behandeling (chemotherapie geïnduceerde tumorcelnecrose en chemotherapie geïnduceerde toxiciteit). Genetische risicofactoren met betrekking tot osteosarcoom worden besproken, zoals het Li-Fraumeni syndroom, het (erfelijke/bilaterale) Retinoblastoom, de helicase-mutatie syndromen en enkele andere zeldzame aandoeningen. Tevens wordt in de inleiding dieper ingegaan op de *onconventionele pathologische subtypes* van het osteosarcoom, omdat deze subtypes vaker bij osteosarcomen van handen en voeten voorkomen (zie hoofdstuk 6).

In **hoofdstuk 2** wordt de literatuur over de chemotherapeutische behandeling van gelokaliseerd osteosarcoom van de extremiteiten gereviewd. Uit fase-2 studies blijkt dat er maar 4 cytostatische middelen zijn met voldoende effectiviteit, gemeten als response rate (RR) van $\geq 20\%$, te weten doxorubicine (RR 43%), ifosfamide (RR 33%), methotrexaat (RR 32%) en cisplatin (RR 26%). Een meta-analyse toonde dat schema's met 2 middelen een significant slechtere overleving hadden (5-jaar event free survival [EFS] 48%, 5-jaar overall survival [OS] 62%) dan wanneer 3 of 4 cytostatische middelen gebruikt worden (EFS 58%, OS 70%). Maar er bleek geen verschil in overleving te zijn tussen schema's waarbij 3 of 4 middelen gebruikt worden. Daarom concluderen we dat de combinatie MAP optimale resultaten oplevert en als standaard behandeling voor het osteosarcoom in hedendaagse protocollen beschouwd moet worden. Een andere conclusie van deze studie was dat verder klinisch onderzoek met dergelijke combinaties cytostatica geen aanvullende waarde heeft, en dat de ontwikkeling van

nieuwe therapie gericht tegen het osteosaroom gebaseerd moet zijn op een beter inzicht in het ontstaan en klinisch-biologisch gedrag van deze maligne tumor.

Mede om deze reden zijn we een studie begonnen naar de gen expressie in osteosarcomen. Het doel van deze studie was om moleculaire mechanismen van deze tumor beter te kunnen begrijpen en de gen-expressieprofielen te koppelen aan overleving en histologische response op chemotherapie. Gen-expressieprofielen van diagnostische biopten van 25 hooggradige osteosarcomen werden onderling vergeleken en met niet-maligne cellen, namelijk mesenchymale stamcellen die beschouwd worden als cellen waar het osteosaroom uit ontstaat, osteoblasten en (benigne) osteoblastomen. De resultaten van deze studie worden beschreven in **hoofdstuk 3**. Het bleek niet mogelijk om de genexpressie profielen te relateren aan de overleving of histologische response. Er waren ongeveer 3000 genen, die significant verschillend tot expressie kwamen in osteosarcomen vergeleken met de mesenchymale stamcellen of met osteoblasten. Op nivo van een signaalcascade (pathway) vonden we dat genen die bij de cel cyclus en de Wnt-signalering betrokken waren, significant verschillen in osteosarcomen. Zo bleek bij osteosarcomen de Wnt3a/ β -catenine (canonical) signalering inactief (indirect bewijs: downregulatie van Axin en CCND1) te zijn, de alternatieve, Wnt5a signalering is overactief evenals genen die betrokken zijn bij de (regulatie van de) celcyclus en de p53/apoptose pathway is afnutteloos (indirect bewijs: downregulatie BBC3/PUMA). Wat deze bevindingen betekenen wordt in de paragraaf "Discussie" besproken.

Hoofdstuk 4 gaat verder in op de statistische achtergrond van de zojuist genoemde array analyse. Dit hoofdstuk beschrijft een algoritme voor de analyse op genoom nivo, dat de Global test genoemd wordt. Bij de Global Test worden klinische variabelen, zoals histologische respons of overleving gerelateerd aan verschillende expressiepatronen van genen, die gegroepeerd worden in signaal transductie pathways. Van het verschil in expressie van de signaal pathways van osteosarcomen en niet kwaadaardige cellen wordt vervolgens de statistische significantie bepaald. De Global test is gebaseerd op het Cox-proportional hazard model en wordt gecorrigeerd voor co-variabelen. De analyse van de osteosarcomen samples lieten zien dat celcyclus genen, genen betrokken bij de DNA-repair en bij de apoptose geassocieerd waren met de overleving van de patiënten. Tenslotte kon ook nog geconcludeerd worden dat met behulp van de Global test gen expressie studies betere statistische resultaten lieten zien.

In **hoofdstuk 5** wordt een onderzoek naar de aanwezigheid van de epidermale groeifactor HER2 beschreven. Aanleiding hiertoe was een fase-2 onderzoek naar de waarde van trastuzumab (Herceptin) bij osteosarcomen (www.cancer.gov/clinicaltrials; MSKCC-99097 en COG-AOST 0121). Deze studie was gestart op grond van enkele publicaties welke HER2 overexpressie bij het osteosaroom rapporteerden en daarmee suggereerden behandelen is met het monoclonale antilichaam trastuzumab, naar analogie van HER2 overexpressie bij mammacarcinoom. In de door ons uitgevoerde studie kon echter immunohistochemisch geen membraan overexpressie van de HER2 receptor aangetoond worden. Evenmin was er aanwijzing voor mRNA overexpressie (RT-PCR) of amplificatie (FISH) van het *HER2*-gen. Op basis van deze resultaten is er volgens ons geen rationale voor het gebruik van

trastuzumab. Tot dusver zijn er geen resultaten van de genoemde fase-2 studie gepubliceerd. Nadat met de micro-array studies de moleculaire complexiteit bij osteosarcomen was aangetoond vroegen we ons af of er op het klinische vlak ook nog aanwijzingen waren voor heterogeniteit van osteosarcomen. Om die vraag te beantwoorden wordt in **hoofdstuk 6** een studie beschreven naar de klinische en pathologische kenmerken van osteosarcomen van handen en voeten, een uitzonderlijke lokalisatie. In deze studie worden 40 patiënten geëvalueerd, waaruit blijkt dat deze lokalisatie slechts in 0.95% van alle osteosarcomen voorkomt. Bijzonder was dat deze patiënten ouder zijn bij diagnose (gemiddelde leeftijd van 42 jaar), vaker voorkomt bij mannen dan bij vrouwen (ratio 1.7:1) en een langere periode hebben, voorafgaande aan de definitieve diagnose. Ook is het osteosarcoom van handen en voeten in ongeveer 30% van de gevallen laaggradig, terwijl dit in 1-2% van de gevallen zo is bij osteosarcomen van de knie. De kans op overlijden na 5-jaar follow-up (FU) bij 30 goed gedocumenteerde patiënten was 20%, bij patiënten met osteosarcoom van de hand lager (38% na 4 jaar FU) dan bij osteosarcomen in de voeten (11% na 2.5 jaar FU). Er waren geen patiënten overleden in de groep osteosarcomen van lage of intermediaire maligniteitsgraad. De enige factor van significant prognostisch belang bleek de maligniteitsgraad te zijn. De conclusie was dan ook dat hooggradige osteosarcomen van handen en voeten dezelfde prognose hebben als osteosarcomen van de knie of schouder en als zodanig behandeld moeten worden.

Hoofdstuk 7 van dit proefschrift gaat over osteosarcoom met pulmonale metastasen. Bij diagnose (synchrone metastasen) worden in 16% van de gevallen pulmonale metastasen gezien; een recidief (metachrone metastasen) komt vrijwel altijd als eerste in de longen voor. De overall survival van patiënten die behandeld waren, was 23%. Het bleek dat overleving van de patiënten uitsluitend bepaald werd door de operabiliteit van de metastasen, zelfs als dit meerdere malen noodzakelijk is. Er bleek geen significant verschil in overleving te zijn tussen patiënten met synchrone of metachrone metastasen. Prognostische factoren zijn het aantal metastasen (minder dan 5 of 5 en meer), mate van necrose van de metastasen en vrouwelijk geslacht. Bij patiënten met metachrone metastasen was het ziektevrij interval nog van prognostisch belang. Chemotherapie bleek geen significante prognostische factor te zijn, hoewel een trend voor betere overleving na chemotherapie gezien werd. De eindconclusie van deze studie is dat genezing bij patiënten met pulmonale metastasen bereikt kan worden met herhaalde resectie, en dat de rol van conventionele chemotherapie hierbij nog onvoldoende aangetoond is.

DISCUSSIE

De conclusie die uit de besproken hoofdstukken getrokken kan worden is dat het osteosaroom biologisch een heterogene en complexe tumor is. Doordat er geen eenduidige moleculair-biologisch kenmerk is van het osteosaroom stagneert de ontwikkeling van nieuwe medicijnen tegen deze ziekte. Ook het klinisch gebruik van geneesmiddelen bij osteosaroom is gelimiteerd, zoals we hebben gezien, waarbij het repertoire aan chemotherapeutische mogelijkheden vooral bij de behandeling van een recidief osteosaroom ernstig beperkt is. Dit wordt mede in de hand gewerkt doordat bij de primaire behandeling alle effectieve middelen al gebruikt zijn, en bij opnieuw gebruiken cumulatieve toxiciteit een belangrijke rol speelt, zoals cardiale toxiciteit, gehoor- en nierschade en fertiliteitsproblemen. Wij hebben geen HER2 overexpressie op osteosaroomcellen kunnen aantonen, wat noodzakelijk is voor de behandeling met de monoclonale antistof trastuzumab (Herceptin). Uit de array studie kwamen als moleculaire aangrijpingspunten de cel cyclus regulatie, de p53/apoptose signalering en de complexe Wnt-signalering als belangrijkste naar voren. Om iets te begrijpen van de rol de deze deregulatie van de Wnt signalering bij osteosaromen speelt, volgt er een korte samenvatting van wat er nu bekend is over Wnt-signalering in mesenchymale stamcellen, de voorloper cellen van osteoblasten en osteocyten en bij maligniteiten in het algemeen, en osteosaroom in het bijzonder.

De Wnt-signalering

Wnts (afkorting van Wingless in *Drosophila* en hetzelfde gen *Int1* in muizen) vormen een belangrijk signaleringssysteem die een belangrijke rol in de ontwikkeling, differentiatie en weefselherstel hebben (zie voor uitgebreide reviews de referenties in de Engelse versie samenvatting). Door het groot aantal liganden (signaaleiwitten, $n=19$), de verscheidenheid aan mogelijke receptoren (Frizzled's (Fzd), $n=10$) receptoren en co-receptoren (Lrp's, Ror en Ryk, $n=8$) zijn er talloze reacties mogelijk na ligand-receptor binding. Daar komt nog dat Wnt remmers, zoals Dickkopf's (Dkk), Wnt-inhibiting factors (WIF's), soluble Frizzled related proteins (sFrp's) en extracellulaire eiwitten zoals proteoglycanen de respons kunnen moduleren afhankelijk van het type weefselcel en het stadium van ontwikkeling (context-dependent). Dat betekent dat het effect van Wnt-signalering in de beenmergniche (reservoir mesenchymale stamcellen) anders is dan dezelfde signalering in kraakbeen, bijvoorbeeld van de metafyse van lange pijpbeenderen (endochondrale botvorming), of de kraakbeenkern van platte beenderen (membraneuze botvorming). Door nieuwere inzichten in de Wnt-signalering is de oudere indeling in canonical versus non-canonical pathway vervangen door respectievelijk het β -catenine afhankelijk en β -catenine onafhankelijk of alternatief systeem. Figuur 1 geeft een overzicht van beide signaleringssystemen en enkele onderlinge verbanden. In het kort komt het erop neer dat het Wnt3a/catenine afhankelijke systeem na Wnt-receptor binding het intracellulaire β -catenine stabiliseert, doordat proteosomale afbraak ervan (Fig.1 F) verhinderd wordt (Fig.1 A). Door de stijgende cytoplasma concentratie komt het β -catenine in de kern, waar het of proliferatie aanzet (de-repression) of differentiatie induceert, door

bijvoorbeeld co-activation van de transcriptiefactor Runx2, wat noodzakelijk is voor de osteogenese.

In het β -catenine onafhankelijke (alternatieve) systeem wordt via het ligand Wnt5a de transcriptiefactor Jun-N-terminal Kinase (Jnk) geactiveerd, dat een rol speelt bij de groei van tumoren (*Wnt/PCP pathway*). Een tweede *activatie* route maakt intracellulair calcium (Ca^{2+}) vrij, wat vervolgens Ca^{2+} -gemedieerde transcriptie activatie geeft, via NEMO of NFAT (*Wnt/Ca²⁺ pathway*). De alternatieve signalering via Wnt5a kan het catenine afhankelijke systeem op een aantal manieren remmen (zie rode cirkels).

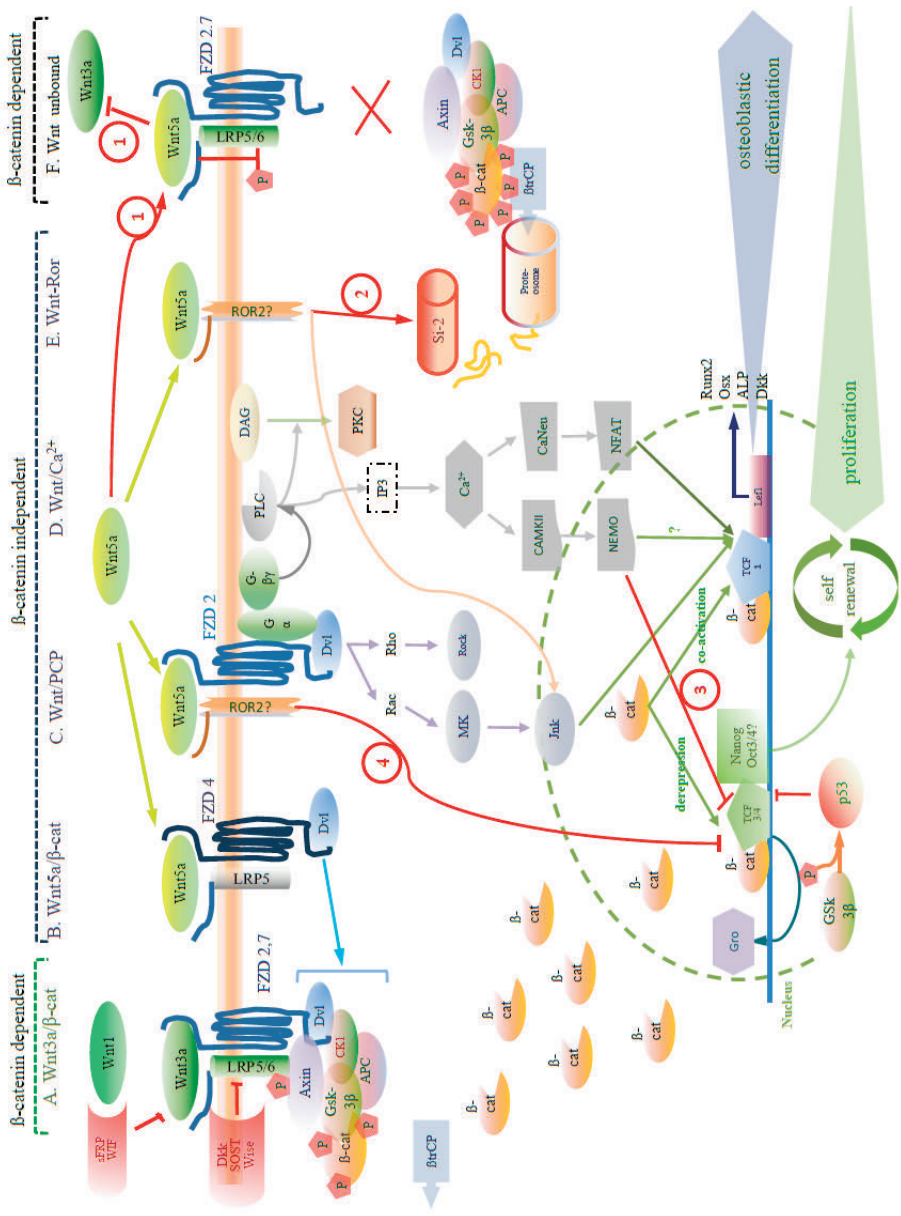
Wnt signalering speelt een grote rol bij de normale botvorming, maar is nog niet tot in alle details opgehelderd. De Wnt-signalering heeft een stadium afhankelijke functie in de mesenchymale stamcel (MSC), die tegengestelde effecten hebben (Figuur 2). In de MSC is de aanwezigheid van β -catenine bepalend voor de daarop volgende richting van de cellijn-ontwikkeling (fate-decision). Het stimuleert de richting naar bot-/kraakbeen, maar het remt de vetcelontwikkeling. Tijdens het daaropvolgende stadium van de osteo-chondrogene voorlopercel remt de aanwezigheid van β -catenine de ontwikkeling van de kraakbeenlijn, en stimuleert de aanzet tot differentiatie naar osteoblast en osteocyt. Maar voordat deze differentiatie definitief kan doorzetten, moet de Wnt3a/ β -catenine signalering uitgezet worden, wat via de Wnt-antagonist Dkk1 gebeurt. Het Wnt3a/ β -catenine heeft dus 3 functies bij de botvorming: 1. keuze voor de (osteo-chondrale) cellijn ontwikkeling, 2. proliferatie van osteo-chondrale voorlopercellen en 3. definitieve differentiatie inductie tot bot en remming van kraakbeenvorming.

Wnt5a speelt hierbij een rol doordat het de Wnt3a/ β -catenine signalering kan remmen, maar zowel de proliferatie als differentiatie van osteoblasten stimuleert.

FIGUUR 1.
Wnt signalering

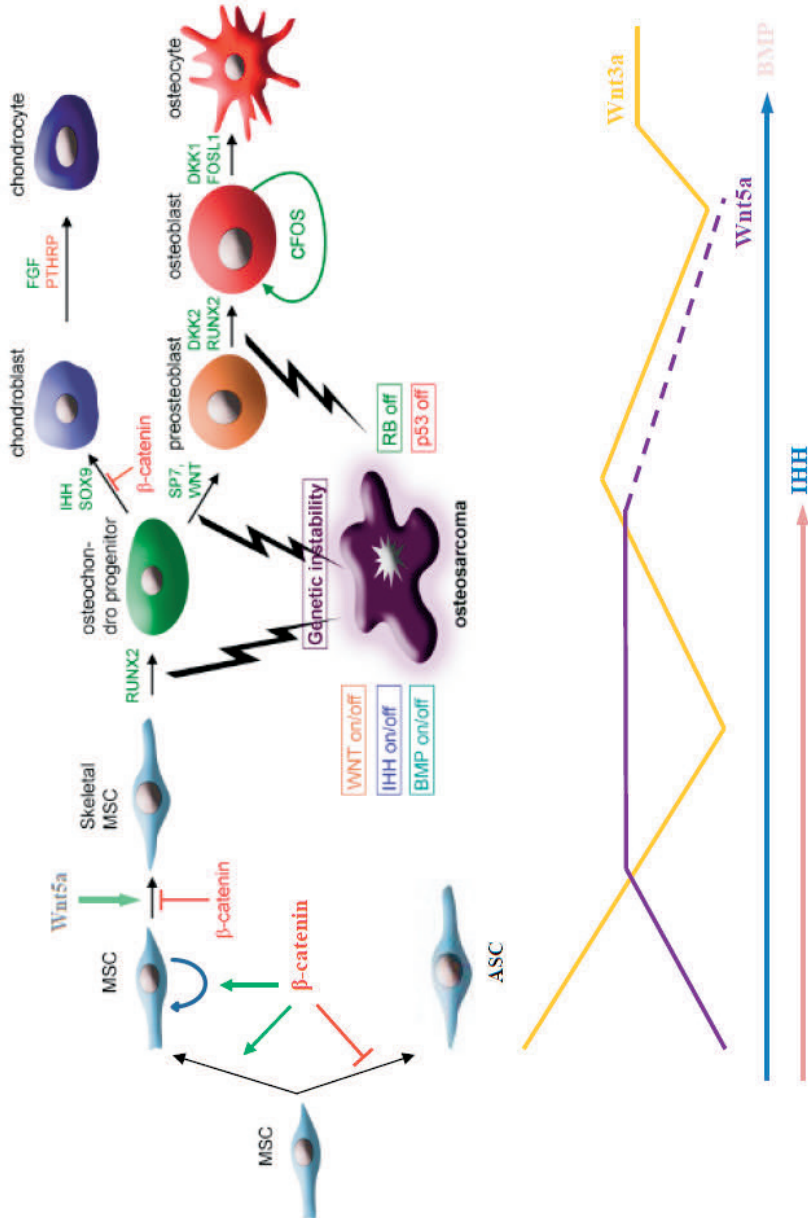
In deze figuur worden een aantal Wnt signalering pathways getoond en cross-talks tussen het β -catenine afhankelijke ("canonical", kolom A) systeem en het β -catenine onafhankelijke of alternatieve ("non-canonical", kolom B-E) systeem. Het geactiveerde Wnt3a/ β -catenine systeem ("on") in kolom A en de β -catenine repressieve ("off") situatie staat in kolom F weergegeven. Voor uitgebreide uitleg en referenties wordt naar de tekst verwezen. Recent is het Wnt-Ror2 pathway toegevoegd aan de 2 andere alternatieve pathways: het Wnt/PCP/Jnk en Wnt/Ca2+ pathway. Het Wnt-Ror2 pathway remt het canonical pathway op 3 niveaus: door competitieve remming met de Wnt3a receptor binding (rode cirkel 1), door toegenomen, Siah-2 gemedieerde β -catenine afbraak (rode cirkel 2), door onderdrukking van TCF3/LEF transcriptie complex via NEMO (rode cirkel 3) of rechtstreekse β -catenine/TCF remming. Een andere modulatie van beide Wnt-signaleringstroutes is de activatie van β -catenine via het non-canonical systeem. Als Wnt5a bindt met de Frizzled4 (Fzd4) receptor kan signaaltransductie via β -catenine verlopen (kolom B). De complexe uitkomst van de Wnt-signalering wordt dus bepaald door de binding van diverse liganden (Wnt3a/canonical Wnt's en Wnt5a/non-canonical Wnt's) met de verschillende receptoren (Fzd's) en de modulatie hiervan door de aanwezigheid van co-receptoren (LRP's en ROR's), remmers (Dickkopf [Dkk], Sclerostin [SOST], Wnt-Inhibiting Factor [WIF] en Soluble Wnt Related Proteins [sFrp's]) en extracellulaire matrix.

LRP5,6 lipoprotein related protein 5,6; Dvl Dishevelled; APC Adenomatous Polyposis Coli; GSK-3 β Glycogen Synthase Kinase-3 β ; CK1 Casein Kinase-1 α ; CamKII Calcium/Calmoduline dependent Kinase II; JNK c-Jun N-terminal Kinase; Rock2 Rho-associated Kinase; β -TrCP is a ubiquitin ligase; TCF1/3 T-cell factor 1/3; Lef1 Lymphoid Enhancer Factor 1; Gro Groucho.



FIGUUR 2.
Wnt-signaling in diverse stadia van de osteoblasten ontwikkeling.

De hypothetische expressie van het Wnt3a/ β -catenine (canonical, oranje) systeem wordt weergegeven door Wnt3a, en het Wnt/ β -catenine onafhankelijk systeem (non-canonical, paars) door Wnt5a. Het Wnt3a/ β -catenine is noodzakelijk voor vroege inductie van de mesenchymale stamcel (MSC) richting osteochondrale cellijn, waarbij de vetcelontwikkeling (adipogene stem cell = ASC) geremd wordt. Tevens is het Wnt3a/ β -catenine systeem noodzakelijk voor proliferatie van de osteochondrale progenitors, remming van de kraakbeen (chondrogene) ontwikkeling en activatie van de Runx2-transcriptiefactor, master gene voor de definitieve osteogene ontwikkeling. Voor de voortgang van de osteogene ontwikkeling moet Wnt3a/ β -catenine geremd worden, waarschijnlijk gemedieerd via Wnt5a en Dkk1, die het β -catenine systeem kunnen remmen. Voor de terminale ontwikkeling van de osteoblast tot osteocyt moet het Wnt3a/ β -catenine systeem weer tot geactiveerd zijn. Verstoring van deze onderlinge samenwerking in de normale osteogene kan aanleiding zijn voor ongecontroleerde proliferatie en ontbreken van controle (differentiation commitment check) op differentiatie, waardoor toenemende chromosomale instabiliteit ontstaat, een kenmerk van osteosarcoom. Bij de normale botontwikkeling spelen andere signalerings systemen, zoals het Indian Hedgehog (IHH) en de Bone Morphogenetic Proteins (BMP) spelen bij de osteogene een belangrijke rol, die echter nog onvolledig opgehelderd zijn.



Wnt signalering, maligniteit en osteosarcoom

In onze array studie vonden we aanwijzingen voor een ontregeld Wnt signaleringssysteem, waarbij de Wnt3a/ β -catenine signalering in osteosarcomen verlaagd tot expressie kwam, en het alternatieve, Wnt5a/ β -catenine onafhankelijk systeem juist tot overactief was, vergeleken met mesenchymale stamcellen of benigne bottumoren, osteoblastomen. Dit is precies tegenovergesteld dan de activerende, oncogene rol, die β -catenine speelt bij epitheliale tumoren, zoals colon carcinoom, ovarium carcinoom, prostaat- of longkanker. Maar ook bij osteosarcomen heeft men gevonden dat er β -catenine overactiviteit is, en dus een oncogene rol heeft. Men kan zich wel afvragen hoe in andere situaties waarbij wel overactiviteit van nucleair β -catenine aanwezig is, zoals het Gardner syndroom of bij osteoblastomen, geen osteosarcoom optreedt, als het Wnt3a/ β -catenine als een oncogeen gezien moet worden. Er is maar 1 studie bij osteosarcoom bekend, waarbij geen nucleair β -catenine gevonden werd, dus het Wnt3a/ β -catenine inactief is, net als in onze studie. Er zijn andere maligniteiten waarbij een inactief β -catenine systeem gecorreleerd wordt aan de pathogenese van kanker. Bij een hooggradige ongedifferentieerd pleomorfe sarcomen werd aangetoond dat de mesenchymale stamcel de voorlopercel was voor het ongedifferentieerd sarcoom, en dat door uitschakeling van het Wnt/ β -catenine systeem de voorlopercel niet verder kon differentiëren tot bindweefsel. Ook was de Wnt5a signalering uitgeschakeld in deze tumoren, waardoor een commitment-viability checkpunt uitviel, waardoor cellen ongecontroleerde, ongedifferentieerde groei vertonen, wat leidt tot de vorming van het sarcoom. Bij cellijnen van het embryonale rhabdomyosarcoom werd gevonden dat de Wnt/ β -catenine verlaagd tot expressie kwam, en dat re-activatie hiervan tot spiercel differentiatie leidde. Tevens vonden de onderzoekers dat de verlaagde Wnt/ β -catenine signalering gepaard ging met resistentie tegen apoptose, wat de differentiatie tot spiercellen blokkeerde. Een laatste voorbeeld van Wnt/ β -catenine inactivatie is beschreven bij het retinoblastoom en na reactivatie zag men een p53 gemedieerde proliferatie stop van de retinoblastoomcellen.

Inactiviteit van het β -catenine systeem werd door Cai et al. van ons lab bevestigd, doordat geen kernaankleuring van het β -catenine gezien werd en de Wnt-luciferase reporter studies van de β -catenine responsieve genen in de osteosarcoom cellijnen negatief waren. Als argument dat inactivatie van de Wnt3a/ β -catenine signalering bijdraagt aan de ontwikkeling van het osteosarcoom, kan aangevoerd worden dat remming van GSK3 β , dat het β -catenine fosforyleert, waardoor het afgebroken kan worden, in 2 van de 4 osteosarcoma cellijnen differentiatie laat zien tot bot.

Wat dan precies de rol is van de disregulatie van de Wnt-signalering bij het ontstaan van osteosarcoom is niet makkelijk te begrijpen. De hypothese is dat door uitschakeling van de Wnt3a/catenine signalering geen differentiatie meer geïnduceerd kan worden en de voorloper cellen in een permanente proliferatie blijven. Het overactieve Wnt5a leidt tot activatie van de osteogenese, die niet tijds-gesynchroniseerd is met de (gestoorde) differentiatie. Omdat hierbij geen goede differentiatie commitment controle meer is en de apoptose a-functioneel is (zoals uit de pathway analyse is gebleken) ontstaat er in toenemende mate instabiliteit van het genoom, wat het kenmerk is van osteosarcoom (zie figuur 2). Bij 75% van de osteosarcomen is

overexpressie van het Wnt5a-ROR2 systeem gevonden, die gecorreleerd was met prognostisch slechtere ziekte. In cellijnen werd Wnt5a overexpressie gecorreleerd met meer invasieve groei. Concluderend zijn er aanwijzingen dat de Wnt3a/ β -catenine en het alternatieve Wnt5a-systeem een belangrijke rol spelen bij de tumorgenese van het osteosarcoom. Deze hypothetische voorstelling van de tumorgenese van het osteosarcoom moeten nog wel door studies bevestigd worden. Hierbij zouden de Wnt-pathways en andere signaleringssystemen bij de normale en abnormale osteogenese, zoals bijvoorbeeld het osteosarcoom, naast elkaar bestudeerd moeten worden. De inzichten die hierbij verkregen worden kunnen ons verder kunnen helpen om een exacte beschrijving te kunnen geven van de aard van de disregulatie van deze systemen bij osteosarcoom. De verwachting is dat hierdoor nieuwe targets voor de behandeling van osteosarcoom gevonden worden.

Wnt signalering en potentiële therapie

Gezien de inactivering van het Wnt3a/ β -catenine systeem en de bevinding dat bij re-activering differentiatie gezien werd in osteosarcoma cellijnen, kan opgevoerd worden dat medicamenteuze therapie, gericht op remmen van de proteosoom gemedieerde degradatie van β -catenine een effect zou kunnen hebben op patiënten met een osteosarcoom, waarbij de Wnt signalering uitstaat. Een van de middelen die hiervoor in aanmerking zou komen is de proteosoom remmer bortezomib. Dit middel heeft bij multiple myeloom patiënten aangetoond herstel van de normale botaanmaak, ongeacht de respons op het myeloom. Hoewel het mechanisme achter het botherstel niet geheel opgehelderd is, denkt men dat bortezomib de Wnt3a antagonist Dkk1 remt, of differentiatie inductie via stabilisatie van β -catenine veroorzaakt, of de tumor cellen in apoptose brengt. Een onderzoeker vond regressie van het osteosarcoom in een muizen model, dat behandeld was met bortezomib, waarbij de proliferatie van de cellen geremd werd, en de maligne cellen toegenomen apoptose vertoonden. bortezomib was veilig in fase-1, fase-2 en fase-3 studies, werd goed verdragen en was weinig toxisch. Zelfs in combinatie met andere cytostatische middelen is bortezomib veilig gegeven. Daarom zou bortezomib een van de weinige middelen zijn die in de toekomst geëvalueerd zouden kunnen worden bij het osteosarcoom met inactieve Wnt/ β -catenine signalering.

Samenvattend kan worden geconcludeerd dat hoog-gradig osteosarcoom op klinisch en moleculair nivo een heterogene ziekte is. Dit is mede oorzaak dat er de laatste 3 decennia geen vooruitgang geboekt is op het gebied van de behandeling. Om deze ziekte goed te behandelen is een combinatie van tenminste 3 middelen in de vorm van neo-adjuvante chemotherapie noodzakelijk samen met radicale chirurgie. Dit geldt voor alle osteosarcomen, ongeacht de lokalisatie in het skelet en of er sprake is van primair gemetastaseerde ziekte. Patiënten met een operabel recidief dienen chirurgische resectie als primaire therapie te krijgen, waarbij de toegevoegde waarde van neo-adjuvante chemotherapie niet bewezen is. In dit proefschrift is aangetoond dat er geen nieuwe ontwikkeling op gebied van conventionele cytostatische medicamenten verwacht kan worden, en moet men patiënten met refractaire

ziekte fase-I en fase-II studies aanbieden. Patiënten met een hooggradig osteosarcoom van de handen of voeten dienen overeenkomstig hooggradige osteosarcomen elders in het lichaam behandeld te worden. Bij niet-hooggradige osteosarcomen van deze lokaties kan alleen chirurgische resectie overwogen worden. Het gebruik van monoclonale antilichamen tegen de HER2 receptor kan op grond van onze onderzoekresultaten niet ondersteund worden. Bij de verdere ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen tegen het osteosarcoom neemt het onderzoek naar signaleringssystemen zowel bij de normale als verstoorde osteogene differentiatie een belangrijke plaats in, zoals bijvoorbeeld de Wnt-signalering. Beter inzicht in deze regulatie geeft ook de mogelijkheid osteosarcomen te behandelen op grond van deze inzichten, zoals bijvoorbeeld proteosoom remmers.